

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 6 期 2021 年 12 月 30 日出版

目次

研究报告

- REST/NRSF 对皮质酮应激模型小鼠抑郁与焦虑样行为影响 余煊, 李祥磊, 孙秀萍, 秦川 (707)
- 反复冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫屏障功能的影响及中医解表方的作用研究
..... 杨居崩, 赵显芳, 聂发龙, 肖纯, 代蓉, 李秀芳 (715)
- 自发性高血压大鼠心肌纤维化时序动态变化 ... 赵健清, 丁露, 曾俊义, 应国秋, 文渊, 聂俊刚, 易达松 (724)
- NOD2 促进二乙基亚硝胺诱导小鼠肝组织炎症的机制研究 许智玲, 张斌, 张顺财 (730)
- 电针干预慢性炎性痛的杏仁核潜在蛋白筛选
..... 陈月蓉, 徐赞赞, 倪雯沁, 丁棋柯, 戴玮, 许颖龄, 朱希潇, 方剑乔, 吴媛媛 (738)
- 复方地黄颗粒对帕金森病模型大鼠小胶质细胞激活及神经行为的干预研究
..... 毕殿勇, 王利, 何竹青, 杨玉芳, 何建成 (749)
- 两种 UC 小鼠模型的病理损伤和肠道菌群对比研究*
..... 湛雪梅, 彭西, 叶俏波, 叶臻, 邓庆, 王娟, 温昌琳, 袁施彬 (758)
- 小型猪 2 型糖尿病模型肠道微生物分析* 田威龙,
蔡文晶, 刘笑笑, 司景磊, 陈奎蓉, 程锋, 李月月, 吕冬玲, 梁靓, 高九昱, 奉玲丽, 莫家远, 兰干球, 梁晶 (768)
- 常用小鼠、大鼠肠道菌群比较研究* 黄树武, 闵凡贵, 王静, 罗银珠, 何丽芳, 陈梅玲, 潘金春 (777)
- 参苓白术散对溃疡性结肠炎模型小鼠的疗效评价* 马琪, 翁与竞, 李佳, 覃施媛, 何燕凤, 马旭东 (785)
- 抗生素诱导的微生物组耗损后促进空肠弯曲菌在小鼠肠道定植*
..... 陈浩浩, 张艳芳, 潘晓明, 高素华, 张辉, 楼宏强 (793)
- 大鼠混合细菌感染性肺炎模型的建立与评价 彭冬冬, 陈相池, 夏伟, 刘学武, 王菲 (800)
- 运动经 FoxO1-脂噬通路缓解 ApoE^{-/-}小鼠高脂血症的研究
..... 花卫成, 付鹏宇, 张纓, 王林佳, 倪震, 龚丽景 (808)

微囊藻毒素-LR 对小鼠原代肝细胞线粒体功能的影响
..... 贺云,陈艺生,任岚,尹一杰,胡桂玲,吴云丽(816)

研究进展

泄泻中医证候动物模型研究进展 王楷,侯雨君,宋玮,陈颖,蒋慧灵,谭玉,周思远(823)

大小鼠抑郁行为实验方法概述 姜宁,张亦文,姚彩虹,黄红,刘新民(830)

肿瘤转移前微环境动物模型的构建与评价方法研究进展

..... 申明,陈彦文,李杨,杨玲玲,梁乾坤,明海霞(839)

*:肠道菌群相关疾病的动物模型专题

《中国实验动物学报》2021 年总目次 (848)

广告 (封二,封三,封底,内插)

主 管

中国科学技术协会

主 办

中国实验动物学会

中国医学科学院医学实验动物研究所

主 编

秦川

编辑部主任

董令赢

编 辑

《中国实验动物学报》编辑部

出 版

《中国实验动物学报》编辑部

发 行

《中国实验动物学报》编辑部

100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号

电话:010-67779337

传真:010-67770690

E-mail:bjb@cnilas.org

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

照 排

同方知网(北京)技术有限公司

印 刷

北京博海升彩色印刷有限公司

邮发代号

2-748

广告发布登记

京朝工商广登字 20170142 号

定 价

每期 50.00 元,全年 300.00 元

中国标准连续出版物号

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

2021 年版权归中国实验动物学会所有

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

本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com

本期执行主编 刘恩岐

本期专题组织 桑 明

本期责任编辑 陈 慧 董令赢

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993

Volume 29, Number 6, December, 2021

CONTENTS

- Effect of REST/NRSF on depression- and anxiety-like behavior in repeated corticosterone injected mice
..... YU Xuan, LI Xianglei, SUN Xiuping, QIN Chuan (707)
- Effect of the superficies-resolving formula of traditional Chinese medicine on cold-warm cycle stimulation and nasal
mucosal immune barrier function in rats
..... YANG Jubeng, ZHAO Xianfang, NIE Falong, XIAO Chun, DAI Rong, LI Xiufang (715)
- Chronological changes in myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats
..... ZHAO Jianqing, DING Lu, ZENG Junyi, YING Guoqiu, WEN Yuan, NIE Jungang, YI Dasong (724)
- Mechanism of NOD2 on the inflammation of mouse liver induced by diethylnitrosamine
..... XU Zhiling, ZHANG Bin, ZHANG Shuncai (730)
- Screening of potential amygdala proteins during the intervention of chronic inflammatory pain with electroacupunc-
ture CHEN Yuerong,
XU Yunyun, NI Wenqin, DING Qike, DAI Wei, XU Yingling, ZHU Xixiao, FANG Jianqiao, WU Yuanyuan (738)
- Effects of compound Rehmannia Granule on microglia activation and neurobehavior in Parkinson's disease model
rats BI Dianying, WANG Li, HE Zhuqing, YANG Yufang, HE Jiancheng (749)
- Comparative study of intestinal flora and histopathological damage in mice with ulcerative colitis induced by DSS
and TNBS
SHEN Xuemei, PENG Xi, YE Qiaobo, YE Zhen, DENG Qin, WANG Juan, WEN Changlin, YUAN Shibin (758)
- Analysis of intestinal microflora in mini-pigs with type 2 diabetes mellitus
..... TIAN Weilong, QI Wenjing, LIU Xiaoxiao, SI Jinglei, CHEN Kuirong, CHENG Feng, LI Yueyue,
LYU Dongling, LIANG Liang, GAO Jiuyu, FENG Lingli, MO Jiayuan, LAN Ganqiu, LIANG Jing (768)
- Comparative study of intestinal flora in common mice and rats
HUANG Shuwu, MIN Fangui, WANG Jing, LUO Yinzu, HE Lifang, CHEN Meiling, PAN Jinchun (777)

Therapeutic effect of Shenling Baizhu powder on ulcerative colitis in mice	
.....	MA Qi, WENG Yujing, LI Jia, QIN Shiyuan, HE Yanfeng, MA Xudong(785)
Antibiotic-induced microbiome depletion promotes the colonization of <i>Campylobacter jejuni</i> in the intestines of mice	
.....	CHEN Haohao, ZHANG Yanfang, PAN Xiaoming, GAO Suhua, ZHANG Hui, LOU Hongqiang(793)
Establishment and evaluation of a mixed bacterial pneumonia rat model	
.....	PENG Dongdong, CHEN Xiangchi, XIA Wei, LIU Xuewu, WANG Fei(800)
Exercise alleviates hyperlipidemia via the FoxO1-lipophagic signaling pathway in ApoE ^{-/-} mice	
.....	HUA Weicheng, FU Pengyu, ZHANG Ying, WANG Linjia, NI Zhen, GONG Lijing(808)
Mitochondrial function in microcystin-LR-induced primary mice hepatocytes	
.....	HE Yun, CHEN Yisheng, REN Lan, YIN Yijie, HU Guiling, WU Yunli(816)
Research progress on animal model construction and evaluation of different TCM syndromes of diarrhea	
.....	WANG Kai, HOU Yujun, SONG Wei, CHEN Ying, JIANG Huiling, TAN Yu, ZHOU Siyuan(823)
Overview of animal behavioral tests of depression	
.....	JIANG Ning, ZHANG Yuwen, YAO Caihong, HUANG Hong, LIU Xinmin(830)
Research progress on the construction and evaluation methods of pre-metastatic niche animal models	
.....	SHEN Ming, CHEN Yanwen, LI Yang, YANG Lingling, LIANG Qiankun, MING Haixia(839)

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

Institute of Laboratory Animal Sciences,

Chinese Academy of Medical Sciences

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Managing Editor

DONG Lingying(董令赢)

Editing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Publishing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Distributor

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

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

Tel: 010-67779337

Fax: 010-67770690

E-mail: bjb@cnlas.org

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

CSSN

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

Copyright 2021 by the Chinese Association for Laboratory
Animal Sciences

余焯,李祥磊,孙秀萍,等. REST/NRSF 对皮质酮应激模型小鼠抑郁与焦虑样行为影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 707-714.

Yu X, Li XL, Sun XP, et al. Effect of REST/NRSF on depression- and anxiety-like behavior in repeated corticosterone injected mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 707-714.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.001

REST/NRSF 对皮质酮应激模型小鼠抑郁与焦虑样行为影响

余焯,李祥磊,孙秀萍,秦川*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家人类疾病动物模型资源库,卫健委人类疾病比较医学重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021)

【摘要】 目的 研究 REST 在皮质酮模型小鼠中的表达情况及 REST 表达上调时对小鼠抑郁与焦虑行为影响,探索其在小鼠抑郁模型中的作用。**方法** 重复皮下注射皮质酮建立小鼠慢性应激模型,利用 AAV 病毒载体过表达小鼠脑内 REST,行为学检测小鼠抑郁与焦虑表型变化,并用实时荧光定量 PCR 探索 REST 对相关基因的影响。**结果** 重复皮下注射皮质酮 4 周能够显著降低小鼠体重 ($P < 0.01$),诱导小鼠抑郁样行为。海马区过表达 REST 影响模型小鼠在抑郁和焦虑行为学测试中的表现,缓解抑郁样表型,降低模型小鼠在悬尾实验和强迫游泳实验中的不动时间;诱导焦虑症状,进入旷场中央区的次数减少,对高架十字迷宫封闭臂的探索次数和停留时间增加;同时能够调节 *Bdnf*、*Nt3*、*Ngf*、*Fgf2* 的 RNA 转录水平。**结论** REST 在皮质酮应激抑郁模型中起着双向调控作用,并不是单一缓解抑郁行为,其机制可能与其参与调节表达的多种基因及信号通路综合作用相关。

【关键词】 抑郁症;动物模型;行为学测试;腺相关病毒;转录调控因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)06-0707-08

Effect of REST/NRSF on depression- and anxiety-like behavior in repeated corticosterone injected mice

YU Xuan, LI Xianglei, SUN Xiuping, QIN Chuan*

(Institute of Medical Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences(CAMS), Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College(PUMC), National Human Disease Animal Model Resource Center, NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

Corresponding author: QIN Chuan. E-mail:qinchuan@pumc.edu.cn

【Abstract】 Objective This research investigated the expression of REST in repeated corticosterone injected mice and the effects of REST on depression- and anxiety-like behaviors in model mice. **Methods** A chronic stress mouse model was established by repeated subcutaneous injections of corticosterone. An AAV virus vector overexpressing REST was injected into the hippocampus of the mouse brain. Then, the depression- and anxiety-like behaviors of mice were assessed by several behavioral tests. Finally, we detected the expression of REST-related genes by real-time RT-PCR. **Results** Repeated subcutaneous injections of corticosterone for 4 weeks successfully induced depression-like behavior and reduced body weight in mice ($P < 0.01$). REST overexpression in the hippocampus influenced the performance of model mice in

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81801333)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81801333).

[作者简介] 余焯(1990—),助理研究员,研究方向:神经退行性疾病、应激相关障碍。Email:yuxuan@cnilas.org

[通信作者] 秦川(1959—),教授,博士生导师,研究方向:实验病理学、神经退行性疾病。Email:qinchuan@pumc.edu.cn

the depression and anxiety behavioral tests. Specifically, it reduced the immobility time of model mice in the tail suspension test and forced swimming test and the number of entries into the central area in the open field test. In addition, REST overexpression increased the exploration frequency and residence time in the enclosed arms of the elevated cross maze. The RNA transcription levels of *Bdnf*, *Nt3*, *Ngf* and *Fgf2* were also affected in model mice after REST overexpression.

Conclusions REST plays a bidirectional role in the corticosterone-induced depression mouse model. Its mechanism may be related to its participation in the regulation of multiple target genes and the comprehensive effect of different signaling pathways.

【Keywords】 depressive disorder; animal model; behavior test; adeno-associated virus; transcription regulator

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

抑郁症又名重度抑郁障碍 (major depressive disorder, MDD), 是一种严重的情绪障碍和精神疾病。有证据表明, 抑郁症同时受到环境和遗传因素的影响, 其中应激引起的下丘脑垂体肾上腺轴 (HPA 轴) 功能异常活跃与抑郁症发病有着密切的联系^[1-3]。抑郁患者检测发现皮质醇水平异常升高, 皮质醇节律紊乱^[4]; 同时地塞米松抑制实验发现, HPA 轴功能异常与急性抑郁状态存在相关性^[5]。多个研究表明, 长期反复皮下注射皮质酮可以诱导小鼠表现抑郁样行为, 并且小鼠抑郁样行为随着注射时间增加而加重^[6-9], 可以用作研究慢性应激的抑郁模型^[10-11]。

抑制元件 1 沉默转录因子 (RE-1-silencing transcription factor, REST) 也称为神经元限制性沉默因子 (neuron restrictive silencer factor, NRSF) 是通过与目标基因 RE-1/NRSE 序列结合, 从而抑制其表达的重要转录调控因子^[12-13]; 它可以与其他蛋白协同作用, 在神经元的分化和发育中发挥多种广泛的调节作用^[14-15]。REST 参与了神经发生 (neurogenesis) 和神经元表型的精细形成 (neuronal phenotype elaboration)^[16]; 能够调控各种编码和非编码神经元特异性基因, 包括发育过程中编码突触可塑性和结构重塑的关键蛋白, 如神经递质受体, 离子通道, 突触囊泡和 miRNA 等^[17-20]; 通过表观遗传修饰参与染色质可塑性、神经应激反应^[21-23]; 可以抑制凋亡、神经保护^[24-25]等。REST 主要在小鼠胚胎的四肢和 CNS 中, 成年小鼠肾上腺胸腺中高表达; 而成年小鼠大脑皮层、前额叶、小脑中低水平表达, 主要位于未分化的神经祖细胞和非神经元细胞^[14, 26]。REST 在神经系统的功能中有着重要作用, REST 与其靶基因的相互作用也涉及到精神和神经系统疾病, 包括阿尔兹海默症、帕金森症、亨廷顿病、唐氏综合征、C1 型尼曼氏病等^[14, 18, 25, 27]。此外, 临床研究脑成像结果和死后大脑解剖显示, 抑

郁症患者脑中神经元丢失和凋亡增加^[28-29]。而且有一部分治疗抑郁症的抗抑郁药和情绪稳定剂, 是通过增强神经营养和神经保护细胞机制产生作用, 而 REST 抑制细胞死亡相关基因表达有着神经保护作用^[27, 30]。在一些抑郁动物模型和临床研究数据中, 人们也发现应激压力能够使 REST 在转录和表达水平发生变化, 例如幼年时期暴露于社会应激的大鼠脑内海马和内侧前额叶皮层 REST 水平下降, 但是成年小鼠暴露于社会应激时海马 REST 表达量上升^[27]。

转录调控因子 REST 在抑郁症的发病和治疗过程中发挥作用的具体功能和机制尚不明确。因此, 本研究希望通过建立皮质酮小鼠模型, 检测 REST 在该抑郁模型中的表达情况, 并通过注射 AAV 上调小鼠海马内 REST 表达水平检测小鼠抑郁与焦虑行为变化, 探索 REST 在小鼠应激模型中的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

48 只 6 ~ 7 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠, 体重 22 ~ 24 g, 购买自华阜康公司【SCXK (京) 2019-0008】, 饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所啮齿类行为学 SPF 屏障设施【SYXK (京) 2018-0019】, 相对湿度约为 50%, 温度控制 22 ~ 25℃, 给予充足食物和饮水, 12 h/12 h 固定灯光周期。动物实验方案通过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物管理和使用委员会审批 (IACUC QC18001)。

1.1.2 主要试剂与仪器

动物组织总 RNA 提取试剂 (DP431, 天根生化有限公司), FastKing 一步法反转录-荧光定量试剂盒 (SYBR Green) (FP313, 天根生化有限公司)。动

物运动轨迹跟踪系统 (Noldus, 荷兰), CFX Connect™ 荧光定量 PCR 检测系统 (Bio-rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 Rest-AAV 注射

Rest 组与 Rest 模型组 24 只小鼠被双侧注射 1 μ L 的 Rest 过表达载体病毒。在 0.4 L/min 的异氟烷深度麻醉下通过脑立体定位手术, 使用 30 Ga 规格的微量注射器 (Hamilton) 和微量注射泵 (WPI) 向小鼠双侧海马注射 AAV 病毒 (相对前囟坐标: -2.8 mm AP, $\pm$ 2.5 mm ML, -3.2 mm DV), 速度为 400 nL/min。注射完成 5 min 后, 缓慢抽出注射针。

1.2.2 皮质酮模型

48 只小鼠随机分为对照组、模型组、REST-AAV 注射组 (Rest 组) 与 REST-AAV 注射并造模组 (Rest 模型组), 对照组和模型组小鼠进行假手术注射 (sham) 以去除手术损伤对小鼠行为学的影响。模型组与 Rest 模型组小鼠每天皮下注射皮质酮 20 mg/kg (1% DMSO, 0.1% Tween-80) 建立内分泌干扰的慢性抑郁模型, 皮质酮溶液浓度为 4 mg/mL; 对照组与 Rest 组每天注射相同体积溶剂作为对照。连续注射 4 周后进行行为学测试, 然后灌流取材进行后续检测。

1.2.3 行为学测试

(1) 旷场实验: 测试小鼠被依次单独放在新颖的空旷方形盒子 (50 $\times$ 50 $\times$ 30 cm) 中央, 记录并统计 5 min 内小鼠的总运动时间、运动路程以及在中心区域和边缘区域停留的时间。

(2) 高架十字迷宫实验: 十字迷宫包括一个中心平台 (5 $\times$ 5 cm)、两个开放的手臂和两个封闭的手臂 (30 $\times$ 5 cm), 架于地板上方 55 cm。封闭臂有一个高 10 cm 的围墙, 末端封闭, 允许 5 勒克斯的光强度, 而开放臂则完全打开。将小鼠放置在中心平台上, 头部朝向开放臂, 让其自由进入四臂探索 5 min。测量小鼠进入开放臂和封闭臂的次数以及在这些臂上停留的时间。

(3) 悬尾实验: 用胶带将小鼠尾巴粘在离底 20 cm 高的检测铁片上, 使用 Noldus 系统实时记录受力变化判断小鼠处于运动或者不动状态, 每组实验共 6 min, 统计小鼠在此期间的不动时间。

(4) 强迫游泳实验: 将小鼠放置于盛有 15 cm 深温水 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 的透明圆筒 (高 25 cm, 直径 10 cm) 中, 每组实验共 6 min, 记录后 4 min 内小鼠的不动时间。每组实验结束后将小鼠擦干放在装有干

燥垫料置于加热垫上的鼠盒中, 直至小鼠毛发完全干燥。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件对所有数据进行统计分析。使用 Shapiro-Wilk 法检验数据正态性。两组数据比较使用独立样本 *t* 检验或配对样本 *t* 检验; 多组数据满足正态分布且方差齐, 使用方差分析 (ANOVA), 并选择 Tukey HSD 法进行两两比较; 多组数据满足正态分布但方差不齐, 使用 Brown-Forsythe 检验, 并选择 Games-Howell 法进行两两比较。双因素数据使用 Greenhouse-Geisser 校正的双因素重复测量方差分析 (repeated measures two-way ANOVA), 选择 Tukey 法进行组间变量的多重比较。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异具有显著统计学意义, $P < 0.001$ 为差异具有极显著统计学意义。

2 结果

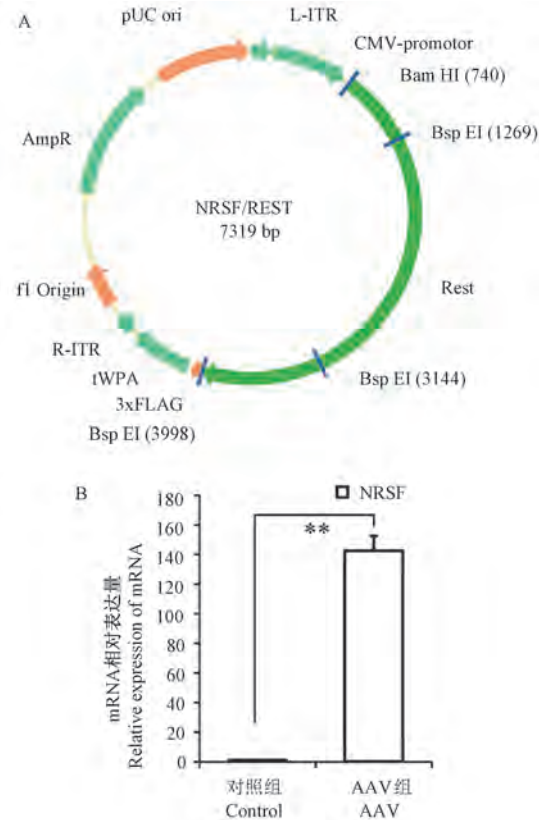
2.1 AAV 载体病毒注射提高小鼠脑海马中 REST/NRSF 的表达

根据 Rest mRNA 编码序列 (NM_011263.2) 设计 AAV 载体, 由和元生物公司完成载体构建和 AAV 病毒合成, 血清型 AAV2/9, 质粒表达载体如图 1A 所示。所得的 REST-AAV 病毒及对照通过立体定位注射至小鼠脑两侧海马。2 周后, 用实时荧光定量 PCR 检测病毒在小鼠脑内的表达效率, 小鼠脑内 Rest 的 mRNA 表达水平较对照病毒注射小鼠有显著升高 ($P < 0.001$), 如图 1B 所示。检测结果表明, 合成的 REST-AAV 病毒能够有效达到脑局部区域过表达 REST 的作用, 可以用于后续实验调控 REST 水平。

2.2 REST/NRSF 过表达影响模型小鼠行为学变化

小鼠重复皮质酮注射建立抑郁模型后 (实验流程第 15 天), 每周对各组小鼠称量体重, 并在注射结束后进行相关行为学测试, 实验流程如图 2 所示。皮质酮对模型小鼠体重的影响如图 3 所示, 双因素重复测量方差分析, 时间主效应显著 $F(3, 005, 132.2) = 39.48, P < 0.0001$; 模型分组主效应显著 $F(3, 44) = 28.88, P < 0.0001$; 交互作用显著 $F(12, 176) = 15.00, P < 0.0001$ 。对照组小鼠体重随小鼠年龄增加逐步增长至 (27.2 $\pm$ 1.5) g; 模型组和

Rest 模型组小鼠体重从第 2 周开始出现显著下降, 分别为(24.3 ± 0.6) g 和(23.9 ± 0.9) g, 两两比较均与对照组具有显著差异, 这与人研究报道结果相似^[9]。而模型组与 Rest 模型组小鼠体重之间并无显著差异, 这说明脑内过表达 REST 不能影响重复注射皮质酮引起的小鼠体重变化。



注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 REST-AAV 病毒表达载体质粒及病毒小鼠体内表达效率

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

Figure 1 Expression vector plasmid of REST-AAV and expression efficiency in mice

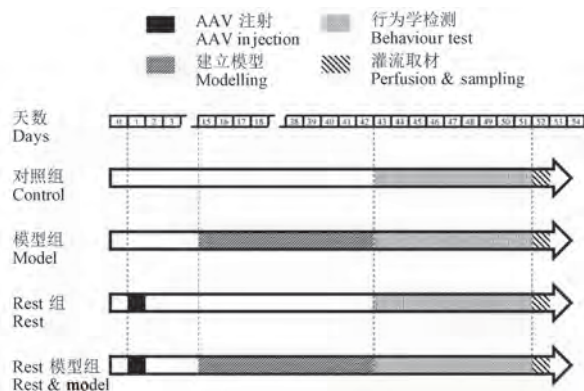
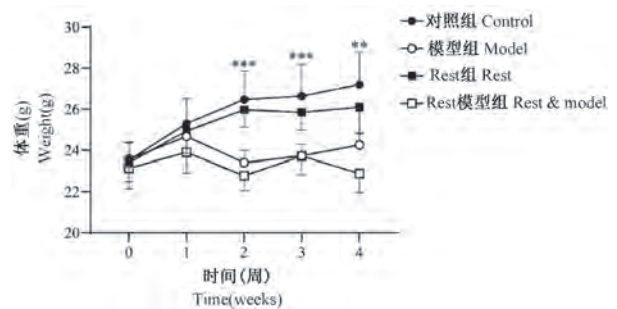


图 2 实验流程

Figure 2 Experimental procedure



注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。时间主效应 $F(3, 005, 132.2) = 39.48, P < 0.0001$; 模型分组主效应 $F(3, 44) = 28.88, P < 0.0001$; 交互作用 $F(12, 176) = 15.00, P < 0.0001$; 受试者 $F(44, 176) = 5.068, P < 0.0001$ 。

图 3 小鼠体重变化

Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Factor time $F(3, 005, 132.2) = 39.48, P < 0.0001$. Factor groups $F(3, 44) = 28.88, P < 0.0001$. Interactions $F(12, 176) = 15.00, P < 0.0001$. Subjects $F(44, 176) = 5.068, P < 0.0001$.

Figure 3 Body weight of mice

重复注射皮质酮造模结束后, 首先进行旷场实验和高架迷宫实验。旷场实验中, Rest 模型组小鼠总运动时间有所减少, 但与其他各组均无显著性差异 (图 4A); 各组小鼠总运动距离也无显著性差异 (图 4B)。小鼠在旷场中央区所处的时间和进入中央区探索的次数是反应小鼠焦虑状态的重要指标。实验结果表明, 各组小鼠在中央区停留的时间并没有差异 (图 4C), 但是 Rest 模型组小鼠进入中央区的次数较对照组减少, 表现出一定的焦虑倾向, 如图 4D 所示, $F(3, 000, 28.05) = 3.879, P = 0.0194$ 。高架迷宫实验中, 对照组和模型组小鼠在开放臂的探索次数和停留时间比例都略大于封闭臂的, 但没有显著性差异, Rest 组小鼠在不同臂的探索次数和停留时间没有区别; 但是 Rest 模型组小鼠对封闭臂的探索次数和停留时间都显著大于在开放臂的 ($P < 0.01$), 表现出较为明显的焦虑行为 (图 5A, 5B)。

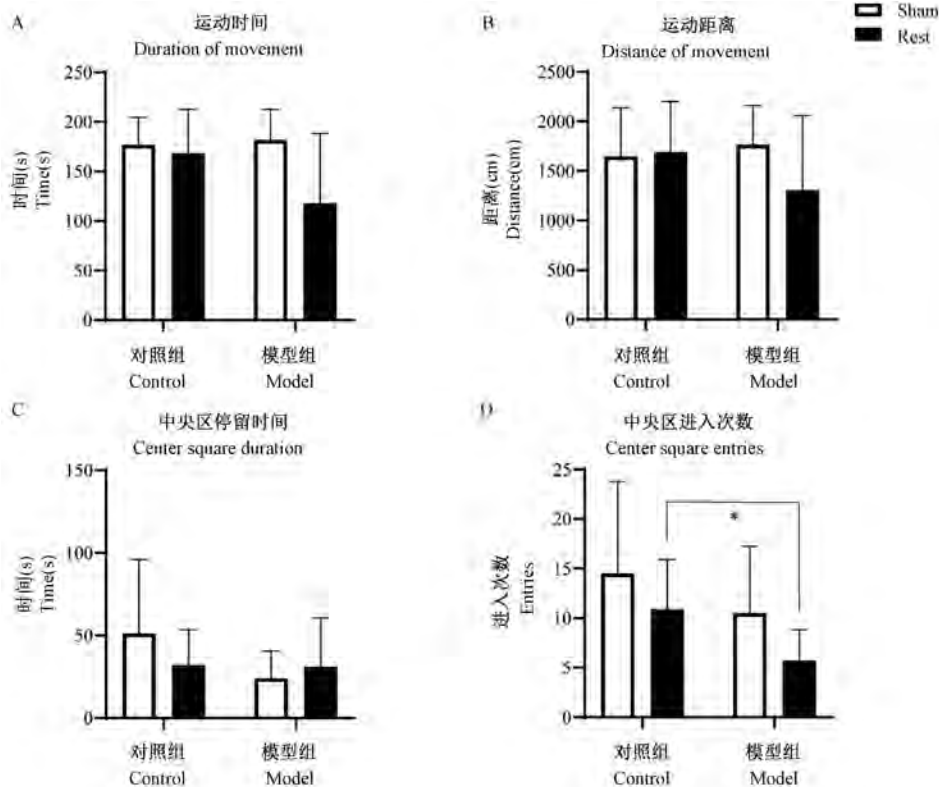
随后, 进一步使用悬尾实验和强迫游泳实验检测各组小鼠的抑郁样行为。在悬尾实验中, 模型组小鼠的不动时间相对对照组增加, Rest 模型组小鼠的不动时间则有所下降, 与对照组和 Rest 组小鼠没有显著性差异, 如图 6A 所示。相似的在强迫游泳实验中 (图 6B), 实验记录后 4 min 内模型组小鼠的不动时间较对照组显著性上升, 而过表达 REST 能减少皮质酮诱导模型引起的不动时间增加 (Rest 模型组), $F(3, 44) = 4.932, P = 0.0049$ 。单独过表达 REST, 未重复注射皮质酮诱

导应激模型,对小鼠的悬尾和游泳不动时间均无显著影响。

2.3 REST/NRSF 过表达调控相关基因变化

行为学实验结束后,将各组小鼠快速安乐死取材,分离小鼠海马区域脑组织提取总 RNA,并进行实时荧光定量 PCR 检测。*Rest* 基因的表达与之前相似,注射有 AAV 的 *Rest* 组和 *Rest* 模型

组小鼠脑内海马 *Rest* 水平较对照组和模型组显著提高。有趣的是皮质酮注射应激模型也能引起小鼠海马 *Rest* 水平上调,但是在注射 AAV 的小鼠上建立该抑郁应激模型反而导致 *Rest* 水平下降。此外,还检测了 *Grin2b*、*Bdnf*、*Nt3*、*Ngf*、*Fgf2* 等抑郁应激相关的基因表达。检测结果发现,皮质酮注射应激模型,对除 *Grin2b* 外基因表

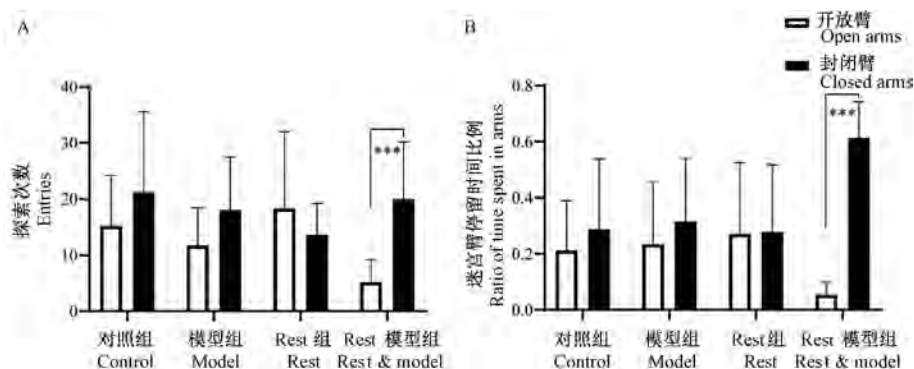


注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。中央区进入次数: $F(3.000, 28.05) = 3.879, P = 0.0194$ 。

图4 小鼠旷场实验自发活动

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Center square entries. $F(3.000, 28.05) = 3.879, P = 0.0194$.

Figure 4 Locomotor activity of mice in open field



注:与 Rest 模型组比较, *** $P < 0.001$ 。

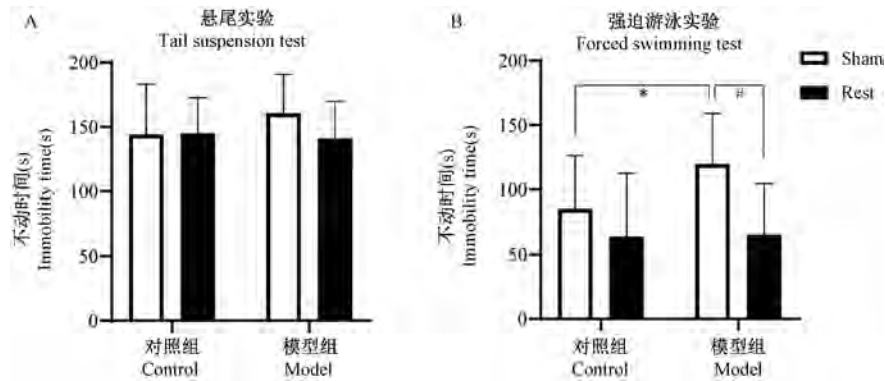
图5 小鼠高架十字迷宫各臂探索次数及时间

Note. Compared with rest model group, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Frequency and time of exploring each arm of elevated cross maze in mice

达水平都有着显著影响,如图 7 所示。模型组小鼠 *Bdnf*、*Nt3*、*Ngf* 的表达水平下降, *Fgf2* 表达水平升高;过表达 *Rest* 则直接下调了 *Bdnf*、*Nt3*、*Ngf* 的表达,但在此基础上建立皮质酮模型,这些基

因表达再无进一步变化;但 *Fgf2* 在小鼠过表达 *Rest* 后,模型引起的表达上升转为下降,这表明过表达 REST 影响了多种相关基因表达,可能引起下游众多信号通路发生变化。

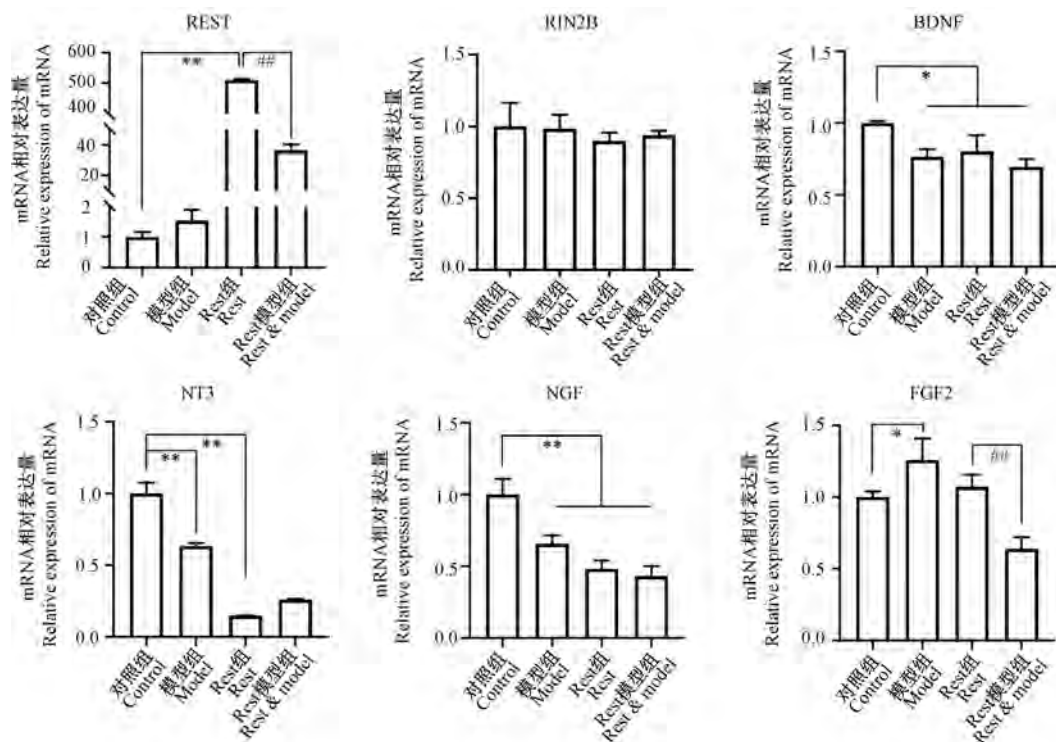


注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与 Rest 模型组比较, # $P < 0.05$;强迫游泳实验: $F(3, 44) = 4.932, P = 0.0049$ 。

图 6 小鼠悬尾实验和强迫游泳实验的不动时间

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with rest model group, # $P < 0.05$. Forced swimming test $F(3, 44) = 4.932, P = 0.0049$.

Figure 6 Immobility time of mice in tail suspension test and forced swimming test



注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 Rest 模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 7 小鼠相关基因 RNA 表达水平

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

Figure 7 Expression of relative genes in mice

3 讨论

REST 是神经发育中的重要转录调控因子,同时也被证实在神经退行性疾病中起着神经保护作用^[18,25,27],并有可能作为抑郁症的生物标志物和治疗对策^[27]。在这项研究中,实验结果首次表明 REST 确实在皮质酮抑郁应激模型中起着重要的作用,海马区过表达 *Rest* 能够直接影响小鼠在抑郁和焦虑行为学测试中的表现,同时能够调节 *Grin2b*、*Bdnf*、*Nr3*、*Ngf*、*Fgf2* 等多种相关基因的 RNA 转录水平。

研究报道称 REST 具有一定的神经保护功能,并可能与抑郁症发病过程中的细胞死亡/存活信号通路及脑神经元损伤机制相关^[14,27],而皮质酮反复注射可能诱导模型小鼠海马内神经元发生退行性改变,因此,REST 的神经保护功能可能在此发挥作用。同时,实验结果表明 REST 过表达可能不是起单纯的神经保护作用;在悬尾实验和强迫游泳实验中,皮质酮模型小鼠表现出显著的抑郁样行为,而 REST 过表达能够减少这两组测试中小鼠的不同时间,表现出一定的抑郁缓解作用;但是在同时过表达 REST 和注射皮质酮诱导应激模型时,小鼠在高架十字迷宫中也表现出强烈的焦虑行为。mRNA 的检测结果从另一方面印证相关的猜测,*Bdnf*、*Nr3*、*Ngf* 等神经营养因子在抑郁模型组小鼠中表达水平下降;但是在 *Rest* 模型组中,REST 过表达并没有上调相关的神经营养因子表达,反而进一步抑制了部分基因的表达。这些结果表明,单纯调控 REST 的表达水平可能并不能作为治疗抑郁症的良好靶点。由于 REST 调控众多重要基因,直接上调 REST 的表达水平可能引起下游众多信号通路发生变化,进一步引起相关神经元和神经环路功能的改变。

此外,构建 AAV 病毒载体过表达 REST 后,发现在实验中使用病毒浓度引起的小鼠海马内其转录水平浓度大幅升高,远超出其生理正常水平和应激模型诱导后表达水平。这可能导致 REST 调控的下游基因产生一系列不可预测的变化,会影响到小鼠抑郁和焦虑样行为。大量临床医学与动物实验科学研究认为应激通常是抑郁和焦虑的重要诱因,且在抑郁患者和抑郁动物模型的相关检测中焦虑反应与应激反应也常常伴随或交替出现,例如大鼠母子分离模型能导致类似焦虑和抑郁的行为增加,以及 HPA 反应变化^[31]。关于 REST 过表达后的实

验结果提示,其可能在焦虑和抑郁的行为变化中有一定功能。

综上所述,首次证实了调节 REST 在小鼠海马的表达,能够改善小鼠的抑郁样行为,但同时可能引起焦虑样行为;神经营养因子基因和神经递质相关基因表达在这一过程中发生了显著变化。由于神经元损伤是抑郁症的重要特征之一,具有神经保护功能的 REST 基因可以作为抑郁症机制和抑郁症治疗研究策略的新方向,实验结果为这一猜想提供了初步的理论依据,同时也提示抑郁症中 REST 的神经保护机制还需要进一步深入的探索。

参 考 文 献 (References)

- [1] Barden N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression [J]. J Psychiatry Neurosci, 2004, 29(3): 185-193.
- [2] Joseph JJ, Golden SH. Cortisol dysregulation: the bidirectional link between stress, depression, and type 2 diabetes mellitus [J]. Ann N Y Acad Sci, 2017, 1391(1): 20-34.
- [3] Mazurka R, Wynne-Edwards KE, Harkness KL. Stressful life events prior to depression onset and the cortisol response to stress in youth with first onset versus recurrent depression [J]. J Abnorm Child Psychol, 2016, 44(6): 1173-1184.
- [4] Catalán R, Gallart JM, Castellanos JM, et al. Plasma corticotropin-releasing factor in depressive disorders [J]. Biol Psychiatry, 1998, 44(1): 15-20.
- [5] Ribeiro SC, Tandon R, Grunhaus L, et al. The DST as a predictor of outcome in depression: a meta-analysis [J]. Am J Psychiatry, 1993, 150(11): 1618-1629.
- [6] Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, et al. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats [J]. Behav Brain Res, 2005, 156(1): 105-114.
- [7] Ngoupaye GT, Yassi FB, Bahane DAN, et al. Combined corticosterone treatment and chronic restraint stress lead to depression associated with early cognitive deficits in mice [J]. Metab Brain Dis, 2018, 33(2): 421-431.
- [8] Yokoyama R, Higuchi M, Tanabe W, et al. (S)-norketamine and (2S,6S)-hydroxynorketamine exert potent antidepressant-like effects in a chronic corticosterone-induced mouse model of depression [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2020, 191: 172876.
- [9] Zhao Y, Ma R, Shen J, et al. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 581(1-2): 113-120.
- [10] 高贵元, 黄捷, 刘丹, 等. 抑郁症的发病机制及抗抑郁药物的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(1): 52-55, 70. Gao GY, Huang J, Liu D, et al. The pathogenesis of depression and the research progress of antidepressants [J]. Chin Med Herald, 2021, 18(1): 52-55, 70.

- [11] 徐雪娇, 李天英, 马芸瑄, 等. 抑郁症动物模型概述 [J]. 医学综述, 2021, 27(7): 1345-1349, 1357.
Xu XJ, Li TY, Ma YX, et al. Overview of animal models of depression [J]. Med Recapitulate, 2021, 27(7): 1345-1349, 1357.
- [12] Chong JA, Tapia-Ramírez J, Kim S, et al. REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons [J]. Cell, 1995, 80(6): 949-957.
- [13] Schoenherr CJ, Anderson DJ. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes [J]. Science, 1995, 267(5202): 1360-1363.
- [14] Zhao Y, Zhu M, Yu Y, et al. Brain REST/NRSF is not only a silent repressor but also an active protector [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(1): 541-550.
- [15] 李白容, 刘厚奇. NRSF 与神经系统发育调控 [J]. 生命科学, 2011, 23(12): 1292-1295.
Li BR, Liu HQ. NRSF and regulation of nervous system development [J]. Chin Bull Life Sci, 2011, 23(12): 1292-1295.
- [16] Johnson R, Teh CH, Kunarso G, et al. REST regulates distinct transcriptional networks in embryonic and neural stem cells [J]. PLoS Biol, 2008, 6(10): e256.
- [17] Baldelli P, Meldolesi J. The transcription repressor REST in adult neurons: physiology, pathology, and diseases [J]. eNeuro, 2015, 2(4): 10-15.
- [18] Hwang JY, Zukin RS. REST, a master transcriptional regulator in neurodegenerative disease [J]. Curr Opin Neurobiol, 2018, 48: 193-200.
- [19] Paonessa F, Latifi S, Scarongella H, et al. Specificity protein 1 (Sp1)-dependent activation of the synapsin I gene (SYN1) is modulated by RE1-silencing transcription factor (REST) and 5'-cytosine-phosphoguanine (CpG) methylation [J]. J Biol Chem, 2013, 288(5): 3227-3239.
- [20] Rodenas-Ruano A, Chávez AE, Cossio MJ, et al. REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors [J]. Nat Neurosci, 2012, 15(10): 1382-1390.
- [21] Hwang JY, Aromolaran KA, Zukin RS. The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection [J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18(6): 347-361.
- [22] Mampay M, Sheridan GK. REST: An epigenetic regulator of neuronal stress responses in the young and ageing brain [J]. Front Neuroendocrinol, 2019, 53: 100744.
- [23] Ballas N, Grunseich C, Lu DD, et al. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis [J]. Cell, 2005, 121(4): 645-657.
- [24] Guida N, Laudati G, Serani A, et al. The neurotoxicant PCB-95 by increasing the neuronal transcriptional repressor REST down-regulates Caspase-8 and increases Ripk1, Ripk3 and MLKL expression determining necroptotic neuronal death [J]. Biochem Pharmacol, 2017, 142: 229-241.
- [25] Lu T, Aron L, Zullo J, et al. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease [J]. Nature, 2014, 507(7493): 448-454.
- [26] Yue F, Cheng Y, Breschi A, et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome [J]. Nature, 2014, 515(7527): 355-64.
- [27] Soga T, Nakajima S, Kawaguchi M, et al. Repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) in social stress and depression [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2021, 104: 110053.
- [28] Alcocer-Gómez E, de Miguel M, Casas-Barquero N, et al. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder [J]. Brain Behav Immun, 2014, 36: 111-117.
- [29] Fasick V, Spengler RN, Samankan S, et al. The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2015, 53: 139-159.
- [30] Hunsberger J, Austin DR, Henter ID, et al. The neurotrophic and neuroprotective effects of psychotropic agents [J]. Dialogues Clin Neurosci, 2009, 11(3): 333-348.
- [31] de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, et al. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2005, 29(2): 271-281.

[收稿日期] 2021-04-11

杨居崩,赵显芳,聂发龙,等. 反复冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫屏障功能的影响及中医解表方的作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 715-723.

Yang JB, Zhao XF, Nie FL, et al. Effect of the superficies-resolving formula of traditional Chinese medicine on cold-warm cycle stimulation and nasal mucosal immune barrier function in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 715-723.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.002

反复冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫屏障功能的影响 及中医解表方的作用研究

杨居崩,赵显芳,聂发龙,肖纯,代蓉,李秀芳*

(云南中医药大学,昆明 650500)

【摘要】 目的 探讨反复冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫屏障功能的影响,考察中医常用解表方麻黄汤和银翘散的作用。**方法** 将SD大鼠置于-15℃ 1 h,再转入25℃ 30 min,冷-热交替刺激4次,末次刺激后检测不同时间点鼻黏膜中IgA蛋白表达水平,检测1 d后鼻腔灌洗液中溶菌酶、sIgA及PGE2含量,血清中的炎症因子含量;冷-热刺激后第9天,再次给予相同条件刺激,分别于末次刺激后1~11 d检测鼻黏膜中IgA蛋白动态变化,鼻腔灌洗液中溶菌酶、PGE2动态变化,血清中炎症因子动态变化,再次刺激1 d后鼻腔灌洗液中sIgA含量;解表方麻黄汤2.43 g生药/kg BW水煎液、银翘散33.48 g生药/kg BW水煎液对两轮冷-热刺激的大鼠进行干预,经第二轮冷-热刺激24 h后检测相应指标。**结果** 反复冷-热刺激后,大鼠鼻黏膜IgA蛋白表达在刺激后1、3 d明显降低,随后逐渐上升,刺激后7 d恢复正常;刺激后1 d sIgA明显降低,溶菌酶及炎症因子无明显变化。当大鼠再次受到冷-热刺激后,鼻黏膜IgA蛋白表达显著下降,鼻腔灌洗液中溶菌酶及PGE2的含量明显降低;血清中TNF- α 、PGE2、IL-1 β 及IL-6的含量显著升高。麻黄汤和银翘散干预后,两方均可升高大鼠鼻黏膜中IgA蛋白表达及鼻腔灌洗液中sIgA的含量,银翘散还可升高溶菌酶含量,降低血清的TNF- α 、IL-1 β 含量。**结论** 反复冷-热刺激可导致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能下降,血清中多种炎症因子或炎症介质释放增加,麻黄汤和银翘散均可提高大鼠鼻黏膜免疫屏障功能,麻黄汤增加IgA含量的作用较明显,银翘散减少炎症因子的作用更明显。

【关键词】 冷-热刺激;鼻黏膜免疫;炎症;解表方

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0715-09

Effect of the superficies-resolving formula of traditional Chinese medicine on cold-warm cycle stimulation and nasal mucosal immune barrier function in rats

YANG Jubeng, ZHAO Xianfang, NIE Falong, XIAO Chun, DAI Rong, LI Xiufang*

(Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Corresponding author: LI Xiufang. E-mail:sofinelxf@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of cold-warm cycle stimulation on nasal mucosal immune barrier function in rats and determine the difference between Mahuang decoction and Yinqiao powder, which are commonly used in traditional Chinese medicine. **Methods** For cold-warm cycle stimulation, SD rats were exposed to four cycles of -15℃ for 1 hour and then 25℃ for 30 minutes. At different time points after the last stimulation, the protein expression of IgA in the

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860724),云南省科技厅-中医联合专项项目(202001AZ070001-001,2019FF002(-054))。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81860724), Yunnan Provincial Department of Science and Technology(202001AZ070001-001, 2019FF002(-054))。

[作者简介] 杨居崩(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理与应用研究。Email:1742312505@qq.com

[通信作者] 李秀芳(1978—),女,教授,硕士生导师,研究方向:中药药理与应用研究。Email:sofinelxf@163.com

nasal mucosa was detected by Western blot. Seven days after the first cold-warm cycle stimulation, the rats were re-subjected to cold-warm cycle stimulation under the same conditions. The dynamic changes in IgA protein expression in the nasal mucosa, lysozyme and prostaglandin E2 (PGE2) levels in nasal lavage fluid and PGE2, TNF- α , IL-6 and IL-1 β serum contents were detected on days 1 ~ 11 after the last stimulation. The rats were randomly divided into negative control, model, Mahuang decoction and Yinqiao powder groups. After repeated cold-warm stimulation for 6 hours, the rats in the negative control group and model group were given distilled water, the Mahuang decoction group was given 2.43 g crude drug/kg body weight Mahuang decoction, and the Yinqiao powder group was given 16.74 g crude drug/kg body weight Yinqiao powder once a day for 7 days 30 minutes after the last stimulation. Except for the negative control group, the other groups were re-subjected to repeated cold-warm stimulation, and the medicines were given twice at 6 and 22 hours after stimulation. Nasal lavage fluid was prepared, nasal mucosal tissue was extracted, and blood was obtained for detecting the corresponding indexes at 24 hours. **Results** After repeated cold-warm cycle stimulation, IgA protein expression in the nasal mucosa was significantly decreased at days 1 and 3 and then gradually increased and returned to normal on day 7. When rats were re-stimulated by cold-warm cycles, IgA protein expression in the nasal mucosa was significantly decreased, and the amounts of lysozyme and PGE2 in nasal lavage fluid were significantly decreased on days 1 and 3. The serum level of TNF- α remained high, and the contents of PGE2 and IL-1 β were significantly increased on days 1 and 3. In contrast, the IL-6 content only increased on day 1 after stimulation. Both Mahuang decoction and Yinqiao powder interventions increased IgA protein expression in the nasal mucosa and sIgA content in nasal lavage fluid. Yinqiao powder also increased the amount of lysozyme in nasal lavage fluid and decreased the serum contents of TNF- α and IL-1 β . **Conclusions** Repeated cold-warm stimulation decreases the function of the nasal mucosal immune barrier and increases the release of several types of inflammatory factors in rats. Mahuang decoction and Yinqiao powder improve the function of the nasal mucosal immune barrier. Mahuang decoction increases the IgA content, and Yinqiao powder reduces inflammatory factors to a greater extent.

【Keywords】 cold-warm cycles stimulation; nasal mucosal immunity; inflammation; superficies-resolving formula

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

近年来,随着 SARS 病毒^[1-2]、MERS 病毒^[3-4]、H1N1 流感病毒^[5-6]、H7N9 禽流感病毒^[7-8]的相继肆虐,目前,新型冠状病毒肺炎在全球流行^[9-13],呼吸系统感染性疾病的防治引起了全世界广泛的关注,这些高致病性病毒的共同特点是均可由呼吸道进入机体进而引发疾病,并且它们的传播途径也主要是呼吸道,其中肺炎等严重的下呼吸道感染(lower respiratory tract infection, LRTI)往往始于上呼吸道感染(upper respiratory tract infection, URTI)研究证实^[12],冠状病毒及流感病毒引起的严重感染均与呼吸道黏膜屏障结构破坏或功能低下密切相关,提高呼吸道黏膜屏障的防御能力是防治呼吸系统感染性疾病的重要途径之一。上呼吸道覆盖于除鼻前庭外鼻腔结构的鼻黏膜,直接与外界接触,是机体与吸入抗原及病原体接触的第一个部位,也是机体天然免疫系统的重要组成部分,其不仅具有一般性的机械屏障作用,还参与体液免疫和细胞免疫过程,是执行局部非特异性免疫功能的主要场所。鼻黏膜免疫屏障的功能易受多种因素的影响,其中,温度变化的刺激尤其重要。研究表明^[14-15],暴露于寒冷的气候环境中会增加机体对普通感冒的易感性,其原因与寒冷刺激引起机体免疫功能抑

制,病毒在低温环境下更容易复制等因素有关^[16]。为进一步考察温度变化的刺激对 SD 大鼠鼻黏膜局部免疫功能及机体炎症反应的影响,本实验采用冷-热循环刺激的方式干预 SD 大鼠,检测其鼻黏膜免疫屏障相关效应分子的变化,并同时考察了循环系统中炎症因子的变化。

解表方是中医临床治疗表证的常用方剂,由于中医表证症状的描述与现代医学的 URTI 症状非常相似,故中医常用解表方治疗上呼吸道感染,并取得了较好的效果。课题组前期研究发现解表方麻黄汤和银翘散均可提高寒冷所致上呼吸道黏膜屏障功能低下模型小鼠唾液中 sIgA 的含量,对鼻腔接种乙型溶血性链球菌感染小鼠有生存保护作用^[17],提示,两个解表方治疗上呼吸道感染的机制与其提高上呼吸道黏膜免疫功能有关。因此在本实验中同时对这两个解表方的作用进行了考察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

120 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重 180 ~ 200 g,购于成都达硕实验动物有限公司【SCXK(川)

2020-030】，饲养于云南中医药大学动物实验室【SYXK(滇)K2017-0005】，饲养期间各组大鼠自由饮水，饲喂普通维持饲料由成都达硕实验动物有限公司提供。饲养环境：昼夜各半循环照明，湿度恒定，温度控制在 22 ~ 25℃。所有操作均符合云南中医药大学实验动物伦理学要求（审批号：R-082018034）。

1.1.2 主要试剂与仪器

BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (Beyotime, P0010), RIPA 裂解液 (强) (Beyotime, P0013B), 吐温-20 (Biofroxx, 1247ML100), 过硫酸胺 (Sangon Biotech, A600072-0025), 10% SDS (Sangon Biotech, B548118), Tris (Genview, BT350-500G), 四甲基乙二胺 (Cellcook, A100761-0100), 甘氨酸 (Biofroxx, 1275GR5009), DTT (Sangon Biotech, A620058-0025), 1 mol/L Tris-HCL 缓冲液 (Solarbio, T1020), 1.5 mol/L Tris-HCL 缓冲液 (Solarbio, T1010), 30% 丙烯酰胺缓冲液 (Solarbio, A1010), Anti-IgA (Novus Biologicals, NB7501); Anti-Goat (Proteintech, SA00001-4), Anti-Rabbit (Proteintech, SA00001-2), Anti-beta Actin (Proteintech, 20536-1-AP), 溶菌酶 (南京建成生物工程研究所, A050-1-1), PGE2 (南京建成生物工程研究所, H099-1), TNF- α (南京建成生物工程研究所, H052-1), IL-1 β (南京建成生物工程研究所, H002), IL-6 (南京建成生物工程研究所, H007-1-2), sIgA (南京建成生物工程研究所, H108-2)。

酶标仪 (Tecan, Infinite M200 PRO, 瑞士), 垂直电泳仪 (Bio-Rad, EPS-301, 美国), 湿转仪 (Bio-Rad, 18113002, 美国), UVP 凝胶成像分析系统 (Bio Spectrum, 美国), 分析天平 (Precisa, XS125A, 瑞士), 冰箱 (青岛海尔, BCD-392MNE, 中国)。

1.1.3 实验药物

银翘散：按《方剂学》^[18] 配伍比例，称取银翘散，全方除薄荷、荆芥外，12 倍水浸泡 30 min，煎煮 15 min，在 10 min 时加入薄荷、荆芥。纱布滤过，再经真空抽滤后液体在 40° 旋蒸至所需浓度相应体积。大鼠的给药剂量为临床等效量 (16.74 g 生药/kg 体重) 的 2 倍 (33.48 g 生药/kg 体重)。

麻黄汤：按《方剂学》^[18] 配伍比例，称取麻黄汤，10 倍水浸泡全方 30 min，先煎麻黄 20 min，再与余药共煎 30 min，纱布滤过，再经真空抽滤后液体在 55° 旋蒸至所需浓度相应体积。大鼠的给药剂量为

换算成人临床等效量 2.43 g 生药/kg 体重。

1.2 方法

1.2.1 单轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

参考文献^[19]稍作修改，取雄性 SD 大鼠 54 只，随机分为阴性对照组、模型组。造模前禁食不禁水 12 h，正常组不予任何刺激；模型组将动物先置于 -15℃ 环境中 1 h，再转移入 25℃ 环境 30 min，循环 4 次，造模结束后恢复进食。模型组于寒冷刺激后 0、6 h、1、3、5、7、9、11 d 每个时间点取 6 只动物，常规方法制备鼻黏膜组织、血清、鼻腔灌洗液，用 Western Blot 法检测鼻黏膜组织中 IgA 的蛋白表达，以 IgA 蛋白表达最低的时间点，ELISA 试剂盒检测大鼠鼻腔灌洗液中溶菌酶、sIgA 及 PEG2 含量，及血清中的 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。

1.2.2 两轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

取雄性 SD 大鼠 42 只，随机分为阴性对照组、模型组。造模前禁食不禁水 12 h，正常组不予任何刺激；各模型组将动物先置于 -15℃ 环境中 1 h，再转移入 25℃ 环境 30 min，循环 4 次，造模结束后恢复进食，各组动物在刺激结束后第 9 天，再次采用相同的冷-热刺激条件刺激大鼠，各组动物于再次刺激后 1、3、5、7、9、11 d 每个时间点取 6 只动物，常规方法制备鼻黏膜组织、血清及鼻腔灌洗液，Western Blot 法检测鼻黏膜组织 IgA 的蛋白表达，ELISA 试剂盒检测鼻腔灌洗液中溶菌酶、sIgA 及 PEG2 的含量，以及血清中 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。

1.2.3 解表方对两轮冷-热刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能下降的影响

取雄性 SD 大鼠 24 只，随机分为阴性对照组、模型组、银翘散组和麻黄汤组。造模前禁食不禁水 12 h，正常组不予任何刺激；其余各组进行首次寒冷刺激，在造模 6 h 后，正常组和模型组灌胃给予蒸馏水 (1 mL/100 g)，银翘散组和麻黄汤组给予相应的药物 (1 mL/100 g)，连续给予 7 d，每天 1 次，在第 9 天时进行第 2 次寒冷刺激，阴性对照组和模型组在第 2 次寒冷刺激后 6 h 后灌胃给予蒸馏水，银翘散组和麻黄汤组给予相应的药物，22 h 时再灌胃给予受试物 1 次，24 h 时按常规方法制备血清、鼻腔灌洗液和鼻黏膜组织。鼻黏膜组织用于检测 IgA 的蛋白表达，大鼠鼻腔灌洗液用于检测溶菌酶、sIgA 及

PGE2 的含量,血清用于检测血清中 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。

1.3 统计学分析

实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析法 (One-way analysis of variance ANOVA),方差齐者采用 LSD 法检验,方差不齐者采用 Tamhane's 法检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。数据统计用 SPSS 26.0,作图用 GraphPad Prism 9 软件。

2 结果

2.1 单轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

结果显示,SD 大鼠在 -15°C 环境中 1 h,再转移入 25°C 环境 30 min,循环 4 次刺激后,随着时间的延长,鼻黏膜中 IgA (图 1a) 蛋白表达持续下降 ($P < 0.05$);单轮冷-热刺激后 1 d,与阴性对照组相比,模型组大鼠鼻腔灌洗液中 sIgA (图 1b) 的含量降低 ($P < 0.05$),而溶菌酶、PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β (图 1c,1d,1e,1f,1g,1h) 无明显差异 ($P < 0.05$)。

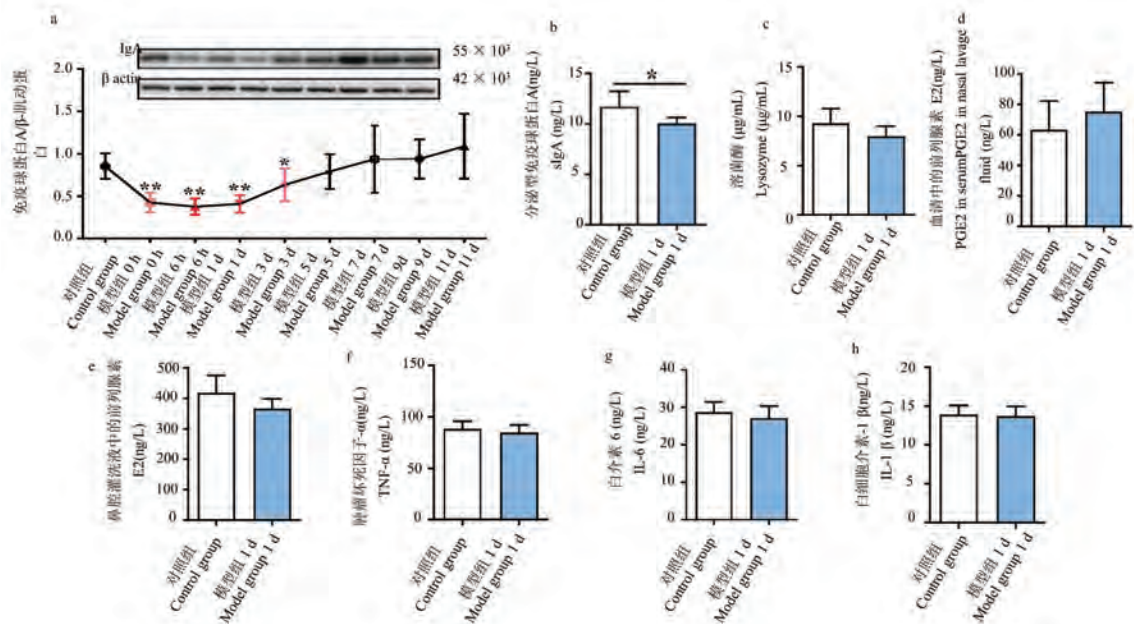
2.2 两轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

结果显示,大鼠在单轮冷-热刺激后第 9 天,对

大鼠进行再次刺激后,随着时间的延长,大鼠鼻黏膜中 IgA (图 2a) 蛋白表达持续下降 ($P < 0.05$),刺激后 1、3、11 d 时鼻腔灌洗液中溶菌酶 (图 2b) 的含量明显低于对照组动物 ($P < 0.05$);刺激后 1 d 时鼻腔灌洗液中 sIgA (图 2c) 含量明显高于对照组动物 ($P < 0.05$);与阴性对照组相比,1、3 d 时模型组血清中 PGE2 (图 2d) 的含量明显高于对照组动物 ($P < 0.05$);而鼻腔灌洗液中的 PGE2 (图 2e),1、3 d 时含量明显低于对照组 ($P < 0.05$);血清中的 TNF- α (图 2f) 含量持续上升,1、3、5、7、11 d 时血清中 TNF- α 的含量明显高于对照组 ($P < 0.05$);刺激后 1、11 d 时血清中 IL-6 (图 2g) 的含量明显高于对照组动物 ($P < 0.05$);1、3、11 d 时血清中 IL-1 β (图 2h) 的含量明显高于对照组 ($P < 0.05$) (见图 2)。

2.3 单轮刺激与两轮刺激大鼠鼻黏膜组织 IgA 蛋白含量的动态变化结果对比

为了比较 SD 大鼠受到单轮冷-热刺激与两轮冷-热刺激后,鼻黏膜中 IgA 蛋白表达的差异,结果显示,SD 大鼠再次受到刺激后,随着时间的延长,鼻黏膜中 IgA 蛋白表达持续下降,恢复速率更慢,1、3、9 d 鼻黏膜中 IgA 蛋白明显低于单轮刺激动物 ($P < 0.05$) (见图 3)。



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

图 1 单轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

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

Figure 1 Effects of single-cycle cold-warm stimulation on immune function of nasal mucosa and serum inflammatory indexes in rats

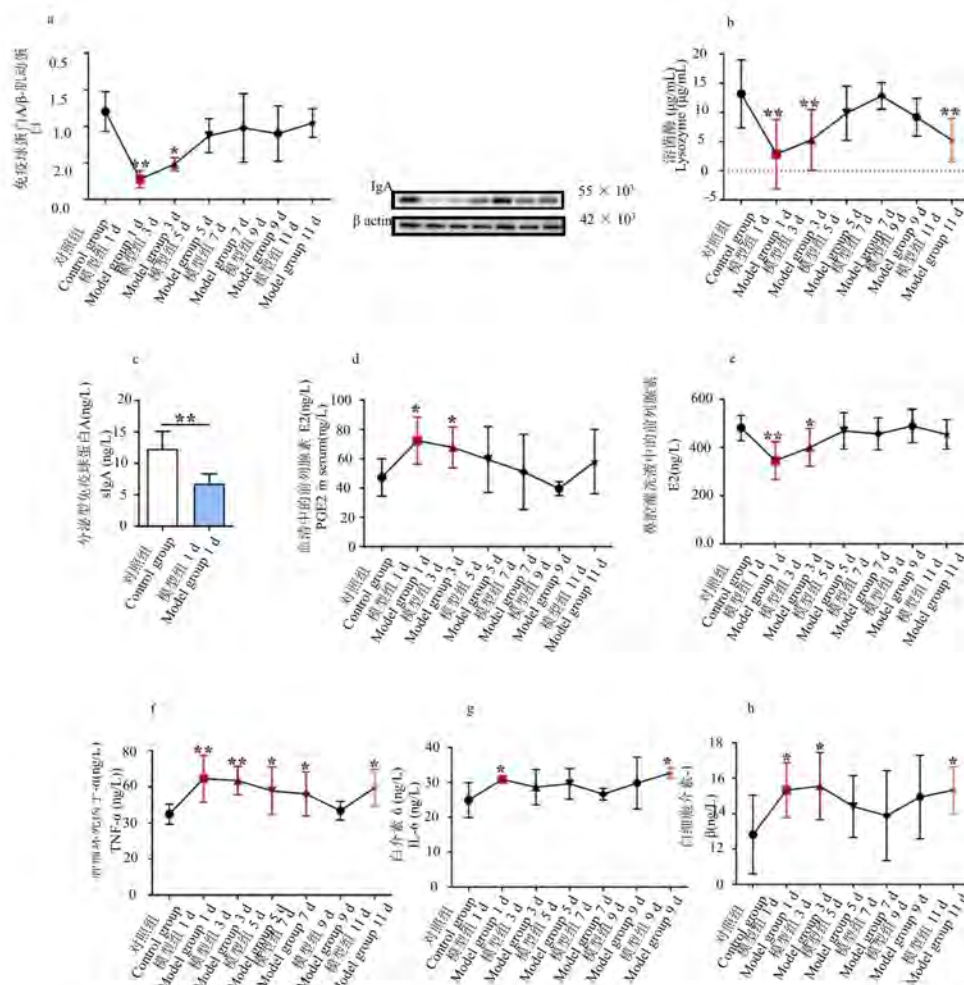
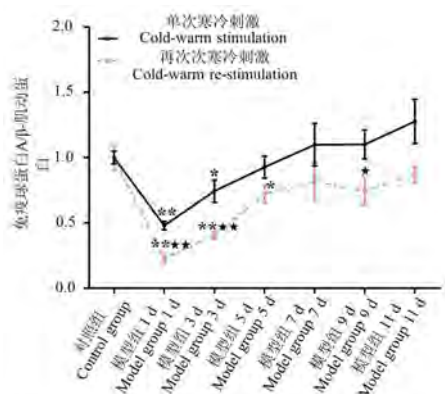


图2 两轮冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫功能及血清炎症指标的影响

Figure 2 Effects of two rounds of cold-warm stimulation on immune function of nasal mucosa and serum inflammatory indexes in rats



注:与单次寒冷刺激相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 单轮刺激与两轮刺激大鼠鼻黏膜组织 IgA 蛋白含量的动态变化结果对比

Note. Compared with cold-warm stimulation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

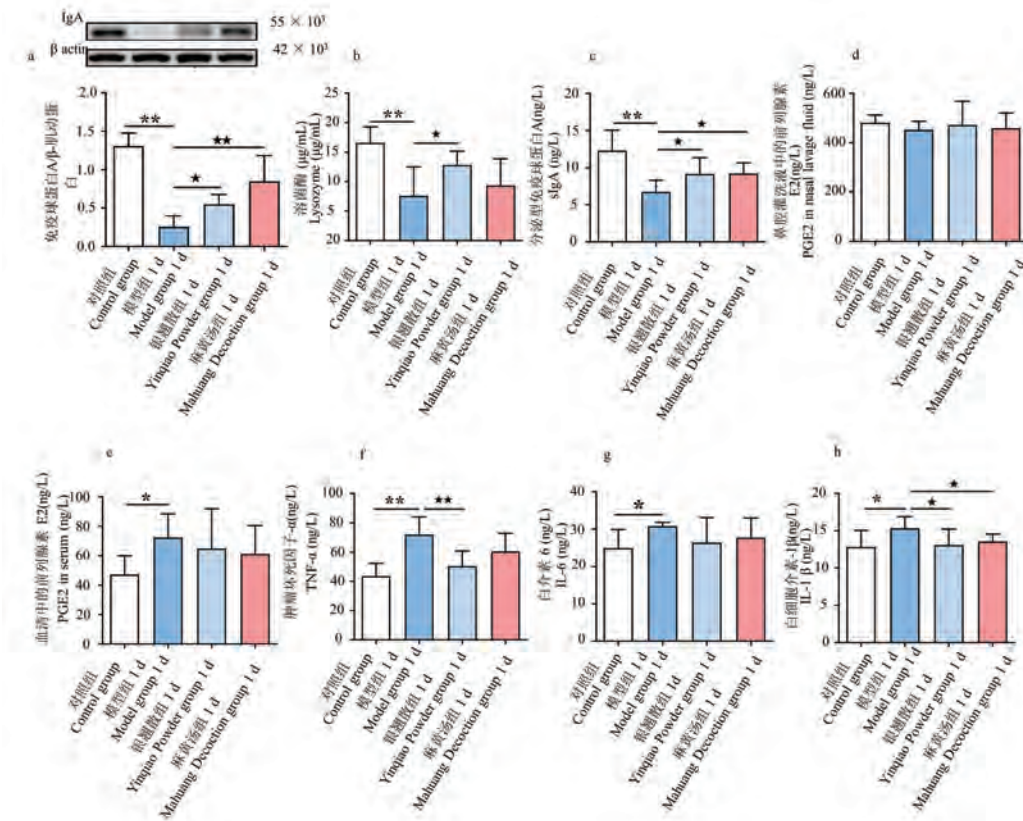
Figure 3 Comparison of dynamic changes of IgA protein content in nasal mucosa between single-round stimulation and two-round stimulation in rats

2.4 解表方对两轮冷-热刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能下降的影响

结果显示,与阴性对照组比较,模型组大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达、鼻腔灌洗液中溶菌酶和 sIgA 明显降低($P < 0.05$),而血清中的炎症因子 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,银翘散组大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白表达、鼻腔灌洗液中溶菌酶含量和 sIgA 含量均明显升高,血清中的炎症因子 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量均明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,麻黄汤组大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白表达、鼻腔灌洗液中的 sIgA 含量均明显升高,而血清中仅 IL-1 β 含量下降, PGE2、TNF- α 、IL-6 含量无明显差异($P > 0.05$)(见图 4)。

3 讨论

URTI 常发生于季节交替之时^[20-22],其症状为



注:与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 4 解表方对两轮冷-热刺激致大鼠鼻黏膜免疫屏障功能下降的影响

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

Figure 4 Effect of superficies-resolving formulas on the decline of nasal mucosal immune barrier function induced by two rounds of cold-warm stimulation in rats

鼻塞、流涕、喉咙痛、咳嗽以及打喷嚏等^[23-24],为自限性疾病,但可发展为肺炎、支气管炎等严重的LRTI,特别是老人、婴幼儿以及具有潜在疾病的人可能造成致命后果^[25-27],研究表明,大多数呼吸道感染具有季节性。在温带地区,URTI在秋季和春季出现的频率增加,并在整个冬季高度流行^[22,28]。冬季寒冷、干燥的气候特点是呼吸道感染增加的主要驱动因素,可促使病毒稳定性增加并加快传播,削弱宿主的免疫系统^[29-31],如2002~2003年重症急性呼吸综合征(SARS-CoV)和最近出现的新型冠状病毒肺炎(SARS-CoV-2)等^[32-35]进一步表明了冬季环境容易促进各种呼吸道病毒感染的传播,并在健康人群中高度流行,研究表明^[36-37]人体暴露于寒冷环境中会增加呼吸道感染的风险及其严重程度,每年冬季都会因气温的下降而导致死亡率和发病率的大幅上升,其死亡率比其他季节平均高出26%,其中24%的人死于呼吸系统疾病^[38]。另

外平均气温每降低1℃,冬季死亡人数就增加8000人^[39]。根据英国230名全科医生在1970年8月至1991年7月期间统计的每万名登记病人的发病率数据显示^[40],随着气温的下降,流感样疾病的发病率增加,发病高峰出现在2月份平均温度最低的时期,其最大的因素是呼吸冷空气会导致气道降温,从而导致呼吸道上皮温度下降,并降低局部呼吸防御功能,如降低粘液纤毛清除率和抑制白细胞吞噬,最终导致呼吸道感染^[41-42]。呼吸道黏膜免疫系统是机体抵御经口鼻入侵病原体的第一道防线,鼻黏膜作为RMIS的重要组成部分,也是病原体入侵的首个接触部位,鼻黏膜免疫功能低下是URTI发生的重要原因,也与URTI反复发作密切相关,故维持鼻黏膜屏障功能的完整性对于URTI防治具有重要意义。结合临床的这些研究报道,本实验探讨了反复冷-热刺激对大鼠鼻黏膜免疫屏障功能的影响,并考察了中医常用解表方麻黄汤和银翘散的作用。

sIgA 作为黏膜免疫系统的主要效应分子,可通过限制病原体的上皮定植,防止病原体进入黏膜上皮,保护黏膜表面免受环境病原体和抗原的侵害^[43-45]。溶菌酶是体液中的非特异性杀菌物质,可反映机体非特异性免疫机能的水平,溶菌酶含量下降,则机体局部抗菌、抗感染能力下降^[46-47]。当受到反复的冷-热刺激后,SD 大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白表达明显下降,在刺激后的第 1 天表达最低,此时鼻腔灌洗中分泌型的 sIgA 显著下降,但溶菌酶含量无明显变化,血清中炎症介质 PGE2 及炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 也都无明显变化,在刺激后的 3 d 内,SD 大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白均呈低表达,但第 3 天后开始呈上升趋势,至第 7 天则完全恢复至正常水平,提示,在短暂的反复冷-热刺激后,会使得鼻黏膜的免疫屏障功能暂时低下,但此时机体的炎症反应不明显。

研究显示,小鼠在初次感染细菌或病毒性肺炎后即使被治愈,再次感染肺炎的机率也会明显升高,会出现免疫系统对相同致病因素的反应性下降的现象^[48]。在本实验研究中,大鼠受到单轮冷-热刺激后 7 d 鼻黏膜中 IgA 蛋白表达就能恢复正常,那如果大鼠再次受到相同条件的冷-热刺激时,大鼠鼻黏膜免疫效应分子 IgA 是否能够再次在短时间内恢复正常呢?为了回答这个问题,大鼠在单轮冷-热刺激后的第 9 天,对大鼠进行相同条件的再次冷-热刺激,结果发现,再次刺激后,随着时间的延长,大鼠鼻黏膜中 IgA 蛋白表达持续下降,刺激后 1、3、9 d 鼻黏膜中 IgA 蛋白表达明显低于单轮冷-热刺激,虽然鼻黏膜中 IgA 蛋白表达在 3 d 后也呈上升趋势,但较单轮冷-热刺激后上升速率更慢,至第 11 天时,鼻黏膜中 IgA 蛋白表达也未恢复正常,同时,再次的冷-热刺激后,模型大鼠鼻腔灌洗液中 sIgA 和溶菌酶的含量均显著下降,血清中 PGE2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 均显著升高,提示,大鼠在受到冷-热刺激后,即使鼻黏膜中 IgA 蛋白表达恢复正常,再次受到冷-热刺激后,鼻黏膜免疫系统功能下降会更明显,机体的防御能力下降,这可能与机体受到反复的冷-热刺激后会造成上呼吸道感染的易感性提高的原因相关。

银翘散源于《温病条例》,由清代温病学家吴鞠通创制,是中医用于治疗风热表证的代表方,使用

至今已有两百多年历史,具有辛凉透表、清热解毒的功效,主要用于温病初起,微恶风寒,头痛口渴,咳嗽咽痛,舌尖红,苔薄白或薄黄,脉浮数等。麻黄汤源于张仲景所著《伤寒论》,是中医用于治疗风寒表证的代表方,具有发汗解表、宣肺平喘、利水消肿的功效,主治外感风寒表实证,恶寒发热,头身疼痛,无汗而喘,舌苔薄白,脉浮紧等。由于两个解表方的主治病症与现代医学中 URTI 的临床症状非常相似,因此,两个解表方被广泛用于 URTI 的治疗,在临床上显示了较好的疗效。本研究的结果显示,反复冷-热刺激后,SD 大鼠鼻黏膜 IgA 蛋白表达明显下降,鼻腔灌洗中分泌型的 sIgA 显著下降,提示鼻黏膜的免疫屏障功能下降,分别给予麻黄汤和银翘散后,均能升高鼻黏膜 IgA 的蛋白表达和鼻腔灌洗中 sIgA 的含量,并且以麻黄汤提高鼻黏膜 IgA 的蛋白表达的作用更加明显。提示,麻黄汤侧重于促进鼻黏膜 IgA 的蛋白表达来发挥提高鼻黏膜免疫功能的作用。银翘散组溶菌酶的含量升高,麻黄汤组无明显变化,提示银翘散可通过提高 sIgA、溶菌酶的含量而发挥增强鼻腔局部非特异性免疫功能的作用。再次冷-热刺激导致 SD 大鼠多种炎症因子明显升高,银翘散和麻黄汤对大鼠鼻腔灌洗液中和血清中 PGE2 均无明显影响,但银翘散可显著降低模型大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 的含量,提示其具有减轻炎症反应的作用,麻黄汤仅能降低 IL-1 β 的含量,提示,银翘散在缓解炎症反应方面作用更为突出。本研究显示,不同药性的麻黄汤与银翘散对寒冷刺激致大鼠鼻黏膜免疫功能低下模型具有相同的作用也有不同的作用,但其具体的作用机制尚不清楚,因此在后续的研究中将对两种解表方的作用机制进行深入研究。为临床治疗 URTI 提供科学的理论依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] Zeng F, Chow KY, Leung FC. Estimated timing of the last common ancestor of the SARS coronavirus [J]. N Engl J Med, 2003, 349(25): 2469-2470.
- [2] Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, et al. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome [J]. Lancet, 2003, 362(9380): 263-270.
- [3] Memish ZA, Perlman S, Van Kerkhove MD, et al. Middle East respiratory syndrome [J]. Lancet, 2020, 395(10229): 1063-1077.

- [4] Chan JF, Lau SK, To KK, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus; another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(2): 465–522.
- [5] Mitka M. H1N1 influenza virus reassorting in pigs, poses unknown risk to human health [J]. *JAMA*, 2010, 304(6): 626–627.
- [6] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus [J]. *Nature*, 2009, 459(7249): 931–939.
- [7] Wang X, Jiang H, Wu P, et al. Epidemiology of avian influenza A H7N9 virus in human beings across five epidemics in mainland China, 2013 – 17: an epidemiological study of laboratory-confirmed case series [J]. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17(8): 822–832.
- [8] Butler D. Flu genomes trace H7N9 evolution [J]. *Nature*, 2015, 519(7542): 137.
- [9] Pascarella G, Strumia A, Piliago C, et al. COVID-19 diagnosis and management; a comprehensive review [J]. *J Intern Med*, 2020, 288(2): 192–206.
- [10] Carfi A, Bernabei R, Landi F, et al. Persistent symptoms in patients after acute COVID-19 [J]. *JAMA*, 2020, 324(6): 603–605.
- [11] McElvaney OJ, McEvoy NL, McElvaney OF, et al. Characterization of the inflammatory response to severe COVID-19 illness [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202(6): 812–821.
- [12] Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(5): 315–328.
- [13] 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.
- [14] Mourtzoukou EG, Falagas ME. Exposure to cold and respiratory tract infections [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2007, 11(9): 938–943.
- [15] Mäkinen TM, Juvonen R, Jokelainen J, et al. Cold temperature and low humidity are associated with increased occurrence of respiratory tract infections [J]. *Respir Med*, 2009, 103(3): 456–462.
- [16] Foxman EF, Storer JA, Fitzgerald ME, et al. Temperature-dependent innate defense against the common cold virus limits viral replication at warm temperature in mouse airway cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(3): 827–832.
- [17] 雷娜, 李艳, 何芳雁, 等. 解表方通过调节黏膜免疫保护上呼吸道感染模型小鼠的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(18): 174–177.
Lei N, Li Y, He FY, et al. Study on the protective effect of Jiebiao prescription on upper respiratory tract infection model mice by regulating mucosal immunity [J]. *Chin J Exp Tradit Med* Formulae, 2013, 19(18): 174–177.
- [18] 李冀. 方剂学 [M]. 高等教育出版社; 2009.
Li J. *Pharmaceutics* [M]. Higher Education Press; 2009.
- [19] Xiao MM, Pan CS, Liu YY, et al. Post-treatment with Ma-Huang-Tang ameliorates cold-warm-cycles induced rat lung injury [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 312.
- [20] Moriyama M, Hugentobler WJ, Iwasaki A. Seasonality of respiratory viral infections [J]. *Annu Rev Virol*, 2020, 7(1): 83–101.
- [21] Nam HH, Ison MG. Respiratory syncytial virus infection in adults [J]. *BMJ*, 2019, 366: l5021.
- [22] Price RHM, Graham C, Ramalingam S. Association between viral seasonality and meteorological factors [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 929.
- [23] Jackson GG, Dowling HF, Spiesman IG, et al. Transmission of the common cold to volunteers under controlled conditions. I. The common cold as a clinical entity [J]. *AMA Arch Intern Med*, 1958, 101(2): 267–278.
- [24] Barrett B, Brown RL, Mundt MP, et al. Validation of a short form Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey (WURSS-21) [J]. *Health Qual Life Outcomes*, 2009, 7: 76.
- [25] Zhang SY, Luo YP, Huang DD, et al. Fatal pneumonia cases caused by human adenovirus 55 in immunocompetent adults [J]. *Infect Dis (Lond)*, 2016, 48(1): 40–47.
- [26] Moreno-Perez D, Calvo C. Epidemiological and clinical data of hospitalizations associated with respiratory syncytial virus infection in children under 5 years of age in Spain: FIVE multicenter study [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2014, 8(2): 209–216.
- [27] Hashem M, Hall CB. Respiratory syncytial virus in healthy adults; the cost of a cold [J]. *J Clin Virol*, 2003, 27(1): 14–21.
- [28] Heikkinen T, Järvinen A. The common cold [J]. *Lancet*, 2003, 361(9351): 51–59.
- [29] Shaw SP. Seasonality and selective trends in viral acute respiratory tract infections [J]. *Med Hypotheses*, 2016, 86: 104–119.
- [30] Peci A, Winter AL, Li Y, et al. Effects of absolute humidity, relative humidity, temperature, and wind speed on influenza activity in Toronto, Ontario, Canada [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(6): e02426–18.
- [31] Shaman J, Kohn M. Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(9): 3243–3248.
- [32] Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome [J]. *Lancet*, 2003, 361(9366): 1319–1325.
- [33] Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, et al. Newly discovered

- coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome [J]. *Lancet*, 2003, 362(9380): 263–270.
- [34] Paules CI, Marston HD, Fauci AS. Coronavirus infections-more than just the common cold [J]. *JAMA*, 2020, 323(8): 707–708.
- [35] Bartoszko JJ, Siemieniuk RAC, Kum E, et al. Prophylaxis against Covid-19: living systematic review and network meta-analysis [J]. *BMJ*, 2021, 373: n949.
- [36] Mäkinen TM, Juvonen R, Jokelainen J, et al. Cold temperature and low humidity are associated with increased occurrence of respiratory tract infections [J]. *Respir Med*, 2009, 103(3): 456–462.
- [37] Sigelman CK. Age and ethnic differences in cold weather and contagion theories of colds and flu [J]. *Health Educ Behav*, 2012, 39(1): 67–76.
- [38] Ou CQ, Song YF, Yang J, et al. Excess winter mortality and cold temperatures in a subtropical city, Guangzhou, China [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77150.
- [39] Alderson MR. Season and mortality [J]. *Health trends*, 1985, 17: 87–96.
- [40] Curwen M. Excess winter mortality in England & Wales with special reference to the effects of temperature and influenza [J]. 1997.
- [41] Foxman EF, Storer JA, Fitzgerald ME, et al. Temperature-dependent innate defense against the common cold virus limits viral replication at warm temperature in mouse airway cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(3): 827–832.
- [42] Eccles R, Wilkinson JE. Exposure to cold and acute upper respiratory tract infection [J]. *Rhinology*, 2015, 53(2): 99–106.
- [43] Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(12): 821–832.
- [44] Mantis NJ, Forbes SJ. Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders [J]. *Immunol Invest*, 2010, 39(4–5): 383–406.
- [45] Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, et al. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms [J]. *Microbes Infect*, 2001, 3(12): 1021–1035.
- [46] Callewaert L, Van Herreweghe JM, Vanderkelen L, et al. Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors [J]. *Trends Microbiol*, 2012, 20(10): 501–510.
- [47] Sarkar S, Gulati K, Mishra A, et al. Protein nanocomposites: Special inferences to lysozyme based nanomaterials [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 151: 467–482.
- [48] Roquilly A, McWilliam HEG, Jacqueline C, et al. Local Modulation of antigen-presenting cell development after resolution of pneumonia induces long-term susceptibility to secondary infections [J]. *Immunity*, 2017, 47(1): 135–147.

[收稿日期] 2021-07-02

赵健清,丁露,曾俊义,等. 自发性高血压大鼠心肌纤维化时序动态变化 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 724-729.

Zhao JQ, Ding L, Zeng JY, et al. Chronological changes in myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 724-729.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.003

自发性高血压大鼠心肌纤维化时序动态变化

赵健清^{1#}, 丁露^{2#}, 曾俊义^{1,2*}, 应国秋¹, 文渊¹, 聂俊刚¹, 易达松¹

(1. 南昌大学第一附属医院心血管内科, 南昌 330006; 2. 南昌大学第一附属医院高血压病研究所, 南昌 330006)

【摘要】 目的 观测自发性高血压大鼠心肌纤维化时序动态变化。方法 纳入 4 周龄 SPF 级雄性自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 45 只、京都种 Wistar 大鼠 (Wistar Kyoto rats, WKY) 35 只, 随机分笼饲养至 42 周, 分别于预设时点尾套法监测收缩压, 超声心动图监测心脏结构与功能; 解剖大鼠心脏标本并计算左室质量指数 (left ventricular mass index, LVMI), Masson 染色观测左室组织纤维化, qRT-PCR 检测左室组织纤维化相关基因 TGF- β_1 、I 型胶原、III 型胶原。结果 6 ~ 12 周 SHR 收缩压快速上升, 12 周时明显高于 WKY ($P < 0.05$), 此后 SHR 血压趋于平稳并维持高位。伴随血压及鼠龄变化, SHR 左室结构相关指标室间隔厚度 (interventricular septal thickness, IVST)、左室后壁厚度 (left ventricular posterior wall thickness, LVPWT)、LVMI 均呈现特征性动态变化。SHR 胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF) 随鼠龄增长逐渐增加, 12 周开始即显著高于 WKY ($P < 0.05$)。SHR 左室心肌纤维化相关基因 TGF- β_1 、I 型胶原、III 型胶原表达均呈现随鼠龄增长先降后升变化, 且 32 周后大幅上调。结论 SHR 心肌纤维化伴随鼠龄及血压变化不断发展演变, 并从结构到功能, 宏观入微观均呈现出时序动态特征性改变。

【关键词】 自发性高血压大鼠; 心肌纤维化; 时序; 动态变化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0724-06

Chronological changes in myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats

ZHAO Jianqing^{1#}, DING Lu^{2#}, ZENG Junyi^{1,2*}, YING Guoqi¹, WEN Yuan¹, NIE Jungang¹, YI Dasong¹

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China.

2. Jiangxi Hypertension Research Institute, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006)

Corresponding author: ZENG Junyi. E-mail: zjy1312@163.com

【Abstract】 Objective To study the chronological changes in myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. **Methods** Forty-five male spontaneously hypertensive rats (SHR) and 35 male Wistar Kyoto rats (WKY) that were four weeks old and specific-pathogen-free were randomly selected and fed in cages until 42 weeks. Systolic blood pressure was measured by the tail-cuff method, and cardiac structure and function were detected by echocardiography at pre-set time points. At the same time points, heart specimens were dissected, and the left ventricular mass index (LVMI) was

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81760082), 江西省自然科学基金资助项目 (20181BAB205005), 江西省教育厅科学技术研究重点资助项目 (GJJ170040), 江西省卫生健康委科技计划 (202130196)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81760082), Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20181BAB205005), the Key Project of Science and Technology Research of Jiangxi Education Department (GJJ170040), the Science and Technology Project of Health Commission of Jiangxi Province (202130196).

[作者简介] 赵健清 (1992—), 男, 住院医师, 研究方向: 心血管疾病。Email: 18270712354@163.com;

丁露 (1988—), 女, 主管检验师, 研究方向: 临床检验与诊断。Email: 578194111@qq.com。

#共同第一作者

[通信作者] 曾俊义 (1981—), 男, 副主任医师, 研究方向: 高血压、心脏重构。Email: zjy1312@163.com

calculated. Myocardial fibrosis of the left ventricle was detected by Masson staining, and TGF- β 1, collagen I and collagen III were detected by qRT-PCR. **Results** The blood pressure of SHR increased rapidly from 6 weeks to 12 weeks and was significantly higher than that of WKY rats at 12 weeks ($P < 0.05$) and then stabilized and remained high. With age and blood pressure changes, the structure-related indexes of the left ventricle, including interventricular septal thickness (IVST), left ventricular posterior wall thickness (LVPWT) and LVMI, all showed dynamic characteristic alterations. The collagen volume fraction (CVF) gradually increased with the age of SHR and was significantly higher than that of WKY rats at 12 weeks and later ($P < 0.05$). The expression of the fibrosis-related factors TGF- β 1, type I collagen and type III collagen in the left ventricle myocardium of SHR all decreased at first and then increased with age to statistically significant levels after 32 weeks. **Conclusions** With increasing age and blood pressure, myocardial fibrosis in SHR continuously develops and presents with the typical characteristics of chronological changes, including structure, function, macro and micro alterations.

【Keywords】 spontaneously hypertensive rats; myocardia fibrosis; chronological; dynamic changes

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

高血压是当前临床患病率最高的心血管疾病之一,我国成人高血压患者已达 2.45 亿,且随着年龄的增加患病率逐渐升高^[1]。高血压患者可出现左心室肥厚、心肌纤维化、心肌细胞凋亡等病理性改变,继而导致心室重构、心律失常和心力衰竭,其中心肌纤维化是高血压导致心肌损伤和结构重塑的重要病理特征^[2]。心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是指心肌成纤维细胞在高血压等因素影响下出现过度增殖,引起 I 型和 III 型胶原为主的细胞外基质比例失调、过度沉积和排列紊乱,从而导致心肌纤维化、心脏顺应性降低、心脏功能障碍,最终引发恶性心律失常及心力衰竭的一系列病理性改变过程^[3]。因此,积极探索高血压心肌纤维化发生机制,寻找延缓甚或逆转纤维化进展的治疗方法对于高血压防治具有重要意义。SHR 是最接近人类原发性高血压病理生理的遗传性动物模型,是高血压心肌纤维化研究较为理想的实验动物。本研究以 SHR 为对象,通过多时点观测 4 ~ 42 周 SHR 血压水平、心脏结构与功能、心肌纤维化组织病理及纤维化相关基因表达的动态变化,多时点多维度呈现 SHR 心肌纤维化伴随鼠龄及血压改变的特征性时序动态变化,可为高血压心肌纤维化相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 周龄 SPF 级雄性 SHR 大鼠 45 只,体重(62.8 ± 5.7)g、WKY 大鼠 35 只,体重(68.5 ± 6.2)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】,饲养于南昌大学第一附属医院动

物实验室【SYXK(赣)2021-0003】,随机分笼饲养,24 h 自由饮水和进食,饲养至 42 周,分别于预设时点检测大鼠各项指标。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22 ~ 25℃。所有操作均符合南昌大学第一附属医院科学实验伦理学要求(审批号:(2021)医研伦审第(5-075))。

1.1.2 主要试剂与仪器

大小鼠智能无创血压计 BP-2010A(北京软隆生物技术有限公司);Vevo 2100 超高分辨率小动物超声成像系统(加拿大 VisualSonics 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);正置荧光显微镜 BX51(日本 Olympus 公司)。Masson 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);TRNzol Universal Reagent(天根生化科技(北京)有限公司);FastQuant RT Kit(with gDNase)(天根生化科技(北京)有限公司);SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)(天根生化科技(北京)有限公司);大鼠 TGF- β 1、I 型胶原、III 型胶原、GAPDH 引物(深圳华大基因股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 鼠尾无创血压监测大鼠血压

分别于 6、8、12、18、24、32、42 周测量 SHR 及 WKY 收缩压,血压测量采用大小鼠智能无创血压计以间接测量法(尾套法)进行,每次血压测量时段相对固定(14:00 ~ 18:00)。间隔 1 min,重复测量 5 次,舍去最高和最低值,取其他 3 个数值均数作为血压测量值。每次血压测量保持可重复的实验环境,确保血压测量数据的可对照性。

1.2.2 超声心动图监测大鼠心脏结构及功能

采用超高分辨率小动物超声成像系统,分别于 6、8、12、18、24、32、42 周进行大鼠心脏超声心动图检

测。测量如下参数:舒张期室间隔厚度(interventricular septal thickness at diastole, IVST)、左心室舒张期末后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness at end diastole, LVPWT)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)由超声系统软件自动测算。各参数检测值取 5 个心动周期平均值。

1.2.3 大鼠左室心肌组织病理形态检测

分别于 6、8、12、18、24、32、42 周进行腹腔注射麻醉,迅速剖胸取出心脏,沿房室环剪去心房及右心室游离壁,保留室间隔和左心室游离壁,测量左室质量,计算左室质量指数(left ventricular mass index, LVMI);大鼠左心室组织进行 Masson 染色,计算胶原容积分数(Collagen Volume Fraction, CVF)。正置显微镜下观察心肌组织形态并拍照,采用 Image J 软件进行图片分析,高倍视野下计算出心肌组织胶原纤维面积占整个组织面积的百分比,即胶原容积分数=胶原面积/总面积,每个标本均随机取 3 个视野测量,计算其均值。

1.2.4 qRT-PCR 检测大鼠心肌纤维化基因 TGF- β_1 、I 型胶原、III 型胶原

分别于 6、8、12、18、24、32、42 周获取大鼠左心室组织,依次进行总 RNA 提取、cDNA 合成及 qPCR 反应,分别按试剂说明书进行。TGF- β_1 :上游引物 5'-GGCTACCATGCCAACTTCTG-3',下游引物 5'-CGTAGTAGACGATGGGCAGT-3'; Collagen I:上游引物 5'-CCCTGCTGGAGAAGAAGGAA-3',下游引物 5'-AGGAGAACCCTTTGGGACCAG-3'; Collagen III:上游引物 5'-ACTGCTGAACGTGGCTCTAA-3',下游引物 5'-GGACCTGGATGTCCACTTGA-3'; GAPDH:上游引物 5'-CAAGTTCAACGGCACA GTCAAG-3',下游引物 5'-ACATACTCAGCAC CAGCATCAC-3'。以 GAPDH 为内参,2^{- $\Delta\Delta CT$} 计算 TGF- β_1 、Collagen I 及 Collagen III 基因相对表达量。

表 1 大鼠鼠尾无创血压动态变化

Table 1 Dynamic changes of systolic blood pressure(SBP) in rats

周龄 Age	WKY 血压(mmHg) SBP of WKY (mmHg)	SHR 血压(mmHg) SBP of SHR (mmHg)
6 周 6 weeks	84.83 $\pm$ 3.82 ^{Δ} ^{∇}	85.39 $\pm$ 4.47 ^{Δ} ^{∇}
8 周 8 weeks	108.49 $\pm$ 6.12 ^{∇}	126.97 $\pm$ 13.35 ^{$\ast$} ^{∇}
12 周 12 weeks	133.63 $\pm$ 10.33 ^{$\ast$} ^{Δ}	174.15 $\pm$ 4.09 ^{$\ast$} ^{Δ}
18 周 18 weeks	134.52 $\pm$ 5.31 ^{$\ast$} ^{Δ}	184.90 $\pm$ 5.23 ^{$\ast$} ^{Δ}
24 周 24 weeks	128.40 $\pm$ 16.43 ^{$\ast$} ^{Δ}	179.13 $\pm$ 5.45 ^{$\ast$} ^{Δ}
32 周 32 weeks	129.04 $\pm$ 7.99 ^{$\ast$} ^{Δ}	187.32 $\pm$ 13.46 ^{$\ast$} ^{Δ}
42 周 42 weeks	115.05 $\pm$ 8.95 ^{$\ast$} ^{∇}	184.61 $\pm$ 5.29 ^{$\ast$} ^{Δ}

注:同周龄 SHR 与 WKY 相比, $\ast P < 0.05$; SHR 或 WKY 与 6 周相比, $\ast P < 0.05$; SHR 或 WKY 与 8 周相比, $\Delta P < 0.05$; SHR 与 12 周相比, $\nabla P < 0.05$ 。(下表/图同)

Note. Compared with WKY of the same age, $\ast P < 0.05$. Compared with SHR or WKY at 6 weeks, $\ast P < 0.05$. Compared with SHR or WKY at 8 weeks, $\Delta P < 0.05$. Compared with SHR at 12 weeks, $\nabla P < 0.05$. (The same in the following tables and figures)

1.3 统计学分析

数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。分别用 Shapiro-Wilk 检验及 Levene 检验分析样本数据分布特点及方差齐性。两组间计量资料比较,符合正态分布资料采用 Students' t 检验,反之则用 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 为统计学差异具有显著性。使用 SPSS 22.0 统计软件分析。

2 结果

2.1 鼠尾无创血压监测大鼠血压

两组间相比,6 周时 WKY 与 SHR 血压处于同一水平,8 周时 SHR 血压较 WKY 显著升高,8 周至 18 周 SHR 与 WKY 血压差距持续扩大,此后随周龄增长,SHR 与 WKY 血压差距持续存在(见表 1)。

2.2 超声心动图监测大鼠心脏结构及功能

6 周时两组大鼠 IVST、LVPWT 均相近;12 周时 SHR 组 IVST 较 WKY 显著增加,此后 IVST 差异在同周龄两组大鼠间持续扩大,并于 32 周时达到最大,32 周后两组间 IVST 差异有所回落;8 周时 SHR 组 LVPWT 即较 WKY 显著增加,此后 LVPWT 差异同样在同周龄两组大鼠间持续扩大,于 32 周时达到最大,32 周后两组间 LVPWT 差异有所减小。LVEF 在不同周龄 SHR 或 WKY 间无显著变化,同周龄两组大鼠间亦无明显差异(见表 2)。

2.3 大鼠心肌组织病理形态改变

除 8 周时两组大鼠 LVMI 相接近,余同周龄 SHR 组 LVMI 均显著高于 WKY(见表 3)。Masson 染色显示,相较于 WKY,SHR 心肌肌束间隙随鼠龄增加不同程度增大,心肌细胞间质和血管周围可见明显的纤维化改变,并伴有胶原沉积(见图 1);6 周时两组大鼠 CVF 相近,12 周 SHR 组 CVF 较 WKY 显著增加,此后 CVF 差异在同周龄两组大鼠间持续扩大(见表 3)。

表 2 大鼠心脏结构和功能的动态变化

Table 2 Dynamic changes of cardiac structure and function in rats

周龄 Age	分组 Groups	IVST (mm)	LVPWT (mm)	LVEF (%)
6 周 6 weeks	WKY	1.29 ± 0.13	1.35 ± 0.10	81.86 ± 2.10
	SHR	1.31 ± 0.09	1.38 ± 0.12	80.07 ± 2.73
8 周 8 weeks	WKY	1.45 ± 0.12	1.54 ± 0.18	83.47 ± 5.27
	SHR	1.62 ± 0.33	1.84 ± 0.25 ^{##}	83.58 ± 4.30
12 周 12 weeks	WKY	1.78 ± 0.32 ^{#Δ}	2.18 ± 0.28 ^{#Δ}	77.58 ± 5.62
	SHR	2.14 ± 0.15 ^{##Δ▽}	2.35 ± 0.24 ^{#Δ}	80.73 ± 5.05
18 周 18 weeks	WKY	2.17 ± 0.35 ^{#Δ▽}	2.34 ± 0.34 ^{#Δ}	79.63 ± 4.39
	SHR	2.88 ± 0.25 ^{##Δ▽}	2.95 ± 0.14 ^{##Δ▽}	78.34 ± 3.80
24 周 24 weeks	WKY	2.37 ± 0.28 ^{#Δ▽}	2.59 ± 0.20 ^{#Δ▽}	77.53 ± 8.92
	SHR	2.97 ± 0.22 ^{##Δ▽}	3.05 ± 0.10 ^{##Δ▽}	77.36 ± 8.03
32 周 32 weeks	WKY	2.26 ± 0.27 ^{#Δ▽}	2.56 ± 0.19 ^{#Δ}	81.23 ± 3.75
	SHR	3.05 ± 0.29 ^{##Δ▽}	3.19 ± 0.52 ^{##Δ▽}	82.95 ± 4.01
42 周 42 weeks	WKY	2.36 ± 0.13 ^{#Δ▽}	2.55 ± 0.41 ^{#Δ}	78.54 ± 2.80
	SHR	2.87 ± 0.19 ^{##Δ▽}	3.04 ± 0.14 ^{##Δ▽}	77.17 ± 7.04

表 3 大鼠左室纤维化指标动态变化

Table 3 Dynamic changes of left ventricular hypertrophy in rats

周龄 Age	分组 Groups	CVF (%)	LVMI (mg/g)
6 周 6 weeks	WKY	0.40 ± 0.03	2.71 ± 0.11
	SHR	0.47 ± 0.04	3.38 ± 0.30 [*]
8 周 8 weeks	WKY	0.55 ± 0.09	2.46 ± 0.16
	SHR	0.87 ± 0.12 [#]	2.58 ± 0.17 [#]
12 周 12 weeks	WKY	0.52 ± 0.21	2.41 ± 0.11
	SHR	1.16 ± 0.13 ^{##Δ}	2.86 ± 0.16 ^{##Δ}
18 周 18 weeks	WKY	0.51 ± 0.16	2.36 ± 0.08
	SHR	1.28 ± 0.10 ^{##Δ▽}	2.75 ± 0.07 ^{##Δ▽}
24 周 24 weeks	WKY	0.61 ± 0.14	2.48 ± 0.07
	SHR	1.71 ± 0.17 ^{##Δ▽※}	2.96 ± 0.07 ^{##Δ▽※}
32 周 32 weeks	WKY	0.68 ± 0.15	2.57 ± 0.19
	SHR	1.92 ± 0.26 ^{##Δ▽※}	3.16 ± 0.02 ^{*Δ▽※}
42 周 42 weeks	WKY	0.75 ± 0.22	2.56 ± 0.32
	SHR	2.43 ± 0.24 ^{##Δ▽※}	3.25 ± 0.13 ^{*Δ▽※}

注:SHR 或 WKY 与 18 周相比, ^{*}*P* < 0.05。

Note. Compared with HR or WKY at 18 weeks, ^{*}*P* < 0.05.

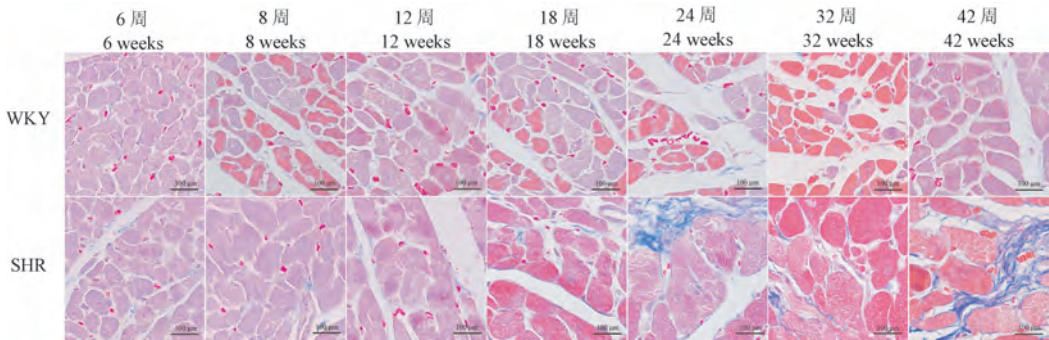


图 1 不同周龄大鼠左室心肌 masson 染色

Figure 1 Masson staining of left ventricular myocardium in rats at different ages

2.4 大鼠心肌纤维化基因 TGF-β₁、I 型胶原、III 型胶原表达变化

6 周时 SHR 较 WKY 左室心肌 TGF-β₁ 表达明

显上调,此后两组间表达差异逐渐缩小,到 32 周时表达接近,随后 SHR 表达再次上升,42 周时 SHR 较 WKY 表达显著上调(见图 2)。

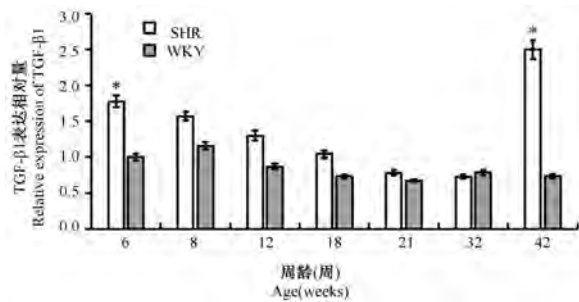


图2 不同周龄大鼠左室心肌 TGF- β_1 动态表达

Figure 2 Dynamic expression of TGF- β_1 in left ventricular myocardium of rats at different ages

6 周至 24 周两组大鼠 I 型胶原表达相近, 24 周后 SHR 左室心肌 I 型胶原表达明显上升, 42 周时 SHR 较 WKY 表达显著上调(见图 3)。

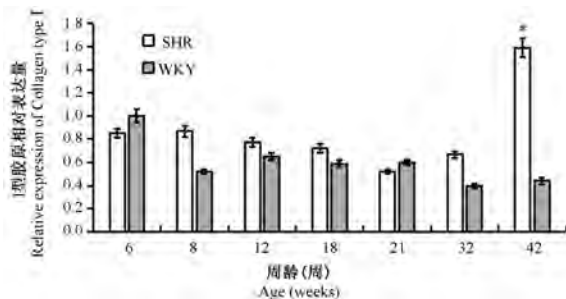


图3 不同周龄大鼠左室心肌 I 型胶原基因动态表达

Figure 3 Dynamic expression of Collagen I in left ventricular myocardium of rats at different ages

6 周至 24 周两组大鼠 III 型胶原表达相近, 32 周时 SHR 较 WKY 表达明显上调, 至 42 周时表达差异进一步扩大(见图 4)。

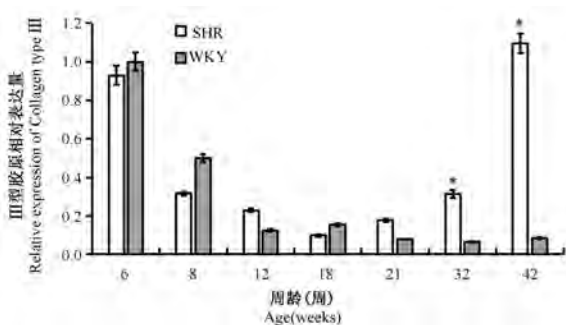


图4 不同周龄大鼠左室心肌 III 型胶原基因动态表达

Figure 4 Dynamic expression of Collagen III in left ventricular myocardium of rats at different ages

3 讨论

高血压心肌纤维化是一个众多体液因子参与调节的病理过程, 可引起心力衰竭、心律失常和心

源性猝死等严重并发症, 对公众健康构成严重危害^[4-5]。因此, 积极探索高血压心肌纤维化相关发生机制, 对于预防或者逆转心肌纤维化的发生具有重要意义。相较于遗传性高血压大鼠 (GHR) 和 Dahl 盐敏感性大鼠 (DSR), SHR 是国际上公认的、应用最广泛的、最接近人类原发性高血压的动物模型。SHR 模型在自然培育条件下产生高血压以及心肌纤维化, 避免了人工干预造成的创伤, 可以作为高血压致心肌纤维化的理想动物模型^[6]。有别于既往相关研究, 本研究选择 4 ~ 42 周 SHR 为观测对象, 共设 7 个观测时点, 从血压水平、心脏结构功能、心肌组织病理、纤维化相关基因表达等多个维度评估 SHR 心肌纤维化的动态演变, 评价体系更为连续多元, 可为高血压心肌纤维化的相关研究提供坚实有益的参考。

本研究结果显示, 6 ~ 12 周 SHR 血压持续快速升高, 之后趋于平稳并维持高位波动, 呈现了 SHR 血压时序变化特征^[7-8]。伴随血压升高并高位维持, 心脏后负荷逐渐增大, SHR 心脏出现时序性肥厚改变。Iliev 等^[9]研究发现, 伴随 SHR 鼠龄增加, 心肌细胞逐渐肥大, 心肌纤维化增加。CVF 作为一个可量化弥散性心肌纤维化指标, 随 SHR 鼠龄增长逐渐增加, 提示 SHR 心肌纤维化呈鼠龄依赖性动态改变。值得关注的是, LVEF 在不同周龄 SHR 或 WKY 间无显著变化, 同周龄两组大鼠间亦无明显差异, 与陈建桥等^[10]的研究一致, 心肌纤维化在 HFpEF 患者临床症状出现之前即已存在, 病程早期 LVEF 不会随着心肌纤维化而发生显著改变。纵观 SHR 血压与心脏重构相关指标动态变化, SHR 心肌纤维化相较血压存在一定的迟滞性, 符合高血压心肌纤维化大体宏观演变过程。

相关研究表明, TGF- β_1 、I 型胶原和 III 型胶原等指标可以从不同层面反映心肌纤维化的演变, 可作为心肌纤维化的动态观测指标^[11-13]。本研究显示, 32 周前 SHR 和 WKY 左室心肌 TGF- β_1 表达均随鼠龄增加呈下调趋势, 32 周后 SHR 左室心肌 TGF- β_1 表达逐渐上升, 42 周时较 WKY 表达显著上调, 与 SHR 心肌纤维化前期处于较低水平而后期迅速发展相符。TGF- β_1 介导的信号通路是多种疾病导致心肌纤维化的共同途径, 可通过促进心肌成纤维细胞向成肌纤维细胞表型转化以及上调结缔组织生长因子等细胞因子表达, 诱导纤维细胞增殖, 进而促进心肌纤维化^[14]。高血压相关临床研究表

明,高血压患者血浆中总 TGF- β 1 及活化 TGF- β 1 水平均较正常血压者显著升高,与高血压引发的心、肾纤维化等靶器官损害有关^[15]。在心肌组织的胶原网络中,I、III型胶原的表达水平及比例变化决定了心肌纤维化的发生发展^[16-17]。本研究中 I 型胶原与 III 型胶原表达均呈现先降后升的趋势,与 TGF- β 1 表达呈现时空一致性,再次印证 SHR 心肌纤维化的时序动态变化特征。有报道显示,TGF- β 1 作为胶原合成的驱动因子,可通过旁分泌和自分泌方式刺激成纤维细胞增生,促使合成胶原增加,表明 TGF- β 1、I 型胶原和 III 型胶原可指示心肌纤维化的发生发展^[18]。

通过对 SHR 中长期的持续观测,证实伴随 SHR 的鼠龄及血压改变,其心肌纤维化不断演变发展,并从宏观入微观呈现出时序改变的特征,充分展现 SHR 作为高血压心肌纤维化动物模型的独特价值,有助于高血压心肌纤维化的相关研究的开展。

参 考 文 献(References)

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组.《中国心血管健康与疾病报告 2019》概要 [J]. 心脑血管病防治, 2020, 20(5): 437-450.
Editing Group of Chinese Cardiovascular Health and Disease Report. Summary of China cardiovascular health and disease report 2019 [J]. Cardio-Cerebrovasc Dis Prev Treat, 2020, 20(5): 437-450.
- [2] Moreno MU, Eiros R, Gavira JJ, et al. The hypertensive myocardium: from microscopic lesions to clinical complications and outcomes [J]. Med Clin North Am, 2017, 101(1): 43-52.
- [3] 温钞麟, 邓玮. 心肌纤维化的发病机制及治疗进展 [J]. 中国心血管病研究, 2020, 18(7): 661-664.
Wen CL, Deng W. Progress in pathogenesis and therapeutics of myocardial fibrosis [J]. Chin J Cardio Res, 2020, 18(7): 661-664.
- [4] 董菲, 高群, 周鹏, 等. 高血压心肌纤维化机制的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(14): 2252-2255.
Dong F, Gao Q, Zhou K, et al. Research progress on the mechanism of hypertensive myocardial fibrosis [J]. Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis, 2020, 18(14): 2252-2255.
- [5] 许明, 杨汉东, 闽新文, 等. 安体舒通改善自发性高血压大鼠心肌纤维化 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(7): 1281-1285.
Xu M, Yang HD, Min XW, et al. Spironolactone improves myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats [J]. Chin J Pathophysiol, 2008, 24(7): 1281-1285.
- [6] Sun Y, Weber KT. Animal models of cardiac fibrosis [J]. Methods Mol Med, 2005, 11(7): 273-290.
- [7] Del Mauro JS, Prince PD, Allo MA, et al. Effects of third-generation beta-blockers, atenolol or amlodipine on blood pressure variability and target organ damage in spontaneously hypertensive rats [J]. J Hypertens, 2020, 38(3): 536-545.
- [8] Caniffi C, Prentki Santos E, Cerniello FM, et al. Cardiac morphological and functional changes induced by C-type natriuretic peptide are different in normotensive and spontaneously hypertensive rats [J]. J Hypertens, 2020, 38(11): 2305-2317.
- [9] Iliev AA, Kotov GN, Landzhov BV, et al. A comparative morphometric study of the myocardium during the postnatal development in normotensive and spontaneously hypertensive rats [J]. Folia Morphol (Warsz), 2018, 77(2): 253-265.
- [10] 陈建桥, 刘宏斌. 射血分数保留的心力衰竭的心肌纤维化及炎症相关标志物 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 23(2): 208-210.
Chen JQ, Liu HB. Ejection fraction preserves myocardial fibrosis and inflammatory markers associated with heart failure [J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2021, 23(2): 208-210.
- [11] Chen H, Moreno-Moral A, Pesce F, et al. WWP2 regulates pathological cardiac fibrosis by modulating SMAD2 signaling [J]. Nat Commun, 2019, 10(11): 4085.
- [12] Weber KT, Sun Y, Gerling IC, et al. Regression of established cardiac fibrosis in hypertensive heart disease [J]. Am J Hypertens, 2017, 30(11): 1049-1052.
- [13] 刘诗英, 邢卫平, 吴志勇, 等. 葛根素对心肌纤维化模型大鼠左室心肌组织中转化生长因子 β 1 和结缔组织生长因子表达的影响 [J]. 临床心血管病杂志, 2010, 26(12): 942-946
Liu SY, Xing WP, Wu ZY, et al. Effects of puerarin on the expression of TGF- β 1 and CTGF in left ventricle myocardial tissue of the rats with myocardial fibrosis [J]. J Clin Cardiol (Chin), 2010, 26(12): 942-946.
- [14] Khalil H, Kanisicak O, Prasad V, et al. Fibroblast-specific TGF- β -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis [J]. J Clin Invest, 2017, 127(10): 3770-3783.
- [15] Torun D, Ozelsancak R, Turan I, et al. The relationship between obesity and transforming growth factor β on renal damage in essential hypertension [J]. Int Heart J, 2007, 48(6): 733-741.
- [16] Florenzano F, Glantz SA. Left ventricular mechanical adaptation to chronic aortic regurgitation in intact dogs [J]. Am J physiol, 1987, 252(5): 969-984.
- [17] Urschel CW, Covell JW, Sonnenblick EH, et al. Myocardial mechanics in aortic and mitral valvular regurgitation: the concept of instantaneous impedance as a determinant of the performance of the intact heart [J]. J Clin Invest, 1968, 47(4): 867-883.
- [18] Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, et al. Autoinduction of transforming growth factor β 1 is mediated by the AP-1 complex [J]. Mol Cell Biol, 1990, 10(4): 1492-1497.

[收稿日期] 2021-07-02

许智玲, 张斌, 张顺财. NOD2 促进二乙基亚硝胺诱导小鼠肝组织炎症的机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 730-737.

Xu ZL, Zhang B, Zhang SC. Mechanism of NOD2 on the inflammation of mouse liver induced by diethylnitrosamine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 730-737.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.004

NOD2 促进二乙基亚硝胺诱导小鼠肝组织炎症的机制研究

许智玲¹, 张斌^{1*}, 张顺财^{2*}

(1. 复旦大学附属中山医院青浦分院感染科, 上海 201700; 2. 复旦大学附属中山医院消化科, 上海 200032)

【摘要】 目的 探讨肝细胞中的模式识别受体 NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2, NOD2) 在肝炎症反应过程中的作用及机制。方法 以二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 注射的 NOD2 基因敲除小鼠为 *Nod2*^{Δ_{hep}} 模型组, DEN 注射的 B6/JNju-*Nod2*^{em1Cflax}/Gpt (*Nod2*^{f/f}) 小鼠为 *Nod2*^{f/f} 模型组, 未注射 DEN 的 NOD2 基因敲除小鼠为 *Nod2*^{Δ_{hep}} 组, 未注射 DEN 的 *Nod2*^{f/f} 小鼠为 *Nod2*^{f/f} 组。使用 HE 染色检测肝病理损伤, 使用 ALT 和 AST 试剂盒检测血清中 ALT 和 AST 水平变化; 对小鼠的肝组织进行 F4/80 免疫组化染色检测肝炎细胞的数量以及 qPCR 法检测肝细胞炎症因子的基因表达水平及肝细胞 NOD2 的表达水平; Ki67 免疫组化染色和 TUNEL 染色检测 DEN 对肝细胞增殖及凋亡的影响; Western Blot 检测肝组织中 NF-κB、MAPK 和 STAT3 信号通路相关蛋白分子的表达。**结果** 与 *Nod2*^{f/f} 模型组相比, *Nod2*^{Δ_{hep}} 模型组小鼠肝损伤情况明显减轻, 表现为细胞坏死及空泡形成明显减少, 血清 ALT 和 AST 水平均明显下降 ($P < 0.01$); 另外与 *Nod2*^{f/f} 模型组相比, *Nod2*^{Δ_{hep}} 模型组中肝组织炎症因子 TNF-α、IL-6、IFN-γ 和 IL-1β 的基因表达水平、肝组织 F4/80 染色阳性细胞数及肝细胞的增殖及凋亡水平均明显下降 ($P < 0.01$); Western Blot 表达结果表明, *Nod2*^{Δ_{hep}} 模型组小鼠肝组织中的 P38、ERK、JNK、p65 以及 JAK2/STAT3 蛋白磷酸化水平较 *Nod2*^{f/f} 模型组明显下降 ($P < 0.05$), 而用于对照的 *Nod2*^{Δ_{hep}} 组小鼠与 *Nod2*^{f/f} 组小鼠上述各项指标均无明显异常。**结论** 肝 NOD2 缺失有减轻小鼠肝细胞炎症及坏死的作用, 其机制可能与其下调肝组织 NF-κB、MAPK 和 STAT3 信号通路相关因子的表达有关。

【关键词】 核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2; 肝炎症; 信号通路; 机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0730-08

Mechanism of NOD2 on the inflammation of mouse liver induced by diethylnitrosamine

XU Zhiling¹, ZHANG Bin^{1*}, ZHANG Shuncai^{2*}

(1. Department of Infection Disease, Qingpu Branch, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201700, China.

2. Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032)

Corresponding author: ZHANG Bin. E-mail: zhxy2010@163.com; ZHANG Shuncai. E-mail: zhang.shuncai@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the role and mechanism of NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2, NOD2), a pattern recognition receptor in liver cells, in the process of liver inflammation. **Methods** NOD2 liver-specific knockout mice were used, and diethylnitrosamine (DEN) was used to construct an acute liver injury model.

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (81871934)。

Funded by the General Program of NSFC (81871934)。

【作者简介】 许智玲 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肝病的发病机制。Email: 1138372147@qq.com

【通信作者】 张斌 (1967—) 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 肝病的诊治。Email: zhxy2010@163.com;

张顺财 (1964—) 男, 博士, 教授, 研究方向: 肝病的发病机制。Email: zhang.shuncai@zs-hospital.sh.cn。

* 共同通信作者

NOD2 knockout mice injected with DEN were used as the *Nod2*^{Δ_{hep}} model group, and injected with DEN B6/JNju-Nod2em1Cflo_x/Gpt (*Nod2*^{f/f}) mice are *Nod2*^{f/f} model group, NOD2 knockout mice without DEN injection are *Nod2*^{Δ_{hep}} group, *Nod2*^{f/f} mice without DEN injection are *Nod2*^{f/f} group. He staining was used to detect the effect of DEN on liver pathological damage, ALT and AST kits were used to detect the changes of serum ALT and AST levels; F4/80 immunohistochemical staining was used to detect the number of hepatitis cells and real-time quantitative qPCR was used to detect the gene expression level of inflammatory factors in liver cells; Ki67 immunohistochemical staining and TUNEL staining were used to detect the effects of den on liver cell proliferation and apoptosis Western blot was used to detect the expression of NF-κB, MAPK and STAT3 signaling pathway related proteins **Result** Compared with *Nod2*^{f/f} model group, *Nod2*^{Δ_{hep}} model group mice liver tissue pathological damage was significantly reduced, manifested as cell necrosis and vacuolization, and *Nod2*^{Δ_{hep}} model group mice serum ALT and AST levels Significantly decreased ($P < 0.01$). In addition, compared with *Nod2*^{f/f} model group, the inflammatory factors TNF-α, IL-6, IFN-γ and IL-1β expression levels, the number of F4/80 staining positive cells in liver tissue, the proliferation and apoptosis levels of the hepatocytes in *Nod2*^{Δ_{hep}} model group were significantly reduced ($P < 0.01$); Western blot expression result showed that the P38, ERK, JNK, p65 and JAK2/STAT3 protein phosphorylation levels in the liver tissue of the *Nod2*^{Δ_{hep}} model group were significantly lower than those of the *Nod2*^{f/f} model group. However, the *Nod2*^{Δ_{hep}} group mice and *Nod2*^{f/f} group mice used for control had no obvious abnormalities in the above indicators. **Conclusions** Loss of NOD2 in the liver can significantly inhibit the inflammation and necrosis of hepatocytes in mice, its mechanism maybe related to the down-regulation of expression of NF-κB, MAPK and STAT3 signaling pathways related factors in liver tissue.

【Keywords】 nucleotide-binding oligomerization domain 2; liver inflammation; signal pathway; mechanism

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

肝作为人体最大的消化器官,受各种有害因素的影响可造成肝损伤。肝损伤早期多表现为肝组织的炎症,若早期肝细胞炎症得不到及时诊治,会逐步发展为肝纤维化,严重会进展为肝硬化,甚至肝癌^[1-2]。因而在肝病防治方面,积极探索肝早期炎症反应的机制具有非常重要的临床意义。有研究发现,机体天然免疫系统主要通过各种模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别病原成分,进一步启动宿主应答免疫防御反应。其中, NOD2 是 PRRs 家族的重要成员,它主要识别细胞内细菌肽聚糖的降解产物胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP),是一种存在于所有革兰阳性菌和阴性菌细胞壁的成分,可以介导宿主抵抗入侵细菌的免疫和炎症反应^[3],因此, NOD2 与炎症反应关系密切。既往有学者发现, NOD2 表达除了与克罗恩病的炎症发生密切相关外,肠源性 MDP 的刺激可激活肝细胞 NOD2 受体并增加其表达,与肝病发生自发性细菌性腹膜炎密切相关^[4-6],但 NOD2 在肝炎炎症性疾病中的具体作用及机制仍不明确。为进一步探索其机制,本研究应用 NOD2 肝特异性敲除小鼠,使用 DEN 构建急性肝损伤模型^[7],以探讨肝细胞 NOD2 受体在肝炎症反应中的作用及可能机制,为肝炎症的诊治提供重要的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只 6 周龄的 SPF 级雄性 B6/JNju-Nod2^{em1Cflo_x}/Gpt(*Nod2*^{f/f})小鼠,体重 19 ~ 21 g,由南京大学模式动物公司提供【SCXK(苏)2018-0008】,随机选择其中 10 只与 Albumin-Cre 小鼠杂交,获得 NOD2 肝特异性敲除小鼠(*Nod2*^{Δ_{hep}}):基因敲除的过程按照文献的方法操作^[8],由南京大学模式动物公司执行。饲养于复旦大学实验动物部【SYXK(沪)2020-0032】,饲养及实验过程遵守动物的 3R 原则,小鼠均分笼饲养,每笼 5 只,采用标准饲料喂养,自由饮水,光照与黑暗各 12 h 交替处理,湿度为 50% ~ 60%,温度为 20 ~ 22℃,适应性喂养 1 周。

1.1.2 主要试剂与仪器

DEN 和三辛酸甘油酯由美国 Sigma 公司提供。总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。PCR 试剂购自上海生工,ALT、AST 测定试剂盒及病理染色试剂购自南京建成公司。P38/p-P38、ERK/p-ERK、JNK/p-JNK、p65/p-p65、JAK2/p-JAK2、STAT3/p-STAT3 等抗体购自美国 Abcam 公司。

超低温冰箱(Thermo 公司,美国);荧光显微镜

(Nikon 公司, 日本); 高速低温离心机 (Sigma 公司, 美国); 实时荧光 PCR 仪 (Eppendorf 公司, 德国); 凝胶扫描成像系统 (Bio-Bod 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

使用 DEN 构建急性肝损伤模型, 以 DEN 注射的 NOD2 基因敲除小鼠为 *Nod2*^{Δ_{hep}} 模型组, DEN 注射的 B6/JNju-Nod2^{em1C_{fllox}}/Gpt (*Nod2*^{f/f}) 小鼠为 *Nod2*^{f/f} 模型组, 未注射 DEN 的 NOD2 基因敲除小鼠为 *Nod2*^{Δ_{hep}} 组, 未注射 DEN 的 *Nod2*^{f/f} 小鼠为 *Nod2*^{f/f} 组, 每组 5 只。DEN 具体使用方法如下: 75% 乙醇消毒小鼠腹部后, 单次腹腔注射 DEN (100 mg/kg, 三辛酸甘油酯溶解) 后 1 周处死小鼠, 取材进行后续实验。全部实验过程未出现小鼠死亡。

1.2.2 组织病理学观察

新鲜肝组织用 4% 多聚甲醛固定后石蜡包埋。石蜡切片厚 5 μm, 苏木精-伊红 (HE) 以及 TUNEL 染色。为进行免疫组织化学染色, 石蜡切片在进行脱蜡、抗原修复及封闭后, 分别孵育 Ki67 (1:500, Abcam, 英国)、F4/80 (1:100, CST, 美国) 抗体, 显微镜下拍照并应用 ImageJ 软件 (NIH, 美国) 统计分析。

1.2.3 血清 ALT 和 AST 水平检测

小鼠麻醉后取静脉血至 1.5 mL 离心管中, 室温静置离心收集血清, 根据 ALT 和 AST 试剂盒说明书检测血清中 ALT 和 AST 水平变化。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR)

NCBI 网站搜索 GenBank 中已有的大鼠 IL-6、TNF-α、IL-1β、IFN-γ 及 NOD2 基因序列设计相应引物, 以 GAPDH 为内参基因, 由上海捷瑞生物设计合成, 序列见表 1。应用 TRIzol 试剂盒裂解提取小鼠肝组织中的总 RNA, 应用 PrimeScriptTM RT reagent Kit 试剂盒 (日本 TaKaRa) 进行逆转录反应合成 cDNA。根据 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书 (日本 TaKaRa), 冰上配制 20 μL 反应体系, 随后使用 ABI7500 仪器进行扩增反应。

1.2.5 免疫蛋白印迹实验 (Western Blot)

肝组织使用含有蛋白酶抑制剂 PMSF (碧云天, 上海) 和磷酸酶抑制剂 (Roche 公司) 的 RIPA 裂解液进行裂解提取总蛋白。配置 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离蛋白、转膜、封闭随后一抗孵育过夜: P38/p-P38 (1:1000, CST)、ERK/p-ERK (1:1000, CST)、JNK/p-JNK (1:1000, CST)、p65/p-p65 (1:1000, CST)、JAK2/p-JAK2 (1:1000, CST)、STAT3/p-STAT3 (1:1000, CST) 和 GAPDH (1:1000, 碧云天), 对应二抗室温孵育 1 h 后 ECL 发光检测结果。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 20.0 进行统计学分析, 计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 两组间均数比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NOD2 肝特异性敲除小鼠模型的鉴定

通过对 *Nod2*^{f/f} 组和 *Nod2*^{Δ_{hep}} 组 NOD2 的 mRNA 及蛋白质的表达水平比较, 发现 *Nod2*^{Δ_{hep}} 组 NOD2 的 mRNA 及蛋白质的表达水平均显著下调 (*n* = 5, *P* < 0.05, 图 1)。表明 NOD2 肝特异性敲除小鼠的模型建立成功。

2.2 肝特异性敲除 NOD2 对 DEN 诱导的小鼠急性肝损伤的影响

HE 染色结果显示, 作为对照的 *Nod2*^{f/f} 组和 *Nod2*^{Δ_{hep}} 组均无明显肝炎症坏死等表现, 而经过 DEN 处理的 *Nod2*^{f/f} 模型组和 *Nod2*^{Δ_{hep}} 模型组均有显著的肝炎症、坏死表现, 进一步对两个模型组比较, 发现 *Nod2*^{Δ_{hep}} 模型组小鼠肝组织损伤情况显著减轻, 表现为细胞坏死及空泡形成显著减少 (图 2A)。对小鼠血清中 ALT 和 AST 的水平检测结果显示, *Nod2*^{f/f} 组和 *Nod2*^{Δ_{hep}} 组无显著性异常, 而 *Nod2*^{f/f} 模型组和 *Nod2*^{Δ_{hep}} 模型组均高于 *Nod2*^{f/f} 组和 *Nod2*^{Δ_{hep}} 组 (*P* < 0.01), 同时, 通过对模型组的比较发现, *Nod2*^{Δ_{hep}} 模型组血清 ALT 及 AST 均低于 *Nod2*^{f/f} 模型组 (*P* < 0.01) (图 2B)。

表 1 相关引物序列

Table 1 Related primer sequence

基因名称 Gene name	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'
GAPDH	TGTGTCCGTCCTGGATCTGA	TTCTGTGTTGAAGTCGCAGGAG
IL-6	TCCATCCAGTTGCCCTTCTTG	TTCCACGATTTCCAGAGAAC
TNF-α	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GGTCTGGCCATAGAAGTGA
IL-1β	TGGCTCAGGCTCACAAGAAA	CATCAGAGGCAAGGAGGAAAAC
IFN-γ	ATGAACGCTACACATGTCATC	CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC
NOD2	TGGTTCAGCCTCTCAGCATGA	AGGACACTCTCGAAGCCTT

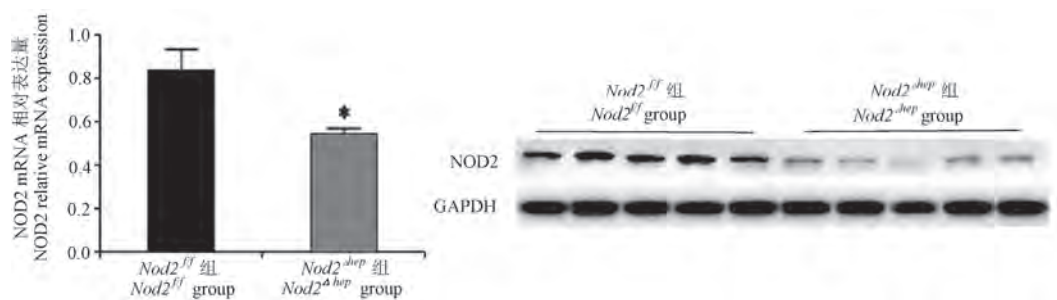
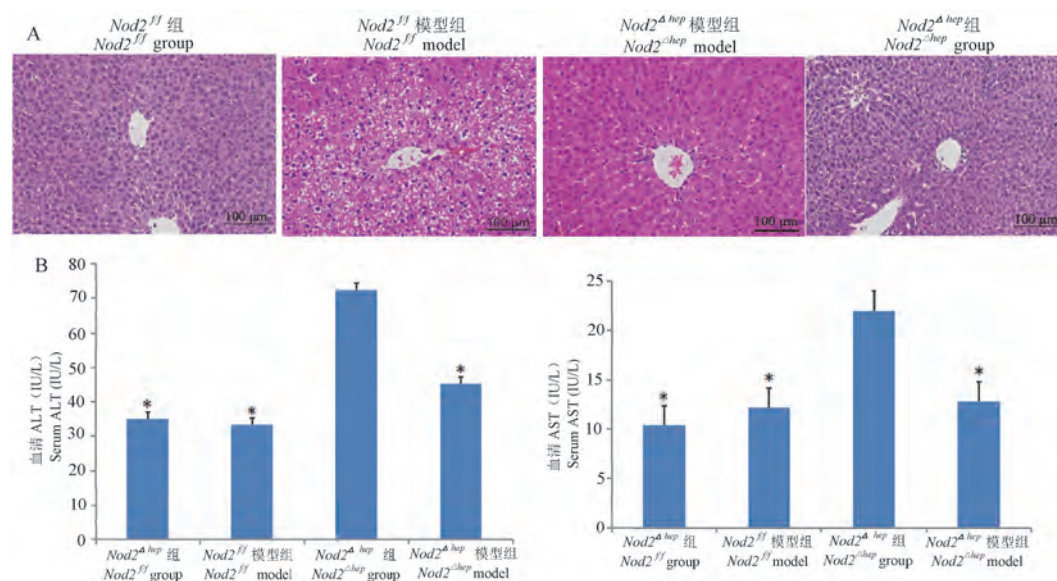


图1 NOD2 基因敲除小鼠的基因表达及 NOD2 蛋白表达

Figure 1 Gene expression and NOD2 protein expression in NOD2 knockout mice



注:A:各组小鼠肝 HE 染色代表性图片;B:各组小鼠血清 ALT 和 AST 水平变化;与 *Nod2^{+/+}* 模型组相比, * $P < 0.01$ 。(下同)

图2 肝 NOD2 缺失对 DEN 诱导的小鼠肝损伤的影响($n=5$)

Note. A. Representative pictures of HE staining of mouse liver in each group. B. Changes in serum ALT and AST levels of mice in each group. Compared with *Nod2^{+/+}* model group, * $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Effect of loss of NOD2 on DEN induced liver injury in mice($n=5$)

2.3 肝特异性敲除 NOD2 对 DEN 诱导的小鼠肝炎症的影响

对小鼠肝组织炎症因子表达水平比较,发现 *Nod2^{Δhep}* 模型组肝组织中 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 和 IL-1 β 的 mRNA 相对表达量均低于 *Nod2^{+/+}* 模型组 ($P < 0.01$) (图 3A)。进一步对小鼠肝组织进行 F4/80 免疫组化染色进行研究,发现 *Nod2^{Δhep}* 模型组 F4/80 染色阳性细胞数也显著低于 *Nod2^{+/+}* 模型组 ($P < 0.01$) (图 3B)。而作为对照的 *Nod2^{+/+}* 组和 *Nod2^{Δhep}* 组肝组织均无显著性异常。

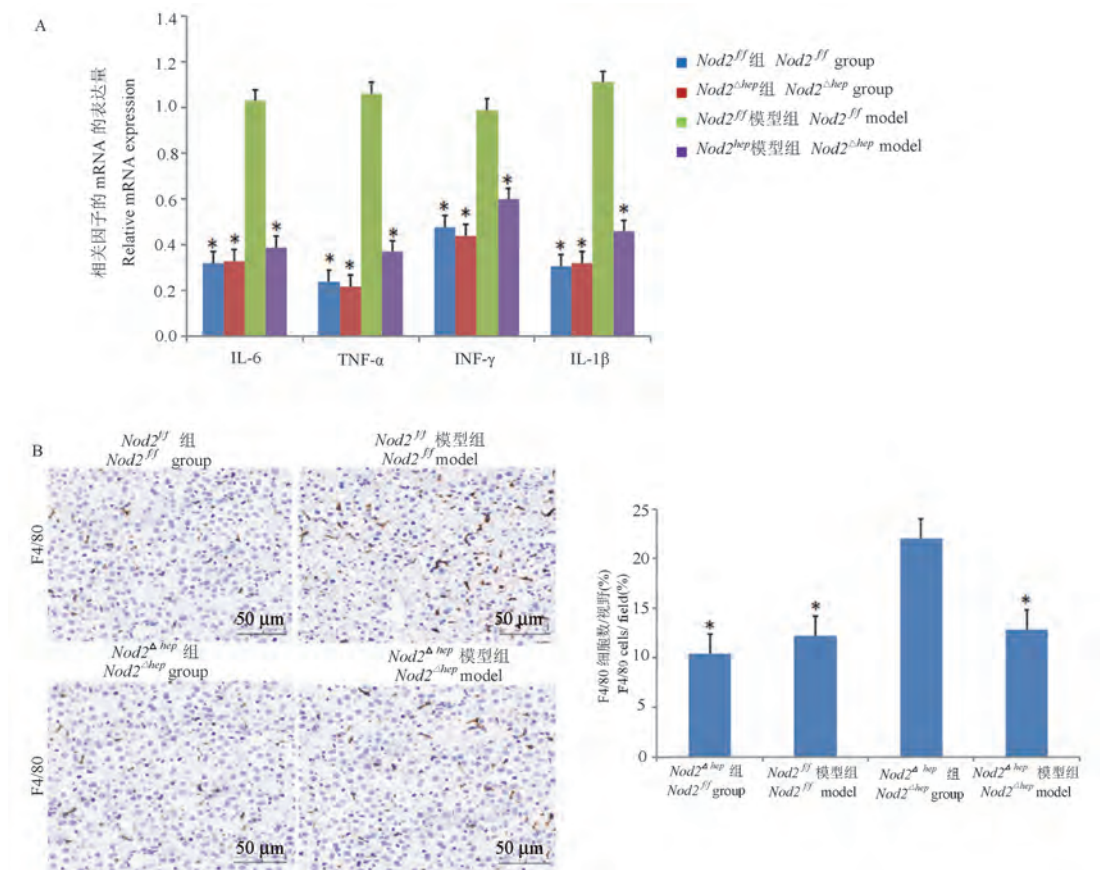
2.4 肝特异性敲除 NOD2 对 DEN 诱导的小鼠肝细胞增殖和凋亡的影响

研究发现,与 *Nod2^{+/+}* 组和 *Nod2^{Δhep}* 组比较, *Nod2^{Δhep}* 模型组及 *Nod2^{+/+}* 模型组肝组织中 Ki67 染色

阳性细胞数及肝细胞凋亡细胞数显著增多 ($P < 0.01$),同时对两个模型组比较发现, *Nod2^{Δhep}* 模型组肝组织 Ki67 染色阳性细胞数及肝细胞凋亡细胞数明显少于 *Nod2^{+/+}* 模型组 ($P < 0.01$) (图 4,5)。

2.5 肝特异性敲除 NOD2 对 DEN 诱导后炎症相关信号通路的影响

通过对肝组织中 P38、ERK、JNK、p65 以及 JAK2/STAT3 蛋白磷酸化水平的比较,发现 *Nod2^{+/+}* 模型组和 *Nod2^{Δhep}* 模型组均显著高于 *Nod2^{+/+}* 组和 *Nod2^{Δhep}* 组,进一步对两个模型组进行比较,发现 *Nod2^{Δhep}* 模型组肝组织中 P38、ERK、JNK、p65 以及 JAK2/STAT3 蛋白磷酸化水平显著低于 *Nod2^{+/+}* 模型组 ($P < 0.05$)。表明肝 NOD2 缺失可下调 NF- κ B、MAPK 和 STAT3 信号通路相关蛋白的表达(见图 6)。

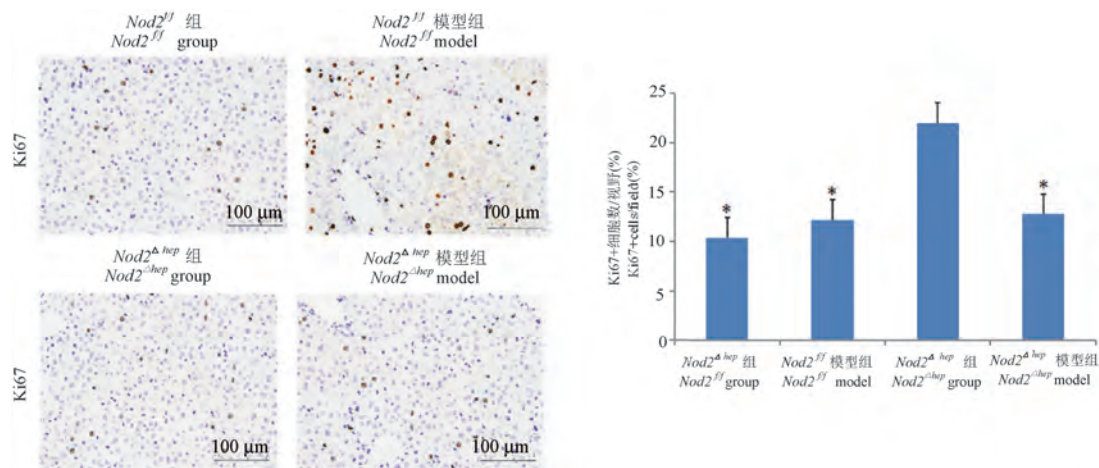


注:A;qPCR 检测各组小鼠肝组织中炎症因子 IL-6、TNF-α、INF-γ 和 IL-1β 的 mRNA 表达水平;B:各组小鼠肝组织中 F4/80 的表达变化。

图 3 肝 NOD2 缺失对 DEN 诱导的小鼠肝炎症的影响($n=5$)

Note. A. qPCR detects the mRNA expression levels of inflammatory factors IL-6, TNF-α, INF-γ and IL-1β in the liver tissues of mice in each group. B. Changes in the expression of F4/80 in the liver tissues of mice in each group.

Figure 3 Effect of loss of NOD2 on DEN induced liver inflammation in mice($n=5$)

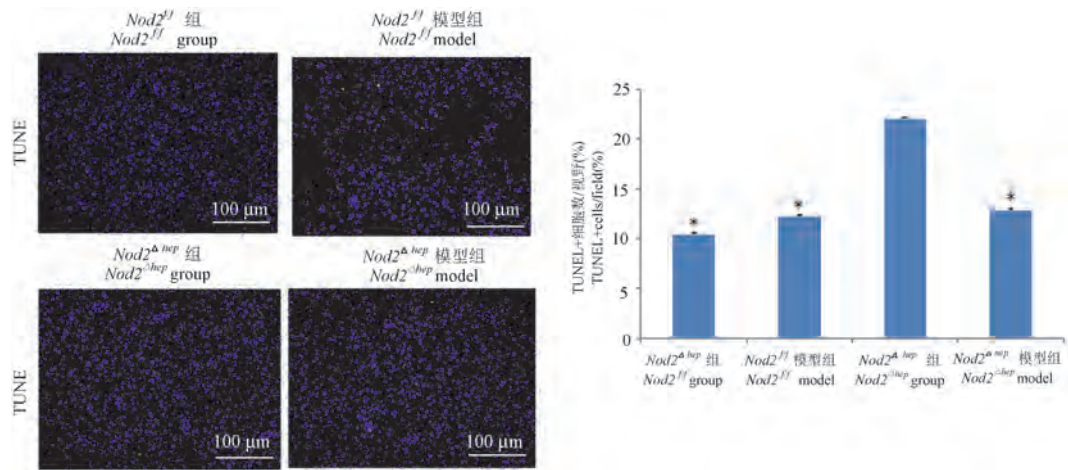


注:免疫组化检测各组小鼠肝组织中 Ki67 表达变化。

图 4 肝 NOD2 缺失对 DEN 诱导的小鼠肝细胞增殖的影响($n=5$)

Note. The expression of Ki67 in the liver tissue of mice in each group was detected by immunohistochemistry.

Figure 4 Effects of NOD2 deficiency on DEN induced hepatocyte proliferation and apoptosis in mice($n=5$)



注:TUNEL 实验检测各组小鼠肝细胞凋亡。
图 5 肝 NOD2 缺失对 DEN 诱导的小鼠肝细胞凋亡的影响($n=5$)
Note. Immunohistochemical detection of TUNEL expression in the liver tissues of mice in each group.

Figure 5 Effects of NOD2 deficiency on DEN induced hepatocyte apoptosis in mice($n=5$)

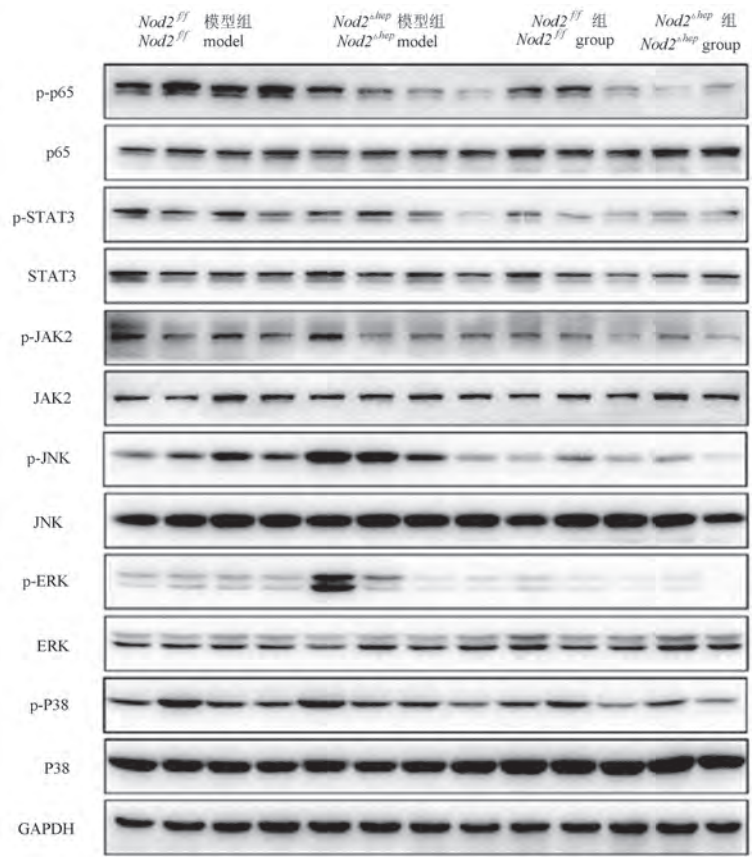


图 6 肝 NOD2 缺失对 DEN 诱导后小鼠肝 NF- κ B、MAPK 和 STAT3 信号通路的影响($n=5$)
Figure 6 Effects of NOD2 deficiency on NF- κ B, MAPK and STAT3 signaling pathways in the liver of DEN induced mic($n=5$)

3 讨论

肝病是常见的疾病,许多肝病因为得不到及时诊治,会从早期的肝炎,逐步进展到肝硬化,甚至肝

癌,是造成患者死亡的主要原因。肝作为最大的消化腺,容易受到代谢物、毒性物质及微生物等多种因素的损伤,造成肝细胞的炎症,严重的可以发生肝细胞坏死。同时肝具有强大的再生修复能力,研

究发现肝切除手术或毒物造成肝损伤后,残肝细胞能迅速由静止状态进入细胞周期,通过 DNA 合成和有丝分裂补偿丢失的肝组织,恢复肝功能。在肝细胞的坏死-再生循环中,炎症是诱发肝疾病的常见原因,是机体快速响应感染或损伤的一种固有免疫,适度的炎症反应能够保护机体免受进一步的损伤。但是,慢性炎症和过度的炎症反应通常是有害的,不仅对机体形成二次打击,也会损伤机体的正常功能^[9],如得不到及时诊治,会进一步形成肝硬化,甚至肝癌。正常情况下,肝可通过各种免疫细胞清除由肠道经门静脉系统到达感知各种细菌成分,但是肝出现损伤后,可以引起肠道菌群失调和肠道通透性增加,肠源性细菌成分通过门静脉系统到达肝增多而清除减少,逐渐累积的细菌成分可持续激活肝免疫反应,加重肝炎症反应和 DNA 损伤,促进肝疾病发展^[10]。肝通过调控促炎和抗炎细胞因子间的平衡,发挥炎症调节作用,在肝再生和肝坏死中也发挥重要的调节作用。因而积极探索肝炎症的免疫机制,有重要的理论意义和临床应用价值。

许多研究证实,有 20% ~ 75% 的慢性肝病患者发生肠道菌群失调^[11],特别是小肠细菌过度生长,使得门脉中内毒素(LPS)水平明显升高的情况下更易发生;另有学者发现,肝硬化患者肠道上皮紧密连接蛋白 ZO-1 表达水平下降,黏膜屏障功能受损,渗透性增加,移位到肝的细菌或其代谢成分增多,容易发现肝炎症,进一步可以加重肝损伤,他们应用抗生素利福昔明抑制肠道细菌过度生长可一定程度缓解肝性脑病和肝硬化失代偿期患者的病情^[12]。学者研究发现,在不同肝炎症模型中,肠源性细菌产物可以诱导肝 NOD2 表达增加,促进机体 TNF- α 和 IFN- γ 的表达,有促进肝炎症反应的作用^[13-14]。NOD2 作为 PRRs 家族的重要成员,可以通过识别肠源性细菌产物 MDP 而被激活,从而启动宿主免疫和炎症反应。学者研究发现,在不同肝炎症模型中,肠源性细菌产物可以诱导肝 NOD2 表达增加,促进机体 TNF- α 和 IFN- γ 的表达,有促进肝炎症反应的作用^[15-16]。NOD2 作为 PRRs 家族的重要成员,可以通过识别肠源性细菌产物 MDP 而被激活,从而启动宿主免疫和炎症反应,但是对 NOD2 在肝炎症中的机制还不完全清楚。因而积极探索 NOD2 与肝炎症发生中的作用及机制具有重要的意义。为探索 NOD2 在肝炎症发病中的作用,我

们借助动物研究所的平台,构建了 NOD2 肝特异性敲除小鼠(*Nod2* ^{Δ hep}),并采用 PCR 和 Western Blot 技术对 NOD2 基因敲除小鼠进行鉴定,通过对 *Nod2*^{f/f} 组和 *Nod2* ^{Δ hep} 组肝组织 NOD2 mRNA 及蛋白质相对表达量的比较,发现 *Nod2* ^{Δ hep} 组 NOD2 的 mRNA 及蛋白质的表达水平均显著下调,表明 NOD2 肝特异性敲除小鼠的模型建立成功。为了使小鼠形成肝炎,选择 DEN 对其干预,当一次性注射 DEN 后可以造成小鼠急性肝损伤,能较好满足小鼠肝炎研究的需要。进一步对其机制进行了探索,发现与 *Nod2*^{f/f} 模型组比较,*Nod2* ^{Δ hep} 模型组小鼠肝组织细胞坏死及空泡形成明显减少,*Nod2* ^{Δ hep} 模型组小鼠血清 ALT 和 AST 水平明显下降($P < 0.01$),而 *Nod2* ^{Δ hep} 组小鼠与 *Nod2*^{f/f} 组小鼠肝组织病理及肝功能均无明显异常。另外通过对各组肝组织炎症因子表达情况进行比较,发现与 *Nod2*^{f/f} 模型组相比,*Nod2* ^{Δ hep} 模型组中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 和 IL-1 β 的基因表达水平及肝组织 F4/80 染色阳性细胞数明显减少($P < 0.01$),而 *Nod2* ^{Δ hep} 组小鼠与 *Nod2*^{f/f} 组小鼠炎症因子表达水平无明显改变;进一步对各组肝细胞增殖凋亡情况进行了比较,发现与 *Nod2*^{f/f} 模型组相比,*Nod2* ^{Δ hep} 模型组中肝细胞的增殖及凋亡水平下降,而 *Nod2* ^{Δ hep} 组小鼠与 *Nod2*^{f/f} 组小鼠增殖及凋亡水平无明显改变;Western Blot 表达结果表明,*Nod2* ^{Δ hep} 模型组小鼠肝组织中的 P38、ERK、JNK、p65 以及 JAK2/STAT3 蛋白磷酸化水平较 *Nod2*^{f/f} 模型组明显下降,而 *Nod2* ^{Δ hep} 组小鼠与 *Nod2*^{f/f} 组小鼠肝组织中相关蛋白磷酸化水平均低于模型组。表明肝 NOD2 缺失可显著抑制 DEN 诱导的小鼠肝炎症因子生成和巨噬细胞聚集,减少了肝细胞死亡,有助于减轻肝损伤程度,其机制可能与其下调肝组织 NF- κ B、MAPK 和 STAT3 信号通路相关因子的表达有关,值得进一步深入研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Tonya MH, Michael AP, Lilia GR, et al. Evaluation of performance characteristics of hepatitis B e antigen serologic assays [J]. J Clin Virol, 2018, 109: 22-28.
- [2] Boege Y, Malehmir M, Healy ME, et al. A dual role of Caspase-8 in triggering and sensing proliferation-associated DNA damage, a key determinant of liver cancer development [J]. Cancer cell, 2017, 32(3): 342-359.
- [3] Fearick CL, McKernan DP. Understanding the regulation of pattern recognition receptors in inflammatory diseases-a 'Nod' in the right direction [J]. Immunology, 2017, 150(3): 237-247.
- [4] Scott MJ, Chen C, Sun Q, et al. Hepatocytes express functional

- NOD1 and NOD2 receptors; a role for NOD1 in hepatocyte CC and CXC chemokine production [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(4): 693–701.
- [5] Wang L, Hartmann P, Haimerl M, et al. Nod2 deficiency protects mice from cholestatic liver disease by increasing renal excretion of bile acids [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(6): 1259–1267.
- [6] Appenrodt B, Grünhage F, Gentemann MG, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2010, 51(4): 1327–1333.
- [7] 吕超, 石清兰, 覃倩, 等. 小鼠实验性肝损伤模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(1): 107–113.
- Lyu C, Shi QL, Qin Q, et al. A review of experimental liver injury models in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(1): 107–113.
- [8] Zhou Y, Hu L, Tang W, et al. Hepatic NOD2 promotes hepatocarcinogenesis via a RIP2-mediated proinflammatory response and a novel nuclear autophagy-mediated DNA damage mechanism [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 9.
- [9] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 428–435.
- [10] Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, et al. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(7): 397–411.
- [11] 易宏淦, 臧梦雅, 吴志远, 等. 慢性肠道炎症促进肝癌的发展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(5): 1–4.
- Yi HG, Zang MY, Wu ZY, et al. Chronic colitis induced by irritant dextran sodium sulphate promote hepatoma development in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 25(5): 1–4.
- [12] Vlachogiannakos J, Viazis N, Vasiannopoulou P, et al. Long-term administration of rifaximin improves the prognosis of patients with decompensated alcoholic cirrhosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(3): 450–455.
- [13] Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. Innate immune cells in liver inflammation [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 949157.
- [14] Chaudhry S, Emond J, Griesemer A. Immune cell trafficking to the liver [J]. *Transplantation*, 2019, 103(7): 1323–1337.
- [15] Rex J, Lutz A, Faletti LE, et al. IL-1 β and TNF- α differentially influence NF- κ B activity and FasL-induced apoptosis in primary murine hepatocytes during LPS-induced inflammation [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 117.
- [16] Motta V, Soares F, Sun T, et al. NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels [J]. *Physiol Rev*, 2015, 95(1): 149–178.

[收稿日期] 2020-09-12

陈月蓉,徐赞赞,倪雯沁,等. 电针干预慢性炎性痛的杏仁核潜在蛋白筛选 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 738–748.
Chen YR, Xu YY, Ni WQ, et al. Screening of potential amygdala proteins during the intervention of chronic inflammatory pain with electroacupuncture [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 738–748.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.005

电针干预慢性炎性痛的杏仁核潜在蛋白筛选

陈月蓉^{1,2}, 徐赞赞^{1,2}, 倪雯沁¹, 丁棋柯³, 戴玮³, 许颖龄^{1,2}, 朱希潇^{1,2},
方剑乔^{1,2*}, 吴媛媛^{1,2*}

(1. 浙江中医药大学第三临床医学院康复医学院, 杭州 310053; 2. 浙江省针灸神经病学研究重点实验室, 杭州 310053; 3. 浙江中医药大学第二临床医学院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 本研究旨在对完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱导的慢性疼痛大鼠的杏仁核进行同位素标记的相对和绝对定量 (isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 蛋白质组学分析, 并对蛋白质表达进行综合分析, 以探讨电针影响慢性疼痛的杏仁核潜在机制。**方法** 将 27 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组 (control 组)、模型组 (model 组) 和电针组 (EA 组), 每组 9 只。左后足跖掌面皮下注射 100 μ L CFA 以诱发慢性炎性痛模型。电针刺激双侧足三里、三阴交穴位共 14 d。基于 iTRAQ 的蛋白质组学分析, 研究杏仁核中的蛋白表达。**结果** 电针可提高伤害性刺激所致炎性痛的缩足阈值 (paw withdrawal thresholds, PWTs)。杏仁核中共有 6319 种蛋白质被定量。在这些蛋白质中, 模型组相对于对照组鉴定出 58 种差异有显著性的蛋白质, 电针组相对于对照组鉴定出 37 种差异有显著性的蛋白质。共有 3 种蛋白质在模型组和电针组的大鼠杏仁核中有显著性差异表达。**结论** 本研究初步探讨了电针干预慢性痛的杏仁核可能机制。

【关键词】 慢性痛; 杏仁核; 蛋白质组学; 完全弗氏佐剂; 电针

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0738-11

Screening of potential amygdala proteins during the intervention of chronic inflammatory pain with electroacupuncture

CHEN Yuerong^{1,2}, XU Yunyun^{1,2}, NI Wenqin¹, DING Qike³, DAI Wei³, XU Yingling^{1,2}, ZHU Xixiao^{1,2},
FANG Jianqiao^{1,2*}, WU Yuanyuan^{1,2*}

(1. the Third School of Clinical Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.

2. Key Laboratory of Acupuncture and Neurology of Zhejiang Province, Hangzhou 310053. 3. the Second School of Clinical Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

Corresponding author: WU Yuanyuan. E-mail: runaway@126.com; FANG Jianqiao. E-mail: fangjianqiao7532@163.com

【Abstract】 Objective The current study was performed to investigate isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)-based quantitative proteomic analysis of the amygdala in rats with complete Freund's adjuvant (CFA)-induced chronic pain. A comprehensive analysis of protein expression was performed to explore the underlying mechanism by which electroacupuncture (EA) affects chronic pain. **Methods** Twenty-seven male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a control group (control group), model group and EA-treated group (EA group), with 9

【基金项目】 浙江省自然科学基金项目 (LY19H270007), 国家自然科学基金面上项目 (82074514, 81873360), 浙江中医药大学校级科研项目 (2021YKJ08, 2021YKJ09)。

Funded by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation Project (LY19H270007), the National Natural Science Foundation of China (82074514, 81873360), School-Level Scientific Research Project of Zhejiang Chinese Medicine University (2021YKJ08, 2021YKJ09)。

【作者简介】 陈月蓉 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 针灸镇痛机制研究。Email: 20201111211181@zcmu.edu.cn

【通信作者】 吴媛媛 (1981—), 女, 副主任中医师, 博士, 研究方向: 针灸镇痛的中枢机制研究。Email: runaway@126.com;

方剑乔 (1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 针灸镇痛与免疫调节效应的基础与临床研究。Email: fangjianqiao7532@163.com。

* 共同通信作者

rats in each group. Inflammatory pain was induced with an intraplantar injection of 100 μ L CFA into the plantar surface of the left hind paw of the male SD rats. EA stimulation of the bilateral Zusanli and Sanyinjiao acupoints was performed for 14 days. Based on iTRAQ-based proteomics analysis, we investigated protein expression in the amygdala. **Results** EA increased the paw withdrawal thresholds (PWTs) in rats with inflammatory pain induced by noxious stimulation. A total of 6319 proteins were quantified in the amygdala. Of these identified proteins, 58 significantly altered proteins were identified in the model group compared with the con group, and 37 were identified in the EA group compared with the con group. Three proteins were found to be differentially expressed in the amygdala of model rats and EA-treated rats. **Conclusions** Our study confirms the possible mechanism underlying the effects of EA on the amygdala in rats with chronic pain.

【Keywords】 chronic pain; amygdala; proteomics; complete Freund adjuvant; electroacupuncture

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

疼痛是一种多维的有意识体验,包括感官成分(对疼痛的严重程度和位置的感知)和消极的情感-动机成分^[1]。慢性疼痛是一个常见且复杂的问题,对个人和社会都有深远的影响^[2]。全球疾病负担研究中,疼痛和疼痛相关疾病是全球残疾和疾病负担的主要原因^[3]。研究表明杏仁核中多种细胞因子、受体和活性变化参与了疼痛的调节^[4-14]。研究发现,电针可缓解痛抑郁和痛记忆动物模型的痛觉异常和情绪障碍,中枢边缘系统中与杏仁核有密切联系的前扣带回皮层参与电针对痛感觉与痛情绪的调节过程^[15-16];但其具体的分子生物学机制仍不明确。本部分实验以完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)诱导的慢性疼痛大鼠模型为载体,对慢性炎性痛大鼠进行电针干预,观察模型大鼠的痛觉异常;筛选并探讨杏仁核中参与电针干预慢性疼痛的差异蛋白;本研究将更深层次地说明慢性痛的发生以及电针干预的新机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠共 27 只,体重为(250 $\pm$ 20)g,购于中国科学院上海实验动物中心【SCXK(沪)2018-0006】。于浙江中医药大学实验动物中心【SYXK(浙)2018-0012】饲养。饲养于 40 cm $\times$ 5 cm $\times$ 25 cm(长 $\times$ 宽 $\times$ 高)的独立送回风净化笼具内,每笼 4 ~ 5 只大鼠。饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料,均由浙江中医药大学实验动物中心提供及饲养,12 h 循环灯光,室温为(25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,相对湿度为(50 $\pm$ 5)%。本实验操作均遵循中华人民共和国《实验动物管理条例》的相关规定及人道主义精神。本实验操作均遵循浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会实验伦理学要求

(伦理审批号:IACUC-20210118-07)。

1.1.2 主要试剂与仪器

CFA(F5881,美国 Sigma);甘油、BSA(G0854、A0332-25G,中国上海生工);尿素、碘乙酰胺、十二烷基磺酸钠、银染试剂盒(161-0731、163-2109、161-0302、161-0450,美国 Bio-Rad);KH₂PO₄、KCl、HCl(10017618、10016318、10011018,中国国药);NH₄HCO₃、三氟乙酸(A6141、T6508,美国 Sigma);Trypsin(317107,美国 Promega);甲酸(064450,美国 Fluka);Tris(T8060-1 kg,中国索莱宝)。

von Frey 丝(Aesthesio,美国 Danmic);电子天平(AB135-S,美国 METTLER TOLEDO);色谱系统、质谱仪、酶标仪、C18 上样柱、C18 分析柱(Easy nLC、Q Exactive、Multiskcan FC、C18 μ m, 100 $\text{\AA}$ 、10 cm, μ mC18-A2,美国 Thermo Scientific);超声破碎仪(JY92-II,中国宁波新芝);SCX 色谱柱(Polysulfoethyl,美国 PolyLCInc)。

1.2 方法

1.2.1 实验方案

实验大鼠随机分为对照组、模型组、电针组,每组 9 只。对照组大鼠于左后足跖掌面皮下注射 100 μ L 的生理盐水。模型组和电针组大鼠于左后足跖掌面皮下注射 100 μ L CFA 以诱发慢性炎性痛模型。电针组电针治疗时间为造模后第 1 ~ 14 天,每日治疗 1 次。其余两组不进行电针干预。取材后对各组大鼠的右侧杏仁核进行同位素标记的相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)蛋白质组学检测,对差异蛋白进行生物信息学分析,以探讨电针影响慢性疼痛的杏仁核潜在机制。实验流程图如图 1 所示。

1.2.2 造模

SD 大鼠适应性喂养 7 d,称重后用 3%戊巴比妥钠注射液腹腔注射(1 mL/Kg)麻醉,对照组大鼠左

后足跖掌面皮下注射生理盐水 0.1 mL, 模型组和电针组大鼠左后足跖掌面皮下注射 0.1 mL CFA。造模成功后, 模型组和电针组大鼠左足可见明显肿胀, 对照组大鼠左足无明显改变。对照组、模型组和电针组大鼠造模后 24 h 左足形态如图 2 所示。

1.2.3 机械痛阈检测

将大鼠放置于金属网上, 再盖以透明的有机玻璃罩, 玻璃罩规格为 20 cm × 10 cm × 15 cm, 室温为 (25 ± 1) °C, 相对湿度为 (50 ± 5) %, 首先让大鼠进行 15 min 左右的环境适应, 当大鼠状态为相对安静后进行检测。用 von Frey 纤维丝对大鼠足底中部进行刺激, 使纤维丝弯曲成 S 形, 刺激时长为 6 ~ 8 s (包括 6, 8 s), 若在刺激期间, 大鼠出现明显的缩足或舔足反应, 则记为阳性。von Frey 纤维丝的力度值共分为 1.4、2、4、6、8、10、15 和 26 g。测试时从 8 g 力度值的纤维丝开始测试, 若使用该力度值的纤维丝不能引起大鼠的缩足或者舔足反应时, 记为阴性“0”, 并使用力度值大一级的纤维丝继续检测; 若使用 8 g 力度值的纤维丝能引起大鼠的缩足或舔足反应时, 记为阳性“x”, 并用小一级力度值的纤维丝继续检测, 直至出现阴性和阳性 (阳性和阴性) 反应

的骑跨。按相同标准连续测定 4 次。为消除每一次检测带来的影响, 两次检测之间应间隔 30 s, 若使用力度值为 26 g 的纤维丝仍不能引起大鼠的阳性反应, 则将 50% 缩足阈值记作 26 g。50% 缩足阈值计算公式为 $50\% \text{ g PWT} = (10^{[x_f + k\delta]}) / 10\,000$, x_f 为最后应用的 von Frey 纤维的力度 log 值, δ 为相邻 von Frey 纤维力度 log 值之间差值的平均值 (即 0.184), k 为阳性和阴性反应类型的查表值^[17]。测试分别第 0 天 (基线)、第 1、7、11 和 14 天进行。

1.2.4 电针方法

电针组选取双侧足三里 (ST36, 胫骨前结节外侧 5 mm) 和三阴交 (SP6, 内踝隆起近 10 mm) 穴位将直径 0.25 mm、长 13 mm 的不锈钢针直刺入穴位, 深度为 5 mm。采用平补平泄法。同侧的足三里和三阴交连接电针。电针参数设置如下: 方波电流输出 (脉宽: 0.2 ms), 电针强度从 1 mA 开始, 每隔 10 min 增加 0.5 mA, 治疗时间为 30 min。刺激频率为 2 Hz。所有的大鼠都被布罩松散地固定, 没有任何身体上的约束。电针时间为造模后第 1 ~ 14 天。每日治疗 1 次, 共治疗 14 d。对照组与模型组不予电针干预。

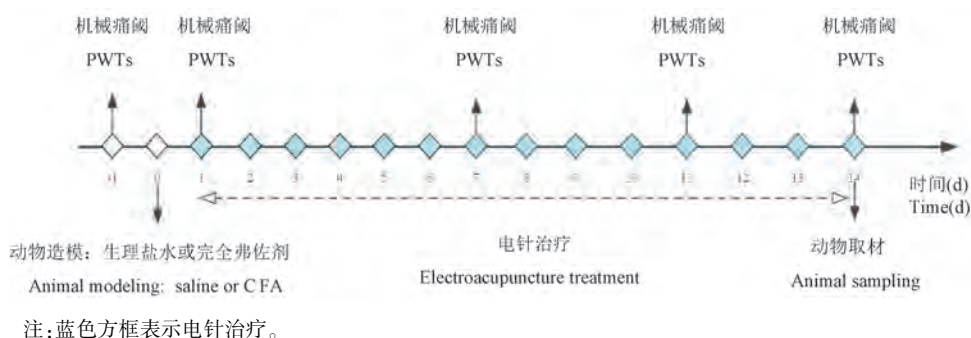


图 1 实验流程图

Note. Blue box indicates electroacupuncture treatment.

Figure 1 Experimental flowchart

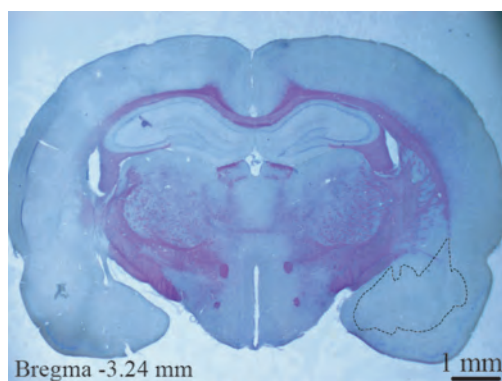


图 2 对照组 (左) 和模型组、电针组 (右) 左足形态

Figure 2 Hind paw photographs revealed an obvious swelling in the guarding posture of CFA rats

1.2.5 取材和蛋白提取

大鼠称重后用 3% 戊巴比妥钠注射液腹腔注射 (1 mL/kg) 麻醉, 经左心室、升主动脉用生理盐水快速灌注 200 mL, 置于冰袋上断头, 开颅, 取脑。根据 Paxinos & Watson 脑立体定位图谱, 切取杏仁核 (前囟向后 0.36 mm 至前囟向后 5.04 mm; 顶部向下 7.4 mm 至 10.2 mm; 正中中线向右 3 mm 至 5.4 mm, 见图 3), 置于 -80°C 冻存。



注: 尼氏染色法; 冰冻切片厚度为 30 μm 。

图 3 杏仁核示意图

Note. Nissl staining. Thickness of frozen section is 30 μm .

Figure 3 Schematic diagram of amygdala nucleus

蛋白提取: 每组 9 个样本, 每 3 个样本混为 1 管, 加入适量 SDT 裂解液 (4% 十二烷基磺酸钠, 100 mmol/L Tris-HCl, pH=7.6), 转移至预先装有适量石英砂 (组织样品另外加入 1 颗 1/4 英寸陶瓷珠) 的 2 mL 离心管中, 进行匀浆破碎, 超声 (80 W, 工作 10 s, 间歇 15 s, 循环 10 次), 沸水 15 min。17 500 rpm 离心 40 min, 取上清及滤液通过 0.22 μm 滤纸完成过滤收集。进行蛋白质定量 (BCA, bicinchoninic acid)。分装样品, -80°C 保存。

1.2.6 iTRAQ 技术绘制蛋白质谱

用 iTRAQ 试剂 (应用生物系统) 标记每个样品的 100 μg 多肽混合物。然后使用 AKTA 净化器系统通过 SCX 层析对 iTRAQ 标记的肽进行分级。以 1 mL/min 的流速以 0% ~ 8% 缓冲液 B (10 mmol/L KH_2PO_4 , pH=3.0, 25% 乙腈, 500 mmol/L KCl) 的梯度洗脱 22 min, 然后在 22 ~ 47 min 内洗脱 8% ~ 52% 缓冲液 B, 在 47 ~ 50 min 内洗脱 52% ~ 100% 缓冲液 B, 在 50 ~ 58 min 内洗脱 100% 缓冲液 B, 以及在 58 min 后洗脱 0% 缓冲液 B。洗脱用 214 nm 处的吸光度监测, 每 1 min 收集 1 次。收集的馏分

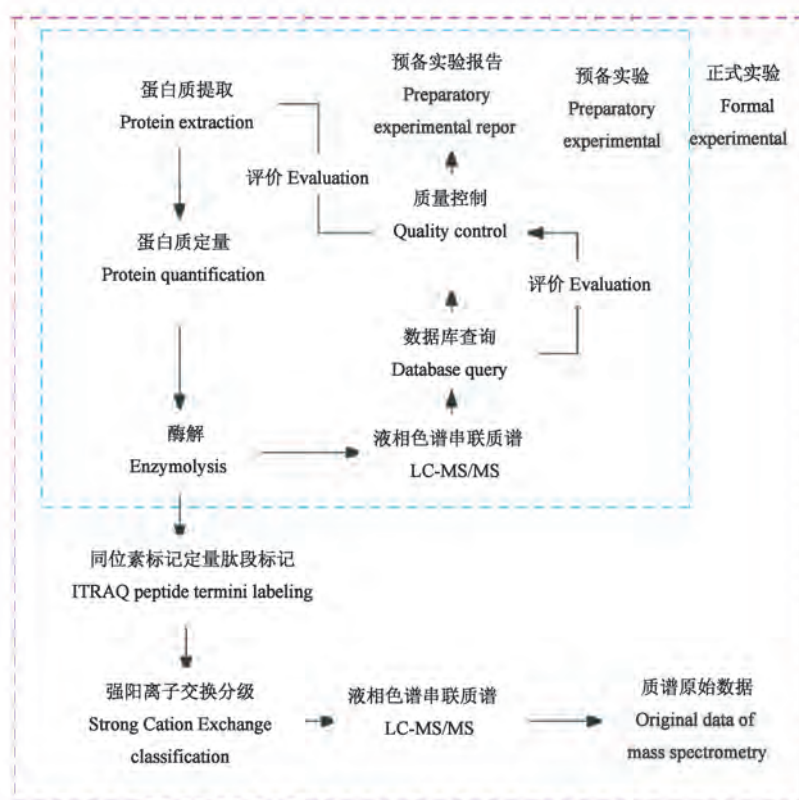


图 4 iTRAQ 实验流程

Figure 4 Work flow of iTRAQ

在 C18 小柱上脱盐,真空离心浓缩。流程图见图 4。

1.2.7 质谱分析

高效液相色谱:样品的分离通过纳升流速的高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)液相系统 Easy nLC 完成。质谱鉴定:经液相系统分离后的样本通过 Q-Exactive 质谱仪完成质谱分析。采集多肽和多肽碎片的质量电荷比的方式如下:每次全扫描后采集 10 个碎片图谱, MS2 Activation Type 为 HCD, Isolation window 为 2 m/z, 二级质谱分辨率 17 500 at 200 m/z, Microscans 为 1, 二级 Maximum IT 为 60 ms, Normalized Collision Energy 为 30 eV, Underfill 为 0.1%。数据分析:查库鉴定与定量分析通过 Mascot 2.2 和 Proteome Discoverer 1.4 完成。

1.2.8 生物信息学分析

进行聚类分析时,首先对目标蛋白质集合的定量信息进行归一化处理(归一化到(-1,1)区间)。样本的分类及蛋白量的分析通过软件 Graphpad Prism 8.0 完成,并将分析结果展示为层次聚类热图。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, Graphpad Prism 8.0 软件整理生成统计图;所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素重复测量方差分析(ANOVA);多重比较中,方差齐时采用最低显著性差异(LSD),方差不齐时采用 Dunnett 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

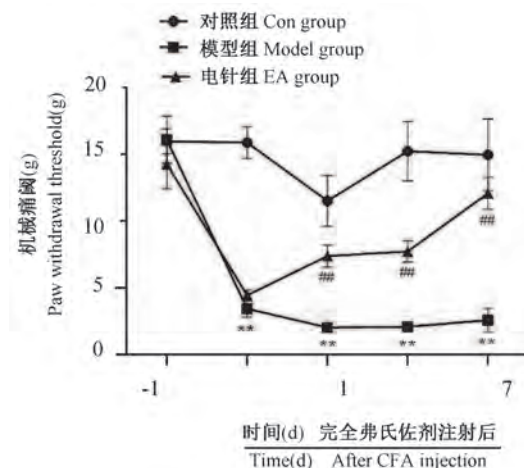
2 结果

2.1 电针对 CFA 诱导的慢性炎性痛大鼠机械痛阈的影响

如图 5 所示,CFA 注射前,各组大鼠左后足机械缩痛阈差异无显著性($P > 0.05$)。CFA 注射后,模型组与电针组大鼠的机械缩痛阈显著下调($P < 0.01$);电针治疗后,电针组大鼠痛阈上调,与模型组相比差异具有显著性。

2.2 对照组大鼠和模型组大鼠杏仁核差异蛋白表达

每组 9 只大鼠,每 3 只大鼠的杏仁核蛋白作为一个蛋白质组学检测样本,每个样本做 3 次方法学重复。iTRAQ 鉴定到的蛋白中符合表达差异倍数大于 1.2 倍(上下调)且 P 值小于 0.05 筛选标准的蛋白质视为差异表达蛋白质,其数量如表 1 所示。



注:与模型组相比,## $P < 0.01$;与对照组相比,** $P < 0.01$ 。

图 5 各组大鼠不同时间点 PWTs 变化

Note. Compared with model group, ## $P < 0.01$. Compared with Con group, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Comparisons of PWTs among groups of rats at different timepoints

其中,对照组与模型组相比,共检测到 58 个差异蛋白,其差异倍数和差异显著性如图 6A 所示。对照组与模型组相比表现出有显著性差异的蛋白质层次聚类分析图见图 6B。

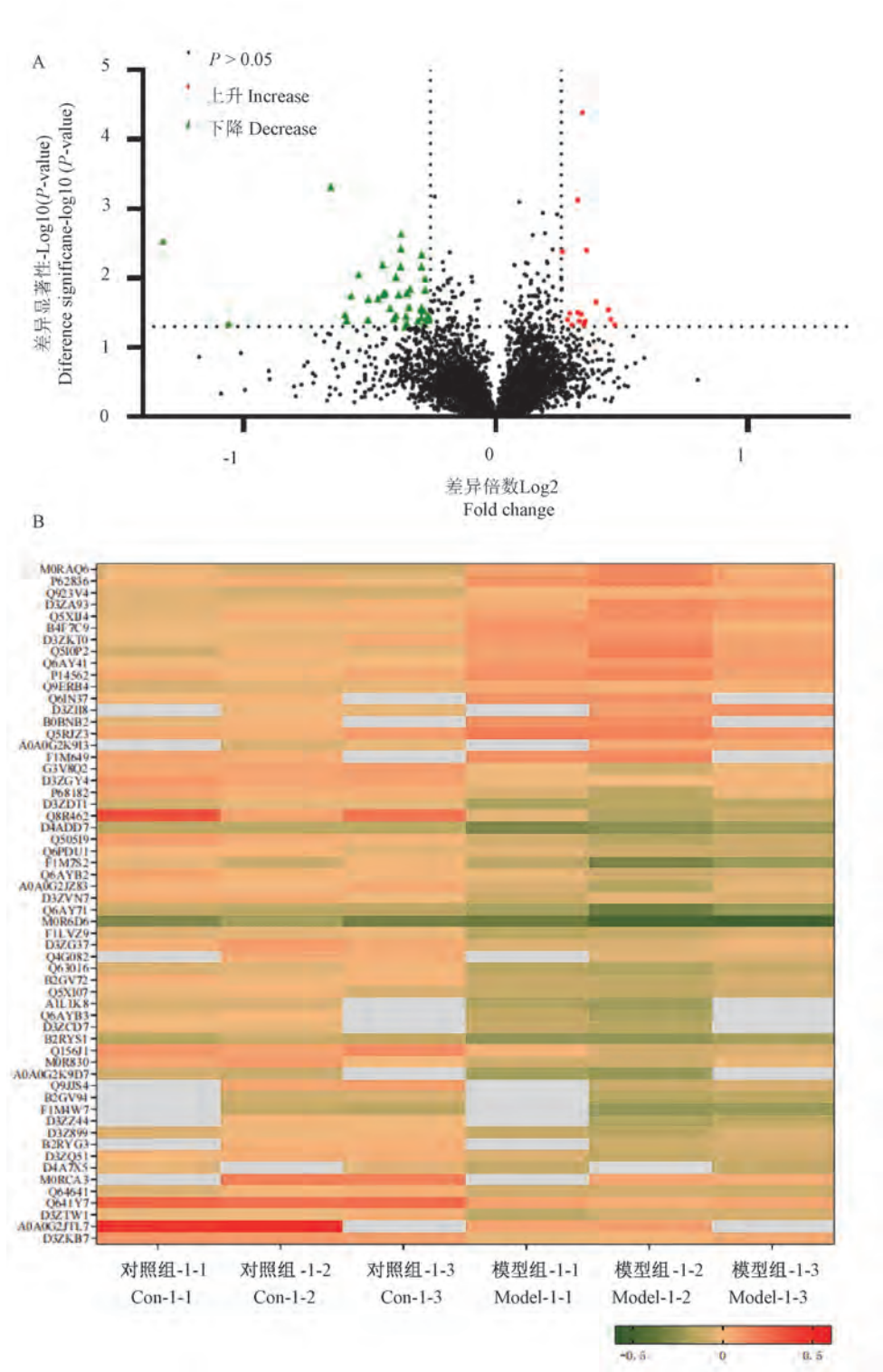
表 1 两组间的差异蛋白数量

Table 1 Number of differential proteins between two groups	
组别 Groups	标记定量蛋白质组学 iTRAQ
模型组 vs 对照组 Model group vs Con group	58
电针组 vs 对照组 Model group vs Con group	37

对照组与电针组相比,共检测到 37 个差异蛋白,其差异倍数和差异显著性如图 7A 所示。对照组与电针组相比表现出显著性差异的蛋白质层次聚类分析图见图 7B。

通过进一步的统计学分析,发现模型组相较于对照组变化有显著性差异且电针组相较于模型组有显著性差异且有意义的有 F 盒蛋白 6 (F-box only protein 6, FBXO6)、组蛋白甲基转移酶 (SET and MYND domain-containing protein, Smyd5)、突触黏附蛋白 (extracellular leucine-rich repeat fibronectin type III domain containing 1, Elfn1) 共 3 个蛋白 (见图 8)。

在本研究中,蛋白质组学揭示了电针治疗慢性痛时影响杏仁核 FBXO6、Smyd5、Elfn1 表达的作用。其中 3 个蛋白的作用见表 2。

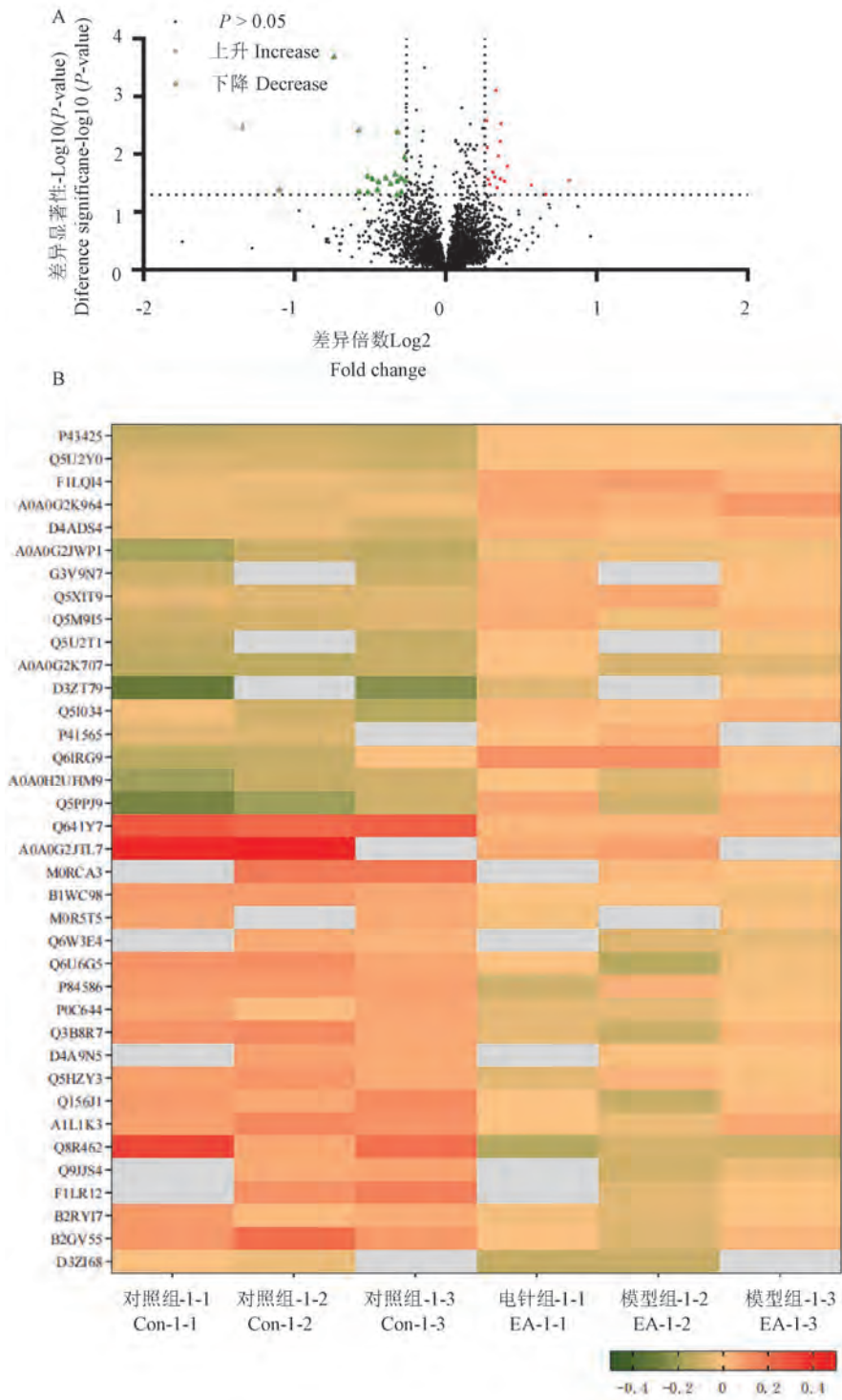


注: A: 绿点为模型组相比对照组下降且差异有显著性; 红点为模型组相比对照组上升且差异有显著性; B: 与对照组相比的差异倍数, 取其以 10 为底的对数值。

图 6 对照组与模型组相比差异有显著性的蛋白分布火山图和层次聚类分析图

Note. A. The green dot is the decrease in the model group compared to the control group and there is a significant difference. The red dot is the increase in the model group than the control group and there is a significant difference. B. The multiple of the difference compared with the control group, which is the logarithmic value with the base 10 as the value.

Figure 6 Volcano plot and heat map of differential proteins between Con group and model group



注:A;绿点为电针组比对照组下降且差异有显著性;红点为电针组比对照组上升且差异有显著性;B;与对照组相比的差异倍数,取其以10为底的对数值。

图7 电针组与对照组相比差异有显著性的蛋白分布火山图和层次聚类分析图

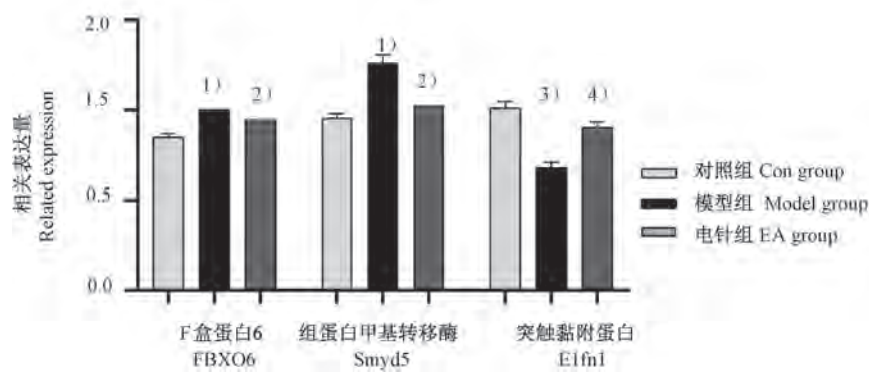
Note. A. The green dot is the decrease in the EA group compared to the control group and there is a significant difference. The red dot is the increase in the EA group than the control group and there is a significant difference. B. The multiple of the difference compared with the control group, which is the logarithmic value with the base 10 as the value.

Figure 7 Volcano plot and heat map of differential proteins between EA group and Con group

表 2 差异蛋白功能

Table 2 Differential protein function

描述 Description	蛋白名称 Protein name	分子质量($\times 10^3$) Molecular weight($\times 10^3$)	功能 Function
Q923V4	F 盒蛋白 6 FBXO6	32. 77	维持基因组稳定性 ^[18] 与糖蛋白相互作用 ^[19] Maintaining genomic stability ^[18] Interaction with glycoprotein ^[19]
D3ZH8	组蛋白甲基转移酶 Smyd5	47. 04	调节基因组稳定性 ^[20] ES 细胞自我更新和识别 ^[21] Regulation of genomic stability ^[20] Self-renewal and identification of ES cells ^[21]
D3ZZ44	突触黏附蛋白 Elfn1	90. 81	突触形成和分化 ^[22-25] 突触释放的速率 ^[26] 改变突触前释放的受体 ^[27] 与代谢性谷氨酸受体交互 ^[28] 参与 GABA 突触形成 ^[29] Synaptic formation and differentiation ^[22-25] Rate of synaptic release ^[26] Receptors that change presynaptic release ^[27] Interaction with mGluR ^[28] GABA synaptic formation ^[29]



注:与对照组相比,¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比,²⁾ $P < 0.05$;与对照组相比,³⁾ $P < 0.05$;与模型组相比,⁴⁾ $P < 0.05$ 。

图 8 电针诱导大鼠杏仁核 FBXO6、Smyd5 和 Elfn1 的表达变化

Note. Compared with Con group, ¹⁾ $P < 0.01$. Compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$. Compared with Con group, ³⁾ $P < 0.05$. Compared with model group, ⁴⁾ $P < 0.05$.

Figure 8 Electroacupuncture induces changes in the expression of FBXO6, Smyd5 and Elfn1 in the amygdala of rats

3 讨论

在本研究中,电针对慢性炎性痛模型大鼠的痛阈有明显的上调作用。疼痛和情绪的调控涉及到中枢与外周的多个环节、多种因子,针灸的调节同样涉及多靶点。在针灸和疼痛研究中,基因组学、蛋白质组学到代谢组学的研究方法的应用开始逐渐增多^[30-31]。因此,研究了电针对杏仁核蛋白表达的影响。基于 iTRAQ 的蛋白质组学分析,模型组与对照组相比共发现 58 个显著改变的蛋白质,其中

17 个在杏仁核中表达上调,41 个表达下调。同时,电针组与对照组相比杏仁核中共有 37 个蛋白发生显著变化,其中 17 个蛋白在杏仁核中表达上调,20 个表达下调。最后,对照组对比模型组且电针组对比模型组差异有显著性且有意义的蛋白为 FBXO6、Smyd5、Elfn1。

FBXO6 是一种参与内质网相关蛋白降解(ER-associated protein degradation, ERAD)的泛素连接酶系统,负责 N-糖蛋白的泛素化^[32]。FBXO6 能够调节细胞对复制应激的敏感性^[33]。此外有研究发现

FBXO6 对 I 型干扰素 (interferon-I, IFN-I) 介导的抗病毒免疫反应的普遍作用^[34]。FBXO6 还能通过抑制内质网应激和抑制 cJun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 的活性以减轻镉对人胚肾 293 细胞 (human embryonic kidney cells, HEK293) 细胞的毒性^[35]。但在疼痛领域中还没有关于 FBXO6 的文献报道。

Smyd5 在维持染色体完整性方面发挥着重要作用^[36]。Smyd5 参与调节了巨噬细胞中的组蛋白甲基化, Smyd5 使赖氨酸 20 上的组蛋白 H4 三甲基化, 从而抑制炎症反应基因包括肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、巨噬细胞炎性蛋白 1 β (macrophage inflammatory protein-1 β , MIP-1 β) 和白介素 1 (interleukin 1, IL-1) 的表达^[37]。这可能与电针缓解 CFA 诱发的慢性炎性痛相关。

Elfn1 是一种突触黏附蛋白, 也是一种假定的 I 型跨膜蛋白, 含有一个富含亮氨酸重复型受体激酶 (leucine-rich repeat receptor kinase, LRR) 结构域、一个纤维连接蛋白 III 型结构域和一个跨膜域^[38]。Elfn1 是 III 组代谢性谷氨酸受体的变构调节器, 也是一种跨突触支架蛋白, 它是招募突触前谷氨酸受体 7 (glutamate metabotropic receptor 7, GRM7) 和离子型谷氨酸海人藻酸受体 (glutamate ionotropic receptor kainate, GRIK2) 以形成突触所必需的^[28,39]。代谢性谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptors, mGluRs) 构成一个内源性调节系统, 它沿整个痛神经轴表达并调节痛觉^[40]。有研究表明第七亚型代谢型谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptor 7, mGluR7) 对疼痛有易化作用^[41]。因此, 电针可能通过 Elfn1 对 mGluR7 的相关作用从而起到镇痛效应。

杏仁核是疼痛情绪-情感维度和疼痛调节的重要大脑中心^[42]。有研究指出中央杏仁核 (central amygdala nucleus, CeA) 中的谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 传递与疼痛有关^[43-44]。炎性痛大鼠 CeA 中过度表达的 mGluR8 可抑制伤害性行为, 而这种效应的产生与 Glu 释放的增加、GABA 的减少等因素相关^[45]。Glu 是中枢神经系统传递疼痛相关信号的主要神经递质。兴奋性谷氨酸能和抑制性 γ -氨基丁酸能传递的失衡被认为是中枢敏感化发展的基础, 而中枢敏感化能引起慢性疼痛患者的临床症状^[46]。Elfn1 在杏仁核中、Glu 能神经元上表达^[27]。因此, 电针对慢性炎性痛大鼠的镇痛效应可能是通过 Elfn1 对杏仁核上的 Glu 能神经元的相关作用产

生的, 但确切机制仍不清楚。

综上所述, 数据表明, CFA 诱导的慢性炎性疼痛会导致杏仁核的蛋白变化, 共有 3 个蛋白质在模型组和电针组的大鼠杏仁核中差异表达。由此可见, 电针“足三里”“三阴交”可明显改善 CFA 诱发的慢性炎性痛。其机制可能与改变杏仁核中 FBXO6、Smyd5、Elfn1 表达相关。后期, 将对 3 个差异蛋白中重要蛋白进行进一步的验证。我们的研究为进一步探讨电针影响慢性疼痛的杏仁核机制铺平了道路。

参 考 文 献 (References)

- [1] Keefe FJ, Rumble ME, Scipio CD, et al. Psychological aspects of persistent pain: current state of the science [J]. J Pain, 2004, 5(4): 195-211.
- [2] Mills SEE, Nicolson KP, Smith BH. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies [J]. Br J Anaesth, 2019, 123(2): e273-e283.
- [3] GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. Lancet, 2017, 390(10100): 1211-1259.
- [4] Bourbia N, Pertovaara A. Involvement of the periaqueductal gray in the descending antinociceptive effect induced by the central nucleus of amygdala [J]. Physiol Res, 2018, 67(4): 647-655.
- [5] Nagasaka K, Takashima I, Matsuda K, et al. Brain activity changes in a monkey model of central post-stroke pain [J]. Exp Neurol, 2020, 323: 113096.
- [6] Itoga CA, Roltsch Hellard EA, Whitaker AM, et al. Traumatic stress promotes hyperalgesia via corticotropin-releasing factor-1 receptor (crfr1) signaling in central amygdala [J]. Neuropsychopharmacology, 2016, 41(10): 2463-2472.
- [7] Hu X, Liu Y, Wu J, et al. Inhibition of P2X7R in the amygdala ameliorates symptoms of neuropathic pain after spared nerve injury in rats [J]. Brain Behav Immun, 2020, 88: 507-514.
- [8] Sagalajev B, Wei H, Chen Z, et al. Oxidative stress in the amygdala contributes to neuropathic pain [J]. Neuroscience, 2018, 387: 92-103.
- [9] Phelps CE, Navratilova E, Dickenson AH, et al. Kappa opioid signaling in the right central amygdala causes hind paw specific loss of diffuse noxious inhibitory controls in experimental neuropathic pain [J]. Pain, 2019, 160(7): 1614-1621.
- [10] Chen L, Wang W, Tan T, et al. GABAA Receptors in the central nucleus of the amygdala are involved in pain- and itch-related responses [J]. J Pain, 2016, 17(2): 181-189.
- [11] Paretkar T, Dimitrov E. Activation of enkephalinergic (Enk) interneurons in the central amygdala (CeA) buffers the behavioral effects of persistent pain [J]. Neurobiol Dis, 2019, 124: 364-372.

- [12] Yuan T, Manohar K, Latorre R, et al. Inhibition of microglial activation in the amygdala reverses stress-induced abdominal pain in the male rat [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 10(3): 527–543.
- [13] Thompson JM, Neugebauer V. Cortico-limbic pain mechanisms [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 702: 15–23.
- [14] Hua T, Chen B, Lu D, et al. General anesthetics activate a potent central pain-suppression circuit in the amygdala [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(7): 854–868.
- [15] Neugebauer V. Amygdala pain mechanisms [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 227: 261–284.
- [16] 冯秀梅, 陈淑萍, 王俊英, 等. 电针对神经痛和负性情绪大鼠杏仁核内痛感觉和情绪成分相关促皮质激素释放因子受体等基因表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2014, 39(6): 448–455.
Feng XM, Chen SP, Wang JY, et al. Effect of electroacupuncture intervention on expression of pain sensory and affection processing-related corticotropin-releasing factor receptor mrna, etc. in the amygdala in neuropathic pain and negative affection rats [J]. *Acupunct Res*, 2014, 39(6): 448–455.
- [17] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55–63.
- [18] Xu HZ, Wang ZQ, Shan HZ, et al. Overexpression of Fbxo6 inactivates spindle checkpoint by interacting with Mad2 and BubR1 [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(24): 2779–2789.
- [19] Liu B, Zheng Y, Wang TD, et al. Proteomic identification of common SCF ubiquitin ligase FBXO6-interacting glycoproteins in three kinds of cells [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(3): 1773–1781.
- [20] Kidder BL, He R, Wangsa D, et al. SMYD5 controls heterochromatin and chromosome integrity during embryonic stem cell differentiation [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(23): 6729–6745.
- [21] Kidder BL, Hu G, Cui K, et al. SMYD5 regulates H4K20me3-marked heterochromatin to safeguard ES cell self-renewal and prevent spurious differentiation [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2017, 10(1): 8.
- [22] Williams ME, de Wit J, Ghosh A. Molecular mechanisms of synaptic specificity in developing neural circuits [J]. *Neuron*, 2010, 68(1): 9–18.
- [23] de Wit J, Ghosh A. Specification of synaptic connectivity by cell surface interactions [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(1): 22–35.
- [24] de Wit J, Hong W, Luo L, et al. Role of leucine-rich repeat proteins in the development and function of neural circuits [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27(1): 697–729.
- [25] de Wit J, Ghosh A. Control of neural circuit formation by leucine-rich repeat proteins [J]. *Trends Neurosci*, 2014, 37(10): 539–550.
- [26] Sylwestrak EL, Ghosh A. Elfn1 regulates target-specific release probability at CA1-interneuron synapses [J]. *Science*, 2012, 338(6106): 536–540.
- [27] Tomioka NH, Yasuda H, Miyamoto H, et al. Elfn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4501.
- [28] Dunn HA, Patil DN, Cao Y, et al. Synaptic adhesion protein ELFN1 is a selective allosteric modulator of group III metabotropic glutamate receptors in trans [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(19): 5022–5027.
- [29] Girgenti MJ, Wang J, Ji D, et al. Transcriptomic organization of the human brain in post-traumatic stress disorder [J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(1): 24–33.
- [30] Sung HJ, Kim YS, Kim IS, et al. Proteomic analysis of differential protein expression in neuropathic pain and electroacupuncture treatment models [J]. *Proteomics*, 2004, 4(9): 2805–2813.
- [31] Wang K, Xiang XH, Qiao N, et al. Genomewide analysis of rat periaqueductal gray-dorsal horn reveals time-, region- and frequency-specific mrna expression changes in response to electroacupuncture stimulation [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6713.
- [32] Yoshida Y, Tokunaga F, Chiba T, et al. Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(44): 43877–43884.
- [33] Zhang YW, Brognard J, Coughlin C, et al. The F box protein Fbx6 regulates Chk1 stability and cellular sensitivity to replication stress [J]. *Mol Cell*, 2009, 35(4): 442–453.
- [34] Du X, Meng F, Peng D, et al. Noncanonical role of FBXO6 in regulating antiviral immunity [J]. *J Immunol*, 2019, 203(4): 1012–1020.
- [35] Hwang GW, Du K, Takahashi T, et al. Inhibition of F-box protein FBXO6 gene expression by RNA interference enhances cadmium toxicity in HEK293 cells [J]. *J Toxicol Sci*, 2011, 36(6): 847–849.
- [36] Kidder BL, He R, Wangsa D, et al. SMYD5 controls heterochromatin and chromosome integrity during embryonic stem cell differentiation [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(23): 6729–6745.
- [37] Stender JD, Pascual G, Liu W, et al. Control of pro-inflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20 [J]. *Mol Cell*, 2012, 48(1): 28–38.
- [38] Dolan J, Walshe K, Alsbury S, et al. The extracellular Leucine-Rich Repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns [J]. *BMC Genomics*, 2007, 8(1): 320.
- [39] Stachniak TJ, Sylwestrak EL, Scheiffele P, et al. Elfn1-induced constitutive activation of mGluR7 determines frequency-dependent recruitment of SOM interneurons [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(23): 2276–2281.
- [40] Goudet C, Magnaghi V, Landry M, et al. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain [J]. *Brain Res Rev*, 2009, 60(1): 43–56.
- [41] Palazzo E, Fu Y, Ji G, et al. Group III mGluR7 and mGluR8 in

- the amygdala differentially modulate nocifensive and affective pain behaviors [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55(4): 537–545.
- [42] Neugebauer V. Amygdala pain mechanisms [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 227: 261–284.
- [43] Ossipov MH, Lai J, Malan TP Jr, et al. Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 909: 12–24.
- [44] Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis [J]. *Lancet Psychiatry*, 2016, 3(8): 760–773.
- [45] Palazzo E, Marabese I, Soukupova M, et al. Metabotropic glutamate receptor subtype 8 in the amygdala modulates thermal threshold, neurotransmitter release, and rostral ventromedial medulla cell activity in inflammatory pain [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(12): 4687–4697.
- [46] Zussy C, Gómez-Santacana X, Rovira X, et al. Dynamic modulation of inflammatory pain-related affective and sensory symptoms by optical control of amygdala metabotropic glutamate receptor 4 [J]. *Mol Psychiatry*, 2018, 23(3): 509–520.
- [收稿日期] 2021-07-14

多发性线粒体功能障碍综合征(MMDS)并发心肌病的新型大鼠模型

多发性线粒体功能障碍综合征(MMDS)是一类与线粒体铁硫簇合成相关核基因(nDNA)突变引发的线粒体疾病。MMDS 可造成线粒体结构和功能的严重破坏,从而损害多种代谢途径。近年来已有 MMDS 患者累及心脏的报道,但具体的临床症状和发病机制尚不清楚,同时缺乏相关的动物模型工具。

中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物资源研究中心基因工程技术课题组的研究人员,选择了一个已报道的 MMDS 致病基因 *Isca1*,利用 *Isca1* 条件敲除(*Isca1*-cKO)大鼠与 α -MHC-Cre 工具大鼠杂交培育建立心肌组织特异性 *Isca1* 敲除杂合子(*Isca1*-HET)大鼠。通过透射电镜分析、呼吸链复合物活性及能量生成分析来观察线粒体形态及功能改变,通过超声影像和组织病理学等技术观察模型大鼠成体后心脏发育特征,此外,通过阿霉素处理观察大鼠心脏对病理刺激的反应性。

结果显示 *Isca1*-HET 大鼠心肌组织表现出典型的 MMDS 特征,包括线粒体形态的破坏,线粒体呼吸链复合物 I、II 和 IV 酶活性受损以及 ATP 代谢异常。同时模型大鼠表现为典型的扩张型心肌病特征,包括心室壁变薄、心室扩张、心功能障碍和心肌纤维化等。

综上,本研究建立了一种 MMDS 并发心肌病的大鼠模型,该模型同时也可作为心肌能量代谢障碍及线粒体心肌病的模型工具。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2021, 4(4):381–390; <https://doi.org/10.1002/ame2.12193>)。

毕殿勇,王利,何竹青,等. 复方地黄颗粒对帕金森病模型大鼠小胶质细胞激活及神经行为的干预研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 749-757.

Bi DY, Wang L, He ZQ, et al. Effects of compound Rehmannia Granule on microglia activation and neurobehavior in Parkinson's disease model rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 749-757.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.006

复方地黄颗粒对帕金森病模型大鼠小胶质细胞 激活及神经行为的干预研究

毕殿勇,王利,何竹青,杨玉芳,何建成*

(上海中医药大学基础医学院,上海 201203)

【摘要】 目的 探讨复方地黄颗粒对不同模型大鼠黑质纹状体小胶质细胞激活、炎症因子表达及神经行为学的干预作用。**方法** 采用黑质两点立体定位注射术结合阿扑吗啡腹腔注射法分别构建 6-羟基多巴胺(6-OHDA)、脂多糖(LPS)模型大鼠。实验大鼠被分为假手术组、模型组、复方地黄颗粒干预组。药物干预组大鼠给予 7 g/(kg·d)的复方地黄颗粒混悬液灌胃,假手术组及模型组大鼠以等量体积生理盐水灌胃(每只 2 mL),每日 1 次,连续 6 周。分别在造模成功后(简称 0 周)及灌胃干预第 2、4、6 周观察、记录阿扑吗啡诱导的自发旋转行为。ELISA 法检测黑质纹状体 TNF- α 等炎症因子表达水平。Western Blot 法检测黑质纹状体 Iba1 等蛋白表达水平。**结果** (1)神经行为学:与模型组(6-OHDA 组;LPS 组)比较,复方地黄颗粒干预组大鼠在第 4、6 周自发旋转行为显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。(2)ELISA 结果:与模型组比较,复方地黄颗粒干预组大鼠黑质纹状体 TNF- α 等促炎因子含量表达显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。(3)Western Blot 结果:与模型组比较,复方地黄颗粒干预组大鼠黑质纹状体 Iba1 等促炎相关蛋白含量表达显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。**结论** 复方地黄颗粒通过抑制模型大鼠黑质纹状体小胶质细胞激活,下调 TNF- α 等炎症因子表达等机制抑制模型大鼠自发旋转行为。

【关键词】 复方地黄颗粒;帕金森病;小胶质细胞;炎症因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)06-0749-09

Effects of compound Rehmannia Granule on microglia activation and neurobehavior in Parkinson's disease model rats

BI Dianyong, WANG Li, HE Zhuqing, YANG Yufang, HE Jiancheng*

(Basic Medical College of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: HE Jiancheng. E-mail: hejc8163@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect of compound Rehmannia granule on the activation of microglia in the substantia nigra and striatum, the expression of inflammatory factors, and neurobehavior in different rat models. **Methods** We established a 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and a lipopolysaccharide (LPS) animal model by administering a two-point stereotactic injection into the substantia nigra, combined with an intraperitoneal injection of apomorphine. Rats were divided into sham, model (6-OHDA and LPS model groups), and compound Rehmannia granule intervention groups (DH + 6-OHDA and DH + LPS groups). Rats in the drug intervention group were given 7 g/(kg·d) compound Rehmannia

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81573899),上海市生物医药科技支撑专项项目(20S21901700),上海市健康辨识与评估重点实验室(21DZ2271000)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81573899), Shanghai Biomedical Science Technology Support Project (20S21901700), Shanghai Key Laboratory of Health Identification and Assessment(21DZ2271000).

【作者简介】 毕殿勇(1975—),男,讲师,研究方向:中医药治疗神经退行性疾病实验研究。Email: bdy965199@163.com

【通信作者】 何建成(1966—),男,教授,博士研究生导师,研究方向:中医药治疗神经退行性疾病实验研究。Email: hejc8163@163.com

granule suspension by gavage, whereas rats in the sham and model groups were given 2 mL saline by gavage once a day for 6 weeks. Spontaneous rotation behavior induced by apomorphine was observed and recorded after the model was established (abbreviation for 0 weeks) as well as at 2, 4, and 6 weeks after intragastric administration. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and other inflammatory factors in the substantia nigra and striatum were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western Blot was used to detect the expression of ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) and other proteins in the substantia nigra and striatum. **Results** (1) For neuroethology, compared with the model groups (i.e., 6-OHDA and LPS groups), the spontaneous rotation behavior of rats in the compound Rehmannia granule intervention group was significantly lower at 4 and 6 weeks ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively). (2) The ELISA result showed that compared with the model group, TNF- α and other pro-inflammatory factors in the substantia nigra and striatum of rats in the compound Rehmannia granule intervention group were significantly lower ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). (3) Western Blot result showed that compared with the model group, the expression of Iba1 and other pro-inflammatory proteins in the substantia nigra and striatum in the compound Rehmannia granule group were significantly lower ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively). **Conclusions** Compound Rehmannia granule intervention inhibits the activation of microglia in the substantia nigra and striatum, downregulates the expression of TNF- α and proinflammatory factors, and attenuates the spontaneous rotation behavior of model rats.

【Keywords】 compound Rehmannia granule; Parkinson's disease; microglia; inflammatory factors

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

帕金森病(Parkinson's disease, PD)属中老年常见慢性、神经退行性疾病,其主要病理特征为黑质致密部多巴胺能神经元进行性丢失、大脑皮层神经元内 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)聚集及路易小体(Lewy bodies, LBs)形成,伴有黑质致密部酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)阳性神经元及神经纤维大量丢失^[1-2]。

PD病因及发病机理尚不十分明确。相关研究发现,氧化应激、线粒体功能障碍及小胶质细胞过度激活所致的黑质致密部多巴胺能神经元内游离型铁离子过度沉积与PD发病密切相关^[3-4]。本课题组长期临床实践证实,复方地黄颗粒在改善PD患者的抑郁、焦虑、睡眠障碍及开-关现象等方面疗效确切^[5-6]。前期研究表明,复方地黄颗粒可通过抑制糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)基因、蛋白表达,促进p-GSK-3 β (phospho S9)蛋白表达等作用抑制因 α -syn错误聚集所致的黑质多巴胺能神经元凋亡^[7]。有研究证实,模型小鼠黑质致密部小胶质细胞可被脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)大量激活,其激活标志物离子化钙结合适配分子1(ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba1)及相关炎症因子IL-1 β 、TNF- α 表达水平显著升高^[8-9]。本研究分别制备LPS和6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)实验模型大鼠,探讨复方地黄颗粒对两种实验模型大鼠黑质纹状体小胶质细胞激活及神经行为学的干预作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

100只8周龄雄性SPF级SD大鼠,体重(180 ± 20)g,购自上海中医药大学实验动物中心【SCXK(沪)2018-0006】。以上动物均饲养于上海中医药大学实验动物中心实验室【SYXK(沪)2018-0008】。本实验研究已通过上海中医药大学实验动物伦理审查委员会批准(PZSHUTCM200911001)。饲养条件:湿度60%~65%,温度23~25℃,自动光-暗控制(LD12:12,即7:00~19:00),自由采食、饮水。实验操作地点:上海中医药大学实验动物中心。

1.1.2 药物

复方地黄颗粒由熟地黄、丹参、钩藤、石菖蒲、全蝎、杭白芍、珍珠母7味药物组方,委托国家中药工程技术研究中心制作,按照既定的工艺流程制备浸膏粉,置于阴冷通风处,药物避光包装。动物给药剂量折算标准参照孙瑞元《定量药理学》所述计算每只大鼠每日用药剂量,即每只标准体重大鼠每日灌胃剂量公式 $DB = DA \times KB/KA$ 。DA为标准体重常人用药剂量,KB为大鼠剂量折算系数(7),KA为标准体重成人剂量折算系数(388),即大鼠每日灌胃药量 $DB = DA \times 7/388$ 。

1.1.3 主要试剂与仪器

大鼠脑立体定位仪(型号SN-3N,成茂公司,日本);10 μ L微量上样器(上海高鸽);微型颅骨钻

(上海奥尔科特生物科技有限公司);多功能酶标仪(型号 DENLEY DRAGON Wellscan MK3, Thermo 公司, 美国);Western Blot 电泳仪(型号 043BR41664, Bio-Rad 公司, 美国)。

ELISA 试剂盒 IL-1 β (Lot: JL20884, 上海将来实业股份有限公司); ELISA 试剂盒 IL-10 (Lot: ER0135, 上海威奥生物科技有限公司); ELISA 试剂盒 TNF- α (Lot: JL13202, 上海将来实业股份有限公司); NF- κ B p65 antibody Rabbit (Lot: D14E12, CST 公司, 美国); phospho-NF- κ B p65 antibody Rabbit (Lot: GR3204852-19, Abcam 公司, 英国); 酪氨酸羟化酶 (Tyrosine hydroxylase, TH) antibody Rabbit (Lot: 58844S, CST 公司, 美国); GAPDH Antibody (Lot: 10011065, Proteintech 公司); β -actin antibody (Lot: #0078629, Proteintech 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (Lot: D110058-0100, 上海生工); 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (Lot: D110087-0100, 上海生工); 离子钙接头蛋白抗体 1 (ionized calcium binding adapter molecule antibody 1 Rabbit, Iba1 antibody Rabbit) (Lot: PTE0556, WAKQ 公司, 日本); BCA Reagent A (Lot: #A4801 A, 碧云天公司); BCA Reagent B (Lot: #A1101B, 碧云天公司); SDS-PAGE 凝胶配备试剂盒 (Lot: #102919191106, 碧云天公司); PVDF Transfer Membranes (0.22 μ mol/L & 0.45 μ mol/L, Immobilon-p Millipore, Bedford, MA, 美国); ECL 化学发光液 (Lot: #1907702, Immobilon-p Millipore, Bedford, MA, 美国); 戊巴比妥钠 (Lot: WS20130112, 上海中西药业股份有限公司); 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) (Lot: #MKCD0817, Sigma 公司, 美国); LPS (Lot: #068M4067 V, Sigma 公司, 美国); 阿扑吗啡 (APO) (Lot: WKQ4315, WKQ 公司, 日本); 抗坏血酸 (Vitamin C) (Lot: #311403, Selleck 公司, 美国)。

1.2 方法

所有实验大鼠术前适应性喂养 1 周, 取无自发旋转行为的健康大鼠纳入研究范围。

1.2.1 LPS 模型大鼠构建

采用黑质两点立体定位术将 LPS (体积为每只 2 μ L, 浓度为 2.5 μ g/ μ L, 生理盐水配制, 现配现用) 注射于右侧黑质致密部制备 LPS 大鼠模型。

1.2.2 6-OHDA 模型大鼠构建

采用黑质两点立体定位术将 3 μ L 6-OHDA 溶液 (浓度为 2 μ g/ μ L, 0.2% 的 Vitamin C 现配) 注射

于右侧黑质致密部, 制备 6-OHDA 大鼠模型。

1.2.3 手术步骤

大鼠麻醉 (1% 戊巴比妥钠, 40 mg/kg, 腹腔注射), 头部去毛备皮。将其头部牢固固定于脑立体定位仪, 使颅骨前后位于同一水平面, 碘伏常规消毒术野皮肤。切开皮肤, 暴露前囟至两耳之间位置, 仔细止血, 剥离骨膜。

参照包新民主编《脑立体定位图谱》寻找、标记前囟中线位置。标记右侧黑质注射位点: (1) 第一点坐标在前囟后 5.2 mm, 颅顶中线右侧 1 mm, 硬膜下 9 mm; (2) 第二点坐标在前囟后 5.2 mm, 颅顶中线右侧 1.2 mm, 硬膜下 8.5 mm。

用颅骨钻轻轻钻透颅骨直至硬脑膜, 微量上样器吸取适量造模药物, 将其垂直固定于脑立体定位仪, 缓慢匀速进针。当针头到达预定位置后以 1 μ L/min 的速度匀速推注药物, 注射完毕留针 5 min, 缓慢退针。假手术组大鼠按体重标准注射同体积生理盐水, 术毕消毒并缝合皮肤切口, 将大鼠放回笼具。

1.2.4 分组及药物干预

术后第 2 周, 腹腔注射 APO (0.5 mg/kg, 0.1 mL/100 g) 诱导、记录大鼠自发旋转行为, 将旋转圈数大于每分钟 7 圈者视为模型成功标志。

(1) LPS 实验模型动物分组: 随机数字表法将 LPS 实验模型大鼠分为 2 组: LPS 模型组 (简称 LPS 组), 复方地黄颗粒干预组 (简称 DH+LPS 组)。另纳入假手术组 (简称 sham 组), 每组大鼠 8 只。

(2) 6-OHDA 实验模型动物分组: 随机数字表法将 6-OHDA 实验模型大鼠分为 2 组: 6-OHDA 模型组 (简称 6-OHDA 组)、复方地黄颗粒干预组 (简称 DH+6-OHDA 组), 另纳入假手术组 (sham 组), 每组大鼠 8 只。

(3) 药物干预: 假手术组、LPS、6-OHDA 组模型大鼠用等量体积生理盐水灌胃, 其余各组大鼠以复方地黄颗粒灌胃 (浓度 1 g/mL, 剂量 7 g/kg), 每日 1 次, 共计 6 周。

1.2.5 神经行为学检测及取材

分别于造模成功时 (简称 0 周) 和灌胃干预的第 2、4、6 周观察、记录 APO 诱导的大鼠自发旋转行为。取材前 24 h 大鼠禁食, 不禁水, 1% 戊巴比妥钠麻醉并脱臼处死大鼠, 在冰上迅速断头取脑, 分离其黑质-纹状体, 液氮保存, 迅速移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.2.6 ELISA 法检测大鼠黑质纹状体组织匀浆液 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 的含量表达

组织匀浆液制备:取 100 mg 黑质纹状体组织加入 1 mL 生理盐水内,低温超声震荡,4℃ 条件下以低温高速离心机 (12 000 r/min) 离心,取其上清液-80℃ 冰箱保存。ELISA 具体实验操作步骤参照生产商说明书。

1.2.7 Western Blot 技术检测各组大鼠黑质纹状体 TH、NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65、Iba1 的蛋白表达水平

RIPA 法提取黑质纹状体组织蛋白,BCA 法蛋白定量。根据分子量不同配置 8% 及 10% 的 SDS-PAGE 凝胶。电泳、蛋白转膜及抗体孵育:电泳,80 V 30 min,110 V 90 min;转膜,200 mA,1 h;5% BSA 封闭,室温,摇床 2 h;一抗孵育:GAPDH Antibody (1:1000);NF- κ Bp65 Antibody 溶液配制 (1:1000);p-NF- κ Bp65 Antibody 溶液配制 (1:1000);tyrosine hydroxylase Antibody (1:1000);ionized calcium binding adaptor molecule-1 Antibody (1:500); β -actin Antibody (1:2000);抗体孵育:4℃ 摇床过夜,1×TBST 洗涤 3 次,每次 5 min;二抗孵育:HRP * Goat anti-Rabbit IgG (H+L) 溶液配制 (1:5000);HRP * Goat anti-Mouse IgG (H+L) (1:5000);室温,摇床 2 h,1×TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。

使用 ECL 化学发光剂于暗室内曝光显影,Imagej 图像分析软件分析目的蛋白条带灰度值,取样本组织蛋白灰度值与 GAPDH、 β -actin 灰度值比值作对比,求得样本组织蛋白相对含量。

1.3 统计学分析

GraphPad Prism 8 软件处理所有实验数据,所有数据服从正态分布,计量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间实验数据比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),组间两两比较采用 LSD/Dunnett/SNK 法,统计结果以 P 值表示, $P < 0.05$ 表示组间存在统计学差异, $P < 0.01$ 表示组间存在显著性差异。

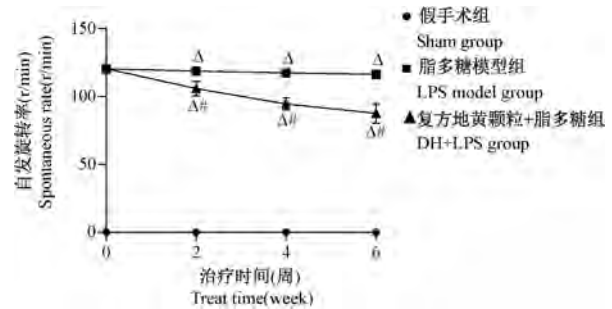
2 结果

2.1 神经行为学

2.1.1 复方地黄颗粒对 LPS 模型大鼠神经行为学的影响

由图 1 可见,与 sham 组比较,LPS 模型大鼠造模后成功(图 1 所示 0 周)出现 APO 诱导的首尾衔接自发旋转行为,组间有显著性差异 ($P < 0.001$);与

LPS 组比较,DH+LPS 组大鼠在 2、4、6 周时的自发旋转圈数明显减少,组间有显著性差异 ($P < 0.001$)。



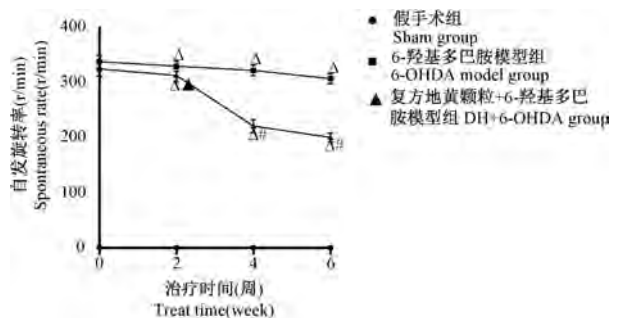
注:与假手术组比较, $\Delta P < 0.001$;与 LPS 模型组比较, $\#P < 0.001$ 。

图 1 复方地黄颗粒对脂多糖模型大鼠神经行为学的影响
Note. Compared with sham group, $\Delta P < 0.001$. Compared with LPS model group, $\#P < 0.001$.

Figure 1 Effect of compound Rehmannia granules on neurobehavior of lipopolysaccharide model rats

2.1.2 复方地黄颗粒对 6-OHDA 模型大鼠神经行为学的影响

由图 2 可见,与 sham 组比较,6-OHDA 模型大鼠造模成功(图 2 所示 0 周)出现 APO 诱导的首尾衔接自发旋转行为,组间有显著性差异 ($P < 0.001$);与 6-OHDA 组比较,DH+6-OHDA 组在 2、4、6 周时的自发旋转圈数明显减少,组间有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。



注:与假手术组相比, $\Delta P < 0.001$;与 6-OHDA 模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\#P < 0.001$ 。

图 2 复方地黄颗粒对 6-羟基多巴胺模型大鼠神经行为学的影响
Note. Compared with sham group, $\Delta P < 0.001$. Compared with 6-OHDA model group, $\Delta P < 0.05$, $\#P < 0.001$.

Figure 2 Effect of compound Rehmannia granules on neurobehavior of 6-hydroxydopamine model rats

2.2 复方地黄颗粒对各组大鼠黑质纹状体炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 含量表达的影响

2.2.1 复方地黄颗粒对 LPS 模型大鼠黑质纹状体炎症因子含量表达的影响

由表 1 可见,与 sham 组比较,LPS 组 IL-1 β 、TNF- α 表达水平显著升高,IL-10 表达水平显著降低,组间有显著性差异($P < 0.001$);与 LPS 组比较,DH+LPS 组 IL-1 β 、TNF- α 表达水平显著降低,IL-10 的表达水平显著升高,组间有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。

2.2.2 复方地黄颗粒对 6-OHDA 模型大鼠黑质纹状体炎症因子含量表达的影响

由表 2 可见,与 sham 组比较,6-OHDA 组 IL-1 β 、TNF- α 表达量显著升高,IL-10 表达水平显著降低,组间有显著性差异($P < 0.001$);与 6-OHDA 组比,DH+6-OHDA 组 IL-1 β 、TNF- α 显著降低,IL-10 表达水平显著升高,组间有显著性差异($P < 0.001$)。

2.3 复方地黄颗粒对模型大鼠黑质纹状 NF- κ

Bp65、p-NF- κ Bp65 蛋白表达的影响

由表 3、图 3 见,与 sham 组比较,6-OHDA 组及 LPS 组大鼠 NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65 表达水平显著升高,组间有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.001$);与 6-OHDA 组及 LPS 组相比较,DH+6-OHDA 及 DH+LPS 组 NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65 表达水平显著降低,组间有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.001$)。

2.4 复方地黄颗粒对模型大鼠黑质纹状体 TH、Iba1 蛋白表达的影响

由表 4、图 4 可见,与 sham 组比较,LPS 组及 6-OHDA 组 Iba1 表达水平显著升高,TH 表达水平显著降低,组间有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.001$);与 6-OHDA 组及 LPS 组相比较,DH+6-OHDA 组及 DH+LPS 组 Iba1 表达水平显著降低,TH 表达水平显著升高,组间有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.001$)。

表 1 复方地黄颗粒对 LPS 模型大鼠黑质纹状体炎症因子含量表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effect of compound Rehmannia granule on expression of inflammatory factors in substantia

nigra and striatum of LPS model rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别 Groups	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
假手术组 Sham group	177.48 $\pm$ 7.38	845.58 $\pm$ 7.12	467.33 $\pm$ 6.57
脂多糖模型组 LPS model group	212.06 $\pm$ 4.58 ^Δ	893.34 $\pm$ 5.02 ^Δ	374.31 $\pm$ 9.17 ^Δ
复方地黄颗粒+脂多糖组 DH+LPS group	197.79 $\pm$ 10.11 [▲]	858.02 $\pm$ 8.80 ^{▲▲}	453.87 $\pm$ 13.45 ^{▲▲}

注:与假手术组相比,^Δ $P < 0.001$;与 LPS 模型组相比,[▲] $P < 0.01$,^{▲▲} $P < 0.001$ 。(下表同)

Note. Compared with sham group, ^Δ $P < 0.001$. Compared with LPS model group, [▲] $P < 0.01$, ^{▲▲} $P < 0.001$. (The same in the following tables)

表 2 复方地黄颗粒对 6-OHDA 模型大鼠黑质纹状体炎症因子含量表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Effect of compound Rehmannia granule on the expression of inflammatory factors in

substantia nigra and striatum of 6-OHDA model rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别 Groups	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
假手术组 Sham group	187.80 $\pm$ 7.74	793.40 $\pm$ 11.62	438.32 $\pm$ 13.56
6-羟基多巴胺模型组 6-OHDA model group	223.21 $\pm$ 8.62 ^Δ	981.80 $\pm$ 6.33 ^Δ	375.94 $\pm$ 10.76 ^Δ
复方地黄颗粒+6-羟基多巴胺组 DH+6-OHDA group	203.02 $\pm$ 1.55 ^{▲▲}	862.35 $\pm$ 12.74 ^{▲▲}	403.13 $\pm$ 7.78 ^{▲▲}

表 3 复方地黄颗粒大鼠黑质纹状体 NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 3 Effect of compound Rehmannia granule on NF- κ Bp65 and p-NF- κ Bp65 protein

expression in substantia nigra and striatum of model rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别 Groups	NF- κ Bp65	p-NF- κ Bp65
假手术组 Sham group	0.53 $\pm$ 0.16	0.29 $\pm$ 0.11
6-羟基多巴胺模型组 6-OHDA model group	1.44 $\pm$ 0.15 ^{▲▲}	0.54 $\pm$ 0.04 [▲]
复方地黄颗粒+6-羟基多巴胺组 DH+6-OHDA group	0.64 $\pm$ 0.13 [■]	0.30 $\pm$ 0.10 [■]
脂多糖模型组 LPS model group	1.21 $\pm$ 0.14 ^{▲▲}	0.74 $\pm$ 0.25 ^{▲▲}
复方地黄颗粒+脂多糖组 DH+LPS group	0.69 $\pm$ 0.13 ^{ΔΔ}	0.28 $\pm$ 0.02 ^{ΔΔ}

注:与假手术组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.001$;与 LPS 模型组比较,^{ΔΔ} $P < 0.001$;与 6-OHDA 模型组比较,[■] $P < 0.05$,[■] $P < 0.001$ 。(下表同)

Note. Compared with sham group, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.001$. Compared with LPS model group, ^{ΔΔ} $P < 0.001$. Compared with 6-OHDA model group, [■] $P < 0.05$, [■] $P < 0.001$. (The same in the following tables)

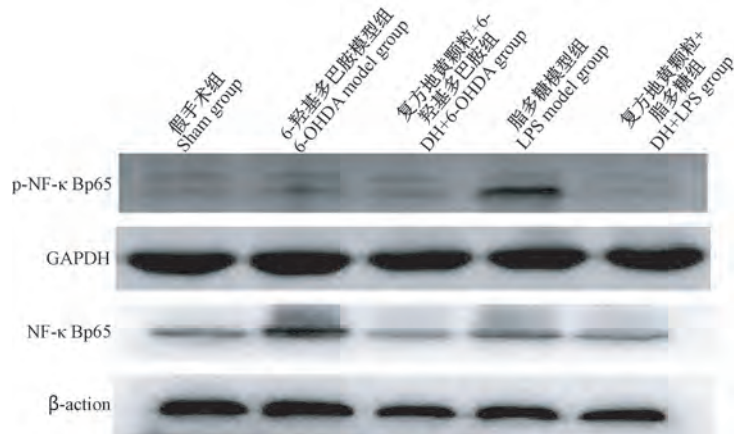


图 3 复方地黄颗粒对模型大鼠黑质纹状体 NF-κ Bp65 和 p-NF-κ Bp65 蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of compound Rehmannia granule on NF-κ Bp65 and p-NF-κ Bp65 protein expression in substantia nigra and striatum of model rats

表 4 复方地黄颗粒对模型大鼠黑质纹状体 TH、Iba1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of compound Rehmannia granule on TH and Iba1 protein expression in substantia nigra and striatum of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	Iba1	TH
假手术组 Sham group	0.64 ± 0.09	0.85 ± 0.06
6-羟基多巴胺模型组 6-OHDA model group	$0.96 \pm 0.10^{\Delta}$	$0.50 \pm 0.06^{\Delta\Delta}$
复方地黄颗粒+6-羟基多巴胺组 DH+6-OHDA group	$0.42 \pm 0.28^{\blacksquare\blacksquare}$	$0.64 \pm 0.05^{\blacksquare}$
脂多糖模型组 LPS model group	$0.86 \pm 0.06^{\Delta\Delta}$	$0.61 \pm 0.08^{\Delta\Delta}$
复方地黄颗粒+脂多糖组 DH+LPS group	$0.49 \pm 0.07^{\Delta\Delta}$	$0.89 \pm 0.13^{\Delta\Delta}$

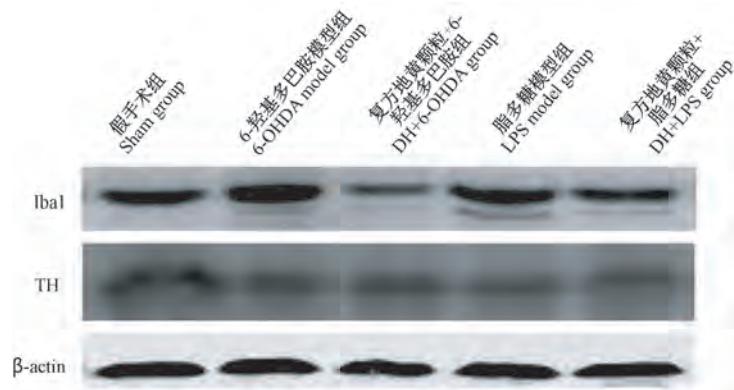


图 4 复方地黄颗粒对模型大鼠黑质纹状体 Iba1 和 TH 蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of compound Rehmanniagranule on Iba1 and TH protein expression in substantia nigra and striatum of model rats

3 讨论

PD 属中医学“颤振”“振掉”范畴。现代医学研究表明^[10-12], PD 发病是衰老、基因突变、环境神经毒素(重金属及杀虫剂)及脑外伤等多重因素共同作用的结果。实验研究表明, 复方地黄颗粒可通过抑制氧化应激、调控黑质多巴胺能神经元凋亡等机制发挥神经保护作用^[13-14], 但复方地黄颗粒的神经保护作用是否与抗炎作用相关尚待进一步研究证实。

小胶质细胞属中枢神经系统固有免疫监视细胞,

参与神经元的发育及神经突触的重塑等多种病理、生理过程^[15]。有研究表明, 过度激活的小胶质细胞可释放多种致炎因子或细胞毒性因子导致神经元损伤, 诱发或加速 PD、阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)等神经退行性疾病的病变进程^[16]。

LPS 为革兰氏阴性菌胞壁的主要成分, 广泛应用于炎症相关 PD 动物模型的制备^[17]。LPS 用于制备 PD 模型动物多采用腹腔注射方式, 其不足之处为不能通过血脑屏障, 且外周给药其刺激作用持续时间较短, 故不宜于长期实验动物模型的研究。本研究采用

黑质立体定位注射术将 LPS 直接注射于中脑黑质部,药物直接透过血脑屏障被注入黑质致密部。实验结果显示,该造模方法具有造模成功率高、症状持续较为持久的特征。

6-OHDA 为儿茶酚胺类神经递质多巴胺的羟基化衍生物,采用脑立体定位注射术可透过血脑屏障直接将其注射于中脑黑质区,在多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)作用下进入多巴胺能神经元,在神经元内被氧化产生过氧化氢、羟自由基等神经毒性物质,诱导氧化应激及线粒体功能障碍,加速黑质致密部多巴胺能神经元变性、丢失^[18],该造模方法多用于长期慢性 PD 实验动物模型的研究。本研究采用 LPS、6-OHDA 动物模型为研究对象,深入探讨复方地黄颗粒对模型大鼠小胶质细胞激活、炎症因子表达及神经行为学的干预作用。

NF- κ B 信号通路由 NF- κ B1 (p50)、NF- κ B (p52)、RelA (p65)、Rel B 和 Rel (c-Rel) 5 种家族成员构成^[19]。生理状态下,该蛋白家族成员以异二聚体的形式(以 p65/p50 异二聚体为主)与其抑制因子 I κ B (inhibitors of NF- κ B) 结合呈稳态形式存在于胞浆中。病理状态下,激活的 NF- κ B 信号通路通过正负反馈机制参与机体免疫炎症反应、细胞增殖及凋亡等病理生理过程^[20]。Muhammad 等^[21]研究表明,LPS 预处理的 C57BL/6 小鼠海马区细胞及 BV2 模型细胞其激活标志物 Iba1 及 p-NF- κ B 及 IL-1 β 等炎症因子表达水平显著升高,故抑制小胶质细胞 NF- κ B 信号通路激活及促炎因子过度表达将有助于 PD 的临床治疗。

复方地黄颗粒由熟地黄、丹参、钩藤、石菖蒲、全蝎、杭白芍、珍珠母 7 味药物组成。熟地黄味甘微温,入肝、肾经,长于滋阴养血、补肾填精。《长沙药解》曰其可“凉肝滋血,清风润木,……滋风木……,血脱甚良”。丹参味苦,微寒,归心、肝经,长于活血祛瘀,通络止痛。全蝎,味辛性平,入肝经,长于息风通络,解毒散结,镇惊止痛。《医宗必读卷十·痹》曰:“治风先治血,血行风自灭”,临床实践证实,丹参、全蝎合用共奏活血通络、养血息风之效,二药合用则息风之力倍增^[22]。石菖蒲味辛苦,性温,归心、胃经,长于化湿开胃、豁痰开窍、醒神益智。《本草备要》曰其可主“补肝益心,去湿逐风,……,风痹惊痫。”诸疾。钩藤甘苦,微寒,归肝、心包经,长于清热平肝,息风定惊。白芍味苦,性平,归肝、脾经,长于补血调经药,《神农本草经》曰:“主邪气腹痛,除血痹,……,利小便,益气”。钩藤、合用白芍共奏养血柔肝、息风止颤之功。珍珠母,咸、寒,归心、肝经,长于平肝潜阳,息风定惊。

临床实践表明,复方地黄颗粒功效以补益肝肾,祛瘀通络、息风见长,该方对 PD 患者失眠、抑郁及便秘等非运动症状有显著改善。

现代药理研究证实,熟地黄含有毛蕊花糖苷、玉叶金花苷酸、海胆苷等 13 种抗氧化活性成分^[23]。周艳等^[24]等研究表明,熟地黄多糖可提高亚急性衰老模型大鼠血肝、脑、肾脏器指数,降低肝、脑、肾组织丙二醛(MDA)含量表达。刘培建等^[25]研究表明,中、高剂量熟地黄多糖能够促进气血亏虚模型小鼠血清粒-巨噬细胞集落集落刺激因子含量,提升小鼠红细胞及血红蛋白表达水平。全蝎含有蝎毒、多糖、氨基酸及三甲胺、甜菜碱等活性成分,相关研究表明,全蝎对肿瘤、心脑血管疾病等临床各科疾病疗效显著^[26]。现代医学研究表明,丹参所含丹参酮、丹参酚酸等主要成分可通过多靶点、多途径显著改善微循环功能障碍,调节由抗动脉粥样硬化所致的心脑血管功能障碍,保护器官免受炎症损伤^[27-28]。现代药理研究表明,石菖蒲含 α -细辛醚(α -Asarone)、 β -细辛醚(β -Asarone)、丁香烯(caryophyllene)等药理活性挥发油,通过抗炎、调节免疫等药理作用对中枢神经系统功能发挥正、负双向调节作用,调节血脑屏障通透功能,抑制大脑神经元凋亡^[29-30]。现代药理研究证实,钩藤含黄酮、萜类、皂苷异、去氢钩藤碱(isocorynoxine)等药理成分,具有抗炎、降压、神经保护及平喘等功效^[31]。白芍含没食子酸、儿茶素、芍药苷、芍药内酯苷等药理活性成分,现代药理研究证实,白芍具有抗炎、抗氧化、养血保肝及神经保护等功效^[32]。王成龙^[33]研究证实,芍药苷、芍药内酯苷通过调控脑组织 cAMP/PKA 信号通路环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 含量发挥养血柔肝作用。珍珠母含大量碳酸钙、碳酸镁及丝氨酸等有机或无机成分,现代研究表明,其功效以镇静、抗炎、抗氧化应激等为主^[34]。临床研究表明,珍珠母对心脑血管、胃肠消化系统及精神类疾病均显示出较佳的疗效^[35-37]。

实验研究结果表明,6-OHDA、LPS 模型大鼠在造模后第 2 周经腹腔注射阿扑吗啡诱导出自患侧向健侧发起的首尾衔接的持续的自发性旋转行为,其证候表现与相关文献报道相符。与 6-OHDA 及 LPS 组比较,复方地黄颗粒灌胃后 DH+6-OHDA 组及 DH+LPS 组大鼠黑质纹状体 IL-1 β 、TNF- α 含量表达显著降低,IL-10 含量表达显著升高,复方地黄颗粒对模型大鼠神经行为学的干预作用与其抑制模型大鼠黑质纹状体促炎因子含量表达相关。

实验结果显示,与 sham 组比较,6-OHDA、LPS 模型组大鼠黑质纹状体 Iba1、NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65 表达水平显著升高,TH 表达水平显著降低。复方地黄颗粒灌胃后大鼠黑质纹状体 Iba1、NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65 表达水平显著降低,TH 表达水平显著升高。复方地黄颗粒通过抑制黑质纹状体小胶质细胞 NF- κ B 信号通路激活,下调 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子表达,显著改善模型大鼠神经行为学障碍。

综上所述,小胶质细胞激活及促炎因子高水平表达与 PD 的发病密切相关。复方地黄颗粒通过抑制模型大鼠黑质纹状体小胶质细胞激活,下调炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 含量表达调节模型大鼠神经行为学障碍。复方地黄颗粒对 PD 模型大鼠神经行为学异常的干预作用与其抗炎机制相关,本研究进一步丰富了复方地黄颗粒治疗 PD 的理论基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Selikhova M, Williams DR, Kempster PA, et al. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease [J]. Brain, 2009, 132(11): 2947-2957.
- [2] 陈丹丹,付文玉,庄宝祥,等. 骨髓间充质干细胞黑质内移植对帕金森病大鼠的治疗作用 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(1): 22-26.
Chen DD, Fu WY, Zhuang BX, et al. Therapeutic effects of transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into substantia nigra on the rat model of Parkinson's disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2013, 21(1): 22-26.
- [3] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models [J]. Neuron, 2003, 39(6): 889-909.
- [4] Hirsch EC. Altered regulation of iron transport and storage in Parkinson's disease [J]. J Neural Transm Suppl, 2006, 71: 201-204.
- [5] 徐鹏恒,何建成,王利,等. 复方地黄汤联合美多巴治疗帕金森病的临床疗效观察 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(2): 838-840.
Xu PH, He JC, Wang L, et al. Clinical efficacy observation on compound Dihuang Decoction combined with Levodopa in the treatment of Parkinson's disease [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(2): 838-840.
- [6] 张蕾,何建成. 何建成教授从肝肾论治帕金森病 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 23-25.
Zhang L, He JC. Experience of professor HE Jiancheng Treating Parkinson's disease with Dihuangcompound prescription [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2021, 39(2): 23-25.
- [7] 滕龙,洪芳,何建成,等. 复方地黄方调控 GSK3 β 信号转导通路缓解帕金森病异动症型大鼠的机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(4): 815-818.
Teng L, Hong F, He JC, et al. Study on mechanism of compound formula rehmannia on remission of rats model of levodopa-induced dyskinesia by regulation of Gsk3 β signal transduction pathway [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018, 36(4): 815-818.
- [8] 刘家岐,赵明,楚世峰,等. 黑质注射 LPS 构建亚急性帕金森病模型的评价 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(3): 431-437.
Liu JQ, Zhao M, Chu SF, et al. Evaluation of subacute Parkinson's disease model by substantia nigra injection LPS [J]. Chin Pharmacol Bulletin, 2020, 36(3): 431-437.
- [9] 洪乐鹏,汪光亮,王迪,等. SHH 信号通路的激活对帕金森病模型小鼠的保护及其机制 [J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(5): 586-592.
Hong LP, Wang GL, Wang D, et al. The protective effects and its mechanisms of purmorphamine on mice models of Parkinson's disease [J]. Chin J Neuroanat, 2017, 33(5): 586-592.
- [10] Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease [J]. J Neural Transm (Vienna), 2017, 124(8): 901-905.
- [11] Ball N, Teo WP, Chandra S, et al. Parkinson's disease and the environment [J]. Front Neurol, 2019, 19(10): 218-226.
- [12] Lill CM, Klein C. Epidemiologie und Ursachender Parkinson-Erkrankung [Epidemiology and causes of Parkinson's disease] [J]. Nervenarzt, 2017, 88(4): 345-355.
- [13] 王利,何建成. 复方地黄颗粒对帕金森病大鼠氧化应激干预作用 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(12): 2840-2842.
Wang L, He JC. Effect of compound Rehmannia granules on oxidative stress in rats with Parkinson's disease [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(12): 2840-2842.
- [14] 王利,何建成. 复方地黄颗粒对帕金森病大鼠细胞凋亡的干预作用 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(8): 4122-4125.
Wang L, He JC. Effects of Compound Dihuang Granules on apoptosis in rats with Parkinson's disease [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(8): 4122-4125.
- [15] Frost JL, Schafer DP. Microglia: architects of the developing nervous system [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(8): 587-597.
- [16] Xu L, He D, Bai Y. Microglia-mediated inflammation and neurodegenerative disease [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(10): 6709-6715.
- [17] Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical perspective: models of Parkinson's disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2464.
- [18] Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease [J]. Br J Pharmacol, 2011, 164(4): 1357-1391.
- [19] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF- κ B system [J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016, 8(3): 227-241.
- [20] Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors [J]. Trends Mol Med, 2007, 13(11): 460-469.
- [21] Muhammad T, Ikram M, Ullah R, et al. Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- κ B signaling [J]. Nutrients, 2019, 11(3): 648-668.
- [22] 徐鹏恒,夏菁,王利. 何建成分阶段治疗帕金森病的思路与方法 [J]. 中医文献杂志, 2018, 36(5): 39-42.
Xu PH, Xia J, Wang L. He Jian's ideas and methods for the treatment of Parkinson's disease [J]. J Tradit Chin Med Lit,

- 2018, 36(5): 39-42.
- [23] 沈华旦, 方江济, 郭鹏程, 等. 基于 HPLC-UV-DPPH 法的地黄和熟地黄药材抗氧化活性成分比较研究 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 582-588.
- Shen HD, Fang JJ, Guo PC, et al. Comparative study on antioxidant active components of Rehmanniaglutinosa and Rehmanniaglutinosa by HPLC-UV-DPPH [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2018, 49(3): 582-588.
- [24] 周艳, 杜莉杰, 郑旭亚, 等. 基于古法特色炮制前后的地黄饮片及其多糖对衰老模型大鼠的抗氧化作用比较 [J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2087-2093.
- Zhou Y, Du LJ, Zheng XY, et al. Comparison of antioxidant effects of Rehmanniaglutinosa decoction pieces and their polysaccharides on aging model rats before and after processing based on the characteristics of ancient methods [J]. Chin Pharm, 2020, 31(17): 2087-2093.
- [25] 刘培建, 苗明三, 高渐联. 熟地黄多糖对气血双虚小鼠全血细胞及血清粒-巨噬细胞集落刺激因子水平的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(38): 7543-7546.
- Liu PJ, Miao MS, Gao JJ. Effects of Rehmanniaglutinosa polysaccharide on the levels of whole blood cells and serum granulocyte macrophage colony stimulating factor in mice with Qi and blood deficiency [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2008, 12(38): 7543-7546.
- [26] 吴福林, 董庆海, 王涵, 等. 中药全蝎研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(12): 108-111.
- Wu FL, Dong QH, Wang H, et al. Research progress of scorpion [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2018, 20(12): 108-111.
- [27] 董帅, 王辉, 谢治深. 丹参功用本草考证及现代药理认识 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(11): 152-155.
- Dong S, Wang H, Xie ZS. Textual research and modern pharmacological understanding of Salvia miltiorrhiza [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2019, 21(11): 152-155.
- [28] 王乐琪, 张云帆, 李莎莎, 等. 丹参治疗微循环障碍作用机制的“成分-靶点-通路”多层次互作网络模型研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 439-450.
- Wang LQ, Zhang YF, Li SS, et al. Study on the “component target pathway” multi-level interaction network model of the mechanism of Salvia miltiorrhiza in the treatment of microcirculation disorders [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2020, 51(2): 439-450.
- [29] 陈俐. 石菖蒲药理作用的实验研究 [J]. 广州医学院学报, 2002, 30(4): 75-78.
- Chen L. Experimental study on pharmacological action of Acorus tatarinowii [J]. Acad J Guangzhou Med Coll, 2002, 30(4): 75-78.
- [30] 林晨, 安红梅. 石菖蒲的中枢神经系统药理作用研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(2): 230-233.
- Lin C, An HM. Study on the central nervous system pharmacological action of Acorus tatarinowii [J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med, 2014, 30(2): 230-233.
- [31] 崔莹. 钩藤化学成分和药理活性研究进展 [J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2015, 18(4): 16-18.
- Cui Y. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Uncaria hynchophylla [J]. J Xi'an Univ Arts Sci (Natural Sci Edit), 2015, 18(4): 16-18.
- [32] 叶先文, 夏澜婷, 任洪民, 等. 白芍炮制的历史沿革及化学成分、药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1951-1969.
- Ye XW, Xia LT, Ren HM, et al. Research progress on the processing history, chemical components and pharmacological effects of Radix Paeoniae Alba [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2020, 51(7): 1951-1969.
- [33] 王成龙. 基于白芍养血柔肝功效的芍药苷、芍药内酯苷药理作用研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2017.
- Wang CL. Study on pharmacological effects of paeoniflorin and paeoniflorin based on the efficacy of Radix Paeoniae Alba in nourishing blood and softening liver [D]. Beijing: University of Traditional Chinese Medicine; 2017.
- [34] 金艳. 珍珠母重镇安神药理作用及临床应用研究进展 [J]. 浙江中医杂志, 2017, 52(5): 388-389.
- Jin Y. Research progress on sedative pharmacological effect and clinical application of Pearl mother town [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med, 2017, 52(5): 388-389.
- [35] 竹青, 曹阳, 王明如. 珍珠母复方治疗高血压病临床疗效观察 [J]. 浙江中医学院学报, 2001, 25(1): 38.
- Zhu Q, Cao Y, Wang MR. Observation on the clinical efficacy of mother of Pearl compound in the treatment of hypertension [J]. J Zhejiang Univ Tradit Chin Med, 2001, 25(1): 38.
- [36] 高远, 张伟英, 于莉, 等. 林平诊治慢性胃炎临床经验 [J]. 新中医, 2019, 51(4): 302-304.
- Gao Y, Zhang WY, Yu L, et al. Lin Ping's clinical experience in the diagnosis and treatment of chronic gastritis [J]. J New Chin Med, 2019, 51(4): 302-304.
- [37] 邹天骏, 林江, 张荻娅, 等. 镇静安神类海洋中药的应用病证及配伍规律分析 [J]. 中医药导报, 2019, 25(19): 116-120.
- Zou TJ, Lin J, Zhang DY, et al. Analysis of disease syndrome and compatibility law of sedative and tranquilizing marine traditional Chinese medicine [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 25(19): 116-120.

[收稿日期] 2021-07-15

湛雪梅,彭西,叶俏波,等. 两种 UC 小鼠模型的病理损伤和肠道菌群对比研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 758-767.

Shen XM, Peng X, Ye QB, et al. Comparative study of intestinal flora and histopathological damage in mice with ulcerative colitis induced by DSS and TNBS [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 758-767.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.007

两种 UC 小鼠模型的病理损伤和肠道菌群对比研究

湛雪梅¹, 彭西^{2*}, 叶俏波³, 叶臻³, 邓庆⁴, 王娟¹, 温昌琳², 袁施彬^{1*}

(1. 西华师范大学生命科学学院, 四川 南充 637002; 2. 成都大学药学院, 成都 610106; 3. 成都中医药大学基础医学院, 成都 611137; 4. 四川扬克斯特科技有限公司, 成都 611135)

【摘要】 目的 用葡聚糖硫酸钠(DSS)和2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)构建小鼠溃疡性结肠炎模型,对比研究临床症状、结肠组织病理损伤和结肠菌群构成。**方法** C57BL/6 雄性小鼠 30 只,随机分为对照组、DSS 组和 TNBS 组。造模期 7 d。每日监测临床症状,包括体重和粪便隐血,造模结束时取结肠做组织病理诊断,使用 16S rDNA 测序技术检测结肠内容物的菌群组成。**结果** 临床显示,DSS 组从第 3 天开始排软便,第 5 天粪便隐血阳性,体重下降;TNBS 组第 2 天体重下降,造模前 4 d 排软便和稀便,且粪便隐血阳性。剖检显示,两个模型组的结肠重量均增加,仅 DSS 组结肠显著变短。组织病理学上,DSS 组结肠溃疡灶部位固有结构破坏及临近隐窝扩张,TNBS 组溃疡灶中见隐窝结构存留及隐窝细胞增生。两个模型组结肠菌群紊乱的特征存在差异。与对照组比较,软壁菌门和蓝藻菌门的丰度在 DSS 组无显著性变化而在 TNBS 组增加($P < 0.05$);酸杆菌门丰度在 DSS 组无显著性变化而在 TNBS 组显著降低($P < 0.05$);放线菌门和乳杆菌属的丰度在 DSS 组降低($P < 0.05$)而在 TNBS 组无显著性变化;拟杆菌属在 DSS 组丰度上升而在 TNBS 组显著下降($P < 0.05$)。**结论** DSS 和 TNBS 乙醇诱导的 UC 模型在临床症状、结肠组织病理损伤特征和肠道菌群结构既有共性,也有其自身特点。研究结果可为动物模型选择提供一定的理论参考。

【关键词】 溃疡性结肠炎;肠道菌群;病理组织损伤;16S rDNA;DSS;TNBS

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)06-0758-10

Comparative study of intestinal flora and histopathological damage in mice with ulcerative colitis induced by DSS and TNBS

SHEN Xuemei¹, PENG Xi^{2*}, YE Qiaobo³, YE Zhen³, DENG Qin⁴, WANG Juan¹, WEN Changlin², YUAN Shibin^{1*}

(1. College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637002, China. 2. College of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu 610106. 3. School of Basic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137. 4. Si Chuan Youngster Technology Co., Ltd, Chengdu 611135)

Corresponding author: YUAN Shibin. E-mail: yshibin1020@cwnu.edu.cn; PENG Xi. E-mail: pengxi@cdu.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金(81973742), 四川省教育厅科研创新团队(自然科学)项目(17TD0037), 西华师范大学英才基金项目(17YC357)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81973742), Creative Research Groups of Sichuan Provincial Education Department (17TD0037), Talent Foundation Project of China West Normal University (17YC357).

【作者简介】 湛雪梅(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:动物生态学。Email:2631242847@qq.com

【通信作者】 袁施彬(1971—),女,教授,博士,研究方向:野生动物营养生态。Email: yshibin1020@cwnu.edu.cn;

彭西(1973—),女,教授,博士,研究方向:药理学。Email: pengxi@cdu.edu.cn。

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective Mouse models of ulcerative colitis (UC) were established with sodium dextran sulfate (DSS) and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) to compare the differences in clinical symptoms, pathological lesions and colonic flora. **Methods** Thirty male C57BL/6 mice were randomly divided into a control group, DSS group and TNBS group. The modeling period was 7 days. Clinical symptoms, including body weight and fecal occult blood, were monitored daily. The colon was harvested at the end of modeling for histopathological diagnosis, and 16S rDNA sequencing technology was used to detect the bacterial composition of the colon contents. **Results** The clinical result showed that DSS induced diarrhea three days after treatment, fecal occult blood was positive, and body weight was decreased on the fifth day. TNBS treatment decreased body weight on the second day, soft and loose stools were observed from the first to the fourth day, and fecal occult blood was positive. At necropsy, the colon weight in both model groups was increased, whereas the colon in the DSS group was significantly shorter. Histopathologically, the ulcer foci in the colon exhibited a damaged histological structure, and the nearby crypts were dilated in the DSS group, whereas residual crypts accompanied by obvious cell proliferation were observed in the ulcer foci of the TNBS group. The characteristics of colon flora disturbances in the two model groups were different. Compared with the control group, the abundances of *Tenericutes* and *Cyanobacteria* were not significantly altered in the DSS group but were increased in the TNBS group ($P < 0.05$). The abundance of *Acidobacteria* was unchanged in the DSS group but significantly decreased in the TNBS group ($P < 0.05$). The abundance of *Actinobacteria* and *Lactobacillus* was significantly decreased in the DSS group but unchanged in the TNBS group ($P < 0.05$). The abundance of *Bacteroidetes* was significantly increased in the DSS group but decreased in the TNBS group ($P < 0.05$). **Conclusions** The UC models induced by DSS and TNBS/ethanol showed similar characteristics in clinical symptoms, pathological changes in colon tissue and intestinal microflora structure, but the two models also exhibited distinct characteristics. The result provide a theoretical reference for animal model selection.

【Keywords】 ulcerative colitis; intestinal flora; histopathological damage; 16S rDNA; DSS; TNBS

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

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的一种, 病因与遗传、免疫和环境因素有关, 主要引起结肠和直肠黏膜及黏膜下层的非特异性慢性炎症, 临床症状包括腹泄、腹痛、便血、呕吐和体重减轻等^[1]。UC 发病时, 可见肠道菌群失衡、肠道免疫反应过度, 并兼有肠道黏膜损伤^[2]。早在 1958 年, 就有将健康人的粪便功能菌移植进患者体内来治疗 UC 的报道^[3]。临床应用显示, 肠道粪菌移植治疗能修复肠道菌群、缓解过度免疫、减轻症状^[4], 但存在供体菌标准化和耐药菌传播等问题。UC 动物模型是研究发病学、筛选药物、评价药效的必要手段, 根据建模方法可分为化学性、免疫和基因修饰性两大类^[5]。其中, DSS (dextran sulfate sodium) 模型和 TNBS (2,4,6-trinitrobenzen sulfonic acid) 乙醇模型是最常用的化学性动物模型^[6-7]。至今尚未见有关于这两种模型肠道菌群改变的对比研究。因此, 本实验分别用 DSS 自由饮法和 TNBS 乙醇混合物灌肠法, 建立 C57BL/6 小鼠的 UC 模型, 对比研究 DSS 模型和 TNBS 模型的结肠病理损伤和菌群构成特征的差异性, 丰富了 UC 动物模型的基础研究资料。结果可为选择不同 UC 动物模型

提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 8 周龄的 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 30 只, 由四川大学提供【SCXK(川)2018-026】, 体重 20 ~ 22 g。动物饲养于成都中医药大学【SYXK(川)2017-179】。造模前适应性喂养 1 周, 室温控制 20 ~ 23℃, 湿度控制 50% ~ 60%, 自然光暗周期。所有实验操作均通过西华师范大学伦理委员会的审查 (审准号: CWN2021D031)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DSS (0216011090, MP Bio 公司)、TNBS (P2297, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司)、注射用盐酸替他明盐酸唑拉西洋 (外兽药证字 43 号, 法国维克有限公司)、便隐血试剂 (BA-2020B, 珠海贝索生物技术有限公司)、无水乙醇 (64-17-5, 成都金山化学试剂有限公司)、苏木素 (420699, 赛默飞世尔科技公司)、伊红 (392155, 赛默飞世尔科技公司)。

RM2235 石蜡切片机 (莱卡, 德国)、CX22 光学显微镜 (莱卡, 日本)、DM1000 徕卡显微成像系统

(莱卡,德国)、819 切片刀(莱卡,德国)、KD-98-II A 恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 分组和模型建立

将 30 只小鼠随机分为对照组、DSS 组和 TNBS 组,每组 10 只,5 只/笼。对照组正常饲喂。DSS 组小鼠自由饮用 4% DSS 药液,每只小鼠药液饮用量为 0.04 mL/(g·d)。TNBS 组小鼠造模前 24 h 禁食不禁水。舒泰(注射用盐酸替他明盐酸唑拉西洋)(0.1 mL/100 g)肌肉注射麻醉小鼠,用 8 号灌肠针从肛门处插入约 3 ~ 4 cm,将 TNBS/乙醇(5% TNBS:50%乙醇=1:1)混合液按 0.1 mL/20 g 体重剂量缓慢注入肠腔内。药液注射完后再注入约 0.2 mL 空气,保持倒立 1 min 后拔出灌肠针。小鼠苏醒后正常饲喂。造模期 7 d。

1.2.2 临床观察

造模期间每日定时称重,观察精神状况和粪便性状,并采用匹拉米洞半定量法测定便隐血。隐血/血便分数评分标准:加显色剂后立即呈紫蓝色(4分);10 s 内呈紫蓝色(3分);1 min 内呈紫红色(2分);1 ~ 2 min 内逐渐产生紫红色(1 min);判读时间内无颜色反应(0分)。

1.2.3 样品采集

结肠内容物样品:造模 7 d 后,用舒泰麻醉处死小鼠,取出结肠组织,置冰盒上,纵向剖开结肠,取结肠内容物放入 2 mL 无菌防冻管中,液氮速冻后,转移于-80℃冰箱,用于肠道菌群检测。将同组的每 3 只小鼠的粪便混合成 1 个样,取 3 个样进行菌群检测。

结肠组织样品:观察结肠的大体病变并拍照记录,测量结肠的长度和重量后,将结肠组织置 4%多聚甲醛液中固定 24 h 以上,用于组织病理诊断。

1.2.4 组织病理学观察

将固定好的结肠进行梯度乙醇脱水、透明、浸蜡和包埋,制成 5 μm 厚的石蜡切片,并进行苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察组织病理损伤情况。

1.2.5 结肠内容物的 16S rDNA 测序

使用 MN NucleoSpin 96 Soil DNA 试剂盒提取结肠内容物的细菌总 DNA,再用 1.8%琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 的浓度和纯度;使用特异性引物(338F-806R)进行 PCR 扩增;再使用 Monarch DNA 胶试剂

盒回收扩增产物。引物序列为 F:5'-ACTCCTACGGAGGCAGCA-3'; R:5'-GGACTACHVGGGTWCTAAT-3'。PCR 产物经定量和文库构建后,利用 Illumina HiSeq 2500 平台进行 16S rDNA V3 + V4 测序。

使用 Trimmomatic v0.33、cutadapt 1.9.1、FLASH v1.2.7 和 UCHIME v4.2 软件分析测序所得 Raw Reads,经过滤与识别,得到最终有效数据(effective reads)。将有效序列聚类为分类单元(OTUs),对 OTUs 进行物种注释,在门和属水平绘制物种分布柱状图和聚类树图。使用 Mothur 软件测算结肠微生物的 Alpha 多样性指数(包括 Ace 指数和 Shannon 指数),进行菌群丰度和多样性评估。用 QIIME 软件进行非度量多维标度法(Non-Metric Multi-Dimensional Scaling, NMDS)分析。最后通过 LefSe(Linear Discriminant Analysis (LDA) Effect Size)分析组间 Biomarker 的统计学差异。

1.3 统计学分析

用 SPSS 26.0 软件分析实验数据,用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示数据结果,用单因素方差法分析组间差异性。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 临床观察、结肠长度和重量变化结果

对照组小鼠精神状况良好,无腹泻、软便和便血。DSS 组小鼠从造模第 3 天粪便松软,随后软便现象日趋严重,至第 7 天排稀溏血便;小鼠精神逐渐萎靡、活动能力下降、毛发失去光泽。TNBS 组在造模第 1 天即有部分小鼠排软便,至第 3 天,粪便稀软不成形,随后渐趋正常(图 1A)。DSS 组从造模后第 5 天体重逐渐下降, TNBS 组从第 2 天急剧下降,随后逐渐上升(图 1C)。对照组粪便隐血检测结果均呈阴性;DSS 组第 5 天开始粪便隐血分数显著升高;TNBS 组部分小鼠在造模第 1 天检出粪便隐血阳性,第 4 天达最高,随后降低(图 1D)。

剖检观察:对照组结肠黏膜层的颜色和厚度正常;DSS 组结肠明显缩短、肠壁增厚、黏膜层颜色暗沉,局部见深褐色、隆起、点状或圆形或不规则形病灶(三角形区域);TNBS 组结肠颜色变红,见少量浅灰褐色,略高于黏膜表面的小病灶(红圈内,图 1B)。

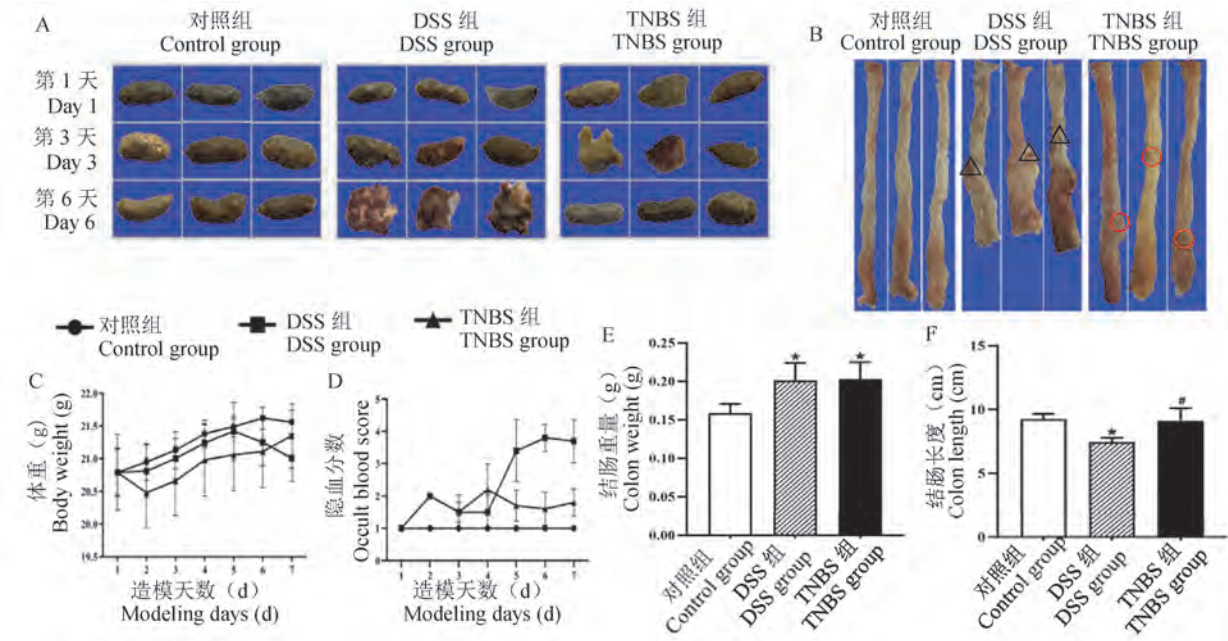
结肠重量:DSS 组和 TNBS 组的结肠重量较对

照组显著增加 ($P < 0.05$), DSS 组和 TNBS 组间无显著差异 ($P > 0.05$) (图 1E)。结肠长度: DSS 组结肠长度较对照组和 TNBS 组显著变短 ($P < 0.05$), 对照组和 TNBS 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 1F)。

2.2 小鼠结肠组织病理诊断结果

如图 2 所示, 对照组结肠的组织结构层次清晰, 黏膜层、黏膜下层和肌肉层清晰可见, 隐窝和杯状

细胞排列整齐。DSS 组结肠黏膜层形成溃疡灶, 坏死波及黏膜全层致固有结构消失, 结缔组织增生, 其间见数量不等的炎症细胞浸润 (三角形); 溃疡灶附近的隐窝扩张 (星号)。TNBS 组结肠黏膜层的隐窝上皮细胞和杯状细胞增生, 局部细胞层次增厚, 偶见分支结构形成 (箭头); 隐窝间结缔组织增生并伴有数量不等的炎性细胞浸润 (方框), 致隐窝间隙增宽。



注: A: 粪便性状变化; B: 剖检病变; C: 体重变化; D: 粪隐血分数变化; E: 结肠重量变化; F: 结肠长度变化; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与 DSS 组比较, # $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 各实验组小鼠体重、隐血分数、结肠长度和重量比较

Note. A. Changes of fecal traits. B. Anatomic appearance. C. Weight change. D. Fecal occult blood fraction changes. E. Changes in colonic weight. F. Changes in colonic length. Compared with the normal group, * $P < 0.05$. Compared with the DSS group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Comparison of body weight, fecal occult blood fraction, colonic length and weight of mice in different experimental groups

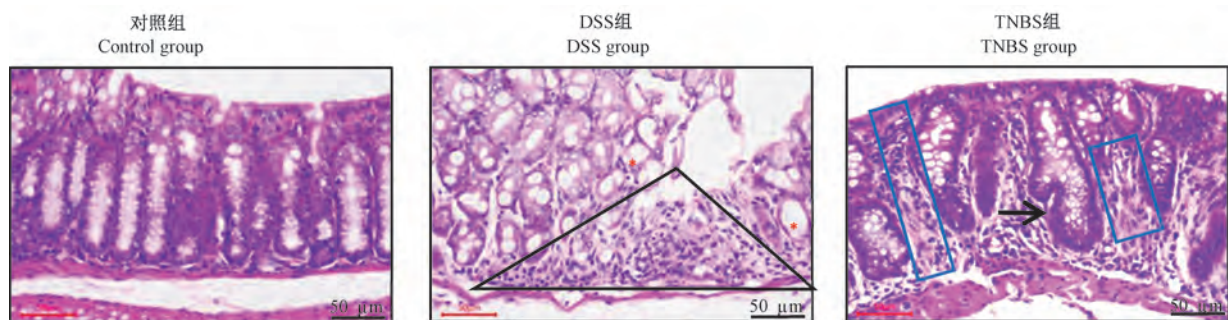


图 2 各组小鼠结肠的组织病理变化

Figure 2 Histopathological changes of mice colon in each group

2.3 小鼠肠道菌群测序结果

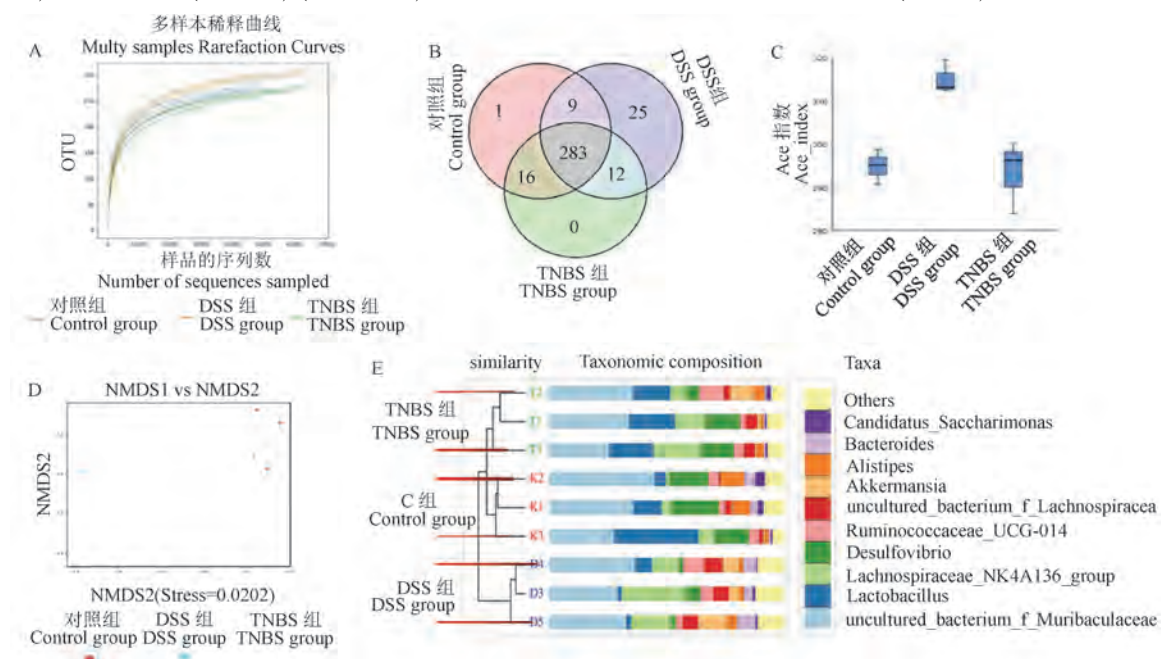
2.3.1 结肠内容物测序结果评估

此次测序共获得 1 185 788 对 Reads, 1 185 631 条 Clean Reads, 每个样品平均有 79 042 条 Clean Reads。各组样品的 GC 含量均在 54% 左右。

测序量与 OTUs 的相关曲线图 3A 显示, 测序量达一定数值后, OTU 数量值稳定, 样本曲线趋于平缓, 表明此次实验的测序数据量能全面反映样本中总的 OTUs 量。用 OTU 数量绘制 Venn 图 3B; 三组共有 283 个 OTU, 对照组和 DSS 组分别特有 OTU 为 1 个和 25 个。DSS 组 (329 个) 显著高于对照组 (309 个) 和 TNBS 组 (311 个) ($P < 0.05$)。

2.3.2 结肠内容物的菌群多样性分析

用 Alpha 多样性分析来反映菌群的丰度和多样性, 其中 shannon 指数用来估算样品中微生物的多样性, shannon 指数越大, 菌群多样性越大。本实验中各组间的 shannon 指数无显著差异 ($P > 0.05$)。Ace 指数代表菌群丰富度, Ace 指数越大, 样品中菌群的丰富度越高。与 TNBS 组 (293.38) 和对照组 (294.79) 相比, DSS 组 (314.95) 小鼠菌群的 Ace 指数最大 ($P < 0.05$) (图 3C)。经 NMDS 分析: 各组内样品距离接近, 菌群差异较小; 反之, 菌群差异较大 (图 3D)。UPGMA 聚类树图表明, 对照组和 TNBS 组菌群的亲缘关系更近 (图 3E)。



注: A: 样本稀释曲线; B: OTU 分析, 数值代表 OTU 数量; C: Ace 指数箱型图; D: NMDS 分析图, 同组样品使用同种颜色表示; E: 聚类树图。

图 3 结肠内容物的菌群丰度和多样性变化

Note. A. Sample dilution curve. B. The result of OTU analysis, the number represents the number of OTU. C. ACE index box chart. D. NMDS analysis diagram, in which each point represents a sample, and the samples in same group is represented by the same color. E. UPGMA Cluster tree diagram.

Figure 3 Changes in abundance and diversity of bacteria in colonic contents

2.3.3 肠道菌群物种注释和差异性分析

对门水平丰度前 10 的菌群进行统计, 其中拟杆菌门 (*Bacteroidia*) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*) 占比最大 ($> 75\%$)。与对照组相比, DSS 组拟杆菌门、变形菌门 (*Proteobacteria*)、*Patescibacteria*、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和脱铁杆菌门 (*Deferribacteres*) 相对丰度降低 ($P < 0.05$); 厚壁菌门、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 相对丰度增高 ($P < 0.05$)。TNBS 组拟杆菌门、变形菌门、*Patescibacteria*、脱铁杆菌门和酸杆菌门 (*Acidobacteria*) 相对丰度降低 ($P <$

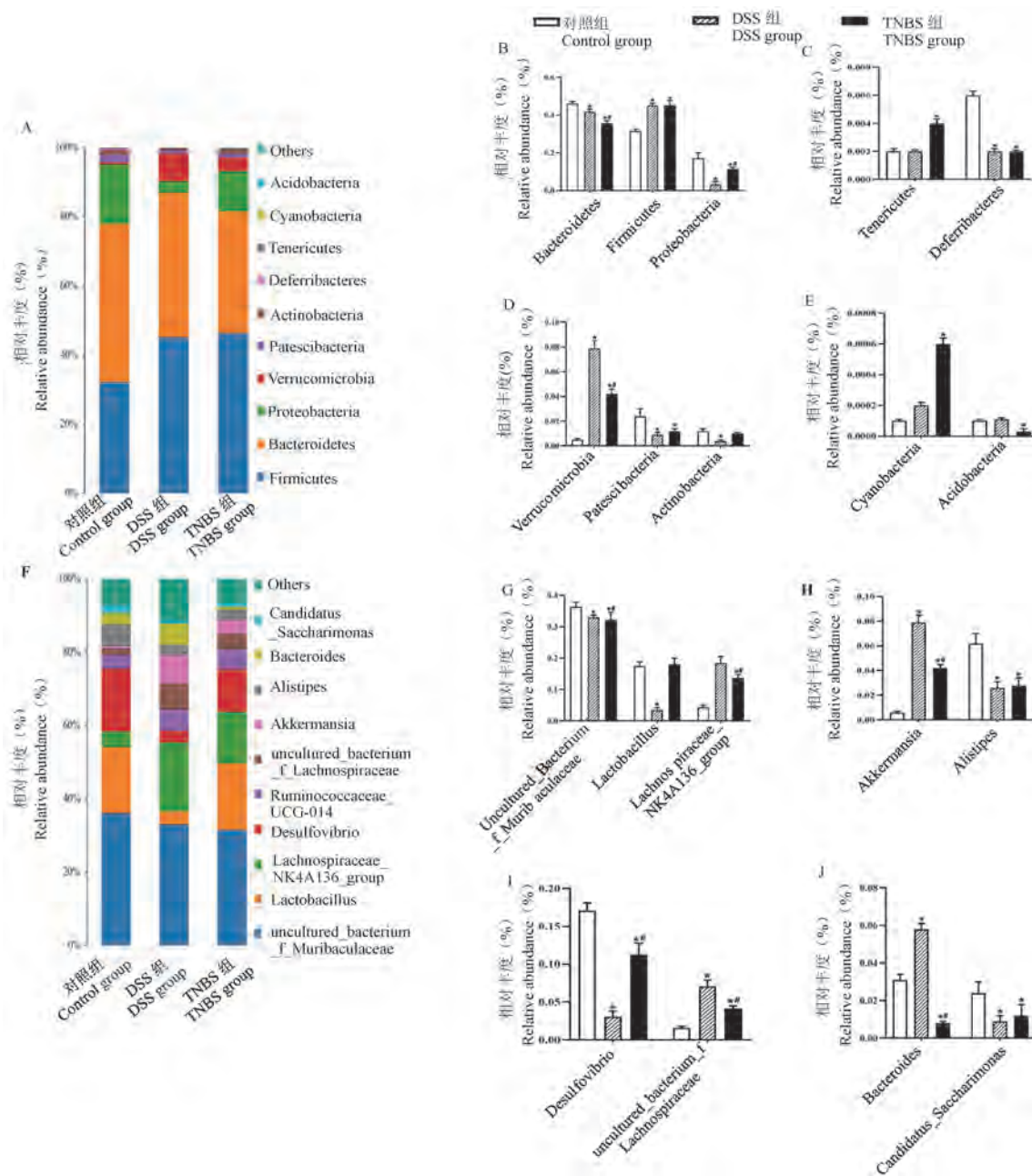
0.05), 厚壁菌门、疣微菌门、软壁菌门 (*Tenericutes*) 和蓝藻菌门 (*Cyanobacteria*) 相对丰度升高 ($P < 0.05$) (见图 4A, 4B, 4C, 4D, 4E)。

对属水平丰度前 10 的菌群进行统计分析。与对照组相比, DSS 组 *uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae*、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、*Alistipes* 和 *Candidatus_Saccharimonas* 相对丰度降低 ($P < 0.05$), *uncultured_bacterium_f_Lachnospiraceae*、*Akkermansia* 和拟杆菌属 (*Bacteroides*) 相对丰度上升 ($P < 0.05$); TNBS 组 *uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae*

bacterium_f_Muribaculaceae、脱硫弧菌属、*Alistipes*、拟杆菌属和 *Candidatus_Saccharimonas* 相对丰度降低 ($P < 0.05$), *Lachnospiraceae_NK4A136_group*、uncultured_ *bacterium_f_Lachnospiraceae* 和 *Akkermansia* 相对丰度升高 ($P < 0.05$) (见图 4F, 4G, 4H, 4I, 4J)。

通过 LefSe 分析比较各组间显著性差异物种, 3 组共有 28 个丰度靠前的显著性差异物种, 以 LDA

值大于 3.5 为筛选标准, 确定各个组中丰度较高的微生物。通过 LefSe 分析显示, DSS 组显著性最高的是 *Clostridium_sensu_stricto_1*、梭菌目 (*Clostridiales*)、梭菌科 (*Clostridiaceae*)、uncultured_ *bacterium_f_Lachnospiraceae* 和梭菌属 (*Clostridia*); TNBS 组显著性最高的是 *Eubacterium_xylophilum_group* (见图 5A, 5B)。

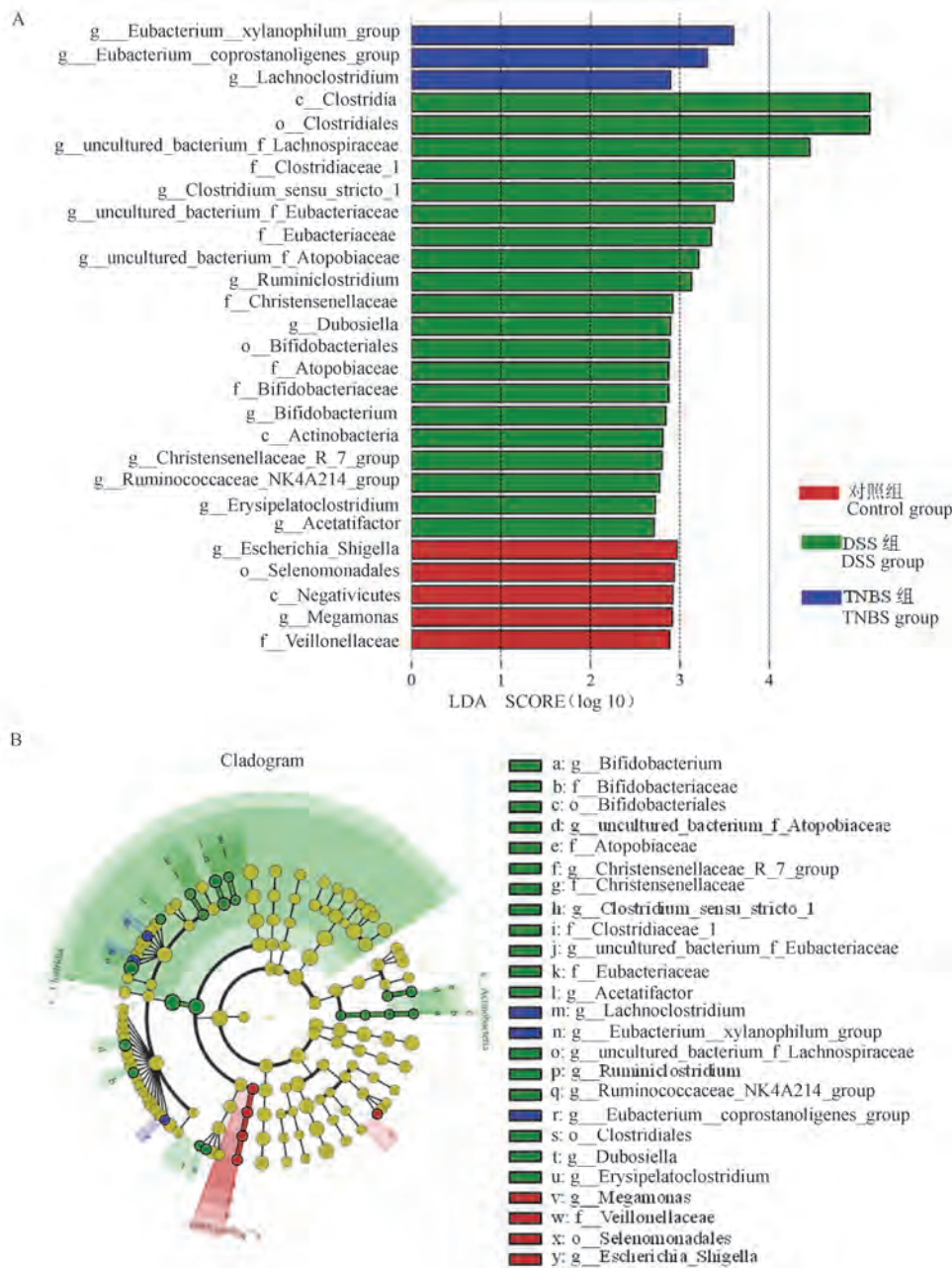


注: A: 门水平丰度前 10 的物种丰度柱状图; B、C、D、E: 各组门水平丰度前 10 的物种显著性; F: 各组属水平丰度前 10 的物种丰度柱状图; G、H、I、J: 各组属水平丰度前 10 存在显著性差异物种。

图 4 各组小鼠菌群组成和差异分析

Note. A. Bar chart of the top 10 species in horizontal abundance of each phyla. B, C, D, E. The top 10 species with significant differences in the level abundance of phyla. F. Bar charts of the top 10 species in horizontal abundance of each genus. G, H, I, J. The first 10 species showed significant differences in horizontal abundance among each group.

Figure 4 Microflora composition and difference analysis of each group



注:A:LDA 值分布柱状图;B:进化分支图。由内至外辐射的圆圈代表了由门至种的分类级别;在不同分类级别上的每一个小圆圈代表该水平下的一个分类,小圆圈直径大小与相对丰度大小成正比;着色原则为将无显著差异的物种统一着色为黄色,红色、绿色和蓝色分别代表对照组、DSS 组和 TNBS 组。

图 5 LefSe 显著性分析

Note. A. Histogram of LDA value distribution. B. Evolutionary branching. The circles radiating from the inside to the outside represent classification levels from phylum to species. Each small circle at different taxonomic levels represents a taxon at that level, and the diameter of the small circle is proportional to the relative abundance. The coloring principle was that the species without significant differences were uniformly colored yellow, red, green and blue represented the control group, DSS model group and TNBS model group, respectively.

Figure 5 Significance analysis of LefSe

3 讨论

UC 动物模型是研究发病机制和药物筛选的重要手段,其中 DSS 和 TNBS 诱导的 UC 模型最为常

用。已有研究报道,这两种模型均表现为肠道黏膜屏障功能降低、肠道免疫功能紊乱并触发炎症反应、肠道菌群失衡、肠道形态结构受损,与人体患者的损伤特征相似^[8-9]。但很少有文献资料系统研究

两种模型的差异性。本研究重点关注 DSS 和 TNBS 诱导的 UC 小鼠模型在临床症状、病理变化特征和肠道菌群构成上的差异。

临床症状显示, DSS 组和 TNBS 组小鼠均表现为稀便、血便和体重波动, 但各有自身特征。DSS 组从造模第 3 天, 稀便和血便症状逐渐加重; TNBS 组造模当天血便, 第 3 天时稀便和血便最严重, 随后逐渐恢复。本实验 DSS 组临床症状与已有研究较一致, 仅粪便性状改变的时间存在差异, 原因可能与不同的药液浓度、实验动物种属、造模周期等因素有关^[10]。也有研究报道 TNBS 小鼠血便症状先加重再恢复^[11-12]。两种模型病程进展的差异性与成模机制密切相关。DSS 不直接腐蚀肠壁, 而是缓慢渐进性损伤肠上皮细胞, 致细菌、肠内抗原等促炎物质进入黏膜层而引发炎症^[13]; TNBS 造模时, 乙醇灼伤肠黏膜后, TNBS 与组织内赖氨酸的 ϵ 基团结合形成完全抗原, 引起免疫应答性炎症反应^[14]。

剖检显示, 两种模型的结肠均表现为重量增加和溃疡灶形成。病理组织变化的共同特征为结肠黏膜上皮细胞和杯状细胞坏死、结缔组织增生和炎性细胞浸润。不同之处有二: 一是结肠溃疡灶结构不同, DSS 组溃疡灶部位固有层消失, 而 TNBS 组溃疡灶内残留隐窝结构; 二是隐窝病变特征不同, DSS 组隐窝扩张更明显, 胞核成分减少, 而 TNBS 组隐窝壁上的细胞核成分致密。已有研究显示, DSS 模型^[15-16]和 TNBS 模型^[17-18]的病理损伤特征相似, 包括结肠缩短、黏膜层结构受损、炎性水肿和炎性浸润。对人 UC 的研究显示, 结肠的组织病理变化包括上皮损伤、隐窝扩张、细胞增生和炎症反应^[8]。本实验中 TNBS 组发生明显的隐窝细胞增生, 与人 UC 的病变特征更接近, 提示 TNBS 模型可能更适用于人 UC 的发病机理和药物筛选研究。

门水平丰度的菌群测序结果显示两种模型的相同之处是: DSS 组和 TNBS 组拟杆菌门、变形菌门、*Patescibacteria* 和脱铁杆菌门的相对丰度都降低, 厚壁菌门和疣微菌门的相对丰度均升高; 不同之处是: 软壁菌门和蓝藻菌门的丰度在 TNBS 组增加而在 DSS 组无显著性变化; 放线菌门丰度仅在 DSS 组显著降低, 酸杆菌门丰度仅在 TNBS 组显著降低。属水平丰度的测序结果显示, DSS 组和 TNBS 组 *uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae*、脱硫弧菌属、*Alistipes* 和 *Candidatus_Saccharimonas* 的相对丰度降低, *uncultured_bacterium_f_Lachnospiraceae* 和

Akkermansia 的相对丰度升高; 区别在于乳杆菌属仅在 DSS 组丰度降低, 拟杆菌属在 DSS 组丰度上升而在 TNBS 组显著下降。结果表明, 两种 UC 模型的肠道菌群在门水平和属水平上均与对照组显著不同, 发生了明显的菌群结构紊乱。已有研究表明, UC 患者或 UC 模型动物不同门和属细菌的相对丰度改变, 均反映出肠道菌群结构紊乱^[19-22]。肠道菌群是肠道微生态系统的重要组成部分, 参与营养和能量供应、保护肠道粘膜屏障、调节宿主免疫^[3, 23-24]。本实验中, 肠道菌群结构紊乱可能加重结肠的组织病理损伤和功能紊乱。在 DSS 和 TNBS 模型中菌群变化, 会对结肠上皮屏障和免疫功能产生特定的干扰作用。因此本实验进一步分析了 3 种常见菌群变化对 UC 潜在的损伤机制。

在属水平上, 与对照组相比, 疣微菌门中的 *Akkermansia* 的相对丰度在两个模型组中都异常升高, 其中 DSS 组最高。部分研究认为, *Akkermansia* 相对丰度与结肠炎小鼠的组织病理损伤和炎症呈正相关^[25-26]。也有研究观察到它的丰度与肠道炎症呈负相关, 原因是 *Akkermansia* 中的艾克曼菌在人体肠道中定植, 有维持肠道菌群、保护肠粘膜、减轻肠道炎症和调节糖脂代谢等作用^[27-29]。因此, 艾克曼菌异常增多对机体是否有益存在争议, 还需进一步探究。

拟杆菌属是与炎症性肠病高度有关的微生物群^[30]。与对照组比较, DSS 组拟杆菌属相对丰度显著升高; TNBS 组相对丰度降低, 与已有研究结果一致^[31-32]。拟杆菌是一种中性菌, 若发生不稳定增殖则为致病菌, 吕志堂等^[33]发现拟杆菌属中的脆弱拟杆菌与结直肠癌和炎症性肠病密切相关。脆弱拟杆菌分为产肠毒素脆弱拟杆菌 (*enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF) 和非产肠毒素脆弱拟杆菌 (*nontoxigenic Bacteroides fragilis*, NTBF)^[34-35]。有研究发现^[36-37]结直肠癌患者肠道中的 ETBF 数量明显升高, 其可能的致癌机制包括干扰粘膜免疫反应、诱导上皮细胞变化等^[38]; 而 NTBF 通过产生胞外多糖保护结肠黏膜免受致炎因子侵害^[39], 抑制结肠炎和结直肠癌的发展^[40]。本实验 DSS 组中拟杆菌属的丰度升高是否与致病性 ETBF 增多有关, TNBS 组中拟杆菌属丰度降低是否与 NTBF 减少有关, 尚需进一步研究。

与对照组相比, DSS 组中乳杆菌属丰度显著降低, TNBS 组无差异。乳杆菌属中乳酸菌是厚壁菌

门中的有益菌,具有抗致病菌、增强上皮屏障、调节免疫等作用,主要通过分泌短链脂肪酸阻止致病菌入侵和增殖,恢复肠道菌群平衡,减少肠道炎症的产生^[41-42]。因此,本实验中,乳酸菌减少与 DSS 组小鼠的结肠上皮损伤和炎症反应的活跃密切相关。

综上所述,DSS 和 TNBS 建立的 UC 小鼠模型在临床症状、结肠组织病理损伤和肠道菌群组成上均有异同,实验结果不仅为 UC 发病机理的研究提供理论依据,也可作为筛选 UC 治疗药物及药效研究时选择不同动物模型提供参考。

参 考 文 献(References)

- [1] Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [2] Shen ZH, Zhu CX, Quan YS, et al. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(1): 5-14.
- [3] 刘鸿程, 宋光. 肠道菌群在溃疡性结肠炎中的研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26(14): 2819-2823.
Liu HC, Song G. Research progress of intestinal flora in ulcerative colitis [J]. *Med Recapitulate*, 2020, 26(14): 2819-2823.
- [4] 林艺娟, 丁健, 黄循钊, 等. 粪菌移植对小鼠实验性结肠炎 TLR4 信号通路及肠黏膜屏障的影响 [J]. *中国微生态学杂志*, 2021, 33(3): 256-263, 270.
Lin YJ, Ding J, Huang XR, et al. Effects of fecal microbiota transplantation on TLR4 signaling pathway and intestinal mucosal barrier in mouse model of experimental colitis [J]. *Chin J Microecol*, 2021, 33(3): 256-263, 270.
- [5] 石磊, 李军祥, 史瑞, 等. 溃疡性结肠炎的动物模型研究进展 [J]. *解放军医药杂志*, 2020, 32(12): 107-112.
Shi L, Li JX, Shi R, et al. Research progress on animal models of ulcerative colitis [J]. *Med Pharm J Chin PLA*, 2020, 32(12): 107-112.
- [6] 何育佩, 杜正彩, 侯小涛, 等. 溃疡性结肠炎动物模型研究进展 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(2): 423-433.
He YP, Du ZC, Hou XT, et al. Research review on animal models of ulcerative colitis [J]. *Modern Tradit Chin Med Mater-Mater-World Sci Tech*, 2020, 22(2): 423-433.
- [7] Kritarth MS, Paresh K. Animal models for preclinical drug research on ulcerative colitis: a review [J]. *J Sci Soc*, 2018, 45(2): 80-83.
- [8] 鲁香凤, 张书信, 傅丽元, 等. 人溃疡性结肠炎与小鼠模型的组织病理学变化比较及机制探讨 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(5): 597-602.
Lu XF, Zhang SX, Fu YL, et al. Comparison of histopathological changes in large intestinal mucosa between human ulcerative colitis and a induced rat model by Sodium Dextran Sulfate [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(5): 597-602.
- [9] Bilsborough J, Fiorino MF, Henkle BW. Select animal models of colitis and their value in predicting clinical efficacy of biological therapies in ulcerative colitis [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2020, 16(5): 567-577.
- [10] 陈素傲, 金世柱. 葡聚糖硫酸钠诱导鼠溃疡性结肠炎模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 142-146.
Chen SA, Jin SZ. Murine model of dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 142-146.
- [11] 燕玉奎, 王志旺, 郭玫, 等. 红芪对小鼠溃疡性结肠炎的作用及其物质基础研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(21): 2698-2701.
Yan YK, Wang ZW, Guo M, et al. Effect of Radix Hedysari on mice ulcerative colitis and its material basis [J]. *Chin J Clin Pharm*, 2019, 35(21): 2698-2701.
- [12] 董瑞娟, 黄翔, 葛东宇, 等. 肠泰胶囊改善三硝基苯磺酸诱导的小鼠实验性结肠炎的作用及其机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(3): 1202-1206.
Dong RJ, Huang X, Ge DY, et al. Effects and mechanism of Changtai Capsule on trinitrobenzene sulfonic acid induced colitis in mice [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 34(3): 1202-1206.
- [13] Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental models of inflammatory bowel diseases [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2015, 1(2): 154-170.
- [14] 张瑶, 颜宏利, 周海玥, 等. 化学法建立溃疡性结肠炎动物模型的研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(27): 4384-4392.
Zhang Y, Yan HL, Zhou HY, et al. Animal models of ulcerative colitis developed with chemicals [J]. *World Chin J Digestology*, 2015, 23(27): 4384-4392.
- [15] 刘丽, 康安, 刘春样, 等. 清肠化湿方对溃疡性结肠炎小鼠炎症及肠道菌群的影响 [J]. *南京中医药大学学报*, 2021, 37(1): 47-53.
Liu L, Kang A, Liu CX, et al. Effects of Qingchang Huashi Decoction on inflammation and gut florain ulcerative colitis mice [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2021, 37(1): 47-53.
- [16] 施丽婕, 刘苏仪, 于潇, 等. 化瘀通阳方对溃疡性结肠炎模型大鼠肠道菌群和氨基酸代谢的影响 [J]. *中医杂志*, 2020, 61(19): 1731-1737.
Shi LJ, Liu SY, Yu X, et al. Effect of Huayu Tongyang Prescription on intestinal flora and amino acid metabolism in rats with ulcerative colitis [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 61(19): 1731-1737.
- [17] 赖慧敏, 黄敏聪, 楼招欢, 等. 天台乌药对 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎模型大鼠的抗炎作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 37-44.
Lai HM, Huang MC, Lou ZH, et al. The effect of Tiantai Radix Linderae on a rat model of ulcerative colitis induced by TNBS [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(2): 37-44.
- [18] 石岩, 姚俊, 许亚平. BC-1215 抑制三硝基苯磺酸诱导的小鼠肠黏膜炎症反应 [J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(9):

- 2241–2247.
- Shi Y, Yao J, Xu YP, et al. BC-1215 inhibits trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice [J]. J Clin Pathol Res, 2020, 40(9): 2241–2247.
- [19] 余今菁, 李欢, 胡邱宇, 等. 基于高通量测序技术的溃疡性结肠炎患者肠道菌群多样性研究 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2018, 47(4): 460–465.
- Yu JJ, Li H, Hu QY, et al. Research on gut microbiota diversity in patients with ulcerative colitis by high-throughput sequencing [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2018, 47(4): 460–465.
- [20] 李云, 戴岳, 夏玉凤. 溃疡性结肠炎内源性代谢物和肠道菌群变化研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(9): 907–913.
- Li Y, Dai Y, Xia YF. Research progress on changes of endogenous metabolites and intestinal flora in ulcerative colitis [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2017, 31(9): 907–913.
- [21] 陈健, 张梁坤, 谷文超, 等. 半夏泻心汤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2871–2880.
- Chen J, Zhang LK, Gu WC, et al. Effect of Banxia Xiexin Decoction on intestinal flora of mice with ulcerative [J]. Chin J Chin Mater Med, 2021, 46(11): 2871–2880.
- [22] 吴昊, 于小红, 王焕君, 等. 雷公藤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 387–396.
- Wu H, Yu XH, Wang HJ, et al. Effect of Tripterygium wilfordii on intestinal flora in mice with ulcerative colitis induced by Dextran Sodium Sulfate [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2020, 51(2): 387–396.
- [23] Chen YH, Michalak M, Agellon LB. Importance of nutrients and nutrient metabolism on human health [J]. Yale J Biol Med, 2018, 91(2): 95–103.
- [24] Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic immunity and the microbiota [J]. Immunity, 2017, 46(4): 562–576.
- [25] Ring C, Klopfeisch R, Dahlke K, et al. Akkermansia muciniphila strain ATCC BAA-835 does not promote short-term intestinal inflammation in gnotobiotic interleukin-10-deficient mice [J]. Gut Microbes, 2019, 10(2): 188–203.
- [26] Bian XY, Wu WR, Yang LY, et al. Administration of Akkermansia muciniphila ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced ulcerative colitis in mice [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 2259.
- [27] 陈凯迪, 严建. 艾克曼菌与炎症性肠病的研究进展 [J]. 江苏医药, 2021, 47(2): 200–203.
- Chen KD, Yan J. Advances in research on Akkmanian and inflammatory bowel disease [J]. Jinagsu Med J, 2021, 47(2): 200–203.
- [28] Bajer L, Kverka M, Kostovcik M, et al. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(25): 4548–4558.
- [29] Earley H, Lennon G, Balfe Á, et al. The abundance of Akkermansia muciniphila and its relationship with sulphated colonic mucins in health and ulcerative colitis [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 15683.
- [30] Zhang SL, Wang SN, Miao CY. Influence of microbiota on intestinal immune system in ulcerative colitis and its intervention [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1674.
- [31] Liu JL, Gao YY, Zhou J, et al. Changes in serum inflammatory cytokine levels and intestinal flora in a self-healing Dextran Sodium Sulfate-induced ulcerative colitis murine model [J]. Life Sci, 2020, 263(1): 118587.
- [32] Wu ZC, Zhao ZL, Deng JP, et al. Sanhuang Shu' ai decoction alleviates DSS-induced ulcerative colitis via regulation of gut microbiota, inflammatory mediators and cytokines [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109934.
- [33] 吕志堂, 许晓娜, 张怡君. 脆弱拟杆菌在炎症性肠病、结直肠癌促进、调控及防治中的作用 [J]. 微生物学杂志, 2020, 40(4): 1–8.
- Lv ZT, Xu XN, Zhang YJ. Role of Bacteroides fragilis in the promotion regulation and prevention of inflammatory bowel disease and colorectal cancer [J]. J Microbiol, 2020, 40(4): 1–8.
- [34] Elahi M, Nakayama-Imahiji H, Hashimoto M, et al. The human gut microbe Bacteroides thetaiotaomicron suppresses toxin release from Clostridium difficile by inhibiting autolysis [J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(2): 187.
- [35] Zheng L, Luo M, Kuang G, et al. Capsular polysaccharide from Bacteroides fragilis protects against ulcerative colitis in an undegraded form [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 570476.
- [36] Keenan JJ, Aitchison A, Purcell RV, et al. Screening for enterotoxigenic Bacteroides fragilis in stool samples [J]. Anaerobe, 2016, 40: 50–53.
- [37] Haghi F, Goli E, Mirzaei B, et al. The association between fecal enterotoxigenic B. fragilis with colorectal cancer [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 879.
- [38] Wong SH, Zhao L, Zhang X, et al. Gavage of fecal samples from patients with colorectal cancer promotes intestinal carcinogenesis in germ-free and conventional mice [J]. Gastroenterology, 2017, 153(6): 1621–1633.
- [39] Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Science, 2016, 352(6289): 1116–1120.
- [40] Lee YK, Mehrabian P, Boyajian S, et al. The protective role of Bacteroides fragilis in a murine model of colitis-associated colorectal cancer [J]. MSphere, 2018, 3(6): e00587–18.
- [41] Zhang Z, Lv J, Pan L, et al. Roles and applications of probiotic Lactobacillus strains [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(19): 8135–8143.
- [42] Wang G, Liu Y, Lu Z, et al. The ameliorative effect of a Lactobacillus strain with good adhesion ability against Dextran Sulfate Sodium-induced murine colitis [J]. Food Funct, 2019, 10(1): 397–409.

田威龙, 蔡文晶, 刘笑笑, 等. 小型猪 2 型糖尿病模型肠道微生物分析 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 768-776.

Tian WL, Qi WJ, Liu XX, et al. Analysis of intestinal microflora in mini-pigs with type 2 diabetes mellitus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 768-776.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.008

小型猪 2 型糖尿病模型肠道微生物分析

田威龙, 蔡文晶, 刘笑笑, 司景磊, 陈奎蓉, 程锋, 李月月, 吕冬玲, 梁靓,
高九昱, 奉玲丽, 莫家远, 兰干球, 梁晶*

(广西大学动物科学技术学院, 南宁 530004)

【摘要】 目的 近期研究证据表明, 肠道微生物与 2 型糖尿病 (T2DM) 等代谢性疾病有关, 相关机制研究多以啮齿类动物为模型, 而在更适合研究人类疾病的猪模型上却鲜有报道。**方法** 为了探究小型猪 T2DM 模型中肠道微生物的组成和结构的变化, 本研究以广西巴马小型猪为动物模型, 通过高脂高糖饮食诱导 T2DM, 建模成功后采集 T2DM 发病组 (T2DM 组) 和普通饮食饲喂的对照组 (CN 组) 个体的新鲜粪便样品, 采用 16S rRNA 基因测序技术进行肠道微生物组成与结构的比较分析。**结果** 结果发现, T2DM 组个体的肠道微生物的多样性发生了明显下降; 在门水平上, 与 CN 组相比, T2DM 组厚壁菌门丰度显著增加 ($P < 0.05$), 而拟杆菌门丰度下降; 在属水平, PCoA 分析发现 CN 组和 T2DM 组组成显著差异, T2DM 组独有与产琥珀酸相关的光冈菌属, 两组比较和 LEfSe 分析发现两组间存在多个显著性差异的菌属: 颤螺旋菌属、普氏菌属和消化球菌属等在 CN 组显著富集, *g_Intestinibacter* 在 T2DM 组中显著富集; 功能预测未发现两组存在显著差异的代谢通路, 两组均主要富集在氨基酸的生物合成、碳新陈代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢以及糖酵解和糖异生等方面。**结论** 本研究发现了 2 型糖尿病小型猪肠道微生物的变化特征和与糖尿病发生密切关联的潜在微生物, 为研究肠道微生物与 2 型糖尿病的关联及其作用机制提供了理论依据。

【关键词】 小型猪; 糖尿病; 肠道微生物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0768-09

Analysis of intestinal microflora in mini-pigs with type 2 diabetes mellitus

TIAN Weilong, QI Wenjing, LIU Xiaoxiao, SI Jinglei, CHEN Kuirong, CHENG Feng, LI Yueyue,
LYU Dongling, LIANG Liang, GAO Jiuyu, FENG Lingli, MO Jiayuan, LAN Ganqiu, LIANG Jing*

(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Corresponding author: LIANG Jing. E-mail: liangjing@gxu.edu.cn

【Abstract】 Objective Recent studies have shown that intestinal microorganisms are associated with metabolic diseases, such as type 2 diabetes mellitus (T2DM), and the reported mechanisms are mostly based on rodent models, but rarely reported in pig models, which are closer to human biology. **Methods** To explore changes in composition and structure of intestinal microorganisms in a mini-pig model of T2DM, the Guangxi Bama mini-pig was provided a high-fat/high-sugar diet to induce T2DM. After successful induction of T2DM, fresh fecal samples were collected from individuals in the T2DM and control (CN group, fed a normal diet) groups, and 16S rRNA gene sequencing technology was used to analyze the composition and structure of intestinal microorganisms. **Results** The sequencing result showed that the diversity of intestinal microorganisms was decreased in T2DM group versus CN groups. At the phylum level, the abundance

【基金项目】 国家自然科学基金 (81860150), 广西自然科学基金 (2018GXNSFAA294038, 2017GXNSFBA198157), 广西研究生教育创新计划资助项目 (YCSW2020006)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81860150), Guangxi Natural Science Foundation of China (2018GXNSFAA294038, 2017GXNSFBA198157), Innovation Project of Guangxi Graduate Education (YCSW2020006).

【作者简介】 田威龙 (1996—), 男, 硕士, 研究方向: 猪遗传育种研究。Email: 2103755661@qq.com

【通信作者】 梁晶 (1989—), 男, 助理教授, 博士, 研究方向: 猪遗传育种研究。Email: liangjing@gxu.edu.cn

of Firmicutes and Bacteroides was significantly increased and decreased, respectively, in T2DM group compared with the CN group. At the genus level, principal coordinates analysis showed that the composition of the CN group was significantly different from that of T2DM group, and the T2DM group had a unique genus of *Mitsuokella* related to succinic acid production. Comparison of the two groups and linear discriminant analysis effect size analysis showed that several bacteria exhibited significant differences between the two groups, such as *Oscillospira*, *Prevotella* and *Peptococcus*, which were significantly enriched in the CN group, and *g__Intestinibacter*, which was significantly enriched in the T2DM group. There were no significant differences in metabolic pathways between the two groups. The two groups were mainly enriched in pathways assigned the biosynthesis of amino acids, carbon metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism, glycolysis and gluconeogenesis. **Conclusions** In this study, we found the characteristics of intestinal microorganism variation and the potential microorganisms closely associated with the occurrence of T2DM in mini-pigs. These findings provide a theoretical basis for the study of the association and related mechanisms between intestinal microorganism and T2DM.

【Keywords】 mini-pig; diabetes mellitus; intestinal microflora

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

糖尿病(DM)是当前威胁全球人类健康最重要的慢性非传染性疾病之一,对公共卫生产生严重威胁。2型糖尿病(T2DM)是胰岛素分泌不足或胰岛素分泌受损引起的代谢综合征,是DM的主要类型。据估计,T2DM患者的数量将从2016年的4.5亿增加到2040年的6.42亿^[1]。除了遗传因素外,全球T2DM患病率的快速增长与营养环境的快速变化密切相关,环境风险因素可通过改变肠道细菌菌群增加患糖尿病的风险^[2]。

得益于测序技术的快速发展,在过去的几年中,有关肠道微生物组的知识有了很大的发展。16S rRNA基因高通量测序发现,哺乳动物在门水平的核心肠道微生物主要是拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、变形菌门和疣微菌门^[3]。肠道微生物组的活动具有重要的代谢功能,这在肥胖症和糖尿病的发生、发展中可能都很重要^[4]。将肠道微生物群与宿主健康和代谢性疾病发展联系起来的因果证据大多来自啮齿动物的研究^[5-6]。然而,重要的差异仍然存在,人类和老鼠胃肠道的一个重要区别是,老鼠的盲肠相对于整个胃肠道的大小比较大,相比之下,人类的盲肠相对较小且没有明确的功能^[6]。此外,盲肠是小鼠体内重要的发酵部位,小鼠发酵能力的增加可显著影响肠道微生物的多样性、组成和功能^[7]。因此,必须谨慎地将小鼠研究和人类研究进行直接的借鉴。

猪与人在生理结构和主要器官大小等方面都较为相似,是理想的医学模型,然而其虽然肥胖却不易患T2DM^[8]。本研究选用广西巴马小型猪为动物模型,是长期近交培育形成的可用于T2DM模型研究的理想素材^[9]。通过高脂高糖饮食诱导产生

T2DM,采集新鲜粪便样品,采用16S rRNA基因测序技术比较T2DM组和CN组小型猪肠道微生物组成差异,补充了小型猪肠道微生物与T2DM发生的关联证据,为利用小型猪研究人类T2DM的发病机制提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究使用的10头6月龄,体重约为19 kg的雌性广西巴马小型猪(普通级)均来自广西大学巴马小型猪繁育场封闭群【SCXK(桂)2018-0003】。在最初1周的适应期中,对所有个体饲喂标准饮食(表1)。随后,随机选择5只小型猪作为对照组(CN组),继续常规食物饮食,而其余5只小型猪改为高脂高糖饮食诱导6个月直至其患病(T2DM组)。高脂高糖饮食配方为:标准饮食饲料+37%蔗糖+10%油脂。实验经广西大学伦理委员会审批(GXLL2018-006)。

表1 CN组标准饮食营养成分表

Table 1 Nutrition composition of standard diet of CN group	
营养成分 Nutrients	含量(%) Content(%)
粗蛋白 Crude protein	16.00
粗纤维 Crude fiber	6.00
粗灰质 Coarse gray matter	8.00
钙 Calcium	0.60
总磷 Total phosphorus	1.00
赖氨酸 Lysine	0.95
蛋氨酸 Methionine	0.27
氯化钠 Common salt	0.80

1.1.2 主要试剂与仪器

DNA 抽提试剂盒 E. Z. N. A.® soil DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.), AxyPrep DNA 胶回收试剂盒 (Axygen Biosciences, Axgen, U.S.). 小型离心机 (ABSON MiFly-6, 合肥艾本森科学仪器有限公司, 中国), 电泳仪 (DYY-6C, 北京市六一仪器厂, 中国), PCR 仪 (ABI GeneAmp® 9700 型, ABI, 美国), 测序仪 (Illumina Miseq, Illumina, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 表型测定和样品采集

在实验进行的 0、2、4、6 月称量体重,并在空腹 16 h 后于前腔静脉采血测量血糖水平。建模成功时收集新鲜粪便样品于 1.5 mL 无菌冻存管中,迅速放入液氮速冻,后保存于 -80 °C 冰箱保存,直至使用。

1.2.2 DNA 提取和测序

为了进行 16S rRNA 测序,将粪便样品根据 E. Z. N. A.® soil DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.) 说明书进行总 DNA 抽提,使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量。以纯化的细菌基因组 DNA 为模板,对 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行扩增和 DNA 测序,使用的引物是 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR 反应体系 20 μ L: 5 $\times$ TransStart FastPfu 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 上下游引物各 0.8 μ L, TransStart FastPfu 0.4 μ L, 模板 DNA 10 ng, 补 ddH₂O 至 20 μ L。扩增程序如下: 95 °C 预变性 3 min, 27 个循环 (95 °C 变性 30 s,

55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 然后 72 °C 稳定延伸 10 min, 最后在 4 °C 进行保存, 扩增产物经凝胶电泳检测后送上海美吉生物医药科技有限责任公司使用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序。

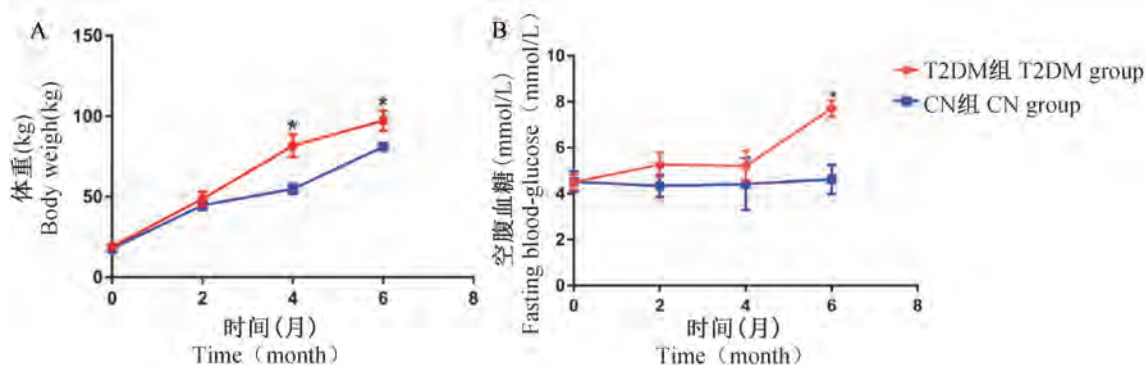
1.2.3 数据分析

使用 fastp 软件^[10] 和 FLASH^[11] 软件对原始测序序列进行质控和拼接; 基于默认参数, 使用 QIIME2 流程中的 DADA2 插件^[12] 对质控拼接之后的优化序列进行降噪处理, 获得 ASV (Amplicon Sequence Variant) 代表序列和丰度信息。基于 Silva 16S rRNA 数据库 (v 138), 使用 QIIME2 中的 Naive bayes 分类器对 ASVs 进行物种分类学分析。

2 结果

2.1 体重与空腹血糖变化

本研究发现实验进行到 4 个月和 6 个月时, T2DM 组的体重极显著高于 CN 组 ($P < 0.01$) (图 1A)。CN 组空腹血糖在整个实验时期变化不明显, 而 T2DM 组的空腹血糖呈上升趋势, 在实验进行到 6 个月 (7.7 ± 0.164) mmol/L 时空腹血糖显著高于 CN 组 ($P < 0.05$) (图 1B)。参考 2010 年 WHO 针对人类颁布的糖尿病诊断标准: 空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L 或任意血糖 ≥ 11.1 mmol/L 即判定为糖尿病患者, 结合国家实验动物专家委员会简报 (2018 年第 47 期) 中对巴马小型猪糖尿病诊断标准应大于现有空腹血糖测定最高值 6.77 mmol/L 的设定, 可以判定本研究广西巴马小型猪 T2DM 模型构建成功。



注: 与 CN 组相比, 干预 4、6 月后, T2DM 组体重具有显著性差异, * $P < 0.05$ 。与 CN 组相比, 干预 6 月后, T2DM 组空腹血糖具有显著性差异, * $P < 0.05$ 。

图 1 体重和空腹血糖变化

Note. Compared with the CN group, the weight of T2DM group was significantly different at 4 and 6 months after intervention, * $P < 0.05$. Compared with CN group, fasting blood glucose in T2DM group was significantly different at 6 months after intervention, * $P < 0.05$.

Figure 1 Changes in body weight and fasting blood glucose

2.2 样本序列信息

本研究对 CN 组和 HFD 组小型猪肠道微生物 16S rRNA 的 v3-v4 区进行高通量测序,对原始序列进行质控拼接之后共获得 576 918 条优化序列,使用 QIIME2 流程中的 DADA2 插件对获得的优化序列进行降噪处理共获得 1587 个 ASV,分为 17 个门、24 个纲、47 个目、82 个科、200 个属和 330 个种。

2.3 Alpha 多样性分析

为了评估微生物群落多样性,首先,对单个样

本进行归一化处理,通过 QIIME2 平台将每个样本内的 ASVs 抽平为 29 202 条序列。然后,利用抽平后的序列计算了细菌物种的多样性指数 (Shannon、Simpson) 和丰富度指数 (Chao1、ACE、Sobs),CN 组和 HFD 组 0、7、15、30 d 不同时期的 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao 指数、ACE 指数和 Sobs 指数之间均无显著性差异,但是 T2DM 组的多样性指数和丰富度指数普遍低于 CN 组 (表 2)。

表 2 CN 组和 T2DM 组的 Alpha 多样性

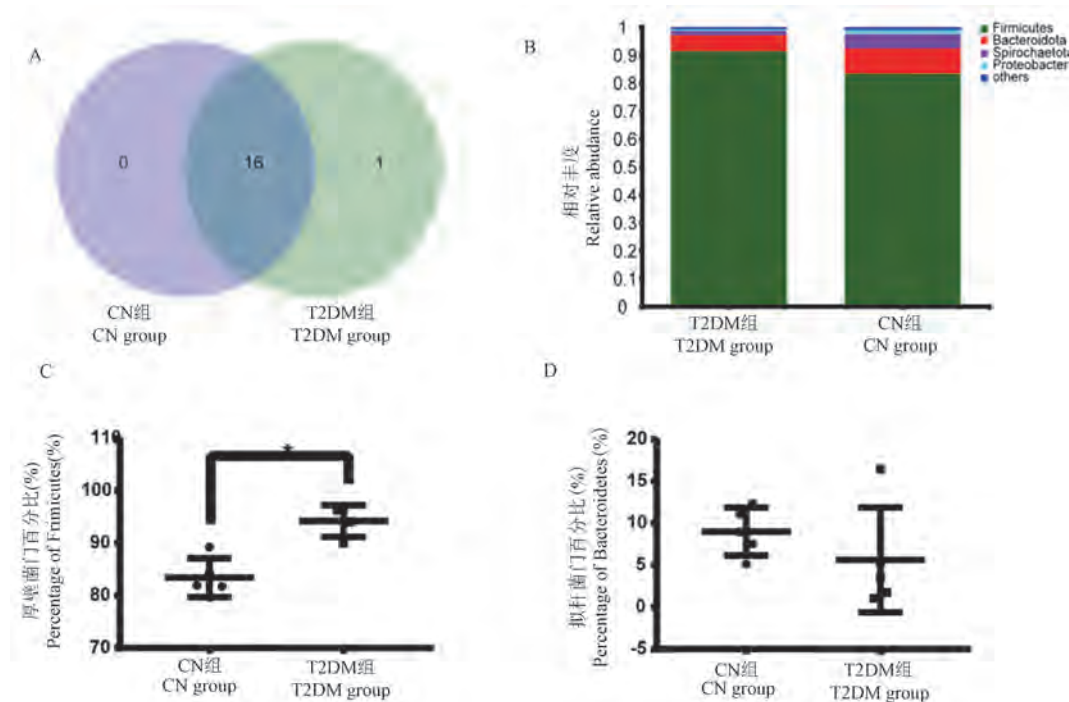
Table 2 Alpha diversity of the CN group and the T2DM group

组别 Groups	Sobs	ACE	Chao	Shannon	Simpson
CN 组 CN group	439.80 ± 24.09	440.70 ± 24.46	440.40 ± 24.38	4.34 ± 0.19	0.05 ± 0.01
T2DM 组 T2DM group	329.00 ± 41.80	329.50 ± 41.96	329.20 ± 41.87	3.80 ± 0.24	0.07 ± 0.01
P 值 P value	0.0508	0.0512	0.0508	0.1105	0.2564

2.4 物种组成及其变化

在门水平上,检测到 CN 组和 T2DM 组共 17 个门,其中两组共有 16 个门,T2DM 组有 1 个特有的门 (图 2A)。CN 组和 T2DM 组的优势门分别为厚壁菌门和拟杆菌门,均占据了各组总数的 90% 以上

(图 2B)。厚壁菌门和拟杆菌门的在两组的比例不同,其中厚壁菌门在 T2DM 组的比例显著高于 CN 组 ($P < 0.05$) (图 2C),拟杆菌门在两组中虽然无显著性差异,但 T2DM 组中的比例要低于 CN 组 (图 2D)。



注: A: Venn 展示的是 T2DM 组和 CN 组共有的门; B: 条形图展示的是两组物种组成; C: 箱型图展示的是厚壁菌门在两组差异; D: 箱型图展示的是拟杆菌门在两组差异。

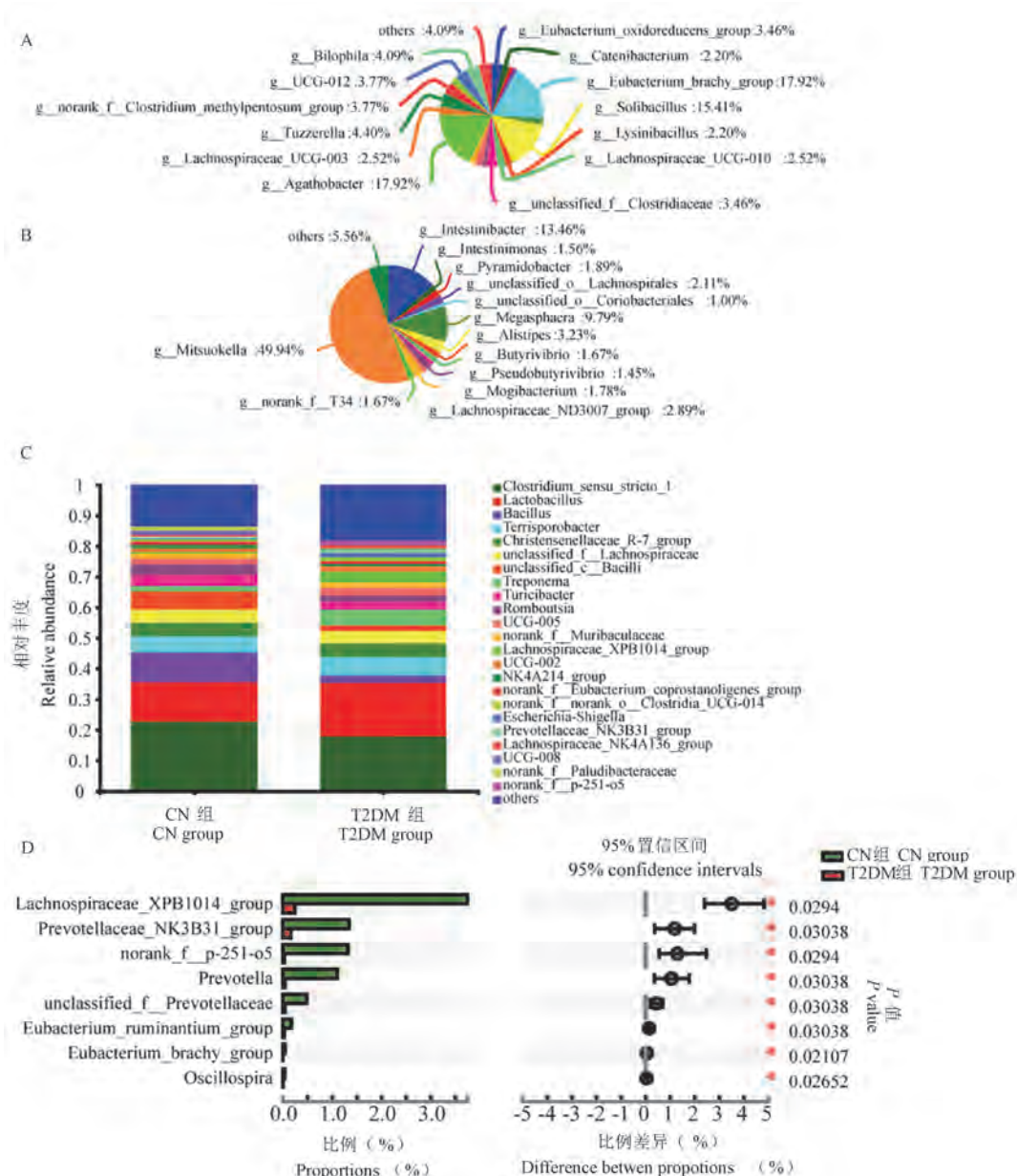
图 2 T2DM 组和 CN 组肠道微生物在门水平的组成和差异

Note. A. Venn shows the common phyla of the T2DM group and the CN group. B. The bar chart shows the species composition of the two groups. C. The box chart shows the differences between Firmicutes in the two groups. D. The box chart shows the differences between Bacteroidetes in the two groups.

Figure 2 Composition and difference of intestinal microflora at phylum level between T2DM group and CN group

在属水平上,共鉴定到 200 个属水平菌,其中 CN 组和 T2DM 组共有的属有 146 个,CN 组有 25 个特有的属,其中排名前 3 的属分别是 *Agathobacter*、*Eubacterium_brachy_group* 和 *Solibacillus* (见图 3A); T2DM 组有 29 个特有的属,其中排名前 3 的属分别是光冈菌属、*g_norank_f_T* 和 *Intestinibacter* (见图

3B)。CN 组和 HFD 组的优势均属主要为 *Clostridium_sensu_stricto_1* 和乳杆菌属 (见图 3C)。此外,发现两组存在显著差异的菌属:普氏菌属、颤螺旋菌属、*Eubacterium_ruminantium_group* 和 *Prevotellaceae_NK3B31_group* 等 8 个菌属在 CN 组的丰度显著高于 T2DM 组 ($P < 0.05$) (图 3D)。



注:A:CN 组特有菌属;B:T2DM 组特有菌属;C:T2DM 组和 CN 组在属水平的物种组成;D:T2DM 组和 CN 组在属水平的物种差异。

图 3 T2DM 组和 CN 组肠道微生物在属水平的组成与差异

Note. A. CN group endemic bacteria. B. T2DM group endemic bacteria. C. The bar chart shows the species composition of T2DM group and CN group at the species level. D. The bar chart shows the differences of T2DM group and CN group at the genus level.

Figure 3 Composition and difference of intestinal microflora at genus level between T2DM group and CN group

2.5 微生物组成差异

为了探讨 CN 组和 T2DM 组的微生物组成是否具有差异, 利用主坐标 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 分析 CN 组和 T2DM 组微生物在门和属水平上的组成。我们发现, 在门水平上有部分样品略有交叉 (见图 4A), 但是在属水平上样品可以按照不同分组完全分开 (见图 4B)。

使用 LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) 分析来识别在门、纲、目、科、属分类水平上负责区分 CN 组和 T2DM 组的关键肠道微生物。共发现了 27 个差异项, 其中 26 个在 CN 组中富集, 1 个在 T2DM 组中富集, CN 组中的差异项远远多于 T2DM 组。LDA 分析结果 (见图 5) 显示 26 个在 CN 组中富集的菌群分别为: 密螺旋体属、颤螺旋菌属、普氏菌属、消化球菌属、螺旋体目、球菌科、普氏菌科、螺旋体科、*g__Lachnospiraceae_XPB1014_group*、*c__Spirochaeti*、*p__Spirochaetota*、*g__prevotellaceae_NK3B31_group*、*g__norank_f__p_251_o5*、*f__p_251_o5*、*g__norank_f__Ruminococcaceae*、*g__unclassified_f__*

prevotellaceae、*g__UCG_009*、*g__Eubacterium_brachy_group*、*g__Solibacillus*、*g__unclassified_o__Oscillospirales*、*f__unclassified_o__Oscillospirales*、*f__norank_o__Bradymonadales*、*g__norank_f__norank_o__Bradymonadales*、*c__Desulfuromonadia*、*o__Bradymonadales*; 1 个在 T2DM 组中富集菌群是: *g__Intestinibacter*。

2.6 肠道微生物组功能预测分析

由于肠道菌群可调节宿主的代谢途径, 使用 PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) 获得样本基因家族的丰度, 然后, 将基因家族信息与对应的 KEGG 功能数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) 进行比对, 获得每个样本中对应的功能信息和丰度信息。本研究发现 CN 组和 T2DM 组之间功能无显著性差异, 均主要富集在氨基酸的生物合成、碳新陈代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢以及糖酵解和糖异生等方面 (见图 6)。

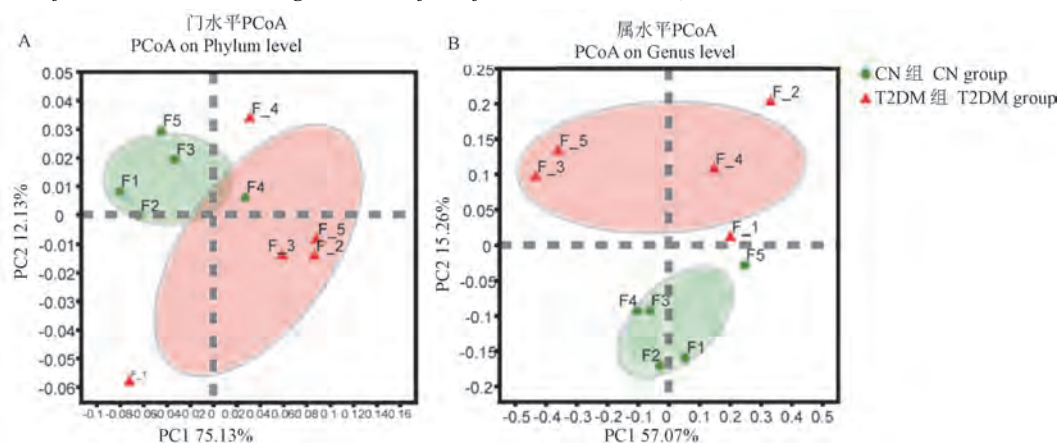


图 4 T2DM 组和 CN 组肠道微生物在门和属水平的 PCoA 分析

Figure 4 PCoA analysis of intestinal microorganisms in the T2DM group and CN group at phylum and genus levels

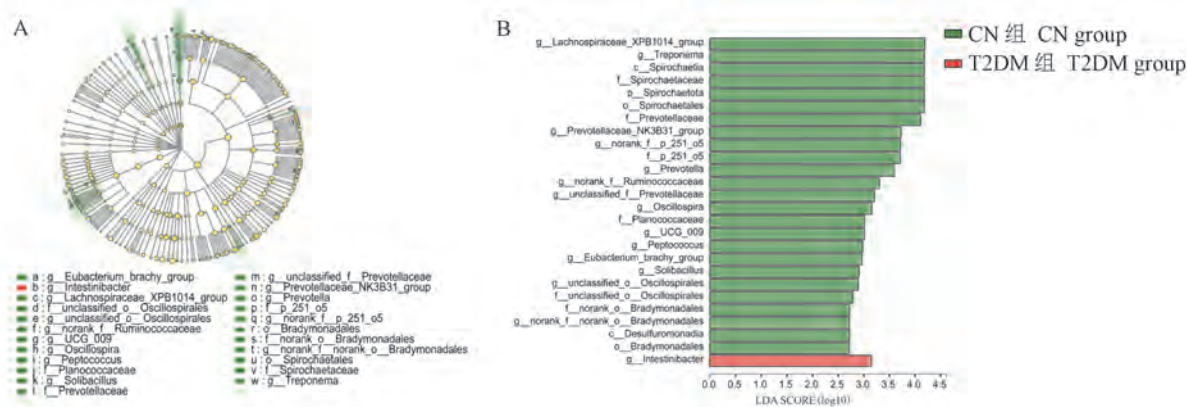


图 5 CN 组和 T2DM 组分支图和柱形图

Figure 5 Cladogram and column diagram of CN group and T2DM group

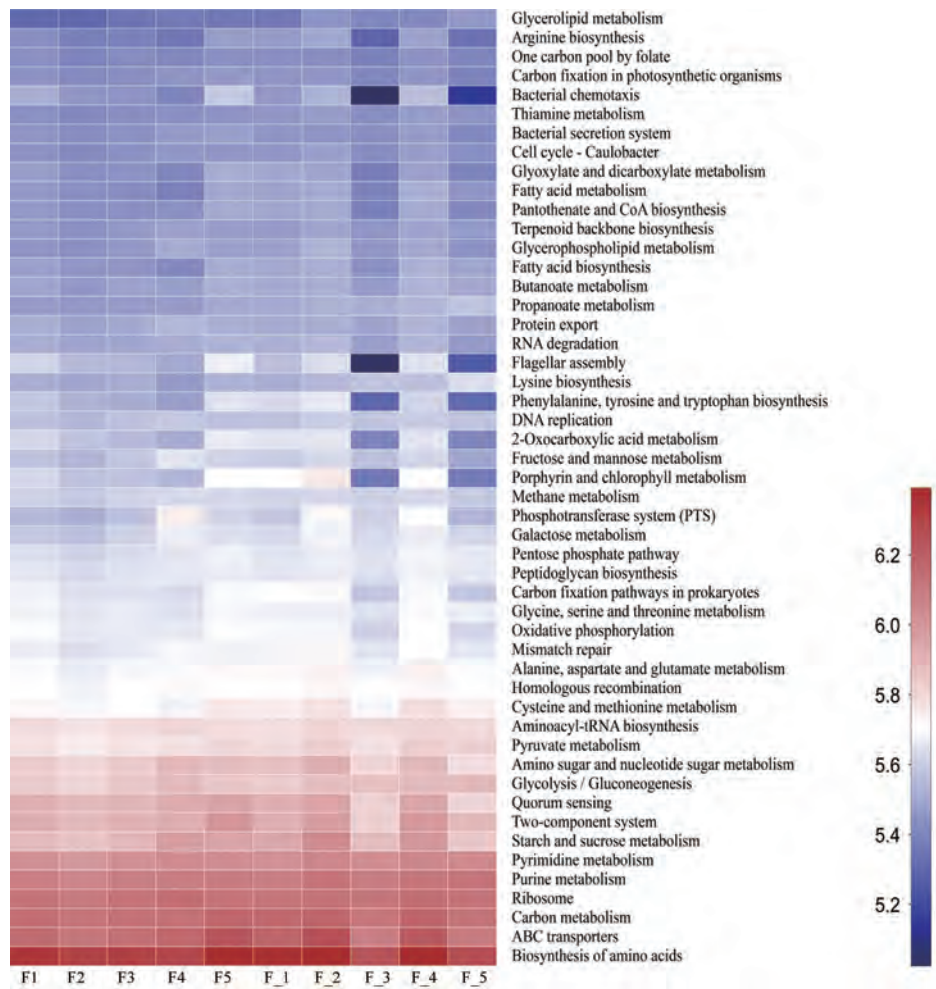


图 6 CN 组和 T2DM 组 KEGG 三级代谢通路热图

Figure 6 Heat map of KEGG level 3 metabolic pathway in CN and T2DM groups

3 讨论

在过去的 10 余年中,肠道微生物群在代谢紊乱(如人类肥胖和 2 型糖尿病)发展过程中所起的作用备受关注。这在一定程度上是由于新一代测序技术的引入,加上粪便样本可获得性的增加。肠道微生物与 T2DM 发生有关的证据正在迅速积累。本研究以广西巴马小型猪为动物模型,通过高脂高糖饮食构建 T2DM 模型,发现与正常饮食组相比,T2DM 组肠道微生物的多样性下降并且菌群结构发生改变。此外,还通过 LEfSe 分析寻找可能与 T2DM 密切相关的肠道微生物,这些结果补充了猪肠道微生物与 T2DM 相关的证据。

本研究发现 T2DM 小型猪肠道微生物的 Alpha 多样性降低,Li 等^[13]通过对来自我国北方糖尿病患者的肠道微生物进行分析,发现与健康个体相比,糖尿病患者的肠道菌群多样性显著降低。T2DM 患

者肠道微生物多样性的降低可引起一定程度的肠道细菌营养不良,并干扰肠道菌群与宿主之间的相互作用。Le 等^[14]发现肠道微生物组成多样性较低的受试者显示出体重增加更多、胰岛素敏感性降低、血脂异常和炎症标记物增加,而细菌丰度的增加仅仅是反映了健康和多样化的饮食,还是直接有助于抵抗 T2DM 仍有待确定。此外,CN 组和 T2DM 组微生物 PCoA 分析发现,CN 组和 T2DM 在门水平和属水平上的组成存在明显差异。Larsen 等^[15]在 2010 年首次研究了 2 型糖尿病患者和对照组患者肠道菌群的差异,结果表明,不同类群的微生物群组成在门水平上存在显著差异。

在门水平,CN 组和 T2DM 组的优势门均为厚壁菌门和拟杆菌门,饮食改变了其在两组中的比例,其中厚壁菌门在 T2DM 组的比例显著高于 CN 组($P < 0.05$),拟杆菌门在两组中虽然无显著性差异,但在 T2DM 组中的比例低于 CN 组。自 2005 年 Ley

等^[16]发现肥胖小鼠中拟杆菌门的丰度低于瘦小鼠,而厚壁菌门比例增加以来,许多研究都发现了类似的结果。这主要是因为厚壁菌门的代谢多样性高于拟杆菌门(分别为 348 条代谢途径和 76 条代谢途径),可以从饮食中获取更多能量^[17]。拟杆菌门主要通过产生丙酸向宿主提供能量,因此当拟杆菌门比例下降时,不仅降低了微生物多样性,还可能影响能量代谢^[18]。此外,拟杆菌门的减少还意味着乙酸和丙酸的产量显著减少,而丙酸可以促进肠道糖异生,影响能量和葡萄糖稳态,因此拟杆菌门的降低可能与糖尿病的发生有关^[19]。

在属水平,T2DM 组有 29 个特有的属,其中含量最多的属是光冈菌属。Serena 等^[20]发现光冈菌属是产生琥珀酸的成员之一。循环中的琥珀酸是一种由微生物群和宿主共同产生的代谢物,体内琥珀酸水平的升高与葡萄糖稳态的损害有关^[21]。事实上,高琥珀酸水平与多种人类疾病有关,包括心血管疾病^[22]和 T2DM^[23]相关。还发现了 CN 组和 T2DM 组显著差异的菌属,比如:颤螺旋菌属、普氏菌属和 *norank_f__p-251-o5* 等在 CN 组显著富集。颤螺旋菌属是一种从未被培养过的神秘细菌属,人们对其在肠道中的生态作用或生理特性知之甚少,使用 16S rRNA 测序却发现其是人类粪便微生物群的主要成分之一^[24]。Goodrich 等^[25]发现颤螺旋菌属的成员是高度遗传的,在较瘦的受试者中富集,这与本文的研究一致。此外,颤螺旋菌属是鸟类、鱼类哺乳动物(老鼠)在食期间盲肠中唯一增加的属,因为颤螺旋菌属能够降解宿主聚糖(如唾液酸和葡萄糖醛酸)^[26],这在一定程度上解释了为什么颤螺旋菌属常富集在较瘦个体中。

为了寻找与 T2DM 密切相关的肠道微生物,使用 LEfSe 分析来识别在门、纲、目、科、属分类水平上负责区分 CN 组和 T2DM 组的关键肠道微生物。结果发现密螺旋体属、*g__norank_f__Ruminococcaceae*、普氏菌属和消化球菌属等 26 个菌群在 CN 组显著富集,而仅有 1 个菌群 *g__Intestinibacter* 在 T2DM 组中富集。说明 T2DM 组与健康对照之间存在许多明显不同的细菌种类,表明肥胖的 T2DM 患者中肠道菌群营养不良。尽管目前对于 2 型糖尿病患者中哪些细菌发生了显著改变尚缺乏共识,但普遍的观察是减少了 2 型糖尿病患者的细菌数量。*g__norank_f__Ruminococcaceae* 是瘤胃菌科的成员。瘤胃菌科是乙酸盐的重要来源。肠道微生物代谢产物的变化

在代谢性疾病发展中比微生物组成本身发挥的作用更大^[27]。肠道微生物群会产生大量代谢产物,短链脂肪酸就是其中较为重要的一种代谢产物。短链脂肪酸是由大肠内不可消化膳食纤维细菌发酵产生的,主要由乙酸、丙酸和丁酸组成。对小鼠的研究表明,补充 SFCA 可以改善胰岛素敏感性和血脂异常,防止体重增加,并增加饮食导致的肥胖小鼠的能量消耗^[28]。因此,短链脂肪酸的减少可能导致肥胖和糖尿病患者的炎症性增高。

关于 T2DM 的病因,医学中已经阐明了许多因素。随着对肠道菌群的深入研究,人们对病因有了新的认识和扩展,也为更好地预防肥胖和糖尿病提供了公共指导。然而种族、宿主遗传学、饮食习惯和药物使用之间的复杂相互作用在塑造微生物群落中都起着重要作用,使其成为一个有趣而又充满挑战的研究领域。此外,目前关于肠道菌群在人类新陈代谢发挥因果作用的结论由于其他混杂因素而变得模糊,例如测序和分析技术的差异以及用于研究的饮食差异,因此,探讨建立的标准化技术准则至关重要。

4 结论

我们发现了 T2DM 组特有的肠道微生物特征和其与 CN 组之间存在显著差异的肠道微生物。这为研究肠道微生物对 T2DM 发挥作用的潜在机制提供了新的证据和理论依据,有利于建立开发基于微生物群的个性化干预措施以应对人类代谢性疾病的方法。

参 考 文 献(References)

- [1] Jaacks LM, Siegel KR, Gujral UP, et al. Type 2 diabetes: A 21st century epidemic [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2016, 30(3): 331-343.
- [2] Boljat A, Gunjača I, Konstantinović I, et al. Environmental risk factors for type 1 diabetes mellitus development [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2017, 125(8): 563-570.
- [3] Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism [J]. Nature, 2012, 489(7415): 242-249.
- [4] Sidhu M, van der Poorten D. The gut microbiome [J]. Aust Fam Physician, 2017, 46(4): 206-211.
- [5] Horie M, Miura T, Hirakata S, et al. Comparative analysis of the intestinal flora in type 2 diabetes and nondiabetic mice [J]. Exp Anim, 2017, 66(4): 405-416.
- [6] Treuting PM, Dintzis SM. Comparative Anatomy and Histology [M]. San Diego: Academic Press; 2012.
- [7] Nguyen TL, Vieira SS, Liston A, et al. How informative is the

- mouse for human gut microbiota research? [J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(1): 1–16.
- [8] 王芳, 牛冬, 余旭平, 等. 猪生物医学模型研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2009, 30(4): 99–102.
- Wang F, Niu D, Yu XP, et al. Research progress of pig biomedical models [J]. *Prog Vet Med*, 2009, 30(4): 99–102.
- [9] Zhang L, Huang Y, Wang M, et al. Development and genome sequencing of a laboratory-inbred miniature pig facilitates study of human diabetic disease [J]. *iScience*, 2019, 19: 162–176.
- [10] Chen S, Zhou Y, Chen Y, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34 (17): i884–i890.
- [11] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [12] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data [J]. *Nat Methods*, 2016, 13(7): 581–583.
- [13] Li Q, Chang Y, Zhang K, et al. Implication of the gut microbiome composition of type 2 diabetic patients from northern China [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5450.
- [14] Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers [J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 541–546.
- [15] Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9085.
- [16] Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (31): 11070–11075.
- [17] Caspi R, Billington R, Ferrer L, et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: D471–D480.
- [18] Kocelak P, Zak-Golab A, Zahorska-Markiewicz B, et al. Resting energy expenditure and gut microbiota in obese and normal weight subjects [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(20): 2816–2821.
- [19] Li Z, Yi CX, Katiraei S, et al. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit [J]. *Gut*, 2018, 67(7): 1269–1279.
- [20] Serena C, Ceperuelo-Mallafre V, Keiran N, et al. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota [J]. *ISME J*, 2018, 12(7): 1642–1657.
- [21] De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, et al. Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis [J]. *Cell Metab*, 2016, 24(1): 151–157.
- [22] Aguiar CJ, Rocha-Franco JA, Sousa PA, et al. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation [J]. *Cell Commun Signal*, 2014, 12: 78.
- [23] van Diepen JA, Robben JH, Hooiveld GJ, et al. SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes [J]. *Diabetologia*, 2017, 60(7): 1304–1313.
- [24] Keren N, Konikoff FM, Paitan Y, et al. Interactions between the intestinal microbiota and bile acids in gallstones patients [J]. *Environ Microbiol Rep*, 2015, 7(6): 874–880.
- [25] Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, et al. Human genetics shape the gut microbiome [J]. *Cell*, 2014, 159(4): 789–799.
- [26] Kohl KD, Amaya J, Passemant CA, et al. Unique and shared responses of the gut microbiota to prolonged fasting: a comparative study across five classes of vertebrate hosts [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2014, 90(3): 883–894.
- [27] Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(6): 341–352.
- [28] Perry RJ, Peng L, Barry NA, et al. Acetate mediates a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome [J]. *Nature*, 2016, 534(7606): 213–217.

[收稿日期] 2021-02-04

黄树武, 闵凡贵, 王静, 等. 常用小鼠、大鼠肠道菌群比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 777-784.

Huang SW, Min FG, Wang J, et al. Comparative study of intestinal flora in common mice and rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 777-784.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.009

常用小鼠、大鼠肠道菌群比较研究

黄树武, 闵凡贵, 王静, 罗银珠, 何丽芳, 陈梅玲, 潘金春*

(广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663)

【摘要】 目的 对 6 种常用品系小鼠和大鼠肠道菌群进行比较研究。**方法** 采集 3 家实验动物生产单位 150 只 SPF 级小鼠和大鼠的 210 份粪便或肠道内容物样本, 依据细菌 16S rDNA V3-V4 区域通用引物对样本进行 PCR 扩增, 并采用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台进行测序。基于动物来源、品种品系、性别、年龄和肠道分段(十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠)等因素, 运用生物信息学分析方法对小鼠和大鼠肠道菌群结构组成多样性及差异性进行聚类分析。**结果** 来源相同的实验小鼠或大鼠的肠道菌群间相似性最高, 而实验小鼠与大鼠的肠道菌群因品种不同存在差异性。实验小鼠不同肠段的肠道菌群有一定差异性, 其粪便样本与其结肠肠道菌群的相似性较高。相同饲养生存环境条件下, 实验小鼠的年龄和肠道肠段是决定动物肠道菌群结构的主要内源性因素, 而品系、性别对其肠道菌群的影响作用较小。**结论** 本研究揭示了常用品系小鼠和大鼠肠道菌群的多样性与差异性, 探讨宿主肠道菌群的相关影响因素, 为肠道菌群与疾病关系的相关研究提供更多基础数据。

【关键词】 小鼠; 大鼠; 肠道菌群

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0777-08

Comparative study of intestinal flora in common mice and rats

HUANG Shuwu, MIN Fangui, WANG Jing, LUO Yinzh, HE Lifang, CHEN Meiling, PAN Jinchun*

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

Corresponding author: PAN Jinchun. E-mail: jcpa@sina.com

【Abstract】 Objective To conduct a comparative study of the intestinal flora in six common strains of mice and rats. **Methods** In this study, 210 feces or intestinal content samples were collected from 150 SPF mice and rats from three experimental animal production units. PCR amplification of the samples was carried out based on common primers of the bacterial 16S rDNA V3-V4 region, and then the Illumina HiSeq 2500 high-throughput system was used for sequencing. Based on the animal source, breed, gender, age and intestinal segmentation (duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon and rectum) factors, bioinformatics method and cluster analysis of differences were applied to analyze the diversity in the structure of the intestinal flora in rats and mice. **Results** The intestinal flora of experimental mice or rats with the same source had the highest similarity, whereas the intestinal flora of experimental mice and rats showed certain differences due to the type of species. The intestinal flora from different intestinal segments of experimental mice exhibited certain differences, and stool samples were more similar to the colonic intestinal flora. Under the same breeding and living environment conditions, the species, age and intestinal segment of experimental mice and rats are the main endogenous factors that determine the structure of the intestinal flora, and the effect of strain and gender on their intestinal flora is

[基金项目] 广州市科技计划项目(201904010093), 广东省基础与应用基础研究基金项目(2020A151010757)。

Funded by Guangzhou Science and Technology Planning Project(201904010093), Guangdong Basic and Applied Basic Research Fund Project(2020A151010757)。

[作者简介] 黄树武(1990—), 男, 本科, 研究方向: 实验动物与微生物学研究。Email: hsw2015@gdlami.com

[通信作者] 潘金春(1979—), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物质量监测和比较医学研究。Email: jcpa@sina.com

minimal. **Conclusions** This study revealed the diversity and differences in the intestinal flora of common mice, explored the influencing factors of the host intestinal flora, and provided more basic data for the relationship between intestinal flora and diseases.

【Keywords】 mice; rats; intestinal flora

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

近年来,随着新一代基因测序技术、生物信息学分析工具和肠道微生物多组学的迅速发展,肠道菌群成为当今科研领域的研究热点之一^[1-4]。目前研究已证实,肠道菌群与人体的肥胖和糖尿病代谢性疾病^[5-6],炎症性肠病^[7],胃肠道癌症^[8],心脑血管疾病^[9-10]以及自身免疫性疾病^[11]等具有密切相关性。而实验小鼠和大鼠作为研究肠道菌群的重要工具动物,因动物来源、品种品系、性别年龄以及不同肠道肠段等多种因素的差异,导致其自身宿主背景的肠道菌群有所区别,况且目前对肠道菌群的影响因素分析不够全面,缺乏相关背景数据,导致对相关肠道菌群研究的动物实验设计或实验结果分析产生一定影响。本研究通过对常用品系的 150 只大、小鼠肠道菌群的高通量测序分析,剖析其肠道菌群的组成结构与丰度,揭示肠道菌群的多样性与差异性,分析宿主肠道菌群的相关影响因素,为肠道菌群研究提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

从广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2018-0002】,北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】和南方医科大学实验动物中心【SCXK(粤)2016-0041】三家实验动物生产单位(分别用代号 SY、BWL、NFY 表示)购买 150 只 SPF 级实验小鼠和大鼠,包括小鼠品系 KM、C57BL/6J、BALB/c、NIH 和大鼠品系 SD、Wistar,具体信息见表 1。所有实验操作都在实验动物使用设施【SYXK(粤)2016-0122】中进行,设施环境指标满足国家标准 GB14925-2010 要求,实验经广东省实验动物监测所动物管理和使用委员会审查(编号:I-IACUC2020105),遵循动物福利和相关伦理要求。

1.1.2 主要试剂与仪器

QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒(QIAGEN 公司,货号 51504),Phusion® Hot Start Flex 2X Master Mix(NEB 公司,货号 M0536L),DL2000 DNA Marker(TaKaRa 公司,货号 3427)等,各种试剂均在有限期

内使用。生物安全柜(德国,Biometra 型),PCR 超净工作台(浙江苏净净化设备有限公司,SW-CJ-1F 型),L96G 梯度型 PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司,L96G 型),电泳仪(北京六一仪器厂,DYY-6C 型)。

1.2 方法

1.2.1 样本采集

在洁净生物安全柜里,对 110 只 6 ~ 8 周龄的小鼠和大鼠无菌操作采集粪便样本于无菌无 DNA 酶/RNA 酶的 1.5 mL EP 管中,小鼠粪便重量为 50 ~ 100 mg,大鼠粪便重量为 100 ~ 200 mg,并对其中 10 只 NIH 品系小鼠安乐死后解剖取十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠六段不同的肠段内容物 50 ~ 100 mg 于 EP 管中。另外,对 40 只 1 周龄、2 周龄、3 周龄、5 周龄的 NIH 品系小鼠,同样采集粪便样本于 EP 管中,采集完后立即将所有样本冻存于-80℃冰箱里。动物粪便样本编号以动物编号记录,而动物十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠的肠道内容物样本分组编号以雌性 I1_a、I1_b、I1_c、I1_d、I1_e、I1_f,雄性 I2_a、I2_b、I2_c、I2_d、I2_e、I2_f 来记录。

1.2.2 样本扩增

根据试剂盒说明书,使用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 对样本进行基因提取,提取的核酸作为 DNA 模板。根据细菌 16S rDNA V3-V4 区域设计特异引物序列 341F:5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3',805R:5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3',扩增的产物长度为 465 bp。PCR 反应体系为样本 DNA 50 ng,Phusion® Hot Start Flex 2X Master Mixart Version 12.5 μL,前后引物(1 μmol/L)各 2.5 μL,后补加无菌水到 25 μL。反应程序为 98℃ 预变性 30 s,98℃ 变性 10 s,54℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,反应进行 35 个循环,后 72℃ 延伸 10 min,最后吸取扩增产物电泳检查产物质量。

1.2.3 高通量测序及生物信息学分析

通过构建 16S rRNA 全长文库,使用 Illumina Hiseq 2500 高通量测序平台进行测序,获得测序数据后利用 overlap 将双端数据进行拼接,并进行质

表 1 实验小鼠和大鼠的信息

Table 1 Information of experimental mice and rats

品种 Breed	品系 Strains	性别 Sex	周龄 Week age	体重(克) Weight(g)	数量 Numbers	来源单位 Source	分组 Groups	动物编号 Animal number
小鼠 Mouse	KM	雌 Female	6 ~ 8	28 ~ 31	5	SY	A1	A1_1 ~ A1_5
			6 ~ 8	29 ~ 30	5	BWL	B1	B1_1 ~ B1_5
		雄 Male	6 ~ 8	32 ~ 35	5	SY	A2	A2_1 ~ A2_5
			6 ~ 8	31 ~ 34	5	BWL	B2	B2_1 ~ B2_5
	C57BL/6J	雌 Female	6 ~ 8	17 ~ 20	5	SY	C1	C1_1 ~ C1_5
			6 ~ 8	17 ~ 19	5	BWL	D1	D1_1 ~ D1_5
		雄 Male	6 ~ 8	19 ~ 22	5	SY	C2	C2_1 ~ C2_5
			6 ~ 8	20 ~ 21	5	BWL	D2	D2_1 ~ D2_5
			6 ~ 8	18 ~ 20	5	SY	K1	K1_1 ~ K1_5
			6 ~ 8	18 ~ 20	5	BWL	J1	J1_1 ~ J1_5
	BALB/c	雌 Female	6 ~ 8	20 ~ 23	5	SY	K2	K2_1 ~ K2_5
			6 ~ 8	21 ~ 23	5	BWL	J2	J2_1 ~ J2_5
		雄 Male	1	3 ~ 5	5	SY	I3	I3_1 ~ I3_5
			2	8 ~ 9	5	SY	I5	I5_1 ~ I5_5
			3	10 ~ 12	5	SY	I7	I7_1 ~ I7_5
			5	20 ~ 23	5	SY	I9	I9_1 ~ I9_5
	NIH	雌 Female	6 ~ 8	25 ~ 28	5	SY	I1	I1_1 ~ I1_5
			1	3 ~ 6	5	SY	I4	I4_1 ~ I4_5
			2	8 ~ 10	5	SY	I6	I6_1 ~ I6_5
			3	12 ~ 14	5	SY	I8	I8_1 ~ I8_5
			5	22 ~ 25	5	SY	I10	I10_1 ~ I10_5
		雄 Male	6 ~ 8	27 ~ 30	5	SY	I2	I2_1 ~ I2_5
			6 ~ 8	170 ~ 200	5	SY	E1	E1_1 ~ E1_5
			6 ~ 8	180 ~ 200	5	BWL	F1	F1_1 ~ F1_5
			6 ~ 8	200 ~ 230	5	SY	E2	E2_1 ~ E2_5
			6 ~ 8	220 ~ 240	5	BWL	F2	F2_1 ~ F2_5
大鼠 Rat	SD	雌 Female	6 ~ 8	150 ~ 180	5	BWL	G1	G1_1 ~ G1_5
			6 ~ 8	160 ~ 180	5	NFY	H1	H1_1 ~ H1_5
		雄 Male	6 ~ 8	170 ~ 200	5	BWL	G2	G2_1 ~ G2_5
			6 ~ 8	190 ~ 210	5	NFY	H2	H2_1 ~ H2_5
	Wistar	雌 Female	6 ~ 8	150 ~ 180	5	BWL	G1	G1_1 ~ G1_5
			6 ~ 8	160 ~ 180	5	NFY	H1	H1_1 ~ H1_5
		雄 Male	6 ~ 8	170 ~ 200	5	BWL	G2	G2_1 ~ G2_5
			6 ~ 8	190 ~ 210	5	NFY	H2	H2_1 ~ H2_5

控、嵌合体过滤,得到高质量的 cleandata,接着调用 DADA2(divisive amplicon denoising algorithm) 对序列进行去噪,相当于以 100%相似度聚类,然后去冗余,得到 Feature(特征),再与 16S 数据库 SILVA(Release132)和 NT-16S 进行序列比对,得到样本中物种注释信息,进而对样本肠道菌群的分类构成与多样性及差异性分析,并生成相关图表。

2 结果

2.1 样本内物种 Alpha 多样性分析

本研究获得 6 ~ 8 周龄的 KM、C57BL/6J、BALB/c、NIH 四种品系小鼠 70 份粪便样本,SD、Wistar 两种品系大鼠 40 份粪便样本,1 周龄、2 周龄、3 周龄、5 周龄 NIH 品系小鼠 40 份粪便样本,以及 6 ~ 8 周龄 NIH 小鼠十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠共 6 个肠段的 60 份肠道内容物样本。

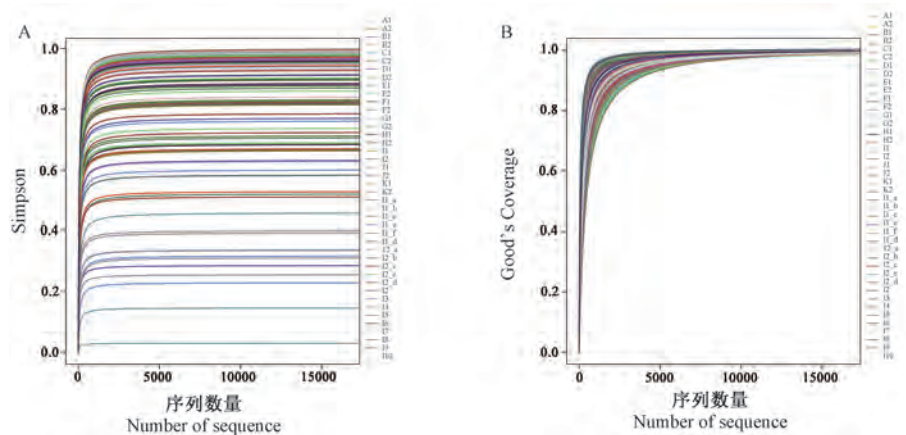
通过对所有样本的 16S rDNA 高通量测序后,

相同组别内的 5 份动物样本的肠道菌群差异性很小,按照分组原则进行聚类分析,且对样本内物种的丰富度与均匀度进行 Alpha 多样性分析,绘制 Simpson 图与 Good's Coverage 图(见图 1),观察到 Simpson 图中所有样本曲线均趋于平缓,说明测序深度已经基本覆盖到样本中所有的物种,样本的测序深度充分,测序数据合理;而 Good's Coverage 图中曲线都趋近于 1,说明样本内物种的丰富度和均匀度足够,样本内物种具有多样性。

2.2 肠道菌群结构组成与影响因素分析

2.2.1 不同来源单位、品种品系和性别的大小鼠肠道菌群分析

在门分类上,四种品系小鼠与两种品系大鼠的粪便样本肠道菌群主要为拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、*Epsilonbacteraeota* 门和疣微菌门(*Verrucomicrobia*),前三者占据 90%以上(图 2A)。在属分类上,肠道



注:A:Simpson 图;B:Good's Coverage 图。

图 1 样本内物种 Alpha 多样性分析

Note. A. Simpson diagram. B. Good's Coverage diagram.

Figure 1 Alpha diversity analysis of sample species

菌群物种多样性程度高,主要为未分类的 *Muribaculaceae* 属、毛螺菌属 NK4A136 组 (*Lachnospiraceae* _ NK4A136 _ group)、另枝菌属 (*Alistipes*)、拟普雷沃菌属 (*Alloprevotella*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、*Muribaculum* 属、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 7 种菌属 (图 2B)。

采用 Circos 圈图分析样本与物种共线性关系以及优势物种的分布情况,并对各样本间的物种丰度进行主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) (图 3),可见不同样本间有所交叉并形成四个大类群,动物来源不同可造成肠道菌群物种组成存在差异,如:BWL 单位的 F1 和 F2, G1 和 G2 组样本代表的 SD、Wistar 大鼠肠道菌群相似性较高,而与 SY 单位的 E2 和 E1, NFY 单位的 H2 和 H1 组样本代表的 SD、Wistar 大鼠肠道菌群存在一定差异性,后者未分类的 *Muribaculaceae* 属所占相对丰度比

例比前者的高;对于同一 SY 单位中 A1 和 A2、K1 和 K2、I1 和 I2、C1 和 C2 组所代表的 KM、BALB/c、NIH 和 C57BL/6 品系小鼠肠道菌群相似度较高,但与 BWL 单位的同种品系小鼠存在差异性;BWL 单位中 B1 和 B2、J2 和 J1、D1 和 D2 组所代表的 KM、BALB/c 和 C57BL/6 品系小鼠肠道菌群亦无明显差异性;另外,通过对比小鼠与大鼠品种肠道菌群中优势菌属,发现小鼠肠道菌群中存在较高丰度的 *Alloprevotella* 属,而 BWL 单位 F1 和 F2, G1 和 G2 的大鼠肠道菌群中未分类的 *Muribaculaceae* 属相对丰度较低,但 G1 和 F1 有更高丰度的 *Bacteroides* 属;NFY 单位的 H2 和 H1 有更高丰度的未分类 *Bacteroidetes* 属。最后,通过对所有同来源单位、同一品种品系、不同性别大小鼠样本间肠道菌群两两比较,其布雷斯蒂斯相异度 (bray-curtis distance) 比较接近,未发现存在明显差异性。

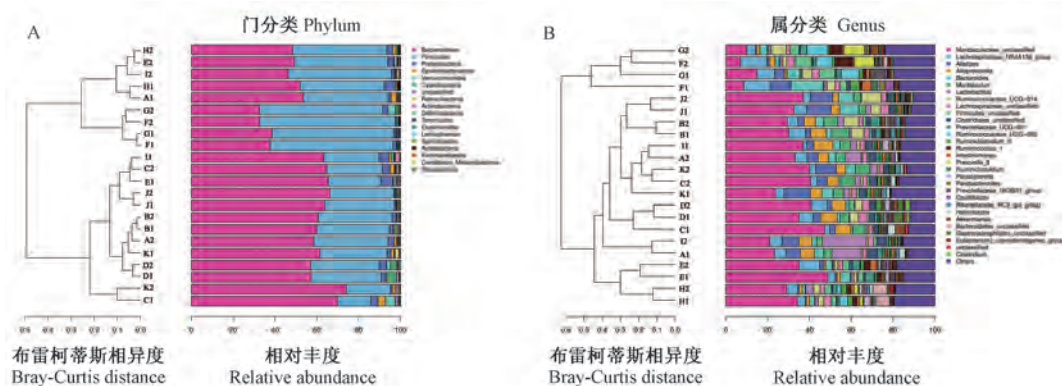
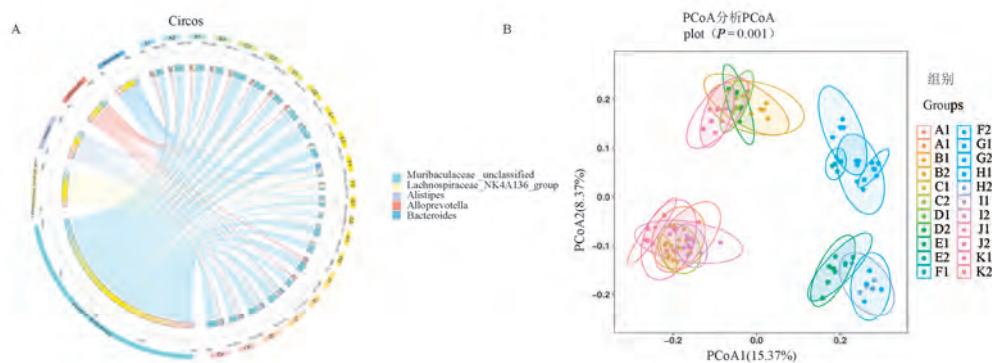


图 2 不同来源单位、品种品系和性别的大、小鼠肠道菌群在门与属分类水平上的丰度柱状图

Figure 2 Histogram of the abundance of intestinal flora of rats and mice from different source units, breeds, strains and genders at the level of phylum and genus classification



注: Circos 圈图左侧代表物种, 右侧代表样本组, 不同颜色代表不同的分类学门类和样本分组。

图 3 样本与物种关系 Circos 圈图与样本间 PCoA 分析

Note. The left side of the Circos circle represents species, and the right side represents sample groups. Different colors represent different taxonomic categories and sample groups.

Figure 3 Sample-species relationship Circos circle diagram and PCoA analysis

2.2.2 不同年龄小鼠肠道菌群分析

通过对 1 周龄、2 周龄、3 周龄和 5 周龄 NIH 小鼠粪便样本分组聚类与 PCoA 分析 (图 4), 发现各年龄段的雌、雄性小鼠肠道菌群优势菌属种类和相对丰度存在差异性。首先, 可观察到 I3 和 I4, I5 和 I6, I7 和 I8, I9 和 I10 两两样本组间的布雷斯蒂斯相异度 (bray-curtis distance) 最近, 其肠道菌群物种构成和相对丰度无明显差异性, 说明性别对 1 ~ 5 周龄的雌雄小鼠肠道菌群影响较小。而随着小鼠年龄的增长, 肠道菌群是一个动态发展变化的过程, 物种的种类数量逐渐增多, 且相对丰度发生着不同的变化。小鼠从出生开始, 1 周龄左右便有肠道菌群的出现, 种类最少, 多样性较低, 以 *Lactobacillus* 属、链球菌属 (*Streptococcus*) 占据主要地位, 且此时雌性小鼠相对雄性小鼠具有较高丰度的假单胞菌属 (*Pseudomonas*); 到 2 周龄, 物种的种类明显增多,

多样性丰富, *Lactobacillus* 属仍占绝对优势地位, 但其相对丰度减少, 出现未分类的 *Muribaculaceae* 属, *Alloprevotella* 属、*Bacteroides* 属和 *Proteus* 属等多种优势菌属; 3 周龄时, 另外观察到出现明显增多的 *Akkermansia* 属、*Eisenbergiella* 属、*Bilophila* 属和瘤胃梭菌属 (*Ruminiclostridium_9*) 等菌属; 5 周龄时, 则以未分类的 *Muribaculaceae* 属、*Lactobacillus* 属、*Alloprevotella* 属、*Bacteroides* 属、*Muribaculum* 属和 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 为主, 且发现此时雌性小鼠相对雄性小鼠有较高丰度的未分类的 *Muribaculaceae* 属, 但只有较低丰度的未分类的 *Clostridiales* 属和 *Alistipes* 属。进而把 5 周龄与 6 ~ 8 周龄的 NIH 小鼠肠道菌群比较分析, 发现这两个周龄段的小鼠肠道菌群相似度较高, 主要优势菌属一致, 说明到 5 周龄后, 肠道菌群已趋于相对稳定共生的状态。

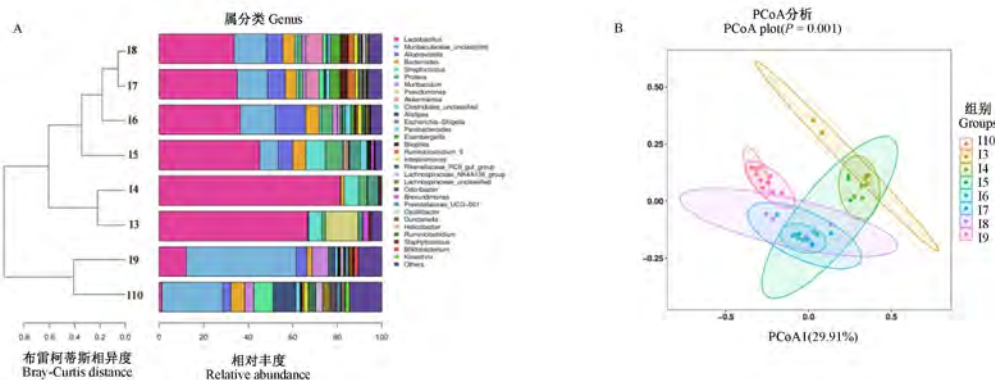


图 4 不同周龄 NIH 小鼠肠道菌群丰度柱状图与 PCoA 分析

Figure 4 Histogram of intestinal flora abundance in NIH mice of different ages and PCoA analysis

2.2.3 不同肠段和粪便样本的小鼠肠道菌群分析

通过对 NIH 小鼠十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠六个不同肠段内容物样本以及粪便样本的菌群进行比较分析(图 5),发现小鼠十二指肠、空肠和回肠的肠道菌群物种种类相对较少,主要为 *Lactobacillus* 属、未分类的 *Muribaculaceae* 属、*Candidatus_arthromitus* 属、*Pseudomonas* 属,且不同性别的小鼠肠道菌群中 *Candidatus_arthromitus* 属所占丰度存在一定差异性。小鼠盲肠和结肠中肠道菌群物种种类数量明显增多,多样性丰富且物种丰度比较均衡,主要为未分类的 *Muribaculaceae* 属、*Lactobacillus* 属、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、*Muribaculum* 属、*Alloprevotella* 属、杜氏杆菌属 (*Dubosiella*)、*Lachnospiraceae* _ NK4A136 _ group、*Alistipes* 属八种菌属。然而直肠中以螺杆菌属 (*Helicobacter*) 为主,小部分是 *Lactobacillus* 属、未分

类的 *Muribaculaceae* 属和 *Pseudomonas* 属。

根据粪便样本与不同肠段肠道菌群比较分析结果,发现分组中 I1 与 I1_e, I2 与 I2_e 样本的布雷柯蒂斯相异度 (bray-curtis distance) 最近,说明粪便样本与结肠的肠道菌群构成相似性最高。

2.2.4 肠道菌群内物种相关性分析

对属水平分类上的微生物丰度,比较样本中优势菌群物种之间的相关性,绘制出热图以及网络图(图 6)。由此可知,优势菌属 *Muribaculum* 属与未分类的 *Muribaculaceae* 属、*Alistipes* 属、*Alloprevotella* 属存在一定的正相关关系。*Lactobacillus* 属与 *Streptococcus* 属、*Proteus* 属和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 存在一定的正相关关系,而与 *Lachnospiraceae* _ NK4A136 _ group、未分类的 *Muribaculaceae* 属存在负相关关系。这提示随着肠道内环境的变化,肠道菌群优势菌属存在互相共生共存与竞争抑制的情况。

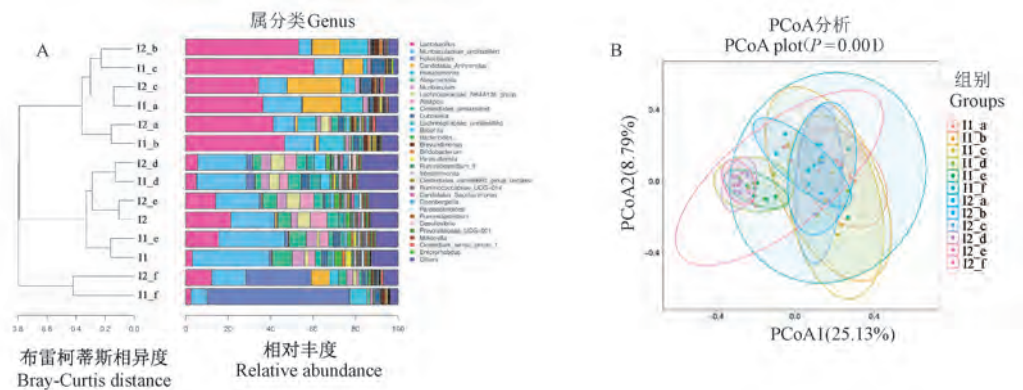
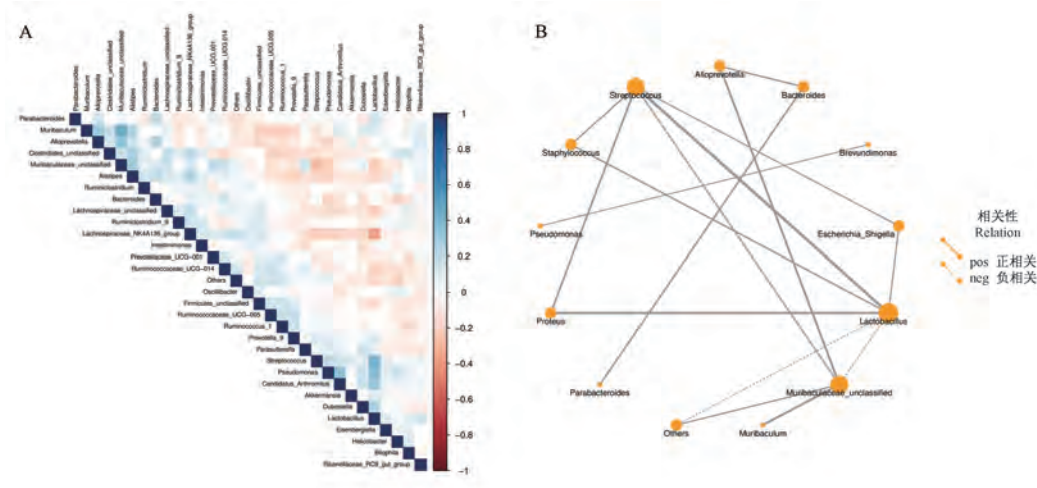


图 5 不同肠段和粪便样本的 NIH 小鼠肠道菌群丰度柱状图与 PCoA 分析

Figure 5 Histogram and PCoA analysis of intestinal flora abundance of NIH mice from different intestinal segments and stool samples



注: A: 热图; B: 网络图。

图 6 肠道菌群内物种相关性分析

Note. A. Heat map. B. Network map.

Figure 6 Species correlation analysis in the intestinal flora

3 讨论

肠道菌群作为人和动物肠道内最复杂多样化的微生物群落,在维持宿主肠道结构和功能、促进营养代谢、调节免疫系统和预防病原菌等方面发挥着重要的作用^[12-14]。本研究通过对 4 种品系小鼠和两种品系大鼠肠道菌群聚类分析,发现小鼠与大鼠肠道菌群具有丰富的多样性,主要有未分类的 *Muribaculaceae* 属、毛螺菌属 NK4A136、另枝菌属、拟普雷沃菌属、拟杆菌属、*Muribaculum* 属和乳杆菌属 7 种菌属。相同来源的同个品种动物的肠道菌群相似度较高,小鼠相对大鼠的肠道菌群具有较高丰度的拟普雷沃菌属,两者优势菌属存在一定差异性,而品系、性别对其影响作用较小。究其原因,考虑主要是小鼠或大鼠的基因型决定了其本身品种品系的遗传基础,在不同饲养生存环境作用下,影响着宿主不同的肠道菌群结构组成^[15]。随着小鼠年龄的增长,肠道菌群是一个竞争选择动态发展变化的过程。小鼠从出生开始,物种的种类和数量逐渐增多且慢慢趋于稳定,相对丰度发生着相应变化。由早期主要的乳杆菌属和链球菌属慢慢演变为未分类的 *Muribaculaceae* 属、乳杆菌属、拟普雷沃菌属、拟杆菌属和 *Muribaculum* 属多种优势菌属共生共存的状态。肠道菌群的改变,其优势菌属间互利共存与竞争抑制,又反作用着宿主肠道结构与功能,最终形成一个肠道菌群稳态^[15-16]。

本研究还发现,小鼠十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠不同肠段菌群分布是不均衡的。随着不同肠段内环境的变化,胃到结肠各肠段的微生物数量快速递增,呈现一定的差异性变化,由十二指肠、空肠和回肠种类较少的乳杆菌属、未分类的 *Muribaculaceae* 属、*Candidatus_arthromitus* 属和假单胞菌属,演变为盲肠结肠中菌群种类和数量明显增多的螺杆菌属、*Muribaculum* 属、拟普雷沃菌属、杜氏杆菌属等,而直肠则以螺杆菌属为主。另外,小鼠粪便样本与其结肠的肠道菌群结构相似性最高,而结肠微生物菌群在动物肠道肠段中发挥着重要的生理学功能^[17],提示可以通过粪便样来间接评价结肠肠道菌群的变化。此外,本研究对于动物运输过程中应激状态对肠道菌群的影响也值得我们注意,长期慢性应激会导致动物肠道菌群的变化^[18]。大量研究也证实,肠道菌群的结构和功能还受到饮食^[19-20]、抗生素^[21]、益生菌和益生元^[22]等多种外源

因素的影响。

本研究揭示了动物来源相同的实验小鼠或大鼠的肠道菌群间相似性最高,而实验小鼠与大鼠的肠道菌群因品种不同存在一定差异性。在一定的饲养生存环境下,实验小鼠的年龄和肠段是决定其肠道菌群多样性与差异性的主要内源性因素,而品系、性别对其肠道菌群的影响作用较小。鉴于多种宿主本身因素影响肠道菌群的变化,实验者研究肠道菌群时,须尽量选择同一饲养环境下,同一品种品系的实验动物,且考虑不同肠段与粪便样本肠道菌群的异同,以及样本采集方法的合理性、可重复性和稳定性,优化实验设计,控制多因素变量来观察单一因素的变化,以保证实验结果的准确性与可靠性。

参 考 文 献 (References)

- [1] Metzker ML. Sequencing technologies-the next generation [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(1): 31-46.
- [2] 许亚昆, 马越, 胡小茜, 等. 基于三代测序技术的微生物组学研究进展 [J]. 生物多样性, 2019, 27(5): 534-542.
Xu YK, Ma Y, Hu XX, et al. Analysis of prospective microbiology research using third-generation sequencing technology [J]. Biodiv Sci, 2019, 27(5): 534-542.
- [3] Degroot AK, Low D, Mizoguchi A, et al. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models [J]. Inflamm Bowel Dis, 2016, 22(5): 1137-1150.
- [4] 郭慧玲, 邵玉宇, 孟和毕力格, 等. 肠道菌群与疾病关系的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 400-410.
Guo HL, Shao YY, Menghe BLG, et al. Research on the relation between gastrointestinal microbiota and disease [J]. Microbiol Chin, 2015, 42(2): 400-410.
- [5] Angelakis E, Armougom F, Million M, et al. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans [J]. Future Microbiol, 2012, 7(1): 91-109.
- [6] Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. Nature, 2012, 490(7418): 55-60.
- [7] Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(34): 13780-13785.
- [8] Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers [J]. ISME J, 2012, 6(2): 320-329.
- [9] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease [J]. Nature, 2011, 472(7341): 57-63.
- [10] Bercik P, Denou E, Collins J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and

- behavior in mice [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(2): 599–609.
- [11] Wu HJ, Ivanov II, Darce J, et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells [J]. *Immunity*, 2010, 32(6): 815–827.
- [12] O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ [J]. *EMBO Rep*, 2006, 7(7): 688–693.
- [13] Ley RE, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes [J]. *Science*, 2008, 320(5883): 1647–1651.
- [14] Kamada N, Seo SU, Chen GY, et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(5): 321–335.
- [15] Benson AK, Kelly SA, Legge R, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(44): 18933–18938.
- [16] 谭振, 翟丽维, 陈少康, 等. 肠道微生物与宿主遗传背景互作关系的研究进展 [J]. *中国畜牧杂志*, 2016, 52(5): 84–88.
- Tan Z, Zhai LW, Chen SK, et al. Research progress of intestinal microbes interactions with the host genetic background [J]. *Chin J Anim Sci*, 2016, 52(5): 84–88.
- [17] Gustafsson BE. The physiological importance of the colonic microflora [J]. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1982, 77: 117–1131.
- [18] 贺星, 刘卫, 朱斌, 等. 应激因素对大鼠肠道菌群影响及机制研究 [J]. *临床军医杂志*, 2021, 49(4): 361–364.
- He X, Liu W, Zhu B, et al. Study on the effect and mechanism of stress factors on rat intestinal flora [J]. *Clin J Med Office*, 2021, 49(4): 361–364.
- [19] Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, et al. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations [J]. *Nature*, 2016, 529(7585): 212–215.
- [20] Wang J, Linnenbrink M, Künzel S, et al. Dietary history contributes to enterotype-like clustering and functional metagenomic content in the intestinal microbiome of wild mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(26): 2703–2710.
- [21] Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(12): 4332–4341.
- [22] Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, et al. Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2019, 29(9): 1335–1340.

[收稿日期] 2021-06-07

马琪,翁与竞,李佳,等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎模型小鼠的疗效评价 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 785-792.
Ma Q, Weng YJ, Li J, et al. Therapeutic effect of Shenling Baizhu powder on ulcerative colitis in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 785-792.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.010

参苓白术散对溃疡性结肠炎模型小鼠的疗效评价

马琪^{1,2#*}, 翁与竞^{1#}, 李佳¹, 覃施媛¹, 何燕凤¹, 马旭东¹

(1. 西南大学动物医学院, 重庆 402460; 2. 西南大学医学研究院免疫研究中心, 重庆 402460)

【摘要】 目的 探究参苓白术散对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的溃疡性结肠炎(UC)模型小鼠的疗效。**方法** 选用雄性 BALB/c 小鼠(6 ~ 8 周龄, 18 ~ 20 g)36 只, 随机分成 6 组, 每组 6 只。A 组: 参苓白术散高剂量组; B 组: 参苓白术散中剂量组; C 组: 参苓白术散低剂量组; D 组: 柳氮磺胺吡啶治疗组; E 组: 空白对照组; F 组: 模型组。以连续 7 d 自由饮用 3.5% 葡聚糖硫酸钠水溶液建立急性 UC 模型, 造模同时分别灌胃给予不同药物治疗, 观察记录小鼠临床表现并结合疾病活动指数评分(DAI)以及处死后的结直肠长度、结肠黏膜损伤眼观评分、结肠组织病理学评分等综合评价参苓白术散对 UC 模型小鼠的治疗效果。**结果** 与 E 组比较, F 组小鼠 DAI 评分显著升高, 结肠明显缩短, 结肠黏膜损伤眼观评分及组织病理学评分显著升高。B 组小鼠的病情改善优于 A、C、D 组。结肠黏膜损伤评分显示, F 组与 B 组比较差异有显著性($P < 0.05$)。参苓白术散可以改善小鼠结肠组织局部损伤, 缓解小鼠 UC 的症状。**结论** 参苓白术散对 UC 模型小鼠有良好的治疗效果, 参苓白术散中剂量的疗效优于参苓白术散高剂量和低剂量。

【关键词】 溃疡性结肠炎; 参苓白术散; 葡聚糖硫酸钠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0785-08

Therapeutic effect of Shenling Baizhu powder on ulcerative colitis in mice

MA Qi^{1,2#*}, WENG Yujing^{1#}, LI Jia¹, QIN Shiyuan¹, HE Yanfeng¹, MA Xudong¹

(1. College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460, China.

2. Immunology Research Center, Medical Research Institute, Southwest University, Chongqing 402460)

Corresponding author: MA Qi. E-mail: mq20183004@swu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the curative effect of Shenling Baizhu powder on dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) model mice. **Methods** Thirty-six male BALB/c mice (6 ~ 8 weeks, 18 ~ 20 g) were randomly divided into 6 groups with 6 mice in each group: group A, high-dose Shenling Baizhu powder; group B, middle-dose Shenling Baizhu powder; group C, low-dose Shenling Baizhu powder; group D, sulfasalazine treatment; group E, blank control; and group F, model. The acute UC model was established by administering 3.5% dextran sulfate sodium solution with drinking water for 7 days, and at the same time of modeling, different drugs were given by intragastric administration. The therapeutic effect of Shenling Baizhu powder on UC mice was evaluated by assessing their clinical manifestations, disease activity index (DAI), colon and rectum length, colon mucosa injury and colon histopathology. **Results** Compared with group E, the DAI score was evidently higher, the colon was markedly shorter, and the visual score and histopathology score of colonic mucosa injury were significantly higher in group F. The condition of group B was

[基金项目] 西南大学新进博士科研资助金(5360300213), 重庆市自然科学基金(cstc2021jcyj-msxmX0982)。

Funded by Research Grants for New Doctors in Southwest University (5360300213), the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyjmsxmX0982)。

[作者简介] 马琪(1989—), 讲师, 博士, 研究方向: 中兽医药物。Email: mq20183004@swu.edu.cn;

翁与竞(2000—), 女, 本科, 研究方向: 中兽医药理。Email: 13509377604@163.com。

#共同第一作者

[通信作者] 马琪(1989—), 讲师, 博士, 研究方向: 中兽医药物。Email: mq20183004@swu.edu.cn

better than that of groups A, C and D. The score of colonic mucosal injury in group F was distinctly higher than that in group B ($P < 0.05$). Shenling Baizhu powder improved the local injury of colon tissue and relieved the symptoms of UC.

Conclusions Shenling Baizhu powder has a good therapeutic effect on UC model mice, and the curative effect of a middle dose of Shenling Baizhu powder was better than that of the high and low doses of Shenling Baizhu powder.

【Keywords】 ulcerative colitis; Shenling Baizhu powder; sodium dextran sulfate

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

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性炎症性肠道疾病, 病变多侵袭结直肠的黏膜及黏膜下层, 其临床症状主要表现为腹痛、腹泻及便血等^[1], 常反复发作, 很难痊愈。研究表明, 该病可能与环境因素、基因遗传等有关^[2-3]。目前普遍认为, UC 机体存在肠黏膜炎症免疫耐受紊乱, 肠黏膜免疫反应异常激活是 UC 发生、发展的重要因素^[4]。近年来, UC 的发病率有持续升高的趋势, 且致癌风险增大^[5]。因此, 寻找治疗 UC 更为安全有效的药物显得尤为迫切。由于传统中药具有整体施治、安全可靠、毒副作用小等特点^[6], 中医药在治疗本病方面已经具有明显的天然优势, 并且已有大量研究显示, 中药可以通过调节肠道菌群^[7], 阻止肠道细菌和内毒素发生移位, 平衡有益菌与细菌病毒, 能明显提高黏膜细胞的再生能力, 降低过高的黏膜通透性, 从而改善黏膜的屏障功能。

UC 证型实证中以大肠湿热为主, 虚证中以脾虚证为主, 在虚实夹杂证型中, 多以脾虚为基础, 并见湿热、寒湿、气滞、血瘀^[8]。而在临床上, 大肠湿热证、脾胃气虚证及脾虚夹湿热证三证型临床多见, 符合中医学理论的病初起多属于实证, 发展日久耗伤正气则形成虚证或虚实夹杂证的疾病发展观^[9]。本研究探讨的脾虚泄泻型 UC 的病机关键为脾虚湿盛, 运化失健^[10]。中医认为, 脾喜燥而恶湿, 外来湿邪, 最易困阻脾土, 以致升降失调, 清浊不分, 水谷杂下而发生泄泻, 即所谓“无湿不成泄”, 故《杂病源流犀烛·泄泻源流》说: “湿盛则飧泄, 乃独由于湿耳。”因此, 健脾温肾、行气导滞是中药治疗 UC 的重要原则^[11]。参苓白术散出自《太平惠民和剂局方》, 是中医治疗脾虚夹湿证的经典方剂, 由党参、白术、茯苓、山药、白扁豆、薏苡仁、砂仁、桔梗、莲子、炙甘草组成, 诸药配伍, 益气健脾, 渗湿止泻^[12]。常用于治疗脾胃虚弱, 体倦乏力, 饮食消化不良, 泄泻, 食少便溏等的脾虚泄泻证。本研究通过葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导小鼠 UC 模型, 探究参苓白术散对其治疗效果。本研究采用 DSS 诱导的 UC 模型的方法, 该造模方法

操作简单、方便重复、实用性强, 成功率高^[13]。DSS 是一种水溶性硫酸多聚糖, 其会增加肠道黏膜通透性、导致上皮细胞坏死、扰乱肠道微菌群、影响机体免疫应答, 从而诱导 UC^[14-16]。本研究通过预实验对比不同浓度 DSS (3%、3.5%、4%) 诱导的小鼠 UC 模型的差异, 筛选出诱导小鼠 UC 最优浓度为 3.5% 水溶液, 该浓度下, UC 症状最典型, 死亡率最低。DSS 的给药方式选择为自由饮用。最后根据体重、大便性状、便潜血、结肠长度、结肠损伤评分、DAI 评分、结肠组织病理学评分等指标, 判断 UC 模型的建立是否成功以及评价参苓白术散的治疗效果。本研究探讨了参苓白术散对 DSS 诱导的 UC 小鼠的治疗效果, 希望能为参苓白术散治疗 UC 提供科学依据并为抗溃疡新药研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

36 只 6 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 体重约 18 ~ 20 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。饲养于西南大学动物实验室【SYXK(渝)2019-0003】。饲养期间各组小鼠为自由饮水、采食。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 湿度恒定, 温度控制在 25℃ 左右。所有操作均符合西南大学动物实验伦理学要求 (审批号: IACUC-20190620-02)。

1.1.2 主要试剂与仪器

葡聚糖硫酸钠 (DSS) (S0948, MW: 36000 - 50000, MP Biomedicals), 邻甲苯胺 (C10659221, 上海麦克林), 无水乙醇 (20190818, 成都金山化学), 柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazine, SASP) (C10865372, 上海麦克林生化), 过氧化氢 (200506, 四川省伊洁士), 冰醋酸 (20170501, 重庆川东化工)。

参考《太平惠民和剂局方》中参苓白术散的配方组成, 药材莲子、薏苡仁、砂仁、桔梗、白扁豆、茯苓、党参、甘草、白术、山药购自重庆荣昌布美大药

房,经西南大学动物医学院刘娟教授鉴定,莲子为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥成熟种子,薏苡仁为禾本科植物薏苡 *Coix. Lacryma-jobi* L. var. *mayuen* (Roman) Stapf 的干燥成熟种仁,砂仁为姜科植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour. 的干燥成熟果实,桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根,白扁豆为豆科植物扁豆 *Dolichos lablab* L. 的干燥成熟种子,茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的干燥根,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根茎,白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎,山药为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根茎。

1.2 方法

1.2.1 药物及试剂的制备

参苓白术散浸膏制备:将药物按莲子肉、薏苡仁、砂仁、桔梗(炒):扁豆(炒):茯苓、党参、甘草、白术(炒)、山药=2:3:4的比例称取 50 g,先后以八倍水、六倍水煎煮 1 h,纱布过滤,合并滤液,蒸发浓缩至 1 g/mL,再分别以 65%、75% 乙醇先后醇沉 24 h,均取上清液,用旋转蒸发仪 75°C 106 r/min,蒸发至 1 g/mL,烘干,4°C 保存。灌胃时以纯净水溶解配置,高剂量 12.56 g/(kg·d),中剂量 6.28 g/(kg·d),低剂量 3.14 g/(kg·d)。

柳氮磺胺吡啶溶液配制:用纯净水配置成

0.045 g/mL 的溶液,剂量为 0.45 g/(mL·d)。

DSS 配制:称取葡聚糖硫酸钠溶解于水中,配成 3.5% 的浓度。

邻甲苯胺冰醋酸溶液配制:取 0.5 g 邻甲苯胺,加入等体积的无水乙醇和冰醋酸,定容至 50 mL,置于棕色瓶中,用锡纸包裹,避光 4°C 保存。

1.2.2 分组及动物的处理

采用随机数字表法把小鼠分为 6 只/组。A 组:参苓白术散高剂量组;B 组:参苓白术散中剂量组;C 组:参苓白术散低剂量组;D 组:柳氮磺胺吡啶治疗组;E 组:空白对照组;F 组:模型组。A、B、C、D、F 组饮用 3.5% DSS 水溶液,E 组饮用纯净水。每天更换新鲜饮水,连续 1 周。A、B、C、D、E、F 组分别以高剂量参苓白术散、中剂量参苓白术散、低剂量参苓白术散、柳氮磺胺吡啶、纯水、纯水按 10 mL/kg 灌胃,共 1 周。

1.2.3 观察指标

记录小鼠每日体重变化、死亡率、粪便性状和隐血。其中,采用邻甲苯胺法检测小鼠粪便隐血,邻甲苯胺法为 1983 年中华医学会全国临床检验方法学术讨论会推荐的方法,利用血红蛋白中的亚铁血红素具有过氧化物酶活性,催化过氧化氢释放出新生氧,使其显色,此方法操作较为简单易行^[17]。检测方法如下^[18]:取小鼠粪便,涂压于滤纸上,在粪便上滴加 2~3 滴 15% 邻甲苯胺冰醋酸溶液;再滴加 2~3 滴 3% H₂O₂;立即观察结果,在 2 min 内显蓝褐色为阳性。参照表 1 的标准评分。

表 1 隐血检测判断标准

Table 1 Criteria for occult blood detection

大便隐血/肉眼血便 Bleeding	判定标准 Judging standard
肉眼血便(+++) Blood traces in stool visible	加入试剂后立即呈现深蓝褐色 After adding the reagent, it immediately appears dark blue-brown
肉眼血便(++) Positive hemocult	加入试剂后初现浅蓝色,逐渐明显蓝褐色 After adding the reagent, it initially appears light blue and gradually turns blue brown
隐血(+) Negative hemocult	加入试剂 10 s 后初现浅蓝色渐变蓝色 After adding the reagent for 10 s, the initial light blue color gradually changes to blue
正常(-) Normal	加入试剂 2 min 后仍不显色 After adding the reagent for 2 min, it still did not show color

1.2.4 结直肠长度的测量

给药结束后,处死小鼠,剖腹,取盲肠末端至肛门段的结直肠,测量其自然长度并记录。

1.2.5 结肠组织黏膜损伤评分

沿肠系膜纵行剪开,平铺于玻璃板上,用冷生理盐水漂洗干净,肉眼观察结肠黏膜损伤程度,依

Cooper 方法进行评分,标准参照表 2^[19]。

1.2.6 疾病活动指数(DAI)评分

参照表 3 的标准评估小鼠的疾病活动指数(DAI)。DAI=(体重下降分数+大便性状分数+大便隐血分数)/3。依 Cooper 方法进行评分,标准如表 3^[19]。

表 2 结肠黏膜肉眼观察评分标准

Table 2 Scoring criteria for eye observation of colonic mucosa

记分 Score	结肠黏膜溃疡指数评分 Score of colonic mucosa ulcer index
0	正常黏膜, 未见损伤 Normal mucosa, no damage
1	充血, 无溃疡 Hyperemia, no ulceration
2	小溃疡, 无明显炎症 Small ulcer, no obvious inflammation
3	广泛的溃疡、坏死或黏连 Extensive ulceration, necrosis, or adhesions
4	巨结肠/狭窄/穿孔 Megacolon/stenosis/perforation

表 3 DAI 评分标准

Table 3 DAI scoring criteria

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

表 4 组织病理学评分标准

Table 4 Histopathological scoring criteria

记分 Score	组织病理学评分 Histopathological score
0	正常形态且无炎症 Normal shape without inflammation
1	小部分杯状细胞丢失及轻微炎症浸润 A small number of goblet cells were lost and there was a slight inflammatory infiltration
2	大面积的杯状细胞缺失及黏膜层中度炎症浸润 Large area of goblet cell loss and moderate inflammatory infiltration of mucosa
3	少量/部分隐窝缺失及黏膜肌层广泛的炎症浸润且伴有黏膜水肿增厚 A small/partial absence of crypts and extensive inflammatory infiltration of the muscularis mucosa with mucosal edema and thickening
4	大面积的隐窝缺失及黏膜下层广泛的炎症浸润 Large area of crypt loss and extensive inflammatory infiltration in submucosa

2.2 体重变化

在治疗期间, B、C、E 组小鼠体重先上升, 后逐渐趋于平稳, A、D、F 组的小鼠体重一直维持在低水平波动。与 F 组相比较, E 组体重明显升高, 差异极具显著性 ($P < 0.01$), C 组次之, 差异极具显著性 ($P < 0.01$), B 组小鼠体重较 F 组高, 差异具有显著性 ($P < 0.05$) (见图 1)。

1.2.7 脏器系数

依次称取小鼠心、肝、脾、肾的脏器重量, 计算各脏器与其体重之比值即为对应的脏器系数。

1.2.8 结肠组织病理学评分

将小鼠整个结肠泡入 10% 中性福尔马林固定后, 用石蜡包埋, 制成切片 (约 5 μm) 后进行伊红-美蓝 (HE) 染色制成病理切片。采用 Leica DFC 显微拍照系统对病理切片进行观察与拍照并进行组织病理学评分, 评分内容包括肠上皮细胞损伤程度和炎症浸润程度, 结果可以用于评价结肠组织损伤程度。评分标准如表 4^[20]。

1.3 统计学分析

所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 多组间的比较采用单因素方差分析, 当差异有统计学意义时采用 LSD- t 法进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

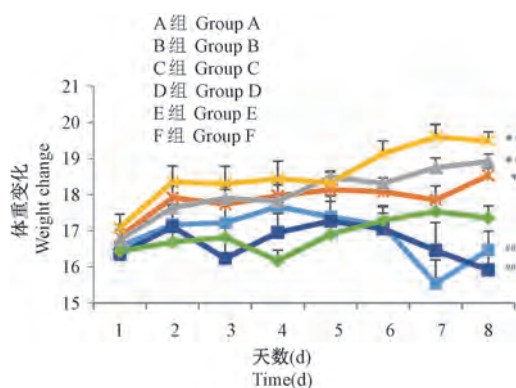
2 结果

2.1 小鼠的一般状况

各组小鼠在实验前精神状态、体重及大便性状等各方面均正常。造模期间, 除 E 组小鼠外, 其他各组小鼠随着造模进程逐渐出现懒动、拱背, 毛发无光泽, 嗜卧扎堆, 且部分小鼠因腹泻便血严重表现出消瘦、站立不稳, 肛周粘附有干涸的血便。给予治疗的 A、B、C 组小鼠精神状态随治疗深入逐渐好转, 其中参苓白术散中剂量组小鼠的腹泻、便血情况显著减轻。

2.3 小鼠结肠黏膜损伤眼观评分

F 组小鼠炎症病变主要靠近肛门段结肠, 病变黏膜充血、水肿、糜烂和溃疡形成。B 组小鼠与 E 组小鼠的结肠评分相近, 表明 B 组恢复较好, 与 F 组比较, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。A、C、D 组无显著性差异 (见图 2)。

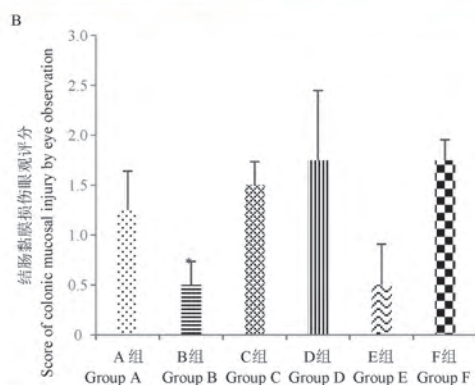
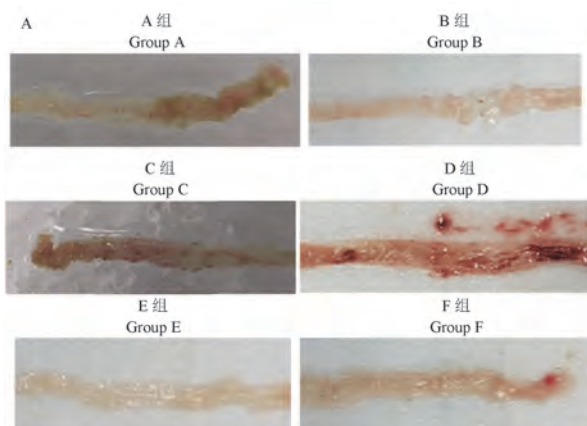


注:与 F 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 E 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 小鼠每日体重变化折线图

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

Figure 1 Daily weight change line chart of mice



注:A:结肠黏膜病变;B:结肠黏膜损伤眼观评分。

图 2 结肠黏膜病变及结肠黏膜损伤眼观评分

Note. A. Mucosal lesion of colon. B. Score of colonic mucosal injury by eye observation.

Figure 2 Lesion and injury score by eye observation of colonic mucosal

2.4 小鼠结肠直肠长度

小鼠结肠长度缩短是 UC 的重要特征^[21]。与 E 组相比, F 组结肠长度明显缩短 ($P < 0.05$)。与 F 组相比, A 组、B 组、C 组、D 组 DSS 所致小鼠结肠缩短的现象均有不同程度的缓解。尤其 B、C 组 ($P < 0.05$) 效果最为明显, 治疗效果好于其他组 (见图 3)。

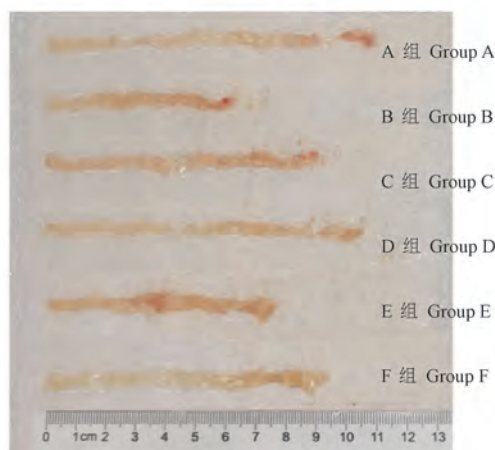
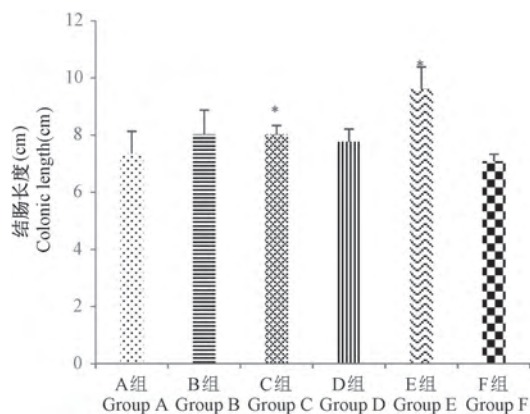


图 3 小鼠结肠长度变化

Figure 3 Changes of colonic length in mice

2.5 隐血及肉眼便血

粪便带血是 UC 的临床特征之一。与 E 组相比, F 组隐血及便血最严重 ($P < 0.05$)。A 组、C 组及 D 组隐血及便血情况逐日严重, 与 F 组相比情况较好。B 组自第 3 天后, 隐血及血便的情况逐渐好转, 直到第 6、7 天, 隐血检测呈阴性。说明 A 组、B 组、C 组及 D 组对 DSS 诱导的 UC 有所改善, 但与 F 组相比, A 组、C 组及 D 组差异无统计学意义, 只有 B 组差异极具显著性 ($P < 0.01$), 治疗效果最明显 (见图 4)。

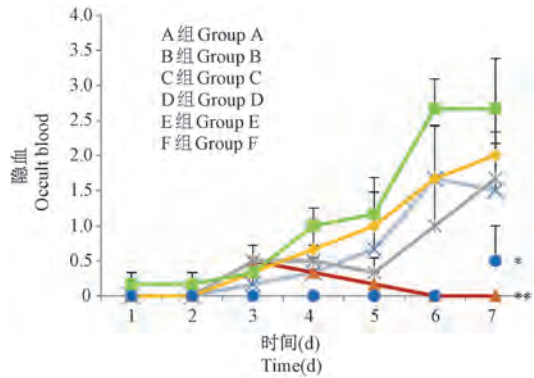


图4 隐血及肉眼便血评分

Figure 4 Occult blood and naked eye hematochezia score

2.6 DAI 评分

F 组的 DAI 评分基本呈上升趋势,显著高于 E 组。最后 2 d, F 组的疾病活动指数比其他组都高,说明各组的的治疗有一定的效果。B 组、E 组基本在同一水平上波动,表明 B 组治疗效果最好(见图 5)。

2.7 脏器系数

结果显示,肝、脾、心、肾的脏器系数无显著性差异,说明 UC 导致的病变不会影响肝、脾、心、肾的脏器功能。(见图 6)。

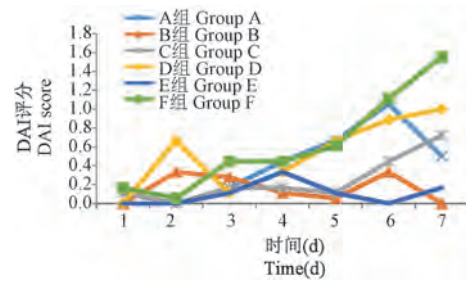


图5 小鼠 DAI 评分

Figure 5 DAI score in mice

2.8 结肠组织病理切片及病理学评分

病理切片结果表明 UC 导致模型组小鼠结肠肠黏膜上皮结构破坏,正常形态消失,上皮细胞及皱襞变矮,整个肠壁变薄,黏膜下层有炎性细胞浸润,组织病理学评分与空白组相比差异具显著性($P < 0.01$)。同时,参苓白术散治疗组小鼠结肠黏膜比较完整。但 D 组结肠肠黏膜上皮破损严重,肠黏膜有显著糜烂,黏膜层、黏膜下层有大量炎性细胞浸润,肠壁显著增厚。说明参苓白术散对 UC 的治疗有一定效果,同时柳氮磺胺吡啶治疗 UC 未取得疗效(见图 7)。

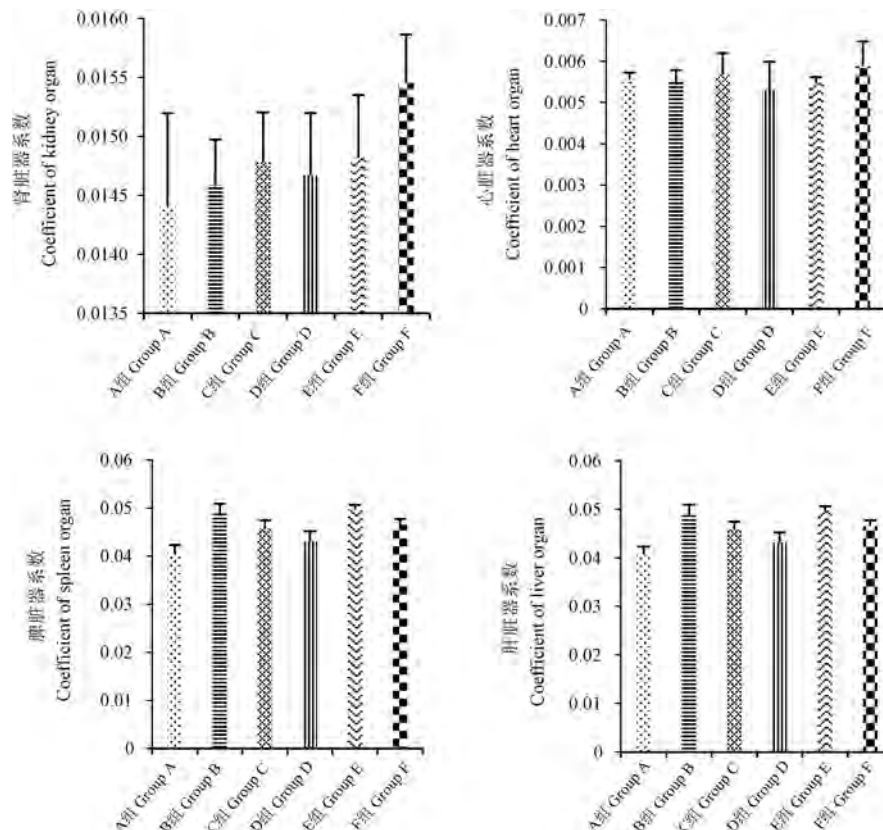
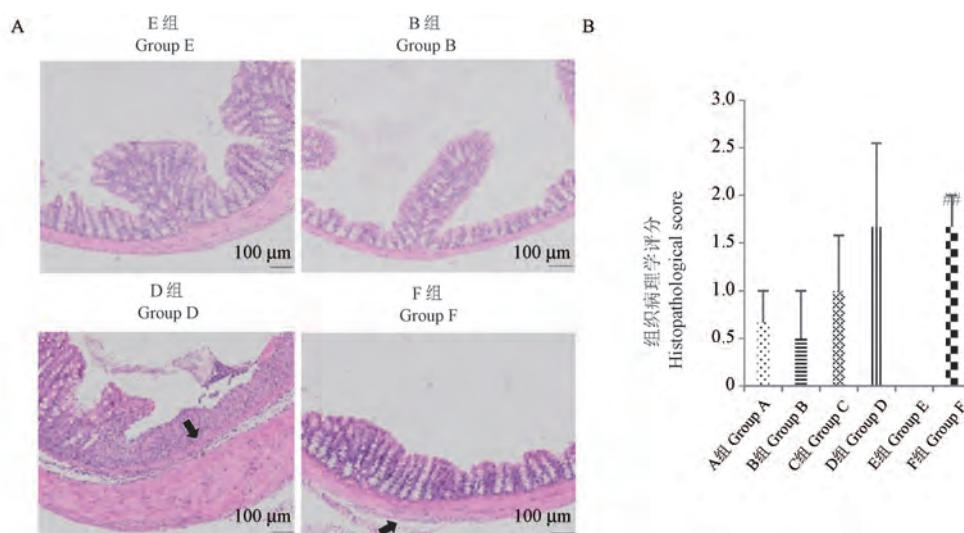


图6 小鼠脏器系数

Figure 6 Organ coefficient of mice



注:A:小鼠结肠组织 HE 染色病理切片;B:组织病理学评分。

图 7 小鼠结肠组织病理学检测($n=3$)

Note. A. Representative images of colon pathologic damages with hematoxylin and eosin (HE) staining. B. Histopathological score.

Figure 7 Histopathological examination of colon tissues in mice($n=3$)

3 讨论

UC 是一种黏膜和黏膜下层的慢性非特异性炎症,病变主要在结肠和直肠,临床主要表现为腹痛、腹泻、排便便等。《医学心悟》指出:“湿多成五泻,泻之属湿明矣。然有湿热,有寒湿,有积食,有脾虚,有肾虚,皆能致泻,宜分而治之。”参苓白术散有健脾渗湿之功,是用于治疗脾虚泄泻型 UC 的有效方剂。临床上已有报道用参苓白术散的加减方或联合方治疗 UC,且有较好的疗效。研究表明中医药辨证治疗 UC,尤其是慢性阶段的 UC 治疗,有药物副作用较小、疗效显著的优势^[22]。

DSS 会破坏肠道上皮细胞的完整性,击破肠道的机械屏障,诱发急性 UC,主要表现为腹泻、溃疡、直肠出血和粒细胞浸润^[14]。同时,还能对肠道生物屏障即肠道菌群产生影响,破坏有益菌的生存环境,导致肠内细菌和病毒移位,使细菌病毒更容易进入上皮细胞而造成上皮损伤^[7]。还因为 DSS 有抗凝作用,所以能延缓血液凝固^[15-16],造成肠道出血。此外,还与机体免疫应答失调有关。因此,本研究采用 DSS 自由饮水的方式建立 UC 小鼠模型,给予不同剂量的参苓白术散治疗,通过对小鼠进行临床表现及结肠相关指标量化评分,综合评价了参苓白术散对 UC 小鼠的治疗效果。

因 DSS 引起小鼠结肠长度的缩短,结肠黏膜损伤,粪便带血,粪便稠度改变是 UC 的重要特征^[21],故本实验观测小鼠的粪便性状,隐血及肉眼血便,结肠长度,结肠黏膜损伤,组织病理学以及一些可

以参考的相关体征。实验数据表明, B 组($P < 0.05$)、C 组($P < 0.01$)、E 组($P < 0.01$)体重均明显较 F 组高, B 组结肠黏膜损伤眼观评分明显低于 F 组($P < 0.05$), F 组结肠长度与 E 组相比明显缩短($P < 0.05$)且 B 组、C 组与 F 组相比小鼠结肠缩短的现象得到缓解($P < 0.05$), F 组与 E 组相比隐血及便血情况明显严重($P < 0.05$)且 B 组相较于 F 组隐血及便血情况明显改善($P < 0.01$), F 组的 DAI 评分基本呈上升趋势且显著高于 E 组,同时 B 组与 E 组 DAI 评分波动相近,另外组织病理学结果显示 F 组与 E 组相比结肠病变严重($P < 0.01$),同时参苓白术散治疗组病理切片与空白组较为相近。以上数据说明高中低剂量的参苓白术散均能改善 UC 小鼠临床症状,其中参苓白术散中剂量治疗组治疗效果最佳。另外,本实验中 D 组治疗效果不明显,可能是由于柳氮磺胺吡啶几乎不溶于水,配成的溶液极易发生沉淀,导致灌胃后小鼠极难吸收,且药物沉积于胃肠致其运化失职、升降失调,以致伤食泄泻,影响进食和给药,进一步加剧了结肠炎炎症,因而 D 组体重一直处于较低的状态,且结肠黏膜损伤眼观评分、粪便隐血、DAI 指数一直不见降低,病理切片也显示结肠病变较为严重。因此, D 组应用羧甲基纤维素钠来配置柳氮磺胺吡啶以增强溶解与吸收。

4 结论

本研究通过采用量化的 UC 临床疾病活动指数评分、结肠眼观评分、组织病理学评分及观察临床

表现综合评价了参苓白术散对 DSS 诱导的小鼠急性 UC 的治疗效果。结果表明,参苓白术散浸膏可以有效改善 UC 小鼠的症状,其中参苓白术散中剂量组治疗效果最好。

参 考 文 献(References)

- [1] Tripathi K, Feuerstein JD. New developments in ulcerative colitis: latest evidence on management, treatment, and maintenance [J]. *Drugs Context*, 2019, 8; 212572.
- [2] 谢晶日, 陈善涛, 刘芝伟. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展 [EB/OL]. [2021-05-11]. <https://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20210430.002>.
Xie JR, Chen ST, Liu ZW. Research progress on pathogenesis of ulcerative colitis [EB/OL]. [2021-05-11]. <https://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20210430.002>.
- [3] Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [4] Pei LY, Ke YS, Zhao HH, et al. Role of colonic microbiota in the pathogenesis of ulcerative colitis [J]. *BMC Gastroenterol*, 2019, 19(1): 10.
- [5] 李沁媚, 王玉涵, 吕菲菲, 等. 溃疡性结肠炎与湿热证溃疡性结肠炎大鼠模型的比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(3): 354-363.
Li QM, Wang YH, Lyu FF, et al. Comparative study of rat models with ulcerative colitis and ulcerative colitis plus damp-heat syndrome [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(3): 354-363.
- [6] 付永平. 民间单方 X 对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎治疗作用的研究 [D]. 贵州: 遵义医科大学; 2020.
Fu YP. Study on the therapeutic effect of Folk Unilateral X on dextran sodium sulfate induced ulcerative colitis in mice [D]. Guizhou: Zunyi Medical University; 2020.
- [7] 袁榴翼, 李小锦, 尹清晨, 等. 中药干预肠道菌群改善肠黏膜屏障功能的研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(8): 1932-1938.
Yuan LY, Li XJ, Yin QS, et al. Research progress on Chinese materia medica intervening intestinal flora to improve intestinal mucosal barrier function [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49(8): 1932-1938.
- [8] 张彦卿, 黄晓青, 范海媚. 中医药治疗溃疡性结肠炎辨证用药分析 [J]. *山西中医*, 2013, 29(11): 56-57.
Zhang YQ, Huang XQ, Fan HM. Analysis of traditional Chinese medicine in the treatment of ulcerative colitis [J]. *Shanxi J Tradit Chin Med*, 2013, 29(11): 56-57.
- [9] 陈玉, 平倩, 刘鹏, 等. 溃疡性结肠炎常见中医证型分布及治疗探讨 [J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(10): 1888-1890.
Chen Y, Ping Q, Liu P, et al. Study of common TCM syndrome types distribution and treatment of ulcerative colitis [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2015, 42(10): 1888-1890.
- [10] 张声生, 李乾构, 沈洪, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识 (2009) [J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(5): 527-532.
Zhang SS, Li QG, Shen H, et al. Consensus on TCM diagnosis and treatment of ulcerative colitis (2009) [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2010, 30(5): 527-532.
- [11] 赖慧敏, 黄敏聪, 楼招欢, 等. 天台乌药对 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎模型大鼠的抗炎作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 37-44.
Lai HM, Huang MC, Lou ZH, et al. The effect of Tiantai Radix Linderae on a rat model of ulcerative colitis induced by TNBS [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(2): 37-44.
- [12] 谢鸣. 方剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2017.
Xie M. Prescription science [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2017.
- [13] 崔国宁, 刘喜平, 董俊刚, 等. 溃疡性结肠炎模型建立方法研究进展 [J]. *今日药学*, 2018, 28(4): 280-284.
Cui GN, Liu XP, Dong JG, et al. The research progress of the method in the establishment of ulcerative colitis model [J]. *Pharm Today*, 2018, 28(4): 280-284.
- [14] 陈素傲, 金世柱. 葡聚糖硫酸钠诱导溃疡性结肠炎模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 142-146.
Chen SA, Jin SZ. Murine model of dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 142-146.
- [15] Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104: 15.25.1-15.25.14.
- [16] Shah YM. The role of hypoxia in intestinal inflammation [J]. *Mol Cell Pediatr*, 2016, 3(1): 1.
- [17] 姜佳丽, 万晓萍. 粪便潜血试验的临床应用 [J]. *中华内科杂志*, 2012, 51(2): 93-94.
Jiang JL, Wan XP. Clinical application of fecal occult blood test [J]. *Chin J Intern Med*, 2012, 51(2): 93-94.
- [18] 魏让, 代应林. 介绍一种新的隐血试验方法—邻甲苯胺法 [J]. *临床检验杂志*, 1984, 2(2): 26-27.
Wei R, Dai YL. A introduction of the new method of occult blood test: o-toluidine method [J]. *Chin J Clin Lab Sci*, 1984, 2(2): 26-27.
- [19] Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. *Lab Invest*, 1993, 69(2): 238-249.
- [20] Ding A, Wen X. Dandelion root extract protects NCM460 colonic cells and relieves experimental mouse colitis [J]. *J Nat Med*, 2018, 72(4): 857-866.
- [21] 赵亚妮, 李瑶, 张妍, 等. 葡聚糖硫酸钠不同给药方式建立小鼠溃疡性结肠炎模型 [J]. *实验动物与比较医学*, 2021, 41(1): 33-39.
Zhao YN, Li Y, Zhang Y, et al. Establishment of ulcerative colitis model in mice by different drug delivery methods of dextran sodium sulfate [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2021, 41(1): 33-39.
- [22] 呼菁玉, 杜晓泉, 刘金响, 等. 脾虚类溃疡性结肠炎动物模型研究进展 [EB/OL]. [2021-06-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5529.r.20211115.0940.034.html>.
Hu JY, Du XQ, Liu JX, et al. Research progress on animal model of ulcerative colitis due to spleen deficiency [EB/OL]. [2021-06-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5529.r.20211115.0940.034.html>.

[收稿日期] 2021-06-07

陈浩浩,张艳芳,潘晓明,等. 抗生素诱导的微生物组耗损后促进空肠弯曲菌在小鼠肠道定植 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 793-799.

Chen HH, Zhang YF, Pan XM, et al. Antibiotic-induced microbiome depletion promotes the colonization of *Campylobacter jejuni* in the intestines of mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 793-799.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.011

抗生素诱导的微生物组耗损后促进空肠弯曲菌 在小鼠肠道定植

陈浩浩¹, 张艳芳¹, 潘晓明¹, 高素华¹, 张辉², 楼宏强^{1*}

(1. 金华职业技术学院医学院分子生物学实验室, 浙江 金华 321007; 2. 金华市食品药品检验检测研究院动物中心, 浙江 金华 321000)

【摘要】 目的 通过抗生素诱导肠道微生物组耗损建立一种空肠弯曲菌在 C57BL/6 小鼠肠道定植的方法。**方法** 将 36 只 C57BL/6 小鼠分为正常组、对照组及实验组, 头孢哌酮钠舒巴坦钠 (50 mg/mL) 连续灌胃 2 d 后, 灌胃空肠弯曲菌 200 μ L, 在建模后第 1 ~ 3 天, 收集肠道内容物进行 16S rDNA 法分析细菌多样性, 收集建模后 1 ~ 7 d 的动物粪便, 探针法 qPCR 检测粪便空肠弯曲菌 *HipO* 基因, 取建模后第 1 ~ 3 天及第 7 天小鼠肠道组织, 免疫荧光法检测肠弯曲菌定植, HE 染色观察病理学改变。**结果** 建模后实验组回肠的乳酸杆菌属、盲肠及结肠的拟杆菌属被抑制, 肠球菌属相对丰度较高, 第 1 天实验组检测到较高丰度的弯曲菌属。在建模后第 1 ~ 3 天, 实验组动物粪便中能检测到较高拷贝数的空肠弯曲菌, 肠道管腔内可见明显的免疫荧光标记的空肠弯曲菌, 而肠道黏膜基本完整, 未见明显的炎症细胞浸润。**结论** 经头孢哌酮钠舒巴坦钠诱导的微生物组耗损后能促进空肠弯曲菌在小鼠肠道内的短期定植。

【关键词】 空肠弯曲菌; 小鼠; 定植; 探针法 qPCR; 16S rDNA 分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0793-07

Antibiotic-induced microbiome depletion promotes the colonization of *Campylobacter jejuni* in the intestines of mice

CHEN Haohao¹, ZHANG Yanfang¹, PAN Xiaoming¹, GAO Suhua¹, ZHANG Hui², LOU Hongqiang^{1*}

(1. Medical Molecular Biology Laboratory, School of Medicine, Jinhua Polytechnic, Jinhua 321007, China.

2. Animal Center, Jinhua Food and Drug Inspection and Testing Research Institute, Jinhua 321000)

Corresponding author: LOU Hongqiang. Email: xyjwk@163.com

【Abstract】 Objective To establish a method of *Campylobacter jejuni* colonization in the intestine of C57BL/6 mice through antibiotic-induced microbiome depletion. **Methods** Thirty-six C57BL/6 female mice were divided into normal, control and experimental groups. After 2 days of cefoperazone sodium and sulbactam sodium intragastric administration (50 mg/mL), 200 μ L of *Campylobacter jejuni* were administered intragastrically. 16S rDNA analysis was performed to detect intestinal contents on days 1 ~ 3 post modeling. Animal feces were collected, and the *HipO* gene of *Campylobacter jejuni* was detected by TaqMan qPCR on days 1 ~ 7 post modeling. Immunofluorescence was used to detect the colonization of *Campylobacter jejuni* in the intestinal tissues of mice at 1, 2, 3 and 7 days, and the pathological changes

[基金项目] 浙江省基础公益研究计划项目 (LGF18H190004), 金华市科学技术研究计划项目 (2021-4-112)。

Funded by Basic Public Welfare Research Project of Zhejiang Province (LGF18H190004), Science and Technology Research Project of Jinhua City (2021-4-112)。

[作者简介] 陈浩浩 (1984—), 男, 讲师, 硕士, 研究方向: 人兽共患病。Email: 20101044@jhc.edu.cn

[通信作者] 楼宏强 (1977—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 病原生物学。Email: xyjwk@163.com

were observed by HE staining. **Results** In the experimental group, the *Lactobacillus* of the ileum and *Bacteroides* of the cecum and colon were inhibited. Additionally, the relative abundance of *Enterococcus* was increased, and a higher abundance of *Campylobacter* was detected on day 1. Higher *Campylobacter jejuni* copy numbers were detected in the feces of the experimental group by TaqMan qPCR on days 1~3, and immunofluorescence-labeled *Campylobacter jejuni* were clearly observed in the intestinal lumen. The intestinal mucosa was mainly intact and showed no obvious inflammatory cell infiltration. **Conclusions** Microbiome depletion induced by cefoperazone sodium and sulbactam sodium promoted the short-term colonization of *Campylobacter jejuni* in the intestine of mice.

【Keywords】 *Campylobacter jejuni*; mice; colonization; TaqMan qPCR; 16S rDNA analysis

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

我国的李春岩院士团队在 20 世纪 90 年代时从吉兰-巴雷综合征患者粪便里成功分离出了空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*, *C. jejuni*), 并经口灌胃构建了周围神经损伤的依沙巴布考克鸡模型^[1]。此外研究人员用空肠弯曲菌菌株灌胃家兔^[2]、小型猪^[3]以及豚鼠^[4]等, 也观察到了实验动物出现神经病理损伤。然而对于这些实验动物的使用是比较有限的, 不仅成本高、可重复性差, 还缺乏足够的免疫和遗传工具来深入研究这些动物^[5]。小鼠通常作为首选的感染动物模型, 却没有在空肠弯曲菌感染相关模型中得到广泛应用^[6-7]。研究显示, 小鼠肠道菌群, 尤其是拟杆菌属、梭状芽孢杆菌及乳酸杆菌等, 竞争性阻止了空肠弯曲菌在小鼠肠道内的定植, 从而使小鼠不易感空肠弯曲菌^[8-9]。

抗生素诱导的微生物组耗损(antibiotic-induced microbiome depletion)是近几年兴起的一种可替代无菌小鼠用于研究肠道微生物群在某些病理条件下作用的新方法^[10-12]。通常认为, 动物肠道内的共生菌群能阻止外源性病原体的侵入, 是宿主防御的重要组成部分^[13]。肠道菌群以多种方式抵抗病原体, 包括消耗病原体生存必需的营养、产生细菌素和有机酸、改变肠腔内的 pH 值或者利用肠道内有限的氧气等^[14-15], 而抗生素打破了肠道菌群的平衡, 还导致细菌裂解、碳源释放以及胆汁酸水平的升高^[16]。本研究利用头孢哌酮钠舒巴坦钠诱导肠道微生物组耗损, 建立一种空肠弯曲菌在 C57BL/6 小鼠肠道定植的方法, 为后续空肠弯曲菌致病性相关的研究提供基础条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

36 只 8 ~ 10 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠, 体重 18 ~ 20 g, 购自杭州医学院【SCXK(浙)2019-

0002】, 饲养于金华市食品药品检验检测研究院动物中心【SYXK(浙)2021-0009】, 给予灭菌饮用水及食物, 昼夜各半循环照明, 湿度恒定, 温度控制在 22 ~ 25℃。所有的动物实验经金华职业技术学院实验动物伦理委员会批准(审批号: JHCDW2021003), 在整个实验过程中, 如果小鼠表现出极度痛苦或体重下降超过 15% 的迹象, 就对其实施安乐死。空肠弯曲菌购自中国工业微生物菌种保藏中心(CICC22936, ATCC33291), 接种于哥伦比亚血琼脂平板上, 微需氧条件下 42℃ 培养 48 h。

1.1.2 主要试剂与仪器

注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠购自辉瑞制药, QIAamp® FAST DNA Stool Mini Kit 购自 QIAGEN 公司, 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, iTaq Universal Probes supermix 及兔抗空肠弯曲菌多克隆抗体购自 Bio-Rad 公司, 驴抗兔 IgG H&L 二抗购自 Abcam 公司, PCR 引物及荧光探针由上海生工生物工程有限公司合成, 16S rDNA 法测序及分析委托上海天昊生物科技有限公司完成。荧光定量 PCR 仪(CFX96, Bio-Rad 公司, 美国), 正置荧光显微镜(BX53, 奥林巴斯, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型构建及分组

将小鼠随机分为 3 组, 分别为正常组($n=6$)、对照组($n=15$)及实验组($n=15$), 适应性喂养 7 d 后, 实验组灌胃 200 μ L 的注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠(50 mg/mL), 第 2 天重复灌胃 1 次, 对照组使用 200 μ L 生理盐水灌胃替代, 正常组不做任何处理。第 3 天实验组和对照组分别灌胃 200 μ L 含空肠弯曲菌(4.0 麦氏浊度, 约 1.2×10^9 CFU/mL)生理盐水溶液, 建模完成^[12,17]。

1.2.2 小鼠肠道细菌多样性分析

在建模后第 1、2、3 天, 麻醉小鼠(每组 3 只), 脱颈安乐死, 立即解剖小鼠, 取末端回肠、近端结肠

及盲肠,收集内容物,参照 QIAamp® FAST DNA Stool Mini Kit 说明书步骤分离纯化 DNA,送生物技术公司进行 16S rDNA 法鉴定细菌种属。

1.2.3 探针法 qPCR 检测粪便空肠弯曲菌

建模后第 1~7 天,每日收集小鼠新鲜粪便,提取粪便细菌 DNA。另于第 7、14 天取末端回肠、近端结肠及盲肠,收集内容物,微需氧条件下 42℃ 液体培养液增菌培养 24 h,收集菌液,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。取 5 μL 作为模板,分别 10 μmol/L *HipO* 上下游引物及探针各 0.5 μL (序列见表 1), 2 × iTaq Universal Probes supermix 10 μL, ddH₂O 3.5 μL。94℃ 3min; 93℃ 30 s, 55℃ 45 s, 40 个循环; Bio-Rad CFX96 PCR 仪上进行扩增,同时扩增已知梯度浓度的空肠弯曲菌 DNA,构建 Cq 值和拷贝数的对数拟合曲线方程,之后根据各样本扩增产物 Cq 值进行拷贝数的绝对定量。

1.2.4 组织学检测

分别在建模后第 1、2、3、7 天,取动物的回肠、结肠及盲肠组织,4%多聚甲醛溶液固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋、切片,经脱蜡,水化,柠檬酸钠缓冲液抗原修复, TritonX-100 透膜,加封闭液后湿盒中

37℃ 孵育 30 min。弃封闭液,加一抗 (兔抗空肠弯曲菌, 1:100) 4℃ 孵育过夜,加二抗 (Donkey Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor® 647, 1:200) 37℃ 孵育 1 h, DAPI 染色,抗淬灭荧光封片剂封片,荧光显微镜拍照计数。对建模后第 3、7 天的回肠、盲肠及结肠石蜡切片进行苏木精、伊红染色后拍照。

1.3 统计学分析

所有数据均采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间数据分析采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 16S rDNA 法鉴定回肠、结肠及盲肠细菌种属

委托生物公司进行了肠道内容物 16S rDNA 测序法分析了细菌群落组成 (见图 1), 结果显示, 对照组回肠内容物中乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 相对丰度较高, 盲肠及结肠内容物中拟杆菌属 (*Bacteroides*) 相对丰度较高, 实验组肠道内容物中皆是肠球菌属 (*Enterococcus*) 相对丰度较高。另外, 在建模后第 1 天实验组肠道中检测到较高丰度的弯曲菌属 (*Campylobacter*)。

表 1 空肠弯曲菌 *HipO* 基因特异性引物及探针序列

Table 1 *HipO* gene-specific primers and probe sequences of *C. jejuni*

名称 Name	引物序列 (5'-3') Primers sequences (5'-3')
<i>HipO</i> 上游引物 <i>HipO</i> sense primer	GAATTGTGATACCTTAAGTGCAGC
<i>HipO</i> 下游引物 <i>HipO</i> antisense primer	AGGCACGCCTAACTATAGCT
探针 Probe	FAM-CTCCTTGCTCATCTTTAGGATAAATTCCTTTCAC-TAMRA

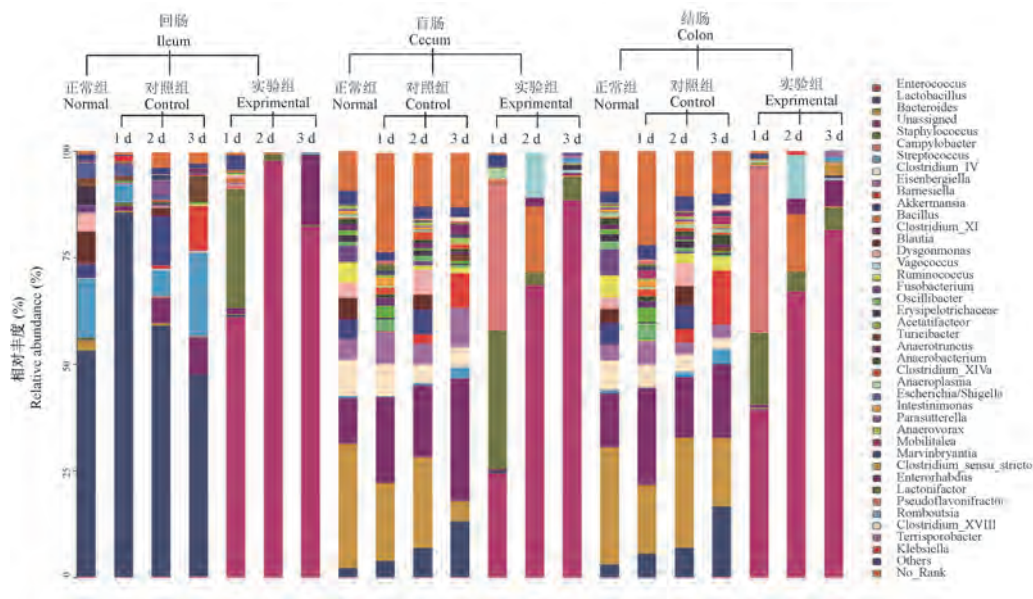


图 1 16S rDNA 测序分析 3 组肠道内容物细菌群落结构结果

Figure 1 Bacterial community structure of the intestinal contents in 3 groups analyzed by 16S rDNA sequencing method

2.2 小鼠粪便检出空肠弯曲菌

建模后收集小鼠粪便,持续 7 d,利用探针法 qPCR 检测空肠弯曲菌 *HipO* 基因,得出 C_q 值(见图 2)和拷贝数的对数拟合曲线方程 $y = -0.303x + 13.379$ ($R^2 = 0.9995$),将各样本的 C_q 值代入公式后计算拷贝数。结果显示,在建模后第 1~3 天的实验组动物粪便中能检测到较高拷贝数的空肠弯曲菌($P < 0.01$,见表 2),而对照组动物粪便仅在第 1 天检出较高拷贝数的空肠弯曲菌。对实验组第 7、14 天肠道内容物增菌培养后,在第 7 天的盲肠和结肠内容物中检测到了较高拷贝数的空肠弯曲菌,分别为 (1850 ± 116) 及 (1238 ± 182) ,在第 14 天的结肠内容物空肠弯曲菌拷贝数 (2990 ± 195) 。

2.3 空肠弯曲菌在小鼠肠道定植

我们对建模后第 1、2、3 及 7 天时小鼠的回肠、结肠及盲肠组织进行了空肠弯曲菌(红色)的免疫荧光染色。结果显示,第 1、2 及 3 天实验组的回肠、结肠、盲肠管腔内可见明显的红色荧光标记的空肠弯曲菌,第 7 天时肠道内未见明显的红色标记(见

图 3);对照组在第 1 天结肠可见少量的红色标记,其他时间段未见红色明显红色荧光标记。

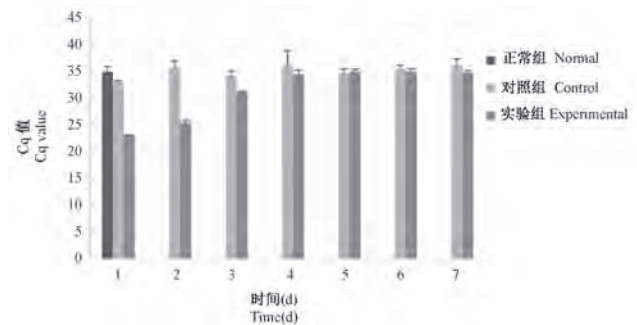


图 2 探针法 qPCR 检测 3 组空肠弯曲菌 *HipO* 基因的 C_q 值

Figure 2 C_q value of *C. jejuni* *HipO* gene in 3 groups detected by TaqMan qPCR

2.4 空肠弯曲菌短期定植未引起小鼠肠道炎症反应

建模后第 3、7 天的回肠、盲肠及结肠 HE 染色结果显示,实验组小鼠肠道黏膜基本完整,未见明显的炎症细胞浸润(见图 4)。

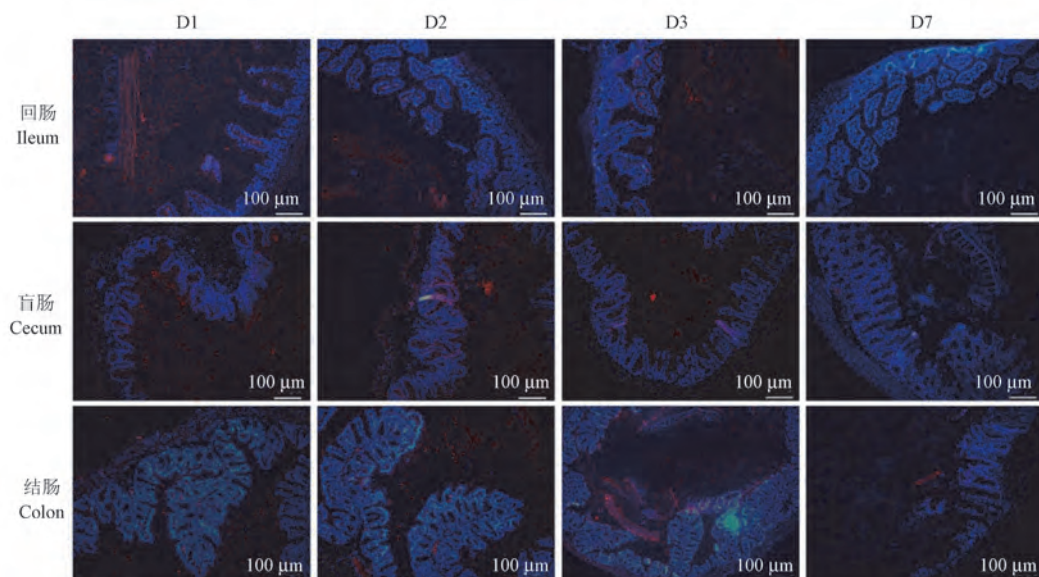
表 2 绝对定量 2 组空肠弯曲菌 *HipO* 基因拷贝数

Table 2 Absolute quantification of *C. jejuni* *HipO* gene copy number in 2 groups

组别 Groups	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D14
对照组 Control	2236 ± 243	391 ± 222	1243 ± 815	594 ± 520	796 ± 369	461 ± 181	367 ± 233	381 ± 145
实验组 Experimental	$2.54 \times 10^6 \pm 2.32 \times 10^5^*$	$4.61 \times 10^5 \pm 1.46 \times 10^5^*$	$8717 \pm 1030^*$	912 ± 384	635 ± 185	632 ± 192	712 ± 172	615 ± 302

注:与对照组相比, * $P < 0.01$ 。

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



注:其中红色荧光为空肠弯曲菌,蓝色为 DAPI 染色。

图 3 建模后第 1、2、3 及 7 天小鼠肠道组织免疫荧光染色

Note. The red fluorescence is *C. jejuni*, the blue is DAPI staining.

Figure 3 Immunofluorescence staining of mouse intestinal tissue at 1, 2, 3 d and 7 d post modeling

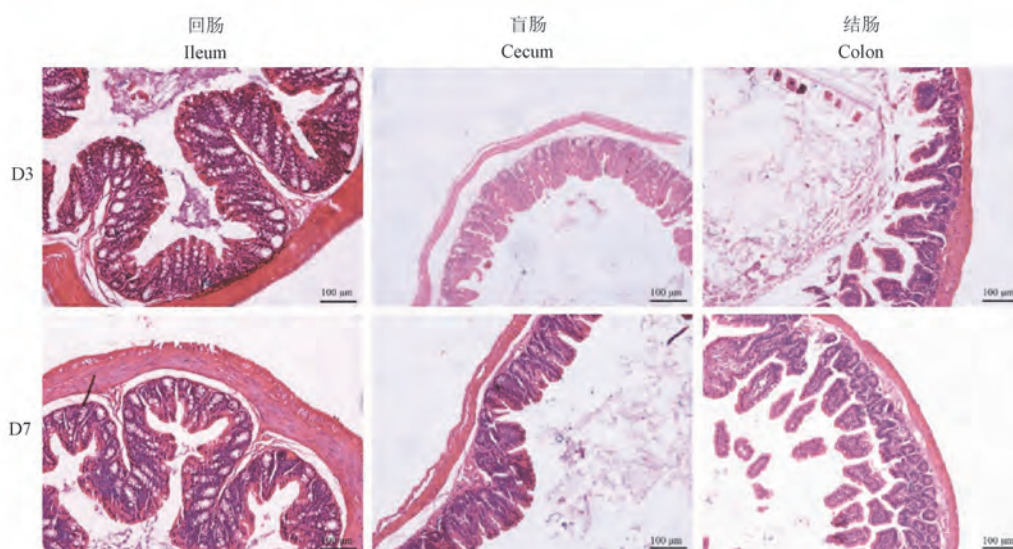


图 4 建模后第 3、7 天小鼠肠道组织 HE 染色

Figure 4 HE staining of mouse intestinal tissue at 3, 7 d post modeling

3 讨论

空肠弯曲菌的宿主较广泛,包括禽类和哺乳类动物,也是弯曲杆菌属中最主要的引起全球范围内人类胃肠炎的致病菌之一。空肠弯曲菌不能在小鼠的消化道内定植,小鼠肠道菌群被认为是阻止了空肠弯曲菌定植的重要因素之一^[16,18],动物的肠道有大量微生物定居,每克结肠粪便中的细菌含量超过 10^{11} 个^[13]。在本研究中,利用头孢哌酮钠舒巴坦钠连续灌胃 2 d,诱导小鼠肠道微生物组耗损,引起肠道菌群平衡失调^[19],使空肠弯曲杆菌能够在小鼠肠道中定植。通过肠道内容物细菌群落组成分析结果表明,回肠中的乳酸杆菌,盲肠及结肠中的拟杆菌属,可能是对病原体提供定植抗性的重要菌群^[20-21]。

一般认为在新鲜粪便中出现或直接从动物肠道中培养出空肠弯曲菌,即可认为空肠弯曲菌在消化道内定植成功。在本研究中,在建模后的前 3 d 的小鼠粪便中都检出了较高拷贝数的空肠弯曲菌,此外在肠道组织切片中,通过免疫荧光染色也证实了空肠弯曲菌在小鼠肠道的定植。在对建模后第 7、14 天小鼠肠道内容物进行增菌培养后,仍能在结肠内容物中检出了少量的空肠弯曲菌,但组织病理学检测也未发现明显的炎性细胞浸润,提示空肠弯曲菌可能没有进入肠道组织的深部。空肠弯曲菌依

赖鞭毛的定向趋化运动,穿越黏膜表面黏液层到达空肠及回肠黏膜细胞表面定植。趋化蛋白 (chemotaxis protein, CheY) 负责将感觉信号从空肠弯曲菌的化学感受器传送到鞭毛,能调节鞭毛的顺时针旋转,研究显示,空肠弯曲菌的 CheY 失活后,其鞭毛的运动性和侵袭力没有改变,但丧失了化学趋化性,造成它不能在动物的肠道细胞内定植^[22-23]。刘硕^[24]采用经口灌胃攻毒昆明小鼠,收集粪便分离培养空肠弯曲菌,之后用分离菌株继续攻毒新一批小鼠,连续传代十八代,从而得到了毒力增强且稳定遗传的分离株。本研究采用建模的菌株为空肠弯曲菌质控标准菌株 ATCC33291,如果采用其他侵袭性及致病性更强的菌株,可能就会有不同的实验结果。

消化道具有复杂的免疫系统,包括免疫细胞、免疫组织和免疫作用因子等,它们之间通过持续有效的相互作用消除侵入的致病菌^[25-26]。当小鼠体内的免疫系统出现变化时,空肠弯曲菌就可以在其肠道内定植,有研究者在空肠弯曲菌攻击免疫缺陷的转基因小鼠前给予口服氨苄西林、万古霉素等广谱抗生素,结果发现空肠弯曲菌在结肠、肠系膜淋巴结及脾等部位定植^[8,17,27]。此外,空肠弯曲菌能有效地在无菌小鼠的肠道内定植,并向其免疫组织器官传播^[28]。可是不管是免疫基因缺陷小鼠还是无菌小鼠,都极大地改变了小鼠的免疫系统,不能

有效模拟空肠弯曲菌在健康人肠道的感染以及后续诱发的相关疾病。另外,近期高通量肠道宏基因组测序分析提示性别因素是对肠道菌群影响最大的^[29],在本研究中,为了肠道菌群保持相对一致,同组小鼠保持同笼饲养,另外饲养周期大于 2 周,所以选取了雌性的小鼠。那么性别或者激素是否会影响空肠弯曲菌的定植,这是一个值得继续深入研究的问题。

综上所述,本研究证实了经头孢哌酮钠舒巴坦钠诱导的微生物组耗损后能促进空肠弯曲菌在小鼠肠道内的短期定植,但如果要维持持续定植并产生致病性仍需要更深入的研究,寻找更合适的方案。

参 考 文 献(References)

- [1] 李春岩,薛平,刘瑞春,等.空肠弯曲菌致鸡格林-巴利综合征动物模型的初步研究[J].脑与神经疾病杂志,1994,2(2):68-69.
Li CY, Xue P, Liu RC, et al. A preliminary study on an animal model of Guillain-Barre syndrome caused by *Campylobacter jejuni* [J]. J Brain Nerv Dis, 1994, 2(2): 68-69.
- [2] 刘怀军,陈薇,刘瑞春,等.构建空肠弯曲菌致兔中枢神经系统病变的动物模型(英文)[J].中国临床康复,2006,10(16):174-177,197.
Liu HJ, Chen W, Liu RC, et al. Construction of rabbit animal model of lesion of central nervous system induced by *Campylobacter jejuni* [J]. Chin J Clin Rehabil, 2006, 10(16): 174-177, 197.
- [3] 薛峰,曾德新,徐飞,等.空肠弯曲菌致 GBS 动物模型的建立[J].中国动物检疫,2015,32(2):19-23.
Xue F, Zeng DX, Xu F, et al. Establishment of the animal model for *C. jejuni* induced GBS [J]. Chin Anim Health Inspection, 2015, 32(2): 19-23.
- [4] 杜凤萍. 吉兰-巴雷综合征源空肠弯曲菌周围神经病 Hartley 豚鼠模型建立[D]. 石家庄:河北医科大学;2013.
Du FP. Axonal degeneration followed by *Campylobacter jejuni* lulei Hartley guinea pig model [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University; 2013.
- [5] Dorrell N, Wren BW. The second century of *Campylobacter* research: recent advances, new opportunities and old problems [J]. Curr Opin Infect Dis, 2007, 20(5): 514-518.
- [6] 程雪婷,陈妍灵,黄晓东.空肠弯曲杆菌感染小鼠模型的研究进展[J].中国实验动物学报,2021,29(1):122-127.
Cheng XT, Chen YL, Huang XD. Advances in mouse models of *Campylobacter jejuni* infection [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 122-127.
- [7] 商宇伟,王楠,黄金林,等.空肠弯曲菌感染动物模型的研究进展[J].中国实验动物学报,2013,21(4):86-90.
Shang YW, Wang N, Huang JL, et al. Progress in animal models of *Campylobacter jejuni* infection [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2013, 21(4): 86-90.
- [8] O' Loughlin JL, Samuelson DR, Braundmeier-Fleming AG, et al. The intestinal microbiota influences *Campylobacter jejuni* colonization and extraintestinal dissemination in mice [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(14): 4642-4650.
- [9] Masanta WO, Heimesaat MM, Bereswill S, et al. Modification of intestinal microbiota and its consequences for innate immune response in the pathogenesis of campylobacteriosis [J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 526860.
- [10] Hernández-Chirilaque C, Aranda CJ, Ocón B, et al. Germ-free and antibiotic-treated mice are highly susceptible to epithelial injury in DSS colitis [J]. J Crohns Colitis, 2016, 10(11): 1324-1335.
- [11] Wang S, Qu Y, Chang L, et al. Antibiotic-induced microbiome depletion is associated with resilience in mice after chronic social defeat stress [J]. J Affect Disord, 2020, 260: 448-457.
- [12] Zarrinpar A, Chaix A, Xu ZZ, et al. Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2872.
- [13] Xu J, Gordon JL. Honor thy symbionts [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(18): 10452-10459.
- [14] Kalliomäki MA, Walker WA. Physiologic and pathologic interactions of bacteria with gastrointestinal epithelium [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2005, 34(3): 383-399.
- [15] Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, et al. Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(1): 946-949.
- [16] Britton RA, Young VB. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile* [J]. Gastroenterology, 2014, 146(6): 1547-1553.
- [17] Brooks PT, Bell JA, Bejcek CE, et al. An antibiotic depleted microbiome drives severe *Campylobacter jejuni*-mediated Type 1/17 colitis, Type 2 autoimmunity and neurologic sequelae in a mouse model [J]. J Neuroimmunol, 2019, 337: 577048.
- [18] Lawley TD, Clare S, Walker AW, et al. Targeted restoration of the intestinal microbiota with a simple, defined bacteriotherapy resolves relapsing *Clostridium difficile* disease in mice [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(10): e1002995.
- [19] Robinson CJ, Bohannon BJ, Young VB. From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2010, 74(3): 453-476.
- [20] Antonopoulos DA, Huse SM, Morrison HG, et al. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation [J]. Infect Immun, 2009, 77(6): 2367

- 2375.
- [21] Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, et al. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing [J]. PLoS Biol, 2008, 6(11): e280.
- [22] Reuter M, Ultee E, Tosefa Y, et al. Inactivation of the core cheVAWY chemotaxis genes disrupts chemotactic motility and organised biofilm formation in *Campylobacter jejuni* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2020, 367(24): fnaa198.
- [23] Korolik V. The role of chemotaxis during *Campylobacter jejuni* colonisation and pathogenesis [J]. Curr Opin Microbiol, 2019, 47: 32-37.
- [24] 刘硕. 空肠弯曲菌连续灌胃经小鼠消化道定植后分离及分离株毒力变化的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学; 2016.
- Liu S. Study planting Isolation and virulence of isolates after *Campylobacter jejuni* gastrointestinal colonization of mice by continuous gavage [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University; 2016.
- [25] Diehl GE, Longman RS, Zhang JX, et al. Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1 (hi) cells [J]. Nature, 2013, 494(7435): 116-120.
- [26] Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(11): 790-801.
- [27] Stahl M, Ries J, Vermeulen J, et al. A novel mouse model of *Campylobacter jejuni* gastroenteritis reveals key pro-inflammatory and tissue protective roles for Toll-like receptor signaling during infection [J]. PLoS Pathog, 2014, 10(7): e1004264.
- [28] Chang C, Miller JF. *Campylobacter jejuni* colonization of mice with limited enteric flora [J]. Infect Immun, 2006, 74(9): 5261-5271.
- [29] Zhang XY, Zhong HZ, Li Y, et al. Sex- and age-related trajectories of the adult human gut microbiota shared across populations of different ethnicities [J]. Nat Aging, 2021, 1: 87-100.

[收稿日期] 2021-06-09

彭冬冬,陈相池,夏伟,等. 大鼠混合细菌感染性肺炎模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 800-807.

Peng DD, Chen XC, Xia W, et al. Establishment and evaluation of a mixed bacterial pneumonia rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 800-807.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.012

大鼠混合细菌感染性肺炎模型的建立与评价

彭冬冬^{1,2}, 陈相池^{1,2}, 夏伟^{1,2}, 刘学武^{1,2}, 王菲^{3*}

(1. 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 长沙 410331; 2. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司, 长沙 410331; 3. 上海市第十人民医院, 上海 200072)

【摘要】 目的 建立金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌混合细菌感染性肺炎模型, 为药效评价提供动物模型支持。**方法** SD 大鼠 36 只, 雌雄各半, 随机分为空白对照组、模型对照组、红霉素组, 每组 12 只。各组麻醉后, 模型对照组、红霉素组气管滴入 1×10^8 CFU/mL 混合菌液, 每只 0.5 mL, 空白对照组滴入等体积生理盐水。造模 2 h 后进行口鼻吸入给药, 每天 3 次, 每次 10 min, 每次间隔 4 h, 连续给药 7 d。给药期间, 观察各组大鼠一般状态; 造模第 3、7 天检查大鼠肺功能, 测定肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中白细胞数与中性粒细胞百分比, ELISA 检测 BALF 中白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α), HE 染色观察肺组织病理学改变, 并对肺组织进行细菌培养计数。**结果** 与空白对照组比较, 模型对照组体温、白细胞 (White Blood Cell, WBC)、中性粒细胞计数 (Neu%)、TNF- α 、IL-6 显著增大, 用力肺活量 (forced vital capacity, FVC)、用力呼气量占用力肺活量比值 (FEV₂₀₀/FVC)、潮气容积 (V_T) 显著减小, 大鼠肺泡结构被破坏, 大量炎症细胞浸润、肺间质增厚; 与模型对照组比较, 红霉素组体温、WBC、Neu%、TNF- α 、IL-6 显著下降, FVC、FEV₂₀₀/FVC、V_T 显著上升, 大鼠肺组织病理学改变明显减轻, 肺组织中金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌数目明显减少。**结论** 本实验采用金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌的混合细菌, 经气管滴入大鼠肺建立细菌感染性肺炎模型成功, 可用来进行药效作用的评价。

【关键词】 细菌性肺炎; 大鼠; 混合感染; 炎症因子; 肺功能

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0800-08

Establishment and evaluation of a mixed bacterial pneumonia rat model

PENG Dongdong^{1,2}, CHEN Xiangchi^{1,2}, XIA Wei^{1,2}, LIU Xuewu^{1,2}, WANG Fei^{3*}

(1. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331, China.

2. Hunan Prima Pharmaceutical Research Center Co. Ltd, Changsha 410331.

3. Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai 200072)

Corresponding author: WANG Fei. E-mail: Wangfei2913@126.com

【Abstract】 Objective To establish a susceptible pneumonia model of mixed bacteria, including *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*, and provide a useful animal model for drug efficacy evaluation. **Methods** Thirty-six healthy adult SD rats (50% male and 50% female) were randomly divided into the blank group, model group and erythromycin group, with twelve rats in each group. After the animals in each group were anesthetized with diethyl ether, the model group and erythromycin group were instilled with 1×10^8 CFU/mL mixed bacterial solution (0.5 mL each rat), and the blank group was instilled with an equal volume of saline. After 2 h, the drug was administered three

【基金项目】 湖南省重点研发计划 (2020DK2003)。

Funded by Hunan Key R & D Program (2020DK2003)。

【作者简介】 彭冬冬 (1990—), 男, 助理研究员, 在职硕士, 研究方向: 中药药理与毒理。Email: pengdongdong@hnsc.org

【通信作者】 王菲 (1980—), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 中医内科呼吸系统。Email: Wangfei2913@126.com

times for 10 min each time in 4 h intervals, followed by continuous administration for the next 7 days. During administration, the general state of rats in each group was observed. On the 3rd and 7th day of modeling, the lung function of rats was evaluated, and the number of white blood cells and percentage of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined. ELISA was used to detect interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in BALF. HE staining was performed to observe the pathological changes and count the bacterial cultures in lung tissues. **Results** Compared with the blank group, the model group showed significantly increased body temperature, WBC, Neu%, TNF- α and IL-6, significantly decreased FVC, FEV200/FVC and VT, damaged alveolar structure, a large number of infiltrated inflammatory cells and interstitial lung thickening. Compared with the model group, the erythromycin group exhibited significantly decreased body temperature, WBC, Neu%, TNF- α and IL-6 and significantly increased FVC, FEV200/FVC and VT. Rat lung histopathological changes were significantly alleviated. The number of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* and *Escherichia coli* were significantly reduced. **Conclusions** In this experiment, a mixture of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli* was instilled into the lungs of rats through the trachea to establish a model of bacterial pneumonia, and this model can be used to evaluate the effect of drugs.

【Keywords】 bacterial pneumonia; rats; mixed infection; inflammatory factors; lung function

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

肺炎是临床上常见的呼吸道疾病,发病率、死亡率常年居高不下,对人们的健康危害极大,对老人和儿童尤甚,在中国每年约有 2100 万儿童罹患肺炎^[1]。肺炎按病因可分为细菌性肺炎、非典型病原体所致肺炎、病毒性肺炎、肺真菌病、其他病原体所致肺炎等,其中细菌性肺炎最为常见^[2]。近年来,国内外学者多采用金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯杆菌等细菌构建单一细菌感染肺炎模型^[3-5],但多种细菌混合后的肺炎感染建模鲜有报道。最新的文献均指出越来越多的社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia, CAP) 病例中诊断出多种微生物混合感染,它们包括细菌、病毒和真菌等多种组合,其中以细菌合并感染最普遍。常见的混合细菌包括肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌以及一些非典型病原体,如肺炎支原体和肺炎衣原体等,它们之间的组合是 CAP 常见的发病原因。混合细菌性肺炎存在于所有年龄段,除以肺炎链球菌为主要病原体的情况外,约 10% ~ 35% 的肺炎病例为多种细菌混合感染。由于细菌之间的相互作用,会影响混合细菌感染性肺炎病情的诊断,并且使得病情更加严重,治疗手段有限、治疗效果差^[6-7]。然而目前对于混合细菌感染性肺炎药物治疗效果评价的研究却很少,因此有必要对其进行研究^[8-9]。本研究拟采用金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌以及大肠杆菌等比例混后侵染大鼠,建立细菌性肺炎模型,旨在建立稳定的混合细菌感染性肺炎模型,为细菌性肺炎发病机制研究及抗细菌性肺炎药物的评价提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

36 只 5 ~ 6 周龄 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重 (200 $\pm$ 20) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2016-0006】,饲养于湖南省药物安全评价研究中心病原微生物实验室 (ABSL-II) (长卫计实备字 (2019) 第 B001 号)【SYXK(湘)2020-0015】,期间给予鼠全价颗粒饲料,自由饮水,室温 (23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度 40% ~ 60%,光照明暗各 12 h,通风良好。动物实验经湖南省药物安全评价研究中心实验动物管理伦理委员会批准 (IACUC2020 (3)038)。

1.1.2 病原微生物

金黄色葡萄球菌,肺炎链球菌,大肠杆菌标准株,由中国人民解放军第四军医大学检验科赠送,在本中心病原微生物实验室培养和扩增。实验前 1 d 将 3 种菌株接种于羊血琼脂糖平板上,于 CO₂ 恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 18 ~ 24 h 后,收集细菌。将上述 3 株细菌收集液用无菌 0.9% 氯化钠注射液稀释至 1 $\times$ 10⁸ CFU/mL,再将 3 株细菌收集液按 1:1:1 混合后,备用。

1.1.3 主要试剂与仪器

注射用乳糖酸红霉素 (规格:以红霉素计 0.25 g/瓶,批号:190602,由东易和天生物科技有限公司生产)、丙泊酚乳状注射液 (规格:20 mL:0.2 g,批号:21912183,由西安力邦制药有限公司生产)、大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) (批号:09/2020)、大鼠

白细胞介素 6 (IL-6) (批号:09/2020), 以上试剂盒均由江苏酶免实业有限公司提供。BCR-RI01-30-C12-PPSU 型大鼠独立通气笼盒系统(山东新华医疗器械股份有限公司)、BSC1300-II-A2 型生物安全柜(山东新华医疗器械股份有限公司)、HRH-MNE3026 型小动物单浓度口鼻吸入染毒系统(北京慧荣和科技有限公司)、BC-5000Vet 型兽用五分类血液细胞分析仪(深圳迈瑞公司)、DFC 420C 型病理成像系统(德国 Leica 公司)、Spectra Max i3x 型多功能酶标仪(上海美谷光子公司)、小动物肺功能检测系统(上海塔望智能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模与给药

麻醉大鼠,将其仰卧解剖板上呈 $30^{\circ} \sim 45^{\circ}$ 角倾斜位置,用 1 mL 的注射器吸取混合细菌液 0.5 mL,连接穿刺长针,耳镜下暴露大鼠气管,注入气管内,抽出插管后,将实验动物保持头高脚低位,并轻轻左右旋转体位,使菌液均匀分布于大鼠的两肺。造模后 2 h 进行口鼻吸入给药,红霉素组大鼠经口鼻吸入给予 5 mg/mL 红霉素溶液,雾化时设置气溶胶质量检测仪浓度范围为 14 000 ~ 16 000 mg/cm³,空白对照组与模型对照组按相同方法给予 0.9% 氯化钠注射液,每天 3 次,每次 10 min,每次间隔 4 h,连续给药 7 d。

1.2.2 观察指标

(1)一般观察:观察各组大鼠活动状况、背毛、呼吸、自主活动等情况。

(2)体温测定:各组于造模第 3、7 天,采用 MC-347 型电子体温计测量大鼠肛温。

(3)肺功能检查:各组于造模第 3、7 天,按性别随机取 6 只大鼠,雌雄各半,采用尾静脉注射 10 mg/kg 丙泊酚乳状注射液(10 mg/mL)麻醉,麻醉后分离气管进行插管,采用小动物肺功能检测仪检测大鼠潮气量(VT)、呼吸频率(f)、每分通气量(MV)、用力肺活量(FVC)、第 0.2 秒量(FEV200),并计算 FEV200/FVC。

(4)肺泡灌洗液中白细胞(WBC)与中性粒细胞(Neu)含量测定:各组于造模第 3、7 天,首先对大鼠左侧主支气管结扎,采用 2 mL 的 0.9% 氯化钠注射液对大鼠右侧肺部进行灌洗,抽取 3 次,收集肺泡灌洗液(BALF),采用兽用五分类血液细胞分析仪检测 WBC 数目及 Neu%。

(5)BALF 中 IL-6、TNF- α 含量测定:将收集到的灌洗液转移至试管内,采用酶联免疫吸附法测定,具体如下:将样品稀释液和待测样品加入各样本孔,加入酶标试剂后 37℃ 温育 60 min。使用配好的洗涤液洗涤 5 次后加入显色剂,37℃ 避光反应 15 min 后加入终止液中止反应,终止反应后 15 min 内应用酶标仪检测 450 nm 处吸光度(OD),计算样本中浓度。

(6)肺组织病理学观察:收集肺泡灌洗液后腹主动脉放血安乐死,解剖取左侧下叶肺组织置于 10% 中性福尔马林溶液固定,经 HE 染色后,采用 DFC 420C 型病理成像系统观察肺组织病理学改变。

(7)肺组织细菌培养计数:除空白对照组外,其余每组中随机抽取 6 只动物(首次及末次解剖各随机挑选 6 只),雌雄各半,取左侧中叶肺组织,用 0.9% 氯化钠注射液清洗表面血迹。称取肺组织 1.0 g 于无菌的 Ep 管中,加入 1 mL 无菌生理盐水研磨成匀浆,采用 10 倍梯度进行稀释(即 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ……),选择适宜的 2 个梯度于选择性培养基上,且每个梯度做 2 个平行,置 $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后进行细菌计数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理,各组数据在分析前进行正态性检验和方差齐性检验,正态分布数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布数据用中位数表示。两组均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态

整个试验期间,空白对照组大鼠背毛光泽、活动能力强、饮食无异常、呼吸状态平稳,无气促现象、无其他异常;模型对照组给大鼠,给药期间背毛无光泽、呼吸急促、活动减少;红霉素组大鼠给药前期背毛无光泽,出现呼吸急促、活动减少现象,但随着给药时间的延长,上述状况明显好转,给药结束时,该组大鼠呼吸状态趋于正常,活动亦明显增多。

2.2 各组大鼠体温变化比较

如表 1 所示,与空白对照组比较,模型对照组造模第 3 ~ 7 天体温显著升高($P < 0.01$);与模型对照组比较,红霉素组造模第 4 ~ 6 天体温明显降低。

表 1 各组大鼠不同时间体温变化比较($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 1 Comparison of body temperature changes of rats in different groups at different times($\bar{x} \pm s, n=6$)

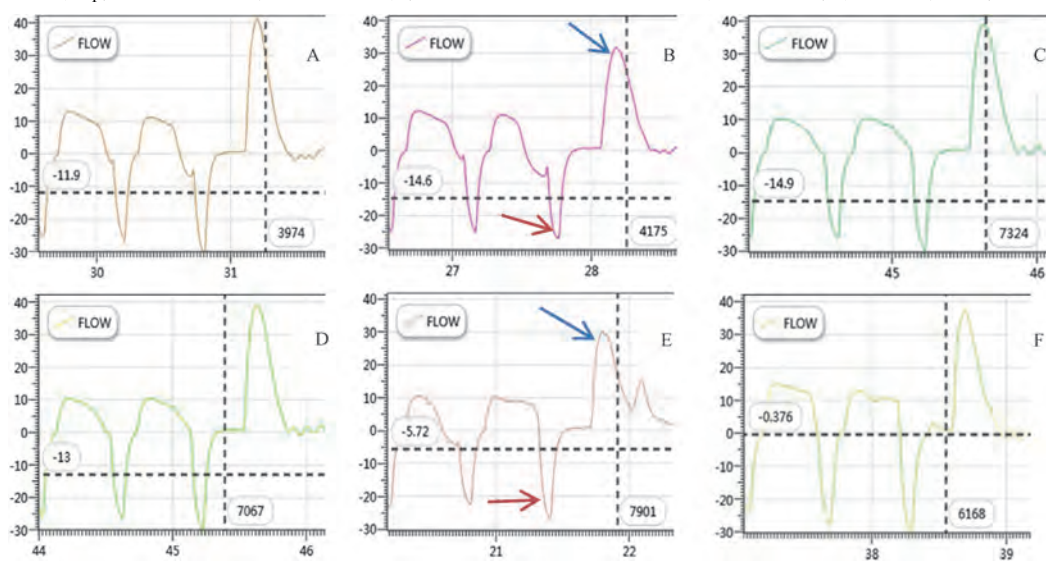
组别 Groups	体温(°C) Body temperature(°C)						
	第 1 天 D1	第 2 天 D2	第 3 天 D3	第 4 天 D4	第 5 天 D5	第 6 天 D6	第 7 天 D7
空白对照组 Blank group	37.0 ± 1.2	36.6 ± 0.9	35.9 ± 3.9	36.2 ± 1.2	36.4 ± 0.8	36.7 ± 0.4	36.8 ± 0.4
模型对照组 Model group	37.2 ± 0.5	36.6 ± 1.1	37.8 ± 0.7 ⁺⁺	37.5 ± 0.6 ⁺⁺	37.5 ± 1.2 ⁺⁺	37.1 ± 0.5 ⁺⁺	37.6 ± 0.3 ⁺⁺
红霉素组 Erythromycin group	36.5 ± 0.5	36.6 ± 0.7	37.7 ± 0.5	36.8 ± 0.3 [*]	35.7 ± 0.5 [*]	36.3 ± 0.7 [*]	37.2 ± 0.5

注:与空白对照组相比, ⁺⁺ $P < 0.01$;与模型对照组相比, ^{*} $P < 0.05$ 。Note. Compared with blank group, ⁺⁺ $P < 0.01$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$.

2.3 各组大鼠肺功能指标比较

如图 1 所示,造模第 3、7 天,模型对照组大鼠最大呼气及吸气流量较空白对照组均有明显降低,提示混合菌感染大鼠后,肺通气功能下降;模型大鼠经过雾化吸入红霉素溶液,发现大鼠最大呼气及吸气流量有所增加,提示红霉素可改善肺通气功能;造模第 3 天后,与空白对照组比较,模型对照组用力肺活量(FVC)显著减小($P < 0.01$)。与模型对照组比较,红霉素组潮气量(V_T)呈增加趋势,呼吸频率(f)呈降低

趋势,但无显著性差异,每分通气量(MV)无显著变化;红霉素组 FEV_{200}/FVC 显著增加($P < 0.01$)。提示,肺炎早期由于肺的通气功能受限,机体会通过增加呼吸频率,进而维持通气量的恒定。造模第 7 天后,与空白对照组比较,模型对照组潮气量、 FEV_{200}/FVC 均显著减小($P < 0.05, P < 0.01$);与模型对照组比较,红霉素组呼吸频率、每分通气量、FCV、 FEV_{200} 呈上升趋势,但无统计学差异,潮气量、 FEV_{200}/FVC 均显著增加($P < 0.01$) (见表 2, 表 3)。



注:造模 D3、D7 空白对照组、模型对照组和红霉素组肺通气功能图谱(图中蓝线和红线箭头分别代表最大呼气流量和最大吸气流量)。

图 1 不同时期各组大鼠肺通气功能图谱及肺功能指标

Note. Modeling D3, D7 lung ventilation function map of blank control group, model control group and erythromycin group (The blue and red arrows represent the maximum expiratory and inspiratory flows respectively).

Figure 1 Lung ventilatory function map and lung function index of rats in different periods

表 2 造模第 3 天各组大鼠肺功能指标比较($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 2 Comparison of lung function indexes of rats in each group 3 days of modeling($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	V_T (mL)	f (次/min)	MV(L/min)	FVC(mL)	FEV_{200} (mL)	FEV_{200}/FVC (%)
空白对照组 Blank group	1.77 ± 0.35	112 ± 26	0.19 ± 0.02	4.02 ± 0.35	3.74 ± 0.31	93.31 ± 0.77
模型对照组 Model group	1.41 ± 0.43	153 ± 31	0.21 ± 0.03	2.77 ± 0.26 ⁺	2.21 ± 0.26	79.96 ± 6.16 ⁺⁺
红霉素组 Erythromycin group	1.59 ± 0.39	132 ± 27	0.20 ± 0.02	3.12 ± 0.52	2.84 ± 0.54	90.65 ± 4.78 ^{**}

注:与空白对照组比较, ⁺ $P < 0.05$, ⁺⁺ $P < 0.01$;与模型对照组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。(下图/表同)Note. Compared with blank group, ⁺ $P < 0.05$, ⁺⁺ $P < 0.01$. Compared with model control group, ^{**} $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

表 3 造模第 7 天各组大鼠肺功能指标比较($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 3 Comparison of lung function indexes of rats in each group 7 days of modeling($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	V_T (mL)	f (次/min)	MV (L/min)	FVC (mL)	FEV ₂₀₀ (mL)	FEV ₂₀₀ /FVC (%)
空白对照组 Blank group	1.78 $\pm$ 0.23	116 $\pm$ 10	0.21 $\pm$ 0.03	4.75 $\pm$ 1.89	4.43 $\pm$ 1.70	93.58 $\pm$ 1.50
模型对照组 Model group	1.22 $\pm$ 0.22 ⁺⁺	125 $\pm$ 15	0.15 $\pm$ 0.01	3.55 $\pm$ 0.45	2.93 $\pm$ 0.63	81.63 $\pm$ 7.70 ⁺⁺
红霉素组 Erythromycin group	1.67 $\pm$ 0.24 ^{**}	130 $\pm$ 25	0.21 $\pm$ 0.01	3.68 $\pm$ 0.20	3.40 $\pm$ 0.12	92.36 $\pm$ 2.94 ^{**}

2.4 各组大鼠 BALF 中 WBC 与 Neu% 比较

如表 4 所示,造模第 3 天,与空白对照组比较,模型对照组白细胞数目显著增加($P < 0.05$);与模型对照组比较,红霉素组白细胞数目显著减少($P < 0.01$),中性粒细胞百分比(Neu%)无显著性差异。造模第 7 天,与空白对照组比较,模型对照组白细胞

数目、中性粒细胞百分比显著增加($P < 0.05, P < 0.01$);与模型对照组比较,红霉素组白细胞数目均显著减小($P < 0.01$)。值得关注的是,模型大鼠在造模后第 7 天白细胞数目较造模后第 3 天有一定的降低,提示肺炎大鼠在造模后第 7 天可能有自愈趋势。

表 4 不同时期各组大鼠 BALF 中 WBC、Neu(%) 比较($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 4 Comparison of WBC and Neu(%) in BALF of different groups of rats in different periods($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	造模第 3 天 3 days of modeling		造模第 7 天 7 days of modeling	
	WBC ($10^9/L$)	Neu (%)	WBC ($10^9/L$)	Neu (%)
空白对照组 Blank group	0.34 $\pm$ 0.06	44.6 $\pm$ 18.0	0.14 $\pm$ 0.11	38.4 $\pm$ 11.8
模型对照组 Model group	1.71 $\pm$ 1.21 ⁺⁺	55.1 $\pm$ 7.1	0.64 $\pm$ 0.17 ⁺⁺	55.5 $\pm$ 11.0 ⁺
红霉素组 Erythromycin group	0.89 $\pm$ 0.37 ^{**}	57.4 $\pm$ 5.8	0.33 $\pm$ 0.18 ^{**}	45.7 $\pm$ 12.2

2.5 各组大鼠 BALF 中 IL-6、TNF- α 比较

如表 5 所示,造模第 3 天,与空白对照组比较,模型对照组 IL-6、TNF- α 显著增加($P < 0.01$);与模型对照组比较,红霉素组 IL-6 虽一定程度降低,但无统计学差异,红霉素组 TNF- α 较模型对照组显著减小($P < 0.01$)。造模第 7 天,与空白对照组比较,模型对照组 IL-6、TNF- α 显著增加($P < 0.01$);与模型对照组比较,红霉素组 IL-6、TNF- α 均显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。

2.6 肺组织病理形态改变

如图 2 所示,空白对照组大鼠肺泡以及肺间质

的组织结构均为正常,首次解剖,模型对照组肺泡结构被破坏,肺泡壁明显增厚,可见肺泡壁血管充血,炎症细胞大量浸润,红霉素组均可见肺泡壁增厚,肺泡壁血管有微量充血,炎症细胞浸润,肺泡结构异常,但上述病理改变较模型对照组均有明显改善。末次解剖模型对照组肺泡壁增厚明显,可见肺泡壁血管少量充血,炎症细胞大量浸润,值得注意的是,末次解剖模型对照组肺组织在炎症细胞浸润方面较首次解剖有所减轻,与肺炎大鼠肺泡灌洗液白细胞结果基本一致,提示该肺炎模型在造模后 7 d 有一定自愈趋势。

表 5 不同时期各组大鼠 BALF 中 IL-6、TNF- α 比较($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5 Comparison of IL-6 and TNF- α in BALF of different groups of rats in different periods($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	造模第 3 天 3 days of modeling		造模第 7 天 7 days of modeling	
	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
空白对照组 Blank group	129.8 $\pm$ 1.8	270.4 $\pm$ 20.2	121.14 $\pm$ 4.8	256.7 $\pm$ 6.3
模型对照组 Model group	152.2 $\pm$ 6.2 ⁺⁺	326.6 $\pm$ 8.1 ⁺⁺	152.6 $\pm$ 8.1 ⁺⁺	310.6 $\pm$ 24.7 ⁺⁺
红霉素组 Erythromycin group	146.3 $\pm$ 4.4	298.1 $\pm$ 4.4 ^{**}	141.3 $\pm$ 3.9 ^{**}	258.6 $\pm$ 11.9 ^{**}

2.7 肺组织细菌培养计数

如表 6 所示,与模型对照组比较,造模第 3 天,红霉素组动物肺组织中大肠埃希菌、金黄葡萄球

菌、肺炎链球菌数目大幅度的降低($P < 0.01$),造模第 7 天,红霉素组动物肺组织中大肠埃希菌、金黄葡萄球菌、肺炎链球菌数目大幅度的降低($P < 0.01$)。

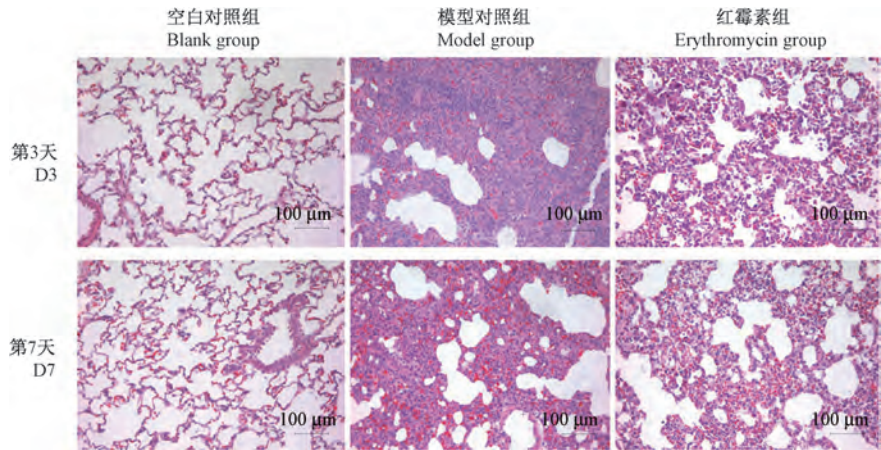


图 2 不同时期各组大鼠肺组织苏木精和伊红染色法结果($n=6$)

Figure 2 Results of hematoxylin and eosin staining in lung tissues of rats in different periods($n=6$)

表 6 不同时期各组大鼠肺组织细菌培养计数比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Comparison of bacterial culture counts of lung tissue in different groups of rats in different periods($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	第 3 天 (CFU/mL) Number of bacteria D3 (CFU/mL)			第 7 天 (CFU/mL) Number of bacteria D7 (CFU/mL)		
	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>
模型对照组 Model group	3100 ± 544	5027 ± 1017	4730 ± 1062	3712 ± 1102	5389 ± 2012	5290 ± 1881
红霉素组 Erythromycin group	447 ± 146 **	633 ± 146 **	1223 ± 287 **	243 ± 89 **	245 ± 70 **	301 ± 103 **

3 讨论

近些年来,国内外先后建立多种细菌感染性肺炎动物模型,但多数研究均是以单一菌株进行动物模型的建立,忽视了 CAP 多为混合感染,且以革兰阴性菌(如肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌等)感染多见,出现该现象可能与广泛应用抗菌药物致细菌耐药有关^[10]。混合细菌感染性肺炎患者除了会出现体温、肺功能、白细胞及肺部 X 光线等指标异常外,容易并发电解质紊乱、呼吸衰竭、心率失常等疾病,严重威胁患者的生命安全,并给临床诊治带来很大的困难,故此类动物模型建立对抗混合细菌感染性肺炎药物评价有着重要意义。因此本研究选用临床上较为普遍的革兰阴性菌(肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌)感染大鼠,按 1:1:1 的剂量混合后进行大鼠气管注射,建立大鼠混合细菌感染性肺炎模型,通过观察各组大鼠肛温、白细胞、肺功能及肺组织形态学变化,并观察金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌在大鼠肺组织定植情况,同时选用临床有效的红霉素雾化后对大鼠混合细菌感染性肺炎模型

的作用。

本实验结果显示,给予每只 0.5 mL 混合菌液感染(1×10^8 CFU/mL)大鼠,大鼠在注入菌液第 2 天就出现了活动减少、呼吸急促、反应迟钝等现象,且第 3 天体温明显上升,这与已报道的动物肺炎感染模型的症状相符^[3]。造模第 3 天,模型对照组动物肺功能检测结果显示,该组动物肺潮气量下降,呼吸频率上升,但每分通气量与空白对照组无明显差异,提示肺炎早期由于肺的通气功能受限,机体会通过增加呼吸频率,进而维持通气量的恒定;造模第 7 天,肺炎模型组动物潮气量、FEV₂₀₀/FVC 明显降低,呼吸频率趋于正常,提示随着病程的推进,模型对照组动物肺通气功能受损。给予红霉素雾化吸入治疗后,潮气量下降,FEV₂₀₀/FVC 提高。结果表明红霉素雾化治疗可以缓解细菌感染性肺炎造成的肺通气功能受损。

金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌表面复合物抗原能引起炎症反应、刺激细胞因子产生^[11-13]。TNF-α 具有广泛的生物活性的前炎症细胞因子,可由多种免疫细胞释放^[14],在免疫应答中, TNF-α 可诱导 IL-6、IL-10 等炎症因子的产生,肺炎

发病期间呈升高趋势,并与病情的程度相关^[15]。IL-6 是一种多功能细胞因子,与炎症密切相关,研究表明肺炎发病过程中 IL-6 显著升高^[16]。本实验结果显示,造模第 3、7 天肺炎模型组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-6 含量均明显上升,提示金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌刺激致大鼠 TNF- α 、IL-6 水平升高,介导炎性反应。给予红霉素雾化治疗后,肺炎动物肺泡灌洗液中的 TNF- α 、IL-6 水平显著降低,这表明红霉素雾化给药能明显下调肺炎大鼠 TNF- α 、IL-6 的水平,缓解 TNF- α 、IL-6 介导炎性反应。对模型对照组与红霉素组动物肺进行细菌培养计数,实验结果显示,红霉素雾化治疗后的动物肺中的金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌数目均有明显的减少,提示红霉素雾化治疗能显著抑制金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌在肺中的复制。

对支气管肺泡灌洗液中成分的检测,是一种有效研究肺组织局部免疫病理过程的方法^[17],能直接反映出感染肺炎的肺泡结构中细胞的类型和数量^[18]。其中白细胞和中性粒细胞的数量与肺炎程度紧密相关,可作为判断患者是否出现肺炎或判断肺炎严重程度的标准^[19]。本实验结果显示,相较于空白对照组,造模第 3、7 天模型对照组白细胞数目,中性粒细胞百分比均明显增加,这表明模型对照组动物肺部出现了炎症反应,肺组织病理学观察显示肺泡结构被破坏,肺间质明显增厚,大量炎性细胞浸润,亦表明该组动物肺部出现了严重的炎症。给予红霉素雾化治疗后,模型动物肺泡灌洗中白细胞数目,中性粒细胞降低明显,表明模型动物肺中的炎症反应得到了明显缓解,肺组织病理学观察结果亦显示该组动物的病变程度明显好转。令人意外的是,与第 3 天相比,在第 7 天模型对照大鼠肺泡灌洗液中白细胞数量出现下降的情况,并且肺组织病理改变也存在一定的改善,说明其具有一定的自愈趋势,与文献报道基本一致^[20]。考虑到传统的肺炎模型通常为重症模型,大鼠病情较重,死亡率较高,因此本实验采用混合细菌经气管单次给药的造模方式,并且给药剂量与文献相比也较低。在第 7 天,发现与空白对照大鼠相比,模型大鼠仍有明显的肺炎指征,因此我们认为本次实验结果仍具有一定参考价值。不过在后续研究中,我们还会对不同病原菌动物模型建立方法进行不断优化,并探索不同病原菌动物模型和菌株接种剂量以及菌株浓度的关

系,必要时辅以免疫抑制剂加强造模效果,为抗肺炎药物有效性评价和作用机制研究建立稳定的肺炎模型。

4 结论

综上所述,肺炎模型大鼠体温、肺功能参数的变化、肺泡灌洗液中炎症细胞与炎症因子以及肺组织病理学变化和肺组织细菌培养计数等指标变化的结果,认为采用金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌混合后经气管滴入大鼠肺部,该方法能成功建立细菌感染性肺炎大鼠模型,此外,发现红霉素溶液雾化给药对肺炎大鼠治疗效果显著。

参 考 文 献(References)

- [1] Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, et al. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia [J]. Bull World Health Organ, 2008, 86(5): 408-416.
- [2] 常建力. 痰热清注射液结合抗生素治疗对细菌性肺炎患者临床症状治愈率及复发率的影响 [J]. 中国药物与临床, 2017, 17(4): 584-586.
Chang JL. Effect of Tanreqing injection combined with antibiotics on the cure rate and recurrence rate of clinical symptoms of bacterial pneumonitis [J]. Chin Remedies Clin, 2017, 17(4): 584-586.
- [3] 谢泳超, 谷陟欣, 朱丽, 等. 裸花紫珠联合万古霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌致大鼠肺炎模型的协同抗菌作用研究 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3070-3073.
Xie YC, Gu SX, Zhu L, et al. Synergistic antibacterial effect of association of Callicarpa nudiflora and Vancomycin Hydrochloride towards rat model of MRSA pneumonia [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2016, 47(17): 3070-3073.
- [4] 张开宇, 童佳兵, 季红燕, 等. 清肺解毒饮对肺炎链球菌肺炎、肺炎克雷伯菌肺炎大鼠模型肺组织 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 及 IL-10 含量变化的影响 [J]. 中医药导报, 2014, 20(5): 10-12.
Zhang KY, Tong JB, Ji HY, et al. Effect of Lung-Clearing and toxin-resolving beverage on TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-10 content changes in lung tissue of streptococcus pneumonia and klebsiella pneumoniae model rats [J]. Guiding J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 20(5): 10-12.
- [5] Russo TA, Davidson BA, Carlino-MacDonald UB, et al. The effects of *Escherichia coli* capsule, O-antigen, host neutrophils, and complement in a rat model of Gram-negative pneumonia [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 226(2): 355-361.
- [6] Cillóniz C, Civičak R, Nicolini A, et al. Polymicrobial community-acquired pneumonia: An emerging entity [J]. Respiriology, 2016, 21(1): 65-75.
- [7] Bartley PS, Deshpande A, Yu PC, et al. Bacterial coinfection in influenza pneumonia: Rates, pathogens, and outcomes [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2021, 23: 1-6.

- [8] Kato H, Yamagishi Y, Hagihara M, et al. Antimicrobial activity of solithromycin and levofloxacin against a murine pneumonia mixed-infection model caused by *Streptococcus pneumoniae* and anaerobic bacteria [J]. *J Infect Chemother*, 2019, 25(4): 311–313.
- [9] Kato H, Hagihara M, Yokoyama Y, et al. Comparison of the in vivo activities of garenoxacin and levofloxacin in a murine model of pneumonia by mixed-infection with *streptococcus pneumoniae* and *parvimonas micra* [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2019, 72(6): 407–412.
- [10] 刘冰, 万朝晖, 林勇. 成人混合细菌感染的支原体肺炎临床特征分析 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2017, 35(4): 417.
Liu B, Wan CH, Lin Y. Analysis of clinical characteristics of adult mycoplasmal pneumonia with mixed bacterial infection [J]. *J Prev Med Chin PLA*, 2017, 35(4): 417.
- [11] 孟江萍, 尹一兵. 肺炎链球菌致病机理的最新研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2002, 22(2): 39–41.
Meng JP, Yin YB. The newest advance in pathogenic mechanism of *streptococcus pneumoniae* [J]. *J Microbiol*, 2002, 22(2): 39–41.
- [12] 王芊, 华川. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌在肺炎致病机制中的研究进展 [J]. *解放军医药杂志*, 2012, 24(5): 43–46.
Wang Q, Hua C. Research progress of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the pathogenesis of pneumonia [J]. *Med Pharma J Chin PLA*, 2012, 24(5): 43–46.
- [13] 李建生, 孔桂莲, 郭盛典. 大肠杆菌肺炎模型老龄大鼠的小肠分泌型 IgA 和肿瘤坏死因子的观测 [J]. *中国危重病急救医学*, 2001, 13(12): 39–41.
Li JS, Kong GL, Guo SD. Changes in intestinal sIgA and tumor necrosis factor in aged rats with *Escherichia coli* pneumonia [J]. *Chin Critical Care Med*, 2001, 13(12): 39–41.
- [14] Warner SM, Knight DA. Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008, 8(1): 44–48.
- [15] 何全利, 李艳丽. 肺炎支原体肺炎患儿 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 表达及临床意义 [J]. *中国医药指南*, 2013, 11(13): 189–190.
He QL, Li YL. Expression of TNF- α , IL-6 and IL-8 in children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and its clinical significance [J]. *Guide Chin Med*, 2013, 11(13): 189–190.
- [16] 崔瑾. 肺炎链球菌 dnaJ 基因缺陷对小鼠肺炎感染模型天然免疫应答的影响 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(2): 21–26.
Cui J. Effect of dnaJ gene defect on natural immune response in mice infected with *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Chin J Biologicals*, 2013, 26(2): 21–26.
- [17] 龚燕, 徐雯霞. 金黄色葡萄球菌肺炎的临床特点及药物敏感性分析 [J]. *中国医药*, 2014, 9(7): 973–975.
Gong Y, Xu WX. Clinical features and antibiotic susceptibility of *staphylococcus aureus* pneumonias [J]. *Chin Med*, 2014, 9(7): 973–975.
- [18] 任立歆, 郭伟, 董汉权, 等. 支气管肺泡灌洗液细菌培养及药敏试验在儿童难治性肺炎诊治中的价值 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2013, 28(4): 258–260.
Ren LX, Guo W, Dong HQ, et al. Value of bacteria culture and antimicrobial susceptibility test of bronchoalveolar lavage fluid in diagnosis and treatment of refractory pneumonia in children [J]. *Chin J Appl Clin Pediatr*, 2013, 28(4): 258–260.
- [19] 张元兵, 刘良倚, 李映霞. 不同人群肺炎患者肺热证程度与外周血白细胞水平相关性的临床研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2008, 12(3): 1076–1078.
Zhang YB, Liu LY, Li YX. Clinical study on correlation of leucocyte level of peripheral blood with degree of pyretic pulmonary syndrome in different bacterial pneumonia patients [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharma*, 2008, 12(3): 1076–1078.
- [20] 孟一鸣, 孙文平, 杨光, 等. 自然感染途径建立肺炎链球菌感染性肺炎小鼠模型 [J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(11): 966–967, 971.
Meng YM, Sun WP, Yang G, et al. Establishment of a pneumonia mice model infected with *Streptococcus pneumoniae* by natural infection route [J]. *Chin J Microecol*, 2011, 23(11): 966–967, 971.

[收稿日期] 2021-07-01

花卫成,付鹏宇,张纓,等. 运动经 FoxO1-脂噬通路缓解 ApoE^{-/-}小鼠高脂血症的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 808-815.

Hua WC, Fu PY, Zhang Y, et al. Exercise alleviates hyperlipidemia *via* the FoxO1-lipophagic signaling pathway in ApoE^{-/-} mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 808-815.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.013

运动经 FoxO1-脂噬通路缓解 ApoE^{-/-} 小鼠高脂血症的研究

花卫成^{1,2}, 付鹏宇³, 张纓², 王林佳², 倪震¹, 龚丽景^{1*}

(1. 北京体育大学运动与体质健康教育部重点实验室, 北京 100084; 2. 北京体育大学运动人体科学学院, 北京 100084; 3. 西北工业大学体育部, 西安 710072)

【摘要】 目的 脂噬是一种针对脂肪的选择性自噬,受 FoxO1 调控。运动作为调节脂代谢紊乱疾病的有效手段,其在高脂血症的作用是否与 FoxO1-脂噬过程有关,目前尚无报道。本研究通过两种运动方式干预高脂血症模型小鼠,检测脂肪组织中脂噬相关指标的变化,以探究运动缓解高脂血症的可能作用机制。**方法** 选取 C57BL/6J 小鼠作为野生对照组(WT 组);载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠构建高脂血症模型,分为安静对照组(CON 组)、中强度持续运动组(MICT 组)和高强度间歇运动组(HIIT 组),干预 6 周,检测各组小鼠血脂水平,HE 染色观察脂肪细胞形态,RT-qPCR 和 Western Blot 测试脂肪组织中 PI3K、Akt/p-Akt、FoxO1/p-FoxO1 和自噬相关指标(Beclin1、Atg7、LC3、p62、Rab7)的变化。**结果** (1)CON 组血浆 TG、TC 和 LDL-C 水平较 WT 组显著增加,运动各组较 CON 组 TG、TC 水平显著降低($P < 0.01$)。(2)HE 染色发现 CON 组较 WT 组同一视野下脂肪细胞数量增加($P < 0.01$)。(3)CON 组较 WT 组 FoxO1、Beclin1、Atg7、LC3 和 Rab7 mRNA 表达增加,PI3K、p-Akt/Akt、p-FoxO1/FoxO1 和 P62 表达量减少($P < 0.01$),Beclin1、Atg7、LC3、Rab7 蛋白含量增加($P < 0.01$);MICT 组和 HIIT 组较 CON 组 FoxO1、Beclin1、LC3、Atg7 和 Rab7 mRNA 表达降低,PI3K、p-Akt/Akt、p-FoxO1/FoxO1 和 p62 蛋白含量增加($P < 0.05$)或($P < 0.01$),Beclin1、Atg7、LC3、Rab7 蛋白含量降低($P < 0.05$)或($P < 0.01$)。**结论** 上述结果表明 MICT 和 HIIT 均可通过抑制脂肪细胞 FoxO1-脂噬通路调节血脂水平、改善高脂血症。

【关键词】 ApoE^{-/-}小鼠;脂噬;FoxO1;中强度持续运动;高强度间歇运动

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)06-0808-08

Exercise alleviates hyperlipidemia *via* the FoxO1-lipophagic signaling pathway in ApoE^{-/-} mice

HUA Weicheng^{1,2}, FU Pengyu³, ZHANG Ying², WANG Linjia², NI Zhen¹, GONG Lijing^{1*}

(1. Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing 100084, China.

2. Sport Science College of Beijing Sport University, Beijing 100084. 3. Sports Department of Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072)

Corresponding author: GONG Lijing. E-mail: lijing.gong@bsu.edu.cn

【Abstract】 Objective Lipophagy is a type of selective autophagy that targets fat and is regulated by FoxO1. Exercise is an effective method to regulate lipid metabolism disorders. Whether the regulation of hyperlipidemia is mediated by the FoxO1-lipophagy pathway remains unreported. In this study, two types of exercise were used as interventions in

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金资助课题(校 2020057)。

Supported by Fundamental Research Funds for the Central Universities of China(U2020057)。

[作者简介] 花卫成(1997—),男,在读硕士研究生,研究方向:运动与脂肪代谢。Email: 2019210254@bsu.edu.cn

[通信作者] 龚丽景(1981—),女,副研究员,博士,研究方向:运动与脂肪代谢,低氧与胃肠道、骨骼肌萎缩。

Email: lijing.gong@bsu.edu.cn

hyperlipidemia model mice, and the changes in lipophagy-related indexes in adipose tissue were detected to explore the possible mechanism by which exercise alleviates hyperlipidemia. **Methods** C57BL/6J mice were selected as the wild-type control group (WT group). The hyperlipidemia model was constructed by apolipoprotein E gene knockout (ApoE^{-/-}), and mice were divided into three groups; the silent control group (CON group), moderate-intensity continuous training group (MICT group) and high-intensity intermittent training group (HIIT group). After 6 weeks of intervention, the blood lipid levels in each group were detected, and the morphology of adipocytes was observed by HE staining. The changes in PI3K, Akt/p-Akt, FoxO1/p-FoxO1 and autophagy-related indexes (Beclin1, Atg7, LC3, p62 and Rab7) in adipose tissue were measured by RT-qPCR and Western Blot. **Results** (1) Plasma TG, TC and LDL-C levels in the CON group were significantly increased compared with the WT group, and TG and TC levels in the exercise groups were significantly decreased compared with the CON group ($P < 0.01$). (2) HE staining showed that the number of adipocytes in the CON group were increased, compared with the WT group in the same field ($P < 0.01$). (3) Compared with the WT group, the mRNA expression levels of FoxO1, Beclin1, Atg7, LC3 and Rab7 were increased in the CON group, and the expression levels of PI3K, p-Akt/Akt, p-FoxO1/FoxO1 and P62 were decreased ($P < 0.01$). In addition, Beclin1, Atg7, LC3 and Rab7 protein contents were increased ($P < 0.01$). The mRNA levels of FoxO1, Beclin1, LC3, Atg7 and Rab7 in the MICT group and HIIT group were lower than those in the CON group, whereas the protein contents of PI3K, p-Akt/Akt, p-FoxO1/FoxO1 and p62 were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The protein contents of Beclin1, Atg7, LC3 and Rab7 were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** These results suggest that both MICT and HIIT alleviate hyperlipidemia by inhibiting of the FoxO1-lipophagic signaling pathway in adipocytes, thereby regulating lipid levels.

【Keywords】 ApoE^{-/-} mice; lipophagy; FoxO1; moderate-intensity continuous exercise; high-intensity intermittent exercise

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

高脂血症(hyperlipidemia, HL)是一种发病率逐年升高的全球性慢性疾病,参与动脉粥样硬化、II型糖尿病和非酒精性脂肪肝等疾病的发生发展,临床特征表现为血液中脂质和脂蛋白含量升高^[1-2]。富含甘油三酯的脂蛋白(TG-rich lipoproteins, TGRLs)负责将血液中的甘油三酯和胆固醇转运到血浆和其他组织,而载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)是TGRLs的重要组成部分^[3]。ApoE与脂质形成脂蛋白复合体来转运脂质,并且可以作为细胞表面脂蛋白受体的配体,介导脂质转运至组织细胞,ApoE缺乏会导致血液中TGRLs转运受阻,是诱发HL的关键因素^[4]。ApoE基因缺陷(ApoE^{-/-})小鼠3月龄左右自发产生高脂血症,而高脂饮食会进一步加重病情,是构建高脂血症的常用模型^[5]。

脂肪组织是调节能量代谢和糖脂代谢的中心^[6]。发生在脂肪细胞中的选择性自噬——脂噬,是一种新近发现的可以选择性识别脂质并将其降解的调节脂代谢稳态的生理过程。该过程能够选择性地动员脂滴中的脂质,经历启动和成核、自噬体的形成、自噬体与溶酶体融合和自噬溶酶体降解的步骤调节脂质代谢^[7]。在自噬启动阶段,肌球蛋白样Bcl-2结合蛋白(coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein 1, Beclin1)发挥重要作用^[8];选择性自噬接头蛋白1(sequestosome 1, SQSTM1/p62)能

将微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)招募到脂滴上,促进自噬体形成^[9];LC3被自噬相关蛋白7(autophagy related protein 7, Atg7)脂化,形成LC3 II,从而闭合自噬体^[10];在晚期自噬体的物质运输以及溶酶体的生物发生过程,Ras相关蛋白7(ras-related GTP-binding protein 7, Rab7)参与其中,并促进溶酶体和自噬体相互作用^[7]。自噬上游的磷酸肌醇3激酶/蛋白激酶B/叉头样转录因子O1(phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B/forkhead box of transcription factors O1, PI3K/Akt/FoxO1)信号通路是其重要调控通路。在脂肪组织中大量表达的FoxO1,属于Fox转录因子家族成员之一,是许多自噬基因(如Beclin1和LC3)的重要调控因子^[11],能促进自噬相关基因的转录,形成FoxO1-脂噬通路。经磷酸化修饰的FoxO1会与细胞核中的14-3-3蛋白结合并移出细胞核,降低其转录活性,使自噬水平下调^[12]。PI3K的激活会导致Akt磷酸化,并使下游的FoxO1磷酸化^[13]。

规律的运动训练具有降低血脂的功效已得到广泛证实^[14]。中等强度持续运动(moderate intensity continuous training, MICT)和高强度间歇运动(high-intensity intermittent training, HIIT)是目前在大众体育中广泛采用的两种健身方式^[15-16]。脂

代谢受到脂肪组织自噬水平的影响, FoxO1 又是调控自噬的重要转录因子。MICT 和 HIIT 发挥改善高脂血症的作用是否与 FoxO1-脂噬途径有关, 目前尚未见报道。因此, 本研究拟通过对比 MICT 和 HIIT 对高脂饮食饲喂的 ApoE 敲除小鼠脂肪组织 FoxO1-脂噬通路相关蛋白表达的影响, 探讨运动预防高脂血症的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只 9 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 体重 (25.17 ± 0.35) g; 35 只 9 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J ApoE^{-/-}小鼠, 体重 (25.32 ± 0.85) g; 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】。所有 ApoE^{-/-}小鼠均饲喂含 21% (w/w) 脂肪和 1.5% (w/w) 胆固醇的高脂饲料(北京科澳协力饲料有限公司, 中国); 野生型小鼠喂食含 4% ~ 5% (w/w) 脂肪的标准维持饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司, 中国)。所有小鼠饲养于北京体育大学动物实验室【SYXK(京)2016-0033】, 温度 22℃, 湿度 50% ~ 70%, 昼夜 12 h/12 h, 可自由进食和饮水, 在实验室适应 1 周后开始正式训练干预。本研究经北京体育大学运动科学实验伦理委员会批准(审批号 2019100A)。

1.1.2 主要试剂与仪器

脂肪固定液 (G1119, Servicebio, 中国), RNA Store 样品保存液 (DP408, TianGen, 中国), 血脂检测试剂盒 (A111-1-1, A110-1-1, A113-1-1, A112-1-1; 南京建成, 中国), 定量 PCR 相关试剂 (MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 9767, PrimeScriptTM Master Mix RR036A, SYBR Premix Ex Taq II RR820A; TaKaRa, 日本), RIPA 裂解液 (P0013B, 碧云天, 中国), 蛋白酶/磷酸酶抑制剂 (04693159001, 04906837001, Roche, 瑞士), BCA 试剂盒 (PierceTM BCA Protein Assay Kit 23227, Thermo Fisher Scientific, 美国), Bolt LDS Sample Buffer (B0007, Novex, 美国), Bolt Reducing Agent (B0009, Novex, 美国), MES Running Buffer (B0002, Invitrogen, 美国), 4% ~ 12% Bis-Tris 梯度胶 (NW04125, Invitrogen, 美国), iBlot 2 NC Regular Stacks (IB23001, Invitrogen, 美国), PI3K 抗体 (Proteintech, 21890-1-AP), Akt 抗体 (Abcam,

ab8805), Phospho-Akt 抗体 (Cell Signaling Tech, 4060), FoxO1 抗体 (Abcam, ab52857), Phospho-FoxO1 抗体 (Abcam, ab131339), Beclin1 抗体 (Abcam, ab207612), Atg7 抗体 (Abcam, ab133528), LC3 抗体 (Proteintech, 14600-1-AP), p62 抗体 (Abcam, ab109012), Rab7 抗体 (Abcam, ab137029), α -Tubulin (Proteintech, 66031-1-IG), Goat anti-Rabbit 抗体 (LI-COR, 926-68071), Goat anti-Mouse 抗体 (LI-COR 926-32210)。

动物跑台 (LF8710MAP, Panlab, 美国), 酶标仪 (BioTek Synergy H1, Bio Tek, 美国), 显微图象分析系统 (DMI4000B, Leica, 德国), 超微量分光光度计 (Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500, Thermo Fisher Scientific, 美国), 蛋白转印仪 (iBlot 2, Thermo Fisher Scientific, 美国), 双色红外荧光成像系统 (Odyssey CLX, LI-COR, 美国)。

1.2 方法

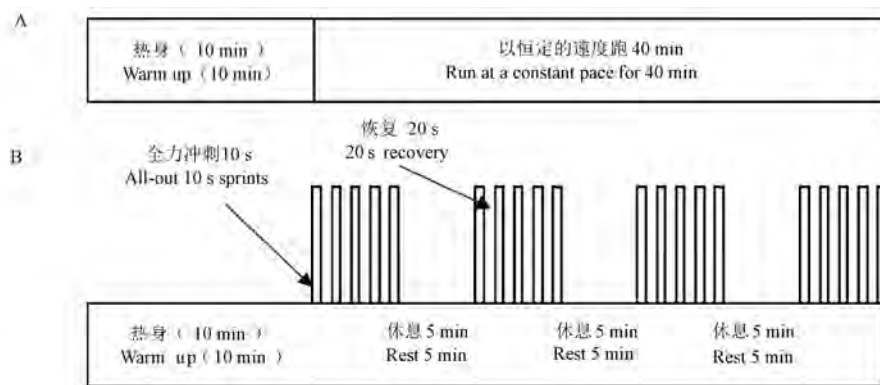
1.2.1 动物分组及实验干预

10 只 C57BL/6J 小鼠作为野生对照组 (WT 组)。5 只 ApoE^{-/-}小鼠用于最大速度测试以制定训练方案, 其余 30 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为 3 组: ApoE^{-/-}安静对照组 (CON 组)、ApoE^{-/-}中强度持续运动组 (MICT 组) 和 ApoE^{-/-}高强度间歇运动组 (HIIT 组)。每组 10 只。

训练开始前用 5 只 ApoE^{-/-}小鼠进行最大速度测试, 根据测试结果制定训练方案。测试方案为 8 cm/s 速度热身 10 min, 之后每 3 min 增加跑速 2 cm/s, 直到力竭, 力竭时的速度为最大速度, 力竭判断标准为连续在电网上停留 3 s 或者电击次数达到 100 次^[16]。最大速度的测试结果为 (45 ± 4) cm/s。

HIIT 组和 MICT 组在开始前 4 d 进行适应性训练(每天在跑步机上跑 10 min, 速度逐渐增加, 分别为 10、12、14 和 16 cm/s)。从 10 周龄开始训练 6 周, WT 组和 CON 组不运动, MICT 组和 HIIT 组每周一、三、五上午 10:00 训练。如图 1, MICT 组在 10 min 热身 ($5 \text{ cm/s} \times 5 \text{ min} + 10 \text{ cm/s} \times 5 \text{ min}$) 后进行 40 min 匀速跑, 速度为 40% 最大跑速 (18 cm/s); HIIT 组在 10 min 热身 ($8 \text{ cm/s} \times 5 \text{ min} + 15 \text{ cm/s} \times 5 \text{ min}$) 后进行四组 $5 \times 10 \text{ s}$ 的短跑, 间歇 20 s, 组间休息 5 min, 速度为 100% 最大跑速 (45 cm/s)^[17]。

1.2.2 取材



注:A:MICT 组训练方案;B:HIIT 组训练方案。

图 1 MICT 组和 HIIT 组训练计划

Note. A. Training program of MICT group. B. Training program of HIIT group.

Figure 1 Schematic diagram of training program for MICT group and HIIT group

在训练干预结束 48 h 后取材,称重,麻醉,心脏穿刺取血,离心取血浆(4℃,3000 rpm,15 min),液氮速冻,-80℃保存。取附睾白色脂肪组织(epididymal WAT,eWAT),分成3份,一份存于固定液中,用于制备石蜡切片;一份存于 RNA 保存液中,4℃放置1 d后-80℃保存;一份液氮速冻,-80℃保存,用于 Western Blot 测试。

1.2.3 血液指标测试

按照试剂盒说明书检测血浆甘油三酯、总胆固醇(total cholesterol,TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol,HDL-C)含量。

1.2.4 脂肪组织形态学测试

脂肪组织经固定液固定后,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,显微图像分析系统观察,拍照,Image-pro Plus 6.0 软件统计组织细胞横截面积。

1.2.5 脂肪组织 mRNA 相对含量测试

引物序列由 Primerbank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>) 网站查询获得,见表 1,引物由 GENEWIZ 公司合成。称取 80 mg 附睾白色脂肪组织,按照试剂盒说明提取总 RNA,超微量分光光度计检测总 RNA 浓度,逆转录操作获取 cDNA,进行实时荧光定量 PCR 扩增。以 β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因/内参基因的相对表达量。

1.2.6 脂肪组织蛋白相对含量测试

称取 80 mg 附睾白色脂肪组织,加入 500 μ L RIPA 裂解液,组织破碎机破碎细胞,分离出总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后制备蛋白样品。SDS-PAGE 电泳分离蛋白,用蛋白转印仪将蛋白转印到 NC 膜

上,室温封闭液封闭 1 h 后孵育一抗(4℃,12 h),TBST 洗去未结合的一抗(3 $\times$ 10 min),室温孵育二抗 1 h,TBST 洗去未结合的二抗(3 $\times$ 10 min),TBS 洗涤(2 $\times$ 5 min),滤纸吸干后双色红外荧光成像系统曝光,Image Studio 软件进行相对定量分析。抗体信息见 1.1.2。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers

引物 Primers	序列 Sequences	长度(bp) Size(bp)
Foxo1	F:5'-CCCAGGCCGGAGTTTAACC-3' R:5'-GTTGCTCATAAAGTCGGTGCT-3'	132
Beclin1	F:5'-ATGGAGGGGTCTAAGCGGTC-3' R:5'-TCCTCTCCTGAGTTAGCCTCT-3'	197
Atg7	F:5'-GTTGCCCCCTTTAATAGTGC-3' R:5'-TGAACCTCAACGTCAAGCGG-3'	161
LC3	F:5'-TTATAGAGCGATACAAGGGGAG-3' R:5'-CGCCGTCTGATTATCTTGATGAG-3'	109
Rab7	F:5'-AAGCCACAATAGGACGGAC-3' R:5'-AGACTGGAACCGTCTTGACC-3'	104
β -actin	F:5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3' R:5'-CCAGTTGTAACAATGCCATGT-3'	154

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 25.0 软件分析,所有数据符合正态分布,结果用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。WT 组和 CON 组间采用独立样本 t 检验,CON 组、MICT 组和 HIIT 组间采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 运动降低 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平

6 周干预结束后,WT 组小鼠体重为(28.55 $\pm$ 1.44) g,CON 组为(30.34 $\pm$ 1.50) g,MICT 组

(30.53 ± 0.36)g, HIIT 组为(29.63 ± 0.56)g, 各組间无显著性差异。血液指标结果表明, CON 组 TG、TC 和 LDL-C 均显著高于 WT 组($P < 0.01$), MICT

组和 HIIT 组 TG 和 TC 水平显著低于 CON 组($P < 0.01$), MICT 组 HDL-C 显著高于 CON 组和 HIIT 组($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 小鼠血浆 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Results of TC, TG, HDL-C and LDL-C in mice plasma($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	甘油三酯 (mmol/L) TG (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L) TC (mmol/L)	高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) HDL-C (mmol/L)	低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) LDL-C (mmol/L)
WT 组 WT group	0.53 ± 0.03	4.95 ± 0.16	2.88 ± 0.28	0.46 ± 0.16
CON 组 CON group	$7.52 \pm 1.48^{**}$	$32.48 \pm 4.14^{**}$	$2.93 \pm 1.11^{\#}$	$7.98 \pm 1.57^{**}$
MICT 组 MICT group	$5.32 \pm 0.45^{##}$	$25.00 \pm 1.36^{##}$	$4.76 \pm 2.01^{\#}$	7.30 ± 2.25
HIIT 组 HIIT group	$5.83 \pm 0.68^{##}$	$24.15 \pm 3.07^{##}$	$3.01 \pm 0.97^{\&}$	7.33 ± 1.30

注: 与 WT 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 CON 相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; 与 MICT 组相比, $^{\&}P < 0.05$, $^{\&\&}P < 0.01$ 。(下同)

Note. Compared with WT group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with CON group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$. Compared with MICT group, $^{\&}P < 0.05$, $^{\&\&}P < 0.01$. (The same in the following figures)

2.2 ApoE^{-/-}小鼠脂肪细胞横截面积减小

6 周干预结束后, 各組小鼠 eWAT 脂肪细胞 HE 染色图片如图 2A 所示。野生型小鼠脂肪细胞横截面积明显大于 ApoE^{-/-}小鼠。CON 组脂肪细胞横截面积(1631.08 ± 375.96) μm^2 与 WT 组(2847.48 ± 556.59) μm^2 相比显著降低($P < 0.05$), MICT 组(1789.69 ± 451.40) μm^2 和 HIIT 组(1872.79 ± 402.86) μm^2 与 CON 组相比无显著性差异, 见图 2B。

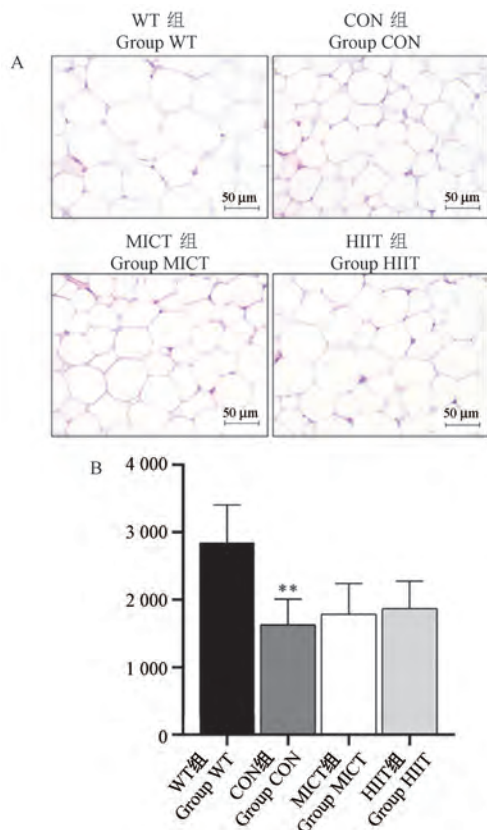


图 2 MICT 和 HIIT 对小鼠附睾脂肪组织细胞横截面积的影响

Figure 2 Effects of MICT and HIIT on adipocyte cross-sectional area of eWAT in mice

2.3 运动下调 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织 FoxO1-自噬相关基因的 mRNA 表达

6 周干预结束后, 各組小鼠 eWAT 实时荧光定量 PCR 结果如图 3 所示。CON 组较 WT 组 FoxO1、Beclin1、LC3、Atg7 和 Rab7 mRNA 相对表达水平显著升高($P < 0.01$)。MICT 组和 HIIT 组 FoxO1、Beclin1、LC3、Atg7 和 Rab7 mRNA 相对表达水平较 CON 组显著下降($P < 0.05$)或($P < 0.01$)。HIIT 组 Beclin1 mRNA 相对表达水平较 MICT 组显著升高($P < 0.05$)。

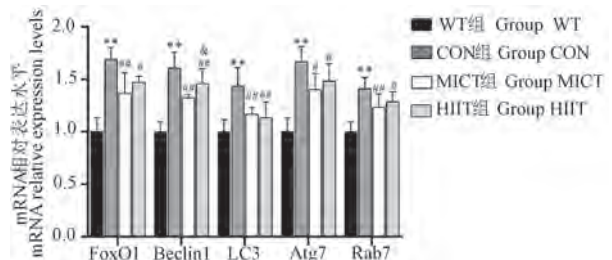


图 3 MICT 和 HIIT 对小鼠附睾脂肪组织 FoxO1-自噬相关基因 mRNA 表达的影响

Figure 3 Effects of MICT and HIIT on mRNA relative expression levels of FoxO1-Autophagy-associated proteins from eWAT in mice

2.4 运动激活 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织 PI3K/Akt/FoxO1 通路并促进自噬

6 周干预结束后, CON 组较 WT 组 PI3K、p-Akt 和 p-FoxO1 蛋白相对表达水平显著下降($P < 0.01$), p-Akt/Akt 和 p-FoxO1/FoxO1 显著下降($P < 0.01$); MICT 组和 HIIT 组较 CON 组 PI3K、p-Akt 水平以及 p-Akt/Akt 和 p-FoxO1/FoxO1 显著上升($P < 0.01$), Foxo1 水平显著下降($P < 0.01$); HIIT 组较 CON 组 Akt 水平显著下降($P < 0.01$), 较 MICT 组 PI3K、Akt、p-Akt、FoxO1 和 p-FoxO1 蛋白相对表达

水平显著下降($P < 0.01$)或($P < 0.05$), p-Akt/Akt 比值显著上升($P < 0.05$), 见图 4A, 4B。

自噬相关蛋白表达情况如图 4C, 4D 所示, CON 组较 WT 组 Beclin1、Atg7、LC3 II/I 和 Rab7 显著上升($P < 0.01$), p62 水平显著下降($P < 0.05$); MICT

组和 HIIT 组较 CON 组 Beclin1、Atg7、LC3 II/I 和 Rab7 水平显著下降($P < 0.01$), MICT 组和 HIIT 组较 CON 组 p62 水平显著上升($P < 0.01$)或($P < 0.05$); HIIT 组较 MICT 组 Beclin1、Atg7、LC3 II/I 和 Rab7 水平显著下降($P < 0.01$)或($P < 0.05$)。

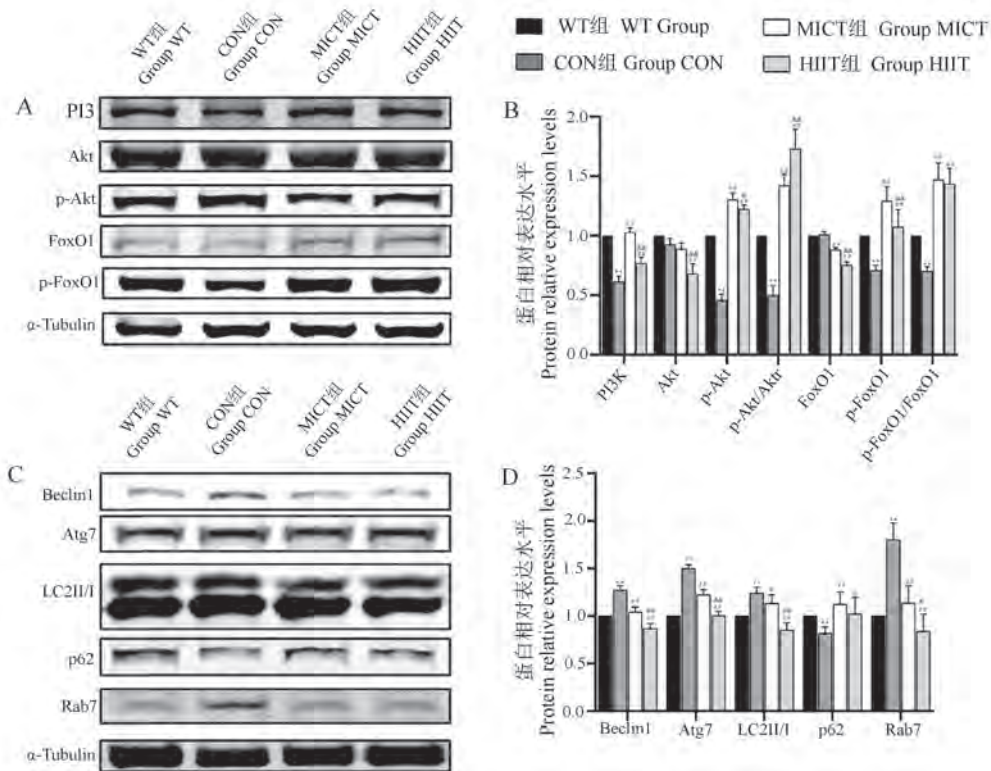


图 4 MICT 和 HIIT 对小鼠附睾脂肪组织蛋白相对表达水平的影响

Figure 4 Effects of MICT and HIIT on protein relative expression levels of eWAT in WT mice and ApoE^{-/-} mice

3 讨论

ApoE^{-/-}小鼠会从 3 ~ 4 月龄开始自发产生高脂血症和动脉粥样硬化, 高脂肪饮食会进一步加剧和加速病情^[18]。本研究中 10 周龄 ApoE^{-/-}小鼠在饲喂高脂饲料 6 周后脂肪细胞横截面积变小, 同时血浆 TG、TC 和 LDL-C 水平升高, 这是由于 ApoE^{-/-}小鼠血液中脂蛋白, 如乳糜微粒(chylomicrons, CM)和极低密度脂蛋白(very low density lipoproteins, VLDL)转运受阻, 难以运输到脂肪组织积累所致^[19]。

此外脂肪组织分解增加也会使 ApoE^{-/-}小鼠血脂升高^[20-21], 而脂噬过程可通过自噬溶酶体途径对脂肪组织中的脂滴进行选择降解^[22]。ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织处于炎症浸润状态, 诱发机体慢性炎症状态^[23], 白细胞介素-6(interleukin, IL-6)等炎症因子的表达会激活信号传导与转录激活因子(signal

transducer and activator of transcription 3, STAT3), 进而上调 FoxO1 的表达^[24], FoxO1 是介导自噬的关键核转录因子^[25]。此外 ApoE 缺失时 PI3K/Akt 信号通路受到抑制^[26], 进而降低 FoxO1 磷酸化水平。本研究 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织中 p-FoxO1/FoxO1 比值下降, 说明细胞核中 FoxO1 比例增加, 发挥转录作用, 导致下游自噬相关基因表达上调, 诱导 ApoE^{-/-}小鼠脂肪细胞面积减小, 血脂水平显著上升, 形成高脂血症^[27]。

MICT 是运动强度低、训练时间长的有氧运动, 其对有高脂血症和动脉粥样硬化倾向的 ApoE^{-/-}小鼠有预防作用。研究发现, 规律的跑台或游泳训练能够降低 ApoE^{-/-}小鼠血脂^[28], 减轻内质网应激介导的内皮功能障碍^[29], 缓解肝细胞胰岛素抵抗和非酒精性脂肪性肝病等症^[30]。而 HIIT 的特点是在短时间的高强度运动中穿插低强度运动或休息, 以减少训练时间并提供较大的生理刺激, 已被证明有

良好的减脂效果^[31]。但 HIIT 运动对 ApoE^{-/-}小鼠的影响研究不多见。本研究结果显示 HIIT 对 ApoE^{-/-}小鼠血脂有改善作用,降低了血浆 TG 和 TC 含量,与 MICT 结果一致;此外,MICT 还提高血浆 HDL-C 含量。两种运动使小鼠脂肪组织细胞横截面积有所增大,提示运动可促使血脂进入脂肪组织细胞储存,并降低 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织细胞脂解作用^[21]。

ApoE 基因缺失也是引起 II 型糖尿病的原因之一,II 型糖尿病会导致脂肪组织 PI3K/Akt 信号通路出现损伤,而运动可以上调 PI3K/Akt 信号通路,改善糖尿病大鼠糖脂代谢^[32-33]。虽然运动对脂噬的影响报道较少,但外源刺激如针刺可促进 PI3K 和 p-Akt 表达,降低海马自噬水平^[34]。Akt 磷酸化激活后可进一步磷酸化 FoxO1 的丝氨酸 256 位点(S256)并降低 FoxO1 结合目标 DNA 的能力^[35]。本研究中,MICT 和 HIIT 均可上调 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织中 PI3K 的表达,促进 Akt 磷酸化,增加 FoxO1 磷酸化水平和 p-FoxO1/FoxO1 比值,以抑制自噬相关基因和蛋白的表达^[35]。Beclin1 是 III 类磷脂酰肌醇 3-激酶(class III phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K III)复合物的组成部分,在自噬启动阶段调节自噬相关蛋白如 LC3 的分布,而 Beclin1 和 LC3 又受到 FoxO1 的直接调控^[36]。本研究中,小鼠 MICT 和 HIIT 后脂肪组织中 Beclin1、Atg7 和 Rab7 mRNA 和蛋白表达水平下降,LC3 mRNA 表达水平及 LC3 II/I 比值下降,说明本研究的运动方式抑制了脂肪组织自噬。随着自噬水平下调,包含 Atg7、LC3 以及其他自噬相关蛋白表达的减少,延缓了自噬体膜的延伸;Rab7 随着自噬体形成附着在自噬体表面,介导自噬体与溶酶体结合形成成熟的自噬溶酶体,其含量的减少可能影响脂肪组织中自噬溶酶体的成熟^[37-38];接头蛋白 p62 在脂噬中负责将 LC3 招募到脂滴上,并随着待降解物质进入自噬溶酶体,随着自噬溶酶体的降解而降解^[39],本研究两种运动后脂肪组织 p62 蛋白表达水平上升,也说明了脂噬水平的下调^[40]。上述结果提示两种运动方式皆可通过促进 FoxO1 磷酸化以抑制 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织自噬,促进脂肪细胞代谢,降低血浆中 TG 和 TC 含量,改善高脂血症状。

综上所述,ApoE 基因缺失所致的高脂血症可激活脂噬水平;6 周 HIIT 和 MICT 均可通过激活 ApoE^{-/-}小鼠脂肪组织 PI3K/Akt 通路,促进 FoxO1

磷酸化,抑制脂噬,降低血脂水平,缓解高脂血症。

参 考 文 献(References)

- [1] Pan X, Bradfield CA, Hussain MM. Global and hepatocyte-specific ablation of Bmal1 induces hyperlipidaemia and enhances atherosclerosis [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13011.
- [2] Sfyr P, Matsakas A. Crossroads between peripheral atherosclerosis, western-type diet and skeletal muscle pathophysiology: emphasis on apolipoprotein E deficiency and peripheral arterial disease [J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 42.
- [3] Wang J, Perrard XD, Perrard JL, et al. ApoE and the role of very low density lipoproteins in adipose tissue inflammation [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 223(2): 342-349.
- [4] Gill PK, Dron JS, Berberich AJ, et al. Combined hyperlipidemia is genetically similar to isolated hypertriglyceridemia [J]. *J Clin Lipidol*, 2021, 15(1): 79-87.
- [5] 赵培, 谭鹤, 彭克楠, 等. 细颗粒物 PM_{2.5} 对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响及机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 33-39.
- Zhao P, Tan H, Peng KN, et al. Influence and mechanisms of fine particulates PM_{2.5} on atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 33-39.
- [6] Ferhat M, Funai K, Boudina S. Autophagy in adipose tissue physiology and pathophysiology [J]. *Antioxid redox signal*, 2019, 31(6): 487-501.
- [7] Schulze RJ, Sathyanarayan A, Mashek DG. Breaking fat: the regulation and mechanisms of lipophagy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862(10): 1178-1187.
- [8] Cairó M, Villarroya J. The role of autophagy in brown and beige adipose tissue plasticity [J]. *J Physiol Biochem*, 2020, 76(2): 213-226.
- [9] Wang L, Zhou J, Yan S, et al. Ethanol-triggered lipophagy requires SQSTM1 in AML12 hepatic cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12307.
- [10] Wang X, Wu R, Lil Y, et al. m⁶A mRNA methylation controls autophagy and adipogenesis by targeting Atg5 and Atg7 [J]. *Autophagy*, 2020, 16(7): 1221-1235.
- [11] Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, et al. FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(10): e861.
- [12] Lettieri-Barbato D, Ioannilli L, Aquilano K, et al. FoxO1 localizes to mitochondria of adipose tissue and is affected by nutrient stress [J]. *Metabolism*, 2019, 95: 84-92.
- [13] Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(11): 1938-1945.
- [14] He N, Ye H. Exercise and hyperlipidemia [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1228: 79-90.
- [15] Miguet M, Fearnbach NS, Metz L, et al. Effect of HIIT versus MICT on body composition and energy intake in dietary restrained and unrestrained adolescents with obesity [J]. *Appl Physiol Nutr*

- Metab, 2020, 45(4): 437-45.
- [16] Groussard C, Maillard F, Vazeille E, et al. Tissue-specific oxidative stress modulation by exercise: a comparison between MICT and HIIT in an obese rat model [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1965364.
- [17] Lavier J, Beaumann M, Ménétrey S, et al. Supramaximal intensity hypoxic exercise and vascular function assessment in mice [J]. *J Vis Exp*, 2019, 145: 2-9.
- [18] Vasquez EC, Peotta VA, Gava AL, et al. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse [J]. *J Biomed Sci*, 2012, 19(1): 22.
- [19] Wang J, Perrard XD, Perrard JL, et al. ApoE and the role of very low density lipoproteins in adipose tissue inflammation [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 223(2): 342-349.
- [20] Dong M, Yang XY, Lim S, et al. Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability via UCP1-dependent lipolysis [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(1): 118-129.
- [21] Sui WH, Li HS, Yang YL, et al. Bladder drug mirabegron exacerbates atherosclerosis through activation of brown fat-mediated lipolysis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(22): 10937-10942.
- [22] Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure [J]. *Cell Metab*, 2014, 19(5): 741-756.
- [23] Pereira SS, Teixeira LG, Aguilar EC, et al. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice fed high fat diet [J]. *Anim Sci J*, 2012, 83(7): 549-555.
- [24] You L, Wang Z, Li H, et al. The role of STAT3 in autophagy [J]. *Autophagy*, 2015, 11(5): 729-739.
- [25] Li KQ, Deng Y, Deng GM, et al. High cholesterol induces apoptosis and autophagy through the ROS-activated AKT/FOXO1 pathway in tendon-derived stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 131.
- [26] Shen L, Wang QH, Tso P, et al. Apolipoprotein E reduces food intake via PI3K/Akt signaling pathway in the hypothalamus [J]. *Physiol Behav*, 2011, 105(1): 124-128.
- [27] Liu L, Zheng LD, Zou P, et al. FoxO1 antagonist suppresses autophagy and lipid droplet growth in adipocytes [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(15): 2033-2041.
- [28] Jakic B, Carlsson M, Buszko M, et al. The effects of endurance exercise and diet on atherosclerosis in young and aged ApoE^{-/-} and wild-type mice [J]. *Gerontology*, 2019, 65(1): 45-56.
- [29] Hong JY, Kim K, Park E, et al. Exercise ameliorates endoplasmic reticulum stress-mediated vascular dysfunction in mesenteric arteries in atherosclerosis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7938.
- [30] Zheng F, Cai Y. Concurrent exercise improves insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease by upregulating PPAR- γ and genes involved in the beta-oxidation of fatty acids in ApoE-KO mice fed a high-fat diet [J]. *Lipids Health Dis*, 2019, 18(1): 6.
- [31] Su L, Fu J, Sun S, et al. Effects of HIIT and MICT on cardiovascular risk factors in adults with overweight and/or obesity: A meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210644.
- [32] 衣雪洁, 孙玉霞, 姚婷婷, 等. 急、慢性运动对 2 型糖尿病大鼠脂肪 PI3K/AKT/GLUT4 通路的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(1): 12-16.
- Yi XJ, Sun YX, Yao TT, et al. Effects of acute and chronic exercise on fat PI3K/AKT/GLUT4 signal pathway in type 2 diabetic rats [J]. *Chin J appl physiol*, 2020, 36(1): 12-16.
- [33] 贾杰, 付鹏宇, 朱镛鑫, 等. 低氧经 mTOR/4E-BP1 和 FOXO1/ATROGIN-1 通路影响骨骼肌蛋白质积累 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(3): 300-309.
- Jia J, Fu PY, Zhu RX, et al. Hypoxia affects skeletal muscle protein accumulation via mTOR/4E-BP1 and FoxO1 /Atrogin-1 pathways [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2020, 36(3): 300-309.
- [34] 孙培养, 李佩芳, 王涛, 等. “通督调神”针刺对脑卒中后抑郁大鼠海马 PI3K/Akt/mTOR 通路及自噬相关蛋白的影响 [J]. *中国针灸*, 2020, 40(11): 1205-1210.
- Sun PY, Li PF, Wang T, et al. Effect of Tongdu Tiaoshen acupuncture on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and autophagy-related proteins of hippocampus in rats with post-stroke depression [J]. *Chin Acup Moxib*, 2020, 40(11): 1205-1210.
- [35] Zhang X, Gan L, Pan H, et al. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(47): 45276-45284.
- [36] Margolis LM, Berryman CE, Murphy NE, et al. PI3K-AKT-FOXO1 pathway targeted by skeletal muscle microRNA to suppress proteolytic gene expression in response to carbohydrate intake during aerobic exercise [J]. *Physiol Rep*, 2018, 6(23): e13931.
- [37] Huang W, Cheng C, Shan WS, et al. Knockdown of SGK1 alleviates the IL-1 β -induced chondrocyte anabolic and catabolic imbalance by activating FoxO1-mediated autophagy in human chondrocytes [J]. *FEBS J*, 2020, 287(1): 94-107.
- [38] Ferhat M, Funai K, Boudina S. Autophagy in adipose tissue physiology and pathophysiology [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31: 487-501.
- [39] Yang L, Ding Y, Chen Y, et al. The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans [J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(7): 1245-1253.
- [40] Zhang Z, Yao Z, Chen Y, et al. Lipophagy and liver disease: New perspectives to better understanding and therapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 339-348.

贺云,陈艺生,任岚,等. 微囊藻毒素-LR 对小鼠原代肝细胞线粒体功能的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 816-822.

He Y, Chen YS, Ren L, et al. Mitochondrial function in microcystin-LR-induced primary mice hepatocytes [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 816-822.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.014

微囊藻毒素-LR 对小鼠原代肝细胞线粒体功能的影响

贺云¹, 陈艺生², 任岚¹, 尹一杰¹, 胡桂玲¹, 吴云丽^{1*}

(1. 福建医科大学基础医学院, 消化道恶性肿瘤教育部重点实验室, 福建省肿瘤微生物学重点实验室, 福州 350122; 2. 福建省立医院临床医学实验研究中心, 福州 350001)

【摘要】 目的 蓝藻水华引起的微囊藻毒素污染是世界性关注话题之一, 微囊藻毒素 LR (MC-LR) 具有强特异性肝毒性, 但其引起肝损伤的确切机制尚未完全阐明。为解决这一问题, 本研究从细胞分子层面探讨 MC-LR 造成肝细胞线粒体功能改变的分子机制。**方法** 提取小鼠原代肝细胞, 加入梯度剂量的 MC-LR (2.5 ~ 10 nmol/L) 作用 48 h, 以未加毒素处理组为对照, 检测 MC-LR 对线粒体功能的影响 (包括 ATP 水平和线粒体膜电位检测), DNA 损伤 (包括彗星试验和 8-OHdG 水平检测), 并分析 p53 抑制剂 pft- α 作用下线粒体功能损伤情况。**结果** MC-LR 造成肝细胞线粒体功能障碍, DNA 损伤且 p53 蛋白表达水平上调; p53 特异性抑制剂 pft- α 减轻 MC-LR 造成的线粒体损伤。**结论** 在本试验条件下, MC-LR 造成小鼠肝细胞线粒体功能异常的机制与其造成 DNA 损伤诱导 p53 上调有关。

【关键词】 微囊藻毒素-LR; 原代肝细胞; 线粒体功能; DNA 损伤; p53

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0816-07

Mitochondrial function in microcystin-LR-induced primary mice hepatocytes

HE Yun¹, CHEN Yisheng², REN Lan¹, YIN Yijie¹, HU Guiling¹, WU Yunli^{1*}

(1. Key Laboratory of Gastrointestinal Cancer (Fujian Medical University), Ministry of Education, Fujian Key Laboratory of Tumor Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China. 2. Center for Experimental Research in Clinical Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001)

Corresponding author: WU Yunli. E-mail: wuyunli422@163.com

【Abstract】 Objective Microcystin contamination caused by cyanobacteria blooms is a profound global concern. Microcystin-LR (MC-LR) was documented to induce potent hepatotoxicity, but the exact mechanisms have not been fully elucidated. To better understand the mechanisms, we conducted the following investigations. **Methods** Primary mouse hepatocytes were isolated, purified and exposed to a MC-LR concentration range of 2.5 ~ 10 nmol/L for 48 h with DMEM treatment as the negative control. Mitochondrial function (ATP levels and mitochondrial membrane potential), DNA damage (comet assay and 8-OHdG levels) and p53 expression were determined in MC-LR-treated cells and control cells. In

【基金项目】 福建省中青年教育科研项目 (JT180165), 福建医科大学启航基金项目 (2018QH1006), 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划 (2018B027)。

Funded by the Scientific Research Project for Young Teachers of Fujian Province (JT180165), Startup Fund for Scientific Research, Fujian Medical University (2018QH1006), Program for New Century Excellent Talents in Fujian Province University (2018B027)。

【作者简介】 贺云 (1990—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 肿瘤微生物学。Email: hey607@126.com

【通信作者】 吴云丽 (1984—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 乙型肝炎病毒感染发病机制。Email: wuyunli422@163.com

addition, experiments were repeated to assess mitochondrial function after pft- α preconditioning. **Results** MC-LR led to a progressive loss in ATP production and mitochondrial membrane potential in a dose-dependent manner. Furthermore, the comprehensive DNA damage examination and upregulated p53 protein level indicated that MC-LR was associated with DNA damage in primary mouse hepatocytes. However, when p53 was blocked by PFT- α , mitochondrial damage was attenuated after MC-LR treatment. **Conclusions** Together, these data indicate that MCLR-induced DNA damage promoted p53 production, which was associated with mitochondrial dysfunction.

【Keywords】 microcystin-LR; primary mouse hepatocyte; mitochondrial function; DNA damage; p53 gene

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

随着水体富营养化的加剧,蓝藻水华给生态环境造成极大压力。微囊藻毒素(microcystins, MCs)是蓝藻细菌的次级代谢产物,为单环七肽活性化合物,具有多脏器毒性,如肝毒性、肾毒性、神经毒性、心脏毒性以及肠道菌群改变等,可通过饮水、食物链传递及水上活动等方式进入动物和人体内,对人体及动物健康造成严重威胁^[1-3]。MCs 具百余种异构体,其中分布最广,毒性最强的是微囊藻毒素 LR (Microcystin-LR, MC-LR)^[4],被国际癌症研究机构(International Agency for Research in Cancer, IARC)定义为可致人类癌症的风险因素(II B 类)。肝作为 MC-LR 累积与作用的靶器官,极易受到损害,研究表明 MC-LR 可引起肝细胞病理学改变:肿胀、炎症,产生活性氧自由基并引起不可逆转的 DNA 损伤,与肝细胞坏死、肝癌发生具有密切联系^[5-7]。然而,MC-LR 的肝毒性机制及致癌机制尚不明确,此前很大一部分研究将细胞死亡归因于 MC-LR 引起的氧化应激^[5,8-10],线粒体功能改变在 MC-LR 诱导的氧化应激中发挥关键作用,甚至在诱导肝细胞死亡以及癌症发生发展过程中起重要作用^[10]。至于 MC-LR 如何诱发线粒体功能障碍方面的研究比较欠缺,具体机制尚不明朗。基于以上分析,该课题以小鼠原代肝细胞为模型,从分子水平上评估 MC-LR 造成线粒体功能异常的机制,旨在为 MC-LR 相关肝疾病的诊断和治疗策略提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

9 只 28 日龄 SPF 雄性 C57BL/6 小鼠,体重约为 10 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2017-0005】。饲养于福建医科大学实验动物中心【SYXK(闽)2016-007】,昼夜各半循环照明,相对湿度 40% ~ 70%,温度在 20 ~ 25℃ 之间。采用无菌营养颗粒料饲料,饮用水为高压的纯

净水,自由采食。动物实验通过福建医科大学动物伦理委员会审查(FJMU IACUC 2020-0115)。

1.1.2 主要试剂与仪器

MC-LR(ENZO, ALX-350-012), IV 型胶原酶(sigma, C5138),胎牛血清(PAN, P30-3302),青霉素和链霉素双抗生素溶液(Gibico, 15140-122),ATP 检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司, S0026), MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (Invitrogen, 34152), Reagent Kit for Single Cell Gel Electrophoresis Assay(Trevigen, 4250-050-K), Mouse 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) ELISA Kit(华美生物, CBS-E10527), GAPDH(Cell Signal, 2118), p53(Cell Signal, 2524)。

冷光仪(Berthold, 德国),激光共聚焦显微镜(Leica, 德国),荧光显微镜(Leica, 德国),分子成像仪(ImageQuant LAS 4000 mini, 美国),多功能酶标仪(Bio-Tek, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠原代肝细胞提取

采用改良二步灌注法分离提取原代肝细胞。28 日龄雄性小鼠深度麻醉后,开腹,从下腔静脉进针,剪断肝沿静脉,匀速灌注 20 mL 不含钙离子的 KRB 缓冲液,待血液冲洗干净后,换成 20 mL 含有 0.5% (w/v) IV 型胶原酶的灌注液同法操作。灌注完成后,摘下肝,释放细胞,通过 3 次低温低速离心去除杂质和死细胞。

1.2.2 细胞培养和毒素处理

纯化的原代细胞以合适的密度种植于鼠尾胶原包被的孔板中,使用含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素双抗生素溶液的 DMEM 培养基,放入含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养。贴壁后,加入 0 ~ 10 nmol/L 不同浓度 MC-LR 毒素进行细胞染毒,以未加 MC-LR 的细胞为对照,培养 48 h,进行后续试验检测。p53 抑制剂 pft- α (5 μ mol/L) 使用时间为处理毒素前 1 h。

1.2.3 线粒体功能检测

该实验中细胞内的 ATP 水平是由基于生物发光技术进行的,首先,冰上裂解细胞,4℃ 12 000 rpm 离心 10 min,取上清备用。使用 ATP 检测试剂盒中 ATP 检测工作液将检测板中作用 5 min,以降低本底。加入样品,迅速混匀,立即用冷光仪测定 CPM 值。根据标准曲线计算样品 ATP 浓度。

该研究使用 MitoProbe™ JC-1 Assay Kit,进行线粒体膜电位检测,具体步骤如下:用 PBS 缓冲液清洗细胞,加入终浓度为 10 μg/mL JC-1 染料,置于 37℃ 培养箱中,避光孵育 20 min, PBS 洗涤 2 次,使用激光共聚焦显微镜在 488 nm 激发波长下观察,拍照,并用 LAS AF LITE 软件计算各实验组的荧光强度。

1.2.4 DNA 损伤检测

彗星试验 (comet 试验):使用 Reagent Kit for Single Cell Gel Electrophoresis Assay 检测细胞 DNA 双链完整性。细胞用胰酶消化后,离心收集细胞,混合于低熔点琼脂糖中,转移至载玻片,低温冷却凝固,于 4℃ 预冷的细胞裂解液中裂解过夜。次日取出,用 pH > 13 的碱性电泳液中避光电泳 30 min。电泳结束后,清洗,染色,荧光显微镜观察,拍照。

使用 Mouse 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) ELISA Kit 检测 8-OHdG 生成水平:裂解细胞,取细胞上清,用样品稀释液稀释 20 倍。使用 HRP 标记待测样品,培养箱中孵育 30 min 后,洗板 3 次,显色后,用多功能酶标仪测定 450 nm 处吸光度值。根据

标准曲线计算相应 8-OHdG 浓度。

1.2.5 Western Blot 检测

提取细胞蛋白后,采用 BCA 蛋白定量法进行定量检测。取 30 μg 总蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,蛋白低温转移至 PVDF 膜, GAPDH, p53 抗体孵育过夜, HRP 标记的二抗处理后,洗膜 3 次,使用分子成像仪进行曝光显影,拍照。

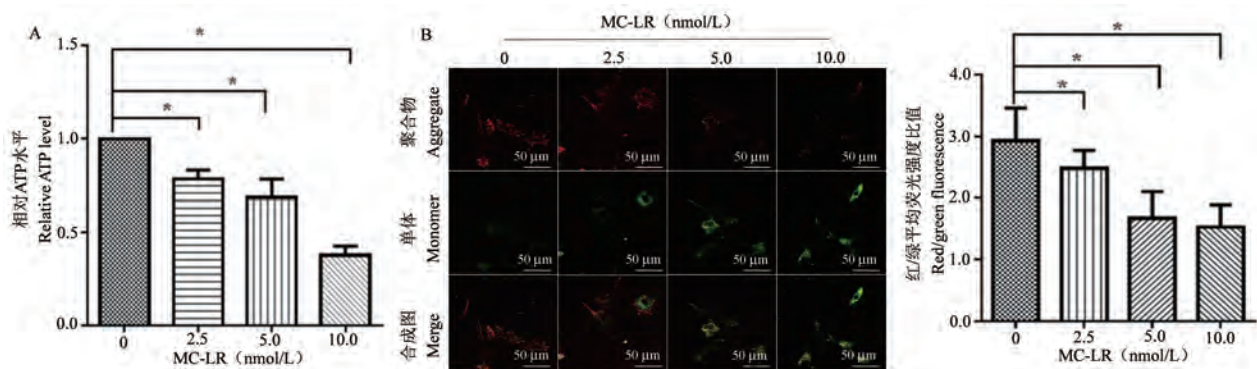
1.3 统计学分析

实验数据采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$),所有实验均重复 3 次,采用 *t* 检验或者方差分析统计实验组与对照组之间的差异,并用 GraphPad Prism 7.0 软件统计作图。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 MC-LR 造成线粒体功能障碍

为了检测线粒体功能,从线粒体膜电位 (MMP, $\Delta\psi_m$) 的变化和细胞能量代谢 (ATP) 变化两个方面进行研究。首先,检测了 ATP 生成水平,结果如图 1 A 所示,与对照组相比,低剂量 2.5 nmol/L MC-LR 处理组就可以使 ATP 水平降低至 0.78 ± 0.05 倍 ($P < 0.05$),随着毒素浓度的增加,ATP 生成量不断减少 (5 nmol/L 组为 0.69 ± 0.10 倍, 10 nmol/L 组为 0.38 ± 0.05 倍, $P < 0.05$),这一作用迅速而又明显。接着,检测了线粒体膜电位。敏感的 JC-1 染料以电势依赖性的方式积聚在线粒体内,正常情况下为聚合物状态,产生红色荧光,线粒体处于异常状态, JC-1 则分解为单体,发绿色荧光,线粒体膜电位



注:不同剂量 (2.5 ~ 10 nmol/L) MC-LR 处理小鼠原代肝细胞 48 h; A: ATP 水平与对照组比较, $* P < 0.05$; B: JC-1 染色激光共聚焦拍照,与对照组相比, $* P < 0.05$ 。

图 1 MC-LR 引起肝细胞线粒体损伤

Note. Hepatocytes were treated with 2.5 ~ 10 nmol/L MC-LR for 48 h. A. Comparison of ATP level in cells subjected to the indicated treatments, $* P < 0.05$. B. Representative confocal imaging of cells treated with the indicated treatments. Compared with normal control group, $* P < 0.05$.

Figure 1 Effect on mitochondrial function of hepatocytes induced by MC-LR

的去极化程度可以通过红/绿荧光强度的比例来衡量。如图 1B 所示, MC-LR 作用 48 h 后, 细胞内红色荧光逐渐减弱, 绿色荧光逐渐增强, 聚合物逐渐解离成单体。通过计算, 空白对照组的膜电位比较高, 红/绿色平均荧光强度比值为 2.93 ± 0.53 , 而毒素处理组比值逐渐降低, 分别为: 2.48 ± 0.29 , 1.67 ± 0.43 , 1.53 ± 0.36 ($P < 0.05$), 影像学图片和计算的数据共同表明线粒体膜电位去极化。综合以上结果, 说明 MC-LR 导致线粒体功能受到损害。

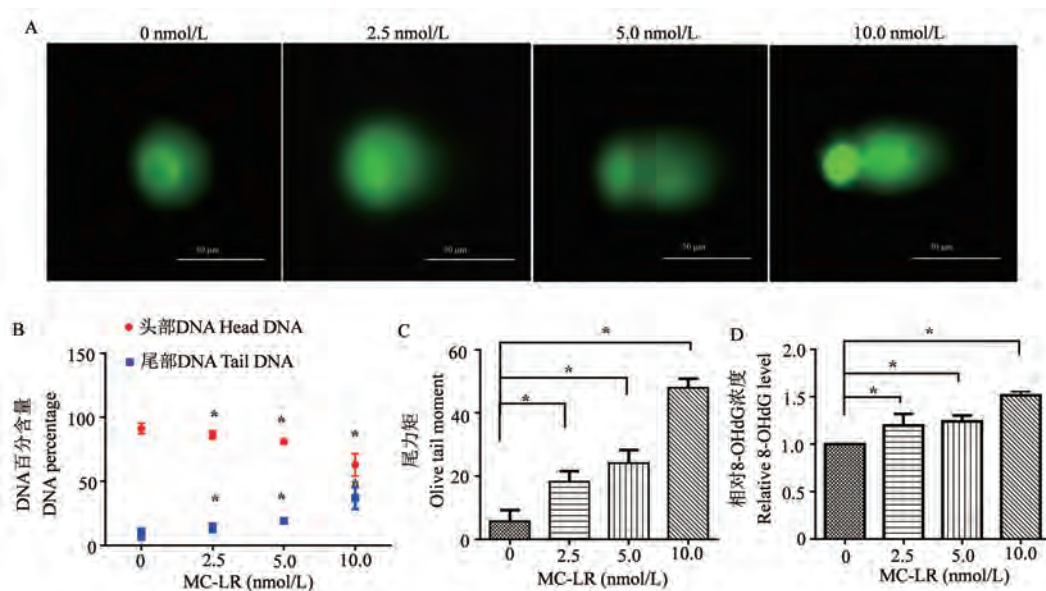
2.2 MC-LR 造成肝细胞 DNA 损伤

采用彗星实验和 8-OHdG 水平检测评价 MC-LR 对肝细胞 DNA 的损伤作用。通过彗星实验影像通过观察 DNA 彗尾形状和迁移模式, 可判断 DNA 双链是否发生断裂, 从单个细胞水平评估细胞的 DNA 损伤。研究中, 如图 2A 所示, 对照组细胞核为圆形, 未出现拖尾, 其头部的荧光强度高, MC-LR 处理后, 单个细胞核拖尾增大, 头部与尾部所占比例发生变化, 且随着处理毒素浓度增加, 拖尾明显变长, 体积变大。分析 DNA 百分比含量 (图 2B), MC-LR 处理后, 细胞核尾部 DNA 百分比的显著增加, 相反的, 头部 DNA 百分比逐步降低。进而该研究检测了

另一个重要指标的尾力矩 (olive tail moment, OTM), 如图 2C, 从单个细胞水平上进行测量, 发现对照组的 OTM 为 5.72 ± 3.56 , 随着毒素浓度增加, OTM 最高增加到 47.96 ± 2.92 (10 nmol/L , $P < 0.05$)。8-OHdG 作为 DNA 损伤的生物学标记^[11], 当细胞发生损伤其浓度急剧升高, 为了检测 DNA 损伤的发生情况, 该研究检测肝细胞的生长培养基中 8-OHdG 的含量。图 2D 实验结果表明, 经过梯度浓度的 MC-LR 处理 48 h 后, 培养基中 8-OHdG 水平变化范围从 1.02 ± 0.03 倍 (2.5 nmol/L 组, $P < 0.05$) 增加到 1.51 ± 0.07 (10 nmol/L 组, $P < 0.05$), 均高于对照组。以上实验结果表明 MC-LR 促使细胞 DNA 双链断裂, 并使 8-OHdG 高表达, 导致 DNA 损伤。

2.3 MC-LR 通过 p53 调控线粒体功能损伤作用

DNA 损伤往往造成 p53 表达增加, 为探索 p53 表达情况, 通过 Western Blot 对细胞内 p53 蛋白进行检测, 结果显示, 5 nmol/L MC-LR 处理组的肝细胞内 p53 蛋白表达量相较于对照组水平上调 (图 3A), 而经过 p53 特异性抑制剂 pft- α 预处理组的 p53 表达量有所恢复。以上结果说明 MC-LR 可促进 p53 表达增加, 这一作用可以被 pft- α 抑制。



注: 不同剂量 ($2.5 \sim 10 \text{ nmol/L}$) MC-LR 处理小鼠原代肝细胞 48 h; A: 彗星实验图; B: 头/尾部 DNA 含量百分比; C: 尾力矩; D: 8-OHdG 浓度; 与对照组相比较, $* P < 0.05$ 。

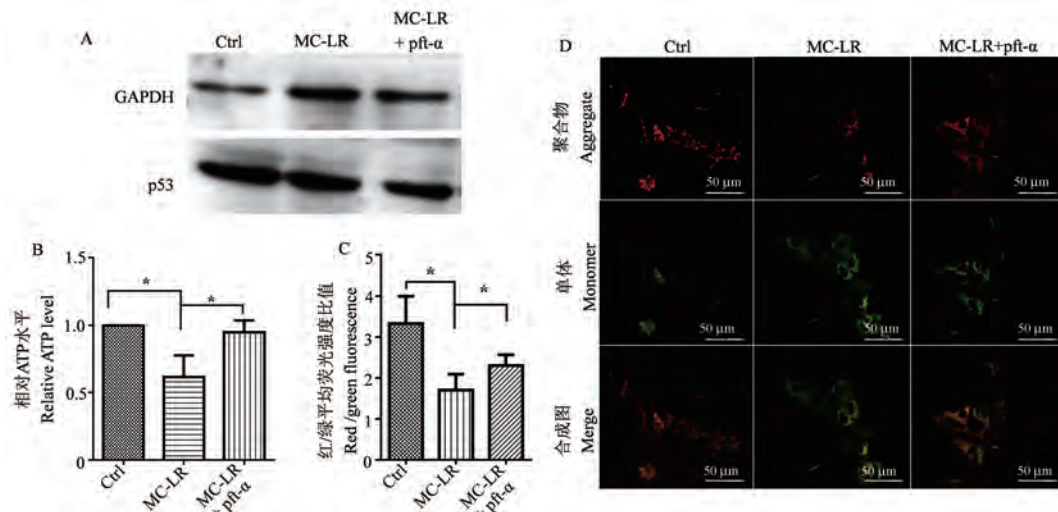
图 2 MC-LR 造成的 DNA 损伤情况

Note. Hepatocytes were treated with $2.5 \sim 10 \text{ nmol/L}$ MC-LR for 48 h. A. Effect of MC-LR on single cell subjected to the indicated treatments. B. Percentage of tail DNA/head DNA. C. Olive tail moment. D. MC-LR treatment resulted in a increase in the 8-OHdG levels. Compared with normal control group, $* P < 0.05$.

Figure 2 Effect of MC-LR on DNA damage

为了进一步验证 p53 对线粒体功能的影响,该课题选取 p53 抑制剂 pft- α 对肝细胞进行预处理,然后使用 5 nmol/L MC-LR 进行染毒处理,48 h 后检测胞内 ATP 水平和 $\Delta\psi_m$ 。研究结果显示(图 3B),MC-LR 处理组胞内 ATP 水平为对照组细胞的 0.62 ± 0.16 倍($P < 0.05$),显著性降低,而 pft- α 预处理组 ATP 水平为对照组的 0.95 ± 0.09 倍($P > 0.05$)相较于对照组未发生明显波动。另外,通过观察激

光共聚焦实验结果图,如图 3D 所示,相较于 MC-LR 处理组,pft- α 预处理组的红色荧光强度增强,绿色荧光减弱。对聚合物呈现的红色荧光和单体呈现的绿色荧光变化情况进行数据分析,发现 pft- α 预处理组红色/绿色平均荧光强度比值明显高于 MC-LR 处理组,但略低于对照组,说明 pft- α 预处理组 $\Delta\psi_m$ 去极化程度低(图 3C)。以上结果表明,DNA 损伤导致 p53 水平上调,从而诱发线粒体功能障碍。



注:pft- α 预处理小鼠原代肝细胞,加毒素 48 h 后;A:p53 蛋白表达;B:pft- α 处理前后的 ATP 水平;C:JC-1 染色,细胞内红/绿平均荧光强度的比值;D:JC-1 染色激光共聚焦拍照;与 MC-LR 处理组相比,* $P < 0.05$ 。

图 3 p53 表达及 pft- α 在线粒体功能损伤中的作用

Note. Primary mice hepatocytes were pre-treated with pft- α , and then treated with tox for 48 h. A. Comparison of p53 expression of cells with the indicated treatments. B. ATP levels of either pft- α -preconditioning or without pft- α on mitochondrial function. C. JC-1 stain, the intracellular red/green fluorescence intensity. D. Representative confocal imaging of cells treated with the indicated treatment. Compared with MC-LR group,* $P < 0.05$.

Figure 3 p53 protein level and the role of pft- α in mitochondrial dysfunction

3 讨论

小鼠原代肝细胞暴露于不同浓度的 MC-LR 毒素中发生了线粒体功能障碍,可能与其诱导的 DNA 损伤,募集 p53 表达增加有关。

蓝藻水华向水体释放过量的次生代谢产物——生物毒素,强烈肝毒性的 MC-LR 毒素通过有机阴离子和胆汁酸的多特异性运输系统进入肝细胞^[12],摄入过量的 MC-LR 造成肝损伤,肝衰竭,严重可诱导肿瘤发生^[13-15],受到广泛的毒理学研究。肝实质性细胞是肝的功能型细胞,也是各种因素所致肝损伤的主要靶细胞。该研究在小鼠原代肝细胞基础上进行的,因为原代肝细胞具有体内的肝细胞相似活性,存在完整的转运载体系统^[16],并且前期研究中发现原代细胞比细胞株对毒素更加敏

感^[5],可以更好地还原 MC-LR 的作用过程,是研究 MC-LR 对肝影响的理想模型。根据前期的研究,MC-LR(0 ~ 100 nmol/L)处理小鼠肝原代肝细胞 48 h 后,肝细胞存活率百分比曲线呈现明显的剂量-效应依赖型,由曲线计算出 MC-LR 对小鼠原代肝细胞的 IC_{50} 值为 26 nmol/L。这些数据表明,小鼠原代肝细胞对 MC-LR 的处理高度敏感,当 MC-LR 的浓度达到一定水平时产生细胞毒性。该研究实验采用低剂量 2.5 ~ 10 nmol/L 作为 MC-LR 的研究浓度。

线粒体作为产生 ATP 的主要基地,满足细胞生长的能量需求,同时参与细胞凋亡、自噬过程,稳定的线粒体膜电位有利于维持细胞正常生理功能^[17-18]。一些蛋白组学的研究发现在 MC-LR 诱导下,线粒体中 NADH 脱氢酶相关蛋白丰度发生变化,进而影响氧化磷酸化进程^[19-20]。另外的报道证

明 MC-LR 能够抑制 ATP 合酶的功能,导致细胞内能量异常进而促使细胞死亡^[21-22]。Majsterek 等^[23]报道,线粒体的形态学改变是 MC-LR 导致细胞死亡的主要原因。肝是人体主要代谢器官,线粒体是物质与能量代谢中心,线粒体功能障碍参与肝细胞癌的发生发展过程^[24-26],因此研究线粒体功能正常与否具有重要意义。MC-LR 进入肝细胞后,线粒体作为易损靶点,迅速受到影响。通过图 1 结果,发现 MC-LR 处理的肝细胞内,ATP 水平呈浓度依赖性快速下降,膜电位检测探针 JC-1 染色结果为红色/绿色平均荧光强度比值下降,与激光共聚焦显微镜图像结果一致,说明线粒体膜电位去极化,以此判断 MC-LR 导致线粒体功能发生障碍。研究报道包括动物体内和体外多种细胞株的试验中,发现 MC-LR 有确切的基因毒性,比如小鼠体内、人外周血淋巴细胞和人正常肝细胞 HL7702 细胞株在内的 DNA 双链发生断裂造成 DNA 损伤^[27-28]。图 2 结果显示,肝细胞经过 MC-LR 处理 48 h 后,损伤标记物 8-OHdG 增多,影像学图片显示细胞核出现明显的拖尾,作为评估 DNA 损伤程度的尾力矩也呈毒素浓度依赖性增加,由此可见 DNA 损伤程度随 MC-LR 浓度增加而增加。这一结果与过去在动物体内以及不同细胞株中的研究结果一致^[29-30]。在机制方面的相关研究中,线粒体功能异常往往被认定为氧化应激损伤造成^[31],而越来越多的证据表明线粒体功能障碍和 DNA 损伤后 p53 积聚亦有相关性^[32-33]。生理情况下,p53 维持低浓度稳定存在于细胞质中,当 DNA 受损时,p53 基因迅速被激活,清除减少,高浓度聚集在胞内,一部分 p53 进入线粒体引发线粒体障碍,触发凋亡^[32,34]。为了揭示 MC-LR 造成线粒体功能障碍的机制,该研究还检测了 p53 表达情况,Western Blot 结果表明 MC-LR 促使肝细胞 DNA 损伤后,募集 p53,而特异性转录抑制剂 pft- α 可减弱其敏感性,仍旧维持在低表达状态。p53 是机体应对 DNA 损伤的天然防护屏障,具有双向调节作用,通过修复损伤的 DNA 使细胞存活,或诱导细胞凋亡消除损伤的细胞维持细胞内稳态,这一选择主要是基于其翻译后修饰调控^[35]。该研究为了探究 p53 在线粒体功能方面的作用,使用 pft- α 预先处理肝细胞,然后用 5 nmol/L MC-LR 染毒,48 h 后检测线粒体功能,结果发现线粒体中 ATP 水平回升, $\Delta\psi_m$ 得以恢复到本底 70% 水平,证明 p53 可调控线粒体功能。

MC-LR 对肝毒性的研究颇多,但是具体的机制仍处于探索阶段。虽然目前发现 MC-LR 可造成 DNA 损伤,促进 p53 基因表达,但鲜有将 p53 与线粒体功能联系起来。该研究着眼于肝细胞线粒体损伤方面,设计实验检测 p53 对线粒体功能的影响,试图从线粒体方面揭示 MC-LR 的毒性作用机制。通过以上实验提示积聚的 p53 参与线粒体功能调控,但也存在一定的不足之处,比如 p53 如何影响线粒体功能,是否与线粒体信号通路产生交集,这些值得进一步深入探讨,也是该课题后续研究方向。

参 考 文 献 (References)

- [1] Lee J, Lee S, Mayta A, et al. Microcystin toxin-mediated tumor promotion and toxicity lead to shifts in mouse gut microbiome [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 206: 111112-111204.
- [2] Park H, Iwami C, Watanabe MF, et al. Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic Microcystis species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994) [J]. *Environ Toxicol*, 2015, 13(1): 61-72.
- [3] Chen L, Chen J, Zhang X, et al. A review of reproductive toxicity of microcystins [J]. *J Hazard Mater*, 2016, 301: 381-399.
- [4] Puddick J, Prinsep MR, Wood SA, et al. High levels of structural diversity observed in microcystins from Microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(11): 5372-5395.
- [5] Wu YL, He Y, Shi JJ, et al. Microcystin-LR promotes necroptosis in primary mouse hepatocytes by overproducing reactive oxygen species [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 377 (2019): 114114-114626.
- [6] Zegura B, Lah TT, Filipic M. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage [J]. *Toxicology*, 2004, 200(1): 59-68.
- [7] Sarkar S, Kimono D, Albadrani M, et al. Environmental microcystin targets the microbiome and increases the risk of intestinal inflammatory pathology via NOX2 in underlying murine model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 8742-8763.
- [8] Nong Q, Komatsu M, Izumo K, et al. Involvement of reactive oxygen species in Microcystin-LR-induced cytogenotoxicity [J]. *Free Radic Res*, 2007, 41(12): 1326-1337.
- [9] Casquilho NV, Moreira-Gomes MD, Magalhães CB, et al. Oxidative imbalance in mice intoxicated by microcystin-LR can be minimized [J]. *Toxicol*, 2018, 144: 75-82.
- [10] Zanchett G, Oliveira-filho EC. Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects [J]. *Toxins (Basel)*, 2013, 5(10): 1896-1917.
- [11] Li X, Zhao Q, Zhou W, et al. The effects of chronic exposure to Microcystin-LR on hepatocyte mitochondrial DNA replication in

- mice [J]. Environ Sci Technol, 2015, 49(7): 4665–4672.
- [12] Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, et al. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 203(3): 257–263.
- [13] Svirčev Z, Drobnac D, Tokodi N, et al. Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms [J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2013, 31(3): 181–200.
- [14] Lin W, Hou J, Guo H, et al. The synergistic effects of waterborne microcystin-LR and nitrite on hepatic pathological damage, lipid peroxidation and antioxidant responses of male zebrafish [J]. Environ Pollut, 2018, 235: 197–206.
- [15] Shuai Y, Lou D, Yin J, et al. Characterization of microcystin-induced dualistic toxic effects on primary rat hepatocytes [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2017, 36(1): 15–27.
- [16] Ulvestad M, Darnell M, Molden E, et al. Evaluation of organic anion-transporting polypeptide 1B1 and CYP3A4 activities in primary human hepatocytes and HepaRG cells cultured in a dynamic three-dimensional bioreactor system [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 343(1): 145–156.
- [17] Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(9): 621–632.
- [18] Ruchko M, Gorodnya O, Ledoux SP, et al. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial dysfunction and apoptosis in oxidant-challenged lung endothelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(3): L530–L535.
- [19] Chen T, Wang Q, Cui J, et al. Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR: a combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy [J]. Mol Cell Proteomics, 2005, 4(7): 958–974.
- [20] Wang M, Wang D, Lin L, et al. Protein profiles in zebrafish (*Danio rerio*) brains exposed to chronic microcystin-LR [J]. Chemosphere, 2010, 81(6): 716–724.
- [21] La-Salette R, Oliveira MM, Palmeira CA, et al. Mitochondria a key role in microcystin-LR kidney intoxication [J]. J Appl Toxicol, 2008, 28(1): 55–62.
- [22] Mikhailov A, Härmälä-Braskén AS, Hellman J, et al. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR [J]. Chem Biol Interact, 2003, 142(3): 223–237.
- [23] Majsterek I, Sicinska P, Tarczynska M, et al. Toxicity of microcystin from cyanobacteria growing in a source of drinking water [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2004, 139(1–3): 175–179.
- [24] Gao WY, Li D, Cai DE, et al. Hepatitis B virus X protein sensitizes HL-7702 cells to oxidative stress-induced apoptosis through modulation of the mitochondrial permeability transition pore [J]. Oncol Rep, 2017, 37(1): 48–56.
- [25] Huang Q, Zhan L, Cao H, et al. Increased mitochondrial fission promotes autophagy and hepatocellular carcinoma cell survival through the ROS-modulated coordinated regulation of the NF- κ B and TP53 pathways [J]. Autophagy, 2016, 12(6): 999–1014.
- [26] Chávez E, Lozano-rosas MG, Domínguez-lópez M, et al. Functional, metabolic, and dynamic mitochondrial changes in the rat cirrhosis-hepatocellular carcinoma model and the protective effect of IFC-305 [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2017, 361(2): 292–302.
- [27] Zegura B, Gajski G, Straser A, et al. Microcystin-LR induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes [J]. Mutat Res, 2011, 726(2): 116–122.
- [28] Dias E, Louro H, Pinto M, et al. Genotoxicity of microcystin-LR in *in vitro* and *in vivo* experimental models [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 949521–949949.
- [29] Díez-Quijada L, Medrano-Padial C, Llana-Ruiz-Cabello M, et al. Cyindrospermopsin-Microcystin-LR combinations may induce genotoxic and histopathological damage in rats [J]. Toxins (Basel), 2020, 12(6): 348–369.
- [30] Zegura B, Volcic M, Lah TT, et al. Different sensitivities of human colon adenocarcinoma (CaCo-2), astrocytoma (IPDDC-A2) and lymphoblastoid (NCNC) cell lines to microcystin-LR induced reactive oxygen species and DNA damage [J]. Toxicon, 2008, 52(3): 518–525.
- [31] Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources [J]. J Endocrinol, 2017, 233(1): R15–R42.
- [32] Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis [J]. Science, 2000, 288(5468): 1053–1058.
- [33] Takumi S, Komatsu M, Furukawa T, et al. P53 plays an important role in cell fate determination after exposure to microcystin-LR [J]. Environ Health Perspect, 2010, 118(9): 1292–1298.
- [34] Mihara M, Erster S, Zaika A, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria [J]. Mol Cell, 2003, 11(3): 577–590.
- [35] Taira N, Yamaguchi T, Kimura J, et al. Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(2): 717–722.

[收稿日期] 2021-03-31

王楷,侯雨君,宋玮,等. 泄泻中医证候动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 823-829.

Wang K, Hou YJ, Song W, et al. Research progress on animal model construction and evaluation of different TCM syndromes of diarrhea [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 823-829.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.015

泄泻中医证候动物模型研究进展

王楷¹,侯雨君¹,宋玮²,陈颖¹,蒋慧灵¹,谭玉¹,周思远^{1*}

(1. 成都中医药大学针灸推拿学院/第三附属医院,成都 610075; 2. 成都中医药大学基础医学院,成都 610075)

【摘要】 泄泻是中医常见疾病,中医辨证治疗常常取得较好疗效。中医证候动物模型的建立对于中医研究具有重大意义,科学简便的动物模型建立方法有利于中医的发展,目前不同的泄泻证型尚无各自统一公认的中医证候模型建立标准。对泄泻肠道湿热证、寒湿困脾证、食滞脾胃证、肝郁脾虚证、脾气亏虚证、脾肾阳虚证动物模型制作方法进行综述,发现目前的泄泻动物模型具有造模方法混乱、造模因素选择随机、模型评价标准主观等问题,并提出模型改进建议,以期建立行业认可、简便高效、科学稳定的泄泻中医症候模型。

【关键词】 泄泻;中医证候;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0823-07

Research progress on animal model construction and evaluation of different TCM syndromes of diarrhea

WANG Kai¹, HOU Yujun¹, SONG Wei², CHEN Ying¹, JIANG Huiling¹, TAN Yu¹, ZHOU Siyuan^{1*}

(1. College of Acupuncture and Massage, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China.
2. College of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075)

Corresponding author: ZHOU Siyuan. E-mail: zsy@cdutcm.edu.cn

【Abstract】 Diarrhea is a common disease in traditional Chinese medicine (TCM), and dialectical treatment with TCM often achieves better result. Establishing animal models of TCM syndromes is of great significance to TCM research. Simple animal model establishment method are conducive to the development of TCM. At present, there is no uniformly recognized standard for establishing TCM syndrome models of diarrhea. The author of this article reviewed the method for generating animal models of diarrhea, including intestinal dampness-heat syndrome, cold-dampness trapping the spleen syndrome, stagnation of spleen and stomach syndrome, liver depression and spleen deficiency syndrome, spleen-qi deficiency syndrome and spleen-kidney yang deficiency syndrome, and found that the current approaches are unclear because of the random selection of modeling factors, subjective model evaluation criteria and other issues. This review provides suggestions for model improvement to establish industry-recognized, simple, efficient, scientific and stable diarrhea TCM syndrome models.

【Keywords】 diarrhea; TCM syndromes; animal models

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

【基金项目】 国家自然科学基金委员会面上项目(82074558)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(82074558).

【作者简介】 王楷(1992—),女,博士研究生,研究方向:针灸治疗功能性胃肠病的效应及其机制。Email:947704057@qq.com

【通信作者】 周思远(1984—),女,博士,副教授,研究方向:针灸治疗功能性胃肠病的效应及其机制。Email: zsy@cdutcm.edu.cn

泄泻是排便频率增加,大便稀溏或排出未消化食物,甚至泻出水样便为主症的病证^[1]。泄泻的病机主要在于脾胃受损,运化失常,清浊不分,而成泄泻。西医病名如急性慢性肠炎,腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant IBS, IBS-D),吸收不良综合征等皆可按泄泻辨证治疗。

辨证论治是中医治病的基本准则,中医证候动物模型的构建对中医研究的发展具有十分重要的意义。目前中医泄泻证候模型的制备尚无公认的标准。大多数研究从疾病的病因、病理方面切入进行造模。造模方法分为物理方法和化学方法,根据造模因素的数量又可分为单因素造模法和复合因素造模法^[2]。根据现有的病理表现和诊断标准,结合中医基础理论,通过评估动物模型的症状表现,肠道功能和病理变化以及方药反证,判断模型制备是否成功。本文通过归纳总结泄泻动物模型的研究进展以及模型评价方法,以期今后的模型研究提供参考。

1 模型建立

1.1 实证

1.1.1 肠道湿热证泄泻模型

肠道湿热泻是指感受湿热疫毒或饮食不洁等原因,出现如腹痛泻下,大便不爽,黏腻臭秽,肛门灼热,口渴喜饮、小便黄,苔黄腻,脉滑数等。阎翔等^[3]通过高糖高脂饮食以及高温高湿环境分别模拟中医“内湿”、“外湿”形成过程造模。李文龙等^[4]在前人基础上,通过改进模型,第一阶段以高糖高脂饲料喂养大鼠,第二阶段将大鼠置于高温高湿造模箱,同时以白酒灌服;第三阶段采用大肠杆菌灌胃;以大鼠毛发蓬松、蜷缩懒动以及食欲不振、饮水量和尿量减少,肛门红肿充血或肛门扩张以及腹泻指数升高、肠道病理判断是否造模成功。该模型通过“外湿+内湿+疫毒”模拟湿热泄泻证的病程,较前期单纯“内湿”“外湿”造模方法增加了产毒大肠杆菌,更加符合中医湿热泄泻形成机理,因此在研究中应用较广^[5-6]。王涛^[7]将前述第三阶段造模方法中的大肠杆菌替换为番泻叶进行造模,并将两种造模方式进行对比,发现两种方法均能建立大鼠肠道湿热证泄泻模型,其中大肠杆菌所造的大鼠模型表现出严重的炎症反应和肠道黏膜损伤;而番泻叶所造的模型则腹泻症状更突出。

1.1.2 寒湿困脾证泄泻模型

寒湿困脾泻是指因外感风寒或寒湿中阻,出现泄泻清稀,或如水样,腹痛,脘腹胀闷,舌苔白腻,脉浮等症状。薛晓倩等^[8]采用改进的环境加疲劳法进行造模,在保持室温在 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下,将大鼠置于水深约 25 cm、水温 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的水池中,游泳 15 min 后用取出立即吹干,并用冰水灌胃,然后将动物饲养在灌有 4 mm 水深的笼子中。持续 6 d 后将大鼠移到正常环境中饲养。李晟等^[9]采用两阶段造寒湿困脾模型,第 1 ~ 7 天使用大黄灌胃、游泳、低温高湿环境造模,第 8 ~ 9 天用大肠杆菌灌胃,使用加味厚朴温中汤治疗有效。

1.1.3 食滞胃肠证泄泻模型

食滞胃肠证泄泻是指摄入过多高蛋白、高热量的食物而导致机体不能正常消化,出现泻下臭秽如败卵、或伴有不消化食物,不思饮食,嗳腐吞酸,舌苔腐腻,脉滑。造模方法主要采用过食肥甘法造模法,常使用甘兰、猪脂、牛乳、面粉等材料制作饲料。根据“饮食自倍,脾胃乃伤”中医理论,孙理想等^[10]、麦楚填等^[11]自制高脂高蛋白饲料喂养大鼠,通过观察造模后大鼠的精神状态、进食量、体重、大便性状验证模型。唐小玲等^[12]选用大剂量熟地制作模型,并用具有消食导滞作用的保和丸来作反证验证模型。熟地造模后的大鼠出现食量减少,大便稀溏,抗疲劳和耐寒能力降低,经保和丸治疗后可以抑制产生稀大便。在动物研究中,因为高能量食物造模法较为简便,比较契合中医食滞胃肠病机的形成原理,因此普遍采用该法模拟临床食积证的形成。

1.2 虚实夹杂证

肝郁脾虚证泄泻的主要症状为情绪紧张或沮丧和激怒时,即出现腹痛泄泻,泻后痛减,胁肋胀痛,暖气食少,舌淡,脉弦。该证是泄泻中最常见的证型,其特点为泻前或泻时必有腹痛、泻后痛减。对于该证型的动物模型研究较多,在模型建立时既要考虑肝郁的“因”,同时又要建立脾虚的“果”。该模型的建立主要分为单因素、复合因素刺激造模。单因素造模法包括单独使用慢性束缚法^[13]、夹尾刺激法、母婴分离^[14]等方法造模;复合因素造模法如番泻叶联合束缚法^[15]、夹尾刺激联合大黄灌胃^[16-17]、CUMS 联合番泻叶溶液灌胃^[18]等;张庆业等^[19]采用母婴分离+束缚刺激+醋酸灌肠三种因素联合造模,通过观察体重变化、直肠高敏、粪便

Bristol 评分和含水量等指标验证模型是否成功。赵荣华等^[20]采用慢性束缚+过度疲劳+饮食失节方法建立模型。王一程等^[21]采用母婴分离联合冰水、束缚、夹尾四种方法造模。以多因素综合刺激作为应激原,符合慢性病程的形成过程。国内外众多学者从肝郁脾虚泄泻临床症状特点出发建立了多种模型,取得了一定的成果,但研究中还存在模型的建立与中医发病机理不完全符合、评价指标未能量化表示等问题。泄泻肝气乘脾证的发生大多是建立在慢性心理、生物和物理等综合因素中刺激人体应激性的基础上演变而来的,故多因素复合造模方法往往可取得更接近临床症状的形成过程。

1.3 虚证

1.3.1 脾气亏虚证泄泻模型

脾虚泄泻是指因脾气亏虚出现食少纳呆、体倦乏力、大便稀溏等表现。脾虚泄泻的动物模型主要造模方法可分为泻下法、饮食失节法、饮食偏嗜法、综合法。常用的泻下药物有番泻叶溶液、大黄溶液等;饮食偏嗜法如采用食醋^[22]、白酒^[23]灌胃法。康楠等^[24]采用特制的方形水槽中放置小平台,平台周边水深约 1.5 cm,大鼠在平台上可自由活动,大鼠进入睡眠就会因为肌肉舒张、松弛而落入水中,同时予以高脂饮食建立脾虚泄泻模型。赵荣华等^[20]采用过度疲劳联合饮食失节复制脾虚证泄泻模型,观察大鼠的粪便性状、排便次数以及是否出现倦怠、毛发稀疏等一般情况判断模型效应。

1.3.2 脾肾阳虚证泄泻模型

脾肾阳虚证泄泻的主要由于久泻不止,由脾及肾,或年老元阳虚衰,黎明前腹痛,腹泻,泻下清稀,甚至完谷不化,小腹及四肢冷痛,腰膝酸软,舌淡苔白,脉沉细。脾肾阳虚泄泻多采用复合因素造模法,如大黄^[25-26]或番泻叶溶液灌胃联合肌注氢化可的松法^[27],番泻叶联合腺嘌呤灌胃造模法^[28],丙基硫氧嘧啶+游泳+饮食不节+番泻叶灌胃法^[29]。侯理伟^[30]采用高浓度番泻叶溶液(1 g/mL)以 10 mL/kg 剂量灌胃 2 周联合避水应激 10 d 建立脾肾阳虚 IBS-D 大鼠模型;刘敏等^[31]在此基础上,采用母子分离联合慢性束缚应激、番泻叶灌胃法制作模型,使用四神丸治疗有效。朱佳杰^[32]对比高、中、低 3 种浓度的番泻叶溶液造模,发现高浓度番泻叶(1.0 g/L, 10 mL/kg)灌胃 4 周可复制脾肾阳虚型泄泻大鼠模型;另外作者还对比了母婴分离、避水应激、直肠扩张三种方法分别联合番泻叶灌胃造模,以体重

下降、D-木糖排泄率评判脾虚证,并且以机体自主活动能力以及肛温作为肾阳虚评价方法,发现 3 种造模方式均能建立脾肾阳虚证泄泻模型;其中母婴分离或避水应激联合番泻叶溶液能增加大鼠内脏敏感性,而直肠扩张分别联合番泻叶溶液未能诱导大鼠内脏高敏。

2 模型评价

泄泻动物模型的评价方法主要可分为动物表征、行为学测试法、微观指标检测法、方药反证法等。

2.1 肠道湿热证

肠道湿热证的动物模型表征为毛发蓬松、蜷缩懒动以及食欲不振、饮水量和尿量减少、体重下降,肛门红肿充血或肛门扩张,腹泻,粪便黄而恶臭,有部分出现黏液脓血便;并且肛温升高^[33]。在现有的研究中,肠道湿热证泄泻检测指标显示腹泻指数升高^[4];5-羟色胺(5-HT)含量升高^[34];病理显示小肠绒毛脱落显著,绒毛上皮细胞明显肿胀,部分坏死或脱落,黏膜下层有轻微充血、严重水肿、轻度炎症^[35];肠组织肥大细胞数目增多等^[34]。可用于反证肠道湿热证的方药主要有九香止泻片^[34,36]、葛根芩连汤^[6]、秦香止泻方^[35]、郁金散^[5]等。

2.2 寒湿困脾证

寒湿困脾证泄泻的动物模型主要表现为倦怠、自主活动减少、便溏、肛周污秽,毛色枯黄、拱毛、脱毛、食量及饮水减少、体重下降或增长缓慢;指标检测显示肠粘膜 AQP4^[8]、回肠粘膜 ZO-1^[37]、小肠 P 物质及 IL-2 的表达均降低^[9];可用于该证的方药包括藿香正气液^[8,37]、加味厚朴温中汤^[9]等。

2.3 食滞胃肠证

食滞胃肠证泄泻的动物模型的表征为大便次数增多,大便臭秽、溏薄、不成形,食量减少,体重增长缓慢;检测肠道 NF-kBp65 蛋白表达下降^[38];在方药反证模型时,通常采用保和丸^[12,39]。

2.4 肝郁脾虚证

肝郁脾虚证动物模型的一般表现为体重减轻、毛发枯黄、腹泻、活动减弱、反应迟钝、情绪由开始的易怒烦躁转为低落^[40];鼠粪便 Bristol 分型积分、粪便含水量、腹泻指数、直肠敏感性测试、稀便率均升高^[19,41];腹壁撤退反射(AWR)^[21]增高,行为学实验包括旷场实验、糖水偏嗜实验、高架十字迷宫^[42]相关数值下降均提示大鼠肝郁模型的建立。在微观指标检测方面,肝郁脾虚证泄泻表现为 IL-2 上

升, IL-10^[41]、白细胞计数、胸腺系数、脾脏系数^[43]、皮质和下丘脑中 SE、RT 的含量^[15]则表现为下降。该证型可以使用经典的中药方剂痛泻要方、柴胡四君子汤进行方药反证。

2.5 脾气亏虚证

脾气亏虚证模型的表现表现为体重增长缓慢, 体温降低, 食物摄取量和水的消耗量减少, 毛变稀疏, 缺乏光泽, 倦怠, 喜扎堆, 反应迟钝, 大便稀溏^[44]; 游泳测试^[45]和大鼠抓力^[46]均下降; 实验室微观检测显示: 肝细胞磷/氧比值、呼吸控制率、肝糖原含量、血浆皮质酮含量、红细胞总数、血红蛋白总数, 肝、脾重量^[45]、血乳酸值、淀粉酶活性、D-木糖排泄率^[47]均表现为下降, 肝线粒体嵴大部分或全部消失^[45]。此证型可通过经典的四君子汤进行方药佐证。

2.6 脾肾阳虚证

脾肾阳虚证模型建立的表现表现为体重下降、进食量和饮水量下降、嗜卧懒动、行动迟缓、爪甲色淡、尾巴变凉、弓背倦怠、喜扎堆、大便清稀, 肛温下降^[32]; 握力试验和负重游泳实验^[32]均下降; 腹泻指数^[26]升高; 胸腺脏器指数降低, 脾、肾、睾丸的脏器指数升高^[26]; IL- β 升高^[27]; D-木糖、血清 ACTH、血清 Cortisone^[32]、尿-17 羟、IL-1 β /IL-4 比值^[27]均降低; 此证型可以使用温补脾肾的四神丸进行方药反证。

3 小结

3.1 存在的问题

3.1.1 造模方法混乱

泄泻中医证型较多, 各种证型的模型建立方法不统一。各种证型的模型建立主要存在造模时给药剂量不精确, 复合造模方法种类繁多、选择随机、重复性差, 西药副作用造成动物损伤较大、混杂因素不确定等问题。例如, 在番泻叶灌胃联合 CUMS 建立肝郁脾虚泄泻模型的研究中, 番泻叶浓度从 0.25 ~ 1 g/mL^[17,32], 以及 CUMS 的选择范围较广, 无统一标准。饮食不节法既是食滞胃肠泄泻的造模方法, 又是脾虚泄泻的造模方法之一, 两者无明确的模型鉴定标准。再如, 慢性应激联合番泻叶灌胃是肝郁脾虚泄泻的常用造模方法, 而有的研究者使用该法建立脾肾阳虚模型^[31]。

3.1.2 复合因素选择随机

应用复合因素造模可以提高模型成功率、增加模型稳定性, 更加符合疾病形成过程。然而各个研

究所选择的造模因素多变, 缺乏各种造模因素之间的对比研究, 导致后续的研究者难以明确造模因素的选择。

3.1.3 模型评价主观性太强

在建立的动物模型中, 大多数研究在判断模型是否成功时简单以动物表现出来的症状为依据, 中医舌脉辨证在动物模型中仍难以实现。例如, 在脾虚证和脾肾阳虚证中, 动物模型均表现出泄泻、体重下降、嗜卧懒动的表现; 食滞胃肠证和脾虚证均出现倦怠、稀便, 毛色枯黄、拱毛、脱毛, 食量及饮水减少、体重下降或增长缓慢的表现。这样导致建立的模型认可度不高, 并且各个实验间缺乏可比性, 这将不利于中医药研究的发展。

3.2 泄泻模型的改进建议

针对以上问题, 一方面, 应开展更多的模型对比分析研究, 确定最佳的造模方法, 包括造模因素、药物剂量、时间周期等的选择, 推荐使用病与证相结合的模型构建方式, 例如肝郁脾虚泄泻常对应西医的肠易激综合征, 可采用国际上最常用的母婴分离法构建模型, 从母鼠产后第 3 天开始, 总共分离 12 d, 每次持续 3 h^[48]。另一方面, 应明确各种中医证型之间的区分鉴定方法, 探索更客观的模型评判指标, 推广方药反证法的应用。通过对前期模型的改进, 以期建立更加标准统一、简便高效、科学稳定的泄泻中医症候模型, 推动疾病的研究以及中医药的发展。

参 考 文 献 (References)

- [1] 张声生, 王垂杰, 李玉锋, 等. 泄泻中医诊疗专家共识意见 (2017) [J]. 中医杂志, 2017, 58(14): 1256-1260.
Zhang SS, Wang CJ, Li YF, et al. Expert consensus on diagnosis and treatment of diarrhea in traditional Chinese medicine (2017) [J]. J Tradit Chin Med, 2017, 58(14): 1256-1260.
- [2] 李晓娟, 白晓晖, 陈家旭. 中医动物模型研制方法及展望 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7): 2263-2266.
Li XJ, Bai XH, Chen JX. Development and prospect of establishment method of traditional Chinese medicine animal models [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 29(7): 2263-2266.
- [3] 阎翔, 郭明阳. 建立温病湿热证动物模型方法探讨 [J]. 成都军区医院学报, 2003, 5(6): 36-38.
Ge X, Guo MY. Method of establishing animal model of fever and dampness-heat syndrome [J]. J Milit Surg South Chin, 2003, 5(6): 36-38.
- [4] 李文龙, 彭芝配, 张金慧, 等. 建立湿热泄泻大鼠模型初探 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(11): 11-12.
Li WL, Peng ZP, Zhang JH, et al. A preliminary study on

- establishing the rat model of dampness-heat catharsis [J]. Guide Chin Med, 2012, 10(11): 11-12.
- [5] Yao W, Yang C, Wen Y, et al. Treatment effects and mechanisms of Yujin Powder on rat model of large intestine dampness-heat syndrome [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 202: 265-280.
- [6] 肖嫩群, 何云山, 张晨阳, 等. 葛根芩连汤对肠道湿热证泄泻小鼠肠道微生物的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(10): 1140-1144.
- Xiao NQ, He YS, Zhang CY, et al. Effect of Gegen Qinlian decoction on intestinal microbiota in diarrhea mice with intestinal dampness-heat syndrome [J]. Chin J Microecol, 2020, 32(10): 1140-1144.
- [7] 王涛. 两种不同方法建立大鼠湿热泄泻模型的比较研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学; 2016.
- Wang T. Comparative study of two different methods to establish the model of dampness-heat catharsis in rats [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University; 2016.
- [8] 薛晓倩, 黄学宽, 高宁, 等. 藿香正气液对湿阻证大鼠结肠黏膜水通道蛋白 4 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 165-169.
- Xue XQ, Huang XK, Gao N, et al. Effect of Huoxiang Zhengqi Liquid on the expression of AQP4 in colonic mucosa of rats with dampness retention syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2012, 18(19): 165-169.
- [9] 李晟, 陈晓阳, 邹志, 等. 加味厚朴温中汤对泄泻湿阻证大鼠胃肠道 P 物质和白细胞介素 2 表达的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2009, 17(5): 296-299.
- Li S, Chen XY, Zou Z, et al. Effect of Jiawei Houpu Wenzhong decoction on gastrointestinal P and IL-2 expression in diarrhea rats with stasis of dampness syndrome [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2009, 17(5): 296-299.
- [10] 孙理想, 彭玉. 伤食泻大鼠模型建立初探 [J]. 内蒙古中医药, 2015, 34(2): 107.
- Sun LX, Peng Y. A preliminary study on the establishment of the rat model of injury eating diarrhea [J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med, 2015, 34(2): 107.
- [11] 麦楚填, 吴美媚, 屈畅, 等. 小儿七星茶对食积模型小鼠肠道菌群的调节作用 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(5): 881-886.
- Mai CT, Wu MM, Qu C, et al. Regulatory effects of Xiao'er Qixingcha on intestinal flora in indigestion model mice [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2018, 35(5): 881-886.
- [12] 唐小玲, 赵劲风, 陈昌华, 等. 熟地所致食滞脾虚小鼠模型初探 [J]. 中国现代医学杂志, 1999, 9(2): 39-40.
- Tang XL, Zhao JF, Chen CH, et al. Preliminary study on the mouse model of spleen deficiency induced by cooked ground [J]. Chin J Mod Med, 1999, 9(2): 39-40.
- [13] 岳利峰, 丁杰, 陈家旭, 等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(6): 396-400.
- Yue LF, Ding J, Chen JX, et al. Establishment and review of rat model of liver depression with spleen insufficiency [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2008, 31(6): 396-400.
- [14] 林剑, 王承党. 早期母婴分离对成年大鼠内脏感觉和肠道炎症的影响 [J]. 胃肠病学, 2013, 18(3): 154-158.
- Lin J, Wang CD. Effect of neonatal maternal separation on visceral sensitivity and intestinal inflammation in adult rats [J]. Chin J Gastroenter, 2013, 18(3): 154-158.
- [15] 孙羽中, 潘伟娟, 陈富丽, 等. 痛泻要方对肠易激综合征肝郁脾虚证大鼠中枢神经系统 SERT 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6): 1408-1411.
- Sun YZ, Pan WJ, Chen FL, et al. Effect of Tongxie Yaofang on SERT of central nervous system in rats with IBS liver depression and spleen deficiency syndrome [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(6): 1408-1411.
- [16] 全俊. D-IBS 与 FD 重叠肝郁脾虚证动物模型的建立及其中药干预机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学; 2015.
- Quan J. Establishment of animal model of D-IBS and FD overlapped liver stagnation and spleen deficiency syndrome and research on its mechanism of traditional Chinese medicine intervention [D]. Yangzhou: Yangzhou University; 2015.
- [17] 唐洪梅, 廖小红, 房财富, 等. 肝郁脾虚型大鼠肠易激综合征模型的建立及评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 138-140.
- Tang HM, Liao XH, Fang CF, et al. The establish and evaluation of irritable bowel syndrome of hepatic and spleen deficiency type [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2012, 18(6): 138-140.
- [18] 罗丹妮, 赵妍, 陈颖, 等. 肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠模型的建立与评价 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(1): 197-201.
- Luo DN, Zhao Y, Chen Y, et al. Establishment and evaluation of IBS-D model rats with liver depression and spleen deficiency syndrome [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2019, 46(1): 197-201.
- [19] 张庆业, 廖小红, 范丽霞, 等. 肝郁脾虚泄泻大鼠模型的建立及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 20-23.
- Zhang QY, Liao XH, Fan LX, et al. Establishment and assessment of the diarrhea rat model of liver-Qi stagnation with spleen deficiency [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(3): 20-23.
- [20] 赵荣华, 谢鸣, 刘进娜, 等. 肝郁、脾虚和肝郁脾虚证模型大鼠行为学变化及柴疏四君子汤对其作用的比较 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(8): 515-528.
- Zhao RH, Xie M, Liu JN, et al. Behavioral changes in rats of liver-stagnation pattern, spleen-deficiency pattern and liver-stagnation with spleen-deficiency pattern and effects of Chaihu Sijunzi Decoction on different patterns [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2015, 38(8): 515-528.
- [21] 王一程, 穆芳园, 王曼宇, 等. 母婴分离联合 3 种应激致腹泻型肠易激综合征大鼠模型的建立和评价 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(6): 2314-2317.
- Wang YC, Mu FY, Wang MY, et al. Development and evaluation of a rat model of diarrhea irritable bowel syndrome by neonatal maternal separation combined with three kinds of stress

- [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(6): 2314-2317.
- [22] 彭成, 罗亮. 过食酸味所致脾虚机理的实验研究 [J]. 山东中医学院学报, 1989, 13(6): 13-14.
Peng C, Luo L. Experimental study on the mechanism of spleen deficiency caused by overeating sour taste [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 1989, 13(6): 13-14.
- [23] 罗光宇, 黄秀凤, 杨明均, 等. 偏食法塑造大鼠脾气虚证模型研究 [J]. 中医杂志, 1990, 4: 49-51.
Luo GY, Huang XF, Yang MJ, et al. Study on the model of spleen qi deficiency syndrome in rats by partial eating method [J]. J Tradit Chin Med, 1990, 4: 49-51.
- [24] 康楠, 王凤云, 陈婷, 等. 脾虚四号方干预对功能性腹泻脾虚证模型大鼠肠上皮细胞微绒毛形态的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 79-83.
Kang N, Wang FY, Chen T, et al. Effect of pixu IV recipe on morphology of intestinal epithelial microvillus in functional diarrhea spleen efficiency syndrome model rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2015, 21(17): 79-83.
- [25] 吴玉泓, 许雅清, 李海龙, 等. 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 116-119.
Wu YH, Xu YQ, Li HL, et al. Preparation of a rat model of ulcerative colitis with spleen and kidney Yang deficiency [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(2): 116-119.
- [26] 蔺晓源, 邓娜, 李霞, 等. 四神丸对脾肾阳虚泄泻模型大鼠实验研究 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(5): 756-758.
Lin XY, Deng N, Li X, et al. Experimental study of sishenwan on model rats with diarrhea of asdthenic splenonephro-yang [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2016, 25(5): 756-758.
- [27] 李能莲, 高建平, 李兰珍, 等. 四神丸对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠 Th1/Th2 免疫平衡的影响 [J]. 河南中医, 2013, 53(10): 1501-1505.
Li NL, Gao JP, Li LZ, et al. Effect of Sishen Pill on Th1/Th2 Immune balance in rats with spleen and kidney Yang deficiency type ulcerative colitis [J]. Henan Tradit Chin Med, 2013, 53(10): 1501-1505.
- [28] 郑洁, 朱莹, 高昂, 等. 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的研制 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016, 24(3): 182-187.
Zheng J, Zhu Y, Gao A, et al. The establishment of the ulcerative colitis rat models with spleen-kidney Yang deficiency pattern [J]. Chin J Integr Tradit Western Med Digestion, 2016, 24(3): 182-187.
- [29] 裴妙荣, 王晓英, 苗得雨. 复合式造大鼠脾肾阳虚模型 [J]. 山西中医, 2012, 28(7): 43-49.
Pei MR, Wang XY, Miao DY. The compound method of making up model of Yang-deficiency of spleen and kidney [J]. Shanxi J TCM, 2012, 28(7): 43-49.
- [30] 侯理伟. 温肾健脾方干预脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠脑-肠 CREB/BDNF/TrkB 信号通路的机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院; 2018.
- Hou LW. Study on mechanism of brain-gut CREB/BDNF/TrkB signaling pathway changes in IBS-D rats With spleen-kidney Yang deficiency syndrome and the intervention effects of warming kidney and strengthening spleen prescription [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences; 2018.
- [31] 刘敏, 薛红, 胡运莲. 四神丸对腹泻型肠易激综合征模型大鼠及离体结肠的实验研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(1): 75-80.
Liu M, Xue H, Hu YL. Experimental study of sishen pill on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome model rats and isolated colon [J]. Modern Tradit Chin Med Mater Medica-World Sci Tech, 2021, 23(1): 75-80.
- [32] 朱佳杰. 脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠模型探索及温肾健脾方干预 CRF 信号通路的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2018.
Zhu JJ. Exploration of spleen and kidney yang deficiency type IBS-D rat model and mechanism study of intervention of kidney and spleen decoction on CRF signal pathway [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2018.
- [33] 赖重波. 马齿苋对大鼠湿热泄泻模型的作用研究 [D]. 南宁: 广西大学; 2019.
Lai CB. Effect of Portulaca oleracea on the rat model of dampness and heat dissipation [D]. Nanning: Guangxi University; 2019.
- [34] 马薇, 彭芝配, 滕久祥, 等. 九香止泻片对湿热泄泻型肠易激综合征大鼠肠道组织肥大细胞与五羟色胺表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(4): 36-44.
Ma W, Peng ZP, Teng JX, et al. Effect of nine enteric tablets on mast cells and 5-HT expression of irritable bowel syndrome rats with damp-heat diarrhea type [J]. Chin J Inf TCM, 2011, 18(4): 36-44.
- [35] 朱克. 湿热腹泻大鼠模型的建立及秦香止泻方相关药效学研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学; 2011.
Zhu K. Establishment of a rat model of damp-heat diarrhea and related pharmacodynamics study of Qinxing Zhixie recipe [D]. Changsha: Hunan University Chinese Medicine; 2011.
- [36] 谭洁. 九香止泻片对湿热泄泻型肠易激综合征模型大鼠作用机制的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学; 2009.
Tan J. Study on the Mechanism of Jiuxiangzhixie tablets on rats with damp-heat diarrhea type irritable bowel syndrome [D]. Changsha: Hunan University Chinese Medicine; 2009.
- [37] 薛晓倩, 黄学宽, 高宁, 等. 藿香正气液对湿阻证大鼠回肠黏膜 ZO-1 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 224-227.
Xue XQ, Huang XK, Gao N, et al. Effects of huoxiang zhengqi liquid on expression of ZO-1 in ileum mucosa of rats with dampness retention syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2011, 17(16): 224-227.
- [38] 白辰, 郑子安, 徐竞男, 等. 食积胃肠积热动物模型的探索与评价 [J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 11(2): 125-129.
Bai C, Zheng ZA, Xu JN, et al. Establishment and evaluation of dyspeptic model animals with accumulated heat in stomach and intestine [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2019, 11(2): 125

- 129.
- [39] 陈建峰, 唐铭翔, 周知午. 保和丸对大鼠血液中胃泌素及胃动素含量的影响 [J]. 湖南中医杂志, 2013, 53(9): 89-90.
Chen JF, Tang MX, Zhou ZW. Effect of Baohe pill on the contents of gastrin and motilin in blood of rats [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2013, 53(9): 89-90.
- [40] 潘小丽, 康朝霞, 毛玮, 等. 电针对功能性消化不良肝郁脾虚模型大鼠胃电节律及胃窦 Cajal 间质细胞表达的影响 [J]. 中医杂志, 2018, 59(17): 1503-1506.
Pan XL, Kang CX, Mao W, et al. Effect of electro-acupuncture on gastric electrical rhythm and expression of Cajal interstitial cells of functional dyspepsia model rats with liver stagnation and spleen deficiency [J]. J Tradit Chin Med, 2018, 59(17): 1503-1506.
- [41] 郭军雄, 许小敏, 汪斌, 等. 中医杂志 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(11): 9-11.
Guo JX, Xu XM, Wang B, et al. Dynamic assessing diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats with liver stagnation and spleen deficiency syndrome [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018, 36(11): 9-11.
- [42] 赵妍. CRF-R1 在针刺治疗 IBS-D 中的作用及其介导的肠上皮屏障信号机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2018.
Zhao Y. Study on the roal of CRF-R1 in the treatment of IBS-D by EA and the signal mechanism of IEB [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM; 2018.
- [43] 吴仪, 龙承星. 泄泻肝气乘脾造模对小鼠血常规及脏器的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2020, 28(9): 330-334.
Wu Y, Long CX. Effect of Ganqichengpi diarrhea on routine hematology parameters and organs in mice [J]. World Chin J Digestol, 2020, 28(9): 330-334.
- [44] 李晶, 王垂杰, 李玉峰, 等. 参苓白术颗粒对功能性腹泻大鼠结肠黏膜紧密连接蛋白表达的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(12): 102-107.
Li J, Wang CJ, Li YF, et al. Effect of Shenling Baizhu particles on intestinal epithelial tight junctions in rats with functional diarrhea [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(12): 102-107.
- [45] 谢仰洲, 陈琦涛, 谢宗岑, 等. 用过劳和饮食失节法塑造大白鼠脾气虚证模型的研究——生化免疫病理和超微结构观察 [J]. 中医杂志, 1987, 5: 57-60.
Xie YZ, Chen QT, Xie ZQ, et al. Study on the model of spleen qi deficiency syndrome in rats by overwork and diet loss [J]. J Tradit Chin Med, 1987, 5: 57-60.
- [46] 马金鑫. 参苓白术散对功能性腹泻脾虚证模型大鼠结肠上皮转运蛋白的影响 [D]. 北京: 中国中医科学院; 2020.
Ma JX. Effect of Shenling Baizhu powder on colonic epithelial transporter in rat model of functional diarrhea with spleen deficiency syndrome [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences; 2020.
- [47] 白世敬, 李峰, 唐旭东, 等. 功能性腹泻脾虚证动物模型制作方法 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(1): 86-88.
Bai SJ, Li F, Tang XD, et al. Making method of functional diarrhea of spleen deficiency syndrome animal model [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2015, 17(1): 86-88.
- [48] Accarie A, Vanuytsel T. Animal models for functional gastrointestinal disorders [J]. Front Psychiatry, 2020, 11(11): 1-23.

[收稿日期] 2021-05-10

姜宁,张亦文,姚彩虹,等. 大小鼠抑郁行为实验方法概述 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 830-838.

Jiang N, Zhang YW, Yao CH, et al. Overview of animal behavioral tests of depression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 830-838.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.016

大小鼠抑郁行为实验方法概述

姜宁,张亦文,姚彩虹,黄红,刘新民*

(中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193)

【摘要】 抑郁症是一种常见的高患病率、高致残率、高复发率的心理疾病,发病机制复杂。实验动物(大小鼠)是研究抑郁症的最常用载体。由于动物的抑郁情绪难以用语言表达,行为实验是其主要的评价方法。目前大鼠和小鼠抑郁行为检测方法是基于兴趣缺失、心境低落、绝望和无价值感为主要特征而设计的,主要包括糖水偏爱、新奇环境摄食抑制、强迫游泳、悬尾、获得性无助等实验。在调研整理国内外关于大鼠和小鼠抑郁行为实验方法的基础上,对其检测原理、实验模式、测试时间和指标评价体系进行了分析总结,总结出可以操作的实验规范,同时对目前常见的抑郁症模型进行概述,有助于根据研究目的选择适当的行为学检测方法和动物模型,对抑郁症的深入研究具有重要意义。

【关键词】 抑郁症;行为实验方法;动物模型;大、小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0830-09

Overview of animal behavioral tests of depression

JIANG Ning, ZHANG Yiwen, YAO Caihong, HUANG Hong, LIU Xinmin*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Corresponding author: LIU Xinmin. E-mail: liuxinmin@hotmail.com

【Abstract】 Depression is a common mental disease with a high prevalence, disability rate and recurrence rate. The pathobiology of depression is multifactorial and not yet completely understood. Animal models and behavioral tests of depression have become essential for developing antidepressant drugs. The core symptoms of depression in depressive rodent models, including anhedonia and despair behaviors, are evaluated by different types of behavioral tests, such as the sucrose preference test, novelty-suppressed feeding test, tail suspension test, forced swim test and others. In this review, the principles and method of behavioral tests for depression that are currently used for antidepressant discovery are discussed and assessed. Moreover, the commonly used animal models of depression are summarized. This review provides valuable information for selecting the appropriate modeling method and behavioral tests according to the purpose of the study. This review aims to serve as a reference for researchers to select common behavioral tests and animal depression models, which may be of great significance for the in-depth study of depression.

【Keywords】 depression; behavioral test; animal model; rats/mice

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

【基金项目】 中国医学科学院创新工程(2021-I2M-1-034),国家重大研发计划(2018YFC1602105)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences(CIFMS) Grant(2021-I2M-1-034), the National Key Research and Development Program of China(2018YFC1602105)。

【作者简介】 姜宁(1989—),女,博士,助理研究员,研究方向:动物行为学和神经精神药理研究。Email: jiangning0603@163.com

【通信作者】 刘新民(1962—),男,博士,教授,研究员,博士生导师,研究方向:动物行为学和神经精神药理研究。

Email: liuxinmin@hotmail.com

抑郁症是一种情感性精神障碍,以显著而持久的心境低落、快感缺失、绝望感和无价值感为主要特征,并伴有植物神经功能紊乱的综合征^[1]。世界卫生组织的统计数据表明抑郁症的全球发病率达 10% ~ 15%,抑郁症的高自杀和自残率严重危害患者的身心健康、工作学习生活及社会交往,同时产生极大的社会经济负担^[2-3]。抑郁症正成为继心脑血管疾病之后导致人类死亡和致残的第二大类疾病^[4]。

抑郁的产生涉及到大脑最复杂的高级思维活动。从分子、组织和器官水平研究情绪的发生机制无法反映数以百亿计的神经元以及神经突触组成的神经系统对外界刺激后经过复杂的生理、生化加工过程产生的综合性整体效应。鉴于动物与人类在进化上的高度保守性,利用实验动物在不同层次的行为响应特征与人类相比具有的相似性,建立模型推演,实现动物与人之间生物效应的等效性分析,是抑郁症发生机制研究及抗抑郁药物药效学评价的主要有效途径。而大鼠和小鼠等啮齿类动物是生命科学、药学和军事医学研究领域常用的实验动物^[5]。以 PubMed 和 CNKI 两种中英文文献库为重点进行查阅,分析整理以综述为重点的文献,总结各实验室有关大鼠和小鼠情绪行为实验技术和方法对抑郁动物模型的评价方法及常用的抑郁动物模型进行综述。

1 大小鼠抑郁行为评价方法概述

大鼠和小鼠抑郁行为检测方法是基于兴趣缺失、心境低落、绝望和无价值感为主要特征而设计的。科学家建立了多种行为实验方法用于检测动物的情绪行为改变。抑郁行为实验方法主要包括糖水偏爱、新奇环境摄食抑制、新奇物体探索、旷场、强迫游泳、悬尾、获得性无助等。

1.1 获得性无助实验(learned helplessness test)

获得性无助实验是指当大鼠接受连续无法控制或预知的厌恶性刺激(电击)后,将其放在可以逃避电击的环境中时,呈现出的逃避行为欠缺的现象,同时还伴有体重减轻、运动性活动减少、攻击性降低等行为改变^[6-7]。该实验是评价抑郁行为一种比较理想的实验方法^[8],可广泛应用于抑郁发病机制研究,以及新药、保健产品研发,在军事医学中也具有重要应用价值。

1.1.1 实验方法

本实验主要分为模型的建立期和条件性回避反应测试期^[9-15]:

(1)模型建立期:a:实验当天动物应放入测试箱(A室或B室)中,适应 5 min。b:动物应在电击箱内接受 30 ~ 60 个运行周期的循环电击。每个运行周期应包括无信号不可逃避的双室足底电击期和间歇期,电击时间应为 3 ~ 10 s,间歇期时间应为 3 ~ 10 s。电刺激频率宜为 5 ~ 15 Hz,刺激电流强度应为大鼠 0.65 ~ 1.80 mA,推荐 0.8 mA;小鼠 0.15 ~ 0.6 mA,推荐 0.25 mA。如采用电压,大鼠应为 65 ~ 70 V,小鼠 30 ~ 36 V。

(2)条件性回避反应测试期:a:模型建立结束后第 2 天应进行条件性回避反应测试。b:动物放入测试箱(A侧或B侧)中,适应 5 min 后,进行 15 ~ 30 个运行周期的实验。c:每个运行周期的总时间应为 30 s,包括 3 ~ 10 s 的条件刺激(灯光/声音)、3 ~ 10 s 的条件刺激+非条件刺激(电击条件同前)和 5 ~ 25 s 间歇期(不给以任何刺激)。d:重复上述步骤连续 2 ~ 3 d。

1.1.2 评价指标

(1)逃避失败次数(times of evasion failures):动物在设定的非条件刺激持续时间内未完成回避反应的总次数;逃避失败次数与动物的抑郁程度成正比。抑郁行为判断标准:30 次电击,动物逃避失败次数大于 25 次或者与对照组相比具有显著性增加($P < 0.05$)。

(2)逃避潜伏期(escape latency):实验开始后,动物第 1 次穿梭至对侧测试箱的时间;逃避潜伏期与动物的抑郁程度成正比。抑郁行为判断标准:逃避潜伏期大于 15 s 或者与对照组相比具有显著性增加($P < 0.05$)。

(3)其他:主动回避次数、安全区时间(无电区域)、运动总时间(实验期间动物处于运动状态的时间)、运动总路程(实验期间动物物理位移的总和)等实验指标亦作为抑郁行为辅助评价指标。这些指标值越少,表明动物抑郁程度越重。

1.2 强迫游泳实验(forced swim test)

Porsolt 等^[16-17]先后于 1977 年和 1978 年建立强迫游泳实验的方法。其原理主要是让动物被迫在一个局限且无法逃脱的空间游泳,由于啮齿类动物先天对水的厌恶,它们在水中会拼命挣扎游动,并试图逃离水环境,一段时间后,发现逃离无望时

动物停止挣扎表现出“行为绝望”状态(漂浮不动状态)。大、小鼠强迫游泳实验以游泳的不动时间为主要指标检测动物的绝望行为,是抗抑郁药物初筛以及检测模型动物是否出现“抑郁样”行为的常用检测实验^[18]。

1.2.1 实验方法

(1)实验前调节测试箱内水温,水温应为 23 ~ 25℃。水深应根据动物体重进行调整,动物尾巴与测试箱底面保持一定距离。

(2)如同时进行多只动物实验,每两只动物间应用不透明挡板隔开。

(3)大鼠强迫游泳实验^[19-21],应在实验前 1 d 预游,24 h 后进行强迫游泳实验。记录 5 min 内动物的不动时间、游泳时间及攀爬时间。

(4)小鼠强迫游泳实验^[22-23],应在检测当天进行,小鼠游泳时间应为 6 min,记录后 4 min 的游泳时间、不动时间及攀爬时间。

1.2.2 评价指标

评价指标应采用动物不动、攀爬、游泳三类动作的时间及次数进行判定。

(1)不动(immobility):动物在水中停止挣扎,呈漂浮状态,仅有轻微的肢体运动以保持头部浮在水面。不动时间越长表明抑郁程度越重。正常小鼠不动时间在检测时间的 40% ~ 80% 内;正常大鼠不动时间在检测时间的 30% ~ 70% 内;抑郁行为判断标准:不动时间与对照组相比显著性增加($P < 0.05$)。

(2)游泳(swimming):动物进行流畅、协调的运动,动物四肢始终在水面以下。游泳时间和游泳距离越少,表明抑郁程度越重。

(3)攀爬(climbing):动物四肢强有力伸出水面,并沿测试箱壁做剧烈的上下动作。5 min 检测期内,SD 大鼠攀爬时间 60 ~ 130 s。攀爬时间越少,表明动物抑郁程度越重。

1.3 悬尾实验(tail suspension test)

1985 年, Steru 等^[24]建立悬尾实验方法,其原理主要是:将小鼠尾巴悬挂,小鼠头部向下成倒悬体位,刚开始小鼠会剧烈挣扎试图逃脱这一不适的状态,但挣扎一段时间后发现逃跑无望会表现出不动状态,也被认为是一种“绝望”状态。悬尾实验以悬尾小鼠的不动时间为指标检测动物的绝望行为,是抗抑郁药物初筛以及检测模型动物是否出现“抑郁样”行为的常用检测实验^[25]。

1.3.1 实验方法

悬尾实验多采用小鼠,其操作方法如下^[26-29]:

(1)实验开始前,动物尾部悬吊使小鼠呈倒悬体位,头部应与悬尾箱底面保持一定距离。

(2)如同时进行多只动物实验时,每两只动物间应用不透明挡板隔开。

(3)记录检测期动物的不动时间。

(4)实验时间应为 6 min,记录后 4 min 内动物的不动时间。

1.3.2 评价指标

用不动、运动挣扎二类动作行为的时间进行判定。

(1)不动:动物停止挣扎,身体保持垂直倒悬状态,静止不动。动物的在悬尾实验中的不动时间越长表明抑郁程度越重。空白对照组 c57 小鼠不动时间较长,均值多大于 100 s;空白对照组 ICR 小鼠不动时间均值多小于 100 s;抑郁行为判断标准:不动时间与对照组相比有显著性增加($P < 0.05$)。

(2)运动挣扎:动物有明显可见的挣扎运动。运动挣扎时间越短,表明抑郁程度越重。

1.4 糖水偏爱实验(sucrose preference test)

糖水偏爱实验是检测抑郁症的一个典型症状—快感缺失的经典实验,是利用啮齿类动物对甜味的偏好而设计一种检测方法。动物禁食一段时间后,同时给予白水和低浓度蔗糖水,以动物对蔗糖水的偏好度(蔗糖偏爱度)为指标检测动物是否出现快感缺失这一抑郁症状^[30]。该实验在大鼠慢性应激模型中应用最广泛,大鼠慢性不可预知性应激模型的建立者 Katz 和大鼠慢性温和应激模型的建立者 Willner 分别于 1982 年和 1987 年首次采用糖水实验检测抑郁模型动物是否出现快感缺失症状^[31-32]。此外,该实验为抗抑郁药物起效速率研究的最主要的行为学检测方法之一。

1.4.1 实验方法

大、小鼠糖水偏爱实验的操作方法上略有不同,对其分别进行总结如下:

(1)大鼠糖水偏爱实验^[33-34]:训练期:动物应单笼饲养,进行 48 h 的蔗糖饮水训练。前 24 h 给予两瓶 1% ~ 2% 蔗糖水,后 24 h,一瓶给予 1% ~ 2% 蔗糖水,另一瓶给予饮用纯水(中途交换两个水瓶位置)。大鼠禁食禁水 14 ~ 23 h 后,进行糖水偏爱指数的测定:测定 1 h 内大鼠对两瓶水的饮用量(g)。

(2)小鼠糖水偏爱实验^[35-37]:操作流程同大鼠。

但在 48 h 饮水训练时,应全程给予 1% ~ 2% 蔗糖水和饮用水(中途交换两个水瓶位置)。训练期结束后,禁水(不禁食)9 ~ 16 h,测定 8 ~ 15 h 内(中间宜交换两瓶位置 1 次)小鼠对两瓶水的饮用量(g)。

1.4.2 评价指标

应采用蔗糖偏嗜度(sucrose preference)作为评价指标,蔗糖偏嗜度(%) = 蔗糖水饮用量 / (蔗糖水饮用量 + 饮用水饮用量) × 100%。

抑郁行为判断标准:蔗糖偏嗜度低于 0.4 或者与对照组相比有显著性减低($P < 0.05$)。

1.5 旷场实验(open field test)

旷场实验是经典的情绪相关行为学检测实验,最早由 Hall 设计^[38]。是用于检测动物在陌生环境中的行为表现,包括自发活动行为和探索行为,是评价动物在新异环境中自主行为、探究行为与紧张度的一种方法。检测指标为动物首次进入中央区的潜伏期、中央区停留时间和穿行次数;结合抑郁模型可检测动物的“抑郁样”行为和药物的抗抑郁作用,检测指标为动物的开场活动性,可人工计数动物的水平爬格次数和垂直站立次数作为行为指标,也可采用自动摄像记录动物运动轨迹,并采用行为学分析软件进行分析运动距离、运动速度、休息时间等行为指标。该实验亦可用于评价抗抑郁药物的起效速率。

1.5.1 实验方法

旷场实验操作简单,在用于抑郁行为学评价中,无适应阶段,操作步骤如下^[39-42]:

(1)实验前,动物应适应检测环境 30 ~ 60 min;
(2)动物放入测试箱后,即开始检测,检测时间宜为 5 ~ 10 min;
(3)每次实验时应从同一位置同一方向将动物放入测试箱中央。

1.5.2 评价指标

(1)总路程(total distance):动物在实验记录时间内产生的物理位移累积;
(2)速度(speed):动物在单位时间产生的物理位移。5 min 内正常动物总路程多为 1000 ~ 2500 cm,速度为 3 ~ 8 cm/s。动物出现抑郁行为时,速度减少;
(3)运动总时间(total move time):动物在实验记录时间内的产生物理位移时所需的时间累积。正常动物运动时间多大于检测时间的 30%;
抑郁行为判断标准:与对照组相比有显著性减低($P < 0.05$);
(4)站立次数(number of standing):动物在实验记录时间内的站立总次数。

10 min 检测时间,正常大鼠站立次数 20 ~ 50 次。
10 min 检测时间,空白对照组小鼠站立次数 60 ~ 130 次;
抑郁行为判断标准:与对照组相比显著减低($P < 0.05$)。

1.6 新奇事物探索实验(novel objective test)

新奇事物探索实验是一种较新的评价抑郁症的典型症状;兴趣缺失的行为学方法。其主要是研究动物对新奇事物的探索行为,是基于动物先天的寻求新奇的行为,并用此来评价抑郁症模型是否存在兴趣缺失症状的方法,一般情况下抑郁症模型动物在新奇事物实验中的探索行为减少^[43]。1998 年 Harris 等^[44]通过对慢性不可预测性应激模型大鼠研究第一次将动物对新奇物体的探索行为作为评价抑郁症动物模型兴趣缺失的评价指标。

1.6.1 实验方法

新奇事物探索实验分为适应期和测试期两个阶段,操作步骤如下^[45-48]:

(1)适应期:动物放入自发活动测试箱,适应 5 min 后,取出,放回原笼;

(2)测试期:在同一环境条件下引入一新物体(应放入中心位置),再将待测动物面壁放入测试箱,开始实验;

(3)检测时间应为 10 min。

1.6.2 评价指标

潜伏期(latency period):实验开始至动物首次主动探索(接触)物体的时间。如规定检测时间内,动物没有接触新物体,则潜伏期记录为检测时间。正常大鼠潜伏期多在 130 s 以内。抑郁行为判断标准:与对照组相比有显著性增加($P < 0.05$)。(注:动物对新物体的探索标准:动物口鼻在新奇物体 ≤ 2 cm 范围内,直指向新奇物体或直接接触物体。)

2 常用的抑郁症动物模型

抑郁动物模型可以模拟人类抑郁症的临床症状且这些症状可被有效的药物逆转,这对于抑郁症发病机制的研究及抗抑郁药物研发、临床疗效评价都有重要的应用价值。抑郁症的发病机制复杂,目前主要是单独或者复合利用化学、物理、生物因子建立各种抑郁障碍动物模型。一个恰当的人类抑郁症的动物模型应尽可能满足以下条件:强烈的现象学和病理生理学相似之处(表面效度),类似的病因(建构效度)和常见的治疗(预测效度)^[49]。

2.1 慢性轻度不可预测应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS)

Katz 等^[31]在 20 世纪 80 年代早期开始慢性应激模型的研究,连续三周给予动物一系列高强度刺激因素如电击、冰水游泳等,动物呈现抑郁状态。Willner 等^[32]在此基础上,降低了应激刺激的强度,延长应激时间,并将快感缺失测试作为该模型的主要评价方法,形成了慢性不可预测性温和应激模型。应激因子包括饲养笼倾斜、潮湿垫料、高温、噪音、束缚、电击、游泳、昼夜节律颠倒等不同刺激因子,且刺激因子安排为多变性和不可预测,可诱导性是模型制造成功的关键。该模型符合抑郁症的诱发因素(长期、慢性、低强度的压力刺激)的特征,具有良好的表现效度、构造效度和预测效度,是国内外最为公认的抑郁动物模型,广泛用于研究抑郁症神经生物学机制也是抗抑郁药物研发最常用的抑郁症动物模型^[50-52]。

2.2 睡眠干扰 (sleep interruption, SI)

睡眠干扰包括物理和化学两种因素诱导的睡眠干扰。化学药物包括咖啡因、去氧麻黄碱、可乐定口服或腹腔注射。物理睡眠干扰方法包括小平台水环境、滚筒、水平转盘、跑台、人工轻触刺激等方法。目前应用较多的睡眠干扰造模方法为滚筒法、水平转盘法和跑台法^[53-54]。SI 是一种可靠的新型抑郁模型,具有睡眠障碍和抑郁症的双向关系的特点^[55-56],对于研究抑郁症发生机制和抗抑郁药物研发有着重要意义。

2.3 慢性束缚 (chronic restraint stress, CRS)

慢性束缚应激是一种非损伤性刺激,是一种常用的应激模型。造模方法是将啮齿类动物重复地置于束缚器内,限制其行动自由一段时间后,动物会表现出快感缺失、体重减轻、饮食减少等抑郁样症状,而这些抑郁样症状均可以被抗抑郁药所改善^[57-58]。CRS 属于不可逃避性或强制性心理的应激模型,能有效地引起典型的非特异性应激反应,且与人类身心性疾病的致病过程有很大的相似性,是目前应用最广泛的一种抑郁症动物模型,对于抑郁症的病理生理研究有着重要意义^[59-60]。

2.4 社会挫败应激 (social defeat stress)

社会挫败应激模型是一种社会性心理应激的抑郁模型,是以动物间的从属关系为基础的社会应激方式,它通过同种动物相同或不同品系个体间的挫败行为导致抑郁样及其他行为改变,能更好地模

拟人类社会活动中的社交困难,快感缺失等是人类抑郁症的核心症状^[61-62]。将动物反复多次的暴露于另一更强壮的有侵略性的同种动物之下从而导致实验动物出现快感缺失、情绪低落等症状^[63]。社会挫败应激模型具有准确的病因,预测,判别和面部有效性,是目前应用广泛的一种抑郁症动物模型^[64-65]。

2.5 嗅球摘除 (olfactory bulbectomy)

1978 年, Cairncross 等^[66]提出了大鼠嗅球切除致抑郁的动物模型,是一种脑损伤模型,嗅球切除模型大鼠的行为学表现和病理生理改变与抑郁症患者吻合,抗抑郁药物在该模型中敏感,且一般需要慢性给药才能发挥抗抑郁作用,与临床起效时程一致^[67]。啮齿类动物嗅球摘除后行为学发生明显改变,嗅球摘除抑郁大鼠模型在行为学、生理学、神经化学和免疫系统的改变均和人类非常相似,很多抗抑郁药物对该模型的行为表现有良好的纠正作用^[68-69],手术切除动物嗅球是一种经典的抑郁动物模型。

2.6 药物诱导 (drug introduce)

利血平模型是最早的药物诱导动物模型。1963 年, Askew^[70]发现首次发现三环类抗抑郁药(丙咪嗪)能够拮抗利血平引起的相关症状,证实了利血平拮抗实验是一种新型的抑郁模型。利血平拮抗模型的原理是通过耗竭脑组织中的单胺类神经递质(如 5-羟色胺,多巴胺,去甲肾上腺素)来抑制中枢神经系统。动物腹腔注射利血平后,会表现出运动不能、眼睑下垂、体温下降等症状^[71]。利血平模型简单、可靠,应用广泛,还可以区分起效慢、作用时间长的抗抑郁药和起效快、作用时间短的抗抑郁药^[72]。

此外还包括高剂量阿扑吗啡降温实验、5-羟色氨酸 (5-hydroxytryptophan, 5-HTP) 诱导甩头实验等。

2.7 基因工程动物 (genetically engineered animals)

基因工程动物模型多针对与抑郁病变相关的基因外源性转入或敲除、或诱导所形成的动物模型。目前主要有 WKY (Wistar Kyoto) 大鼠、5-羟色胺 1A 受体 (5-HT_{1A} Receptor, 5-HT_{1A}) 低敏感性 FSL (Flinder Resistant Line) 大鼠、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 能突触突变性 FH (Fawn Hooded) 大鼠、多巴胺神经功能低下大鼠 (Swim

Low-active Model, SwLo)。

WKY 大鼠是抑郁和焦虑共病遗传模型。强迫游泳时间长,习得性无助行为显著,对应激敏感,游泳应激后,皮质酮水平显著升高。在旷场实验和高架十字迷宫中表现焦虑状态。同时,WKY 大鼠对 5-羟色胺重摄取抑制剂具有抗药性,因此可用于抗抑郁药物的抗药性研究^[73]。

FSL 大鼠对胆碱能受体激动剂敏感,5-HT_{1A} 受体敏感性降低^[74]。食欲减少,快动眼睡眠潜伏期缩短,时间延长。免疫系统异常,但糖水偏爱实验未表现快感缺失。FSL 大鼠对抗抑郁药物敏感,可用于抗抑郁药物筛选。

FH 大鼠脑内 5-HT 能突触突变,喜好摄入大量乙醇,基础皮质酮水平高,常用于抗抑郁药物的筛选^[75]。

SwLo 大鼠多巴胺神经功能减弱,强迫游泳时间长,活动少^[76]。慢性而非急性抗抑郁治疗可以增加其在强迫游泳中的活动时间。

2.8 其它

前面常用情绪行为实验方法中,获得性无助、强迫游泳、悬尾等方法本身也可利用正常动物,模拟抑郁症动物模型进行研究。

3 小结与展望

大、小鼠与人类同源基因高达 85%,是最常用的实验动物,广泛用于抑郁症发生机制及药物防护的研究,其结果可以类推到人,避免了直接以人为对象进行研究的伦理问题^[77]。抑郁症发病机制复杂,临床症状多样,根据人类抑郁症的核心症状:兴趣缺失、心境低落、绝望和无价值感为特征,科学家设计并建立了多种用于检测动物的抑郁样行为改变的大小鼠行为实验方法,主要包括糖水偏爱实验(评价快感缺失)、新奇环境摄食抑制、新奇物体探索(兴趣缺乏)、旷场(活动度减少)、强迫游泳、悬尾和学习无助实验(绝望行为)等。常用的抑郁症动物模型包括应激模型、药物诱导模型、转基因模型及其他模型等。如何选择规范的行为学检测方法及合适的动物模型,对于抑郁症的发生发展机制研究,以及新药、保健食品功效评价具有十分重要的作用。结合本文的综述结果,一般来说,研究抑郁行为改变时,应至少采取上述抑郁行为实验方法中的 2 种,每种实验方法应重复 1 次,且全部行为检测方法中,应都呈现同向性改变或至少 1 次

应表现出统计学上的显著性差异;选择动物模型时,应选择两种或以上不同致病原理模拟的动物模型,且至少两种模型显示出改善作用并出现统计学意义。

目前的抑郁行为的评价方法主要是关注于动物的单一行为活动对其评价,是以提取动物的整体活动指标为主,如时间、次数、饮水量等指标,缺少对复杂行为学变化的评价的多维、精细、敏感的指标体系。近年来,随着计算机的出现,计算机、成像、传感、电子工程和信息等多种新兴学科的迅速发展和各种新技术向动物行为实验领域的交叉渗透融合^[78],给行为学实验中提取动物的三维空间运动情况、面部表情变化,声音辨识等指标提供了技术基础,也为行为学评价方法从评价动物单一部位、二维空间行为变化推进到多部位,三维精细活动信息全方位采集提供了可能。同时,随着一些能同时捕获多种行为信息的设备不断问世,单一个体的行为检测手段正向群体环境下交互行为研究方法转变,可以同时获得多只动物在群体的抑郁行为学数据动物抑郁行为特征。可以预测将多学科的技术融合于动物行为实验研究中,建立规范、稳定的更接近人类抑郁症临床表现的动物模型,构建更精准、系统的行为学评价方法,准确解读、全面诠释模型动物的行为学表型内涵,并与临床症状相匹配,提高动物模型的表观、预测、结构效度,是动物行为实验方法的发展方向。

参 考 文 献(References)

- [1] Xu P, Wang K, Lu C, et al. Effects of the chronic restraint stress induced depression on reward-related learning in rats [J]. Behav Brain Res, 2017, 321: 185-192.
- [2] Malhi GS, Mann JJ. Depression [J]. Lancet, 2018, 392(10161): 2299-2312.
- [3] Smith K. Mental health: a world of depression [J]. Nature, 2014, 515(7526): 180-181.
- [4] The burden of depression [J]. Nature, 2014, 515(7526): 163.
- [5] 方肇勤,潘志强,卢文丽,等.大鼠和小鼠辨证论治标准的建立和用途[J].中西医结合学报,2009,7(10):907-912. Fang ZQ, Pang ZQ, Lu WL, et al. Methodology and purposes of establishing mouse and rat models for syndrome differentiation and treatment [J]. Chin J Integr Med, 2009, 7(10): 907-912.
- [6] Seligman ME, Beagley G. Learned helplessness in the rat [J]. J Comp Physiol Psychol, 1975, 88(2): 534-541.
- [7] Sherman AD, Sacquitne JL, Petty F. Specificity of the learned helplessness model of depression [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1982, 16(3): 449-454.
- [8] Takamori K, Yoshida S, Okuyama S. Availability of learned

- helplessness test as a model of depression compared to a forced swimming test in rats [J]. *Pharmacology*, 2001, 63(3): 147–153.
- [9] Vollmayr B, Henn FA. Stress models of depression [J]. *Clin Neurosci Res*, 2003, 3(4–5): 245–251.
- [10] Zazpe A, Artaiz I, Labeaga L, et al. Reversal of learned helplessness by selective serotonin reuptake inhibitors in rats is not dependent on 5-HT availability [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 52(3): 975–984.
- [11] Kobayashi H, Iwata M, Mitani H, et al. VPA improves the tolerance for the stress in learned helplessness rats [J]. *Neurosci Res*, 2012, 71(4): 355–363.
- [12] 陈力, 薛瑞, 于能江, 等. 小补心汤总黄酮对获得性无助小鼠的抗抑郁作用及其对 HPA 轴功能的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(6): 815–821.
- Chen L, Xue R, Yu NJ, et al. Total flavonoids extracted from xiaobuxin-tang on hyperactivity of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in mouse learned helplessness model [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2015, 31(6): 815–821.
- [13] Pryce CR, Azzinnari D, Sigrist H, et al. Establishing a learned-helplessness effect paradigm in C57BL/6 mice: behavioural evidence for emotional, motivational and cognitive effects of aversive uncontrollability perse [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(1): 358–372.
- [14] Muneoka K, Shirayama Y, Horio M, et al. Differential levels of brain amino acids in rat models presenting learned helplessness or non-learned helplessness [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013, 229(1): 63–71.
- [15] Yamada K, Kobayashi M, Shiozaki S, et al. Antidepressant activity of the adenosine A2A receptor antagonist, istradefylline (KW-6002) on learned helplessness in rats [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2014, 231(14): 2839–2849.
- [16] Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants [J]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1977, 229(2): 327–336.
- [17] Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. “Behavioural despair” in rats and mice: Strain differences and the effects of imipramine [J]. *Eur J Pharmacol*, 1978, 51(3): 291–294.
- [18] Hao Y, Ge H, Sun M, et al. Selecting an appropriate animal model of depression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4827.
- [19] Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth [J]. *Behav Brain Res*, 73(1–2): 43–46.
- [20] Xue R, Jin ZL, Chen HX, et al. Antidepressant-like effects of 071031B, a novel serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor [J]. *Eur Neuropsychopharm*, 2013, 23(7): 728–741.
- [21] Zhang LM, Zhao N, Guo WZ, et al. Antidepressant-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for the translocator protein (18kDa) in chronically stressed rats [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 113: 567–575.
- [22] 陈怡西, 王琼, 张永亮, 等. 模拟失重大鼠的抑郁样行为学表现 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(17): 141–145.
- Chen YX, Wang Q, Zhang YL, et al. Depressive behavioral on rats of simulated weightlessness [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2014, 17: 141–145.
- [23] 方玲, 杨莉莉. 人参皂苷 Rh2 对慢性不可预知应激所致抑郁小鼠的治疗作用及机制研究 [J]. *浙江医学*, 2019, 41(21): 2269–2273, 2352.
- Fang L, Yang LL. herapeutic effect and mechanism of ginsenoside Rh2 on mice with chronic unpredictable stress-induced depression [J]. *Zhejiang Med J*, 2019, 41(21): 2269–2273, 2352.
- [24] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, 85(3): 367–370.
- [25] 孙秀萍, 张晓萌, 卢聪, 等. 悬尾实验实时检测分析处理系统的研制及初步应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(5): 66–71.
- Sun XP, Zhang XM, Lu C, et al. Development and application of computer-auto-controlling and analysis system for tail suspension [J]. *Chin J Comp Med*, 2014, 24(5): 66–71.
- [26] Can A, Dao DT, Terrillion CE, et al. The tail suspension test [J]. *J Vis Exp*, 2012, 90(59): e3769.
- [27] 李腾飞, 孙秀萍, 石哲, 等. 不同品系小鼠在三种常见抑郁检测方法中的行为学表现 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(8): 20–23.
- Li TF, Sun XP, Shi Z, et al. Different behavioral activities of different mouse strains detected by three common tests for depression [J]. *Chin J Comp Med*, 2011, 21(8): 20–23.
- [28] Chen HX, Jin ZL, Zhang LM, et al. Antidepressant-like activity of YL-0919: a novel combined selective serotonin reuptake inhibitor and 5-HT1A receptor agonist [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83271.
- [29] An L, Li J, Yu ST, et al. Effects of the total flavonoid extract of Xiaobuxin-Tang on depression-like behavior induced by lipopolysaccharide and proinflammatory cytokine levels in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 163: 83–87.
- [30] Matthews K, Forbes N, Reid IC. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress [J]. *Physiol Behav*, 1995, 57(2): 241–248.
- [31] Katz RJ. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 16(6): 965–968.
- [32] Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93(3): 358–364.
- [33] Sun XP, Shi Z, Pan RL, et al. Antidepressant-like effects and mechanism of action of SYG in depression model in rats [J]. *Neuroendocrinol Lett*, 2014, 35(2): 129–136.
- [34] Ning J, Lv JW, Wang H, et al. Ginsenoside 20 (S)-protopanaxadiol attenuates depressive-like behaviour and neuroinflammation in chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats [J]. *Behav Brain Res*, 2020, 393: 112710.

- [35] Sun XP, Shi Z, Li TF, et al. Antidepressant-like effects of total saikosaponins of *Bupleurum yinchowense* in mice [J]. *J Med Plants Res*, 2012, 6(26): 4308-4316.
- [36] Mutlu O, Ulak G, Laugeray A, et al. Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009, 92(1): 82-87.
- [37] Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(7): 1686-1698.
- [38] Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality [J]. *J Comp Physiol Psychol*, 1934, 18(3): 385-403.
- [39] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247-251.
- [40] An L, Zhang YZ, Yu NJ, et al. Role for serotonin in the antidepressant-like effect of a flavonoid extract of *Xiaobuxin-Tang* [J]. *Pharmacol Biochem Be*, 2008, 89(4): 572-580.
- [41] 买文丽, 王琼, 刘新民, 等. 小鼠自主活动实验中的评价指标 [J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(3): 172-175, 244.
- Mai WL, Wang Q, Liu XM, et al. Significant parameters in evaluation of spontaneous activity in mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2008, 16(3): 172-175, 244.
- [42] 王琼, 买文丽, 李翔华, 等. 自主活动实时测试分析处理系统的建立与开心散安神镇静作用验证 [J]. *中草药*, 2009, 40(11): 1773-1779.
- Wang Q, Mai WL, Li YH, et al. Establishment of computer-based image-processing system for animal's locomotor activity and sedative verification by Kaixin Powder [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 40(11): 1773-1779.
- [43] 薛涛, 郭丽莎, 刘新民, 等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(3): 321-326.
- Xue T, Wu LS, Liu XM, et al. Research progress on animal models of depression and their evaluation methods [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2015, 23(3): 321-326.
- [44] Harris RB, Zhou J, Youngblood BD, et al. Failure to change exploration or saccharin preference in rats exposed to chronic mild stress [J]. *Physiol Behav*, 1998, 63(1): 91-100.
- [45] 何怡然, 马静遥, 陈铃铃, 等. DS-1226 对慢性限制活动大鼠的抗抑郁作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(3): 42-47.
- He YR, Ma JY, Chen LL, et al. Antidepressant-like effect of DS-1226 on chronic restraint rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2013, 21(3): 42-47.
- [46] Li Y, Zheng X, Liang J, et al. Coexistence of anhedonia and anxiety-independent increased novelty-seeking behavior in the chronic mild stress model of depression [J]. *Behav Process*, 2010, 83(3): 331-339.
- [47] Shoval G, Shbiro L, Hershkowitz L, et al. Prohedonic effect of cannabidiol in a rat model of depression [J]. *Neuropsychobiology*, 2015, 73(2): 123-129.
- [48] 张北月, 卢聪, 董黎明, 等. 不同时长的束缚应激致雌雄大鼠的抑郁样行为改变 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(11): 18-23.
- Zhang BY, Lu C, Dong LM, et al. Depressive-like behavior of male and female rats induced by restraint stress with different restraint duration [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(11): 18-23.
- [49] Yan HC, Cao X, Das M, et al. Behavioral animal models of depression [J]. *Neurosci Bull*, 2010, 26(4): 327-337.
- [50] Wilhelm K, Parker G, Dewhurst-Savellis J, et al. Psychological predictors of single and recurrent major depressive episodes [J]. *J Affect Disorders*, 1999, 54(1-2): 139-147.
- [51] Giles DE, Jarrett RB, Biggs M, et al. Clinical predictors of recurrence in depression [J]. *Am J Psychiat*, 1989, 146(6): 764-767.
- [52] Dang H, Chen Y, Liu X, et al. Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression [J]. *Prog Neuro Psychoph*, 2009, 33(8): 1417-1424.
- [53] 武宏伟. 人参皂苷水解产物对慢性应激所致学习记忆功能减退的改善作用 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2015.
- Wu HY. Ameliorative effects of hydrolyzates of ginsenosides on learning and memory dysfunction caused by chronic stress [D]. Beijing: Peking Union Medical College; 2015.
- [54] 高江晖, 卜兰兰, 石哲, 等. 不同时间睡眠干扰所致小鼠的类抑郁样行为 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(5): 405-409.
- Gao JH, Bu LL, Shi Z, et al. Depression-like behavior induced by 5-15 days sleep interruption in mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2011, 19(5): 405-409.
- [55] Tempesta D, Curcio G, De Gennaro L, et al. Long-term impact of earthquakes on sleep quality [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55936.
- [56] Riemann D, Berger M, Voderholzer U. Sleep and depression—results from psychobiological studies: An overview [J]. *Biol Psychol*, 2001, 57(1-3): 67-103.
- [57] 唐已婷, 陈家旭. 慢性束缚应激动物模型的研究进展 [J]. *北京中医药大学学报*, 2002, 25(1): 25-28.
- Tang YT, Chen JX. Research progress on animal models of chronic restraint stress [J]. *J Beijing Univ TCM*, 2002, 25(1): 25-28.
- [58] Jiang N, Lv JW, Wang HX, et al. Antidepressant-like effects of ginsenoside Rg1 in the chronic restraint stress-induced rat model [J]. *Digital Chin Med*, 2019, 2(4): 207-218.
- [59] 迟强, 许鹏, 卢山, 等. 慢性束缚应激动物模型生物学特性及相关机制研究进展 [J]. *临床军医杂志*, 2013, 41(12): 1299-1301.
- Chi Q, Xu P, Lu S, et al. Research progress on biological characteristics and related mechanisms of chronic restraint stress animal models [J]. *Clin J Med Offic*, 2013, 41(12): 1299-1301.

- [60] Liu L, Zhou X, Zhang Y, et al. The identification of metabolic disturbances in the prefrontal cortex of the chronic restraint stress rat model of depression [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 305: 148–156.
- [61] Abela HM, Réus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression [J]. *Braz J Psychiatry*, 2013, 35: S112-S120.
- [62] Toyoda A. Social defeat models in animal science: What we have learned from rodent models [J]. *Anim Sci J*, 2017, 88(7): 944–952.
- [63] Donahue RJ, Muschamp JW, Russo SJ, et al. Effects of striatal Δ FosB overexpression and ketamine on social defeat stress-induced anhedonia in mice [J]. *Biol Psychiatry*, 2014, 76(7): 550–558.
- [64] 张磊阳, 贺敏, 李玥, 等. 抑郁症动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(9): 92–97.
Zhang LY, He M, Li Y, et al. Research progress on animal models of depression [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(9): 92–97.
- [65] Ito N, Hirose E, Ishida T, et al. Kososan, a Kampo medicine, prevents a social avoidance behavior and attenuates neuroinflammation in socially defeated mice [J]. *J Neuroinflamm*, 2017, 14(1): 98.
- [66] Cairncross KD, Cox B, Forster C, et al. A new model for the detection of antidepressant drugs: Olfactory bulbectomy in the rat compared with existing models [J]. *J Pharmacol Met*, 1978, 1(2): 131–143.
- [67] 周云丰, 陶雪, 王丽莎, 等. 嗅球切除动物模型的特点和应用研究进展 [J]. *药科学报*, 2019, 54(7): 1157–1165.
Zhou YF, Tao X, Wang LS, et al. Progress in characteristics and application of olfactory bulbectomy animal model [J]. *Acta Pharm Sin*, 2019, 54(7): 1157–1165.
- [68] Yuan TF, Slotnick BM. Roles of olfactory system dysfunction in depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, 54: 26–30.
- [69] 苗茸茸, 曲显俊. 抑郁症动物模型的研究进展 [J]. *实验动物科学*, 2019, 36(3): 80–85.
Miao RR, Qu XJ. Research progress in animal models of depression [J]. *Lab Anim Sci*, 2019, 36(3): 80–85.
- [70] Askew BM. A simple screening procedure for imipramine-like antidepressant agents [J]. *Life Sci*, 1963, 2(10): 725–730.
- [71] 宗阳, 朱立静, 孙冰婷, 等. 利血平诱导的抑郁模型的研究进展 [J]. *中国药房*, 2016, 27(19): 2697–2699.
Zong Y, Zhu LJ, Sun BT, et al. Research progress of reserpine induced depression model [J]. *Chin Pharm*, 2016, 27(19): 2697–2699.
- [72] 叶娜, 郑卫英. 抑郁症动物模型建立及评价的研究进展 [J]. *数理医药学杂志*, 2015, 28(6): 902–904.
Ye N, Zheng WY. Research Progress on establishment and evaluation of depression animal model [J]. *J Math Med*, 2015, 28(6): 902–904.
- [73] Overstreet DH. Selective breeding for increased cholinergic function: Development of a new animal model of depression [J]. *Biol Psychiat*, 1986, 21(1): 49–58.
- [74] Kovacević T, Skelin I, Diksic M. Chronic fluoxetine treatment has a larger effect on the density of a serotonin transporter in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat model of depression than in normal rats [J]. *Synapse*, 2010, 64(3): 231–240.
- [75] Paré WP. Stress ulcer susceptibility and depression in Wistar Kyoto (WKY) rats [J]. *Physiol Behav*, 1989, 46(6): 993–998.
- [76] Chen F, Lawrence AJ. 5-HT transporter sites and 5-HT_{1A} and 5-HT₃ receptors in fawn-hooded rats: a quantitative autoradiography study [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2000, 24(7): 1093–1102.
- [77] 蒋洋洋, 朱浩, 张海. 人类与小鼠同源 lncRNA 基因及其表观遗传调控靶基因分析 [J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(6): 731–735.
Jiang YY, Zhu H, Zhang H. Analysis of orthologous lncRNAs in humans and mice and their species-specific epigenetic target genes [J]. *J South Med Univ*, 2018, 38(6): 731–735.
- [78] 孙秀萍, 王琼, 石哲, 等. 动物行为实验方法学研究的回顾与展望 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(3): 1–7.
Sun XP, Wang Q, Shi Z, et al. Review and prospect of experiment methodology on animal behavior [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(3): 1–7.

[收稿日期] 2021-04-22

申明,陈彦文,李杨,等. 肿瘤转移前微环境动物模型的构建与评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 839-847.

Shen M, Chen YW, Li Y, et al. Research progress on the construction and evaluation methods of pre-metastatic niche animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 839-847.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.017

肿瘤转移前微环境动物模型的构建与评价方法研究进展

申明^{1,2}, 陈彦文¹, 李杨¹, 杨玲玲¹, 梁乾坤¹, 明海霞^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学中西医结合研究所, 兰州 730000)

【摘要】 肿瘤转移是一个庞杂的过程, 转移前微环境(PMN)概念的提出, 揭示了肿瘤转移的关键因素。实验动物模型在模拟人类的疾病进程、开发新型药物及疗法和临床试验等方面有着巨大的贡献, 现已被广泛用于研究肿瘤行为学相关研究, 其中肿瘤的肺转移微环境模型具有操作性强、成功率高、实验效果良好等优点。基于肿瘤转移前微环境这一概念, 本文围绕肿瘤的肺转移前微环境实验动物模型的构建方法及评价指标展开综述。

【关键词】 肿瘤转移前微环境; 肺转移前微环境模型; 小鼠; 构建与评价方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0839-09

Research progress on the construction and evaluation methods of pre-metastatic niche animal models

SHEN Ming^{1,2}, CHEN Yanwen¹, LI Yang¹, YANG Lingling¹, LIANG Qiankun¹, MING Haixia^{1,2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Institute of Integrative Medicine with Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

Corresponding author: MING Haixia. E-mail: 18909429885@163.com

【Abstract】 Tumor metastasis is a complicated process. The concept of the pre-metastatic niche (PMN) reveals the essential factors of tumor metastasis. Experimental animal models have made significant contributions to simulating the process of human diseases, developing new drugs and therapies and clinical trials. In particular, they have been widely used in the study of tumor behavior. The pulmonary metastasis tumor models have the advantages of high reproducibility, high success rates and promising experimental result. Based on the concept of PMN, this article summarizes the method and evaluation indicators of pulmonary metastasis animal models.

【Keywords】 pre-metastatic niche; pre-metastatic niche of lung model; mice; construction and evaluation methods
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 甘肃省科技厅自然科学基金项目(20JR5RA178, 20JR10RA320), 甘肃省中医药研究中心开放课题(zyzx-2020-zx2), 甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目(2020KCZD-4, 2021KCZD-1), 甘肃中医药大学中西医结合基础学科科研培育项目(2020-2021-12), 兰州市科技计划项目(2020-ZD-55, 2021-1-96), 甘肃省教育科技创新项目(2021CXZX-745)。

Funded by the Natural Science Foundation of Gansu Province(20JR5RA178, 20JR10RA320), Open Project of Gansu Research Center of Traditional Chinese Medicine(zyzx-2020-zx2), Scientific Research and Innovation Fund Project of Gansu University of Chinese Medicine(2020KCZD-4, 2021KCZD-1), Scientific Research and Cultivation Project of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Gansu University of Chinese Medicine(2020-2021-12), Science and Technology Project in Lanzhou(2020-ZD-55, 2021-1-96), Gansu Educational Science and Technology Innovation Project(2021CXZX-745).

【作者简介】 申明(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤生物学性状及肺系疾病的中医药防治基础研究。Email: 1245264324@qq.com

【通信作者】 明海霞(1976—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤生物学性状及肺系疾病的中医药防治基础研究。

Email: 18909429885@163.com

根据世界卫生组织国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 全球最新癌症数据统计^[1]:2020 年全球新发癌症病例 1929 万例,死亡 996 万例。尽管目前随着靶向治疗及免疫治疗逐渐完善,但癌症死亡率仍居高不下,导致肿瘤患者死亡的主要原因就是转移。自 Paget^[2]1889 年初次提出“种子和土壤”假说用于解释肿瘤的转移,在此基础上,Kaplan 等^[3]提出了转移前微环境 (pre-metastatic niche, PMN) 这一概念,认为原发性肿瘤来源的分泌因子在转移前特异性的到达待转移组织器官中,通过相互作用适应性的改变其微环境,从而构建一个适合原发性肿瘤转移的生长环境,诱使循环中漂浮的原发性肿瘤细胞在此处定植、聚集、增殖,最终形成转移病灶。目前,转移前微环境的研究模型以肺为主^[4]。本文将围绕肿瘤微环境形成机制及肺转移前微环境模型构建与评价进行概述。

1 肿瘤转移前微环境的形成

肿瘤转移前微环境的形成机制比较复杂,主要与肿瘤细胞分泌因子 (tumor-derived secreted factors, TDSFs)、抑制性免疫细胞的动员募集以及该组织部位基质成分炎症极化三个因素的相互作用有关。而 TDSFs、髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 是肿瘤转移的关键^[3,5-6]。

TDSFs 可通过直接动员和招募 MDSCs 来促进转移前微环境形成,其中包括促炎因子,如肿瘤细胞坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A),它们会特异性地诱导肺部钙结合炎性蛋白 S100A8/A9 (S100 calcium binding protein A8/A9, S100A8/A9) 的高表达,形成肺转移前微环境。目前作用明确的细胞主要有 VEGFR1+造血祖细胞、CD11b+MDSCs。CD11b+MDSCs 可以通过表达整合素、多功能蛋白聚糖 (Versican)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 及在 TDSFs 作用下分泌多种趋化、炎症因子来动态重塑、建立转移前微环境,促进肿瘤干细胞特性和上皮间质转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT),从而促进肿瘤发展^[7]。

原位肿瘤细胞产生趋化因子-2 (C-C motif

chemokine ligand 2, CCL2) 可招募肿瘤相关巨噬细胞和 Treg,同时,CCL2 通过与表面的 CCR2 相互作用增加 MDSCs 向转移前微环境迁移^[8]。肿瘤细胞还通过分泌巨噬细胞迁移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF)、白细胞介素 (interleukin, IL)-8 以及纤溶酶原激活物抑制因子 1,激活星形胶质细胞进而分泌 IL-6、TNF- α ,参与肿瘤血管的构建。在 CCL2 作用下,CD11b+Ly6C+单个核细胞被招募到肺转移前微环境中对局部组织微环境进行改造从而增加肺转移。CD11b+Ly6C+粒细胞还可通过产生铃蟾多样性肽 8 (bombina variegata peptide, Bv8) 蛋白促进肺转移前微环境形成,这些 MDSCs 是转移前微环境形成过程中的关键细胞成分^[7-8]。由此可见,肿瘤细胞分泌的多种细胞因子,如 TNF- α 、TGF- β 、VEGF-A 等,可通过直接动员和招募骨髓中的 MDSCs,促进转移前微环境的形成。

2 肿瘤的肺转移微环境模型

根据临床数据显示,肺是肿瘤转移常见的器官。大约 30% 的胃癌患者在中后期阶段会出现肺转移,骨肉瘤患者在远处转移器官中发生在肺部的概率高达 90%,乳腺癌、结肠癌、黑色素瘤等均可表现出肺部高转移率^[9-10],因此建立肺转移前微环境模型符合临床环境。该模型的建立能够更好的体现在转移前微环境中,多种细胞因子对肿瘤转移过程中不同的调控作用,有助于新型靶向抗肿瘤药物的设计、开发。此外,肺转移前微环境模型具有操作简便、成功率高等优点,可便于观察原发性肿瘤转移的发生率及后续发展,为临床抗肿瘤治疗提供了现实依据,有助于制定可行化方案。

肺转移前微环境模型主要包括自发性转移模型和实验性转移模型。目前,人类肿瘤异种移植模型在临床前环境中帮助预测抗肿瘤功效最为常用,通过利用哺乳动物体内微环境所培养的人源性肿瘤细胞来模拟人类肿瘤的进展,动物的基质细胞、血管网和生长因子为肿瘤细胞提供了天然的异质微环境^[11]。自发性与诱发性动物模型通常是由人工诱导的癌症动物组成,这些模型易于构建,但会存在较大的不确定性。通过移植人肿瘤组织或注射肿瘤细胞系来产生移植的动物模型能够显示出更高的可控性和致瘤效率,但不能反应肿瘤转移的整个生物学进程。

3 动物的选择及方法

建立实验动物模型,以试图捕捉人类肿瘤发展中复杂的病理过程为目的,长期以来,在临床前环境中提供了评估新型抗肿瘤药物潜力。动物模型能够较好的阐明哺乳动物生物过程的基本原理,而实验室小鼠通常是首选的模式生物,由于具有的高度遗传同源性和特定的无病原体(specific pathogen-free, SPF)维持条件,科学结果的再现性较高,现已在肿瘤定植和转移模型中广泛的使用^[12]。

3.1 裸鼠

1969 年, Rygaard 等^[13]首次成功地建立了裸鼠-人肿瘤异种移植模型,此模型很大程度上保留了人类肿瘤细胞在组织病理特征以及对抗肿瘤剂的敏感性,降低了实验和临床研究之间的差距。选择裸鼠建立转移模型,一方面,该小鼠无毛发覆盖,能够可视化观察肿瘤的发展,另一方面,由于存在先天性无胸腺、T 淋巴细胞的功能缺乏等特点,裸鼠表现出明显的免疫功能受损,有利于肿瘤细胞的生长、定植和转移,建立肿瘤模型具有较高的成功率^[14]。但其灵敏度较低,而 Naomoto 等^[15]基于这一局限,将 BALB/c 裸鼠通过尾静脉注射人结肠癌细胞系 RPM14788 建立肺转移前微环境模型,在注射后的第 2 天,可在肺间质中观察到中性粒细胞浸润形成的炎性微环境,21 d 的小鼠肺组织形成多发性转移灶,提示造模成功。该模型具有高度的肺转移率和可重复性,有助于研究肺转移途径且能够更加方便的评估药物疗效。裸鼠作为标准受体现已被广泛用于人源肿瘤异种移植模型(patient-derived xenograft, PDX),尤其体现在胃肠癌的高移植率。Wang 等^[16]通过 BALB/c 裸鼠尾静脉注射含人胃腺癌细胞系 MGC80-3 成功建立肺转移模型,指出 MMP-2、MMP-9 在胃癌细胞转移过程中过度活化,转移前的微生境中诱发 EMT,其标记物 β -连环蛋白、E-钙粘蛋白的基因水平降低,而纤连蛋白、波形蛋白和 Snail 蛋白的表达水平增加。王洁等^[17]将临床所获胃癌标本移植到 BALB/c 裸鼠中建立异种移植模型,之后将荧光染料 MHI-148 进行腹腔注射,经检测,微环境中转移瘤趋化因子 CXCL12、MMP-2 和转移相关 IGF1R 信号通路等表达上调,最终在小鼠肺组织中可观察到转移灶。Li 等^[18]选择 BALB/c 裸鼠,分别通过尾静脉注射和腹腔注射 COL10A1 敲除的 MKN45 胃癌细胞建立了胃癌肺转移模型,证

明敲除 COL10A1 可降低 EMT,下调 MMP-2、MMP-9 的表达,从而抑制转移前微环境的形成,以上两种方法均成功地建立了胃癌肺转移前微环境模型。

3.2 SCID 小鼠

Bosma 在 1993 年首次定义了同时缺乏功能性 T、B 淋巴细胞的严重联合免疫缺陷(Severe Combined Immune-deficiency, SCID)小鼠。Knips 等^[19]首次采用动物模型来研究 Merkel 细胞多瘤病毒感染对 MCC 皮肤癌发生、转移作用,选择 SCID 小鼠肩胛骨皮下注射 WaGa 和 MKL-1 皮肤癌细胞,结果显示与 MKL-1 细胞相比, WaGa 肿瘤在转移前微环境中参与炎症反应、生长因子活性及上调 Wnt 信号通路,更具有侵袭性,在肺中表现出了更高数量的自发性转移。Otani 等^[20]通过选择 SCID 小鼠分别原位注射 A549 人肺腺癌细胞、FT821 人大细胞肺癌细胞和 PC-9 人肺腺癌细胞建立肺癌肺转移前微环境模型,给予抗癌药物 CDDP 和埃罗替尼进行干预。结果仅检测到 A549 模型小鼠存在肺转移,且经 CDDP 治疗后肺部转移情况并未改善,可能与观察到的强烈的氟代脱氧葡萄糖(fludeoxyglucose, FDG)摄取有关,此研究中的异种原位移植模型有潜力成为开发抗癌新疗法的基本工具,可用于许多非小细胞肺癌细胞系和抗癌药物。大量研究表明与裸鼠相比,选择 SCID 小鼠建立的肿瘤转移模型成功率更高,但存在着 T、B 淋巴细胞渗露的局限性^[21]。

3.3 NOD-SCID 小鼠

NOD/SCID 小鼠是由 NOD 和 SCID 小鼠杂交而成,该小鼠患有由 T 淋巴细胞浸润和胰岛破坏引起的糖尿病,由于小鼠中成熟 T、B 淋巴细胞的缺失, NK 细胞功能受损等先天和适应性免疫的多种缺陷,使它们成为人类造血干细胞和实体瘤移植更好的受体。然而,在 NOD/SCID 小鼠中仍存在残留的 NK 细胞活性^[22]。外周血中的循环肿瘤细胞(circulating tumor-cell, CTC)在适合的局部微环境下进入次级或远端器官组织形成转移灶,微环境中的免疫细胞可经历表型变化变成促肿瘤表型,协助肿瘤细胞免疫逃逸以及向远处的组织器官迁移。阙祖俊等^[23]在前期实验中成功建立了非小细胞肺癌循环肿瘤细胞系(CTC-TJH-01),通过尾静脉注射法,将 GFP/Luc 双标的 CTC-TJH-01 细胞系在 NOD-SCID 小鼠中成功地构建了肺癌肺转移前微环境模型,尽可能模拟临床术后肿瘤转移过程,将转移前

微环境免疫因素归入评估系统,可用于研究免疫疗法对肿瘤转移的抑制作用。Chiou 等^[24]将 A549 肺癌细胞通过尾静脉注射植入 NOD-SCID 小鼠建立转移模型,以评估卵泡刺激素在器官转移中的作用,所有小鼠肺中均可检测到转移瘤的形成,发现卵泡刺激素可能通过肿瘤细胞和器官微环境之间的相互作用抑制转移前微环境中的血管生成。NOD/SCID 小鼠现常用于结直肠癌肺转移前微环境模型构建。Hite 等^[25]选择 NOD-SCID 小鼠,通过将荧光素酶标记的 HT-29 结肠癌细胞采用直肠注射、盲肠壁注射、酸性灌肠等方法成功建立结肠肺转移模型,结果相较其余两组,直肠注射组小鼠肺转移较高且死亡率低,能较好的模拟患者结肠癌的转移进程,是目前用于患者结肠癌转移评估最理想的原位转移模型。实验室在 NOD-SCID 小鼠的基础上,将其与 IL-2 受体 γ 缺陷小鼠或 Jak3 缺陷小鼠杂交,建立了 NK 细胞功能性缺失的 NOD-SCID-IL2rg^{-/-} (NOG/NSG) 小鼠^[22]。该小鼠主要体现出对人源化组织的高移植率,有研究显示,将 TMD231 人乳腺癌细胞分别植入 NOD/SCID 和 NSG 小鼠的乳腺脂肪垫中建立乳腺癌肺转移模型,结果显示 NSG 小鼠的成瘤率更稳定,且更早发现肺转移^[26]。Armacki 等^[27]将 Panc1 人胰腺癌细胞皮下注射至 NSG 小鼠中建立胰腺癌肺转移模型,得出外泌体可调控 S100 A mRNA 向肺成纤维细胞中转移,肺转移灶纤维化增强,粘连蛋白表达增加,从而促进肺转移前微环境的形成。为阐明肿瘤干细胞(CSCs)在转移中的潜在作用,Matsuda 等^[28]选择 NOG 小鼠,将 PDAC 人胰腺癌细胞通过尾静脉注射建立了胰腺癌肺转移模型,且发现肺中 CSC 标记物高表达,证实 PDAC 转移潜能与 CSC 和 EMT 相关。但由于 NOG/NSG 小鼠饲养环境严格且价格相对高昂,故目前在肿瘤转移前微环境的动物模型中鲜少使用。而其他品系在不同癌症类型中都存在各自的优势,因此仍是建立肿瘤转移模型重要的资源。

3.4 BABL/c 小鼠

BABL/c 小鼠对小鼠乳腺肿瘤病毒诱发的乳腺癌具有高度敏感性,是建立乳腺癌转移最常用的动物模型。骨肉瘤的胫内原位注射模型,在过去通常被认为是自发转移的模型,Maloney 等^[29]对此提出质疑,通过将 K7M2 骨肉瘤细胞系胫骨内注射至 BALB/c 小鼠中,注射后 1 周,通过肉眼观察及 HE 染色均发现全部小鼠肺部表面有明显转移灶,而在

第 4 周,93%的小鼠在骨髓内形成肿瘤组织。并建立了截肢组模型以确定转移细胞的来源,所得结果均指向该模型应为实验型转移模型。胫内注射模型提供了一种可行的造模方法,但存在注射时肿瘤细胞栓塞这一局限。尽管如此,该模型可用于检查转移后期阶段,如肿瘤细胞外渗及在肺转移前微环境中的过度增殖。Warren 等^[30]通过细胞转染技术获得 ZsGreen/Luc 双标的 4T1 细胞和 YAP/TAZ 敲除细胞分别经尾静脉注射至 BALB/c 小鼠中,以测试转肿瘤移是否需要 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)和具有 PDZ 结合序列的转录共活化因子 TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ)。经用荧光显微镜观察到发光信号,提示造模成功,结果显示对照细胞的小鼠的转移负荷增加速度明显快于 YAP/TAZ 敲除小鼠。为探讨乳腺癌肺转移前微环境中免疫因子的动态变化,朱文文等^[31]通过尾静脉注射和皮下注射两种方法,分别将 4T1 乳腺癌细胞接种到 BABL/c 小鼠中,两种方法均成功建立了乳腺癌肺转移前微环境模型,相较于皮下注射法,尾静脉注射法的转移过程较为迅速,并测得肺组织中的 Th1 型细胞因子在尾静脉组中表现出先升后降的趋势,在皮下注射组处于较低水平,而 Th2 型细胞因子在两组中均表现出升高的趋势,提示随着癌症发展,可形成免疫抑制微环境促进肿瘤细胞的转移。Rashid 等^[32]将表达荧光素酶基因的 4T1-luc2 乳腺癌细胞系对 BABL/c 小鼠分别进行原位移植法与尾静脉注射法来比较其中的差异,两种造模方式均可达到理想的成瘤率,并对转移瘤进行了基因组微阵列分析以评估不同方法所致转移瘤的基因组图谱,结果提示尾静脉法与术后转移瘤的基因表达没有显著差异。这也是尾静脉法的一大优势,值得一提的是,尾静脉注射法由于不能实现从原发肿瘤到转移病灶的全过程,故此造模方法仅适用于肿瘤发展的中后期阶段的临床研究。

3.5 C57BL/6 小鼠

C57BL/6 小鼠是一种最常用的近交系小鼠,由于其在遗传方面较为稳定,往往是转基因动物模型构建的首选。Hou 等^[33]将非靶向基因 LLC-sgNTC 和 Atrx 缺陷型 Lewis 细胞系(LLC-sgAtrx)通过尾静脉注射到 C57BL/6 小鼠中,结果显示小鼠肺中均产生了转移灶。并证明 Atrx 缺陷促进了转移前微环境中 T 细胞的浸润,提高了细胞程序性死亡-配体 1

(programmed cell death 1 ligand1, PD-L1) 和抗原肽-MHC 分子复合物 I 类 (peptide-major histocompatibility complex class I, pMHC I) 在 Lewis 细胞表面的表达,并增强了 T 细胞的体外细胞毒性。Zhang 等^[34]为探讨 RGDV-吉西他滨对肿瘤转移的作用途径,同样选择 C57BL/6 小鼠,将 Lewis 肺癌细胞注入右腋下皮肤成功建立肺癌肺转移前微环境模型。经检测治疗组小鼠血清中肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor) TNF- α 、IL-8、MMP-2 和 MMP-9 的表达水平降低,提示 RGDV-吉西他滨对转移前微环境有抑制作用。该小鼠也是作为研究黑色素瘤经常选择的动物模型^[35]。Fu 等^[36]尾静脉注射 B16F10-Fluc 黑色素瘤细胞与体外活化的 Pmel-1 CD8+Teff 细胞至 C57BL/6 小鼠中,对照组小鼠检测到肺表面有大量转移结节,而由于免疫记忆,Teff 组中 CD69、CD25 的高表达说明了 CD8+T 细胞被充分激活。王佳等^[37]采用尾静脉注射将 B16F10 黑色素瘤细胞分别注射到 C57BL/6 和巨噬细胞 Act1 表达被靶向抑制的小鼠 (anti-Act1) 中成功建立黑色素瘤肺转移前微环境模型。相较 C57BL/6 模型组,anti-Act1 小鼠肺组织中的 CD45 和 CD68 表达明显降低,转移前微环境中炎症细胞的浸润能力被抑制。孟星君等^[38]分别采用腹腔注射、皮下注射及尾静脉注射法将 C57BL/6 小鼠接种 B16F10 黑色素瘤细胞,结果显示尾静脉组肺部转移率最高,说明肿瘤细胞主要通过血液循环途径实现转移,转移前微环境中血管的生成是主要推动因素。Sohn 等^[39]将 B16F10-shControl 细胞和 B16F10-shAhnaK 细胞通过尾静脉注射至 C57BL/6 小鼠中,探讨桥粒联结蛋白 (recombinant desmoyokin, AHNAK) 在肿瘤转移过程中的作用,成功建立了黑色素瘤肺前微环境模型,证明了 AHNAK 参与 TGF- β 诱导的 EMT,有助于肿瘤细胞的迁徙。关于肿瘤肺转移前微环境模型常见的动物选择及方法如表 1 所示。

4 肺转移前微环境模型的评价方法

模型构建是实验研究进行的前提,现如今随着技术不断完善,多种方法可供选择作为评价模型构建是否成功的指标。当选择模型时,应当尽可能地选择与人类癌症相似的模型为其设计干预疗法。例如,动物肿瘤模型发病机制、进展和分期、病理因素、转移潜能、肿瘤负荷程度、激素反应

性和免疫抑制等与人类是否相似,能否适合针对治疗术后环境中的转移性疾病的测试疗法。在肺转移前微环境模型构建中,HE 染色法 (hematoxylin and eosin stain) 是常见的评价手段,所得成功率为 100%^[40]。荧光素酶 (luciferase) 和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 现已被广泛用于细胞生物学、肿瘤学等多种研究,其可作为一种细胞标记物为研究人员提供了检测基因表达和细胞跟踪的方法^[41]。生物发光成像是一种高度敏感、高通量的技术,其能够使实验动物的疾病进程呈现可视化并对治疗效果进行纵向评估,检测到的光信号作为肿瘤负荷的定量指标,已在许多肿瘤模型中得到验证^[42]。使用荧光作为检测和量化转移的方法,能够更直观地分析候选基因如何影响肿瘤细胞的转移、定植,可以给研究人员提供独立的数据,提高结果的可信度,然而由 GFP 转染引起的细胞损伤可能会导致对实验结果有一定的误差,因此在实验过程中应仔细考虑 GFP 对细胞的毒性作用。

正电子发射断层显像 (positron emission tomography, PET) 是近几年发展迅速的诊断技术,现已被用于评估肿瘤发生发展、转移过程中的代谢途径,其原理为放射性标记的正电子发射断层扫描底物在生理浓度下进行追踪,从而可以对肿瘤模型和肿瘤异质性进行无创成像^[43]。另外,对肿瘤转移相关的目标基因及特异性生物标记的定性分析也可作为模型建立的评价指标,通常涉及免疫组化、蛋白印迹分析、实时定量 PCR 等多种方法。

5 总结和展望

癌症是目前危害人类健康的主要疾病,其转移是导致死亡的主要原因之一,“肿瘤转移前微环境”的提出无疑是一个突破点,抑制 PMNs 的形成,对肿瘤的复发和转移会有一定的积极作用。癌症发展到中后期,原发性肿瘤不断增值,器官和组织发生病理性改变,形成以低氧、低 pH、组织高压为特点的微环境,在适合的局部微环境下,存在于外周血中的循环肿瘤细胞才能“播散”、“定植”、进入次级或远端器官组织,从而发展为转移灶。因此能否对转移前微环境进行干预来达到抗肿瘤作用,从而发现新型药物及疗法,现已成为热门的研究问题。

表 1 肿瘤肺转移前微环境模型动物选择及造模方法

Table 1 Selection of animals and modeling method of the pre-metastasis niche of lung model

小鼠 Mice	癌症类型 Types of cancer	方法 Method	细胞浓度 Cell concentration	成功率 Success rate	成瘤时间 Tumor formation time	评价方法 Evaluation method
裸鼠 Nude mice	RPM14788 人结肠癌 RPM14788 human colon carcinoma	尾静脉注射 Tail-vein injection	$2 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$	100%	21 d	HE 染色法 HE staining
	MGC80-3 人胃腺癌 MGC80-3 human gastric adenocarcinoma	腹腔注射 Intraperitoneal injection	$2 \times 10^6 / 200 \mu\text{L}$	50%	45 d	HE 染色法、免疫组化分析、 显微镜观察 HE staining, immunohistochemistry methods
	MKN45 胃癌 MKN45 gastric cancer	原位移植 Orthotopic transplantation	$5 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$	/	21 d	HE 染色法、免疫组化分析、 实时荧光定量 PCR HE staining, immunohistochemistry methods, Quantitative Real-time PCR
	临床胃癌标本 Clinical specimens of gastric cancer	/	$1 \times 10^7 / 200 \mu\text{L}$	/	28 d	HE 染色法、免疫组化分析、 实时荧光定量 PCR HE staining, immunohistochemistry methods, Quantitative Real-time PCR
SCID 小鼠 SCID mice	/	/	/	90%	30 d	HE 染色法 HE staining
	MCC 皮肤癌 Skin neoplasms	皮下注射 Subcutaneous injection	$1 \times 10^6 / 200 \mu\text{L}$	/	/	HE 染色法、实时荧光定量 PCR HE staining, immunohistochemistry methods, Quantitative Real-time PCR
	A549 人肺腺癌 A549 human lung adenocarcinoma	原位注射 Situ injectable	$2 \times 10^6 / \text{mL}$	100%	50 d	PET-CT 系统 Integrated PET-CT system
	CTC-TJH-01 非小细胞肺癌 CTC-TJH-01 non-small cell lung cancer	尾静脉注射 Tail-vein injection	$1 \times 10^7 / \text{mL}$	100%	50 d	生物发光成像 Bioluminescent imaging
NOD-SCID 小鼠 NOD-SCID mice	A549 肺腺癌 A549 lung adenocarcinoma	直肠注射 Rectal injection	$1 \times 10^6 / \mu\text{L}$	100%	10 周 10 weeks	生物发光成像 Bioluminescent imaging
	HT-29 结肠癌 HT-29 colorectal carcinoma	/	$4 \times 10^4 / 10 \mu\text{L}$	56%	3 ~ 6 周 3 ~ 6 weeks	生物发光成像、HE 染色 Bioluminescent imaging, HE staining
NSG 小鼠 NSG mice	TMD231 人乳腺癌 TMD231 human breast adenocarcinoma	原位移植 Situ injectable	$1 \times 10^6 / \text{mL}$	100%	7 d	HE 染色法 HE staining
	Panc1 人胰腺癌 Human pancreatic carcinoma	皮下注射 Subcutaneous injection	$2 \times 10^6 / \text{mL}$	/	/	免疫组化分析、定量 PCR Immunohistochemistry methods, Quantitative PCR
NOG 小鼠 NOG mice	PDCA 人胰腺癌 Human pancreatic carcinoma	尾静脉注射 Tail-vein injection	$1 \times 10^5 / \text{mL}$	/	8 周 8 weeks	定量 PCR Quantitative PCR

续表 1

小鼠 Mice	癌症类型 Types of cancer	方法 Method	细胞浓度 Cell concentration	成功率 Success rate	成瘤时间 Tumor formation time	评价方法 Evaluation method
BABL/c 小鼠 BABL/c mice	K7M2 骨肉瘤 K7M2 osteosarcoma	骨髓注射 Intra-bone marrow injection	$1 \times 10^6 / \mu\text{L}$	100%	7 d	HE 染色法 HE staining
	4T1 乳腺癌 4T1 breast cancer	尾静脉注射 Tail-vein injection	$2.5 \times 10^4 / \mu\text{L}$	/	3 ~ 6 周 3 ~ 6 weeks	生物发光成像 Bioluminescent imaging
	/	皮下注射 Subcutaneous injection	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{L}$	>70%	/	生物发光成像、HE 染色法 Bioluminescent imaging, HE staining
		原位移植 Situ injectable	$1 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$	/	7 d	HE 染色法 HE staining
			$1 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$	/	21 d	HE 染色法 HE staining
		/	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{L}$	>70%	/	生物发光成像、HE 染色法 Bioluminescent imaging, HE staining
	Lewis 肺癌 Lewis lung cancer	尾静脉注射 Tail-vein injection	$1 \times 10^6 / \mu\text{L}$	100%	30 d	生物发光成像 Bioluminescent imaging
	B16F10 黑色素瘤 B16F10 melanoma	皮下注射 Subcutaneous injection	$2 \times 10^7 / 200 \mu\text{L}$	100%	/	肺结节计数 Pulmonary nodules
	/	尾静脉注射 Tail-vein injection	$2.5 \times 10^5 / 100 \mu\text{L}$	100%	24 d	生物发光成像 Bioluminescent imaging
		/	/	100%	14 d	免疫组化分析、肺结节计数 Immunohistochemistry methods, pulmonary nodules
C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	/	/	$3 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$	100%	2 周 2 weeks	肺结节计数 Pulmonary nodules
	/	/	$1 \times 10^5 / 200 \mu\text{L}$	/	20 d	HE 染色 HE staining

尽管多数研究人员认为动物模型能够提供关于新型免疫疗法和药物等有价值的临床前信息,但部分肿瘤模型并不能很好地预测人类临床试验,存在着因模型建立不充分而导致多种不可控因素的存在,从而影响结果可行性,这也是为什么实验效果不能在临床中得到体现。因此,无论采用何种模型来评估新疗法,理解每种方法的局限性都是至关重要的。

参 考 文 献(References)

[1] International Agency for Research on Cancer, Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020 [EB/OL]. [2020-12-15]. <https://www.iarc.fr/faq/latest-global-cancer-data-2020-qa/>.

[2] Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889 [J]. Cancer Metastasis Rev, 1989, 8(2): 98-101.

[3] Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-

metastatic niche [J]. Nature, 2005, 438(7069): 820-827.

[4] 魏华民, 花宝金. 髓源性抑制细胞在构筑转移前微环境促肿瘤转移中的作用 [J]. 中国癌症杂志, 2017, 27(6): 516-520.

Wei HM, Hua BJ. Role of myeloid-derived suppressor cells in premetastatic niche formation and tumor metastasis promotion [J]. Chin Oncol, 2017, 27(6): 516-520.

[5] Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. N Engl J Med, 2018, 378(19): 1811-1823.

[6] Akhtar M, Haider A, Rashid S, et al. Paget's "Seed and Soil" theory of cancer metastasis: an idea whose time has come [J]. Adv Anat Pathol, 2019, 26(1): 69-74.

[7] Kyung SY, Kim DY, Yoon JY, et al. Sulforaphane attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2018, 19(1): 13.

[8] Ramani V, Teshima T, Tamura K, et al. Melanoma-derived soluble DC-HIL/GPNMB promotes metastasis by excluding T-lymphocytes from the pre-metastatic niches [J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(11): 2443-2451.

[9] 苏锐良, 李玉民, 张凡. 胃癌常见器官转移规律的研究进展

- [J]. 中国临床研究, 2020, 33(1): 106-109.
- Su RL, Li YM, Zhang F. Research progress on metastasis of common organs in gastric cancer [J]. Chin J Clin Res, 2020, 33(1): 106-109.
- [10] 白磊鹏, 吕家兴, 李哲宏, 等. 一种建立骨肿瘤肺转移模型的方法研究 [J]. 医学研究杂志, 2020, 49(11): 104-107.
- Bai LP, Lv JX, Li ZH, et al. A method of establishing lung metastasis model of bone tumor [J]. J Med Res, 2020, 49(11): 104-107.
- [11] 刘宏飞, 陈晓红, 黄志刚, 等. 类器官和人源性肿瘤组织异种移植模型在肿瘤研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 103-108, 122.
- Liu HF, Chen XH, Huang ZG, et al. Application of organoids and patient-derived xenograft models in cancer research [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 103-108, 122.
- [12] Martinov T, McKenna KM, Tan WH, et al. Building the next generation of humanized hemato-lymphoid system mice [J]. Front Immunol, 2021, 12: 643852.
- [13] Rygaard J, Povsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "nude" mice. 1969 [J]. APMIS, 2007, 115(5): 604-606.
- [14] Szadvari I, Krizanov O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment [J]. Physiol Res, 2016, 65(4): S441-S453.
- [15] Naomoto Y, Kondo H, Tanaka N, et al. Novel experimental models of human cancer metastasis in nude mice: Lung metastasis, intraabdominal carcinomatosis with ascites, and liver metastasis [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1987, 113(6): 544-549.
- [16] Wang X, Wang B, Zhan W, et al. Melatonin inhibits lung metastasis of gastric cancer *in vivo* [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109018.
- [17] 王洁, 赵宁宁, 张彩勤, 等. 基于临床肿瘤标本的胃癌转移模型建立 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 7-12.
- Wang J, Zhao NN, Zang CQ, et al. Establishment of a nude mouse model of gastric cancer metastasis model derived from clinical tumor specimens [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 7-12.
- [18] Li T, Huang H, Shi G, et al. TGF- β 1-SOX9 axis-inducible COL10A1 promotes invasion and metastasis in gastric cancer via epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): 849.
- [19] Knips J, Czech-Sioli M, Spohn M, et al. Spontaneous lung metastasis formation of human Merkel cell carcinoma cell lines transplanted into scid mice [J]. Int J Cancer, 2017, 141(1): 160-171.
- [20] Otani T, Kondo K, Takizawa H, et al. Noninvasive monitoring of cisplatin and erlotinib efficacy against lung cancer in orthotopic SCID mouse models by small animal FDGPET/CT and CT [J]. Oncol Rep, 2019, 41(1): 447-454.
- [21] 曾洁, 谢栓栓, 王昌惠. 肺癌小鼠转移模型研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2017, 44(11): 769-773.
- Zeng J, Xie SS, Wang CH. Research progress of mice metastasis models for lung cancer [J]. Cancer Res Prev Treat, 2017, 44(11): 769-773.
- [22] Okada S, Vaeteewoottacharn K, Kariya R. Application of highly immunocompromised mice for the establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) models [J]. Cells, 2019, 8(8): 889.
- [23] 阙祖俊, 罗斌, 董昌盛, 等. "正虚伏毒"肺癌研究平台的构建 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(4): 11-16.
- Que ZJ, Luo B, Dong CS, et al. Construction of lung cancer research platform under the theory of "hidden toxicity due to vital qi deficiency" [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2019, 53(4): 11-16.
- [24] Chiou J, Chang YC, Tsai HF, et al. Follistatin-like protein 1 inhibits lung cancer metastasis by preventing proteolytic activation of osteopontin [J]. Cancer Res, 2019, 79(24): 6113-6125.
- [25] Hite N, Klinger A, Hellmers L, et al. An optimal orthotopic mouse model for human colorectal cancer primary tumor growth and spontaneous metastasis [J]. Dis Colon Rectum, 2018, 61(6): 698-705.
- [26] Tonsing-Carter E, Bailey BJ, Saadatzaheh MR, et al. Potentiation of carboplatin-mediated DNA damage by the Mdm2 modulator Nutlin-3a in a humanized orthotopic breast-to-lung metastatic model [J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(12): 2850-2863.
- [27] Armacki M, Polaschek S, Waldenmaier M, et al. Protein Kinase D1, reduced in human pancreatic tumors, increases secretion of small extracellular vesicles from cancer cells that promote metastasis to lung in mice [J]. Gastroenterology, 2020, 159(3): 1019-1035.
- [28] Matsuda Y, Yoshimura H, Ueda J, et al. Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid IL2R γ (null) (NOG) mice [J]. Am J Pathol, 2014, 184(3): 674-685.
- [29] Maloney C, Edelman MC, Kallis MP, et al. Intratibial injection causes direct pulmonary seeding of osteosarcoma cells and is not a spontaneous model of metastasis: a mouse osteosarcoma model [J]. Clin Orthop Relat Res, 2018, 476(7): 1514-1522.
- [30] Warren JSA, Feustel PJ, Lamar JM. Combined use of tail vein metastasis assays and real-time *in vivo* imaging to quantify breast cancer metastatic colonization and burden in the lungs [J]. J Vis Exp, 2020, 11: 149.
- [31] 朱文文, 赵娜, 刘北星. 乳腺癌肺转移过程中 Th1/Th2 型细胞因子的动态变化 [J]. 微生物学杂志, 2020, 40(1): 52-57.
- Zhu WW, Zhao N, Liu BX. Dynamic change of Th1/Th2 cytokines during lung metastasis of breast cancer [J]. J Microbiol, 2020, 40(1): 52-57.
- [32] Rashid OM, Nagahashi M, Ramachandran S, et al. Is tail vein injection a relevant breast cancer lung metastasis model? [J]. J Thorac Dis, 2013, 5(4): 385-392.
- [33] Hou T, Jiang S, Wang Y, et al. Alpha thalassemia/intellectual

- disability X-linked deficiency sensitizes non-small cell lung cancer to immune checkpoint inhibitors [J]. *Front Oncol*, 2021, 10: 608300.
- [34] Zhang XY, Zhang JH, Liu WC, et al. Exploring the action of RGDV-gemcitabine on tumor metastasis, tumor growth and possible action pathway [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 2045–2322.
- [35] 王峥, 苗晋鑫. 黑色素瘤小鼠模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 120–127.
- Wang Z, Miao JX. The current state of mouse modeling in melanoma research [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(2): 120–127.
- [36] Fu J, Yu A, Tang J, et al. Adoptive CD8+ T cell therapy generates immunological memory to inhibit melanoma metastasis [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(11): 7262–7274.
- [37] 王佳, 李丽, 黎冰林, 等. 抑制巨噬细胞 Act1 表达对黑色素瘤肺转移的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4): 1–6.
- Wang J, Li L, Li BL, et al. Targeted suppression of macrophage Act1 inhibits the lung metastasis of melanoma cells in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(4): 1–6.
- [38] 孟星君, 李孝东, 刘俊, 等. C57BL/6J 小鼠黑色素瘤肺转移模型的构建 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(2): 139–144.
- Meng XJ, Li XD, Liu J, et al. Establishment of a C57BL/6J mouse model of metastatic melanoma in the lung [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(2): 139–144.
- [39] Sohn M, Shin S, Yoo JY, et al. Ahnak promotes tumor metastasis through transforming growth factor- β -mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14379.
- [40] Grosset AA, Loayza-Vega K, Adam-Granger É, et al. Hematoxylin and eosin counterstaining protocol for immunohistochemistry interpretation and diagnosis [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2019, 27(7): 558–563.
- [41] Lan Q, Chen Y, Dai C, et al. Novel enhanced GFP-positive congenic inbred strain establishment and application of tumor-bearing nude mouse model [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(10): 3626–3638.
- [42] Ravoori MK, Margalit O, Singh S, et al. Magnetic resonance imaging and bioluminescence imaging for evaluating tumor burden in orthotopic colon cancer [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6100.
- [43] Liu F, Zhao B, Xia XT, et al. Al18F labeled sulfonamide-conjugated positron emission tomography tracer *in vivo* tumor-targeted imaging [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 17006–17014.

[收稿日期] 2021-05-17