

中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

双月刊 1993 年 6 月创刊

第 30 卷 第 1 期 2022 年 2 月 28 日出版

目次

开篇词

《中国实验动物学报》——开篇词 主编 秦川 (1)

《中国实验动物学报》——大事记 主编 秦川 (2)

研究报告

美沙拉秦干预下 IBD 小鼠结肠组织的转录组分析 王怡如,周唯,蒋笑影,潘一滨,许言午,曹永清 (7)

肝特异性 LCMT1 基因敲除小鼠模型的制备及鉴定 莫娇,敖青青,郑志坚,吴懿洁,梁宁静,廖思米,王新航,陆彩玲,唐深,李习艺 (17)

MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用 毛玉宁,柳森森,巩森森,赵菊梅,师长宏 (23)

基于肠道菌群探讨雄性 WHBE 兔与日本大耳白兔胆固醇代谢的差异性 沈利叶,黄俊杰,徐剑钦,徐雁云,陈民利,潘永明 (31)

β -arrestin2 基因敲除对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响 陈婷婷,单杉,李南,汪子颖,杞萌,张胜男,胡姗姗,魏伟,孙妩弋 (40)

基于数据挖掘及动物实验探讨维持洛哌丁胺诱导便秘小鼠模型稳定性的研究 郭莎,张娟娟,梁兴禹,李雪梅,何振曦,杨莎 (47)

不同体重对正常饮食下小鼠腹主动脉瘤进展影响的回顾性研究 刘懿,田康利,夏聪聪,刘浩乐,付维来,许杨威,白亮,刘恩岐,赵四海 (57)

硫辛酸合成酶低表达对小鼠抗氧化能力的影响 严森森,吕梦迪,杨学思,陶映君,徐光翠,赵英政 (64)

无卵黄冷冻液冷冻食蟹猴精液方法的优化 陈衍,高江梅,赵世坤,李比海,饶军华,杨世华 (70)

甲炎康泰颗粒剂对自身免疫性甲状腺炎大鼠免疫相关细胞因子的影响 潘雅婧,张秋娥,张程斐,吴丽丽,秦灵灵,胡凯文,刘铜华 (77)

基于 RNA 测序分析不同低氧暴露模式对大鼠胫骨前肌差异基因表达的影响 ... 龚丽景,贾杰,付鹏宇 (84)

冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库的建立	吴玥,向志光,高葇,孔琪(92)
基于 16S rRNA 测序分析两种呼肠孤病毒对小鼠肠道菌群的影响	王诗雨,林家锋,蒋欣如,孙森,王颖,陶晓莉(100)

研究进展

抽动障碍免疫相关动物模型研究进展	张晓蒙,马丙祥,周荣易,史文丽,李华伟(107)
诱发支气管哮喘动物模型气道重塑特征的方法和评价	何婷,钱佩瑶,洪敏,刘成勇,郑劼(117)
蝇类抗性品系培育的研究进展	汤红日,王灵军,徐红玲,谢治梅,蔡娟,郑明辉,贺莉芳,刘晖(124)
阿尔茨海默病实验动物模型评述	李少创,韩诚,秦亚莉,赵雅飞,魏文一,杨杰,帅月圆,郭栋(131)
高甘油三酯血症动物模型研究进展	关媛媛,郑燕飞,朱玲慧,王立英,白帆,李天星,孙紫薇,李玲孺(146)

广告	(封二,封底,内插)
----------	------------

主 管

中国科学技术协会

主 办

中国实验动物学会

中国医学科学院医学实验动物研究所

主 编

秦川

编辑部主任

董令赢

编 辑

《中国实验动物学报》编辑部

出 版

《中国实验动物学报》编辑部

发 行

《中国实验动物学报》编辑部

100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号

电话:010-67779337

传真:010-67770690

E-mail:bjb@cnilas.org

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

照 排

同方知网(北京)技术有限公司

印 刷

北京博海升彩色印刷有限公司

邮发代号

2-748

广告发布登记

京朝工商广登字 20170142 号

定 价

每期 50.00 元,全年 300.00 元

中国标准连续出版物号

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

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

本期执行主编 代解杰

本期责任编辑 陈 慧 董令赢

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993

Volume 30, Number 1, February, 2022

CONTENTS

RNA-seq based gene expression profiling of colon tissue from a mesalazine-treated mouse model of inflammatory bowel disease	WANG Yiru, ZHOU Wei, JIANG Xiaoying, PAN Yibin, XU Yanwu, CAO Yongqing(7)
Establishment of liver-specific leucine carboxyl methyltransferase-1 gene knockout mice	MO Jiao, AO Qingqing, ZHENG Zhijian, WU Yijie, LIANG Ningjing, LIAO Simi, WANG Xinhang, LU Cailing, TANG Shen, LI Xiyi(17)
Role of matrix metalloproteinase-2 in the invasion and metastasis of gastric cancer	MAO Yuning, LIU Sensen, GONG Miaomiao, ZHAO Jumei, SHI Changhong(23)
Analysis of differences in cholesterol metabolism between male WHBE rabbits and Japanese white rabbits based on intestinal microbiota	SHEN Liye, HUANG Junjie, XU Jianqin, XU Yanyun, CHEN Minli, PAN Yongming(31)
Effect of β -arrestin2 deficiency on the function of mouse peritoneal macrophages	CHEN Tingting, SHAN Shan, LI Nan, WANG Ziyang, QI Meng, ZHANG Shengnan, HU Shanshan, WEI Wei, SUN Wuyi(40)
Stability of mouse models of loperamide-induced constipation based on data mining and animal experiments	GUO Sha, ZHANG Juanjuan, LIANG Xingyu, LI Xuemei, HE Zhenxi, YANG Sha(47)
Effects of different body weights on the progression of abdominal aortic aneurysm in chow diet feeding mice: a retrospective study	LIU Yi, TIAN Kangli, XIA Congcong, LIU Haole, FU Weilai, XU Yangwei, BAI Liang, LIU Enqi, ZHAO Sihai(57)
Effects of low expression of lipoic acid synthase on antioxidant capacity in mice	YAN Sensen, LYU Mengdi, YANG Xuesi, TAO Yingjun, XU Guangcui, ZHAO Yingzheng(64)
Optimization of cryopreservation of cynomolgus monkey semen with yolk-free solution	CHEN Yan, GAO Jiangmei, ZHAO Shikun, LI Bihai, RAO Junhua, YANG Shihua(70)
Effects of JiaYanKangTai granules on immune-associated cytokines in rats with autoimmune thyroiditis	PAN Yajing, ZHANG Qiue, ZHANG Chengfei, WU Lili, QIN Lingling, HU Kaiwen, LIU Tonghua(77)
RNA sequencing analysis of differentially expressed genes of the anterior tibial muscle in rats after different modes	

of hypoxia exposure	GONG Lijing, JIA Jie, FU Pengyu(84)
Establishment of a comparative transcriptomics database of coronavirus infected animal models	WU Yue, XIANG Zhiguang, GAO Ran, KONG Qi(92)
Analysis of the effects of two reoviruses on the intestinal flora of mice based on 16S rRNA sequencing	WANG Shiyu, LIN Jiafeng, JIANG Xinru, SUN Miao, WANG Ying, TAO Xiaoli(100)
Research progress on immune-related animal models of tic disorders	ZHANG Xiaomeng, MA Bingxiang, ZHOU Rongyi, SHI Wenli, LI Huawei(107)
Methods and evaluation of airway remodeling characteristics in animal models of bronchial asthma	HE Ting, QIAN Peiyao, HONG Min, LIU Chengyong, ZHENG Jie(117)
Breeding for resistance strains in flies; a review	TANG Hongri, WANG Lingjun, XU Hongling, XIE Zhimei, CAI Juan, ZHENG Minghui, HE Lifang, LIU Hui(124)
A review of experimental animal models of Alzheimer's disease	LI Shaochuang, HAN Cheng, QIN Yali, ZHAO Yafei, WEI Wenyi, YANG Jie, SHUAI Yueyuan, GUO Dong(131)
Research progress on animal models of hypertriglyceridemia	GUAN Yuanyuan, ZHENG Yanfei, ZHU Linghui, WANG Liying, BAI Fan, LI Tianxing, SUN Ziwei, LI Lingru(146)

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

王怡如,周唯,蒋笑影,等. 美沙拉秦干预下 IBD 小鼠结肠组织的转录组分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 7-16.
Wang YR, Zhou W, Jiang XY, et al. RNA-seq based gene expression profiling of colon tissue from a mesalazine-treated mouse model of inflammatory bowel disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 7-16.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.001

美沙拉秦干预下 IBD 小鼠结肠组织的转录组分析

王怡如^{1#},周唯^{1#},蒋笑影¹,潘一滨¹,许言午²,曹永清^{1*}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院肛肠科,上海 200032; 2. 上海中医药大学基础医学院生物化学教研室,上海 201203)

【摘要】 目的 应用转录组测序技术 (RNA sequencing, RNA-seq) 检测炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 小鼠结肠组织的基因表达变化,增进对美沙拉秦 (5-aminosalicylic acid, 5-ASA) 治疗 IBD 的分子机制的理解。**方法** 用葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 建立 IBD 小鼠模型。将 15 只 C57BL/6 小鼠随机均分为三组:对照组、DSS 组和 DSS+5-ASA 组。每组随机选择 3 只小鼠取结肠组织进行测序,经两组间比较,鉴定差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 及重要生物学信号通路。随后通过基因表达数据库 (gene expression omnibus, GEO) 中溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 患者和经美沙拉秦治疗后患者结肠组织活检的微阵列 (microarray) 数据,验证前面鉴定得到的子显著 DEGs。**结果** DSS+5-ASA 组与 DSS 组比较中共得到 2983 个差异表达基因,上调基因 604 个,下调基因 753 个;DSS 组与对照组比较,共得到 1626 个差异表达基因,其中上调基因 820 个,下调基因 806 个。GO (gene ontology) 和 KEGG 富集分析结果显示,这些 DEGs 与免疫反应等信号通路有关。部分表达差异显著的基因如 *Rnase1* 和 *Cxcl10*,在 UC 患者结肠组织中有相似的表达趋势。**结论** 经美沙拉秦治疗的 IBD 模型小鼠结肠组织的基因表达谱,与 IBD 患者对比进行验证,得到数个 IBD 治疗过程中可能涉及的基因和生物学通路,增加了美沙拉秦对 IBD 治疗作用机制的进一步理解。

【关键词】 炎症性肠病;美沙拉秦;葡聚糖硫酸钠;转录组测序;差异表达基因

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0007-10

RNA-seq based gene expression profiling of colon tissue from a mesalazine-treated mouse model of inflammatory bowel disease

WANG Yiru^{1#}, ZHOU Wei^{1#}, JIANG Xiaoying¹, PAN Yibin¹, XU Yanwu², CAO Yongqing^{1*}

(1. Department of Anal-rectal Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. 2. Department of Biochemistry, School of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

Corresponding author: CAO Yongqing. E-mail: cyq88tcm@163.com

【Abstract】 Objective To explore gene expression profiling of colon tissues from mesalazine-treated inflammatory bowel disease (IBD) mice using RNA-sequencing (RNA-seq), and provide a better understanding of the mechanism of mesalazine (5-ASA) in the treatment of IBD. **Methods** Dextran sodium sulfate (DSS) was used to establish the IBD mouse model. Fifteen mice (C57BL/6) were randomly assigned to three groups: control ($n=5$), DSS ($n=5$, using DSS to induce IBD), and DSS+5-ASA ($n=5$, using 5-ASA to treat IBD). Three mice per group were randomly selected and colon tissues extracted for RNA-seq. Bioinformatic analysis was used for two comparisons (DSS vs. control, and DSS+5-

【基金项目】 国家自然科学基金资助课题 (81874469, 81202696)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81874469, 81202696)。

【作者简介】 王怡如 (1991—), 女, 博士, 研究方向: 中医外科学 (肛肠方向)。Email: wangyiru1707@163.com;

周唯 (1991—), 女, 博士, 研究方向: 中医外科学 (肛肠方向)。Email: zhouweitcm@163.com。

#共同第一作者

【通信作者】 曹永清 (1961—), 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医外科及中医药治疗大肠肛门疾病。

Email: cyq88tcm@163.com

ASA vs. DSS), and differentially expressed genes (DEGs) and biological signal pathways were identified. The top DEGs were further examined using microarray data of biopsies from ulcerative colitis patients and those treated with 5-ASA.

Results Bioinformatic analysis identified 2983 DEGs, including 604 up-regulated and 753 down-regulated genes in the DSS+5-ASA group and DSS group comparison. In the DSS group and control group comparison, there were 1626 DEGs, 820 of which were up-regulated and 806 were down-regulated. Gene ontology and KEGG analysis of these DEGs suggested certain biological processes and pathways. The expression patterns of top DEG candidates, such as *Rnase1* and *Cxcl10*, were confirmed in patients' samples. **Conclusions** By exploring gene expression profiles in colon tissues from 5-ASA-treated IBD mice using RNA-seq and human mucosal biopsies, this study identified genes and pathways involved in the treatment process of IBD, providing new insights for understanding the mechanism of 5-ASA in IBD treatment.

【Keywords】 inflammatory bowel disease; mesalazine; dextran sodium sulfate; RNA sequencing; differentially expressed genes

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

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一组慢性、复发的消化道炎症性疾病,包括克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC)。UC 临床表现常见腹痛、腹泻、粘液血便等。近年来,IBD 已从传统的西方常见病逐渐发展为一种全球性疾病,世界胃肠病学组织 (World Gastroenterology Organization, WGO) 2015 年发布的指南报道欧洲与北美 UC 最高患病率分别为 505/10 万、249/10 万^[1]。据预测,由于人口基数庞大,我国 IBD 总病例数或将在 2025 年达到 150 万^[2],据粗略估算,当前我国 UC 的患病率为 11.6/10 万,已居亚洲之首^[3-4]。IBD 反复发作,迁延难愈,患者多为 20 ~ 40 岁的青壮年,患病不但极大影响患者生存质量,还带来沉重的经济负担,对 IBD 的防治和机制研究艰巨而迫切。

IBD 的发病机制通常认为与环境、感染、免疫、遗传等因素有关,免疫因素被认为是诱发 IBD 的关键因素^[5]。IBD 继发于肠道黏膜免疫系统的异常应答可能引起持续的慢性炎症,免疫细胞激活后及其分泌的炎性细胞因子,在 IBD 的发生发展过程中发挥着重要的调控作用^[6-7]。

IBD 的治疗药物包括氨基水杨酸制剂^[8]、糖皮质激素^[9]、抗生素、免疫抑制剂及生物制剂等^[10]。其中,美沙拉秦 (5-aminosalicylic acid, 5-ASA) 是 5-氨基水杨酸的新型衍生药物,在肠道内通过接触肠粘膜直接作用于黏膜及黏膜下组织,发挥抗炎作用,临床上对于轻、中度 UC 的疗效较好,而副作用较柳氮磺吡啶小^[11-12],但该药物的体内药理机制尚不明确,以往相关研究大多集中于蛋白水平,而在 IBD 这类复杂疾病的病理过程中,病变组织经治疗好转后,其基因表达可能发生显著变化,故基因水平的药理机制急需进一步探索。

前期以“IBD”、“UC”和“5-ASA”、“mesalazine”、“RNA-seq”为关键词在中英文数据库中进行检索,未查询到应用转录组测序技术探索美沙拉秦治疗 IBD 小鼠结肠组织中基因表达情况的研究。故课题组以葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导建立 IBD 结肠炎小鼠,并以美沙拉秦进行干预,经测量小鼠体重、粪便性状、DAI 评分、结肠组织炎症程度及血清 IL-6 和 TNF- α 水平,提示成功建立了 IBD 小鼠肠炎模型,证实美沙拉秦有效减轻了小鼠结肠炎症,在 IBD 小鼠肠炎发展过程中发挥了治疗作用^[13],现将通过对结肠组织进行转录组测序,从分子层面探索美沙拉秦治疗 IBD 的作用机制,试图增进对这一过程的深入理解,为其临床应用提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

15 只 10 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠,体重 20 ~ 23 g,购于上海西普尔必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2018-0006】,饲于上海中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)2020-0009】,予灭菌饲料、蒸馏水自由食饮,房间每 12 h 光照/黑暗循环,温度 22 ~ 25℃,湿度 50% ~ 70%。本研究经过上海中医药大学附属龙华医院伦理审查批准【审批号:2018LCSY452】,实验动物按照 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 主要试剂与仪器

美沙拉秦缓释颗粒剂 (艾迪莎,批号:15237,上海爱的发制药有限公司) 研磨成粉后用灭菌蒸馏水配制成 25 mg/mL 的混悬液。DSS (分子量 36 000 ~ 50 000, CAS#9011-18-1 M.W.) (MP Biomedicals 公

司,美国),用灭菌蒸馏水配制成 2.5% (质量体积比)的溶液。超纯水机(Millipore,型号:Millipore,德国),4℃冰箱(中科美菱公司,型号:YC-260L,中国),超低温冰箱(SANYO,型号:MDF-U 32V,日本),包埋机(Thermo,型号:HistoStar,美国),切片机(Leica,型号:RM2235,德国),组织脱水机(Leica,型号:TP1020,德国),涡旋振荡器(其林贝尔仪器制造有限公司,型号:D1008E,中国),掌上离心机(其林贝尔仪器制造有限公司,型号:D1008E,中国),低温离心机(Eppendorf,型号:5810R,德国),电子天平(光学仪器厂,型号:FA1604,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模

适应性饲养 1 周后,将 15 只小鼠完全随机分为 3 组,每组 5 只,分别为对照组(Control 组)、模型组(DSS 组)和美沙拉秦组(DSS+5-ASA 组)。参考 Chassaing 等^[14]造模方法,给予 DSS 组和 DSS+5-ASA 组小鼠 2.5% DSS(每组 300 mL,每 2 d 一换)自由饮用 7 d,第 8 天起给予灭菌蒸馏水继续自由饮用 7 d;对照组小鼠自由饮用等量的灭菌蒸馏水。第 8 天开始,DSS+5-ASA 组小鼠给予美沙拉秦(0.5 g/(kg·d))灌胃 7 d,每天 2 次,每次 0.2 mL,对照组和 DSS 组小鼠灌胃等量的灭菌蒸馏水。

1.2.2 模型评估指标

记录各组小鼠体重变化、粪便性状、血便、疾病活动指数^[15](disease activity index,DAI)、结肠组织炎症程度指标评估造模效果。使用 ELISA 试剂盒(pg/mL,Abcam,美国)检测美沙拉秦用药后各组小鼠血清中 IL-6 与 TNF- α 的表达水平,评估美沙拉秦治疗作用。

1.2.3 转录组测序

每组随机选取 3 只小鼠的结肠组织作为样本,送至上海云序生物科技有限公司进行高通量转录组测序。

(1)总 RNA 提取与质控:使用 TRIzol(TaKaRa,日本)从小鼠结肠组织中提取总 RNA,分别通过 NanoDrop® ND-1000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific,美国)和变性琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 浓度、纯度和完整性。

(2)文库制备与测序:使用 rRNA 去除试剂盒移除总 RNA 中的 rRNAs 后,通过总 RNA 文库制备试剂盒预处理 RNA。将 10 pM 文库变性为单链 DNA 分子,在 Illumina flowcell 上捕获后原位扩增为簇

(cluster),通过 BioAnalyzer 2100 生物分析仪(Agilent,美国)进行文库质控和定量后,在 Illumina HiSeq™4000(Illumina,美国)测序仪上采用双端模式(PE mode)进行 150 cycle 测序。

(3)测序分析:经过图像和碱基识别后,从 Illumina HiSeq 测序仪上收获原始序列(reads);经 cutadapt 软件(v1.9.3)修剪,删除低质量 reads,获得高质量 reads 用于分析。使用 hisat2 软件(v2.1),将高质量 reads 比对到小鼠参考基因组(UCSC MM10)上,根据 ensembl gtf 基因注释文件中已注释的 mRNA,通过 cuffdiff 软件(cufflinks 的一部分)获得 FPKM(fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments),作为 mRNA 的表达谱。使用 R 的 heatmap2 函数,以 FPKM 值进行差异表达 mRNA 聚类分析。基于倍数变化(fold change) ≥ 2.0 ,即 $\log(FC) \geq 1.0$, $P\text{-value} \leq 0.05$ 及 FPKM 值至少在一个样品中 ≥ 0.1 作为差异筛选阈值,并在此基础上进行基因本体论(gene ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)富集分析。GO 分析包括生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF),GO 分析注释并推测这些差异表达 mRNA 的功能;KEGG 通路分析则是推断它们可能参与的生物学信号通路,以 $P \leq 0.05$ 作为显著富集的阈值。应用 TargetScan 和 miRanda 软件预测关键环状 RNA(circular RNA, circRNA)、微小 RNA(microRNA, miRNA)和差异 mRNA 之间的相互作用,用 Cytoscape 软件构建 circRNA-miRNA-mRNA 关系网络。

1.2.4 UC 患者结肠组织活检数据

以“IBD”、“UC”、“CD”和“5-ASA”、“mesalazine”为关键词在 GEO 数据库中进行搜索,仅得到了一个与人类 UC 相关的公共数据集(GSE46451)。该数据集通过微阵列(Microarray)技术检测了 3 组(无炎症无用药组、有炎症无用药组和有炎症美沙拉秦治疗组, $n=3$)UC 患者结肠组织的基因表达谱,以探究美沙拉秦对 UC 患者的治疗效果与副作用^[16]。具体操作为:将活检组织切片置于 24 孔培养板的一个孔中,内有 300 μ L 无血清 HL-1 培养基,依次加入 100 U/mL 青霉素钠、100 mg/mL 硫酸链霉素、50 μ g/mL 庆大霉素,分别加入和不加 5-ASA(50 mmol)后在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 6 h。FC > 2 和 $P < 0.05$ 定义为基因差异表

达。更多细节见 MacFie 等^[16]的原始论文。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 7.0 软件 (GraphPad Software 公司, 美国) 进行数据统计与分析。计量资料均采用平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。正态分布的计量资料组间比较采用 *t* 检验 (student's *t* test) 或单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, 偏态分布的计量资料组间比较采用秩和检验 (Kruskal-Wallis test)。转录组测序基因表达差异分析采用 Quasi-likelihood (QL) *F* 检验。 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 mRNA 表达谱

转录组测序在 3 组小鼠结肠组织中共检测到 22

585 个 mRNA, 其中有 2983 个差异表达。当 DSS 组与对照组比较时, 分别有 820 个上调和 806 个下调的 mRNA; DSS+5-ASA 组与 DSS 组之间分别有 604 个上调和 753 个下调的 mRNA。表 1 列举了 DSS+5-ASA 组与 DSS 组比较中上调和下调的前 10 个差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 及其基因描述。散点图描述了差异表达 mRNA 的分布 (图 1A), 热图展示了对这些差异表达 mRNA 使用分层聚类分析的结果 (图 1B), 每一列代表一个样品的表达模式, 高和低表达水平分别由红线和绿线指示。编码-非编码基因共表达网络 (coding and non-coding co-expression, CNC) 分析确定了一个由 72 个 mRNA、39 个 miRNA 和 9 个 circRNA 组成的 circRNA-miRNA-mRNA 网络 (图 2)。

表 1 DSS+5-ASA 组与 DSS 组比较中差异表达前 10 位的 mRNA

Table 1 Top 10 DEGs in DSS+5-ASA vs. DSS

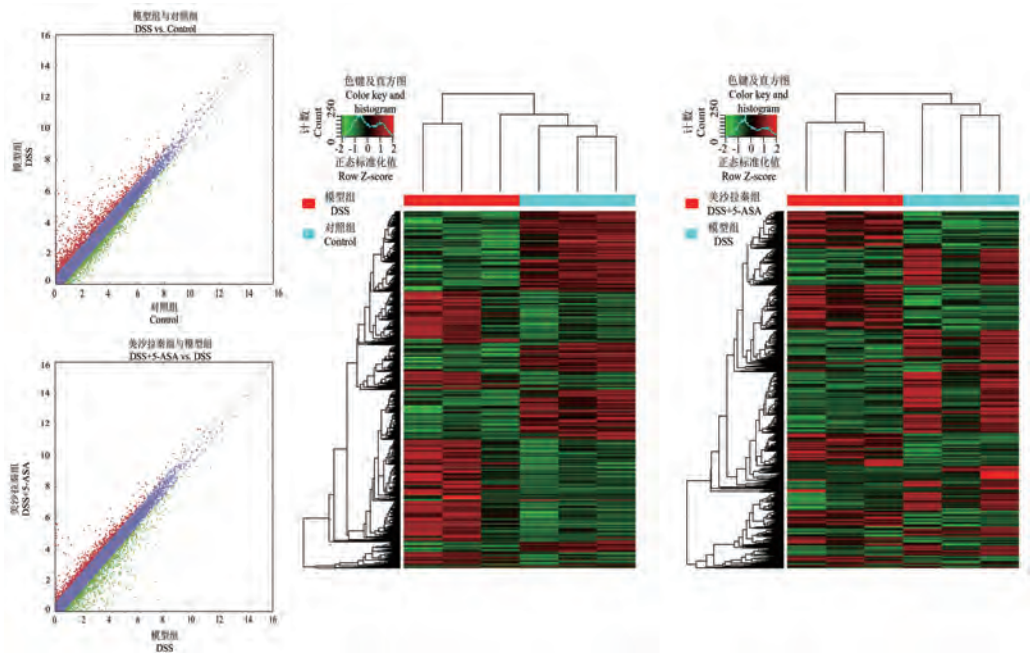
基因 Gene	基因描述 Description	倍数变化 FC	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
上调 (DSS+美沙拉秦组 vs. DSS 组) Up-regulated (DSS+5-ASA vs. DSS)	<i>Pdia2</i> 蛋白质二硫异构酶 2 Protein disulfide isomerase associated 2	15.6	0.01
	<i>Pnliprp1</i> 胰脂肪酶相关蛋白 1 Pancreatic lipase related protein 1	8.8	0.03
	<i>Cpb1</i> 胰羧肽酶 B1 Carboxypeptidase B1	7.9	0.04
	<i>Reg1</i> 再生胰岛源性 1 Regenerating islet-derived 1	6.8	0.02
	<i>Ctrl</i> 糜蛋白酶样 Chymotrypsin-like	5.8	0.00
	<i>Rnase1</i> 核糖核酸酶, RNase A 家族, 1 Ribonuclease, RNase A family, 1	4.8	0.00
	<i>Mat1a</i> 蛋氨酸腺苷转移酶 I, α Methionine adenosyltransferase I, α	4.6	0.01
	<i>Cpa2</i> 胰羧肽酶 A2 Carboxypeptidase A2, pancreatic	4.5	0.00
	<i>Gm14434</i> 预测基因 14434 Predicted gene 14434	4.4	0.00
	<i>Gp2</i> 糖蛋白 2 Glycoprotein 2	4.1	0.00
下调 (DSS+美沙拉秦组 vs. DSS 组) Down-regulated (DSS+5-ASA vs. DSS)	<i>Krt5</i> 角蛋白 5 Keratin 5	7.2	0.02
	<i>Krt6b</i> 角蛋白 6B Keratin 6B	6.1	0.05
	<i>Fabp6</i> 脂肪酸结合蛋白 6, 回肠 Fatty acid binding protein 6, ileal	6.0	0.00
	<i>Anpep</i> 丙氨酰氨肽酶 Alanyl aminopeptidase	5.9	0.00
	<i>Ppbp</i> 促血小板碱性蛋白 Pro-platelet basic protein	5.5	0.00
	<i>Ltf</i> 乳转铁蛋白 Lactotransferrin	5.4	0.00
	<i>Cxcl10</i> 趋化因子配体 10 Chemokine ligand 10	5.0	0.01
	<i>Mmp13</i> 基质金属肽酶 13 Matrix metalloproteinase 13	4.8	0.00
	<i>Iigp1</i> 干扰素诱导 GTP 酶 1 Interferon inducible GTPase 1	4.7	0.00
	<i>Gm4841</i> 预测基因 4841 Predicted gene 4841	4.5	0.00

2.2 GO 和 KEGG 分析

差异表达 mRNA 的 GO 分析结果显示, 在生物学过程 (BP) 方面, DSS 组与对照组相比, 最丰富 BP 的条目是免疫系统过程 (上调) 和单生物体过程 (下调, 图 3A)。同时, DSS 组与 DSS+5-ASA 组相比, 最重要 BP 的条目分别是单生物体运输 (上调) 和对其其他生物的防御反应 (下调, 图 3B)。在细胞成分 (CC) 方面, DSS 组与对照组相比较时, 最富集的 CC

条目集中于细胞外区域 (上调) 和细胞器 (下调, 图 3C); DSS 组与 DSS + 5-ASA 组比较时, 最富集的 CC 条目是囊泡 (上调) 和细胞外区域 (下调, 图 3D)。

在分子功能 (MF) 域中, DSS 组与 control 组比较, 最丰富的 MF 条目为蛋白质结合 (上调) 和催化活性 (下调, 图 4A); 而当 DSS 组与 DSS+5-ASA 组相比时, 结果显示催化活性 (上调) 和转运活性最为重要 (下调, 图 4B)。

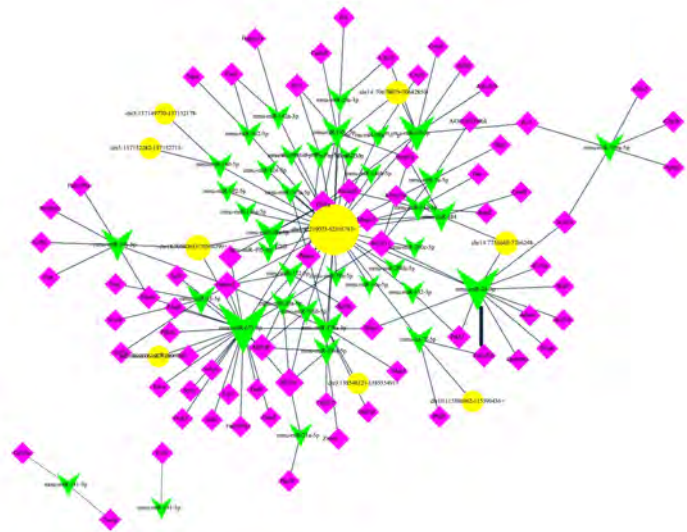


注:A:所有基因的表达分布。实线表示分析默认的显著倍数变化(≥ 2);B:差异表达基因的分层聚类分析。每一列代表一个样品的表达模式,高和低表达水平分别由红线和绿线指示。

图 1 应用转录组测序分析美沙拉秦治疗 DSS 诱导的 IBD 的基因表达谱

Note. A. Expression distribution of all genes. Solid lines indicate significant fold changes (≥ 2) by default for analysis. B. Hierarchical cluster analysis of differentially expressed genes. Each column represents the expression pattern of one sample, with high and low expression levels indicated by red and green lines, respectively.

Figure 1 Bioinformatics analysis of gene expression profiling during mesalazine treatment of DSS-induced IBD by RNA-seq



注:该网络由 72 个 mRNA(紫色),39 个 miRNA(绿色)和 9 个 circRNA(黄色)构成。

图 2 编码-非编码基因共表达网络

Note. The network consists of 72 mRNAs (purple), 39 miRNAs (green) and 9 circRNAs (yellow).

Figure 2 Coding-noncoding co-expression (CNC) network analysis

对差异表达 mRNA 进行 KEGG 分析,共鉴定出 285 条通路。根据 P 值和富集分数,分别列出了 DSS 组与对照组比较、DSS+5-ASA 组与 DSS 组比较时上调和下调的前 10 个通路(图 5A 和

5B)。比较结果中的相同通路包括粘蛋白 O-聚糖生物合成、胰腺分泌物、丙酸代谢、外源性物质通过细胞色素 P450 的代谢、近端小管碳酸氢盐回收(DSS+5-ASA 组与 DSS 组相比表达上调,

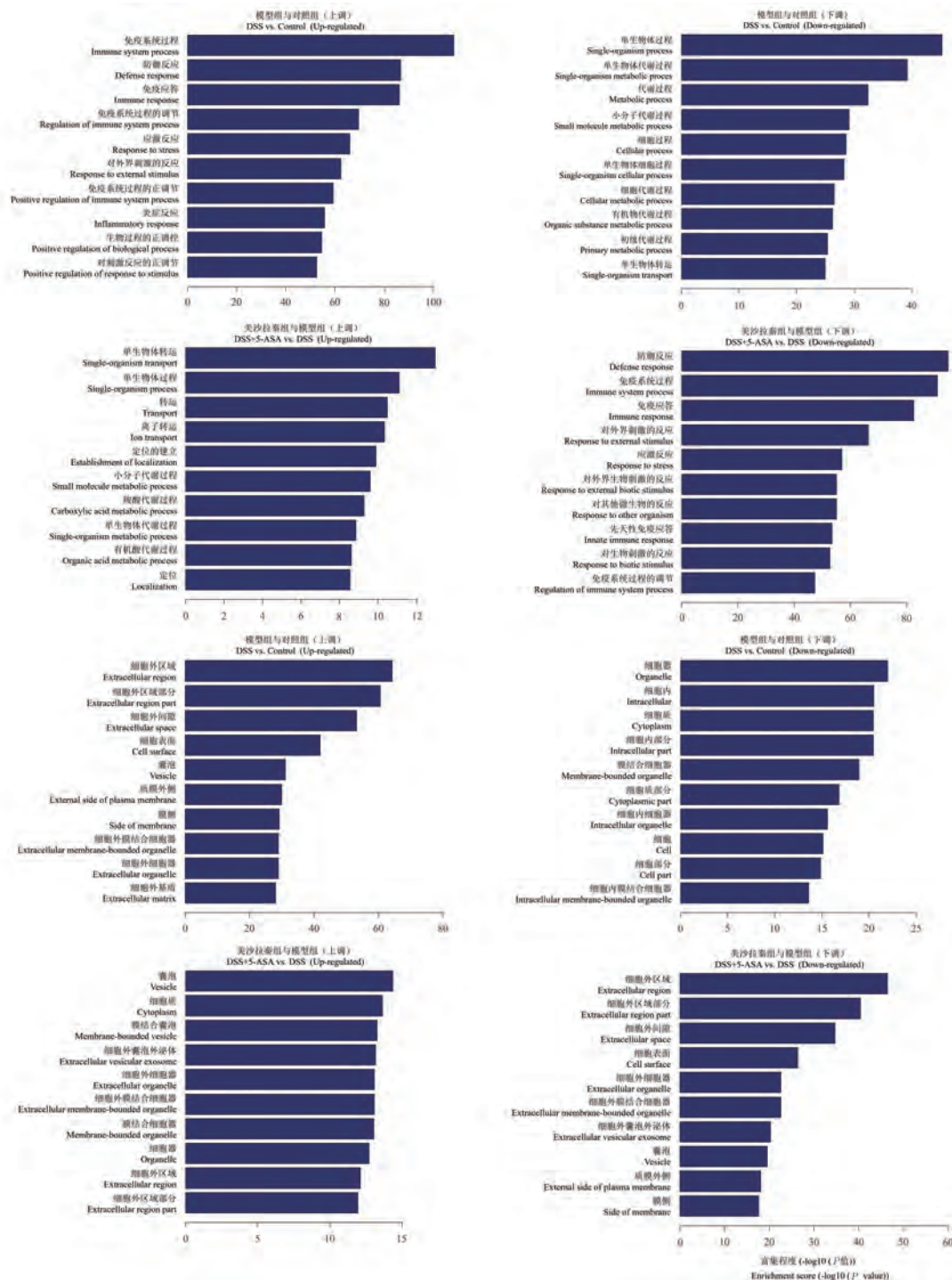


图3 差异表达基因的GO(BP和CC)分析

Figure 3 GO (BP and CC) analysis of DEGs

DSS组与对照组相比下调)和金黄色葡萄球菌感染、细胞因子-细胞因子受体相互作用、TNF信号通路、肺结核、利什曼病和弓形虫病(DSS+5-ASA组与DSS组相比表达下调,DSS组与对照组相比上调)。

2.3 部分差异表达 mRNA 的验证

为进一步验证上述结果,在DSS+5-ASA组和

DSS组比较中,选择了差异表达最显著的10个上调和下调的DEGs(表2),在GEO数据库(GSE46451)中将这10个DEGs与UC患者结肠组织样本中的表达水平进行对照。如表2所示,与无炎症无用药组和有炎症美沙拉秦治疗组相比,有炎症无用药组中的角蛋白6B(Keratin 6B, KRT6B)和 γ 干扰素诱导蛋白-10(interferon- γ -

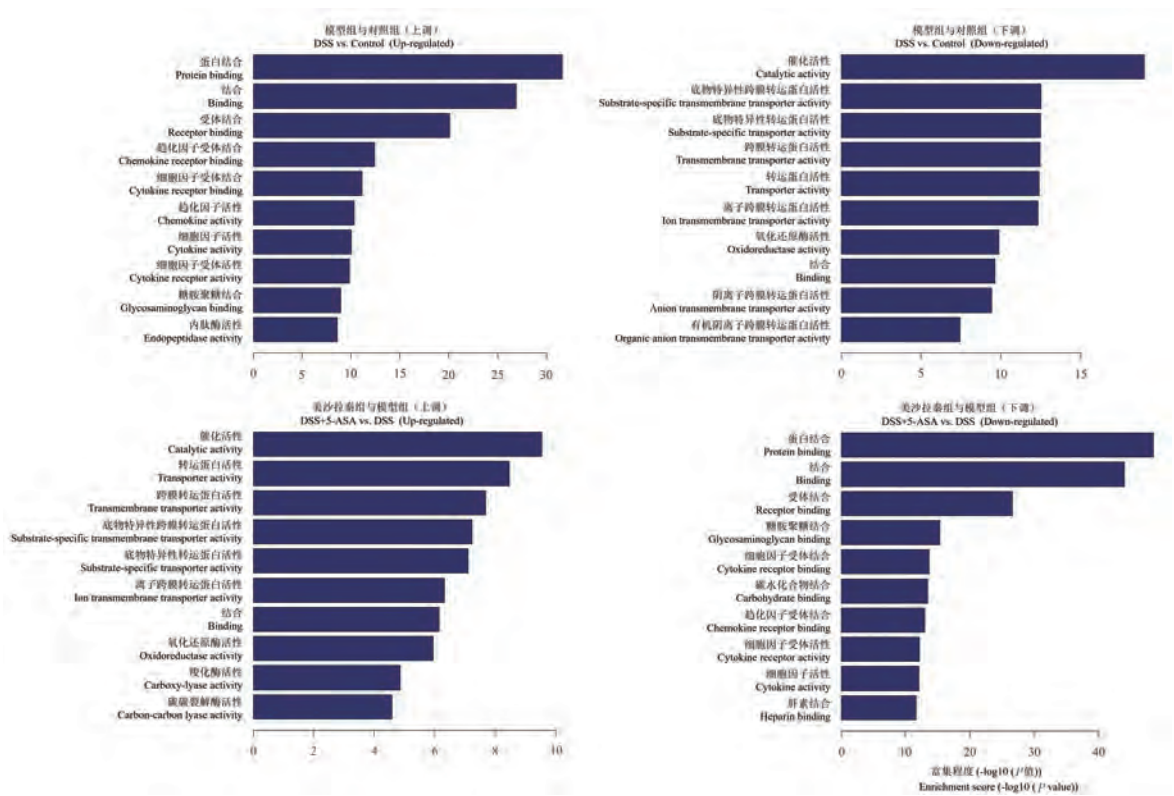


图 4 差异表达基因的 MF 分析
Figure 4 MF analysis of DEGs

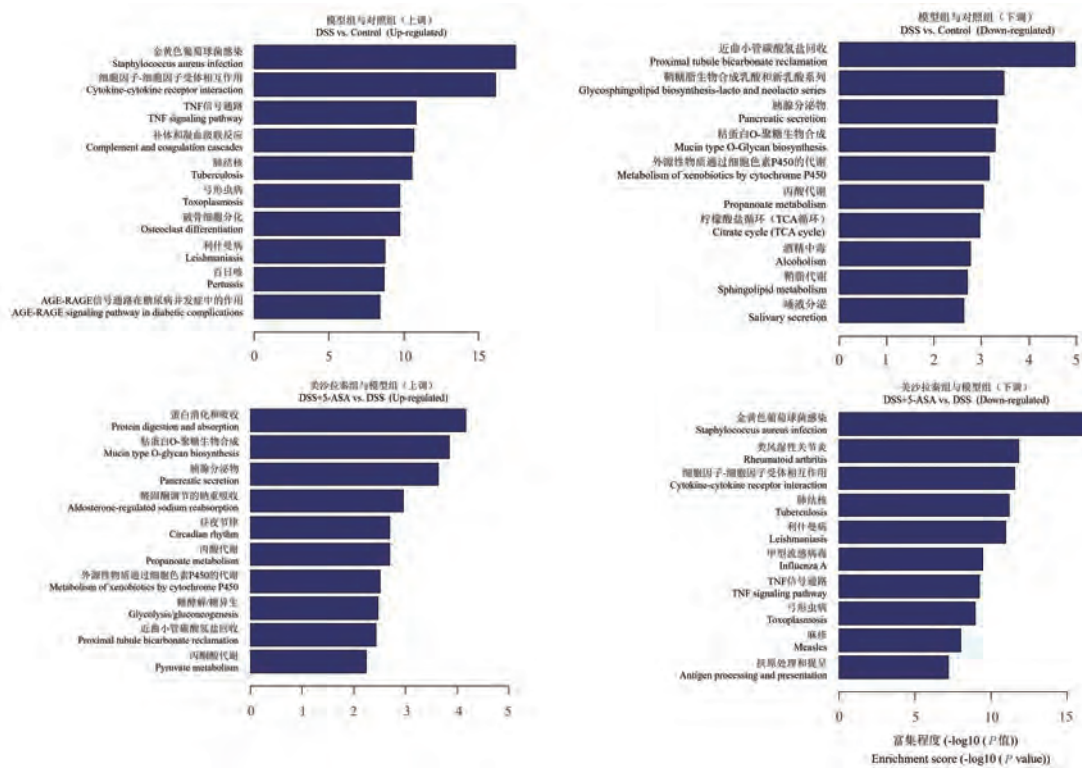


图 5 差异表达基因的 KEGG 分析
Figure 5 KEGG analysis of DEGs

inducible protein-10, CXCL10) 表达升高,核糖核
酸酶 1 (ribonuclease 1, RNASE1) 和胰羧肽酶 B1
(carboxypeptidase B1, CPB1) 表达下调。微阵列
结果与我们的转录组测序结果部分一致。

表 2 UC 患者结肠活检组织验证差异表达基因

Table 2 Validation of selected DEGs from colonic biopsies of UC patients

基因 Gene	无炎症无用药 Non-inflamed_no drug			有炎症无用药 Inflamed_no drug			有炎症美沙拉秦治疗 Inflamed_5-ASA		
	GSM 1130498	GSM 1130499	GSM 1130500	GSM 1130492	GSM 1130493	GSM 1130494	GSM 1130495	GSM 1130496	GSM 1130497
PDIA2	108.8	122.5	125.0	112.7	120.4	117.1	122.5	132.7	113.9
PNLIPRP1	125.7	117.2	120.5	117.6	104.5	116.9	109.9	140.3	122.0
CPB1	414.4	823.6	389.3	167.2	476.2	197.1	160.3	957.6	144.1
CTRL	132.1	112.8	133.2	138.0	130.8	130.2	137.5	137.8	142.8
RNASE1	4178.9	3433.8	2547.2	1852.0	2333.9	986.3	1494.8	1953.2	2324.2
MAT1A	122.2	108.1	113.2	106.8	121.6	123.0	102.9	122.5	129.9
CPA2	127.8	120.1	125.2	119.1	117.9	115.2	118.7	119.5	124.1
GP2	237.3	208.3	140.9	145.9	236.9	142.6	133.8	214.6	171.6
KRT5	116.1	109.3	118.0	121.0	124.8	121.4	110.0	119.2	117.6
KRT6B	131.2	122.7	132.9	241.8	185.0	418.0	156.7	123.5	162.5
FABP6	117.6	119.9	119.7	117.2	143.2	126.6	169.9	116.9	128.4
ANPEP	589.8	1044.8	610.3	562.1	2132.6	353.7	639.4	1166.3	2012.7
PPBP	194.3	219.1	208.2	248.0	210.4	209.5	278.2	199.5	197.1
LRF	144.2	138.2	135.2	155.4	147.0	145.6	146.7	127.9	137.2
CXCL10	475.5	215.0	295.7	585.2	346.6	2050.2	287.8	540.4	433.4
MMP13	128.3	136.1	147.5	123.7	120.1	133.8	120.7	120.6	126.8

3 讨论

转录组测序技术可在单核苷酸水平高效全面的获得组织器官在特定状态下的整体转录过程, mRNA 作为 DNA 与功能蛋白之间的生物信息桥梁, 测定肠粘膜组织在不同生理、病理状态下的转录活动有助于对基因表达模式及表达水平进行量化, 为疾病研究提供重要策略。5-ASA 是临床治疗 IBD 肠道炎症的常用药物, 其药理作用可能与花生四烯酸代谢、抑制反应性氧自由基生成、逆转丁酸代谢障碍、抑制免疫细胞活性及细胞因子表达有关^[17], 研究报道, 5-ASA 能下调肠道黏膜 IL-6 与 TNF- α 等与 IBD 密切相关的炎性细胞因子水平, 经 5-ASA 治疗后的炎性结肠组织中 NF- κ B 原位激活被强烈抑制, 提示其可能通过干扰促炎性 NF- κ B 信号传导, 抑制 AMPK 活性从而减轻了大鼠的结肠炎症^[18-19], 但以上美沙拉秦的药理机制是否为 5-ASA 的特异性作用尚存在争议。尽管 RNA-seq 技术已发展成熟, 以 DSS 诱导的经典 IBD 小鼠模型及以 5-ASA 作为阳性对照药物的研究也在 IBD 领域广泛应用, 但目前仍缺乏应用 RNA-seq 技术在基因水平研究 5-ASA 治疗 IBD 作用机制的报道。本研究建立了 DSS 诱导的 IBD 小鼠模型, 其肠炎表现与人类 UC 相似^[20], 经 5-ASA 灌胃治疗 7 d 后, 小鼠实验性肠炎

得到减轻^[16], 通过 RNA-seq 检测各组肠粘膜组织 mRNA 的表达谱, 将两组间的显著差异基因与 GEO 数据库中 UC 患者活检样本的基因表达进行对比, 部分 DEGs (如 *Krt6b*、*Cxcl10*、*Rnase1* 和 *Cpb1*) 得到了验证, 一方面说明了测序结果的准确性, 另一方面提示经美沙拉秦治疗后的 IBD 小鼠模型与 UC 患者的基因表达变化具有相似性, 这些表达趋势相同的基因可能揭示了部分药理机制的一致性, 也可能是治疗 IBD 的潜在靶点。*Krt6b* 属于角蛋白基因家族, 组织受损时, 促炎信号能够调节 *Krt6b* 的表达。Klinghammer 等^[21]发现, TNF- α 对角质形成细胞具有强烈的刺激作用, 可诱导 *Krt6b* 的表达, 尽管尚未见文献报道 *Krt6b* 与 IBD 之间的关系, 基于上述理论和研究结果, 推测 TNF- α 可能上调了 DSS 诱导的 IBD 小鼠结肠黏膜中 *Krt6b* 的表达, 从而导致肠上皮屏障的破坏。*Cxcl10* 是一种炎症趋化因子, 在 IFN- γ 诱导的单核细胞促进促炎细胞因子的释放方面起着重要的作用, 在 IBD 患者的体内 CXCL10 表达水平显著上升^[22]。Hyun 等^[23]认为, 阻断 *Cxcl10* 能够缓解 C57BL/6 小鼠结肠炎症状, 减轻肠道炎症。测序结果示, DSS 组小鼠结肠组织中的 *Krt6b* 和 *Cxcl10* 的表达水平显著高于 DSS+5-ASA 组 and 对照组, 与前人研究具有一致性。*Rnase1* 是一种对血管和组织起保护作用的细胞外循环内切酶。它可以被促炎

细胞因子调节,从而影响炎症过程中的内皮细胞功能^[24]。Bedenbender 等^[25]发现,TNF- α 或 IL-1 β 诱导的炎症内皮细胞中 *Rnase1* 的表达显著降低。测序结果发现,与其他两组相比,DSS 诱导的小鼠炎性结肠组织中 *Rnase1* 的表达明显下降,与前人研究趋势相符。

同时,基于这些差异表达 mRNA 的 GO(BP) 分析结果显示,其功能条目与免疫系统过程、代谢过程(包括免疫反应和炎症反应)和防御反应等相关,表明黏膜免疫,尤其是 T 细胞反应可能在结肠炎性损伤及 5-ASA 的治疗过程中起到了重要作用。Holleran 等^[26]指出先天性和适应性免疫途径的功能障碍导致了 IBD 中异常的肠道炎症反应,测序结果为这一观点增加了证据支持。最后,基于差异表达 mRNA 的 KEGG 分析,提示 5-ASA 治疗肠炎的体内过程不仅与细胞因子-细胞因子受体相互作用、TNF 信号途径、感染等炎症和免疫过程有关,还涉及胰腺分泌、黏蛋白型 O-聚糖型生物合成、细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)、丙酸代谢等多种机制,具有广谱治疗作用^[17],证明了以往药理研究中的部分机制。其中,外分泌型胰腺功能不全(exocrine pancreatic insufficiency, EPI)是由于原发性胰腺疾病或继发性外分泌型胰腺功能受损导致的消化不良和吸收不良的重要原因。EPI 在 IBD 患者中发病率较高,国外研究统计,在 38% 的 CD 患者和 53% 的 UC 患者中,胰腺病变没有胰腺炎的先兆。大约三分之一的 CD 患者具有针对胰腺成分的自身抗体,这提示 EPI 可能是由免疫诱导的途径削弱了外分泌的功能引起的,且这些抗体似乎对 CD 具有特异性^[27]。黏蛋白型 O-聚糖是黏蛋白的主要成分,它们分布在人体的各种黏膜部位,特别是在携带细菌的肠黏膜中表达。黏蛋白是黏液的主要成分,由杯状细胞分泌,并在常驻菌群和结肠中潜在的免疫细胞之间形成保护性的稳态屏障^[28]。Xuan 等^[29]发现大肠癌细胞中的 Core 3 黏蛋白型 O-聚糖修复可以促进 MUC1/p53/mir-200c 依赖的上皮功能。细胞色素在人类的许多组织中表达,尤其是在肝脏和肠道组织中。细胞色素 P450 是一种可自身氧化的单氧酶,能够代谢多种异源物质。感染和炎症过程与细胞色素的代谢密切相关,大多数细胞色素酶具有类似于促炎性细胞因子的功能,此外,它们通过直接激活感觉神经元和炎性细胞因子参与病理性疼痛的发生和发展^[30]。近期研究示,肠道细

菌代谢的短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFA),如乙酸和丁酸,可减轻 IBD 动物模型的炎症程度,对于增强肠道屏障功能和维持肠道稳态也具有重要性^[31-33]。最后,基于差异的 DEGs,预测并构建了一组由 72 个 mRNA、39 个 miRNA 和 9 个 circRNA 组成的编码-非编码基因组成的共表达网络,基因共表达网络主要围绕枢纽基因(Hub gene)或基因模块(Gene modules)展开,枢纽基因是某个通路或生物过程的关键基因,而有相似表达的基因则会被归为同一模块,枢纽基因与其链接的基因模块的相关性可以初步鉴定一些候选基因,为疾病诊治提供预测及靶点,也为我们的进一步研究提供了方向。

综上,本研究表明,5-ASA 治疗 DSS 诱导的 IBD 小鼠实验性肠炎的机制涉及了与免疫、炎症、代谢等一系列生物学过程,改变了炎性肠粘膜的基因表达,治疗前后部分差异表达的基因与 UC 患者的基因表达一致,虽然这些结果尚待进一步验证,但仍为 5-ASA 的机制提供了部分依据,也今后的研究提供新的线索和思路。

参 考 文 献(References)

- [1] Bernstein CN, Eliakim A, Fedail S, et al. World gastroenterology organisation global guidelines inflammatory bowel disease: update august 2015 [J]. J Clin Gastroenterol, 2016, 50(10): 803-818.
- [2] Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025 [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12(12): 720-727.
- [3] Ng SC, Shi HY, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies [J]. Lancet, 2017, 390(10114): 2769-2778.
- [4] 薛林云, 欧阳钦, 黄中华, 等. 近 20 年中国 IBD 研究进展——20 年文献总结 [J]. 国际消化病杂志, 2013, 33(4): 276-278.
Xue LY, Ouyang Q, Huang ZH, et al. Research progress of IBD in China in the past 20 years-20-year literature summary [J]. Int J Dig Dis, 2013, 33(4): 276-278.
- [5] Park JH, Peyrin-Biroulet L, Eisenhut M, et al. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules [J]. Autoimmun Rev, 2017, 16(4): 416-426.
- [6] Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Nature, 2007, 448(7152): 427-434.
- [7] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(5): 313-323.
- [8] Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease

- (IBD) [J]. *Pharmacol Rep*, 2011, 63(3): 629–642.
- [9] Gabryel M, Skrzypczak-Zielinska M, Kucharski MA, et al. The impact of genetic factors on response to glucocorticoids therapy in IBD [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2016, 51(6): 654–665.
- [10] Pugliese D, Felice C, Papa A, et al. Anti TNF- α therapy for ulcerative colitis: current status and prospects for the future [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017, 13(3): 223–233.
- [11] Schreiber S, Hanauer SB, Sandborn WJ, et al. Time to symptom resolution in ulcerative colitis with multimatrix mesalazine treatment: a pooled analysis [J]. *J Crohns Colitis*, 2020, 14(9): 1274–1281.
- [12] Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults [J]. *Gut*, 2019, 68(3): s1–s106.
- [13] Zhou W, Zhang HY, Pan YB, et al. circRNA expression profiling of colon tissue from mesalazine-treated mouse of inflammatory bowel disease reveals an important circRNA-miRNA-mRNA pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(7): 10187–10207.
- [14] Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104: 15.25.1–15.25.14.
- [15] Hirata I, Yasumoto S, Toshina K, et al. Evaluation of the effect of pyrrolidine dithiocarbamate in suppressing inflammation in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(11): 1666–1671.
- [16] MacFie TS, Poulosom R, Parker A, et al. DUOX2 and DUOX2 form the predominant enzyme system capable of producing the reactive oxygen species H_2O_2 in active ulcerative colitis and are modulated by 5-aminosalicylic acid [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(3): 514–524.
- [17] 郑家驹. 氨基水杨酸盐治疗炎症性肠病的药理学研究 [J]. *中国药房*, 2005, 16(13): 1025–1028.
- Zheng JJ. Pharmacological study of aminosalicylates in the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Chin Pharm*, 2005, 16(13): 1025–1028.
- [18] Bantel H, Berg C, Vieth M, et al. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF- κ B in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2000, 95(12): 3452–3457.
- [19] Park H, Kim W, Kim D, et al. Mesalazine activates adenosine monophosphate-activated protein kinase: implication in the anti-inflammatory activity of this anti-colitic drug [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2019, 12(4): 272–280.
- [20] 陈素傲, 金世柱. 葡聚糖硫酸钠诱导鼠溃疡性结肠炎模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 142–146.
- Chen SA, Jin SZ. Murine model of dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 142–146.
- [21] Klinghammer K, Walther W, Hoffmann J. Choosing wisely - Preclinical test models in the era of precision medicine [J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 55: 36–45.
- [22] Ostvik AE, Granlund AV, Bugge M, et al. Enhanced expression of CXCL10 in inflammatory bowel disease: potential role of mucosal Toll-like receptor 3 stimulation [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(2): 265–274.
- [23] Hyun JG, Lee G, Brown JB, et al. Anti-interferon-inducible chemokine, CXCL10, reduces colitis by impairing T helper-1 induction and recruitment in mice [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2005, 11(9): 799–805.
- [24] Lu L, Li J, Moussaoui M, et al. Immune modulation by human secreted RNases at the extracellular space [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1012.
- [25] Bedenbender K, Scheller N, Fischer S, et al. Inflammation-mediated deacetylation of the ribonuclease 1 promoter via histone deacetylase 2 in endothelial cells [J]. *FASEB J*, 2019, 33(8): 9017–9029.
- [26] Holleran G, Lopetuso L, Petito V, et al. The innate and adaptive immune system as targets for biologic therapies in inflammatory bowel disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 2020.
- [27] Singh VK, Haupt ME, Geller DE, et al. Less common etiologies of exocrine pancreatic insufficiency [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(39): 7059–7076.
- [28] Ye J, Wei X, Shang Y, et al. Core 3 mucin-type O-glycan restoration in colorectal cancer cells promotes MUC1/p53/mir-200c-dependent epithelial identity [J]. *Oncogene*, 2017, 36(46): 6391–6407.
- [29] Xuan L, Luan G, Wang Y, et al. MicroRNAs regulating mucin type O-glycan biosynthesis and transforming growth factor beta signaling pathways in nasal mucosa of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps in Northern China [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2019, 9(1): 106–113.
- [30] Stavropoulou E, Pircalabioru GG, Bezirtoglou E. The role of cytochromes P450 in infection [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 89.
- [31] Chen J, Vitetta L. Butyrate in inflammatory bowel disease therapy [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(5): 1511.
- [32] Zhai S, Qin S, Li L, et al. Dietary butyrate suppresses inflammation through modulating gut microbiota in high-fat diet-fed mice [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2019, 366(13): 153.
- [33] Li G, Lin J, Zhang C, et al. Microbiota metabolite butyrate constrains neutrophil functions and ameliorates mucosal inflammation in inflammatory bowel disease [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1968257.

[收稿日期] 2021-07-06

莫娇,敖青青,郑志坚,等. 肝特异性 LCMT1 基因敲除小鼠模型的制备及鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 17-22.
Mo J, Ao QQ, Zheng ZJ, et al. Establishment of liver-specific leucine carboxyl methyltransferase-1 gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 17-22.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.002

肝特异性 LCMT1 基因敲除小鼠模型的制备及鉴定

莫娇¹,敖青青¹,郑志坚¹,吴懿洁¹,梁宁静¹,廖思米¹,王新航²,陆彩玲¹,
唐深²,李习艺^{1*}

(1. 广西医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,南宁 530021; 2. 广西医科大学基础医学院免疫学教研室,南宁 530021)

【摘要】 目的 建立肝特异性 LCMT1 基因敲除小鼠模型。**方法** 运用 CRISPR/Cas9 技术构建肝特异性 LCMT1-KO 小鼠。通过 RT-PCR、实时定量 PCR、Western Blot 和 HE 染色等方法鉴定及比较野生和敲除小鼠的差异;观察和分析两组小鼠的一般情况、繁殖能力和子代存活率。**结果** 成功鉴定子代的基因型;LCMT1-KO 小鼠肝 LCMT1 mRNA 和蛋白质水平显著低于对照组小鼠;两组小鼠的饮食、饮水、体重、繁殖能力、子代存活率、肝外观和 HE 染色无明显差异;LCMT1-KO 小鼠心脏、大脑和肾组织中 LCMT1 表达与对照组相比没有显著变化;LCMT1-KO 小鼠 sgRNA 未发生脱靶。**结论** 成功构建肝特异性 LCMT1 基因敲除小鼠,为研究 LCMT1 基因在疾病中的调控作用提供实验手段。

【关键词】 肝;LCMT1;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) 01-0017-06

Establishment of liver-specific leucine carboxyl methyltransferase-1 gene knockout mice

MO Jiao¹, AO Qingqing¹, ZHENG Zhijian¹, WU Yijie¹, LIANG Ningjing¹, LIAO Simi¹, WANG Xinhang²,
LU Cailing¹, TANG Shen², LI Xiyi^{1*}

(1. Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China.

2. Immunology, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021)

Corresponding author: LI Xiyi. E-mail: leeciye@163.com

【Abstract】 Objective To establish a liver-specific leucine carboxyl methyltransferase-1 (Lcmt1) gene knockout mouse model. **Methods** The Lcmt1 knockout (Lcmt1-KO) mice were established with CRISPR/Cas9 technology. RT-PCR, Real-time PCR, Western Blot and hematoxylin/eosin staining were used to characterize the differences between wildtype and gene knockout mice. The general condition, reproductive ability and survival rate of offspring were also observed in the two groups of mice. **Results** The genotypes of offspring were successfully identified. The hepatic mRNA and protein levels of Lcmt1 were significantly lower in Lcmt1-KO mice than those in control mice. No significant differences in diet, drinking water, body weight, reproductive ability, survival rate of offspring, liver appearance and hematoxylin/eosin staining were found between the two groups. The expression level of Lcmt1 in brain, heart and kidney tissues were equivalent between the two groups. The single guide RNA used to generate Lcmt1-KO mouse had no off-target actions.

【基金项目】国家自然科学基金(81860585,82160612),广西自然科学基金(2018GXNSFAA281130)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81860585, 82160612), Guangxi Natural Science Foundation (2018GXNSFAA281130).

【作者简介】莫娇(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:蛋白磷酸酶甲基化调控的分子机制研究。Email:1633728470@qq.com

【通信作者】李习艺(1974—),女,教授,博士生导师,研究方向:代谢性疾病。Email:leeciye@163.com

Conclusions The liver-specific Lcmt1-KO mouse model was successfully constructed. This model provides the experimental means for studying the regulatory role of hepatic Lcmt1 in diseases.

【Keywords】 liver; Lcmt1; Cre/loxP; gene knockout

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

亮氨酸羧基甲基转移酶 1 (Leucine carboxyl methyltransferase 1, LCMT1) 是一种大小为 38×10^3 包含 334 个氨基酸的蛋白质,其序列高度保守,广泛存在于动物、植物和酵母中^[1-3]。LCMT1 通过催化蛋白磷酸酶 2A 催化亚基 C (PP2Ac) 的羧基端亮氨酸 309 位点发生甲基化,从而发挥其重要作用^[4-5]。蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 是丝氨酸/苏氨酸家族的特异性蛋白磷酸酯酶之一,由结构亚基 A,调节亚基 B 和催化亚基 C 组成的异源三聚体复合物,通过对下游信号通路去磷酸化发挥重要的作用^[6-8]。研究发现 LCMT1 和蛋白磷酸酶甲基酯酶 1 (PPME1) 共同维持 PP2Ac 甲基化水平的动态平衡^[9-10],干扰甲基化动态平衡导致有丝分裂纺锤体大小异常、细胞生长缓慢、细胞损伤甚至死亡^[11-12]。全身敲除 LCMT1 基因,导致全胚裂解物 PP2Ac 甲基化水平显著降低,胎儿肝造血功能严重缺陷,胚胎死亡率高达 90%^[13]。高表达 LCMT1 促进 PP2Ac 去甲基化,保护细胞免受 H_2O_2 诱导的氧化损伤^[14-16]。上述证据表明 LCMT1 在细胞增殖和胚胎发育过程中是必不可少的。目前关于 LCMT1 在肝的研究较少,国内外尚无在肝中特异性敲除 LCMT1 基因的动物模型。本课题通过 Cre/Loxp 系统特异性敲除肝 LCMT1 基因,在动物水平上探讨 LCMT1 基因在肝中的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

采用 CRISPR/Cas9 技术构建 8 周龄 SPF 级 C57BL/6N 背景的 $LCMT1^{fllox/+}$ 小鼠与 Alb-Cre^{+/+} 小鼠雌雄各 2 只,体重 18~22 g。该工作与赛业生物科技有限公司【SCXK(粤)2018-0032】合作完成。动物饲养在广西医科大学 SPF 级实验动物中心【SYXK(桂)2020-0003】,8 周龄的 WT 鼠和 KO 鼠各 5 只,体重 18~21 g。饲养环境:温度 20~26℃,湿度 40%~70%,氨浓度不超过 14 mg/m³,每 12 h 进行明暗交替,垫料、鼠盒、水瓶高压灭菌。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审查备案号:202107001)。

1.1.2 主要试剂与仪器

鼠尾 DNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、DL2000 DNA Marker (TaKaRa 公司);TRIzol (天根生化科技有限公司);SYBR Green Master (Roche 公司);I 型核酸染料 (北京索莱宝科技有限公司);琼脂糖粉、PVDF 膜、化学发光液 (Invitrogen 公司);蛋白预染 Marker (Thermo Fisher Scientific 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Anti-Tubulin (上海碧云天生物技术有限公司,货号:AF0001);Anti-LCMT1 (上海圣克鲁斯生物技术有限公司,货号:SC-81609);山羊抗鼠 IgG/HRP、山羊抗兔 IgG/HRP (北京中杉金桥生物技术有限公司);4% 多聚甲醛通用型组织固定液 (大连美仑生物技术有限公司)。

PCR 仪、iBright 蛋白免疫印迹成像系统、-80℃ 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific 公司);水平凝胶电泳装置、电泳槽、电泳仪 (Bio-Rad 公司);凝胶扫描成像系统 (北京天根生化科技有限公司);超纯水仪 (Millipore 公司);超净工作台 (苏州净化设备有限公司);水平摇床 (上海智城分析仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 肝 LCMT1 敲除小鼠的构建策略

LCMT1 基因位于小鼠 7 号染色体,有 11 个外显子,在 2 号和 3 号外显子两端插入 Loxp 位点 (图 1A)。根据 CRISPR/Cas9 技术原理,用显微注射法将 sgRNA、Cas9 蛋白和打靶载体注射到小鼠受精卵。经胚胎移植,获得阳性 F0 代小鼠。由阳性 F0 代小鼠与野生型小鼠交配得到 F1 代 ($LCMT1^{fllox/+}$) 杂合子小鼠。

1.2.2 肝 LCMT1 敲除小鼠的繁殖流程

将引进的 $LCMT1^{fllox/+}$ 小鼠与 Alb-Cre^{+/+} 小鼠进行交配,筛选出子代基因型为 $LCMT1^{fllox/+}/Alb-Cre^{+/-}$ 的小鼠进行自交,最终获得子代基因型为 $LCMT1^{fllox/fllox}/Alb-Cre$ 小鼠 (KO 小鼠) 和 Alb-Cre^{-/-} 小鼠 (WT 小鼠) (图 1B)。

1.2.3 肝 LCMT1 敲除小鼠的基因型鉴定

对 4 周龄小鼠编号,剪下约 1 cm 鼠尾,置于 EP 管内,在冰上剪碎小鼠尾巴,加入 180 μ L 的 Buffer GL、20 μ L 的 Proteinase K 和 10 μ L 的 RNase A,混匀

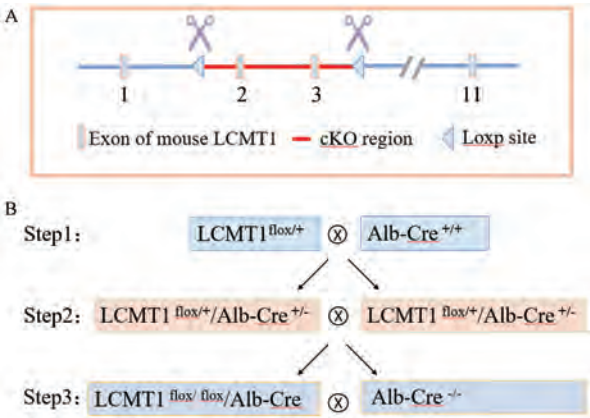


图 1 LCMT1 敲除小鼠的构建策略与流程图
Figure 1 strategy and flow chart of LCMT1 knockout mouse

后于 56℃ 水浴锅消化过夜提取 DNA。取 1 μL DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳。电泳完成后在凝胶扫描成像系统显影,根据对应片段长度进行基因型鉴定。Loxp 基因的上游引物:5'-GTGCAGGCATCAGAGAGACAAGC-3',下游引物:5'-GACAAGGTCTCACTTCATATCCTGG-3'; Cre 基因上游引物:5'-GAACGCACTGATTTTCGACCA-3',下游引物:5'-GCTAACCAGCGTTTTTCGTTTC-3'。

1. 2. 4 观察小鼠的基本情况和繁育能力

观察两组小鼠的饮食、饮水、活动、生长发育状态和繁殖能力等。

1. 2. 5 小鼠肝 LCMT1 基因 mRNA 水平检测

(1)总 RNA 提取:取 8 周龄小鼠新鲜肝,置于 EP 管中,加入 150 μL TRIzol,用匀浆器研磨使组织充分溶解,再加入 850 μL TRIzol 溶液,经酚/氯仿法提取总 RNA,使用 Bio Spec-nano 分光光度计测定 RNA 浓度。

(2)RNA 逆转录:利用 TaKaRa 公司的逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA。

(3)实时定量 PCR 体系:反应体系总共 20 μL; ddH₂O 3 μL,SYBR Premix (2×) 10 μL,前后引物各 1 μL,cDNA 5 μL。PCR 仪扩增条件:95℃ 预变性 1 min,95℃ 变性 20 s,60℃ 退火延伸 1 min,40 个循环。内参 β-actin 上游引物:5'-GTGACGTTGACATC CGTAAAGA-3',下游引物:5'-GCCGGACTCATCGTA

CTCC-3'。目的基因 LCMT1 上游引物:5'-AGAAGGAACGGCTGCTGTTGAATG-3',下游引物:5'-CTGCCCCGAGGTAGCCCCACTG-3'。

1. 2. 6 Western Blot

(1)组织总蛋白提取:随机选取 LCMT1-KO 小鼠和 WT 小鼠各 3 只,使用 RIPA 裂解液提取小鼠肝、大脑、心和肾组织总蛋白,利用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

(2)SDS-PAGE 电泳:采用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳 2 h,转膜 1.5 h,37℃ 摇床封闭 1 h,4℃ 过夜孵育 LCMT1 一抗 (1:1000),次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入山羊抗兔 IgG (1:4000),37℃ 孵育 2 h。TBST 洗 3 次,每次 10 min。

(3)化学发光显影:化学发光剂 A 液和 B 液按 1:1 配置,用枪头向 PVDF 膜加适量发光液,并小心涂抹均匀,用 iBright 蛋白免疫印迹成像系统显影。

1. 2. 7 肝苏木精-伊红染色

小鼠肝置于 4% 多聚甲醛组织固定液中,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色,观察肝形态学。

1. 2. 8 LCMT1 sgRNA 脱靶分析

登录 Cas-OFFinder 网站 (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>),将 sgRNA 序列录入,以小于等于 3 个碱基错配作为判断标准,脱靶信息如表 1 所示,其中红色代表靶序列与 sgRNA 系列不同的碱基。根据脱靶位点的 DNA 序列设计 PCR 引物,对 LCMT1-KO 小鼠鼠尾 DNA 进行扩增,琼脂糖凝胶电泳,切胶回收纯化目的片段,测序检测脱靶情况。

1. 3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析,采用平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) Graphpad Prism 8 软件绘图。两组数据比较采用独立样本 t 检验,以双侧 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2. 1 肝 LCMT1 敲除小鼠基因型鉴定

小鼠交配产生子代的基因型鉴定结果见图 2。使用 Loxp 引物和 Cre 引物对小鼠的基因型进行鉴定,若 DNA 中存在 LCMT1^{flox/flox},则能扩增出 234 bp

表 1 脱靶位点信息

Table 1 Off-target information

sgRNA 序列 sgRNA sequence	脱靶位点 Off-target site	脱靶序列 Off-target sequence
GTCAGCCTTGTTACTTACTGTGG	AG3	GGCACCTTTCTTACTTACTGTCAG
AGTTAGTCTAGCCTACTTGCTGG	AG7	TGAGAGTCTAGCCTACTTGCAAG
TGCTACCACACTAAGTAACAAGG	BG2	TGATACCTCATTAAGTAACACAG
AGCAAGTAGGCTAGACTAACTGG	BG7	AGCCAGCAGGCTAGACTAACTGG

的片段,否则只有 172 bp 的片段;若有 Cre 基因,则能扩增出 204 bp 的片段,反之则无法扩增出条带。如图 2A 所示 1、2、3、5、6、8 均为带有 234 bp 的 LCMT1^{fllox/fllox} 基因目的条带;如图 2B 所示 2、3、5、6 均为带有 204 bp 的 Cre 基因目的条带。其中 2、3、5、6 为 LCMT1-KO 小鼠,1、4、7、8 为 WT 小鼠,9、10、11 为空白对照。

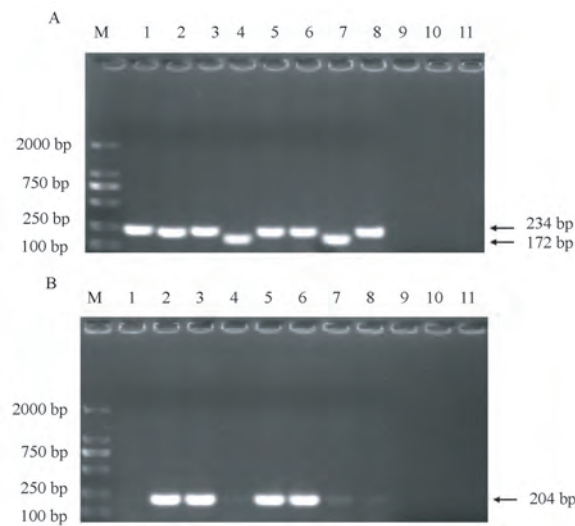


图 2 小鼠基因型鉴定
Figure 2 Mouse genotype identification

2.2 小鼠的一般情况

8 周龄的 WT 小鼠和 KO 小鼠每日饮水、饮食和体重无明显差异。两组小鼠生长发育良好,毛发柔顺有光泽(见图 3)。

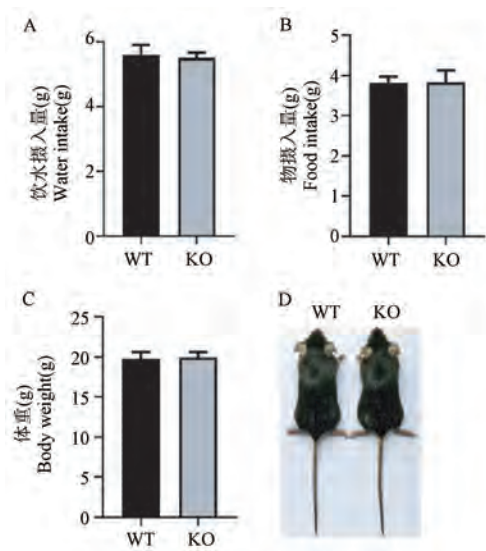


图 3 小鼠的一般情况
Figure 3 General situation of mouse

2.3 小鼠的繁育情况

LCMT1-KO 母鼠每胎产 5 ~ 9 只幼鼠,成活率 > 90%,其中 LCMT1-KO 小鼠与 WT 小鼠的雌雄比例如图 4 所示,LCMT1-KO 小鼠与 WT 小鼠繁殖情况无明显差异。

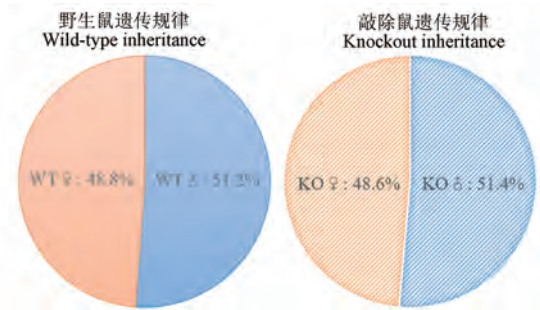
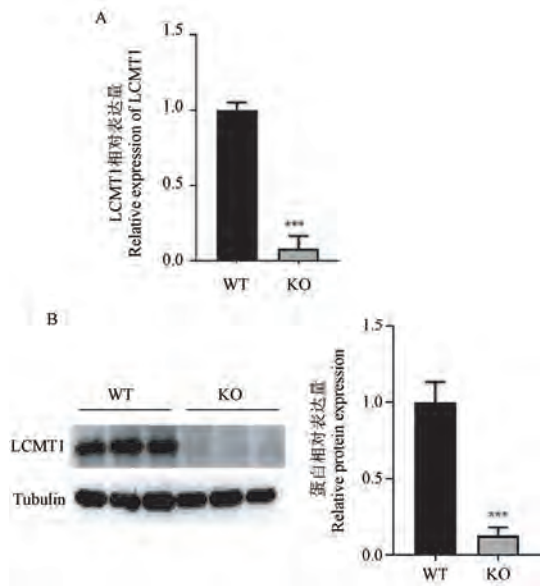


图 4 小鼠的繁殖规律
Figure 4 Reproduction law of mouse

2.4 小鼠肝 LCMT1 的 mRNA 和蛋白水平

实时定量 PCR 结果显示 LCMT1-KO 小鼠与 WT 小鼠相比肝中 LCMT1 mRNA 水平显著降低,具有统计学差异($P < 0.001$) (见图 5A)。Western Blot 结果显示,与 WT 小鼠相比,LCMT1-KO 小鼠肝 LCMT1 蛋白表达显著降低($P < 0.01$) (见图 5B)。



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。
图 5 肝 LCMT1 基因表达和蛋白表达
Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Liver LCMT1 gene expression and liver LCMT1 protein expression

2.5 小鼠肝组织形态学改变

两组小鼠肝质地柔软、边缘锐利、表面光滑无结节,呈棕红色(见图 6A)。HE 染色结果显示两组小鼠

肝小叶以中央静脉(CLV)为中心,呈放射性排列整齐,肝细胞核呈紫蓝色,细胞质着色均匀呈红色。未发现脂肪滴异常积累和炎细胞浸润(见图 6B)。

2.6 小鼠肝外组织 LCMT1 的蛋白水平

Western Blot 检测小鼠 LCMT1 在肝外组织的表达,两组小鼠 LCMT1 的表达在心脏、大脑和肾组织

中没有显著差异(见图 7)。

2.7 LCMT1 敲除小鼠脱靶位点分析

LCMT1-KO 小鼠 PCR 产物的测序峰图如图 8 所示,在可能脱靶的位点处未发现碱基突变、移码、套峰、少峰和乱峰等现象,因此 LCMT1-KO 小鼠 sgRNA 未发生脱靶。

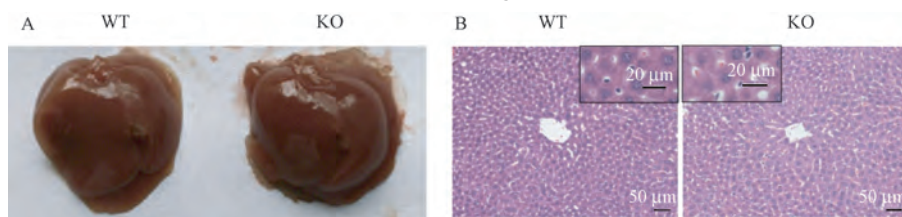


图 6 小鼠肝组织及 HE 染色

Figure 6 Liver of mouse and HE staining

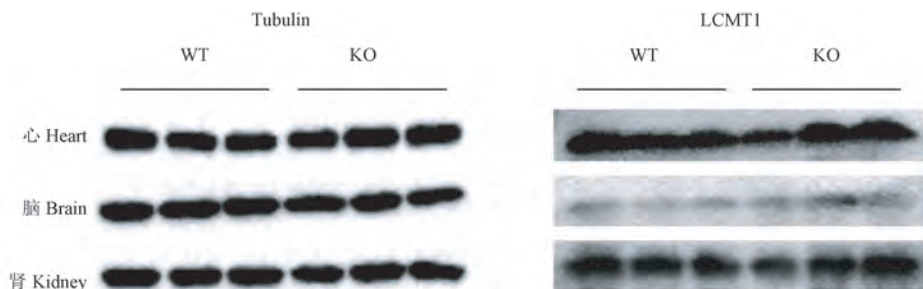
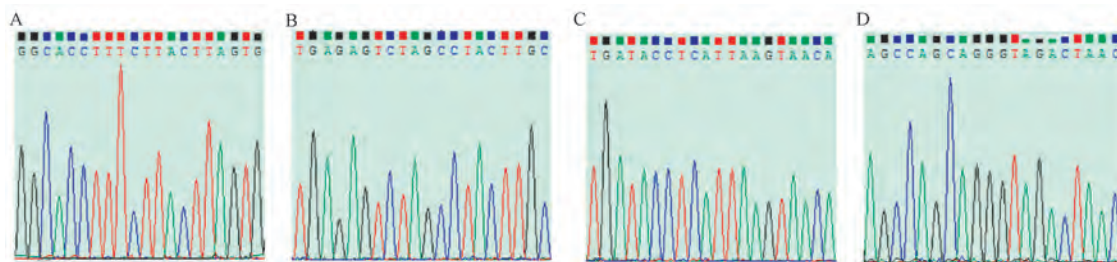


图 7 肝外组织 LCMT1 蛋白表达

Figure 7 LCMT1 protein expression in extrahepatic tissue



注:A:AG3 位点;B:AG7 位点;C:BG2 位点;D:BG7 位点。

图 8 PCR 产物的测序峰图

Note. A. AG3 site. B. AG7 site. C. BG2 site. D. BG7 site.

Figure 8 Sequencing peak map of PCR products

3 讨论

LCMT1 催化 PP2Ac 甲基化,调节 PP2A 的活性和生物学功能^[17]。PP2A 在真核生物中广泛表达,通过调节关键蛋白的去磷酸化,参与细胞代谢、细胞分化和细胞周期等生理活动,已有大量报道显示 PP2A 在肿瘤、阿尔兹海默病和糖尿病等多种疾病的病理进程中发挥关键性作用^[18]。LCMT1 作为细胞内唯一催化 PP2Ac 甲基化的酶,其对机体的作用尚未知。为探讨 LCMT1 在体内的功能,既往研究尝

试构建全身 LCMT1 敲除小鼠,但结果显示 LCMT1 敲除纯合鼠子代存活率下降,在胚胎期 12.5 d 时 LCMT1 蛋白几乎全部失活,胎儿肝发育和造血功能受损,基因敲除鼠通常在胚胎期的 14.5 ~ 16.5 d 死亡^[13],无法满足后续功能研究需求,同时也提示 LCMT1 对小鼠胚胎早期发育具有不可或缺的作用,对 LCMT1 功能的体内研究需采取条件敲除的策略。

既往研究结果显示,PP2A 在肝糖代谢发挥重要作用。肝特异性敲除 PP2Ac 小鼠对外周葡萄糖的清除能力增强,促进糖原沉积,抑制糖异生,增加

小鼠糖代谢稳态^[19]。课题组前期研究发现肝细胞 MIHA 中 siRNA LCMT1, PP2Ac 去甲基化水平和糖原合成增加,糖异生基因的表达水平降低^[20],提示 LCMT1 可能通过调控 PP2A 在肝糖代谢中发挥重要作用。为进一步探讨肝 LCMT1 在体内的功能,本研究采用 CRISPR/Cas9 方法构建肝特异 LCMT1 敲除小鼠。由于 LCMT1 的敲除作用是通过 Alb-cre 对两个同向 LoxP 位点的特异性识别剪切而实现,而肝特异 Alb-cre 小鼠的 Alb-cre 活性仅局限于肝,在胚胎发育早期并未对全身的 LCMT1 位点发生剪切,因而小鼠胚胎得以发育存活,从而实现肝特异性敲除 LCMT1 小鼠的成功构建。

本研究构建成功的基因敲除鼠,经基因测序未发现 sgRNA 脱靶,采用实时定量 PCR 和 Western Blot 检测小鼠各脏器 LCMT1 的表达,显示肝 LCMT1 水平显著降低,而在肝外组织中的表达没有显著变化。结果表明肝 LCMT1 特异性基因敲除小鼠表型符合预期。在目前完成的 8 周饲养时长中,该基因敲除小鼠生长发育良好,毛发柔顺有光泽,繁殖子代符合孟德尔遗传定律,子代存活率高。解剖见肝发育良好表面无结节,HE 染色显示小鼠肝细胞排列整齐,未见细胞变性和坏死等病变,未见与野生型鼠存在显著性差异。后续研究将探讨在高糖高脂饮食、衰老等代谢压力下,肝 LCMT1 基因特异敲除对小鼠糖脂代谢的影响,以进一步明确 LCMT1 在肝的功能。

参 考 文 献 (References)

- [1] De Baere I, Derua R, Janssens V, et al. Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue [J]. *Biochemistry*, 1999, 38(50): 16539–16547.
- [2] Creighton MT, Kolton A, Kataya ARA, et al. Methylation of protein phosphatase 2A-Influence of regulators and environmental stress factors [J]. *Plant Cell Environ*, 2017, 40(10): 2347–2358.
- [3] Wu Z, He Q, Zeng B, et al. Juvenile hormone acts through FoxO to promote Cdc2 and Orc5 transcription for polyploidy-dependent vitellogenesis [J]. *Development*, 2020, 147(18): dev188813.
- [4] Lee J, Stock J. Protein phosphatase 2A catalytic subunit is methyl-esterified at its carboxyl terminus by a novel methyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(26): 19192–19195.
- [5] MacKay KB, Tu Y, Young SG, et al. Circumventing embryonic lethality with Lcmt1 deficiency: generation of hypomorphic Lcmt1 mice with reduced protein phosphatase 2A methyltransferase expression and defects in insulin signaling [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): 65967.
- [6] Yabe R, Tsuji S, Mochida S, et al. A stable association with

PME-1 may be dispensable for PP2A demethylation: Implications for the detection of PP2A methylation and immunoprecipitation [J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(9): 1486–1496.

- [7] Reynhout S, Janssens V. Physiologic functions of PP2A: Lessons from genetically modified mice [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(1): 31–50.
- [8] Nasa I, Kettenbach AN. Effects of carboxyl-terminal methylation on holoenzyme function of the PP2A subfamily [J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48(5): 2015–2027.
- [9] Wu CG, Zheng A, Jiang L, et al. Methylation-regulated decommissioning of multimeric PP2A complexes [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2272.
- [10] Sents W, Ivanova E, Lambrecht C, et al. The biogenesis of active protein phosphatase2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity [J]. *FEBS J*, 2013, 280(2): 644–661.
- [11] Xia X, Gholkar A, Senese S, et al. A LCMT1-PME-1 methylation equilibrium controls mitotic spindle size [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(12): 1938–1947.
- [12] Lee JA, Pallas DC. Leucine carboxyl methyltransferase-1 is necessary for normal progression through mitosis in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(42): 30974.
- [13] Lee JA, Wang Z, Sambo D, et al. Global loss of leucine carboxyl methyltransferase-1 causes severe defects in fetal liver hematopoiesis [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(25): 9636–9650.
- [14] 秦富. PP2A 甲基化调控在细胞氧化应激中的作用研究 [D]. 南宁: 广西医科大学; 2016.
- [15] 秦 F. The role of PP2A methylation regulation in cellular oxidative stress [D]. Nanning: Guangxi Medical University; 2016.
- [16] Wang X, Tang S, Qin F, et al. Proteomics and phosphoproteomics study of LCMT1 overexpression and oxidative stress: overexpression of LCMT1 arrests H₂O₂-induced loss of cells viability [J]. *Redox Rep*, 2019, 24(1): 1–9.
- [17] Tang S, Qin F, Wang X, et al. H₂O₂ induces PP2A demethylation to downregulate mTORC1 signaling in HEK293 cells: H₂O₂ demethylates PP2A to downregulate mTORC1 [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(9): 1182–1191.
- [18] Wu CG, Zheng A, Jiang L, et al. Methylation-regulated decommissioning of multimeric PP2A complexes [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2272.
- [19] Sutter BM, Wu X, Laxman S, et al. Methionine inhibits autophagy and promotes growth by inducing the SAM-responsive methylation of PP2A [J]. *Cell*, 2013, 154(2): 403–415.
- [20] Xian L, Hou S, Huang Z, et al. Liver specific deletion of Ppp2cα enhances glucose metabolism and insulin sensitivity [J]. *Aging*, 2015, 7(4): 223–232.
- [20] 梁紫微. PP2Ac 甲基化在衰老及肝脏糖代谢调控中作用的研究 [D]. 南宁: 广西医科大学; 2019.
- [20] Liang ZW. The role of PP2Ac methylation in aging and the regulation of liver glucose metabolism [D]. Nanning: Guangxi Medical University; 2019.

[收稿日期] 2021–08–09

毛玉宁,柳森森,巩森森,等. MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 23-30.

Mao YN, Liu SS, Gong MM, et al. Role of matrix metalloproteinase-2 in the invasion and metastasis of gastric cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 23-30.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.003

MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用

毛玉宁^{1,2}, 柳森森², 巩森森^{1,2}, 赵菊梅^{1*}, 师长宏^{2*}

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

【摘要】 目的 探索 MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用, 以为胃癌转移提供新的预测指标及治疗靶点。**方法** 选择胃癌细胞系 MKN-1 转染慢病毒, 使 MMP2 低表达, 获得细胞系 sh-MMP2, 并通过 RT-PCR 及 Western Blot 检测转染后 MKN-1 细胞中 MMP2 表达情况。进一步通过细胞划痕实验、Transwell、CCK8 实验分别检测 MMP2 低表达后细胞迁移能力、侵袭能力、增殖能力变化。利用裸鼠建立 sh-MMP2 细胞系异种移植模型及转移模型, 观察 MMP2 低表达后体内肿瘤生长变化及体内转移能力变化。通过 RT-PCR 及 Western Blot 检测 MMP2 对 EMT 及细胞凋亡的影响。**结果** MMP2 低表达后胃癌细胞迁移能力 ($P < 0.05$)、侵袭能力 ($P < 0.01$)、增殖能力 ($P < 0.05$) 均下降。体内实验结果显示 MMP2 低表达可显著减缓肿瘤生长及体内转移 ($P < 0.01$)。进一步实验表明降低 MMP2 的表达, 可抑制细胞 EMT 过程并增加细胞凋亡。**结论** MMP2 低表达可通过抑制 EMT 过程及增加细胞凋亡, 减弱胃癌细胞迁移能力、侵袭能力和增殖能力, 抑制胃癌的发展。

【关键词】 胃癌; MMP2; 转移; 侵袭

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0023-08

Role of matrix metalloproteinase-2 in the invasion and metastasis of gastric cancer

MAO Yuning^{1,2}, LIU Sensen², GONG Miaomiao^{1,2}, ZHAO Jumei^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China. 2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032)

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

【Abstract】 Objective To explore the role of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) in gastric cancer invasion and metastasis, so as to provide a new predictive index and therapeutic target for gastric cancer metastasis. **Methods** Gastric cancer cell line MKN-1 was transfected with lentivirus to make a cell line with low expression of MMP2, denoted sh-MMP2. Real-time PCR and Western Blot were used to detect MMP2 expression in MKN-1 cells after transfection. Cell scratch, Transwell and CCK8 assays were used to detect changes in migration, invasion and proliferation, respectively, of MKN-1 cells. Xenotransplantation and metastasis models of MKN-1 NC and MKN-1 sh-MMP2 cell lines were established in nude mice, and changes in tumor growth and metastasis were observed *in vivo*. The effects of MMP2 on apoptosis and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) were detected by Real-time PCR and Western Blot. **Results** The migration ($P < 0.05$), invasion ($P < 0.01$) and proliferation ($P < 0.05$) of gastric cancer MKN-1 cells were decreased with the reduction of MMP2 expression. *In vivo* result showed that low expression of MMP2 significantly slowed down tumor growth and metastasis ($P < 0.01$). Further experiments demonstrated that decreasing MMP2 expression in gastric cancer cells

【基金项目】 国家自然科学基金(31772546)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(31772546).

【作者简介】 毛玉宁(1998—), 女, 硕士生, 研究方向: 肿瘤分子病理与药物研究。Email: yuningmao98@163.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, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤分子病理与药物研究。Email: jmz2003.stu@163.com。

* 共同通信作者

increased apoptosis and inhibited the EMT process. **Conclusions** Low expression of MMP2 can retard the development of gastric cancer by increasing cell apoptosis and inhibiting the EMT process, as well as reducing the migration, invasion and proliferation of gastric cancer cells.

【Keywords】 gastric cancer; MMP2; metastasis; invasion

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

胃癌是全球第五大恶性肿瘤,其发病率为 5.7%,死亡率为 8.2%,为全球癌症相关死亡第三位^[1]。我国胃癌的发生率为 10.26%,仅次于肺癌位于第二位,死亡率为 12.45%,位于癌症相关死亡第三位^[1]。目前临床胃癌的治疗方式主要为手术治疗并辅以放疗及化疗,胃癌早起症状不明显但早期胃癌患者的 5 年生存率高达 95%^[2],大部分患者发现时已经是晚期而晚期患者的五年生存率却低于 30%^[3]。生存率低的主要原因为术后复发及远处转移^[4],因此筛选出胃癌转移相关基因可以通过提高诊断准确性及针对性治疗从而提高患者生存率。目前已筛选出一些分子,如 RelA、环氧合酶-2、NF- κ B 信号通路的分子等,这些分子均在胃腺癌组织中表达增加,并参与肿瘤的生长、侵袭和转移^[5-9]。目前基质金属蛋白酶被报道在多种癌症中与肿瘤的复发转移相关,但其要作为转移预测指标及治疗靶点还需要探究及明确其作用机制。

MMPs(matrix metalloproteinase,MMP)又称基质金属蛋白酶,是锌依赖性内切蛋白酶家族,现已报道的 MMPs 有 20 多种^[10],在炎症调节、器官发育、癌症发展中均发挥作用^[11-13]。

因 MMP2 可水解胶原蛋白导致细胞外基质降解,故与肿瘤的转移密切相关^[14-15]。已有文献报道,MMP2 参与甲状腺癌、肺癌、肝癌、口腔癌的发生发展,并与转移密切相关^[16-19]。然而 MMP2 在胃癌中的作用尚不清楚。本研究旨在研究 MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用,探索其调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

18 只 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠,6 ~ 7 周龄,体重 22 ~ 25 g,购自常州卡文斯实验动物有限公司【SCXK(苏)2016-0010】,饲养在空军军医大学实验动物中心 SPF 级屏障设施内【SYXK(陕)2018-001】。环境温度 23 ~ 25℃,相对湿度 40% ~ 60%,12 h 昼夜交替,饲料经辐照处理,饮用水经高温高

压灭菌处理,动物自由摄食和饮水。动物实验通过了空军军医大学实验动物福利及伦理委员会批准(审批号:20180512)。细胞异种移植模型分为 MKN-1 sh-MMP2 组和 MKN-1 NC 组,每组 5 只裸鼠。体内转移实验分为 MKN-1 sh-MMP2 组和 MKN-1 NC 组,每组 4 只裸鼠。

1.1.2 细胞

人胃癌细胞 SGC-7901、MKN45、MKN-1、BGC-823 及人正常胃黏膜细胞 GES-1 购买于国家实验细胞资源共享平台。C61262 为本实验室培养的人胃癌原代细胞。细胞培养条件为 RPMI-1640 培养基(10%胎牛血清 + 1%青链霉素),37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.1.3 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基和 0.05%胰酶购自美国 HyClone 公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司;荧光定量 PCR 及 RNA 提取试剂盒等分子生物相关试剂均购自大连宝生物工程有限公司。基质胶购自美国 Becton Dickinson 公司,transwell 小室购自美国 Corning Incorporated 公司,酶标仪(Biotek Take,美国),荧光定量 PCR 仪(StepOne Plus,Thermo Fisher,美国)等。

1.2 方法

1.2.1 构建 MMP2 低表达胃癌细胞株

检测胃正常细胞系 GES-1 及五株胃癌细胞 MKN-1、MKN-45、BGC-823、SGC-7901、C61262 本底 MMP2 表达,并选择 MMP2 高表达胃癌细胞株构建 sh-MMP2 细胞株。之后设计 3 个小干扰 RNA 并转染所选 MMP2 高表达胃癌细胞株,通过 qRT-PCR 和 Western Blot 实验检测其敲低效果,选取敲低效果最佳小干扰 RNA 序列包装合成慢病毒,之后将慢病毒转染所选细胞,嘌呤霉素(5 μ g/mL)持续筛选,待细胞稳定后,观察荧光信号并通过 qRT-PCR 和 Western Blot 检测转染效率,确认稳转株构建成功并记作 sh-MMP2。

1.2.2 实时 RT-PCR 分析

按照商品化 RNA 提取试剂盒(总 RNA 提取试剂盒,TIANGEN,DP419)说明书提取总 RNA。用微

量酶标仪测定 RNA 浓度,根据测定结果,将其浓度调整至 500 ng/ μ L。根据 TaKaRa 试剂盒说明书 (PrimeScriptRT Master Mix, TaKaRa, RR036A) 将 RNA 逆转录为 cDNA,反转录条件设置为 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 15 s。荧光定量 PCR 反应按照 TaKaRa 试剂盒 (SYBR Premix Ex Taq II, TaKaRa, RR820A) 进行荧光定量 PCR 反应。PCR 反应体系 (20 μ L): SYBR Premix Ex Taq II 10 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 7.6 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, PCR 反应 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s (荧光测量) 40 个循环。PCR 反应结束后直接进行熔解曲线分析 (95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s)。测定待测样本中各基因的 Ct 值, 每组样本检测 3 次, 每次检测均做 3 个复孔, 最终 Ct 值以平均数表示。扩增的基因包括 MMP2、E-Cadherin、Vimentin、Bax、Bcl-2, 内参为 β -actin, 相关信息见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequences of genes	
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
MMP2	F: 5'-ATGACAGCTGCACCACTGAG-3'
	R: 5'-ATTGTGTGCCAGGAAAGTG-3'
E-Cadherin	F: 5'-CTGGCTGACATGTACGGAGG-3'
	R: 5'-TCTCAAGGGAAGGGAGTGA-3'
Vimentin	F: 5'-AGCACTGAGAACTAGCAGCG-3'
	R: 5'-TGAGGGCTCCTAGCGGTTTA-3'
Bax	F: 5'-GCCCTTTTGCTTCAGGGTTTC-3'
	R: 5'-GGAAAAAGACCTCTCGGGGG-3'
Bcl-2	F: 5'-CAGGATAACGGAGGCTGGGATG-3'
	R: 5'-ACTTGTGGCCAGATAGGCA-3'
β -actin	F: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
	R: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

1.2.3 免疫印迹分析

在 RIPA 裂解缓冲液中裂解细胞。使用 BCA 试剂 (中国 Beyotime) 测量蛋白质浓度。通过 SDS-PAGE 分离等量的蛋白质, 并用相应抗体 MMP2 (Abcam, ab92536)、E-Cadherin (Proteintech, 20874-1-AP)、Vimentin (Proteintech, 10366-1-AP)、Bax (Cell Signaling, 5023)、Bcl-2 (Cell Signaling, 15071) 进行免疫印迹。

1.2.4 Transwell 实验

将包被基质胶的小室放入 24 孔板中, 在上室加入 300 μ L 预热的无血清培养基, 使基质胶水化, 室温下静置 30 min 后, 吸去剩余培养基。对数期生长的低表达 MMP2 胃癌细胞及阴性对照 (NC) 细胞用 0.25% 的胰酶消化并计数, 用含无血清的 1640 培养

基重悬, 调整细胞密度为 1×10^5 , 取 100 μ L 细胞悬液培养在 24 孔板 transwell 小室的上室, 下室加入 500 μ L 含 10% 血清的 1640 培养基。37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱培养 48 h 后, 取出小室弃掉培养基, 轻轻擦掉上室的细胞, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.2% 结晶紫染色 10 min 后, 用 PBS 清洗 3 次, 置于显微镜下拍照观察。

1.2.5 伤口愈合实验

将低表达 MMP2 的胃癌细胞及阴性对照 (NC) 细胞接种于六孔板, 显微镜下观察汇合度达到 90%, 取 200 μ L 的枪头制造划痕, 尽量保证每个孔的划痕宽度一致。吸掉细胞培养液, PBS 清洗孔板 3 次, 去掉划痕产生的细胞碎片。加入新鲜无血清培养基 RPMI-1640, 显微镜下拍照, 记为 0 h 细胞划痕状态。将 6 孔板放回培养箱继续培养, 按 0、24、48 h 拍照, 倒置显微镜观察。通过比较图像数据确定细胞迁移情况。

1.2.6 细胞增殖

通过 CCK8 测定法测量细胞增殖。将细胞铺在 96 孔板 (2000 个细胞/孔) 中, 并在培养 0、6、12、18、24、30 h, 加入 100 μ L 培养基/CCK8 混合物 (培养基: CCK8, 9:1) 孵育 3 h 后, 测量 450 nm 处吸光度值。

1.2.7 肿瘤细胞异种移植

将 MKN-1 sh-MMP2 细胞及 MKN-1 NC 细胞用 0.25% 的胰酶消化后制备成细胞悬液, 用 PBS 把细胞稀释成 1×10^6 /mL 接种到 6 ~ 7 周龄的免疫缺陷裸鼠皮下, 每组 5 只用游标卡尺测量皮下肿瘤的长度 (l) 和宽度 (w), 肿瘤体积 (V) 计算公式为: $V = 1/2 \times l \times w^2$ 。连续测定肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线。

1.2.8 体内转移模型

将 MKN-1 sh-MMP2 细胞及 MKN-1 NC 细胞用 0.25% 的胰酶消化后制备成细胞悬液, 用 PBS 把细胞稀释成 1×10^6 /mL 打入 6 ~ 7 周龄的免疫缺陷裸鼠尾静脉, 每组 4 只, 通过小动物成像观察体内转移情况, 待出现转移后取小鼠肺组织切片进行 HE 染色。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8.4.0 软件进行数据统计学分析, 所有实验均重复 3 次, 计量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异极具显著性。

2 结果

2.1 构建 MMP2 低表达胃癌细胞株

为了探索 MMP2 与胃癌侵袭和转移的关系,构建 MMP2 低表达稳转细胞株。通过 RT-PCR 及 Western Blot 检测胃正常细胞系 GES-1 及五株胃癌细胞本底 MMP2 表达后发现 MKN-1 及 C61262 细胞 MMP2 本底表达高(图 1A、1B),因 C61262 细胞为本研究室原代培养细胞,细胞状态不稳定,因此,选用 MKN-1 进行下一步实验。之后将设计的 3 个小干扰 RNA 转染 MMP2 高表达胃癌细胞株 MKN-1,通过 qRT-PCR 和 Western Blot 实验检测发现 si-MMP2 628 敲低效果最佳(图 1C、1D)。因此选取 si-MMP2 628 序列包装合成慢病毒,将慢病毒转染 MKN-1 细胞并检测 MMP2 表达情况,确认 MKN-1 sh-MMP2 构建成功(图 1E、1F)。

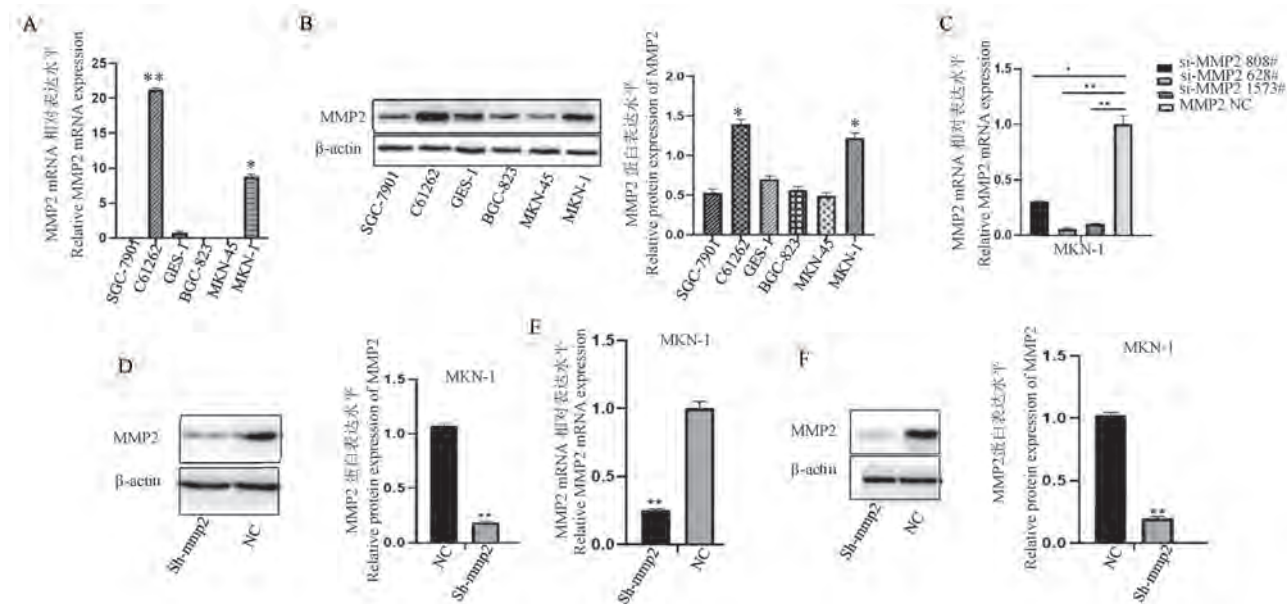
2.2 降低 MMP2 表达可抑制胃癌细胞侵袭、迁移和增殖能力

MMP2 低表达稳转细胞株构建成功后,检测敲

低后细胞侵袭、迁移、增殖能力变化。Transwell 结果显示,MMP2 低表达后 MKN-1 细胞侵袭能力显著降低(图 2A)。进一步检测细胞迁移能力变化,细胞划痕实验显示与对照组相比,MMP2 低表达后细胞迁移能力显著下降(图 2B)。细胞增殖实验显示与对照组相比,MMP2 低表达后 MKN-1 细胞增殖能力降低(图 2C)。以上数据表明,MMP2 与肿瘤细胞侵袭、迁移、增殖能力均显著相关。

2.3 降低 MMP2 表达可延缓肿瘤生长及体内转移

体外实验表明 MMP2 与肿瘤细胞侵袭、迁移、增殖能力显著相关。于是进一步进行体内实验验证 MMP2 在体内的功能,将 MMP2 低表达 MKN-1 细胞及对照组细胞以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种到裸鼠皮下,密切监测肿瘤生长情况。待肿瘤长至 100 mm^3 左右时每 4 d 测量肿瘤最长直径(l),肿瘤最短直径(w),以计算公式 $V = 1/2 \times l \times w^2$ 计算肿瘤体积,20 d 后 MMP2 低表达组肿瘤体积平均为 495 mm^3 ,对照组肿瘤平均体积为 992 mm^3 。综上所述,MMP2 低表达组肿瘤体积明显小于对照组肿瘤,肿瘤重量

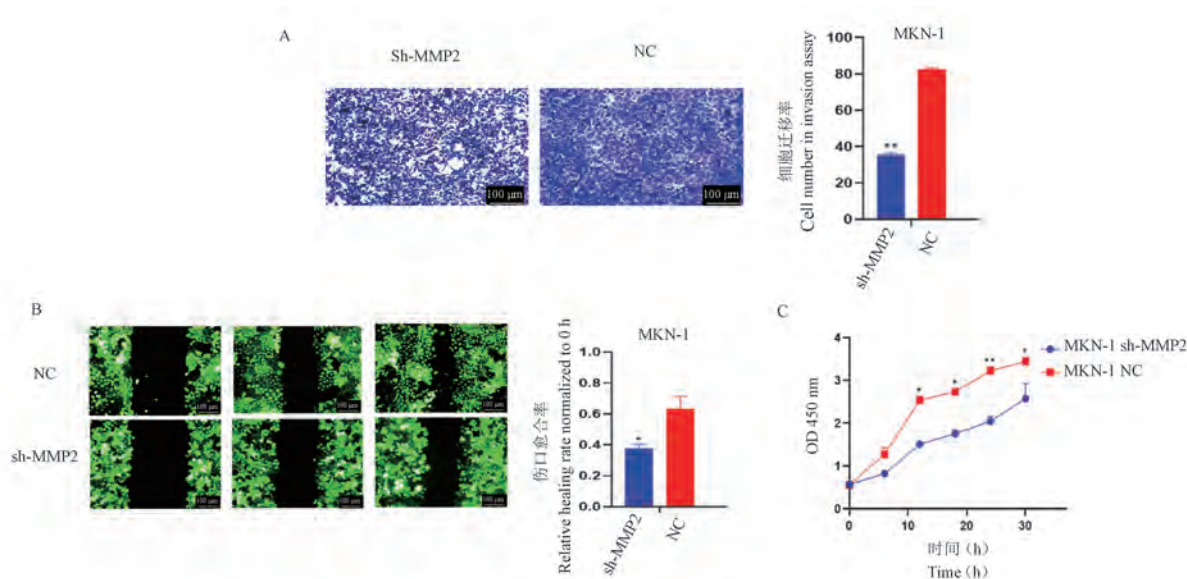


注:A;qRT-PCR 分析胃正常细胞系 GES-1 及五株胃癌细胞 MKN-1、MKN-45、BGC-823、SGC-7901、C61262 本底 MMP2 表达情况;B;Western Blot 分析胃正常细胞系 GES-1 及五株胃癌细胞 MKN-1、MKN-45、BGC-823、SGC-7901、C61262 本底 MMP2 表达情况;C;qRT-PCR 分析 3 个小干扰 RNA 转染 MKN-1 后 MMP2 表达情况;D;Western Blot 分析转染 si-MMP2 628 后 MMP2 蛋白表达水平;E;qRT-PCR 分析转染慢病毒后 MMP2 表达情况;F;Western Blot 分析转染慢病毒后 MMP2 表达情况;与 MKN-1 NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下同)

图 1 构建 MMP2 低表达稳转细胞株

Note. A. The expression of background MMP2 in normal gastric cell line GES-1 and five gastric cancer cell lines MKN-1, MKN-45, BGC-823, SGC-7901 and C61262 were analyzed by qRT-PCR. B. The expression of background MMP2 in normal gastric cell line GES-1 and five gastric cancer cell lines MKN-1, MKN-45, BGC-823, SGC-7901 and C61262 were analyzed by Western Blot. C. Expression of MMP2 after transfection of MKN-1 with three small interfering RNAs was analyzed by qRT-PCR. D. Western Blot analysis of MMP2 protein expression level after si-MMP2 628 transfection. E. Expression of MMP2 after lentivirus transfection was analyzed by qRT-PCR. F. Western Blot analysis of the expression of MMP2 after lentivirus transfection. Compared with MKN-1 NC, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 Construction of stable cell line with low expression of MMP2



注:A;Transwell 分析 MMP2 低表达后细胞侵袭能力变化;B;细胞划痕实验分析 MMP2 低表达后细胞迁移能力变化;C;CCK8 实验分析 MMP2 低表达后细胞增殖能力变化。

图 2 降低 MMP2 表达可抑制胃癌细胞侵袭、迁移和增殖能力

Note. A. Transwell analysis of changes in cell invasion ability after low expression of MMP2. B. Cell scratch assay was used to analyze the changes of cell migration ability after low expression of MMP2. C. CCK8 assay was used to analyze the changes of cell proliferation ability after low expression of MMP2.

Figure 2 Reducing the expression of MMP2 inhibit the invasion, migration and proliferation of gastric cancer cells

明显小于对照组(图 3A),且与对照组相比肿瘤生长缓慢(图 3B),提示 MMP2 表达变化可影响体内肿瘤生长。将 MKN-1 sh-MMP2 细胞及 MKN-1 NC 细胞通过尾静脉打入裸鼠体内,小动物成像结果显示 MMP2 低表达后细胞在体内转移能力下降(图 3C),肺组织切片显示对照组 3 只出现明显肺转移,而 MMP2 低表达组 4 只裸鼠肺部未出现转移(图 3D)。

2.4 降低 MMP2 表达可减少胃癌细胞 EMT 过程

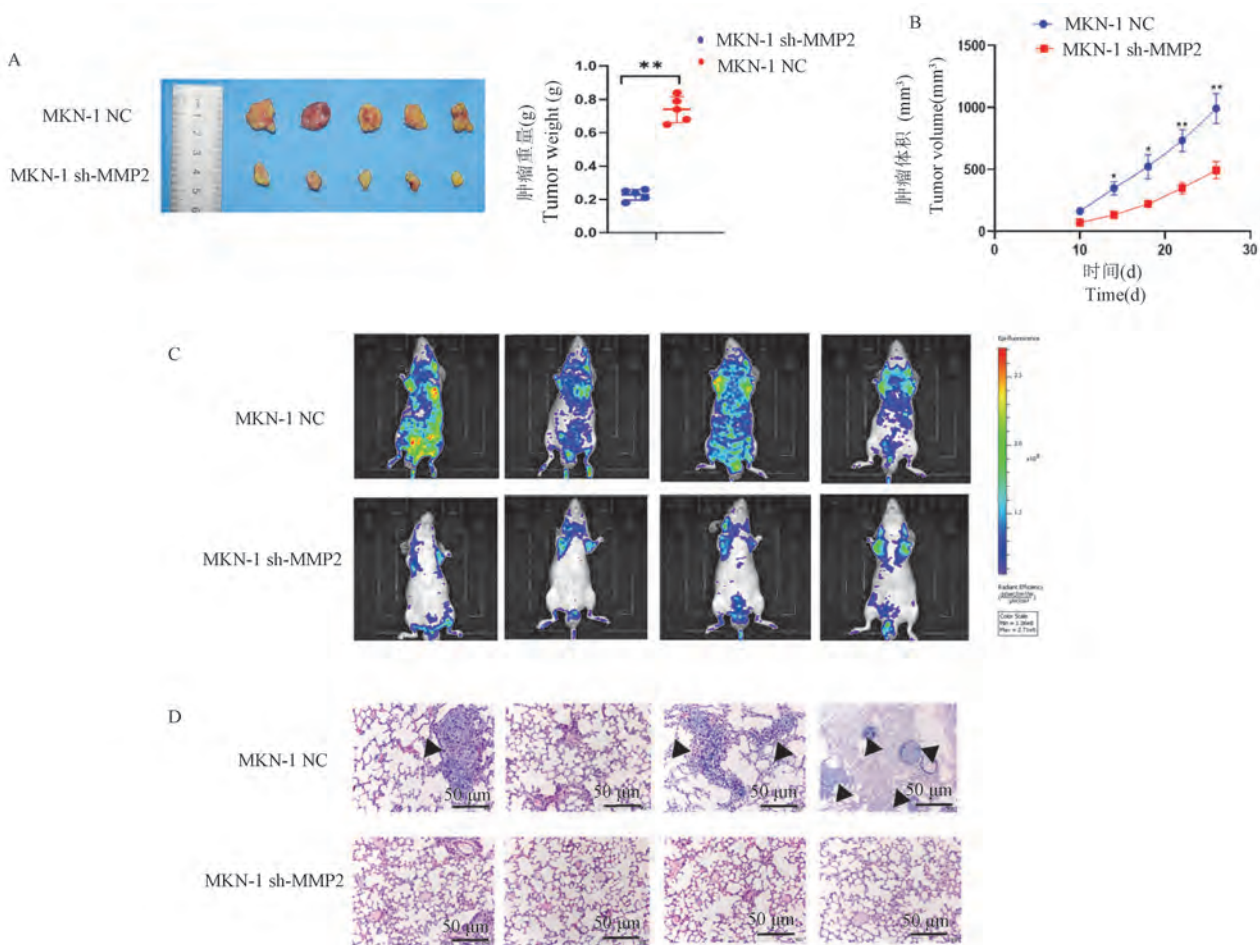
为了探讨 MMP2 影响胃癌细胞侵袭、迁移、增殖的具体作用机制,我们进一步检测了上皮间质转化相关分子 E-cadherin 及 Vimentin 表达情况,结果显示,MMP2 低表达后 MKN-1 细胞上皮标志物 E-cadherin mRNA 表达量升高,间质标志物 Vimentin mRNA 表达量降低(图 4A),提示降低 MMP2 表达,可抑制上皮间质转化。同样在蛋白水平也发现 MMP2 低表达后 MKN-1 细胞上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达量升高,间质标志物 Vimentin 蛋白表达量降低(图 4B),说明 MMP2 低表达可抑制上皮间质转化。以上数据表明,MMP2 可通过影响上皮间质转化过程进而影响肿瘤侵袭及转移。

2.5 降低 MMP2 表达可增加细胞凋亡

为了探索 MMP2 影响细胞增殖的相关机制,我们研究了 MMP2 的表达与凋亡相关分子的关系。实验发现 MMP2 低表达后 MKN-1 细胞 Bax mRNA 表达量升高,Bcl-2 mRNA 表达量降低(图 5A),提示 MMP2 低表达可通过增加细胞凋亡从而延缓肿瘤细胞生长。在蛋白水平发现 MMP2 低表达后 MKN-1 细胞 Bax 蛋白表达量升高,Bcl-2 蛋白表达量降低(图 5B),说明 MMP2 低表达可通过增加细胞凋亡进而延缓肿瘤生长。进一步将细胞异种移植模型的肿瘤组织进行 TUNEL 染色,结果显示与对照组相比 MMP2 低表达后 MKN-1 细胞凋亡增加(图 5C)。以上数据表明,MMP2 低表达可通过增加细胞凋亡抑制肿瘤生长。

3 讨论

基质金属蛋白酶通过影响细胞外基质从而在肿瘤生长和转移过程中发挥重要作用。虽然有文章报道 MMP2 参与胃癌的发生与进展,但 MMP2 在胃癌中的具体作用仍然不清楚^[21]。本研究揭示了 MMP2 对于胃癌细胞侵袭、迁移、增殖的影响。首先通过慢病毒转染的方式获得了低表达 MMP2 的胃

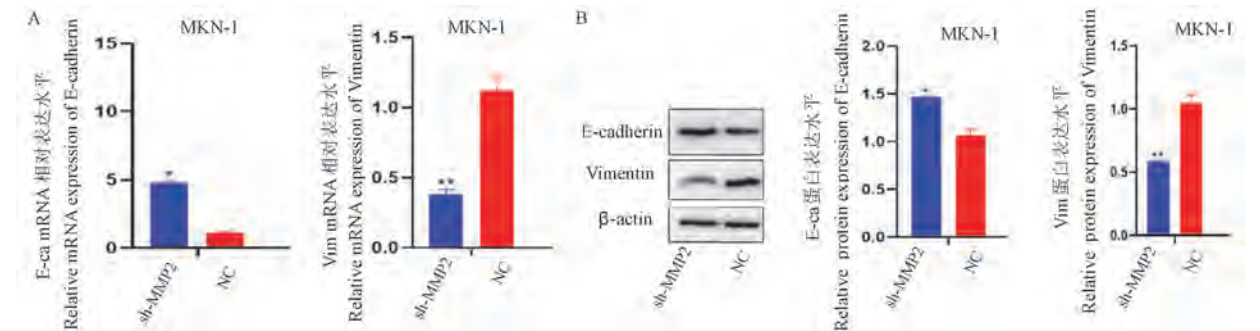


注:A:MMP2 低表达后体内肿瘤生长情况;B:MMP2 低表达后体内肿瘤生长曲线;C:MMP2 低表达后体内转移情况;D:MMP2 低表达后小鼠肺部组织 HE 结果。

图 3 降低 MMP2 表达可显著延缓体内肿瘤生长及体内转移

Note. A. Changes in tumor growth *in vivo* after low expression of MMP2. B. Tumor growth curve *in vivo* after low expression of MMP2. C. *In vivo* metastasis after low expression of MMP2. D. HE results in lung tissues of mice after low expression of MMP2.

Figure 3 Decreased MMP2 expression can significantly delay tumor growth and metastasis *in vivo*

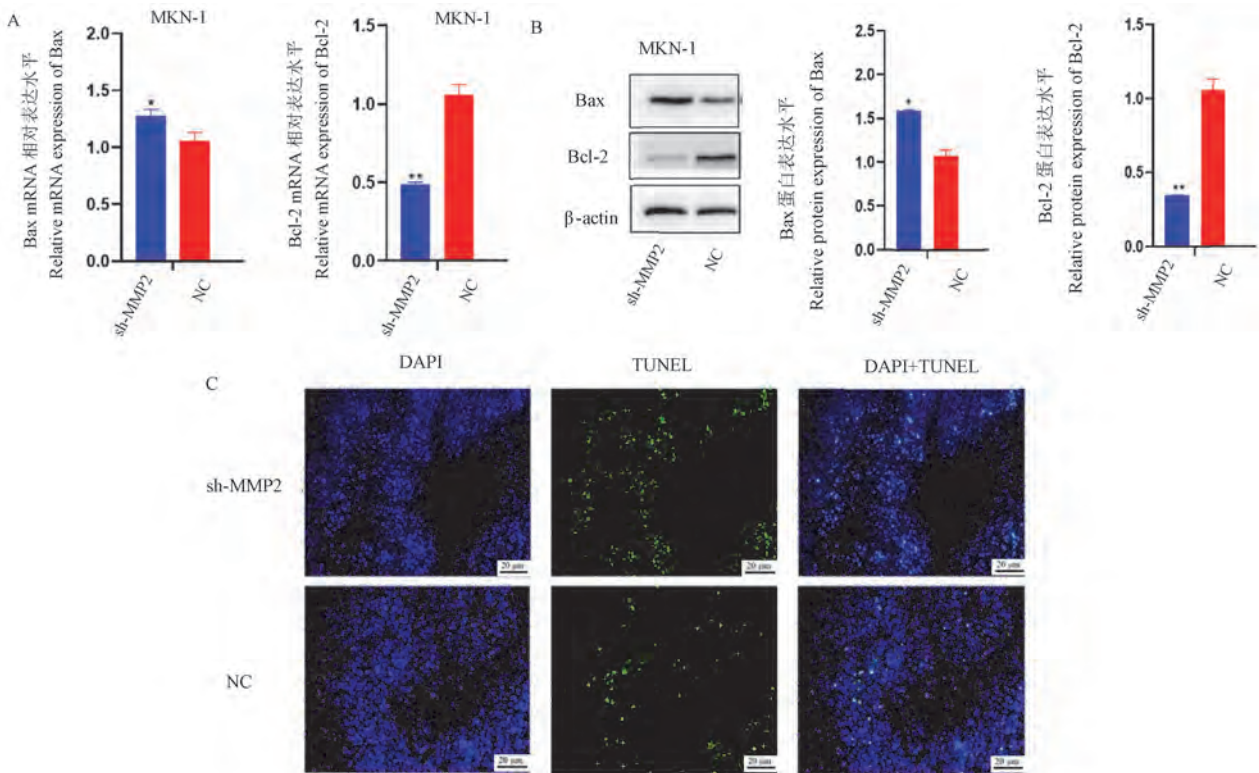


注:A:qRT-PCR 分析 MMP2 低表达后 E 钙黏蛋白及波形蛋白表达情况;B:Western Blot 分析 MMP2 低表达后 E 钙黏蛋白及波形蛋白表达情况。

图 4 降低 MMP2 表达可抑制胃癌细胞 EMT 过程

Note. A. Expression of E cadherin and vimentin after low expression of MMP2 was analyzed by qRT-PCR. B. The expression of E cadherin and vimentin after the low expression of MMP2 was analyzed by Western Blot.

Figure 4 Reducing the expression of MMP2 can inhibit the EMT process of gastric cancer cells



注:A;qRT-PCR 分析 MMP2 低表达后 Bax 及 Bcl-2 表达情况;B;Western Blot 分析 MMP2 低表达后 E 钙黏蛋白及波形蛋白表达情况;C: CDX 组织 TUNEL 染色结果。

图 5 降低 MMP2 表达可增加细胞凋亡

Note. A. The expression of Bcl-2 and Bax after low expression of MMP2 was analyzed by qRT-PCR. B. The expression of E cadherin and vimentin after the low expression of MMP2 was analyzed by Western Blot. C. TUNEL staining results of CDX tissue.

Figure 5 Decrease of MMP2 expression increased apoptosis

癌细胞株 MKN-1,相关实验显示 MMP2 低表达后胃癌细胞的侵袭、迁移、增殖能力均下降,提示 MMP2 可能参与了胃癌发展。这与肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌的相关研究报道结果相一致^[22-26]。上皮间质转化过程的特征是上皮表型的丧失和间充质表型的获得^[27]。大量文献表明 MMP2 是调节细胞外基质重要的细胞外蛋白水解酶,并且可通过 PI3K/Akt-NF- κ B 通路影响上皮间质转化从而促进喉部肿瘤生长和迁移^[20]。已有文献报道 MMP2 可通过促进上皮间质转化过程加快三阴乳腺癌的发展^[28]。为了探究 MMP2 调控胃癌转移的机制,进一步探究了 MMP2 与上皮间质转化标志物之间的关系。上皮标志物(E 钙黏蛋白)和间充质标志物(波形蛋白)常用来评估上皮间质转化过程,在低表达 MMP2 的胃癌细胞中发现上皮标志物表达上升,间质标志物表达下降,这表明 MMP2 通过影响上皮间质转化从而影响胃癌发展。

细胞异种移植模型及 CCK8 实验表明,MMP2 低表达后细胞增殖能力显著降低。于是进一步研

究 MMP2 低表达引起细胞增殖能力降低的具体作用机制。细胞凋亡是影响细胞增殖的重要因素之一,其中 Bcl-2 家族是细胞凋亡研究中最受关注的家族之一,其分子成员 Bcl-2 和 Bax 最具代表性,Bax 为细胞凋亡促进因子,Bcl-2 为细胞凋亡的抑制因子^[29]。检测胃癌细胞 MMP2 低表达后 Bax 及 Bcl-2 的变化用于评估细胞凋亡情况,结果显示降低 MMP2 的表达后,Bax 在 mRNA 水平及蛋白水平均高于对照组,而 Bcl-2 在 mRNA 水平及蛋白水平均低于对照组,提示 MMP2 低表达可增加细胞凋亡从而抑制细胞增殖。进一步将细胞异种移植模型组织进行 TUNEL 染色,结果证实 MMP2 低表达可通过增加细胞凋亡抑制肿瘤生长。

总之,本研究证实,MMP2 低表达使上皮标志物 E-cadherin 表达上升,间质标志物 Vimentin 表达下降,提示 MMP2 低表达可通过抑制上皮间质转化过程降低胃癌细胞的侵袭、迁移能力。并且 MMP2 低表达使细胞凋亡促进因子 Bax 表达量增加,抑制凋亡因子 Bcl-2 表达降低,TUNEL 染色同样提示用

MKN-1 sh-MMP2 细胞建立细胞异种移植模型后肿瘤组织细胞凋亡增加,提示 MMP2 低表达可通多增加细胞凋亡从而抑制细胞增殖以及延缓体内肿瘤生长。综上所述,MMP2 低表达可通过抑制上皮间质转化过程降低肿瘤细胞侵袭和迁移能力,通过增加细胞凋亡抑制肿瘤细胞增殖。以上数据提示 MMP2 在胃癌的发生及转移中至关重要,并且可能是胃癌转移标志物及潜在治疗靶点。

参 考 文 献 (References)

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Schernberg A, Rivin Del Campo E, Rousseau B, et al. Adjuvant chemoradiation for gastric carcinoma; State of the art and perspectives [J]. Clin Transl Radiat Oncol, 2018, 10: 13-22.
- [3] Kim YJ, Hwang KC, Kim SW, et al. Potential miRNA-target interactions for the screening of gastric carcinoma development in gastric adenoma/dysplasia [J]. Int J Med Sci, 2018, 15(6): 610-616.
- [4] Lee BL, Lee HS, Jung J, et al. Nuclear factor- κ B activation correlates with better prognosis and Akt activation in human gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 2518-2525.
- [5] Yamanaka N, Sasaki N, Tasaki A, et al. Nuclear factor- κ B p65 is a prognostic indicator in gastric carcinoma [J]. Anticancer Res, 2004, 24(2): 1071-1075.
- [6] Chen Z, Liu M, Liu X, et al. COX-2 regulates E-cadherin expression through the NF- κ B/Snail signaling pathway in gastric cancer [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(1): 93-100.
- [7] Smale ST. Hierarchies of NF- κ B target-gene regulation [J]. Nat Immunol, 2011, 12(8): 689-694.
- [8] Zhang HD, Jiang LH, Sun DW, et al. The role of mir-130a in cancer [J]. Breast Cancer, 2017, 24(4): 521-527.
- [9] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 86.
- [10] Chakraborti T, Das S, Mandal M, et al. Role of Ca^{2+} -dependent metalloprotease-2 in stimulating Ca^{2+} ATPase activity under peroxynitrite treatment in bovine pulmonary artery smooth muscle membrane [J]. IUBMB Life, 2010, 53(3): 167-173.
- [11] Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(8): 617-629.
- [12] Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(3): 221-233.
- [13] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(3): 161-174.
- [14] Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases [J]. Amino Acids, 2011, 41(2): 271-290.
- [15] Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, et al. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen [J]. Nature, 1980, 284(5751): 67-68.
- [16] Murugan AK, Al-Amr A, Al-Ansari MM, et al. Single nucleotide polymorphisms in matrix metalloproteinase 2 (MMP2) enhance BRAFV600E mutation-mediated oncogenicity and invasiveness of papillary thyroid cancer cells [J]. Endocr Relat Cancer, 2021, 28(4): 273-289.
- [17] Han LP, Sheng BW, Zeng QD, et al. Correlation between MMP2 expression in lung cancer tissues and clinical parameters: a retrospective clinical analysis [J]. BMC Pulm Med, 2020, 20(1): 283.
- [18] Liu DR, Kang HX, Gao MT, et al. Exosome-transmitted circ_ MMP2 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulating MMP2 [J]. Mol Oncol, 2020, 14(6): 1365-1380.
- [19] Tsai CW, Hsu HM, Wang YC, et al. Contribution of MMP2 promoter genotypes to oral cancer susceptibility, recurrence and metastasis in Taiwan [J]. Anticancer Res, 2018, 38(12): 6821-6826.
- [20] Zhu Y, Yan L, Zhu WJ, et al. MMP2/3 promote the growth and migration of laryngeal squamous cell carcinoma via PI3K/Akt-NF- κ B-mediated epithelial-mesenchymal transformation [EB/OL]. (2018-11-4) [2019-01-18], <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jep.28242>.
- [21] Wang XF, Chang XY, He CY, et al. ATP5B promotes the metastasis and growth of gastric cancer by activating the FAK/AKT/MMP2 pathway [J]. FASEB J, 2021, 35(4): e20649.
- [22] Zeng FY, Yu N, Han YY, et al. The long non-coding RNA MIAT/mir-139-5p/MMP2 axis regulates cell migration and invasion in non-small-cell lung cancer [J]. J Biosci, 2020, 45: 51.
- [23] Wu DM, Deng SH, Liu T, et al. TGF- β -mediated exosomal lnc-MMP2-2 regulates migration and invasion of lung cancer cells to the vasculature by promoting MMP2 expression [J]. Cancer Med, 2018, 7(10): 5118-5129.
- [24] Wang XQ, Yang B, She YP, et al. The lncRNA TP73-AS1 promotes ovarian cancer cell proliferation and metastasis via modulation of MMP2 and MMP9 [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(9): 7790-7799.
- [25] Liu G, Ren F, Song YS, et al. Upregulation of SPOCK2 inhibits the invasion and migration of prostate cancer cells by regulating the MT1-MMP/MMP2 pathway [J]. Peer J, 2019, 7: e7163.
- [26] Zhang XB, Shi G, Gao F, et al. TSPAN1 upregulates MMP2 to promote pancreatic cancer cell migration and invasion via PLC γ [J]. Oncol Rep, 2019, 41(4): 2117-2125.
- [27] Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, et al. EMT in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(2): 128-134.
- [28] Qin H, Liu XQ, Li FJ, et al. PAD1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in triple-negative breast cancer cells by regulating MEK1-ERK1/2-MMP2 signaling [J]. Cancer Lett, 2017, 409: 30-41.
- [29] DA Silva Machado F, Munari FM, Scariot FJ, et al. Piperlongumine induces apoptosis in colorectal cancer HCT 116 cells independent of Bax, p21 and p53 status [J]. Anticancer Res, 2018, 38(11): 6231-6236.

[收稿日期] 2021-06-28

沈利叶, 黄俊杰, 徐剑钦, 等. 基于肠道菌群探讨雄性 WHBE 兔与日本大耳白兔胆固醇代谢的差异性 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 31–39.

Shen LY, Huang JJ, Xu JQ, et al. Analysis of differences in cholesterol metabolism between male WHBE rabbits and Japanese white rabbits based on intestinal microbiota [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 31–39.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.004

基于肠道菌群探讨雄性 WHBE 兔与日本大耳白兔胆固醇代谢的差异性

沈利叶, 黄俊杰, 徐剑钦, 徐雁云, 陈民利, 潘永明*

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究所, 杭州 310053)

【摘要】 目的 从肠道菌群途径分析雄性日本大耳白兔黑眼系 (white hair and black eyes rabbit, WHBE 兔) 和日本大耳白兔胆固醇代谢的差异性。**方法** 各取 4 ~ 5 月龄雄性 WHBE 兔和日本大耳白 (JW) 兔 6 只, 取血检测血脂水平, 并取结肠内容物提取 DNA 后进行 16S rRNA 微生物测序, 观察肠道菌群结构与功能的变化。**结果** 雄性 WHBE 兔血清总胆固醇 (TC) 和低密度脂蛋白-胆固醇水平 (LDL-C) 均明显低于 JW 兔 ($P < 0.05$)。多样性分析显示, 两品系兔的肠道微生物群分离明显, WHBE 兔 Chao1 指数显著低于 JW 兔 ($P < 0.05$)。在门水平, WHBE 兔梭杆菌门、软壁菌门和蓝藻菌门的丰度低于 JW 兔 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且厚壁菌门/拟杆菌门比值亦低于 JW 兔 ($P > 0.05$)。在属水平, WHBE 兔中有 24 个菌属的相对丰度与 JW 兔存在显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。LEFSe 分析显示, WHBE 兔中发现了 5 个关键菌属, 以理研菌科 RC9 群 (*Rikenellaceae_RC9_gut_group*) 最多; JW 兔中发现了 10 个关键菌属, 以瘤胃球菌科 UCG-014 (*Ruminococcaceae_UCG_014*) 最多。PICRUSt 功能预测显示, 两品系兔肠道菌群中的花生四烯酸代谢和醚脂代谢途径存在显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。相关性分析显示, TC 和 LDL-C 水平与短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、回肠杆菌属 (*Ileibacterium*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、罗尔斯顿菌属 (*Ralstonia*)、*Mollicutes_RF39_unclassified* 呈正相关, 与 *Coriobacteriaceae_unclassified*、厌氧菌属 (*Anaerovorax*)、梭菌属 (*Clostridium*)、DTU014_unclassified、*Barnesiellaceae_unclassified*、瘤胃球菌科 UCG-009 (*Ruminococcaceae_UCG_009*)、*Clostridiales_vadinBB60_group_unclassified* 呈负相关。**结论** 雄性 WHBE 兔和 JW 兔胆固醇代谢的差异性与宿主的肠道菌群结构与功能差异有关, 其中肠道菌群中的花生四烯酸代谢和醚脂代谢途径尤为关键。

【关键词】 WHBE 兔; 日本大耳白兔; 胆固醇代谢; 肠道菌群

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0031-09

Analysis of differences in cholesterol metabolism between male WHBE rabbits and Japanese white rabbits based on intestinal microbiota

SHEN Liye, HUANG Junjie, XU Jianqin, XU Yanyun, CHEN Minli, PAN Yongming*

(Laboratory Animal Research Center/Institute of Comparative Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: PAN Yongming. E-mail: pym@zcmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To analyze the differences in cholesterol metabolism between male white hair and black eye (WHBE) rabbits and Japanese white rabbits by gut microbiota. **Methods** Six male WHBE rabbits and six male Japanese

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (31970514), 浙江省中西医结合循环系疾病诊治重点实验室开放基金项目 (2C32102)。

Funded by the National Natural Science of China (31970514), Opening Project of Key Laboratory of Integrative Chinese and Western Medicine for the Diagnosis and Treatment of Circulatory Disease of Zhejiang Province (2C32102).

【作者简介】 沈利叶 (1996—) 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 实验动物与比较药理。Email: 17805053349@163.com

【通信作者】 潘永明 (1979—) 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物与比较医学。Email: pym@zcmu.edu.cn

white (JW) rabbits aged 4 to 5 months were used and blood samples were collected for blood lipid detection. DNA was extracted from colon samples and 16S rRNA microbial sequencing was performed to observe changes in the structure and function of gut microbiota. **Results** Serum total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels of male WHBE rabbits were significantly lower than those of JW rabbits ($P < 0.05$). Diversity analysis showed that the gut microbiota of these two strains of rabbits were significantly isolated, and the Chao1 index of WHBE rabbits was significantly lower than that of JW rabbits ($P < 0.05$). At the phylum level, the abundances of Fusobacteria, Tenericutes, and Cyanobacteria of WHBE rabbits were also lower than those of JW rabbits ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the Firmicutes/Bacteroidetes ratio was lower than that of JW rabbits ($P > 0.05$). At the genus level, the relative abundance of 24 genera in WHBE rabbits was significantly different from that of JW rabbits ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Linear discriminant analysis effect size analysis showed that five key genera were found in WHBE rabbits, and *Rikenellaceae_RC9_gut_group* was the most abundant, whereas ten key genera were found in JW rabbits, and *Ruminococcaceae_UCG_014* was the most abundant. PICRUSt functional prediction analysis showed that there were significant differences in arachidonic acid metabolism and ether lipid metabolism between gut microbiota in the two strains of rabbit ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Correlation analysis showed that TC and LDL-C levels were positively correlated with *Brevundimonas*, *Ileibacterium*, *Fusobacterium*, *Ralstonia* and *Mollicutes_RF39_unclassified*, and negatively correlated with *Coriobacteriaceae_unclassified*, *Anaerovorax*, *Clostridium*, *DTU014_unclassified*, *Barnesiellaceae_unclassified*, *Ruminococcaceae_UCG_009*, and *Clostridiales_vadinBB60_group_unclassified*. **Conclusions** The differences in cholesterol metabolism between male WHBE rabbits and JW rabbits may be related to differences in the structure and function of host gut microbiota, in which arachidonic acid metabolism and ether lipid metabolism pathways are particularly critical.

【**Keywords**】 WHBE rabbit; Japanese white rabbit; cholesterol metabolism; gut microbiota

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

哺乳动物的胃肠道是由一个动态的、巨大的微生物群落组成,十分复杂,是多基因特征与宿主遗传和环境因素相互作用和共同进化的结果。微生物组学的发展,对揭示肠道微生物群在宿主的生理和免疫中起着重要作用^[1]。肠道菌群可调节宿主的许多代谢过程,包括葡萄糖代谢、能量平衡和脂质代谢^[2]。肠道菌群的失衡与代谢扰动有关,并可能导致各种疾病致病性,如肥胖和糖尿病^[3]。然而,肠道菌群的可遗传性问题或者在多大程度受宿主基因组的影响至今还尚未完全清楚。

在生物医学研究中,兔是常用的实验动物之一,兔在消化、免疫、代谢等领域被广泛的应用。日本大耳白兔黑眼系(white hair and black eyes rabbit, WHBE 兔)是从日本大耳白兔(Japanese white rabbit, JW 兔)生产群中因发现具有白毛且黑色眼睛的外观表型特征而被保留下来,通过继代培育而成的新的实验兔品系。经过多年的生物学特性研究与应用,发现在免疫代谢、肠易激综合症、神经退行性疾病模型中具有独特的研究价值^[4-6],如 WHBE 兔肠道免疫低于日本大耳白兔^[4]。最近本课题组发现雄性 WHBE 兔总胆固醇水平明显低于日本大耳白兔^[7]。近来有研究发现一类携带肠道粪便代谢 A(intestinal stool metabolism A, IsmA)基因的特殊

肠道菌群,其或能代谢足够的胆固醇来影响宿主的健康^[8]。因此,基于肠道菌群与免疫、脂质代谢、保持肠屏障的完整性和调节神经行为特性等多方面的联系^[9],深入了解同种不同品系兔胆固醇代谢差异与肠道菌群的联系具有重要的科学意义。本研究以雄性 WHBE 兔和日本大耳白兔为研究对象,利用 16S rRNA 微生物测序技术观察这两品系兔肠道菌群结构与功能的变化,进而探讨胆固醇代谢差异与肠道菌群的联系,也为 WHBE 兔在医学研究中的应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

各取 4 ~ 5 月龄普通级雄性 WHBE 兔和日本大耳白(JW)兔各 6 只,体重为 2.0 ~ 2.5 kg;来源于浙江中医药大学动物实验研究中心的繁育基地【SCXK(浙)2020-0005】;饲养于本校动物实验研究中心兔饲养室【SYXK(浙)2021-0012】,12 h/12 h 明暗交替,环境温度 20 ~ 22℃,相对湿度为 40% ~ 70%。所有饲养管理与操作经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准(IACUC 批准号:20190930-06)。

1.1.2 主要试剂与仪器

总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白-胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白-胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒, 购自美康生物科技股份有限公司; 全自动生化分析仪 (3100, 日立公司, 日本); NovaSeq 测序仪 (Illumina 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 血脂测定

雄性 WHBE 兔和 JW 兔适应性饲养观察均无异常后, 禁食不禁水 12 h 后, 取耳中动脉血 2 mL, 分离血清, 在全自动生化仪上测定 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平的变化。

1.2.2 结肠内容物的收集和 16S rRNA 肠道菌群测序

兔耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠溶液 90 mg/kg 过量麻醉行安乐死, 腹部剃毛并消毒后立即剖腹, 用无菌止血钳夹住结肠两端并剪断, 转移至无菌操作台下收集结肠内容物。从结肠内容物中提取总 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量。用引物 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 805R (5'-GACTACHVGGGTATCC-3') 扩增 16S rRNA 的 V3 ~ V4 可变区的扩增子。构建 16S rRNA 测序文库, 利用 NovaSeq 测序仪进行 2 × 250 bp 对端测序, 对测序得到的原始数据采用 cutadapt 1.9 软件进

行低质量数据过滤, 确保后续信息分析结果的准确性。用 FLASH 1.2.8 软件进行双端拼接, 将双端数据合并成一个长的扩增片段, 用 QIIME2 DADA2 插件进行序列质量控制和特征表构建, 用 QIIME2 特征分类器 (2019.7) 进行序列比对, 并用 SILVA 的物种注释数据库 (release 132) 和 NT-16S (2019.04.05) 进行注释和后续的生物信息学分析, 包括 α 多样性 (Chao1 指数、Shannon 指数) 和 β 多样性分析。PICRUST 2.0 (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states 2.0) 软件和“京都基因和基因组百科全书” (KEGG) 数据库用于微生物群落的功能预测。

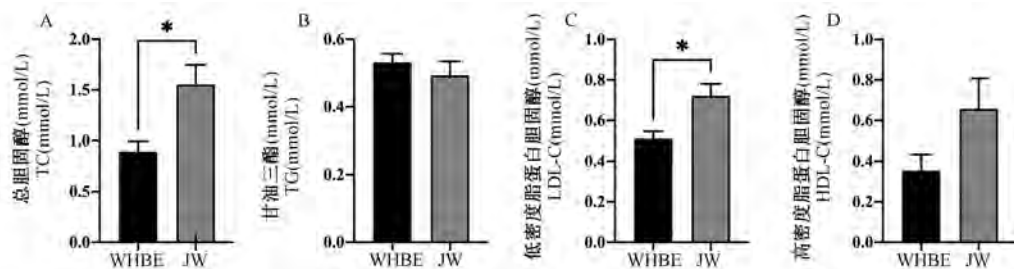
1.3 统计学分析

所有实验数据用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学处理用 GraphPad prism 8.0 软件进行, 两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。用 STAMP (statistical analysis of metagenomic profiles) 软件进行 Welch t 检验, 比较门和属水平的相对丰度; 肠道菌群菌属的差异分析采用 LEfSe (linear discriminant analysis effect size) 分析。

2 结果

2.1 两品系兔血脂的变化

雄性 WHBE 兔血清 TC 和 LDL-C 水平均明显低于 JW 兔 ($P < 0.05$), 但两品系兔 TG 和 HDL-C 水平则差异不显著 ($P > 0.05$) (见图 1)。



注: A: 总胆固醇; B: 甘油三酯; C: 低密度脂蛋白-胆固醇; D: 高密度脂蛋白-胆固醇; 与 JW 兔比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 雄性 WHBE 兔和 JW 兔血脂成分的比较

Note. A. Total Cholesterol. B. Triglyceride. C. Low-Density Lipoprotein. D. High-density Lipoprotein. Compared with JW rabbit, * $P < 0.05$.

Figure 1 Comparison of blood lipid composition between male WHBE and JW rabbits

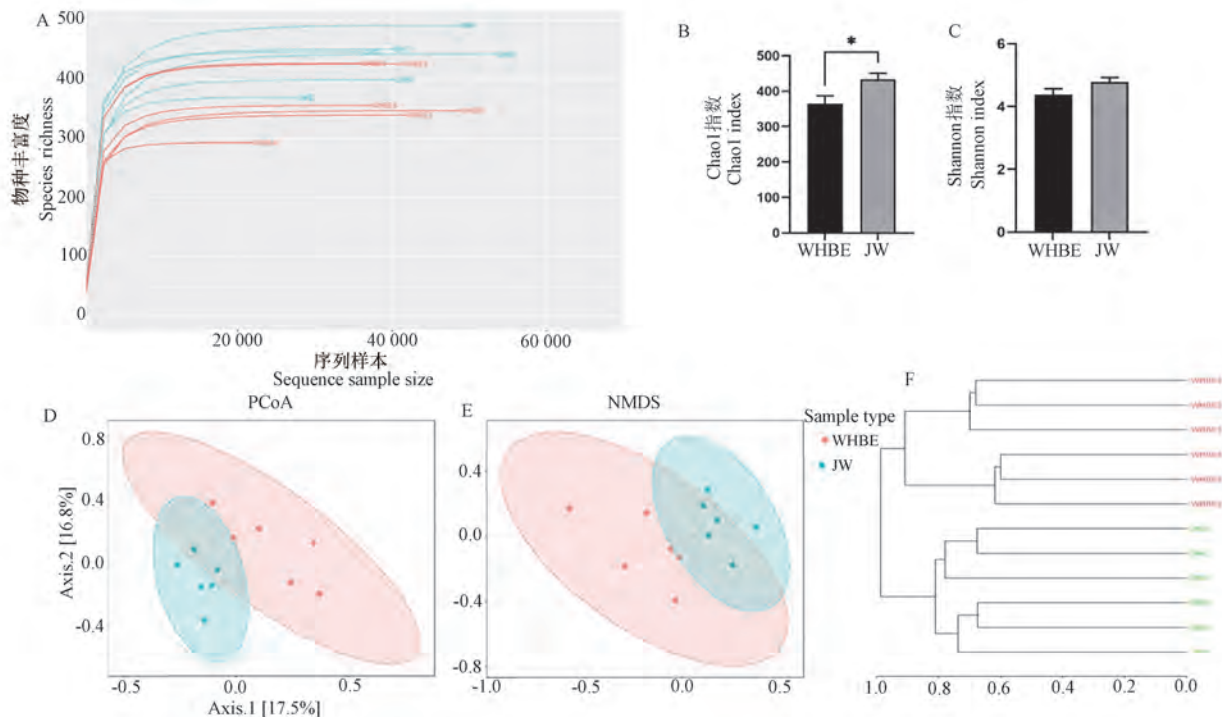
2.2 两品系兔肠道菌群多样性分析结果

稀释曲线可用来比较分析不同测序样本中的物种丰富度以及评估测序数据量是否足够。图 2A 所示, 雄性 WHBE 兔和 JW 兔的结肠内容物样本的稀释曲线趋向平缓, 说明测序深度足够, 并发现雄性 WHBE 兔的物种丰富度低于 JW 兔。 α 多样性分

析显示, 雄性 WHBE 兔 Chao1 和 Shannon 指数均低于 JW 兔, 其中 Chao1 指数差异显著 ($P < 0.05$); β 多样性分析显示, 基于主坐标分析 (PCoA) 中的 Bray-Curtis 距离指数和 ANOSIM 统计方法发现雄性 WHBE 兔和 JW 兔的群落明显分离, 两品系间微生物组分差异显著 (Bray-Curtis Anosim $R = 0.47$, $P <$

0.003), 并与非度量多维尺度 (NMDS) 和 Bray-Curtis 相似性分析结果一致 ($\text{stress} = 0.13$, $P <$

0.003)。聚类树状图分析也显示雄性 WHBE 兔和 JW 兔群落区分明显, 见图 2。



注: A: 稀释曲线; B: Chao1 指数; C: Shannon 指数; D: PCoA 分析; E: NMDS 分析; F: 树状聚类分析; 与 JW 兔比较, $*P < 0.05$ 。

图 2 雄性 WHBE 兔和 JW 兔肠道菌群多样性分析

Note. A. Rarefaction curve. B. Chao1 index. C. Shannon index. D. PCoA analysis. E. NMDS analysis. F. Dendrogram analysis. Compared with JW rabbit, $*P < 0.05$.

Figure 2 Diversity analysis of gut microbiota of male WHBE rabbits and JW rabbits

2.3 两品系兔肠道菌群结构与组成分析结果

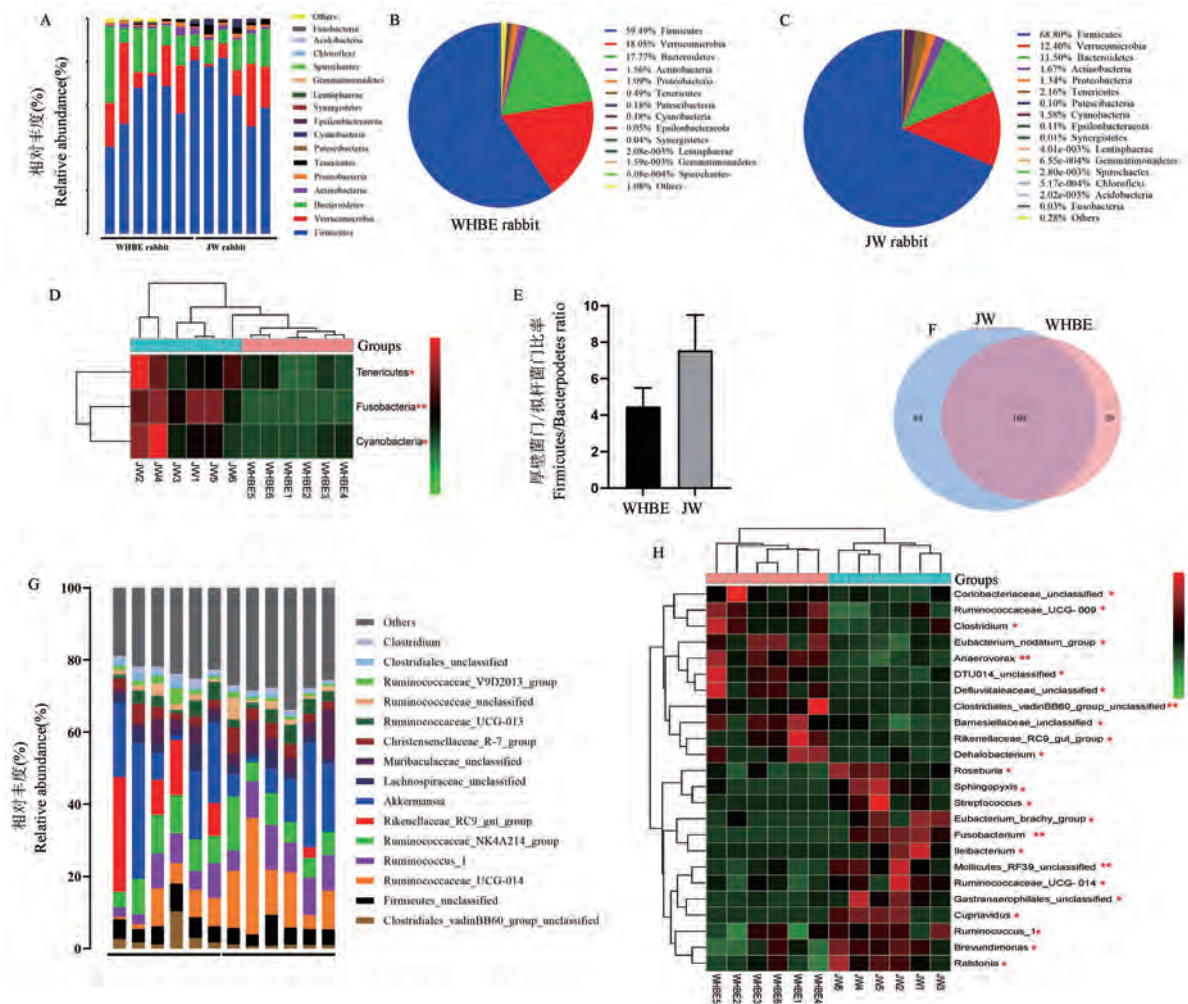
测序结果显示, 雄性 WHBE 兔和 JW 兔肠道菌群分别有 13 个菌门和 16 个菌门, 在 WHBE 兔中未见梭杆菌门 (*Fusobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 和酸杆菌门 (*Acidobacteria*), 其中厚壁菌门 (*Firmicutes*)、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 的相对丰度之和大于 90%, 是兔肠道菌群中的主要优势菌门。另外, WHBE 兔梭杆菌门 (*Fusobacteria*)、软壁菌门 (*Tenericutes*) 和蓝藻菌门 (*Cyanobacteria*) 的相对丰度均显著低于 JW 兔 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时厚壁菌门/拟杆菌门比值亦略低于 JW 兔 ($P > 0.05$)。

属水平上, 雄性 WHBE 兔和 JW 兔肠道菌群分别发现了 198 个菌属和 253 个菌属, 其中 169 个为共有菌属。前 15 个主要菌属主要包括阿克曼西亚菌属 (*Akkermansia*)、理研菌科 RC9 群 (*Rikenellaceae* _ RC9 _ gut _ group)、瘤胃球菌科 NK4214 群 (*Ruminococcaceae* _ NK4214 _ group)、瘤胃球菌属 1

(*Ruminococcus* _ 1)、瘤胃球菌科 UCG _ 014 (*Ruminococcaceae* _ UCG _ 014)、*Firmicutes* _ *unclassified*、*Clostridiales* _ *vadinBB60* _ group _ *unclassified*、*Lachnospiraceae* _ *unclassified*、*Muribaculaceae* _ *unclassified*、*Ruminococcaceae* _ *unclassified*、克里斯滕森菌科 r-7 群 (*Christensenellaceae* _ r-7 _ group)、瘤胃球菌科 UCG _ 013 (*Ruminococcaceae* _ UCG _ 013)、瘤胃球菌科 V9D2013 群 (*Ruminococcaceae* _ V9D2013 _ group)、*Clostridiales* _ *unclassified*、梭菌属 (*Clostridium*)。其中 WHBE 兔 *Coriobacteriaceae* _ *unclassified*、瘤胃球菌科 UCG-009 (*Ruminococcaceae* _ UCG _ 009)、厌氧菌属 (*Anaerovorax*)、梭菌属 (*Clostridium*)、DTU014 _ *unclassified*、缠结优杆菌群 (*Eubacterium* _ *nodatum* _ group)、*Defluviitaleaceae* _ *unclassified*、*Clostridiales* _ *vadinBB60* _ group _ *unclassified*、*Barnesiellaceae* _ *unclassified*、脱卤杆菌属 (*Dehalobacterium*)、理研菌科 RC9 群 (*Rikenellaceae* _ RC9 _ gut _ group) 的相对丰

度明显高于 JW 兔($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而罗尔斯通氏菌属 (*Roseburia*)、鞘氨醇盒菌属 (*Sphingopyxis*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、短真杆菌群 (*Eubacterium _ brachy _ group*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、回肠杆菌属 (*Ileibacterium*)、*Mollicutes_RF39_unclassified*、瘤胃球菌科 UCG-014

(*Ruminococcaceae _ UCG _ 014*)、瘤胃球菌科 1 (*Ruminococcus _ 1*)、亲铜菌属 (*Cupriavidus*)、*Gastranaerophilales _ unclassified*、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、罗尔斯顿菌属 (*Ralstonia*) 的相对丰度均明显低于 JW 兔($P < 0.05$, $P < 0.01$) (见图 3)。



注: A: 门分类; B: WHBE 兔门水平的组成; C: JW 兔门水平的组成; D: 门水平的差异菌; E: 厚壁菌门/拟杆菌门比值; F: 属水平的韦恩分析; G: 前 15 个属水平的组成; H: 属水平的差异菌。

图 3 在门和属水平上的雄性 WHBE 兔和 JW 兔肠道菌群结构组成的差异

Note. A. Phylum classification. B. WHBE rabbit at phylum level. C. JW rabbit at phylum level. D. Differential bacteria at the phylum level. E. Firmicutes/Bacteroidetes ratio. F. Venn analysis at the genus level. G. The composition of top 15 genus level. H. Different bacteria at genus level.

Figure 3 Difference of gut microbiota composition between male WHBE and JW rabbits at phylum and genus levels

2.4 两品系兔肠道菌群 LEFSe 分析

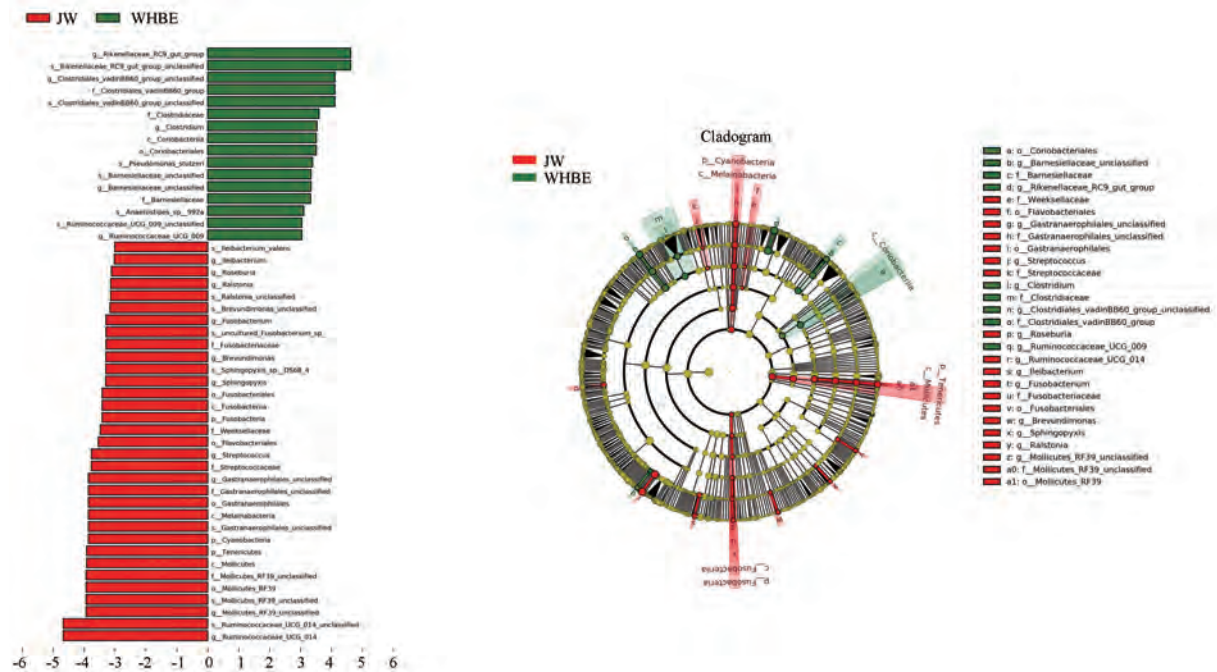
使用 LEFSe 分析以发现各个层次的显著特征。根据 LDA 阈值>3 两品系兔间共有 15 个不同的差异菌属, 其中 WHBE 兔有 5 种差异菌属, 其中 *Rikenellaceae_RC9_gut_group* 得分最高; JW 兔有 10 种差异菌属, 其中 *Ruminococcaceae_UCG_014* 得分最高 (见图 4)。

2.5 两品系兔肠道菌群功能预测

采用 PICRUSt 2.0 预测肠道菌群功能, 图 5 结果显示, 两品系兔肠道菌群功能差异主要在脂代谢、氨基酸代谢、能量代谢、碳水化合物代谢、有害异物生物降解代谢和膜运输等, 其中 WHBE 兔肠道菌群中氨基苯甲酸降解、细菌分泌系统、光合生物的固碳作用、赖氨酸降解、戊糖和葡萄糖醛酸的相

互转化、色氨酸代谢等 6 个途径较丰富, JW 兔中花生四烯酸代谢、氨基氨基酸代谢、二恶英降解、醚脂

代谢、氟苯甲酸降解、烟酸和烟酰胺代谢、硫酸代谢、二甲苯降解等 13 个途径较丰富。



注: A: 两品系兔差异丰富特征的 LDA 得分直方图, LDA 阈值 > 3.0; B: 用分支图表示两品系兔之间的显著差异。从内到外的彩色节点代表从门到属的分类单元。

图 4 LEfSe 分析识别潜在的生物标志物

Note. A. Histogram of the LDA scores for differentially abundant features between the two strains of rabbits, LDA threshold > 3.0. B. Cladogram for taxonomic representation of significant differences between the two strains of rabbits. The colored nodes from the inner to the outer circles represent taxa from the phylum to genus level.

Figure 4 Potential biomarkers were defined by LEfSe analysis

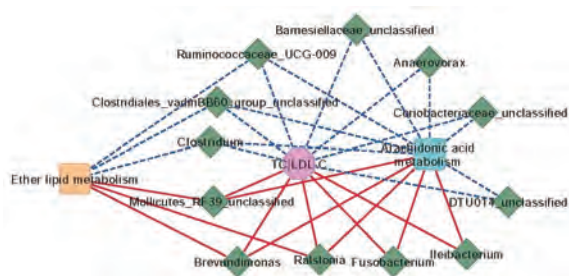


图 5 PICRUSt 2.0 预测两品系兔的肠道菌群功能

Figure 5 Prediction of gut microbiota function of two strains of rabbits by PICRUSt 2.0

2.6 肠道菌群及其代谢途径与 TC 和 LDL 的相关性分析

Spearson 相关分析显示, TC 和 LDL-C 水平与 *Brevundimonas*、*Ileibacterium*、*Fusobacterium*、*Ralstonia*、*Mollicutes* _ *RF39* _ *unclassified* 呈正相关, 与 *Coriobacteriaceae* _ *unclassified*、*Anaerovorax*、*Clostridium*、*DTU014* _ *unclassified*、*Clostridiales* _ *vadinBB60* _ *group* _ *unclassified*、*Barnesiellaceae* _ *unclassified*、*Ruminococcaceae* _ *UCG-009* 呈负相关。另外, 上述 12 种差异菌属与花生四烯酸代谢密切相关, 同时 *Mollicutes* _ *RF39* _ *unclassified*、*Clostridiales* _ *vadinBB60* _ *group* _ *unclassified*、*Ralstonia*、*Brevundimonas*、*Ruminococcaceae* _ *UCG-009*、*Clostridium* 等 6 个菌属与醚脂代谢亦显著相关, 见图 6。



注: 红实线代表正相关, 蓝虚线代表负相关。

图 6 肠道菌群及其代谢途径与 TC 和 LDL-C 的相关性分析
Note. The red solid line represents positive correlation, the blue dotted line represents negative correlation.

Figure 6 Correlation analysis of gut microbiota and its metabolic pathways with TC and LDL-C

3 讨论

近来发现, 个体之间的微生物群组成也存在较大的不同, 并与环境变化和遗传有关^[10]。肠道微生物群已被证明影响血液和组织中的脂质代谢和脂质水平, 无论是在人类或实验动物上, 肠道微生物群的变化与脂质异常引起的相关疾病有关, 如动脉粥样硬化、非酒精性肝病^[11], 故肠道微生物群被认为是宿主代谢的中央调节器。课题组前期在制作 WHBE 兔胰岛素抵抗动脉粥样硬化模型时, 意外发现正常雄性 WHBE 兔和日本大耳白兔胆固醇水平存在明显差异, 并在高脂诱导后 WHBE 兔胆固醇水平升高更为显著^[7], 介于脂质与肠道菌群的联系, 提示这种现象可能与肠道菌群有关。多样性分析结果也证实了, 雄性 WHBE 兔肠道微生物群的多样性明显低于日本大耳白兔且群落区分明显, 表明 WHBE 兔肠道菌群可能有其自身潜在的特殊性。

与先前关于兔肠道微生物群的研究一致^[12], 兔肠道微生物群主要以厚壁菌门、疣微菌门和拟杆菌门为主, 并发现 WHBE 兔肠道微生物群在门或属水平上的数量以及厚壁菌门/拟杆菌门比率均小于日本大耳白兔。厚壁菌门/拟杆菌门被认为与宿主微生物发酵产生的能量代谢有关, 并通过调节脂肪代谢、炎症以及内分泌功能改变等影响宿主健康状况^[13], 提示 WHBE 兔对营养和能量需求可能低于日本大耳白兔。这与 LEFSe 分析发现与碳水化合物代谢有关的 *Ruminococcaceae* _ *UCG_014* 是日本大耳白兔的优势菌属^[14], 而 *Rikenellaceae* _ *RC9_gut_group* 则是 WHBE 兔优势菌属结果一致, 已有报道高丰度的 *Rikenellaceae* _ *RC9_gut_group* 与动物每日能量需求降低相关^[14]; 这些变化与肠道菌群功能预测中发现能量代谢、碳水化合物代谢和氨基酸代谢途径丰度改变相符。

PICRUSt 功能预测发现这两品系兔脂质代谢的差异可能与花生四烯酸代谢和醚脂代谢有关, 花生四烯酸代谢可串联营养代谢、免疫力和炎症, 在肥胖、糖尿病、非酒精性脂肪肝、心血管疾病和神经退行性疾病中发挥着重要的作用^[15-16], 醚脂代谢也与代谢紊乱、神经退行性疾病、癌症有关^[17], 这两个脂质代谢途径也符合当前 WHBE 兔在医学疾病模型应用中的特殊性。进一步相关分析发现 TC 和 LDL-C 水平与 *Brevundimonas*、*Ileibacterium*、*Fusobacterium*、*Ralstonia*、*Mollicutes* _ *RF39* _ *unclassified* 呈正相关, 而与 *Coriobacteriaceae* _ *unclassified*、*Anaerovorax*、*Clostridium*、*DTU014* _ *unclassified*、*Barnesiellaceae* _ *unclassified*、*Ruminococcaceae* _ *UCG-009*、*Clostridiales* _ *vadinBB60_group_unclassified* 呈负相关; 这些差异菌群也与花生四烯酸代谢或醚脂代谢相关。已有研究表明, *Brevundimonas* 菌可分解和解毒芳香族化合物, 与脂质代谢途径呈正相关^[18]。 *Ileibacterium* 的功能目前虽尚未完全明确, 但已有研究发现高脂肪/蔗糖饮食可以使该菌增加 10 倍^[19], 提示可能该菌与代谢相关的疾病有关。此外, 肠道微生物群对宿主脂质代谢的影响还可能通过肠道微生物群的代谢物所介导的, 如短链脂肪酸 (SCFA)、次级胆汁酸和三甲胺 (TMA) 和促炎细菌衍生因子 (如脂多糖)。SCFA 如乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐均是源自结肠中纤维发酵的细菌代谢物。SCFA 对宿主代谢十分重要, 可用作能量产生、脂肪生成、糖异生和胆固醇合成的底物^[20]。结合文献发现, *Ralstonia*、

Mollicutes _ *RF39* _ *unclassified*、*Barnesiellaceae* _ *unclassified*、*Clostridium*、*Clostridiales* _ *vadinBB60* _ *group*、*Coriobacteriaceae_unclassified*、*Anaerovorax* 均是产生 SCFA 的菌群,如 *Mollicutes_RF39_unclassified* 通过产生 SCFA、诱导 T 细胞增殖和保护肠粘膜功能进而有益于肠道免疫平衡^[21]; *Clostridiales* _ *vadinBB60_group* 也能产生 SCFA,并与肥胖、血脂异常和胰岛素抵抗相关^[22]; *Barnesiellaceae* 能产生丙酸,并与 LDL 呈负相关^[23]。 *Fusobacterium* 与 TMA 分解产物三甲胺 N-氧化物 (TMAO) 明显相关, TMAO 被认为与动脉粥样硬化等心血管疾病有关^[24]。 *Rikenellaceae_RC9_gut_group* 与丁酸代谢和胆汁酸代谢有关^[25]。

近来发现,花生四烯酸代谢通路是体内产生炎症介质并诱导炎症的主要通路,其代谢通路包括环氧合酶 (COX) 脂氧合酶 (LOX) 和细胞色素 P450 (CYP450) 3 种途径。肠道菌群中拟杆菌门下的一些菌群可自身产生花生四烯酸代谢产物,同时,肠道菌群的结构与功能发生改变也可以通过蛋白激酶 C 途径激活磷脂酶 A2,使花生四烯酸从膜磷脂中释放出来,进而通过花生四烯酸的三条代谢通路被分解为各种促炎类花生酸^[26],这一途径也会使生物膜发生代谢,胆固醇作为生物膜的重要组成部分,从而影响胆固醇代谢。有研究发现,饲喂花生四烯酸能使小鼠肠道菌群中的 *Clostridium*、*Ruminococcaceae_UCG-009* 等与肥胖相关的菌群发生改变,菌群的改变与花生四烯酸相互作用,可能影响体内相关的脂代谢^[27];且这些菌群以及厚壁菌门和拟杆菌门比值均在 WHBE 兔和 JW 兔中存在差异。此外,醚脂是甘油磷脂中独特的一类,不仅是哺乳动物细胞膜的结构组分和第二信使贮存器,而且还可能参与膜融合、离子运输、胆固醇流出和氧化,同时醚脂也影响生物膜中脂筏结构域的组织稳定性^[28]。 *Clostridium* 菌属中存在醚脂已经有不同的研究报道^[28],在其他益生菌中也推测存在醚脂,肠道菌群与醚脂代谢途径可能存在紧密联系。因此,推测雄性 WHBE 兔的肠道菌群结构与功能的差异影响花生四烯酸代谢和醚脂代谢,进而影响胆固醇代谢的变化。

综上所述,雄性 WHBE 兔和 JW 兔胆固醇代谢的差异性与宿主的肠道菌群结构与功能差异有关,其中肠道菌群中的花生四烯酸代谢和醚脂代谢途径尤为关键。

参 考 文 献 (References)

- [1] Kostic AD, Gevers D, Siljander H, et al. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(2): 260–273.
- [2] Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 56–64.
- [3] Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism [J]. *Nature*, 2012, 489(7415): 242–249.
- [4] 王志远, 刘月环, 余陈欢, 等. WHBE 兔与日本大耳白兔不同生长阶段肠道免疫功能的比较研究 [J]. *实验动物与比较医学*, 2012, 32(2): 125–128.
Wang ZY, Liu YH, Yu CH, et al. Comparative study on immunological functions of intestina parva between WHBE rabbit and Japanese white rabbit [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2012, 32(2): 125–128.
- [5] 潘永明, 张利棕, 陈民利, 等. WHBE 兔脾虚型肠易激综合征模型的建立 [J]. *实验动物与比较医学*, 2008, 28(5): 313–317.
Pan YM, Zhang LZ, Chen ML, et al. Study on irritable bowel syndrome model of spleen deficiency type in WHBE rabbits [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2008, 28(5): 313–317.
- [6] 徐剑钦, 陈民利, 刘军平, 等. 高胆固醇饮食加铜水喂养 WHBE 兔引起的脑组织病理学改变 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3): 96–103.
Xu JQ, Chen ML, Liu JP, et al. Brain histopathological changes in WHBE rabbits fed with high cholesterol diet plus copper drinking water [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(3): 96–103.
- [7] 刘军平, 潘永明, 陈民利, 等. 白毛黑眼兔与日本大耳白兔胰岛素抵抗动脉粥样硬化模型的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(3): 339–346.
Liu JP, Pan YM, Chen ML, et al. Comparison of the WHBE and Japanese white rabbit models of insulin resistance atherosclerosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(3): 339–346.
- [8] Kenny DJ, Plichta DR, Shungin D, et al. Cholesterol metabolism by uncultured human gut bacteria influences host cholesterol level [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28(2): 245–257.
- [9] Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, et al. The gastrointestinal microbiome: a review [J]. *J Vet Intern Med*, 2018, 32(1): 9–25.
- [10] Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? [J]. *Science*, 2010, 330(6012): 1768–1773.
- [11] Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2019, 20(4): 461–472.
- [12] Fang S, Chen X, Zhou L, et al. Faecal microbiota and functional capacity associated with weaning weight in meat rabbits [J].

- Microb Biotechnol, 2019, 12(6): 1441–1452.
- [13] 刘彩虹, 张和平. 肠道菌群与肠道内营养物质代谢的相互作用 [J]. 中国乳品工业, 2014, 42(5): 33–36, 57.
- Liu CH, Zhang HP. Research on the interaction of intestinal flora and intestinal nutrient metabolism [J]. Chin Dairy Ind, 2014, 42(5): 33–36, 57.
- [14] McLoughlin S, Spillane C, Claffey N, et al. Rumen microbiome composition is altered in sheep divergent in feed efficiency [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1981.
- [15] Sonnweber T, Pizzini A, Nairz M, et al. Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3285.
- [16] Bosetti F. Arachidonic acid metabolism in brain physiology and pathology: lessons from genetically altered mouse models [J]. J Neurochem, 2007, 102(3): 577–586.
- [17] Dean JM, Lodhi IJ. Structural and functional roles of ether lipids [J]. Protein cell, 2018, 9(2): 196–206.
- [18] Li X, Cao Z, Yang Y, et al. Correlation between Jejunal microbial diversity and muscle fatty acids deposition in broilers reared at different ambient temperatures [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 11022.
- [19] Cox LM, Sohn J, Tyrrell KL, et al. Description of two novel members of the family Erysipelotrichaceae: *Ileibacterium valens* gen. nov., sp. nov. and *Dubosiella newyorkensis*, gen. nov., sp. nov., from the murine intestine, and emendation to the description of *Faecalibaculum rodentium* [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017, 67(10): 1247–1254.
- [20] den Besten G, Lange K, Havinga R, et al. Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013, 305(12): G900–G910.
- [21] Zhou C, Chen LL, Lu RQ, et al. Alteration of intestinal microbiota composition in oral sensitized C3H/HeJ mice is associated with changes in dendritic cells and T cells in mesenteric lymph nodes [J]. Front Immunol, 2021, 12: 631494.
- [22] Harrison CA, Laubitz D, Ohland CL, et al. Microbial dysbiosis associated with impaired intestinal Na^+/H^+ exchange accelerates and exacerbates colitis in ex-germ free mice [J]. Mucosal Immunol, 2018, 11(5): 1329–1341.
- [23] Cui J, Yang X, Wang F, et al. Effects of ammonia on growth performance, lipid metabolism and cecal microbial community of rabbits [J]. PLoS One, 2021, 16(6): e0252065.
- [24] Fu BC, Hullar MAJ, Randolph TW, et al. Associations of plasma trimethylamine N-oxide, choline, carnitine, and betaine with inflammatory and cardiometabolic risk biomarkers and the fecal microbiome in the Multiethnic Cohort Adiposity Phenotype Study [J]. Am J Clin Nutr, 2020, 111(6): 1226–1234.
- [25] Du R, Bei H, Jia L, et al. Danggui Buxue Tang restores antibiotic-induced metabolic disorders by remodeling the gut microbiota [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 259: 112953.
- [26] 蔡亚玮, 刘建宏, 马宁. 花生四烯酸靶向代谢组学在炎症中的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(19): 2721–2723, 2728.
- Cai YW, Liu JH, Ma N. Arachidonic acid targeting metabolomics in inflammation [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(19): 2721–2723, 2728.
- [27] Zhuang P, Shou Q, Lu Y, et al. Arachidonic acid sex-dependently affects obesity through linking gut microbiota-driven inflammation to hypothalamus-adipose-liver axis [J]. J Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(11): 2715–2726.
- [28] Mawatari S, Sasuga Y, Morisaki T, et al. Identification of plasmalogens in *Bifidobacterium longum*, but not in *Bifidobacterium animalis* [J]. J Sci Rep, 2020, 10(1): 427.

[收稿日期] 2021–07–31

陈婷婷, 单杉, 李南, 等. β -arrestin2 基因敲除对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 40–46.
Chen TT, Shan S, Li N, et al. Effect of β -arrestin2 deficiency on the function of mouse peritoneal macrophages [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 40–46.
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.005

β -arrestin2 基因敲除对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响

陈婷婷, 单杉, 李南, 汪子颖, 杞萌, 张胜男, 胡姗姗, 魏伟*, 孙妩弋*

(安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,
合肥 230032)

【摘要】 目的 探讨 β -arrestin2 基因敲除对小鼠腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophage, pM ϕ) 功能的影响。**方法** 分别分离野生型(wild type, WT) 和 β -arrestin2 基因敲除(β -arrestin2^{-/-}) 小鼠的 pM ϕ , Transwell 法检测 β -arrestin2 基因敲除对 pM ϕ 迁移的影响; 中性红吞噬实验检测缺失 β -arrestin2 基因的 pM ϕ 吞噬功能的变化; 流式细胞术检测 pM ϕ 表面分子 CD86 的变化情况; ELISA 法检测 β -arrestin2 基因敲除对 pM ϕ 炎症因子产生的影响; Western Blot 法检测 β -arrestin2、JAK1/STAT1 通路相关蛋白的表达。**结果** 与 WT 组相比, 敲除 β -arrestin2 明显降低了 pM ϕ 的迁移能力, 增强了 pM ϕ 的吞噬功能, 且上调 pM ϕ 表面 CD86 分子的表达, 同时 pM ϕ 分泌炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的水平也明显升高; Western Blot 检测结果表明, 缺失 β -arrestin2 的 pM ϕ 中 p-JAK1、p-STAT1 的表达明显上调。**结论** β -arrestin2 对小鼠 pM ϕ 的迁移、吞噬、极化等功能具有调节作用, 其机制可能与调控 JAK1/STAT1 通路有关。

【关键词】 β -arrestin2; 腹腔巨噬细胞; 炎症因子; JAK1; STAT1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0040-07

Effect of β -arrestin2 deficiency on the function of mouse peritoneal macrophages

CHEN Tingting, SHAN Shan, LI Nan, WANG Ziyang, QI Meng, ZHANG Shengnan, HU Shanshan, WEI Wei*, SUN Wuyi*

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anhui-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032, China)

Corresponding author: SUN Wuyi. E-mail: sunwuyi51@aliyun.com; WEI Wei. E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of β -arrestin2 deficiency on the function of mouse peritoneal macrophages (pM ϕ). **Methods** The primary mouse pM ϕ were isolated from wild type mice and β -arrestin2 gene knockout mice. The migration of pM ϕ was measured by Transwell assay. Changes in the phagocytosis of pM ϕ after β -arrestin2 gene knockout were detected by the neutral red phagocytosis test. The expression of CD86 on pM ϕ was analyzed by flow cytometry. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in pM ϕ were detected by ELISA. Protein expression levels of β -arrestin2, JAK1, p-JAK1, STAT1 and p-STAT1 were detected by Western Blot. **Results** Compared with the control group, β -arrestin2 knockout significantly inhibited the migration ability of pM ϕ , and significantly enhanced the phagocytosis of pM ϕ and the expression of CD86. The production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α was

【基金项目】 国家自然科学基金(81770605, 81300332), 安徽医科大学科研水平提升计划(2021xkjT016)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81770605, 81300332), the Research Level Improvement Program of Anhui Medical University (2021xkjT016).

【作者简介】 陈婷婷(1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 肝脏药理学。Email: 1945010416@stu.ahmu.edu.cn

【通信作者】 孙妩弋(1981—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肝脏药理学。Email: sunwuyi51@aliyun.com;

魏伟(1960—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 临床药理学。Email: wwei@ahmu.edu.cn。

* 共同通信作者

significantly increased in pM ϕ after β -arrestin2 depletion. The result of Western Blot showed that β -arrestin2 deficiency significantly up-regulated the levels of p-JAK1 and p-STAT1 in pM ϕ . **Conclusions** These result indicated that β -arrestin2 plays an important role in regulating the migration, phagocytosis and polarization of pM ϕ , and these effects appear to be mediated by the JAK1/STAT1 signaling pathway.

【**Keywords**】 β -arrestin2; peritoneal macrophages; inflammatory cytokines; JAK1; STAT1

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

巨噬细胞是参与炎症免疫反应的重要效应细胞之一,具有呈递抗原、分泌细胞因子等功能,从而调控机体微环境,发挥免疫调节作用。巨噬细胞具有高度可塑性,经过不同的刺激后,可以分化为特定的表型,包括经典活化的 M1 型巨噬细胞和选择性活化的 M2 型巨噬细胞^[1]。M1 型巨噬细胞主要表达 CD86 等基因,能够帮助宿主抵御病毒和微生物的感染,抑制肿瘤,产生多种炎症因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 等,进而参与炎症及免疫反应^[2-3]。腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophage, pM ϕ)作为腹腔内最主要的细胞类型之一,参与了腹腔内各种类型的免疫炎症反应。已有研究报道,pM ϕ 与腹膜炎以及腹膜炎引起的全身性脓毒血症、腹腔器官胰腺、肠道等炎症性疾病密切相关^[4]。因此,更好地了解 pM ϕ 的特征和功能对于炎症免疫反应相关疾病的治疗具有重要意义。

β -arrestin2 广泛表达于哺乳动物的组织细胞和免疫细胞中,是一种重要的接头蛋白和信号转导调控蛋白,其在细胞增殖、迁移、凋亡和炎症反应中发挥重要的调节作用^[5-6]。然而, β -arrestin2 对 pM ϕ 功能的影响尚未见相关报道。本研究采用 β -arrestin2 基因敲除小鼠(β -arrestin2^{-/-}),观察 β -arrestin2 基因敲除对小鼠 pM ϕ 功能的影响,初步探讨 β -arrestin2 调控 pM ϕ 功能的可能机制,为后续深入研究 β -arrestin2 在免疫应答和相关临床疾病中的作用提供前期实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性 β -arrestin2^{-/-}小鼠,6 ~ 8 周龄,体重约为 20 g。购自美国 Jackson 实验室【1511A06788】,遗传背景 C57BL/6J。8 只 SPF 级雌性野生型(wide type, WT)C57BL/6J 小鼠,6 ~ 8 周龄,体重约为 20 g,购

自江苏集萃药康生物科技股份有限公司【SCXK(苏)2018-0008】。实验动物在安徽医科大学临床药理研究所 SPF 级动物房饲养及繁育【SYXK(皖)2020-001】,给予动物自由饮水与摄食,饲养环境温度 20 ~ 25℃,湿度 40% ~ 70%,光照 12 h。所有操作经安徽医科大学实验动物伦理委员会批准(审批号:LLSC20200794)。

1.1.2 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养基(以色列 Biological Industries, 01-100-1ACS),脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(美国 Sigma, L2880),胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司, 11011-8611),Transwell 小室(美国 Corning, 3422),中性红(大连美仑生物技术有限公司, MB4613),APC 标记的 Anti-CD86(美国 Biolegend, 105113),小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, ml002095、ml063132、ml002293),Anti- β -arrestin2(美国 Affinity, DF6305)、Anti-p-JAK1(美国 Affinity, AF2012)、Anti-JAK1(美国 Affinity, AF5012)、Anti-STAT1(美国 Affinity, AF6300)、Anti- β -actin(美国 Affinity, AF7018),Anti-p-STAT1(英国 Abcam, ab109461)。

Infinite M1000 PRO 多功能酶标仪(TECAN, 瑞士),Image Quant 化学发光成像系统(GE, 美国),CytoFLEX 流式细胞仪(Beckman, 美国),BX53 正置显微镜(Olympus, 日本),BIO-RAD powerpac164-5070 电泳仪(BIO-RAD, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物的繁育鉴定

将 β -arrestin2^{-/-}雄性小鼠与 WT 雌性小鼠 1:2 比例合笼,饲养过程中,每日观察和记录小鼠的生长情况,每周更换 2 次垫料,及时补充饲料和饮用水。将繁殖出的 F1 代杂合子小鼠继续进行合笼,获得的 F2 代小鼠按本实验室此前方法进行基因型检测^[7],筛选出年龄和性别匹配的同窝 β -arrestin2^{-/-}小鼠和 WT 对照小鼠进行实验。

1.2.2 pM ϕ 的分离提取及分组处理

pM ϕ 的提取参照耿田欣等^[8]方法,颈椎脱臼处死小鼠后,无菌条件下磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)灌洗并收集腹腔液。1000 rpm 离心 10 min, 所得细胞沉淀用 RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素混合溶液)重悬接种至 6 孔板中, 于 37℃ 培养 4 h 后, 洗去未贴壁细胞, 余下的贴壁细胞即为 pM ϕ , 并在显微镜下观察细胞形态。体外使用 LPS(终浓度 100 ng/mL)刺激 pM ϕ , 分为 WT 对照组(WT control)、LPS 刺激组(WT + LPS)、 β -arrestin2 基因敲除对照组(β -arrestin2^{-/-} control)、 β -arrestin2 基因敲除刺激组(β -arrestin2^{-/-} + LPS), 每组 5 只小鼠。

1.2.3 Transwell 法检测 pM ϕ 的迁移能力

用 RPMI 1640 无血清培养基重悬细胞, 并调整细胞密度为每毫升 1×10^5 个, 将 100 μ L 细胞悬液加入上室, 下室加入 500 μ L 含 10% 血清的培养基, 培养 24 h 后, 用湿棉签擦拭小室内未迁移的细胞, PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min。0.01% 结晶紫染色液染色 30 min, PBS 清洗 3 次, 晾干, 在显微镜下观察膜底细胞拍照计数。

1.2.4 中性红吞噬实验检测 pM ϕ 的吞噬功能

将细胞悬液的密度调整为每毫升 5×10^4 个, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 培养 24 h 后, PBS 清洗 3 次, 加入 0.075% 中性红溶液 100 μ L, 继续培养 2 h 后, 弃去中性红溶液, PBS 洗 3 次, 加入 100 μ L 细胞裂解液(50% 乙醇:50% 乙酸 = 1:1), 4℃ 过夜, 酶标仪检测波长为 540 nm 处的吸光度(OD)值。

1.2.5 流式细胞术检测 pM ϕ 表面分子 CD86 的变化

LPS 刺激后收集细胞, PBS 洗 1 遍, 1200 rpm 离心 5 min, 弃上清, 加入 50 μ L PBS 重悬细胞, 再加入 1 μ L CD86-APC 荧光标记抗体, 4℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗 1 遍, 加入 300 μ L PBS 重悬, 流式细胞仪检测。

1.2.6 ELISA 检测 pM ϕ 炎症细胞因子的释放量

细胞分组处理后, 收集细胞上清液, 采用 ELISA 试剂盒检测 pM ϕ 分泌炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平。操作按照试剂盒说明书步骤进行, 配制并滴加标准品、上清液样品, 再依次加入酶标试剂及显色剂 A、B, 酶标仪检测 OD 值, 按照说明书绘制标准曲线, 并计算炎症因子含量。

1.2.7 Western Blot 法检测 pM ϕ 中 β -arrestin2、JAK1、p-JAK1、STAT1、p-STAT1 的表达

收集细胞, 提取蛋白。配制 10% 的 SDS-PAGE 凝胶, 上样进行电泳, 转移至 PVDF 膜上, 用含 0.05% 吐温 20 的 PBS 配制的 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜, 37℃ 摇床封闭 2 h, 孵育抗 β -arrestin2、JAK1、p-JAK1、STAT1、p-STAT1、 β -actin 抗体, 4℃ 过夜, 洗去一抗后, 37℃ 孵育二抗 2 h 后, 洗去二抗, 化学发光成像系统显影。采用 Image J 图像分析软件进行结果分析, 测得条带的灰度值, 计算各组目的条带与内参 β -actin 的比值以反映目的蛋白表达水平, 比较各组间差异。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。结果用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间的差异比较采用单因素方差分析, GraphPad Prism 8.0 绘制柱状图, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 β -arrestin2 敲除对小鼠 pM ϕ 的形态的影响

倒置显微镜下观察了贴壁后 pM ϕ 的细胞形态。结果显示, WT 组小鼠 pM ϕ 呈圆形, 部分细胞出现伪足, 呈梭形。而 β -arrestin2^{-/-} 组小鼠 pM ϕ 多呈圆形, 边缘光滑, 较少见伪足(见图 1)。

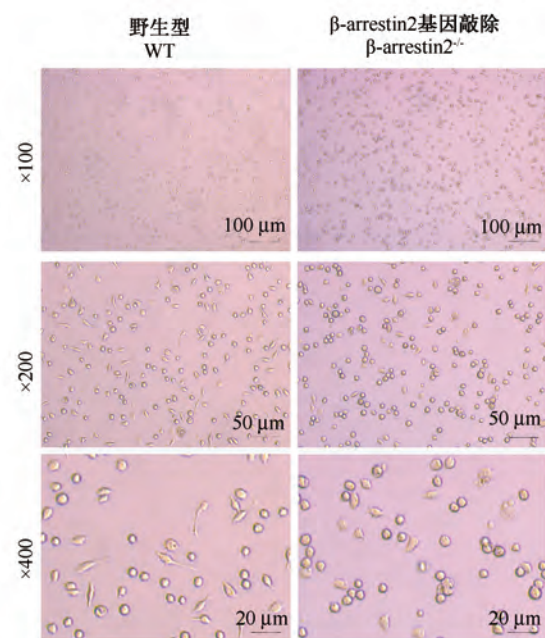


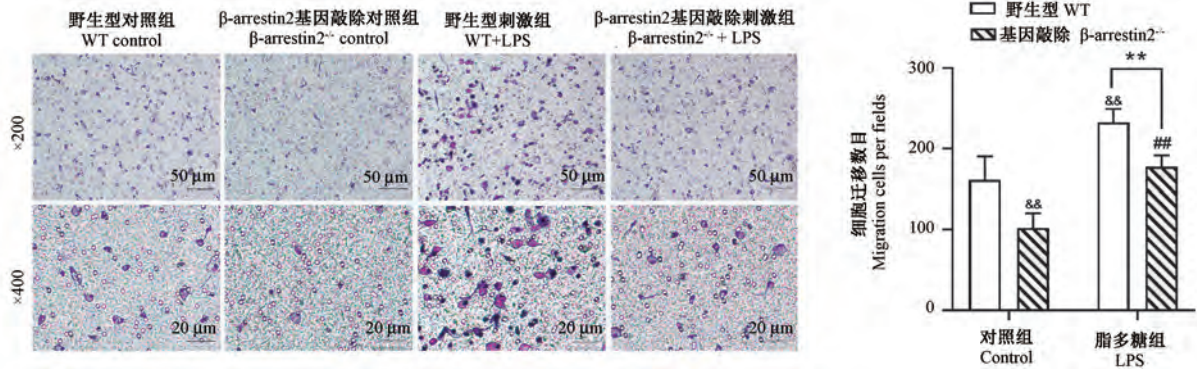
图 1 pM ϕ 的形态学观察

Figure 1 Morphological observation of pM ϕ

2.2 β -arrestin2 敲除对小鼠 pM ϕ 的迁移能力的影响

为了研究 β -arrestin2 是否参与了 pM ϕ 迁移过程,通过 Transwell 迁移实验检测 β -arrestin2 基因敲除对 pM ϕ 迁移的影响。结果如图 2 所示,与未刺激

的对照组 pM ϕ 相比,LPS 刺激后 pM ϕ 的细胞迁移数目明显增加;与 WT 组 pM ϕ 相比, β -arrestin2 基因敲除明显减少了 pM ϕ 的细胞迁移数目($P < 0.01$)。提示 β -arrestin2 基因敲除可以抑制 pM ϕ 的迁移能力。



注:与野生型对照组相比,[&] $P < 0.05$,^{&&} $P < 0.01$;与 β -arrestin2 基因敲除对照组相比,^{##} $P < 0.01$;与野生型刺激组相比,^{**} $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 β -arrestin2 基因敲除对 pM ϕ 迁移能力的影响

Note. Compared with WT control group,[&] $P < 0.05$,^{&&} $P < 0.01$. Compared with β -arrestin2^{-/-} control group,^{##} $P < 0.01$. Compared with WT+LPS group,^{**} $P < 0.01$. (The same in the flowing figures)

Figure 2 Effect of β -arrestin2 deficiency on the migration ability of pM ϕ

2.3 β -arrestin2 敲除对小鼠 pM ϕ 吞噬功能的影响

吞噬功能被认为是巨噬细胞参与免疫反应的重要指标之一,因此我们采用了中性红实验检测 β -arrestin2 基因敲除对 pM ϕ 吞噬功能的影响。结果如图 3 所示,与未刺激的对照组相比,LPS 刺激明显升高 pM ϕ 的吞噬指数($P < 0.01$);与 WT 组 pM ϕ 相比, β -arrestin2 基因敲除后显著提高了小鼠 pM ϕ 的吞噬指数($P < 0.01$)。以上结果提示 β -arrestin2 基因敲除可以增强巨噬细胞的吞噬功能。

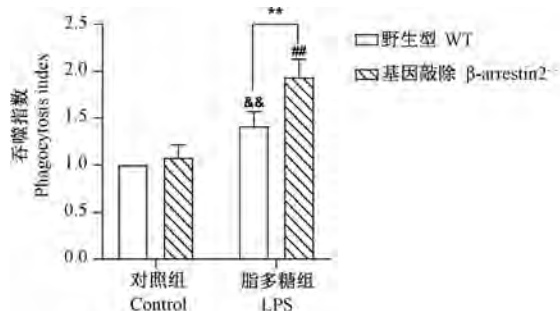


图 3 β -arrestin2 基因敲除对 pM ϕ 吞噬功能的影响

Figure 3 Effect of β -arrestin2 deficiency on the phagocytic ability of pM ϕ

2.4 β -arrestin2 敲除对小鼠 pM ϕ 表面分子 CD86 表达的影响

CD86 作为 M1 型巨噬细胞的表面标志,其表达

水平与巨噬细胞的极化程度密切相关^[9]。为了探究 β -arrestin2 基因敲除对 M1 型巨噬细胞极化的影响,使用流式细胞仪检测 pM ϕ 表面分子 CD86 的水平变化。结果如图 4 显示,与未刺激的对照组相比,LPS 刺激后,小鼠 pM ϕ 表面分子 CD86 的表达均明显升高;与 WT 组相比, β -arrestin2 基因敲除后明显增加了 CD86 的表达水平($P < 0.01$),提示 β -arrestin2 可能参与了 LPS 诱导的 M1 型巨噬细胞的极化过程。

2.5 β -arrestin2 敲除对小鼠 pM ϕ 炎症因子分泌量的影响

极化的 M1 型巨噬细胞可以分泌大量的炎症因子,为了进一步验证 β -arrestin2 基因敲除对 pM ϕ 极化能力的影响,我们使用 ELISA 试剂盒检测 β -arrestin2 基因敲除对 pM ϕ 分泌炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响。结果如图 5 所示,与对照组相比,LPS 刺激后,小鼠 pM ϕ 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的分泌量明显升高($P < 0.01$);与 WT 组 pM ϕ 相比, β -arrestin2 基因敲除明显上调了 pM ϕ 中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的分泌水平($P < 0.01$)。

2.6 β -arrestin2 敲除对 JAK1/STAT1 信号通路的影响

为了进一步阐明 β -arrestin2 基因敲除对 pM ϕ 功能影响的可能机制,我们通过 Western Blot 法检测了 JAK1/STAT1 通路相关蛋白的水平变化。结果

显示, β -arrestin2^{-/-} 组 pM ϕ 中几乎不表达 β -arrestin2; WT 组中, 在 LPS 的刺激下, β -arrestin2 的表达较对照组明显降低(图 6A, $P < 0.01$), 提示在炎性环境下, β -arrestin2 在 pM ϕ 功能调控中发挥作用。与未刺激的对照组相比, LPS 刺激后 p-JAK1 和

p-STAT1 的表达明显上升(图 6B, $P < 0.01$); 与 WT 组 pM ϕ 相比, β -arrestin2 基因敲除后明显促进了 p-JAK1 和 p-STAT1 表达(图 6B, $P < 0.01$)。以上结果提示 β -arrestin2 基因敲除可以促进 pM ϕ 中 JAK1/STAT1 通路的激活。

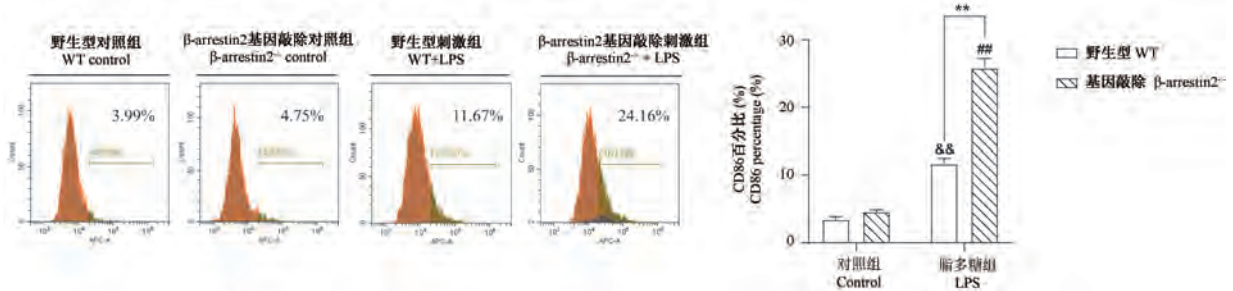


图 4 β -arrestin2 基因敲除对小鼠 pM ϕ 表面分子 CD86 表达的影响

Figure 4 Effect of β -arrestin2 deficiency on the expression of CD86 on the surface of mouse pM ϕ

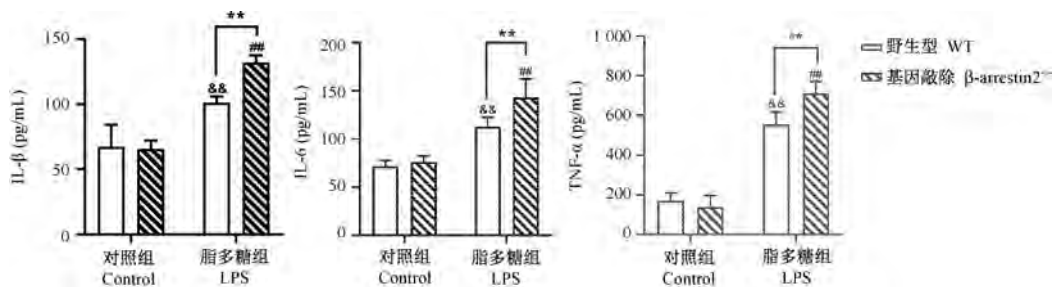
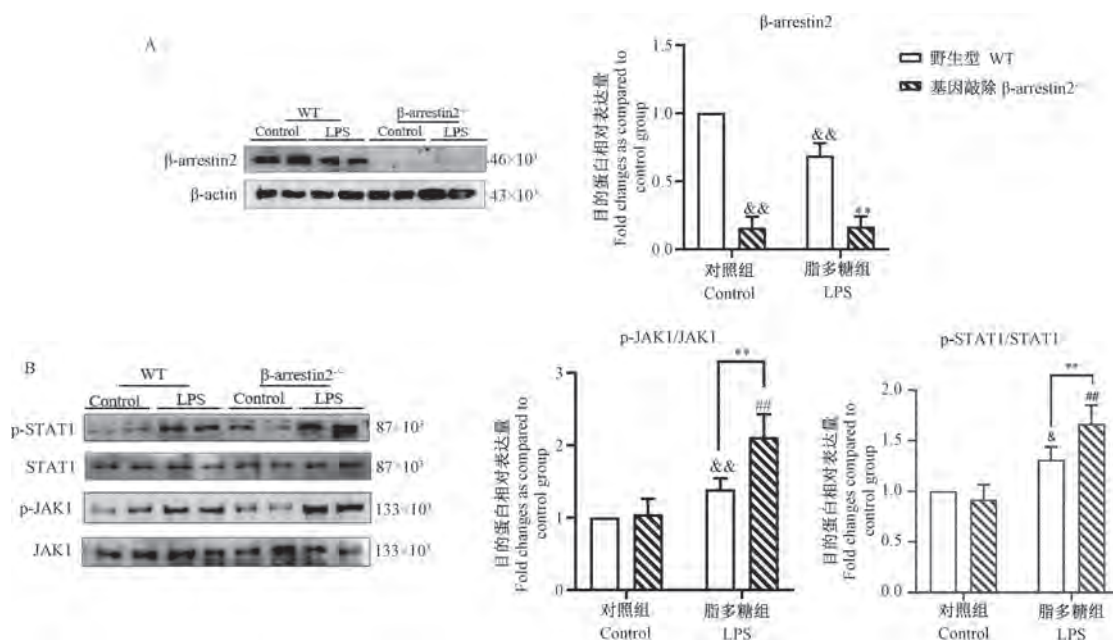


图 5 β -arrestin2 基因敲除对 pM ϕ 分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的影响

Figure 5 Effects of β -arrestin2 deficiency on the production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α by pM ϕ



注: A: LPS 刺激后, WT 组和 β -arrestin2^{-/-} 组 pM ϕ 中 β -arrestin2 的表达变化; B: LPS 刺激后, WT 组和 β -arrestin2^{-/-} 组 pM ϕ 中 p-JAK1、p-STAT1 的表达变化。

图 6 β -arrestin2 基因敲除对小鼠 pM ϕ 中 JAK1/STAT1 通路基因变化的影响

Note. A. The expression of β -arrestin2 in WT group and β -arrestin2^{-/-} group under LPS stimulation. B. The expression of p-JAK1 and p-STAT1 in WT group and β -arrestin2^{-/-} group under LPS stimulation.

Figure 6 Effects of β -arrestin2 deficiency on the expression changes of JAK1/STAT1 pathway in pM ϕ

3 讨论

巨噬细胞是固有免疫系统的重要组成部分,在炎症、防御、修复、代谢等生理过程中至关重要^[9]。迄今为止,最常见的巨噬细胞来源是骨髓、脾和腹腔。从腹腔中分离的 pM ϕ 是进行体外模拟炎症刺激、细胞信号检测、吞噬作用、毒理学等研究常用的巨噬细胞来源^[10]。越来越多的研究表明,pM ϕ 的免疫及炎症反应与各种炎症性疾病和癌症的致病过程密切相关^[11-12]。这些研究提示,研究 pM ϕ 的功能调控,不仅有利于深入探讨固有免疫应答的具体机制,对于相关腹腔器官炎症性疾病乃至全身感染性疾病的治疗也具有重要意义。

β -arrestin2 作为细胞中重要的接头蛋白和信号转导调控蛋白,与多种疾病的发生、发展存在联系,如内分泌疾病、肿瘤和纤维化疾病等^[13]。已有研究发现 β -arrestin2 在脾和白细胞中高度表达,提示其在调节免疫系统功能方面可能具有重要作用^[14]。目前陆续有研究报道 β -arrestin2 参与 CD4⁺ T 淋巴细胞、中性粒细胞等多种免疫细胞的功能调节^[15]。因此,本实验选择了小鼠 pM ϕ 作为研究对象,采用体外细胞培养的方法,观察了 β -arrestin2 对 pM ϕ 功能的调节作用。本研究发现在 LPS 的刺激下,WT 小鼠的 pM ϕ 中 β -arrestin2 的表达水平明显下降,提示 β -arrestin2 可能与 pM ϕ 的功能调控有关。巨噬细胞的迁移是其发挥生物学功能的过程中必不可少的环节之一,经 LPS 刺激活化后的巨噬细胞的迁移能力明显增强,会迅速募集到炎症感染部位,从而参与机体的炎症免疫反应^[16]。 β -arrestin2 作为一种支架蛋白,在介导细胞肌动蛋白骨架重排,调节各类免疫细胞迁移过程中具有重要影响,研究表明, β -arrestin2 基因敲除后,Th2 细胞的迁移能力明显降低^[17];此外,在缺失 β -arrestin2 基因的淋巴细胞中,T、B 细胞的迁移能力也明显降低^[18]。那么, β -arrestin2 对 pM ϕ 的迁移能力是否有影响呢?本研究 Transwell 实验发现, β -arrestin2 基因敲除可以明显降低 pM ϕ 的迁移能力。吞噬功能也是检测巨噬细胞功能的重要指标,活化的巨噬细胞不仅可以分泌特定的细胞因子参与机体的炎症反应,其吞噬功能也进一步增强,在机体的非特异性免疫应答中起到重要作用^[19]。我们采用中性红实验观察了 β -arrestin2 对 pM ϕ 的吞噬功能的影响,研究发现, β -arrestin2 基因敲除可以明显提升 pM ϕ 的吞噬功能。细胞因子的合成和分泌是反映巨噬细胞极化的重要标志,巨噬细胞极化后可合成和分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子,参与固有免疫及适应性免疫应

答的启动^[20]。本研究表明 β -arrestin2 基因敲除后,LPS 诱导的 M1 型巨噬细胞极化相关分子 CD86 的表达也明显增加,同时 pM ϕ 释放的炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的水平也明显上升。这些结果表明 β -arrestin2 可能还参与了 pM ϕ 分泌炎症因子和极化的调控过程。

大量研究表明,JAK/STAT 在多种炎症因子刺激下激活,进而发挥信号转导和转录调控作用,影响巨噬细胞的免疫功能^[21]。已有研究表明,抑制 JAK1/STAT1 信号通路的激活,可以下调巨噬细胞表面吞噬受体的表达,从而显著抑制人源单核细胞株 THP-1 诱导成的巨噬细胞的吞噬功能^[22]。此外,在体外 LPS 诱导的炎症模型中,JAK1 和 STAT1 的磷酸化程度明显升高,从而促进了 RAW264.7 巨噬细胞向 M1 型的极化^[23];另有文献报道,在 LPS 诱导的内毒素休克模型中,与 WT 小鼠相比,STAT1 基因缺失的小鼠具有明显的抵抗性,M1 型巨噬细胞极化和炎症分子的分泌程度也明显降低^[24]。在急性结肠炎中,选择性抑制 JAK1 的活性可以显著抑制骨髓源性巨噬细胞中 STAT1 的信号转导和 M1 型巨噬细胞的极化程度^[25]。提示 JAK1/STAT1 通路是调控巨噬细胞极化的关键性通路之一。另有研究表明,在体外用 LPS 诱导建立小胶质细胞活化模型, β -arrestin2 高表达后能明显抑制 STAT1 信号通路的活化,同时,下调 β -arrestin2 在骨髓源性巨噬细胞的表达,可以促进 STAT1 信号通路的激活^[26-27]。那么在 pM ϕ 中, β -arrestin2 是否通过影响 JAK1/STAT1 信号通路参与调控 pM ϕ 的功能呢?本研究通过 Western Blot 检测发现,与 WT 组相比, β -arrestin2 基因敲除后可以增强 JAK1 和 STAT1 的磷酸化程度,提示 β -arrestin2 敲除可以促进 pM ϕ 中 JAK1/STAT1 信号通路的激活。

综上所述,本研究发现了 β -arrestin2 基因敲除后,pM ϕ 的迁移能力、吞噬功能、炎症细胞因子的释放以及极化能力明显发生改变,提示 β -arrestin2 可能参与了 pM ϕ 功能的调控过程,其作用可能是通过调控 JAK1/STAT1 信号通路来实现的。这一发现为今后深入探讨 β -arrestin2 在巨噬细胞功能中的发挥的作用,以及相关临床疾病的机制探究提供了重要的实验依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity [J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 123-147.
- [2] 仰明明,牛婷,刘擎,等. MMP12 缺失引起小鼠血液和白色脂肪中巨噬细胞的变化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29 (3): 14-20.

- Yang MM, Niu T, Liu Q, et al. Matrix metalloproteinase-12 knockout regulates macrophages in the blood and white fat in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(3): 14-20.
- [3] 张慧琴, 霍乃蕊, 冀霞, 等. 羊骨胶原肽对大鼠腹腔巨噬细胞免疫能力的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(2): 176-182.
- Zhang HQ, Huo NR, Ji X, et al. Effect of sheep bone collagen peptide on immune function in rat peritoneal macrophages [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(2): 176-182.
- [4] Liu T, Liu F, Peng LW, et al. The peritoneal macrophages in inflammatory diseases and abdominal cancers [J]. *Oncol Res*, 2018, 26(5): 817-826.
- [5] Peterson YK, Luttrell LM. The diverse roles of arrestin scaffolds in G protein-coupled receptor signaling [J]. *Pharmacol Rev*, 2017, 69(3): 256-297.
- [6] Sun WY, Gu YJ, Li XR, et al. β -arrestin2 deficiency protects against hepatic fibrosis in mice and prevents synthesis of extracellular matrix [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 389.
- [7] 孙妩弋, 孙家昌, 厉歆然, 等. Arrb2 基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(6): 878-881.
- Sun WY, Sun JC, Li XR, et al. Breeding and genotype identification of Arrb2 gene knockout mice [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2018, 34(6): 878-881.
- [8] 耿田欣, 臧光耀, 严金川. 3% 巯基乙酸盐肉汤诱导法高效提取小鼠腹腔巨噬细胞 [J]. *江苏大学学报 (医学版)*, 2019, 29(1): 45-48, 53.
- Geng TX, Zang GY, Yan JC. Efficient extraction of primary peritoneal macrophages in mice induced by 3% thioglycollate broth [J]. *J Jiangsu Univ (Med Ed)*, 2019, 29(1): 45-48, 53.
- [9] Xu HT, Lee CW, Li MY, et al. The shift in macrophages polarisation after tendon injury: A systematic review [J]. *J Orthop Translat*, 2019, 21: 24-34.
- [10] Roohani S, Tacke F. Liver injury and the macrophage issue: molecular and mechanistic facts and their clinical relevance [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7249.
- [11] 杨晓, 陈冲. 小鼠腹腔巨噬细胞亚群对病毒拟似物 Poly I:C 的免疫应答效应比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(11): 16-22.
- Yang X, Chen C. Comparison of immune responses induced by poly (I:C) in mouse peritoneal macrophage subsets [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(11): 16-22.
- [12] Cassado AA, D'Imperio LM, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 225.
- [13] Wang W, Li X, Zheng D, et al. Dynamic changes of peritoneal macrophages and subpopulations during ulcerative colitis to metastasis of colorectal carcinoma in a mouse model [J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(7): 669-680.
- [14] Du JJ, Sun JC, Li N, et al. β -Arrestin2 deficiency attenuates oxidative stress in mouse hepatic fibrosis through modulation of NOX4 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(7): 1090-1100.
- [15] Li H, Smalligan DA, Xie N, et al. β -arrestin 2-mediated immune suppression induced by chronic stress [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2011, 18(3): 142-149.
- [16] Li J, Li C, Zhuang Q, et al. The evolving roles of macrophages in organ transplantation [J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 5763430.
- [17] Lin R, Choi YH, Zidar DA, et al. β -Arrestin-2-dependent signaling promotes CCR4-mediated chemotaxis of murine T-helper type 2 cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(6): 745-755.
- [18] Fong AM, Premont RT, Richardson RM, et al. Defective lymphocyte chemotaxis in β -arrestin2- and GRK6-deficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(11): 7478-7483.
- [19] Chauhan AK, Jakhar R, Paul S, et al. Potentiation of macrophage activity by thymol through augmenting phagocytosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 18(2): 340-346.
- [20] 姜文清, 戚艳, 沙若荷, 等. PTEN 在多烯磷脂酰胆碱下调 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应中的抑制作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(8): 44-49.
- Jiang WQ, Qi Y, Sha RH, et al. Inhibitory effect of PTEN on polyene phosphatidylcholine in downregulating LPS-induced macrophage inflammatory response [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(8): 44-49.
- [21] Wang A, Singh K, Ibrahim W, et al. The promise of JAK inhibitors for treatment of sarcoidosis and other inflammatory disorders with macrophage activation: a review of the literature [J]. *Yale J Biol Med*, 2020, 93(1): 187-195.
- [22] Lei Q, Li L, Huang W, et al. HEV ORF3 downregulates CD14 and CD64 to impair macrophages phagocytosis through inhibiting JAK/STAT pathway [J]. *J Med Virol*, 2019, 91(6): 1112-1119.
- [23] 孙颖, 刘玲, 施晓艳, 等. 丹皮酚通过下调 mir-155/JAK1-STAT1 通路抑制巨噬细胞 M1 极化 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(9): 2158-2164.
- Sun Y, Liu L, Shi XY, et al. Paeonol inhibits macrophage M1 polarization by down-regulating mir-155/JAK1-STAT1 pathway [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2020, 45(9): 2158-2164.
- [24] Luu K, Greenhill CJ, Majoros A, et al. STAT1 plays a role in TLR signal transduction and inflammatory responses [J]. *Immunol Cell Biol*, 2014, 92(9): 761-769.
- [25] Kim TW, Shin JS, Chung KS, et al. Anti-inflammatory mechanisms of Koreanaside A, a lignan isolated from the flower of forsythia koreana, against LPS-induced macrophage activation and DSS-induced colitis mice: the crucial role of AP-1, NF- κ B, and JAK/STAT signaling [J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1163.
- [26] 蒋庆玲. β -Arrestins 对小胶质细胞极化的调节在帕金森病发生中的作用及其机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学; 2019.
- Jiang QL. β -Arrestins-orchestrated microglia polarization and their potential roles in the pathogenesis of Parkinson disease [D]. Nanjing: Nanjing Medical University; 2019.
- [27] Tang Y, Shi Y, Gao Y, et al. Oxytocin system alleviates intestinal inflammation by regulating macrophages polarization in experimental colitis [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(18): 1977-1992.

[收稿日期] 2021-08-09

郭莎,张娟娟,梁兴禹,等. 基于数据挖掘及动物实验探讨维持洛哌丁胺诱导便秘小鼠模型稳定性的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 47-56.

Guo S, Zhang JJ, Liang XY, et al. Stability of mouse models of loperamide-induced constipation based on data mining and animal experiments [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 47-56.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.006

基于数据挖掘及动物实验探讨维持洛哌丁胺诱导便秘小鼠模型稳定性的研究

郭莎,张娟娟,梁兴禹,李雪梅,何振曦,杨莎*

(成都中医药大学针灸推拿学院,成都 610075)

【摘要】 目的 通过文献数据挖掘与实验研究相结合的方法,挖掘洛哌丁胺诱导便秘小鼠模型造模特点及影响因素,为建立稳定的实验便秘模型提供一定参考。**方法** 文献研究部分以便秘及动物模型为主题词,检索中英文数据库,筛选使用洛哌丁胺诱导便秘小鼠模型的实验研究,提取资料并进行分析;动物实验部分,采用雄性 C57BL/6 小鼠,给予 5 mg/kg 及 10 mg/kg 的洛哌丁胺灌胃,每日给药 1 次。从含水率、首次黑便时间、小肠推进率等评价造模效果,观察洛哌丁胺不同剂量及给药时间对便秘小鼠的影响。**结果** 纳入符合标准的文献 69 篇,洛哌丁胺给药剂量多为 5、10 mg/kg,多用灌胃给药,频率为给药 1 次,给药时间多为 30 min。根据文献研究结果,实验部分从造模第 1 天开始,5 mg/kg 及 10 mg/kg 组与空白组相比含水率显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而造模第 7~14 天,5 mg/kg 组与 10 mg/kg 组相比含水率明显升高($P < 0.05$),对比造模 3、7、14 d 后含水率变化情况,各模型组均在停药 1 d 后升高,至停药后 14 d 含水率均保持在较高水平;对比造模 3、7、14 d 的首次黑便时间,造模 7、14 d 的 5 mg/kg 及 10 mg/kg 组与空白组及造模 3 d 的 5 mg/kg 组相比均升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);对比小肠推进率,各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 涉及即时效应实验可选择予以小鼠洛哌丁胺灌胃 1 次进行便秘造模,其他长期干预实验可选择予以小鼠 10 mg/kg 的洛哌丁胺浓度灌胃,于造模第 3 天开始干预,同时继续灌胃洛哌丁胺维持造模,以维持模型稳定性。

【关键词】 便秘;洛哌丁胺;小鼠模型;模型特点;模型稳定性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0047-10

Stability of mouse models of loperamide-induced constipation based on data mining and animal experiments

GUO Sha, ZHANG Juanjuan, LIANG Xingyu, LI Xuemei, HE Zhenxi, YANG Sha*

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Corresponding author: YANG Sha. E-mail: yangsha@cdutcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore influencing factors of loperamide-induced constipation in mouse models by combining literature data mining and experimental research, to provide a reference for the establishment of a stable experimental constipation model. **Methods** Literature study, Constipation and animal model were used to search main titles, and then relevant literature from Chinese and English databases were retrieved. Then experimental studies were screened for mouse models of constipation induced by loperamide. Finally, data were extracted and analyzed by researchers. Experimental study, Male C57BL/6 mice were given 5 and 10 mg/kg loperamide orally once daily. We evaluated water

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82004487)。

Funded by the National Science Foundation for Young Scholars of China(82004487)。

[作者简介] 郭莎(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:针灸治疗功能性疾病机制研究。Email:657388062@qq.com

[通信作者] 杨莎(1987—),女,副教授,医学博士,研究方向:针灸治疗功能性疾病机制研究。Email:yangsha@cdutcm.edu.cn

content, timing of first melena and the intestinal propulsion rate to observe the effects of different doses and administration time of loperamide on mice with constipation. **Results** Literature study, We included 69 articles that met the standards, among which it was found that loperamide was mostly administered at doses of 5 and 10 mg/kg, with multiple intragastric administrations, the frequency of administration was once, and time of administration was mostly 30 min. Experimental study: From the day 1 of modeling, the water content of the 5 and 10 mg/kg groups significantly decreased ($P < 0.05$) compared with the blank group. From day 7 to 14 of modeling, the water content of the 5 mg/kg group was significantly increased compared with the 10 mg/kg group ($P < 0.05$). Comparison of changes in water content at 3, 7 and 14 days after modeling showed that the water content in each model group increased 1 day after drug withdrawal, and remained at high levels at 14 days after drug withdrawal. The timing of the first melena between day 7 and 14 of modeling was significantly increased ($P < 0.05$) in the 5 and 10 mg/kg groups compared with the blank group. There were no significant differences in small intestinal propulsion rates among all groups ($P > 0.05$). **Conclusions** In the immediate effect experiment, loperamide was administered to mice for one time constipation modeling. For long-term intervention experiments, we can choose to treat mice with 10 mg/kg loperamide on the third day of modeling, and continue administration of loperamide to maintain the stability of the model.

【**Keywords**】 constipation; loperamide; mouse model; model features; model stability

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

便秘是以便次减少,大便坚硬,常伴有腹痛腹胀等为主要症状的常见胃肠道疾病^[1]。据最新流行病学调查显示,便秘全球人群患病率约为 11.4% ~ 12%, 其中中国人群发病率约为 9.5% ~ 11.7%^[2]。便秘的发病率高,症状反复,易增加患癌风险,极大的降低了患者的生活质量^[3]。引起便秘的原因较多,其中药物导致的便秘是其最主要的部分^[4]。而随着美国阿片类药物使用增多,阿片类药物的不良作用特别是阿片类引起的便秘越来越受到重视^[5],在美国,57%使用阿片类药物的受试者出现便秘的不良反应^[6]。便秘的动物模型已广泛应用于阐明疾病本身潜在的发病机制、不同干预方式起效机制研究及新药筛选中。研究表明,当前便秘动物模型的建立多以药物诱导为主,其中以洛哌丁胺诱导便秘模型多见^[7]。洛哌丁胺作为类阿片受体激动剂,可导致胃肠动力减弱^[8],常用于诱导便秘小鼠模型,但有研究显示使用洛哌丁胺造模后动物易自愈^[9],且长时间使用存在耐药的可能性^[10]。建立符合便秘要求且稳定的动物模型是开展相关实验研究的关键,但目前洛哌丁胺诱导便秘小鼠模型还未稳定完善,急需进行进一步总结及研究。

数据挖掘可从大量数据中挖掘出未知且有价值的规律及知识^[11],现已广泛用于疾病的预防和治疗、新药研发推广等方面^[12]。将数据挖掘的结果进行分析总结后,再设计相关实验研究可提高研究结果的可信度及可重复性。因此,如图 1 所示,本研究旨在对国内外已发表的洛哌丁胺诱导便秘小鼠模

型实验研究进行挖掘,以总结洛哌丁胺诱导方法,基于文献研究结果进行动物实验研究,以期寻找洛哌丁胺诱导便秘小鼠模型相对稳定的方法,进而降低阿片类药物导致便秘研究的临床前结果向临床转化的风险。

1 材料与方法

1.1 文献研究

1.1.1 文献检索

检索 PubMed、EMBASE、Web of Science、中国期刊全文数据库(CNKI)、中国学术期刊数据库(万方)、中国科技期刊数据库(VIP)、中国生物医学文献服务系统(CBM),检索年限自建库至 2021 年 1 月。英文检索词为:主题词:“Constipation”“Loperamide”,自由词:“Chronic constipation”“Colonic Inertia”“mice”。中文检索词为:主题词:“便秘”“动物模型”,自由词:“慢性便秘”“功能性便秘”“慢传输便秘”“特发性便秘”“药物诱导”“洛哌丁胺”“哺乳动物”“小鼠”。

1.1.2 文献纳入标准

(1)研究类型:实验性随机对照实验;(2)研究对象:洛哌丁胺诱导的便秘小鼠模型,小鼠品系、性别、年龄不做限制;(3)干预措施:针灸,艾灸,中药,西药等有效干预措施。

1.1.3 文献排除标准

(1)实验对象非小鼠的研究;(2)离体研究;(3)疾病为肠易激综合症便秘;(4)其他诱导建模方法;(5)案例研究,综述,会议摘要,无单独对照组的

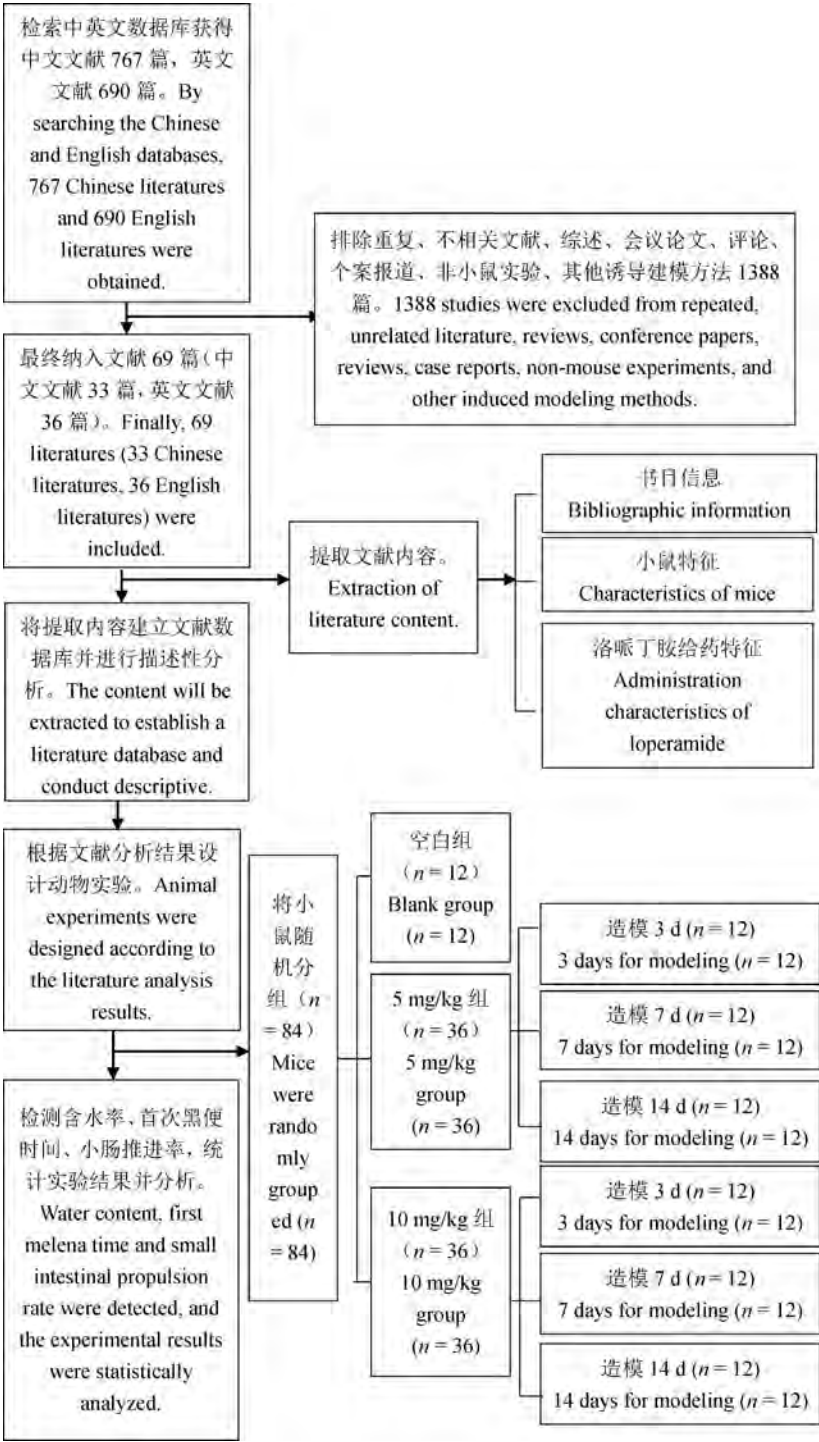


图 1 实验流程图

Figure 1 Experimental flow chart

实验动物研究; (6) 重复文献; (7) 无法提取原始资料, 联系作者后仍无法获取的文献。

1. 1. 4 文献筛选与资料提取

两名研究人员严格按照纳入/排除标准对文题及摘要进行独立筛选, 排除明显不符合的文献后, 进一步阅读全文进行筛选, 如果有异议, 则征求第 3

位研究者的意见, 以获取最终的收录文献。两名研究者阅读全文后独立提取相关数据并核对。提取内容包括: (1) 书目信息: 出版年份, 第一作者, 期刊; (2) 小鼠特征: 品系, 使用的动物数量, 性别, 体重, 年龄; (3) 洛哌丁胺给药特征: 剂量, 给药时间, 给药频率, 给药途径。

1.1.5 统计学分析

将提取内容录入 Excel 建立文献数据库,采用 SPSS 24.0 统计软件对数据进行统计分析,统计学方法采用描述性统计。使用 GraphPad Prism 8.4 进行图表绘制。

1.2 动物实验研究

1.2.1 材料

(1)实验动物:84 只 6 ~ 8 周 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠,体重 (20 ± 2) g,成都达硕实验动物有限公司提供【SCXK(川)2020-030】。动物饲养于成都中医药大学动物实验室【SYXK(川)2019-049】。饲养期间各组小鼠喂以普通清洁级饲料,自由饮水,饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定。实验过程对动物的处置遵循科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定,符合实验伦理学要求(IACUC 号:ACU21-C003)。

(2)主要试剂与仪器:盐酸洛哌丁胺(西安杨森制药有限公司,批号:H10910085),活性炭(巩义市海星供水材料有限公司),阿拉伯树胶(成都科龙化工试剂厂,批号:2015012601),电热恒温鼓风恒温干燥箱(中兴伟业仪器有限公司,型号:202)。

1.2.2 方法

(1)动物分组:所有小鼠适应性喂养 7 d 后,随机分为空白组(12 只)、5 mg/kg 组(36 只)、10 mg/kg 组(36 只),同时 5 mg/kg 组及 10 mg/kg 根据造模天数分为 3、7、14 d 组各 12 只。

(2)实验造模:分别配制 5 mg/kg 及 10 mg/kg 的洛哌丁胺混悬液对小鼠进行灌胃,给药时间为每日 9:00,给药体积为每 10 g 小鼠体重 0.1 mL。

(3)观察指标:粪便含水率检测:于小鼠适应性喂养及给药后,收集小鼠 6 h 粪便,并称重、记录粪便湿重。然后将各组小鼠粪便放入恒温干燥箱中烘干,干燥箱设置为 200℃,连续烘干 30 min,再次

称重并记录粪便干重。最后计算小鼠粪便含水率 = $(\text{粪便湿重} - \text{粪便干重}) / \text{粪便湿重} \times 100\%$ 。

首次黑便时间:于造模 3、7、14 d 后每组小鼠各取 6 只禁食 12 h,对小鼠给予浓度为 100 g/L 的活性炭悬液 0.2 mL 灌胃,期间小鼠自由饮食,活性炭灌胃后至首粒黑便排出的时间,即为首次黑便时间,观察后小鼠不予以造模,继续检测粪便含水率至造模后第 14 天。

小肠推进率:于造模 3、7、14 d 后取每组剩余 6 只小鼠禁食 12 h,每只小鼠灌胃 0.2 mL 活性炭悬液,30 min 后脱颈处死。迅速打开小鼠腹腔,取出肠道,无张力拉直后测量并记录小鼠幽门到碳末推进末端距离和小肠的全肠长度,计算小肠推进率。小肠推进率(%) = $\text{肠道内碳末推进距离} / \text{小肠全长} \times 100\%$ 。

1.2.3 统计学分析

用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析,符合正态分布的数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不符合数据用中位数及四分位数间距[M(P25, P75)]表示。多组间对比采用单因素方差分析,两组间比较用 LSD 法,不符合正态分布时采用非参数检验,以 $P < 0.05$ 作为具有统计学意义的标准。

2 结果

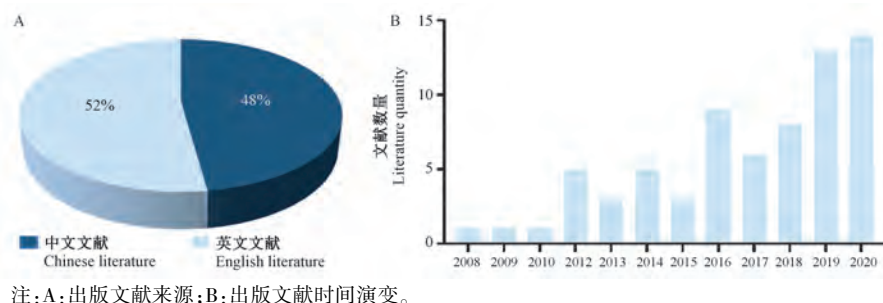
2.1 文献研究结果

2.1.1 文献特征

符合纳入标准的文献共 69 篇,其中中文文献 33 篇(48%),英文文献 36 篇(52%)。从发表年份看,2010 后有关洛哌丁胺诱导便秘的实验研究文献发表数量开始上升,其中 2020 年发表文献数量最多,占总比例的 17%,见图 2。

2.1.2 小鼠特征

由表 1 可见,在品系选择上,小鼠造模的实验中



注:A:出版文献来源;B:出版文献时间演变。

图2 出版文献特征

Note. A. Sources of published literature. B. Time evolution of published literature.

Figure 2 Features of published literature

涉及多种品系,其中最常用的是 KM(28 项研究,占 40.6%)和 ICR(17 项研究,占 24.6%)。在性别选择上,大多数研究中使用雄性动物(61 项研究,占 88.4%),而仅有 1 篇文献(1.4%)使用雌性动物,其

余研究则选择使用雌雄各半(6 项研究,占 8.7%),或未报告动物的性别(1 项研究,占 1.4%)。在年龄选择上,仅有 32 项研究报告了动物年龄,其中小鼠的年龄中位数为 7.5 周。

表 1 小鼠特征表

Table 1 Mouse characteristics

变量 Variable	类型 Type	文献数量 (n = 69) Literature quantity (n = 69)
品系-n (%) Strain-n (%)	KM	28(40.6)
	ICR	17(24.6)
	BALB/c	12(17.4)
	C57BL/6	3(4.3)
	其他小鼠 Other mice	9(13.0)
性别-n (%) Sex-n (%)	雌性 Female	1(1.4)
	雄性 Male	61(88.4)
	雌雄各半 Male and female half	6(8.7)
	未提 Not given	1(1.4)
年龄(周)-中位数(四分位数) Age (weeks) -Median (Quartile)	/	7.5(6,8)

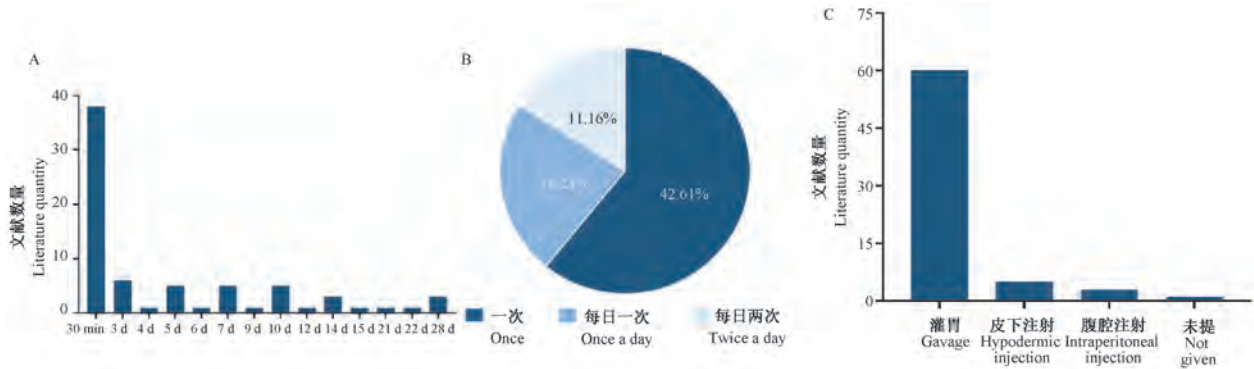
2.1.3 洛哌丁胺频率、剂量及给药方式

由表 2 可见,从洛哌丁胺常用给药剂量来看,多为:5 mg/kg (21.7%)、10 mg/kg (21.7%)、3 mg/kg(18.8%)及 4 mg/kg(10.1%)。从洛哌丁胺给药天数看,最短的为给药后 30 min 处死,最长的为 28 d,而常用的则为:30 min (38 项研究,55.1%)、3 d(6 项研究,8.7%)、7 及 10 d(5 项研究,7.2%),见图 3A。从洛哌丁胺每日给药频率来看,小鼠最常用频率为给药一次(42 项研究,60.9%),其次为每日 1 次(16 项研究,23.2%),最少为每日 2 次(11 项研究,15.9%),见图 3B。从给药方式来看,小鼠常用为灌胃(87%),其次为皮下注射(7.2%)、腹腔注射(4.3%),有 1 项研究未提及给药方式,见图 3C。

表 2 洛哌丁胺给药剂量频率表

Table 2 Dose frequency table of loperamide administration

剂量 (mg/kg) Dose (mg/kg)	频数 Number of studies	频率 (%) Percentage (%)
5.00	15	21.7
10.00	15	21.7
3.00	13	18.8
4.00	7	10.1
8.00	3	4.3
0.30	2	2.9
0.50	2	2.9
1.00	2	2.9
6.00	2	2.9
9.38	2	2.9
1.50	1	1.4
2.40	1	1.4
6.67	1	1.4
9.60	1	1.4
20.00	1	1.4
50.00	1	1.4

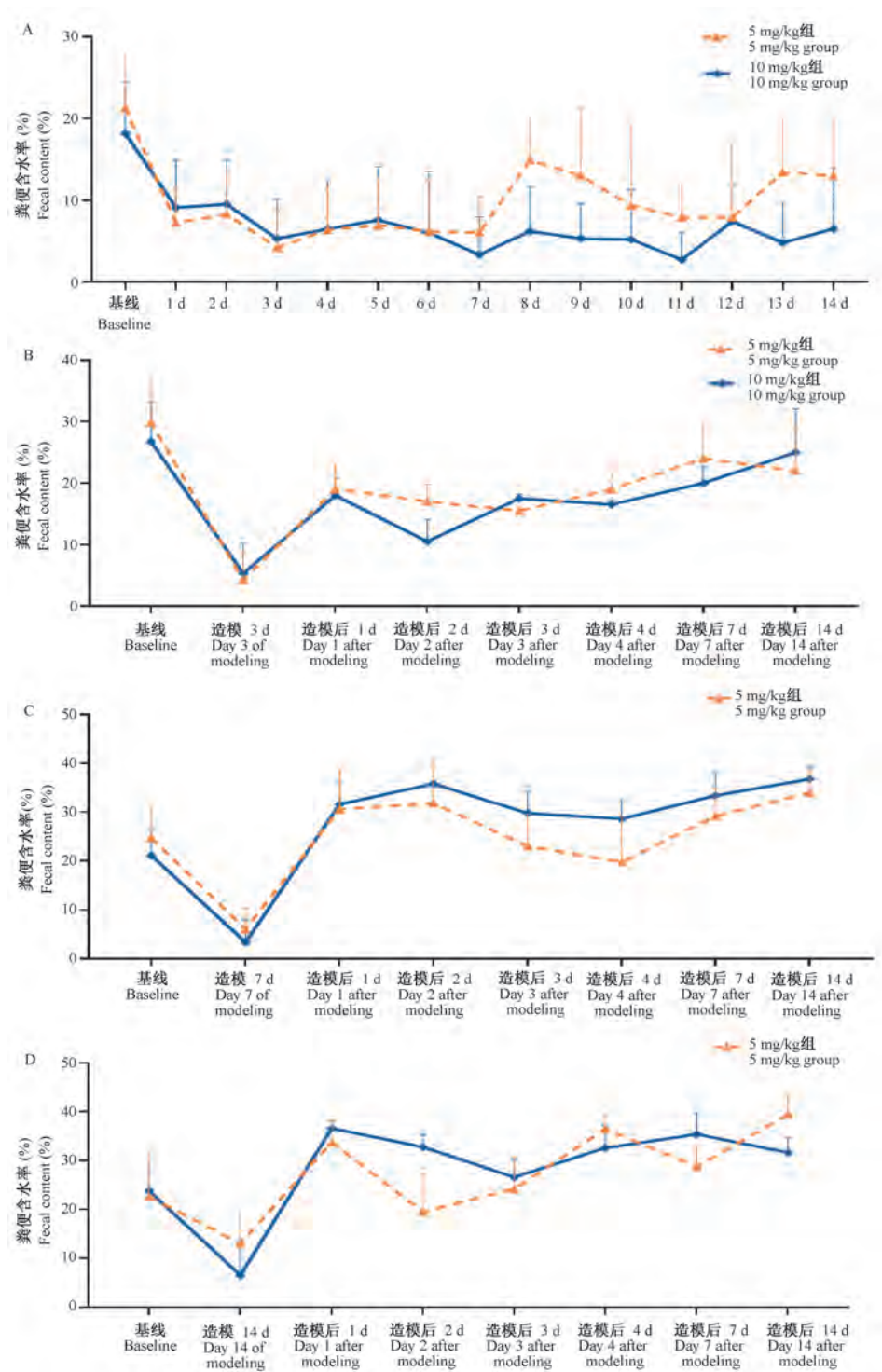


注:A:洛哌丁胺给药天数;B:洛哌丁胺给药频率;C:洛哌丁胺给药方式。

图 3 洛哌丁胺频率、剂量及给药方式

Note. A. Days of loperamide administration. B. Frequency of loperamide administration. C. Administration of loperamide administration.

Figure 3 Frequency, dose and administration of loperamide



注:A:5 mg/kg 组及 10 mg/kg 组造模 14 d 含水率趋势图;B:5 mg/kg 组及 10 mg/kg 组造模 3 d 后含水率恢复趋势图;C:5 mg/kg 组及 10 mg/kg 组造模 7 d 后含水率恢复趋势图;D:5 mg/kg 组及 10 mg/kg 组造模 14 d 后含水率恢复趋势图。

图 4 5 mg/kg 组及 10 mg/kg 组含水率趋势图

Note. A. Water content trend chart of the 5 mg/kg group and 10 mg/kg group at 14 days after modeling. B. Water content trend chart of 5 mg/kg group and 10 mg/kg group after 3 days of modeling. C. Water content trend chart of 5 mg/kg group and 10 mg/kg group 7 days after modeling. D. Water content trend chart of 5 mg/kg group and 10 mg/kg group after 14 days of modeling.

Figure 4 Water content trend of 5 mg/kg group and 10 mg/kg group

2.2 验证性实验研究结果

2.2.1 便秘小鼠粪便含水率情况

如表 3、表 4 及图 4A 所示,从造模第 1 天开始,各模型组与空白组对比含水率明显下降($P < 0.05$),5 mg/kg 组与 10 mg/kg 组在前 6 d 含水率差异不明显,但第 7 天至第 14 天期间,10 mg/kg 组含水率与 5 mg/kg 组对比显著降低($P < 0.05$)。

从造模 3、7、14 d 后含水率恢复情况看,各模型组含水率均随恢复天数的增加,含水率呈先增加后减少再增加的趋势,到 14 d 恢复期时,造模 3 d 各模型组与基线期相比无统计学意义($P > 0.05$),造模 7、14 d 各模型组与基线期相比含水率显著升高($P < 0.05$),但组间差异不明显($P > 0.05$) (图 4B、4C、4D)。

表 3 便秘小鼠造模前 5 d 粪便含水率 [M(P25,P75)]

Table 3 Fecal moisture content of constipated mice 5 days before membrane formation [M(P25,P75)]						
组别 Groups	基线 Baseline	造模第 1 天 Day 1 of modeling	造模第 2 天 Day 2 of modeling	造模第 3 天 Day 3 of modeling	造模第 4 天 Day 4 of modeling	造模第 5 天 Day 5 of modeling
空白组 Blank group	11.31(5.15,14.68)	18.00(15.21,23.89)	9.54(6.87,19.47)	18.24(13.42,23.29)	22.19(17.54,29.89)	7.98(4.47,22.35)
5 mg/kg 组 5 mg/kg group	24.00(20.38,30.61)	7.68(4.39,9.81) **	8.44(2.11,9.19) *	2.68(0.45,3.79) **	2.27(0.00,8.28) **	4.21(0.71,15.46) *
10 mg/kg 组 10 mg/kg group	14.48(11.03,24.28)	4.56(3.71,12.54) **	7.43(4.20,8.50)	4.75(1.25,7.31) **	7.98(2.93,13.05) **	6.27(1.78,13.32)

注:与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 便秘小鼠造模后 9 d 粪便含水率 [M(P25,P75)]

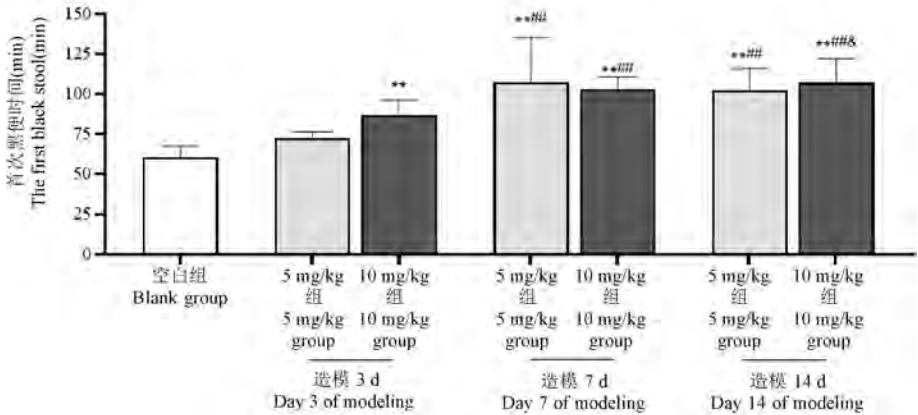
Table 4 Fecal moisture content of constipated mice 9 days after membrane formation [M(P25,P75)]					
组别 Groups	造模第 6 天 Day 6 of modeling	造模第 7 天 Day 7 of modeling	造模第 8 天 Day 8 of modeling	造模第 10 天 Day 10 of modeling	造模第 14 d Day 14 of modeling
空白组 Blank group	17.71(10.23,20.17)	17.74(12.54,21.49)	25.22(8.18,28.11)	20.39(16.54,21.98)	24.50(17.03,31.79)
5 mg/kg 组 5 mg/kg group	2.55(0.00,7.81)	6.26(1.28,8.22) **	16.89(13.86,18.20)	6.24(0.00,10.95)	13.07(10.10,20.77)
10 mg/kg 组 10 mg/kg group	5.48(0.00,13.01) *	3.48(0.00,5.25) ##	6.07(0.92,12.39) **##	2.20(0.00,11.91) **	0.00(0.00,14.08) **

注:与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 5 mg/kg 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。
Note. Compared with blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with 5 mg/kg group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

2.2.2 便秘小鼠首次黑便时间情况

如图 5 所示,除 5 mg/kg 造模 3 d 组外,其余各组首次黑便时间与空白组对比均升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。造模 7、14 d 的各模型组与

5 mg/kg 造模 3 d 组相比首次黑便时间明显升高($P < 0.01$)。10 mg/kg 造模 14 d 组与 10 mg/kg 造模 3 d 组相比增加明显($P < 0.05$)。其余各组差异均无统计学意义($P > 0.05$)。



注:与空白组相比, ** $P < 0.01$;与 5 mg/kg 造模 3 d 组相比, ## $P < 0.01$;与 10 mg/kg 造模 3 d 组相比, & $P < 0.05$ 。

图 5 便秘小鼠首次黑便时间 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. Compared with blank group, ** $P < 0.01$. Compared with 5 mg/kg group for 3 days, ## $P < 0.01$. Compared with 10 mg/kg group for 3 days, & $P < 0.05$.

Figure 5 Time of the first black stool in constipated mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.2.3 便秘小鼠小肠推进率情况

如图 6 显示,5 mg/kg 造模 3 d 组小肠推进率与空

白组对比有下降的趋势,但差异不明显($P > 0.05$)。其余各组间对比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

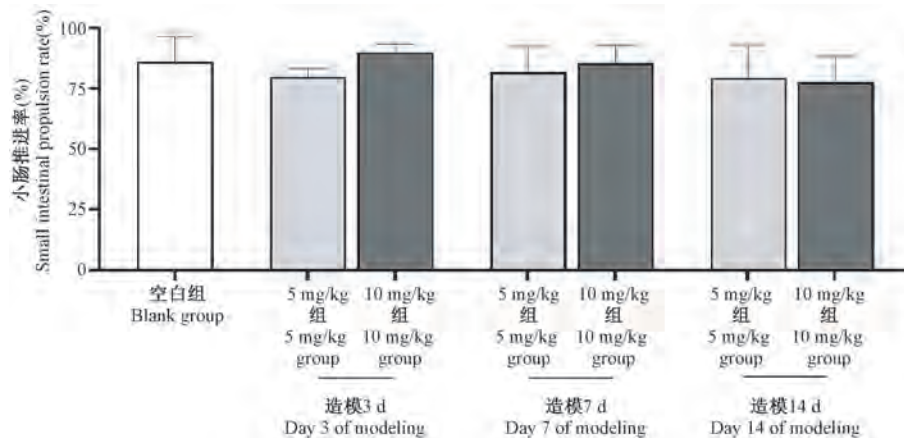


图 6 便秘小鼠小肠推进率($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Figure 6 Small intestinal propulsion rate of constipated mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

便秘尤其是阿片类药物引起的便秘患病率逐年上升,其发病机制及治疗方法还需进一步研究,因此建立符合人类便秘病理生理特点并且稳定的动物模型至关重要。研究显示,小鼠常用于观察排便实验及胃肠运动^[13]。因此本文通过文献研究与实验研究相结合的方式,统计洛哌丁胺诱导便秘使用的小鼠特征及药物剂量、给药方式及时间后,进行洛哌丁胺诱导便秘小鼠的稳定性实验研究,以期寻找更为稳定的洛哌丁胺诱导便秘小鼠模型。洛哌丁胺为临床上常用抗腹泻药物,是 μ -阿片受体的激动剂,可阻止乙酰胆碱和前列腺素的释放^[14],从而抑制肠道水分分泌^[15],减缓肠道蠕动并延长其内容物通过时间^[16]。同时动物应用洛哌丁胺造模后耐受良好,且粪便干硬,含水率降低,肠道传输时间增加^[17]。因此洛哌丁胺符合临床便秘患者的生理病理特点,可诱导便秘动物模型。但洛哌丁胺制备便秘模型时,给药剂量、方式及时间多样,且易出现药物平台期^[18],模型稳定性不高^[9],并且针对小鼠的稳定性研究较少。因此,研究洛哌丁胺有效给药剂量、方式、时间、及便秘小鼠模型制备稳定性很有必要。

动物模型的建立与品系、性别及年龄等动物特征密切相关。本研究显示,目前在洛哌丁胺诱导便秘小鼠模型的研究中,常用的小鼠品系为 KM 小鼠与 ICR 小鼠,两者同属封闭群小鼠,均具有经济易得的特点^[19]。而 BALB/c 小鼠与 C57BL/6 小鼠也

运用较多,两者均为近交系小鼠,具有高度的遗传稳定性和基因同源性,在实验研究中易于重复和比较^[20]。同时本研究统计发现大多实验常选用雄性动物,这可避免雌性大鼠的激素产生的复合效应影响实验结果^[21]。最后小鼠年龄与便秘模型也密切相关,有研究显示老年小鼠可因结肠运动迟缓引起便秘^[22],本研究文献分析也显示,大多数研究均采用 6 ~ 8 周龄的性成熟小鼠。因此考虑到实验的可重复性和稳定性,本研究实验部分选择了 6 ~ 8 周龄的雄性 C57BL/6 型小鼠进行实验。

本研究统计分析发现,小鼠常用洛哌丁胺给药剂量为:10、5 mg/kg,给药方式为灌胃,而结合给药频率及造模天数来看,小鼠常用频率为给药 1 次、每日 1 次,常用造模时间为 30 min。因此从文献中发现,大多数实验采取干预结束后立即进行洛哌丁胺灌胃的方式,以避免小鼠造模后出现自愈,但多用于即时效应实验如药物研究中^[23-25],其他需长期干预如针灸等实验则不适用。因此还需进行相关动物实验来观察洛哌丁胺不同给药浓度及时间的造模效果,以研究其稳定性。值得注意的是,团队在前期预实验中,参照研究^[18]加入了 50 mg/kg 的浓度进行对比,但造模 3 d 死亡率高达 80%,考虑为洛哌丁胺药物毒性导致小鼠出现死亡^[26]。因此本实验研究选择了更为安全且运用最多的 5 mg/kg(造模期间死亡率 15%)、10 mg/kg(造模期间死亡率 10%)两个不同浓度对比,采取文献中运用较多的每日 1 次及灌胃的方式,同时观察连续造模 14 d 的含水率及其 3、7、14 d 造模后的含水率恢复情况、首次

黑便时间及小肠推进率,以进一步研究其模型稳定性。

本研究中实验部分对比 5、10 mg/kg 两个给药浓度发现,造模第 1 天,各模型组含水率均较空白组明显下降($P < 0.05$),而造模第 3 天时各造模组含水率为前 7 d 最低,且各模型组间无明显差异($P > 0.05$)。但从造模第 7 天开始至第 14 天,总体来看 5 mg/kg 组与 10 mg/kg 组相比含水率明显增加($P < 0.05$)。从首次黑便时间来看,10 mg/kg 组造模 3 d 与空白组对比明显上升($P < 0.05$),而连续给药 7、14 d 对比空白组及给药 3 d 组均明显上升,但组间差异不明显。以上均说明,洛哌丁胺造模 1 d 即可出现明显便秘症状,但造模 7 d 后易出现药物作用平台期,随着造模时间增加,其对肠道水分分泌及蠕动的抑制作用反而减弱,而 5 mg/kg 组对比 10 mg/kg 组更易出现药物平台期。从小鼠造模后恢复情况来看,各模型组的含水率均在停止造模 1 d 后增加至较高水平,直到停药后 14 d,含水率均保持在较高水平。说明以 5、10 mg/kg 的洛哌丁胺浓度灌胃小鼠停药后,便秘症状均可自愈,这与文献报道一致^[9]。从小肠推进率来看,各模型组与空白组相比无统计学差异,组间差异也不显著,有可能是药物浓度还不足以使其产生阳性反应,这与之前研究一致^[18]。总之,鉴于本研究中观察到的小鼠自愈性及洛哌丁胺药物平台期的结果,建议长期干预实验可予以小鼠 10 mg/kg 的洛哌丁胺浓度灌胃,于造模 3 d 检查模型效果后进行干预,同时继续灌胃洛哌丁胺以维持模型稳定性。

综上,结合文献及实验研究发现,为维持便秘模型稳定性,进行即时效应实验时可在干预后予以小鼠灌胃洛哌丁胺 1 次进行便秘造模,药物浓度选择 5 mg/kg 或 10 mg/kg 均可。而进行需长期干预的实验时,可选择 10 mg/kg 的洛哌丁胺浓度灌胃,造模 3 d 后可进行干预,在干预的同时继续予以洛哌丁胺灌胃。本文对洛哌丁胺诱导便秘小鼠造模方法做一概述,同时对其模型稳定性进行了研究,以为建立科学稳定的便秘小鼠模型提供依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Hassan I, Pemberton JH, Young-Fadok TM, et al. Ileorectal anastomosis for slow transit constipation: long-term functional and quality of life results [J]. J Gastrointest Surg, 2006, 10(10): 1330-1337.
- [2] Sperber AD, Bangdiwala SI, Drossman DA, et al. Worldwide prevalence and burden of functional gastrointestinal disorders, results of rome foundation global study [J]. Gastroenterology, 2021, 160(1): 99-114.
- [3] Watanabe T, Nakaya N, Kurashima K, et al. Constipation, laxative use and risk of colorectal cancer: The Miyagi Cohort Study [J]. Eur J Cancer, 2004, 40(14): 2109-2115.
- [4] Leung L, Riutta T, Kotecha J, et al. Chronic constipation: an evidence-based review [J]. J Am Board Fam Med, 2011, 24(4): 436-451.
- [5] Ford AC, Brenner DM, Schoenfeld PS. Sa1150 efficacy of pharmacological therapies for the treatment of opioid-induced constipation: systematic review and Meta-analysis [J]. Gastroenterol, 2013, 108(10): 1566-1574.
- [6] Cook SF, Lanza L, Zhou X, et al. Gastrointestinal side effects in chronic opioid users: results from a population-based survey [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2010, 27(12): 1224-1232.
- [7] 王萍, 方晓艳, 苗明三. 基于中西医临床病证特点的便秘动物模型分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20): 200-205.
- [8] Wang P, Fang XY, Miao MS. Analysis of animal models of constipation based on the characteristics of clinical symptoms of traditional Chinese and Western medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(20): 200-205.
- [9] Baker DE. Loperamide: a pharmacological review [J]. Rev Gastroenterol Disord, 2007, 7: 11-18.
- [10] 黄亚娟, 蒋士生, 向燕芳. 洛哌丁胺对大鼠慢传输型便秘模型的稳定性研究 [J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(7): 153-156.
- [11] Huang YJ, Jiang SS, Xiang YF. Effect of loperamide on the stability of the rat model of slow transit constipation: An experimental study [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2020, 36(7): 153-156.
- [12] Williams JT, Ingram SL, Henderson G, et al. Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance [J]. Pharmacol Rev, 2013, 65(1): 223-254.
- [13] 陶至立, 陈慧娟. 数据挖掘在中医证候研究中的应用进展 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(6): 91-95.
- [14] Tao ZL, Chen HJ. Advances in application of data mining in TCM syndrome research [J]. Shanghai J TCM, 2021, 55(6): 91-95.
- [15] 刘彦培, 刘恩顺. 医学数据挖掘综述 [J]. 光明中医, 2018, 33(12): 1714-1716.
- [16] Liu YP, Liu ES. A survey of medical data mining [J]. Guangming J Chin Med, 2018, 33(12): 1714-1716.
- [17] 王岚, 彭成. 便秘动物模型的研究进展 [J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(2): 174-176.
- [18] Wang L, Peng C. Research progress of animal models of constipation [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2007, 24(2): 174-176.
- [19] Wang L, Hu L, Xu Q, et al. Bifidobacterium adolescentis exerts strain-specific effects on constipation induced by loperamide in BALB/c mice [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 318.

- [15] Hughes S, Higgs NB, Turnberg LA. Loperamide has antisecretory activity in the human jejunum *in vivo* [J]. Gut, 1984, 25(9): 931-935.
- [16] 国家药典委员会. 临床用药须知 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2005.
National Pharmacopoeia Commission. Clinical medication instructions [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2005.
- [17] Yin J, Liang Y, Wang D, et al. Naringenin induces laxative effects by upregulating the expression levels of c-Kit and SCF, as well as those of aquaporin 3 in mice with loperamide-induced constipation [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(2): 649-658.
- [18] 姚一博, 王迪, 王钱陶, 等. 盐酸洛哌丁胺诱导的小鼠慢传输型便秘模型的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 370-375.
Yao YB, Wang D, Wang QT, et al. Establishment of an oral mucositis model in golden hamsters by 5-fluorouracil combined with mechanical scratch [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 370-375.
- [19] 林健, 黄宗锈, 陈冠敏, 等. ICR 和昆明种小鼠生物法检测麻痹性贝类毒素毒性差异比较 [J]. 现代预防医学, 2011, 38(23): 4937-4938, 4942.
Lin J, Huang ZX, Chen GM, et al. Comparison of ICR and KM mice used in biological examination of paralytic shellfish poison [J]. Modern Prev Med, 2011, 38(23): 4937-4938, 4942.
- [20] 管彤, 徐渴. 野生小鼠的实验动物化及研究进展 [J]. 实验动物科学, 2020, 37(3): 69-72.
Guan T, Xu K. Experimental animalization and research progress of wild mice [J]. Lab Anim Sci, 2020, 37(3): 69-72.
- [21] Wang X, Yang B, Yin J, et al. Electroacupuncture via chronically implanted electrodes improves gastrointestinal motility by balancing sympathovagal activities in a rat model of constipation [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019, 16(6): G797-G805.
- [22] West CL, Amin JY, Farhin S, et al. Colonic motility and jejunal vagal afferent firing rates are decreased in aged adult male mice and can be restored by an aminosterol [J]. Front Neurosci, 2019, 13: 955.
- [23] Lee S, Cil O, Haggie PM, et al. 4, 8-Dimethylcoumarin inhibitors of intestinal anion exchanger slc26a3 (down-regulated in adenoma, DRA) for anti-absorptive therapy of constipation [J]. J Med Chem, 2019, 62(17): 8330-8337.
- [24] 祁秀玲, 陈俊荣, 于永军, 等. 香黄通便胶囊泻下作用的研究 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(11): 13-15.
Qi XL, Chen JR, Yu YJ, et al. Study on cathartic effects of Xianghuangtongbian Capsule [J]. Chin Med Herald, 2014, 11(11): 13-15.
- [25] Kakino M, Izuta H, Ito T, et al. Agarwood induced laxative effects via acetylcholine receptors on loperamide-induced constipation in mice [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(8): 1550-1555.
- [26] 赖根福, 雷招宝. 洛哌丁胺的不良反应与合理用药 [J]. 药学与临床研究, 2009, 17(4): 341-343.
Lai GF, Lei ZB. Adverse reactions and rational use of loperamide [J]. Pharm Clin Res, 2009, 17(4): 341-343.

[收稿日期] 2021-08-10

刘懿,田康利,夏聪聪,等. 不同体重对正常饮食下小鼠腹主动脉瘤进展影响的回顾性研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 57-63.

Liu Y, Tian KL, Xia CC, et al. Effects of different body weights on the progression of abdominal aortic aneurysm in chow diet feeding mice: a retrospective study [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 57-63.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.007

不同体重对正常饮食下小鼠腹主动脉瘤进展影响的回顾性研究

刘懿¹, 田康利¹, 夏聪聪¹, 刘浩乐¹, 付维来², 许杨威¹, 白亮¹, 刘恩岐¹, 赵四海^{1*}

(1. 西安交通大学医学部实验动物中心, 西安 710061; 2. 天津医科大学第二医院血管外科, 天津 300211)

【摘要】 目的 分析正常饮食情况下,术前体重对猪胰弹性蛋白酶(PPE)诱导的小鼠腹主动脉瘤进展的影响。**方法** 回顾分析本实验室最近半年44例PPE诱导的小鼠腹主动脉瘤模型中,术前不同体重对后期腹主动脉直径和腹主动脉瘤进展的影响,分析两者的相关性。对术前体重低于25 g的8例入选小鼠(模型组1)和术前体重高于30 g的8例入选小鼠(模型组2)进行体重、脂肪分布、腹主动脉直径、腹主动脉直径变化、腹主动脉瘤病变组织学和免疫组织化学比较。正常阴性对照小鼠未给与任何处理。**结果** 44例小鼠腹主动脉瘤血管直径和术前体重的相关系数为0.005,未发现体重对腹主动脉瘤进展有显著影响。进一步分析发现,模型1组和模型2组在术后14 d血管直径(1.35 mm vs 1.27 mm)和血管直径变化上(0.85 mm vs 0.72 mm)差异没有显著性。相比正常血管,模型组1和模型组2小鼠在术后14 d,腹主动脉肾下灌注段直径显著增加,全部形成动脉瘤。组织学呈弹性纤维断裂、平滑肌细胞耗竭、炎症反应增加和血管新生异常等典型的腹主动脉瘤病变特征。**结论** 在正常饮食小鼠,体重未见影响腹主动脉瘤的进展。

【关键词】 体重;腹主动脉瘤;猪胰弹性蛋白酶;免疫组织化学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)01-0057-07

Effects of different body weights on the progression of abdominal aortic aneurysm in chow diet feeding mice: a retrospective study

LIU Yi¹, TIAN Kangli¹, XIA Congcong¹, LIU Haole¹, FU Weilai², XU Yangwei¹, BAI Liang¹, LIU Enqi¹, ZHAO Sihai^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710061, China.

2. Department of Vascular Surgery, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211)

Corresponding author: ZHAO Sihai. E-mail: sihaizhao@xjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective This study aimed to analyze the effect of preoperative body weight on the progression of porcine pancreatic elastase (PPE)-induced abdominal aortic aneurysm (AAA) in mice fed a normal diet. **Methods** We retrospectively analyzed the association of preoperative body weight and postoperative abdominal aortic diameter in 44 PPE-induced abdominal aortic aneurysm mouse models in our laboratory. Sixteen mice, divided into group 1 ($n=8$, preoperative weight less than 25 g) and group 2 ($n=8$, preoperative weight of more than 30 g) were chosen for the following analysis. The body weight, fat distribution, abdominal aorta diameter and diameter changes of all mice were analyzed. Comparative analysis of histology and immunohistochemistry of AAA lesions was conducted among group 1, group 2 and normal control animals. The normal control mice were free of surgery. **Results** The correlation coefficient between the aortic diameter and preoperative body weight was 0.005 (using the 44 included mice). No significant influence of body weight was found on the

【基金项目】 陕西省自然科学基金资助(2020PT-004,2020PT-007),国家自然科学基金(82070470)。

Funded by the Shaanxi Province Natural Science Foundation (2020PT-004, 2020PT-007), the National Natural Science Foundation of China (82070470).

【作者简介】 刘懿(1986—),女,在读硕士研究生,研究方向:心血管病理学。Email: liuyi619@stu.xjtu.edu.cn

【通信作者】 赵四海(1980—),男,教授,博士,研究方向:心血管疾病动物模型。Email: sihaizhao@xjtu.edu.cn

progression of AAA in mice fed a normal diet in this study. Further analysis found that there were no significant differences in the abdominal aortic diameter (1.35 mm vs 1.27 mm) and diameter changes (0.85 mm vs 0.72 mm) between the model groups 1 and 2 at day 14 after the surgery. Compared with normal control mice, PPE-treated mice in model groups 1 and 2 had a significant increase in the diameter of the infrarenal aorta at postoperative day 14, and all formed aneurysms. Histological observations showed typical AAA lesion features, such as elastic fiber breakage, smooth muscle exhaustion, increased inflammation and abnormal angiogenesis. **Conclusions** Body weight was not associated with the progression of PPE-induced AAA in mice fed a normal diet.

【Keywords】 body weight; abdominal aortic aneurysm; porcine pancreatic elastase; immunochemistry

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

腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)是指各种致病危险因素引起的腹主动脉局部扩张,导致动脉直径超过正常值的 50%^[1-2]。AAA 的危险因素主要包括了吸烟、年龄、性别、家族遗传史和高血压等,其最终发病是遗传因素和生活习惯共同引起^[3]。由于目前提供给动脉瘤病人的有效的药物治疗措施尚未建立,外科治疗仍是目前有效治疗手段^[2,4-5]。各种原因导致的突发动脉瘤破裂死亡率可达到 80%以上,很多病人没有来的及入院或在入院不久死亡,AAA 已经成为一种严重影响人们健康的疾病^[1-4]。随着我国社会的快速发展,国人肥胖或者亚肥胖人数在逐渐增加,而超重和很多疾病,包括动脉粥样硬化和糖尿病等,都呈现出正相关,已经成为一个重要的疾病危险因素^[6-8]。虽然 AAA 和动脉粥样硬化都是常见的外周血管病,但两者在发病机制上很多不同,关于超重/肥胖是否也可以促进 AAA 进展,目前临床数据分析结果不一致,尚未有定论^[9-11]。在实验室,模拟 AAA 的动物模型有多种,包含猪胰弹性蛋白酶(porcine pancreatic elastase, PPE)灌注法、血管紧张素(Angiotensin II, Ang II)输注法和氯化钙涂抹法等,而前两种方法又更为常用^[12-14]。有研究显示,通过高脂饮食诱导的超重或肥胖可以促进 Ang II 诱导的小鼠 AAA 的形成,提升该方法的成模率^[15]。在实际工作中,饲喂正常饮食情况下,即使是相近周龄的近交系小鼠,由于母鼠产仔个数、营养和后天发育的差别,体重也不尽相同,是否不同体重也会影响 AAA 的造模成功率和疾病进展? 为了回答该问题,我们回顾性分析了本实验室 2021 年以来用作对照组的 PPE 诱导的 AAA 模型小鼠,探究体重是否可以影响 AAA 的发展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究所用 45 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠

(模型组 44 只,正常对照组 1 只用于组织学观察),10 ~ 14 周龄,体重 24 ~ 32 g,均来自于西安交通大学实验动物中心【SCXK(陕)2018-001】。饲养于西安交通大学实验动物中心【SYXK(陕)2020-005】,饲养期间各组小鼠自由饮水,饮食。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22 ~ 25℃。所有操作均符合西安交通大学实验动物伦理学要求(审批号:2019-1178)。

1.1.2 主要试剂与仪器

PPE(Sigma, E1250)用 PBS 配置成 1.5 U/mL 工作液。平滑肌细胞 α -actin 抗体(Novus Biologicals, NB300-978),巨噬细胞(CD68)抗体(BioLegend, 137002),CD31 抗体(BioLegend, 100402),MMP-2 抗体(R&D Systems, AF1488),MMP-9 抗体(R&D Systems, AF909),生物素标记羊抗大鼠二抗(VECTOR, BA-9400),生物素标记驴抗羊二抗(Jackson ImmunoResearch, 705-065-003),链霉亲和素-辣根过氧化物酶偶联物(Jackson ImmunoResearch, 016-030-084),AEC 试剂盒(VECTOR, SK-4200),苏木素伊红(HE)染液(武汉赛维尔生物科技有限公司, G1005),冷冻包埋剂 OCT(SAKURA, 4583),其他试剂均为国产分析纯,弹力纤维染液为国产相关试剂配制。

手术显微镜(上海玉研,型号:YAN-4A);手术显微镜照相机(麦克奥迪,型号:ProS5 Lite);冰冻切片机(Leica,型号:CM1950);生物显微镜(Nikon,型号:80i);生物显微镜照相机(Olympus,型号:DP72)和图像分析软件(Mitani, WinRoof 6.5),图表制作和数据分析软件(Prism7.0)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

回顾性分析本实验室 2021 年 1 月以来 44 只 PPE 诱导的 AAA 小鼠模型体重和成瘤后腹主动脉直径数据,先用 Prism 7.0 进行两者相关性回归分

析。然后根据小鼠体重分布(23.9 ~ 32.1 g),将正常饮食小鼠根据体重筛选出两组,纳入体重 < 25 g 的小鼠作为模型 1 组(正常饮食体重较轻者, $n=8$)和体重>30 g 的小鼠作为模型 2 组(正常饮食体重较重者, $n=8$)。PPE 诱导小鼠 AAA 模型方法如下:小鼠称重后,转入到诱导麻醉盒中做术前预麻醉。小鼠麻醉后,转移至手术平台,继续面罩吸入麻醉。将小鼠取仰卧位固定,脱毛剂去掉腹部被毛,手术区皮肤用碘酒消毒,腹部正中切开长约 2 ~ 3 cm,拨开腹腔内容物,暴露肾下腹主动脉至髂动脉分叉处,结扎侧支血管,游离出准备灌注的腹主动脉段。手术段腹主动脉放置 3 根 8-0 丝线,上下游活结结扎。用 8-0 缝合针头在髂动脉分叉结扎线临近处扎破血管,清理溢出血液,用显微手术镊将套管(PE-10)经血管刺破口处插入动脉。中游结扎线结扎固定插管后,注射泵迅速注射约 30 μ L PPE,灌注持续 5 min 后,拔出插管,11-0 丝线缝合动脉切口,重建下肢血流,关闭腹腔。术后将小鼠笼盒放于温暖环境保暖,待小鼠活动正常后放回饲养室,整个手术过程在体式显微镜下完成。

1.2.2 动脉直径测量及取材

对于接受手术并进行 PPE 灌注的小鼠,术前(记为 0 d)及术后 14 d 用显微镜照相机进行腹主动脉拍照和直径测量。根据镜下观察和动脉直径测量结果,血管直径扩张超过 50% 以上判定为 AAA。术后 14 d 后安乐死小鼠,取 AAA 段血管,新鲜组织用 OCT 包埋,冰冻切片连续切片(5 μ m)备用。分离小鼠皮下、附睾周围和背部脂肪,称取组织湿重。

1.2.3 腹主动脉瘤病变组织学检测和分析

组织切片分别进行 HE、弹力纤维和 Masson 染色,免疫组织化学染色采用生物素-链霉亲和素过氧化物酶法,包括血管平滑肌细胞、巨噬细胞、新生血管、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)和 MMP-9 染色。在进行组织学评价中,从轻度到重度分为四个级别(I-IV)进行评价。以弹力纤维破坏为例, I 级:弹力纤维层破坏和血管平滑肌细胞减少等损伤仅局限于 1 层弹力纤维层; II 级:损伤涉及两层或全部,但仅限于 1/4 血管; III 级:损伤涉及所有弹力纤维层,但仅限于 1/2 血管以下; IV 级:损伤涉及所有弹力纤维层并延伸至 3/4 血管以上。平滑肌细胞耗竭和巨噬细胞染色阳性细胞数量显示血管壁炎症反应程度,可

根据浸润的面积和部分分为 4 个级别(I-IV),其标准同上。对于外膜血管新生(CD31 标记)采用镜下计数新生血管数量的方法分析、MMP-2 和 MMP-9 的免疫组织化学染色结果利用软件计算阳性着色面积。

1.3 统计学分析

结果用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据采用 GraphPad Prism 7.0 进行统计学分析,两组比较数据先进行正态检验,符合正态检验情况下采用两组均数 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 小鼠体重与 AAA 成瘤和血管直径变化的相关性分析

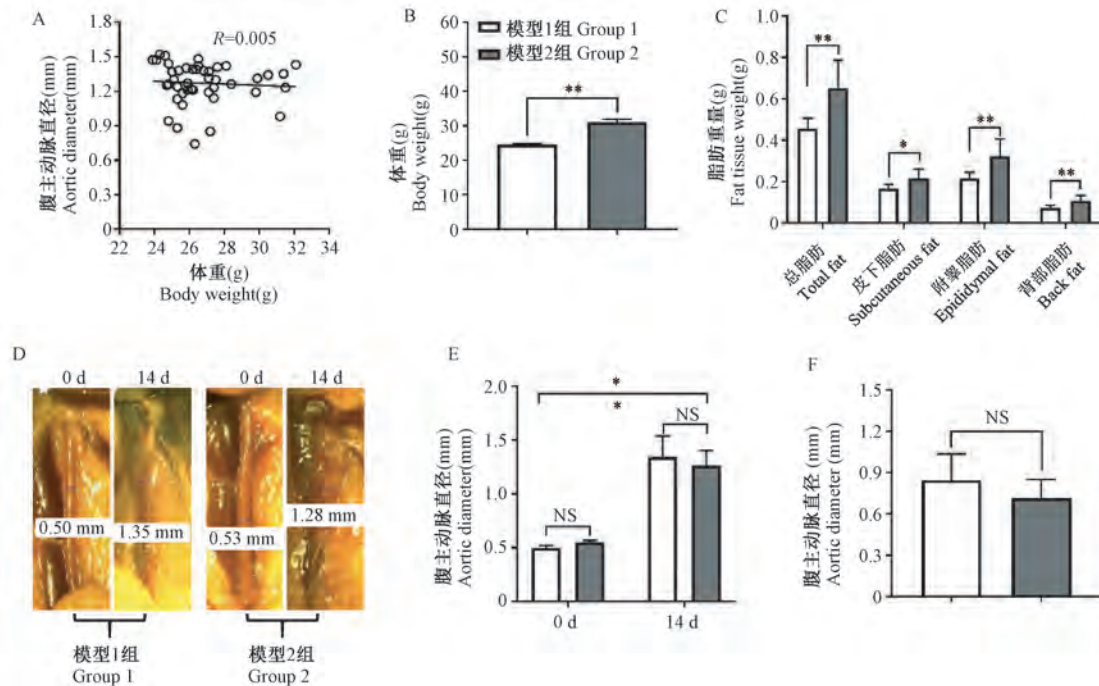
如图 1A 所示,我们回顾性分析纳入了本实验室 2021 年 1 月以来 44 只 PPE 诱导的 AAA 小鼠模型体重和成瘤后腹主动脉直径数据,然后进行相关性分析发现术前体重和术后血管扩张程度相关系数只有 0.005,相关系数较低。根据体重将纳入小鼠分为体重偏轻的模型 1 组和体重较大的模型 2 组,两组平均体重分别为 24.5 g 和 31.1 g(图 1B)。PPE 灌注手术后 14 d,分离小鼠不同部位脂肪,称取湿重发现两组小鼠在不同部位脂肪重量均有显著性差异(图 1C)。进一步分析术后血管直径,可以看到两组小鼠在 PPE 灌注手术后 14 d 均出现了灌注段血管扩张,模型 1 组平均从 0.50 mm 左右扩张到 1.35 mm,模型 2 组平均从 0.55 mm 左右扩张到 1.27 mm(图 1D)。两组小鼠血管直径相比术前均有显著性差异,达到血管瘤诊断标准,但相同时间节点上,两组小鼠血管直径差异不大,未见体重对 AAA 成瘤有大的影响(图 1E)。同样,我们也分析了两组小鼠血管直径变化的情况,将手术后 14 d 血管直径减去术前直径,两组小鼠血管直径变化的差异也不显著(图 1F)。

2.2 不同体重小鼠 AAA 组织学比较

如图 2 所示,正常血管镜下可见结构清晰,平滑肌细胞排列整齐,弹力纤维连续整齐。两组 PPE 模型小鼠的血管腔明显扩大,平滑肌细胞着色变浅,甚至消失,可见明显的炎症细胞弥散性浸润,血管结构紊乱。两组小鼠在具体病变特征上差异不大,均呈现血管腔增大、血管结构改变和炎症细胞浸润

特征。正常血管弹力纤维染色一般可见小鼠腹主动脉有 4 层左右的弹力纤维层,弹力纤维呈现规律性的弯曲。PPE 模型小鼠弹力纤维破坏较为严重,中膜弹力纤维多断裂、退行性变、甚至消失或只留

下残迹,经组织学评分,本实验模型 1 组 8 只小鼠中,2 只评分为 III 级,6 只评分为 IV 级;模型 2 组 8 只小鼠中,3 只评分为 III 级,5 只评分为 IV 级,损伤涉及所有弹力纤维层。



注:A:腹主动脉直径和体重相关性分析;B:两组小鼠体重;C:两组小鼠脂肪分布比较;D:血管代表性图片;E:两组小鼠腹主动脉直径;F:两组小鼠腹主动脉直径变化;与模型组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$;NS,统计没有显著性。

图 1 正常饮食小鼠体重与腹主动脉瘤直径相关性分析

Note. A. Correlation analysis between AAA diameter and body weight. B. Body weight. C. Fat tissue weight. D. Representative pictures of AAA. E. Diameter of abdominal aorta before and after surgery. F. Aortic diameter change. Compared with group 1, $*P < 0.05$, $**P < 0.05$. NS. Not significant.

Figure 1 Correlation analysis between body weight and AAA diameter in normal diet feeding mice

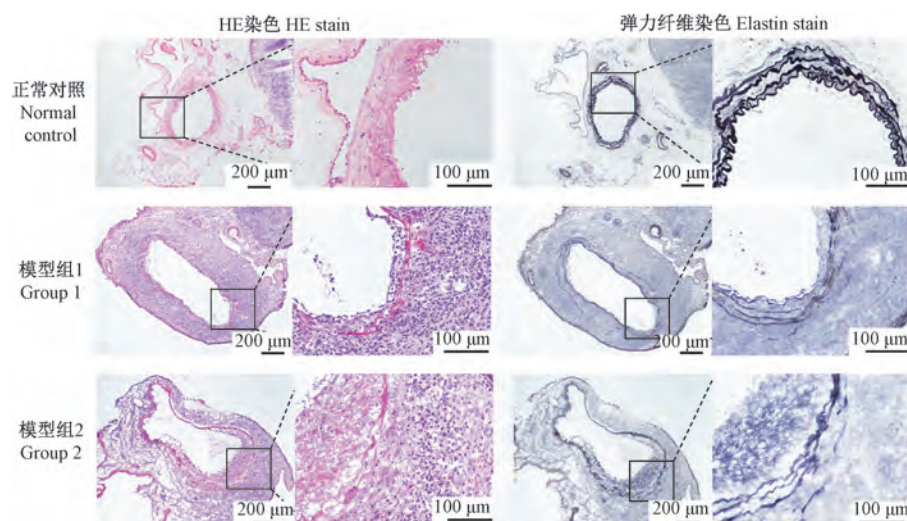


图 2 正常饮食下不同体重小鼠 AAA 组织学比较

Figure 2 Histological comparison of AAA in different body weight mice

2.3 不同体重小鼠 AAA 瘤体平滑肌细胞损耗和巨噬细胞浸润比较

以平滑肌 α -actin 标记平滑肌细胞,免疫组织化学染色结果显示正常血管平滑肌层呈现典型的环状结构着色,平滑肌细胞和弹性纤维排列规律(图 3)。相比于正常腹主动脉,PPE 灌注小鼠血管显示平滑肌细胞损耗殆尽,着色很浅。模型 1 组和模型 2 组差别不大,其中模型 1 组 8 只小鼠,有

1 只损伤评分为 III 级,7 只评分为 IV 级;模型 2 组有 2 只损伤评分为 III 级,6 只评分为 IV 级。和平滑肌细胞组织学评价结果类似,巨噬细胞(CD68 标记)浸润在两个模型组也非常严重,其中模型 1 组 8 只小鼠评分为 IV 级;模型 2 组有 1 只损伤评分为 III 级,7 只评分为 IV 级。正常血管巨噬细胞染色偶见阳性着色细胞,分析可能为血管局部定居的炎症细胞。

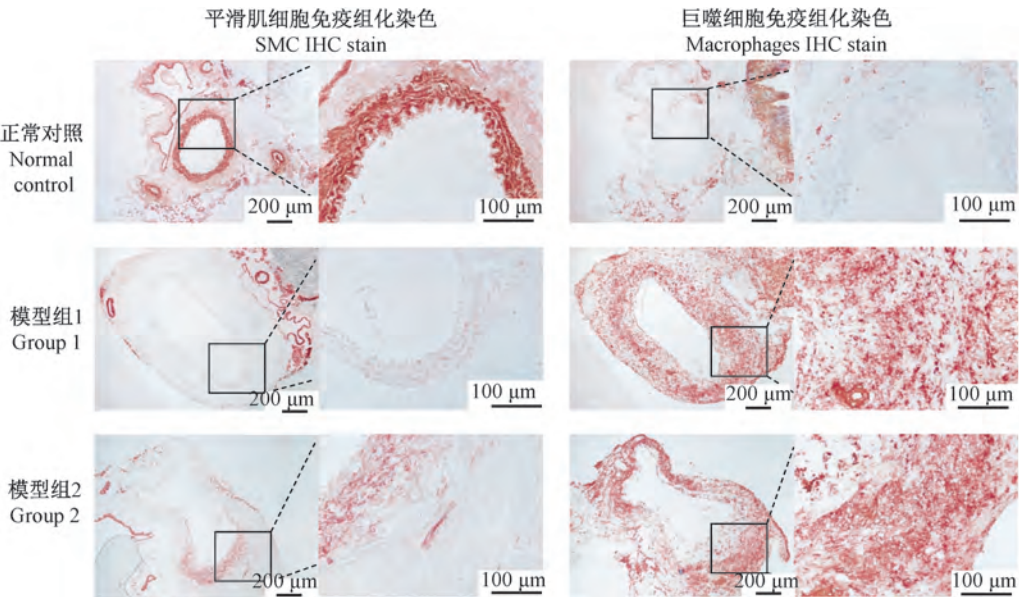


图 3 正常饮食下不同体重小鼠 AAA 组织平滑肌细胞和巨噬细胞染色
Figure 3 Immunohistochemical staining of smooth muscle cells and macrophages

2.4 不同体重小鼠 AAA 瘤体 MMP-2 和 MMP-9 表达比较

MMPs 在 AAA 起始和进展中扮演重要角色,在炎症反应和血管重塑等进程中均起到重要作用。如图 4 所示,正常血管的 MMP-2 和 MMP-9 表达很少,即使是血管周围定居的巨噬细胞等炎性细胞也

未见表达。相比于正常动脉血管,PPE 灌注小鼠腹主动脉瘤体组织 MMP-2 和 MMP-9 升高,其与炎症细胞浸润,尤其是巨噬细胞的浸润有很大关系,在表达位置上也多有重合,在血管重塑发挥着重要作用。但在不同体重小鼠,这两个基质金属蛋白酶表达水平差异并不显著。

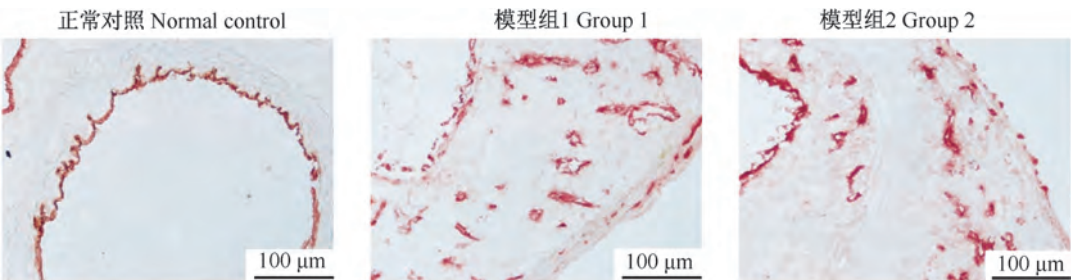


图 4 正常饮食下不同体重小鼠 AAA 组织 MMP-2 和 MMP-9 染色
Figure 4 Immunohistochemical staining of MMP-2 and MMP-9 in AAA tissues

2.5 不同体重小鼠 AAA 瘤体血管新生的比较

异常血管新生也是 AAA 的重要特征之一,血管新生异常在 AAA 进展中发挥了重要作用。如图 5 所示,用 CD31 标记血管内皮细胞,观察新生血管情况正常血管除管腔侧内皮着色外,血管其他部位未

见明显的新生血管。而在模型 1 组和模型 2 组小鼠,可见血管外膜有数量众多的新生血管,AAA 瘤体部位伴有异常血管新生。通过统计模型 1 组和模型 2 组新生血管的数量,模型 1 组稍多于模型 2 组,但无统计学差异。

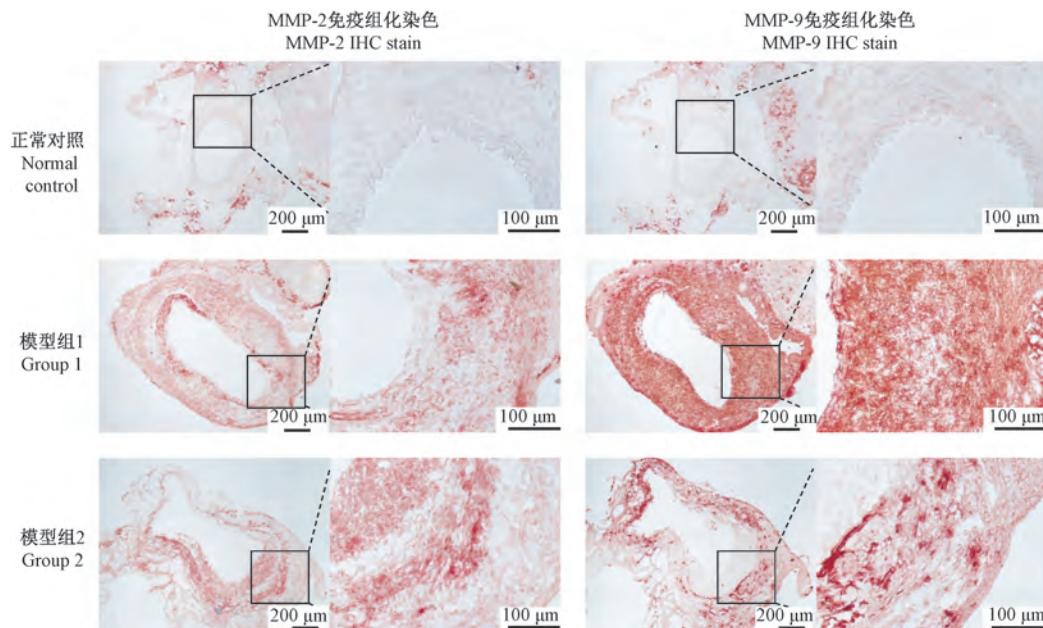


图 5 正常饮食下不同体重小鼠 AAA 组织血管新生观察

Figure 5 Angiogenesis in AAA tissues of normal diet feeding mice

3 讨论

在本研究中,我们通过回顾本实验 PPE 制备的 AAA 小鼠模型状况,专注分析了正常饮食下,体重这一因素在 AAA 进展中可能起到的作用。在 AAA 相关研究中,PPE 诱导模型是最常用的模型之一^[12-13]。相比其他模型,PPE 模型较好的模拟了炎症反应参与 AAA 进展的情况,而且弹力纤维断裂/降解和平滑肌细胞凋亡消失等组织学表现也很典型^[13,16]。一般来讲,可选用 8 周龄以上小鼠用 PPE 灌注来进行 AAA 造模,进而开展后续研究^[12,16]。文献报道超重和肥胖可以影响小鼠 AAA 的进展^[15]。在正常饮食饲养状态下,相同或相近周龄小鼠,其体重也有差异,是否在 AAA 造模的时候需要考虑体重这一因素的影响?为了回答这一问题,我们通过回顾本实验室数据,初步分析了在正常饮食情况下,小鼠体重差异对 PPE 诱导的 AAA 影响。分析结果显示两者相关性较小。

以往基于小鼠的研究认为肥胖可以促进夹层 AAA 的进展,所采用的模型是 Ang II 模型,该模型一般均伴随主动脉夹层^[13,17]。但在 Ang II 诱导的

模型中,高脂血症是必须的,但在人类,高脂血症和动脉瘤的关系仍未明确论^[17]。而 PPE 模型在野生型小鼠上即可诱导,不依赖于高脂血症,避免了这一混杂因素带来的困扰。流行病学研究对于肥胖或超重是否促进 AAA 进展,也仍未完全获得一致结论。在研究体重和 AAA 的关系上,只有腰臀比可能和 AAA 发展呈正相关^[9]。由于流行病学研究结果的不一致,超重或肥胖和腹主动脉瘤进展的关系尚需进一步明确^[9-11]。在本次研究中,虽然只是涉及到正常饮食的小鼠,在自然体重差异情况下,并未观察到体重差异对 AAA 的明显影响。这可能与 PPE 模型造模因素中不涉及血脂及其相关代谢变化有关。由于本回顾分析中纳入的均是正常饮食小鼠,两个模型组体重差异基本涵盖了 10~14 周龄小鼠正常体重的范围,结果证实体重正常范围内的差异对 AAA 的影响有限,这为我们在进行造模时候对动物体重的选择具有参考意义。

体重增加和糖尿病呈正相关,两者是相互促进的关系。但令人意外的是,越来越多的临床证据证明,糖尿病却对动脉瘤的进展起到抑制作用,而在动物实验也得到验证^[18-19]。在本实验中,我们未观

察到体重对 AAA 的明显影响,虽然统计学差异并不显著,体重小的模型 1 组在 PPE 造模后,其血管直径变化比体重较大的模型 2 组稍大一些。在本实验中,我们使用的是正常饮食小鼠,并未诱导肥胖,将来的实验中可以考虑尝试在肥胖小鼠中研究肥胖对 AAA 的影响。总之,本实验明确了正常饮食情况下,体重并未对 AAA 的形成和发展造成显著影响,正常范围内的体重差异不对 PPE 诱导小鼠 AAA 模型的稳定性造成困扰。

参 考 文 献 (References)

- [1] Golledge J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(4): 225–242.
- [2] Davis FM, Rateri DL, Daugherty A, et al. Abdominal aortic aneurysm: novel mechanisms and therapies [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2015, 30(6): 566–573.
- [3] Marcaccio CL, Schermerhorn ML. Epidemiology of abdominal aortic aneurysms [J]. *Semin Vasc Surg*, 2021, 34(1): 29–37.
- [4] Sakalihasan N, Michel JB, Katsargyris A, et al. Abdominal aortic aneurysms [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 34.
- [5] Bobadilla JL, Kent KC. Screening for abdominal aortic aneurysms [J]. *Adv Surg*, 2012, 46: 101–109.
- [6] Chandramouli C, Tay WT, Bamadhaj NS, et al. Association of obesity with heart failure outcomes in 11 Asian regions: a cohort study [J]. *PLoS Med*, 2019, 16(9): e1002916.
- [7] Zhang L, Wang Z, Wang X, et al. Prevalence of overweight and obesity in China: results from a cross-sectional study of 441 thousand adults, 2012–2015 [J]. *Obes Res Clin Pract*, 2020, 14(2): 119–126.
- [8] Gao M, Lv J, Yu C, et al. Metabolically healthy obesity, transition to unhealthy metabolic status, and vascular disease in Chinese adults: a cohort study [J]. *PLoS Med*, 2020, 17(10): e1003351.
- [9] Cronin O, Walker PJ, Golledge J, et al. The association of obesity with abdominal aortic aneurysm presence and growth [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 226(2): 321–327.
- [10] Wang L, Djousse L, Song Y, et al. Associations of diabetes and obesity with risk of abdominal aortic aneurysm in men [J]. *J Obes*, 2017: 3521649.
- [11] Apoloni RC, Zerati AE, Wolosker N, et al. Analysis of the correlation between central obesity and abdominal aortic diseases [J]. *Ann Vasc Surg*, 2019, 54: 176–184.
- [12] Krishna SM, Morton SK, Li J, et al. Risk factors and mouse models of abdominal aortic aneurysm rupture [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7250.
- [13] Sénémaud J, Caligiuri G, Etienne H, et al. Translational relevance and recent advances of animal models of abdominal aortic aneurysm [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(3): 401–410.
- [14] 吴献贤, 刘星, 张娜, 等. 醋酸脱氧皮质酮 (DOCA) 加高盐诱导动脉瘤发生发展的作用及潜在机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(1): 27–34.
- Wu XX, Liu X, Zhang N, et al. The role and potential mechanism of deoxycorticosterone acetate plus salt-induced aneurysm development [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(1): 27–34.
- [15] Police SB, Thatcher SE, Charnigo R, et al. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(10): 1458–1464.
- [16] Xu B, Iida Y, Glover KJ, et al. Inhibition of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)-A or its receptor activity suppresses experimental aneurysm progression in the aortic elastase infusion model [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(8): 1652–1666.
- [17] Liu J, Daugherty A, Lu H. Angiotensin II and abdominal aortic aneurysms: an update [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(28): 4035–4048.
- [18] Taimour S, Franzén S, Zarrouk M, et al. Nationwide comparison of long-term survival and cardiovascular morbidity after acute aortic aneurysm repair in patients with and without type 2 diabetes [J]. *J Vasc Surg*, 2020, 71(1): 30–38.
- [19] Miyama N, Dua MM, Yeung JJ, et al. Hyperglycemia limits experimental aortic aneurysm progression [J]. *J Vasc Surg*, 2010, 52(4): 975–983.

[收稿日期] 2021-08-21

严森森, 吕梦迪, 杨学思, 等. 硫辛酸合成酶低表达对小鼠抗氧化能力的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 64-69.
Yan SS, Lyu MD, Yang XS, et al. Effects of low expression of lipoic acid synthase on antioxidant capacity in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 64-69.
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.008

硫辛酸合成酶低表达对小鼠抗氧化能力的影响

严森森, 吕梦迪, 杨学思, 陶映君, 徐光翠, 赵英政*

(新乡医学院公共卫生学院, 河南 新乡 453003)

【摘要】 目的 建立一种硫辛酸合成酶基因低表达的基因修饰小鼠, 并检测其抗氧化能力。**方法** 将硫辛酸合成酶基因 3'-UTR 区域 Loxp 小鼠与 E2a-Cre 小鼠杂交, 从子代小鼠中鉴定出 *Lias*^{L/+} 小鼠并进一步繁殖、鉴定基因型。选取基因型为 *Lias*^{L/L} 和 *Lias*^{+/+} 的 8 周龄雄性小鼠各 10 只; 称重、麻醉后经股动脉采血, 然后分离小鼠肺、肾及肝, 并称重。应用 Western Blot、免疫组化方法检测肺、肾、肝组织中硫辛酸合成酶 (LIAS) 蛋白的表达水平; 分离血清, 检测总抗氧化能力 (TAC); 对肾、肝、肺匀浆后提取总蛋白, 检测其 SOD、CAT 酶活性及 MDA 含量。**结果** Western Blot 及免疫组化分析显示, 除小鼠肝 LIAS 免疫组化分析结果外, *Lias*^{L/L} 组小鼠较 *Lias*^{+/+} 组小鼠肾、肝及肺组织中 LIAS 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。与 *Lias*^{+/+} 组小鼠相比, *Lias*^{L/L} 组小鼠血清 TAC 水平显著降低 ($P < 0.05$), *Lias*^{L/L} 小鼠肾、肝、肺脏器中 SOD、CAT 酶活性显著降低, MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 本研究鉴定了硫辛酸合成酶基因低表达的基因修饰小鼠, 其在肾、肝及肺中表达较野生型小鼠均降低, 并导致相应脏器的氧化损伤。

【关键词】 硫辛酸合成酶; 基因分型; 氧化损伤; 小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0064-06

Effects of low expression of lipoic acid synthase on antioxidant capacity in mice

YAN Sensen, LYU Mengdi, YANG Xuesi, TAO Yingjun, XU Guangcui, ZHAO Yingzheng*

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

Corresponding author: ZHAO Yingzheng. E-mail: yingzhengzhao@126.com

【Abstract】 Objective To establish a lipoic acid synthase gene-modified mouse model and detect their antioxidant capacity. **Methods** Mice with a loxP-modified 3'-UTR region of the lipoic acid synthase gene were hybridized with EIIa-Cre mice. *Lias*^{L/+} mice were identified from their offspring genotypes, and further propagated. Three genotypes of offspring were identified. Ten 8-week-old male mice with *Lias*^{L/L} and *Lias*^{+/+} genotypes were randomly selected. After weighing and anesthesia, blood was collected via the femoral artery, and then the kidneys, livers and lungs were collected and weighed. Western Blot and immunohistochemistry were used to detect expression levels of lipoic acid synthase (LIAS) protein in kidney, liver and lung tissue. Serum was collected to detect total antioxidant capacity (TAC). The total protein of tissue homogenates from kidney, liver and lung samples were used to detect the activities of superoxide dismutase and catalase, and the content of malondialdehyde. **Results** The expression levels of Lias in kidney, liver and lung samples from *Lias*^{L/L} mice were significantly lower than those from *Lias*^{+/+} mice by semi-quantitative western blotting and immunohistochemical analysis ($P < 0.05$). Compared with the *Lias*^{+/+} group, serum levels of TAC and enzyme activities of superoxide dismutase and catalase in kidney, liver and lung samples were decreased, and the malondialdehyde level increased in the *Lias*^{L/L}

【基金项目】 国家自然科学基金 (81773399, 81370916), 研究生科研创新支持计划项目 (YJSCX202155Y)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81773399, 81370916), Research and Innovation Support Program for Graduate Students (YJSCX202155Y).

【作者简介】 严森森 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 肺纤维化机制及干预。Email: xhldyjs@163.com

【通信作者】 赵英政 (1979—), 男, 副教授, 研究方向: 职业性肺疾患防治研究。Email: yingzhengzhao@126.com

group ($P < 0.05$). **Conclusions** Kidney, liver and lung expression levels of *Lias* were lower in mice with a modified 3'-UTR region of *Lias* than those of wild-type mice, with corresponding oxidative damage observed in these organs.

【Keywords】 lipoic acid synthase; genotyping; oxidative damage; mice model

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

机体内抗氧化系统能清除由于内源或外源刺激生成的自由基,维持自由基在机体内的平衡。然而,当自由基过量产生或机体对其清除能力下降时,过量的自由基会损伤生物大分子,损害细胞、组织及器官,导致氧化损伤。研究表明肿瘤、糖尿病及心血管等疾病发病均与氧化损伤有关^[1-3]。

硫辛酸为一种生成于线粒体的强抗氧化剂,可以清除自由基,减缓机体衰老,并能还原再生维生素 C、维生素 E 和谷胱甘肽等其他抗氧化剂^[4]。临床上 α -硫辛酸已用于减轻糖尿病患者外周神经病变^[5]。硫辛酸合成酶(lipoic acid synthase, LIAS)是合成硫辛酸的关键酶^[6]。本研究鉴定了应用 Cre-Loxp 技术修饰 LIAS 基因的 3'-UTR 区域,使硫辛酸合成酶基因体内低表达的小鼠模型,并检测了小鼠抗氧化能力。应用该小鼠模型将有利于探讨氧化应激相关疾病的发病机制及进行抗氧化治疗效果评估。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只 6 周龄的 SPF 级雄性以 C57BLKS/J 小鼠为遗传背景的 LIAS 基因 3'-UTR 区域修饰的 *Lias*^{loxp/loxp} 小鼠,体重 19 ~ 21 g,由北卡罗来纳大学教授赠送。10 只 6 周龄 SPF 级雌性 E2a-Cre 小鼠购自赛业生物科技有限公司【SCXK(苏)2018-0003】。*Lias*^{loxp/loxp} 小鼠与 E2a-Cre 小鼠交配后将使 LIAS 基因的 3'-UTR 表达不稳定,从而使 LIAS 表达降低。从 *Lias*^{loxp/loxp} 小鼠与 E2a-Cre 小鼠的子代小鼠中鉴定出 *Lias*^{L/L} 小鼠并进一步繁殖、基因型鉴定。随机各选择 10 只 8 周龄 SPF 级雄性 *Lias*^{L/L} 和 *Lias*^{+/+} 小鼠,体重为 (22 ± 2) g,用于抗氧化相关指标检测。小鼠均饲养于新乡医学院公共卫生学院具有独立通风系统(IVC)的动物房【SYXK(豫)2016-0006】。室内温度控制在 20 ~ 25℃,相对湿度 60% ~ 70%,明暗周期 12 h/12 h。饲养期间小鼠自由进食饮水(上海斯莱康提供 SPF 级小鼠饲料)。动物实验所有操作均遵守新乡医学院动物研究伦理规范(审批号:XYLL-2017087)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DNA 提取试剂盒及 PCR 引物由上海生工提供,GoTaq® Master Mixes 购自 Promega (M7123);RIPA 细胞/组织裂解液(北京索莱宝科技有限公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物科技公司),一抗兔多抗 LIAS 抗体(Proteintech,美国),一抗兔单抗细胞色素 C 氧化酶(cytochrome oxidase, COX)亚基 IV(COX IV)(Cell Signaling,美国)、二抗山羊抗兔 IgG (H+L)-HRP(Proteintech,美国);丙二醛(MDA)试剂盒(上海碧云天生物科技公司),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(上海碧云天生物科技公司),过氧化氢酶(CAT)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);凝胶电泳仪(Bio-Rad,美国),化学发光成像系统(ProteinSimple,美国),多功能酶标仪(Thermo,美国)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增技术鉴定小鼠基因型

剪 3 ~ 5 mm 小鼠尾巴放入 PCR 管中,4℃ 保存,用试剂盒提取基因组 DNA,作为 PCR 模板。采用上游引物 5'-CTAAAGTGTAGCCAAGCCCT-3',下游引物:5'-CTTCTCTGACTGCAGATCCT-3',鉴定修饰的 LIAS 基因;采用上游引物 5'-CTAAAGTGTAGCCAAGCCCT-3',下游引物:5'-GTCACGGAGTCCATATGTGT-3',鉴定野生型 WT 基因。PCR 反应体系:2 × EasyTaq SuperMix 6.25 μL,超纯水 3.05 μL,浓度为 10.0 μmol/L 的下游引物与下游引物各 0.3 μL, DNA 模板 0.5 μL。PCR 反应条件为:预变性 94℃,5 min;变性 94℃,30 s;退火 60℃,30 s;延伸 72℃,30 s;共进行 34 个循环;终延伸 72℃,10 min。取 PCR 反应终产物 8.0 μL,在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电压 110 V,时间 25 min。采用凝胶成像分析系统观察分析条带。野生型产生 500 bp 目标片段,而 LIAS 修饰基因产生 300 bp 目标片段。

1.2.2 动物处理和样品采集

对选择的 *Lias*^{L/L} 和 *Lias*^{+/+} 小鼠称重后,以 4% 异氟烷麻醉,股动脉采血后处死动物;分离小鼠肺、肾、肝并称重。将左肺下叶,左侧肾及约 5.0 mg 肝组织置于 4% 多聚甲醛中固定,剩余肺、肝组织以及

右肾用于检测 LIAS 蛋白表达及抗氧化能力相关指标。将采集的外周血室温静置 2 h 后, 2000 rpm 离心 5 min 分离血清, 用于检测总抗氧化能力。所有样品均保存于 -80°C 。

1.2.3 Western Blot 检测 LIAS 蛋白表达

采用蛋白印迹法检测小鼠肺、肾、肝组织 LIAS 蛋白表达水平。3 种组织各称取 20 mg, 剪碎, 加入 200 μL RIPA 裂解液和 2.0 μL 的 PMSF, 充分混匀, 然后用组织破碎仪 70 Hz 匀浆 3 ~ 5 min。将匀浆液 4°C 、11 304 rpm 离心 10 ~ 15 min, 取上清液采用 BCA 法定量总蛋白。用浓度为 12% 的分离胶进行电泳, PVDF 膜进行转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 封闭后加一抗兔多抗 LIAS 抗体 (1:2000)、COXIV (1:2000) 室温下孵育 2 h。用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入二抗山羊抗兔 IgG (H+L)-HRP (1:4000), 37°C 孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10 min。使用 AI600 凝胶成像系统显像, 用 Image J 软件进行分析, 测定目的蛋白与相应内参的灰度比值。以 COXIV 为内参蛋白, 比较 LIAS 蛋白的相对表达水平。

1.2.4 免疫组化检测 LIAS 蛋白表达

肺、肾、肝组织固定 24 h 后, 石蜡包埋, 切片脱蜡至水, 3% 双氧水封闭, 用柠檬酸缓冲液进行微波修复, 冷却。3% BSA 室温封闭 30 min, 加 LIAS 抗体 (1:200), 4°C 过夜。之后用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入二抗山羊抗兔 IgG (H+L)-HRP (1:200), 室温孵育 50 min。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加 DAB 显色, 在显微镜下观察终止显色。用苏木素轻微复染, 脱水、透明、封片, 在光镜下观察。苏木素染细胞核为蓝色, DAB 显出的阳性表达为棕黄色。

1.2.5 抗氧化能力检测

用总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, TAC) 检测试剂盒 (美国 Cell Biolabs 公司) 检测小鼠

血清总抗氧化能力, 采用 Cu^{2+} 还原法用酶标仪测定在 490 nm 波长下吸光度, 结果以尿酸当量 (uric acid equivalents, UAE) 表示血清 TAC 含量; 肺、肝和肾组织测定总蛋白后, 采用比色法试剂盒检测超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性以及丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 含量, 分别在 560、240 及 532 nm 波长处用酶标仪测量吸光度。所有检测的操作均按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学分析

所有数据采用 SPSS 19.0 及 GraphPad Prism 8 进行处理。正态分布数值变量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较方差齐时采用 t 检验, 方差不齐时采用 t' 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 基因型鉴定

如图 1 所示。野生型 ($Lias^{+/+}$) 小鼠仅 500 bp 显示出条带, 而杂合子 ($Lias^{+/-}$) 小鼠分别在 500 bp 和 300 bp 显示出两个条带。纯合子 ($Lias^{L/L}$) 小鼠仅在 300 bp 处产生目的条带。阴性对照无条带显示。

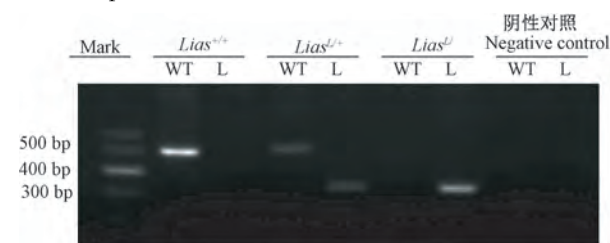


图 1 3 种小鼠基因型鉴定电泳图

Figure 1 Electrophoretic map for genotyping in three genotype mice

2.2 $Lias^{+/+}$ 和 $Lias^{L/L}$ 小鼠体重及其脏器重比较

与 $Lias^{+/+}$ 组小鼠比较, $Lias^{L/L}$ 组小鼠体重、肺重及肾重无显著性差别 ($P > 0.05$), 而肝重量显著性升高 ($P < 0.05$) (见图 2)。

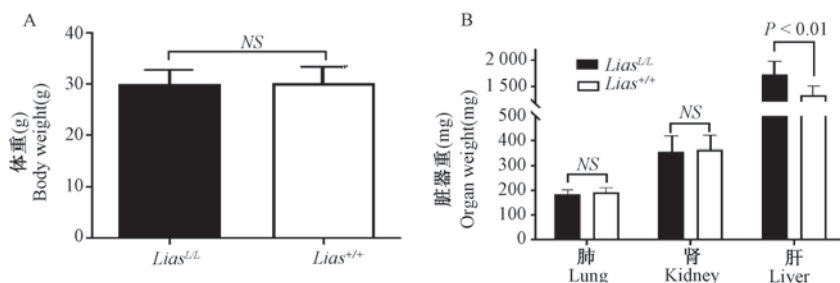


图 2 $Lias^{+/+}$ 和 $Lias^{L/L}$ 小鼠体重及其脏器重比较

Figure 2 Comparison of the body weight and organ weight between $Lias^{+/+}$ and $Lias^{L/L}$ mice

2.3 *Lias*^{+/+}和 *Lias*^{L/L}小鼠肺、肾及肝中 LIAS 蛋白的表达

2.3.1 免疫组化结果

如图 3A 所示。与野生型 *Lias*^{+/+} 小鼠比较, *Lias*^{L/L} 小鼠肺泡间隔出现淋巴细胞的浸润; *Lias*^{L/L} 小鼠出现肾间质炎症细胞浸润, 肾小球肥大、系膜细

胞和系膜基质增多等病理学改变; *Lias*^{L/L} 小鼠肝细胞内多呈大泡样混合型脂滴, 伴散在炎症细胞浸润。如图 3B、3C、3D 所示。与 *Lias*^{+/+} 小鼠比较, *Lias*^{L/L} 小鼠肺及肾中 LIAS 蛋白表达量降低, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 两组小鼠肝中 LIAS 蛋白表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。

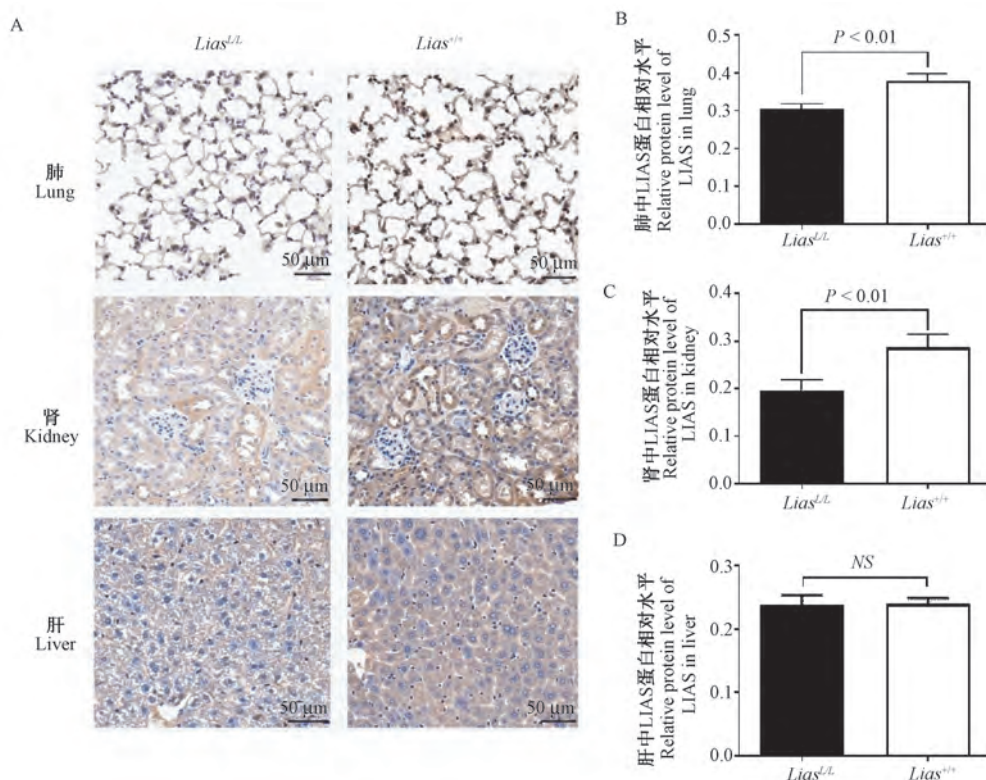


图 3 *Lias*^{+/+}和 *Lias*^{L/L}小鼠肺、肾及肝中 LIAS 蛋白表达的免疫组化结果

Figure 3 LIAS protein expression of lungs, kidneys and livers in *Lias*^{+/+} and *Lias*^{L/L} mice by immunohistochemical staining

2.3.2 Western Blot 检测结果

结果如图 4 所示:与 *Lias*^{+/+} 组小鼠比较, *Lias*^{L/L} 组小鼠肺、肾及肝组织中 LIAS 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。

2.4 LIAS 低表达对小鼠抗氧化能力的影响

与 *Lias*^{+/+} 组小鼠比较, *Lias*^{L/L} 组小鼠血清中 TAC 含量显著性降低 ($P < 0.05$); 与 *Lias*^{+/+} 小鼠比较, *Lias*^{L/L} 小鼠肺、肾及肝组织中 CAT、SOD 水平均降低, MDA 含量增高, 差异均具有显著性 ($P < 0.05$) (见图 5)。

3 讨论

培育和建立疾病动物模型是深入研究疾病发生发展机制的重要手段, 有助于认识疾病发生发展规律。本研究通过 Cre-Loxp 技术建立了内源性硫

辛酸合成酶基因低表达的氧化损伤 *Lias*^{L/L} 小鼠模型, 该特性能够在子代中稳定遗传。目前在抗氧化相关研究中主要是通过化学物刺激或手术干预的方式来构建氧化损伤模型^[7-8]。与这些造模方式不同, 本研究建立的小鼠模型造成的氧化损伤是内源性的, 可以持续存在, 能够保持动物模型的相对稳定; 此外, 该小鼠模型属于遗传损伤模型, 通过繁殖易于获得。

本研究通过 Western Blot 及免疫组化方法测定肺、肾及肝中 LIAS 蛋白的表达水平。结果发现除小鼠肝免疫组化灰度值分析结果外, *Lias*^{L/L} 小鼠较野生型小鼠肺、肾及肝组织中 LIAS 蛋白表达均降低。这些结果表明在 Cre 工具小鼠提供的 CRE 酶的作用下剪切了 *Lias* 基因启动子区域 Loxp 位点, 导致 *Lias* 基因在全身各器官的低表达。实验动物体重、脏器重是动物实验中重要的观察指标, 有助于衡量

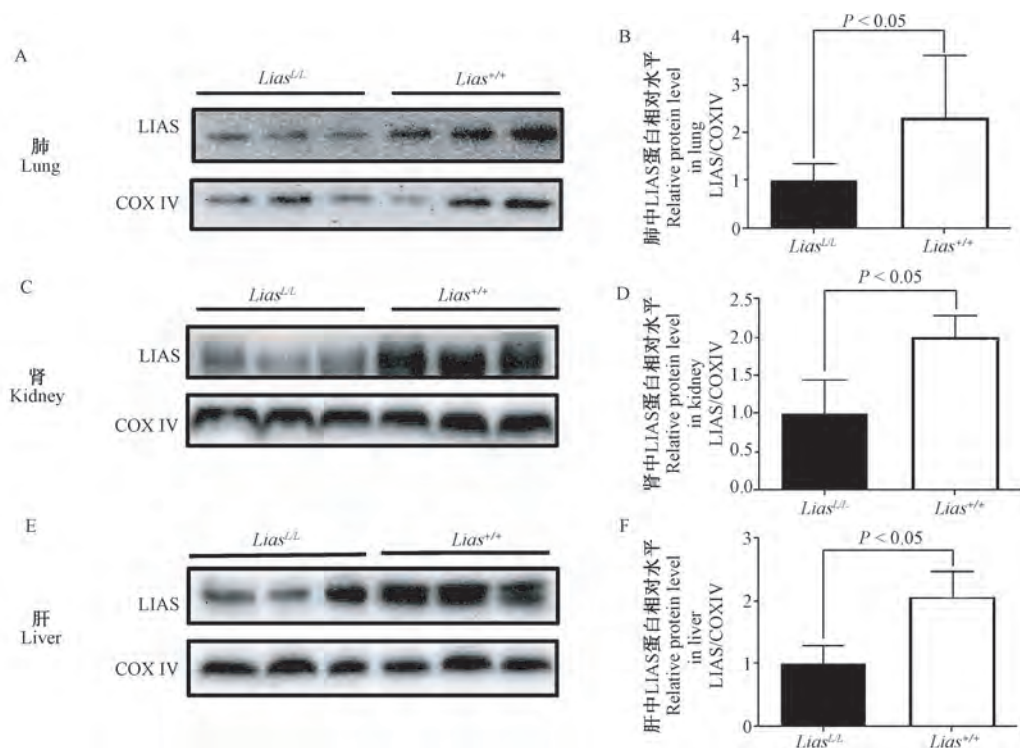


图 4 $Lias^{+/+}$ 和 $Lias^{L/L}$ 小鼠肺、肾及肝中 LIAS 蛋白表达的 Western Blot 检测结果

Figure 4 Expression of LIAS in lungs, kidneys and livers of $Lias^{+/+}$ and $Lias^{L/L}$ mice by Western Blot

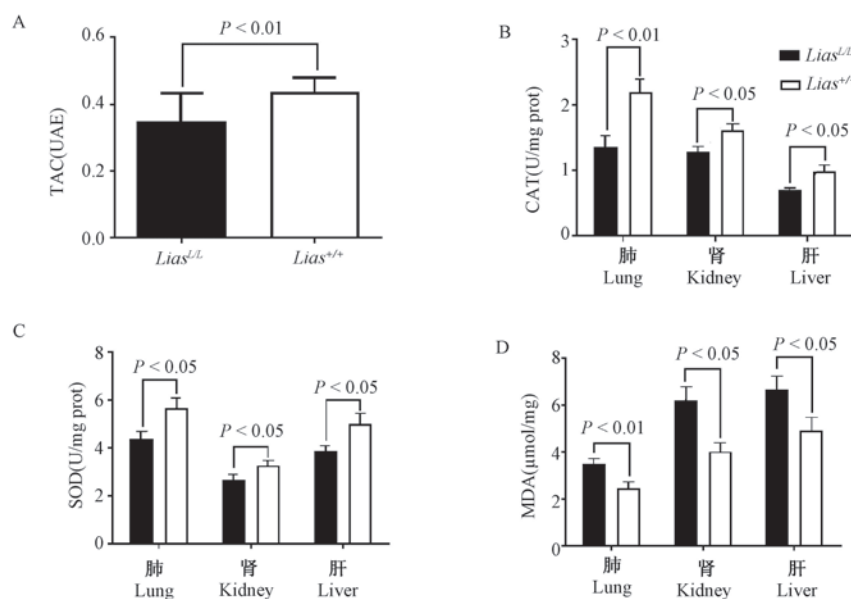


图 5 LIAS 低表达对小鼠抗氧化能力的影响

Figure 5 Effects of lower expression of LIAS on antioxidant capacity in $Lias^{L/L}$ mice

动物生长发育是否发育健康的重要依据^[9]。本研究结果显示,与 $Lias^{+/+}$ 小鼠比较, $Lias^{L/L}$ 小鼠体重、肺重及肾重无显著差异,而 $Lias^{L/L}$ 小鼠肝重显著增加,表明 LIAS 低表达可能导致了小鼠肝损伤。对免疫组化结果分析还发现,与 $Lias^{+/+}$ 小鼠比较, $Lias^{L/L}$ 小鼠肺泡间隔有明显淋巴细胞浸润,显示出炎症表

现; $Lias^{+/+}$ 小鼠肾组织结构完整,无明显病理学改变; $Lias^{L/L}$ 小鼠出现肾间质炎症细胞浸润,肾小球肥大、系膜细胞和系膜基质增多等病理学改变。这些结果表明在 $Lias^{L/L}$ 小鼠中 LIAS 基因低表达可对小鼠脏器造成了不同程度的损伤。

在线粒体内生成的硫辛酸具有强抗氧化作用。

已有研究证明补充外源硫辛酸可增加细胞内抗氧化剂 SOD、GSH、维生素 C 水平^[10-12]。本研究进一步探讨了 Lias 低表达小鼠抗氧化能力的改变。通过 Cu²⁺还原法检测机体血清中总抗氧化能力,结果发现与 *Lias*^{+/+} 小鼠相比, *Lias*^{L/L} 小鼠外周血 TAC 水平显著性降低 ($P < 0.05$),表明内源性 Lias 低表达降低了动物的整体抗氧化能力。*Lias*^{L/L} 小鼠肺、肾、肝中 SOD、CAT 酶活性降低,MDA 水平升高。这些结果表明 *Lias*^{L/L} 小鼠各脏器抗氧化能力降低,并产生了氧化损伤。本研究还发现 *Lias*^{L/L} 小鼠肝细胞中存在脂肪堆积,肝重增加可能与脂肪肝有关。有研究表明氧化应激及其导致脂质过氧化被认为脂肪肝发生的有害因素^[13-15]。因此,推测 *Lias* 基因低表达导致的抗氧化能力降低,清除内源自由基能力下降,过量自由基对肝细胞产生氧化损伤。*Lias*^{L/L} 小鼠模型也可应用于非酒精性肝损伤的相关研究。

综上所述,本研究建立的 *Lias*^{L/L} 小鼠具有较低的抗氧化水平,导致机体肺、肾及肝的氧化损伤。*Lias*^{L/L} 小鼠为一种新型的氧化损伤小鼠模型,可进一步应用于常见慢性疾病如糖尿病、动脉粥样硬化等疾病中氧化应激机制对疾病发生发展影响的研究以及应用于抗氧化剂抗氧化干预效果评价的研究。应用该新模型也有助于筛查新的抗氧化干预靶点,从而改善氧化应激相关疾病的治疗干预策略。

参 考 文 献 (References)

- [1] 肖莉,张倩雨,马莹,等. 氧化应激在肿瘤糖代谢中的作用研究 [J]. 肿瘤, 2018, 38(9): 901-906.
Xiao L, Zhang QY, Ma Y, et al. Study on the role of oxidative stress in tumor glucose metabolism [J]. Tumor, 2018, 38(9): 901-906.
- [2] 原野,王国坤. 氧化应激相关酶在心血管疾病中的研究进展 [J]. 第二军医大学学报, 2021, 42(5): 538-542.
Yuan Y, Wang GK. Research progress of oxidative stress related enzymes in cardiovascular diseases [J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2021, 42(5): 538-542.
- [3] 阎婷婷,赵英政,易宪文,等. 氧化应激及炎症对糖尿病肾病的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2019, 36(8): 701-705.
Yan TT, Zhao YZ, Yi XW, et al. Effects of oxidative stress and inflammation on diabetic nephropathy [J]. J Xin Med Univ, 2019, 36(8): 701-705.
- [4] Chang MY, Xu GC, Xiong C, et al. Alpha-lipoic acid attenuates silica-induced pulmonary fibrosis by improving mitochondrial function via AMPK/PGC1 α pathway activation in C57BL/6J mice [J]. Toxicol Lett, 2021, 350: 121-132.
- [5] Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, et al. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy [J]. Diabetes Care, 1995, 18(8): 1160-1167.
- [6] Cicchillo RM, Booker SJ. Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in Escherichia coli: both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide [J]. J Am Chem Soc, 2005, 127(9): 2860-2861.
- [7] 吴柳盛,刘继先,乌达,等. 食管腺癌动物模型建立方法的研究进展 [J]. 医学综述, 2021, 27(14): 2783-2788.
Wu LS, Liu JX, Wu D, et al. Research progress in the establishment of animal model of esophageal adenocarcinoma [J]. Med Recapitulate, 2021, 27(14): 2783-2788.
- [8] Ruan Y, Robinson NB, Khan FM, et al. The translation of surgical animal models to human clinical research: A cross-sectional study [J]. Int J Surg, 2020, 77: 25-29.
- [9] 殷帼英,刘娟,曹德庆,等. 宫内砷暴露对小鼠脏器重量和脏器系数的跨代遗传影响 [J]. 环境与健康杂志, 2017, 34(10): 861-864.
Yin GY, Liu J, Cao DQ, et al. Intergenerational genetic effects of intrauterine arsenic exposure on organ weight and organ coefficient in mice [J]. J Environ Health, 2017, 34(10): 861-864.
- [10] Jiang Z, Lu W, Zeng Q, et al. High glucose-induced excessive reactive oxygen species promote apoptosis through mitochondrial damage in rat cartilage endplate cells [J]. J Orthop Res, 2018, 36(9): 2476-2483.
- [11] 李晓波. 依帕司他联合硫辛酸治疗对糖尿病周围神经病变患者神经传导速度及血清 SOD 和 GSH 水平的影响 [J]. 当代医学, 2021, 27(15): 14-16.
Li XB. Effect of epalrestat combined with lipoic acid on nerve conduction velocity and serum SOD and GSH levels in patients with diabetic peripheral neuropathy [J]. Contemp Med, 2021, 27(15): 14-16.
- [12] 贾维娜,顾庆,王遂军,等. α -硫辛酸注射液对糖尿病肾病氧化应激和代谢指标的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(13): 1384-1387.
Jia WN, Gu Q, Wang SJ, et al. Effect of Lipoic acid injection on patients with diabetic nephropathy [J]. J Clin Exp Med, 2020, 19(13): 1384-1387.
- [13] Ferro D, Baratta F, Pastori D, et al. New insights into the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: gut-derived lipopolysaccharides and oxidative stress [J]. Nutrients, 2020, 12(9): 2762.
- [14] Yuan S, Pan Y, Zhang Z, et al. Amelioration of the lipogenesis, oxidative stress and apoptosis of hepatocytes by a novel proteoglycan from ganoderma lucidum [J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(10): 1542-1550.
- [15] Damba T, Bourgonje AR, Abdulle AE, et al. Oxidative stress is associated with suspected non-alcoholic fatty liver disease and all-cause mortality in the general population [J]. Liver Int, 2020, 40(9): 2148-2159.

[收稿日期] 2021-08-30

陈衍, 高江梅, 赵世坤, 等. 无卵黄冷冻液冷冻食蟹猴精液方法的优化 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 70-76.

Chen Y, Gao JM, Zhao SK, et al. Optimization of cryopreservation of cynomolgus monkey semen with yolk-free solution [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 70-76.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.009

无卵黄冷冻液冷冻食蟹猴精液方法的优化

陈衍^{1#}, 高江梅^{2#}, 赵世坤¹, 李比海², 饶军华^{2*}, 杨世华^{1*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 岭南现代农业广东实验室, 广州 510260; 2. 广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260)

【摘要】 目的 由于传统的精子冷冻液存在卵黄等不确定成分, 具有生物污染的风险。因此, 本研究旨在利用 Origio 及 Quinn's 两种商品化无卵黄冻存液保存食蟹猴种质资源并确定食蟹猴精子最佳冻存条件。**方法** 利用阴茎电刺激收集雄猴精液, 使用两种冻存液按不同体积比与精液混合后悬挂于液氮表面不同高度冻存食蟹猴精子。复苏后, 统计精子存活率、复苏率及顶体完整率确定冻存液最佳条件, 并在最佳条件下使用 Quinn's 冻存液证实精浆对精子冷冻的影响。**结果** 使用 Origio 和 Quinn's 精子冻存液冻存食蟹猴精子的最优条件为: 悬挂高度距液氮面 5 cm, 精液冻存液体积比为 1:0.5, 在最优条件下, Quinn's 组精子复苏率为 $38.02\% \pm 14.98\%$, 显著高于 Origio 组精子复苏率 $15.11\% \pm 14.49\%$ 。顶体完整率无组间差异。保留精浆可提高无卵黄冻存液的冷冻效果。保留精浆后的精子复苏率、顶体完整率分别为 $37.57\% \pm 13.22\%$ 、 $84.64\% \pm 8.82\%$; 不保留精浆的精子复苏率、顶体完整率分别为: $21.46\% \pm 7.25\%$ 、 $75.50\% \pm 9.62\%$ 。**结论** 无卵黄冻存液可成功保存食蟹猴精子, 为食蟹猴生育力的保护及种质资源保存提供了一种安全可靠的方式。

【关键词】 无卵黄冷冻液; 精子冻存; 食蟹猴

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0070-07

Optimization of cryopreservation of cynomolgus monkey semen with yolk-free solution

CHEN Yan^{1#}, GAO Jiangmei^{2#}, ZHAO Shikun¹, LI Bihai², RAO Junhua^{2*}, YANG Shihua^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangdong Laboratory of Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510260, China. 2. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260)

Corresponding author: RAO Junhua. E-mail: junhua919@163.com; YANG Shihua. E-mail: yangsh@scau.edu.cn

【Abstract】 Objective There is a risk of biological contamination from egg yolk and unidentified components in traditional sperm cryopreservation solution. Therefore, this study aimed to use two commercial yolk-free cryopreservation

【基金项目】 国家自然科学基金 (81941006), 广东省特支计划本土创新创业团队 (2019BT02Y276), 科技部重点研发计划 (2018YFA0801404)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81941006), Guangdong Special Support Program(2019BT02Y276), the National Key R&D Program of China(2018YFA0801404)。

【作者简介】 陈衍 (1996—), 男, 硕士, 研究方向: 灵长类辅助生殖技术。Email: 292800880@qq.com;

高江梅 (1985—), 女, 博士, 研究方向: 人类重大疾病灵长类动物模型研究。Email: gaojm@giz.gd.cn。

#共同第一作者

【通信作者】 饶军华 (1968—), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 人类疾病灵长类动物模型研究。Email: junhua919@163.com;

杨世华 (1972—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 灵长类动物生殖工程与基因修饰疾病动物模型研究。Email: yangsh@scau.edu.cn。

* 共同通信作者

solutions, Origio and Quinn's, to preserve the semen of cynomolgus monkey and to determine the optimal cryopreservation conditions for this species. **Methods** Semen from male monkeys was collected by penile electrical stimulation. The two kinds of cryopreservation solution were used to freeze sperm under conditions of different freezing suspension heights above the surface of liquid nitrogen and different cryopreservation liquid volume ratios. The optimal conditions of cryopreservation solution were determined from sperm viability, recovery and acrosomal integrity rates after cryopreservation, and the effect of seminal plasma on sperm cryopreservation was confirmed using optimal conditions with Quinn's cryopreservation solution. **Results** The optimal conditions for cryopreservation of cynomolgus monkey sperm with Origio and Quinn's solution were suspended at 5 cm above liquid nitrogen, and a volume ratio of semen to cryopreservation solution of 1:0.5. Under these optimal conditions, the recovery rate using Quinn's solution $38.02\% \pm 14.98\%$ was significantly higher than that using Origio solution $15.11\% \pm 14.49\%$. There was no significant difference in acrosomal integrity between the two solutions. Preservation using seminal plasma can improve the freezing effect of yolk-free cryopreservation solution. The recovery and acrosomal integrity rates with seminal plasma were $37.57\% \pm 13.22\%$ and $84.64\% \pm 8.82\%$, respectively, compared with recovery and acrosomal integrity rates without seminal plasma of $21.46\% \pm 7.25\%$ and $75.50\% \pm 9.62\%$, respectively. **Conclusions** Yolk-free cryopreservation solution successfully preserved cynomolgus monkey sperm, and provides a safe and reliable way for conserving the fertility of male cynomolgus monkeys.

【Keywords】 yolk-free cryopreservation solution; sperm cryopreservation; cynomolgus monkey

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

超低温冷冻是一种较为有效的保存方式,被广泛应用于农业、医学等领域的种质资源保存^[1-3]。自 Bunge 等^[4]使用冷冻复苏后的精子获得成功妊娠以来,精子冷冻技术为雄性保留生殖能力做出了巨大贡献。由于精子冷冻保存过程中精子冷冻损伤、冷休克、氧化损伤等原因,冷冻保存的精子复苏率较低^[5-6]。由于鸡卵黄具有抗冷休克和冷冻保护作用,含有卵黄的精子冻存液使用极为广泛,但卵黄可能含有病原体,具有生物安全风险^[7]。Quinn's 和 Origio 两种无卵黄冻存液已被人类精子库和生殖医学中心所采用。前者产自美国 SAGE 公司,主要成分有 10 mg/mL HSA、甘油、庆大霉素和一些无机盐、氨基酸等。后者产自丹麦,其主要成分为 HSA、重组人胰岛素和 10 μ g/mL 的硫酸庆大霉素。这两种无卵黄冻存液,避免了动物性传染病以及不能被定量的标准成分所带来的固有变化^[8]。但是,这两种冻存液是否可用于非人灵长类精子保存仍待证实。

食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 是我国二级重点保护动物,常作为生殖研究和疾病模型研究的实验动物^[9-11]。利用食蟹猴研究并开发有效的精子冷冻方法,可为保存其他濒危或具有重要意义的非人灵长类物种精液提供参考^[12]。例如,本团队成功构建了 Shank3 基因突变的自闭症模型食蟹猴,有效的精子保存方法对于大量制备突变序列相同的突变猴群及疾病模型群至关重要^[10]。

因此,本实验利用两种不同的无卵黄冻存液冷

冻食蟹猴精子并优化关键冷冻步骤。通过精液冷冻后活率、精子复苏率和顶体完整率确定两种无卵黄冻存液的最佳使用条件,并进一步证实精浆对精子冷冻的保护作用,以期保护非人灵长类种质资源提供一种安全有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 只健康成年普通级雄性食蟹猴,体重 (7.57 ± 0.56) kg,购自广州相观生物科技有限公司【SCXK(粤)2018-0043】。以上动物均饲养于广东省科学院动物研究所【SYXK(粤)2018-0187】。本实验所有程序均由广东省科学院动物研究所伦理委员会批准(GIZ20210312)。饲养环境:温度 16 ~ 26℃,湿度 40% ~ 70%,光照周期明暗均为 12 h。实验期间动物定时喂食和自由饮水。

1.1.2 主要试剂与仪器

若无特殊说明,所用试剂均来自 Sigma 公司。Origio 和 Quinn's 无卵黄精子冻存液(SAGE, Coopersurgical)于 4℃ 保存。以 Tris-卵黄为基础的精子冷冻稀释液 TTE 被用于对照组,此培养基每 10 mL 包括 Tris-HCl 0.02 g, TES 0.12 g, Glucose 0.2 g, Lactose 0.2 g, Raffinose 0.02 g, Streptomycin 0.0005 g, Penicillin-G 0.000063 g 和卵黄 2 mL^[13]。配制完成后-80℃ 保存,使用前,添加 10% 甘油。精子稀释液成分表见表 1。

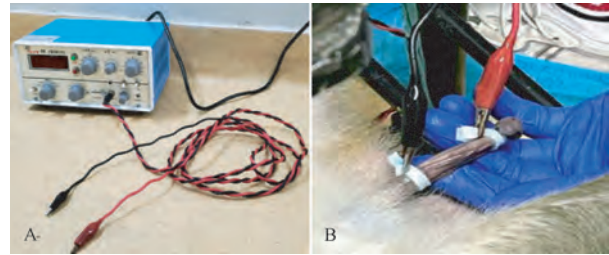
表 1 精子稀释液
Table 1 Sperm diluent

成分 Component	浓度 Concentration
KCl	0.236 g/L
NaCl	7.422 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.294 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.102 g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.048 g/L
NaHCO ₃	0.168 g/L
Glucose	0.901 g/L
HEPES(Na salt)	1.302 g/L
HEPES(acid form)	1.192 g/L
Na-Lactate(60% syrup)	1.852 mL
Phenol red	0.010 g/L
PVP	0.100 g/L

1.2 方法

1.2.1 精液收集和处理

本实验对食蟹猴进行阴茎电刺激采集精液(见图 1),在清醒的状态下将食蟹猴保定于猴椅。每只猴至少采集 3 次,每次间隔 3 d 以上,从 6 只猴采集 28 份精液样本。精液样本置于 37℃ 下保存 30 min,使其充分液化。将精子稀释液加入至精液中,直至每毫升精液混合物的精子密度为每毫升 2×10^6 条。3066 rpm 离心 5 min,洗涤 2 次。每次洗涤完成后,去掉上清,并吸取适量精子洗涤液小心重悬。洗涤结束后,进行常规分析及冷冻保存。在冻存前每份样本需取 20 μL 分别用于精子活率及顶体完整率的检测。



注:A:电刺激仪;B:阴茎电刺激采精。
图 1 精液采集的设备与方法
Note. A. Electro-stimulator. B. Penile electroejaculation.

Figure 1 Equipment and method of semen collection

1.2.2 排精量及精液密度、运动度、畸形率及顶体完整率评估

吸取 1 μL 新鲜液化精液,加入 99 μL 等温精子稀释液稀释后滴加到预热的计数板上,加热致死后在光学显微镜下计数 25 个大方格中左上、右上、左下、右下及正中 5 个方格的精子数量,根据公式:精子密度=5 个方格精子总数×5×原始精液倍数×10⁴,计算

出精子密度。另取 10 μL 洗涤后的精子混合液滴加到预热的血球计数板上,在光学显微镜下计数向前运动和不运动的精子。每次至少计数 200 个,重复 2 次,计算运动精子百分比即为精子运动度^[14]。

另取 10 μL 洗涤稀释后的精液滴加到载玻片上,滴加 4% 的甲醛溶液固定、风干后,观察精子的头部、颈部及尾部是否有畸形,如弯折、卷曲、带有原生质滴,计数后计算精子畸形率。另外用精子稀释液将精液样品洗涤、离心并稀释到适当浓度后取 20 μL 滴在载玻片上,滴加 4% 的甲醛固定,风干后滴加 10 μg/mL 的 Alexa Fluor 488 conjugate 覆盖,在湿盒中 37℃ 避光孵育 30 min。孵育完成后,用 PBS 洗去多余染料,在荧光显微镜下检查,其激发光波长和发射光波长分别为 488 nm 和 530 nm,顶体完整的精子被染成均匀的苹果绿色,而顶体不完整的精子部分着色或不着色。计数顶体完整的精子和顶体不完整的精子,计算顶体完整率。操作步骤参考相关文献报道^[15-16]。

1.2.3 精子冷冻及实验设计

Origio 和 Quinn's 为商品化冻存液,冻存步骤参考产品说明书。Origio:将精子冻存液于室温预温 2 h 后,用精子冻存液与洗涤稀释后的精液按 1:0.5、1:1 和 1:1.5 的比例进行稀释。将混合物在室温下保持 10 min,随后分装至冷冻麦管。在距离液氮表面 0.5、5 和 10 cm 3 个不同高度悬挂冷冻麦管 30 min。最后,将麦管移至液氮中保存。Quinn's:将精子冻存液提前置于室温下,用精子冻存液与精液按 1:0.5、1:1 和 1:1.5 的比例进行稀释后将混合物浸入装有水的烧杯中,置于 4℃ 冰箱缓慢降温 1.5 h,在距离液氮表面 0.5、5 和 10 cm 3 个不同高度悬挂冷冻麦管 30 min,最后投入液氮冷冻保存。TTE:冻存步骤参考文献报道^[17]。用预热至 37℃ 的 TTE 稀释液将样品稀释,并将混合物浸入装有水的烧杯中,置于 4℃ 冰箱缓慢降温 2 h。随后向稀释精液中加入等体积、预冷至 4℃、含有 10% 甘油的 TTE 冷冻液。TTE 冷冻液分 5 次加入,每次加入 1/5,加 1 次间隔 1 min。将稀释精液分装至 4℃ 的冷冻麦管中。在距液氮面上方 5 cm 处冷冻 10 min 后投入液氮保存。

精浆对精子冷冻保存的影响实验设计:将每个个体的精液样本分为 2 等份,3066 rpm 离心 5 min。随后,1 份保留精浆,1 份不保留精浆。按 1.2.3 中所述的 Quinn's 的实验方法,将精液与冻存液 1:1

混合。缓慢降温结束后,将保留精浆组与不保留组每组分别分装 3 管,在距液氮面 5 cm 高度处悬挂 30 min 后放入液氮保存。

1.2.4 冷冻精子复苏及复苏率的计算

将冷冻麦管从液氮取出后,立即放入 37℃ 水浴锅中 1 min,剪断麦管两端收集冷冻精液。经洗涤后,参照文献^[18]公式计算,即复苏率(%)=解冻后运动度/冷冻前运动度×100。

1.3 统计学分析

所有数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,精子活率、复苏率及顶体完整率等百分比数据在分析前均经过平方根的反正弦转换。探讨精浆对精子冻存影响的数据分析采用配对 *t* 检验,其余则经完全随机设计的单因素方差分析 (One way Anova) 及最小显著差法 (LSD) 检验数据间的差异显著性, *P* < 0.05 则判定为差异显著。以上所有数据的处理均通过 Graphpad prism 6.0 软件完成。

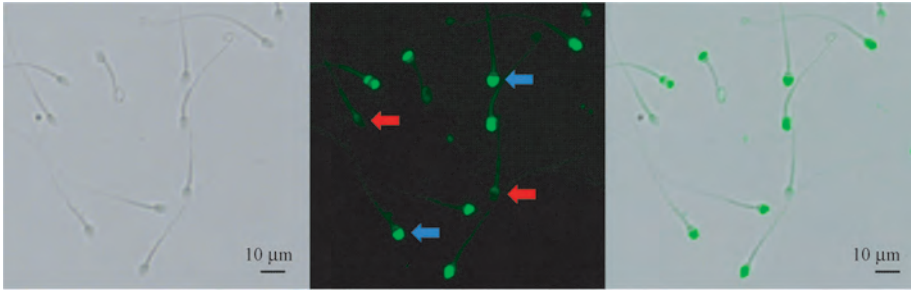
2 结果

2.1 食蟹猴精液基本情况

28 份精液样本被用于本实验。6 只成年食蟹猴精液量 (0.41 ± 0.39) g,精子密度每毫升 ($4.53 \times 10^9 \pm 4.20 \times 10^9$),精子活率 ($80.68\% \pm 8.15\%$)、畸形率 ($15.59\% \pm 12.03\%$) 及顶体完整率 ($82.46\% \pm 14.99\%$)。精子顶体染色及评价见图 2。

2.2 液氮面不同悬挂高度对食蟹猴精子冷冻复苏的影响

28 份精液样本被用于本实验,统计结果如表 2 所示。健康猴精液与两种冻存液按照说明书混合平衡后活率未表现出明显差异。当悬挂高度为 5 cm 时,两种冻存液均表现出相对较好的保护效果,并与 0.5、10 cm 高度相比差异显著。而同为 5 cm 的高度下,与 Origio 相比,Quinn's 复苏率较高且差异显著。顶体完整率各组之间无差异。



注:蓝色箭头指向顶体完整的精子;红色箭头指向顶体不完整的精子。

图 2 精子顶体荧光染色及评价

Note. The blue arrow points to the sperm with intact acrosome. The red arrows point to sperm with incomplete acrosome.

Figure 2 Spermatozoal acrosome staining

表 2 两种冻存液在不同悬挂高度下冷冻对精子冷冻复苏的影响

Table 2 Effects of two cryopreservation solutions on sperm cryosurvival at different suspension heights

冻存液 Solution	鲜精活率(%) Fresh sperm motility (%)	平衡后活率(%) Post-holding motility (%)	悬挂高度(cm) Suspension height(cm)	复苏率(%) Recovery rate(%)	顶体完整率(%) Acrosomal integrity (%)
Origio	80.10 ± 3.24	64.30 ± 12.78 ^a	0.5	7.02 ± 5.23 ^{cd}	59.16 ± 22.84 ^a
			5.0	21.28 ± 15.72 ^b	58.13 ± 18.33 ^a
			10.0	3.19 ± 2.18 ^d	58.91 ± 26.00 ^a
Quinn's		68.08 ± 11.12 ^a	0.5	16.32 ± 9.29 ^{bc}	57.93 ± 23.23 ^a
			5.0	42.15 ± 21.77 ^a	55.67 ± 17.70 ^a
			10.0	16.35 ± 13.63 ^{bc}	52.52 ± 19.23 ^a

注:每一列数据上标字母不同即为差异显著 (*P* < 0.05)。

Note. Different superscripts within a column indicate significant differences (*P* < 0.05).

2.3 不同冻存液稀释比对食蟹猴精子冷冻复苏效率的影响

28 份精液样本被用于本实验。使用 TTE 作为有卵黄冻存液的对照组。在使用不同比例的无卵

黄冻存液混合后,冻存液比例越少,平衡后精子活率越高,且稀释比为 1:0.5 时复苏率较高。但与 TTE 相比,冷冻复苏率较低 (*P* < 0.05)。顶体完整率各组之间无差异 (见表 3)。

表 3 3 种冻存液在不同稀释比例下对精子冷冻复苏的影响

Table 3 Effects of 3 cryopreservation solutions on sperm cryosurvival at different dilution ratios					
冻存液 Solution	鲜精活率(%) Fresh sperm motility(%)	稀释比例(v/v) Dilution ratio(v/v)	平衡后活率(%) Post-holding motility(%)	复苏率(%) Recovery rate(%)	顶体完整率(%) Acrosomal integrity(%)
Origio	80.43 ± 3.33	1:0.5	74.56 ± 12.15 ^a	15.11 ± 14.49 ^d	57.22 ± 23.55 ^b
		1:1	67.92 ± 13.27 ^{abc}	13.58 ± 10.55 ^d	62.87 ± 23.86 ^{ab}
		1:1.5	62.53 ± 16.68 ^c	12.99 ± 11.67 ^d	69.86 ± 24.69 ^a
Quinn's		1:0.5	72.78 ± 7.77 ^{ab}	38.02 ± 14.98 ^b	66.50 ± 18.50 ^{ab}
		1:1	66.81 ± 14.52 ^{abc}	30.77 ± 11.91 ^{bc}	69.17 ± 16.46 ^{ab}
		1:1.5	64.42 ± 17.40 ^{bc}	24.66 ± 15.50 ^c	56.29 ± 22.03 ^b
TTE		/	74.53 ± 7.42 ^a	52.41 ± 20.32 ^a	59.75 ± 19.43 ^{ab}

2.4 精浆对冷冻复苏效率的影响

3 份精液样本被用于本实验。设保留和不保留精浆组。使用 Quinn's 冻存液,在液氮面悬挂高度为 5 cm,稀释比为 1:1 的条件下进行精子冻存。在

保留精浆的情况下,除了精子平衡后活率差异不显著外,保留精浆组的复苏率及顶体完整率显著高于不保留精浆组(见表 4)。

表 4 精浆对精子冷冻复苏的影响

Table 4 Effect of seminal plasma on sperm cryosurvival				
精浆 Seminal plasma	鲜精活率(%) Fresh sperm motility(%)	平衡后活率(%) Post-holding motility(%)	复苏率(%) Recovery rate(%)	顶体完整率(%) Acrosomal integrity(%)
保留 With	72.86 ± 6.05	72.03 ± 7.10 ^a	37.57 ± 13.22 ^a	84.64 ± 8.82 ^a
不保留 Without		65.61 ± 5.26 ^a	21.46 ± 7.25 ^b	75.50 ± 9.62 ^b

3 讨论

1949 年甘油作为冷冻保护剂被成功应用于精子冷冻保存,启动了精液冷冻保存的研究和应用^[19]。因卵黄可维持精子膜脂质的稳定性并补充冷冻引起的卵磷脂、胆固醇丢失,故被用于精子的冷冻保存。Origio 和 Quinn's 为不同品牌精子冷冻保护剂,虽不含卵黄,但其他成分,如葡萄糖,甘油等,也能取得较好的精子冷冻效果,被广泛应用于人类精子库及生殖医学中心。抗冻保护剂主要分为渗透型和非渗透型,而冷冻保护液常包含其中一种或几种成分。不同保护液的冷冻效果也具有差异^[20]。例如甘油和乙二醇对猕猴精子保护效果相近,而二甲基亚砜保护效果较差^[21]。含有卵黄成分的 TTE 冻存液有效复苏率波动范围较大,这可能与操作者手法、精子计数经验、食蟹猴精子质量以及不同蛋黄批次有关^[6,17,22]。TTE 冻存液虽被广泛应用于灵长类精子冻存中,但配制要求较高,需使用当天产出的鸡蛋进行卵黄抽取。除此之外,卵黄成分复杂,且存在生物安全风险,这些因素使得这种冻存液的使用和相关研究具有较大局限性^[7]。在本次实验中,共使用 3 种不同的冷冻保护液,并采用液氮蒸汽法进行精子冷冻。其中 TTE 冷冻保护剂包含了渗透型的甘油、非渗透型的棉子糖、葡萄糖等物质^[23],而商品化人用冻存液除了甘油、糖类等

物质外还加入了人血清白蛋白等非渗透型高聚物。此外,Quinn's 冻存液首次被应用于食蟹猴。在参照文献报道及产品说明书操作后,TTE 冻存液冻存效率达到了文献报道水平,但另外两种无卵黄商品化冻存液冻存效果较差。因此,本实验采用了不同稀释比例及不同的降温速率对这两种冻存液冻存步骤进行了改良。结果显示,液氮面上悬挂高度为 5 cm,稀释比例为 1:0.5 时冷冻保护效果最好,且 Quinn's 表现出更好的复苏率。

在冷冻过程中,悬挂高度直接影响着细胞内外渗透压和 pH 的平衡。低高度下的快速降温和高高度下的慢速降温均不适用于食蟹猴的精子冷冻保存,但中高度(5 cm)可有效提高精子的冷冻活率,这可能是由于在距液氮液面较高的高度下,降温过慢导致细胞过度脱水,或者在低高度下冰晶快速形成而造成的细胞死亡。不同的稀释比则决定于精子细胞内脱水速度。实验表明在不同稀释比的条件下,冻存液比例越低,平衡时精子活率相对越高。这可能是随着冻存液用量的减少,降低了冻存液成分如甘油对细胞的毒性作用且降低了细胞渗透压的变化的程度。通过步骤优化发现,最适高度和稀释比均与冻存液说明书不一致。3 种冻存液都是以甘油作冷冻保护剂,食蟹猴最适甘油浓度为 5%,人的最适浓度为 7.5%^[24-25]。2 种商品化无卵黄冻存液甘油浓度为 7.5%,则若采用 1:0.5 的稀释比,最

终甘油浓度更接近食蟹猴最适甘油浓度,但是否还存在更加适合的降温速率及稀释比还需进一步细化分组。与人的精子冻存效果相比,在复苏率上存在较大差异,除了冷冻保护剂最适浓度不同以外,也可能与精子构成有关。据悉,人精子膜的固醇磷脂比例可达 0.88,具有较好的抗冷休克能力,而牛的固醇磷脂比较低,为 0.45,且牛精子冷冻复苏效果也较差^[23]。因此,这种物种差异引起固醇磷脂比也可能是影响冷冻效率的重要因素之一。为探究精浆对精子冷冻保护作用的影响,本实验比较了保留精浆和去除精浆的精子在冷冻前的平衡活率和经冻存后的复苏率及顶体率。结果显示:在保留精浆后,精子平衡后活率、复苏率及顶体完整率都有提升。这表明精浆对精子的冷冻保护存在一定的益处,且与前人研究一致^[22]。在其他动物方面,如猪、羊等保留精浆后冷冻可以增强精子的抗冻能力^[26-27]。其作用原理与卵黄类似,含有的脂质和胆固醇可以结合在精子膜上提供保护^[28]。与鲜精相比,冻精复苏后的顶体率均存在下降。这表明一部分精子在冷冻后会造成一定程度的顶体损伤。此外,也有一部分精子会自发顶体反应,但由于顶体反应级联信号通路涉及分子较多,机制复杂,如 Ca^{2+} 、G 蛋白等作用,导致本实验中不同条件下顶体完整率暂不具备一定规律^[29]。因此,顶体完整率在本实验中可能并不适合被用作评判冻存液效果的有效标准。

本实验仅采用了液氮蒸汽法,改变冷冻方法如定向冷冻、玻璃化冷冻有可能对复苏结果起到一定的改善作用^[30-31]。细胞内液渗透压的变化也与平衡时间的长短有关,时间过长引起细胞过度脱水,时间短细胞内残留水分过多,冷冻时会形成更多大冰晶损伤细胞。而平衡温度决定精子是否能提前适应温度的降低。不足的是,本实验未对平衡时间以及平衡温度进行探讨。最新研究报道,利用高压均质这一技术对卵黄进行处理后,使蛋黄中的微生物失去或钝化生物活性,规避了动物源性的污染风险^[32-33]。这一技术的改良已成功应用于猪精液的冻存但是否能有效应用于非人灵长类暂不清楚^[34]。Wang 等^[16]将抗冻蛋白 III 用于猕猴的精子冻存,发现抗冻蛋白的加入对精子冷冻复苏起一定的积极作用,但合适的蛋白浓度也需进一步被确认^[35]。

4 结论

本实验成功证实了 Origio 和 Quinn's 这两种冻

存液在食蟹猴上的适用性,在优化冷冻步骤后精子复苏后活率显著提升。最佳冻存条件为:冷冻高度距液氮面 5 cm、精液冻存液体积比为 1:0.5。与 Origio 冻存液相比,Quinn's 冻存液具有更好的保护作用。保存精浆可显著提高无卵黄冻存液的冷冻效果。

参 考 文 献(References)

- [1] 罗嘉慧, 卢秋翰, 李国萃, 等. 保存条件对恒河猴 CD8^+ T 细胞活性的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 33-37.
Luo JH, Lu QH, Li GC, et al. Effect of storage conditions on the activity of CD8^+ T cells in rhesus monkeys [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 33-37.
- [2] Silva AMD, Pereira AF, Comizzoli P, et al. Cryopreservation and culture of testicular tissues: an essential tool for biodiversity preservation [J]. Biopreserv Biobank, 2020, 18(3): 235-243.
- [3] Bosch E, de Vos M, Humaidan P. The future of cryopreservation in assisted reproductive technologies [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 67.
- [4] Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa [J]. Nature, 1953, 172(4382): 767-768.
- [5] Grötter LG, Cattaneo L, Marini PE, et al. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization [J]. Reprod Domest Anim, 2019, 54(4): 655-665.
- [6] Yan Y, Ao L, Wang H, et al. Cryopreservation of cynomolgus macaque (macaca fascicularis) sperm by using a commercial egg-yolkfree freezing medium [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(6): 744-748.
- [7] Si W, Wang H, Reid C, et al. Effect of sugar type on the survival of frozen-thawed rhesus monkey (Macaca mulatta) sperm [J]. Am J Primatol, 2006, 68(1): 103-108.
- [8] Tiwari A, Tekcan M, Sati L, et al. A new media without animal component for sperm cryopreservation: motility and various attributes affecting paternal contribution of sperm [J]. J Assist Reprod Genet, 2017, 34(5): 647-657.
- [9] Yang X, Shu L, Cai L, et al. Homozygous missense mutation Arg207Cys in the WEE2 gene causes female infertility and fertilization failure [J]. J Assist Reprod Genet, 2019, 36(5): 965-971.
- [10] Zhou Y, Sharma J, Ke Q, et al. Atypical behaviour and connectivity in SHANK3-mutant macaques [J]. Nature, 2019, 570(7761): 326-331.
- [11] Huang Y, Ding C, Liang P, et al. HBB-deficient Macaca fascicularis monkey presents with human β -thalassemia [J]. Protein Cell, 2019, 10(7): 538-542.
- [12] Zhang X, Meng Y, Houghton P, et al. Ancestry, Plasmodium cynomolgi prevalence and rhesus macaque admixture in cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) bred for export in Chinese breeding farms [J]. J Med Primatol, 2017, 46(2): 31

- 41.
- [13] Sankai T, Terao K, Yanagimachi R, et al. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. *J Reprod Fertil*, 1994, 101(2): 273-278.
 - [14] Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, et al. Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation [J]. *Theriogenology*, 2009, 71(9): 1425-1432.
 - [15] Chen B, Li S, Yan Y, et al. Cryopreservation of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) sperm with glycerol and ethylene glycol, and its effect on sperm-specific ion channels-CatSper and Hv1 [J]. *Theriogenology*, 2017, 104: 37-42.
 - [16] Wang S, Duan Y, Yan Y, et al. Improvement of sperm cryo-survival of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) by commercial egg-yolk-free freezing medium with type III antifreeze protein [J]. *Anim Reprod Sci*, 2019, 210: 106177.
 - [17] Si W, Zheng P, Li Y, et al. Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm [J]. *Am J Primatol*, 2004, 62(4): 301-306.
 - [18] Younis AI, Rooks B, Khan S, et al. The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa [J]. *J Androl*, 1998, 19(2): 207-214.
 - [19] Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures [J]. *Nature*, 1949, 164(4172): 666.
 - [20] 李森, 郁丽丽, 张艺宝, 等. 三种不同冷冻保护剂对小鼠附睾冷冻效果的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(2): 62-65.
 - Li M, Yu LL, Zhang YB, et al. Comparison of the effect of three cryoprotectants on vitrification cryopreservation of mouse epididymis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2014, 22(2): 62-65.
 - [21] Li YH, Cai KJ, Kovacs A, et al. Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa [J]. *J Androl*, 2005, 26(3): 387-395.
 - [22] 平述煌. 树鼩和猕猴精子冷冻保存工艺的创建和优化的研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学; 2011.
 - Ping SH. Cryopreservation of spermatozoa in Tree Shrews and Rhesus monkeys [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology; 2011.
 - [23] Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, et al. Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure [J]. *J Androl*, 2001, 22(6): 1012-1018.
 - [24] Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes [J]. *Cryobiology*, 1992, 29(2): 255-266.
 - [25] Yan Y, Ao L, Wang H, et al. Cryopreservation of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) sperm by using a commercial egg-yolkfree freezing medium [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2016, 55(6): 744-748.
 - [26] Colás C, Junquera C, Pérez-Pé R, et al. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock [J]. *Microsc Res Tech*, 2009, 72(8): 566-572.
 - [27] Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa [J]. *J Anim Sci*, 1973, 37(2): 528-531.
 - [28] Fernández-Juan M, Gallego M, Barrios B, et al. Immunohistochemical localization of sperm-preserving proteins in the ram reproductive tract [J]. *J Androl*, 2006, 27(4): 588-595.
 - [29] 任枚琪, 杨瀚云, 史潇. 精子功能的生理机制及研究进展 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2020, 39(6): 519-523.
 - Ren MQ, Yang HY, Shi X. Research progress in the physiological mechanism of sperm activation [J]. *J Int Reprod Health/Fam Plan*, 2020, 39(6): 519-523.
 - [30] 唐丹, 司晨洋, 严亚萍, 等. 低温定向冷冻法冻存食蟹猴精液的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(6): 1699-1701.
 - Tang D, Si CY, Yan YP, et al. Study on the preservation of frozen sperm of *Macaca fascicularis* by directional freezing technique [J]. *J Anhui Agri Sci*, 2014, 42(6): 1699-1701.
 - [31] 郑红, 李波, 杨世华, 等. 滇南小耳猪精液的直接冷冻保存 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(6): 61-65.
 - Zheng H, Li B, Yang SH, et al. Cryopreservation of sperm with directional freezing method in Yunnan Diannan miniature pig [J]. *Chin J Comp Med*, 2010, 20(6): 61-65.
 - [32] Li JH, Wei XY, Wang QH, et al. Homogeneous isolation of nanocellulose from sugarcane bagasse by high pressure homogenization [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(4): 1609-1613.
 - [33] 李杨, 李明达, 张毅方, 等. 低压均质处理对大豆分离蛋白溶解性及结构的影响 [J]. *农业机械学报*, 2019, 50(3): 345-351.
 - Li Y, Li MD, Zhang YF, et al. Effect of low pressure homogenization on solubility and structure of soybean protein isolate [J]. *T Chin Soc Agric Mach*, 2019, 50(3): 345-351.
 - [34] 汪俊跃, 何孟纤, 张树山, 等. 高压均质 (HPH) 处理鸡蛋卵黄对猪冻精质量的影响 [J]. *中国兽医科学*, 2021, 51(7): 932-938.
 - Wang JY, He MX, Zhang SS, et al. Effect of high pressure homogenization (HPH) on quality of boar cryopreservation semen [J]. *Chin Veter Sci*, 2021, 51(7): 932-938.
 - [35] Tomás RMF, Bailey TL, Hasan M, et al. Extracellular antifreeze protein significantly enhances the cryopreservation of cell monolayers [J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(10): 3864-3872.

[收稿日期] 2021-08-13

潘雅婧,张秋娥,张程斐,等. 甲炎康泰颗粒剂对自身免疫性甲状腺炎大鼠免疫相关细胞因子的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 77-83.

Pan YJ, Zhang QE, Zhang CF, et al. Effects of JiaYanKangTai granules on immune-associated cytokines in rats with autoimmune thyroiditis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 77-83.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.010

甲炎康泰颗粒剂对自身免疫性甲状腺炎大鼠 免疫相关细胞因子的影响

潘雅婧^{1,2}, 张秋娥^{2,3}, 张程斐², 吴丽丽², 秦灵灵², 胡凯文^{1*}, 刘铜华^{2*}

(1. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078; 2. 北京中医药大学中医养生学北京市重点实验室, 北京 100029;
3. 陕西中医药大学第一临床医学院, 西安 711301)

【摘要】 目的 检测甲炎康泰颗粒剂对自身免疫性甲状腺炎大鼠免疫相关细胞因子的影响, 探讨甲炎康泰颗粒剂改善自身免疫性甲状腺炎的作用机制。**方法** 30 只雌性 Lewis 大鼠随机选取正常组 10 只, 其余 20 只采用皮下注射甲状腺球蛋白结合口服碘水造模共 7 周。造模成功大鼠随机分为模型组 10 只、给药组 10 只。甲炎康泰颗粒剂连续干预 8 周后, ELISA 法检测甲状腺抗体水平; HE 染色观察甲状腺病理改变; qPCR 法检测靶点因子基因表达; 抗体芯片法检测靶点蛋白表达并绘制聚类热图。**结果** 模型组 TPOAb、TGAb 较正常组显著升高, 给药组 TPOAb、TGAb 较模型组显著降低。模型组甲状腺滤泡细胞破坏、大量淋巴细胞浸润, 给药组甲状腺病理改变较模型组缓解。模型组 IFN- γ 、TNF- α 、IL-17、CCL3、CX3CL1 基因表达量较正常组升高, 给药组 IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17、CCL3、CX3CL1 较模型组降低。各组间细胞因子聚类较好, 模型组 IL-17、CCL3、CX3CL1 蛋白表达量较正常组升高, 给药组 IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、CCL3、CX3CL1 较模型组降低。**结论** 甲炎康泰颗粒剂可调节免疫相关细胞因子而减轻自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺损伤。

【关键词】 甲炎康泰; 自身免疫性甲状腺炎; 细胞因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0077-07

Effects of JiaYanKangTai granules on immune-associated cytokines in rats with autoimmune thyroiditis

PAN Yajing^{1,2}, ZHANG Qiue^{2,3}, ZHANG Chengfei², WU Lili², QIN Lingling², HU Kaiwen^{1*}, LIU Tonghua^{2*}

(1. DongFang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China. 2. Key Laboratory of Health Cultivation of Beijing, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029. 3. the First School of Clinical Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 711301)

Corresponding author: LIU Tonghua. E-mail: thliu@vip.163.com; HU Kaiwen. E-mail: kaiwenh@163.com

【Abstract】 Objective This study aimed to investigate the effects of JiaYanKangTai granules on immune-associated cytokines in rats with autoimmune thyroiditis, and the mechanisms for treating autoimmune thyroiditis. **Methods** 30 Lewis rats were randomly assigned into the control group (CON, $n=10$) and the induced group ($n=20$). The induced rats were then randomly divided into the model group (EAT, $n=10$) and the administrative group (JYKT, $n=10$) after immunization by subcutaneous injections of thyroglobulin and drinking iodine-containing water for 7 weeks. Rats of the

【基金项目】 国家重大科技项目计划(2020AA005), 中医养生学北京市重点实验室(BZ0259)。

Funded by National Science and Technology Project(2020AA005), Key Laboratory of Health Cultivation of Beijing(BZ0259)。

【作者简介】 潘雅婧(1989—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 中西医结合防治内分泌代谢病和肿瘤研究。Email: panyajing@bucm.edu.cn

【通信作者】 刘铜华(1963—), 男, 教授、主任医师, 博士, 研究方向: 中医药防治内分泌代谢病临床和基础研究。Email: thliu@vip.163.com

胡凯文(1964—), 男, 教授、主任医师, 博士, 研究方向: 中西医结合防治肿瘤等病研究。Email: kaiwenh@163.com

* 共同通信作者

JYKT group were administrated JiaYanKangTai granules for 8 weeks. The expression levels of anti-thyroperoxidase (TPOAb) and anti-thyroglobulin (TGAb) were detected. Pathological changes of the thyroid were observed. Gene and protein expression levels of multiple cytokines were detected by qPCR and antibody arrays, respectively. Differentially-expressed cytokines were analyzed and cluster heatmapping was performed. **Results** Expression levels of TPOAb and TGAb were significantly higher in the EAT group than those in the CON group. Pathological changes to the thyroid were alleviated in the JYKT group compared with those in the EAT group. Gene expression levels of chemokine C-C Motif Chemokine Ligand 3 (CCL3), C-X3-C motif chemokine ligand 1 (CX3CL1), interleukin-17 (IL-17), interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were significantly higher in the EAT group than those in the CON group. Gene expression levels of CCL3, CX3CL1, IL-4, IL-17, IFN- γ and TNF- α were significantly lower in the JYKT group than those in the EAT group. Differential-expressed cytokines were well-clustered. Protein expression levels of CCL3, CX3CL1 and IL-17 were significantly higher in the EAT group than those in the CON group. Protein expression levels of CCL3, CX3CL1, IL-4, IFN- γ and TNF- α were significantly lower in the JYKT group than those in the EAT group. **Conclusions** JiaYanKangTai granules alleviated damage of the thyroid in autoimmune thyroiditis by regulating immune-related cytokines.

【Keywords】 JiaYanKangTai granules; autoimmune thyroiditis; cytokine

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

自身免疫性甲状腺疾病是临床常见的一类器官特异性自身免疫性疾病,主要包括桥本氏甲状腺炎、Graves'病等^[1-2],发病与遗传易感性、环境因素、情绪压力等因素相关,发病率因年龄、性别、种族、地域而异^[3-4]。流行病学调查显示,自身免疫性甲状腺疾病在女性人群发病率为 5% ~ 15%,在男性人群发病率 1% ~ 5%,且遗传率较高(55% ~ 75%)^[4]。自身免疫性甲状腺疾病是临床甲状腺功能异常主要原因,对包括甲状腺在内的全身多器官和系统造成损害,影响患者生活质量。现代医学以对症治疗为主,包括饮食管控、甲状腺素替代治疗、糖皮质激素或免疫调节剂治疗和外科手术等^[5-6]。在缓解症状、改善生活质量等方面仍缺乏有针对性的、安全有效的药物,中医药治疗在降低抗体滴度、改善临床症状、缓解甲状腺肿大、缩短病程等方面有独特优势^[7]。

甲炎康泰为北京中医药大学东方医院院内制剂,已获国家专利(专利号 ZL 201610642433.6),由柴胡、郁金、夏枯草、穿山龙、浙贝母、玄参、山慈菇、黄芪、乌梅九味中药组成,具有疏肝解郁、化痰祛瘀、软坚散结之效^[8-9]。甲炎康泰治疗甲状腺疾病临床疗效明确,对患者急躁、易怒、乏力、心悸等症状改善明显,组方中药活性成分多、作用靶点广泛,作用机制值得深入研究。本研究在课题组前期基础上,结合高特异性、高通量的抗体芯片技术,检测甲炎康泰颗粒剂对实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠(experimental autoimmune thyroiditis, EAT)免疫相关细胞因子的影响,补充甲炎康泰改善自身免疫性甲状腺炎作用机制,为其临床应用提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 5 周龄 SPF 级雌性 Lewis 大鼠,体重约 150 g,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】。大鼠饲养于北京中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房【SYXK(京)2020-0033】。饲养环境:温度(22 ± 3)℃、相对湿度 55% ± 10%,12 h 光照/12 h 黑暗交替循环。本实验严格执行中华人民共和国国家标准 GB14925-2001 并通过北京中医药大学动物实验伦理委员会审查批准(BUCM-4-202922901-4148)。

1.1.2 主要试剂与仪器

甲状腺球蛋白(美国 Sigma, T1126-1G)、完全弗氏佐剂(美国 Sigma, F5881)、不完全弗氏全佐剂(美国 Sigma, F5506)、碘化钠(上海源叶生物, S30233)、甲状腺球蛋白 ELISA 试剂盒(武汉华美生物, CSB-E11199r)、HiScript III RT SuperMix(南京诺唯赞生物, R323-01)、Taq Pro Universal SYBR Qpcr Master Mix(南京诺唯赞生物, Q712-02)、大鼠抗体芯片试剂盒(美国 Raybiotech, QAR-CYT-3、QAR-CYT-4)、甲炎康泰颗粒剂(北京康仁堂药业,批号: DRUG-N202103171200585990)。

光学显微镜(Olympus, BX53, 日本)、酶标仪-多功能检测系统(Promega, GloMax-Multi, 美国)、电子天平(Mettler-Toledo, ML54/02, 中国)、离心机(Sigma, 3K15, 德国)、实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 7500 Real time PCR System, 美

国),芯片扫描仪(Innopsys,InnoScan 300,法国)。

1.2 方法

1.2.1 造模、分组及给药

大鼠适应性喂养 1 周后,按体重随机分为正常组 10 只、造模组 20 只。正常组大鼠自由摄食饮水。造模组大鼠饮用含碘水(含碘化钠 0.064%),第 3 周初次免疫,以完全弗式佐剂 1:1 乳化甲状腺球蛋白(终浓度 0.05%),在大鼠颈后部、左右下腹部皮下注射混合乳化剂每只 0.2 mL,间隔 2 d 先后注射 2 次。第 4 ~ 7 周强化免疫,以不完全弗式佐剂 1:1 乳化甲状腺球蛋白(终浓度 0.05%),在相同部位皮下注射混合乳化剂每只 0.2 mL,每周 1 次,共 4 次。

第 7 周末,检测血清甲状腺过氧化物酶抗体(thyroid peroxidase antibody, TPOAb)、甲状腺球蛋白抗体(thyroglobulin antibody, TGAAb)水平,鉴定是否成模。将造模成功大鼠按抗体水平随机分为模型组和给药组。给药组灌胃胃炎康泰溶液,灌胃剂量 2.834 g/(kg·d)(参照人和动物体表面积等效剂量换算,并结合本课题组前期多次实验确定^[10-11]),每日 1 次;正常组和模型组用等容量去离子水灌胃,灌胃容量 10 mL/kg,每日 1 次,连续给药 8 周。

1.2.2 甲状腺抗体水平检测

大鼠采用 2%戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)麻醉后经腹主动脉取血,3000 rpm 离心 10 min 后分离上层血清。ELISA 法检测血清 TPOAb、TGAAb 水平:在已包被的酶标板每孔加入生物素标志物反应液 50 μ L,再分别在标准品孔、样品孔中依次分别加入标准品 S₁ ~ S₆、待测血清样品 50 μ L,37℃ 孵育 1 h 后充分洗涤;在每孔加入辣根过氧化物酶标记亲和素反应液 50 μ L,37℃ 孵育 30 min 后充分洗涤;在每孔加入发光底物 A 和发光底物 B 各 50 μ L,37℃ 避光孵育 15 min 后,在每孔加入反应终止液 50 μ L。酶标仪测定光度值(OD₄₅₀),用标准品绘制标准曲线,并计算各血清样品浓度。

1.2.3 甲状腺形态观察

每组各取 3 只大鼠,采用 2%戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)麻醉后沿腹中线向上,剖开胸腔,小心剥离心包膜及周围组织,充分暴露心脏通过心脏灌注固定:注射针头沿心尖插入升主动脉方向,剪开右心耳,依次向大鼠体内注入足量生理盐水、4%多聚甲醛。固定后于冰上快速剥取大鼠甲状腺,置于

4%多聚甲醛溶液,制作石蜡切片,HE 染色,显微镜下观察甲状腺形态改变。

1.2.4 靶点基因表达水平检测

实时荧光定量检测白介素 4(interleukin-4, IL-4)、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 17(interleukin-17, IL-17)、趋化因子 CC 亚群配体 3(C-C motif chemokine ligand 3, CCL3)、趋化因子 CX3C 亚群配体 1(C-X3-C motif chemokine ligand 1, CX3CL1) 基因表达。TRIzol 法提取大鼠甲状腺 RNA:向甲状腺组织加入适量 TRIzol, 12 000 rpm 4℃ 离心 5 min 取上清,加氯仿震荡,离心后取上清,加异丙醇沉淀 RNA,离心后取上清,加无水乙醇洗脱,得到 RNA 沉淀。使用 HiScript III RT SuperMix 试剂盒配制反转录体系,反应条件为:42℃ 2 min 去除 DNA;37℃ 15 min→85℃ 5 s,冷却后得到 cDNA。使用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 qPCR 扩增,反应条件为:95℃ 30 s 预变性;95℃ 10 s→60℃ 30 s,40 循环;95℃ 15 s→60℃ 60 s→95℃ 15 s 检测融解曲线。待测基因相对表达量以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 表示。(待测基因上下游引物序列如表 1 所示)。

表 1 待测基因上下游引物序列

Table 1 Forward and reverse primers of target genes	
基因名称 Genes	上下游序列 Forward and reverse primers
IL-4	F:5'-TGATGTACCTCCGTGCTTGA-3' R:5'-TTCCTCGTAGGATGCTTTT-3'
IFN- γ	F:5'-AGCCAGTACAGACGAAGA-3' R:5'-GCCTGAGCCAGAAACCT-3'
TNF- α	F:5'-CTCATTCTGCTCGTGG-3' R:5'-CTCCGCTTGGTGTTT-3'
IL-17F	F:5'-TCCCTCCGAAGGACCAG-3' R:5'-GACACTCAGGCTGTATCAACG-3'
CCL3	F:5'-GCTGCCCTTGCTGTTCTTCT-3' R:5'-CAAAGGCTGCTGGTCTCAAA-3'
CX3CL1	F:5'-TGTTTATCACTCCTGTCCTG-3' R:5'-GCCTTCCACCATCTCCC-3'
GAPDH	F:5'-CTCTGCTCCTCCCTGTTTC-3' R:5'-CGATACGGCCAAATCC-3'

1.2.5 靶点蛋白表达水平检测

采用抗体芯片检测蛋白表达水平:试剂盒室温平衡 30 min,抗体芯片超净台中干燥 2 h。按试剂盒说明书梯度稀释混合细胞因子标准品。向芯片每孔加入 100 μ L 封闭液,室温摇床封闭 1 h。向每孔加入 60 μ L 标准液或待测样品,4℃ 摇床孵育过夜。次日洗板,每孔加入 150 μ L 洗液 I 清洗每次 5 min、

进行 5 次;再加入 150 μL 洗液 II 清洗每次 5 min、进行 5 次。洗净后向每孔加入 80 μL 混合细胞因子抗体,室温摇床孵育 2 h。再次分别用洗液 I、洗液 II 洗板。洗净后向每孔加入 80 μL Cy3-链霉亲和素,室温避光摇床孵育 1 h。再次先后用洗液 I、洗液 II 充分洗涤并干燥芯片。采用芯片扫描仪扫描,扫描波长 532 nm,分辨率 10 μm 。通过 Raybiotech 软件提取数据,计算各细胞因子相对表达量并绘制聚类热图。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 (中文版) 软件进行数据统计。符合正态分布的定量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式示出,多组资料之间比较采用单因素方差分析;非正态分布的定量资料和计数资料采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 甲状腺抗体水平

如表 2 所示,模型组大鼠血清 TPOAb、TGAb 抗体表达量较正常组显著升高 ($P < 0.01$);给药组大鼠血清 TPOAb、TGAb 抗体表达量较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。

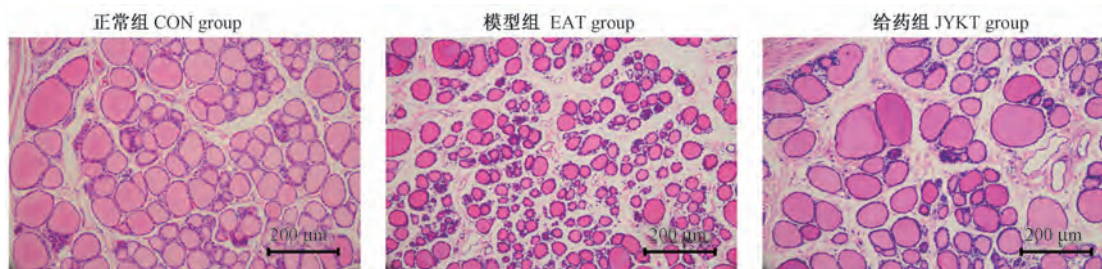


图 1 大鼠甲状腺形态

Figure 1 Morphology of thyroids of rats

2.4 靶点蛋白水平和聚类分析

如图 3 所示,对以上细胞因子绘制聚类热图,正常组与模型组、给药组两两之间细胞因子差异显著,聚类较好。如图 4 所示,模型组 IL-17、CCL3、CX3CL1 蛋白表达量较正常组显著升高 ($P < 0.01$);给药组 IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、CCL3、CX3CL1 蛋白表达量较模型组显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

在中医药理论中,自身免疫性甲状腺疾病属于“瘰病”“瘰瘤”范畴,病位主要在颈前甲状腺,与肝、脾密切相关,基本病机为气滞、血瘀、痰凝壅结颈

表 2 大鼠血清 TPOAb、TGAb 抗体水平

Table 2 Expressions of serum TPOAb and TGAb		
组别 Groups	TPOAb (IU/mL)	TGAb (IU/mL)
正常组 CON group	26.186 $\pm$ 2.563	13.456 $\pm$ 0.597
模型组 EAT group	248.872 $\pm$ 45.638**	76.540 $\pm$ 10.495**
给药组 JYKT group	186.585 $\pm$ 30.360 [#]	63.089 $\pm$ 3.577 [#]

注:与正常组比,** $P < 0.01$;模型组比,[#] $P < 0.05$ 。(下同)

Note. Compared with CON group,** $P < 0.01$. Compared with EAT group,[#] $P < 0.05$. (The same in the following figures)

2.2 甲状腺形态变化

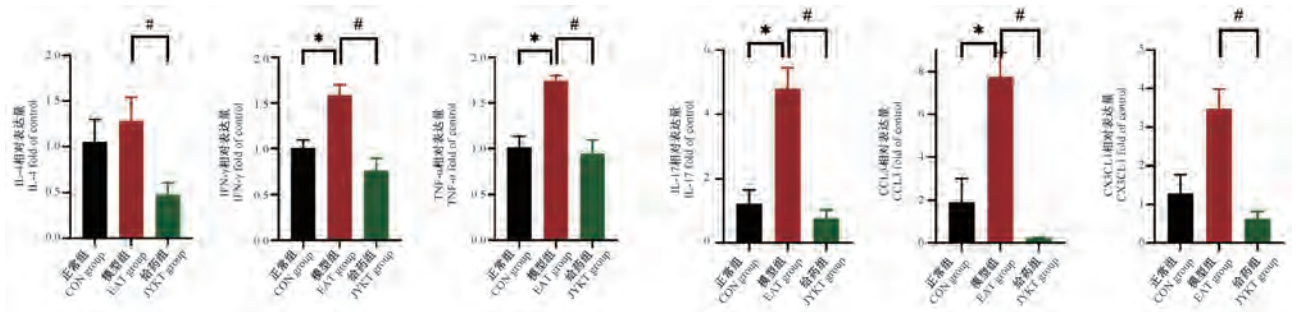
如图 1 所示,正常组大鼠甲状腺滤泡结构正常,滤泡腔内红色胶质饱满、分布均匀,滤泡上皮细胞排列紧密。与正常组相比,模型组大鼠甲状腺滤泡细胞结构存在不同程度破坏,滤泡上皮细胞排列不紧密,滤泡体积变小、数量增多、滤泡腔皱缩,腔内胶质减少,滤泡间质存在大量淋巴细胞浸润。与模型组相比,给药组大鼠甲状腺滤泡细胞结构破坏程度较轻,滤泡腔皱缩、胶质减少、滤泡间质淋巴细胞浸润等情况有所缓解。

2.3 靶点基因水平

如图 2 所示,模型组 IFN- γ 、TNF- α 、IL-17、CCL3、CX3CL1 基因相对表达量较正常组显著升高 ($P < 0.05$);给药组 IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17、CCL3、CX3CL1 基因表达量较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。

前。其发病与情志内伤密切相关。长期郁怒忧思、情志不遂,导致肝气郁结,或痰湿凝聚,或气滞血瘀,或气郁化火,发为瘰病^[12]。中医药在治疗瘰病方面历史悠久,经验丰富,是单独使用中药治疗有效的优势病种,在降低抗体水平、改善不适症状、缩短病程等方面有一定优势。其中,疏肝解郁、化痰祛瘀、软坚散结是治疗瘰病重要方法。

甲炎康泰是刘铜华教授总结多年临床诊疗经验提出的治疗甲状腺疾病经验方,为北京中医药大学东方医院院内制剂,广泛用于肝郁气滞、痰凝血瘀型甲状腺疾病的治疗。方中柴胡、郁金为君药,共奏疏肝解郁之效;夏枯草、穿山龙为臣药,共助君

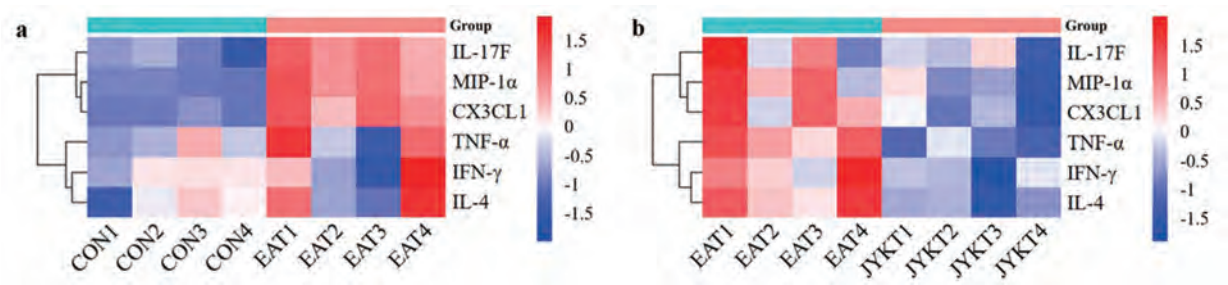


注:与正常组比,* $P < 0.05$;与模型组比,# $P < 0.05$ 。

图 2 大鼠 IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17、CCL3、CX3CL1 基因相对表达量

Note. Compared with CON group, * $P < 0.05$. Compared with EAT group, # $P < 0.05$.

Figure 2 Gene expressions of IL-4, IFN- γ , TNF- α , IL-17, CCL3 and CX3CL1

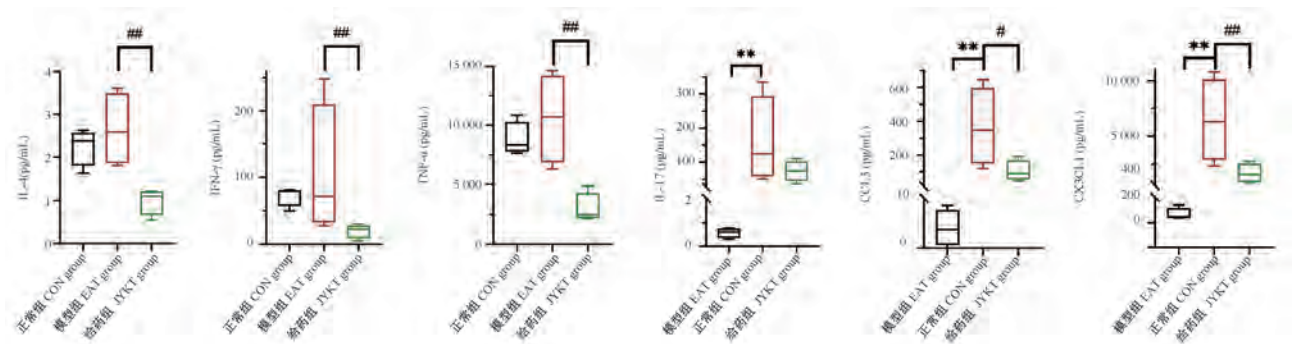


注:CON:正常组;EAT:模型组;JYKT:给药组。

图 3 大鼠差异表达细胞因子热图

Note. CON. The control group. EAT. The model group of experimental autoimmune thyroiditis. JYKT. The administrative group by JiaYanKangTai granules.

Figure 3 Clustering heatmaps of differential-expressed cytokines



注:与正常组比,** $P < 0.01$;与模型组比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图 4 大鼠 IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17、CCL3、CX3CL1 表达量

Note. Compared with CON group, ** $P < 0.01$. Compared with EAT group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 4 Expressions of IL-4, IFN- γ , TNF- α , IL-17, CCL3 and CX3CL1

药以清肝散结、化痰通络;浙贝母、玄参、山慈菇、黄芪为佐药,一则清热解毒、化痰除湿、软坚散结,一则补脾益气,祛邪而不伤正;乌梅为使药,收敛生津,以防诸药苦寒伤阴。诸药相合,从肝论治,共奏疏肝解郁、化痰祛瘀、软坚散结之功。临床试验证实甲炎康泰治疗桥本氏甲状腺炎证属肝郁气滞、痰凝血瘀者,可显著改善急躁易怒、神疲乏力、太息心

悸等症状,降低抗体水平,缓解甲状腺肿大^[8-9,13]。

自身免疫性甲状腺炎发生时,T、B 淋巴细胞、巨噬细胞、浆细胞等浸润甲状腺,诱发免疫紊乱。本实验采用甲状腺球蛋白免疫佐剂联合口服碘剂诱导作为体内模型,该模型是研究自身免疫性甲状腺炎的经典模型,通过外源性甲状腺球蛋白触发大鼠产生免疫反应,通过免疫佐剂打破免疫耐受稳态,

较好地模拟了甲状腺肿大、甲状腺滤泡破坏及功能障碍、淋巴细胞浸润等病理特点,具有可重复性好、成模率高等优势^[7,14]。在此模型上发现甲炎康泰颗粒剂(2.834 g/(kg·d))可降低甲状腺抗体水平,缓解甲状腺滤泡结构破坏、胶质减少、淋巴细胞浸润等病理改变,从而减轻自身免疫性甲状腺炎甲状腺损伤。

研究证实自身免疫性甲状腺疾病存在淋巴细胞免疫紊乱和功能障碍,当甲状腺炎发生时,B 淋巴细胞产生大量抗甲状腺抗体,产生细胞毒作用,造成甲状腺损害,Th1、Th2、Th17 等大量淋巴细胞浸润并破坏甲状腺正常结构,分泌 IL-1 β 、IL-4、IFN- γ 、IL-17 等多种效应因子进一步放大免疫效应,导致免疫紊乱,加剧甲状腺结构和功能的破坏^[15]。促炎性因子 IFN- γ 和 IL-4 分别是诱导 Th1、Th2 细胞介导免疫应答的关键指示信号,并可调控 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、PGE2 等炎症因子释放,诱导淋巴细胞浸润甲状腺,并放大免疫反应效应^[16-18]。IL-17 是 Th17 细胞效应因子,可招募中性粒细胞,刺激多种促炎性因子分泌,加速自身免疫性甲状腺炎进展^[19]。很多趋化因子与自身免疫性甲状腺疾病相关,CCL3 与甲状腺免疫密切相关,可反映甲状腺免疫紊乱早期病变^[20],CX3CL1 是唯一一种细胞内化的趋化因子,甲状腺激素可通过驱动整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 内化而调节 CX3CL1 及其受体 CX3CR1 表达,诱导白细胞趋化和黏附,诱导 CD8+ 淋巴细胞、NK 细胞迁移和黏附,导致甲状腺免疫紊乱^[21-22]。本实验结合抗体芯片检测技术同时检测多种细胞因子,该技术具有灵敏性高、特异性强、准确性好等优势,在自身免疫性疾病、心血管疾病、肿瘤等学科新药研发、靶点筛选、药物机制探索领域发挥重要作用^[23-24]。通过模型组和正常组比较发现 IL-4、IL-17、IFN- γ 、TNF- α 、CCL3、CX3CL1 等免疫相关细胞因子与自身免疫性甲状腺炎发病相关,与既往研究相一致。甲炎康泰颗粒剂可通过调节这些免疫相关细胞因子表达而减轻甲状腺损伤,从而发挥治疗作用。

综上,本实验在 EAT 大鼠模型上验证了甲炎康泰颗粒剂可调节免疫相关细胞因子表达水平,减轻自身免疫性甲状腺炎的甲状腺损伤,初步阐明了甲炎康泰干预自身免疫性甲状腺炎机制,为其临床应用提供了实验证据,后续实验需对相关靶点因子及上下游通路做进一步深入验证。

参 考 文 献 (References)

- [1] Botello A, Herrón M, Salcedo V, et al. Prevalence of latent and overt polyautoimmunity in autoimmune thyroid disease: a systematic review and meta-analysis [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2020, 93(4): 375-389.
- [2] Ragusa F, Fallahi P, Elia G, et al. Hashimotos, thyroiditis: epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2019, 33(6): 101367.
- [3] Merrill SJ, Minucci SB. Thyroid autoimmunity: an interplay of factors [J]. Vitam Horm, 2018, 106: 129-145.
- [4] Martin TC, Ilieva KM, Visconti A, et al. Dysregulated antibody, natural killer cell and immune mediator profiles in autoimmune thyroid diseases [J]. Cells, 2020, 9(3): 665-688.
- [5] Lontiris MI, Mazokopakis EE. A concise review of Hashimoto thyroiditis (HT) and the importance of iodine, selenium, vitamin D and gluten on the autoimmunity and dietary management of HT patients. Points that need more investigation [J]. Hell J Nucl Med, 2017, 20(1): 51-56.
- [6] Biondi B, Cappola AR, Cooper DS. Subclinical hypothyroidism: a review [J]. JAMA, 2019, 322(2): 153-160.
- [7] Ma B, Chen D, Liu Y, et al. Yanghe decoction suppresses the experimental autoimmune thyroiditis in rats by improving NLRP3 inflammasome and immune dysregulation [J]. Front Pharmacol, 2021, 21(12): 645354.
- [8] 刘铜华. 一种治疗桥本氏甲状腺炎的药物组合物及其制备方法: CN106421633B [P]. 2019-06-18.
Liu TH. The components and preparations of a new prescription for Hashimoto's thyroiditis: CN106421633B [P]. 2019-06-18.
- [9] 邓莉. 甲炎康泰治疗桥本氏甲状腺炎的临床疗效观察及药效研究 [D]. 西安: 陕西中医药大学; 2016.
Deng L. Clinical observation of the effect of Jia Yan Kang Tai mixture on the treatment of Hashimoto's thyroiditis and efficacy study [D]. Xi'an: Shaanxi University of Chinese Medicine; 2016.
- [10] Hou Y, Guo X, Zhang C, et al. Protective effects of Jiayan Kangtai granules on autoimmune thyroiditis in a rat model by modulating Th17/Treg cell balance [J]. J Tradit Chin Med, 2018, 38(3): 380-390.
- [11] 张程斐, 王明慧, 孙伯菊, 等. 甲炎康泰对自身免疫性甲状腺炎大鼠 T-bet/GATA3 的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(10): 3437-3442.
Zhang CF, Wang MH, Sun BJ, et al. Effect of Jia-Yan-Kang-Tai on T-bet/GATA3 in thyroid tissue and spleen of autoimmune thyroiditis rats [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2020, 22(10): 3437-3442.
- [12] 钱晨宏, 蒋烈浩, 郑国湾, 等. 中医药治疗桥本甲状腺炎现状与进展 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2021, 31(3): 287-289.
Qian CH, Jiang LH, Zheng GW, et al. Status and progress of

- Chinese medicine for Hashimoto's thyroiditis [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med, 2021, 31(3): 287-289.
- [13] 丁雷, 董笑克, 刘玮, 等. 刘铜华教授治疗自身免疫性甲状腺炎的临床经验 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(10): 3456-3460.
- Ding L, Dong XK, Liu W, et al. Professor Liu Tonghua's clinical experience in treatment of autoimmune thyroiditis [J]. World Sci Tech Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2020, 22(10): 3456-3460.
- [14] Faustino LC, Li CW, Stefan-Lifshitz M, et al. A novel mouse model of autoimmune thyroiditis induced by immunization with adenovirus containing full-length thyroglobulin cDNA; Implications to genetic studies of thyroid autoimmunity [J]. Thyroid, 2020, 30(9): 1338-1345.
- [15] Li Q, Wang B, Mu K, et al. The pathogenesis of thyroid autoimmune diseases; New T lymphocytes-Cytokines circuits beyond the Th1-Th2 paradigm [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2204-2216.
- [16] 周芳宇, 王欣, 谭贵琴, 等. Graves 病细胞免疫学机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 98-102.
- Zhou FY, Wang X, Tan GQ, et al. Advances in research on cellular immunological mechanism of Graves' disease [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 98-102.
- [17] Fallahi P, Ferrari SM, Ragusa F, et al. Th1 chemokines in autoimmune endocrine disorders [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2020, 105(4): dgz289.
- [18] Di Dalmazi G, Chalan P, Caturegli P. MYMD-1, a novel immunometabolic regulator, ameliorates autoimmune thyroiditis via suppression of Th1 responses and TNF- α release [J]. J Immunol, 2019, 202(5): 1350-1362.
- [19] Zake T, Skuja S, Kalere I, et al. Upregulated tissue expression of T helper (Th) 17 pathogenic interleukin (IL)-23 and IL-1 β in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease [J]. Endocr J, 2019, 66(5): 423-430.
- [20] Massolt ET, Effraïmidis G, Korevaar TI, et al. Aberrant levels of hematopoietic/neuronal growth and differentiation factors in euthyroid women at risk for autoimmune thyroid disease [J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153892.
- [21] Dhaiban S, Al-Ani M, Elemam NM, et al. Targeting chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Inflamm Res, 2020, 13: 619-633.
- [22] Davis PJ, Glinsky GV, Lin HY, et al. Actions of thyroid hormone analogues on chemokines [J]. J Immunol Res, 2016, 2016: 3147671.
- [23] Poulsen TBG, Karamehmedovic A, Aboo C, et al. Protein array-based companion diagnostics in precision medicine [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2020, 20(12): 1183-1198.
- [24] 康婷, 陈波, 欧三桃. 慢性肾脏病血管钙化大鼠血清炎症因子抗体芯片检测及分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 9-15.
- Kang T, Chen B, Ou ST. Antibody microarray analysis of serum inflammatory cytokines in rats with chronic renal disease vascular calcification [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 9-15.

[收稿日期] 2021-08-31

龚丽景, 贾杰, 付鹏宇. 基于 RNA 测序分析不同低氧暴露模式对大鼠胫骨前肌差异基因表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 84-91.

Gong LJ, Jia J, Fu PY. RNA sequencing analysis of differentially expressed genes of the anterior tibial muscle in rats after different modes of hypoxia exposure [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 84-91.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.011

基于 RNA 测序分析不同低氧暴露模式对大鼠 胫骨前肌差异基因表达的影响

龚丽景¹, 贾杰², 付鹏宇^{3*}

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

【摘要】 目的 筛选慢性间歇低氧暴露和急性低氧暴露对大鼠胫骨前肌差异表达基因及其相关通路分析。**方法** SD 大鼠 24 只, 分为常氧对照组(C 组)、慢性间歇低氧组(IH 组, 氧浓度为 12.4%, 每天 8 h, 共 4 周)和急性低氧组(AH 组, 氧浓度为 12.4%, 每天 24 h, 共 3 d)。干预后, 测试抓力和瘦体重, 取胫骨前肌(TA)进行 HE 染色后, 再统计肌纤维横截面积(FCSA), Western Blot 法测试 Atrogin-1 和 MuRF1 的蛋白相对含量, 并提取大鼠 TA 总 RNA 进行测序, 筛选其差异基因, 并分析相关的生物过程(BP)和通路(pathway)。**结果** (1)干预期间各时间点 IH 组体重低于 C 组, AH 组体重持续下降; 干预后, AH 组瘦体重和相对抓力显著低于 C 组($P < 0.05$)。(2)IH 组和 AH 组肌纤维形态出现损伤, 且 IH 组更加明显, 而各组 TA 的 FCSA 无显著差异。(3)IH 组 TA 中 Atrogin-1 和 MuRF1 含量显著均高于 C 组, AH 组中 MuRF1 含量显著高于 C 组($P < 0.05$)。(4)筛选差异基因发现, 在 AH/C 组上调而在 IH/C 组下调的差异基因为慢肌结构相关基因。GO 和 KEGG 分析可知, IH/C 组差异基因主要富集于 PPAR 通路; 上调差异基因功能富集在抗氧化和糖脂代谢过程, 下调基因富集在快慢肌之间转化和氧化应激过程; AH/C 组上调差异基因功能主要富集于氧化应激、炎症反应和快肌和慢肌之间的转化, 下调基因富集于 smad 蛋白信号转导和泛素蛋白连接酶结合等过程。**结论** 慢性间歇低氧和急性低氧影响大鼠胫骨前肌差异表达分别富集于影响糖脂代谢水平和促进氧化应激及炎症反应上, 说明不同低氧模式可通过不同转录途径而影响骨骼肌的代谢。

【关键词】 慢性间歇低氧; 急性低氧; 骨骼肌; RNA 测序

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0084-08

RNA sequencing analysis of differentially expressed genes of the anterior tibial muscle in rats after different modes of hypoxia exposure

GONG Lijing¹, JIA Jie², FU Pengyu^{3*}

(1. Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing Sport University, Beijing 100084, China. 2. Sport Science College, Beijing Sport University, Beijing 100084.
3. Department of Physical Education, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072)

Corresponding author: FU Pengyu. E-mail: 1402884452@qq.com

【Abstract】 Objective Screening for differentially expressed genes (DEGs) in anterior tibial muscle of rats and pathway analysis after chronic intermittent hypoxia and acute hypoxia exposure. **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into the normoxia control group (C group), the chronic intermittent hypoxia group (IH group, 12.4% O₂, 8 h/d, 4 weeks) and the acute hypoxia group (AH group, 12.4% O₂, 24 h/d, 3 d). The grasping force and lean

【基金项目】 中央高校基本科研业务费专项资金资助课(2021TD012)。

Funded by the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China(2021TD012)。

【作者简介】 龚丽景(1981—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 运动与脂肪代谢, 低氧与骨骼肌萎缩。Email: lijing.gong@bsu.edu.cn

【通信作者】 付鹏宇(1991—), 女, 助理教授, 博士, 研究方向: 低氧与骨骼肌萎缩。Email: 1402884452@qq.com

body weight were examined after the interventions. The anterior tibial muscle (TA) fiber cross-sectional area (FCSA) was examined by hematoxylin/eosin staining. Relative protein expression levels of Atrogin-1 and muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) were examined by western blotting. Total RNA of TA was extracted and sequenced, DEGs were screened, and the biological process (BP) and pathways enriched by DEGs were analyzed. **Results** (1) During the intervention, body weights of the IH group were lower than those of the C group at each time point, and the body weight of AH group continued to decrease. After the intervention, the lean body weight and relative grip in the AH group were significantly lower than in the C group ($P < 0.05$). (2) The morphology of muscle fibers of the TA was destroyed in the IH and AH groups, and was more obvious in the IH group, but there were no significant differences in FCSA. (3) The levels of Atrogin-1 and MuRF1 in TA in the IH group were significantly higher than those in the C group, and the MuRF1 level in the AH group was significantly higher than the C group ($P < 0.05$). (4) The DEGs up-regulated in AH/C group comparison but down-regulated in the IH/C group comparison were slow muscle structure-related genes. Gene Ontology and KEGG analysis showed that the DEGs in the IH/C group were mainly enriched in peroxisome proliferator-activated receptor signaling pathway and other pathways. The function of up-regulated DEGs was mainly concentrated in the process of antioxidant and glycolipid metabolism, and for down-regulated genes were concentrated in the processes of transformation between fast and slow muscles and oxidative stress. The functions of up-regulated DEGs in the AH/C group were mainly concentrated in oxidative stress, inflammatory response and transformation between fast and slow muscles, and for the down-regulated DEGs were concentrated in Smad protein signal transduction and ubiquitin protein ligase binding. **Conclusions** The DEGs of AT of rats affected by chronic intermittent hypoxia and acute hypoxia were enriched for processes in glycolipid metabolism and promoting oxidative stress and inflammatory responses, respectively, suggesting that different hypoxia modes affect skeletal muscle metabolism through different pathways.

【Keywords】 chronic intermittent hypoxia; acute hypoxia; skeletal muscle; RNA sequencing

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

骨骼肌是人体内最大的器官,是蛋白质储存和糖代谢的重要场所,在维持姿势、运动、呼吸、能量和代谢稳态、体温维持和调节及内分泌等方面都发挥着重要的作用^[1]。同时,骨骼肌也是高耗能组织,氧气不足会明显影响骨骼肌代谢,促进肌肉蛋白质代谢率增加,诱导肌萎缩,常见于缺氧性疾病如慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)和阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS)等,或见于世居平原者进入高原环境旅游、训练或从事军事活动。骨骼肌萎缩会导致肌肉质量减少、功能下降,从而威胁缺氧性疾病患者健康,减弱运动员和士兵高原训练的效果,或影响高原旅游大众的生产生活^[2]。

骨骼肌在缺氧时会经历 3 个时期:预警期、抵抗/适应期和失适应期^[3]。预警期中骨骼肌突然受到低氧刺激,会出现一系列应激反应,导致肌肉蛋白分解增加和一系列肌肉功能相关蛋白表达的改变;而在适应期内骨骼肌会发生解剖和生理上的过度补偿,随着低氧暴露时间的延长,又会进入失适应阶段,肌萎缩程度进一步加重。提示不同模式的低氧暴露诱导肌萎缩可能经历不同的生理过程。数日的急性低氧暴露可模拟初上高原的情况。研

究发现,8%氧浓度环境下暴露 2 d 和 4 d 均可导致小鼠骨骼肌蛋白质分解增加,诱导骨骼肌萎缩^[4]。慢性间歇低氧暴露可模拟生理性缺氧疾病的病理过程或运动员的低住高练(living low-training high, LoHi)的训练环境。研究显示,慢性间歇低氧暴露可降低大鼠的骨骼肌指数(骨骼四肢骨骼肌质量之和/身高²),促进大鼠骨骼肌组织和成肌细胞的衰老^[5]。上述研究证实急性低氧和慢性间歇低氧可诱导骨骼肌萎缩。

不同类型的肌纤维在形态、代谢和收缩特性等方面存在较大差异^[6]。低氧暴露所致的肌萎缩具有肌纤维选择性。本实验室前期研究对比了慢肌、快肌和混合肌对 4 周连续低氧(氧浓度 12.4%)的适应情况,发现快肌对低氧更为敏感^[7],因此本研究选择了快肌——胫骨前肌作为研究对象。有关低氧诱导肌萎缩的分子作用机制尚存在争议,多数研究以骨骼肌蛋白的合成和分解相关蛋白的表达入手,难以深入探究该过程的机制,且不同低氧暴露模式可能诱导不同的基因信号以参与肌萎缩的发生,因此本研究拟通过采用 RNA 测序的研究方法,探究急性低氧暴露和慢性间歇低氧暴露对大鼠胫骨前肌的差异基因表达影响及其富集通路,为治疗缺氧性疾病和防治高原肌萎缩提供可能的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 10 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,初始体重为 (333.56 ± 6.35) g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2015-0001】,随机分为常氧对照组(C组, $n=16$)和慢性间歇低氧组(IH组, $n=8$),IH组大鼠每天在氧浓度为 12.4% 的低氧房内暴露 8 h,共 4 周。在干预的第 25 天(干预结束前 3 d),将 C 组大鼠按体重随机均分为 2 组,一组继续维持 C 组常氧环境饲养,另一组命名为急性低氧组(AH组, $n=8$),AH组大鼠置于低氧房,干预方案为每天 24 h,氧浓度为 12.4%,共干预 3 d,分组情况如图 1。动物饲养在北京体育大学动物实验室【SYXK(京)2016-0033】内进行。本项目获得北京体育大学运动科学伦理审查委员会的批准(批准号:2019038A)。每天记录大鼠体重和摄食量。

1.1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(Merck, P8410), Anti-Atrogin1/Fbx32 (Abcam, ab74023), Anti-MuRF1 (Abcam, ab172479), Anti- α -tubulin (Sigma, T6074), 山羊抗兔二抗(LI-COR, 926-68071), RNA 保存液等为国产试剂。

小动物抓力仪(DB-YLS-13 A,北京智鼠多宝), 双能 X 射线骨密度仪(dual energy X-ray absorptiometer, DEXA; Lunar Idxa, 美国), 电子天平(Sartorius, 美国), 倒置光学显微镜(Leica, DMI3000, 德国), 电泳槽和干转转膜系统(Life Technologies, 美国), 近红外光谱(Near Infrared)检测系统(LI-COR, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 抓力仪测试抓力

每周训练大鼠练习 1 次抓力仪,干预结束即刻测试抓力,测量 3 次,取最大值,并计算相对抓力(最大抓力/体重)。

1.2.2 DEXA 法测量瘦体重

低氧干预结束后,所有大鼠禁食 12 h,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)麻醉,DEXA 测量体成分,计算瘦体重百分比(瘦体重/体重)。

1.2.3 取材

干预 4 周后,麻醉取材,心脏取血处死,取胫骨前肌(musculi tibialis anterior, TA),分成 3 份,1 份置于 RNA 保存液中,用于提取 RNA 和测序;1 份置于液氮冷冻后转移至 -80°C 保存,用于蛋白检测;第 3 份置于 4% 多聚甲醛中固定,后续石蜡包埋、切片和 HE 染色。

1.2.4 胫骨前肌肌纤维形态和面积计算

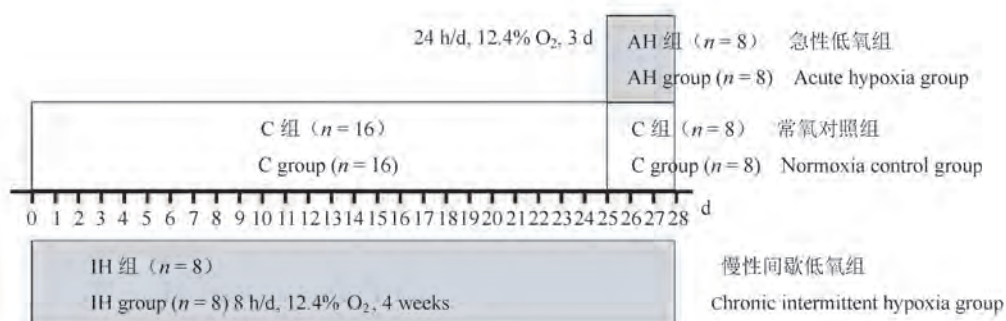
TA 组织 HE 染色后,在 10×40 倍镜下观察并拍照。肌纤维横截面积(fiber cross sectional area, FCSA)用软件 Image-Pro Plus(IPP)6.0 计算。

1.2.5 Western Blot 法检测蛋白质表达

TA 总蛋白质提取后,用聚丙烯酰胺梯度胶电泳分离蛋白,转膜至 NC 膜上,明胶溶液封闭,孵育 Atrogin1 和 MuRF1 抗体, 4°C 过夜,室温孵育山羊抗兔 IgG 抗体,最后使用 Image Studio Ver 5.2 软件曝光,对条带的信号值进行相对定量分析,以 α -tubulin 为内参。

1.2.6 骨骼肌 RNA 测序和功能分析

TA 的 RNA 提取后进行片段化处理,然后进行 cDNA 的合成,PCR 富集文库片段,基于华大基因 BGISEQ 平台进行 RNA 测序。对测序数据进行过



注:大鼠分组及干预情况示意图;白色框表示常氧环境,灰色框表示低氧环境。

图 1 大鼠分组及干预示意图

Note. The diagram of rats grouping and intervention. Normoxic environment in white box, hypoxic environment in grey box.

Figure 1 Diagram of rats grouping and intervention

滤、质量评估和比对结果评估, 然后进行表达量计算, 分析差异表达基因, 并使用基因本体论数据库 (Gene Ontology, GO) 分析、基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 对差异基因进行富集分析和 Pathway 分析。

1.3 统计学分析

数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行分析, 各组间比较采用单因素方差分析, 显著性差异以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示; 采用 DESeq 对基因表达进行差异分析, 筛选差异倍数 Fold Change > 2 , 显著性 P value < 0.05 被认为富集分析具有统计学意义。

2 结果

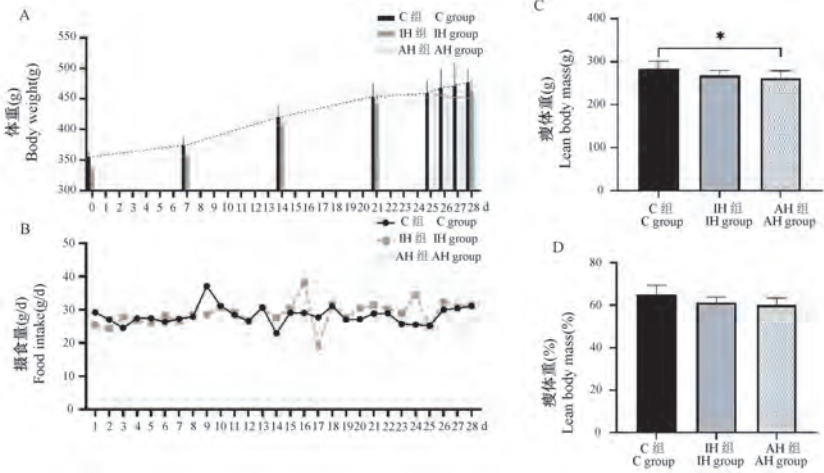
2.1 干预期间大鼠的体重、摄食量和瘦体重

干预期间, IH 组体重在各时间点均低于 C 组,

但无显著性差异; AH 组干预 3 d 期间呈下降趋势, 且随着干预时间的延长, AH 组较 C 组的体重差值逐渐增加 (各时间点下降率分别为 2.99%、3.76% 和 5.88%), 但各时间点较 C 组无显著差异, 如图 2A。IH 组摄食量在干预前 3 d 低于 C 组, 但在干预后期逐渐与 C 组接近; AH 组摄食量干预期间持续低于 C 组, 如图 2B。干预后测试各组大鼠瘦体重, AH 组大鼠瘦体重显著低于 C 组 ($P < 0.05$), IH 较 C 组也有下降趋势, 但无显著性差异, 如图 2C; 各组间瘦体重百分比无显著性差异, 如图 2D。

2.2 干预后大鼠抓力

干预末次测试大鼠抓力, 与 C 组相比, IH 组和 AH 组大鼠抓力均有下降, 且 AH 组下降更为明显, 但各组间无显著性差异, 如图 3A; 用抓力/体重表示相对抓力, 比较各组大鼠的相对抓力结果显示, AH 组抓力较 C 组显著下降 ($P < 0.01$), 如图 3B。

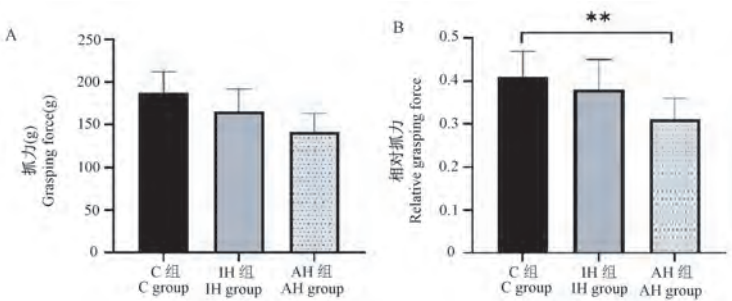


注: A: 干预期间体重 (g); B: 干预期间摄食量 (g/d); C: 干预后瘦体重 (g); D: 干预后瘦体重百分比 (瘦体重/体重); 与 C 组相比, $*P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠体重、摄食量变化和瘦体重

Note. A. Body weight during intervention (g). B. Food intake during intervention (g/d). C. Lean body mass after intervention (g). D. Percent of lean body weight after intervention (lean body weight/body weight). Compared with C group, $*P < 0.05$.

Figure 2 Changes of body weight, food intake and body mass in the rats



注: A: 抓力 (g); B: 相对抓力 (抓力/体重); 与 C 组相比, $**P < 0.01$ 。

图 3 干预后各组大鼠抓力和相对抓力

Note. A. Grasping force (g). B. Relative grasping force (grasping force/weight). Compared with C group, $**P < 0.01$.

Figure 3 Grasping force and relative grasping force of the rats after intervention

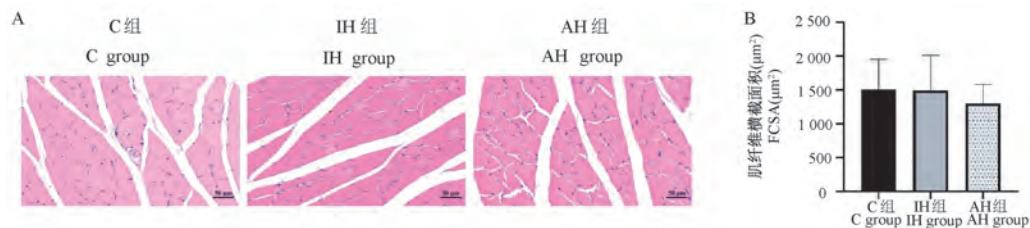
2.3 干预后大鼠胫骨前肌 FCSA

HE 染色观察大鼠 TA 肌纤维形态发现, AH 组和 IH 组较 C 组肌纤维形态呈现不规则状, 肌纤维面积大小不一, 肌间隔增加, 肌纤维出现裂痕, IH 组较 AH 组更加明显, 如图 4A; 统计 FCSA 结果显示, IH 组和 AH 组 FCSA 均低于 C 组, 但均无显著性差异, 如图 4B。

2.4 干预后大鼠肌萎缩蛋白 Atrogin1 和 MuRF1

含量

干预后, IH 组大鼠 TA 中肌萎缩相关蛋白肌萎缩 F-box 蛋白 (muscle-specific F-box protein, Atrogin1) 和肌肉特异性环指蛋白 1 (muscle-specific ring finger 1, MuRF1)^[8] 相对含量显著高于 C 组 ($P < 0.05$), AH 组大鼠肌萎缩蛋白 Atrogin1 相对含量显著高于 C 组 ($P < 0.05$), 如图 5。

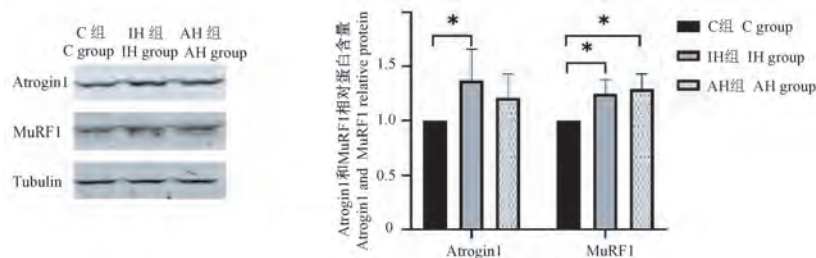


注: A: TA 的 HE 染色图; B: TA 的 FCSA (μm²)。

图 4 干预后各组大鼠肌纤维形态和 FCSA

Note. A. HE staining diagram of TA. B. FCSA of TA (μm²).

Figure 4 Muscle fiber morphology and FCSA of TA in the rats after intervention



注: Atrogin1 和 MuRF1 的 Western Blot 结果; 与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 干预后各组大鼠 TA 中 Atrogin1 和 MuRF1 蛋白条带和相对含量

Note. Western Blot of Atrogin1 and MuRF1. Compared with C group, * $P < 0.05$.

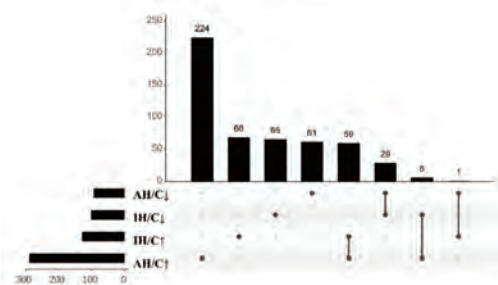
Figure 5 Atrogin1 and MuRF1 protein bands and relative content of TA in the rats after intervention

2.5 干预后大鼠 TA 测序结果

2.5.1 IH/C 组和 AH/C 组的差异基因筛选

IH/C 组差异基因共有 228 个, 其中上调基因 128 个, 下调基因 100 个; AH/C 组差异基因共有 380 个, 其中上调基因 289 个, 下调基因 91 个。

在 IH/C 组和 AH/C 组中均上调的基因有 59 个; 均下调的基因有 29 个; 在 AH/C 组中上调而在 IH/C 组中下调的基因有 6 个, 分别为: 慢肌肌钙蛋白 I1 (troponin I type 1, slow skeletal, TNNI1), 肌球蛋白轻链 2 (myosin light chain 2, MYL2), 慢肌肌钙蛋白 C1 (troponin C type 1, slow, TNNC1), 慢肌肌钙蛋白 T1 (troponin T type 1, slow skeletal, TNNT1), 锌指蛋白 385B (zinc finger protein 385B, ZFP385B) 和 LOC501116; 在 AH/C 组中下调而在 IH/C 组中上调的基因有 1 个, 为磷脂酶 A2 IIA (phospholipase A2, group IIA, PLA2G2A), 如图 6。



注: IH/C ↑ 表示 IH/C 组上调基因, IH/C ↓ 表示 IH/C 组下调基因; AH/C ↑ 表示 AH/C 组上调基因, AH/C ↓ 表示 AH/C 组下调基因。连线表示有交集。

图 6 IH/C 组和 AH/C 组上/下调差异基因 UpSet 图

Note. IH/C ↑ means up-regulated genes between IH groups and group C, IH/C ↓ means down-regulated genes between IH groups and group C. AH/C ↑ means up-regulated genes between AH groups and group C, AH/C ↓ means down-regulated genes between AH groups and group C. Lines represent intersections.

Figure 6 UpSet diagram of differential genes in groups IH/C and AH/C

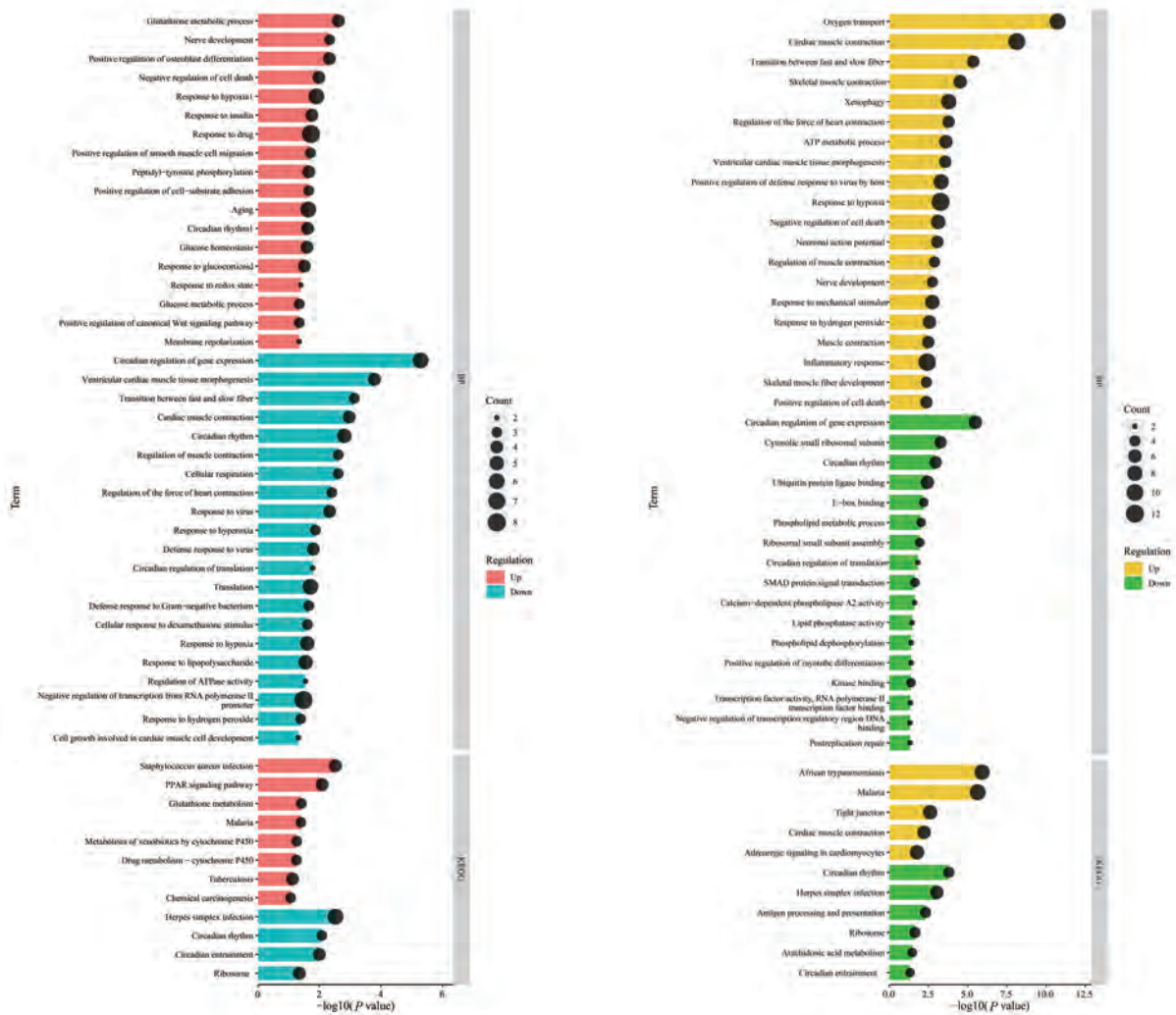
2.5.2 GO 分析差异基因所富集的生物过程

根据 *P* value 值大小排序,列出各组排名前 20 的上/下调差异基因所富集的生物过程 (biological process, BP) (从上至下 *P* value 值依次增加)。

IH/C 组上调差异基因所富集的 BP 主要为:谷胱甘肽代谢,细胞死亡的负性调节,低氧应答,胰岛素应答,葡萄糖稳态状态,对糖皮质激素的反应,对氧化还原状态的反应和葡萄糖代谢过程;IH/C 组下调差异基因 BP 主要为:快慢肌之间的转化,调节骨骼肌收缩,对过度缺氧的反应,对低氧的反应和对过氧化氢的反应。根据 *P* value 值大小排序,列出各组差异基因所富集的通路(从上至下 *P* value 值依次增加)。IH/C 组上调差异基因所富集的通路主

要为过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 信号通路和谷胱甘肽代谢通路 (glutathione metabolism),如图 7A。其中,PPAR 信号通路所富集的差异基因包括:脂联素 (adiponectin, ADIPOQ), 血管生成素样蛋白 4 (angiopoietin-like factor 4, ANGPTL4), 外周脂蛋白 1 (perilipin 1, PLIN1), 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, PCK1)。

AH/C 组上调差异基因所富集的 BP 主要为:氧气运输,快肌和慢肌之间的转化,骨骼肌收缩,ATP 代谢,低氧应答,神经元动作电位,肌肉收缩,对过氧化氢的反应,炎症应答,骨骼肌纤维发育和细胞死亡的调节;AH/C 组下调差异基因 BP 主要为:磷



注:A:IH/C 组差异基因所富集的 BP 及 Pathway;B:AH/C 组差异基因所富集的 BP 及 Pathway。

图 7 IH/C 组和 AH/C 组差异基因所富集的 BP 及 Pathway

Note. A. The enriched biological-process and pathway of differential genes in group IH/C. B. The enriched BP and pathway of differential genes in AH/C group.

Figure 7 Enriched BP and pathway of differential genes in groups IH/C and AH/C

脂代谢过程, smad 蛋白信号转导, 肌管分化的正向调节, 泛素蛋白连接酶结合, 脂质磷酸酶活性, 如图 7B。

3 讨论

生理性缺氧疾病和高原/低氧环境造成的骨骼肌萎缩都会给机体健康带来巨大风险。许多研究采用不同的低氧暴露时长和低氧浓度(海拔高度)均观察到了骨骼肌萎缩的现象, 其中在海拔 3700 ~ 4300 m 时, 瘦体重的减少最为明显^[9], 因此本研究选择了海拔 4000 m 所对应的氧浓度作为低氧干预浓度。但有关不同低氧暴露方式导致肌萎缩的作用机制尚无定论。

本研究显示, 慢性间歇低氧暴露后, 大鼠体重在干预期间持续低于常氧组, 4 周干预结束后, 虽然大鼠骨骼肌已对低氧产生一定的适应(表现为瘦体重、抓力、FCSA 无显著改变), 但 HE 染色可见 TA 肌间隔增加, 肌纤维呈现不规则状, 且肌萎缩相关蛋白 Atrogin1 和 MuRF1 表达均显著增加, 提示慢性间歇低氧暴露仍对肌纤维产生了一定程度的损伤^[10]; 急性低氧暴露后, 大鼠体重在干预期间持续降低, 且降低率随低氧暴露时间的延长而增加, 干预 3 d 后, 瘦体重和相对抓力较常氧组显著下降。其中, 急进低氧环境造成的食欲抑制及胃肠功能障碍造成的摄食量下降可能是诱因之一; 此外, TA 肌间隔也有所增加, 但肌纤维损伤程度不及间歇低氧干预, 且肌萎缩蛋白 MuRF1 表达较常氧组增加。此研究结果提示, 慢性间歇和急性低氧暴露均可导致大鼠骨骼肌出现一定程度的萎缩, 但不同的低氧模式对大鼠骨骼肌的影响不同, 慢性间歇低氧主要从微观结构和分子层面影响 TA, 而急性低氧主要从质量和功能层面影响 TA, 说明不同的低氧模式可能通过不同途径影响骨骼肌。

因此, 本研究通过骨骼肌 RNA 测序探究不同低氧模式对 TA 差异基因表达的富集通路, 发现慢性间歇低氧可上调骨骼肌的抗氧化过程(谷胱甘肽代谢)、糖代谢(胰岛素应答、葡萄糖稳态状态和葡萄糖代谢过程)和 PPAR 通路。研究发现, 葡萄糖利用障碍和脂代谢紊乱可损害骨骼肌质量和功能, 而谷胱甘肽(glutaredoxin, Grx)是氧化还原稳态的重要代谢调节因子, 骨骼肌中含有丰富的 Grx, Grx 缺失小鼠可出现肌萎缩, 并伴随有骨骼肌葡萄糖利用障碍和脂质沉积^[11]。本研究中, IH/C 组差异通

路——PPAR 通路中所富集的脂代谢基因全部为上调基因(ADIPOQ、PLIN1、PCK1), 且在 IH/C 组中上调而在 AH/C 组下调的差异基因为 PLA2G2A, 这些基因均与糖脂代谢密切相关^[12]。研究发现, 间歇低氧可影响骨骼肌中脂质的含量。中重度 OSAHS 患者循环系统中棕榈酸(palmitic acid, PA)和游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)在过夜后增肌, 并可异位至股外侧肌中并导致胰岛素抵抗(insulin resistance, IR), 导致肌肉中脂质增加, 且增加程度与呼吸暂停低通气指数(apnea-hypopnea index, AHI)呈正相关^[13]。提示慢性间歇低氧可通过损害 TA 的糖脂代谢功能而导致骨骼肌功能受损, 而此过程中伴随着以 Grx 为主的抗氧化能力增强, 说明骨骼肌在损伤同时也逐步对低氧环境产生习服, 并表现为骨骼肌质量的恢复。

急性低氧可上调骨骼肌的肌纤维类型的转化(快慢肌之间的转化)、氧化应激反应(对过氧化氢的反应)和炎症反应过程。急性低氧主要对肌纤维类型的转化作用主要表现为促进快肌向慢肌的转化, 表现为调节慢肌结构的相关基因(TNNI1、TNNC1、TNNT1 和 ZFP385B^[14])表达增加。研究发现, 急性低氧干预(氧浓度 6.5%, 暴露 4 h)可降低甘肃酚鼠骨骼肌中糖酵解相关酶的活性, 增加肌红蛋白的含量, 说明在急性低氧的应激刺激下, 机体可通过向慢肌转变, 利用慢肌特征以保持肌肉较充分的氧供应, 从而减少或避免低氧对骨骼肌造成的损伤^[15]。而急性低氧还可造成骨骼肌炎症和氧化应激水平增加, 从而造成肌萎缩的发生。研究发现急性低氧可增加脯氨酰羟化酶 3(prolyl hydroxylase 3, PHD3)的表达, 进而增加低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的转录^[16]。而 PHD3 高表达可以促进肌萎缩的发生, 其发挥作用的机制与介导炎症信号通路而影响骨骼肌中蛋白质的转运密切相关^[17]。此外, 急性低氧暴露还可增加骨骼肌的氧化应激水平, 该过程可能受到核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)-过氧化氢酶通路的调控^[18-20]。提示急性低氧可促进快肌纤维向慢肌纤维转变, 以适应低氧应激对肌肉的损伤, 但仍不敌该过程中伴随着的炎症反应和氧化应激水平的增加, 最终导致肌萎缩的发生, 并降低肌肉力量^[21]。

4 结论

不同低氧模式对大鼠胫骨前肌基因表达产生

不同的影响。慢性间歇低氧可能通过影响骨骼肌的糖脂代谢基因水平以促进肌肉的损伤,但该过程伴随着抗氧化能力的提高,可能由此促进肌肉对低氧的适应;急性低氧虽可促进胫骨前肌肌纤维向慢肌的转化,但不敌急性低氧激活氧化应激和炎症反应,这可能是肌萎缩的诱因。

参 考 文 献 (References)

- [1] Kupr B, Schnyder S, Handschin C. Role of nuclear receptors in exercise-induced muscle adaptations [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017, 7(6): a029835.
- [2] Edwards LM, Murray AJ, Tyler DJ, et al. The effect of high-altitude on human skeletal muscle energetics: 31P-MRS results from the caudwell xtreme everest expedition [J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10681.
- [3] Millet GP, Debevec T, Brocherie F, et al. Commentaries on viewpoint: human skeletal muscle wasting in hypoxia: a matter of hypoxic dose? [J]. J Appl Physiol (1985), 2017, 122(2): 409-411.
- [4] de Theije CC, Langen RC, Lamers WH, et al. Distinct responses of protein turnover regulatory pathways in hypoxia- and semistarvation-induced muscle atrophy [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 305(1): L82-L91.
- [5] Guo H, Zhang Y, Han T, et al. Chronic intermittent hypoxia aggravates skeletal muscle aging by down-regulating Klc1/grx1 expression via Wnt/ β -catenin pathway [J]. Arch Gerontol Geriatr, 2021, 96: 104460.
- [6] Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions [J]. Microsc Res Tech, 2000, 50(6): 500-509.
- [7] 付鹏宇, 胡扬, 李燕春, 等. 低氧暴露所致大鼠骨骼肌萎缩的蛋白转化调节机制 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 423-432.
- Fu PY, Hu Y, Li YC, et al. Protein turnover regulation mechanism of rat skeletal muscle atrophy induced by hypoxia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 423-432.
- [8] Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1 [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014, 307(6): E469-E484.
- [9] 周瑾. 白藜芦醇和精氨酸对高住低训大鼠骨骼肌萎缩的影响及机制研究 [D]. 北京: 北京体育大学; 2016.
- Zhou J. Effect and mechanism of resveratrol and arginine on muscle atrophy of HiLo rats [D]. Beijing: Beijing Sport University; 2016.
- [10] Chaudhary P, Sharma YK, Sharma S, et al. High altitude mediated skeletal muscle atrophy: Protective role of curcumin [J]. Biochimie, 2019, 156: 138-147.
- [11] Yang Y, Liao Z, Xiao Q. Metformin ameliorates skeletal muscle atrophy in Grx1 KO mice by regulating intramuscular lipid accumulation and glucose utilization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 533(4): 1226-1232.
- [12] Hara Y, Watanabe N. Changes in expression of genes related to glucose metabolism in liver and skeletal muscle of rats exposed to acute hypoxia [J]. Heliyon, 2020, 6(7): e04334.
- [13] Koenig AM, Koehler U, Hildebrandt O, et al. The effect of obstructive sleep apnea and continuous positive airway pressure therapy on skeletal muscle lipid content in obese and nonobese men [J]. J Endocrinol Soc, 2021, 5(8): bvab082.
- [14] Lina LS, Yang YG, Liu W, et al. Zinc finger protein-activating transcription factor up-regulates vascular endothelial growth factor- α expression *in vitro* [J]. Chin Med Sci J, 2012, 27(3): 171-175.
- [15] 山萌, 王文静, 葛宝, 等. 甘肃鼯鼠适应低氧的肌纤维类型和代谢特征 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(10): 18-24.
- Shan M, Wang WJ, Ge B, et al. Muscle fiber types and metabolic characteristics of Gansu zokor (*Myospalax cansus*) in adaptation to hypoxia [J]. J Northwest A F Univ (Nat Sci Ed), 2016, 44(10): 18-24.
- [16] Fujita N, Markova D, Anderson DG, et al. Expression of prolyl hydroxylases (PHDs) is selectively controlled by HIF-1 and HIF-2 proteins in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: distinct roles of PHD2 and PHD3 proteins in controlling HIF-1 α activity in hypoxia [J]. J Biol Chem, 2012, 287(20): 16975-16986.
- [17] Li F, Yin C, Ma Z, et al. PHD3 mediates denervation skeletal muscle atrophy through Nf- κ B signal pathway [J]. Faseb J, 2021, 35(4): e21444.
- [18] Gallego-Selles A, Martin-Rincon M, Martinez-Canton M, et al. Regulation of Nrf2/Keap1 signalling in human skeletal muscle during exercise to exhaustion in normoxia, severe acute hypoxia and post-exercise ischaemia: Influence of metabolite accumulation and oxygenation [J]. Redox Biol, 2020, 36: 101627.
- [19] Ji W, Wang L, He S, et al. Effects of acute hypoxia exposure with different durations on activation of Nrf2-ARE pathway in mouse skeletal muscle [J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0208474.
- [20] 杨根梦, 洪世君, 王一航, 等. Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP3 炎性小体与自噬调节作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 103-107.
- Yang GM, Hong SJ, Wang YH, et al. Progress of research in the regulation of Nrf2/keap1/p62, NLRP3 inflammasome and autophagy [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 103-107.
- [21] Schmidt CA, Goldberg EJ, Green TD, et al. Effects of fasting on isolated murine skeletal muscle contractile function during acute hypoxia [J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0225922.

[收稿日期] 2021-08-12

吴玥, 向志光, 高蓐, 等. 冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 92-99.
Wu Y, Xiang ZG, Gao R, et al. Establishment of a comparative transcriptomics database of coronavirus infected animal models [J].
Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 92-99.
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.012

冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库的建立

吴玥, 向志光, 高蓐, 孔琪*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室, 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 构建冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库, 从基因表达水平比较冠状病毒感染人和动物模型后的异同, 为动物实验与临床研究提供数据支撑。**方法** 从 GEO、ArrayExpress 等数据库中下载冠状病毒 (以 SARS-CoV、SARS-CoV-2、MERS-CoV 为主) 感染动物模型与人的转录组数据, 对测序数据进行质控、标准化、去除批次效应, 分析不同病毒株在感染不同物种、细胞或组织后所引起的基因表达变化, 构建基于 Django 网络应用框架的数据库, 建立检索界面, 提供数据分析与可视化展示功能。**结果** 本研究系统性整理了 43 套测序数据集, 建立了冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库。数据库包含 3 种冠状病毒、4 个物种、14 种组织/细胞、2373 个样本。数据库展示不同基因在不同物种、不同病毒株、不同感染时间、不同滴度、不同细胞或组织中的表达差异。同时嵌入生物信息学分析工具可挖掘基因表达差异, 富集差异基因的分子功能、信号通路, 并预测对细胞的潜在影响。**结论** 本文建立了冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库。可为冠状病毒感染动物模型基因表达水平研究提供数据资源和分析工具。

【关键词】 冠状病毒; 数据库; SARS-CoV-2; 动物模型; 基因表达; 比较分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0092-08

Establishment of a comparative transcriptomics database of coronavirus infected animal models

WU Yue, XIANG Zhiguang, GAO Ran, KONG Qi*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious, Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

Corresponding author: KONG Qi. E-mail: infor@cnilas.org

【Abstract】 Objective To establish a comparative transcriptomics database of coronavirus infected animal models, explain the similarities and differences between human and animal models of coronavirus infection at the gene expression level, and provide evidence-based support for animal experiments and clinical research. **Methods** We downloaded coronavirus (mainly severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV; severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2 and middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) infected animal models and human gene expression profiles from the Gene Expression Omnibus (GEO) and ArrayExpress databases, performed quality control, standardization, and removal of the batch-effect, analyzed differential gene expression of different species, cells, or tissues

[基金项目] 北京市自然科学基金资助项目 (M21027), 传染病重大专项 (2017ZX10304402-001)。

Funded by Beijing Natural Science Foundation (M21027), Major Projects for Infectious Diseases (2017ZX10304402-001).

[作者简介] 吴玥 (1993—), 女, 研究实习员, 研究方向: 比较医学数据库建设。Email: wuyue@cnilas.org

[通信作者] 孔琪 (1978—), 男, 副研究员, 研究方向: 比较医学, 生物信息学。Email: kongqi@cnilas.org

infected by some virus subtypes of above coronavirus, constructed a database based on the Django web application framework, established retrieval interface, data analysis and visualization tools. **Results** We established a comparative transcriptomics database of coronavirus infected animal models based on 43 datasets, comprising 3 coronaviruses, 4 species, 14 tissues/cells, and 2373 samples. The database includes gene expressions of different species, virus strains, infection times, titers, and cells/tissues. In addition, we developed bioinformatics analysis tools to enable the analysis of differential genes and to predict the enrichment of molecular functions, pathways, and effects on cells. **Conclusions** In this study, we established a comparative transcriptomics database of coronavirus infected animal models that provides data resources and analysis tools for the study of coronavirus infected animal models under different conditions and gene expression levels.

【**Keywords**】 coronavirus; database; SARS-CoV-2; animal model; gene expression; comparative analysis

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

冠状病毒是套式病毒目 (*Nidovirales*) 冠状病毒科 (*Coronaviridae*) 冠状病毒属 (*Coronavirus*) 的一类线性单股正链 RNA 病毒, 其中对人类致病性较强的包括 SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus)、MERS-CoV (middle east respiratory syndrome coronavirus) 和 SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), 其病原致病性和动物模型方面有一定的相似性^[1]。

SARS-CoV-2 引起的新型冠状病毒肺炎 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19) 在世界各国爆发流行, 截止 2021 年 11 月已造成 2.49 亿人感染和 504 万人死亡^[2-3]。新型冠状病毒感染危害极强, 需要动物模型研究其发病机理、病毒溯源和传播机制、疫苗药物评价等^[4]。

冠状病毒感染动物模型大致分为 3 类: 啮齿类、灵长类和其他哺乳动物, 主要包括转基因小鼠、叙利亚仓鼠、雪貂、非人灵长类、猫、犬等。不同动物对冠状病毒的易感性不同, 能不同层面的反应人类疾病, 有助于疫苗药物评价和发病机理研究等^[5-8]。基于动物模型从基因层面开展比较转录组学研究有助于理解不同物种、不同毒株、不同滴度、不同时间等条件下基因差异性表达情况^[9]。

随着高通量测序技术的不断发展, 转录组学数据迅速累积, 但目前还没有一个专题数据库将已有的数据资源进行整合, 深入分析形成跨种并且多维度比较人与实验动物在感染冠状病毒后的基因表达情况, 筛选差异基因。因此, 我们首次建立了冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库, 通过采集整合基因表达数据库 (gene expression omnibus, GEO)、芯片表达数据库 (ArrayExpress) 等公共数据库中冠状病毒感染动物模型基因表达谱数据, 进行不同冠状病毒感染动物模型表达数据的挖掘和分析^[10-11]。可提供不同冠状病毒感染不同物种/细胞/时间的基因表达变化情况。根据差异表达基

因, 分析其涉及的信号通路和生物调控网络。冠状病毒比较转录组学数据库为世界首个冠状病毒基因表达谱专题数据库, 在研究人与实验动物感染冠状病毒后表达模式及差异基因挖掘具有重要意义。

1 方法

1.1 数据收集和处理

通过 NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)、EBI ArrayExpress 数据库 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) 等数据库, 收集 SARS-CoV、SARS-CoV-2、MERS-CoV 等冠状病毒感染不同人/动物/细胞的基因芯片、转录组数据。收集背景数据, 包括动物模型、病毒株、感染时间、滴度、感染器官或细胞等。将不同物种背景数据与基因表达数据进行对应、整合、质控, 标准化、注释, 去除批次效应, 用于可视化展示和差异基因分析。

1.2 数据库建设

本数据库使用 Django (v 2.2.6) 软件 (<https://djangoproject.com>) 开发, 部署在 CentOS Linux server (v 7.7) 服务器。网站服务使用 nginx (v 1.10.1)。使用 Plotly (v 1.5.10) 实现表达数据在线交互式可视化展示。所有在线分析生成的图片具有交互功能。可在线调整图片属性, 例如大小、样式、配色、显示的内容等。分析结果可导出矢量图 (SVG 格式)。用户也可下载生成的数据。

1.3 访问方式

数据库网址: <https://covid.com-med.org.cn>。

2 结果

2.1 数据库结构和内容

本数据库由简单检索、专业检索、分析工具、数据统计、帮助信息五个版块组成 (图 1)。分析工具中包括种间比较、种内比较和多基因基因表达谱 3 种工具。数据库包括 43 个数据集, 3 种病毒 (SARS-CoV、

SARS-CoV-2、MERS-CoV), 22 个病毒株, 4 个物种 (人、小鼠、猴、雪貂), 14 种组织/细胞, 29 个感染时间, 15 种病毒滴度, 共涉及 2373 个样本(表 1)。

2.2 检索方式

本数据库主要有 2 种检索方式, 一种是简单检索 (simple search), 另一种是专业检索 (advanced search)。在使用简单检索时, 用户可使用基因名称、别名、注释、功能描述和通路信息等进行搜索。数据库将展示所有与搜索内容相关的基因与对应描述。点击基因名称可进入详细页。详情页包括基因信息以及与数据库外链, 单基因表达谱信息。

对于专业检索, 用户可自由组合多种检索条件, 包括物种名称、病毒名称、病毒毒株、细胞/组织

类型、项目编号等对数据库中样品进行专业检索。展示详细检索结果, 帮助用户找到合适的样本数据, 并通过交互式联动饼图进行对应统计展示。可对历史检索信息进行记录, 方便查询历史记录。

2.3 基因表达谱

2.3.1 单基因表达谱

通过简单检索, 输入基因、蛋白、通路名称后, 可从不同层面对所采集数据集进行整合分析。实现不同层面的比较, 直观比较冠状病毒感染人类和动物模型后基因表达差异。使用箱形图显示比较结果并显示 *P* 值。用户可以查看目标基因在不同物种、病毒株、不同细胞、不同感染时间、不同滴度中的差异性表达情况(图 2)。

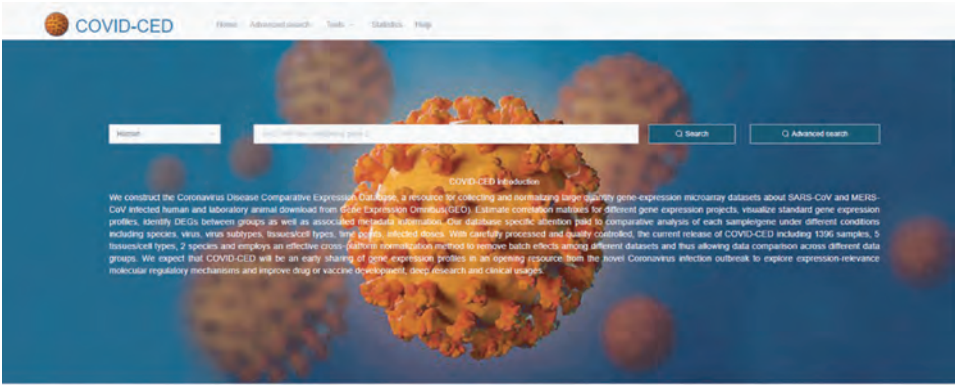


图 1 数据库首页

Figure 1 Homepage of the database

表 1 数据库样本信息

Table 1 Database sample information

类别 Type	内容 Content	数量 Count
物种 Species	人类、小鼠、猴、雪貂 Human, mouse, monkey, ferret	4
病毒 Viruses	SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS-CoV、	3
病毒株 Strains	Urbani、MA15、Tor2、EMC/2012、USA-WA1/2020...	22
组织/细胞 Tissues/cells	Airway epithelial cell、A549、Caco2、Calu-3、Dendritic cell、Fibroblast、H1299...	14
感染时间 Infection time	3 h、12 h、18 h、24 h、30 h、36 h、54 h、72 h...	29
滴度 Titres	MOI 0.2、MOI 0.3、MOI 1、MOI 2、MOI 5...	15

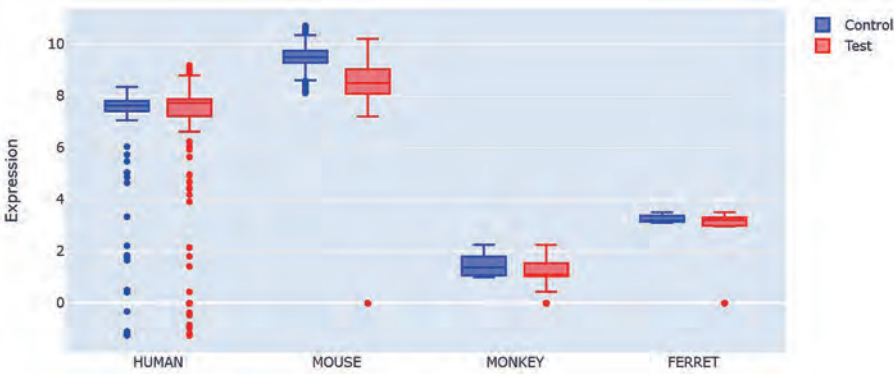


图 2 单基因表达谱

Figure 2 Single gene expression profile

2.3.2 多基因表达谱

进入多基因表达谱 (GEM profile) 页面, 通过输入多个基因名称, 并选择组合参数。例如可以选择不同物种、不同病毒、不同病毒株、不同感染时间、不同滴度、感染组织/器官、不同测序数据类型。也可更详细的选择感染时间、组别、GSE 编号等。最后选择数据归一化方式 (raw 或 Z 值转换), 通过折线图、柱形图、热图、箱形图、相关性图的形式进行可视化展示 (图 3)。同时提供内置的工具包对生成的图片进行颜色、大小和样式个性化更改。所有图片均可以通过 SVG 格式下载使用。可跨物种比较和展示, 采用不同物种并排放置的方式展示。可检测多个基因在多个物种中的表达变化趋势。

2.4 差异基因比较分析

差异基因分析是寻找关键 marker 基因的最主要手段。用户可对感兴趣的物种、实验条件下的基因表达差异分析。通过物种内、物种间差异基因分析这两种工具, 在线组合不同指标设计实验, 寻找易感基因, 并对易感基因进行功能富集分析。值得注意的是, 种内差异基因分析工具仅限一种物种。跨种差异基因分析工具允许用户选择两种物种进行比较分析。

确定物种选项后, 用户可进一步选择研究的细

胞类型、病毒类型、时间、滴度等信息。提交分析后系统将对样品进行自动检测。用户可对样本属性差别较大、不适合用于后续整合比较分析的异常样品进行过滤 (图 4)。通过聚类热图与 PCA 聚类图的形式进行可视化展示样品相关性 (图 5)。用户可根据热图与 PCA 图选择用于后续分析的样本。

用户可自由选择比较组, 通常做差异基因只能进行 24 h 感染组 (Treat 24 h) 与 0 h 感染组 (Treat 0 h) 两组比较。感染性实验比较特殊, 两个时间点会有 4 组样品 (Treat 24 h, mock 24 h, Treat 0 h, mock 0 h)。为此我们引入复杂设计比较模式 (Treat 24 h-mock 24 h) - (Treat 0 h-mock 0 h), 可在让处理组与各自对照比较完成后, 再进行不同时间点比较。这个分析模式也适用于不同物种的比较, 例如人的肺细胞和小鼠的肺细胞不能直接比, 但是 (Human lung treat-Human lung control) - (Mouse lung treat-Mouse lung control) 与各自对照比较后再进行比较, 便可以实现物种各自组织处理后的变化之间的比较, 可分析哪些基因在不同物种中是一致表达的或特异表达的。

用户可对选定样本进行差异基因分析的阈值 FDR (默认小于 0.05) 与 Log2FC (默认大于 1) 进行

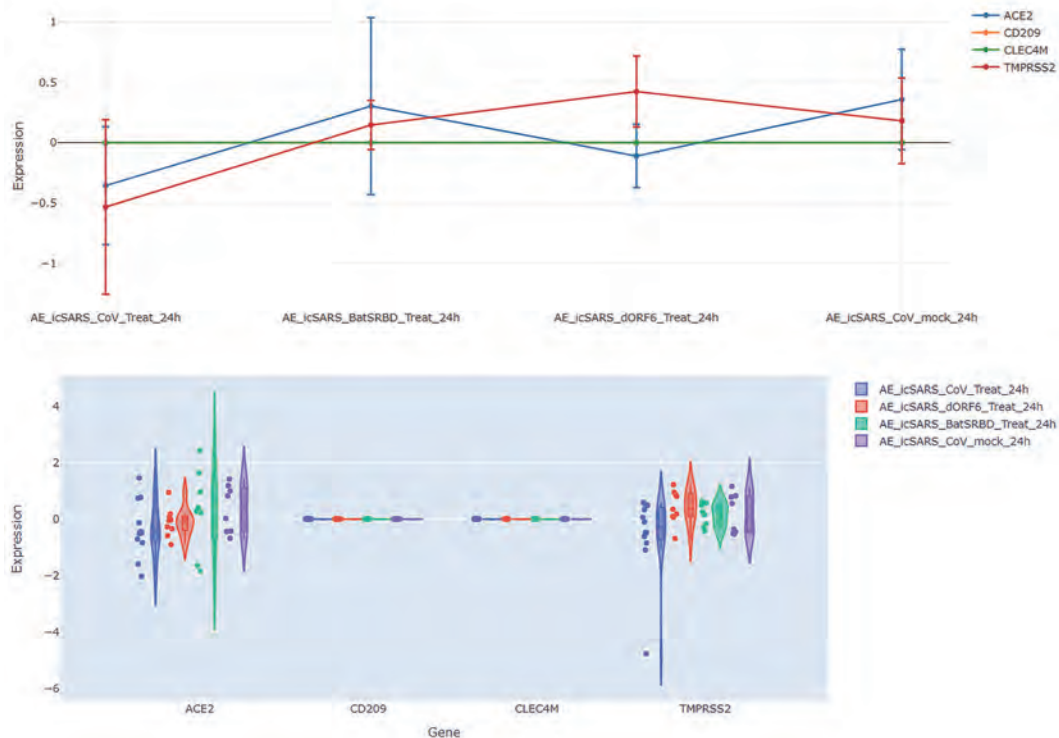


图 3 多基因表达谱绘制

Figure 3 Multiple gene expression profile

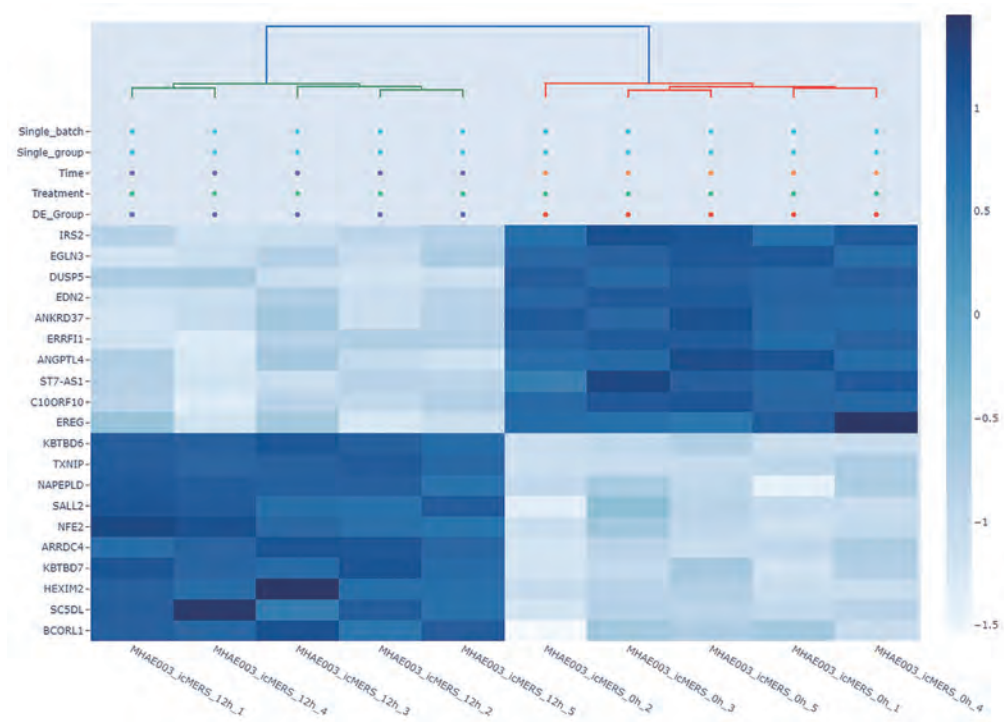


图 6 人类-小鼠感染病毒后差异基因热图

Figure 6 Differential gene heatmap for human-mouse infected virus

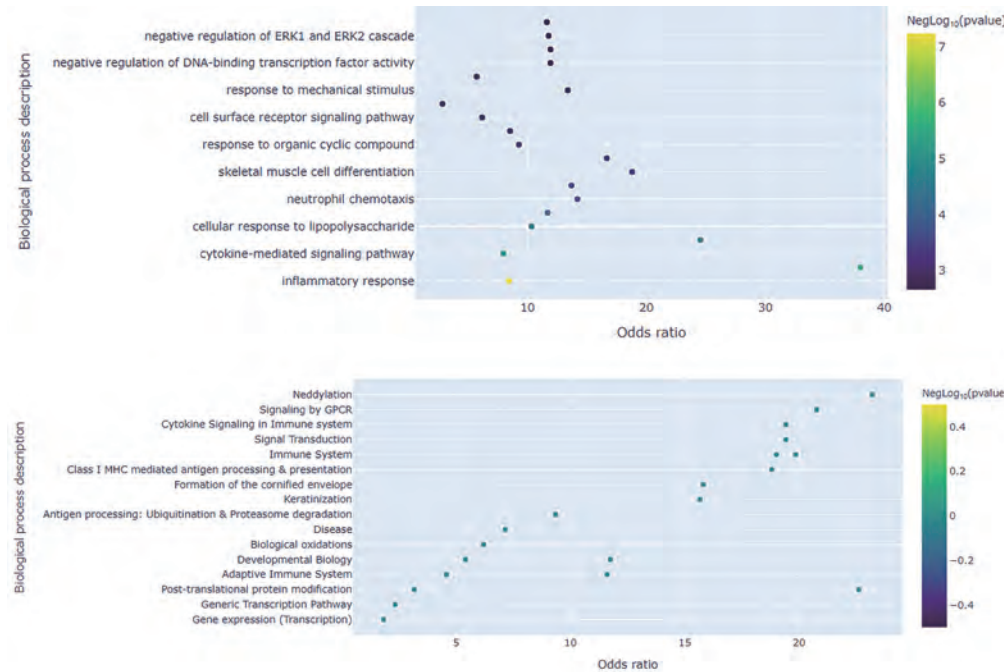


图 7 差异表达基因的生物学过程富集结果

Figure 7 Biological process enrichment result for differentially expressed genes

3 讨论

为了比较分析冠状病毒感染动物模型后基因表达谱变化,我们采集公共数据库中冠状病毒感染动物模型相关开放数据集,建立了冠状病毒感染动

物模型比较转录组学数据库,并持续更新。用户可在基因表达水平进行不同物种、病毒株、滴度、时间等变量的比较分析,提供冠状病毒感染动物模型基因表达层面的数据挖掘及关联分析。通过比较不同基因不同物种在不同感染条件下的表达水平变

化,从基因表达水平研究冠状病毒感染不同动物模型的致病机制,并进一步开展聚类分析和功能富集等生物信息分析。

世界卫生组织(WHO)及各国都强调了新冠疫情数据共享和开放的重要性。新的数字平台和开放科学实践的发展可能对加强全球研究和创新合作作出巨大贡献^[12-15]。已有多项研究通过现有的开放数据库发表^[16-17]。已建立并且在公开期刊发表论文的与冠状病毒研究相关的数据库有 GISAID、CoVDB、ViPR、2019nCoV、Drugvirus、CARD、D3Targets-2019-nCoV、CoV2-ID 等,主要储存病毒的基因序列,流行病学信息,药物靶点信息,并且主要基于病毒基因序列进行分析,无基因表达信息的整合分析^[18-25]。

冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库通过对不同平台的测序数据进行质控、标准化、去除批次效应,获得校正后的基因表达数据,实现跨平台的数据分析。可展示冠状病毒感染动物模型后的基因表达图谱,筛选差异表达基因。可比较分析不同物种、不同病毒株、不同剂量及不同时间点的基因表达。为发现和预测可能用于新冠致病相关研究的靶基因或治疗靶点提供数据依据。本数据库将继续更新冠状病毒表达谱数据,纳入更多的数据类型,比如自有数据和类器官数据、单细胞测序数据,研究基因在细胞水平的表达情况。本数据库是在中国医学科学院医学实验动物研究所秦川教授的指导下建立的,在此表示感谢。也感谢魏强、薛婧等专家提出的宝贵意见。

参 考 文 献 (References)

- [1] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [2] 国家卫生健康委员会. 疫情通报 [EB/OL]. (2021-11-1) [2020-11-1]. http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/list_gzbd.shtml.
National Health Commission. Epidemic situation notification [EB/OL]. (2021-11-1) [2020-11-1]. http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/list_gzbd.shtml.
- [3] Shu Y, McCauley J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data - from vision to reality [J]. *Euro Surveill*, 2017, 22(13): 30494.
- [4] 杨钧婷, 王晓堂, 续国强, 等. 新型冠状病毒肺炎动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(9): 111-116.
Yang JT, Wang XT, Xu GQ, et al. Research and progress in animal models of coronavirus disease 2019 [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(9): 111-116.
- [5] Xu X, Chen P, Wang J, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2020, 63(3): 457-460.
- [6] 实验动物. 新型冠状病毒肺炎(COVID-19)动物模型制备指南: GB/Z 39502-2020 [S]. 2021.
Laboratory animal. Guideline of COVID-19 animal models preparation: GB/Z 39502-2020 [S]. 2021.
- [7] 实验动物. 人类感染性疾病动物模型评价指南: T/CALAS 30-2017 [S]. 2021.
Laboratory animal. Evaluation guideline for animal model of human infectious diseases: T/CALAS 30-2017 [S]. 2021.
- [8] 实验动物. 动物实验生物安全通用要求: T/CALAS 7-2017 [S]. 2021.
Laboratory animal. Biosafety requirement for laboratory animal experiment: T/CALAS 7-2017 [S]. 2021.
- [9] Cleary SJ, Pitchford SC, Amison RT, et al. Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(21): 4851-4865.
- [10] Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 991-995.
- [11] Brazma A, Parkinson H, Sarkans U, et al. ArrayExpress-a public repository for microarray gene expression data at the EBI [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(1): 68-71.
- [12] 习近平. 在统筹推进新冠肺炎疫情防控和经济社会发展工作部署会议上的讲话 [J]. *中国工运*, 2020, 5: 8-14.
Xi JP. Speech at the conference on the overall promotion of the prevention and control of the COVID-19 epidemic and the deployment of economic and social development [J]. *Chin Social*, 2020, 5: 8-14.
- [13] 王志心, 刘治, 刘兆军. 基于机器学习的新型冠状病毒(COVID-19)疫情分析及预测 [J]. *生物医学工程研究*, 2020, 39(1): 1-5.
Wang ZX, Liu Z, Liu ZJ. COVID-19 analysis and forecast based on machine learning [J]. *J Biomed Eng Res*, 2020, 39(1): 1-5.
- [14] 鹿音. 新冠肺炎疫情防控中的大数据应用: 希望与挑战 [J]. *世界知识*, 2020, 8: 68-69.
Lu Y. Big data application in novel coronavirus pneumonia epidemic prevention and control: hope and challenge [J]. *World Affairs*, 2020, 8: 68-69.
- [15] Song P, Karako T. COVID-19: Real-time dissemination of scientific information to Figureht a public health emergency of international concern [J]. *Biosci Trends*, 2020, 14(1): 1-2.
- [16] Heymann DL. Data sharing and outbreaks: best practice exemplified [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 469-470.
- [17] Munster VJ, Koopmans M, van Doremalen N, et al. A novel coronavirus emerging in china-key questions for impact assessment [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 692-694.
- [18] Shu Y, McCauley J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data-from vision to reality [J]. *Euro Surveill*, 2017, 22(13): 30494.

- [19] Huang Y, Lau SK, Woo PC, et al. CoVDB: a comprehensive database for comparative analysis of coronavirus genes and genomes [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36: 504–511.
- [20] Pickett BE, Sadat EL, Zhang Y, et al. ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40: 593–598.
- [21] 赵文明, 宋述慧, 陈梅丽, 等. 2019 新型冠状病毒信息库 [J]. 遗传, 2020, 42(2): 212–221.
- Zhao WM, Song SH, Chen ML, et al. The 2019 novel coronavirus resource [J]. Hereditas, 2020, 42(2): 212–221.
- [22] Andersen PI, Ianevski A, Lysvand H, et al. Discovery and development of safe-in-man broad-spectrum antiviral agents [J]. Int J Infect Dis, 2020, 93: 268–276.
- [23] Children's Hospital Los Angeles COVID-19 Analysis Research Database (CARD)-A Resource for Rapid SARS-CoV-2 Genome Identification Using Interactive Online Phylogenetic Tools [EB/OL]. [2020-05-23]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.11.089763v2.full.pdf>.
- [24] Shi Y, Zhang X, Mu K, et al. D3Targets-2019-nCoV: a webserver for predicting drug targets and for multi-target and multi-site based virtual screening against COVID-19 [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(7): 1239–1248.
- [25] Bustin S, Coward A, Sadler G, et al. CoV2-ID, a MIQE-compliant sub-20-min 5-plex RT-PCR assay targeting SARS-CoV-2 for the diagnosis of COVID-19 [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 22214.

[收稿日期] 2021-11-18

Animal Models and Experimental Medicine, AMEM 专栏文章推介

AMEM 从 2021 年 12 月起,陆续刊出系列文章,发表在专栏文章版块,旨在为杰出的基础医学科学成果提供国际交流共享平台,并及时对学术热点问题进行报道,增加期刊国际学术影响力。

威廉·凯林、彼得·拉特克利夫和格雷格·塞门扎因为发现“细胞如何感知和适应供氧环境变化”而获得了 2019 年度的诺奖。当细胞由于通气不足等因素导致氧气需求超过氧气供应时,就会低氧。一些慢性疾病如:慢性阻塞性肺病、心血管疾病、肿瘤等都能造成低氧的细胞内环境。动脉粥样硬化和肺动脉高压和心力衰竭等心脑血管疾病是造成我国成人致死率最高的疾病,常诱发组织缺氧。我国成人中预计近 1 亿人患有慢阻肺,慢阻肺引起的肺部气流限制也会造成组织低氧,进而影响病人的日常生活,甚至导致劳动力丧失,最终还可能发展为呼吸衰竭或肺源性心脏病。此外我国有近千万人口居住在高原之上,由于高原低氧而诱发的高原病也严重危害国人的健康。因此研究低氧适应的分子机制对这些疾病的预防和治疗有重大的意义。

AMEM 在 2021 年的第 4 期推出了低氧适应的专栏,从器官缺氧条件下的病理变化及缺氧适应机制,到高原和穴居地下生活动物低氧适应,再到低氧激活的信号通路,从不同角度,不同水平对有机体的低氧反应及其低氧适应这一热点领域进行了深入探讨。封面文章是哈佛医学院, Schepens 眼科研究所的杨梦璐等人系统阐述了角膜在缺氧条件下的病理变化及缺氧适应机制,并对该领域目前使用的动物模型及未来的研究方向进行了讨论^[1]。以色列海法大学的 Eviatar 教授等综述了不同缺氧环境下的哺乳动物通过调节生理活动、基因表达和基因突变的方式来维持机体的代谢水平,重点对高原哺乳动物及以色列地下啮齿动物科进行介绍,以此作为人类缺氧适应研究的借鉴^[2]。郑州大学的王振龙博士综述了小型哺乳动物在长期缺氧环境的耐受方式,重点介绍了生物体通过生理生化改变、活性氧 ROS 的激活、HIF-1 调控、血管内皮生长因子和促红细胞生成素的表达等方式应对缺氧环境,并且对低氧适应动物的组学现状以及抗癌机制进行深入探讨,为人类缺氧疾病的研究提供了合适的实验动物模型^[3]。

参考文献 (References)

- [1] Pang K, Lennikov A, Yang M. Hypoxia adaptation in the cornea: Current animal models and underlying mechanisms [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 300–310.
- [2] Li F, Qiao Z, Duan Q, et al. Adaptation of mammals to hypoxia [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 311–318.
- [3] Li M, Pan D, Sun H, et al. The hypoxia adaptation of small mammals to plateau and underground burrow conditions [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 319–328.

王诗雨,林家锋,蒋欣如,等. 基于 16S rRNA 测序分析两种呼肠孤病毒对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 100-106.

Wang SY, Lin JF, Jiang XR, et al. Analysis of the effects of two reoviruses on the intestinal flora of mice based on 16S rRNA sequencing [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 100-106.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.013

基于 16S rRNA 测序分析两种呼肠孤病毒对小鼠肠道菌群的影响

王诗雨[#],林家锋[#],蒋欣如,孙淼,王颖,陶晓莉^{*}

(锦州医科大学基础医学院病原生物学教研室,辽宁 锦州 121000)

【摘要】 目的 探究 T1L 和 NBV 两种呼肠孤病毒对小鼠肠道菌群结构的影响。**方法** 将 25 只小鼠随机分为 5 组(对照组、NBV 滴鼻组、NBV 灌胃组、T1L 滴鼻组、T1L 灌胃组),每组 5 只。对照组用 PBS 灌胃,其余组别均用 2×10^7 PFU/mL 病毒滴度感染小鼠。7 d 后采集小鼠粪便,从每组 5 个样本中选出粪便重量较重的 3 个样本,对粪便 DNA 进行 V3+V4 可变区特异性扩增,运用 16S rRNA 测序分析小鼠粪便中菌群的丰度、多样性及物种组成结构。**结果** T1L 和 NBV 灌毒后的小鼠肠道菌群丰度和多样性与对照组相比有所下降,且 T1L 滴鼻组下降最为显著 ($P < 0.05$);与 NBV 灌胃组相比,NBV 滴鼻组的菌群丰度和多样性增加显著 ($P < 0.05$)。在门的级别上,T1L 和 NBV 灌胃组中厚壁菌(*Firmicutes*)丰度明显减少,T1L 和 NBV 滴鼻组中拟杆菌(*Bacteroidetes*)丰度明显减少;在属的级别上,T1L 滴鼻组、T1L 灌胃组和 NBV 灌胃组中罗姆布茨菌(*Romboutsia*)丰度明显减少,T1L 滴鼻组中别样杆菌(*Alistipes*)丰度明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** T1L 和 NBV 感染小鼠会降低菌群的丰度和多样性,可能通过有益菌减少或致病菌增多来破坏菌群平衡。此外,病毒的感染方式不同,对菌群的影响也有所不同。

【关键词】 呼肠孤病毒;16S rRNA;肠道菌群;感染方式

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0100-07

Analysis of the effects of two reoviruses on the intestinal flora of mice based on 16S rRNA sequencing

WANG Shiyu[#], LIN Jiafeng[#], JIANG Xinru, SUN Miao, WANG Ying, TAO Xiaoli^{*}

(Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

Corresponding author: TAO Xiaoli. E-mail: taoxiaoli@jzmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of two reoviruses, T1L and NBV, on the structure of mouse intestinal flora. **Methods** The mice were randomly divided into five groups: control, instillation-NBV (int-NBV), oral-NBV, instillation-T1L (int-T1L), and oral-T1L groups, with five mice in each group. The control group was intragastrically administered with phosphate buffered saline, and other groups were each infected with a viral titer of 2×10^7 PFU/mL. After 7 days, mouse feces were collected and three samples were selected using the heavier stool weights from each group. After V3+V4 amplification, 16S rRNA technology was used to estimate the richness, diversity and composition of bacterial flora. **Results** After T1L and NBV instillation, the abundance and diversity of intestinal flora were lowered compared with the control group, with a significant decrease ($P < 0.05$) in the int-T1L group. The abundance and diversity were markedly augmented ($P < 0.05$) in the int-NBV group compared with the oral-NBV group. At the phylum level, the abundance of Firmicutes was markedly reduced in both the oral-T1L and oral-NBV groups compared with the control

【基金项目】 辽宁省大学生创新训练项目(201910160037)。

Funded by Innovative Training Project for College Students in Liaoning Province(201910160037).

【作者简介】 王诗雨(1999—),女,本科,研究方向:感染病毒的动物模型建立。Email:2692458551@qq.com;

林家锋(1997—),男,硕士研究生,研究方向:病毒的致病机制及其动物模型建立。Email:215470273@qq.com。

[#]共同第一作者

【通信作者】 陶晓莉(1985—),女,讲师,博士,研究方向:病毒的致病机理和免疫效应。Email:taoxiaoli@jzmu.edu.cn

groups, and the abundance of Bacteroidetes was markedly reduced in both the int-T1L and int-NBV groups compared with the control group. At the genus level, Romboutsia was markedly lower in the int-T1L, oral-T1L and oral-NBV groups versus the control group, and Alistipes was markedly augmented in the int-T1L group ($P < 0.05$). **Conclusions** Two reoviruses, T1L and NBV, reduced the abundance and diversity of mouse flora and may destroy flora balance through the reduction of beneficial bacteria or the increase of pathogenic bacteria. Different infection routes have different effects on the flora of mice.

【Keywords】 reovirus; 16S rRNA; intestinal flora; infection way

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

人类肠道富含多种微生物群落,能够定期监视免疫系统、提供营养物质及抵抗致病物质侵害,拥有极其重要的功能^[1-3]。由于个体之间肠道菌群存在差异,且菌群微生态和宿主之间的联系每时每刻都在变化,因此菌群和宿主间的作用机制成为新兴研究的热点^[4-5]。一旦有病原微生物感染机体,这种作用机制是否有效、菌群的丰度和多样性是否差异显著、肠道微生态紊乱的过程又是怎样,种种疑问都亟需进一步的解决。

正呼肠孤病毒是一类双链 RNA 病毒,无囊膜,一般可分为两种亚型:哺乳动物非融合性病毒(MRV)、融合性病毒(NBV、ARV、BroV 等)^[6-8]。T1L 隶属于 MRV Lang 型,分离自人体肠道及呼吸道,研究表明,经口接种的 T1L 能够跨越回肠细胞直接攻击肠道微环境,扰乱消化系统正常的免疫功能^[9]。NBV 为纳尔森海湾病毒,可从人、鸟、牛、羊中分离出来,是一种典型的人兽共患病病毒;它能特异性结合膜受体 NgR1,在黏附因子 A 的作用下释放出病毒颗粒入侵呼吸道和消化道,扰乱宿主体内微生物正常活动^[10-11]。本研究通过 16S rRNA 测序分析 NBV 和 T1L 两种正呼肠孤病毒对小鼠肠道菌群的影响,比较不同感染方式对微生物群落及其结构的差异,从肠道微生态的角度为正呼肠孤病毒的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

25 只 SPF 级雄性封闭群 KM 小鼠,4 ~ 5 周龄,体重 15 ~ 18 g,健康状况良好,购于锦州医科大学实验动物中心【SCXK(辽)2019-0003】。动物饲养于锦州医科大学动物实验室【SYXK(辽)2019-0007】,湿度 60%,温度 25℃,12 h 昼夜交替。所有操作均经锦州医科大学实验动物伦理委员会审核(IACUC 号:2019014)。

1.1.2 病毒株

NBV、T1L 病毒株经空斑滴度测定,病毒浓度为

2×10^7 PFU/mL,由锦州医科大学病原生物学实验室-80℃冰箱保存。

1.1.3 主要试剂与仪器

粪便基因组 DNA 提取试剂盒(中国 TIANGEN 公司,DP328),无水乙醇(北京化工厂有限公司,20120110),乌拉坦(中国 Sigma 公司,94300)。

微量分光光度计(Thermo,美国),高通量测序仪(Illumina,美国),分析天平(Mettler Toledo,瑞士),超纯水机(Millipore,德国),-80℃低温冰箱(Thermo,美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠分组及处理

随机将 25 只 SPF 级 KM 小鼠均分为 5 个组别,每组 5 只,每天按照所称量的体重处理,即:对照组(Control 组)、NBV 滴鼻组(Int-NBV 组)、NBV 灌胃组(Oral-NBV 组)、T1L 滴鼻组(Int-T1L 组)、T1L 灌胃组(Oral-T1L 组)。处理方法:对照组:0.2 mL/10 g PBS 灌胃;NBV 滴鼻组:0.2 mL/10 g NBV 滴鼻;NBV 灌胃组:0.2 mL/10 g NBV 灌胃;T1L 滴鼻组:0.2 mL/10 g T1L 滴鼻;T1L 灌胃组:0.2 mL/10 g T1L 灌胃。连续 7 d,期间给予充足的超纯水和小鼠饲料以供自由摄取。

1.2.2 小鼠粪便样品采集

灌毒完成后,次日于超净无菌环境下用 20%乌拉坦麻醉小鼠,75%乙醇消毒腹部,腹腔正中解剖,采集小鼠肠道内容物于高压灭菌过的 2 mL EP 管中,称重标记,迅速置于-80℃里保存。

1.2.3 粪便 16S rRNA 测序

从每组 5 个粪便样品中遴选出重量较高的 3 个样本,分别提取总 DNA 并测定浓度及纯度。按照引物序列(338F:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3';806R:5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),对粪便 DNA 进行 V3+V4 可变区的特异性扩增且细菌的 16S rRNA 测序。

1.2.4 数据处理

按照新版 Illumina MiSeq 和 HiSeq 处理平台提供的模拟下机数据,经数据拆解、引物切除、PE

Reads 有效拼接和 Tags 过滤, OUTs 聚类, 在 FLASH 软件下进行质控分析, 获得最终数据。

1.3 统计学分析

Excel 2010 建立数据库, 结果均用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并且用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件分析, 两组间比较用成组 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析, Alpha 和 Beta 多样性检验均经 Bray Curtis 检验, 显著性水平 α 为 0.05, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 菌群测序结果分析

16S rRNA 测序显示, 每组小鼠样品 PCR 扩增产物的大小集中在 (400 ± 100) bp 之间, 和 V3+V4 可变区大小基本吻合。小鼠粪便样品的稀释曲线 (rarefaction curve) 是计算随机抽取样品 OTUs 大小, 按统计量和物种多样性来绘制曲线。结果显示, 随着测序数量的增加, 每个样品聚类物种数目也在增加, 且斜率逐渐降低, 说明小鼠粪便样品送测数量合理, 测序深度足以满足后续研究 (见图 1)。

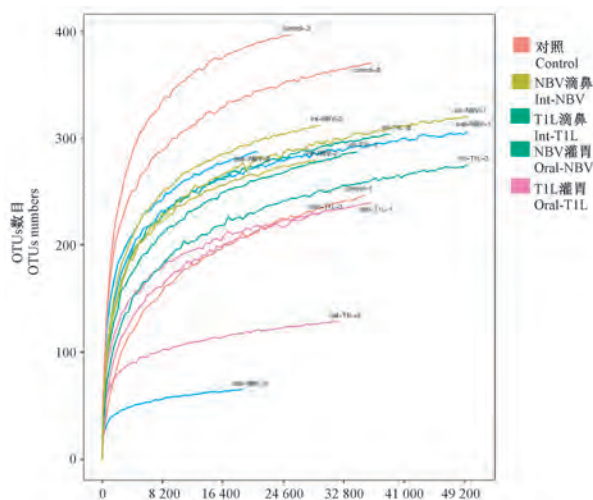


图1 小鼠粪便样品稀释曲线

Figure 1 Rarefaction curve of mouse stool sample

物种累积曲线 (species accumulation curve) 用来判断样本量是否充分。结果显示, 在样本量渐增的同时, 所对应的物种数目也在增加, 且曲线渐趋平坦, 同样说明小鼠测序样品的数量合理 (见图 2)。

2.2 粪便样品比较分析

Anosim 分析基于 Bray Curtis 距离来比较组间和组内差异, 从而判断组间群落差异是否具有显著性。结果显示, 统计参数 $R > 0$, 即组间差异大于组内差异, 说明分组合理, 且 $P < 0.05$ 说明统计学上差

异具有显著性 (见图 3)。

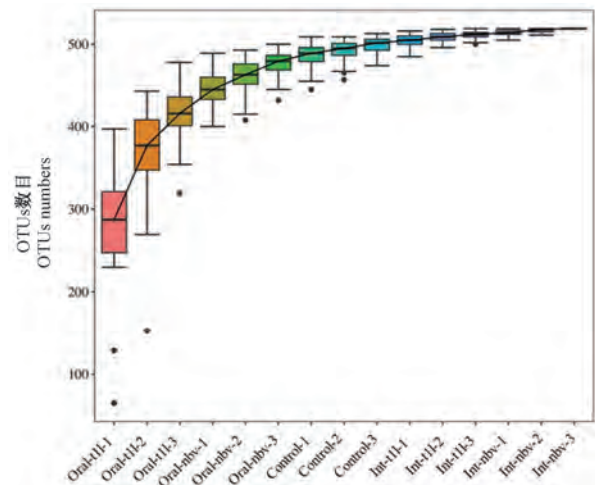


图2 小鼠粪便样品物种累积曲线

Figure 2 Species accumulation curve of mouse stool sample

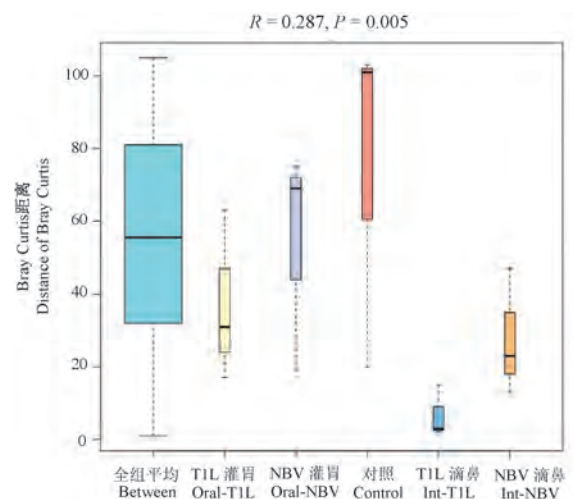


图3 基于 Bray Curtis 距离的 Anosim 盒状图

Figure 3 Anosim box plot based on Bray Curtis distance

2.3 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性由丰富度和多样性共同决定, 囊括多个指标, 以 Chao1 和 Shannon 指数最具代表。Chao1 值越大, 则物种越丰富、数量越多; Shannon_2 值越大, 则物种越多样化, 分配越均匀。结果显示: 和对照组相比, NBV 和 T1L 感染后 Chao1 和 Shannon_2 值都降低, 且 T1L 滴鼻组明显降低, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); NBV 滴鼻组和灌胃组相比, 两种指数升高且有统计学的差异 ($P < 0.05$)。总的来说, NBV 和 T1L 灌毒后菌群丰度和多样性都有所下降, 以 T1L 滴鼻组最为明显; 两种灌毒方式相比, 滴鼻后的小鼠菌群丰富度和多样性都有所增加, 以 NBV 滴鼻组最为明显 (见表 1)。

表 1 小鼠菌群 Alpha 多样性($n=3$)

Table 1 Alpha diversity of mouse flora($n=3$)

组别 Groups	Chao1	Shannon_2
对照组 Control group	339.43 ± 79.09	5.20 ± 1.81
NBV 滴鼻组 Int-NBV group	306.63 ± 23.33 [#]	5.18 ± 0.33 [#]
NBV 灌胃组 Oral-NBV group	226.40 ± 138.97	4.57 ± 1.24
T1L 滴鼻组 Int-T1L group	291.77 ± 12.32 [*]	4.37 ± 0.34 [*]
T1L 灌胃组 Oral-T1L group	201.97 ± 61.68	4.12 ± 0.91

注:与 Control 组相比, $^*P < 0.05$;与 oral-NBV 组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。
Note. Compared with control groups, $^*P < 0.05$. Compared with oral-NBV groups, $^{\#}P < 0.05$.

等级丰度曲线(rank abundance curve)宽度反映物种丰度,平缓程度反映均匀性。结果显示,对照组小鼠肠道微生物丰度和均匀性最高,而 NBV、T1L 灌毒后都有所降低(见图 4)。

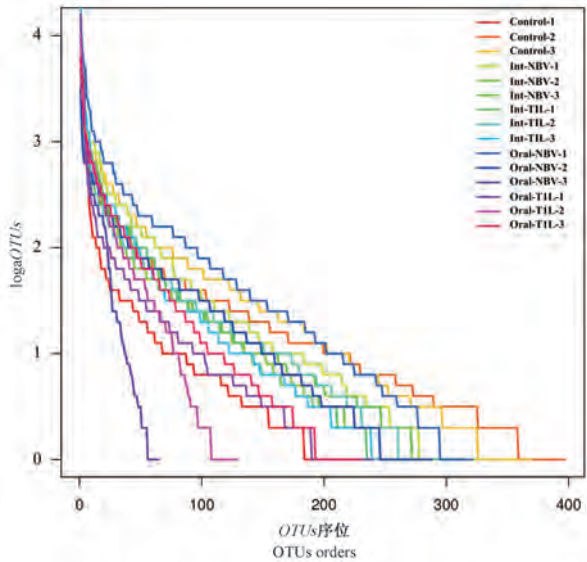


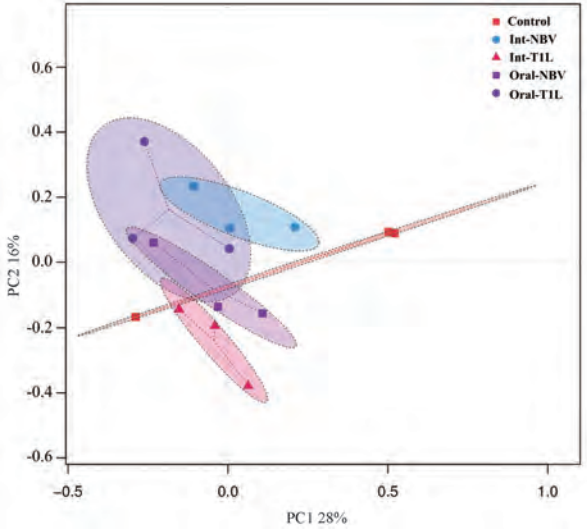
图 4 小鼠菌群的等级丰度曲线

Figure 4 Rank abundance curve of mouse flora

2.4 Beta 多样性分析

Beta 多样性是对 Bray Curits、Unweighted UniFrac、Weighted UniFrac 多变量综合统计,探讨多个样品间是否具有显著群落差异。作为 Beta 多样性降维方式的一种,主坐标分析(PCoA 分析)是从任意尺度寻找差异大小,点之间的距离越近,代表物种组成越相似。结果显示,各组点都较集中,其中 NBV 滴鼻组和对照组有明显分界线;此外,NBV 滴鼻组和灌胃组之间相距甚远区分鲜明,说明 NBV 灌毒对菌群产生了影响。总的来看,NBV 滴鼻能明

显改变小鼠微生物群落的结构(见图 5)。



注:横纵坐标代表样品间差异程度最大的代表性值。

图 5 基于 Bray Curtis 距离的 PCoA 分析

Note. The abscissa and ordinate represent the representative value with the largest difference between samples.

Figure 5 PCoA analysis based on Bray Curtis distance

2.5 粪便物种群落结构分析

从门级别的分布情况来看,共检测出 9 种主要细菌门类,厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)位列前三。与对照组相比,T1L、NBV 灌胃组的厚壁菌门丰度减少,NBV 灌胃组的变形菌门丰度显著增加,T1L、NBV 滴鼻组的拟杆菌门丰度减少。与 NBV 灌胃组相比,NBV 滴鼻组变形菌门的含量显著降低;与 T1L 灌胃组相比,T1L 滴鼻组拟杆菌门的含量显著降低($P < 0.05$)(见图 6)。同样,从门级别的相应热图也显示一致结果(见图 7)。

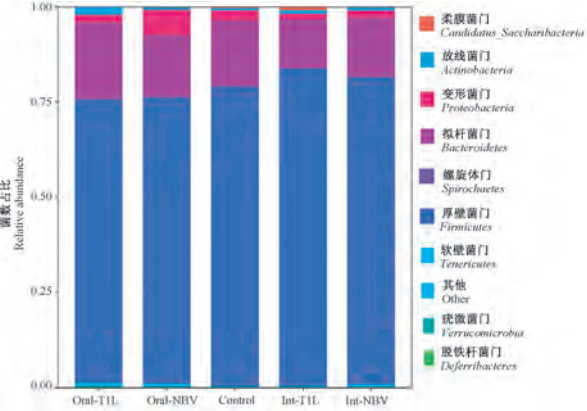


图 6 门级别上物种的相对丰度柱状图

Figure 6 Histogram of relative abundance of species at phylum level

从属级别的分布情况来看,与对照组相比,灌毒后的乳酸菌属 (*Lactobacillus*) 丰度显著增加,T1L 滴鼻组的别样杆菌属 (*Alistipes*) 丰度显著增加,NBV 灌胃组的瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*) 丰度显著增

加,T1L 滴鼻组、T1L 灌胃组和 NBV 灌胃组的罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*) 丰度显著降低 ($P < 0.05$) (见图 8)。同样,从属级别的相应热图也显示一致结果 (见图 9)。

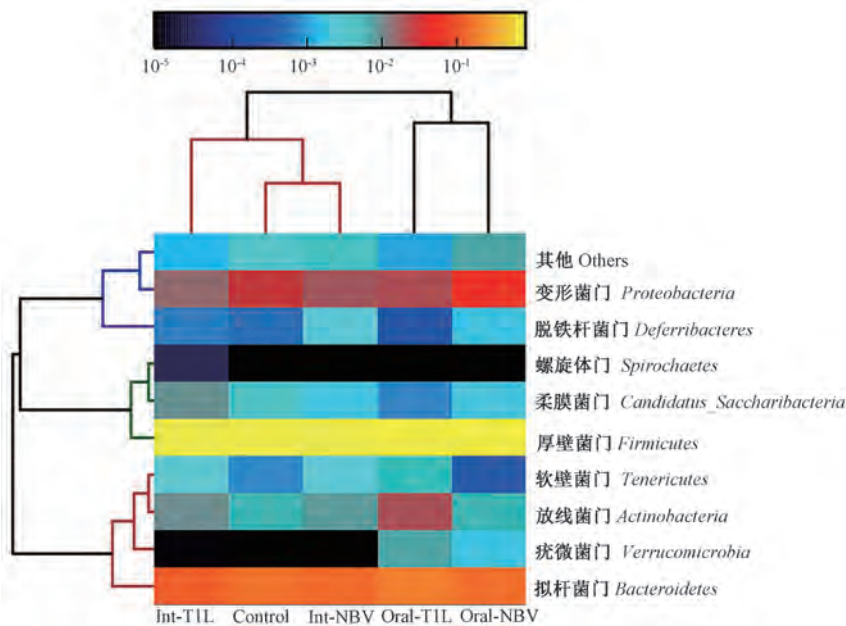


图 7 门级别上物种的相对丰度热图

Figure 7 Heat map of relative abundance of species at phylum level

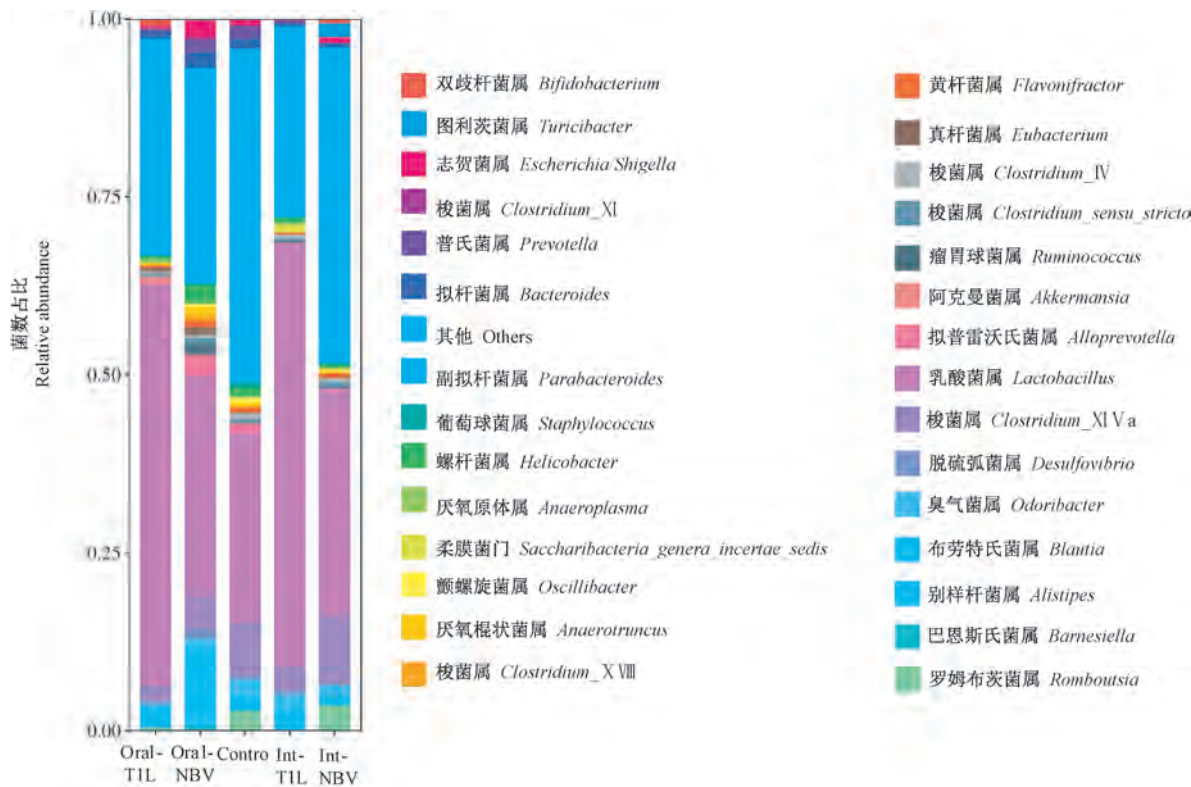


图 8 属级别上物种的相对丰度柱状图

Figure 8 Histogram of relative abundance of species at genus level

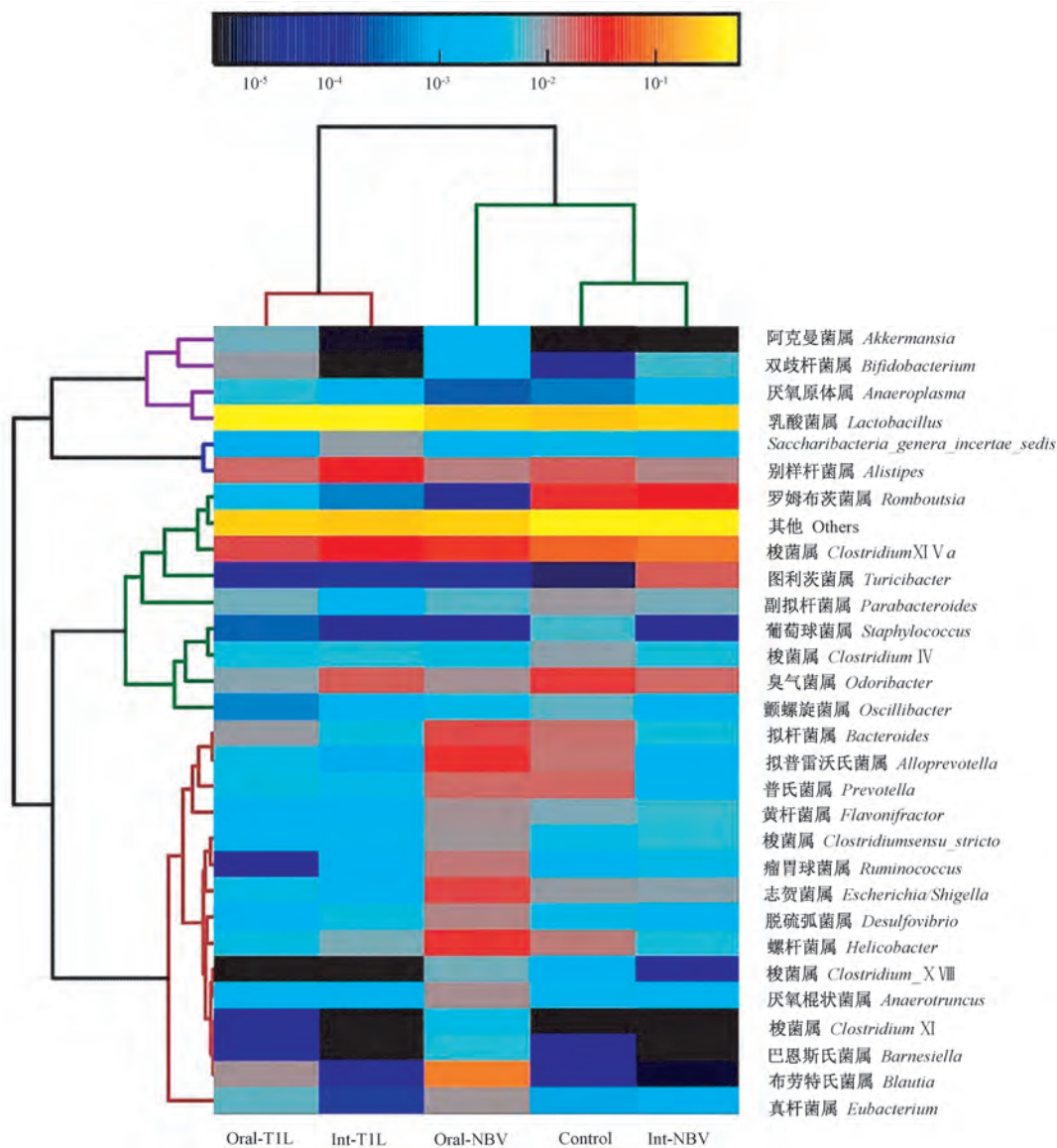


图 9 属级别上物种的相对丰度热图

Figure 9 Heat map of relative abundance of species at genus level

3 讨论

肠道菌群维系着机体稳态,是不可小觑的“天然屏障”。通过寄居在与外界相通的呼吸道或肠道粘膜表面,细菌之间或细菌与环境之间形成了一种特殊的共生关系,且相对平衡^[12]。若共生关系失衡,庞大的微生物群落会发挥独特作用,从而周而复始地保护免疫系统及相关器官,让机体处于健康状态^[13]。因此,肠道菌群的相对稳定及其与宿主间形成的相互依存关系显得极为重要。

T1L 和 NBV 都可经呼吸道和消化道感染宿主,诱发咳嗽、肺炎、腹泻、发热等炎症反应^[14]。研究表明,病毒在气管表面首次增殖,能够破坏呼吸道菌

群平衡,刺激细胞趋化因子生成,进而影响消化系统正常功能^[15-16]。Chen 等^[17]发现,呼肠孤病毒感染会改变肠道菌群,主要表现在有益细菌的损失和致病菌的代偿性增多,这可能是肠道病变的主要原因,但具体机制尚未阐明。本次研究透过 16S rRNA 测序技术,展现了经 T1L 和 NBV 感染后小鼠肠道微生物丰度和多样性都有所降低,是菌群紊乱的潜在因素;其中,经呼吸道感染 T1L 对肠道菌群的影响最为显著。从门的级别上,厚壁菌等有益细菌在病毒感染后有所减少,而变形菌等机会致病菌被认为是大肠杆菌侵袭力增加的促进因素,它在 NBV 经胃肠道感染后显著增加;从属的级别上,别样杆菌增加可能导致哺乳动物发生肠道炎症,提示 T1L 经消

化道感染会大大增强此菌的危害^[18-20]。另一方面,感染方式不同,小鼠的肠道微生物群落也表现出差异。Bassis 等^[21]已经发现,病原微生物经口鼻摄入可直达胃肠道和呼吸道上皮,而且胃肠道病原体也可经肠胃-食管逆流至下呼吸道;尚且 NBV 作为一种既可经胃肠道又可经呼吸道侵入的呼肠孤病毒,通过呼吸道感染会大大增加对正常微生物定植的威胁^[22]。基于前人勘究及本次实验研究,初步推测 NBV 经呼吸道感染比消化道更能改变菌群的丰度和多样性,可能对宿主微生态平衡的破坏力更强,但具体机制还有待深入研究。

综上,T1L 和 NBV 两种呼肠孤病毒感染均可致小鼠肠道菌群紊乱,主要表现在丰度和多样性减低,且机会致病菌富集。此外,病毒的感染方式不同也会导致肠道菌群的结构不同,优势菌种呈现明显差异。因此,从肠道菌群的角度出发,抗病毒药物如何能够在发挥药效的同时维护微生态的平衡,将是未来思考的一大课题。

参 考 文 献 (References)

- [1] Shirvani Rad S, Nikkiah A, Orvatinia M, et al. Gut microbiota: a perspective of precision medicine in endocrine disorders [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2020, 19(2): 1827-1834.
- [2] Serrano D, Pozzi C, Guglietta S, et al. Microbiome as mediator of diet on colorectal cancer risk: the role of vitamin D, markers of inflammation and adipokines [J]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 363.
- [3] Jin M, Qian Z, Yin J, et al. The role of intestinal microbiota in cardiovascular disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2343-2350.
- [4] Mangiola F, Nicoletti A, Gasbarrini A, et al. Gut microbiota and aging [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(21): 7404-7413.
- [5] Zhang J, Zhang J, Wang R. Gut microbiota modulates drug pharmacokinetics [J]. *Drug Metab Rev*, 2018, 50(3): 357-368.
- [6] Duncan R, Corcoran J, Shou J, et al. Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species [J]. *Virology*, 2004, 319(1): 131-140.
- [7] Zhang X, Lei X, Ma L, et al. Genetic and pathogenic characteristics of newly emerging avian reovirus from infected chickens with clinical arthritis in China [J]. *Poult Sci*, 2019, 98(11): 5321-5329.
- [8] Teng L, Xie Z, Xie L, et al. Sequencing and phylogenetic analysis of an avian reovirus genome [J]. *Virus Genes*, 2014, 48(2): 381-386.
- [9] Brown JJ, Short SP, Stencel BJ, et al. Reovirus-induced apoptosis in the intestine limits establishment of enteric infection [J]. *J Virol*, 2018, 92(10): e02062-e02079.
- [10] Tao XL, Zhao W, Tong W, et al. The effects of autophagy on the replication of Nelson Bay orthoreovirus [J]. *Virol J*, 2019, 16(1): 90.
- [11] Forrest JC, Campbell JA, Schelling P, et al. Structure-function analysis of reovirus binding to junctional adhesion molecule 1. Implications for the mechanism of reovirus attachment [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(48): 48434-48444.
- [12] Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2019, 20(4): 461-472.
- [13] Nishida A, Inoue R, Inatomi O, et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Clin J Gastroenterol*, 2018, 11(1): 1-10.
- [14] Kim M, Chung YH, Johnston RN. Reovirus and tumor oncolysis [J]. *J Microbiol*, 2007, 45(3): 187-192.
- [15] Aguirre de Cárcer D, Hernández B, Rastrojo A, et al. Infection with diverse immune-modulating poxviruses elicits different compositional shifts in the mouse gut microbiome [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173697.
- [16] Deriu E, Boxx GM, He XS, et al. Influenza virus affects intestinal microbiota and secondary salmonella infection in the gut through type I interferons [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(5): e1005572.
- [17] Chen X, Zheng M, Huang M, et al. Muscovy duck reovirus infection disrupts the composition of intestinal microbiota in muscovy ducklings [J]. *Curr Microbiol*, 2020, 77(5): 769-778.
- [18] Xu H, Wei Y, Ma H, et al. Alterations of gut microbiome in the patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2315.
- [19] 曲巍, 张智, 马建章, 等. 高通量测序研究益生菌对小鼠肠道菌群的影响 [J]. *食品科学*, 2017, 38(1): 214-219.
- Qu W, Zhang Z, Ma JZ, et al. Effect of probiotics on gut microbiota in mice evaluated by high-throughput sequencing [J]. *Food Sci*, 2017, 38(1): 214-219.
- [20] Becker C, Neurath MF, Wirtz S. The intestinal microbiota in inflammatory bowel disease [J]. *ILAR J*, 2015, 56(2): 192-204.
- [21] Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals [J]. *mBio*, 2015, 6(2): e00037.
- [22] Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(11): 790-801.

[收稿日期] 2021-03-01

张晓蒙, 马丙祥, 周荣易, 等. 抽动障碍免疫相关动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 107-116.
Zhang XM, Ma BX, Zhou RY, et al. Research progress on immune-related animal models of tic disorders [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 107-116.
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.014

抽动障碍免疫相关动物模型研究进展

张晓蒙¹, 马丙祥^{2*}, 周荣易^{2*}, 史文丽², 李华伟²

(1. 河南中医药大学, 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南省中西医结合儿童医院, 郑州 450000)

【摘要】 抽动障碍(tic disorders, TD)为儿童常见疾病, 发病率不断上升, 其病因及发病机制尚不明确, 随着临床中感染与 TD 症状诱发和加重关系的认识及 TD 免疫炎症相关研究的进展, 免疫异常也逐渐被认为是其重要致病因素及病理过程之一, 建立 TD 免疫学动物模型是其免疫相关实验研究的基础, 因此本文通过查阅国内外相关文献, 系统介绍了国际上 TD 免疫相关动物模型的研究概况, 并依据表面效度、结构效度和预测效度的国际动物模型评价标准对模型优劣进行比较分析, 以期国内 TD 的相关实验研究提供参考。

【关键词】 抽动障碍; 免疫; 动物模型; 链球菌; 抗体

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0107-10

Research progress on immune-related animal models of tic disorders

ZHANG Xiaomeng¹, MA Bingxiang^{2*}, ZHOU Rongyi^{2*}, SHI Wenli², LI Huawei²

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China. 2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Henan Provincial Children's Hospital of Integrative Medicine, Zhengzhou 450000)
Corresponding author: MA Bingxiang. E-mail: mbx1963@163.com; ZHOU Rongyi. E-mail: zhourongyitcm@sina.com

【Abstract】 Tic disorders (TD) are relatively common, with an increasing incidence, in children. The etiology and pathogenesis of TD are still unclear. With increased understanding of the relationship between infection, induction and exacerbation of TD symptoms in clinical practice, as well as research progress on TD-related immune inflammation, immune abnormalities are regarded as one of the important factors involved in the pathological processes of TD. The establishment of immunological TD animal models has provided the basis of immune-related experimental research. Therefore, this study systematically reviews the research status of TD immune-related animal models by consulting relevant domestic and foreign literature, and compares the advantages and disadvantages of models using international evaluation criteria of face validity, construct validity and predictive validity of animal models, to provide reference for domestic TD-related experimental research.

【Keywords】 tic disorders; immune; animal model; Streptococcus; antibody

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

抽动障碍(tic disorders, TD), 又称抽动症, 是一种常发生于儿童期的以肌肉的不自主、突然、快速的收缩和(或)发声为主要表现的神经发育障碍性

疾病, 国内发病率约为 6.1%^[1]。TD 常共患强迫症、注意缺陷多动障碍、情绪障碍、焦虑障碍等其他疾病^[2], 严重影响儿童的生活质量及心理健康, 因

【基金项目】 国家自然科学基金(81904252)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81904252).

【作者简介】 张晓蒙(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 儿童精神神经系统疾病。Email: mxcz1912@163.com

【通信作者】 马丙祥(1963—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向: 儿童精神神经系统疾病。Email: mbx1963@163.com;

周荣易(1990—), 男, 博士, 主治医师, 副教授, 研究方向: 儿童精神神经系统疾病。Email: zhourongyitcm@sina.com。

* 共同通信作者

此加强对本病的研究意义重大。截至目前,TD 的病因及发病机制尚未完全阐明,目前的研究多集中在基于皮质-纹状体-丘脑-皮质(cortico-striato-thalamo-cortical, CSTC)回路的多巴胺(Dopamine, DA)和 5-羟色胺(serotonin, 5-HT)等神经递质失衡并开发出相应的药物,取得一定的疗效,为 TD 的临床控制提供药物选择。但在临床治疗中,越来越多学者发现药物治疗 TD 无法有效控制其症状反复,TD 的复发成为临床难题,而其复发或加重常常会在上呼吸道感染、免疫功能低下等的情况下出现,这引起人们的高度重视。随着 TD 与链球菌感染关系的相关报道^[3]不断增加,TD 存在的自身免疫异常受到广泛关注。国外研究发现 TD 存在一些抗体、免疫细胞、细胞因子、免疫球蛋白等异常及免疫相关的遗传学改变^[4],免疫炎症发病机制成为 TD 病因及发病机理研究的国际前沿热点。

为研究 TD 的免疫炎症机制,国际上大量针对 TD 的免疫相关动物模型应运而生。纵观国内研究,学者多关注于感染、免疫因素与 TD 临床症状的严重程度的关联性研究,对抽动症免疫机制的实验研究涉及较少。动物模型是开展实验研究的基础,作为国际新兴的研究热点,对 TD 免疫相关动物模型的研究有助于深入探索其发病机制,解答临床疑惑,而国内尚未见有关 TD 免疫相关模型的详细报道。为详细了解 TD 免疫模型的国际研究情况,推动国内 TD 免疫发病机制研究的进展,本文系统总结了目前国际上针对 TD 免疫异常的模型研究,详细分析各种免疫模型的优势,以期为国内 TD 临床前实验研究提供模型参考。

1 细菌抗原或病毒模拟物诱导的主动免疫模型

早在 20 世纪 90 年代已有研究表明部分儿童在 A 组链球菌(group A Streptococcus, GAS)感染后出现急性抽动障碍,并提出了儿童自身免疫性神经精神疾病(pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection, PANDAS)的概念^[5]。研究显示 TD 患者似乎更容易受到 GAS 感染,并产生较强的体液免疫反应,导致症状加重^[6-7]。GAS 感染可激活机体的自身免疫反应,增加血脑屏障通透性,GAS 诱导的抗体靶向作用于大脑中负责控制运动的神经元,促使抽动症状的出现^[8],且抗 GAS 抗体滴度与 TD 严重程度成正相关^[9],因此产生了用细菌抗原或病毒模拟物来诱导自身抗体生成并发生相应免疫病理改变的主

动免疫模型。

1.1 GAS 感染相关模型

GAS 感染模型为最早建立的 TD 免疫模型,通过将含有 GAS M6 型匀浆的弗氏佐剂对雌性 SJL/J 小鼠皮下注射建立 A 组乙型溶血性链球菌(group A β -hemolytic streptococcal, GABHS)免疫的小鼠模型,这些小鼠在野外试验和洞板试验中有更高频率的直立行为。经检测发现一些 GABHS 免疫小鼠对深部小脑核(deep cerebellar nuclei, DCN)、苍白球和丘脑这些与感觉运动和情绪处理相关脑区域具有免疫反应性,并且在 DCN 中有免疫球蛋白 IgG 的沉积^[10](见表 1)。与 GAS M6 诱导的小鼠模型相似,使用含 GAS M18 菌株成分的弗氏佐剂对雄性幼年大鼠进行免疫,并腹腔注射加热灭活的百日咳杆菌作为附加佐剂建立 GAS M18 诱导的大鼠模型,大鼠的运动症状及强迫行为增加,并产生抗微管蛋白抗体,使钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 信号增强,在大鼠的纹状体、丘脑和额叶皮层中有抗体沉积,且伴随着皮层和基底神经节中多巴胺和谷氨酸等神经递质水平的变化,而治疗 TD 的药物氟哌啶醇、帕罗西汀可使异常行为缓解^[11](见表 1)。

GAS 感染诱发自身免疫抗体激活导致了大鼠出现 TD 样行为异常,成为 TD 免疫发病机制的重要佐证,但在建模过程中如何破坏了血脑屏障的完整性使抗体通过血脑屏障并作用于相关脑区域仍缺乏相关的研究证据。对于该模型未来的研究可关注影响血脑屏障完整性的因素、抗体进入大脑的途径及如何发挥生物学作用。

1.2 其他微生物感染模型

GAS 诱导的 TD 模型的建立为感染诱发机体免疫反应动物模型的设计提供了思路,多种微生物感染 TD 模型被制备出来,它们极大推动了 TD 免疫机制研究进程。有学者通过注射病毒模拟物 poly(I:C)来刺激怀孕小鼠建立母体免疫模型,其后代在大理石掩埋实验表现出类似于 TD 的重复、刻板行为及理毛行为增加^[12],且后续研究指出产前免疫激活导致了其后代出生后持续的免疫改变,主要表现为调节性(Treg)T 细胞缺陷和 CD4(+)T 细胞反应升高,以及脾 Gr-1(+)细胞水平升高,CD4(+)T 细胞反应升高导致白细胞介素 IL-17、IL-6 增加,这些改变可进一步引起异常行为的发展或持续^[13](见表 1),且当消除 IL-6 后其后代行为异常也减少,因此可能 IL-6 发挥了主要作

用^[14]。研究显示,早期各种内源性或外源性因素引起的免疫激活可能在生命早期阶段启动神经网络的发展和突触的形成,并在生命后期形成免疫和内分泌组织与神经系统的交互作用^[15]。因此,免疫模型具有一定的子代遗传特性。

2 血清抗体直接输注诱导的被动免疫模型

血清抗体注射为 TD 免疫模型的另一种造模

方法,该模型是将 TD 患者的血清抗体直接输注到大鼠或小鼠体内,作用于其脑组织而引起模型鼠脑功能的改变导致类似于抽动行为的发生。该方法制备的动物模型生物学改变与细菌抗原诱导的主动免疫模型相似,研究显示,血清抗体注射与脑中的分子靶向补体 C4 蛋白和 α -2-巨球蛋白发生交叉反应并产生免疫沉淀是该模型成功的基础^[10]。

表 1 细菌抗原或病毒模拟物诱导的主动免疫模型

Table 1 Active immune model induced by bacterial antigens or virus mimics

暴露物 Exposure	造模方法 Modeling method	对照组 暴露物 Control group	行为表现 (表面效度) Behaviors (Face validity)	病理改变 (结构效度) Pathological changes (Construct validity)	预测效度 Predictive validity	参考文献 References
GAS M6 型 抗原 GAS M6 antigen	对 6 周龄雌性 SJL/J 小鼠皮下注射含有 GAS M6 型匀浆的 FA,并每隔 4 ~ 6 周进行 1 次强化,共 3 次强化 6-week-old female SJL/J mice were subcutaneously injected with FA containing GAS M6 homogenate, and boosted every 4 ~ 6 weeks for a total of three boosts	弗氏佐剂 Freund's adjuvant	在野外和洞板试验中直立行为 ↑ Rearing in open-field and hole-board tests ↑	DCN、苍白球和丘脑有 IgG 沉积,以 DCN 为著,且血清抗 DCN 抗体阳性者的抗体沉积更高 DCN, globus pallidus and thalamus have IgG deposits, mainly DCN, and those with positive serum anti-DCN antibodies have higher antibody deposits	/	[10]
GAS M18 型抗原 GAS M18 antigen	对 5 周龄雄性 Lewis 大鼠皮下注射含 GAS M18 菌株成分的 FA,并腹腔注射加热灭活的百日咳杆菌作为附加佐剂,并在 14 d 和 28 d 后进行强化 Five-week-old male Lewis rats were subcutaneously injected with FA containing GAS M18 strain components, and heat-inactivated bacillus pertussis was injected intraperitoneally as an additional adjuvant, and they were strengthened after 14 days and 28 days.	PBS	食物操纵和平衡木行走障碍 及强迫行为(自发的理毛行为) Impaired food manipulation and beam walking, compulsive behavior (induced-grooming)	纹状体、丘脑和额叶皮质中 IgG 沉积,钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 信号,DA,谷氨酸,GAS 大鼠血清与人多巴胺 D1 和 D2 受体膜抗原的反应 IgG deposition in striatum, thalamus and frontal cortex, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II signal, DA, Glutamate, Reaction of GAS rat serum with human dopamine D1 and D2 receptor membrane antigens	DA D2 受体拮抗剂氟哌啶醇选择性 5-HT 再摄取抑制剂帕罗西汀可使异常运动减少 The DA D2 receptor antagonist haloperidol and the selective 5-HT reuptake inhibitor paroxetine can reduce abnormal movements	[11]
病毒模拟物 poly (I:C) Virus mimic poly (I:C)	在 C57BL/6J 小鼠怀孕第 10.5、12.5 和 14.5 d 时注射病毒模拟物 poly (I:C) C57BL/6J mice were injected with virus mimic poly (I:C) on the 10.5, 12.5 and 14.5 days of pregnancy	生理盐水 Saline	其后代在大理石掩埋和自我理毛测试中的重复刻板行为 The repetitive stereotypies of the offspring in the marble burying and self-grooming test	Treg 细胞缺陷,CD4(+) T 细胞反应 ↑,脾 Gr-1(+) 细胞水平,CD4(+) T 细胞反应。IL-17、IL-6 Treg cell defect, CD4(+) T cell response, spleen Gr-1(+) cell level, CD4(+) T cell response, IL-17, IL-6	/	[12-13]

注:PBS:磷酸缓冲盐溶液;FA:弗氏佐剂。

Note. PBS. Phosphate buffer saline. FA. Freund's adjuvant.

2.1 中枢(纹状体)注射血清抗体模型

研究显示 TD 患儿存在抗纹状体神经元抗体,抗体与纹状体神经元结合可引起纹状体功能障碍从而诱导行为异常^[16]。实验研究显示,TD 患者血清中的抗体可激活大鼠脑组织中超极化激活的环核苷酸通道 4 (hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide channel 4,HCN4),调控 CSTC 回路的神经信号转导平衡为该模型发病的基础^[17]。将含有高水平的抗神经元或抗核抗体(anti-nuclear antibody,ANAb)的 TD 患者血清注射到大鼠的腹侧纹状体,发现大鼠的口腔刻板行为增加^[18],国内亦有与之类似的研究可复制 TD 的抽动症状^[19]。且纹状体输注 TD 血清后,SD 大鼠表现出更多的刻板行为,这

些行为与输入抗 HCN4 抗体的量相关^[17](见表 2)。

2.2 外周注射血清抗体模型

外周注射血清抗体模型造模思路及方法与中枢注射模型类似,且具有一定的验证效应。研究显示,通过向雄性成年 BALB/c 小鼠皮下注射抗 GAS IgM 单克隆抗体,小鼠嗅探行为、头部摆动和理毛行为增加,诱发受体小鼠出现抽动行为,这与抗 GAS IgM 抗体调控皮质-纹状体投射相关的区域引起了 Fos 样免疫反应有关^[20],另外直接输注被含 GABHS 匀浆免疫过的小鼠血清也可产生与注射 TD 患者血清相似的效应,而清除供体血清中 IgG 则此行为改变消失^[21],这些有力验证了 TD 自身免疫发病机制的存在(见表 2)。

表 2 血清抗体直接输注诱导的被动免疫模型

Table 2 Passive immune model induced by direct infusion of serum antibodies						
暴露物 Exposure	造模方法 Modeling method	对照组 暴露物 Control group	行为表现(表面效度) Behaviors (Face validity)	病理改变 (结构效度) Pathological changes (Construct validity)	预测效度 Predictive validity	参考 文献 References
TD 患者的血清或 γ-免疫球蛋白 (IgG) Serum or γ- immunoglobulin (IgG) of patients with TD	以 0.5 mL/h 的速率向雄 性 Fischer344 大鼠纹状体 内微量泵入 TD 患者的血 清或从血清分离出的 γ-免 疫球蛋白(IgG) 72 h Microinjection of TD patient's serum or γ- immunoglobulin (IgG) isolated from serum into the striatum of male Fischer344 rats at a rate of 0.5 mL/h for 72 h	健康儿童的 血清 Serum for healthy children	大鼠舔食↑、前爪摇动↑ (第 1~3 天),无端发声 的情节↑ Licking and forepaw shaking (Day 1~3), episodes of unprovoked audible vocalizations	纹状体 IgG 沉积 Striatum IgG deposition	/	[16]
含有高浓度的抗 神经元或 ANAb 的 TD 患者的 血清 Serum of TD patients with high concentrations of anti-neuronal or anti- nuclear antibodies	将含有高浓度的抗神经元或 ANAb 的 TD 患者血清双 侧注入雄性 SD 大鼠的腹 侧纹状体内 Inject the serum of TD patients with high concentrations of anti- neuronal or anti-nuclear antibodies into the ventrolateral striatum of male SD rats bilaterally	TD 患者及正常 受试者血清(抗 体水平较低者) Serum of TD patients and normal subjects (those with lower antibody levels)	口腔刻板行为(吃木屑、自 咬、啃食动作、与理毛无关 的舔舐),生殖器理毛行 为,且与自身抗体的水平 呈正相关 Oral stereotypies (eating sawdust, self-biting, nibbling, licking that has nothing to do with grooming), genital grooming and these are positively correlated with the level of autoantibodies	/	/	[18]
含有高浓度 ANAb 的 TD 患者 的血清 Serum of TD patients with high concentrations of ANAb	将含有高浓度 ANAb (24.47 μg/mL) 的 TD 患 者的血清经微量注射泵注 射到雄性 SD 大鼠的纹状 体内 Inject the serum of TD patients with high concentrations of ANAb (24.47 μg/mL) into the striatum of male SD rats via a microinjection pump	低浓度抗体的 TD 患者血清 或 PBS TD patient serum with low concentration of antibody or PBS	不自主咀嚼↑、反复无目 地啃食↑、前爪从面部到 嘴的推爪样动作↑ Chewing involuntarily, repeated gnawing without eyes, pushing the front paw from the face to the mouth	/	/	[19]

续表 2

暴露物 Exposure	造模方法 Modeling method	对照组 暴露物 Control group	行为表现(表面效度) Behaviors (Face validity)	病理改变 (结构效度) Pathological changes (Construct validity)	预测效度 Predictive validity	参考 文献 References
含抗 HCN4 抗体的 TD 患者血清或纯化的抗 HCN4 抗体 TD patient serum with anti-HCN4 antibodies or purified anti-HCN4 antibodies	向 8 周龄的雄性 SD 大鼠纹状体微泵注射含抗 HCN4 抗体的 TD 患者血清或纯化的 HCN4 抗体 Microinjection of TD patient serum containing anti-HCN4 antibody or purified HCN4 antibody into the striatum of 8-week-old male SD rats	注意缺陷多动障碍患者或健康对照者的血清 Serum from patients with attention deficit hyperactivity disorder or healthy controls	刻板行为,理毛行为,过度活跃 Stereotypies, grooming, hyperactivity	TD 患者血清中抗 HCN4 抗体较高,可与大鼠脑组织(皮层和纹状体、丘脑)中的 120×10^3 蛋白(HCN4)发生反应 The anti-HCN4 antibody in the serum of TD patients is relatively high, which can react with the 120×10^3 protein (HCN4) in the rat brain tissue (cortex and striatum, thalamus).	/	[17]
抗 GAS IgM 单克隆抗体 Anti-GAS IgM monoclonal antibody	向 2 ~ 3 个月的雄性 BALB/c 小鼠皮下注射抗 GAS IgM 单克隆抗体 Subcutaneous injection of anti-GAS IgM monoclonal antibody into male BALB/c mice aged 2 ~ 3 months	抗 GAS IgG 或抗 KLH IgM Anti-GAS IgG or anti-KLH IgM	抗 GAS IgM 组摇头、嗅探行为,剧烈理毛行为;抗 GAS IgG 组无明显刻板行为;抗 KLH IgM 组活动 Head bobbing, sniffing, and intense grooming. No obvious stereotypies behavior in anti-GAS IgG group. Anti-KLH IgM group activities	抗 GAS IgM 在与涉及运动控制的皮质纹状体投射相关区域(包括尾状核、伏隔核和运动皮层的子区域)沉积,并刺激了 Fos 样免疫反应 Anti-GAS IgM is deposited in the cortical striatal projections involved in motor control (including the caudate nucleus, nucleus accumbens, and subregions of the motor cortex) and stimulates Fos-like immune responses	/	[20]
被 GABHS 匀浆免疫过的小鼠的血清 Serum of mice immunized with GABHS homogenate	将被含有 GABHS 匀浆的 PBS 免疫过的 SJL/J 小鼠(供体小鼠)的血清通过尾静脉输注到未成熟的 6 周龄雄性 SJL/J 小鼠(受体小鼠),并每隔 3 周进行 3 次增强 Serum of SJL/J mice (donor mice) immunized with PBS containing GABHS homogenate was infused into immature 6-week-old male SJL/J mice (recipient mice) through the tail vein, and mice were then boosted three times at 3-week intervals	PBS 血清;清除了 IgG 的 GABHS 血清和 PBS 血清 PBS serum. IgG-depleted GAS serum. PBS mouse serum; IgG-depleted PBS serum	直立行为,理毛行为;注入清除了抗体的免疫血清后这些行为消失 Rearing, grooming, these behaviors disappear after injecting immune serum that has eliminated antibodies	海马和脑室周围区域的 IgG 沉积 IgG deposition in the hippocampus and periventricular area	/	[21]

注:KLH:血蓝蛋白;CFA:完全弗氏佐剂。
Note. KLH. Keyhole limpet hemocyanin. CFA. Complete Freund's adjuvant.

3 直接注射免疫因子模型

前瞻性研究表明,TD 患者体内 IL-12 和肿瘤坏死因子 TNF- α 水平较高,且在症状加重期间进一步升高,这表明 TD 症状加重可能与涉及中枢神经系统的细胞因子诱导的炎症过程有关^[22]。研究结果显示,促炎细胞因子可调节多种神经传导,如谷氨

酸能、 γ -氨基丁酸能、多巴胺能和去甲肾上腺素能神经传导,从而引起神经胶质网络的改变和神经精神异常的后果^[23]。因此细胞因子不仅具有免疫调节作用,而且还具有调节神经活动的作用,一些神经精神疾病的细胞因子的异常可能与此有关,已有实验证实通过注射细胞因子或其受体可诱导 TD 免疫相关模型。

3.1 注射 IL-2 和 IL-6 模型

IL-2 是一种外周免疫细胞以及中枢神经系统驻留细胞产生的细胞因子,研究显示,IL-2 可诱导活化 T 细胞的增值并影响 Treg 细胞的存活,在激活自身免疫应答的同时,影响中皮层皮质结构中 DA 的释放。临床研究发现一些 TD 患者存在 Treg 细胞缺乏而抑制自身反应性淋巴细胞能力下降的现象^[24]。通过向妊娠中期至晚期的自身免疫性疾病敏感的 SJL/J 小鼠注射 IL-2,IL-2 可穿过胎盘并导致后代长期持续的 T 细胞发育加速且倾向于产生促炎 Th1 型细胞的免疫紊乱及旷场活动、理毛和直立行为增加等行为异常^[25](见表 3)。而向雄性 BALB/c 小鼠腹膜内施用 IL-2,不仅导致前额叶皮质的 DA 转换更高,而且还会增加海马和下丘脑中去甲肾上腺素的利用率,同样注射 IL-6 也可获得类似的结果^[26](见表 3)。因此导致后代行为异常的主要过程可能为母体的免疫反应,而不是胎儿的直接感染。

3.2 注射可溶性 IL-2 受体 (sIL-2R) 和可溶性 IL-6 受体 (sIL-6R) 模型

可溶性细胞因子受体是缺乏膜结合受体的正常体液成分,可溶性细胞因子受体作为细胞因子和淋巴细胞活性的调节剂起重要作用,在一些自身免疫病症和精神病症中细胞因子受体增加,它们可以在与免疫激活有关的疾病中充当疾病活动的重要生物标记。向 BALB/c 雄性小鼠单次皮下注射 sIL-2R α 或 β ,其头部运动、理毛、直立、嗅探等刻板行为增加,且伏隔核和前额叶皮层的 c-Fos 表达增加,Fos 样免疫反应的分布和 sIL-2Rs 的沉积部位相似,sIL-2Rs 可能充当新型的脑免疫信使,促进了神经精神病的疾病进程^[27]。此外,可溶性 sIL-6R 水平也与某些自身免疫性疾病和精神疾病的疾病进展呈正相关,在雄性 BALB/c 小鼠中注射重组人 sIL-6R α 后刻板行为和探索性运动行为增加,注射的 sIL-6R 主要定位于与 CSTC 回路相关的脑区,在伏隔核、尾壳核、运动皮质、丘脑核中与 IL-6 跨膜信号蛋白 gp130 共定位;实验证实外源性 sIL-6R 可能作为一种神经免疫信使,穿过血脑屏障靶向作用于富含 IL-6 反式信号蛋白的 CSTC 电路,并诱导重复刻板行为的产生^[28](见表 3)。

4 免疫相关的转基因及特定小鼠品系模型

抽动障碍的发病机制明显受到遗传因素的影响

响,已报道有多个候选基因与抽动障碍相关,且已经开发了几个相应的基因敲除突变小鼠品系模型,如多巴胺转运蛋白基因敲除模型、单胺氧化酶 A 基因敲除模型等^[29]。其中一些转基因及特定小鼠品系,如 Hdc 基因敲除 (Histidine Decarboxylase Knockout, Hdc-KO) 小鼠、BTBR T+tf/J 小鼠品系等,因存在 TD 样行为异常及相关免疫异常,也可作为 TD 免疫相关模型研究。

4.1 Hdc 基因敲除小鼠模型

组氨酸脱羧酶是组胺生物合成的关键酶,在人体中组氨酸脱羧酶由 Hdc 基因编码,Hdc-KO 小鼠无法合成组胺,其抽动样刻板行为明显增加,并且纹状体中多巴胺增加及细胞内信号转导改变,通过在大脑注入组胺、氟哌啶醇可使刻板行为减少,且组胺输注可降低纹状体 DA 水平^[30]。最新的研究表明组胺生物合成的破坏可能通过影响小胶质细胞的功能与 TD 的发生相关:小胶质细胞是中枢神经系统的主要固有免疫细胞,可产生并分泌细胞因子来参与调节炎症和免疫反应,以及细胞生长、存活和分化,介导神经炎症并调节大脑发育^[31-32],Hdc-KO 小鼠组胺缺乏导致纹状体和下丘脑小胶质细胞的分支减少,表达胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 的小胶质细胞减少,因表达 IGF-1 的小胶质细胞具有神经保护作用并限制炎症反应,故将导致对炎症激发反应的过度敏感,如对脂多糖的反应增强^[33],因此 Hdc 敲除可能引起小鼠大脑过度免疫炎症促发了 TD 样改变。

4.2 BTBR T+tf/J 小鼠品系模型

BTBR T+tf/J 小鼠是一种近交系小鼠,常作为孤独症谱系障碍模型^[34],但与 TD 模型中描述的免疫和行为障碍有重合之处,都描述了某些重复刻板行为增加,对比 C57BL/6J 小鼠及 BTBR $\times$ C57BL/6J F1 代小鼠,其大理石掩埋和理毛行为增加,使用多巴胺 D2 受体拮抗剂氟哌啶醇及选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂帕罗西汀可使异常运动减少^[35],研究测定 BTBR 小鼠在没有特定的环境暴露影响下血清 IgG 和 IgE, IgG 抗脑抗体,沉积在大脑中的 IgG 和 IgE 的含量明显增高,细胞因子 IL-1 β , IL-18, IL-33 升高,且分泌 IgG 的 B 细胞数量也增加^[36],这些与主动免疫模型产生的生物学效应类似,表明该品系小鼠本身也可作为 TD 动物模型。

表 3 直接注射免疫因子模型
Table 3 Direct injection of immune factors model

暴露物 Exposure	造模方法 Modeling method	对照组 暴露物 Control group	行为表现 (表面效度) Behaviors (Face validity)	病理改变 (结构效度) Pathological changes (Construct validity)	预测效度 Predictive validity	参考 文献 References
IL-2	对妊娠第 12~16 天的 SJL/J 孕鼠每天腹腔注射含 IL-2 的 PBS SJL/J pregnant mice on the 12th ~ 16th day of pregnancy were intraperitoneally injected with PBS containing IL-2 every day	PBS	旷场活动 ↑、理毛 ↑ 和直立行为 ↑ (长期持续) Open-field activity ↑, grooming ↑, rearing ↑ (long-lasting)	小鼠幼崽的 T 细胞发育 ↑, TH 细胞反应向 TH1 分化倾斜; 同基因 B 淋巴瘤细胞或异基因脾细胞刺激的 IL-2 幼鼠的体外增殖和细胞毒性反应高于对照 PBS 幼鼠 The T cell development of mouse pups ↑, with a skewing toward TH1 cell differentiation; In vitro proliferation and cytotoxicity of IL-2 pups stimulated by syngeneic B lymphoma cells or allogeneic spleen cells were higher than that of control PBS pups	/	[25]
IL-2 IL-6	3 月大的 BALB/c 小鼠腹腔注射 IL-2 或 IL-6 3-month-old BALB/c mice were intraperitoneally injected with IL-2 or IL-6	IL-1β	IL-2: 非动态探索 ↑, 挖掘 ↑, 直立行为 ↑ IL-6: 动态探索 ↑, 挖掘 ↑、直立 ↑, 运动次数 ↑, 理毛行为 ↑ IL-2. Non-ambulatory exploration ↑, digging ↑, rearing ↑ IL-6. Ambulatory exploration ↑, digging ↑, rearing ↑, locomotion ↑, grooming ↑	IL-2: 下丘脑和海马区去甲肾上腺素的利用率以及前额叶皮层中的 DA 转换 ↑ IL-6: 海马区和前额叶皮层中 5-HT 和中皮层 DA 活性 ↑ IL-2. The utilization of norepinephrine in the hypothalamus and hippocampus and the DA conversion in the prefrontal cortex ↑ IL-6. 5-HT and DA activity in the hippocampus and prefrontal cortex ↑	/	[26]
sIL-2R	雄性 BALB/c 小鼠皮下注射 sIL-2Rα 或 sIL-2Rβ Male BALB/c mice were injected subcutaneously with sIL-2Rα or sIL-2Rβ	sIL-1R1 或 PBS sIL-1R1 or PBS	sIL-2Rα 和 sIL-2Rβ: 抬头摇头 ↑、直立 ↑、理毛 ↑、嗅探行为 ↑、转动 ↑ 且 sIL-2Rβ 小鼠的水平和垂直动态活动 ↑ sIL-2Rα and sIL-2Rβ. Head up head bobbing ↑, rearing ↑, grooming ↑, sniffing ↑, turning ↑ sIL-2Rβ, vertical and horizontal ambulatory activity ↑	尾状核、伏隔核和前额叶皮层的 c-Fos 表达 ↑ sIL-2Ra 和 sIL-2Rb 在尾状核、伏隔核壳和核和运动皮层上沉积 C-Fos expression in caudate putamen, nucleus accumbens and prefrontal cortex ↑ sIL-2Ra and sIL-2Rb are deposited on the caudate nucleus, nucleus accumbens shell and nucleus, and motor cortex	/	[27]
sIL-6R	向雄性 BALB/c 小鼠皮下注射重组人 sIL-6Rα Subcutaneous injection of recombinant human sIL-6Rα into male BALB/c mice	PBS	垂直活动 ↑、直立 ↑、转动 ↑、摇头 ↑ Vertical movements ↑, rearing ↑, turning ↑, head bobbing ↑	sIL-6R 与在伏隔核、尾壳核、运动和边缘下皮质以及丘脑核中参与 IL-6 反式信号传递的跨膜蛋白的 gp130 共定位 sIL-6R co-localized with gp130, a transmembrane protein involved in IL-6 trans-signaling, in the nucleus accumbens, caudate-putamen, motor and infralimbic cortices, and thalamic nuclei	/	[28]

5 其他免疫相关模型

1-2,5-二甲氧-4-碘苯-2-氨基丙烷(1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, DOI) 诱导的大鼠模型为国际上常用的 TD 模型,实验证实该模型血清和纹状体的 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 明显升高,且大麻素和硫必利可减少 DOI 大鼠血清和纹状

体中的炎症因子,显著改善大鼠行为学改变,并抑制纹状体 TLR/NF-κB 和 TLR/MAPK 信号通路的激活,而 NF-κB 是最重要的调节蛋白,参与细胞存活、免疫反应和炎症反应等细胞生命活动,TLR2 和 TLR4 与炎症密切相关^[37],并且脂多糖可加重 DOI 诱导的小鼠模型的刻板行为及炎性细胞因子水平,可能与 TD 的复发有关^[38],因此可作为研究 TD 免

疫学变化及治疗药物的模型。

6 讨论

TD 免疫动物模型的验证亦基于目前人类疾病动物模型评价的 3 个因素:(1)表观效度为 TD 临床症状与动物模型行为表现之间的现象学相似性;(2)预测效度是指对经过验证的治疗抽动障碍药物的反应性;(3)结构效度是指基于已知的 TD 疾病病理生理学的理论基础,用于评估抽动障碍的病因学和病理生理学过程与动物模型中行为表现的神经生物学基础之间的一致性^[29,39]。以 3 种效度作为评价现有 TD 免疫模型优势与不足的标准:从表面效度而论,各种免疫动物模型都可模拟人类 TD 某些症状,具有一定的表面效度,但由于 TD 患者的表现复杂多样,而动物模型的行为学表现谱较为狭窄,故不足以全面模拟 TD 患者的临床症状,多数免疫模型主要表现为自主活动如直立或理毛行为增加,可模拟患者的全身性抽动,而直接注射抗体模型异常行为的表现形式更为多样,如舔舐、自咬、啃食等口腔刻板行为明显增加,可模拟患者的口腔部位抽动甚至发声性抽动,注射细胞因子受体模型可见到头部运动的增加,可模拟人头部抽动症状。对于结构效度,目前 TD 的免疫生理病理机制仍未阐明,故免疫模型的结构效度欠佳,但已有学者提出了 GAS 感染后产生了抗神经元的交叉反应性抗体^[8]或大脑固有免疫细胞小胶质细胞异常^[40]与 TD 发病密切相关的猜测和假说,就此而言 GAS 感染模型和 Hdc-KO 模型相对具有一定的结构效度,而相对于 GAS 抗原主动免疫产生特异性抗体而言直接注射抗体的模型缺乏针对性,结构效度较弱,但随着研究的不断推进免疫机制不断被阐释,免疫模型或将具有良好的结构效度。对于预测效度,目前较多的临床实验已证实 TD 患者存在各种免疫异常,且已有研究表明通过免疫调节剂匹多莫德^[41]或抗生素头孢地尼治疗^[42]可减轻 TD 症状,因此针对 TD 免疫异常的治疗方法及药物也会顺势而生,免疫动物模型将具有良好的预测效度,未来的研究可关注于抗炎或抗生素等药物对 TD 免疫系统的作用及治疗反应。另外从技术层面而言,GAS 主动免疫模型造模方法相对较为成熟,模型可复制性强,但抗原制备过程稍复杂;直接注射抗体模型造模方法相对较为简单,但对技术的要求较高,对鼠脑解剖学要熟知,且操作不当可引起脑部感染,对实验结果的

影响因素较多;转基因模型虽靶点精确,但操作较为复杂,价格昂贵,不易制备。总体而言,TD 相关的免疫动物模型研究仍处于初始阶段,由于对 PANDAS 的研究较多,其中的 GAS 抗原主动免疫模型较为成熟,可促进 TD 感染相关临床问题的解决及自身免疫机制的阐明,且异常行为持续时间较长,有利于研究进行。免疫相关的 TD 动物模型重现了一些类似人类 TD 的异常行为,且动物模型出现的多种行为异常和大脑变化与人类 TD 研究中报道的发现高度相关,证实了 TD 患者中存在免疫异常的假设,故推测免疫模型或将成为一种良好的模型。

通过免疫相关模型研究的最新进展,捕获有特定免疫改变的动物模型有望为制定 TD 的有效治疗策略及开发和验证新型药物提供实验平台,未来的研究应关注和确定这些疗法的机制,并明确适用于哪些 TD 儿童;同时免疫相关的动物模型也可对未来 TD 免疫机制的阐明提供基础;对于其免疫机制研究或将明确一些生物标记物,如抗体、细胞因子等改变,由于这些免疫因子的可检测性,对于本病的诊断或预后可提供一定的参考。且模型动物均以服务显示研究为根本研究目的,就目前研究来看,神经-免疫相互作用的病因及发病机制在 TD 的研究地位日渐突出,临床上的人体学研究均显示免疫因素在 TD 发病学中的特殊重要地位,因此免疫相关模型具有超前的预测效度和结构效度,能够指引未来科研的发展,应受到重点的关注。

参 考 文 献 (References)

- [1] Yang C, Zhang L, Zhu P, et al. The prevalence of tic disorders for children in China: a systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(30): e4354.
- [2] Hirschtritt ME, Lee PC, Pauls DL, et al. Lifetime prevalence, age of risk, and genetic relationships of comorbid psychiatric disorders in tourette syndrome [J]. *JAMA Psychiatry*, 2015, 72(4): 325-333.
- [3] 刘芳,叶静萍,姚宝珍,等. 儿童抽动障碍与链球菌感染关系的 Meta 分析 [J]. *医学研究杂志*, 2019, 48(3): 124-129, 176.
Liu F, Ye JP, Yao BZ, et al. Meta-analysis of the relationship between tic disorder and streptococcal infection in children [J]. *J Med Res*, 2019, 48(3): 124-129, 176.
- [4] Martino D, Zis P, Buttiglione M. The role of immune mechanisms in Tourette syndrome [J]. *Brain Res*, 2015, 1617: 126-143.
- [5] Hsu CJ, Wong LC, Lee WT. Immunological dysfunction in tourette syndrome and related disorders [J]. *Int J Mol Sci*,

- 2021, 22(2): 853.
- [6] Martino D, Chiarotti F, Buttiglione M, et al. The relationship between group A streptococcal infections and Tourette syndrome; a study on a large service-based cohort [J]. *Dev Med Child Neurol*, 2011, 53(10): 951-957.
 - [7] Blackburn JS. Tic disorders and PANDAS [J]. *Semin Pediatr Neurol*, 2018, 25: 25-33.
 - [8] Spinello C, Laviola G, Macrì S. Pediatric autoimmune disorders associated with streptococcal infections and tourette's syndrome in preclinical studies [J]. *Front Neurosci*, 2016, 10: 310.
 - [9] Murphy TK, Sajid M, Soto O, et al. Detecting pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcus in children with obsessive-compulsive disorder and tics [J]. *Biol Psychiatry*, 2004, 55(1): 61-68.
 - [10] Hoffman KL, Hornig M, Yaddanapudi K, et al. A murine model for neuropsychiatric disorders associated with group A beta-hemolytic streptococcal infection [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(7): 1780-1791.
 - [11] Brimberg L, Benhar I, Mascaro-Blanco A, et al. Behavioral, pharmacological, and immunological abnormalities after streptococcal exposure: a novel rat model of Sydenham chorea and related neuropsychiatric disorders [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2012, 37(9): 2076-2087.
 - [12] Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, et al. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism [J]. *Brain Behav Immun*, 2012, 26(4): 607-616.
 - [13] Hsiao EY, McBride SW, Chow J, et al. Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(31): 12776-12781.
 - [14] Smith SE, Li J, Garbett K, et al. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6 [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(40): 10695-10702.
 - [15] Bilbo SD, Schwarz JM. The immune system and developmental programming of brain and behavior [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2012, 33(3): 267-286.
 - [16] Hallett JJ, Harling-Berg CJ, Knopf PM, et al. Anti-striatal antibodies in Tourette syndrome cause neuronal dysfunction [J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 111(1-2): 195-202.
 - [17] Yeh CB, Shui HA, Chu TH, et al. Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide channel 4 (HCN4) involvement in Tourette's syndrome autoimmunity [J]. *J Neuroimmunol*, 2012, 250(1-2): 18-26.
 - [18] Taylor JR, Morshed SA, Parveen S, et al. An animal model of Tourette's syndrome [J]. *Am J Psychiatry*, 2002, 159(4): 657-660.
 - [19] 赵萌, 刘钊, 邓佳卉. 抽动秽语综合征自身免疫动物模型的建立及评价 [J]. *空军医学杂志*, 2019, 35(3): 206-208, 232.
 - Zhao M, Liu Z, Deng JH. Evaluation of autoimmune animal model of tourette syndrome [J]. *Med J Air Force*, 2019, 35(3): 206-208, 232.
 - [20] Zhang D, Patel A, Zhu Y, et al. Anti-streptococcus IgM antibodies induce repetitive stereotyped movements; cell activation and co-localization with Fc α/μ receptors in the striatum and motor cortex [J]. *Brain Behav Immun*, 2012, 26(4): 521-533.
 - [21] Yaddanapudi K, Hornig M, Serge R, et al. Passive transfer of streptococcus-induced antibodies reproduces behavioral disturbances in a mouse model of pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection [J]. *Mol Psychiatry*, 2010, 15(7): 712-726.
 - [22] Leckman JF, Katsoyich L, Kawikova I, et al. Increased serum levels of interleukin-12 and tumor necrosis factor- α in Tourette's syndrome [J]. *Biol Psychiatry*, 2005, 57(6): 667-673.
 - [23] Myint AM, Kim YK. Network beyond IDO in psychiatric disorders: Revisiting neurodegeneration hypothesis [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, 48: 304-313.
 - [24] Martino D, Johnson I, Leckman JF. What does immunology have to do with normal brain development and the pathophysiology underlying tourette syndrome and related neuropsychiatric disorders? [J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 567407-567407.
 - [25] Ponzio NM, Servatius R, Beck K, et al. Cytokine levels during pregnancy influence immunological profiles and neurobehavioral patterns of the offspring [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1107: 118-128.
 - [26] Zalcman S, Murray L, Dyck DG, et al. Interleukin-2 and-6 induce behavioral-activating effects in mice [J]. *Brain Res*, 1998, 811(1-2): 111-121.
 - [27] Zalcman SS, Patel A, Mohla R, et al. Soluble cytokine receptors (sIL-2R α , sIL-2R β) induce subunit-specific behavioral responses and accumulate in the cerebral cortex and basal forebrain [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e36316.
 - [28] Patel A, Zhu Y, Kuzhikandathil EV, et al. Soluble interleukin-6 receptor induces motor stereotypies and co-localizes with gp130 in regions linked to cortico-striato-thalamo-cortical circuits [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41623.
 - [29] Godar SC, Mosher LJ, Di Giovanni G, et al. Animal models of tic disorders: a translational perspective [J]. *J Neurosci Methods*, 2014, 238: 54-69.
 - [30] Baldan LC, Williams KA, Gallezot JD, et al. Histidine decarboxylase deficiency causes tourette syndrome; parallel findings in humans and mice [J]. *Neuron*, 2014, 81(1): 77-90.
 - [31] Lenz KM, Nelson LH. Microglia and beyond: innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 698.
 - [32] Arcuri C, Mecca C, Bianchi R, et al. The pathophysiological role of microglia in dynamic surveillance, phagocytosis and structural remodeling of the developing CNS [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 191.
 - [33] Frick L, Rapanelli M, Abbasi E, et al. Histamine regulation of microglia: Gene-environment interaction in the regulation of central nervous system inflammation [J]. *Brain Behav Immun*,

- 2016, 57: 326–337.
- [34] 周荣易, 党伟利, 周正, 等. 孤独症谱系障碍动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(3): 380–386.
Zhou RY, Dang WL, Zhou Z, et al. Advances in research of animal models of autism spectrum disorders [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(3): 380–386.
- [35] Amodeo DA, Jones JH, Sweeney JA, et al. Differences in BTBR T+tf/J and C57BL/6J mice on probabilistic reversal learning and stereotyped behaviors [J]. Behav Brain Res, 2012, 227(1): 64–72.
- [36] Heo Y, Zhang Y, Gao D, et al. Aberrant immune responses in a mouse with behavioral disorders [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e20912.
- [37] Long H, Wang C, Ruan J, et al. Gastrodin attenuates neuroinflammation in DOI-induced Tourette syndrome in rats [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2019, 33(5): e22302.
- [38] Long HY, Si ZY, Wang CY, et al. Lipopolysaccharide aggravated DOI-induced Tourette syndrome; elaboration for recurrence of Tourette syndrome [J]. Metab Brain Dis, 2017, 32(6): 1929–1934.
- [39] 柯钟灵, 陈燕惠. 抽动障碍动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 416–422.
Ke ZL, Chen YH. Research advances in animal models of tic disorder [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 416–422.
- [40] Frick L, Pittenger C. Microglial dysregulation in OCD, tourette syndrome, and PANDAS [J]. J Immunol Res, 2016, 2016: 8606057.
- [41] Li E, Ruan Y, Chen Q, et al. Streptococcal infection and immune response in children with Tourette's syndrome [J]. Childs Nerv Syst, 2015, 31(7): 1157–1163.
- [42] Murphy TK, Parker-Athill EC, Lewin AB, et al. Cefdinir for recent-onset pediatric neuropsychiatric disorders: a pilot randomized trial [J]. J Child Adolesc Psychopharmacol, 2015, 25(1): 57–64.

[收稿日期] 2021–03–23

何婷,钱佩瑶,洪敏,等. 诱发支气管哮喘动物模型气道重塑特征的方法和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 117-123.

He T, Qian PY, Hong M, et al. Methods and evaluation of airway remodeling characteristics in animal models of bronchial asthma [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 117-123.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.015

诱发支气管哮喘动物模型气道重塑特征的方法和评价

何婷¹, 钱佩瑶¹, 洪敏¹, 刘成勇^{2*}, 郑劼^{1,3*}

(1. 南京中医药大学药学院 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210023; 2. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 3. 南京中医药大学医学院·整合医学学院, 南京 210023)

【摘要】 气道重塑是慢性哮喘最复杂的病理基础之一, 建立具有气道重塑特征的支气管哮喘动物模型对评价药效及阐明病理机制的研究具有重要的意义。通过对相关动物模型进行分析比较, 总结可行的支气管哮喘气道重塑动物模型构建方法。

【关键词】 支气管哮喘; 气道重塑; 动物模型; Th2 型细胞因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0117-07

Methods and evaluation of airway remodeling characteristics in animal models of bronchial asthma

HE Ting¹, QIAN Peiyao¹, HONG Min¹, LIU Chengyong^{2*}, ZHENG Jie^{1,3*}

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Key Laboratory of Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medicine, Nanjing 210023, China. 2. Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029. 3. Nanjing University of Chinese Medicine School of Medicine and Holistic Integrative Medicine, Nanjing 210023)

Corresponding author: LIU Chengyong. E-mail: lcy8601@163.com; ZHENG Jie. E-mail: jessiezheng@njucm.edu.cn

【Abstract】 Airway remodeling is one of the most complicated pathological characteristics of chronic asthma. The establishment of an animal model of bronchial asthma with airway remodeling characteristics has great significance to evaluate treatment efficacy and to elucidate the pathological mechanisms of chronic asthma. Based on the analysis and comparison of published asthma animal models, the method ology of feasible animal models of airway remodeling for bronchial asthma was summarized in the current review.

【Keywords】 bronchial asthma; airway remodeling; animal model; Th2 cytokine

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

哮喘是世界上最常见的呼吸系统疾病之一, 全球约有 3 亿人在接受治疗。这带来了巨大的经济负担, 其全球经济耗费超过结核病和艾滋病的总和^[1]。临床治疗使用糖皮质激素、 β_2 受体激动剂、

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金项目(81904282)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81904282).

【作者简介】 何婷(1996—), 女, 硕士, 研究方向: 过敏性疾病的研究。Email: 875632374@qq.com

【通信作者】 刘成勇, 男, 博士, 副主任中医师, 研究方向: 慢性哮喘致病机制研究。Email: lcy8601@163.com;

郑劼, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 过敏性疾病的研究。Email: jessiezheng@njucm.edu.cn。

* 共同通信作者

抗胆碱能药物、白三烯受体拮抗剂和茶碱类药物,这些药物在急性期缓解哮喘发作上取得显著效果,但长期应用后疗效下降,使得哮喘的发病率和死亡率不仅没有降低,反而呈现上升的趋势,提示上述药品对于哮喘急性期缓解控制疗效明显,但不可长期应用,无法根治^[2]。气道重塑是哮喘反复发作和不完全可逆性的主要原因,也是难治性哮喘的主要病理基础之一。所以建立合适的气道重塑模型对治疗药物的筛选以及药物效应评价具有重要意义。

《2009 年全球哮喘协议》^[3]将哮喘定义为多种细胞和细胞因子参与的一种气道的慢性炎症,将导致呼吸困难、胸闷和咳嗽,以及反复发作。这些病症与肺内气流阻塞有关,这种阻塞通常是可自发或经治疗后逆转的,但随着病程的延长可导致气道结构发生改变,而不可逆转。这种病理现象称为气道重塑—表现为气道壁增厚、管腔狭窄、气流受限。涉及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积、气道平滑肌(airway smooth muscle, ASM)增厚、上皮纤维化、肌成纤维细胞增生、炎症细胞浸润、杯状细胞增生等^[4]。

哮喘是一种独特的人类疾病,动物与人之间存在巨大的种属差异,所以常用的模型并不能完全反映人体真实的病变特点,需要根据研究目的选择合适的动物造模。现将国内外有关支气管哮喘气道重塑动物模型的构建进行比较分析。

在 PubMed 数据库(2015 ~ 2020)查找关键词“airways remodeling”和“asthma”,并限定为“other Animals”,共得到 270 篇文献,部分文献尚未标明自己所采用的动物的性别。以下将针对不同种类动物模型的构建进行分析评价。

1 支气管哮喘气道重塑模型

常用过敏性哮喘模型的建立分为两个阶段,第 1 阶段是致敏,抗原刺激 B 细胞后,产生 IgE 可与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面高亲和受体 FcεR1 结合^[1],使动物致敏。第 2 阶段是激发,再次接触到抗原后,气道中的效应细胞(肥大细胞和嗜碱性粒细胞)将通过 FcεR1 激活,迅速引发超敏反应。在两个 IgE 分子同过敏原交联后^[2],这些效应细胞释放预先形成且能快速合成的递质,例如组胺,导致支气管痉挛,水肿和分泌粘液,大量粘液堵塞会导致气流不畅。同时,上皮细胞转化为间质细胞,气道外基质沉积,气道平滑肌增厚,上皮纤维化,胶原

蛋白沉淀,进而导致气道重塑。所以建立动物模型时分为两个阶段,致敏期和激发期。常用的方法在致敏期腹腔注射过敏原,在激发期用雾化的方法激发,使用的抗原包括屋尘螨(HDM)、卵清蛋白(OVA);佐剂包括氢氧化铝、氢氧化镁、硫酸铝钾。

2 气道重塑模型的实验动物种属

2.1 小鼠气道重塑模型

小鼠免疫遗传背景较为清楚,小鼠基因组与人类基因组有着 90% 以上的相似性,因此小鼠常被用作构建哮喘模型。根据种属不同,可分为 BALB/c 小鼠, C57BL/6 小鼠。小鼠造模的优点如下,实验成本较低,造模方法较为成熟,可选择种系较多^[5]。但也存在以下缺点,小鼠造模后形成的肺部的炎症与人类哮喘病理特征不同^[6],小鼠造模后晚期非生理性支气管狭窄^[5],此外,它对过敏原易产生耐受性^[7]。BALB/c 小鼠的特点,体积小、繁殖能力强^[8]、免疫系统与人类接近, BALB/c 小鼠易对 OVA 和花粉致敏产生气道高反应性和明显 IgE 超敏反应^[9],因此选用 OVA 为过敏原时,多选用 BALB/c 小鼠。C57BL/6 小鼠对屋尘螨(HDM)和 OVA 均敏感, C57BL/6 小鼠用 OVA 作为致敏原构建哮喘模型^[10]后,小鼠出现明显的呼吸急促、哮喘音、腹肌抽搐、烦躁及口唇紫绀等典型的哮喘症状,但并未形成气道重塑,因此 C57BL/6 小鼠可能不适用于气道重塑模型的建立。临床研究发现,哮喘在女性中发病率高于男性。也有文献表明在接受 OVA 刺激后,雌性小鼠同雄性小鼠相比能产生更强烈的过敏性炎症反应^[11]。此外,在 IL-13 和 OVA 的联合刺激下,同雄性小鼠相比,雌性小鼠表现出更加强烈的 Th2 型反应^[12]。

2.2 大鼠气道重塑模型

Wistar 大鼠与 SD 大鼠,两种品系的雌雄大鼠都曾用作哮喘造模,造模后的过敏反应由 IgE 介导,产生迟发型过敏反应的时间与临床患者相似,大鼠价格便宜,能获得大量的肺泡灌洗液。雄性 SD 大鼠较多使用,可能是因为其耐受性强,能够长时间耐受高浓度的雾化激发,最终出现典型过敏性炎症反应^[13]。但使用大鼠造模也有局限性,主要是缺乏相关的分子生物学试剂,且易对过敏原产生耐受性。

2.3 豚鼠气道重塑模型

豚鼠是常用的呼吸道过敏性疾病的模型动物。

因为它们肺部在解剖学、药理学和生理学上与人类具有相似之处^[14]。与上述哮喘的啮齿动物模型一样,豚鼠对 OVA 敏感,易诱发与哮喘患者相似的炎症反应,其中包括嗜酸性粒细胞增多和气道反应性 (airway hyperresponsiveness, AHR) 增强^[15],能产生典型的 I 型变态反应,雾化激发后能产生速发型与迟发型哮喘反应。豚鼠模型的缺点主要是豚鼠的变态反应由 IgG 而非 IgE 介导。造模后的豚鼠不会出现气道重塑,以及对 OVA 个体反应差异大,部分豚鼠可能不出现哮喘反应,而少数豚鼠可能会发生急性过敏性休克而死亡^[15]。此外,缺乏相关的分子生物学试剂,价格昂贵也使得豚鼠不是气道重塑模型构建的理想动物。

3 根据过敏原分类建立气道重塑模型

分析前文筛选的文献,报道表现出气道重塑的病理特征,按过敏原分类分为以下 2 类。

表 1 用不同的过敏原刺激构建哮喘的气道重塑模型的方法
Table 1 Airway remodeling model of asthma with different allergen

不同的刺激方法 Different ways of Stimulation method	致敏原 Sensibiligen	OVA /HDM (μ g)	佐剂 Adjuvant	刺激时间 Stimulate time
腹腔注射+ 雾化 长期 Intraperitoneal injection(ip)+ aerosol inhalation long time	卵清蛋白 OVA	20 μ g	20 μ g OVA 溶于含 2.25mg 氢氧化铝的 200 μ L 溶液 20 μ g OVA in 2.25 mg/200 μ L Al(OH) ₃	第 0、7、14 天腹腔注射 D0, 7, 14 ip
		-	1%OVA(w/v) ^[16]	第 21 天开始,每次雾化 30 min,8 周 From D21 30 min each time, aerosol inhalation, eight weeks inhalation
	卵清蛋白 OVA	20 μ g	20 μ g OVA 溶于 2 mL 氢氧化铝和氢氧化镁混合液 20 μ g OVA/2 mL Al(OH) ₃ /Mg(OH) ₂	第 0、7、17 天腹腔注射 D0, 7, 17 ip
		-	1% OVA in saline ^[17]	第 24 ~ 26 天,每次雾化 20 min,之后,每周 1 次,连续 17 周 Aerosol inhalation, D24 ~ 26, 20 min, aerosol once a week, 17 weeks
	卵清蛋白 OVA	1 mg	1 mg OVA 溶于含 100 mg 氢氧化铝于 1.5 mL 生理盐水 1 mg OVA in 100 mg Al(OH) ₃ in 1.5 mL saline	第 1 ~ 8 天腹腔注射 D1 ~ 8 ip
		-	OVA (0.1 mg/mL) ^[18]	每隔 2 d 雾化,每次 30 min,8 周 Once every two days 30 min a time eight weeks
	卵清蛋白 OVA	25 mg	25 mg OVA 溶含 1.75 mg 氢氧化铝的溶液 25 mg/mL OVA and 1.75 mg Al(OH) ₃	第 14、18、22、26 天腹腔注射 D14, 18, 22, 26 ip
		-	1%OVA(w/v) ^[19]	第 32 ~ 38 天每次雾化 30 min D32 ~ 38, 30 min a time
	卵清蛋白 OVA	100 μ g	100 μ g OVA 溶于氢氧化铝溶液 100 μ g OVA in Al(OH) ₃	第 1、14 天腹腔注射 D1, 14 ip
		-	1% OVA(w/v) ^[20]	第 19、21、23、25、27 天每次雾化 30 min D19, 21, 23, 25, 27 30 min a time
	卵清蛋白 OVA	10 μ g	10 μ g OVA 溶于含 1.5 mg 的 200 μ L 生理盐水 10 μ g OVA in 1.5 mg Al(OH) ₃ in 200 μ L saline	aerosol inhalation 第 1、14、21 天腹腔注射 D1, 14, 21 ip
		-	OVA (1% w/v in saline) ^[21]	第 26、27、33、34、47、48 天雾化,每次 20 min D26, 27, 33, 34, 47, 48 20 min once time

续表 1

不同的刺激方法 Different ways of stimulation method	致敏原 Sensibiligen	OVA /HDM (μg)	佐剂 Adjuvant	刺激时间 Stimulate time
腹腔+雾化 短期 Intraperitoneal injection + aerosol inhalation short time	卵清蛋白 OVA	20 μg	20 μg OVA 溶于含 2 mg 氢氧化铝于 500 μL PBS 20 μg OVA 2 mg Al (OH) ₃ in 500 μL PBS	第 0, 7, 14 天腹腔注射 D0, 7, 14 ip
	—		OVA(4%) ^[22]	2 d 雾化 1 次, 每次 30 min, 2 周 30 min a time, two weeks once every two days
	卵清蛋白 OVA	10 mg	10 mg OVA 溶于含 100 mg 氢氧化铝溶液 10 mg OVA in 100 mg Al(OH) ₃	第 0, 15 天腹腔注射 D0, 15 ip
	大鼠 Rats	OVA(2%) ^[23]	每次雾化 30 min, 1 周 2 次, 3 周 30 min a time, two times a week three weeks	
	卵清蛋白 OVA	10 μg	10 μg OVA 溶于含 2.25 mg 氢氧化铝于 100 μL 溶液 10 μg OVA in 2.25 mg in Al(OH) ₃ 100 μL	第 0, 7 天腹腔注射 D0, 7 ip
			OVA (1% in PBS) ^[24]	每次雾化 15 min, 1 周 3 次, 2 周 15 min a time, three times a week, two weeks
	卵清蛋白 OVA	20 μg	20 μg OVA 溶于含 4 mg 氢氧化铝于 0.2 mL 生理 盐水 10 μg OVA in 4 mg Al(OH) ₃ in 0.2 mL saline	第 1, 12 天腹腔注射 D1, 12 ip
		—	5% OVA ^[25]	第 18 ~ 23 天 每天雾化 1 次, 30 min D18 ~ 23 30 min once a day
		—	5% OVA	第 26 ~ 55 天 每周雾化 2 次 D26 ~ 55 atomization twice a week
	卵清蛋白 OVA	20 μg	20 μg OVA 溶于含 20 mg Al(OH) ₃ 于 0.2 mL 生理 盐水 20 μg OVA in 20 mg Al(OH) ₃ in 0.2 mL saline	第 0, 14 天腹腔注射 D0, 14 ip
腹腔+滴鼻 长期 Intraperitoneal injection + nasal inhalation long time		—	1%OVA ^[26]	第 21 ~ 27 天 每天雾化 1 次, 每次 60 min D21 ~ 27 once a day 60 min
	卵清蛋白 OVA	25 μg	25 μg OVA 溶于含 2 mg 氢氧化铝的 PBS 25 μg OVA in 2 mg Al(OH) ₃ in PBS ^[27]	第 0 天 25 μg , 第 7 天 100 μg 腹腔注射 D0 25 μg , D7 100 μg ip
		100 μg	100 μg OVA 溶于含氢氧化铝的 PBS 100 μg OVA/100 μL Al(OH) ₃ in PBS	每周雾化 1 次, 7 周 Once a week 7 weeks
	卵清蛋白 OVA	100 μg	100 μg OVA 溶于含 2.25 mg 氢氧化铝于 200 μL PBS 100 μg OVA in 2.25 mg in Al (OH) ₃ 200 μL PBS ^[28]	第 0, 7, 14 天腹腔注射 D0, 7, 14 ip
		100 μg	50 μL PBS	第 21 天开始每周雾化 3 次, 6 周 Form D21, three times a week, six week
	卵清蛋白 OVA	100 μg	100 μg OVA 溶于 100 μL 氢氧化铝溶液 100 μg OVA/100 μL Al(OH) ₃ ^[29]	第 1 天腹腔注射 D1 ip
		100 μg	100 μg OVA 溶于 200 μL 含氢氧化铝的 PBS 100 μg OVA in 2.25 mg in Al(OH) ₃ 200 μL PBS	第 8 天腹腔注射 D8 ip
			50 μL PBS	每周雾化 1 次, 5 周 Once a week, 5 weeks
	卵清蛋白 OVA	100 μg	100 μg OVA 溶于氢氧化铝溶液 100 μg OVA in Al(OH) ₃	第 0, 12 天腹腔注射 D0, 12 ip
		50 μg	50 μg OVA 溶于 50 μL PBS 50 μg /50 μL OVA in PBS ^[30]	第 18 ~ 23 天滴鼻 D18 ~ 23 nasal inhalatio
腹腔+滴鼻 短期 Intraperitoneal injection + nasal inhalation short time	卵清蛋白 OVA	10 μg	10 μg OVA 溶于 100 μL 生理盐水 10 μg OVA/100 μL in saline ^[31]	第 0, 2, 4, 7, 9, 10 天腹腔注射 D0, 2, 4, 7, 9, 10 ip
		20 μg	20 μg OVA 溶于 20 μL 生理盐水 20 μg OVA/20 μL saline	第 15, 18, 21 天滴鼻 D15, 18, 21 Intratracheal instillation
	屋尘螨 HDM	50 μg	HDM 腹腔注射 HDM ip	D0, 7, 14
		25 μg	HDM 滴鼻 ^[32] HDM aerosol inhalation ^[32]	D21 ~ 23
		1 μg	HDM 滴鼻 ^[33] HDM intratracheal instillation ^[33]	D0
	屋尘螨 HDM	10 μg	HDM 滴鼻 HDM aerosol inhalation	D6 ~ 10
		10 μg	HDM 滴鼻 HDM aerosol inhalation	每周滴鼻 3 次, 5 周 Three times a week, five weeks
	屋尘螨 HDM	25 μg	HDM 滴鼻 HDM aerosol inhalation ^[34]	每周滴鼻 5 次, 5 周 Five times a week, five weeks
滴鼻 短期 Aerosol inhalation short time	屋尘螨 HDM	25 μg	HDM 滴鼻 HDM aerosol inhalation ^[34]	每周滴鼻 5 次, 5 周 Five times a week, five weeks

按上述的分类方法,总结为以下几类:(1)长期造模,腹腔注射 OVA(溶于 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 中)致敏,OVA 雾化激发,采用此方法的共有 3 篇文献^[16-18],两篇文献的致敏剂量为 20 μg ,雾化时则采用浓度为 1%。其中一篇文献^[17]在造模结束后 14 d 检测了 AHR,气道重塑,粘液分泌,胶原蛋白沉淀等气道重塑相关病理机制,仍然尚未恢复到基线值。(2)短期造模,腹腔注射 OVA 致敏,OVA 雾化激发,8 篇文献^[19-26],致敏时的 OVA 给药量最高为 25 mg,其他小鼠均使用 10 μg 或者 20 μg OVA 进行致敏,而大鼠用 1 mg 或者 10 mg 的 OVA 进行致敏,致敏次数在 2 ~ 3 次;激发期用的 OVA 浓度范围在 1% ~ 5%。上述两种模型最主要的区别在于激发期的激发次数,因此表现出不同的病理特征。(3)长期造模,腹腔注射 OVA 致敏,OVA 滴鼻激发,采用此方法的共有 3 篇文献^[27-29],致敏过程如 Balkrishna 等^[27] OVA 给药量为 D0(25 μg)D7(100 μg),激发过程中用 100 μg OVA 进行 7 次刺激;Yang 等^[28]两次均为 100 μg ,用 100 ng 进行 5 次刺激。Chen 等^[29]致敏过程均给与 100 μg OVA,后给予 100 μg 进行激发,共 18 次。(3)短期造模,共有 2 篇文章^[30-31]分别采用 5、100 μg 进行致敏后连续 5 d 50 μg OVA 滴鼻激发,或者 10 μg OVA 咽喉刺激激发。

我们发现,长期造模多选用 OVA 作为抗原,慢性模型更能模拟人体哮喘的特点,主要表现为 Th2 型细胞因子介导的过敏性炎症,包括嗜酸性粒细胞浸润,气道高反应性^[35]。Luo 等^[16]采用 20 μg OVA 溶于 200 μL 含 2.25 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ 溶液在 D0、D7、D14 进行腹腔注射致敏,D22 ~ D77,连续 8 周,每周 3 次,每次 30 min,用 1% OVA 进行雾化激发的方法。小鼠表现出气道重塑(气道壁增厚、上皮细胞纤维化、杯状细胞增生、分泌粘液、胶原蛋白沉淀)以及炎性细胞浸润,Th2 型细胞因子增多。此外,在一些慢性哮喘模型中,气道高反应性(AHR)和肺部炎症在最后 1 次过敏原刺激后持续数天或数周,它们的维持情况因实验方案的不同而有所变化。

急性模型,Sharma 等^[20]用 OVA(100 μL , 0.2 mg/mL 溶于含 2.25 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ 溶液中)在 D1 和 D14 进行腹腔注射致敏,在 D28 用 OVA(20 μL , 5 mg/mL 溶于 saline 中)激发,发现气道高反应性在 24 h 后上升,在 48 h 后,恢复到正常值。Kung 等^[36]腹腔注射 OVA(500 μL , 0.016 mg/mL, 2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ 溶液中)在 D0、D6 致敏,然后用 0.5% OVA 在早晚各激发 1 次,时间为 30 min。肺部的炎症在

6 周内完全消失。此外,急性期模型缺乏气道重塑等病理变化,包括上皮细胞纤维化,上皮细胞增生等现象^[37]。

上述方法造出哮喘模型的气道重塑病理特征如表 2 所示:(1)用 50 μg HDM 腹腔注射致敏后,再用 20 μg HDM 连续 3 d 滴鼻进行激发;(2)HDM 气管注射 1 μg 致敏后,先连续 5 d 用 10 μg HDM 进行激发,再连续 5 周,每周 3 次激发;(3)用 25 μg HDM 连续 5 周滴鼻。

急性模型在造模过程中,多采用高浓度的致敏原刺激^[38],造成肺实质炎症,尤其是血管、小支气管的炎症,与人类哮喘的发展过程、病理表现不同。急性模型的缺点,在最后 1 次抗原刺激后的 2 周内,气道炎症和气道高反应性会消退^[17]。肺部的炎症在 6 周内完全消失。

哮喘模型动物在分析哮喘的发病机制和病理生理学上有重要作用,本文比较不同实验方案中选择实验动物、过敏原、佐剂、致敏和激发时间的异同点。通过上述的急慢性模型分类比较,我们发现,急性模型造模周期短,短期内出现强烈的炎症反应,以及气道重塑,但在停止抗原激发后,2 周内炎症反应就可恢复到基线值,气道重塑也会消退,所以不能较好地模拟人体哮喘的病理特征。而慢性模型的炎症反应和气道重塑在停止抗原激发的 2 周后,用 OVA 作为抗原的模型组同空白组相比,呼吸间歇值仍然存在显著性差异,提示其气道重塑仍然存在^[17]。此外,Deng 等^[19]的造模方法,提示小鼠的气道壁增厚,同人类哮喘的病理表现—气道平滑肌增厚较为相似。如前文所述,哮喘的慢性模型更多地使用 OVA 作为抗原,BALB/c 小鼠作为模型动物。因此,模拟以气道重塑为特征的慢性哮喘动物模型可选用雌性 BALB/c 小鼠,使用 Luo 等^[16]的造模方法,D0、D7、D14 腹腔注射 20 μg OVA 溶于 200 μL 含 2.25 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ 混悬液中,自 D21 起,用浓度为 1% 的 OVA 雾化,8 周,每周 3 次,每次 30 min。

我们的研究发现,小鼠是常用的模式动物,被广泛地应用到哮喘模型构建,实验成本较低,造模方法成熟。因此相应的抗体种类多,便于科学实验的展开。但是,小鼠因为体型较小,可供分析的样本量较少。大鼠也被用于构建哮喘模型,所提供的样本量较多,但相应的抗体种类较少,不利于开展部分科学实验。豚鼠也用于构建哮喘模型,且肺部结构与人体相似,但受制于抗体种类,对于大部分科学实验的进行都有限制。基于此,我们认为,使用小鼠构建哮喘模型,有益于科学实验的开展。

表 2 哮喘模型的气道重塑相关病理特征

Table 2 Pathological characteristics related to airway remodeling in asthma models									
不同的刺激方法 Different ways of stimulation method	作者 Author	胶原蛋白沉淀 Collagen deposition	粘液分泌 Mucus secretion	气道纤维化 Airway fibrosis	杯状细胞增生 Goblet cell hyperplasia	TH2 型细胞因子 Th2 cytokine	气道壁增厚 Thickening of the airway	炎症细胞浸润 Inflammatory cell infiltration	气道高反应 Airway hyperreactivity
腹腔+雾化长期 Intraperitoneal injection (ip) + aerosol inhalation long time	Luo 等 ^[16]	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++
	Flanagan 等 ^[17]	+++	++	+++	+++	+++	-	+++	+++
	Huang 等 ^[18]	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	-
腹腔+雾化 短期 Intraperitoneal injection (ip) + aerosol inhalation short time	Deng 等 ^[19]	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
	Sharma 等 ^[20]	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
	Prabhala 等 ^[21]	-	-	+++	-	-	-	+++	+++
	Cheng 等 ^[22]	+++	-	-	-	-	-	+++	+++
	Ge 等 ^[23]	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	-
	Anatriell 等 ^[24]	+++	+++	-	-	+++	-	+++	-
腹腔+滴鼻 长期 Intraperitoneal injection + nasal inhalation long time	Balkrish 等 ^[27]	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-
	Yang 等 ^[28]	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-
	Chen 等 ^[29]	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
腹腔+滴鼻 短期 Intraperitoneal injection + nasal inhalation short time	An 等 ^[30]	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-
	Boldrini-Leite 等 ^[31]	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
腹腔+滴鼻 短期 Intraperitoneal injection + nasal inhalation short time	Yao 等 ^[32]	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	+++
	Debeuf 等 ^[33]	+++	-	-	+++	+++	-	+++	-
气管+滴鼻 Transtracheal injection+ nasal inhalation	McAlinden 等 ^[34]	+++	+++	+++	-	-	-	+++	-

在研究哮喘发病机制的过程中,除上述涉及到的动物模型,还需要充分利用新的技术,包括组织培养技术和计算机建模等。这些方法为哮喘研究和药物研发提供新的思路,许多技术已经被开发来研究疾病的机制,如分子对接技术(配体受体)、虚拟病人。但新的技术也是基于已知的疾病机制,而选择合适动物模型是研究疾病机制的基石。

参 考 文 献(References)

[1] Han RT, Kim S, Choi K, et al. Asthma-like airway inflammation and responses in a rat model of atopic dermatitis induced by neonatal capsaicin treatment [J]. J Asthma Allergy, 2017, 10: 181-189.

[2] Pedro GB, Aun MV, Takejima P, et al. United airway disease: current perspectives [J]. J Asthma Allergy, 2016, 9: 93-100.

[3] Kroegel C, Wirtz H. History of guidelines for the diagnosis and management of asthma; from opinion to control [J]. Drugs, 2009, 69(9): 1189-1204.

[4] Shinagawa K, Kojima M. Mouse model of airway remodeling; strain differences [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 168

(8): 959-967.

[5] Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma [J]. Clin Exp Allergy, 2007, 37(7): 973-988.

[6] Kumar RK, Foster PS. Modeling allergic asthma in mice; pitfalls and opportunities [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 27(3): 267-272.

[7] Fulkerson PC, Rothenberg ME, Hogan SP. Building a better mouse model; experimental models of chronic asthma [J]. Clin Exp Allergy, 2005, 35(10): 1251-1253.

[8] Shapiro SD. The use of transgenic mice for modeling airways disease [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2008, 21(5): 699-701.

[9] Pabst R. Animal models for asthma; controversial aspects and unsolved problems [J]. Pathobiology, 2002, 70(5): 252-254.

[10] 李寅超, 赵宜红. 泡桐花总黄酮抗 C57BL/6 小鼠哮喘气道炎症的实验研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(8): 451-453.

Li YC, Zhao YH. Experimental study on the effect of total flavonoids of paulownia flower on airway inflammation in C57BL/6 mice with asthma [J]. World J Integr Tradit Western Med, 2007, 2(8): 451-453.

[11] Melgert BN, Postma DS, Kuipers I, et al. Female mice are more

- susceptible to the development of allergic airway inflammation than male mice [J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35(11): 1496–1503.
- [12] Zhao H, Moarbes V, Gaudreault V, et al. Sex differences in IL-33-induced STAT6-dependent type 2 airway inflammation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 859.
- [13] 妥海燕, 王志旺, 任远, 等. 卵清白蛋白复制哮喘动物模型的方法及评价研究进展 [J]. *甘肃中医药大学学报*, 2016, 33(1): 71–74.
- Tuo HY, Wang ZW, Ren Y, et al. Methods and evaluation of ovalbumin in replicating asthma animal models [J] *J Gansu Univ Chin Med*, 2016, 33(1): 71–74.
- [14] 罗凤鸣, 王曾礼, 刘小菁, 等. 糖皮质激素对哮喘大鼠 Clara 细胞分泌蛋白表达的影响 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25(9): 26–29.
- Luo FM, Wang ZL, Liu XJ, et al. Effect of glucocorticoids on the expression of secreted protein in Clara cells of asthmatic rats. [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2002, 25(9): 26–29.
- [15] Pretolani M, Vargaftig BB. Role of eosinophil mobilization and activation in experimental airway inflammation and bronchopulmonary hyperreactivity [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, 796: 72–81.
- [16] Luo J, Zhang L, Zhang X, et al. Protective effects and active ingredients of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extracts on airway responsiveness, inflammation and remodeling in mice with ovalbumin-induced allergic asthma [J]. *Phytomedicine*, 2019, 52: 168–177.
- [17] Flanagan TW, Sebastian MN, Battaglia DM, et al. 5-HT2 receptor activation alleviates airway inflammation and structural remodeling in a chronic mouse asthma model [J]. *Life Sci*, 2019, 236: 116790.
- [18] Huang Y, Wang L, Jia XX, et al. Vitamin D alleviates airway remodeling in asthma by down-regulating the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 68: 88–94.
- [19] Deng L, Ma P, Wu Y, et al. High and low temperatures aggravate airway inflammation of asthma: Evidence in a mouse model [J]. *Environ Pollut*, 2020, 256: 113433.
- [20] Sharma P, Yi R, Nayak AP, et al. Bitter taste receptor agonists mitigate features of allergic asthma in mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 46166.
- [21] Prabhala P, Wright DB, Robbe P, et al. Laminin $\alpha 4$ contributes to airway remodeling and inflammation in asthma [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 317(6): L768–L777.
- [22] Cheng Q, Shang Y, Huang W, et al. p300 mediates the histone acetylation of ORMDL3 to affect airway inflammation and remodeling in asthma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76: 105885.
- [23] Ge Y, Cheng R, Sun S, et al. Fangxiao Formula alleviates airway inflammation and remodeling in rats with asthma via suppression of transforming growth factor- β /Smad3 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 119: 109429.
- [24] Anatriello E, Cunha M, Nogueira J, et al. Oral feeding of *Lactobacillus bulgaricus* N45.10 inhibits the lung inflammation and airway remodeling in murine allergic asthma: Relevance to the Th1/Th2 cytokines and STAT6/T-bet [J]. *Cell Immunol*, 2019, 341: 103928.
- [25] Shao Y, Chong L, Lin P, et al. MicroRNA-133a alleviates airway remodeling in asthama through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by targeting IGF1R [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4068–4080.
- [26] Pu Y, Liu Y, Liao S, et al. Azithromycin ameliorates OVA-induced airway remodeling in BALB/c mice via suppression of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 58: 87–93.
- [27] Balkrishna A, Solleti SK, Singh H, et al. Calcio-herbal formulation, Divya-Swasari-Ras, alleviates chronic inflammation and suppresses airway remodelling in mouse model of allergic asthma by modulating pro-inflammatory cytokine response [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110063.
- [28] Yang G, Volk A, Petley T, et al. Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling [J]. *Cytokine*, 2004, 28(6): 224–232.
- [29] Chen YF, Huang G, Wang YM, et al. Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) protects against airway inflammation and airway remodeling in asthmatic mice [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 285.
- [30] An G, Wang W, Zhang X, et al. Combined blockade of IL-25, IL-33 and TSLP mediates amplified inhibition of airway inflammation and remodelling in a murine model of asthma [J]. *Respirology*, 2019, 25(6): 603–612.
- [31] Boldrini-Leite LM, Michelotto PV Jr, de Moura SAB, et al. Lung tissue damage associated with allergic asthma in BALB/c mice could be controlled with a single injection of mesenchymal stem cells from human bone marrow up to 14 d after transplantation [J]. *Cell Transplant*, 2020, 29: 963689720913254.
- [32] Yao L, Wang S, Wei P, et al. Huangqi-Fangfeng protects against allergic airway remodeling through inhibiting epithelial-mesenchymal transition process in mice via regulating epithelial derived TGF- $\beta 1$ [J]. *Phytomedicine*, 2019, 64: 153076.
- [33] Debeuf N, Zhakupova A, Steiner R, et al. The ORMDL3 asthma susceptibility gene regulates systemic ceramide levels without altering key asthma features in mice [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 144(6): 1648–1659.
- [34] McAlinden KD, Deshpande DA, Ghavami S, et al. Autophagy activation in asthma airways remodeling [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60(5): 541–553.
- [35] Foster PS, Ming Y, Matthei KI, et al. Dissociation of inflammatory and epithelial responses in a murine model of chronic asthma [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(5): 655–662.
- [36] Kung TT, Jones H, Adams GK 3rd, et al. Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1994, 105(1): 83–90.
- [37] Holgate ST, Davies DE, Puddicombe S, et al. Mechanisms of airway epithelial damage: epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma [J]. *Eur Respir J Suppl*, 2003, 44: 24s–29s.
- [38] Leong KP, Huston DP. Understanding the pathogenesis of allergic asthma using mouse models [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2001, 87(2): 96–109.

汤红日,王灵军,徐红玲,等. 蝇类抗性品系培育的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 124-130.

Tang HR, Wang LJ, Xu HL, et al. Breeding for resistance strains in flies: a review [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 124-130.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.016

蝇类抗性品系培育的研究进展

汤红日,王灵军,徐红玲,谢治梅,蔡娟,郑明辉,贺莉芳,刘晖*

(遵义医科大学寄生虫学教研室,贵州 遵义 563003)

【摘要】 随着杀虫剂的广泛应用,农业、卫生类病媒生物抗药性日益严重,不仅影响果蔬生产,危害人类健康,更带来环境污染和生态破坏等问题。昆虫抗性品系培育作为研究抗药性机制和抗性治理的一种重要实验室研究手段,越来越受到研究者的关注。蝇是一类分布广泛的公共卫生和农业害虫,通过抗性品系培育研究也可为有害蝇类的抗性机制研究和虫害防制提供可靠的实验数据和理论基础。本文综述了蝇类等昆虫的生理生化抗性、行为抗性、遗传变异和共生菌抗性等抗药性机制,点滴法、浸渍法、药膜法、喷雾法等多种蝇类抗性品系的培育方法,以及毒力测定、抗性倍数计算、基因表达、遗传变异等抗性品系的鉴定方法和影响因素,最终通过对比不同抗性品系培育和鉴定方法对蝇类抗药性研究的影响,以期对蝇类抗药性机制研究和抗药性监测与综合治理等提供参考。

【关键词】 蝇;抗药性;抗性品系;培育

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0124-07

Breeding for resistance strains in flies: a review

TANG Hongri, WANG Lingjun, XU Hongling, XIE Zhimei, CAI Juan, ZHENG Minghui, HE Lifang, LIU Hui*

(Department of Parasitology, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China)

Corresponding author: Liu Hui. E-mail: liuhui6032@sina.com

【Abstract】 Insecticide resistance amongst agricultural pests and disease vectors are an increasing threat to human health, and the production of fruits and vegetables with the overuse of pesticides is causing serious ecological damage and environmental contamination. The breed of strains with resistance to insects has become an important laboratory approach in studies on resistance mechanisms and insect-pest control, and has gained growing attention from scientists worldwide. Research on breeding strains with resistance to flies, which are one of the widespread agricultural and public health pests, can also provide reliable data and the theoretical basis to understand the resistance mechanism of harmful flies and for future pest management. The present review performed a systematic summary on the following fields. First, we review the resistance mechanisms of flies and other insects, exploring physiological, biochemical, behavioral, genetic variation, and symbiotic resistance. Second, we review four cultivation method frequently applied for flies, such as topical application, dipping, residual film and spraying. Third, we summarize the identification method and influencing factors of resistant strains, such as virulence determination, resistance multiplier calculation, gene expression, and genetic variation. Finally, we compare the recent identification and breeding resistant varieties method. In conclusion, this review aims to provide

【基金项目】 国家自然科学基金(82060374,31960025),贵州省科技厅科技基金(黔科合基础[2020]1Y348),遵义医科大学学术新苗培养及创新探索专项(黔科合平台人才[2017]5733-027);大学生创新创业训练计划(ZYDC2018009,20195200187,201910661010)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(82060374, 31960025), Science and Technology Foundation of Guizhou Science and Technology Department([2020]1Y348), Zunyi Medical University Science Foundation([2017]5733-027), College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program(ZYDC2018009, 20195200187, 201910661010).

【作者简介】 汤红日(1985—),男,硕士研究生,研究方向:寄生虫感染与免疫。Email:hongritang1@163.com

【通信作者】 刘晖,女,教授,硕士生导师,研究方向:寄生虫感染与免疫。Email:liuhui6032@sina.com

significant application value and research insights for studies of resistance mechanisms, resistance monitoring and integrated pest management.

【Keywords】 flies; resistance; resistance strains; breeding

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

蝇是分布广泛的一类公共卫生和农业害虫,中国常见蝇类检索表将其分 9 科 280 属,1546 种和亚种,家蝇 (*Musca domestica*)、桔小实蝇 (*Bactrocera dorsalis* Hendel)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 等常见蝇类因传播疾病、危害果蔬业,防制备受重视。化学防治因作用高效在农业和卫生有害蝇类防治中被广泛使用,但人们为提高害虫防制效果而盲目超剂量、频繁地滥用化学杀虫剂导致了抗药性产生。自 1908 年 Melander 首次发现梨园蚧 (*Aspidiotus perniciosus*) 对石硫合剂产生抗性^[1]和 40 年代家蝇对 DDT 产生严重的抗性以来^[2],该问题日益严重,多重抗药性的出现更使抗药性问题雪上加霜。因而不得不加速农药开发和使用,但也加剧环境污染和生态破坏等系列问题,抗药性问题已成为一个全球性难题。有害蝇类防治同样面临严峻挑战,许多问题仍未能探明,而抗性品系培育研究将为有害蝇类抗药性机制研究和抗药性综合治理策略制定提供可靠的实验室数据和理论基础。

1 蝇类抗药性产生机制

昆虫抗药性是因长期使用杀虫剂而出现的一种现象,市场上的农药几乎均有涉及,所有杀虫剂几乎都能使昆虫产生抗药性,以双翅目和鳞翅目的昆虫最多。据不完全统计,对一种或多种杀虫剂产生抗药性的节肢动物已达 600 多种,而这一数据仍在不断增加^[2-3]。蝇类等昆虫抗性机制的产生主要与生理生化抗性、行为抗性、遗传变异以及共生菌抗性等有关,且存在多机制协同作用。

1.1 生理生化机制

目前主要可分代谢抗性、靶标抗性、表皮抗性等。代谢抗性研究主要涉及细胞色素 P450 酶 (P450 s)、酯酶 (CarEs)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs) 3 大酶类和 ABC 转运蛋白等,其抗药性产生与脂肪体、中肠、马氏管等组织参与解毒、代谢作用有关^[4]。杀虫剂作用后,昆虫体内多种酶活性增加、代谢增强,可将杀虫剂降解为低毒或无毒化合物排出体外或者转化加以利用,达到解毒目的并能遗传给子代,增加了害虫防制难度。研究表明,昆虫体内乙酰胆碱酯酶 (AChE)、神经递质 γ -氨基丁酸

(GABA)、神经膜钠离子通道 (SC) 等杀虫剂的作用靶标对杀虫剂敏感度降低,与昆虫抗药性产生有关。有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂可造成黑腹果蝇^[5]、家蝇^[6]和油橄榄果实蝇 (*Bactrocera oleae*)^[7]等昆虫的药物作用靶标 AChE 敏感度降低,从而引起靶标抗性产生。黑腹果蝇对环双烯类杀虫剂产生的抗药性则与其作用靶标受体 GABA 对杀虫剂不敏感有关^[8]。桔小实蝇高效氯氰菊酯抗性品系的表皮几丁质层密度显著增加,导致杀虫剂通过其表皮渗透能力降低,产生表皮抗性,同时因脂肪体中脂肪颗粒数增多引起代谢增强,二者共同作用可降低杀虫剂的毒性^[9]。

1.2 行为抗性

在自然环境中,昆虫依靠求生本能可产生趋利避害,逃离杀虫剂环境,造成种群行为习性改变,产生行为抗性^[10]。在自然环境中,昆虫的嗅觉系统可对环境中分散的气味分子进行选择识别,并能将感知到来自环境的化学信号进行加工和分析处理,促使机体产生相应反应^[11]。Festucci-Buselli 等^[12]研究指出,家蝇适应环境的行为能力对杀虫剂抗性演变具有重要作用,Hubbard 等^[13]证实家蝇通过减少摄入吡虫啉杀虫剂食饵的行为以逃避诱杀。此外,田间瓜实蝇 (*Bactrocera cucurbitae*) 可通过驱避产卵或减少取食的行为来逃避杀虫剂的毒杀^[14]。

1.3 遗传变异

自然界中昆虫种群为适应不利生存环境通过遗传变异发生进化,但种群中因环境改变而出现基因变异的频率极低,使得这类进化过程很漫长;而人为长期使用杀虫剂且改变杀虫剂使用频率、剂量,将导致昆虫携带大量抗性基因,是抗性进化的主要原因。昆虫产生抗药性的主要原因可归结为结构基因变异、基因扩增以及基因表达改变等遗传变异,是一种进化现象^[15]。由于重复性基因存在功能过剩和变异类型多样,人为选择使抗性基因出现频率越来越高,故杀虫剂做为抗性基因的定向选择剂,促进了基因变异和抗性进化的产生,尤其是亚致死浓度杀虫剂更有利于促进昆虫抗性的发生发展^[16]。Liu^[17]、Scott^[18]研究发现菊酯类、有机氯类和 DDT 等杀虫剂抗性作用机理是由于钠离子通道

(voltage gated sodium channel, VGSC) 的持续活化使昆虫经由兴奋、痉挛到麻痹而导致其死亡,而 *kdr* 基因 L1014 位点突变恰恰是引起钠离子通道蛋白第二结构域 S6 区段编码的氨基酸序列改变的原因。此外,家蝇抗药性产生还与 AChE 编码等位基因 *Ace* 突变有关^[19],而桔小实蝇和家蝇马拉硫磷抗性产生主要是由于 *CarEs*、*GSTs*、*P450s* 基因扩增或过表达等所致^[20-21]。因此,遗传变异机制也是抗性品系培育稳定性研究的重要基础。

1.4 共生菌抗性机制

昆虫共生菌不仅能在宿主的代谢活动中供给必需营养物质,而且能通过共生菌代谢物增强昆虫的抗逆性和抗药性。研究认为,昆虫主要是通过改变体表和体内的共生菌种群密度、多样性和共生菌基因突变等方式而增强昆虫的抗药性^[14]。早在 1967 年 Boush 等^[22]就证明苹果绕实蝇 (*Rhagoletis pomonella*) 幼虫体内的共生菌铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas melophthora*) 能降解敌敌畏、狄氏剂等多种杀虫剂。Robacker 等^[23]发现,从苹果绕实蝇体内分离出的聚团肠杆菌,可降解寄主体内的致死有毒物根皮苷,从而形成安全的寄生环境。桔小实蝇的共生菌弗氏柠檬酸杆菌 (*CF-BD*) 能降解敌百虫杀虫剂^[24],米氏克雷伯菌 (*K.michiganensis* BD17) 通过调节宿主桔小实蝇肠道内的脯氨酸和精氨酸代谢,提高宿主低温下的生存力^[25]。Gupta 等^[26]用铜绿假单胞菌感染黑腹果蝇肠道时发现,沃尔巴克氏菌 (*Wolbachia*) 有激发抗性和降低致死率作用,雄蝇肠道感染沃尔巴克氏菌 96 h 后解毒基因 *GSTd8* 表达显著增高,且不携带共生菌的雄蝇比携带共生菌的雄蝇死亡率高 2.26 倍。此外,一种野生型热带果蝇 (*Drosophila paulistorum*) 感染沃尔巴克氏菌后,可引起脂肪代谢相关基因 *FASN1*、嗅觉结合蛋白基因 *LUSH* 和快速嗅觉识别相关酯酶基因 *Esterase 6* 表达下调^[27-28],表明共生菌抗性机制与其他抗性机制还存在交互作用。

2 蝇类抗性品系的培育与鉴定

随着黑腹果蝇等昆虫基因组测序完成和生物分子技术的应用,抗性品系培育做为实验室抗性机制研究的重要手段,有力地促进了抗药性机制研究的发展,对推动抗药性治理研究也起到重要作用^[29]。一般而言,实验室抗性品系培育要经历 10 代以上抗性才会明显升高,而无杀虫剂选择压下抗

性衰退较为缓慢且不稳定^[30]。自 1980 年我国大规模使用菊酯类杀虫剂以来,短短几年家蝇的抗药性几乎以数量级趋势增长,而在实验室家蝇经高效氯氰菊酯选育 22 代后,抗药性增加了 104 倍达到高抗性,但其抗性衰退至少需要 50 代才能恢复接近敏感品系^[31]。

2.1 抗性品系培育的常用方法

常用方法有点滴法、浸渍法、药膜法、喷雾法等,主要通过不同给药方式进行毒力测定,逐代或隔代调整给药浓度和剂量,进行抗性品系培育。点滴法便于操作和标准化测试,但因表皮抗性作用,杀虫剂吸收有所限制。张莹等^[32]用点滴法历经 10 代培育出 167.01 倍抗性水平的高效氯氰菊酯抗性家蝇。浸渍法多用于幼虫,幼虫汰选法能够快速高效提升有害蝇类抗药性水平,宜做为抗药性家蝇的选育方法^[33]。将幼虫浸渍于梯度浓度的杀虫剂中充分接触,该法操作简便,但要综合考虑幼虫的趋水特性,浸渍时间,杀虫剂浓度、剂量、溶解性质等因素,排除易致死非杀虫剂因素等。程梅等^[34]根据冈田绕眼果蝇 (*Phortica okadai*) 体型比家蝇小巧,脆弱且对空气敏感,且没有趋水特性,采用了相对易操作、损伤小的药膜法。因此,不同昆虫因生物学特性不同,使用的培育方法不同,抗性品系培育和抗性维持所需时间和杀虫剂剂量等也不相同,在实际的抗性品系培育中往往是参照标准进行相应的方法改良。

2.2 抗性品系鉴定

(1) 抗性倍数测定:抗性倍数做为衡量抗性水平的重要指标,主要通过毒力测定(生物测定)杀虫剂对昆虫抗药性种群与敏感种群的致死中量 (LD_{50}) 或半数致死浓度 (LC_{50}) 比值计算抗性倍数。我国规定,抗性倍数在 5 ~ 10 倍为低抗,10 ~ 40 倍为中抗,40 ~ 160 倍为高抗,而达到 160 倍以上则视为极高抗水平,随着抗性水平的提升其遗传稳定性也会逐渐提高^[14,16,30,32]。

(2) 抗性相关酶活性检测:由于蝇类抗性产生与 *P450s*、*AChE*、*Est*、*GSTs*、*CarEs* 等酶活性增加与杀虫剂解毒代谢作用增强有关,所以利用抗性品系构建过程中抗药性相关酶活性测定结果比较,酶活性单位变化做为抗性品系鉴定的重要参考指标。Claudianos 等^[20]研究发现家蝇马拉硫磷品系 *CarEs* 活性显著高于敏感品系,而在桔小实蝇马拉硫磷品系中 *CarEs* 则主要在幼虫中发挥代谢作用,其蛹期

GSTs 会显著增高,进入成虫阶段时则 P450s 发挥主导作用^[21]。由于不同昆虫在不同生活史周期,参与不同杀虫剂代谢解毒作用的酶不尽相同,故对不同蝇类抗性品系鉴定时,如何选择酶的种类、活性等还有诸多问题需要进一步探索。

(3) 抗性相关基因检测:蝇类抗性产生与多个基因过表达和靶标点突变有关,研究表明家蝇 P450s 多个家族基因过表达与拟除虫菊酯等杀虫剂抗性及交互抗性产生有关^[35],家蝇和油橄榄果实蝇 AChE 编码基因的点突变致其结构和功能改变也对其抗药性产生有重要作用^[6-7]。丁岩等^[19]在家蝇钠离子通道基因型和乙酰胆碱酯酶(AChE)基因型测定中,分别检测出抗性等位基因(1014F)和抗性等位基因 Ace(342 A/V)。赵佳佳^[21]则通过连续 13 代筛选,将桔小实蝇马拉硫磷品系抗性水平增至 21.10 倍,并检测出 BdGSTd2、CYP4D46、CYP6D9 基因过量表达,与敏感品系相比 BdGSTd2 和 CYP6D9 基因表达量在三龄幼虫期、蛹期和成虫期分别增长 13.67、19.8、1.91 倍和 13.58、3.76、2.98 倍,CYP4D46 基因表达量在马氏管和脂肪体中分别增长 3.73 和 2.6 倍。

2.3 抗性品系建立的影响因素

影响蝇类生存的主要因素有气候、寄主、天敌及生物特性等,而温度、湿度、光照及地理经纬度等是实验室进行抗性品系培育需要考虑的重要环境因素。杀虫剂选择是抗性进化的主要动力,尤其亚致死浓度药物作用胁迫昆虫利于抗药性产生和发展^[16],特别是繁殖快、发生世代多的害虫,抗性积累和发展更迅速。因此杀虫剂选择压则是抗性品系培育必不可少的最重要人为因素,且随着连续用药剂量和用药浓度的增加,抗性水平会呈现快速增长趋势^[36]。如刘艳等^[37]对用 LC₆₀ 氯菊酯连续汰选野外捕获家蝇,与实验室敏感品系比仅用 7 代抗性增高 110 倍,致死中量也由 3.24 ng/μl 增至 450 ng/μl。姚其^[38]按 30 d、60 d、90 d、120 d 等 4 个不同频率的时间用高效氯氰菊酯汰选桔小实蝇,抗性依次从 98.0 倍变为 190.7 倍、139.3 倍、89.0 倍、61.9 倍,呈先扬后抑现象,表明随着汰选频次增加抗性增势明显,而间隔时间延长则可致抗性降低。来守国^[39]用甲维盐、乙基多杀菌素和高效氯氰菊酯 LC₂₀、LC₁₀ 和 LC₅ 浓度处理铃木氏果蝇(*Drosophila suzukii*)和黑腹果蝇时发现,随着亚致死浓度升高,铃木氏果蝇多功能氧化酶(MFO)活性和黑腹果蝇

AChE 酶、GSTs 酶活性抑制作用明显增强。可见在抗性品系培育过程中,用于汰选的杀虫剂浓度越高,有害蝇类所受药物环境选择压就越大,抗性倍数提升就越快,且连续杀虫剂选择压汰选会使有害蝇类抗药性发展更快。一旦有害蝇类失去杀虫剂环境选择压作用或汰选间隔时间延长,则会出现抗性衰退现象^[38]。

3 蝇类抗性品系应用研究

目前文献报道实验室已经成功构建的蝇类抗性品系包括家蝇高效氯氰菊酯和溴氰菊酯抗性品系^[31-32,37,40-41],桔小实蝇的马拉硫磷、高效氯氰菊酯、多杀霉素抗性品系^[21,38,42],黑腹果蝇高效氯氰菊酯和 DDT 抗性品系^[12,39,43]等,这些有害蝇类抗性品系培育不仅为抗药机制研究打下了基础,且在抗性综合治理方面也有重要应用前景。

3.1 抗性品系培育与抗药性治理

蝇类抗药性防制中除需要不断更新杀虫剂外,混用不同机理的杀虫剂或采用增效剂亦可提高药物作用效果和延长药物作用时间^[44-45],对于已产生抗药性的害虫,轮用不同机理的新型杀虫剂更加有效,既可杀死带有突变基因的抗性个体,又能降低原有抗性基因的频率^[46]。因此,通过实验室培育抗性品系开展杀虫剂交互抗性机制研究,通过评估杀虫剂的抗药性水平开展早期监测,对人们的生活和健康具有重要意义。

3.2 抗性品系培育与昆虫生物适合度

生物适合度是指昆虫在杀虫剂胁迫下可通过代偿和应激机制改变自身部分机能来抵御杀虫剂的伤害,使其能在不利环境条件下存活并繁衍后代。Shah 等^[40]研究发现,家蝇溴氰菊酯抗性品系明显有繁殖率和生活力上的生存劣势。Platt 等^[43]研究也发现抗 DDT 黑腹果蝇雄蝇出现了求偶率较低、攻击性较弱等繁殖率和生存力下降的情形。研究表明蝇类的适合度发育与杀虫剂选择压密切相关^[41]。在抗性品系的培育中,有害蝇类抗性基因型适合度一般比敏感基因型高,具有生存优势,但停止施药后,抗药性基因型有害蝇类会表现出生活力和繁殖力降低,产生适合度代价^[47]。随着抗药性进一步发展,抗性基因的频率会越来越高,且果蝇抗性基因型的适合度代价还与 Ace 基因诱导的抗药性酶活性降低有关^[43]。李培征等^[48]提出,抗性低风险的桔小实蝇多杀霉素抗性品系,在停用杀虫剂

后,存在死亡率增加、发育历期延长和繁殖力下降等适合度代价,但有利于恢复该杀虫剂对桔小实蝇的敏感性。可见有害蝇类适合度研究对抗性治理和抗性遗传方式的研究都具有重要意义,在抗性品系培育中抗性基因型蝇类的生存优势可能是抗性治理中的劣势,而抗性基因型蝇类表现的适合度代价却有可能成为抗性治理的优势并为抗性策略研究提供新思路。

3.3 抗性品系培育与害虫治理效果评估

Højland 等^[49]在抗性品系培育研究中认为,对实验室驯化的不同抗性品系家蝇、果蝇代谢相关基因的表达和突变的研究,在一定程度上亦能用于对田间、果园等环境中害虫抗药性产生和遗传变异情况的评估,在发现抗性发展还不稳定时阻止或延缓其发展,以达到科学有效治理抗性之目的。鉴于果蝇在抗药性研究和遗传机制应用中的优良表现^[50],刘丽等^[51]也首次利用抗性品系培育中,蝇类化学杀虫剂逐渐产生抗性,导致灭杀效率逐渐降低的特点,引入单调递减的负指数函数做为杀虫剂作用函数构建了化学防制的单种群非自治害虫治理模型,以研究害虫抗药性发展对虫害控制的影响,并推演出了理论上害虫灭绝的临界条件。可见,实验室抗性品系培育中抗性的产生和变化做为田间害虫抗性产生发展过程的模拟推演,并借助大数据技术实现害虫防制的虚拟仿真研究,对害虫治理效果评估和害虫治理方式数字化有重要意义。

4 结语

百年来杀虫剂历经数次更新换代,新药的研发应用总是伴随杀虫剂抗药性的不断产生,有害蝇类抗药性问题也随着交互抗性和多重抗性的产生愈发严峻。蝇类抗性品系培育做为抗药性机制研究的一种重要方法,现已被成功应用于害虫的抗性机制研究和虫害抗性治理的过程研究。开展蝇类抗性品系的培育研究,尤其是对一些重要农业、病媒蝇类的抗药性品系培育,不仅可建立多种方案监测蝇类抗药性,还可通过抗性品系的培育关注抗药机制与传播环境之间的联系,对推动有害蝇类抗药性机制研究、抗药性监测治理与人类生产生活结合都具有重要的研究价值。随着多组学技术的发展,在抗性品系培育中将生物测定法与一些新的生物化学指标和分子生物学指标检测及转基因技术等联合应用,如杀虫剂抗药性相关的 P450s、AChE 等关

键酶活性或基因检测,以及拜耳作物科学适合大量样品基因表达检测的突变位点 DNA 测序技术或无法明确突变位点时采用的随机扩增多肽性 DNA 技术 (RAPD)。此外,英国 LGC 公司的 KASP-PCR, PASA 和 TaqMan-MGB 探针法等都能运用于有害蝇类抗药性基因检测。这些新技术使得抗性品系培育与鉴定方法的应用日趋成熟、实用便捷,尤其是随着第二代、第三代测序技术的测序速率和准确性大幅提高,且成本降低,其应用前景更值得期待。

参 考 文 献 (References)

- [1] Melander AL. Can insects become resistance to sprays [J]. Econ Entomol, 1914, 7(2): 167-173.
- [2] Denholm I, Devine GJ, Williamson MS. Insecticide resistance on the move [J]. Science, 2002, 297(5590): 2222-2223.
- [3] Anonymous. Choice of law rules for the construction and Interpretation of written instruments [J]. Nature, 2011, 473(7348): 470-477.
- [4] Pignatelli P, Ingham VA, Balabanidou V, et al. The Anopheles gambiae ATP-binding cassette transporter family: phylogenetic analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance [J]. Insect Mol Biol, 2018, 27: 110-122.
- [5] Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, et al. Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(13): 5922-5926.
- [6] Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, et al. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance [J]. Biochem J, 2001, 359(1): 175-181.
- [7] Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, et al. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* [J]. Insect Mol Biol, 2002, 11(4): 329-336.
- [8] Hosie AM, Aronstein K, Sattelle DB, et al. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors [J]. Trends Neurosci, 1997, 20(12): 578-583.
- [9] Lin Y, Jin T, Zeng L, et al. Cuticular penetration of β -cypermethrin in Insecticide Susceptible and resistant strains of *Bactrocera dorsalis* [J]. Pestic Biochem Phys, 2012, 103(3): 189-193.
- [10] Lockwood JA, Byford RL, Story RN, et al. Behavioral resistance to the pyrethroids in the horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) [J]. Environ Entomol, 1985, 14(6): 873-880.
- [11] Leal WS. Odorant reception in insects: roles of receptors binding proteins and degrading enzymes [J]. Annu Rev Entomol, 2013, 58: 373-391.
- [12] Festucci-Buselli RA, Carvalho-Dias AS, de Oliveira-Andrade M, et al. Expression of Cyp6g1 and Cyp12d1 in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* [J]. Insect Mol

- Biol, 2005, 14(1): 69–77.
- [13] Hubbard CB, Gerry AC. Genetic evaluation and characterization of behavioral resistance to imidacloprid in the house fly [J]. Pestic Biochem Physiol, 2021, 171: 104741.
- [14] 敖国富, 林嘉, 刘旭祥, 等. 实蝇害虫抗药性研究进展 [J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(3): 401–415.
- Ao GF, Lin J, Liu XX, et al. Advances in research on insecticide resistance in the Tephritidae [J]. Chin Bull Entomol, 2019, 56(3): 401–415.
- [15] Kristian B, Sean DS, David MS, et al. Pesticide durability and the evolution of resistance: A novel application of survival analysis [J]. Pest Manag Sci, 2018, 74(8): 1953–1963.
- [16] 徐莉, 王建华, 梅宇, 等. 解毒酶和转运蛋白介导的害虫抗药性分子机制研究进展 [J]. 农药学学报, 2020, 22(1): 1–10.
- Xu L, Wang JH, Mei Y, et al. Research progress on the molecular mechanisms of insecticides resistance mediated by detoxification enzymes and transporters [J]. Chin J Pestic Sci, 2020, 22(1): 1–10.
- [17] Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions [J]. Annu Rev Entomol, 2015, 60: 537–559.
- [18] Scott JG. Evolution of resistance to pyrethroid insecticides in *Musca domestica* [J]. Pest Manag Sci, 2017, 73(4): 716–722.
- [19] 丁岩, 杨婵, 李梅, 等. 广西北海市家蝇杀虫剂抗性基因频率的检测与分析 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2017, 28(1): 12–15.
- Ding Y, Yang C, Li M, et al. Frequency of alleles associated with insecticide resistance in a field housefly population from Beihai city, Guangxi Zhuang Autonomous Region [J]. Chin J Vector Biol Control, 2017, 28(1): 12–15.
- [20] Claudianos C, Russell RJ, Oakeshott JG. The same amino acid substitution in orthologous Esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly [J]. Insect Biochem Mol Biol, 1999, 29(8): 675–686.
- [21] 赵佳佳. 桔小实蝇马拉硫磷抗性品系选育及代谢抗性机制研究 [D]. 重庆: 西南大学; 2014.
- Zhao JJ. Resistance selection to malathion and the mechanisms of metabolic resistance In *Bactrocera dorsalis* (Hennel) [D]. Chongqing: Southwest University; 2014.
- [22] Boush MG, Matsumura F. Insecticidal degradation by *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiote of the apple maggot [J]. J Econ Entomol, 1967, 60(4): 918–920.
- [23] Robacker DC, Lauzon CR. Purine metabolizing capability of (*Enterobacter agglomerans*) affects volatiles production and attractiveness to Mexican fruit fly [J]. J Chem Ecol, 2002, 28(8): 1549–1563.
- [24] Cheng D, Guo Z, Riegler M, et al. Gut symbiont enhances insecticide resistance in a significant pest, the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [J]. Microbiome, 2017, 5(1): 13.
- [25] Raza MF, Wang Y, Cai Z, et al. Gut microbiota promotes host resistance to low temperature stress by stimulating its arginine and proline metabolism pathway in adult *Bactrocera dorsalis* [J]. PLoS Pathog, 2020, 16(4): e1008441.
- [26] Gupta V, Vasanthakrishnan RB, Siva JJ, et al. The route of infection determines *Wolbachia* antibacterial protection in *Drosophila* [J]. Proc Biol Sci, 2017, 284(1856): 20170809.
- [27] Bai ão GC, Schneider DI, Miller WJ, et al. The effect of *Wolbachia* on gene expression in *Drosophila paulistorum* and its implications for symbiont induced host [J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 465.
- [28] 王争艳, 何梦婷, 鲁玉杰. 共生微生物对昆虫化学通讯的影响 [J]. 应用昆虫学报, 2020, 57(6): 1240–1248.
- Wang ZY, He MT, Lu YJ. Influence of microbial symbionts on chemical communication in insects [J]. Chin Bull Entomol, 2020, 57(6): 1240–1248.
- [29] 朱昌亮. 媒介生物抗药性机制研究主要进展 [J]. 中华卫生杀虫药械, 2016, 22(4): 313–316.
- Zhu CL. Research progress on the resistance mechanism of medical vectors to insecticides [J]. Chin J Hyg Insecticides Eq, 2016, 22(4): 313–316.
- [30] 章玉苹, 曾玲, 陆永跃, 等. 桔小实蝇对敌百虫抗性稳定性及再增长趋势 [J]. 昆虫学报, 2008, 51(10): 1044–1049.
- Zhang YP, Zeng L, Lu YY, et al. Resistance stability and re-growth in adults of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) to trichlorphon [J]. Acta Entomol Sin, 2008, 51(10): 1044–1049.
- [31] 曹辉. 家蝇的抗性相对适合度的研究 [D]. 济南: 山东师范大学; 2010.
- Cao H. Review on resistance and relative fitness of housefly [D]. Jinan: Shangdong Normal University; 2010.
- [32] 张莹, 唐勇, 孙炳欣. 家蝇对高效氯氰菊酯抗药性的选育研究 [J]. 中华卫生杀虫药械, 2018, 24(1): 27–28.
- Zhang Y, Tang Y, Sun BX. Selection of resistant strain of *Musca domestica* against beta-cypermethrin [J]. Chin J Hyg Insect Equip, 2018, 24(1): 27–28.
- [33] 孙红迪, 史慧勤, 杨振洲. 3 种选育家蝇抗药性方法的比较 [J]. 中华卫生杀虫药械, 2011, 17(3): 167–170.
- Sun HD, Shi HQ, Yang ZZ. Comparison of three methodstobreed insecticide Resistanceof *Muscado mestica* [J]. Chin J Hyg Insect Equip, 2011, 17(3): 167–170.
- [34] 程梅, 吕思颖, 熊雄, 等. 两种菊酯类杀虫剂对冈田绕眼果蝇成虫的室内毒力测定 [J]. 医学动物防制, 2019, 35(6): 575–577.
- Cheng M, Lv SY, Xiong X, et al. Laboratory toxicity determination of two pyrethroid insecticides against adults of *Amiota okadae* [J]. J Med Pest Control, 2019, 35(6): 575–577.
- [35] Feyereisen R. Insect CYP genes and P450 enzymes [M]. Insect Molecular Biology and Biochemistry: Elsevier, Amsterdam. 2012: 236–316.
- [36] Chaton PF, Ravanel P, Meyran JC, et al. The toxicological

- effects and bioaccumulation of fipronil in larvae of the mosquito *Aedes aegypti* in aqueous medium [J]. *Pestic Biochem Phys*, 2001, 69(3): 183–188.
- [37] 刘艳, 李梅, 邱星辉. 家蝇对氯菊酯抗性的分子机制研究 [J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2020, 27(2): 106–111.
- Liu Y, Li M, Qiu XH. Research on the molecular mechanism of housefly resistance to permethrin [J]. *Acta Parasitol Med Entomol Sin*, 2020, 27(2): 106–111.
- [38] 姚其. 桔小实蝇抗性品系对三种杀虫剂的抗药性发展动态研究 [D]. 广州: 华南农业大学; 2017.
- Yao Q. Resistance dynamics of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) resistant strains to three insecticides [D]. Guangzhou: South China Agricultural University; 2017.
- [39] 来守国. 三种杀虫剂对斑翅果蝇和黑腹果蝇的亚致死效应研究 [D]. 泰安: 山东农业大学; 2017.
- Lai SG. Sublethal effect of three insecticides on *Drosophila suzukii* and *Drosophila melanogaster* [D]. Tai'an: Shangdong Agricultural University; 2017.
- [40] Shah RM, Shad SA. House fly resistance to chlorantraniliprole: cross resistance patterns, stability and associated fitness costs [J]. *Pest Manag Sci*, 2020, 76(5): 1866–1873.
- [41] Shi J, Zhang L, Mi J, et al. Role transformation of fecundity and viability: The leading cause of fitness costs associated with beta-cypermethrin resistance in *Musca domestica* [J]. *PLoS One*, 2020, 15(1): e0228268.
- [42] Langmüller AM, Nolte V, Galagedara R, et al. Fitness effects for Ace insecticide resistance mutations are determined by ambient temperature [J]. *BMC Biol*, 2020, 18(1): 157.
- [43] Platt N, Kwiatkowska RM, Irving H, et al. Target-site resistance mutations (kdr and RDL), but not metabolic resistance, negatively impact male mating competitiveness in the malaria vector *Anopheles gambiae* [J]. *Heredity (Edinb)*, 2015, 115(3): 243–252.
- [44] Shaw B, Hemer S, Cannon MFL, et al. Insecticide control of *Drosophila suzukii* in commercial sweet cherry crops under cladding [J]. *Insects*, 2019, 10(7): 196.
- [45] Alam M, Shah RM, Shad SA, et al. Fitness cost, realized heritability and stability of resistance to spiromesifen in house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2020, 18(1): 104648.
- [46] Khan HA, Akram W, Haider MS. Genetics and mechanism of resistance to deltamethrin in the house fly, *Musca domestica* L., from Pakistan [J]. *Ecotoxicology*, 2015, 24(6): 1213–1220.
- [47] Liu N, Scott JG. Phenobarbital induction of CYP6D1 is due to a transacting factor on autosome 2 in housefly [J]. *Insect Mol Biol*, 1997, 6(1): 77–81.
- [48] 李培征, 陆永跃, 梁广文, 等. 桔小实蝇抗多杀霉素生物适合度代价 [J]. *环境昆虫学报*, 2014, 36(1): 67–70.
- Li PZ, Lu YY, Liang GW, et al. Fitness cost of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) strain resistant to Spinosad [J]. *J Environ Entomol*, 2014, 36(1): 67–70.
- [49] Højland DH, Jensen KM, Kristensen M. Expression of xenobiotic metabolizing cytochrome P450 genes in a spinosad-resistant *Musca domestica* L. strain [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103689.
- [50] 胡永艳, 孔申申. 果蝇模型与心脏衰老遗传机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(11): 85–89.
- Hu YY, Kong SS. *Drosophila* as a model to study genetics of cardiac aging [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(11): 85–89.
- [51] 刘丽, 曲若文, 康宝林, 等. 具有抗药性发展的非自治害虫治理模型研究 [J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2018, 41(1): 30–34.
- Liu L, Qu RW, Kang BL, et al. Study on a non-autonomous pest management model with resistance development [J]. *J Nanjing Normal Univ (Natural Sci Edit)*, 2018, 41(1): 30–34.

[收稿日期] 2021-08-14

李少创,韩诚,秦亚莉,等. 阿尔茨海默病实验动物模型评述 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 131-145.

Li SC, Han C, Qin YL, et al. A review of experimental animal models of Alzheimer's disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 131-145.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.017

阿尔茨海默病实验动物模型评述

李少创^{1,2}, 韩诚^{1,2*}, 秦亚莉^{1,2}, 赵雅飞^{1,2}, 魏文一^{1,2}, 杨杰^{1,2}, 帅月圆^{1,2}, 郭栋¹

(1. 山西中医药大学, 山西 晋中 030619; 2. 中医脑病山西省重点实验室, 山西 晋中 030619)

【摘要】 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种病因未明且与年龄相关的不可逆性神经退行性疾病。临床表现以认知和记忆功能丧失为主。目前, 对于该病的发病机制及药物治疗效用的探索已成为现代脑科学研究的热点之一, 但是其复杂的发生机制和病理学变化对实验动物模型的选择提出了重大挑战。本文就常用实验动物种类的特点、多种动物模型的甄选和模型构建方法进行了详细的评述。AD 常用动物模型可分为自然动物模型、物理干预模型、化学干预模型、基因干预动物模型, 以及其他类型。本文对这些模型构建方法、病理变化情况和适用实验类型进行总结和评述, 希望能为研究者选用和建立实验动物模型提供参考。

【关键词】 阿尔茨海默病; 动物模型; 构建方法; 评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0131-15

A review of experimental animal models of Alzheimer's disease

LI Shaochuang^{1,2}, HAN Cheng^{1,2*}, QIN Yali^{1,2}, ZHAO Yafei^{1,2}, WEI Wenyi^{1,2}, YANG Jie^{1,2}, SHUAI Yueyuan^{1,2}, GUO Dong¹

(1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China. 2. Shanxi Key Laboratory of Chinese Medicine Encephalopathy, Jinzhong 030619)

Corresponding author: HAN Cheng. E-mail: hc@sxtcm.edu.cn

【Abstract】 Alzheimer's disease (AD) is an irreversible and age-associated neurodegenerative disease with unclear etiology, and is characterized by a gradual loss of cognitive and memory functions. At present, investigation into the pathogenesis of AD and the efficacy of drug treatment has become one of the hotspots in the field of brain science. It is challenging to select proper experimental animal models of AD because of its complicated etiological mechanisms and pathological changes. This article gives a detailed review of the characteristics of multiple laboratory animals and related AD models, as well as the method of model construction. In general, AD animal models can be divided into natural, physical intervention, chemical intervention, genetic intervention, and other animal models. This paper has summarized and commented on the method of models' construction, the changes of pathology and applicable types of experiments, hoping to provide reference for researchers to select and establish experimental animal models.

【Keywords】 Alzheimer's disease; animal models; construction method; evaluation

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

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种病因尚不明确的认知和记忆功能逐渐丧失的不

可逆转的神经变性类疾病, 多发于老年人群。据统计全球约有 5000 万 AD 患者^[1], 中国的患病情况亦

【基金项目】 国家自然科学基金 (81874420, 81703959, 82004236), 山西省教育厅自然科学类项目 (2020L0405)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81874420, 81703959, 82004236), Natural Science Project of Shanxi Education Department (2020L0405).

【作者简介】 李少创 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 证候规律研究。Email: 2945758772@qq.com

【通信作者】 韩诚 (1987—), 男, 博士, 讲师, 硕士生导师, 研究方向: 中医藏象理论研究。Email: hc@sxtcm.edu.cn

不容乐观。据推测,随着中国老年人口的快速增加,未来 20 年中国的痴呆患者将大幅增加^[2],这会极大的增加中国家庭和医疗系统以及社会的负担^[3]。

AD 患者可表现出进行性记忆减退,执行功能受损,日常活动困难,思维和行为方式改变,以及语言功能损害等临床症状^[4]。AD 的特征性病理表现为由神经元外蛋白质片段—— β 淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 的异常聚集,神经元内 Tau 蛋白的异常积累,神经胶质增生和神经元丢失导致的大脑萎缩^[5],同时伴有脑血管淀粉样变性,炎症和重大突触改变等^[6-8]。面对这一种破坏性较强的退行性神经疾病,其复杂的病因和病理变化,以及严重的社会危害性,对临床医生和科研工作者提出了重大挑战,而实验动物模型的正确选择则是解决这一难题

的前提条件。本文通过总结当前各类 AD 实验动物模型的建立方法,针对其优势、适用条件和不足进行了详细评述,以期为研究者选用和建立实验动物模型提供可靠的参考依据。

1 实验对象的选择

人类和动物在生理上有极大的相似性^[9],因此可以通过在动物身上模拟构建各类疾病模型,探索疾病的生物学机制,验证相关治疗方法的有效性。目前,用于制备 AD 模型的动物包括黑腹果蝇^[10]、秀丽隐杆线虫^[11]、斑马鱼^[12]、小鼠、大鼠、犬^[13]、恒河猴^[14-15]和黑猩猩^[16]等。实验动物在种属和生理条件上不尽相同,因此研究者可以根据所要研究的疾病机制和需要模拟的神经病理变化来选择合适的实验动物(见表 1)。

表 1 AD 实验动物的选择

Table 1 Selection of AD experimental animals						
动物 Animal	所属 Belonging	生理特点 Physiological characteristics	优势 Advantages	不足 Disadvantages	适用范围 Scope of application	参考文献 References
黑腹果蝇 Drosophila melanogaster	昆虫纲双翅目果蝇科 Insecta Diptera Drosophilidae	低等生物,遗传物质较少 Lower organisms with less genetic material	遗传易操作 Genetically manageable	脑结构与人差距较大 There is a big gap between brain structure and humans	Tau 蛋白异常研究及转基因 Tau protein abnormality research and genetic modification	[10]
秀丽隐杆线虫 Caenorhabditis elegans	线虫纲小杆线虫目小杆科 Chromadorea Rhabditida Rhabditidae	体积小,寿命短 Small size, short life	体积小,寿命短,易于繁殖和实验操作 Small size, short life span, easy for reproduction and experimental operation	脑结构与人差距较大 There is a big gap between brain structure and humans	AD 发展中各种事件的顺序 Sequence of various events in AD development	[11]
斑马鱼 Zebrafish	辐鳍鱼纲鲤形目鲤科 Actinopterygii Cypriniformes Cyprinidae	体型小,具有与人相同 γ -分泌酶复合物 Small size, with the same γ -secretase complex as human	体型小,易于大规模饲养和基因操作,具有与人相同的直系 PSEN1 基因和 PSEN2 基因 Small size, easy for large-scale breeding and genetic manipulation, with the same direct line PSEN1 gene and PSEN2 gene as human	脑结构与人差距较大,缺乏明显的高级认知行为 There is a big gap between brain structure and human, lack of obvious high-level cognitive behavior	早老素 1 基因和早老素 2 基因转基因动物 Transgenic animals with presenilin 1 gene and presenilin 2 gene	[12]
小鼠 Mice	哺乳纲啮齿目鼠科 Mammalian Rodentia Muridae	与人具有高度直系同源,具有哺乳动物生理学上的相似性,并且体型小 It has a high degree of orthology with humans, has similarity in mammalian physiology, and is small in size	脑结构与人相近,饲养和维护成本低 The brain structure is similar to that of humans, and the cost of feeding and maintenance is low	培育转基因品系周期长,时间成本高 Cultivating genetically modified strains has a long cycle and high time cost	最常用的转基因动物,用来评估认知功能障碍 The most commonly used genetically modified animals to assess cognitive dysfunction	-

续表 1

动物 Animal	所属 Belonging	生理特点 Physiological characteristics	优势 Advantages	不足 Disadvantages	适用范围 Scope of application	参考文献 References
大鼠 Rat	哺乳纲啮齿目鼠科 <i>Mammalian Rodentia Muridae</i>	具有哺乳动物生理学上的相似性,并且体型较小 Similar to mammalian physiology and small in size	相比小鼠,脑容量更大,脑结构与人更为相近,饲养和维护成本低 Compared with mice, the brain capacity is larger, the brain structure is more similar to that of humans, and the cost of feeding and maintenance is low	培育转基因品系周期长,时间成本高 Cultivating genetically modified strains has a long cycle and high time cost	用作转基因动物,用来评估认知功能障碍 Used as a genetically modified animal to assess cognitive dysfunction	-
犬 Dog	哺乳纲食肉目犬科 <i>Mammals Carnivora Canidae</i>	可以患有与人相似的年龄相关性认知功能障碍 May suffer from age-related cognitive dysfunction similar to humans	可以自然地再现 AD 的关键方面,包括 A β 病理学,神经元变性以及学习和记忆障碍 Can naturally reproduce key aspects of AD, including A β pathology, neuronal degeneration, and learning and memory impairment	不会出现神经斑块和神经缠结 No nerve plaques and tangles	可作为自然动物模型,并可进行 A β 靶向药物的测定 It can be used as a natural animal model and can be used for the determination of A β targeted drugs	[13]
恒河猴 Rhesus Monkey	哺乳纲灵长目猴科 <i>Mammals Primates Cercopithecidae</i>	大脑在功能网络的整体架构和组织功能网络上具有很大的相似性,并且系统发育上更接近人类,视网膜具有其他哺乳动物不具有的特征(黄斑,中央凹)。药物动力学与人更为接近。进化具有高度保守性 The brain has great similarities in the overall structure of the functional network and the organizational functional network, and is closer to humans in system development, and the retina has features (macular, fovea) that other mammals do not have. Pharmacokinetics are closer to humans. Evolution is highly conservative	大脑结构比较接近人类,可以接受训练并执行感知和认知任务 The brain structure is closer to human beings and can be trained to perform perceptual and cognitive tasks	价格高,可用性受限,维护要求高,以及道德考虑 High price, limited availability, high maintenance requirements, and ethical considerations	人类临床和电生理研究 Human clinical and electrophysiological research	[14-15]
黑猩猩 Chimpanzee	哺乳纲灵长目人科 <i>Mammals Primates Hominidae</i>	大脑在功能网络的整体架构和组织功能网络上具有很大的相似性,并且系统发育上更接近人类,视网膜具有其他哺乳动物不具有的特征(黄斑,中央凹)。药物动力学与人更为接近 The brain has great similarities in the overall structure of the functional network and the organizational functional network, and is closer to humans in system development, and the retina has features (macular, fovea) that other mammals do not have. Pharmacokinetics are closer to humans	大脑结构最为接近人类,可以接受训练并执行感知和认知任务 The brain structure is closest to human beings and can be trained to perform perceptual and cognitive tasks	价格高,可用性受限,维护要求高,以及道德考虑 High price, limited availability, high maintenance requirements, and ethical considerations	人类临床和电生理研究 Human clinical and electrophysiological research	[16]

2 实验动物模型的构建

由于阿尔茨海默病发病机制尚不明确,学者围绕 AD 患者临床表现出的衰老特征和该疾病所特有的病理特征来进行合理推测并提出了众多发病假说,AD 模型的构建思路即是以各种假说为依据的。目前尚未真正模拟出与 AD 患者所有病理特征完全相符的模型,一方面,阿尔茨海默病的病理特征呈现出多样性特点;另一方面,动物和人类在生理上相似度虽然很高,但二者之间仍存在着一些差异。此外,动物模型设计的充分性、合理性会极大程度的影响受试药物效应的可靠性,进而影响将科学研究成果应用于临床。

因此,选择合适的实验动物模型是解决这一难题的前提条件。目前,可用的 AD 动物模型包括:自然动物模型、人工干预动物模型、遗传动物模型、其他动物模型。

2.1 自然动物模型

年龄是 AD 发病的重要危险因素之一^[17]。自然动物模型以高龄老化作为 AD 的发病基础,可自发形成。一方面符合衰老或老化生理特征,另一方面无需人为干预,减少了人为因素参与所产生的误差,主要包括自然衰老模型和快速衰老模型。

2.1.1 自然衰老模型

衰老过程在动物(如啮齿类动物和犬科动物,以及非人灵长类动物)和人类所表现的体征(如认知功能下降、记忆能力衰退)比较相似^[18]。该模型不需要干预因素,可自发形成,模型动物的老化症状与 AD 患者相似。但此类动物不会自发地形成 AD 典型的病理特征(如淀粉样蛋白沉积),可以用于开展生理性老化与 AD 之间关系的相关研究^[19-20]。常用的衰老动物为小鼠和大鼠,小鼠衰老期在 12 ~ 24 月龄,大鼠衰老期在 21 ~ 32 月龄^[21-22]。但是,由于造模周期较为漫长,受试动物很可能在衰老过程中变生其他疾病或死亡,导致动物个体之间差异性增大或组内动物数量减少,最终导致实验失败。

2.1.2 快速衰老模型

此模型最早由日本京都大学 Takeda 等^[23]培育出来,并将其命名为快速老化小鼠(senescence-accelerated mouse, SAM),包括快速衰老系 P 系(SAMP)和正常衰老系 R 系(SAMR)。P 系小鼠的

衰老进程明显加快,可作为研究衰老相关机制实验的受试动物。R 系保留了动物的正常衰老特性,可作为 P 系实验动物的对照样本。SAMP 系小鼠可表现出 AD 特有的 A β 聚集、tau 蛋白异常过度磷酸化、神经元丢失等病理改变^[24]。SAMP 系当中的 SAMP8 小鼠由于老化迅速和 AD 病理特征性改变发生早的特点,受到很多研究者的青睐,是较为理想的动物模型。

2.2 人工干预模型

2.2.1 物理干预模型

以 AD 疾病发生病理假说为基础,采用各种物理干预手段对实验动物进行干预,来制备相应动物模型。具体建模方法见表 2。

(1)胆碱能损伤模型

胆碱能损伤假说认为,AD 痴呆的严重程度与胆碱能神经元丧失的程度呈正相关性^[25-26]。并且认知功能的正常与否依赖于足够的胆碱能神经传递^[27],乙酰胆碱作为重要的神经递质之一,其在脑内神经元含量的减少,会引起认知和记忆能力的下降。一方面,在 AD 患者大脑中存在着广泛的神经元和突触缺陷,其中基底前脑神经元的退化在很大程度上影响了神经递质传递的有效性,从而导致 AD 认知能力的下降^[28]。另一方面,乙酰胆碱脂酶活性增强,加速乙酰胆碱的分解,并且胆碱乙酰转移酶活性降低导致乙酰胆碱合成减少^[29],更加剧了乙酰胆碱的匮乏程度,导致神经元之间的传递障碍,最终发展为 AD^[30]。

本方法通过手术损伤海马伞的方法,造成动物胆碱能系统损坏、动物空间定向困难和记忆缺陷,进而制备胆碱能损伤模型^[31-32]。

(2)颈总动脉结扎模型

研究表明,老年人脑血流量减少、血流减慢,脑部神经元长期处于慢性缺血缺氧状态,随时间延长,出现认知记忆障碍等 AD 病理特征表现^[33]。

通过结扎受试动物颈总动脉来建立 AD 模型,包括单侧颈总动脉永久性结扎法^[34]、双侧颈总动脉永久性结扎法^[35-37],另有一侧颈总动脉闭塞一侧颈总动脉的狭窄法、双侧颈总动脉狭窄法、不对称双侧颈动脉狭窄法^[38]。此模型通过结扎颈总动脉使脑组织处于缺血状态,随后出现空间学习记忆障碍。

(3)化学干预模型

化学干预模型主要以 AD 疾病发生病理假说为理论基础,通过向动物脑部特定区域以及身体各部

表 2 人工干预 AD 动物模型分类表

Table 2 Classification table of artificial intervention AD animal models

模型 Models	动物 Animal	化学物质/ 物理方法 Chemical substances/ physical methods	操作方法 Method of operation	损伤部位 Injury site	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 References
胆碱能损伤模型 Cholinergic injury model	Wistar 大鼠/SD 大鼠 Wistar rat/SD rat	物理损伤 Physical damage	-	海马伞 Hippocampal fimbria	模拟胆碱系统损害,空间定向和记忆障碍 Simulate cholinergic system damage, spatial orientation and memory impairment	不出现 A β 和 tau 病理 No A β and tau pathology	[31-32]
颈总动脉结扎模型 Common carotid artery ligation model	SD 大鼠/Wistar 大鼠/C57BL/6J 小鼠 SD rat/Wistar rat/C57BL/6J mice	物理结扎 Physical ligation	-	颈动脉 Carotid artery	脑慢性缺血,认知障碍 Chronic cerebral ischemia, cognitive impairment	不出现 A β 和 tau 病理 No A β and tau pathology	[34-37]
	BALB/c 小鼠 BALB/c mice	A β ₁₋₄₂	410 pmol, 3 μ L, 脑定位注射,注射时长 1 min,留针 3 min 410 pmol, 3 μ L, brain localization injection, injection time 1 min, needle retention 3 min	侧脑室 (Bregma 点后 0.5 mm, 中线旁开 1.0 mm, 深度 2.5 mm) Lateral ventricle (0.5 mm behind Bregma point, 1.0 mm lateral to midline, 2.5 mm in depth)	-	-	[39]
A β 注射模型 A β infusion model	SD 大鼠 SD rats	A β ₁₋₄₀	1 g/L, 1 μ L, 脑定位注射,注射时长 5 min,留针 5 min 1 g/L, 1 μ L, brain localization injection, injection time 5 min, needle retention 5 min	海马齿状回背侧 (前囟后 3.3 mm, 右侧旁开 2.0 mm, 硬脑膜下 3.0 mm, 门齿钩平面低于耳间线平面 2.4 mm) The dorsal side of the hippocampal dentate gyrus (3.3 mm posterior to the bregma, 2.0 mm lateral to the right, 3.0 mm below the dura mater, and the incisor hook plane is 2.4 mm below the interaural line)	A β 沉积, 炎症反应, 学习记忆障碍 A β deposition, inflammation, learning and memory impairment	不符合 AD 渐进性发病的特点 A β 聚集在注射局部 Does not meet the characteristics of the progressive onset of AD, A β accumulates at the injection site	[40]
	SD 大鼠 SD rats	A β ₂₅₋₃₅	10 μ g/ μ L, 脑定位注射,左右各 1 μ L, 5 min 注射完,留针 5 min 10 μ g/ μ L, brain localization injection, 1 μ L each on the left and right, after 5 min injection, keep the needle for 5 min	双侧海马 CA1 区 (前囟为零点, 穿刺点位于前囟后 3.5 mm, 中线右侧旁开 2 mm, 以微量注射器自脑表面垂直进针 3 mm) CA1 area of the hippocampus on both sides (the bregma is the zero point, the puncture point is 3.5 mm behind the bregma, 2 mm on the right side of the midline, and the needle is vertically inserted 3 mm from the brain surface with a micro syringe)	-	-	[41]
鹅膏蕈氨酸注射模型 Ibotenic acid infusion model	SD 大鼠 SD rats	IBO	5 μ g/ μ L, 1 μ L	Meynert 基底核 (前囟后 1.0 mm, 中线旁开 3.0 mm, 深 7.3 mm) Meynert basal nucleus (1.0 mm behind bregma, 3.0 mm next to midline, 7.3 mm deep.)	A β 沉积和 tau 蛋白增加, 以及记忆障碍 A β deposition and tau protein increase, and memory impairment	不出现神经纤维缠结 No neurofibrillary tangles	[44]
链脲菌素注射模型 Streptozotocin infusion model	大鼠 Long Evans rats	STZ	40 mg/kg, 注射时长 3 min 40 mg/kg, injection time 3 min	双侧脑内 (前囟后 1.0 mm, 中线右侧旁开 1.0 mm, 颅骨下 2.5 mm) In both sides of the brain (1.0 mm behind the bregma, 1.0 mm lateral to the right side of the midline, 2.5 mm below the skull)	A β 沉积, tau 蛋白过度磷酸化, 胆碱能缺失, 氧化应激 A β deposition, tau protein hyperphosphorylation, cholinergic loss, oxidative stress	不出现神经纤维缠结和老年斑 No neurofibrillary tangles and age spots	[48]
D-半乳糖注射模型 D-galactose infusion model	小鼠 Swiss albino mice	D-gal	150 mg/kg, 每天 1 次, 连续注射 42 d 150 mg/kg, once a day, continuous injection for 42 d	皮下注射/腹腔注射 Subcutaneous injection/ Intraperitoneal injection	组织的氧化应激和炎症, 认知和胆碱系统障碍, tau 蛋白过度磷酸化 Tissue oxidative stress and inflammation, cognitive and cholinergic system disorders, tau protein hyperphosphorylation	不出现 A β 和神经纤维缠结以及老年斑 No A β , neurofibrillary tangles and age spots	[49-50]

续表 2

模型 Models	动物 Animal	化学物质/ 物理方法 Chemical substances/ physical methods	操作方法 Method of operation	损伤部位 Injury site	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 References
三氯化铝注射模型 Aluminum trichloride infusion model	Wistar 大鼠 Wistar rats	三氯化铝 Aluminum trichloride	100 mg/kg, 连续注射 60 d 100 mg/kg, continuous injection for 60 d	腹腔注射 Intraperitoneal injection	A β 聚集, 神经元变性, 学习和记忆障碍 A β aggregation, neuronal degeneration, learning and memory impairment	造模时间长, 中枢胆碱能未降低, NFTs 不同于 AD 患者 Modeling time is long, central cholinergic is not reduced, NFTs are different from AD patients	[54]
冈田酸注射模型 Okadaic acid infusion model	SD 大鼠 SD rats	OKA	40 ng/ μ L, 5 μ L, 注射时长 5 min, 留针 5 min 40 ng/ μ L, 5 μ L, injection time 5 min, needle retention 5 min	侧脑室(前囟后 0.8 mm, 中线旁开 1.5 mm, 垂直进针 3.6 mm) Lateral ventricle (0.8 mm posterior to the bregma, 1.5 mm lateral to the midline, 3.6 mm vertical needle insertion)	表现出 Tau 蛋白过度磷酸化和 A β 病理表现 Shows Tau protein hyperphosphorylation and A β pathological manifestations	不出现神经纤维缠结 No neurofibrillary tangles	[57]
东莨菪碱注射模型 Scopolamine infusion model	Wistar 大鼠 Wistar rats	SCOP	0.2 mL/150 g, 连续注射 14 d 0.2 mL/150 g, continuous injection for 14 d	腹腔 Abdominal cavity	出现空间和记忆障碍 Space and memory impairment	不出现 A β 典型的病理特征, 神经纤维缠结 No typical pathological features of A β , neurofibrillary tangles	[58]

位(皮下、腹腔等)注射不同化学物质来模拟构建 AD 疾病模型。具体建模方法见表 2。

2.2.2 A β 注射模型

β -淀粉样蛋白沉积所形成的老年斑 (senile plaques, SP) 是 AD 病理特征主要表现之一。A β 注射模型通过向脑内各区域注射不同长度 A β 多肽片段 (A β ₁₋₄₂^[39]、A β ₁₋₄₀^[40]、A β ₂₅₋₃₅^[41]) 来达到急性损伤,进而模拟构建 AD 模型^[42-43]。

此模型需要 35 ~ 42 d 的时间,影响因素单一,且属于急性损伤,与 AD 慢性起病的特点不符。此外,A β 容易停留聚集在注射部位,而不是像 AD 患者脑内的弥散状态。

2.2.3 鹅膏蕈氨酸注射模型

AD 病理特征之一表现为明显的神经元缺失,引发认知和记忆的严重障碍。将鹅膏蕈氨酸 (Ibotenic acid, IBO) 注入与学习记忆强相关的 Meynert 基底核,模型动物表现为大脑内神经元缺失、A β 蛋白沉积和 Tau 蛋白水平增加以及胆碱能系统损坏^[44]。另有 A β 结合 IBO 共同使用来模拟 AD 模型^[45]。

2.2.4 链脲菌素注射模型

向动物侧脑室注射链脲菌素 (streptozotocin,

STZ) 来破坏脑部能量代谢,使动物出现相应的 A β 沉积、tau 蛋白高度磷酸化、胆碱能功能异常、氧化应激等^[46]。

STZ 模型与 AD 许多病理特点相符,但此模型在注射 STZ 后要等待 3 个月后来观察 AD 病理特征^[47],且动物死亡率较高^[48]。

2.2.5 D-半乳糖注射模型

D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 具有还原性,会引发动物组织的氧化应激和炎症,进而导致神经元的衰老。

通过皮下注射 D-gal 来建立亚急性衰老模型,导致认知和胆碱能功能异常^[49-50]。此模型造模相对简便,但大脑内不出现 A β 沉积等病理表现。

2.2.6 三氯化铝注射模型

金属元素在 AD 的发病中占有重要的作用^[51]。此模型通过向小鼠腹腔注射三氯化铝来建立空间学习记忆损伤模型^[52]。脑组织中高浓度的铝使 A β 聚集加快,神经元变性坏死,空间学习和记忆能力遭到损害^[53]。此模型通过腹腔注射三氯化铝造成动物脑组织中 A β 增多以及神经元的变性,进而模拟 AD 病理特征^[54]。

另有口服三氯化铝来构建 AD 疾病模型^[55]。

2.2.7 冈田酸注射模型

冈田酸(okadaic acid, OKA)是蛋白磷酸酶选择抑制剂,在向受试动物脑内不同位置注射后会诱导 Tau 蛋白过度磷酸化^[56]。

模型动物在 OKA 注射后可以诱导产生记忆损伤,tau 磷酸化的增加以及特殊脑区中的 β -淀粉样蛋白的形成^[57]。

2.2.8 东莨菪碱注射模型

东莨菪碱(scopolamine, SCOP)为胆碱能拮抗剂,腹腔注射后可出现胆碱功能障碍和氧化应激^[58]。此模型可以造成动物学习记忆障碍,但缺乏 tau 蛋白过度磷酸化和 A β 沉积等 AD 典型的病理改变。

3 转基因动物模型

转基因动物模型以遗传学说为其基础,将人或动物的疾病相关基因作为目的基因进行修饰,再拼接一个特定的启动子后植入动物(最常用为小鼠,少数为大鼠、果蝇、斑马鱼)受精卵内。再将受精卵导入假孕动物体内使其稳定遗传以复制 AD 特定病理特征。

研究表明,多个基因都与 AD 的发生有着密切的关系,主要有淀粉样前体蛋白 APP、微管相关蛋白 MAPT、早老素 PSEN1、载脂蛋白 APOE 和髓系细胞-2 上表达的触发受体 TREM2,以及淀粉样蛋白原的剪切酶 BACE1(β -分泌酶 1)^[59-61]。由于 AD 两个确定的病理标志是 A β 和 tau,这些模型多专注于淀粉样蛋白,仅有少部分关注于 tau。其中 APP 和 PSEN1 基因与 A β 的生成有关,APOE 基因参与 A β 沉积形成过程。Tau 基因突变可引发 tau 蛋白表达异常,进而出现 tau 蛋白异常磷酸化及神经缠结等 AD 病理特征。AD 转基因模型主要包括 APP 转基因模型、Tau 蛋白转基因模型、PSEN1 转基因模型、APOE 转基因模型、双转基因模型以及多转基因模型等^[62]。具体建模方法见表 3。

尽管许多转基因模型在评估新型疗法潜力方面的实用性上仍存在较大争议,但了解可用的不同模型并对其功能进行详细了解,可以帮助研究者选择最佳模型,以探索疾病机制或评估候选药物。转基因动物模型依然是目前 AD 模型中的主要模型,已为人类了解疾病的部分机制做出了巨大贡献,并且在以后的其他实验中可能会开创出疾病新的治疗方法。

3.1 APP 转基因模型

A β 沉积是 AD 病理改变的重要特征之一,APP 作为 A β 的上游前体蛋白,影响着 A β 的产生。过量表达 A β 蛋白可以形成 SP,影响着 AD 病理过程的发展。

此模型通过转染或敲除 APP 基因,促进动物脑内 A β 产生,进而表现出 A β 沉积的病理特征。但模型动物大脑区域中不会出现神经纤维缠结和明显的神经元丢失。

3.2 Tau 蛋白转基因模型

Tau 蛋白是一种细胞内被用作支架的微管相关蛋白,可以促进微管的聚集。其主要存在于轴突中,但体细胞和树突中也存在 Tau 蛋白。在病理条件下,Tau 过度翻译表达以及异常修饰,尤其是过度磷酸化修饰,会影响其与微管结合的亲和力,进而导致 Tau 聚集性增强和清除率下降。

此类模型仿效了 AD 患者 Tau 蛋白异常修饰而被广泛应用,但不能用于模拟 AD 其他病理过程。

3.3 PS 转基因模型

位于 14 号染色体上的 PS-1 基因和位于 1 号染色体上 PS-2 基因共同控制着 APP 剪切酶之一的 γ -分泌酶复合物的形成。PS 基因突变时会影响到 γ -分泌酶复合物结构的稳定性,进而影响到下游 APP 的剪切过程。

PS1 中的突变是家族性 AD 的最常见原因,但它们不会在转基因小鼠模型中形成淀粉样蛋白斑块。因此,PS 突变常与 APP 或其他突变结合使用,来加强转基因后的协同效应。

3.4 双转基因模型

双转基因模型是在单转基因模型的基础上结合另外一种单转基因模型构建而成的。APP 小鼠大脑皮层可形成老年斑,但几乎观察不到神经纤维缠结,为解决问题,人类的 Tau 和 PS 基因被引入到 APP 小鼠当中,建立出 APP/Tau 双转基因小鼠。

APP/PS 双转基因小鼠通过加速表达 A β ,实现更快速且稳定地形成 A β 增多、聚集的病理特征表现。但这类模型与 APP 模型一样,无法形成 Tau 病理。而 APP/Tau 双转基因小鼠可同时出现 A β 斑块沉积和神经纤维缠结。

3.5 多转基因模型

AD 病理存在多种基因缺陷,单转基因模型或双转基因模型难以完全契合 AD 的全部病理特征。因此,研究者创建了多转基因模型来全面模拟 AD 的病理特征。

表 3 常用 AD 转基因动物模型分类表

Table 3 Classification of commonly used AD transgenic animal models

模型 Models	基因 Gene	名称 Name	突变/启动子 Mutation/promoter	动物品系 Animal strains	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 References
APP 转 基因模型 APP transgenic model	APP	PDAPP	hAPP (Ind), human PDGF- β promoter	C57BL/66 × DBA2	6 ~ 8 月龄时形成 Aβ 斑块, 胶质增生, 脑血管淀粉样变性, 3 个月时出现空间 记忆障碍 Formation of Aβ plaques at 6 ~ 8 months of age, gliosis, cerebrovascular amyloidosis, and spatial memory impairment at 3 months	无典型 tau 病理 改变 No typical tau pathological changes	[63-64]
		Tg2576	hAPP (Swe), isoform 695, hamster PrP promoter	C57BL/6	9 ~ 11 月龄时出现 Aβ 斑块, 胶质增 生, 突触丢失, 脑血管淀粉样变性, 6 月 龄时出现空间和学习记忆障碍 Aβ plaques, glial hyperplasia, loss of synapses, and cerebrovascular amyloidosis appear at 9 ~ 11 months of age, and space, learning and memory disorders appear at 6 months of age	无典型 tau 病理 改变 No typical tau pathological changes	[65-66]
		APP23	hAPP (Swe), isoform 751, mouse Thy1 promoter	C57BL/6	6 ~ 8 月龄时形成 Aβ 斑块, 过度磷酸 化的 tau 蛋白, 胶质增生, 神经元丢失, 脑血管淀粉样变性, 3 月龄时出现认知 和空间记忆障碍 Formation of Aβ plaques at 6 ~ 8 months of age, hyperphosphorylated tau protein, glial hyperplasia, neuronal loss, cerebrovascular amyloidosis, cognitive and spatial memory impairment at 3 months of age	不出现神经纤维 缠结 No neurofibrillary tangles	[67]
		J20	hAPP (Swe, Ind), human PDGF- β promoter	C57BL/6	6 ~ 8 月龄时形成 Aβ 斑块, 胶质增生, 突触和神经元丢失, 脑血管淀粉样变 性, 2 月龄时出现识别记忆障碍和 3 个 月时出现空间记忆障碍 Formation of Aβ plaques at 6 ~ 8 months of age, glial hyperplasia, loss of synapses and neurons, cerebrovascular amyloidosis, recognition and memory impairment at 2 months of age and spatial memory impairment at 3 months	无典型 tau 病理 改变 No typical tau pathological changes	[68]
		TgCRND8	hAPP (Swe, Ind), hamster PrP promoter	C3H/He- C57BL/6	3 ~ 5 月龄时形成 Aβ 斑块, 胶质增生, 突触和神经元丢失, 脑血管淀粉样变 性, 6 月龄时出现进行性工作和空间记 忆障碍 Formation of Aβ plaques at 3 ~ 5 months of age, glial hyperplasia, loss of synapses and neurons, cerebrovascular amyloidosis, and progressive work and spatial memory impairment at 6 months of age	无典型 tau 病理 改变 No typical tau pathological changes	[69]
		APPNL-G-F knock-in	hAPP (Swe, Ibe, Arc), endogenous APP promoter	C57BL/6	2 月时形成 Aβ 斑块, 胶质增生, 突触丢 失, 6 月龄时出现空间记忆障碍 Formation of Aβ plaques at 2 months, glial hyperplasia, loss of synapses, and spatial memory impairment at 6 months of age	无典型 tau 病理 改变 No typical tau pathological changes	[70]
		TgSweDI	hAPP (Swe, Dutch, Iowa), mouse Thy1 promoter	C57BL/6	3 月龄时形成 Aβ 斑块, 胶质增生, 脑血 管淀粉样变性, 6 月时出现学习记忆 障碍 Formation of Aβ plaques at 3 months of age, gliosis, cerebrovascular amyloidosis, and learning and memory impairment at 6 months	无典型 tau 病理 改变 No typical tau pathological changes	[71]
		APP693Δ	hAPP (Osaka), mouse PrP promoter	B6C3F1, back- crossed to C57BL/6	8 月龄时形成 Aβ 斑块, tau 蛋白过度磷 酸化, 胶质增生, 神经元丢失, 8 月时出 现空间记忆障碍 Formation of Aβ plaques at 8 months of age, hyperphosphorylation of tau protein, glial hyperplasia, neuron loss, and spatial memory impairment at 8 months	不出现老年斑和神 经纤维缠结 No senile plaques and neurofibrillary tangles	[72]

续表 3

模型 Models	基因 Gene	名称 Name	突变/启动子 Mutation/promoter	动物品系 Animal strains	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 References
Tau 转基因模型 Tau transgenic model	Tau	APP21	hAPP (Swe, Ind), the ubiquitin-C promoter	SD rat	9 月龄时出现弥漫性斑块和血管周围淀粉样蛋白沉积。脑淀粉样血管病, 19 月龄时出现长时程增强效应缺陷和学习障碍 Diffuse plaques and perivascular amyloid deposits appeared at 9 months of age. Cerebral amyloid angiopathy, with defects in long-term potentiation and learning disabilities at 19 months of age	无典型 tau 病理改变 No typical tau pathological changes	[73]
		McGill-R-Thy1-APP	hAPP (Swe, Ind), mouse Thy1. 2 promoter	Wistar rat	1 周时海马和皮层中的神经元出现 A β 。6 月龄时出现细胞外 A β 斑块和小胶质细胞密度增加, 18 月龄时出现神经元丢失, 20 月龄时胆碱能神经支配减少, 3 月龄时出现恐惧反应缺陷, 4 ~ 6 月龄时出现空间和工作记忆缺陷以及视觉辨别能力严重缺陷 A β appeared in neurons in the hippocampus and cortex at 1 week. The density of extracellular A β plaques and microglia increased at 6 months of age, neuron loss at 18 months of age, cholinergic innervation decreased at 20 months of age, fear response defects appeared at March, 4 ~ 6 months Spatial and working memory deficits and severe deficits in visual discrimination at age	无典型 tau 病理改变 No typical tau pathological changes	[74-77]
		hTau	hMAPT (all 6 isoforms, non-mutant), human tau promoter	C57BL/6	9 月龄时出现 tau 病理, 神经元丢失, 12 月龄时出现认知和空间记忆障碍 Tau pathology and neuron loss at 9 months of age, cognitive and spatial memory impairment at 12 months of age	不出现 A β 斑块 No A β plaques	[78]
	Tau	rTg4510	hMAPT (h0N4R P301 L), human CaMKII α promoter	mixed: 129S6 (activator) $\times$ FVB (responder)	8 月龄时出现神经纤维缠结, 突触和神经元丢失, 3~5 月龄出现空间记忆障碍 Neurofibrillary tangles appear at 8 months of age, synapses and neurons are lost, and spatial memory disorders appear at 3 ~ 5 months of age	不出现 A β 斑块 No A β plaques	[79-80]
		TauP301S Line19 or PS19	hMAPT (h1N4R P301S), mouse PrP promoter,	(C57BL/6 $\times$ C3H) F1	8 月龄时出现神经纤维缠结, 胶质增生, 7 月龄时出现空间和学习记忆障碍 Neurofibrillary tangles and glial hyperplasia appear at 8 months of age, and space, learning and memory disorders appear at 7 months of age	不出现 A β 斑块 No A β plaques	[81]
		PS1M146VKI	PS1M146VK	129/C57BL/6	神经元丢失 Neuron loss	不出现 A β 沉积和 A β 斑块, 也不会出现神经纤维缠结 No A β deposits, A β plaques, and no neurofibrillary tangles	[82]
PS 转基因模型 PS transgenic model	PS	PS1P117 L	P117 L	B6D2	可以形成 A β 斑块 Can form A β plaques	不出现 tau 病理表现 No pathological manifestations of tau	[83]
		PS1 ν 97 L-Tg	V97 L	C57BL/6	表现出神经纤维缠结和神经元丢失 Exhibits neurofibrillary tangles and neuron loss	不出现 A β 沉积和 A β 斑块 No A β deposits and A β plaques	[84]
APOE 转基因模型 APOE transgenic model	APOE	APOE2 Knock-in	APOE2 inserted with expression regulated by endogenous regulatory elements and the mouse APOE gene inactivated	C57BL/6	A β 增多 Increased A β	无典型 tau 病理改变 No typical tau pathological changes	[85]

续表 3

模型 Models	基因 Gene	名称 Name	突变/启动子 Mutation/promoter	动物品系 Animal strains	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 References	
双转基因 模型 Double transgenic model	APP+PS	APP ^{swe} / PSEN1 ^{ΔE9} APP/PS1	or	m/hAPP (Swe), hPSEN1 (m/hAPP (Swe), hPSEN1 (ΔE9), mouse PrP promoters	(C57BL/6 × C3H)F2	6 ~ 9 月龄时形成 Aβ 斑块,胶质增生,突触和神经元丢失,脑血管淀粉样变性,6 月龄时出现空间和记忆障碍 Formation of Aβ plaques at 6 ~ 9 months of age, glial hyperplasia, loss of synapses and neurons, cerebrovascular amyloidosis, and space and memory impairment at 6 months of age	无典型 tau 病理改变 No typical tau pathological changes	[86]
		APPPS1-21 or APPPS1	or	hAPP (Swe), hPSEN1 (L166P), mouse Thy1 promoter	C57BL/6J	6 ~ 8 月龄形成斑块,胶质增生,突触和神经元丢失,脑血管淀粉样变性,7 月龄时出现空间和学习记忆障碍 Plaque formation at 6 ~ 8 months of age, glial hyperplasia, loss of synapses and neurons, cerebrovascular amyloidosis, and space and learning and memory impairment at 7 months of age	无典型 tau 病理改变 No typical tau pathological changes	[87]
		5×FAD		hAPP (Swe, Fl, Lon), hPSEN1 (M146 L, L286 V), mouse Thy1 promoter	C57BL/6×SJL	2 月龄时形成 Aβ 斑块,胶质增生,突触和神经元丢失,脑血管淀粉样变性,3 月龄时出现进行性空间记忆障碍,6 月龄出现学习记忆障碍 Formation of Aβ plaques at 2 months of age, glial hyperplasia, loss of synapses and neurons, cerebrovascular amyloidosis, progressive spatial memory impairment at 3 months, learning and memory impairment at 6 months of age	无典型 tau 病理改变 No typical tau pathological changes	[88]
		PSAPP		APPK670 N/M671 L PS1M146 L, PrP promoters	Tg2576	Aβ 沉积和斑块 Aβ deposits and plaques	无典型 tau 病理改变 No typical tau pathological changes	[89]
		APP+PS1		hAPP (Swe Ind), PSEN1 L166P, mouse PrP promoters	Inbred 344 rats Fischer	Aβ 斑块,脑血管淀粉样变性,12 ~ 14 月龄时出现记忆损伤 Aβ plaques, cerebrovascular amyloidosis, memory impairment at 12 ~ 14 months of age	无典型 tau 病理改变 No typical tau pathological changes	[90]
		TgF344-AD		hAPP (Swe), PSEN1: deltaE9, mouse PrP promoters	Fischer 344 rats	6 ~ 26 月龄海马和皮质中出现 Aβ 斑块,6 月龄时蓝斑处出现 tau 过度磷酸化,6 ~ 24 月龄出现空间和记忆缺陷 Aβ plaques appear in the hippocampus and cortex at 6 ~ 26 months old, tau hyperphosphorylation appears at the locus coeruleus at 6 months old, and space and memory deficits appear at 6 ~ 24 months old	—	[91]
		APP+tau TAPP		tauP301 L/APP ^{sw} , mouse PrP promoters	Tg2576×JNPL3	3 月龄时出现 tau 病理特征,6 月龄时表现出 Aβ 形成的斑块 Tau pathological features appear at the age of 3 months, and plaques formed by Aβ appear at the age of 6 months	—	[92]
		多基因转 基因模型 Multigene transgenic model	APP+PS +tau	3×Tg	hAPP (Swe), hPSEN1 (M146 V), hMAPT (h0N4RP301 L), mouse Thy1.2 promoter (APP, MAPT), endogenous PSEN1 promoter	C7BL/6, 129X1/SvJ, 129S1/Sv	6 月龄时形成 Aβ 斑块,12 月龄时出现 tau 病理表现,胶质增生,4 月龄时出现进行性学习记忆障碍,6 月龄出现空间记忆障碍 Formation of Aβ plaques at 6 months of age, tau pathological manifestations and glial hyperplasia at 12 months of age, progressive learning and memory impairment at 4 months of age, and spatial memory impairment at 6 months of age	—

多转基因模型是根据需要将三个或三个以上易感基因结合在一起来建立基因模型。此类模型可以用于测试 AD 特定的病理分子机制或研究候选

药物对特定病理的作用和疗效,也可用于比较两类转基因模型之间的差异。3xTg 模型是典型的多转基因模型,同时具有 APP、PS1、Tau 三个基因突变。

该模型可表现出 A β 沉积形成的斑块和 tau 病理改变,以及神经纤维缠结。

4 其他动物模型

除了自然动物模型、人工干预动物模型、遗传动物模型以外,研究者还基于近年出现的新的发病假说创建了相关动物模型。主要有自身免疫模型、人源肠道菌群动物模型。

4.1 自身免疫模型

AD 的一个重要病理特征为 A β 蛋白在大脑和脑血管系统的沉积^[94],AD 神经变性严重程度与脑内 A β 抗体的水平密切相关^[95]。动物实验证明主被动免疫疗法均能减少转基因小鼠的体内的 A β 含量并可挽救记忆缺陷^[96]。于是研究者不再局限于研究淀粉样斑块沉积,而将研究视角聚焦于自身免疫层面。虽然免疫疗法也像动物实验一样可以降低患者体内的 A β 含量,但免疫疗法临床试验均未能改善患者的记忆力。

4.2 人源肠道菌群动物模型

随着这几年对肠道菌群的研究加深,越来越多的研究表明肠道菌群与 AD 的发生发展有着密不可分的联系^[97]。因此,有研究人员将 AD 患者粪便的菌群提取液经口灌胃小鼠来制备人源肠道菌群动物模型^[98]。该模型可以探索肠道微生物群对 AD 发病机制的远程贡献背后的特定信号介质或机制。

5 问题与展望

阿尔茨海默病已成为危害老年人的全球性疾病,受到了世界认知科学、神经科学、心理学等领域学者的广泛关注。目前常用的 AD 实验动物模型众多,表现出的疾病症状及病理改变各不相同,各种动物模型都有各自的长处与不足,因此需要根据疾病发生原理和实验目的不同选择相应的模型。

但是,即便 AD 的相关研究成果层出不穷,为何至今仍然鲜有有效的治疗方法和手段问世。笔者认为,AD 有效治疗方法开发的主要障碍是缺乏适当的模型,而构建恰当的疾病模型需要明确疾病发生的机制。AD 发病机制尚不明确,未能形成定论或达成统一认识,模拟构建出完全符合疾病发病机制特点的模型似乎是遥不可及的。此外,AD 是一种复杂的慢性神经退行性疾病,并且可能是人类所特有的,当前单一病因途径或单一致病因素的观点

限制了 AD 在动物身上的模拟,以及动物模型的发展。就此,我们一方面需要在 3R 原则的指导下尝试开发新的实验动物种类;另一方面则可以从整合医学理念出发,从整体和宏观角度综合判别疾病发生机制和多靶点治疗途径,以拟定更加完善且符合疾病本质的研究方案和治疗手段。

参 考 文 献(References)

- [1] Alzheimer's Disease International, Patterson C. World Alzheimer Report 2018[R/OL]. [2018-09-21]. <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2018/#:~:text=The%20World%20Alzheimer%20Report%202018%20highlights%20an%20urgent,some%20of%20the%20complex%20questions%20surrounding%20dementia%20research.>
- [2] Jia L, Quan M, Fu Y, et al. Dementia in China: epidemiology, clinical management, and research advances [J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(1): 81-92.
- [3] Xu J, Wang J, Wimo A, et al. The economic burden of dementia in China, 1990-2030: implications for health policy [J]. *Bull World Health Organ*, 2017, 95(1): 18-26.
- [4] Tarawneh R, Holtzman DM. The clinical problem of symptomatic alzheimer disease and mild cognitive impairment [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(5): a006148.
- [5] Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Neurofibrillary pathology leads to synaptic loss and not the other way around in Alzheimer disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2002, 4(3): 235-238.
- [6] Katsumoto A, Takeuchi H, Takahashi K, et al. Microglia in Alzheimer's disease: risk factors and inflammation [J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 978.
- [7] Dansokho C, Heneka MT. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease [J]. *J Neural Transm*, 2018, 125(5): 771-779.
- [8] Tönnies E, Trushina E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(4): 1105-1121.
- [9] Denes AS, Jékely G, Steinmetz PR, et al. Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria [J]. *Cell*, 2007, 129(2): 277-288.
- [10] Sivanantharajah L, Mudher A, Shepherd D. An evaluation of *Drosophila* as a model system for studying tauopathies such as Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci Methods*, 2019, 319: 77-88.
- [11] Luo Y. Alzheimer's disease, the nematode *Caenorhabditis elegans*, and ginkgo biloba leaf extract [J]. *Life Sci*, 2006, 78(18): 2066-2072.
- [12] Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research [J]. *Front Genet*, 2014, 5: 189.
- [13] Sarasa M, Pesini P. Natural non-transgenic animal models for research in Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2009, 6(2): 171-178.

- [14] Toledano A, Álvarez MI, López-Rodríguez AB, et al. ¿Existe la enfermedad de Alzheimer en todos los primates? Patología Alzheimer en primates no humanos y sus implicaciones fisiopatológicas (II) [J]. *Neurologia*, 2014, 29(1): 42–55.
- [15] Heuer E, Rosen RF, Cintron A, et al. Nonhuman primate models of Alzheimer-like cerebral proteopathy [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(8): 1159–1169.
- [16] Edler MK, Munger EL, Meindl RS, et al. Neuron loss associated with age but not Alzheimer's disease pathology in the chimpanzee brain [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2020, 375(1811): 20190619.
- [17] Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, et al. National institute on aging-Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2012, 8(1): 1–13.
- [18] Liberman MC. Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies [J]. *F1000Res*, 2017, 6: 927.
- [19] Van Dam D, De Deyn PP. Drug discovery in dementia: the role of rodent models [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(11): 956–970.
- [20] Van Dam D, De Deyn PP. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164(4): 1285–1300.
- [21] 王喆, 李瑞生. 衰老动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(3): 67–70.
Wang J, Li RS. Research progress of aging animal model [J]. *Chin J Comp Med*, 2013, 23(3): 67–70.
- [22] 向婷婷, 张长城, 刘朝奇, 等. 竹节参总皂苷干预自然衰老大鼠肝脏炎症的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(6): 848–853.
Xiang TT, Zhang CC, Liu CQ, et al. Effects of total saponins of *Panax japonicus* on liver inflammation natural aging rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2017, 33(6): 848–853.
- [23] Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, et al. A new murine model of accelerated senescence [J]. *Mech Ageing Dev*, 1981, 17(2): 183–194.
- [24] Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(4): 639–659.
- [25] Francis PT, Palmer AM, Sims NR, et al. Neurochemical studies of early-onset Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 1985, 313(1): 7–11.
- [26] Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, et al. Neuropathological and biochemical observations on the noradrenergic system in Alzheimer's disease [J]. *J Neurol Sci*, 1981, 51(2): 279–287.
- [27] Gerretsen P, Pollock BG. Drugs with anticholinergic properties: a current perspective on use and safety [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2011, 10(5): 751–765.
- [28] Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction [J]. *Science*, 1982, 217(4558): 408–414.
- [29] 董云芳, 冯慧利, 陈芳, 等. 金思维对东莨菪碱致记忆障碍小鼠胆碱能系统的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(1): 107–113.
Dong YF, Feng HL, Chen F, et al. Effect of herbal formula GAPT on cholinergic system in mice with scopolamine-induced memory impairment [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(1): 107–113.
- [30] Lombardo S, Maskos U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment [J]. *Neuropharmacology*, 2015, 96: 255–262.
- [31] Hefti F, Dravid A, Hartikka J. Chronic intraventricular injections of nerve growth factor elevate hippocampal choline acetyltransferase activity in adult rats with partial septo-hippocampal lesions [J]. *Brain Res*, 1984, 293(2): 305–311.
- [32] 龙大宏, 姚志彬, 何蕴韶, 等. 神经生长因子对老年鼠穹窿海马伞损伤后齿状回胆碱能突触重构的作用 [J]. *神经解剖学杂志*, 1997, 13(1): 51–54.
Long DH, Yao ZB, He YS, et al. Effect of nerve growth factor on cholinergic synapse remodeling in dentate gyrus after fimbria fornix injury in aged rats [J]. *Chin J Neuroanat*, 1997, 13(1): 51–54.
- [33] 高凤超, 陈翔, 田新英. 血管性痴呆危险因素及发病机制的研究进展 [J]. *医学综述*, 2014, 20(6): 1068–1071.
Gao FC, Chen X, Tian XY, et al. Study progress of the risk factors and pathogenesis of Vascular Dementia [J]. *Med Recapitulate*, 2014, 20(6): 1068–1071.
- [34] 张振强, 贾亚泉, 王自闯, 等. 化痰通络汤预先灌胃的合并高脂血症脑缺血大鼠神经系统功能、脑组织病理变化观察 [J]. *山东医药*, 2018, 58(43): 47–50.
Zhang ZQ, Jia YQ, Wang ZC, et al. Observation of nervous system function and pathological changes of brain tissues in rats with hyperlipidemia and cerebral ischemia after pretreatment of Huatan Tongluo decoction [J]. *Shandong Med J*, 2018, 58(43): 47–50.
- [35] 胡久略, 商健, 侯紫君, 等. 温肾醒脑方对血管性痴呆大鼠认知功能的影响及机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(10): 2450–2455.
Hu JL, Shang J, Hou ZJ, et al. Effect of Wenshen Xingnao decoction on cognitive function in Vascular Dementia rats and its mechanism [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2019, 37(10): 2450–2455.
- [36] 孙成成, 刘剑刚, 刘美霞, 等. 双侧颈总动脉结扎致大鼠脑血流低灌注不同时程的神经功能障碍和病理学变化 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(6): 470–476.
Sun CC, Liu JG, Liu MX, et al. Neural dysfunction and pathological changes in different time courses of cerebral blood flow hypoperfusion induced by bilateral common carotid artery ligation in rats [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2020, 40(6): 470–476.
- [37] Washida K, Hattori Y, Ihara M. Animal models of chronic cerebral hypoperfusion: from mouse to primate [J]. *Int J Mol*

- Sci, 2019, 20(24): 6176.
- [38] 侯外方, 张茂森, 张琳, 等. 血管性认知障碍动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(4): 542-552.
- Hou WF, Zhang MS, Zhang L, et al. Research progress using animal models of vascular cognitive impairment [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(4): 542-552.
- [39] 刘鑫, 余盈, 何蔚. 欧前胡素对 $A\beta_{1-42}$ 致阿尔茨海默病模型小鼠的神经保护作用 [J]. 赣南医学院学报, 2020, 40(5): 451-455.
- Liu X, Yu Y, He W. Neuroprotective effects of imperatorin in a mouse model of Alzheimer's disease induced by $A\beta_{1-42}$ [J]. J Gannan Med Univ, 2020, 40(5): 451-455.
- [40] 易健, 刘柏炎, 蔡光先. 超微六味地黄汤对老年痴呆大鼠认知功能和脑组织碱性成纤维生长因子表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 139-142.
- Yi J, Liu BY, Cai GX. Study on effect of Ultra-powder Liuwei Dihuang decoction on recognize and bFGF in Alzheimer's disease rats bFGF [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2011, 17(21): 139-142.
- [41] 赵娣, 李爽, 徐婧. 蒲公英总黄酮改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导的阿尔茨海默病大鼠记忆功能障碍的观察 [J]. 中国药物评价, 2019, 36(1): 41-45.
- Zhao D, Li S, Xu J. The protection effects of total flavonoids from dandelion on memorizing ability in AD rats induced by $A\beta_{25-35}$ [J]. Chin J Drug Eval, 2019, 36(1): 41-45.
- [42] Facchinetti R, Bronzuoli MR, Scuderi C. An animal model of Alzheimer disease based on the intrahippocampal injection of amyloid β -peptide (1-42) [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1727: 343-352.
- [43] 杨晶莹, 肖移生, 姜劼琳, 等. 黄精丸对阿尔茨海默病大鼠大脑的抗氧化作用及 $A\beta_{1-42}$, APP 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 32-38.
- Yang JY, Xiao YS, Jiang JL, et al. Effect of Huangjingwan on antioxidant functions and $A\beta_{1-42}$ and APP protein expressions in brain of Alzheimer's disease rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(6): 32-38.
- [44] 陈惠芳, 莫友胜, 杨从, 等. 槲皮素对鹅膏蕈氨酸致痴呆大鼠模型海马神经元的保护作用及机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(5): 552-556.
- Chen HF, Mo YS, Yang C, et al. Protective effect and mechanism of quercetin on hippocampal neurons in IBO-injured rats [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2018, 29(5): 552-556.
- [45] Shabani S, Sarkaki A, Ali Mard S, et al. Central and peripheral administrations of levothyroxine improved memory performance and amplified brain electrical activity in the rat model of Alzheimer's disease [J]. Neuropeptides, 2016, 59: 111-116.
- [46] Zhou M, Chen S, Peng P, et al. Dulaglutide ameliorates STZ induced AD-like impairment of learning and memory ability by modulating hyperphosphorylation of tau and NFs through GSK3 β [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 511(1): 154-160.
- [47] Melita SP, Jelena OB, Martina KB, et al. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study [J]. J Neural Transm (Vienna), 2011, 118(5): 765-772.
- [48] Nataniel LC, Enrique JR, Stephanie JS, et al. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: Relevance to sporadic Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2006, 9(1): 13-33.
- [49] Wang C, Cai Z, Wang W, et al. Piperine regulates glycogen synthase kinase-3 β -related signaling and attenuates cognitive decline in D-galactose-induced aging mouse model [J]. J Nutr Biochem, 2020, 75: 108261.
- [50] 孙荣花, 李爽, 邵莹, 等. D-半乳糖致小鼠亚急性衰老模型方法优化 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 293-297.
- Sun RH, Li S, Shao Y, et al. Method optimization of D-galactose induced mice subacute aging model [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2015, 31(4): 293-297.
- [51] 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.
- [52] 李莉, 李晓秀, 郭鹏骥, 等. 衰老模型大鼠空间记忆的改变及抑郁样行为的研究 [J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(9): 816-820.
- Li L, Li XX, Guo PJ, et al. Changes in spatial memory and depressive-like behavior in an aging rat model [J]. J Chin Med Univ, 2017, 46(9): 816-820.
- [53] 张志慧, 贾振华, 康健生, 等. $A\beta$ 损伤人脑微血管内皮细胞培养液对正常神经元凋亡的影响及通心络胶囊的干预作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 166-171.
- Zhang ZH, Jia ZH, Kang JS, et al. Effect of $A\beta$ injury-based human brain microvascular endothelial cell culture solution on apoptosis of normal neurons and intervention effect of Tongxinluo capsule [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2017, 23(17): 166-171.
- [54] Mustafa HN. Neuro-amelioration of cinnamaldehyde in aluminum-induced Alzheimer's disease rat model [J]. J histotechnol, 2020, 43(1): 11-20.
- [55] Ahmad Rather M, Justin Thenmozhi A, Manivasagam T, et al. Neuroprotective role of Asiatic acid in aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease [J]. Front Biosci (Schol Ed), 2018, 10: 262-275.
- [56] Kaushal A, Wani WY, Bal A, et al. Okadaic acid and hypoxia induced dementia model of Alzheimer's type in rats [J]. Neurotox Res, 2019, 35(3): 621-634.
- [57] Song XY, Hu JF, Chu SF, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates okadaic acid induced spatial memory impairment by the GSK3 β /tau signaling pathway and the $A\beta$ formation prevention in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 710(1-3): 29-38.
- [58] Haider S, Tabassum S, Perveen T. Scopolamine-induced greater alterations in neurochemical profile and increased oxidative stress demonstrated a better model of dementia: A comparative study [J]. Brain Res Bull, 2016, 127: 234-247.
- [59] 唐伟, 张营丽, 王威, 等. 阿尔茨海默病发病机制的研究进

- 展 [J]. 医学与哲学, 2014, 35(1): 49-51.
- Tang W, Zhang YL, Wang W, et al. Progress of research on pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Med Phil, 2014, 35(1): 49-51.
- [60] 张雅梦. 新发 PSEN1 M139I 基因突变在早发型家族性 Alzheimer 病中的病理功能研究 [D]. 青岛: 青岛大学; 2020.
- Zhang YM. A novel presenilin 1 M139I mutation and its pathological function in a Chinese family with early-onset Alzheimer's disease [D]. Qingdao: Qingdao University; 2020.
- [61] Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease [J]. N Engl J Med, 2013, 368(2): 117-127.
- [62] Blackmore T, Meftah S, Murray TK, et al. Tracking progressive pathological and functional decline in the rTg4510 mouse model of tauopathy [J]. Alzheimers Res Ther, 2017, 9(1): 77.
- [63] Rockenstein EM, McConlogue L, Tan H, et al. Levels and alternative splicing of Amyloid β Protein Precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease [J]. J Biol Chem, 1995, 270(47): 28257-28267.
- [64] Games D, Adams D, Alessandrini R, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein [J]. Nature, 1995, 373(6514): 523-527.
- [65] Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice [J]. Science, 1996, 274(5284): 99-102.
- [66] Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes [J]. Nat Med, 1998, 4(1): 97-100.
- [67] Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(24): 13287-13292.
- [68] Mucke L, Masliah E, Yu GQ, et al. High-level neuronal expression of β 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation [J]. J Neurosci, 2000, 20(11): 4050-4058.
- [69] Chishti MA, Yang DS, Janus C, et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695 [J]. J Biol Chem, 2001, 276(24): 21562-21570.
- [70] Saito T, Matsuba Y, Mihira N, et al. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease [J]. Nat Neurosci, 2014, 17(5): 661-663.
- [71] Davis J, Xu F, Deane R, et al. Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid β -protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor [J]. J Biol Chem, 2004, 279(19): 20296-20306.
- [72] Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, et al. A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's s-type dementia [J]. Ann Neurol, 2008, 63(3): 377-387.
- [73] Agca C, Fritz JJ, Walker LC, et al. Development of transgenic rats producing human β -amyloid precursor protein as a model for Alzheimer's disease: transgene and endogenous APP genes are regulated tissue-specifically [J]. BMC Neurosci, 2008, 9: 28.
- [74] Leon WC, Canneva F, Partridge V, et al. A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment [J]. J Alzheimers Dis, 2010, 20(1): 113-126.
- [75] Galeano P, Martino Adami PV, Do Carmo S, et al. Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease [J]. Front Behav Neurosci, 2014, 8: 321.
- [76] Wilson EN, Abela AR, Do Carmo S, et al. Intraneuronal amyloid beta accumulation disrupts hippocampal CRTCL1-dependent gene expression and cognitive function in a rat model of Alzheimer disease [J]. Cereb Cortex, 2017, 27(2): 1501-1511.
- [77] Petrask T, Vojtechova I, Lobellova V, et al. The McGill transgenic rat model of Alzheimer's disease displays cognitive and motor impairments, changes in anxiety and social behavior, and altered circadian activity [J]. Front Aging Neurosci, 2018, 10: 250.
- [78] Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, et al. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms [J]. J Neurochem, 2003, 86(3): 582-590.
- [79] Santacruz K, Lewis J, Spire T, et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function [J]. Science, 2005, 309(5733): 476-481.
- [80] Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, et al. Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L) [J]. J Neurosci, 2005, 25(46): 10637-10647.
- [81] Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model [J]. Neuron, 2007, 53(3): 337-351.
- [82] Guo Q, Fu W, Sopher BL, et al. Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice [J]. Nat Med, 1999, 5(1): 101-106.
- [83] Zufferey V, Vallet PG, Moeri M, et al. Maladaptive exploratory behavior and neuropathology of the PS-1 P117L Alzheimer transgenic mice [J]. Brain Res Bull, 2013, 94: 17-22.
- [84] Wang Y, Cheng Z, Qin W, et al. Val97Leu mutant presenilin-1 induces tau hyperphosphorylation and spatial memory deficit in mice and the underlying mechanisms [J]. J Neurochem, 2012, 121(1): 135-145.
- [85] Mann KM, Thorngate FE, Katoh-Fukui Y, et al. Independent effects of APOE on cholesterol metabolism and brain A β levels in an Alzheimer disease mouse model [J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(17): 1959-1968.
- [86] Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide

- in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase [J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(2): 159–170.
- [87] Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, et al. A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology [J]. EMBO Rep, 2006, 7(9): 940–946.
- [88] Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation [J]. J Neurosci, 2006, 26(40): 10129–10140.
- [89] Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes [J]. Nat Med, 1998, 4(1): 97–100.
- [90] Agca C, Klakotskaia D, Schachtman TR, et al. Presenilin 1 transgene addition to amyloid precursor protein overexpressing transgenic rats increases amyloid beta 42 levels and results in loss of memory retention [J]. BMC Neurosci, 2016, 17(1): 46.
- [91] Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, et al. A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric A β , and frank neuronal loss [J]. J Neurosci, 2013, 33(15): 6245–6256.
- [92] Lewis J, Dickson DW, Lin WL, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP [J]. Science, 2001, 293(5534): 1487–1491.
- [93] Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction [J]. Neuron, 2003, 39(3): 409–421.
- [94] Mehta PD. Amyloid beta protein as a marker or risk factor of Alzheimer's disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2007, 4(4): 359–363.
- [95] McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease [J]. Ann neurol, 1999, 46(6): 860–866.
- [96] Bachmeier CJ, Beaulieu-Abdelahad D, Mullan MJ, et al. Epitope-dependent effects of Beta-amyloid antibodies on Beta-amyloid clearance in an *in vitro* model of the blood-brain barrier [J]. Microcirculation, 2011, 18(5): 373–379.
- [97] Sochocka M, Donskow-Lysoniewska K, Diniz BS, et al. The gut microbiome alterations and inflammation-driven pathogenesis of Alzheimer's disease-a critical review [J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(3): 1841–1851.
- [98] 朱华, 刘小海, 李卓, 等. 建立阿尔茨海默症人源肠道菌群动物模型 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 55–62.
- Zhu H, Liu XH, Li Z, et al. Establishment of a human flora-associated mouse model correlated with Alzheimer's disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 55–62.

[收稿日期] 2021-08-30

关媛媛,郑燕飞,朱玲慧,等. 高甘油三酯血症动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 146–152.
Guan YY, Zheng YF, Zhu LH, et al. Research progress on animal models of hypertriglyceridemia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 146–152.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.018

高甘油三酯血症动物模型研究进展

关媛媛¹, 郑燕飞², 朱玲慧¹, 王立英¹, 白帆¹, 李天星¹, 孙紫薇^{2*}, 李玲孺^{2*}

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100020; 2. 北京中医药大学国家中医体质与治未病研究院, 北京 100020)

【摘要】 高甘油三酯血症(HTG)与肥胖、代谢综合征和糖尿病密切相关,同时也是诱发急性胰腺炎(AP)和增加动脉粥样硬化性心血管疾病(ASCVD)发病风险的重要影响因素之一,是当前的研究热点。成功建立符合要求的动物模型是开展相关实验研究的关键,本文对 HTG 动物模型的研究现状进行了系统的总结,以期为深入研究 HTG 的发病机制和降脂药物的筛选提供动物模型参考。

【关键词】 高甘油三酯血症(HTG);动物模型;甘油三酯(TG)

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0146-07

Research progress on animal models of hypertriglyceridemia

GUAN Yuanyuan¹, ZHENG Yanfei², ZHU Linghui¹, WANG Liying¹, BAI Fan¹, LI Tianxing¹, SUN Ziwei^{2*},
LI Lingru^{2*}

(1. College of TCM, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100020, China. 2. National Institute of TCM Constitution and Preventive Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100020)
Corresponding author: SUN Ziwei. E-mail: ziweisun@163.com; LI Lingru. E-mail: lilingru912@163.com

【Abstract】 Hypertriglyceridemia (HTG) has become a research hotspot because it is tightly associated with obesity, metabolic syndrome and diabetes, and is also one of the important factors of inducing acute pancreatitis (AP) and increasing the risk of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD). The success of replicating animal model of hypertriglyceridemia is one of the key of research in experimental hypertriglyceridemia. The paper summarizes the research of hypertriglyceridemia animal model in order to provide reference for studying in-depth mechanism and selecting antilipidemic drugs.

【Keywords】 hypertriglyceridemia(HTG); animal model; triglyceride(TG)

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

高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia, HTG)是血脂异常的重要表现,通常定义为空腹血清甘油三酯(triglycerides, TG) ≥ 150 mg/dl^[1]。HTG 的发生

是由于体内 TG 水平升高,即富含 TG 的脂蛋白(triglyceride-rich lipoproteins, TGRL)加工和分解代谢改变或血浆 TG 清除率降低^[2]。HTG 与肥胖、代

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81874413),北京市科技新星计划(Z201100000820027),中华中医药学会“青年人才托举工程”(CACM-2018-QNRC2-C02),北京中医药大学科研创新团队项目(2019-JYB-TD),中央高校基本科研业务费专项资金资助北京中医药大学新教师启动基金项目(2020-JYB-XJSJJ-004)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81874413), Beijing Nova Program(Z201100000820027), Youth Talent Promotion Project of Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine(CACM-2018-QNRC2-C02), Youth Innovation Team Project of Beijing University of Chinese Medicine(2019-JYB-TD), Central University Basic Scientific Research Business Fee Beijing University of Chinese Medicine New Teachers Start Fund Project(2020-JYB-XJSJJ-004).

【作者简介】 关媛媛(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:体病相关与慢病防控研究。Email:20200931079@bucm.edu.cn

【通信作者】 孙紫薇(1990—),女,助理研究员,博士,研究方向:中医体质学;经典方剂的配伍与应用。Email:ziweisun@163.com;

李玲孺(1986—),女,研究员,博士,研究方向:体质辨识与病证关系。Email:lilingru912@163.com。

* 共同通信作者

谢综合征和糖尿病密切相关也是诱发急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 和增加动脉粥样硬化性心血管疾病 (atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD) 风险的重要影响因素之一^[3]。

他汀类药物是治疗高脂血症的首选药但他汀降 TG 的作用有限。根据 2007 ~ 2014 年美国健康与营养调查 (NHANES) 数据显示 HTG 的总体患病率为 25.9%, 其中接受他汀类药物治疗的患病率为 31.6%^[4]。HTG 也是我国高脂人群中常见的血脂异常类型。2012 年全国调查结果显示高胆固醇血症的患病率为 4.9%, HTG 的患病率为 13.1%, 约是高胆固醇血症患病率的 3 倍^[5]。临床上降脂的首要目标是降低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平, 但即使患者经标准治疗 LDL-C 达标后, 仍可能发生心血管事件 (cardiovascular disease, CVD), 尤其是使用他汀治疗后 TG 不达标患者 CVD 的发生风险远高于 TG 达标者^[6]。有研究表明降 TG 与降 LDL-C 的临床效益是相似的且可能与载脂蛋白 B (ApoB) 的绝对减少有关这使 HTG 成为当前的研究热点^[7]。成功建立符合要求的动物模型是开展相关实验研究的关键, 然而目前 HTG 的造模方法还未成熟完善, 很少有研究对其进行系统总结归纳。现本文根据时间分类 (急性、慢性、先天性) 对 HTG 动物模型做一概述以期为深入研究 HTG 的潜在发病机制和降 TG 药物的筛选提供动物模型参考。

1 急性 HTG 动物模型

1.1 注射法

注射类方法是通过一次性实验动物尾静脉注射、腹腔注射或皮下注射使其血清 TG 一过性快速升高的一种造模方法。此方法简单、便捷、可控, 可使实验动物处于高水平的 TG 状态^[8]。但这种高 TG 状态呈剂量依赖性且持续时间不长, 与人类发病机制差异较大与临床病症特点的吻合度也仅为 34% 一般常用于降脂药物的初筛和药效评价^[9]。目前用注射类方法建立急性 HTG 动物模型的造模方法有 Triton-WR1339 (TWR) 注射法、poloxamer-407 (P-407) 注射法和 chlorpyrifos (CPF) 注射法。

TWR 和 P-407 均是一种表面活性剂, 可通过直接抑制脂蛋白酯酶 (lipoprotein lipase, LPL) 和肝脂肪酶的活性来增加血清 TG 浓度和极低密度脂蛋白胆固醇 (VLDL-C) 的含量^[10-11]。研究表明, Zarzecki

等^[10]给雌性 C57BL/6 小鼠腹腔注射 TWR (400 mg/kg) 可在 24 h 内引起急性 HTG, 血清 TG 可升至正常小鼠的 20 倍左右, 升 TG 效果显著, 常用于 HTG 调脂药物的筛选, 但其不足之处是药品成本较高。Yeom 等^[12]给雄性 SD 大鼠一次性腹腔注射 P-407 (400 mg/kg) 也可在 24 h 内迅速升高血清 TG 和 TC。研究表明 P-407 的毒性非常低, 长期使用也可确保小鼠的安全性^[13], 是目前诱导混合型急性高脂血症动物模型的常用方法。CPF 是一种有机磷杀虫剂, 其诱导急性 HTG 的机制尚不清楚。Acker 等^[14]研究表明, 单次 CPF 皮下注射 (50 mg/kg) 给药可快速导致雄性 Wistar 大鼠 TG 和 LDL-C 水平增加, 且使高密度脂蛋白 (High density lipoprotein cholesterol, HDL) 水平下降可作为一种研究 CPF 促动脉粥样硬化的动物模型。Ono 等^[15]研究表明, 通过将其腺病毒注射到雄性 C57BL/6 小鼠体内, 在肝脏中过度表达 NH(2)-末端豆蔻酰化信号附加的 Akt (myristoylation signal-attached Akt, myr-Akt), 也可导致显著的高甘油三酯血症, 并伴有脂肪肝和肝肿大, 这可能是 Akt 诱导 SREBP-1 表达和独立于 SREBP-1 的脂肪酸合成机制共同作用的结果。

1.2 灌胃法

与高脂饮食喂养相比, 灌胃法可以保证动物间食物摄入量的一致性, 建模周期相对较短, 避免了饮食喂养法引起的动物厌食现象。缺点是乳液应低温储存, 口服困难, 动物容易腹泻或消化不良, 实验动物容易死亡等^[16]。现阶段, 建立 HTG 动物模型常用的灌胃方法有五味子素 B 溶剂 (schisandrin B, Sch B) 灌胃法、果糖水灌胃法和食用油灌胃法等均可在较短时间内引起动物血清 TG 升高。

研究表明, 用橄榄油配制五味子素 B 溶剂 (Sch B) 给雄性 ICR 小鼠灌胃, 能够在 48 h 快速升高小鼠 TG 是一个实用且简便的急性单纯性 HTG 动物模型^[17]。Sch B 诱导的高甘油三酯血症和肝脂肪变性是由脂肪分解: 脂肪细胞大小减少和血清非酯化脂肪酸 (nonesterified fatty acid, NEFA) 增加以及外源性来源血清载脂蛋白 B48 (apolipoprotein, Apo B48) 增加引起的^[18]。当 Sch B 灌胃联合高糖高脂饮食时可同时升高血清 TG 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平可用于制备混合型高脂血症动物模型^[19]。

果糖水和食用油灌胃可通过扰乱机体饮食平衡而达到迅速升高血脂的目的, 造成急性 HTG 的机

制与人类较为接近,但其高 TG 状态维持的时间较短,适用于做口服脂质耐受性测试(OLTT),对于评估肠道及全身脂质代谢具有重要意义。Ochiai 等^[20]给高脂饲料喂养 1 周后的雄性 ddY 小鼠在禁食 12 h 后灌胃大豆油(5 mL/kg),可在 2 ~ 3 h 内迅速升高小鼠血清 TG(400 mg/dl)水平,并于 6 h 后恢复至正常水平。石慧荣等^[21]用高蛋白低碳水化合物饲料(基础饲料 31.3%,干酪素 50%,L-胱氨酸 0.2%,玉米淀粉 4.5%,蔗糖 10%,大豆油 4%)喂养雄性 SD 大鼠 1 周,禁食禁饮 24 h 后只予 20%果糖灌胃,每次 4 h,灌胃 5 次,于末次灌胃后 8 h 血清 TG 达高峰,约为正常饮食大鼠血清 TG 的 2 倍。

2 慢性 HTG 动物模型

慢性 HTG 动物模型的造模方法包括基因修饰法、高脂饮食喂养法和复合因素造模法。

2.1 基因修饰法

国内外多使用基因修饰法研究基因缺陷导致的家族性高甘油三酯血症(familial hypertriglyceridemia, FHTG)。LPL, 载脂蛋白 C2 (apolipoprotein C2, APOC2), 载脂蛋白 A5 (apolipoprotein C5, APOA5), 脂肪酶成熟因子 1 (lipase maturation factor 1, LMF1), 甘油-3-磷酸脱氢酶 1 (glycerol 3-phosphate dehydrogenase1, GPD1) 和糖基磷脂酰肌醇锚定的高密度脂蛋白结合蛋白 1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding protein 1, GPIHBP1) 是导致严重 HTG 的六个经典基因^[22]。

Weinstock 等^[23]研究显示,纯合 LPL 基因敲除的小鼠幼崽 TG 水平是对照组的 3 倍,VLDL-C 水平是对照组的 7 倍,其无法在哺乳期存活,会在出生后 18 ~ 24 h 内死亡。杂合 LPL 基因敲除小鼠可存活至成年并有轻度高甘油三酯血症,与对照相小鼠相比,进食或 10%蔗糖饮食,TG 水平会升高 1.5 ~ 2 倍。这可能与 LPL 血清 TG 清除速率降低,VLDL 部分分解代谢率降低有关。Yang 等^[24]通过对 GPIHBP1 基因修饰,复制了 HTG C57BL/6 小鼠模型并探讨了 HTG 对 AP 细胞修复再生的影响。Liu 等^[25]通过转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)技术突变了斑马鱼的 APOC2 基因,获得了严重的 HTG 和乳糜微粒血症动物模型。Wei 等^[26]开发了在肝和肠道中表达人 APOC3 的转基因猪,这些动物的血清 TG 水平可增加 2.5 倍,但总胆固醇

和 HDL-C 水平正常。它们表现出延迟的 TG 吸收和清除,这与 APOC3 在阻碍 TRL 分解代谢中的已知作用是一致的。Gao 等^[27]通过对 APOC2 基因敲除的仓鼠连续静脉注射正常仓鼠血清而提高了新生儿仓鼠的存活率,并发现在后期可表现出严重的 HTG,创建了一种具有严重 HTG 的新型 ApoC2 缺失哺乳动物模型。Takanashi 等^[28]使用 APOA5 基因敲除小鼠联合高碳水饮食喂养,成功地重构了人类 APOA5 缺乏症引起的严重 HTG,而这种基因功能缺陷型的 HTG 会因高碳水化合物饮食或衰老等环境因素的刺激而加剧。Toshihiro 等^[29]研究发现一种 APOC2 的模拟肽可以逆转 APOC2 基因突变小鼠的 HTG,可作为一种潜在的新疗法用于治疗 APOC2 缺乏症。

基因修饰法的优点是可以很好地模拟在遗传条件下 HTG 的发生、发展过程,是 FHTG 较理想的造模方法。缺点是成本高、技术难度大,且来源珍贵,无法大范围推广使用。

2.2 高脂饮食喂养法

高脂饮食喂养法是指用高 TC、高 TG 的饲料进行喂养,导致实验动物血清脂质升高,造成脂代谢紊乱的一种造模方法。

大鼠和小鼠是最常见的建立高脂模型的实验动物,但大鼠、小鼠对高脂饲料不敏感,单纯高脂饲料喂养还会造成动物厌食的情况,而且饲料喂养不能保证实验动物的进食量相等,在后期指标检测时会影响结果的准确性。且大鼠和小鼠的脂质分布与人类的脂质分布不同,其体内主要以 HDL 为主,血浆 TG 的清除率比人大很多^[30]。适合高脂饲料喂养的实验动物主要是豚鼠和仓鼠。豚鼠和仓鼠对高脂饲料极为敏感且脂代谢方式与人类相似,其大部分循环胆固醇和人类一样,都是通过 LDL 转运的^[31]。仓鼠容易因膳食胆固醇摄入过多而引起高胆固醇血症^[32],而豚鼠摄入高脂饲料易引起血清 TG 升高,且运动训练会降低豚鼠血清 TG 并增加血清 HDL^[33],与人类脂质代谢方式极为相似,是较理想的 HTG 动物模型。

有研究发现,给予雄性 Hartley 豚鼠和雄性 Wistar 大鼠相同配方的高脂饲料(0.1%胆固醇、10%猪油)的高脂饲料,豚鼠形成了典型的高脂血症及高甘油三酯血症动物模型,大鼠血脂未发生改变,而肝脏发生了明显的脂肪性病变^[34]。由此可见,豚鼠更容易出现血脂升高,而大鼠更易诱发形成典型的脂肪肝模型。刘伟^[35]还发现延长光照时间可以加重雌性豚鼠的胰岛素抵抗,加速糖、脂代谢紊乱的形成。这

与长期熬夜、倒班及作息不规律的人群易患糖尿病、肥胖、高血脂等相关疾病密切相关。不足之处是豚鼠价格较贵,灌胃较困难,且成年豚鼠体重较大,操作较困难。因此,目前国内外学者选用豚鼠作为 HTG 动物模型的频率一直不如大鼠。

2.3 复合因素造模法

复合因素造模法是指在高脂饲料喂养的基础上增加其他干预方式(如添加高糖饮食喂养或脂肪乳剂灌胃、饮酒等)的一种造模方法。研究表明,蔗糖有利于肝脂肪酸酯化,促进 TG-VLDL 合成;果糖会减弱 VLDL-TGs 的分解代谢,引起 TG 大量沉积^[36]。脂肪乳剂灌胃法可通过模拟人类的高脂饮食,使模型体内相关生化指标迅速上升,具有操作简单、造模时间短、死亡率低等特点^[37]。复合梯度饮酒模拟了人类“过食肥甘醇酒”的饮食特点,其升高血脂的主要机制可能有:(1)乙醇抑制 PPAR α ,阻滞脂肪酸(fatty acid, FA)氧化及转运。(2)乙醇抑制 AMPK,减少 FA 氧化,增加 FA 合成^[38]。单纯的高脂饲料喂养很难建立 HTG 动物模型^[39],但若在高脂饲料喂养的同时添加高糖饮食或脂肪乳剂灌胃、饮酒等复合因素,造模会相对容易成功。

马文静^[40]使用含 10%牛油、20%蔗糖和 10%果糖的高糖高脂饲料成功建立了 HTG 动物模型,可使模型组雄性 SD 大鼠血浆 TG 升高 298%,并稳定持续 10 周左右。孙赫等^[41]用正常基础饲料喂养配合 10 mL/kg 剂量的高脂乳剂(吐温 60%、食用油 15%、胆固醇 6%、胆酸钠 2%、丙基硫氧嘧啶 0.2%)给雄性 SD 大鼠灌胃,并在造模前一次性腹腔注射维生素 D3 60 万单位/kg,仅 10 d 便可使大鼠 TG 升高 3 倍,且稳定性较高。杜宇忠等^[42]用高糖高脂饲料(20%蔗糖、15%猪油、0.8%胆固醇、0.2%胆酸钠、适量的酪蛋白、磷酸氢钙、石粉等)加不同梯度的酒精喂养,自由饮食饮酒,4 周后可使模型组雄性 SD 大鼠 TG 显著升高 150%左右。灵长类的脂质代谢机制与人类最为接近,可用于评估血脂异常的临床前研究。Butler 等^[43]通过给成年雄性恒河猴喂养中脂饮食(约 23% kcal)和高果糖玉米糖浆 500 mL,可在 1 个月后使其空腹血清 TG 增加 3 倍多,较好地复制了恒河猴 HTG 动物模型。

值得注意的是,高脂饲料并不能成功诱导小鼠慢性 HTG,这可能是由于外源性 TC 的大量摄入抑制了小鼠内源性 TG 合成,或同时抑制了 TG 从肝向血液的释放^[44]。国内外学者常用载脂蛋白 E 基因

敲除(ApoE⁻)和低密度脂蛋白受体敲除(low density lipoprotein receptor, LDLR⁻)的 C57BL/6 小鼠联合高果糖饮食诱导 HTG。Mastrocola 等^[45]研究证明,喂养高果糖饮食的 LDLR⁻ C57BL/6 小鼠可比喂养高脂饮食的 C57BL/6 小鼠血清 TG 增加 2 倍多。

3 先天性 HTG 动物模型

常见的先天性 HTG 动物模型主要有大鼠和兔。Kune 等^[46]的研究表明,遗传性 HTG 大鼠(hereditary hypertriglyceridemic rats, HHTg)有高血压和高血清 TG,但不升高血清 TC,而且这种脂质代谢紊乱还与血小板聚集密切相关。Mangat 等^[47]的研究表明,成年的雄性 JCR:LA-cp 大鼠正常饮食的情况下其血清 TG 水平即为正常大鼠的 3 倍左右,这主要是因为成年雄性 JCR:LA-cp 大鼠肝会分泌过多 VLDL,从而表现出高瘦素血症、高胰岛素血症和明显的 HTG。“watanble heritablehyperlipidemic rabbit”(WHHL)兔的 LDL 受体先天性缺陷,从出生时就表现为高胆固醇血症和 HTG,是作为脂质代谢、动脉硬化不可多得的模型^[8],已被世界各地广泛应用于研究。Kawai 等^[48]的研究发现,WHHL 兔与日本白兔(Japanese white rabbit, JW)的杂交可形成餐后 HTG 兔模型(postprandial hypertriglyceridemic rabbit, PHT),即在喂食标准饮食的情况下,血清 TG 水平就非常高。此外,圣托马斯医院(the St. Thomas Hospital rabbit, STH)兔表现出孟德尔形式的高甘油三酯血症,伴随着 APOB 脂蛋白生成增加和动脉粥样硬化加速^[49]。

4 总结

建立科学有效的实验动物模型是整个实验研究的关键环节。现本文根据时间分类以及常见动物种类(见表 1)对 HTG 动物模型做一概述,可根据不同的实验目的和实验能力,选择最理想的动物模型。急性 HTG 动物模型造模方便,用时短, TG 升高明显,可用于降脂药物的初步筛选和验证;基因修饰 HTG 动物模型和先天性 HTG 动物模型可模拟遗传条件下 HTG 的发生、发展过程,是 FHTG 最理想的造模方法,可用于 HTG 发病的深层机理探索;高脂饮食喂养法和复合因素造模法与 HTG 发病机制最相似,与临床特征最吻合,可用于 HTG 的机制研究和药效评价。目前, HTG 的造模方法还十分有限,本文对现有造模方法做一概述,以期今后 HTG 的药效筛选和机制研究提供模型参考。

表 1 高甘油三酯动物模型及其作用机制
Figure 1 High triglyceride animal model and its mechanism

类型 Type	动物模型 Animal model	可能的作用机制 Mechanisms
小鼠 Mice	TWR 和 P-407 腹腔注射 TWR and P-407 injection	抑制 LPL 活性 ^[10-11] Decreased LPL activity ^[10-11]
	myr-Akt 过表达 ^[15] myr-Akt expression	未知 Unknown
	五味子素 B 溶剂灌胃 Schisandra B gavage	增加 NEFA 和 Apo B48 ^[18] Add NEFA and Apo B48 ^[18]
	食用油 ^[20] 灌胃 Oil gavage	未知 Unknown
	LPL 基因缺陷 Defective LPL gene	抑制 LPL 活性 ^[23] Decreased LPL activity ^[23]
	GPIHBP1 基因缺陷 Defective GPIHBP1 gene	抑制 LPL 活性 ^[24] Decreased LPL activity ^[24]
	APOA5 基因敲除 Knock out APOA5 gene	抑制 LPL 活性 ^[28] Decreased LPL activity ^[28]
	apoC-II 基因缺陷 Defective apoC-II gene	抑制 LPL 活性 ^[29] Decreased LPL activity ^[29]
	CPF 皮下注射 ^[14] CPF injection	未知 Unknown
	果糖、蔗糖 Fructose and sugar gavage	增加脂肪从头合成 ^[36] Increased de novo lipogenesis ^[36]
大鼠 Rats	高脂乳剂、维生素 Emulsion and vitamin D3 gavage	加重血管钙化 ^[41] Aggravating vascular calcification ^[41]
	HHTg	胰岛素抵抗 ^[46] Insulin resistance ^[46]
	JCR:LA-cp	VLDL 分泌增加, LPL 活性饱和 ^[47] Increased VLDL secretion and saturated LPL activity ^[47]
仓鼠 Hamster	APOC2 基因敲除 Knockout APOC2 gene	抑制 LPL 活性 ^[27] Decreased LPL activity ^[27]
豚鼠 Guinea pigs	高脂饲料 Diet feeding	肝 TG 合成及 VLDL 分泌速率增加 ^[35] Hepatic TG synthesis and VLDL secretion rate increased ^[35]
斑马鱼模型 Zebrafish model	APOC2 功能缺失突变体 APOC2 loss-of-function mutant	抑制 LPL 活性 ^[25] Decreased LPL activity ^[25]
猪模型 Pig	APOC3 转基因 APOC3 transgenic	延迟 TRL 清除 ^[26] Delayed TRL clearance ^[26]
灵长类动物模型 Primat models	恒河猴, 高果糖饮食 Rhesusmacaques, high-fructose diet	增加从头脂肪生成 ^[43] Increased de novo lipogenesis ^[43]
	Watanabe 遗传性高脂血症 (WHHL) 模型 Watanble heritablehyperlipidemic Rabbit	减少含有 APOB 的脂蛋白的清除 ^[8] Reduced clearance of APOB-containing lipoproteins ^[8]
	兔子 Rabbit	餐后血脂增加 ^[48] Increased postprandial lipemia ^[48]
	托马斯医院 (STH) 兔 Thomas Hospital rabbit	增加 LDL 和 VLDL 组分中 APOB 的产生 ^[49] Increased production of APOB in both the LDL and VLDL fractions ^[49]

参 考 文 献 (References)

[1] Simha V. Management of hypertriglyceridemia [J]. BMJ, 2020, 371: 1-19.

[2] Sandesara PB, Virani SS, Fazio S, et al. The forgotten lipids: triglycerides, remnant cholesterol, and atherosclerotic

cardiovascular disease risk [J]. Endocr Rev, 2019, 40(2): 537-557.

[3] Wolska A, Yang ZH, Remaley AT. Hypertriglyceridemia: new approaches in management and treatment [J]. Curr Opin Lipidol, 2020, 31(6): 331-339.

[4] Fan W, Philip S, Granowitz C, et al. Prevalence of US adults

- with triglycerides ≥ 150 mg/dl; NHANES 2007–2014 [J]. *Cardiol Ther*, 2020, 9(1): 207–213.
- [5] 诸骏仁, 高润霖, 赵水平, 等. 中国成人血脂异常防治指南 (2016 年修订版) [J]. *中华心血管病杂志*, 2016, 44(10): 833–853.
- Zhu JR, Gao RL, Zhao SP, et al. Chinese guidelines for the prevention and treatment of dyslipidemia in adults (2016 revision) [J]. *Chin J Cardiol*, 2016, 44(10): 833–853.
- [6] 王绵, 郝玉明. 他汀时代对高甘油三酯血症再认识 [J]. *临床荟萃*, 2018, 33(6): 469–473.
- Wang M, Hao YM. Further understanding of hypertriglyceridemia in the statin era [J]. *Clin Focus*, 2018, 33(6): 469–473.
- [7] Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, et al. Association of triglyceride-lowering LPL variants and LDL-C-lowering LDLR variants with risk of coronary heart disease [J]. *JAMA*, 2019, 321(4): 364–373.
- [8] Wang L, Xu T, Wang R, et al. Hypertriglyceridemia acute pancreatitis: animal experiment research [EB/OL]. [2021-05-03]. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10620-021-06928-0.pdf>
- [9] 李艳, 宋亚刚, 苗明三, 等. 基于高脂血症临床病症特点的动物模型分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(8): 3557–3561.
- Li Y, Song YG, Miao MS, et al. Analysis of animal model based on the clinical symptom of disease's characteristics of hyperlipemia [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(8): 3557–3561.
- [10] Zarzecki MS, Araujo SM, Bortolotto VC, et al. Hypolipidemic action of chrysin on Triton Wr-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice [J]. *Toxicol Rep*, 2014, 1: 200–208.
- [11] Johnston TP. The P-407-induced murine model of dose-controlled hyperlipidemia and atherosclerosis: a review of findings to date [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, 43(4): 595–606.
- [12] Yeom M, Park J, Lee B, et al. Electroacupuncture ameliorates poloxamer 407-induced hyperlipidemia through suppressing hepatic SREBP-2 expression in rats [J]. *Life Sci*, 2018, 203: 20–26.
- [13] Sharyo S, Kumagai K, Yokota-Ikeda N, et al. Amelioration of renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of IL-6 production in the poloxamer 407-induced mouse model of hyperlipidemia [J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 110(1): 47–54.
- [14] Acker CI, Nogueira CW. Chlorpyrifos acute exposure induces hyperglycemia and hyperlipidemia in rats [J]. *Chemosphere*, 2012, 89(5): 602–608.
- [15] Ono H, Shimano H, Katagiri H, et al. Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement [J]. *Diabetes*, 2003, 52(12): 2905–2913.
- [16] 胡慧明, 朱彦陈, 朱巧巧, 等. 实验性高脂血症动物模型比较分析 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(20): 3709–3714.
- Hu HM, Zhu YC, Zhu QQ, et al. Analysis on animal models of experimental hyperlipidemia [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2016, 41(20): 3709–3714.
- [17] 王晓艳, 储著胜, 李伟霞, 等. 五味子素 B 诱导高甘油三酯血症小鼠模型的方法研究 [J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(14): 1636–1641.
- Wang XY, Chu ZS, Li WX, et al. Study on the method of establishing hypertriglyceridemia model by schisandrin B [J]. *Chin J New Drugs*, 2020, 29(14): 1636–1641.
- [18] Zhang Y, Zhao J, Zhou SF, et al. Biochemical mechanism underlying hypertriglyceridemia and hepatic steatosis/hepatomegaly induced by acute schisandrin B treatment in mice [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 8.
- [19] 王晓艳, 储著胜, 张辉, 等. 基于脂质代谢组学评价五味子素 B 诱导的急性高甘油三酯血症小鼠模型 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(6): 833–839.
- Wang XY, Chu ZS, Zhang H, et al. Evaluation of schisandrin B-induced mouse model of hypertriglyceridemia based on lipid metabolomics [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2019, 35(6): 833–839.
- [20] Ochiai M. Evaluating the appropriate oral lipid tolerance test model for investigating plasma triglyceride elevation in mice [J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): 1–17.
- [21] 石慧荣, 唐国都, 梁志海, 等. 急性高甘油三酯血症大鼠模型研究 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31(1): 18–21.
- Shi HR, Tang GD, Liang ZH, et al. Study on the acute high blood triglycerides model in rat [J]. *Lab Anim Sci*, 2014, 31(1): 18–21.
- [22] Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, et al. European atherosclerosis society consensus panel: the polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2(8): 655–666.
- [23] Weinstock PH, Bisgaier CL, Aalto-Setälä K, et al. Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(6): 2555–2568.
- [24] Yang N, Li B, Pan Y, et al. Hypertriglyceridaemia delays pancreatic regeneration after acute pancreatitis in mice and patients [J]. *Gut*, 2019, 68(2): 378–380.
- [25] Liu C, Gates KP, Fang L, et al. Apoc2 loss-of-function zebrafish mutant as a genetic model of hyperlipidemia [J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(8): 989–998.
- [26] Wei J, Ouyang H, Wang Y, et al. Characterization of a hypertriglyceridemic transgenic miniature pig model expressing human apolipoprotein CIII [J]. *FEBS J*, 2012, 279(1): 91–99.
- [27] Gao M, Yang C, Wang X, et al. ApoC2 deficiency elicits severe hypertriglyceridemia and spontaneous atherosclerosis: A rodent model rescued from neonatal death [J]. *Metabolism*, 2020, 109: 1–12.
- [28] Takanashi M, Kimura T, Li C, et al. Critical role of SREBP-1c

- Large-VLDL pathway in environment-induced hypertriglyceridemia of Apo AV deficiency [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(3): 373–386.
- [29] Toshihiro S, Akiko S, Boris LV, et al. Creation of Apolipoprotein C-II (ApoC-II) mutant mice and correction of their hypertriglyceridemia with an ApoC-II mimetic peptide [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 356(2): 341–53.
- [30] Fernandez ML, McNamar DJ. Dietary fat-mediated changes in hepatic apoprotein B/E receptor in the guinea pig: effect of polyunsaturated, monounsaturated, and saturated fat [J]. *Metabolism*, 1989, 38(11): 1094–1102.
- [31] Fernandez ML, Volek JS. Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2006, 3: 17.
- [32] Chen W, Fan S, Xie X, et al. Novel PPAR pan agonist, ZBH ameliorates hyperlipidemia and insulin resistance in high fat diet induced hyperlipidemic hamster [J]. *PLoS One*, 2014, 239(4): 1–12.
- [33] Ensign WY, McNamara DJ, Fernandez ML. Exercise improves plasma lipid profiles and modifies lipoprotein composition in guinea pigs [J]. *J Nutr Biochem*, 2002, 13(12): 747–753.
- [34] 李金莲, 高南南, 杨润梅. 豚鼠高脂血症模型的建立及机制探讨 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(2): 115–119.
- Li JL, Gao NN, Yang RM. Establishment and mechanisms of a guinea pig model of hyperlipidemia and comparison with the rat model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2009, 17(2): 115–119.
- [35] 刘伟. 光照节律对豚鼠糖脂代谢的影响及芪葵颗粒干预机制的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学; 2020.
- Liu W. Effects of light rhythm on glycolipid metabolism in guinea pigs and the mechanism of intervention of Qi Kui granules [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine; 2020.
- [36] Hirano T, Mamo JC, Poapst ME, et al. Impaired very low-density lipoprotein-triglyceride catabolism in acute and chronic fructose-fed rats [J]. *Am J Physiol*, 1989, 256(1): 559–565.
- [37] Zhou X, Zhang W, Liu X, et al. Interrelationship between diabetes and periodontitis: role of hyperlipidemia [J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60(4): 667–674.
- [38] 唐琪晶, 陈素红, 潘丹丹, 等. 白术精提物对代谢性高脂血症大鼠的药效及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(9): 1803–1807.
- Tang QJ, Chen SH, Pan DD, et al. Preliminary study on efficacy and mechanism of *Atractylodes Macrocephalae* Rhizoma extracts in metabolic hyperlipidemia rats [J]. *Chin J New Drugs*, 2015, 40(9): 1803–1807.
- [39] 刘国庆. 严重高甘油三酯及混合型高脂血症基因修饰动物模型的制备及应用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(7): 570.
- Liu GQ. Preparation and application of gene modified animal models of severe hypertriglyceride and mixed hyperlipidemia [J]. *Chin J Arterioscl*, 2009, 17(7): 570.
- [40] 马文静. 高甘油三酯血症大鼠模型及血脂变化的特性研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心营养与健康所; 2020.
- Ma WJ. Study on the hypertriglyceridemia rat model and its lipid change [D]. Beijing: National Institute for Nutrition and Health Chinese Center for Diseases Control and Prevention; 2020.
- [41] 孙赫, 李文雄. 高脂血症大鼠模型几种造模方法的比较 [J]. *动物医学进展*, 2014, 35(3): 78–82.
- Sun H, Li WX. Comparison of hyperlipidemia rat modeling methods [J]. *Progress Veter Med*, 2014, 35(3): 78–82.
- [42] 杜宇忠, 苏洁, 颜美秋, 等. 陈皮醇提物对高脂血症模型大鼠甘油三酯的改善作用及其机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(1): 190–195.
- Du YZ, Su J, Yan MQ, et al. Improvement effect and mechanism of ethanol extract from *Citri Reticulatae Pericarpium* on triglyceride in hyperlipidemia model rat [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2021, 46(1): 190–195.
- [43] Butler AA, Price CA, Graham JL, et al. Fructose-induced hypertriglyceridemia in rhesus macaques is attenuated with fish oil or ApoC3 RNA interference [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(4): 805–818.
- [44] 鲍和, 张昌龙, 苏娅萍, 等. 高脂饮食诱导建立小鼠高脂血症模型 [J]. *西北药学杂志*, 2019, 34(1): 47–51.
- Bao H, Zhang CL, Su YP, et al. The establishment of hyperlipidemic models induced by high fat diets in mice [J]. *Northwest Pharm J*, 2019, 34(1): 47–51.
- [45] Mastrocola R, Collino M, Penna C, et al. Maladaptive modulations of NLRP3 inflammasome and cardioprotective pathways are involved in diet-induced exacerbation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1–12.
- [46] Kune J, Mazeaud MM, Devynck MA, et al. Platelet hypoaggregability in hereditary hypertriglyceridemic rats: relation to plasma triglycerides [J]. *Thromb Res*, 1997, 88(4): 347–353.
- [47] Mangat R, Su J, Scott PG, et al. Chylomicron and apoB48 metabolism in the JCR: LA corpulent rat, a model for the metabolic syndrome [J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(35): 477–481.
- [48] Kawai T, Ito T, Ohwada K, et al. Hereditary postprandial hypertriglyceridemic rabbit exhibits insulin resistance and central obesity: a novel model of metabolic syndrome [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(12): 2752–2757.
- [49] Beaty TH, Prenger VL, Virgil DG, et al. A genetic model for control of hypertriglyceridemia and apolipoprotein B levels in the Johns Hopkins colony of St. Thomas Hospital rabbits [J]. *Genetics*, 1992, 132(4): 1095–1104.