

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2期 2022年4月30日出版

目次

研究报告

- 乙酸联合束缚应激诱导腹泻型肠易激综合征小鼠模型的制备
..... 程斌,黄琴,王军蒙,陈伟,张瑞斌,董龙聪,吴巧凤(153)
- 胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型的构建及评估* ... 罗宝花,刘晓秋,雷静玉,张彩勤,张永斌,师长宏(161)
- 大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用
..... 孙银凤,杨丹,白敏,宋冰,康万荣,汪永锋,张延英(169)
- LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型的建立及其 BCR 突变分析 ... 李哲,蔡方舟,李丹,陈倩,苑一真,王卫(177)
- 内皮细胞条件性敲除 EMCN 小鼠模型建立及肿瘤肺转移对比分析 张国新,高苒(185)
- 莲心碱通过抑制 NF- κ B 激活 Nrf2/HO-1 通路发挥抗炎抗氧化作用
..... 张锐虎,姚茹,史泽雅,郭氏,霍怡彤,侯佳楠,陈朝阳(191)
- 复方中药提取物增强免疫力作用及初步机制研究 王涛,戴明珠,李延川,彭逸,李春启(198)
- 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠肠道机能的调节作用
..... 王丽,吉喆,董丽,路昕,秦菲,胡戈,周海涛,曹建民(208)
- 从人体尿液中分离肾源细胞构建拟肾血管单位小鼠皮下嵌合模型及其初步评价*
..... 蒋超,王超,任晓楠,周晓辉(216)
- H1N1 流感病毒树鼯模型生物学特性的研究*
..... 金亮子,吴芳芳,邓伟,奎秀莹,罕园园,孙晓梅,仝品芬,李娜,王喜军,代解杰(223)
- 人血管紧张素转化酶 2(ACE2)BAC 转基因小鼠模型的制备及鉴定*
..... 朱孟敏,刘玲玲,牛博文,彭秀华,陈丽香,秦波音,杨华,李峰(230)
- 小细胞肺癌原代细胞脑转移模型研究初探* 吕玥莹,赵庆亚,焦明,杨玉琴(239)
- 复合微生态制剂对小鼠肠道免疫功能的影响 ... 白培细,裴婷,孔佳美,杨逢清,李涛,王海东,任玉红(245)

巨噬细胞 MED1 缺失对小鼠血糖水平及胰岛素抵抗的影响
..... 高杰,夏聪聪,张亚莉,姚雷清,席雨燕,邹宇佳,王令,白亮,刘恩岐(253)

研究进展

肌腱病动物模型的研究进展 李帝均,王桂杉,刘海峰,王斌(260)

人源化小鼠在呼吸道病原研究中的应用与发展* 程春雨,段翔,李颜(267)

神经干细胞移植在神经退行性疾病中的研究进展
..... 郭文文,赵亚,白敏,张延英,王颖花,汪永锋,师长宏(274)

功能性消化不良动物模型的研究进展 陶睿智,顾任钧,夏雅雯,韩鸿宽,陆可沁,陆茵,孙广志(283)

高原肺水肿动物模型研究进展 向雪梅,郭鑫,曾佳容,刘倍余,张耀雷,孙红玉(291)

*:人源化小鼠与感染动物模型专题

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://zgsydw.cnjournals.com/sydwybjyx/ch/index.aspx>

本期执行主编 谭毅

本期专题组织 周晓辉

本期责任编辑 陈慧 董令赢

照 排

同方知网(北京)技术有限公司

印 刷

北京博海升彩色印刷有限公司

邮发代号

2-748

广告发布登记

京朝工商广登字 20170142 号

定 价

每期 50.00 元,全年 300.00 元

中国标准连续出版物号

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

2022 年版权归中国实验动物学会所有

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

本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网;www.183read.com

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993

Volume 30, Number 2, April, 2022

CONTENTS

- Preparation of a mouse model of irritable bowel syndrome with diarrhea induced by acetic acid combined with restraint stress
CHENG Bin, HUANG Qin, WANG Junmeng, CHEN Wei, ZHANG Ruibin, DONG Longcong, WU Qiaofeng(153)
- Construction and evaluation of humanized immune system mouse model with human pancreatic cancer
..... *LUO Baohua, LIU Xiaoqiu, LEI Jingyu, ZHANG Caiqin, ZHANG Yongbin, SHI Changhong*(161)
- Protective effect of Dahuang Mudan Decoction on liver injury in rats with acute pancreatitis
SUN Yinfeng, YANG Dan, BAI Min, SONG Bing, KANG Wanrong, WANG Yongfeng, ZHANG Yanying(169)
- Establishment of chronic infection mouse model by LCMV-CL13 virus and analysis of BCR mutation
..... *LI Zhe, CAI Fangzhou, LI Dan, CHEN Qian, YUAN Yizhen, WANG Wei*(177)
- Establishment of endothelial conditional EMCN-knockout mouse model and comparative analysis of tumor lung metastasis *ZHANG Guoxin, GAO Ran*(185)
- Liensinine exerts anti-inflammatory and antioxidant effects by inhibiting nuclear factor- κ B and activating the nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2/heme oxygenase-1 pathway
... *ZHANG Ruihu, YAO Ru, SHI Zeya, GUO Min, HUO Yitong, HOU Jianan, CHEN Zhaoyang*(191)
- Study of the immunity-enhancing effect and mechanism of Chinese herbal compound extract
..... *WANG Tao, DAI Mingzhu, LI Yanchuan, PENG Yi, LI Chunqi*(198)
- Effects of curcumin and/or aerobic exercise on intestinal function in dyslipidemia rats
..... *WANG Li, JI Zhe, DONG Li, LU Xin, QIN Fei, HU Ge, ZHOU Haitao, CAO Jianmin*(208)
- Construction and preliminary evaluation of a mouse subcutaneous chimeric model of renal vascular unit based on isolation of kidney-derived cells from human urine
..... *JIANG Chao, WANG Chao, REN Xiaonan, ZHOU Xiaohui*(216)
- Biological characteristics of a tree shrew model infected with H1N1 influenza virus
..... *JIN Liangzi, WU Fangfang, DENG Wei, KUI Xiuying, HAN Yuanyuan, SUN Xiaomei, TONG Pinfen, LI Na, WANG Xijun, DAI Jiejie*(223)

Preparation and identification of human angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) BAC transgenic mouse model
ZHU Mengmin, LIU Lingling, NIU Bowen, PENG Xiuhua, CHEN Lixiang, QIN Boyin, YANG Hua, LI Feng(230)

Establishment of primary cell brain metastasis model of small cell lung cancer: a preliminary study
 *LYU Yueying, ZHAO Qingya, JIAO Ming, YANG Yuqin*(239)

Effect of compound microecological preparation on intestinal immune function in mice
 *BAI Peitian, PEI Ting, KONG Jiamei, YANG Fengqing, LI Tao, WANG Haidong, REN Yuhong*(245)

Effects of macrophage MED1 deficiency on blood glucose levels and insulin resistance in mice *GAO Jie,*
XIA Congcong, ZHANG Yali, YAO Leiqing, XI Yuyan, ZOU Yujia, WANG Ling, BAI Liang, LIU Enqi(253)

Advances in research into animal experimental models of tendinopathy
 *LI Dijun, WANG Guishan, LIU Haifeng, WANG Bin*(260)

Application and development of humanized mice for respiratory pathogen research
 *CHENG Chunyu, DUAN Xiang, LI Yan*(267)

Research progress of neural stem cell transplantation in neurodegenerative diseases
GUO Wenwen, ZHAO Ya, BAI Min, ZHANG Yanying, WANG Yinghua, WANG Yongfeng, SHI Changhong(274)

Progress of animal models of functional dyspepsia
 *TAO Ruizhi, GU Renjun, XIA Yawen, HAN Hongkuan, LU Keqin, LU Yin, SUN Guangzhi*(283)

Evolution of animal models of high altitude pulmonary edema
 *XIANG Xuemei, GUO Xin, ZENG Jiarong, LIU Beiyu, ZHANG Yaolei, SUN Hongyu*(291)

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://zggydw.cnjournals.com/sydwbyjyx/ch/index.aspx>

CSSN

ISSN 1005-4847
 CN 11-2986/Q

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

程斌,黄琴,王军蒙,等. 乙酸联合束缚应激诱导腹泻型肠易激综合征小鼠模型的制备 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 153-160.

Cheng B, Huang Q, Wang JM, et al. Preparation of a mouse model of irritable bowel syndrome with diarrhea induced by acetic acid combined with restraint stress [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 153-160.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.001

乙酸联合束缚应激诱导腹泻型肠易激综合征小鼠模型的制备

程斌,黄琴,王军蒙,陈伟,张瑞斌,董龙聪,吴巧凤*

(成都中医药大学针灸推拿学院,成都 610075)

【摘要】 目的 采用3%乙酸(acetic acid, AA)直肠灌注联合束缚应激的方法制备腹泻型肠易激综合征(irritable bowel syndrome with diarrhea, IBS-D)小鼠模型,并评价模型的可行性。**方法** 雄性C57BL/6J小鼠45只,均分为健康对照组(C组)、3%乙酸组(A组)、3%乙酸+束缚组(A+R组)。比较各组小鼠干预前后体重变化和存活情况,以及干预后粪便含水量、全肠道转运时间、内脏痛阈值,比较两种造模方法的优劣。观察C组和A+R组的结肠病理形态的变化,采用FD4渗透实验评价小鼠肠道粘膜完整性,ELISA法检测血清5-HT和TNF- α 的含量,免疫组化法检测结肠组织中5-HTR3A的表达,明确该造模方法的病理变化特征。**结果** 与C组相比,A+R组的内脏痛阈值、粪便含水量显著升高($P < 0.001$);全肠道转运时间明显缩短($P < 0.05$),而A组内脏痛阈值和粪便含水量虽然也明显降低($P < 0.05$),但全肠道转运时间仅有变化的趋势,无显著性差异($P > 0.05$)。A+R组血浆中FD4含量显著增加($P < 0.001$),血清中5-HT和TNF- α 含量明显增加($P < 0.05$),结肠组织中5-HTR3A表达量也显著增加($P < 0.001$)。**结论** 与3%乙酸灌肠相比,3%乙酸灌肠联合束缚应激的方式能较好地模拟IBS-D患者的肠道局部相关症状,并能模拟相关的病理改变。

【关键词】 腹泻型肠易激综合征;乙酸;束缚应激;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)02-0153-08

Preparation of a mouse model of irritable bowel syndrome with diarrhea induced by acetic acid combined with restraint stress

CHENG Bin, HUANG Qin, WANG Junmeng, CHEN Wei, ZHANG Ruibin, DONG Longcong, WU Qiaofeng*

(Acupuncture and Moxibustion College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Corresponding author: WU Qiaofeng. E-mail: wuqiaofeng@cdutcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To prepare an irritable bowel syndrome with diarrhea (IBS-D) mouse model by rectal perfusion with acetic acid combined with restraint stress, and to evaluate the feasibility of the model. **Methods** Forty-five male C57BL/6J mice were divided into a healthy control group (Group C), 3% acetic acid group (Group A), and 3% acetic acid combined with restraint stress group (Group A+R). The body weights and survival rates of the groups were compared before and after intervention, and the fecal water content, total intestinal transport time, and colonic pain threshold of each group were compared after intervention. The advantages and disadvantages of the two modeling method were then assessed. Pathological changes to the colons in Group C and Group A+R were observed. Fluorescein isothiocyanate-dextran 4 (FD4) was used to evaluate the integrity of the intestinal mucosa of mice in Group C, and the

【基金项目】 国家自然科学基金(81873383),国家重点研发计划(2019YFC1709001)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81873383), National Key Research and Development Program(2019YFC1709001).

【作者简介】 程斌(1994—),男,在读硕士研究生,研究方向:针灸调整神经-内分泌-免疫机制的研究。Email:1029799228@qq.com

【通信作者】 吴巧凤(1977—),女,研究员,研究方向:针灸与内稳态调节。Email:wuqiaofeng@cdutcm.edu.cn

model with the best success rate was determined. To clarify the pathological characteristics of this modeling method, the serum contents of 5-HT and TNF- α were determined by ELISA, and the expression of 5-HTR3A in colon tissue was detected with immunohistochemistry. **Results** Compared with Group C, Group A+R had a significantly increased colonic pain threshold and fecal water content ($P < 0.001$). The total intestinal transport time was significantly shortened ($P < 0.05$), and the colonic pain threshold and fecal water content were significantly decreased in Group A ($P < 0.005$); however, there was no significant difference in intestinal transport time between the groups ($P > 0.05$). Compared with Group C, Group A+C showed a significant increase in the content of plasma FD4 and serum 5-HT and TNF- α and the expression of 5-HTR3A in colon tissues ($P < 0.05$). **Conclusions** Compared with 3% acetic acid, treatment with 3% acetic acid combined with restraint stress more convincingly simulated the local intestinal symptoms and related pathological changes seen in IBS-D patients.

【Keywords】 irritable bowel syndrome with diarrheal; acetic acid; restraint stress; mouse

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

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹痛或腹部不适并伴有排便异常为主的肠功能紊乱性疾病,根据罗马IV诊断标准,该病共分为四型,其中腹泻型肠易激综合征最为常见,主要表现为腹痛、腹泻以及肠道动力紊乱^[1]。其相关动物模型的研究与制备也较多,主要包括束缚应激刺激法、番泻叶灌胃、理化因素刺激法、母婴分离法、基因敲除法以及多种方式联合刺激等方法^[2]。而乙酸刺激法因操作简单,成模周期短,被较多用于IBS-D模型的研究。但是,既往研究大多采用大鼠构建模型,相关的小鼠造模方法仍不成熟,而众所周知,小鼠饲养方便、操作方便、繁殖速度快,因此,构建IBS-D小鼠模型将进一步推进相关科研实验的进度,并方便后期开展基因敲除等实验。因此,本研究借鉴乙酸诱导IBS-D大鼠模型,开展适宜浓度乙酸诱导腹泻型肠易激综合征小鼠模型的制备。前期经过不同浓度乙酸以及不同灌注次数探索发现,小鼠直肠多次灌注较低浓度乙酸是一种很有潜力的建模方法,但肠道局部症状不容易稳定。考虑到心理应激等因素是肠易激综合征的高风险因素^[3],以及有乙酸联合束缚应激的相关报道^[4]。因此,本实验通过比较3%乙酸经直肠灌注和3%乙酸经直肠灌注联合束缚应激两种造模方法探讨构建IBS-D小鼠模型的较优方式,以期为后期相关的实验研究奠定模型基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用45只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性C57BL/6J小鼠,9~12周龄,体重(26 ± 2)g,由成都药康生物科技有限公司【SCXK

(川)2020-034】提供,动物在成都中医药大学SPF级实验动物中心【SYXK(川)2019-049】饲养,昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在22~26℃,相对湿度55%~65%,光暗周期12h/12h。所有操作均符合成都中医药大学实验伦理学要求(备案号:2019-04)。

1.1.2 主要试剂与仪器

Fluorescein isothiocyanate-dextran 4(FD4, 平均分子量:3000~5000, Sigma, BCCC8276)、5-HT酶联免疫试剂盒(elabscience, E-EL-0033c)、TNF- α 酶联免疫试剂盒(elabscience, E-EL-M0049c)、Anti-5-HTR3A(Affinity, DF134415)。

小鼠麻醉机(RWD life science, 中国)、恒温箱(中兴, 中国)、千分位天平(赛多利斯, 中国)、离心机(湘仪, 中国)、HS6病理切片扫描影像分析系统(舜宇, 中国)等。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

选用45只健康雄性小鼠适应性饲养7d,按体重随机分为健康对照组(C组)、模型组(3%乙酸组(A组)、3%乙酸联合束缚应激组(A+R组)),其中C组小鼠正常饮食,不予任何处理,模型组小鼠给予3%乙酸溶液($\geq 99\%$ 乙酸与生理盐水体积比为3:97)灌肠。具体操作为:在异氟烷吸入麻醉状态下,在距肛门3~4cm的结肠中注入(200 ± 20) μ L的3%乙酸溶液,用手指夹住肛门附近皮肤组织,使肛门处于闭合状态,持续10s,然后注入(200 ± 20) μ L的生理盐水冲洗,将小鼠悬空,直到小鼠苏醒,3d后再重复1次。期间对A+R组小鼠进行3次束缚应激,每次1h, A组小鼠不予束缚应激;模型构建时间为8d,具体干预如图1。

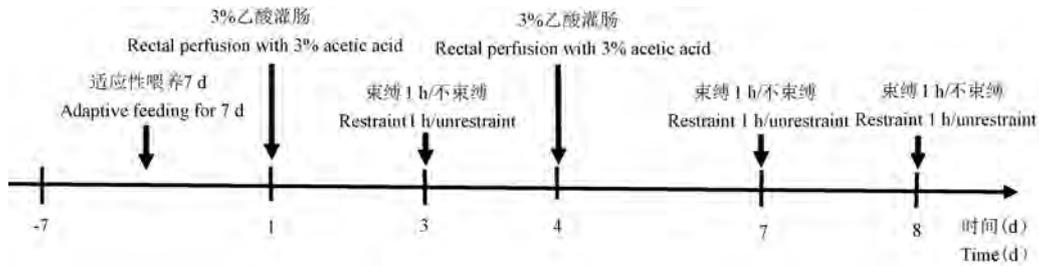


图 1 模型的构建方法

Figure 1 Model construction method

1.2.2 观察指标及取材

(1) 一般情况: 观察小鼠毛发和日常活动, 每日称重, 计算各组小鼠的体重变化百分数 [(当前的体重×100)/造模前体重]。并记录整个造模周期内各组小鼠的存活情况。

(2) 粪便含水量和全肠道转运时间: 造模结束后第 2 天, 观察并测量各组小鼠的粪便含水量 (fecal water content, FWC) 和全肠道转运时间 (total intestinal transport time)^[5]。评估前所有小鼠禁食不禁水 12 h, 按每只 0.2 mL 的容量经口灌入 3% 苯酚红混悬液。记录 4 h 内小鼠灌胃到首粒红便排出的时间。期间观测各组小鼠的粪便性状, 并收集小鼠 2 h 内的粪便, 200℃ 恒温箱烘烤 30 min, 计算烘烤前后大便重量变化, 计算粪便含水量。

(3) 内脏高敏感性: 造模结束后第 3 天, 对每组小鼠进行结肠扩张 (colorectal distention, CRD) 刺激, 并使用腹壁撤退反射 (abdominal withdrawal reflex, AWR) 评分^[6] 进行内脏痛阈值评价, 以 3 分 (结肠扩张时腹部肌肉收缩, 腹肌抬离桌面) 作为内脏痛阈值评估小鼠的内脏敏感性^[7], 并记录注入水的体积, 每只小鼠重复测量 3 次, 每次间隔 5 min, 取 3 次的平均值作为小鼠的内脏痛阈值。AWR 评分

标准 (见表 1)。

(4) 样本采集: 在造模第 4 天采用异氟烷吸入麻醉方法取血, 离心 (4000 rpm, 10 min, 4℃) 获得血清, -80℃ 保存备用, 并剪取小鼠肛门上 1 cm 到盲肠端的结肠组织, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 常规切片。造模结束后第 5 天, 将小鼠禁食 4 h 后, 称取各小鼠的体重, 以灌胃的方式给予每只小鼠 600 mg/kg 的 FD4 溶液 (1×PBS 配制, 浓度为 75 mg/mL, 避光保存), 2 h 后对小鼠行取血, 将所取的血置于 1.5 mL 棕色 Tube 管中, 并以 50 U/mL 的比例加入 1% 的肝素钠, 混匀后室温静置 30 min 后, 通过低温离心机 (12 000 rpm, 10 min, 4℃) 离心获取小鼠血浆^[8-9], 于 -80℃ 冰箱避光保存。

1.2.3 结肠粘膜组织 HE 染色评分和结肠粘膜屏障完整性评价

结肠组织切片, 采用苏木精-伊红染色法染色, 并在光镜下观察结肠组织的组织形态及结构。血浆样品解冻后, 检测血浆样本中 FD4 的含量。

1.2.4 血清 5-HT 和 TNF-α 含量

将置于 -80℃ 保存的血清取出, 严格按照 ELISA 说明书要求检测血清样本中 5-HT 和 TNF-α 的含量。

表 1 AWR 评分标准

Table 1 AWR scoring criteria

得分 Score	评分标准 Standard for evaluation
1 分 One score	结肠扩张时身体静止不动, 头部运动减少 When the colon dilates, the body stays still and the head moves less
2 分 Two score	结肠扩张时腹部肌肉收缩, 但腹肌未抬离桌面 When the colon dilates, the abdominal muscles contract but do not lift off the table
3 分 Three score	结肠扩张时腹部肌肉收缩, 腹肌抬离桌面 When the colon dilates, the abdominal muscles contract and lift off the table
4 分 Four score	结肠扩张时骨盆抬起, 身体呈弓形, 会阴部离开地面 When the colon expands, the pelvis is raised, the body is arched, and the perineum is lifted off the ground

1.2.5 免疫组化检测结肠中 5-HTR3A 含量

结肠组织石蜡切片经脱蜡复水、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭以后,分别加入 5-HTR3A 抗体 4℃ 孵育过夜,清洗后加入羊抗兔二抗室温孵育 50 min、清洗后 DAB 显色、复染细胞核、脱水封片,通过 HS6 全扫仪器采集图像,并通过 Image pro plus 6.0 软件分析。

1.3 统计学分析

结果用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有数据均用 SPSS 24.0 和 Image pro plus 6.0 以及 Graph Pad Prism 8 软件进行统计分析并绘制统计图,两样本均数比较采用单样本 t 检验,多个样本均数间比较采用单因素方差分析,体重变化百分数组间比较采用重复测量方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

通过体重的变化百分数来反映小鼠应激后的恢复情况,在小鼠第 1 次乙酸灌肠后,体重明显下降,但第 3 天后恢复到造模前体重水平;第 2 次乙酸灌肠后,体重下降百分数与第 1 次乙酸灌肠后相当,但其体重的回升速度变慢。在整个模型构建期间,与 C 组相比,A 组与 A+R 组小鼠体重均未见明显增长,其中 A 组小鼠的体重回升更明显(见图 2A)。期间模型组小鼠的活动均变少,毛发稍显无光泽。在实验过程中,C 组未发生死亡现象,A 组和 A+R 组均存在小鼠死亡的情况,死亡率分别为 6.7% 和 13.3%(见图 2B)。

2.2 粪便含水量和全肠道转运时间

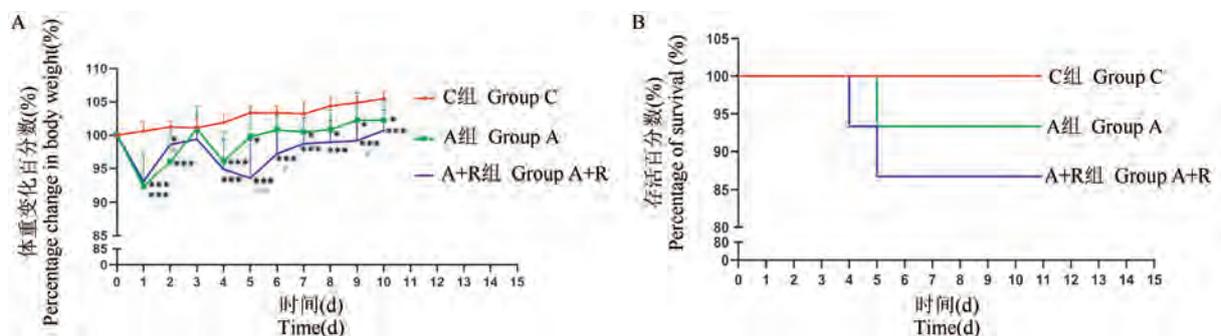
粪便含水量作为反映小鼠的腹泻情况以及肠道通透性的客观指标。结果如图 3A 所示,与 C 组小鼠的粪便含水百分数 ($43.53\% \pm 6.61\%$) 相比,A 组小鼠粪便含水百分数 ($48.86\% \pm 2.18\%$) 存在明显差异 ($P < 0.05$),A+R 组小鼠的粪便含水百分数 ($57.45\% \pm 6.19\%$) 存在显著性差异 ($P < 0.001$),并且 A 组与 A+R 组相比也存在显著性差异 ($P < 0.001$)。通过观察各组小鼠的全肠道转运时间和 4 h 内红便排出百分数来反映各组小鼠的肠道动力情况,结果如图 3B 和图 3C 所示,与 C 组的全肠道转运时间 (172.97 ± 51.27) min 相比 A+R 组的全肠道转运时间 (130.41 ± 25.37) min 明显缩短 ($P < 0.05$)。而 A 组全肠道转运时间 (140.62 ± 45.48) min 虽然缩短,但与 C 组相比未见明显差异 ($P > 0.05$),并且 A+R 组 4 h 内红便排出百分数明显增加。

2.3 内脏敏感性

通过统计注入水的体积来测量小鼠的内脏敏感性,A 组小鼠的注水量 (0.10 ± 0.02) mL 与 A+R 组小鼠的注水量 (0.08 ± 0.02) mL 均较 C 组小鼠的注水量 (0.13 ± 0.02) mL 明显降低 ($P < 0.001$),且两组间存在明显差异 ($P < 0.05$) (见图 4)。

2.4 结肠粘膜组织 HE 染色和结肠粘膜屏障完整性

A+R 组和 C 组小鼠结肠组织壁光滑无充血水肿,肠道组织与周围器官均无明显粘连,HE 染色显示,A+R 组小鼠结肠组织中的细胞排列稍显紊乱,炎性细胞无明显增加(见图 5A)。在对结肠粘膜

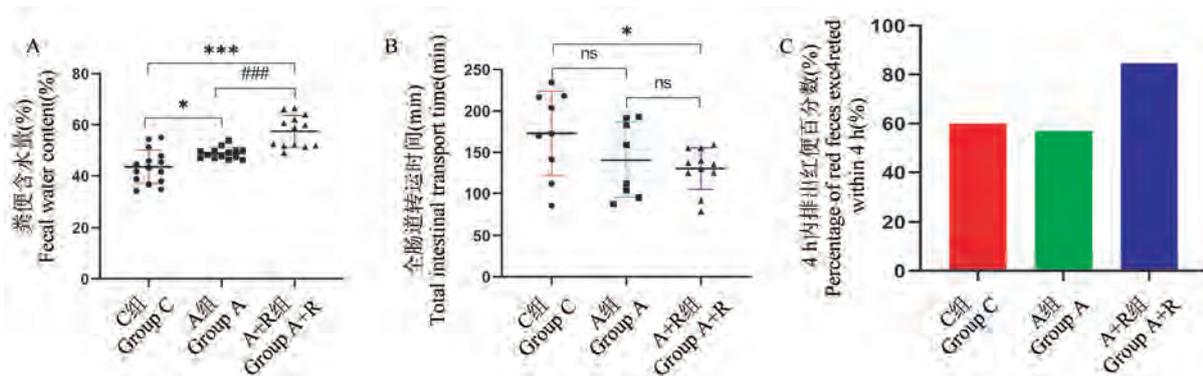


注:A:C组($n = 15$),A组($n = 14$),A+R组($n = 13$);与C组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;与A组相比,# $P < 0.05$,### $P < 0.001$ 。

图 2 不同组别小鼠的体重变化及存活情况的比较

Note. A. Group C ($n = 15$), Group A ($n = 14$), Group A+R ($n = 13$). Compared with the group C, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with the group A, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$.

Figure 2 Comparison of body weight change and survival of mice in different groups



注:与 C 组相比, ^{ns} $P > 0.05$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;与 A 组相比, ^{ns} $P > 0.05$, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ 。(下同)

图 3 不同组别小鼠的粪便含水量、全肠道转运时间及 4 h 内红色粪便排出百分数的比较

Note: Compared with the Group C, ^{ns} $P > 0.05$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with the Group A, ^{ns} $P > 0.05$, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 3 Comparison of fecal water content, total intestinal transport time and percentage of red fecal excretion within 4 h in different groups of mice

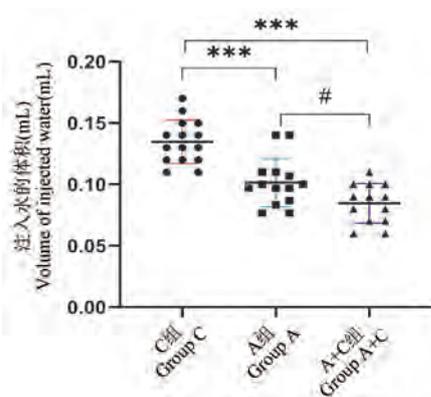


图 4 注入水的体积(内脏痛阈值)

Figure 4 Volume of injected water (visceral pain threshold)

屏障的完整性(肠道通透性)的测量中发现,与 C 组血浆中 FD4 的含量(0.58 ± 0.23) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相比, A+

R 组小鼠血浆中 FD4 的含量(1.85 ± 0.42) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 升高($P < 0.001$)(见图 5B)。

2.5 血清中 5-HT 和 TNF- α 的含量

5-HT 被认为是参与 IBS-D 发病的重要的胃肠激素之一,与肠道动力显著相关,而血清中 TNF- α 作为反映 IBS-D 小鼠全身炎症状态的指标之一。在对 C 组小鼠和 A+R 组小鼠血清中 5-HT 和 TNF- α 含量的检测中,发现 A+R 组血清中 5-HT 含量(229.70 ± 15.76) ng/mL 相对于 C 组血清中的 5-HT 含量(173.74 ± 8.11) ng/mL 显著增加($P < 0.001$)(见图 6A);而 A+R 组血清中 TNF- α 的含量(59.31 ± 3.82) pg/mL 与 C 组血清中 TNF- α 的含量(52.78 ± 3.28) pg/mL 相比有显著性差异($P < 0.05$)(见图 6B)。

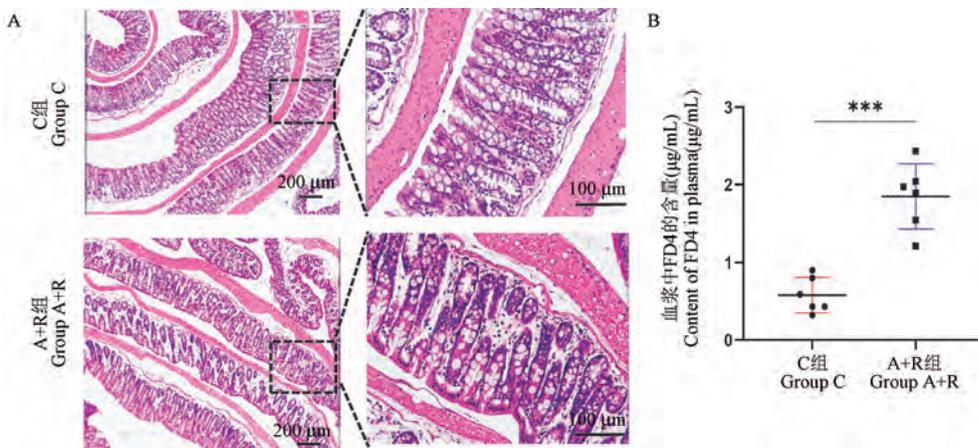


图 5 结肠 HE 染色结果及血浆中 FD4 的含量

Figure 5 HE staining of colon and the content of FD4 in plasma

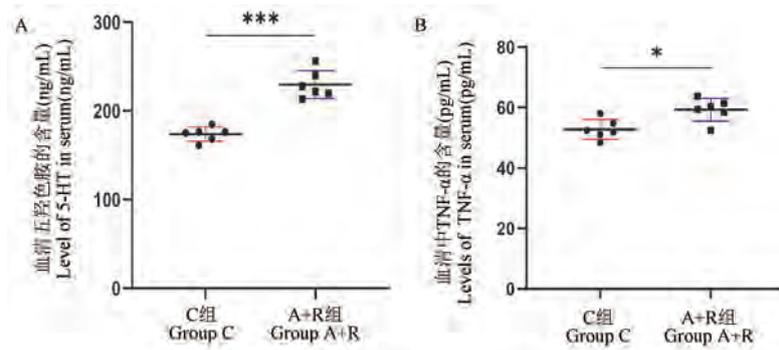


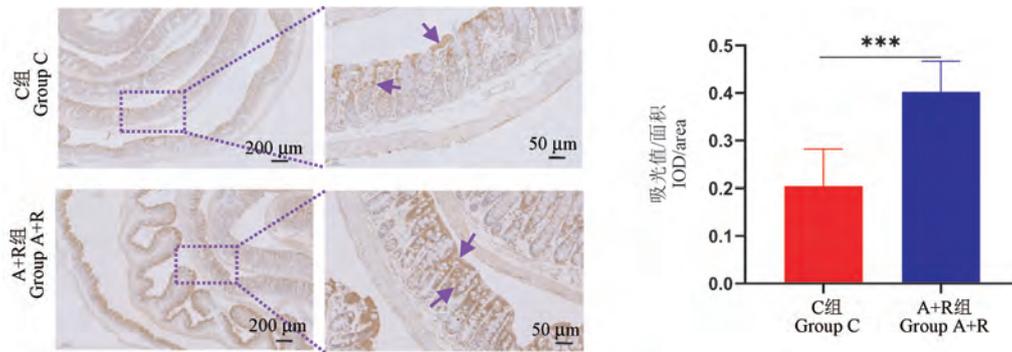
图 6 血清中 5-HT 和 TNF- α 的含量

Figure 6 Level of 5-HT and TNF- α in serum

2.6 结肠组织中 5-HTR3A 的表达情况

5-HTR3A 作为 5-HT₃ 受体亚型,与肠道高敏感的形成密切相关。通过免疫组化测定结肠组织中

5-HTR3A 的表达量 (IOD 值),观察到 A+R 组结肠组织中 5-HTR3A 的表达量显著增加 ($P < 0.001$) (见图 7)。



注:“→”;5-HTR3A 表达的位置。

图 7 5-HTR3A 在结肠组织中的表达量

Note. “→”. The site of 5-HTR3A expression.

Figure 7 Expression of 5-HTR3A in colon tissue

3 讨论

IBS-D 的病因及具体的病理生理机制尚不清楚,症状由多种机制共同作用导致,目前认为 IBS-D 主要是肠道通透性增加、内脏的敏感性增高、胃肠运动障碍、肠-脑轴调节异常、肠道感染、肠道菌群失调、饮食及心理社会等因素共同作用的结果,并伴有低度炎症^[10]。关于 IBS-D 造模方法的研究与制备也较多,主要包括束缚应激刺激法、番泻叶灌胃、理化因素刺激、母婴分离法以及多种方式联合刺激等方法诱导 IBS-D 模型,虽然这些造模方法各有优点,但因造模周期长、造模成本高以及需要投入大量的精力,故在模型的制备上存在一定的局限性。而乙酸刺激作为一种常见的理化刺激方法,因操作简单,成模周期短,被较多用于 IBS-D 模型的制备与疾病研究。

目前 IBS-D 动物模型主要围绕肠道动力、内肠

敏感性、肠道通透性等相关的病理生理改变来验证模型的建立是否成功^[5,11-13]。研究发现,乙酸灌肠能诱导肠道高敏感,而且在结肠运动以及肠道通透性方面也有改变^[14]。本研究观察到 A+R 组的全肠道转运时间明显减少,内脏敏感性显著增加,模型小鼠均出现大便质稀,甚者为水样便。随着时间延长,小鼠的水样便以及稀便率降低,且在造模结束后第 2 天,粪便含水量仍高于 C 组,而 A 组小鼠除了内脏敏感性增加和粪便含水量升高外,其全肠道转运时间在造模结束后均未发生明显变化。而与以往乙酸诱导 IBS-D 模型的研究类似^[15],本研究也存在小鼠死亡的现象,分析原因可能是小鼠肠道脆弱,乙酸刺激过强,并且此实验为体内刺激,导致部分小鼠不耐受而死亡。这一点在造模期间各组小鼠的体重变化中也有部分反映,在直肠灌注乙酸后小鼠的体重显著下降,但随后迅速恢复,表明小鼠的恢复能力较强,这也间接说明了为什么结肠 HE

染色未见明显炎性细胞浸润,但与 A 组比较, A+R 组小鼠体重恢复更缓慢,并不会明显增加小鼠的死亡率。以往研究发现胃肠炎患者康复后约有 10% 的患者会发展成 IBS-D,并长期伴有腹痛、腹泻等症状^[16],而在患胃肠炎症期间,心理因素会增加胃肠炎患者康复后患肠易激综合征的风险^[3]。在肠道疾病相关的动物实验中也发现束缚应激可以加重疾病的相关症状及病理改变^[17]。因此, A+R 组小鼠能成功诱导 IBS-D 肠道相关症状,可能与胃肠急性炎症期间的应激反应有关。

与 C 组相比, A+R 组小鼠血浆中 FD4 的含量明显增加,表明小鼠结肠组织的肠道通透性增加,其结肠粘膜屏障功能受损。而肠上皮结构的完整性受损被认为是 IBS-D 发生腹泻的重要因素之一^[18-19]。此外, 3% 乙酸联合束缚应激诱导的 IBS-D 模型小鼠结肠组织中的炎性细胞与健康对照组相比无明显增加,也未发现明显的炎性细胞聚集/浸润现象,但血清中 TNF- α 存在明显差异。这与临床 IBS-D 患者的相关表现类似,有报道发现,与健康受试者相比, IBS-D 患者结肠组织无明显病理改变,但血清中多种炎症细胞因子发生了变化,其中 TNF- α 变化最为明显^[20]。

5-HT 被认为是参与 IBS-D 发病的重要的胃肠激素之一。有研究认为在 IBS-D 患者以及动物模型中,血清中 5-HT 的含量均有所增加^[21-22]。大鼠腹腔注射 5-HT 能显著加快肠道内容物的排出时间,甚至导致腹泻^[23]。而 5-HT 可与肠道中的 5-HT 相关受体结合对肠道敏感、肠道吸收和分泌以及肠道动力产生直接或间接的影响,从而导致腹痛、腹泻以及肠道动力的改变。其中 5-HT₃ 受体与 IBS-D 的发病机制密切相关,在肠道感觉功能中发挥着重要作用^[24]。5-HTR3A 作为 5-HT₃ 受体的亚型之一,在关于 5-HT₃ 受体功能性的研究中,发现其余的 5-HT₃ 受体亚型与 5-HTR3A 受体共同表达时才能形成功能性异聚体,发挥相应的作用^[25]。因此,本实验观察到血清中 5-HT 变化以及结肠组织中 5-HTR3A 含量增加,结果发现其与临床 IBS-D 相关报道一致。

综上所述,我们认为, 3% 乙酸联合束缚应激的方式能够较好的模拟 IBS-D 肠道局部相关症状,并改变血清中 5-HT 和 TNF- α 的含量以及肠道 5-HTR3A 的表达,与临床 IBS-D 表现相符,是一种具有较好推广价值的 IBS-D 小鼠模型制备方法。

参 考 文 献 (References)

- [1] Oka P, Parr H, Barberio B, et al. Global prevalence of irritable bowel syndrome according to Rome III or IV criteria: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(10): 908-917.
- [2] 张薇, 郑倩华, 蒋一璐, 等. 肠易激综合征内脏高敏动物模型的研究现状 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(11): 5655-5658.
Zhang W, Zheng QH, Jiang YL, et al. Research status on animal models of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(11): 5655-5658.
- [3] Wouters MM, Van Wanrooy S, Nguyen A, et al. Psychological comorbidity increases the risk for postinfectious IBS partly by enhanced susceptibility to develop infectious gastroenteritis [J]. *Gut*, 2016, 65(8): 1279-1288.
- [4] 安钰, 白殿卿, 付健, 等. 乙酸灌肠加束缚应激致大鼠肠易激综合征模型的建立及其评价 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(15): 1548-1551.
An Y, Bai DQ, Fu J, et al. Establishment and evaluation of a rat model of IBS model induced by intracolonic instillation of acetic acid and restraint stress [J]. *World Chin J Dig*, 2009, 17(15): 1548-1551.
- [5] Zhang Y, Zhang H, Zhang W, et al. LncRNA XIST modulates 5-hydroxytryptan-induced visceral hypersensitivity by epigenetic silencing of the SERT gene in mice with diarrhea-predominant IBS [J]. *Cell Signal*, 2020, 73: 109674.
- [6] Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [7] 陈颖, 赵妍, 罗丹妮, 等. 腹壁撤退反射实验测量方法概述 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(8): 89-93.
Chen Y, Zhao Y, Luo DN, et al. A summary of measurement methods for abdominal withdrawal reflex text [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(8): 89-93.
- [8] Woting A, Blaut M. Small intestinal permeability and gut-transit time determined with low and high molecular weight fluorescein isothiocyanate-dextran in C3H mice [J]. *Nutrients*, 2018, 10(6): 685.
- [9] Volynets V, Reichold A, Bardos G, et al. Assessment of the intestinal barrier with five different permeability tests in healthy C57BL/6J and BALB/cJ mice [J]. *Dig Dis Sci*, 2016, 61(3): 737-746.
- [10] 李海龙, 任维, 李彦敏, 等. 肠易激综合征相关致病因素及发病机制研究进展 [J]. *医学与哲学(B)*, 2017, 38(2): 73-76.
Li HL, Ren W, Li YM, et al. Research progress in the pathogenesis of irritable bowel syndrome [J]. *Med Philos*, 2017, 38(2): 73-76.
- [11] Tsang SW, Auyeung KK, Bian ZX, et al. Pathogenesis,

- experimental models and contemporary pharmacotherapy of irritable bowel syndrome; story about the brain-gut axis [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14(8): 842-856.
- [12] Lin MJ, Yu BP. Role of high-affinity choline transporter 1 in colonic hypermotility in a rat model of irritable bowel syndrome [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2018, 24(4): 643-655.
- [13] Jin Y, Ren X, Li G, et al. Beneficial effects of Rifaximin in post-infectious irritable bowel syndrome mouse model beyond gut microbiota [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 33(2): 443-452.
- [14] 旺建伟, 胥风华, 殷越, 等. 痛泻要方对多因素复制肠易激综合征大鼠作用的方证相关研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(2): 553-559.
- Wang JW, Xu FH, Yin Y, et al. Effect of Tongxie Yaofang on multi-factor-induced rat model of irritable bowel syndrome on the theory of correlation between formula and syndrome [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2017, 32(2): 553-559.
- [15] 张北华, 王微, 王风云, 等. 腹泻型肠易激综合征大鼠模型不同造模方法的比较研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(5): 1092-1095.
- Zhang BH, Wang W, Wang FY, et al. Research of different modeling methods of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2018, 36(5): 1092-1095.
- [16] Thabane M, Kottachchi DT, Marshall JK. Systematic review and meta-analysis: The incidence and prognosis of post-infectious irritable bowel syndrome [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007, 26(4): 535-544.
- [17] 张淑芳, 吴小平, 卢放根. 慢性应激对小鼠溃疡性结肠炎的影响 [J]. *国际消化病杂志*, 2008, 28(6): 520-523.
- Zhang SF, Wu XP, Lu FG. A study of the effects of chronic stress on ulcerative colitis in mice [J]. *Int J Dig Dis*, 2008, 28(6): 520-523.
- [18] Piche T. Tight junctions and IBS-the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation? [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2014, 26(3): 296-302.
- [19] Zhou Q, Verne ML, Fields JZ, et al. Randomised placebo-controlled trial of dietary glutamine supplements for postinfectious irritable bowel syndrome [J]. *Gut*, 2019, 68(6): 996-1002.
- [20] 张茹, 王福贤. 肠易激综合征患者 IL-8 和 TNF- α 含量变化的意义 [J]. *临床消化病杂志*, 2004, 16(4): 167-168.
- Zhang R, Wang FX. The role of IL-8 and TNF- α in the pathogenesis of irritable bowel syndrome [J]. *Chin J Clin Gastroenterol*, 2004, 16(4): 167-168.
- [21] 张川, 李定国, 王彝康, 等. 肠易激综合征患者 5-羟色胺含量的变化 [J]. *上海第二医科大学学报*, 2001, 21(1): 66-68.
- Zhang C, Li DG, Wang YK, et al. The alteration of 5-Hydroxytryptamine content in the patients with irritable bowel syndrome [J]. *Acta Univ Med Secondae Shanghai*, 2001, 21(1): 66-68.
- [22] 杜丽东, 吴国泰, 刘峰林, 等. 肠易激综合征大鼠模型的复制与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(6): 43-48.
- Du LD, Wu GT, Liu FL, et al. Replication and evaluation of a rat model of irritable bowel syndrome [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2014, 22(6): 43-48.
- [23] Oosterbosch L, von der Ohe M, Valdovinos MA, et al. Effects of serotonin on rat ileocolonic transit and fluid transfer *in vivo*: possible mechanisms of action [J]. *Gut*, 1993, 34(6): 794-798.
- [24] Garsed K, Chernova J, Hastings M, et al. A randomised trial of ondansetron for the treatment of irritable bowel syndrome with diarrhoea [J]. *Gut*, 2014, 63(10): 1617-1625.
- [25] Niesler B, Walstab J, Combrink S, et al. Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT3C, 5-HT3D, and 5-HT3E [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 72(1): 8-17.

[收稿日期] 2021-10-09

罗宝花, 刘晓秋, 雷静玉, 等. 胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型的构建及评估 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 161-168.
Luo BH, Liu XQ, Lei JY, et al. Construction and evaluation of humanized immune system mouse model with human pancreatic cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 161-168.
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.002

胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型的构建及评估

罗宝花^{1,2}, 刘晓秋¹, 雷静玉², 张彩勤², 张永斌^{3*}, 师长宏^{2*}

(1. 广州中医药大学科技创新中心, 广州 510405; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 3. 广州中医药大学实验动物中心, 广州 510405)

【摘要】 目的 构建并评估胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型, 以为胰腺癌的免疫治疗研究提供理想的临床前模型。方法 应用 Ficoll 密度梯度离心法, 从健康人外周血中分离出新鲜的单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 经尾静脉注射植入重度联合免疫缺陷小鼠 NCG 体内, 以构建免疫系统人源化小鼠模型, 随后在小鼠皮下植入人胰腺癌细胞系 Asp1, 并定期监测肿瘤生长情况, 在 PBMC 植入后第 3 周, 应用断尾法采集小鼠外周血进行流式分析, 检测人 CD45⁺ 细胞的水平, 当肿瘤生长至 100 ~ 200 mm³ 时开始给予抗 PD-1 单抗治疗, 持续治疗 3 周后, 对小鼠施行安乐死并取材, 应用流式细胞术、免疫组化等方法分析胰腺癌免疫系统人源化小鼠外周血、脾、骨髓及肿瘤组织中免疫细胞的浸润及活化情况。结果 植入人 PBMC 3 周后, 在小鼠外周血、脾及骨髓中可检测到较高水平的人 CD45⁺ 细胞; 重建的人源免疫系统能够显著抑制人胰腺癌肿瘤的生长 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 并被人抗 PD-1 单抗活化, 促进肿瘤组织中细胞毒性 CD8⁺T 细胞浸润和 PD-L1 表达。结论 成功构建胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型, 其免疫系统能够对入抗 PD-1 单抗作出反应, 抑制肿瘤生长, 可作为一种理想的临床前动物模型用于胰腺癌免疫治疗研究。

【关键词】 免疫系统人源化; 免疫治疗; PBMC; 胰腺癌

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0161-08

Construction and evaluation of humanized immune system mouse model with human pancreatic cancer

LUO Baohua^{1,2}, LIU Xiaoqiu¹, LEI Jingyu², ZHANG Caiqin², ZHANG Yongbin^{3*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China.
2. Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032. 3. Laboratory Animal Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn; ZHANG Yongbin. E-mail: yongbinzhang@gzucm.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct a humanized-immune-system mouse model with human pancreatic cancer and evaluate its effectiveness in order to provide an ideal preclinical animal model for pancreatic cancer immunotherapy research. **Methods** Ficoll density gradient centrifugation was used to isolate fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy people. The cells were injected into the tail vein of severe combined immunodeficiency NOD/ShiJ-

【基金项目】 国家自然科学基金 (32070532), 军队实验动物专项课题 (SYDW[2021]001)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32070532), Special Project of Military Laboratory Animals (SYDW[2021]001).

【作者简介】 罗宝花 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药防治肿瘤及相关机制研究。Email: 2412190275@qq.com

【通信作者】 师长宏 (1973—), 男, 教授, 研究方向: 肿瘤模型的制备与评价。Email: changhong@fmmu.edu.cn;

张永斌 (1973—), 男, 正高级实验师, 研究方向: 动物模型研究。Email: yongbinzhang@gzucm.edu.cn。

* 共同通信作者

Prkdc em26Cd52 Il2rg em26Cd22 (NCG) mice to construct a model with a humanized immune system. We then subcutaneously implanted human pancreatic cancer Asp1 cells into the mice and regularly monitored tumor growth. Three weeks later, the peripheral blood of the reconstructed mice was collected for flow cytometric analysis to detect the levels of human CD45⁺ cells. When the tumors grew to 100 ~ 200 mm³, immunotherapy with human anti-PD-1 monoclonal antibody was started. After continuous treatment for 3 weeks, the mice were euthanized, and samples taken. Flow cytometry, immunohistochemistry, and other method were used to analyze the infiltration and activation of human immune cells in the peripheral blood, spleen, bone marrow, and tumor tissues of the humanized-immune-system mice with human pancreatic cancer. **Results** Three weeks after implantation of human PBMC, high levels of human CD45⁺ cells were detected in the peripheral blood, spleen, and bone marrow of the mice. The reconstructed humanized immune system inhibited the growth of human tumors ($P < 0.01$, $P < 0.001$) and was activated by human anti-PD-1 monoclonal antibody to promote cytotoxic CD8⁺ T cell infiltration and PD-L1 expression in the tumor tissues. **Conclusions** A humanized immune system mouse model with human pancreatic cancer was successfully constructed. The reconstructed humanized immune system responded well to human anti-PD-1 monoclonal antibodies and restrained the growth of human pancreatic tumor cells. Thus, this study has provided an ideal preclinical animal model of immunotherapy for pancreatic cancer.

【Keywords】 humanized immune system; immunotherapy; PBMC; pancreatic cancer

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

胰腺癌是一种恶性程度极高的肿瘤,其发病隐匿、进展迅速、预后极差,5 年生存率仅为 8.5%^[1-3]。临床数据显示,胰腺癌对放疗不敏感,对化疗易耐药,手术切除是目前治疗胰腺癌的主要手段^[4-6]。然而,多数患者在确诊时已存在局部血管的浸润或转移,术后的转移率和复发率很高,患者术后 5 年总生存率不超过 20% ~ 25%^[7-8]。因此,迫切需要寻找新的治疗策略来提高胰腺癌的治疗效果。

近年来,肿瘤免疫疗法和免疫检查点抑制剂的诞生给肿瘤治疗带来了革命性的变化,针对细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4, CTLA-4) 和程序性死亡蛋白 1/程序性死亡蛋白配体 1 (programmed death protein 1/programmed death protein ligand 1, PD-1/PD-L1) 的免疫检查点抑制剂在非小细胞肺癌、黑色素瘤、肾癌等恶性肿瘤的治疗中取得了卓越疗效^[9-11],显示了人体免疫系统在抗肿瘤方面的巨大潜力。目前针对胰腺癌开展的免疫疗法包括免疫检查点抑制剂、CAR-T 疗法、溶瘤病毒、肿瘤疫苗、免疫因子调节剂等,大部分免疫治疗的疗效评估都是临床研究^[12-15],周期较长,进程缓慢,少数的临床前研究也是在自发胰腺癌小鼠模型上进行^[16-18],由于存在种间差异,临床前研究结果与肿瘤患者实际临床特点的一致性较差,难以实现临床转化,因此,亟需找到一个合适的临床前动物模型来推动胰腺癌免疫治疗策略的开发。近年来,随着重度联合免疫缺陷小鼠的不断改良,具有人免疫系统的人源化小鼠

模型得以建立,通过将患者来源的肿瘤细胞系或肿瘤组织移植入免疫系统人源化小鼠体内构建的肿瘤免疫双人源化小鼠模型,可以极大程度地模拟患者体内肿瘤组织与免疫系统的相互作用,可能成为推动肿瘤免疫治疗策略临床前研究的理想工具。

本研究通过将人外周血单个核细胞和人胰腺癌细胞系 Asp1 同时植入重度联合免疫缺陷小鼠 NCG 体内以构建胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型并进行模型的有效性评估,以期后续开展的胰腺癌免疫治疗研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 5 ~ 6 周龄 SPF 级雌性重度联合免疫缺陷 NCG 小鼠,体重 22 ~ 25 g,购自江苏集萃药康生物科技有限公司【SCXK(苏)2018-0008】,饲养在空军军医大学实验动物中心 SPF 级屏障设施内【SYXK(陕)2017-001】。环境温度 23 ~ 25℃,相对湿度 40% ~ 60%,12 h 昼夜交替,小鼠笼盒、垫料、饲料及饮用水等经高温高压灭菌处理,动物自由摄食和饮水。相关动物实验获得空军军医大学实验动物福利及伦理委员会批准(审批号:20180512)。

1.1.2 细胞系

人胰腺癌细胞系 Asp1 细胞购买于 ATCC,使用 DMEM 培养基(10%胎牛血清+1%青链霉素)于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.1.3 主要试剂与仪器

4 份健康人新鲜外周血从西京医院输血科获取,获得医学伦理委员会批准(KY20193035),人淋巴细胞分离液、小鼠淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物科技发展有限公司),抗人 hCD45 流式抗体(BD, 555482),抗鼠 mCD45 流式抗体(BD, 553082),IHC 试剂盒(康为世纪有限公司),抗人 PD-L1 抗体(Abcam, ab205921),抗人 CD45 抗体(CST, 13917 S),抗人 CD8 抗体(proteintech, 66868-1-Ig),抗人 CD4 抗体(Abcam, ab133616),抗人颗粒酶 B 抗体(Abcam, ab208586),胎牛血清、DMEM 培养基、0.05%胰酶(Gibco);人抗 PD-1 单抗帕博利珠单抗(K 药)购自 MSD;荧光正置显微镜(奥林巴斯 BX43)用于免疫组织化学染色分析,FC500(Beckman Coulter)和 Flow Jo 软件用于流式细胞采集与数据分析。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

NCG 小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为未重建组(Aspc1)、重建不治疗组(Aspc1+PBMC)及重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K),共 3 组,每组 8 只,所有动物均饲养在 SPF 级屏障设施内。

1.2.2 PBMC 的分离纯化

应用 Ficoll 密度梯度离心法 1750 rpm, 20℃, 20 min 获取第 2 层环状乳白色淋巴细胞层,即 PBMC,加入 3 ~ 5 倍体积的红细胞裂解液,4℃裂解 5 min,随后加入 3 ~ 5 倍体积 buffer 重悬细胞,750 rpm, 4℃, 10 min 低速离心以去除血小板,重复 3 次,最后用 PBS 重悬细胞计算细胞数量和活率。

1.2.3 免疫系统人源化小鼠模型的构建

获取新鲜纯化的 PBMC 后,用 PBS 重悬为 5×10^7 /mL,并置于冰上,每只小鼠注射剂量为 1×10^7 ,经尾静脉注射植入 NCG 小鼠体内,构建免疫系统人源化小鼠模型。

1.2.4 流式细胞术分析小鼠外周血中人免疫细胞的重建水平

PBMC 植入后第 3 周用断尾法采集小鼠外周血,并用 Ficoll 密度梯度离心法分离出 PBMC 制成单个细胞悬液,同时标记流式抗人 hCD45 和抗鼠 mCD45 荧光抗体后,进行流式分析,评估小鼠外周血中人免疫细胞的重建水平。计算方法:hCD45/(hCD45+mCD45),应用 FlowJo 7.6.1 软件进行分析及绘图。

1.2.5 胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型的构建

PBMC 植入 NCG 小鼠体内后第 2 天,将处于对数生长期的 Aspc1 细胞经 0.05%的胰蛋白酶消化后,用无菌 PBS 缓冲液和 Matrigel 基质胶以 1:1 的比例将细胞重悬至 2×10^6 /200 μ L,经皮下植入小鼠体内,构建胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型。

1.2.6 肿瘤生长监测及 K 药治疗

在肿瘤细胞接种后,动态监测肿瘤生长情况,每周 2 次监测肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线,肿瘤体积计算方法: $V(\text{mm}^3) = \text{长}(\text{mm}) \times \text{宽}^2(\text{mm}^2)/2$,当肿瘤生长至 100 ~ 200 mm^3 时,重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)开始给予 K 药治疗,经腹腔注射,每周 2 次,每次剂量为 10 mg/kg,持续治疗 3 周,未重建组(Aspc1)及重建不治疗组(Aspc1+PBMC)给予等剂量生理盐水。

1.2.7 免疫浸润情况分析

治疗 3 周结束后,终止实验,对荷瘤小鼠采用吸入 CO₂ 安乐死,收集各组小鼠肿瘤组织、脾及骨髓,固定于 4%多聚甲醛溶液中,石蜡包埋后做组织切片,进行免疫组织化学染色或免疫荧光染色,显微镜下观察染色结果并拍照,应用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行半定量分析。

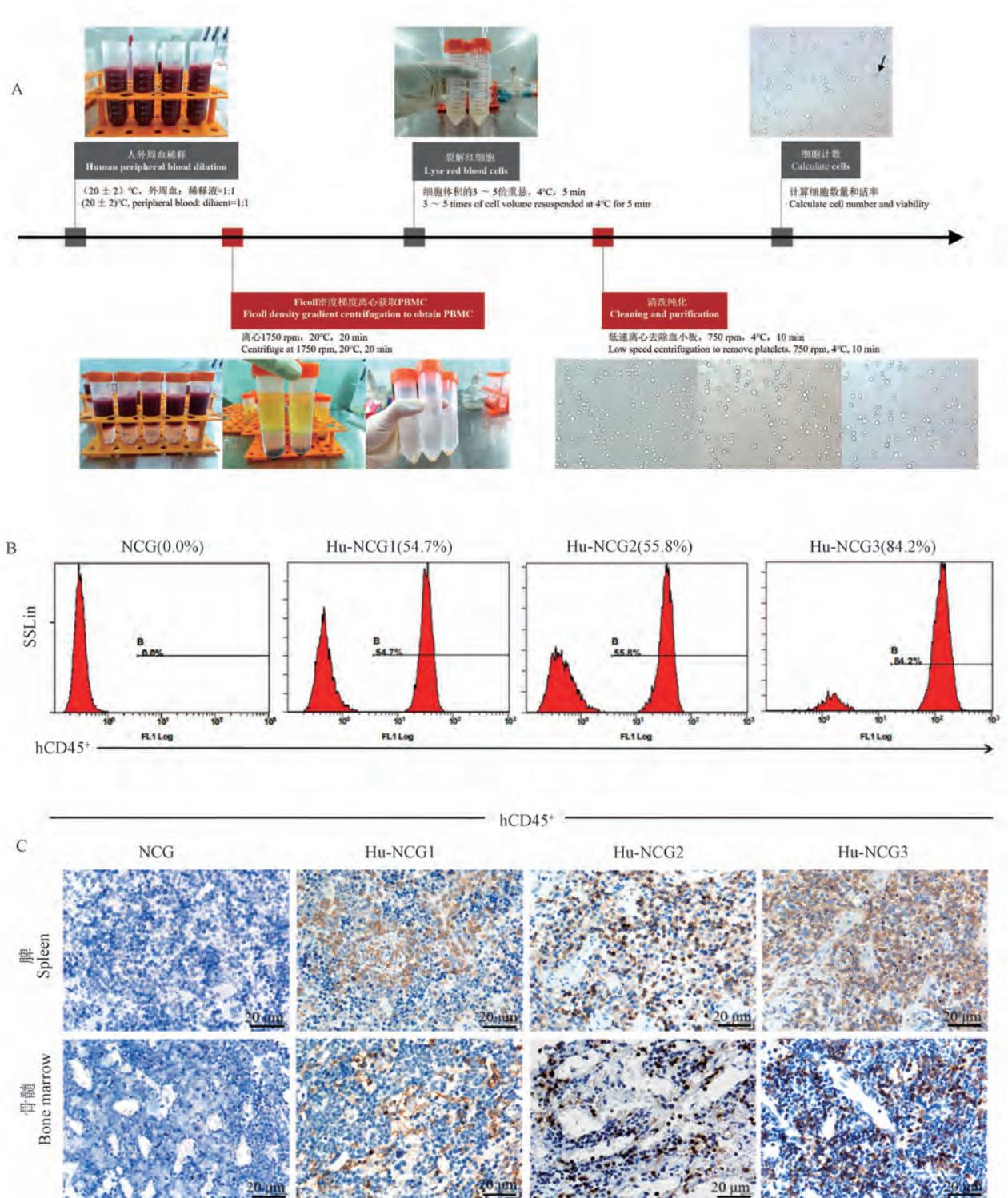
1.3 统计学分析

使用 Graphpad Prism 8.0 统计软件对数据进行统计分析,以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 *t* 检验法进行组间差异性分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建免疫系统人源化小鼠模型

经过多次实验摸索,确定按照图 1A 指示的流程,应用 Ficoll 密度梯度离心法获得新鲜的纯度 > 94%,活率 > 98%的人 PBMC,然后经尾静脉注射植入重度联合免疫缺陷小鼠 NCG 体内,在 PBMC 植入 3 周后采集小鼠外周血,利用流式细胞术分析小鼠外周血免疫细胞中人 CD45⁺细胞比例,结果显示,小鼠外周血中 hCD45/(hCD45 + mCD45) > 25% (54.7% ~ 84.2%) (图 1B),待实验结束时,收集重建小鼠的脾及骨髓,用 4%多聚甲醛溶液固定后,石蜡包埋做组织切片,进行免疫组织化学染色,结果显示,脾和骨髓中也含有较高水平的人 CD45⁺细胞(图 1C),这些结果均提示免疫系统人源化小鼠模型构建成功。



注:A:PBMC 分离纯化操作流程;B:PBMC 植入 3 周后流式分析重建小鼠外周血免疫细胞中人 CD45⁺ 细胞百分比;C:重建小鼠脾和骨髓中人 CD45⁺ 细胞的表达情况。

图 1 成功构建免疫系统人源化小鼠模型

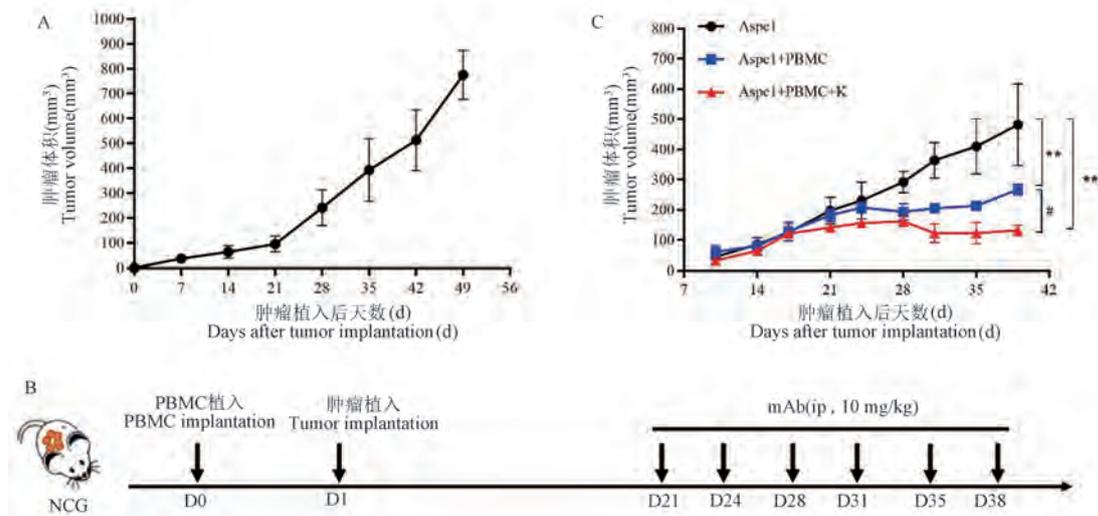
Note. A. PBMC separation and purification procedure. B. Flow cytometry analysis of the percentage of human CD45⁺ cells in the peripheral blood immune cells of reconstructed mouse 3 weeks after PBMC implantation. C. The expression of human CD45⁺ cells in spleen and bone marrow of mouse was detected.

Figure 1 Humanized immune system mouse model was successfully constructed

2.2 重建的人源免疫系统能够抑制人源胰腺癌生长

本研究在构建胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型前,先在重度联合免疫缺陷小鼠 NCG 皮下植入 2×10^6 Aspc1 细胞,并对其生长情况进行定期监测,结果显示,Aspc1 细胞在植入第 3 周时,肿瘤体积达 100 mm^3 左右(见图 2A),可以开始治疗,而 Hu-PBMC 小鼠模型(humanized-peripheral blood mononuclear cells, Hu-PBMC)的重建时间一般为 3 周左右^[19],因此,本研究在后续进行胰腺癌免疫系

统人源化小鼠模型构建时,在相近的时间点分别将 PBMC 和 Aspc1 植入 NCG 体内,在 PBMC 植入后第 3 周,肿瘤体积达 $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ 时进行流式检测以评估人源免疫系统的重建效果,并开始 K 药治疗(图 2B)。结果显示,与未重建组(Aspc1)相比,重建不治疗组(Aspc1+PBMC)能够减缓肿瘤生长($P < 0.01$),而重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)减缓肿瘤生长的作用则更为显著($P < 0.001$)(图 2C),提示重建的人源免疫系统有功能,能够发挥抗肿瘤作用。



注:A:Aspc1 在 NCG 小鼠体内的生长曲线;B:胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型的构建策略及 K 药治疗策略;C:未重建组(Aspc1)、重建不治疗组(Aspc1+PBMC)及重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)的肿瘤生长曲线;与未重建组(Aspc1)相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与重建不治疗组(Aspc1+PBMC)相比, # $P < 0.01$ 。

图 2 重建的人源免疫系统能够抑制人源胰腺癌生长

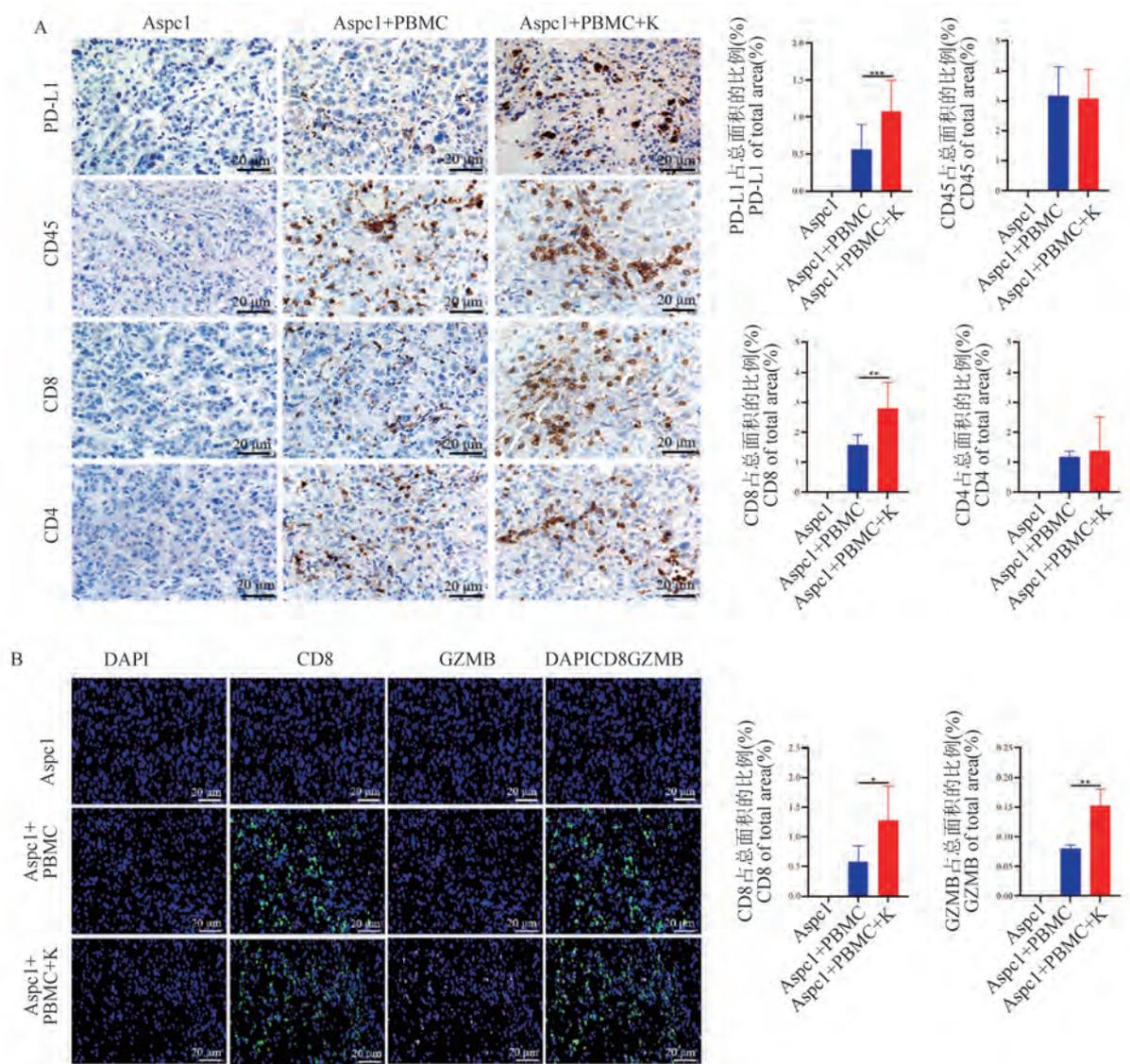
Note. A. Growth curve of Aspc1 in NCG mouse. B. Construction strategy of humanized immune system mouse model with human pancreatic cancer and treatment strategy of K drug. C. Tumor growth curves of the non-reconstruction group (Aspc1), reconstruction without treatment group (Aspc1+PBMC) and reconstruction of K drug treatment group (Aspc1+PBMC+K). Compared with non-reconstruction group (Aspc1), ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with reconstruction without treatment group (Aspc1+PBMC), # $P < 0.01$.

Figure 2 Reconstructed humanized immune system inhibits the growth of human pancreatic cancer

2.3 重建的人源免疫系统能够被人抗 PD-1 单抗活化

K 药治疗结束后,收集未重建组(Aspc1)、重建不治疗组(Aspc1+PBMC)及重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)小鼠的肿瘤组织做免疫组织化学染色和免疫荧光染色,分析不同处理组之间肿瘤组织内人 PD-L1、CD45、CD8、CD4 和颗粒酶 B(Granzyme B, GZMB)的表达差异,结果显示,未重建组(Aspc1)的肿瘤组织内无人 PD-L1、CD45、CD8、CD4 和 GZMB 表达,重建不治疗组(Aspc1+

PBMC)与重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)组的肿瘤组织均有人 PD-L1、CD45、CD8、CD4 和 GZMB 表达,与重建不治疗组(Aspc1+PBMC)相比,重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)的肿瘤组织中 CD45 和 CD4 的表达无显著性差异,而 PD-L1 ($P < 0.001$)、CD8 ($P < 0.01$) 和 GZMB ($P < 0.01$) 的表达显著性增多(图 3A,3B),这些结果表明重建的人源免疫系统能够被人抗 PD-1 单抗活化,而且人抗 PD-1 单抗治疗诱导的增强的抗肿瘤作用主要与 CD8⁺T 的活化有关。



注:未重建组(Aspc1)、重建不治疗组(Aspc1+PBMC)及重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)肿瘤组织中人 PD-L1、CD45、CD8、CD4 和 GZMB 的差异表达情况;与重建不治疗组(Aspc1+PBMC)相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 重建的人源免疫系统能够被人抗 PD-1 单抗活化

Note. Differential expression of human PD-L1, CD45, CD8, CD4 and GZMB in tumor tissues of the non-reconstruction group (Aspc1), reconstruction without treatment group (Aspc1+PBMC) and reconstruction of K drug treatment group (Aspc1+PBMC+K). Compared with the reconstruction without treatment group (Aspc1+PBMC), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Reconstructed humanized immune system can be activated by human anti-PD-1 monoclonal antibody

3 讨论

CD45 分子在所有白细胞上都有表达,称为白细胞共同抗原,是所有免疫细胞的共同标志物^[20]。Hu-PBMC 小鼠模型是一种构建较为简单和经济的免疫系统人源化小鼠模型,当人 PBMC 植入重度联合免疫缺陷小鼠后第 3 周,小鼠外周血免疫细胞中人 CD45⁺细胞的比例大于 25%时,提示该模型构建成功^[19]。Hu-PBMC 小鼠模型主要以重建人的 T 淋

巴细胞为主,比例可达 90%以上,因此该模型是研究成熟 T 细胞功能及其效应的理想模型,可用于研究人效应 T 细胞的活化过程或用于免疫治疗药物的评估等^[21]。但是,该模型有一明显的局限性,由于重建的人源免疫细胞与鼠源细胞的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)不匹配,会出现致死性的移植物抗宿主反应(graft-versus-host disease, GVHD),通常在 PBMC 植入后 4 ~ 6 周开始出现,其严重程度与人 T 细胞的植入水

平直接相关,可以通过小鼠体重减轻、炸毛、弓背等症状来评估。由于 GVHD 的发生, Hu-PBMC 小鼠模型实验观察窗口期较短,在实验过程中需要充分利用免疫系统人源化小鼠模型的窗口期,以保证肿瘤免疫双人源化小鼠模型构建成功后还能有足够的时间窗口进行后续实验,因此,在进行肿瘤免疫双人源化小鼠模型的构建时,需要综合考虑免疫重建所需的时间以及人源肿瘤的生长情况。为了充分利用实验窗口期,本研究实施了在构建胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型前,先在重度联合免疫缺陷小鼠皮下植入胰腺癌细胞并对其生长情况进行动态监测,以确定肿瘤植入与进行免疫重建的最佳时间,从而实现最长的免疫治疗窗口。

在对临床患者的肿瘤标本进行免疫药物筛选时,理想情况下应该使用患者自身的 PBMC 进行重建,但是由于肿瘤患者接受过化疗或自身免疫力下降等诸多原因,从肿瘤患者外周血中获取的 PBMC 数量非常有限,而 Hu-PBMC 小鼠模型构建的成功率与植入的 PBMC 的数量密切相关,多数情况下从肿瘤患者外周血中获取的 PBMC 数量不能满足实验要求,因此,在无法从患者上获取足量的 PBMC 的情况下,可以考虑使用正常人的 PBMC 进行重建并分组评估给予不同干预的治疗效果。但由于不同个体来源的 PBMC 可能会对免疫治疗药物产生不同的反应,因此,我们在进行免疫系统人源化小鼠模型的构建时会同时选用 3 个以上的 PBMC 供体,对同一种免疫治疗药物进行评估,以明确该药物在不同个体上是否具有普适性。根据本实验结果,不同的供体对帕博利珠单抗具有一致的反应性。

PD-1 是一种免疫负调控分子,能够在 T 细胞上表达,PD-L1 是其配体,在肿瘤微环境中,PD-1/PD-L1 的相互作用可促使肿瘤细胞逃避免疫监测,从而促进肿瘤进展。与正常组织相比,肿瘤组织中 PD-L1 的表达明显增多,大量研究认为这是由抗肿瘤免疫反应诱导的,肿瘤浸润淋巴细胞在识别肿瘤抗原后,释放 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)产生抗肿瘤免疫反应,与此同时,肿瘤细胞会表达 PD-L1 产生一种适应性免疫抵抗以逃避免疫细胞的杀伤^[22-23],因此,肿瘤组织中 PD-L1 的表达上调,可认为是一种肿瘤免疫反应活化的标志。CD8⁺T 细胞是细胞毒性 T 淋巴细胞,能够分泌各种细胞因子参与免疫反应,如 IFN- γ 、GZMB 等,对肿瘤细胞具有直接杀伤作用,是机体发挥抗肿瘤作用的关键细胞^[24]。在本

研究中,未进行免疫重建的小鼠体内肿瘤组织不表达 PD-L1,无 CD8⁺T 细胞浸润,而进行免疫重建后,肿瘤组织中有人源性 CD8⁺T 细胞的浸润和 PD-L1 的表达,表明小鼠体内的人源肿瘤组织能够诱导重建的人源免疫系统发挥抗肿瘤免疫反应,抑制肿瘤生长,即免疫系统人源化小鼠模型具有人免疫功能。在给予 K 药治疗后,与不治疗的免疫系统人源化小鼠相比,肿瘤组织中浸润的人源性 CD45⁺细胞、CD4⁺T 细胞的含量无明显变化,而 CD8⁺T 细胞、GZMB 和 PD-L1 的表达明显增多,表明抗 PD-1 单抗治疗诱导的增强的肿瘤抑制作用主要与 CD8⁺T 的活化有关,重建的人源性 CD8⁺T 细胞能够与抗 PD-1 单抗发生反应。

本研究构建的胰腺癌免疫双人源化小鼠模型具备人源肿瘤细胞和人源免疫系统,能够较好地模拟胰腺癌患者体内肿瘤组织与免疫系统之间的相互作用,可以作为临床肿瘤患者的“替身”用于评估临床前胰腺癌免疫疗法的有效性及其安全性,有望成为推动肿瘤免疫治疗策略临床前研究的理想工具。

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] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States [J]. Cancer Res, 2014, 74(11): 2913-2921.
- [3] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 global cancer statistics? [J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1): 22.
- [4] Wioletta MS, Karol RP, Magdalena S, et al. Surgical treatment of pancreatic cancer [J]. Pol Przegl Chir, 2018, 90(2): 45-53.
- [5] Goto Y, Nakamura A, Ashida R, et al. Clinical evaluation of intensity-modulated radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer [J]. Radiat Oncol, 2018, 13(1): 118.
- [6] Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 379(25): 2395-2406.
- [7] Matsumoto I, Murakami Y, Shinzaki M, et al. Proposed preoperative risk factors for early recurrence in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma after surgical resection; a multicenter retrospective study [J]. Pancreatology, 2015, 15(6): 674-680.
- [8] Panicea A, Hosokawa P, Henderson W, et al. Characteristics of 10-year survivors of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. JAMA Surg, 2015, 150(8): 701-710.

- [9] Suresh K, Naidoo J, Lin CT, et al. Immune checkpoint immunotherapy for non-small cell lung cancer: benefits and pulmonary toxicities [J]. *Chest*, 2018, 154(6): 1416-1423.
- [10] Willmore ZN, Coumbe BGT, Crescioli S, et al. Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: treatment of melanoma and immune mechanisms of action [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(3): 544-556.
- [11] Gul A, Stewart TF, Mantia CM, et al. Salvage ipilimumab and nivolumab in patients with metastatic renal cell carcinoma after prior immune checkpoint inhibitors [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(27): 3088-3094.
- [12] Patnaik A, Kang SP, Rasco D, et al. Phase I study of pembrolizumab (MK-3475; anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(19): 4286-4293.
- [13] Bear AS, Vonderheide RH, O' Hara MH. Challenges and opportunities for pancreatic cancer immunotherapy [J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(6): 788-802.
- [14] Henriksen A, Dyhl-Polk A, Chen I, et al. Checkpoint inhibitors in pancreatic cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 78: 17-30.
- [15] Schizas D, Charalampakis N, Kole C, et al. Immunotherapy for pancreatic cancer: A 2020 update [J]. *Cancer Treat Rev*, 2020, 86: 102016.
- [16] Lau SP, van Montfoort N, Kinderman P, et al. Dendritic cell vaccination and CD40-agonist combination therapy licenses T cell-dependent antitumor immunity in a pancreatic carcinoma murine model [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e000772.
- [17] Lu SW, Pan HC, Hsu YH, et al. IL-20 antagonist suppresses PD-L1 expression and prolongs survival in pancreatic cancer models [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4611.
- [18] Zhang Y, Chandra V, Riquelme Sanchez E, et al. Interleukin-17-induced neutrophil extracellular traps mediate resistance to checkpoint blockade in pancreatic cancer [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(12): e20190354.
- [19] De La Rochere P, Guil-Luna S, Decaudin D, et al. Humanized mice for the study of immuno-oncology [J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(9): 748-763.
- [20] Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation [J]. *Immunol Cell Biol*, 1997, 75(5): 430-445.
- [21] Lin S, Huang G, Cheng L, et al. Establishment of peripheral blood mononuclear cell-derived humanized lung cancer mouse models for studying efficacy of PD-L1/PD-1 targeted immunotherapy [J]. *MAbs*, 2018, 10(8): 1301-1311.
- [22] Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3384-3391.
- [23] Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(127): 127ra37.
- [24] Xie YF, Xie F, Zhang L, et al. Targeted anti-tumor immunotherapy using tumor infiltrating cells [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(22): e2101672.

[收稿日期] 2021-11-03

孙银凤,杨丹,白敏,等. 大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 169-176.
Sun YF, Yang D, Bai M, et al. Protective effect of Dahuang Mudan Decoction on liver injury in rats with acute pancreatitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 169-176.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.003

大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用

孙银凤^{1,2}, 杨丹¹, 白敏¹, 宋冰^{1,2}, 康万荣^{1,2}, 汪永锋^{1,2*}, 张延英^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学甘肃省实验动物行业技术中心, 兰州 730000)

【摘要】 **目的** 探讨大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用。**方法** 将96只SPF级Wistar大鼠随机分为空白组、模型组、大黄牡丹汤高、中、低剂量组(14、7、3.5 g/(kg·d))、奥曲肽组(10 μg/(kg·d)),各16只,采用5%牛磺胆酸钠溶液逆行注射胰胆管复制模型,于造模前1h及造模后12、24h分别给药1次,采集样本。观察大鼠一般体征,生化测定血清淀粉酶(AMS)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、胆碱酯酶(ChE)、C反应蛋白(CRP)含量,HE染色观察胰腺和肝组织病理形态变化,ELISA法检测大鼠肝组织TNF-α、IL-1β、IL-6含量;Western Blot法检测大鼠肝组织PI3K/Akt/NF-κB通路关键蛋白表达水平。**结果** (1)与空白组比较,模型组大鼠一般生存状况相对较差,AMS、ALT、AST、CRP含量增高,ChE含量降低;HE染色镜下可见胰腺组织结构不完整、坏死、充血和炎性浸润严重,肝细胞排列紊乱、坏死、脂肪样变、炎症浸润明显;肝组织匀浆液中TNF-α、IL-1β、IL-6含量均显著升高;肝组织中PI3K、p-Akt、p-NF-κB p65、Bax蛋白表达水平平均升高,Bcl-2蛋白表达水平下降($P < 0.05$)。(2)与模型组比较,各治疗组大鼠生存状态改善;镜下胰腺组织水肿、充血、坏死程度明显改善,肝细胞排列紊乱、坏死、脂肪样变、炎症浸润等情况明显减轻;AMS、ALT、AST、CRP含量不同程度降低,ChE含量升高;肝组织匀浆液中TNF-α、IL-1β、IL-6含量均下降;肝组织中PI3K、p-Akt、p-NF-κB p65、Bax蛋白表达水平平均下降,Bcl-2蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。**结论** 大黄牡丹汤有效改善急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)模型大鼠一般状态、生化指标以及胰腺和肝组织病理改变,其作用机制可能是通过调控PI3K/Akt/NF-κB信号通路,从而减轻肝损伤。

【关键词】 急性胰腺炎;大黄牡丹汤;肝损伤;PI3K/Akt/NF-κB信号通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0169-08

Protective effect of Dahuang Mudan Decoction on liver injury in rats with acute pancreatitis

SUN Yinfeng^{1,2}, YANG Dan¹, BAI Min¹, SONG Bing^{1,2}, KANG Wanrong^{1,2}, WANG Yongfeng^{1,2*}, ZHANG Yanying^{1,2*}

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Gansu Experimental Animal Industry Technology Center, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

Corresponding author: WANG Yongfeng. E-mail: wyf@gszy.edu.cn; ZHANG Yanying. E-mail: 1360599656@qq.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effects of Dahuang Mudan against liver injury in rats with acute pancreatitis. **Methods** Overall, 96 SPF Wistar rats were randomly divided into blank, model, Dahuang Mudan decoction high-, medium-, and low-dose (14, 7, 3.5 g/(kg·d), respectively), and octreotide (10 μg/(kg·d)) groups, with

【基金项目】 国家自然科学基金(82160871, 81760828), 甘肃中医药大学研究生创新基金(2021CX35), 甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目(2021KCYB-6)。

Fund by National Natural Science Foundation of China(82160871, 81760828), Graduate Innovation Fund of Gansu University of Traditional Chinese Medicine(2021CX35), Scientific Research and Innovation Fund Project of Gansu University of Traditional Chinese Medicine (2021KCYB-6).

【作者简介】 孙银凤(1993—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 急性胰腺炎。Email: 1243067671@qq.com

【通信作者】 汪永锋(1967—), 男, 教授, 硕士, 研究方向: 医学解剖学。Email: wyf@gszy.edu.cn;

张延英(1964—), 男, 实验研究员, 硕士, 研究方向: 实验动物学。Email: 1360599656@qq.com。

* 共同通信作者

16 animals in each group. The acute pancreatitis model was generated by retrograde injection of 5% sodium taurocholate solution into the pancreaticobiliary duct. before the model and every 12 h after the model. Samples were collected 24 h after the mold. To observe the rats' general physical signs, serum amylase (AMS), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), cholinesterase (ChE), and C-reactive protein (CRP) contents were biochemically determined, and hematoxylin and eosin staining used to observe pancreatic and hepatic histopathological changes. ELISA was employed to detect rat liver tissue TNF- α , IL-1 β , and IL-6 contents, and western blotting was used to detect the expression of key rat liver PI3K/Akt pathway proteins. **Results** (1) Compared with the blank group, the model group rats' general survival status was relatively poor; their contents of AMS, ALT, AST, and CRP increased and that of ChE decreased. Microscopic analysis of HE staining showed the pancreatic tissue had incomplete structure, and was necrotic and congested with severe inflammatory infiltration; liver cells showed disordered arrangement, and liver tissue showed necrosis, steatosis, and inflammatory infiltration. The TNF- α , IL-1 β , and IL-6 contents of the liver tissue homogenate were significantly increased; PI3K, p-Akt, p-NF- κ B p65, and Bax protein expression levels decreased and Bcl-2 protein expression increased, especially in the Dahuang Mudan high-dose group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). (2) Compared with the model group, the general condition of the rats in each treatment group improved to varying degrees: the degree of pancreatic tissue edema, congestion, and necrosis visible under the microscope was significantly improved, and liver cell arrangement disorder, necrosis, steatosis, inflammatory infiltration, among others, were alleviated. AMS, ALT, AST, and CRP contents decreased to varying degrees, and the ChE content increased. Liver tissue homogenate TNF- α , IL-1 β , and IL-6 contents decreased; PI3K, p-Akt, p-NF- κ B p65, and Bax protein levels decreased; while the levels of Bcl-2 protein increased, especially in the Dahuang Mudan high-dose group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** Dahuang Mudan decoction effectively improved the general health, biochemical indicators, and pathological changes to the pancreas and liver of acute pancreatitis model rats. The mechanism of its liver-damage-reducing action may involve regulation of the PI3K/Akt signaling pathway.

【Keywords】 acute pancreatitis; Dahuang Mudan Decoction; liver injury; PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway

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

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)作为病情复杂、并发症多、病死率高的急腹症,易合并心、脑、肺、肾、肝等脏器的损害,发生多系统器官功能衰竭^[1]。肝是 AP 最易受损器官之一,15% ~ 60%的 AP 患者会合并肝损伤^[2]。大黄牡丹汤由大黄、芒硝、丹皮、桃仁、冬瓜仁 5 味中药组成,共奏泻热破瘀、通腑散结之效。本课题组前期研究表明该方能够有效改善 AP 模型大鼠肝肾功能损伤,降低炎症因子水平,促进胰腺组织修复^[3-6]。目前 AP 肝损伤发病机制尚未明确,研究发现 AP 肝损伤的发病进展与炎症因子级联效应息息相关,PI3K/Akt/NF- κ B 途径与炎症介质密切相关。因此,本研究进一步基于 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路关键分子深入探讨大黄牡丹汤对 AP 肝损伤的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

96 只 2 月龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体重(200 \pm 20)g,购自甘肃中医药大学 SPF 级实验动物中心【SCXK(甘)2020-0001】。饲养于甘肃中医药大学

SPF 级实验动物中心【SYXK(甘)2020-0009】。饲养条件:饮水自由,昼夜各半循环照明,湿度恒定 45% ~ 55%,温度维持 21 ~ 25 $^{\circ}$ C,常规饲养 2 d 后进行实验。正式实验前常规饲养 1 周,所有操作均遵守甘肃中医药大学实验动物伦理原则(审批号:2021-242)。

1.1.2 主要试剂与仪器

大黄牡丹汤实验处方^[7]:大黄、桃仁、芒硝、牡丹皮、冬瓜子,常规煎煮至浓度达到 1 g/mL,4 $^{\circ}$ C 冷藏备用。奥曲肽,国药一心制药有限公司,171003;牛磺胆酸钠,北京索莱宝科技有限公司,1111J051;大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒,上海酶联生物科技有限公司,05/2021;PI3K 抗体,abcam 公司,GR3192684-9; p-Akt 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体、GAPDH 抗体,ImmunoWay 公司, B0601、B5501、B4101、B1501; p-NF- κ B p65 抗体, GeneTex 公司, 821904930。微量注射泵(深圳圣诺医疗设备有限公司,SN-50T6,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制

采用 3%戊巴比妥钠进行麻醉,按文献^[8-9]方法

复制 AP 大鼠模型,麻醉后将大鼠固定,进行剔毛和消毒,然后于剑突下切开,充分显露胰胆管与十二指肠,夹闭胰胆管远端,从十二指肠肠壁穿刺进入胰胆管,用动脉夹固定针头。将 5% 牛磺胆酸钠溶液使用微量泵恒速向胰胆管管内注入,注射完成后,继续夹闭 5 min,然后取下头皮针,等待 5 min 后逐层缝合即可。

1.2.2 动物分组及实验干预

大黄牡丹汤折算剂量参考《中药药理实验方法学》^[10],根据人大鼠体表面积换算,大黄牡丹汤高、中、低组分别给予(14、7、3.5 g/kg)。空白组、模型组给予等体积蒸馏水灌胃。奥曲肽组予 10 μg/kg 奥曲肽背部皮下注射。各治疗组分别于造模前 1 h、造模后 12、24 h 分别给药治疗。

1.2.3 样本采集及指标检测

采用 3% 戊巴比妥钠进行麻醉,心脏采血后,离心机统一分离血清并冻存,取胰腺和肝组织,部分组织用 4% 多聚甲醛固定,部分组织 -80℃ 冰箱冻存。

1.2.4 各组大鼠一般状态。

观察大鼠的精神和活动状态、扭体反应、弓背反应及便质改变等情况。

1.2.5 各组大鼠胰腺、肝组织病理学改变

取用甲醛固定的胰腺组织和肝组织,进行 HE 染色,脱蜡→覆水→苏木精染色→乙酸分化→伊红染色→脱水→封片等步骤,然后选取合适的放大倍数观察胰腺、肝组织病理形态变化,肝组织 HE 染色完毕后,参照 Camargo 等^[11]病理组织评分法对肝组织镜下病理进行评分(见表 1)。

1.2.6 血清生化指标检测

取冻存血清,用全自动生化仪检测 AMS、ALT、AST、ChE、CRP 含量。

1.2.7 ELISA 法检测各组大鼠肝组织 TNF-α、IL-

1β、IL-6 含量

将肝组织制备成匀浆液,用 ELISA 试剂盒进行检测各组大鼠肝组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量,一切操作严格按照说明书进行,依据标准曲线计算肝组织匀浆样本中各个指标的含量。

1.2.8 Western Blot 法检测各组大鼠肝组织 PI3K、p-Akt、p-NF-κB p65、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平

各组大鼠干预 24 h 后,将肝组织匀浆后,提取总蛋白并测定浓度,然后电泳、转膜、封闭,分别经过一抗过夜、二抗孵育和曝光等步骤,用 Image J 软件进行扫描并分析条带。以 GAPDH 为内参。

1.3 统计学分析

结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 24.0 软件处理所有数据,组间均数差异的比较用方差分析,方差齐用 LSD 法比较,方差不齐用 Tamhane's T2 法比较。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 大黄牡丹汤对各组大鼠一般体征的影响

空白组大鼠一切体征正常,无异常反应出现;而模型组大鼠在造模后出现精神倦怠,眯眼,毛色杂乱,弓背、扭体反应明显;各治疗组在药物干预后观察到上述体征均有不同程度改善,其中大黄牡丹汤高剂量组大鼠的改善作用最为明显。

2.2 大黄牡丹汤对各组大鼠胰腺组织 HE 染色观察

如图 1 所示,空白组大鼠的胰腺组织病理切片未见异常改变,模型组大鼠可见胰腺腺泡间隙扩张,间质水肿和充血,部分腺泡细胞坏死,内含大量炎细胞浸润;各治疗组大鼠可见部分腺泡细胞水肿、出血及炎性细胞浸润均有不同程度减轻,尤以大黄牡丹汤高剂量组胰腺组织损伤程度最轻。

表 1 肝组织镜下病理评分标准

Table 1 Pathological scoring criteria of liver tissue under microscope

评分 Grading	损伤程度 Degree of injury
0	无损伤 No injury
1	轻微损伤:细胞核固缩,局限性胞质空泡形成 Minor lesion. Nuclear pyknosis, localized cytoplasmic vacuole formation
2	中度损伤:广泛性细胞核固缩,血管充血、水肿,点状坏死 Moderate injury. Extensive nuclear pyknosis, vascular congestion, edema, punctate necrosis
3	严重损伤:中性粒细胞浸润,肝细胞坏死,严重充血 Severe injury. Neutrophil infiltration, hepatocyte necrosis, hepatic cord congestion

2.3 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织 HE 染色观察

如图 2 所示,空白组大鼠肝小叶结构完整,肝细胞大小均匀,无变性、坏死等病理改变,无炎症细胞浸润;模型组大鼠局部可见肝细胞点状坏死,明显充血、水肿,胞质内可见微小的圆形脂肪空泡,并伴有少量炎性细胞浸润;各治疗组大鼠血管充血、水肿明显减轻,偶见点状坏死,少量炎细胞浸润,肝组织炎症明显改善,未发现片状坏死等情况,以大黄牡丹汤高剂量组肝组织损伤程度最轻。

2.4 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织病理学评分的影响

空白组大鼠基本处于 0 分区域,模型组大鼠 6 只处于 3 分区域,2 只处于 2 分区域,奥曲肽组大鼠 1、2、3 分区域均散见,大黄牡丹汤高剂量组大鼠集中散于 1、2 分区域,中剂量组超过半数散于 2 分区域,低剂量组多处于 2、3 分区域,大黄牡丹汤组大鼠明显呈剂量依赖性,提示大黄牡丹汤能够有效改善大鼠肝损伤(见表 2)。

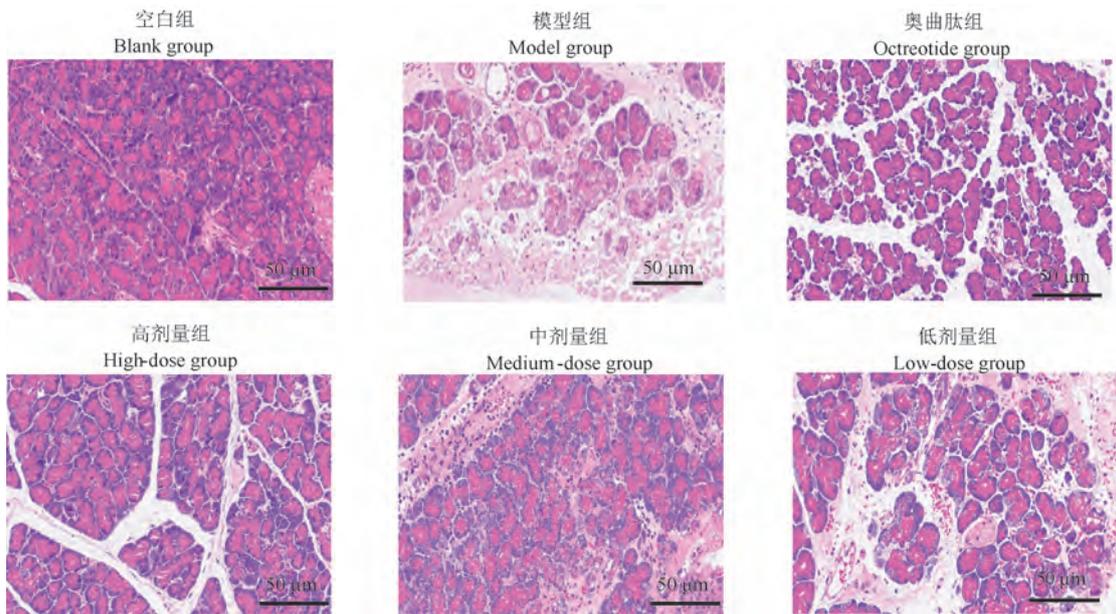


图 1 各组大鼠胰腺组织病理变化

Figure 1 Pathological changes of pancreatic tissue of rats in each group

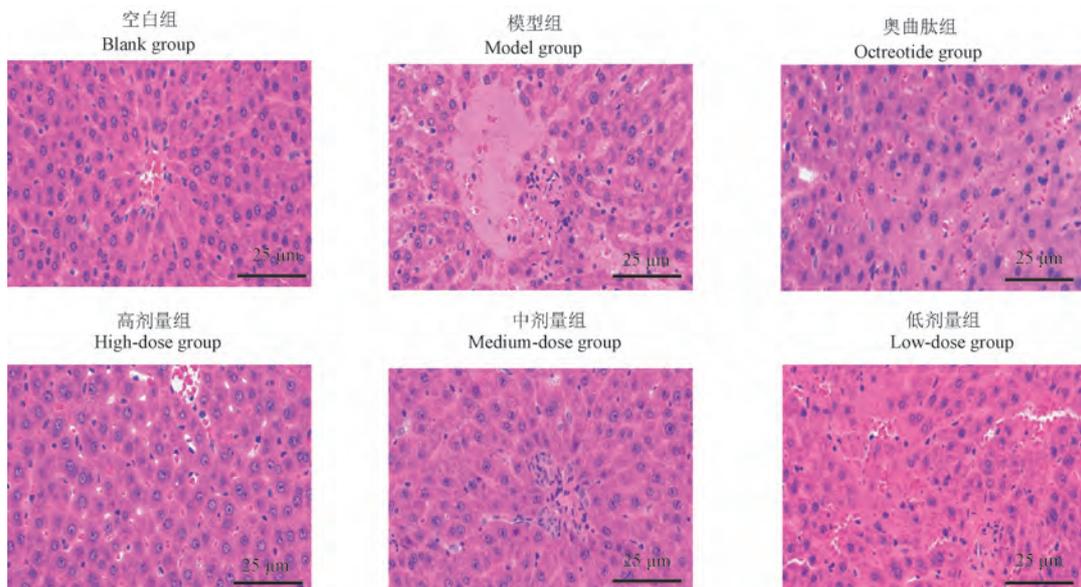


图 2 各组大鼠肝组织病理变化

Figure 2 Pathological changes of liver tissue of rats in each group

表 2 大黄牡丹汤对 AP 大鼠模型肝损伤病理分级的影响 (n = 8)

Table 2 Effects of Dahuang Mudan Decoction on the pathological grading of liver injury in AP rat model (n = 8)

组别 Groups	剂量 (g/kg) Dose (g/kg)	不同病变程度的分布例数 Number of cases with different degree of lesion			
		0	1	2	3
空白组 Blank group	-	8	0	0	0
模型组 Model group	-	0	0	2	6
奥曲肽组 Octreotide group	10 ⁻⁵	0	2	3	3
高剂量组 High-dose group	14	0	3	3	2
中剂量组 Medium-dose group	7	0	2	4	2
低剂量组 Low-dose group	3.5	0	1	3	4

2.5 大黄牡丹汤对各组大鼠生化指标的影响

与空白组比较,模型组大鼠 AMS、ALT、AST、CRP 含量显著性升高,而 ChE 含量显著性降低 (P < 0.05);在各治疗组大鼠中 AMS、ALT、AST、CRP 含量均有下降趋势,而 ChE 含量有上升趋势,其中尤以大黄牡丹汤高剂量组显著 (P < 0.05) (见表 3)。

2.6 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量水平的影响

与空白组比较,模型组大鼠 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量显著升高 (P < 0.05);与模型组比较,各治疗组

大鼠上述指标均呈下降趋势,其中尤以大黄牡丹汤高剂量组显著 (P < 0.05) (见表 4)。

2.7 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织 PI3K、p-Akt、p-NF-κB p65、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

与空白组相比,模型组大鼠肝组织 PI3K、p-Akt、p-NF-κB p65、Bax 蛋白表达显著升高,而 Bcl-2 蛋白表达呈下降趋势 (P < 0.05);与模型组比,各治疗组大鼠 PI3K、p-Akt、p-NF-κB p65、Bax 蛋白表达均不同程度下降,而 Bcl-2 蛋白表达不同程度上升,其中尤以大黄牡丹汤高剂量组显著 (P < 0.05) (见表 5、图 3)。

表 3 大黄牡丹汤对 AP 大鼠肝组织 AMS、ALT、AST、ChE、CRP 含量的影响 (x̄ ± s, n = 6)

Table 3 Effects of DaHuang MuDan Decoction on the contents of AMS, ALT, AST, ChE and CRP liver tissues of AP rats (x̄ ± s, n = 6)

组别 Groups	剂量 (g/kg) Dose (g/kg)	血清淀粉酶 (U/L) AMS (U/L)	谷丙转氨酶 (U/L) ALT (U/L)	谷草转氨酶 (U/L) AST (U/L)	胆碱酯酶 (U/L) ChE (U/L)	C 反应蛋白 (mg/L) CRP (mg/L)
空白组 Blank group	-	1390.83 ± 246.85	49.80 ± 8.44	67.02 ± 10.86	108.50 ± 22.85	0.02 ± 0.01
模型组 Model group	-	2704.17 ± 403.85 [#]	152.52 ± 25.13 [#]	415.38 ± 56.59 [#]	55.67 ± 20.23 [#]	0.06 ± 0.01 [#]
奥曲肽组 Octreotide group	10 ⁻⁵	1946.17 ± 355.52 [*]	113.83 ± 29.83 [*]	232.27 ± 71.24 [*]	77.50 ± 22.03	0.04 ± 0.01 [*]
高剂量组 High-dose group	14	1878.67 ± 110.77 ^{*Δ}	73.15 ± 24.77 [*]	173.02 ± 51.08 [*]	88.50 ± 20.39 [*]	0.02 ± 0.01 [*]
中剂量组 Medium-dose group	7	1883.60 ± 436.74 ^{*Δ}	78.02 ± 13.03 [*]	221.98 ± 76.88 [*]	83.00 ± 25.63	0.03 ± 0.01 [*]
低剂量组 Low-dose group	3.5	2411.38 ± 527.56	163.58 ± 84.03	370.82 ± 143.82	65.17 ± 29.43	0.04 ± 0.01 [*]

注:与空白组比较, [#]P < 0.05;与模型组比较, ^{*}P < 0.05;与低剂量组比较, ^ΔP < 0.05。(下表同)

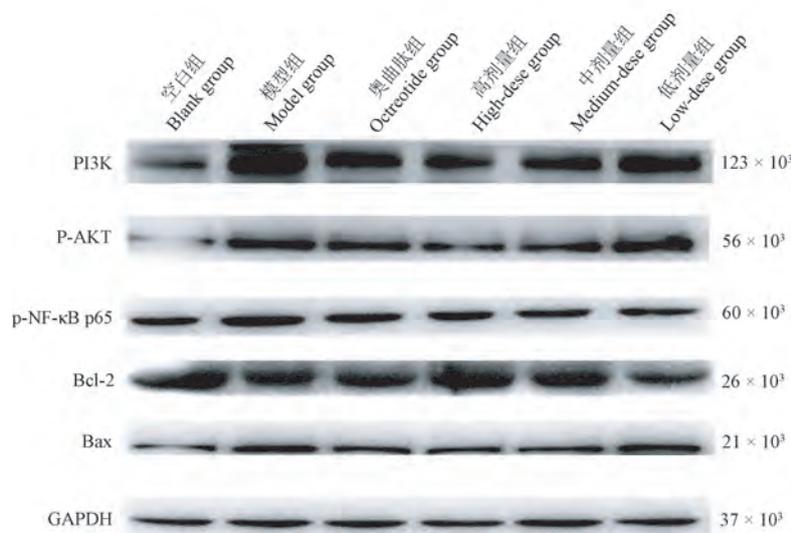
Note. Compared with blank group, [#]P < 0.05. Compared with model group, ^{*}P < 0.05. Compared with low-dose group, ^ΔP < 0.05. (The same in the following tables)

表 4 大黄牡丹汤对 AP 大鼠肝组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 4 Effects of DaHuang Mudan Decoction on the contents of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in liver tissues of AP rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose(g/kg)	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
空白组 Blank group	-	116.42 \pm 8.52	131.66 \pm 7.61	83.86 \pm 6.05
模型组 Model group	-	148.63 \pm 4.61 [#]	184.50 \pm 10.25 [#]	133.83 \pm 4.11 [#]
奥曲肽组 Octreotide group	10 ⁻⁵	130.30 \pm 3.81 [*]	154.89 \pm 5.82 [*]	105.57 \pm 3.05 [*]
高剂量组 High-dose group	14	122.07 \pm 3.96 ^{*Δ}	144.34 \pm 7.29 ^{*Δ}	92.88 \pm 2.97 ^{*Δ}
中剂量组 Medium-dose group	7	123.09 \pm 7.51 ^{*Δ}	159.67 \pm 5.90 ^{*Δ}	98.45 \pm 5.93 ^{*Δ}
低剂量组 Low-dose group	3.5	138.92 \pm 8.37 [*]	178.41 \pm 14.85	115.25 \pm 6.88 [*]

表 5 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织 PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 Effects of DaHuang Mudan Decoction on the protein expression levels of PI3K, p-Akt, p-NF- κ B p65, Bcl-2 and Bax in liver tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose(g/kg)	PI3K/GAPDH	p-Akt/GAPDH	p-NF- κ B p65/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH
空白组 Blank group	-	0.97 \pm 0.06	0.60 \pm 0.03	1.15 \pm 0.09	1.63 \pm 0.17	1.01 \pm 0.05
模型组 Model group	-	1.37 \pm 0.07 [#]	1.34 \pm 0.07 [#]	1.69 \pm 0.10 [#]	1.22 \pm 0.06 [#]	1.58 \pm 0.07 [#]
奥曲肽组 Octreotide group	10 ⁻⁵	1.20 \pm 0.05 [*]	1.26 \pm 0.05	1.47 \pm 0.11 [*]	1.25 \pm 0.07	1.29 \pm 0.06 [*]
高剂量组 High-dose group	14	1.15 \pm 0.06 ^{*Δ}	1.08 \pm 0.06 ^{*Δ}	1.33 \pm 0.11 ^{*Δ}	1.43 \pm 0.14 ^{*Δ}	1.18 \pm 0.04 ^{*Δ}
中剂量组 Medium-dose group	7	1.17 \pm 0.03 ^{*Δ}	1.10 \pm 0.07 ^{*Δ}	1.39 \pm 0.05 ^{*Δ}	1.19 \pm 0.09 ^{Δ}	1.26 \pm 0.03 ^{*Δ}
低剂量组 Low-dose group	3.5	1.36 \pm 0.03	1.42 \pm 0.09	1.57 \pm 0.12	0.92 \pm 0.10 [*]	1.40 \pm 0.03 [*]

图 3 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织 PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65、Bcl-2、Bax 蛋白表达电泳Figure 3 Protein expression electrophoresis of PI3K, p-Akt, p-NF- κ B p65, Bcl-2 and Bax in liver tissues of rats in each group treated by Rhubarb Mudan Decoction

3 讨论

AP 发生时, PI3K/Akt 通路活化, 可以诱导促炎细胞因子(如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 的趋化和表达, 导致“炎症级联风暴反应”, 进一步损伤其他器官, 肝与胰腺毗邻, AP 发生时产生的炎症因子可通过局部扩散或门静脉血流进入肝直接损伤肝细胞, 使得肝损伤成为 AP 发生时重要的并发症^[12-13]。

大黄牡丹作为张仲景的经方之一, 出自《金匱要略》, 主治湿热蕴结, 气血凝滞所致肠痈。方中大黄与丹皮二者合用, 共泻肠腑湿热瘀结, 为方中君药。芒硝和桃仁俱为臣药, 其中芒硝助大黄荡涤实热, 促其速下; 桃仁破血逐瘀, 协君药以通淤滞。冬瓜仁清理利湿, 排脓消痈, 涤荡湿热, 是为佐药。本方泻热与逐瘀并用, 使瘀结湿热速下, 痛随利减, 痈肿得消, 诸症自愈。

在 AP 炎症期间, 炎症细胞因子使 PI3K/Akt/NF- κ B 通路活化, 活化的 NF- κ B 转录因子进入细胞核, 恢复其转录激活活性。NF- κ B 的活化可以诱导促炎因子的表达, 进而趋化大量炎症细胞浸润、聚集到炎症部位, 最终导致炎症反应^[12]。

AP 在发展过程中, 炎症级联效应的爆发, 使大量炎症因子进入肝, 引起肝细胞的异常凋亡。Lapierre 等^[14]发现, AP 发生时肝细胞的异常凋亡与肝的损伤程度密切相关, 且组织损伤情况与病理改变相符合。刘宏等^[15]研究发现, AP 肝损伤大鼠肝细胞异常凋亡数量与凋亡指数呈正相关。Bcl-2 蛋白家族包括抗凋亡蛋白(Bcl-2)和促凋亡蛋白(Bax), Bax/Bcl-2 比率的升高是细胞凋亡的原因之一, 因此, 可通过降低 Bax/Bcl-2 的比率来减轻肝损伤^[16]。

本实验通过对凋亡相关蛋白(Bcl-2 和 Bax) 的检测, 发现蛋白表达含量治疗前后有差异变化, 但在病理切片上并未明确改变, 以待后续进一步实验证明。

本实验结果显示, 模型组 AP 大鼠一般生存状态相对较差, 肝组织中 PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65 蛋白表达显著升高, 炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌水平显著升高。与模型组比较, 各治疗组 AP 大鼠的一般生存状态不同程度缓解, 肝组织病理损伤不同程度修复, ELISA 结果表明 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量呈下降趋势, 肝组织中 PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65、Bax 蛋白表达水平均呈下降趋势, 其中大黄牡

丹汤高剂量干预效果最为显著。这可能与高剂量大黄牡丹汤有效抑制了 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路的活化, 进而抑制 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子的异常分泌, 减轻了由此产生的炎症风暴级联放大反应, 提高了肝的防御功能, 进而减轻了肝损伤。

参 考 文 献(References)

- [1] Horibe M, Sasaki M, Sanui M, et al. Continuous regional arterial infusion of protease inhibitors has no efficacy in the treatment of severe acute pancreatitis: a retrospective multicenter cohort study [J]. *Pancreas*, 2017, 46(4): 510-517.
- [2] Zhao G, Zhuo YZ, Cui LH, et al. Modified Da-chai-hu Decoction regulates the expression of occludin and NF- κ B to alleviate organ injury in severe acute pancreatitis rats [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(5): 355-362.
- [3] 宋冰, 汪永锋, 余四九, 等. 基于 TLR4/MYD88 信号通路探讨大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠模型的保护作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(1): 17-26.
Song B, Wang YF, Yu SJ, et al. The protective effect of Dahuang Mudan Decoction on acute pancreatitis in rats based on TLR4/MYD88 signaling pathway [J]. *Acta Lab Ani Sci Sin*, 2021, 29(1): 17-26.
- [4] 张艳霞, 张延英, 舒畅, 等. 大黄牡丹汤组方对急性胰腺炎大鼠的保护作用 [J]. *中医研究*, 2015, 28(2): 55-58.
Zhang YX, Zhang YY, Shu C, et al. The protective effect of RPDP on acute pancreatitis in rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2015, 28(2): 55-58.
- [5] 张延英, 汪永锋, 张艳霞, 等. 大黄牡丹汤组方对急性胰腺炎大鼠胰腺细胞凋亡的影响 [J]. *吉林中医药*, 2014, 34(10): 982-984.
Zhang YY, Wang YF, Zhang YX, et al. Effect of RPDP on pancreatic cell apoptosis in rats with acute pancreatitis [J]. *Jilin Tradit Chin Med*, 2014, 34(10): 982-984.
- [6] 张延英, 舒畅, 蔡兴, 等. 大黄牡丹汤组方对急性胰腺炎模型大鼠炎症反应及氧化应激水平的影响 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31(5): 24-27.
Zhang YY, Shu C, Cai X, et al. Effect of RPDP on inflammatory response and oxidative stress in acute pancreatitis model rats [J]. *Lab Anim Sci*, 2014, 31(5): 24-27.
- [7] 农菲菲, 罗爽, 赵钟祥, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS 技术的大黄牡丹汤治疗 IBD 大鼠的血清代谢组学研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(5): 571-579.
Nong FF, Luo S, Zhao ZX, et al. Serum metabolomics study of Dahuang Mudan Decoction in the treatment of IBD rats based on UPLC / Q-TOF-MS technology [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2019, 30(5): 571-579.
- [8] 冯辉, 吴标, 赵习德, 等. 生长抑素联合大柴胡汤对重症急性胰腺炎大鼠的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(7): 1297-1301.
Feng H, Wu B, Zhao XD, et al. The effect of somatostatin combined with Dachaihu decoction on severe acute pancreatitis in

- rats [J]. *Chin J Pathophys*, 2016, 32(7): 1297-1301.
- [9] 袁琳, 周秉舵, 王晓素, 等. 三种不同严重程度大鼠重症胰腺炎模型比较研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(5): 20-23.
- Yuan L, Zhou BT, Wang XS, et al. A comparative study of three severe pancreatitis models in rats of different severity [J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 25(5): 20-23.
- [10] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社; 2006.
- Li YK. *Experimental methodology of traditional Chinese medicine pharmacology* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press; 2006.
- [11] Camargo CA Jr, Madden JF, Gao W, et al. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent [J]. *Hepatology*, 1997, 26(6): 1513-1520.
- [12] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 86.
- [13] Zhang H, Shan Y, Wu Y, et al. Berberine suppresses LPS-induced inflammation through modulating Sirt1/NF- κ B signaling pathway in RAW264.7 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 52: 93-100.
- [14] Lapiere P, Béland K, Alvarez F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis [J]. *Transl Res*, 2007, 149(3): 107-113.
- [15] 刘宏, 邓明明. 重症胰腺炎肝细胞凋亡的机制及展望 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(9): 1153-1155.
- Liu H, Deng MM. The mechanism and prospect of hepatocyte apoptosis in severe pancreatitis [J]. *Chongqing Med*, 2010, 39(9): 1153-1155.
- [16] Aamazadeh F, Ostadrahimi A, Rahbar SY, et al. Bitterapricot ethanolic extract induces apoptosis through increasing expression of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 in PANC-1 pancreatic cancer cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(13): 1895-1904.

[收稿日期] 2021-09-03

李哲,蔡方舟,李丹,等. LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型的建立及其 BCR 突变分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 177-184.

Li Z, Cai FZ, Li D, et al. Establishment of chronic infection mouse model by LCMV-CL13 virus and analysis of BCR mutation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 177-184.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.004

LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型的建立及其 BCR 突变分析

李哲,蔡方舟,李丹,陈倩,苑一真,王卫*

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

【摘要】 目的 建立淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型,分析其作为 B 细胞受体高频突变研究模型的可能性。方法 C57BL/6N 小鼠经尾静脉途径接种 2×10^6 PFU 剂量 LCMV-CL13 病毒,感染后第 10、20、30、40、50、60、70 天采集样品,通过 qPCR 检测组织病毒载量,流式检测分析外周血 CD4⁺T、CD8⁺T、CD19⁺B 细胞及脾生发中心 B 细胞比例,免疫组库测序分析 BCR V 区基因丰度及突变率。结果 在 LCMV-CL13 病毒感染小鼠体内检测到 1×10^6 copies/ μ L 水平的病毒复制;在感染平台期,小鼠外周血 CD4⁺T 细胞比例逐渐升高 ($13.15\% \pm 0.72\%$),CD8⁺T 细胞先降低 ($2.17\% \pm 0.40\%$) 后逐渐恢复 ($6.65\% \pm 0.52\%$),CD19⁺B 细胞以及生发中心 B 细胞比例分别增加至 ($40.32\% \pm 0.46\%$) 和 ($10.03\% \pm 0.60\%$);测序结果证明 BCR 重链 V 基因使用频率下降,突变率显著性升高 ($P < 0.05$)。结论 成功建立 LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型;此模型可用于 BCR 突变研究,为研究慢性病毒感染导致的 B 细胞高频突变奠定了基础。

【关键词】 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒;高频突变;生发中心 B 细胞;B 细胞受体

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0177-08

Establishment of chronic infection mouse model by LCMV-CL13 virus and analysis of BCR mutation

LI Zhe, CAI Fangzhou, LI Dan, CHEN Qian, YUAN Yizhen, WANG Wei*

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC). Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS). Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious. NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China)

Corresponding author: WANG Wei. E-mail: wangw@cnilas.org

【Abstract】 **Objective** To establish an LCMV-CL13 chronic infection mouse model and analyze its use for B cell somatic hypermutation research. **Methods** C57BL/6N mice were inoculated with 2×10^6 plaque-forming units of LCMV-CL13 virus via tail vein injection. The tissue viral load was then detected by quantitative polymerase chain reaction on days 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 70 post-infection. The CD4⁺ and CD8⁺T cell and CD19⁺B cell ratios in peripheral blood and the germinal center B cell percentage of the spleen were determined by flow cytometry, and the gene abundance and BCR V region mutation rate were analyzed using immune repertoire technology. **Results** LCMV-CL13-infected mice maintained a tissue viral load of 1×10^6 copies/ μ L virus. The percentage of CD4⁺T cells in the peripheral blood gradually increased in the infection plateau phase to ($13.15\% \pm 0.72\%$), while the percentage of CD8⁺T cells first decreased to ($2.17\% \pm$

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (81873963), 医科院创新工程项目 (2021-I2M-1-035)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81873963), Innovation Engineering Project of the Academy of Medical Sciences (2021-I2M-1-035)

【作者简介】 李哲 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 比较医学专业。Email: lizhelxz@163.com

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

0.40%) and then gradually recovered to (6.65% ± 0.52%), and the percentages of CD19⁺ B cells and germinal center B cells increased to (40.32% ± 0.46%) and (10.03% ± 0.60%), respectively. Sequencing result demonstrated that the frequency of V gene usage decreased and the mutation rate of the heavy chain CDR3 V gene increased 1.7-fold with increasing infection time. **Conclusions** We successfully established a LCMV-CL13 chronic infection mouse model. This model can be used to study BCR mutations, and provides a research tool for investigating B cell somatic hypermutation caused by chronic viral infection.

【Keywords】 lymphocytic choriomeningitis virus; somatic hypermutation; germinal center B cell; B cell receptor

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

人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、甲型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 等慢性病毒感染威胁全球人类健康, 是全球公共安全的重要威胁^[1-2], 亟待研发能有效抑制慢性病毒感染的策略。具有高频突变特点的广谱中和抗体 (broadly neutralizing antibodies, bNAbs) 被证明可抑制特定病毒的多种突变毒株^[3], 成为控制慢性病毒感染的希望所在。体细胞高突变 (somatic hypermutation, SHM) 是指抗体可变区 (variable region, V) 基因发生高频率点突变^[4], 增加抗体基因的遗传多样性和亲和力^[5], 是 bNAbs 诱导的关键环节。因此, SHM 为抗体亲和力成熟和抗体多样性的产生提供了分子基础, 也是优化抗体依赖性免疫反应的关键^[6]。

尽管进行了多年的深入研究, 但影响抗体基因发生 SHM 以及 SHM 靶向机制尚不清楚, 原因之一是缺乏可用于 SHM 研究的动物模型。建立可用于 SHM 研究的动物模型具有重要意义, 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒克隆 13 (lymphocytic choriomeningitis virus clone 13, LCMV-CL13) 感染, 作为全身性慢性病毒感染模型被广泛使用, 并被用于研究驱动人类慢性病毒感染的机制^[7-8]。为了深入探究 SHM 发生机制, 本文使用 LCMV-CL13 病毒尾静脉感染 C57BL/6N 小鼠, 分析感染小鼠中出现持续的生发中心 (germinal center, GC) 反应, 及 B 细胞受体 (B cell receptor, BCR) V 基因的突变情况, 分析其作为 B 细胞受体高频突变研究模型的可能性, 以期 SHM 实验研究提供借鉴, 同时为抗体生成、进化机制研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

80 只 SPF 级雌性 C57BL/6N 小鼠, 周龄为 6 ~ 8 周, 体重约 18 ~ 22 g, 购自北京维通利华实验动物

技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】。实验动物的饲养及实验操作在中国医学科学院医学实验动物研究所动物生物安全二级实验室 (ABSL-2) 【SYXK(京)2019-0039】进行。饲养及实验环境: 室内温度 22 ~ 25℃, 湿度 40% ~ 70%, 12 h 光照/黑暗循环; 动物在笼内自由摄食饮水。本实验过程遵循 3R 原则, 已获得中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会 (IACUC) 的批准 (WW21001)。

1.1.2 病毒株

淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒克隆 13 株 (lymphocytic choriomeningitis virus clone 13, LCMV-CL13) 由第三军医大学叶丽林教授赠送, 由本课题组扩增。扩增后的病毒液经 RNA 提取及 PCR 扩增后送由中美泰和公司测序鉴定为目的序列, 噬斑法检测病毒滴度为 1.72×10^7 PFU/mL。

1.1.3 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养基 (Gibco; C22400500BT)、PBS (Gibco; C10010500BT)、GK1.5 抗体 (Bio X cell; BE0003-1-100)、抗凝剂 (索莱宝; G0280)、RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit; 74104)、RNA 逆转录试剂盒 (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit; K1632)、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II; RR820A)、总 RNA 提取试剂盒 (Mag MAX[™] mir Vana[™] Total RNA Isolation Kit; A27828)、BCR 建库试剂盒 (KC-Digital[™] Stranded BCR-seq Library Prep Kit for Illumina, DT0811-02, Seq Health)、红细胞裂解液 (BD FACS[™] Lysing Solution; 349202), 流式抗体及染色方案见表 1。

高速冷冻型离心机 (SCIOLOGEX, 美国)、多用途冷却离心机 (HITACHI, 日本)、普通 PCR 仪 T100[™] Thermal Cycler (Bio-Rad, 美国)、实时荧光定量 PCR 仪 Quant Studio[™] 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems[™], 美国)、流式仪型号为 BD FACS Aria II (BD, 美国)。

表 1 抗体使用一览表

Table 1 List of used antibodies

组别 Panel	抗体 Antibody	克隆号 Clone	公司 Company
外周血流式 Peripheral blood flow	FITC anti-mouse CD45	30-F11	Biolegend
	PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD3	17A2	Biolegend
	PE/Cyanine7 anti-mouse CD19	6D5	Biolegend
	PE anti-mouse CD4	GK1.5	Biolegend
	APC anti-mouse CD8a	53-6.7	Biolegend
脾流式 Spleen flow	FITC anti-mouse/human CD45R/B220	RA3-6B2	Biolegend
	PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD19	6D5	Biolegend
	PE anti-mouse/human GL7 Antigen	GL7	Biolegend
	APC anti-mouse CD95 (Fas)	SA367H8	Biolegend

1.2 方法

1.2.1 动物分组及感染

80 只 C57BL/6N 小鼠分成两组。其中 70 只为实验组,用于感染模型构建;10 只设立为对照组。实验组 C57BL/6N 小鼠感染前 1 d 腹腔注射 500 μg CD4 抗体,感染当天经尾静脉注射 LCMV-CL13 病毒 2×10^6 PFU,感染后第 2 天再次经腹腔注射 500 μg CD4 抗体^[9];对照组小鼠经腹腔及尾静脉注射同等体积的 PBS。

1.2.2 LCMV-CL13 感染小鼠体重监测

C57BL/6N 小鼠感染后,每日观察小鼠临床表现,包括一般状况、体态、毛发、饮食、活动、排便等。感染后前 15 d 每天称重 1 次,感染 15 d 后每 4 d 称重 1 次。

1.2.3 组织采集

病毒感染后第 10、20、30、40、50、60、70 天收集动物血液及组织样本。具体地,从小鼠眼眶静脉丛取血 100 μL 置于装有 10 μL EDTA.2K 抗凝剂 (10X) 的 EP 管中,用于流式检测;排尽血液后,脱颈椎处死小鼠收集肠、肾、肝、脑组织,用于病毒载量检测;收集脾充分研磨制备单细胞悬液,用于流式检测。

1.2.4 组织病毒载量检测

使用 RNA 试剂盒提取小鼠肠、肾、肝、脑组织 RNA,反转录试剂盒将 RNA 反转为 cDNA,采用 SYBR Green 染料法检测组织中 LCMV-CL13 病毒载量^[9]。

1.2.5 外周血淋巴细胞比例检测

取小鼠外周血 100 μL 置于流式管中,同时加入流式荧光抗体 CD45-FITC、CD3-PerCP/Cyanine5.5、CD4-PE、CD8a-APC 和 CD19-PE/Cyanine7 各 5 ~ 10 μL ,室温避光孵育 30 min,裂解红细胞,PBS 洗涤 2

次,2%多聚甲醛固定,流式上机检测荧光信号。

1.2.6 脾淋巴细胞比例检测

取小鼠脾置于 RPMI 1640 不完全培养基充分研磨,经 70 μm 滤网过滤、裂解红细胞,制备获得单细胞悬液。加入流式荧光抗体 CD45R/B220-FITC、CD19-PerCP/Cyanine5.5、GL7-PE、CD95 (FAS)-APC 各 5 ~ 10 μL ;冰上避光孵育 20 min,2%多聚甲醛固定,流式上机检测荧光信号。采用 Flow Jo V10 对多色流式细胞仪上机结果进行分析。

1.2.7 免疫组库建库、测序

制备小鼠脾单细胞悬液,分离淋巴细胞,由武汉康测科技有限公司进行建库、测序。具体地,提取细胞总 RNA、逆转录获取单链 cDNA、UID (Unique Identifier) 标记、使用免疫球蛋白亚型 (IgM、IgA、IgG、IgD、IgE、IgK 和 IgL) 的特异性引物 (gene specific primer, GSP) 进行 PCR 扩增和文库构建,运用高通量测序技术检测靶向扩增后 B 细胞 CDR3 区域^[10]。

1.2.8 生物信息学分析

首先,使用 MiXCR (v3.0.3) 软件^[11],将纠错和去重后的数据与国际免疫遗传学数据库 IMGT (<http://www.imgt.org>) 的 V、D、J 基因片段进行比对^[12]。获取比对结果并开展后续深度分析。其次,数据多样性指标至关重要,多样性与免疫应答密切相关^[13]。采用 Shannon entropy 指数^[14] 计算样本 IGH 组成多样性,Shannon entropy 值越大,说明样本多样性越高。

1.3 统计学分析

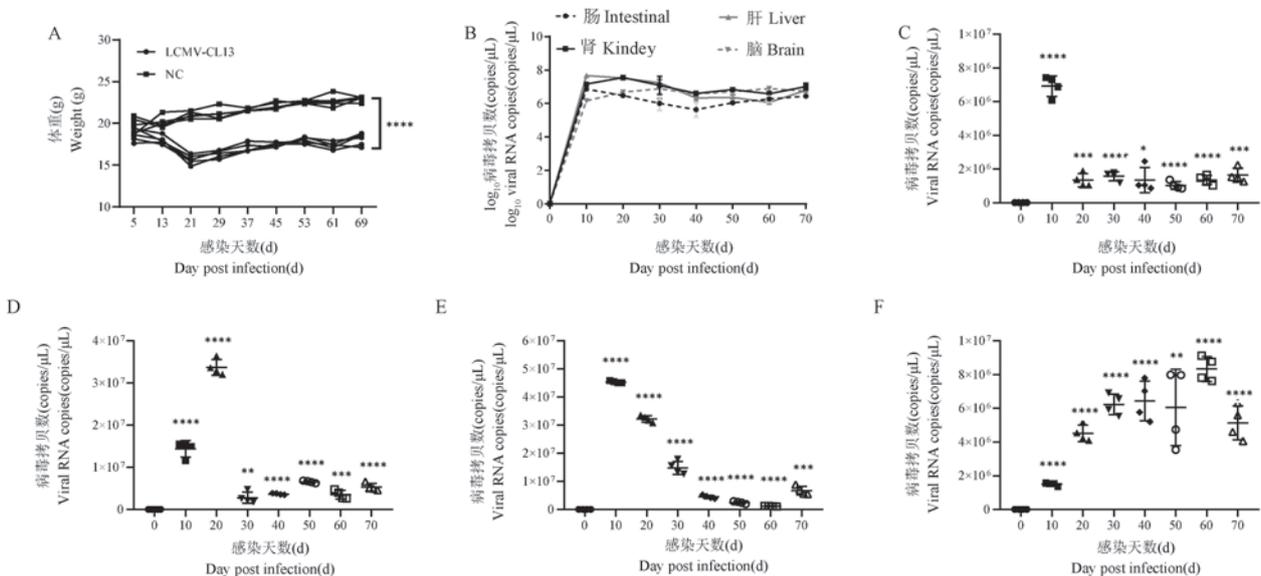
实验数据使用 GraphPad Prism 8 软件进行作图和统计分析,以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析,两组间均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LCMV-CL13 病毒在小鼠体内维持慢性感染状态

为了解 LCMV-CL13 病毒对 C57BL/6N 小鼠的致病情况,每天观察小鼠疾病表现,监测体重变化,小鼠感染后第 7 天出现明显疾病表现,如竖毛、弓背、体重下降等症状,感染后 21 d 体征逐渐恢复;在感染后 32 d 体重下降最为明显,并再次出现明显竖毛、弓背、体重下降等症状,感染后 40 d 体征逐渐恢复,可能受自身免疫反应影响^[15],感染后实验组动物较对照组体重明显下降($P < 0.0001$),说明病毒感染可对小鼠致病(图 1A)。为检测 LCMV-CL13 病毒在 C57BL/6N 小鼠体内的复制扩增情况,每

10 d 采集小鼠肠、肾、肝、脑组织提取病毒 RNA,使用实时荧光定量 PCR 测定病毒载量。根据组织病毒载量结果,感染可分为急性感染期(0 ~ 10 d)及平台期(10 ~ 70 d)(图 1B)。急性感染期,小鼠组织病毒载量迅速上升,在肠(7×10^6 copies/ μ L)、肝(4.5×10^7 copies/ μ L)组织维持高水平复制;而后组织病毒载量逐渐降低并保持在 10^6 copies/ μ L 水平(图 1C、1E),进入平台期,主要在肾(3.5×10^7 copies/ μ L)、脑(4.5×10^6 copies/ μ L)组织维持高水平复制;之后在肾组织病毒载量逐渐降低并保持在 10^7 copies/ μ L 水平复制,在脑组织中病毒载量逐渐升高并保持在 6×10^6 copies/ μ L 水平复制(图 1D、1F)。综上结果表明,LCMV-CL13 病毒可在 C57BL/6N 小鼠维持较高水平的病毒载量及慢性感染。



注:A:C57BL/6N 小鼠感染 LCMV-CL13 后体重变化;B:C57BL/6N 小鼠感染 LCMV-CL13 后组织病毒载量变化趋势;C、D、E、F:C57BL/6N 小鼠感染 LCMV-CL13 后肠、肾、肝、脑组织的病毒载量;与阴性对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ 。

图 1 LCMV-CL13 小鼠感染模型体重、组织病毒载量的动态变化

Note. A. Changes in body weight of C57BL/6N mice after infection with LCMV-CL13. B. The tissue viral load trend of C57BL/6N mice infected with LCMV-CL13. C、D、E、F. Viral load in the intestine, kidney, liver, and brain tissues of C57BL/6N mice infected with LCMV-CL13. Compared with the negative control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 1 Dynamic changes of body weight and tissue viral load of LCMV-CL13 mouse infection model

2.2 病毒感染引起 CD8⁺T 细胞耗竭、CD19⁺B 细胞增加

为了解 LCMV-CL13 慢性感染是否会导致小鼠外周血适应性免疫细胞(CD4⁺T、CD8⁺T 及 CD19⁺B 细胞)的动态变化,在不同时间点收集外周血进行流式检测。结果发现,与未感染状态相比,GK1.5 抗体先清除 CD4⁺T 细胞,感染后 20 d 开始 CD4⁺T 细胞比例随感染时间延长而恢复,感染后第 70 天可

达到 $13.15\% \pm 0.72\%$ (图 2)。CD8⁺T 细胞比例先降低后增加;在感染后 10 d 占比($9.49\% \pm 1.31\%$),随着感染的持续,感染后 40 d 降低最明显($2.17\% \pm 0.40\%$);随之 CD8⁺T 细胞比例开始升高,感染后 70 d CD8⁺T 细胞比例可达到($6.65\% \pm 0.52\%$)(图 2),但未恢复到正常水平。CD19⁺B 细胞比例在感染前 40 d 无明显变化,感染后 40 d 比例逐渐升高,感染后 70 d 达到($40.32\% \pm 0.46\%$)(图

2), 显著高于未感染状态。综上所述, GK1.5 抗体注射成功耗尽了小鼠体内 CD4⁺T 细胞, 帮助病毒感染; CD8⁺T 细胞在感染过程出现持续耗竭, 后随着

CD4⁺T 细胞比例增加而部分恢复; CD19⁺B 细胞比例受慢性病毒感染影响逐渐增加, 提示病毒诱发了显著的体液免疫反应。

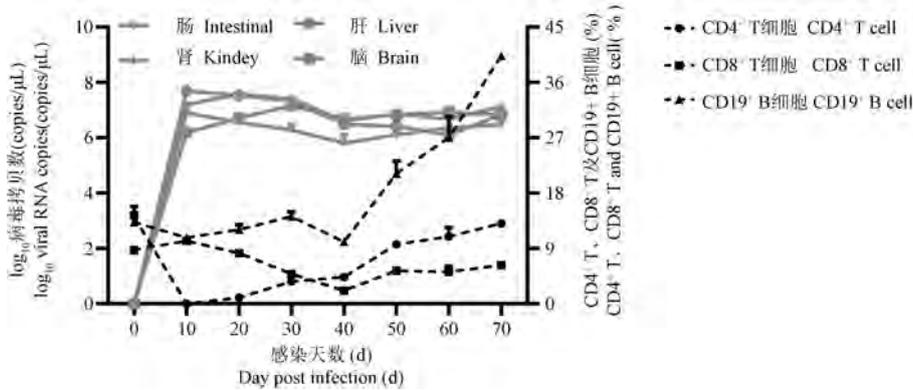


图2 感染后不同时间点, 病毒拷贝数与外周血 CD4⁺T、CD8⁺T、CD19⁺B 细胞比例变化

Figure 2 Trend of virus RNA copies and the proportion of CD4⁺T, CD8⁺T, and CD19⁺B cells in the peripheral blood at different time points after infection

2.3 病毒感染诱导 GC B 细胞比例增加

生发中心是免疫反应发生时, B 细胞在其中增殖、生长和突变的特殊区域。为了研究 B 细胞的成熟及 BCR 的突变, 本文研究了 LCMV-CL13 感染后脾生发中心 B 细胞的变化趋势, 我们对 LCMV-CL13 慢性感染小鼠脾中特异性 GC B 细胞 (B220⁺CD19⁺GL7⁺FAS⁺) 进行流式检测。结果发现, 急性期感染

中, GC B 细胞比例急剧下降, 感染后第 40 ~ 70 天, GC B 细胞比例由 (2.28% ± 2.68%) 增加至 (10.03% ± 0.60%) (图 3)。提示我们 LCMV-CL13 病毒感染初期可能对脾产生急性损伤, 感染平台期尤其感染后 30 ~ 70 d, GC B 细胞增加速率较快, 提示这一时期病毒特异性 GC B 细胞增殖较快, 发生针对病毒的体液免疫反应。

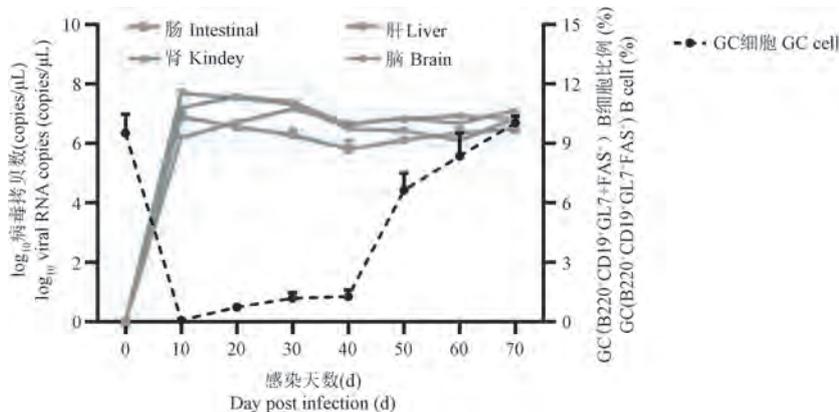


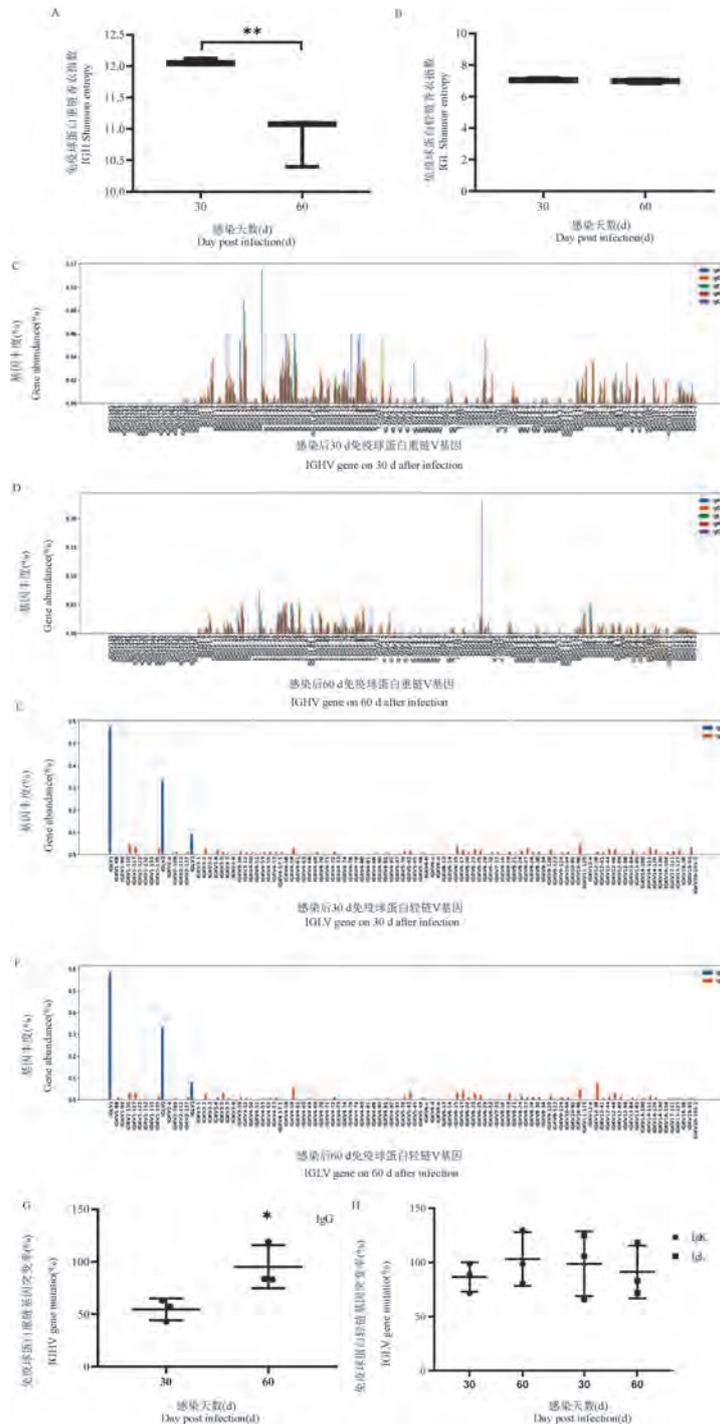
图3 感染后不同时间点, 病毒拷贝数与脾中 GC B (B220⁺CD19⁺GL7⁺FAS⁺) 细胞比例变化

Figure 3 Trend of virus RNA copies and the proportion of GC B cell (B220⁺CD19⁺GL7⁺FAS⁺) in the spleen at different time points after infection

2.4 样品多样性及 V 基因使用频率、突变率分析

BCR 是一种长在 B 淋巴细胞表面的免疫球蛋白分子 (immunoglobulin, Ig), 由重链及轻链构成, 与抗体同属于免疫球蛋白家族。BCR 库多样性主要受免疫球蛋白基因中 V、D、J 基因片段重组及 V-D-J 连接时发生核苷酸突变、插入或删除的影响。我们

采用香农指数 (Shannon index) 为组间多样性的评价指标。分析感染后 30 d 与感染后 60 d IGH、IGL 多样性以及 V 基因使用频率、突变率 (图 4), 重链多样性具有显著性差异 ($P < 0.01$) (图 4A), 轻链多样性无显著性差异 (图 4B), 重链 V 区基因片段中, 感染后 60 d 组 IGHV6-3、IGHV1-58、IGHV3-6 基因使用



注: A, B: 感染后 30、60 d, 重轻链多样性分析; C, D: 感染后 30、60 d, 重链 V 区基因使用频率分析; E, F: 感染后 30、60 d, 轻链 V 区基因使用频率分析, 横坐标表示 V 基因亚型, Y 轴表示每个基因表达丰度; G, H: 感染后 30、60 d, 重轻链 CDR3 V 基因突变率分析; 与感染后 30、60 d 数据相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 分析感染后 30、60 d 重轻链多样性、V 基因丰度及突变率

Note. A, B. Diversity analysis of heavy and light chains at 30 and 60 days after infection. C, D. Frequency analysis of heavy chain V region gene usage 30 and 60 days after infection. E, F. Frequency analysis of light chain V region gene usage 30 and 60 days after infection. The X-axis represents V gene subtypes, and the Y-axis represents the expression abundance of each gene. G, H. Mutation rate analysis of heavy and light chain CDR3 V gene at 30 and 60 days after infection. Compared with data of 30 and 60 days after infection, * $P < 0.05$.

Figure 4 Analysis of the diversity of heavy and light chains, the abundance and mutation rate of V gene on 30, 60 days after infection

频率高于感染后 30 d 组 ($P < 0.05$), 其他基因则在感染后 30 d 组表达更多或两组表达无统计学差异 (图 4C, 4D)。轻链 V 区基因片段中, 感染后 60 d 组基因使用频率与感染后 30 d 组无显著性差异 (图 4E, 4F)。可能是感染后 60 d 形成了针对抗原的特异性克隆。SHM 定义为 V 基因片段的突变频率, CDR3 区是抗原识别的重要部位, 其特异性是被认为是 SHM 突变的结果。为了确定此小鼠模型是否发生 SHM, 本实验分析不同时间点 CDR3 区域 V 基因突变率。突变率采用每 10 000 个碱基中发生突变的碱基数量表示。如图 4G, 4H 所示, 感染后 60 d 相比于感染后 30 d, 重链 V 基因突变率有显著性升高 ($P < 0.05$), 且突变率 $CDR3(60\text{ d})/CDR3(30\text{ d})$ 约为 1.7 倍。结果证明: 感染时间的增加, V 区基因点突变增高。综上, 提示 Ig 基因发生 SHM, 且突变产生针对病毒的特异性克隆, 造成多样性降低。

3 讨论

LCMV-CL13 慢性感染小鼠是一种广泛用于研究病毒慢性感染机制的动物模型, 为治疗人类慢性病毒性疾病和其他慢性疾病 (如癌症) 提供了宝贵的见解^[16-19], 包括抗原呈递的 MHC 限制、T 细胞效应功能和记忆^[20]; LCMV-CL13 感染小鼠在感染 8 d 后体重下降 20%, 具有明显临床疾病评分。感染后 1 ~ 5 周病毒保持高水平复制, 感染后 6 周血浆病毒滴度下降; 感染后 3 周内, $CD8^+$ T 细胞数量逐渐降低, $CD4^+$ T 细胞数量先升高后降低^[15]。至今为止, 该小鼠模型多用于 T 细胞研究。有研究证明, 成年小鼠在感染病毒时注射 CD4 单克隆抗体, 小鼠组织可终身保持高病毒水平^[21]。因此, 为建立慢性感染小鼠模型, 本实验通过先消耗 $CD4^+$ T 细胞再经尾静脉注射途径接种 LCMV-CL13 病毒, 感染后小鼠出现竖毛、弓背等体征, 体重出现明显下降、在检测期内组织病毒载量维持在相对较高水平。我们同时聚焦小鼠细胞、体液免疫反应。通过流式检测小鼠外周血 $CD4^+$ T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞以及 $CD19^+$ B 细胞比例, 发现 $CD8^+$ T 细胞、 $CD19^+$ B 细胞比例随着 $CD4^+$ T 细胞比例的增加而增加, 这与慢性病毒感染研究结果相符合^[22]。以上结果证明, 我们成功建立 LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型, 且小鼠外周适应性免疫反应较为强烈。

Ig 基因 SHM 在抗体介导的免疫反应中起关键作用。在抗病毒感染过程中, 生发中心 (germinal

center, GC) B 细胞发生 SHM 及类别转换 (class switch recombination, CSR) 诱导亲和力成熟, 丰富抗体可变区多样化、提高抗体中和活性^[23-24]。因此, GC B 细胞是产生有效体液免疫的关键所在^[25]。基于此, 我们流式检测 GC B 细胞比例, 发现感染前期 GC B 细胞比例急剧下降, 这可能与 IFN-I 诱导的炎症有关^[26]。在生发中心微环境中, GC B 细胞在暗区 (dark zone, DZ) 进行增殖和 Ig 基因 SHM, 在亮区 (light zone, LZ) 进行基于亲和力的选择^[27]。我们结果显示: 感染后第 40 ~ 60 天, GC B 细胞比例增加较快, 说明此阶段 GC B 细胞快速增殖。基于此, 我们推测感染后 40 ~ 60 d 可能发生 B 细胞高频突变。为了验证我们的假设, 分离感染后 30、60 d 脾 B 细胞进行 BCR 建库以及测序分析。对重链、轻链多样性以及 V 基因使用频率、突变进行比较分析。结果表明: 感染后 60 d 重链多样性降低, V 基因使用频率下降, 但 V 基因突变率增高 1.7 倍。表明 LCMV-CL13 慢性病毒感染模型发生 B 细胞高频突变, Ig V 基因突变率随感染时间逐渐增加, 产生病毒特异性克隆, 导致 BCR 库多样性降低。

SHM 可以增加免疫球蛋白对抗原识别和结合的亲和力, 虽然过去对 SHM 的分子机制进行了详细的研究, 但仍有很多内容尚未阐明。例如, 影响 SHM 发生的关键基因及调控基因尚未明确。在本研究中, 我们在成功建立 LCMV-CL13 慢性感染小鼠模型的基础上, 流式分析外周血、脾免疫细胞比例, 并首次对 B 细胞进行 BCR 突变分析, 初步探究 V 区基因使用频率、突变率随感染时间的变化情况。这为在 LCMV-CL13 慢性病毒感染小鼠模型中研究 B 细胞高频突变、探究中和抗体的形成机制提供了基础信息以及数据支持。本研究下一步将扩大组内样本数量, 从病毒与宿主共进化角度出发, 筛选影响 BCR 突变的关键基因以及 CDR3 序列特异性识别的抗原特征, 从而进一步探寻抗体生成及进化机制。

参 考 文 献 (References)

- [1] Lee MS, Park CH, Jeong YH, et al. Negative regulation of type I IFN expression by OASL1 permits chronic viral infection and $CD8^+$ T-cell exhaustion [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9 (7): e1003478.
- [2] Zehn D, Utzschneider DT, Thimme R. Immune-surveillance through exhausted effector T-cells [J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 16: 49-54.
- [3] Koff WC, Burton DR, Johnson PR, et al. Accelerating next-

- generation vaccine development for global disease prevention [J]. *Science*, 2013, 340(6136): 1232910.
- [4] Odegard VH, Schatz DG. Targeting of somatic hypermutation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(8): 573-583.
- [5] Tarsalain A, Maman Y, Meng FL, et al. Ig Enhancers Increase RNA Polymerase II stalling at somatic hypermutation target sequences [J]. *J Immunol*, 2022, 208(1): 143-154.
- [6] Pilzecker B, Jacobs H. Mutating for good: DNA damage responses during somatic hypermutation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 438.
- [7] Mbanwi AN, Wang C, Geddes K, et al. Irreversible splenic atrophy following chronic LCMV infection is associated with compromised immunity in mice [J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47(1): 94-106.
- [8] Berghaler A, Flatz L, Hegazy AN, et al. Viral replicative capacity is the primary determinant of lymphocytic choriomeningitis virus persistence and immunosuppression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(50): 21641-21646.
- [9] He R, Yang X, Liu C, et al. Efficient control of chronic LCMV infection by a CD4 T cell epitope-based heterologous prime-boost vaccination in a murine model [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(9): 815-826.
- [10] Pineda S, Sigdel TK, Liberto JM, et al. Characterizing pre-transplant and post-transplant kidney rejection risk by B cell immune repertoire sequencing [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1906.
- [11] Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 380-381.
- [12] Lefranc MP, Giudicelli V, Duroux P, et al. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): 413-422.
- [13] Kim D, Park D. Deep sequencing of B cell receptor repertoire [J]. *BMB Rep*, 2019, 52(9): 540-547.
- [14] Wu J, Liu D, Tu W, et al. T-cell receptor diversity is selectively skewed in T-cell populations of patients with Wiskott-Aldrich syndrome [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(1): 209-216.
- [15] Stamm A, Valentine L, Potts R, et al. An intermediate dose of LCMV clone 13 causes prolonged morbidity that is maintained by CD4⁺ T cells [J]. *Virology*, 2012, 425(2): 122-132.
- [16] Kim PS, Ahmed R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(2): 223-230.
- [17] Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection [J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 682-687.
- [18] Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection [J]. *Cell*, 2009, 138(1): 30-50.
- [19] Wherry EJ. T cell exhaustion [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(6): 492-499.
- [20] Zinkernagel RM. Lymphocytic choriomeningitis virus and immunology [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002, 263: 1-5.
- [21] Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection [J]. *J Virol*, 1994, 68(12): 8056-8063.
- [22] Fahey LM, Brooks DG. Opposing positive and negative regulation of T cell activity during viral persistence [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(3): 348-354.
- [23] Oreste U, Ametrano A, Coscia MR. On origin and evolution of the antibody molecule [J]. *Biology (Basel)*, 2021, 10(2): 140.
- [24] Lim CC, Choong YS, Lim TS. Cognizance of molecular methods for the generation of mutagenic phage display antibody libraries for affinity maturation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1861.
- [25] Weisel FJ, Mullett SJ, Elsner RA, et al. Germinal center B cells selectively oxidize fatty acids for energy while conducting minimal glycolysis [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(3): 331-342.
- [26] Fallet B, Narr K, Ertuna YI, et al. Interferon-driven deletion of antiviral B cells at the onset of chronic infection [J]. *Sci Immunol*, 2016, 1(4): eaah6817.
- [27] Attaf N, Baaklini S, Binet L, et al. Heterogeneity of germinal center b cells: new insights from single-cell studies [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(11): 2555-2567.

[收稿日期] 2022-01-25

张国新,高苒. 内皮细胞条件性敲除 EMCN 小鼠模型建立及肿瘤肺转移对比分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 185-190.

Zhang GX, Gao R. Establishment of endothelial conditional EMCN-knockout mouse model and comparative analysis of tumor lung metastasis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 185-190.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.005

内皮细胞条件性敲除 EMCN 小鼠模型建立及肿瘤肺转移对比分析

张国新^{1,2,3}, 高苒^{1,2,3*}

(1. 国家人类疾病动物模型资源库, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021; 2. 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021; 3. 中国医学科学院医学实验动物研究所 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立内皮细胞条件性敲除 EMCN 基因小鼠模型, 探讨 C57BL/6 小鼠与内皮细胞条件性敲除 EMCN 小鼠模型体内肿瘤肺转移存在的差异。方法 将内皮细胞特异性 Tek-CreERT2 小鼠与 EMCN^{fllox/fllox} 小鼠杂交, 将子代雄性 EMCN^{fllox/wt}/Tek-CreERT2⁺ 与雌性 EMCN^{fllox/fllox} 小鼠交配, 取得内皮细胞特异性敲除 EMCN 基因小鼠 (EMCN^{fllox/fllox}/Tek-CreERT2⁺, EMCN^{cko})。通过在 DNA 和蛋白水平验证基因敲除准确性及效率, 提取小鼠基因组 DNA 后, PCR 扩增检测 Tek-CreERT2 及 FLOX 位点, Tamoxifen 诱导后, Western Blot 检测组织中 EMCN 蛋白的表达。对正常 C57BL/6 小鼠与 EMCN^{cko} 小鼠表型进行观察及脏器 HE 染色。为了证实 EMCN 敲除对肿瘤转移的影响, 将 LLC 细胞尾静脉注射 C57BL/6 与 EMCN^{cko} 小鼠, 2 周后解剖取肺检测肺转移情况, 并对 2 组小鼠的肺转移结果统计对比分析。将 LLC 细胞皮下注射 C57BL/6 与 EMCN^{cko} 小鼠, 2 周后手术切除皮下肿瘤, 分别在术后 2、3 周观察肺转移情况, 将两组肺组织进行 HE 染色, 并对两组小鼠的肺转移结果统计对比分析。结果 从 DNA 和蛋白水平证实 EMCN^{fllox/fllox}/Tek-creERT2⁺ 小鼠成功构建。小鼠组织 HE 切片分析显示基因敲除小鼠脏器发育无异常。尾静脉注射 LLC 及皮下注射 LLC 后切除肿瘤的 C57BL/6 和 EMCN^{cko} 小鼠均可以发生肺转移, 与 C57BL/6 小鼠相比, 内皮细胞 EMCN 的缺失显著促进了小鼠肺转移。结论 成功获得内皮细胞 EMCN 条件性敲除小鼠, 内皮细胞 EMCN 敲除小鼠肿瘤肺转移的能力显著优于正常 C57BL/6 小鼠, 预期为肿瘤肺转移动物模型各项研究提供快速发生肺转移的动物模型。

【关键词】 EMCN 基因; 内皮细胞; Tek-CreERT2/EMCN^{fllox/fllox}; 肺转移

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0185-06

Establishment of endothelial conditional EMCN-knockout mouse model and comparative analysis of tumor lung metastasis

ZHANG Guoxin^{1,2,3}, GAO Ran^{1,2,3*}

(1. National Human Disease Animal Model Resource Center, NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China. 2. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Disease, Beijing 100021. 3. Institute of Laboratory Animal Sciences Chinese Academy of Medical Science (CAMS), Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021)

Corresponding author: GAO Ran. E-mail: gaoran@cnilas.org

【基金项目】 国家重点研发计划 (2021YFF0702801)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China (2021YFF0702801)。

【作者简介】 张国新 (1996—) 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 肿瘤转移与肿瘤动物模型。Email: zhangguoxin@cnilas.org

【通信作者】 高苒 (1980—) 女, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤转移与肿瘤动物模型。Email: gaoran@cnilas.org

【Abstract】 Objective To establish an endothelial conditional EMCN-knockout mouse model and explore the differences between tumor lung metastases in these and C57BL/6 mice. **Methods** Endothelial-cell-specific Tek-creERT2 mice were mated with EMCN^{flox/flox} mice. Male EMCN^{flox/wt}/Tek-creERT2⁺ mice were crossed with female EMCN^{flox/flox} mice to acquire endothelial cell-specific EMCN-knockout mice (EMCN^{flox/flox}/Tek-creERT2⁺, EMCN^{eccko}). To verify the gene knockout accuracy and efficiency at the DNA and protein level, the genomic DNA of mice was extracted, and the Tek-creERT2 and Flox sites were detected by PCR amplification. After tamoxifen induction, expression of the EMCN protein was detected on Western Blot. The phenotypes of normal C57BL/6 mice and EMCN^{eccko} mice were observed, and the organs were stained with hematoxylin and eosin (HE). To confirm the effect of EMCN knockout on tumor metastasis, (Lewis lung carcinoma, LLC) LLC cells were intravenously injected into C57BL/6 and EMCN^{eccko} mice. After 2 weeks, the lungs were dissected to detect metastasis, and the result for the two groups of mice were compared and analyzed. LLC cells were subcutaneously injected into C57BL/6 and EMCN^{eccko} mice. The subcutaneous tumors were removed 2 weeks later, and lung metastasis was observed 2 and 3 weeks after the operation. The lung tissues were stained with HE, and the metastasis result of the two groups were compared and analyzed. **Results** We confirmed the successful construction of EMCN^{flox/flox}/Tek-creERT2⁺ mice at the gene and protein level. Preliminary phenotypic analysis showed no abnormal organ development in the gene-knockout mice. C57BL/6 and EMCN^{eccko} mice given intravenous injection and tumor resection after subcutaneous injection can develop lung metastases. Compared with C57BL/6 mice, the deletion of endothelial cell EMCN expression significantly promoted lung metastasis. **Conclusions** Endothelial-cell-specific EMCN-knockout mice were successfully obtained. The frequency of lung metastasis in endothelial cell EMCN-knockout mice was significantly higher than that in normal C57BL/6 mice. This approach is expected to provide an efficient lung metastasis animal model for the study of tumor metastasis.

【Keywords】 EMCN; endothelial cells; Tek-CreERT2/EMCN^{flox/flox}; lung metastasis

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

数十年的癌症研究揭示了介导癌症进展的遗传和分子途径,发现了许多合理的治疗靶点,有望改善肿瘤患者的临床治疗效果^[1]。但是,恶性肿瘤的转移是一个包含多因素的动态复杂过程,仍是导致 90% 以上肿瘤患者死亡的主要原因^[2]。从原发灶脱离的播散性癌细胞在远处器官部位引发新肿瘤。转移级联涉及多个步骤,包括侵袭、从原发肿瘤进入循环、全身播散、外渗、再激活和生长。肺转移常见于不同类型的癌症,包括乳腺癌、胃肠道肿瘤、肾癌、黑色素瘤、不同类型的肉瘤以及肺癌本身^[3-4]。肿瘤微环境和细胞-细胞相互作用显著影响肿瘤细胞转移和肿瘤进展^[5],内皮细胞作为肿瘤微环境中基质成分,与癌细胞之间的相互作用通过生成新血管或破坏内皮细胞的屏障功能促进肿瘤进展^[6]。因此,研究内皮细胞影响肿瘤转移的机制需要进一步探索,建立一种良好的肺转移动物模型是研究和治疗肿瘤转移的前提。

内皮粘蛋白(endomucin, EMCN)是一种 I 型完整膜糖蛋白,在静脉和毛细血管内皮细胞中表达。它由 261 个氨基酸组成,其胞外结构域在丝氨酸和苏氨酸残基处高度 O-糖基化,并且具有几个潜在的 N-糖基化位点^[7]。在涉及的许多细胞粘附分子中,

EMCN 作为膜结合糖蛋白在毛细血管后小静脉内皮细胞的管腔侧特异表达,并在生理和病理性血管生成中发挥作用^[8]。然而,EMCN 在肿瘤转移中的作用尚未见报道。本研究拟采用尾静脉注射 LLC 细胞和皮下接种 LLC 细胞后手术切除肿瘤的方法建立肺转移小鼠模型,比较内皮细胞 EMCN 敲除小鼠和 C57BL/6 小鼠肿瘤肺转移的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只 8 周龄 SPF 级正常 C57BL/6 小鼠,体重约为 25 g,EMCN^{flox/flox} 纯合子转基因小鼠 6 只和 Tek-CreERT2 转基因小鼠 6 只购自北京唯尚立德生物科技有限公司【SCXK(京)2019-0008】。小鼠于中国医学科学院医学实验动物研究所 SPF 级动物饲养间饲养【SYXK(京)2019-0039】。实验操作在中国医学科学院医学实验动物研究所地下动物房进行,室内温度控制在 20 ~ 25℃,湿度范围 40% ~ 70%。小鼠用具每周进行 1 次清洗高压处理。在实验时,严格遵循 3R 原则及动物福利。本课题使用小鼠通过了中国医学科学院医学实验动物研究所实验动

物伦理委员会审查(IACUC-GR21003)。

1.1.2 细胞

LLC 小鼠肺癌细胞株为本课题组保藏。

1.1.3 主要试剂与仪器

DMEM 培养基、胎牛血清均购买自美国 Gibco 公司,细胞培养瓶购自 NEST,手术器械购自德国 FST 公司,吸入麻醉剂异氟烷(Isoflurane)购自深圳瑞沃德公司。相差倒置显微镜(Zeiss, 日本);离心机(ependorf, 德国);数字游标卡尺(上海台海工量具公司)。

1.2 方法

1.2.1 转基因小鼠的繁殖与鉴定

将内皮细胞特异性 Tek-CreERT2 小鼠与 EMCN^{fllox/fllox} 小鼠杂交,获得子代后,将子代雄性 EMCN^{fllox/wt}/Tek-CreERT2⁺ 与雌性 EMCN^{fllox/fllox} 小鼠交配,取得内皮细胞特异性敲除 EMCN 基因小鼠(EMCN^{fllox/fllox}/Tek-CreERT2⁺, EMCN^{ecKO})。EMCN^{fllox/fllox} 为纯合子小鼠,后续雌雄均取纯合子 EMCN^{ecKO} 小鼠与 EMCN^{fllox/fllox} 小鼠杂交繁殖。利用 DNA 提取试剂盒提取鼠尾 DNA,设计合成鉴定 flox 位点引物(Forward: 5'-AACAAAATTATGGTCTTT TCCG-3', Reversed: 5'-CCTAAGATGCTAGTGTTCCG CC-3')和 Tek-creERT2 的引物(Forward: 5'-AAGATACAGCCTTTCCCATCCTAAT-3', Reversed: 5'-TTAAGCAAAATAATAGATTTGAGGC-3')。PCR 总反应体系 20 μ L: 2 \times PCR Master Mix 10 μ L, 上游引物和下游引物各 1 μ L, 提取的 DNA 作为模板 2 μ L, 无 RNA 酶的水 6 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。结束后,取 PCR 反应产物 7 μ L 在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 110 V 25 min, 凝胶成像系统拍照分析。

1.2.2 尾静脉肺转移模型构建

将对数生长期的 LLC 细胞消化离心,用 PBS 重悬细胞,制成 1×10^7 /mL 的细胞悬液,尾静脉注射 C57BL/6 和 EMCN^{ecKO} 小鼠每只 100 μ L,尾静脉注射 14 d 后,解剖取肺,HE 染色观察肺转移情况。

1.2.3 皮下肿瘤手术切除肺转移模型构建

将对数生长期的 LLC 细胞消化离心,用 PBS 重悬细胞,制成 3×10^6 /mL 的细胞悬液,皮下注射 C57BL/6 和 EMCN^{ecKO} 小鼠每只 100 μ L,皮下注射 21 d 后,手术切除皮下肿瘤,在肿瘤切除后 14、21 d 解剖取肺观察肺转移情况。

1.2.4 HE 染色

将福尔马林固定的组织石蜡包埋后,组织切片 4 μ m 厚度。60 $^{\circ}$ C 烘箱 2 h 后进行切片的常规脱蜡,二甲苯 I 20 min,二甲苯 II 10 min,无水乙醇 30 s, 95%乙醇 30 s,75%乙醇 30 s,蒸馏水 5 min,苏木素染色 4 min,0.5%盐酸酒精分化 9 s,流水冲洗 15 min,75%乙醇 10 s,85%乙醇 10 s,伊红染色 10 s,后续脱水 95%乙醇 10 s,无水乙醇 10 s,二甲苯 I 10 s,二甲苯 II 10 s,封片剂封片后观察。

1.2.5 Western Blot

将小鼠麻醉后解剖,心脏灌注后取肺,使用 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,12 000 rpm 离心 30 min,取上清后加入 5 \times loading buffer,金属浴中 100 $^{\circ}$ C 10 min。通过 SDS-PAGE 将蛋白分离,250 mA 90 min 电泳将蛋白转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭后,一抗孵育过夜。TBST 清洗后,二抗室温 1 h,在成像系统进行扫描分析。

1.3 统计学分析

肿瘤转移面积通过 Image J 测量,肿瘤体积的数据通过 Graphpad Prime 8 软件进行分析。实验数据均采用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 *t* 检验进行分析比较。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

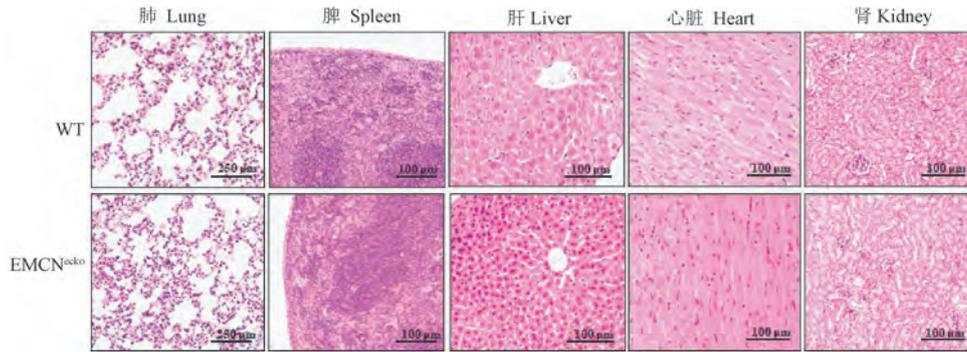
2 结果

2.1 EMCN^{ecKO} 小鼠表型分析

C57BL/6 遗传背景的内皮细胞 EMCN 基因敲除小鼠与野生型 C57BL/6 鼠外观形态,繁殖能力无显著性差异。通过 HE 切片染色显示,与 C57BL/6 小鼠比,EMCN^{ecKO} 小鼠主要脏器未见异常(见图 1)。

2.2 内皮细胞 EMCN 敲除小鼠基因和蛋白鉴定

对 C57BL/6 和 EMCN^{ecKO} 小鼠鼠尾基因组 DNA 扩增产物鉴定结果。如图 2 所示:A 图中 1 号为野生型对照,未见条带。2,3,5 号样品条带在 1800 bp 位置左右,为 Tek-creERT2 阳性小鼠,4 号样品未见条带,为 Tek-creERT2 阴性小鼠。B 图中 1 号样品条带大小在 180 bp 左右,为野生型小鼠。对于 EMCN^{fllox/fllox} 小鼠鉴定,2 号和 4 号样品条带在 220 bp 位置左右,为 EMCN^{fllox/fllox} 纯合小鼠,3 号样品条带在 180 bp 和 220 bp 位置左右,为杂合 EMCN^{fllox/fllox} 小鼠。Western Blot 检测 C57BL/6 和 EMCN^{ecKO} 小鼠肺组织中 EMCN 的表达情况,结果显示 EMCN^{ecKO} 小鼠肺中 EMCN 被敲除(*P* < 0.001) (见图 3)。

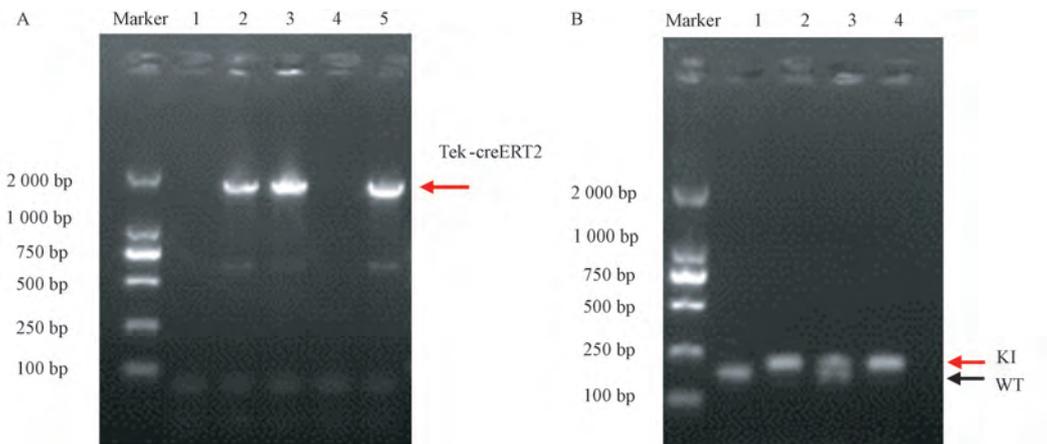


注: C57BL/6 和 EMCN^{ecko} 小鼠相比无显著差异。

图 1 C57BL/6 和 EMCN^{ecko} 小鼠主要脏器 HE 染色

Note. There was no significant difference between C57BL/6 and EMCN^{ecko} mice.

Figure 1 HE staining of main organs of C57BL/6 and EMCN^{ecko} mice

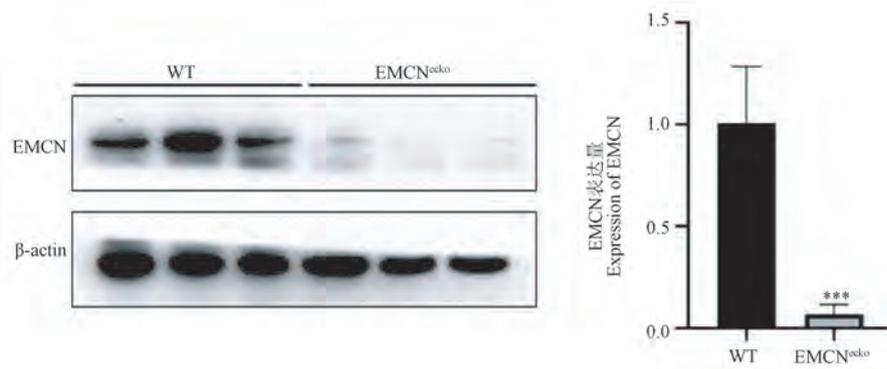


注: A: 1: 野生型小鼠, 2, 3, 5: Tek-creERT2 阳性小鼠, 4: Tek-creERT2 阴性小鼠; B: 1: 野生型小鼠, 2, 4: EMCN^{flox/flox} 纯合小鼠, 3: EMCN^{flox/flox} 杂合小鼠。

图 2 部分小鼠 PCR 基因型鉴定结果

Note. A. 1. Wild type. 2, 3, 5. Tek-creERT2 positive mice. 4. Tek-creERT2 negative mice. B. 1. Wild type. 2, 4. EMCN^{ecko} homozygous mice. 3. EMCN^{ecko} Heterozygote mice.

Figure 2 Results of genotype identification of some mice by PCR



注: C57BL/6 和 EMCN^{ecko} 小鼠肺组织中 EMCN 的表达水平。

图 3 Western Blot 检测结果

Note. The expression of EMCN in lung tissue of C57BL/6 and EMCN^{ecko} mice.

Figure 3 Western Blot results

2.3 C57BL/6 和 EMCN^{cko} 小鼠尾静脉肺转移情况对比分析

C57BL/6 和 EMCN^{cko} 小鼠每组各 5 只,尾静脉注射 LLC 细胞 14 d 后,解剖取肺,然而检测肺转移

情况,C57BL/6 和 EMCN^{cko} 小鼠均发生肺转移,与 C57BL/6 小鼠比,EMCN^{cko} 组小鼠肺转移结节数目显著增多,具有统计学意义($P < 0.01$),表明,内皮细胞 EMCN 的敲除显著地促进了肺转移的发生。



注:A:C57BL/6 和 EMCN^{cko} 小鼠中肿瘤转移的肺;B:转移灶的数量;与 WT 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 4 肺转移检测

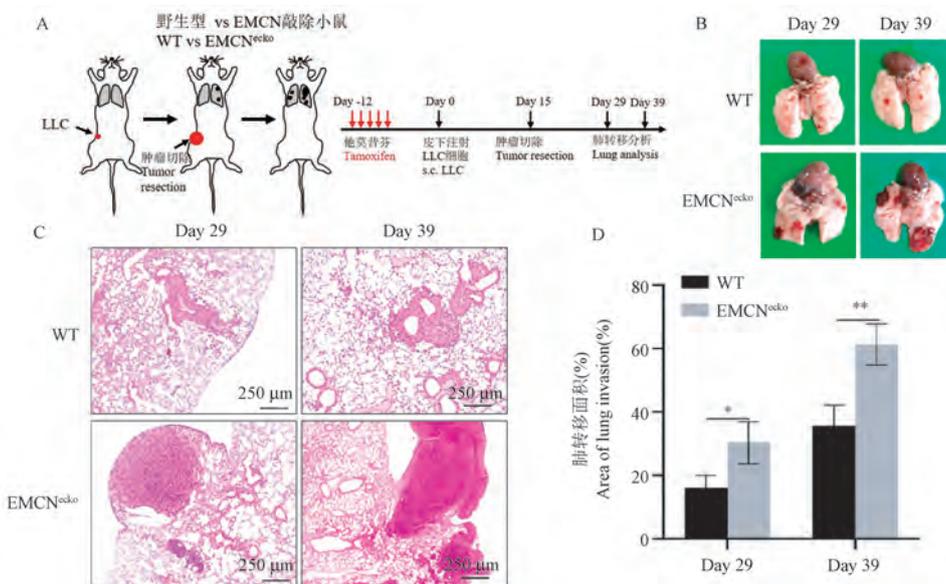
Note. A. Lung metastasis in C57BL/6 and EMCN^{cko} mice. B. The number of metastases foci. Compared with WT group, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Lung metastasis detection

2.4 C57BL/6 和 EMCN^{cko} 小鼠皮下肿瘤手术后切除肺转移情况对比分析

为了更好的模拟临床肿瘤患者术后复发,我们构建了皮下肿瘤手术后切除肺转移小鼠模型,该模型可以模拟肿瘤细胞从原发灶脱离,突破基质穿入血管的过程,比传统的尾静脉注射肿瘤细胞直接进入血液循

环系统更能模拟肿瘤转移的整个过程^[9]。结果显示:C57BL/6 和 EMCN^{cko} 小鼠在手术后 3 周均可发生肺转移,而 EMCN^{cko} 小鼠比 C57BL/6 小鼠更容易发生肺转移($P < 0.05, P < 0.01$),EMCN^{cko} 小鼠作为一种快速肺转移模型优于 C57BL/6 小鼠,为肿瘤肺转移动物模型各项研究提供快速发生肺转移的小鼠模型(见图 5)。



注:A:C57BL/6 和 EMCN^{cko} 小鼠皮下肿瘤切除后肺转移模型建立方案;B:C57BL/6 和 EMCN^{cko} 小鼠中不同时间的肺转移;C:肺组织 HE 染色;D:肺转移面积分析;与 WT 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 肺转移检测

Note. A. Establishment of lung metastasis model after subcutaneous tumor resection in C57BL/6 and EMCN^{cko} mice. B. Lung metastasis at different times in C57BL/6 and EMCN^{cko} mice. C. Lung tissue HE staining. D. The analysis of lung metastasis area. Compared with WT group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Lung metastasis detection

3 讨论

开发新的有效药物以阻断肿瘤转移的研究离不开有效的动物模型^[10]。然而建立快速肺转移动物模型用于肿瘤转移研究至关重要^[11]。以往的肿瘤肺转移模型是通过尾静脉注射肿瘤细胞直接进入血液循环系统,然而缺少了肿瘤细胞从原发灶进入血液的过程,因此无法模拟人类肿瘤转移的过程,在本研究中,我们通过手术切除原发肿瘤,观察肺转移情况,构建了一种更好的模拟临床肿瘤患者术后复发的肺转移小鼠模型。

粘蛋白属于构成粘液主要结构成分的糖蛋白家族^[12]。EMCN 属于糖蛋白家族成员之一,是一种膜结合糖蛋白,由毛细血管后小静脉内皮细胞内腔表达^[7]。毛细血管后小静脉是炎症期间白细胞募集的主要场所,EMCN 在维持正常的生理状态发挥了重要作用^[13]。本实验采用 Cre-Loxp 系统构建了内皮细胞条件性敲除小鼠模型,取鼠尾组织基因组 DNA、PCR 扩增和凝胶电泳等鉴定出 EMCN 敲除鼠的基因型,通过 Western Blot 法检测不同脏器中 EMCN 的表达水平,结果显示内皮细胞条件性敲除 EMCN 基因小鼠模型构建成功。HE 染色结果显示, C57BL/6 和 EMCN^{cko} 小鼠肺能够观察到细胞肿瘤转移的结节存在,这表明构建的手术后切除模型发生肺转移,建模成功。与 C57BL/6 小鼠相比, EMCN^{cko} 小鼠肺转移结节数显著增加,表明内皮细胞 EMCN 的敲除显著的促进了肿瘤的肺转移。

综上,与正常 C57BL/6 小鼠比,在肿瘤肺转移的形成能力上,EMCN^{cko} 小鼠具有明显优势,我们分析推断内皮细胞 EMCN 基因缺失引起的肺部的改变是易于形成肺转移的重要原因,在应用方面,预期可将 EMCN 敲除小鼠肺转移动物模型应用于各项分子机制探索及药物研发中,该方法模型构建周期短,成功率高,节约成本,更能符合临床肿瘤患者的术后复发,可用于肿瘤肺转移和复发的防治研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Steeg PS. Targeting metastasis [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16 (4): 201-218.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [3] Obenauf AC, Massagué J. Surviving at a distance: organ-specific metastasis [J]. Trends Cancer, 2015, 1(1): 76-91.
- [4] Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells [J]. Nature, 2016, 529(7586): 298-306.
- [5] Stuelten CH, Parent CA, Montell DJ. Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(5): 296-312.
- [6] Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(9): 533-548.
- [7] Zhang G, Yang X, Gao R. Research progress on the structure and function of endomucin [J]. Anim Mod Exp Med, 2021, 3 (4): 325-329.
- [8] Niu T, Zhao M, Jiang Y, et al. Endomucin restores depleted endothelial glycocalyx in the retinas of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. FASEB J, 2019, 33(12): 13346-13357.
- [9] Singhal M, Gengenbacher N, Abdul Pari AA, et al. Temporal multi-omics identifies LRG1 as a vascular niche instructor of metastasis [J]. Sci Transl Med, 2021, 13(609): eabe6805.
- [10] Gengenbacher N, Singhal M, Augustin HG. Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives [J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(12): 751-765.
- [11] Fontebasso Y, Dubinett SM. Drug development for metastasis prevention [J]. Crit Rev Oncog, 2015, 20(5-6): 449-473.
- [12] Dhanisha SS, Guruvayoorappan C, Drishya S, et al. Mucins: structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2018, 122: 98-122.
- [13] Zahr A, Alcaide P, Yang J, et al. Endomucin prevents leukocyte-endothelial cell adhesion and has a critical role under resting and inflammatory conditions [J]. Nat Commun, 2016, 7: 10363-10371.

[收稿日期] 2022-01-17

张锐虎,姚茹,史泽雅,等. 莲心碱通过抑制 NF- κ B 激活 Nrf2/HO-1 通路发挥抗炎抗氧化作用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 191-197.

Zhang RH, Yao R, Shi ZY, et al. Liensinine exerts anti-inflammatory and antioxidant effects by inhibiting nuclear factor- κ B and activating the nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2/heme oxygenase-1 pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 191-197.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.006

莲心碱通过抑制 NF- κ B 激活 Nrf2/HO-1 通路发挥 抗炎抗氧化作用

张锐虎^{1,2#},姚茹^{1,2#},史泽雅^{1,2},郭民^{1,2},霍怡彤^{1,2},侯佳楠^{1,2},陈朝阳^{1,2*}

(1. 山西医科大学实验动物中心,太原 030001;2. 山西省实验动物与人类疾病动物模型重点实验室,太原 030001)

【摘要】 目的 探讨莲心碱(liensinine, lie)在脂多糖(lipid polysaccharides, LPS)诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型中的抗炎抗氧化作用机制。方法 将细胞分为对照组(Control group), LPS 组(LPS group), 莲心碱(0.5、1、2 μ mol/L)组。采用 CCK-8 法筛选莲心碱的无细胞毒性浓度, Griess 法检测一氧化氮(NO)的浓度, 酶联免疫法(ELISA)检测前列腺素 2(PGE2)的浓度以及促炎因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)的含量, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 COX-2 和 iNOS mRNA 的表达, DCFH-DA 探针检测细胞中活性氧(ROS)含量, 试剂盒检测细胞中超氧化物歧化酶(SOD)的活性以及谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)的含量, 蛋白质免疫印迹法(Western Blot)检测 NF- κ B、MAPK 和 Nrf2/HO-1 通路中关键蛋白的表达情况。结果 0 ~ 4 μ mol/L 莲心碱对细胞活力无影响, 与 LPS 组相比, 莲心碱组(0.5、1、2 μ mol/L)细胞中的促炎因子含量下降($P < 0.05$), NO 和 PGE2 浓度下降($P < 0.05$), COX-2 和 iNOS mRNA 表达降低($P < 0.05$), NF- κ B 和 MAPK 通路被抑制($P < 0.05$), 且具有剂量依赖性, 莲心碱处理后 ROS 和 MDA 的含量显著低于 LPS 组($P < 0.01$), SOD 的活性和 GSH 的含量显著高于 LPS 组($P < 0.01$), Nrf2/HO-1 通路活性也较于 LPS 组显著增加($P < 0.05$)。结论 莲心碱通过抑制 NF- κ B 和 MAPK 通路与激活 Nrf2/HO-1 通路发挥抗炎抗氧化作用。

【关键词】 莲心碱;脂多糖;RAW264.7 巨噬细胞;炎症;氧化应激

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0191-07

Liensinine exerts anti-inflammatory and antioxidant effects by inhibiting nuclear factor- κ B and activating the nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2/heme oxygenase-1 pathway

ZHANG Ruihu^{1,2#}, YAO Ru^{1,2#}, SHI Zeya^{1,2}, GUO Min^{1,2}, HUO Yitong^{1,2}, HOU Jianan^{1,2}, CHEN Zhaoyang^{1,2*}

(1. Laboratory Animal Center of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China. 2. Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Animal Model of Human Disease, Taiyuan 030001)

Corresponding author: CHEN Zhaoyang. E-mail: ccytcn@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the anti-inflammatory and antioxidant effects of liensinine (LIE) derived from lotus on a lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 macrophage inflammatory model, and to study the molecular mechanisms responsible for these effects in relation to the nuclear factor (NF- κ B), mitogen-activated protein kinase

【基金项目】 山西省实验动物专项资金项目(2015K02)。

Funded by the Special Fund Project for Experimental Animals of Shanxi Province(2015K02).

【作者简介】 张锐虎(1978—),男,实验师,硕士,研究方向:人类疾病动物模型。Email:337119092@qq.com;

姚茹(1993—),女,硕士,研究方向:人类疾病动物模型。Email:m18734116230@163.com。

#共同第一作者

【通信作者】 陈朝阳(1972—),男,教授,硕士,研究方向:人类疾病动物模型。Email:ccytcn@163.com

(MAPK), and nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase (HO)-1 pathways. **Methods** RAW264.7 macrophages were divided into Control group, LPS group and LIE (0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$) groups. Cells were subjected to Cell Counting Kit 8 screening of non-cytotoxic concentrations of LIE, nitric oxide (NO) was detected by the Griess method, prostaglandin 2 (PGE2) and pro-inflammatory factors (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) were detected by enzyme-linked immunoassay, cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide (iNOS) synthase gene expression were detected by real-time polymerase chain reaction, and reactive oxygen species (ROS) were detected by dichloro-dihydro-fluorescein diacetate assay (which detects superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) contents), and NF- κB , MAPK, and Nrf2/HO-1 pathway protein expression were detected by Western Blot. **Results** LIE 0 ~ 4 $\mu\text{mol/L}$ had no effect on cell viability. Levels of pro-inflammatory factors levels were significantly lower in the LIE (0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$) group compared with the LPS group, NO and PGE2 concentrations and COX-2 and iNOS mRNA expression levels were all decreased, and NF- κB and MAPK pathways were inhibited ($P < 0.05$) in dose-dependent manners. The ROS and MDA contents were also significantly lower and SOD activity and GSH were significantly higher compared with the LPS group ($P < 0.01$), and the activity of the Nrf2/HO-1 pathway was also significantly higher than that of the LPS group ($P < 0.05$). **Conclusions** LIE exerts anti-inflammatory and antioxidant effects by inhibiting the NF- κB and MAPK pathways and activating the Nrf2/HO-1 pathway.

[Keywords] liensinine; lipopolysaccharide; RAW264.7 macrophages; inflammation; oxidative stress

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

氧化应激与炎症是造成许多疾病发生的重要原因,如急性肺损伤等^[1]。因此,寻找同时具有抗炎与抗氧化作用的药物将对此类疾病的治疗具有积极作用。RAW264.7 细胞是小鼠巨噬细胞,巨噬细胞在一些炎性组织损伤中起关键作用,是一种主要的免疫效应细胞^[2]。LPS 是革兰氏阴性菌外膜的主要成分,会通过抑制 Nrf2/HO-1 通路激活 NF- κB 、MAPK 通路刺激巨噬细胞 ROS 含量的增加和炎症介质的生成^[3]。近年来,许多传统药物的活性成分被提取用于疾病的研究^[4],其中莲心碱是一种二苄基四氢异喹啉类生物碱,从莲子中分离得到,具有抗高血压、抗心律失常、血管平滑肌等生物活性^[5]。已报道莲心碱对叔丁基过氧化氢诱导的人肝细胞 HepG2 细胞系氧化应激具有细胞保护作用^[6],还可抑制大鼠灌注后炎症因子 TNF- α 和 IL-1 的表达^[7],但并未报道其抗氧化抗炎作用靶点,前期我们也在动物水平证明了莲心碱通过抗氧化与抗炎作用对急性肺损伤具有显著预防效果^[8]。因此,本研究我们将在细胞水平对莲心碱抗炎抗氧化作用及分子机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

RAW264.7 细胞购于上海细胞库。

1.1.2 主要试剂与仪器

莲心碱(HPLC $\geq 98\%$)(北京中科质检生物有

限公司,批号:2586-96-1,中国);脂多糖(Sigma 公司,美国);TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司,中国);CCK-8、NO、PGE2 试剂盒(碧云天生物技术有限公司);ROS、GSH、MDA、SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国);PrimeScriptTM RTMasterMix、SYBR PremixEX Taq II (TaKaRa 公司,日本);一抗、二抗(CST 公司,美国); β -actin、COX-2、iNOS 引物由上海生工合成;化学发光成像仪(G-Box Chemixx9, Syngene 公司,英国);流式细胞仪(FACS-Calibur, BD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

RAW264.7 细胞用完全培养基培养(89%的 DMEM 培养基、10%胎牛血清和 1%的 100 IU/mL 青霉素-链霉素)培养在培养箱中(37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2)。

1.2.2 CCK-8 毒性检测

将 RAW264.7 细胞接种到 96 孔板(5×10^4 个细胞/孔)中,培养 24 h 后,加入 100 μL 不同浓度(0、0.25、0.5、1、2、4、8 和 16 $\mu\text{mol/L}$)的莲心碱。24 h 后,倒掉培养基,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 和 100 μL 含莲心碱的培养液,孵育 4 h 后在酶标仪 450 nm 下检测吸光度。

1.2.3 细胞炎症相关指标的测定

RAW264.7 细胞被接种到 24 孔板(1×10^5 个细胞/孔)中,培养 24 h 后,加入 100 μL 不同浓度的莲心碱(0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$) 2 h,用 LPS(2 $\mu\text{g/mL}$) 刺激 24 h。将细胞培养液离心(2000 rpm, 10 min)后

吸取上清至新的离心管,在各孔细胞中均加入 50 μL Griess Reagent I、Griess Reagent II 后轻轻振荡,于 540 nm 下检测,以测定 NO 浓度。按 ELISA 试剂盒说明书检测上清液中 PGE2、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量。

1.2.4 qRT-PCR

RAW264.7 细胞被接种在 6 孔板 (2×10^5 个细胞/孔),培养 24 h,随后用不同浓度的莲心碱(0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞 2 h,用 2 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激细胞 12 h。采用 TRIzol 试剂裂解细胞提取总 RNA 后进行浓度测定,反转录为 cDNA,进行 qRT-PCR 检测,结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对表达量表示。引物为:COX-2: F: 5'-CTGGAACATGGACTCACTCAGTTTG-3', R: 5'-AGGCCTTTGCCACTGCTTGTA-3'; iNOS: F: 5'-CAAGCACATTTGGGAATGGAGA-3', R: 5'-CAGAAGTGGGCTACATGCTGGAG-3'; β -actin: F: 5'-CAAGCACATTTGGGAATGGAGA-3', R: 5'-CAGAAGTGGGCTACATGCTGGAG-3'。

1.2.5 细胞氧化应激相关指标的测定

RAW264.7 细胞被接种在 6 孔板 (2×10^5 个细胞/孔),培养 24 h,随后用不同浓度的莲心碱(0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞 2 h,用 2 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激细胞 1 h。孵育 30 min (10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA, 37 $^{\circ}\text{C}$),收集细胞悬液离心(1000 r/min, 10 min),倒掉上清加 200 μL Binding Buffer 用流式进行检测,结果以平均荧光强度值表示,代表 ROS 含量。

RAW264.7 细胞被接种到 6 孔板 (2×10^6 个细胞/孔),培养 24 h 后,加入 100 μL 不同浓度的莲心碱(0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$) 2 h,用 2 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 12 h,倒掉上清,收集细胞后根据相应试剂盒说明书测定 MDA、SOD 和 GSH 的含量。

1.2.6 Western Blot

将 3×10^6 细胞接种于 T25 细胞培养瓶,培养 12 h,随后用 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ 的莲心碱干预细胞 6 h,2 $\mu\text{g/mL}$ LPS 诱导细胞 1 h。PBS 清洗两次细胞,加入 1 mL 裂解液冰上裂解 30 min,吸至离心管中离心(12 000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$),吸取上清测蛋白浓度,加入 Loading Buffer 后煮沸 5 min。进行凝胶电泳,转膜,封闭,一抗孵育过夜,二抗孵育,曝光,用 Image J 进行条带分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组比较采用 LSD- t 检

验, $P < 0.05$ 与 $P < 0.01$ 被认为差异具有显著性以及差异极具显著性。

2 结果

2.1 莲心碱对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞具有抗炎作用

当用 0 ~ 4 $\mu\text{mol/L}$ 莲心碱处理时,细胞存活率没有降低,我们在随后的实验中使用了无毒浓度(0.5、1 和 2 $\mu\text{mol/L}$)莲心碱。

如图 1 所示,与对照组相比,LPS 组 NO(表示为亚硝酸盐)、PGE2 和促炎性细胞因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1)的含量显著增加($P < 0.01$),与 LPS 组相比,莲心碱组显著抑制了这些促炎介质的生成($P < 0.01$),且与莲心碱剂量呈依赖性。

2.2 莲心碱抑制了 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 COX-2、iNOS mRNA 表达和 NF- κ B、MAPK 通路

qRT-PCR 结果如图 2A、2B 所示,与对照组相比,LPS 组 COX-2 与 iNOS mRNA 表达量显著升高($P < 0.01$),莲心碱处理后,与 LPS 组相比,显著降低了 COX-2 与 iNOS 的 mRNA 表达量($P < 0.01$)。

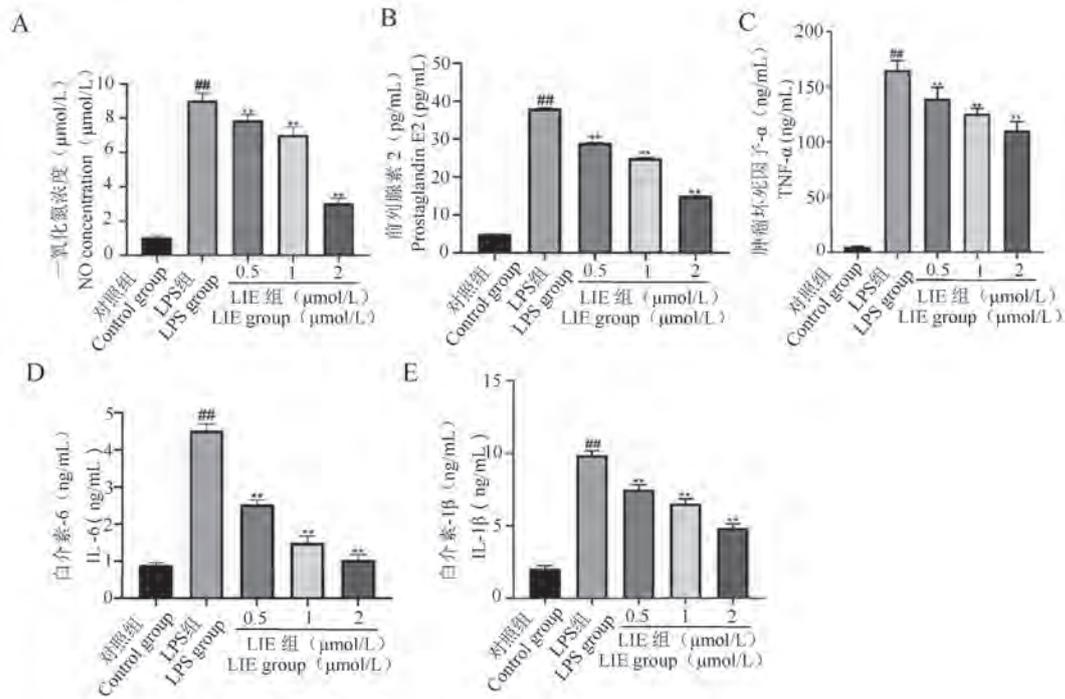
Western Blot 检测结果如图 2C、2D、2E、2F 所示,与对照组相比,LPS 组 I κ B α 显著发生降解和磷酸化,NF- κ B p65、p38、ERK1/2、JNK1/2 显著发生磷酸化($P < 0.05$);与 LPS 组相比,莲心碱组显著抑制了 I κ B α 的降解和磷酸化以及 NF- κ B p65、p38、ERK1/2 和 JNK1/2 的磷酸化($P < 0.05$),这些结果表明莲心碱可以抑制 NF- κ B 和 MAPK 通路。

2.3 莲心碱对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗氧化作用

如图 3 所示,通过对平均荧光值分析表明,与对照组相比,LPS 组的 ROS 生成增加,但使用莲心碱进行处理后,ROS 生成显著减少($P < 0.01$),LPS 组 MDA 含量显著增加,GSH 含量和 SOD 活性显著降低($P < 0.01$),莲心碱进行处理后,MDA 含量显著减少,SOD 活性和 GSH 含量显著增加($P < 0.01$)。

2.4 莲心碱激活了 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 Nrf2/HO-1 通路

如图 4 所示,与 LPS 组相比,莲心碱组 Keap1 表达显著降低,并以剂量依赖的方式促进 Nrf2 和 HO-1 表达($P < 0.05$)。这些结果表明,莲心碱有效地激活了 Nrf2/HO-1 通路。



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

图 1 莲心碱对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞的 NO、PGE2、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量的影响

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

Figure 1 Effects of LIE on the contents of NO, PGE2, TNF-α, IL-6 and IL-1β in LPS-induced RAW264.7 Macrophages

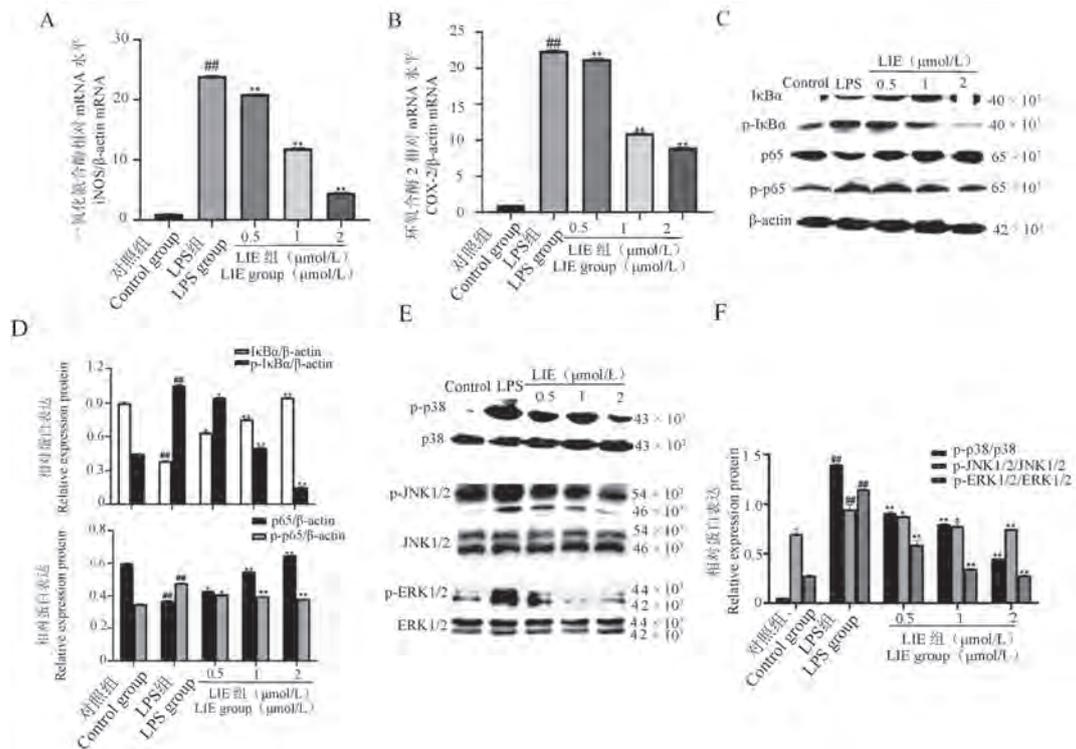


图 2 莲心碱对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞的 COX-2 和 iNOS 的表达以及 NF-κB 和 MAPKs 通路的影响

Figure 2 Effects of LIE on iNOS mRNA expression and NF-κB and MAPKs pathway in LPS-induced RAW264.7 Macrophages

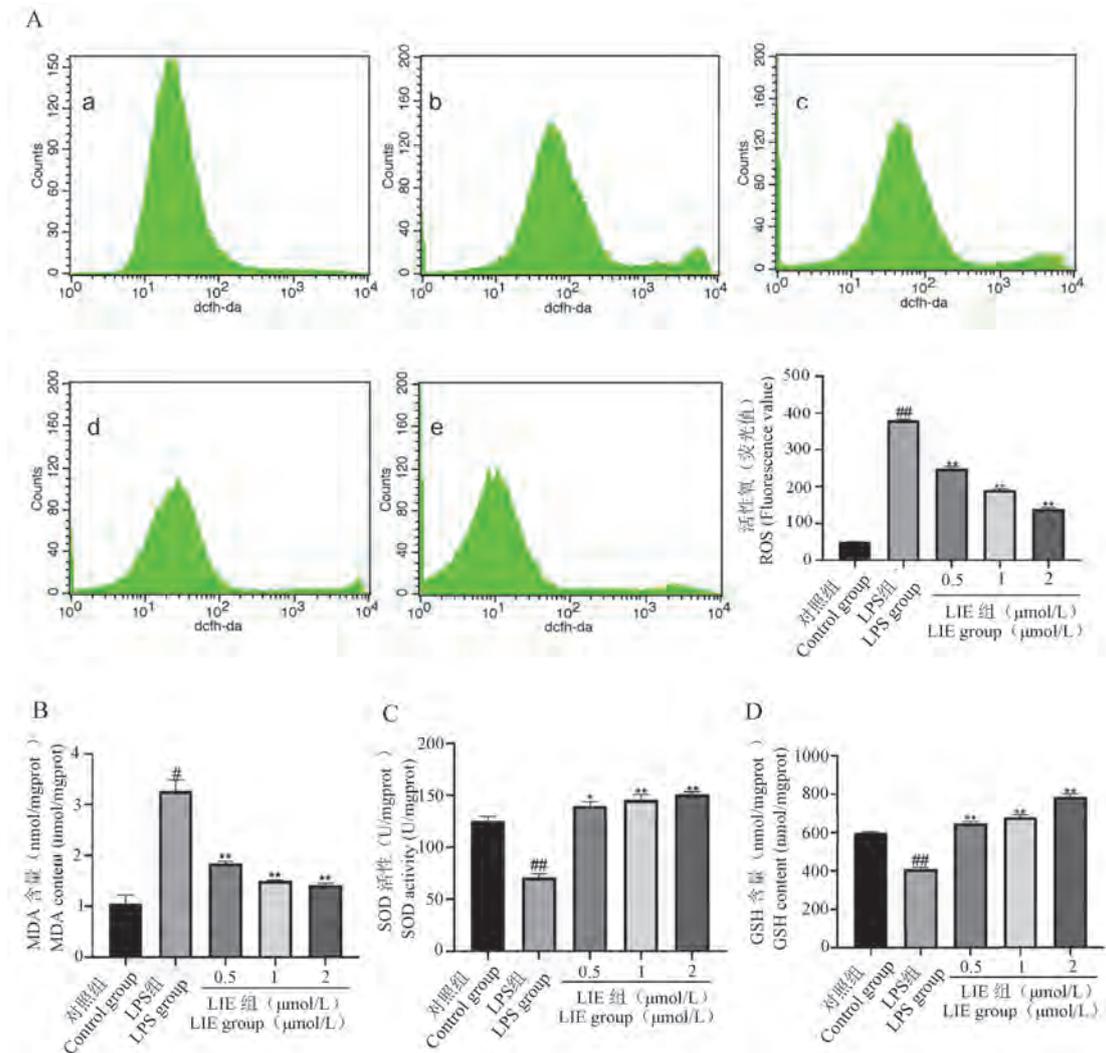


图 3 莲心碱对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中 ROS、MDA 和 GSH 的含量以及 SOD 活性影响

Figure 3 Effects of LIE on the contents of ROS, MDA, GSH and SOD activity in LPS-induced RAW264.7 macrophages

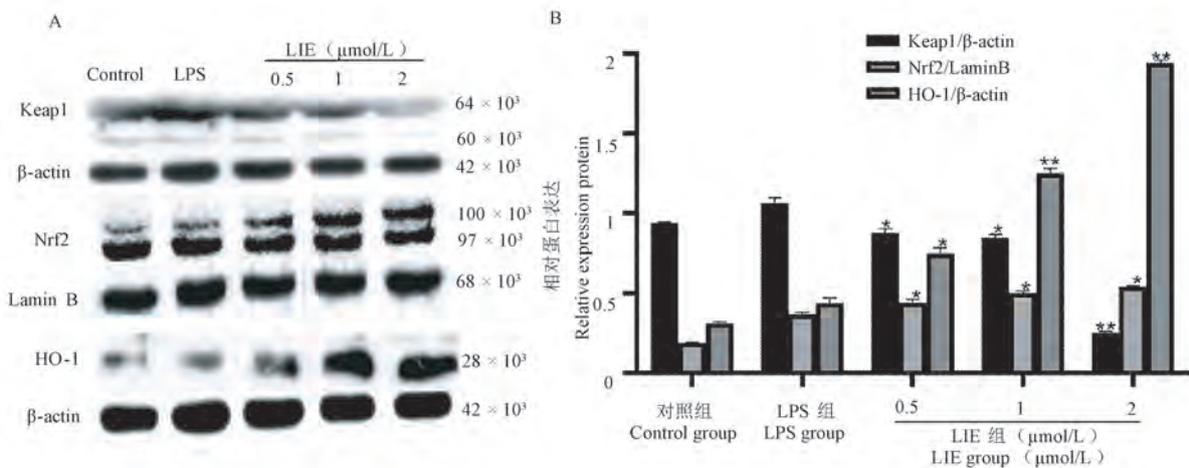


图 4 莲心碱对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中 Nrf2/HO-1 通路的影响

Figure 4 Effects of LIE on Nrf2/HO-1 pathway in LPS-induced RAW364.7 macrophages

3 讨论

炎症与氧化应激是互相依赖存在的^[9],许多疾病同时伴随着炎症与氧化应激的发生,如急性肺损伤,莲心碱已被证实具有抗炎抗氧化作用^[8],但分子机制尚未明确,因此明确其抗炎抗氧化机制对于此类疾病的治疗具有重要意义。我们通过 LPS 诱导 RAW264.7 细胞不仅验证了莲心碱的抗炎抗氧化作用而且证明了其抗炎抗氧化作用的机制。

PGE2 和 NO 是两种重要的促炎介质^[10];iNOS 向体内传递气体信号并参与 NO 的产生;环氧合酶 COX-2 参与 PGE2 的产生^[11]。我们的研究表明,莲心碱通过降低 COX-2 和 iNOS 的转录水平,显著降低了 PGE2 和 NO 的生成。TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 作为促炎因子可以促进炎症^[12]。我们的研究表明,莲心碱能显著降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的释放,从而证实了莲心碱的抗炎活性。LPS 通过促进 I κ B α 的降解,将重要的抗炎分子靶标 NF- κ B 从 I κ B α 中分离出来。许多炎症介质,包括诱导型 iNOS 和 COX-2,将随着 NF- κ B 进入细胞核而增加表达^[13-14]。当 LPS 诱导炎症时,MAPK 信号通路被激活,P38、ERK 和 JNK 被磷酸化,还调节某些基因的转录水平,包括 iNOS 和 COX-2^[15-16]。在我们的研究中,莲心碱阻断了 I κ B α 的降解,并抑制了 p65、p38、ERK 和 JNK 的磷酸化。因此,莲心碱的抗炎作用可能是通过抑制 NF- κ B 和 MAPK 通路来实现的。

当机体发生氧化应激会产生过量的 ROS,破坏抗氧化系统,致使细胞发生氧化性损伤^[17]。MDA 可以破坏细胞膜,这是氧化应激的标志,氧化应激造成的损害可以通过抗氧化酶的活性得到改善,包括 SOD 和 GSH^[18-19]。实验表明,莲心碱能显著降低 LPS 诱导的 ROS 和 MDA 的生成。此外,LPS 诱导巨噬细胞会降低 GSH 水平和 SOD 活性,莲心碱可以有效地逆转这一改变。许多天然植物化合物可以通过 Nrf2/HO-1 途径减轻 LPS 诱导的氧化应激。当抗氧化分子进入细胞时,Nrf2 从 Keap1 分离并移位到细胞核,上调 HO-1 的表达,从而发挥抗氧化作用^[20]。我们的研究表明,用莲心碱处理后显著增加了 Nrf2 和 HO-1 的核表达,降低了 Keap1 的表达。在此,我们证明了莲心碱可能通过激活 Nrf2/HO-1 通路来减轻 LPS 引起的氧化应激。

综上所述,莲心碱通过抑制 NF- κ B 和 MAPK 信号通路,从而抑制 iNOS 和 COX-2 的表达和促炎因

子(TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6)的释放,发挥抗炎作用;通过活化 Nrf2/HO-1 通路,抑制 ROS、MDA 的生成,增加 SOD 的活性和 GSH 的含量,发挥抗氧化作用。本研究对莲心碱抗炎抗氧化作用机制的研究期望可以为伴有炎症与氧化应激的疾病的治疗提供一个新的方向。

参 考 文 献(References)

- [1] Yang H, Song Z, Hong D. CRBN knockdown mitigates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by suppression of oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress associated NF- κ B signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109761.
- [2] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. *Cytokine*, 2008, 42(2): 145-151.
- [3] Tang J, Diao P, Shu X, et al. Quercetin and quercitrin attenuates the inflammatory response and oxidative stress in LPS-induced RAW264.7 Cells: *In vitro* assessment and a theoretical model [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 7039802.
- [4] 苏敏, 龚小见, 周欣. 中药有效成分抗宫颈癌作用机制的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(4): 675-684.
Su M, Gong XJ, Zhou X. Research progress in mechanism of traditional Chinese medicine active ingredients against cervical cancer [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2019, 44(4): 675-684.
- [5] Dong ZX, Zhao X, Gu DF, et al. Comparative effects of liensinine and neferine on the human ether-a-go-go-related gene potassium channel and pharmacological activity analysis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 29(3-4): 431-442.
- [6] Xie Y, Zhang Y, Zhang LT, et al. Protective effects of alkaloid compounds from *Nelumbinis Plumula* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress [J]. *Molecules*, 2013, 18(9): 10285-10300.
- [7] 余万桂, 邓德明, 张恒文, 等. 莲心碱对大鼠脑缺血再灌注损伤血清中 IL-1、TNF- α 的影响 [J]. *长江大学学报(自科版)医学卷*, 2008, 5(4): 1-2, 5.
Yu WG, Deng DM, Zhang HW, et al. Effects of liensinine on serum IL-1 and TNF- α in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Yangtze Univ (Nat Sci Edit) Med*, 2008, 5(4): 1-2, 5.
- [8] 陈朝阳, 姚茹, 王璐, 等. 莲心碱对 LPS 诱导小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3): 343-348.
Chen ZY, Yao R, Wang L, et al. Protective effects of liensinine on LPS-induced acute lung injury in mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(3): 343-348.
- [9] Liu Q, Lv H, Wen Z, et al. Isoliquiritigenin activates nuclear factor erythroid-2 related factor 2 to suppress the NOD-like receptor protein 3 inflammasome and inhibits the NF- κ B pathway in macrophages and in acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1518.
- [10] Gil TY, Jin BR, Hong CH, et al. *Astilbe Chinensis* ethanol

- extract suppresses inflammation in macrophages via NF- κ B pathway [J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 302.
- [11] Ren J, Su D, Li L, et al. Anti-inflammatory effects of Aureusidin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via suppressing NF- κ B and activating ROS and MAPKs-dependent Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 387: 114846.
- [12] He J, Han S, Li XX, et al. Diethyl Blechnic exhibits anti-inflammatory and antioxidative activity via the TLR4/MyD88 signaling pathway in LPS-Stimulated RAW264.7 cells [J]. Molecules, 2019, 24(24): 4502.
- [13] Kim HJ, Joe HI, Zhang Z, et al. Anti-inflammatory effect of *Acalypha australis* L. via suppression of NF- κ B signaling in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and LPS-induced septic mice [J]. Mol Immunol, 2020, 119: 123-131.
- [14] Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology [J]. Cell, 2017, 168(1-2): 37-57.
- [15] Zhang WB, Yang F, Wang Y, et al. Inhibition of HDAC6 attenuates LPS-induced inflammation in macrophages by regulating oxidative stress and suppressing the TLR4-MAPK/NF- κ B pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109166.
- [16] Xiong H, Cheng Y, Zhang X, et al. Effects of taraxasterol on iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW 264.7 macrophages [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(1): 753-757.
- [17] Niki E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(2): 809-817.
- [18] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges [J]. Anal Biochem, 2017, 524: 13-30.
- [19] He L, He T, Farrar S, et al. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(2): 532-553.
- [20] Sun XQ, Wu C, Qiu YB, et al. Heme oxygenase-1 attenuates seawater drowning-induced acute lung injury through a reduction in inflammation and oxidative stress [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 74: 105634.

[收稿日期] 2022-01-18

王涛,戴明珠,李延川,等. 复方中药提取物增强免疫力作用及初步机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 198-207.
Wang T, Dai MZ, Li YC, et al. Study of the immunity-enhancing effect and mechanism of Chinese herbal compound extract [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 198-207.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.007

复方中药提取物增强免疫力作用及初步机制研究

王涛¹, 戴明珠², 李延川¹, 彭逸², 李春启^{2*}

(1. 无限极(中国)有限公司, 广州 510610; 2. 杭州环特生物科技股份有限公司, 杭州 310051)

【摘要】 目的 通过体外细胞和体内斑马鱼实验,快速评价复方中药提取物增强免疫力作用,并进行初步机制研究。**方法** 在体外实验中利用 RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞初步评价复方中药提取物的生物活性;再以酒石酸长春瑞滨诱导建立斑马鱼活体免疫低下模型,分别从斑马鱼巨噬细胞生成和吞噬功能、T 细胞生成及相关炎症、免疫基因的表达等多个方面,观察复方中药提取物的干预作用。**结果** 体外实验中复方中药提取物有良好的生物安全性,其在 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下可提高酒石酸长春瑞滨诱导后的 RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞存活率。体内研究表明,复方中药提取物在 222、667、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时均可明显改善长春瑞滨诱导的斑马鱼巨噬细胞数量的减少,同时增强巨噬细胞吞噬能力;222、667 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度可显著增加 T 细胞荧光强度;222、667、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度均可明显恢复模型对照组中 *rag1*、*rag2* 基因相对表达量被下调的情况,并均可以显著下调模型斑马鱼 *TNF- α* 基因相对表达量;复方中药提取物 222 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可显著上调免疫因子 *IL-12* 基因表达量,在 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时显著上调 *IFN- γ* 基因表达量。**结论** 体内、外实验表明复方中药提取物具有明显的增强免疫力作用。

【关键词】 斑马鱼;复方中药提取物;巨噬细胞;T 细胞;基因水平

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 02-0198-10

Study of the immunity-enhancing effect and mechanism of Chinese herbal compound extract

WANG Tao¹, DAI Mingzhu², LI Yanchuan¹, PENG Yi², LI Chunqi^{2*}

(1. Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou 510610, China. 2. Hunter Biotechnol Inc., Ltd., Hangzhou 310051)

Corresponding author: LI Chunqi. E-mail: jackli@zhunter.com

【Abstract】 Objective To quickly evaluate the immune enhancement effect of Chinese herbal compound extract (CHCe) and study the potential mechanism using *in vitro* cell and *in vivo* zebrafish models. **Methods** In the *in vitro* experiments, RAW 264.7 mouse mononuclear macrophage cells were treated with vinorelbine tartrate, and the protective effect of CHCe on vinorelbine tartrate-induced toxicity was evaluated. The zebrafish immunocompromised model was established using vinorelbine tartrate. The number of macrophages and their phagocytic function, the number of T-lymphocytes, and the expression of inflammation- and immune-related genes in zebrafish were used to observe the effects of CHCe in the zebrafish immunocompromised model. **Results** The result showed that CHCe had good biosafety and increased the survival rate of RAW 264.7 cells treated with 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vinorelbine tartrate. *In vivo* studies showed that 222, 667 and 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHCe significantly inhibited the reduction of macrophages induced by vinorelbine and enhanced the phagocytic ability of macrophages. Both 222 and 667 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHCe significantly increased the number of T-lymphocytes, and 222, 667 and 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHCe significantly restored the down-regulation of *rag1* and *rag2* genes in the

【基金项目】 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09031059), 国家重点研发计划项目(2018YFC1602101)。

Funded by National “Major New Drug Innovation” Science and Technology Major Special Projects (2017ZX09031059), National Key R&D Program of China (2018YFC1602101).

【作者简介】 王涛(1976—), 男, 硕士, 研究方向: 食品工程和保健食品开发。Email: 156379067@qq.com

【通信作者】 李春启(1963—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 药理学和毒理学。Email: jackli@zhunter.com

model group, and down-regulated the expression of tumor necrosis factor- α . A dose of 222 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHCe up-regulated the relative expression level of interleukin-12, and 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHCe up-regulated the relative expression level of interferon- γ .

Conclusions *In vivo* and *in vitro* experiments showed that CHCe had a marked immunity enhancement effect.

【Keywords】 zebrafish; Chinese herbal compound extract(CHCe); macrophages; T-lymphocytes; gene expression

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

免疫力可以保护机体不受侵害,近年来,由于生态失衡导致的免疫性疾病越来越多,西药不能起到预防作用,治疗效果不甚明显且存在毒副作用。而中药及其提取物在中医药基础理论指导下,擅治未病,最讲究协调和平衡且毒副作用小,所以中药及其提取物增强免疫力一直是新研究方向。已有研究表明,灵芝多糖和生物碱均能明显增强小鼠巨噬细胞吞噬能力和 T 淋巴细胞转化能力,同时可提高小鼠外周血中 IFN- γ 的表达水平^[1-2]。五味子多糖^[3-4]、白术多糖及内酯^[5]均具有抗氧化和增强机体免疫力活性;菟丝子提取物是有效的抗菌剂,抗氧化剂和抗炎剂^[6-7];党参^[8]和茯苓^[9]在多种急性和慢性炎症的不同实验模型中显示抗炎活性。然而大部分研究都是以传统的大小鼠为动物模型进行评价,具有造模时间长、成本高、通量小等缺点。

斑马鱼(*Danio rerio*, zebrafish)是一种国际认可的新型模式生物,其引人注目的优势是胚胎发育的透明性,基于高通量的检测体系,以及短时-高效-低费筛选。随着“3R(reduction, replacement, refinement)原则”的推行与实施,其在药物的靶点鉴别、疾病的模型开发和毒性评价中应用越来越广泛^[10-13]。本研究采用体外细胞实验和体内斑马鱼免疫低下模型探究复方中药提取物对免疫力的影响,从 RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞活性,斑马鱼巨噬细胞数量及其吞噬功能, T 细胞数量,免疫相关基因水平多方面考察复方中药提取物的生物安全性与增强免疫作用,对复方中药提取物增强免疫功能进行验证并提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

转基因巨噬细胞绿色荧光(Tg(*mpeg1:EGFP*))斑马鱼,转基因 T 细胞红色荧光(Tg(*rag2:DsRed*))斑马鱼,均为受精后 2 d(2 days post fertilization, dpf)已出膜幼鱼,体重每尾约 0.25 mg,均来源于杭州环特生物科技股份有限公司。斑马鱼成鱼以自然成对的交配方式进行胚胎繁殖,胚胎置于标准稀

释水中(标准稀释水:294.0 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 123.3 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 63.0 mg/L NaHCO_3 和 5.5 mg/L KCl)在 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵化,电导率 450 ~ 550 $\mu\text{S}/\text{cm}$; pH 为 6.5 ~ 8.5;硬度为 50 ~ 100 mg/L CaCO_3 。由杭州环特生物科技股份有限公司养鱼中心繁殖提供【SYXK(浙)2022-0004】,并通过国际 AAALAC 认证(001458)^[14-15]。所有操作经杭州环特生物科技股份有限公司审批(001458)。实验结束后,使用 0.25 g/L 三卡因甲基磺酸盐对所有斑马鱼进行麻醉安乐死,符合美国兽医协会(American Veterinary Medical Association, AVMA)对斑马鱼麻醉安乐死的要求^[16]。

1.1.2 细胞

RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞,订购于中国典型培养物保藏中心,培养条件:(89% DMEM + 1% 双抗 + 10% FBS)完全培养基,37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养。

1.1.3 主要试剂与仪器

酒石酸长春瑞滨(上海麦克林生化科技有限公司,批号:C10946321);盐酸小檗胺(上海源叶生物科技有限公司,批号:R29J6F1);百令胶囊(杭州中美华东制药有限公司,批号:180303);二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司,批号:BCBZ1685);MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:G020-1-1);胎牛血清(FBS, Gibico 公司,批号:2152441P);双抗(Gibico 公司,批号:2145455);DMEM(Gibico 公司,批号:8120203);RNA 快速提取试剂盒(上海奕杉生物科技有限公司,货号:RN001);iTaq Universal SYBR Green Supermix(Bio-rad 公司,货号:1725124);Fast Quant RT Kit(With gDNase)试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司,货号:KR106);荧光微球(Sigma 公司,批号:MKCB2036 V)。

多功能酶标仪(SPARK, TECAN, Switzerland);细胞培养箱(3111, Thermo, USA);紫外-可见分光光度计(Nanodrop 2000, Thermo, USA);普通 PCR 扩增仪(T100, Bio-rad, Singapore);荧光定量 PCR 仪(CFX Connect, Bio-rad, Singapore);低位裙边 96 孔板(透明)(HSP9601, Bio-rad, USA);6 孔板(Nest

Biotech, China); 电动聚焦连续变倍荧光显微镜 (AZ100, Nikon, Japan); 显微注射仪 (IM-300, Narishige, Japan); 拉针仪 (PC-10, Narishige, Japan)。

1.2 方法

1.2.1 复方中药提取物的制备

提取液 1: 赤灵芝→提取罐中提取→过筛 (80 目); 提取液 2: 菟丝子、茯苓、五味子、党参、白术→提取罐中提取→过筛 (80 目)。将提取液进行浓缩, 浓缩过程中温度不可以超过 95℃, 真空度 -0.03 ~ -0.08 Mpa, 浓缩至固形物含量在产品标准范围内进行出料。

1.2.2 RAW 264.7 细胞培养及复方中药提取物处理

取生长状态良好的 RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞, 2000 个/孔分别接种于 96 孔细胞板使细胞贴壁完全。弃去旧培养基: (1) 每孔依次加入复方中药提取物 62.5、125、250、500 及 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的培养基, 加入体积均为 100 μL , 24 h 后弃去旧的培养基, 避光条件下每孔加入 100 μL 含 0.5 mg/mL MTT 的培养基, 继续孵育 4 h, 弃去上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 摇床振荡 5 min, 用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔吸光度 (OD) 值, 确定复方中药提取物最佳处理浓度。(2) 除正常对照孔及溶剂对照孔 (0.1% DMSO) 外, 其余每孔均加入酒石酸长春瑞滨 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的培养基后, 再依次加入复方中药提取物 27.8、83.3、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度以及阳性对照组盐酸小檗碱 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的培养基。孵育 24 h 后弃去旧的培养基, 避光条件下每孔加入 100 μL 含 0.5 mg/mL MTT 的培养基, 继续孵育 4 h 弃去上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 摇床振荡 5 min, 用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔 OD 值, 评价复方中药提取物对 RAW 264.7 细胞存活率的影响。

1.2.3 复方中药提取物安全性考察

选取受精后 2 d (2 days post fertilization, dpf) Tg (*mpeg1:EGFP*) 转基因斑马鱼于 6 孔板中, 每孔 (实验组) 均处理 30 尾斑马鱼, 容量为 3 mL。设置加药组: 复方中药提取物 62.5、125、250、500、1000、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 同时设置正常对照组 (养鱼用水处理的斑马鱼)。加盖置于 28℃ 培养箱中孵育, 每隔 24 h 统计并及时移除死亡斑马鱼, 记录孵育至 6 dpf 时斑马鱼各脏器毒性表型与死亡情况, 确定复方中药提取物对正常斑马鱼的最大检测浓度 (maximum tolerated

concentration, MTC)。

1.2.4 复方中药提取物对斑马鱼巨噬细胞生成的影响

取 2 dpf Tg (*mpeg1:EGFP*) 转基因斑马鱼于 6 孔板中, 设置加药组: 复方中药提取物 222、667、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 同时设置对照组: 阳性对照盐酸小檗碱 5.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 正常对照组及模型对照组。除正常对照组外, 其余各组均水溶给予酒石酸长春瑞滨 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 建立斑马鱼巨噬细胞减少症模型。各组加盖置于 28℃ 培养箱中孵育至 3 dpf 时, 在荧光显微镜下观察斑马鱼尾部静脉血管中巨噬细胞荧光强度 (S1), 并拍照。使用尼康 NIS-Elements D 3.20 高级图像处理软件采集数据。

1.2.5 复方中药提取物对斑马鱼巨噬细胞吞噬功能的影响

选取 2 dpf Tg (*mpeg1:EGFP*) 转基因斑马鱼, 均静脉注射红色荧光微球 (直接用生理盐水稀释为 2% 溶液, 每尾 10 nL) 作为异物以建立斑马鱼巨噬细胞吞噬功能模型。将模型斑马鱼分配于 6 孔板中, 30 尾/(孔·3 mL 体系), 设置加药组: 复方中药提取物 222、667、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 同时设置对照组: 阳性药百令胶囊 15.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和模型对照组。加盖置于 28℃ 培养箱中孵育至 6 dpf 时, 在荧光显微镜下观察斑马鱼体内 (全身) 荧光微球残留的数目 (N), 并拍照。使用 Image J 高级图像处理软件采集数据。

1.2.6 复方中药提取物对斑马鱼 T 细胞的影响及初步机制研究

选取 2 dpf Tg (*rag2:DsRed*) 转基因斑马鱼于 6 孔板中, 设置加药组: 复方中药提取物 222、667、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 同时设置对照组: 阳性对照百令胶囊 60.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 正常对照组及模型对照组。除正常对照组外, 其余实验组均水溶给予酒石酸长春瑞滨 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 建立斑马鱼 T 细胞减少症模型。各组加盖置于 28℃ 培养箱中孵育至 5 dpf 时, (1) 对 T 细胞生成的影响: 在荧光显微镜下观察斑马鱼 T 细胞荧光强度 (S2), 并拍照, 使用尼康 NIS-Elements D 3.20 高级图像处理软件采集数据; (2) 机制研究: 收集斑马鱼样本, 采用经典的 TRIzol 法提取各浓度组斑马鱼总 RNA, 以 β -actin 作为基因表达的内参, 通过 q-PCR 法检测目的基因肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、重组激活型基因-1 (*rag1*)、重组激活型基因-2 (*rag2*)、白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12) 和 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 的转录水平, 进行复方

中药提取物增强免疫力初步机制研究。引物序列:β-actin-FOR: 5'-TCGA GCAGGAGATGGGAACC-3', β-actin-REV: 5'-CTCGTGA TACCGCAAGATTC-3'; TNF-α-FOR: 5'-AGGAGAGTTGCCTTTACCGC-3', TNF-α-REV: 5'-AATGGATGGCAGCCTTGGAA-3'; rag1-FOR: 5'-GGAAGGACTGAGAGAGAGGGCCG-3', rag1-REV: 5'-AGGACCAGATCCGTGCTTCTCG-3'; rag2-FOR: 5'-TGGAAGCCCTGTCTTACCT-3', rag2-REV: 5'-GACTCCACATCATCCAGGC-3'; IL-12-FOR: 5'-AACTCCTA CAAGCCCAGCAC-3', IL-12-REV: 5'-ACACTCGGTGCTCAAACGAA-3'; IFN-γ-FOR: 5'-GCCTGGGGAGTATGTTTCT-3', IFN-γ-REV: 5'-CAGGAAGATGGGCTGTGCAT-3'。基因相对表达量计算公式: RNA 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$; $\Delta\Delta C(t) = \Delta C(t)_{\text{实验组}} - \overline{\Delta C(t)}_{\text{模型对照组}}$; $\Delta C(t) = C(t)_{\text{目的基因}} - C(t)_{\beta\text{-actin}}$

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prim 5.0 软件进行统计学分析,

数据处理结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;多组间采用方差分析和 Dunnett's *t* 检验,两独立样本用 TTEST 检验,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异判定标准。

2 结果

2.1 复方中药提取物对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

当复方中药提取物浓度为 62.5 ~ 250 μg/mL 时,RAW 264.7 细胞存活率均 > 90.0%;当复方中药提取物浓度为 500 μg/mL 时,RAW 264.7 细胞存活率下降为 84.0%。故确定复方中药提取物对 RAW 264.7 细胞最大安全浓度为 250 μg/mL(见表 1)。

由表 2 可知,酒石酸长春瑞宾可导致 RAW 264.7 细胞存活率显著下降;同时复方中药提取物 3 倍浓度梯度干预后,细胞存活率呈剂量依赖性升高,复方中药提取物 250 μg/mL 可显著提高 RAW 264.7 细胞存活率($P < 0.01$)。

表 1 复方中药提取物对 RAW 264.7 细胞安全浓度评价实验结果($n=4, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Experimental results of evaluating the safe concentration of CHCe on RAW264.7 cells($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	浓度(μg/mL) Concentrations(μg/mL)	细胞存活率(%) Cell survival rate(%)
正常对照组 Control group	- 63	100.0 ± 3.8 92.2 ± 8.0
复方中药提取物 CHCe	125	95.2 ± 5.5
	250	91.3 ± 3.0
	500	84.0 ± 4.2
	1000	85.1 ± 5.6

表 2 复方中药提取物对 RAW264.7 细胞存活率的影响评价实验结果($n=4, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Experimental results of CHCe on the survival rate of RAW264.7 cells($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	浓度(μg/mL) Concentrations(μg/mL)	OD 值 OD value	细胞存活率(%) Cell survival rate(%)
正常对照组 Control group	-	1.9 ± 0.3	100.0
溶剂对照组 Solvent control group	0.1% DMSO	2.0 ± 0.0***	100.9
模型对照组 Model control group	-	0.5 ± 0.0	27.9
盐酸小檗胺 Berbamine hydrochloride	25	0.9 ± 0.1*	48.0
	28	0.6 ± 0.0	31.1
	83	0.7 ± 0.0	34.1
	250	0.8 ± 0.1**	41.3

注:与模型对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。(下表同)

Note. Compared with the model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following tables)

2.2 复方中药提取物对斑马鱼的 MTC

在实验终点,复方中药提取物 62.5 ~ 2000 μg/mL 浓度组斑马鱼均未见明显异常,各脏器和

行为状态与正常斑马鱼相似(见图 1)。提示复方中药提取物对正常斑马鱼的 MTC 为 2000 μg/mL。



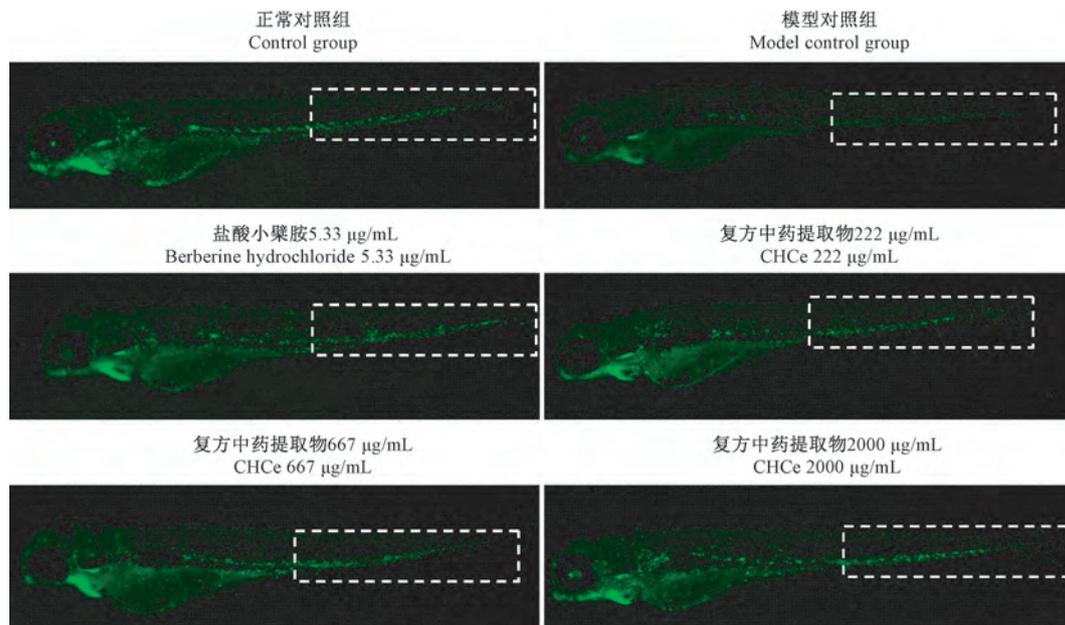
图 1 复方中药提取物浓度摸索实验结果图片展示

Figure 1 Picture display of the experimental results of the concentration of CHCe

2.3 复方中药提取物对斑马鱼巨噬细胞生成的影响

由统计结果可知(图 2,表 3),酒石酸长春瑞宾可导致斑马鱼免疫力低下,表现为与正常对照组比较,酒石酸长春瑞宾组斑马鱼中巨噬细胞荧光强度

显著降低;复方中药提取物低、中、高 3 倍浓度梯度干预后,巨噬细胞荧光强度均显著升高,巨噬细胞减少的改善功效分别为 18% ($P < 0.05$)、21% ($P < 0.01$) 和 22% ($P < 0.01$)。



注:绿色荧光颗粒为巨噬细胞,黄色虚线框内为分析区域(泄殖孔至尾部末端静脉血管)。

图 2 复方中药提取物处理后斑马鱼尾部静脉血管巨噬细胞荧光强度典型图

Note. The green fluorescent particles are macrophages, and the yellow dotted frame is the analysis area (Veins from cloaca to tail end).

Figure 2 Typical graph of fluorescence intensity of macrophages after CHCe treatment

表 3 复方中药提取物对巨噬细胞减少改善功效评价实验结果($n=4, \bar{x} \pm s$)
Table 3 Experimental results of the effect of CHCe on macrophages($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentrations($\mu\text{g}/\text{mL}$)	巨噬细胞荧光强度(像素) Fluorescence intensity of macrophagespixel(pixel)	巨噬细胞减少改善功效(%) Improved efficacy of macrophage reduction(%)
正常对照组 Control group	-	42 681 \pm 1279 **	-
模型对照组 Model control group	-	38 104 \pm 849	-
盐酸小檗胺 Berbamine hydrochloride	5	51 059 \pm 1095 ***	34
复方中药提取物 CHCe	222	44 898 \pm 2189 *	18
	667	46 015 \pm 1369 **	21
	2000	46 385 \pm 1277 **	22

2.4 复方中药提取物对斑马鱼巨噬细胞吞噬功能的影响

由统计结果可知(图 3,表 4),与模型对照组比较,复方中药提取物低、中、高 3 个浓度组均可明显减少斑马鱼体内荧光微球残留数目($P < 0.05$),表明复方中药提取物具有促巨噬细胞吞噬功能作用。

2.5 复方中药提取物对斑马鱼 T 细胞生成的影响

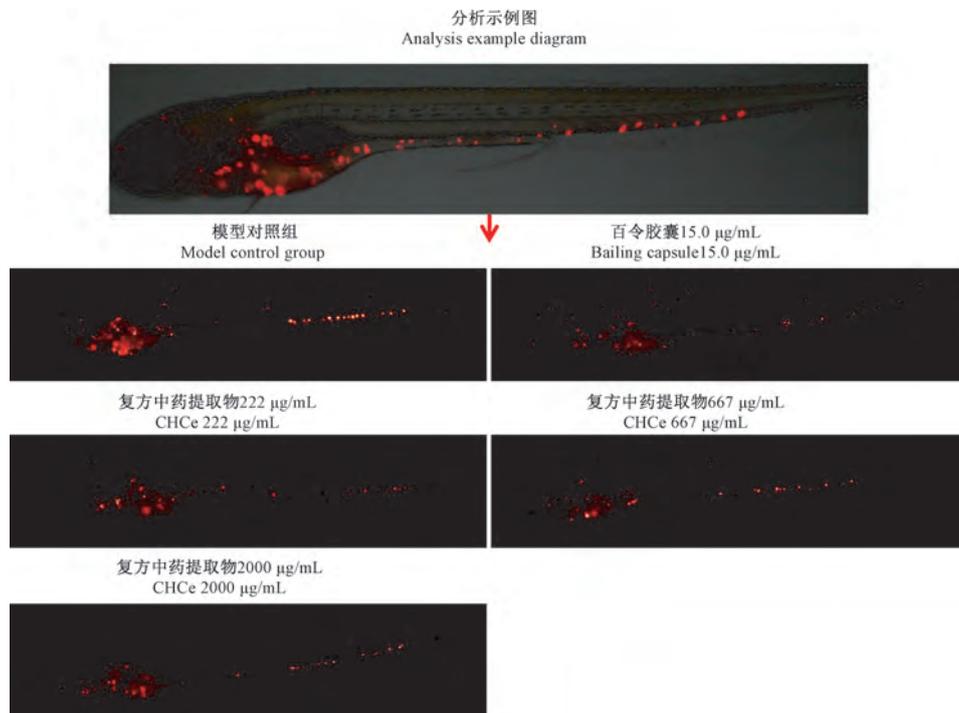
由统计结果可知(表 5,图 4),与正常对照组比较,模型对照组 T 细胞荧光强度极显著降低,表明酒石酸长春瑞宾可诱导斑马鱼免疫抑制。与模型

对照组比较,复方中药提取物中浓度 T 细胞荧光强度显著升高($P < 0.01$);但高浓度对 T 细胞荧光强度无升高作用且呈现降低的作用趋势。

2.6 复方中药提取物对斑马鱼 T 细胞的影响及初步机制研究

2.6.1 RNA 浓度及纯度

在实验终点,提取斑马鱼总 RNA,用超微量分光光度计测定 RNA 浓度及纯度(A260/A280 比值),结果表明 A260/A280 比值均在 1.88 ~ 2.03 之间,表明提取得到斑马鱼总 RNA 质量较好,可用于后续 q-PCR 实验(见表 6)。



注:红色荧光颗粒为荧光微球。

图 3 复方中药提取物处理后斑马鱼体内(全身)残留荧光微球典型图

Note. Red fluorescent particles are fluorescent microspheres.

Figure 3 Typical image of residual fluorescent microspheres in zebrafish whole body after CHCe treatment

表 4 复方中药提取物对巨噬细胞吞噬功能促进功效评价实验结果($n=10, \bar{x} \pm s$)Table 4 Experimental results of CHCe on the promotion of macrophage phagocytic function($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentrations($\mu\text{g}/\text{mL}$)	荧光微球残留数目(个) Residual number of fluorescent microspheres(N)	巨噬细胞吞噬功能促进功效(%) Promoting effect of macrophage phagocytosis(%)
模型对照组 Model control group	-	90.2 \pm 1.3	-
百令胶囊 Bailing capsule	15	78.7 \pm 2.8**	13
复方中药提取物 CHCe	222	73.3 \pm 4.2*	19
	667	74.1 \pm 5.2*	18
	2000	76.0 \pm 3.7*	16

表 5 复方中药提取物对 T 细胞减少改善功效评价实验结果($n=10, \bar{x} \pm s$)Table 5 Experimental results of the effect of CHCe on T-lymphocytes($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentrations($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T 细胞荧光强度(像素) Fluorescence intensity of T-lymphocytes(pixel)	T 细胞减少改善功效(%) Improvement effect of T-lymphocytes reduction(%)
正常对照组 Control group	-	48 178 \pm 5225***	-
模型对照组 Model control group	-	13 779 \pm 1138	-
百令胶囊 Bailing capsule	60	25 799 \pm 2534***	87
复方中药提取物 CHCe	222	23 153 \pm 2752	68
	667	29 760 \pm 3784**	116
	2000	9474 \pm 1285	-31

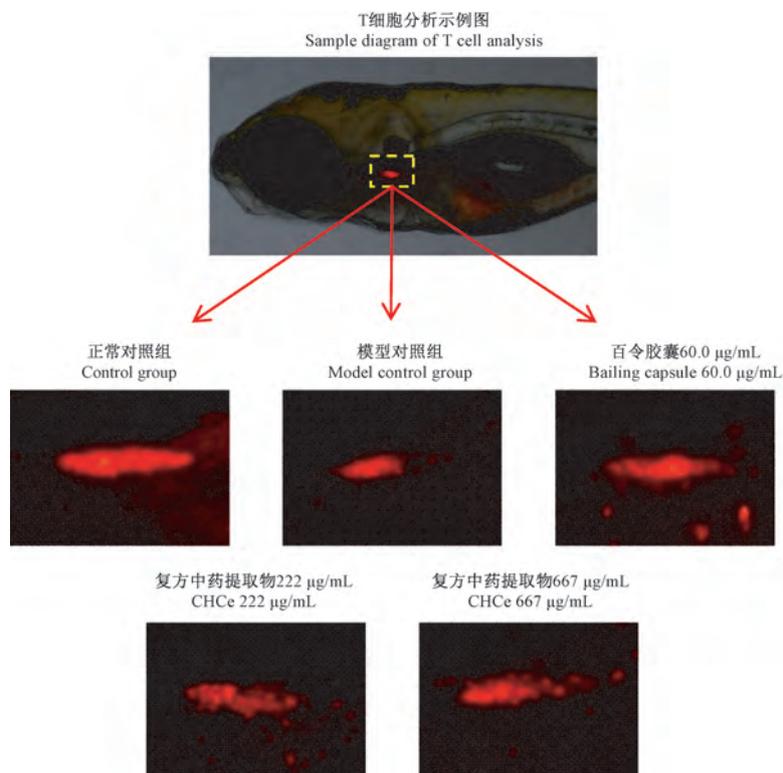


图 4 复方中药提取物处理后斑马鱼 T 细胞荧光强度典型图

Note. Red fluorescent particles are T cells.

Figure 4 Typical graph of fluorescence intensity of T-lymphocytes after CHCe treatment

2.6.2 对重组激活型基因 *rag1* 和 *rag2* 的影响

根据基因相对表达量公式计算,与正常对照组比较,模型对照组 *rag1*、*rag2* 基因相对表达量均显著下调($P < 0.01$),复方中药提取物干预后,低、中、高浓度组 *rag1*、*rag2* 基因相对表达量均显著恢复(见表 7)。

2.6.3 对免疫因子 *IL-12* 和 *IFN-γ* 的影响

根据表 8 显示与正常对照组比,模型对照组 *IL-12* 基因相对表达量极显著下调($P < 0.001$),复方中药提取物干预后,在实验终点,低浓度组 *IL-12* 基因相对表达量极显著上升($P < 0.001$),中、高浓度组出现负反馈调节。

与正常对照组比较,模型对照组 *IFN-γ* 基因相对表达量显著下调($P < 0.01$),复方中药提取物 3 倍浓度梯度干预后,*IFN-γ* 基因相对表达量呈剂量依赖性恢复,复方中药提取物高浓度组 *IFN-γ* 基因相对表达量极显著上升($P < 0.001$)。

2.6.4 对致炎症因子 *TNF-α* 的影响

模型对照组 *TNF-α* 基因相对表达量(1.000)与正常对照组(0.006)比较极显著上调($P < 0.001$)。复方中药提取物低、中、高浓度组 *TNF-α* 基因相对表达量分别为 0.023、0.002 和 0.008($P < 0.001$),提示复方中药提取物可显著下调 *TNF-α* 基因相对表达量(见表 9)。

表 6 总 RNA 的浓度及纯度

Table 6 Concentration and purity of total RNA

组别 Groups	浓度(μg/mL) Concentrations(μg/mL)	总 RNA 浓度/(μg/μL) Total RNA concentration/(μg/μL)	A260/A280
正常对照组 1 Control group 1	-	0.8	2.0
正常对照组 2 Control group 2	-	0.8	2.0
正常对照组 3 Control group 3	-	0.8	2.0
模型对照组 1 Model control group 1	-	0.9	1.9
模型对照组 2 Model control group 2	-	0.9	1.9
模型对照组 3 Model control group 3	-	1.0	1.9
复方中药提取物 CHCe	222-1	0.8	2.0
	222-2	0.8	2.0
	222-3	0.8	2.0
	667-1	0.7	2.0
	667-2	0.7	2.0
	667-3	0.7	2.0
	2000-1	0.9	2.0
	2000-2	0.8	2.0
	2000-3	0.8	2.0

表 7 复方中药提取物对 *rag1* 和 *rag2* 基因表达的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 7 Effect of CHCe on *rag1* and *rag2* gene expression($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	浓度(μg/mL) Concentrations(μg/mL)	<i>rag1</i> 基因相对表达量 <i>rag1</i> relative gene expression	<i>rag2</i> 基因相对表达量 <i>rag2</i> relative gene expression
正常对照组 Control group	-	2.0 ± 0.1**	2.2 ± 0.2**
模型对照组 Model control group	-	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
百令胶囊 Bailing capsule	60	1.2 ± 0.0***	1.2 ± 0.1*
复方中药提取物 CHCe	222	1.6 ± 0.1**	1.6 ± 0.1*
	667	1.6 ± 0.0**	1.5 ± 0.2*
	2000	1.9 ± 0.2***	1.6 ± 0.0**

表 8 复方中药提取物对 *IL-12* 和 *IFN- γ* 基因表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 8 Effect of CHCe on *IL-12* and *IFN- γ* gene expression ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>IL-12</i> 基因相对表达量 <i>IL-12</i> relative gene expression	<i>IFN-γ</i> 基因相对表达量 <i>IFN-γ</i> relative gene expression
正常对照组 Control group	-	$2.3 \pm 0.1^{***}$	$3.0 \pm 0.4^{**}$
模型对照组 Model control group	-	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
百令胶囊 Bailing capsule	60	1.0 ± 0.0	$2.5 \pm 0.4^*$
复方中药提取物 CHCe	222	$2.5 \pm 0.0^{***}$	1.0 ± 0.1
	667	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.0
	2000	1.2 ± 0.0	$3.5 \pm 0.1^{***}$

表 9 复方中药提取物对 *TNF- α* 基因表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 9 Effect of CHCe on *TNF- α* gene expression ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>TNF-α</i> 基因相对表达量 <i>TNF-α</i> relative gene expression
正常对照组 Control group	-	$0.006 \pm 0.000^{***}$
模型对照组 Model control group	-	1.000 ± 0.060
百令胶囊 Bailing capsule	60	$0.044 \pm 0.002^{***}$
复方中药提取物 CHCe	222	$0.023 \pm 0.003^{***}$
	667	$0.002 \pm 0.000^{***}$
	2000	$0.008 \pm 0.001^{***}$

3 讨论

复方中药提取物是灵芝^[1-2]、五味子^[3-4]、白术^[5]、菟丝子^[6-7]、茯苓^[9]和党参^[8]提取物为主要原料,在之前的研究中,这 6 味中药提取物均具有增强免疫力相关报道;此外,菟丝子^[6-7]、党参^[8]和茯苓^[9]在多种急性和慢性炎症模型中显示强抗炎活性。在本实验条件下,体外细胞实验中当复方中药提取物在 $62.5 \sim 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,RAW 264.7 细胞存活率均 $> 90.0\%$,表明复方中药提取物具有良好的生物安全性,且在巨噬细胞的免疫作用方面,对于降低免疫力的造模剂来说,复方中药提取物也有很好的改善作用,与对照组相比,细胞活性上升,这可能是由于复方中药提取物主要原料的安全性和促进免疫力的作用。例如灵芝多糖可影响免疫细胞和免疫相关细胞,包括促进 B 和 T 淋巴细胞,树突状细胞,巨噬细胞和自然杀伤细胞活性^[17-18]。复方中药提取物同时在本次实验中表现出较好的改善免疫力低下模型中巨噬细胞数量和吞噬能力,以及 T 细胞的荧光强度,表明复方中药提取物在体内实验中能有效的增强机体免疫力,在之前的报道中,复方中药提取物中具备的灵芝提取物可下调

LPS 诱导的促炎因子,并促进 BV-2 和原发性小胶质细胞的抗炎细胞因子表达。另外,灵芝提取物通过改变巨噬细胞吞噬作用从而达到先天免疫应答的激活^[19],对于基因表达水平方面,不同浓度的复方中药提取物对免疫力低下模型抗炎因子水平的恢复,以及致炎因子水平的降低可以很好的从分子机制解释复方中药提取物的增强免疫力的原理,另外相当多的研究对复方中药提取物中的中药成分免疫基因水平的表达给出了很好的解释^[20-22],例如五味子可通过增加衰老小鼠的血清 *IL-2*, *IL-4*, *IFN- γ* , *IgG*, *IgM* 和 *IgA* 的水平,降低 *TNF- α* 和 *IL-6* 的含量,并增加白血球数量,吞噬活性,淋巴细胞增殖和体外脾指数去增强衰老小鼠的免疫力^[23]。这些研究都为本次实验提供了有效的实验依据的支撑,复方中药提取物的增强免疫力功效也均与之报道相符合。

4 结论

在体外实验中复方中药提取物有良好的生物安全性,且可明显提高酒石酸长春瑞滨诱导后小鼠单核巨噬细胞的存活率。体内研究表明,复方中药提取物可明显改善长春瑞滨诱发的斑马鱼巨噬细

胞及 T 细胞数量的减少,同时增强体内巨噬细胞的活性和吞噬能力;复方中药提取物可明显恢复模型对照组中 *rag1*、*rag2* 基因相对表达量被下调的情况,复方中药提取物上调免疫因子 *IL-12* 的表达量、*IFN- γ* 基因的相对表达量,复方中药提取物可显著下调 *TNF- α* 基因相对表达量。体内、外实验表明复方中药提取物具有明显的增强免疫力作用。综上所述,复方中药提取物具有明显的抗炎及增强免疫力的作用。本研究可为复方中药提取物作为新的免疫保健食品和二次开发提供指导性依据。

参 考 文 献(References)

- [1] 程丽佳, 谢欣蓉, 杨明, 等. 灵芝提取物对提高小鼠机体免疫力作用研究 [J]. 成都大学学报(自然科学版), 2017, 36(4): 361-363.
Cheng LJ, Xie XR, Yang M, et al. Effect of Ganoderma lucidum extract on improving immunity of mice [J]. J Chengdu Univ(Nat Sci), 2017, 36(4): 361-363.
- [2] Cui X, Zhang Y. Neuropharmacological effect and clinical applications of Ganoderma (Lingzhi) [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1182: 143-157.
- [3] 吴志青, 朱长生, 王勇飞. 五味子的生理作用及其在猪饲料中的应用研究进展 [J]. 饲料广角, 2016, 13: 41-42.
Wu ZQ, Zhu CS, Wang YF. Physiological function of Schisandra chinensis and its application in pig feed [J]. Feed Chin, 2016, 13: 41-42.
- [4] Chen X, Tang R, Liu T, et al. Physicochemical properties, antioxidant activity and immunological effects *in vitro* of polysaccharides from Schisandra sphenanthera and Schisandra chinensis [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 131: 744-751.
- [5] 丁采苒. 白术及其提取物免疫调节功能和机制研究 [D]. 开封: 河南大学; 2016.
Ding CR. Studies on immune regulation function and mechanism of Atractylodes and its extracts [D]. Kaifeng: Henan University; 2016.
- [6] Noreen S, Noreen S, Ghumman SA, et al. The genus Cuscuta (Convolvaceae): An updated review on indigenous uses, phytochemistry, and pharmacology [J]. Iran J Basic Med Sci, 2019, 22(11): 1225-1252.
- [7] 林慧彬, 林建强, 林建群, 等. 山东产四种菟丝子免疫增强作用的比较研究 [J]. 中西医结合学报, 2003, 1(1): 51-53.
Lin HB, Lin JQ, Lin JQ, et al. Comparative study on immune enhancement of four kinds of Cuscuta from Shandong [J]. J Chin Integr Med, 2003, 1(1): 51-53.
- [8] Hossen MJ, Kim MY, Kim JH, et al. Codonopsis lanceolata: a review of its therapeutic potentials [J]. Phytother Res, 2016, 30(3): 347-356.
- [9] Tian H, Liu ZJ, Pu YW, et al. Immunomodulatory effects exerted by Poria Cocos polysaccharides via TLR4/TRAF6/NF- κ B signaling *in vitro* and *in vivo* [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108709.
- [10] MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(10): 721-731.
- [11] Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease [J]. Curr Opin Genet Dev, 2000, 10(3): 252-256.
- [12] Cavalcante LDS, Toner M, Uygun K, et al. Leveraging the zebrafish to model organ transplantation [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2019, 24(5): 613-619.
- [13] Meshalkina DA, N Kizlyk M, V Kysil E, et al. Zebrafish models of autism spectrum disorder [J]. Exp Neurol, 2018, 299: 207-216.
- [14] Zhou J, Xu QY, Guo SY, et al. Rapid analysis of hypolipidemic drugs in a live zebrafish assay [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2014, 72: 47-52.
- [15] Zhu XY, Liu HC, Guo SY, et al. A zebrafish thrombosis model for assessing antithrombotic drugs [J]. Zebrafish, 2016, 13(4): 335-344.
- [16] Shen B, Liu HC, Ou WB, et al. Toxicity induced by Basic Violet 14, Direct Red 28 and Acid Red 26 in zebrafish larvae [J]. J Appl Toxicol, 2015, 35(12): 1473-1480.
- [17] Wang X, Lin Z. Immunomodulating effect of Ganoderma (Lingzhi) and possible mechanism [J]. 2019, 1182: 1-37.
- [18] Ren L, Zhang J, Zhang T. Immunomodulatory activities of polysaccharides from Ganoderma on immune effector cells [J]. Food Chem, 2020, 340: 127933.
- [19] Cai Q, Li Y, Pei G. Polysaccharides from Ganoderma lucidum attenuate microglia-mediated neuroinflammation and modulate microglial phagocytosis and behavioural response [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 63.
- [20] Jin X, Ruiz Beguerie J, Sze DM, et al. Ganoderma lucidum (Reishi mushroom) for cancer treatment [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 6: CD007731.
- [21] Li X, He Y, Zeng P, et al. Molecular basis for Poria cocos mushroom polysaccharide used as an antitumor drug in China [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(1): 4-20.
- [22] Zhang W, Cheng N, Wang Y, et al. Adjuvant activity of PCP-II, a polysaccharide from Poria cocos, on a whole killed rabies vaccine [J]. Virus Res, 2019, 270: 197638.
- [23] Li X, Gao J, Yu Z, et al. Regulatory effect of anwulignan on the immune function through its antioxidation and anti-apoptosis in D-galactose-induced aging mice [J]. Clin Interv Aging, 2020, 15: 97-110.

[收稿日期] 2021-07-06

王丽, 吉喆, 董丽, 等. 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠肠道机能的调节作用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 208-215.

Wang L, Ji Z, Dong L, et al. Effects of curcumin and/or aerobic exercise on intestinal function in dyslipidemia rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 208-215.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.008

姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠肠道机能的调节作用

王丽¹, 吉喆¹, 董丽¹, 路昕¹, 秦菲^{2,3}, 胡戈⁴, 周海涛^{2,3*}, 曹建民^{1*}

(1. 北京体育大学, 北京 100084; 2. 北京联合大学, 北京 100101; 3. 北京联合大学 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100191; 4. 常州大学, 江苏 常州 213164)

【摘要】 目的 探讨姜黄素(curcumin)和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠肠道机能的调节作用。方法 5周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 随机分为普通饮食+安静组(CON 组)、高脂饮食+安静组(HDC 组)、高脂饮食+姜黄素+安静组(HDM 组)、高脂饮食+有氧运动组(HDE 组)和高脂饮食+姜黄素+有氧运动组(HDME 组)。高脂饮食各组以高脂饲料喂养, 普通饮食组以维持饲料喂养。第 3 周起, HDM、HDME 组以 200 g/(kg·d)姜黄素灌胃, 其余组以等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠灌胃; HDE、HDME 组进行运动强度为 70%~75% 最大摄氧量的有氧运动, 其余组无任何运动干预。6 周干预结束后 24 h, 腹主动脉取血, 取盲肠组织、盲肠内容物。全自动生化分析仪检测血脂水平; HE 染色后观察大鼠盲肠组织形态; Western Blot 法检测盲肠组织闭锁小带蛋白-1(zona occludens-1, ZO-1)蛋白质表达水平; 16S rDNA 基因测序技术检测盲肠内容物肠道菌群分布。结果 姜黄素和/或有氧运动均可降低血脂紊乱大鼠血清总胆固醇、甘油三酯($P < 0.05$); 上调盲肠组织 ZO-1 蛋白质表达水平($P < 0.05$)并改善组织形态; 改善肠道菌群的多样性和均匀度($P < 0.05$)。结论 姜黄素和/或有氧运动均可通过有效调节肠道菌群, 改善血脂紊乱大鼠肠黏膜屏障完整性及肠道机能。其中联合干预效果最佳。

【关键词】 姜黄素; 有氧运动; 血脂紊乱; 肠道菌群; 闭锁小带蛋白-1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0208-08

Effects of curcumin and/or aerobic exercise on intestinal function in dyslipidemia rats

WANG Li¹, JI Zhe¹, DONG Li¹, LU Xin¹, QIN Fei^{2,3}, HU Ge⁴, ZHU Haitao^{2,3*}, CAO Jianmin^{1*}

(1. Beijing Sport University, Beijing 100084, China. 2. Beijing Union University, Beijing 100101. 3. Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, Beijing Union University, Beijing 100191. 4. Changzhou University, Changzhou 213164)

Corresponding author: ZHOU Haitao. E-mail: zsettle@sina.com; CAO Jianmin. E-mail: bsucaojianmin@aliyun.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of curcumin and/or aerobic exercise on intestinal function in dyslipidemic rats. **Methods** Forty specific-pathogen free male Sprague Dawley rats were divided randomly into the following groups: normal diet + quiet (CON group), high-fat diet + quiet (HDC group), high-fat diet + curcumin + quiet

【基金项目】 北京体育大学 2020 年中央高校基本科研业务费专项资金资助(2020033), 北京联合大学科研项目(ZK30202104)。

Funded by Fundamental Research Funds for Central Universities in 2020 of Beijing Sport University (2020033), the Academic Research Projects of Beijing Union University (ZK30202104).

【作者简介】 王丽(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 运动营养、运动训练监控。Email: 2696167005@qq.com

【通信作者】 周海涛(1976—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向: 运动营养与健康促进。Email: zsettle@sina.com;

曹建民(1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 运动营养。Email: bsucaojianmin@aliyun.com。

* 共同通信作者

(HDM group), high-fat diet + aerobic exercise (HDE group), and high-fat diet + curcumin + aerobic exercise (HDME group). All the high-fat diet groups received a high-fat diet and the CON group received a maintenance diet. From the third week, the HDM and HDME groups were also given 200 g/(kg · d) curcumin, and the other groups were given 0.5% sodium carboxymethyl cellulose. The HDE and HDME groups underwent aerobic exercise intervention with 70% ~ 75% maximal oxygen uptake, while the other groups did not undergo any exercise intervention. Twenty-four hours after the 6 weeks intervention, blood was taken from the abdominal aorta, and cecal tissue and contents were collected. Blood lipid levels were detected using an automatic biochemical analyzer. Cecal morphology was observed by hematoxylin and eosin staining. Expression of zonula occludens-1 (ZO-1) protein in cecal tissue was detected by western blot. The distribution of the intestinal flora in the cecal contents was detected by 16S rDNA sequencing. **Results** Curcumin and/or aerobic exercise significantly decreased serum total cholesterol and triglyceride levels ($P < 0.05$), up-regulated ZO-1 expression in cecal tissue ($P < 0.05$), attenuated the cecal histopathological changes, and improved the diversity and evenness of the intestinal flora in dyslipidemic rats ($P < 0.05$). **Conclusions** Curcumin and/or aerobic exercise can reduce blood lipid levels in dyslipidemic rats, regulate the cecal intestinal flora, protect the integrity of the intestinal mucosal barrier, and adjust intestinal function, with the combination of curcumin and aerobic exercise having the greatest effect.

【Keywords】 curcumin; aerobic exercise; dyslipidemia; intestinal flora; zonula occludens-1

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

随着生活水平提高,人民饮食结构发生巨大变化,高糖、高脂饮食摄入大幅增加。血脂紊乱、高血压、非酒精性脂肪肝等疾病发病率持续增高。近年来,全球儿童、青少年血脂异常发生率呈现逐年上升的趋势。血脂紊乱极易诱发肠道菌群紊乱、肠黏膜屏障损伤^[1]。血脂紊乱患者肠道菌群呈现明显的特异性^[2]。研究证明调节肠道菌群不仅可以有效保护血脂紊乱患者肠道黏膜屏障^[3],还可以改善其血脂水平^[4]。姜黄素及有氧运动均具有改善肠道生理功能和降血脂作用^[5-7]。本实验以高血脂症大鼠为模型,探讨姜黄素联合有氧运动干预对血脂紊乱大鼠肠黏膜屏障、肠道菌群等肠道生理功能的影响,以期营养与运动的联合干预改善儿童、青少年时期高脂饮食诱导血脂紊乱及其并发症提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40 只 5 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 200 g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】,饲养于北京体育大学 SPF 级动物实验室【SYXK(京)2021-0053】,作息模拟正常生物节律,室温 20 ~ 24℃,湿度 50% ~ 70%,标准大鼠笼饲养,高脂饲料由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供【SCXK(京)2019-0010】。所有操作均符合北京体育大学动物科学实验伦理学要求(批准号:2019094A)。

1.1.2 主要试剂与仪器

姜黄素(纯度:95%,宁波中药制药股份有限公司,批号:CP20191007);苏木精伊红染液(Servicebio 公司,批号:G1005)、一抗(兔抗):闭锁小带蛋白-1(zonaoccludens-1, ZO-1)(Immunoway 公司,批号:YN1410)、二抗:辣根酶标记山羊抗兔 IgG(天德悦公司,批号:S004)、粪便 DNA 小提试剂盒(广州美基生物科技有限公司,批号:IVD3301-50)。病理切片机(徕卡,德国);脱水机(DIAPATH,意大利);高速组织研磨仪(Servicebio,中国);酶标检测仪(Thermo FC,美国);VeritiPro™ PCR 仪(ABI,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及饲养条件

大鼠适应性饲养 7 d 后称重,使用随机数字表法分组,分为普通饮食+安静组(CON 组)、高脂饮食+安静组(HDC 组)、高脂饮食+姜黄素+安静组(HDM 组)、高脂饮食+有氧运动组(HDE 组)和高脂饮食+姜黄素+有氧运动组(HDME 组),每组 8 只,共 5 组。各组自由摄食饮水;CON 组普通饲料喂养,其他各组高脂饲料喂养。根据预实验及参考文献^[8]确定姜黄素实验剂量为 200 mg/(kg · d)。

1.2.2 干预手段

第 3 周,HDM 组和 HDME 组训练前 0.5 h 灌胃姜黄素溶液,每天 1 次,其余各组均以等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠灌胃;HDE 组和 HDME 组进行有氧运动干预^[9],坡度 5°,运动强度:70% ~ 75% 最大摄氧量,运动时长:60 min,频率:每天 1 次,每周 6 d,训练周期:6 周,其他组无任何运动干预。

1.2.3 实验取材

末次运动训练后 24 h 取材。取材前称重,质量分数 20% 乌拉坦麻醉,腹主动脉取血,静置 2 h 后 3000 r/min 离心 10 min 制备血清。冰上取盲肠部位肠道内容物,置于冻存管中,-80℃ 冰箱冻存待测。取盲肠全段,用预冷磷酸盐缓冲液冲洗干净后分为两部分,部分组织置于 4% 多聚甲醛溶液固定,其余组织存于液氮中速冻,后转移至-80℃ 冰箱保存。

1.2.4 血清血脂水平的测定

全自动生化分析仪测定血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)。

1.2.5 HE 染色检测大鼠盲肠组织形态

制备大鼠盲肠组织石蜡切片,切片入苏木素染液染 3 ~ 5 min,自来水洗,分化液分化,自来水洗,返蓝液返蓝,流水冲洗。切片依次入 85%、95% 的梯度酒精脱水各 5 min,入伊红染液染色 5 min。切片依次放入无水乙醇 I 5 min-无水乙醇 II 5 min-无水乙醇 III 5 min-二甲苯 I 5 min-二甲苯 II 5 min 透明,中性树胶封片。最后显微镜镜检,图像采集分析。图像中细胞质呈红色,细胞核呈蓝色。

1.2.6 Western Blot 检测盲肠组织 ZO-1 蛋白表达

称取适量大鼠盲肠组织,加入 RIPA 蛋白提取剂匀浆,4℃ 离心提取后,使用 BCA 方法进行蛋白定量,电泳时上样量为 20 μg。一抗 ZO-1 (1/1000) 4℃ 孵育过夜。次日洗膜并加入一抗相同种属的二抗 (1/10000) 孵育 2 h。TBST 洗膜 6 次后进行化学发光,凝胶成像仪中显像。β-actin 为内参。

1.2.7 16S rDNA 基因测序技术检测肠道菌群

取适量盲肠内容物,对内容物肠道菌群 DNA 样本 V3-V4 区域进行 PCR 扩增、文库制备、文库质检、定量,使用设定的 TAG 序列进行样本区分。

PCR 扩增程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,62℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 末端延伸 8 min,4℃ 保存。采用 Illumina Hiseq 2500 高通量测序平台对检测合格的文库进行测序。

1.2.8 生物信息学分析

参考 Silva 数据库,根据 97% 相似度将序列聚类获得操作分类单元,并进行分类注释^[10]。基于操作分类单元聚类结果,根据线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA) 进行 LEfSe 多级物种差异判别分析,并找出组间具有显著差异的物种^[11];使用 Rstudio 软件分析群落的多样性及差异并制图。

1.3 统计学分析

实验数据用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据统计分析采用 SPSS 21.0 软件。组间分析采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA),方差齐采用最小显著差数法 (Least Significant Difference, LSD) 法,方差不齐采用 Tamhane 法。采用适用于 2 × 2 析因设计 (因素 A 为姜黄素,因素 B 为有氧运动) 的方差分析方法。 $P < 0.05$ 表示为差异具有显著性, $P < 0.01$ 表示为差异极具显著性。

2 结果

2.1 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠血脂水平的影响

TC:与 CON 组相比,HDC 组显著升高 ($P < 0.05$);与 HDC 组相比,HDM 组、HDE 组、HDME 组显著降低 ($P < 0.05$);与 HDME 组相比,HDM 组显著升高 ($P < 0.05$)。TG:与 CON 组相比,HDC 组显著升高 ($P < 0.05$);与 HDC 组相比,HDM 组、HDE 组、HDME 组显著降低 ($P < 0.05$)。HDL-C:与 CON 组相比,HDC 组显著降低 ($P < 0.05$);与 HDC 组相比,HDE 组显著升高 ($P < 0.05$)。LDL-C:与 CON 组相比,HDC 组显著升高 ($P < 0.05$);与 HDC 组相比,HDME 组显著降低 ($P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠血脂水平的影响 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of curcumin and/or aerobic exercise on lipid levels in dyslipidemia rats ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
CON 组 Group CON	2.21 ± 0.42	0.88 ± 0.29	0.71 ± 0.15	0.56 ± 0.28
HDC 组 Group HDC	3.45 ± 0.53*	3.42 ± 0.93*	0.52 ± 0.17*	0.96 ± 0.31*
HDM 组 Group HDM	2.49 ± 0.36 [#] △	1.20 ± 0.46 [#]	0.64 ± 0.21	0.87 ± 0.15
HDE 组 Group HDE	2.31 ± 0.21 [#]	0.85 ± 0.34 [#]	0.66 ± 0.13 [#]	0.87 ± 0.21
HDME 组 Group HDME	2.09 ± 0.29 [#]	0.92 ± 0.33 [#]	0.64 ± 0.05	0.77 ± 0.11 [#]

注:与 CON 组相比,* $P < 0.05$;与 HDC 组相比,[#] $P < 0.05$;与 HDME 组相比,△ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with group CON, * $P < 0.05$. Compared with group HDC, [#] $P < 0.05$. Compared with group HDME, △ $P < 0.05$.

2.2 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠盲肠组织形态的影响

CON 组肠道纹理清晰,无炎症浸染;杯状细胞清楚且内部无浸染。与 CON 组相比,HDC 组细胞核数量减少,肠道纹理模糊,出现炎症浸染;杯状细胞不清楚且内部出现炎症浸染;与 HDC 组相比,HDM 组、HDE 组、HDME 组肠道纹理清晰;杯状细胞清楚且内部出现较少的炎症浸染;其中 HDME 组

改善更为显著(见图 1)。

2.3 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠盲肠组织 ZO-1 蛋白质表达的影响

盲肠组织 ZO-1 蛋白质表达:与 CON 组相比,HDC 组显著降低($P < 0.05$);与 HDC 组相比,HDM 组、HDE 组、HDME 组显著升高($P < 0.05$);与 HDME 组相比,HDM 组、HDE 组 ZO-1 蛋白表达有降低趋势但无显著性差异($P > 0.05$)(见图 2)。

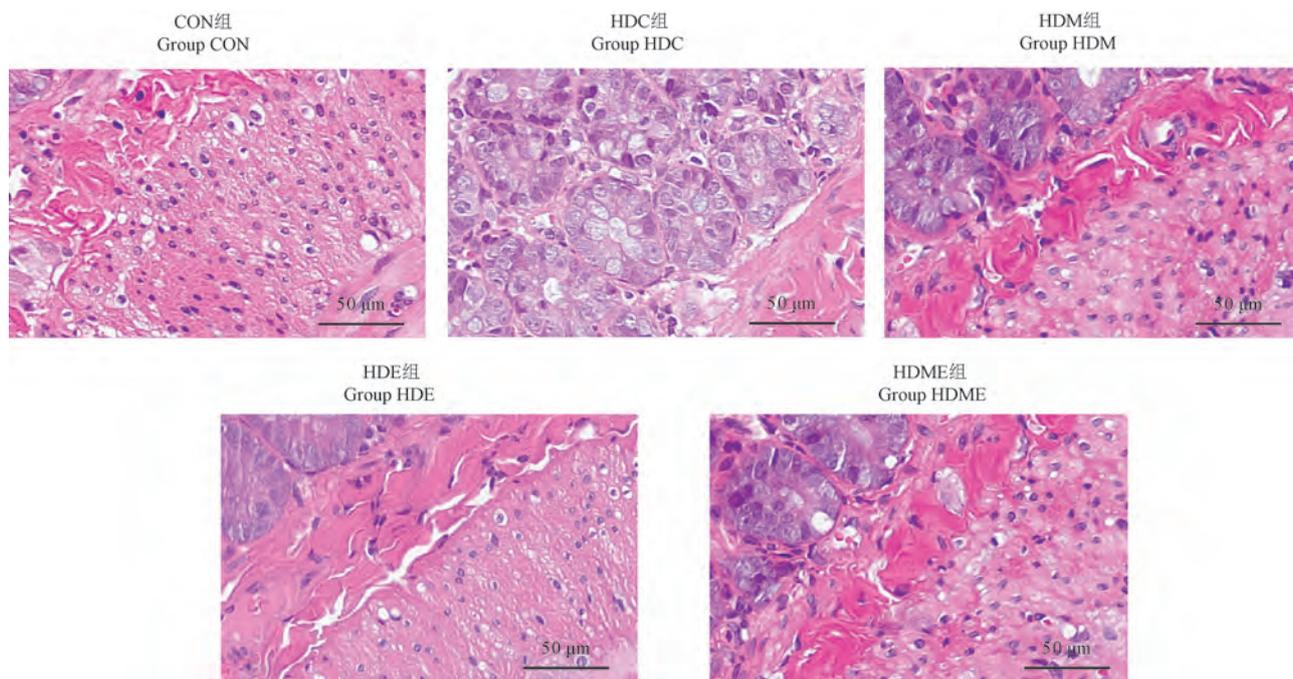


图 1 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠盲肠组织形态的影响

Figure 1 Effects of curcumin and/or aerobic exercise on cecal tissue morphology in dyslipidemia rats

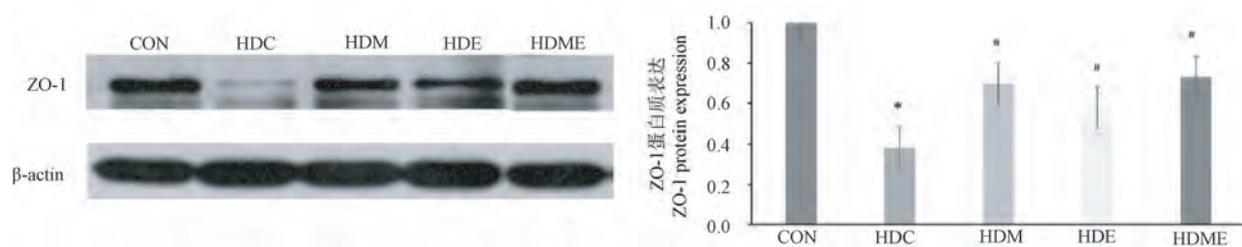


图 2 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠盲肠组织 ZO-1 蛋白质表达的影响

Figure 2 Effects of curcumin and/or aerobic exercise on cecal ZO-1 expression in dyslipidemia rats

2.4 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠肠道菌群结构的影响

Alpha Diversity 多样性通常用于衡量物种多样性及均匀度^[12]。其中 Chao1 指数用于衡量物种多样性,Simpson 指数用于衡量物种均匀度。与 CON 组比,HDC 组大鼠肠道菌群 Chao1 指数、Simpson 指数显著降低($P < 0.05$);与 HDC 组比,HDM 组、

HDE 组和 HDME 组大鼠粪便菌群 Chao1 指数、Simpson 指数显著升高($P < 0.05$);与 HDME 组比,HDM 组、HDE 组有降低趋势但无显著性差异($P > 0.05$)。

Beta Diversity 多样性用于分析个体间微生物组成的相似性^[12]。CON 组与 HDC 组大鼠肠道菌群分离,无重叠部分;HDM 组、HDE 组、HDME 组分别与

HDC 组分离,且与 CON 组重叠,HDME 组重叠百分比最大(见图 3)。

为进一步揭示各组大鼠肠道菌群基因组特征,对 5 组大鼠肠道菌群类群进行 LDA 分析,统计出具有统计学差异的生物标识。图 4A 是 5 组样本从门水平到属水平的 LDA 值,基柱越长代表该分类单元的差异越显著。CON 组、HDC 组、HDM 组、HDE

组、HDME 组起重要作用的生物标识分别有 13 个、10 个、6 个、1 个、11 个。图 4B 拟杆菌属、普雷沃氏菌属、Papillibacter、Elusimicrobiaceae 等差异最大的前 4 个属在 CON 组中富集;梭菌属、厚壁菌属、疣微菌属等在 HDC 组富集;Erysipelotrichaceae、Barnesiella 等在 HDM 组富集;变形菌属、Epsilonproteobacteria、螺杆菌属在 HDME 组富集(图 4)。

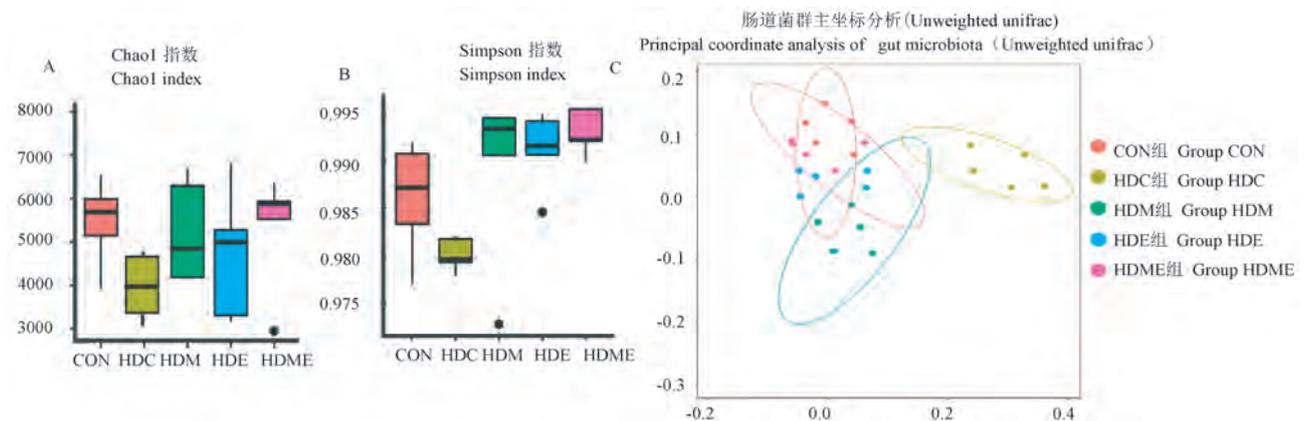


图 3 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠肠道菌群丰度及多样性的影响

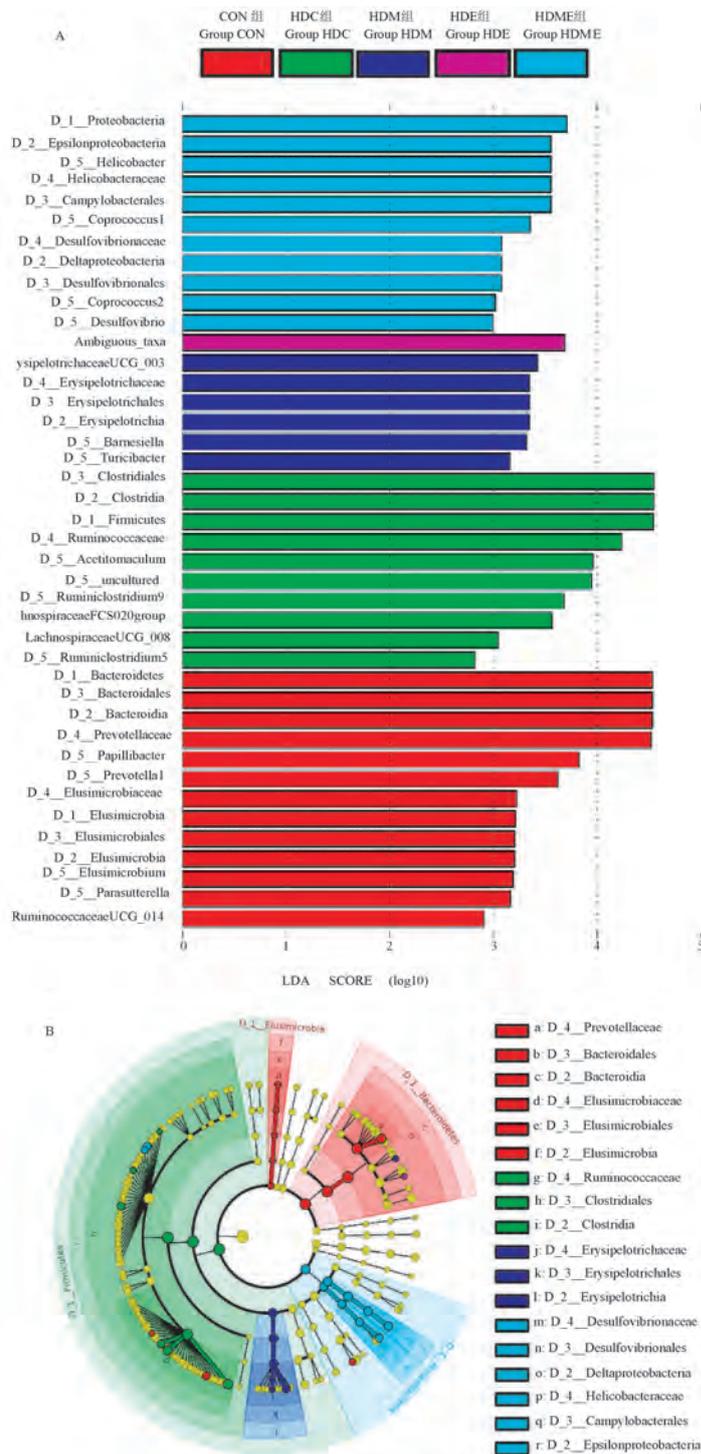
Figure 3 Effects of curcumin and/or aerobic exercise on intestinal microflora abundance and diversity in dyslipidemia rats

3 讨论

研究表明,宿主肠道菌群水平不仅取决于遗传因素,还与年龄、饮食、生活环境等因素密切相关^[13]。高脂饮食致血脂紊乱可诱发肠道菌群紊乱,破坏肠黏膜屏障完整性,影响脂质的消化与吸收,严重危害人体健康^[14-15]。Resta^[16]研究发现:高脂饮食干预后,大鼠在脂质代谢过程中产生次生胆汁酸、硫化氢等有害产物,损害结肠黏膜,破坏细菌赖以生存的肠道微环境。Chen 等^[14]研究发现,高脂肪饮食降低了大鼠肠道菌群的丰度和多样性,拟杆菌门丰度降低和厚壁菌门的丰度增加。食物中的热量可以被厚壁菌门吸收,从而促进脂肪在宿主体内的储存,血清 TC、TG 显著升高。ZO-1 蛋白是构成紧密连接必须的多域支架蛋白,在维持紧密连接结构和功能方面发挥着不可替代的作用^[17]。作为标志性蛋白,ZO-1 蛋白与肠黏膜屏障功能呈正相关^[18]。ZO-1 蛋白正常表达可以维持肠黏膜屏障完整,并修复被损坏的肠道黏膜;其表达下调或活性降低则会影响细胞间紧密连接形成,阻碍肠黏膜发挥防御屏障功能,加剧有害细菌及毒素穿透肠道入血引发肠源性感染、肠漏的风险。血脂紊乱的发生与发展,会严重损害肠黏膜屏障紧密连接处的结构

域结合“桥接”ZO-1 蛋白^[19]。调节肠道菌群不仅可有效改变肠黏膜屏障的完整性和肠道上皮细胞,还可调节脂质的代谢平衡^[20]。生短链脂肪酸菌群是维持肠黏膜屏障完整性的关键因素^[20]。生短链脂肪酸菌属丰度的增加,有效促进短链脂肪酸的生成,可间接刺激杯状细胞分泌粘液增强肠黏膜屏障功能和完整性,上调 ZO-1 蛋白质表达水平^[20]。本研究中 HDC 组大鼠 8 周高脂饮食后血脂水平异常,肠道菌群多样性和均匀度降低(生短链脂肪酸菌属粪球菌属、瘤胃球菌属、双歧杆菌属、拟杆菌属丰度降低,厚壁菌门与拟杆菌门比值升高),与 Chen 等^[14]研究相一致;ZO-1 蛋白质表达水平降低,肠黏膜屏障出现炎症浸润,通透性增强,说明 8 周高脂饮食不仅可诱发大鼠血脂紊乱,还可诱发大鼠肠道菌群紊乱,肠黏膜屏障功能及完整性破坏,建模成功。

姜黄素能够促进肠道益生菌生长,有效改善肠道菌群紊乱,保护肠黏膜屏障完整^[21]。Li 等^[22]研究发现,姜黄素可通过降低高脂饮食鼠厚壁菌门/拟杆菌门比值及脱硫弧菌丰度,升高阿克曼氏菌属和生短链脂肪酸菌属丰度,预防高脂饮食诱导的脂肪肝变性。阿克曼氏菌可通过增加大鼠胃肠道黏液层厚度,改善胃肠道黏膜屏障,从而阻止有害物质通过肠道进入血液,阻止脂肪在体内大量储存,



注:A:LDA 分值分布图,生物标识的筛选阈值是 LDA score = 2,将筛选出的生物标识按 LDA score 值由大到小排列;B:物种聚类树图。根据筛选出的 LDA 结果构建进化树(门到属水平)不同颜色节点表示在对应组别中显著富集,且对组间差异存在显著影响的微生物类群;黄色节点代表该水平的细菌在两组之间的分布无显著性差异。

图 4 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠肠道菌群差异性的影响(LEfSe 分析)

Note. A. Distribution of LDA scores. The screening threshold of biomarkers was LDA score = 2, and the screened biomarkers were arranged according to LDA score value from large to small. B. Clustering tree of species. Phylogenetic trees (phylum to genus level) were constructed from the selected LDA results. Different color nodes represent microbial groups that are significantly enriched in corresponding groups and have significant influence on the differences between groups. The yellow nodes indicate that there is no significant difference in the distribution of bacteria at this level between the two groups.

Figure 4 Effects of curcumin and/or aerobic exercise on intestinal microflora difference in dyslipidemia rats (LEfSe analysis)

改善肥胖引起的高血脂相关代谢性疾病^[23]。短链脂肪酸能够通过抑制肝脂肪生成酶活性和调节胆固醇在血液和肝中的分布来降低 TG 和 TC 水平^[24-25]。Ghosh 等^[26]研究发现,姜黄素可通过改善肠黏膜屏障紧密连接结构,上调肠黏膜屏障蛋白 occludin、ZO-1 蛋白质表达水平,保护高脂饮食鼠的肠黏膜屏障。运动能够有效促进肠道菌群的多样性和均匀度。Evans 等^[5]研究发现,运动可以抑制高脂饮食小鼠拟杆菌属丰度的上升及放线菌属和厚壁菌属丰度的下降,有效降低厚壁菌门/拟杆菌门比值。人体实验中亦发现 12 周有氧运动可有效增加老年女性肠道拟杆菌的相对丰度^[27]。此外,有氧运动可通过减少炎症浸染的方式保护高脂饮食鼠肠黏膜屏障的形态和完整性^[28]。

本研究中姜黄素和/或有氧运动干预均能提高血脂紊乱大鼠肠道菌群的多样性和均匀度。在门水平上,厚壁菌门/拟杆菌门比值显著降低。在属水平上,生短链脂肪酸菌瘤胃球菌属、粪球菌属丰度升高,有助于短链脂肪酸的生成。大量的短链脂肪酸有助于提高肠组织 ZO-1 蛋白表达水平,修复受损肠黏膜屏障,有效降低血脂水平,与相关研究较为一致。其中 HDME 组效果最佳,说明联合干预效果优于单一干预。

4 结论

姜黄素和/或有氧运动均能够显著改善血脂紊乱大鼠血脂水平异常及肠道菌群的多样性和均匀度,提高有益菌群的丰度;上调 ZO-1 蛋白质表达水平,修复受损肠黏膜屏障,调节肠道肠能。其中联合干预效果最佳。

参 考 文 献(References)

- [1] Kim HI, Yun SW, Han MJ, et al. IL-10 expression-inducing gut bacteria alleviate high-fat diet-induced obesity and hyperlipidemia in mice [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30(4): 599-603.
- [2] Li H, Liu B, Song J, et al. Characteristics of gut microbiota in patients with hypertension and/or hyperlipidemia: A cross-sectional study on rural residents in xinxiang county, Henan Province [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(10): 399.
- [3] Wei F, Liu Y, Bi C, et al. Nostoc sphaeroides Kütz ameliorates hyperlipidemia and maintains the intestinal barrier and gut microbiota composition of high-fat diet mice [J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(5): 2348-2359.
- [4] Jiang T, Xu C, Liu H, et al. Linderæ radix ethanol extract alleviates diet-induced hyperlipidemia by regulating bile acid metabolism through gut microbiota [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 627920.
- [5] Evans CC, LePard KJ, Kwak JW, et al. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92193.
- [6] Petriz BA, Castro AP, Almeida JA, et al. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 511.
- [7] Burge K, Gunasekaran A, Eckert J, et al. Curcumin and intestinal inflammatory diseases: molecular mechanisms of protection [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1912.
- [8] Xu X, Wang H, Guo D, et al. Curcumin modulates gut microbiota and improves renal function in rats with uric acid nephropathy [J]. *Ren Fail*, 2021, 43(1): 1063-1075.
- [9] 何诗依, 李铁瑛, 严露, 等. 4 周有氧运动对 Apelin 基因敲除鼠糖耐量和骨骼肌糖代谢相关基因表达的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 2019, 38(6): 479-485.
- [9] He SY, Li TY, Yan L, et al. Effects of 4-week aerobic exercise on glucose tolerance and glucose metabolism related gene expression in skeletal muscle of apelin knockout mice [J]. *Chin J Sports Med*, 2019, 38(6): 479-485.
- [10] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [11] Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. *Genome Biol*, 2011, 12(6): R60.
- [12] 王雨, 许达峰, 周开伦, 等. miRNA-144 基因过表达对肝癌小鼠的抑瘤作用及对肠道菌群的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(5): 87-93.
- [12] Wang Y, Xu DF, Zhou KL, et al. Antitumor effect of miRNA-144 gene overexpression and modulation of intestinal flora in a mouse model of liver cancer [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(5): 87-93.
- [13] Natividad JM, Huang X, Slack E, et al. Host responses to intestinal microbial antigens in gluten-sensitive mice [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6472.
- [14] Chen D, Yang Z, Chen X, et al. The effect of Lactobacillus rhamnosus hsrlym 1301 on the intestinal microbiota of a hyperlipidemic rat model [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 386.
- [15] Du P, Zhou J, Zhang L, et al. GC × GC-MS analysis and hypolipidemic effects of polyphenol extracts from Shanxi-aged vinegar in rats under a high fat diet [J]. *Food Funct*, 2020, 11(9): 7468-7480.
- [16] Resta SC. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling [J]. *J Physiol*, 2010, 587(17): 4169-4174.
- [17] Yuan M, Chen X, Su T, et al. Supplementation of kiwifruit polyphenol extract attenuates high fat diet induced intestinal barrier damage and inflammation via reshaping gut microbiome [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 702157.
- [18] Shen L, Weber CR, Raleigh DR, et al. Tight junction pore and

- leak pathways: a dynamic duo [J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 283-309.
- [19] Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, et al. Negative effects of a High-Fat Diet on intestinal permeability: a review [J]. *Adv Nutr*, 2020, 11(1): 77-91.
- [20] Peng L, Li ZR, Green RS, et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-Activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers [J]. *J Nutr*, 2009, 139(9): 1619-1625.
- [21] Scazzocchio B, Minghetti L, D'archivio M. Interaction between gut microbiota and curcumin: a new key of understanding for the health effects of curcumin [J]. *Nutrients*, 2020, 12(9): 2499.
- [22] Li S, You JM, Wang ZR, et al. Curcumin alleviates high-fat diet-induced hepatic steatosis and obesity in association with modulation of gut microbiota in mice [J]. *Food Res Int*, 2021, 143: 110270.
- [23] Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(22): 9066-9071.
- [24] Larkin TA, Astheimer LB, Price WE. Dietary combination of soy with a probiotic or prebiotic food significantly reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolaemic subjects [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2009, 63(2): 238-245.
- [25] Pereira DI, McCartney AL, Gibson GR. An *in vitro* study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 4743-4752.
- [26] Ghosh SS, Bie J, Wang J, et al. Oral supplementation with non-absorbable antibiotics or curcumin attenuates western diet-induced atherosclerosis and glucose intolerance in LDLR^{-/-} mice--role of intestinal permeability and macrophage activation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108577.
- [27] Morita E, Yokoyama H, Imai D, et al. Aerobic exercise training with brisk walking increases intestinal bacteroides in healthy elderly women [J]. *Nutrients*, 2019, 11(4): 868.
- [28] Campbell SC, Wisniewski PJ, Noji M, et al. The effect of diet and exercise on intestinal integrity and microbial diversity in mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150502.

[收稿日期] 2021-12-10

蒋超,王超,任晓楠,等. 从人体尿液中分离肾源细胞构建拟肾血管单位小鼠皮下嵌合模型及其初步评价 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 216-222.

Jiang C, Wang C, Ren XN, et al. Construction and preliminary evaluation of a mouse subcutaneous chimeric model of renal vascular unit based on isolation of kidney-derived cells from human urine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 216-222.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.009

从人体尿液中分离肾源细胞构建拟肾血管单位 小鼠皮下嵌合模型及其初步评价

蒋超,王超,任晓楠,周晓辉*

(复旦大学附属公共卫生临床中心,上海 201508)

【摘要】 目的 将健康人体尿液中分离培养的肾源细胞与人源间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)以3:3:2的比例混合,并移植到NOD-SCID免疫缺陷小鼠皮下而构建人源化嵌合小鼠模型。方法 (1)体外培养MSCs、HUVECs,同时从健康人体尿液中分离培养肾源细胞,并对该细胞进行免疫荧光鉴定。(2)将上述3种细胞以3:3:2的比例混合后与Matrigel基质胶一起注射到NOD-SCID小鼠皮下形成人源组织,通过HE染色、免疫组织化学对移植模型进行鉴定。结果 (1)成功地从尿液中分离培养出肾源细胞,并检测鉴定了肾小管上皮细胞和集合管细胞;(2)将3种细胞混合后注射到NOD-SCID免疫缺陷小鼠皮下可初步形成小管结构以及与小鼠血管相连接的人源血管结构。结论 具有肾小管上皮细胞和集合管细胞的肾源细胞与HUVECs和MSCs皮下移植入NOD-SCID免疫缺陷小鼠体内可形成嵌合的人肾血管单位小鼠模型。该模型可为肾病个体化治疗和相关病毒感染研究提供一个人源化动物模型。

【关键词】 肾源细胞;人肾血管单位小鼠模型;皮下注射;间充质干细胞;人脐静脉内皮细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)02-0216-07

Construction and preliminary evaluation of a mouse subcutaneous chimeric model of renal vascular unit based on isolation of kidney-derived cells from human urine

JIANG Chao, WANG Chao, REN Xiaonan, ZHOU Xiaohui*

(Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China)

Corresponding author: ZHOU Xiaohui. E-mail: zhouxiaohui@shphc.org.cn

【Abstract】 Objective To construct a humanized chimeric mouse model by subcutaneously transplanting NOD-SCID immunodeficient mice with kidney-derived cells cultured from healthy human urine mixed with human mesenchymal stem cells (MSCs) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** (1) Kidney-derived cells were isolated from healthy human urine and cultured *in vitro*. MSCs and HUVECs were also cultured *in vitro*. All three kinds of cells were identified by immunofluorescence. (2) The three cell types were then mixed in a ratio of 3:3:2 and injected

【基金项目】 上海市科学技术委员会实验动物专项(19140905300,19140905301),上海市卫生健康委员会项目(20204Y0335),上海市公共卫生临床中心院级科研课题(KY-GW-2021-05, KY-GW-2021-38),上海实验动物安全控制管理信息平台研究及应用示范(21140900200),生物安全实验室实验动物信息可追溯系统应用评价研究(21140900202)。

Funded by the Laboratory Animal Special Project of Shanghai Science and Technology Commission(19140905300,19140905301), Shanghai Municipal Health Commission Project(20204Y0335), Shanghai Public Health Clinical Center Hospital Project(KY-GW-2021-05, KY-GW-2021-38), Research and Application Demonstration of Shanghai Laboratory Animal Safety Control Management Information Platform(21140900200), Research on Application Evaluation of Laboratory Animal Information Traceability System in Biosafety Laboratory(21140900202).

【作者简介】 蒋超(1997—),男,在读硕士研究生,研究方向:肾脏病动物模型。Email: 20211300004@fudan.edu.cn

【通信作者】 周晓辉(1973—),男,博士,研究员,研究方向:感染免疫学与实验动物模型。Email: zhouxiaohui@shphc.org.cn

subcutaneously with Matrigel into NOD-SCID mice to develop human tissue. The transplantation model was identified by hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry. **Results** (1) Kidney-derived cells were successfully isolated and cultured from urine, and renal tubular epithelial cells and collecting duct cells were detectable and identified by immunohistochemistry. (2) After subcutaneous injection into NOD-SCID immunodeficient mice, the three kinds of cells initially developed tubule structures and human-derived vascular structures that communicated with the murine systemic circulation. **Conclusions** We successfully created a chimeric mouse model of the human renal vascular unit by subcutaneous transplantation of kidney-derived cells, HUVECs, and MSCs, including renal tubular epithelial cells and collecting tubular cells, into NOD-SCID immunodeficient mice. This model may provide a humanized animal model for research into the individualized treatment of human chronic kidney disease and kidney-related viral infections

【Keywords】 kidney-derived cells; human renal vascular unit mouse model; subcutaneous transplantation; mesenchymal stem cells (MSCs); human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

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

当前肾病特别是慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 已成为一种全球性的疾病, 为全球卫生健康和经济领域造成巨大的负担^[1]。据估计, 截至 2017 年全球 CKD 患者人数约 6.9 亿人, 其中中国的患病率 10.8%, 患者人数约 1.3 亿人, 排名全球第一位, 给人民的健康和生活带来了巨大的威胁^[2]。

CKD 病因较为复杂, 其致病机制需要个体化精准医学的深入研究。而在 CKD 病程后期进展到终末期肾病 (end stage kidney disease, ESKD) 的患者, 目前除了进行肾透析和肾移植, 没有其它有效的治疗方案。肾透析的病人不仅要承受透析带来的痛苦, 严重影响了病人的生活质量, 而且还需要承担昂贵的医疗费用。虽然肾移植病人比较于肾透析病人有更好的生活质量和更长的存活率, 但是由于新增肾透析病人例数大于肾移植例数, 待移植患者数量持续增加, 造成移植器官短缺问题^[3]。据 2015~2016 年的肾移植数据显示, 在肾透析患者中只有 1 例患者能够接受肾移植手术 (供需比为 1:55 ~ 1:44)^[4]。而且肾移植的病人由于需要长期服用免疫抑制药物, 也会受到 BK polyomavirus (BKV) 感染, 从而引发 BKV 相关肾病、出血性膀胱炎等一系列疾病, 甚至导致病人死亡^[5]。因此, 亟需为 CKD 患者提供更加有效的治疗方案以及解决肾移植手术后 BKV 感染问题。但无论是 CKD 个体化精准医学研究还是 BKV 感染都缺乏合适的体内研究 (*In vivo*) 模型。

人源化小鼠模型 (humanized mice model), 即把有功能的人类基因、组织或细胞移植入小鼠体内构建而成, 其已经被广泛用于人类疾病的临床前研究和病毒感染性研究^[6]。例如目前比较成熟的免疫系统人源化小鼠, 被用于移植抗宿主疾病 (graft versus host disease, GVHD)、过敏性疾病和一些病毒

感染性疾病的研究; 肝人源化小鼠模型, 用于肝病、药物代谢和肝炎病毒感染性等研究; 人源性组织异种移植 (patient-derived xenografts, PDX) 模型可用于研究、评价筛选抗肿瘤药物, 为癌症的个体化精准医疗提供了不可缺少的研究工具^[7]。

目前用于 CKD 个体化精准医学研究的肾人源化小鼠模型还非常少见。因此, 本研究探索了一种基于人源细胞构建人肾血管单位皮下嵌合小鼠模型的方法, 主要是将从尿液中分离的肾源细胞 (其中包括了肾小管上皮细胞和集合管细胞) 与 MSCs 和 HUVECs 注入 NOD-SCID 免疫缺陷小鼠皮下构建而成, 可为 CKD 等相关肾病的个体化精准医学研究、药物筛选和 BKV 感染研究提供一种合适的人源化小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本实验选用 SPF 级 8 周龄 NOD-SCID 雌性小鼠 4 只, 体重 18 ~ 20 g。该小鼠购买于江苏集萃药康生物科技股份有限公司【SCXK(苏)2018-0008】, 并在上海市 (复旦大学附属) 公共卫生临床中心实验动物部无菌隔离器中饲养【SYXK(沪)2020-0019】。小鼠饲养环境: 温度为 18 ~ 25℃, 湿度适宜, 光照 12 h, 黑暗 12 h, 每笼 3 只, 自由饮水取食。本实验所有操作均符合上海市公共卫生临床中心伦理委员会的伦理批件 (2019-D021)。

1.1.2 细胞

人间充质干细胞 (MSCs) (购买于上海然其生物科技有限公司); 人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) (上海交通大学附属第九人民医院于士颜课题组馈赠); 尿液中分离的肾源细胞 (具体方法见后 1.2.1)。

1.1.3 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(11995-065, Gibco); DMEMF/12 培养基(11320-033, Gibco); 肾小管上皮增殖培养基 REGM(CC-3190/CC-4127, Lonza); iCell 原代间充质干细胞无血清培养基(PriMed-iCell-012-SF, 赛百康); PBS 含钙镁离子(SH30256.01, Hyclone); Washing Buffer(DMEM 培养基、HEPES(15630106, Gibco)、GlutaMAX™(35050-061, Gibco)、Primocin™(invivogen)、Rho-kinase inhibitor(Y-27632)、1%青链霉素); Primary Medium 基础培养基(DMEMF/12 培养基、10%胎牛血清 FBS(Gibco)、REGM™ SingleQuots(CC-4127, Lonza)、Primocin™(invivogen)、1%青链霉素); 0.25%胰酶(Gibco); Villin(1D2C3)抗体(sc-58897, Santa Cruz); GATA3 抗体(AF2605-SP, R&D Systems); HLA-A 抗体(ab52922, Abcam); CD13 抗体(32720 s, CST); spectrum Cytokeratin 抗体(ab9377, Abcam); 高分子量 FITC-Dextran(R-FD-007); Matrigel 基质胶(356234, Corning); Cell Adhere™ Laminin-521(77004, Stem Cell)。

生物安全柜(HR40-11B2, Thermo Fisher Scientific, 美国); 超净工作台(SW-CJ-2FD, 苏州智净净化设备有限公司); CO₂ 培养箱(3111, Thermo Fisher Scientific, 美国); 冷冻离心机(Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific, 美国); 普通离心机(TDL80-2B, 上海安亭科学仪器厂); 无菌隔离器; 倒置相差显微镜(Leica, 德国); 荧光倒置显微镜(DMI-3000, Leica, 德国); 恒温水浴锅(博讯, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

(1) 肾源细胞分离与培养: 先收集健康成人尿液 300 ~ 400 mL 于无菌的培养瓶中。在生物安全柜中将其分装到 50 mL 离心管中, 2000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清剩余 1 mL, 然后全部移入 1 个新的 50 mL 离心管中; 加入 15 ~ 20 mL Washing Buffer, 1000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清剩余 0.2 mL; 然后加入 1 mL Primary Medium 悬浮沉淀, 将其转移到 12 孔板中(预先用 laminin-521 包被), 再补入 1 mL Primary Medium, 接下来 3 d 每天加入 1 mL Primary Medium, 第 4 天时吸弃约 4 mL 培养基, 并补入 1 mL REGM 增殖培养基, 之后每天更换一半的培养基, 培养 14 d 左右, 细胞密度 80% ~ 90%, 标记为

P0 代。然后对 P0 代细胞进行 1 : 2 传代。PBS 清洗 1 ~ 2 次, 0.25%胰酶, 37℃, 于 5% CO₂ 培养箱中消化 5 min 后终止消化, 1000 r/min, 离心 5 min, 弃去上清, 加入新的 REGM 增殖培养基继续培养。

(2) 间充质干细胞(MSCs)培养: 将冻存于液氮中的 MSCs 置于 37℃ 水浴锅复苏后, 加入 5 mL iCell 原代间充质干细胞无血清培养基于 T-25 培养瓶中培养。当培养 2 ~ 3 d 后细胞状态良好, 密度长满 80% ~ 90% 时, 即可 1 : 2 进行传代。将细胞置于生物安全柜中, PBS 清洗 1 ~ 2 次, 0.25%胰酶消化, 1000 r/min, 离心 5 min, 弃去上清, 加入 5 mL 新的培养基并温和的混匀细胞, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱继续培养。

(3) 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)培养: HUVECs 复苏后于 DMEM 完全培养基中, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 当细胞汇合密度 80% ~ 90%, 可 1 : 2 进行传代。在灭菌的生物安全柜中, 无菌 PBS 清洗 2 遍, 加入 0.25%胰酶于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中消化 2 min 后终止消化, 1000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 加入 5 mL 新 DMEM 完全培养基, 混匀细胞, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱继续培养。

1.2.2 皮下移植肾源细胞、MSCs 和 HUVECs

将培养在 CO₂ 培养箱中生长状态良好的肾源细胞、MSCs 和 HUVECs 置于生物安全柜中, 胰酶消化、离心, 台盼蓝染色并用血球计数板计数: 分别取 1.5×10^6 个肾源细胞, 1.5×10^6 个 MSCs 和 1×10^6 个 HUVECs/只小鼠。然后用 200 μL Matrigel 基质胶将上面 3 种细胞充分混匀, 并用 1 mL 的无菌注射器将细胞混合物注射入 NOD-SCID 小鼠皮下。待 14 d 时, 从隔离包中取出小鼠, 通过尾静脉注射 50 mg/mL, 0.2 mL 的 200×10^3 高分子量 FITC-Dextran(1 种可注射进入血管中的绿色体内示踪剂, 能够在体内血管中循环), 待 0.5 ~ 1 h 后处死小鼠取出移植植物。

1.2.3 HE 染色

移植植物 10% 的福尔马林固定后, 脱水、透明、石蜡包埋切片、脱蜡, 梯度乙醇复水等步骤后。苏木精染色 2 ~ 3 min, 自来水冲洗, 盐酸酒精溶液分化; 然后用伊红 1 ~ 2 min 染细胞质, 进行脱水, 中性树脂胶封片, 显微镜检测拍照。

1.2.4 免疫组化

皮下移植植物用 4% 的多聚甲醛固定, 脱水、透明、石蜡包埋切片, 然后将石蜡切片置于 60℃ 烤箱中烤

片 1 h,二甲苯-I、二甲苯-II脱蜡处理后,依次放入无水乙醇、85%乙醇、75%乙醇、蒸馏水中。将复水后的切片置于柠檬酸抗原修复液中,于微波炉内煮沸进行抗原修复,再用 3%过氧化氢清除内源性过氧化物酶。接下来进行抗体孵育,首先将切片组织用 5% BSA 室温封闭 1 h。加入一抗,人类白细胞抗原 HLA-A(用于检测人源血管结构);细胞角蛋白 Cytokeratin(用于检测人源小管结构)4℃冰箱孵育过夜。第 2 天拿出用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。加入抗 HLA-A 和 Cytokeratin 的荧光二抗,室温避光孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,最后用 DAPI 染细胞核,封片后在荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.5 细胞免疫荧光

将细胞铺板于 8 孔 Nunc™ Lab-Tek™ 小室中,铺板密度 80% ~ 90%。用 4%组织细胞固定液或者遇冷的 100% 甲醇室温固定细胞 20 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;加入 0.5% TritonX-100 通透 15 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。5% BSA 室温封闭 1 h,分别加入一抗 Villin(肾近端小管上皮细胞标记

物),CD13(肾近端小管上皮细胞标记物),GATA3(集合管细胞标记物),4℃孵育过夜。第 2 天用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,分别加入荧光二抗,室温避光孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;最后加入 DAPI 染色液复染细胞核,PBS 洗涤后于激光共聚焦镜下观察拍照。

2 结果

2.1 尿液中成功分离培养出肾源细胞

人类肾具有广泛的管状结构,如肾近端小管、远端小管、集合管等结构。研究发现人体每天大约有几千个活细胞从肾的管状系统和尿路下游部分(包括输尿管、膀胱和尿道)随着尿液排出体外。其中包括了肾小管上皮细胞、足细胞、尿路上皮细胞和免疫细胞等^[8]。参照相关研究的培养方案^[9],我们用特定的肾上皮细胞培养基(REGM 培养基)定向培养,成功地培养出了肾源细胞。下图是第 5、7、9、11 天生长状态良好的细胞(图 1A,1B,1C,1D)。另外也成功培养了 HUVECs 和 MSCs(图 1E,1F)。

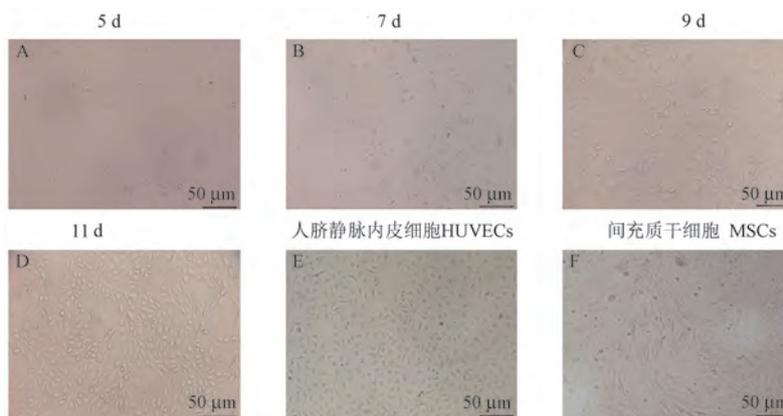
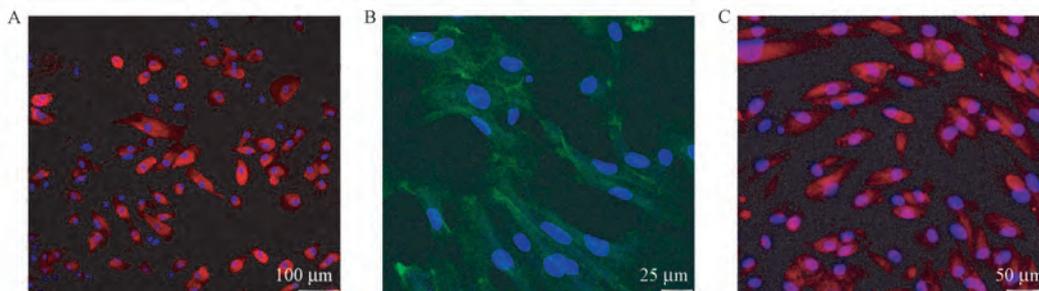


图 1 人体尿液分离的肾源细胞和 HUVECs、MSCs

Figure 1 Kidney-derived cells from human urine and HUVECs, MSCs



注:A:肾近端小管上皮细胞;CD13(红色);B:肾近端小管上皮细胞绒毛蛋白;Villin(绿色);C:集合管;GATA3(红色)。

图 2 肾源细胞免疫荧光鉴定

Note. A. Renal proximal tubular epithelial cells. CD13 (red). B. Renal proximal tubular epithelial cells. Villin (green). C. Collecting tubule. GATA3 (red).

Figure 2 Kidney-derived cells is detected by immunofluorescence

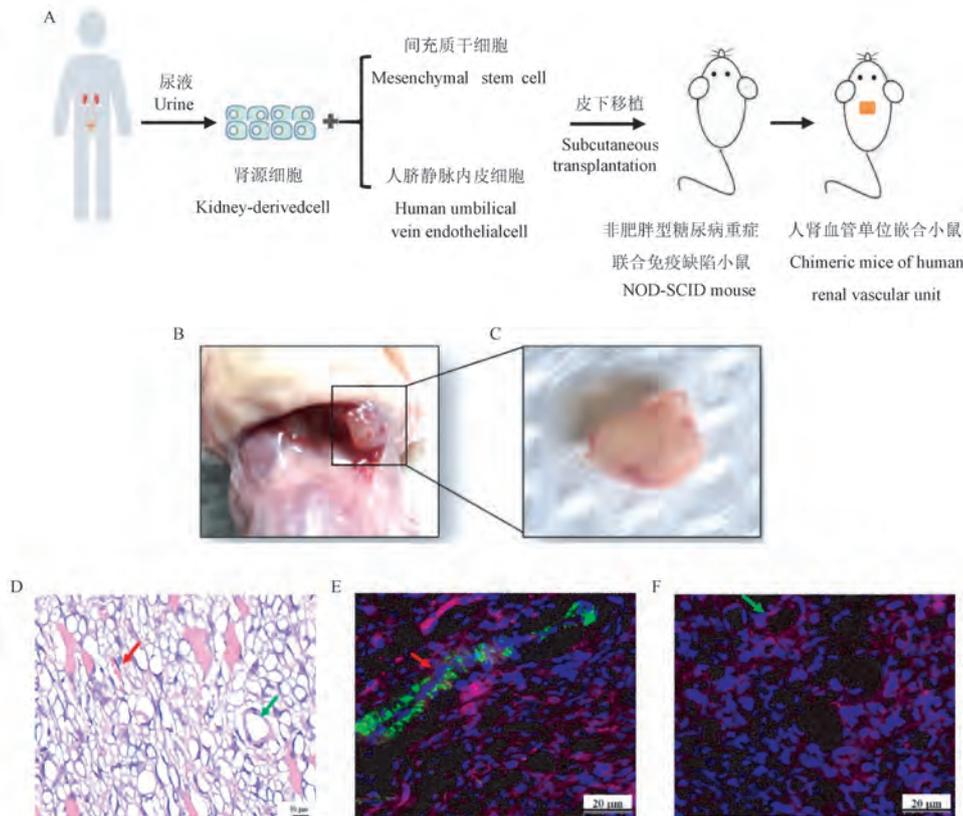
2.2 免疫荧光检测到尿液分离的肾源细胞中存在肾小管上皮细胞和集合管细胞

为了鉴定尿液中分离的肾源细胞组分,通过免疫荧光检测了相关肾小管上皮细胞表面标记物,包括肾近端小管上皮细胞表达的特异性 CD13 (图 2A),绒毛蛋白 Villin (图 2B) 和集合管细胞表达的 GATA3 (图 2C)。结果初步表明,本实验分离获得的肾源细胞中至少包含了肾近端小管上皮细胞和集合管细胞。

2.3 皮下移植肾源细胞、MSCs 和 HUVECs 形成的移植物及人源血管单位和小管结构的检测

按照比例 3 : 3 : 2, 分别取 1.5×10^6 个肾源细胞、 1.5×10^6 个 MSCs 和 1.0×10^6 个 HUVECs, 与 Matrigel 基质胶混合后移植到 NOD-SCID 小鼠皮下, 14 d 后取小鼠皮下移植物 (图 3A)。在取出移植物之前, 尾静脉注射了高分子量的 FITC-dextran (作为

一种体内的示踪剂,可在小鼠体内血管中随着血液循环分布全身,用于检测人源血管是否和小鼠血管相连接)。检测结果如下,肉眼可见小鼠皮下形成了较小的移植块(图 3B 和 3C)。随后分别通过 HE 染色和免疫荧光对该移植物进行了分析检测。首先通过 HE 染色观察到移植物中具有血管结构(图 3D 中红色箭头所示)和小管结构(图 3D 中绿色箭头所示)。为了进一步确定移植物中形成的血管和小管是否是人类来源的,随后对其进行了免疫荧光检测。免疫荧光检测结果显示,移植物中形成的血管能够表达人类白细胞抗原 HLA-A (图 3E); 而且该血管中出现了经尾静脉注射的 FITC-dextran (绿色),说明该血管是人源血管并与小鼠血管相连接。同时免疫荧光也检测到细胞角蛋白 (Cytokeratin) 表达,而该蛋白主要表达于小管管腔上皮细胞中,证明了小管结构的存在(图 3F)。



注:A:皮下嵌合的人肾血管单位小鼠模型构建示意图;B,C:形成于小鼠皮下的移植物;D:移植物的 HE 染色结果;血管结构(红色箭头),小管结构(绿色箭头);E:免疫荧光检测移植物 HLA-A 和 FITC-dextran 结果;人源血管结构(红色箭头);F:免疫荧光检测 Cytokeratin 结果;人源小管结构(绿色箭头)。

图 3 皮下移植物的组织病理形态、免疫荧光检测

Note. A. Schematic diagram of subcutaneous construction of human renal vascular unit mouse model. B, C. The grafts formed in the subcutaneous issue of mice. D. HE staining result of the graft. Vascular structure (red arrow), Tubular structure (green arrow). E. Immunofluorescence detection of HLA-A and FITC-dextran results of the graft. Human-derived vascular structure (red arrow). F. Immunofluorescence detection of Cytokeratin result. Human-derived tubular structure (green arrow).

Figure 3 Histopathological morphology and immunofluorescence detection of subcutaneous grafts

3 讨论

研究发现人体泌尿系统中的一些活细胞会随着尿液排出体外,其中包含有肾小管上皮细胞、足细胞、尿路上皮细胞和肾祖细胞等^[8]。已有研究利用尿液中分离培养的肾源细胞建立体外细胞模型来研究相关肾疾病^[10]。例如尿液来源的足细胞、肾近端小管细胞可体外建立遗传性肾疾病 Alport syndrome、遗传性纤毛病变的细胞模型,用于疾病诊断和机制研究^[11-12]。2019 年, Schutgens 等^[13]用囊性纤维化病人尿液中的细胞建立了肾类器官疾病模型,并预测该类器官为临床药物有效性的评估提供了一定的参考性价值。该研究表明尿液来源的细胞在建立肾病类器官体外模型以及评估药物治疗效果等方面存在巨大潜力。2021 年, Wang 等^[8]单独将尿液来源的肾祖细胞,注射到经过手术损伤的免疫缺陷小鼠原位肾中,可形成肾小管管腔结构,包括有肾近端小管、髓袢以及肾远端小管结构,但未形成人源血管结构,且也未对肾小管结构进行功能检测。另外,由于该模型涉及较为复杂的肾切除的肾损手术,而移植后肾功能恢复的程度还无法精确掌控,因而在可推广性上有一定的限制。也有研究将从肾实质中分离获得的肾小管上皮细胞用于肾人源化小鼠模型的构建,该实验最后也检测到了相关肾小管结构^[14]。但是从肾实质中获取细胞需要复杂的手术操作程序,因此难以针对每个疾病个体构建研究模型并用于个体化精准医学研究,从而限制了其推广。

本研究使用尿液分离的肾源细胞(包含肾小管上皮细胞和集合管细胞等),相比较于从肾实质中分离获得的细胞具有明显的优势。除了临床来源充足、容易获取以外,更能代表个体的特征,反映最接近人体的生理表型,具有很大的潜力用于构建基于 CKD 病人的个体化小鼠模型,为 CKD 个体化精准医疗提供研究工具。在精准医疗领域,当前 PDX 模型是被广泛用于肿瘤新药评价筛选,药物治疗策略的选择以及肿瘤新靶标筛选等方面研究。该模型是直接将患者新鲜的肿瘤组织移植于免疫缺陷小鼠体内构建而成,能够较好的保留原发肿瘤的异质性和遗传特性,具有较好的临床结果预见性^[15]。本研究构建的模型与 PDX 模型较有一定相似性,均采自人体的组织或细胞,均移植到免疫缺陷小鼠而构建的模型。由此方法可构建基于病人的个体化肾疾病(例如遗传性肾病)研究模型,作为疾病药物

筛选和疾病机制研究的工具,因此可能具有较好的应用前景。另一方面,这两种模型也有所不同:本研究从尿液分离的肾源细胞不属于肿瘤细胞,没有肿瘤细胞的恶化及转移等特性;此外其体外培养需要肾细胞生长所需的特殊细胞因子和培养基。

除了肾源细胞之外,本实验所构建模型所具有的优势是加入了血管内皮细胞(HUVECs)和间充质干细胞(MSCs)。诚然,肿瘤瘤块等移植物接种到小鼠体内,也可由周边小鼠血管形成增生和浸入,但这种方式对形成功能单位的组织块并不利。而人源移植物如果能形成自身人源血管,并能与宿主小鼠的体循环相连通,对于移植入的人源细胞体内存活,形成甚至恢复相应的组织结构起到非常重要的作用^[14,16]。HUVECs 具有形成人源血管的能力,可在体内形成人源血管结构^[17]。而 MSCs 兼具了多向分化能力和旁分泌功能^[18],通过多种旁分泌机制促进各种组织再生,血管生成、促细胞增殖、抑制凋亡、抗炎和介导免疫反应等^[19]。此外相关研究也表明将血管内皮细胞和 MSCs 同时移植入免疫缺陷小鼠体内可形成稳定的、有功能的血管网络。MSCs 还可形成血管周围细胞稳定血管^[20]。因此肾源细胞与 HUVECs 及 MSCs 按比例同时移植入免疫缺陷小鼠体内,更加有利于肾源细胞在宿主体内形成与宿主小鼠循环系统相连通的模拟人肾血管单位的组织结构,这也是本文重要的集成创新点之一。当然,本研究构建的皮下嵌合小鼠模型在一定程度上模拟了肾血管单位,其成熟程度和功能还未知。因此,后续我们将进一步开展相关实验以及肾包膜下原位嵌合的研究,进而对原位嵌合物进行结构和功能的鉴定和检测,并深入分析基因表达特征。

慢性肾病(CKD)作为全球性的重大疾病,其发病原因及病程结局复杂,亟需开展个体化精准医疗相关研究;目前关于 CKD 个体化精准医学研究缺乏合适的体内研究(*In vivo*)模型。人源化小鼠模型是开展人类疾病机制、药物筛选研发等相关研究比较理想的模型。本研究构建的人肾血管单位小鼠皮下嵌合模型有可能成为 CKD 机制、药物筛选等个体化精准医疗相关研究工具之一。此外,目前对于 CKD 除了肾透析和肾移植外没有其它有效的治疗方法,而肾移植则面临着移植器官短缺和移植后 BKV 感染问题^[21-22]。BKV 感染是临床上导致肾移植术后排斥反应的一个重要诱因,而其感染尚缺乏特异性的治疗药物;BKV 病毒受体尚不明确,主要

特异性感染人类肾中肾小管上皮细胞,进而扩大感染至肾实质、其它尿路部分和血液循环,从而引发 BKV 相关肾病^[23]。目前 BKV 相关研究多为体外细胞培养以及基于人肾类器官的体外感染研究^[13],尚缺乏合适的动物模型。本研究用肾源细胞(其中包括了肾小管上皮细胞)与 MSCs 和 HUVECs 构建皮下嵌合的肾血管单位人源化小鼠模型,能够形成与宿主小鼠相连接的人肾血管单位以及肾小管结构,在一定程度上模拟了人肾血管单位结构,从而也具有用于 BKV 感染体内研究的潜力。

总之,目前肾人源化小鼠方面的研究尚不多见。本研究提供了一种基于人体尿液中肾源细胞而构建的皮下肾血管单位嵌合小鼠模型,可能在肾疾病的发病机制和药物筛选等精准个体化医学研究以及肾特异的病毒感染研究等临床前研究中具有广阔的应用前景。

参 考 文 献(References)

- [1] Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, et al. Global prevalence of chronic kidney disease—a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158765.
- [2] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 709–733.
- [3] 林涛. 我国活体肾移植的现状与思考 [J]. *中华器官移植杂志*, 2020, 41(10): 577–578.
Lin T. Current status and thinking of living donor kidney transplantation in my country [J]. *Chin J Organ Transplant*, 2020, 41(10): 577–578.
- [4] 江文诗, Gomez MP, Paez G, 等. 数据之美——聚焦全球器官捐献发展趋势 [J]. *中华移植杂志(电子版)*, 2019, 13(1): 28–33.
Jiang WS, Gomez MP, Paez G, et al. The beauty of data-focusing on the development trend of global organ donation [J]. *Chin J Transplant (Electronic Edition)*, 2019, 13(1): 28–33.
- [5] Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, et al. BK polyomavirus; clinical aspects, immune regulation, and emerging therapies [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2017, 30(2): 503–528.
- [6] Walsh NC, Kenney LL, Jangalwe S, et al. Humanized mouse models of clinical disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2017, 12: 187–215.
- [7] Ito R, Takahashi T, Ito M. Humanized mouse models: application to human diseases [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 3723–3728.
- [8] Wang Y, Zhao Y, Zhao Z, et al. Single-cell RNA-Seq analysis identified kidney progenitor cells from human urine [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(4): 305–312.
- [9] Zhou T, Benda C, Dünzinger S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(12): 2080–2089.
- [10] Bondue T, Arcolino FO, Veys KRP, et al. Urine-derived epithelial cells as models for genetic kidney diseases [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1413.
- [11] Iampietro C, Bellucci L, Arcolino FO, et al. Molecular and functional characterization of urine-derived podocytes from patients with Alport syndrome [J]. *J Pathol*, 2020, 252(1): 88–100.
- [12] Molinari E, Sayer JA, Gunay-aygun M. Using human urine-derived renal epithelial cells to model kidney disease in inherited ciliopathies [J]. *Transl Sci Rare Dis*, 2019, 4(1–2): 87–95.
- [13] Schutgens F, Rookmaaker MB, Margaritis T, et al. Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(3): 303–313.
- [14] Pleniceanu O, Harari-steinberg O, Omer D, et al. Successful introduction of human renovascular units into the mammalian kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(12): 2757–2772.
- [15] 李克娟, 黄昊, 高蓓. 人源肿瘤异种移植模型在精准肿瘤医学中的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(1): 91–98.
Li KJ, Huang H, Gao R. Research progress of patient-derived xenografts in precision cancer medicine [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(1): 91–98.
- [16] Long DA, Norman JF, Fine LG. Restoring the renal microvasculature to treat chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2012, 8(4): 244–250.
- [17] Melero-martin JM, Khan ZA, Picard A, et al. *In vivo* vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells [J]. *Blood*, 2007, 109(11): 4761–4768.
- [18] Liu D, Cheng F, Pan S, et al. Stem cells: a potential treatment option for kidney diseases [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 249.
- [19] Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang SY, et al. Engineering robust and functional vascular networks *in vivo* with human adult and cord blood-derived progenitor cells [J]. *Circ Res*, 2008, 103(2): 194–202.
- [20] Kim HK, Lee SG, Lee SW, et al. A Subset of paracrine factors as efficient biomarkers for predicting vascular regenerative efficacy of mesenchymal stromal/stem cells [J]. *Stem Cells*, 2019, 37(1): 77–88.
- [21] 贺雪梅, 储爱琴, 王玉, 等. 肾移植受者术后感染的回顾性研究 [J]. *中国临床保健杂志*, 2021, 24(1): 121–124.
He XM, Chu AQ, Wang Y, et al. A retrospective study of postoperative infection in kidney transplant recipients [J]. *Chin J Clin Healthc*, 2021, 24(1): 121–124.
- [22] 孔祥瑞, 李修彬, 孙玉洁, 等. 肾移植受者 BK 病毒感染情况分析 [J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(48): 3859–3862.
Kong XR, Li XB, Sun YJ, et al. Analysis of BK virus infection in kidney transplant recipients [J]. *Natl Med J Chin*, 2020, 100(48): 3859–3862.
- [23] 许瀚仁, 王继纳, 杨橙, 等. 肾移植术后 BK 病毒感染与人肾小管上皮细胞的相关性研究进展 [J]. *实用器官移植电子杂志*, 2021, 9(2): 169–172.
Xu HR, Wang JN, Yang C, et al. Research progress on the correlation between BK virus infection and human renal tubular epithelial cells after kidney transplantation [J]. *Prac J Organ Transplan(Electronic Version)*, 2021, 9(2): 169–172.

[收稿日期] 2022-01-06

金亮子,吴芳芳,邓伟,等. H1N1 流感病毒树鼯模型生物学特性的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 223-229.
Jin LZ, Wu FF, Deng W, et al. Biological characteristics of a tree shrew model infected with H1N1 influenza virus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 223-229.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.010

H1N1 流感病毒树鼯模型生物学特性的研究

金亮子^{1,2#}, 吴芳芳^{3#}, 邓伟¹, 奎秀莹¹, 罕园园¹, 孙晓梅¹, 仝品芬¹,
李娜¹, 王喜军^{3*}, 代解杰^{1*}

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118; 2. 昆明医科大学, 昆明 650500;
3. 广西壮族药用植物园, 西南濒危药材资源开发国家工程中心, 南宁 530023)

【摘要】 目的 建立 H1N1 流感病毒感染树鼯模型, 探讨流感病毒动力学变化和在呼吸系统组织中的分布特征。方法 选择 3 ~ 3.5 周岁成年树鼯 (*Tupaia Belangeri Chinensis*) 24 只, 雌雄各半, 随机分为空白组 (B 组) 和模型组 (M 组) 各 12 只, 使用 H1N1 流感病毒每只 600 μ L ($1 \times 10^{6.8}$ TCID₅₀/0.1 mL) 经鼻腔感染 M 组树鼯, 在 -3 ~ 10 d 期间每天早晨测量肛温, 同时采集咽拭子、鼻拭子和血液样本测定病毒载量。并测定 2、4、7 d 血液中抗流感的中和抗体。2、3、5、10 d 随机处死 3 只树鼯, 采集鼻甲、气管、咽部和肺组织进行病毒载量检测, 取 3、5、10 d 组织进行病理学检测。结果 M 组的树鼯表现为被毛蓬乱、食欲不振、运动迟缓、体温升高和鼻咽分泌物增加等临床症状; 感染后 1 d 开始可以在呼吸道中检测到病毒载量, 3 d 血液中出现病毒载量; 病理结果显示鼻甲、咽、气管和肺组织中均有一定程度的病理改变。结论 树鼯感染流感病毒后出现的临床症状与人类极为相似, 所建立的流感树鼯模型对研究流感的发病机制与抗流感药物评价提供了有重要价值的工具。

【关键词】 流感; H1N1 A/PR8/34 病毒; 树鼯; 感染; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0223-07

Biological characteristics of a tree shrew model infected with H1N1 influenza virus

JIN Liangzi^{1,2#}, WU Fangfang^{3#}, DENG Wei¹, KUI Xiuying¹, HAN Yuanyuan¹, SUN Xiaomei¹,
TONG Pinfen¹, LI Na¹, WANG Xijun^{3*}, DAI Jiejie^{1*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China. 2. Kunming Medical University, Kunming 650500. 3. National Engineering Laboratory for the Development of Southwestern Endangered Medicinal Materials, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023)
Corresponding author: DAI Jiejie. E-mail: dj@imbcams.com.cn; WANG Xijun. xijunw@sina.com

【基金项目】 云南省科技人才和平台计划项目 (2017HC019), 昆明市科技创新团队 (2019-1-R-24483), 云南省基础研究项目 (202101AT070288), 云南省基础研究项目 (202001AT070145), 广西科技基地和人才专项《民族药药效物质基础研究方法创新人才培养示范基地建设》(桂科 AD18126013), 中央引导地方科技创新基地建设类项目《广西特色药用资源开发科技创新基地建设》(桂科 ZY21195044)。

Funded by Yunnan Province Science and Technology Talents and Platform Plan Project (2017HC019), Kunming Science and Technology Innovation Team (2019-1-R-24483), Yunnan Fundamental Research Projects (202101AT070288), Yunnan Fundamental Research Projects (202001AT070145), Scientific and Technology Development Program of Guangxi (AD18126013), the "Ba Gui Scholars" Program of Guangxi, and the Central Government Guides Local Science and Technology Development Fund Projects (ZY21195044).

【作者简介】 金亮子 (1995—), 女, 硕士, 研究方向: 人类疾病动物模型的建立及疾病机理研究。Email: jlz0518@qq.com;

吴芳芳 (1982—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中药质量标准, 有效性研究及健康产品开发研究。Email: wfftn@163.com。

#共同第一作者

【通信作者】 代解杰 (1961—), 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型的建立与应用。Email: dj@imbcams.com.cn;

王喜军 (1961—), 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究。Email: xijunw@sina.com。

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To establish a tree shrew model of H1N1 influenza virus infection and to explore the dynamics of the influenza virus and its distribution in respiratory tissues. **Methods** Twenty-four 3 to 3.5-years-old adult tree shrews (*Tupaia Belangeri Chinensis*), with equal numbers of males and females, were randomly divided into a blank group (group B) and a model group (group M) of 12 tree shrews each. H1N1 influenza virus 600 $\mu\text{L}/\text{bird}$ ($1 \times 10^{6.8}$ TCID₅₀/0.1 mL) were inoculated into M group tree shrews through the nasal cavity; the rectal temperature was measured every morning from 3 d before until 10 d after inoculation, and throat swabs, nasal swabs, and blood samples were collected to determine the viral load. Blood levels of neutralizing antibodies against influenza were determined on days 2, 4, and 7. Three tree shrews were randomly sacrificed on days 2, 3, 5, and 10, turbinate, trachea, pharynx, and lung tissues were collected for viral load detection, 3, 5, and 10 days of tissue were taken for histopathology. **Results** Tree shrews in group M showed clinical symptoms such as a disheveled coat, loss of appetite, slow movement, increased body temperature, and increased nasopharyngeal secretion, and their blood viral load appeared. There were some pathological changes to the turbinate, pharynx, trachea, and lung tissue of group M. **Conclusions** The clinical symptoms of tree shrews infected with influenza virus were very similar to those of humans. The established influenza virus tree shrew model provides a valuable tool for studying the pathogenesis of influenza and evaluating anti-influenza drugs.

【Keywords】 influenza; H1N1 A/PR8/34 virus; tree shrew; infection; animal model

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

流行性感冒简称流感,是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病。流感病毒是一种正黏病毒科负链 RNA 病毒,包含 8 个具有负极性的单链 RNA 分子。该科的 5 个属包括甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、索戈托病毒和伊萨病毒(传染性鲑鱼贫血病毒)^[1]。甲型流感病毒感染最为常见和严重,它在短时间内迅速传播并影响大地理区域的人口,在 1918 年至 1919 年的流感大流行期间,估计有三分之一的世界人口、受到感染并患有临床症状明显的疾病^[2]。

流感病毒不断变异,流感大流行随时可能爆发,合适的动物模型可以研究流感感染特性及传播特性,为流感的防控、药物筛选及疫苗的研究提供工作基础。动物模型用于模拟复杂的生物现象和人类疾病特征,多年来,动物模型已成功用于疾病机理、药物发现、靶点验证和临床前试验^[3]。流感动物模型提高了我们对疾病发生发展机理和病理生理学的理解,是阐明流感发病机制的关键^[4]。小鼠和雪貂常用于流感病毒研究,但也有一定的局限性^[5]。小鼠体型较小,不易观察到疾病的表现,许多流感毒株需要提前适应才能成功感染小鼠^[6]。雪貂模型由于价格高、大小不均、抗体反应性差^[7],有必要寻求新的流感动物模型,开展疾病的发生机制研究具有重要的科学意义。树鼯与灵长类动物的亲缘关系比与啮齿类动物的亲缘关系更近,具有体型小、易于繁殖、成本低等优点,成为研究人类疾病的理想对象^[8]。从传染病的角度来看,树鼯容易感染人类病原体,并表现出类似于人类感染的临床

症状^[9]。因此,本研究通过流感病毒感染树鼯,探讨流感病毒在不同组织中的病毒动力学及其在各组织中的分布规律,为其疾病的发病机制和药物研发提供一种有科学价值新的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

H1N1 流感病毒血清抗体阴性、3 ~ 3.5 岁普通级树鼯(中缅树鼯滇西亚种)24 只,雌雄各半,体重 105 ~ 150 g。来源于中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心【SCXK(滇)K2018-0002】,饲养于中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心负压独立通风树鼯笼具(IVC)中【SYXK(滇)K2018-0002】,饲养环境温度控制在 20 ~ 25℃,湿度控制在 40% ~ 70%,人工光照每天 12 h,换气次数每小时大于 15 次。所有操作均符合中国医学科学院医学生物学研究所伦理要求(编号:DWSP202004001)。

1.1.2 细胞

犬肾上皮细胞(MDCK 细胞)购于北纳生物。

1.1.3 病毒及感染途径

H1N1 A/Puerto Rico/8/1934(A/PR/8)流感病毒株由中国医学科学院医学生物学研究所刘龙丁教授惠赠。经普通级鸡胚增殖后收集病毒尿囊液,病毒滴度为 $1 \times 10^{6.8}$ TCID₅₀/0.1 mL, -80℃冰箱储存备用,实验均在中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心 BSL-2(生物安全 II 级)实验室

中进行。

保定树鼩待稳定 5 min 后,用每只 600 μL ($1 \times 10^{6.8}$ TCID₅₀/0.1 mL) 病毒液通过滴鼻的方式感染树鼩。

1.1.4 主要试剂与仪器

PBS (Hyclone, 美国), 病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, 德国), One Step Prime Script TM RT-PCR Kit (TaKaRa, 日本), 4% 多聚甲醛固定液 (美伦生物, 中国), 普通级 1% 鸡红细胞, 血凝板 (Nunc, 丹麦), 台式高速离心机 (Hitachi, CT15RE, 日本), 实时定量荧光 PCR 仪 (BIO-RAD, CFX-96, 美国), 生物安全柜 (Forma, A/B3, 美国), 切片机 (徕卡, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

树鼩随机分为空白组 (B 组) 和模型组 (M 组), 每组 12 只, 感染后观察 10 d。M 组用 H1N1 A/PR/8/34 滴鼻方式感染树鼩, B 组用 PBS 滴鼻处理树鼩。

1.2.2 体温的测定

每天上午 8:30 保定树鼩后保持 5 ~ 10 min, 待动物稳定后测定肛温。

1.2.3 病毒载量的测定

每天采树鼩的鼻拭子、咽拭子, 用尾静脉采血法采集外周血样 0.3 mL, 使用实时定量荧光 PCR (RT-PCR) 绝对定量测定法研究了甲型 H1N1 A/PR/8/34 流感病毒在感染后 1 ~ 10 d 的病毒载量的变化情况^[10], 引物及探针序列见表 1。

表 1 H1N1 A/PR/8/34 引物序列

Table 1 H1N1 A/PR/8/34 primer sequence

引物及探针 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
上游 Forward	5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA-3'
下游 Reverse	5'-GGTGACAGGATTGCTCTGTCTTTA-3'
探针 Probe	5'-FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-TAMR-3'

1.2.4 特异性抗体检测

分别测定感染后 2、4、7 和 10 d 血清样品。首先标记 96 孔微量滴定板, 然后用高碘酸钾 (KIO_4) 处理血清以去除非特异性凝集原。每孔加入 25 μL 生理盐水, 第 1 个空孔加入 25 μL 处理过的血清样品, 稀释至最后一孔, 丢弃最后一孔的最后 25 μL 。每孔 (1:1) 加入等体积 (25 μL) 含有 4 个血凝单位病毒的生理盐水, 最后加入 1% 鸡红细胞悬液 50

μL 。小心地敲击滴定板的 4 个侧面进行混合。在室温下放置 30 min 后读取抗体滴度^[11]。

1.2.5 病理学检测

腹腔注射 0.4 mL (3% 戊巴比妥钠) 安乐死树鼩, 采集鼻甲、咽、气管和肺组织, 4% 多聚甲醛固定液固定, 石蜡包埋切片, HE 染色镜下观察拍照。

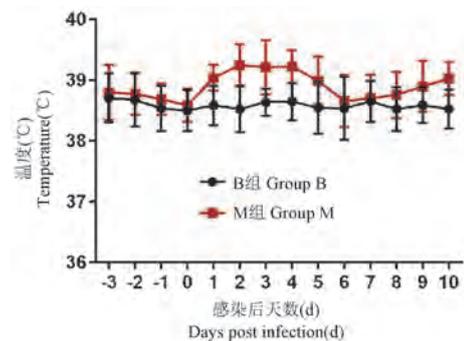
1.3 统计学分析

数据表示为平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。两组间的数据采用独立样本 *t* 检验, 组间比较采用方差分析, 组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。 GraphPad Prism 7.0 用于绘图和数据分析。

2 结果

2.1 树鼩的体征及温度变化

所有树鼩 0 d 的临床体征均正常, 感染后 1 ~ 7 d, M 组树鼩出现活动迟缓、被毛蓬乱、食欲减退和鼻咽分泌物增加等的临床体征, 并在 9 d 逐渐消失。M 组树鼩在接种流感病毒株后体温有所升高, 2 d 到达最高为 39.2 $^{\circ}\text{C}$ 。与 B 组相比, M 组温度显著性升高 ($P < 0.05$), 差异具有统计学意义 (见图 1)。



注: 与 B 组相比, $*P < 0.05$ 。

图 1 H1N1 病毒感染树鼩后的体温变化

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

Figure 1 Body temperature of tree shrews infected with H1N1 virus

2.2 树鼩体内的流感病毒复制

感染后 1 ~ 10 d 收集树鼩咽拭子、鼻拭子和血液样品。鼻拭子中的病毒载量在 1 ~ 2 d 达到峰值后开始下降, 10 d 略有增加。咽拭子和鼻拭子的病毒载量趋势大致相同。血液中的病毒载量在 3 d 开始出现, 5 d 到达最高, 且可持续至 10 d (见图 2)。

感染后 2 d 鼻甲、咽部、气管和肺部组织可检测到病毒载量 (约 $1 \times 10^{2-3}$ copies/mL), 一直持续到 10, 5 d 有明显的峰值, 以肺组织病毒载量表达最高 (见图 3)。

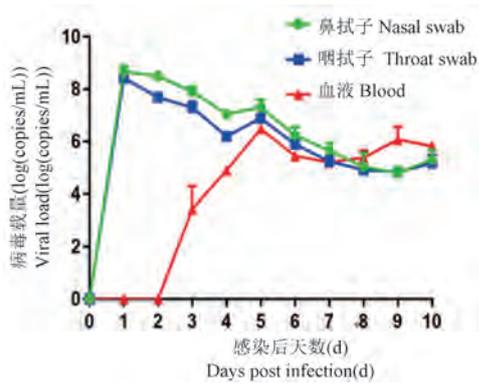


图 2 H1N1 感染树鼩后鼻拭子、咽拭子和血清中的病毒载量变化情况

Figure 2 Changes on viral load in nasal swabs, pharyngeal swabs and serum of tree shrews infected with H1N1 virus

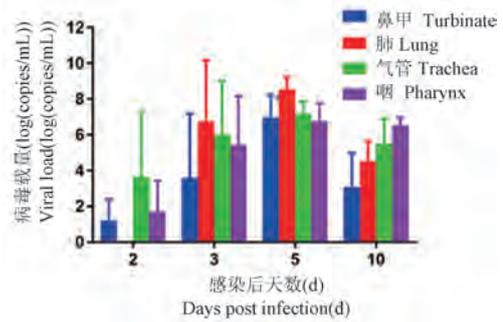


图 3 H1N1 病毒感染树鼩后不同时间鼻甲、咽、气管和肺组织的病毒载量变化

Figure 3 Changes of viral load in turbinate, pharynx, trachea and lung tissues during different time after infection with H1N1 virus infection in tree shrews

2.3 血清病毒载量及特异性抗体

感染后 3 d 血液中可检测病毒到载量,在 5 d 达到峰值。感染后 2 d 开始产生血清抗体,并一直呈上升趋势,表明病毒感染树鼩后在体内可复制,呈持续性感染状态后不断产生血清抗体(见图 4)。

2.4 树鼩组织的病理变化

在感染后 3,5 和 10 d 取鼻甲、咽、气管和肺组织进行病理检查(见图 5)。病理结果显示,B 组树鼩的鼻甲、咽、气管和肺组织未见明显病理改变(图 5a,5b,5c,5d)。M 组树鼩的鼻甲 3 d 有一定程度的

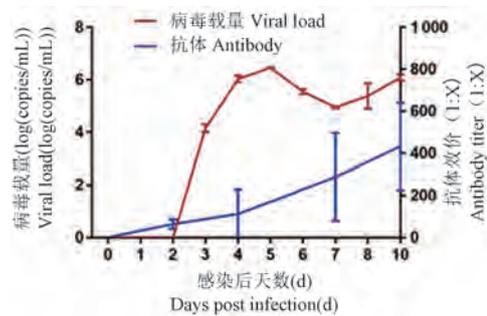


图 4 血液中病毒载量及抗体水平

Figure 4 Viral load and antibody levels in blood

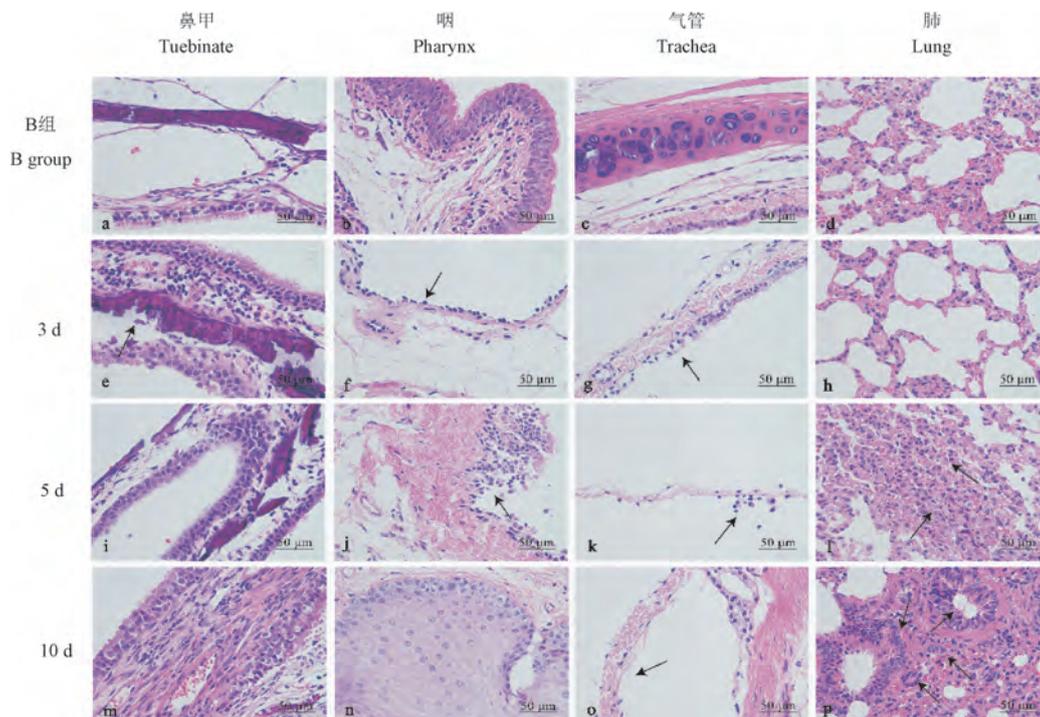


图 5 H1N1 感染树鼩后不同时间点鼻甲、咽、气管和肺组织的病理变化

Figure 5 Pathological changes of turbinate, pharynx, trachea and lung tissues of tree shrews infected with H1N1 during different time

损伤(图 5e), 5 d 和 10 d 没有明显的病理改变(图 5i, 5m)。3, 5 d 咽组织上皮细胞坏死、脱落(图 5f, 5j), 10 d 未见明显病理改变(图 5n)。感染后 3、5、10 d 气管组织均出现上皮细胞坏死和脱落(图 5g, 5k, 5o), 随着感染天数的增加, 损伤逐渐加重。3 d 肺组织无明显病理变化(图 5h), 5 d 肺泡壁出现小面积增厚(图 5l), 伴有少量的炎性细胞浸润, 10 d 肺泡壁大面积增厚(图 5p), 伴有少量的炎性细胞浸润。

组织病理结果提示, 流感病毒经上呼吸道感染先损害鼻甲和咽, 并逐渐蔓延至气管和肺, 最后导致肺部感染, 引起肺组织的病理实质性改变。

3 讨论

抗流感病毒药物和疫苗的研发都需要合适的动物模型。理想的流感动植物模型, 需要比较全面的模拟流感疾病的临床表现及病理变化^[12]。目前常用于建立流感模型动物有雪貂、小鼠和非人灵长类等。雪貂和人类在肺生理学、细胞受体分布和感染临床症状方面有相似之处^[13], 并且易感, 主要用于传播力方面的研究及致病机制研究, 但个体差异较大, 价格较贵, 商品化试剂少。小鼠成本较低, 但小鼠个体较小, 不易观察到疾病的表现, 并且许多流感毒株需要提前经过适应之后, 才能成功感染小鼠。恒河猴、食蟹猴等其他非人灵长类动物不易操作, 价格昂贵, 存在一定的伦理方面的制约^[14]。本研究选择树鼩来建立流感动植物模型, 在动物出现流感样的临床症状、血清病毒复制及抗体和病理变化上进行有益的探索。树鼩是一种小型的非灵长类哺乳动物, 树鼩与人类在生理学、分类学、基因组学及免疫学等生理生化特性方面的相似性高于常用的雪貂、小鼠等实验动物。我们的研究表明, H1N1 A/PR8/34 流感病毒在树鼩呼吸道能够有效复制, 在下呼吸道表现出典型的流感症状和病理变化, 如急性支气管炎和肺炎^[15]。

人流感的临床症状主要以流涕、咳嗽、肌肉酸痛等为主要表现^[16]。本研究中发现流感病毒感染树鼩后, 树鼩表现主要以鼻腔分泌物增加、流涕为主, 也存在被毛蓬乱及精神萎靡; 恒河猴及食蟹猴等非人灵长类动物模型临床表现为流涕, 打喷嚏, 还有呼吸困难等症状^[17]; 小鼠模型表现反应迟钝, 竖毛, 弓背, 食欲减退甚至出现死亡; 雪貂模型出现

厌食、体重减轻、昏睡等症状^[18]。相比而言, 树鼩模型表现的临床症状与非人灵长类动物甚至人的表现和程度更为相似。

病毒载量及抗体可以反映病毒复制与自我防御机制之间的相互作用^[19], 高峰通常出现在出现症状时^[20]。树鼩感染流感病毒后, 鼻、咽拭子在 1 d 和 2 d 达到高峰, 可以达到 1×10^8 copise/mL, 这与人类感染流感病毒后出现的病毒载量高峰相似^[21], 与恒河猴感染流感病毒的趋势相似但有些许不同。恒河猴感染流感病毒后, 在 1 d 和 2 d 达到高峰, 5 d 和 6 d 再次上升^[22]。小鼠感染流感病毒后肺部可能出现肺炎症状^[23], 病毒载量也可以检测到, 但未发现与人类相似的峰值^[24], 并且小鼠的临床症状与人类不相似, 更容易死亡^[25], 这是由于小鼠呼吸道中的受体分布及蛋白质的相互作用与人类不同所导致的^[26]。这从另一个方面反映出树鼩作为流感动植物模型比大鼠和小鼠更接近灵长类动物。根据临床的回顾性研究, 病毒载量可以在人呼吸道中长期存在^[27], 这和我们的结果相一致, 在 10 d 依然可以鼻甲、咽、气管及肺中检测到流感的病毒载量。H1N1 流感病毒的主要感染为气管支气管炎, 大量病毒附着于气管和支气管^[28]。因此, 我们还检测了鼻甲、气管、咽和肺组织中的病毒载量。发现 2 d 即可在鼻甲、气管、咽组织中测出病毒载量, 5 d 达到峰值, 最高可达到 1×10^9 copise/mL, 各组织病毒载量趋势一致。说明病毒在次日开始复制, 并逐渐扩散至下呼吸道。流感病毒通过直接病毒感染或免疫系统反应造成的损害影响呼吸道^[29]。肺组织病毒载量在 5 d 达到高峰, 同时出现病理损伤。表明流感病毒随着时间的推移逐渐从上呼吸道传播到下呼吸道, 感染组织器官。之后, 病毒载量缓慢下降, 因为流感病毒可以感染肺内皮细胞并造成损伤, 但提示不能在肺内皮细胞中进一步复制^[30]。而小鼠肺的病毒载量高峰则在 3 d^[31]。10 d 各组织中病毒载量仍可以检测到, 有动物实验表明, 肺中的病毒载量一般要 25 d 才能完全清除^[32]。

从病理结果可以看出, 树鼩感染流感病毒 3 d 后, 首先在鼻甲中进行复制并产生损伤, 然后是咽部, 随着时间的推移, 病毒逐渐扩散并在肺组织中复制, 气管损伤持续存在, 肺泡出现弥漫性的增厚, 说明存在炎性病变, 这与感染病人的尸检报告一致, 人感染后可出现气管和支气管炎^[33], 支气管壁

的上皮细胞出现细胞脱落和坏死,肺出现了弥漫性间质性肺炎^[34]。树鼯感染流感病毒表现的症状和人类似的症状是由于受体分布和人类似^[5],可能更能模拟人感染流感病毒的病理变化情况。

在之前的报道中,流感病毒可以在没有适应的情况下感染树鼯^[5],这说明有新的流感病毒流行的时候,树鼯可以作为一种快速替代模型。这项研究的结果表明,甲型流感可以感染树鼯并引起肺炎。树鼯的症状与人类高度相似,有体温升高、流涕等临床症状^[35]。在鼻咽拭子中,可以连续检测血液和组织中的病毒载量,并诱导血清中特异性抗体的形成。树鼯能较好地模拟流感病毒感染后的病毒复制和病理变化,是很好的流感动物模型。树鼯的优势是存在与人类相似的唾液酸受体,基因组与人类相似。流感病毒无需适应即可感染树鼯。饲养方便、体型小、价格低也是树鼯的优点。本研究建立的树鼯感染模型在临床表现、病毒复制和病理变化等方面均能满足 H1N1 流感病毒疾病模型的建模要求,此模型可以对开展甲型流感病毒的作用机制、药物评价及疫苗学研究有较好的参考意义。

参 考 文 献(References)

- [1] Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 7(6): 440-451.
- [2] Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(1): 15-22.
- [3] Rosner M, Reithofer M, Fink D, et al. Human embryo models and drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 637.
- [4] Liang GB, He ZH. Animal models of emphysema [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132(20): 2465-2475.
- [5] Yang ZF, Zhao J, Zhu YT, et al. The tree shrew provides a useful alternative model for the study of influenza H1N1 virus [J]. *Virol J*, 2013, 10: 111-120.
- [6] Zhu Z, Yang Y, Feng Y, et al. Infection of inbred BALB/c and C57BL/6 and outbred institute of cancer research mice with the emerging H7N9 avian influenza virus [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2013, 2(8): 1-7.
- [7] Maher JA, DeStefano J. The ferret: an animal model to study influenza virus [J]. *Lab Anim (NY)*, 2004, 33(9): 50-53.
- [8] Jiang LM, Lu CX, Sun QM. Tree shrew as a new animal model for the study of dengue virus [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 621164.
- [9] Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Tupaia belangeri as an experimental animal model for viral infection [J]. *Exp Anim*, 2014, 63(4): 367-374.
- [10] Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1559-1582.
- [11] Kaufmann L, Syedbasha M, Vogt D, et al. An Optimized Hemagglutination Inhibition (HI) assay to quantify influenza-specific antibody titers [J]. *J Vis Exp*, 2017, 130: 55833. 1-10.
- [12] 朱华, 许黎黎, 鲍琳琳, 等. H7N9 禽流感病毒小鼠感染动物模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(1): 18-21. Zhu H, Xu LL, Bao LL, et al. Establishment of an animal model of H7N9 avian influenza virus infection in mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2014, 22(1): 18-21.
- [13] Belser JA, Barclay W, Barr I, et al. Ferrets as models for influenza virus transmission studies and pandemic risk assessments [J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(6): 965-971.
- [14] O'donnell CD, Subbarao K. The contribution of animal models to the understanding of the host range and virulence of influenza A viruses [J]. *Microbes Infect*, 2011, 13(5): 502-515.
- [15] Johnston SL. Anti-influenza therapies [J]. *Virus Res*, 2002, 82(1-2): 147-152.
- [16] 周望展, 何卫, 胡云双. 甲型流感和乙型流感患者的临床症状、白细胞计数、C-反应蛋白的差异分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2021, 31(10): 1215-1218. Zhou WZ, He W, Hu YS. Difference analysis of clinical symptoms, white blood cell count and C-reactive protein between influenza A and influenza B patients [J]. *Chin J Health Lab Tec*, 2021, 31(10): 1215-1218.
- [17] Moncla LH, Ross TM, Dinis JM, et al. A novel nonhuman primate model for influenza transmission [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78750.
- [18] Belser JA, Eckert AM, Tumpey TM, et al. Complexities in ferret influenza virus pathogenesis and transmission models [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3): 733-744.
- [19] Li IW, Hung IF, To KK, et al. The natural viral load profile of patients with pandemic 2009 influenza A(H1N1) and the effect of oseltamivir treatment [J]. *Chest*, 2010, 137(4): 759-768.
- [20] To KK, Chan KH, Li IW, et al. Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus [J]. *J Med Virol*, 2010, 82(1): 1-7.
- [21] Myers MA, Smith AP, Lane LC, et al. Dynamically linking influenza virus infection kinetics, lung injury, inflammation, and disease severity [J]. *Elife*, 2021, 10: e68864.
- [22] Shinya K, Gao Y, Cilloniz C, et al. Integrated clinical, pathologic, virologic, and transcriptomic analysis of H5N1 influenza virus-induced viral pneumonia in the rhesus macaque [J]. *J Virol*, 2012, 86(11): 6055-6066.
- [23] Bao LL, Xu LL, Zhu H, et al. Transmission of H7N9 influenza virus in mice by different infective routes [J]. *Virol J*, 2014, 11: 185.
- [24] Zhang SP, Hu B, Xu JF, et al. Influenza A virus infection induces liver injury in mice [J]. *Microb Pathog*, 2019,

- 137: 103736.
- [25] Margine I, Krammer F. Animal models for influenza viruses: implications for universal vaccine development [J]. *Pathogens*, 2014, 3(4): 845-874.
- [26] Kamal RP, Katz JM, York IA. Molecular determinants of influenza virus pathogenesis in mice [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014, 385: 243-274.
- [27] Rodrigues Guimarães Alves V, Perosa AH, de Souza Luna LK, et al. Influenza A(H1N1)pdm09 infection and viral load analysis in patients with different clinical presentations [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2020, 115: e200009.
- [28] van Riel D, Munster VJ, de Wit E, et al. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(4): 1215-1223.
- [29] Kalil AC, Thomas PG. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology [J]. *Crit Care*, 2019, 23(1): 258.
- [30] Han T, Lai Y, Jiang Y, et al. Influenza A virus infects pulmonary microvascular endothelial cells leading to microvascular leakage and release of pro-inflammatory cytokines [J]. *Peer J*, 2021, 9: e11892.
- [31] 刘国星, 黄元铭, 程森, 等. 甲型 H1N1 流感病毒感染对小鼠肺损伤及肠道菌群的影响 [J]. *疾病监测*, 2021, 36(7): 689-695.
- Liu GX, Huang YM, Cheng M, et al. Effects of influenza A (H1N1) virus infection on lung injury and intestinal flora in mice [J]. *Dis Sur*, 2021, 36(7): 689-695.
- [32] Alsuwaidi AR, George JA, Almarzooqi S, et al. Sirolimus alters lung pathology and viral load following influenza A virus infection [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 136.
- [33] Kuiken T, Taubenberger JK. Pathology of human influenza revisited [J]. *Vaccine*, 2008, 4: 59-66.
- [34] 齐晶, 吕福东, 段雪晶, 等. 新甲型 H1N1 流感重症死亡病例呼吸道及外周免疫器官病理形态学及免疫细胞的变化 [J]. *首都医科大学学报*, 2015, 36(5): 761-767.
- Qi J, Lyu FD, Duan XJ, et al. Pathological morphology change of respiratory and peripheral immune organ and the change of immune cells [J]. *J Capit Med Univ*, 2015, 36(5): 761-767.
- [35] Gaitonde DY, Moore FC, Morgan MK. Influenza: diagnosis and treatment [J]. *Am Fam Physician*, 2019, 100(12): 751-758.

[收稿日期] 2022-02-10

朱孟敏,刘玲玲,牛博文,等. 人血管紧张素转化酶 2 (ACE2) BAC 转基因小鼠模型的制备及鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 230-238.

Zhu MM, Liu LL, Niu BW, et al. Preparation and identification of human angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) BAC transgenic mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 230-238.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.011

人血管紧张素转化酶 2 (ACE2) BAC 转基因小鼠模型的制备及鉴定

朱孟敏^{1,2#}, 刘玲玲^{1,2#}, 牛博文^{1,2}, 彭秀华^{1,2}, 陈丽香^{1,2}, 秦波音^{1,2}, 杨华^{1,2}, 李峰^{1,2*}

(1. 上海市公共卫生临床中心, 上海 201508; 2. 上海市新发再现传染病研究所, 上海 201508)

【摘要】 目的 期望获得含有全长 hACE2 基因序列的 hACE2 人源化小鼠模型, 为心血管疾病、新冠肺炎发病机制研究、药物与疫苗研发提供重要工具。方法 将纯化含有 hACE2 完整编码序列的 BAC 质粒, 利用小鼠受精卵显微注射和输卵管移植技术获得多个首建鼠, 分别育种建系, 通过杂交育种获得稳定遗传 F2 代小鼠品系, 进一步对 F2 代小鼠 hACE2 基因整合、基因拷贝数、相对荧光定量 PCR、Western Blot 和免疫荧光进行分析。结果 育种获得 hACE2-6-9、hACE2-14-3、hACE2-15-1 和 hACE2-15-2 共 4 个小鼠品系。基因整合结果显示, hACE2-6-9、hACE2-15-1 和 hACE2-15-2 小鼠品系含有完整的 hACE2 基因座位点及较长的基因调控区, hACE2-14-3 含有完整的 hACE2 基因座位点及 3' UTR 较短的基因调控区。相对荧光定量 PCR 和 Western Blot 检测结果显示, hACE2-6-9、hACE2-15-1 和 hACE2-15-2 品系小鼠肠道中 hACE2 mRNA 和蛋白表达水平较低, 而整合较短调控序列的 hACE2-14-3 小鼠品系则表达水平较高。免疫荧光染色结果显示 hACE2-15-1 品系小鼠肾小管和肺血管内皮细胞中均有 hACE2 表达。结论 获得了含有全长基因序列的 hACE2 人源化 BAC 转基因小鼠, 保留完整的 hACE2 启动子及基因调控区, 从而为心血管疾病、新冠肺炎发病机制研究、hACE2 基因表达调控机制研究和药物、疫苗的研发提供重要工具。

【关键词】 ACE2; 人源化小鼠; 细菌人工染色体; 基因表达

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0230-09

Preparation and identification of human angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) BAC transgenic mouse model

ZHU Mengmin^{1,2#}, LIU Lingling^{1,2#}, NIU Bowen^{1,2}, PENG Xiuhua^{1,2}, CHEN Lixiang^{1,2}, QIN Boyin^{1,2}, YANG Hua^{1,2}, LI Feng^{1,2*}

(1. Animal Model Department, Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China. 2. Shanghai Institute of Emerging and Reproducing Infectious Diseases, Shanghai 201508)

Corresponding author: LI Feng. E-mail: lifeng30286@shphc.org.cn

【Abstract】 Objective To obtain a novel coronavirus pneumonia transgenic mouse model with constitutive human angiotensin converting enzyme 2 (hACE2) gene expression, that can efficiently maintain human physiological levels of a

[基金项目] 国家十三五传染病重大专项 (2017ZX10304402-001-006, 2017ZX10304402-001-012), 上海科委平台提升项目 (21DZ2291300), 上海市公共卫生临床中心院内项目 (KY-GW-2018-11, KY-GW-2019-11, KY-GW-2021-39)。

Funded by Major Special Projects of Infectious Diseases in the 13th Five Year Plan (2017ZX10304402-001-006, 2017ZX10304402-001-012), Platform Upgrading Project of Shanghai Science and Technology Commission (21DZ2291300), Hospital Project of Shanghai Public Health Clinical Center (KY-GW-2018-11, KY-GW-2019-11, KY-GW-2021-39)。

[作者简介] 朱孟敏 (1988—), 男, 硕士。Email: 18101912037@163.com;

刘玲玲 (1993—), 女, 硕士。Email: liu_lingling600@163.com。

#共同第一作者

[通信作者] 李峰 (1972—), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向: 基因修饰动物模型研究。Email: lifeng30286@shphc.org.cn

bacterial artificial chromosome (BAC) hACE2 gene. This model could provide an important tool for research into cardiovascular disease, the pathogenesis of novel coronavirus pneumonia, and the development of drugs and vaccines. **Methods** A BAC plasmid containing the complete coding sequence of human ACE2 (*hACE2*) was purified and transgenic mice were established by fertilized egg microinjection and Fallopian tube transplantation. Stable F2 mouse strains were obtained by cross-breeding and analyzed in relation to integration of the hACE2 gene, gene copy number, relative fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR), Western Blot, and immunofluorescence. **Results** Four mouse strains (hACE2-6-9, hACE2-14-3, hACE2-15-1 and hACE2-15-2) were obtained. The result of gene integration showed that the hACE2-6-9, hACE2-15-1 and hACE2-15-2 strains contained the complete hACE2 gene locus and long gene regulatory region, while hACE2-14-3 contained the complete hACE2 gene locus and a short gene regulatory 3' untranslated region. Relative fluorescence quantitative PCR and western blot showed that hACE2 mRNA and protein levels in the intestine were lower in the hACE2-6-9, hACE2-15-1 and hACE2-15-2 strains, while expression levels were higher in the hACE2-14-3 strain with shorter regulatory sequences. Immunofluorescence staining showed that hACE2 was expressed in renal tubular epithelial cells and pulmonary vascular endothelial cells in hACE2-15-1 mice. **Conclusions** We obtained novel coronavirus pneumonia hACE2 transgenic mice with the full-length gene sequence and the complete promoter and gene regulatory regions. This model will provide an important tool for the study of cardiovascular diseases and the pathogenesis of novel coronavirus pneumonia, as well as for examining mechanisms regulating hACE2 gene expression and the development of drugs and vaccines.

【Keywords】 ACE2; humanized mice; bacterial artificial chromosome; gene expression

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

血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 是近年来肆虐全球疫情新冠病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 的功能宿主受体, 由 ACE2 功能基因编码翻译的蛋白质属于二肽基羧基二肽酶血管紧张素转化酶家族^[1]。人血管紧张素转换酶 2 (hACE2) 基因位于人的 X 染色体, 编码 805 个氨基酸残基, 属于 I 型跨膜糖蛋白, 相对分子质量为 120×10^3 。基因编码区较大, 长达 41 572 bp, 目前有关 hACE2 基因的表达调控元件研究如火如荼^[2-4]。通过基因序列同源性比对, 人的血管紧张素转化酶 1 与血管紧张素转化酶 2 有着较大的相似性^[5]。ACE2 在维持体液平衡、血压的稳定、炎症浸润和细胞增殖等方面有着非常重要的作用, 同时 ACE2 在肾、肠道以及生殖泌尿系统特异性表达意味着其在调节上述器官方面也起到不同的作用^[6]。此外, 最为重要的是该基因编码蛋白是 SARS 病毒糖蛋白的功能受体, 该病毒的棘突 Spike 蛋白 (S 蛋白) 可以和人类细胞表面的 ACE2 受体特异性结合, 造成宿主细胞内感染, 从而导致人体内的细胞因子风暴和级联免疫反应^[7]。

近几年, hACE2 人源化小鼠模型已成为研究新冠病毒 SARS-CoV-2 最具可靠的动物模型, 其在新冠疾侵入途径、病变经过、发病机制和特效药物筛选等热门研究领域扮演着不可或缺的工具载体^[8]。目前, hACE2 人源化小鼠模型构建策略主要

有 3 种形式: (1) 通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术将鼠源部分序列或者胞外区全部替代为对应的人源序列结构, 这样的目的是能够将插入的人源序列发挥最大的作用, 并且在不影响小鼠正常生理功能的情况下, 使人 ACE2 的表达能够充分。(2) 在使用人类角蛋白 18 (cytokeratin 18, K18) 启动子作为调控和驱动 hACE2 时, 将安全岛 H11 的位点进行过表达的处理, 该手段的主要目标是用于模拟人类易感新冠病毒的感染研究。(3) 通过全长替换的方式, 将鼠源的 ACE2 全长序列替换为对应的人源 ACE2 序列^[9]。以上 3 种构建策略在目的基因 ACE2 的表达水平上可能有所不同, 而且使用不同物种的启动子也会影响上述目的基因的表达。我们的策略是将人的 ACE2 功能基因、启动子、增强子和相关的调控序列全部引入到小鼠基因组中, 不去除鼠源 ACE2 的相关类似的区域, 观察在后期基因表达和组织蛋白水平的情况, 尤其是研究人源的 ACE2 调控序列在小鼠体内发挥的作用。

本文利用长片段 BAC 质粒随机整合的方法, 将包含有人的 ACE2 功能基因、启动子和相关调控序列引入到小鼠基因组中, 不仅可以研究人的 ACE2 目的功能基因和蛋白在肠道、肾小管和肺血管内皮细胞组织中的表达水平, 而且能够比较不同调控序列的长度是否影响功能基因的蛋白表达水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

体重 15 ~ 18 g 的 4 周龄 C57BL/6J 雌鼠 10 只, 体重 20 ~ 25 g 的 12 周龄 C57BL/6J 雄鼠 10 只, 体重 25 ~ 30 g 的 6 ~ 8 周龄 ICR 雌鼠 30 只及体重 35 ~ 40 g 的 3 月龄 ICR 雄鼠 15 只均为 SPF 级动物, 购自上海吉辉实验动物饲养有限公司【SCXK(沪)2017-0012】。转基因阳性小鼠为上海市公共卫生临床中心实验动物部【SCXK(沪)2020-0002】保种品系。实验用鼠均饲养于上海市公共卫生临床中心实验动物部【SYXK(沪)2020-0019】SPF 动物设施内。饲养室内光照为 12 h 明暗交替, 湿度 40% ~ 60%, 温度 22 ~ 25℃。动物操作要求符合上海市公共卫生临床中心实验动物伦理要求【公卫伦审 2020-D069-01 号】。

1.1.2 主要试剂与仪器

BAC 质粒 (BACPAC 资源中心, RP11-478H11), M16 培养液 (Merk, M7292-100 ML), M2 培养液 (Merk, M7176-100 ML), 透明质酸酶 (Merck, H1136), 孕马血清促性腺激素 (宁波第二激素厂, PMSG) 人绒毛膜促性腺激素 (宁波第二激素厂, HCG), 动物基因组 DNA 小量提取试剂盒 (上海莱枫, DK611-02), EasyPure RNA Kit 试剂盒 (北京全式金, ER201-01), 反转录试剂盒 (上海翊圣, 11123ES60), qPCR 试剂盒 (上海翊圣, 11201ES03/08/60), Anti-ACE2 抗体 (Abcam, ab108209)。

Leica 组织切片仪 (Leica CM1950, 德国), 显微操作系统 (Eppendorf, 德国), 倒置显微镜 (Leica, 德国), 拉针仪 (Sutter, 美国), 体式显微镜 (奥林巴斯, 日本), 高速冷冻离心机 (Thermo, 美国), 台式摇床 (春兰仪器, 中国), PCR 仪 (Eppendorf, 德国), 生化培养箱 (上海一横, 中国), qPCR 仪 (杭州博日, 中国), 电泳仪/电泳槽 (上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 BAC 质粒的纯化

商品化 BAC 质粒 RP11-478H11 (序列号: AC097625.11) 全长 194 492 bp, 包含 hACE2 基因及其调控序列。将上述 BAC 质粒菌种接种到 100 mL 氯霉素抗性 LB 培养液中, 32℃ 过夜振荡培养 16 ~ 20 h。用质粒提取试剂盒抽提 BAC 质粒, 用限制性内切酶切并进行脉冲场凝胶电泳鉴定, 脉冲场凝胶

电泳参数为电压: 6 V/cm、脉冲角度: 120℃、转换时间: 1 ~ 25 s、条带范围: 2 ~ 300 kb、电泳时间: 18 h。将鉴定正确的 BAC 质粒在透析液 (浓度为 0.5 mL 的 1 mol/L Tris-HCl, 10 μL 的 0.5 mmol/L EDTA 和 1 mL 的 5 mol/L NaCl 用无菌水定容到 50 mL) 中过夜透析纯化, 将 BAC 质粒溶液稀释到 1 ~ 3 ng/μL 注射备用。

1.2.2 人源化 BAC 转基因小鼠获得

利用拉针仪制备注射针 (外径: 1.0 mm, 内径: 0.78 mm, 长度: 10 cm) 和固定针 (外径: 1.5 mm, 内径: 1.1 mm, 长度: 10 cm), 固定针口为外径 100 ~ 120 μm, 内径 20 ~ 30 μm 左右, 最后弯针角度 15° 备用。用注射针将稀释的 BAC 质粒注射到胚胎的雄原核内, 看到原核内部膨大为止, 最后转移至 M16 培养液中培养。于第 1 日 16:00, 将 4 周龄 C57BL/6J 雌鼠按每只 5U 腹腔注射 PMSG, 饲养 47 h 后, 按每只 5U 腹腔注射 HCG 并与种公鼠合笼过夜。第 4 天 9:00 输卵管膨大部收集受精卵进行显微注射。用注射针将稀释的 BAC 质粒注射到胚胎的雄原核内, 看到原核内部膨大为止, 最后转移至 M16 培养液中培养。

胚胎移植: 取 0.5 d 假孕 ICR 受体鼠, 麻醉, 剔除背部毛发, 酒精及碘酊消毒, 剪开脊柱背侧皮肤, 剪开脊柱两侧 0.5 cm 处肌肉层, 用钝头镊子夹住脂肪垫拉出附带的卵巢及输卵管, 用脂肪夹固定, 在体视显微镜下找出输卵管壶腹部, 用 1 mL 注射器针头在壶腹部前侧刺一切口, 之后将胚胎经此切口吹入输卵管壶腹部, 分别缝合肌肉层及皮肤, 碘酊消毒。18 d 后观察代孕鼠的妊娠分娩情况, 将出生 7 d 的小鼠打耳洞标记, 并进行 hACE2 外源基因整合情况鉴定。

1.2.3 转基因小鼠外源基因的检测

利用表 1 中的引物来确定转基因小鼠基因的整合情况。反应体系和条件详见说明书, 反应结束后, 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 绝对定量法测定外源基因的拷贝数

使用绝对定量 PCR 法对各品系 F2 代小鼠的的拷贝数进行检测。按照表 1 中的引物进行目的基因的测定, 具体的步骤如下: 以 BAC 质粒为外源基因拷贝数测定的标准样品, 将质粒浓度稀释到 50 ng/μL, 依次 10 倍梯度稀释 5 次, 最终获得 5 组标准样品, 每个浓度梯度标准品进行 3 次重复, 来保证有效数据的可靠性。使用表 1 中的引物对以上的 5 个标

准品 BAC 质粒进行 qRT-PCR 实验。反应体系和条件详见说明书,上述实验每组设置 3 个平行的样本。

获得的 Ct 值通过公式生成的绝对定量标准曲线,从而得到转基因小鼠 ACE2 的拷贝数浓度。

表 1 所需 PCR 引物名称、序列及产物大小

Table 1 Name, sequence and product size of PCR primers required

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	产物大小(bp) Product size(bp)
hACE2-E1	F:TCTGAGAGTTGTGAGTGT R:GCATGGCTTGGAAGTATATC	747
hACE2-E17	F:CCACCGATTATTCCTTGTG R:GCACATTCTACACAGTCTCT	750
hACE2-ident10KB-5' UTR	F:TCCAACCTCAACCTTCCTA R:CCTCTCTCTCCTTACTACTAC	591
hACE2-ident6KB-5' UTR	F:CCAATAAGAACCAGACACAAC R:ACCACCAAGCCACCATTA	977
hACE2-ident30KB-3' UTR	F:GTGTTGCTTGTCCAGTCT R:TTCTCGGTGTGTGTGTTAT	964
hACE2-ident10KB-3' UTR	F:GGTGCCTTACTCAATCCA R:CCTTGTCTGCTCTTCTTCA	743
lncRNA-genomic	F:TGATGCCAGAGATGTAATGT R:GGTTGCTCAGTCCTTGT	504
BMX-genomic	F:GGCACCATCACTTCTACTT R:GGCTTACCTTGTGATTCCA	560
hACE2-3' UTR-5KB	F:GGAATGAGATACCACCTTAATG R:ATAATAGCAACGCCACCAA	811
hACE2-qPCRcopy	F:CCACTGTCATCTTCATCGTA R:ATCCACCTCCACTTCTCTAA	137
BMX-RT/qPCR	F:AATGGCTGCTTGCTGAAT R:GTCTGACTTGCTGCTGTAT	303
PIR-RT/qPCR	F:GATGGTGGAGCCTCAGTA R:GTTGGTGTGCGAGTGTA	132
lncRNA-RT/qPCR	F:AGCACACGAGTATCTGAAG R:TTCTGTTGTCAAGGTCAC	244

1.2.5 相对定量 PCR 法检测 hACE2、BMX、PIR 和 lnc 基因的表达量

收集各品系转基因小鼠的相应组织,进行 RNA 提取和 cDNA 制备,使用 qPCR 试剂盒 Hieff[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix(No Rox)进行荧光定量 PCR。反应体系及仪器操作步骤详见说明书。所获得的 Ct 值与对照组进行比较分析。以上 qRT-PCR 实验中均设置 3 个平行样品,并通过 3 次重复实验获得结果。

1.2.6 Western Blot 检测 hACE2 蛋白表达

将组织剪碎匀浆后,离心取上清,并测定上样蛋白浓度。准备蛋白电泳的试剂物品,按顺序在梳子孔内加入蛋白样品。浓缩胶电压用 90 V,分离胶电压用 120 V,待溴酚蓝快到底部时停止电泳。之后进行转膜,将 PVDF 膜用甲醇透膜,安装转膜装置结构到电泳槽中,电泳仪调至恒流,220 mA,1 h。转膜完成后,取出 PVDF 膜,去除多余的膜,标记好正反面。孵育一抗(1:500,4℃过夜)和二抗(1:5000,室温 1~2 h),TBST 洗膜 3 次,打开化学 ECL 发光系统,用镊子将膜转移至发光用平板上,滴加 ECL 发光液,在化学发光系统中曝光观察,根据条带情况适当调节曝光时间,保存图片。

1.2.7 免疫荧光检测 hACE2 蛋白分布

组织的固定及包埋:新鲜组织取材后立刻置于组织固定液中,4℃固定过夜。固定组织 PBS 冲洗 3 遍后,置于 30%蔗糖溶液中,4℃冰箱中放置,直至组织块完全沉淀于溶液底部。将组织块取出按正

确方向放在包埋盒中,加入 OCT,置于液氮蒸汽中速冻,待 OCT 完全凝固,放入-80℃冰箱保存待用。

切片及免疫荧光染色:对固定的组织块进行连续切片,每张厚度为 10 μm,做好标记,-20℃保存备用。取出切片 40℃烘片 15 min,PBS 中漂洗 3 次,每次 10 min;0.3% TritonX-100 中 1:10 加入 H₂O₂ 溶液避光处理 15 min;PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;1% BSA+1%马血清室温下封闭 2 h;加入一抗 ACE2(1:400),4℃放置 48 h;去除一抗,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;加入连有荧光素的相应的二抗,室温避光孵育 2 h;PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;DAPI 染色 10 min;PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;甘油封片,激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。所有数值以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)的方式显示。用单因素方差分析(ANVOA)进行 *q* 检验。组间比较用方差分析,*P* < 0.05 为差异具有显著性,*P* < 0.01 为差异极具有显著性。

2 结果

2.1 各品系小鼠整合及拷贝数测定

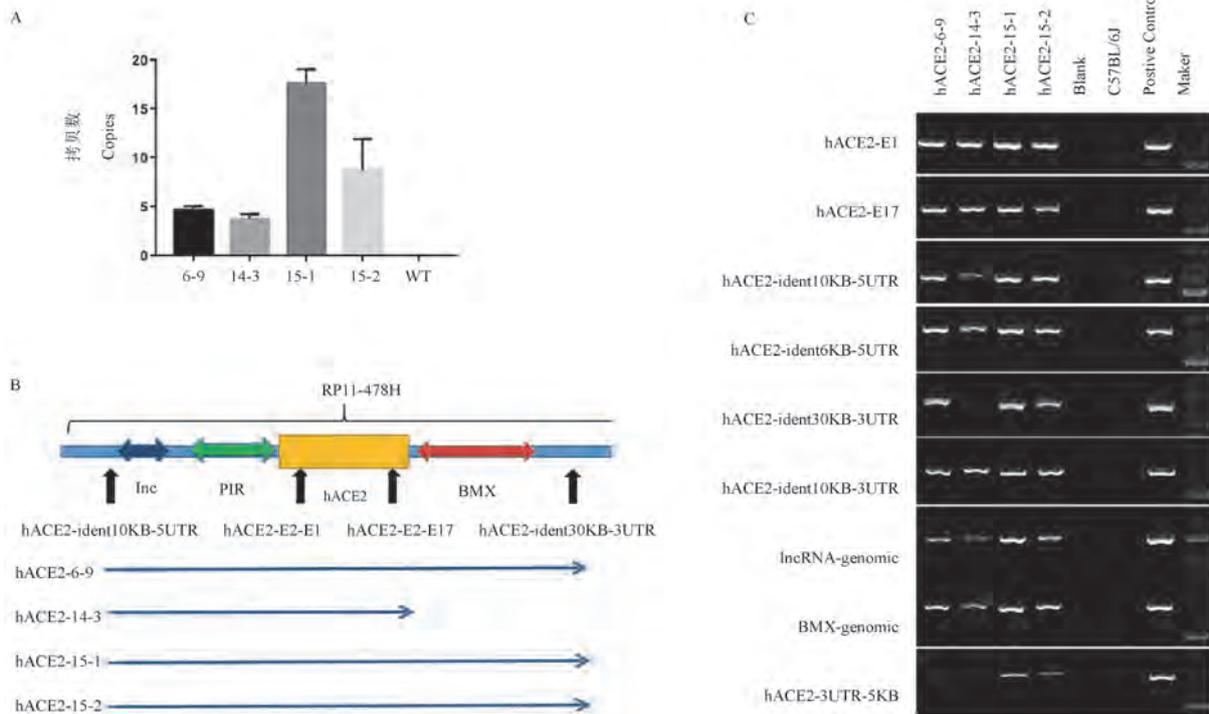
基因拷贝数检测(图 1A)显示,hACE2-15-1 拷贝数最高,而 hACE2-14-3 最低。分别在 5' UTR、3' UTR、编码区设计鉴定引物(图 1B),将获得的 F0 代小鼠基因组进行 PCR 鉴定,共获得 4 只阳性首建鼠,分别与 C57BL/6J 小鼠进行杂交育种获得 4 个

品系,除 hACE2-ident30KB-3UTR 在 hACE2-14-3 品系未能扩增出目的条带,其他引物均能在 4 个 hACE2 转基因小鼠基因组中扩增出单一明亮的条带(图 1C),基因整合情况如图 1B 所示。

2.2 相对荧光定量 PCR 法检测小鼠肠道四段中 hACE2 基因表达水平

相对荧光定量 PCR 结果显示,十二指肠、空肠、

回肠和结肠中,hACE2-14-3 小鼠品系 hACE2 mRNA 表达最高,hACE2-6-9 最低,其余两个品系差异不大(图 2)。hACE2-6-9 和 hACE2-14-3 品系在肠道四段中人的 ACE2 的 mRNA 的相对表达量差异极具显著性($P < 0.01$)。hACE2-14-3 与 hACE2-15-1 在十二指肠和回肠中,mRNA 的相对表达量差异具有显著性($P < 0.05$),空肠和结肠中,在 mRNA 的相对表

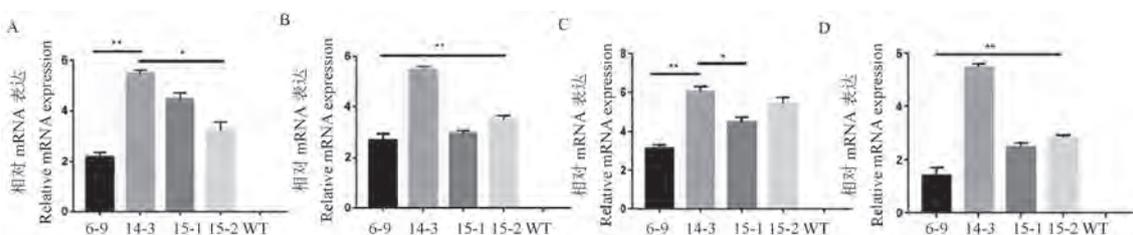


注:A:4个转基因小鼠外源基因 hACE2 的拷贝数柱状图;B:4个转基因小鼠整合片段在 BAC 上的位置;C:4个转基因小鼠基因组鉴定 PCR 图。

图 1 外源基因检测、拷贝数鉴定及在整合片段在 BAC 上的位置

Note. A. Four transgenic mice copy number histogram of foreign gene hACE2. B. PCR map of genome identification of four transgenic mice. C. The position of four transgenic mouse integration fragments on BAC.

Figure 1 Foreign gene detection, copy number identification and position of integrated fragment on BAC



注:A:4个转基因小鼠在十二指肠中 mRNA 的表达;B:4个转基因小鼠在空肠中 mRNA 的表达;C:4个转基因小鼠在回肠中 mRNA 的表达;D:4个转基因小鼠在结肠中 mRNA 的表达;与 hACE2-14-3 相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 2 十二指肠、空肠、回肠和结肠中 hACE2 的 mRNA 相对表达水平

Note. A. mRNA expression in duodenum of four transgenic mice. B. MRNA expression of four transgenic mice in jejunum. C. MRNA expression in ileum of four transgenic mice. D. MRNA expression of four transgenic mice in colon. Compared with hACE2-14-3, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

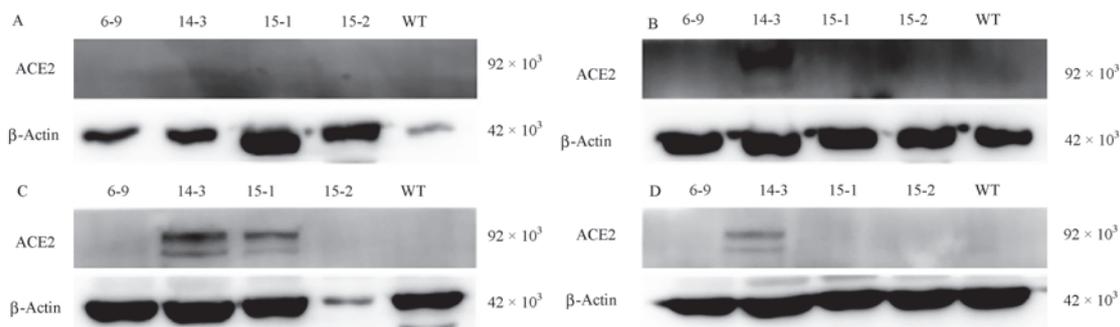
Figure 2 Relative expression levels of hACE2 mRNA in duodenum, jejunum, ileum and colon

达量差异极具显著性 ($P < 0.01$)。hACE-14-3 与 hACE2-15-2 在十二指肠中, mRNA 的相对表达量差异具有显著性 ($P < 0.05$), 而在回肠中, 无显著性差异, 在空肠和结肠中, mRNA 的相对表达量差异极具显著性 ($P < 0.01$)。

2.3 Western Blot 检测小鼠肠道四段 hACE2 蛋白的表达

在转基因 hACE2 小鼠的肠道四段组织中, hACE2-14-3 的 hACE2 蛋白表达水平最高, hACE2-15-1 次之, 其他 2 个小鼠品系未检测相关蛋白的

表达(图 3)。其中, 在十二指肠组织中, hACE2-14-3 有微量的 hACE2 蛋白表达, 其他品系在 小鼠中未检测到相关蛋白的表达(图 3A)。在空肠组织中, hACE2-14-3 的蛋白表达水平最高, 其他品系在 小鼠中未检测到相关蛋白的表达(图 3B)。在回肠组织中, hACE2-14-3 的蛋白表达水平依然最高, hACE2-15-1 次之, 其他品系在 小鼠中未检测到相关蛋白表达(图 3C)。在结肠组织中, hACE2-14-3 的 hACE2 蛋白表达水平最高, 其他品系基本无表达(图 3D)。



注: A: 4 个转基因小鼠在十二指肠中 hACE2 蛋白的表达; B: 4 个转基因小鼠在空肠中 hACE2 蛋白的表达; C: 4 个转基因小鼠在回肠中 hACE2 蛋白的表达; D: 4 个转基因小鼠在结肠中 hACE2 蛋白的表达;

图 3 十二指肠、空肠、回肠和结肠中 hACE2 蛋白的相对表达水平

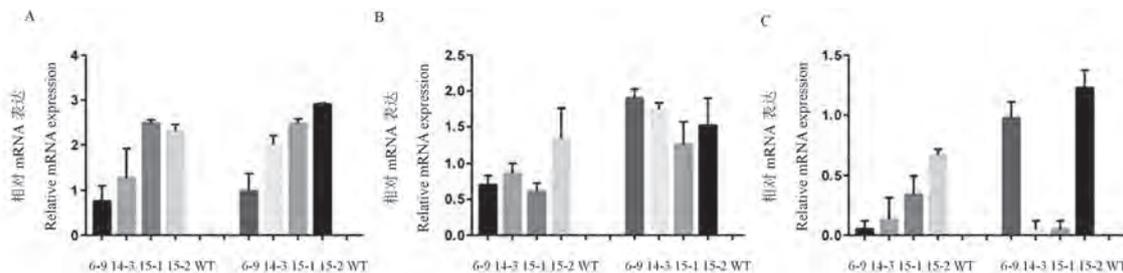
Note. A. Expression of hACE2 protein in duodenum of four transgenic mice. B. Expression of ACE2 protein in jejunum of four transgenic mice. C. Expression of ACE2 protein in ileum of four transgenic mice. D. Expression of ACE2 protein in colon of four transgenic mice.

Figure 3 Relative expression levels of hACE2 protein in duodenum, jejunum, ileum and colon

2.4 相对定量 PCR 法测定小鼠空肠和结肠中 hACE2 基因座其他 3 个基因的表达水平

图 4A 是在 4 个品系小鼠空肠和结肠组织的 BMX 基因 mRNA 的表达水平, 其中 hACE2-15-1 的 BMX 基因在空肠中 mRNA 表达水最高,

hACE2-6-9 表达最低, 结肠组织中, hACE2-15-2 的表达最高, hACE2-6-9 的表达依然最低。图 4B 是在 4 个品系小鼠空肠和结肠组织的 PIR 基因 mRNA 的表达水平, 其中 hACE2-15-2 的 PIR 基因在空肠中 mRNA 表达水最高, 而 hACE2-15-1



注: A: 4 个转基因小鼠在空肠和结肠中 BMX 基因 mRNA 的表达水平; B: 4 个转基因小鼠在空肠和结肠中 PIR 基因 mRNA 的表达水平; C: 4 个转基因小鼠在空肠和结肠中 Inc 基因 mRNA 的表达水平。

图 4 空肠和结肠中 3 种 mRNA 剪切形式基因的表达水平

Note. A. Expression level of BMX gene mRNA in jejunum and colon of four transgenic mice. B. Expression level of PIR gene mRNA in jejunum and colon of four transgenic mice. C. Expression level of Inc gene mRNA in jejunum and colon of four transgenic mice.

Figure 4 Gene expression levels of three mRNA cleavage forms in jejunum and colon

表达最低,在结肠组织中,hACE2-6-9 的表达最高,hACE2-15-1 的表达最低。图 4C 是在 4 个品系小鼠空肠和结肠组织的 Inc 基因 mRNA 的表达水平,其中 hACE2-15-2 的 Inc 基因在空肠中 mRNA 表达水最高,hACE2-6-9 表达最低,在结肠组织中,hACE2-15-2 的表达最高,hACE2-15-1 的表达最低。

2.5 免疫荧光检测肾小管和肺血管内皮细胞中

hACE2 的分布

免疫荧光染色结果显示,以对照组 hACE2-15-1 肾小管未加抗体为参照,可见实验组 hACE2-15-1 肾小管中有较为丰富的 hACE2 的蛋白表达(图 5a,5b,5c,5d,5e,5f)。在实验组肺血管内皮细胞中,如红色箭头所示,hACE2 均匀的表达分布在血管内皮细胞中(图 5g,5h,5i),对照组小鼠品系在肺血管内皮细胞中 hACE2 则无表达(图 5j,5k,5l)。

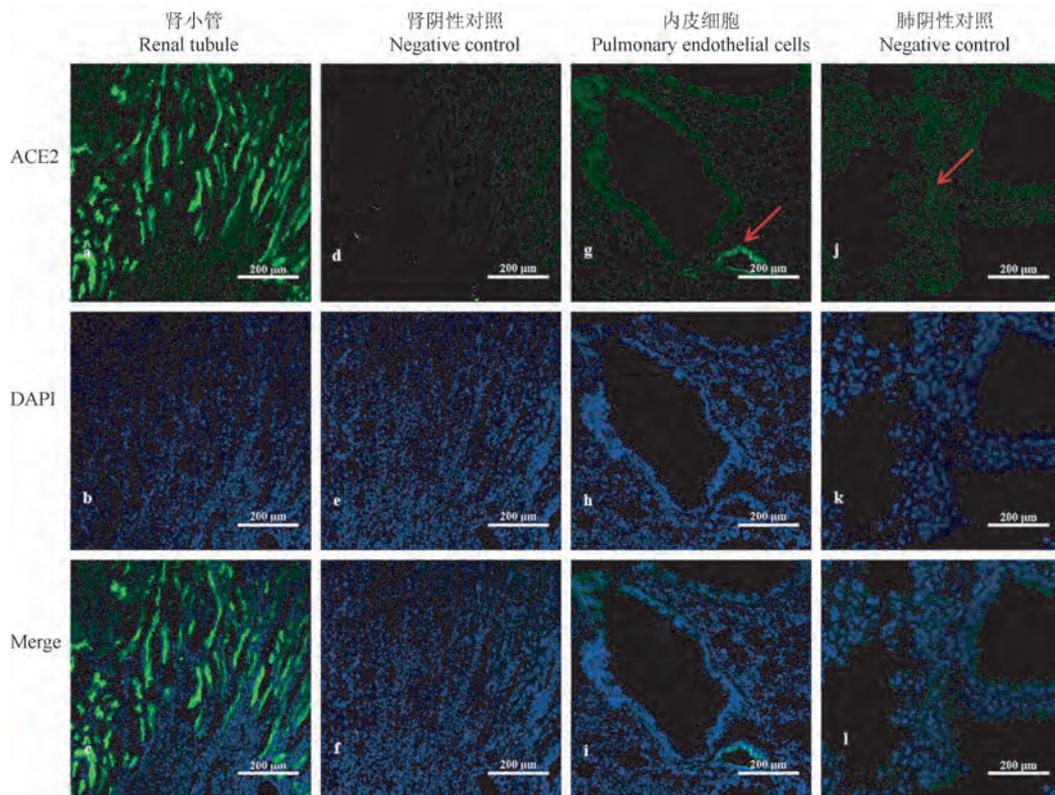


图 5 hACE2-15-1 肾小管和肺血管内皮细胞中 hACE2 的免疫荧光

Figure 5 hACE2-15-1 immunofluorescence of ACE2 in vascular endothelial cells of renal tubules and lungs

3 讨论

SARS-CoV-2 感染小鼠模型是有效解决新冠病毒入侵人体后,病毒的复制增殖、致病机制机理和疫苗药物研发的重要研究工具和手段^[10]。ACE2 人源化转基因小鼠可能作为有价值的 SARS-CoV、SARS-CoV-2 易感动物模型。目前已报道多种 ACE2 人源化转基因小鼠。研究结果显示这些 hACE2 人源化转基因小鼠存在诸多缺陷^[11]。CAG 复合启动子全身性普遍表达 hACE2 基因,CK18 启动子在上皮细胞表达 hACE2 基因,这两种转基因小鼠不能模拟 hACE2 基因的真实表达情况^[12]。小鼠 Ace2 启动子由于不能含有全部的小鼠 Ace2 基因调控区而只能部分模拟鼠源性 hACE2 基因的表达^[13]。

Donoghue 等^[14]制作在心脏特异性表达 hACE2 的人源化转基因小鼠,ACE2 超表达引起心脏传导异常及室性心律失常。感染实验显示 hACE2 转基因表达水平和病毒感染后病理变化程度直接相关,即 hACE2 转基因表达水平严重影响 SARS-CoV 病毒复制水平及感染后组织病理变化。接近生理性表达水平的 hACE2 人源化转基因小鼠预期更有利于心血管疾病以及新冠肺炎(COVID-19)发病分子机制研究和相关药物研发^[15]。我们利用含有 194 kb 的 hACE2 基因座位点的细菌人工染色体(BAC),结合小鼠原核显微注射技术,成功制备 4 个含有全长 hACE2 基因序列的人源化 BAC 转基因小鼠品系。人源化小鼠含有完整的 hACE2 基因调控序列,包括 hACE2 5'-UTR、3'-UTR 以及全部的内含子区和外

显子区。这些人源化小鼠均携带包括 rs2074192、rs6632677、rs4646142、rs4240157、rs2048683 在内的人 ACE2 的 5 个 SNP 突变位点,保留完整的人 hACE2 启动子及基因调控区,从而为心血管疾病、新冠肺炎发病机制研究、hACE2 基因表达调控机制研究和药物、疫苗的研发提供重要工具。

人 ACE2 基因表达调控比较复杂,受诸多因素影响。高血压和糖尿病小鼠肾内,ACE2 的蛋白表达下调。Zisman 等^[16]发现,在人特发性扩张型心脏病的终末期心脏中,ACE2 的表达明显增加。Kuba 等^[17]发现,在急性肺损伤小鼠动物模型中,ACE2 表达明显减少。Koitka 等^[18]发现,ACE2 在肾病和肾次全切除大鼠体内的表达明显减少。RAAS 抑制剂,包括血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素 II 型受体拮抗剂可以上调 ACE2 mRNA 水平^[19]。近期研究表明 ACE2 可能参与了 SARS-CoV-2 感染人体诱发多脏器损伤过程,其可能的机制是 SARS-CoV-2 结合 ACE2 后,通过不明机制下调人体细胞中 ACE2 含量,失调 ACE-Ang II-AT1R 轴和 ACE2-Ang 1-7-Mas 轴之间的平衡,Ang 1-7 水平下降,而 Ang II 表达绝对或是相对升高,使细胞因子(尤其促炎因子)表达升高,诱发炎症风暴,出现全身炎症反应^[20]。本研究制备的几个小鼠品系,我们对肠道中 ACE2 的表达进行较深入的研究,hACE2-14-3 小鼠品系整合最短的 3' UTR 区域,检测肠道四段的 mRNA 水平和蛋白表达量发现,与其他未丢失 3' UTR 区域的小鼠品系相比 ACE2 表达产物要高,表明 3' UTR 基因组区域可能存在肠道特异性表达的调控序列。

目前研究发现,自然 SARS-Cov-2 仅可感染树鼯、雪貂、非人灵长类等动物,对小鼠无法感染,故 ACE2 转基因人源化小鼠普遍被应用于 SARS-Cov-2 等临床研究。常见的 ACE2 转基因鼠有多种,包括以小鼠 ACE2 启动子、CMV、HFH4、或 K18 启动子驱动 ACE2 cDNA 表达的转基因鼠,以及小鼠 ACE2 部分片段人源化的基因敲入小鼠,这些小鼠模型在感染 SARS-Cov-2 病毒以后均出现不同程度的临床症状,但与人临床症状还有一定的差异,这可能与转基因小鼠中 hACE2 的表达调控与人存在差异有关。本研究制备的 BAC 转基因人源化小鼠含有较完整的 ACE2 启动子区域及增强子区,相比于传统的转基因鼠或者基因敲入小鼠,能够更好地在小鼠体内模拟人 ACE2 的表达调控。且本研究制备的小

鼠在肾小管上皮细胞、肺血管内皮细胞和肠道等组织中均有人 ACE2 的表达,与人体中 ACE2 的定位相近,是 ACE2 基因表达调控、心血管疾病和冠状病毒感染机制等研究的良好小鼠模型,也为新冠药物疫苗开发提供一些数据参考。

总之,本研究报道了 1 种全长基因序列的 hACE2 人源化 BAC 转基因小鼠。该小鼠有以下特点:(1)含有全长 hACE2 基因序列,包括全部的内含子区;(2)含有人源 hACE2 基因自身的启动子,且包含 hACE2 基因 5'-UTR 和 3'-UTR 基因表达调控区;(3)携带包括 rs2074192、rs6632677、rs4646142、rs4240157、rs2048683 在内的人 ACE2 的 5 个 SNP 突变位点,这 5 个 SNP 突变位点可能和病毒感染及人群疫苗接种后免疫反应有关联。

参 考 文 献 (References)

- [1] Beacon TH, Delcuve GP, Davie JR. Epigenetic regulation of ACE2, the receptor of the SARS-CoV-2 virus [J]. *Genome*, 2021, 64(4): 386-399.
- [2] Blume C, Jackson CL, Spalluto CM, et al. A novel ACE2 isoform is expressed in human respiratory epithelia and is upregulated in response to interferons and RNA respiratory virus infection [J]. *Nat Genet*, 2021, 53(2): 205-214.
- [3] Onabajo OO, Banday AR, Stanifer ML, et al. Interferons and viruses induce a novel truncated ACE2 isoform and not the full-length SARS-CoV-2 receptor [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(12): 1283-1293.
- [4] Ng KW, Attig J, Bolland W, et al. Tissue-specific and interferon-inducible expression of nonfunctional ACE2 through endogenous retroelement co-option [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(12): 1294-1302.
- [5] 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.
- [6] Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, et al. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2 [J]. *Biochimie*, 2020, 179: 85-100.
- [7] Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice [J]. *Nature*, 2020, 583(7818): 830-833.
- [8] Rathnasinghe R, Strohmeier S, Amanat F, et al. Comparison of transgenic and adenovirus hACE2 mouse models for SARS-CoV-2 infection [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 2433-2445.
- [9] Mittal A, Manjunath K, Ranjan RK, et al. COVID-19

- pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2 [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(8): e1008762.
- [10] Angeloni A, Bogdanovic O. Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation [J]. *Essays Biochem*, 2019, 63(6): 707-715.
- [11] Pu M, Chen J, Tao Z, et al. Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(3): 441-451.
- [12] 秦川, 刘先菊, 沈洁, 等. 血管紧张素转换酶 2 在 SARS-CoV 感染中的功能(第 1 部分)——血管紧张素转换酶 2 基因剔除小鼠的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2005, 15(6): 327-329.
- Qin C, Liu XJ, Shen J, et al. The role of converting enzyme 2 in SARS-CoV infection (Part I)— establishment of angiotensin-converting enzyme 2 knockout mouse [J]. *Chin J Comp Med*, 2005, 15(6): 327-329.
- [13] Perera JDR, Carufe KEW, Glazer PM. Peptide nucleic acids and their role in gene regulation and editing [J]. *Biopolymers*, 2021, 112(12): e23460.
- [14] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9 [J]. *Circ Res*, 2000, 87(5): E1-E9.
- [15] Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, et al. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *Cell*, 2020, 182(1): 50-58.
- [16] Zisman D, Safieh M, Simanovich E, et al. Tocilizumab (TCZ) decreases angiogenesis in rheumatoid arthritis through its regulatory effect on miR-146a-5p and EMMPRIN/CD147 [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 739592.
- [17] Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury [J]. *Nat Med*, 2005, 11(8): 875-879.
- [18] Koitka A, Cooper ME, Thomas MC, et al. Angiotensin converting enzyme 2 in the kidney [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35(4): 420-425.
- [19] Ye R, Liu Z. ACE2 exhibits protective effects against LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting the LPS-TLR4 pathway [J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 113: 104350.
- [20] Bhat EA, Khan J, Sajjad N, et al. SARS-CoV-2: Insight in genome structure, pathogenesis and viral receptor binding analysis-an updated review [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107493.

[收稿日期] 2022-02-15

吕玥莹,赵庆亚,焦明,等. 小细胞肺癌原代细胞脑转移模型研究初探 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 239-244.
Lyu YY, Zhao QY, Jiao M, et al. Establishment of primary cell brain metastasis model of small cell lung cancer: a preliminary study [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 239-244.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.012

小细胞肺癌原代细胞脑转移模型研究初探

吕玥莹,赵庆亚,焦明,杨玉琴*

(上海市第一人民医院,上海交通大学,上海 201600)

【摘要】目的 本研究拟分离培养保留原始肿瘤的重要特征和功能的小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 原代细胞,并在此基础上构建 SCLC 原代细胞脑转移小鼠模型,为 SCLC 脑转移患者的药物研发和评估提供更贴近临床的动物模型。**方法** 收集临床病人的新鲜 SCLC 肿瘤组织样本进行小鼠皮下移植,通过小鼠的荷瘤情况、肿瘤组织大小和肿瘤生长曲线的结果,确定小细胞肺癌人源肿瘤异种移植 (patient-derived xenograft, PDX) 模型的构建情况。并对成瘤后的肿瘤组织进行原代细胞分离培养,通过细胞划痕实验和增殖实验检测细胞的增殖和侵袭能力。通过颈动脉注射原代细胞构建 SCLC 脑转移模型,并通过临床表现和病理观察确定转移模型是否成功。**结果** (1) 成功构建 SCLC 皮下 PDX 模型,肿瘤传代时间约为 56 d,肿瘤生长曲线呈对数生长趋势。(2) 成功分离筛选出具备成瘤性的 SCLC 原代 L0 细胞,并证实该 L0 细胞具备较强的细胞迁移和增殖能力。(3) 颈动脉注射法成功构建 SCLC 脑转移模型,并分离出具备脑转移特性的 SCLC 脑转移 B0 细胞。**结论** 本研究利用分离培养 SCLC 原代细胞,成功构建 SCLC 原代细胞的脑转移的模型。

【关键词】 小细胞肺癌;原代细胞;脑转移;模型构建;颈动脉注射

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0239-06

Establishment of primary cell brain metastasis model of small cell lung cancer: a preliminary study

LYU Yueying, ZHAO Qingya, JIAO Ming, YANG Yuqin*

(Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201600, China)

Corresponding author: YANG Yuqin. E-mail: fudanyan2007@sina.com

【Abstract】 Objective To isolate and culture primary small cell lung cancer (SCLC) cells that retain the important characteristics and functions of the original tumor, and use them to construct a brain metastasis model of SCLC, as an animal model for drug development and the evaluation of patients with SCLC brain metastasis. **Methods** Fresh SCLC tumor tissue samples were collected from patients and transplanted subcutaneously into mice. The result ing patient-derived xenograft (PDX) mouse model of SCLC was assessed in terms of tumor presence, tumor size, and tumor growth. Primary cells were isolated and cultured from the tumor tissue after tumor formation, and their proliferation and invasion abilities were detected by cell scratch and proliferation tests. An SCLC brain metastasis model was constructed by injecting primary cells into the carotid artery, and the model was assessed in terms of its clinical manifestations and pathological observations. **Results** (1) A subcutaneous PDX model of SCLC was constructed successfully. The tumor passage time was about 56 days, and the tumor growth curve showed a logarithmic growth trend. (2) Primary L0 SCLC cells with tumorigenicity were successfully isolated and screened, and demonstrated strong cell migration and proliferation abilities. (3) An SCLC brain

[基金项目]上海市科学技术委员会“科技计划项目”(201409002300)。

Funded by "Science and Technology Plan Project" of Shanghai Science and Technology Commission(201409002300).

[作者简介]吕玥莹(1994—),女,实验动物中心技术员,研究方向:动物模型的构建。Email:2545804092@qq.com

[通信作者]杨玉琴(1980—),女,高级兽医师,硕士,研究方向:动物模型的构建。Email:fudanyan2007@sina.com

metastasis model was successfully constructed by carotid injection, and SCLC B0 cells with brain metastasis characteristics were isolated. **Conclusions** Primary SCLC cells were successfully isolated and cultured from SCLC tumor tissue samples, and a brain metastasis model using primary SCLC cells was successfully constructed.

【Keywords】 small cell lung cancer; primary cells; brain metastasis; model construction; carotid injection

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

肺癌是全球范围内恶性肿瘤最常见的疾病。2020 年世界卫生组织国际癌症研究机构发布的全球最新癌症负担数据中,中国癌症新发病例为 457 万例,肺癌位于第一位为 82 万例,约占总数的 18%;中国癌症死亡人数为 300 万例,肺癌高达 71 万,占癌症死亡总数的 23.8%。其中小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 是肺癌中一种较常见的恶性肿瘤,属侵袭性最强的亚型^[1-2],首次就诊时脑转移发生率为 10%,诊疗过程中为 40% ~ 50%,存活 2 年以上的达 60% ~ 80%。同时脑转移瘤也是影响小细胞肺癌患者生存的重要因素之一^[3-5],未治疗的脑转移瘤患者中位生存期 1 ~ 2 个月,治疗后延长为 4 ~ 6 个月^[6-8],因此,如何提高小细胞肺癌脑转移瘤患者的生存期是目前小细胞肺癌研究和治疗领域的重点。而构建一个贴近临床的小细胞肺癌脑转移模型对小细胞肺癌脑转移患者治疗方案的研发具有重要意义。基于以上原因,本研究拟分离培养保留病人肿瘤重要特征和功能的 SCLC 原代细胞,利用免疫缺陷小鼠构建 SCLC 原代细胞脑转移模型,为 SCLC 脑转移患者的新型药物研发和评估提供支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

15 只 6 周龄 SPF 级 B-NDG 小鼠,体重约为 24 ~ 27 g,从百奥赛图江苏基因生物技术有限公司订购【SCXK(苏)2016-0004】。饲养于上海市第一人民医院实验动物中心【SYXK(沪)2019-0028】。饲养期间各组小鼠自由饮水,Co60 辐照饲料由江苏省协同医药生物工程有限责任公司【苏饲证(2019)01008】提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22 ~ 25℃。所有操作均符合上海市第一人民医院实验伦理学要求(审批号:IACUC 2020AW139)。

1.1.2 临床材料

临床小细胞肺癌标本来自上海市第一人民医院,肿瘤标本的取得经过患者本人及家属同意,并

签署知情同意书,相应实验通过上海市医院医学伦理委员会的批准(批准编号:2022sq252)。

1.1.3 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清(FBS)购自以色列 Biological Industries 公司,磷酸缓冲盐溶液(PBS)购自美国 Gibco 公司,双抗购自 AMRESCO 公司,10%中性多聚甲醛购自北京索莱宝生物科技有限公司,75%乙醇溶液购自山东安捷高科消毒科技有限公司,1 mL 注射器购自中国双鸽集团聚民生物科技有限公司,眼科镊购自上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂,眼用剪购自上海三友外科器材有限公司,持针器购自上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂,生物安全柜购自美国 Thermofisher-Scientific 公司,呼吸麻醉机购自美国 Matrx 公司。

1.2 方法

1.2.1 SCLC 人源肿瘤异种移植(patient-derived xenograft, PDX)皮下接种动物模型

收集病人的新鲜肿瘤组织样本,使用 PBS 对活性标本进行震荡洗涤。将样本放于装有 10 mL 的含 20% FBS 的 4℃ RPMI-1640 培养基于 15 mL 离心管中于 4℃ 条件下保存,接种前用含双抗的标本清洗液洗涤 2 次,用剪子根据组织大小剪成 2 mm³ 大小的组织块,采用少量的 FBS 重悬。异氟烷麻醉小鼠,剃出小鼠侧腰部的毛,再用乙醇棉球消毒,用眼科剪剪开约 2 mm 长的切口,于切口两侧皮下分别接种肿瘤组织,缝合切口,接种 5 只 B-NDG 小鼠为 SCLC 的 PDX 皮下接种动物模型,成为 P0 代。

1.2.2 SCLC 原代细胞分离方法

P0 代小鼠皮下肿瘤长至 800 ~ 1200 mm³ 时通过颈椎脱臼法处死,完整的剥离取出肿瘤组织,置于干净的培养皿中拍照之后剪成 2 mm³ 大小的组织块,用含双抗的 1640 培养基洗涤 2 次,置于 1 个新的培养皿中将组织块剪成 0.2 ~ 0.5 mm³ 的碎块,移入 1.5 mL 的 EP 管中。加入 1 mL 胰酶消化液,置于 37℃ 水浴震荡,直至组织碎块弥散开。收集细胞悬液移除大的细胞团块,过 70 μm 细胞过滤器,将过滤的液体转移至新的 15 mL 离心管中。

1000 rpm 离心 3 min, 移除上清, 加入 3 ~ 5 mL 的 1640 培养基, 用吹打重悬细胞, 反复操作。将细胞悬液转移至新的培养皿中, 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱中培养。将从 SCLC 原代 PDX 模型中分离的细胞记作原代 L0 细胞。

1.2.3 原代 L0 细胞增殖实验

通过 CCK-8 测定法测量细胞增殖能力。将细胞铺在 96 孔板 (2000 个细胞/孔) 中, 并在培养 0、6、12、18、24 h, 加入 100 μL 培养基/CCK-8 混合物 (培养基:CCK8, 9:1) 孵育 3 h 后, 测量 450 nm 处吸光度值。

1.2.4 原代 L0 细胞划痕实验

将分离的原代 L0 细胞接种于六孔板, 待细胞贴壁后, 用 200 μL 的枪头制造划痕确保宽度一致。后用 PBS 清洗 3 次, 弃掉细胞碎片, 加入新鲜的培养基。将 6 孔板箱继续培养, 按 0、12、24、48 h 时倒置显微镜观察拍照, 确定细胞迁移情况。

1.2.5 肿瘤生长曲线测定

皮下移植的肿瘤, 定期监测肿瘤生长。用游标卡尺测量小鼠肿瘤体积, 每周 2 次测量肿瘤体积, 动态反应肿瘤的增长情况。测量肿瘤的长径 (length) 与短径 (width), 通过公式计算肿瘤体积: $V = \text{Length} \times \text{Width}^2 \times 0.5$, 绘制肿瘤生长曲线。

1.2.6 SCLC 脑转移模型颈动脉注射方法

异氟烷麻醉 10 只 B-NDG 小鼠后, 用 29 G (胰岛素针) 针头颈动脉注射细胞悬液 100 μL (包含分离的原代 L0 细胞 1×10^5 个), 缝合皮肤, 碘酒消毒。

1.2.7 临床观察

在实验过程中, 对 SCLC 的 PDX 皮下接种动物模型 P0 代小鼠和颈动脉注射原代细胞构建 SCLC 脑转移模型小鼠进行小鼠临床症状观察, 观察小鼠的活动状况、背毛、呼吸、自主活动等情况。

1.2.8 组织病理学检查

将病人的新鲜肿瘤组织样本、SCLC 的 PDX 皮下模型 P0 代小鼠剥离的皮下肿瘤组织和 SCLC 脑转移模型的小鼠分离脑部的肿瘤组织, 按照病理取材制作脑部石蜡切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色处理, 进行形态学观察。

1.2.9 SCLC 脑转移瘤原代细胞分离方法

SCLC 脑转移瘤模型小鼠, 通过颈椎脱臼法处死, 小鼠头部剃毛, 用剪子剪开小鼠头部的皮肤和头骨, 将在小鼠脑部的肿瘤完整的剥离取下。将新鲜的肿瘤组织置于干净的培养皿中。后续 SCLC 脑

肿瘤原代细胞分离方法具体操作同方法 1.2.2 所述。将分离过的 SCLC 细胞记作原代 B0 细胞。

1.3 统计学分析

结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有数据均用 GraphPad Prism 5 软件处理, 多组间比较使用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 SCLC 的 PDX 模型建立

临床观察结果显示, 小鼠状态良好, 无异常反应。小鼠荷瘤情况显示成功构建 SCLC 原代 PDX 模型构建 (图 1A)。肿瘤组织表明光滑, 瘤体呈白色, 质地韧性 (图 1B)。肿瘤体积生长曲线结果显示, 肿瘤增长呈对数生长趋势, 符合肿瘤生长特点 (图 1C)。通过 HE 染色病理结果显示, PDX 皮下模型与 SCLC 患者肿瘤组织原始肿瘤形态具有较高的相似性, 表明皮下成瘤能较好地保持组织病理学特征 (图 1D)。

2.2 SCLC 原代 L0 细胞的获取和检测

P0 代小鼠肿瘤组织经胰蛋白酶消化和原代细胞分离处理后, 可以观察到形态呈梭形和多边形, 形态与纤维状的成纤维细胞明显不同, 证明成功分离 SCLC 原代 L0 细胞 (图 2A)。细胞增殖实验显示, 原代 L0 细胞具备较强的增殖能力 (图 2B)。细胞划痕实验显示原代 L0 细胞具备较强的迁移能力 (图 2C)。原代 L0 细胞具备肿瘤细胞的特性。

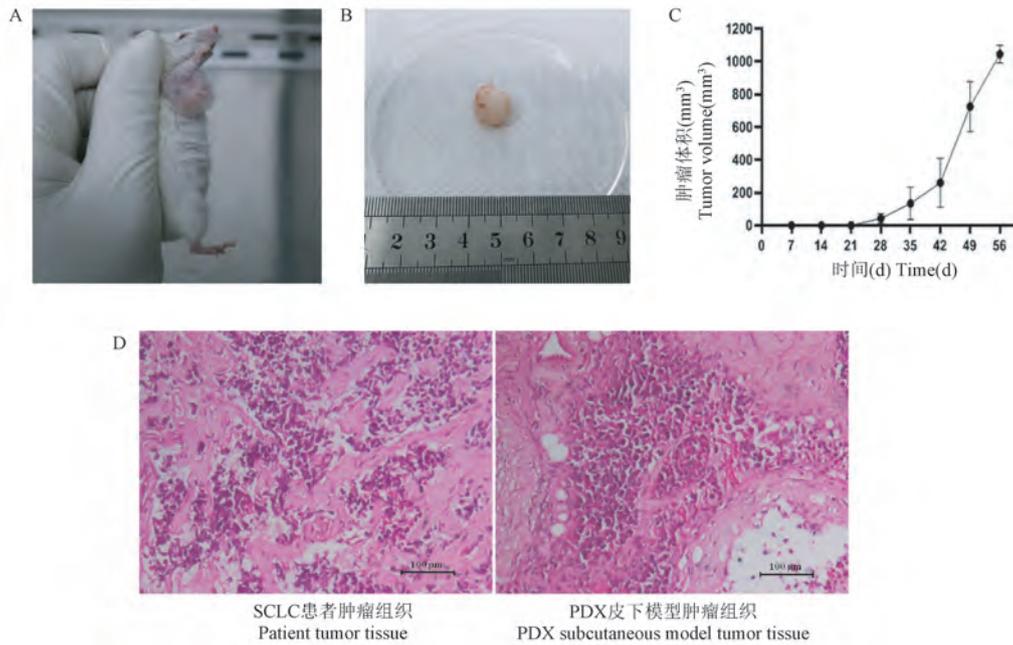
2.3 SCLC 脑转移模型构建

在 SCLC 脑转移模型构建实验中, 脑转移成功率为 25%, 实验第 50 天开始小鼠出现共济失调和偏瘫的情况, 进食进水量显著减少 (图 3A)。HE 染色显示肿瘤细胞呈巢状排列, 间质较少, 细胞异质性明显 (图 3B)。对脑转移模型成瘤的肿瘤组织细胞分离处理筛选后细胞形态的观测, 获得肿瘤细胞 B0 (图 3C)。

3 讨论

在小细胞肺癌脑转移的研究过程中, 构建一个合适的 SCLC 的脑转移模型对于研究脑转移的机制、评估新型药物和为病人制定合理的治疗方案至关重要^[9]。

目前小细胞肺癌脑转移动物模型的研制整体相对滞后, 建立肿瘤转移动物模型的常用方法包

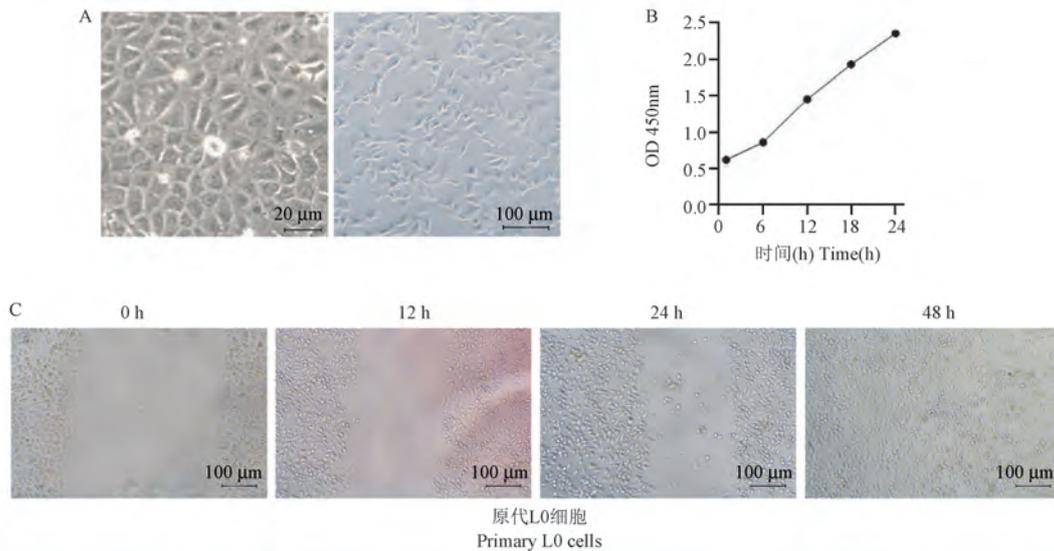


注:A:小鼠荷瘤情况;B:肿瘤生长情况;C:肿瘤生长曲线;D:HE染色结果。

图1 SCLC的PDX模型的建立

Note. A. Tumor bearing mice. B. Tumor growth. C. Tumor growth curve. D. HE staining results.

Figure 1 Establishment of PDX model of SCLC



注:A:细胞的生长形态(左:原代L0细胞;右:原代成纤维细胞);B:细胞增殖实验结果;C:细胞划痕实验结果。

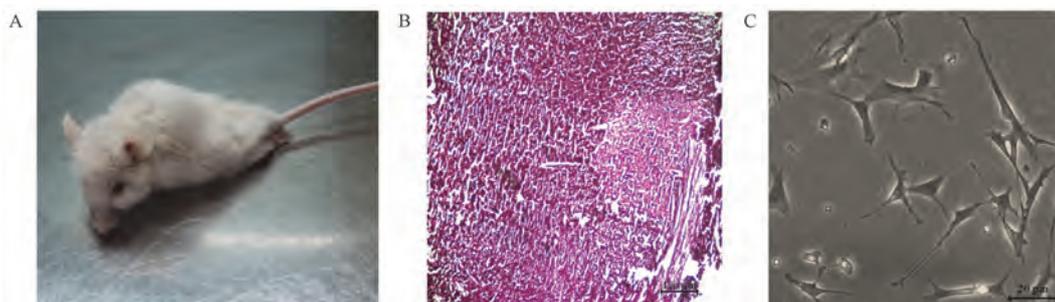
图2 原代L0细胞的获取和检测

Note. A. Growth morphology of cells (Left. Primary L0 cells. Right. Primary fibroblasts). B. Cell proliferation test results. C. Cell scratch test results.

Figure 2 Acquisition and detection of primary L0 cells

括:PDX、基因敲除或转基因、肿瘤细胞系注射等。其中PDX最大程度上保留肿瘤的微环境和原代肿瘤的生物学和组织学特性,这一优点有利于抗肿瘤药物的筛选,为个体化抗肿瘤治疗开辟新途径,然而PDX多为皮下建立,发生转移机率低,目前未见

脑转移的报道^[10-12]。通过基因工程技术导入癌基因或失活抑癌基因,可制备肿瘤的遗传性小鼠模型,但由于原发瘤发展过快而导致转移瘤的发生机率不高^[13]。Meuwissen等^[14]报道肺上皮细胞Trp53与Rb1条件性基因敲除产生的小鼠肺癌小鼠可



注: A: 小鼠荷瘤情况; B: HE 染色结果; C: 肿瘤细胞 B0 的生长形态。

图 3 SCLC 脑转移模型的构建

Note. A. Tumor bearing mice. B. HE staining results. C. Growth morphology of B0 tumor cell.

Figure 3 Construction of brain metastasis cell line of SCLC

发生多处转移,但脑转移率低于 10%。

将成熟的细胞系注射到脏器或血管内,可以建立各种肿瘤转移模型,由于细胞系肿瘤活性好、周期短且可以通过反复筛选获得高转移株,是目前转移瘤模型研究中最具潜能的方式^[15]。但成熟细胞系由于长期体外培养,细胞特性与临床差距较大,且目前未见有高脑转移细胞系的报道^[16],同时目前临床很难获得较大肿瘤样本,多为少量的穿刺样本,无法进一步开展有效实验,这是研究小细胞肺癌转移的主要障碍^[17-18]。在本研究中由于接收病人的新鲜 SCLC 肿瘤组织样本量较少,分离原代细胞实际操作存在困难,故先构建 SCLC 原代 PDX 模型,使 SCLC 在小鼠体内进行扩增,并在 P0 代小鼠成瘤后的肿瘤组织中分离 SCLC 原代 L0 肿瘤细胞。在成功分离培养出原代细胞后,通过划痕实验和增殖实验结果证明原代 L0 肿瘤细胞有较强的侵袭性和增殖能力,通过颈动脉注射的方式成功构建 SCLC 脑转移模型。

本实验初次采用此原代细胞建立脑转移模型,实验中还存在许多不足,仍需要解决一些问题:其中最主要的就是脑转移模型成功率较低,实验中脑转移成功率为 25%,但一个标准的模型除能贴近人类疾病外还应有较高的可重复性,因此我们对脑转移瘤进一步进行了分离和培养,后续将继续筛选 SCLC 高脑转移细胞株。其次缺乏药效评价相关的探索,模型的构建应该同临床需求紧密相关,后续我们将在此研究的基础上继续开展药效评价和药物的筛选工作,使模型的构建具备更多的临床价值。

参 考 文 献 (References)

- [1] Shan QG, Shi JX, Wang XH, et al. A new nomogram and risk classification system for predicting survival in small cell lung cancer patients diagnosed with brain metastasis: a large population-based study [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 640.
- [2] 张昆, 孙洋, 翟所锴, 等. 干扰 lncRNA HOXA-AS3 负调控 miR-340-5p 对小细胞肺癌细胞 DMS114/DDP 顺铂耐药性的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 96-101.
Zhang K, Sun Y, Zhai SK, et al. Interference of lncRNA HOXA-AS3 negatively regulates the effect of miR-340-5p on cisplatin resistance in DMS114/DDP small cell lung cancer cells [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 96-101.
- [3] Norden AD, Wen PY, Kesari S. Brain metastases [J]. Curr Opin Neurol, 2005, 18(6): 654-661.
- [4] Quan AL, Videtic GM, Suh JH. Brain metastases in small cell lung cancer [J]. Oncology, 2004, 18(8): 961-987.
- [5] 朱亚如, 黄卫妹, 吴源周, 等. 人源性的小细胞肺癌异种移植动物模型及耐药模型的建立 [J]. 中国肺癌杂志, 2019, 22(1): 6-14.
Zhu YR, Huang WM, Wu YZ, et al. Establishment of a patient-derived xenotransplantation animal model for small cell lung cancer and drug resistance model [J]. Chin J Lung Cancer, 2019, 22(1): 6-14.
- [6] 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.
- [7] Kallianos A, Rapti A, Zarogoulidis P, et al. Therapeutic procedure in small cell lung cancer [J]. J Thorac Dis, 2013, 5(4): 420-424.
- [8] Zhang J, Jin J, Ai Y, et al. Differentiating the pathological subtypes of primary lung cancer for patients with brain metastases based on radiomics features from brain CT images [J]. Eur Radiol, 2020, 31(2): 1022-1028.
- [9] Hellman B, Brodin D, Andersson M, et al. Radiation-induced DNA-damage and gene expression profiles in human lung cancer cells with different radiosensitivity [J]. Exp Oncol, 2005, 27(2): 102-107.
- [10] Hiroshima Y, Maawy A, Zhang Y, et al. Patient-derived mouse models of cancer need to be orthotopic in order to evaluate targeted anti-metastatic therapy [J]. Oncotarget, 2016, 7(44): 71696-71702.

- [11] Tew BY, Sallhia B. The establishment and utilization of patient derived xenograft models of central nervous system metastasis [J]. *J Vis Exp*, 2021, 7: 171.
- [12] 刘宏飞, 陈晓红, 黄志刚, 等. 类器官和人源性肿瘤组织异种移植模型在肿瘤研究中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(3): 103-108, 122.
- Liu HF, Chen XH, Huang ZG, et al. Application of organoids and patient-derived xenograft models in cancer research [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(3): 103-108, 122.
- [13] Sakamoto S, Inoue H, Kohda Y, et al. Interferon-induced transmembrane protein 1 (ifitm1) promotes distant metastasis of small cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 4934.
- [14] Meuwissen R, Linn SC, Linnoila RI, et al. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(3): 181-189.
- [15] 毛玉宁, 郭文文, 赵菊梅, 等. 基于动物模型筛选胃癌转移相关基因及鉴定方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(7): 112-117.
- Mao YN, Guo WW, Zhao JM, et al. Screening and identifying gastric cancer metastasis-related genes using animal models [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(7): 112-117.
- [16] Zhang C, Lowery FJ, Yu D. Intracarotid cancer cell injection to produce mouse models of brain metastasis [J]. *J Vis Exp*, 2017, 120: 55085.
- [17] Byers LA, Rudin CM. Small cell lung cancer: where do we go from here? [J]. *Cancer*, 2015, 121(5): 664-672.
- [18] Gan Y, Liu P, Luo T. Successful treatment of an elderly patient with combined small cell lung cancer receiving anlotinib: a case report [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 775201.

[收稿日期] 2022-02-14

综述:成年后海马神经发生与阿尔茨海默病的神经再生治疗

阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病,是导致老年痴呆的最常见原因。然而,目前尚无能够终止 AD 病程进展的治疗药物和方法。其中部分原因可能与老年 AD 患者脑内神经网络退变的不可逆性有关,通过诱导神经元新生补偿神经元丢失以及重塑退变的神经网络,有望成为 AD 治疗的新方向。

来自遵义医科大学基础药理教育部重点实验室的研究者对 AD 与海马神经发生的研究进展进行了回顾。尽管成年海马神经元新生 (adult hippocampal neurogenesis, AHN) 数目有限,但数目不多的新生神经元仍然可以赋予海马神经环路极高的可塑性,并在学习-记忆/遗忘、情绪等功能调控中发挥重要作用。文中对目前 AD 患者和大/小鼠中 AHN 改变的相关研究进行了总结和分析,指出尽管在 AD 前中期海马神经发生可能呈现数量上的短暂增多,但在中后期 AHN 整体呈现为减少。虽然内源性 AHN 在数量、范围和新生神经元类型等方面具有较大局限性,促进 AHN 对于 AD 的预防和治疗仍可能具有一定意义。同时, AHN 也可以作为一个简单易得、稳定且最接近 AD 患者大脑实际情况的模型,用以研究和测试其他的 AD 促神经再生治疗方法。

此外,本文还回顾了通过细胞移植以及诱导胶质细胞重编程两种手段诱导 AD 脑内神经再生相关研究进展,分析了其在补偿神经元丢失和重塑退变神经网络以治疗阿尔茨海默病存在广阔前景,以及在诱导神经新生效率、特异性及安全性等方面尚存在的较多问题和可能的研究方向。该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 5(1): 3-14; <https://doi.org/10.1002/ame2.12212>)。

白培钿,裴婷,孔佳美,等. 复合微生态制剂对小鼠肠道免疫功能的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 245-252.

Bai PT, Pei T, Kong JM, et al. Effect of compound microecological preparation on intestinal immune function in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 245-252.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.013

复合微生态制剂对小鼠肠道免疫功能的影响

白培钿[#],裴婷[#],孔佳美,杨逢清,李涛,王海东,任玉红^{*}

(山西农业大学 动物医学学院,山西 晋中 030801)

【摘要】 目的 旨在研究复合微生态制剂对小鼠肠道黏膜免疫功能的影响 方法 选取 28 日龄 BALB/C 小鼠 80 只,通过灌胃低、中、高不同剂量(2.5、5、10 g/kg 体重)的复合微生态制剂,第 14 天和第 28 天采取血液样本和空肠组织,并取材免疫器官进行免疫器官指数测定。用比浊法检测血液中溶菌酶含量,用 ELISA 法检测小鼠空肠黏膜免疫细胞因子(IL-4、IL-10、IFN- γ)和 SIgA 含量;用荧光定量 PCR 检测小鼠空肠黏膜免疫细胞因子 mRNA 表达水平。**结果** (1)不同剂量复合微生态制剂均可提高小鼠肠道黏膜免疫细胞因子及 SIgA 的含量和免疫细胞因子 mRNA 的表达水平。第 14 天,中剂量组小鼠空肠黏膜免疫细胞因子 IL-4、IL-10、IFN- γ 及 SIgA 含量和 mRNA 表达水平极显著高于对照组($P < 0.01$)。第 28 天,低剂量组和中剂量组空肠黏膜 IL-4 含量极显著提高($P < 0.01$);中剂量组 IL-10、IFN- γ 及 SIgA 含量和 mRNA 表达水平极显著高于对照组($P < 0.01$);中、高剂量组 IL-4、IL-10 及 IFN- γ 的 mRNA 表达水平均不同程度高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);低剂量组 IL-4、IL-10 mRNA 表达水平与对照组差异不显著($P > 0.05$)。(2)第 14 天,中剂量组免疫器官指数显著高于对照组($P < 0.05$),第 28 天,各实验组免疫器官指数均显著高于对照组($P < 0.05$)。(3)各实验组小鼠溶菌酶含量显著高于对照组($P < 0.05$)。**结论** 复合微生态制剂能促进小鼠的生长,增加小鼠免疫器官指数,提高小鼠血液中溶菌酶含量及肠道黏膜免疫功能,减少肠道感染性疾病发生。

【关键词】 微生态制剂;小鼠肠道;免疫细胞因子;SIgA;免疫器官指数

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0245-08

Effect of compound microecological preparation on intestinal immune function in mice

BAI Peitian[#], PEI Ting[#], KONG Jiamei, YANG Fengqing, LI Tao, WANG Haidong, REN Yuhong^{*}

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

Corresponding author: REN Yuhong. E-mail:renyuhong1963@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of compound microecological preparation on the immune function of the intestinal mucosa of mice. **Methods** BALB/C mice at 28 days of age were selected for use in this study, and composite microecological preparations of high, medium, and low doses (2.5, 5 and 10 g/kg body weight) were given by gavage. Blood and jejunum tissue were sampled on the 14th and 28th days, and the immune organ index was measured. The blood lysozyme content was detected by turbidimetry, and the jejunum mucosa SIgA and immune cytokine (IL-4, IL-10 and IFN- γ) contents of mice were detected by ELISA. The expression of immunocytokine mRNA in the jejunum mucosa was detected by fluorescence quantitative PCR. **Results** (1) The different compound microecological preparation doses increased the SIgA and immune cytokine contents and enhanced the expression of immune cytokine mRNA in the intestinal mucosa of

【基金项目】 山西省重点研发计划项目(201803D221009-4)。

Funded by Shanxi Province Key Research Project(201803D221009-4).

【作者简介】 白培钿(1996—),男,硕士,研究方向:动物疾病发生与免疫。Email:359827412@qq.com;

裴婷(1995—),女,硕士,研究方向:动物疾病发生与免疫。Email:1135748413@qq.com。

[#]共同第一作者

【通信作者】 任玉红(1963—),女,教授,研究方向:动物疾病发生与免疫。Email:renyuhong1963@163.com

mice. On the 14th day, the contents of IL-4, IL-10 and IFN- γ ; the expression of IL-4, IL-10 and IFN- γ mRNA; and the content of SIgA were significantly higher in the treated groups than the control group ($P < 0.01$). On the 28th day, the content of IL-4 in the jejunal mucosa of the low-dose and medium-dose groups was significantly increased ($P < 0.01$). In the middle-dose group, IL-10 and IFN- γ protein and mRNA levels and SIgA protein levels were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). In the middle-dose and high-dose groups, IL-4, IL-10, and IFN- γ mRNA expression was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant difference in the expression of IL-4 and IL-10 mRNA between the low-dose and control groups ($P > 0.05$). (2) On the 14th day, the immune organ index of the medium dose group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). (3) On the 28th day, compared with the control group, each experimental group's immune organ index was significantly increased ($P < 0.05$). The lysozyme content of each experimental group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Compound microecological preparation promoted the growth and increased the immune organ index, lysozyme content, and intestinal mucosal immune function of mice, consequently reducing the incidence of intestinal infectious diseases.

【Keywords】 microecological preparation; intestinal tract of mice; immunocytokines; sIgA; index of immune organ
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着我国养殖业的迅速发展,抗生素作为饲料添加剂被大量用于畜禽疾病防治及促进畜禽生长。然而,抗生素的滥用导致耐药细菌大量产生,大大降低了药物疗效,同时药物在畜禽产品中大量残留,直接危害动物源性食品安全和人类健康。2017年6月,我国农业农村部发布《全国遏制动物源细菌耐药行动计划(2017~2020年)》的通知,要求我国从2020年起在动物养殖生产中全面禁止使用人兽共用或容易产生耐药性的抗菌药物作为动物促生长剂^[1]。微生态制剂能够改善动物肠道健康,提高生长性能,增强机体免疫力,但是微生态制剂存在活菌数低,不易保存等问题。酶制剂能够补充动物体内酶类的不足,消除抗营养因子,增强机体免疫力,但是酶制剂也存在稳定性差,不易保存等一系列的问题。近年来,研究者开始对益生菌和酶制剂的共同作用效果进行研究,提高益生菌剂和酶制剂的质量和作用效果。本课题组成功研制一种酶与微生态制剂复合组剂(申请公布号:CN113439798A)^[2],以期应用于畜禽生产中,为养殖业“减抗禁促”提供新的饲料添加剂。本研究通过对小鼠灌胃不同剂量复合微生态制剂,研究其对小鼠肠道黏膜免疫功能、免疫器官指数及血液溶菌酶含量的影响,旨在为复合微生态制剂在养殖业的应用提供理论依据,同时为养殖业研制能替代抗生素的安全、高效及绿色的饲料添加剂提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

80只28日龄清洁级BALB/C小鼠,体重为(16±

2)g,雌雄各半购自山西医科大学实验动物中心【SCXK(晋)2019-0005】。饲养于山西农业大学动物实验室【SYYK(晋)2020-0003】,维持饲料购自山西医科大学动物实验中心。实验期间同室分笼喂养,饲养温度为(22±2)℃,湿度为40%~60%,自由采光和饮水。本实验方案符合山西农业大学动物护理与使用委员会的要求(SXAU-EAW-2020SD0201)。

1.1.2 主要试剂与仪器

复合微生态制剂:由枯草芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌、啤酒酵母菌、中性蛋白酶及纤维素酶所组成(总活菌数 1.0×10^{11} CFU/g),由微生态制剂研发课题组研制(专利申请号:20211059339 2.7)。IL-4、IL-10、IFN- γ 、SIgA检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;溶菌酶(LZM)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;实时荧光定量试剂盒诺购自唯赞生物科技有限公司;TRIzol(美国life);反转录试剂盒为TaKaRa产品等。

SpectraMax M5 酶标仪(Molecular Devices,美国);StepOnePlus 实时荧光定量PCR仪(ABI,美国)等。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

小鼠正常饲喂饲养7d后,按照随机分组原则分为4组,每组雌雄各10只,实验组持续灌胃复合微生态制剂28d,对照组灌胃生理盐水。实验动物分组及处理见表1。

1.2.2 样品采集

在第14天和第28天,从各组随机选取10只小鼠(雌雄各半),麻醉后采血,置于非抗凝采血管内,

表 1 实验动物分组

Table 1 Groups of experimental animals

分组 Groups	处理 Treatment
对照组 Control group	日粮+无菌蒸馏水灌胃 0.2 mL Daily diet+aseptic distilled water was intragastrically administered for 0.2 mL
低剂量组 Low dose group	日粮+复合微生态制剂灌胃 2.5 g/kg 体重 Daily diet+compound microecological preparation was administered intragastrically to 2.5 g/kg body weight
中剂量组 Medium dose group	日粮+复合微生态制剂灌胃 5.0 g/kg 体重 Daily diet+compound microecological preparation was administered intragastrically to 5.0 g/kg body weight
高剂量组 High dose group	日粮+复合微生态制剂灌胃 10 g/kg 体重 Daily diet+compound microecological preparation was administered intragastrically to 10 g/kg body weight

分离血清,用于溶菌酶含量的测定。采血后处死小鼠,取胸腺、脾和肠系膜淋巴结并称重,用于免疫器官指数测定。小鼠空肠样品的采集处理方法参考文献^[3],用于总 RNA 的提取和免疫细胞因子含量的测定,小鼠空肠黏膜免疫细胞因子(IL-4、IL-10、IFN- γ)检测方法参考文献^[4-5]。

1.2.3 生长性能的测定

在实验期间 0、7、14、21 和 28 d 时,对每组小鼠进行空腹称重,计算平均体重。

1.2.4 免疫器官指数的测定

免疫器官指数=免疫器官重量(mg)/体重(g)

1.2.5 溶菌酶的测定

按试剂盒说明测定各组小鼠血清溶菌酶浓度。计算数据以每毫升血清中所含微克溶菌酶表示,即 $\mu\text{g/mL}$ 。严格按照试剂盒操作要求检测溶菌酶的活力,按公式计算溶菌酶含量。

溶菌酶含量=(测定透光度-空白透光度)/(标准透光度-空白透光度) \times 标准品浓度 \times 样本测试前稀释倍数

1.2.6 空肠黏膜细胞因子及 SIgA 含量测定

空肠黏膜细胞因子 IL-4、IL-6、IFN- γ 以及 SIgA 含量测定参照 ELISA 试剂盒说明书进行所有标准品和样本均设复孔。酶标仪检测各孔 OD 值,计算肠道黏膜内细胞各细胞因子的浓度。

1.2.7 荧光定量测定肠道黏膜 IL-4、IL-10 和 IFN- γ mRNA 相对表达量

根据 NCBI 上基因数据库查找目的基因 IL-4、IL-10 和 IFN- γ 以及内参 GAPDH 相对应的基因序列,运用 Primer 5.0 软件设计各基因的上下游引物(如表 2 所示)。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环。目的基因的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示。

1.3 统计学分析

用 SPSS 25.0 软件进行统计学处理,各组数据均采用单因素方差分析(one-way ANOVA),实验结果用平均值 \pm 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,用 GraphPad Prism 5 绘制柱状图。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 复合微生态制剂对小鼠体重的影响

小鼠灌胃微生态复合制剂后,各阶段体重变化如表 3 所示。从表 3 可知小鼠在灌胃不同剂量的复合微生态制剂第 7 天和第 14 天,各组小鼠体重均有所增加,但无显著差异性($P > 0.05$);在第 21 天和第 28 天,中剂量组和高剂量组的小鼠体重增加明显,差异具有显著性($P < 0.05$),低剂量组的小鼠体重无显著性差异($P > 0.05$)。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

引物名称 Genes	引物序列(5'-3') Sequence of primer(5'-3')	产物大小(bp) Product size(bp)
GAPDH	F:GGCTCGGAAGTCCAGAAAGAAG R:CTCGGCACTCAGACGCAAAG	139
IL-10	F:TTTCAAACAAAGGACCAG R:ACTGGATCATTTCCGATAAGGCTTG	100
IL-4	F:TCCTGCTCTTCTTTCTCG R:GCGTCCCTTCTCCTGTGACCTCGTT	101
IFN- γ	F:GCCTCATACTCATAACCTCA R:CATGCAGGACAGGGATAGCTTGAGC	142

表 3 各组小鼠体重变化情况(g)

Table 3 Changes of mice body weight in different groups(g)

组别 Groups	D0	D7	D14	D21	D28
对照组 Control group	17.23 ± 0.45	25.65 ± 0.51	31.00 ± 0.53	35.25 ± 0.23	37.95 ± 0.55
低剂量组 Low dose group	16.00 ± 1.54	26.50 ± 0.95	31.33 ± 0.84	36.45 ± 0.37	38.20 ± 0.57
中剂量组 Middle dose group	16.50 ± 1.60	28.13 ± 0.97	34.16 ± 0.78	38.12 ± 0.56 [#]	39.80 ± 0.72 [#]
高剂量组 High dose group	16.50 ± 1.56	25.31 ± 0.78	31.00 ± 0.56	36.05 ± 0.45 [#]	38.85 ± 0.50 [#]

注:与对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。(下图/表同)

Note. Compared with control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

2.2 复合微生态制剂对小鼠免疫器官指数的影响

由表 4 可以看出,灌胃复合微生态制剂第 14 天,不同剂量的复合微生态制剂均能不同程度提高小鼠的免疫器官指数,且中剂量组差异具有显著性

($P < 0.05$)。第 28 天,低剂量组和高剂量组小鼠的脾指数和胸腺明显高于对照组,且差异具有显著性($P < 0.05$);中剂量组免疫器官指数极显著高于对照组($P < 0.01$)。

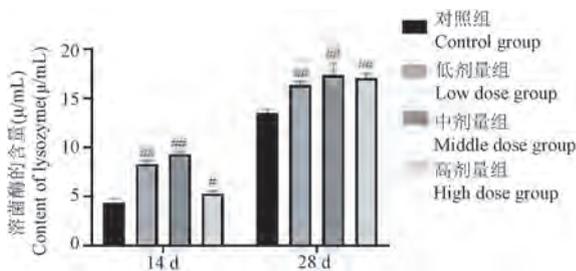
表 4 复合微生态制剂对免疫器官指数的影响

Table 4 Effect of the compound probiotics on immune organ index

组别 Groups	D14			D28		
	脾指数 Spleen index	淋巴结指数 Lymph node index	胸腺指数 Thymus index	脾指数 Spleen index	淋巴结指数 Lymph node index	胸腺指数 Thymus index
对照组 Control group	3.05 ± 0.02	3.14 ± 0.05	1.78 ± 0.10	3.15 ± 0.04	3.21 ± 0.07	1.83 ± 0.04
低剂量组 Low dose group	3.08 ± 0.03	3.15 ± 0.06	1.83 ± 0.08	3.93 ± 0.06 ^{##}	3.22 ± 0.07	1.98 ± 0.07 [#]
中剂量组 Middle dose group	3.20 ± 0.02 [*]	3.19 ± 0.07 [*]	1.92 ± 0.06 [#]	4.14 ± 0.05 ^{##}	3.35 ± 0.07 ^{##}	2.14 ± 0.06 ^{##}
高剂量组 High dose group	3.09 ± 0.02	3.16 ± 0.05	1.82 ± 0.04	3.68 ± 0.04 ^{##}	3.23 ± 0.07	2.08 ± 0.04 [#]

2.3 复合微生态制剂对血清溶菌酶含量的影响

由图 1 可知,在灌胃复合微生态制剂第 14 天和第 28 天,不同剂量的复合微生态制剂均能不同程度的提高小鼠血清中溶菌酶的含量。第 14 天,低剂量组和中剂量组小鼠的溶菌酶含量均明显高于对照组,且差异极具显著性($P < 0.01$);高剂量组小鼠的溶菌酶含量增加,差异具有显著性($P < 0.05$)。第 28 天,各实验组溶菌酶含量均明显高于对照组,差异极具显著性($P < 0.01$)。



注:与对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

图 1 复合微生态制剂对小鼠血清溶菌酶含量的影响

Note. Compared with control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

Figure 1 Effect of the compound probiotics on lysozyme in serum

2.4 复合微生态制剂对空肠黏膜免疫细胞因子含量的影响

由图 2 可知,小鼠灌胃复合微生态制剂第 14 天和第 28 天,低剂量组空肠黏膜的 IL-4 含量均呈不同程度高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);中剂量组空肠黏膜 IL-4 含量显著高于对照组($P < 0.01$);高剂量组空肠黏膜 IL-4 含量均无显著性差异($P > 0.05$)。第 14 天,中剂量组空肠黏膜 IL-10 含量高于对照组,差异具有显著性($P < 0.05$)。低剂量组和高剂量组空肠黏膜 IL-10 含量与对照组无显著性差异($P > 0.05$);第 28 天,各实验组小鼠空肠黏膜 IL-10 含量呈不同程度高于对照组,其中,低剂量组和高剂量组显著高于对照组($P < 0.05$),中剂量组空肠黏膜 IL-10 含量极显著增加($P < 0.01$)。小鼠在灌胃复合微生态制剂第 14 天和第 28 天,各实验组小鼠肠道黏膜 IFN- γ 含量呈不同程度高于对照组。与对照组相比,中剂量组空肠黏膜 IFN- γ 含量明显增加,差异极显著($P < 0.01$);低剂量组和高剂量组空肠黏膜 IFN- γ 含量明显增加,差异显著($P > 0.05$)。

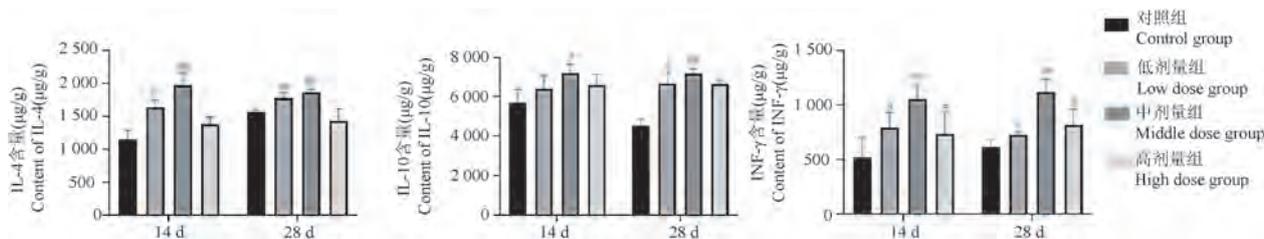


图 2 微生态复合制剂对 IL-4、IL-10 和 IFN-γ 含量的影响

Figure 2 Effect of the compound probiotics on IL-4, IL-10 and IFN-γ content

2.5 复合微生态制剂对空肠黏膜免疫细胞因子 mRNA 表达水平的影响

由图 3 可知,小鼠灌胃复合微生态制剂第 14 天和第 28 天,低剂量组空肠黏膜 IL-4、IL-10 mRNA 表达量与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$), IFN-γ

mRNA 表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)。中剂量组空肠黏膜 IL-4、IL-10 和 IFN-γ mRNA 表达量增加,差异极具显著性 ($P < 0.01$)。高剂量组空肠黏膜 IL-4、IL-10 和 IFN-γ mRNA 表达量不同程度高于对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

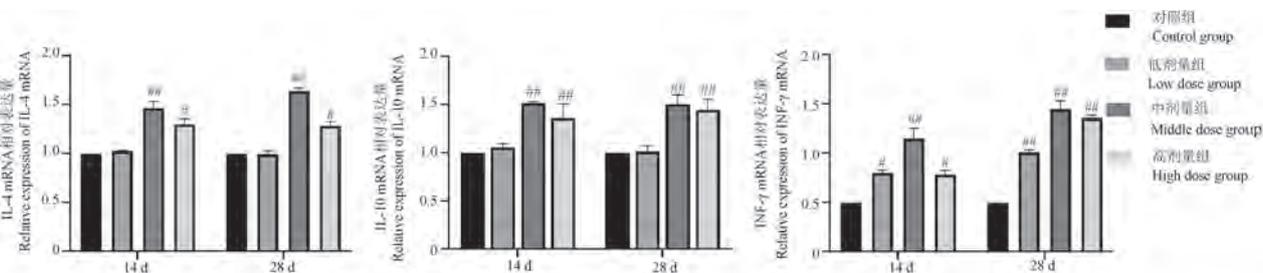


图 3 复合微生态制剂对 IL-4、IL-10 及 IFN-γ mRNA 表达水平的影响

Figure 3 Effect of the compound probiotics on the relative expression of IL-4, IL-10 and IFN-γ mRNA

2.6 复合微生态制剂对空肠黏膜 SIgA 含量的影响

由图 4 可知,小鼠灌胃复合微生态制剂第 14 天,低剂量组 SIgA 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$),中剂量组 SIgA 含量明显高于对照组,且差异极具显著性 ($P < 0.01$);高剂量组的含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。第 28 天,各实验组小鼠空肠黏膜 SIgA 含量均明显高于对照组,其中,中剂量组的 SIgA 含量显著高于对照组,差异极具显著性 ($P < 0.01$);低剂量组和高剂量组 SIgA 含量增加,差异均具有显著性 ($P < 0.05$)。

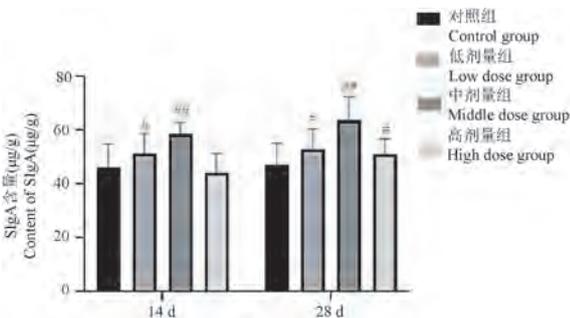


图 4 复合微生态制剂对空肠黏膜 SIgA 含量的影响

Figure 4 Effect of the compound probiotics on SIgA content in jejunal mucosa

3 讨论

免疫器官指数是评价机体免疫力的一项重要指标^[6],能反映身体免疫反应的水平,免疫器官指数升高代表机体免疫力提高,免疫器官指数降低则为机体免疫能力降低^[7-8]。脾、胸腺和淋巴结是机体的免疫器官,具有免疫功能,其中脾是免疫细胞储存的场所,能清除血液中异物、抗原及衰老死亡的红细胞^[9];胸腺是 T 细胞成熟的场所,参与机体细胞免疫^[10]。淋巴结具有滤过淋巴、产生淋巴细胞的作用,还能进行免疫应答。张雷等^[11]研究发现微生态制剂能够使雏鸡的免疫器官指数的增加,提高免疫力。本实验结果表明,不同剂量复合微生态制剂均可不同程度提高小鼠胸腺、淋巴结和脾的免疫器官指数,且中剂量组免疫器官指数高于其它两组,此结果与胡影等^[12]的研究结果一致。这说明复合微生态制剂在一定程度上促进小鼠免疫器官的生长、发育,可增强小鼠机体的免疫力。

溶菌酶作为一种体内碱性小分子量的蛋白水解酶,是单核细胞、中性粒细胞和巨噬细胞的产物,对革兰氏阳性菌有显著的抑菌效果^[13]。在动物体

正常的防御、非特异性免疫和免疫反应中起着重要的作用,是构成机体非特异性免疫系统的重要因子之一。通过测定溶菌酶的活力,可估测机体的非特异性免疫的能力^[14]。本研究中,灌胃不同剂量复合微生态制剂均可以增加小鼠血清中溶菌酶的含量,此结果与刘宇等^[15]的研究一致。由此可见,复合微生态制剂作用于小鼠后,可促进小鼠产生并释放出溶菌酶,从而增加机体杀菌、抗感染的能力。

肠道黏膜免疫系统是肠道屏障的重要组成部分,与肠道上皮细胞相互作用、相互影响,保护肠道免受细菌、病毒等微生物的粘附和入侵及防止异物的吸收,起到机体第一道防线的作用。复合微生态制剂是由酶制剂和益生菌复合制成的复合制剂,其中的益生菌能够在肠道内定殖并改善菌群平衡,对宿主健康有益。益生菌进入机体后可参与活化肠道相关淋巴组织,诱导 T、B 淋巴细胞和巨噬细胞分泌细胞因子,也可作用于肠道黏膜上皮细胞使黏膜局部 T 细胞增殖和活化产生白介素-4 (IL-4)、白介素-10 (IL-10) 和干扰素- γ (IFN- γ) 等细胞因子以及使 B 细胞产生 Ig, 直接或者间接调控肠道黏膜免疫^[16-18]。其中 IL-4 能够促进 Th0 细胞向 Th2 细胞分化,促进 B 淋巴细胞增殖分化,诱导 IgE 和 IgG 产生,也可促进 NK 细胞的增殖、分化使产生 IFN- γ 的能力增强,调节免疫反应应答^[19-20]。IL-10 属于 Th2 型细胞因子,主要由 Treg 细胞分泌,有抑制 Th1 细胞分泌 IL-2、IL-3、集落刺激因子和肿瘤坏死因子- α 的作用而发挥抗感染作用。同时,也可刺激 B 细胞分化增生,促进抗体生成^[21]。IFN- γ 主要由活化的 Th1 细胞和 NK 细胞产生,可刺激巨噬细胞活化的作用,促进抗原呈递细胞表达 MHC II 类分子,提高抗原递呈能力,增强 NK 细胞和 CTL 细胞的杀伤活性,促进 B 淋巴细胞分化、增殖;抗病毒感染和抗肿瘤作用^[22]。本研究发现复合微生态制剂可增加空肠黏膜 IL-4、IL-10 和 IFN- γ 的含量及 mRNA 表达水平,其结果与崔畅婉等^[23]的研究结果一致。低剂量组和中剂量组可促进小鼠肠道黏膜分泌 IL-4 和 IL-10,这可能是由于益生菌在黏膜表面和黏膜下层被肠黏膜淋巴样组织中的巨噬细胞吞噬并提取特征抗原传递给 T、B 淋巴细胞和其他免疫细胞。适量的益生菌可刺激调节性 T 淋巴细胞分化,使 Th0 细胞分化为 Th2 细胞,增加 IL-4、IL-10 的含量^[24-25]。复合微生态制剂可能通过不同途径来改善小鼠免疫功能。Rizzello 等^[26]认为,乳酸菌的免疫调节功

能主要体现在刺激 NK 细胞增殖并增强其细胞功能,从而增强动物机体的抵抗力。Fink 等^[27]报道嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌显著提高 NK 细胞的活力和杀菌能力。本研究中,灌服复合微生态制剂可以提高小鼠空肠黏膜 IFN- γ mRNA 表达水平及含量,这可能是由于嗜酸乳杆菌可通过 Toll 样受体 9 传导信号,增加小鼠派尔集合淋巴结中 IFN- γ 阳性细胞的数量^[28-29],且添加适量复合微生态制剂可以促进树突状 (DC) 细胞分泌白介素-12,白介素-12 可以激活 NK 细胞并促使其合成、分泌 IFN- γ ^[27,30] 从而抑制病毒的复制,起到免疫调节作用和增强抗病毒能力。

肠道黏膜免疫系统由多种免疫成分组成,分泌性免疫球蛋白 A (SIgA) 是肠道黏膜免疫的主要保护效应,是防御病原菌在肠道粘附和定植的第一道防线。SIgA 通过结合聚合免疫球蛋白受体 (pIgR)^[31],从基底外侧表面传输到黏膜表面,用于保护肠黏膜上皮细胞,提升消化道黏膜防御功能^[32]。有研究表明微生物种群的变化会影响固有免疫的激活,以维持黏膜稳态。Nagayama 等^[33]给小鼠灌胃酵母补充物后,小鼠的空肠的 SIgA 含量增加。本研究发现复合微生态制剂能够增加肠道黏膜 SIgA 的分泌,这可能是益生菌在肠道定植后,自身及代谢产物作为抗原物质被 M 细胞吞噬或内化形成内体, M 细胞内的抗原快速释放并被树状突细胞摄取,后者随之迁移至派尔集合淋巴结的 T 淋巴细胞区或系膜淋巴结,将抗原提呈给初始 T 淋巴细胞,激活 Th2 细胞,产生大量白介素-5,活化派尔集合淋巴结生发中心的 B 淋巴细胞,使其转化为浆细胞分泌 IgA,提高 SIgA 的含量水平^[34]。表明复合微生态制剂可促进小鼠空肠黏膜 IgA 浆细胞分泌 SIgA,提高 SIgA 在空肠黏膜的含量,增强小鼠空肠黏膜的免疫功能,减少肠道病原微生物的感染。

4 结论

复合微生态制剂能促进小鼠的生长,提高小鼠免疫器官指数及血液中溶菌酶的含量,增强小鼠抗感染的能力;复合微生态制剂能提高肠道黏膜免疫细胞因子的表达水平,促进肠道黏膜分泌免疫球蛋白,进而增强肠道黏膜免疫功能,减少肠道感染性疾病的发生。

参 考 文 献 (References)

[1] 农业部关于印发《全国遏制动物源细菌耐药行动计划(2017-

- 2020 年)》的通知 [J]. 中华人民共和国农业部公报, 2017, 7: 45-46.
- Notice of the Ministry of agriculture on printing and distributing the "national action plan to curb drug resistance of bacteria from animals (2017-2020)" [J]. Zhonghua Renmin Gongheguo Nongyebu Gongbao, 2017, 7: 45-46.
- [2] 任玉红, 裴婷, 王海东, 等. 一种酶与微生态制剂复合组剂及其制备方法: CN113439798A [P]. 2021-09-28.
- Ren YH, Pei T, Wang HD, et al. A kind of enzyme and microecological compound and preparation method there of CN113439798A [P]. 2021-09-28.
- [3] 程玉鑫. 干酪乳杆菌发酵蓝莓果渣对高脂膳食小鼠肠道屏障功能的调节作用及机制 [D]. 武汉: 华中农业大学; 2020.
- Chen YX. Lactobacillus casei fermentend blueberry pomace regulates the intestinal barrier function of high fat diet mice and the underlying mechanisms [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University; 2020.
- [4] 杨田田, 于龙魅, 刘二强, 等. 天蚕素 A-马盖宁杂合肽对小鼠小肠黏膜结构、小肠黏膜免疫功能和肠道菌群的影响 [J]. 动物营养学报, 2014, 26(11): 3387-3395.
- Yang TT, Yu LM, Liu EQ, et al. Effects of cecropin A-Magainin hybrid peptide on small intestinal mucosal structure, mucosal immune function and intestinal microflora in mice [J]. Chin J Anim Nutr, 2014, 26(11): 3387-3395.
- [5] 刘丹, 杨波, 蓝程, 等. 感染后肠易激综合征小鼠肠黏膜和血中细胞因子的表达变化 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2015, 36(6): 841-845.
- Liu D, Yang B, Lan C, et al. Altered expression of intestinal mucosa and blood cytokines in post-infectious irritable bowel syndrome mouse [J]. J Sun Yat-sen Univ (Med Sci), 2015, 36(6): 841-845.
- [6] 饶泽斌, 曾艳, 刘宇波, 等. 饲料添加干酪乳杆菌代田株对断奶仔猪生长性能、抗氧化功能和结肠生物胺的影响 [J]. 动物营养学报, 2021, 33(6): 3165-3175.
- Rao ZB, Zeng Y, Liu YB, et al. Effects of Lactobacillus casei Strain Shirota on growth performance, antioxidant function and bioamines in colon of weaned piglets [J]. Chin J Anim Nutr, 2021, 33(6): 3165-3175.
- [7] Xu B, Wu S, Han Q. Modulation of the growth performance and innate immunity of loaches (*Paramisgurnus dabryanus*) upon dietary mannan oligosaccharides [J]. 3 Biotech, 2021, 11(3): 133.
- [8] 巩萍, 孙铜, 戴晓莉, 等. 松花粉对环磷酰胺增效减毒作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 60-63.
- Gong P, Sun T, Dai XL, et al. Synergism and attenuation effects of Pini Pollen on cyclophosphamide [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(5): 60-63.
- [9] 阳帆, 康丹菊, 陈志宝, 等. 飞机草总黄酮对小鼠免疫调节功能的影响 [J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(5): 56-60.
- Yang F, Kang DJ, Chen ZB, et al. Effects of total flavonoids from *Pteris odorata* on immune regulation in mice [J]. J Tradit Chin Vet Med, 2020, 39(5): 56-60.
- [10] 艾西木江·热甫卡提, 尤力都孜·买买提, 阿不都热衣木·肉孜, 等. 土大黄根提取物对实验性银屑病小鼠组织器官形态学的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(9): 41-47.
- Haximjan R, Yultuz M, Abdiryim R, et al. Effects of *Rumex L.* root extract on the morphology of skin and some organs in mouse model of experimental psoriasis [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(9): 41-47.
- [11] 张雷, 王欢欢, 葛莹, 等. 饮用微生态制剂对雏鸡生产性能、免疫器官指数和肠道益生菌的影响 [J]. 浙江农业科学, 2020, 61(1): 196-198.
- Zhang L, Wang HH, Ge Y, et al. Effects of dietary microecological agents on growth performance, immune organ indexes and intestinal profitable microflora in chicks [J]. J Zhejiang Agr Sci, 2020, 61(1): 196-198.
- [12] 胡影, 曹云芳, 樊琼, 等. 酵母培养物对鹌鹑生长性能、免疫器官指数及肠道菌群的影响 [J]. 中国农学通报, 2019, 35(24): 144-149.
- Hu Y, Cao YF, Fan Q, et al. Effects of yeast culture on growth performance, immune organ index and intestinal flora of quail [J]. Chin Agr Sci Bull, 2019, 35(24): 144-149.
- [13] 张新帅, 阮瑶, 刘武康, 等. 致病菌抵抗溶菌酶机制的研究进展 [J]. 食品科学, 2020, 41(17): 298-306.
- Zhang XS, Ruan Y, Liu WK, et al. Mechanism of pathogen resistance to lysozyme: a review [J]. Food Sci, 2020, 41(17): 298-306.
- [14] 黄俊祥. 氟中毒对肉仔鸡血细胞数、血清溶菌酶和补体 C3、C4 含量的影响 [J]. 现代牧业, 2020, 4(2): 30-33.
- Huang JX. Dietary high fluoride decreased the blood cells number, serum lysozyme and complement content in chickens [J]. Modern Anim Husbandry, 2020, 4(2): 30-33.
- [15] 刘宇, 朱战波, 孙秀军, 等. 复合活菌制剂对断奶仔猪生长性能及血清溶菌酶含量的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(9): 784-787.
- Liu Y, Zhu ZB, Sun XJ, et al. Effect of live microbe preparation on the growth performance and serum sozyme content in weaned piglets [J]. Chin J Microcol, 2010, 22(9): 784-787.
- [16] Shan M, Gentile M, Yeiser JR, et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals [J]. Science, 2013, 342(6517): 447-453.
- [17] Ding S, Yan W, Ma Y, et al. The impact of probiotics on gut health via alternation of immune status of monogastric animals [J]. Anim Nutr, 2021, 7(1): 24-30.
- [18] Christensen HR, Frøkiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells [J]. J Immunol, 2002, 168(1): 171-178.
- [19] Szkodzinski J, Hudzik B, Osuch M, et al. Serum concentrations of interleukin-4 and interferon-gamma in relation to severe left ventricular dysfunction in patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention [J]. Heart Vessels, 2011, 26(4): 399-407.
- [20] Kotowicz K, Dixon GL, Klein NJ, et al. Biological function of

- CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes [J]. *Immunology*, 2000, 100(4): 441-448.
- [21] 周建光, 杨梅, 华川. IL-10 与自身免疫性疾病关系的研究进展 [J]. *医学综述*, 2012, 4(17): 2743-2745.
Zhou JG, Yang M, Hua C. Research progress on the relationship between IL-10 and autoimmune diseases [J]. *Med Recapitulate*, 2012, 4(17): 2743-2745.
- [22] 吴艳梅, 张颖, 周琳, 等. 四君子汤对脾虚小鼠感染念珠菌后血清中 IFN- γ 含量及腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(8): 182-185, 225.
Wu YM, Zhang Y, Zhou L, et al. Effect of Sijunzi decoction on serum INF- γ content and peritoneal macrophage in spleen deficiency mice infected with candida [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2020, 47(8): 182-185, 225.
- [23] 崔畅婉, 于淼, 吴思, 等. 骆驼奶对小鼠肠道黏膜免疫功能的影响 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2018, 38(2): 106-110.
Cui CW, Yu M, Wu S, et al. Effects of camel milk on intestinal mucosal immune function in mice [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2018, 38(2): 106-110.
- [24] Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, et al. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic lactobacillus rhamnosus Lcr35 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): 56-63.
- [25] 鄯素会, 潘颖, 高丽洁. 益生菌对肠道黏膜免疫的调节作用 [J]. *临床合理用药杂志*, 2016, 9(14): 179-181.
Xi SH, Pan Y, Gao LJ. Regulation of probiotics on intestinal mucosal immunity [J]. *Chin J Clin Rat Drug Use*, 2016, 9(14): 179-181.
- [26] Rizzello V, Bonaccorsi I, Dongarrà ML, et al. Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 473097.
- [27] Fink LN, Zeuthen LH, Christensen HR, et al. Distinct gut-derived lactic acid bacteria elicit divergent dendritic cell-mediated NK cell responses [J]. *Int Immunol*, 2007, 19(12): 1319-1327.
- [28] 林如琴, 吴娴波, 张益多, 等. 嗜酸乳杆菌抑制大肠杆菌 O157:H7 肠道定植体内外实验 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(16): 2603-2607.
Lin RQ, Wu XB, Zhang YD, et al. Inhibiting effect of Lactobacillus acidophilus on intestinal colonization of enterohaemorrhagic *E.coli* O157:H7 *in vitro* and *vivo* [J]. *J Pract Med*, 2016, 32(16): 2603-2607.
- [29] Dogi CA, Weill F, Perdigón G. Immune response of non-pathogenic gram(+) and gram(-) bacteria in inductive sites of the intestinal mucosa study of the pathway of signaling involved [J]. *Immunobiology*, 2010, 215(1): 60-69.
- [30] Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8 T cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(10): 645-657.
- [31] Sun H, Bi J, Lei Q, et al. Partial enteral nutrition increases intestinal sIgA levels in mice undergoing parenteral nutrition in a dose-dependent manner [J]. *Int J Surg*, 2018, 49: 74-79.
- [32] Kengang TS, Kapila S, Shanmugam VP, et al. Fermented milk with probiotic Lactobacillus rhamnosus S1K3 (MTCC5957) protects mice from salmonella by enhancing immune and nonimmune protection mechanisms at intestinal mucosal level [J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 30: 62-73.
- [33] Nagayama T, Sugimoto M, Ikeda S, et al. Effects of astaxanthin-enriched yeast on mucosal IgA induction in the jejunum and ileum of weanling mice [J]. *Anim Sci J*, 2014, 85(4): 449-453.
- [34] 张鑫, 郭军. 益生菌与肠道黏膜免疫研究进展 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2017, 38(11): 58-64.
Zhang X, Guo J. Research progress on association of probiotics with intestinal mucosal immunity [J]. *Anim Husb Feed Sci*, 2017, 38(11): 58-64.

[收稿日期] 2021-07-16

高杰,夏聪聪,张亚莉,等. 巨噬细胞 MED1 缺失对小鼠血糖水平及胰岛素抵抗的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 253-259.

Gao J, Xia CC, Zhang YL, et al. Effects of macrophage MED1 deficiency on blood glucose levels and insulin resistance in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 253-259.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.014

巨噬细胞 MED1 缺失对小鼠血糖水平及胰岛素抵抗的影响

高杰^{1,2}, 夏聪聪², 张亚莉², 姚雷清², 席雨燕², 邹宇佳², 王令^{1*}, 白亮², 刘恩岐²

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2. 西安交通大学医学部基础医学院, 西安 710061)

【摘要】 目的 研究巨噬细胞 MED1 在胰岛素抵抗发生中的调控作用。方法 选用 8 周龄 SPF 级雄性巨噬细胞 MED1 敲除 (MED1^{ΔMac}) 和野生型 (MED1^{fl/fl}) 小鼠为模型, 给予高脂饮食饲喂 0、4、8、12、16 和 20 周, 诱导肥胖和胰岛素抵抗发生。在高脂饮食饲喂的不同时期, 动态检测体重、总甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC) 和血糖水平。高脂饲喂 20 周后, 通过苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝和脂肪组织病理学改变。结果 高脂饮食饲喂后, 与 MED1^{fl/fl} 对照组小鼠相比, MED1^{ΔMac} 小鼠体重有升高的趋势, 但无显著性差异, 且两组小鼠血浆 TC 和 TG 无差异。两组小鼠血糖在高脂饮食饲喂的 0、4、8、12 和 16 周均无明显差异, 但在 20 周时, MED1^{ΔMac} 小鼠血糖显著升高 ($P < 0.01$), 肝脂肪变性增强, 而且 MED1^{ΔMac} 小鼠肝重量、皮下脂肪和内脏脂肪均有增加趋势。进一步葡萄糖耐受性试验 (glucose tolerance test, GTT) 和胰岛素耐受性试验 (insulin tolerance test, ITT) 表明, 两组小鼠的葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性无明显差异。结论 巨噬细胞 MED1 缺失促使血糖水平升高、肝脂肪变性, 但对胰岛素抵抗无明显影响, 提示巨噬细胞 MED1 在糖代谢中可能具有关键调控作用。

【关键词】 MED1; 炎症; 巨噬细胞; 胰岛素抵抗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0253-07

Effects of macrophage MED1 deficiency on blood glucose levels and insulin resistance in mice

GAO Jie^{1,2}, XIA Congcong², ZHANG Yali², YAO Leiqing², XI Yuyan², ZOU Yujia²,
WANG Ling^{1*}, BAI Liang², LIU Enqi²

(1. School of Biological Science Technology and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China.

2. Laboratory Animal Center, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710061)

Corresponding author: WANG Ling. E-mail: wl@snut.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the regulatory role of macrophage MED1 in the development of insulin resistance. **Methods** Eight-week-old and specific-pathogen-free male macrophage-specific MED1 knockout (MED1^{ΔMac}) and wild-type (MED1^{fl/fl}) mice were used in this animal model study. Mice were fed a high-fat diet (HFD) for 0, 4, 8, 12, 16, 20 weeks to induce obesity and insulin resistance. Body weight, total triglyceride, total cholesterol and blood glucose were dynamically monitored every 4 weeks. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe liver and adipose histopathology after an HFD for 20 weeks. **Results** After an HFD regime, the body weight increase of MED1^{ΔMac} mice tended to be greater than that of the MED1^{fl/fl} control group. The blood glucose of MED1^{ΔMac} mice increased significantly ($P < 0.01$) compared with that of MED1^{fl/fl} mice after an HFD for 20 weeks. Compared with the MED1^{fl/fl} mice, the liver

【基金项目】 中国博士后科学基金资助项目 (2020M673424)。

Funded by the China Postdoctoral Science Foundation (2020M673424).

【作者简介】 高杰 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 脂质代谢。Email: gjsxlgdx@163.com

【通信作者】 王令 (1985—), 男, 副教授, 研究方向: 功能基因与基因组学研究。Email: wl@snut.edu.cn

weight, subcutaneous fat weight and visceral fat weight of $MED1^{\Delta Mac}$ mice also showed a tendency to increase. In addition, the hepatic steatosis was more severe in $MED1^{\Delta Mac}$ mice than in $MED1^{fl/fl}$ mice. Furthermore, a glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) showed no significant difference in glucose tolerance or insulin sensitivity between the two groups. **Conclusions** Deficiency of macrophage $MED1$ promoted an increase in blood glucose levels but had no obvious effect on insulin resistance, suggesting macrophage $MED1$ has a key regulatory role in glucose metabolism.

【Keywords】 $MED1$; inflammation; macrophage; insulin resistance

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

糖代谢紊乱、胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 与多种代谢综合征如 2 型糖尿病、肥胖、动脉粥样硬化等心血管代谢性疾病存在着密切的相关关系,严重危害人类健康和生活质量^[1-3]。迄今为止,由于糖代谢紊乱、胰岛素抵抗病因复杂,发病机制与病理过程尚未完全阐明,故仍缺乏有效的预防与治疗策略。慢性炎症是诱导胰岛素抵抗病理过程的关键因素^[4-5]。已有研究表明,脂肪过多积累引起的炎症和脂质代谢异常可导致肥胖相关胰岛素抵抗的发生。肥胖小鼠实验研究表明,巨噬细胞浸润脂肪组织,分泌产生 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 等炎症细胞因子,使机体处于低度炎症反应状态^[4]。提示巨噬细胞相关的炎症活动可能参与胰岛素抵抗的发生。

转录辅激活子 $MED1$ 是 Mediator 复合物的核心成员,是多种核受体和转录因子的关键辅激活子,调控机体各种生物学过程,如生殖、发育、分化和代谢等^[6]。Chen 等^[7]研究表明,骨骼肌 $MED1$ 特异性敲除之后,小鼠葡萄糖耐受性提高以及胰岛素敏感性增强,并且能够抵抗高脂饮食诱导的肥胖。前期研究发现,肝 $MED1$ 具有调控胰岛素敏感性的作用^[8];同时进一步研究显示,巨噬细胞 $MED1$ 的表达显著影响机体炎症反应程度^[9]。据此,我们猜想 $MED1$ 通过巨噬细胞参与糖代谢及胰岛素抵抗的发生发展。为探讨巨噬细胞 $MED1$ 调控胰岛素抵抗发生的作用,本研究通过构建肥胖模型,在不同时期分析 $MED1^{\Delta Mac}$ 小鼠血糖水平和胰岛素抗性,为预防和治疗胰岛素抵抗及代谢综合征提供了理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

$MED1^{fl/fl}$ 小鼠由美国西北大学 Feinberg 医学院 Janardan K. Reddy 教授赠送,通过与巨噬细胞特异性 Cre (Lyz2-Cre) 小鼠 (购买自美国 Jackson 实验

室) 杂交,获得 $MED1^{\Delta Mac}$ 和同窝野生型对照 $MED1^{fl/fl}$ 小鼠【SCXK (陕) 2018-001】。选取 9 只 $MED1^{fl/fl}$ 和 7 只 $MED1^{\Delta Mac}$ SPF 级雄性小鼠,8 周龄,体重约为 21 g。饲养期间,全部动物均在西安交通大学医学部实验动物中心【SYXK (陕) 2020-005】无特定病原菌 (specific pathogen free, SPF) 屏障设施内饲养,各组小鼠自由饮水。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医学部实验动物管理法规定 (审批号: IACUC 2017581)。

1.1.2 主要试剂与仪器

200 mg/mL 葡萄糖溶液 (G8270-100G), 60% Kcal 高脂饲料 (D12492), 胰岛素注射液 (KVG574), TG (198021)、TC (192061) 试剂盒, 4% 甲醛 (ISO014), hematoxylin (G1005-1), eosin (G1005-2)。

血糖仪 (Ascensia Diabetes Cares Holdings AG, Contour plus one, 印度尼西亚), 毛细管离心机 (凯达, TG12 M, 中国), 全波长酶标仪 (TECAN, Infinite M200 Pro, 瑞士), 莱卡切片机 (LEIKA, RM2235, 德国), 正置光学显微镜 (尼康, Nikon Eclipse E100, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

动物分为两组: $MED1^{fl/fl}$ 对照组和 $MED1^{\Delta Mac}$ 敲除组。分别给予高脂饮食 (HFD) 饲喂 0、4、8、12、16 和 20 周, 动态监测体重、血糖和胰岛素抗性。

1.2.2 葡萄糖耐受性试验 (glucose tolerance test, GTT) 和胰岛素耐受性试验 (insulin tolerance test, ITT)

GTT 实验: 小鼠禁食 16 h 腹腔注射葡萄糖 (2 g/kg), 尾部取血, 运用血糖仪分别于注射后 0、30、60、90 和 120 min 测定血糖水平。

ITT 实验: 小鼠禁食 4 h, 腹腔注射胰岛素 (0.75 U/kg), 尾部取血, 运用血糖仪分别于注射后 0、30、60、90 和 120 min 测定血糖水平。

1.2.3 血浆与肝 TG、TC 测定分析

禁食 4 h, 毛细管采集尾部血样, 3000 r/min 离心 15 min, 收集血浆, 测定血浆 TG、TC 含量。

1.2.4 组织病理学检测

高脂饮食饲喂结束后, 取小鼠肝和白色脂肪组织, 4% 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 制作石蜡切片 (4 μm), HE 染色后, 10 × 20 倍镜下观察肝、脂肪细胞形态, 用 Image J 软件分析脂肪细胞大小。

1.3 统计学分析

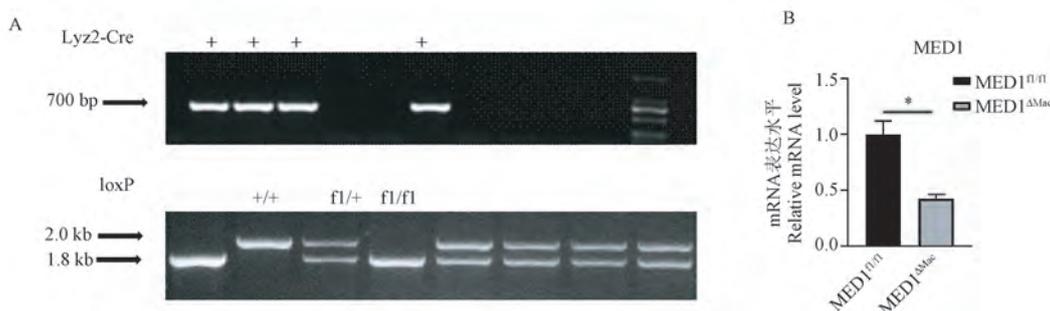
结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有数据采用 SPSS 13.0 和 GraphPad Prism 8 软件处理, 多组间比较使用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 巨噬细胞 MED1 敲除 (MED1^{ΔMac}) 小鼠模型构建

为了确定 MED1 在胰岛素抵抗发生中的调控作用, 我们构建了 MED1^{ΔMac} 模型鼠。具体构建过程

为: 将 8 周龄左右 MED1^{fl/fl} 小鼠与 Lyz2-Cre 小鼠进行交配, 获得 MED1^{fl/+}/Lyz2-Cre^{+/-} 杂合小鼠, 此小鼠再与 MED1^{fl/+}/Lyz2-Cre^{-/-} 小鼠杂交, 筛选获得 MED1^{ΔMac} 小鼠。以子代小鼠尾巴基因组 DNA 为模板, 运用 loxP 引物进行 PCR 扩增, 获得的 1.8 kb 片段代表筛选出的小鼠均带有两个 loxP 位点, 2.0 kb 片段代表野生型小鼠, 若同时出现 1.8 kb 和 2.0 kb 条带, 则代表杂合小鼠。运用 Cre 引物进行扩增获得 700 bp 的片段, 表明筛选出的小鼠是 Cre 阳性 (+) (图 1A)。如果小鼠携带 fl/fl 位点, 同时 Cre 阳性, 则表明巨噬细胞 MED1 基因被敲除, 即 MED1^{ΔMac} 小鼠。为进一步确定巨噬细胞 MED1 的敲除效率, 我们分别从 mRNA 水平检测 MED1 的表达。分离培养 MED1^{fl/fl} 和 MED1^{ΔMac} 小鼠腹腔巨噬细胞, 提取总 RNA, RT-PCR 结果表明, 与 MED1^{fl/fl} 小鼠相比, MED1^{ΔMac} 小鼠巨噬细胞中 MED1 mRNA 表达水平显著降低 (*P* < 0.05) (图 1B)。以上实验结果表明, MED1^{ΔMac} 小鼠模型构建成功, 为后续功能学实验研究奠定了坚实的基础。



注: A: Lyz2-cre 和 loxP 引物进行 PCR (+: Lyz2-cre 阳性小鼠; fl/fl; 双 loxP 位点小鼠; fl/+; 单 loxP 位点小鼠; +/+; 无 loxP 位点小鼠); B: 腹腔巨噬细胞 MED1 mRNA 表达情况; 与 MED1^{fl/fl} 小鼠相比, * *P* < 0.05。

图 1 巨噬细胞 MED1 敲除小鼠基因型鉴定

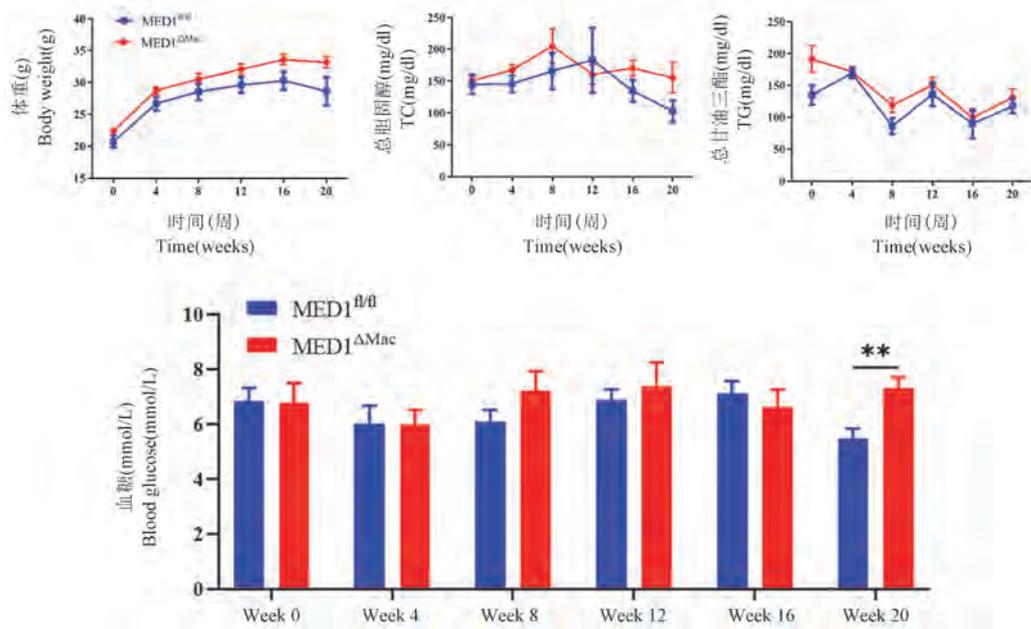
Note. A. PCR Genotyping of MED1^{fl/fl} and MED1^{ΔMac} mice using Lyz2-cre and loxP primer (+, Lyz2-cre positive mice. fl/fl. Double loxP locus mice. fl/+. Single loxP locus mice. +/+. loxP free mice). B. Statistical analysis of expression of MED1 in peritoneal macrophage by RT-PCR. Compare with MED1^{fl/fl} mice, * *P* < 0.05.

Figure 1 Genotyping of macrophage-specific MED1 knockout mice

2.2 巨噬细胞 MED1 参与血糖调控, 但不影响胰岛素抗性

选用 8 周龄 MED1^{fl/fl} 和 MED1^{ΔMac} 雄性小鼠为模型, 分别给予高脂饮食 0、4、8、12、16 和 20 周, 诱导小鼠肥胖发生。在高脂饮食饲喂的不同时期, 动态检测体重、TG、TC 和血糖水平。从图 2 可以看出, 高脂饮食饲喂后, 与 MED1^{fl/fl} 小鼠相比, MED1^{ΔMac} 小鼠体重有升高的趋势, 但无显著性差

异, 且两组小鼠血浆 TC 和 TG 无差异。两组小鼠血糖在高脂饮食饲喂的 0、4、8、12 和 16 周均无明显差异, 但在 20 周时, MED1^{ΔMac} 小鼠血糖显著升高 (*P* < 0.01) (图 2), 而且, MED1^{ΔMac} 小鼠肝重量、皮下脂肪和内脏脂肪均有增加趋势 (图 3)。然而, 进一步葡萄糖耐受性试验和胰岛素耐受性试验表明, 两组小鼠的葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性无明显差异 (图 4)。



注: MED1^{fl/fl}: 野生型小鼠; MED1 Δ^{Mac} : MED1 基因敲除小鼠; 与 MED1^{fl/fl} 小鼠相比, ** $P < 0.01$ 。

图 2 高脂饮食诱导下巨噬细胞 MED1 缺失小鼠体重、血糖和 TC、TG 变化

Note. MED1^{fl/fl}. Wild-type mice. MED1 Δ^{Mac} . MED1 knockout mice. Compared with MED1^{fl/fl} mice, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Changes in body weight, blood glucose, TC and TG of macrophage-specific MED1 knockout mice induced by HFD

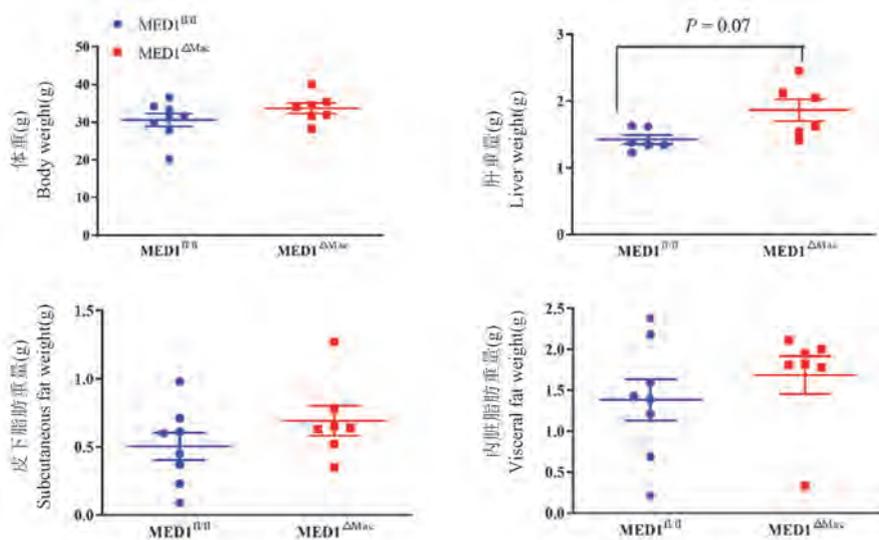


图 3 HFD 饲喂 20 周后巨噬细胞 MED1 缺失小鼠肝和脂肪重量

Figure 3 Liver and fat weight of macrophage-specific MED1 knockout mice after 20 weeks of HFD feeding

2.3 巨噬细胞 MED1 缺失促进肝脂肪变性、内脏脂肪细胞扩张

为评估巨噬细胞 MED1 缺失对肝脂肪变性的作用,在 HFD 20 周后处理小鼠,肝石蜡切片进行 HE 染色,结果表明,喂食 HFD 的 MED1^{fl/fl} 小鼠的肝细胞被大的细胞质脂质液滴扩张,而这种效应在喂食 HFD 的 MED1 Δ^{Mac} 小鼠中更为明显(见图 5)。

同时为了评估巨噬细胞 MED1 敲除对脂肪组

织炎性细胞浸润的影响,我们在皮下脂肪组织(sWAT)、内脏脂肪组织(gWAT)石蜡切片进行 HE 染色,研究表明,无论是皮下脂肪组织还是内脏脂肪组织,喂食 HFD 的 MED1 Δ^{Mac} 小鼠与其对照组相比有巨噬细胞积累但并未看到明显巨噬细胞浸润(图 6A),而 MED1 Δ^{Mac} 小鼠内脏脂肪细胞面积更大,小鼠皮下脂肪细胞大小未见明显差异(图 6B)。

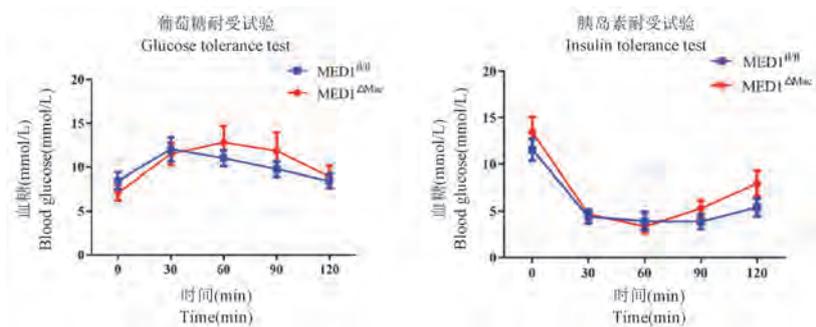


图 4 HFD 饲养 20 周后巨噬细胞 MED1 缺失小鼠 GTT 和 ITT 测定

Figure 4 Determination of GTT and ITT of macrophage-specific MED1 knockout mice after 20 weeks of HFD feeding

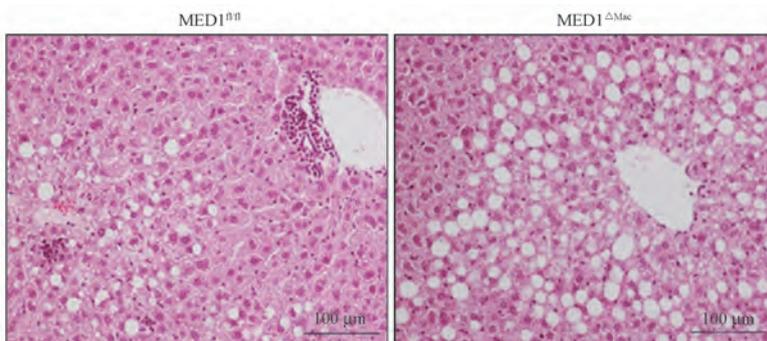
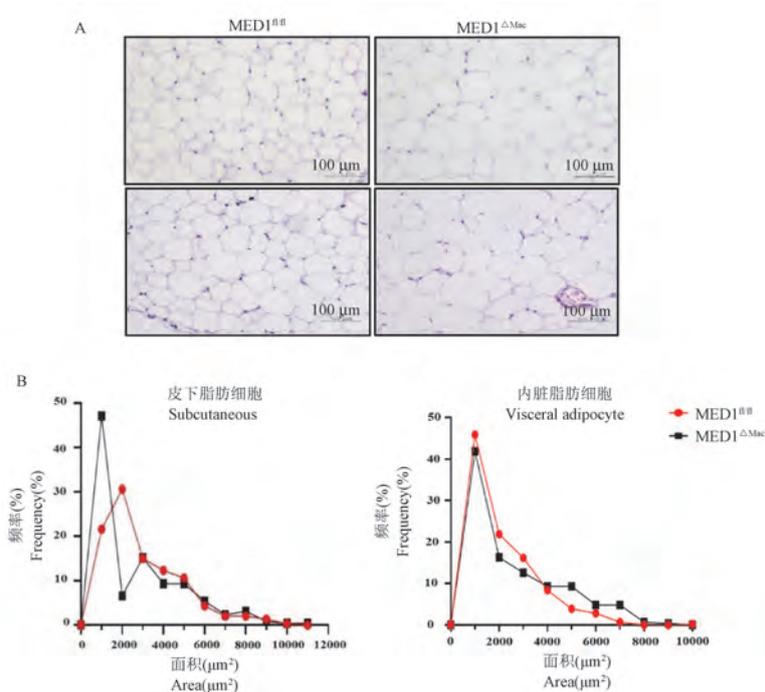


图 5 小鼠肝切片 HE 染色

Figure 5 HE staining of mouse liver tissue



注: A:脂肪组织 HE 染色; B:脂肪细胞面积频率。

图 6 HFD 饲养 20 周后 MED1^{fl/fl} 和 MED1^{ΔMac} 小鼠内脏、皮下脂肪 HE 染色及脂肪细胞大小分布

Note. A. HE staining of fat tissue. B. Adipocyte area frequency.

Figure 6 HE staining of fat tissue and adipocyte size distribution in MED1^{fl/fl} and MED1^{ΔMac} mice after 20 weeks of HFD feeding

3 讨论

近年来,肥胖是导致胰岛素抵抗的主要危险因素,肥胖与脂肪细胞功能紊乱、巨噬细胞浸润和轻度炎症有关。脂肪组织合成并分泌多种生物活性分子,即脂肪因子和细胞因子,它们影响脂质和葡萄糖的代谢。有研究表明,胰岛素抵抗程度会由于血清脂肪酸代谢作用的不同而变化^[10]。根据资料显示,具有生物活性的脂质分子:长链酰基辅酶 A、神经酰胺和二酰甘油,这些脂质在脂肪细胞中的积累可能与胰岛素抵抗的发生有关^[11]。目前认为,巨噬细胞在诱导胰岛素抵抗病理过程中扮演重要角色。巨噬细胞是一种具有高度可塑性和异质性的细胞群体,在体内外不同微环境细胞因子和微生物产物的影响下可表现出不同的表型和功能。根据活化状态和功能不同,主要分为 M1 型和 M2 型^[12]。M1 和 M2 型巨噬细胞在肥胖诱导胰岛素抵抗的发生、发展中分别起到促进和抑制的作用。M1 型巨噬细胞浸润脂肪组织,促炎症反应因子如 TNF- α 、IL-6 等释放增多,使机体所处于的低度慢性炎症状态,通过胰岛素干扰信号传导通路引起肝、骨骼肌及脂肪组织的胰岛素抵抗。

MED1 是转录调控复合物的关键辅激活因子,其调控多个基因表达,亦是组织中脂质和能量代谢的关键调控者。本课题组前期发现肝 MED1 特异性敲除(MED1^{Δiv})小鼠能够抵抗高脂饮食和 PPAR γ 诱导的脂肪肝形成,增强胰岛素敏感性。有研究报道骨骼肌 MED1 特异敲除小鼠葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性均增强,能够抵抗高脂饮食诱导的肥胖^[7]。而本研究中,我们发现巨噬细胞 MED1 特异性敲除小鼠对胰岛素的敏感性并没有增强,可能是 MED1 在不同细胞的功能差异引起,具体机制还需进一步研究解析。

MED1 是 PPARs 的关键辅激活子,PPAR α 激动剂能减缓 NAFLD 大鼠脂质代谢失调,具有适度的胰岛素增敏作用^[13]。Jia 等^[14]研究发现,与 PPAR α 缺失表型相似,肝实质细胞 MED1 缺失导致脂肪酸氧化代谢相关基因的表达受到严重阻滞。肝 MED1 缺失能够减弱糖皮质激素受体激活剂诱导的肝细胞脂肪变性^[15]。在本研究中,我们试图确定巨噬细胞 MED1 缺失是否影响胰岛素抵抗,在巨噬细胞

MED1 缺失时,通过生理状态下肥胖导致的慢性炎症来探究对胰岛素抵抗的影响。通过 HFD 饲喂,巨噬细胞 MED1 缺失小鼠更能表现出肥胖、血浆胆固醇和甘油三酯水平的升高,葡萄糖耐量和胰岛素耐量的受损,尽管两组之间的差异并不显著,但仍可提示巨噬细胞 MED1 缺失在胰岛素抵抗中发挥的作用,而结果不显著可能与生理状态下肥胖导致的免疫细胞募集较慢产生的慢性炎症有关,因此可能没有较多的巨噬细胞浸润,我们可以尝试用注射脂多糖诱发小鼠快速炎症反应来观察巨噬细胞 MED1 缺失后对靶组织的作用;而对于靶组织而言,在 HFD 喂养下主要表现为肥胖和巨噬细胞浸润,这点在肝组织中较为明显,因此,当巨噬细胞 MED1 缺失后,可能促进了胰岛素抵抗的发生发展。

本研究以巨噬细胞 MED1 特异性敲除小鼠为动物模型,发现巨噬细胞缺失 MED1 引起 HFD 诱导的血糖水平升高,肝脂肪变性和脂肪细胞增大,但无显著胰岛素抵抗,为后续 MED1 功能解析和巨噬细胞介导的肥胖性炎症研究提供参考。

参 考 文 献(References)

- [1] Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders [J]. Nature, 2017, 542(7640): 177-185.
- [2] Rosen ED. Epigenomic and transcriptional control of insulin resistance [J]. J Intern Med, 2016, 280(5): 443-456.
- [3] Lee YS, Wollam J, Olefsky JM. An integrated view of immunometabolism [J]. Cell, 2018, 172(1-2): 22-40.
- [4] Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance [J]. Clin Invest, 2006, 116(7): 1793-1801.
- [5] Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance [J]. J Clin Invest, 2003, 112(12): 1821-1830.
- [6] Zhu Y, Qi C, Jain S, et al. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor [J]. J Biol Chem, 1997, 272(41): 25500-25506.
- [7] Chen W, Zhang XT, Birsoy K, et al. A muscle-specific knockout implicates nuclear receptor coactivator MED1 in the regulation of glucose and energy metabolism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(22): 10196-10201.
- [8] Bai L, Jia Y, Viswakarma N, et al. Transcription coactivator mediator subunit MED1 is required for the development of fatty liver in the mouse [J]. Hepatology, 2011, 53(4): 1164-1174.
- [9] Bai L, Li Z, Li Q, et al. Mediator 1 is atherosclerosis protective

- by regulating macrophage polarization [J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2017, 37(8): 1470-1481.
- [10] 高青松, 刘源, 赵爽, 等. 不同类型脂肪酸对 SD 大鼠血清脂肪酸及胰岛素抵抗的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(5): 50-56.
- Gao QS, Liu Y, Zhao S, et al. Effects of different types of fatty acids on serum fatty acid and insulin resistance in SD rats [J]. *Chin J Comp Med*, 2010, 20(5): 50-56.
- [11] Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance; common threads and missing links [J]. *Cell*, 2012, 148(5): 852-871.
- [12] Chawla A. Control of macrophage activation and function by PPARs [J]. *Circ Res*, 2010, 106(10): 1559-1569.
- [13] 石巧娟, 刘月环, 楼琦, 等. 非酒精性脂肪肝大鼠 PPAR α 基因表达及脂代谢和胰岛素水平的变化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(8): 26-30.
- Shi QJ, Liu YH, Lou Q, et al. Changes of PPAR α gene expression and lipid metabolism and insulin levels in rats with non-alcoholic fatty liver [J]. *Chin J Comp Med*, 2009, 19(8): 26-30.
- [14] Jia Y, Qi C, Kashireddi P, et al. Transcription coactivator PBP, the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein, is required for PPAR α -regulated gene expression in liver [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(23): 24427-2434.
- [15] Jia Y, Viswakarma N, Fu T, et al. Conditional ablation of mediator subunit MED1 (MED1/PPARBP) gene in mouse liver attenuates glucocorticoid receptor agonist dexamethasone-induced hepatic steatosis [J]. *Gene Expr*, 2009, 14(5): 291-306.

[收稿日期] 2021-07-15

李帝均,王桂杉,刘海峰,等. 肌腱病动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 260-266.

Li DJ, Wang GS, Liu HF, et al. Advances in research into animal experimental models of tendinopathy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 260-266.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.015

肌腱病动物模型的研究进展

李帝均^{1,2}, 王桂杉^{1,2}, 刘海峰^{1,2}, 王斌^{1,2,3*}

(1. 山西医科大学第二医院骨科, 太原 030001; 2. 骨与软组织损伤修复山西省重点实验室, 太原 030001;
3. 浙江大学医学院第一附属医院, 杭州 310006)

【摘要】 肌腱病(tendinopathy)的患病率近年来在世界范围内持续上升,给人们带来巨大经济负担和精神压力,不同程度降低了人类生活质量。现有治疗方案仍无法对该类疾病实现治愈,动物模型是研究肌腱病的重要工具,在肌腱病病理生理改变以及治疗方式的研究中发挥至关重要的作用。本文综述了近些年国内外肌腱病动物模型研究现状,探讨了几种常见造模方案的优缺点,同时对造模动物和造模部位的选择、损伤肌腱的改变进行了阐述,旨在为今后研究者选择更为合适、高效的动物实验模型提供参考。

【关键词】 肌腱病;动物模型;造模方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0260-07

Advances in research into animal experimental models of tendinopathy

LI Dijun^{1,2}, WANG Guishan^{1,2}, LIU Haifeng^{1,2}, WANG Bin^{1,2,3*}

(1. the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China. 2. Shanxi Key Laboratory of Bone and Soft Tissue Injury Repair, Taiyuan 030001. 3. the First Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006)

Corresponding author: WANG Bin. Email: wangbin_pku@163.com

【Abstract】 The incidences of tendinopathies have been increasing worldwide in recent years, causing huge economic burdens and mental stress in patients and reducing the quality of human life to varying degrees. Animal models are important tools in tendinopathy research and play a crucial role in the study of pathophysiological changes and novel treatment modalities. This article reviews the status of animal models developed in recent years and discusses the advantages and disadvantages of several common modeling protocols, including the choice of modeling animal and modeling site and the alterations to injured tendons, with the aim of providing a reference to help future researchers select suitable and efficient animal models.

【Keywords】 tendinopathy; animal models; building models

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

肌腱病是由于过度使用、代谢以及血管改变等因素而造成的肌腱微损伤,常引起局部疼痛、肿胀并伴有不同程度的运动能力丧失的一系列综合征^[1-2],微观表现为受影响肌腱的结构、成分和细胞

异常^[3]。目前我国肌腱病的患病率呈逐年上升,给人们带来了巨大的经济负担和精神负担^[4]。现有的肌腱病治疗方式主要包括:物理治疗、非甾体消炎药、局部注射糖皮质激素、富血小板血浆等^[5]。

【基金项目】 国家自然科学基金(81802204),中国博士后科学基金(2020M671453)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81802204), Postdoctoral Science Foundation of China(2020M671453).

【作者简介】 李帝均(1994—),在读硕士研究生,研究方向:干细胞及骨关节炎基础研究。Email: lidijun0113@163.com

【通信作者】 王斌(1984—),男,副主任医师,医学博士,硕士生导师,研究方向:骨关节炎相关研究。Email: wangbin_pku@163.com

目前虽然治疗方式众多,但是仍缺乏安全有效的治疗方法,这也一直是国内外研究的重点及热点,同时需要更优的动物模型开展临床前研究,为进一步治疗方案的临床转化与研发提供重要依据。本文通过查阅相关文献总结并归纳,从实验动物的选择、损伤部位、动物造模方法等方面展开综述。

1 实验动物的选择

通过查阅文献并计算,目前应用于肌腱病模型研究的各动物占比约为:大鼠(53%)、小鼠(14.5%)、兔(14.5%)、羊(11%)、马(6%)、狒狒(<1%)。

1.1 小鼠

小鼠的遗传背景明确且遗传性状稳定,在基因调控、蛋白质的表达等方面应用广泛,伴随小鼠动物模型的扩增,促进了肌腱病在基因通路领域的快速发展。Abraham 等^[6]在小鼠体内模型中发现特定信号通路(NF- κ B)有抑制肌腱炎症的潜力。与其他哺乳动物相比较,小鼠与人类基因匹配高达 80%~90%,并且其妊娠期短、繁育和生长速率快、寿命较短,因此能够有效的进行动物模型研究^[7]。此外小鼠活动时前肢抬高,双后肢为主要承重点,这与人类跟腱病发生相似,进一步为小鼠跟腱病模型提供了一定的解剖基础。但小鼠体型结构较小,造模时无论选择手术还是药物注射难度都较大,同时进行相关操作需要配备精细的仪器以确保造模的疗效,其应用也得到一定限制。

1.2 大鼠

常见大鼠种类包括:Wistar 大鼠、SD 大鼠等。大鼠抗感染能力强,可实现多种方式造模,诸如:跑台刺激、注射胶原酶等,且大鼠容易获取、饲养成本低、生长速率快、实验转运管理方便。但是大鼠损伤后愈合较快,且局部容易形成瘢痕组织,使得动物模型效果的观察与后期临床干预受到一定时间限制。目前大鼠在肌腱病研究领域的应用众多,Norelli 等^[8]使用肌腱手术缺损模型研究大鼠脂肪来源干细胞对跟腱损伤修复影响,Lai 等^[9]在大鼠缺损跟腱中研究衰老对肌腱愈合的影响,Shi 等^[10]发现在缺损跟腱的大鼠中骨髓间充质干细胞可促进跟腱的再生,Liu 等^[11]在跟腱胶原酶注射模型的研究结果表明外泌体可促进肌腱病的愈合。近些年,基因编辑大鼠模型用于基因调节、通路选择、分子表达等研究,推动了肌腱病治疗的研究进展^[12]。但

是目前基因编辑大鼠模型种类偏少,无法取代小鼠在基因领域的核心作用。

综上所述,啮齿类动物目前作为小型动物肌腱病模型研究已取得一定的进展,但仍需将其相关成果应用于大型动物甚至临床实验中以确保安全有效性。

1.3 兔

新西兰兔作为常见的实验动物,在细胞和组织生理与人类相似^[13]。随着肌腱病领域相关研究的迅速开展,如今兔已广泛用于肌腱损伤后肌肉变化、附着点形成以及损伤后体内生长因子变化等研究^[14]。兔肩胛下肌肉复合体与人肩部冈上肌复合体在解剖和生物力学上相似,使得兔肩袖复合体成为研究肩部损伤的可靠模型,为探索肩袖肌腱病研究提供了基础^[14]。Kaminein 等^[15]利用胶原酶注射构建兔的动物模型,观察到生长因子有改变趋势。Ahn 等^[16]通过外科手术制造兔跟腱损伤模型,观察跟腱病变后肌肉组织的改变情况。兔肌腱损伤与人类肌腱病病变细胞外基质改变相似,在研究肌腱损伤病理进程、致病机制分析以及治疗方案筛选具有重要意义。与啮齿类相比它们能够提供更大的肌腱组织样本,也更利于外科手术操作;但是它们花费相对较高,且兔机体耐受较差,在手术后易出现腹泻甚至死亡,通常需要对其进行特殊护理。

1.4 大型哺乳动物

大型哺乳动物包括绵羊、马等动物,体型较大、造模相对方便、容易进行外科操作。其中绵羊作为慢性肌腱损伤研究模型,局部组织可伴有大量纤维组织及新生血管形成^[17]。有研究表明:在绵羊肌腱组织部分断裂的肌腱病模型中,在不同时间点愈合肌腱各区域的基因表达和组织学存在显著差异^[18]。但绵羊作为大型动物模型之一,喂养管理费用较高,代价昂贵^[19]。马和人在病理组织上有很大相似性,使得马成为临床肌腱病研究的一个重要模型。已有 Gaesser 等^[20]通过给马注射胶原酶,研究自体蛋白溶液注射改善肌腱病治疗。另外马的肌腱病模型还可用于研究 mirRNA29a 调节促进肌腱愈合再生^[21]。与绵羊一样同为大型动物模型,马的成本、饲养费用以及动物管理等方面经济性较差,同时也缺乏大样本研究。目前,此类研究主要以国外团队为主,缺少国内相关动物实验报道。

1.5 非人灵长类动物

非人灵长类动物与人类在解剖结构、生理功能

以及免疫学表现最接近。此类模型已普遍应用于流行性感病毒、肝炎病毒以及其他病毒研究。随着肌腱病研究的深入,非人灵长类动物肌腱损伤模型也取得一定成果。其中,与其他哺乳类动物比较,只有此类动物才具有真正的肩袖^[22], Sonnabend 等^[23]认为:由于狒狒与人类肩部具有类似结构,狒狒是研究肩袖损伤的最佳动物模型。虽然此类动物在多方面与人类有很大相似性,但是他们饲养管理更加困难,同时伴随而来的伦理和经济问题也阻碍了该类动物模型研究的进展,近些年来也缺乏相关实验研究报道。

2 损伤部位选择

2.1 肩袖

肩袖肌腱损伤是最常见的肩部损伤,同时肩袖也是常见肌腱损伤动物模型部位之一,损伤后组织常伴有不可逆的肌肉萎缩、僵硬和脂肪浸润^[24]。由于肩部结构存在着解剖特殊性,肩峰的存在构成了肩袖肌腱损伤模型不可缺少的条件,大鼠在解剖学上与人最为相似,而其他动物的肩峰则与人类相差较大,其次大鼠活动时前肢抬高与人类肢体伸展相似^[24-25]。虽然兔肩袖模型损伤后伴有明显脂肪浸润,也有类似于人类肩部的特殊结构,但综合考虑解剖结构、病理改变、手术操作、经济学等各方面因素,使得大鼠成为肩袖损伤的最佳模型^[14]。目前已在在大鼠模型中深入开展肩袖的慢性损伤研究,例如通过跑步机构建慢性肌腱损伤模型,研究脂肪干细胞外泌体能否通过改善 M2 巨噬细胞极化来改善慢性肩袖病变^[26]。随着肌腱疾病研究进一步深入,肩袖损伤模型将为今后肌腱病研究提供更坚实的理论基础。

2.2 髌腱

髌腱位于膝关节表面,处在髌骨与小腿胫骨之间并连接两者,主要协助大腿屈伸活动。由于人体膝关节不断运动,髌腱长期处于周期性负荷之下,髌腱成为肌腱病常发、多发部位^[27]。膝关节是人体下肢活动最频繁的关节,髌腱作为膝关节屈伸活动的重要结构,该部位的动物模型也便于进行生物力学测试研究。Dan 等^[28]在研究手术对髌骨肌腱病中生物力学的变化趋势中发现:与对照组相比,肌腱硬度明显下降。另有研究利用干细胞疗法治疗髌腱损伤,开启髌腱损伤修复的再生新思路^[29]。通常髌腱尺寸相对较大且解剖表浅、容易获得^[7],

涉及髌腱的基础研究也是临床前研究的重点。但是髌腱整体呈宽薄型,药物注射造模难度大,局部操作要求精细,对操作人员技术要求更高。

2.3 跟腱

跟腱作为人体最大最长的肌腱,通常可承受超过个体 12.5 倍的重量,长期高强度的负荷压力使得跟腱病发生率增高^[30]。跟腱也是目前动物模型研究最常用部位之一,其优势在于部位表浅、操作方便、取材容易,有利于开展跟腱病机制的相关研究,已广泛应用于多种不同种类动物模型的建立。例如在绵羊跟腱病模型中观察跟腱超声表现及其弹性变化,作者通过注射 I 型胶原酶构建跟腱损伤动物模型^[31];在小鼠体内糖代谢驱动肌腱病发展的潜在机制研究中,利用跑步机和注射 TGF- β 1 诱导跟腱病变^[32];利用大鼠外科手术跟腱造模,研究间充质干细胞促进跟腱病愈合基质^[33];兔胶原酶注射模型中,研究增加软组织动员对肌腱损伤的影响^[34]。各不同类型的跟腱病模型丰富了跟腱部位的基础研究,为探索一条最佳跟腱病治疗道路提供了基础。

2.4 屈肌腱

涉及屈肌腱的动物模型包括指浅屈肌腱、指深屈肌腱,此处肌腱由于其缺血性和低细胞性同时存在,愈合过程很缓慢,符合肌腱病损伤愈合特点。虽然目前已有动物模型用来研究屈肌腱的损伤修复,但与其它部位肌腱组织相比,屈肌腱相对较小,限制了在小型动物中应用。同时大型动物也具有肌腱病自然发生的优势^[7],目前此类动物模型仍以羊、马等大型哺乳动物为主。Iacopetti 等^[35]通过绵羊指深屈肌腱模型构建研究肌腱病新的治疗方案。也有研究构建杂交马指浅屈肌腱手术模型,以比较影像学、组织学、生化及生物力学等参数结果的变化^[36]。近些年随着对马肌腱病的研究深入,其屈肌腱造模方式应用更加普遍,进一步促进了大型动物模型研究成果向临床转化。

3 建模方法

3.1 机械刺激

3.1.1 跑台跑步

动物跑台跑步作为一种肌腱病造模方法,它通过构建肌腱过度使用方式引起肌腱内、外部机制变化从而诱导肌腱病。在内部利用超过组织的重复负荷引起内部组织微创伤引起病理改变;外部通过肌腱反复与周围的撞击导致损伤^[37]。该造模方法

现已应用于跟腱^[38]、肩袖、以及髌腱^[39]等多部位动物模型研究。Yoshida 等^[40]研究表明,40 d 大鼠跑台跑步训练后,实验组的自发性运动活动次数明显高于对照组。另有研究:跑台跑步训练后可引起冈上肌腱生化及组织病理发生改变^[41]。跑台跑步不需要给予动物注射药物或者制造动物组织损伤,更符合肌腱病慢性损伤模型;但通过跑台跑步构建动物模型成本昂贵,且目前仅仅适合于鼠类,效果无法在大型动物模型得到验证,其应用受到很大限制。

另一方面由于鼠类自身活动的影响,此类造模方式的强度、持续时间一直在不断探索。Zhao 等^[42]研究表明,12 周高强度跑步运动形式的长期机械过载会引起炎症和分解代谢反应,进一步引起小鼠跟腱病变。针对如何准确量化动物运动量从而设计动物模型训练,Yoshida 团队^[39-40]在多次研究中提出 2 周适应性训练联合 40 d 跑台跑步训练的方案,发现肌腱纤维束出现撕裂,组织病理评分也明显降低。而 Abraham 等^[43]研究在 2 周适应性训练及 12 周运动训练后组织病理也呈现明显变化。另有研究表明在一周适应性训练及 12 周运动训练可出现明显肌腱生物力学改变^[44]。目前研究者们对于跑台跑步训练具体方案的大体方案已达成统一认识:首先为 1 或 2 周适应性训练,然后维持 4 ~ 12 周的常规运动训练。在适应性训练中,三分之一选择 1 周,三分之二选择 2 周。常规运动训练中,过去 5 ~ 10 年的研究中,8 周或者 12 周的训练时间更容易被研究者们所接受;但是最近 5 年时间里,更多的实验选择 4 周或者 6 周这类时间相对较短的造模方式。尽管近些年跑台跑步模型的开发利用在肌腱病动物模型研究中取得进展,但是人体肌腱病特点为反复损伤而未能痊愈,可在几个月或者几年内发展形成。而动物模型的改变为连续性训练损伤所致,两者损伤机制并非一致,因此动物模型不能完全复制临床人体肌腱病改变。

3.1.2 疲劳载荷

疲劳载荷是在一定范围内,给予肌腱不规则的载荷刺激,以引起肌腱组织学和生物力学变化。Bell 等^[45]对大鼠髌腱施加 1~15 N 的疲劳载荷,肌腱的组织学细胞密度出现增加,力学性能中硬度和最大负荷出现下降。该模型可产生与人类肌腱损伤相似的组织学和生物力学改变,此类造模方式时间短且可控性强,能够短期内达到预期效果,且肌腱的损伤往往都是急性所致,而人类腱病的发生发

展则是长期反复刺激的结果,此类模型实际应用已较少用于实验。

3.2 化学诱导

3.2.1 胶原酶注射

胶原酶注射的腱病模型一直得到普遍接受,且广泛应用于大鼠、小鼠、羊、兔、马的跟腱、冈上肌、髌腱等部位。de Cesar Netto 等^[46]给兔跟腱注射不同剂量(0.1、0.3 mg/mL)胶原酶后,在后期结果中发现高剂量(0.3 mg/mL)注射胶原酶可表现出更为明显的组织学及生物力学改变;低剂量连续注射则更好的模拟人类跟腱病进行性和慢性的特征。另有研究表明,注射总剂量为 0.3 mg I 型胶原酶作用于大鼠跟腱可引发腱病样改变,肌腱的硬度、最大拉力呈显著下降^[47]。综合研究发现:在鼠类动物模型中,胶原酶每次最常用注射总剂量为 0.3 mg;由于厂家不同及胶原酶产品不断更新,很遗憾在兔及大型哺乳动物研究中大部分作者未能给出明确的标准剂量。在注射频率选择中,既往强调单次注射达到实验效果;近些年研究者们不断探索最佳实验模型,同时伴随着部分文献研究结果公布,表明持续性胶原酶注射更能模拟人类肌腱病特征。Liu 等^[11]在最新研究中使用持续两周胶原酶注射(共计 7 次)进行造模,结果与对照组相比可观察到实验组明显的肌腱组织改变。目前鉴于研究经费及实验条件等限制,在肌腱病实验中,大鼠胶原酶注射模型为比较理想造模方式,但该方式如何选择最佳注射剂量及频率并使其标准化仍需要未来研究者提供更加可靠证据。

尽管胶原酶注射法简单高效,药物剂量可控,可在短期内完成动物模型构建,同时引起的组织学及生物力学变化明显,与人类肌腱病后期改变相似,但其也存在一定局限性。诸如:体内肌腱病改变为损伤后生理改变,而胶原酶通过降解肌腱组织来诱导腱病的产生;注射胶原酶不能模拟肌腱病的自然发生病程,特别是组织微环境中分子水平在不同阶段变化过程,因此其无法也不能完全复制临床肌腱病的发生。

3.2.2 TGF- β 注射

TGF- β 是一种带有广泛活性的小分子蛋白,其种类繁多、功能复杂,其中注射 TGF- β 1 在肌腱病动物模型中最为常见。Bittermann 等^[48]通过小鼠跟腱注射 TGF- β 1 诱导肌腱病模型,结果中观察到肌腱肿大、增生,但外观形态基本正常。另有在兔髌腱

研究中:观察 TGF- β 注射后兔肌腱 4 周、16 周的组织变化以及生物力学改变,得出结论 TGF- β 注射是一种温和的、看似可逆的肌腱损伤模型^[49]。TGF- β 注射后引起的肌腱损伤较轻,涉及细胞基质改变不明显,且肌腱损伤具有可逆性^[50],此类可用于早期或者轻度肌腱损伤模型;而人类肌腱病呈渐进式加重,近些年该种造模方式在肌腱模型中应用相对少见。

3.2.3 其他

注射卡拉明胶用于评估 IL-1 受体拮抗剂在肌腱病理改变中作用^[51],注射后与对照组相比动物活动性降低,肌腱长度变短。另有研究显示该模型诱导巨噬细胞增加多余中性粒细胞,因此在炎症引起肌腱损伤的机制研究模型中可能具有潜在作用^[52]。

在过去的研究中可通过注射前列腺素引起肌腱组织病变。Khan 等^[53]将不同剂量前列腺素注射兔髌腱中,发现明显的脂肪浸润、纤维组织降解缺失。至今前列腺素引起肌腱机制的改变未得到证实,该模型对于临床应用也尚不清楚,近些年相关研究已慢慢淡化此类模型的作用。

此外还包括利用 KGN(kartogenin)刺激软骨细胞分化建立肌腱病模型等^[54]。涉及化学因子种类繁多,各类因子被证实仅仅在肌腱病的发生机制某一方面存在一定作用,在构建实验动物模型时需慎重选择。

3.3 外科手术

近几年,外科手术在肌腱动物模型设计中得到了一定应用,通过构建肌腱损伤、半离断、中间部分切除等方式诱导肌腱病产生。如小动物模型涉及肩袖等难以操作部位可使用肌腱钳夹损伤方式构建模型;而大型动物在跟腱、髌腱屈肌腱等相对容易解剖等部位造模时,可进行肌腱部分横断或中间部分切除制造缺损来诱导肌腱病产生。Tsang 等^[55]研究在马的指浅屈肌外侧横断损伤后可出现明显肌腱增厚。外科手术造模过程简单易行、重复性好、周期短,可在短期实现肌腱病模型构建;与其他方式相比,外科手术费用较低,对实验过程器材要求低,可实现反复建模。近几年,随着人们对损伤后炎症认识的加深,外科手术造模在大型动物中得到应用,但外科手术伴随着有创的肌腱损伤,还有一定风险破坏周围组织结构完整性,更适合急性肌腱损伤研究。同时损伤的动物恢复后遗留瘢痕组

织对动物的活动产生影响,局部病理生理改变与临床慢性肌腱病发生机制相差较大,该模型在未来研究中仍需要更完善的手术方案来构建临床有效的动物模型。

动物模型的成功构建是实验动物研究关键,是整个实验开展的基础。在肌腱病中,造模成功后可表现为:宏观上肌腱组织大体形态变粗、影像学局部组织肿胀增厚以及微观组织病理改变等。它们是动物模型构建成功的主要标志,同样也是疾病研究的观察指标。目前肌腱模型构建方式种类多且原理各不同,共同效果旨在引起肌腱组织疾病样改变,以模拟临床肌腱病特征从而达到实验研究需要。

4 总结与展望

肌腱病动物模型研究迅速发展,但鉴于人类肌腱病发生的复杂性,动物实验模型与临床人体肌腱损伤仍有很大差异。综上,大鼠是目前造模最常见动物,最常见的部位为跟腱组织,最常见的方式为胶原酶注射,但临床应根据研究目的选择最适合的动物模型,目前还没有一个完美的肌腱病动物模型。现有研究肌腱病建模方法各有优缺点,跑台跑步在肌腱损伤机制上与人更为相似;而胶原酶注射引发体内微环境改变更符合人体晚期肌腱病损伤。腱病的损伤机制是一个复杂的过程,涉及从基因到信号通路再到分子机制、从蛋白表达到组织改变、从体内到体外等。动物局部解剖结构、腱病损伤外在机制、损伤后内部细胞分子改变等各方面与人类腱病发生发展各有不同,现有动物模型只能从单一某方面模拟肌腱损伤。目前肌腱病造模方式众多,它们从易行性、可重复性以及经济性考虑各有优劣,为了更深层次推进肌腱病新的热点、难点研究,未来仍需开发构建更合理的动物模型服务于临床。

参 考 文 献(References)

- [1] 周游,唐康来.肌腱病模型研究进展[J].中国运动医学杂志,2013,32(9):829-833,844.
Zhou Y, Tang KL. Advances in the study of tendinopathy models [J]. Chin J Sports Med, 2013, 32(9): 829-833, 844.
- [2] Lui PP, Maffulli N, Rolf C, et al. What are the validated animal models for tendinopathy? [J]. Scand J Med Sci Sports, 2011, 21(1): 3-17.
- [3] Lebaschi A, Deng XH, Zong J, et al. Animal models for rotator cuff repair [J]. Ann Ny Acad Sci, 2016, 1383(1): 43-57.
- [4] Dean BJF, Dakin SG, Millar NL, et al. Review: emerging concepts in the pathogenesis of tendinopathy [J]. Surgeon, 2017, 15(6): 349-354.

- [5] Millar NL, Silbernagel KG, Thorborg K, et al. Tendinopathy [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 1.
- [6] Abraham AC, Shah SA, Golman M, et al. Targeting the NF- κ B signaling pathway in chronic tendon disease [J]. Sci Transl Med, 2019, 11(481): eaav4319.
- [7] Longo UG, Forriol F, Campi S, et al. Animal models for translational research on shoulder pathologies: from bench to bedside [J]. Sports Med Arthrosc Rev, 2011, 19(3): 184–193.
- [8] Norelli JB, Plaza DP, Stal DN, et al. Tenogenically differentiated adipose-derived stem cells are effective in Achilles tendon repair *in vivo* [J]. J Tissue Eng, 2018, 9: 1–20.
- [9] Lai F, Tang H, Wang JJ, et al. Effects of aging on the histology and biochemistry of rat tendon healing [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2021, 22(1): 949.
- [10] Shi Z, Wang Q, Jiang D. Extracellular vesicles from bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells regulate inflammation and enhance tendon healing [J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 211.
- [11] Liu A, Wang Q, Zhao Z, et al. Nitric oxide nanomotor driving exosomes-loaded microneedles for achilles tendinopathy healing [J]. ACS Nano, 2021, 15(8): 13339–13350.
- [12] Jelinsky SA, Lake SP, Archambault JM, et al. Gene expression in rat supraspinatus tendon recovers from overuse with rest [J]. Clin Orthop Relat Res, 2008, 466(7): 1612–1627.
- [13] Warden SJ. Animal models for the study of tendinopathy [J]. Br J Sports Med, 2007, 41(4): 232–240.
- [14] Gupta R, Lee TQ. Contributions of the different rabbit models to our understanding of rotator cuff pathology [J]. J Shoulder Elb Surg, 2007, 16(5): S149–S157.
- [15] Kaminein S, Butterfield T, Sinai A. Percutaneous ultrasonic debridement of tendinopathy—a pilot achilles rabbit model [J]. J Orthop Surg Res, 2015, 10: 70.
- [16] Ahn KS, Lee NJ, Kang CH, et al. Serial changes of tendon histomorphology and strain elastography after induced achilles tendinopathy in rabbits: an *in vivo* study [J]. J Ultrasound Med, 2017, 36(4): 767–774.
- [17] Turner AS. Experiences with sheep as an animal model for shoulder surgery: strengths and shortcomings [J]. J Shoulder Elb Surg, 2007, 16(5): S158–S163.
- [18] Biasutti S, Dart A, Smith M, et al. Spatiotemporal variations in gene expression, histology and biomechanics in an ovine model of tendinopathy [J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0185282.
- [19] Coleman SH, Fealy S, Ehteshami JR, et al. Chronic rotator cuff injury and repair model in sheep [J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85(12): 2391–2402.
- [20] Gaesser AM, Underwood C, Linardi RL, et al. Evaluation of autologous protein solution injection for treatment of superficial digital flexor tendonitis in an equine model [J]. Front Vet Sci, 2021, 8: 697551.
- [21] Watts AE, Millar NL, Platt J, et al. MicroRNA29a treatment improves early tendon injury [J]. Mol Ther, 2017, 25(10): 2415–2426.
- [22] Sonnabend DH, Young AA. Comparative anatomy of the rotator cuff [J]. J Bone Joint Surg Br, 2009, 91(12): 1632–1637.
- [23] Sonnabend DH, Howlett CR, Young AA. Histological evaluation of repair of the rotator cuff in a primate model [J]. J Bone Joint Surg Br, 2010, 92(4): 586–594.
- [24] Derwin KA, Baker AR, Codsí MJ, et al. Assessment of the canine model of rotator cuff injury and repair [J]. J Shoulder Elb Surg, 2007, 16(5): S140–S148.
- [25] Perry SM, Getz CL, Soslowsky LJ. Alterations in function after rotator cuff tears in an animal model [J]. J Shoulder Elb Surg, 2009, 18(2): 296–304.
- [26] Wang C, Zhang Y, Zhang G, et al. Adipose stem cell-derived exosomes ameliorate chronic rotator cuff tendinopathy by regulating macrophage polarization: from a mouse model to a study in human tissue [J]. Am J Sports Med, 2021, 49(9): 2321–2331.
- [27] Hast MW, Zuskov A, Soslowsky LJ. The role of animal models in tendon research [J]. Bone Joint Res, 2014, 3(6): 193–202.
- [28] Dan MJ, Oliver RA, Crowley JD, et al. The effect of surgery on patellar tendinopathy: novel use of MRI questions the exploitability of the rat collagenase model to humans [J]. Knee, 2019, 26(6): 1182–1191.
- [29] Wagner JR, Taguchi T, Cho JY, et al. Evaluation of stem cell therapies in a bilateral patellar tendon injury model in rats [J]. J Vis Exp, 2018, 133: 56810.
- [30] Komi PV. Relevance of *in vivo* force measurements to human biomechanics [J]. J Biomech, 1990, 23: 23–25.
- [31] Serrani D, Volta A, Cingolani F, et al. Serial ultrasonographic and real-time elastosonographic assessment of the ovine common calcaneal tendon, after an experimentally induced tendinopathy [J]. Vet Sci, 2021, 8(4): 54.
- [32] Sikes KJ, McConnell A, Serkova N, et al. Untargeted metabolomics analysis identifies creatine, myo-inositol, and lipid pathway modulation in a murine model of tendinopathy [J]. J Orthop Res, 2021, 3: 10.
- [33] Lee SY, Kwon B, Lee K, et al. Therapeutic mechanisms of human adipose-derived mesenchymal stem cells in a rat tendon injury model [J]. Am J Sports Med, 2017, 45(6): 1429–1439.
- [34] Imai K, Ikoma K, Chen Q, et al. Biomechanical and histological effects of augmented soft tissue mobilization therapy on achilles tendinopathy in a rabbit model [J]. J Manipulative Physiol Ther, 2015, 38(2): 112–118.
- [35] Iacopetti I, Perazzi A, Maniero V, et al. Effect of MLS[®] laser therapy with different dose regimes for the treatment of experimentally induced tendinopathy in sheep: pilot study [J]. Photomed Laser Surg, 2015, 33(3): 154–163.
- [36] Johnson SA, Valdés-martínez A, Turk PJ, et al. Longitudinal tendon healing assessed with multi-modality advanced imaging and tissue analysis [EB/OL]. [2021–05–28]. <https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/evj.13478>.
- [37] Tucker JJ, Riggín CN, Connizzo BK, et al. Effect of overuse-

- induced tendinopathy on tendon healing in a rat supraspinatus repair model [J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(1): 161-166.
- [38] Zhang J, Li F, Nie D, et al. Effect of metformin on development of tendinopathy due to mechanical overloading in an animal model [J]. *Foot Ankle Int*, 2020, 41(12): 1455-1465.
- [39] Yoshida M, Funasaki H, Marumo K. Efficacy of autologous leukocyte-reduced platelet-rich plasma therapy for patellar tendinopathy in a rat treadmill model [J]. *Muscles Ligaments Tendons J*, 2016, 6(2): 205-215.
- [40] Yoshida M, Funasaki H, Kubota M, et al. Therapeutic effects of high molecular weight hyaluronan injections for tendinopathy in a rat model [J]. *J Orthop Sci*, 2015, 20(1): 186-195.
- [41] Kocadal O, Pepe M, Akyurek N, et al. The evaluation of exogenous melatonin administration in supraspinatus overuse tendinopathy in an experimental rat model [J]. *Clin Shoulder Elb*, 2019, 22(2): 79-86.
- [42] Zhao G, Zhang J, Nie D, et al. HMGB1 mediates the development of tendinopathy due to mechanical overloading [J]. *PLoS One*, 2019, 14(9): e0222369.
- [43] Abraham T, Fong G, Scott A. Second harmonic generation analysis of early achilles tendinosis in response to *in vivo* mechanical loading [J]. *BMC Musculoskelet Dis*, 2011, 12: 26.
- [44] Heinemeier KM, Skovgaard D, Bayer ML, et al. Uphill running improves rat achilles tendon tissue mechanical properties and alters gene expression without inducing pathological changes [J]. *J Appl Physiol (1985)*, 2012, 113(5): 827-836.
- [45] Bell R, Robles-Harris MA, Anderson M, et al. Inhibition of apoptosis exacerbates fatigue-damage tendon injuries in an *in vivo* rat model [J]. *Eur Cells Mater*, 2018, 36: 44-56.
- [46] de Cesar Netto C, Godoy-Santos AL, Augusto Pontin P, et al. Novel animal model for achilles tendinopathy: controlled experimental study of serial injections of collagenase in rabbits [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192769.
- [47] Lee SY, Chieh HF, Lin CJ, et al. Characteristics of sonography in a rat achilles tendinopathy model: possible non-invasive predictors of biomechanics [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5100.
- [48] Bittermann A, Gao S, Rezvani S, et al. Oral ibuprofen interferes with cellular healing responses in a murine model of achilles tendinopathy [J]. *J Musculoskelet Disord Treat*, 2018, 4(2): 49.
- [49] Stone D, Green C, Rao U, et al. Cytokine-induced tendinitis: a preliminary study in rabbits [J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(2): 168-177.
- [50] Lake SP, Ansoorge HL, Soslowsky LJ. Animal models of tendinopathy [J]. *Disabil Rehabil*, 2008, 30(20-22): 1530-1541.
- [51] Berkoff DJ, Kallianos SA, Eskildsen SM, et al. Use of an IL1-receptor antagonist to prevent the progression of tendinopathy in a rat model [J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(4): 616-622.
- [52] Marsolais D, Duchesne E, Côté C H, et al. Inflammatory cells do not decrease the ultimate tensile strength of intact tendons *in vivo* and *in vitro*: protective role of mechanical loading [J]. *J Appl Physiol (1985)*, 2007, 102(1): 11-17.
- [53] Khan MH, Li Z, Wang JH. Repeated exposure of tendon to prostaglandin-E2 leads to localized tendon degeneration [J]. *Clin J Sport Med*, 2005, 15(1): 27-33.
- [54] Yuan T, Zhang J, Zhao G, et al. Creating an animal model of tendinopathy by inducing chondrogenic differentiation with Kartogenin [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148557.
- [55] Tsang AS, Dart AJ, Biasutti SA, et al. Effects of tendon injury on uninjured regional tendons in the distal limb: An *in-vivo* study using an ovine tendinopathy model [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215830.

[收稿日期] 2022-01-15

程春雨,段翔,李颜. 人源化小鼠在呼吸道病原研究中的应用与发展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 267-273.

Cheng CY, Duan X, Li Y. Application and development of humanized mice for respiratory pathogen research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 267-273.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.016

人源化小鼠在呼吸道病原研究中的应用与发展

程春雨,段翔,李颜*

(模式动物与疾病研究教育部重点实验室,蛋白质与多肽药物教育部工程研究中心,医药生物技术国家重点实验室,南京大学化学与生物医药创新研究院,医学院模式动物研究所,南京 210061)

【摘要】 小鼠模型对于呼吸道病原的研究有着重要意义。然而进化所带来的肺及免疫系统的物种差异,使小鼠模型难以精准模拟人体的呼吸道病原感染。通过构建免疫系统人源化小鼠,可更好地再现人体免疫系统对呼吸道病原感染的应答。构建肺组织人源化小鼠和肺/免疫系统双人源化小鼠可实现人特异性的呼吸道病原感染及其免疫响应。本综述将从免疫系统、肺、肺/免疫系统双人源化3个方面,回顾人源化小鼠在人类呼吸道病原研究方面的进展。

【关键词】 人源化小鼠;呼吸道病原;肺;免疫

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0267-07

Application and development of humanized mice for respiratory pathogen research

CHENG Chunyu, DUAN Xiang, LI Yan*

(MOE Key Laboratory of Model Animals for Disease Study. MOE Engineering Research Center of Protein and Peptide Medicine. the State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology. Chemistry and Biomedicine Innovation Center. Model Animal Research Center, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210061, China.)

Corresponding author: LI Yan. E-mail: yanli@nju.edu.cn

【Abstract】 Mouse models are of great interest for studying human respiratory pathogens. However, evolutionary species divergence has led to differences in lung structure and the immune system between humans and mice, making the study of human respiratory pathogens in mouse models a longstanding challenge. In contrast, mice with a humanized immune system can faithfully reproduce human immune responses to respiratory pathogen infection, and mice with humanized lung and lung-immune systems can be used to examine human trophic respiratory pathogen infection and the corresponding immune responses. This review summarizes the contributions and recent progress of these types of humanized mice in respiratory pathogen research.

【Keywords】 humanized mice; respiratory pathogens; lung; immunity

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

世界卫生组织 (WHO) 的报告显示,呼吸系统疾病是 2019 年全球最主要的三大死亡原因之一,其中

下呼吸道感染仍然是世界上最致命的传染病,排在人类十大主要死亡原因的第四位^[1]。合适的动物

【基金项目】 国家重点研发计划青年项目 (2019YFA0802900), 国家自然科学基金 (32070942, 32122035), 江苏省双创计划。

Funded by National Key Research and Development Program of China (2019YFA0802900), National Natural Science Foundation of China (32070942, 32122035), Program for Innovative Talents and Entrepreneur in Jiangsu.

【作者简介】 程春雨 (1997—), 博士研究生, 研究方向: 器官人源化小鼠模型。Email: chengcy@nicemice.cn

【通信作者】 李颜 (1985—), 教授, 博士生导师, 研究方向: 人源化小鼠模型、人源病毒感染、肿瘤免疫治疗及人免疫细胞发育。

Email: yanli@nju.edu.cn

模型不仅能够加速呼吸道病原致病机制的研究,更能为呼吸道病原的预防与治疗提供评价工具。目前已用于呼吸道病原研究的实验动物有很多,例如小鼠、大鼠、豚鼠、雪貂和非人灵长类动物等。小鼠因具有容易饲养且饲养成本低和繁殖快等优点,被广泛应用于科学研究。遗传背景均一、实验结果一致的近交系小鼠更是研究基因功能或疾病机制的首选。然而小鼠与人之间存在的物种差异,导致人鼠肺及免疫系统有所不同,从而使一些人源呼吸道病原无法直接感染小鼠,或者造成在小鼠与临床显著不同的病理与免疫特征。为了能更有效地研究和治疗呼吸道病原感染,免疫系统人源化小鼠、肺人源化小鼠、肺/免疫系统双人源化小鼠等模型在过去半个世纪逐渐发展和成熟。

1 免疫系统人源化小鼠

免疫系统人源化小鼠主要指将人的造血干细胞注射到免疫缺陷小鼠体内,然后在小鼠体内发育出人免疫细胞谱系的小鼠模型。早在 1980 年,研究人员就发现了重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠品系——CB17-Prkdc^{scid},该小鼠 T 细胞和 B 细胞均存在严重缺陷,胸腺和外周淋巴组织严重萎缩。而后在 1988 年,McCune 等^[2]在 SCID 小鼠中植入人胎肝来源的造血干细胞和人体胸腺组织,构建出了 SCID 人源化小鼠。SCID 人源化小鼠虽然支持人类 T、B 细胞分化,但存在“泄露”——即小鼠随着年龄增长发育出自体 T、B 细胞。后来,研究人员观察到具有非肥胖糖尿病(non-obese diabetes, NOD)的 NOD-SCID 小鼠具有更强的支持人类造血干细胞植入的能力,原因是 NOD 品系中小鼠巨噬细胞的信号调控蛋白 α (Sirpa) 具有突变,削弱了小鼠巨噬细胞对人类细胞的吞噬作用^[3-4]。但 NOD-SCID 人源化小鼠仍保留部分小鼠 NK 细胞,且也存在“泄露”的情况。此后研究人员一直在寻求人源化小鼠背景品系上的突破。2002 年,研究者发现突变白细胞介素 2(IL-2)受体共同 γ 链(IL2rg),可导致小鼠 NK 细胞活性的丧失和 T、B 淋巴细胞谱系的消失。据此,研究人员构建了 NOD-SCID IL2rg^{tm1sug}(NOG)小鼠品系^[5]。随后,研究人员用完整的无效等位基因替代小鼠的 IL2rg,在此基础上构建了 BRG、NSG 等小鼠品系。以 NOG、BRG 和 NSG 为背景构建的免疫系统人源化

小鼠,表现出稳定的人免疫细胞的定植与分化能力,过去十几年在人源病原感染以及肿瘤免疫治疗中发挥着越来越重要的作用。

1.1 结核杆菌

结核病(tuberculosis, TB)仍然是严重威胁人类健康安全的全局性传染病,然而唯一获得许可的结核疫苗卡介苗(Bacille Calmette-Guérin, BCG)的保护效力因人群和地区不同而不同^[6]。深入理解人体对结核分枝杆菌(myco bacterium tuberculosis, Mtb)的免疫应答,将帮助开发更有效的 TB 疫苗及治疗方案。目前,响应 Mtb 感染的核心免疫过程在不同动物模型中未能得到一致的结论。而通过免疫系统人源化小鼠则可直接观察人免疫系统对 Mtb 感染的响应,与临床更为相关和接近。

2013 年,2 个课题组相继报道了在免疫系统人源化小鼠鼻内感染 Mtb 可诱导肺肉芽肿形成^[7-8]。该病理特征与在结核病患者体内观察到的现象非常相似,表现为 T 细胞环绕着人巨噬细胞形成的坏死中心,并被大量成纤维细胞包围。同时,在没有免疫系统人源化的小鼠中则观察不到肺肉芽肿形成。值得一提的是,2013 年 Heuts 等^[7]发现 CD4⁺ T 细胞对结核分枝杆菌的感染具有意想不到的作用。他们发现人源化小鼠器官中的分枝杆菌数量高于非人源化对照,并且细菌负荷的增加是由人 CD4⁺ T 细胞介导。这一发现挑战了既往应用其他动物模型进行的 Mtb 研究,体现出免疫系统人源化小鼠模型的不可替代性,即探索人免疫系统在病原感染中的物种特异性反应。

免疫系统人源化小鼠也常被用来评价结核病疫苗,通过在免疫系统人源化 NOG 小鼠上接种卡介苗或 CpG-C(一种含有结核分枝杆菌抗原 ESAT-6 的脂质体制剂),研究人员观察到 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞分泌相关细胞因子,例如 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2^[9]。与 C57BL/6 小鼠和 Hartley 豚鼠相比,人源化小鼠模型提供了疫苗可以进一步诱导人类 T 细胞免疫反应的证据。此外关于结核病疫苗的开发方面,人源化小鼠也可以作为新型疫苗的评价平台。此前一项研究中,研究人员从 50 个预测多肽中筛选出 6 个免疫优势肽,构建了一种新的多肽疫苗,命名为 MP3RT^[10]。免疫系统人源化 NSG 小鼠经 MP3RT 免疫后,IFN- γ 的分泌、CD3⁺ IFN- γ ⁺ T 细胞和 MP3RT 特异性 IgG 抗体均显著增加,证明 MP3RT 是一种有潜力的多肽结核疫苗。

1.2 流感病毒

在流感研究方面,特定基因敲除小鼠模型和人类基因转基因小鼠模型被广泛应用于研究某一基因在流感病毒感染中的作用。而免疫系统人源化小鼠模型则可以用来测试人免疫系统对疫苗及治疗的响应等^[11]。

理想的疫苗能够诱导长期免疫记忆,并产生高滴度、广谱性的中和抗体。然而,由于甲型流感病毒包膜抗原 HA 的序列变异,甲型流感病毒的多个亚型已经进化,使疫苗的开发变得困难。例如, H7N9 亚型流感疫苗对人类的免疫原性始终低于其他亚型的疫苗^[12]。针对这一问题, Wada 等^[13]修饰了 H7 特异性 T 细胞表位中的关键残基,然后在以 NOD-SCID/*Jak3*^{null} (由于缺乏 IL-2R 介导的 *Jak3* 信号传导从而导致 NK 细胞发育受损) 为基础品系构建的免疫系统人源化小鼠上进行了测试,他们发现免疫后的人源化小鼠中 IgG 结合 HA 的能力和强度有所改善,证明 H7N9 免疫原性弱是由于其特异性的 T 细胞表位所导致的,同时体现了人源化小鼠模型可以模拟人免疫细胞对不同抗原表位的响应能力,并且是探究不同流感病毒亚型的感染过程及免疫系统应答的优秀模型。此外,使用不同策略开发的疫苗,包括抗病毒 DNA 疫苗,也可以在免疫系统人源化小鼠模型中进行测试。研究者根据人单核细胞上的 *FcγRI* 可增强体内抗原呈递的原理,将编码抗人 *FcγRI* 单链可变抗体 (scFv) 的序列与编码含有 T、B 细胞表位的甲型流感病毒血凝素亚基间肽 (hemagglutinin intersubunit peptide) 的序列偶联,再将其构建到真核表达载体系统 pTriEx-3 Neo 中^[14]。免疫系统人源化 NOD-SCID *IL2rg*^{null} 小鼠注射该嵌合载体分子后,可以产生抗流感的 IgG 和流感特异性的细胞毒性 T 细胞。

为了在人源化小鼠体内能够更好地模拟人体抗病毒反应,研究者通过基因工程手段进一步改造免疫缺陷小鼠品系,用不同的 HLA 单倍型取代小鼠 MHC I 类和 II 类分子,从而使人 T 细胞在小鼠胸腺中能够正确发育成熟。例如,2016 年 Majji 等^[15]开发了名为“DRAGA”的免疫缺陷小鼠品系,同时表达人 II 类分子 HLA-DR4 和 I 类分子 HLA-A2。而后研究发现针对 H1N1 血凝素蛋白的人单克隆抗体能够清除免疫系统人源化 DRAGA 小鼠的流感病毒^[16]。另一项研究展示了人源化 DRAGA 小鼠可以支持 H1N1 和 H3N2 甲型流感病毒的感染,且被

感染的人源化 DRAGA 小鼠可以产生抗病毒中和抗体和驻肺的 CD103⁺T 细胞^[17]。这些结果表明,人源化 DRAGA 小鼠甲型流感病毒感染模型可以产生与人类相似的肺部病理表现和抗病毒免疫反应。

2 肺人源化小鼠

小鼠作为临床前模式动物有着诸多的优势,但人鼠之间数百万年的进化隔离,物种差异造成一些人源呼吸道病原不能感染小鼠,例如新型冠状病毒 (SARS-CoV-2)。新型冠状病毒肺炎的爆发,对全球公共卫生及经济都造成了巨大损失,直至现在仍严重威胁着全世界人民的生命健康与安全。通过对小鼠进行改造,例如基因人源化、人肺组织异位移植及人-鼠肺嵌合等方法,可以实现利用小鼠模型对人源呼吸道病原进行研究。

2.1 基因人源化

为了克服物种特异性障碍,将人类受体蛋白通过转基因或者腺病毒转导的方式在小鼠中表达,可使小鼠对人源呼吸道病原易感。转基因动物是指将外源重组基因整合到宿主基因组且稳定表达,并可遗传的一类动物。转基因小鼠往往存在构建时间长、繁育周期长等问题,但一旦构建完成,可通过繁育大规模生产。而采用腺病毒转导方式构建人源化小鼠的技术方法简单,周期短(2~3周),可在多种基因修饰背景鼠上进行构建,但转导的基因不能遗传给后代,因此需要重复构建。两种基因人源化方法各有优势,适用于不同条件下的实验设计。以冠状病毒为例,根据其遗传学差异和血清学特性可将冠状病毒分为 α 、 β 、 γ 和 δ 四个属,其中可感染人的主要是 α 属中的 HCoV-229E 与 HCoV-NL63,以及 β 属中的 HCoV-OC43、HCoV-HKU1、严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 (SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) 和 SARS-CoV-2^[18]。除 HCoV-OC43 外^[19],其余人冠状病毒均不可以很好地感染普通小鼠。因此,为了更好地研究人冠状病毒的致病机制以及开发相关疫苗和抗病毒药物,研究者们开发了一系列基因人源化小鼠。

ACE2 是 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的共同受体,同时也是研发新冠疫苗及治疗药物的重要靶点。2007 年,3 个课题组几乎同时对 hACE2 转基因小鼠进行了报道。这些转基因小鼠模型的主要差别在于应用不同的启动子以驱动人 ACE2 在小鼠组织中特异表达,包括上皮细胞 *Krt18* 启动子、小鼠内

源性 ACE2 启动子以及外源性的复合启动子 CAG (带有 CMV-IE 增强子的鸡 β -肌动蛋白启动子) 等^[20-22]。2016 年, Menachery 等^[23]利用肺纤毛上皮细胞启动子 HFH4 构建了 HFH4-hACE2 转基因小鼠。所有这些转基因小鼠都易感 SARS-CoV, 但是无论采取何种表达策略, 在 SARS-CoV 研究中, 小鼠都死于病毒感染大脑, 而大脑感染在临床中极少观察到。在新型冠状病毒肺炎爆发后, 这些在 SARS 感染小鼠模型构建上积累的经验也很快被应用于新冠病毒研究^[24-26]。这些模型同样支持 SARS-CoV-2 的感染, 但由于它们在人 ACE2 的表达上存在差异, 最终的感染程度也不尽相同。其中, 较高剂量的 SARS-CoV-2 鼻内接种会导致 K18-hACE2 小鼠死亡, 并对包括肺、肝和肾在内的各种器官造成严重损害, 而较低剂量感染则引起的损伤症状较轻^[27], 在大多数组织中表现为剂量依赖性效应, 与临床表型较为类似。因此, K18-hACE2 模型似乎是迄今为止报道的最敏感、最接近临床表型的新冠小鼠模型。除 hACE2 转基因小鼠外, 2020 年 6 月, Sun 等^[28]将表达人 ACE2 的腺病毒在鼠肺中转导, 快速建立了首个新冠肺炎非转基因小鼠模型。该小鼠在感染 SARS-CoV-2 后, 肺中可检测到高滴度的新冠病毒, 并出现相应的肺炎症状和病理特征。

2012 年, MERS 爆发后, Zhao 等^[29]率先应用表达 MERS-CoV 受体的人 DPP4 腺病毒构建了 MERS-CoV 易感小鼠, 并且证明这些小鼠可用于评估 MERS 疫苗和抗病毒疗法。随后 Agrawal 等^[30]于 2015 年构建了在 CAG 启动子控制下表达 hDPP4 的转基因小鼠, 该小鼠感染 MERS-CoV 几天后出现了体重持续减轻和死亡。2017 年, 研究人员又开发了另一种 hDPP4 转基因小鼠, 并证明 MERS-CoV 感染引起的致命性肺炎具有病毒载量依赖性^[31]。目前, 针对 4 种低致病性人冠状病毒 (HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-OC43、HCoV-HKU1) 小鼠模型构建方面的研究还相对比较少。2005 年, Lassnig 等^[32]报道了针对 229E 受体 APN 人源化的转基因小鼠, 但是免疫健全的 hAPN 转基因小鼠却对 229E 不易感, 而当小鼠同时存在 Stat1 缺陷时, 可检测到病毒在肺部和肠道的大量复制。提示对一些人源呼吸道病原来说, 仅仅将感染受体人源化还不能够完全支持病原在小鼠中感染。

2.2 组织异位移植

尽管可以通过基因人源化对小鼠进行改造, 使

其适应人源呼吸道病毒的感染, 但人鼠的物种差异性可能会导致利用小鼠模型产生与临床相矛盾的结果。因此, 直接利用人体器官或组织研究病毒感染或许更是更优的选择。

在过去的几十年中, 通过移植一种或多种人体组织或细胞到小鼠体内的方法已被广泛用于 HIV、HBV、HCV 和其他重要病原体的研究。早在 1994 年, 已有将 8 ~ 12 周的人胎肺组织植入免疫缺陷 SCID 小鼠的肾包囊或者皮下的报道, 结果显示异位移植的人胎肺组织可快速生长发育, 并分化成与正常人肺相似的结构^[33]。2012 年, De Paepe 等^[34]通过比较移植的部位 (肾包膜下和皮下), 证明肾包囊移植更有利于人胎肺组织微血管的重塑。同年, Maidji 等^[35]同样将胎肺组织移植入免疫缺陷 SCID 小鼠肾包膜下, 并向其直接注射人巨胞病毒 (HCMV) 临床分离株, 发现 HCMV 能感染人肺泡上皮和间充质细胞, 并在 2 周内有效地在肺移植组织中复制, 导致大量病变。水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 和 HCMV 一样, 感染具有种属限制。2017 年, Wang 等^[36]利用人肺肾包囊移植小鼠模型证实异位移植的人肺组织也可支持 VZV 的感染。而 2019 年 Wahl 等^[37]报道了人肺皮下移植小鼠模型 (LoM), 结果显示 LoM 可支持例如 MERS-CoV、RSV、HCMV 和寨卡病毒等人源病毒的感染和复制。以上结果表明, 这种在免疫缺陷鼠上异位移植的人肺组织理论上可支持所有人源呼吸道病原的感染, 或许可作为今后呼吸道病原感染的通用模式动物, 包括 SARS-CoV-2。Wahl 等^[38]于 2021 年将 LoM 应用于新冠研究, 结果显示 SARS-CoV-2 在人肺移植组织中主要感染人肺上皮细胞, 如肺泡中的 2 型肺泡细胞 (hAEC2s) 和气道中的纤毛细胞, 而 EIDD-2801 (一种目前处于 II/III 期临床试验的口服广谱抗病毒药物) 的治疗和预防给药能显著抑制 SARS-CoV-2 在肺移植组织中的复制。同年, 厦门大学的夏宁邵团队通过同样的构建策略, 也证实了异位移植的人肺组织可支持 SARS-CoV-2 的感染和复制^[39]。

2.3 人-鼠肺嵌合

通过皮下或肾包囊异位移植的人胎肺组织虽然可以生长发育, 形成人肺类似结构, 但其不具备正常肺组织气体交换的生理功能。因此, 无法利用该小鼠模型研究呼吸道病原的传播和流行动力学等。为了维持人肺细胞的生理功能, 可在鼠肺原位嵌合人肺细胞, 构建人-鼠肺嵌合小鼠模型。构建

人-鼠肺嵌合与构建肝嵌合小鼠的思路相类似,都需要先对鼠源细胞进行破坏,从而为植入的人源细胞提供生长空间。然而,肝细胞的组成较为均一,可通过自身肝细胞基因缺陷或者转入毒性基因等造成鼠源肝细胞损伤。而肺细胞组成复杂,难以利用基因工程方法同时损伤多种鼠肺细胞。因此,研究人员往往通过感染 H1N1 流感病毒和给予萘^[40]以及博来霉素^[41]这两种化学药物来诱导小鼠肺损伤。其中萘诱导的损伤较为特异,基本只针对 Club 细胞,而博来霉素较为广谱,可同时诱导气道和肺泡细胞损伤。

通常情况下,可以通过静脉注射或者气管滴注的方式移植人肺细胞。目前,可用于移植的人肺细胞主要有肺干细胞、人胎肺细胞和胚胎干细胞(ESCs)或诱导多能干细胞(iPSCs)定向分化的肺样细胞等。慢性阻塞性肺病(COPD)是一种以慢性支气管炎和/或肺气肿为特征的疾病,最终可发展为肺心病和呼吸衰竭。Wang 等^[42]通过移植表达转录因子 p63 和角蛋白-5(Krt5)的远端气道干细胞(DASC)到 COPD 小鼠中,证实移植人 DASCs 可以减轻 COPD 小鼠肺部炎症和肺气肿。而 hAEC2s 同样具有肺干细胞特性,Kathirya 等^[43]通过将 hAEC2s 移植到博来霉素诱导损伤的 NSG 小鼠肺部,10 d 后可在肺泡受损区域检测到人细胞团。ESCs 或 iPSCs 具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性,可体外定向诱导分化至肺细胞谱系。Soh 等^[44]通过干细胞标记物 CD166 进一步富集 hESCs 分化产生的肺上皮细胞(LEC),可以在 LEC 移植后提高肺损伤 NOD-SCID 小鼠的生存能力并改善其肺功能。胎肺细胞因其处于生长发育阶段,因此也具备一定的干细胞潜能。2015 年,Rosen 等^[45]将 20 ~ 22 周人胎肺单细胞悬液静脉输注到萘损伤和辐照的 SCID 小鼠中,7 周后在鼠肺中检测到 3%左右的人肺嵌合。但目前应用人-鼠肺嵌合模型来研究呼吸道病原感染的报道还比较少,一个可能的原因是人肺嵌合的比例还有待提升。

3 肺/免疫系统双人源化小鼠

病原感染的预防和治疗通常与先天性和适应性免疫有关,由于单纯的肺人源化小鼠模型缺乏人的免疫细胞,限制了其在病原感染所引发的免疫反应方面的研究。所以在肺人源化小鼠模型的基础上,进一步通过移植人的免疫细胞,可以建立肺/免

疫系统双人源化小鼠模型。

近日,耶鲁大学 Flavell 团队利用腺病毒将人 ACE2 转导到人源化 MISTRG6 小鼠的肺部,建立了 MISTRG6-hACE2 小鼠模型^[46]。研究人员应用该模型描述了 SARS-CoV-2 感染后长达 28 d 的人先天性和适应性免疫反应,表明被感染的小鼠具有新冠慢性感染的关键特征,包括体重减轻、病毒 RNA 持续性存在、T 淋巴细胞减少等,同时还利用该模型评估了患者来源的抗体和类固醇治疗对于控制新冠早期感染的重要作用。尼帕病毒(NiV)是一种人畜共患的副粘病毒,可引起人类致命的呼吸道疾病和脑炎。2014 年,伊拉斯姆斯大学 Rockx 团队通过人肺皮下移植模型证实了 NiV 病毒感染靶向人肺组织中的内皮和上皮,并形成合胞体^[47],但关于 NiV 病毒诱导急性肺损伤(ALI)的分子机制仍不是非常清楚。在之后的一项研究中,该团队在人肺组织皮下移植的基础上,结合了骨髓、肝和胸腺(BLT)免疫系统重建来研究 NiV 病毒^[48],结果显示人体免疫系统的存在可干扰 NiV 病毒传播,感染区域浸润的免疫细胞可产生大量的细胞因子和趋化因子。2019 年,Wahl 等^[37]利用同样的双人源化小鼠模型(BLT-L)感染 HCMV,观察到抗原特异性体液免疫应答和 T 细胞免疫反应。2021 年 Wang 等^[49]也利用类似的模型研究了 H1N1 流感病毒在肺/免疫系统双人源化小鼠中的感染,发现人肺移植感染 H1N1 后,组织驻留记忆 T 细胞显著增加,并产生病毒特异性 T 细胞和抗病毒 IgM 及 IgG。

4 展望

新冠爆发后,由于人鼠物种差异,原始毒株不能感染普通小鼠,因此基因人源化小鼠模型在新冠初期研究中发挥了不可替代的作用。而我国科学家与病毒也在争分夺秒赛跑,为新冠小鼠模型的研发作出了巨大贡献,如中国医学科学院医学实验动物研究所秦川研究员团队在全球率先报道了 hACE2 转基因小鼠模型^[24],而广州呼吸疾病国家重点实验室赵金存教授团队则利用腺病毒载体(Ad5)成功建立了首个非转基因新冠小鼠模型等^[28]。我国起步较晚,近年来虽有一定发展,但仍需继续努力,希望未来能吸引更多优秀的中国科学家加入人源化小鼠研究。

人源化小鼠在呼吸道病原致病机制研究、药物开发及疫苗评价等方面已有了诸多的应用,但是仍

存在许多不足,有许多地方需要改进。例如,免疫系统人源化小鼠的人 B 细胞发育和激活存在问题,导致产生的体液免疫反应较弱,难以产生抗原特异性高亲和力抗体。目前已有研究针对这一现状进行优化,如构建人 BAFF 和 IL-6 转基因小鼠,为人 B 细胞的发育和激活提供必需的细胞因子等。而基因人源化小鼠虽然可以使人源特异性病原感染小鼠,但转基因和腺病毒转导的方式都存在基因非特异性表达不能完全还原人体生理表达水平的现象,因此未来仍需要更深入地研究如何更精准地控制基因表达。皮下肺移植模型理论上可以感染所有人源呼吸道病原,结合免疫系统双人源化还可以研究病原感染后的免疫反应。但人肺移植无法模拟人正常的气体交换生理功能,即人肺细胞处于一种“功能不全”的状态。而人-鼠肺嵌合模型内的人肺细胞在鼠肺原位定植、发育,有希望参与到正常的气体交换中。但相关研究还比较少,且研究中所展示的人肺嵌合比例还比较低,有待进一步提高,可尝试诱导更强的肺损伤,移植重建功能更强的人肺细胞等。期望未来还会有更适合、更完善的人源化小鼠模型被不断地开发出来,应用于更多种类呼吸道病原的研究。

参 考 文 献(References)

- [1] World Health Organization. The top 10 causes of death [R]. Geneva: WHO, 2020.
- [2] McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, et al. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function [J]. *Science*, 1988, 241(4873): 1632-1639.
- [3] Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(12): 1313-1323.
- [4] Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, et al. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(11): 786-798.
- [5] Rongvaux A, Takizawa H, Strowig T, et al. Human hematolymphoid system mice: current use and future potential for medicine [J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 635-674.
- [6] Gong W, Liang Y, Mi J, et al. Peptides-based vaccine MP3RT induced protective immunity against mycobacterium tuberculosis infection in a humanized mouse model [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 666290.
- [7] Heuts F, Gavier-Widén D, Carow B, et al. CD4+ cell-dependent granuloma formation in humanized mice infected with mycobacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 6482-6487.
- [8] Calderon VE, Valbuena G, Goetz Y, et al. A humanized mouse model of tuberculosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63331.
- [9] Grover A, Troy A, Rowe J, et al. Humanized NOG mice as a model for tuberculosis vaccine-induced immunity: a comparative analysis with the mouse and guinea pig models of tuberculosis [J]. *Immunology*, 2017, 152(1): 150-162.
- [10] Arrey F, Löwe D, Kuhlmann S, et al. Humanized mouse model mimicking pathology of human tuberculosis for in vivo evaluation of drug regimens [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 89.
- [11] Peiris JM, Poon LL, Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans [J]. *Clin Virol*, 2009, 45(3): 169-173.
- [12] Mulligan MJ, Bernstein DI, Winokur P, et al. Serological responses to an avian influenza A/H7N9 vaccine mixed at the point-of-use with MF59 adjuvant: A randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2014, 312(14): 1409-1419.
- [13] Wada Y, Nithichanon A, Nobusawa E, et al. A humanized mouse model identifies key amino acids for low immune genicity of H7N9 vaccines [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1283.
- [14] Ivanova II, Mihaylova NM, Manoylov IK, et al. Targeting of influenza viral epitopes to antigen-presenting cells by genetically engineered chimeric molecules in a humanized NOD SCID gamma transfer model [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(9): 1056-1070.
- [15] Majji S, Wijayalath W, Shashikumar S, et al. Differential effect of HLA class-I versus class-II transgenes on human T and B cell reconstitution and function in NRG mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28093.
- [16] Mendoza M, Ballesteros A, Qiu Q, et al. Generation and testing anti-influenza human monoclonal antibodies in a new humanized mouse model (DRAGA: HLA-A2. HLA-DR4. Rag1 KO. IL-2R γ KO. NOD) [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2018, 14(2): 345-360.
- [17] Mendoza M, Gunasekera D, Pratt KP, et al. The humanized DRAGA mouse (HLA-A2. HLA-DR4. RAG1 KO. IL-2R g c KO. NOD) establishes inducible and transmissible models for influenza type A infections [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2020, 16(9): 2222-2237.
- [18] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 181-192.
- [19] McIntosh K, Becker WB, Chanock RM. Growth in suckling-mouse brain of " IBV-like " viruses from patients with upper respiratory tract disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1967, 58(6): 2268-2273.
- [20] McCray PB Jr, Pewe L, Wohlford-Lenane C, et al. Lethal infection of K18-HACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *J Virol*, 2007, 81(2): 813-821.
- [21] Yang XH, Deng W, Tong Z, et al. Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus infection [J]. *Comp Med*, 2007, 57(5): 450-459.
- [22] Tseng CT, Huang C, Newman P, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human

- Angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor [J]. *J Virol*, 2007, 81(3): 1162–1173.
- [23] Menachery VD, Yount BL Jr, Sims AC, et al. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(11): 3048–3053.
- [24] Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice [J]. *Nature*, 2020, 583(7818): 830–833.
- [25] Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, et al. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *Cell*, 2020, 182(1): 50–58.
- [26] Winkler ES, Bailey AL, Kafai NM, et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(11): 1327–1335.
- [27] Dong W, Mead H, Tian L, et al. The K18-human ACE2 transgenic mouse model recapitulates non-severe and severe COVID-19 in response to an infectious dose of the SARS-CoV-2 virus [J]. *J Virol*, 2022, 96(1): e0096421.
- [28] Sun J, Zhuang Z, Zheng J, et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment [J]. *Cell*, 2020, 182(3): 734–743.
- [29] Zhao J, Li K, Wohlford-Lenane C, et al. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(13): 4970–4975.
- [30] Agrawal AS, Garron T, Tao X, et al. Generation of a transgenic mouse model of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection and disease [J]. *J Virol*, 2015, 89(7): 3659–3670.
- [31] Li K, Wohlford-Lenane CL, Channappanavar R, et al. Mouse-adapted MERS coronavirus causes lethal lung disease in human DPP4 knockin mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(15): E3119–E3128.
- [32] Lassnig C, Sanchez CM, Egerbacher M, et al. Development of a transgenic mouse model susceptible to human coronavirus 229E [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(23): 8275–8280.
- [33] Péault B, Tirouvanziam R, Sombardier MN, et al. Gene transfer to human fetal pulmonary tissue developed in immunodeficient SCID mice [J]. *Hum Gene Ther*, 1994, 5(9): 1131–1137.
- [34] De Paepe ME, Chu S, Hall S, et al. The human fetal lung xenograft: validation as model of microvascular remodeling in the postglandular lung [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2012, 47(12): 1192–1203.
- [35] Maidji E, Kosikova G, Joshi P, et al. Impaired surfactant production by alveolar epithelial cells in a SCID-hu lung mouse model of congenital human cytomegalovirus infection [J]. *J Virol*, 2012, 86(23): 12795–12805.
- [36] Wang W, Pan D, Fu W, et al. A SCID mouse-human lung xenograft model of varicella-zoster virus infection [J]. *Antiviral Res*, 2017, 146: 45–53.
- [37] Wahl A, De C, Abad Fernandez M, et al. Precision mouse models with expanded tropism for human pathogens [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(10): 1163–1173.
- [38] Wahl A, Gralinski LE, Johnson CE, et al. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801 [J]. *Nature*, 2021, 591(7850): 451–457.
- [39] Fu W, Wang W, Yuan L, et al. A SCID mouse-human lung xenograft model of SARS-CoV-2 infection [J]. *Theranostics*, 2021, 11(13): 6607–6615.
- [40] Stripp BR, Maxson K, Mera R, et al. Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269(6): L791–L799.
- [41] Hay J, Shahzeidi S, Laurent G. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage [J]. *Arch Toxicol*, 1991, 65(2): 81–94.
- [42] Wang X, Zhao Y, Li D, et al. Intrapulmonary distal airway stem cell transplantation repairs lung injury in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(6): e13046.
- [43] Kathiriya JJ, Wang C, Zhou M, et al. Human alveolar type 2 epithelium transdifferentiates into metaplastic KRT5+ basal cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(1): 10–23.
- [44] Soh BS, Zheng D, Li Yeo JS, et al. CD166(pos) subpopulation from differentiated human ES and iPS cells support repair of acute lung injury [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(12): 2335–2346.
- [45] Rosen C, Shezen E, Aronovich A, et al. Preconditioning allows engraftment of mouse and human embryonic lung cells, enabling lung repair in mice [J]. *Nat Med*, 2015, 21(8): 869–879.
- [46] Sefik E, Israelow B, Mirza H, et al. A humanized mouse model of chronic COVID-19 [EB/OL]. (2021-02-26) [2021-12-17]. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01155-4>.
- [47] Valbuena G, Halliday H, Borisevich V, et al. A human lung xenograft mouse model of Nipah virus infection [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(4): e1004063.
- [48] Escaffre O, Saito TB, Juelich TL, et al. Contribution of human lung parenchyma and leukocyte influx to oxidative stress and immune system-mediated pathology following Nipah virus infection [J]. *J Virol*, 2017, 91(15): e00275–17.
- [49] Wang Y, Wang L, Fu C, et al. Exploration of human lung-resident immunity and response to respiratory viral immunization in a humanized mouse model [J]. *J Immunol*, 2022, 208(2): 420–428.

郭文文,赵亚,白敏,等. 神经干细胞移植在神经退行性疾病中的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 274-282.
Guo WW, Zhao Y, Bai M, et al. Research progress of neural stem cell transplantation in neurodegenerative diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 274-282.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.017

神经干细胞移植在神经退行性疾病中的研究进展

郭文文^{1,2}, 赵亚², 白敏¹, 张延英³, 王颖花⁴, 汪永锋^{3*}, 师长宏^{2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 3. 甘肃中医药大学/甘肃省道地药材质量标准化技术与推广工程实验室/甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室/甘肃省实验动物行业技术中心, 兰州 730000; 4. 延安大学, 陕西 延安 716000)

【摘要】 神经退行性疾病是一类可导致感觉丧失、运动功能丧失和记忆衰竭等症状的难治性疾病, 传统治疗方法虽能延缓疾病进展, 但局限性明显。而神经干细胞移植作为一种潜在的新型治疗方式能够有效促进神经细胞的功能恢复及组织再生, 在神经退行性疾病的治疗应用方面前景广阔。因此, 本文通过对神经干细胞的现有来源及其在神经退行性疾病治疗中的研究进展进行综述, 以期对神经干细胞移植在神经退行性疾病治疗中的应用提供新的思路。

【关键词】 神经干细胞; 神经退行性疾病; 神经分化; 神经营养因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0274-09

Research progress of neural stem cell transplantation in neurodegenerative diseases

GUO Wenwen^{1,2}, ZHAO Ya², BAI Min¹, ZHANG Yanying³, WANG Yinghua⁴, WANG Yongfeng^{3*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032. 3. Gansu University of Chinese Medicine/Gansu Engineering Laboratory for Quality Standardization of Authentic Medicinal Materials in Gansu Province/Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Chemistry and Quality Research in Gansu Province/Gansu Experimental Animal Industry Technology Center, Lanzhou 730000. 4. Yan'an University, Yan'an 716000)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn; WANG Yongfeng. E-mail: wyf@gszy.edu.cn

【Abstract】 Neurodegenerative diseases are refractory diseases that can cause symptoms such as loss of sensation, loss of motor function and memory failure. Although traditional treatment method can delay the progress of such diseases, they have obvious limitations. A potential new treatment method involving neural stem cell transplantation can effectively promote the functional recovery and tissue regeneration of nerve cells, and provides a promising treatment for neurodegenerative diseases. Therefore, this paper reviews the existing sources of neural stem cells and research progress using these cells in the treatment of neurodegenerative diseases, and provides the foundation and direction for further research and application of neural stem cell transplantation in neurodegenerative diseases.

【Keywords】 neural stem cells; neurodegenerative disease; nerve differentiation; neurotrophic factors

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

【基金项目】 国家自然科学基金(81760828), 甘肃省中医药管理局科研课题(GZK-2019-26), 甘肃省自然科学基金(20JR5RA186), 陕西省创新能力支持计划(2021PT-037), 军队实验动物专项课题(SYDW(2018)01)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81760828), Scientific Research Project of Gansu Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine(GZK-2019-26), Gansu Provincial Natural Science Fund(20JR5RA186), Shaanxi Province Innovation Capacity Support Plan(2021PT-037), Special Topic of Military Experimental Animals(SYDW(2018)01).

【作者简介】 郭文文(1996—), 女, 在读硕士研究生。Email: 553743953@qq.com

【通信作者】 师长宏, 男, 博士, 教授, 博士生导师。Email: changhong@fmmu.edu.cn;

汪永锋, 男, 教授, 研究方向: 临床基础研究。Email: wyf@gszy.edu.cn。

* 共同通信作者

神经干细胞(neural stem cell, NSC)能够分化为多种细胞谱系,这些细胞谱系包括神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞等,在神经再生中起到重要的作用^[1]。NSC 分布在整个发育中的大脑中,位于大脑中的两个主要神经源性生态位——侧脑室的脑室下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回的颗粒下区(subgranular zone, SGZ)^[2]。中枢神经系统(central nervous system, CNS)发生急性损伤、慢性损伤或退行性变后,内源性 NSC 变得活跃并参与脑修复过程,但受伤的 CNS 内的 NSC 被限制在分散的位置,数量很少且被不支持神经元分化的微环境所包围,从而导致 CNS 内在自我修复能力不足或无效^[3]。

随着生命科学领域各项研究技术的不断成熟,对大脑进行全面深层次研究已经具备可能。其中,NSC 移植是近年来脑研究领域的重要热点之一,该技术已广泛应用于各种神经性疾病的治疗研究。有报道指出移植人神经诱导性干细胞可用于治疗大小鼠模型中包括创伤性脑损伤、脊髓损伤及中风等在内的多种神经疾病^[4]。当前,大多数 NSC 研究依赖于啮齿动物模型。但是,人与啮齿动物的 NSC

有很大不同,许多疾病风险基因在二者之间表达存在较大差异。因此,基于人神经细胞嵌合小鼠的模型制备可在动物水平实现对人脑的模拟,且相关神经诱导性干细胞移植已应用于各个领域,以便更加深入了解干细胞在受伤大脑中的治疗作用的潜在机制。NSC 的体外分离分析已被证明是揭示神经发生的细胞和分子机制的重要方法,能够进一步用于基于干细胞疗法的神经系统疾病和损伤的治疗^[5]。因此,外源性 NSC 移植是目前治疗神经退行性疾病及研究的热点。本文就 NSC 的来源及其在神经退行性疾病治疗研究进展进行综述,以期对神经退行性疾病的治疗提供新的思路。

1 神经干细胞来源

NSC 移植所需要的细胞量巨大,细胞来源已成为 NSC 移植应用于临床治疗及科学研究必须解决的首要问题^[6]。研究表明,具有自我更新能力的 NSC 能够从啮齿动物的胚胎组织和人脑组织中分离出来^[7]。目前已明确可从 3 种来源获得 NSC,包括从原代组织中直接提取、从多能干细胞中分化以及从体细胞中转分化(见图 1)。

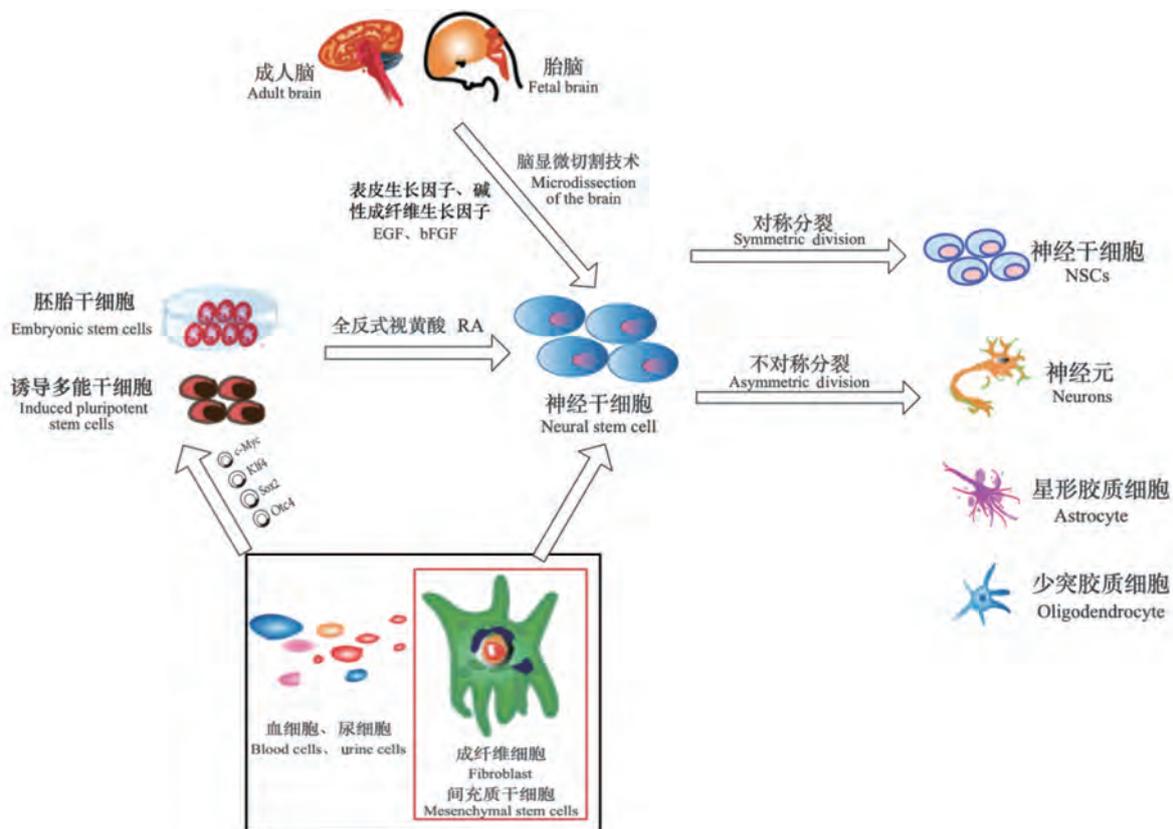


图 1 神经干细胞的来源

Figure 1 Source of neural stem cells

1.1 从原代组织中直接提取

从原代组织中直接提取的方法是直接从胎儿或成人的脑和脊髓组织中直接提取 NSC, 进而进行体外诱导分化。NSC 位于成人大脑和胚胎的不同区域, 它们有产生不同类型的神经元和胶质细胞的趋势。成年哺乳动物大脑中的脑室下区和胚胎脑中的神经节隆起是富含 NSC 的区域, 为 NSC 提供了良好的来源^[8]。1992 年 Reynolds 等^[9]首次从成年哺乳动物脑室管膜下区分离鉴定出 NSC; 最近 Farshad 等^[10]通过改进脑显微切割技术, 缩短手术时间, 在适宜的环境温度和无菌条件下从胚胎小鼠颅骨中取出整个脑组织并分离出较高比例的 NSC。而通过大脑纹状体和胸脊髓的显微解剖可获得原始 NSC, 将分离出的原始 NSC 在含有表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 的单细胞悬浮液中进行体外培养, 可形成称为“神经球”的非依附性球形簇, 也可以选择性的在培养基中进行单层贴壁培养。但是由于提供三维环境的胚状体 (embryoid body, EB) 更有利于 NSC 的分化和培养, 因此, EB 培养是目前分离和维持 NSC 最流行和最可靠的方法^[11]。

1.2 多能干细胞向神经干细胞的分化

多能干细胞包括胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 和诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs), 两者都可通过分化产生所需要的细胞^[12]。ESC 源自植入前胚胎, 具有多能性, 可以分化为外胚层、内胚层和中胚层^[13]。有充分证据表明, ESC 可以分化为 NSC, 然后分化为神经元或神经胶质^[14]。诱导 ESCs 向 NSC 转分化的实验技术方法众多, 其中, 通过采用全反式视黄酸 (all-trans retinoic acid, RA) 诱导 NSC 的方法最为经典。研究表明, RA 可以调节 ESC 的生殖细胞分化和神经分化, 建立并改善 ESC 分化为 NSC 所依赖的微环境^[15]。诱导分化过程中加入 RA 的时间点及浓度的不同会导致细胞命运的不同。例如, 高 RA 浓度会增加神经分化的速度, 而低 RA 浓度会诱导 ESCs 向心肌细胞分化; 高 RA 浓度诱导 ESCs 为背侧表型, 低 RA 浓度诱导 ESCs 腹侧表型^[16]。然而这种方法分化效率低, 可能导致组织移植中神经过度生长或形成肿瘤, 同时也包括伦理安全等问题, 因此, 不适用于移植治疗^[17]。

2006 年, 日本京都大学 Takahashi 等^[13]首次报

道了有关诱导多能干细胞的研究, 该研究使用逆转录病毒转染多能性基因 (Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4), 通过适当的信号输入有效地将成纤维细胞转分化为 iPSCs。随着技术发展, 人类 iPSCs (hiPSCs) 可以通过使用一组相同的多能性相关基因获得^[18], 从其他细胞类型如人角质形成细胞、人外周血细胞、脂肪细胞、肝细胞、胃细胞等获得 hiPSCs 也成为可能^[19]。Kozhich 等^[20]通过无血清和缺乏营养的培养基单层培养中, 使 iPSCs 经过神经“玫瑰花结”阶段直接分化为 NSC^[21], 这种方法适用于从人类 iPSCs 标准化分化和生成神经细胞。在形态学、电生理特性和基因表达谱方面, iPSCs 衍生的神经元与人类神经元具有相似的特征。因此, iPSCs 衍生的 NSC 已成为细胞疗法的一个理想的来源^[22]。

1.3 从体细胞中转分化

随着诱导多能干细胞 (iPSCs) 技术的发展, 使用来自胚胎或胎儿神经组织的同种异体 NSC 的研究方法正逐渐成为主流。通过重编程成体细胞获得 hiPSC 是研究疾病发生和发病机制的代表性方法系统^[23], 然而, 这种方式需要较长时间才能将这些细胞分化为功能性神经细胞, 且在重编程过程中表现出遗传信息的重置。相反, 将体细胞直接转分化为神经元细胞的速度更快、效率更高, 细胞治疗更安全, 并且可以保留捐赠者的年龄特征^[24]。

转分化, 也称为谱系重编程, 最初是由塞尔曼和卡托斯在 1974 年创造的^[25]。在这个过程中, 一种类型的成熟体细胞可不经中间多能状态直接转化为另一种类型的成熟体细胞, 其主要特征在于 iPSC 阶段的缺失或不明显, 以及通过重编程增殖细胞 (例如成纤维细胞或星形胶质细胞) 直接获得 NSC^[24]。

研究证明谱系特异性转录因子 (transcription factor, TF) 的强制表达可以重新编程各种体细胞类型的发育潜力, 将 TF 与培养基补充剂 (例如稳定生成 NSC 所需的小分子和生长因子) 结合使用, 可实现体细胞直接转分化为 NSC^[26]。与 iPSC 生成相比, 能够转化为 iNSC 的 TF 的选择非常多样化。第一个直接转化策略是通过在小鼠成纤维细胞中过表达三种 TF, 即 Ascl1、Brn2 和 Myt1l (BAM 因子), 以将人类成纤维细胞转化为 NSC^[27]。近年来, 人们发现多种 TF 组合可以用来从成纤维细胞产生亚型特异性蛋白, 而在 TF 筛选转化研究中已经发现了额外的促神经元因子, 如 brn3a/b/c、brn4s 和

ezh2^[28]。此外,使用病毒载体将外源性基因引入细胞是目前 NSC 诱导转分化中最突出的方法,其中慢病毒和逆转录病毒因其能够有效地直接整合到宿主细胞的基因组中并赋予适当水平的 TF 表达,是目前最常使用的病毒载体^[29]。然而,TFs 的病毒传递具有不良副作用,可能导致肿瘤发生及突变,影响其临床应用^[30]。除了 TF 外,在体外培养中,还可利用小分子调控特异性靶点和表观遗传机制来产生神经祖细胞和神经元^[31]。小分子可以介导施加病毒剂的 TF 输送,以提高重编程效率。据报道,通过将细胞连续暴露于 12 个小分子的组合中,可以有效且直接地将人类成纤维细胞重编程为谷氨酸能神经元,这些化学诱导神经元 (ciN) 显示出神经元转录网络及成熟的放电模式,并形成功能性突触^[32]。

除此之外,通过向细胞培养基中添加多种因子,特别是各种生长因子,如脑源性神经营养因子 (BDNF)、血小板源性生长因子 (PDGF)、表皮生长因子 (EGF)、成纤维细胞生长因子 2 (FGF-2) 和全反式视黄酸 (RA),能够将骨髓来源的人类间充质干细胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) 重编程为神经干细胞^[33]。

与多能干细胞诱导得到的神经元相比,转分化的 NSC 具有明显优势,它能够在体外进行扩增,并保留产生多种神经元亚型和胶质细胞的能力^[34]。而这种来自体细胞如皮肤成纤维细胞、尿细胞和血细胞转分化在临床上容易实现^[35]。

NSC 作为中枢神经系统中的储备细胞,通过神经祖细胞阶段分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,替代凋亡和死亡细胞进行损伤后的修复。还可分泌神经营养因子、生长因子和细胞因子促进突触生长,保护现有神经细胞免受原位损伤^[36]。以上 3 种来源特别是从 iPSCs、ESC 中获得的 NSC 和胶质细胞可帮助急慢性损伤后的神经功能恢复,用于神经退行性疾病的治疗^[37]。

2 神经干细胞在神经退行性疾病治疗中的作用

神经退行性疾病 (neurodegenerative diseases, ND) 是一种因外周或中枢神经系统内的神经元细胞丢失而引起的疾病状态,内源性神经细胞的可修复性不足或治疗失败是治疗该类疾病的重要障碍^[38]。基于干细胞的移植,特别是使用来自 iPSC、ESC 或 NSC 的神经元和神经胶质细胞,将成为神经退行性

疾病的常规治疗方法,并且可能通过不同的机制,如神经营养因子的产生、神经炎症的降低、突触可塑性的增强和细胞的替代,对神经退行性疾病产生有益的作用^[39]。这一类疾病主要包括创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI)、脊髓损伤 (Spinal cord injury, SCI)、中风 (Stroke)、阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 及帕金森综合征 (Parkinson's disease, PD) 等。

2.1 创伤性脑损伤

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是一种常见疾病,其主要损害是血脑屏障 (BBB) 破坏和神经元坏死^[40]。血脑屏障破坏导致缺氧增加,造成神经损伤和死亡,损伤神经元释放异常神经递质导致兴奋性毒性细胞损伤和死亡,继而出现慢性炎症及进一步的细胞损伤等病理表现^[41]。

研究发现,细胞治疗已成为 TBI 的一种新型治疗方式,多种类型的细胞都可用于 TBI 的治疗,如 NSC、ESC、NPC、MSCs、人源性畸胎瘤细胞 (NTera2, NT2)、多能成体祖细胞和内皮祖细胞等^[42]。其中通过 NSC 和 MSCs 的分化促进细胞置换是 TBI 后的重要治疗作用机制^[43]。NSC 可通过“生物桥”在 SVZ 和损伤部位之间形成通路,直接从 SVZ 迁移到损伤部位并分化为神经元和神经胶质细胞,从而增强宿主神经源性细胞的迁移^[44]。此外,内皮细胞通过产生可溶性生长因子,如脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 刺激 NSC 的增殖和分化以及成神经细胞的迁移^[45]。

目前,由于 NSC 和 NPCs 难以大量产生,在临床试验中受到限制,而 MSCs 由于易于分离、免疫抑制特性以及缺乏伦理争议的特点,被认为是具有临床应用前景的治疗细胞^[46]。相关研究证明 TBI 后, MSC 移植细胞可以在损伤部位存活和迁移,有助于神经保护、神经修复和运动功能。在 Mahmood 等^[47]的临床前研究中,将 MSC 直接递送到大脑中的受损组织,或通过静脉内或动脉内注射间接递送,可显著改善 TBI 引起的运动和认知缺陷,并且输注的 MSC 能够绕过血脑屏障提高 TBI 后大脑中神经保护因子的表达。Munoz 等^[48]的研究表明,将 MSCs 直接植入海马体后, MSCs 促进了内源性 NSC 的增殖、迁移和分化。此外, MSC 的分泌组可以通过降低脑组织中细胞因子的表达来调节 TBI 后的炎

症反应。Zhang 等^[49]在 TBI 患者的颅骨修复手术期间将 MSCs 直接移植到受伤脑组织中未显示出不良反应,表明 MSCs 在临床应用中治疗 TBI 的安全性。

2.2 脊髓损伤

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)可破坏神经脉冲传导信号,导致脊髓的正常功能发生暂时或永久的变化,是最致残的神经系统疾病之一^[50]。目前,SCI 的治疗策略主要是促进大脑和脊髓受损神经元的神经再生及突触重塑以恢复神经功能。Zhao 等^[51]研究证明,移植的 NSC 可以在宿主脊髓中分化为神经元,并向损伤部位迁移,促进神经纤维的修复和再生,使得脊髓神经元的凋亡显著减少。通过斜面测试、后肢运动功能评分(包括后肢运动的频率和质量)以及运用 Mp150 数据采集分析系统评估运动神经传导等显示,NSC 移植可显著改善脊髓横断模型大鼠的运动功能。

Lu 等^[52]的一项研究显示,NSC 移植能够特异性支持脊髓损伤后的轴突再生。这项研究中,用特异性 ELISA 检测发现,移植前体外培养的 NSC 能够分泌大量神经营养因子,移植 2 周后在 SCI 模型小鼠中观察到,NSC 在脊髓损伤部位容易存活,有良好的血管形成,并能短距离迁移,最主要的是宿主中对 NSC 所分泌的神经营养因子敏感的轴突细胞得到显著生长。

2.3 中风

中风(stroke)是一种急性脑血管疾病,包括缺血性和出血性中风。已有报道发现,人类 iPSCs 或 ESCs 衍生的 NSC 系在缺血性和出血性中风动物模型中提供神经营养因子并促进血管生成和神经生成^[53]。即移植的 NSC 可以通过分化为成熟的神经细胞类型并整合到宿主脑组织中充当细胞替代疗法,促进血管生成并启动神经修复机制,包括突触重组和神经发生^[54]。近年来,能够产生成熟神经细胞等多种细胞类型的 NSC 系得到发展,包括从胎儿组织、胚胎干细胞(ESCs)和诱导多能干细胞(iPSCs)中分离出的 NSC,都被证明能促进中风和类似神经障碍后的恢复。胎儿来源的 NSC 是通过在孕后 7 ~ 21 d 分离人胎儿皮层、中脑或脊髓组织而产生的。当这些细胞在有丝分裂原如表皮生长因子(EGF)和成纤维细胞生长因-2(FGF-2)中培养时,即使没有遗传修饰,也能长期扩增,同时保持其神经源性和胶质源性多分化潜能^[55]。然而,也有研究表明,胎儿 NSC 比其他 NSC 系衰老速度更快,不

利于大规模诱导分化^[56]。胚胎干细胞诱导的神经干细胞(ESC-NSC)的治疗用途可能优于胎儿来源的 NSC,因为理论上有限永生的 ESC-NSC 来源,可以扩大细胞制造以满足临床需求^[57]。

目前为止,还没有临床试验测试 ESC-NSC 用于中风,但是 Daadi 等^[58]在补充有 EGF、bFGF 和白血病抑制因子的无血清培养基中,从 hESCs 中分离出一种同质的可自我更新的 hNSC 系,并在大脑中动脉闭塞(MCAO)中风模型大鼠中测试这些细胞的功效,结果显示移植的细胞存活良好,并分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。行为学分析表明,与移植前组和载体治疗组相比,移植 NSC 显著增强了受损对侧前肢的独立使用。该研究克服了伦理和监管方面的挑战,解决了从 ESCs 衍生治疗性 NSC 系的问题,为未来 ESC-NSC 治疗中风的临床试验铺平了道路。

2.4 阿尔茨海默病

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种因大脑皮层和皮层下区域神经元数量显著减少导致的记忆丧失和认知障碍疾病^[59]。在病理学上,AD 的特征是突触和神经元的广泛丢失、炎症以及 β -淀粉样蛋白(A β)和过度磷酸化的 tau 神经原纤维缠结^[60],且 Poon 等^[61]在 AD 患者及动物模型中观察到神经营养素表达减少和神经营养素轴突运输受损。由于神经营养因子在突触可塑性、神经元健康以及学习和记忆中发挥重要作用,因此恢复 AD 大脑中丢失的神经营养因子是治疗的关键所在。Marsh 等^[62]的研究将正常小鼠 NSC 移植到老年 3xTg-AD 小鼠的海马体中观察到,NSC 移植可以改善海马突触密度,挽救海马体依赖性学习和记忆,为改善认知提供了潜在的结构基础。但是 NSC 移植后淀粉样蛋白和 tau 的水平没有变化,而是由于 NSC 产生高水平的神经营养因子显著影响了认知和突触可塑性。

早期研究表明,神经生长因子可防止神经元死亡,改善兴奋性毒性和淀粉样蛋白毒性动物模型的记忆功能^[63],用于治疗 AD 脑中的神经元变性和细胞死亡。然而,神经生长因子不能穿过血脑屏障,通过外周给药无法将神经生长因子输送到大脑。最新的技术方法采用生物基因治疗方法(基因修饰细胞),神经生长因子可直接插入大脑并扩散 2 ~ 5 mm^[64]。Tuszynski 等^[65]在 8 名轻度 AD 患者中进行了一项体外生物基因传递的 I 期临床试验,将自体

成纤维细胞经基因修饰后表达人神经生长因子植入大脑。经过 22 个月的随访,没有发现副作用。最终研究显示 NSC 可以进行遗传修饰产生新基因,并且在移植后具有高迁移能力,可用来代替纤维母细胞,纤维母细胞在移植后主要用于递送神经生长因子以防止基底前脑胆碱能神经元的退化^[66]。

2.5 帕金森综合征

帕金森综合征(Parkinson's disease, PD)是仅次于阿尔茨海默病的第 2 种最常见的神经退行性疾病,影响全球超过 600 万人,其临床表现主要是运动功能障碍,具体特征表现为运动迟缓、肌强直、静止性震颤和姿势不稳^[67]。大多数与 PD 相关的神经退行性过程是由病理性 α -突触核蛋白(α -syn)的积累驱动的, α -突触核蛋白是一种突触前神经元蛋白,在神经系统中聚集形成路易小体(Lewy bodies, LBs)和路易神经突(Lewy neurites, LNs)^[68]。此外,在病理学方面,中脑黑质致密部(SNpc)中多巴胺能(DA)神经元的缺失以及剩余 DA 细胞中称为 LB 的细胞质蛋白聚集体的存在是 PD 的标志^[69]。因此 SNpc 神经元的缺失导致纹状体多巴胺能(DA)神经元的缺乏,是 PD 发病的主要原因。

DA 细胞移植被认为是最有前途的细胞替代疗法,将中脑 DA 神经元移植到 DA 耗竭的纹状体中

可以恢复 DA 神经传递以替代 PD 患者丢失的神经元。最近 Zhang 等^[70]的研究表明神经干细胞体外分化过程中,使用二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)(中药何首乌的活性成分),能够增加 tuj-1 阳性神经元的数量,提高酪氨酸羟化酶(th)阳性细胞及多巴胺转运体阳性神经元的比例,而后者是成熟 DA 神经元的晚期标志。此外中脑 DA 神经元的纹状体移植可以从各种来源获得,例如胎儿组织、颈动脉体细胞及未成熟的视网膜细胞^[71]。而神经干细胞能够分化为支持性神经胶质亚型,如星形胶质细胞,这些亚型可以产生关键的生长因子来影响突触可塑性和神经元功能,并调节脑血管形成,可能在功能恢复中发挥重要作用,因此许多人尝试使用 NSC 进行神经元置换,推测在神经元分化后细胞将与宿主神经元回路整合,以替换在 PD 中死亡的神经元^[72]。然而,这项工作具有挑战性,且结果喜忧参半。相反,最近的研究表明^[73],神经营养因子(BDNF、GDNF、IGF-1、NGF)的内源性分泌或遗传过度表达可能为基于 NSC 的治疗提供一种替代且可能更有前景的方法。移植 NSC 分泌的神经营养因子能够增加突触可塑性,并促进神经元存活,从而改善认知和运动表现,增强长期治疗作用。

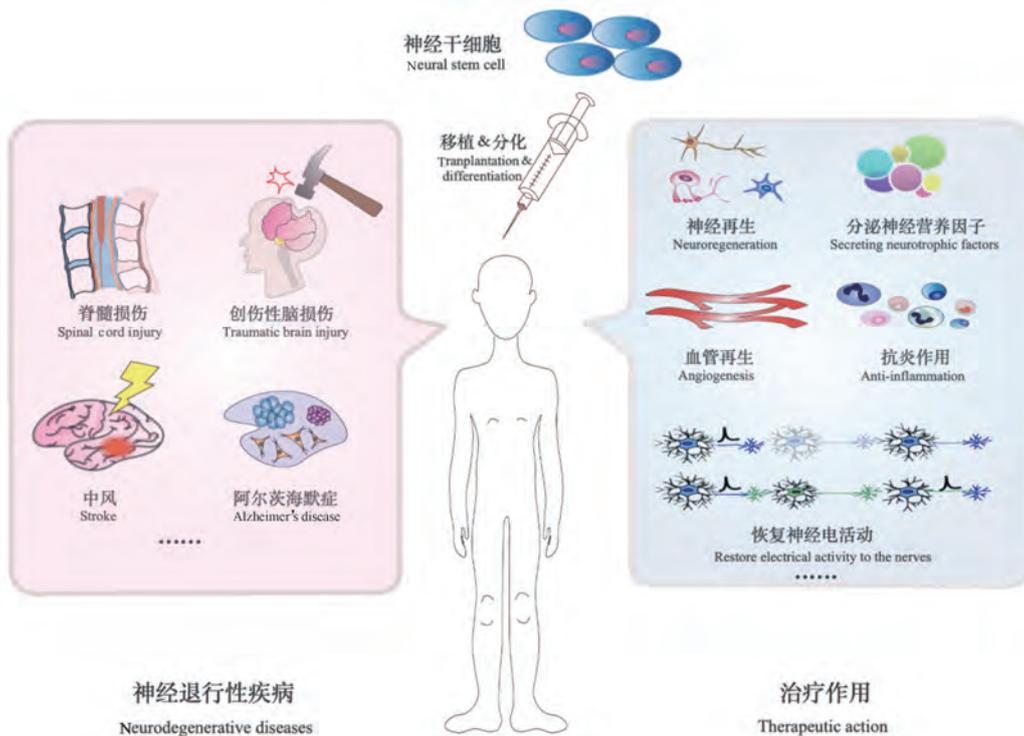


图 2 神经干细胞的治疗作用
Figure 2 Therapeutic effects of neural stem cells

3 总结与展望

将外源性 NSC 通过不同的途径移植到 ND 模型动物体内后可通过不同的机制,其发挥的作用可能有^[74](见图 2):(1) NSC 再分化为神经元和胶质细胞,分泌神经营养因子等,改善受损神经元的存活情况;(2) 促进损伤部位的血管生成和神经再生;(3) 启动小胶质细胞或周围造血细胞所介导的抗炎作用,保护新生血管;(4) 促进神经纤维的修复和再生,恢复神经动作电位。

对于大多数 CNS 损伤,已经提出应用不同来源的干细胞来进行自发恢复,但大多只能产生出有限的细胞表型。最近研究建议将诱导多能干细胞(iPSCs)用于自体移植,但在应用过程中,这些基因调控的细胞由于逆转录病毒载体的不受控制整合和重组事件的发生将导致癌症形成^[75],因而目前临床上用于神经性疾病治疗的最佳选择还是 NSC。NSC 与受损细胞具有相同的组织来源,通常被认为是细胞介导的神经疾病治疗的最佳细胞类型^[76]。

NSC 移植到哺乳动物 CNS 的基础研究和临床应用已经进行了几十年,尽管神经移植可以促进受损神经元的再生与重建,恢复神经功能缺陷,但目前要实现临床应用,仍存在一些关键障碍需要克服,其中包括^[6-14]:(1) NSC 的诱导分化和增殖的机制尚不明确,在目前研究水平下尚不能精准控制 NSC 的定向分化,从而影响了 NSC 移植的治疗效果;(2) 移植与宿主之间的多种免疫学问题,鼠源性 NSC 与人源性 NSC 的种属差异以及动物内环境与人体内环境的差异导致的移植后排斥反应;(3) 移植的 NSC 具有成瘤的高风险以及伦理学问题等;(4) NSC 在活生物体内生存率低和治疗效果不佳。

即使有诸多障碍与困难存在,但是在干细胞治疗和研究方面,NSC 科学为人们更好理解疾病打下了基础,NSC 移植的治疗潜力已经在不同的 ND 动物模型中得到证实,这将是神经退行性疾病最具前景的治疗方法。目前,NSC 治疗的潜在机制尚不清楚,还需要更多的基础研究进一步解决上述问题。但是当前大多数 NSCs 研究依赖于啮齿动物模型,而人与啮齿动物的 NSCs 有很大不同,许多疾病风险基因在二者之间表达存在较大差异。因此本文通过综述 NSCs 的基本特性、来源及目前细胞移植的技术手段在各种神经退行性疾病中的应用进展,以期建立人神经干细胞嵌合动物模型的成熟方

法提供参考,从而在动物水平实现对人脑的模拟,更好地为神经科学研究提供动物模型和研究基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] Pang AL, Xiong LL, Xia QJ, et al. Neural stem cell transplantation is associated with inhibition of apoptosis, bcl-xl upregulation, and recovery of neurological function in a rat model of traumatic brain injury [J]. *Cell Transplant*, 2017, 26(7): 1262-1275.
- [2] Huang L, Zhang L. Neural stem cell therapies and hypoxic ischemic brain injury [J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 173: 1-17.
- [3] Gonzalez R, Hamblin MH, Lee JP. Neural stem cell transplantation and CNS diseases [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2016, 15(8): 881-886.
- [4] De Gioia R, Biella F, Citterio G, et al. Neural stem cell transplantation for neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3103.
- [5] Guo W, Patzlaff NE, Jobe EM, et al. Isolation of multipotent neural stem or progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(11): 2005-2012.
- [6] Hsu YC, Chen SL, Wang DY, et al. Stem cell based therapy in neural repair [J]. *Biomed*, 2013, 36(3): 98-105.
- [7] Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose derived stem cells-a review [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(4): 1111-1126.
- [8] Li H, Hader AT, Han YR, et al. Isolation of a novel rat neural progenitor clone that expresses Dlx family transcription factors and gives rise to functional GABAergic neurons in culture [J]. *Dev Neurobiol*, 2012, 72(6): 805-820.
- [9] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. *Science*, 1992, 255(5052): 1707-1710.
- [10] Farshad HM, Maryam SZ, Bahareh AS, et al. Isolation and culture of embryonic mouse neural stem cells [J]. *J Vis Exp*, 2018, 141: 10.
- [11] Deshpande K, Saatian B, Martirosian V, et al. Isolation of neural stem cells from whole brain tissues of adult mice [J]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2019, 49(1): e80.
- [12] Liu G, David BT, Trawczynski M, et al. Advances in pluripotent stem cells: history, mechanisms, technologies, and applications [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(1): 3-32.
- [13] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [14] Wang J, Jiao F, Pan XH, et al. Directed differentiation of chick embryonic germ cells into neural cells using retinoic acid induction *in vitro* [J]. *Neurosci Methods*, 2009, 177(1): 168-176.
- [15] Wu H, Zhao J, Fu B, et al. Retinoic acid induced upregulation of miR-219 promotes the differentiation of embryonic stem cells

- into neural cells [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(7): e2953.
- [16] Rohwedel J, Guan K, Wobus AM. Induction of cellular differentiation by retinoic acid *in vitro* [J]. *Cells Tissues Organs*, 1999, 165(3-4): 190-202.
- [17] Zhang SC. Embryonic stem cells for neural replacement therapy: prospects and challenges [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2003, 12(6): 625-634.
- [18] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [19] Galiakberova AA, Dashinimaev EB. Neural stem cells and methods for their generation from induced pluripotent stem cells *in vitro* [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 815.
- [20] Kozhich OA, Hamilton RS, Mallon BS. Standardized generation and differentiation of neural precursor cells from human pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2013, 9(4): 531-536.
- [21] Wilson PG, Stice SS. Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells [J]. *Stem Cell Rev*, 2006, 2(1): 67-77.
- [22] Rhee YH, Ko JY, Chang MY, et al. Protein based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6): 2326-2335.
- [23] Samoilova EM, Kalsin VA, Kushnir NM, et al. Adult neural stem cells: basic research and production strategies for neurorestorative therapy [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 4835491.
- [24] Mollinari C, Merlo D. Direct reprogramming of somatic cells to neurons: pros and cons of chemical approach [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(6): 1330-1336.
- [25] Selman K, Kafatos FC. Transdifferentiation in the labial gland of silk moths: is DNA required for cellular metamorphosis [J]. *Cell Differ*, 1974, 3(2): 81-94.
- [26] Zhang M, Lin YH, Sun YJ, et al. Pharmacological reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by signaling-directed transcriptional activation [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(5): 653-667.
- [27] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors [J]. *Nature*, 2010, 463(7284): 1035-1041.
- [28] Traxler L, Edenhofer F, Mertens J. Next-generation disease modeling with direct conversion: a new path to old neurons [J]. *FEBS Lett*, 2019, 593(23): 3316-3337.
- [29] Mollinari C, Merlo D. Direct reprogramming of somatic cells to neurons: pros and cons of chemical approach [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(6): 1330-1336.
- [30] Cheng L, Hu W, Qiu B, et al. Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia [J]. *Cell Res*, 2014, 24(6): 665-679.
- [31] Gao L, Guan W, Wang M, et al. Direct generation of human neuronal cells from adult astrocytes by small molecules [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 8(3): 538-547.
- [32] Yang Y, Chen R, Wu X, et al. Rapid and efficient conversion of human fibroblasts into functional neurons by small molecules [J]. *Stem Cell Rep*, 2019, 13(5): 862-876.
- [33] Herman A, Liebau S, Gastl R, et al. Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 83(8): 1502-1514.
- [34] Kim J, Efe JA, Zhu S, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(19): 7838-7843.
- [35] Erharter A, Rizzi S, Mertens J, et al. Take the shortcut-direct conversion of somatic cells into induced neural stem cells and their biomedical applications [J]. *FEBS Lett*, 2019, 593(23): 3353-3369.
- [36] Mira RG, Lira M, Cerpa W. Traumatic Brain injury: mechanisms of glial response [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 740939.
- [37] Kim SU, Lee HJ, Kim YB. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases [J]. *Neuropathology*, 2013, 33(5): 491-504.
- [38] Hamid AM, Mitra-Sadat SS, Zarrindast MR. Therapeutic potential of stem cells for treatment of neurodegenerative diseases [J]. *Biotechnol Lett*, 2020, 42(7): 1073-1101.
- [39] De Gioia R, Biella F, Citterio G, et al. Neural stem cell transplantation for neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3103.
- [40] Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic brain injury: an overview of epidemiology, pathophysiology, and medical management [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 213-238.
- [41] McGinn MJ, Povlishock JT. Pathophysiology of traumatic brain injury [J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2016, 27(4): 397-407.
- [42] Das M, Mayilsamy K, Mohapatra SS, et al. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of traumatic brain injury: progress and prospects [J]. *Rev Neurosci*, 2019, 30(8): 839-855.
- [43] Weston NM, Sun D. The potential of stem cells in treatment of traumatic brain injury [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018, 18(1): 1.
- [44] Tajiri N, Kaneko Y, Shinozuka K, et al. Stem cell recruitment of newly formed host cells via a successful seduction? Filling the gap between neurogenic niche and injured brain site [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74857.
- [45] Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, et al. Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(5): 1008-1016.
- [46] Cozene B, Sadanandan N, Farooq J, et al. Mesenchymal stem cell-induced anti-neuroinflammation against traumatic brain injury [J]. *Cell Transplant*, 2021, 30: 9636897211035715.
- [47] Mahmood A, Lu D, Chopp MJ. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury [J]. *J*

- Neurotrauma, 2004, 21(1): 33–39.
- [48] Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, et al. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(50): 18171–18176.
- [49] Zhang ZX, Guan LX, Zhang K, et al. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury [J]. Cytotherapy, 2008, 10(2): 134–139.
- [50] Mourelo Fariña M, Salvador de la Barrera S, Montoto Marqués A, et al. Update on traumatic acute spinal cord injury. Part 2. [J]. Med Intensiva, 2017, 41(5): 306–315.
- [51] Zhao XM, He XY, Liu J, et al. Neural stem cell transplantation improves locomotor function in spinal cord transection rats associated with nerve regeneration and IGF-1 R expression [J]. Cell Transplant, 2019, 28(9–10): 1197–1211.
- [52] Lu P, Jones LL, Snyder EY, et al. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2003, 181(2): 115–129.
- [53] Stonesifer C, Corey S, Ghanekar S, et al. Stem cell therapy for abrogating stroke-induced neuroinflammation and relevant secondary cell death mechanisms [J]. Prog Neurobiol, 2017, 158: 94–131.
- [54] Chau MJ, Deveau TC, Song M, et al. iPSC Transplantation increases regeneration and functional recovery after ischemic stroke in neonatal rats [J]. Stem Cells, 2014, 32(12): 3075–3087.
- [55] Pollock K, Stroemer P, Patel S, et al. A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke [J]. Exp Neurol, 2006, 199(1): 143–155.
- [56] Baker EW, Kinder HA, West FD. Neural stem cell therapy for stroke: A multimechanistic approach to restoring neurological function [J]. Brain Behav, 2019, 9(3): e01214.
- [57] Sugaya K, Vaidya M. Stem cell therapies for neurodegenerative diseases [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1056: 61–84.
- [58] Daadi MM, Steinberg GK. Manufacturing neurons from human embryonic stem cells; biological and regulatory aspects to develop a safe cellular product for stroke cell therapy [J]. Regen Med, 2009, 4(2): 251–263.
- [59] Guan R, Wen X, Liang Y, et al. Trends in Alzheimer's disease research based upon machine learning analysis of pubmed abstracts [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(10): 2065–2074.
- [60] Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, et al. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2016, 388(10043): 505–517.
- [61] Poon WW, Blurton Jones M, Tu CH, et al. β -Amyloid impairs axonal BDNF retrograde trafficking [J]. Neurobiol Aging, 2011, 32(5): 821–833.
- [62] Marsh SE, Blurton Jones M. Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: The role of neurotrophic support [J]. Neurochem Int, 2017, 106: 94–100.
- [63] Hemming ML, Patterson M, Reske Nielsen C, et al. Reducing amyloid plaque burden via *ex vivo* gene delivery of an A β degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease [J]. PLoS Med, 2007, 4(8): e262.
- [64] Sudhakar V, Richardson RM. Gene therapy for neurodegenerative diseases [J]. Neurotherapeutics, 2019, 16(1): 166–175.
- [65] Tuszynski MH, Thal L, Pay M, et al. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease [J]. Nat Med, 2005, 11(5): 551–555.
- [66] Liu X, Li F, Stubblefield EA, et al. Irect reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells [J]. Cell Res, 2012, 22(2): 321–332.
- [67] Titova N, Padmakumar C, Lewis SJG, et al. Parkinson's: a syndrome rather than a disease [J]. J Neural Transm (Vienna), 2017, 124(8): 907–914.
- [68] Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease [J]. J Neural Transm (Vienna), 2017, 124(8): 901–905.
- [69] Raza C, Anjum R, Shakeel NUA. Parkinson's disease: mechanisms, translational models and management strategies [J]. Life Sci, 2019, 226: 77–90.
- [70] Zhang L, Yang H. Promotive effects of tetrahydroxystilbene glucoside on the differentiation of neural stem cells from the mesencephalon into dopaminergic neurons [J]. Neurosci Lett, 2021, 742: 135520.
- [71] Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle [J]. Nat Med, 2010, 16(6): 653–661.
- [72] Marsh SE, Mathew BJ. Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: the role of neurotrophic support [J]. Neurochem Int, 2017, 106: 94–100.
- [73] Ambasadhan R, Dolatabadi N, Nutter A, et al. Potential for cell therapy in Parkinson's disease using genetically programmed human embryonic stem cell-derived neural progenitor cells [J]. J Comp Neurol, 2014, 522(12): 2845–2856.
- [74] Ginberg G, Hadar AZ, Lazarovici P, et al. Neural stem cells: therapeutic potential for neurodegenerative diseases [J]. Br Med Bull, 2012, 104: 7–19.
- [75] Erharter A, Rizzi S, Mertens J, et al. Take the shortcut direct conversion of somatic cells into induced neural stem cells and their biomedical applications [J]. FEBS Lett, 2019, 593(23): 3353–3369.
- [76] Lee JP, Jeyakumar M, Gonzalez R, et al. Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease [J]. Nat Med, 2007, 13(4): 439–447.

陶睿智,顾任钧,夏雅雯,等. 功能性消化不良动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 283-290.
Tao RZ, Gu RJ, Xia YW, et al. Progress of animal models of functional dyspepsia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 283-290.
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.018

功能性消化不良动物模型的研究进展

陶睿智¹, 顾任钧², 夏雅雯¹, 韩鸿宽¹, 陆可沁¹, 陆茵¹, 孙广志^{2*}

(1. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京中医药大学, 南京 210000; 2. 南京中医药大学第二附属医院, 南京中医药大学, 南京 210000)

【摘要】 功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是临床上的常见病, 其难愈性、易复发的特点使其成为现代难治性疾病之一。由于 FD 病因不明, 其造模方法存在争议, 造模后模型效果的持续时间对于模型合理性有重要参考价值, 但目前缺少全面概括现有模型持续效果的文章。通过模型的持续效果, 将 FD 动物模型概括为持续型和临时型, 以期为该动物模型的建立提供可靠参考。

【关键词】 功能性消化不良; 持续效果; 动物模型; 造模方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 02-0283-08

Progress of animal models of functional dyspepsia

TAO Ruizhi¹, GU Renjun², XIA Yawen¹, HAN Hongkuan¹, LU Keqin¹, LU Yin¹, SUN Guangzhi^{2*}

(1. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China. 2. the Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000)
Corresponding author: SUN Guangzhi. E-mail: zhiguangsun@njucm.edu.cn

【Abstract】 Functional dyspepsia (FD) is a common and recurring disease, which is difficult to treat so it becomes a refractory disease. Because of the unknown etiology of FD, the current modeling method used in animal research remain controversial. The lasting effect of animal models provides an important reference value for potential treatments of FD. However, no article has comprehensively summarized the lasting effect of existing animal models of FD. To provide a reliable reference for establishing an FD animal model, we classify each model as sustained type and temporary type based on its lasting effect.

【Keywords】 functional dyspepsia; duration; animal model; methods of modeling

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

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是以上腹痛、上腹胀满、早饱、嗝气、食欲不振、恶心、呕吐等为主要症状^[1], 排除器质性疾病后的一组临床综合征, 是临床最常见的功能性胃肠疾病之一^[2]。该疾病人群患病率在全球范围内变化很大, 西方国

家的总体患病率较高 (10% ~ 40%), 亚洲的患病率较低 (5% ~ 30%)^[3]。FD 作为一种慢性疾病, 在病程上具有周期性和波动性的特点^[4]。罗马 IV 将 FD 诊断标准总结为: 在过去 3 个月中每周至少有 3 d 伴有消化不良症状, 发病在 6 个月以上, 并且不能通

【基金项目】 国家自然科学基金 (82074312)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82074312).

【作者简介】 陶睿智 (1999—), 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理学研究。Email: taoruizhi0612@163.com

【通信作者】 孙广志 (1963—), 博士, 博士生导师, 研究方向: 消化系统疾病。Email: zhiguangsun@njucm.edu.cn

过排便而得到缓解^[5-7]。

动物模型已被广泛用于确定 FD 的病理机制的研究,世界各地的研究人员尚未开发出针对 FD 特定的模型和药物^[8]。FD 在病程上有持续时间的特征^[5-7],造模的成功时间与效果的持续时间对于实验者操作以及模型合理性都有重要参考价值,但目前缺少全面概括现有模型持续效果的文章。检索国内外文献,通过分析近几年发表的 FD 的造模方法,从作用机制影响效果的长短将其大致分为持续型和临时型两类^[9],这两类模型在导致 FD 的机制上有着不同特点。由于 FD 的发病机制尚未完全明确,内脏高敏感^[10]、胃顺应性降低^[11]、胃排空延缓^[12]目前被认为是 FD 的关键病理机制,焦虑也是 FD 患者的常见心理状态^[13]。临时型 FD 模型主要通过急性压力刺激、药物临时干预来达到短暂的胃肠动力障碍、内脏敏感性增加以及肠道炎症等;持续型 FD 模型主要通过长期慢性刺激、长期药物干预以及长期多因素干预的方法造成动物胃肠动力障碍、内脏敏感性增高以及胃肠激素紊乱等来模拟 FD 的症状。

本文希望从持续效果来进行 FD 动物模型的分类与整理,以期对 FD 的研究提供帮助。

1 临时型 FD 模型

1.1 浸水压力应激

Lee 等^[14]选取 16 ~ 18 周的 SD 大鼠(250 ~ 300 g),用浸水约束压力进行造模。该课题组设置了 2 h 压力组和 4 h 压力组,大鼠身体被固定在铁笼内,除了头部以外身体浸没在水中(19 ± 1)℃,分别持续 2 h 和 4 h。处死大鼠后测定大鼠十二指肠组织中 occludin 和 ZO-1 蛋白和 mRNA 水平以评价炎症,血浆中 ACTH 和皮质醇的水平以评价应激状态。与空白组相比,4 h 组 occludin 和 ZO-1 蛋白及 mRNA 水平明显降低,ACTH 及皮质醇水平明显升高。该模型通过应激改变肠上皮通透性来诱导炎症,从而模拟 FD 的原发部位之一即十二指肠区域的病理变化。

1.2 酸化刺激

Shin 等^[15]选择 ICR 小鼠 21 ~ 26 g,在末次给药 30 min 后,腹腔注射溶于生理盐水的 0.6% 的醋酸(10 mL/kg)来进行造模,同时灌胃给予 5% 伊文斯兰溶液(0.1 mL/kg),30 min 后处死小鼠来测定小肠推进率,与正常组相比推进率明显降低。Mine 等^[16]给予大鼠结肠注射 0.6% 的醋酸,造成其内脏运动反应(visceromotor response, VMR)明显增加,从

而制备 SD 大鼠内脏高敏感性 FD 动物模型;Kim 等^[17]选取成年雄性 ICR 小鼠,在末次给药 30 min 后,腹腔注射 0.5% 的醋酸,30 min 后处死,观察小肠推进率明显降低。Chen 等^[18]选取成年 SD 大鼠,利用手术结肠滴注 4% 醋酸(1 mL)来进行炎症后肠易激综合征模型的制备,结果发现该模型能使大鼠的胃肠动力明显紊乱该类模型造模时间短且效果明显,能短暂引起胃内压升高,模拟 FD 模型。

1.3 顺铂注射

毕娉娉等^[19]选取 KM 小鼠,腹腔注射顺铂 2 mg/kg,连续 4 d 进行造模。检测相关指标发现小鼠胃排空延缓对照组为 64.03%,而模型组为 93.86%。同时,小肠推进显著增加,对照组为 56.07%,模型组为 73.18%。张广龙等^[20]利用顺铂注射液进行造模,在首次给药 60 min 后,给予成年 SD 大鼠腹腔注射顺铂注射液(6 mg/kg),于 4 d 后处死,测定胃中的残留量,结果显示模型组胃残留率(87.9%)明显高于对照组(44.8%)。Shin 等^[15]同样通过腹腔注射给予 ICR 小鼠 5 mg/kg 的顺铂注射液来延缓小鼠胃排空,使小鼠胃动力下降。

1.4 受体阻断剂/激动剂注射

1.4.1 阻断 M 受体

Chang 等^[21]选取成年 KM 小鼠,通过末次给药 1 h 后,腹腔注射阿托品注射液(1.5 mg/kg)来复制胃肠动力障碍模型。测定胃排空率以及激素变化来评价小鼠胃肠动力的变化;放射免疫法测试大鼠胃肠激素在体内血浆、胃窦、十二指肠、下丘脑含量的变化。结果表明,阿托品组胃排空能力降低,小肠推进率降低,胃泌素含量下降,血管活性肠肽含量升高,造模成功。Zhang 等^[22]选取 8 周龄 SD 大鼠,腹腔注射 1 mg/kg 的阿托品,15 min 后观察胃慢波频率,发现其频率紊乱。

1.4.2 阻断阿片受体

He 等^[23]选取 KM 小鼠进行慢性便秘(STC)造模,灌胃给予小鼠 10.0 mg/kg 洛哌丁胺每天 2 次,持续 10 d。对排便频率、湿便重、干便重进行评估。Shin 等^[15]通过腹腔注射给予 ICR 小鼠 5 mg/kg 的洛哌丁胺来延缓小鼠胃排空(空白组为 50.2%,模型组为 34.9%),造成胃肠动力障碍。

1.4.3 激动 α_2 肾上腺素受体

Mine 等^[16]利用可乐定(0.03 mg/kg)给予 ddY 小鼠皮下注射来进行 FD 动物模型的造模,能够引起内脏运动反应增加,改变干湿便重;邹璇^[24]选取 200 g 左右的成年 SD 雄性大鼠,在末次给药后 30 min,给予模型组以及给药组皮下注射 100 μ g/kg 可

乐定 (CD) 进行造模并 30 min 后对模型进行评价, 其胃顺应性及胃排空率均下降。

1.4.4 激动多巴胺受体

Kanemasa 等^[25] 选取 6 周成年 Wistar 大鼠, 末次给药 15 min 后, 皮下注射 3 mg/kg 或口服 20 mg/kg 吗啡来模拟胃肠动力障碍模型, 60 min 处死后测定小肠推进, 发现同对照组相比明显降低; 同样, Mine 等^[16] 利用吗啡 (1 mg/kg) 皮下注射复制 ddY 小鼠 FD 模型, 能够造成内脏运动反应增加。

2 持续型模型

2.1 长期高脂饮食

Zhou 等^[26] 选取雄性 SD 大鼠 (100 ~ 150 g), 空白组给予普通饮食 (11.3% 大卡的脂肪), 模型组给予高脂饮食 (58% 大卡的脂肪), 给予 2 周后, 处死动物并测定胃排空率, 发现高脂饮食大鼠排空率降低了 26%。

2.2 慢性压力应激

Liang 等^[27] 选取雄性 Wistar 大鼠 (180 ~ 220 g), 通过夹尾使大鼠焦虑和紧张, 持续 30 min 后, 让大鼠以适当速度在特定跑步机上跑步 10 min, 使大鼠疲劳。每日 4 次, 连续 10 d。测定胃排空率、小肠推进率以及血清 MTL、VIP 等水平, 发现胃排空率和小肠推进率明显降低, MTL 较对照组明显降低, VIP 水平明显升高。大鼠胃肠蠕动减慢, 出现运动障碍, 符合 FD 的特征。谭树慧等^[28] 通过对 SD 大鼠每次随机采用慢性应激束缚、食物剥夺、过度疲劳等刺激方式复制 FD 动物模型, 相邻 2 d 采用不同的慢性刺激方式, 连续刺激 21 d。此法认为大鼠长期受到不规律的慢性刺激, 长期处于应激状态下, 出现 FD 症状。范梦男等^[29] 采用改良郭氏夹尾刺激法联合张氏不规则喂食法复制雄性 SD 大鼠 FD 模型。将使用纱布包裹的夹钳连续不断地夹大鼠尾巴末端 1/3 处, 每次夹尾刺激持续 30 min, 每天 1 次, 以此激怒大鼠并使其互相厮打, 连续 21 d。王璟等^[30]、王敏等^[31] 采用了夹尾激怒加不规律饮食法造模。此法相对缓和, 每日夹尾次数下降, 通过长期的夹尾刺激引起大鼠内脏敏感性增加, 贴合临床 FD 的症状。

2.3 c-Kit 单克隆抗体注射

陈峭等^[32] 选取 SD 大鼠, 腹腔注射抗 c-Kit 单克隆抗体 (ACK2) 各 100 μ g, 2 d 1 次, 连续 5 次。2 周后取材前给予大鼠半固体糊, 30 min 后测定胃残留率、小肠推进率以及 Cajal 细胞超微结构。结果发现与对照组相比, 模型组胃残留率显著增加, 小肠推

进率显著减少, Cajal 间质细胞呈凋亡样改变, 从而造成小鼠持续胃肠动力障碍。

2.4 碘乙酰胺灌胃

吕林等^[33] 采用碘乙酰胺灌胃结合改良小平台法。选取 10 只 SD 幼鼠, 给予 0.1% 蔗糖碘乙酰胺溶液灌胃 (0.2 mL/d), 连续灌胃 6 d。出生后第 43 天, 给予改良小平台法处理, 造成小鼠劳倦, 每日持续 14 h, 连续 14 d。检测抓力、胃排空率、小肠推进率、胃体纵行肌和胃窦环形肌条收缩力均降低; 吴震宇等^[34] 选取 9 只 10 日龄 SD 大鼠, 给予每天 0.2 mL 灌胃, 持续 6 d。灌胃结束后各组大鼠正常饲养至 7 周龄, 7 周龄起以郭氏夹尾刺激至 8 周龄。检测大鼠胃敏感性、顺应性、胃排空率等指标均降低。同样 Zhang 等^[22] 通过选取 10 日龄 SD 大鼠灌胃给与 2% 蔗糖的 0.1% 碘乙酰胺溶液 (每天 0.2 mL) 进行 FD 的造模, 能够减慢大鼠胃排空, 造成胃慢波频率紊乱。

2.5 三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS) 注射

Winston 等^[35] 选取 10 日龄雄性 SD 大鼠, 从其肛门向结肠中插入 2 cm 导管, 肠内注射 0.2 mL 用 10% 乙醇溶解的三硝基苯磺酸 (130 mg/kg), 将动物以朝下的姿势保持约 2 min, 并保持肛门闭合 1 min, 以防止 TNBS 溶液泄漏来诱导新生儿动物结肠炎。给予液体营养餐并进行大鼠饱腹感和胃排空检测, 结果表明模型大鼠与空白组相比进食量减少且胃排空延迟。该方法选取 10 日龄动物造成其幼年损伤, 引发炎症及内脏高敏感, 持续效果时间长。

2.6 新型序贯应激法

景富春等^[36] 运用新生幼崽胃刺激法和母婴分离法 2 种方法并结合束缚应激法刺激幼龄动物, 造成焦虑, 从而建立持续型胃高敏感大鼠模型。该课题组选取 1 日龄 SD 大鼠, 自出生后第 2 天起, 每天与母鼠分离 3 h, 至 3 周结束。同时幼鼠于出生后第 10 天起给予 0.1% 碘乙酰胺的 2% 蔗糖溶液灌胃 (每只 0.2 mL), 持续 6 d, 并于第 8 周进行束缚应激实验, 持续 90 min 后放回原笼, 持续 7 d。分别于灌胃后第 2 ~ 6、18、56 天进行称重, 进行旷场试验、胃排空试验, 评价胃黏膜炎症反应等。结果表明, 模型组大鼠体重低于空白组, 胃排空率降低, 大鼠在中央格停留时间、穿行格数、直立次数明显减少, 符合焦虑样 FD 模型。

3 总结

本文通过对近年来 FD 动物模型的整理 (见表

1),初步根据造模时间和持续效果时间的长短将FD动物模型分为临时型和持续型。总结发现临时型造模方法主要有急性刺激、药物干预等。其中浸水约束压力主要利用急性压力会破坏肠道稳态,短暂引起十二指肠和胃运动障碍^[14],通过增加黏膜GDNF扩增ISC和EC细胞分化诱导内脏超敏反应^[37];酸化刺激导致胃排空延迟,胃肠功能调节障碍以及内脏超敏感^[38];顺铂等化疗药物可作用于延髓呕吐中枢,并直接损伤胃黏膜而引起呕吐恶心等胃肠道毒副反应^[39];阿托品、洛哌丁胺、可乐定、多巴胺可分别阻断胃肠道平滑肌的受体如M受体^[40]或阿片受体^[41]以及激动 α_2 肾上腺素受体^[16]、多巴胺受体^[42]来松弛平滑肌而造成胃肠动力障碍,模拟FD的症状。该方法持续效果较短,药物代谢之后,胃肠动力恢复,具有起效快,造模简单的优点,可以基本模拟FD临床上腹痛及烧灼或便秘等症状。该模型以胃排空率、小肠推进率降低及胃肠激素紊乱为指标,多选用成年动物。

持续型造模方法主要有慢性刺激、药物干预、母婴分离、不规则喂食等。其中慢性高脂饮食通过上调胃肌层神经丛中胆汁酸受体TGR5和nNOS,影响胃肠激素水平如GLP-1的表达来延缓胃排空^[26];持续压力通过影响胃肠动力以及激素的分泌,造成持续性的胃肠敏感性增加、功能障碍和消化不

良^[43];体内注射c-Kit单克隆抗体(ACK2),可以造成肠道动力基本单位Cajal间质细胞损伤^[44-45],从而导致小肠的异常运动^[46];碘乙酰胺通过诱导细胞缺氧、胃肠黏膜损伤而引起动物焦虑和抑郁^[47],造成动物胃肠道固有损伤及炎症反应;三硝基苯磺酸通过引起Th1型炎症反应^[48]来造成胃肠动力障碍。该模型可以基本模拟FD临床上焦虑、早饱、食欲不振等症状^[49-50],以动物体重下降,进食量减少,胃排空率及小肠推进率下降、胃肠激素紊乱为评价指标,既可选用成年动物,也可选用幼年动物。

临时型造模模型成功时间多在当天,在模拟症状方面效果明显,适用于针对某一症状的动物实验研究,其持续效果也相对短暂,多利用当天进行模型评价。但临时型往往难以从整体上反应FD的病证^[51],其在效果上还有待改进。如今脑-肠轴以及肠道菌群的研究成为热点^[52],压力已被证明对于脑-肠轴具有深刻影响,是多种慢性消化系统疾病和肠道型炎症疾病的诱因^[53],神经胃肠病学与FD存在着密切联系^[54]。临床上FD大多病程迁延,大约50%患有FD的人有持续性症状^[4],其与患者的社会心理状态以及压力影响有关。采用持续型方法进行FD造模虽然造模时间长,但可以基本模拟病人焦虑以及压抑的特点,表现出FD作为慢性消化道疾病的症状,与临床具有更高的吻合度。

表1 FD动物模型汇总表

Table 1 Summary of FD animal models

分类方式 Classifications	模型类别 Types	动物 Animals	方法 Methods	造模成功时间 Modeling success time	造模持续时间 Modeling duration	原理 Principles
持续效果 Lasting effect	临时型 Temporary type	成年SD大鼠 Adult SD rats	浸水约束压力 Immersion restraint pressure	约束4 h Restraint for 4 h	1 d	浸水压力刺激,产生肠道应激和炎症反应 Immersion pressure stimulates intestinal stress and inflammatory response
		成年SD大鼠/成年ICR小鼠 Adult SD rat/Adult ICR mice	酸化刺激 Acidification stimulation	造模后30 min 30 min after modeling	1 d	酸化胃肠道,刺激引起内脏高敏感性,延迟胃排空 Acidify the gastrointestinal tract, stimulate the visceral hypersensitivity and delay gastric emptying
		成年SD大鼠/成年ICR小鼠/成年KM小鼠 Adult SD rat/Adult ICR mice/Adult KM mice	顺铂注射 Cisplatin (i.p.)	造模后4 d内 Within 4 d after modeling	4 d	抗癌药物的胃肠道副作用导致恶心呕吐,造成胃动力障碍 Gastrointestinal side effects of anticancer drugs lead to nausea and vomiting, resulting in gastric motility disorders
		成年KM小鼠/成年SD大鼠 Adult KM mice/Adult SD rat	阿托品注射 Atropine (i.p.)	造模后1 h内 Within 1 h after modeling	1 d	阻断M胆碱受体,松弛胃肠道平滑肌,造成胃肠动力障碍 Block muscarinicreceptor to relax gastrointestinal smooth muscle and cause gastrointestinal motility disorder

续表 1

分类方式 Classifications	模型类别 Types	动物 Animals	方法 Methods	造模成功时间 Modeling success time	造模持续时间 Modeling duration	原理 Principles
		成年 KM 小鼠/成年 ICR 小鼠 Adult KM mice/Adult ICR mice	洛哌丁胺灌胃/腹腔注射 Loperamide (i.g/i.p.)	造模后 8 h 内 Within 8 h after modeling	1 d	阻断阿片受体,抑制乙酰胆碱和前列腺素的释放,抑制平滑肌收缩 Block opioid receptor and inhibit the release of acetylcholine, prostaglandins and inhibit the contraction of smooth muscle
		成年 SD 大鼠/成年 ddY 小鼠 Adult SD rat/Adult ddY mice	可乐定注射 Clonidine (i.p.)	造模后 30 min 30 min after modeling	1 d	激动 α_2 肾上腺素受体,舒张小肠平滑肌,造成胃肠动力障碍 Activate α_2 adrenoceptor to relax small intestinal smooth muscle, causing gastrointestinal motility disorder
	持续型 Sustained type	成年 Wistar 大鼠/成年 ddY 小鼠 Adult Wistar rat/Adult ddY mice	多巴胺受体激动剂注射 Dopamine receptor agonist (i.p.)	造模后 60 min 60 min after modeling	1 d	激动胃肠道多巴胺受体,松弛胃部平滑肌,造成胃肠动力障碍 Activate the dopamine receptor of gastrointestinal tract to relax the smooth muscle of stomach and cause gastrointestinal motility disorder
		成年 SD 大鼠 Adult SD rat	长期高脂饮食 Long-term high-fat diet	造模后 14 d 内 Within 14 d after modeling	14 d 以上 More than 14 days	高脂饮食,影响胆汁分泌和胃肠激素表达 High-fat diet affects bile secretion and gastrointestinal hormone expression
		成年 Wistar 大鼠 Adult Wistar rat	夹尾激怒 Tail-clip irritation	造模后 10 d/21 d 内 Within 10 d/21 d after modeling	10 d/21 d 以上 More than 10/21 days	夹尾结合强迫运动,产生焦虑紧张情绪,增加内脏敏感性 Tail clamping combined with forced exercise can produce anxiety and increase visceral sensitivity
		成年 SD 大鼠 Adult SD rat	c-Kit 单克隆抗体注射 C-kit monoclonal antibody (i.p.)	造模后 10 d 内 Within 10 d after modeling	14 d 以上 More than 14 days	导致 Cajal 间质细胞凋亡样改变,造成胃肠动力障碍 Apoptosis-like changes in Cajal stromal cells result in gastrointestinal motility disorders
		幼龄 SD 大鼠 Neonatal SD rat	碘乙酰胺灌胃 Iodoacetamide (i.g.)	造模后 6 d 内 Within 6 d after modeling	56 d 以上 More than 56 days	损伤黏膜,刺激胃肠道产生高敏感性,降低胃顺应性 The damage of mucosa leads to gastrointestinal high sensitivity and reduces gastric compliance
		幼龄 SD 大鼠 Neonatal SD rat	三硝基苯磺酸注射 TNBS injection	造模后 1 d 内 Within 1 d after modeling	56 d 以上 More than 56 days	刺激胃肠道炎症反应,产生饱腹感,造成胃肠动力障碍 Stimulate the inflammatory of gastrointestinal tract to produce a sense of satiety and gastrointestinal motility disorder
		幼龄 SD 大鼠 Neonatal SD rat	新型序贯应激法 New sequential stress method	造模 18 d 后 18 d after modeling	56 d 以上 More than 56 days	束缚应激结合母婴分离产生焦虑,刺激胃肠炎症反应,造成内脏高敏感性 Restraint stress combined with mother-infant separation produces anxiety to cause gastrointestinal inflammatory response and visceral hypersensitivity

现今 FD 的病因病机还不完全明确,并没有一个模型能够完全模拟 FD 的症状,临床与模型间的“沟壑”客观存在,这需要科研工作者从临床出发,

进行更进一步的研究。发病部位及机制上,应聚焦于上消化道。胃以及十二指肠的功能紊乱是 FD 病理生理学的基础,对 FD 中胃及十二指肠病理学的

细致认识有助于我们发现新的生物标记物和治疗靶点;动物模型的选择和探究上,应当分型论治,先明确功能性消化不良的亚型及其区别,寻找稳定可靠具有代表性且的动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Potter M, Talley NJ. New insights into functional dyspepsia; further evidence for postprandial distress syndrome as a distinct disease [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3(4): 217–218.
- [2] Enck P, Azpiroz F, Boeckstaens G, et al. Functional dyspepsia [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17081.
- [3] Mahadeva S, Ford AC. Clinical and epidemiological differences in functional dyspepsia between the East and the West [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2016, 28(2): 167–174.
- [4] Ford AC, Mahadeva S, Carbone MF, et al. Functional dyspepsia [J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1689–1702.
- [5] 姚学敏, 金颖, 徐华, 等. 功能性消化不良罗马IV标准亚型临床特征研究 [J]. *中国全科医学*, 2019, 22(13): 1582–1587.
Yao XM, Jin Y, Xu H, et al. Study on clinical characteristics of Rome IV standard subtype of functional dyspepsia [J]. *Chin Gen Prac*, 2019, 22(13): 1582–1587.
- [6] Stanghellini V, Chan FK, Hasler WL, et al. Gastrointestinal disorders [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(6): 1380–1392.
- [7] Madisch A, Andresen V, Enck P, et al. The diagnosis and treatment of functional dyspepsia [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2018, 115(13): 222–232.
- [8] Camilleri M, Bueno L, Andresen V, et al. Pharmacological, pharmacokinetic, and pharmacogenomic aspects of functional gastrointestinal disorders [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(6): 1319–1331.
- [9] Ye Y, Wang XR, Zheng Y, et al. Choosing an animal model for the study of functional dyspepsia [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 2018: 1531958.
- [10] Simrén M, Törnblom H, Palsson OS, et al. Visceral hypersensitivity is associated with GI symptom severity in functional GI disorders; consistent findings from five different patient cohorts [J]. *Gut*, 2018, 67(2): 255–262.
- [11] Asano T, Aida S, Suemasu S, et al. Aldioxa improves delayed gastric emptying and impaired gastric compliance, pathophysiologic mechanisms of functional dyspepsia [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17519.
- [12] Camilleri M, Chedid V, Ford AC, et al. Gastroparesis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 41.
- [13] Tominaga K, Sakata Y, Kusunoki H, et al. Rikkunshito simultaneously improves dyspepsia correlated with anxiety in patients with functional dyspepsia; A randomized clinical trial (the DREAM study) [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2018, 30(7): e13319.
- [14] Lee HS, Kim DK, Kim YB, et al. Effect of acute stress on immune cell counts and the expression of tight junction proteins in the duodenal mucosa of rats [J]. *Gut Liver*, 2013, 7(2): 190–196.
- [15] Shin SJ, Kim D, Kim JS, et al. Effects of gamisoyo-san decoction, a traditional Chinese medicine, on gastrointestinal motility [J]. *Digestion*, 2018, 98(4): 231–237.
- [16] Mine Y, Itakura T, Oku S, et al. DSP-6952, a novel 5-HT(4) receptor partial agonist, inhibits visceral hypersensitivity and ameliorates gastrointestinal dysfunction in experimental animals [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 826: 123–132.
- [17] Kim JN, Nam JH, Lee JR, et al. The traditional medicine banhasasim-tang depolarizes pacemaker potentials of cultured interstitial cells of Cajal through M3 muscarinic and 5-HT3 receptors in murine small intestine [J]. *Digestion*, 2020, 101(5): 536–551.
- [18] Chen Y, Xiao S, Gong Z, et al. Wuji wan formula ameliorates diarrhea and disordered colonic motility in post-inflammation irritable bowel syndrome rats by modulating the gut microbiota [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2307.
- [19] 毕娉娉, 陈斯琪, 张广龙, 等. 连翘酯苷 A 对化疗模型小鼠胃肠动力障碍的改善作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(1): 105–111.
Bi PP, Chen SQ, Zhang GL, et al. Effect of forsythin A on gastrointestinal motility disorder in chemotherapy model mice [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2021, 27(1): 105–111.
- [20] 张广龙, 毕娉娉, 李雅琦, 等. 6-姜酚对化疗性大鼠胃动力障碍的影响及作用机制研究 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(1): 84–88.
Zhang GL, Bi PP, Li YQ, et al. Study on the effect and mechanism of 6-gingerol on chemotherapeutic gastric motility disorder in rats [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2021, 37(1): 84–88.
- [21] Chang X, Wang S, Bao YR, et al. Multicomponent, multitarget integrated adjustment - Metabolomics study of Qizhiweitong particles curing gastrointestinal motility disorders in mice induced by atropine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 189: 14–21.
- [22] Zhang S, Li S, Liu Y, et al. Electroacupuncture via chronically implanted electrodes improves gastric dysmotility mediated by autonomic-cholinergic mechanisms in a rodent model of functional dyspepsia [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2018, 30(10): e13381.
- [23] He Q, Han C, Huang L, et al. Astragaloside IV alleviates mouse slow transit constipation by modulating gut microbiota profile and promoting butyric acid generation [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(16): 9349–9361.
- [24] 邹璇. 芍药苷对大鼠功能性消化不良的影响及其机制研究 [D]. 大连: 大连医科大学; 2020.
Zou X. Effect of paeoniflorin on functional dyspepsia in rats and its mechanism [D]. Dalian: Dalian Medical University; 2020.
- [25] Kanemasa T, Koike K, Arai T, et al. Pharmacologic effects of naldemedine, a peripherally acting μ -opioid receptor antagonist, in *in vitro* and *in vivo* models of opioid-induced constipation [J].

- Neurogastroenterol Motil, 2019, 31(5): e13563.
- [26] Zhou H, Zhou S, Gao J, et al. Upregulation of bile acid receptor TGR5 and nNOS in gastric myenteric plexus is responsible for delayed gastric emptying after chronic high-fat feeding in rats [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 308(10): G863-G873.
- [27] Liang Q, Yan Y, Mao L, et al. Evaluation of a modified rat model for functional dyspepsia [J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2018, 24(4): 228-235.
- [28] 谭树慧, 任卫琼, 夏伯候, 等. 醋炙乌药-木香对肝郁气滞型功能性消化不良模型大鼠胃排空及胃肠激素的影响 [J]. *中国药房*, 2019, 30(5): 684-688.
- Tan SH, Ren WQ, Xia BH, et al. Effects of vinegar roasted black medicine and wood incense on gastric emptying and gastrointestinal hormones in rats with liver stagnation type functional dyspepsia [J]. *Chin Pharm*, 2019, 30(5): 684-688.
- [29] 范梦男, 张博, 陈苏宁. 胃痛消痞方对肝郁脾虚型功能性消化不良大鼠 5-HT 及其受体表达影响的实验研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(11): 229-232, 299.
- Fan MN, Zhang B, Chen SN. Experimental study on the effect of Weitong Xiaopi Recipe on the expression of 5-HT and its receptor in rats with functional dyspepsia of liver depression and spleen deficiency [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2020, 38(11): 229-232, 299.
- [30] 王璟, 万春平, 杨榆青, 等. 香苓开胃方对功能性消化不良大鼠干预效应及机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(8): 4129-4132.
- Wang J, Wan CP, Yang YQ, et al. Study on the intervention effect and mechanism of Xiangling Kaiwei formula on rats with functional dyspepsia [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(8): 4129-4132.
- [31] 王敏, 曾代文, 温珠明. 疏肝和胃方对肝郁脾虚证功能性消化不良大鼠 Cajal 间质细胞的影响 [J]. *实用医院临床杂志*, 2020, 17(3): 8-12.
- Wang M, Zeng DW, Wen ZM. Effect of Shugan Hewei Recipe on Cajal stromal cells in rats with functional dyspepsia of liver depression and spleen deficiency syndrome [J]. *Pract J Clin Med*, 2020, 17(3): 8-12.
- [32] 陈峭, 谢胜, 周晓玲, 等. “以俞调枢”法对胃肠动力障碍模型大鼠消化道内 Cajal 间质细胞超微结构表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(12): 2959-2962, 3113-3114.
- Chen Q, Xie S, Zhou XL, et al. Effect of “Shu tiaoshu” method on the ultrastructural expression of Cajal stromal cells in the digestive tract of rats with gastrointestinal motility disorder [J]. *Chin Archives Tradit Chin Med*, 2019, 37(12): 2959-2962, 3113-3114.
- [33] 吕林, 唐旭东, 王凤云, 等. 胃动力障碍型功能性消化不良动物模型的建立 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(8): 944-999.
- Lv L, Tang XD, Wang FY, et al. Establishment of animal model of functional dyspepsia with gastric motility disorder [J]. *Chin J Integr Trad West Med*, 2017, 37(8): 944-999.
- [34] 吴震宇, 张声生, 李培彩, 等. 碘乙酰胺灌胃联合夹尾应激诱导大鼠 FD 模型的建立及评价 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2015, 23(7): 462-466.
- Wu ZY, Zhang SS, Li PC, et al. Establishment and evaluation of FD model induced by iodoacetamide gavage combined with tail pinch stress in rats [J]. *Chin J Integr Tradit Western Med Digestion*, 2015, 23(7): 462-466.
- [35] Winston JH, Aguirre JE, Shi XZ, et al. Impaired interoception in a preclinical model of functional dyspepsia [J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(9): 2327-2337.
- [36] 景富春, 张军, 冯诚, 等. 新型序贯应激致焦虑样胃高敏感性大鼠功能性消化不良模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(5): 551-557.
- Jing FC, Zhang J, Feng C, et al. Establishment of a functional dyspepsia model of anxiety like gastric hypersensitivity rats induced by a new sequential stress method [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(5): 551-557.
- [37] Lin L, Feng B, Zhou R, et al. Acute stress disrupts intestinal homeostasis via GDNF-RET [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(10): e12889.
- [38] Wauters L, Talley NJ, Walker MM, et al. Novel concepts in the pathophysiology and treatment of functional dyspepsia [J]. *Gut*, 2020, 69(3): 591-600.
- [39] 李博, 袁秋贞, 王岩, 等. 8 种中药注射剂联合顺铂治疗恶性胸腔积液的网状 Meta 分析 [J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(10): 1052-1057.
- Li B, Yuan QZ, Wang Y, et al. Mesh meta analysis of 8 traditional Chinese medicine injections combined with cisplatin in the treatment of malignant pleural effusion [J]. *Chin Hosp Pharm J*, 2019, 39(10): 1052-1057.
- [40] Amato A, Baldassano S, Caldara GF, et al. Pancreatic polypeptide stimulates mouse gastric motor activity through peripheral neural mechanisms [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2017, 29(1): e12901.
- [41] Jeon YJ, Lee JS, Cho YR, et al. Banha-sasim-tang improves gastrointestinal function in loperamide-induced functional dyspepsia mouse model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111834.
- [42] Yang YL, Ran XR, Li Y, et al. Expression of dopamine receptors in the lateral hypothalamic nucleus and their potential regulation of gastric motility in rats with lesions of bilateral substantia nigra [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 195.
- [43] Darwin E, Murni AW, Nurdin AE. The Effect of psychological stress on mucosal IL-6 and helicobacter pylori activity in functional dyspepsia [J]. *Acta Med Indones*, 2017, 49(2): 99-104.
- [44] Sanders KM, Ward SM, Hennig GW. Problems with extracellular recording of electrical activity in gastrointestinal muscle [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(12): 731-741.
- [45] Zhang G, Xie S, Hu W, et al. Effects of electroacupuncture on interstitial cells of Cajal (ICC) ultrastructure and connexin 43 protein expression in the gastrointestinal tract of functional

- dyspepsia (FD) rats [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 2021–2027.
- [46] Chai Y, Huang Y, Tang H, et al. Role of stem cell growth factor/c-Kit in the pathogenesis of irritable bowel syndrome [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(4): 1187–1193.
- [47] 李建锋, 谢胜, 陈广文, 等. 碘乙酰胺在消化系统疾病动物模型研究中的应用概况 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(4): 533–539.
- Li JF, Xie S, Chen GW, et al. Application of iodoacetamide in animal model research of digestive system diseases [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(4): 533–539.
- [48] Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview [J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2016, 11: 9–15.
- [49] 李军祥, 陈諳, 李岩. 功能性消化不良中西医结合诊疗共识意见(2017 年) [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2017, 25(12): 889–894.
- Li JX, Chen C, Li Y. Consensus on diagnosis and treatment of functional dyspepsia with integrated traditional Chinese and western medicine (2017) [J]. *Chin J Integr Tradit Western Med Dig*, 2017, 25(12): 889–894.
- [50] 张声生, 钦丹萍, 周强, 等. 消化系统常见病功能性消化不良中医诊疗指南(基层医生版) [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8): 3619–3625.
- Zhang SS, Qin DP, Zhou Q, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of common diseases of digestive system functional dyspepsia (grass roots doctor version) [J]. *Chin J Tradit Chin Med*, 2019, 34(8): 3619–3625.
- [51] 吕林, 黄穗平, 王静, 等. 功能性消化不良动物造模方法分析 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(11): 1378–1380.
- Lv L, Huang SP, Wang J, et al. Analysis of animal modeling methods for functional dyspepsia [J]. *Chin J Integr Trad West Med*, 2016, 36(11): 1378–1380.
- [52] Cryan JF, O’Riordan KJ, Cowan CSM, et al. The microbiota-gut-brain axis [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(4): 1877–2013.
- [53] Rengarajan S, Knoop KA, Rengarajan A, et al. A potential role for stress-induced microbial alterations in IgA-associated irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. *Cell Rep Med*, 2020, 1(7): 100124.
- [54] Labanski A, Langhorst J, Engler H, et al. Stress and the brain-gut axis in functional and chronic-inflammatory gastrointestinal diseases: A transdisciplinary challenge [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 111: 104501.

[收稿日期] 2021-08-07

向雪梅,郭鑫,曾佳容,等.高原肺水肿动物模型研究进展[J].中国实验动物学报,2022,30(2):291-298.

Xiang XM, Guo X, Zeng JR, et al. Evolution of animal models of high altitude pulmonary edema [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 291-298.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.019

高原肺水肿动物模型研究进展

向雪梅,郭鑫,曾佳容,刘倍余,张耀雷,孙红玉*

(西部战区总医院基础医学实验室,成都 610083)

【摘要】高原肺水肿(high altitude pulmonary edema,HAPE)是指在高原缺氧条件下发生的急性呼吸衰竭,至今发生机制不明确,尚无标准动物模型。HAPE动物模型是研究HAPE病理机制及寻找有效诊疗手段的基础,其制备方法包括低张性缺氧暴露、缺氧暴露联合疲劳诱导、转基因技术等。该文梳理了近七十年国内外HAPE模型发展历程,并概括总结了HAPE动物模型的制备方法、评价指标,力争为科研和医务工作者提供有益参考。

【关键词】高原肺水肿;动物模型;综述

【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2022)02-0291-08

Evolution of animal models of high altitude pulmonary edema

XIANG Xuemei, GUO Xin, ZENG Jiarong, LIU Beiyu, ZHANG Yaolei, SUN Hongyu*

(Basic Medical Laboratory, General Hospital of Western War Zone, Chengdu 610083, China)

Corresponding author: SUN Hongyu. E-mail: shongyu2008@163.com

【Abstract】High altitude pulmonary oedema (HAPE) is defined as acute respiratory failure following hypoxic exposure to high altitude. The pathogenesis is not clear, and there is no standard animal model. Animal models is the basis of exploring the pathogenesis and treatment on HAPE. Also, it's the basis of searching for effective diagnosis and treatment. The method of production of animal models include singly hypoxia exposure, hypoxia exposure combined with fatigue, transgenic technology, etc. This brief review focuses on the animal models from the model creation and model evaluation, in order to provide useful information for researchers and medical practitioners.

【Keywords】high altitude pulmonary oedema; animal models; review

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

高原肺水肿(high altitude pulmonary edema, HAPE)是一种危及生命的疾病,主要发生在迅速上升到高原但未适应高海拔环境的个体^[1-3]。HAPE的患病率约为1%~2%^[4],通常随着海拔的上升而增加^[5]。HAPE的早期体征表现为咳嗽、活动时呼吸困难、劳累、作业能力下降,然后逐渐发展为静息时呼吸困难、端坐呼吸、紫绀、咳嗽,重者因呼吸衰竭而死亡^[6]。临床上将肺水肿分为肺泡性水肿和间质性肺水肿,前者具有明显症状和体征,易为临

床所发现;后者发展隐匿缓慢,可无症状和体征,故易被临床检查所忽略,通常也称为亚临床肺水肿。HAPE早期及恢复期多表现为间质性肺水肿,肺纹理增粗;进展期与稳定期病变主要累及肺实质^[7-8]。

自从20世纪60年代HAPE被认为是非心源性肺水肿以来,已经提出过许多病理生理学假说来解释在年轻且健康的个体中突然出现肺水肿的现象。既往认为,肺动脉高压是HAPE产生的主要机制,为HAPE的形成提供了血液动力学基础^[9-10]。目

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(81772001)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81772001).

【作者简介】向雪梅,女,技师,硕士,研究方向:高原疾病发病机制及诊治。E-mail:1351396900@qq.com

【通信作者】孙红玉,女,副主任技师,医学博士,硕士生导师,研究方向:高原疾病发病机制及诊治、干细胞和组织工程策略的再生医学。E-mail:Shongyu2008@163.com

前认为,低氧引起的低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF-1 α)等介导的多个基因的转录发生改变,进而引起生化代谢、神经调控、免疫应答、血管功能、体液平衡等的异常改变。近日,格日力^[11]、马四清等^[12]、吴刚等^[13]提出 HIF-1 或许将成为调控低氧肺动脉高压的一个靶点, HIF-1 是细胞适应低氧环境调控基因表达最重要的转录因子。目前已证实 HIF-1 可以控制人体内多达数百种(占 2% ~ 5% 基因组)低氧反应基因^[14]。HIF-1 α 以氧依赖性方式降解,在正常氧时被降解,缺氧时 HIF-1 α 被保护免于降解,增加低氧靶基因表达,增加对低氧的适应性^[15]。这些靶基因的表达能够促进红细胞、毛细血管的生成以保持氧供,加速糖酵解、抑制线粒体的呼吸来维持 ATP 供给、调节血红蛋白水平和氧化还原酶类活性来调控免疫及体液平衡、一些能够调节血管紧张度、细胞凋亡和存活基因转录因子的蛋白。最新研究表明表观遗传学与 HIF 协同参与低氧转录反应^[16]。总之,所有细胞和分子防御的目的是为了恢复能量代谢和保持氧的稳态。经过近 70 年的探索,HAPE 动物模型的制备方法及相关病理生理特点取得一些进展^[6,17-23]。本文梳理了相关进展,综述如下。

1 HAPE 模型的制备方法

根据低氧暴露方式分为缺氧暴露、转基因动物模拟缺氧、缺氧暴露联合其它方法 3 种,具体制备方法如下。

1.1 缺氧暴露

低压低氧是国内外制备 HAPE 模型最常用的方法,动物低氧方案各有利弊,尚无确切统一的标准化方案。接下来分为大鼠和其它动物两部分阐述。

1.1.1 大鼠

大鼠是最常用的动物,包括 Sprague-Dawley 品系(SD)、Wistar 品系。早在 1971 年就出现了用低压低氧的方式制备 HAPE 模型, Bartlett 等^[24]将成年 SD 雄性大鼠在低压舱中暴露于 4200 m (450 mmHg) 21 d。结果表明,暴露在高海拔环境下的动物会经历 1 个早期阶段,此时,肺的重量增加,如果暴露持续足够长的时间(在这些条件下为 20 ~ 21 d),水肿消退,肺泡增生的速度加快,肺泡表面积增加,这一变化可能具有适应性意义。虽然该研究并没有获得典型的 HAPE 动物模型,可能是因为海拔

不够高,但为早期的 HAPE 模型研究提供了有益的参考。

1983 年,刘士群等^[25]采用成年大白鼠,模拟 5000 m 高原。结果以斑块状分布的间质性肺水肿为主,肺泡性肺水肿出现的数目少,且程度轻。实验证明了大白鼠在模拟 5000 m 下 48 ~ 72 h 可发生间质性肺水肿,也证明了高原缺氧所引起的肺动脉压升高和局部肺血液灌注增加是产生 HAPE 的主要机制。刘士群等^[26]紧接着在 1984 年模拟 6000 m 高原以观察大、小鼠的缺氧反应,发现在低压缺氧的 24 ~ 72 h,大、小白鼠的肺含水量均趋向增高。刘士群的这两项研究为国内的 HAPE 模型奠定了基础。

随后,不管是在模型制备上,还是机制探索上都取得了一定的进展。首先,在模型制备上, Colice 等^[27]选用两种 SD 的变异品系,即 Hilltop (H) 和 Madison (M) 来探索 HAPE 动物模型,得到的都是轻度间质性 HAPE,但 M 比 H 大鼠在 24000 英尺模拟下暴露 9 ~ 12 h 后会出现更严重的 HAPE。其次,在 HAPE 的发生机制上,到 1999 年大多数研究低氧致水肿机制的工作都集中在在肺毛细血管内皮细胞通透性的改变和肺血管床张力改变的因素上。Tomlinson 等^[28]将目光放到了气道上皮功能上,发现像人类一样,中度低压缺氧的亚急性暴露(气压 = 0.5 atm, 24 h)会抑制 SD 大鼠气道上皮的钠转运。之后,在药物预防和治疗 HAPE 上, Berg 等^[29]假设银杏叶提取物可以预防 HAPE,将 SD 大鼠置于高原舱(380 mmHg, 10% 氧浓度) 24 h,但该模型无 HAPE 典型的组织病理表现,猜测其原因可能是海拔不够高,或者暴露时间不够长。以上的这些研究以最终获得间质性 HAPE 为主,少有肺泡性 HAPE。

2015 年,王雷琛等^[30]通过缺氧暴露的方法(模拟海拔 6000 m, 72 h),得到间质性和肺泡性 HAPE 模型,猜测其原因可能是海拔较高、暴露时间较长。2020 年,林雪等^[21]不仅重复了王雷琛等^[30]的模型,同时还设置了实地低氧组(4200 m, 28 d),比较这两种不同低氧胁迫方式构建 HAPE 模型的效果。结果两组 SD 大鼠 HAPE 模型构建成功,且都得到肺泡性水肿。以上两项研究提示 6000 m 72 h 低压低氧暴露可得到肺泡性 HAPE 模型,未来需要更多的研究判断其稳定性。此外,这是初次在实地低氧环境中建立适合高海拔地区的、简单有效且可复制的大鼠 HAPE 实验模型^[21]。

综上所述,SD 大鼠在低压低氧条件下可诱导间质性 HAPE 模型,也可诱导肺泡性 HAPE 模型,这主要取决于海拔高度、持续时间、上升速率等^[31]。

除了常用的 SD 大鼠,国内外学者也选用 Wistar 大鼠,模拟海拔 5000 ~ 6000 m,暴露 24 ~ 72 h 制备 HAPE 模型,镜下可见明显的肺泡隔增宽、毛细血管充血等间质性肺水肿表现,提示得到的 HAPE 模型以间质性肺水肿表现为主,肺泡性肺水肿少见^[32-34]。

1.1.2 其它动物

除了大鼠,人们尝试用绵羊来制备 HAPE 模型。Bland 等^[35]和 Landolt 等^[36]未能检测到成年绵羊在缺氧期间肺淋巴流量的增加。之后大量证据表明,绵羊对缺氧的肺血管反应可能与其他哺乳动物不同^[37-39],甚至有文献报告缺氧会导致新生绵羊血管外肺水减少^[40]。以上研究表明绵羊不适合制备 HAPE 模型。

王雷琛等^[41]采用小鼠(昆明种),雌雄各半,模拟 6000 m 高原,共 72 h,观察到肺间质性肺泡性水肿。王雷琛 2015 年发表的两篇文章^[30,41]所用的大鼠品系不同,但高原条件一致,均表现出间质性和肺泡型水肿,并与林雪等^[21]的报道一致,这是一项可喜的发现,提示该条件下诱导的 HAPE 模型的稳定性较好。

2003 年, Kleinsasser 等^[42]用猪制备 HAPE 模型。猪的体积大,可以使用肺部 X 射线来帮助诊断肺水肿。选用 8 ~ 10 周龄的家养白猪在缺氧(18 468 英尺,10%氧浓度)下暴露 1 周。只有 1 头猪 X 射线阳性,但是肺气体交换障碍和支气管肺泡灌洗液变化提示早期肺水肿。

常见的 HAPE 高原模拟以 6000 m 为主,暴露时长在 24 ~ 72 h。2020 年,石继鹏等^[22]探索新的 HAPE 模型,选用新的品系(BALB/c 小鼠),共暴露 72 h,且模拟的海拔高达 8000 m,此前最高的实验记录为 25 000 英尺^[43](约 7600 m),结果显示,肺泡壁明显增厚,肺泡间充血伴大量炎症细胞浸润,提示肺泡性 HAPE 模型建立成功。

综上所述,制备 HAPE 模型建议选用大鼠,其病理生理表现与人类 HAPE 病例相似^[37,44-48]。海拔越高,病理生理表现越明显,急性的暴露时长通常在 1 ~ 3 d。

1.2 模拟缺氧-转基因工程技术

转基因工程是当今最先进的技术之一,将此技

术应用在 HAPE 模型领域的最新文献发表在 2020 年,并立即引起众多学者的关注。Gojkovic 等^[49]条件性删除小鼠骨髓细胞中的 Von Hippel-Lindau 因子(VHL),研究低氧反应对肺水肿的影响,该模型显示出一些最重要的 HAPE 症状,确定了髓系 VHL 缺失小鼠作为 HAPE 模型的可能性。

随后,Nikinmaa^[50]对此进行评论,指出 Gojkovic 的模型具备 HAPE 的大多数的症状,并提出,这是一种有潜力、有希望的 HAPE 动物模型。稍后,Swenson 等^[51]也展开评论,提出 Gojkovic 的小鼠炎症性 HAPE 模型是分子生物学和基因操作的一个杰作,是在无肺炎的情况下产生的炎性肺水肿,可能在 HAPE 的晚期并依赖于 HIF 的机制中发挥作用,但不能作为 HAPE 的标准模型,对于研究和治疗 HAPE 的研究者而言,HAPE 的动物模型一直是像圣杯一样的追求^[52]。一个好的小型动物模型将允许进行更广泛和高通量的实验,以更好地了解病理生理过程,并筛查预防和治疗药物或非药物策略,尚需更多的学者探索 HAPE 模型,不能停止建立 HAPE 标准模型的脚步^[51]。

1.3 缺氧暴露联合其它方法

1.3.1 缺氧暴露联合疲劳诱导

缺氧和劳累已被确定为 HAPE 发展的两个主要因素^[53],使动物产生劳累的方法包括跑台力竭运动、游泳、睡眠干扰等,其中使用得最多的是跑台力竭运动^[54]。

自 1937 年第 1 例 HAPE 病例报道后,到 1968 年仅有几百例的临床案例报道而无相关的机制报道。Wayne 等^[48]人假设 HAPE 可能与肺小动脉收缩、心输出量增加等有关,于是利用 Long-Evans 大鼠(150 ~ 225 g)诱发了一种早期形式的肺水肿,即血管周围水肿。模型的制备方式为低氧暴露联合游泳运动。结果表明,缺氧或小动脉阻断后的肺动脉高压均可引起幼鼠早期肺水肿。该研究奠定了大鼠作为研究 HAPE 机制实验动物的基础。

国内学者模拟高原 4000 ~ 6000 m,用游泳(每日游 6 次,每次 40 min)或跑台力竭运动(15 ~ 20 m/min,每次 40 min)使动物劳累,用 SD 大鼠来进一步复制 HAPE 动物模型,成功建立间质性 HAPE 模型^[55]、低氧习服模型^[56]、出血性 HAPE 模型^[23]。

在国外的报道中,2010 年,Bai 等^[17]模拟高原 4700 m,让大鼠行走 48 h,每 4 h 停顿 1 次,表现为典型的出血性肺水肿,与单纯缺氧或单纯运动相

比,缺氧和运动相结合对肺泡-毛细血管屏障的损害更为严重,缺氧和劳累可以在不引起肺部炎症的情况下出现 HAPE 样症状^[17]。2012 年 She 等^[57]复制以上 Bai 的模型研究了远端肺形态学的细节。肺片显示肺间质增厚和肺泡腔中红细胞的肿胀。提示通过复制 Bai 的模型,得到较好的重现效果。

2019 年,Paul 等^[43]引入肺部 chest X-ray 检查更准确地诊断 HAPE,另外,模拟海拔高达 25 000 英尺(约 7620 m),雄性 SD 大鼠游泳直到筋疲力尽,擦干后立即放置在缺氧模拟室内 18 h。经 X 射线检测的该 HAPE 模型得到证实,大鼠死亡率很低,有望应用于 HAPE 模型的建立。Scott 等^[45]还观察到炎症和 HAPE 是协同事件,彼此之间没有起因和影响。

综上,低氧暴露联合疲劳诱导似乎适合制备肺泡性、出血性等更为危重的 HAPE 模型。

1.3.2 缺氧暴露联合内毒素感染

大鼠通常能很好地耐受高原,不容易发展成肺水肿。Ono 等^[58]用肠炎沙门氏菌内毒素预处理雄性 SD 大鼠(重 200 ~ 250 g),模拟高原 4300 m,暴露 24 h,组织学证据显示,内毒素预处理后低氧暴露的大鼠肺内形成了斑块状分布的肺水肿,组织学形态与 HAPE 患者类似。

1.3.3 缺氧暴露联合病毒感染

正如 Ono 等^[58](1993 年)研究了内毒素预处理增加了大鼠对 HAPE 的易感性那样,Carpenter 等^[59]假设先前存在的病毒性呼吸道感染会增加小动物对低氧引起的肺水肿的敏感性。Carpenter 等^[59]用鼠副流感病毒(仙台病毒)感染幼鼠(22 ~ 24 d; 50 ~ 60 g),然后将幼鼠暴露在缺氧环境下(常压,10%氧浓度)24 h,结果表明,先前存在的病毒性呼吸道感染会使幼鼠对低氧环境下肺血管通透性的敏感性增强。这一发现与当时发表的一些文献相似,即被诊断出 HAPE 的儿童往往在高海拔暴露之前就已患有呼吸道感染^[60],提示早前的呼吸道感染可能增加了儿童患 HAPE 的机率。

1.3.4 缺氧暴露联合化学药物诱导

2004 年,曾南阳^[61]在 5200 米高原实地,给 Wistar 大白鼠注射肾上腺素(0.05 mg/100 g)。所有动物给药后均出现心衰引起肺水肿最后死亡。镜下见典型的肺泡性水肿病理特征。该研究指出肾上腺素诱发的大鼠高原性肺水肿均有心衰症状,且高原性肺水肿体征出现早、病情发展快。

2011 年,陈有等^[62]也在高原实地(3700 m)展开研究,他们给雄性新西兰大白兔注射生理盐水(共 400 mL)。该研究设计较全面,其一,输入生理盐水诱导间质型 HAPE 向肺泡型肺水肿转变;其二,加以地塞米松来促进肺水通道蛋白 5 表达,以减轻肺水肿;其三,使用心得安抑制肺水通道蛋白 5 表达,以降低重吸收功能,促进建立肺泡性 HAPE 模型。结果显示,地塞米松组未出现肺泡型 HAPE,而心得安组出现 2 只肺泡型肺水肿动物,这与实验设计相符。此外,该研究考虑到临床上多数 HAPE 患者发病前有夜间入睡困难的情况,设置睡眠干扰组,通过输液加睡眠干扰方式,能使 37.5%(3/8)动物诱导出肉眼可见的肺泡型 HAPE 动物模型。

2 HAPE 动物模型评价指标

动物暴露于低氧环境后,会引发一系列的缺氧应激反应,主要表现为肺动脉压升高、动脉血气改变、肺含水量增多,支气管肺泡灌洗液中的总蛋白及炎性细胞因子水平增加,肺泡毛细血管渗透率增加、肺泡液体清除能力下降、肺屏障通透性增加、生化及氧化应激指标改变、组织学表现异常等。HAPE 模型常用评价指标见表 1。

3 结语

在这篇综述中,我们描述了 HAPE 常用制备方法以及部分病理生理特点。由于高原低张性缺氧是引起 HAPE 的根本原因^[63],因此缺氧环境是制备 HAPE 模型必不可少的。缺氧环境有 2 种方式可以实现,第 1 种方式是在高原上进行实地研究,但由于受到地理条件的限制,开展的并不多;第 2 种,同时也是最常用的方式是进行高原模拟,即使用高原舱,据报道已有复合低压舱可模拟高原低气压,高温、低温、干热、紫外线照射等环境因素,为 HAPE 动物模型研究提供了实验平台^[64]。有时只依靠缺氧暴露并不能得到满意的模型,为了进一步制备稳定、可靠的 HAPE 模型,部分研究会联合其它方法,包括疲劳、内毒素感染、病毒感染、药物注射等。HAPE 模型最常用方法是缺氧暴露,其次是低氧暴露联合疲劳,之后是低氧暴露联合其它方法。

用于创建 HAPE 的动物包括大鼠、小鼠、猪、兔、灵长类和绵羊^[42,65-67]。国内外常用雄性大鼠,因在临床上男性患病率比女性高。不同于肺水肿动物模型,其制备方法多种多样,包括化学药物、高

表 1 高原肺水肿动物模型的评价指标
Table 1 Evaluation indicators of HAPE models

动物模型 Animal models	肺部生理指标 Lung water content	动脉血气 Arterial blood gas	生化指标 Biochemical index	炎症指标 Inflammatory index	氧化应激指标 Oxidative stress index	肺泡液体清除率 Alveolar fluid clearance	肺屏障通透性 Barrier permeability of lung	支气管肺泡灌洗液 Bronchoalveolar lavage fluid (BAL)
高原肺水肿 HAPE	肺含水量 Lung water content	↑	酸碱度 pH ↓	血红蛋白 Hemoglobin ↑	肿瘤坏死因子-α TNF-α ↑	热休克蛋白 70 HSP70 ↑	钠和水重吸收 Na and water reabsorption ↓	血管示踪蛋白 (I ¹²⁵ 白蛋白) Vascular tracer protein (I ¹²⁵ Albumin) ↑
	平均肺动脉压 Mean PAP	↑	动脉血二氧化碳分压 PaCO ₂ ↓	白蛋白 Albumin ↑	白介素 6 IL-6 ↑	热休克蛋白 72 HSP72 ↑	上皮钠转运 Epithelial Na-transport ↓	胸腔积液总蛋白浓度 Total protein concentration of pleural effusion ↑
	肺间质水肿评分 Pulmonary interstitial edema score	↑	动脉血氧分压 PaO ₂ ↓	钙 Ca ↑	白介素 1β IL-1β ↑	血栓素 B ₂ TxB ₂ ↑	β1-肾上腺素 β1-adrenergics ↑	血浆蛋白浓度 Plasma protein concentration ↑
			氧合指数 Fio ₂ /PaO ₂ ↓	心率 Heart rate ↑	白介素 β IL-β ↑	丙二醛 MDA ↑	β2-肾上腺素 β2-adrenergics ↑	渗透评分 Infiltration score ↑
			肺泡动脉氧分压差 AaD _{O₂} ↓	碳酸氢根 HCO ₃ ⁻ ↓	中性粒细胞 Neutrophils ↑	-	水通道蛋白-1 AQP-1 ↓	白蛋白渗透指数 Albumin leakage index ↑
				跨血管蛋白 Transvascular protein ↑	巨噬细胞 Macrophage ↑	-	水通道蛋白 β-5 AQPβ-5 ↓	白蛋白 Albumin ↑
				血管内红细胞 Transvascular red cell ↑	乳酸脱氢酶 LDH ↑	-	Na ⁺ /K ⁺ ATP 酶 a-1 Na ⁺ /K ⁺ ATPase a-1 ↓	肺泡灌洗液总蛋白 Total BAL protein ↑
					白三烯 E4 LTE4 ↑	-	-	白三烯 B4 LTB4 ↑

原暴露等^[68]。HAPE 作为肺水肿的一部分,至今仍缺乏标准、可靠的实验模型,随着新技术的发展与普及,转基因工程小鼠模型已经出现并适用于炎症 HAPE 研究^[50]。另外,动物实验难以像临床一样通过肺部 CT 或超声^[69]检查诊断 HAPE。因此,并没有明确的评价指标证实 HAPE 动物模型建立成功,可通过完善 CT 检查以进行优化。

总的来说,标准的 HAPE 动物模型的缺失仍然是阻碍 HAPE 研究发展的关键原因之一。HAPE 动

物模型发展至今,取得了可喜的成果,但仍然存在很多难题与痛点,包括动物对高原的耐受性、高原条件限制、无明确的评价指标、指向性不强、重现性不好等,有待进行更多的基础研究。

参 考 文 献 (References)

[1] Bärtsch P, Maggiorini M, Ritter M, et al. Prevention of high-altitude pulmonary edema by nifedipine [J]. N Engl J Med, 1991, 325(18): 1284-1289.
[2] Cruden NL, Newby DE, Webb DJ. Salmeterol for the prevention of high-altitude pulmonary edema [J]. N Engl J Med, 2002, 347

- (16): 1282-1285.
- [3] Schoene RB. Unraveling the mechanism of high altitude pulmonary edema [J]. *High Alt Med Biol*, 2004, 5(2): 125-135.
- [4] Hackett PH, Rennie D, Levine HD. The incidence, importance, and prophylaxis of acute mountain sickness [J]. *Lancet*, 1976, 2(7996): 1149-1155.
- [5] Cremona G, Asnagli R, Baderna P, et al. Pulmonary extravascular fluid accumulation in recreational climbers: a prospective study [J]. *Lancet*, 2002, 359(9303): 303-309.
- [6] Scherrer U, Rexhaj E, Jayet PY, et al. New insights in the pathogenesis of high-altitude pulmonary edema [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52(6): 485-492.
- [7] 向兴利, 杜智敏, 马志习, 等. 高原肺水肿的 CT 诊断 [J]. *中华放射学杂志*, 2002, 36(2): 41-52.
Xiang XL, Du ZM, Ma ZX, et al. CT diagnosis of high altitude pulmonary edema [J]. *Chin J Radiol*, 2002, 36(2): 41-52.
- [8] 王玮, 陈辉武, 魏经国, 等. 高原肺水肿的 CT 表现及动态观察 [J]. *中华放射学杂志*, 2004, 38(11): 52-55.
Wang W, Chen HW, Wei JG, et al. CT manifestations and dynamic observation of high altitude pulmonary edema [J]. *Chin J Radiol*, 2004, 38(11): 52-55.
- [9] 石建国, 季华庆, 陈想贵, 等. 高原肺水肿患者血流动力学变化研究 [J]. *中国全科医学*, 2021, 34(17): 2192-2197.
Shi JG, Ji HQ, Chen XG, et al. Hemodynamic changes in patients with high altitude pulmonary edema [J]. *Chin J Gen Pract*, 2021, 34(17): 2192-2197.
- [10] Swenson ER, Bärtsch P. High-altitude pulmonary edema [J]. *Compr Physiol*, 2012, 2(4): 2753-2773.
- [11] 格日力. 2019 年诺贝尔生理学或医学奖对高原医学研究的启示 从氧感知通路的新发现谈未来高原医学研究的机遇 [J]. *中国高原医学与生物学杂志*, 2020, 41(1): 2-5.
Ge RL. Inspiration of Nobel Prize in physiology or medicine in 2019 on plateau medicine research. Opportunities for future plateau medicine research from the new discovery of oxygen sensing pathway [J]. *Chin J Plateau Med Biol*, 2020, 41(1): 2-5.
- [12] 马四清, 宋青. 高原肺水肿防治研究进展 [J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(6): 603-608.
Ma SQ, Song Q. Research progress on prevention and treatment of high altitude pulmonary edema [J]. *Med J Chin PLA*, 2021, 46(6): 603-608.
- [13] 吴刚, 高文祥, 高钰琪. HIF-1: 高原肺水肿防治的新靶点 [J]. *中国高原医学与生物学杂志*, 2020, 41(1): 8-10, 16.
Wu G, Gao WX, Gao YQ. HIF-1: a new target for prevention and treatment of high altitude pulmonary edema [J]. *Chin J Plateau Med Biol*, 2020, 41(1): 8-10, 16.
- [14] Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 [J]. *Blood*, 2005, 105(2): 659-669.
- [15] Frede S, Fandrey J. Cellular and molecular defenses against hypoxia [J]. Springer New York, 2014, 2014: 23-35.
- [16] Shih HM, Wu CJ, Lin SL. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells [J]. *J Formos Med Assoc*, 2018, 117(11): 955-963.
- [17] Bai C, She J, Goolaerts A, et al. Stress failure plays a major role in the development of high-altitude pulmonary oedema in rats [J]. *Eur Respir J*, 2010, 35(3): 584-591.
- [18] Höschele S, Mairbäurl H. Alveolar flooding at high altitude: failure of reabsorption? [J]. *News Physiol Sci*, 2003, 18: 55-59.
- [19] Li Y, Zhang Y, Zhang Y. Research advances in pathogenesis and prophylactic measures of acute high altitude illness [J]. *Respir Med*, 2018, 145: 145-152.
- [20] Wang T, Hou J, Xiao W, et al. Chinese medicinal plants for the potential management of high-altitude pulmonary oedema and pulmonary hypertension [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 815-827.
- [21] 林雪, 雷有芳, 蒲小燕. 不同低氧胁迫方式构建 SD 大鼠高原肺水肿模型的比较研究 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(5): 367-373.
Lin X, Lei YF, Pu XY. Comparative study on SD rat models of high altitude pulmonary edema under different hypoxia stress [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2020, 40(5): 367-373.
- [22] 石继鹏, 李晓琳, 陈乐乐, 等. 藏麻多糖对大鼠高原脑水肿和肺水肿的保护作用 [J]. *国际药学研究杂志*, 2020, 47(7): 542-548.
Shi JP, Li XL, Chen LL, et al. Protective effect of *Potentilla anserina* polysaccharide on high altitude brain edema and pulmonary edema in rats [J]. *J Int Pharm Res*, 2020, 47(7): 542-548.
- [23] 海乐, 胡昌华. 七叶皂苷钠对大鼠高原肺水肿的干预研究 [J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2010, 3(2): 102-105.
Hai L, Hu CH. Intervention of sodium aescinate on high altitude pulmonary edema in rats [J]. *Chin J Lung Dis (Electronic Edition)*, 2010, 3(2): 102-105.
- [24] Bartlett D Jr, Remmers JE. Effects of high altitude exposure on the lungs of young rats [J]. *Respir Physiol*, 1971, 13(1): 116-125.
- [25] 刘士群, 高京生, 李德勤, 等. 大白鼠实验性高原肺水肿 [J]. *第三军医大学学报*, 1983, 5(4): 257-262, 348.
Liu SQ, Gao JS, Li DQ, et al. Experimental high altitude pulmonary edema in rats [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*, 1983, 5(4): 257-262, 348.
- [26] 刘士群, 高京生, 李德勤, 等. 大、小白鼠在模拟 6000 米高原七天肺含水量变化 [J]. *第三军医大学学报*, 1984, 6(2): 111-115.
Liu SQ, Gao JS, Li DQ, et al. Changes of lung water content in rats and mice at simulated altitude of 6000 m for seven days [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*, 1984, 6(2): 111-115.
- [27] Colice GL, Lee YJ, Chen J, et al. Susceptibility to high-altitude pulmonary edema in Madison and Hilltop rats. I. Ventilation and fluid balance [J]. *J Appl Physiol* (1985), 1995, 78(6): 2279-2285.

- [28] Tomlinson LA, Carpenter TC, Baker EH, et al. Hypoxia reduces airway epithelial sodium transport in rats [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(5): L881-L886.
- [29] Berg JT. Ginkgo biloba extract prevents high altitude pulmonary edema in rats [J]. *High Alt Med Biol*, 2004, 5(4): 429-434.
- [30] 王雷琛, 王剑波. 新型化合物 BZ-1 对大鼠实验性高原肺水肿的预防作用 [J]. *中南药学*, 2015, 13(2): 124-127.
Wang LC, Wang JB. Preventive effect of new compound BZ-1 on experimental high altitude pulmonary edema in rats [J]. *Central South Pharm*, 2015, 13(2): 124-127.
- [31] Richalet JP. High altitude pulmonary oedema: still a place for controversy? [J]. *Thorax*, 1995, 50(9): 923-929.
- [32] 李福祥, 夏前明, 李鸿雁, 等. 低氧习服对模拟高原低氧大鼠肺组织的影响 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2008, 7(3): 199-204, 242.
Li FX, Xia QM, Li HY, et al. Effects of hypoxia acclimatization on lung tissue of rats with simulated high altitude hypoxia [J]. *Chin J Respir Crit Care Med*, 2008, 7(3): 199-204, 242.
- [33] Tsai MC, Lin HJ, Lin MT, et al. High-altitude pulmonary edema can be prevented by heat shock protein 70-mediated hyperbaric oxygen preconditioning [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2014, 77(4): 585-591.
- [34] 李茁, 赵立明, 王丛, 等. 高压氧预处理对高原肺水肿大鼠肺水通道蛋白-5 的影响 [J]. *武警医学*, 2011, 22(11): 938-942.
Li Z, Zhao LM, Wang C, et al. Effect of hyperbaric oxygen pretreatment on lung aquaporin-5 in rats with high altitude pulmonary edema [J]. *Med J Chin PAPF*, 2011, 22(11): 938-942.
- [35] Bland RD, Demling RH, Selinger SL, et al. Effects of alveolar hypoxia on lung fluid and protein transport in unanesthetized sheep [J]. *Circ Res*, 1977, 40(3): 269-274.
- [36] Landolt CC, Matthay MA, Albertine KH, et al. Overperfusion, hypoxia, and increased pressure cause only hydrostatic pulmonary edema in anesthetized sheep [J]. *Circ Res*, 1983, 52(3): 335-341.
- [37] Lockhart A, Saiag B. Altitude and the human pulmonary circulation [J]. *Clin Sci (Lond)*, 1981, 60(6): 599-605.
- [38] Reeves JT, Wagner WW Jr, McMurtry IF, et al. Physiological effects of high altitude on the pulmonary circulation [J]. *Int Rev Physiol*, 1979, 20: 289-310.
- [39] Design of the mammalian respiratory system [J]. *Respir Physiol*, 1981, 44(1): 161-164.
- [40] Hansen TN, Hazinski TA, Bland RD. Effects of asphyxia on lung fluid balance in baby lambs [J]. *J Clin Invest*, 1984, 74(2): 370-376.
- [41] 王雷琛, 姜艳, 张迪, 等. 虎杖苷对模拟高原低氧环境所致小鼠脑、肺损伤的保护作用 [J]. *中南药学*, 2015, 13(4): 343-348.
Wang LC, Jiang Y, Zhang D, et al. Protective effect of polydatin on brain and lung injury induced by simulated high altitude hypoxia environment in mice [J]. *Central South Pharm*, 2015, 13(4): 343-348.
- [42] Kleinsasser A, Levin DL, Loeckinger A, et al. A pig model of high altitude pulmonary edema [J]. *High Alt Med Biol*, 2003, 4(4): 465-474.
- [43] Paul S, Gangwar A, Patir H, et al. Reverse translating SUL1A1, a potential biomarker in roentgenographically tested rat model of rapid HAPE induction [J]. *Life Sci*, 2019, 229: 132-138.
- [44] Hazelrig CG, Osmundson PJ, Schirger A, et al. Pathology of high altitude pulmonary edema [J]. *JAMA*, 1963, 186: 508-509.
- [45] Scott KW, Barer GR, Leach E, et al. Pulmonary ultrastructural changes in hypoxic rats [J]. *J Pathol*, 1978, 126(1): 27-33.
- [46] Sobin SS, Tremmer HM, Hardy JD, et al. Changes in arteriole in acute and chronic hypoxic pulmonary hypertension and recovery in rat [J]. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1983, 55(5): 1445-1455.
- [47] Heath D, Moosavi H, Smith P. Ultrastructure of high altitude pulmonary oedema [J]. *Thorax*, 1973, 28(6): 694-700.
- [48] Wayne TF Jr, Severinghaus JW. Experimental hypoxic pulmonary edema in the rat [J]. *J Appl Physiol*, 1968, 25(6): 729-732.
- [49] Gojkovic M, Darmasaputra GS, Veliça P, et al. Deregulated hypoxic response in myeloid cells: A model for high-altitude pulmonary oedema (HAPE) [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2020, 229(2): e13461.
- [50] Nikinmaa M. Finally, a promising model for high-altitude pulmonary edema (HAPE)-A Mountaineers' Malady [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2020, 229(2): e13472.
- [51] Swenson ER, Bärtsch P. The search for a model of high-altitude pulmonary oedema must continue [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2021, 231(1): e13485.
- [52] Schoene RB, Goldberg S. The quest for an animal model of high altitude pulmonary edema [J]. *Int J Sports Med*, 1992, 13: S59-S61.
- [53] Basnyat B, Murdoch DR. High-altitude illness [J]. *Lancet*, 2003, 361(9373): 1967-1974.
- [54] 霍妍, 赵安鹏, 李雪, 等. 急性高原病的动物模型研究现状 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(1): 26-30.
Huo Y, Zhao AP, Li X, et al. Research status of animal models of acute mountain sickness [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2021, 37(1): 26-30.
- [55] 陈有, 高钰琪, 李素芝, 等. 高原肺水肿动物模型的初步研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2006, 11(28): 1176-1177.
Chen Y, Gao YQ, Li SZ, et al. Preliminary study on animal model of high altitude pulmonary edema [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*, 2006, 11(28): 1176-1177.
- [56] 王义和, 薄海, 刘静, 等. 高原肺水肿大鼠模型的建立与研究 [J]. *武警医学*, 2008, 19(6): 489-491, 577.
Wang YH, Bo H, Liu J, et al. Establishment and study of rat model of high altitude pulmonary edema [J]. *Med J Chin Peop Arm Pol For*, 2008, 19(6): 489-491, 577.

- [57] She J, Goolaerts A, Shen J, et al. KGF-2 targets alveolar epithelia and capillary endothelia to reduce high altitude pulmonary oedema in rats [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(12): 3074-3084.
- [58] Ono S, Westcott JY, Chang SW, et al. Endotoxin priming followed by high altitude causes pulmonary edema in rats [J]. *J Appl Physiol (1985)*, 1993, 74(4): 1534-1542.
- [59] Carpenter TC, Reeves JT, Durmowicz AG. Viral respiratory infection increases susceptibility of young rats to hypoxia-induced pulmonary edema [J]. *J Appl Physiol (1985)*, 1998, 84(3): 1048-1054.
- [60] Durmowicz AG, Noordewier E, Nicholas R, et al. Inflammatory processes may predispose children to high-altitude pulmonary edema [J]. *J Pediatr*, 1997, 130(5): 838-840.
- [61] 曾南阳. 在海拔 5200 米模拟肺水肿模型. 第六届国际高原医学大会专刊 [C]. 2004: 363-364.
Zeng NY. Simulating pulmonary edema model at 5200 m, Special issue of the 6th International Conference on high altitude medicine [C]. 2004: 363-364.
- [62] 陈有, 李素芝, 高钰琪, 等. 输液诱导建立肺泡型高原肺水肿动物模型 [J]. *西南国防医药*, 2011, 21(8): 835-837.
Chen Y, Li SZ, Gao YQ, et al. Establishment of alveolar high altitude pulmonary edema animal model induced by infusion [J]. *Med J National Defending Forces Southwest Chin*, 2011, 21(8): 835-837.
- [63] 高文祥, 吴刚, 徐立聪, 等. 高原肺水肿发生机制与临床转化的现状与展望 [J]. *生物医学转化*, 2021, 2(2): 1-7, 71.
Gao WX, Wu G, Xu LC, et al. Current situation and Prospect of pathogenesis and clinical transformation of high altitude pulmonary edema [J]. *Biomed Transform*, 2021, 2(2): 1-7, 71.
- [64] 许永华, 张琼, 曹金军, 等. 创建大型复合低压舱扩大医学实验平台种类 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(7): 60-63.
Xu YH, Zhang Q, Cao JJ, et al. Create a large composite low pressure cabin and expand the types of medical experimental platforms [J]. *Chin J Com Med*, 2012, 22(7): 60-63.
- [65] Ryan J, Bloch K, Archer SL. Rodent models of pulmonary hypertension; harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH [J]. *Int J Clin Pract Suppl*, 2011, 172: 15-34.
- [66] Stepanek J, Klocke D, Malvin G, et al. The piglet as an animal model for hypobaric hypoxia [J]. *Wilderness Environ Med*, 1998, 9(1): 8-13.
- [67] Scherrer U, Sartori C, Lepori M, et al. High-altitude pulmonary edema; from exaggerated pulmonary hypertension to a defect in transepithelial sodium transport [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1999, 474: 93-107.
- [68] 吴万民, 张金红, 杨义, 等. 高原舱模拟大鼠急性高原肺水肿及脑水肿的研究概况 [J]. *解放军药科学学报*, 2018, 34(3): 258-260.
Wu WM, Zhang JH, Yang Y, et al. Research overview of acute high altitude pulmonary edema and brain edema in rats simulated by high altitude cabin [J]. *Pharm J Chin PLA*, 2018, 34(3): 258-260.
- [69] 马德花, 鲍海咏, 张宏, 等. 肺部超声监测在严重高原肺水肿中的应用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(9): 815-820.
Ma DH, Bao HY, Zhang H, et al. Application of lung ultrasound examination in severe high altitude pulmonary edema [J]. *Chin Crit Care Med*, 2017, 29(9): 815-820.

[收稿日期] 2021-07-09