

# 中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

月刊 1993年6月创刊

第30卷 第6期 2022年10月30日出版

## 目次

### 研究报告

- 肠上皮细胞 *Tlr4* 特异性敲除基因鼠鉴定及免疫学特征观察 .....  
..... 白立鼎,陈银潇,李兆栋,李佳颖,樊亚东,张晓雨,张翟轶,边育红,王相玲,刘建卫,赵舒武(733)
- 贻贝粘蛋白对痔病大鼠模型治疗作用的实验研究 .....  
..... 田茂生,高记华,戚文月,刘朝阳,吴琳琳,高策,顾铭,康瑞娟,李利霞(742)
- 抗 PD-1 单抗联合顺铂的新辅助治疗策略对 NSCLC 人源化小鼠模型肿瘤复发与转移的影响 .....  
..... 李惠,郭文文,王荟荟,秦靖,张彩勤,赵菊梅,师长宏(751)
- 激素性股骨头坏死中 Hif-1 $\alpha$ /VEGF 信号轴和 H 型血管改变的实验研究 .....  
..... 于海洋,卢增鹏,汪海燕,曹盼举,姚川江,曹林忠,田杰祥,张晓刚(759)
- 小鼠 *Spata3* 蛋白结构和功能的生信分析及初鉴 ..... 李美宁,马庆,弓韬,张引红,闫萍,翟翔,郭睿(767)
- 多囊卵巢综合征大鼠子宫内膜中 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达异常与胰岛素抵抗的关系 .....  
..... 尹丽红,焦琳,陈裕,陈嘉欣,杜斯琪,王翰林,赵舜滢,殷春霞,曹丽芬,余万霖,谢长才(777)
- 乳腺癌血行肺转移模型家兔血小板与凝血功能变化研究 .....  
..... 吴国泰,马倩倩,陈艳娥,杜晓红,王晓禹,杜丽东(784)
- 自发矮小症突变大鼠家系的建立及其主要生物学特性测定 .....  
..... 包峰云,龙红,秦廷洋,霍春茂,唐克桐,张仕斌(792)
- 黄芩-连翘配伍对脂多糖诱导小鼠急性肺炎模型的保护作用 .....  
..... 武振帅,纪鹏,魏彦明,徐誉彰,张晓松,武凡琳,任建明,李琛琛,华永丽,姚万玲,袁子文(800)
- 雌性大鼠吸烟对仔鼠行为学影响的研究 .....  
..... 韩雨,陈晨,王鑫峰,张海阳,陈俞,许德玮,姚铁翼,邵晓云,徐绍业(810)
- 应用微卫星技术对 KM 小鼠种子群体遗传质量进行比较分析 .....  
..... 左琴,魏杰,付瑞,刘佐民,王洪,岳秉飞(819)

## 研究进展

- SPF 猪的培育、质量控制及其应用 ..... 孙静,葛良鹏,丁玉春,张进威,梁浩,马继登(824)
- 啮齿类动物烟碱依赖相关的行为学评价方法 ..... 李凯欣,陈欢,刘方邻,刘勇,侯宏卫,胡清源(830)
- 大小鼠学习记忆行为实验方法分类概述 ..... 姜宁,张亦文,黄红,陈善广,李莹辉,刘新民(839)
- D-半乳糖法制备 AD 动物模型的分类总结与初步评价 ..... 魏玉婷,朱田田,苏明莉,贾静,严兴科(846)
- 斑马鱼幼鱼模型在急性肾损伤研究中的适用性 ..... 王雪,夏青,王荣春,王西新,张云,刘可春(857)
- 多模态超声在类风湿关节炎动物模型中的应用进展 .....  
..... 赵海玥,王雅哲,施依璐,段莎莎,赵捷,张璐,白天昊,张小杉(861)
- 神经干细胞应用于 CCI 创伤性脑损伤模型修复的研究进展 .....  
..... 王颖花,赵亚,郭文文,刘可,艾庆燕,师长宏(867)
- 广告 ..... (封二、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/sydwbyjx/ch/index.aspx>

本期执行主编 刘恩歧

本期责任编辑 陈 慧 董令赢

## 照 排

同方知网(北京)技术有限公司

## 印 刷

北京博海升彩色印刷有限公司

## 邮发代号

2-748

## 广告发布登记

京朝工商广登字 20170142 号

## 定 价

每期 50.00 元,全年 300.00 元

## 中国标准连续出版物号

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

## 2022 年版权归中国实验动物学会所有

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

本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com

---

---

# ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Monthly, Established in June 1993

Volume 30, Number 6, October, 2022

---

## CONTENTS

- Identification and immunological characterization of intestinal epithelial cell-specific *Tlr4* gene knockout mice ...  
..... *BAI Liding, CHEN Yinxiao, LI Zhaodong, LI Jiaying, FAN Yadong,*  
*ZHANG Xiaoyu, ZHANG Zhaiyi, BIAN Yuhong, WANG Xiangling, LIU Jianwei, ZHAO Shuwu*(733)
- Therapeutic effect of mussel adhesive protein on hemorrhoids disease in rats ..... *TIAN Maosheng,*  
*GAO Jihua, QI Wenyue, LIU Zhaoyang, WU Linlin, GAO Ce, GU Ming, KANG Ruijuan, LI Lixia*(742)
- Neoadjuvant treatment strategy by anti-PD-1 immunotherapy combined with cisplatin inhibits recurrence and metas-  
tasis of NSCLC in a humanized mouse model .....  
*LI Hui, GUO Wenwen, WANG Huihui, QIN Jing, ZHANG Caiqin, ZHAO Jumei, SHI Changhong*(751)
- Changes in Hif-1 $\alpha$ /VEGF signal axis and type-H vessels in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head ...  
..... *YU Haiyang, LU Zengpeng,*  
*WANG Haiyan, CAO Panju, YAO Chuanjiang, CAO Linzhong, TIAN Jiexiang, ZHANG Xiaogang*(759)
- Bioinformatics analysis and primary identification of the structure and function of mouse *Spata3* protein .....  
..... *LI Meining, MA Qing, GONG Tao, ZHANG Yinhong, YAN Ping, ZHAI Xiang, GUO Rui*(767)
- Relationship between abnormal expression of PI3K/AKT pathway-related protein and insulin resistance of rats of  
polycystic ovary syndrome with endometrial insulin resistance .....  
..... *YIN Lihong, JIAO Lin, CHEN Yu, CHEN Jiaxin,*  
*Du Siqu, WANG Hanlin, ZHAO Shunying, YIN Chunxia, CAO Lifan, YU Wanlin, XIE Changcai*(777)
- Changes in platelets and coagulation function in a rabbit model of breast cancer lung metastasis .....  
..... *WU Guotai, MA Qianqian, CHEN Yane, DU Xiaohong, WANG Xiaoyu, DU Lidong*(784)
- Establishment of a rat model family with spontaneous short stature and identification of its main biological character-  
istics .....  
... *BAO Fengyun, LONG Hong, QIN Tingyang, HUO Chunmao, TANG Ketong, ZHANG Shibin*(792)
- Protective effect of *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* in an acute pneumonia mouse model induced by lipopo-  
lysaccharide ..... *WU Zhenshuai, JI Peng, WEI Yanming, XU Yuzhang,*

ZHANG Xiaosong, WU Fanlin, REN Jianming, LI Chenchen, HUA Yongli, YAO Wanling, YUAN Ziwen(800)	
Effect of smoking on behavior of female rats .....	HAN Yu, CHEN Chen,
WANG Xinfeng, ZHANG Haiyang, CHEN Yu, XU Dewei, YAO Tieyi, SHAO Xiaoyun, XU Shaoye(810)	
Population genetic quality analysis of a closed KM mouse colony by microsatellites .....	
..... ZUO Qin, WEI Jie, FU Rui, LIU Zuomin, WANG Hong, YUE Bingfei(819)	
Production, quality control and application of SPF pigs .....	
..... SUN Jing, GE Liangpeng, DING Yuchun, ZHANG Jinwei, LIANG Hao, MA Jideng(824)	
Nicotine addiction models and evaluation of animal behavior .....	
..... LI Kaixin, CHEN Huan, LIU Fanglin, LIU Yong, HOU Hongwei, HU Qingyuan(830)	
Overview of animal behavioral tests of learning and memory .....	
..... JIANG Ning, ZHANG Yiwen, HUANG Hong, CHEN Shanguang, LI Yinghui, LIU Xinmin(839)	
Classification and research progress on animal models of Alzheimer's disease prepared by D-galactose .....	
..... WEI Yuting, ZHU Tiantian, SU Mingli, JIA Jing, YAN Xingke(846)	
Applicability of zebrafish larvae in the research of acute kidney injury .....	
..... WANG Xue, XIA Qing, WANG Rongchun, WANG Xixin, ZHANG Yun, LIU Kechun(857)	
Advances in the application of multimodal ultrasound in animal models of rheumatoid arthritis .....	
ZHAO Haiyue, WANG Yaxi, SHI Yilu, DUAN Shasha, ZHAO Jie, ZHANG Lu, BAI Tianhao, ZHANG Xiaoshan(861)	
Research progress of neural stem cells in repairing CCI traumatic brain injury model .....	
..... WANG Yinghua, ZHAO Ya, GUO Wenwen, LIU Ke, AI Qingyan, SHI Changhong(867)	

---

**Responsible Institution**

China Association for Science and Technology

**Sponsor**

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

**Editor-in-Chief**

QIN Chuan(秦川)

**Managing Editor**

DONG Lingying(董令赢)

**Editing**

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

**Publishing**

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

**Distributor**

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica  
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021

Tel: 010-67779337

Fax: 010-67770690

E-mail: bjb@cnilas.org

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

**CSSN**

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

**Copyright 2022 by the Chinese Association for Laboratory  
Animal Sciences**

白立鼎,陈银潇,李兆栋,等. 肠上皮细胞 *Tlr4* 特异性敲除基因鼠鉴定及免疫学特征观察 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 733-741.

Bai LD, Chen YX, Li ZD, et al. Identification and immunological characterization of intestinal epithelial cell-specific *Tlr4* gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 733-741.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.001

## 肠上皮细胞 *Tlr4* 特异性敲除基因鼠鉴定及免疫学特征观察

白立鼎,陈银潇,李兆栋,李佳颖,樊亚东,张晓雨,张翟轶,边育红,王相玲,  
刘建卫,赵舒武\*

(天津中医药大学,天津 301617)

**【摘要】** 目的 鉴定肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除 (*Tlr4<sup>fl/fl</sup> Cre T*) 鼠,评价其免疫学特征。方法 应用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Tlr4<sup>fl/fl</sup> Cre T* 基因鼠,PCR 和免疫荧光鉴定 *Tlr4<sup>fl/fl</sup> Cre T* 基因鼠基因型,观察基因鼠的一般生物学特征、繁殖能力和子代存活率。HE 染色、流式细胞术及 ELISA 比较基因鼠和野生型小鼠免疫器官结构、肠黏膜免疫细胞比例及细胞因子分泌水平差异。结果 从基因和蛋白水平验证 *Tlr4<sup>fl/fl</sup> Cre T* 基因鼠的建立。与野生型鼠比,*Tlr4<sup>fl/fl</sup> Cre T* 基因鼠的一般生物学特征无明显差异、子代存活率 > 90%;胸腺、脾及肝生理结构无显著性差异;脾淋巴细胞增殖能力、血清及肠黏膜细胞因子分泌水平无显著性差异;但 CD4<sup>+</sup>T 和  $\gamma\delta$ T 细胞显著减少。结论 成功构建了肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除小鼠 (*Tlr4<sup>fl/fl</sup> Cre T*),为研究肠上皮 *Tlr4* 基因在肠道疾病、肿瘤及代谢性疾病中的作用提供实验手段。

**【关键词】** *Tlr4* 基因;肠黏膜;CRISPR/Cas9;Cre/Loxp;基因敲除

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0733-09

### Identification and immunological characterization of intestinal epithelial cell-specific *Tlr4* gene knockout mice

BAI Liding, CHEN Yinxiao, LI Zhaodong, LI Jiaying, FAN Yadong, ZHANG Xiaoyu, ZHANG Zhaiyi, BIAN Yuhong,  
WANG Xiangling, LIU Jianwei, ZHAO Shuwu\*

(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

Corresponding author: ZHAO Shuwu. E-mail: zhao\_shuwu@126.com

**【Abstract】** **Objective** To study the role of intestinal epithelial *Tlr4* in systemic immune effects by establishing a mouse model of conditional *Tlr4* knockout in intestinal epithelia. **Methods** Intestinal epithelial cell-specific *Tlr4* gene knockout mice (*Tlr4<sup>fl/fl</sup> Cre T*) were established by CRISPR/Cas9 technology. The genotype of *Tlr4<sup>fl/fl</sup> Cre T* mice was identified by PCR and immunofluorescence. The general biological characteristics, reproductive capacity, and offspring survival rate were also investigated. Differences in immune organ structures, the intestinal mucosal immune cell ratio, and cytokine secretion levels between wildtype and *Tlr4<sup>fl/fl</sup> Cre T* mice were compared by HE staining, flow cytometry, and ELISAs. **Results** Establishment of *Tlr4<sup>fl/fl</sup> Cre T* mice was verified at gene and protein levels. Compared with wildtype mice, *Tlr4<sup>fl/fl</sup> Cre T* mice had no significant difference in general biological characteristics and offspring survival rate of > 90%. No significant differences in the physiological structure of the thymus, spleen, or liver, proliferation of splenic

[基金项目]国家自然科学基金(81873100)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81873100).

[作者简介]白立鼎(1994—),男,在读硕士研究生,研究方向:中医药抗肿瘤。Email:1127168004@qq.com

[通信作者]赵舒武(1971—),女,教授,博士,研究方向:中医治则与方药的机理研究。Email:zhao\_shuwu@126.com

lymphocytes, and serum cytokine level, and intestinal mucosa were found between the two groups. However, the number of CD4<sup>+</sup> T and  $\gamma\delta$ T cells appeared to be significantly low in *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> Cre T mice. **Conclusions** The intestinal epithelial cell-specific *Tlr4* gene knockout mouse model was successfully established, which provides the experimental means to study the regulatory roles of *Tlr4* expression of intestinal epithelial cells in diseases.

**【Keywords】** *Tlr4* gene; intestinal mucosal; CRISPR/Cas9; Cre/Loxp; gene knockout

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

*Tlr4* (toll-like receptor 4, TLR4) 基因位于 9 号染色体(9q32-q33)上,是由 4 个外显子和 3 个内含子组成的模式识别受体<sup>[1]</sup>。TLR4 既可被外源性脂多糖激活,也可识别内源性配体,如高迁移率族蛋白 B1、热休克蛋白等,引起下游信号通路的激活,分泌细胞因子,发挥免疫调节作用<sup>[2]</sup>。TLR4 广泛表达于多种免疫细胞及上皮细胞中,其中肠上皮细胞的 TLR4 可“感受”肠道微生态变化,具有调节和维持肠黏膜局部和机体的免疫稳态的重要作用<sup>[3]</sup>。

肠上皮细胞持续暴露于肠道微生态,生理状态下,肠上皮 TLR4 表达较低以耐受肠道菌群,避免过度免疫反应引起肠道的损伤<sup>[4]</sup>。一旦菌群失调或者其他因素导致肠上皮 TLR4 信号通路异常激活,就会导致多种肠道疾病的发生,如肠易激综合征<sup>[5]</sup>、克罗恩病<sup>[6]</sup>、胃肠道肿瘤等<sup>[7]</sup>。肠上皮 TLR4 的异常表达甚至参与机体其他系统疾病的发生发展,如心脑血管疾病等<sup>[8]</sup>。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 基因鼠,同时评价该基因鼠的一般生物学特征,进一步从大体形态-组织学结构-细胞-细胞因子层面较全面评价 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 基因鼠的免疫学特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 野生型小鼠,每组小鼠均为雌、雄各 3 只,6 周龄,体重约为 20 g,购自北京维通利华公司【SCXK(京)2021-0006】。SPF 级 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre W 及 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 小鼠,遗传背景 BALB/cJGpt,每组小鼠均为雌、雄各 3 只,6 周龄,体重约为 20 g。购自江苏集萃药康生物科技有限公司【SCXK(苏)2018-0008】。饲养环境:小鼠于屏障环境饲养,自由饮水,环境温度 20 ~ 26℃,湿度 40% ~ 70%,光照/昼夜 12 h 交替。实验动物饲养于天津中医药大学实验动物中心【SYXK(津)2020-0005】。所有操作均符合天津中医药大学实验动物伦理学要求(TCM-LAEC2020074)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

PCR 扩增试剂(上海翌圣公司);TLR4 抗体(贝茵莱生物科技有限公司);CK-18(博奥森生物技术有限公司);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记山羊抗兔 IgG、Alexa Fluor 647 标记山羊抗小鼠 IgG(上海翌圣生物科技股份有限公司);琼脂糖、小鼠组织淋巴细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司);免疫细胞表型鉴定试剂:别藻青蛋白(Allophycocyanin, APC)标记的抗 CD8 抗体(CD8-APC)、CD49-APC、CD11b-FITC、CD4-FITC、TCR $\gamma\delta$ -FITC、CD11c-FITC、Guava 流式细胞仪(Guava flow cytometry, Millipore 公司,美国);ELISA 检测试剂盒(杭州联科生物有限公司)。目的基因 loxP、Cre 上、下游引物由江苏集萃药康公司设计,上海生工生物工程技术服务有限公司,loxP 基因(扩增片段 294 bp):上游引物 *Tlr4*-5wt-tF1 5'-CACAGTAAAGTTTCGTAACCTTTGG-3';下游引物 *Tlr4*-5wt-tR1 5'-AATTGCTGTGCTATTGCTTGGG-3',Cre 基因(扩增片段长度 567 bp):上游引物: Vll1-ProF1 5'-GTGTTTGGTTTGGTTTCCTCTGCATAAGA-3';下游引物: Cre5R1 5'-GCAGGCCAAATTTTGGTGTACGGTCA-3'。XR+型凝胶成像仪(Molecular Imager Gel Doc XR+ system, BIO-RAD 公司,美国);Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪(Full wavelength multi-function microplate reader, Thermo 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠的构建及繁育

根据 CRISPR/Cas9 技术原理,将 sgRNA、Cas9 蛋白和打靶载体显微注射到小鼠受精卵,经胚胎移植,获得阳性 F0 代小鼠,阳性 F0 代小鼠与野生型小鼠配繁得到 F1 代(*Tlr4*<sup>fllox/-</sup>)杂合子小鼠。将 *Tlr4*<sup>fllox/-</sup>小鼠自交获得 *Tlr4*<sup>fllox/fllox</sup>小鼠,将 *Tlr4*<sup>fllox/fllox</sup>小鼠与 ProVilli-Cre T 小鼠交配,筛选出子代基因型 *Tlr4*<sup>fllox/-</sup>/ProCre<sup>+/-</sup>小鼠,将其与 *Tlr4*<sup>fllox/fllox</sup>配繁,获得子代基因型 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 和 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre W 小鼠。

#### 1.2.2 PCR 技术鉴定小鼠的基因型

无菌剪取鼠耳(1 × 1 mm<sup>2</sup>),采用酶裂解法

55℃裂解 12 h(蛋白酶 K 终浓度 20 mg/mL),乙醇沉淀法提取小鼠基因组 DNA,以所得 DNA 为模板进行 PCR 扩增,50 μL 反应体系如下:2 × HiEff PCR Master Mix 25 μL、上游引物(10 μmol/L)2 μL、下游引物(10 μmol/L)2 μL、模板 DNA 5 μL、去离子水补足至 50 μL。反应条件:94℃ 3 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,共 40 个循环;72℃ 10 min。使用 1%琼脂糖凝胶与核酸染料对 PCR 扩增产物进行可视化,在凝胶成像仪中观察结果并拍照。

### 1.2.3 免疫荧光鉴定肠上皮 TLR4 蛋白表达

取 5 μm 厚的小肠冰冻切片,室温 5%山羊血清封闭 1 h,一抗 TLR4(1:500)、CK-18(1:500),4℃ 孵育过夜。次日切片复温,荧光二抗 FITC(1:100) Alexa Fluor 647(1:400)孵育 0.5 h, PBS 冲洗, DAPI 复染,荧光显微镜观察并拍照。

### 1.2.4 免疫器官组织形态学观察

脱颈处死小鼠,立即切取脾、肝和胸腺(各 5 × 5 mm<sup>2</sup>)4%多聚甲醛中固定,24 h 换固定液 1 次,固定 48 h,脱水、透明、石蜡包埋,切片厚度 5 μm。HE 染色,光学显微镜下观察拍照。

### 1.2.5 脾淋巴细胞增殖实验

脱颈处死小鼠,研磨脾,淋巴细胞分离试剂盒分离脾淋巴细胞,每毫升 5 × 10<sup>6</sup> 个淋巴细胞悬液接种 96 孔培养板,加入 5 μg/mL 刀豆蛋白,培养 48 h 后,CCK-8 检测淋巴细胞的增殖。刺激指数(SI)计算公式为:SI = (OD<sub>450</sub> 刺激 - OD<sub>450</sub> 对照) / (OD<sub>450</sub> 未刺激 - OD<sub>450</sub> 对照)<sup>[9]</sup>。

### 1.2.6 流式细胞术检测肠黏膜免疫细胞

脱颈处死小鼠,分离小肠,纵向剖开冲洗,剪成 1 ~ 2 cm 小段,于含 EDTA 和 DTT 的裂解液充分裂解(37℃、200 r/min 摇床 20 min,3 次),40 μm 滤网过滤裂解液,Percoll 梯度离心法分离滤液,小心吸取中间乳白色细胞层,PBS 清洗,每 1.5 mL EP 管中 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞,分别加入荧光基因标记的抗体,4℃ 避光孵育 30 min,PBS 洗涤细胞,1 mL PBS 重悬细胞,避光,流式细胞仪进行检测<sup>[10]</sup>。

### 1.2.7 ELISA 技术检测血清和肠黏膜细胞因子水平

目内眦采血并收集血液,4℃ 静置 4 h,4000 r/min,离心 10 min,得到血清,分装并保存于 -80℃ 待测。脱颈处死小鼠,分离小肠,纵向剖开,生理盐水漂洗,吸水纸吸取多余水分,刮取黏膜、匀

浆,匀浆液分装保存于 -80℃ 待测。按照 ELISA 检测试剂盒流程操作,测量酶标仪 450 nm 吸光度(OD)值,按照公式计算细胞因子的含量。

### 1.3 统计学分析

所有数据均用 Graph Pad Prism 5 和 SPSS 17.0 软件处理,两组间数据比较使用独立样本 *t* 检验,多组间数据比较使用单因素 ANOVA 分析。*P* < 0.05 表示具有统计学意义。

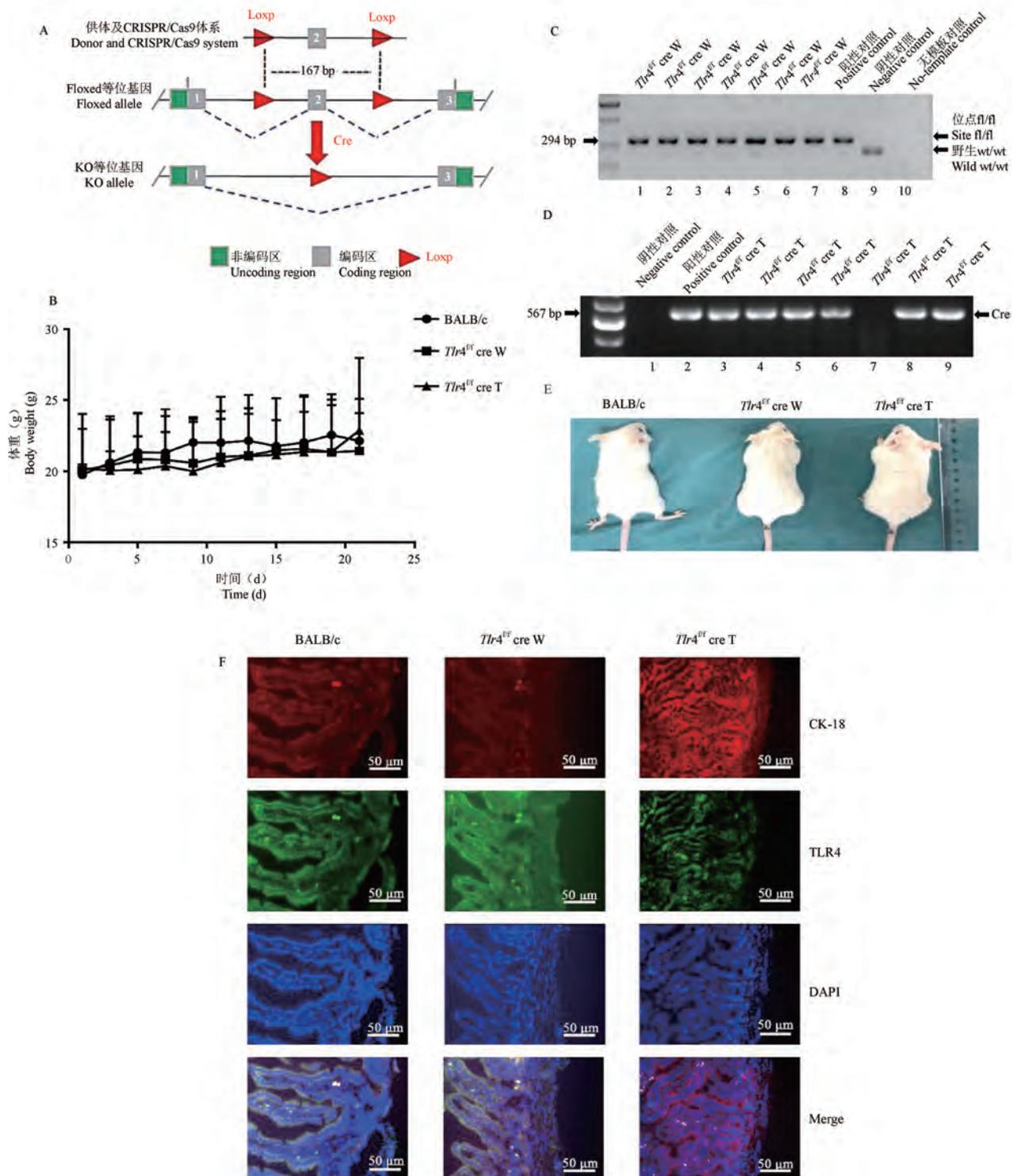
## 2 结果

### 2.1 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠的构建及一般生物学特征观察

*Tlr4*<sup>fl/fl</sup> 基因小鼠是在 *Tlr4* 基因 2 号外显子(167 bp)两端插入 Loxp 位点(图 1A),1 ~ 7 号泳道内检测的结果为 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> 小鼠,8 号泳道检测结果为野生型小鼠(图 1C)。与表达 Cre 的转基因小鼠交配,从而获得 Cre 重组酶切除肠上皮 *Tlr4* 基因的条件敲除小鼠。雄性 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup>/Pro Cre<sup>+</sup> 小鼠与雌性 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> 小鼠杂交后代进行基因鉴定,2 ~ 6,8 ~ 9 号泳道内检测的结果为 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup>/ProCre<sup>+</sup> 小鼠(图 1D),即肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除(*Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T)鼠。免疫荧光双染结果显示:与 BALB/c 组相比,*Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre W 鼠肠上皮 TLR4 荧光强度无减弱,而 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠肠上皮 TLR4 荧光强度显著减弱(图 1F)。*Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠生长发育良好,毛发柔顺有光泽,身长及体重等未表现出区别于 BALB/c 野生型鼠的差异(图 1B,1E)。*Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 母鼠每胎产 8 ~ 10 只幼鼠,幼鼠成活率 > 90%。6 周龄 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠与 BALB/c 鼠相比每日饮水、饮食和体重无明显差异。*Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠的构建策略及鉴定结果合格,基因特异性敲除对一般生物学特征无显著影响。

### 2.2 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠主要免疫器官的组织学分析

与 BALB/c 鼠比,*Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre W 及 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠的胸腺、脾及肝的大体形态均未见异常变化,各脏器指数均无显著性差异(图 2A,2B,2C)。*Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre W 及 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠上述 3 个器官的 HE 染色光镜下的形态结构未见异常改变:胸腺内有明确的皮质和髓质、且皮质/髓质无异常改变(图 2D),脾的切面可见白髓和红髓结构、且两者比例正常(图 2E),肝的肝小叶呈多边形,其中央可见中央静脉,围绕中央静脉是迷路样肝索以及肝血窦(图 2F),肝小叶之间可见有门管区。

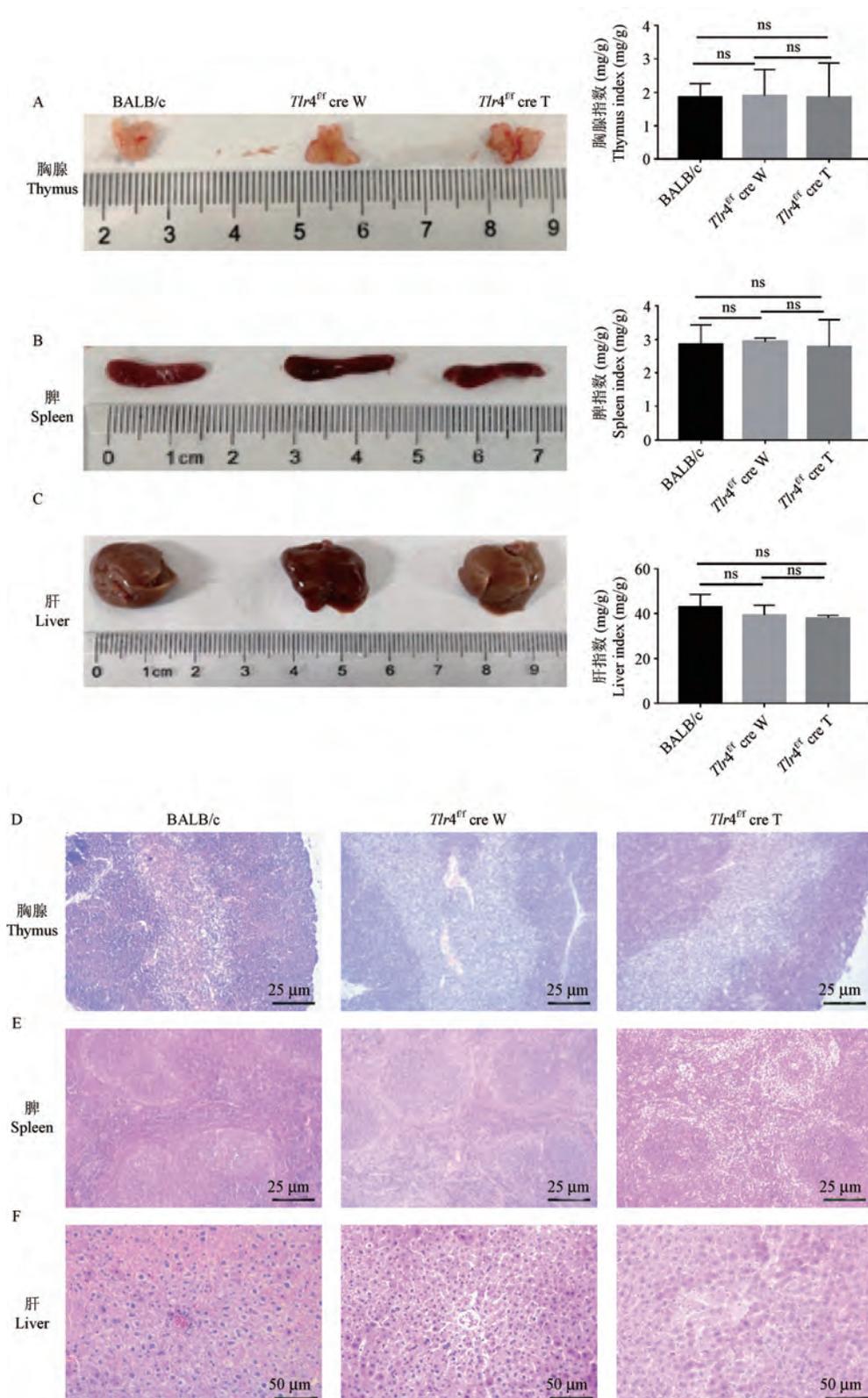


注:A: *Tlr4<sup>fl/fl</sup>* cre T 鼠的构建策略与流程图;B: 小鼠体重;C, D: 小鼠耳组织 DNA 经 PCR 扩增后电泳条带;E: 小鼠外形体征;F: 小鼠肠上皮 TLR4 免疫荧光图。

图 1 *Tlr4<sup>fl/fl</sup>* cre T 鼠的构建策略及鉴定结果

Note. A. Strategy and flow chart of *Tlr4<sup>fl/fl</sup>* cre T mice. B. Mice weight. C, D. Electrophoresis band of PCR amplification of mice ear tissue DNA. E. Appearance and signs of mice. F. Intestinal epithelium TLR4 immunofluorescence.

Figure 1 Strategy and identification of *Tlr4<sup>fl/fl</sup>* cre T mice



注: A, B, C: 胸腺、脾、肝外形特征及指数; D, E, F: 胸腺、脾、肝结构 HE 染色。

图 2 *Tlr4<sup>fl/fl</sup> cre T* 鼠主要免疫器官的形态学观察

Note. A, B, C. Thymus, spleen, liver profile and index. D, E, F. Thymus, spleen, liver tissue in the HE stained histopathological images.

Figure 2 Morphology observation of the main organs of *Tlr4<sup>fl/fl</sup> cre T* mice

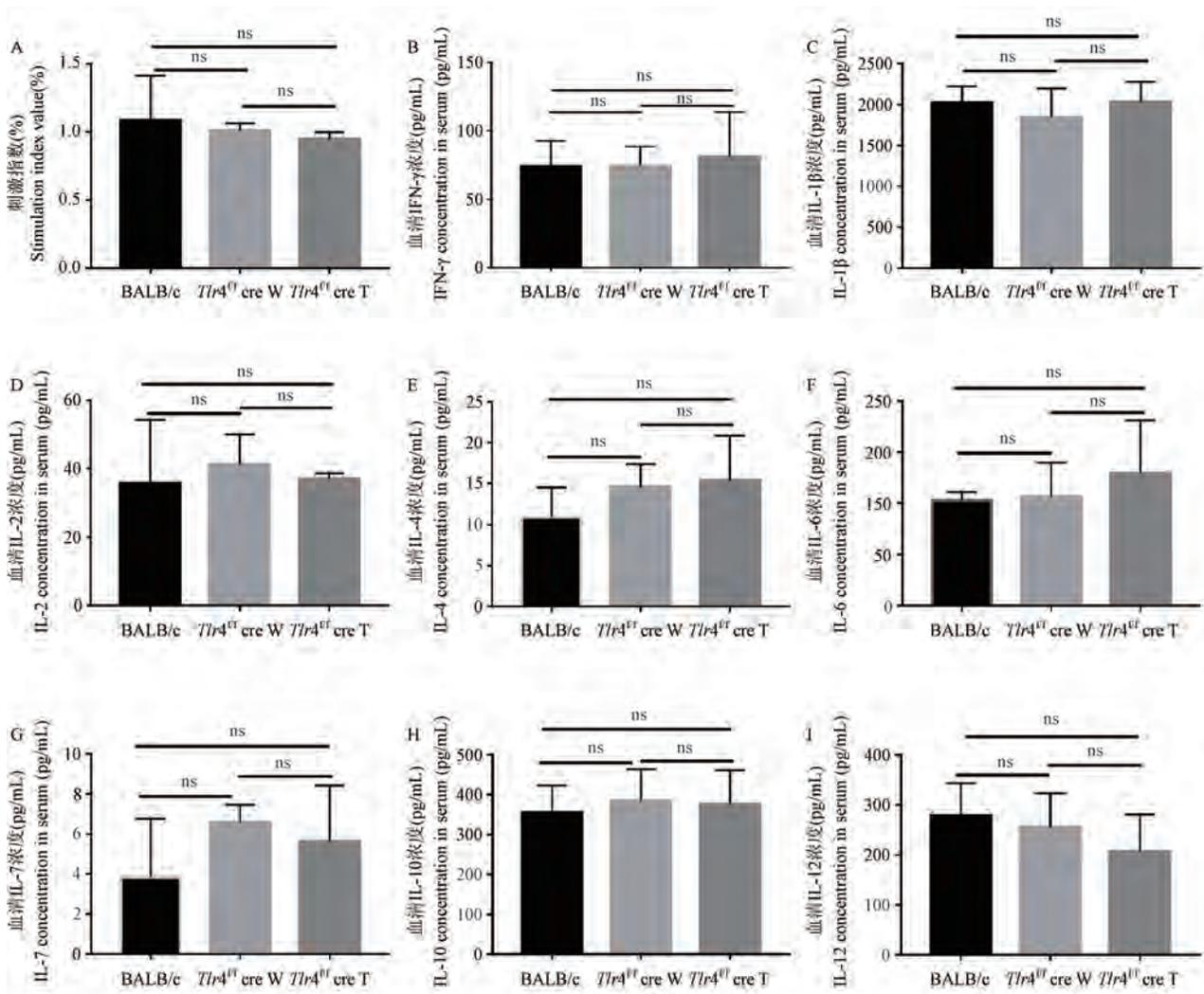
### 2.3 肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对脾淋巴细胞增殖及血清细胞因子的影响

与 BALB/c 鼠相比, *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre W 和 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠的脾淋巴细胞刺激指数均无明显差异, 提示小鼠肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对脾淋巴细胞增殖活性无显著影响(图 3A)。与 BALB/c 鼠比, *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre W 和 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠血清因子如 IFN- $\gamma$ (图 3B)、IL-1 $\beta$ (图 3C)、IL-2(图 3D)、IL-4(图 3E)、IL-6(图 3F)、IL-7(图 3G)、IL-10(图 3H)、IL-12(图 3I), 均无明显差异, 提示小鼠肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对上述血清细胞因子无显著影响。

### 2.4 肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对肠黏膜免疫细胞及细胞因子的影响

与 BALB/c 鼠比, *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre W 鼠肠黏膜主要相关免疫细胞包括 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、巨噬细胞、NK 细胞及树突状细胞, 数量和比例无显著性差异(图 4A~4F); 与 BALB/c 鼠比, *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 鼠肠黏膜 CD4<sup>+</sup>T 和  $\gamma\delta$ T 细胞数量和比例显著降低, 其余 4 种免疫细胞无差异性改变(图 4A, 4C)。

肠黏膜细胞因子包括 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12、IL-10, BALB/c、*Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre W 及 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 三组间相比无显著性差异(图 4G~4N)。

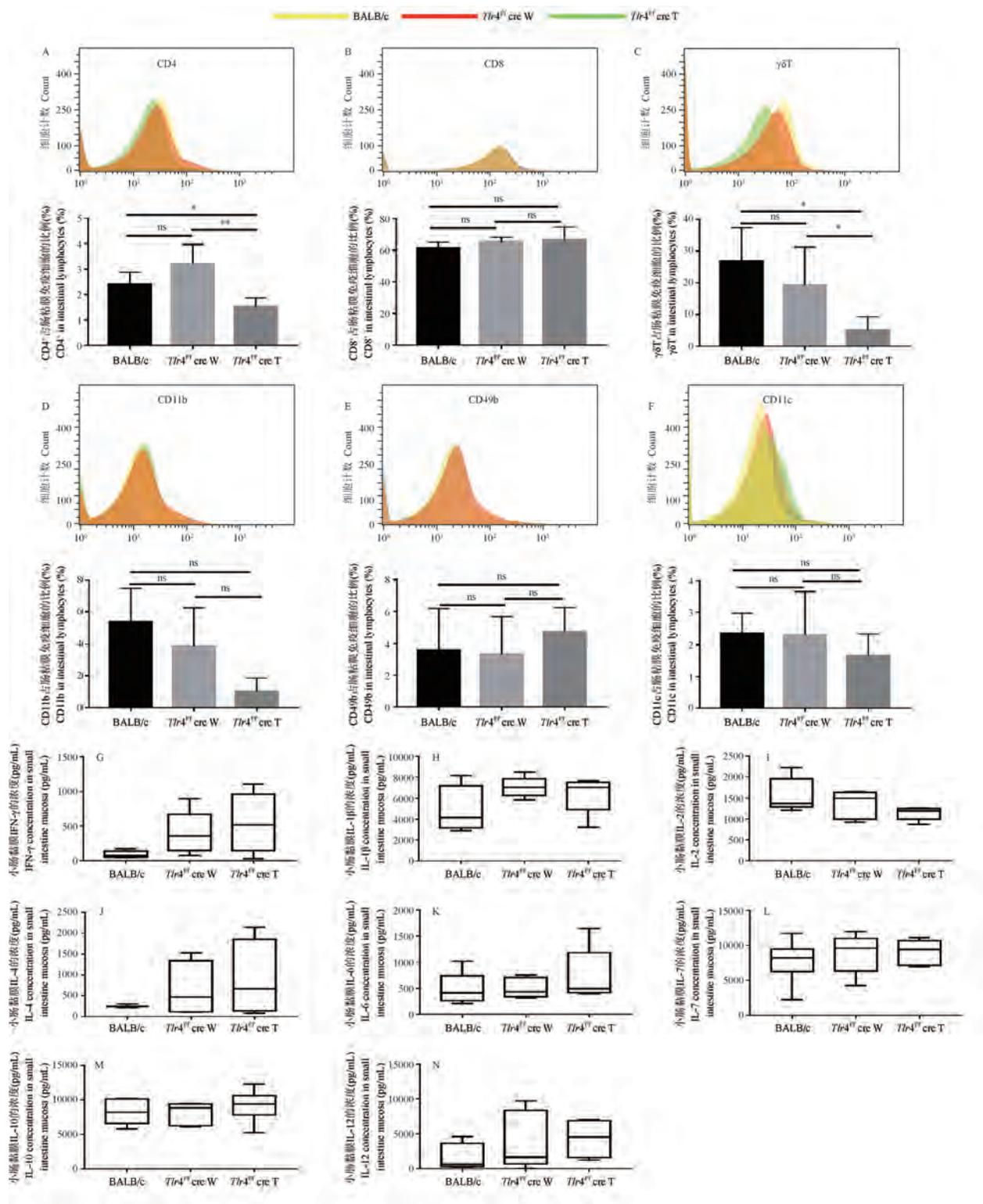


注: A: 脾淋巴细胞刺激指数柱状图; B ~ I: 血清细胞因子浓度 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12。

图 3 肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对脾淋巴细胞增殖及血清细胞因子的影响

Note. A. The stimulation index of splenic lymphocyte proliferation. B ~ I. Serum cytokine concentrations IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12.

Figure 3 Changes of effects of *Tlr4* specific knockout of intestinal epithelium on splenic lymphocyte proliferation and serum cytokines



注: A~ F: 肠黏膜 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、γδT 淋巴细胞及肠黏膜巨噬细胞、NK 细胞、肠黏膜树突状细胞; G ~ N: 肠黏膜细胞因子浓度如 IFN-γ、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12。

图 4 肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除对肠黏膜免疫细胞及细胞因子的影响

Note. A ~ F. Intestinal mucosa CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、γδT lymphocytes and macrophages, NK, dendritic cell in intestinal mucos. G ~ N. The concentrations of cytokines in the intestinal mucosa such as IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12.

Figure 4 Changes of effects of *Tlr4* specific knockout of intestinal epithelium on intestinal mucosal immune cells and cytokines

### 3 讨论

肠上皮 TLR4 的过度激活不仅引起肠道疾病,同时与肿瘤、代谢综合征的发生密切相关<sup>[11]</sup>,目前大多数研究采用的都是小分子抑制剂或全身敲除的方式来抑制 TLR4 的激活,具有器官靶向性差的局限性<sup>[12-13]</sup>,不能准确的阐述肠上皮 TLR4 在疾病中的作用。因此本研究利用 CRISP/Cas9 技术成功构建了肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除基因鼠(*Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T),评估其免疫特征,为研究肠上皮 TLR4 在疾病中的作用以及临床治疗提供新的手段。实验结果显示,除 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 基因鼠肠黏膜局部 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞及  $\gamma\delta$ T 细胞比例明显下降以外,在一般生物学特征、繁育能力、子代存活率以及免疫特征方面 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 相较于 BALB/c 均无显著性改变,因此我们猜测 TLR4 的表达与 CD4<sup>+</sup>T 及  $\gamma\delta$ T 细胞数量存在密切联系,并进行了相关文献调研及实验研究。

文献表明:肠黏膜淋巴细胞的募集受肠上皮 TLR4 的调控,且 CD4<sup>+</sup>T 细胞的数量与 TLR4 密切相关,如在新生儿坏死性小肠结肠炎中,肠上皮 TLR4 激活导致同源趋化因子配体 25 大量分泌,进而募集更多 CD4<sup>+</sup>T 细胞到病变部位,导致其病情的加重<sup>[14]</sup>。肠上皮细胞 TLR4 信号通路的激活,释放单核细胞趋化蛋白-1 和人中性粒细胞趋化因子-1,显著上调肠黏膜 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞比例,增强肠黏膜免疫<sup>[15]</sup>。正常生理状态下,肠上皮 TLR4 感受肠道微生态的动态变化,从而维持肠黏膜 CD4<sup>+</sup>T 细胞动态平衡<sup>[16]</sup>。通过实验,认为特异性敲除肠上皮 *Tlr4* 基因,导致其无法感受肠道微生态信号,可能是导致肠黏膜 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞显著减少的主要原因。肠上皮与  $\gamma\delta$ T 细胞的相互作用对于肠黏膜免疫的稳态至关重要。肠上皮  $\gamma\delta$ T 可调节和修复上皮屏障,调控肠上皮细胞生长和分化都具有重要影响<sup>[17]</sup>。此外,肠黏膜局部细胞因子如 IL-1 $\alpha$ 、IL-15、IL-18、IL-21、IL-7 等,对于肠上皮  $\gamma\delta$ T 细胞的增殖至关重要<sup>[18-20]</sup>,前期研究表明,肠上皮 TLR4/MyD88 非依赖通路的激活可以促进肠黏膜 IL-7 水平显著增高<sup>[21]</sup>。本研究结果显示 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 小鼠的肠黏膜  $\gamma\delta$ T 显著减少,肠黏膜细胞因子的水平无显著性差异。考虑肠黏膜  $\gamma\delta$ T 细胞数量受到多种复杂因素的影响,并非受肠黏膜细胞因子单因素造成肠黏膜  $\gamma\delta$ T 的数量减少。因此在未来的研究中我们将继续深入探索,明确其具体机制。

肠黏膜免疫系统是中药发挥免疫药效、调节人体免疫功能的重要途径,同时中药大分子如蛋白质、多肽、多糖等依赖于菌群的分解发挥效用,如甘草多糖通过调节肠道菌群、激活肠黏膜免疫发挥抑制荷瘤鼠移植瘤增长的作用<sup>[22]</sup>,然而作为识别肠道菌群和调节肠黏膜稳态的肠上皮 TLR4 在其中的作用机制,尚不明了。后续研究将利用 *Tlr4*<sup>fl/fl</sup> cre T 基因鼠,探讨口服生物利用度极低的中药多糖抑制皮下移植瘤的作用机制,并进一步明确肠上皮 TLR4 信号通路的角色作用。鉴于肠上皮 TLR4 的激活在肠道疾病、肿瘤、代谢性疾病等密切相关,通过构建肠上皮 *Tlr4* 特异性敲除小鼠,为研究其机制、治疗方法提供技术支持。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Zhou LT, Zheng DC, Wang SY, et al. Genetic association of Toll-like receptor 4 gene and coronary artery disease in a Chinese Han population [J]. Springerplus, 2016, 5(1): 1533.
- [ 2 ] 李嘉慧,王欣佩,冷静. TLR4/NF- $\kappa$ B 参与动脉粥样硬化发生发展机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 137-142.  
Li JH, Wang XP, Leng J. The mechanism of TLR4/NF- $\kappa$ B in atherosclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 137-142.
- [ 3 ] Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines [J]. J Immunol, 2002, 168(2): 554-561.
- [ 4 ] Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis [J]. Cell, 2004, 118(2): 229-241.
- [ 5 ] 张杰,李红,王进海,等. 肠道微生态对腹泻型肠易激综合征的影响及其作用机制探讨 [J]. 世界临床药物, 2019, 40(5): 340-346.  
Zhang J, Li H, Wang JH, et al. The effect and mechanism of intestinal microbiota in the pathogenesis of diarrhea type irritable bowel syndrome [J]. World Clin Drug, 2019, 40(5): 340-346.
- [ 6 ] 朱瑞齐,庄培丽,周璐,等. TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 在克罗恩病结肠组织的表达及临床意义 [J]. 中国现代医生, 2021, 59(29): 17-20, 193.  
Zhu RQ, Zhuang PL, Zhou L, et al. Expression and clinical significance of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B in the colonic tissues of patients with Crohn's disease [J]. Chin Modern Doctor, 2021, 59(29): 17-20, 193.
- [ 7 ] Shi YJ, Zhao QQ, Liu XS, et al. Toll-like receptor 4 regulates spontaneous intestinal tumorigenesis by up-regulating IL-6 and GM-CSF [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 385-397.
- [ 8 ] Perez-Pardo P, Dodiya HB, Engen PA, et al. Role of TLR4 in

- the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice [J]. *Gut*, 2019, 68(5): 829-843.
- [ 9 ] Cao J, Zhang HH, Yang ZM, et al. Effect of dehydroepiandrosterone on the immune response and gut microbiota in dextran sulfate sodium-induced colitis mice [J]. *Mol Immunol*, 2020, 118(2): 60-72.
- [ 10 ] Zhu Y, Cui G, Miyauchi E, et al. Intestinal epithelial cell-derived IL-15 determines local maintenance and maturation of intraepithelial lymphocytes in the intestine [J]. *Int Immunol*, 2020, 32(5): 307-319.
- [ 11 ] Burgueño JF, Abreu MT. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(5): 263-278.
- [ 12 ] Graças JP, Ranocha P, Vitorello VA, et al. The class III peroxidase encoding gene *AtPrx62* positively and spatiotemporally regulates the low pH-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* roots [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7191.
- [ 13 ] Islam K. The bump-and-hole tactic: expanding the scope of chemical genetics [J]. *Cell Chem Biol*, 2018, 25(10): 1171-1184.
- [ 14 ] Egan CE, Sodhi CP, Good M, et al. Toll-like receptor 4-mediated lymphocyte influx induces neonatal necrotizing enterocolitis [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(2): 495-508.
- [ 15 ] Xie SZ, Shang ZZ, Li QM, et al. *Dendrobium huoshanense* polysaccharide regulates intestinal lamina propria immune response by stimulation of intestinal epithelial cells via toll-like receptor 4 [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 222(2): 115028.
- [ 16 ] 杨雪, 赵旭晶. 奥美拉唑联合肠道微生态调节剂治疗新生儿坏死性小肠结肠炎的疗效分析 [J]. *河北医学*, 2022, 28(3): 472-477.
- Yang X, Zhao XJ. An analysis of the efficacy of omeprazole combined with intestinal microecological regulator in the treatment of neonatal necrotizing enterocolitis [J]. *Hebei Med*, 2022, 28(3): 472-477.
- [ 17 ] Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial  $\gamma\delta$ T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(13): 6147-6151.
- [ 18 ] Lodolce JP, Boone DL, Chai S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation [J]. *Immunity*, 1998, 9(5): 669-676.
- [ 19 ] Tsuda J, Li W, Yamanishi H, et al. Involvement of CD56<sup>bright</sup>CD11c<sup>+</sup> cells in IL-18-mediated expansion of human  $\gamma\delta$ T cells [J]. *J Immunol*, 2011, 186(4): 2003-2012.
- [ 20 ] 陈永强, 郑璐, 王鹏, 等. 糖原合酶激酶-3 $\beta$ 抑制剂 TWS119 联合细胞因子促进 CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T 细胞分化及功能 [J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(11): 974-979.
- Chen YQ, Zheng L, Wang P, et al. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibitor TWS119 combined with cytokines promotes the differentiation and function of CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T cells [J]. *Immunol J*, 2021, 37(11): 974-979.
- [ 21 ] 王丽, 赵颖, 崔换天, 等. 基于 IL-7 的甘草多糖抗肿瘤机制的研究 [J]. *天津中医药*, 2016, 33(6): 373-377.
- Wang L, Zhao Y, Cui HT, et al. Study on the anti-tumor mechanism of Gancao polysaccharide on production of IL-7 [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2016, 33(6): 373-377.
- [ 22 ] Zhang XY, Zhao SW, Song XB, et al. Inhibition effect of glycyrrhiza polysaccharide (GCP) on tumor growth through regulation of the gut microbiota composition [J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 137(4): 324-332.

[收稿日期] 2022-03-15

田茂生,高记华,戚文月,等. 贻贝粘蛋白对痔病大鼠模型治疗作用的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 742-750.

Tian MS, Gao JH, Qi WY, et al. Therapeutic effect of mussel adhesive protein on hemorrhoids disease in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 742-750.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.002

## 贻贝粘蛋白对痔病大鼠模型治疗作用的实验研究

田茂生<sup>1,3,4</sup>,高记华<sup>2,3\*</sup>,戚文月<sup>1,3</sup>,刘朝阳<sup>1,3</sup>,吴琳琳<sup>1,3</sup>,高策<sup>2,3</sup>,顾铭<sup>5</sup>,  
康瑞娟<sup>5</sup>,李利霞<sup>2,3</sup>

(1. 河北中医学院,石家庄 050091;2. 河北中医学院第一附属医院,石家庄 050011;3. 河北省中西医结合胃肠病研究重点实验室,石家庄 050011;4. 山西省人民医院,太原 030002;5. 中国科学院过程工程研究所,北京 100190)

**【摘要】** 目的 本研究基于直肠局部用药要求建立巴豆油诱导的痔病大鼠模型,探究贻贝粘蛋白(MAP)的抗痔疗效和黏附性,并探讨其作用机制。方法 以巴豆油为致炎剂建立痔病大鼠模型,将40只SPF级SD大鼠按体重随机分为4组,造模后1h各组大鼠予以相应治疗。D4取材,处死前30min将1%伊文思蓝(EBD)注入大鼠尾静脉,计算肛肠系数,评价血管通透性,Western Blot法检测黏蛋白Muc2、Muc4的蛋白相对表达量,ELISA法检测大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA表达量。通过在体实验和离体实验比较异硫氰酸荧光素(FITC)标记的MAP在大鼠直肠的荧光成像,观察比较MAP在直肠的黏附性。结果 MAP可减少大鼠肛门直肠肿胀、分泌物和渗出情况,肛肠系数结果提示MAP可降低肛门直肠肿胀程度( $P < 0.01$ ),EBD含量提示MAP可降低局部血管通透性( $P < 0.01$ ),增加黏蛋白Muc2、Muc4的相对表达量( $P < 0.05$ ),降低血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA表达量( $P < 0.01$ ),荧光成像结果显示MAP在直肠环境内表现出良好的黏附性和稳定性。结论 海洋生物材料贻贝粘蛋白具有良好黏附性,能够减轻大鼠肛门直肠黏膜肿胀、增加黏膜黏蛋白表达、抑制炎症、修复黏膜屏障、促进黏膜愈合、改善痔病大鼠模型症状,可为痔病药物的临床前研究提供可靠依据。

**【关键词】** 痔病;巴豆油模型;贻贝粘蛋白;黏膜屏障;黏附性

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)06-0742-09

## Therapeutic effect of mussel adhesive protein on hemorrhoids disease in rats

TIAN Maosheng<sup>1,3,4</sup>, GAO Jihua<sup>2,3\*</sup>, QI Wenyue<sup>1,3</sup>, LIU Zhaoyang<sup>1,3</sup>, WU Linlin<sup>1,3</sup>, GAO Ce<sup>2,3</sup>,  
GU Ming<sup>5</sup>, KANG Ruijuan<sup>5</sup>, LI Lixia<sup>2,3</sup>

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China. 2. the First Affiliated Hospital of Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011. 3. Key Laboratory of Gastroenterology Research of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Hebei Province, Shijiazhuang 050011. 4. Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030002. 5. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

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

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(82174381),国家重点研发计划项目(2016YFC1103200),中国博士后科学基金项目(2021M701035),河北中医学院科研能力提升重点项目(KTZ2019033),河北中医学院研究生创新能力培养资助项目(XCXZZBS2021019)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(82174381), National Key Research and Development Program of China(2016YFC1103200), China Postdoctoral Science Foundation Project(2021M701035), Key Project of Research Capacity Improvement of Hebei University of Chinese Medicine(KTZ2019033), Project of Postgraduate Creativity Training Foundation of Hebei University of Chinese Medicine(XCXZZBS2021019).

**【作者简介】** 田茂生(1988—),男,博士,主治医师,研究方向:中医药防治结直肠肛门及盆底疾病。Email: t-ms1988@163.com

**【通信作者】** 高记华(1964—),男,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:中医药防治结直肠肛门及盆底疾病。Email: gaojihua2005@163.com

**【Abstract】 Objective** The anti-hemorrhoid efficacy and adhesion of mussel adhesive protein (MAP) was studied and its mechanism evaluated. **Methods** Croton oil was used to stimulate the anorectal mucosa to establish the model. Forty specific-pathogen-free grade Sprague-Dawley rats were divided into four experimental groups. One hour after model creation, different treatments were applied to each group by rectal administration under anesthesia. General observation was performed on the fourth day. A 1% solution of EBD was injected into the tail vein 30 min before rats were sacrificed. Approximately 8 mm of rectum was cut off and weighed to calculate the anorectal coefficient. Vascular permeability was evaluated by measuring EBD concentrations. Western Blot was used to detect relative protein expression levels of Muc2 and Muc4, and ELISA was used to detect expression of serum tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL-6), and malonaldehyde (MDA) in rats. Fluorescence imaging of FITC-labeled MAP at different times was compared and observed by fluorescence microscopy. **Results** General observations revealed that MAP could reduce the redness, edema, mucosal secretion, and exudation in the rectal area of rats. Anorectal coefficient result suggested that MAP could reduce the degree of rectal swelling ( $P < 0.01$ ), and EBD contents suggested that MAP could reduce local vascular permeability ( $P < 0.01$ ). Relative expression levels of mucins Muc2 and Muc4 were increased ( $P < 0.05$ ), whereas expression levels of serum TNF- $\alpha$ , IL-6, and MDA were decreased ( $P < 0.01$ ). Fluorescence imaging indicated that FITC-MAP could maintain good adhesion and stability in the rectum. **Conclusions** MAP could increase the expression of mucosal mucin, inhibit inflammation, repair the mucosal barrier, promote mucosal healing, and improve the symptoms of hemorrhoids in a rat model, which can provide a reliable basis for preclinical research of hemorrhoids drugs.

**【Keywords】** hemorrhoids disease; croton oil induced model; mussel adhesive protein; mucosal barrier; adhesion  
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

痔病是一种常见的肛肠疾病,是直肠肛垫组织的异常病理性肥大、移位<sup>[1-2]</sup>,痔组织的肿胀脱垂、出血、疼痛、炎性刺激、排便困难等是痔病常见的临床症状,肛肠疾病患者中合并痔病症状的占比可达 98.09%<sup>[3-5]</sup>。痔病治疗原则是治疗有症状的痔<sup>[3-6]</sup>,由于该病的特殊性和高病发率,直肠局部用药成为 I、II 度痔病患者的最佳治疗方式,同时也给直肠局部抗痔药物的药效学研究带来了更多的挑战<sup>[7-12]</sup>。目前痔病仍然没有绝对有效的药物治法,这是由于痔病症状是缓慢出现且是多因素的,涉及到肛垫微循环调节障碍、肛垫悬吊组织退行性病变等原因。

海洋生物贻贝的足丝腺分泌物提取的大分子蛋白——贻贝粘蛋白(MAP),已在临床中证明具有局部抗炎和促进愈合的作用<sup>[13-14]</sup>。一项针对体外生物活性研究的双盲对照临床试验显示,MAP 能够减少促炎因子(IL-1 $\alpha$ , IL-6, COX-2)表达,保护 HaCaT 细胞免受 UVB 诱导的细胞死亡和凋亡<sup>[15]</sup>。随着生物材料技术的发展,海洋生物贻贝的足丝腺经粉碎、提取、色谱纯化、浓缩等制备工艺,可得到高纯度的生物大分子蛋白,进一步加工合成新型凝胶制剂贻贝粘蛋白肛肠敷料<sup>[16]</sup>。本研究基于直肠局部用药要求建立巴豆油诱导的痔病大鼠模型,探究贻贝粘蛋白(MAP)的抗痔疗效和黏附性,并探讨其作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验动物

68 只 6 ~ 8 周龄的 SPF 级 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,雌雄各半,由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(浙)2020-0002】。进行实验期间,大鼠被饲养于菲诺克生物科技(上海)有限公司屏障设施实验室【SYXK(沪)2018-0023】,温度(22  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C,湿度 40% ~ 70%,12 h 交替昼夜灯光,以标准的实验室饲料、正常饮用水喂养 1 周,实验前 12 h 禁食但不禁水。所有实验方案均经菲诺克生物科技实验动物福利伦理审查委员会批准(phenotek-sh008)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

吡啶(C10376055,上海麦克林生化技术有限公司),巴豆油(KD2HE-FH,东京化工股份有限公司),橄榄油(K1809057,上海阿拉丁生化技术有限公司),甲酰胺(C10541284,上海麦克林生化技术有限公司),伊文斯蓝染料(EBD,C10325619,上海麦克林生化技术有限公司),异硫氰酸荧光素(FITC,C11189816,上海麦克林生化技术有限公司),2% 异氟烷(2017171101,深圳瑞沃德生命技术有限公司),复方醋酸地塞米松乳膏(1905001X,华润三九制药有限公司),贻贝粘蛋白肛肠敷料(MAP,江阴

贝瑞森生化技术有限公司), 蛋白提取液 (MDL91201, MDL), 蛋白酶抑制剂 (MD912893, MDL), 中等蛋白分子量 marker (ThermoFisher Scientific), 重组 Anti-actin 抗体 (MD6553, MDL), 二抗 (MD912565, MDL), 重组 Anti-MUC2 抗体 (ab133555, Abcam), 重组 Anti-MUC4 抗体 (ab194363, Abcam)。

多通道动物麻醉系统 (深圳瑞沃德生命技术有限公司, 中国), FA-N 电子天平 (上海力辰邦西仪器科技有限公司, 中国), Q24 型组织破碎匀浆仪 (鼎昊源科技有限公司, 中国), SH-1000Lab 全波长酶标仪 (株式会社日立制造所, 日本), D3024R 台式高速冷冻型离心机 (大龙兴创实验仪器有限公司, 中国), Leica ASP300S 型全自动脱水机 (LEICA 公司, 德国), Leica RM2245 型半自动切片机 (LEICA 公司, 中国), Leica TS5015 型全自动染色机 (LEICA 公司, 德国), Olympus BX45 型光学显微镜 (Olympus 公司, 日本), DP72 型图像分析系统 (Olympus 公司, 日本), MZX81 立体荧光显微镜 (广州明美光电技术有限公司, 中国), 超低温冷冻存储箱 (长虹美菱有限公司, 中国), PVDF 膜 (ISEQ00010, Millipore, 美国), 3 MM 滤纸 (3030861, Whatman, 英国), TS-100 脱色摇床 (海门其林贝尔仪器制造公司), 电泳仪 (BG-subMIDI, 北京百晶生物技术有限公司), SDS-PAGE 电泳系统 (Bio-Rad, 美国), 凝胶成像系统 (GelDoc-It310, UVP, 美国), 化学发光成像系统 (ChemiScope6100, 上海勤翔科学仪器有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 MAP 对痔病模型的药效学实验

(1) 分组: 将 40 只 SPF 级 SD 大鼠按体重随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为对照组、模型组、地米组和贻贝组。

(2) 造模和给药: 在前期研究基础上采用优化方案造模<sup>[12]</sup>, 取直径合适的棉签浸泡于 6% 巴豆油混合液, 缓慢置入大鼠肛门直肠至合适的深度后停留 10 s, 抽出棉签均匀涂在肛周皮肤。对照组用橄榄油替代巴豆油。造模后 1 h, 每组大鼠经肛门直肠进行局部治疗, 疗程每天 1 次, 连续 3 d, 治疗时动物吸入 2% 异氟烷维持麻醉状态 2 h。对照组未接受治疗, 模型组给予空白凝胶基质, DXM 组给予复方醋酸地塞米松乳膏, MAP 组给予贻贝粘蛋白肛肠敷料。给药时采用 1 mL 去针头注射器, 将注射器插入大鼠肛门直

肠至 10 mm, 注射推注药物每只 200  $\mu$ L。

(3) 实验取材: 造模后 D4 解剖取材, 处死前 30 min 将 1% 的 EBD (2 mL/kg) 注入大鼠尾静脉。按优化方案取材, 取材前动物吸入过量 CO<sub>2</sub> 安乐处死, 处死后由同一操作者截取 8 mm 直肠作为标本, 部分标本取材迅速置于液氮中保存 3 h, 再移至 -80℃ 低温冰箱保存备用。眼眶取血约 1.5 mL, 保存至无菌采血管, 室温血液自然凝固 30 min, 4℃ 条件离心 10 min 左右 (3000 r/min), 仔细收集上清, 置于 -80℃ 低温冰箱保存备用。

(4) 大体观察: D4 各组大鼠称重, 观察粪便情况, 肛周皮肤及肛门直肠黏膜有无水肿、黏液、分泌物渗出情况。

(5) 黏膜肿胀抑制率: 采用 Image J 软件分析各组标本的照片, 测算 EBD 染色肿胀范围的面积, 分析比较各组肿胀情况, 肿胀抑制率 (%) = (对照组肿胀面积 - 实验组肿胀面积) / 对照组肿胀面积  $\times$  100%。

(6) 肛肠系数: 按标准取材后对每组动物标本进行湿重称重, 计算肛肠系数, 肛肠系数 (%) = 标本湿重 / 动物体重  $\times$  100%。

(7) 血管通透性的定量检测: 根据文献检测血管通透性的方法<sup>[17-18]</sup>, 标本置于含有甲酰胺 (1 mL / 100 mg) 的试管中, 在 55℃ 的水浴中孵育 24 h, 在室温下离心 15 min (5000 r/min), 收集上清液。酶标仪测定 620 nm 处吸光度, 计算组织中 EBD 渗出量, 定量评估血管通透性。

(8) Western Blot 检测: 蛋白提取, 组织加液氮进行匀浆, 4℃, 12 000 rpm, 15 min 离心, 收集上清; BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度, 将各个标准品和待测样品在 562 nm 处的吸光值减去空白标准品的平均吸光值。制备 SDS-PAGE 凝胶, 配制 5% 浓缩胶 4 mL, 凝胶板重新垂直放置, 插入样品梳, 玻璃夹板“凹”面贴紧电泳槽, 两侧用夹子固定电泳槽。加入总蛋白样品与蛋白质凝胶电泳上样缓冲液混合, 95℃ 变性 10 min, 电泳使染料至分离胶适当位置, 将蛋白条带通过转移电泳方式转印至 PVDF 膜。转膜时将样品胶与膜装入转膜夹板中, 放入含有转膜缓冲液的转移电泳槽中, 恒压状态下转膜 2 h。抗体孵育: 封闭: 小心取出转移膜置于封闭液中, 室温、摇床上缓慢摇动状态下封闭 1 h; 一抗反应: 将一抗用封闭液稀释; 将封闭后的膜分别加入对应的一抗工作液中, 4℃ 反应过夜。洗膜: 将反应膜放入平皿中,

用  $1 \times$  TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,洗净未结合的一抗;二抗反应:将二抗用 1 菌素  $\times$  TBST 稀释 300 倍;将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液中作用 60 min;洗膜:用  $1 \times$  TBST 洗膜,洗去游离二抗。按 1 : 1 (v/v) 混合 ECL 试剂盒中两种液体,将混合液均匀铺在 PVDF 膜表面,室温作用 4 min,抖掉膜上液体,放入成像系统成像,软件分析蛋白条带灰度值,计算样本组织蛋白相对含量。

(9) 酶联免疫法检测:通过 ELISA 法检测血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA 的表达含量,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

### 1.2.2 MAP 肠道黏附性的实验

制备 FITC-MAP 溶液,MAP 与 FITC 按 100 : 1 比例混合,4 $^{\circ}$ C 反应 24 h,避光保存待用。取 28 只 SPF 级 SD 大鼠按体重随机分为 3 组,分别为在体组 12 只,离体组 12 只,对照组 4 只。在体组大鼠以 2% 异氟烷吸入诱导麻醉,每只大鼠灌肠予以 FITC-MAP 溶液 (1 mg/mL,每只 1 mL),燕尾夹关闭肛门,分别于灌肠后 2、4、8、24 h 处死解剖取材,截取 4 cm 直肠作为标本,完成荧光成像观察。离体组大鼠麻醉后解剖,取直肠 8 cm,剥离周围脂肪及内容物,生理盐水冲洗后置入加湿的培养皿,取 4 cm 肠段处作

标记,远端燕尾夹关闭肛门,近端灌注 FITC-MAP 溶液 (1 mg/mL,每只 1 mL),标记处结扎,分别于灌注后 0、0.5、1、2 h 取标记段直肠为标本,完成荧光成像观察。对照组大鼠未进行任何干预,方法同前,取材后 0 h 对标本荧光成像观察。

### 1.3 统计学分析

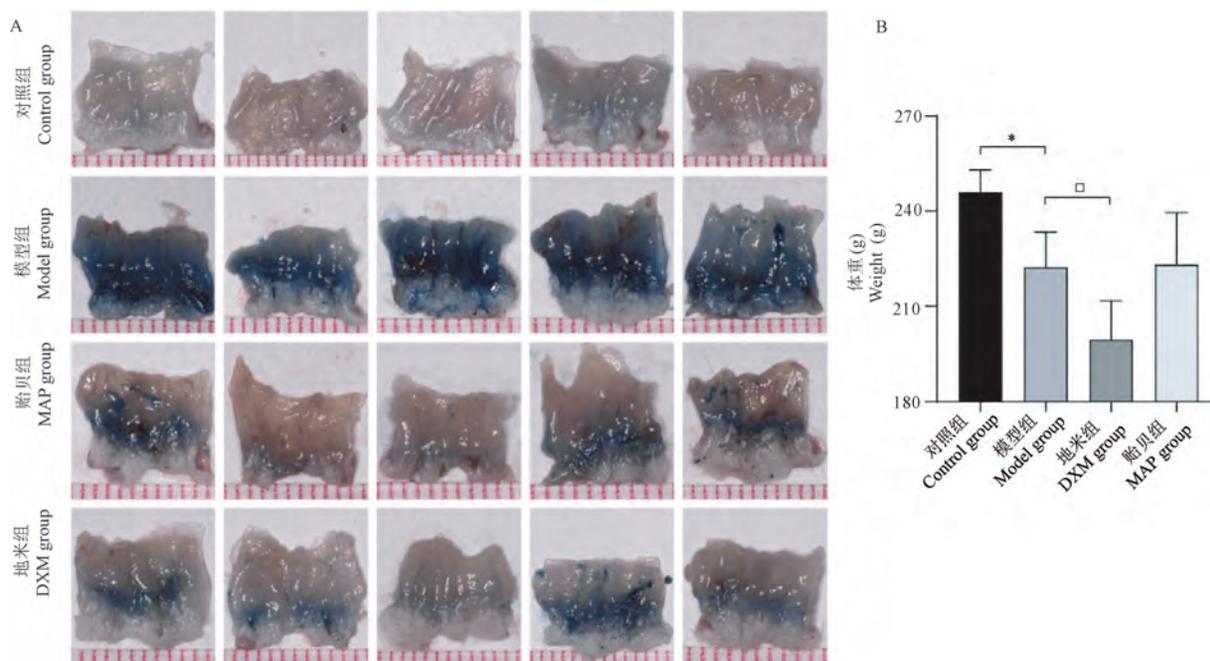
采用 SPSS 25.0 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行统计分析。测量数据均以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,进行正态性检验,组间比较采用单因素方差分析或非参数检验, $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 MAP 对大鼠痔病模型的药效学实验结果

#### 2.1.1 大体形态观察结果

各组动物取材后拍照记录,如图 1A 所示,观察肛肠黏膜可见痔病模型大鼠的肛周皮肤及直肠黏膜呈现不同程度的肛周肿胀、黏膜水肿、黏液分泌和血性渗出物。地米组大鼠体重明显减少,较其他实验组差异具有显著性 (图 1B,  $P < 0.05$ ),其他组体重无统计学差异。提示地米组和贻贝组病灶区域的病变程度均低于模型组,说明 MAP 可减轻肛门



注:A:各组肛门直肠黏膜大体形态观察;B:各组体重比较;与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ;与模型组相比,  $\square P < 0.05$ 。(下同)

图 1 大体形态观察结果

Note. A. Observation of the gross morphology of anorectal mucosa in each group. B. Weight comparison of each group. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with the model group,  $\square P < 0.05$ . (The same in the following figures)

Figure 1 Observation on gross morphology

直肠黏膜肿胀,促进损伤黏膜愈合,但 DXM 可引起体重下降。

2.1.2 黏膜肿胀抑制率结果

通过 Image J 软件分析标本照片,测算标本 EBD 染色肿胀范围的面积,结果可知地米组和贻贝组黏膜肿胀范围较对照组明显减少,差异具有显著性(图 2A,  $P < 0.01$ ),地米组肿胀抑制率 53.09%,贻贝组肿胀抑制率 36.08%,表明工具药 DXM 与 MAP 均能一定程度缓解巴豆油诱导的大鼠肛门直肠黏膜肿胀。

2.1.3 肛肠系数结果

各组肛肠系数的结果见图 2B 所示,与对照组比,模型组的肛肠系数明显增大( $P < 0.01$ ),表明模型组的肛门直肠黏膜的组织密度增加,黏膜水肿充血程度增加。与模型组比,地米组的肛肠系数显著降低( $P < 0.05$ ),表明地米组的肛门直肠黏膜的组

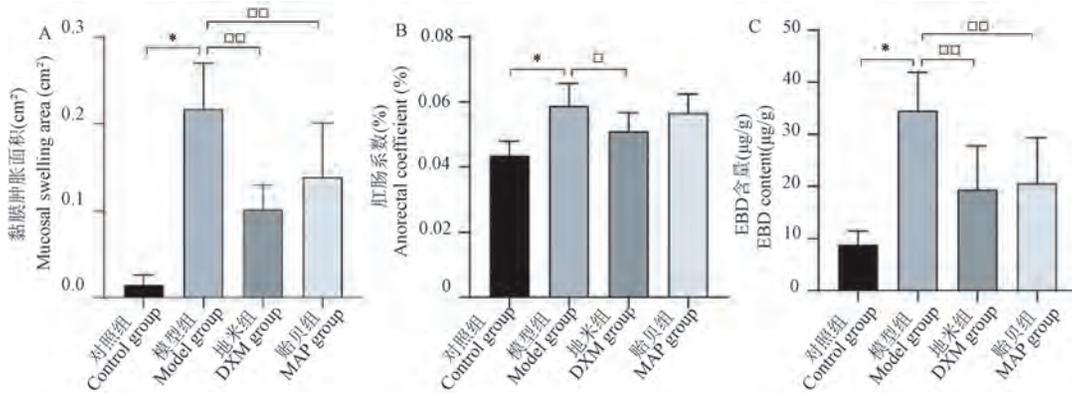
织密度降低,黏膜水肿充血程度降低,即动物模型差异具有显著性,模型建立成功。贻贝组的肛肠系数低于模型组,肛门直肠黏膜的水肿充血程度降低,说明 MAP 可一定程度上缓解模型病变。

2.1.4 血管通透性的定量检测结果

通过对各组 EBD 含量定量检测结果显示(图 2C),地米组和贻贝组的 EBD 含量均显著低于模型组( $P < 0.01$ ),这说明经肛门直肠局部外用 DXM 和 MAP 能显著降低模型病灶组织局部的血管通透性,且 MAP 的效力与 DXM 相当。

2.1.5 Western Blot 检测结果

Western Blot 显示,与对照组相比,模型组蛋白相对表达量差异具有显著性,与模型组相比,贻贝组、地米组蛋白相对表达量差异具有显著性(图 3,  $P < 0.05$ ),表明痔病模型大鼠局部治疗后,增加了黏蛋白 Muc2、Muc4 的相对表达量。

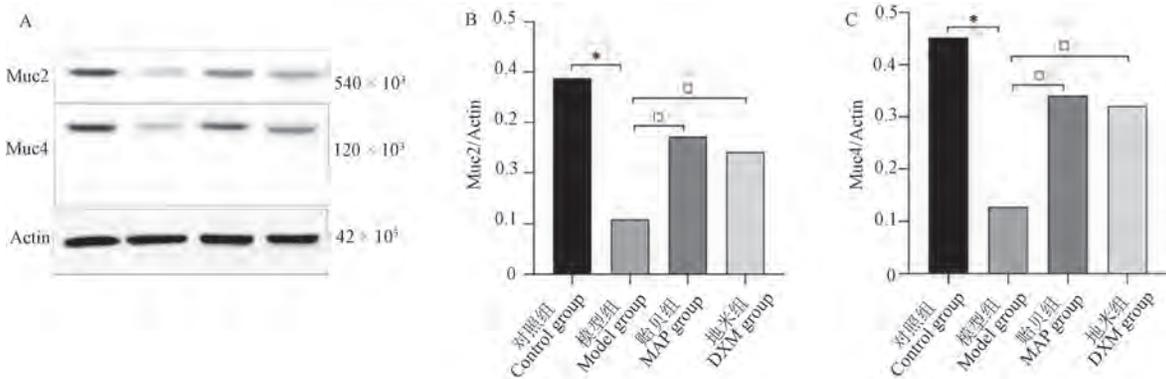


注:A:黏膜肿胀面积的比较;B:肛肠系数的比较;C:伊文思蓝含量的比较;与模型组相比,□□ $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 各组数据比较结果

Note. A. Comparison of mucosal swelling area. B. Comparison of anorectal coefficient. C. Comparison of EBD content. Compared with model group, □□ $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

Figure 2 Comparison results of each group of data



注:A: Muc2、Muc4 的表达;B: Muc2 的相对表达量;C: Muc4 的相对表达量。

图 3 各组 Muc 2、Muc 4 蛋白相对表达量的比较

Note. A. The expression of Muc2 and Muc4. B. The relative expression of Muc2. C. The relative expression of Muc4.

Figure 3 Comparison of relative expression levels of Muc2 and Muc4 proteins in each group

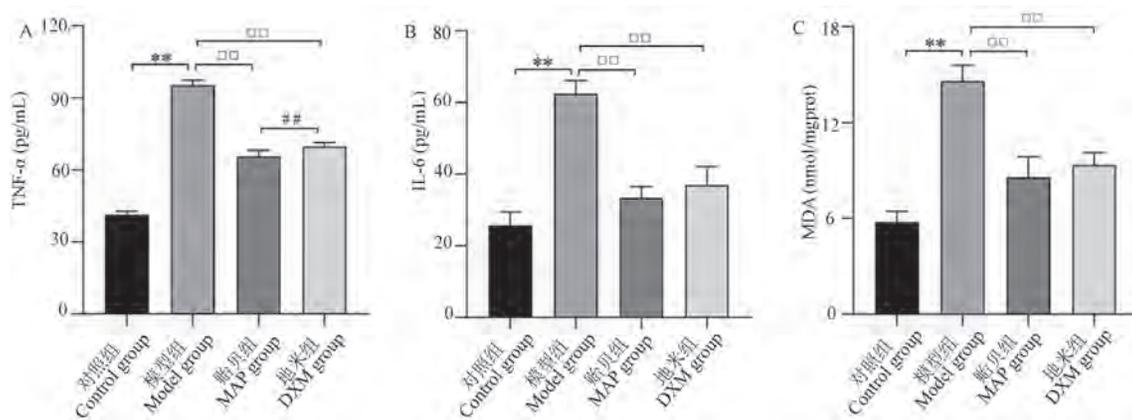
2.1.6 酶联免疫法检测检测结果

ELISA 的检测结果显示,痔病模型模型组血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA 表达量与对照组比差异具有显著性(图 4,  $P < 0.01$ ),模型组高于对照组,局部药物干预后与模型组相比,贻贝、地米组表达量下降,差异具有显著性(图 4,  $P < 0.01$ ),且与贻贝组相比,地米组 TNF- $\alpha$  表达量差异具有显著性(图 4,  $P < 0.01$ )。

2.2 MAP 肠道黏附性的评价结果

通过荧光显微镜观察 FITC-MAP 溶液灌注于大鼠直肠腔内的情况,并获取不同时间点在体和

离体大鼠直肠组织的荧光成像图像。FITC-MAP 溶液在荧光显微镜下显示为绿色,可作为 MAP 在直肠黏膜的黏附性和降解趋势的参考。在体组可见大鼠直肠的绿色荧光成像与时间呈正相关,提示 MAP 在大鼠肠腔环境内能保持良好的黏附性,且经肛门直肠用药后与直肠黏膜的作用时间可达 24 h(图 5)。离体组大鼠的直肠组织荧光成像结果显示,MAP 在离体直肠中也具有良好的稳定性。但是,对照组大鼠的直肠组织荧光成像几乎找不到荧光颜色(图 6)。



注:A:血清 TNF- $\alpha$  表达量;B:血清 IL-6 表达量;C:血清 MDA 表达量;与对照组相比, \*\*  $P < 0.01$ ;与贻贝组相比, ##  $P < 0.01$ 。

图 4 各组血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA 表达量的比较

Note. A. The expression of TNF- $\alpha$ . B. The expression of IL-6. C. The expression of MDA. Compared with the control group, \*\*  $P < 0.01$ . Compared with the MAP group, ##  $P < 0.01$ .

Figure 4 Comparison of serum TNF- $\alpha$ , IL-6 and MDA expression levels in each group

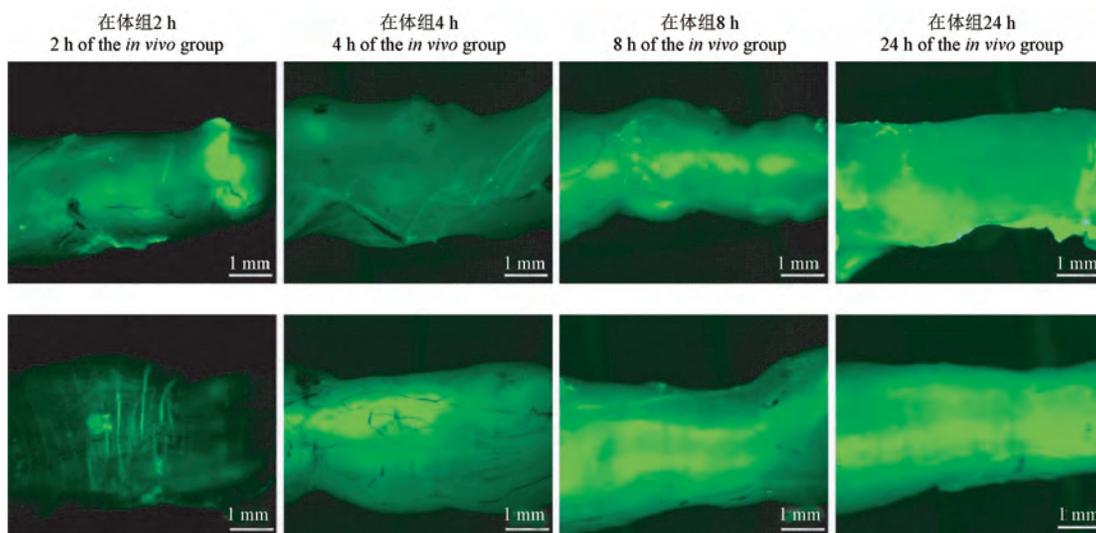


图 5 在体组荧光成像

Figure 5 Fluorescence imaging in the in vivo group

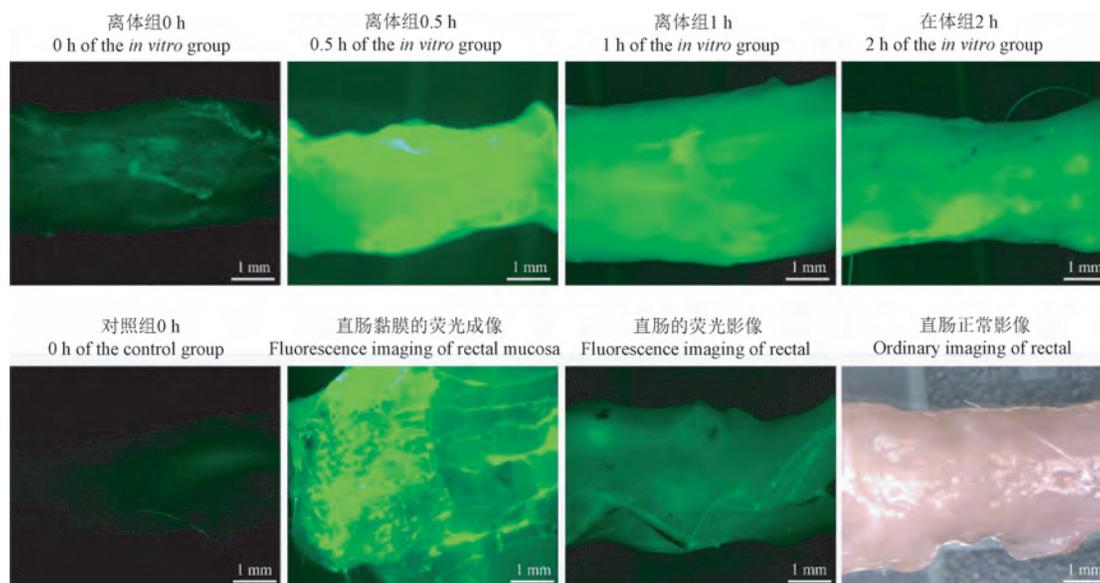


图 6 离体组和对照组的荧光成像

Figure 6 Fluorescence imaging in the *in vitro* group and control group

### 3 讨论

痔病的症状多表现为肛垫的充血、肿胀、糜烂、出血、分泌物增多等现象,痔病发生部位即肛垫黏膜区,黏膜上皮是包含多种功能的上皮细胞复合体,黏膜表层有大量分泌功能的黏液分泌细胞,如杯状细胞、柱状细胞等,可分泌黏蛋白、黏多糖、糖原等防御功能物质,共同构成黏液屏障,黏附有害物质,阻止微生物入侵。肛垫黏膜的细胞结构决定了其不仅有重要防御功能,当致病因子突破肛垫黏膜屏障时会引起局部组织的神经激素内分泌调节障碍,痔血管出现扩张,毛细血管的通透性增加,肛垫黏膜水肿、充血、损伤,局部感染出现炎症,导致症状性痔出现。因此,肛垫黏膜屏障功能的完整与修护在痔病的防治中具有重要意义。

本研究采取巴豆油刺激大鼠肛门直肠黏膜产生炎症反应诱导大鼠痔病模型<sup>[19]</sup>,损伤局部毛细血管壁,破坏血管内皮屏障,增加血管通透性,引起组织损伤血浆渗出,这一过程降低了血浆胶体渗透压,促进更多组织液滤出毛细血管,累积于间质间隙,发生组织水肿、黏膜充血,由此模型大鼠的肛门直肠黏膜组织呈明显肿胀<sup>[20]</sup>。因此,定量评估血管通透性的变化是该实验模型的关键。Azeemuddin 等<sup>[19]</sup>报道了一种利用 EBD 外渗技术定量检测血管通透性的方法<sup>[21]</sup>,于巴豆油造模前 30 min 尾静脉注射 EBD,灌胃给药 5 d 后处死动物,再评价组织中 EBD 含量。笔者对 EBD 的使用方法进行优化,选择

治疗 3 d 后动物处死前 30 min 尾静脉注射 EBD。定量检测结果更直接反映不同疗法对动物血管通透性变化的影响,同时规避造模及给药操作等人为因素对 EBD 渗出的干扰,保障实验数据精准,为模型评价提供精确定量指标。局部给药时采取 2% 异氟烷吸入诱导麻醉,使动物维持一定时间麻醉静息状态,确保药物制剂经肛门直肠用药后在体内的有效及起效时间,降低排便频率差异对疗效评价的影响。目前还没有公认的阳性药物用于评价该模型的建立,巴豆油诱导的大鼠痔病模型具有炎症性模型特征,因此以经典抗炎药物 DXM 为工具药,用于评价模型建立<sup>[22]</sup>。实验发现连续应用 DXM 可引发大鼠体重明显下降,尽管其能够降低局部血管通透性,抗炎疗效明显,但糖皮质激素药物存在一定安全性问题,不适合长期应用。

脏器系数又称脏体比,是某器官的重量与体重的重量之比,脏器系数的增加表明该器官可能发生充血、水肿、增生肥大等病变<sup>[18]</sup>。在这项研究中,肛门直肠组织不是一个完整的器官,而是直肠末端的一部分,截取标本时操作误差可能对肛肠系数的精度产生一定影响,半定量评价指标肛肠系数可从一定程度反映疗效。黏膜上皮细胞分泌的黏液主要来自杯状细胞等分泌细胞,对维持黏膜屏障功能有重要作用,形成黏液的主要蛋白是 Muc2、Muc4<sup>[23-24]</sup>,属于分泌型黏蛋白,能够促进上皮细胞的受损部位愈合,促进黏膜修复。机体内自由基作用于脂质发生过氧化反应,氧化终产物为 MDA,其

含量反映的是机体抗氧化潜在能力的重要参数,可以反映机体脂质过氧化速率和强度,间接反映组织过氧化损伤程度。

MAP 是一种基于海洋生物贻贝足丝腺黏附机制开发的仿生物材料,已广泛应用外科、妇产科、烧伤整形科、皮肤科、激光美容等多个领域<sup>[13-14]</sup>,表现出良好的局部抗炎和促进愈合功效<sup>[15,25]</sup>。本实验评价了 MAP 对痔病大鼠模型的治疗效果及黏膜的修复情况,经大体观察、肛肠系数、血管通透性比较、Western Blot、ELISA 法检测发现 MAP 在复杂的直肠环境中可保持长期黏附,不受排便等因素影响,保证了 MAP 与肛肠黏膜有效接触面积和起效时间,局部外用可造成大鼠直肠黏膜中黏蛋白 Muc2 和 Muc4 蛋白相对表达量增加,炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6,黏膜修复相关因子 MDA 的表达量下降,MAP、DXM 均可一定程度改善模型大鼠的病变,缓解肛周肿胀、黏膜水肿充血,促进黏膜创面愈合。MAP 具有生物黏附剂给药系统的相似特性<sup>[26]</sup>,在不稳定的直肠环境中发挥优势。MAP 含有 20% 的赖氨酸,使蛋白质具有较高的正电荷,并通过静电作用与细胞紧密快速结合。MAP 中含有的 3,4 二羟基苯丙氨酸(DOPA)可被氧化生成邻二醌,与未氧化的多巴交联形成网状生物支架,促进细胞黏附和爬行,促进直肠黏膜组织再生和修复。交联的 MAP 可通过静电相互作用与覆盖在肠上皮细胞表面的黏蛋白结合<sup>[27]</sup>,黏蛋白、黏多糖是具有重要防御功能的物质,形成直肠黏膜屏障功能,可有效阻止微生物、微粒和大分子入侵。黏蛋白由高分子量丝状糖蛋白组成,与 MAP 的化学结构和功能上有相似之处,MAP 可以取代受损黏蛋白修复结直肠上皮细胞,恢复细胞间的紧密连接<sup>[28]</sup>,恢复直肠黏膜屏障功能的完整性,减少对黏膜上皮细胞的持续炎症刺激<sup>[29]</sup>。MAP 具有较强的抗氧化能力<sup>[30]</sup>,可保护组织免受内部氧化应激的损伤,通过与硫化氢反应,保护黏蛋白的二硫键不被破坏,维持和恢复黏液层的完整性,中和各种氧自由基,起到抗炎修复作用。

综上所述,本研究评价了 MAP 对大鼠痔病模型肛门直肠黏膜肿胀的治疗效果,研究结果表明,MAP 能够减轻大鼠肛门直肠黏膜肿胀、增加黏膜黏蛋白表达、抑制炎症、修复黏膜屏障、促进黏膜愈合、改善痔病大鼠模型症状,同时证实其在直肠复杂环境中的良好黏附性,为痔病药物的临床前药理药效研究提供可靠方法。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] Thomson WH. The nature of haemorrhoids [J]. Brit J Surg, 2010, 62(7): 542-552.

- [2] Thomson WH. The nature and cause of haemorrhoids [J]. Proc R Soc Med, 1975, 68(9): 574-575.

- [3] Gallo G, Martellucci J, Sturiale A, et al. Consensus statement of the Italian society of colorectal surgery (SICCR): management and treatment of hemorrhoidal disease [J]. Tech Coloproctol, 2020, 24(2): 145-164.

- [4] Yamana T. Japanese practice guidelines for anal disorders I. hemorrhoids [J]. J Anus Rectum Colon, 2017, 1(3): 89-99.

- [5] 范干一, 田茂生. 痔上黏膜套扎术加外痔切除术治疗重度混合痔临床疗效观察 [J]. 中国药物与临床, 2020, 20(17): 2880-2881.

- Fan GY, Tian MS. Clinical effect of hemorrhoidal mucosal ligation combined with external hemorrhoidectomy for severe mixed hemorrhoids [J]. Chin Reme Clin, 2020, 20(17): 2880-2881.

- [6] Davis BR, Lee-Kong SA, Migaly J, et al. The American society of colon and rectal surgeons clinical practice guidelines for the management of hemorrhoids [J]. Dis Colon Rectum, 2018, 61(3): 284-292.

- [7] Hua S. Physiological and pharmaceutical considerations for rectal drug formulations [J]. Front Pharmacol, 2019, 13(10): 1196.

- [8] 钱伯初, 史红, 郑晓亮. 痔疮动物模型制作方法研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(2): 119-122.

- Qian BC, Shi H, Zheng XL. Progress in preparation methodology of animal models of hemorrhoids [J]. Chin J Comp Med, 2007, 17(2): 119-122.

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

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

- [10] 马宗国, 江南, 余梦瑶, 等. 痔疮动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(5): 446-450.

- Ma ZG, Jiang N, Yu MY, et al. Research progress of animal models of hemorrhoids [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(5): 446-450.

- [11] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 中药痔疮动物模型制备规范(草案) [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(5): 211-212.

- Chinese Medicine Association of Chinese Medicine Experimental Pharmacology Professional Committee. Preparation specification for animal model of traditional Chinese medicine hemorrhoids (Draft) [J]. Pharm Clin Chin Med, 2017, 33(5): 211-212.

- [12] 田茂生, 戚文月, 刘朝阳, 等. 痔病相似症状定量评估模型的实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 5237-5240.

- Tian MS, Qi WY, Liu ZY, et al. Experimental study on quantitative evaluation model of similar symptoms of hemorrhoids [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(10): 5237-5240.

- [13] 高敏, 张长虹, 周俊, 等. 贻贝粘蛋白综述 [J]. 安徽农业科

- 学, 2011, 39(32): 19860–19862.
- Gao M, Zhang CH, Zhou J, et al. Overview of mussel adhesive protein [J]. J Anhui Agri Sci, 2011, 39(32): 19860–19862.
- [14] Lee BP, Messersmith PB, Israelachvili JN, et al. Mussel-inspired adhesives and coatings [J]. Annu Rev Mater Res, 1989, 41(1): 99–132.
- [15] Liu ZQ, Jiang M, Zhao JM, et al. Efficacy of a wound-dressing biomaterial on prevention of postinflammatory hyperpigmentation after suction blister epidermal grafting in stable vitiligo patients: a controlled assessor-blinded clinical study with *in vitro* bioactivity investigation [J]. Arch Dermatol Res, 2020, 312(9): 635–645.
- [16] Waite JH, Tanzer ML. Polyphenolic substance of mytilus edulis: novel adhesive containing L-dopa and hydroxyproline [J]. Science, 1981, 212(4498): 1038–1040.
- [17] Radu M, Chernoff J. An *in vivo* assay to test blood vessel permeability [J]. J Vis Exp, 2013, 16(73): e50062.
- [18] Schoeffner DJ, Warren DA, Muralidara S, et al. Organ weights and fat volume in rats as a function of strain and age [J]. J Toxicol Environ Health A, 1999, 56(7): 449–462.
- [19] Azeemuddin M, Viswanatha GL, Rafiq M, et al. An improved experimental model of hemorrhoids in rats: evaluation of antihemorrhoidal activity of an herbal formulation [J]. ISRN Pharmacol, 2014, 11(4): 530931.
- [20] Faujdar S, Sati B, Sharma S, et al. Phytochemical evaluation and anti-hemorrhoidal activity of bark of *Acacia ferruginea* DC [J]. J Tradit Complement Med, 2018, 9(2): 85–89.
- [21] Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, et al. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation [J]. Expert Rev Mol Med, 2009, 11: e19.
- [22] Waldron NH, Jones CA, Gan TJ, et al. Impact of perioperative dexamethasone on postoperative analgesia and side-effects: systematic review and meta-analysis [J]. Br J Anaesth, 2013, 110(2): 191–200.
- [23] Larsson JM, Karlsson H, Crespo JG, et al. Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation [J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(11): 2299–2307.
- [24] Bankole E, Read E, Curtis MA, et al. The relationship between mucins and ulcerative colitis: a systematic review [J]. J Clin Med, 2021, 10(9): 1935.
- [25] Xiao CM. Rationalizing the development of biomaterials with a new way of thinking [J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(11): 864–866.
- [26] Gong C, Lu CC, Li BQ, et al. Injectable dopamine-modified poly( $\alpha$ , $\beta$ -aspartic acid) nanocomposite hydrogel as bioadhesive drug delivery system [J]. J Biomed Mater Res A, 2017, 105(4): 1000–1008.
- [27] Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(33): 6016–6029.
- [28] Sheng YH, Hasnain SZ, Florin TH, et al. Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(1): 28–38.
- [29] Keane TJ, Dziki J, Sobieski E, et al. Restoring mucosal barrier function and modifying macrophage phenotype with an extracellular matrix hydrogel: potential therapy for ulcerative colitis [J]. J Crohns Colitis, 2017, 11(3): 360–368.
- [30] 柯林楠, 汤京龙, 宋茂谦, 等. 贻贝粘蛋白中多巴氧化还原状态表征方法研究 [J]. 中国医疗器械杂志, 2018, 42(5): 365–367.
- Ke LN, Tang JL, Song MQ, et al. Study on the 3, 4-dihydroxyphenylalanine redox state characterization method of mussel adhesive protein [J]. Chin J Med Instrum, 2018, 42(5): 365–367.

[收稿日期] 2021–11–29

李惠,郭文文,王荟荟,等. 抗PD-1单抗联合顺铂的新辅助治疗策略对NSCLC人源化小鼠模型肿瘤复发与转移的影响[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 751-758.

Li H, Guo WW, Wang HH, et al. Neoadjuvant treatment strategy by anti-PD-1 immunotherapy combined with cisplatin inhibits recurrence and metastasis of NSCLC in a humanized mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 751-758.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.003

# 抗PD-1单抗联合顺铂的新辅助治疗策略对NSCLC人源化小鼠模型肿瘤复发与转移的影响

李惠<sup>1,2</sup>, 郭文文<sup>2</sup>, 王荟荟<sup>2,3</sup>, 秦靖<sup>2</sup>, 张彩勤<sup>2</sup>, 赵菊梅<sup>1\*</sup>, 师长宏<sup>2\*</sup>

(1. 延安大学基础医学院, 陕西 延安 716000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 3. 甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730030)

**【摘要】** 目的 利用人源化小鼠模型探讨抗PD-1单抗联合顺铂的新辅助治疗策略对人非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)术后复发与转移的影响。方法 选择重度联合免疫缺陷小鼠NCG,通过序贯移植人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)和人非小细胞肺癌细胞的方法,构建免疫系统-肿瘤双人源化NSCLC小鼠移植模型;评估不同新辅助治疗策略的疗效,包括顺铂治疗、抗PD-1单抗(帕博利珠单抗)治疗以及联合治疗;通过小动物活体成像观察各治疗组小鼠术后肿瘤复发与转移情况;通过免疫组化分析肿瘤组织中Ki67的表达,观察肿瘤细胞增殖情况;利用免疫荧光分析肿瘤免疫微环境的变化。结果 成功构建了免疫系统-肿瘤双人源化NSCLC小鼠模型,重建小鼠外周血、各脏器以及肿瘤组织中均有人免疫细胞的浸润;活体成像结果显示新辅助抗PD-1单抗治疗能抑制肿瘤的复发及转移,联合治疗组效果最为显著;免疫组化结果显示联合治疗组中小鼠肿瘤组织Ki67表达明显降低;免疫荧光结果表明帕博利珠单抗治疗可增加肿瘤组织中CD45<sup>+</sup>免疫细胞、CD8<sup>+</sup>免疫细胞的浸润,联合治疗后CD45<sup>+</sup>免疫细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞的浸润更为明显;此外,颗粒酶B(granzyme B, GzmB)在CD8<sup>+</sup>T细胞杀伤肿瘤中发挥重要作用,免疫组织化学染色结果显示帕博利珠单抗治疗可增加肿瘤组织中granzyme B的浸润,联合治疗后granzyme B阳性细胞的浸润更为明显。结论 新辅助帕博利珠单抗联合顺铂有效提高了人源化小鼠免疫系统杀伤NSCLC的能力,显著抑制了NSCLC的复发和转移。

**【关键词】** 人源化小鼠模型;非小细胞肺癌;新辅助治疗;帕博利珠单抗;顺铂

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)06-0751-08

## Neoadjuvant treatment strategy by anti-PD-1 immunotherapy combined with cisplatin inhibits recurrence and metastasis of NSCLC in a humanized mouse model

LI Hui<sup>1,2</sup>, GUO Wenwen<sup>2</sup>, WANG Huihui<sup>2,3</sup>, QIN Jing<sup>2</sup>, ZHANG Caiqin<sup>2</sup>, ZHAO Jumei<sup>1\*</sup>, SHI Changhong<sup>2\*</sup>

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China. 2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032. 3. School of Basic Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730030)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn; ZHAO Jumei. E-mail: jzm2003.stu@163.com

**【基金项目】** 国家自然科学基金(32070532),陕西省创新能力支撑计划(2021PT-054,2021PT-037)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(32070532), Innovation Capability Support Plan of Shaanxi Province(2021PT-054, 2021PT-037).

**【作者简介】** 李惠(1994—),女,硕士,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。Email: 1228559790@qq.com

**【通信作者】** 师长宏(1973—),男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn;

赵菊梅(1970—),女,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。Email: jzm2003.stu@163.com。

\* 共同通信作者

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of a neoadjuvant treatment strategy of an anti-PD-1 monoclonal antibody combined with cisplatin on postoperative recurrence and metastasis of non-small cell lung cancer (NSCLC) in a humanized mouse model. **Methods** Human peripheral blood mononuclear cells and human NSCLC cells were sequentially transplanted into the severe combined immunodeficiency mouse (NOD/ShiLtJGpt-Prkdc<sup>em26Cd52</sup>Il2rg<sup>em26Cd22</sup>/Gpt, NCG) to establish an immune system-tumor double humanized NSCLC model. We evaluated the treatment effect of various neoadjuvant strategies in the double humanized NSCLC model, including cisplatin, anti-PD-1 (pembrolizumab), and combined treatments. Tumor recurrence and metastasis were observed by optical imaging. Ki67 expression in tumor tissue was analyzed by immunohistochemistry to assess tumor cell proliferation. Changes in the tumor immune microenvironment were detected by immunofluorescence. **Results** The double humanized NSCLC model was successfully established. Immune cells had infiltrated into peripheral blood, organs, and tumors. Optical imaging showed that neoadjuvant anti-PD-1 treatment inhibited tumor recurrence and metastasis, and the effect of combined treatment was more obvious. Moreover, combination treatment significantly decreased Ki67 expression in tumor tissues. Large numbers of CD8<sup>+</sup> and CD45<sup>+</sup> cells in tumors were observed after anti-PD-1 treatment, and many more CD8<sup>+</sup> and CD45<sup>+</sup> T cells were found in the combined therapy group. Granzyme B plays an important role in tumor killing by CD8<sup>+</sup> T cells. Immunohistochemical staining showed that anti-PD-1 treatment increased granzyme B in tumor tissues, which was more obvious after combined treatment. **Conclusions** Neoadjuvant pembrolizumab combined with cisplatin effectively improves the anti-tumor effect in humanized mice and significantly inhibits tumor recurrence and metastasis.

**【Keywords】** humanized mouse model; non-small cell lung cancer; neoadjuvant therapy; pembrolizumab; cisplatin  
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肺癌是目前世界范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,2020 年全球新发肺癌患者约 220 万例,死亡 180 万例,其中 NSCLC 占比为 80% ~ 85%<sup>[1]</sup>。早期和部分晚期 NSCLC 的治疗以根治性手术为主,手术虽能带来一定的控制效果,但局部复发和远处转移率高达 30% ~ 55%<sup>[2-3]</sup>。因此,寻找有效减少术后风险的围手术期治疗方案是当前可切除 NSCLC 治疗亟待解决的问题之一。

新辅助化疗是指在实施局部治疗方法(如手术)前所做的全身治疗<sup>[4]</sup>。手术前进行基于铂类的新辅助化疗是早期 NSCLC 临床常用治疗策略,与单纯手术相比,新辅助化疗能够改善患者的围手术期状况,包括降低肿瘤分期,提高完全切除率和消除微转移灶等。但 Felip 等<sup>[5]</sup>发现无论是术前新辅助化疗还是术后辅助化疗,较单纯手术相比,NSCLC 的 5 年生存率仅能提高约 5%。另一方面,以免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICIs)为代表的免疫治疗极大改善了包括 NSCLC 在内的多种肿瘤的治疗效果<sup>[6]</sup>,且 ICIs 与化疗的结合能够进一步扩大晚期 NSCLC 的获益人群<sup>[7-8]</sup>。鉴于免疫治疗与化疗联合治疗的成功应用,能否将这种联合治疗方案应用于可切除 NSCLC 的新辅助治疗值得关注。目前,关于新辅助 ICIs 联合化疗的最优治疗方案以及对术后复发转移的直接影响尚未有研究报告,其对肿瘤免疫微环境的影响也未充分阐明。

且近年来新辅助免疫治疗研究使用的模型都是鼠源性实验<sup>[9]</sup>,缺乏说服力。因此,采用能够模拟人体肿瘤免疫微环境的临床前动物模型来进行新辅助联合治疗的研究显得至关重要。

通过在重度联合免疫缺陷小鼠中移植人的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),进而重建人的免疫系统,获得 Hu-PBMC (Humanized-peripheral blood mononuclear cells) 模型,在 ICIs 评估方面具有独特的应用前景<sup>[10]</sup>。本研究在成功构建 Hu-PBMC 模型的基础上,进一步移植人的 NSCLC 细胞,构建了免疫系统-肿瘤双来源化非小细胞肺癌移植模型,然后进行了顺铂、帕博利珠单抗以及二者联合的新辅助治疗研究,以期为 NSCLC 的临床新辅助治疗提供有效策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

40 只 4 ~ 7 周龄 SPF 级雌性重度联合免疫缺陷小鼠(NOD/ShiLtJGpt-Prkdc<sup>em26Cd52</sup>Il2rg<sup>em26Cd22</sup>/Gpt, NCG),体重(22 ± 2)g,购自成都药康生物科技有限公司【SCXK(川)2020-034】。室温(22 ± 2)℃,相对湿度 40% ~ 70%,明暗交替,光照 12 h/12 h,饮用水经过高压蒸汽灭菌,自由饮水、摄食,饲养于空军军医大学实验动物中心 SPF 级屏障设施【SYXK

【陕】2019-001】。相关动物实验获得了空军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(No. 19013)。

### 1.1.2 细胞

人非小细胞肺癌细胞株 H1299 购买于 ATCC, 并通过慢病毒转染标记荧光素酶(H1299-luc), 保存于本实验室。该细胞培养于 RPMI-1640 培养基(10%胎牛血清 + 1%青链霉素), 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养。

### 1.1.3 主要试剂与仪器

新鲜外周血取自空军军医大学第一附属医院输血科, 并获得医学伦理委员会批准(KY20193035); 胎牛血清、RPMI-1640 培养基和 0.05% 胰酶购自美国 Gibco 公司; 人 Ficoll-Paque™ PREMIUM 1.084 sterile solution 试剂购自美国 GE Healthcare; 小鼠淋巴细胞分离液试剂购自中国天津市灏洋生物科技有限公司; 抗人流式检测抗体: FITC-CD45 抗体、PE-CD3e 抗体购自美国 BD Biosciences 产品; IHC 试剂盒购自康为世纪有限公司; 抗人 CD45、CD8、Ki67 和 GzmB 抗体购于美国 Abcam; 顺铂购自中国齐鲁制药有限公司; 帕博利珠单抗购自美国默沙东公司。流式细胞分析仪 FC500 购自美国贝克曼库尔特有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 人源化 NSCLC 小鼠模型的构建及鉴定

采用 Ficoll 密度梯度离心法提取不同供体的新鲜 PBMC, 通过尾静脉注射入小鼠体内, 细胞量为每只  $1 \times 10^7$  PBMC。PBMC 移植 2 周后, 将对数生长期的 H1299-luc 细胞系接种于小鼠皮下, 细胞量为每只  $5 \times 10^6$  个 H1299-luc 细胞。移植 3 周后采用剪尾法取重建小鼠静脉血, 并分离出 PBMC, 加入抗人 CD3<sup>+</sup> T 细胞、CD45<sup>+</sup> 免疫细胞荧光抗体进行标记, 采用流式分析评估重建小鼠外周血中人免疫细胞的比例, FlowJo 10 软件进行数据分析。

### 1.2.2 免疫组化染色检测小鼠肝、肺、脾以及肿瘤中人免疫细胞的比例

CO<sub>2</sub> 安乐死重建小鼠和未重建小鼠, 收集其肝、肺、脾以及肿瘤组织, 固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 制备组织切片, 经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、抗原修复后, 滴加一抗(抗人 CD45 和抗人 GzmB), 4℃ 孵育过夜。次日滴加二抗, DAB 显色后苏木精复染, 经梯度乙醇与二甲苯脱水后封片, 光学显微镜采图, 并用 Image-Pro Plus 软件进行定量分析。

### 1.2.3 新辅助治疗策略

H1299-luc 皮下移植后, 每周 2 次动态监测小鼠肿瘤体积  $ab^2/2$  (a 为长径, b 为短径), 在皮下肿瘤达到 150 ~ 200 mm<sup>3</sup> 时, 将小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 并开始新辅助治疗: (1) 对照组, PBS, 静脉注射, 5 d 2 次; (2) 新辅助帕博利珠单抗组, 20 mg/kg, 静脉注射, 5 d 2 次; (3) 新辅助顺铂组, 3 mg/kg, 腹腔注射, 5 d 2 次; (4) 新辅助帕博利珠单抗联合顺铂组, 同时给药, 用药剂量及次数同上。

### 1.2.4 免疫荧光观察肿瘤组织中 CD45<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 浸润情况

将肿瘤组织用多聚甲醛溶液固定, 并进行石蜡包埋切片, 经脱蜡覆水、抗原修复、BSA 封闭后, 孵育一抗 Anti-CD45 抗体、Anti-CD8 抗体、DAPI 进行细胞核染色, 4℃ 孵育过夜后加入荧光二抗, 避光孵育 1 h, 加抗荧光衰减剂封片后置 4℃ 保存, 荧光显微镜下观察拍片, 并用 Image-Pro Plus 软件进行定量分析。

### 1.2.5 小动物活体成像系统 (*in vivo* imaging system, IVIS)

治疗结束后, 通过切除小鼠的皮下原发肿瘤来模拟临床手术以及观察术后肿瘤的复发与转移。小鼠腹腔注射 200 μL 15 mg/mL 荧光素 (luciferin), 经过异氟烷气麻后仰卧放入成像暗箱平台, 采用 IVIS 系统 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) 进行光学成像, 其生物发光强度用光子  $p/(\text{sec} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr})$  表示。待小鼠出现明显衰竭症状后处死小鼠, 解剖观察各脏器转移灶, 并立即用 IVIS 检测离体组织中的肿瘤转移灶信号。使用了版本为 Living Image 4.7.3 软件获取和分析数据。

## 1.3 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计学分析, 结果用平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组间比较采用非配对 *t* 检验法进行差异分析,  $P < 0.05$  为具有统计学意义; 多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

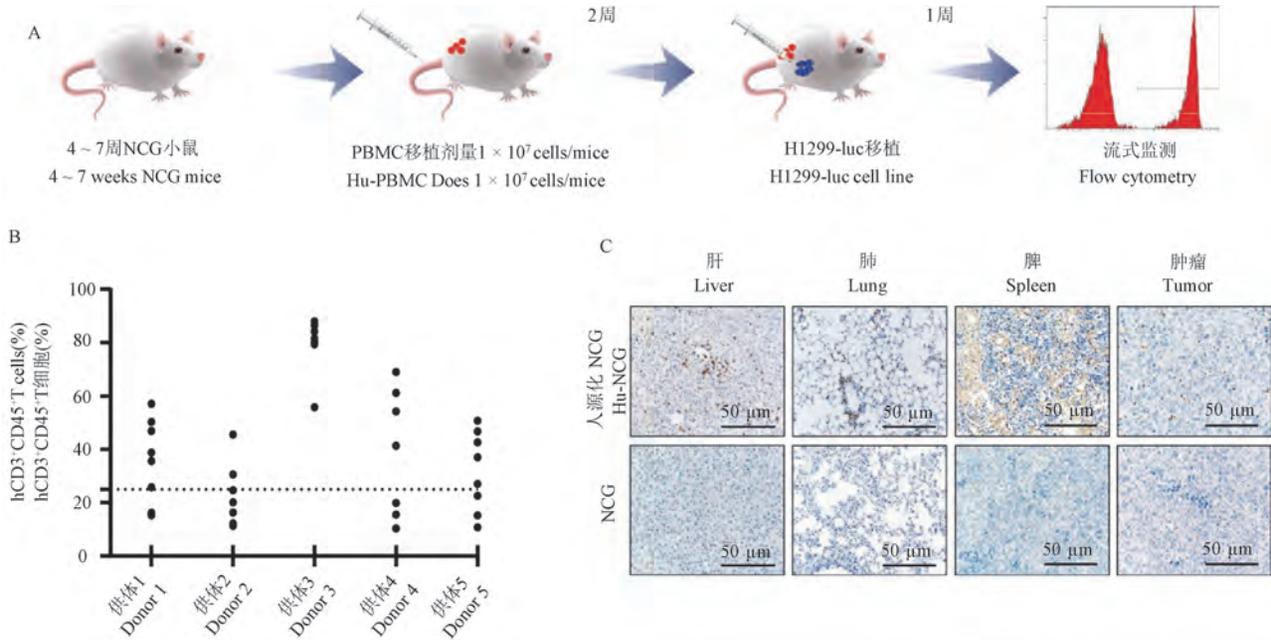
## 2 结果

### 2.1 成功构建人源化的非小细胞肺癌小鼠模型

本实验免疫系统-肿瘤双人源化模型的构建策略如图 1A 所示。人新鲜外周血中的 PBMCs 移植 3 周后检测小鼠外周血中人 CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T 细胞含量,

如图 1B 所示,来自不同供体的不同小鼠外周血中  $CD45^+CD3^+$  T 细胞比例不同,大于 25% 时标志着免疫系统人源化小鼠构建成功<sup>[10]</sup>。免疫组化结果如图 1C,未重建小鼠脾、肝、肺以及肿瘤中没有免疫细

胞浸润,而免疫系统重建小鼠的脾、肝、肺以及肿瘤中均有  $hCD45^+$  免疫细胞浸润,其中脾中  $hCD45^+$  免疫细胞浸润最为明显,说明人免疫细胞可以浸润小鼠各脏器以及肿瘤中。



注:A:免疫系统-肿瘤双人源化模型的构建策略;B:不同小鼠外周血中  $CD3^+CD45^+$  T 细胞重建水平;C:小鼠肝、肺、脾以及肿瘤中  $hCD45^+$  免疫细胞染色。

图 1 免疫系统人源化小鼠模型的构建及鉴定

Note. A. Construction strategy of immune system-tumor dual-humanization model. B. The proportion of  $CD3^+CD45^+$  T cells in peripheral blood of different mice. C. IHC of  $hCD45^+$  cells in liver, lung, spleen and tumor of mice.

Figure 1 Construction and identification of humanized mouse model of immune system

## 2.2 新辅助联合治疗能够明显抑制术后肿瘤的复发和转移

模型构建成功后,新辅助治疗策略如图 2A 所示。新辅助治疗结束后连续成像至术后第 12 天,顺铂组较对照组无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),帕博利珠单抗单药组荧光信号弱与对照组、顺铂单药组;与帕博利珠单抗单药组相比,联合治疗组信号更弱 ( $P < 0.05$ ),如图 2B,2C。IVIS 成像及肉眼观察术后第 12 天的小鼠肝、肺,结果如图 2D,2E,联合治疗组中小鼠的肝、肺转移灶的数量明显少于与对照组中小鼠的肝、肺转移灶的数量,与上述的活体成像结果一致。说明新辅助联合治疗能够明显抑制术后的脏器转移。

## 2.3 新辅助治疗对肿瘤 Ki67 的影响

免疫组化结果如图 3A,3B,四组小鼠肿瘤组织中 Ki67 表达的比较,有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。顺铂单药组肿瘤组织 Ki67 表达与对照组小鼠无显著

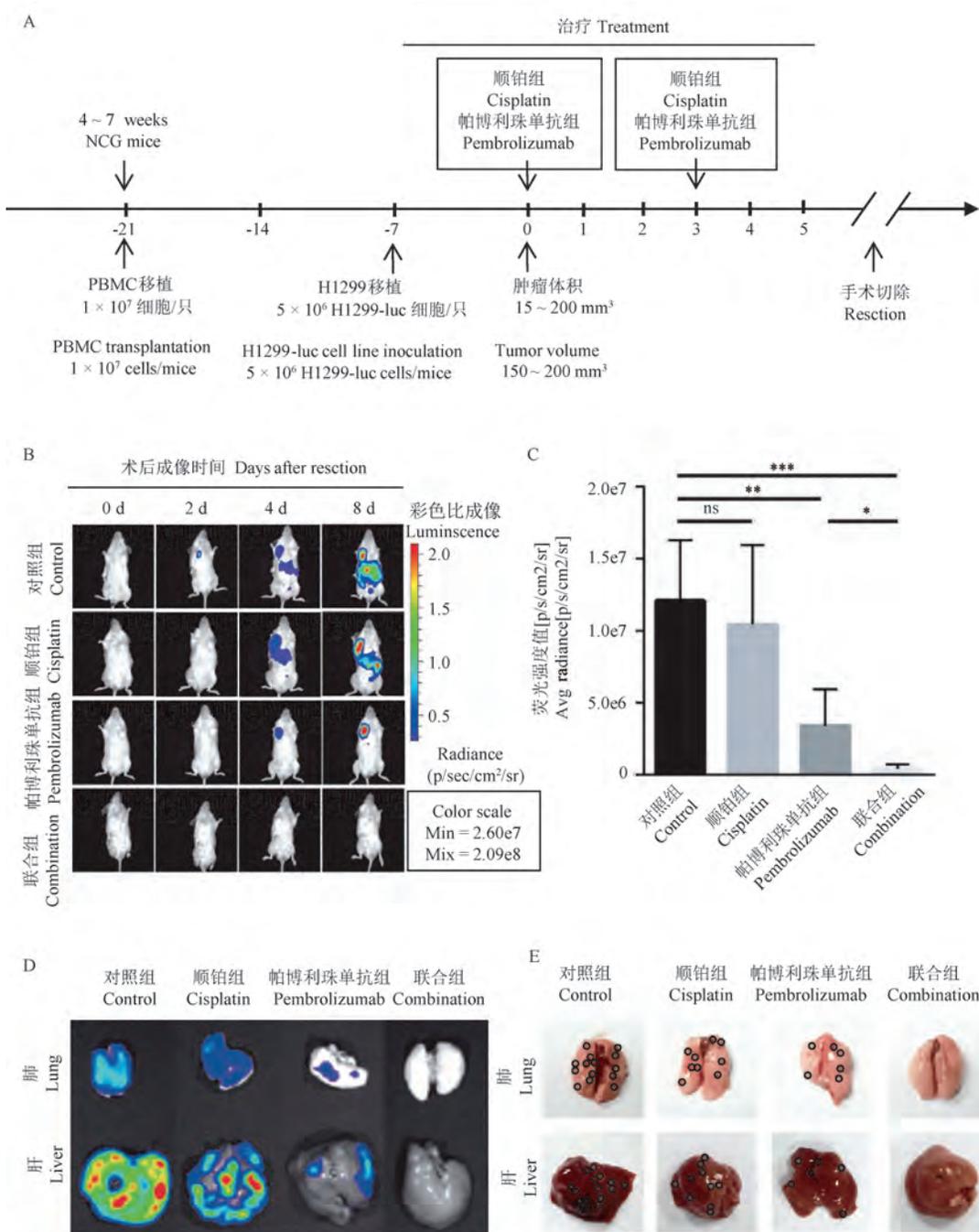
性差异 ( $P > 0.05$ );帕博利珠单抗单药组小鼠肿瘤组织 Ki67 表达低于对照组、顺铂组 ( $P < 0.05$ ),联合治疗组肿瘤组织 Ki67 表达较帕博利珠单抗单药组降低更加显著 ( $P < 0.05$ ),说明联合治疗能够显著抑制肿瘤细胞的增殖。

## 2.4 新辅助治疗对肿瘤组织中 $CD45^+$ 免疫细胞、 $CD8^+$ T 以及 Granzyme B 的影响

肿瘤组织免疫荧光染色结果如图 4A,4B,4 组小鼠肿瘤组织中  $CD45^+$  免疫细胞、 $CD8^+$ T 浸润数量的比较,具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。顺铂组小鼠肿瘤组织中  $hCD45^+$  免疫细胞、 $CD8^+$ T 细胞浸润与对照组无显著性差异 ( $P > 0.05$ );帕博利珠单抗单药组小鼠肿瘤组织中  $hCD45^+$  免疫细胞、 $CD8^+$ T 细胞浸润高于对照组 ( $P < 0.05$ ),与顺铂联合治疗后肿瘤组织中  $hCD45^+$  免疫细胞、 $CD8^+$ T 细胞浸润更加明显 ( $P < 0.05$ )。GzmB 是  $CD8^+$ T 淋巴细胞杀伤靶肿瘤细胞过程中最主要的效应分子,肿瘤组织免疫组化

染色结果显示(如图 4C,4D),4 组小鼠肿瘤组织中 GzmB 表达的比较,具有统计学意义( $P < 0.05$ )。顺铂组小鼠肿瘤组织中 GzmB 与对照组无显著性差异( $P > 0.05$ );帕博利珠单抗单药组小鼠肿瘤组织

中 GzmB 高于对照组( $P < 0.05$ ),与顺铂联合治疗后肿瘤组织中 GzmB 更加明显( $P < 0.05$ )。说明联合治疗能够促进免疫细胞向肿瘤组织中浸润并杀伤肿瘤细胞。



注:A:新辅助治疗策略;B:每4 d 活体成像变化;C:小鼠 IVIS 荧光信号值量化;D:小鼠肝、肺 IVIS 成像;E:小鼠肝、肺肉眼观,小圆圈为转移灶。

图 2 新辅助治疗后复发与转移情( $n = 5$ )

Note. A. Neoadjuvant treatment strategy. B. IVIS every four days. C. Quantification of mouse IVIS fluorescence signal. D. IVIS imaging of mouse liver and lung. E. Gross appearance of mouse liver and lung, small circle for metastasis foci.

Figure 2 Recurrence and metastasis after neoadjuvant treatments( $n = 5$ )

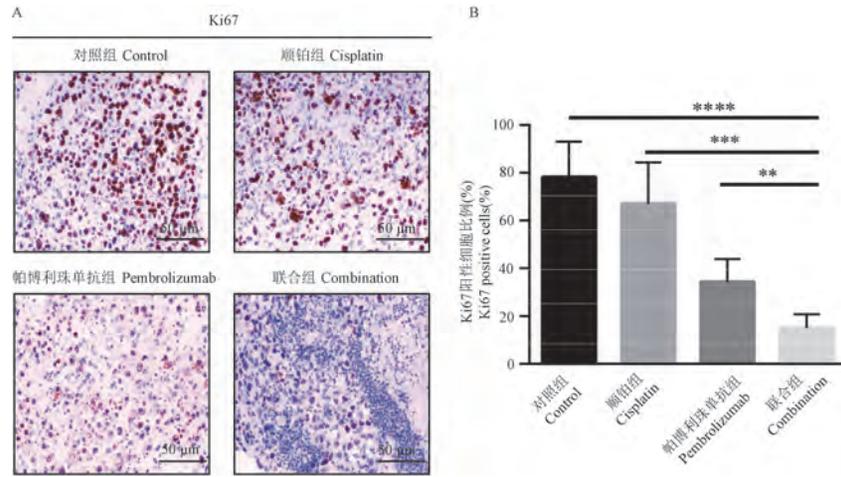


图 3 新辅助免疫治疗后肿瘤组织 Ki67 的变化 ( $n = 5$ )

Figure 3 Changes of Ki67 in tumor tissue after neoadjuvant immunotherapy ( $n = 5$ )

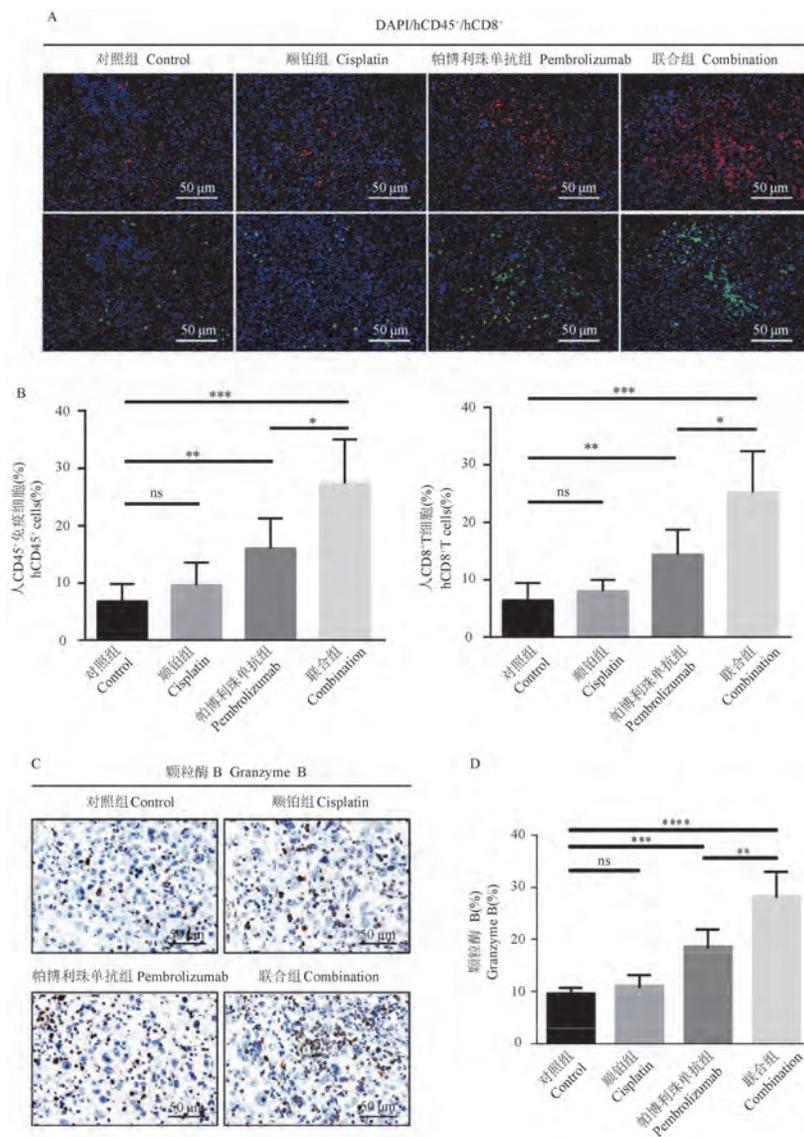


图 4 新辅助免疫治疗后肿瘤免疫微环境的变化 ( $n = 5$ )

Figure 4 Analysis of tumor immune microenvironment after neoadjuvant treatments ( $n = 5$ )

### 3 讨论

本研究成功构建了人源化 NSCLC 小鼠模型,研究了新辅助免疫联合化疗对手术后复发与转移的影响,进一步分析了其潜在的免疫机制,这与 Liu 等<sup>[11]</sup>的研究结果一致,即新辅助疗法的应用对原发性肿瘤切除后的远处转移具有显著的抑制作用。与已报道的实验不同,本研究创新性的使用了人源化小鼠作为新辅助免疫治疗的动物模型,因而能够测试临床常用的免疫检查点抑制剂的疗效。另一方面,目前正在进行的关于 NSCLC 新辅助治疗的 I/II 期单臂临床试验的终点事件主要是手术标本的完全病理缓解(CR)、部分病理缓解(PR)以及主要病理缓解(MPR)等<sup>[12-13]</sup>,缺乏对新辅助治疗后复发转移的直接观察。同时,利用 IVIS 活体成像动态观察了小鼠术后的复发转移情况,能够更加直观准确地评价新辅助治疗的效果。本研究获得的新辅助免疫治疗小鼠模型不仅限于评估免疫治疗的效果,还可进一步用于筛选预测新辅助效果的生物标志物,优化术前的治疗方案,揭示新辅助免疫治疗的机制以及评估不同免疫治疗的联合策略。

文献报道,免疫检查点抑制剂联合化疗的新辅助治疗策略能够改善肿瘤免疫微环境<sup>[14]</sup>。本研究发现帕博利珠单抗联合顺铂抗肿瘤效果的增强是由于肿瘤组织中 CD8<sup>+</sup>T 细胞的广泛浸润,并促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞分泌 GzmB 杀伤肿瘤细胞。研究证实,ICIs 在免疫抑制的“冷肿瘤”中无效,其特征在于缺乏 T 细胞浸润;而 T 细胞浸润丰富的“热”肿瘤与良好的 ICI 疗效密切相关<sup>[15]</sup>。本研究发现,构建的 NSCLC 人源化移植肿瘤属于免疫抑制的“冷”肿瘤,基于免疫治疗联合化疗的关键策略是将其转化为“热”肿瘤。Correale 等<sup>[16]</sup>建立了 MC38 结肠肿瘤小鼠模型,顺铂与抗 PD-1 抗体和抗 PD-L1 抗体联合给药,发现联合治疗 CD8<sup>+</sup>T 细胞的数量高于对照组,机制是通过 CXCL9/CXCL10/CCL5 轴促进 T 细胞浸润。同时,研究报道,术前新辅助化疗增加了 CD8<sup>+</sup>T 和 GzmB 浸润,改善了卵巢癌的临床结局<sup>[17]</sup>。本研究发现,帕博利珠单抗联合顺铂治疗组肿瘤组织中出现了大量的 CD45<sup>+</sup>免疫细胞、CD8<sup>+</sup>T 浸润,与对照组和单药治疗相比有显著差别,提示“冷”肿瘤向“热”肿瘤转化,并且促进 CD8<sup>+</sup>T 的效应分子颗粒酶 B 的分泌,从而增强了抗肿瘤效果。此外,化疗杀伤肿瘤细胞后能够释放大量肿瘤特异

性抗原(tumor-specific antigen, TSA)<sup>[18]</sup>;同时,化疗进而促进 I 类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex-I, MHC-I)上调,使 TSA 向 CD8<sup>+</sup>细胞毒性 T 细胞的呈递<sup>[19-20]</sup>。PD-1/PD-L1 抑制剂可以通过重新激活 T 细胞的功能发挥抗肿瘤作用<sup>[21]</sup>。总之,新辅助免疫治疗联合化疗能够通过上述机制共同发挥作用来增强抗肿瘤效果。

本实验采用移植人新鲜外周血中的 PBMCs 构建 hu-PBMC 模型,其操作简单、免疫系统重建速度快,是进行免疫检查点抑制剂评估常用的人源化动物模型<sup>[10]</sup>。该类模型重建的免疫系统以人的 T 细胞为主,适合各种 T 细胞相关的免疫疗法的评估。但是 Hu-PBMC 模型缺乏重建的人 B 细胞和 NK 细胞等免疫亚群。因此在后续实验中,我们将利用人 CD34<sup>+</sup>造血干细胞构建的人源化小鼠模型<sup>[22]</sup>,进一步研究其他免疫亚群在联合治疗中的作用。

总之,本研究发现帕博利珠单抗联合顺铂新辅助治疗可以显著增加肿瘤中 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润以及 GzmB 的分泌,提示新辅助免疫治疗联合化疗可增强免疫检查点抑制剂的治疗效果,有效抑制 NSCLC 的局部复发与远处转移。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Pisters KM, Le Chevalier T. Adjuvant chemotherapy in completely resected non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(14): 3270-3278.
- [3] Hopstaken JS, de Ruiter JC, van Diessen JNA, et al. Treatment of non-small cell lung cancer [J]. Ned Tijdschr Geneesk, 2021, 165: D5486.
- [4] Hellmann MD, Chaft JE, William WN Jr, et al. Pathological response after neoadjuvant chemotherapy in resectable non-small-cell lung cancers: proposal for the use of major pathological response as a surrogate endpoint [J]. Lancet Oncol, 2014, 15(1): e42-e50.
- [5] Felip E, Rosell R, Maestre JA, et al. Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(19): 3138-3145.
- [6] Chiu LC, Lin SM, Lo YL, et al. Immunotherapy and vaccination in surgically resectable non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Vaccines, 2021, 9(7): 689.
- [7] Dafni U, Tsourti Z, Vervita K, et al. Immune checkpoint inhibitors, alone or in combination with chemotherapy, as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer. A

- systematic review and network meta-analysis [J]. Lung Cancer, 2019, 134: 127–140.
- [ 8 ] Saalfeld FC, Wenzel C, Christopoulos P, et al. Efficacy of immune checkpoint inhibitors alone or in combination with chemotherapy in nslc harboring erbb2 mutations [J]. J Thorac Oncol, 2021, 16(11): 1952–1958.
- [ 9 ] Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(4): 1547–1552.
- [ 10 ] Lin S, Huang G, Cheng L, et al. Establishment of peripheral blood mononuclear cell-derived humanized lung cancer mouse models for studying efficacy of PD-L1/PD-1 targeted immunotherapy [J]. MAbs, 2018, 10(8): 1301–1311.
- [ 11 ] Liu J, Blake SJ, Yong MC, et al. Improved efficacy of neoadjuvant compared to adjuvant immunotherapy to eradicate metastatic disease [J]. Cancer Discov, 2016, 6(12): 1382–1399.
- [ 12 ] Provencio M, Nadal E, Insa A, et al. Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial [J]. Lancet Oncol, 2020, 21(11): 1413–1422.
- [ 13 ] Shu CA, Gainor JF, Awad MM, et al. Neoadjuvant atezolizumab and chemotherapy in patients with resectable non-small-cell lung cancer: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial [J]. Lancet Oncol, 2020, 21(6): 786–795.
- [ 14 ] Park YH, Lal S, Lee JE, et al. Chemotherapy induces dynamic immune responses in breast cancers that impact treatment outcome [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 6175.
- [ 15 ] Liu YT, Sun ZJ. Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration [J]. Theranostics, 2021, 11(11): 5365–5386.
- [ 16 ] Correale P, Aquino A, Giuliani A, et al. Treatment of colon and breast carcinoma cells with 5-fluorouracil enhances expression of carcinoembryonic antigen and susceptibility to HLA-a (\* )<sub>02.01</sub> restricted, CEA-peptide-specific cytotoxic T cells *in vitro* [J]. Int J Cancer, 2003, 104(4): 437–445.
- [ 17 ] Pölcher M, Braun M, Friedrichs N, et al. Foxp3<sup>+</sup> cell infiltration and granzyme B<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> cell ratio are associated with outcome in neoadjuvant chemotherapy-treated ovarian carcinoma [J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(6): 909–919.
- [ 18 ] Fu D, Wu J, Lai J, et al. T cell recruitment triggered by optimal dose platinum compounds contributes to the therapeutic efficacy of sequential PD-1 blockade in a mouse model of colon cancer [J]. Am J Cancer Res, 2020, 10(2): 473–490.
- [ 19 ] Ohtsukasa S, Okabe S, Yamashita H, et al. Increased expression of CEA and MHC class I in colorectal cancer cell lines exposed to chemotherapy drugs [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129(12): 719–726.
- [ 20 ] Anyaegbu CC, Lake RA, Heel K, et al. Chemotherapy enhances cross-presentation of nuclear tumor antigens [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107894.
- [ 21 ] Allard B, Allard D, Stagg J. Methods to evaluate the antitumor activity of immune checkpoint inhibitors in preclinical studies [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1458: 159–177.
- [ 22 ] Rongvaux A, Willinger T, Martinek J, et al. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(4): 364–372.

[收稿日期] 2022-03-23

于海洋,卢增鹏,汪海燕,等. 激素性股骨头坏死中 Hif-1 $\alpha$ /VEGF 信号轴和 H 型血管改变的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 759-766.

Yu HY, Lu ZP, Wang HY, et al. Changes in Hif-1 $\alpha$ /VEGF signal axis and type-H vessels in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 759-766.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.004

## 激素性股骨头坏死中 Hif-1 $\alpha$ /VEGF 信号轴和 H 型血管改变的实验研究

于海洋<sup>1,2</sup>, 卢增鹏<sup>1,2</sup>, 汪海燕<sup>2,3</sup>, 曹盼举<sup>4</sup>, 姚川江<sup>1,2</sup>, 曹林忠<sup>1,2</sup>,  
田杰祥<sup>1,2</sup>, 张晓刚<sup>1,2\*</sup>

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学附属医院, 兰州 730000; 3. 成都中医药大学, 成都 610000; 4. 宝鸡市中医医院, 陕西 宝鸡 721000)

**【摘要】** 目的 观察 Hif-1 $\alpha$ /VEGF 信号轴和骨中特异性 H 型血管在 SINFH 模型大鼠股骨头中的改变, 探究其在骨坏死发生中的改变及意义。方法 30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为空白组 (CG)、模型组 (MG)、去铁胺组 (DFO), 每组 10 只。MG 组及 DFO 组采用甲强龙联合脂多糖法行 SINFH 造模, CG 组及 MG 组腹腔注射生理盐水, DFO 组予腹腔注射 250 mg/(kg·d) 甲磺酸去铁胺。造模 6 周后, 运用 Micro-CT 分析观察股骨头微观结构变化, HE 染色观察股骨头组织病理变化, 免疫荧光染色分析股骨头中 H 型血管改变, RT-PCR 分析股骨头中 Hif-1 $\alpha$ /VEGF 信号轴相关因子的表达。结果 Micro-CT 分析显示, MG 组、DFO 组股骨头均出现骨小梁稀疏, 但 MG 组骨小梁出现断裂情况, 且股骨头软骨下囊性变形成。HE 染色显示, 与 CG 组比, MG 组和 DFO 组均出现明显的股骨头坏死 ( $P < 0.01$ )。免疫荧光染色显示, 与 CG 组比较, MG 组股骨头中 H 型血管量显著下降 ( $P < 0.05$ ), 与 MG 组比较 DFO 组股骨头中 H 型血管量显著增加 ( $P < 0.01$ )。与 CG 组比, MG 组 Osterix<sup>+</sup> 成骨 (祖) 细胞量均出现下降 ( $P < 0.01$ ), 与 MG 组比, DFO 组 Osterix<sup>+</sup> 成骨 (祖) 细胞量增加 ( $P < 0.01$ )。RT-PCR 分析显示, 与 CG 比较 MG 组大鼠股骨头 Hif-1 $\alpha$ 、VEGF、Osterix、Runx2 (mRNA) 表达下降 ( $P < 0.01$ ), 与 MG 组比, DFO 组 Hif-1 $\alpha$ 、VEGF、Osterix、Runx2 (mRNA) 表达升高 ( $P < 0.01$ )。结论 在 SINFH 大鼠模型中, 激素诱导 Hif-1 $\alpha$ /VEGF 信号轴调控障碍, 以及特异性 H 型血管发生损害, 提示骨特异的 H 型血管损害可能是激素性股骨头坏死的关键发病机制之一。

**【关键词】** 激素性股骨头坏死; H 型血管; Hif-1 $\alpha$ /VEGF 信号轴; 实验研究

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0759-08

## Changes in Hif-1 $\alpha$ /VEGF signal axis and type-H vessels in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head

YU Haiyang<sup>1,2</sup>, LU Zengpeng<sup>1,2</sup>, WANG Haiyan<sup>2,3</sup>, CAO Panju<sup>4</sup>, YAO Chuanjiang<sup>1,2</sup>, CAO Linzhong<sup>1,2</sup>,  
TIAN Jiexiang<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiaogang<sup>1,2\*</sup>

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (81960832, 81860859), 甘肃省科技计划资助/自然科学基金 (21JR11RA161), 甘肃省中医药管理局 (GZKP-2021-17, GZKP-2020-31), 甘肃中医药大学附属医院院内课题 (gzfy-2021-04), 宝鸡市卫生健康委员会科研项目 (2020-026), 张晓刚全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函[2022]75 号)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81960832, 81860859), Gansu Provincial Science and Technology Program/Natural Science Foundation (21JR11RA161), Gansu Administration of Traditional Chinese Medicine (GZKP-2021-17, GZKP-2020-31), Project in Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine (gzfy-2021-04), Scientific Research Project of Baoji Health Committee (2020-026), Zhang Xiaogang National Famous Traditional Chinese Medicine Expert Inheritance Studio Construction Project ([2022]75).

**【作者简介】** 于海洋 (1983—), 男, 在读博士研究生, 副主任医师, 研究方向: 中医骨伤科学。Email: doctoryhy@163.com

**【通信作者】** 张晓刚 (1960—), 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医骨伤科学, 生物力学, 非创伤性股骨头坏死。

Email: zxg0525@163.com

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000. 3. Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610000. 4. Baoji Hospital of Chinese Medicine, Baoji 721000)

Corresponding author: ZHANG Xiaogang. E-mail: zxcg0525@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the changes in the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ )/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling axis and specific type H vessels in the femoral head of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH) model rats and explore the role of these changes in the development of osteonecrosis. **Methods** Thirty specific pathogen-free grade male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group (CG), model group (MG) and deferoxamine group (DFOG), with 10 rats in each group. The MG and DFOG were treated with methylprednisolone combined with lipopolysaccharide for SONFH modeling, the CG and MG received intraperitoneal injections of normal saline, and the DFOG received intraperitoneal injections of 250 mg/kg deferoxamine mesylate. Six weeks after modeling, micro-computed tomography was performed to observe the microstructural changes of the femoral head, hematoxylin/eosin staining was used to observe the histopathological changes of the femoral head, immunofluorescence staining was used to analyze the changes of type H vessels in the femoral head, and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to analyze expression of HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling axis-related factors in the femoral head. **Results** Micro-computed tomography analysis showed that the femoral head in the MG and DFOG had sparse bone trabeculae, but the bone trabeculae in the MG exhibited fractures and the femoral head showed subchondral cystic degeneration. Hematoxylin/eosin staining showed that compared with the CG, both the MG and DFOG had obvious femoral head necrosis ( $P < 0.01$ ). Immunofluorescence staining showed that compared with the CG, the amount of type H vessels in the femoral head was significantly lower in the MG ( $P < 0.05$ ) and significantly higher in the DFOG ( $P < 0.01$ ). Compared with the CG, the amount of osterix<sup>+</sup> osteoblast (progenitor) cells was significantly lower in the MG ( $P < 0.01$ ) and significantly higher in the DFOG ( $P < 0.01$ ). RT-PCR showed that the expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF, osterix, and Runx2 (mRNA) in the femoral head was significantly lower in the MG than CG ( $P < 0.01$ ) and significantly higher in the DFOG than MG ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Steroid-induced HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling axis dysregulation and specific type H vessel damage were observed in this SONFH rat model, suggesting that bone-specific type H vessel damage may be a key pathogenetic factor of SONFH.

**【Keywords】** SINFH; type-H vessels; Hif-1 $\alpha$ /VEGF signaling axis; experimental study

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

糖皮质激素诱导的股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of femoral head, SINFH)是糖皮质激素使用后最严重的副作用之一<sup>[1]</sup>。我国流行病学调查显示,累计非创伤性骨坏死患者达 812 万例,主要发病人群为青壮年,糖皮质激素是非创伤性骨坏死的高危因素,糖皮质激素使用是股骨头坏死仅次于创伤的第二大诱因<sup>[2-3]</sup>。当前国内外学者对 SINFH 展开了大量研究,虽然提出了多种发病机制假说,如脂质代谢紊乱、炎症免疫因素、骨质疏松、骨髓间充质干细胞分化障碍、骨内压增高、血管内凝血、细胞凋亡、基因多态性和激素细胞毒性理论等<sup>[4-6]</sup>,但仍未能完全明确其病理机制。研究发现人和动物干骺端和骨膜内存在的骨内特殊微血管——H 型血管(CD31<sup>hi</sup>Emcn<sup>hi</sup>)具有正向骨形成作用,对骨祖细胞和成骨细胞的分布、生存、激活具有重要的意义,在成血管成骨偶联中具有重要的地位,对骨量维持

和机械强度具有重要作用。进一步研究发现在人类的股骨头中同样分布着 H 型血管<sup>[7-8]</sup>,但其在 SINFH 发病中的具体作用未见报道。

人体不同解剖部位的骨改建速度差异很大,基础条件下股骨头的松质骨骨转率是股骨远端松质骨骨转率的三倍多<sup>[9]</sup>。这一特点决定了股骨头对营养和氧气分配的高需求,骨细胞的正常功能严重依赖为成骨系统提供微环境的血液供应系统。H 型血管是新陈代谢专门化的骨微环境的关键组成部分,具有获得营养和氧气的特权,从而具有促进血管周围细胞(包括前骨祖细胞、骨祖细胞、成熟的和超成熟的成骨细胞)生长的潜力<sup>[10]</sup>。糖皮质激素可以直接损伤内皮细胞,导致内皮细胞凋亡,损害新血管的形成,最终对骨的血液供应系统造成损害<sup>[11]</sup>。股骨头血供主要来源于纤细且易受损的支持带血管<sup>[11]</sup>,股骨头部位代谢活跃<sup>[9]</sup>,血供脆弱,决

定局部易出现缺氧情况。缺氧诱导因子(Hypoxia-inducible factors, Hif)是氧稳态的主要调节者,负责细胞应对低氧水平的能力。VEGF是Hif-1 $\alpha$ 下游基因。VEGF作为一种特异的内皮细胞有丝分裂原和血管生成启动子,以旁分泌和自分泌的方式发挥着重要作用,可以促进H型血管生长<sup>[10]</sup>。Hif-1 $\alpha$ 在常氧条件下被脯氨酸-4-羟化酶结构域(PHD)羟基化,然后被Von Hippel-Lindau蛋白迅速降解。在缺氧或缺铁状态下,PHD活性受到抑制,Hif-1 $\alpha$ 会积聚并移位到细胞核内,激活大量的缺氧诱导因子靶基因,应用铁螯合剂除PHD抑制剂或基因沉默外,铁螯合剂还可通过降低细胞内Fe<sup>2+</sup>浓度和抑制PHD活性来抑制缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 的降解<sup>[12-13]</sup>。

最新研究发现,缺氧反应主要调控因子Hif-1 $\alpha$ 及其下游基因VEGF在股骨头坏死中发挥着重要的作用<sup>[9,14-15]</sup>。在本研究旨在分析SINFH大鼠模型的Hif-1 $\alpha$ /VEGF信号通路改变和H型血管损害情况,为SINFH的防治提供一些新的方向和见解。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

实验选用SPF级12周龄SD雄性大鼠30只,体重(300 $\pm$ 30)g,由甘肃中医药大学实验动物中心提供【SCXK(甘)2020-0001】,常规充足饲料喂养,自由饮水,日光灯12h明暗交替,室温20~25 $^{\circ}$ C,相对湿度40%~52%,饲养于甘肃中医药大学实验动物中心SPF级实验室【SYXK(甘)2020-0009】。本实验通过甘肃中医药大学动物伦理审查批准实施【2021-255】。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

小型动物Micro-CT(vivaCT 80, SCANCO Medical AG公司瑞士);冰冻切片(Leica 2016,德国);荧光显微镜(Leica DM2500,德国);实时定量PCR仪(Iq5, Bio-Rad 美国);注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(H20030727, 荣生制药有限公司);注射用甲磺酸去铁胺(DFO)(H20140678, 瑞士诺华公司);小鼠抗大鼠CD31抗体(M1511-8, 华安生物);兔抗大鼠Osterix抗体(ER1914-47, 华安生物);山羊抗大鼠Emcn抗体(bs-5884R, Vioss);TRIeasy<sup>TM</sup> Total RNA Extraction Reagent(10606ES60, YESEN);Hyper Script<sup>TM</sup> III RT Super Mix for qPCR with Gdna Remover(R202-02, 新贝生物);2 $\times$ S6 Universal SYBR qPCR

Mix(Q204-01, 新贝生物)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 激素性股骨头坏死动物分组与模型干预

大鼠适应性喂养1周后按随机数字法分为3组,空白组(CG),模型组(MG)和去铁胺组(DFO),每组各10只。MG和DFO组大鼠腹腔内注射腹腔注射脂多糖(LPS 20  $\mu$ g/kg),每次间隔24h,连续2次;末次注射后24h后,两侧臀肌交替注射甲强龙(40 mg/kg)3次,每次间隔24h;同时DFO组予腹腔注射甲磺酸去铁胺(250 mg/kg),直至处死动物。其余两组予等量生理盐水注射。为预防感染,予臀肌注射青霉素4万单位/鼠,每周2次。

#### 1.2.2 Micro-CT分析

造模6周后,大鼠腹腔注射过量戊巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉后放血,取左侧股骨头,甲醛固定24h。运用小型动物Micro-CT进行股骨头扫描(分辨率10.5  $\mu$ m,100 kV,98  $\mu$ A),观察股骨头骨小梁结构、股骨头形态以及软骨质下囊性变形成情况。

#### 1.2.3 HE染色

左侧股骨头4%甲醛固定48h后10%EDTA脱钙,之后修剪至适宜大小,置入包埋盒中,流水冲洗30min。梯度乙醇脱水。再将组织块置于二甲苯中置换酒精,将股骨头石蜡包埋。苏木精伊红(HE)染色,中性树脂封片。在400倍光学显微镜下观察干燥后的封片,观察骨小梁结构和骨细胞陷窝。参照股骨头坏死诊断标准:股骨头中空骨陷窝形成或成骨细胞、骨细胞核固缩,伴有骨髓中周围其余细胞坏死<sup>[16]</sup>。出现大于1处坏死病灶认定为出现SINFH。计算3组激素性股骨头坏死的发生率。

#### 1.2.4 免疫荧光染色

左侧股骨头4%甲醛固定48h后10%EDTA脱钙,之后修剪至适宜大小,梯度乙醇脱水,二甲苯透明。石蜡包埋。石蜡切片,将蜡块切为5  $\mu$ m厚切片。石蜡切片脱蜡和水化,用柠檬酸钠热修复两次,PBS洗,3%的过氧化氢封闭,PBS洗;滴加5%的Triton X-100室温15min,滴加正常山羊血清,室温孵育15min。用滤纸吸去组织上多余血清,直接滴加血清稀释的一抗至没过切片,抗体浓度为Endomucin(山羊抗大鼠,1:200),CD31(小鼠抗大鼠,1:200),Osterix(兔抗大鼠,1:200),湿盒中4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。37 $^{\circ}$ C复苏;滴加荧光素标记的与一抗来源相匹配的二抗,37 $^{\circ}$ C孵育60min(从此步骤后都需避光操作),PBS洗5min $\times$ 3次,滴加DAPI室

温染核 5 min, PBS 洗 5 min × 3 次, 封片: 抗荧光催化剂封片。于激光扫描共聚焦荧光显微镜 (FluoView™ FV1000) 下进行观察和照相。取 5 张切片, 免疫荧光强度使用 Image J 软件进行半定量分析。

### 1.2.5 RT-PCR 分析

取各组大鼠右侧股骨头, 放入做好标记的已装有 TRIzol 的 Ep 管内, 放入 -80℃ 冰箱存用。按照 TRIzol 试剂说明书提取股骨头总的 RNA。计算样品总 RNA 浓度, 完成总 RNA 的制备; 根据大鼠 Hif-1 $\alpha$ 、VEGF、Osterix、Runx2 序列, 使用 Premier 5.0 设计合成扩增 Hif-1 $\alpha$ 、VEGF、Osterix、Runx2 片段的特异性引物 (以 GAPDH 基因作为 PCR 的内参照), 进行引物序列设计 (见表 1); 根据反转录以及 PCR 反应体系及条件, 进行 RT-PCR 实验。为减少误差, 各

组 Hif-1 $\alpha$ 、VEGF、Osterix、Runx2 的表达水平均以相对表达量来表示。

### 1.3 统计学分析

采用统计软件 SPSS 21 进行统计分析, 坏死率比较采用 fisher 精确概率检验, 组间两两比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。采用 Origin pro 8.5 绘图软件进行绘图。

## 2 结果

### 2.1 Micro-CT 分析结果

CG 组股骨头骨小梁排列整齐, 股骨头形态规则; MG 组见股骨头骨小梁稀疏、变薄, 部分骨小梁断裂, 软骨下囊性变形成; DFO 组骨小梁稀疏, 但无明显断裂情况, 未见囊性变形成 (见图 1)。

表 1 各检测基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of each detection gene

基因 Gene	上游 Forward	下游 Reverse
Hif-1 $\alpha$	5'-CCGCCACCACCTGATGAATC-3'	5'-GTGAGTACCGTAGTCTGATGCC-3'
VEGF	5'-CGGTGTGGTCTTTCGTCCTTCTTAG-3'	5'-AGGGATGGGTTTGTCTGTTTCTG-3'
Runx2	5'-CTTCGTCAGCGTCTCTATVAGTTCC-3'	5'-TCCATCAGCGTCAACACCATCATTCC-3'
Osterix	5'-GCCTACTTACCCGTCTGACTTTGC-3'	5'-CCCTCCAGTTGCCCACTATTGC-3'
GAPDH	5'-TGATGGGTGTAACCACGAG-3'	5'-AGTGATGGCATGGACTGTGG-3'

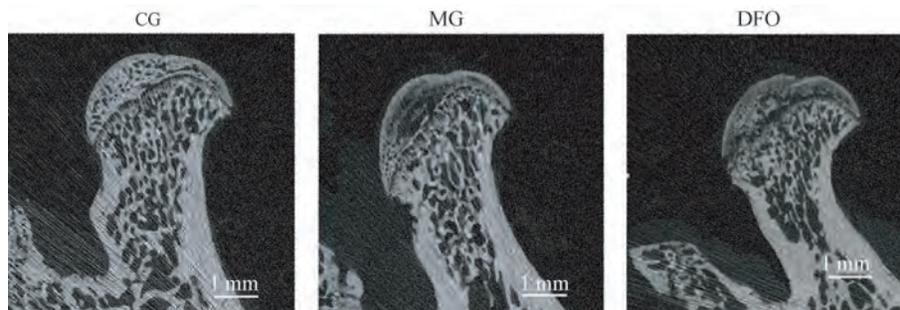
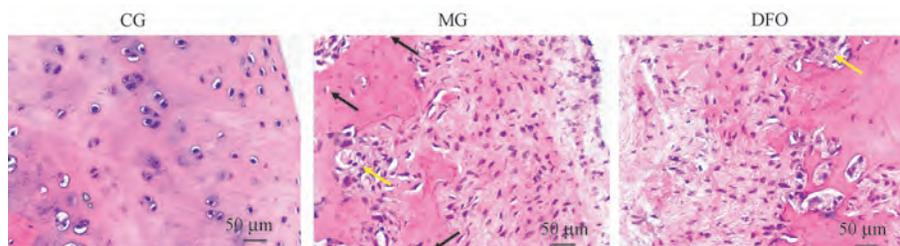


图 1 各组大鼠股骨头 Micro-CT 扫描

Figure 1 Results of Micro-CT scanning of the femoral head of rats in each group



注: 黑色箭头所指空骨陷窝; 黄色箭头为变性坏死的骨组织。

图 2 各组大鼠股骨头 HE 染色

Note. The black arrow refers to the empty bone lacunae. The yellow arrow refers to denatured and necrotic bone tissue.

Figure 2 HE staining of the femoral head of rats in each group

## 2.2 组织形态计量学和免疫荧光染色分析

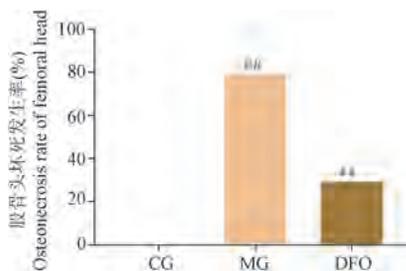
### 2.2.1 HE 染色

HE 染色知 CG 组骨细胞及细胞核染色均匀, 未见空骨陷窝形成; MG 组股骨头有空骨陷窝形成, 见点状骨髓坏死出血, 并出现纤维结构增生, 炎性细胞浸润; DFO 组仅少量标本出现空骨陷窝形成, 有点状骨髓坏死出血, 且程度较模型组轻(图 2)。

参照股骨头坏死诊断标准<sup>[16]</sup>, CG 组 0/10 只, MG 组 8/10 只, DFO 组 3/10 只出现股骨头坏死, 采用 fisher 精确概率检验结果如下(图 3)。

### 2.2.2 免疫荧光染色结果

股骨头切片免疫荧光染色可见 CG 组大鼠股骨头中微血管 CD31、Emcn 染色强阳性(H 型血管), Osterix<sup>+</sup>成骨(祖)细胞大量分布, 主要分布于骨膜及骨髓周围 H 型血管大量分布的区域; 而在 MG 组股骨头中 CD31、Emcn 染色弱阳性, 伴随见 Osterix<sup>+</sup>成



注:与 CG 组相比,  $^{##}P < 0.01$ ; 与 MG 组比较,  $^{**}P < 0.01$ 。

图 3 股骨头坏死 fisher 精确概率检验结果

Note. Compared with CG group,  $^{##}P < 0.01$ . Compared with MG group,  $^{**}P < 0.01$ .

Figure 3 Fisher test for osteonecrosis of the femoral head

骨(祖)细胞分布减少。DFO 组可见 CD31、Emcn 染色强阳性微血管, 同时可见 Osterix<sup>+</sup>成骨(祖)细胞相较与 MG 组分布数量增多, 主要分布于骨膜及骨髓周围 H 型血管大量分布的区域(图 4)。

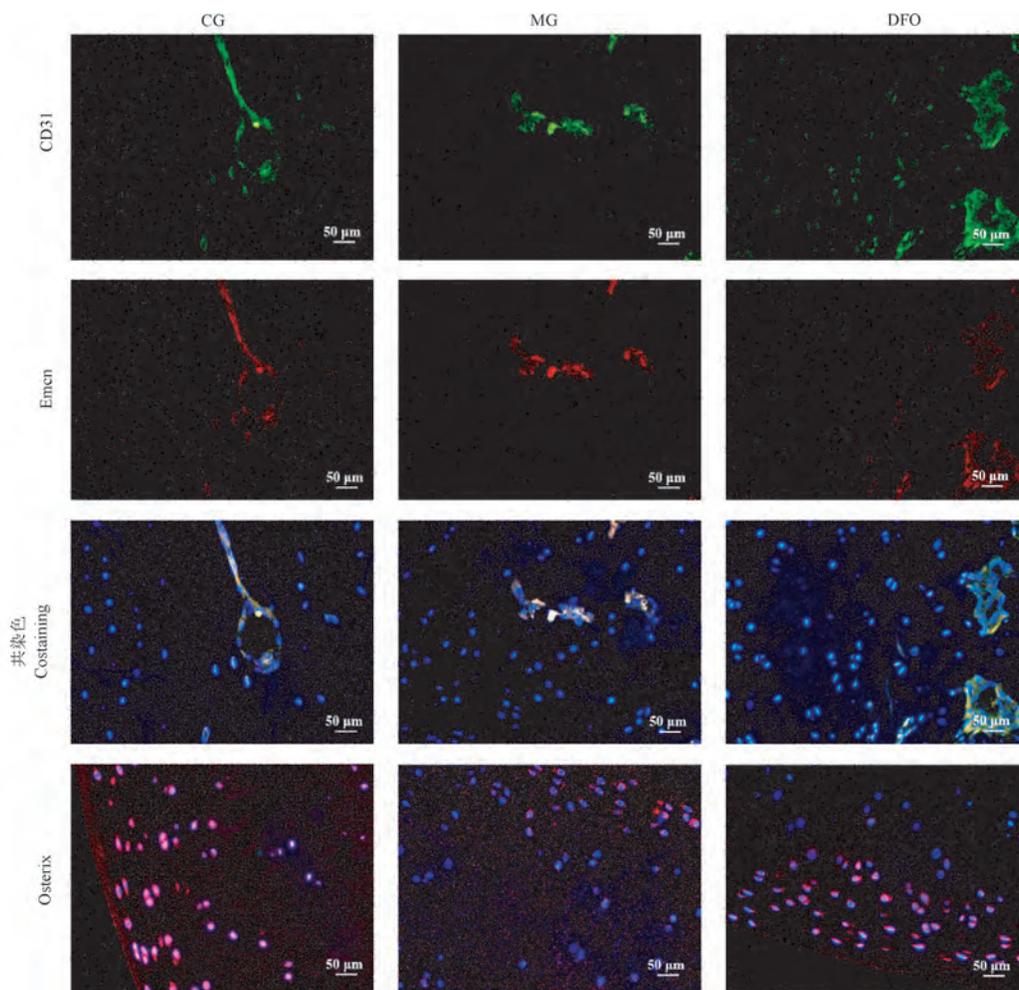


图 4 各组大鼠股骨头免疫荧光染色

Figure 4 Immunofluorescence staining of the femoral head of rats in each group

免疫荧光染色相对面积分析,与 CG 组比较, MG 组大鼠股骨头中 H 型血管的量下降,具有统计学意义( $P < 0.01$ );与 MG 组比较, DFO 组大鼠股骨头中 H 型血管的量增多,具有统计学意义( $P < 0.05$ );与 CG 组比较, MG 组 Osterix<sup>+</sup>成骨(祖)细胞量下降,具有统计学意义( $P < 0.01$ );与 MG 组比较, DFO 组 Osterix<sup>+</sup>成骨(祖)细胞量增多,具有统计学意义( $P < 0.01$ )(见图 5)。

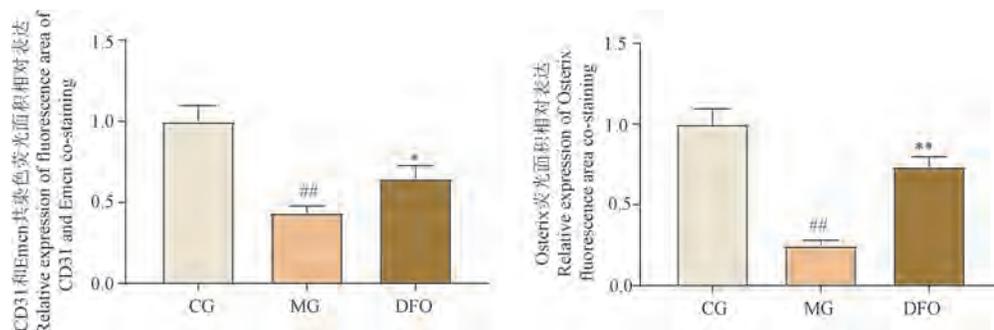
### 2.3 RT-PCR 分析

Hif-1 $\alpha$  mRNA 检测结果:与 CG 组比较, MG 组大鼠股骨头中 Hif-1 $\alpha$  表达下降,具有统计学意义( $P < 0.01$ );与 MG 组比较, DFO 组 Hif-1 $\alpha$  表达升高,具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

VEGF mRNA 检测结果:与 CG 组比较, MG 组大鼠股骨头中 VEGF 表达下降,具有统计学意义( $P < 0.01$ );与 MG 组比较, DFO 组 VEGF 表达升高,具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

Osterix mRNA 检测结果:与 CG 组比较, MG 组大鼠股骨头中 Osterix 表达下降,具有统计学意义( $P < 0.01$ );与 MG 组比较, DFO 组 Osterix 表达升高,具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

Runx2 mRNA 检测结果:与 CG 组比较, MG 组大鼠股骨头中 Runx2 表达下降,具有统计学意义( $P < 0.01$ );与 MG 组比较, DFO 组 Runx2 表达升高,具有统计学意义( $P < 0.01$ )(见图 6)。



注:与 CG 组相比, ## $P < 0.01$ ;与 MG 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。(下同)

图 5 各组大鼠股骨头免疫荧光相对面积

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

Figure 5 Relative area of immunofluorescence of femoral head of rats in each group

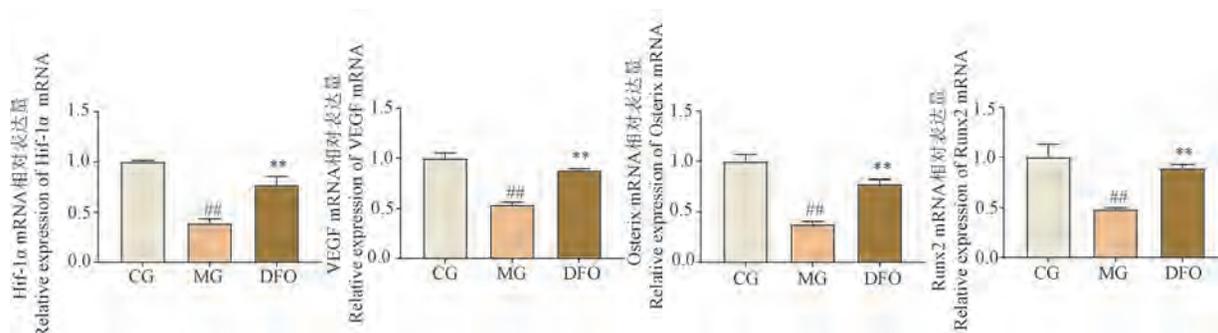


图 6 各组大鼠股骨头 RT-PCR 表达情况

Figure 6 RT-PCR examination of the femoral head of rats in each group

## 3 讨论

股骨头坏死是一种发生于髋关节的灾难性骨关节疾病,通常会导致髋关节的破坏<sup>[17]</sup>。该病高发于 30 ~ 50 岁,影响患者后 30 ~ 50 年的工作和生活,自然进程常进展为股骨头塌陷和严重的髋关节炎,全髋关节置换术通常为其终末治疗手段<sup>[18]</sup>。尽

管髋关节置换手术日趋成熟,但是年轻髋关节置换患者仍然需面对如假体松动、再次或多次翻修、活动受限等诸多问题,放任病程进展消极等待关节置换也不是应有的科学态度。目前尚无公认有效的保髋治疗方法。有效地促进坏死骨修复,及早恢复股骨头软骨下骨机械强度,避免关节塌陷是保髋治疗成败的关键,多数专家认为血供恢复是股骨坏

死骨修复的先决条件<sup>[19]</sup>。

近期随着对其分布、形态、功能认识的加深, H 型血管备受关注。大量激素应用诱发股骨头血运障碍,进而导致股骨头内细胞凋亡,诱发股骨头坏死发生<sup>[9]</sup>,可见血运与骨骼细胞在股骨头发生、发展中的同样重要,而具有成血管成骨偶联作用的 H 型血管可能在股骨头坏死中发挥了重要作用。骨内特殊的微血管——H 型血管具有正向骨形成作用,除了具有营养和氧气分配的优先权,而且分泌活性物质为成骨系提供微环境, Osterix 阳性的成骨祖细胞、胶原蛋白 1 $\alpha$  阳性的成骨细胞和 Runx2 阳性的前成骨祖细胞选择性的分布在 H 型血管周围<sup>[10]</sup>。前文提及,人类股骨头同样存在 H 型血管,并且与骨量呈正相关,在干骺端及股骨头等骨高转换的部位 H 型血管对骨量、骨强度具有明显相关性<sup>[7-8]</sup>。在本研究中发现,激素诱导的股骨头坏死中,股骨头中的 H 型血管受到明显损害,提示 SINFH 中 H 型血管损害可能是该病发生发展的一个重要因素。去铁胺可有效降低细胞内的铁离子,稳定 Hif-1 $\alpha$ ,调控缺氧反应。研究发现应用 Hif-1 $\alpha$  稳定剂—去铁胺可以减轻甲强龙对大鼠股骨头 CD31<sup>hi</sup>Emcn<sup>hi</sup> 亚型血管的损害作用<sup>[20]</sup>。进一步观察到重要的缺氧反应调控因子 Hif-1 $\alpha$  及其下游因子 VEGF 在 SINFH 中表达下降,而运用去铁胺可以改善这种情况,提示缺氧反应调控与 H 型血管两者之间必然存在着密切的联系。

研究发现 SINFH 中存在缺氧反应调控异常,表现为 Hif-1 $\alpha$ 、VEGF 下降<sup>[14]</sup>。Weinstein 等<sup>[9]</sup>通过对 Hif-1 $\alpha$  和 VEGF 的基因表达检测,证明 Hif-1 $\alpha$ 、VEGF 表达在 SINFH 早期就开始降低,且 Hif-1 $\alpha$ 、VEGF 的表达异常、骨血管和骨强度的降低发生于骨量的丢失和微结构的恶化之前。胡亮等<sup>[21]</sup>通过动物实验,提示提高 Hif-1 $\alpha$  可以促进激素性股骨头缺血性坏死的骨修复。Hif-1 $\alpha$  激活可增加细胞耐缺氧能力应对短暂的缺氧以避免细胞凋亡,以 Hif-1 $\alpha$  可以促进下游靶基因 VEGF 表达进而促进血管生成和血供改善是机体应对慢性缺氧的机制之一。VEGF 是调节血管发育的最重要的生长因子之一,目前研究将其视为骨修复的关键调节因子<sup>[22-24]</sup>。这与我们研究中观察到的结果相似,在本研究中,SINFH 大鼠出现缺氧反应调控障碍表现为 Hif-1 $\alpha$ 、VEGF 降低,进一步可能抑制 H 型血管生成而出现 H 型血管损害,提示 Hif-1 $\alpha$ /VEGF 信号调控障碍导致 H 型血管异常

在 SINFH 发生发展过程中起到了关键作用。

骨骼是一种高度血管化的组织,骨血管系统在骨骼的维持骨量和骨骼修复中发挥着重要的作用<sup>[25]</sup>。血管系统不仅负责运输循环细胞、氧气、营养物质和代谢废物,而且还提供钙和磷酸盐(它们是基质矿化的基础),也提供血管分泌素信号因子,调控骨骼生长和骨稳态<sup>[26]</sup>。H 型血管是在成血管成骨偶联中具有重要的地位<sup>[10]</sup>。我们研究提示骨特异的 H 型血管损害可能是激素性股骨头坏死的关键发病机制之一,促生 H 型血管可能是激素性股骨头坏死防治的关键靶点。但本实验仅为动物实验,在人体激素性骨头坏死中的具体情况,需要进一步探索研究。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Zheng LZ, Wang JL, Kong L, et al. Steroid-associated osteonecrosis animal model in rats [J]. J Orthop Translat, 2018, 13: 13-24.
- [ 2 ] Zhao DW, Yu M, Hu K, et al. Prevalence of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head and its associated risk factors in the Chinese population; results from a nationally representative survey [J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128 (21): 2843-2850.
- [ 3 ] Tan B, Li W, Zeng P, et al. Epidemiological study based on China osteonecrosis of the femoral head database [J]. Orthop Surg, 2021, 13(1): 153-160.
- [ 4 ] Zhang Q, Jin L, Jin L. Role of coagulopathy in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. J Int Med Res, 2018, 46(6): 2141-2148.
- [ 5 ] Zhao X, Wei Z, Li D, et al. Glucocorticoid enhanced the expression of ski in osteonecrosis of femoral head; the effect on adipogenesis of rabbit BMSCs [J]. Calcif Tissue Int, 2019, 105 (5): 506-517.
- [ 6 ] Yuan L, Li W, Wang X, et al. The relationship between genetic polymorphisms in apolipoprotein E (ApoE) gene and osteonecrosis of the femoral head induced by steroid in Chinese Han population [J]. Genes Genom, 2018, 40(2): 225-231.
- [ 7 ] Wang L, Zhou F, Zhang P, et al. Human type H vessels are a sensitive biomarker of bone mass [J]. Cell Death Dis, 2017, 8 (5): e2760.
- [ 8 ] Gao F, Mao T, Zhang Q, et al. H subtype vascular endothelial cells in human femoral head: an experimental verification [J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(4): 1497-1505.
- [ 9 ] Weinstein RS, Hogan EA, Borrelli MJ, et al. The pathophysiological sequence of glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in male mice [J]. Endocrinology, 2017, 158(11): 3817-3831.
- [ 10 ] Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone [J]. Nature, 2014, 507(7492): 323-328.

- [11] Zalavras C, Shah S, Birnbaum MJ, et al. Role of apoptosis in glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2003, 13(2-4): 221-235.
- [12] FernándezTorres J, ZamudioCuevas Y, MartínezNava GA, et al. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) in the articular cartilage: a systematic review[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(12): 2800-2810.
- [13] David V, Martin A, Isakova T, et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production [J]. *Kidney Int*, 2016, 89(1): 135-146.
- [14] Zhao D, Qiu X, Wang B, et al. Epiphyseal arterial network and inferior retinacular artery seem critical to femoral head perfusion in adults with femoral neck fractures [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2017, 475(8): 2011-2023.
- [15] Yin BH, Chen HC, Zhang W, et al. Effects of hypoxia environment on osteonecrosis of the femoral head in Sprague-Dawley rats [J]. *J Bone Miner Metab*, 2020, 38(6): 780-793.
- [16] 董玉雷, 周磊, 李玉龙, 等. 大鼠激素性股骨头坏死模型的建立和评价 [J]. *中国医学科学院学报*, 2015, 37(2): 152-156.
- Dong YL, Zhou L, Li YL, et al. Establishment and assessment of rat models of glucocorticoid-induced osteonecrosis [J]. *Acta Acad Med Sin*, 2015, 37(2): 152-156.
- [17] 谢程欣, 王维, 余城墙, 等. 酒精性股骨头坏死动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(7): 139-144.
- Xie CX, Wang W, Yu CQ, et al. Research progress in animal models of alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(7): 139-144.
- [18] Mont MA, Cherian JJ, Sierra RJ, et al. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: where do we stand today? A ten-year update [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2015, 97(19): 1604-1627.
- [19] 沈莹姗, 乌日莎娜, 庄至坤, 等. 基于病理表型辨析激素性与酒精性股骨头坏死的血瘀证特点 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(8): 4868-4872.
- Shen YS, Wu RSN, Zhuang ZK, et al. Study on characteristics of differentiation of blood stasis syndrome between steroid and alcohol induced osteonecrosis of the femoral head based on pathological phenotype [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(8): 4868-4872.
- [20] Jing X, Du T, Yang X, et al. Desferoxamine protects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head via activating HIF-1 $\alpha$  expression [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(12): 9864-9875.
- [21] 胡亮, 王军海, 王志烈, 等. 骨形态发生蛋白 2 联合突变型低氧诱导因子 1 $\alpha$  修复激素性股骨头缺血性坏死 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(28): 4440-4446.
- Hu L, Wang JH, Wang ZL, et al. Combination of bone morphogenetic protein 2 and mutant hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  repairs steroid-induced avascular necrosis of the femoral head [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22(28): 4440-4446.
- [22] Zha Y, Li Y, Lin T, et al. Progenitor cell-derived exosomes endowed with VEGF plasmids enhance osteogenic induction and vascular remodeling in large segmental bone defects [J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 397-409.
- [23] Kim ME, Seon JK, Kang JY, et al. Bone-forming peptide-4 induces osteogenic differentiation and VEGF expression on multipotent bone marrow stromal cells [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 734483.
- [24] Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 937-945.
- [25] 单宇, 王亮, 张敏, 等. 铁蓄积、骨内血管与骨质疏松关系的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(7): 954-957, 962.
- Shan Y, Wang L, Zhang M, et al. Research advance in the relationship among iron accumulation, blood vessel in bone, and osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporos*, 2017, 23(7): 954-957, 962.
- [26] Zhao Y, Xie L. Unique bone marrow blood vessels couple angiogenesis and osteogenesis in bone homeostasis and diseases [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2020, 1474(1): 5-14.

[收稿日期] 2022-03-06

李美宁,马庆,弓韬,等. 小鼠 Spata3 蛋白结构和功能的生信分析及初鉴 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 767-776.  
Li MN, Ma Q, Gong T, et al. Bioinformatics analysis and primary identification of the structure and function of mouse Spata3 protein [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 767-776.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.005

# 小鼠 Spata3 蛋白结构和功能的生信分析及初鉴

李美宁<sup>1</sup>,马庆<sup>1</sup>,弓韬<sup>1</sup>,张引红<sup>2</sup>,闫萍<sup>1</sup>,翟翔<sup>1</sup>,郭睿<sup>1\*</sup>

(1. 山西医科大学生物化学与分子生物学教研室, 出生缺陷与细胞再生山西省重点实验室, 太原 030001; 2. 山西医科大学实验动物中心, 实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室, 太原 030001)

**【摘要】** 目的 对小鼠精子发生相关蛋白 3(spermatogenesis associated protein 3, Spata3) 的序列进行分析, 探讨其结构和功能。方法 利用 NCBI 数据库比对小鼠 Spata3 的同源性、ExPASy ProtParam 软件分析理化特征、SOPMA 及 GOR4 预测空间构象、NetPhos3.1 及 STRING 数据库分析蛋白修饰位点及蛋白间相互作用关系等信息、免疫组化和免疫荧光染色检测其组织细胞定位。结果 小鼠和人的 Spata3 基因 CDS 序列 64% 相同, 是碱性不稳定亲水蛋白, 无信号肽, 属于非跨膜的胞内蛋白, 主要定位于睾丸组织各级精子细胞核和胞质, 以圆形精子细胞表达量最高。小鼠 Spata3 含 1 个内在无序区结构域, 30 个潜在的磷酸化位点, 11 个潜在的 O-型糖基化位点, 可能与 Spata46、Spert 等蛋白相互作用。结论 小鼠 Spata3 是精子发生过程中的保守蛋白, 可能调节精子发生变形过程。

**【关键词】** Spata3; 精子发生; 生物信息学; 蛋白质修饰位点; 蛋白质相互作用

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0767-10

## Bioinformatics analysis and primary identification of the structure and function of mouse Spata3 protein

LI Meining<sup>1</sup>, MA Qing<sup>1</sup>, GONG Tao<sup>1</sup>, ZHANG Yinong<sup>2</sup>, YAN Ping<sup>1</sup>, ZHAI Xiang<sup>1</sup>, GUO Rui<sup>1\*</sup>

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Shanxi Key Laboratory of Birth Defect and Cell Regeneration, Taiyuan 030001, China. 2. Department of Laboratory Animal Science, Shanxi Medical University, Shanxi Key Laboratory of Laboratory Animal and Animal Model of Human Diseases, Taiyuan 030001)

Corresponding author: GUO Rui. E-mail: ruiguo@sxmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To analyze the sequence of mouse spermatogenesis associated protein 3 (Spata3) and explore its structure and function. **Methods** The NCBI database was used to compare the homology of mouse Spata3. ExPASy ProtParam software was used to analyze its physical and chemical characteristics. SOPMA and GOR4 predicted the spatial conformation. NetPhos3.1 and the STRING database were used to analyze protein modification sites and protein-protein interactions. Immunohistochemistry and immunofluorescence were used to observe the localization of Spata3 protein. **Results** Mouse Spata3 had 64% homology with humans in coding sequence. It was a basic unstable hydrophilic protein without a signal peptide. It was a non-transmembrane intracellular protein. It was mainly located in the nucleus and cytoplasm of sperm at all levels of testicular tissue, and its expression in round sperm cells was the highest. Spata3 contained an internal disordered domain, 30 potential phosphorylation sites, and 11 potential O-glycosylation sites, which may interact with proteins such as Spata46 and Spert. **Conclusion** Spata3 is a conserved protein in spermatogenesis and may regulate spermatogenesis.

**【Keywords】** Spata3; spermatogenesis; bioinformatics; protein modification site; protein-protein interaction

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

**【基金项目】** 山西省回国留学人员科研资助项目(2021-081), 山西省自然科学基金(20210302123322, 202103021224240)。

Funded by the Research Project Supported by Shanxi Scholarship Council of China(2021-081), Natural Science Foundation of Shanxi Province (20210302123322, 202103021224240).

**【作者简介】** 李美宁(1976—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 发育分子生物学。Email: lmnsmu@hotmail.com

**【通信作者】** 郭睿(1972—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 发育分子生物学。Email: ruiguo@sxmu.edu.cn

哺乳动物精子形成是一个非常复杂特异的过程,包括精子细胞发生的分化与增殖分裂和精子细胞变态成形。精子细胞的特殊形成过程受到多种因素的精细调控,尤其是睾丸组织特异性表达蛋白,深入探究其内在形成过程及参与分子的功能将有利于理解精子发生的分子机制,进而为揭示男性不育的发病机制提供理论和实验支持。精子发生相关蛋白 3 (spermatogenesis associated protein 3, Spata3), 亦称睾丸与生精细胞凋亡相关基因 1, 是我国学者傅俊江等<sup>[1]</sup>于 2003 年应用小鼠隐睾模型和抑制消减杂交筛选出的新 EST 片段,通过巢式 PCR 首次从小鼠克隆获得,并利用人类 cDNA 文库得到人同源基因,因在小鼠隐睾模型的患侧组织中表达较高,推测可能与生精细胞凋亡相关。随后研究者通过基因表达谱芯片分析发现非梗阻性无精症患者 Spata3 表达水平比正常男子降低 5.58 倍,提出 Spata3 可能是无精症的分子诊断标记<sup>[2]</sup>。近年来国内外的研究表明 Spata3 主要位于睾丸组织,基因缺失后精子形态改变,受精能力下降<sup>[3]</sup>,因此 Spata3 可能与精子发生及变形过程紧密相关。但目前对该基因功能发挥的作用途径有凋亡<sup>[1]</sup>与自噬<sup>[4]</sup>两个不同方面的报道,所以有必要利用生物信息学的相关技术系统梳理分析 Spata3 基因和蛋白的特征,进而为明确其发挥功能的分子作用机制和途径指引方向。因此,本文利用生物信息学的方法<sup>[5]</sup>,分析预测 Spata3 的理化特征、空间构象及相互作用蛋白等,并借助免疫组织化学染色和荧光染色初步验证 Spata3 的细胞定位,为下一步研究其在精子发生变形中的作用机制提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

6 只 8 周龄 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠,体重 20 ~ 25 g,由山西医科大学实验动物中心提供【SCXK(晋)2019-0004】,给予灭菌饲料、蒸馏水自由饮食,饲养室温度 22 ~ 25℃、湿度 50% ~ 70%、每 12 h 光照/黑暗循环。颈椎脱臼处理后分离睾丸组织,用于免疫组织染色,实验操作在山西医科大学实验动物中心实验室完成【SYXK(晋)2019-0007】。所有操作符合山西医科大学动物实验伦理学要求(SYDL2020006)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

Anti-Spata3 (ProSci, 6551), 即用型免疫组化试

剂盒(博士德, SA1028), Cy3 标记 donkey anti-rabbit 荧光二抗(Jackson, 711-175-152), Pro Long® Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen, P36931), 正置光学显微镜(尼康, Nikon Eclipse E100, 日本), 荧光显微镜(尼康, Ni-U, 日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠 Spata3 序列来源

基因在染色体定位信息、cDNA 及蛋白质序列来源于美国国家生物技术信息中心数据库, 基因登录号 NC-000067.7。

#### 1.2.2 小鼠 Spata3 一般特征分析

分子组成、分子质量、等电点、酸碱性及稳定性等理化性质应用 ExPASy 系统的 ProtParam tool 软件分析。亲疏水性通过 ProtScale 软件计算。有无信号肽采用 SignalP 6.0 Server 软件在线分析。跨膜区利用 TMHMM Server v. 2.0 软件预测<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.3 小鼠 Spata3 高级结构预测

二级结构使用 SOPMA 和 GOR 4 软件在线分析<sup>[7]</sup>。三级结构借助 Robetta 软件从头计算建模。蛋白结构域应用 Uniprot 网站预测。

#### 1.2.4 小鼠 Spata3 蛋白潜在修饰位点分析

磷酸化位点使用 NetPhos3.1 软件分析; N-型糖基化位点应用 NetNGlyc1.0 分析; O-型糖基化位点采用 YinOYang1.2 Server 分析。

#### 1.2.5 小鼠 Spata3 蛋白功能预测

基因表达谱和细胞表达模式通过 GEO 分析。亚细胞定位和核定位序列借助 PSORT 和 NLStradamu 软件预测。分子功能、细胞组分和生物学通路利用 NetGO 3.0 软件分析。与小鼠 Spata3 互作蛋白通过 STRING 数据库预测。

#### 1.2.6 免疫组织化学染色

免疫组织化学染色分析主要参考文献<sup>[4]</sup>进行。取 8 周龄 BALB/c 雄性小鼠睾丸组织, 4% 多聚甲醛固定、常规石蜡包埋、连续切片(厚 5 μm)、铺片于载玻片上, 烤箱烘干。使用通用型免疫组织化学试剂盒经亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(avidin biotinylated enzyme complex, ABC)法进行检测。一抗(兔抗 Spata3 多克隆抗体)1:400, 4℃ 孵育过夜; 次日加生物素标记的山羊抗兔二抗(1:200)室温孵育 1 h; ABC 液 37℃ 孵育 30 min, 最后 DAB 显色、苏木素复染、脱水、透明、封片。光学显微镜观察结果, 结果判定以出现棕黄色颗粒为阳性染色。所有实验均重复 3 次。

### 1.2.7 免疫细胞荧光染色

睾丸组织曲精小管内细胞的间接免疫荧光染色分析主要参照文献<sup>[8]</sup>进行。取 8 周龄 BALB/c 雄性小鼠睾丸组织置于预冷的 PBS 中,快速分离曲精小管,使用胶原酶消化成单细胞,取 50 μL 涂片,室温晾干。山羊血清封闭 1 h,一抗(兔抗 Spata3 多克隆抗体)1:200,4℃ 孵育过夜。次日加 Cy3 标记的驴抗兔二抗(1:400),37℃ 孵育 1 h,漂洗后加 20 μL 含 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)的抗淬灭封片剂。荧光显微镜下观察拍照。上述实验均重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 小鼠 Spata3 基因及蛋白序列信息

#### 2.1.1 基因信息

小鼠 Spata3 基因位于 1 号染色体 C5 区,基因全长 15 542 bp,含有 8 个外显子(见图 1)。

#### 2.1.2 cDNA 信息

小鼠 Spata3 的 cDNA 全长 1107 bp,碱基序列见 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_027300.4](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_027300.4)。其碱基组成及百分比:269 A(24.3%);347 C(31.3%);237 G(21.4%);254 T(22.9%)。开放阅读框起始于第 105 位,止于第 686 位,共 582 bp,与人 SPATA3 CDS 序列 64% 相同(见图 2)。

#### 2.1.3 蛋白质序列信息和理化性质

小鼠 Spata3 蛋白质含有 193 个氨基酸,分子式为 C<sub>901</sub>H<sub>1449</sub>N<sub>277</sub>O<sub>269</sub>S<sub>15</sub>,相对分子质量为 20 947.01,含有 2911 个原子,氨基酸序列见 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/170172533>。利用 CLUSTALW 2.1 和 ESPript 3.0 分析小鼠 Spata3 的氨基酸的同源性,结果显示分别与人 52.8%、猕猴 53.9%、大鼠 77.4%、黑猩猩 44.1% 同源(图 3)。采用 ProtParam tool 软件在线统计得到:其中脯氨酸占比最大(17.1%),丝氨酸次之(16.1%),色氨酸比例最小(1.0%)(见表 1)。其中带负电氨基酸残基有 10 个,带正电氨基酸残基有 28 个。其等电点预测是 9.83,呈碱性。其不稳定系数 101.98,表示小鼠 Spata3 可能是不稳定蛋白。

表 1 小鼠 Spata3 蛋白氨基酸组成

Table 1 Amino acids components of mouse Spata3

氨基酸 Amino acid	个数 Count	含量(%) Percentage composition
丙氨酸 Ala	10	5.2
精氨酸 Arg	15	7.8
赖氨酸 Lys	13	6.7
组氨酸 His	5	2.6
甘氨酸 Gly	9	4.7
亮氨酸 Leu	13	6.7
缬氨酸 Val	7	3.6
脯氨酸 Pro	33	17.1
丝氨酸 Ser	31	16.1
苏氨酸 Thr	7	3.6
天冬酰胺 Asn	5	2.6
天冬氨酸 Asp	4	2.1
半胱氨酸 Cys	12	6.2
谷氨酰胺 Gln	9	4.7
谷氨酸 Glu	6	3.1
异亮氨酸 Ile	3	1.6
甲硫氨酸 Met	3	1.6
苯丙氨酸 Phe	3	1.6
酪氨酸 Tyr	3	1.6
色氨酸 Trp	2	1.0

### 2.2 小鼠 Spata3 蛋白的亲(疏)水性

小鼠 Spata3 平均亲水性经 ProtParam tool 软件计算为-0.806,脂肪系数 48.03。采用 ProtScale 软件梳理其氨基酸的亲疏水性,其中第 12~15 位的精氨酸亲水性最强,亲水性-3.487;而第 104 位的亮氨酸疏水性最强,亲水性 1.609。Spata3 蛋白氨基酸亲疏水性分布(图 4)表明亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,属于亲水性蛋白。

### 2.3 小鼠 Spata3 蛋白质的信号肽预测

运用 SignalP 6.0 Server 软件进行信号肽预测,结果显示 Signal Peptide(Sec/SPI)的值为 0(o 线),Other 值为 1.001,表明小鼠 Spata3 蛋白无信号肽序列,为非分泌型蛋白,不跨胞膜运输(图 5)。

### 2.4 小鼠 Spata3 蛋白质的跨膜区域分析

应用 TMHMM Server v. 2.0 在线软件预测小鼠 Spata3 的跨膜区。图 6 中蓝色细线所对应的纵轴数

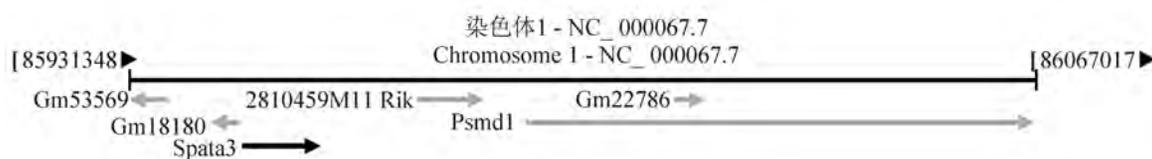


图 1 小鼠 Spata3 基因在染色体中的位置

Figure 1 Chromosome location of mouse Spata3

		一致性 Identities	间隙 Gaps
小鼠 Mouse	1	CACCATGAAGAAGGTCAAAAAGAAAAGTCTGATTCCAGGCGCCGAGGAATCCATTTC	60
人 Human	1	ATGAAGAAGGTCAAGAAGAAAAGTCTGATTCCAGGCGCCGAGGAATCCATTTC	56
小鼠 Mouse	61	ACCGCAGACTAGTCCGATTCC---TCACAGCAGCCAGCTCAGAAACCCCGCCGTCATG	117
人 Human	57	CCAGCATGCTAGTCCAATTCACCTCTCAGCAGCCTAGCCCTGAATCCACACC-----	110
小鼠 Mouse	118	TCCAGAGCCCGCTCG-CCACCATCTAAGCCACAGC---CTTGCCAGGAGTCCACCACAC	173
人 Human	111	---ACAGCA-GCCTAGTCTGAATCCACACCACAGCAGCCTAGCCCTGAATCCAC---AC	163
小鼠 Mouse	174	CACACCAAGTTAACCTTGAGCCCTAAACCGCAACAGCATACA--CCACAGCCTCTCCCGCC	231
人 Human	164	CACAGATTCCAGCCTTGAAACCACCTCCCGGACGCGCAGCATTCCA-AGCCCTCCAGCA	222
小鼠 Mouse	232	TCCAGAGAAACCTGCC--TCATCTCCGTTCTGCTGCTACC--CA--TGG-AACCTAAC-CA	283
人 Human	223	CCC---GAAATCCGCGCTCCTCTGCTGCTTTTATCTCCAGATGCTAACGTGAAAGGCA	279
小鼠 Mouse	284	ATTCTTCAAGCAGGAAAGCAGCAGTGCCTCTGACCTATGTTGGCCCAACGCTCTGCTCC	343
人 Human	280	GGCCCTCAATCCAGGAAAGCAGG---GCCTCTGATTCCGCGCCCGCCGCAITCTGCTCC	336
小鼠 Mouse	344	TGTGCAGCCTGCCCGGCGAGCTCCGCTTGTGGCATGCTCTGGGGCTTTGCCATAGCCGA	403
人 Human	337	TGTGCCACTTGCCCTGCAGCTCCGCTTGTGGCGTCTGGGGCTATGCCATAGCCGC	396
小鼠 Mouse	404	ATCTTTGATGCTCTCTACCTCGGGACTGGTATCCATG---CCAGGGAGAGGAGTCCCA	460
人 Human	397	ATCTTCGATGCTCTCTGCTCGGGACTGG-CAG--ATGGCGCCAGGGAGAGGACTCCCC	453
小鼠 Mouse	461	AACCTTCTCACCTTCTACAGAAAACCGTCAAGGAAGTACTGGCTCCCGTAACCTCTCGT	520
人 Human	454	AACCTGCTCACCTTCTACAGAAAATCTTCAAGAAAACCTCCAGTATCGTAACCGGTGT	513
小鼠 Mouse	521	GCTTCAAGCTCTCGAACTGTTGCTGTGGCTCTGGGGCCCTTTGGGAGTTGCTACTTCAT	580
人 Human	514	CCTCCAAGCCCTCGAACTGTTGCTGTGGCTCTGGGGCTCTAGGAGTGCCTACTACAT	573
小鼠 Mouse	581	GGCTGA 586	
人 Human	574	CACTGA 579	

图 2 小鼠与人 Spata3 CDS 比对结果

Figure 2 Blast result of Spata3 CDS between mouse and human

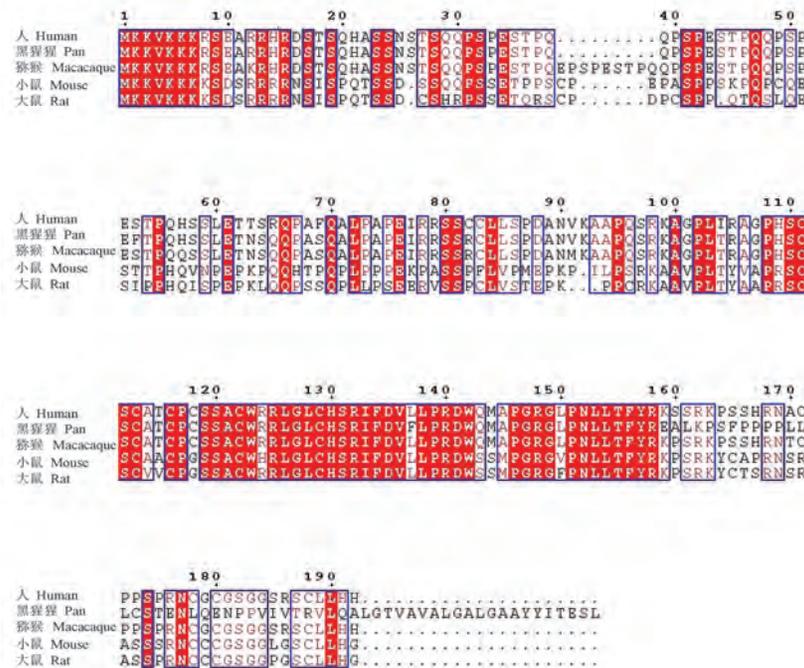
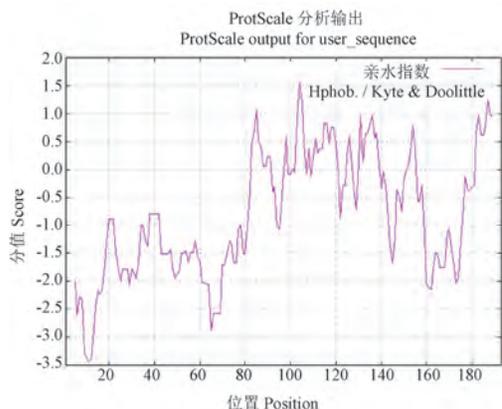


图 3 小鼠与人、猕猴、黑猩猩 Spata3 蛋白同源性比对结果

Figure 3 Homologous comparison of Spata3 in mouse, human, macaque and pan troglodytes



注:正值代表疏水区;负值代表亲水区。

图 4 小鼠 Spata3 蛋白疏水性分析

Note. Positive value represents hydrophobic area. Negative values represent hydrophilic area.

Figure 4 Hydrophobicity analysis of mouse Spata3

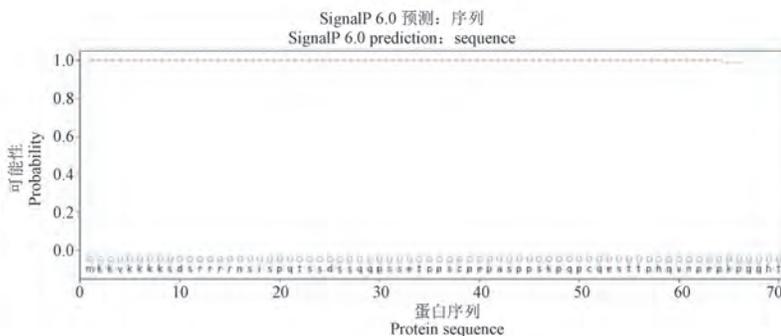


图 5 小鼠 Spata3 蛋白信号肽预测

Figure 5 Signal peptide prediction of mouse Spata3

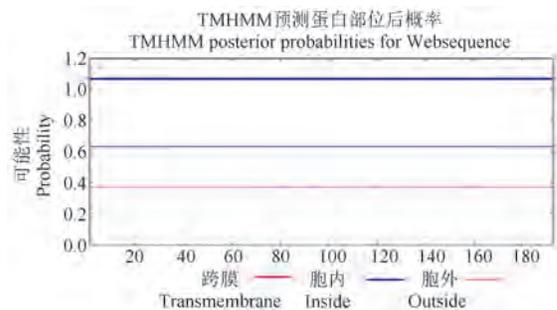


图 6 小鼠 Spata3 蛋白跨膜区预测

Figure 6 Transmembrane region prediction of mouse Spata3

### 2.6 小鼠 Spata3 蛋白的三级结构预测分析

通过 Rosetta 软件从头计算的方法进行三维空间结构预测,从图 9A 可见小鼠 Spata3 蛋白存在大量无规则卷曲结构,α 螺旋数量较少,符合二级结构预测结果。此三维结构模型的可信度是 0.44,总误差分析在 5 ~ 25 埃之间(图 9B)。

### 2.7 小鼠 Spata3 蛋白质结构域

利用 Uniprot 网站分析蛋白结构域。数据库结

值说明该蛋白质位于胞内的概率约 0.63041,粉色细线相对应的纵坐标数值表示该蛋白质位于胞外的可能性约 0.36959,无跨膜螺旋存在,蓝色粗线表示综合结果,位于胞内(总概率大于 1),预测结果显示小鼠 Spata3 蛋白属于非跨膜的胞内蛋白(图 6)。

### 2.5 小鼠 Spata3 蛋白质的二级结构预测

相似度阈值设置为 8,通过 SOPMA 软件分析小鼠 Spata3 蛋白可能含有 4 种二级结构:无规则卷曲为 77.72%、α 螺旋为 7.77%、延伸链为 10.88%和 β 折叠为 3.63%(图 7)。采用 GOR 4 预测其含有两种二级结构:无规则卷曲为 87.05%和延伸链为 12.95%(图 8)。综上,小鼠 Spata3 蛋白的主要结构为无规则卷曲和延伸链,无规则卷曲结构可能与其功能发挥密切相关。

果显示小鼠 Spata3 蛋白 1 ~ 92 属于无序区域,与 Novopro 蛋白质固有无序区域预测结果相符(图 10)。组成特征表现为 16 ~ 33 为极性氨基酸残基区、34 ~ 51、64 ~ 91 为富含脯氨酸残基区。内在无序区域与蛋白在细胞内的相变聚集及功能发挥密切相关,另外脯氨酸富集区可能提供了 SH<sub>3</sub> 结构域的识别位点。

### 2.8 小鼠 Spata3 蛋白磷酸化修饰位点

NetPhos 3.1 软件在线分析蛋白潜在磷酸化位点,阈值设定为 0.5,小鼠 Spata3 蛋白含有 30 个潜在磷酸化位点。其中丝氨酸位点占大多数,有 25 个;苏氨酸位点仅 5 个;酪氨酸可能无磷酸化。糖原合成酶激酶 3β(glycogen synthase kinase 3, GSK3β)等激酶能够催化相应位点磷酸化(图 11)。

### 2.9 小鼠 Spata3 蛋白 N/O-糖基化位点预测

N-型糖基化位点经 NetNGlyc1.0 在线软件预测显示没有 N-型糖基化位点(图 12A)。YinOYang1.2 在线软件分析得出小鼠 Spata3 蛋白有 11 个可能的 O-型糖基化位点(图 12B)。

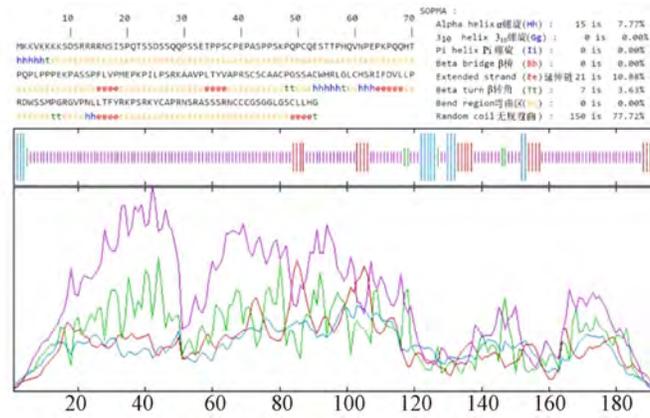


图 7 小鼠 Spata3 蛋白 SOPMA 软件预测二级结构

Figure 7 Secondary structure of mouse Spata3 by SOPMA software

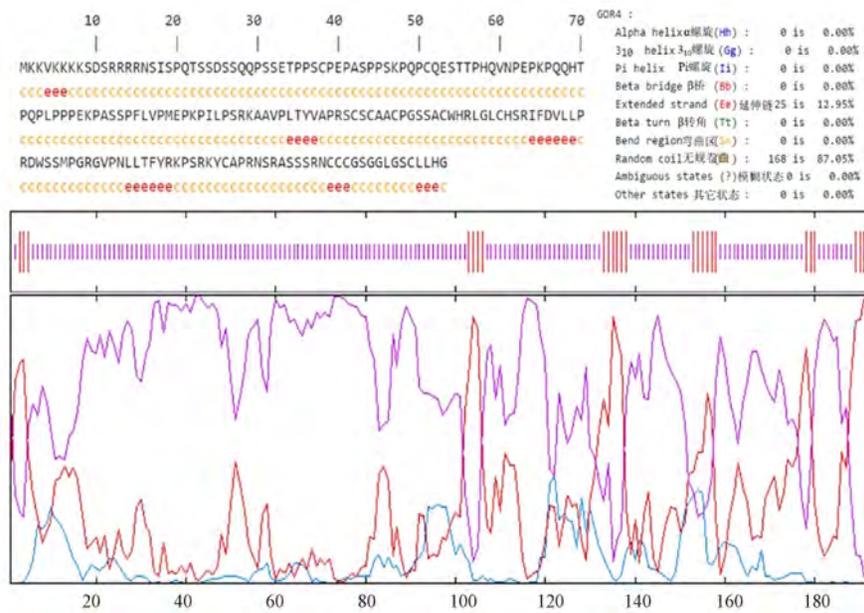
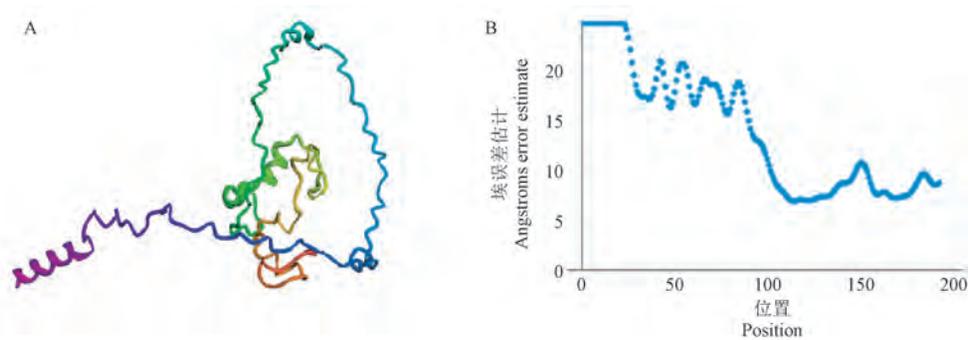


图 8 小鼠 Spata3 蛋白 GOR4 软件预测二级结构

Figure 8 Secondary structure of mouse Spata3 by GOR4 software



注:A:三级结构模型;B:可信度曲线。

图 9 小鼠 Spata3 蛋白 Rosetta 软件三级结构建模分析

Note. A. The model of tertiary structure. B. The curve of angstroms error estimate.

Figure 9 Tertiary structure and model analysis of mouse Spata3 by Rosetta software

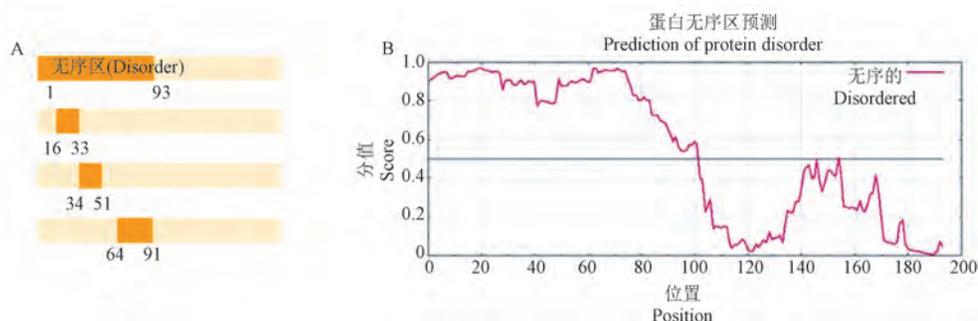
### 2.10 小鼠 Spata3 蛋白在组织中的表达分析

利用 NCBI 网站基因表达谱分析显示小鼠 Spata3 在睾丸组织中大量表达,附睾有少量表达,其它组织中未发现表达(图 13)。

### 2.11 小鼠 Spata3 蛋白在睾丸细胞中的表达分析

通过 GEO 数据库分析显示小鼠 spata3 在精子

发育的各阶段细胞具有表达,并且圆形精子细胞表达较高(图 14A)。我们对 8 周雄性小鼠睾丸组织进行免疫组织化学染色,结果显示小鼠 Spata3 蛋白染色阳性呈棕黄色颗粒,主要出现在曲精小管的圆形和长形精子细胞,精母细胞呈弱阳性,但精原细胞、间质细胞及支持细胞未检测到阳性信号(图 14B)。



注:A:序列组成示意图;B:蛋白无序区预测。

图 10 小鼠 Spata3 蛋白无序结构域预测

Note. A. The schematic diagram of sequence. B. The prediction of protein disorder region.

Figure 10 Disordered domain prediction of mouse Spata3

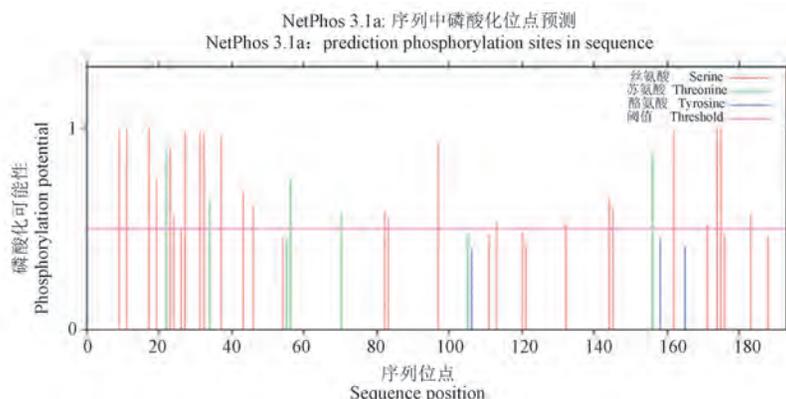
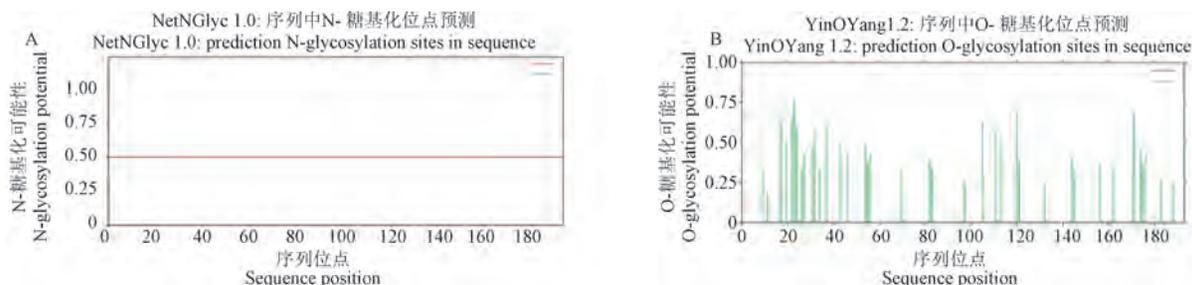


图 11 小鼠 Spata3 蛋白潜在磷酸化位点

Figure 11 Phosphorylation site prediction of mouse Spata3



注:A:N-糖基化可能位点;B:O-糖基化可能位点。

图 12 小鼠 Spata3 蛋白 N-/O-糖基化位点分布

Note. A. N-glycosylation potential site. B. O-glycosylation potential site.

Figure 12 N-/O-glycosylation site prediction of mouse Spata3

### 2.12 小鼠 Spata3 蛋白质的亚细胞定位及核定位序列

利用 PSORT 软件,选择 PSORT II Prediction,预测分析蛋白的亚细胞定位,结果显示小鼠 Spata3 定位于细胞核、线粒体、细胞质和细胞骨架,概率分别为:73.9%、13.0%、8.7%和 4.3%。利用 NLStradamus 分

析 Spata3 蛋白的核定位序列为 2-KKVKKK KSDSRRRRN-16(预测阈值标准 0.6)。The Human Protein Atlas 数据库预测蛋白极可能存在于细胞核内。收集曲精小管消化细胞进行免疫荧光染色实验,结果显示红色荧光标记的 Spata3 蛋白主要集中在圆形精子和长形精子细胞胞核和胞质(图 15)。

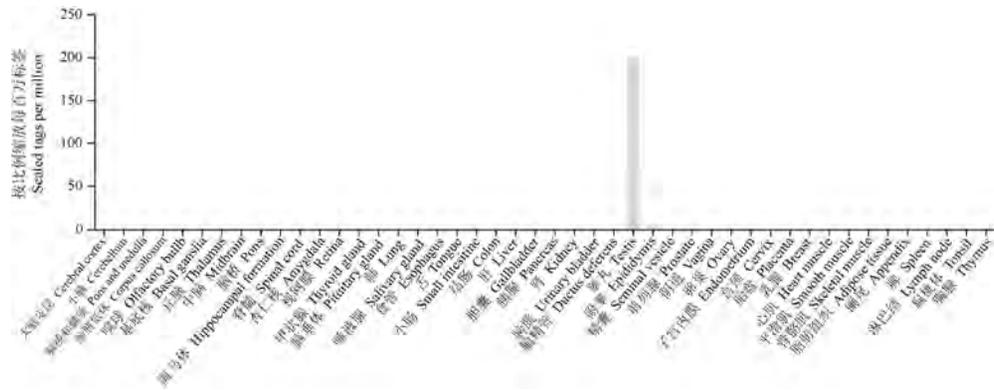
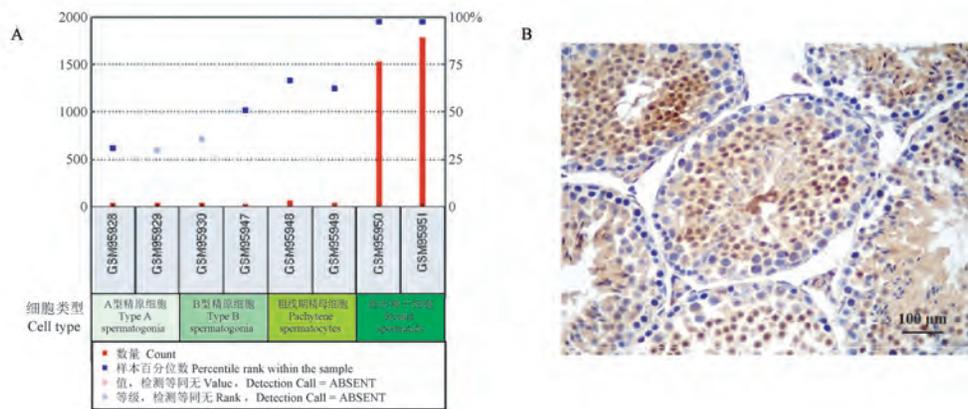


图 13 小鼠 Spata3 蛋白组织定位  
Figure 13 Tissue localization of mouse Spata3

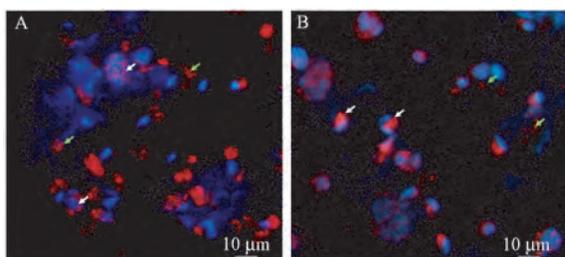


注:A:GEO 细胞表达分析;B:免疫组化检测。

图 14 小鼠 Spata3 蛋白在精子发育各阶段细胞表达

Note. A. The GEO analysis of cell expression. B. Immunohistochemical detection.

Figure 14 Cell expression pattern of mouse Spata3 in spermatogenesis



注:A:圆形精子为主;B:长形精子为主;白色箭头指示核核;绿色箭头指示胞质。

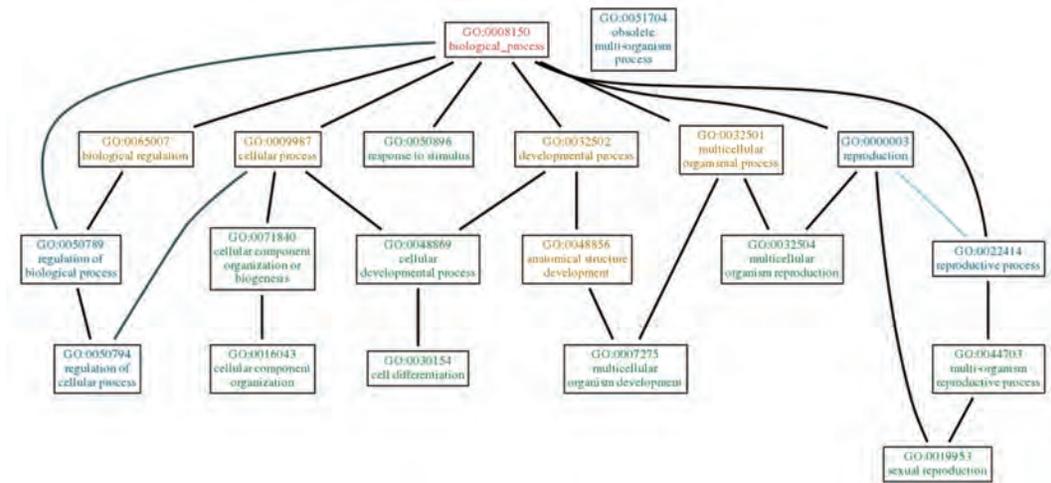
图 15 小鼠 Spata3 蛋白在精子细胞中的定位

Note. A. Round spermatids. B. Elongate spermatids. White arrow indicates nuclear. Green arrow indicates cytoplasm.

Figure 15 Subcellular localization of mouse Spata3 in spermatids

### 2.13 小鼠 Spata3 蛋白功能和相互作用预测

利用 NetGO 3.0 对蛋白功能进行分析,小鼠 Spata3 分子功能是与蛋白和核酸的结合,分值大于 0.7;细胞组分是位于胞质和核内,分值大于 0.7;生物学通路主要参与细胞分化、有性生殖等,相关性大于 0.6(图 16)。进一步通过 STRING 数据库预测可能与小鼠 Spata3 互作的蛋白质,交互数量阈值设置为 10,建构互作蛋白质的网络图,结果显示小鼠 Spata3 与 Spata1、Spata9、Spata20、Spata25、Spata46、Tmem225、Fam71f 等有相互作用(图 17),相关度均高于 0.6。



注:颜色代表相关度:红色(1.0 ~ 0.9), 褐色(0.9 ~ 0.8), 蓝色(0.8 ~ 0.7), 绿色(0.7 ~ 0.6), 黑色(0.6 ~ 0)。

图 16 小鼠 Spata3 参与的生物学通路

Note. The color represents correlation. Red (1.0 ~ 0.9), brown (0.9 ~ 0.8), blue (0.8 ~ 0.7), green (0.7 ~ 0.6), black (0.6 ~ 0).

Figure 16 Biological process predication of mouse Spata3

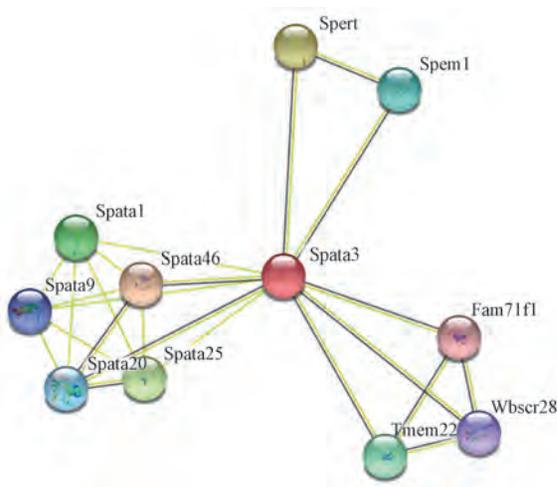


图 17 小鼠 Spata3 蛋白相互作用预测

Figure 17 Interactional proteins predication of mouse Spata3

### 3 讨论

精子发生是由精原细胞通过有丝分裂、减数分裂和精子变形等一系列高度有序的生理过程最后形成成熟的精子<sup>[9-10]</sup>。精子发育障碍是引起男性不育的主要原因,但目前对参与这一高度有序发育过程的分子和相关调控机制仍认识不足。Spata3 基因是利用抑制消减杂交方法筛选的差异表达基因并发现小鼠隐睾组织表达较正常组织升高,推测其可能与生精细胞凋亡有关<sup>[1]</sup>。随后在非梗阻性无精症患者的睾丸组织检测发现 Spata3 表达较正常组织显著降低<sup>[2]</sup>。近年有研究者利用全外显子突变谱分析发现 Spata3 外显子突变位点与男性前列

腺癌<sup>[11]</sup> 的发生相关,采用 CRISPR/Cas 技术敲除 Spata3 基因后小鼠精子形态明显改变,体外受精能力减弱<sup>[3]</sup>。综合上述文献,提示 Spata3 在精子的发育过程中具有重要功能。我们课题团队十余年来亦致力于 Spata3 的研究工作,明确了小鼠 Spata3 的睾丸组织表达,在细胞实验中发现 Spata3 对细胞凋亡无影响,但能够促进自噬的发生<sup>[4]</sup>,这与前述文献报道的 Spata3 与凋亡相关存在偏差。而且目前对 Spata3 基因发挥生物学功能的分子机制研究未见相关的文献报道,因此需要重新系统的梳理认识 Spata3 的特性。

目前一般先通过生物信息学技术对功能不详的基因进行分析预测,以获得相关基因及其蛋白质的基本情况,再结合实验研究来验证该基因的可能作用机制。本文利用生物信息学方法首先对 Spata3 的基因和氨基酸序列进行了比对分析,发现小鼠 Spata3 蛋白在人类有同源蛋白,同源性较高,约 64%,而且与猕猴、黑猩猩的也具有较高同源性,表明 Spata3 是哺乳动物精子发生过程中的保守蛋白,这为以小鼠作为模型研究其功能和机制奠定了基础。利用 ExPASy 系统的 ProtParam tool 等软件分析得出小鼠 Spata3 是碱性亲水蛋白质,稳定性较差、无信号肽和跨膜区。通过 SOPMA、GOR 4 等预测结果显示 Spata3 二级结构主要为无规则卷曲,三级结构特征是 N 端的内在无序区,染色实验结果显示其亚细胞定位于胞核和胞质。这种碱性蛋白在胞核易于和染色体结合,有可能通过其内在无序区相变

聚集而发挥功能<sup>[12]</sup>。生物学功能预测 Spata3 主要参与细胞分化、有性生殖等,进一步利用 STRING 软件蛋白质相互作用分析推测其可能与 Spata46、Spert 等蛋白质相互作用。Spata46 是特异性表达定位于顶体下区核膜中的跨膜蛋白,Chen 等<sup>[13]</sup>研究显示其参与精子头部重塑和精卵融合。缺失 Spata46 引起精子头部形状异常和精卵融合失败,导致雄性不育。因此我们推测 Spata3 可能与互作蛋白结合参与精子发生和变形的精细调控。

我们利用生物信息学方法对鼠 Spata3 的基因和氨基酸序列进行了比对,预测了其理化特性和三维空间构象等信息,初步验证了其细胞组织定位。鼠 Spata3 蛋白质可能通过与 Spata46、Spert 等蛋白质相互作用,从而参与精子发生过程。

#### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] 傅俊江, 卢光琇, 李麓芸, 等. 睾丸生精细胞凋亡相关基因 *TSARG1* 与 *Mtsarg1* 的分子克隆及 *Mtsarg1* 基因的表达谱分析 [J]. 遗传学报, 2003, 30(1): 25-29.  
Fu JJ, Lu GX, Li LY, et al. Molecular cloning for testis spermatogenesis cell apoptosis related gene *TSARG1* and *Mtsarg1* and expression analysis for *Mtsarg1* gene [J]. Acta Genet Sin, 2003, 30(1): 25-29.
- [ 2 ] Malcher A, Rozwadowska N, Stokowy T, et al. Potential biomarkers of nonobstructive azoospermia identified in microarray gene expression analysis [J]. Fertil Steril, 2013, 100(6): 1686-1694.
- [ 3 ] Girault MS, Dupuis S, Ialy-Radio C, et al. Deletion of the *Spata3* gene induces sperm alterations and *in vitro* hypofertility in mice [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1959.
- [ 4 ] 王玉晶, 温丽敏, 白欣艳, 等. 小鼠精子发生相关蛋白 3 基因在小鼠生精细胞的特异表达及对 HEK 293T 细胞凋亡和自噬的影响 [J]. 解剖学报, 2018, 49(1): 41-48.  
Wang YJ, Wen LM, Bai XY, et al. Novel expression of spermatogenesis-associated protein 3 gene in mouse spermatogenic cells and its influence upon apoptosis and autophagy in HEK 293T cells [J]. Acta Anat Sin, 2018, 49(1): 41-48.
- [ 5 ] 周唯君, 彭涛, 周栋珍, 等. rpl15 在斑马鱼胚胎中的表达形式探究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 9-15.  
Zhou WJ, Peng T, Zhou DZ, et al. Expression of rpl15 in zebrafish embryos [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 9-15.
- [ 6 ] 王晓宇, 秦凯莉, 赵莹珠, 等. 人锌指蛋白 219 结构和功能的生物信息学分析 [J]. 生命的化学, 2021, 41(10): 2243-2253.  
Wang XY, Qin KL, Zhao YZ, et al. Bioinformatics analysis of the structure and function of human zinc finger protein 219 [J]. Chem Life, 2021, 41(10): 2243-2253.
- [ 7 ] Zhou B, Wei C, Khan MA, et al. Characterization and molecular cloning of novel isoforms of human spermatogenesis associated gene *SPATA3* [J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(4): 3827-3834.
- [ 8 ] 杨红, 李晓宾, 李婷, 等. 丝氨酸/精氨酸蛋白特异激酶 SRPK2 在小鼠睾丸组织中的表达及意义 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(2): 171-177.  
Yang H, Li XB, Li T, et al. Expression and significance of SR-protein-specific kinase SRPK2 in mouse testis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(2): 171-177.
- [ 9 ] Griswold MD. Spermatogenesis: the commitment to meiosis [J]. Physiol Rev, 2016, 96(1): 1-17.
- [ 10 ] Pereira CD, Serrano JB, Martins F, et al. Nuclear envelope dynamics during mammalian spermatogenesis: new insights on male fertility [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2019, 94(4): 1195-1219.
- [ 11 ] Oh JJ, Shivakumar M, Miller J, et al. An exome-wide rare variant analysis of Korean men identifies three novel genes predisposing to prostate cancer [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 17173.
- [ 12 ] Shin Y, Berry J, Pannucci N, et al. Spatiotemporal control of intracellular phase transitions using light-activated optoDroplets [J]. Cell, 2017, 168(1/2): 159-171.
- [ 13 ] Chen J, Gu Y, Zhang Z, et al. Deficiency of SPATA46, a novel nuclear membrane protein, causes subfertility in male mice [J]. Biol Reprod, 2016, 95(3): 58.

[收稿日期] 2022-04-13

尹丽红,焦琳,陈裕,等. 多囊卵巢综合征大鼠子宫内膜中 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达异常与胰岛素抵抗的关系 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 777-783.

Yin LH, Jiao L, Chen Y, et al. Relationship between abnormal expression of PI3K/AKT pathway-related protein and insulin resistance of rats of polycystic ovary syndrome with endometrial insulin resistance [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 777-783.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.006

# 多囊卵巢综合征大鼠子宫内膜中 PI3K/AKT 通路 相关蛋白表达异常与胰岛素抵抗的关系

尹丽红<sup>1</sup>,焦琳<sup>2</sup>,陈裕<sup>2</sup>,陈嘉欣<sup>3</sup>,杜斯琪<sup>2</sup>,王翰林<sup>2</sup>,赵舜滢<sup>1</sup>,殷春霞<sup>2</sup>,  
曹丽芬<sup>2</sup>,余万霖<sup>2</sup>,谢长才<sup>2\*</sup>

(1. 广州中医药大学第二临床医学院,广州 510006;2. 广东省中医院,广州 510120;  
3. 广州医科大学附属中医医院,广州 510130)

**【摘要】** 目的 通过脱氢表雄酮(DHEA)联合高脂饮食(HFDs)构建多囊卵巢综合征(PCOS)子宫内膜局部胰岛素抵抗(IR)的大鼠模型,通过检测子宫内膜中胰岛素相关蛋白及 PI3K/AKT 通路相关蛋白的表达水平,观察子宫内膜是否存在胰岛素抵抗并探究其可能机制。方法 选取 32 只 21 日龄 SD 雌性大鼠,随机分为模型组( $n = 24$ )与对照组( $n = 8$ )。模型组每天于颈背部皮下注射 DHEA 6 mg/100 g 并以高脂饲料喂养,对照组于颈背部皮下注射同等体积的注射用玉米油并以正常饲料喂养,实验周期 30 d。根据阴道涂片及卵巢组织染色结果筛选出 PCOS 大鼠,通过检测空腹血糖(FBG)、血清胰岛素水平(FINS)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)筛选出 PCOS 伴 IR 的大鼠(PCOS-IR 组),再通过检测其与对照组子宫内膜中 IR 相关蛋白(IRS1、GLUT-4)及 PI3K/AKT 通路相关蛋白(PI3K、PI3K p110 $\alpha$ 、p-AKT、AKT)的表达差异,探究其可能机制。结果 对照组大鼠涂片示规律动情、卵巢组织结构正常,而模型组大鼠动情周期紊乱、卵巢符合多囊卵巢表现,且模型组大鼠与对照组比较,其 FBG( $P > 0.05$ )、FINS( $P > 0.05$ )及 HOMA-IR 指数( $P < 0.01$ )均升高,其中从模型组筛选出 PCOS 大鼠 11 只,PCOS-IR 大鼠 8 只,其中 6 只子宫内膜组织 IRS1、GLUT-4 表达水平显著降低( $P < 0.01$ ),提示子宫内膜组织存在 IR。此外,与对照组相比,PCOS-IR 组子宫内膜组织中的 PI3K 表达水平上升( $P < 0.05$ ),PI3K p110 $\alpha$ ( $P < 0.01$ )、p-AKT( $P < 0.01$ )及 AKT 表达水平( $P > 0.05$ )降低,提示子宫内膜中 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达下调。结论 PCOS 伴 IR 大鼠其表现特征性的多囊卵巢组织、糖代谢异常,其子宫内膜可能存在胰岛素抵抗,且可能与 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达异常有关。

**【关键词】** 多囊卵巢综合征;胰岛素抵抗;脱氢表雄酮;高脂饮食;大鼠模型;子宫内膜

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0777-07

## Relationship between abnormal expression of PI3K/AKT pathway-related protein and insulin resistance of rats of polycystic ovary syndrome with endometrial insulin resistance

YIN Lihong<sup>1</sup>, JIAO Lin<sup>2</sup>, CHEN Yu<sup>2</sup>, CHEN Jiabin<sup>3</sup>, DU Siqi<sup>2</sup>, WANG Hanlin<sup>2</sup>, ZHAO Shunying<sup>1</sup>, YIN Chunxia<sup>2</sup>,  
CAO Lifeng<sup>2</sup>, YU Wanlin<sup>2</sup>, XIE Changcai<sup>2\*</sup>

**【基金项目】** 广东省自然科学基金项目(2019A1515011504),市校(院)联合资助项目(202102010261)。

Funded by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2019A1515011504), Municipal School (College) Joint Funding Project (202102010261).

**【作者简介】** 尹丽红(1995—),女,硕士,研究方向:针灸治疗肥胖合并抑郁障碍相关疾病。Email:20201120404@stu.gzucm.edu.cn

**【通信作者】** 谢长才(1969—),男,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:针灸治疗肥胖内分泌相关疾病。Email:hxie114@163.com

- (1. the Second Clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China.
  2. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120. 3. the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510130)
- Corresponding author: XIE Changcai. E-mail: hxie114@163.com

**【Abstract】 Objective** To establish a rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS) with endometrial insulin resistance (IR) by combining dehydroepiandrosterone (DHEA) with a high fat diet (HFDs). And by detecting the expression levels of insulin resistance related proteins and PI3K/AKT pathway-related proteins in the endometrium, we can observe whether there is insulin resistance in the endometrium and explore its possible mechanism. **Methods** Thirty-two 21-day-old SD female rats were randomly divided into a Model group (Model group,  $n = 24$ ) and Control group (Control group,  $n = 8$ ). The Model group was subcutaneously injected with 6 mg/100 (g · d) DHEA on the back of the neck and fed the high fat diet. The Control group was subcutaneously injected with the same volume of corn oil for injection on the back of the neck and fed a normal diet. The experimental period was 30 days. In accordance with the result of vaginal smear and ovarian tissue staining, PCOS rats were screened. And PCOS with IR rats (PCOS-IR) were screened by detecting fasting blood glucose (FBG), serum insulin level (FINS), and insulin resistance index (HOMA-IR). Then by detecting the differences in the expression of IR-related proteins (IRS1, GLUT-4) and PI3K/AKT pathway-related proteins (PI3K, PI3K p110 $\alpha$ , p-AKT, AKT) in the endometrium between the two groups to explore the possible mechanism. **Results** Smears from rats in the Control group showed regular estrus and a normal ovarian tissue structure, whereas those of rats in the Model group had disordered estrous cycles and the ovaries had polycystic ovary manifestations. Compared with the Control group, FBG ( $P > 0.05$ ), FINS ( $P > 0.05$ ), and HOMA-IR ( $P < 0.01$ ) of rats in the Model group were all increased, among which 11 PCOS rats and eight PCOS with IR rats were screened from the Model group. Additionally, western blotting of IR-related proteins in endometrial tissue showed that IRS1 and GLUT-4 expression in the PCOS-IR were decreased ( $P < 0.01$ ), suggesting the existence of IR in the endometrial tissue. Compared with the Control group, the PI3K expression level was increased in the PCOS-IR group ( $P < 0.05$ ), and the PI3K p110 $\alpha$  ( $P < 0.01$ ), p-AKT ( $P < 0.01$ ), AKT ( $P > 0.05$ ) expression levels were decreased in the endometrial tissues, suggesting that it may be related to the down-regulation of PI3K/AKT pathway-related protein expression in the endometrium. **Conclusions** Rats with PCOS and IR have characteristic polycystic ovary tissue and abnormal glucose metabolism, and their endometrium is mostly insulin resistant, and may be related to the downregulation of PI3K/AKT pathway-related protein expression.

**【Keywords】** polycystic ovary syndrome; insulin resistance; dehydroepiandrosterone; high-fat diet; rat model; endometrial

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

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是临床常见的妇科内分泌与生殖障碍并存的疾病<sup>[1]</sup>。随着生活方式和环境因素的改变, PCOS 的发病率更是呈持续上升的趋势<sup>[2]</sup>。目前此病的发病机制虽尚不明确, 但以胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 为中心的代谢紊乱是 PCOS 患者重要的病理生理改变之一<sup>[3]</sup>。据报道, 临床约 50% ~ 70% 的 PCOS 患者存在胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)<sup>[4]</sup>。PCOS 伴 IR 引起外周组织对胰岛素的敏感性下降, 血清胰岛素水平升高, 升高的胰岛素导致高雄激素血症, 过高的雄激素一方面可以作用于卵巢抑制卵泡发育, 另一方面又会进一步加剧外周 IR, 两者形成恶性循环, 最终造成育龄期 PCOS 患者受孕困难, 生育力低下<sup>[5]</sup>。随着研究的

深入, 在 21 世纪初, Moran 等<sup>[6]</sup>、McGee 等<sup>[7]</sup>发现卵巢局部存在 IR 现象, 提出了卵巢 IR 的概念。卵巢 IR 不仅会改变卵巢的糖代谢情况, 更重要的是可以使卵巢处于功能亢进的状态, 对促性腺激素的反应性显著增加, 甾体激素分泌异常, 造成卵泡发育障碍。然而, 随着近年来辅助生殖技术的发展, PCOS 患者在体外受精-胚胎移植周期中仍然存在低种植率、高流产率的现象<sup>[8]</sup>, 因此有学者认为子宫 IR 可能是 PCOS 患者生育力低的重要原因<sup>[9]</sup>。

IR 临床诊断指标是基于空腹血糖和空腹胰岛素的 HOMA-IR 指数, 此外, 新兴的 IR 生物标记物也可作为诊断的参考指标<sup>[10]</sup>; 其主要信号调控途径包括胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate 1, IRS1/磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase,

PI3K)、丝氨酸-苏氨酸激酶 (serine-threonine kinase, Akt) 通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路及 Smad3 通路等。IR 的机制主要为胰岛素与胰岛素受体结合缺陷及胰岛素信号传导异常。研究表明,胰岛素受体及 PI3K 表达降低,减少囊泡移位到细胞膜外,导致葡萄糖进入细胞内数量减少。胰岛素受体的丝氨酸磷酸化作用,降低胰岛素受体对 PI3K 的激活作用,导致葡萄糖吸收和利用减少<sup>[11-12]</sup>。本研究拟初步筛选出 PCOS 伴 IR 大鼠,以动情周期紊乱、卵巢符合多囊卵巢表现且 FBG、FINS、HOMA-IR 指数均高于对照组为模型筛选标准,最终通过检测子宫内膜中胰岛素抵抗相关蛋白及 PI3K/AKT 通路相关蛋白的表达水平,观察子宫内膜是否存在胰岛素抵抗并探究其可能机制。拟深入 PCOS 潜在病理生理改变——子宫内膜 IR,为寻找治疗 PCOS 的作用靶点提供新思路,为临床解决 PCOS 患者妊娠率低、流产率高的问题提供新的治疗方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

32 只 SPF 级 21 日龄 SD 雌性大鼠,体重 43 ~ 57 g,购于广州南方医大实验动物科技发展有限公司【SCXK(粤)2016-0041】。饲养期间各组大鼠自由饮水,高脂饲料由广东省医学实验动物中心【粤饲证(2019)05073】提供,其成分为蔗糖 20%,猪油 15%,胆固醇 1.2%,胆酸钠 0.2%,酪蛋白 10%,磷酸氢钙 0.6%,石粉 0.4%,预混料 0.4% 及基础饲料 52.2%。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 23 ~ 26℃,实验室通气良好,清洁,大鼠可以自由饮水和进食,饲养于广东省中医院动物实验室【SYXK(粤)2018-0094】。所有操作均符合广东省中医院实验动物伦理学要求(审批号:2020077)。

#### 1.1.2 实验药物

脱氢表雄酮 (DHEA) (Sigma, 批号 252805),注射用玉米油(产自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号 C116025)。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

胰岛素 ELISA 检测试剂盒 (Proteinch, 批号 KE20008), IRS1 抗体 (Abclonal, 批号 A0245), PI3K 抗体 (Cell signaling technology, 批号 3358S), PI3K

p110 $\alpha$  抗体 (Cell signaling technology, 批号 4249), AKT 抗体 (Proteintech, 批号 60203), p-AKT (Ser473) 抗体 (Cell signaling technology, 批号 4060), GLUT-4 抗体 (Proteinch, 批号 66846),  $\beta$ -actin 抗体 (Cell signaling technology, 批号 4970S), 二抗 (Cell signaling technology, 批号 7074S、7076S), 瑞氏染色液 (碧云天, 批号 C0135), 苏木素-伊红染液 (碧云天, 批号 C0105S)。EonC 酶标仪 (美国 BioTek 公司), 血糖检测仪 (德国拜耳公司), IX71 光学显微镜 (日本奥林巴斯株式会社)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组及实验干预

将 SPF 雌性大鼠 32 只随机分为 2 组:模型组 ( $n = 24$ ) 和对照组 ( $n = 8$ )。模型组每天于颈背部皮下注射 DHEA 6 mg/100 g 并以高脂饲料喂养,对照组于颈背部皮下注射同等体积的注射用玉米油并以正常饲料喂养。实验周期 30 d 结束后,根据阴道涂片及卵巢组织染色结果从模型组中筛选出 PCOS 模型成功的大鼠 11 只,其次通过检测 PCOS 模型成功大鼠的 FBG、FINS、HOMA-IR 指数筛选出 PCOS-IR 组大鼠 8 只。最后检测 PCOS-IR 组与对照组 IR 相关蛋白 (IRS1、GLUT-4) 及 PI3K/AKT 通路相关蛋白 (PI3K、PI3K p110 $\alpha$ 、p-AKT、AKT) 表达结果。大鼠子宫 IR 模型制备:照改良后的 PCOS 大鼠动物模型造模方法<sup>[13]</sup>,大鼠颈背部皮下注射 DHEA 6 mg/100 g,并以高脂饲料喂养,每天 1 次,连续 30 d。

#### 1.2.2 形态指标测试及取材

实验期间每 3 d 记录 1 次大鼠体重,造模后第 30 天,大鼠 20:00 禁食,次日晨采用 2% 戊巴比妥钠 (0.2 mL/100 g) 腹腔注射麻醉后,于腹主动脉取血 5 ~ 8 mL,测定其空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS) 及计算胰岛素抵抗指数 (insulin resistance index, HOMA-IR)<sup>[14]</sup>;小心剥离出大鼠子宫,记录重量。

#### 1.2.3 阴道涂片瑞氏染色和卵巢组织 HE 染色

(1) 阴道涂片瑞氏染色:造模后第 24 ~ 30 天,连续 7 d 取阴道上皮细胞涂片,进行瑞氏染色,干燥后检验;(2) 卵巢组织 HE 染色:空腹采血后摘取大鼠双侧卵巢,固定包埋后以 3.5  $\mu$ m 的厚度切片,最后进行 HE 染色分析,并在光学显微镜下观察组织涂片。

#### 1.2.4 Western Blot

大鼠子宫内膜组织加裂解液冷冻匀浆后,离心

(13 500 r/min, 4℃) 20 min, 上清液经 BCA 法检测蛋白浓度。上样量为 20 μL, 电泳条件 110 V, 100 ~ 120 min, 湿法转膜, 条件 200 mA, 120 min, 其他方法步骤按常规 Western Blot 进行, 用 Bio-Rad 公司的 ECL 试剂盒在化学发光检测器中检测, 用 Image J 进行分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。正态数据以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 标识, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 t 检验两两配对进行统计学分析。P < 0.01 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体重和子宫质量比结果

实验过程中, 每 3 d 记录 1 次大鼠体重, 如图 1A 所示, 两组大鼠体重差异无统计学意义。实验结束后取各组大鼠子宫组织称重, 结果表明两组子宫重量亦差异无统计学意义 (图 1B)。

2.2 阴道涂片及卵巢组织 HE 染色结果

连续 7 d 观察各组大鼠阴道上皮细胞形态, 如图 2A 所示, 观察到对照组大鼠规律动情, 前期涂片

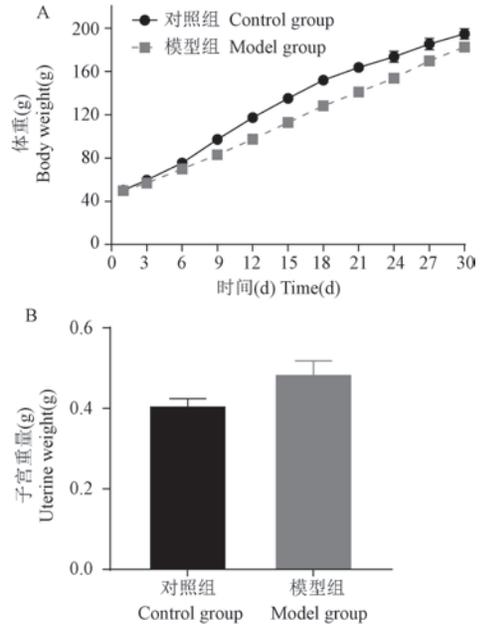
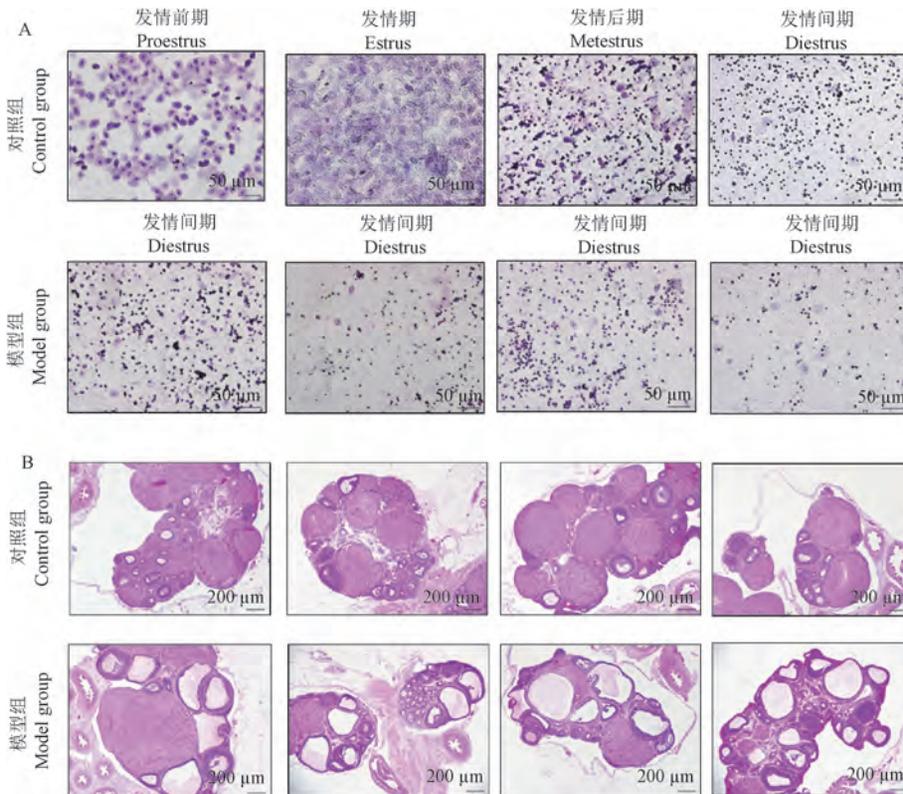


图 1 各组大鼠体重和子宫重量比较

Figure 1 Comparison of body weight and terine weight in each group of rats

以有核上皮细胞为主, 发情期以角质化上皮细胞为主, 发情后期涂片均见核上皮细胞、角质化上皮细胞



注: A: 各组大鼠阴道涂片; B: 卵巢组织 HE 染色。

图 2 阴道涂片与卵巢组织 HE 染色

Note. A. Vaginal smear in each group of rats. B. HE staining of ovarian tissue in each group of rats.

Figure 2 Vaginal smear and HE staining of ovarian tissue

胞与白细胞,发情间期主要见白细胞。而模型组大鼠阴道涂片长期停滞在发情间期或后期,动情周期紊乱。此外,如图 2B 所示,对照组大鼠卵巢组织结构正常,具体可见各个时期卵泡和黄体,颗粒细胞排列整齐;相反模型组大鼠卵巢内偶见卵泡与黄体,排列松散,闭锁卵泡数量较多,且多呈囊性扩张,说明对照组大鼠卵巢基本正常,模型组大鼠卵巢符合多囊卵巢表现。

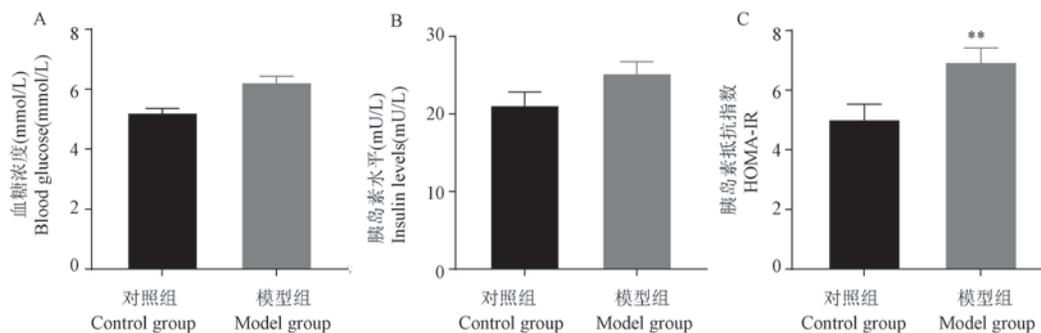
### 2.3 各组大鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 指数比较

结果如图 3 所示,对照组 ( $n = 8$ ) 与模型组 ( $n = 24$ ) 大鼠 FBG 水平 (图 3A) 分别为 ( $4.12 \pm 0.42$ ) mmol/L、( $4.98 \pm 0.49$ ) mmol/L; FINS 水平 (图 3B) 分别为 ( $44.30 \pm 5.29$ ) mU/L、( $51.28 \pm 6.81$ ) mU/L; HOMA-IR 指数 (图 3C) 分别为 ( $7.78 \pm 0.78$ )、( $11.29 \pm 1.60$ )。与对照组比较,模型组大鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 指数均升

高。其中,HOMA-IR 值差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 对照组与 PCOS-IR 组蛋白相对表达水平

Western Blot 检测子宫内膜组织 IR 及 PI3K/AKT 通路相关蛋白结果中,与对照组蛋白表达条带模型相比,PCOS-IR 组的 IRS1、GLUT-4 条带模型明显变窄、颜色变浅,其蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ),提示子宫内膜存在 IR 状态。且 PI3K/AKT 通路相关蛋白结果中,PCOS-IR 组的 AKT 条带模型变化不明显,其表达水平降低 ( $P > 0.05$ ),PI3K 条带模型变宽、颜色变深,其蛋白表达水平显著上升 ( $P < 0.05$ );PI3K p110 $\alpha$ 、p-AKT 条带模型变窄、颜色变浅,PI3K p110 $\alpha$ 、p-AKT 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ),提示 PI3K/AKT 胰岛素信号通路下调。图 4 所示为对照组与 PCOS-IR 组蛋白相对表达结果。

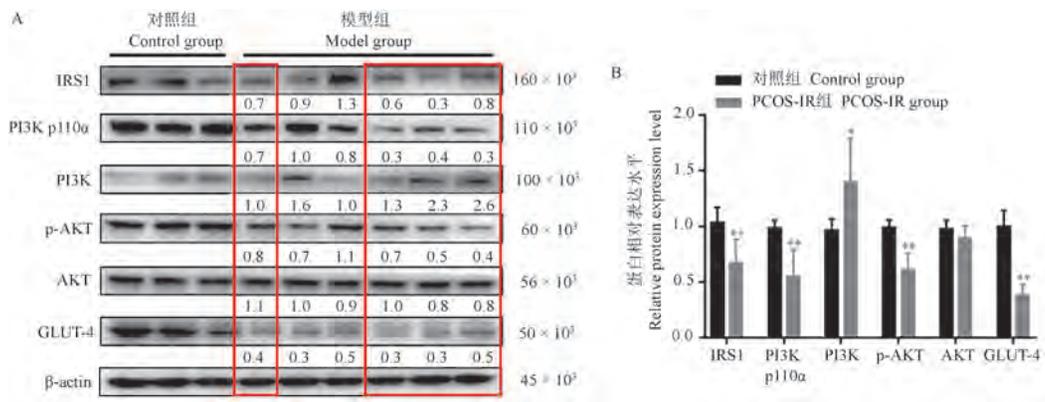


注:A:干预 30 d 后,两组大鼠 FBG 无显著性差异;B:干预 30 d 后,两组 FINS 无显著性差异;C:干预 30 d 后,与对照组相比, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 3 各组大鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 值比较

Note. A. After 30 days of intervention, there was no significant difference in FBG between the two groups. B. After 30 days of intervention, there was no significant difference in FINS between the two groups. C. After 30 days of intervention. Compared with the control group, \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 3 Comparison of FBG, FINS and HOMA-IR indexes in each group of rats



注:A:模型组中标红为 PCOS-IR 组,其余为 PCOS-非 IR 组;与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 4 对照组与 PCOS-IR 组蛋白相对表达结果

Note. A. The red mark in the model group is the PCOS-IR group, and the rest are the PCOS-non-IR group. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 4 Expression results of the control group and the PCOS-IR group

### 3 讨论

研究显示 PCOS 患者,不管是自然怀孕或通过辅助生殖技术怀孕后,流产率达到 33% ~ 50%,是正常孕妇的 3 倍<sup>[15]</sup>。且有研究表明,胰岛素抵抗可以影响下丘脑-腺垂体-卵巢轴轴,增加雄激素的水平,并影响卵子的质量,对 PCOS 患者的生殖功能障碍有重要影响<sup>[16]</sup>。但是,到目前为止,胰岛素抵抗如何影响多囊卵巢综合征患者的生殖功能,目前尚缺乏研究。本课题以 PCOS 大鼠子宫内膜是否存在胰岛素抵抗的实验为切入点,通过构建可靠、简便、符合临床特征的动物模型,观察多囊卵巢综合征大鼠子宫内膜中 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达异常与胰岛素抵抗的关系,以期深入 PCOS 潜在病理生理改变,为寻找治疗 PCOS 的作用靶点提供新思路。

PCOS 模型建立以无排卵或偶发性排卵、性激素分泌紊乱、糖脂代谢异常、胰岛素抵抗、卵巢多囊性病理改变等为主要评价指标<sup>[17]</sup>。经 DHEA 处理的大鼠表现出包括高雄激素血症、月经紊乱和多囊卵巢等 PCOS 表现<sup>[18-22]</sup>。然而,此种方法建立的模型不全表现胰岛素抵抗。研究表明,增加 HFDs 可通过 PCOS 对胰岛素相关机制的反应加剧其内分泌和代谢功能障碍从而获得 IR<sup>[23-24]</sup>。另外,Zhang 等<sup>[13]</sup>研究也指出,DHEA+HFDs 诱导的 PCOS 的不同表型,可用于研究该综合征的生殖和代谢特征。因此,本研究在 DHEA 的基础上联合 HFDs 构建大鼠 PCOS-IR 模型。本研究结果显示,模型组建立的动物模型更接近 PCOS 临床特征,出现显著增加的体重,紊乱的动情周期,明显的卵巢多囊样改变,伴显著的糖代谢改变(FBG、FINS 及 HOMA-IR 指数均升高),表现出了 IR 特征。本实验对子宫内膜组织 IR 相关蛋白(IRS1、GLUT-4)的表达进行了检测,发现 PCOS-IR 组 IRS1、GLUT-4 表达水平较对照组显著降低,说明 PCOS-IR 组大鼠子宫内膜组织胰岛素抵抗状态,这与吴峰等<sup>[25]</sup>用高脂饲料建立的胰岛素抵抗大鼠模型特征基本一致,其机制可能为 IRS1 丝氨酸磷酸化干扰邻近磷酸化酪氨酸结合区段,阻碍正常的酪氨酸磷酸化,影响 IRS1 与胰岛素受体的相互作用并削弱 IRS1 酪氨酸磷酸化作用。

在多囊卵巢综合征的研究当中,脂肪组织、卵巢组织和肝组织中被发现存在胰岛素代谢通路异常<sup>[26]</sup>,而子宫内膜组织中的胰岛素代谢通路鲜有研究。因此,本实验进一步对子宫内膜组织 PI3K/Akt

通路相关蛋白(PI3K、PI3K p110 $\alpha$ 、p-AKT、AKT)的表达进行了检测,发现 PCOS-IR 组较对照组大鼠 AKT 表达水平降低,PI3K p110 $\alpha$ 、p-AKT 表达水平显著降低,说明 PCOS-IR 组大鼠子宫内膜组织出现胰岛素信号通路环节异常——下调,这将揭示子宫内膜组织局部的胰岛素抵抗发生机制的可能——子宫内膜中 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达异常。

综上所述,脱氢表雄酮联合高脂饮食构建了具有特征性的多囊卵巢组织、糖代谢异常的 PCOS 伴 IR 大鼠,其大鼠可能存在子宫内膜局部胰岛素抵抗,其可能与子宫内膜中 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达异常有关。子宫内膜局部 IR 是 PCOS 潜在的病理生理改变,这为寻找治疗 PCOS 的作用靶点提供了新思路,即针对多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗靶器官——子宫内膜,基于子宫内膜胰岛素信号调控途径的中西医干预性研究将是今后的重要方向之一。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] 中华医学会妇产科学分会内分泌学组及指南专家组. 多囊卵巢综合征中国诊疗指南 [J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(1): 2-6.  
Endocrinology Group and Guidelines Expert Group of Obstetrics and Gynecology Branch of Chinese Medical Association. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2018, 53(1): 2-6.
- [ 2 ] Ding T, Hardiman PJ, Petersen I, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in reproductive-aged women of different ethnicity: a systematic review and meta-analysis [J]. Oncotarget, 2017, 8(56): 96351-96358.
- [ 3 ] Diamanti-Kandaraki E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications [J]. Endocr Rev, 2012, 33(6): 981-1030.
- [ 4 ] 陈锦明, 王维斌, 张萍, 等. 二陈汤对多囊卵巢综合征大鼠卵巢组织 IRS-1/IRS-2 的调节作用 [J]. 福建中医药, 2021, 52(5): 50-52.  
Chen JM, Wang WB, Zhang P, et al. Effects of Erchen Decoction on expression of IRS-1/IRS-2 in ovarian tissue of rats with polycystic ovary syndrome [J]. Fujian J Tradit Chin Med, 2021, 52(5): 50-52.
- [ 5 ] Anagnostis P, Tarlatzis BC, Kauffman RP. Polycystic ovarian syndrome (PCOS): long-term metabolic consequences [J]. Metabolism, 2018, 86: 33-43.
- [ 6 ] Moran C, Huerta R, Conway-Myers BA, et al. Altered autophosphorylation of the insulin receptor in the ovary of a woman with polycystic ovary syndrome [J]. Fertil Steril, 2001, 75(3): 625-628.
- [ 7 ] McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles [J]. Endocr Rev, 2000, 21(2): 200-214.

- [ 8 ] Urman B, Tiras B, Yakin K. Assisted reproduction in the treatment of polycystic ovarian syndrome [J]. *Reprod Biomed Online*, 2004, 8(4): 419-430.
- [ 9 ] Qi J, Wang W, Zhu Q, et al. Local cortisol elevation contributes to endometrial insulin resistance in polycystic ovary syndrome [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(7): 2457-2467.
- [ 10 ] YEE Hongyun, 杨晶晶, 万毅刚, 等. 胰岛素抵抗的分子机制及中药的干预作用 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(7): 1289-1294.  
YEE HY, Yang JJ, Wan YG, et al. Molecular mechanisms of insulin resistance and interventional effects of Chinese herbal medicine [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2019, 44(7): 1289-1294.
- [ 11 ] 孙志梅, 齐亚娟. 胰岛素信号通路及胰岛素抵抗 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(52): 62-63.  
Sun ZM, Qi YJ. Insulin signaling pathway and insulin resistance [J]. *World Latest Med Inf*, 2019, 19(52): 62-63.
- [ 12 ] 肖娟, 任伟. 胰岛素抵抗与胰岛素信号通路异常研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2020, 36(21): 3463-3466.  
Xiao J, Ren W. Research progress of insulin resistance and abnormal insulin signaling pathway [J]. *Mod Med Heal*, 2020, 36(21): 3463-3466.
- [ 13 ] Zhang H, Yi M, Zhang Y, et al. High-fat diets exaggerate endocrine and metabolic phenotypes in a rat model of DHEA-induced PCOS [J]. *Reproduction*, 2016, 151(4): 431-441.
- [ 14 ] Wang Z, Zhai D, Zhang D, et al. Quercetin decreases insulin resistance in a polycystic ovary syndrome rat model by improving inflammatory microenvironment [J]. *Reprod Sci*, 2017, 24(5): 682-690.
- [ 15 ] Hudecova M, Holte J, Olovsson M, et al. Long-term follow-up of patients with polycystic ovary syndrome; reproductive outcome and ovarian reserve [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(5): 1176-1183.
- [ 16 ] DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment [J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(5): 1454-1460.
- [ 17 ] 徐海燕, 杜青, 徐琳本, 等. 两种肥胖型多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗大鼠模型的构建及评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(5): 644-650.  
Xu HY, Du Q, Xu LB, et al. Construction and evaluation of two obese rat models of polycystic ovary syndrome with insulin resistance [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(5): 644-650.
- [ 18 ] Ward RC, Costoff A, Mahesh VB. The induction of polycystic ovaries in mature cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (DHA) [J]. *Biol Reprod*, 1978, 18(4): 614-623.
- [ 19 ] Lee MT, Anderson E, Lee GY. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone [J]. *Anat Rec*, 1991, 231(2): 185-192.
- [ 20 ] Anderson E, Lee MT, Lee GY. Cystogenesis of the ovarian antral follicle of the rat; ultrastructural changes and hormonal profile following the administration of dehydroepiandrosterone [J]. *Anat Rec*, 1992, 234(3): 359-382.
- [ 21 ] Sander V, Luchetti CG, Solano ME, et al. Role of the N, N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone [J]. *Reproduction*, 2006, 131(3): 591-602.
- [ 22 ] 王玉荣, 谈勇. 多囊卵巢综合征动物模型与中医药干预研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(6): 478-483.  
Wang YR, Tan Y. Progress in study on animal models of polycystic ovary syndrome and intervention with traditional Chinese medicine [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2009, 17(6): 478-483.
- [ 23 ] Oh H, Boghossian S, York DA, et al. The effect of high fat diet and saturated fatty acids on insulin signaling in the amygdala and hypothalamus of rats [J]. *Brain Res*, 2013, 1537: 191-200.
- [ 24 ] Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome [J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(5): 149.
- [ 25 ] 吴峰, 都健, 王慧敏, 等. 胰岛素抵抗大鼠的肝脏中丝氨酸/酪氨酸磷酸化异常与血清 TNF- $\alpha$  相关 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(5): 360-363.  
Wu F, Du J, Wang HM, et al. Serum TNF- $\alpha$  is correlated with the abnormality of serine/tyrosine phosphorylation of IRS-1 in the liver of insulin-resistant rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2009, 17(5): 360-363.
- [ 26 ] Chang EM, Han JE, Seok HH, et al. Insulin resistance does not affect early embryo development but lowers implantation rate in *in vitro* maturation-*in vitro* fertilization-embryo transfer cycle [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013, 79(1): 93-99.

吴国泰,马倩倩,陈艳娥,等. 乳腺癌血行肺转移模型家兔血小板与凝血功能变化研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 784-791.

Wu GT, Ma QQ, Chen YE, et al. Changes in platelets and coagulation function in a rabbit model of breast cancer lung metastasis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 784-791.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.007

# 乳腺癌血行肺转移模型家兔血小板与凝血功能变化研究

吴国泰<sup>1,2</sup>, 马倩倩<sup>1</sup>, 陈艳娥<sup>1</sup>, 杜晓红<sup>1</sup>, 王晓禹<sup>1</sup>, 杜丽东<sup>1,2\*</sup>

(1. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000)

**【摘要】** 目的 研究乳腺癌血行肺转移模型家兔血小板与凝血功能的变化规律。方法 取健康雌性新西兰白兔 12 只, 随机分为 2 组: 正常组和模型组, 模型组家兔左侧第 3 乳房乳垫注射 VX2 组织悬液, 再经耳缘静脉注射 VX2 细胞悬液, 构建乳腺癌血行肺转移家兔模型。观察 42 d 内家兔精神状态、饮食情况, 监测体重和肿瘤大小, 检测血小板相关参数 PLT、MPV、PDW、PCT 和凝血相关指标 PT、APTT、TT、FIB 及 D-二聚体; 实验终点 ELISA 法检测血清 CD63、CD62P、TXB<sub>2</sub> 及血浆 GMP-140 水平; 取肿瘤组织和肺用 10% 甲醛固定、石蜡包埋、切片、HE 染色, 光学显微镜下观察肿瘤和肺组织形态变化。结果 家兔乳垫注射 VX2 组织悬液附加静脉注射 VX2 细胞悬液, 能成功构建乳腺癌血行肺转移家兔模型, 肺转移率 100%, 模型家兔血液处于高凝状态, 14 ~ 42 d 内, PLT、MPV、PCT 均明显增加; 10 ~ 30 d 内, PT、APTT、TT 均明显缩短, 且 FIB、D-二聚体含量均明显增加; 血清 CD63、CD62P、TXB<sub>2</sub> 及血浆 GMP-140 水平明显增高; 模型家兔乳腺中肿瘤细胞增多、排列疏松、炎性细胞浸润; 肺组织可见肿瘤细胞团块伴出血、坏死。结论 乳腺癌血行肺转移模型家兔血液环境异常, 表现为血小板活化和血液高凝状态。

**【关键词】** 乳腺癌肺转移; 家兔模型; 血小板活化; 血液凝固

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0784-08

## Changes in platelets and coagulation function in a rabbit model of breast cancer lung metastasis

WU Guotai<sup>1,2</sup>, MA Qianqian<sup>1</sup>, CHEN Yane<sup>1</sup>, DU Xiaohong<sup>1</sup>, WANG Xiaoyu<sup>1</sup>, DU Lidong<sup>1,2\*</sup>

(1. Pharmacy School, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Gansu Province Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

Corresponding author: DU Lidong. E-mail: lidong\_du@126.com

**【Abstract】** **Objective** To study the changes in platelets and coagulation function in a rabbit model of breast cancer lung metastasis. **Methods** Twelve female New Zealand white rabbits were randomly divided into two groups: normal group and model group. A VX2 breast cell suspension was injected into the third breast pad and injected intravenously through the ear marginal vein. The mental state, diet, body weight, and tumor size of the rabbits were observed over 42 days. Platelet-related parameters (PLT, MPV, PDW, and PCT) and coagulation-related indexes (PT, APTT, TT, FIB, and D-dimer) were detected at corresponding time points. The levels of CD63 and CD62P TXB<sub>2</sub> in serum, and GMP-140 in plasma, were

**【基金项目】** 甘肃省教育厅双一流学科建设重点科研项目 (GSSYLXM-05), 甘肃省 2019 年重点人才项目 (2019-039)。

Funded by Key Research Projects of Double First-class Discipline Construction of Gansu Provincial Department of Education (GSSYLXM-05), Key Talent Projects in Gansu Province in 2019 (2019-039).

**【作者简介】** 吴国泰 (1978—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药药理毒理与中药大健康产品研发。Email: 1018830451@qq.com

**【通信作者】** 杜丽东 (1978—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药药理毒理与中药大健康产品研发。Email: lidong\_du@126.com

detected by ELISA. The tumor tissue and lung tissue were fixed with 10% formaldehyde, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin. Morphological changes in the tumor and lung tissue were observed under an optical microscope. **Results** The rabbit model of breast cancer lung metastasis was successfully established by injecting a VX2 tissue suspension into the breast pad and a VX2 cell suspension intravenously. The lung metastasis rate was 100%. The blood of the model rabbits was in a hypercoagulable state. The levels of PLT, MPV, and PCT increased significantly from 14 to 42 days, the PT, APTT, and TT indexes were significantly shortened, and the contents of FIB and D-dimer were significantly increased from 10 to 30 days. The levels of CD63, CD62P and TXB<sub>2</sub> in serum, and GMP-140 in plasma, increased significantly. Tumor cells increased in number, appeared loosely arranged, and were infiltrated by inflammatory cells in the mammary gland of model rabbits. A tumor cell mass with hemorrhage and necrosis was observed in the lung tissue, which contained hemosiderin deposition. **Conclusions** The blood circulation in the rabbit model of breast cancer lung metastasis was abnormal, and this manifested as platelet activation and a hypercoagulable state in the blood.

**【Keywords】** breast cancer lung metastasis; rabbit model; platelet activation; blood coagulation

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

2020 年全球最新癌症负担数据显示乳腺癌成为全球第一大癌症,其全球新发病例占新发癌症总数的 11.7%,也是全球女性癌症死亡的首位原因,占总数的 15.5%<sup>[1]</sup>。目前,临床采用改良根治手术的方法治疗乳腺癌,但术后复发转移仍是引起患者死亡的最主要原因<sup>[2]</sup>,乳腺癌转移患者中 21%~32%发生于肺<sup>[3]</sup>,经血液肺转移是乳腺癌转移复发的主要途径,乳腺癌患者的血液存在一定程度的高凝状态,不仅血小板数量显著上升,同时血小板功能也显著改变<sup>[4]</sup>。研究发现血小板能引起乳腺癌肿瘤细胞侵袭、转移,帮助肿瘤细胞逃脱免疫系统的攻击杀伤<sup>[5]</sup>。乳腺癌血行肺转移动物模型已有研究,但模型动物血液血小板与凝血功能变化规律研究鲜见报道,本文从血小板活化和凝血状态的角度探讨乳腺癌血行肺转移模型家兔血液微环境的变化规律,为乳腺癌血行肺转移相关研究提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级新西兰白兔,3 月龄,雄性 2 只,体重 2.5 kg;雌性 12 只,未孕,体重 1.5~2.0 kg,均由中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心提供【SCXK(甘)2020-0001】,生长兔配合饲料由临沂市瑞泰饲料有限公司提供,实验操作均在甘肃中医药大学科研实验中心 SPF 级动物实验室进行【SYXK(甘)2020-0003】,所有家兔均分笼饲养,每笼 1 只,自由进食及饮水。室温(25.0±0.5)℃,相对湿度(55%±5%),明暗各 12 h,适应 7 d 开始实验,实验方案经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(2019-SY011)。

#### 1.1.2 瘤 株

VX2 兔实体瘤组织,由广州吉妮欧生物科技有限公司提供。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

阿司匹林肠溶片(由 Bayer S. p. A. 生产,国药准字 J20171021,批号 BJ52622)。大鼠抗血浆 α 颗粒膜蛋白(GMP-140)ELISA 试剂盒、大鼠血栓素(TXB<sub>2</sub>)ELISA 试剂盒、大鼠血小板 α 颗粒膜蛋白(CD62P)ELISA 试剂盒、大鼠 CD63 分子(CD63)ELISA 试剂盒,均购自上海江莱实业股份有限公司,批号分别为 JL10386、JL12324、JL50846 和 JL20774。

电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);电动组织匀浆器(宁波新芝生物科技股份有限公司);低温高速离心机(德国 Kendro 公司);光学显微镜(日本尼康公司);全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);全自动血凝仪(郑州瑞郎光学光源医疗电子有限公司);酶标仪(美国 Thermo 公司);生物组织包埋机(JB-P5,武汉俊杰电子有限公司);病理切片机(RM2016,德国徕卡);组织摊片机(KD-P,郑州博邦仪器有限公司)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 VX2 兔实体瘤在体培养

参考文献<sup>[6-7]</sup>并改进,将液氮保存的 VX2 兔实体瘤组织于 37℃ 水浴解冻、复苏后,按肿瘤组织与生理盐水 1:9(质量(g):体积(mL))比例,用组织匀浆器制备悬液。取雄性新西兰白兔 2 只,麻醉,取 1 mL 组织悬液注入兔右侧后腿外侧肌内,单笼饲养。每天观察各兔的活动、饮食状态,每 3 d 检视 1 次接种部位肿瘤生长情况,直至接种部位可见实体瘤形成。

### 1.2.2 VX2 肿瘤组织悬液制备

家兔后腿外侧肌瘤体直径大于 1 cm 时进行瘤体剥离,用 8% 硫化钠对兔右侧后腿瘤体所在部位脱毛,麻醉,常规消毒无菌条件下剥离实性瘤体,瘤体用生理盐水冲洗后,切除边缘纤维结缔组织,置于有生理盐水的无菌培养皿中将瘤块剪碎,按质量:体积比 1:9(肿瘤组织:生理盐水)用组织匀浆器制备肿瘤组织悬液,备用。

### 1.2.3 VX2 细胞悬液制备

参考文献<sup>[8-9]</sup>并改进,取 20 mL VX2 组织悬液在低温条件下(4℃)1500 r/min 离心 5 min,弃上清液;用 200 目细胞滤网过滤,置于冰预冷的试管内,1500 r/min 离心 5 min,弃上清液,试管内加入适量 PBS 液轻轻振荡混匀,用 300 目细胞滤网过滤,去细胞团块,500 r/min 离心 5 min,弃上清液,再加 15 mL PBS 液混匀,显微镜下细胞计数并调整浓度约为  $1 \times 10^6$ /mL。

### 1.2.4 乳腺癌血行肺转移家兔模型建立

取雌性兔 12 只,体重 1.5 ~ 2.0 kg,随机抽取 6 只作为模型组,麻醉,仰位固定,用碘伏消毒,在左侧第 3 乳房乳垫注射组织悬液每只 0.3 mL,确认无出血无渗出后,碘伏消毒;模型组家兔再经耳缘静脉注入 VX2 细胞悬液每只 0.3 mL;剩余 6 只作为正常组,注射等容量生理盐水,所有家兔单笼饲养。

### 1.2.5 检测指标

(1)一般状态:观察各组家兔精神状态、饮食情况。若有家兔死亡,记录死亡时间,并大体解剖。每 7 d 称体重 1 次,并用卡尺测量家兔乳腺移植性肿瘤的长、短径,计算肿瘤体积,肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) =  $0.5 \times \text{长径}(\text{mm}) \times (\text{短径}(\text{mm}))^2$ 。

(2)血小板相关参数检测:各组家兔每 7 d 耳缘静脉采血 20  $\mu\text{L}$ ,置于含有 40  $\mu\text{L}$  EDTA 的 EP 管中,用全自动血液细胞分析仪检测 PLT、MPV、PDW、PCT。

(3)凝血指标检测:各组家兔每 10 d 麻醉后,用含有柠檬酸钠的抗凝管心脏采血 2 mL,充分混匀,4℃ 条件下 1500 r/min 离心 15 min,分离血浆,用全自动凝血仪测定血浆 PT、APTT、TT、FIB 及 D-D 二聚体。

(4)血小板活化因子检测:造模第 42 天,麻醉家兔,心脏取血约 5 mL,室温静置 2 h,以 1500 r/min 离心 20 min,分离血清;心脏取血 2 mL 置于含 EDTA 的抗凝管中,充分混匀,4℃ 条件下 1500 r/min

离心 15 min,分离血浆;ELISA 法检测血清 CD62P、CD63、TXB<sub>2</sub> 及血浆 GMP-140 含量。

(5)肿瘤组织、肺组织形态检测:造模第 42 天,各家兔心脏取血后,静脉空气栓法处死,模型组在移植瘤所在乳房局部脱毛、消毒、切口,摘取实体瘤组织,正常组取部分乳垫;开胸,取出全部肺,用生理盐水清洗表面血渍,检视大体形态。取部分实体瘤块和右肺组织,用 10% 甲醛固定,石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察组织形态学变化。

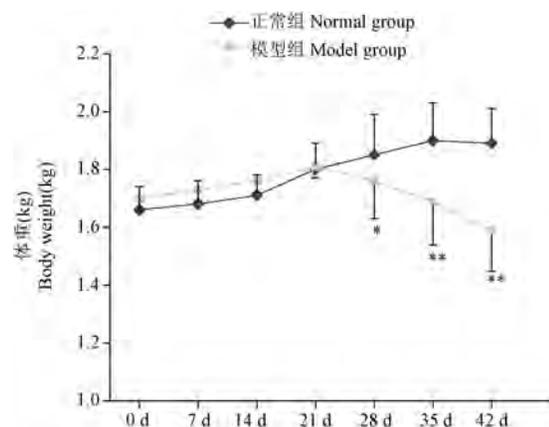
### 1.3 统计学分析

所有数据采用 SPSS 19.0 软件进行处理,符合正态分布的数据采用平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,不符合正态分布则采用中位数表示,采用独立样本 *t* 检验、重复测量方差分析(正态分布)或秩和检验(非正态分布)进行比较, $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般状态

正常组家兔和模型组家兔造模前状态良好、反应灵敏、活泼好动、毛色洁白有光泽、饮食正常、体表未见肿块、乳房未见异常、大小便正常。造模后 1 ~ 21 d,模型组 6 只家兔精神状态较好,与造模前无明显差异,体重增加。第 28 ~ 42 天,模型组家兔精神状态逐渐变差,反应迟钝,活动量减少,毛色暗淡杂乱,局部脱落,饮食减少,体重逐渐下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),42 d 内无家兔死亡(见图 1)。



注:与正常组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 各组家兔体重变化情况( $n = 6$ )

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

Figure 1 Body weight change of rabbits( $n = 6$ )

## 2.2 肿瘤生长情况

正常组家兔在实验期间乳房未见明显变化, 躯体各部位未见实体肿块。模型组家兔造模 7 d 后, 左侧第 3 乳房部位肉眼可见小结节, 质硬, 瘤体边界清楚, 形状规则, 触诊活动度较差, 第 14 天肿瘤体积明显增大, 但均无统计学意义; 第 21 ~ 42 天, 移植瘤体积迅速增大 ( $P < 0.01$ ), 个别家兔移植部位皮肤溃烂, 渗血、结痂 (见图 2)。

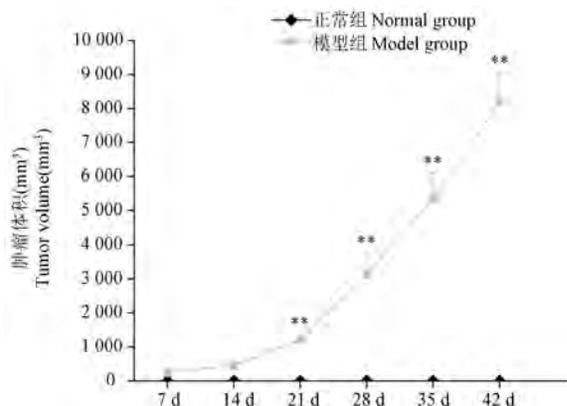


图 2 各组家兔肿瘤体积变化情况 ( $n = 6$ )

Figure 2 Changes of tumor volume in rabbits ( $n = 6$ )

## 2.3 外周血血小板相关参数变化

造模前及造模第 7 天, 各组家兔 PLT、MPV 无显著性差异; 与正常组相比, 造模第 14 ~ 42 天, 模型组家兔 PLT 和 MPV 明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P <$

0.01)。造模前各组家兔外周血 PCT 无显著性差异; 与正常组相比, 造模第 14 ~ 42 天, 模型组家兔外周血 PCT 均逐渐升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。实验期间, 各组家兔外周血 PDW 均无显著性差异。结果提示模型家兔血小板的数量和功能发生了明显改变, 表现为血小板活化和数量增多 (见图 3)。

## 2.4 外周血 PT、APTT、TT、FIB 和 D-二聚体含量变化

造模前, 各组家兔外周血 PT、APTT、TT、FIB 和 D-二聚体含量均无显著性差异; 与正常组相比, 造模第 10、20、30 天, 模型组家兔 PT、APTT、TT 均明显缩短 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且随时间延长, 缩短幅度加大; 第 10、20、30 天, 模型组家兔 FIB、D-二聚体含量均明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 表明模型组家兔外周血凝血速度加快, 纤维蛋白降解程度较高 (见图 4)。

## 2.5 血清 CD62P 和 CD63 含量变化

造模第 42 天, 与正常组比, 模型组家兔血清 CD62P 和 CD63 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ) (图 5)。

## 2.6 血清 TXB<sub>2</sub> 和血浆 GMP-140 含量变化

造模第 42 天, 与正常组相比, 模型组家兔血清 TXB<sub>2</sub> 和血浆 GMP-140 含量均显著升高 ( $P < 0.01$ ) (见图 6)。

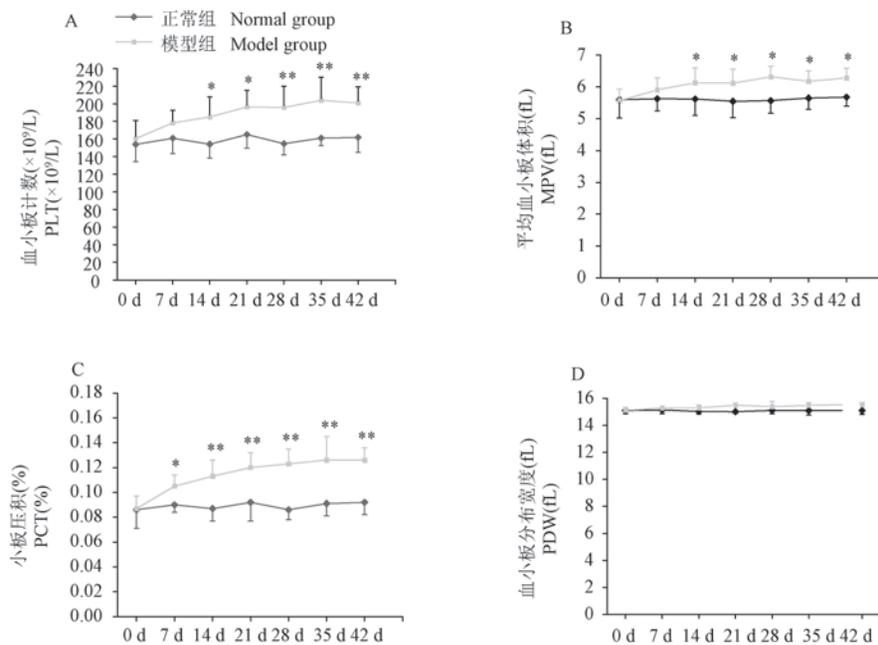


图 3 家兔外周血血小板相关参数变化 ( $n = 6$ )

Figure 3 Changes of platelet related parameters in rabbit peripheral blood ( $n = 6$ )

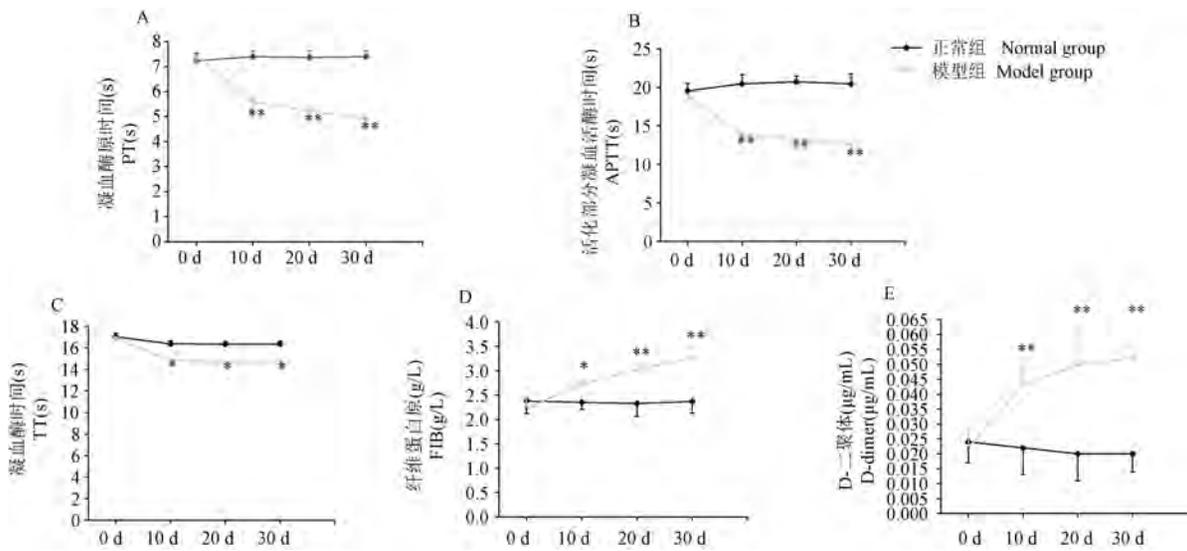


图 4 家兔外周血 PT、APTT、TT、FIB 和 D-二聚体变化 ( $n = 6$ )

Figure 4 Changes of PT, APTT, TT, FIB and D-dimer in rabbit peripheral blood ( $n = 6$ )

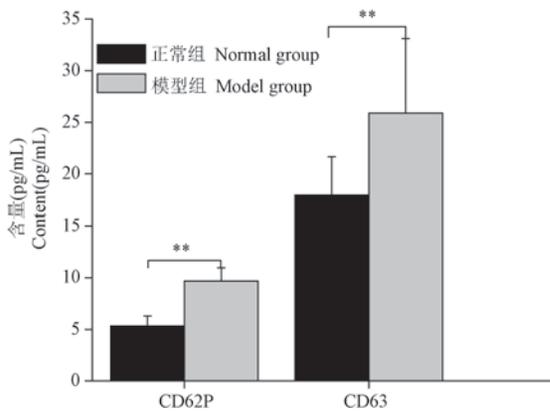


图 5 兔血清 CD62P 和 CD63 含量变化 ( $n = 6$ )

Figure 5 Changes of CD62P and CD63 in rabbit serum ( $n = 6$ )

### 2.7 肿瘤组织形态变化

正常组家兔各乳房部位及全身未见肿块, 皮肤及乳垫组织 HE 染色后光镜下可见腺体细胞完整、排列整齐紧密, 大小均一, 未见炎性细胞; 模型组家兔可见移植部位的瘤体呈结节状, 与周围组织边界清晰, 质韧, 剥离切开后内见肿瘤血管丰富、不同程度灶性坏死、出血; HE 染色后光镜下可肿瘤细胞排列紧密, 大小不等, 呈不规则的团块状或条索状, 核大, 染色较深, 多见瘤巨细胞和多倍体细胞, 易见核分裂, 大量炎性胞浸润 (见图 7)。

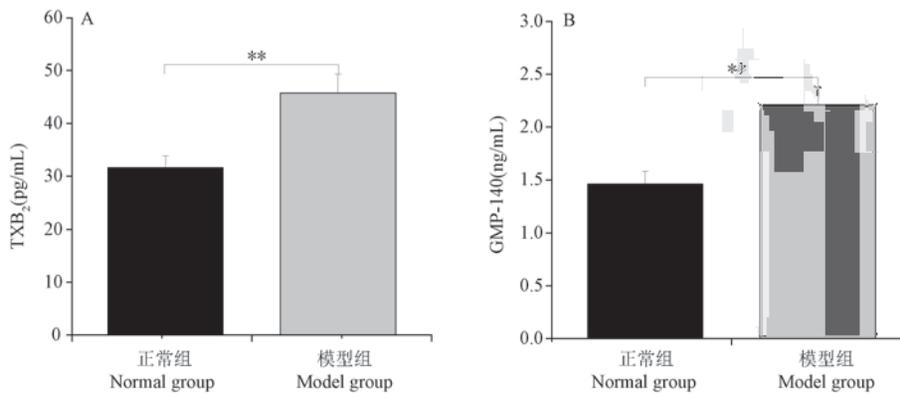


图 6 家兔血浆 TXB<sub>2</sub> 和 GMP-140 含量变化 ( $n = 6$ )

Figure 6 Changes of plasma TXB<sub>2</sub> and GMP-140 in rabbits ( $n = 6$ )

### 2.8 肺组织形态变化

正常组家兔肺组织柔软红润,表面光滑,形态正常,HE 染色后光镜下可见肺泡腔呈空泡状、薄壁结构,大小均匀;模型组家兔肺组织不同程度充血,

表面多处可见明显肿瘤转移灶,边界清晰,镜下可见瘤细胞弥漫性分布,大小不一、质实、染色深,转移瘤细胞排列紧密、核大深染、核膜清晰、核仁明显,核分裂增多(见图 8)。

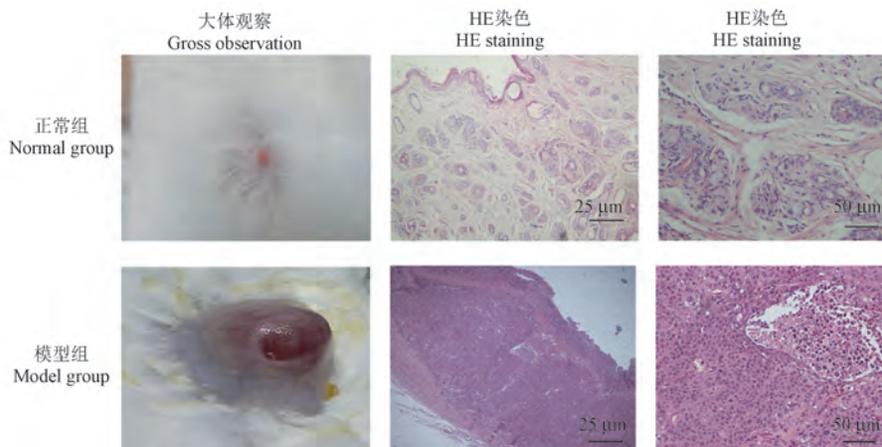


图 7 家兔乳腺肿瘤组织形态的变化

Figure 7 Histological changes of breast tumors in rabbits

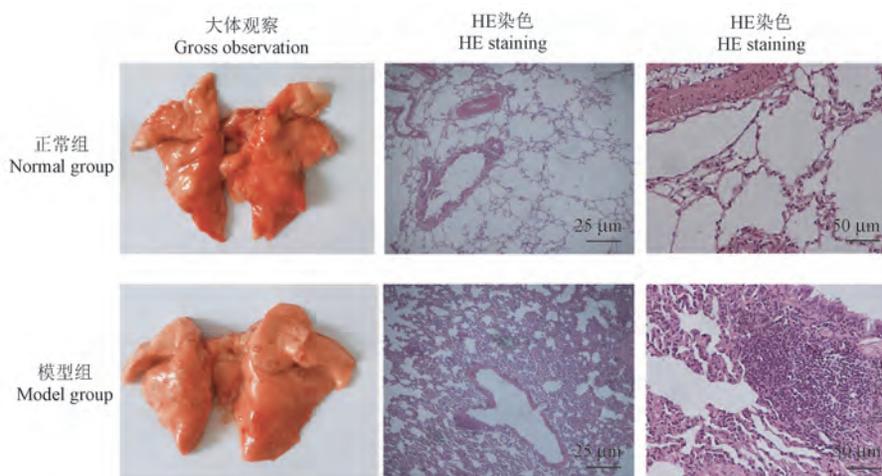


图 8 家兔肺组织形态的变化

Figure 8 Morphological changes of lung tissue in rabbits

## 3 讨论

恶性肿瘤的血行转移是一个复杂的过程,近年来,肿瘤血行转移血液环境因素对肿瘤转移的影响越来越受到人们的重视,尤其血小板的变化是研究的热点。有证据表明,在恶性间皮瘤、妇科恶性肿瘤、肾、胃、结肠直肠癌和乳腺癌等多种恶性肿瘤中都存在血小板活化现象<sup>[10-11]</sup>,且血小板聚集和活化现象越明显,血行转移也越多;相反,研究发现加入抗血小板药物如肝素、阿司匹林等可明显减弱肿瘤的转移<sup>[12-13]</sup>。

乳腺癌动物模型包含自发型、诱发型、移植型、

转基因型等,每种模型都有各自的特点和应用条件,其中移植性乳腺癌动物模型,造模周期短,成本低,肿瘤生长速度和个体差异较小,成功率高<sup>[14]</sup>。乳腺癌是伴有远处转移最常见的恶性肿瘤之一,癌细胞直接或经血行传播侵入血循环而至远处转移,其中最常见远处转移部位为肺<sup>[15]</sup>。有研究比较了皮下接种、乳垫接种、尾静脉接种、心内接种 4 种方法制备的小鼠乳腺癌移植瘤模型肿瘤进展与转归情况。结果显示,皮下接种无转移,乳垫接种出现肺部转移,尾静脉接种瘤细胞主要集中于肺部,心内接种组瘤细胞呈现全身播散,认为乳垫接种制备的移植瘤模型,操作简便,与临床病理过程相近,

适合乳腺癌的基础与药理研究;尾静脉接种适合进行乳腺癌肺转移的研究<sup>[16]</sup>。

综合前期研究报道,我们发现乳腺癌血行肺转移动物模型通常采用 BALB/c 纯系小鼠尾静脉注射<sup>[17]</sup>,或第二乳头的脂肪垫注射<sup>[18]</sup>4T1 乳腺癌细胞株,均成功建立乳腺癌肺转移小鼠模型。但家兔乳腺癌肺转移模型报道较少,其实家兔比小鼠在该模型复制中有更多的优势,如血液样本、组织标本载量大,可以更好的进行动态检测等。我们选用体型较大的家兔做为模式生物,并改进了乳腺癌血行肺转移家兔模型,技术要点包括乳腺癌家兔模型的复制和乳腺癌家兔肿瘤肺转移模型的两部分,首先建立移植性乳腺癌家兔模型尤为重要,用 VX2 组织悬液乳垫注射法操作简便、成瘤率高,是理想的模型制作方法,可在短期内提供生长迅速、性质稳定、容易发生多组织脏器转移的移植性乳腺癌兔模型,动物模型病程进展和人类转移性乳腺癌相似,且肿瘤出现时间为 21 d,与文献报道一致<sup>[6,19]</sup>,尤其在第 42 天未见家兔死亡,提示更适宜于长疗程药物的药效学实验。

在成功复制移植性乳腺癌家兔模型的基础上,经耳缘静脉给予 VX2 细胞悬液进行血行刺激建立 BCLM 家兔模型,所有模型组家兔肺部均存在转移灶,成模率 100%。两种因素复合刺激所建立的 BCLM 家兔模型既符合临床病理过程,又符合靶向性较高的肺转移研究,为进一步研究乳腺癌的肺转移的药效学实验提供了可靠的方法学基础。

本研究所建立的 BCLM 模型家兔血液系统环境异常,血小板数量和活性明显增高,血液出现高凝血状态,也存在纤维蛋白降解加速等,与临床乳腺癌晚期患者凝血异常、血栓增多等并发症基本吻合<sup>[20]</sup>。本研究对肿瘤细胞与血小板之间的相互作用尚未进一步验证和阐述,理论上讲当肿瘤细胞在肺泡间微血管中传输时,分泌的细胞因子刺激血小板活化,导致血小板聚集和肿瘤细胞-血小板栓子形成,形成癌栓,可以通过血栓弹力图进行表征;当模型家兔肿瘤细胞游离入血时,体内血小板就会被肿瘤细胞激活,从而处于过度活化状态。这也是肿瘤患者血液普遍存在高凝状态的原因之一,亦需要在药效学研究过程中加以评估。

#### 参 考 文 献 (References)

[ 1 ] 刘军兰. 乳腺癌首次成为全球最常见的癌症 [J]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2020, 14(6): 389.

Liu JL. Breast cancer is the world's most common cancer for the

first time [J]. Chin J Breast Dis (Electron Edit), 2020, 14(6): 389.

[ 2 ] 陈合波, 林小燕. 乳腺癌肺转移患者生存质量调查分析 [J]. 陕西医学杂志, 2016, 45(7): 928-929.

Chen HB, Lin XY. Investigation of quality of life in breast cancer patients with lung metastasis [J]. Shaanxi Med J, 2016, 45(7): 928-929.

[ 3 ] Wu Q, Li JJ, Zhu S, et al. Breast cancer subtypes predict the preferential site of distant metastases: A SEER based study [J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 27990-27996.

[ 4 ] 李晶晶, 钟春生. 血小板与肿瘤相关性研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(23): 3896-3900.

Li JJ, Zhong CS. Research progress on correlation between platelets and tumor [J]. J Mod Oncol, 2017, 25(23): 3896-3900.

[ 5 ] 贾杰昌, 王公平. 抗血小板药物在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 中国疗养医学, 2019, 28(3): 260-262.

Jia JC, Wang GP. Research progress of antiplatelet drugs in tumor therapy [J]. Chin J Convalescent Med, 2019, 28(3): 260-262.

[ 6 ] 姚青, 陈江浩, 凌瑞, 等. 组织块悬液注射法制作兔 VX<sub>2</sub> 乳腺癌模型 [J]. 中国癌症杂志, 2004, 14(1): 22-23.

Yao Q, Chen JH, Ling R, et al. Establishment of VX<sub>2</sub> breast carcinoma model in rabbit by injection of tissue mass suspension [J]. Chin Oncol, 2004, 14(1): 22-23.

[ 7 ] 谭红娜. 乳腺癌前哨淋巴结显像的动物实验及临床应用研究 [D]. 上海: 复旦大学; 2011.

Tan HN. Animal experiment and clinical application of sentinel lymph node imaging in breast cancer [D]. Shanghai: Fudan University; 2011.

[ 8 ] 高斌, 贺克武, 李嘉嘉. 剪碎法及匀浆法制备兔肌肉 VX2 肿瘤单细胞悬液的方法比较 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(41): 8315-8317.

Gao B, He KW, Li JJ. Preparation of single cell suspension from rabbit muscle VX2 tumor with scissors versus homogenate method [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2007, 11(41): 8315-8317.

[ 9 ] 吴勇超, 李智岗, 史博, 等. 经脾种植 VX2 瘤株悬液建立兔肝转移瘤模型 [J]. 介入放射学杂志, 2019, 28(9): 861-864.

Wu YC, Li ZG, Shi B, et al. Establishment of rabbit metastasis model by spleen implantation of VX2 tumor strain suspension [J]. J Intervent Radiol, 2019, 28(9): 861-864.

[ 10 ] 沈淑华. 血小板参数检测在诊断乳腺癌中的应用价值 [J]. 当代医药论丛, 2020, 18(12): 158-159.

Shen SH. The value of platelet parameter detection in the diagnosis of breast cancer [J]. Contemp Med Symp, 2020, 18(12): 158-159.

[ 11 ] 刘艳兰, 李菊香, 龚皓. 血小板增多与肿瘤的关系 [J]. 中国处方药, 2014, 12(10): 86.

Liu YL, Li JX, Gong H. Relationship between thrombocytosis and tumor [J]. J Chin Prescription Drug, 2014, 12(10): 86.

[ 12 ] 汪更胜, 熊平. NLR、RDW、MPV 在乳腺癌疗效跟踪中的临

- 床应用 [J]. 中国现代手术学杂志, 2015, 19(5): 329-334.
- Wang GS, Xiong P. Clinical application of NLR, RDW and MPV in follow-up of breast cancer [J]. Chin J Mod Operative Surg, 2015, 19(5): 329-334.
- [13] 牛佳慧, 沈国双. 血小板相关参数与恶性肿瘤相关性的研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(1): 86-90.
- Niu JH, Shen GS. Progress of research on association between platelet related parameters and cancers [J]. Med Recapitulate, 2020, 26(1): 86-90.
- [14] 唐宏涛, 魏敏杰. 乳腺癌实验动物模型的制备与应用 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(3): 234-237.
- Tang HT, Wei MJ. Establishment and application of animal models of breast cancers [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2007, 15(3): 234-237.
- [15] 晁振华, 赵素容, 蒋琛琛, 等. C<sub>3</sub>H 小鼠乳腺癌实验性肺转移模型的建立及评价 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(2): 291-292.
- Chao ZH, Zhao SR, Jiang CC, et al. The establishment and evaluation of breast cancer cells in C<sub>3</sub>H mouse model for lung metastasis [J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(2): 291-292.
- [16] 孙丽华, 崔海峰, 彭博, 等. 4 种方法制备小鼠乳腺癌移植瘤模型的比较研究 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(4): 449-455.
- Sun LH, Cui HF, Peng B, et al. Comparative study of 4 methods for the establishment of mouse breast cancer xenograft model [J]. Chin J New Drugs, 2020, 29(4): 449-455.
- [17] Li CL, Qi Q, Lu N, et al. Gambogic acid promotes apoptosis and resistance to metastatic potential in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells [J]. Biochem Cell Biol, 2012, 90(6): 718-730.
- [18] 李日飞, 袁娜, 冶冬阳, 等. 乳腺癌实验动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 113-118.
- Li RF, Yuan N, Ye DY, et al. Research progress in experimental animal models of breast cancer [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(2): 113-118.
- [19] 凌瑞, 陈江浩, 姚青, 等. 兔转移性乳腺癌模型: 肿瘤生长及转移 [J]. 中国癌症杂志, 2005, 15(1): 11-13.
- Ling R, Chen JH, Yao Q, et al. A metastatic breast cancer model in rabbit: tumor growth and metastasis [J]. Chin Oncol, 2005, 15(1): 11-13.
- [20] 姚家炳, 翟保平, 贾琳娇, 等. 乳腺癌患者脉管癌栓与临床病理特征及预后的关系 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(9): 872-874.
- Yao JB, Zhai BP, Jia LJ, et al. Relationship between vascular tumor thrombus and clinicopathological features and prognosis in breast cancer patients [J]. J Chin Pract Diagn Ther, 2017, 31(9): 872-874.

[收稿日期] 2021-12-01

## 《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R 国际刊号 ISSN 1671-7856 邮局代号 82-917

### 一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊)。征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。栏目设置包括研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等栏目。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、被《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、中国生物医学期刊数据库等数据库收录。

### 二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章正文字数在 5000 字左右。

投稿网址: <http://zgswydw.cnjournals.com/zgbjyxzz/ch/index.aspx>

期待您的来稿!

包峰云,龙红,秦廷洋,等. 自发矮小症突变大鼠家系的建立及其主要生物学特性测定 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 792-799.

Bao FY, Long H, Qin TY, et al. Establishment of a rat model family with spontaneous short stature and identification of its main biological characteristics [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 792-799.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.008

# 自发矮小症突变大鼠家系的建立及其主要生物学特性测定

包峰云,龙红,秦廷洋,霍春茂,唐克桐,张仕斌\*

(贵州遵义医科大学实验动物中心,贵州 遵义 563006)

**【摘要】** 目的 建立自发常染色体显性突变矮小症 SD 大鼠模型家系,测定其主要生物学特性数据。方法 将封闭群 SD 大鼠生产群中出现的矮小症突变个体扩群繁殖建立家系,统计后代中矮小症与正常个体的性状分离比例,鉴定其遗传模式;测定家系个体的体重、体尺,主要脏器重量及指数,血液生理(18项)生化(20项)等指标以及繁殖性能等数据,明确突变个体的表型特征及生物学特性。**结果** 建立了自发常染色体显性突变的矮小症 SD 大鼠封闭群家系,家系暂时命名为 SSR;成年(12周龄)SSR 体重分别为野生型的 57%(♂)和 65%(♀),差异极具显著( $P < 0.01$ );成年 SSR 体长、尾长、胫骨长、股骨长等体尺数据以及主要脏器(心、肝、脾、肺、肾、睾丸/卵巢)重量均显著低于野生型大鼠( $P < 0.01$ );成年 SSR 胫骨长、股骨长指数及主要脏器(心、肝、脾、肺、肾、睾丸/卵巢)指数与野生型之间无显著性差异( $P > 0.05$ );成年雌性 SSR 生殖器官发育正常,但不排卵。**结论** 建立了能稳定遗传的自发常染色体显性突变的矮小症 SD 大鼠家系,可作为人类生长发育及生殖功能研究的动物模型。

**【关键词】** 矮小症;SD 大鼠;动物模型;表型鉴定

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0792-08

## Establishment of a rat model family with spontaneous short stature and identification of its main biological characteristics

BAO Fengyun, LONG Hong, QIN Tingyang, HUO Chunmao, TANG Ketong, ZHANG Shibin\*

(Laboratory Animal Center of Zunyi Medical University, Zunyi 563006, China)

Corresponding author: ZHANG Shibin. E-mail: 574610922@qq.com

**【Abstract】** **Objective** The aim of this study was to establish a rat model of spontaneous short stature associated with female infertility. The main biological characteristics of the rat model were then identified. **Methods** The pedigree of mutant individuals with a short stature in the production group of SD rats was established by expanding the population. The proportion of offspring of mutant individuals with a short stature and that of the normal individuals was calculated and the genetic model was identified. Weight, body size, weight and index of main organs, blood physiology (18 items), biochemistry (20 items), and reproductive performance of the mutant individuals were determined to clarify their phenotypic characteristics and biological characteristics. **Results** A family of SD rats with idiopathic autosomal dominant mutations was established, which was named SSR. Adult (12 weeks old) SSR rat weights were 57% of wildtype (♂) and 65% (♀), Very significant difference ( $P < 0.01$ ). The body length, tail length, tibia length, femur length and other body size data of adult SSR and the weight of main organs (heart, liver, spleen, lungs, kidneys, testes/ovaries) were

[基金项目] 2022年度贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzkwj2022-397)。

Funded by 2022 Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project(gzkwj2022-397).

[作者简介] 包峰云(1996—),男,硕士,研究方向:人类疾病动物模型。Email:2605630383@qq.com

[通信作者] 张仕斌(1981—),男,副教授,硕士生导师,研究方向:实验动物。Email:574610922@qq.com

significantly lower than those of wild type rats ( $P < 0.01$ ); There were no significant differences in the adult SSR rat shinbone length, femoral bone length index, or major organ indexes, compared with the wildtype ( $P > 0.05$ ). Reproductive organ development of adult female rats was normal, but ovulation was not observed. **Conclusions** Spontaneous autosomal dominant mutations in dwarfism lines that can be stably inherited were established, which can be used as an applied study for human growth and infertility models. Female individuals were found to be infertile during the study, but further studies are needed to determine whether infertile individuals can have children.

**【Keywords】** short stature; SD rat; animal model; phenotypic identification

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

矮小症(short stature, SS)是影响人口素质的重要因素之一,我国儿童矮小症患病率约 3%<sup>[1]</sup>,即约有 800 万矮小症患者,并且以 16.1 万的年增速递增。因此,开展矮小症病因诊断、干预、预后、预防研究对于提高人口素质具有非常重要的现实意义和社会意义。矮小症常见的病因包括:骨骼系统疾病如软骨发育不良<sup>[2]</sup>;先天性酶的代谢缺陷如粘多糖病和肝糖原累积症<sup>[3]</sup>;内分泌激素分泌不足<sup>[4]</sup>,甲状腺功能减退<sup>[5]</sup>(克汀病)等等。矮小症的病因仅通过临床评估能发现的不超过 40%<sup>[6]</sup>,大部分的病因都与遗传有关,需要通过基因检测明确和诊断。

动物模型是开展人类矮小症研究必不可少的工具。有 4 种比较著名和常用的自发常染色体隐性突变矮小症啮齿类模型:Snell 小鼠(dw)、Ames 小鼠(df)、spontaneous dwarf 大鼠(SDR)和 Little 小鼠(lt)。dw 小鼠是由编码脑垂体转录因子 Pit-1 基因发生点突变引起的,突变后导致 3 种脑垂体细胞系发育障碍<sup>[7]</sup>;df 小鼠则是由于转录因子 Prop-1 基因发生突变,通过 Pit-1 基因的激活因子发生作用的<sup>[8]</sup>;SDR 大鼠主要是生长激素(GH)调控的基因发生了突变<sup>[9]</sup>;lt 小鼠则是由于编码生长激素释放激素受体的基因发生了错义突变,导致生长激素释放激素受体失去了与生长素释放激素特定结合的能力<sup>[10]</sup>。矮小症动物模型除主要用于生长发育相关研究外,也在睡眠<sup>[11-12]</sup>、认知<sup>[13]</sup>、应激<sup>[14]</sup>、能量代谢<sup>[15]</sup>、抗肿瘤<sup>[16-18]</sup>等方面开展了相关性及其机制的应用研究,凸显出越来越广泛的新的应用价值。矮小症动物模型更多的应用特性及其机理则需要开展更广泛深入的研究。

国内陈芷沅教授<sup>[19]</sup>最早于 1982 年在津白 3(TA3)小鼠群体中发现矮小症小鼠,经过十多年的繁殖与选种培育成近交系。姚菊芳等<sup>[20]</sup>于 2016 年在 Wistar 大鼠繁育群中意外发现矮小突变个体,经过 22~23 代全同胞兄妹交配培育成近交系,但未鉴定到致病基因。Cui 等<sup>[21]</sup>于 2015 年利用锌指核酸

酶技术(ZFNs)制备了生长激素受体(GHR)基因突变的矮小症小型猪模型。Yu 等<sup>[22]</sup>又于 2018 年利用 dual-sgRNAs/Cas9system 制备了 GHR 基因修饰的矮小症小型猪。尽管如此,国内矮小症动物模型资源仍显稀少。

遵义医科大学实验动物中心在封闭群 SD 大鼠的繁育过程中偶然发现 2 只自发矮小症的雄性个体,本研究通过将突变个体与野生型个体配种进行扩群繁殖建立家系,初步对家系个体进行了表型特征及遗传模式的鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

用于创建家系的 2 只 SPF 级雄性矮小症突变 SD 大鼠和 6 只雌性野生型 SD 大鼠,体重分别为 160~190 g 和 270~290 g,均 12 周龄,遗传背景为封闭群,来源于遵义医科大学实验动物中心【SCXK(黔)2021-0002】,饲养于本中心 SPF 级大鼠饲养室【SYXK(黔)2021-0004】。实验大鼠饲养期间自由饮水,饲喂由江苏省协同医药生物工程责任有限公司【苏饲证(2019)01008】提供的生长繁殖饲料,饲养环境:昼夜各半循环照明,温度控制在 20~26℃,相对湿度控制在 40%~70%。动物实验符合遵义医科大学实验动物福利伦理管理相关要求(ZMU22-2203-530)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

孕马血清促性腺激素(PMSG),人绒毛膜促性腺激素(hCG)(宁波第二激素厂)。

FA2204 电子天平(上海浦春计量仪器有限公司);不锈钢直尺;HF-400B 型宠物 DR(江苏康派医疗科技有限公司);斯玛特 SMT-120VP 生化分析仪(成都斯马特科技有限公司);迈瑞 BC-2800Vet 动物专用血细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 矮小症突变大鼠扩群繁殖建立家系及其遗传模式鉴定

将 2 只 12 周龄矮小症雄性 SD 大鼠按 1 : 3 与野生型雌鼠合笼配种, 在出生的 F1 代个体中, 将体重小于群体均值 2 倍标准差者判定为矮小症突变个体, 计算突变型与野生型分离比例, 作遗传性卡方检验以判定其遗传模式。对建立的矮小症 SD 大鼠家系按照国际标准命名法则进行命名。

### 1.2.2 生长曲线及成年大鼠体重、体尺测量以及骨发育情况检测

使用电子秤直接测定 3 周龄(离乳)至 12 周龄(成年)各周龄大鼠体重, 按性别及性状分组作生长曲线, 并以 12 周龄体重数据作差异显著性检验; 使用不锈钢直尺测定 12 周龄大鼠体长、尾长; 使用 HF-400B 型宠物 DR 对成年大鼠进行 X 光拍摄, 着重观察长骨(胫骨及股骨)软骨发育情况及其之间关节腔间隙大小, 测量胫骨长及股骨长, 同时分别计算胫骨长指数及股骨长指数, 按不同性别及不同性状作差异显著性检验。胫骨长指数和股骨长指数可分别反映这 2 种长骨的发育情况, 计算方法为: 胫骨长指数 = 胫骨长/体长 × 100%, 股骨长指数 = 股骨长/体长 × 100%, 数值偏小表明发育不良。

### 1.2.3 成年脏器重量及指数

使用电子天平测定 12 周龄矮小症大鼠和野生型大鼠主要脏器重量, 计数脏器指数并进行差异显著性检验。

### 1.2.4 成年血液生理生化指标

采用眼眶静脉丛采血方法采集 12 周龄大鼠全血用于测定 18 项血液生理指标及 20 项血液生化指标。18 项血液生理指标例如白细胞总数(WBC)、淋巴细胞数目(Lymph)、单核细胞数目(Mon)等分别按不同性别及不同性状作差异显著性检验; 20 项血液生化指标例如白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、球蛋白(GLOB)等各项指标分别按不同性别及不同性状作差异显著性检验。

### 1.2.5 成年雌性矮小症大鼠发情周期及排卵检测

选择 6 只成年矮小症雌性大鼠, 采用阴道涂片方法连续 5 d 检测其发情情况。采用超数排卵方法检测成年矮小症雌性大鼠是否排卵: 对 6 只成年矮小症雌性大鼠于 16:00 开始每只注射 10 IU PMSG, 间隔 48 h 后每只注射 10 IU hCG, 注射 hCG 后按 1 : 1 与野生型雄鼠合笼, 合笼后第 2 天 9:00 采用麻醉呼吸机麻醉大鼠, 然后采用颈椎脱位法处死大

鼠, 接着解剖大鼠剪取输卵管, 在体视显微镜下划开输卵管膨大部采集受精卵并计数。

## 1.3 统计学分析

测定数值以平均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用独立 *t* 检验作差异显著性分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 矮小症大鼠命名及遗传模式鉴定

参照国际命名法则, 暂时将矮小症大鼠命名为 SSR(short stature rat, SSR)。将 2 只 SSR 雄鼠与野生型雌鼠交配后, 获得的 82 只 F1 代个体中突变型个体 39 只(18 ♂ 21 ♀), 野生型个体 43 只(20 ♂ 23 ♀), 性状分离比例符合 1 : 1 的分配比例, 性状在不同性别间无差异分布, 卡方适合性检验(表 1)表明矮小症性状遗传模式符合常染色体单基因显性遗传的孟德尔定律。

表 1 矮小症 SD 大鼠家系 F1 代性状统计及卡方检验

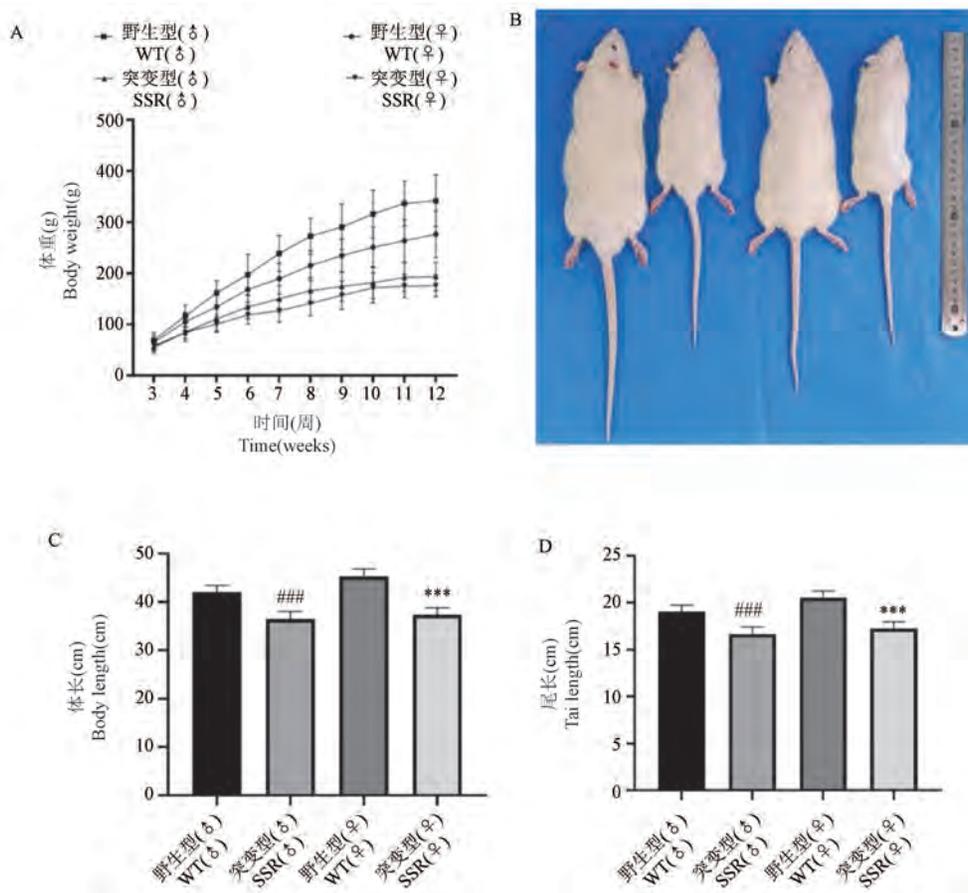
性状类别 Traits type	观察次数 O	理论次数 E	O-E	$\chi_c^2$
突变型 MT	39	41	-2	0.0548
野生型 WT	43	41	2	0.0548
总和 Total	82	82	0	0.1096

注:  $\chi_c^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E} = 0.1096 < \chi_{0.05(1)}^2$

### 2.2 SSR 生长曲线及成年体重、体尺数据以及骨发育情况

生长曲线(图 1A)显示, SSR 从 3 周龄至 12 周龄各周龄体重均明显小于同年龄、同性别野生型大鼠。两种性别成年 SSR 体重分别为野生型的 57% (♂) 和 65% (♀), 差异极具显著性( $P < 0.01$ , 图 1A)。成年 SSR 大鼠与野生型个体外观比较见图 1B, 成年 SSR 体长(图 1C)、尾长(图 1D)均低于同年龄、同性别野生型大鼠, 差异极具显著性( $P < 0.01$ )。

成年 SSR 长骨关节间隙未见增大(图 2A), 表明长骨软骨发育未见异常, 股骨长(图 2B)、胫骨长(图 2C)均低于同年龄、同性别野生型大鼠, 差异极具显著性( $P < 0.01$ ), 而胫骨长及股骨长占体长比例在不同性别及性状间差异不显著(表 2,  $P > 0.05$ ), 表明 SSR 长骨发育相对正常, 为匀称型身材矮小症。



注:与雌性野生型相比,\*\*\*  $P < 0.01$ ;与雄性野生型相比,###  $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 SSR 生长曲线、成年体重及体尺比较

Note. Compared with females WT, \*\*\*  $P < 0.01$ . Compared with males WT, ###  $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

Figure 1 Growth curves of SSR and macroscopic findings regarding body weight, body length and tail length

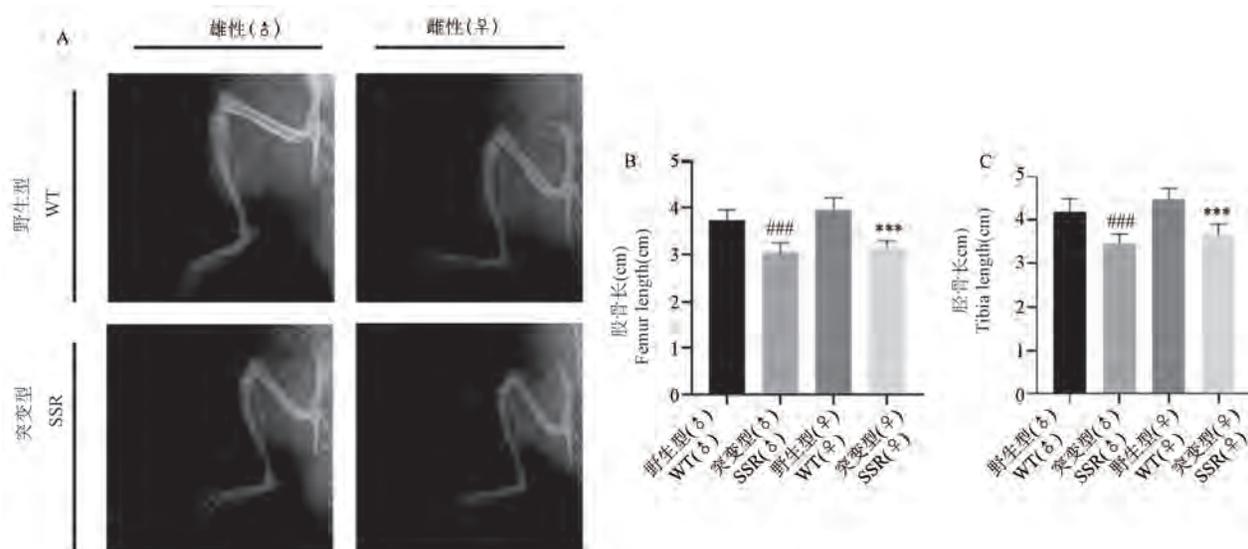


图 2 X 光显示 SSR 骨发育情况及胫骨、股骨长度比较

Figure 2 Radio graphic findings regarding the lengths of the femur and tibia

表 2 成年 SSR 与野生型大鼠体尺(胫骨长、股骨长)指数比较( $n=10$ )

**Table 2** Body size (tibia lengths and femur lengths) indexes of adult SSR and widetype rats( $n=10$ )

性别 Sex		胫骨长指数 Tibia length index	股骨长指数 Femur length index
雄性(♂) Males(♂)	SSR	10.24 ± 0.66	8.84 ± 0.43
	WT	9.92 ± 0.46	8.76 ± 0.45
雌性(♀) Female(♀)	SSR	9.98 ± 0.46	8.77 ± 0.48
	WT	10.23 ± 0.27	9.09 ± 0.20

### 2.3 成年 SSR 脏器重量及指数

成年 SSR 与野生型大鼠主要脏器重量比较见表 3,除卵巢外,SSR 的心、肝、脾、肺、肾及睾丸重量均显著低于野生型大鼠( $P < 0.01$ )。

脏器指数中(见表 4),成年雄性及雌性 SSR 的肝指数均显著低于野生型大鼠,而成年雄性 SSR 辜

丸指数显著高于野生型大鼠。

### 2.4 成年 SSR 与野生型大鼠血液生理生化指标比较

18 项血液生理指标测定结果中雄性 SSR 淋巴细胞百分比、单核细胞百分比、中性粒细胞百分比,较野生型差异极显著( $P < 0.01$ ),雌性 SSR 白细胞总数、淋巴细胞数目,较野生型相比显著性差异( $P < 0.05$ )。20 项血液生化指标测定结果中雌雄 SSR 较野生型各项指标无显著性差异( $P > 0.05$ )(见表 5,表 6)。

### 2.5 成年雌性 SSR 繁殖能力检测

阴道涂片检测见图 3,未发现成年雌性 SSR 发情周期异常;超数排卵实验表明,成年雌性 SSR 未发生排卵,但对卵巢组织进行病理切片 HE 染色,观察到卵泡发育(见图 4)。导致雌性 SSR 不孕的病理原因还需进一步检测。

表 3 成年 SSR 与野生型大鼠主要脏器重量比较

**Table 3** Main organ weights of adult SSR and wide type rats

性别 Sex		心 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	睾丸 Testis	卵巢 Ovary
雄性(♂) Males(♂)	SSR( $n=11$ )	0.73 ± 0.11**	6.78 ± 1.36**	0.31 ± 0.04**	1.23 ± 0.28**	1.33 ± 0.21**	2.39 ± 0.27**	-
	WT( $n=12$ )	1.56 ± 0.36	20.55 ± 2.99	0.72 ± 0.09	3.28 ± 1.25	3.37 ± 0.43	3.37 ± 0.48	-
雌性(♀) Female(♀)	SSR( $n=15$ )	0.62 ± 0.08**	6.32 ± 1.01**	0.29 ± 0.06**	1.18 ± 0.26**	1.22 ± 0.17**	-	0.11 ± 0.06
	WT( $n=12$ )	1.08 ± 0.20	14.48 ± 4.41	0.74 ± 0.32	2.43 ± 1.38	2.40 ± 0.26	-	0.11 ± 0.02

注:与野生型比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。(下表同)

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

表 4 成年 SSR 与野生型大鼠主要脏器指数比较

**Table 4** Organ indexes of adult SSR and wide type rats

性别 Sex		心 Heart	肝 Live	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	睾丸 Testis	卵巢 Ovary
雄性(♂) Males(♂)	SSR( $n=10$ )	3.43 ± 0.57	31.84 ± 4.84**	1.46 ± 0.28	5.78 ± 1.14	6.27 ± 0.87	11.29 ± 1.28**	-
	WT( $n=11$ )	3.10 ± 0.57	40.96 ± 4.81	1.45 ± 0.16	6.49 ± 2.26	6.71 ± 0.68	6.75 ± 1.02	-
雌性(♀) Female(♀)	SSR( $n=10$ )	3.34 ± 0.40	33.69 ± 3.85**	1.55 ± 0.32**	6.27 ± 1.04	6.54 ± 0.66*	-	0.59 ± 0.32
	WT( $n=10$ )	3.25 ± 0.30	43.05 ± 8.68	1.92 ± 0.44	7.22 ± 3.73	7.30 ± 0.88	-	0.27 ± 0.14

## 3 讨论

本实验对遵义医科大学实验动物中心封闭群 SD 大鼠生产群中自发突变的矮小症个体进行扩群繁殖建立了家系,家系暂时命名为 SSR。SSR 的遗传学及生物学特性明显不同于已报道的几种矮小症或侏儒症小鼠/大鼠模型。已报道的 Snell 小

鼠<sup>[7]</sup>、Ames 小鼠<sup>[8]</sup>、SDR 大鼠<sup>[9]</sup>、Little 小鼠<sup>[10]</sup>、CCI 大鼠<sup>[2]</sup>均为常染色体隐性遗传,其中 CCI 大鼠隐性纯合突变个体表现出完全不育的性状。姚菊芳等<sup>[20]</sup>报道的 SWDR 大鼠的雌性突变个体具有繁殖能力,只是繁殖性能低于野生型大鼠,但突变性状的遗传机制尚不明确。本实验创建的 SSR 家系其遗传模式为常染色体显性遗传,性状表现为明显的

表 5 成年 SSR 与野生型大鼠血液生理指标比较

Table 5 Blood physiological indexes of adult SSR and wide type rats

项目 Project	白细胞总数 (10 <sup>9</sup> /L) WBC(10 <sup>9</sup> /L)	淋巴细胞数目 (10 <sup>9</sup> /L) Lymph(10 <sup>9</sup> /L)	单核细胞数目 (10 <sup>9</sup> /L) Mon(10 <sup>9</sup> /L)	中性粒细胞数目 (10 <sup>9</sup> /L) Gran(10 <sup>9</sup> /L)	淋巴细胞百分比 (%) Lymph(%)
雄性(♂) SSR(n = 4)	6.23 ± 1.97	3.50 ± 1.14	0.43 ± 0.13	2.30 ± 0.77	0.56 ± 0.05**
Males(♂) WT(n = 6)	8.25 ± 3.04	5.92 ± 2.07	0.32 ± 0.13	2.02 ± 0.93	0.72 ± 0.04
雌性(♀) SSR(n = 8)	5.18 ± 3.58*	3.93 ± 1.87*	0.29 ± 0.19	1.67 ± 1.27	0.68 ± 0.07
Female(♀) WT(n = 5)	9.52 ± 2.75	7.20 ± 2.38	0.34 ± 0.09	1.98 ± 0.51	0.75 ± 0.05
项目 Project	单核细胞百分比 (%) Mon(%)	中性粒细胞 百分比(%) Gran(%)	红细胞数目 (10 <sup>12</sup> /L) RBC(10 <sup>12</sup> /L)	血红蛋白 (g/L) HGB(g/L)	红细胞压积 (%) HCT(%)
雄性(♂) SSR(n = 4)	0.07 ± 0.01**	0.37 ± 0.04**	9.95 ± 0.29	166.25 ± 6.55	0.53 ± 0.03
Males(♂) WT(n = 6)	0.04 ± 0.01	0.24 ± 0.04	10.24 ± 0.77	183.50 ± 13.28	0.58 ± 0.04
雌性(♀) SSR(n = 8)	0.05 ± 0.01	0.27 ± 0.06	7.14 ± 3.04	115.63 ± 60.75	0.40 ± 0.17
Female(♀) WT(n = 5)	0.04 ± 0.01	0.21 ± 0.04	6.87 ± 4.18	155.80 ± 35.12	0.50 ± 0.11
项目 Project	平均红细胞体积 (fL) MCV(fL)	平均红细胞血红蛋白含量(pg) MCH(pg)	平均红细胞血红蛋白浓度 MCHC	红细胞分布宽度 变异系数(g/L) RDW	血小板数目 (10 <sup>9</sup> /L) PLT(10 <sup>9</sup> /L)
雄性(♂) SSR(n = 4)	53.38 ± 2.74	16.70 ± 0.78	313.25 ± 6.50	0.12 ± 0.01	1119.00 ± 337.92
Males(♂) WT(n = 6)	56.85 ± 2.07	17.90 ± 0.62	315.50 ± 6.16	0.11 ± 0.01	1182.33 ± 867.04
雌性(♀) SSR(n = 8)	56.94 ± 3.85	15.24 ± 4.58	273.38 ± 86.70	0.12 ± 0.02	1042.75 ± 618.23
Female(♀) WT(n = 5)	57.34 ± 2.11	17.68 ± 0.54	309.20 ± 5.26	2.27 ± 4.82	1122.00 ± 343.74
项目 Project	平均血小板 体积(fL) MPV(fL)	血小板分布 宽度 PDW	血小板压积 (%) PCT(%)		
雄性(♂) SSR(n = 4)	6.30 ± 0.33	15.85 ± 0.26	0.0062 ± 0.0007		
Males(♂) WT(n = 6)	6.37 ± 0.20	16.33 ± 0.43	0.0033 ± 0.0024		
雌性(♀) SSR(n = 8)	6.40 ± 0.63	16.26 ± 0.60	0.0045 ± 0.0017		
Female(♀) WT(n = 5)	6.18 ± 0.15	15.92 ± 0.13	0.0050 ± 0.0023		

表 6 成年 SSR 与野生型大鼠血液生化指标比较

Table 6 Blood biochemical indices of adult SSR and wide type rats

项目 Project	白蛋白(g/L) ALB(g/L)	总蛋白(g/L) TP(g/L)	球蛋白(g/L) Glob(g/L)	白球比(%) A/G(%)	丙氨酸氨基 转移酶(U/L) ALT(U/L)
雄性(♂) SSR(n = 4)	33.68 ± 1.19	68.69 ± 2.32	35.03 ± 1.70	0.96 ± 0.05	50.25 ± 11.03
Males(♂) WT(n = 5)	34.44 ± 1.87	70.32 ± 4.49	35.88 ± 2.86	0.96 ± 0.05	151.40 ± 221.24
雌性(♀) SSR(n = 8)	33.68 ± 1.21	66.79 ± 2.46	33.13 ± 1.54	1.02 ± 0.04	62.25 ± 51.32
Female(♀) WT(n = 5)	34.18 ± 6.75	66.46 ± 14.29	32.26 ± 7.56	1.07 ± 0.07	49.60 ± 14.21
项目 Project	碱性磷酸酶(U/L) ALP(U/L)	肌酐(μmol/L) Cre(μmol/L)	尿素(mmol/L) Urea(mmol/L)	尿酸比(%) U/C(%)	葡萄糖(mmol/L) GLU(mmol/L)
雄性(♂) SSR(n = 4)	345.00 ± 129.47	31.58 ± 7.61	7.05 ± 0.72	246.37 ± 52.76	5.13 ± 0.63
Males(♂) WT(n = 5)	342.00 ± 68.61	28.68 ± 11.38	6.68 ± 0.86	265.66 ± 109.23	5.15 ± 1.50
雌性(♀) SSR(n = 8)	303.00 ± 88.42	35.13 ± 12.15	6.79 ± 0.86	223.16 ± 129.47	5.65 ± 0.97
Female(♀) WT(n = 5)	220.20 ± 72.50	31.40 ± 17.80	6.32 ± 1.31	231.25 ± 78.32	6.29 ± 2.39
项目 Project	天门冬氨酸氨基 转移酶(U/L) AST(U/L)	总胆汁酸 (μmol/L) TBA(μmol/L)	淀粉酶 (U/L) AMY(U/L)	脂肪酶 (U/L) LPS(U/L)	乳酸脱氢酶 (U/L) LDH(U/L)
雄性(♂) SSR(n = 4)	165.75 ± 68.65	19.77 ± 10.25	1449.16 ± 59.71	17.00 ± 2.94	363.50 ± 84.15
Males(♂) WT(n = 5)	186.50 ± 26.16	19.00 ± 2.64	1846.67 ± 157.80	17.33 ± 0.58	1235.33 ± 631.62
雌性(♀) SSR(n = 8)	136.17 ± 28.56	16.44 ± 11.06	1211.67 ± 113.03	21.83 ± 14.32	539.00 ± 249.38
Female(♀) WT(n = 5)	129.00 ± 10.68	14.04 ± 4.82	1212.25 ± 337.21	16.75 ± 0.50	526.50 ± 97.87
项目 Project	肌酸激酶(U/L) CK(U/L)	尿酸(μmol/L) UA(μmol/L)	总胆固醇(mmol/L) TC(mmol/L)	甘油三酯(mmol/L) TG(mmol/L)	总CO <sub>2</sub> (mmol/L) Toll CO <sub>2</sub> (mmol/L)
雄性(♂) SSR(n = 4)	1733.00 ± 1571.86	39.50 ± 18.28	2.80 ± 0.98	1.07 ± 0.57	25.08 ± 1.84
Males(♂) WT(n = 5)	1851.33 ± 464.10	85.33 ± 39.72	2.97 ± 0.19	2.90 ± 0.26	27.90 ± 1.57
雌性(♀) SSR(n = 8)	2312.83 ± 772.26	60.67 ± 23.41	2.61 ± 0.48	1.10 ± 0.47	25.63 ± 1.77
Female(♀) WT(n = 5)	2645.00 ± 657.18	36.00 ± 20.30	2.49 ± 0.86	0.95 ± 0.36	22.83 ± 6.02

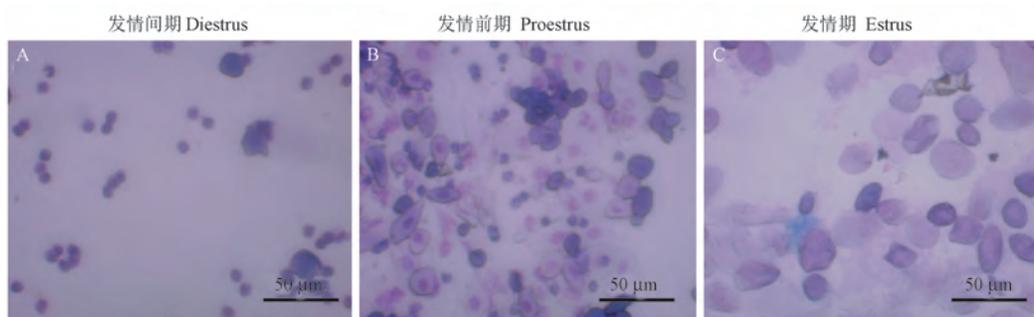


图 3 成年 SSR 阴道涂片

Figure 3 Adult SSR vaginal smear

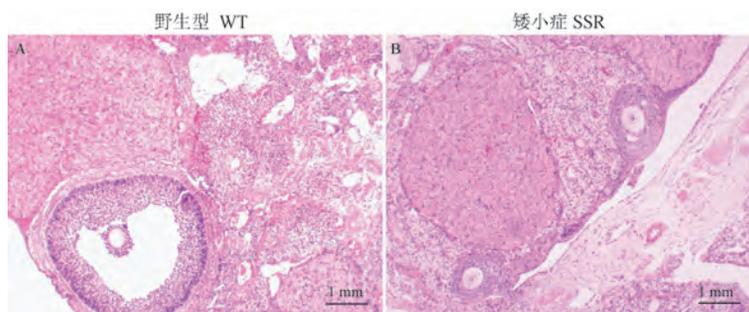


图 4 成年雌性 SSR 与野生型大鼠卵巢病理切片

Figure 4 Adult female SSR ovarian pathology section

匀称型身材缩小,软骨发育未见异常,但雌性突变个体伴发排卵障碍性不孕,因此无法通过自然交配得到隐性纯合突变个体,家系的创建只能利用杂合子进行保种和传代。SSR 可作为生长发育及生殖功能研究的新的动物模型,但其确切的致病基因及分子病理机制还需要进一步深入的研究。同时,SSR 雌性突变个体的生殖功能表型特征也需要进一步系统准确的鉴定。

矮小症通常可根据不同类型骨骼发育异常归类为短肢型、短躯干型和匀称型 3 类<sup>[23]</sup>。软骨发育不全、假性软骨发育不全、软骨外胚层发育不良以及多发性骨骺发育不良均导致长骨发育不良,呈现为短肢型矮小症;粘多糖病 IV 型为严重的短躯干型矮小症;而许多病因不明的特发性矮小症则属于匀称型。这种分类方法有助于矮小症的病因诊断。由于大小鼠本身个体体尺很小,不易直观判定其矮小症类型。本研究借鉴大型经济类动物牛的体长指数(体长/体高 × 100)和肢长指数(胸肢长/体高 × 100)来鉴定 SSR 体型的匀称性和长骨发育情况。由于大鼠体高无法准确界定和测量,因此我们以“胫骨长/体长 × 100%”定义为胫骨长指数,将“股骨长/体长 × 100%”定义为股骨长指数分别来

判定胫骨及股骨的发育情况,结果表明,同年龄段 SSR 与野生型大鼠相比,胫骨长指数与股骨长指数无显著性差异,由此将 SSR 判定为匀称型矮小症。是否能将胫骨长指数与股骨长指数作为大小鼠矮小症表型分类的一个通用的科学指标,可能还需要在更多类型矮小症动物模型中进行验证和进一步探讨。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Yuan Y, Zhou B, Wang K, et al. Identification of contributing predictors for short stature and pre-shortness among 7310 Chinese preschool-aged children [J]. *Endocrine*, 2021, 71 ( 2 ): 443-452.
- [ 2 ] Tanaka M, Watanabe M, Yokomi I, et al. Establishment of a novel dwarf rat strain; cartilage calcification insufficient (CCI) rats [J]. *Exp Anim*, 2015, 64(2): 121-128.
- [ 3 ] Yoshida CA, Kawane T, Moriishi T, et al. Overexpression of Galnt3 in chondrocytes resulted in dwarfism due to the increase of mucin-type O-glycans and reduction of glycosaminoglycans [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(38): 26584-26596.
- [ 4 ] Liu Z, Mohan S, Yakar S. Does the GH/IGF-I axis contribute to skeletal sexual dimorphism? Evidence from mouse studies [J]. *Growth Horm IGF Res*, 2016, 27: 7-17.
- [ 5 ] Yang J, Yi N, Zhang J, et al. Generation and characterization of a hypothyroidism rat model with truncated thyroid stimulating hormone receptor [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 4004.

- [ 6 ] Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(9): 3080-3092.
- [ 7 ] van Buul S, Van den Brande J. The Snell-dwarfmouse. I. General growth pattern, before and during growth hormone and thyroxine therapy [J]. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1978, 89(4): 632-645.
- [ 8 ] Sornson MW, Wu W, Dasen JS, et al. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism [J]. *Nature*, 1996, 384(6607): 327-333.
- [ 9 ] Takeuchi T, Suzuki H, Sakurai S, et al. Molecular mechanism of growth hormone (GH) deficiency in the spontaneous dwarf rat; detection of abnormal splicing of GH messenger ribonucleic acid by the polymerase chain reaction [J]. *Endocrinology*, 1990, 126(1): 31-38.
- [ 10 ] Jansson JO, Downs TR, Beamer WG, et al. Receptor-associated resistance to growth hormone-releasing factor in dwarf little mice [J]. *Science*, 1986, 232(4749): 511-512.
- [ 11 ] Kelly JM, Bianchi MT. Mammalian sleep genetics [J]. *Neurogenetics*, 2012, 13(4): 287-326.
- [ 12 ] Andersen ML, Lee KS, Guindalini C, et al. Altered sleep patterns and physiologic characteristics in spontaneous dwarf rats [J]. *Comp Med*, 2009, 59(4): 344-349.
- [ 13 ] Basu A, McFarlane HG, Kopchick JJ. Spatial learning and memory in male mice with altered growth hormone action [J]. *Horm Behav*, 2017, 93: 18-30.
- [ 14 ] Leiser SF, Miller RA. Nrf2 signaling, a mechanism for cellular stress resistance in long-lived mice [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(3): 871-884.
- [ 15 ] Darcy J, McFadden S, Fang Y, et al. Increased environmental temperature normalizes energy metabolism outputs between normal and Ames dwarf mice [J]. *Aging*, 2018, 10(10): 2709-2722.
- [ 16 ] Alderman JM, Flurkey K, Brooks NL, et al. Neuroendocrine inhibition of glucose production and resistance to cancer in dwarf mice [J]. *Exp Gerontol*, 2009, 44(1-2): 26-33.
- [ 17 ] Lann D, LeRoith D. The role of endocrine insulin-like growth factor-I and insulin in breast cancer [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2008, 13(4): 371-379.
- [ 18 ] Steerman R, Shevah O, Laron Z. Congenital IGF1 deficiency tends to confer protection against post-natal development of malignancies [J]. *Eur J Endocrinol*, 2011, 164(4): 485-489.
- [ 19 ] 陈芷沅. 突变体——侏儒小鼠 [J]. *遗传*, 1986, 8: 24.  
Chen ZR. Mutant-dwarf mice [J]. *Genetic*, 1986, 8: 24.
- [ 20 ] 姚菊芳, 华征宇, 王斌, 等. 近交系侏儒大鼠的培育及其主要生物学特性测定 [J]. *实验动物与比较医学*, 2016, 36(4): 295-300, 306.  
Yao JF, Hua ZY, Wang B, et al. Breeding of inbred dwarf rats and its main biological characteristics [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2016, 36(4): 295-300, 306.
- [ 21 ] Cui D, Li F, Li Q, et al. Generation of a miniature pig disease model for human Laron syndrome [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15603.
- [ 22 ] Yu H, Long W, Zhang X, et al. Generation of GHR-modified pigs as Laron syndrome models via a dual-sgRNAs/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 41.
- [ 23 ] 曹来宾. 侏儒的 X 线分析(二) [J]. *实用放射学杂志*, 1989(2): 97-98.  
Cao LB. X-ray analysis of dwarf(II) [J]. *J Pract Radiol*, 1989(2): 97-98.

[收稿日期] 2022-05-16

武振帅,纪鹏,魏彦明,等. 黄芩-连翘配伍对脂多糖诱导小鼠急性肺炎模型的保护作用[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 800-809.

Wu ZS, Ji P, Wei YM, et al. Protective effect of *Scutellaria Radix-Forsythiae fructus* in an acute pneumonia mouse model induced by lipopolysaccharide [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 800-809.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.009

## 黄芩-连翘配伍对脂多糖诱导小鼠急性肺炎模型的保护作用

武振帅,纪鹏\*,魏彦明\*,徐誉彰,张晓松,武凡琳,任建明,李琛琛,华永丽,姚万玲,袁子文

(甘肃农业大学动物医学院,兰州 730070)

**【摘要】** 目的 研究黄芩-连翘不同比例配伍对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠急性肺炎模型的保护作用差异。方法 首先采用加热回流法制备不同配伍比例黄芩-连翘组合物。选取健康KM小鼠144只,随机分为12组(正常对照组、模型组、地塞米松阳性药物组、9个黄芩-连翘不同比例配伍组),每组12只,连续灌服相应药物7 d,正常对照组和模型组给予等量生理盐水;第8天,除正常对照组外,其余组小鼠均采用LPS(10 mg/mL)滴鼻法建立小鼠急性肺炎模型。造模6 h后迅速采样。通过小鼠临床体征、日均体重增长量、采食量、脏器指数、小鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6含量、血常规、肺组织形态学观察及肺损伤病理组织学评分,评估黄芩-连翘不同比例配伍组对小鼠急性肺炎模型的保护作用差异。结果 建模后各组小鼠存活率为100%。正常对照组小鼠临床体征正常,呼吸音正常,反应灵敏;模型组小鼠反应迟钝,蜷缩扎堆,听诊发现肺部有啰音。不同给药组较模型组相比,整体情况较好,尤其黄芩-连翘配伍组(1:1,2:3,1:2)活动较多,反应较灵敏。小鼠日均体重增长量、日均采食量、肾指数、肝指数、脾指数和胸腺指数差异不显著( $P > 0.05$ );与正常对照组比,模型组肺指数、血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6含量、血常规指标、肺组织损伤病理组织学评分显著升高( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),小鼠肺出现大量炎性细胞浸润,肺泡壁明显增厚,SFTPC蛋白在肺组织肺泡与肺泡间隔区域表达量显著增加,大量阳性细胞表达SFTPC蛋白;与模型组相比,黄芩-连翘配伍组(3:1,3:2,2:1,1:3,3:0,0:3)的心指数、黄芩-连翘配伍组(1:2)的肺指数、黄芩-连翘配伍组(1:1,2:3,1:2)小鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6含量、黄芩-连翘配伍组(1:1,2:3,1:2)血常规指标含量、黄芩-连翘配伍组(3:2,1:1,2:3,1:2)肺组织损伤评分显著降低( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),4个黄芩-连翘配伍组(3:2,1:1,2:3,1:2)小鼠肺病理现象明显减轻,SFTPC蛋白在肺组织肺泡与肺泡间隔区域表达量显著减少,阳性细胞的表达量较少。结论 黄芩-连翘配伍(1:1,2:3,1:2)对LPS诱导的急性肺炎具有明显保护作用。

**【关键词】** 急性肺炎;脂多糖;黄芩;连翘;配伍

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)06-0800-10

**【基金项目】** 甘肃农业大学伏羲英才项目(Gaufx-02Y05),甘肃省高校产业支撑项目(2020C-14-1),甘肃农业大学青年导师基金资助项目(GAU-QDFC-2021-04),财政部和农业农村部-国家现代产业技术体系资助(CARS-37),甘肃农业大学横向项目(GSAU-JSYF-2021-021)。

Funded by Fuxi Talents Project of Gansu Agricultural University (Gaufx-02Y05), Gansu Province College Industry Support Project (2020C-14-1), Project Supported by the Youth Tutor Fund of Gansu Agricultural University (GAU-QDFC-2021-04), Ministry of Finance and Ministry of Agriculture and Rural Affairs-National Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-37), Horizontal Project of Gansu Agricultural University (GSAU-JSYF-2021-021).

**【作者简介】** 武振帅(1995—),男,在读硕士研究生,研究方向:中兽医学与中兽药研发。Email:2874871437@qq.com

**【通信作者】** 纪鹏(1986—),男,硕士生导师,副教授,研究方向:中兽医学与中兽药研发。Email:jip@gsau.edu.cn;

魏彦明(1963—),男,教授,研究方向:中兽医学及中药药理学研究。Email:weiyim@gsau.edu.cn。

\* 共同通信作者

## Protective effect of *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* in an acute pneumonia mouse model induced by lipopolysaccharide

WU Zhenshuai, JI Peng<sup>\*</sup>, WEI Yanming<sup>\*</sup>, XU Yuzhang, ZHANG Xiaosong, WU Fanlin, REN Jianming, LI Chenchen, HUA Yongli, YAO Wanling, YUAN Ziwen

(College of Veterinary Medicine of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Corresponding author: JI Peng. E-mail: jip@gsau.edu.cn; WEI Yanming. E-mail: weiyim@gsau.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To study the protective effect of various proportions of *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* in an acute pneumonia mouse model induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** The *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* composition with various compatibility ratios was prepared by the heating reflux method. In total, 144 healthy KM mice were randomly divided into 12 groups (normal control, model, dexamethasone positive drug, and nine groups of *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* at various proportions) with 12 mice in each group. Normal control and model groups were administered the same amount of normal saline and the other groups were administered corresponding drugs for 7 continuous days. On day 8, except for the normal control group, mice in other groups were treated with LPS (10 mg/mL) by dripping a solution into the nasal cavity to establish the acute pneumonia model. Samples were collected quickly at 6 hours after modeling. The protective effects of various proportions of *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* in the acute pneumonia mouse model were evaluated by clinical signs, average daily weight gain, feed intake, the viscera index, serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 contents, blood routine index, lung histopathological observation, and lung injury histopathological score. **Results** After modeling, the survival rate of mice in each group was 100%. The normal control group had normal clinical signs, breath sounds, and a sensitive reaction. Mice in the model group were unresponsive and huddled together with rales in the lungs detected by auscultation. Compared with the model group, the overall situation of the various administration groups was better. In particular, the *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* combination groups (1 : 1, 2 : 3, 1 : 2) showed more activity and sensitive reactions. No significant differences were observed in daily body weight increase, daily feed intake, or kidney, liver, spleen, and thymus indexes ( $P > 0.05$ ). Compared with the normal control group, the lung index, serum contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6, blood biochemical indexes, and histopathological score of lung tissue injury were significantly increased in the model group ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The alveolar wall had significantly thickened, SFTPC protein expression in alveolar and interalveolar regions of lung tissue was significantly increased, and a large number of cells expressed SFTPC protein. Compared with the model group, the heart index of the *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* combination groups (3 : 1, 3 : 2, 2 : 1, 1 : 3, 3 : 0, 0 : 3), the lung index of the *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* combination group (1 : 2), and the serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  And IL-6 content, blood routine index content of the *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* combination groups (1 : 1, 2 : 3, 1 : 2), lung tissue injury scores of the *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* combination groups (3 : 2, 1 : 1, 2 : 3, 1 : 2) were significantly decreased ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The lung pathology of mice in the four *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* groups (3 : 2, 1 : 1, 2 : 3, 1 : 2) was reduced significantly, the expression level of SFTPC protein in the alveolar and interalveolar regions of lung tissue was reduced significantly, and the number of positive cells was low. **Conclusions** Combination of *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus*(1 : 1, 2 : 3, 1 : 2) has a significant protective effect on LPS-induced acute pneumonia.

**【Keywords】** acute pneumonia; lipopolysaccharide; *Scutellariae Radix*; *Forsythiae Fructus*; compatibility

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

畜禽肺炎发病率高、发病急且病死率高,严重危害养殖效益。如多杀性巴氏杆菌、溶血性巴氏杆菌、肺炎链球菌、结核杆菌等常可引起犊牛肺炎<sup>[1]</sup>;链球菌、肺炎球菌、葡萄球菌等都可引起羊肺炎,对

羊只剖检发现其肺部有发炎及质变的迹象<sup>[2]</sup>。脂多糖(LPS),又名内毒素,是革兰氏阴性菌细胞壁外膜中的主要成分,当浓度升高时会引发强烈炎症反应,其在动物体内可以诱发炎性细胞浸润, TNF- $\alpha$ 、

IL-1 $\beta$ 、IL-6 等炎症因子的释放<sup>[3]</sup>,引起的炎症机理与革兰氏阴性菌感染相似,故采用 LPS 建立急性肺炎动物模型属于经典方法之一<sup>[4]</sup>。可通过建立小鼠急性肺炎模型来筛选防治药物。急性肺炎所致急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是心肺功能衰竭、氧化应激、急性炎症性疾病等多种因素引起的一种严重的呼吸系统疾病,可引起严重临床并发症和高死亡率,并可导致呼吸窘迫综合征<sup>[5-7]</sup>。肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)是由 II 型肺泡上皮细胞(alveolar epithelium cell II, AEC II)分泌的一种脂蛋白,主要含有 4 种蛋白,但只有表面活性物质相关蛋白 C(surfactant-associated protein C, SFTPC)是 II 型肺泡上皮细胞表达的活性蛋白<sup>[8]</sup>。阮玲瑛等<sup>[9]</sup>研究表明 II 型肺泡上皮细胞与许多肺部疾病的发生及病理过程有关。中药黄芩,是唇形科植物黄芩的干燥根<sup>[10]</sup>,具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效,常用于治疗肺热咳嗽、黄疸等<sup>[11]</sup>,其主要活性成分为黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等。连翘为木犀科植物,具有清热解毒、散结消肿、疏散风热功效,常用于治疗肺炎、痢疾和疮疡等<sup>[12-13]</sup>,其主要活性成分为连翘苷、连翘脂素、木犀草素与牛蒡子苷元等。黄芩和连翘配伍,遵循了中药药对相须为用的原则,是中(兽)医临床上防治温热病的常用药对之一<sup>[14]</sup>。因此,本研究主要分析了黄芩-连翘不同配伍比例对小鼠急性肺炎的保护效果差异,旨在筛选出防治急性肺炎效果确切的最佳配伍比例,为后期开发畜禽肺炎防治药物奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验动物

144 只 4 周龄 SPF 级雄性 KM 小鼠,体重 18 ~ 22 g,购自兰州兽医研究所实验动物中心【SCXK(甘)2020-0002】,饲养场地为甘肃省动物疾病防治药物创制工程研究中心实验动物房【SYXK(甘)2019-0002】,12 h 光照,12 h 黑暗周期循环,自由饮食饮水,适应性喂养 3 d 后开始实验。动物实验获得甘肃农业大学伦理委员会批准(GSAU-Eth-VMC-2021-013)。在小鼠饲养和实验过程中已做到按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义的关怀。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

黄芩、连翘饮片购自甘肃省兰州市黄河药材市

场,经甘肃农业大学动物医学院中兽医教研室魏彦明教授鉴定;地塞米松(广东华南药业集团有限公司,国药准字 H44024469);LPS(索莱宝);TNF- $\alpha$  试剂盒(上海酶联,货号:ml002095)、IL-1 $\beta$  试剂盒(上海酶联,货号:ml063132)和 IL-6 试剂盒(上海酶联,货号:ml002293)、Rabbit Anti-SFTPC Polyclonal Antibody(bs-10067R)购自北京博奥森生物技术有限公司、SFTPC Polyclonal Antibody 购自武汉三鹰生物技术有限公司等。

YP502N 电子天平(上海天美天平仪器有限公司);血常规分析仪(Boule Medical AB 公司);Olympus DP-71 显微照相系统(日本 Olympus 公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司,型号:RM2245);KD-BM 组织包埋机(上海艾牧生物科技有限公司);DZ5-WS 多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);BSA224S-CW 分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);Spectra Max Plus<sup>384</sup> 酶标仪(美谷分子仪器有限公司)等。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 实验药物的制备

取黄芩、连翘饮片,粉碎后过 60 目筛,备用。分别按照 9 个黄芩-连翘不同比例(3:2,3:0,3:1,2:1,1:1,2:3,1:2,1:3,0:3)制备不同混合物,各取 6.00 g 于 500 mL 圆底烧瓶中,加入 120 mL 蒸馏水,加热回流 1 h,3500 r/min 离心 5 min,取上清液。余下药渣再加入 120 mL 蒸馏水,加热回流 30 min,3500 r/min 离心 5 min,合并 2 次取上清液,真空浓缩至 48 mL。

#### 1.2.2 动物实验与采样

将 144 只健康 KM 小鼠随机分为正常对照组(K)、模型组(M)、9 个黄芩-连翘不同比例(3:2,3:0,3:1,2:1,1:1,2:3,1:2,1:3,0:3)配伍干预组、地塞米松阳性药物组(Y)组,每组 12 只。地塞米松阳性药物组给予地塞米松 2 mg/kg,9 个黄芩-连翘不同比例(3:2,3:0,3:1,2:1,1:1,2:3,1:2,1:3,0:3)配伍干预组依次给予相应药物的提取液 0.1 mL/10 g(相当于生药量 1.2 mg/10 g),灌服,1 次/日,连续 7 d,正常对照组和模型组给予等量生理盐水。参考 Ye 等<sup>[15]</sup>的方法,在实验第 8 天,灌药 1 h 后,除正常对照组外,其他组均采用 LPS(10 mg/kg 体重)滴鼻造模,造模前 12 h 禁食不禁水。将小鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠溶液麻醉;然后用移液器精确吸取浓度为 10 mg/mL 的 LPS

溶液,左手控制住小鼠的头部,右手轻轻推移液器,枪头可见吸取的小液滴,轻轻靠向小鼠右鼻孔,左手立刻快速有力度的向上提 35 cm 左右,再缓慢轻轻回到左手起始位置,进行来回 10 次,然后同样的操作向小鼠左鼻孔滴加小液滴,左右鼻孔依次滴加,直至液体滴注完成,最后松开小鼠,将小鼠置于鼠板,腹部朝上、头部朝上倾斜的体位保持 30 min 以上,待小鼠复苏,放回原笼饲养观察。实验过程中记录小鼠采食量与体重。观察各组小鼠精神状态、活动状态等,并记录。小鼠造模 6 h 后,采取血液样本后,用 3% 戊巴比妥钠溶液麻醉,然后将小鼠固定在手术板上,采取心、肝、脾、肺、肾、胸腺。计算心、肝、脾、肺、肾、胸腺的器官指数。计算公式如下:脏器指数=器官质量/动物体质量。

### 1.2.3 血常规检测与血清制备

各组小鼠采集全血首先进行血常规检测,然后将余下全血置于 1.5 mL 离心管中,静置后经 3500 r/min 离心 15 min,取血清置于 -80℃ 冰箱保存。

### 1.2.4 肺病理组织学观察

将肺以 4% 的甲醛固定 14 d 后,通过常规石蜡包埋、切片、HE 及 IHC 染色并观察。

### 1.2.5 小鼠血清炎症因子测定

按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,测定各组小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计学处理,符合正态分布的定量资料以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 来表示,多组资料之间比较采用单因素方差分析,事后比较采用 LSD 法;非正态分布的定量资料采用非参数检验。 $P < 0.05$  表示差异具有显著性, $P < 0.01$  表示差异极具显著性。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

正常对照组小鼠表现正常,毛发顺滑、比较活泼、呼吸均匀、反应灵敏;模型组小鼠精神状态差,反应迟钝,毛发杂乱,蜷缩扎堆,听诊发现肺部有啰音等。不同给药组较模型组比,整体情况较好,尤其黄芩-连翘配伍组(1:1,2:3,1:2)活动较频繁,反应较灵敏。

### 2.2 小鼠体重与采食量分析

如图 1 所示,各组小鼠的日均体重增长量及日均采食量差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.3 脏器指数变化

如表 1 所示,各组小鼠肾指数、肝指数、脾指数和胸腺指数差异均不显著( $P > 0.05$ );与正常对照组相比,模型组的心脏指数差异不显著( $P > 0.05$ );与模型组比,黄芩-连翘配伍组(3:2)小鼠心脏指数显著降低( $P < 0.05$ ),黄芩-连翘药对组(3:1,2:1,1:3,3:0,0:3)的心脏指数极显著降低( $P < 0.01$ );与正常对照组相比,模型组小鼠肺指数极显著升高( $P < 0.01$ ),表明急性肺炎造模成功,与模型组相比,黄芩-连翘配伍组(1:2)的肺指数显著降低( $P < 0.05$ ),说明黄芩-连翘配伍组(1:2)对 LPS 诱导小鼠急性肺炎保护作用较好。

### 2.4 小鼠血常规指标变化分析

如表 2 所示,造模 6 h 后,与正常对照组比较,模型组血液中白细胞总数和中性粒细胞总数显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,黄芩-连翘配伍组(3:2,1:1,2:3,1:2)能显著降低白细胞总数和中性粒细胞总数( $P < 0.01$ ),结果与地塞米松组一致;黄芩-连翘配伍组(2:1,1:3,3:0)也能显著

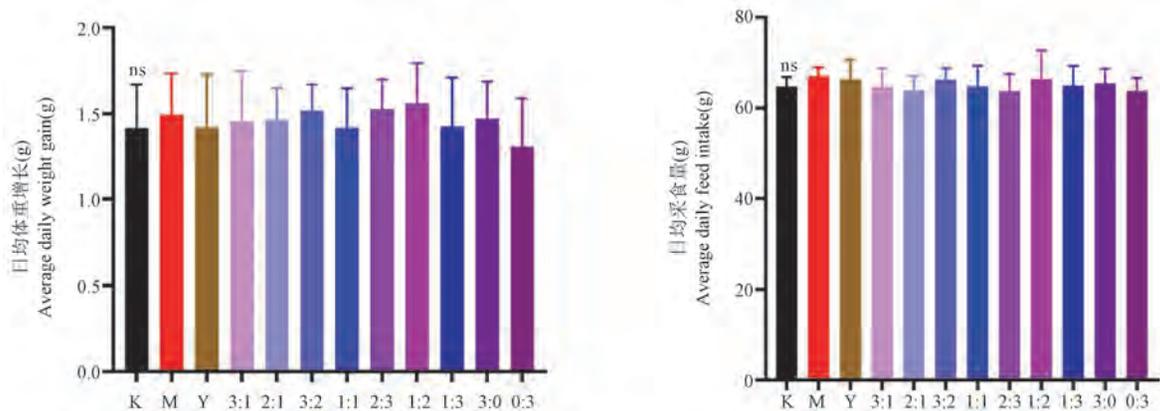


图 1 小鼠日均体重增长量及采食量变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

Figure 1 Changes in average daily weight gain and food intake of mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

降低白细胞总数( $P < 0.05$ ); 血液中血红蛋白总数无统计学意义( $P > 0.05$ ); 比较血液中平均红细胞血红蛋白浓度, 与正常对照组比较, 模型组血液中平均红细胞血红蛋白浓度显著升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 黄芩-连翘配伍组都能显著降低血液中平均红细胞血红蛋白浓度( $P < 0.01$ ); 比较血液中红细胞总数, 与正常对照组比较, 模型组血液中红细胞总数显著升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 黄

芩-连翘配伍组(2:3)能显著降低红细胞总数( $P < 0.01$ ), 结果与地塞米松组一致; 比较血液中血小板总数, 与对照组比较, 模型组血小板总数显著降低( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 黄芩-连翘配伍组(1:1, 2:3, 1:2)血液中血小板总数显著升高( $P < 0.05$ ), 结果与地塞米松组一致; 结果表明, 黄芩-连翘配伍组(3:2, 1:1, 2:3, 1:2)对 LPS 诱导的小鼠急性肺炎有明显减轻作用。

表 1 小鼠脏器指数的变化( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Changes of viscera index of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别 Groups	心脏指数(%) Cardiac index (%)	肝指数(%) Liver index (%)	脾指数(%) Spleen index (%)	肺指数(%) Lung index (%)	肾指数(%) Kidney index (%)	胸腺指数(%) Thymus index (%)
K	0.61 ± 0.02	4.55 ± 0.21 <sup>ns</sup>	0.37 ± 0.07 <sup>ns</sup>	0.67 ± 0.04	1.12 ± 0.09 <sup>ns</sup>	0.38 ± 0.04 <sup>ns</sup>
M	0.63 ± 0.02	4.71 ± 0.17	0.38 ± 0.06	0.71 ± 0.06 <sup>##</sup>	1.15 ± 0.09	0.38 ± 0.05
Y	0.64 ± 0.03	4.68 ± 0.21	0.35 ± 0.06	0.71 ± 0.05	1.15 ± 0.09	0.37 ± 0.05
3:1	0.60 ± 0.03 <sup>**</sup>	4.77 ± 0.18	0.37 ± 0.04	0.71 ± 0.04	1.12 ± 0.04	0.38 ± 0.05
2:1	0.60 ± 0.01 <sup>**</sup>	4.51 ± 0.18	0.36 ± 0.03	0.70 ± 0.05	1.12 ± 0.05	0.38 ± 0.03
3:2	0.61 ± 0.03 <sup>**</sup>	4.51 ± 0.21	0.38 ± 0.05	0.70 ± 0.05	1.12 ± 0.05	0.40 ± 0.03
1:1	0.62 ± 0.03	4.50 ± 0.24	0.37 ± 0.05	0.70 ± 0.04	1.09 ± 0.07	0.38 ± 0.06
2:3	0.63 ± 0.03	4.54 ± 0.19	0.39 ± 0.04	0.69 ± 0.04	1.13 ± 0.06	0.40 ± 0.05
1:2	0.63 ± 0.01	4.51 ± 0.20	0.39 ± 0.05	0.67 ± 0.02 <sup>**</sup>	1.12 ± 0.05	0.39 ± 0.04
1:3	0.60 ± 0.04 <sup>**</sup>	4.62 ± 0.23	0.35 ± 0.05	0.71 ± 0.02	1.09 ± 0.09	0.36 ± 0.06
3:0	0.59 ± 0.03 <sup>**</sup>	4.52 ± 0.18	0.38 ± 0.05	0.70 ± 0.04	1.14 ± 0.09	0.38 ± 0.05
0:3	0.59 ± 0.02 <sup>**</sup>	4.51 ± 0.20	0.39 ± 0.05	0.70 ± 0.04	1.12 ± 0.07	0.34 ± 0.04

注:与对照组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。(下图/表同)

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

表 2 黄芩-连翘配伍对小鼠血常规指标的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effect of compatibility of *Scutellariae Radix-Forsythiae fructus* on blood routine index of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别 Groups	白细胞总数 ( $\times 10^9/L$ ) WBC ( $\times 10^9/L$ )	中性粒细胞总数 ( $\times 10^9/L$ ) GRA ( $\times 10^9/L$ )	血红蛋白总数 (g/dL) HGB (g/dL)	平均红细胞血红蛋白浓度(g/dL) MCHC (g/dL)	红细胞总数 ( $\times 10^{12}/L$ ) RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	血小板总数 ( $\times 10^9/L$ ) PLT ( $\times 10^9/L$ )
K	2.98 ± 1.28	1.38 ± 0.80	14.65 ± 4.22 <sup>ns</sup>	35.30 ± 1.79	9.63 ± 0.41	1018.33 ± 402.56
M	6.02 ± 1.14 <sup>##</sup>	2.49 ± 0.51 <sup>##</sup>	14.54 ± 1.47	44.13 ± 2.37 <sup>##</sup>	8.34 ± 0.30 <sup>##</sup>	641.58 ± 300.91 <sup>##</sup>
Y	3.82 ± 0.84 <sup>**</sup>	1.88 ± 0.64 <sup>**</sup>	14.58 ± 1.96	36.55 ± 1.75 <sup>**</sup>	8.94 ± 0.56 <sup>**</sup>	946.75 ± 317.02 <sup>**</sup>
3:1	5.33 ± 1.74	2.32 ± 0.66	14.67 ± 2.12	41.68 ± 2.38 <sup>**</sup>	8.54 ± 0.54	748.92 ± 270.66
2:1	4.55 ± 1.57 <sup>**</sup>	2.23 ± 0.55	14.68 ± 0.77	41.83 ± 1.38 <sup>**</sup>	8.22 ± 0.50	804.83 ± 205.32
3:2	3.07 ± 2.15 <sup>**</sup>	1.55 ± 1.01 <sup>**</sup>	14.61 ± 0.93	36.49 ± 2.88 <sup>**</sup>	8.65 ± 0.52	735.92 ± 358.73
1:1	3.70 ± 1.81 <sup>**</sup>	1.65 ± 0.84 <sup>**</sup>	14.36 ± 2.87	36.09 ± 2.60 <sup>**</sup>	8.94 ± 0.61 <sup>**</sup>	952.83 ± 273.92 <sup>**</sup>
2:3	3.34 ± 1.78 <sup>**</sup>	1.53 ± 0.63 <sup>**</sup>	14.72 ± 1.03	35.48 ± 1.77 <sup>**</sup>	8.98 ± 0.49 <sup>**</sup>	959.67 ± 352.88 <sup>**</sup>
1:2	3.88 ± 1.68 <sup>**</sup>	1.52 ± 0.63 <sup>**</sup>	14.54 ± 2.00	35.80 ± 1.56 <sup>**</sup>	8.87 ± 1.00 <sup>**</sup>	940.75 ± 303.90 <sup>**</sup>
1:3	4.68 ± 1.41 <sup>**</sup>	2.13 ± 0.51	14.88 ± 1.11	35.88 ± 1.74 <sup>**</sup>	8.68 ± 0.53	736.75 ± 272.20
3:0	4.78 ± 1.02 <sup>**</sup>	2.12 ± 0.82	14.76 ± 0.47	36.55 ± 1.86 <sup>**</sup>	8.55 ± 0.69	748.25 ± 394.68
0:3	4.95 ± 1.21	2.23 ± 0.80	14.54 ± 1.39	36.68 ± 1.06 <sup>**</sup>	8.80 ± 0.69	795.17 ± 417.46

## 2.5 各组小鼠肺组织切片病理学观察

用同一显微镜观察并拍照,对切片的肺损伤程度进行评分。每个切片随机选择 6 个视野。将炎性细胞浸润、肺泡壁厚度变化、肺泡充血损伤程度作

为肺组织损伤评分依据<sup>[16]</sup>,具体见表 3。

如图 2,图 3 所示,通过 HE 染色后组织形态学观察结果显示黄芩-连翘药对 LPS 诱导的小鼠急性肺炎的保护作用。正常对照组小鼠肺部结构正常,

无渗出液,且没有炎性细胞浸润等病理现象;与正常对照组比较,模型组肺组织结构松散,有大量炎性细胞浸润,可观察到肺泡壁间质明显增厚及出血等病理现象,并且其肺组织损伤评分均升高;与模型组比较,黄芩-连翘配伍组(3:2,1:1,2:3,1:2)的肺组织有一定程度好转,肺组织充血减轻,出血减少、炎性细胞浸润减少、肺泡壁间质增厚减轻,黄芩-连翘配伍组(1:3)也有一定的好转,并且黄芩-连翘配伍组(3:2,1:1,2:3,1:2,1:3)与地塞米松组肺组织损伤评分均降低。

如图 4,图 5 所示,免疫组织化学实验研究发现,滴加过 Rabbit Anti-SFTPC Polyclonal Antibody (bs-10067R)工作液的小鼠肺组织切片均出现褐色区域,而阴性对照组未出现,认为褐色区域为阳性表达。表明 SFTPC 蛋白在肺组织中均有表达。与正常对照组比较,模型组 SFTPC 蛋白在肺组织肺泡与肺泡间隔区域表达量显著增加,大量阳性细胞表达 SFTPC 蛋白;与模型组比较,黄芩-连翘配伍组(3:2,1:1,2:3,1:2)SFTPC 蛋白在肺组织肺泡与肺泡间隔区域表达量显著减少,阳性细胞的表达量较少。结果表明,黄芩-连翘配伍组(3:2,1:1,2:3,1:2)对 LPS 诱导的小鼠急性肺炎有明显减轻作用。

表 3 小鼠肺病理组织学评分标准

**Table 3** Scoring standard of lung histopathology in mice

评分(分) Score(points)	肺组织受损伤情况 Lung tissue injury	程度 Degree
0	肺组织正常 Normal lung tissue	无损伤或轻微 No damage or minor
1	肺组织受损程度少于 25% Lung tissue injury less than 25%	病灶轻微 Focal mild
2	肺组织受损程度 25% ~ 50% Lung tissue injury of 25% ~ 50%	中度损伤 Moderate damage
3	肺组织受损程度 50% ~ 75% Lung tissue injury of 50% ~ 75%	严重损伤 Serious injury
4	肺组织受损程度大于 75% Lung tissue injury greater than 75%	极严重病变 Very severe disease

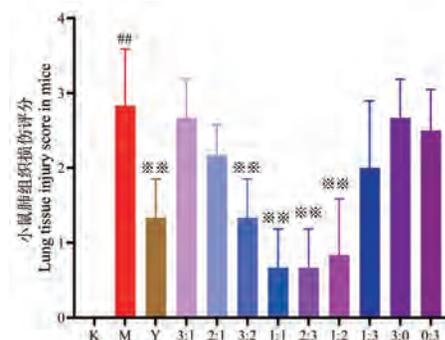


图 2 小鼠肺组织损伤评分(  $\bar{x} \pm s, n = 6$  )

Figure 2 Lung tissue injury score of mice(  $\bar{x} \pm s, n = 6$  )

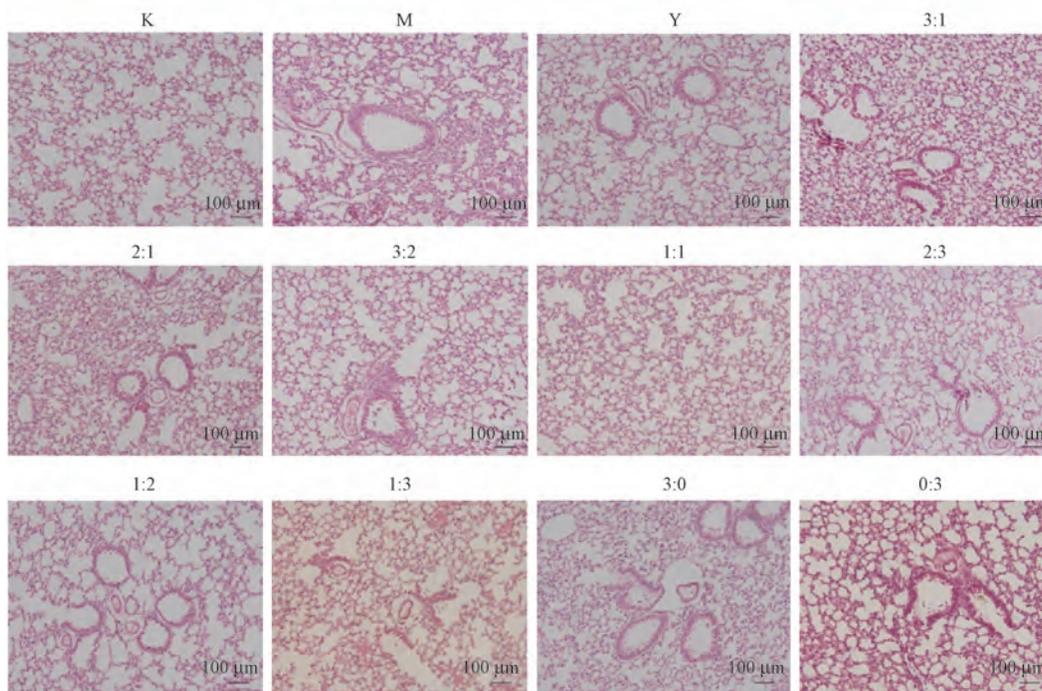


图 3 各组小鼠肺组织病理形态变化

Figure 3 Pathological changes of lung tissues in mice of each group

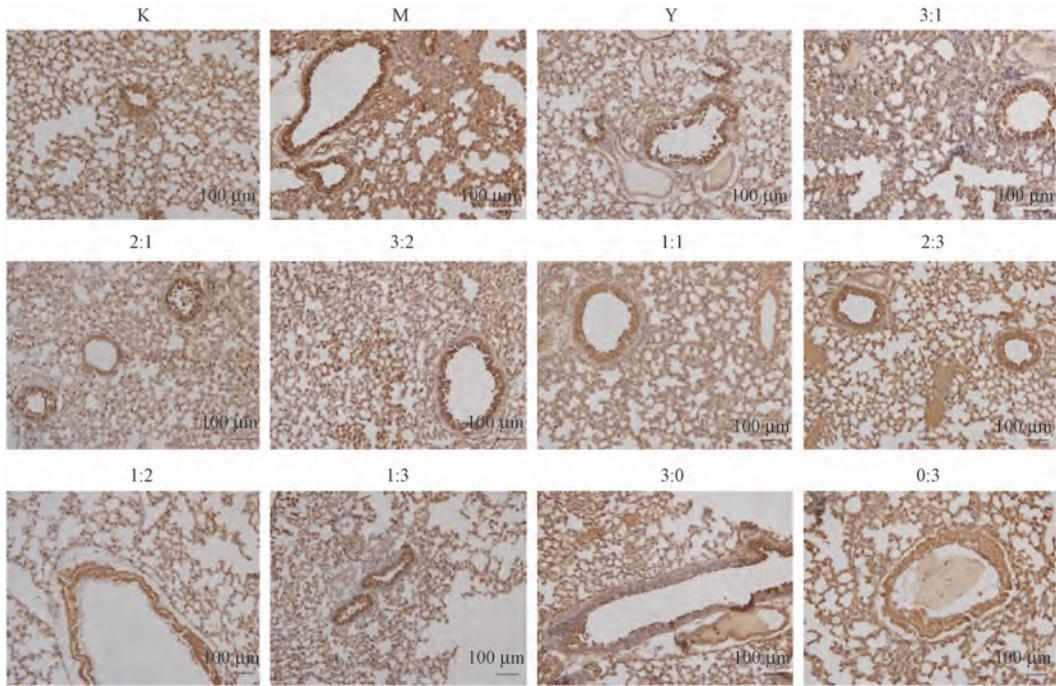


图 4 SFTPC 蛋白在小鼠肺组织中的分布 (IHC)

Figure 4 Distribution of SFTPC protein in lung tissue of mice (IHC)

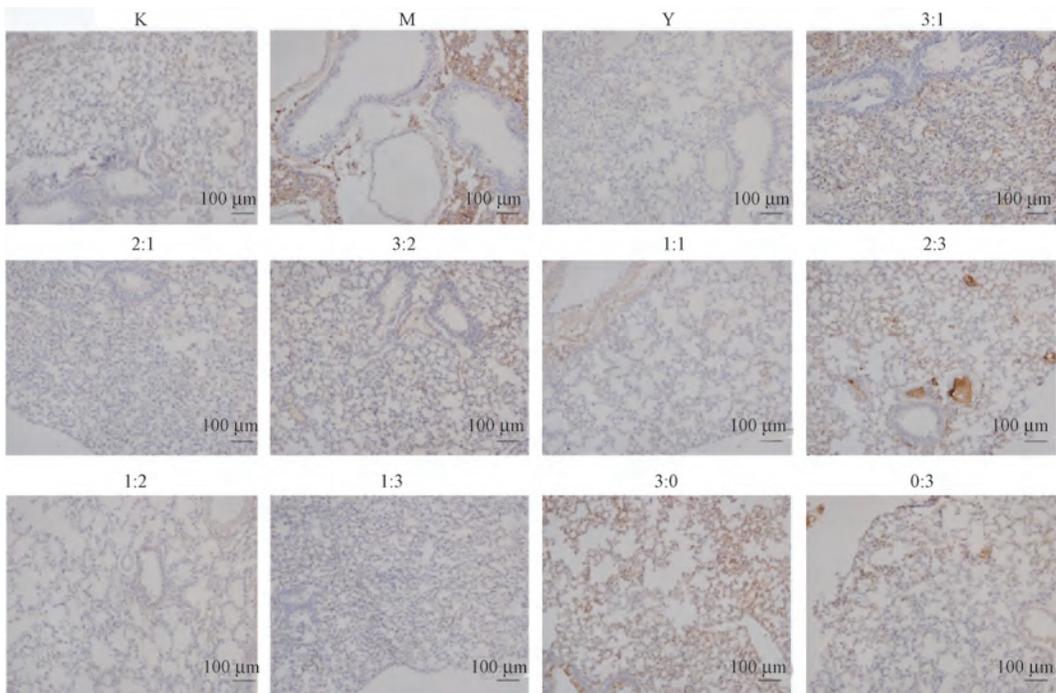


图 5 SFTPC 蛋白在小鼠肺组织中的分布 (阴性对照, IHC)

Figure 5 Distribution of SFTPC protein in lung tissue of mice (Negative control, IHC)

2.6 小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的含量测定的结果分析

如表 4 所示,与对照组比,模型组小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的含量显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,黄芩-连翘配伍组 (1:1, 2:3, 1:2) 小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的含量显著降低 ( $P < 0.01$ ),黄芩-连翘配伍组 (3:2) 小鼠血清

中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的含量显著降低 ( $P < 0.05$ );与模型组相比,黄芩-连翘配伍组 (3:2, 1:1, 2:3, 1:2) 小鼠血清中 IL-6 的含量显著降低 ( $P < 0.01$ ),黄芩-连翘配伍组 (2:1) 小鼠血清中 IL-6 的含量显著降低 ( $P < 0.05$ ),说明黄芩-连翘配伍组 (1:1, 2:3, 1:2) 在一定程度上抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的分泌。

表 4 小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的含量 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )  
 Table 4 The contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in serum of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别 Groups	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
K	395.70 $\pm$ 12.77	80.85 $\pm$ 3.25	92.06 $\pm$ 2.78
M	556.87 $\pm$ 75.15 <sup>##</sup>	92.66 $\pm$ 4.47 <sup>##</sup>	123.20 $\pm$ 17.51 <sup>##</sup>
Y	452.84 $\pm$ 14.81 <sup>**</sup>	87.40 $\pm$ 4.02 <sup>**</sup>	95.85 $\pm$ 2.75 <sup>**</sup>
3:1	554.44 $\pm$ 82.40	89.04 $\pm$ 2.49	107.16 $\pm$ 18.13
2:1	544.74 $\pm$ 95.03	89.75 $\pm$ 3.59	102.69 $\pm$ 8.75 <sup>**</sup>
3:2	469.55 $\pm$ 42.42 <sup>**</sup>	87.64 $\pm$ 2.87 <sup>**</sup>	100.19 $\pm$ 8.06 <sup>**</sup>
1:1	424.54 $\pm$ 20.80 <sup>**</sup>	84.61 $\pm$ 3.68 <sup>**</sup>	97.41 $\pm$ 3.88 <sup>**</sup>
2:3	436.67 $\pm$ 12.30 <sup>**</sup>	83.17 $\pm$ 2.77 <sup>**</sup>	92.53 $\pm$ 5.91 <sup>**</sup>
1:2	426.15 $\pm$ 22.70 <sup>**</sup>	83.19 $\pm$ 2.01 <sup>**</sup>	94.09 $\pm$ 11.59 <sup>**</sup>
1:3	516.71 $\pm$ 92.86	89.19 $\pm$ 3.25	117.52 $\pm$ 22.11
3:0	535.58 $\pm$ 104.72	89.94 $\pm$ 4.95	107.09 $\pm$ 13.08
0:3	544.20 $\pm$ 22.06	90.96 $\pm$ 3.26	112.71 $\pm$ 26.74

### 3 讨论

近年来,国内外的肺炎动物模型建立方法很多,根据肺炎病原学可分为细菌性、真菌性、病毒性、支原体、脂多糖(LPS)诱导性、化学诱导性等多种类型<sup>[17]</sup>。其中脂多糖诱导的肺炎动物模型较为常用,此模型常用的建立方法包括全身给药法、气管内给药法、吸入法以及雾化法等。全身给药法由于诱发全身免疫反应较重,故用于建立急性呼吸窘迫呼吸综合征模型;气管内给药法由于小鼠操作较难及操作不当会导致实验失败;雾化法由于需要专用的暴露塔,使用该方法的研究较少;本研究根据各种给药方法优缺点及实验室的条件综合考虑选择吸入法中的滴鼻法,此方法操作简单,能很好反映出小鼠肺部的炎症状况,具体操作步骤是将小鼠麻醉后,将配置好的一定浓度的 LPS 溶液滴入小鼠鼻孔中使其全部吸入即可。

脂多糖诱导的小鼠急性肺炎模型,影响小鼠心、肺组织,血液中的炎性细胞以及血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的水平,提前摄入一定剂量的黄芩-连翘配伍组合物对脂多糖诱导的小鼠急性肺炎有较好的保护作用,主要从改善心脏功能、肺部炎症反应等方面促进炎症恢复。

急性肺炎所致急性肺损伤是由一些不可控制的炎症反应引起的肺部功能障碍综合征,导致大量炎症因子和效应细胞相互激活和相互作用<sup>[18]</sup>。脂多糖称为内毒素(LPS),是比较常见的炎症激发因素<sup>[19]</sup>,可使小鼠肺出现炎性细胞浸润,产生大量炎症因子,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等<sup>[3]</sup>,继而从外周血中招募大量中性粒细胞等炎性细胞进入肺中,诱导炎性细胞在肺泡和肺间质内聚集,进一步释放炎症

因子,造成炎症级联式反应,引起细胞因子风暴产生<sup>[20]</sup>。全血中的白细胞(中性粒细胞为主)是诱导小鼠急性肺炎的重要细胞,在炎症反应早期可发现其显著性升高。LPS 进入小鼠肺部,诱发肺间质发生水肿进而导致急性肺损伤,出现低氧血症、呼吸困难等症状。本研究利用 LPS 诱导小鼠急性肺炎模型,分析黄芩-连翘不同配伍的抗炎作用差异。通过给小鼠鼻腔滴入 LPS 建立急性肺炎模型,同时使用生理盐水作为对照,不同比例黄芩-连翘配伍作为给药组,地塞米松作为阳性对照组,以模拟治疗急性肺炎的过程。模型组小鼠精神状态差、反应迟钝、活动减少、呼吸急促、听诊肺部有湿罗音等,正常对照组小鼠表现正常、活泼、呼吸均匀、反应灵敏,初步判断 LPS 诱导的小鼠急性肺炎模型复制成功;与模型组相比,各给药组小鼠活动基本正常,整体情况较好。与正常对照组相比,模型组小鼠肺指数极显著升高( $P < 0.01$ ),与模型组相比,黄芩-连翘配伍组(1:2)的肺指数显著降低( $P < 0.05$ ),说明黄芩-连翘配伍能预防小鼠急性肺炎的发生。与正常对照组比较,模型组血液中白细胞总数和中性粒细胞总数明显升高( $P < 0.01$ ),说明急性肺炎造模成功;与模型组比较,黄芩-连翘不同配伍组(3:2,1:1,2:3,1:2)能明显降低白细胞总数和中性粒细胞总数( $P < 0.01$ ),说明黄芩-连翘不同配伍组(3:2,1:1,2:3,1:2)能降低炎性细胞浸润。小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 是常见炎症因子,通过不同炎症通路诱导产生,进而介导急性肺炎的发生。研究结果显示,模型组小鼠血清中的炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的含量明显高于正常对照组,说明急性肺炎造模成功,LPS 引起了小鼠肺部的炎症;黄芩-连翘不同配伍组(1:1,2:3,1:2)可

明显降低小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的含量 ( $P < 0.01$ ), 说明黄芩-连翘配伍组 (1 : 1, 2 : 3, 1 : 2) 具有很好的抗炎作用。

在组织学方面, 肺是动物体非常重要的器官之一。为研究肺组织的病理变化, 本研究使用组织学染色与肺组织病理评分方法。肺上皮细胞包括肺泡 I 型和肺泡 II 型细胞。发生急性肺炎后, 肺泡 I 型细胞可转为肺泡 II 型细胞, 促进肺泡的再生, 并协调肺的稳态<sup>[21]</sup>; 肺泡上皮完整性恢复对肺内环境的恢复至关重要<sup>[22]</sup>。为研究肺泡上皮细胞的恢复情况, 可以用典型标志物 SFTPC 来识别肺泡 II 型细胞, 通过免疫组织化学判断肺泡 II 型细胞在 SFTPC 蛋白上的表达量<sup>[23]</sup>。病理组织学结果显示, LPS 诱导的小鼠急性肺炎模型肺组织的病理表现为肺泡充血、炎性细胞浸润、肺泡壁增厚等急性肺炎特征, 说明通过鼻腔滴入 LPS 成功建立了急性肺炎模型。而黄芩-连翘配伍组 (3 : 2, 1 : 1, 2 : 3, 1 : 2) 小鼠肺组织肺泡充血、炎性细胞浸润、肺泡壁增厚症状均较模型组减轻。与正常对照组相比较, 模型组病理组织学评分均升高; 与模型组相比, 黄芩-连翘配伍组 (1 : 1, 2 : 3, 1 : 2) 和阳性给药组评分均降低。免疫组化结果显示, 与正常对照组相比较, 模型组 SFTPC 蛋白在肺组织肺泡与肺泡间隔区域表达量明显增加, 有大量肺泡 II 型细胞表达 SFTPC 蛋白, 而阴性对照组未加 SFTPC 抗体, 根据阴性对照组的的结果来看其未出现 SFTPC 蛋白阳性表达, 进一步说明了结果的可靠性; 与模型组相比较, 黄芩-连翘配伍组 (3 : 2, 1 : 1, 2 : 3, 1 : 2), SFTPC 蛋白在肺组织肺泡与肺泡间隔区域表达量明显减少, 推测肺泡 II 型细胞数量下降, 说明黄芩-连翘不同配伍组 (3 : 2, 1 : 1, 2 : 3, 1 : 2) 可改善 LPS 诱导的急性肺炎的发生, 为初步阐明黄芩-连翘配伍干预急性肺炎模型机制的研究奠定基础, 后续将围绕 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  与 IL-6 相关的上下游关键信号通路做进一步的实验验证。

综上所述, 通过分析小鼠急性肺炎模型临床症状、脏器指数、血清炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量、血常规、HE 及 IHC 染色肺组织形态学观察及肺组织损伤病理组织学评分等指标变化的结果, 将 LPS 经过鼻腔进入小鼠肺部能成功建立小鼠急性肺炎模型。且综合研究发现黄芩-连翘不同配伍组 (1 : 1, 2 : 3, 1 : 2) 可显著预防 LPS 诱导的急性肺炎, 为临床畜禽急性肺炎的防治提供依据。

## 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] 刘针伶. 肉犊牛肺炎致病原因及防治措施分析 [J]. 畜牧业, 2021, 32(5): 117, 119.  
Liu ZL. Analysis of pathogenic causes and prevention measures of pneumonia of meat calf [J]. Livest Poul Ind, 2021, 32(5): 117, 119.
- [ 2 ] 庞军. 中西医结合治疗羊肺炎 [J]. 中兽医学杂志, 2019, 214(6): 69.  
Pang J. Combination of Chinese and Western medicine to treat sheep pneumonia [J]. Chin J Tradit Vet Sci, 2019, 214(6): 69.
- [ 3 ] Meng L, Li LY, Lu S, et al. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF- $\kappa$ B and PI3K/Akt/mTOR pathways [J]. Mol Immunol, 2018, 94: 7-17.
- [ 4 ] 张亚平, 张广平, 苏萍, 等. 不同途径吸入脂多糖致大鼠急性肺炎模型的优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7): 82-88.  
Zhang YP, Zhang GP, Su P, et al. Optimization of rat model of acute pneumonia induced by inhalation of lipopolysaccharide in different ways [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(7): 82-88.
- [ 5 ] Meng XL, Hu L, Li WQ. Baicalin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by suppressing oxidative stress and inflammation via the activation of the Nrf2-mediated HO-1 signaling pathway [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2019, 392(11): 1421-1433.
- [ 6 ] Zhang LM, Zhang J, Zhang Y, et al. Interleukin-18 binding protein attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via suppression NF- $\kappa$ B and activation Nrf2 pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 505(3): 837-842.
- [ 7 ] Abedi F, Hayes AW, Reiter R, et al. Acute lung injury: The therapeutic role of Rho kinase inhibitors [J]. Pharm Res, 2020, 155: 104736.
- [ 8 ] Xia Y, Feng S, Liu Z, et al. Rhodium(I)-catalyzed sequential C(sp)-C(sp<sup>3</sup>) and C(sp<sup>3</sup>)-C(sp<sup>3</sup>) bond formation through migratory carbene insertion [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2015, 54(27): 7891-7894.
- [ 9 ] 阮玲瑛, 薛坤娇, 应林燕, 等. 敲除 Brg1 基因对小鼠肺泡 II 型上皮细胞数量和功能的影响及其机制研究 [J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(7): 656-663.  
Ruan LY, Xue KJ, Ying LY, et al. Effect of Brahma-related gene1 knockout on the number and function of type II alveolar epithelial cells in mice [J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(7): 656-663.
- [ 10 ] 房城, 于兴博, 郑秀茜, 等. 黄芩的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 化学工程师, 2021, 35(3): 52-54.  
Fang C, Yu XB, Zheng XQ, et al. Research progress in the chemical constituents and pharmacological mechanism of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Chem Eng, 2021, 35(3): 52-54.

- [11] 姜希红, 刘树民. 黄芩药理作用及其化学物质基础研究 [J]. 中国药师, 2020, 23(10): 2004-2012.  
Jiang XH, Liu SM. Research on Pharmacological Effects and Substance Basis of *Scutellaria Baicalensis* [J]. Chin Pharm, 2020, 23(10): 2004-2012.
- [12] 郭婷, 黄家宇, 董莉. 连翘的化学成分研究 [J]. 西北药学杂志, 2020, 35(5): 648-652.  
Guo T, Huang JY, Dong L. Study on chemical constituents of *Forsythia suspensa* [J]. Northwest Pharm J, 2020, 35(5): 648-652.
- [13] 孙晨智, 马楠, 王亚静, 等. 连翘化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 2021, 31(4): 286-291.  
Sun CZ, Ma N, Wang YJ, et al. Isolation and identification of chemical constituents of *Forsythia suspensa* [J]. Chin J Med Chem, 2021, 31(4): 286-291.
- [14] 王泽凤. 温病学古方中以连翘为核心的药对及其配伍规律探讨 [J]. 山西中医, 2020, 36(1): 45-46.  
Wang ZF. Study on the drug pairs and compatibility rule of *forsythia* in ancient formulae of febrile diseases [J]. Shanxi J Tradit Chin Med, 2020, 36(1): 45-46.
- [15] Ye J, Guan M, Lu Y, et al. Protective effects of Hesperetin on Lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting MD2 [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 852: 151-158.
- [16] Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, et al. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice [J]. Crit Care, 2009, 13(1): R1.
- [17] 唐思璇, 肖芳. 脂多糖诱导肺炎动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 864-869.  
Tang SX, Xiao F. Research progress on lipopolysaccharide-induced pneumonia animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 864-869.
- [18] Ionescu L, Byrne RN, van Haaften T, et al. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: *in vivo* evidence for stem cell paracrine action [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 303(11): 967-977.
- [19] 张晓音, 吴旻, 李雨萌, 等. 脂多糖的效应及其机理研究进展 [J]. 动物医学进展, 2015, 36(12): 133-136.  
Zhang XY, Wu J, Li YM, et al. Research progress on effect and mechanism of lipopolysaccharide [J]. Progress Vet Med, 2015, 36(12): 133-136.
- [20] Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(3): 557-581.
- [21] Penkala IJ, Liberti DC, Pankin J, et al. Age-dependent alveolar epithelial plasticity orchestrates lung homeostasis and regeneration [J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(10): 1775-1789.
- [22] Losa D, Chanson M. The lung communication network [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(15): 2793-2808.
- [23] Sun YL, Hurley K, Villacorta-Martin C, et al. Heterogeneity in human iPSC-derived alveolar epithelial type II cells revealed with ABCA3/SFTPC reporters [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2021, 65(4): 442-460.

[收稿日期] 2022-01-11

## 勘误声明

本刊对下述论文进行勘误:

出版信息	2022 年 30 卷 2 期, 页码为: 中文目录页、英文目录页及 283 页
论文标题	功能性消化不良动物模型的研究进展
稿次	<input type="checkbox"/> 录用定稿 <input type="checkbox"/> 排版定稿 <input type="checkbox"/> 整期定稿 <input checked="" type="checkbox"/> 印刷版 <input type="checkbox"/> 其它
作者	陶睿智, 顾任钧, 夏雅雯, 韩鸿宽, 陆可沁, 陆茵, 孙广志
DOI	10. 3969/J. ISSN. 1005-4847. 2022. 02. 018
勘误内容	中文目录页: 将“孙广志”修改为“孙志广” 英文目录页: 将“SUN guangzhi”修改为“SUN zhiguang” 283 页: 将两处“孙广志”修改为“孙志广”; 将两处“SUN guangzhi”修改为“SUN zhiguang”
其他说明	无

特此告知并诚挚地向读者致歉。

《中国实验动物学报》编辑部

日期: 2022 年 5 月 31 日

韩雨,陈晨,王鑫峰,等. 雌性大鼠吸烟对仔鼠行为学影响的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 810-818.  
Han Y, Chen C, Wang XF, et al. Effect of smoking on behavior of female rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 810-818.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.010

## 雌性大鼠吸烟对仔鼠行为学影响的研究

韩雨<sup>1</sup>, 陈晨<sup>1</sup>, 王鑫峰<sup>1</sup>, 张海阳<sup>4</sup>, 陈俞<sup>4</sup>, 许德玮<sup>4</sup>, 姚铁翼<sup>4</sup>, 邵晓云<sup>1,3\*</sup>, 徐绍业<sup>2\*</sup>

(1. 桂林医学院基础医学院, 广西 桂林 541004; 2. 桂林医学院科学实验中心, 广西 桂林 541004; 3. 桂林医学院脑与认知神经重点实验室, 广西 桂林 541004; 4. 桂林医学院临床医学院, 广西 桂林 541004)

**【摘要】** 目的 探讨亲代成年雌鼠香烟烟雾暴露对子代大鼠行为学及大脑皮层坍塌反应调节蛋白1 (CRMP1)、死亡相关蛋白激酶1 (DAPK1) 蛋白表达的影响。方法 将18只8周龄健康SD雌性大鼠随机分为烟熏组(9只)和对照组(9只), 烟熏组行香烟烟雾暴露构建烟熏模型, 对照组正常饲养, 烟熏1个月后将其与正常雄鼠合笼并继续烟熏直至分娩。将烟熏组和对照组分娩后的子代大鼠(F1代)分别进行旷场实验、转棒疲劳实验、Morris水迷宫实验等动物行为学检测, 分析亲代雌鼠香烟烟雾暴露后对其子代的焦虑情况、运动耐受能力、以及空间学习记忆能力的影响。Western Blot检测不同发育阶段(0、7、21 d和4周)各组子代大鼠的大脑皮层组织中DAPK1和CRMP1蛋白表达情况。结果 在旷场实验结果显示, 烟熏组F1代子代大鼠在总区域中的运动总距离和平均运动速度明显增加( $P < 0.05$ ), 其中进入中央区的次数、在中央区的运动距离和停留时间均较对照组F1代明显增加( $P < 0.05$ ); 转棒疲劳实验结果发现, 烟熏组F1代持续运动时间以及运动距离较对照组均显著减少( $P < 0.05$ ); Morris水迷宫结果显示, 烟熏组和对照组F1代的逃避潜伏期和到达平台的游泳路程无明显差异, 但游泳速度较对照组明显下降( $P < 0.05$ ); 烟熏组F1代在目标象限停留时间占比和进入目标象限次数均较对照组明显减少( $P < 0.05$ ), 且平均游泳速度和总游泳路程也明显下降( $P < 0.01$ ); 此外, Western Blot结果表明, 烟熏组F1代大鼠脑组织中DAPK1和CRMP1在发育早期(0、7、21 d)的蛋白表达均较对照组下降。结论 亲代雌鼠香烟烟雾暴露可能会增加其子代大鼠的焦虑情绪, 降低运动耐受能力, 并使其空间记忆能力减退, 这可能与子代大鼠脑组织中CRMP1和DAPK1分子的调控有关。

**【关键词】** 香烟烟雾暴露; 子代大鼠; 神经系统; 行为学; CRMP1; DAPK1

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0810-09

### Effect of smoking on behavior of female rats

HAN Yu<sup>1</sup>, CHEN Chen<sup>1</sup>, WANG Xinfeng<sup>1</sup>, ZHANG Haiyang<sup>4</sup>, CHEN Yu<sup>4</sup>, XU Dewei<sup>4</sup>, YAO Tiewei<sup>4</sup>,  
SHAO Xiaoyun<sup>1,3\*</sup>, XU Shaoye<sup>2\*</sup>

(1. Basic Medicine College, Guilin Medical University, Guilin 541004, China. 2. Science Experiment Center, Guilin Medical College, Guilin 541004. 3. Key Laboratory of Brain and Cognitive Neuroscience, Guilin Medical College, Guilin 541004. 4. Department of Clinical Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541004)

Corresponding author: SHAO Xiaoyun. E-mail: sxy2155@163.com; XU Shaoye. E-mail: shaoyexu@glmc.edu.cn

**【基金项目】** 国家自然科学基金(31660269), 广西自然科学基金(2021GXNSFAA075004, 2017GXNSFAA198003, 2016GXNSFBA380098), 广西硕士研究生创新项目(YCSW2022371), 国家级大学生创新创业训练计划项目(201810601011), 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划资助项目。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(31660269), Guangxi Natural Science Foundation of China(2021GXNSFAA075004, 2017GXNSFAA198003, 2016GXNSFBA380098), Guangxi Postgraduate Innovation Project (YCSW2022371), National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (201810601011), the Project Supported by the Training Program of 1000 Young and Middle-Aged Backbone Teachers in Guangxi Colleges and Universities.

**【作者简介】** 韩雨(1996—), 男, 硕士, 研究方向: 神经退行性疾病。Email: hayy7@163.com

**【通信作者】** 徐绍业(1979—), 男, 高级实验师, 硕士, 研究方向: 实验动物学。Email: shaoyexu@glmc.edu.cn;

邵晓云(1978—), 女, 教授, 博士, 研究方向: 神经退行性疾病。Email: sxy2155@163.com。

\* 共同通信作者

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of passive smoking in adult female rats on behavior and expression of collapsin response regulatory protein 1 (CRMP1) and death-related protein kinase 1 (DAPK1) in the cerebral cortex of offspring. **Methods** Eighteen 8-week-old healthy female SD rats were randomly divided into the passive smoking group ( $n = 9$ ) and control group ( $n = 9$ ). The passive smoking group was treated with smoke to establish the passive smoking model, whereas the control group was treated normally. After 1 month of smoking, female rats were mated with males and continued smoking until delivery. Offspring (F1 generation) of passive smoking and control groups were evaluated by an open field test, rotary rod fatigue test, and Morris water maze test. These animal behavior tests were conducted to analyze the effects of passive smoking on anxiety, exercise tolerance, and spatial learning and memory abilities of the offspring. Moreover, CRMP1 and DAPK1 protein expression in cerebral cortex tissues of offspring was detected by Western Blot at various developmental stages (0, 7, and 21 days and 4 weeks (adult)) after birth. **Results** The open field test showed that the total movement distance and average movement speed of the F1 generation in the passive smoking group were significantly increased in the total area ( $P < 0.05$ ), and the number of entering the central area, and the movement distance and residence time in the central area were significantly increased compared with those of the control ( $P < 0.05$ ). The rotary rod fatigue test showed that the sustained movement time and movement distance of the F1 generation in the passive smoking group were significantly reduced compared with those in the control group ( $P < 0.001$ ). The Morris water maze showed that escape latency of the F1 generation had no significant difference between passive smoking group and control groups, but swimming speed was significantly decreased in the passive smoking group ( $P < 0.001$ ). Compared with the control group, the proportion of time and time of the F1 generation entering the target quadrant in the passive smoking group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the swimming speed and total swimming distance were also decreased significantly ( $P < 0.01$ ). Additionally, Western Blot showed that CRMP1 and DAPK1 protein expression in offspring of the passive smoking group was significantly lower than that of the control group at 0, 7, and 21 days. **Conclusions** Passive smoking in parental female rats promoted anxiety, reduced exercise tolerance, and impaired spatial memory of offspring, which may be related to regulation of CRMP1 and DAPK1 expression in the brain tissue of offspring.

**【Keywords】** cigarette smoke exposure; offspring rats; nervous system; animal behavior; CRMP1; DAPK1

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

香烟烟雾中含有大量尼古丁等有害化合物,长期处于此环境中的孕期哺乳类动物可导致胎儿流产、死胎、畸形等现象,同时吸烟对神经系统的发育和功能的影响也是其众多影响之一,其中烟草对神经传递和认知功能的发育有显著的负面影响<sup>[1]</sup>。但香烟烟雾暴露对子代神经系统的影响及相关分子机理尚不清楚。坍塌反应调节蛋白(Collapsing response mediator proteins, CRMPs)家族包含 CRMP1、2、3、4、5 共 5 个成员,在神经系统发育过程中高度表达,是神经系统发育中的主要磷酸化蛋白之一<sup>[2]</sup>。研究显示 CRMP1 能够调节微管的组装和微丝肌动蛋白的重组,介导神经营养因子诱导神经元突起的延伸,而 CRMP1 表达的减少同时影响微管的装配导致神经元轴突的稳定性下降和胞浆的运输障碍,直接导致神经元功能异常和退化,并促进神经元死亡。另外 CRMP1 和 CRMP2 能通过不同的信号通路调节树突棘成熟,促进/增加海马神经元突起的生长、脊柱的形成和树突棘的密度<sup>[3]</sup>。CRMP1 和 CRMP4 是发育中的小鼠大脑锥体神经元树突正确定向所必需的<sup>[4]</sup>。CRMP5 对视网膜神经

节细胞有着神经保护和神经再生作用<sup>[5]</sup>。死亡相关蛋白激酶 1 (Death-associated protein kinase 1, DAPK1) 是一种钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶<sup>[6]</sup>,在机体中广泛参与由多种信号介导的细胞死亡过程<sup>[7]</sup>,同时在大脑中高度表达<sup>[8]</sup>。研究表明,它与神经系统疾病相关的多种神经元损伤有关<sup>[9]</sup>。DAPK1 作为细胞凋亡正调控因子,可通过上调 p53 基因的表达而促使细胞进入 I 型细胞凋亡程序,也可与非 p53 依赖的经典凋亡途径发生关联<sup>[10]</sup>。另有研究发现,DAPK1 亦可诱导一种不需要半胱天冬酶参与的 II 型细胞死亡或称自体吞噬性细胞死亡<sup>[9]</sup>。

实验前期研究初步证明了香烟烟雾暴露对胎儿多器官发育均有一定影响<sup>[11]</sup>。本实验进一步研究亲代雌鼠香烟烟雾暴露对子代大鼠行为学的影响,通过旷场实验、转棒疲劳实验和 Morris 水迷宫实验从整体水平检测大鼠的焦虑、运动耐受能力、以及对空间位置和方向的学习记忆能力的影响。同时,在分子水平通过 Western Blot 检测亲代雌鼠香烟烟雾暴露对子代大鼠大脑皮层组织中 DAPK1 和

CRMP1 蛋白表达的影响。旨在阐明亲代雌鼠香烟烟雾暴露对子代神经系统行为学的影响及其机制,为预防和治疗香烟烟雾暴露引起的神经系统损伤提供分子靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

选用 18 只 7 ~ 8 周龄 SPF 级 SD 雌性大鼠,体重 200 ~ 220 g,雄性 9 只,体重 220 ~ 240 g,均购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。大鼠饲养提供标准饲料,饮用高压灭菌水,光照和黑暗各 12 h 轮流交替,湿度保持在 60%左右,温度控制在 22℃左右,饲养于桂林医学院实验动物中心【SYXK(桂)2020-0005】。动物实验经桂林医学院实验动物伦理委员会审查,符合动物福利伦理相关要求(GLMC-IACUC-2021006)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

广西某品牌香烟(20支/包);RIPA裂解液(Beyotime Biotechnology,上海,中国);PMSF苯甲基磺酰氟(Solarbio Life Sciences,北京,中国);磷酸酶抑制剂(MCE, Monmouth Junction, NJ, 美国);兔源 CRMP1 多克隆抗体(Proteintech Rosemont, IL, 美国);兔源 DAPK1 多克隆抗体(Proteintech Rosemont, IL, 美国);鼠源 GAPDH 单克隆抗体(Proteintech Rosemont, IL, 美国);Protein marker(Thermo Waltham, MA, 美国);BCA试剂盒(Beyotime Biotechnology,上海,中国);ECL发光试剂盒(Thermo Waltham, MA, 美国)。

自制半封闭式烟熏染毒箱(150 cm × 60 cm × 60 cm);旷场装置(型号 XR-XZ301)、转棒疲劳仪(型号 XR1514-RZPM)、Morris 水迷宫(型号 XR-XM101),均由上海欣软信息科技有限公司生产。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 烟熏大鼠模型的建立及分组

参照徐绍业等<sup>[12]</sup>使用的自制半封闭式烟熏染毒箱(150 cm × 60 cm × 60 cm),以饲养箱为骨架,分为上下两层,箱两边预留 1 cm × 1 cm 通气孔各 3 个。参照陈茜等<sup>[13]</sup>烟熏模型方法并改进,在箱内上下层各设置一个燃烟点,每个燃烟点每次连续自燃香烟 10 支,烟熏维持约 60 min,每天 2 次(9:00, 15:00)。将亲代雌鼠随机分为烟熏组和对照组各 9 只,烟熏组雌鼠置于半封闭式烟熏染毒箱,对照组

雌鼠于同环境、同饲料喂养,但不给予烟雾吸入;用于合笼交配的雄鼠 9 只不作处理,正常饲养。烟熏 1 个月,将烟熏组和对照组雌鼠分别以 2 : 1 比例与雄鼠合笼(每晚 19:00),次日晨分笼,反复数日,直至确定雌鼠怀孕则停止合笼。待孕鼠分娩出子代大鼠后则停止烟熏处理,烟熏持续两个月左右。随后在烟熏组和对照组中不同亲代大鼠繁育的后代中筛选出体重相当的 3 窝仔鼠(每窝分别为 11 只、12 只、13 只),待成年(约 4 周龄)进行旷场实验、转棒疲劳实验、Morris 水迷宫实验。同时,收集不同发育阶段(0、7、21 d 和 4 周)烟熏组和对照组子代大鼠的大脑皮层脑组织,Western Blot 检测 CRMP1 和 DAPK1 蛋白的表达情况。实验使用戊巴比妥钠过量麻醉对大鼠进行安乐死处理。

#### 1.2.2 旷场实验

旷场实验检测大鼠自发探索能力、活动能力和焦虑情绪。SD 大鼠选用旷场装置(50 cm × 50 cm × 50 cm)为底部和侧壁均为黑色有机板的自发活动箱,应用自发活动视频分析系统将自发活动箱平均分为 25 格,设定周边 16 格为外周区,中间 9 格为中央区。实验前将待测大鼠置于旷场装置自由停留 5 min 进行环境适应,每天 1 次,连续 2 d。正式实验时间尽量与环境适应时间一致。正式实验即将待测大鼠放入旷场装置底板中心,随后使其自由活动 300 s,记录子代大鼠全程运动总距离、平均运动速度,以及进入中央区和外周区的次数、在中央区和外周区的运动距离和停留时间,子代大鼠运动路径图见图 1A。

#### 1.2.3 转棒疲劳实验

转棒疲劳实验检测大鼠的运动耐受能力。预先将待测大鼠置于转棒疲劳仪(转棒直径 60 mm,跑道宽度 80 mm)进行训练,每次以 40 r/min 转速持续 5 min,每只大鼠每天训练 3 次,期间间隔 15 min,共训练 2 d。2 d 后进行正式测试,每只鼠测试 3 次,方法与训练期相同,记录大鼠在转棒疲劳仪上的持续运动时间及运动距离,取平均值。

#### 1.2.4 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫实验检测大鼠对位置和方向的空间学习记忆能力。水迷宫水池直 160 cm,将水池均分为 4 个象限,设置隐匿逃生平台(直径 8 cm)于其中 1 个象限的中央,根据 4 个象限分别以 A、B、C、D 标记为大鼠 4 个人水点。注水深度 50 cm,注水后使平台没入水面以下 1 cm,实验时向水池内注入黑

色墨水使之与池水混匀。测试期间迷宫外部各参照物保持不变,水温维持( $25 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 。首先进行获得性训练(即定位航行实验),随机选择一个入水点将大鼠面向池壁轻轻放入水中,若 2 min 内四肢登上隐匿平台,则使其在平台上停留 15 s;若 2 min 内尚未找到平台,则人为引导其寻找平台并停留 15 s,每只大鼠每天训练 4 次,分别从 4 个不同的入水点入水,每次训练间隔 15 ~ 20 min,连续 5 d,记录大鼠的逃避潜伏期、到达平台的游泳路程、以及平均游泳速度。第 6 天进行空间探索实验,即在定位航行实验基础上撤除逃生平台,将待测大鼠从原平台象限(目标象限)的对侧入水,计时 2 min,记录大鼠到达目标象限的时间、进入目标象限的次数、在目标象限停留时间、平均游泳速度、总游泳路程。

### 1.2.5 Western Blot

取烟熏组 and 对照组子代大鼠不同生长阶段的大脑皮层组织,用 RIPA 裂解液(临用时添加蛋白酶抑制剂 PMSF 和磷酸酶抑制剂)完全裂解脑组织,提取大脑皮层组织总蛋白,采用 BCA 试剂盒法测定蛋白浓度。将各组蛋白样品按一定顺序加入上样孔,进行电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭 2 h 后,选择目的抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱旋转孵育过夜,次日用  $1 \times$  TBST 洗膜后进行室温二抗孵育 1 h,再次洗膜后应用 ECL 化学发光液对目的蛋白条带进行曝光显影。

### 1.3 统计学分析

结果用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。所有数据均用 SPSS 25 和 GraphPad Prism 8 软件处理,若两组独立样本符合正态分布且方差齐,则采用独立样本  $t$  检验,反之则采用非参数检验(Wilcoxon 秩和检验)。以  $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 亲代雌鼠香烟烟雾暴露增强了子代大鼠的焦虑感

旷场实验结果显示,烟熏组子代大鼠在总区域较对照组的运动总距离( $P < 0.05$ ,图 1B)和平均运动速度( $P < 0.05$ ,图 1C)明显增加;子代大鼠在中央区的运动情况显示,烟熏组子代大鼠进入中央区的次数( $P < 0.05$ ,图 1D)、在中央区的运动距离( $P < 0.05$ ,图 1E)、以及在中央区的停留时间( $P < 0.05$ ,图 1F)明显增加。同时,子代大鼠在外周区的运动情况表现为,烟熏组较对照组子代大鼠进入外周区的次数( $P < 0.05$ ,图 1G)和在外周区运动的距

离( $P < 0.05$ ,图 1H)明显增加,但烟熏组子代大鼠在外周区停留时间有所减少( $P < 0.05$ ,图 1I)。上述结果推测,亲代雌鼠香烟烟雾暴露可能促使子代大鼠运动亢奋激发其探索新知的能力,同时也增加了子代大鼠的焦虑情绪(见图 1)。

### 2.2 亲代雌鼠香烟烟雾暴露降低子代大鼠的运动耐受能力

转棒疲劳实验结果显示,烟熏组子代大鼠在转棒疲劳仪上的持续运动时间( $P < 0.001$ ,图 2A)和运动的距离( $P < 0.001$ ,图 2B)较对照组子代大鼠显著减少。表明亲代雌鼠香烟烟雾暴露会导致子代大鼠运动耐受能力显著下降(见图 2)。

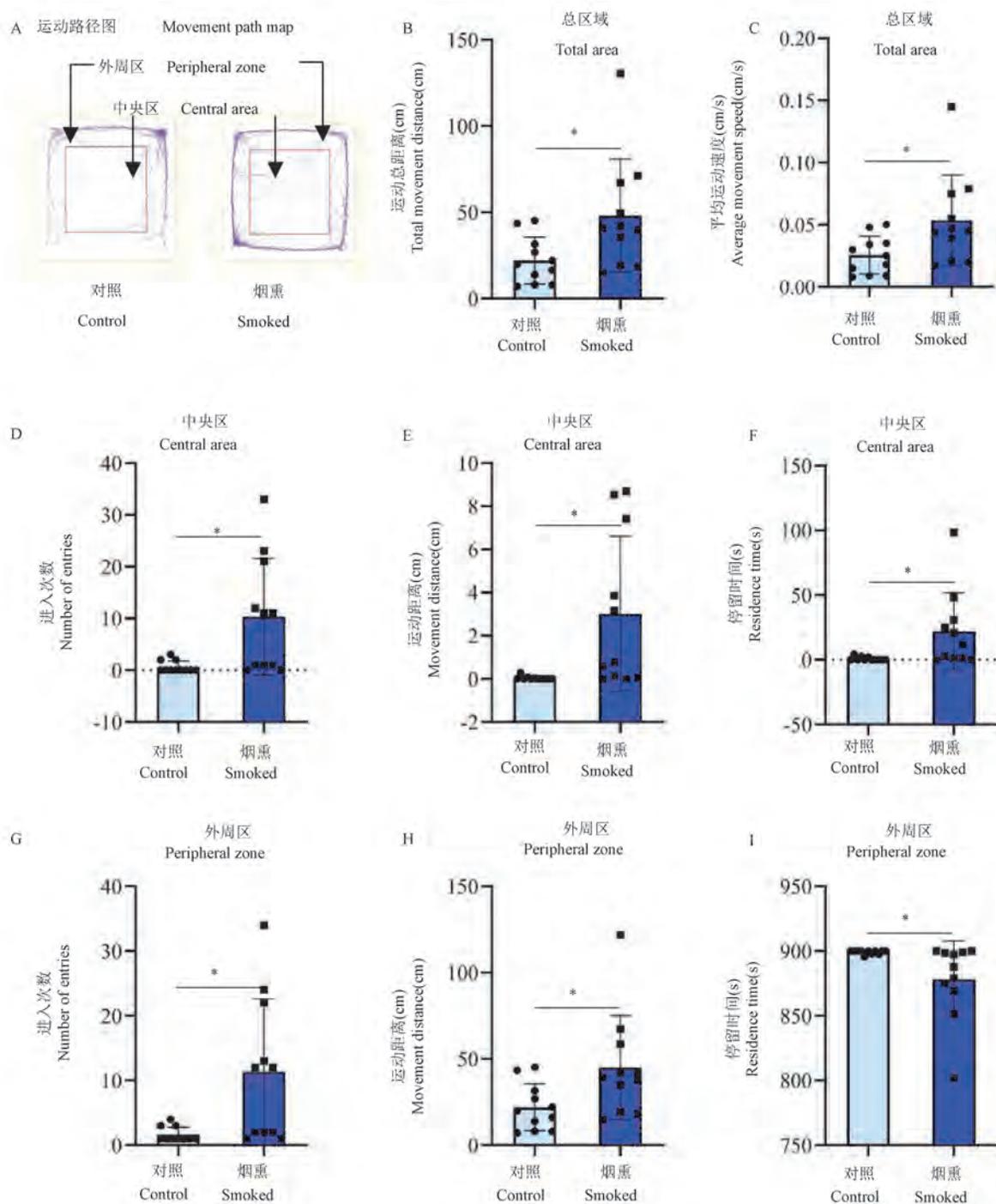
### 2.3 亲代雌鼠香烟烟雾暴露对子代大鼠空间学习和记忆能力的影响

Morris 水迷宫实验结果显示,在获得性训练的定位航行实验中,烟熏组子代大鼠的逃避潜伏期( $P > 0.05$ ,图 3A)和抵达平台的运动路程( $P > 0.05$ ,图 3B)与对照组无显著性差异。随着训练天数的增加,子代大鼠逃避潜伏期和抵达平台的运动路程均逐渐缩小,表明亲代雌鼠香烟烟雾暴露并没有影响子代大鼠的学习能力,但烟熏组子代大鼠的游泳速度较对照组明显下降( $P < 0.001$ ,图 3C)。

在撤除平台后进行的探索实验中,烟熏组子代大鼠较对照组在目标象限停留的时间占比下降( $P < 0.05$ ,图 3D),进入目标象限的次数明显减少( $P < 0.05$ ,图 3E)。整个游泳过程中烟熏组子代大鼠的平均游泳速度明显降低( $P < 0.01$ ,图 3F),总游泳路程也较对照组显著减少( $P < 0.01$ ,图 1G)。这表明亲代雌鼠香烟烟雾暴露会导致其子代大鼠的空间记忆能力减退,且运动能力也明显减弱(见图 3)。

### 2.4 不同发育阶段子代大鼠大脑皮层中 CRMP1、DAPK1 的蛋白表达情况

Western Blot 结果显示,烟熏组子代 CRMP1 蛋白在 0 d( $P < 0.001$ ,图 4A,4B)、7 d( $P < 0.05$ ,图 4C,4D)、21 d( $P < 0.05$ ,图 4E,4F)的表达水平均显著低于对照组。而在 4 周( $P > 0.05$ ,图 4G,4H)时,两组间 CRMP1 蛋白表达无明显差异。DAPK1 蛋白的表达水平在各个检测阶段 0 d( $P < 0.001$ ,图 4A,4B)、7 d( $P < 0.01$ ,图 4C,4D)、21 d( $P < 0.05$ ,图 4E,4F)、4 周( $P < 0.001$ ,图 4G,4H)均具有显著性差异,尤其是在发育早期。表明亲代雌鼠香烟烟雾暴露可影响子代大鼠大脑皮层中 CRMP1 和 DAPK1 的表达(见图 4)。



注:A:子代大鼠在旷场装置上的运动路径图;B:子代大鼠在总区域的运动总距离;C:子代大鼠在总区域的平均运动速度;D:子代大鼠进入中央区的次数;E:子代大鼠在中央区的运动距离;F:子代大鼠在中央区的停留时间;G:子代大鼠进入外周区的次数;H:子代大鼠在外周区的运动距离;I:子代大鼠在外周区的停留时间;与对照组相比, \*  $P < 0.05$ 。

图1 烟熏组和对照组子代大鼠的旷场实验结果( $n = 11$ )

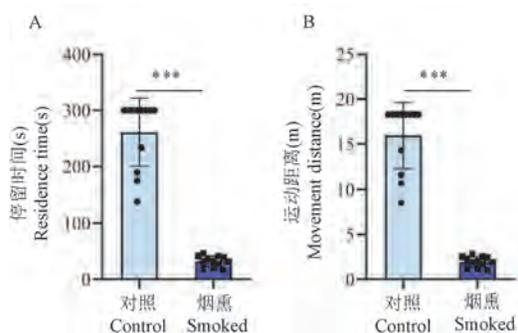
Note. A. Movement path map of offspring rats on the open field device. B. The total movement distance of offspring rats in the total area. C. Average movement speed of offspring rats in the total area. D. The number of offspring rats entering the central region. E. Movement distance of offspring rats in the central region. F. Residence time of offspring rats in central region. G. The number of offspring rats entering the peripheral area. H. Movement distance of offspring rats in peripheral area. I. Residence time of offspring rats in peripheral area. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 1 Open field test results of offspring rats in the smoked group and the control group ( $n = 11$ )

### 3 讨论

众所周知,中国是一个烟草生产和消费大国。虽然中国女性有吸烟习惯者较欧美女性少,但是中国男性吸烟者众多,由此导致的女性被动吸入二手烟的几率亦随之增加。香烟烟雾中含有的大量尼古丁等有害化合物被母体吸收后将导致孕妇妊娠期并发症<sup>[14]</sup>,也可能通过胎盘屏障进入胎儿体内影响胎儿大脑发育<sup>[15]</sup>,怀孕期间长期处于此环境可导致胎盘早剥、流产、死产、早产(< 37 周妊娠)和低出生体重(< 2500 g)<sup>[16]</sup>等,并且会导致胎儿神经发育不良及后代多指(趾)畸形等有害影响。

到目前为止,孕妇香烟烟雾暴露对后代大脑神经系统发育的影响及相关分子机理尚不清楚。为了探究香烟烟雾暴露对其子代神经系统发育的影响,本研究通过香烟烟雾暴露对亲代雌鼠进行烟熏

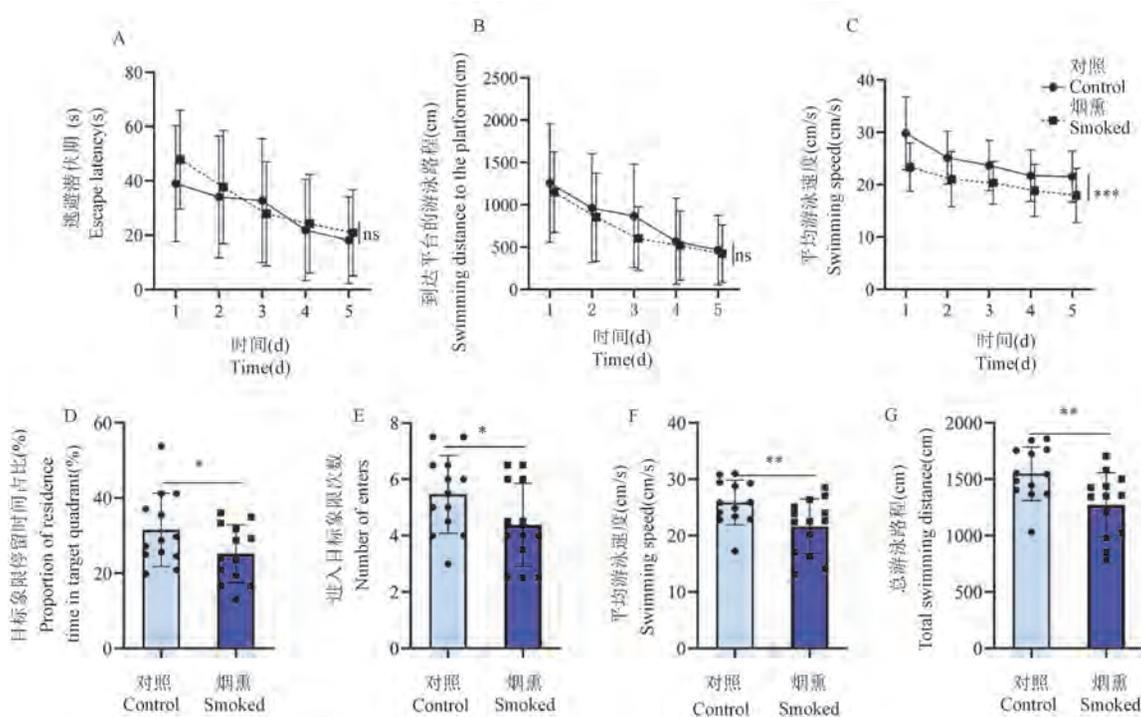


注:A:子代大鼠的运动时间;B:子代大鼠的运动距离;与对照组相比,\*\*\* $P < 0.001$ 。

**图 2** 烟熏组和对照组子代大鼠转棒疲劳实验结果( $n = 12$ )

Note. A. Exercise time of offspring rats. B. Movement distance of offspring rats. Compared with the control group, \*\*\* $P < 0.001$ .

**Figure 2** Results of rod-rotating fatigue test of offspring rats in the smoked group and control group( $n = 12$ )

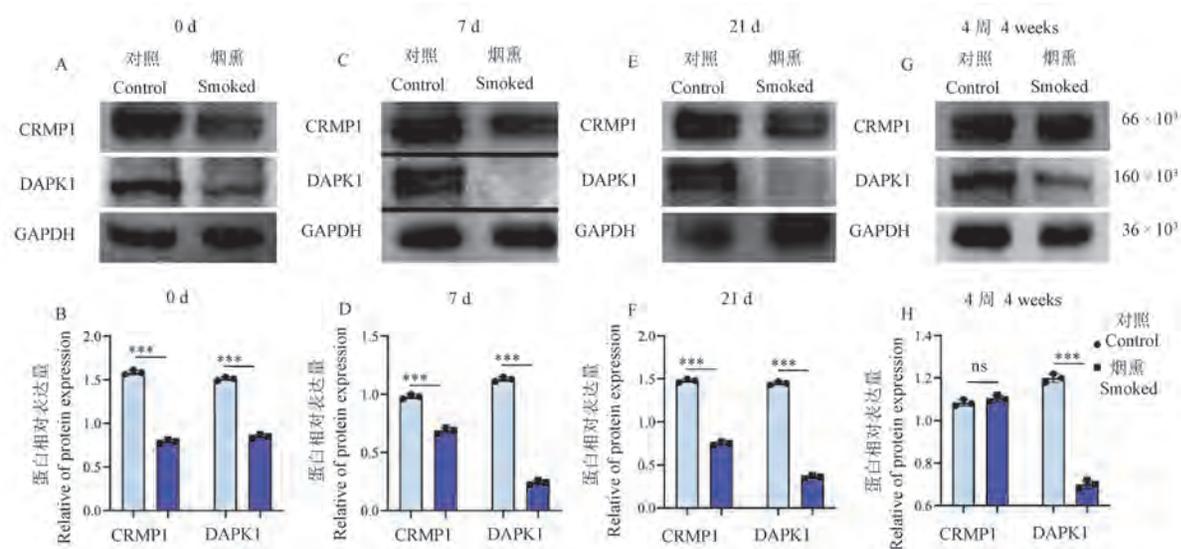


注:定位航行实验:A:子代大鼠的逃避潜伏期,B:子代大鼠抵达平台的游泳路程,C:子代大鼠的平均游泳速度;空间探索实验:D:子代大鼠在目标象限停留时间占比,E:子代大鼠进入目标象限的次数,F:子代大鼠的平均游泳速度,G:子代大鼠的总游泳路程;与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。(下图同)

**图 3** 烟熏组和对照组子代大鼠 Morris 水迷宫实验结果( $n = 13$ )

Note. The positioning navigation experiment. A. Escape latency of offspring rats. B. The swimming distance of offspring rats reaching the platform. C. Average swimming speed of offspring rats. The space exploration experiment. D. Proportion of residence time of offspring rats in target quadrant. E. The number of offspring rats entering the target quadrant. F. Average swimming speed of offspring rats. G. Total swimming distance of offspring rats. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . (The same in the following figures)

**Figure 3** Morris water maze test results of offspring rats in the smoking group and control group( $n = 13$ )



注:A,B:子代大鼠出生 0 d;C,D:子代大鼠出生 7 d;E,F:子代大鼠出生 21 d;G,H:子代大鼠出生 4 周。

图 4 Western Blot 检测烟熏组和对照组子代大鼠不同发育阶段大脑皮层 CRMP1、DAPK1 蛋白表达情况

Note. A, B. Progeny rats were born 0 d. C, D. Progeny rats were born for 7 d. E, F. Progeny rats were born for 21 d. G, H. The progeny rats were born 4 weeks.

Figure 4 Western Blot analysis of CRMP1 and DAPK1 protein expression in cerebral cortex of offspring rats at different developmental stages in the smoking group and the control group

处理,并通过动物行为学检测子代大鼠在情绪、运动能力及学习记忆等方面的变化。烟熏组和对照组亲代雌鼠分别娩出 53 只和 72 只子代大鼠,其中对部分成年期子代大鼠(4 周)进行动物行为学检测,部分发育期(0 d,7 d,21 d,4 周)子代大鼠进行 Western Blot 检测。

旷场实验结果显示,烟熏组子代大鼠进入旷场中央区的频率更高,且其在总区域的运动总路程和平均运动速度均较对照组明显增加,这可能与亲代雌鼠香烟烟雾暴露导致其子代大鼠过度活跃有关。有研究比较了在亲代雄鼠和雌鼠中尼古丁暴露对其子代大鼠的行为学影响,结果发现尼古丁暴露的雌鼠其子代大鼠表现为过度活跃和冲动性行为增加<sup>[17]</sup>。Liu 等<sup>[18]</sup>曾报道亲代雌性接触尼古丁可能会导致子代大鼠产生神经生物学障碍,如多动症、学习和记忆问题等。同时,本研究结果还显示,烟熏组子代大鼠在外周区和中央区之间的穿越次数亦较对照组明显增多,由此表明,亲代雌鼠香烟烟雾暴露后将导致其子代更强烈的焦虑感,这与 Zhou 等<sup>[19]</sup>的研究结果一致,即母体尼古丁暴露的子代在幼年期表现出身体和神经行为发育迟缓,增加焦虑水平。

二手烟暴露将会引起哮喘、呼吸道感染、肺生长和功能受损、运动耐受性下降、认知障碍、行为问

题等多种不良健康风险。多项研究表明,香烟烟雾暴露可减缓小鼠的生长发育,并使小鼠的运动能力明显减弱<sup>[20-21]</sup>。但目前关于亲代香烟烟雾暴露后对子代运动能力影响的报道甚少。本研究转棒疲劳实验结果显示,亲代烟熏组的子代大鼠运动耐受能力显著下降,与对照组存在极显著性差异( $P < 0.001$ )。由此可见,亲代香烟烟雾暴露也可影响其子代的运动耐受能力。

Morris 水迷宫主要用于检测实验动物的学习和记忆能力。本研究在 Morris 水迷宫前 5 d 的获得性训练中表现为,子代大鼠的逃避潜伏期和寻找平台的总路程在烟熏组和对照组之间无明显的差异;随着训练天数的延长,二者潜伏时间和寻找路程均随之缩短,且二者几乎趋于一致。上述研究表明,亲代大鼠香烟烟雾暴露并不影响子代大鼠的学习能力。这与 Alzoubi 等<sup>[22]</sup>在水烟暴露对大鼠学习能力影响的研究结果相一致。但是,烟熏组子代大鼠的平均游泳速度却较对照组明显降低,这进一步说明亲代雌鼠香烟烟雾暴露会对子代大鼠的运动能力产生不良影响,这与转棒疲劳实验结果一致。在后续的空间探索实验中,烟熏组子代大鼠在目标象限停留的时间以及进入目标象限的次数都明显减少,由此表明,亲代雌鼠香烟烟雾暴露后会影子代大鼠的空间记忆能力。此前一项关于水烟环境对大

鼠学习记忆影响的研究发现,接触水烟环境的大鼠会导致短期和长期记忆受损<sup>[22]</sup>。而且,据报道,围产期尼古丁暴露会导致子代小鼠的注意力和记忆力的显著缺陷,有趣的是,这一缺陷具有性别依赖性,雄性后代而非雌性后代更明显<sup>[23]</sup>。同时,在空间探索实验中,亲代烟熏组雌鼠的子代大鼠的平均游泳速度以及总游泳路程也明显减少,同样表明,亲代雌鼠香烟烟雾暴露会减弱子代大鼠的运动能力。

有研究表明,香烟烟雾暴露会诱发脑部炎症和氧化应激<sup>[24]</sup>,在子代小鼠大脑皮层产生炎症反应,如坏死和细胞质空泡化,还观察到大量的凋亡细胞和死亡的神经元,对大脑的功能产生负面影响,从而导致子代小鼠记忆功能的异常<sup>[25]</sup>。为了探究亲代香烟烟雾暴露对子代生长发育及凋亡的影响,本研究分别收集子代大鼠出生后不同阶段(0 d、7 d、21 d、4 周)的大脑皮层组织,并选择与发育和凋亡相关的靶分子 CRMP1 和 DAPK1 进行蛋白水平检测,从结果可以看出,烟熏组子代大鼠较正常组子代大鼠脑组织中 CRMP1 和 DAPK1 蛋白表达水平均显著降低。由于 CRMP1 具有调节树突棘成熟、促进/增加海马神经元突起的生长、脊柱的形成以及增加树突棘密度的功能<sup>[3]</sup>,推测亲代大鼠香烟烟雾暴露导致 CRMP1 显著下降,可能造成树突棘的成熟障碍,并导致神经元突起生长受限,从而影响了脑细胞的正常生理功能;同时,DAPK1 作为细胞凋亡正调控因子,促进细胞凋亡<sup>[6]</sup>,广泛参与由多种信号介导的细胞死亡过程<sup>[7]</sup>,而亲代大鼠香烟烟雾暴露致使子代大鼠脑组织中 DAPK1 的表达降低,可能打破了脑组织中正常细胞凋亡和发育的平衡。但亲代雌鼠香烟烟雾暴露后导致其子代大鼠产生的一系列行为学改变(焦虑、运动耐受能力减退、空间记忆能力减退等)是否与 CRMP1、DAPK1 相关联,该靶分子调节子代大鼠行为学改变的机制如何则仍需进一步探讨。

本研究结果表明亲代雌鼠香烟烟雾暴露可增强子代大鼠的焦虑感、降低其运动耐受能力,并导致子代大鼠的记忆力减退,这可能与 CRMP1 和 DAPK1 的调节有关。于此,我们认为有必要以多种形式开展反吸烟宣传活动,提高公众对二手烟危害的认识以及保护女性及儿童们免受其害,并从分子生物学角度进一步探索香烟烟雾暴露导致神经系统损害的治疗靶点。

## 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Hajdusianek W, zórawik A, Waliszewska-Prosoł M, et al. Tobacco and nervous system development and function-new findings 2015–2020 [J]. *Brain Sci*, 2021, 11(6): 797.
- [ 2 ] Nakamura F, Ohshima T, Goshima Y. Collapsin response mediator proteins: their biological functions and pathophysiology in neuronal development and regeneration [J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 188–200.
- [ 3 ] Zhang ZQ, Zhang JF, Li J, et al. Ketamine Regulates Phosphorylation of CRMP2 to mediate dendritic spine plasticity [J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(3): 353–364.
- [ 4 ] Takaya R, Nagai J, Piao W, et al. CRMP1 and CRMP4 are required for proper orientation of dendrites of cerebral pyramidal neurons in the developing mouse brain [J]. *Brain Res*, 2017, 1655: 161–167.
- [ 5 ] Lauzi J, Anders F, Liu H, et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of CRMP-5 on retinal ganglion cells in an experimental *in vivo* and *in vitro* model of glaucoma [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0207190.
- [ 6 ] Su Y, Deng MF, Xiong W, et al. MicroRNA-26a/Death-Associated Protein kinase 1 signaling induces synucleinopathy and dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease [J]. *Biol Psychiatry*, 2019, 85(9): 769–781.
- [ 7 ] Sulaiman Alsaadi M. Role of DAPK1 in neuronal cell death, survival and diseases in the nervous system [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2019, 74: 11–17.
- [ 8 ] Wang S, Shi XD, Li H, et al. DAPK1 signaling pathways in stroke: from mechanisms to therapies [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(6): 4716–4722.
- [ 9 ] Singh P, Ravanan P, Talwar P. Death Associated Protein Kinase 1 (DAPK1): a regulator of apoptosis and autophagy [J]. *Front Mol Neurosci*, 2016, 9: 46.
- [ 10 ] Pei L, Shang Y, Jin H, et al. DAPK1-p53 interaction converges necrotic and apoptotic pathways of ischemic neuronal death [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(19): 6546–6556.
- [ 11 ] 徐绍业, 曹山虎, 张大红, 等. 被动吸烟对大鼠卵泡发育和胚胎发育的影响 [J]. *现代预防医学*, 2014, 41(17): 3194–3197.  
Xu SY, Cao SH, Zhang DH, et al. Effects of passive smoking on follicular development and embryo development in rats [J]. *Modern Prev Med*, 2014, 41(17): 3194–3197.
- [ 12 ] 徐绍业, 易瑾希, 冯希瑶, 等. 孕期被动吸烟动物模型的制备方法概述 [J]. *现代预防医学*, 2018, 45(11): 2056–2058.  
Xu SY, Yi JX, Feng XY, et al. Constructing methods on passive smoking animal models during pregnancy [J]. *Modern Prev Med*, 2018, 45(11): 2056–2058.
- [ 13 ] 陈茜, 陈瑞. 香烟烟雾诱导小鼠 COPD 模型 B 细胞免疫与气流受限的研究 [J]. *岭南急诊医学杂志*, 2021, 26(3): 229–232.  
Chen Q, Chen R. Study on B-cell immunity and airflow

- restriction induced by cigarette smoke in mice with COPD [J]. Lingnan J Emerg Med, 2021, 26(3): 229-232.
- [14] Braun M, Klingelhöfer D, Oremek GM, et al. Influence of second-hand smoke and prenatal tobacco smoke exposure on biomarkers, genetics and physiological processes in children-an overview in research insights of the last few years [J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(9): 3212.
- [15] 王晨冉, 孙杨华, 徐韬. 孕妇吸烟与儿童孤独症谱系障碍关系队列研究的 Meta 分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(11): 1921-1926.
- Wang CR, Sun YH, Xu T. Maternal smoking and childhood autism spectrum disorders; a Meta-analysis [J]. Chin J Epidemiol, 2020, 41(11): 1921-1926.
- [16] Claire R, Chamberlain C, Davey MA, et al. Pharmacological interventions for promoting smoking cessation during pregnancy [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2020, 3(3): CD010078.
- [17] Lee H, Chung S, Noh J. Maternal nicotine exposure during late gestation and lactation increases anxiety-like and impulsive decision-making behavior in adolescent offspring of rat [J]. Toxicol Res, 2016, 32(4): 275-280.
- [18] Liu F, Tao XR, Pang G, et al. Maternal nicotine exposure during gestation and lactation period affects behavior and hippocampal neurogenesis in mouse offspring [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1569.
- [19] Zhou L, Tao X, Pang G, et al. Maternal nicotine exposure alters hippocampal microglia polarization and promotes anti-inflammatory signaling in juvenile offspring in mice [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 661304.
- [20] 黄凡, 蒋九江, 陈华杰. 被动吸烟对小鼠运动能力的影响 [J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2011, 32(1): 50-54.
- Huang F, Jiang JJ, Chen HJ. Effect of passive smoking to mouse movement ability [J]. J Jinggangshan Univ (Natural Sci Edit), 2011, 32(1): 50-54.
- [21] 王建设, 朱命琪. 被动吸烟对小鼠生长及有氧运动能力的影响 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2010, 38(3): 164-166.
- Wang JS, Zhu MQ. Influence on weight and the ability of aerobic exercise in passive smoking mice [J]. J Henan Normal Univ (Natural Sci Edit), 2010, 38(3): 164-166.
- [22] Alzoubi KH, Khabour OF, Alharahshah EA, et al. The effect of waterpipe tobacco smoke exposure on learning and memory functions in the rat model [J]. J Mol Neurosci, 2015, 57(2): 249-256.
- [23] Zhang L, Spencer TJ, Biederman J, et al. Attention and working memory deficits in a perinatal nicotine exposure mouse model [J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0198064.
- [24] Wilson CB, McLaughlin LD, Nair A, et al. Inflammation and oxidative stress are elevated in the brain, blood, and adrenal glands during the progression of post-traumatic stress disorder in a predator exposure animal model [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76146.
- [25] Prasedya ES, Ambana Y, Martyasari NWR, et al. Short-term E-cigarette toxicity effects on brain cognitive memory functions and inflammatory responses in mice [J]. Toxicol Res, 2020, 36(3): 267-273.

[收稿日期] 2022-03-18

## 《中国实验动物学报》稿约

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

### 一、杂志介绍

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

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

### 二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgsydw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!

左琴,魏杰,付瑞,等. 应用微卫星技术对 KM 小鼠种子群体遗传质量进行比较分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 819-823.

Zuo Q, Wei J, Fu R, et al. Population genetic quality analysis of a closed KM mouse colony by microsatellites [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 819-823.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.011

# 应用微卫星技术对 KM 小鼠种子群体遗传质量进行比较分析

左琴,魏杰,付瑞,刘佐民,王洪\*,岳秉飞\*

(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

**【摘要】** 目的 应用微卫星技术在 2013 年和 2020 年对同一个 KM 小鼠种子群体进行遗传质量检测和分析。方法 2013 年和 2020 年分别提取 30 只 KM 小鼠 DNA,应用 30 个微卫星标记进行 PCR 扩增,基因测序后计算等位基因数、杂合度和多态信息含量等参数。结果 2013 年该群体有 95 个等位基因,平均杂合度为 0.4864,平均多态信息含量(PIC)为 0.4418。2020 年该群体有 122 个等位基因,平均杂合度分别为 0.5150,平均多态信息含量(PIC)分别为 0.4818。结论 KM 小鼠种子群体具有良好的遗传稳定性和多样性,符合封闭群动物的群体遗传概貌特征。

**【关键词】** KM 小鼠;微卫星标记;封闭群;遗传多样性

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)06-0819-05

## Population genetic quality analysis of a closed KM mouse colony by microsatellites

ZUO Qin, WEI Jie, FU Rui, LIU Zuomin, WANG Hong\*, YUE Bingfei\*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Corresponding author: YUE Bingfei. E-mail: y6784@126.com; WANG Hong. E-mail: wanghong@nifdc.org.com

**【Abstract】 Objective** To analyze the population genetic quality of the same closed KM mouse colony in 2013 and 2020 by microsatellites. **Methods** DNA was extracted from 30 KM mice in 2013 and 2020. Thirty pairs of microsatellites primers were used for PCR amplification and DNA sequencing to evaluate genetic quality by the number of alleles, heterozygosity and polymorphism content. **Results** Ninety-five alleles were found in 2013, average heterozygosity was 0.4864 and average polymorphism content was 0.4418. There were 122 alleles, average heterozygosity was 0.5150, and average polymorphism content was 0.4818. **Conclusions** The closed KM mice colony had genetic stability and genetic diversity, which satisfied the genetic characteristics of a closed colony of laboratory animals.

**【Keywords】** KM mice; microsatellites; closed colony; genetic diversity

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

KM 小鼠是我国特有的应用最广泛的封闭群小鼠,有抗病力和适应力强,繁殖率和成活率高等特点。追溯其历史,1926 年美国 Rockfeller 研究所从瑞士引入白化小鼠培育成瑞士种小鼠。1944 年从

印度 Haffkine 研究所引入我国云南昆明,1950 年由昆明引入北京天坛(卫生部生物制品检定所现址),1955 年由北京生物制品研究所扩种生产,推广到全国使用的一种封闭群小鼠<sup>[1]</sup>。1961 年引入到卫生

**【基金项目】** 国家重点研发计划(2021YFF0703200)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China(2021YFF0703200).

**【作者简介】** 左琴(1975—),女,硕士,副研究员,研究方向:实验动物遗传与资源保存。Email:zuoqin2001@163.com

**【通信作者】** 岳秉飞(1960—),男,研究员,博士,研究方向:动物遗传学。Email:y6784@126.com;

王洪(1977—),女,研究员,硕士,研究方向:免疫遗传检测。Email:wanghong@nifdc.org.com。

\* 共同通信作者

部药品生物制品检定所(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所)<sup>[2]</sup>,在中检院封闭饲养至今。广泛用于药理、毒理、病毒和细菌引起的传染病的研究,以及生物制品的检定工作中<sup>[3]</sup>。KM 小鼠的遗传质量对种群维持及检定工作至关重要,有必要定期对封闭群 KM 小鼠进行遗传质量检测和分型。

封闭群实验动物的质量保证有赖于严谨的科学繁育方式和完善的检测技术手段,二者相互影响,促进实验动物繁育和检测的良性循环。KM 小鼠种群在中检院封闭饲养了 60 余年,中检院长期对该种群遗传监测,并致力于封闭群实验动物遗传质量检测方法的研究和相关标准的制定,应用国家标准的生化标记检测法的 14 个位点分别在 1990 年和 2010 年对本单位的 KM 小鼠种群进行了遗传质量检测,1990 年种群的平均杂合度是 0.2625,多态性信息含量是 0.2065,2010 年群体的平均杂合度是 0.1615,多态性信息含量是 0.1307,此研究同时表明有效位点为 7~9 个,在位点数量少的情况,不能客观反映实验动物群体遗传结构特征<sup>[4]</sup>。由于生化标记方法的有效位点较少的局限性,1990 年和 2010 年的检测结果未能准确描述中检院 KM 小鼠种子群体的遗传结构信息。

2010 年国家标准“GB14923-2010 哺乳类实验动物的遗传质量控制”更新发布,要求对封闭群的动物进行遗传检测,推荐生化标记检测法、下颌骨测量法、DNA 检测法等检测方法。2017 年中国实验动物行业协会颁布实施了行业团体标准《T/CALAS 21-2017 实验动物小鼠、大鼠微卫星标记检测方法》,弥补了生化标记检测法的局限性,微卫星方法的位点数量多且多态性丰富,位点实现了全基因组覆盖<sup>[5]</sup>。

本研究应用团体标准的微卫星技术,对同一种群的封闭群 KM 小鼠种子群体进行遗传质量检测,比较 2013 年和 2020 年 KM 小鼠群体遗传结构变化,监测种群遗传质量,完善种群遗传背景资料,探讨封闭群种群维持的重要性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验动物

在 2013 年和 2020 年,分别从中国食品药品检定研究院 KM 小鼠种子群体基础群中随机选择 30

只,10 周龄以上,雌雄各半,剪取尾尖组织 1 cm 冻存,用于 DNA 提取。所有动物均为 SPF 级【SCXK(京)2017-0008】。动物饲养于温度 22~26℃,湿度 40%~70%,光照 12 h 明 12 h 暗的屏障环境中,自由采食、自由饮水,饲养于中国食品药品检定研究院【SYXK(京)2017-0013】。实验操作符合中国食品药品检定研究院动物福利伦理要求(中检动(福)第 2019(A)001 号)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

PCR 扩增试剂(TaKaKa, R007A),琼脂糖(Sigma, V900510);PCR 仪(伯乐, Bio-rad MyCycler, 美国),离心机(赛默飞, Thermo MULTIFUGE X1R, 美国),Bio-Rad 电泳仪(伯乐, Bio-Rad PowerPar, 美国),微量分光光度计(赛默飞, Thermo MULTIFUGE X1R, 美国)等。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 样本 DNA 的提取制备

用氯仿/异戊醇法提取基因组 DNA,用琼脂糖电泳和 NanoDrop 微量分光光度计对 DNA 完整性、浓度和纯度进行测定。所有样本的 A260/280 为 1.8~2.0,浓度调整为 40~80 ng/ $\mu$ L, -20℃ 保存备用。

#### 1.2.2 引物及扩增程序

按照团体标准合成 30 对荧光引物,并按照标准方法进行 PCR 扩增<sup>[5]</sup>。序列详见 T/CALAS 21-2017 表 1(<http://www.lascn.com/uploadfiles/zlbz/2018/6/201806081412336328.pdf>)。

#### 1.2.3 扩增产物分型

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测特异性后进行微卫星基因型分型。微卫星基因型分型均由北京擎科新业生物技术有限公司完成。经实验条件优化特异性差或不能进行有效测序分型的位点不计入有效位点。

### 1.3 统计 学 分 析

将有效测序分型结果导入 Popgen 1.32 软件中,计算两个代次 KM 小鼠在各微卫星位点上的基因频率、平均有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、平均杂合度,同时利用和 Littleprogram 0.6 软件计算位点的多态性信息含量(PIC)。

参照团体标准,对两个代次群体的遗传构成进行评价,比较分析不同代次的群体遗传概貌。同时也通过 PIC 等结果对标准位点的适用性进行分析。

## 2 结果

### 2.1 2013 年 KM 小鼠的遗传分型结果

2013 年该群体共检测到 98 个等位基因, 平均等位基因数是 3.2667, 平均观测杂合度为 0.4445, 平均期望杂合度为 0.4953, 平均杂合度为 0.4864, 30 个微卫星位点中, 1 个位点 (D12Nds11) 是单态性, 高度多态性位点有 13 个 ( $PIC > 0.5$ ), 中度多态性位点有 13 个 ( $0.25 < PIC < 0.5$ ), 低度多态性位点有 4 个 ( $PIC < 0.25$ ), 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.4418。各遗传参数详见表 1。

### 2.2 2020 年 KM 小鼠的遗传分型结果

2020 年该群体共检测到 126 个等位基因, 平均

等位基因数 4.2, 平均观测杂合度为 0.4489, 平均期望杂合度为 0.5239, 平均杂合度为 0.5150, 30 个微卫星位点中, 单态性位点有 1 个 (D15 Mit5), 高度多态性位点有 15 个 ( $PIC > 0.5$ ), 中度多态性位点有 10 个 ( $0.25 < PIC < 0.5$ ), 低度多态性位点有 5 个 ( $PIC < 0.25$ ), 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.4818。各遗传参数详见表 2。

### 2.3 2013 年和 2020 年 KM 小鼠群体遗传结构参数的比较

2013 年种群的遗传结构参数和 2020 年种群的遗传结构参数经统计分析比较, 7 个参数中除了有效等位基因有显著性差异外, 其余 6 个参数无显著性差异, 各参数及  $P$  值见表 3。

表 1 2013 年 KM 小鼠 30 个微卫星位点的遗传参数

Table 1 Genetic parameters of 30 STR loci of KM mice in 2013

微卫星位点 Loci	等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	观测杂合度 Obs_Het	期望杂合度 Exp_Het	平均杂合度 Ave_Het	香隆指数 Shannon's information index	多态性信息含量 PIC	多态程度 Degree of polymorphism	遗传平衡 $P$ 值 Hardy Weinberg $P$ value
D1Mit365	2	1.3243	0.2857	0.2494	0.2449	0.4101	0.2150	低 Low	$P > 0.05$
D2Mit15	4	2.9654	0.4667	0.6740	0.6628	1.2085	0.6051	高 High	$P < 0.01$
D3Mit29	2	1.7610	0	0.4438	0.4321	0.6237	0.3388	中 Middle	$P < 0.01$
D4Mit235	2	1.0689	0.0667	0.0655	0.0644	0.1461	0.0623	低 Low	$P > 0.05$
D5Mit48	2	1.7664	0.6364	0.4545	0.4339	0.6255	0.3398	中 Middle	$P > 0.05$
D6Mit102	6	4.2755	0.8000	0.7791	0.7661	1.5989	0.7320	高 High	$0.01 < P < 0.05$
D6Mit8	3	1.2270	0.2000	0.1881	0.1850	0.3944	0.1769	低 Low	$P > 0.05$
D6Mit15	3	2.6572	0.1034	0.6346	0.6237	1.0325	0.5491	高 High	$P < 0.01$
D7Mit281	2	1.5139	0.2333	0.3452	0.3394	0.5227	0.2818	中 Middle	$P > 0.05$
D7Mit12	4	3.4417	0.5333	0.7215	0.7094	1.2969	0.6557	高 High	$P < 0.01$
D8Mit33	3	1.9311	0.3793	0.4906	0.4822	0.8213	0.4219	中 Middle	$P > 0.05$
D8Mit14	4	2.9173	0.7000	0.6684	0.6572	1.1343	0.5880	高 High	$P > 0.05$
D9Mit23	6	3.9207	0.8621	0.7580	0.7449	1.4893	0.7027	高 High	$0.01 < P < 0.05$
D9Mit21	4	2.2086	0.6000	0.5565	0.5472	1.0315	0.5045	高 High	$P > 0.05$
D10Mit12	2	1.5139	0.4333	0.3452	0.3394	0.5227	0.2819	中 Middle	$P > 0.05$
D11Mit4	4	2.3653	0.6667	0.5870	0.5772	1.0208	0.5181	高 High	$P > 0.05$
D12Mit7	2	1.9968	0.1600	0.5094	0.4992	0.6923	0.3746	中 Middle	$P < 0.01$
D12Nds11	1	1.0000	0	0	0	0	-	-	-
D13Mit3	4	2.4310	0.7500	0.5994	0.5886	1.0358	0.5151	高 High	$P > 0.05$
D14Mit3	2	2.0000	0.5000	0.5091	0.5000	0.6931	0.3750	中 Middle	$P > 0.05$
D15Mit5	2	1.7630	0.5000	0.4401	0.4328	0.6243	0.3391	中 Middle	$P > 0.05$
D15Mit15	3	2.6432	0.5667	0.6322	0.6217	1.0286	0.5466	高 High	$P > 0.05$
D16Mit9	2	1.7241	0.3333	0.4271	0.4200	0.6109	0.3318	中 Middle	$P > 0.05$
D17Mit11	4	2.3778	0.5333	0.5893	0.5794	1.0826	0.5338	高 High	$P < 0.01$
D17Nds3	6	4.4554	0.8333	0.7887	0.7756	1.6298	0.7439	高 High	$P > 0.05$
D18Mit19	5	1.5943	0.2333	0.3791	0.3728	0.8056	0.3560	中 Middle	$P < 0.01$
D18Mit9	6	3.6645	0.7586	0.7399	0.7271	1.4488	0.6815	高 High	$P < 0.01$
D19Mit16	2	1.5571	0.2667	0.3638	0.3578	0.5433	0.2938	中 Middle	$P > 0.05$
D19Mit3	3	1.9088	0.5667	0.4842	0.4761	0.7250	0.3776	中 Middle	$P > 0.05$
DXMit16	3	1.7527	0.3667	0.4367	0.4294	0.7281	0.3707	中 Middle	$P > 0.05$
均值 Mean	3.2667	2.2576	0.4445	0.4953	0.4864	0.8509	0.4418	-	-
标准差 St. Dev	1.4368	0.9276	0.2516	0.1996	0.1964	0.4060	0.1467	-	-

表 2 2020 年 KM 小鼠 30 个微卫星位点的遗传参数

Table 2 Genetic parameters of 30 STR loci of KM mice in 2020

微卫星位点 Loci	等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	观测杂合度 Obs_Het	期望杂合度 Exp_Het	平均杂合度 Ave_Het	香隆指数 Shannon's information index	多态性 信息含量 PIC	多态程度 Degree of polymorphism	遗传平衡 P 值 Hardy Weinberg P value
D1Mit365	4	1.3580	0.2670	0.2680	0.2630	0.5250	0.2430	低 Low	0.01 < P < 0.05
D2Mit15	5	3.2030	0.6000	0.6990	0.6880	1.3580	0.6470	高 High	0.01 < P < 0.05
D3Mit29	5	4.4230	0.5330	0.7870	0.7740	1.5490	0.7390	高 High	P < 0.01
D4Mit235	2	1.9650	0	0.4990	0.4910	0.6840	0.3710	中 Middle	P < 0.01
D5Mit48	5	2.4420	0.5670	0.6010	0.5910	1.0490	0.5060	高 High	P < 0.01
D6Mit102	7	3.4550	0.3000	0.7230	0.7110	1.5080	0.6760	高 High	P < 0.01
D6Mit8	4	2.9080	0.6330	0.6670	0.6560	1.1590	0.5900	高 High	0.01 < P < 0.05
D6Mit15	6	1.5310	0.2000	0.3530	0.3470	0.7630	0.3300	中 Middle	P < 0.01
D7Mit281	2	1.9650	0.6000	0.4990	0.4910	0.6840	0.3710	中 Middle	P > 0.05
D7Mit12	3	1.6380	0.3670	0.3960	0.3890	0.6610	0.3350	中 Middle	P > 0.05
D8Mit33	4	2.4100	0.4330	0.5950	0.5850	1.0610	0.5310	高 High	P < 0.01
D8Mit14	6	4.4890	1.0000	0.7900	0.7770	1.6290	0.7440	高 High	P < 0.01
D9Mit23	5	2.4830	0.2000	0.6070	0.5970	1.1000	0.5280	高 High	P < 0.01
D9Mit21	5	3.9740	0.7330	0.7610	0.7480	1.4910	0.7100	高 High	P > 0.05
D10Mit12	2	1.6420	0	0.3980	0.3910	0.5800	0.3150	中 Middle	P < 0.01
D11Mit4	6	1.9500	0.6000	0.4960	0.4870	1.0490	0.4650	中 Middle	P > 0.05
D12Mit7	3	2.0480	0.5000	0.5200	0.5120	0.7950	0.4110	中 Middle	0.01 < P < 0.05
D12Nds11	3	1.3120	0	0.2420	0.2380	0.4680	0.2210	低 Low	P < 0.01
D13Mit3	4	1.6560	0.3670	0.4030	0.3960	0.7190	0.3490	中 Middle	0.01 < P < 0.05
D14Mit3	5	3.7900	0.5000	0.7490	0.7360	1.4160	0.6890	高 High	P < 0.01
D15Mit5	1	1.0000	1.0000	0	0	0	-	-	-
D15Mit15	5	2.9800	0.5000	0.6760	0.6640	1.2600	0.6040	高 High	0.01 < P < 0.05
D16Mit9	2	1.0690	0.0670	0.0660	0.0640	0.1460	0.0620	低 Low	P > 0.05
D17Mit11	4	3.1030	1.0000	0.6890	0.6780	1.2260	0.6190	高 High	P < 0.01
D17Nds3	12	6.6180	0.9670	0.8630	0.8490	2.1420	0.8340	高 High	P > 0.05
D18Mit19	3	1.4480	0.3000	0.3150	0.3090	0.5630	0.2780	中 Middle	0.01 < P < 0.05
D18Mit9	3	2.0200	0.4000	0.5140	0.5050	0.8570	0.4420	中 Middle	P > 0.05
D19Mit16	3	1.3500	0.2330	0.2640	0.2590	0.4750	0.2330	低 Low	P > 0.05
D19Mit3	4	3.1750	0.5330	0.6970	0.6850	1.2230	0.6230	高 High	P < 0.01
DXMit16	3	2.3230	0.0670	0.5790	0.5690	0.9600	0.5050	高 High	P < 0.01
均值 (Mean)	4.2000	2.5243	0.4489	0.5239	0.5150	0.9700	0.4818	-	-
标准差 (St. Dev)	2.0580	1.2450	0.2970	0.2175	0.2141	0.4691	0.2391	-	-

表 3 2013 年种群和 2020 年种群遗传参数的比较

Table 3 Comparison of genetic parameters of colony in 2013 and colony in 2020

遗传结构参数 Genetic parameter	有效平均等位 基因数 Na	有效等位 基因数 Ne	观测杂合度 Obs_Het	期望杂合度 Exp_Het	平均杂合度 Ave_Het	香隆指数 I Shannon's information index
2013 年种群 Colony in 2013	3.27 ± 1.44 *	2.26 ± 0.93	0.44 ± 0.25	0.50 ± 0.20	0.49 ± 0.20	0.85 ± 0.40
2020 年种群 Colony in 2020	4.20 ± 2.06	2.52 ± 1.25	0.45 ± 0.30	0.52 ± 0.22	0.52 ± 0.21	0.97 ± 0.47
P 值 P value	0.04	0.30	0.85	0.45	0.45	0.23

注:与 2020 年种群相比, \* P &lt; 0.05。

Note. Compared with colony in 2020, \* P &lt; 0.05.

### 3 讨论

本研究应用微卫星 DNA 标记检测法的 30 个位点对 2013 年和 2020 年的同一 KM 小鼠种群进行遗传结构分析,对同一种群相隔 15 个世代进行遗传监测。2013 年种群的平均杂合度是 0.4864,观测杂合度和期望杂合度间检验无差异,2020 年种群的平均

杂合度是 0.5150,观测杂合度和期望杂合度间检验无差异。按照团体标准 T/CALAS 21-2017,封闭群平均杂合度在 0.5 ~ 0.7,期望杂合度和观测杂合度经卡方检验无差异,可认定为合格的封闭群体<sup>[5]</sup>,2020 年的研究表明该种群是遗传质量合格的封闭群。比较 2013 年和 2020 年的遗传结构参数,除在有效等位基因上有显著性差异,其余 6 项参

数无显著性差异,与此同时,2020 的参数均高于 2013 的参数。同一种群在没有引入外来血缘的影响条件下,其原因可能是 2013 年的种群样本选择没有避开同窝个体随机选取,2013 年之后,根据微卫星检测结果的反馈,调整繁育方式,从而提升了实验动物遗传质量。研究表明对于群体遗传多样性的评价,其可靠性主要取决于采用样本对与总体的代表性和遗传标记对基因组的代表性<sup>[6]</sup>。

实验动物作为一种特殊的实验材料,其标准化一直受到行业内的高度重视。实验动物的特殊性在于,作为有生命的实验材料,其微生物质量和遗传质量一直处于动态平衡之中。而实验动物质量控制的目的是将动态平衡保持在可控范围内,进而保证动物实验和科研结果的准确性和可重复性。保持封闭群实验动物的遗传特征和遗传质量的稳定性,科学的饲养管理是基础,遗传监测是有效手段。国家标准 GB14923-2010 哺乳类实验动物的遗传质量控制附录 B 实验动物封闭群的繁殖方法中说明,根据种群大小,建议了 3 种繁殖交配方式,分别是最佳避免近亲法,循环交配法和随选交配法。1994 年陈国强等<sup>[7]</sup>通过净化建立 KM 小鼠种群,通过循环交配法和随选交配法交配繁殖维持,比较了 9 个生化标记位点,得到了循环交配法比随选交配法更能保持封闭群实验动物的遗传特征。中检院在 2011 年以前,种群以随选交配法维持传代保种,从 2011 年开始建立保种群和生产群,保种群采用循环交配法维持传代保种,从 2013 年和 2020 年的遗传监测结果显示,目前种群是合格种群。

理论上封闭群的种群数量无限,在种群内随选交配,种群可以达到 Hardy-Weinberg 平衡,种群的基因频率和基因型频率会保持不变,但实践中动物种群的数量都是有限的,即使采用避免近亲交配的方法维系种群,随着传代世代数的增加,种群的近交系数上升,不可避免的发生遗传漂变,不符合 Hardy-Weinberg 定律。要想建立稳定的封闭群种群,必须保持种群遗传多样性,防止近交系数的上升。在 2009 年,商海涛等<sup>[8]</sup>提出建立标准化的 KM 小鼠种群,是 KM 小鼠亟待解决的问题,尝试进行种群融合,并提示种群融合的过程中要足够的杂交样本数,并采取适当措施才能使小鼠的遗传多样性得到保持。

本研究对 KM 小鼠种子群体的遗传结构进行分析,提供了 KM 小鼠遗传背景数据,为封闭群实验小

鼠的研究应用提供借鉴,提升动物种子资源的质量,为进行 KM 的种群融合研究打基础,以期建立标准化种群。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] 章根木,姚甘火. 中国昆明小鼠(KM 鼠)遗传背景资料调查 [J]. 中国实验动物学杂志, 1997, 7(4): 246-251.  
Zhang GM, Yao GH. Investigation on genetic background data of Kunming mouse (KM mouse) in China [J]. Chin J Lab Anim Sci, 1997, 7(4): 246-251.
- [ 2 ] 孙靖. 几种近交品系小鼠的毛色基因 [J]. 动物学报, 1981, 27(3): 208-212.  
Sun J. The coat colour genes of inbred mouse strains Ta1, Ta2 and 615 [J]. Acta Zool Sin, 1981, 27(3): 208-212.
- [ 3 ] 魏泓. 医学实验动物学 [M]. 成都: 四川科学技术出版社; 1998.  
Wei H. Medical laboratory animal science [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press; 1998.
- [ 4 ] 王洪,魏杰,李晓波,等. 生化标记方法在 KM 小鼠遗传结构分析中的应用 [J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(2): 144-149.  
Wang H, Wei J, Li XB, et al. Application of biochemical markers on analysis of population genetic structure in KM mice [J]. Lab Anim Comp Med, 2017, 37(2): 144-149.
- [ 5 ] 中国实验动物学会,王洪,魏杰,等. T/CALAS 21-2017. 小鼠、大鼠微卫星 DNA 标记检测方法, ICS65.020.30, B 44, 2017 [S]. 2018.  
The China Association for Laboratory Animal Sciences(CALAS), Wang H, WEI J, et al. T/CALAS 21-2017. method for detecting microsatellite markers of laboratory mice and rats ICS65.020.30, B 44, 2017 [S]. 2018.
- [ 6 ] 王洪,杜小燕,徐平,等. 上海 KM 小鼠种子群体遗传状况分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 27-32.  
Wang H, Du XY, Xu P, et al. Population genetic quality analysis of outbred KM mice from Shanghai Seed Center [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(12): 27-32.
- [ 7 ] 陈国强,曹征操,徐平,等. 屏障系统内昆明小鼠随机交配群体的建立及相关特性研究 [J]. 上海实验动物科学, 1994, 14(2): 71-74.  
Chen GQ, Cao ZC, Xu P, et al. Establishment of the random mating colony of KM mouse in the barrier system [J]. Shanghai Lab Anim Sci, 1994, 14(2): 71-74.
- [ 8 ] 商海涛,魏泓,岳秉飞,等. 应用微卫星标记对三个昆明小鼠封闭群的遗传学研究 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(2): 1-6.  
Shang HT, Wei H, Yue BF, et al. Microsatellite analysis in 3 Kunming mice outbred colonies [J]. Lab Anim Sci, 2009, 26(2): 1-6.

[ 收稿日期 ] 2022-02-07

孙静,葛良鹏,丁玉春,等. SPF猪的培育、质量控制及其应用[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 824-829.

Sun J, Ge LP, Ding YC, et al. Production, quality control and application of SPF pigs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 824-829.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.012

## SPF猪的培育、质量控制及其应用

孙静<sup>1,2,3,4\*</sup>, 葛良鹏<sup>1,2,3,4\*</sup>, 丁玉春<sup>1,2,3,4</sup>, 张进威<sup>1,2,3,4</sup>, 梁浩<sup>1,2,3,4</sup>, 马继登<sup>1,5</sup>

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 农业部养猪科学重点实验室, 重庆 402460; 3. 国家生猪技术创新中心, 重庆 402460; 4. 重庆市养猪科学重点实验室, 重庆 402460; 5. 畜禽遗传资源发掘与创新利用四川省重点实验室 四川农业大学, 成都 611130)

**【摘要】** 无特定病原体 (specific pathogen-free pig, SPF) 猪是专为预防特定猪病来计划性生产的猪, 对生猪生产、生命科学研究和生物制品研发等意义重大。本文综述了 SPF 猪的质量控制及国内外病原控制现状、病原净化方法, 并简要介绍了 SPF 猪的应用和发展趋势。

**【关键词】** SPF猪; 生产; 质量控制; 病原净化方法; 应用

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0824-06

## Production, quality control and application of SPF pigs

SUN Jing<sup>1,2,3,4\*</sup>, GE Liangpeng<sup>1,2,3,4\*</sup>, DING Yuchun<sup>1,2,3,4</sup>, ZHANG Jinwei<sup>1,2,3,4</sup>, LIANG Hao<sup>1,2,3,4</sup>, MA Jideng<sup>1,5</sup>

(1. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China. 2. Key Laboratory of Pig Industry Science, Ministry of Agriculture, Chongqing 402460. 3. National Center of Technology Innovation for Swine, Chongqing 402460. 4. Chongqing Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460. 5. Farm Animal Genetic Resource Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130)

Corresponding author: SUN Jing. E-mail: sunjing85026@163.com; GE Liangpeng. E-mail: geliangpeng1982@163.com

**【Abstract】** Specific-pathogen-free (SPF) pigs have been developed to prevent specific pig diseases and are important not only in the pig production industry, but also in life science research, and the production of biological products. Here, we review research progress on pathogen control and the quality control procedures applied to the production of SPF pigs throughout the world. We also provide an overview of the method for the purification of pathogens from SPF pigs, and briefly discuss the current applications of SPF pigs and potential future developments.

**【Keywords】** SPF pigs; production; quality control; purification of pathogenic microorganisms; application

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

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (32072687), 重庆市技术创新与应用发展专项重点项目 (cstc2021jsex-dxwtBX0007), 四川省区域创新合作项目 (22QYCX0023), 重庆市科研机构绩效引导专项 (20524), 重庆市博士后基金特别资助项目 (21310)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (32072687), Chongqing Technology Innovation and Application Development Key Project (cstc2021jsex-dxwtBX0007), Sichuan Province Regional Innovation Cooperation Project (22QYCX0023), Performance Incentive and Guidance Project for Scientific Research Institutions in Chongqing (20524), Special Funded Project of Chongqing Postdoctoral Fund (21310).

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

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

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

\* 共同通信作者

SPF 猪制备技术于上世纪 50 年代由美国内布拉斯加州立大学 George Young 博士创立,他运用剖腹产手术方法替代自然分娩方式成功生产出 SPF 猪。随后美国、加拿大、英国、丹麦、瑞士、德国、法国、荷兰、原捷克斯洛伐克、南斯拉夫、澳大利亚、日本等国家和地区先后在政府支持下,建立 SPF 猪审定协会或认定委员会,制定 SPF 猪认定标准,严格控制遗传学质量,建立饲养净化猪群的整套生产体系和管理服务体系,推行 SPF 猪生产计划。目前为止,欧美多个国家成立了 SPF 猪认证机构。比如,美国国家 SPF 猪认证机构(National SPF Swine Accrediting Agency, NSSAA)通过制定 SPF 猪群评估标准,定期对养殖场猪群健康检查、对上市猪只的屠宰抽查来跟踪猪群中的特定疾病以及疾病预防等手段来提高猪的生产效率。丹麦培根和肉类理事会(Danish Bacon and Meat Council, DBMC)自 1968 年以来组织了丹麦 SPF 猪计划<sup>[1]</sup>,现有 300 多个猪场拥有 SPF 核心群及种猪群<sup>[2-3]</sup>以及 SPF 哥廷根小型猪种群(Ellegaard Gottingen 小型猪公司)<sup>[4]</sup>;到 2015 年,挪威建立了两个 SPF 核心群和 40 多个 SPF 猪繁殖封闭群,还建立了 20 个生产猪群提供商业化使用<sup>[5]</sup>。日本 SPF 猪协会成立于 1969 年,70 年代开始对外推广 SPF 猪。目前为止,经认证的 SPF 猪养殖场超过 190 个,约占日本猪场数量的 5%,共生产了 9.7% 的 SPF 母猪和约 10% 的 SPF 肉猪(<http://www.j-spf.com/>)。我国台湾地区由徐兴镛博士于 1982 年建立 SPF 实验室,开展实验用 SPF 小型猪和 SPF 肉猪的培育;在大陆地区,北京 SPF 猪育种管理中心最早开展 SPF 猪的研究,该中心于 1988 年承担了国家科委七五重点科技攻关“SPF 猪系统开发与研究”;之后江苏省农业科学院、重庆市畜牧科学院和中国农业科学院哈尔滨兽医研究所等单位先后建立 SPF 猪生产繁育系统,开展 SPF 猪的培育和应用推广。

## 1 SPF 猪的质量控制

对 SPF 猪群实施质量控制主要涉及遗传、病原和环境 3 大方面。

### 1.1 遗传质量控制

生产过程中,封闭群的管理模式适用于 SPF 猪种群的繁育,近交系的管理模式适用于特定实验用 SPF 猪群的选育。“金字塔”生产管理可实现 SPF 猪种群保种、繁育和生产使用:核心群主要为本

品种选育工作,扩繁群主要是扩大繁育良种群体数量,生产群主要是供给实验用 SPF 仔猪群。

目前,基于全基因组的单核苷酸多态性(SNP)标记计算个体的基因组育种值,选择优秀个体已成为了现代育种工作的常用手段之一,也适用于 SPF 核心群的建立。采用个体选配法选留初代 SPF 猪群,对所有个体进行亲缘关系分析,获得各自的亲缘关系系数和所有样本的聚类结果,判断样本间血缘的远近情况;通过逐头分析,选定与配公/母猪个体。选配计划执行后,在下次配种期来临之前,应分析个体过去的交配结果,找出生产过优良后代的杂交组合继续使用,并可增选具有相应品质的公母猪与之交配。生产性能是 SPF 猪选育的关键,公猪个体对种群的影响大。因此,建议按照公猪构建家系,采取家系间相互交配,家系内不交配的方式,有计划地制约 SPF 核心群的近交系数的增长。

### 1.2 病原微生物质量控制

对 SPF 猪群健康评估应基于各个疾病的临床证据,而不仅仅是指标疾病。对所有年龄阶段的猪的临床症状进行评估,对猪群生产效率的评估、寄生虫控制计划、疫苗接种计划和药物使用计划等,对任何可疑疾病都要进行明确的诊断测试。比如, Safron and Gonder 建议在血清学检测中,伪狂犬病和布鲁氏菌病必须为阴性<sup>[6]</sup>。另外,对猪繁殖与呼吸综合征、胸膜肺炎放线杆菌、支原体病和传染性胃肠炎等疫病进行常态化检查。

一般每 3 个月临诊 1 次,抽样(群体数的 5% 左右)并采集外周血分离血清样品、采集口鼻黏液、新鲜粪便样品以及皮屑样品,按个体和样品类型标注,由第三方资质公司检测病原。

### 1.3 环境质量控制

总体上,SPF 猪的生产应落实“外紧内松”的生物安全防护原则,并做到制度化和常态化。根据 GB14925-2010《实验动物环境及设施》的规定,正压的屏障环境和隔离环境适用于 SPF 级及无菌级动物的生产、实验和检疫,但在实际生产中原则上只要与普通猪群隔开饲养,保持在传染病源不能侵入的环境中饲养,对人员流、空气流、水流、动物物流和物流这“五流”制定详细而严谨的操作规程,防止病原微生物通过空气、工作人员、饲料及用品、饮水、蚊虫和鼠害等途径感染或污染猪群。也可选择一些节能环保的措施:比如,利用高温杀菌(>75℃ 的自来水)并冷却后的水作为 SPF 猪的饮用水,替

代纯水是可行的;利用微波干燥替代钴-60 辐照的方式杀灭商品化饲料中微生物,可节约 SPF 猪的饲喂成本。

总之,SPF 猪场的生物安全管理是 SPF 猪微生

物质量控制最有效的措施,也是猪场疫病防控的核心防线。可根据各猪场的具体情况和 SPF 猪的认证或评价要求综合考虑生产中的关键危害控制点,研究部署 SPF 猪生产的计划。

表 1 各国对 SPF 猪的病原控制

Table 1 Pathogen control of SPF pigs in different countries

检测项目 Test item	中国 China	丹麦 Denmark	美国 USA	日本 Japan
猪瘟 Swine fever	√	√	-	-
口蹄疫 Foot and mouth disease	√	√	-	-
传染性胃肠炎 Transmissible gastroenteritis of swine	√	√	-	-
布鲁氏菌病 Brucella	√	√	√	-
猪伪狂犬病 Pseudorabies	√	√	√	√
猪血虱和疥螨 Haematopinus suis and Sarcoptes suis	√	√	√	-
猪喘气病 Mycoplasmal pneumonia of swine	√	√	√	√
猪萎缩性鼻炎 Swine infectious atrophic rhinitis	-	√	√	√
传染性胸膜肺炎 Porcine infectious pleuropneumonia	√	√	-	-
猪痢疾 Swine dysentery	√	√	√	√
猪水泡病 Swine vesicular disease	-	√	-	-
弓形虫病 Toxoplasmosis	-	-	-	√
钩端螺旋体病 Leptospirosis	-	-	√	-
猪繁殖与呼吸障碍综合症 Porcine reproductive and respiratory syndrome	√	-	-	-
猪流行性腹泻 Porcine epidemic diarrhea	√	-	-	-
猪巴氏杆菌病 Pasteurellosis	√	-	-	-
猪链球菌病 Swine streptococcosis	√	-	-	-
流行性乙型脑炎 Japanese encephalitis	□	-	-	-
猪沙门氏菌病 Salmonellosis	□	-	-	-
猪圆环病毒病 Porcine circovirus	□	-	-	-
猪流感 Swine influenza	□	-	-	-
猪皮肤真菌病 Swine fungal skin disease	□	-	-	-

注:√:各国 SPF 猪病原控制指标;□:新增的 SPF 猪病原控制指标<sup>[8]</sup>。

Note. √. Pathogen control indexes of SPF swine in different countries. □. The added pathogen control indexes of SPF swine<sup>[8]</sup>.

## 2 国内外 SPF 猪的病原控制现状

病原微生物控制是 SPF 猪质量控制的核心之一,各国(或地区)对 SPF 猪的病原控制各不相同(表 1)。在参考了丹麦等畜牧业发达国家 SPF 猪病原控制技术,并结合我国养猪生产的现状,起草了 GB/T 22914-2008《SPF 猪病原的控制与监测》<sup>[7]</sup>,推荐我国 SPF 猪群临床检查应没有口蹄疫、猪水泡病、猪瘟、非洲猪瘟、布鲁氏杆菌、弓形体病、猪痢疾密螺旋体病、流行性乙型脑炎、细小病毒病、猪丹毒、猪肺疫、猪链球菌病、旋毛虫病、猪囊尾蚴病、猪伪狂犬病等 15 种病原,实验室检测没有猪伪狂犬病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒、猪瘟病毒、布鲁氏杆菌、猪产毒素多杀性巴氏杆菌、猪肺炎支原体、猪胸膜肺炎放线杆菌、猪痢疾密螺旋体、猪血虱、猪疥螨等 12 种病原。十三五期间,在国家重点研发计划项目《畜禽疫病防控专用实验动物开发》的实施期间,补充了包括乙型脑炎病毒、猪圆环病毒 2 型、沙门氏菌、猪流感病毒和猪皮肤病原真菌等 5 项作为 T/CALAS 33-2017《实验动物 SPF 猪微生物学监测》的 SPF 猪病原控制指标,并更新了 SPF 猪的定义,即:经过人工培育,对其携带的微生物和寄生虫实行控制,遗传背景明确或来源清楚的用于科学研究的猪<sup>[8]</sup>。

## 3 SPF 猪的病原净化方法

SPF 猪的净化重点是进行病原微生物的净化,排除其携带的相关原核生物(细菌、放线菌、螺旋体和支原体)、真核生物(真菌)和非细胞类(病毒)以及寄生虫病原。SPF 猪的病原净化主要分为剖腹产手术法、无菌接产法、逐级净化法和胚胎移植法,在实际生产中还可使用菌(群)移植技术等手段促进 SPF 猪群的肠道健康。

### 3.1 剖腹产手术法

剖腹产手术法包括子宫切开术和子宫切除术,两种手术方式都可阻断母体病原体通过胎盘进入胎儿体内。采用子宫切开术可保存优良母猪个体,提高其繁殖利用率,但母猪术后护理难度和经费需求大幅度增加;子宫切除术无需实施术后护理,但母猪只能利用 1 次,术后无害化淘汰。可根据实际情况选择手术方式,常用于第 1 代(又称“初代”) SPF 猪群的建立。

手术获得的新生仔猪通常在隔离环境或屏障环境下饲养至断奶。根据 GB14925-2010《实验动物环境及设施》的规定,屏障环境和隔离环境严格控制了人员、物品和空气的进出,对温度、最大日温差、相对湿度、换气次数、动物笼具处气流速度、静压差、空气洁净度、沉降菌浓度、氨浓度、噪声和照度等环境技术指标作出了规定。正压下屏障环境和隔离环境可最大程度地阻断病原经空气、饮水或物品传递等途径污染舍内环境,适用于 SPF 动物的生产、实验和检疫。隔离环境对静压差、空气洁净度和沉降菌浓度这 3 项环境技术指标的规定更为严格,对隔离笼具、空气过滤设备的需求更高,程序更复杂、费用更贵。因此,隔离环境仅推荐用于哺乳期仔猪的人工饲养,以提高 SPF 仔猪的存活率。

### 3.2 无菌接产法

为最大化保存和利用优良猪种和个体,或从其他猪场或个体散户购买新生仔猪用于构建或扩大第 1 代 SPF 猪种群时可采用无菌接产法。该方法涉及新生仔猪的无菌接产、转运、消毒和人工饲养。随着实验动物运输隔离器的研制不断成熟,目前无菌接产通常采用 SPF 动物运输隔离器或保温运输箱等设备<sup>[9]</sup>进行新生仔猪的转运,有效地保障新生仔猪不受外界病原微生物的污染。此外,随着无菌动物培育设施的研制成功,亦可利用无菌运输隔离器<sup>[8]</sup>等实现新生仔猪的无菌转运。

### 3.3 逐级净化法

当母猪群体无烈性或垂直传播病原,如口蹄疫、猪水泡病、蓝耳病、伪狂犬病、细小病毒病、猪瘟等病原时,可通过优化饲养设施、加强饲养管理以及药物治疗等方法清除、部分清除或根除场内的某些特定猪病病原,建立 SPF 猪种群。该方法既能大量地保存优良母猪个体,提高仔猪存活率和生长性能,也能有效阻断外环境的各类潜在病原的威胁。

### 3.4 胚胎移植法

猪胚胎移植法主要分为非手术法、腹腔镜微创手术法和开腹手术法 3 种,其中开腹手术是应用最多的猪胚胎移植方法<sup>[10]</sup>。开腹手术胚胎移植法难度较低,易于学习,受体母猪术后也可再次用于配种或作为受体,但应注意粘连风险。在国内,戴琦<sup>[11]</sup>利用胚胎移植培育出了 SPF 五指山近交系小型猪群体,实现了对猪瘟、伪狂犬、蓝耳病、猪流感病、弓形虫、布鲁氏菌病、衣原体等病原的净化效果。Niu 等<sup>[12]</sup>通过基因编辑灭活猪内源性逆转录

病毒(PERV)聚合酶基因,通过核移植和胚胎移植手术生产出了具有灭活 PERV 的健康仔猪。由此可见,对重要的基因工程猪实施 SPF 疫病净化,不仅能降低异种生物反应器的免疫排斥影响,也防止人畜共患病和重要猪病等病原的传播,使猪这一物种成为人类异种器官移植最有希望的器官来源<sup>[13]</sup>。

### 3.5 菌(群)移植法

仔猪对其周围环境的微生物很敏感<sup>[14]</sup>,胃肠道微生物群是通过与母体及其环境接触而逐渐形成的<sup>[15-16]</sup>。因此,对外科手术获得的新生仔猪尽早接种健康的母源微生物群落来提高 SPF 仔猪肠道健康是一个值得尝试的方向。值得注意的,不少研究揭示了抗生素抗性基因(antibiotic resistance gene, ARG)随 FMT 沉积到受体动物体内并持久存在<sup>[17-19]</sup>,它们提示肠道微生物的早期接种是一种有趣的可能性。通过刺激肠道微生物群在仔猪生长发育中尽快达到理想的状态,但是还需要做更多的工作来预测应该使用哪些群落,或更加谨慎地选择供体、提高对供体来源微生物群的筛选或加工处理,防止潜在病原、ARGs 等从母体或环境中传播到幼年动物体内,影响 SPF 猪群的健康。

## 4 SPF 猪的应用

SPF 猪对饲养设施的要求低于无菌猪和悉生猪,更倾向传统饲养。因此,在生产中“SPF”这个定义更具商业价值。

### 4.1 种猪健康的维持

对种猪进行临床、病原学和血清学等检查,通过检疫和药物处理等净化措施淘汰猪瘟、伪狂犬、蓝耳病、口蹄疫等重要猪病病原阳性个体;对病原检查阴性的健康个体保留并按 SPF 猪饲养管理策略实施繁育,可有效控制病原的水平传播和垂直传播。此外,SPF 状态保障了从进口的种猪不会将国家规定排除的病原体引入本地猪种,但 SPF 的状态并不能从父母代遗传给后代,一旦 SPF 动物从高生物安全设施中转出,SPF 状态将丧失。

### 4.2 生物安全管理理念的提高

“SPF”突出了猪场生物安全的含义,即通过对病原感染、传播途径的控制,降低动物感染、动物产品和环境的污染,保证养猪生产安全,提高经济效益。生产 SPF 猪的农场通过精细化管理<sup>[2]</sup>,注重动物福利和生物安全细节,对并借助先进理论和计算机技术对繁育数据的分析,将保证 SPF 种猪的质

量。因此,推广 SPF 猪生产管理理念可规范化养猪生产环境,保护猪场免遭新发病原体入侵以及防止病原在场内不同区域间的传播,防止非洲猪瘟等烈性传染病的再次爆发和蔓延。

### 4.3 兽用疫苗和药物研发

SPF 猪在疫苗研发和生产过程中承担重要作用。利用 SPF 猪模型进行临床药理学及安全性评价实验,观察动物模型对新药的耐受程度和药代动力学,可为制定给药方案提供可靠的且重复性好的结果依据,为新药或疫苗的批准上市奠定基础。此外,由于已知的干扰病原体被排除,SPF 猪的血清是猪病检测试剂盒研发的理想阴性对照品。

### 4.4 医用猪模型

猪的心血管、泌尿生殖、皮肤、骨骼和消化等系统与人类的相似性促使在研究中更多地使用猪作为研究模型。此外,由于猩猩等灵长类动物在来源、种群规模、伦理以及经费等方面的限制,猪在越来越多的领域用于相关药品、医疗器械、化妆品等临床前动物实验研究。遗传、环境和微生物质量均得到控制的 SPF 猪作为实验动物模型可提高相关实验结果的准确性和稳定性,减少实验误差和异质性问题。

值得注意的是,猪用于生物医学研究时可能还要排除流感病毒、脑心肌炎病毒、钩端螺旋体病、丹毒、旋毛虫病等其他临床和亚临床病原,尤其是作为异种器官移植<sup>[20]</sup>的医用供体猪需要排除的病原微生物检测指标高达 42 种,涉及 13 项细菌类、3 项真菌类、9 项寄生虫类和 17 项病毒类指标(BD43/T959.2-2014)。

### 4.5 生物医药产品原材料

标准化生产的 SPF 猪可保证血清、细胞、组织、器官和其他猪源材料的质量,具有广泛的应用价值。比如,SPF 猪的猪胶原蛋白提取物适用于生产医美注射用胶原蛋白和人软骨修复产品,猪肺来源的磷脂提取物是治疗和预防早产儿呼吸窘迫综合征药物(商品名“固尔苏”)的主要成分;SPF 猪的主动脉瓣是心脏瓣膜移植手术中人工生物瓣膜的主要来源;猪骨也可用于制作人种植牙骨粉等。

## 5 结语

SPF 猪的生产条件低于无菌猪和悉生猪,关键是防止特定微生物病原的再感染。但 SPF 猪不一定没有体内寄生虫,可能会发现蛔虫、结节虫和球

虫的轻度感染,在实验室使用前可通过粪便或血液等样本的测试或诊断选择相关病原阴性 SPF 猪个体。未来制定规范化的 SPF 猪生物学特性描述标准,建立规范而准确的生物学特性数据库,不仅能为我国 SPF 猪的繁育和保种提供衡量尺度,更将能提高国产大动物实验的质量水平,为猪源性生物制品的研发和商品化利用提供基础性数据保障。

#### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] Zhuang Q, Barfod K, Wachmann H, et al. Risk factors for *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 infection in Danish genetic specific pathogen-free pig herds [J]. *Vet Rec*, 2007, 160(8): 258-262.
- [ 2 ] Filippitzi ME, Brinch Kruse A, Postma M, et al. Review of transmission routes of 24 infectious diseases preventable by biosecurity measures and comparison of the implementation of these measures in pig herds in six European countries [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(2): 381-398.
- [ 3 ] Kruse AB, Nielsen LR, Alban L. Herd typologies based on multivariate analysis of biosecurity, productivity, antimicrobial and vaccine use data from Danish sow herds [J]. *Prev Vet Med*, 2020, 181: 104487.
- [ 4 ] 王爱德, 甘世祥, 魏泓, 等. 丹麦 Gottingen 小型猪科学考察报告 [J]. *实验动物科学与管理*, 2002, 19(1): 51-52.  
Wang AD, Gan SX, Wei H, et al. An autopic report on Danish Gottingen minipigs [J]. *Lab Anim Sci Adm*, 2002, 19(1): 51-52.
- [ 5 ] Kolstoe EM, Iversen T, Østensvik Ø, et al. Specific pathogen-free pig herds also free from *Campylobacter*? [J]. *Zoonoses Public Health*, 2015, 62(2): 125-130.
- [ 6 ] Safron J, Gonder JC. The SPF pig in research [J]. *ILAR J*, 1997, 38(1): 28-31.
- [ 7 ] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. SPF 猪病原的控制与监测: GB/T 22914-2008 [S]. 2008.  
General administration of quality supervision, inspection and quarantine of the People's Republic of China, Standardization administration. Control and monitoring of SPF swine pathogens; GB/T 22914-2008 [S]. 2008.
- [ 8 ] 中国实验动物学会. 实验动物 SPF 猪微生物学监测: T/CALAS 33-2017 [S]. 2017.  
Chinese association for laboratory animal sciences. Laboratory animal-SPF swine-microbiological surveillance; T/CALAS 33-2017 [S]. 2017.
- [ 9 ] 孙静, 杜蕾, 丁玉春, 等. 无菌猪的制备与微生物质量控制 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(6): 699-702.
- Sun J, Du L, Ding YC, et al. Breeding and microbiological quality control of germ-free pig [J]. *Acta Lab Aim Sci Sin*, 2017, 25(6): 699-702.
- [ 10 ] 吴亚林, 李继良, 周伟良, 等. 猪体细胞克隆胚胎移植技术要点分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(6): 1126-1132.  
Wu YL, Li JL, Zhou WL, et al. Analysis on the technical key points of porcine (*Sus scrofa*) somatic cell cloning embryo transfer [J]. *J Agr Biotech*, 2019, 27(6): 1126-1132.
- [ 11 ] 戴琦. 利用胚胎移植及相关技术培育实验用 SPF 小型猪 [D]. 西安: 西北农林科技大学; 2008.  
Dai Q. Study on cultivation of SPF mini-pig for labory use by embryo transfer and relative technology [D]. Xi'an: Northwest A & F University; 2008.
- [ 12 ] Niu D, Wei HJ, Lin L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2017, 357(6357): 1303-1307.
- [ 13 ] Furlow B. Living pig bioreactors can repair damaged donor lungs [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(9): e72.
- [ 14 ] Nowland TL, Kirkwood RN, Torok VA, et al. Characterisation of early microbial colonisers within the spiral colon of pre- and post-natal piglets [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(4): 312.
- [ 15 ] Thompson CL, Wang B, Holmes AJ. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs [J]. *ISME J*, 2008, 2(7): 739-748.
- [ 16 ] Korpela K, Helve O, Kolho KL, et al. Maternal fecal microbiota transplantation in cesarean-born infants rapidly restores normal gut microbial development: a proof-of-concept study [J]. *Cell*, 2020, 183(2): 324-334.
- [ 17 ] Sun J, Chen Y, Ding Y, et al. Deposition of resistant bacteria and resistome through FMT in germ-free piglets [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2021, 73(2): 187-196.
- [ 18 ] Birkegård AC, Halasa T, Folkesson A, et al. Persistence of antimicrobial resistance genes from sows to finisher pigs [J]. *Prev Vet Med*, 2018, 149: 10-14.
- [ 19 ] Sun J, Liao XP, D'Souza AW, et al. Environmental remodeling of human gut microbiota and antibiotic resistome in livestock farms [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1427.
- [ 20 ] Reichart B, Längin M, Radan J, et al. Pig-to-non-human primate heart transplantation: The final step toward clinical xenotransplantation? [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2020, 39(8): 751-757.

[收稿日期] 2022-01-19

李凯欣,陈欢,刘方邻,等. 啮齿类动物烟碱依赖相关的行为学评价方法 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 830-838.  
Li KX, Chen H, Liu FL, et al. Nicotine addiction models and evaluation of animal behavior [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 830-838.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.013

# 啮齿类动物烟碱依赖相关的行为学评价方法

李凯欣<sup>1,2</sup>, 陈欢<sup>1</sup>, 刘方邻<sup>2,3</sup>, 刘勇<sup>3</sup>, 侯宏卫<sup>1\*</sup>, 胡清源<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 国家烟草质量监督检验中心, 烟草生物学效应重点实验室, 转化神经生物学联合实验室, 郑州 450001; 2. 中国科学技术大学, 合肥 230026; 3. 中国科学院合肥物质科学研究院, 合肥 230031)

**【摘要】** 吸烟人口众多对社会的影响广泛, 其中烟碱是烟气中最为关注的药理学成分之一。长期摄入烟碱会导致烟碱依赖行为, 烟碱依赖会影响依赖者的大脑高级功能, 可能涉及焦虑、学习记忆障碍以及决策能力异常等。为方便研究烟碱依赖的分子机制, 目前普遍通过构建啮齿类烟碱依赖动物模型, 以更好的研究其各项生理变化。本综述对已有的动物行为学评价实验在烟碱依赖动物模型中的应用进行总结及评价, 以期研究者构建啮齿类动物烟碱依赖评价模型提供可靠的参考依据。

**【关键词】** 烟碱依赖; 成瘾动物模型; 动物行为学; 啮齿类动物; 评价方法

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0830-09

## Nicotine addiction models and evaluation of animal behavior

LI Kaixin<sup>1,2</sup>, CHEN Huan<sup>1</sup>, LIU Fanglin<sup>2,3</sup>, LIU Yong<sup>3</sup>, HOU Hongwei<sup>1\*</sup>, HU Qingyuan<sup>1,2,3\*</sup>

(1. China Tobacco Quality Supervision and Test Center, Key Laboratory of Tobacco Biological Effects, Joint Laboratory of Translational Neurobiology, Zhengzhou 450001, China. 2. University of Science and Technology of China, Hefei 230026. 3. Hefei Institute of Physical Sciences, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

Corresponding author: HOU Hongwei. E-mail: qsfctc@163.com; HU Qingyuan. E-mail: huqy1965@163.com

**【Abstract】** The large number of smokers has had a broad effect on society. Nicotine is one of the most widely concerning components of cigarette smoke. Long-term intake of nicotine can lead to nicotine dependence that affects higher brain functions, which may involve anxiety, learning and memory impairments, and abnormal decision-making. To facilitate analyzing the molecular mechanisms of nicotine dependence, it is common to establish rodent nicotine dependence models to better understand the physiological changes. This review summarizes and evaluates studies of the behavior in nicotine-dependent animal models to provide a reliable reference for researchers to establish rodent nicotine-dependent models for evaluation.

**【Keywords】** nicotine dependence; animal addiction models; animal behavior; rodents; evaluation method

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

药物依赖涉及社会科学、心理学、药理学、精神病学、遗传学、行为学等多个学科<sup>[1]</sup>。烟碱依赖 (nicotine dependence, ND) 是药物依赖中影响最广泛

的一类,《2020年中国吸烟危害健康报告》显示,全世界大约有10亿烟民,2018年中国15岁以上吸烟率为26.6%,人数超3亿<sup>[2]</sup>。烟气成分非常复

**【基金项目】** 省部级重点科技项目(110202101018 (XX-04), 110202102014)。

Funded by Provincial and Ministerial Key Science and Technology Projects(110202101018 (XX-04), 110202102014)。

**【作者简介】** 李凯欣(1998—), 女, 硕士, 研究方向: 烟碱成瘾行为及相关基因的研究。Email: likx@tbscience.com

**【通信作者】** 胡清源, 男, 博士, 博士生导师, 研究方向: 烟草化学及分析化学的科研与烟草质量监督工作。Email: huqy1965@163.com;

侯宏卫, 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 烟草化学、吸烟与健康 and 生物标志物的研究。Email: qsfctc@163.com。

\* 共同通信作者

杂,已经发现了 7000 多种物质,其产生的神经生物效应目前主要利用烟碱或烟气冷凝物等进行动物和细胞实验来揭示<sup>[3]</sup>。烟草具有双重效应,积极强化作用主要发生在依赖的开始阶段,包括轻度欣快感、记忆力增强和情绪放松,而吸烟的消极影响则由戒断引起,包括情绪低落、焦虑和记忆受损,两者结合最终导致烟草使用和依赖<sup>[4]</sup>。

建立具有相应表型特征动物模型是分子机制研究的基础。相较于其他模式生物,啮齿类动物具有体型较小、性情温顺、易于饲养、繁殖周期短等优点,且结构、功能、代谢及依赖特点也与人类高度类似,其中烟碱依赖模型的啮齿类动物以小鼠和大鼠为主。通过模拟烟碱依赖环境构建动物模型,有助于研究脑部组成结构的改变与行为变化的关系和发生机制,包括相关脑区的激活、脑部神经递质水平的变化、脑部高级功能的改变等。本文针对各类行为学测试在 ND 研究中的应用及优缺点进行了详细分析,为 ND 动物模型的成瘾机制、脑部功能损伤及行为障碍研究提供有益的参考。

## 1 烟碱依赖行为的神经生物学基础

ND 的形成产生了心理障碍和行为障碍双重影响。而在烟碱成瘾的分子机制的研究中以人为研究对象多有不便,因此动物模型凭借其饲养简单、繁殖速度快与人类同源性高、可训练等优势成为了较好可替代的研究对象,在烟碱依赖的研究中发挥着重要作用。在之前的研究中基于多种 ND 动物模型的建立,通过微透析、病毒示踪、光遗传等技术发现烟碱可以引起中脑腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA)、前额叶皮层 (prefrontal cortex, PFC)、海马 (hippocampus, HP) 等与学习记忆相关脑区神经递质的变化<sup>[5-6]</sup>。主要涉及 3 大神经系统:多巴胺能系统、5-羟色胺系统、谷氨酸系统,其投射通路如图 1 所示<sup>[7]</sup>。烟碱作用于烟碱乙酰胆碱受体 (nAChRs),引起脑中相关神经递质的变化,激活细胞内信号传导通路,导致神经元的形态结构及脑部高级功能改变,最终导致 ND 形成<sup>[8]</sup>。

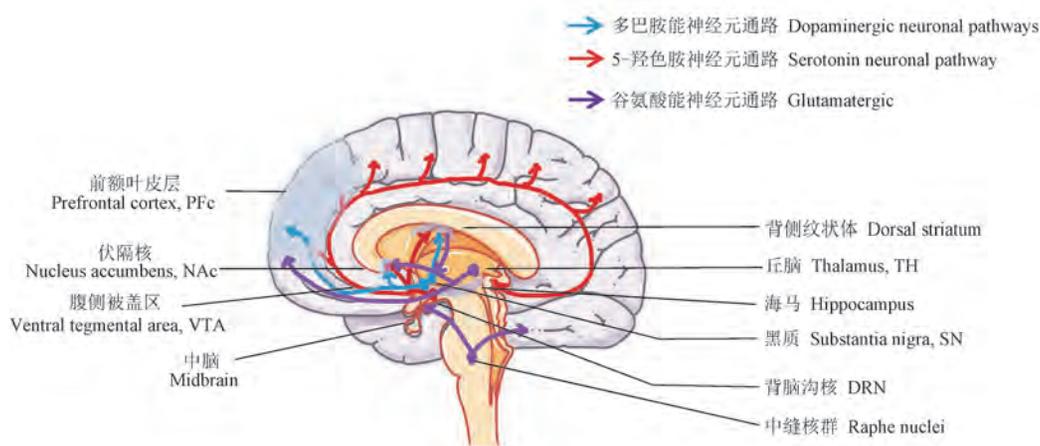


图 1 3 大神经系统在大脑相关脑区的部分投射

Figure 1 Three major nervous systems project to related areas of the brain

### 1.1 烟碱依赖的奖赏效应

ND 引起的奖赏效应主要由多巴胺能系统中的神经递质 DA 介导,其中 DA 主要由中脑基底核的黑质 (substantia nigra, SN) 和 VTA 区产生。烟碱摄入后通过引起 NAc 区 DA 的大量释放使得机体产生愉悦感,是引起依赖性的主要原因<sup>[9]</sup>。多巴胺引起奖赏效应的通路称为中脑边缘通路 (mesolimbic pathway) 或奖赏通路 (reward way)<sup>[10]</sup>。此外,从黑质投射到纹状体的黑质-纹状体通路,也与 ND 行为有关<sup>[11]</sup>。因此烟碱导致多巴胺能系统中的 DA 释

放异常是形成 ND 生理上的主要诱因<sup>[12]</sup>。心理上主要跟强化作用有关,会逐渐增加产生奖励感觉的烟碱剂量,即精神依赖行为,是引发复吸行为的原因<sup>[13-14]</sup>。大鼠 ND 动物模型微透析实验发现,急性给予烟碱注射或慢性长期烟碱暴露均显著增加 NAc 中 DA 释放水平,表明 DA 在 ND 过程中起到重要作用<sup>[15]</sup>。烟碱的奖励作用类似于多巴胺受体的激动剂,可以激活 D1 受体来促进 ND<sup>[16]</sup>。在啮齿类动物中烟碱引起的奖赏效应主要表现为对烟碱的自主性使用偏好,也是 ND 行为的一个核心特征<sup>[17-18]</sup>。

## 1.2 烟碱依赖的戒断效应

烟碱戒断后引起的戒断效应主要与 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 神经递质有关, 在解剖学上 5-羟色胺能神经元起源于脑中缝核群, 通常与情感性疾病、自杀、冲动和药物滥用有关<sup>[19]</sup>。该系统的神经递质为 5-羟色胺, 是一种单胺类的抑制性神经递质, 其在维持突触的可塑性、增强学习记忆、情绪等方面发挥了重要作用<sup>[8]</sup>。5-HT 还可以通过调节多巴胺神经元上的 5-HT 受体来调节多巴胺释放<sup>[20]</sup>, NAc 的多巴胺神经元上的 5-HT<sub>1A</sub> 受体可以促进 DA 释放<sup>[21]</sup>, 而其戒断效应的产生主要是纹状体和中脑的多巴胺能神经元上的 5-HT<sub>2A</sub> 和 5-HT<sub>2C</sub> 受体可以抑制 DA 释放, 从而增加焦虑症状<sup>[22-23]</sup>。研究表明慢性烟碱暴露可以引起大脑 5-HT 水平升高, 可能是易成瘾和复吸的另一个风险因素<sup>[24]</sup>, 戒断后其水平下降, 提高 5-HT 水平有助于减弱复吸等 ND 行为<sup>[8]</sup>, 这也解释了戒烟后会引起焦虑抑郁症状与 5-HT 神经元活动下降有关<sup>[25]</sup>。ND 导致的情绪不稳定、亢奋不安等现象都与 5-HT 受体在引起情绪行为异常有关<sup>[26]</sup>, 该效应在啮齿类动物中主要表现为过度梳理、咀嚼、震颤、湿狗抖动 (wet-dog shakes) 和牙齿打颤, 可通过这些行为特征来评价动物模型产生地戒断行为<sup>[27]</sup>。

## 1.3 烟碱依赖行为的形成

烟碱依赖行为的形成还依赖于谷氨酸能系统, 其主要参与大脑突触可塑性、认知、学习和记忆以及发育过程<sup>[23]</sup>, 其中谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 是最重要的兴奋性神经递质, 50% 的 Glu 参与突触传递, 离子型 Glu 受体参与学习、记忆、药物依赖及神经退行性疾病等多种病理生理过程<sup>[28]</sup>。啮齿类动物模型在评价其烟碱成瘾后学习和记忆的能力上也有很好的应用。烟碱进入大脑后可以作用到 PFC 通过引起 Glu 释放兴奋多巴胺神经元, 产生奖赏效应<sup>[5]</sup>。另一方面, 烟碱可以作用到兴奋性 Glu 神经元, 形成长时程增强 (long-term potentiation, LTP), 大脑由神经元细胞和神经胶质细胞构成并互相连接, 烟碱通过谷氨酸能系统增强这些连接, 引起大脑的结构改变。这也是烟碱依赖行为的另一大神经基础。

## 1.4 烟碱依赖与其他神经递质的关系

烟碱在脑中还与其它神经递质系统有相互作用。研究发现, 对啮齿类动物模型给予急性或慢性烟碱处理后, 大鼠中脑的去甲肾上腺素

(norepinephrine, NE) 释放都会增多<sup>[29]</sup>。烟碱通过两个途径来调控 NE 的分泌, 一是直接作用到蓝斑末梢的 nAChRs; 二是间接作用通过 GABA 来调节 NE 的分泌<sup>[5]</sup>。另外, 烟碱通过代谢性 GABAB 受体 (ABABRs) 介导缓慢抑制, 调节整个大脑的突触可塑性<sup>[30]</sup>。GABA 受体激动剂会降低烟碱诱导的 NE 释放增加, 阻碍条件位置偏爱 (conditioned place preference, CPP) 的形成和烟碱的自给药行为<sup>[31]</sup>。内源性大麻受体也与烟碱的成瘾有关<sup>[32]</sup>。内源大麻受体拮抗剂会减弱中脑边缘系统多巴胺的活动, 从而减弱烟碱奖赏效应<sup>[33]</sup>。总的来说, 多种神经递质均参与调节了 ND 行为的形成。

## 2 烟碱依赖模型行为学评价实验

根据烟碱成瘾的神经生物学基础, 大脑结构和功能的异常可以总结为精神依赖性、躯体依赖性以及耐药性 3 个特征。精神依赖性主要体现在初始阶段, 即动物情绪愉悦、自主活动增加、记忆力增强等促使动物产生心理上渴求。躯体依赖性和耐药性主要表现为动物的精神活动刺激反应增强, 停止烟碱暴露会导致烟碱戒断症状, 如躯体戒断体征、焦虑和抑郁样行为、学习和记忆缺陷、烦躁不安等。ND 动物模型的行为学测试包括行为偏好、学习与记忆、认知和决策功能、情绪、运动协调能力等 5 大方面, 通过这些实验有助于建立及评估 ND 模型 (见图 2)。

### 2.1 行为偏好训练实验

行为偏好训练实验主要通过特定的仪器及模拟成瘾过程的训练方式给予动物致瘾性药物或对照物, 使动物将致瘾性物质和环境建立联系, 最终产生偏好。利用啮齿类动物建立与人类一致的 ND 行为, 从而进一步研究该动物模型的依赖程度及分子机制。行为偏好训练主要分为自身给药模型、自给光模型、条件性位置偏爱模型、行为敏化模型等<sup>[34]</sup>。啮齿动物对烟碱的依赖可以通过反复注射烟碱、通过渗透微泵长期输注烟碱、口服烟碱、卷烟烟气暴露、烟碱雾化暴露和含烟碱电子烟气溶胶暴露等不同的给药方式来获得。行为偏好训练实验的评价标准主要从可靠性、测试效度、实用性和敏感性 4 个方面来进行评估。

#### 2.1.1 自给药实验

自给药实验 (self-administration test, SA) 是通过操作性条件反射测试箱 (operant conditioning test



图 2 啮齿类动物烟碱依赖模型行为学评价

Figure 2 Behavioral evaluation of nicotine dependence models in rodents

box) 对实验动物进行自我给药训练,其最显著的特征是其获取烟碱的方式是完全自主行为(压杆或者鼻触)<sup>[35]</sup>。大小鼠烟碱的静脉给药浓度范围为 0.03 ~ 0.1 mL/kg,过低不足以形成药物依赖,过高会导致烟碱厌恶<sup>[36]</sup>。训练的程序设定有固定比率和累进比率两种,比较动物在每个阶段的压杆或鼻触次数在不同程序中的变化<sup>[37]</sup>,成瘾后的戒断阶段即断点可以评价其成瘾性的高低及动物觅药渴求程度的高低<sup>[38]</sup>。静脉自给药模型中实验动物能够很好的模拟用药者主动觅药过程和用药行为,可以精准掌握药物的摄入剂量,是研究药物成瘾的经典模型,但缺点是动物手术难度高、操作难度大,失败率较高<sup>[39-40]</sup>。目前已经开发出了更能模拟烟气吸入方式的烟碱自给药模型,如新型气溶胶吸入式的烟碱自给药模型<sup>[41]</sup>,通过动物自主鼻触释放含有不同浓度烟碱的电子烟气溶胶(20, 40, 80 mg/mL)<sup>[42]</sup>。用于评价含烟碱或烟碱盐等不同类型的烟碱产品,气溶胶自给药模型还可用于评价卷烟烟气和电子烟气溶胶中其他复杂的化学成分和添加剂等对烟碱依赖的增强特性,但气溶胶释放稳定性

的精准控制和动物实际摄入药物剂量的准确评价仍是技术难点。

自身给药训练能够准确统计用药次数。在结构效度上与人类成瘾机制类似,充分反映了动物的主观要求,可信度高,但是也有局限性,不能很好的反映无药可用时的强烈渴求状态。

### 2.1.2 条件位置偏爱实验

条件位置偏爱实验(conditional position preference, CPP)是根据巴普洛夫条件反射原理建立起来的动物模型,主要通过给予动物奖赏或厌恶刺激或者对照溶剂,使得动物对注射的物和环境之间建立联系。其通常由 3 个隔间构成,两个隔间的环境必须具有差异性,在空间配置、颜色、地板甚至其他感觉上都要形成对比,中间的隔间用于适应环境。烟碱训练时选择在白箱注射烟碱,黑箱注射生理盐水,多次操作后可以让动物对环境和烟碱形成条件性匹配<sup>[43]</sup>。目前已成功建立的烟碱 CPP 模型,在 0.1 ~ 1.4 mg/kg 的剂量范围内均可诱发大鼠 CPP<sup>[44]</sup>。此外利用 CPP 训练给予奖励性刺激来研究奖赏系统的相关神经通路也是研究成瘾的重

要手段<sup>[44]</sup>。啮齿类动物可以通过 CPP 训练来构建 ND 模型后进而评价其对学习记忆的影响<sup>[45]</sup>以及对性别差异造成的偏好差异进行评价<sup>[46-47]</sup>。

CPP 动物模型的构建原理依托于低级神经系统支配的低级反射活动,训练更为简易且廉价,实验周期也较短,因此其在成瘾行为模型构建中也有十分广泛的应用,比较适用于数据量较大的实验,且数据较离散。

### 2.1.3 行为敏化训练

行为敏化训练主要基于“神经激励敏化”理论,即对成瘾药物从“喜欢”到“需要”的心理活动的一种转变<sup>[8]</sup>,行为敏化的建立过程包括 3 个阶段,即形成期、转换期和表达激发期。形成期每天对动物进行烟碱注射,持续 5 ~ 7 d;转换期停止给药,戒断 4 ~ 7 d,在这一期间动物行为转变为敏化;表达激发期动物接受烟碱注射后可激发动物行为敏化,其自发性活动明显的增加。通过 3 个时期的训练,动物从对烟碱的高活动性转变为行为敏化。动物行为敏化训练后会产生运动行为增加等成瘾性运动效应<sup>[48]</sup>,烟碱通过直接或间接方式引起脑内 DA 水平升高后,直接表现是动物活动性增加<sup>[49]</sup>。啮齿类动物通常表现为在相对狭窄的空间内运动行为增加和反复行为的增加(如咀嚼、摇头和挠痒),实验中可以进一步用运动协调能力实验来评价成瘾性高低。

目前成瘾致敏理论已经得到广泛认同,具有良好的理论和结构基础,并且操作简单易行,实验周期较短,评价方法直观,是一种良好的 ND 以及抗成瘾药效评价。

## 2.2 决策与认知实验

长期烟碱暴露会导致大脑结构发生变化,影响与决策有关的神经结构和大脑功能,可以利用风险决策实验来检测动物的决策能力受损程度。啮齿类动物决策和认知评价实验包括大鼠博弈任务(rat gambling task, RGT)、概率折扣任务(probability discounting task, PDT)、延迟奖励任务以及大鼠气球模拟风险决策任务(rat balloon analog risk task, R-BART)等<sup>[50]</sup>。良好决策行为的基础包括了奖赏、情绪、学习记忆、运动执行等多个神经系统<sup>[8]</sup>。大脑功能损伤可能导致认知障碍、行为异常等现象,“从认知改善到复发预防”已经被作为成瘾障碍辅助治疗的思路<sup>[51]</sup>。神经递质如 DA、5-HT 等也参与调节风险决策及多种认知功能<sup>[52]</sup>。通过 PDT 实验发现

研究发现,成瘾会导致眶额皮层和额叶皮质受损,进而影响决策。决策认知测试可以评价大小鼠烟碱偏好训练中的决策行为及认知水平<sup>[53]</sup>,延迟奖励任务中的冲动选择可以预测烟碱戒断后的再次使用情况<sup>[54]</sup>。

## 2.3 动物情绪测试实验

由戒烟导致的身体、情感和认知症状组成的戒断综合征,是复吸的危险因素<sup>[55]</sup>。这些戒断症状在停止烟碱暴露后的第 1 周内最为明显,其中焦虑和抑郁样的行为,以及学习和记忆缺陷甚至会持续数月<sup>[56]</sup>。啮齿类动物的情感症状比躯体症状更微妙,因此评估需要一系列行为分析来揭示与戒断相关的情感变化(单一测试不行)。情绪测试主要包括高架迷宫(elevated plus maze, EPM)、零迷宫(zero maze)或 O 型迷宫(O Maze)、蔗糖偏好测试(sucrose preference test, SPT)、悬尾测试(tail suspension test, TST)、强迫游泳测试(forced swim test, FST)、颅内自我刺激(intracranial self-stimulation, ICSS)等<sup>[57]</sup>,通过 ND 动物的情绪状态可以反映戒断症状的严重程度。EPM 用来测试动物烟碱暴露后的焦虑情况<sup>[58]</sup>,EPM 容易测试和记录,不需要预训练,但依赖于啮齿动物的探索性<sup>[59]</sup>。小鼠在 O 迷宫开放臂探索的时间减少反映了其在摄入烟碱后的焦虑行为<sup>[60]</sup>。SPT 和 FST 用于烟碱戒断期间动物快感缺乏和抑郁的测试<sup>[61-62]</sup>,小鼠在烟碱戒断过程中,蔗糖偏好程度下降<sup>[63]</sup>。FST 测试表明烟碱戒断模型中其绝望行为增加表现为不运动,为了排除运动性能不足,可以补充耐力游泳测试<sup>[62]</sup>。快感缺乏是戒断的症状之一,ICSS 可用于评估戒断过程中的快感缺乏<sup>[64]</sup>,也作为评估烟碱暴露和急性、慢性戒断烟碱给药的方法<sup>[65]</sup>。

## 2.4 学习记忆能力实验

大脑中  $\alpha 7$  和  $\alpha 4\beta 2$  的 nAChRs 在与学习和记忆至关重要的脑区如海马和大脑皮层中大量表达<sup>[66]</sup>,小鼠接触电子烟气溶胶或戒烟后,其戒断症状如学习和记忆缺陷会从第 1 天持续到第 90 天<sup>[67]</sup>。烟碱长期作用于 nAChRs 会导致其脱敏,对动物的学习和记忆能力有一定的影响。迷宫类实验是研究啮齿类动物学习、记忆和空间定向以及认知能力常用的实验仪器,主要包括 T 迷宫、Y 迷宫、水迷宫、八壁迷宫等类型<sup>[68]</sup>,在评估 ND 动物模型的认知下降、海马结构损伤和烟碱对空间记忆的影响时常使用此迷宫进行测试,已发现烟碱暴露模型中雄性小鼠

的注意力和工作记忆有显著缺陷<sup>[69]</sup>。运用八臂迷宫评估发现小鼠烟碱暴露后存在空间记忆和参考记忆缺陷<sup>[70]</sup>。此外还可以采用不同的学习记忆方式,如改进的高架迷宫测试、情境恐惧条件反射测试、被动回避测试和物体识别测试评价 ND 及戒断过程中的学习记忆能力。

### 2.5 运动协调能力实验

低剂量的烟碱会增加小鼠和大鼠的运动活性并引起运动敏化。通过对啮齿类动物进行感觉测试、运动测试、反射测试和梁平衡测试,来评估其神经缺陷和神经损伤的级别<sup>[71]</sup>。其评价测试包括:旷场实验(open-field test, OFT)、转棒测试(rotarod test, RRT)、横梁行走、握力测试和网格行走测试(grid walk test, GWT)等。OFT 用来评价实验动物在空阔的环境中的各种行为发生情况<sup>[72]</sup>,通过记录分析发现烟碱戒断后动物存在颤抖、摇晃、跳跃、后退、点头、咀嚼、站立、抓挠、梳理、打转、挖洞、腹部收缩、舔舐等状态的异常<sup>[56]</sup>。RRT 和横梁行走可以测量运动协调和平衡,用于测试摄入烟碱形成依赖

后对运动协调可能产生的副作用,评估其感觉运动神经功能缺损<sup>[73]</sup>。通过横梁行走测试能够检测 ND 带来的精细运动缺陷<sup>[73]</sup>。抓力测试评价了烟碱对动物肢体肌肉的影响,网格行走测试主要可以对运动异常和行为缺陷进行评估<sup>[74]</sup>;这些测试大多数都需要自动化设备和软件来进行视频分析。

### 2.6 实验数据采集及分析方法

行为学实验需要对指标进行客观判断,观察过程中不能影响动物的正常活动,尽量保证实验结果的正确性。目前对于动物行为学的测试可以借助仪器设备进行数据采集,包括数据信息、视频信息、声音信息等<sup>[75]</sup>(见图 3)。图像处理法能够对动物行为进行更灵活、精细、全面的测量,目前已成为最受欢迎的行为识别技术<sup>[76]</sup>。Peleh 等<sup>[77]</sup>发明一种跟踪和分析工具,用于小鼠组的行为观察。现已开发了多种软件分析系统及算法设计,基本流程如下图所示,可以在线对运动轨迹、划分区域内啮齿类动物各种行为特征进行分析,生成运动轨迹热图和各类图表,提高动物行为学实验的准确性和实验效率。

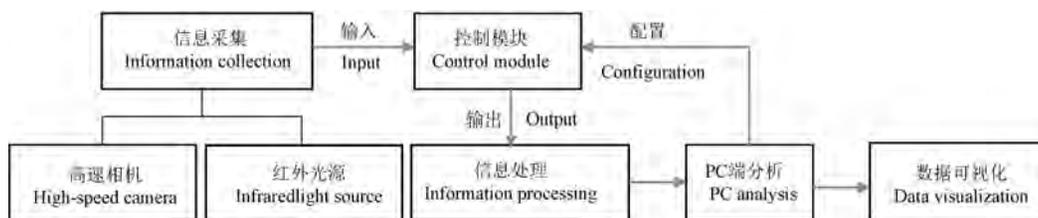


图 3 实验数据采集及分析流程

Figure 3 Experimental data acquisition and analysis process

## 3 小结

烟碱成瘾机制非常复杂,如何评价动物模型的依赖程度高低及其戒断症状是值得深入探讨的问题。开展 ND 的形成、维持和复吸等相关机制研究,首要挑战是开发具有更高更有效性的依赖和戒断的动物模型及行为学评价模型。通过多种暴露方法建立 ND 模型及烟碱戒断动物模型,可以从成瘾程度的高低、戒断症状的轻重、药物治疗的效果等多个方面进行评价。

在行为学测试中,除检测方法、技术参数外,还有很多因素会对实验结果产生影响,应得到足够的重视。首先给药方式的选择上应更接近于烟草产品的实际使用情况。其次应不断开发更完善的测试方法及行为学自动化记录分析仪器设备,以减少外界影响,提升数据采集分析的客观性和准确性。另外现有研究大部分只使用成年雄性啮齿类动物

来评估烟碱戒断及药物治疗的影响。为了提高各种 ND 模型的预测效率,可以开发更有效的动物依赖和戒断模型研究 ND 及戒断后的症状。此外探究 ND 与性别和年龄的差异将对人类 ND 的治疗有更大的意义,可能会促进新的药物疗法的发展,减轻 ND 及戒断的症状。将有望全面揭示相关脑区和神经环路,神经递质等分子机制。

### 参 考 文 献(References)

- [1] Hyman SE. Addiction; a disease of learning and memory [J]. Am J Psychiatry, 2005, 162(8): 1414-1422.
- [2] 王辰,肖丹,池慧.《中国吸烟危害健康报告 2020》概要[M].北京:人民卫生出版社;2021.  
Wang C, Xiao D, Chi H. Summary of China Smoking Hazards Health Report 2020 [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2021.
- [3] 耿召良,张婕,葛永辉,等.烤烟主流烟气内源有害成分与烟叶化学成分相关性[J].应用生态学报,2015,26(5): 1447-1453.

- Geng ZL, Zhang J, Ge YH, et al. Correlation between endogenous harmful components in mainstream cigarette smoke and chemical constituents in tobacco leaves [J]. *Chin J Applied Ecol*, 2015, 26(5): 1447-1453.
- [ 4 ] Manning V, Verdejo-Garcia A, Lubman DI. Neurocognitive impairment in addiction and opportunities for intervention [J]. *Curr Opin Behav Sci*, 2017, 13: 40-45.
- [ 5 ] 胡赢凡. 尼古丁依赖脑结构变化的磁共振成像研究 [D]. 武汉: 中国科学院大学(中国科学院精密测量科学与技术创新研究院);2021.
- Hu YF. A magnetic resonance imaging study of brain structural changes in nicotine dependence [D]. Wuhan: Innovation Academy for Precision Measurement Science and Technology; Chinese Academy of Sciences; 2021.
- [ 6 ] Schultz W. Responses of midbrain dopamine neurons to behavioral trigger stimuli in the monkey [J]. *J Neurophysiol*, 1986, 56(5): 1439-1461.
- [ 7 ] Ikemoto S, Qin M, Liu ZH. Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(3): 723-730.
- [ 8 ] 韩龙. 尼古丁导致决策能力异常的神经机制探讨 [D]. 合肥: 中国科学技术大学; 2018.
- Han L. The neural mechanism of nicotine-induced abnormality in decision-making [D]. Hefei: University of Science and Technology of China; 2018.
- [ 9 ] Cooper S, Robison AJ, Mazei-Robison MS. Reward circuitry in addiction [J]. *Neurotherapeutics*, 2017, 14(3): 687-697.
- [10] Lüscher C. The emergence of a circuit model for addiction [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2016, 39: 257-276.
- [11] Nutt DJ, Lingford-Hughes A, Erritzoe D, et al. The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2015, 16(5): 305-312.
- [12] Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, et al. Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(1): 31-59.
- [13] Subramaniyan M, Dani JA. Dopaminergic and cholinergic learning mechanisms in nicotine addiction [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1349(1): 46-63.
- [14] Gipson CD, Reissner KJ, Kupchik YM, et al. Reinstatement of nicotine seeking is mediated by glutamatergic plasticity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(22): 9124-9129.
- [15] Rahman S, Zhang J, Corrigan WA. Effects of acute and chronic nicotine on somatodendritic dopamine release of the rat ventral tegmental area; *in vivo* microdialysis study [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 348(2): 61-64.
- [16] Spina L, Fenu S, Longoni R, et al. Nicotine-conditioned single-trial place preference: selective role of nucleus accumbens shell dopamine D<sub>1</sub> receptors in acquisition [J]. *Psychopharmacology*, 2006, 184(3): 447-455.
- [17] Solinas M, Belujon P, Fernagut PO, et al. Dopamine and addiction: what have we learned from 40 years of research [J]. *J Neural Transm*, 2019, 126(4): 481-516.
- [18] Baik JH. Dopamine signaling in reward-related behaviors [J]. *Front Neural Circuits*, 2013, 7: 152.
- [19] Cools R, Roberts AC, Robbins TW. Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes [J]. *Trends Cogn Sci*, 2008, 12(1): 31-40.
- [20] Yan QS. Activation of 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors within the nucleus accumbens increases local dopaminergic transmission [J]. *Brain Res Bull*, 2000, 51(1): 75-81.
- [21] van den Heuvel Leigh L. Stahl's essential psychopharmacology: Neuroscientific basis and practical applications (4th edition) [J]. *J Child Adolesc Ment Health*, 2014, 26(2): 157-158.
- [22] Kaswan NK, Mohammed Izham N, Tengku Mohamad T, et al. Cardamonin modulates neuropathic pain through the possible involvement of serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptor pathway in CCI-induced neuropathic pain mice model [J]. *Molecules*, 2021, 26(12): 3677.
- [23] Popescu A, Marian M, Drăgoi AM, et al. Understanding the genetics and neurobiological pathways behind addiction (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(5): 544.
- [24] Balasubramani PP, Chakravarthy VS, Ravindran B, et al. A network model of basal Ganglia for understanding the roles of dopamine and serotonin in reward-punishment-risk based decision making [J]. *Front Comput Neurosci*, 2015, 9: 76.
- [25] Müller CP, Homberg JR. The role of serotonin in drug use and addiction [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 277: 146-192.
- [26] Maria Alexandra Stanescu A, Totan A, Mircescu D, et al. Assessment of suicidal behavior in dermatology (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(1): 73-77.
- [27] Balfour DJK, Munafò MR. The Neuropharmacology of Nicotine Dependence [M]. Switzerland: Springer International Publishing; 2015.
- [28] Grillner P, Svensson TH. Nicotine-induced excitation of midbrain dopamine neurons *in vitro* involves ionotropic glutamate receptor activation [J]. *Synapse*, 2000, 38(1): 1-9.
- [29] Yuen EY, Wei J, Liu W, et al. Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex [J]. *Neuron*, 2012, 73(5): 962-977.
- [30] Li SP, Park MS, Kim JH, et al. Chronic nicotine and smoke treatment modulate dopaminergic activities in ventral tegmental area and nucleus accumbens and the  $\gamma$ -aminobutyric acid type B receptor expression of the rat prefrontal cortex [J]. *J Neurosci Res*, 2004, 78(6): 868-879.
- [31] Li X, Slesinger PA. GABAB receptors and drug addiction: psychostimulants and other drugs of abuse [M]. Behavioral Neurobiology of GABAB Receptor Function. Cham: Springer International Publishing; 2020.
- [32] Liu Q, Yu J, Li X, et al. Cannabinoid receptor GPR55 activation blocks nicotine use disorder by regulation of AMPAR phosphorylation [J]. *Psychopharmacology*, 2021, 238(11): 3335-3346.

- [33] Fang Q, Li FQ, Li YQ, et al. Cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant disrupts nicotine reward-associated memory in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2011, 99 (4): 738-742.
- [34] Wei Z, Zhang X. Similarities and differences in diagnostic criterion [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1010: 105-132.
- [35] Funada M. Animal models for evaluating of drug dependence liability [J]. *Nihon Rinsho*, 2010, 68(8): 1459-1464.
- [36] Gellner CA, Belluzzi JD, Leslie FM. Self-administration of nicotine and cigarette smoke extract in adolescent and adult rats [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 109: 247-253.
- [37] 赵春, 张栗, 马宝苗, 等. 累进比率在自身给药模型中的应用 [J]. *中国药物依赖性杂志*, 2011, 20(3): 169-172.  
Zhao C, Zhang L, Ma BM, et al. Application of progressive ratio in self-administration model [J]. *Chin J Drug Depend*, 2011, 20(3): 169-172.
- [38] Ding ZM, Gao Y, Sentir AM, et al. Self-administration of cotinine in wistar rats; comparisons to nicotine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2021, 376(3): 338-347.
- [39] Flores RJ, Uribe KP, Swalve N, et al. Sex differences in nicotine intravenous self-administration: a meta-analytic review [J]. *Physiol Behav*, 2019, 203: 42-50.
- [40] Clemens KJ, Stuart A, Ferguson SG. Pre-quit nicotine decreases nicotine self-administration and attenuates cue- and drug-induced reinstatement [J]. *J Psychopharmacol*, 2019, 33 (3): 364-371.
- [41] Lallai V, Chen YC, Roybal MM, et al. Nicotine e-cigarette vapor inhalation and self-administration in a rodent model: sex- and nicotine delivery-specific effects on metabolism and behavior [J]. *Addict Biol*, 2021, 26(6): e13024.
- [42] Montanari C, Kelley LK, Kerr TM, et al. Nicotine e-cigarette vapor inhalation effects on nicotine & cotinine plasma levels and somatic withdrawal signs in adult male Wistar rats [J]. *Psychopharmacology*, 2020, 237(3): 613-625.
- [43] Wilar G, Shinoda Y, Sasaoka T, et al. Crucial role of dopamine D2 receptor signaling in nicotine-induced conditioned place preference [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(12): 7911-7928.
- [44] Lin R, Liang J, Wang R, et al. The raphe dopamine system controls the expression of incentive memory [J]. *Neuron*, 2020, 106(3): 498-514.
- [45] Dalaveri F, Nakhaee N, Esmailpour K, et al. Effects of maternal separation on nicotine-induced conditioned place preference and subsequent learning and memory in adolescent female rats [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 639: 151-156.
- [46] Liu J, Tao X, Liu F, et al. Behavior and hippocampal epac signaling to nicotine CPP in mice [J]. *Transl Neurosci*, 2019, 10: 254-259.
- [47] Yarbass G, Keser A, Kanit L, et al. Nicotine-induced conditioned place preference in rats: sex differences and the role of mGluR5 receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(2): 374-382.
- [48] 李佩云, 景漫毅, 吴宁, 等. 成瘾的行为学动物模型研究 [J]. *中国药物滥用防治杂志*, 2021, 27(2): 118-124.
- Li PY, Jing MY, Wu N, et al. Behavioral animal models of addiction [J]. *Chin J Drug Abuse Prev Treat*, 2021, 27(2): 118-124.
- [49] Natsheh JY, Espinoza D, Bhimani S, et al. The effects of the dopamine D2/3 agonist quinpirole on incentive value and palatability-based choice in a rodent model of attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *Psychopharmacology*, 2021, 238 (11): 3143-3153.
- [50] Orsini CA, Hernandez CM, Bizon JL, et al. Deconstructing value-based decision making via temporally selective manipulation of neural activity: insights from rodent models [J]. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 2019, 19(3): 459-476.
- [51] Rezapour T, DeVito EE, Sofuoglu M, et al. Perspectives on neurocognitive rehabilitation as an adjunct treatment for addictive disorders: from cognitive improvement to relapse prevention [J]. *Prog Brain Res*, 2016, 224: 345-369.
- [52] Jenni NL, Larkin JD, Floresco SB. Prefrontal dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors regulate dissociable aspects of decision making via distinct ventral striatal and amygdalar circuits [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(26): 6200-6213.
- [53] Orsini CA, Blaes SL, Dragone RJ, et al. Distinct relationships between risky decision making and cocaine self-administration under short- and long-access conditions [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2020, 98: 109791.
- [54] Diergaarde L, Pattij T, Poortvliet I, et al. Impulsive choice and impulsive action predict vulnerability to distinct stages of nicotine seeking in rats [J]. *Biol Psychiatry*, 2008, 63(3): 301-308.
- [55] Elhassan S, Bagdas D, Damaj MI. Effects of nicotine metabolites on nicotine withdrawal behaviors in mice [J]. *Nicotine Tob Res*, 2017, 19(6): 763-766.
- [56] Chellian R, Behnood-Rod A, Buijnzeel DM, et al. Rodent models for nicotine withdrawal [J]. *J Psychopharmacol*, 2021, 35(10): 1169-1187.
- [57] Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, et al. The forced swim test as a model of depressive-like behavior [J]. *J Vis Exp*, 2015(97): 52587.
- [58] Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 69-74.
- [59] Biala G, Kruk M. Influence of bupropion and calcium channel antagonists on the nicotine-induced memory-related response of mice in the elevated plus maze [J]. *Pharmacol Rep*, 2009, 61 (2): 236-244.
- [60] Nguyen C, Mondoloni S, Le Borgne T, et al. Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety [J]. *Neuron*, 2021, 109(16): 2604-2615.
- [61] Zhao D, Xu X, Pan L, et al. Pharmacologic activation of cholinergic alpha7 nicotinic receptors mitigates depressive-like behavior in a mouse model of chronic stress [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 234.
- [62] Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Nunes-Freitas AL, et al.

- Exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on depressive-like behavior during exposure and withdrawal [J]. Behav Brain Res, 2011, 221(1): 282–289.
- [63] Alkhlaif Y, Bagdas D, Jackson A, et al. Assessment of nicotine withdrawal-induced changes in sucrose preference in mice [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2017, 161: 47–52.
- [64] Harris AC, Tally L, Muelken P, et al. Effects of nicotine and minor tobacco alkaloids on intracranial-self-stimulation in rats [J]. Drug Alcohol Depend, 2015, 153: 330–334.
- [65] Bauzo RM, Buijnzeel AW. Animal models of nicotine withdrawal: intracranial self-stimulation and somatic signs of withdrawal [J]. Methods Mol Biol, 2012, 829: 257–268.
- [66] 徐毅. 2 型糖尿病脑组织尼古丁受体的改变及增强  $\alpha 7$  尼古丁受体功能改善糖尿病小鼠空间学习记忆障碍的分子机制 [D]. 贵阳: 贵州医科大学; 2020.
- Xu Y. The alterations of nicotinic acetylcholine receptors in type 2 diabetic brain and the molecular mechanism of enhancing the function of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors to ameliorate spatial learning and memory impairment in diabetic mice [D]. Guiyang: Guizhou Medical University; 2020.
- [67] Ponzoni L, Braida D, Carboni L, et al. Persistent cognitive and affective alterations at late withdrawal stages after long-term intermittent exposure to tobacco smoke or electronic cigarette vapour: behavioural changes and their neurochemical correlates [J]. Pharmacol Res, 2020, 158: 104941.
- [68] Miladi Gorji H, Rashidy-Pour A, Fathollahi Y. Effects of morphine dependence on the performance of rats in reference and working versions of the water maze [J]. Physiol Behav, 2008, 93(3): 622–627.
- [69] Zhang L, Spencer TJ, Biederman J, et al. Attention and working memory deficits in a perinatal nicotine exposure mouse model [J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0198064.
- [70] Gawel K, Gibula E, Marszalek-Grabska M, et al. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2019, 392(1): 1–18.
- [71] Song Y, Yang Y, Cui Y, et al. Lipoxin A4 methyl ester reduces early brain injury by inhibition of the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)-dependent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) pathway in a rat model of intracerebral hemorrhage [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 1838–1847.
- [72] Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1916: 99–103.
- [73] Shi X, Bai H, Wang J, et al. Behavioral assessment of sensory, motor, emotion, and cognition in rodent models of intracerebral hemorrhage [J]. Front Neurol, 2021, 12: 667511.
- [74] Zhu W, Gao Y, Wan J, et al. Changes in motor function, cognition, and emotion-related behavior after right hemispheric intracerebral hemorrhage in various brain regions of mouse [J]. Brain Behav Immun, 2018, 69: 568–581.
- [75] 史丽娟, 王斯博, 赵剑, 等. 基于 LVRT 系统的动物行为学实验系统 [J]. 仪器仪表学报, 2021, 42(1): 137–145.
- Shi LJ, Wang SB, Zhao J, et al. Experimental system of animal behavioristics based on LVRT system [J]. Chin J Sci Instrum, 2021, 42(1): 137–145.
- [76] Pačuta A, Žagar A, Kočíková B, et al. Time matters. Locomotor behavior of *Lacerta viridis* and *Lacerta agilis* in an open field maze [J]. Acta Ethol, 2018, 21(2): 91–99.
- [77] Peleh T, Bai X, Kas MJH, et al. RFID-supported video tracking for automated analysis of social behaviour in groups of mice [J]. J Neurosci Methods, 2019, 325: 108323.

[收稿日期] 2022-02-22

## 《中国实验动物学报》刊期变更通知

为缩短出版周期,及时反映本学科最新科技动态,应广大读者、作者要求,本刊向主管部门及北京市新闻出版局提出申请变更刊期。经批准《中国实验动物学报》自 2022 年 8 月份起由双月刊变更为月刊。从 2023 年期起全年共 12 期。

欢迎读者积极订阅! 欢迎各位学者踊跃投稿!

姜宁,张亦文,黄红,等. 大小鼠学习记忆行为实验方法分类概述 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 839-845.

Jiang N, Zhang YW, Huang H, et al. Overview of animal behavioral tests of learning and memory [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 839-845.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.014

# 大小鼠学习记忆行为实验方法分类概述

姜宁<sup>1</sup>,张亦文<sup>1</sup>,黄红<sup>1</sup>,陈善广<sup>3</sup>,李莹辉<sup>3</sup>,刘新民<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193;2. 宁波大学新药技术研究院,浙江 宁波 315000;  
3. 中国航天员科研训练中心人因工程重点实验室,北京 100094)

**【摘要】** 学习记忆发生机制复杂,表现形式多样,产生过程涉及到信号的识别和辨认、信息的获得、巩固、再现和再巩固等多个环节;记忆的信息又包括图象记忆、声音记忆、嗅觉记忆、空间位置记忆等;根据信息保存时间的长短,分为短时记忆与长时记忆。行为学实验是评价学习记忆的主要手段。迄今为止,科学家建立了多种大、小鼠行为实验方法用于学习记忆的评价。本文首次对学习记忆行为学实验方法进行了分类和概述,针对不同类型列举不同的评价方法,为基于行为实验的学习记忆研究、相关的产品研发提供参考。

**【关键词】** 学习记忆;行为实验方法;大、小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0839-07

## Overview of animal behavioral tests of learning and memory

JIANG Ning<sup>1</sup>, ZHANG Yiwen<sup>1</sup>, HUANG Hong<sup>1</sup>, CHEN Shanguang<sup>3</sup>, LI Yinghui<sup>3</sup>, LIU Xinmin<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China. 2. Institute of Drug Discovery Technology, Ningbo University, Ningbo 315000.  
3. National Key Laboratory of Human Factors Engineering, China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094)  
Corresponding author: LIU Xinmin. E-mail: liuxinmin@hotmail.com

**【Abstract】** The mechanisms involved in learning and memory are complex and the forms of expression are diverse. The process of learning and memory involves signal recognition, information acquisition, consolidation, reproduction, and reconsolidation. Memory information includes image memory, sound memory, olfactory memory, and spatial location memory. Information can be divided into short-term memory and long-term memory according to how long it is stored. Behavioral experiments are the main method to evaluate learning and memory. To date, scientists have established a variety of behavioral experimental method in rats and mice to evaluate learning and memory. In this paper, the experimental method of behavioral learning and memory are classified and summarized for the first time, and different evaluation method are listed for the different experimental types. Our review provides a reference for behavioral experiment-based learning and memory research, and related product development.

**【Keywords】** learning and memory; behavioral test; 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

学习记忆是生物体基本的认知功能,是指大脑接受外界信息,经过加工处理,转换成内在的心理活动,从而获取知识或应用知识的过程,是生物生存与进化中的一种复杂的高级神经活动行为<sup>[1]</sup>。学习记忆的产生与注意、兴趣、判断、决策等因素密切相关,是一种复杂的生理生化反应涉及到众多的神经递质包括胆碱能、兴奋性氨基酸、神经肽等<sup>[2]</sup>。国际科学界已经认识到细胞、分子和组织器官水平的研究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、生化加工过程后产生的综合整体效应<sup>[3]</sup>。从整体和综合的角度开展认知科学研究成为世界各国科学家关注的重点,基于动物行为实验的学习记忆能力评价方法已成为研究其发生机制和寻找有效防治措施的最可靠的手段,广泛用于认知功能障碍疾病(阿尔茨海默病、血管性痴呆等相关疾病)、改善学习记忆药物和保健品功效评价,以及航天等特因环境所致认知损伤及防护措施等研究<sup>[4-5]</sup>。

由于学习记忆发生机制复杂,产生过程涉及多个环节,记忆的信息多样,刺激因素也不同,科学家们设计了多种学习记忆行为实验方法用于学习记忆的评价。自 1930 年 Tolman 和 Honziks 首次建立 14 个单元的 T 型迷宫学习记忆行为实验方法以来,斯金纳箱、巴恩斯迷宫、Morris 水迷宫实验、新物体识别实验、跳台实验、避暗实验、奖励性操作式条件反射实验等相继出现<sup>[2]</sup>。本文首次对小鼠学习记忆行为实验方法的分类进行概述,在介绍相关定义、原理的同时,列举相对应的行为学实验进行说明,为研究者选择合适的行为学检测方法提供一些建议,以期为基于行为实验的学习记忆研究、相关的产品研发提供参考。

## 1 基于学习记忆发生的过程的行为实验方法

学习(learning)是神经系统接受外界环境变化获得新行为和经验的过程(获得新知识),而记忆(memory)是对获得的经验或行为保持的过程(对新知识的保留)。学习和记忆的过程包括获得、巩固、再现及再巩固 4 个环节<sup>[2,6]</sup>。获得是指感知的内容在大脑皮层留下记忆痕迹的过程,巩固是指记忆痕迹由短时不稳定状态逐渐转化为长时稳定且牢固状态的过程,记忆再现则为记忆痕迹通过回忆或再认方式给以重现的过程,记忆再巩固是指已经巩固的记忆被提取激活后变得不稳定,需经过再次巩固

阶段才能重返稳定状态的过程<sup>[7]</sup>。因此,可以通过设置获得、巩固、再现及再巩固等不同的实验模式对学习记忆的发生过程进行评价。如避暗实验中,动物由于嗜暗习性而偏好进入和在暗室停留(给予电击),动物为避免伤害寻找安全区而进入明室,经几次反复后,最终记住安全区域。实验过程中,首先获得的形成(获得模式),获得形成后(1 h 后,一般为 24 h)进行巩固模式实验,动物形成巩固的记忆后可以进入再现模式的检测<sup>[8-9]</sup>。研究认为 M 胆碱阻滞剂莨菪碱影响记忆的获得,蛋白质合成抑制剂及 NaNO<sub>2</sub> 脑缺氧会造成记忆巩固障碍,而 40% 的乙醇则影响记忆的再现<sup>[10-11]</sup>。

根据信息保存时间的长短,记忆可以分为短时记忆(short term memory, STM)与长时记忆(long term memory, LTM)。短时记忆可以保持几秒到几小时,长时记忆则可保持数周甚至数年。有研究表明短时记忆只需对已存在的突触蛋白加以修饰、改变突触连接强度即可实现;而长时记忆则需要启动基因转录和新蛋白质的合成才能变得长久稳定。跳台、避暗、物体认知和迷宫类实验方法都可以评价短时记忆和长时记忆<sup>[6,12]</sup>。T 迷宫、Y 迷宫等行为实验评价的“工作记忆”(working memory)一般指“短时记忆”,是对“正在经历”的信息进行短暂储存和加工以指导下一步行动计划。背景条件性恐惧记忆行为学检测等方法已经用于研究长期记忆形成的分子神经生物学机制<sup>[13]</sup>。

## 2 非联合型学习和联合型学习的行为实验方法

学习分为非联合型学习(non-associative learning)和联合型学习(associative learning)两种。非联合型学习是一种在刺激与反应之间没有明确联系的简单学习形式,指对单一刺激做出的行为反应的改变。跳台实验中<sup>[14-15]</sup>,通过给予一定程度的电刺激,动物为避免伤害而寻找安全区(绝缘跳台),经几次反复后,最终记住安全区域,这是一种对电信号刺激的反应,是一种典型的非联合型学习检测方法,其他常用非联合型学习检测方法还包括避暗、迷宫、物体认知实验等。联合型学习是刺激和反应之间存在确定联系的学习,联合性学习需要对不同条件刺激之间的相互关联与自身行为及其后果之间的因果联系进行学习。在 20 世纪初,俄罗斯生理学家伊万·巴甫洛夫(Ivan Pavlov),最早建立了巴甫洛夫的经典条件反射。经典条件反射是

利用奖励性物质的激励性质完成对不同条件刺激信号的辨识学习。给予动物条件刺激(视觉或声信号或符号)<sup>[16-17]</sup>,接着给予奖赏物质,动物逐渐形成对刺激信号的条件性趋近行为,或者直接给予动物奖赏物质,动物形成对奖赏物质位置的条件性趋近行为<sup>[18]</sup>。

### 3 程序性记忆和陈述性记忆的行为实验方法

记忆分为程序性记忆(procedural memory)和陈述性记忆(declarative memory)。程序性记忆又称为内隐性记忆(implicit memory)或反射性记忆,是对运动技能、感知觉、程序和规则等的记忆,具有自主或反射的性质,这种记忆形成缓慢,需要多次重复和演习才能完成。程序性记忆的完成不需要有意识的回忆过程,一旦形成即可保持较长时间。常见的程序性包括斯金纳箱、触屏奖赏、穿梭实验等。在穿梭实验中<sup>[19]</sup>,给予某一特定信号(如灯光、声音等),若动物在规定时间内对不发生反应,立即给予惩罚性刺激(电刺激为主),动物为了躲避电击会穿梭至对侧安全区(被动条件反射),经过反复训练后(一般连续 5 d)则可形成将特定信号与惩罚性刺激结合起来的条件反射-主动逃避反应(主动条件反射),是一种高级、复杂的联想式程序性记忆的获得与巩固过程。

陈述性记忆又称外显性记忆(explicit memory),是对地点、事实等的回忆,需要有意识的进行,这种记忆形成迅速,但同时又容易遗忘<sup>[20]</sup>。陈述性记忆又进一步分为情景记忆(episodic memory)和语义记忆(semantic memory)。情景记忆是将特定事件与其发生的时间、地点相互联系形成记忆。语义记忆是对经验的抽象概括,一般通过多次经验形成。在 Morris 水迷宫实验中,动物在多次训练中,学会了寻找固定位置的隐蔽平台,形成稳定的空间位置认知,这种空间认知是加工空间信息(外部线索)形成的,进入意识系统,属于陈述性记忆<sup>[21]</sup>。

### 4 空间记忆和非空间记忆的行为实验方法

空间记忆是学习和探索周围环境的基本认知功能,是一种获取空间布局信息的能力,使我们能沿着一条路径在环境中找到目标位置<sup>[22]</sup>。常用的评价啮齿类动物的空间学习记忆能力的行为学方法包括迷宫、跳台、物体位置实验等。迷宫类实验

(Morris 水迷宫、T 迷宫和八臂放射状迷宫等)可以检测空间参考记忆,实验中,大鼠和小鼠经过多次训练,学会在各种类型的迷宫中寻找固定位置的隐蔽平台/出口/食物,从而形成稳定的空间位置认知,是一种以异我为参照点的参考认知,隐蔽平台/出口/食物的位置与动物自身所处的位置和状态无关<sup>[23]</sup>。这种空间参考记忆的储存机制主要涉及边缘系统(如海马)以及大脑皮层有关脑区<sup>[24]</sup>。Morris 水迷宫是评价动物空间学习记忆能力的经典行为学实验,它能有效地分离动物空间辨认与其它能力<sup>[25-26]</sup>。物体认知-物体位置识别实验是利用啮齿类动物会对移动到新位置的物体表现出更多的探索活动,可用于检测动物对物体所在位置的空间记忆能力的检测<sup>[27]</sup>。而物体认知-新物体识别实验<sup>[28]</sup>,利用动物在新奇偏爱性这种内在动力的驱动下,对新物体表现出更大的兴趣,会更多的接近新物体,对其进行探索活动,是一种用于检测动物非空间的物体识别记忆能力的认知行为检测方法。

### 5 基于不同刺激原理的行为实验方法

按照刺激因素原理不同,可分为奖赏、惩罚、自主活动 3 大类行为实验方法。以惩罚原理检测的学习记忆行为学实验是通过对动物施加以电、水刺激为重点的惩罚性刺激元素,在实验中设定可逃避惩罚性刺激的策略,让动物学会并记住避免这些伤害性刺激,主要包括跳台、避暗、穿梭、水迷宫等。

通过施加各种奖励性刺激,动物通过随机发现、主动探索和(或)操作、获得经验、巩固记忆并再现,最终使动物形成条件反射,属于基于奖赏原理的学习记忆行为实验方法。这类方法由于对动物的行为和心理伤害刺激小,对相关递质分泌和神经信号传导不产生与行为学本身无关的干扰,是评价动物空间定向、决策、反应、判断、联合型记忆、工作记忆能力的主要行为实验方法,主要包括操作奖赏、触屏奖赏、食物迷宫等。

基于自发活动原理的学习记忆行为实验方法是利用动物对新奇物体或者新环境好奇的天性,给予动物新奇事物,或者将动物置于新奇环境,动物由于好奇产生探索行为而检测动物对新物体、新环境的学习记忆能力,这类方法不需要学习训练,亦不用禁食禁水,或施加惩罚或奖赏刺激,几乎对动物不产生正向或者反向应激<sup>[2]</sup>。但是与动物运动机能状态密切相关,凡能影响动物运动机能的药物

和动物本身状态均可能影响该实验的正常结果。基于自发活动原理的学习记忆行为实验方法主要包括物体认知、迷宫(T 迷宫、Y 迷宫、八臂迷)等。

## 6 基于操作任务的行为实验方法

1938 年心理学家斯金纳(B. F. Skinner)在经典条件反射基础上首次提出了操作条件反射的学习记忆行为实验方法。操作条件反射根据条件刺激的不同,可分为操作式防御性条件反射和奖赏操作条件反射。操作式防御性条件反射是给予刺激信号(如灯光或声音),随即给予动物足部电击刺激(惩罚性刺激),动物进行操作,踩踏板或拉杠杆,则能够断开电路以避免或终止电击,这样通过训练,使动物能够结合刺激信号,习得通过操作行为预防或终止伤害性刺激(如电刺激)建立操作条件反射。奖赏操作条件反射以能引起奖赏效应的物质(食物、糖水等中性强化物质)作为非条件刺激信号,动物通过对踏板的偶然触碰,发现了踏板操作能获得奖励物质(固体或者液体物质),多次之后,最后动物学会了踏板获得奖赏这一行为,形成简单的操作行为反应-结果之间的操作条件反射。石哲等<sup>[29]</sup>、陈铃铃等<sup>[30]</sup>在国内首次建立了高智能、高自动化的操作式条件反射检测系统-奖赏性操作条件反射,以能引起奖赏效应的物质作为条件刺激信号,并结合非条件刺激信号(灯光或声音),动物通过随机发现、主动探索、获得经验,巩固记忆并再现,最终使动物形成条件反射。并通过设计条件反射训练、固定比率操作训练、信号辨识和信号消退等组合实验方案,能更精准的研究动物对复杂操作方式与辨识信号的学习记忆能力。王克柱<sup>[19]</sup>在此基础上进行了改进,通过结合计算机、信息学等技术,依据动物心理学,建立了自由适应模式、单次和连续多次操作、位置识别、信号辨识、条件性强化贬值、消退等实验模式,实现了在动物复杂操作任务下的兴趣、反应、判断、学习记忆等认知行为的全面评价。此外,大小鼠触屏操作法作为一种新兴的、计算机自动化的奖赏性操作条件反射方法也逐渐被科学家们应用于学习记忆能力的检测<sup>[31-32]</sup>。大小鼠触屏操作与奖赏性操作条件反射相同,而两者的不同在于动物操作装置和信号呈现方式:前者一般通过操纵杆或操作踏板作为动物操作装置,信号一般是简单的灯光或声音等固定样式的信号;而后者则是通过在触摸屏上呈现任意样式、任意位置的图案作为

信号,动物直接触碰屏幕进行操作而完成奖赏性操作条件反射。也有一些实验利用触屏操作装置进行操作式防御性条件反射,使用如底部电击等惩罚作为结果,通过学习预防惩罚建立条件反射<sup>[33]</sup>。操作性条件反射可通过设置多重复杂的操作任务、信号辨识和模式组合,用于执行操作任务时的复杂学习记忆能力的检测,可以模拟航天航空航海及高科技作业人群的反应、判断、决策和学习记忆的评价。

## 7 其他

此外,不同的学习记忆行为学实验方法也包含着对不同信息(图象、场景、声音、嗅觉、触觉)的学习和记忆,也可按照对不同信息的学习记忆能力进行分类。物体认知-物体情景记忆实验是检测动物对物体所处实验背景的记忆能力的方法,可以评价动物对情景记忆能力<sup>[34]</sup>。条件性恐惧实验以可以场景和声音为线索评价动物的恐惧记忆<sup>[35]</sup>。评价动物的嗅觉记忆能力的嗅觉辨别实验,可以检测小鼠对与食物相联系的气味的辨识粗略分析小鼠对不同辨识能力,嗅觉六臂迷宫实验可以用来分析小鼠嗅觉的空间引导辨识能力<sup>[36-37]</sup>。此外,像穿梭和奖赏实验联想式学习记忆实验方法可以以声音、图像、嗅觉为线索(刺激信号),同时也可以视觉与触觉结合、视觉与嗅觉结合等多信息组合去评价或者比较学习记忆的能力。

## 8 小结与展望

现代科技发展使得人类生存环境、生活模式和生存空间发生了重大转变,老年性痴呆等学习记忆障碍性疾病正逐步成为危害人类身心健康的头号杀手<sup>[2]</sup>。学习记忆行为实验方法为研究这些挑战人类生存发展的难题,寻找其有效的防治方法和手段提供了基础方法学支撑。在学习记忆行为实验研究中,大小鼠是最常使用的实验动物<sup>[38]</sup>。迄今为止,科学家已建立了多种大、小鼠行为实验方法用于学习记忆的评价,从最初简单的 T 型迷宫实验(空间工作记忆)到可以评价精细操作能力的奖励性操作条件反射实验,从简单的人工观察计数到计算机智能化、自动化检测,从单一的评价指标的获得到系统的精细敏感指标评价体系的建立,学习记忆动物行为实验方法实现了不同学习记忆过程、不同刺激原理、不同操作任务等涵盖(见表 1)。

表 1 常见的学习记忆行为实验分类

Table 1 Classification of common learning and memory behavior experiments

常见的行为学实验方法 Common behavioral experimental methods	学习记忆发生的过程 Process of learning and memory	学习类型 Types of learning	记忆类型 Types of memory	空间记忆和非空间记忆 Spatial/non-spatial memory	刺激方法的原理 Principle	是否涉及操作任务 Involved in operation tasks or not
水迷宫 Morris water maze	获得、巩固 Acquisition and consolidation	非联合型学习 Non-associative learning	陈述性记忆 Declarative memory	空间记忆 Spatial memory	惩罚原理 Punishment	否 No
Y 迷宫 Y maze	获得 Acquisition	非联合型学习 Non-associative learning	陈述性记忆 Declarative memory	空间记忆 Spatial memory	自发活动原理 Spontaneous activity	否 No
T 迷宫 T maze	获得 Acquisition	非联合型学习 Non-associative learning	陈述性记忆 Declarative memory	空间记忆 Spatial memory	自发活动原理 Spontaneous activity	否 No
跳台实验 Step-down test	获得、巩固、再现 Acquisition, consolidation and reproduction	非联合型学习 Non-associative learning	程序性记忆 Procedural memory	空间记忆 Spatial memory	惩罚原理 Punishment	否 No
避暗实验 Step-through test	获得、巩固、再现 Acquisition, consolidation and reproduction	非联合型学习 Non-associative learning	程序性记忆 Procedural memory	非空间记忆 Non-spatial memory	惩罚原理 Punishment	否 No
穿梭实验 Shuttle-box test	获得、巩固、再现 Acquisition, consolidation and reproduction	非联合型学习 Non-associative learning	程序性记忆 Procedural memory	非空间记忆 Non-spatial memory	惩罚原理 Punishment	否 No
新物体识别实验 Novel object recognition task	获得 Acquisition	非联合型学习 Non-associative learning	陈述性记忆 Declarative memory	非空间记忆 Non-spatial memory	自发活动原理 Spontaneous activity	否 No
物体位置识别实验 Object location recognition task	获得 Acquisition	非联合型学习 Non-associative learning	陈述性记忆 Declarative memory	空间记忆 Spatial memory	自发活动原理 Spontaneous activity	否 No
情景记忆实验 Episodic memory experiment	获得 Acquisition	非联合型学习 Non-associative learning	陈述性记忆 Declarative memory	非空间记忆 Non-spatial memory	自发活动原理 Spontaneous activity	否 No
时序记忆实验 Sequential memory experiment	获得 Acquisition	非联合型学习 Non-associative learning	陈述性记忆 Declarative memory	非空间记忆 Non-spatial memory	自发活动原理 Spontaneous activity	否 No
奖赏性操作条件反射 Reward based operating test	获得、巩固、再现 Acquisition, consolidation and reproduction	联合型学习 Associative learning	程序性记忆 Procedural memory	空间记忆和非空间记忆 Spatial memory and non-spatial memory	奖赏原理 Reward	是 Yes
自身给药条件反射 Self-administration test	获得、巩固、再现 Acquisition, consolidation and reproduction	联合型学习 Associative learning	程序性记忆 Procedural memory	非空间记忆 Non-spatial memory	奖赏原理 Reward	否 No
操作式防御性条件反射 Defensive based operating test	获得、巩固、再现 Acquisition, consolidation and reproduction	联合型学习 Associative learning	程序性记忆 Procedural memory	空间记忆和非空间记忆 Spatial memory and non-spatial memory	惩罚原理 Punishment	是 Yes
触屏操作法 Touch-screen testing method	获得、巩固、再现 Acquisition, consolidation and reproduction	联合型学习 Associative learning	程序性记忆 Procedural memory	空间记忆和非空间记忆 Spatial memory and non-spatial memory	奖赏原理 Reward	是 Yes

可以预计,随着人工智能、生物信息、材料等生命科学以外的新技术、新方法向动物行为实验方法领域的融合发展,动物行为实验方法学正逐渐转向三维行为信息的提取和分析,评价指标正逐步精细化、量化和自动化。目前,适应航天等特因环境作业,执行操作任务时的认知作业评价方法已在我国成功应用。同时,学习记忆行为实验检测分析设备也日趋微型化、集成化和智能化。可用于评价包括特因环境(如高低温、高湿、低压等)应激在内的,复合多重刺激源条件,涵盖学习记忆的不同类型的动物学习记忆行为实时在线检测分析方法,也正成为国际实验动物学习记忆行为实验方法发展的前沿领域。

#### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] 张雯艳, 陆媛. 老年轻度认知功能障碍患者相关病因及治疗的研究进展 [J]. 国际老年医学杂志, 2021, 42(1): 57-61.  
Zhang WY, Lu Y. Advances in etiology and treatment of mild cognitive impairment in older people [J]. Int J Geriatr, 2021, 42(1): 57-61.
- [ 2 ] 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.
- [ 3 ] 刘新民, 陈善广. 基于动物行为的学习记忆实验方法 [A]. 中国空间科学学会空间生命专业委员会第二十届学术研讨会 [C]; 2014.  
Liu XM, Chen SG. Experimental method of learning and memory based on animal behavior [A]. The 20th Academic Symposium of the Space Life Professional Committee of the Chinese Society of Space Sciences [C]; 2014.
- [ 4 ] 薛承景, 李建民. 学习和记忆研究的行为学方法论述 [J]. 河北医药, 2007, 29(1): 77-78.  
Xue CJ, Li JM. Discussion on behavioral methods of learning and memory research [J]. Hebei Med J, 2007, 29(1): 77-78.
- [ 5 ] Wang Q, Zhang YL, Li YH, et al. The memory enhancement effect of Kai Xin San on cognitive deficit induced by simulated weightlessness in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 187: 9-16.
- [ 6 ] 张承彦, 郭进. 学习与记忆的研究进展 [J]. 生物学教学, 2005, 30(3): 6-7.  
Zhang CY, Guo J. Research progress of learning and memory [J]. Biol Teach, 2005, 30(3): 6-7.
- [ 7 ] 韩怡凡, 陈先瑜. 中枢胆碱能递质系统与学习记忆关系的研究 [J]. 生理科学进展, 1983, 14(3): 216-222.  
Han YF, Chen XY. Study on the relationship between central cholinergic transmitter system and learning and memory [J]. Prog Physiol Sci, 1983, 14(3): 216-222.
- [ 8 ] 薛丹, 陈善广, 徐淑萍, 等. 构建自动、智能及敏感度高的避暗实验检测系统 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(15): 2778-2782.  
Xue D, Chen SG, Xu SP, et al. Establishment of a highly automated and intelligent experimental system of passive avoidance for mice [J]. J Clin Rehabilitative Tissue Eng Res, 2010, 14(15): 2778-2782.
- [ 9 ] 黄红, 陈碧清, 姜宁, 等. 鲜天麻对睡眠干扰诱导小鼠学习记忆障碍的改善作用 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2509-2516.  
Huang H, Chen BQ, Jiang N, et al. Fresh *Gastrodia elata* ameliorates learning and memory impairments in sleep interruption induced mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(9): 2509-2516.
- [ 10 ] 张小蕾, 贾效先, 张均田. 九种莨菪碱衍生物与东莨菪碱药理作用的比较 [J]. 中国医学科学院学报, 1988, 10(3): 179-183.  
Zhang XL, Jia XX, Zhang JT. Comparison of pharmacological effects of nine anisodamine derivatives and scopolamine [J]. Acta Acad Med Sin, 1988, 10(3): 179-183.
- [ 11 ] 张磊, 张均田. 人参和三七对小鼠记忆的易化作用 [J]. 中西医结合杂志, 1987, 7(10): 610-612.  
Zhang L, Zhang JT. Facilitation effect of ginseng and *Panax Notoginseng* on memory in mice [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 1987, 7(10): 610-612.
- [ 12 ] Lynch MA. Long-term potentiation and memory [J]. Physiol Rev, 2004, 84(1): 87-136.
- [ 13 ] Herry C, Johansen JP. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits [J]. Nat Neurosci, 2014, 17(12): 1644-1654.
- [ 14 ] 刘新民, 王圣平, 于澍仁, 等. 计算机控制的小鼠跳台测试仪 [J]. 中国药理学通报, 1994, 10(6): 471-472.  
Liu XM, Wang SP, Yu SR, et al. Computer controlled mouse platform jumping tester [J]. Chin Pharmacol Bull, 1994, 10(6): 471-472.
- [ 15 ] Kameyama T, Nabeshima T, Kozawa T. Step-down-type passive avoidance- and escape-learning method: Suitability for experimental amnesia models [J]. J Pharmacol Methods, 1986, 16(1): 39-52.
- [ 16 ] Parkinson JA, Willoughby PJ, Robbins TW, et al. Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs Pavlovian approach behavior: further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems [J]. Behav Neurosci, 2000, 114(1): 42-63.
- [ 17 ] Wyvell CL, Berridge KC. Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement [J]. J Neurosci, 2000, 20(21): 8122-8130.
- [ 18 ] Simon NW, Mendez IA, Setlow B. Effects of prior amphetamine exposure on approach strategy in appetitive Pavlovian conditioning in rats [J]. Psychopharmacology (Berl), 2009, 202(4): 699-709.

- [19] 王克柱. 基于奖赏操作的慢性束缚应激所致大鼠认知功能损伤及 Rg1, Rb1 防护作用研究 [D]. 北京: 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所; 2016.  
Wang KZ. The influence of chronic restraint stress and the impact of Rg1, Rb1 intervention on rats; change of cognitive function in reward based instrumental conditioning [D]. Beijing: Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College; 2016.
- [20] 李葆明. 陈述性记忆的形成和  $\beta$ -受体的作用 [A]. 第三届海内外华人中青年学者神经科学研讨会 [C]; 2004.  
Li BM. The formation of declarative memory and the role of beta receptors [A]. The 3rd Seminar on Neuroscience of Chinese Young and Middle-aged Scholars at Home and Abroad [C]; 2004.
- [21] 胡镜清, 温泽淮, 赖世隆. Morris 水迷宫检测的记忆属性与方法学初探 [J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(2): 117-119, 187.  
Hu JQ, Wen ZH, Lai SL. A preliminary study in the memory attribution and methodology in Morris water maze test [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2000, 17(2): 117-119, 187.
- [22] Chen WF, Liu BL, Li XL, et al. Sex differences in spatial memory [J]. Neuroscience, 2020, 443: 140-147.
- [23] 段新, 马光瑜, 张艳美. 东莨菪碱慢性给药大鼠作为老龄相关记忆损害模型的探索 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(2): 97-100.  
Duan X, Ma GY, Zhang YM. Exploration on animal model for senile memory deficits induced by repeatedly giving multiple doses of scopolamine to rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2005, 13(2): 97-100.
- [24] O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat [J]. Brain Res, 1971, 34(1): 171-175.
- [25] Chen Z, Kamei C. Facilitating effects of histamine on spatial memory deficit induced by scopolamine in rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(9): 814-818.
- [26] 余建, 黄育文, 陈忠. 经过改良的评价大鼠空间记忆能力的交替电刺激 Y 型迷宫 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2003, 32(2): 38-42, 57.  
Yu J, Huang YW, Chen Z. Improved alternative electro-stimulus Y-maze for evaluating the spatial memory of rats [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2003, 32(2): 38-42, 57.
- [27] 宋广青, 孙秀萍, 刘新民. 大鼠物体识别实验方法综述 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(7): 55-60, 67.  
Song GQ, Sun XP, Liu XM. The review of object recognition task in rats [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(7): 55-60, 67.
- [28] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data [J]. Behav Brain Res, 1988, 31(1): 47-59.
- [29] 石哲, 陈善广, 陈玲玲, 等. 奖励性操作式条件反射任务在大鼠学习记忆研究中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(4): 9-15.  
Shi Z, Chen SG, Chen LL, et al. Evaluation of reward-relevant learning and memory behavior with operant conditioning task in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2012, 20(4): 9-15.
- [30] 陈铃铃, 石哲, 陈善广, 等. 奖励性操作条件反射实时测试分析处理系统研制 [J]. 航天医学与医学工程, 2013, 26(4): 278-282.  
Chen LL, Shi Z, Chen SG, et al. Development of real-time reward-directed instrumental learning test and analysis system [J]. Space Med Med Eng, 2013, 26(4): 278-282.
- [31] Palmer D, Dumont JR, Dexter TD, et al. Touchscreen cognitive testing: Cross-species translation and co-clinical trials in neurodegenerative and neuropsychiatric disease [J]. Neurobiol Learn Mem, 2021, 182: 107443.
- [32] Sullivan JA, Dumont JR, Memar S, et al. New frontiers in translational research: Touchscreens, open science, and the mouse translational research accelerator platform [J]. Genes Brain Behav, 2021, 20(1): e12705.
- [33] Jager A, Dam SA, Van Der Mierden S, et al. Modulation of cognitive flexibility by reward and punishment in BALB/cJ and BALB/eByJ mice [J]. Behav Brain Res, 2020, 378: 112294.
- [34] Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2007, 31(5): 673-704.
- [35] Camp RM, Johnson JD. Repeated stressor exposure enhances contextual fear memory in a beta-adrenergic receptor-dependent process and increases impulsivity in a non-beta receptor-dependent fashion [J]. Physiol Behav, 2015, 150: 64-68.
- [36] Besser G, Jobs L, Liu DT, et al. The Sniffin' sticks odor discrimination memory test: a rapid, easy-to-use, reusable procedure for testing olfactory memory [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2019, 128(3): 227-232.
- [37] 杨天鹏, 唐敏, 刘巧琼, 等. 丁香酚通过嗅觉通路改善昆明鼠学习记忆的机制 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(6): 487-489.  
Yang TP, Tang M, Liu QQ, et al. Mechanisms of Eugenol improving learning and memory through olfactory pathway on Kunming mice [J]. Chin J Rehabil Med, 2007, 22(6): 487-489.
- [38] 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, Pan 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.

魏玉婷,朱田田,苏明莉,等. D-半乳糖法制备 AD 动物模型的分类总结与初步评价 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 846-856.

Wei YT, Zhu TT, Su ML, et al. Classification and research progress on animal models of Alzheimer's disease prepared by D-galactose [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 846-856.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.015

# D-半乳糖法制备 AD 动物模型的分类总结与初步评价

魏玉婷,朱田田,苏明莉,贾静,严兴科\*

(甘肃中医药大学针灸推拿学院,兰州 730000)

**【摘要】** 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)作为一种常见的大脑神经退行性疾病,严重影响老年患者的身心健康与生活质量。研究制备 AD 动物模型,尤其是复制同时具备行为、生化及病理学特征的 AD 模型,对 AD 发病机制及治疗研究具有重要意义。本文分类总结了近年来以单纯 D-半乳糖(D-galactose, D-gal)及 D-gal 结合  $\beta$  淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ )寡聚体、AlCl<sub>3</sub>、NaNO<sub>2</sub> 制备 AD 动物模型的方法。从药物诱导 AD 的机制、学习记忆受损的表现,以及氧化应激、炎症反应、神经元损伤、A $\beta$  及 Tau 集聚等病理改变角度对各类造模方法进行评价和探讨,以期为 AD 动物模型制备和研究提供依据。

**【关键词】** 阿尔茨海默病;D-半乳糖;动物模型;分类;综述

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)06-0846-11

## Classification and research progress on animal models of Alzheimer's disease prepared by D-galactose

WEI Yuting, ZHU Tiantian, SU Mingli, JIA Jing, YAN Xingke\*

(College of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Gansu University of CM, Lanzhou 730000, China)

Corresponding author: YAN Xingke. E-mail: yanxingke@126.com

**【Abstract】** As a common neurodegenerative disease, Alzheimer's disease (AD) seriously affects the physical and mental health, and the quality of life, of patients. The preparation of AD animal models is therefore of significance, especially models that can effectively replicate abnormal behavioral, biochemical, and pathological changes. In this review, the method of preparing AD animal models based on D-galactose alone, and D-galactose combined with an amyloid beta protein (A $\beta$ ) oligomer, AlCl<sub>3</sub>, and NaNO<sub>2</sub> were summarized. The mechanism of drug-induced AD, the presentation of impaired learning memory, and pathological changes such as oxidative stress, inflammatory reactions, neuron damage, and A $\beta$  and Tau aggregation are evaluated and discussed to provide a reference for future studies involving AD animal models.

**【Keywords】** Alzheimer's disease (AD); D-galactose (D-gal); animal model; classification; review

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

**【基金项目】** 甘肃中医药大学引进人才科研启动基金项目(2019YJRC-05),甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目(2022KCYB-7),甘肃省教育厅高等学校青年博士基金项目(2021QB-072),甘肃省教育厅优秀研究生“创新之星”项目(2021CXZX-755)。

Funded by Introduction of Talent Research Start-up Fund Project of Gansu University of Chinese Medicine (2019YJRC-05), Scientific Research and Innovation Fund Project of Gansu University of Chinese Medicine (2022KCYB-7), Youth Doctoral Fund Project of Gansu Provincial Department of Education (2021QB-072), "Innovation Star" Project of Excellent Postgraduates of Gansu Provincial Department of Education (2021CXZX-755).

**【作者简介】** 魏玉婷(1991—),女,博士,研究方向:针灸调节效应的脑功能机制。Email: 1416627446@qq.com

**【通信作者】** 严兴科,男,博士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:针灸调节效应的生物学机制。Email: yanxingke@126.com

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种病情进行性加重的大脑神经退行性疾病,严重影响着老年群体的身心健康和生活质量<sup>[1-2]</sup>。调查显示,我国 AD 患者已超过 1000 万<sup>[3]</sup>,占全球病例总数的 25%<sup>[4]</sup>。现代医学认为各脑区不同程度的萎缩、细胞外间隙  $\beta$  淀粉样蛋白 (amyloid beta protein, A $\beta$ ) 沉积形成的老年斑 (senile plaque, SP) 及细胞内 Tau 蛋白磷酸化引起的神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 是 AD 的主要病理特征<sup>[5-7]</sup>。目前,AD 的确切病因及发病机制尚无定论,国内外暂无特效治疗手段,故建立具备 AD 行为学表现、病理学特征的动物模型对阐明该病的病理机制及新药研发等具有重要的意义。

近年来,常用的 AD 动物模型包括以自然衰老、快速老化 (SAM 小鼠)、转基因为代表的先天性 AD 模型,这类模型能较为全面的模拟 AD 患者的行为学、生化及病理学改变特征<sup>[8]</sup>,但同时因自然衰老模型需将大小鼠维持饲养至 18 ~ 24 月龄,建模时间长,且随着老鼠逐渐进入老龄状态,自身状态随之变差,增加了实验过程中动物死亡的概率<sup>[9]</sup>;快速老化模型属近交系鼠群,其繁殖能力较差,来源较局限;转基因模型价格昂贵等,在一定程度上限制了各模型的使用范围。此外,也有通过物理或化学方法构建的后天性 AD 模型,如损伤胆碱能系统、注射神经毒性药物等,但这些单一的模型复制方法,只能从某一角度反映 AD 的病理机制,未能较为全面的呈现出 AD 多病理改变的特征。近年来,复合式造模法因可模拟 AD 多因素致病的特点,成为当前 AD 动物模型研究的热点。其中以 D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 诱导的衰老模型为基础配合具有神经毒性的药物共同制备的 AD 动物模型最为常见。本文从行为学及病理学改变角度对 D-gal 及其结合其他药物制备的后天性 AD 模型进行了总结和评价,以期为该疾病今后的深入研究提供参考。

## 1 单纯 D-gal 诱导的 AD 动物模型

### 1.1 D-gal 诱发衰老的机理

研究表明,长期服用 D-gal,会导致啮齿类动物体内代谢异常,氧化应激增强,神经元数量减少及结构损伤<sup>[10-12]</sup>,多用于制备大脑老化和抗衰老药理研究的动物模型<sup>[13-14]</sup>。D-gal 诱发衰老的主要机制为长期大量注射该物质能使体内产生过多的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)<sup>[15]</sup>,造成各器官抗

氧化酶超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 等活性降低,导致机体对自由基的清除能力下降,体内自由基的大量堆积破坏了细胞结构和功能,使得机体多器官、多系统功能减退<sup>[16-17]</sup>。此外,D-gal 致衰老的机制也与免疫缺陷、炎症反应、线粒体功能障碍、端粒缩短等相关<sup>[18-19]</sup>。

### 1.2 D-gal 复制 AD 动物模型

研究发现,D-gal 诱导的动物模型除衰老外,还会出现认知、记忆障碍的行为学表现及胆碱能神经元减少、A $\beta$  免疫反应物的聚集等病理变化<sup>[20]</sup>。单独使用 D-gal 制备的 AD 动物模型,用药剂量在 100 ~ 200 mg/kg,造模周期约为 6 ~ 12 周。

(1) 调控 A $\beta$ 、Tau 蛋白的表达,破坏神经元结构

D-gal 干预可造成 A $\beta$ 、Tau 蛋白的异常表达、神经元损伤。Yu 等<sup>[21]</sup>观察了 D-gal 对大鼠的影响。经 Morris 水迷宫测试,发现模型大鼠逃避潜伏期延长、目标象限停留时间减少,同时出现海马 CA1 区树突棘密度降低,Tau 蛋白过度磷酸化水平升高,突触相关蛋白表达下降、细胞自噬活性异常的病理改变。杜艳军等<sup>[22]</sup>发现,D-gal 会造成海马区突触损伤、神经元丢失及 A $\beta$  的高表达,但未明确指出是否形成 SP。郑清等<sup>[23]</sup>的研究证实,D-gal 干预后的大鼠兴奋性降低、探究及认知功能减退,其海马区突触数量减少,双螺旋细丝蛋白-1 (PHF-1) 沉积,而 PHF 是 NFTs 的主要成分之一。Liang 等<sup>[24]</sup>的研究表明 D-gal 长期刺激会造成海马区 A $\beta$  蛋白的沉积。

(2) 诱导氧化应激、炎症反应

D-gal 复制的 AD 动物模型表现出机体氧化应激及中枢炎症反应的病理改变。Budni 等<sup>[25-26]</sup>研究发现,D-gal 灌胃 4 周后,大鼠出现习惯记忆及自发探索功能减退,6 周后表现出空间记忆障碍,其前额叶皮质和海马体中线粒体呼吸链复合物的活性增加,促使机体产生大量的 ROS,出现过氧化反应,证实了氧化损伤与 AD 模型认知障碍的相关性,并指出线粒体能量代谢的异常可能是引起机体氧化损伤造成 AD 的分子机制之一。Ali 等<sup>[27]</sup>的研究也明确了这种模型复制方法会损伤白化小鼠的空间学习及短时记忆功能,诱导细胞氧化应激损伤。此外,该研究也指出 D-gal 干预会刺激促炎因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 等的释放,诱发或加重机体的炎症反应。Rehman 等<sup>[28]</sup>发现 D-gal 复

制的 AD 模型,具备学习、记忆受损,运动迟缓的行为学改变,同时也能表现出中枢炎症反应、氧化损伤等病理改变。

此外,He 等<sup>[29]</sup>的研究表明 D-gal 复制的 AD 模型动物学习记忆功能的减退可能与其损害肠道菌群,增强促炎调控通路活性,诱发中枢炎症反应,即与肠道微生物-肠-脑轴的失调密切相关。而 Mansour 等<sup>[30]</sup>研究发现,去除雌性大鼠双侧卵巢结合 D-gal 腹腔注射后,大鼠也会出现空间学习记忆及自发探索功能的障碍,其机制可能与该造模方法诱导脑组织中 A $\beta$  沉积、Tau 蛋白过度磷酸化;增加 NOX-1、TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达;通过提高 MPC-1 和 GluR II 的含量引起兴奋性神经毒性作用以及调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的活性,抑制细胞自噬等相关。提示机体雌激素含量的改变也是导致 AD 发生的可能原因。

## 2 D-gal 为基础的复合式 AD 动物模型

除上述单独使用 D-gal 建立 AD 动物模型外,也有研究在 D-gal 诱导动物衰老的基础上,配合具有神经毒性的药物采用复合式方法制备 AD 动物模型,主要包括 D-gal 联合 A $\beta$  类寡聚体、D-gal 联合三氯化铝 (AlCl<sub>3</sub>)、D-gal 联合亚硝酸钠 (NaNO<sub>2</sub>)。

### 2.1 D-gal 联合 A $\beta$ 类寡聚体

#### 2.1.1 A $\beta$ 类寡聚体诱发 AD 的机理

A $\beta$  是由  $\beta$  淀粉样前体蛋白 ( $\beta$ -amyloid precursor protein, APP) 经  $\gamma$ -分泌酶和  $\beta$ -分泌酶的蛋白水解产生的产物<sup>[31]</sup>。少量的 A $\beta$  可发挥营养神经细胞和增强突触可塑性的作用,而 A $\beta$  的异常增多及聚集则具有神经毒性作用。按其结构的不同,A $\beta$  可分为单体、寡聚体和纤维,部分研究认为可溶性寡聚体 A $\beta$  的聚集与 AD 患者认知功能障碍关系密切<sup>[32-33]</sup>。A $\beta$  寡聚体通过与 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR)、 $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑啉受体 ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPAR)、神经元表面的胰岛素受体 (insulin receptor, Ins R) 等的结合,借助不同信号通路诱发机体氧化应激反应,导致神经元凋亡,细胞内 A $\beta$  异常沉积,进而使机体认知功能障碍<sup>[34]</sup>。D-gal 联合 A $\beta$  类寡聚体复制 AD 动物模型时,D-gal 剂量为 50 ~ 150 mg/kg,A $\beta$  用量为 2 ~ 5  $\mu$ L,造模周期约 6 ~ 7 周。

#### 2.1.2 D-gal 联合 A $\beta$ 类寡聚体复制 AD 动物模型

(1) 促进 A $\beta$  聚集,Tau 蛋白磷酸化,损害神经元结构或功能

D-gal 联合 A $\beta$  类寡聚体的复合式造模方法体现了 AD 脑组织中 A $\beta$  聚集、Tau 蛋白磷酸化、神经元损伤的病理学特征。Ye 等<sup>[35]</sup>发现 D-gal 联合 A $\beta_{25-35}$  造模后的大鼠空间学习及记忆障碍,检测发现其海马区神经元超微结构受损,磷酸化 Tau (p-Tau) 蛋白表达增加。Deng 等<sup>[36]</sup>的研究证实了 D-gal 联合 A $\beta_{25-35}$  复制的动物模型具备 AD 学习记忆功能减退的行为学表现,也符合 AD 脑组织中 APP、Tau 蛋白表达增加、神经元凋亡的病理特征。张淑萍等<sup>[37]</sup>的研究表明 D-gal 联合 A $\beta_{1-42}$  复制的动物模型也会表现出认知功能减退及海马神经元超微结构受损的异常改变,但对 A $\beta_{1-42}$  的用量未进行说明。

(2) 破坏胆碱能系统,降低抗氧化功能,引起炎症反应

D-gal 联合 A $\beta$  类寡聚体的复合式造模方法模拟了与 AD 发病相关的中枢胆碱能功能低下、过氧化损伤及炎症反应假说。王改凤<sup>[38]</sup>研究发现,D-gal 联合 A $\beta_{25-35}$  复制的 AD 大鼠模型,学习及空间记忆功能受损,同时其脑组织中乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 活性明显升高,表明大鼠胆碱能系统受损。Zhang 等<sup>[39]</sup>的实验结果与上述研究一致。同时,两项研究均指出该造模法可破坏大鼠的抗氧化能力,造成过氧化损伤,具体表现为 SOD 活性降低,MDA 浓度升高。此外,在前者的研究中还出现了炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  含量显著增多的现象。

### 2.2 D-gal 联合 AlCl<sub>3</sub>

#### 2.2.1 AlCl<sub>3</sub> 诱发 AD 的机理

铝 (Al) 在体内的蓄积会导致大脑出现氧化损伤、胆碱能功能减退及认知障碍<sup>[40]</sup>。研究表明,AD 患者脑组织中 Al 的含量显著升高<sup>[41]</sup>。Al 诱导 AD 动物模型的机制为:一方面 Al 是促氧剂,可诱导机体组织器官 ROS 生成增多,抗氧化酶活性降低,使脂质、蛋白质、核酸的结构和功能异常,导致细胞凋亡或功能丧失,引发 AD<sup>[42-43]</sup>;另一方面,Al 通过诱导  $\alpha$ -分泌酶和  $\beta$ -分泌酶的活性,调节 APP 的表达和水解过程,增加脑组织 A $\beta$  的生成,引起 AD<sup>[44-45]</sup>。此外,Al 也可以通过调节蛋白激酶和蛋白磷酸酶的活性,诱导 Tau 蛋白过度磷酸化和异常聚集,进而形成 NFTs<sup>[46]</sup>。D-gal 联合 AlCl<sub>3</sub> 复制 AD

动物模型时,不同报道中两者的用量相差较大,造模周期约 6 ~ 12 周。

### 2.2.2 D-gal 联合 $\text{AlCl}_3$ 复制 AD 动物模型

D-gal 联合  $\text{AlCl}_3$  复制的 AD 模型可出现  $\text{A}\beta$ 、Tau 蛋白表达增加、神经细胞凋亡、胆碱能系统损伤、氧化应激及炎症反应等病理改变。陈建国等<sup>[47]</sup>发现 D-gal 联合  $\text{AlCl}_3$  制备的 AD 大鼠模型学习记忆功能受损,大脑皮质神经元内 Tau 蛋白、海马  $\text{A}\beta$  含量显著增加,匀浆中 GSH-Px、SOD 活性下降,MDA 水平增高,表明模型大鼠脑组织中  $\text{A}\beta$  等蛋白生成清除机制失衡,机体氧化还原平衡失调。Chiroma 等<sup>[48]</sup>观察了 D-gal 联合  $\text{AlCl}_3$  干预后大鼠的行为学和病理改变,结果显示模型大鼠记忆认知功能减退,海马中 Tau 蛋白发生过度磷酸化改变,且神经细胞大量丢失。Mahdi 等<sup>[49]</sup>的研究也表明该模型复制方法会引起大鼠神经元结构和数量的异常改变,出现氧化应激及炎症反应。Ji 等<sup>[50]</sup>的研究发现上述造模法建立的 AD 模型学习记忆、视觉识别、探索能力减退,同时出现海马神经元突触损伤, AChE 活性增加,促炎因子释放增多,抗氧化物活性降低的病理改变。此外, Song 等<sup>[51]</sup>也发现 D-gal 联合  $\text{AlCl}_3$  干预会影响小鼠脑组织内神经递质的释放以及肠道菌群的紊乱,这些也被证实与 AD 的发生发展密切相关。

### 2.3 D-gal 联合亚硝酸钠 ( $\text{NaNO}_2$ )

#### 2.3.1 $\text{NaNO}_2$ 诱发 AD 的机理

$\text{NaNO}_2$  是一种氧化剂,机体持续摄入会诱导血红蛋白中的二价铁氧化成为三价铁,形成高铁血红蛋白,促使组织缺氧,引起细胞内的游离  $\text{Ca}^{2+}$  增多、自由基生成增加。一方面这将诱导机体发生氧化应激,导致蛋白磷酸酯酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 活性下降,引起神经元骨架蛋白的过度磷酸化;另一方面将促进 NFT<sub>s</sub> 的形成。此外,在酸性环境下  $\text{NaNO}_2$  易转化成 NO, NO 与超氧阴离子结合生成过氧亚硝酸盐, NO 和过氧亚硝酸盐可以诱导 Tau 蛋白的过度磷酸化,诱导 AD 的发生<sup>[52-53]</sup>。D-gal 联合  $\text{NaNO}_2$  复制 AD 动物模型时,药物用量多集中在 D-gal 120 mg/kg 和  $\text{NaNO}_2$  90 mg/kg,造模周期为 60 d。

#### 2.3.2 D-gal 联合 $\text{NaNO}_2$ 复制 AD 动物模型

D-gal 联合  $\text{NaNO}_2$  复制的 AD 动物模型多体现出胆碱能系统损伤、中枢炎症反应、氧化应激的病理特征。周张玖智等<sup>[54]</sup>通过 D-gal 联合  $\text{NaNO}_2$  复

合干预建立的 AD 模型学习记忆障碍,皮层组织中 MDA、IL-6、TNF- $\alpha$  含量显著升高, SOD、GSH-Px 活性降低,表明该模型体内自由基平衡失调,促炎因子释放增加。Zhang 等<sup>[55]</sup>的研究证实了如前所述复制的 AD 模型表现出神经炎症反应及氧化/抗氧化失衡的病理改变,同时,大鼠额叶皮质和海马中 AChE 水平升高, Ach 和 ChE 含量降低,表明该模型胆碱能系统也受到损害。Wang 等<sup>[56]</sup>发现,当 D-gal 的用量为每小时 1250 mg/kg,会代偿性上调脑组织中 SOD 活性及 GSH 水平,并会诱导海马 CA1、CA3、CA4 区神经元损伤。

根据现有文献,总结了上述几种 AD 动物模型的制备方法、行为学表现和病理改变(见表 1),梳理了不同 AD 动物模型的模型特征(见表 2)。

## 3 结语

复制具备 AD 行为学表现和病理生化特征的动物模型是当今研发治疗 AD 新药物、探索新疗法的重要手段和载体。现常用的以 D-gal 为基础的 AD 动物模型制备以单纯 D-gal、D-gal 联合  $\text{A}\beta$  类寡聚体、D-gal 联合  $\text{AlCl}_3$  及 D-gal 联合  $\text{NaNO}_2$  为主。

从病程发展看, D-gal 干预致衰老接近 AD 慢性起病的过程。从行为学表现看,上述诸法复制的动物模型均能体现出学习障碍、记忆受损、行为异常等与临床 AD 患者相类似的表现。从病理生化改变看,诸法虽未能彻底满足各假说支撑下 AD 的发病机制,但也体现出该病多因素致病的特点。首先,各造模法的共同点在于均能诱导机体发生氧化应激、炎症反应,故均可适用于研究 AD 患者氧化反应、神经炎症的内在机制及研发抗氧化、抑制神经炎症的相关药物。此外, D-gal、D-gal 联合  $\text{A}\beta$  类寡聚体、D-gal 联合  $\text{AlCl}_3$  可模拟 AD 神经元损伤、 $\text{A}\beta$  聚集和 Tau 蛋白过度磷酸化的病理改变,可用于研究 AD 神经元结构受损或功能障碍及  $\text{A}\beta$ 、Tau 病理产物异常表达的内在机制及多靶向药物干预 AD 的作用机制。D-gal 联合  $\text{A}\beta$  类寡聚体、D-gal 联合  $\text{AlCl}_3$ 、D-gal 联合  $\text{NaNO}_2$  也能破坏胆碱能功能,重现 AD 胆碱能系统紊乱的病理特征,适用于研究胆碱能系统损伤与 AD 发病相关的神经机制及探讨拟胆碱药物的疗效评价。D-gal、D-gal 联合  $\text{AlCl}_3$  涉及肠道菌群失调的相关表现,可用于一些通过调节肠道菌群改善 AD 相关药物的内在机制探讨。相比较而言, D-gal 结合  $\text{A}\beta$  类寡聚体、 $\text{AlCl}_3$  复制的模型病理

特征更清晰,考虑到前者模型制备复杂,成功率低,故 D-gal 结合  $\text{AlCl}_3$  复制的模型适用性最高。

但上述诸法也存在一定的局限性。首先,虽有个别文献提到单纯 D-gal 刺激会形成 NFTs 的主要成分 PHF,但其内在机制尚不明确,结合该药物诱导衰老的相关研究,推断其作用的主要靶点是诱导机体的氧化应激、炎症反应等,而不是影响体内  $\text{A}\beta$  或 Tau 蛋白的产生及代谢过程。 $\text{A}\beta$  类寡聚体可直接模拟 AD 的特征性病理改变,但不敢保证体外给药与机体之间的相互作用和机体因病变生成病理

产物影响其功能的作用机理相一致;同时作为一种创伤性刺激,易对周边脑组织产生损伤。 $\text{NaNO}_2$  本身是一种氧化剂,其诱导的 Tau 蛋白过度磷酸化不能排除是破坏氧化还原平衡产生的后效应。 $\text{AlCl}_3$  能同时调节  $\text{A}\beta$  的生成及 Tau 蛋白磷酸化和聚集过程,相比较而言,能较好的反映 AD 特有病理改变的内在机制。总体而言,D-gal、 $\text{A}\beta$  类寡聚体、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{NaNO}_2$  均直接或间接参与调控  $\text{A}\beta$  高表达、Tau 蛋白过度磷酸化的过程,但诸法均未明确指出在 AD 动物模型中是否出现 SP、NFTs,推测可能与模型复

表 1 D-半乳糖法制备 AD 动物模型的具体方法、行为学表现、病理改变

Table 1 Specific methods, behavioral manifestations and pathological changes of ad animal model prepared by D-galactose method

模型 Models	动物 Animal	方法 Method	行为学表现 Behavior features	病理改变 Pathological changes
	SD 大鼠 SD rat	120 mg/kg, 腹腔注射 8 周 120 mg/kg, intraperitoneal injection for 8 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 目标象限停留时间 ↓ Morris Water Maze (MWM). Escape latency ↑, target quadrant dwell time ↓	海马: 树突棘密度 ↓, PSD95 ↓, SYP1 ↓, p-Tau ↑, GSK3β/mTOR 信号通路活性 ↑ <sup>[21]</sup> Hippocampus. The density of dendritic spines ↓, PSD95 ↓, SYP1 ↓, p-Tau ↑, the activity of GSK3β/MTOR signaling pathway ↑ <sup>[21]</sup>
	SD 大鼠 SD rat	150 mg/kg, 腹腔注射 12 周 150 mg/kg, intraperitoneal injection for 12 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 穿越平台次数 ↓ MWM. Escape latency ↑, target-platform crossing times ↓	海马: 神经元结构紊乱; $\text{A}\beta_{1-42}$ ↑; p-ERK ↓, p-CREB ↓; ERα (雌激素受体 α) ↓ <sup>[22]</sup> Hippocampus. Neuronal structural disorder. $\text{A}\beta_{1-42}$ ↑. p-ERK ↓, p-CREB ↓. ERα (estrogen receptor α) ↓ <sup>[22]</sup>
	SD 大鼠 SD rat	100 mg/kg, 腹腔注射 6 周 100 mg/kg, intraperitoneal injection for 6 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 平台象限时间比率 ↓; 旷场实验: 运动距离 ↓, 直立次数 ↓, 中心区域运动时间比率 ↓ MWM. Escape latency ↑, percentage of dwell time in the target quadrant ↓. Open-field test. Movement distance ↓, upright times ↓, ratio of movement time in the central area ↓	海马: 突触数量 ↓, 突触形态异常; PHF-1 (NFTs 的主要成分) ↑; PI3K ↑, AKT ↑, p-AKT ↑, mTOR ↑ <sup>[23]</sup> Hippocampus. The number of synapses ↓, abnormal synaptic morphology. PHF-1 (main components of NFTs) ↑. PI3K ↑, AKT ↑, p-AKT ↑, mTOR ↑ <sup>[23]</sup>
D-gal 模型 D-gal model	SD 大鼠 SD rat	120 mg/kg, 腹腔注射 7 周 120 mg/kg, intraperitoneal injection for 7 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 目标象限停留时间 ↓ MWM. Escape latency ↑, target quadrant dwell time ↓	海马: 神经元结构异常; $\text{A}\beta$ ↑; NF-κB ↑, IL-1β ↑, TNF-α ↑; MAP-2 ↓, SOD ↓, CAT ↓, ROS ↑, MDA ↑ <sup>[24]</sup> Hippocampus. Abnormal neuronal structure. $\text{A}\beta$ ↑. NF-κB ↑, IL-1β ↑, TNF-α ↑. MAP-2 ↓, SOD ↓, CAT ↓, ROS ↑, MDA ↑ <sup>[24]</sup>
	Wistar 大鼠 Wistar rat	100 mg/kg, 灌胃 1、2、4、6、8 周 100 mg/kg, irrigation stomach for 1, 2, 4, 6, 8 weeks	旷场实验: 水平和垂直活动次数 ↓ 八臂迷宫: 潜伏期 ↑ Open-field test: the number of horizontal and vertical activities ↓ 8-arm radial maze. incubation period ↑	海马: 第 4、6、8 周时 MDA ↑, 羰基蛋白质 ↑; 前额叶皮层和海马: 第 1、2、4、6 和 8 周时线粒体呼吸链复合物 I、II、II-III 和 IV 的活性 ↑ <sup>[25-26]</sup> Hippocampus. MDA and carbonyl protein at week 4, 6 and 8 ↑. Prefrontal cortex and hippocampus. The activity of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, II-III and IV at week 1, 2, 4, 6 and 8 ↑ <sup>[25-26]</sup>
	白化小鼠 Albino mice	120 mg/kg, 腹腔注射 8 周 120 mg/kg, intraperitoneal injection for 8 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 目标象限停留时间 ↓; Y-迷宫: 自发交替百分比 ↓ MWM. Escape latency ↑, target quadrant dwell time ↓. Y-maze. The percentage of spontaneous alternation ↓	海马: SYP ↓, PSD95 ↓, BACE-1 ↑, APP ↑, $\text{A}\beta$ ↑; NF-κB ↑, TNF-α ↑, IL-1β ↑; SIRT1 ↓, NrF-2 ↓, HO-1 ↓ <sup>[27]</sup> Hippocampus. SYP ↓, PSD95 ↓. BACE-1 ↑, APP ↑, $\text{A}\beta$ ↑. NF-κB ↑, TNF-α ↑, IL-1β ↑. SIRT1 ↓, NrF-2 ↓, HO-1 ↓ <sup>[27]</sup>
	SD 大鼠 SD rat	100 mg/kg, 腹腔注射 7 周 100 mg/kg, intraperitoneal injection for 7 weeks	Morris 水迷宫: 平台潜伏期 ↑, 平均游泳速度 ↓; Y-迷宫实验: 自发交替百分比 ↓ MWM. Platform latency ↑, average swimming speed ↓. Y-maze. The percentage of spontaneous alternation ↓	皮层和海马: SYP ↓, STX ↓; p-JNK ↑, Bax ↑, Bcl-2 ↓, Bax/Bcl-2 ↑; BACE-1 ↑, RAGE ↑, $\text{A}\beta$ ↑; GFAP ↑; ROS ↑, MDA ↑; NF-κB ↑, iNOS ↑, TNF-α ↑ <sup>[28]</sup> Cortex and hippocampus. SYP ↓, STX ↓. p-JNK ↑, Bax ↑, Bcl-2 ↓, Bax/Bcl-2 ↑. BACE-1 ↑, RAGE ↑, $\text{A}\beta$ ↑. GFAP ↑. ROS ↑, MDA ↑. NF-κB ↑, iNOS ↑, TNF-α ↑ <sup>[28]</sup>

续表1

模型 Models	动物 Animal	方法 Method	行为学表现 Behavior features	病理改变 Pathological changes
	SD 大鼠 SD rat	120 mg/kg, 腹腔注射 8 周 120 mg/kg, intraperitoneal injection for 8 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 目标象限停留时间 ↓ MWM. Escape latency ↑, target quadrant dwell time ↓	海马 CA1 区: Iba-1 (离子钙接头蛋白分子-1) ↑ 血清: LPS (脂多糖) ↑, ZO-1 (闭锁小带蛋白 1) ↓, DAO (二胺氧化酶) ↑, S-100β ↑, TLR4/NF-κB 信号通路活性 ↑ <sup>[29]</sup> Hippocampal CA1 region. Iba-1 (Ionized calcium binding adaptor molecule-1) ↑. Serum. LPS (lipopolysaccharide) ↑, ZO-1 (Zonula occludens-1) ↓, DAO (Diamine oxidase) ↑, S-100β ↑, the activity of TLR4/NF-κB signaling pathway ↑ <sup>[29]</sup>
	Wistar 大鼠 Wistar rat	150 mg/kg, 腹腔注射 8 周 150 mg/kg, intraperitoneal injection for 8 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 目标象限停留时间 ↓; 新型物体识别: 偏好指数 ↓, 新物体识别能力 ↓ MWM. Escape latency ↑, target quadrant dwell time ↓. Novel object recognition. Preference index ↓, new object recognition ability ↓	皮层和海马: 神经元结构异常; 海马: Aβ <sub>1-42</sub> ↑; p-tau ↑; NOX-1 (NADPH 氧化酶-1) ↑, TNF-α ↑; GluR-II (谷氨酸受体 II) ↑, MPC-1 (线粒体丙酮酸载体-1) ↑; p38 MAPK ↑, HER-2 (人类表皮生长因子受体 2) ↑, ERR-α (雌激素相关受体 α) ↑, PI3K/Akt/mTOR 信号通路活性 ↓ <sup>[30]</sup> Cortex and hippocampus: abnormal neuronal structure. Hippocampus. Aβ <sub>1-42</sub> ↑. p-tau ↑. NOX-1 (NADPH oxidase 1) ↑, TNF-α ↑. GluR-II (Glutamate receptor 2) ↑, MPC-1 (Mitochondrial pyruvate carrier-1) ↑. p38 MAPK ↑. HER-2 (Human epidermal growth factor receptor-2) ↑, ERR-α (Estrogen-related receptor-2) ↑, the activity of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway ↓ <sup>[30]</sup>
	SD 大鼠 SD rat	D-gal 100 mg/kg, 腹腔注射 42 d, 第 21 天海马注射 5 μL 的 Aβ <sub>25-35</sub> D-gal 100 mg/kg, intraperitoneal injection for 42 d, and injection 5 μL of Aβ <sub>25-35</sub> in hippocampus at 21st day	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 目标象限停留时间 ↓, 穿过平台的次数 ↓ MWM. Escape latency ↑, target quadrant dwell time ↓, target-platform crossing times ↓	海马: 神经元结构异常; p-tau ↑, CaM-CaMKIV 信号通路活性 ↑ <sup>[35]</sup> Hippocampus. Abnormal neuronal structure. p-tau ↑, the activity of CaM-CaMKIV signaling pathway ↑ <sup>[35]</sup>
D-gal 联合 Aβ 模型 D-gal combined with Aβ model	SD 大鼠 SD rat	D-gal 150 mg/kg, 腹腔注射 7 周, 第 5 周在海马注射 2 μL 的 Aβ <sub>25-35</sub> D-gal 150 mg/kg, intraperitoneal injection for 7 weeks, and injection 2 μL of Aβ <sub>25-35</sub> in hippocampus at 5th week	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 穿过平台次数 ↓ MWM. Escape latency ↑, target-platform crossing times ↓	皮层和海马: SYP ↓; APP ↑; tau ↑, caspase-3 ↑; Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATP ↓; Glu ↑, c-GABA ↓; AChE ↑, ACh ↓; SOD ↓, CAT ↓, GSH-Px ↓, MDA ↑ <sup>[36]</sup> Cortex and hippocampus. SYP ↓. APP ↑. tau ↑, caspase-3 ↑. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATP ↓. Glu ↑, c-GABA ↓. AChE ↑, ACh ↓. SOD ↓, CAT ↓, GSH-Px ↓, MDA ↑ <sup>[36]</sup>
	SD 大鼠 SD rat	D-gal 0.125 g/kg, 颈背部皮下注射 40 d, 第 40 天海马注射 Aβ <sub>1-42</sub> D-gal 0.125 g/kg, subcutaneous injection on the nape back for 40 d, and injection Aβ <sub>1-42</sub> in hippocampus at 40th day	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 航行距离 ↑ MWM. Escape latency ↑, swimming distance ↑	海马: 神经元结构异常; 血清: SOD ↓, MDA ↑, 胸腺指数和脾指数 ↓ <sup>[37]</sup> Hippocampus. Abnormal neuronal structure. Serum. SOD ↓, MDA ↑, thymus index and spleen index ↓ <sup>[37]</sup>
	SD 大鼠 SD rat	D-gal 150 mg/kg, 皮下注射 6 周, 第 7 周海马注射 4 nmol/L 的 Aβ <sub>25-35</sub> D-gal 150 mg/kg, subcutaneous injection for 6 weeks, and injection 4 nmol/L of Aβ <sub>25-35</sub> in hippocampus at 7th week	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 目标象限内游泳距离 ↓ MWM. Escape latency ↑, swimming distance in target quadrant ↓	海马: AChE ↑, ChAT ↓; SOD ↓, MDA ↑; TNF-α ↑, IL-1 ↑ <sup>[38]</sup> Hippocampus. AChE ↑, ChAT ↓. SOD ↓, MDA ↑. TNF-α ↑, IL-1 ↑ <sup>[38]</sup>
	SD 大鼠 SD rat	D-gal 0.05 g/kg, 腹腔注射 6 周, 第 7 周海马注射 2 μL 的 Aβ <sub>1-40</sub> D-gal 0.05 g/kg, intraperitoneal injection for 6 weeks, and injection 2 μL of Aβ <sub>1-40</sub> in hippocampus at 7th week	回避训练: 逃跑反应数 ↑, 电击持续时间 ↑ Avoidance training. The number of escape reactions ↑, duration of electric shock ↑	海马: 神经元形态异常、神经元凋亡率 ↑、Bcl-2 ↓, Bax ↑, Caspase 3 ↑, Caspase 9 ↑, Bax/Bcl-2 ↑; AChE ↑, ChE ↑, ChAT ↓; MDA ↑, ROS ↑, SOD ↓ <sup>[39]</sup> Hippocampus. Abnormal neuron morphology, neuron apoptosis rate ↑, Bcl-2 ↓, Bax ↑, Caspase 3 ↑, Caspase 9 ↑, Bax/Bcl-2 ↑. AChE ↑, ChE ↑, ChAT ↓. MDA ↑, ROS ↑, SOD ↓. MDA ↑, ROS ↑, SOD ↓ <sup>[39]</sup>

续表1

模型 Models	动物 Animal	方法 Method	行为学表现 Behavior features	病理改变 Pathological changes
	SD 大鼠 SD rat	腹腔注射 D-gal (180 mg/kg) 联合灌胃 AlCl <sub>3</sub> (15 mg/kg), 持续 12 周 Intraperitoneal injection of D-gal (180 mg/kg) combined with irrigation stomach of AlCl <sub>3</sub> (15 mg/kg) for 12 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 穿越平台次数 ↓ MWM. Escape latency ↑, target-platform crossing times ↓	海马: Aβ <sub>40</sub> ↑, Aβ <sub>42</sub> ↑; p-Tau ↑; MDA ↑, GSH ↓, SOD ↓ <sup>[47]</sup> Hippocampus. Aβ <sub>40</sub> ↑, Aβ <sub>42</sub> ↑. p-Tau ↑. MDA ↑, GSH ↓, SOD ↓ <sup>[47]</sup>
	Wistar 大鼠 Wistar rat	腹腔注射 D-gal (60 mg/kg) 和 AlCl <sub>3</sub> (200 mg/kg), 持续 10 周 Intraperitoneal injection of D-gal (60 mg/kg) and AlCl <sub>3</sub> (200 mg/kg) for 10 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 穿越平台次数 ↓ MWM. Escape latency ↑, target-platform crossing times ↓	海马: 锥体细胞数量 ↓; Bcl-2 mRNA ↓, Caspase-3 mRNA ↑; PP2A ↓; GSK-3β 活性 ↑ <sup>[48]</sup> Hippocampus. The number of pyramidal cells ↓. Bcl-2 mRNA ↓, Caspase-3 mRNA ↑, PP2A ↓. the activity of GSK-3β ↑ <sup>[48]</sup>
D-gal 联合 AlCl <sub>3</sub> 模型 D-gal combined with AlCl <sub>3</sub> model	Wistar 大鼠 Wistar rat	腹腔注射 D-gal (60 mg/kg) 结合灌胃 AlCl <sub>3</sub> (200 mg/kg), 持续 10 周 Intraperitoneal injection of D-gal (60 mg/kg) combined with irrigation stomach of AlCl <sub>3</sub> (200 mg/kg) for 10 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 目标象限停留时间 ↓ MWM. Escape latency ↑, target quadrant dwell time ↓	海马: 神经元结构异常, 神经元数量 ↓; MDA ↑, SOD ↓, GSH ↑; Nestin ↓; GFAP ↓ <sup>[49]</sup> Hippocampus. Abnormal neuronal structure. The number of neurons ↓. MDA ↑, SOD ↓, GSH ↑. Nestin ↓. GFAP ↓ <sup>[49]</sup>
	C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	皮下注射 D-gal (120 mg/kg) 结合灌胃 AlCl <sub>3</sub> (200 mg/kg), 持续 60 d Subcutaneous injection of D-gal (120 mg/kg) combined with irrigation stomach of AlCl <sub>3</sub> (200 mg/kg) for 60 d	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 穿过平台的次数 ↓, 目标象限停留时间 ↓; 新物体识别: 偏好指数 ↓, 新物体识别能力 ↓; 旷场实验: 中央区域活动时间 ↓ MWM. Escape latency ↑, target-platform crossing times ↓, target quadrant dwell time ↓. Novel object recognition. Preference index ↓, new object recognition ability ↓. Open-field test. Movement time in the central area ↓	海马: 神经元结构异常, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATP 酶活性 ↓; p-Tau ↑; ChAT ↓, AChE ↑; GSH-Px ↓, SOD ↓, MDA ↑; TNF-α ↑, IL-6 ↑, IL-1β ↑ <sup>[50]</sup> Hippocampus. Abnormal neuronal structure. The activity of Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATP ↓. p-Tau ↑. ChAT ↓, AChE ↑. GSH-Px ↓, SOD ↓, MDA ↑. TNF-α ↑, IL-6 ↑, IL-1β ↑ <sup>[50]</sup>
	ICR 小鼠 ICR mice	腹腔注射 D-gal (120 mg/kg) 结合灌胃 AlCl <sub>3</sub> (30 mg/kg), 持续 10 周 Intraperitoneal injection of D-gal (120 mg/kg) combined with irrigation stomach of AlCl <sub>3</sub> (30 mg/kg) for 10 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 目标象限停留时间 ↓; 跳台实验: 潜伏期 ↓, 错误次数 ↑ MWM. Escape latency ↑, target quadrant dwell time ↓. Step-down test. Incubation period ↓, the number of errors ↑	海马: 神经元结构异常; Aβ ↑; p-Tau ↑; PI3K/Akt/GS-3β 信号通路活性 ↓; 血清: 5-HT ↓, DA ↓, GABA ↓; 肠道菌群失调 <sup>[51]</sup> Hippocampus. Abnormal neuronal structure. Aβ ↑. p-Tau ↑. The activity of PI3K/Akt/GS-3β signaling pathway ↓. Serum. 5-HT ↓, DA ↓, GABA ↓. Dysbacteriosis <sup>[51]</sup>
	KM 小鼠 KM mice	皮下注射 D-gal (120 mg/kg) 和 NaNO <sub>2</sub> (90 mg/kg), 持续 60 d Subcutaneous injection of D-gal (120 mg/kg) and NaNO <sub>2</sub> (90 mg/kg) for 60 d	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 穿越平台次数 ↓; 跳台实验: 潜伏期 ↓, 错误次数 ↑; 避暗实验: 潜伏期 ↓ MWM. Escape latency ↑, target-platform crossing times ↓. Step-down test. Incubation period ↓, the number of errors ↑. Step-through test. Incubation period ↓	脑组织: MDA ↑, SOD ↓, GSH-Px ↓; IL-6 ↑, TNF-α ↑ <sup>[54]</sup> Brain tissue. MDA ↑, SOD ↓, GSH-Px ↓. IL-6 ↑, TNF-α ↑ <sup>[54]</sup>
D-gal 联合 NaNO <sub>2</sub> 模型 D-gal combined with NaNO <sub>2</sub> model	KM 小鼠 KM mice	腹腔注射 D-gal (120 mg/kg) 和 NaNO <sub>2</sub> (90 mg/kg), 持续 60 d Intraperitoneal injection of D-gal (120 mg/kg) and NaNO <sub>2</sub> (90 mg/kg) for 60 d	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 目标象限交叉次数 ↓; 跳台实验: 潜伏期 ↓, 错误次数 ↑; 避暗实验: 潜伏期 ↓ MWM. Escape latency ↑, target quadrant crossing times ↓. Step-down test. Incubation period ↓, the number of errors ↑. Step-through test. Incubation period ↓	前额叶皮质和海马: BDNF ↓, TrkB ↓; ACh ↓, AChE ↑, ChAT ↓; SOD ↓, GSH ↓; IL-1β ↑, IL-10 ↓ <sup>[55]</sup> Prefrontal cortex and hippocampus. BDNF ↓, TrkB ↓. ACh ↓, AChE ↑, ChAT ↓. SOD ↓, GSH ↓. IL-1β ↑, IL-10 ↓ <sup>[55]</sup>
	KM 小鼠 KM mice	腹腔注射 D-gal (1250 mg/kg) 和 NaNO <sub>2</sub> (90 mg/kg), 持续 8 周 Intraperitoneal injection of D-gal (1250 mg/kg) and NaNO <sub>2</sub> (90 mg/kg) for 8 weeks	Morris 水迷宫: 逃避潜伏期 ↑, 目标象限停留时间 ↓ MWM. Escape latency ↑, target quadrant dwell time ↓	海马: 神经元结构异常; 脑组织: AChE ↑; SOD ↑, GSH ↑, MDA ↑, CAT ↓ <sup>[56]</sup> Hippocampus. Abnormal neuronal structure. Brain tissue. AChE ↑. SOD ↑, GSH ↑, MDA ↑, CAT ↓ <sup>[56]</sup>

表 2 D-半乳糖法制备的 AD 动物模型特征总结

Table 2 Summary of characteristics of AD animal model prepared by D-galactose method

模型 Models	认知表现 Cognitive performance	病理改变 Pathological changes	主要优缺点 Main advantages and disadvantages
D-gal 模型 D-gal model	空间学习障碍, 记忆(空间、短期、习惯)受损, 自发探索功能障碍, 兴奋性降低, 运动迟缓 <sup>[21-30]</sup> Spatial learning disorder, memory (spatial, short-term, habit) impairment, spontaneous exploration dysfunction, decreased excitability, bradykinesia <sup>[21-30]</sup>	Aβ 聚集 <sup>[22,24,27-28,30]</sup> , Tau 蛋白过度磷酸化 <sup>[21,23,30]</sup> , 突触损伤 <sup>[21,23,27-28]</sup> , 神经元结构异常 <sup>[22,24,28,30]</sup> , 星形胶质细胞增生 <sup>[28]</sup> , 氧化损伤 <sup>[24-28]</sup> , 炎症反应 <sup>[24,27-30]</sup> , 细胞自噬损伤 <sup>[21,30]</sup> , 肠道菌群失调 <sup>[29]</sup> Aβ aggregation <sup>[22,24,27-28,30]</sup> , Tau hyperphosphorylation <sup>[21,23,30]</sup> , synaptic injury <sup>[21,23,27-28]</sup> , abnormal neuronal structure <sup>[22,24,28,30]</sup> , astrocyte proliferation <sup>[28]</sup> , oxidative damage <sup>[24-28]</sup> , inflammatory reaction <sup>[24,27-30]</sup> , autophagy injury <sup>[21,30]</sup> , dysbacteriosis <sup>[29]</sup>	衰老模型特点突出; 造模时间长, AD 特有病理改变的内在机制不明确 Aging model features outstanding. Modeling time is long, the internal mechanism of AD specific pathological changes is not clear
D-gal 联合 Aβ 模型 D-gal combined with Aβ model	空间学习障碍, 记忆(空间、短期)受损, 运动能力受损 <sup>[35-39]</sup> Spatial learning disorder, memory (spatial, short-term) impairment, sports ability damage <sup>[35-39]</sup>	Aβ 聚集 <sup>[36]</sup> , Tau 蛋白过度磷酸化 <sup>[35-36]</sup> , 胆碱能系统损伤 <sup>[36,38-39]</sup> , 突触受损 <sup>[36]</sup> , 神经元结构异常或凋亡 <sup>[35,37,39]</sup> , 氧化损伤 <sup>[26,37-39]</sup> , 炎症反应 <sup>[38]</sup> , 神经递质合成或释放异常 <sup>[36]</sup> Aβ aggregation <sup>[36]</sup> , Tau hyperphosphorylation <sup>[35-36]</sup> , cholinergic system damage <sup>[36,38-39]</sup> , synaptic injury <sup>[36]</sup> , abnormal neuronal structure or neuronal apoptosis <sup>[35,37,39]</sup> , oxidative damage <sup>[26,37-39]</sup> , inflammatory reaction <sup>[38]</sup> , abnormal synthesis or release of neurotransmitters <sup>[36]</sup>	AD 经典病理改变相对明显; 造模难度大, 成功率低, 药物分布集中, 不符合脑组织中 Aβ 弥散分布的特点。 The classic pathological changes of AD are relatively obvious; modeling is difficult and the success rate is low, the drug distribution is concentrated, which does not conform to the characteristics of Aβ dispersion and distribution in brain tissue
D-gal 联合 AlCl <sub>3</sub> 模型 D-gal combined with AlCl <sub>3</sub> model	空间学习障碍, 记忆(空间、短期)功能减退, 自发探索功能障碍, 视觉识别能力受损, 水平运动功能异常, 焦虑状态 <sup>[47-51]</sup> Spatial learning disorder, memory (spatial, short-term) impairment, spontaneous exploration dysfunction, impaired visual recognition, abnormal horizontal movement function, anxiety state <sup>[47-51]</sup>	Aβ 聚集 <sup>[47,51]</sup> , Tau 蛋白过度磷酸化 <sup>[47-48,50-51]</sup> , 胆碱能系统损伤 <sup>[50]</sup> , 神经元结构异常或凋亡 <sup>[48-51]</sup> , 氧化损伤 <sup>[47,49-50]</sup> , 炎症反应 <sup>[49-50]</sup> , 肠道菌群紊乱 <sup>[51]</sup> , 神经递质合成或释放异常 <sup>[51]</sup> Aβ aggregation <sup>[47,51]</sup> , Tau hyperphosphorylation <sup>[47-48,50-51]</sup> , cholinergic system damage <sup>[50]</sup> , abnormal neuronal structure or neuronal apoptosis <sup>[48-51]</sup> , oxidative damage <sup>[47,49-50]</sup> , inflammatory reaction <sup>[49-50]</sup> , imbalance in the intestinal flora <sup>[51]</sup> , abnormal synthesis or release of neurotransmitters <sup>[51]</sup>	能较全面的模拟 AD 临床及病理生化表现; D-gal 和 AlCl <sub>3</sub> 的用量相差较大。 It can comprehensively simulate the clinical, pathological and biochemical manifestations of AD; the dosage of D-gal and AlCl <sub>3</sub> varies greatly
D-gal 联合 NaNO <sub>2</sub> 模型 D-gal combined with NaNO <sub>2</sub> model	空间学习障碍, 记忆(空间、短期)功能减退 <sup>[54-56]</sup> Spatial learning disorder, memory (spatial, short-term) impairment <sup>[54-56]</sup>	胆碱能系统损伤 <sup>[55-56]</sup> , 神经元结构异常 <sup>[56]</sup> , 氧化损伤 <sup>[54-56]</sup> , 炎症反应 <sup>[54-55]</sup> Cholinergic system damage <sup>[55-56]</sup> , abnormal neuronal structure <sup>[56]</sup> , oxidative damage <sup>[54-56]</sup> , inflammatory reaction <sup>[54-55]</sup>	药物用量及造模周期相对统一; Aβ 聚集和 Tau 蛋白过度磷酸化的病理特征不明显 Drug dosage and modeling cycle are relatively unified. The pathological features of Aβ aggregation and Tau hyperphosphorylation are not obvious

制中药物用量及造模周期的长短相关, 药物剂量小, 干预时间短, 在一定程度上, 可能会导致沉积在各脑区的 Aβ 经体内特定的降解酶所降解或者 Tau 蛋白磷酸化/去磷酸化的酶系统活性尚未受到严重影响, 使得沉积的 Aβ 或过度磷酸化的 Tau 蛋白不足以形成 SP 或 NFTs。故在原有研究的基础上, 加设干预药物的不同剂量组别及延长建模周期, 以此明确各造模法是否具备 AD 的典型病理改变, 会成为今后新的研究方向。有研究认为, 轻度认知功能障碍 (mild cognitive impairment, MCI) 作为 AD 的早期

阶段, 其动物模型与 AD 动物模型相比, 应具备早于 AD 的发病年龄、轻微的认知减退及轻度的病理生化改变<sup>[57]</sup>。已有文献报道了用 D-gal 配合高脂饲料喂养构建 MCI 动物模型的相关研究<sup>[58]</sup>, 这是否意味着上述诸法在控制动物大小、用药剂量及造模时间的条件下, 可以构建出较为理想的 MCI 动物模型。其次, 各模型制备方法选用的动物种类及年龄不尽相同, 一方面无法确定诱导 AD 的药物干预哪一类型的实验动物时导致的病理变化与人体更接近; 另一方面, 不同年龄的实验动物对致 AD 药物的

耐受性不同,引起的模型动物生化及病理改变不同。研究发现,对 3 月龄大鼠进行 D-gal 干预后诱导衰老的模型最接近自然衰老,造模效果好于小于 3 月龄的大鼠<sup>[59]</sup>。

综上,D-gal 为基础的复合式 AD 模型复制方法是近年来研究者探索较多的内容,结合各实验动物、药物自身结构和特征,进行大量实验研究后,总结出制备 AD 动物模型相对统一的动物种类、药物用量、给药方式、给药周期及各模型动物相对特异性的行为学、生化及病理改变是今后研究的重点。

#### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] 田金洲. 中国痴呆诊疗指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2018.
- Tian JZ. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of Alzheimer disease and other dementias [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2018.
- [ 2 ] Martinez B, Peplow PV. MicroRNAs as diagnostic and therapeutic tools for Alzheimer's disease: advances and limitations [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(2): 242-255.
- [ 3 ] Jia LF, Quan MN, Fu Y, et al. Dementia in China: epidemiology, clinical management, and research advances [J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(1): 81-92.
- [ 4 ] Cui M, Jiang YF, Zhao QH, et al. Metabolomics and incident dementia in older Chinese adults: the Shanghai aging study [J]. *Alzheimers Dement*, 2020, 16(5): 779-788.
- [ 5 ] 刘宁, 秦亚莉, 韩诚, 等. 基于海马糖皮质激素受体蛋白表达的阿尔茨海默病痰浊证发病机制研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(7): 3536-3539.
- Liu N, Qin YL, Han C, et al. Research progress on pathogenesis of Alzheimer's disease with syndrome of turbid phlegm based on expression of glucocorticoid receptor protein in hippocampus [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(7): 3536-3539.
- [ 6 ] Hamley IW. The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. role in Alzheimer's and fibrillization [J]. *Chem Rev*, 2012, 112(10): 5147-5192.
- [ 7 ] Sharma N, Singh AN. Exploring biomarkers for Alzheimer's disease [J]. *J Clin Diagn Res*, 2016, 10(7): 1-6.
- [ 8 ] 邓婷, 谢丹妮, 王平, 等. 阿尔茨海默病动物模型建立及评价研究分析 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2020, 34(11): 847-856.
- Deng T, Xie DN, Wang P, et al. Research and analysis on the establishment and evaluation of animal models of Alzheimer disease [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2020, 34(11): 847-856.
- [ 9 ] 秦川. 医学实验动物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2008.
- Qin C. Medical laboratory animal science [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2008.
- [ 10 ] Wei H, Cai Y, Chu J, et al. Temporal gene expression profile in hippocampus of mice treated with D-galactose [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28(5): 781-794.
- [ 11 ] Wei H, Li L, Song Q, et al. Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 157(2): 245-251.
- [ 12 ] Zhong JJ, Wang F, Wang ZF, et al. Aloin attenuates cognitive impairment and inflammation induced by D-galactose via down-regulating ERK, p38 and NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 48-54.
- [ 13 ] Wang XK, Liu JH, Wu TS, et al. Bergapten attenuates D-galactose-induced immunosenescence in BALB/c mice [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2018, 32(4): 309.
- [ 14 ] 杨华青, 赵磊, 徐美利, 等. 两种甜叶菊废渣提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化作用 [J]. *中国食品学报*, 2020, 20(10): 34-42.
- Yang HQ, Zhao L, Xu ML, et al. Antioxidant effect of two kinds of stevia residue extracts on D-galactose induced aging mice [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2020, 20(10): 34-42.
- [ 15 ] Rehman SU, Shan SA, Ali T, et al. Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(1): 255-271.
- [ 16 ] Qu Z, Zhang J, Yang H, et al. Protective effect of tetrahydropalmatine against D-galactose induced memory impairment in rat [J]. *Physiol Behav*, 2016, 154(11): 114-125.
- [ 17 ] Gao J, He H, Jiang WJ, et al. Salidroside ameliorates cognitive impairment in a D-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 293: 27-33.
- [ 18 ] 刘建亚, 冯文静, 王仁萍, 等. D-半乳糖致衰老动物模型及其机制研究进展 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2018, 17(3): 224-227.
- Liu JY, Feng WJ, Wang RP, et al. Research progress in D-galactose-induced aging animal model and its mechanisms [J]. *Chin J Mult Organ Dis Elderly*, 2018, 17(3): 224-227.
- [ 19 ] Zhu JH, Mu XY, Zeng J, et al. Ginsenoside Rg1 prevents cognitive impairment and hippocampus senescence in a rat model of D-galactose-induced aging [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e101291.
- [ 20 ] Hua XD, Lei M, Zhang YJ, et al. Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease [J]. *Life Sci*, 2007, 80(20): 1897-1905.
- [ 21 ] Yu CC, Wang J, Ye SS, et al. Preventive electroacupuncture ameliorates D-galactose-induced Alzheimer's disease-like pathology and memory deficits probably via inhibition of GSK3 $\beta$ /mTOR signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 1428752.
- [ 22 ] 杜艳军, 陶一鸣, 田青, 等. 基于 ERK/CREB 信号通路探讨艾灸肾俞穴改善去卵巢合 D-半乳糖 AD 样大鼠神经元丢失的机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(6): 1-7, 259-261.

- Du YJ, Tao YM, Tian Q, et al. To Study the Mechanism of Moxibustion at Shenshu points to improve neuron loss in ovariectomized D-galactose AD-like rats based on ERK/CREB signaling pathway [J]. Chin Arc Tradit Chin Med, 2021, 39(6): 1-7, 259-261.
- [23] 郑清, 孔立红, 余超超, 等. 电针对 D-半乳糖诱导的阿尔茨海默病大鼠认知功能及海马神经元自噬的影响 [J]. 针刺研究, 2020, 45(9): 689-695.
- Zheng Q, Kong LH, Yu CC, et al. Effects of electroacupuncture on cognitive function and neuronal autophagy in rats with D-galactose induced Alzheimer's disease [J]. Acupunc Res, 2020, 45(9): 689-695.
- [24] Liang S, Zheng Y, Lei L, et al. Corydalis edulis total alkaloids (CETA) ameliorates cognitive dysfunction in rat model of Alzheimer disease through regulation of the antioxidant stress and MAP2/NF- $\kappa$ B [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 251: 112540.
- [25] Budni J, Pacheco R, da Silva S, et al. Oral administration of D-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats [J]. Behav Brain Res, 2016, 302: 35-43.
- [26] Budni J, Garcez ML, Mina F, et al. The oral administration of D-galactose induces abnormalities within the mitochondrial respiratory chain in the brain of rats [J]. Metab Brain Dis, 2017, 32(3): 811-817.
- [27] Ali A, Shan SA, Zaman N, et al. Vitamin D exerts neuroprotection via SIRT1/NrF-2/NF- $\kappa$ B signaling pathways against D-galactose-induced memory impairment in adult mice [J]. Neurochem Int, 2021, 142: 104893.
- [28] Rehman SU, Shan SA, Ali T, et al. Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(1): 255-271.
- [29] He C, Huang ZS, Yu CC, et al. Preventive electroacupuncture ameliorates D-galactose-induced Alzheimer's disease-like inflammation and memory deficits, probably via modulating the microbiota-gut-brain axis [J]. Iran J Basic Med Sci, 2021, 24(3): 341-348.
- [30] Mansour HM, Fawzy HM, El-Khatib AS, et al. Inhibition of mitochondrial pyruvate carrier 1 by lapatinib ditosylate mitigates Alzheimer's-like disease in D-galactose/ovariectomized rats [J]. Neurochem Int, 2021, 150: 105178.
- [31] Sondag CM, Dhawan G, Combs CK. Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia [J]. J Neuroinflammation, 2009, 6: 1.
- [32] Salgado-Puga K, Pena-Ortega F. Cellular and network mechanisms underlying memory impairment induced by amyloid  $\beta$  protein [J]. Protein Pept Lett, 2015, 22(4): 303-321.
- [33] 王丽莎, 刘新民, 陶雪, 等.  $\beta$ -淀粉样蛋白寡聚体脑内注射动物模型在阿尔茨海默病研究中的应用 [J]. 药学学报, 2018, 53(7): 1060-1067.
- Wang LS, Liu XM, Tao X, et al. Application of the animal model of intracerebral injection of amyloid- $\beta$  oligomers to the study of Alzheimer's disease [J]. Acta Pharm Sin, 2018, 53(7): 1060-1067.
- [34] 安鹏远, 王钦文, 徐淑君. 不同聚集状态的 A $\beta$  寡聚体在阿尔茨海默病发生中的作用机制研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2016, 43(2): 109-114.
- An PY, Wang QW, Xu SJ. The role and underlying mechanism of differently aggregated components of oligomeric  $\beta$ -amyloid protein in the progress of Alzheimer's disease [J]. Prog Biochem Biophys, 2016, 43(2): 109-114.
- [35] Ye T, Li XQ, Zhou P, et al. Chrysophanol improves memory ability of D-galactose and A $\beta_{25-35}$  treated rat correlating with inhibiting Tau hyperphosphorylation and the CaM-CaMKIV signal pathway in hippocampus [J]. 3 Biotech, 2020, 10(3): 111.
- [36] Deng SD, Lu HM, Chi HG, et al. Neuroprotective effects of OMO within the hippocampus and cortex in a D-galactose and A $\beta_{25-35}$ -induced rat model of Alzheimer's disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 1067541.
- [37] 张淑萍, 刘璐, 王秀梅, 等. 衰老模型联合  $\beta$ -淀粉样蛋白 1-42 建立大鼠阿尔茨海默病模型研究 [J]. 中国全科医学, 2015, 18(36): 4459-4463.
- Zhang SP, Liu L, Wang XM, et al. Building rat Alzheimer disease model by combining aging model and  $\beta$ -amyloid peptide 1-42 [J]. Chin Gen Prac, 2015, 18(36): 4459-4463.
- [38] 王改凤. 补肾益智方对 D-半乳糖联合  $\beta$ -淀粉样蛋白 25-35 致老年痴呆模型大鼠的作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(49): 7307-7313.
- Wang GF. Effects of *Bushen Yizhi* decoction on Alzheimer's disease model rats induced by D-galactose combined with amyloid- $\beta$  25-35 and the underlying mechanism [J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res, 2016, 20(49): 7307-7313.
- [39] Zhang JG, Tang CZ, Liao WY, et al. The antiapoptotic and antioxidative stress effects of zhisanzhen in the Alzheimer's disease model rat [J]. Neuroreport, 2019, 30(9): 628-636.
- [40] Kumar A, Dogra S, Prakash A. Protective effect of curcumin (Curcuma longa), against aluminium toxicity: Possible behavioral and biochemical alterations in rats [J]. Behav Brain Res, 2009, 205(2): 384-390.
- [41] Mirza A, King A, Troakes C, et al. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease [J]. J Trace Elem Med Biol, 2017, 40: 30-36.
- [42] 陶长秀, 杨文明, 汪美霞, 等. 阿尔茨海默病发病机制研究概览 [J]. 中医药临床杂志, 2015, 27(10): 1370-1372.
- Tao CX, Yang WM, Wang MX, et al. Overview of research on the pathogenesis of Alzheimer disease [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2015, 27(10): 1370-1372.
- [43] Norenberg S, Bohrer D, Schetinger MR, et al. Silicon reverses lipid peroxidation but not acetylcholinesterase activity induced by longterm exposure to low aluminum levels in rat brain regions [J]. Biol Trace Elem Res, 2016, 169(1): 77-85.
- [44] Liang RF, Li WQ, Wang H, et al. Impact of sub-chronic aluminium-maltolate exposure on catabolism of amyloid precursor protein in rats [J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(6): 445-452.

- [45] Wang LP, Hu JL, Zhao Y, et al. Effects of aluminium on  $\beta$ -amyloid(1-42) and secretases (APP-cleaving enzymes) in rat brain [J]. Neurochem Res, 2014, 39(7): 1-8.
- [46] Wang P, Wang ZY. Metal ions influx is a double edged sword for the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Ageing Res Rev, 2017, 35: 265-290.
- [47] 陈建国, 江祺川, 温博, 等. Deoxygedunin 对 D-半乳糖联合  $\text{AlCl}_3$  诱导大鼠阿尔茨海默病病理改变的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(6): 496-500, 561, 582.  
Chen JG, Jiang QC, Wen B, et al. Effects of deoxygedunin on Alzheimer-like pathologic dysfunction induced by D-galactose combined with  $\text{AlCl}_3$  [J]. Chin J Appl Physiol, 2018, 34(6): 496-500, 561, 582.
- [48] Chiroma SM, Baharudin MTH, Mat Taib CN, et al. *Centella asiatica* protects D-galactose/ $\text{AlCl}_3$  mediated Alzheimer's disease-Like rats via PP2A/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in their hippocampus [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(8): 1871.
- [49] Mahdi O, Chiroma SM, Hidayat Baharudin MT, et al. WIN55, 212-2 attenuates cognitive impairments in  $\text{AlCl}_3$  + D-galactose-induced Alzheimer's disease rats by enhancing neurogenesis and reversing oxidative stress [J]. Biomedicines, 2021, 9(9): 1270.
- [50] Ji DS, Wu XM, Li DL, et al. Protective effects of chondroitin sulphate nano-selenium on a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 154: 233-245.
- [51] Song X, Zhao Z, Zhao Y, et al. *Lactobacillus plantarum* DP189 prevents cognitive dysfunction in D-galactose/ $\text{AlCl}_3$  induced mouse model of Alzheimer's disease via modulating gut microbiota and PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway [J]. Nutr Neurosci, 2021, 10: 1-13.
- [52] 胡志红, 范玲玲, 胡咏梅. 亚硝酸钠对大鼠海马骨架蛋白磷酸化水平及空间学习记忆的影响 [J]. 生理学报, 2015, 67(5): 479-486.  
Hu ZH, Fan LL, Hu YM. Effect of sodium nitrite on phosphorylation of cytoskeletal proteins and spatial learning and memory in rats [J]. Acta physiol Sin, 2015, 67(5): 479-486.
- [53] 吴燕春, 胡小勤, 周蓓, 等. 复方扶芳藤合剂对 D-半乳糖、亚硝酸钠致小鼠认知障碍功能的改善作用 [J]. 中成药, 2019, 41(9): 2216-2219.  
Wu YC, Hu XQ, Zhou B, et al. Effect of fufangteng mixture on cognitive impairment induced by D-galactose and sodium nitrite in mice [J]. Chin Tradit Patent Med, 2019, 41(9): 2216-2219.
- [54] 周张玖智, 丁杨芳, 胡艳丽. 京尼平苷酸对 D-半乳糖/亚硝酸钠诱导的阿尔茨海默病小鼠学习记忆的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(5): 1188-1191.  
Zhou ZJZ, Ding YF, Hu YL. Effects of geniposide on learning and memory in Alzheimer's disease mice induced by D-galactose/sodium nitrite [J]. Chin J Gerontol, 2019, 39(5): 1188-1191.
- [55] Zhang D, Wang X, Li R, et al. Extract of the aerial part of *polygala tenuifolia* attenuates D-galactose/ $\text{NaNO}_2$ -induced learning and memory impairment in mice [J]. Planta Med, 2020, 86(18): 1389-1399.
- [56] Wang PP, Sun HX, Liu DY, et al. Protective effect of a phenolic extract containing indoline amides from *portulaca oleracea* against cognitive impairment in senescent mice induced by large dose of D-galactose/ $\text{NaNO}_2$  [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 203: 252-259.
- [57] 孟庆慧, 张岫美. 轻度认知障碍动物模型进展 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(6): 1064-1067.  
Meng QH, Zhang YM. Advances in animal models of mild cognitive impairment [J]. Chin J Gerontol, 2011, 31(6): 1064-1067.
- [58] 姚明江, 李浩, 赵文明, 等. D-半乳糖合并半高脂饲料致认知功能障碍大鼠模型的建立及评价 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(6): 647-650.  
Yao MJ, Li H, Zhao WM, et al. Establishment and evaluation on rat model of cognitive impairment achieved by D-galactose and semi-high-fat diet [J]. Chin J Gerontol, 2009, 29(6): 647-650.
- [59] Hadzi-Petrushev N, Stojkovski V, Mitrov D, et al. D-galactose induced changes in enzymatic antioxidant statue in rats of different ages [J]. Physiol Res, 2015, 64(1): 61-70.

[收稿日期] 2021-09-02

王雪,夏青,王荣春,等. 斑马鱼幼鱼模型在急性肾损伤研究中的适用性 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 857-860.  
Wang X, Xia Q, Wang RC, et al. Applicability of zebrafish larvae in the research of acute kidney injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 857-860.  
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.016

## 斑马鱼幼鱼模型在急性肾损伤研究中的适用性

王雪,夏青,王荣春,王西新,张云\*,刘可春\*

(齐鲁工业大学(山东省科学院),山东省科学院生物研究所,济南 250103)

**【摘要】** 斑马鱼作为一种新兴的脊椎模式生物,近来被广泛应用于人类疾病研究。斑马鱼幼鱼前肾解剖结构简单,但在组织结构和分子水平上与哺乳动物后肾相似,并具备同样复杂的生物学功能,损伤后的病变反应与人类肾相似,同时斑马鱼幼鱼具有自身特点和优势,是进行肾发育和肾疾病研究的重要模型。本文从斑马鱼幼鱼前肾的生物学特点、幼鱼肾损伤的病变反应机制及在肾损伤研究中的应用优势 3 方面阐述该模型在急性肾损伤研究中的适用性。

**【关键词】** 斑马鱼;急性肾损伤;动物模型;幼鱼

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0857-04

### Applicability of zebrafish larvae in the research of acute kidney injury

WANG Xue, XIA Qing, WANG Rongchun, WANG Xixin, ZHANG Yun\*, LIU Kechun\*

(Biology Institute, Qilu University of Technology(Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China)

Corresponding author: ZHANG Yun. E-mail: xiaohan\_0818@163.com; LIU Kechun. E-mail: hliukch@sdas.org

**【Abstract】** As an emerging vertebrate animal model, zebrafish have been widely used in human disease research. Although simple in form, the larval pronephros is similar to the mammal kidney in terms of histological structure, gene expression, and functional complexity. Furthermore, the response of zebrafish larvae to kidney damage is similar to that of mammals. Because of their unique features and other advantages, zebrafish larvae present a useful model for research into kidney development and disease. This review discusses the applicability of zebrafish larvae in research into acute kidney injury based on the biological characteristics of the pronephros, the pathogenic mechanisms involved, and the advantages for kidney injury research.

**【Keywords】** zebrafish; acute kidney injury; animal model; larvae

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

肾是机体的主要排泄器官,能排出体内代谢废物、毒素,肾血流量大,易于累积有害物质,容易发生肾功能损伤。随着社会发展,环境污染、药物滥用等问题日益严重,人们接触药物或毒性物质的机率增加,急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的发生率呈大幅上升趋势。AKI 时肾功能迅速下降,排

泄受阻,患者对用药更加敏感,给治疗带来了难度,目前临床上对 AKI 尚缺乏有效的治疗措施,AKI 严重威胁着人类健康。虽然近年来人们对 AKI 的认识有所提高,但对于不同条件下 AKI 病变发展背后的分子机制,尤其是关于如何促进肾自身的损伤修复机能方面仍亟需开展更多研究。

**【基金项目】** 山东省优秀青年人才基金项目(ZR2020YQ60)。

Funded by Shandong Provincial Natural Science Foundation(ZR2020YQ60)。

**【作者简介】** 王雪(1978—),女,硕士,研究方向:药物活性筛选与安全性评价。Email: wangxue@sdas.org

**【通信作者】** 张云,女,博士,研究方向:药物活性筛选与安全性评价。Email: xiaohan\_0818@163.com;

刘可春,男,博士,研究方向:药物活性筛选与安全性评价。Email: hliukch@sdas.org。

\* 共同通信作者

斑马鱼是一种小型淡水硬骨鱼类,成鱼体长仅 3 ~ 4 cm。斑马鱼基因与人类基因具有高度同源性,体内许多器官功能机制及生理信号途径与哺乳动物相似,对毒性物质产生与人类相似的反应表现。因此,斑马鱼在发育生物学、疾病模型及药物研发等领域得到日益广泛的应用,成为继于啮齿动物之后的又一重要脊椎模式生物。72 hpf 后,斑马鱼各器官基本发育完成,体格小、鱼体透明、可视性强,相比于成鱼更易在显微镜下进行观察操作,斑马鱼幼鱼期是开展实验的重要阶段。本文结合斑马鱼幼鱼前肾的生物学特点、幼鱼肾损伤病变反应机制及斑马鱼幼鱼在 AKI 研究中的应用优势,对斑马鱼幼鱼模型在 AKI 研究中的适用性进行阐述。

## 1 斑马鱼幼鱼前肾的生物学特点

在进化上,斑马鱼肾分为幼鱼期(larvae)的前肾(pronephros)和成鱼(adult)期的中肾(mesonephros),受精后 14 h(hours post fertilization, hpf)时,肾开始发育,48 hpf 时,发育完成并具备滤过功能。斑马鱼前肾仅由一对肾单位组成,两个肾小球在背部中线、背主动脉腹侧处融合,肾小管分居于两侧,向尾部延伸汇于泄殖腔。斑马鱼前肾在解剖结构上比中肾及人类的后肾简单,但在细胞类型和分子水平上具有相似性,由内皮细胞、足细胞和肾小管上皮细胞组成,并含有相似基因,人类肾疾病中发现的一些异常基因,在斑马鱼前肾发育与功能维持中也发挥重要作用<sup>[1]</sup>。斑马鱼前肾具备同样复杂的生物学功能,负责调节幼鱼水电解质平衡,维持内环境稳定<sup>[2]</sup>。

肾小管是 AKI 中发生损伤的重要部位。与哺乳动物类似,根据上皮细胞形态和细胞上所表达转运体的不同,斑马鱼幼鱼前肾的肾小管可分为不同节段,包括颈段(neck)、近端肾小管曲段(proximal convoluted tubule, PCT)和近端肾小管直段(proximal straight tubule, PST)、远端肾小管近段(distal early, DE)和远端肾小管远段(distal late, DL)和短的肾弓(pronephric duct, PD)<sup>[3]</sup>,这与哺乳动物肾小管的节段划分基本一致。前肾肾小管每个节段的组织结构、表达基因及离子转运体的分布与哺乳动物肾小管的相应节段具有相似性。比如,幼鱼前肾近端肾小管上皮细胞呈两极化结构,包括顶端刷状缘与含有离子转运体的基底膜,细胞核偏向于管腔内表面<sup>[4]</sup>。近端肾小管表达 *slc9a3* 基因<sup>[3]</sup>及酸碱平衡

相关的转运体如:AE2(chloride/bicarbonate anion exchanger)、NBCn1(sodium/bicarbonate cotransporter)、NHE(sodium/hydrogen exchanger)等<sup>[5]</sup>,具有调节体液 PH 的功能。斑马鱼前肾与哺乳动物后肾在组织结构及功能上的相似性,表明斑马鱼幼鱼应用于人类肾疾病研究具有生物学基础。

## 2 斑马鱼幼鱼肾损伤反应机制

### 2.1 斑马鱼幼鱼对 AKI 的损伤性反应

发生 AKI 时,斑马鱼幼鱼模型表现出与哺乳动物相似的病变反应,包括幼鱼局部或全身水肿、肾功能下降和前肾组织结构损伤等。3 dpf 斑马鱼幼鱼经肾毒性物质处理后,早期即出现近端肾小管体积膨大、结构紊乱、上皮细胞刷状缘缺失和坏死等组织改变,电镜观察发现受损上皮细胞内线粒体呈扁平、杆状等异常形态,或出现肿胀,并出现线粒体嵴断裂及基质颗粒丢失<sup>[6]</sup>,线粒体功能出现异常,这些表现均与哺乳动物发生 AKI 后的病变反应一致<sup>[7-8]</sup>。同时,分子水平检测显示,哺乳动物体内已确认的一些肾损伤相关标志物基因,如 *hmox1*(heme oxygenase 1)、*clu*(clusterin)和 *kim-1*(*havcr-1*)等,在幼鱼体内也出现不同程度反应性上调<sup>[9]</sup>。

### 2.2 斑马鱼幼鱼肾损伤修复机制

脊椎动物不同种属间,肾的自我修复能力不同,目前人们对于肾修复的分子调控机制还不明确。细胞水平研究表明,哺乳动物和斑马鱼幼鱼间在肾修复过程中具有保守性<sup>[10]</sup>,近端肾小管发生损伤后,尚存活的部分上皮细胞发生去分化、增殖,重新覆盖于裸露的肾小管基底膜上,恢复管腔结构的完整,而斑马鱼成鱼则依赖“干细胞”再生进行肾修复。因此,相较于成鱼,斑马鱼幼鱼模型更适于进行 AKI 中肾修复机制或治疗药物筛选研究。

### 2.3 药物在斑马鱼幼鱼体内的代谢转化

斑马鱼体内表达多种药物吸收代谢所需的转运蛋白<sup>[11]</sup>和代谢酶类<sup>[12]</sup>,如 I 相代谢酶细胞色素 P450(cytochrome450, CYP450), II 相代谢酶尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(uridine-diphospho glucuronosyl transferase, UGT)和磺基转移酶(sulfotransferase, SULT)等<sup>[13]</sup>,不同发育时期,斑马鱼表达的转运蛋白及代谢酶种类不同。斑马鱼对药物转运蛋白及代谢酶类的调控模式与人类相似,斑马鱼体内某些 CYP450 与人体内的 CYP450 具有相同的抑制剂/激动剂和底物。Gorgulho 等<sup>[14]</sup>利用斑马鱼对醋氨酚

的肾毒性研究,为了解斑马鱼幼鱼对药物的吸收和代谢转化情况,对药物处理后的斑马鱼幼鱼(5 dpf)组织进行提取,并利用 LC-MS 进行成分分析,结果除 N-乙酰基亚胺醌(N-acetyl-P-benzoquinoneimine, NAPQI)和醋氨酚谷胱甘肽结合物两种性质极不稳定的成分外,所有人体内已发现的醋氨酚代谢物均可以在斑马鱼幼鱼体内检测到,表明药物在斑马鱼幼鱼体内的代谢转化方式与人类相似。

### 3 斑马鱼幼鱼模型在 AKI 研究中的应用优势

#### 3.1 体格小、药物用量少

由于斑马鱼幼鱼体格小,于普通细胞培养板内利用水溶液处理方式即可对一定样本量的幼鱼群体进行给药,药物用量一般为  $\mu\text{g}$  级。对于一些性质不稳定或存在其他问题的药物,可以利用显微注射方式将药物直接注入斑马鱼体内。庆大霉素具有肾毒性,常用于肾损伤造模,由于其生物利用度低,通过水溶液给药后进入斑马鱼幼鱼体内的庆大霉素量极低<sup>[14]</sup>。研究中利用显微注射将庆大霉素溶液通过心脏静脉窦(cardiac venous sinus)注入斑马鱼幼鱼血液循环系统,成功造成幼鱼 AKI,幼鱼出现心包水肿、近端肾小管扩张、上皮细胞刷状缘缺失等肾损伤表现<sup>[15-16]</sup>。

#### 3.2 前肾结构简单、鱼体透明、便于直接观察

斑马鱼幼鱼鱼体透明,前肾仅由一对肾单位组成,结构简单,借助于组织特异显色,可在整体水平上对幼鱼肾进行原位观察。*wt1* (Wilms' tumor gene)是肾发育关键因子,为肾发育和修复的分子标志物。斑马鱼 *wt1* 包括 *wt1a* 与 *wt1b* 两种同源基因,在 > 30 hpf 斑马鱼, *wt1b* 基因高表达于肾<sup>[17]</sup>。利用 *wt1b* 启动子构建的 Tg(*wt1b*:GFP)转基因斑马鱼,肾小球和肾小管显示绿色荧光,显微镜下可直接原位观察肾各部位的形态。Chvistou-Savina 等<sup>[18]</sup> 研究中利用显微注射将荧光标记的葡聚糖( $10 \times 10^3$ )分子注入幼鱼血液循环系统,然后定时采集幼鱼荧光图像,测量荧光强度随时间降低速率,作为检测肾小球滤过功能的指标。同时,通过在显微镜下观察近端肾小管荧光强度,检测其对荧光标记物的摄取情况,可以直接评估近端肾小管重吸收功能<sup>[19]</sup>。

#### 3.3 易于进行基因编辑

斑马鱼在体外完成受精和胚胎发育过程,在受精卵单细胞期通过显微注射对基因组进行编辑操作。近年来,随着基因编辑技术的发展<sup>[20]</sup>,越来越

多的斑马鱼突变体和转基因品系被构建,并广泛用于基因功能分析、疾病建模等。Podocin 是足细胞表面表达的一种重要膜分子,与另两种膜分子, Nephlin 和 CD2A,共同组成蛋白复合体,并与相邻足细胞膜表面的蛋白复合体相互连接,构成裂孔隔膜的主要元件,对维持肾小球滤过膜的完整性具有重要作用<sup>[21]</sup>。Zhou 等<sup>[22]</sup>利用 *podocin* 启动子构建的 Tg(*pod*:NTR-mCherry)转基因斑马鱼,在足细胞表面表达硝基还原酶和红色荧光蛋白,与甲硝唑反应产生毒性代谢物而引起足细胞凋亡,以此建立条件诱导斑马鱼急性肾损伤模型,并可在显微镜下直接观察测量红色荧光强度变化,了解足细胞凋亡程度。

### 4 总结

斑马鱼幼鱼体格小、数量大、鱼体透明,是一种兼具了细胞模型优点的整体模式生物,非常适用于进行高通量基因筛查和药物发现研究。荧光转基因和显微注射等技术的应用从模型建立及观察检测等多方面为利用斑马鱼幼鱼开展 AKI 研究带来便利,使研究者能在动物整体水平上从幼鱼表型、组织结构及分子表达等不同层面进行原位观察与研究,极大地促进了该模型在 AKI 研究中的应用。

作为一种淡水鱼类,斑马鱼幼鱼前肾与哺乳动物的肾在组织结构上存在一定差异。斑马鱼幼鱼肾小管缺少细段部分,缺乏尿液浓缩功能;肾弓比哺乳动物收集管短而简单<sup>[23]</sup>;斑马鱼肾小管上无致密斑结构,而包含特有的斯坦尼氏小体(Corpuscles of Stannius, CS)<sup>[24]</sup>,有研究认为斯坦尼氏小体可能与哺乳动物肾的致密斑功能相似<sup>[25]</sup>;同时,斑马鱼幼鱼仅有一对肾单位,无法模拟 AKI 时哺乳动物肾组织复杂的内环境变化,尤其是肾单位间的相互作用情况。因此,相比于小鼠等哺乳动物模型,斑马鱼幼鱼模型更适用于 AKI 前期探索研究和药物快速筛查,所获得的结果对后续的哺乳动物实验具有重要借鉴意义。

另外,由于斑马鱼幼鱼体格小,无法获取足量的血液、尿液样本,不易进行组织定量,人类及哺乳动物模型上常用的一些肾功能指标在斑马鱼幼鱼模型上无法检测,目前已有研究中针对幼鱼前肾的肾功能检测方法,尤其是量化指标尚比较匮乏,因此,在斑马鱼幼鱼肾功能检测方面还需要开展更多探索性研究,以使其在 AKI 及其它肾疾病机制与治疗研究中得到更好的应用。

## 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Drummond IA, Davidson AJ. Zebrafish kidney development [J]. *Methods Cell Biol*, 2016, 134: 391-429.
- [ 2 ] McCampbell KK, Springer KN, Wingert RA. Analysis of nephron composition and function in the adult zebrafish kidney [J]. *J Vis Exp*, 2014, 90: e51644.
- [ 3 ] Wingert RA, Davidson AJ. The zebrafish pronephros; A model to study nephron segmentation [J]. *Kidney Int*, 2008, 73(10): 1120-1127.
- [ 4 ] Drummond IA, Majumdar A, Hentschel H, et al. Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function [J]. *Development*, 1998, 125(23): 4655-4667.
- [ 5 ] Drummond IA. Zebrafish kidney development [J]. *Methods Cell Biol*, 2004, 76: 501-530.
- [ 6 ] Waring WS, Moonie A. Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury [J]. *Clin Toxicol (Phila)*, 2011, 49(8): 720-728.
- [ 7 ] Yan LJ. Folic acid-induced animal model of kidney disease [J]. *Anim Model Exp Med*, 2021, 4(4): 329-342.
- [ 8 ] Gerhardt LMS, Liu J, Koppitch K, et al. Single-nuclear transcriptomics reveals diversity of proximal tubule cell states in a dynamic response to acute kidney injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(27): e2026684118.
- [ 9 ] Bauer B, Liedtke D, Jarzina S, et al. Exploration of zebrafish larvae as an alternative whole-animal model for nephrotoxicity testing [J]. *Toxicol Lett*, 2021, 344: 69-81.
- [ 10 ] Loverre A, Capobianco C, Ditunno P, et al. Increase of proliferating renal progenitor cells in acute tubular necrosis underlying delayed graft function [J]. *Transplantation*, 2008, 85(8): 1112-1119.
- [ 11 ] Mihaljevic I, Popovic M, Zaja R, et al. Phylogenetic, syntenic, and tissue expression analysis of *slc22* genes in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 626.
- [ 12 ] Levi L, Ziv T, Admon A, et al. Insight into molecular pathways of retinal metabolism, associated with vitellogenesis in zebrafish [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302(5): E626-E644.
- [ 13 ] Hill A, Mesens N, Steemans M, et al. Comparisons between in vitro whole cell imaging and in vivo zebrafish-based approaches for identifying potential human hepatotoxicants earlier in pharmaceutical development [J]. *Drug Metab Rev*, 2012, 44(1): 127-140.
- [ 14 ] Gorgulho R, Jacinto R, Lopes SS, et al. Usefulness of Zebrafish larvae to evaluate drug-induced functional and morphological renal tubular alterations [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(1): 411-423.
- [ 15 ] Cianciolo Cosentino C, Roman BL, et al. Intravenous microinjections of Zebrafish larvae to study acute kidney injury [J]. *J Vis Exp*, 2010, 42: 2079.
- [ 16 ] McKee RA, Wingert RA. Nephrotoxin microinjection in zebrafish to model acute kidney injury [J]. *J Vis Exp*, 2016, 113: e54241.
- [ 17 ] Perner B, Englert C, Bollig F. The Wilms tumor genes *wt1a* and *wt1b* control different steps during foation of the zebrafish pronephros [J]. *Dev Biol*, 2007, 309(1): 87-96.
- [ 18 ] Christou-Savina S, Beales PL, Osborn DP. Evaluation of zebrafish kidney function using a fluorescent clearance assay [J]. *J Vis Exp*, 2015, 96: e52540.
- [ 19 ] McCampbell KK, Wingert RA. New tides: using zebrafish to study renal regeneration [J]. *Transl Res*, 2014, 163(2): 109-122.
- [ 20 ] Outtandy P, Russell C, Kleta R, et al. Zebrafish as a model for kidney function and disease [J]. *Pediatr Nephrol*, 2019, 34(5): 751-762.
- [ 21 ] Kawachi H, Suzuki K, Miyauchi N, et al. Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states;entification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2009, 13(4): 275-280.
- [ 22 ] Zhou WB, Hildebrandt F. Inducible podocyte injury and proteinuria in transgenic zebrafish [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(6): 1039-1047.
- [ 23 ] Wingert RA, Selleck R, Yu J, et al. The *cdx* genes and retinoic acid control the positioning and segmentation of the zebrafish pronephros [J]. *PLoS Genet*, 2007, 3(10): 1922-1938.
- [ 24 ] Ishibashi K, Imai M. Prospect of a stanniocalcin endocrine/paracrine system in mammals [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 282(3): F367-F375.
- [ 25 ] Butler DG, Zhang DH, Villadiego R, et al. Response by the corpuscles of Stannius to hypotensive stimuli in three divergent ray-finned fishes (*Amia calva*, *Anguilla rostrata*, and *Catostomus commersoni*): cardiovascular and morphological changes [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 132: 198-208.

[收稿日期] 2022-01-14

赵海玥,王雅哲,施依璐,等. 多模态超声在类风湿关节炎动物模型中的应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 861-866.

Zhao HY, Wang YX, Shi YL, et al. Advances in the application of multimodal ultrasound in animal models of rheumatoid arthritis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 861-866.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.017

## 多模态超声在类风湿关节炎动物模型中的应用进展

赵海玥<sup>1</sup>,王雅哲<sup>2\*</sup>,施依璐<sup>2</sup>,段莎莎<sup>2</sup>,赵捷<sup>2</sup>,张璐<sup>1</sup>,白天昊<sup>1</sup>,张小杉<sup>2\*</sup>

(1. 内蒙古医科大学,呼和浩特 010110;2. 内蒙古医科大学附属医院超声科,呼和浩特 010050)

**【摘要】** 类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是以滑膜炎为主要特征的慢性自身免疫性疾病,可导致关节畸形及功能障碍。RA动物模型能很好地模拟疾病发生发展的病理生理过程,广泛用于RA实验研究。多模态超声技术可以定性、定量诊断RA,监测病情变化,评估药物疗效,引导局部给药及靶向治疗,为RA动物模型研究提供精准方法。该文综述了多模态超声在RA动物模型诊疗中的应用情况。

**【关键词】** 类风湿关节炎;多模态超声;动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)06-0861-06

### Advances in the application of multimodal ultrasound in animal models of rheumatoid arthritis

ZHAO Haiyue<sup>1</sup>, WANG Yaxi<sup>2\*</sup>, SHI Yilu<sup>2</sup>, DUAN Shasha<sup>2</sup>, ZHAO Jie<sup>2</sup>, ZHANG Lu<sup>1</sup>, BAI Tianhao<sup>1</sup>, ZHANG Xiaoshan<sup>2\*</sup>

(1. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China. 2. Department of Ultrasound, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050)

Corresponding author: ZHANG Xiaoshan. E-mail: 13947133133@163.com; WANG Yaxi. E-mail: ttwangyaxi@163.com

**【Abstract】** Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by synovial inflammation, which can lead to joint deformity and dysfunction. Animal models of RA simulate the pathological and physiological processes of its occurrence and development, and are widely used in RA studies. Multimodal ultrasound technology allows qualitative and quantitative diagnosis of RA, monitors changes in conditions, evaluates drug efficacy, and guides local administration and targeted therapy, providing an accurate evaluation method for research of RA animals. This article reviews the application of multimodal ultrasound in the diagnosis and treatment of RA animal models.

**【Keywords】** rheumatoid arthritis; multimodal ultrasound; animal model

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

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种自身免疫性疾病,以侵蚀关节为主要临床表现,可伴有关节外表现,病因尚不明确。在炎性细胞因子

及新生血管共同作用下,滑膜水肿增厚,血管翳形成,进而引起骨质破坏,关节畸形,患者生活质量下降<sup>[1]</sup>。因此,尽早检出滑膜血管翳是改善RA预后

**【基金项目】** 内蒙古科技厅科技计划项目(2019GG081),内蒙古自治区自然科学基金项目(2021MS08018)。

Funded by Inner Mongolia Science and Technology Planning Project (2019GG081), Inner Mongolia Natural Science Foundation Project (2021MS08018).

**【作者简介】** 赵海玥(1989—),女,硕士研究生,研究方向:蒙药治疗类风湿关节炎机制研究。Email:836494718@qq.com

**【通信作者】** 张小杉(1979—),男,博士,主任医师,硕士生导师,研究方向:蒙药治疗类风湿关节炎机制研究。

Email:13947133133@163.com;

王雅哲(1982—),女,博士,副主任医师,研究方向:RGD靶向微泡介导UBM评估蒙药抗类风湿关节炎血管新生机制研究。

Email:ttwangyaxi@163.com。

\* 共同通信作者

的关键<sup>[2]</sup>。随着超声探头工艺和图像处理技术的进步,促进了诊断技术的不断发展及诊断模式的多样化。RA 动物模型能很好地再现疾病发生发展的病理生理过程,可供研究人员寻求潜在的治疗靶点,为临床治疗 RA 奠定基础<sup>[3]</sup>。目前,RA 动物实验中常用的超声技术包括灰阶超声、多普勒超声、超声造影、超声生物显微镜、超声引导穿刺活检和关节腔注射及超声靶向破坏技术。上述多种超声技术协同作用互为补充,形成了综合性无创的多模态超声。它是在常规二维超声基础上发展起来的多功能超声检测手段,弥补了单一超声成像模式的不足,为疾病诊断提供更可靠的依据<sup>[4]</sup>。本文拟对多模态超声在 RA 动物模型诊疗中的应用进行综述,为 RA 动物实验研究提供影像学评估方法。

## 1 RA 动物模型

RA 动物模型主要有啮齿类大小鼠、兔类、非人灵长类等。啮齿类动物模型因遗传背景稳定、成本低、易于处理而被广泛应用<sup>[5-6]</sup>。RA 模型的制备方法主要有诱导型、转基因型两类<sup>[7]</sup>:(1)诱导型关节炎包括胶原诱导型关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)、佐剂诱导型关节炎(adjuvant-induced arthritis, AIA)、链球菌细胞壁诱导型关节炎等<sup>[6]</sup>。CIA 的病理学及免疫学发展过程与人 RA 相似度高,适用于机制探索、药物开发等多方面研究<sup>[8]</sup>;AIA 病理表现与人 RA 相似,价格便宜、制作方便、容易成模,但病变具有一定自限性<sup>[9]</sup>,故对同一实验组前后对照研究评估药物疗效时需将此因素考虑在内;链球菌细胞壁诱导型关节炎在观察急性反应方面具有优势,但成本较高,且不能在非人灵长类动物中被诱导,应用受限<sup>[10]</sup>。(2)转基因型 RA 模型主要有 K/BxN 转基因型、人肿瘤坏死因子(TNF)转基因型和白介素-1 缺陷型(IL-1 $\alpha^{-/-}$ )等,是研究 RA 发病机制和分子靶向制剂较好的模型。K/BxN 转基因型小鼠模型发展迅速,可在多种小鼠品系中复制,适合筛选抗关节炎药物及治疗新靶点;TNF 转基因型小鼠表型稳定,进展相对缓慢,适合 TNF- $\alpha$  等抗体的靶向治疗及相关免疫机制的研究;IL-1 $\alpha^{-/-}$ 转基因型小鼠主要用于全基因组微阵列分析,研究 IL-1 $\beta$  在类风湿疾病中的作用<sup>[5-6]</sup>。不同的模型,其发病机制不同,应根据实际要解决的科学问题选择合适的模型。

## 2 多模态超声在 RA 动物模型诊断中的应用

### 2.1 高频超声

RA 模型在炎性早期表现为皮温升高、关节肿胀、活动受限等。其主要病理生理学改变为关节内滑膜因炎症细胞浸润而出现水肿增厚,在炎性因子及滑膜新生血管共同作用下,形成滑膜血管翳,血管翳侵入关节周围骨组织,导致骨表面连续性中断、缺损及骨质破坏<sup>[11]</sup>。高频超声(常用频率为 15 ~ 20 MHz)能实时动态监测病变发展进程。

超声波的发射和接收都是通过超声探头来实现的。灰阶超声利用脉冲-回波的原理,以脉冲波的形式进入人体,在声束路径上遇见不同声阻抗的两个界面会产生反射或散射现象,这样就有部分超声能量返回探头并被接收处理,这部分信号即为回波信号。回波信号由探头转换为电信号后被超声仪进行放大、后处理形成不同灰度等级的图像,即灰阶超声图像。通过分析图像可以获得组织结构与病变信息,因此,灰阶超声可清晰分辨 RA 关节滑膜组织,关节腔积液及骨组织,显示 RA 关节病变的形态学变化。滑膜炎表现为关节腔内增厚的低回声区,形态不规则,探头加压不变形;关节腔积液表现为不规则的无回声区;骨质破坏表现为骨皮质回声粗糙,连续性中断<sup>[12]</sup>。于静等<sup>[13]</sup>研究显示高频超声诊断滑膜增生和关节腔积液较为准确,与 MRI 诊断结果符合,具有省时、经济成本低等优势,但对软骨及骨的观察尚不满意。马茹等<sup>[14]</sup>研究表明高频超声适用于 RA 模型滑膜炎的评估,敏感性优于足趾厚度检测及关节炎评分。灰阶超声可对 RA 模型关节病变严重程度进行定量评估,为 RA 诊断及预后评价提供影像学支持。

多普勒超声可评估滑膜血流,在评估小动物关节疾病中具有重要应用价值<sup>[14]</sup>。用于 RA 模型的多普勒超声检查技术包括彩色多普勒血流成像(color doppler flow imaging, CDFI)和能量多普勒成像(power doppler imaging, PDI)。CDFI 利用多普勒频移原理,基于运动目标显示器、自相关技术、彩色数字扫描转换和彩色编码等过程实现血流的彩色成像,并根据红细胞的移动方向、速度及分散情况,调配红、绿、蓝三基色,改变其亮度,叠加在灰阶图像上显示。红色表示血流朝向探头方向,蓝色表示血流背离探头方向,绿色、五彩镶嵌表示湍流。颜色亮度与血流速度呈正比,故 CDFI 可以反映血流

速度和方向的变化,但受检测灵敏度及角度依赖性的影响,检测结果通常会存在较大差异。PDI 提取和显示能量信号强度,其频移能量强度取决于取样中红细胞相对数量的多少,故 PDI 能够显示较完整的血管网,特别是对小血管和低速血流更易显示,且不受角度依赖性的影响,可敏感地反映滑膜内新生血管,在评估 RA 滑膜炎活动性方面应用较多<sup>[15-17]</sup>。Liu 等<sup>[18]</sup>在研究中指出 PDI 可对滑膜血流进行分级,并量化分析了滑膜新生血管随时间的变化过程,表明 PDI 是监测滑膜血管变化的敏感指标,但 PDI 只能检测到直径大于 100  $\mu\text{m}$  血管内的血流信号,对微小血管内血流信号的检出效果并不理想。

此外,灰阶超声和多普勒超声可分别对滑膜增生、滑膜血供及骨破坏进行评分,即目前临床应用较多的 Szkudlarek 评分标准<sup>[19]</sup>。RA 动物实验研究中参考 Szkudlarek 评分对滑膜血流进行分级:0 分,无血流信号;1 分,少许点状血流信号;2 分,多发点状及条状血流信号,充盈面积小于滑膜总面积的一半;3 分,树枝状、网状血流信号,走行迂曲,出现融合血流,充盈面积大于滑膜总面积的一半。虽然滑膜血供分级被广泛借鉴于 RA 动物研究中<sup>[18,20]</sup>,但超声对 RA 模型骨破坏评估尚未报道,这可能与动物关节小、超声评估困难有关。

## 2.2 超声造影

超声波遇见小于入射声波的界面会发生散射,散射强弱与散射体大小、形状及周围组织的声阻抗差有关,血液中的有形成分(红细胞、白细胞及血小板等)声阻抗差小,散射很微弱,故超声波通过时,无波反射。超声造影(contrast-enhanced ultrasound, CEUS)是指人为的在血液中加入声阻抗值与血液截然不同的介质(微气泡),增强组织血管内的散射回声,提高信噪比,从而更敏感地反映组织微血管的灌注信息<sup>[21]</sup>。CEUS 常用的造影剂 SonoVue,粒径小、分散均匀,稳定性好<sup>[22]</sup>,可以检测直径 < 50  $\mu\text{m}$  的毛细血管,能够清晰地显示 RA 滑膜血流灌注情况,在早期诊断滑膜炎方面具有良好的临床应用价值。Liu 等<sup>[20]</sup>研究结果指出 CEUS 评估 RA 滑膜新生血管优于 PDI。CEUS 还可通过机器自带的后处理软件,绘制时间-强度曲线,为滑膜灌注提供定量数据<sup>[2,15]</sup>。滑膜超声造影可根据国际关节炎分级标准<sup>[23]</sup>进行评估:0 级,滑膜无增强;1 级,滑膜轻度增强,增强强度 < 周围组织;2 级,滑膜明显增强,增强

强度 > 周围组织。

除广泛用于临床的 SonoVue,实验中应用的超声造影剂,还包括各种靶向造影剂,即将抗体、多肽等特异性配体连接到微泡上,利用其与炎症部位相应受体的特异性结合,进行 RA 的早期诊断及疗效评估等。Zhao 等<sup>[24]</sup>将血管内皮生长因子受体 2 抗体与荧光染料 cy5.5 整合到微泡上,制备多模态靶向造影剂,与炎症病灶中的血管内皮生长因子(vascular epithelial growth factor, VEGF)特异性结合,通过 CEUS 及光学成像系统检测,验证了 VEGF 在 AIA 大鼠关节炎组织中呈高表达,在分子层面上揭示靶病变的炎症变化。

## 2.3 超声生物显微镜

尽管高频超声在评估 RA 模型具有可行性,允许在整个实验中对同一动物进行对比分析;但由于 RA 模型动物通常体型较小,超声分辨率仍显不足<sup>[17]</sup>。超声生物显微镜(ultrasound biomicroscope, UBM)由高频换能器和高分辨率超声仪构成,工作原理与灰阶超声相似,利用探头产生 40 ~ 100 MHz 的脉冲,在一定范围内来回作线性扫描,其反向散射返回能量转换为射频信号,信号按照一定比例被放大、加工、时间增益补偿后形成图像在显示屏上呈现,利用图像灰度、明暗度代表不同组织结构。其探头频率高,分辨力好,故适用于浅表组织成像,临床常用于眼科病变的检测<sup>[25]</sup>。在动物模型中,UBM 最早应用于小鼠心脏观察<sup>[26]</sup>,后续用于 CIA 大鼠模型及小鼠结肠肿瘤的检测<sup>[27]</sup>。宋海霞<sup>[28]</sup>研究显示 UBM 可清晰地显示增厚的滑膜、新生血管及关节腔积液等,是 RA 实验研究理想的影像学方法。马俊福等<sup>[29]</sup>用 UBM 观察温经通络法对 CIA 大鼠疗效的影响,并与病理结果相比较,也证明了 UBM 对 CIA 大鼠早期诊断、病情监测及疗效观察具有较好的应用价值。

## 3 多模态超声在 RA 动物模型治疗中的应用

### 3.1 超声引导穿刺活检和关节腔注射

以往实验研究因获取动物病理标本需要处死动物,而造成实验过程中模型需求量较大,超声引导穿刺活检技术可以弥补这一缺陷,实现在活体内连续动态评估 RA 病程及干预后疗效,并以病理评分作为金标准,与超声结果进行相关性分析,从而验证超声评估 RA 的可行性和有效性<sup>[12,18,20,30]</sup>。超声引导下关节腔注射给药安全性好,利于药物在局

部吸收,减少全身给药所致的副作用。林娇娇等<sup>[31]</sup>研究表明超声引导下关节腔内注射纳米载药颗粒治疗 RA,疗效好且副作用小,在 RA 治疗中具有重要价值。超声引导下关节腔注射实现了精准给药,为实验研究及临床治疗提供了优化方案。

### 3.2 超声靶向治疗

除用于诊断性研究,微泡还可作为治疗剂,在超声介导的治疗中发挥重要作用<sup>[32]</sup>。超声微泡可作为一种良好的递送载体,保护药物分子或基因在运输过程中免受内源性清除,将其靶向传递到病灶区,借助基于超声空化效应及声孔效应等生物物理学特性的超声靶向破坏技术(ultrasound targeted microbubble destruction,UTMD),使其在靶区受控释放,并增加血管的通透性,促进药物进入组织和细胞,提高靶区的药物吸收和生物利用度,减少全身副作用<sup>[33-35]</sup>。张焯<sup>[36]</sup>研究显示于大鼠膝关节腔内注射携氧紫杉醇脂质微泡,经超声辐照关节(强度 2 w/cm<sup>2</sup>,时间 30 s),可较好的靶向破坏载药微泡,提高病灶区药物吸收,减轻 CIA 大鼠关节炎。Zhao 等<sup>[37]</sup>研究指出,与静脉注射游离甲氨蝶呤(methotrexate,MTX)相比,UTMD 介导的 MTX 脂质微泡受控释放可精确影响炎性病灶,显著提高 RA 疗效。Wang 等<sup>[38]</sup>证实了 UTMD 可促进地塞米松磷酸钠靶向脂质体在 RA 协同治疗中的可行性和有效性,指出叶酸偶联的地塞米松磷酸钠靶向脂质体局部释放对 CIA 大鼠具有良好的治疗效果。动物模型的超声靶向治疗,为临床使用新型靶向载药微泡治疗 RA 提供实验依据,使超声靶向治疗有望成为 RA 新的治疗方案。

## 4 结语

灰阶显像及多普勒技术,可定性、定量诊断 RA,对病情活动性变化进行实时监测;超声造影在检测 RA 早期病变中具有独特的优势;UBM 则可清晰显示 RA 模型的关节病变,适合小型动物及浅表疾病的检测;靶向微泡的应用,实现了在分子影像层面对 RA 的诊断,为超声分子影像早期精准诊断 RA 和药物疗效评估奠定基础。超声引导穿刺实现了对动物实验的连续性观察,减少动物的损耗,更好的模拟 RA 病程;UTMD 实现了靶向控释给药,提高局部疗效的同时减少全身副作用,为 RA 治疗的机制研究和疗效验证起到推动和促进作用,为临床应用奠定基础。故多模态超声在 RA 动物实验中具

有便捷、实时监测、准确性及定量等优势,在 RA 早期诊断、病情监测及药效评价方面意义重大,是 RA 动物实验研究中重要的影像学方法,具有实用价值。

### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] Deng C, Zhang Q, He P, et al. Targeted apoptosis of macrophages and osteoclasts in arthritic joints is effective against advanced inflammatory arthritis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 2174.
- [ 2 ] 赵敏,王雅哲,段莎莎,等. 类风湿性关节炎滑膜增生的影像学评价方法 [J]. *中国医学影像学杂志*, 2021, 29(9): 952-956.  
Zhao M, Wang YX, Duan SS, et al. Imaging evaluation methods of rheumatoid arthritis synovial hyperplasia [J]. *Chin J Med Imaging*, 2021, 29(9): 952-956.
- [ 3 ] Bessis N, Decker P, Assier E, et al. Arthritis models: usefulness and interpretation [J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(4): 469-486.
- [ 4 ] 杨军. 发展中的多模态超声心动图 [J]. *中国临床医学影像学杂志*, 2020, 31(3): 153, 158.  
Yang J. Developing multimodal echocardiography [J]. *J Chin Clin Med Imag*, 2020, 31(3): 153, 158.
- [ 5 ] 李利青,张逢,彭馥芝,等. 类风湿关节炎实验性动物模型研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(11): 1492-1497.
- [ 6 ] Li LQ, Zhang F, Peng FZ, et al. Advances on experimental models of rheumatoid arthritis [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2021, 37(11): 1492-1497.
- [ 7 ] Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2018, 40(3): 193-200.
- [ 8 ] 夏晴,纪羽婷,刘海亮,等. 类风湿关节炎动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(11): 107-113.  
Xia Q, Ji YT, Liu HL, et al. Research progress on animal models of rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30 (11): 107-113.
- [ 9 ] Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease [J]. *Pathophysiology*, 2005, 12(3): 167-181.
- [ 10 ] 刘元刚,刘树滔,饶平凡. 类风湿性关节炎啮齿动物模型的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(6): 470-473.  
Liu YG, Liu ST, Rao PF. Recent advances in research on rodent models of rheumatoid arthritis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2007, 15(6): 470-473.
- [ 11 ] Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62 (8): 2192-2205.
- [ 12 ] Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review [J]. *JAMA*, 2018, 320(13): 1360-1372.

- [12] Gong Y, Huang Y, Su Y, et al. Value of contrast-enhanced ultrasonography in evaluating rheumatoid arthritis: preliminary research based on an animal model [J]. *Med Sci Monit*, 2021, 27; e931327.
- [13] 于静, 聂宏娟, 王泽, 等. 超声对类风湿关节炎动物模型早期诊断价值的研究 [J]. *中国药物与临床*, 2014, 14(8): 1056–1058.  
Yu J, Nie HJ, Wang Z, et al. Study on the value of ultrasound in early diagnosis of rheumatoid arthritis animal model [J]. *Chin Remedies Clin*, 2014, 14(8): 1056–1058.
- [14] 马茹, 陈冬雪, 鄢泽然, 等. 补肾祛寒治尪汤联合甲氨蝶呤对大鼠胶原诱导性关节炎模型的抗炎作用研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2021, 55(4): 85–91.  
Ma R, Chen DX, Yan ZR, et al. Research on anti-inflammatory effect of kidney-supplementing cold-dispelling Zhiwang Decoction combined with methotrexate on CIA model rats [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2021, 55(4): 85–91.
- [15] 张淑娟, 杨光, 王辉. 高频超声及超声造影对大鼠类风湿关节炎模型早期滑膜改变的研究 [J]. *中国超声医学杂志*, 2018, 34(12): 1134–1136.  
Zhang SJ, Yang G, Wang H. The research of high frequency ultrasound and contrast enhanced ultrasound in the early stage of rheumatoid arthritis in rats [J]. *Chin J Ultrasound Med*, 2018, 34(12): 1134–1136.
- [16] 吴长洁, 王亚辉, 华兴, 等. 超声造影动态评价兔类风湿关节炎模型炎症活动性的价值 [J]. *第三军医大学学报*, 2018, 40(11): 984–990.  
Wu CJ, Wang YH, Hua X, et al. Dynamic evaluation of inflammation activity in rheumatoid arthritis rabbits using contrast-enhanced ultrasound [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2018, 40(11): 984–990.
- [17] Clavel G, Marchiol-Fournigault C, Renault G, et al. Ultrasound and Doppler micro-imaging in a model of rheumatoid arthritis in mice [J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(12): 1765–1772.
- [18] Liu H, Chen S, Huang C, et al. Longitudinal changes in knee joint synovial vascularity in a rabbit model of rheumatoid arthritis: quantification using power Doppler ultrasound and contrast-enhanced ultrasound [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2021, 47(8): 2430–2441.
- [19] Szkudlarek M, Court-Payen M, Jacobsen S, et al. Interobserver agreement in ultrasonography of the finger and toe joints in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(4): 955–962.
- [20] Liu H, Huang C, Chen S, et al. Value of contrast-enhanced ultrasound for detection of synovial vascularity in experimental rheumatoid arthritis: an exploratory study [J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(11): 5740–5751.
- [21] 王博冉, 乔春梅, 李春歌, 等. 多模态超声检查技术及超声评分方法在类风湿性关节炎中的应用 [J]. *中华医学超声杂志(电子版)*, 2021, 18(3): 330–333.  
Wang BR, Qiao CM, Li CG, et al. Application of multimodal ultrasound and ultrasound scoring in rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Med Ultrasound Electron Ed*, 2021, 18(3): 330–333.
- [22] Kotopoulos S, Popa M, Mayoral Safont M, et al. SonoVue<sup>®</sup> vs. sonazoid<sup>™</sup> vs. optison<sup>™</sup>: which bubble is best for low-intensity sonoporation of pancreatic ductal adenocarcinoma? [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(1): 98.
- [23] Klauser A, Demharter J, De Marchi A, et al. Contrast enhanced gray-scale sonography in assessment of joint vascularity in rheumatoid arthritis: results from the IACUS study group [J]. *Eur Radiol*, 2005, 15(12): 2404–2410.
- [24] Zhao C, Zhang R, Luo Y, et al. Multimodal VEGF-targeted contrast-enhanced ultrasound and photoacoustic imaging of rats with inflammatory arthritis: using dye-VEGF-antibody-loaded microbubbles [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2020, 46(9): 2400–2411.
- [25] Zhu Y, Fang L, Zhong Y, et al. Clinical and ultrasound biomicroscopic characteristics of congenital fibrovascular pupillary membrane-induced secondary *Glaucoma* [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 763137.
- [26] Turnbull DH, Bloomfield TS, Baldwin HS, et al. Ultrasound backscatter microscope analysis of early mouse embryonic brain development [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(6): 2239–2243.
- [27] de Oliveira RP, Baptista RP, Martins C, et al. 3-D endoluminal ultrasound biomicroscopic imaging and volumetry of mouse colon tumors [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2021, 47(10): 2990–3001.
- [28] 宋海霞. 超声生物显微镜在早期类风湿性关节炎实验研究中的应用 [D]. 广州: 南方医科大学; 2014.  
Song HX. Evaluation of UBM in experiment study of early rheumatoid arthritis [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2014.
- [29] 马俊福, 侯秀娟, 刘小平, 等. 超声生物显微镜对温经通络法干预胶原诱导性关节炎大鼠滑膜增生的研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(9): 2285–2289.  
Ma JF, Hou XJ, Liu XP, et al. Observation on synovial hyperplasia of CIA rats intervened by Wenjing Tongluo therapy by applying ultrasound biomicroscopy [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2017, 35(9): 2285–2289.
- [30] Li S, Su L, Lv G, et al. Ultrasound guided intra-articular injection of triptolide-loaded solid lipid nanoparticle for treatment of antigen-induced arthritis in rabbits [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 824015.
- [31] 林娇娇, 苏立阳, 曾雅婷, 等. 超声引导下腔内注射雷公藤甲素纳米粒治疗兔类风湿性关节炎的实验研究 [J]. *临床超声医学杂志*, 2021, 23(7): 483–487.  
Lin JJ, Su LY, Zeng YT, et al. Experimental study of ultrasound-guided intra-articular injection of triptolide nanoparticle on rabbit rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Ultrasound Med*, 2021, 23(7): 483–487.
- [32] Köse G, Darguzyte M, Kiessling F. Molecular ultrasound imaging [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10(10): 1935.
- [33] Li H, Zhang Y, Shu H, et al. Highlights in ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated gene/drug delivery strategy for

- treatment of malignancies [J]. *Int J Pharm*, 2022, 613: 121412.
- [34] Duan L, Yang L, Jin J, et al. Micro/nano-bubble-assisted ultrasound to enhance the EPR effect and potential theranostic applications [J]. *Theranostics*, 2020, 10(2): 462-483.
- [35] Ingram N, McVeigh LE, Abou-Saleh RH, et al. Ultrasound-triggered therapeutic microbubbles enhance the efficacy of cytotoxic drugs by increasing circulation and tumor drug accumulation and limiting bioavailability and toxicity in normal tissues [J]. *Theranostics*, 2020, 10(24): 10973-10992.
- [36] 张焯. 超声介导携氧载紫杉醇脂质微泡对大鼠类风湿关节炎的实验研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学; 2016.
- Zhang Y. Effect of ultrasound-mediated oxygen and paclitaxel-loaded lipid microbubbles on rheumatoid arthritis rats [D]. Chongqing: Chongqing Medical University; 2016.
- [37] Zhao Z, Lin X, Zhang L, et al. Lipidated methotrexate microbubbles: a promising rheumatoid arthritis theranostic medicine manipulated via ultrasonic irradiation [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2021, 17(7): 1293-1304.
- [38] Wang L, Zhu B, Huang J, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction augmented synergistic therapy of rheumatoid arthritis via targeted liposomes [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(24): 5245-5256.
- [收稿日期] 2022-03-15

## 孕鼠免疫新冠灭活疫苗和免疫后感染对子代小鼠行为学的影响

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起的 SARS-CoV-2 肺炎的大流行已经给全球公共卫生和医疗系统带来了巨大的压力和灾难性后果。孕妇感染新型冠状病毒后罹患重症的风险较高,不仅可能导致早产、流产等不良妊娠结局,还可能增加婴儿产后感染的概率,但是出于对孕妇和胎儿的保护,新冠灭活疫苗的研发未将孕妇列入 III 期临床试验。由于新冠灭活疫苗是一款全新的疫苗,有关其在妊娠期的安全性和有效性的数据有限,导致孕妇对接种疫苗心存顾虑,而动物疾病模型的相关研究可以为临床上孕妇及育龄期女性接种新冠灭活疫苗提供参考。

来自中国医学科学院医学实验动物研究所的研究人员,结合前期的研究结果:孕鼠接种新冠疫苗后能够产生免疫反应,孕鼠免疫和免疫后感染其子代生长发育未表现出异常,出生时的组织病理学结果显示子代主要脏器包括后代小鼠大脑、脑干发育均未见明显异常,进一步研究了孕鼠免疫和免疫后感染对子代行为学的影响。本实验以 SARS-CoV-2 易感的 hACE2 孕鼠为研究对象,结果显示在旷场实验及 Morris 水迷宫实验中,F1 代成年后自由活动未受影响,并且具有良好的空间参考和学习记忆能力,提示 F0 代免疫和免疫后感染,其 F1 代成年后行为学能力未受影响,罹患神经精神疾病的风险未增加。

综上所述,本实验以 SARS-CoV-2 易感的 hACE2 孕鼠为研究对象,通过旷场实验和 Morris 水迷宫实验研究 F1 代小鼠成年后的自由活动行为、空间参考和学习记忆能力,旨在为临床上孕妇及育龄期女性接种新冠灭活疫苗提供参考。

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*, 2022, 5(5): 430-435; <https://doi.org/10.1002/ame2.12261>)。

王颖花,赵亚,郭文文,等. 神经干细胞应用于CCI创伤性脑损伤模型修复的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6):867-872.

Wang YH, Zhao Y, Guo WW, et al. Research progress of neural stem cells in repairing CCI traumatic brain injury model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6):867-872.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.018

# 神经干细胞应用于CCI创伤性脑损伤模型 修复的研究进展

王颖花<sup>1,2</sup>,赵亚<sup>2</sup>,郭文文<sup>2,3</sup>,刘可<sup>2,3</sup>,艾庆燕<sup>1\*</sup>,师长宏<sup>2\*</sup>

(1. 延安大学医学院,陕西 延安 716000;2. 空军军医大学实验动物中心,西安 710032;3. 甘肃中医药大学,兰州 730030)

**【摘要】** 创伤性脑损伤(TBI)作为一种严重颅脑损伤,是造成青壮年死亡和残疾的主要原因之一。重症TBI患者面临严重的神经功能缺失和行为能力障碍,但目前临床上缺乏有效的治疗措施。神经干细胞(NSCs)作为中枢神经系统中的多潜能细胞,可分泌神经营养因子、分化为中枢神经及周围神经系统细胞,在TBI的治疗中发挥重要作用。动物模型研究表明,诱导内源性NSCs和移植外源性NSCs再生神经元均可改善TBI动物模型的颅脑损伤症状。本文选择TBI模型中最精确、最稳定的控制皮质冲击(CCI)模型为研究对象,分别综述了诱导内源性NSCs再生神经元和移植外源性NSCs在CCI模型中的应用进展,以期为TBI治疗提供新的思路。

**【关键词】** 创伤性脑损伤;神经干细胞;控制皮质冲击模型;内源性;外源性

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)06-0867-06

## Research progress of neural stem cells in repairing CCI traumatic brain injury model

WANG Yinghua<sup>1,2</sup>, ZHAO Ya<sup>2</sup>, GUO Wenwen<sup>2,3</sup>, LIU Ke<sup>2,3</sup>, AI Qingyan<sup>1\*</sup>, SHI Changhong<sup>2\*</sup>

(1. Yan'an University School of Medicine, Yan'an 716000, China. 2. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032. 3. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn; AI Qingyan. E-mail: aqy\_2001@163.com

**【Abstract】** Traumatic brain injury (TBI) is a severe craniocerebral injury and a main cause of death and disability in young adults. Patients with severe TBI exhibit severe neurological deficits and behavioral disorders, but there is no effective treatment strategy. Neural stem cells (NSCs) are multipotent cells in the central nervous system, which secrete neurotrophic factors, differentiate into central and peripheral nervous system cell types, and play an important role in the treatment of TBI. Recent studies in animal models have demonstrated that the induction of endogenous NSCs and transplantation of regenerative neurons from exogenous NSCs can improve the symptoms in TBI animal models. Among the various TBI models, the cortical impact injury model has the most promising application in research of TBI treatments because of its accuracy and easy manipulation. Thus, in this review, we focus on cortical impact injury models to summarize their progress in the induction of endogenous NSCs to regenerate neurons and transplantation of exogenous NSCs to provide a new therapeutic strategy for TBI.

**【Keywords】** traumatic brain injury; neural stem cells; cortical impact injury model; endogenous; exogenous

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

**【基金项目】**陕西省创新能力支撑计划(2021PT-037),军队实验动物专项课题(SYDW2018-01)。

Funded by Shaanxi Province Innovation Capacity Support Plan(2021PT-037), Special Topic of Military Experimental Animals(SYDW2018-01).

**【作者简介】**王颖花(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:神经干细胞和创伤性脑损伤。Email: w960985427@163.com

**【通信作者】**师长宏(1973—),男,博士生导师,研究方向:肿瘤模型的制备与评价。Email: changhong@fmmu.edu.cn;

艾庆燕(1975—),女,副教授,研究方向:生殖医学。Email: aqy\_2001@163.com。

\* 共同通信作者

创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)是由外力直接或者间接作用引起的脑结构损伤或脑功能的生理变化,可造成脑部细胞死亡、胶质瘢痕形成以及炎症损伤等,进而可能导致短暂或永久性的神经功能障碍。TBI 被认为是世界范围内年轻人死亡和残疾的主要原因之一<sup>[1-3]</sup>。根据损伤进程和病理改变可将 TBI 分为原发性损伤和继发性损伤。当头部因受到外力而引起挫伤、撕裂伤、弥漫性轴索损伤、脑肿胀以及颅内出血为主要表现的原发性损伤,随着各种促炎因子的分泌、脑内胶质细胞的激活以及外周免疫细胞的趋化,形成广泛的炎症反应<sup>[4-5]</sup>,导致血脑屏障(blood brain barrier, BBB)破坏、氧化应激损伤、谷氨酸兴奋性毒性和神经炎症,进而引起以脑出血、脑血肿和脑水肿等症状为主要表现的继发性损伤<sup>[6-9]</sup>。

神经干细胞(neural stem cell, NSCs)已被证明是一种潜在的 TBI 治疗手段,可对提供营养支持的损伤环境做出反应,并能够分化和整合到宿主的大脑中,进而治疗 TBI。调节内源性 NSCs 功能以及移植外源性 NSCs,均可以进行损伤修复和神经细胞再生,促进神经功能恢复从而治疗 TBI<sup>[10-11]</sup>。建立 TBI 动物模型对于探索 TBI 的病理生理学机制及开发潜在的治疗手段至关重要,对于神经干细胞如何有效的治疗 TBI,一个重要的研究基础是在于模型的建立。其中,控制性皮质冲击模型(cortical impact injury, CCI)<sup>[12-13]</sup>通过对皮层穿透深度、停留时间以及速度的精确控制,从而产生的形态学变化和脑血管损伤,类似于人类的创伤反应,并与临床观察到的神经行为和认知障碍的程度较为相似,可更好模拟临床头部损伤中的变化。该模型的制备方法是将小鼠用异氟烷麻醉并固定于脑立体定位仪上,在两耳之间正中做一矢状切口,将头骨暴露在外,根据选择的动物不同(如大小鼠、猪等)可使用不同直径的钻头在左或右侧顶骨窗上方做颅骨切除手术,暴露硬脑膜,并在保持硬脑膜完整性的情况下,使用颅脑损伤打击器,将其移至相应的坐标点,调节并校正打击零界面<sup>[14-16]</sup>。据文献报道在不同的哺乳动物中均可进行不同程度损伤参数的 TBI 建模,并分为轻度、中度以及重度<sup>[17]</sup>。因此,该模型能够有效控制损伤的参数(时间、速度和打击深度),并受个体差异影响小,造模稳定,几乎可以反应临床所有类型的脑损伤特征<sup>[18]</sup>,成为 TBI 最常用的模型。因而,本文聚焦 CCI 诱导的 TBI 动物,分别阐述

内源性 NSCs 介导的细胞再生和外源性 NSCs 移植在 CCI 模型中的作用机制及其研究进展,以期为 TBI 的神经修复提供新的治疗思路。

## 1 内源性神经干细胞(endogenous neural stem cells)

内源性 NSCs 是一种存在于神经系统,可分泌神经营养因子,具有自我更新、分化为神经元及支持性神经胶质细胞的多潜能细胞。近年来研究发现,在成年哺乳动物的室周区、海马、纹状体、嗅球、脊髓各节段室管膜下等终生存在神经元再生,其中侧脑室壁的室管膜下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回的颗粒下层(subgranular zone, SGZ)是产生内源性 NSCs 最为活跃的区域<sup>[19]</sup>。侧脑室 SVZ 的内源性 NSCs 可经吻侧迁移流(rostral migratory stream, RMS)迁移至嗅球。在此过程中,内源性 NSCs 经过不断的增殖、分化,发育为成熟的嗅球中间神经元,参与嗅神经的再生<sup>[20]</sup>;而海马齿状回 SGZ 的内源性 NSCs 可以定向迁移至颗粒细胞层,在此分化发育为成熟神经元,并整合进入海马神经环路,参与学习和记忆<sup>[21]</sup>。正常机体中,内源性 NSCs 一般处于静息状态,当受到外界损伤刺激时,如 TBI、脑缺血缺氧等,内源性 NSCs 可被激活为活跃的 NSCs,并在多种细胞因子、调控基因的作用下发生增殖、迁移并分化为神经元和神经胶质细胞(星形胶质细胞和少突胶质细胞)。

### 1.1 调节内源性神经干细胞治疗 TBI

对于调节内源性 NSCs 治疗 TBI,在 CCI 制备的 TBI 小鼠模型已有大量研究。据报道,在 CCI 制备的 TBI 小鼠模型中发现大脑皮质和海马区的神经元会大量缺失,而三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T3)可通过自噬进行选择清除受损线粒体,从而防止神经元死亡,并促进 NSCs 向成熟神经元的分化,改善 TBI 后的行为缺陷<sup>[22-23]</sup>。

另有研究在小鼠 TBI 发生 7 d 后,使用渗透泵向小鼠的外侧脑室注入外源性血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)进行治疗,发现小鼠 TBI 病变体积显著减小,创伤部位血管生成、脑室下区和周围皮层的细胞增殖分化可显著增加,其中增殖分化的细胞大多数为星形胶质细胞和少突胶质细胞,也有少量的神经元。表明 TBI 发生后,外源性 VEGF 可以通过诱导 NSCs 增殖分化迁移功能,增强神经发生和血管生成,发挥神经保护作用,进而促进损伤后的大脑修复及神经可

塑性<sup>[24-26]</sup>。

进一步研究发现 Akt (protein kinase B) 信号通路在 TBI 治疗中发挥重要作用<sup>[24-27]</sup>。有研究表明外源性 VEGF 早期是通过介导 Akt 信号通路发挥神经保护作用,而血管紧张素 II 受体 2 型 (angiotensin II receptor type 2, AT2) 激动剂 CGP42112A 可以通过诱导神经保护性 Akt 和细胞外调节激酶 1/2 (extracellular-regulated kinases1/2, ERK1/2) 的早期活化,增强神经营养因子和神经生长因子表达,并且促进 TBI 后 SVZ 及 SGZ 的 NSCs 增殖、分化及迁移<sup>[27]</sup>。此外,另有研究发现星形胶质细胞特异性过表达胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 后,可通过激活 Akt 磷酸化、促进 GFAP 蛋白上调以及星形胶质细胞自分泌从而促进海马神经元的存活,发挥神经保护作用,改善 TBI 后的认知和运动功能<sup>[28]</sup>。

## 1.2 内源性神经干细胞功能治疗 TBI 存在的主要问题

在 TBI 发生后,内源性 NSCs 在多种细胞因子、调控基因的作用下发生增殖、迁移并分化,进而促进损伤修复和神经可塑性,改善 TBI 导致的认知和运动障碍。虽然具有大量研究表明内源性 NSCs 在治疗 TBI 中发挥作用,但仍存在一些问题。

(1) 内源性 NSCs 在体内大多处于静息状态,如何使其在受到损伤刺激后快速活化为活跃的 NSCs,进而迁移分化为神经元和胶质细胞,修复 TBI 后的神经损伤,仍需进一步研究;(2) 在 CCI 损伤模型中,研究发现绝大多数祖细胞形成了星形胶质细胞,只有少部分分化为成熟的神经元<sup>[29]</sup>,仅靠这些激活的神经干细胞,神经功能不足以完全被修复,如何定向诱导使其分化为神经元,进而改善 TBI 后的神经功能障碍,也是目前限制其应用原因之一;(3) 新生细胞的数目和存活率均是有限的,如何促进外源性(细胞因子、调控基因)的干预增加新生细胞的数目,提高其存活率,有待研究;(4) 受伤的中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 内的 NSCs 被限制在离散的位置,且数量很少;(5) TBI 后的微环境不支持神经元分化,从而导致自我修复能力有限,不能更好的实现治疗 TBI 的目的<sup>[30-31]</sup>。因此,研究者们尝试移植外源性 NSCs 治疗 TBI。

## 2 外源性神经干细胞 ( exogenous neural stem cells )

TBI 发生后,周围损伤的神经组织可能会永久

受损。内源性 NSCs 治疗有限,外源性 NSCs 一方面可以通过参与和促进脑损伤部位结构的重建、和宿主建立功能性的突触联系、在体内长期分泌神经营养因子,从而改善神经功能障碍;另一方面还可以激活宿主内源性修复机制。因此,在动物模型上,移植外源性 NSCs 已成为一种治疗脑损伤行之有效的治疗方法。外源性 NSCs 主要包括胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs)、多能成体祖细胞 (multipotent adult progenitor cell, MAPCs)、成体神经干细胞 (adult neural stem cells, NSCs)、诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 以及间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSCs) 等来源的神经干细胞。近些年研究已成功将外源性 NSCs 应用于 TBI 动物模型的治疗中。

### 2.1 移植外源性神经干细胞治疗 TBI

将人胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 来源的大脑类器官移植到 CCI 诱导的重度联合免疫缺陷 (severe combined immunodeficiencies, SCID) 小鼠模型中,发现移植的类器官在小鼠受损皮质组织中存活,并分化大量的 NSCs,且宿主脑内有成熟神经元和星形胶质细胞的浸润,从而促进神经修复和再生<sup>[32]</sup>,同时,人神经干细胞 (human neural stem cells, hNSCs) 在体外和移植体内均表达和释放神经营养因子如神经胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)、脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF),这些神经营养因子可促进 TBI 后认知功能的恢复<sup>[33]</sup>。

在 CCI 制备的 TBI 大鼠模型中,通过静脉注射多能成体祖细胞 (MAPCs),发现在细胞治疗后的急性期内 MAPCs 可通过血脑屏障,并进一步增加海马齿状回小胶质细胞/巨噬细胞的凋亡来减弱长期神经炎症反应,从而保持正常的神经元和星形胶质细胞功能,发挥内源性神经修复的作用,为 TBI 后提供神经保护并改善空间学习能力<sup>[34]</sup>。

在 TBI 发生两周后使用低剂量的成体 NSCs 进行脑室内移植,发现移植后的成体 NSCs 不仅通过 (sonic hedgehog, Shh) 信号通路在体内合成生长因子,并显著降低了脑外伤后胼胝体的反应性星形胶质细胞增生和小胶质细胞/巨噬细胞活化,因此,脑室内 NSC 移植可显著减轻 TBI 后的神经炎症,也可能与宿主细胞相互作用刺激 SVZ 内源性 NSCs 的再生<sup>[35]</sup>。

在内侧额叶皮质 (medial frontal cortex, mFC) CCI 制备的大鼠模型中,于大鼠损伤 7 d 后移植经病毒感染而重编程的诱导多能干细胞 (iPSC),发现这些 iPSC 在宿主体内存活并迁移至受损部位,进一步分化为 NSCs,这些 NSCs 原位分化为神经元和神经胶质细胞,并发挥内源性 NSCs 的作用,改善 TBI 后认知和运动功能<sup>[36]</sup>。

在 TBI 大鼠中,通过静脉输注进行骨髓间充质干细胞 (MSCs) 移植,观察到骨髓来源的 MSCs 不仅显著降低促炎细胞因子的表达,增强神经营养因子的分泌,并且可选择性地迁移至 TBI 大鼠损伤的脑组织,进一步分化为神经元和星形胶质细胞,修复 TBI 后的神经损伤<sup>[37-39]</sup>。

综上所述,TBI 发生后,可通过脑内、血管内等途径移植外源性 NSCs,这些移植的外源性 NSCs 进一步分化为 NSCs,不仅可以在宿主中枢神经系统内生存、迁移并分化为成熟的神经细胞类型,替代 TBI 受损的细胞,促进血管生成并启动神经修复机制;还可释放抗炎因子和生长因子,提供神经营养支持,恢复神经元之间的连接,增强神经组织的再生和修复,达到重建和稳定受损大脑的作用<sup>[40-43]</sup>。

## 2.2 不同来源的外源性 NSCs 治疗 TBI 的优缺点比较

目前,移植外源性 NSCs 广泛应用于治疗 TBI 的研究,不同来源的外源性 NSCs 优缺点不同。

ESC 来源 NSCs 在神经移植中具有较高的存活率和可塑性,但因存在伦理争议、移植排斥反应以及畸胎致瘤性极大的限制了其在 TBI 中的临床应用<sup>[44]</sup>;MAPCs 来源的 NSCs 取材方便、体外培养能快速大量扩增、免疫源性低、不易癌变,且能通过血脑屏障,本身具有分化为神经元和星形胶质细胞的潜能,可能是未来研究治疗 TBI 的潜在方向<sup>[45]</sup>;而成体 NSCs 因存在于特定部位,故只能发挥有限的功能,并且可塑性较 ESCs 差,它们向其他组织类型的分化也受到限制,因此,在临床上,应用成体 NSCs 治疗 TBI 是不现实的<sup>[46]</sup>;iPSCs 可以从患者自身提取,具有自体移植的潜力,避免了伦理规范和移植排斥的担忧,这些优点为治疗 TBI 等许多神经退行性疾病带来了希望,但由于 iPSC 被病毒感染而重新编程,具有一定的致瘤性,在临床使用之前,需要考虑其安全性<sup>[47-48]</sup>;目前,临床前模型已将 MSCs 用于 TBI 治疗,并且通过基因修饰的方法,提高 MSCs 移植后的存活率、增强其归巢能力以及神经生长因子

的分泌,促进 MSCs 治疗 TBI 的疗效,因此,以 MSCs 为基础促进脑损伤组织恢复治疗 TBI 是一个颇具前景的选择<sup>[49]</sup>。

在外源性 NSCs 治疗 TBI 的动物模型中,自体移植可以有效的降低移植排斥反应,体外移植显示了更好的移植存活率和移植入损伤后的神经元分化。这些外源性 NSCs 移植进入宿主体内不仅可分化为成熟的神经细胞类型,替代 TBI 受损的细胞;而且释放抗炎因子和生长因子,提供神经营养支持,发挥神经修复和神经再生的作用。但外源性 NSCs 治疗 TBI 应用于人体,还需进一步深入研究。

## 3 总结与展望

干细胞移植应用于各类 TBI 治疗备受关注。然而,由于脑外伤的复杂性和异质性,干细胞应用于人类 TBI 后的神经修复和再生仍是一个遥远的目标。但大量的研究已表明,刺激内源性 NSCs 介导的细胞再生以及移植外源性 NSCs 均可改善 TBI 后脑损伤。

CCI 诱导的 TBI 动物模型中,体内的内源性 NSCs 数量有限,因此,如何调控内源性 NSCs 在体内大量增殖及分化,并制定策略引导使其向神经元方向迁移到损伤部位,使其长期存活是目前面临的主要问题。

目前,由于内源性 NSCs 治疗 TBI 的有限性,移植外源性 NSCs 治疗 TBI 已成为主要的研究方向。在应用外源性 NSCs 治疗 CCI 诱导的 TBI 动物模型中,这些外源细胞的固有特性和局部宿主环境决定了移植细胞的命运,因此,外源性 NSCs 移植成功需要一个最佳的细胞来源和受控的宿主环境。

但外源性 NSCs 的应用尚面临一些关键问题有待解决:(1)在不同的 TBI 动物模型中,移植后的细胞具有不同的存活率,是否可以对各类 TBI 动物模型进行优化来提高移植细胞的存活率;(2)移植神经干细胞在各类 TBI 动物模型中增殖和分化,尤其是诱导定向分化的机制仍不明确;(3)植入的神经干细胞在各类 TBI 动物模型中是否可以形成功能性突触或神经环路,有待进一步研究;(4)移植细胞选择的最佳途径/剂量/时机也值得进一步研究;(5)由于细胞移植的支架种类较多,在各类 TBI 动物模型中如何选用合适的支架以修复损伤的神经组织,也需探索。

因此,关于 TBI 的治疗方案仍需进一步的研究

探索,随着医学技术的进步,相信很快可通过移植外源性 NSCs 和调节内源性 NSCs 功能在体内外各类 TBI 动物模型中带来一定的进展。

#### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] Timofeev I, Santarius T, Koliass AG, et al. Decompressive craniectomy-operative technique and perioperative care [J]. *Adv Tech Stand Neurosurg*, 2012, 38: 115–136.
- [ 2 ] Laker SR. Epidemiology of concussion and mild traumatic brain injury [J]. *PM R*, 2011, 3(10): S354–S358.
- [ 3 ] Hyder AA, Wunderlich CA, Puvanachandra P, et al. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective [J]. *NeuroRehabilitation*, 2007, 22(5): 341–353.
- [ 4 ] Reis C, Gospodarev V, Reis H, et al. Traumatic brain injury and stem cell: pathophysiology and update on recent treatment modalities [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 6392592.
- [ 5 ] Dinet V, Petry KG, Badaut J. Brain-immune interactions and neuroinflammation after traumatic brain injury [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1178.
- [ 6 ] Bains M, Hall ED. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822(5): 675–684.
- [ 7 ] Das M, Mohapatra S, Mohapatra SS. New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 236.
- [ 8 ] Maas A, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults [J]. *Lancet Neurol*, 2008, 7: 728–741.
- [ 9 ] Zhang YB, Li SX, Chen XP, et al. Autophagy is activated and might protect neurons from degeneration after traumatic brain injury [J]. *Neurosci Bull*, 2008, 24(3): 143–149.
- [ 10 ] 卢延华, 管博文, 刘旭, 等. 模拟衰老大鼠星形胶质细胞条件培养基对神经干细胞增殖能力的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(2): 153–160.
- Lu YH, Guan BW, Liu X, et al. Effects of rat senescent astrocytes on the proliferation of neural stem cells [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(2): 153–160.
- [ 11 ] 石昌杰, 花秋红, 张丽红, 等. 神经干细胞特异性 LSD1 基因敲除对小鼠情绪及记忆的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(1): 79–84.
- Shi CJ, Hua QH, Zhang LH, et al. Effects of neural stem cell LSD1 conditional knockout on the mood and memory in mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(1): 79–84.
- [ 12 ] Najem D, Rennie K, Ribocco-Lutkiewicz M, et al. Traumatic brain injury: classification, models, and markers [J]. *Biochem Cell Biol*, 2018, 96(4): 391–406.
- [ 13 ] Povlishock JT, Hayes RL, Michel ME, et al. Workshop on animal models of traumatic brain injury [J]. *Neurotrauma*, 1994, 11(6): 723–732.
- [ 14 ] Cui W, Wu X, Feng D, et al. Acrolein induces systemic coagulopathy via autophagy-dependent secretion of von willebrand factor in mice after traumatic brain injury [J]. *Neurosci Bull*, 2021, 37(8): 1160–1175.
- [ 15 ] Luo J, Wu X, Liu H, et al. Antagonism of protease-activated receptor 4 protects against traumatic brain injury by suppressing neuroinflammation via inhibition of Tab2/NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Neurosci Bull*, 2021, 37(2): 242–254.
- [ 16 ] Cui W, Wu X, Shi Y, et al. 20-HETE synthesis inhibition attenuates traumatic brain injury-induced mitochondrial dysfunction and neuronal apoptosis via the SIRT1/PGC-1 $\alpha$  pathway: A translational study [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(2): 129–164.
- [ 17 ] Chen B, Shi QX, Nie C, et al. Establishment and evaluation of a novel high-efficiency model of graded traumatic brain injury in mice [J]. *World Neurosurg*, 2021, 154: e7–e18.
- [ 18 ] 刘克辛. 肝疾患基础及其实验动物模型 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2003.
- Liu KX. Basis of liver disease and its experimental animal model [M]. Beijing: China Medical Science Press; 2003.
- [ 19 ] Christian KM, Song H, Ming GL. Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2014, 37: 243–262.
- [ 20 ] Curtis MA, Kam M, Nannmark U, et al. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension [J]. *Science*, 2007, 315(5816): 1243–1249.
- [ 21 ] Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus [J]. *J Comp Neurol*, 2001, 435(4): 406–417.
- [ 22 ] Fox GB, Fan L, Levasseur RA, et al. Sustained sensory/motor and cognitive deficits with neuronal apoptosis following controlled cortical impact brain injury in the mouse [J]. *J Neurotrauma*, 1998, 15(8): 599–614.
- [ 23 ] Lin C, Li N, Chang H, et al. Dual effects of thyroid hormone on neurons and neurogenesis in traumatic brain injury [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 671.
- [ 24 ] Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, et al. Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(5): 1008–1016.
- [ 25 ] Han L, Jiang C. Evolution of blood-brain barrier in brain diseases and related systemic nanoscale brain targeting drug delivery strategies [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(8): 2306–2325.
- [ 26 ] Gensel JC, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury [J]. *Brain Res*, 2015, 1619: 1–11.
- [ 27 ] Umschweif G, Liraz-Zaltsman S, Shabashov D, et al. Angiotensin receptor type 2 activation induces neuroprotection and neurogenesis after traumatic brain injury [J]. *Neurotherapeutics*, 2014, 11(3): 665–678.
- [ 28 ] Madathil SK, Carlson SW, Brelsfoard JM, et al. Astrocyte-specific overexpression of insulin-like growth factor-1 protects hippocampal neurons and reduces behavioral deficits following

- traumatic brain injury in mice [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67204.
- [29] Salman H, Ghosh P, Kernie SG. Subventricular zone neural stem cells remodel the brain following traumatic injury in adult mice [J]. J Neurotrauma, 2004, 21(3): 283–292.
- [30] Cizkova D, Nagyova M, Slovinska L, et al. Response of ependymal progenitors to spinal cord injury or enhanced physical activity in adult rat [J]. Cell Mol Neurobiol, 2009, 29(6): 999–1013.
- [31] Foret A, Quertainmont R, Botman O, et al. Stem cells in the adult rat spinal cord: plasticity after injury and treadmill training exercise [J]. J Neurochem, 2010, 112(3): 762–772.
- [32] Bao Z, Fang K, Miao Z, et al. Human cerebral organoid implantation alleviated the neurological deficits of traumatic brain injury in mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021; 6338722.
- [33] Gao J, Prough DS, McAdoo DJ, et al. Transplantation of primed human fetal neural stem cells improves cognitive function in rats after traumatic brain injury [J]. Exp Neurol, 2006, 201(2): 281–292.
- [34] Bedi SS, Hetz R, Thomas C, et al. Intravenous multipotent adult progenitor cell therapy attenuates activated microglial/macrophage response and improves spatial learning after traumatic brain injury [J]. Stem Cells Transl Med, 2013, 2(12): 953–960.
- [35] Sullivan GM, Armstrong RC. Transplanted adult neural stem cells express sonic hedgehog *in vivo* and suppress white matter neuroinflammation after experimental traumatic brain injury [J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 9342534.
- [36] Dunkerson J, Moritz KE, Young J, et al. Combining enriched environment and induced pluripotent stem cell therapy results in improved cognitive and motor function following traumatic brain injury [J]. Restor Neurol Neurosci, 2014, 32(5): 675–687.
- [37] Zhang R, Liu Y, Yan K, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury [J]. Neuroinflammation, 2013, 10: 106.
- [38] Chen X, Katakowski M, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production [J]. Neurosci Res, 2002, 69(5): 687–691.
- [39] Wang S, Kan Q, Sun Y, et al. Caveolin-1 regulates neural differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neurons by modulating Notch signaling [J]. Int J Dev Neurosci, 2013, 31(1): 30–35.
- [40] Gincberg G, Arien-Zakay H, Lazarovici P, et al. Neural stem cells; therapeutic potential for neurodegenerative diseases [J]. Br Med Bull, 2012, 104: 7–19.
- [41] Falnikar A, Li K, Lepore AC. Therapeutically targeting astrocytes with stem and progenitor cell transplantation following traumatic spinal cord injury [J]. Brain Res, 2015, 1619: 91–103.
- [42] Lee ST, Park JE, Lee K, et al. Noninvasive method of immortalized neural stem-like cell transplantation in an experimental model of Huntington's disease [J]. J Neurosci Methods, 2006, 152(1/2): 250–254.
- [43] Barish ME, Herrmann K, Tang Y, et al. Human neural stem cell biodistribution and predicted tumor coverage by a diffusible therapeutic in a mouse glioma model [J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(6): 1522–1532.
- [44] Sugaya K, Vaidya M. Stem cell Therapies for neurodegenerative diseases [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1056: 61–84.
- [45] Supronowicz P, Gill E, Trujillo A, et al. Multipotent adult progenitor cell-loaded demineralized bone matrix for bone tissue engineering [J]. Tissue Eng Regen Med, 2016, 10(4): 275–283.
- [46] Gengatharan A, Malvaut S, Marymonchyk A, et al. Adult neural stem cell activation in mice is regulated by the day/night cycle and intracellular calcium dynamics [J]. Cell, 2021, 184(3): 709–722.
- [47] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell, 2006, 126(4): 663–676.
- [48] Jiang L, Li R, Tang H, et al. MRI tracking of iPS cells-induced neural stem cells in traumatic brain injury rats [J]. Cell Transplant, 2019, 28(6): 747–755.
- [49] Haus DL, López-Velázquez L, Gold EM, et al. Transplantation of human neural stem cells restores cognition in an immunodeficient rodent model of traumatic brain injury [J]. Exp Neurol, 2016, 281: 1–16.

[收稿日期] 2022-03-22