

目次

研究报告

高脂高糖饮食诱导五指山小型猪动脉粥样硬化模型肠道菌群的变化	沈利叶, 潘永明, 徐雁云, 郁晨, 黄俊杰, 马全鑫, 陈民利 (299)
复方地黄颗粒对帕金森病阴虚动风证小鼠血清环核苷酸的调节及多巴胺能神经元的修复作用	何竹青, 王利, 王滢迪, 邰鹏飞, 杨玉芳, 何建成 (309)
中华眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响	许林, 魏颖, 徐书静, 张启云, 郭静, 周舒婷, 孙黔云 (316)
<i>Clcn3</i> 敲除对幼龄小鼠实质器官的影响	经争辉, 李春英, 刘蓉, 任俞华, 崔诗雨, 赵文宝, 张海峰 (326)
肌肉特异性表达 Cas9 示踪同源打靶载体的构建及其在 C2C12 细胞中的整合	王晓萌, 周慧敏, 董奕彤, 陈胜男, 安铁洙, 殷萍, 王春生 (333)
联合法诱导内脏高敏感模型的比较研究	侯雨君, 赵映, 蒋慧灵, 谭玉, 张薇, 李琰, 郑倩华 (343)
一种啮齿类动物脑内微透析记录的清醒活动装置的设计和应用研究	张钰, 周澧, 张玲, 孙秀萍, 李祥磊, 秦川 (350)
斑马鱼缓慢性心律失常模型的构建	张凯玉, 王圆, 胡燕燕, 张静, 施雯婷, 赵外荣, 唐靖一, 周忠焱 (358)
小鼠室管膜细胞体外培养及多纤毛形成过程分析	张源, 武慧渊 (370)
生殖细胞条件性敲除 <i>Usp16</i> 基因小鼠的建立、鉴定及表型分析	李卫杰, 梁冬丽, 刘永忠, 王朝霞, 乔中东, 徐汪节 (376)
不同风格音乐对 CUMS 抑郁大鼠行为的影响及机制研究	李懿, 曾莉, 何丽雯, 谭冬梅, 张倩, 谭毅 (384)
慢性皮肤溃疡大鼠模型的比较研究	张百荣, 李梦秋, 范华娜, 沈志滨, 尹永芹, 陶曙红, 郑芳昊, 陈艳芬 (392)
经宫颈机械损伤联合脂多糖灌注法构建小鼠宫腔黏连模型	常品, 张胜辉, 陈童彤, 孙钰棕, 张花, 潘莹, 刘彦礼, 林俊堂 (400)

转基因人源化 ACE2 裸小鼠模型的建立
..... 孙路,付函君,刘云鹏,武婧,林凯丽,石桂英,王敬竹,孙井江,高虹(408)

研究进展

斑马鱼黑色素瘤模型研究进展 刘诗成,张瑞,唐景峰,陈兴珍(416)
酒精性肝病与肠道微生物群落研究进展 李国华,李鹤龄,陈智岗,刘海原,王宏(423)
大小鼠失眠模型和评价方法研究进展 夏天吉,闫明珠,王智,靳苏维,刘新民,潘瑞乐,常琪(428)
基于肠道菌群的免疫调节策略用于结直肠癌联合治疗研究的进展 李惠,赵菊梅,师长宏(436)
慢性肾病相关性瘙痒症的动物模型研究进展 韩壤乐,胡琼丹,王丽(444)

广告 (封二、封底、内插)

主 管	照 排
中国科学技术协会	同方知网(北京)技术有限公司
主 办	印 刷
中国实验动物学会	北京博海升彩色印刷有限公司
中国医学科学院医学实验动物研究所	邮发代号
主 编	2-748
秦川	广告发布登记
编辑部主任	京朝工商广登字 20170142 号
董令赢	定 价
编 辑	每期 50.00 元,全年 300.00 元
《中国实验动物学报》编辑部	中国标准连续出版物号
出 版	ISSN 1005-4847
《中国实验动物学报》编辑部	CN 11-2986/Q
发 行	2022 年版权归中国实验动物学会所有
《中国实验动物学报》编辑部	本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子
100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号	杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网
电话:010-67779337	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
传真:010-67770690	论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述
E-mail:bjb@cnilas.org	网站著作权使用费。
http://zgswdw.cnjournals.com/sydwbyjyx/ch/index.aspx	本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com
本期执行主编 王 强	
本期责任编辑 陈 慧 董令赢	

CONTENTS

Changes in intestinal flora in a Wuzhishan minipig atherosclerosis model induced by high-fat and high-sugar diet
 ... SHEN Liye, PAN Yongming, XU Yanyun, YU Chen, HUANG Junjie, MA Quanxing, CHEN Minli(299)

Regulation of serum cyclic nucleotides and repair of dopaminergic neurons in mice with Yin deficiency and moving
wind syndrome of Parkinson's disease by compound Dihuang Granule
 HE Zhuqing, WANG Li, WANG Yingdi, HUAN Pengfei, YANG Yufang, HE Jiancheng(309)

Effect of *Naja atra* venom on blood coagulation in rats
 XU Lin, WEI Ying, XU Shujing, ZHANG Qiyun, GUO Jing, ZHOU Shuting, SUN Qianyun(316)

Effect of *Cln3* knockout on parenchymal organs in young mice
 JING Zhenghui, LI Chunying, LIU Rong, REN Yuhua, CUI Shiyu, ZHAO Wenbao, ZHANG Haifeng(326)

Establishment of C2C12 cells with integration of a muscle-specific Cas9-tracking expression vector
 WANG Xiaomeng,
 ZHOU Huimin, DONG Yitong, CHEN Shengnan, AN Tiezhu, YIN Ping, WANG Chunsheng(333)

Visceral hypersensitivity model of irritable bowel syndrome established by combined methods: a comparative study
 HOU Yujun, ZHAO Ying, JIANG Huiling, TAN Yu, ZHANG Wei, LI Ying, ZHENG Qianhua(343)

Design and application of a rodent awake activity device for brain microdialysis recording
 ZHANG Yu, ZHOU Li, ZHANG Ling, SUN Xiuping, LI Xianglei, QIN Chuan(350)

Establishment of a bradycardiac arrhythmia model in zebrafish ZHANG Kaiyu, WANG Yuan,
 HU Yanyan, ZHANG Jing, SHI Wenting, ZHAO Wairong, TANG Jingyi, ZHOU Zhongyan(358)

Primary culture of mouse ependymal cells and analysis of the multicilia formation process
 ZHANG Yuan, WU Huiyuan(370)

Establishment, identification and phenotyping of a germ cell-specific deubiquitinating enzyme 16 conditional knock-
out mouse
 LI Weijie, LIANG Dongli, LIU Yongzhong, WANG Zhaoxia, QIAO Zhongdong, XU Wangjie(376)

Effects of different style music on behavior in CUMS depression rats
 LI Yi, ZENG Li, HE Liwen, TAN Dongmei, ZHANG Qian, TAN Yi(384)

Rat models of chronic skin ulcers; a comparative study ZHANG Bairong, LI Mengqiu, FAN Huana, SHEN Zhibin, YIN Yongqin, TAO Shuhong, ZHENG Fanghao, CHEN Yanfen(392)

Establishment of a mouse intrauterine adhesion model by transcervical mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion CHANG Pin, ZHANG Shenghui, CHEN Tongtong, SUN Yuliang, ZHANG Hua, PAN Ying, LIU Yanli, LIN Juntang(400)

Establishment of transgenic humanized ACE2 nude mouse model SUN Lu, FU Hanjun, LIU Yunpeng, WU Jing, LIN Kaili, SHI Guiying, WANG Jingzhu, SUN Jingjiang, GAO Hong(408)

Research progress in zebrafish melanoma model LIU Shicheng, ZHANG Rui, TANG Jingfeng, CHEN Xingzhen(416)

Research progress on alcoholic liver diseases and gut microbiota LI Guohua, LI Heling, CHEN Zhigang, LIU Haiyuan, WANG Hong(423)

Research progress on animal models of insomnia and evaluation methods XIA Tianji, YAN Mingzhu, WANG Zhi, JIN Suwei, LIU Xinmin, PAN Ruile, CHANG Qi(428)

Research progress of intestinal flora immunomodulation combined therapy for colorectal cancer LI Hui, ZHAO Jumei, SHI Changhong(436)

Advances in animal models of pruritus associated with chronic kidney disease HAN Rangyue, HU Qiongdan, WANG Li(444)

Responsible Institution China Association for Science and Technology	Distributor Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica 5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021 Tel: 010-67779337 Fax: 010-67770690 E-mail: bjb@cnilas.org http://zgswdw.cnjournals.com/sydwbybjx/ch/index.aspx
Sponsor Chinese Association for Laboratory Animal Sciences Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences	CSSN ISSN 1005-4847 CN 11-2986/Q
Editor-in-Chief QIN Chuan(秦川)	Copyright 2022 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
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	

沈利叶,潘永明,徐雁云,等. 高脂高糖饮食诱导五指山小型猪动脉粥样硬化模型肠道菌群的变化 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 299-308.

Shen LY, Pan YM, Xu YY, et al. Changes in intestinal flora in a Wuzhishan minipig atherosclerosis model induced by high-fat and high-sugar diet [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 299-308.

Doi:10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2022. 03. 001

高脂高糖饮食诱导五指山小型猪动脉粥样硬化模型肠道菌群的变化

沈利叶,潘永明,徐雁云,郁晨,黄俊杰,马全鑫,陈民利*

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究所,杭州 310053)

【摘要】 目的 观察高脂高糖饮食致五指山小型猪动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)模型肠道菌群的变化。**方法** 雄性五指山小型猪 12 只,按体重分为两组,即正常对照(NC)组和模型(AS)组,每组 6 只。NC 组饲喂正常饲料,AS 组饲喂高脂高糖饲料,连续饮食 24 周后,前腔静脉采血测定糖脂代谢等生化指标,同时进行葡萄糖耐量试验。实验结束后行安死术,观察体内脂肪沉积,并取主动脉血管行苏丹 IV 染色和腹主动脉血管行 HE 染色分别观察脂质沉积和组织病理学变化。取盲肠内容物进行 16S rDNA 测序分析肠道菌群的变化。**结果** 与 NC 组比较,AS 模型组血清总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、血糖(GLU)、果糖胺(FMN)菌明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),体重和体内脂肪沉积亦显著增加($P < 0.01$),同时 AS 模型组主动脉血管明显脂质沉积和 AS 病变。肠道菌群测序分析显示,与 NC 组相比,AS 模型组肠道菌群 α -多样性显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。在门水平上,AS 模型组拟杆菌门和放线菌门明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),变形菌门和厚壁菌门/拟杆菌门比值均显著升高($P < 0.05$)。在属水平上,AS 模型组黑斯伯利亚菌属(*Hespellia*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae _incertae _sedis*)、假丁酸弧菌属(*Pseudobutyrvibrio*)、巴恩斯氏菌属(*Barnesiella*)等 17 个菌属的相对丰度显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),沙壤土杆菌属(*Ramlibacter*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingorhabdus*)、污水管杆菌属(*Cloacibacillus*)、草酸杆菌属(*Oxalobacter*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、新鞘脂菌属(*Novosphingobium*)等 11 个菌属的相对丰度显著上升($P < 0.05$)。功能预测分析显示,脂多糖生物合成、脂多糖生物合成蛋白途径、初级胆汁酸的生物合成、花生四烯酸代谢等多条途径可能参与 AS 的形成。相关分析显示,TC、内中膜厚度、脂质沉积、果糖胺与草酸杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、污水管杆菌属、梭菌属、瘤胃球菌属等 14 个菌属存在关联。**结论** 高脂高糖饮食诱导的五指山小型猪 AS 模型具有肥胖、糖脂代谢紊乱和明显的 AS 病变的特点,其发生可能与肠道菌群失调有关。

【关键词】 肠道菌群;高脂高糖饮食;动脉粥样硬化模型;五指山小型猪

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0299-10

Changes in intestinal flora in a Wuzhishan minipig atherosclerosis model induced by high-fat and high-sugar diet

SHEN Liye, PAN Yongming, XU Yanyun, YU Chen, HUANG Junjie, MA Quanxing, CHEN Minli*

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

Corresponding author: CHEN Minli. E-mail: cmli991@zcmu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31970514)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China(31970514).

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

[通信作者] 陈民利(1963—)女,教授,研究方向:实验动物与比较医学。Email:cmli991@zcmu.edu.cn

[Abstract] Objective To observe changes in the intestinal flora in a Wuzhishan minipig model of atherosclerosis (AS) induced by a high-fat/high-sugar diet. **Methods** Twelve male Wuzhishan minipigs were divided into normal control (NC) and AS model groups according to body weight ($n = 6$ per group). The NC group was fed a normal diet and the AS model group was fed a high-fat/high-sugar diet. After 24 weeks of continuous diet, blood samples were taken from the anterior vena cava to determine biochemical indexes, including glucolipid metabolism, and a glucose to tolerance test was also performed. At the end of the experiment, the minipigs were euthanized and body fat deposition was observed. The aortic vessels were stained with Sudan IV and the abdominal aortic vessels were stained with hematoxylin and eosin to observe lipid deposition and histopathological changes, respectively. The cecal contents were used for 16S rDNA sequencing to analyze changes in the intestinal flora. **Results** Serum total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, blood glucose, and fructosamine levels were all significantly higher in the AS model group compared with the NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Body weight and body fat deposition were also significantly higher in the AS model group ($P < 0.01$). The aortic vessels showed increased lipid deposition and AS lesions. DNA sequencing analysis showed significantly lower intestinal flora α -diversity in the AS model group compared with the NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). At the phylum level, the phyla Bacteroidetes and Actinomycetes were significantly reduced in the AS model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the phylum Proteobacteria and the Firmicutes/Bacteroidetes ratio were significantly increased ($P < 0.05$). At the genus level, the relative abundances of 17 genera, including *Hespellia*, *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae_incertae_sedis*, *Pseudobutyribrio*, and *Barnesiella*, were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the relative abundances of 11 genera, including *Ramlibacter*, *Sphingorhabdus*, *Cloacibacillus*, *Oxalobacter*, *Sphingomonas*, and *Novosphingobium*, were significantly increased ($P < 0.05$). Functional prediction analysis showed that multiple pathways such as lipopolysaccharide biosynthesis, lipopolysaccharide biosynthesis proteins, primary bile acid biosynthesis, and arachidonic acid metabolism may participate in the formation of AS. Correlation analysis showed that total cholesterol, intima media thickness, lipid deposition, and fructosamine were associated with 14 genera, including *Oxalobacter*, *Sphingomonas*, *Cloacibacillus*, *Clostridiales_unclassified*, and *Ruminococcus*. **Conclusions** High-fat/high sugar diet-induced AS in Wuzhishan minipigs is characterized by obesity, disturbed glucolipid metabolism, and obvious AS lesions, possibly related to dysbiosis of the intestinal flora.

[Keywords] intestinal flora; high-fat and high-sugar diet; atherosclerosis model; Wuzhishan minipig
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

心血管疾病是全世界人口死亡的主要原因^[1], 据统计我国心血管疾病死亡率一直占据首位^[2], 并呈逐年上升趋势, 给我国的医疗卫生行业带来了巨大的经济负担^[3]。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是心血管疾病的主要病理基础^[4], 也被认为是一种慢性代谢综合征, 其特征是由血管内皮损伤引起的轻度血管炎造成的长期代谢紊乱。大量的研究已证实, AS 的发生与饮食、血脂异常、糖尿病、高血压各种代谢紊乱性疾病等环境因素有关, 而饮食是引起 AS 的重要环境因素。高脂高糖饮食是目前常见的一种生活方式, 研究发现高脂饮食能够改变肠道中定植的微生物, 从而导致肠道通透性的增加和菌群代谢产物水平的变化, 激活体内多条通路^[5], 加重肥胖与 AS 的发生发展^[6]。

小型猪与人的各器官系统不仅在形态结构上相似, 而且生理学功能也基本相同, 特别是心血管系统与胃肠道系统, 且 AS 病变与人类 AS 病变的分布特点相一致, 并具有人类成熟斑块的特点^[7]。五

指山小型猪是我国的特色小型猪品种。前期研究发现五指山小型猪在饲喂高脂 6 个月后, 会发生明显的脂质代谢异常和炎症反应, 主动脉病理可见明显的 AS 斑块^[8], 但对肠道菌群的变化尚不清楚。为此, 本研究采用高脂高糖饮食诱导五指山小型猪 AS 模型, 观察五指山小型猪 AS 模型肠道菌群的变化, 为五指山小型猪在 AS 研究中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

12 只 3 ~ 4 月龄普通级雄性五指山小型猪, 体重 12 ~ 15 kg, 购买于五指山小型猪购自海南省农业科学院畜牧兽医研究所【SCXK(琼)2014-0006】。所有小型猪饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心普通环境设施中【SYXK(浙)2018-0012】。室温 (22 ± 2) °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 光照黑暗交替 12 h/12 h。所有饲养和操作均经过浙江中医药大

学实验动物管理与伦理委员会审查并批准(批准号:ZSLL-2016-0031)。

1.1.2 主要试剂与仪器

苏丹 IV 粉末(美国 Sigma 公司);曙红 Y(国药集团化学试剂有限公司);苏木精(上海伯奥生物科技有限公司);总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triacylglycerol, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、葡萄糖(glucose, GLU)、果糖胺(FMN, fructosamine)等生化试剂盒均购自宁波美康生物科技股份有限公司。RM2245 半自动石蜡切片机(德国徕卡公司);Autostainer XL 自动染色机(德国徕卡公司);2.0 RS Nana Zoomer 数字切片扫描设备(日本滨松公司);日立 3100 全自动生化分析仪(日本日立公司)。

1.2 方法

1.2.1 AS 模型的建立

五指山小型猪经适应性饲养 8 周后,根据体重随机分成 2 组,即正常对照(normal control, NC)组和 AS 组,每组 6 只。NC 组饲喂基础饲料,AS 组饲喂高脂高糖(high fat/sugar diet, HFS)饲料,连续饲喂 24 周,HFS 饲料配方为 1.5%胆固醇、15.0%起酥油、10.0%蛋黄粉、20.0%果糖、1.0%食盐和 52.5%基础饲料,每组饲喂量为体重的 2.5%,分成两等份,上下午各 1 次,每 2 周重新称重计算饲喂量。

1.2.2 生化检测

造模 24 周后,禁食不禁水 16 h,取前腔静脉血 5 mL,3000 rpm,离心 10 min,分离血清,使用日立 3100 全自动生化分析仪检测血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C、GLU、FMN 等生化指标。同时进行糖耐量试验,耳缘静脉注射 1.2 mL/kg 50%葡萄糖注射液,在 1 ~ 2 min 内注射完毕,检测注射后 0、5、15、30、60、120 min 的血糖值,计算糖耐量曲线下面积(area under glucose tolerance curve, U-GLU)。

1.2.3 体重与体脂观察

造模 24 周后,禁食不禁水 16 h,称重,行安乐死,取腹部脂肪、大网膜脂肪、肠系膜脂肪、睾丸周边脂肪进行称重。

1.2.4 组织病理观察

动物安乐死后取主动脉弓至腹主动脉髂部的主动脉血管,经 4%中性甲醛固定 24 h 后,用苏丹 IV 染液染色 15 min 后,拍照后用 Image-pro Plus 6.0 软

件测定主动脉的脂质沉积率(脂质沉积率=红染面积/血管总面积 $\times$ 100%)。另取部分腹主动脉血管组织经 10%中性甲醛固定 24 h 后,制备 4 μ m 石蜡切片,进行 HE 染色后用 NDP.view 2 软件观察腹主动脉血管组织的病变情况,并计算腹主动脉内中膜厚度(intima-media thickness, IMT)。

1.2.5 16S rDNA 测序及生物信息学分析

每组随机取 3 只动物的盲肠内容物进行 16S rDNA 测序,按照 Stool DNA Kit(200)试剂盒说明从五指山小型猪盲肠内容物中提取微生物总 DNA。琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,紫外分光光度计进行 DNA 定量。随后使用引物扩增 16S rDNA 基因的可变区(V3 和 V4)该部分及 16S rDNA 测序交由杭州联川生物科技有限公司完成。对获得的原始数据进行预处理,质量优化,舍弃低质量序列,连接序列,过滤连接的序列,获得最终用于分析的序列。使用 Versearch v2.3.4 软件进行过滤,将相似度大于 97%的操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)进行分类,进一步使用核糖体数据库项目分类器给每一个 OTU 选择一条代表序列,最终得到各 OTU 的代表序列和对应丰度。在 Microbiomeanalyst 网站上分析菌群 α -多样性和 β -多样性,在门和属水平上对比两个组的差异,找出具有显著性差异的微生物类型,默认阈值为 0.05。在联川生物云平台上使用 LEfSe(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)分析两个组之间差异丰富的微生物分类群,使用联川 PICRUST2 功能分析预测微生物基因功能,然后使用京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库对预测的基因及其功能进行注释。

1.3 统计学分析

所有数据均采用平均值 $\pm$ 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,采用 GraphPad prism 8.0 软件统计处理,组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。肠道菌群数据组间比较使用 STAMP(statistical analysis of metagenomic profiles)软件分析,采用 Welch's t -test 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。联川云工具进行 LEfSe 分析和 PICRUST2 功能富集以及相关性聚类分析。

2 结果

2.1 血脂变化

与 NC 组相比,AS 组血清 TC、HDL-C 和 LDL-C

均显著升高 ($P < 0.01$), 但 TG 差异不显著 ($P > 0.05$) (见图 1)。

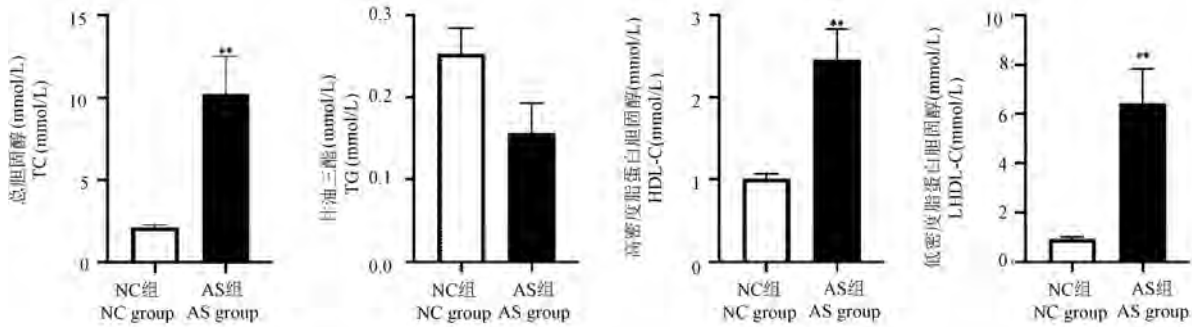
2.2 血糖、果糖胺与糖耐量的变化

与 NC 组比, AS 组 GLU 和 FMN 均显著上升 ($P < 0.05, P < 0.01$); 糖耐量试验结果显示, AS 模型组给糖后的血糖曲线均高于 NC 组, 在 15、60、90

min 时具有显著性差异, 且 AS 模型组 G-AUC 显著高于 NC 组, ($P < 0.05$) (见图 2)。

2.3 体重和体脂分布的变化

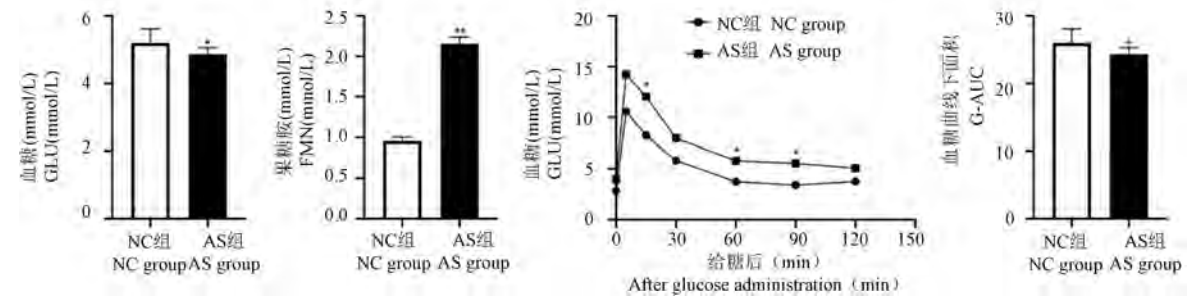
与 NC 组相比, AS 组小型猪体重、腹部脂肪、大网膜脂肪、肠系膜脂肪、睾丸周边脂肪和总脂肪重量均显著增加 ($P < 0.01$) (见表 1)。



注: 与 NC 组相比, ** $P < 0.01$ 。
图 1 各组血脂水平的变化

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

Figure 1 Changes of blood lipid levels in each group



注: 与 NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图/表同)
图 2 各组血糖、果糖胺与糖耐量的变化

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

Figure 2 Changes of blood glucose, fructose amine and glucose tolerance in each group

表 1 各组体重和体脂分布的变化

Table 1 Changes of body weight and body fat distribution in each group

组别 Groups	体重(kg) Weight (kg)	体内脂肪沉积情况(g) Body fat deposition (g)				
		腹部脂肪 Abdominal fat	大网膜脂肪 Omentum fat	肠系膜脂肪 Mesenteric fat	睾丸周边脂肪 Gonadal fat	总脂肪 Total fat
NC 组 NC group	22.13 ± 1.57	77.56 ± 11.89	12.02 ± 2.02	2.18 ± 0.42	5.89 ± 0.43	97.65 ± 14.35
AS 组 AS group	41.35 ± 1.80**	675.12 ± 123.53**	85.90 ± 13.37**	23.76 ± 3.95**	23.57 ± 3.13**	808.35 ± 137.82**

2.4 主动脉血管脂质沉积的变化

主动脉血管苏丹Ⅳ染色显示, NC 组血管内皮无明显红染脂质沉积, 无突起; 而 AS 组主动脉血管内皮上有明显红染脂质沉积与脂质条纹, 且脂质沉

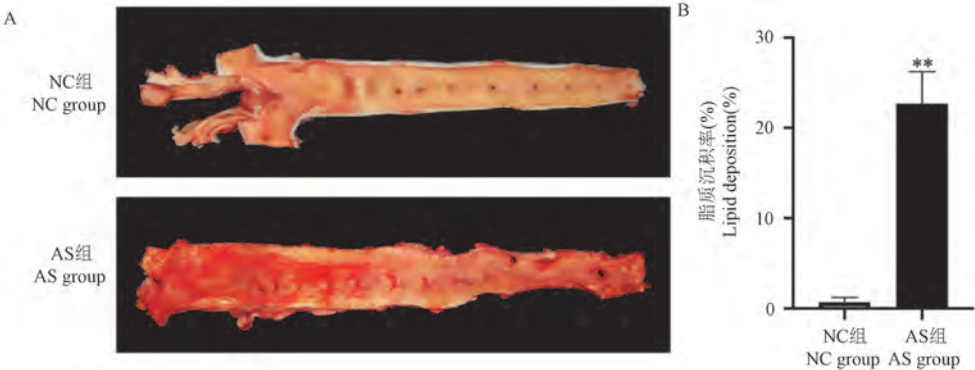
积处呈斑块状突起。定量分析结果显示, AS 组主动脉血管脂质沉积率显著增加 ($P < 0.01$) (见图 3)。

2.5 AS 模型腹主动脉血管组织病理学观察

HE 染色结果显示, NC 组腹主动脉血管结构

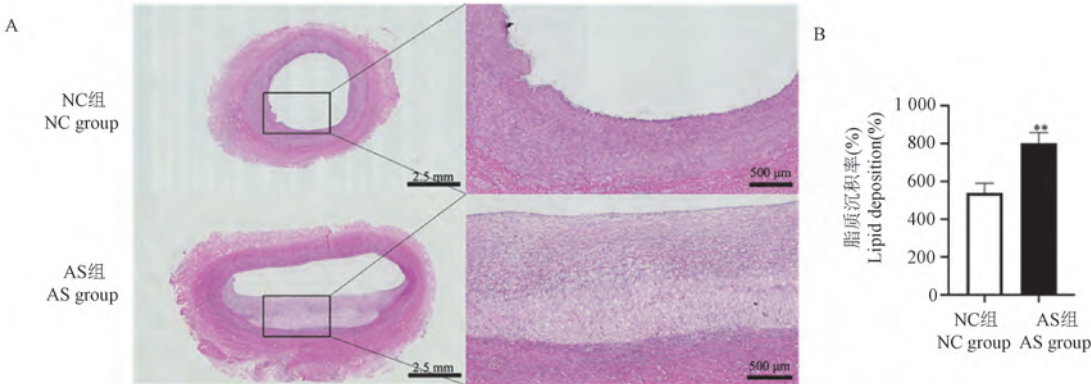
完整清晰,内膜内皮细胞整齐排列,未见有突起斑块,中膜外膜平滑肌细胞排列紧密,弹力纤维层结构完整,未见明显异常。AS 组腹主动脉血管结构破坏,内膜内皮细胞突起,含大量泡沫细胞及炎性

细胞,增生明显,外膜平滑肌细胞与弹力纤维层排列松散。定量分析结果显示,与 NC 组比,AS 组腹主动脉血管 IMT 显著增加($P < 0.01$) (见图 4)。



注:A:主动脉血管苏丹IV染色代表图;B:脂质沉积率。
图3 各组主动脉血管脂质沉积的变化
Note. A. The representative picture of Sudan IV staining of aortic vessels. B. Lipid deposition rate.

Figure 3 Changes of lipid deposition in aortic vessels in each group



注:A:腹主动脉血管 HE 染色代表图,右图为左图黑框的 40 倍放大图;B:内中膜厚度。
图4 各组腹主动脉血管组织病理学观察
Note. A. The representative picture of HE staining of abdominal aortic vessels, and the right picture is an enlarged 40-fold of the black frame of the left picture. B. Intima-media thickness.

Figure 4 Histopathological observation of abdominal aorta in each group

2.6 肠道菌群的分析结果

2.6.1 多样性分析

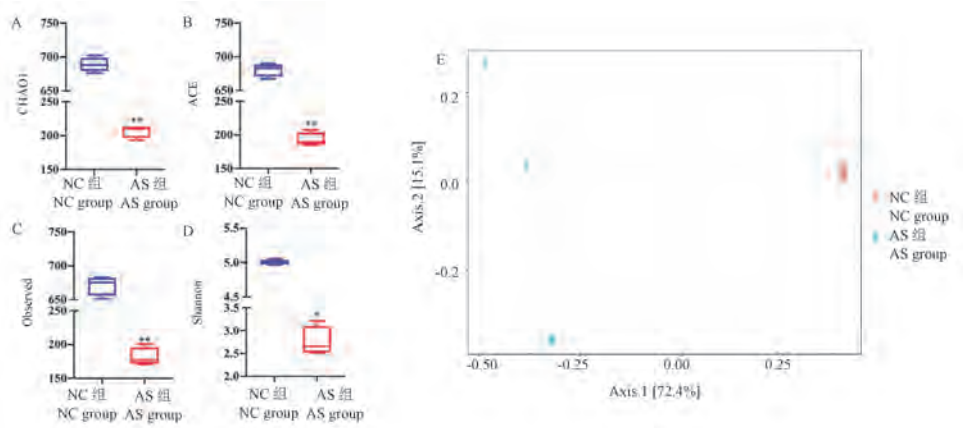
α -多样性是体现体内肠道微生物物种的个数(丰富度)以及每个物种的数量及分布(均匀度),常见指标为 Chao1、ACE、Observed、Shannon。Chao1 是 C 用 Chao1 算法估计样本 OTU 数量的指数,可以度量物种类别多样性。ACE 也是用来估计群落种 OTU 数目的指数,与 Chao1 的算法不同,这两个指数可以显示肠道微生物群落的丰富度。Observed 描述的是群落中实际的 OTU 的个数。Shannon 可以描述群落物种的丰富度和均匀度,相同物种丰富度的

情况下,群落中的物种均匀度越高,则多样性越大。与 NC 组相比,AS 组的 Chao1、ACE、Observed、Shannon 指数均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 5A, 5B, 5C, 5D)。 β -多样性分析是对不同样本之间的微生物群落构成进行比较分析。将各样本在属水平下,基于 Bray-Curtis index 距离进行 PCoA 分析。以第一主坐标 (Axis1) 为基准,NC 组与 AS 组相距较远,表明长期的高脂高糖饮食能够使五指山小型猪 AS 模型的肠道菌群发生 (图 5E)。

2.6.2 从门水平上分析 AS 模型小型猪肠道菌群组成变化

将样本进行 OTU 聚类分析,在门的水平上对物种进行分类,五指山小型猪的盲肠内容物中的菌群主要包括厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、螺旋体菌门(Spirochaetes)、变形杆菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、广古菌门(Euryarchaeota)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、软壁菌门(Tenericutes)、互养菌门(Synergistetes)、纤维杆菌门

(Fibrobacteres)、梭杆菌门(Fusobacteria)等 11 个门(图 6A)。NC 组的优势菌群为厚壁菌门与拟杆菌门,占有菌群的 90.4%,AS 组的优势菌群为厚壁菌门、变形杆菌门和拟杆菌门,占总菌群的 97.2%。与 NC 组比,AS 组拟杆菌门和放线菌门丰度均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),变形菌门丰度则明显升高($P < 0.05$)(图 6C);同时厚壁菌门/拟杆菌门比值亦显著升高($P < 0.05$)(图 6B)。

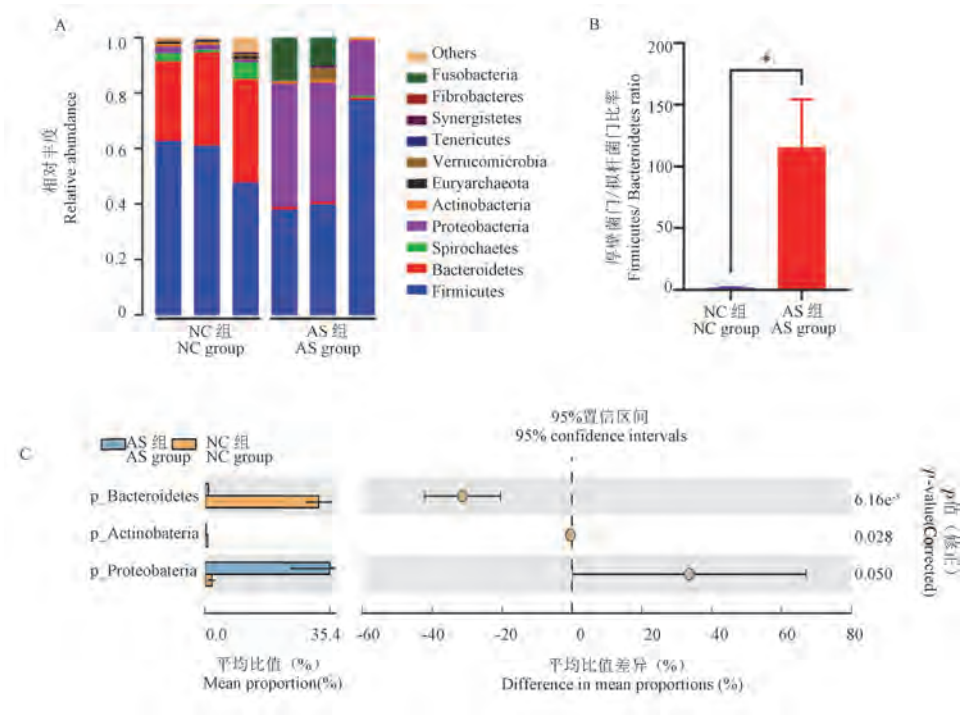


注: A: CHAO1; B: ACE; C: Observed; D: Shannon; E: β -多样性。

图 5 各组肠道菌群多样性分析

Note. A. CHAO1. B. ACE. C. Observed. D. Shannon. E. β -diversity.

Figure 5 Analysis of intestinal flora diversity in each group



注: A: 门水平各菌群相对丰度柱状图; B: 厚壁菌门/拟杆菌门比值; C: 差异菌门。

图 6 各组肠道菌群在门水平上的变化

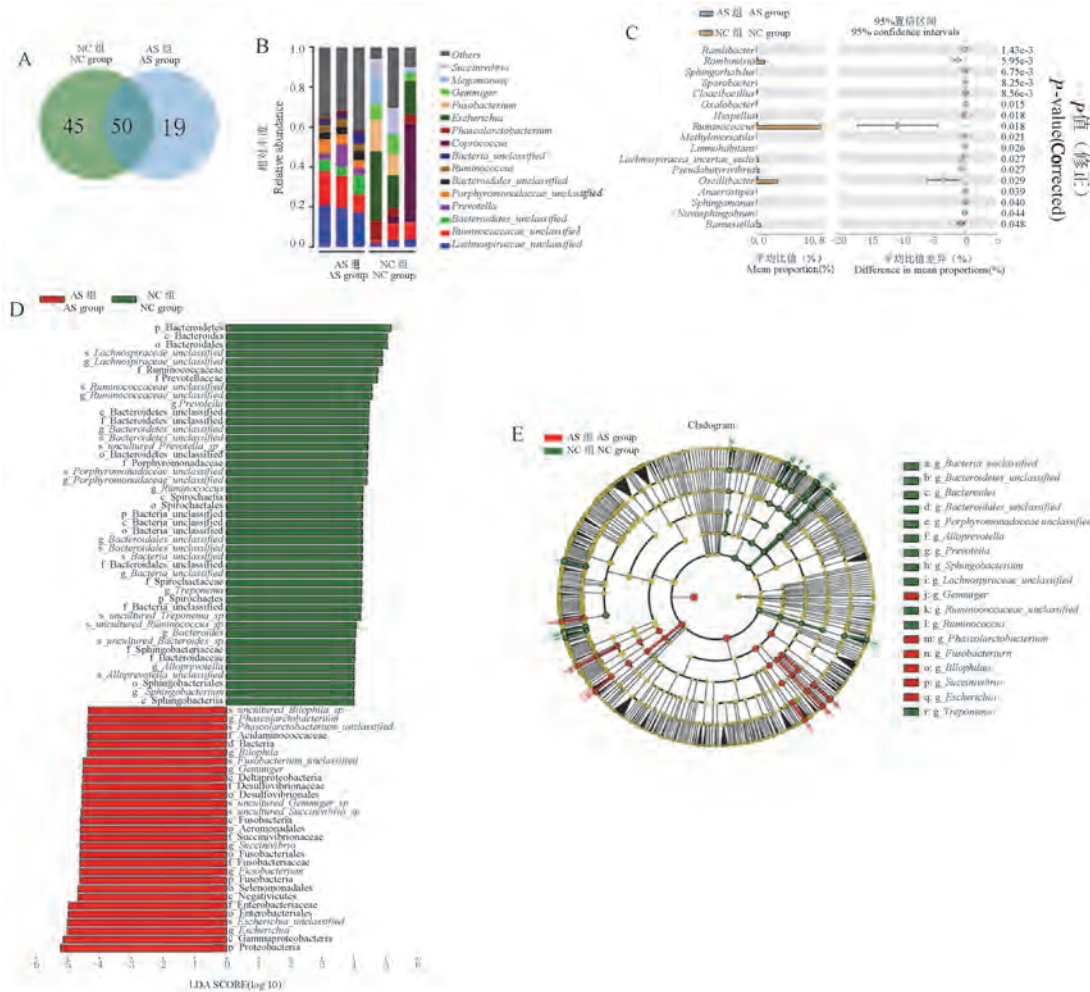
Note. A. Histogram of relative abundance of intestinal flora at phylum level. B. Firmicutes/Bacteroidetes ratio. C. The differential phylum.

Figure 6 Changes of intestinal flora at phylum level in each group

2.6.3 从属水平上分析 AS 模型小型猪的肠道菌群组成变化

NC 组与 AS 组肠道菌群种类在属水平上分别发现 95 个和 69 个属,其中普氏菌属(*Prevotella*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、粪球菌属(*Coprococcus*)、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)为前 15 个丰度较高的菌属。与 NC 组相比,AS 组黑斯伯利亚属(*Hespellia*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae_incertae_sedis*)、假丁酸弧菌属(*Pseudobutyrvibrio*)、颤杆菌属(*Oscillibacter*)、巴恩斯氏菌属(*Barnesiella*)等 17 个

菌属的相对丰度显著下降($P < 0.05, P < 0.01$),沙壤土杆菌属(*Ramlibacter*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingorhabdus*)、污水管杆菌属(*Cloacibacillus*)、草酸杆菌(*Oxalobacter*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、新脂醇菌属(*Novosphingobium*)等 11 个菌属的相对丰度显著上升($P < 0.05$)。LEfSe 分析发现普氏菌属(*Prevotella*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)和芽绿菌属(*Gemmiger*)等这些菌属在 AS 发生过程中产生了影响(见图 7)。



注:A:NC 组与 AS 组比较韦恩图;B:前 15 个菌属的相对丰度;C:属水平菌群差异图;D:LDA 条形图;E:属水平 LEfSe 图。

图 7 各组肠道菌群在属水平的变化

Note. A. Venn diagram of NC group and AS group. B. The relative abundance of the top 15 genera. C. Differential genera. D. The LDA bar chart. E. LEfSe diagram.

Figure 7 Changes of intestinal flora at genus level in each group

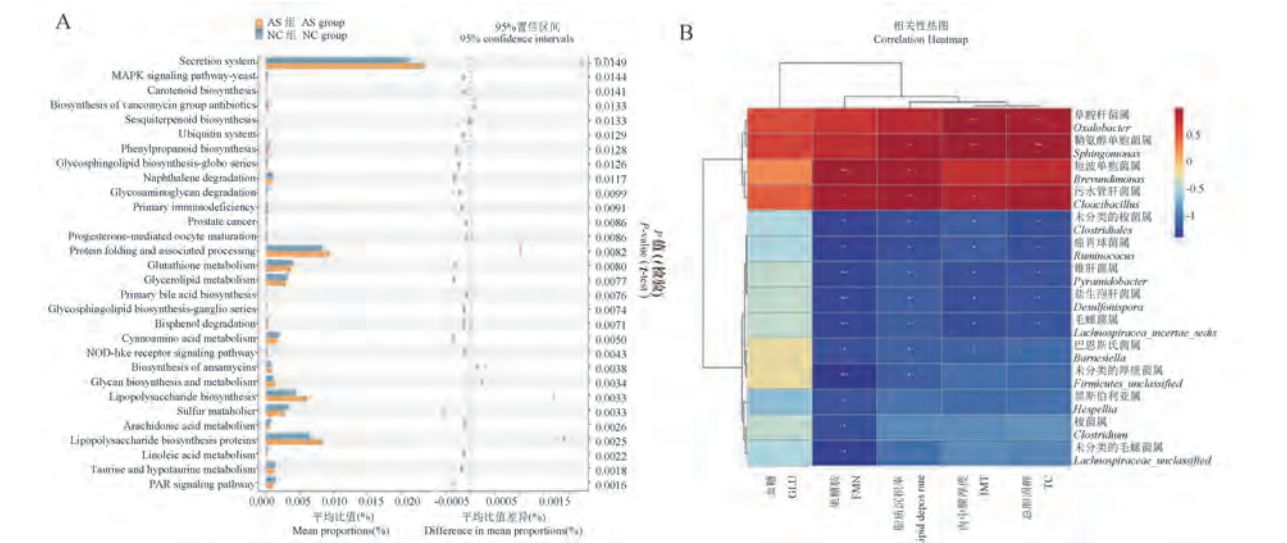
2.6.4 肠道菌群功能预测及与 AS 相关指标的关联分析

PICRUS2 功能分析结果显示,与 NC 组相比,

AS 组肠道菌群的分泌系统、多糖的生物合成和代谢、脂多糖(LPS)的生物合成、脂多糖生物合成蛋白等 15 条途径丰度显著增加($P < 0.05$),而谷胱甘肽

代谢、甘油酯代谢、初级胆汁酸的生物合成、鞘糖脂生物合成-神经节苷脂系列、NOD-样受体信号通路、硫代谢、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、牛磺酸和次生牛磺酸代谢等 37 条途径丰度显著降低 ($P < 0.05$) (见图 8A)。另外,相关分析显示,草酸杆菌属与 IMT、TC 明显正相关,鞘氨醇单胞菌属于 TC、IMT、脂质沉积率明显正相关,短波单胞菌属与脂质

沉积率、果糖胺明显正相关,污水管杆菌属、未分类的梭菌属、瘤胃球菌属、锥杆菌属、盐生孢杆菌属、毛螺菌属与 TC、IMT、脂质沉积、果糖胺明显相关,巴恩斯氏菌属与 IMT、脂质沉积、果糖胺呈负相关;未分类的厚壁菌属与脂质沉积、果糖胺呈负相关,黑斯伯利亚属、梭菌属和未分类的毛螺菌属与果糖胺呈负相关(见图 8B)。



注:A:PICRUSt2 预测分析肠道菌群功能;B:肠道菌群与 AS 相关指标的关联分析。
图 8 肠道菌群功能预测及与 AS 相关指标的关联分析

Note. A. PICRUSt2 predicted and analyzed prediction of intestinal flora function by PICRUSt2. B. Correlation analysis between intestinal flora and AS related indicators.

Figure 8 Functional prediction of intestinal flora and correlation analysis with AS related indicators

3 讨论

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是严重危害人类健康的一类重大疾病。AS 是 CVD 的主要病理基础,过度食用富含高脂、高糖的食物和某些环境因素均会导致严重的代谢变化^[9],但这种 AS 相关性进程的起始事件却不完全清楚。最近研究证实肠道菌群与心脏代谢疾病密切相关^[10],营养的摄入、肠道菌群及宿主之间的相互作用会改变 CVD 的发生率^[11]。五指山小型猪具有在高脂环境下易出现血脂紊乱、肥胖以及易形成 AS 的特点^[7-8]。本研究采用模拟人类的高脂高糖饮食饲喂五指山小型猪 24 周后,能呈现出肥胖和体内脂肪沉积、糖脂代谢紊乱、糖耐量异常等代谢综合征现象,主动脉血管有明显凸起的脂质条纹,中内膜厚度增加以及典型的 AS 病变。由此可见,五指山小型猪 AS 模型的血管病变与人类临床 AS 血管病变较为相似。16S rDNA 高通量测序结果显示,高脂高糖饮食后五

指山小型猪的肠道菌群多样性明显降低,表明肠道菌群失衡。

正常人群的肠道优势菌门为厚壁菌门和拟杆菌门,其次是放线菌门与疣微菌门^[12],这与五指山小型猪的肠道菌群总体特征十分相似。拟杆菌门是人类及小型猪体内的优势菌种,拟杆菌能够降解食物中的大分子碳水化合物,降解成葡萄糖和其他易消化的小分子糖类,从而提高食物的利用率。拟杆菌是体内维持体内肠道微生物稳态的重要菌群^[10],当体内拟杆菌门特殊物种发生变化,它们在营养消化和能量吸收等代谢功能也会发生变化,可能会导致肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化和神经退行性疾病等炎症性疾病^[13]。在肥胖人群中,厚壁菌门与拟杆菌门的比值上升,肥胖人群的心血管患病率也高于正常人群,冠心病患者的拟杆菌门也存在显著下降^[14]。同样,在高脂高糖饮食诱导的 AS 模型猪肠道菌群的拟杆菌门显著降低,厚壁菌门与拟杆菌门的比值显著上升,提示高脂高糖饮食诱导五指

山小型猪出现的肥胖、糖脂代谢紊乱和 AS 的形成,可能与拟杆菌门丰度减少和肠道菌群失调有关。放线菌门虽在肠道微生物中所占比例较小,但放线菌门是维持肠道屏障稳态的主要菌门之一,它还能参与调节肠道通透性、免疫系统、新陈代谢和肠脑轴^[15]。在本研究也发现 AS 模型猪的放线菌门显著下降,提示可能存在肠道通透性增加,肠道屏障稳态被破坏的现象。另外,健康的哺乳动物肠道含有少量变形菌门的细菌,当这些细菌的数量较少时,这些细菌表现为良性,但是当数量增加并改变肠道微生物结构,会成为引发炎症的微生物^[16]。这与本研究中观察到五指山小型猪 AS 模型中变形菌门丰度上升相一致,表明高脂高糖饮食会引起五指山小型猪肠道菌群结构改变,影响肠道通透性和肠屏障功能,促发脂质紊乱和炎症,加速 AS 形成。

肠道菌群失衡可引起肠粘膜通透性的增加,特别是革兰氏阴性菌外膜上的脂多糖(LPS)可进入血液循环,引发慢性炎症与血栓形成,促进 AS 的发生;另外,LPS 也可与 Toll 样受体 4 结合,促进脂蛋白相关受体的表达,摄取脂质并影响胆固醇转运,加剧泡沫细胞生成和 AS 的发生发展。在本研究中,观察到五指山小型猪 AS 模型中鞘氨醇杆菌属、梭状菌属、鞘氨醇单胞菌属、新鞘氨醇菌属等革兰氏阴性菌丰度的增加,能产生低毒的 LPS,且与菌群功能预测到 LPS 的生物合成和 LPS 生物合成蛋白途径丰度增加相一致,推测五指山小型猪 AS 的发生发展可能与肠道菌群失调引发的 LPS 慢性低度炎症有关。

进一步关联分析显示,TC、内中膜厚度、脂质沉积、果糖胺与草酸杆菌属、鞘氨醇单胞菌、污水管杆菌属、梭菌属、瘤胃球菌属等 14 个菌属存在关联。Briand 等^[17]研究发现,在高胆固醇血症金黄地鼠中 *Oxalobacter* 菌属与总胆固醇水平明显相关,这与本研究一致。*Sphingomonas* 的 DNA 被发现存在于 AS 斑块与血清中,该菌可产生脂化蛋白参与体内的免疫反应^[18],本研究相关分析也显示该菌与 TC、IMT 和脂质沉积关联,推测该菌可能参与血管中斑块的生成与发展。短波单胞菌属普遍存在于土壤和水中,被认为无处不在,有报告发现该菌在心内膜炎的患者血液中存在^[19],推测该菌能够激发机体免疫反应,参与促炎反应,从而促进脂质沉积和斑块的发展。瘤胃球菌属被认为与肥胖等代谢性疾病相关,在肥胖患者中与体重和血脂呈明显正相关^[20],

且该菌属与机体肥胖、胃肠道炎症、血脂异常、胆汁酸代谢以及 AS 斑块发生均相关,同时瘤胃球菌属能够通过降解纤维素产生短链脂肪酸,调节机体免疫反应和血脂代谢^[21-22],影响 AS 斑块发生,同时该菌属能够产生炎性多糖,诱导 Toll 样受体 4 产生肿瘤坏死因子- α (TNF- α),而 TNF- α 在 AS 过程中发挥促炎作用^[23]。相关性分析结果发现,瘤胃球菌属与 TC、IMT、脂质沉积和果糖胺明显相关,提示瘤胃球菌属在五指山小型猪 AS 模型中可能通过产生短链脂肪酸和炎性多糖参与体内糖脂代谢和 AS 斑块形成。最近,毛螺菌属等菌群被发现冠状动脉粥样硬化患者中丰度降低,且这些患者的脂多糖生物合成蛋白、脂多糖生物合成、蛋白质折叠等途径显著上升^[24],同时该菌还被发现与血糖水平相关联,并能够通过产生短链脂肪酸进而调节机体的免疫炎症反应^[25]。同样,在五指山小型猪 AS 模型中毛螺菌属丰度下降,提示该菌可能参与 AS 进程中的炎症反应。可见,通过这些菌属与 AS 相关指标的关联分析,为进一步寻找 AS 发生的关键靶向菌群提供了新的方向,同时也表明了五指山小型猪 AS 的发生与肠道菌群失调有关。

综上所述,高脂高糖饮食诱导的五指山小型猪 AS 模型具有肥胖、糖脂代谢紊乱和明显的 AS 病变的特点,其发生可能与肠道菌群失调有关。

参 考 文 献 (References)

- [1] Joseph P, Leong D, McKee M, et al. Reducing the global Burden of cardiovascular disease, part 1: the epidemiology and risk factors [J]. *Circ Res*, 2017, 121(6): 677-694.
- [2] 《中国心血管健康与疾病报告 2020》编写组. 《中国心血管健康与疾病报告 2020》要点解读 [J]. *中国心血管杂志*, 2021, 26: 209-218.
The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Interpretation of the main points of China Cardiovascular Health and Disease report 2020 [J]. *Chin J Cardiovase Med*, 2021, 26(3): 209-218.
- [3] Liu S, Li Y, Zeng X, et al. Burden of cardiovascular diseases in China, 1990-2016: Findings from the 2016 global burden of disease study [J]. *JAMA Cardiol*, 2019, 4(4): 342-352.
- [4] Ambrose JA, Srikanth S. Vulnerable plaques and patients: improving prediction of future coronary events [J]. *Am J Med*, 2010, 123(1): 10-16.
- [5] Leigh SJ, Morris MJ. Diet, inflammation and the gut microbiome: mechanisms for obesity-associated cognitive impairment [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(6): 165767.
- [6] Zhu YH, Xian XM, Wang ZZ, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation [J].

- Biomolecules, 2018, 8(3): 80.
- [7] 陈民利. 西藏小型猪和五指山小型猪的生理特点及其动脉粥样硬化的发病特征比较研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(5): 325–328.
- Chen ML. Comparative study on physiological characteristics and atherosclerotic characteristics of Tibetan miniature pig and Wuzhishan minipig [J]. Exp Anim Comp Med, 2018, 38(5): 325–328.
- [8] 郁晨, 刘志华, 潘永明, 等. 高脂环境下五指山小型猪和西藏小型猪冠心病相关血脂和炎症易感基因的表达 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 1–10.
- Yu C, Liu ZH, Pan YM, et al. Expression of coronary heart disease-related blood lipids and inflammatory susceptibility genes in Wuzhishan minipigs and Tibetan minipigs under high fat environment [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 1–10.
- [9] Zabek A, Paslawski R, Paslawska U, et al. The influence of different diets on metabolism and atherosclerosis processes-A porcine model: Blood serum, urine and tissues 1H NMR metabolomics targeted analysis [J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0184798.
- [10] Lyu M, Wang YF, Fan GW, et al. Balancing herbal medicine and functional food for prevention and treatment of cardiometabolic diseases through modulating gut microbiota [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2146.
- [11] Brown JM, Hazen SL. Microbial modulation of cardiovascular disease [J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(3): 171–181.
- [12] Li DY, Tang WHW. Gut microbiota and atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2017, 19(10): 39.
- [13] Gibiino G, Lopetuso LR, Scaldaferri F, et al. Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals [J]. Dig Liver Dis, 2018, 50(7): 635–639.
- [14] Liu H, Chen X, Hu X, et al. Alterations in the gut microbiome and metabolism with coronary artery disease severity [J]. Microbiome, 2019, 7(1): 68.
- [15] Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, et al. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis [J]. Dig Liver Dis, 2018, 50(5): 421–428.
- [16] Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, et al. Proteobacteria: a common factor in human diseases [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 9351507.
- [17] Briand F, Sulpice T, Giammarinaro P, et al. Saccharomyces boulardii CNCM I-745 changes lipidemic profile and gut microbiota in a hamster hypercholesterolemic model [J]. Benef Microbes, 2019, 10(5): 555–567.
- [18] Tanaka A, Leung PS, Gershwin ME. Environmental basis of primary biliary cholangitis [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2018, 243(2): 184–189.
- [19] Estrela AB, Abraham WR. Brevundimonas vancouveriensis sp. nov., isolated from blood of a patient with endocarditis [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60(9): 2129–2134.
- [20] Zeng Q, Li DF, He Y, et al. Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 13424.
- [21] Kurilshikov A, van den Munckhof ICL, Chen L, et al. Gut microbial associations to plasma metabolites linked to cardiovascular phenotypes and risk [J]. Circ Res, 2019, 124(12): 1808–1820.
- [22] Moon YH, Iakiviak M, Bauer S, et al. Biochemical analyses of multiple endoxylanases from the rumen bacterium Ruminococcus albus 8 and their synergistic activities with accessory hemicellulose-degrading enzymes [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(15): 5157–5169.
- [23] Toya T, Corban MT, Marrietta E, et al. Coronary artery disease is associated with an altered gut microbiome composition [J]. PLoS One, 2020, 15(1): e0227147.
- [24] Han Y, Gong Z, Sun G, et al. Dysbiosis of gut microbiota in patients with acute myocardial infarction [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 680101.
- [25] Enqi W, Huanhu Z, Ritu W, et al. Age-stratified comparative analysis of the differences of gut microbiota associated with blood glucose level [J]. BMC Microbiol, 2019, 19(1): 111.

[收稿日期] 2021-09-25

何竹青,王利,王滢迪,等. 复方地黄颗粒对帕金森病阴虚动风证小鼠血清环核苷酸的调节及多巴胺能神经元的修复作用[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 309-315.

He ZQ, Wang L, Wang YD, et al. Regulation of serum cyclic nucleotides and repair of dopaminergic neurons in mice with Yin deficiency and moving wind syndrome of Parkinson's disease by compound Dihuang Granule [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 309-315.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.002

复方地黄颗粒对帕金森病阴虚动风证小鼠血清
环核苷酸的调节及多巴胺能神经元的修复作用

何竹青,王利,王滢迪,郇鹏飞,杨玉芳*,何建成*

(上海中医药大学,上海 201203)

【摘要】 目的 探讨复方地黄颗粒对帕金森病(Parkinson's disease, PD)阴虚动风证小鼠血清环核苷酸(cAMP, cGMP)的调节及多巴胺神经元的修复作用。**方法** 将 24 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为正常组(Normal)、模型组(MPTP+NS)、治疗组(MPTP+CDG), 每组 8 只。正常组小鼠注射生理盐水, 模型组腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)构建 PD 动物模型, 两组均每日 1 次, 连续注射 5 d。治疗组造模后给予复方地黄颗粒(Compound Dihuang Granule, CDG)灌胃治疗, 每日 1 次, 连续给药 7 d。本研究从 PD 小鼠病因、症状、客观指标检测、以方测证等方面验证该模型的中医证候属性, 并探讨 CDG 对 PD 阴虚动风证小鼠血清中环核苷酸及酪氨酸羟化酶表达影响。**结果** 模型组小鼠行为学、舌色度值比率、血清环核苷酸含量、酪氨酸羟化酶含量与正常组差异显著($P < 0.05$)。给予 CDG 治疗后能显著改善小鼠的行为学及相关客观指标($P < 0.05$)。**结论** 给予 MPTP 腹腔注射制备的帕金森病阴虚动风证小鼠模型稳定、可靠, CDG 能调节血清中环核苷酸含量, 有效修复损伤的多巴胺能神经元。

【关键词】 阴虚动风证; 帕金森病; 病证结合; 复方地黄颗粒; 模型制备

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0309-07

Regulation of serum cyclic nucleotides and repair of dopaminergic neurons in
mice with Yin deficiency and moving wind syndrome of Parkinson's disease by
compound Dihuang Granule

HE Zhuqing, WANG Li, WANG Yingdi, HUAN Pengfei, YANG Yufang*, HE Jiancheng*

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: YANG Yufang. E-mail: yyfapple@icloud.com; HE Jiancheng. E-mail: hejc8163@163.com

【Abstract】 Objective To investigate regulation of serum cyclic nucleotides (cAMP and cGMP) and the repair of dopamine neurons in mice with Yin deficiency and moving wind syndrome of Parkinson's disease (PD) by Compound Dihuang Granule. **Methods** Overall, 24 male C57BL/6 mice were randomly divided into normal (Normal), model (MPTP + NS), and treatment (MPTP + CDG) groups with eight mice in each group. The normal group was injected with

【基金项目】国家自然科学基金(81573899), 国家自然科学基金青年项目(82104640), 上海市生物医药科技支撑专项项目(20S21901700), 上海市健康辨识与评估重点实验室项目(21DZ2271000), 上海市青年科技英才扬帆计划(19YF1448500).

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81573899), Youth Project of National Natural Science Foundation of China (82104640), Shanghai Biomedical Science Technology Support Project (20S21901700), Shanghai Key Laboratory of Health Identification and Assessment (21DZ2271000), Shanghai Sailing Program (19YF1448500).

【作者简介】何竹青(1993—), 女, 博士, 研究方向: 中医证候、心脑血管方面研究。Email: Zhuqing_He@outlook.com

【通信作者】杨玉芳(1991—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中医药防治神经退行性疾病的机制。Email: yyfapple@icloud.com;

何建成(1966—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中医诊断、心脑血管方面研究。Email: hejc8163@163.com。

* 共同通信作者

normal saline and the model group was intraperitoneally injected with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to establish the PD animal model. Both groups were injected once a day for 5 consecutive days. The treatment group was administered Compound Dihuang Granule (CDG) by gavage once a day for 7 days. The TCM syndrome attribute of the model was verified by etiology, symptoms, the objective index, and formula test in PD mice and the effect of CDG on expression of cyclic nucleotides and tyrosine hydroxylase in the serum of PD mice with Yin deficiency and moving wind syndrome was assessed. **Results** Significant differences in behavior, the tongue chroma value ratio, serum cyclic nucleotide content, and tyrosine hydroxylase content were found between model and normal control groups ($P < 0.05$). CDG treatment significantly improved the behavior and related objective indexes of mice ($P < 0.05$). **Conclusions** The mouse model of Yin deficiency and moving wind syndrome of Parkinson's disease prepared by intraperitoneal injection of MPTP is stable and reliable. CDG regulates the content of cyclic nucleotides in serum and effectively repairs damaged dopaminergic neurons.

【Keywords】 Yin deficiency moving wind syndrome; Parkinson's disease; combination of disease and syndrome; Compound Dihuang Granules; model preparation

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

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是第二大神经退行性疾病,属于中医“颤证”的范畴^[1-2]。根据本课题组前期研究发现,阴虚动风证是临床最常见的证型^[3-4]。PD 根本病机为脏腑失调,以肝肾阴虚为主,“瘀”“痰”“毒”互结为要,为虚实夹杂之疾。复方地黄颗粒便是基于以上理论研制并经临床反复验证,是治疗阴虚动风证帕金森病取得良好效果的中药复方。动物实验发现本方通过多途径、多靶点、多环节发挥作用,其机制具体体现在抗氧化应激^[5],抗细胞凋亡^[6],提高自噬水平^[7]等方面。本研究将从对血清环核苷酸的调节及损伤的多巴胺能神经元修复作用两方面,进一步探讨 CDG 发挥作用的机制。

动物模型的选择对探索 PD 的发病机制及治疗至关重要。病证结合动物模型,具有中医学特色,能够体现“病”与“证”的双重特性,对探索疾病的发展规律,探究方药作用具有重要的价值。课题组运用 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)腹腔注射制备 PD 阴虚动风证小鼠模型,本研究通过小鼠病因、症状、客观指标变化、以方测证方面进一步对模型进行评价,在此基础上探讨 CDG 的作用机制,为其临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 SPF 级 C57BL/6 雄性健康小鼠,7 ~ 8 周龄,体重 20 ~ 22 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK(沪)2017-0005】,实验动物饲养及观察

于上海中医药大学实验动物中心进行【SYXK(沪)2020-0009】。小鼠适应性喂养 1 周,自由进食、饮水。饲养环境:室温(23 ± 2)℃,相对湿度(55 ± 10)%,光照、黑夜 12 h 循环。本实验动物饲养及操作皆符合上海中医药大学实验动物伦理委员会的相关审批(PZSHUTCM200717037)。

1.1.2 主要试剂与仪器

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(Sigma, M0896-100MG);cAMP、cGMP 试剂盒(上海威奥生物科技有限公司,EM3362S/EM3363S);TH(Sigma, sc-25269 AC);Beta Actin(Proteintech, 20536-1-AP)。

病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号 RM2016);体视显微镜(中国麦克奥迪公司,型号 MoticSMZ-171);多功能酶标仪(美国 BioTek, Synergy 2);近红外双色荧光成像系统(美国 LI-COR 公司,OdysseyCLx)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模方法

24 只 C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周后,采用随机数字表将 24 只小鼠,随机分成正常组(Normal)、模型组(MPTP+NS)、治疗组(MPTP+CDG)。16 只小鼠采用 MPTP 腹腔注射法制备阴虚动风证 PD 模型,MPTP 溶于无菌生理盐水中,按 30 mg/kg 剂量腹腔注射,每日 1 次,连续 5 d;设正常组 8 只,腹腔注射相同体积的生理盐水。

造模成功标准:在帕金森病造模成功的基础上兼有阴虚症状^[8-10]:(1)病理上出现多巴胺神经元的丢失;(2)小鼠出现运动迟缓、震颤、僵直等神经行为学症状;(3)小鼠出现毛发干枯,舌象红,小便量少色黄,大便干燥等症状。

1.2.2 复方地黄颗粒制备及给药

复方地黄颗粒 (Compound Dihuang Granule, CDG), 由熟地黄, 白芍, 钩藤, 珍珠母, 丹参, 石菖蒲, 全蝎组成, 由国家中药工程技术研究中心制备。

小鼠每日用量: 参考《定量药理学》(孙瑞元.《定量药理学》北京: 人民卫生出版社, 1987: 247) 计算。小鼠每日用量 = 标准体重成人每日用量 $\times$ 1/388。

治疗组小鼠造模后按 10 g/kg 剂量给予复方地黄颗粒灌胃, 其它小鼠给予同等剂量的生理盐水灌胃, 每日 1 次, 给药 1 周。

1.2.3 行为学检测

旷场实验(open field test): 旷场实验在 30 cm $\times$ 30 cm 的旷场中进行。实验前小鼠先适应环境 1 h, 开始时将小鼠放于旷场中心, 摄像头记录小鼠运动情况 5 min。实验后得到实时录像, 分析其距离中心点的运动距离及中心区域的停留时间。

爬杆实验(pole test): 将小鼠头朝上置于杆上, 训练小鼠学会掉头以及爬完全杆路程, 每只小鼠训练 3 次, 每次间隔 1 h。记录各组小鼠治疗后掉头时间以及爬完全程所用时间, 每只小鼠测试 3 次, 取平均值为最终结果。

各组小鼠造模前连续 3 d 进行行为学训练, 治疗结束后对其进行行为学检测。

1.2.4 微舌象采集

运用 MoticSMZ-171 体视显微镜, Motic Images Plus 3.0($\times 64$) 软件, 治疗结束后, 在同一光源下进行小鼠舌苔的拍摄。将所拍摄照片输入电脑, 采用 Adobe Photoshop. 2020. 图像软件。图像舌面从舌尖到舌根均等分为 5 等份, 取中间 1/5 的面积作为舌象的量化分析域^[11], 读取 R1、G1、B1^[12] (分别代表红、蓝、绿三种基本颜色) 数值, 分别进行红色度 R 的计算: $R = R1 / (R1 + G1 + B1)$ 、绿色度 G 计算: $G = G1 / (R1 + G1 + B1)$ 和蓝色度 B 的计算: $B = B1 / (R1 + G1 + B1)$ 。

1.2.5 环核苷酸含量检测

各组小鼠取血, 静置 2 h 后, -4°C 状态下离心 (3000 rpm, 10 min), 取上清液 -80°C 冰箱保存待测。ELISA 法检测各组小鼠中环核苷酸, 环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 含量, 并计算 cAMP/cGMP 值。

1.2.6 多巴胺能神经元损伤评估

小鼠纹状体装离心管放液氮中, -80°C 冰箱保存, Western Blot 法检测小鼠纹状体中酪氨酸化酶 (TH) 蛋白表达水平。灌流后取小鼠全脑, 放入 4% 多聚甲醛固定, 分别经 20% 蔗糖、30% 蔗糖脱水后冰冻切片切片机切片, 取小鼠黑质层面进行免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 法检测阳性 TH⁺ 多巴胺能神经元细胞。

1.3 统计学分析

运用 GraphPad Prism 8 软件统计, 实验数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组数据采用单因素方差分析 (One-way analysis of variance, One-way ANOVA), 或双因素方差分析 (Two-way analysis of variance, Two-way ANOVA), $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠行为学检测

小鼠的运动轨迹显示, 与正常组相比, 模型组小鼠运动距离减少, 中心区域停留时间增加, 经治疗后, 运动、探索能力得到改善, 差异具有显著性 ($P < 0.001$)。模型组小鼠的反应力较正常组减弱, 运动迟缓, 具体表现在转头时间、爬杆时间明显增加, 经过治疗后运动能力改善 ($P < 0.001$) (见图 1)。

2.2 小鼠微舌象及舌色度值分析

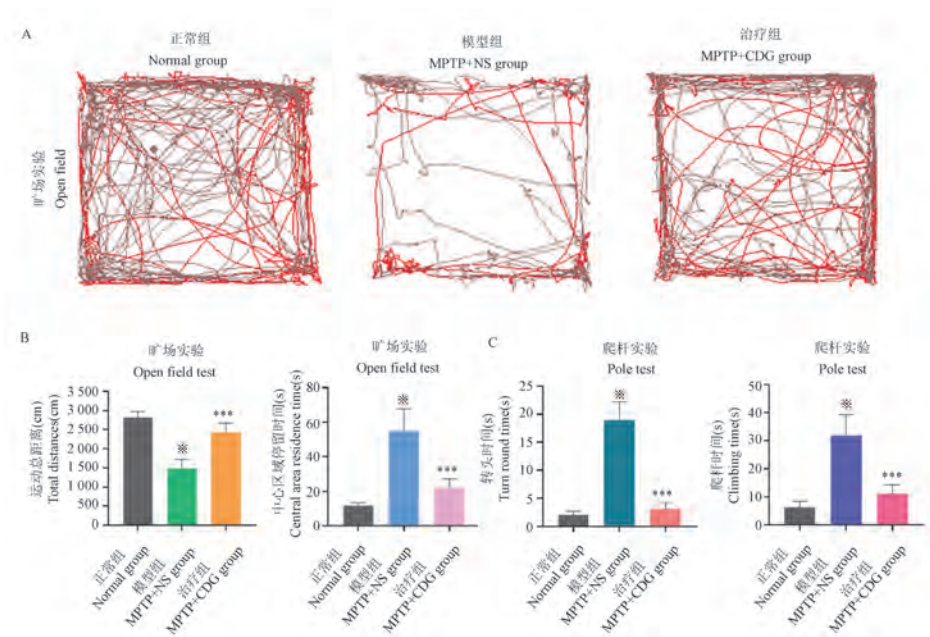
经舌色度值分析发现, 与正常组小鼠相比, 模型组小鼠舌色红色度值比例明显升高, 绿色度值比值 G、蓝色度比值 B 明显低于正常组小鼠 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 治疗组小鼠舌色红色度值比例明显降低, 绿色度值比值 G、蓝色度比值 B 升高 ($P < 0.01$) (见图 2)。

2.3 环核苷酸 (cAMP、cGMP) 表达

与正常组相比, 模型组小鼠血清中 cAMP 明显升高 ($P < 0.001$), 而 cGMP 显著下降 ($P < 0.001$), 且模型组 cAMP/cGMP 比值明显高于正常组 ($P < 0.001$)。经过治疗后, cAMP 下降, cGMP 升高, 其比值较模型组明显降低 ($P < 0.05$) (见图 3)。

2.4 多巴胺能神经元损伤评估

IHC 显示, 与正常组相比, 模型组小鼠黑质致密部 TH⁺ 阳性多巴胺神经元细胞数量减少 ($P < 0.001$), 经治疗后, 其含量显著增加 ($P < 0.01$, $n = 3$)。模型组小鼠纹状体内 TH 蛋白表达明显低于正常组, 治疗后含量增加 ($P < 0.01$, $n = 3$) (见图 4)。

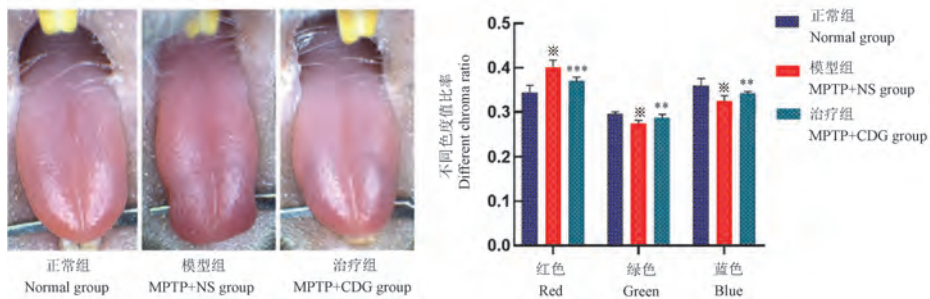


注:A: 小鼠运动轨迹;B: 旷场实验;C: 爬杆实验;与正常组相比,*** $P < 0.001$;与模型组相比,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

图1 各组小鼠行为学检测

Note. A. Trajectory map of mice. B. Open field test. C. Pole test. Compared with the normal group, *** $P < 0.001$. Compared with the model group, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 Behavioral test of mice in each group

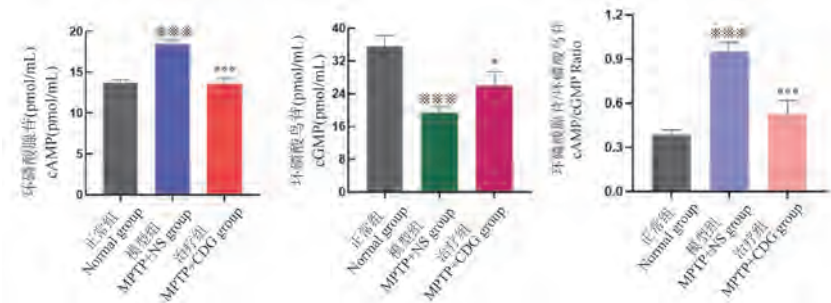


注:与模型组相比,** $P < 0.01$ 。(下图同)

图2 小鼠微舌象及舌色度值分析结果

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

Figure 2 Analysis of microscopic tongue image and chromaticity value of tongue color in mice

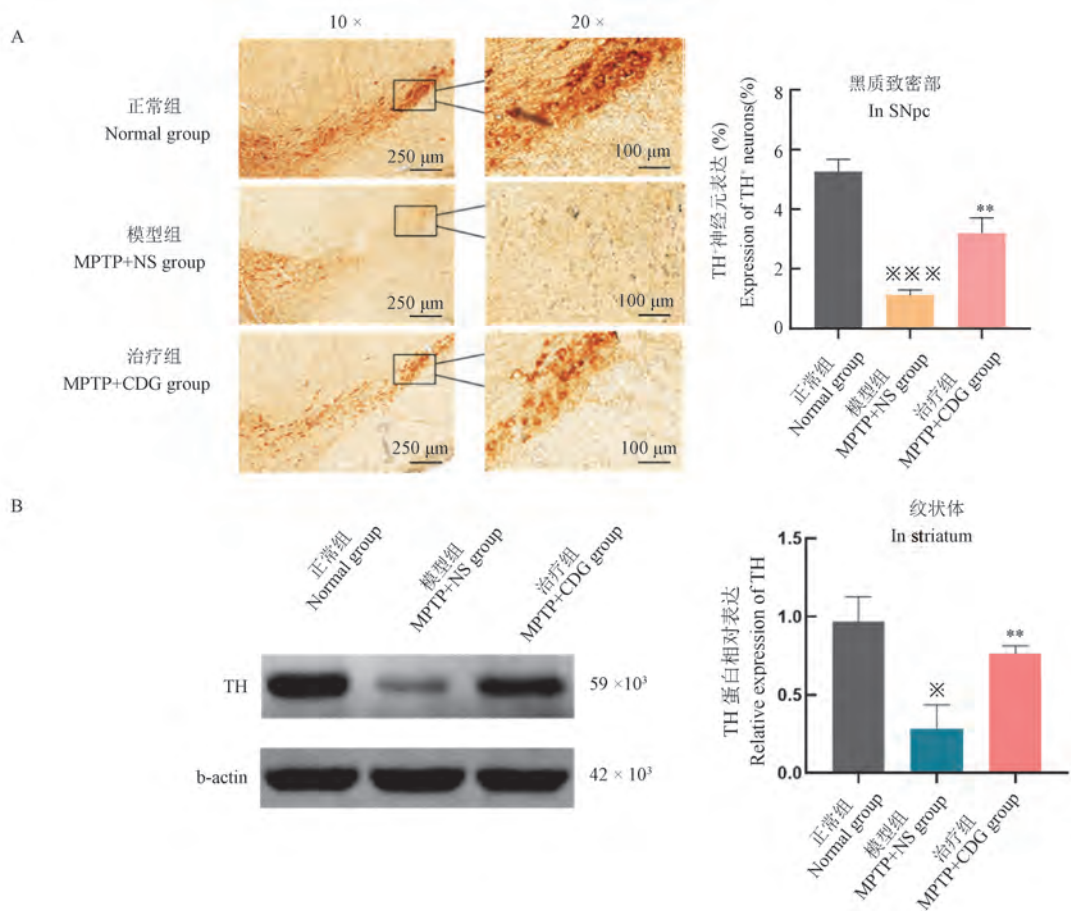


注:与模型组相比,* $P < 0.05$ 。(下图同)

图3 环核苷酸表达及比值

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

Figure 3 cAMP, cGMP expression and ratio



注:A: 酪氨酸羟化酶在黑质致密部表达;B: 酪氨酸羟化酶在纹状体内表达;与正常组相比, **P* < 0.05。

图 4 酪氨酸羟化酶表达

Note. A. Expression of TH in SNpc. B. Expression of TH in striatum. Compared with the normal group, **P* < 0.05.

Figure 4 Expression of TH

3 讨论

PD 是第二大神经退行性疾病,病因多样,发病机制复杂^[13],中医将其归属于“颤证”范畴。西药短期内对改善 PD 症状有效,但长期使用副作用较多,不能缓解患者病情,严重影响了其临床运用的顺从性。中医治疗 PD 强调辨证论治,早期中医药的干预可扼发病之势^[14],中晚期协同西药增效减毒,避免、缓解并发症^[15-16]。何建成教授认为,“虚”“瘀”“痰”“毒”贯穿 PD 发病总过程,肝肾阴虚,脏腑功能失调为本,肝风、痰浊、瘀热、毒聚络损为实^[17]。何建成教授研制的复方地黄颗粒(CDG)具有补肾养肝,息风止颤,化痰活血,通络解毒之功。临床运用 CDG 能改善 PD 患者症状,联合西药美多芭“增效减毒”,对 PD 患者有一定的神经保护作用^[18]。

病证结合动物模型是现阶段中医药基础研究

的重要载体^[19]。神经毒素 MPTP 制备 PD 小鼠动物模型是目前研究者常用的建模方法^[20]。MPTP 能通过血脑屏障,生成代谢产物 MPP⁺,抑制线粒体呼吸链复合体 I 的活性,导致氧化应激和 ATP 生成的减少,造成多巴胺能神经元死亡^[21]。课题组前期运用 MPTP 腹腔注射制备 PD 阴虚动风证小鼠模型^[10]。本实验进一步从小鼠的病因、行为学、舌象等对该模型进行验证,在此基础上探讨 CDG 治疗 PD 阴虚动风证小鼠的作用机理。结果显示:造模后小鼠病理显示多巴胺能神经元丢失,同时具备 PD 阴虚证的典型症状。如造模后小鼠 TH 表达减少,出现颤动、运动迟缓、抓握能力较差、便秘、毛色干枯、舌红、小便量少、大便干燥等症状。给予 CDG 治疗后,小鼠舌红色度值明显降低(*P* < 0.01),运动综合能力得到显著改善(*P* < 0.001),TH 表达增加(*P* < 0.01)。这说明 CDG 在一定程度上能改善小鼠阴虚症状,减轻小鼠多巴胺神经元的损伤。

环核苷酸(cAMP、cGMP)可调节细胞功能,与机体神经内分泌系统的功能密切相关^[22]。本研究对小鼠血清中环核苷酸测定,发现模型组小鼠血清中cAMP明显升高,cGMP显著下降。已有的研究表明,cAMP、cGMP两者作用常具有拮抗性,类似于中医阴阳相互制约的关系,多数的研究将其作为判断中医阴虚、阳虚证候的关键指标之一^[23-24]。本研究中cAMP/cGMP比值明显高于正常组($P < 0.001$),提示本模型具有阴虚特性。给予CDG干预之后,血清cAMP明显下降,cGMP升高,两者比值降低($P < 0.001$)。提示CDG可能通过调节血清环核苷酸(cAMP、cGMP)含量改善小鼠阴虚的症状。

PD发生的根本原因在于黑质中多巴胺能神经元的变性缺失^[25]。TH为多巴胺合成的限速酶,MPTP在体内形成的代谢产物能抑制TH的活性降低多巴胺含量^[26],因此,TH含量在一定程度上反映了多巴胺神经元的数量^[27]。本研究分别用IHC、Western Blot法检测小鼠黑质、纹状体中TH含量,结果显示,模型组小鼠黑质中阳性TH⁺多巴胺能神经元细胞数量减少,纹状体内TH蛋白水平表达降低($P < 0.01$),治疗后,两者表达皆明显增加($P < 0.01$),这表明CDG能修复PD阴虚动风证小鼠损伤的多巴胺能神经元。

综上,本研究进一步从PD小鼠病因、症状、客观指标检测、以方测证等方面验证该模型的中医证候属性,本模型可靠、稳定。复方地黄颗粒,方以补肾养肝为主,祛痰、化瘀、解毒为辅,其治疗切中帕金森病的根本病机。本研究证实复方地黄颗粒治疗PD阴虚动风证小鼠疗效显著,能调节血清中环核苷酸含量,有效修复损伤的多巴胺能神经元。

参 考 文 献(References)

- [1] Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease [J]. J Neural Transm (Vienna), 2017, 124(8): 901-905.
- [2] 王永炎. 中医老年颤证诊断和疗效评定标准(试行) [J]. 山东中医学院学报, 1992, 16(6): 55.
- Wang YY. Criteria for diagnosis and efficacy evaluation of senile fibrillation syndrome in traditional Chinese medicine (Trial) [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 1992, 16(6): 55.
- [3] 盛慧敏, 何建成, 王文武, 等. 帕金森病中医证候的现代文献研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 967-969.
- Sheng HM, He JC, Wang WW, et al. The literature research of syndromes of TCM about Parkinson's disease [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2011, 22(4): 967-969.
- [4] 王文武, 何建成, 冉秋, 等. 帕金森病常见中医证候、症状和证候要素的文献研究 [A]. 第二次全国中西医结合诊断学术研讨会论文集 [C]. 丽江: 中国中西医结合学会; 2008.
- Wang WW, He JC, Ran Q, et al. Literature study on common TCM syndromes, symptoms and syndrome elements of Parkinson's disease [A]. Proceedings of the second national symposium on integrated traditional Chinese and western medicine diagnosis [C]. Lijiang: China Society of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine; 2008.
- [5] 滕龙, 洪芳, 何建成. 阴虚动风证帕金森病异动症模型大鼠的氧化应激反应及复方地黄方的干预作用 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 25-29.
- Teng L, Hong F, He JC. Oxidative stress in the rat models of Parkinson's disease dyskinesia with Yin deficiency stirring wind pattern, and the interventional effect of compound formula Rehmannia on the disease condition [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(1): 25-29.
- [6] 王振华, 何建成, 张春燕. 复方地黄方对帕金森病大鼠细胞凋亡的影响 [J]. 新中医, 2010, 42(4): 86-88.
- Wang ZH, He JC, Zhang CY. Effect of compound dihuang formula on apoptosis in rats with Parkinson's disease [J]. J New Chin Med, 2010, 42(4): 86-88.
- [7] 何建成. 自噬与帕金森病及中药干预研究 [J]. 医学研究杂志, 2017, 46(6): 1-4.
- He JC. Autophagy and Parkinson's disease and intervention of traditional Chinese medicine [J]. J Med Res, 2017, 46(6): 1-4.
- [8] 田德禄. 中医内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2003.
- Tian DL. Internal medicine of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing; 2003.
- [9] 刘军. 中国帕金森病的诊断标准(2016版) [J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(4): 268-271.
- Liu J. Diagnostic criteria of Parkinson's disease in China (2016 Edition) [J]. Chin J Neurol, 2016, 49(4): 268-271.
- [10] 梁建庆, 何建成. 病证结合帕金森病小鼠模型的构建 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(20): 4961-4963.
- Liang JQ, He JC. Establishment of a mice model of Parkinson's disease with combination of disease and syndrome for preliminary study [J]. Chin J Gerontol, 2017, 37(20): 4961-4963.
- [11] 潘志强, 卢文丽, 方肇勤. 小鼠舌象的显微拍摄 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(3): 189-191.
- Pan ZQ, Lu WL, Fang ZQ. Shoting picture of the tongue about mice in microscope [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2007, 13(3): 189-191.
- [12] 冉秋, 何建成. 帕金森病大鼠显微舌象研究 [J]. 中医药信息, 2009, 26(6): 13-14.
- Ran Q, He JC. Study on the tongue shoting picture of PD rat in microscope [J]. Inf Tradit Chin Med, 2009, 26(6): 13-14.
- [13] J Deuschl G, Beghi E, Fazekas F, et al. The burden of neurological diseases in europe; an analysis for the global burden of disease Study 2017 [J]. Lancet Public Health, 2020, 5(10): e551-e567.
- [14] 曾毅, 刘玲, 吴东南, 等. 中医“治未病”理论在帕金森病防治中的应用 [J]. 湖北中医杂志, 2021, 43(3): 53-56.

- Zeng Y, Liu L, Wu DN, et al. Application of “preventive treatment” theory of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of Parkinson’s disease [J]. Hubei J Tradit Chin Med, 2021, 43(3): 53–56.
- [15] Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: a review [J]. JAMA, 2020, 323(6): 548–560.
- [16] 岑川, 何建成. 中医药防治帕金森病药物左旋多巴副作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(12): 2530–2532.
- Cen C, He JC. The side effects of LD and the progress of the prevention and treatment of TCM For Parkinson’s Disease [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2009, 27(12): 2530–2532.
- [17] 何建成. 帕金森病中医药治疗的再思考-兼谈“滋肾平肝, 化痰活血, 解毒散结”是帕金森病的基本治疗法则 [J]. 中医药通报, 2005, 4(1): 12–14.
- He JC. Rethinking on the treatment of Parkinson’s disease with TCM-also on “nourishing the kidney and calming the liver, resolving phlegm and activating blood circulation, detoxifying and dispersing knots” is the basic treatment principle of Parkinson’s disease [J]. Tradit Chin Med J, 2005, 4(1): 12–14.
- [18] 徐鹏恒, 何建成, 王利, 等. 复方地黄汤联合美多巴治疗帕金森病的临床疗效观察 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(2): 838–840.
- Xu PH, He JC, Wang L, et al. Clinical efficacy observation on compound dihuang decoction combined with levodopa in the treatment of Parkinson’s disease [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(2): 838–840.
- [19] 钟森杰, 李静, 李琳, 等. 病证结合动物模型研究思路述评 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(8): 141–144.
- Zhong SJ, Li J, Li L, et al. A review of research ideas in combination of disease and syndrome animal models [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2021, 28(8): 141–144.
- [20] Kin K, Yasuhara T, Kameda M, et al. Animal models for Parkinson’s disease research: Trends in the 2000 s [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5402.
- [21] Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical perspective: models of Parkinson’s disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2464.
- [22] 张译心, 王鑫, 刘博, 等. 2 型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 219–229.
- Zhang YX, Wang X, Liu B, et al. Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi-Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 219–229.
- [23] 冉秋, 何建成. 一体化病证结合帕金森病大鼠模型中医证候属性研究 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(6): 465–471.
- Ran Q, He JC. Study on the traditional Chinese medicine syndrome properties of the rat models of Parkinson’s disease and “ combining syndrome and disease ” induced by 6-hydroxydopamine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2011, 19(6): 465–471.
- [24] 张翠珍, 王天芳. cAMP、cGMP 拮抗性代谢调节与中医证候关系研究进展 [J]. 北京中医药大学学报, 1999, 22(6): 51–53.
- Zhang CZ, Wang TF. Research progress on the relationship between camp, cGMP antagonistic metabolic regulation and TCM syndromes [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 1999, 22(6): 51–53.
- [25] Jankovic J, Tan EK. Parkinson’s disease: etiopathogenesis and treatment [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2020, 91(8): 795–808.
- [26] 胡雅岑, 徐倩, 郭纪峰, 等. MPTP 诱导的帕金森病小鼠模型黑质脑组织 DNA 甲基化研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42(3): 277–285.
- Hu YC, Xu Q, Guo JF, et al. Abnormal DNA methylation in substantia nigra region of MPTP-induced mice model of Parkinson’s disease [J]. Progress Biochem Biophy, 2015, 42(3): 277–285.
- [27] 林臻, 陈洪志, 赵航, 等. MPTP 诱导 C57BL/6 小鼠帕金森模型的制备和评估 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 57–62, 85.
- Lin Z, Chen HZ, Zhao H, et al. Preparation and assessment of a C57BL/6 mouse Parkinson’s model induced by MPTP [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 57–62, 85.

[收稿日期] 2021-10-14

许林,魏颖,徐书静,等. 中华眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 316-325.

Xu L, Wei Y, Xu SJ, et al. Effect of *Naja atra* venom on blood coagulation in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 316-325.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.003

中华眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响

许林^{1,2}, 魏颖^{1,2}, 徐书静¹, 张启云², 郭静^{2,3}, 周舒婷², 孙黔云^{1,2*}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014;
3. 山西大学中医药现代研究中心, 太原 030006)

【摘要】 目的 研究中华眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响。**方法** 体外实验采用中华眼镜蛇毒及其分离峰与大鼠全血孵育,测定血栓弹力图;体内采用尾静脉或肌肉注射眼镜蛇毒,取不同时间点全血测定血栓弹力图;取体内外实验分离的血浆测定LDH活力、血红蛋白、vWF、P-selectin含量并采用酶切发色底物法测定凝血相关酶活性。**结果** 体内外实验结果表明,眼镜蛇毒及其部分分离峰可明显引起大鼠凝血功能的异常,表现为凝血因子减少、纤维蛋白原水平低下、血小板功能减弱;同时大鼠血浆血红蛋白含量及LDH活力显著升高。体外实验中眼镜蛇毒及其部分分离峰可显著下调酶切凝血酶及纤溶酶底物活性。体内实验中肌肉注射后血浆中P-selectin含量0.5 h时显著升高,酶切凝血因子Xa底物活性6 h内显著上调;尾静脉注射后血浆酶切凝血酶底物活性2 h内显著上调,6 h内vWF含量明显升高。**结论** 中华眼镜蛇毒能明显引起大鼠凝血功能的异常,其作用主要与激活凝血系统导致凝血因子消耗、纤维蛋白原减少以及血小板消耗等有关。

【关键词】 中华眼镜蛇毒;凝血功能;蛇伤;血栓弹力图

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0316-10

Effect of *Naja atra* venom on blood coagulation in rats

XU Lin^{1,2}, WEI Ying^{1,2}, XU Shujing¹, ZHANG Qiyun², GUO Jing^{2,3}, ZHOU Shuting², SUN Qianyun^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China. 2. the Key Laboratory of Chemistry for Natural Products, Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014. 3. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Corresponding author: SUN Qianyun. E-mail: sunqy@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of *Naja atra* venom on blood coagulation in rats. **Methods** Whole blood was incubated with *Naja atra* venom or various fractions *in vitro* and a thromboelastogram was obtained. In an *in vivo* experiment, *Naja atra* venom was injected via the tail vein or intramuscularly and whole blood samples were collected at various time points to obtain the thromboelastogram. LDH, hemoglobin, vWF, and P-selectin were measured in plasma. The activity of coagulation-related enzymes in plasma was measured by the chromogenic substrate method. **Results** The *in vitro* and *in vivo* result showed that *Naja atra* venom and some of its fractions obviously induced an abnormality in the coagulation function in rats, which was characterized by a lack of coagulation factors, low level of fibrinogen, and lowering of the platelet count and function, while the plasma hemoglobin content and LDH activity were increased significantly. *In vitro*, *Naja atra* venom and its fractions significantly decreased the enzymatic activities of cleaving S2238 and S2251. *In vivo*, after intramuscular injection, the content of P-selectin was significantly increased at 30 min and the enzymatic activity of cleaving S2765 was significantly increased within 6 h. After tail vein injection, the enzymatic activity of cleaving S2238

【基金项目】 国家自然科学基金项目(32160129),贵州省科技计划及平台人才项目(黔科合人才[2016]4018号、黔科合支撑[2018]2828号、黔科合平台人才[2019]5702号)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(32160129), Guizhou Provincial Science and Technology Foundation (QKHC[2016]4018, QKHZC[2018]2828, QKHPTRC [2019]5702)。

【作者简介】 许林(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:天然毒素蛋白的结构与功能及应用。Email:xulin9712@163.com

【通信作者】 孙黔云(1968—),男,研究员,博士,研究方向:动物毒素结构与功能及应用。Email:sunqy@hotmail.com

was increased significantly within 2 h and vWF content was increased obviously within 6 h. **Conclusions** *Naja atra* venom induces an obvious abnormality in the blood coagulation function of rats. Its effect is mainly related to the consumption of coagulation factors and fibrinogen caused by activation of the coagulation system and the consumption of platelets.

[Keywords] *Naja atra* venom; blood coagulation function; snakebite; thromboelastogram.

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

蛇伤是危害劳动者生命健康的全球公共卫生问题,根据世界卫生组织报道,每年毒蛇咬伤多达 270 万人,其中眼镜蛇伤较为普遍^[1]。在我国,眼镜蛇伤的发病率居蛇伤的第二位(16.68%),病死率为 1.6%,其临床表现主要有局部水肿,坏死,麻痹,运动障碍等^[2-3]。临床眼镜蛇伤患者中有的表现出凝血功能的异常^[4],而有的患者没有表现出凝血功能的异常^[5],由于临床蛇伤的复杂性,对于凝血功能的异常是否是眼镜蛇伤的必然结果并没有明确的结论,迄今关于眼镜蛇毒对凝血功能的影响研究较少,且早期研究大多采用血浆测定凝血 4 项^[6-7],测定过程无血细胞参与,无法完全反映凝血变化过程,因此有必要进一步开展眼镜蛇毒对凝血功能的影响研究。本研究基于全血凝血功能测定的方法,进行眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响,以期临床救治及相关新药研究提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

80 只 6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 200 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。SPF 级饲料购于北京华阜康生物科技股份有限公司【京饲证(2019)06076】,饲养环境:相对湿度 40% ~ 70%,温度控制在 22 ~ 25℃,饲养期间各组大鼠自由饮水,饲养于贵州医科大学天然产物化学重点实验室【SYXK(黔)2018-0001】。实验动物方案经贵州医科大学实验动物伦理委员会审查通过(审批号:No. 2101082),动物福利均符合相关实验动物管理条例。

1.1.2 主要试剂与仪器

中华眼镜蛇毒(*Naja atra* venom)冻干粉(贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室),蛋白分离介质 SP Sephadex C-25(GE Healthcare 公司,美国),血栓弹力图试剂盒普通杯(北京乐普生物技术有限公司,中国),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,中国),vWF 以及

P-selectin 试剂盒(武汉基因美科技有限公司,中国);纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)试剂盒(上海太阳生物技术有限公司,中国),纤溶酶底物 S2251、凝血因子 Xa 底物 S2765、凝血酶底物 S2238、组织型纤溶酶原激活剂底物 S2288、血浆激肽酶底物底物 S2302(上海船夫生物技术有限公司,中国),其他所用试剂均为国产分析纯,符合实验要求。

CFMS LEPU-8800 血栓弹力图仪(北京乐普生物技术有限公司,中国),Spectra MAX-190 连续波长酶标仪(Molecular Devices 公司,美国),Milli Q 超纯水系统(Millipore 公司,美国),5810R 冷冻离心机(Eppendorf 公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 眼镜蛇毒及其分离峰制备

称取 0.1 g 眼镜蛇毒冻干粉溶于 1 mL PBS 缓冲液,3000 rpm 离心 10 min,取上清分装冻存。

经 SP Sephadex C-25 柱分离眼镜蛇毒,参照文献^[8]收集样品,编号为 FI ~ FVII。测定 OD 值后换算成蛋白含量,再使用含 0.15 mol/L NaCl 的醋酸钠缓冲液稀释成所需要的浓度后分装冻存。

1.2.2 动物样本采集

(1)体外实验:10 只 SPF 级雄性 SD 大鼠适应性喂养 3 d 后禁食 12 h,腹腔注射 10 mg/mL 戊巴比妥钠麻醉,经腹主动脉取血,枸橼酸钠抗凝管中混匀,每两只混合后共制备 60 mL 全血,一共 5 批全血供实验使用。取眼镜蛇毒、FI ~ FVII 分离峰不同浓度 50 μ L 加入至 1 mL 大鼠全血中,以 PBS 为对照,混匀,37℃ 孵育 30 min,取 340 μ L 血样测定血栓弹力图,其余血样 3000 rpm 离心 10 min,取上清分装冻存。

实验设置眼镜蛇毒高、中、低剂量组为 125、12.5、1.25 μ g/mL;FI ~ FVII 为 25 μ g/mL;FI 高、中、低剂量组为 25、2.5、0.8 μ g/mL;FVI 高、中、低剂量组为 50、25、12.5 μ g/mL。上述浓度均为终浓度。

(2)体内实验:70 只 SD 大鼠适应性喂养 3 d,随机分为肌肉注射组、尾静脉注射组和 PBS 对照组,每组 6 ~ 9 只不等,分别将眼镜蛇毒 0.5 mg/kg 一次性尾静脉注射和 1 mg/kg 一次性肌肉注射至大

鼠体内,于注射后 0.5、1、2、6 h 取血,将血样混匀后取 340 μL 血样进行血栓弹力图测定,其余血样 3000 rpm 离心 10 min,取上清分装冻存。

1.2.3 血栓弹力图(TEG)测定

血栓弹力图普通杯测试试剂盒恢复至室温,血栓弹力图仪升温至 37℃,取全血血样 1 mL 与试剂 1 混合,颠倒 4 ~ 5 次后静置 4 min,取 340 μL 血样加入普通杯杯槽中,加入 20 μL 试剂 2,测定血栓弹力图。

1.2.4 LDH 活性测定

取体内或体外制备的大鼠血浆按照酶活测定方法测定 LDH 活性。

按式(1)计算 LDH 活性(U/L):
$$\text{LDH 活性} = \frac{\text{测定 OD}_{450} - \text{对照 OD}_{450}}{\text{标准 OD}_{450} - \text{空白 OD}_{450}} \times 0.2 \times 1000(1)$$

1.2.5 血浆血红蛋白含量测定

取体内或体外制备的血浆用 PBS 稀释 10 倍后取 200 μL 加入 96 孔板,于 412 nm 处测定吸光度,以 $A_{412\text{ nm}}$ 值表示血红蛋白含量。

1.2.6 酶切发色底物活性测定

参考文献^[9],取体内或体外制备的血浆采用单一时间点法和酶动力学方法测定酶切纤溶酶底物 S2251、凝血因子 Xa 底物 S2765、凝血酶底物 S2238、组织型纤溶酶原激活剂底物 S2288、血浆激肽酶底物 S2302 活性,以 1 mg/mL 原矛头蝮蛇毒(*Protobothrops mucrosquamatus* venom, PMV)为阳性对照,PBS 为阴性对照,取血浆 20 μL 或 40 μL、相关底物 40 μL 或 20 μL、PBS 40 μL,总体系为 100 μL,混匀后 37℃ 恒温避光孵育,设置孵育时间 4 或 6 h、间隔检测时间 15 或 30 min 测定 $A_{405\text{ nm}}$ 。

1.2.7 FIB、P-selectin、vWF 含量

取制备的血浆采用 ELISA 法测定 P-selectin、

vWF 含量,采用凝固法测定 FIB 含量。

1.3 统计学分析

实验数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 22.0 软件进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 眼镜蛇毒分离峰的制备

眼镜蛇毒经 SP Sephadex C-25 分离后获得 7 个主要分离峰(图 1)。命名为 FI ~ FVII。

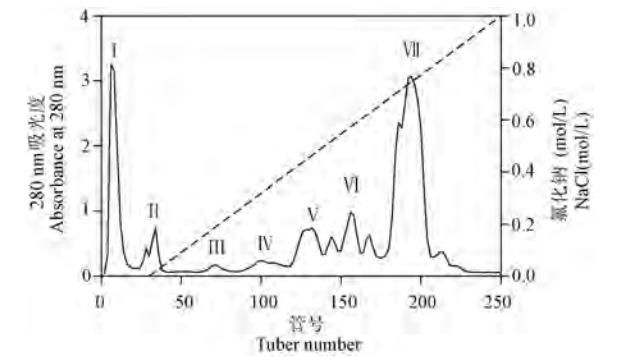


图 1 眼镜蛇毒 SP-Sephadex C-25 层析图

Figure 1 Ion-exchange chromatography of *Naja atra* venom on a SP-Sephadex C-25 column

2.2 体外实验结果

2.2.1 血栓弹力图结果

表 1 显示,与空白组相比,FI、FVI、FVII 分离峰能显著延长 R 值($P < 0.05$),提示凝血因子性低凝。FIV、FV、FVI 分离峰显著减小 Angle 值($P < 0.05$),表明纤维蛋白原功能性低凝。FIII、FIV、FV、FVI、FVII 分离峰 CI 值显著减小($P < 0.05$),提示血液处于低凝状态。

表 2 可知,与空白组相比 FI (25、2.5 μg/mL) 及 FVI (50 μg/mL) 均延长 R 值($P < 0.01$)。除 FI

表 1 FI ~ FVII 血栓弹力图测定结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Results of TEG of FI ~ FVII ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Groups	凝血因子激活时间 (min) R (min)	血块形成速率 (min) K (min)	血凝速率 (°) Angle (°)	最大振幅 (mm) MA (mm)	综合凝血指数 CI
对照 Control	1.73 ± 0.06	0.80 ± 0.00	79.47 ± 0.80	75.10 ± 3.05	6.00 ± 0.36
FI	30.13 ± 2.15**	—	—	—	—
FII	2.03 ± 0.21	1.07 ± 0.38	75.93 ± 5.57	70.03 ± 3.99	4.80 ± 1.04
FIII	2.27 ± 0.50	1.10 ± 0.30	75.03 ± 3.75	70.40 ± 3.70	4.60 ± 0.70*
FIV	3.57 ± 1.10	1.30 ± 0.36	71.63 ± 4.44*	69.27 ± 4.20	3.27 ± 0.78**
FV	3.23 ± 0.81	1.10 ± 0.17	73.90 ± 1.95**	69.97 ± 2.97	3.83 ± 0.55**
FVI	3.57 ± 0.68*	1.63 ± 0.42	65.40 ± 4.03**	67.17 ± 2.06*	2.47 ± 0.95**
FVII	2.67 ± 0.42*	0.87 ± 0.12	76.57 ± 3.27	73.03 ± 2.68	4.83 ± 0.32*

注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. (The same in the following tables)

(25 μg/mL),FI、FVI其余各浓度均增大 K 值($P < 0.05$),减小 Angle 值($P < 0.05$),提示纤维蛋白原功能性低凝。FVI(50、25 μg/mL)减小 MA($P < 0.05$),提示血小板性低凝。FI、FVI各浓度均降低 CI 值($P < 0.05$)。

表 3 显示,眼镜蛇毒(125、12.5 μg/mL)延长 R 值($P < 0.01$)。3 个浓度均降低 Angle 值($P < 0.01$),降低 CI 值($P < 0.01$),且浓度越大,CI 值

越小。
图 2 可知眼镜蛇毒 12.5 μg/mL、FI 2.5 μg/mL、FVI 25 μg/mL 浓度下血栓弹力图与对照组相比均产生明显变化。

2.2.2 LDH 结果

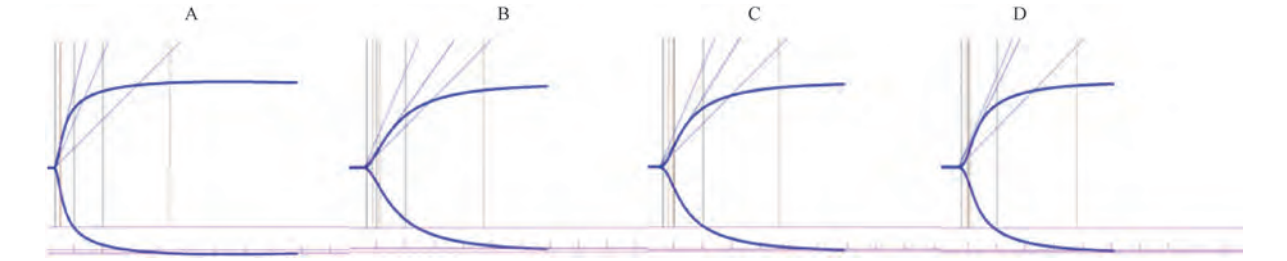
图 3 显示,与空白组相比,眼镜蛇蛇毒(125、12.5 μg/mL)、FI(25、2.5 μg/mL)、FIV及FVII分离峰孵育后血浆显著增高 LDH 活力($P < 0.05$)。

表 2 FI 和FVI血栓弹力图测定结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Results of TEG of FI and FVI($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Groups	凝血因子激活时间(min) R (min)	血块形成速率(min) K (min)	血凝速率(°) Angle(°)	最大振幅(mm) MA (mm)	综合凝血指数 CI
对照 Control	1.73 ± 0.06	0.80 ± 0.00	79.47 ± 0.8	75.10 ± 3.05	6.00 ± 0.36
FI	25.0 30.13 ± 2.15 **	—	—	—	—
	2.5 2.80 ± 0.26 **	1.73 ± 0.21 *	66.67 ± 2.74 **	64.77 ± 6.38	2.70 ± 0.95 **
	0.8 3.20 ± 0.95	1.43 ± 0.21 *	70.43 ± 2.19 **	68.77 ± 2.11 *	3.33 ± 0.50 **
FVI	50.0 3.07 ± 0.15 **	1.70 ± 0.10 **	66.67 ± 2.20 **	60.43 ± 6.16 *	2.03 ± 0.91 **
	25.0 3.07 ± 0.64	1.37 ± 0.12 *	68.60 ± 3.39 **	67.10 ± 2.17 *	3.10 ± 0.26 **
	12.5 2.27 ± 0.32	1.37 ± 0.15 *	70.90 ± 1.08 **	67.53 ± 8.51	3.83 ± 0.92 *

表 3 眼镜蛇毒不同浓度血栓弹力图测定结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Results of TEG with different concentrations of *Naja atra* venom($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Groups	凝血因子激活时间(min) R (min)	血块形成速率(min) K (min)	血凝速率(°) Angle(°)	最大振幅(mm) MA (mm)	综合凝血指数 CI
对照 Control	1.73 ± 0.06	0.80 ± 0.00	79.47 ± 0.80	75.10 ± 3.05	6.00 ± 0.36
眼镜蛇毒 <i>Naja atra</i> venom	125.00 6.23 ± 0.06 **	2.40 ± 0.44 *	59.87 ± 5.20 *	63.03 ± 5.45 *	0.23 ± 0.40 **
	12.50 3.63 ± 0.29 **	1.60 ± 0.60	65.23 ± 2.98 **	71.40 ± 3.91	2.93 ± 0.72 **
	1.25 2.80 ± 0.00	1.13 ± 0.06 **	74.30 ± 0.72 **	69.50 ± 0.85 *	4.10 ± 0.10 **



注:A:对照;B:眼镜蛇毒 12.5 μg/mL;C:FI 2.5 μg/mL;D:FVI 25 μg/mL
图 2 体外孵育后大鼠全血血栓弹力图变化
Note. A. Control. B. *Naja atra* venom 12.5 μg/mL. C. FI 2.5 μg/mL. D. FVI 25 μg/mL.

Figure 2 Changes of whole blood TEG in rats after in vitro incubation

2.2.3 血红蛋白含量

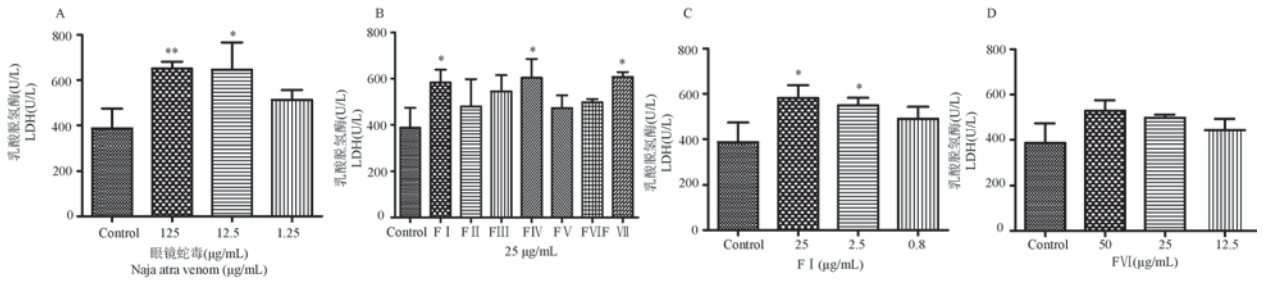
图 4 可知眼镜蛇蛇毒(125、12.5、1.25 μg/mL)、FI(25、2.5、0.8 μg/mL)、FII、FIV、FVI(50、25、12.5 μg/mL)及FVII分离峰血红蛋白含量显著升高($P < 0.05$)。

2.2.4 酶切发色底物活性测定结果

由图 5A、5B、5C、5D 可知与空白组相比眼镜蛇毒(125、12.5、1.25 μg/mL)及FVI分离峰(50、25

μg/mL)均下调酶切凝血酶 S2238 底物活力($P < 0.05$)。

由图 5E、5F 可知空白组相比眼镜蛇毒(125、12.5、1.25 μg/mL)酶切纤溶酶 S2251 底物活性随浓度增加而减小($P < 0.05$)。图 5G、5H、5I、5J、5K、5L 可知 FI、FII、FIII、FVI(50、25 μg/mL)、FVII分离峰酶切纤溶酶底物 S2251 活性均显著上调($P < 0.05$)。

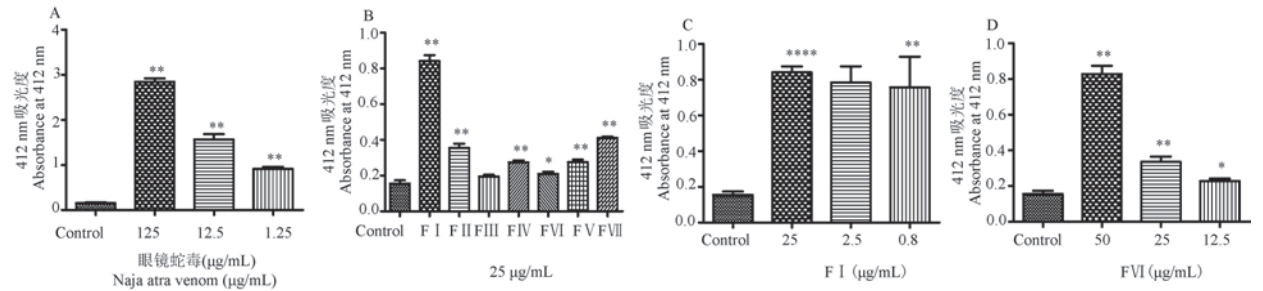


注:A:不同浓度眼镜蛇毒;B:FI ~FⅦ;C:不同浓度 FI ;D:不同浓度 FⅥ;与空白相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 3 体外孵育后大鼠血液中 LDH 变化($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A. *Naja atra* venom in different concentrations. B. FI ~FⅦ. C. FI in different concentrations. D. FⅥ in different concentrations. Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures).

Figure 3 Changes of LDH in the blood of rats after *in vitro* incubation($\bar{x} \pm s, n = 3$)



注:A:不同浓度眼镜蛇毒;B:FI ~FⅦ;C:不同浓度 FI ;D:不同浓度 FⅥ。

图 4 体外孵育后大鼠血液中血红蛋白含量变化

Note. A. *Naja atra* venom in different concentrations. B. FI ~FⅦ. C. FI in different concentrations. F. FⅥ in different concentrations.

Figure 4 Changes of hemoglobin content in rat blood after *in vitro* incubation

2.3 体内实验结果

2.3.1 血栓弹力图结果

表 4 可知,肌肉注射组 0.5、2、6 h 内 K 值显著增大($P < 0.05$),Angle 及 CI 值 6 h 内显著减小($P < 0.01$),1 ~ 6 h MA 值显著减小($P < 0.01$),且该注射方式 6 h 出现一定程度的纤溶亢进,与空白组

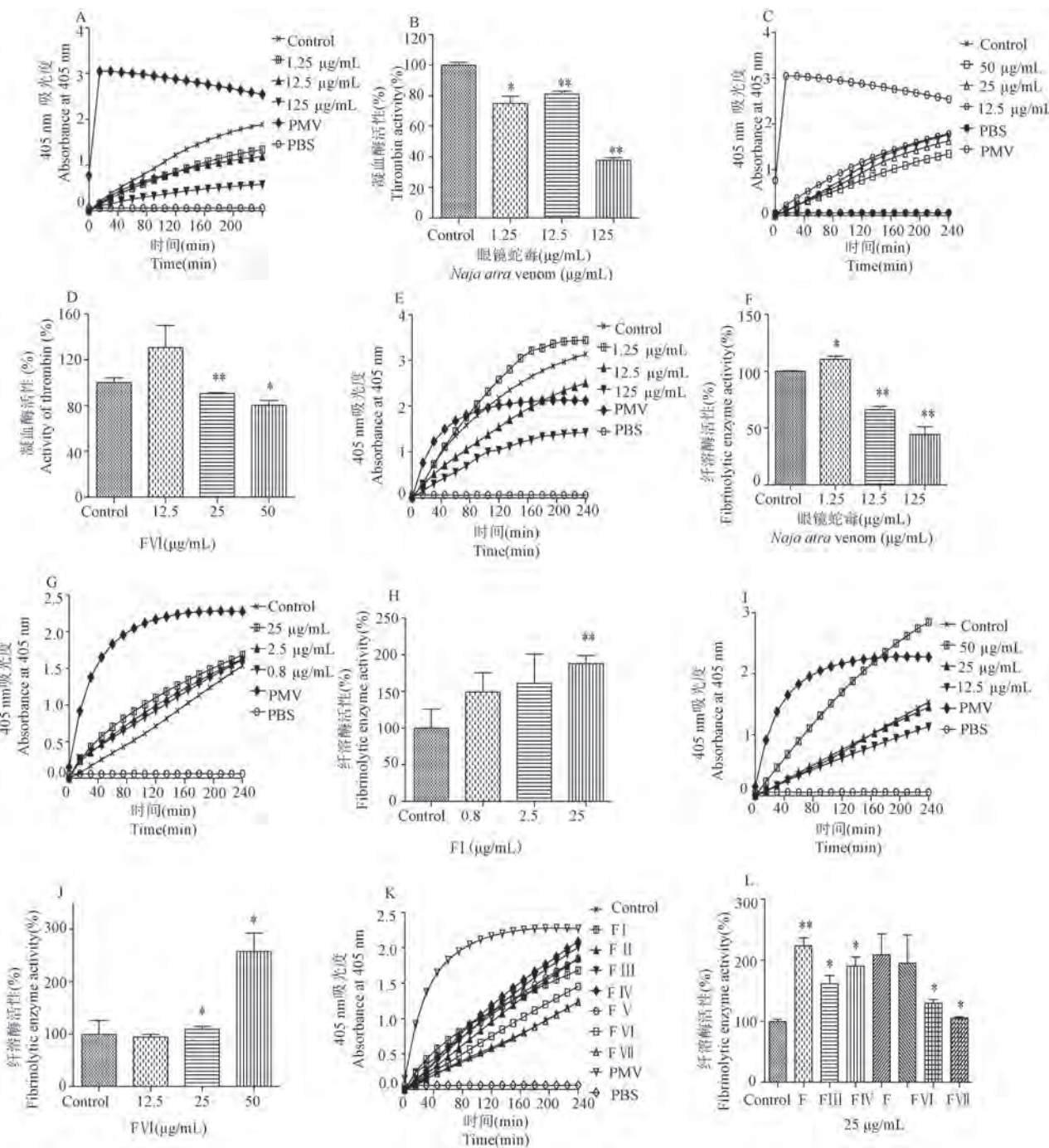
相比具有显著性差异($P < 0.01$),提示低凝出血风险增大。由表 5 可知,静脉注射眼镜蛇毒 1 h 内 K 值显著增大($P < 0.05$),Angle、MA、CI 显著减小($P < 0.01$),1 h 达最小值,提示低凝出血风险增大。由图 6 可知肌肉注射和尾静脉注射组血栓弹力图与空白组相比均有明显变化。

表 4 肌肉注射组不同时间点血栓弹力图测定结果($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Results of TEG at different time points in intramuscular injection group($\bar{x} \pm s$)							
组别 Groups	<i>n</i>	凝血因子激活时间(min) R (min)	血块形成速率(min) K (min)	血凝速率(°) Angle(°)	最大振幅(mm) MA (mm)	综合凝血指数 CI	纤溶速率(%) LY30(%)
对照 Control	6	1.78 ± 0.57	0.80 ± 0.00	81.87 ± 1.96	75.42 ± 1.84	6.17 ± 0.56	0.00 ± 0.00
0.5 h	7	2.96 ± 1.05 *	1.04 ± 0.21 *	75.09 ± 3.74 **	70.76 ± 4.97	4.23 ± 1.27 **	0.00 ± 0.00
1 h	7	2.44 ± 0.96	1.03 ± 0.25	75.77 ± 4.11 **	69.71 ± 3.33 **	4.15 ± 1.07 **	0.00 ± 0.00
2 h	9	2.43 ± 0.66	1.14 ± 0.36 *	74.47 ± 5.28 **	67.78 ± 5.44 **	4.13 ± 1.46 **	0.00 ± 0.00
6 h	6	2.50 ± 0.43 *	0.95 ± 0.14 *	76.78 ± 1.75 **	69.68 ± 4.00 **	4.58 ± 0.46 **	8.65 ± 8.01 **

表 5 尾静脉注射组不同时间点血栓弹力图测定结果($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Results of TEG at different time points in intravenous injection group($\bar{x} \pm s$)						
组别 Groups	<i>n</i>	凝血因子激活时间(min) R (min)	血块形成速率(min) K (min)	血凝速率(°) Angle(°)	最大振幅(mm) MA (mm)	综合凝血指数 CI
对照 Control	6	2.27 ± 0.49	0.85 ± 0.12	79.82 ± 2.65	74.48 ± 2.07	5.58 ± 0.74
0.5 h	8	3.16 ± 1.13	1.28 ± 0.43 *	72.18 ± 5.91 *	66.93 ± 3.80 **	3.50 ± 1.46 **
1 h	8	3.36 ± 1.06 *	1.29 ± 0.44 *	71.94 ± 5.89 **	65.71 ± 4.69 **	3.06 ± 1.68 **
2 h	7	3.24 ± 1.29	0.99 ± 0.38	75.60 ± 5.20	70.73 ± 5.07	4.11 ± 1.90
6 h	6	2.55 ± 0.34	0.87 ± 0.16	78.50 ± 2.89	69.95 ± 4.65	4.73 ± 0.68

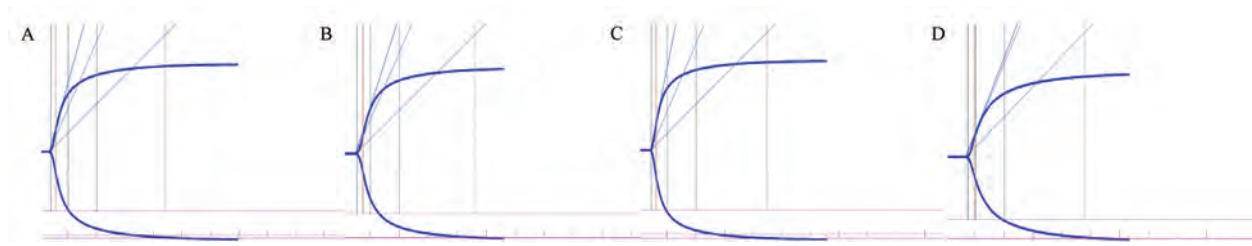


注:A,B:不同浓度眼镜蛇毒酶切 S2238 底物酶动力学曲线及酶活力变化;C,D:不同浓度 FVI 酶切 S2238 底物酶动力学曲线及酶活力变化;E,F:不同浓度眼镜蛇毒酶切 S2251 底物酶动力学曲线及酶活力变化;G,H:不同浓度 FI 酶切 S2251 底物酶动力学曲线及酶活力变化;I,J:不同浓度 FVI 酶切 S2251 底物酶动力学曲线及酶活力变化;K,L:FI ~ FVII 酶切 S2251 底物酶动力学曲线及酶活力变化

图 5 体外孵育后血浆酶切 S2238 和 S2251 底物酶动力学曲线及酶活力变化($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A, B. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2238 of *Naja atra* venom in different concentrations. C, D. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2238 of FVI in different concentrations. E, F. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2251 of *Naja atra* venom in different concentrations. G, H. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2251 of FI in different concentrations. I, J. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2251 of FVI in different concentrations. K, L. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2251 of FI ~ FVII.

Figure 5 Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2238 and S2251 in plasma after incubation *in vitro*($\bar{x} \pm s, n = 3$)



注:A:肌肉注射对照组;B:肌肉注射 2 h;C:尾静脉注射对照组;D:尾静脉注射 1 h。

图 6 注射眼镜蛇毒后大鼠血栓弹力图变化

Note. A. Intramuscular injection control. B. Intravenous injection 2 h. C. Intramuscular injection control. D. Intravenous injection 1 h.

Figure 6 Changes of TEG after injection of *Naja atra* venom in rats

2.3.2 LDH 结果

由图 7 可知与空白组对比,两种注射方式 6 h 内 LDH 活力显著增高($P < 0.05$)。

2.3.3 血浆血红蛋白含量

由图 8 可知,与空白组相比,肌肉注射组 1、6 h 时血红蛋白含量显著增高($P < 0.05$),静脉注射组 2 h 内血红蛋白含量显著增高($P < 0.01$)。

2.3.4 FIB 测定结果

由图 9 知尾静脉注射组 FIB 含量在 1 h 和 6 h 时与空白组相比存在显著性差异($P < 0.05$),肌肉

注射组各时间点 FIB 含量均有一定降低,但无统计学意义(数据未列出)。

2.3.5 酶切发色底物活性实验结果

由图 10A,10B 可知尾静脉注射组在 2 h 内酶切凝血酶底物 S2238 活性与空白组相比产生显著性差异($P < 0.05$)。由图 10C,10D 可知肌肉注射组 6 h 内酶切凝血因子 Xa 底物 S2765 活性与空白组比较具有显著性差异($P < 0.01$)。酶切纤溶酶底物 S2251、血浆激肽酶底物 S2302 及组织型纤溶酶原激活剂底物 S2288 活性与空白组相比无显著性差异(数据未列出)。

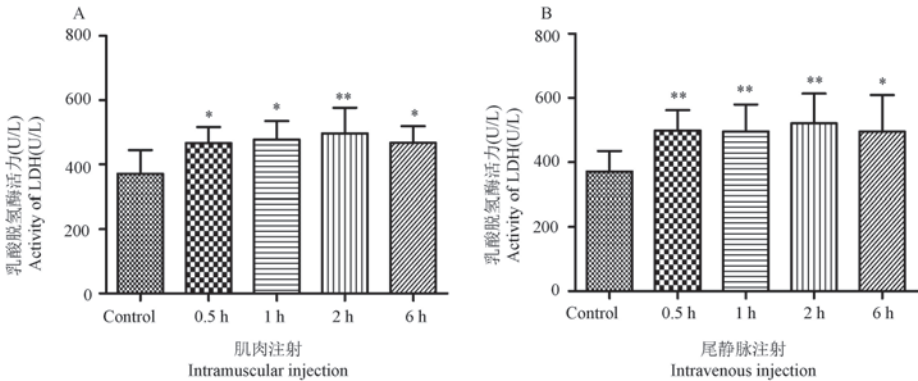


图 7 大鼠注射眼镜蛇毒后不同时间点 LDH 变化

Figure 7 Changes of LDH at different time points after injection of *Naja atra* venom in rats

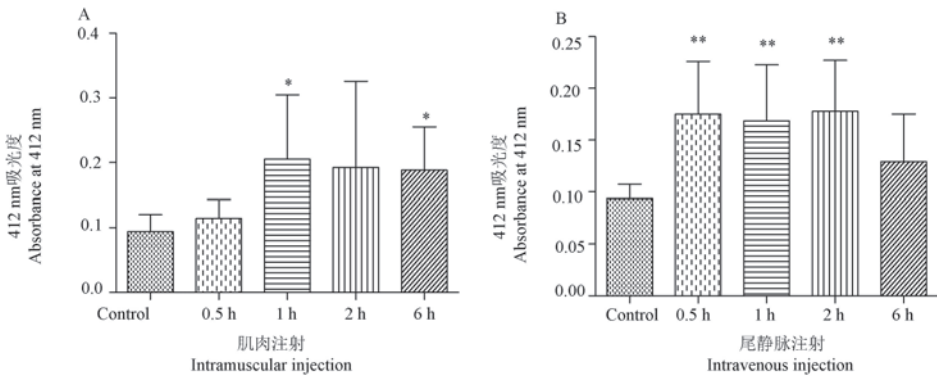


图 8 大鼠注射眼镜蛇毒后不同时间点血红蛋白含量变化

Figure 8 Changes of hemoglobin content at different time points after injection of *Naja atra* venom in rats

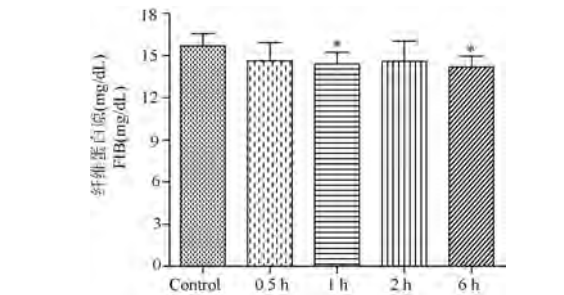
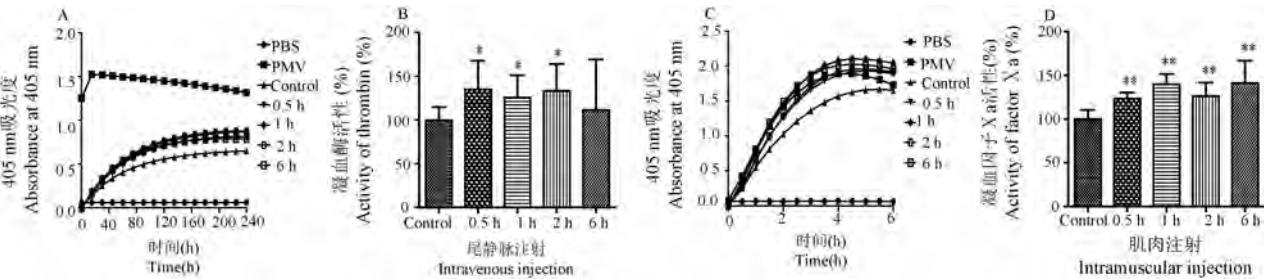


图 9 尾静脉注射眼镜蛇毒后不同时间点 FIB 变化
Figure 9 Changes of FIB at different time points after injection of *Naja atra* venom into the tail vein



注:A,C:酶切 S2238 及 S2765 底物动力学曲线变化;B,D:酶切 S2238 及 S2765 底物活力变化。
Note. A, C. Changes of the enzyme kinetics curves of cleaving S2238 and S2765. B, D. Changes of enzymatic activities of cleaving S2238 and S2765.
Figure 10 Changes of enzyme kinetics curves and enzymatic activities of cleaving S2238 and S2765 after injection of *Naja atra* venom in plasma of rats

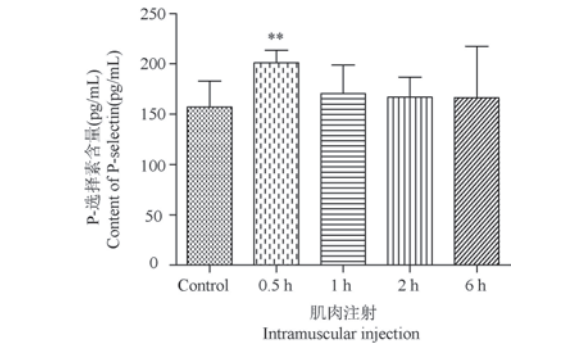


图 11 肌肉注射眼镜蛇毒后大鼠血液中 P-selectin 变化
Figure 11 Changes of P-selectin in rats blood after injection of *Naja atra* venom

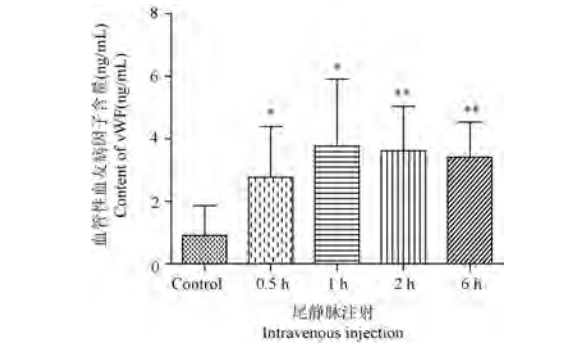


图 12 注射眼镜蛇毒后大鼠血液中 vWF 变化
Figure 12 Changes of vWF in rats blood after injecting *Naja atra* venom

2.3.6 P-selectin 测定结果

由图 11 可知,肌肉注射眼镜蛇毒 0.5 h 时 P-selectin 含量显著增高($P < 0.01$)。静脉注射 0.5 h 时 P-selectin 有上调但无统计学意义(数据未列出)。

2.3.7 vWF 测定结果

由图 12 可见,尾静脉注射眼镜蛇毒后 6 h 内 vWF 含量显著增高($P < 0.05$),1 h 时变化最为明显。肌肉注射组有一定升高但无统计学意义(数据未列出)。

3 讨论

临床上眼镜蛇伤病人情况复杂,部分眼镜蛇伤病例中凝血功能障碍不明显^[10],但少部分急危重症眼镜蛇伤病人伴有凝血功能的异常,主要表现为活化部分凝血活酶时间(APTT)延长、凝血酶原时间(PT)延长、凝血酶时间(TT)延长、纤维蛋白原(FIB)下降^[11-12],眼镜蛇伤是否与凝血功能障碍有必然联系,尚未能完全确定。目前眼镜蛇伤相关研究多聚焦在其神经毒、细胞毒等毒素方面的影响^[13-14]。关于眼镜蛇毒对凝血功能影响的基础研究不多,从 1973 年到 2021 年,在 CNKI、维普网、万方数据、PubMed 数据库上可查询到文献较少,且早期研究多采用血浆测定凝血四项,常规凝血四项主要采用抗凝血浆检测 APTT、PT、TT、FIB,血浆中不含血细胞,只检测血浆本身凝血功能,故不能完全反应凝血变化的病理生理过程。因此有必要从基础研究的角度进一步认识和阐明眼镜蛇毒对凝血功能的影响情况。针对凝血四项的不足,血栓弹力图可用全血监测血液凝固动态全过程,能比较好地弥补传统凝血检测中无血细胞参与的不足,更接近临床实际凝血变化。基于此,本研究利用血栓弹力

图研究和评价眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响,以便进一步认识眼镜蛇伤中凝血功能的影响,为临床救治和新药研究提供科学参考。

研究表明眼镜蛇毒属于混合型毒素,既有血液毒,又有神经毒,其主要功能组分有神经毒素、细胞毒素、金属蛋白酶、眼镜蛇毒因子、氧化酶类、水解酶类等成分^[15]。为进一步认识眼镜蛇毒不同组分对凝血功能的影响,本研究体外实验中采用能较好地将眼镜蛇毒组分分开的 SP-Sephadex C-25 凝胶进行分离,得到 7 个分离峰,其中 FI 峰含有磷脂酶 A2、L-氨基酸氧化酶、眼镜蛇毒因子、蛇毒金属蛋白酶^[16-17],FII 中主要含有乙酰胆碱酯酶,FIII 中主要含有磷酸二酯酶^[17],FIV、FV 峰中富含半胱氨酸蛋白、蛇毒金属蛋白酶及神经生长因子^[16],FVI 中主要含有神经毒素^[17],FVII 中主要含有细胞毒素^[17]。血栓弹力图实验及相关活性结果表明 FI 峰孵育后全血 R 值显著延长,血液未凝固,说明血液凝血功能异常,这可能由于 FI 峰中磷脂酶 A2、L-氨基酸氧化酶、蛇毒金属蛋白酶抑制血小板聚集所引起^[18-19],同时血浆中血红蛋白含量显著上升,LDH 活力升高,表明细胞膜完整性遭到破坏,这可能由眼镜蛇毒因子激活补体生成攻膜复合物、磷脂酶 A2 酶切卵磷脂产生溶血卵磷脂等引起^[20-21]。FIV 峰综合凝血指数 CI 显著降低,血红蛋白含量升高,提示该峰中的金属蛋白酶可通过抑制血小板等表现出抗凝作用,除此之外可能存在细胞毒素,造成血红蛋白的升高。FV、FVI 峰血栓弹力图结果显示凝血因子减少,纤维蛋白原减少,血小板功能减弱,可能是 FV 峰中某些金属蛋白酶切割直接凝血因子,水解纤维蛋白原,抑制血小板聚集所导致^[22]。此外 FVI、FVII 峰孵育后血浆血红蛋白含量升高,说明 FVI、FVII 组分含有细胞毒素可破坏细胞,溶解红细胞造成血红蛋白含量升高^[17]。酶切发色底物结果表明,随眼镜蛇毒浓度增大,孵育处理后血浆切割凝血酶底物、纤溶酶底物活性显著下调,这与血栓弹力图中表现出凝血因子减少这一变化保持一致。

体内血栓弹力图实验表明眼镜蛇毒具有显著的抗凝作用,0.5 mg/kg 浓度下尾静脉注射组大鼠及 1 mg/kg 浓度下肌肉注射组大鼠均表现出凝血因子、纤维蛋白原减少,血小板功能的减弱,1 h 内尾静脉注射组大鼠抗凝效果略优于肌肉注射组。大鼠注射眼镜蛇毒后凝血因子的减少可能是凝血系统激活导致凝血因子的消耗。文献报导大鼠注射

眼镜蛇毒后能够延长 APTT、PT,该结果也提示凝血因子存在减少或缺乏^[6]。通过测定纤维蛋白原的含量发现,尾静脉注射后大鼠血浆各时间点纤维蛋白原均有一定的下降,这可能是体内凝血系统被激活导致纤维蛋白原消耗也可能是纤维蛋白原被酶切水解所致。同时体内注射眼镜蛇毒后 P-selectin、vWF 含量、血红蛋白含量及 LDH 活力均有不同程度的增加。P-selectin 是内皮细胞和血小板含有的黏附分子,vWF 是内皮细胞含有的分子,二者均可作为血小板活化和内皮细胞损伤的标志物^[23-25]。P-selectin、vWF 含量上调提示眼镜蛇毒在体内引起内皮细胞、血小板激活与消耗,从而在血栓弹力图中表现为 MA 值降低,血小板功能的减弱。同时血浆血红蛋白含量及 LDH 活力增高提示细胞损伤,其原因为眼镜蛇毒中细胞毒素,磷脂酶 A2 等造成细胞膜的破坏,进一步造成继发性凝血功能紊乱。酶切发色底物活性测定结果表明两种注射方式酶切凝血酶、凝血因子 Xa 底物活性均有一定上调,提示眼镜蛇毒注射到大鼠体内后激活了凝血系统,导致凝血因子被消耗,从而表现出凝血因子的减少。

本研究基于大鼠全凝血功能评价,结合血管内皮损伤等指标,通过体内体外实验展示了眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响,其作用与激活凝血系统导致凝血因子消耗、纤维蛋白原减少、血小板消耗等有关。上述结果能够进一步认识眼镜蛇毒对凝血功能毒性机理,本研究有助于为临床蛇伤防治策略及新药研究提供参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] World Health Organization. Snakebite envenoming [EB/OL]. [2021-05-17]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>.
- [2] 林正奎, 罗毅. 中华眼镜蛇咬伤治疗研究概况 [J]. 蛇志, 2018, 30(2): 327-330.
Lin ZK, Luo Y. A survey of research on treatment of *Naja atra* bite [J]. J SNAKE, 2018, 30(2): 327-330.
- [3] Faiz MA, Ahsan MF, Ghose A, et al. Bites by the monocled cobra, *Naja kaouthia*, in chittagong division, bangladesh: epidemiology, clinical features of envenoming and management of 70 identified cases [J]. Am J Trop Med Hyg, 2017, 96(4): 876-884.
- [4] 谢勤丽, 王灿, 李涛. 重庆地区蛇咬伤后急救处理 [J]. 创伤外科杂志, 2015, 17(3): 236-239.
Xie QL, Wang C, Li T. Research of emergency treatment of snakebite in Chongqing [J]. J Traumatol Surg, 2015, 17(3): 236-239.
- [5] 冯庆金. 凝血功能在毒蛇咬伤治疗前后变化规律的研究 [J]. 黑龙江中医药, 2021, 50(2): 407-408.

- Feng QJ. Study on the changes of coagulation function before and after treatment of snakebite [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med, 2021, 50(2): 407-408.
- [6] 杨嘉琳, 孔天翰. 危急重症眼镜蛇伤大鼠多项凝血指标动态变化 [J]. 蛇志, 2010, 22(3): 198-202.
- Yang JL, Kong TH. Dynamic changes of multiple blood coagulation functions in a rat model with intensive *Naja atra* cantor snakebite [J]. J SNAKE, 2010, 22(3): 198-202.
- [7] 唐荣德, 李景新, 蒋三员, 等. 眼镜蛇伤模型造模探讨及多项指标的动态观察 [J]. 蛇志, 2003, 15(2): 25-28.
- Tang RD, Li JX, Jiang SY, et al. Exploration of making models with cobratox in and trending observation of many indices for models [J]. J SNAKE, 2003, 15(2): 25-28.
- [8] 孙黔云, 李敏, 杨付梅. 眼镜蛇毒中一个弱纤维蛋白原水解活性金属蛋白酶的纯化和性质研究 (英文) [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(10): 835-843.
- Sun QY, Li M, Yang FM. Purification and characterization of a metalloproteinase with weak fibrinogenolytic activity from *Naja atra* venom [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2007, 23(10): 835-843.
- [9] 李亚男, 孙黔云, 路青瑜. 原矛头蝮蛇毒及其分离峰对凝血功能的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(2): 284-290.
- Li YN, Sun QY, Lu QY. Effect of *Protobothrops mucrosquamatus* venom and its fractions on blood coagulation [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2015, 29(2): 284-290.
- [10] 贺华. 眼镜蛇咬伤中毒的临床特征与院前急救策略分析 [D]. 衡阳: 南华大学; 2015.
- He H. The clinical features and pre-hospital first aid strategies of patients with cobra bites: a retrospective analysis of 115 cases [D]. Hengyang: University of South China; 2015.
- [11] 周冬林, 陈宇, 胡春安, 等. 中药加血液灌流治疗眼镜蛇咬伤的临床观察 [J]. 江西医药, 2015, 50(12): 1450-1452.
- Zhou DL, Chen Y, Hu CA, et al. Clinical observation on treatment of Cobra bite with traditional Chinese medicine and hemoperfusion [J]. Jiangxi Med J, 2015, 50(12): 1450-1452.
- [12] 吴鑫钟, 曾林生, 赵强, 等. 蛇毒清合剂、放血疗法联合西医常规治疗眼镜蛇咬伤的临床效果 [J]. 中国当代医药, 2021, 28(11): 182-185.
- Wu XZ, Zeng LS, Zhao Q, et al. Clinical effect of Sheduqing mixture, bloodletting combined with routine western medicine in the treatment of *Naja bite* [J]. Chin Mod Med, 2021, 28(11): 182-185.
- [13] Zhao C, Zhao J, Yang Q, et al. Cobra neurotoxin produces central analgesic and hyperalgesic actions via adenosine A1 and A2A receptors [J]. Mol Pain, 2017, 13: 1744806917720336.
- [14] Chiou JT, Wang LJ, Lee YC, et al. *Naja atra* cardiotoxin 1 induces the FasL/Fas death pathway in human leukemia cells [J]. Cells, 2021, 10(8): 2073.
- [15] Liu CC, Lin CC, Hsiao YC, et al. Proteomic characterization of six Taiwanese snake venoms: Identification of species-specific proteins and development of a SISCAPA-MRM assay for cobra venom factors [J]. J Proteomics, 2018, 187: 59-68.
- [16] 云南省动物研究所第四研究室. 蛇毒的研究和利用 II. 湖南产眼镜蛇毒(*Naja Naja atra*)的柱层析分离及各分离峰的毒性和酶活力测定 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1976, 8(2): 157-160.
- Fourth Laboratory, Yunan Institute of Zoology (Kunming). Studies on snake venoms and their utilization. II. Identification of toxins and enzymes in the venom of *naja naja atra* (from hunan) after fractionation by chromatography [J]. Acta Bioch Bioph Sin, 1976, 8(2): 157-160.
- [17] Sun QY, Bao J. Purification, cloning and characterization of a metalloproteinase from *Naja atra* venom [J]. Toxicon, 2010, 56(8): 1459-1469.
- [18] Kazandjian TD, Arrahman A, Still KBM, et al. Anticoagulant activity of *Naja nigricollis* venom is mediated by phospholipase A2 toxins and inhibited by varespladib [J]. Toxins (Basel), 2021, 13(5): 302.
- [19] Ullah A. Structure-function studies and mechanism of action snake venom L-Amino acid oxidases [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 110.
- [20] Vogel CW, Finnegan PW, Fritzinger DC. Humanized cobra venom factor: structure, activity, and therapeutic efficacy in preclinical disease models [J]. Mol Immunol, 2014, 61(2): 191-203.
- [21] Trento MVC, Sales TA, de Abreu TS, et al. Exploring the structural and functional aspects of the phospholipase A2 from *Naja spp* [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 140: 49-58.
- [22] Sun QY, Wang CE, Li YN, et al. Inhibition of platelet aggregation and blood coagulation by a P-III class metalloproteinase purified from *Naja atra* venom [J]. Toxicon, 2020, 187: 223-231.
- [23] 李嘉琳, 李梦诗, 李斌, 等. P-选择素缺失对小鼠生理特征的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 14-19.
- Li JL, Li MS, Li B, et al. Effects of P-selectin gene knockout on the biological characteristics of mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(1): 14-19.
- [24] 刘正泉, 赵自刚. 防治内毒素休克凝血功能紊乱的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 146-150.
- Liu ZQ, Zhao ZG. Advances in prevention and treatment drug therapy for coagulation disorders during endotoxin shock [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 146-150.
- [25] Thomazini CM, Sachetto ATA, de Albuquerque CZ, et al. Involvement of von Willebrand factor and botrocetin in the thrombocytopenia induced by Bothrops jararaca snake venom [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(9): e0009715.

经争辉,李春英,刘蓉,等. *Cln3* 敲除对幼龄小鼠实质器官的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 326–332.

Jing ZH, Li CY, Liu R, et al. Effect of *Cln3* knockout on parenchymal organs in young mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 326–332.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.004

Cln3 敲除对幼龄小鼠实质器官的影响

经争辉^{1,2}, 李春英³, 刘蓉^{1,2}, 任俞华^{1,4}, 崔诗雨^{1,2}, 赵文宝², 张海峰^{1,2*}

(1. 西安交通大学转化医学研究院遗传与发育研究所, 西安 710100; 2. 西安交通大学基础医学院病理学系, 西安 710061; 3. 浙江省丽水学院, 浙江 丽水 323000; 4. 陕西省西安市高陵区医院检验科, 西安 710299)

【摘要】 目的 探究 *Cln3* 敲除对幼龄小鼠实质器官发育的影响, 为 *Cln3* 基因敲除动物应用提供理论参考。**方法** PCR 鉴定 FVB 小鼠基因型; 野生型 (*Cln3*^{+/+})、杂合子 (*Cln3*^{+/-}) 及纯合子 (*Cln3*^{-/-}); 小鼠 3 周龄时, 采集心、肝、脾、肺、肾和脑等主要实质器官并拍照, 利用 Image J 软件测量其投影面积; 中性福尔马林溶液固定各实质器官, 石蜡切片进行 HE 染色, 全切片利用全自动数字病理扫描分析系统扫描后观察器官细微结构。**结果** 与 *Cln3*^{+/+} 和 *Cln3*^{+/-} 小鼠相比, *Cln3*^{-/-} 小鼠体重显著降低 ($P < 0.05$); *Cln3* 缺失会显著降低小鼠心、肝、脾、肺及肾的体积 ($P < 0.05$), 但不会影响小鼠脑的大小 ($P > 0.05$); HE 染色显示, *Cln3*^{-/-} 小鼠各实质器官组织结构未见异常, 实质细胞体积相对较小。**结论** *Cln3* 敲除导致幼龄小鼠的实质器官减小, 未对幼龄小鼠实质器官产生明显病理损伤。

【关键词】 基因修饰小鼠; *Cln3* 敲除; 实质器官; HE 染色

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0326-07

Effect of *Cln3* knockout on parenchymal organs in young mice

JING Zhenghui^{1,2}, LI Chunying³, LIU Rong^{1,2}, REN Yuhua^{1,4}, CUI Shiyu^{1,2}, ZHAO Wenbao², ZHANG Haifeng^{1,2*}

(1. Institute of Genetics and Developmental Biology of Translational Medicine Institute, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710100, China. 2. Department of Pathology of Basic Medicine College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061. 3. Lishui University, Lishui 323000. 4. Department of Clinical Laboratory of Gaoling District Hospital in Xi'an, Xi'an 710299)

Corresponding author: ZHANG Haifeng. E-mail: zhfl9841011@xjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effect of *Cln3* gene knockout on parenchymal organs in mice to provide reference data for the application of *Cln3* gene knockout mice. **Methods** Wild-type (*Cln3*^{+/+}), heterozygous (*Cln3*^{+/-}), and homozygous mice (*Cln3*^{-/-}) were identified by polymerase chain reaction. Heart, liver, spleen, lung, kidney, and brain were collected from 3-week-old mice and photographed, and their projection areas were measured using ImageJ software. The parenchymal organs were then fixed in neutral formalin solution, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin (HE). The slides were then scanned using a automated digital pathology scan analysis system to observe changes in tissue structure. **Results** Body weight was significantly decreased in homozygous knockout mice compared with wild-type and heterozygous mice ($P < 0.05$). Deletion of *Cln3* significantly reduced the volumes of the heart, liver, spleen, lung, and kidney ($P < 0.05$), but not the brain ($P > 0.05$). HE staining indicated that the structures of the parenchymal organs were normal in *Cln3*^{-/-} mice, but the parenchymal cell volume was relatively

【基金项目】 国家自然科学基金(81402312), 中央高校基本科研业务费专项资金资助(xjj2018158), 中国博士后科学基金(2014M552462). Funded by the National Natural Science Foundation of China (81402312), the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (xjj2018158), China Postdoctoral Science Foundation (2014M552462).

【作者简介】 经争辉(1997—), 男, 硕士, 研究方向: 氯离子通道与肿瘤. Email: jingzhenghui4005@163.com

【通信作者】 张海峰(1984—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 氯离子通道与肿瘤. Email: zhfl9841011@xjtu.edu.cn

small. **Conclusions** Knockout of *Clcn3* could reduce the sizes of the major parenchymal organs in young mice, but did not cause any obvious pathological damage to these organs.

【Keywords】 genetically modified mice; *Clcn3* knockout; parenchymal organs; HE staining

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

电压门控氯离子通道 3 (chloride voltage-gated channel 3, *Clcn3*) 在哺乳动物组织中广泛表达, 主要分布于细胞膜、胞浆, 细胞核内少量分布; 小鼠体内共有 4 种不同的 *Clcn3* 亚型, 分别为 *Clcn3a*, *Clcn3b*, *Clcn3c*, *Clcn3e*, 其主要区别是不同亚型的 *Clcn3* 蛋白 N 端和 C 端氨基酸序列不同^[1]。容积调控性阴离子通道 (volume-regulated anion channel, VRAC) 是一类具有种属、组织细胞差异性的功能蛋白复合体。*Clcn3* 被认为是一种潜在 VRAC 候选蛋白, 其胞膜组份对保持特定组织细胞体积平衡至关重要^[2-4]; 多数 *Clcn3* 分布于胞浆内, 位于溶酶体膜上的 *Clcn3* 作为 $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ 交换体, 降低溶酶体内 pH 值使其酸化, 从而维持溶酶体系统的正常生物学功能^[5]; 胞核内 *Clcn3* 功能研究少见报道。亚细胞分布的 *Clcn3* 通过复杂的分子机制, 参与细胞增殖、迁移、凋亡、分化、药物转运等生物学过程^[6-13], 在肿瘤^[14]、免疫^[15]、炎症^[16]、神经^[17]、生殖^[18]、心血管^[19]等相关疾病的发生发展中具有重要作用, 其可作为相关疾病诊断和治疗的潜在靶点。

基因编辑动物是研究基因与人类疾病发生关系的有效动物模型, 通过构建 *Clcn3* 基因敲除动物, 有助于揭示其参与相关疾病发生发展的分子机制。本研究旨在收集 *Clcn3*^{+/+}、*Clcn3*^{+/-} 及 *Clcn3*^{-/-} 小鼠的心、肝、脾、肾、肺和脑等主要实质器官组织, 观察 *Clcn3* 缺失对主要实质器官大体和组织结构的影响, 为以 *Clcn3* 敲除小鼠为模型动物的科学实验提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Clcn3 基因敲除 FVB SPF 级小鼠由中国苏州赛业生物公司【SCXK(苏)2018-0003】通过 CRISPR-cas9 技术生产。简要步骤如下: 靶向小鼠 *Clcn3* 的 sgRNA 和 cas9 mRNA 共同注射到雌性小鼠的受精卵中, 经胚胎移植生产 *Clcn3*^{-/-} 小鼠 (gRNA1: GATTTATTTAACCCTAATGAAGG 和 gRNA2: AATGGGCTGTATTGTCCTCCTGG); 将 *Clcn3*^{-/-} 与 *Clcn3*^{+/+} 小鼠交配, 繁殖杂合子小鼠; 后代 *Clcn3*^{+/-} 小

鼠由杂合子 *Clcn3*^{+/-} 小鼠自交繁殖。*Clcn3*^{+/-} 小鼠饲养 (深圳大学第一附属医院邓志钦馈赠) 在西安交通大学动物实验中心的 SPF 级动物房【SYXK(陕)2018-001】。本实验使用 15 只 SPF 级 FVB 小鼠, 3 周龄, 体重约为 6 ~ 12 g, 其中野生型、杂合子和纯合子小鼠各 5 只。饲养环境: 屏障环境、独立换气; 昼夜光照各半, 湿度恒定; 自由采食和饮水。所有动物实验操作符合西安交通大学伦理委员会要求 (2021-1499)。

1.1.2 主要试剂与仪器

引物合成 (擎科生物, 中国), 蛋白酶 K (天根生物, RT403, 中国), 2X Taq Master Mix (苏州近岸蛋白质科技, E005-01B, 中国), TritonX-100 (Thermo Fisher, 85111, 美国), 100 bp DNA ladder (天根生物, MD109, 中国), Tris (博奥拓达, T6061, 中国), 琼脂糖 (天根生物, RT101, 中国)。干式恒温器 (合众生物, GH-100, 中国), 凝胶电泳仪 (BIO-RAD, 1704469, 美国), 凝胶成像系统 (Bio-Rad, ChemiDoc MP, 美国), 轮转式石蜡切片机 (瑞沃德, S700A, 中国), 全自动数字病理扫描分析系统 (江丰生物, KF-PRO-002, 中国), PCR 仪 (BIO-RAD, T100, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠基因型鉴定

(1) 小鼠基因组 DNA 提取: 小鼠出生后 2 ~ 3 周, 剪取鼠尾 2 ~ 3 mm 放入 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL 裂解液 (1.37 g KCl, 1.2 g Tris, 1 mL TritonX-100, 溶于 1 L 纯水中, 加入浓盐酸调节 pH = 9.0) 和 4 μL 的蛋白酶 K, 56 $^{\circ}\text{C}$ 过夜裂解。裂解完成后, 98 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 15 min 终止裂解。10 000 rpm 离心 15 min, 取上清, 即可得到小鼠基因组 DNA。

(2) 小鼠基因型鉴定: 小鼠基因型均通过 PCR 进行鉴定。PCR 反应体系为 25 μL , 其中 2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 μL , 上下游引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 基因组 DNA 3 μL , 纯水 7.5 μL 。PCR 鉴定小鼠基因型共需要 3 条引物, 引物的序列信息如表 1 所示。PCR 反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 退火 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 10 μL PCR 产物加入

到 2% 琼脂糖凝胶中,100 V 电泳 40 min 后在凝胶成像系统中拍照,分析小鼠的基因型。F1、R1 用来扩增突变的 *Cln3* 基因,产物大小为 654 bp;F2、R1 用来扩增正常的 *Cln3* 基因,产物大小为 769 bp。

1.2.2 小鼠样品采集

小鼠出生后,母鼠喂养至 3 周龄,脱颈处死,剪开小鼠的胸腔和腹腔,采集小鼠的心、肝、脾、肾、肺和脑组织。采集的小鼠组织器官用 PBS 冲洗干净后,摆放在具有标尺的手术布上拍照,利用 Image J 软件测量小鼠各器官的面积。拍照完毕后,将小鼠器官放入 10% 福尔马林溶液中常温保存,用于制作石蜡切片。

1.2.3 石蜡切片制作及 HE 染色

小鼠组织器官浸入 10% 中性福尔马林溶液(10 倍体积)固定 24 h 后,利用不同浓度梯度的乙醇溶

液进行脱水处理,步骤为:70%、80% 和 90% 的乙醇溶液分别脱水 2 h;95% 和 100% 的乙醇溶液分别浸泡脱水 1 h。接着,将小鼠器官放入 100% 二甲苯溶液内透明 30 min 后,浸蜡包埋:将透明好的小鼠器官放入石蜡二甲苯混合液中(1:1)30 min,然后浸入石蜡 I 和 II 中各 2 h。包埋好的小鼠组织利用切片机切片,切片厚度为 4 μm。石蜡切片脱蜡后,利用苏木素伊红染液行 HE 染色。树胶封片后,利用病理数字切片系统扫描 HE 切片, *KIBIO. SlideViewer* 软件观察不同基因型小鼠主要实质器官细微结构。

1.3 统计学分析

数据以平均值 ± 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)展示。采用 *Sigmaplot* 12.5 中的单因素方差分析(ANOVA)比较组间差异,差异显著时采用 Student-Newman-Keuls 检验进行事后多重比较,显著性水平置于 0.05。

表 1 小鼠基因型鉴定所使用的引物序列

引物序列(5'-3')	靶基因	产物长度(bp)
Primer sequence(5'-3')	Targeted gene	Product length(bp)
F1:TCTGATGGGGACTAAGTATGCAG	突变 <i>Cln3</i>	654
R1:TCCCAGAGACAATGAGGCTAAGG	Mutated <i>Cln3</i>	
F2:TTAGTGCTGGCTGTGGCATC	正常 <i>Cln3</i>	769
R1:TCCCAGAGACAATGAGGCTAAGG	WT <i>Cln3</i>	

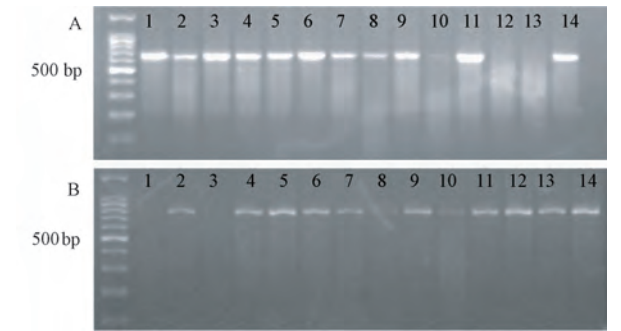
2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定

三引物 PCR 法鉴定野生型(*Cln3*^{+/+})、杂合子(*Cln3*^{+/-})及纯合子(*Cln3*^{-/-}) FVB 小鼠;F1、R1 引物靶向扩增经 CRISPR-CAS9 编辑过的 *Cln3* 基因,产物大小为 654 bp, F2、R1 引物靶向扩增正常的 *Cln3* 基因,产物大小为 769 bp(表 1)。如图 1 所示,利用 F1、R1 和 F2 扩增鼠尾 DNA,1 和 3 号小鼠只出现 654 bp 的条带,为纯合子小鼠;12 和 13 号小鼠经 3 条引物扩增后只出现了 769 bp 的条带,为野生型小鼠;其他小鼠经 3 条引物扩增后同时出现了 654 bp 和 769 bp 的条带,为杂合子小鼠。

2.2 *Cln3* 敲除对小鼠体重的影响

如图 2A 所示,*Cln3*^{-/-} 小鼠头、体、尾、毛发、四肢、耳、鼻、口、眼等器官未见明显畸形。*Cln3* 敲除小鼠生长明显缓慢,3 周龄的 *Cln3*^{-/-} 小鼠体型明显小于 *Cln3*^{+/+} 和 *Cln3*^{+/-} 小鼠。*Cln3*^{+/+} 与 *Cln3*^{+/-} 小鼠的体重差异不显著($P > 0.05$),但均显著高于 *Cln3*^{-/-} 小鼠的体重($P < 0.05$),野生型、杂合子、纯合子小鼠 3 周龄时的平均体重分别为 10.4、10.2 和



注:A:F1 和 R1 扩增产物(654 bp);B:F2 和 R1 扩增产物(769 bp)。

图 1 部分小鼠的基因型鉴定结果

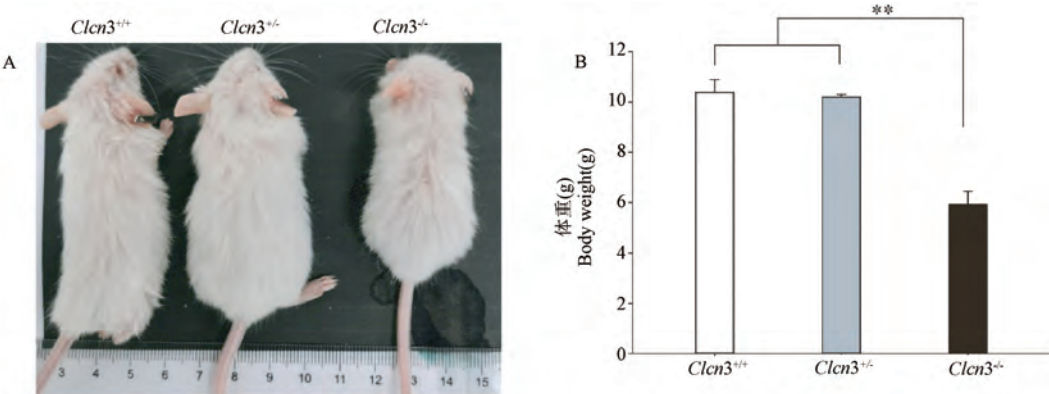
Note. A. The product size of amplification using primer F1 and R1(654 bp). B. The product size of amplification using primer F2 and R1(769 bp).

Figure 1 Genotype results of mice identification

5.9 g(图 2B)。

2.3 *Cln3* 敲除对小鼠实质器官面积的影响

为进一步剖析 *Cln3*^{-/-} 小鼠生长缓慢和体型矮小之因,我们观察了小鼠主要实质器官的发育状况。3 周龄小鼠处死后,采集心、肝、脾、肺、肾、脑等组织并拍照,利用 Image J 软件测量其面积。如图 3 所示,*Cln3*^{+/+} 和 *Cln3*^{+/-} 小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾



注:A:不同基因型小鼠3周龄时的外形特征;B:不同基因型小鼠3周龄时的体重;与 *Cln3*^{+/+}或 *Cln3*^{+/-}小鼠相比, ** *P* < 0.05。(下同)

图2 不同基因型小鼠3周龄时的外形特征及体重

Note. A. Physical features of different genotypes mice at 3 weeks. B. Body weight of different genotypes mice at 3 weeks. Compared with *Cln3*^{+/+} or *Cln3*^{+/-} mice, ** *P* < 0.05. (The same in the following figures)

Figure 2 Physical features and body weight of different genotypes mice at 3 weeks

等器官的投影面积差异不显著($P > 0.05$),但均显著大于 *Cln3*^{-/-}小鼠($P < 0.05$);脾变化最为明显,野生型和杂合子小鼠的脾平均面积为 53.6 mm² 和 50.1 mm²,而 *Cln3* 敲除的纯合子小鼠的脾面积只有 25.5 mm²,减少了将近 50%。此外,不同基因型小鼠脑组织的面积没有显著差异($P > 0.05$)。以上数据提示 *Cln3* 敲除会导致幼龄小鼠主要实质器官减小。

2.4 *Cln3* 敲除对小鼠实质器官微观结构的影响

Cln3^{-/-}小鼠生长缓慢,体型矮小,主要实质器官体积明显减小。HE 染色小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑组织切片,观察 *Cln3* 敲除对小鼠主要实质器官组织结构的影响。如图 4 所示,不同基因型小鼠心脏的心肌纤维呈柱状,卵圆形细胞核位于心肌细胞中央,没有发生明显变化;与 *Cln3*^{+/+}和 *Cln3*^{+/-}小鼠相比,*Cln3*^{-/-}小鼠单位面积上的心肌细胞数量明显增多提示 *Cln3*^{-/-}小鼠心肌细胞的体积变小。小鼠肝的 HE 染色切片显示:不同基因型小鼠的肝结构未发生明显改变,肝小叶结构正常,肝细胞核大而圆。敲除 *Cln3* 导致小鼠脾红髓和白髓的面积相对变小,脾结构组成未见明显变化。小鼠肺组织切片 HE 染色显示:与 *Cln3*^{+/+}、*Cln3*^{+/-}小鼠相比,*Cln3*^{-/-}小鼠的肺泡壁明显变薄,细胞数量减少。*Cln3*^{-/-}小鼠肾基本结构健全,肾小球血管球发育不全,即细胞聚集、毛细血管祥不明显。不同基因型小鼠的脑组织结构未见明显改变。

3 讨论

Cln3 广泛表达于哺乳动物的各种组织细胞

中,在细胞增殖、迁移、凋亡、分化、生殖、脑发育以及心血管疾病中等方面具有重要的作用^[11,18-22]。*Cln3* 基因编辑动物是探讨其功能、参与相关疾病发生发展机制的理性动物模型。黄雪莲等^[23]利用 *Cln3* 敲除小鼠研究匹伐他汀药物降脂作用的机制。Xiong 等^[24]利用基因编辑技术生产的小鼠在心肌细胞中特异性高表达 *Cln3*,为研究 *Cln3* 在心脏中的作用提供了理想的动物模型。利用基因编辑模式动物探讨 *Cln3* 基因的功能虽已被广泛报道,但 *Cln3* 基因敲除对小鼠实质器官的影响还未被系统阐述,尤其是幼龄小鼠。本实验采集了野生型、杂合子以及 *Cln3* 敲除的纯合子小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾和脑组织,系统分析 *Cln3* 基因敲除对幼龄小鼠实质器官大小和组织结构的影响。

本实验未使用成年小鼠,均使用 3 周龄的幼龄小鼠,可排除因分笼、饮食等外界因素干扰,进而更准确反映 *Cln3* 敲除对小鼠实质器官发育的影响。本实验发现 *Cln3* 敲除的纯合子小鼠在 3 周龄时的体重显著低于野生型和杂合子的体重,这与潘萌等^[1]所描述的一致。测量不同基因型小鼠实质器官的面积后发现,*Cln3*^{-/-}小鼠心、肝、脾、肺、肾的面积显著小于野生型和杂合子小鼠,提示 *Cln3*^{-/-}小鼠主要实质器官发育迟缓、体积小是小鼠体重明显降低的主要原因之一。不同基因型 3 周龄小鼠脑面积无显著差异,推测:脑作为动物最重要的器官,在动物器官未发育完全之前,机体会优先供应脑发育之需。总之,本研究发现 *Cln3* 基因敲除小鼠的实质器官显著减小。

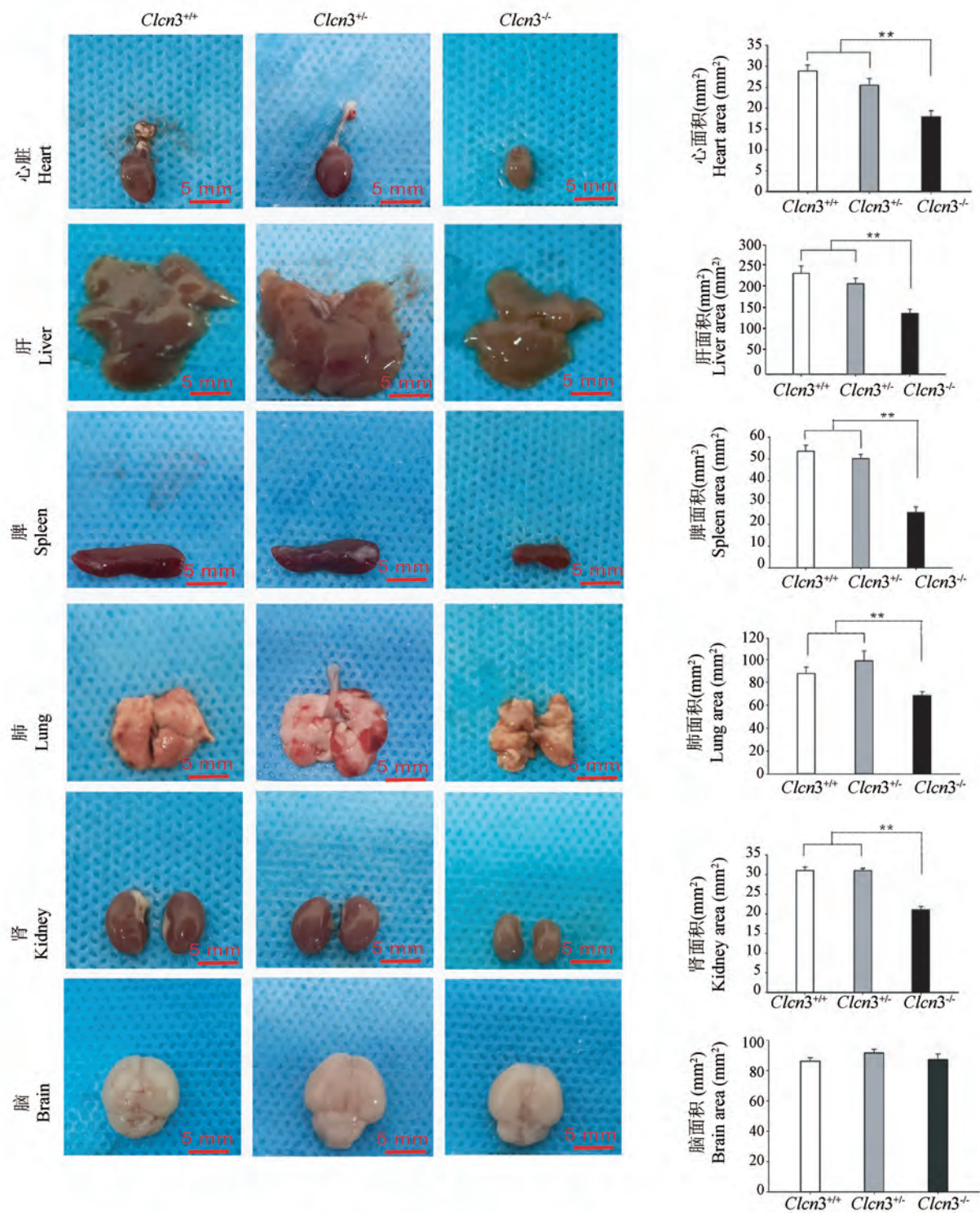


图3 不同基因型小鼠3周龄时的实质器官面积

Figure 3 Parenchymal organs area of different genotypes mice at 3 weeks

利用器官组织切片 HE 染色,我们进一步观察了 *Clcn3* 敲除对小鼠主要实质器官组织结构的影响。HE 染色结果提示 *Clcn3* 基因敲除未影响小鼠心脏的结构,可导致心肌细胞变小; *Clcn3* 敲除未

影响小鼠脾和肾的结构组成,但明显减小了小鼠脾红髓和白髓的体积以及肾毛细血管球的体积; *Clcn3*^{-/-} 小鼠肺泡壁明显变薄,细胞数量减少; *Clcn3*^{-/-} 小鼠肝和脑组织结构未见明显改变,而

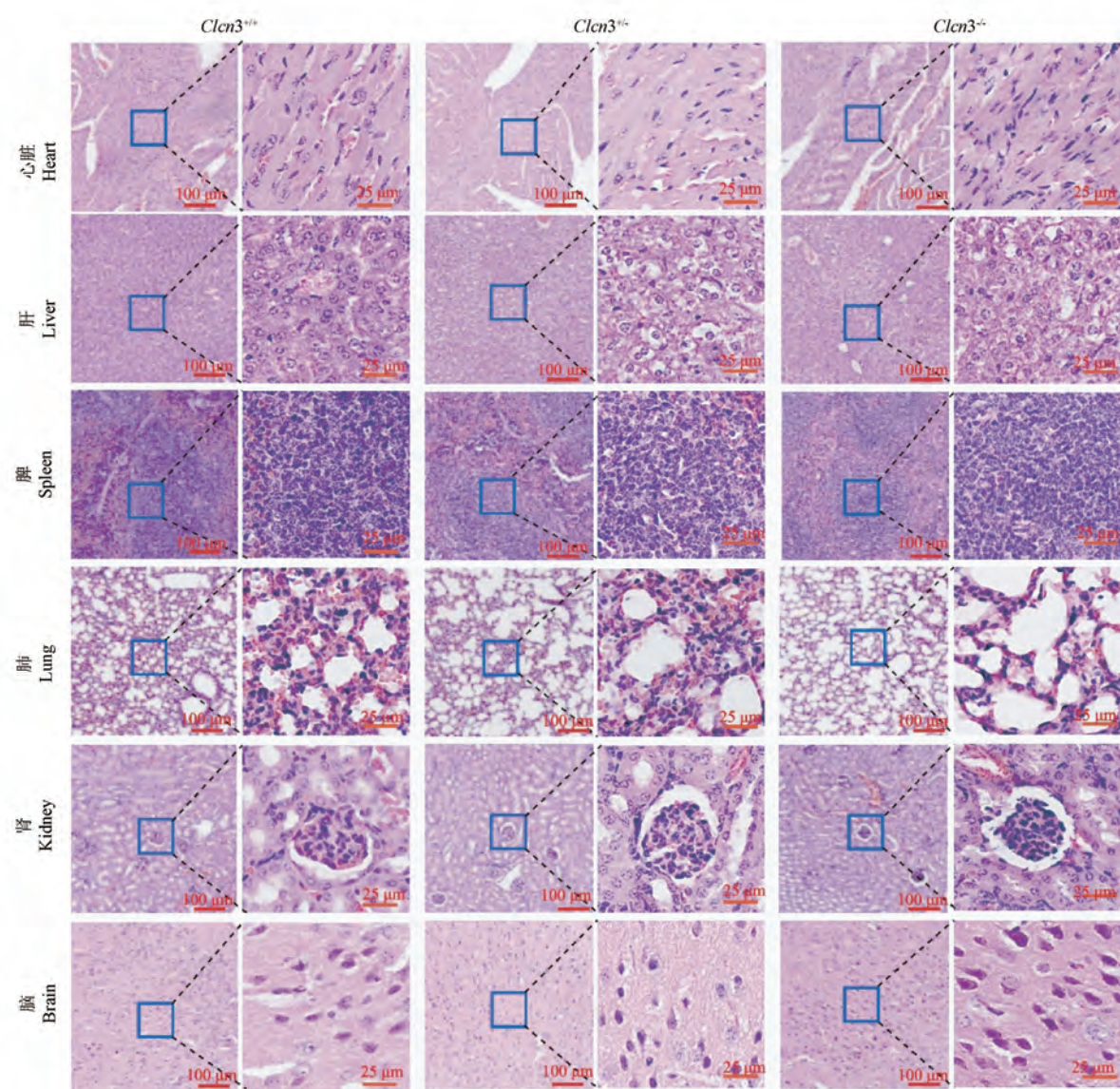


图 4 不同基因型小鼠实质器官的 HE 染色
Figure 4 Parenchymal organs HE staining of mice

Stobrawa 等^[22]发现干扰 *Clcn3* 表达会导致小鼠的海马区在 7 月龄时消失,而本实验的脑组织 HE 切片显示 3 周龄小鼠的脑组织结构并没有产生明显改变,这提示我们 *Clcn3* 敲除导致小鼠海马区丢失可能是一个渐进的过程。综上所述,敲除 *Clcn3* 不会造成小鼠实质器官结构组成改变,但会导致小鼠实质器官的结构或细胞体积减小,这是导致 *Clcn3* 敲除小鼠实质器官面积和体重显著降低的主要原因之一。*Clcn3* 通过何种机制影响细胞生长、延缓器官发育,有待运用高通量测序、翻译后修饰、基因组、蛋白组学等多种技术手段更加深入地探讨研究。

基因修饰动物在生物医学领域的应用十分广

泛,例如发病机制探究,药物筛选等^[25]。本实验探究了 *Clcn3* 敲除对小鼠实质器官的影响,发现敲除 *Clcn3* 会导致幼龄小鼠的实质器官减小,但未对幼龄小鼠实质器官产生明显的病理损伤,可以为相关实验研究提供理论参考。

4 结论

Clcn3 基因敲除会降低幼龄小鼠体重和实质器官的大小,但未对幼龄小鼠实质器官产生明显的病理损伤。

参 考 文 献 (References)

[1] 潘萌,张燕丽,何惠明,等. 电压门控氯通道 3 (CLIC-3) 的生物学作用及其与疾病的关系[J]. 医学分子生物学杂志,

- 2014, 5: 274–277.
- Pang M, Zhang YL, He HM, et al. The biological role of voltage-gated chloride channel 3 (ClC-3) and its relationship with disease [J]. J Med Mol Biol, 2014, 5: 274–277.
- [2] Hermoso M, Satterwhite CM, Andrade YN, et al. ClC-3 is a fundamental molecular component of volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channels and volume regulation in HeLa cells and *Xenopus laevis* oocytes [J]. J Biol Chem, 2002, 277(42): 40066–40074.
- [3] Duan D, Winter C, Cowley S, et al. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel [J]. Nature, 1997, 390(6658): 417–421.
- [4] 叶东, 张海峰, 朱林燕, 等. ClC-3 siRNA 抑制鼻咽癌细胞调节性容积回缩 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(2): 216–220.
- Ye D, Zhang HF, Zhu LY, et al. ClC-3 siRNA inhibits the regulated volume shrinkage of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J South Med Univ, 2011, 31(2): 216–220.
- [5] Hara-Chikuma M, Yang B, Sonawane ND, et al. ClC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation [J]. J Biol Chem, 2005, 280(2): 1241–1247.
- [6] Zhou FM, Huang YY, Tian T, et al. Knockdown of chloride channel-3 inhibits breast cancer growth *in vitro* and *in vivo* [J]. J Breast Cancer, 2018, 21(2): 103–111.
- [7] Zhang HF, Zhu LY, Zuo WH, et al. The ClC-3 chloride channel protein is a downstream target of cyclin D1 in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(3): 672–683.
- [8] Cuddapah VA, Habela CW, Watkins S, et al. Kinase activation of ClC-3 accelerates cytoplasmic condensation during mitotic cell rounding [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2012, 302(3): C527–538.
- [9] Habela CW, Olsen ML, Sontheimer H. ClC3 is a critical regulator of the cell cycle in normal and malignant glial cells [J]. J Neurosci, 2008, 28(37): 9205–9217.
- [10] Ganapathi SB, Wei SG, Zaremba A, et al. Functional regulation of ClC-3 in the migration of vascular smooth muscle cells [J]. Hypertension, 2013, 61(1): 174–179.
- [11] Guan YY, Wang GL, Zhou JG. The ClC-3 Cl⁻ channel in cell volume regulation, proliferation and apoptosis in vascular smooth muscle cells [J]. Trends Pharmacol Sci, 2006, 27(6): 290–296.
- [12] Zhang HN, Zhou JG, Qiu QY, et al. ClC-3 chloride channel prevents apoptosis induced by thapsigargin in PC12 cells [J]. Apoptosis, 2006, 11(3): 327–336.
- [13] Chen Q, Liu XQ, Luo ZS, et al. Chloride channel-3 mediates multidrug resistance of cancer by upregulating P-glycoprotein expression [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 6611–6623.
- [14] Hong S, Bi MM, Wang L, et al. ClC-3 channels in cancer [J]. Oncol Rep, 2015, 33(2): 507–514.
- [15] Wang GL, Qian Y, Qiu QY, et al. Interaction between Cl⁻ channels and CRAC-related Ca²⁺ signaling during T lymphocyte activation and proliferation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(4): 437–446.
- [16] Huang LY, He Q, Liang SJ, et al. ClC-3 chloride channel/antiporter defect contributes to inflammatory bowel disease in humans and mice [J]. Gut, 2014, 63(10): 1587–1595.
- [17] Dickerson LW, Bonthius DJ, Schutte BC, et al. Altered GABAergic function accompanies hippocampal degeneration in mice lacking ClC-3 voltage-gated chloride channels [J]. Brain Res, 2002, 958(2): 227–250.
- [18] Liu SW, Li Y, Zou LL, et al. Chloride channels are involved in sperm motility and are downregulated in spermatozoa from patients with asthenozoospermia [J]. Asian J Androl, 2017, 19(4): 418–424.
- [19] Tao J, Liu CZ, Yang J, et al. ClC-3 deficiency prevents atherosclerotic lesion development in ApoE^{-/-} mice [J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 87: 237–247.
- [20] Mao JW, Chen LX, Xu B, et al. Suppression of ClC-3 channel expression reduces migration of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(9): 1706–1716.
- [21] Xu B, Mao JW, Wang LW, et al. ClC-3 chloride channels are essential for cell proliferation and cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2010, 42(6): 370–380.
- [22] Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, et al. Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus [J]. Neuron, 2001, 29(1): 185–196.
- [23] 黄雪莲, 黄运英, 任竹潇, 等. 匹伐他汀通过影响脂肪 ClC-3 氯通道介导其降脂作用和改善胰岛素抵抗 [J]. 中国医师杂志, 2014, 16(10): 1309–1314.
- Huang XL, Huang YY, Ren ZX, et al. Pitavastatin improves antilipemic effect and insulin resistance by regulating chloride channel protein 3 chloride channel of adipose tissue [J]. J Chin Phys, 2014, 16(10): 1309–1314.
- [24] Xiong D, Wang GX, Burkin DJ, et al. Cardiac-specific overexpression of the human short ClC-3 chloride channel isoform in mice [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009, 36(4): 386–393.
- [25] 樊林花, 刘茂林, 刘田福. 人类疾病基因工程动物模型的研究与应用 [J]. 医学综述, 2009, 15(7): 1009–1012.
- Fan LH, Liu ML, Liu TF. Research and application of genetically engineered animal models of human diseases [J]. Med Recapitulate, 2009, 15(7): 1009–1012.

王晓萌,周慧敏,董奕彤,等. 肌肉特异性表达 Cas9 示踪同源打靶载体的构建及其在 C2C12 细胞中的整合 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 333-342.

Wang XM, Zhou HM, Dong YT, et al. Establishment of C2C12 cells with integration of a muscle-specific Cas9-tracking expression vector [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 333-342.

Doi:10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2022. 03. 005

肌肉特异性表达 Cas9 示踪同源打靶载体的构建及其在 C2C12 细胞中的整合

王晓萌¹,周慧敏¹,董奕彤¹,陈胜男¹,安铁洙¹,殷萍²,王春生^{1*}

(1. 东北林业大学生命科学学院,哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省医院,哈尔滨 150040)

【摘要】 目的 本研究拟构建肌肉特异表达 Cas9 示踪同源打靶载体,为成肌细胞分化研究及肌肉特异表达 Cas9 小鼠模型制作奠定基础。**方法** 人工合成肌肉特异启动子 SP,替换 PX459 载体中的 CMV 启动子,构建肌肉特异表达 Cas9 载体;载体在 C2C12 细胞中的编辑效率由 *Xba*I 和 T7E1 酶切检测;在此基础上通过同源重组引入 DsRed 红色荧光蛋白构建 Cas9 示踪载体;将示踪载体的 SP-Cas9-DsRed 部分连接至 *Rosa*26 位点左右同源臂之间,构建肌肉特异表达 Cas9 示踪重组载体;将该载体与 PX459-*Rosa*26 共转染至 C2C12 细胞并进行嘌呤霉素筛选,观察荧光的表达,同时,提取细胞 DNA 进行 PCR 鉴定和测序,检测载体在 C2C12 细胞中的整合情况。**结果** 酶切鉴定以及对目的片段的测序结果表明,成功构建了肌肉特异表达 Cas9 载体 PX459-*Rosa*26-SP 和肌肉特异同源打靶示踪载体 Donor-Cas9-SP-DsRed;*Xba*I 和 T7E1 酶切实验表明,PX459-*Rosa*26-SP 在 C2C12 细胞中具有较高的编辑效率;转染后的 C2C12 细胞出现红色荧光,表明 Donor-Cas9-SP-DsRed 具有表达活性且在肌肉细胞中特异表达;PCR 鉴定和测序结果表明,Donor-Cas9-SP-DsRed 在 C2C12 细胞 *Rosa*26 位点成功整合。**结论** 成功构建了肌肉特异表达 Cas9 示踪同源打靶载体 Donor-Cas9-SP-DsRed,在为肌肉特异表达 Cas9 小鼠模型制备提供载体基础的同时,也为肌肉相关基因疾病的研究与基因治疗提供了新的思路。

【关键词】 SP 启动子;肌肉特异表达;CRISPR/Cas9;*Rosa*26;C2C12

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0333-10

Establishment of C2C12 cells with integration of a muscle-specific Cas9-tracking expression vector

WANG Xiaomeng¹, ZHOU Huimin¹, DONG Yitong¹, CHEN Shengnan¹, AN Tiezhu¹, YIN Ping², WANG Chunsheng^{1*}

(1. Laboratory of Developmental Biology, College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China.
2. Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150040)

Corresponding author: WANG Chunsheng. E-mail: wangchunsheng79@nefu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct a muscle-specific Cas9-tracking expression vector to examine myoblast differentiation and establish a muscle-specific Cas9-expressing mouse model. **Methods** The muscle-specific promoter SP was synthesized to replace the CMV promoter in the PX459 vector. The editing efficiency of the recombinant vector in C2C12 cells was assessed by *Xba*I and T7E1 digestion. A DsRed fluorescent reporter protein was linked through homologous recombination to construct a muscle-specific Cas9-tracking expression vector (PX459-*Rosa*26-SP-DsRed). The

【基金项目】国家自然科学基金资助项目(82001113),中央高校基本科研业务费专项 B 类项目资金资助(2572019BD02)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China (82001113), Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (2572019BD02).

【作者简介】王晓萌(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:动物转基因技术。Email:wangxiaom1027@163.com

【通信作者】王春生(1979—),男,副教授,博士,研究方向:动物多能干细胞及其应用。Email:wangchunsheng79@nefu.edu.cn

SP-Cas9-DsRed fragment was connected between the left and right homologous arms of the Rosa26 site to construct a muscle-specific Cas9-tracking expression recombinant vector. The vector was cotransfected with PX459-Rosa26 into C2C12 cells that were selected by puromycin and fluorescence was observed. DNA was extracted for PCR and sequencing to detect integration of the vector in C2C12 cells. **Results** Enzyme digestion and sequencing showed that PX459-Rosa26-SP and Donor-Cas9-SP-DsRed were constructed successfully. Enzyme digestion showed that the editing efficiency of PX459-Rosa26-SP was 18.38%. The transfected C2C12 cells emitted red fluorescence, indicating that Donor-Cas9-SP-DsRed was specifically expressed in muscle cells. PCR and sequencing showed that Donor-Cas9-SP-DsRed was successfully integrated at the Rosa26 site in C2C12 cells. **Conclusions** A muscle-specific Cas9-tracking expression vector was constructed successfully, which provides the basis to prepare a muscle-specific Cas9-expressing mouse model and new research ideas for gene therapy of muscle-related genetic diseases.

[Keywords] SP promoter; muscle-specific expression; CRISPR/Cas9; Rosa26; C2C12

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

外源基因的组织特异性表达在研究基因功能、细胞分化以及再生医学等领域具有广泛的应用前景。组织特异性启动子是调控基因表达的“开关”，可实现外源基因在某些部位进行特异表达^[1]。骨骼肌具有生命周期长，操作方便，合成的蛋白容易进入体循环的特点^[2-4]，是基因治疗及动物模型构建的理想靶点，但肌肉特异载体的低表达水平限制了肌肉作为靶点的可能性。因此，选择高转录效力的肌肉特异启动子尤为重要。 α -actin 是一种天然的骨骼肌启动子，可在骨骼肌细胞中特异表达，而在其他非肌肉细胞中几乎没有活性^[5]，但是由于受多种因素的影响， α -actin 的转录活性不稳定^[6]。1999 年，Li 等^[7]在对 α -actin 启动子和肌肉增强子的结构进行分析后，对肌肉特异性调控元件进行了重排与组装，合成包含 MEF-1、MEF-2、SRE 和 TEF-1 四种作用元件的肌肉特异启动子 SP，其转录活性是 α -actin 的 4 ~ 5 倍。2021 年，Malerba 等^[8]将 SP 启动子调控的抗肌萎缩蛋白 MD1 腺病毒载体注射到肌萎缩小鼠模型中，SP 启动子驱动了 MD1 在小鼠心肌中的高水平表达。

CRISPR/Cas 系统是细菌和古细菌抵御外来遗传物质的一种获得性免疫防御机制^[9]，包括能识别靶基因的 CRISPR 序列和具有核酸酶活性的相关蛋白两个部分。研究最为深入的 CRISPR/Cas9 系统已被广泛运用于转基因动物的构建^[10-13]。在该系统中，sgRNA (single guide RNA) 中存在一段与靶点 PAM 序列 (NGG) 上游互补的序列，可引导 Cas9 结合至靶位点，对靶 DNA 的 PAM 序列上游 3 个碱基的位置进行切割使其双链断裂 (DSB)^[14]。双链断裂的修复通过非同源末端连接 (NHEJ) 或同源定向修复 (HDR) 两种机制来实现。因此，利用 CRISPR/Cas9 系统，并提供外源基因同源载体作为 HDR 的

“原料”，即可实现外源基因的定点敲入。

利用 CRISPR/Cas9 系统和组织特异启动子，可进行组织特异的基因编辑。为构建肌肉特异表达 Cas9 小鼠模型，本研究选取小鼠 Rosa26 位点作为靶位点，构建 SP 启动子驱动的肌肉特异性表达 Cas9 示踪同源靶载体。同时，这一研究也为构建疾病模型和基因疾病的相关治疗提供了新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株、载体和细胞

感受态细胞 DH5 α (Cat# DL1001) 购于上海唯地生物技术有限公司。PX459-Rosa26 载体为实验室自存载体 (载体上已连接 Rosa26 位点的 sgRNA)。Rosa26 供体载体购于广州易锦生物技术有限公司 (Cat# DC-DON-SH02)。载体详细信息见图 1。C2C12 细胞和 293T 细胞为实验室前期冻存细胞。

1.1.2 主要试剂与仪器

2 $\times$ Vazyme LAMP Master Mix (Vazyme, P312-01), 2 $\times$ ES Taq Master Mix (CW BIO, CW0690), Endo-free Plasmid Mini Kit II (Omega, D6950-01), Gel Extraction Kit (CW BIO, CW2302M), Lipfectamine 2000 (Invitrogen, 11668030), GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo, K0721), T4 DNA Ligase (TAKARA, 2011A), T7 Endonuclease I 酶 (NEB, E3321), 同源重组酶 (Vazyme, C112-01), 限制性内切酶 *Kpn*I (Promega, R6341), *Age*I (Promega, R7251), *Xba*I (Promega, R6181), *Eco*RI (Promega, R6011), *Mlu*I (Promega, R6381), *Bst*BI (Thermo, ER0121)。

PCR 仪 (Applied Biosystems, 9700, 美国), 分光

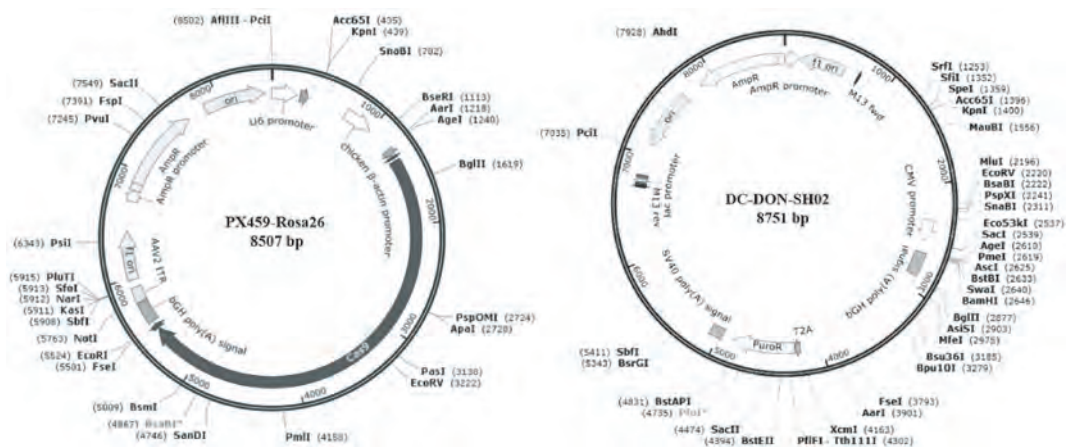


图 1 载体示意图
Figure 1 Diagram of plasmid

光度计(Thermo, NanoDrop 2000, 美国), 倒置荧光显微镜(Carl Zeiss, Axiovert 200, 德国), CCD 成像系统(Nikon, DS-Fi1, 日本), 离心机(Beckman Coulter, Microfuge 16, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 肌肉特异性表达 Cas9 载体的构建

(1)SP 启动子的合成与 PCR 扩增:SP 序列参照 Li 等^[7]的报道,由南京金斯瑞生物科技公司合成后连接于 pUC57 载体,测序正确的载体命名为 pUC57-SP。利用 Primer 5 软件设计 SP 启动子上下游引物并命名为 SP-F 和 SP-R(引物序列见表 1),在上下游引物的 5' 端分别引入 *KpnI* 和 *AgeI* 的酶切位点,引物交由哈尔滨睿博兴科生物技术有限公司合成(本研究所用引物均由该公司合成)。以载体 pUC57-SP 为模板,进行 SP 启动子的 PCR 扩增。反应组成:模板 10 ng, SP-F 1 μ L, SP-R 1 μ L, 2 $\times$ ES Taq Master Mix 12.5 μ L, 补加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 5 min(预变性);95 $^{\circ}$ C 30 s(变性),62 $^{\circ}$ C 30 s(退火),72 $^{\circ}$ C 90 s(延伸),共 31 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min(终延伸)。1% 琼脂糖凝胶电泳检测后对目的条带进行胶回收。

(2)PX459-Rosa26-SP 的连接:PX459-Rosa26 为连有打靶 Rosa26 位点 sgRNA 的 PX459 载体。采用 *KpnI* 和 *AgeI* 分别对 SP 启动子扩增片段与 PX459-Rosa26 载体双酶切,电泳检测后对目的条带进行胶回收。将上述获得的载体长片段和 SP 启动子进行连接,反应组成:SP 回收产物 40 ng, PX459-Rosa26 回收产物 100 ng, T4 DNA 连接酶 0.5 μ L, 10 $\times$ Buffer 1 μ L, 补加 ddH₂O 至 10 μ L。连接条件为 4 $^{\circ}$ C 16 h。连接产物使用感受态细胞 DH5 α 进行

转化,挑取单个菌落进行培养,按照质粒小提试剂盒说明书对菌液进行提取,所得质粒经 *KpnI* 和 *AgeI* 酶切鉴定后送至哈尔滨睿博兴科生物技术有限公司测序(本研究所有测序均由该公司完成)。

1.2.2 PX459-Rosa26-SP 在 C2C12 细胞中编辑活性检测

(1)细胞转染与 DNA 的提取:C2C12 细胞培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度。传代后,待细胞融合度达到 60% ~ 70%,使用 Lipfectamine 2000 转染试剂转染 PX459-Rosa26 或 PX459-Rosa26-SP 载体,未转染的 C2C12 细胞作为对照组。转染 72 h 后,提取 C2C12 细胞 DNA。

(2)打靶位点的 PCR 扩增:*Rosa26* 序列中, *XbaI* 酶切位点为 PX459-Rosa26-SP 打靶位点,利用 Primer 5 软件在 *XbaI* 酶切位点左右为 207 bp 和 398 bp 处设计引物并命名为 mRosa26-*XbaI*-F1 和 mRosa26-*XbaI*-R1(引物序列见表 1),扩增产物理论值为 600 bp。对 C2C12 DNA 进行 PCR 扩增,电泳检测后对目的条带进行胶回收。

(3)编辑效率检测:采用两种方法检测 SP 启动子和 CMV 启动子带动 Cas9 蛋白的编辑效率。对 PCR 产物进行限制性内切酶 *XbaI* 酶切检测。反应组成:*XbaI* 0.5 μ L, PCR 胶回收产物 200 ng, 10 $\times$ FD Buffer 1 μ L, 补加 ddH₂O 至 10 μ L。酶切条件为 37 $^{\circ}$ C 1 h。2% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切情况。

对 PCR 产物进行 T7E1 酶切检测。PCR 产物退火杂交,反应组成:PCR 产物 200 ng, 10 $\times$ NEBuffer2 2 μ L, 补加 Nuclease-free Water 至 19 μ L。退火杂交条件:95 $^{\circ}$ C 5 min(预变性);95 ~ 85 $^{\circ}$ C, -2 $^{\circ}$ C/s;85 ~ 25 $^{\circ}$ C, -0.1 $^{\circ}$ C/s(条件降温)。杂交后

的产物经 T7E1 酶切鉴定。反应组成:退火反应产物 19 μL , T7E1 1 μL 。酶切条件为 37℃ 水浴 15 min 后加入 0.25 mol/L 的 EDTA 1.5 μL 终止反应。2% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切情况。

1.2.3 PX459-Rosa26-SP-DsRed 示踪载体的构建

(1) T2A-DsRed 片段的 PCR 扩增:根据实验室保存的含有 T2A-DsRed 的载体序列,利用 Primer 5 软件设计 T2A-DsRed 上下游引物并命名为 T2A-DsRed-F 和 T2A-DsRed-R,引物 5' 端引入同源臂(引物序列见表 1)。通过 PCR 进行 T2A-DsRed 的扩增。反应组成:T2A-DsRed-F 1 μL , T2A-DsRed-R 1 μL ,模板 10 ng, 2 $\times$ ES Taq Master Mix 12.5 μL ,补加 ddH₂O 至 25 μL 。反应程序:95℃ 5 min(预变性);95℃ 30 s(变性),62℃ 30 s(退火),72℃ 45 s(延伸),共 32 个循环;72℃ 7 min(终延伸)。电泳检测后对目的条带进行胶回收。

(2) PX459-Rosa26-SP-DsRed 的连接:将得到的 T2A-DsRed 片段与经 *EcoRI* 酶切后的 PX459-Rosa26-SP 载体进行同源重组。反应组成:T2A-DsRed 片段 20 ng, PX459-Rosa26-SP 载体大片段 80 ng, Exnase II 1 μL , 5 $\times$ CE II Buffer 2 μL ,补加 ddH₂O 至 10 μL 。同源重组条件为 37℃ 30 min,立即至于冰上冷却。同源重组产物使用感受态细胞 DH5 α 进行转化,提取质粒后测序。

1.2.4 PX459-Rosa26-SP-DsRed 示踪载体的检测

按 1.2.2 中的条件和方法对 C2C12 细胞进行培养和 PX459-Rosa26-SP-DsRed 载体的转染,设置未转染的 C2C12 细胞作为对照组。48 h 后,观察荧光表达情况。

1.2.5 肌肉特异表达 Cas9 同源打靶示踪载体的构建

(1) SP-Cas9-DsRed 的扩增:利用 Primer 5 软件根据 PX459-Rosa26-SP-DsRed 载体 SP 启动子的上游和 DsRed 下游设计引物,将 Donor 载体 *MluI* 与 *BstBI* 酶切位点对应的同源臂分别引入上下游引物,并命名为 T-MluI-SP-F 和 T-BstBI-R(引物序列见表 1)。以 PX459-Rosa26-SP-DsRed 为模板,PCR 扩增。反应组成:T-MluI-SP-F 1 μL , T-BstBI-R 1 μL ,载体 10 ng, 2 $\times$ Vazyme LAMP Master Mix 12.5 μL ,补加 ddH₂O 至 25 μL 。PCR 反应程序:98℃ 2 min(预变性);98℃ 30 s(变性),65℃ 30 s(退火),72℃ 5 min(延伸),共 30 个循环;72℃ 7 min(终延伸)。电泳检测后对目的条带进行胶回收。

(2) 同源臂载体 Donor 的酶切:利用 *MluI* 和 *BstBI* 对 DC-DON-SH02 Rosa26 供体载体进行大量双酶切,电泳检测后对大片段进行胶回收。

(3) Donor-Cas9-SP-DsRed 示踪载体的连接:将得到的 SP-Cas9-DsRed 片段与 Donor 载体大片段进行同源重组。反应组成:SP-Cas9-DsRed 片段 40 ng, Donor 载体大片段 50 ng, Exnase II 1 μL , 5 $\times$ CE II Buffer 2 μL ,补加 ddH₂O 至 10 μL 。同源重组条件为 37℃ 30 min,立即至于冰上冷却。同源重组产物使用感受态细胞 DH5 α 进行转化,提取质粒,所得质粒经 *MluI* 和 *BstBI* 酶切鉴定后测序。

1.2.6 Donor-Cas9-SP-DsRed 示踪载体在 C2C12 细胞中整合情况的检测

(1) 细胞转染及荧光观察:按 1.2.2 中的条件和方法对 C2C12 细胞进行培养以及 PX459-Rosa26 载体与 Donor-SP-Cas9-DsRed 的共转染。48 h 后,对荧光表达情况进行观察。

(2) 同源打靶载体整合情况的 PCR 鉴定:转染 48 h 后加入 Puro 筛选 7 d,提取细胞 DNA。利用

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primers	序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
SP-F	GGTACCCACCATTCCTCAGCACACCC
SP-R	ACCGGTCTGCAGAGGCCTGCATGCAA
mRosa26-XbaI-F1	CCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATCAGT
mRosa26-XbaI-R1	GGAGCGGGAGAAATGGATATGAAG
T2A-DsRed-F	CAAAAAAGAAAAAGGAATTCGGCAGTGGAGAGGGCAGA
T2A-DsRed-R	GCGAGCTCTAGTTAGTTCGAATTACTGGGAGCCGAGTGGCG
T-MluI-SP-F	CTCCAGTCTTTCTAGACGCGTCGTTACATAACTTACGGTAAATGGC
T-BstBI-R	GGGATCCGATTTAAAGCGCAATCGAGGCTGATCAGCGAGC
5'-Rosa26-F	AGGGAGCGGAAAACTCTCCA
5'-SP-R	CCGTCGTCCACAACCCACTC
3'-Poly(A)-F	GACCGTGTACAAGGCCAAGA
3'-Poly(A)-R	TCAAGCCAGTCCAAGAGAAAGCA

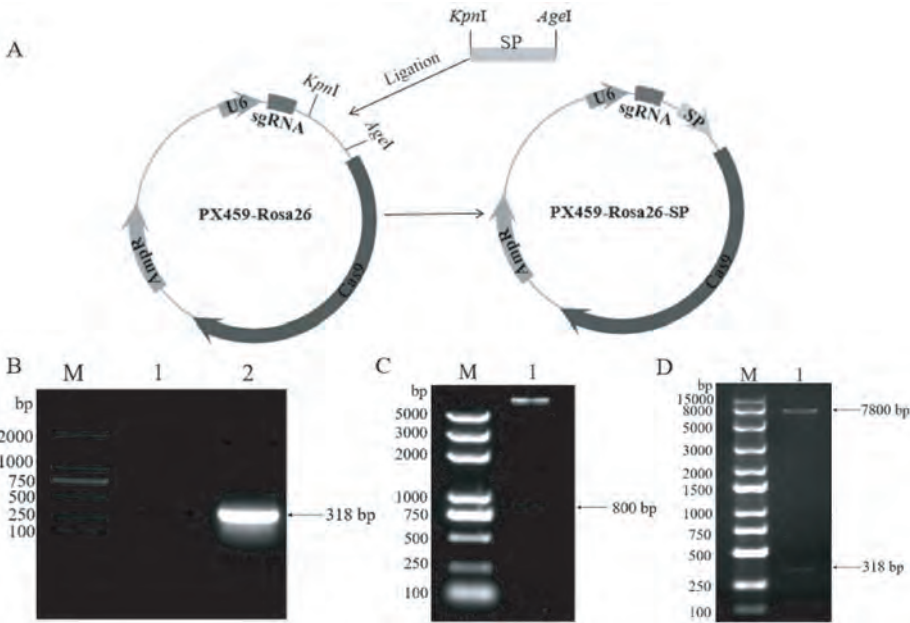
Primer 5 软件设计两对鉴定引物并命名为 5'-Rosa26-F, 5'-SP-R 和 3'-Poly(A)-F, 3'-Poly(A)-R (引物序列见表 1)。对 C2C12 细胞 DNA 进行 PCR 扩增。反应组成: 上下游引物各 1 μL, 2×Vazyme LAMP Master Mix 12.5 μL, C2C12 细胞 DNA 10 ng, 补加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 反应程序: 98℃ 2 min (预变性); 98℃ 30 s (变性), 62℃ 30 s (退火), 72℃ 5 min (终延伸), 共 30 个循环; 72℃ 7 min (终延伸)。电泳检测后对目的条带进行胶回收和测序。

2 结果

2.1 肌肉特异性表达 Cas9 载体 PX459-Rosa26-SP 的构建

PX459-Rosa26 为实验室前期构建的载体, 该载

体上已连有打靶 Rosa26 位点 sgRNA, 因此, 选用 PX459-Rosa26 作为骨架进行改造(图 2A)。使用含有限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Age*I 酶切位点的引物 SP-F 和 SP-R 对 PUC57-SP 载体进行 SP 启动子的扩增。电泳结果显示, 在约 300 bp 处观察到与理论值相符的特异性条带(图 2B), 即 SP 启动子扩增成功。用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Age*I 分别对 SP 启动子片段和载体 PX459-Rosa26 进行酶切, 如图 2C 所示, 在约 800 bp 处出现 PX459-Rosa26 载体小片段, 回收 SP 启动子目的片段及载体大片段并进行连接。对重组质粒进行 *Kpn*I 和 *Age*I 双酶切鉴定, 结果显示, 在约 7800 bp 和 300 bp 处出现目的条带(图 2D), 与理论值相符。重组质粒进行测序鉴定, 目的片段未发生突变, 该重组质粒命名为 PX459-Rosa26-SP。



注: A: PX459-Rosa26-SP 载体构建示意图; B: SP 启动子 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图; M: DL-2000 Marker, 1: 阴性对照, 2: PCR 产物; C: SP 启动子酶切产物琼脂糖凝胶电泳图; M: DL-5000 Marker, 1: 酶切产物; D: PX459-Rosa26-SP 酶切产物琼脂糖凝胶电泳图; M: 250 bp DNA Ladder, 1: 酶切产物。

图 2 PX459-Rosa26-SP 载体的构建

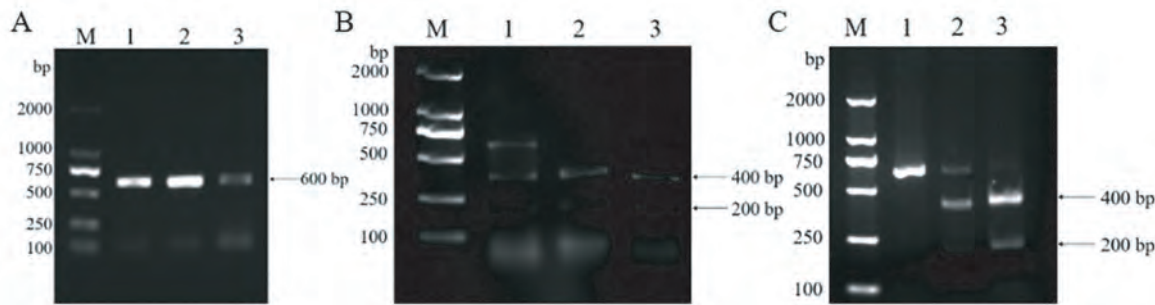
Note. A. The diagram of PX459-Rosa26-SP construction. B. Results of agarose gel electrophoresis of SP promoter PCR product. M. DL-2000 Marker. 1. Control. 2. PCR product. C. Results of agarose gel electrophoresis of SP promoter enzyme digestion product. M. DL-5000 Marker. 1. Enzyme digestion product. D. Results of agarose gel electrophoresis of PX459-Rosa26-SP enzyme digestion product. M. 250 bp DNA Ladder. 1. Enzyme digestion product.

Figure 2 Construction of PX459-Rosa26-SP vector

2.2 肌肉特异性表达 Cas9 载体 PX459-Rosa26-SP 编辑效率的检测

将 pAcGFP1-N1 载体, PX459-Rosa26 载体, PX459-Rosa26-SP 载体分别转染 C2C12 细胞, 同时设置一组未转染载体的 C2C12 细胞为阴性对照。48 h 后, 转染了 GFP 载体的 C2C12 细胞观察到绿色荧光表达, 表明外

源质粒已经转染至 C2C12 细胞。转染 72 h 后, 分别提取转染 PX459-Rosa26 载体, PX459-Rosa26-SP 载体和未转染的 3 组细胞的 DNA。使用引物 mRosa26-XbaI-F1 和 mRosa26-XbaI-R1 分别对 3 组细胞的 DNA 进行扩增。如图 3A 所示, 在约 600 bp 处出现目的条带。PCR 产物进行 *Xba*I 酶切后, 理论上会被切为 200 bp 与

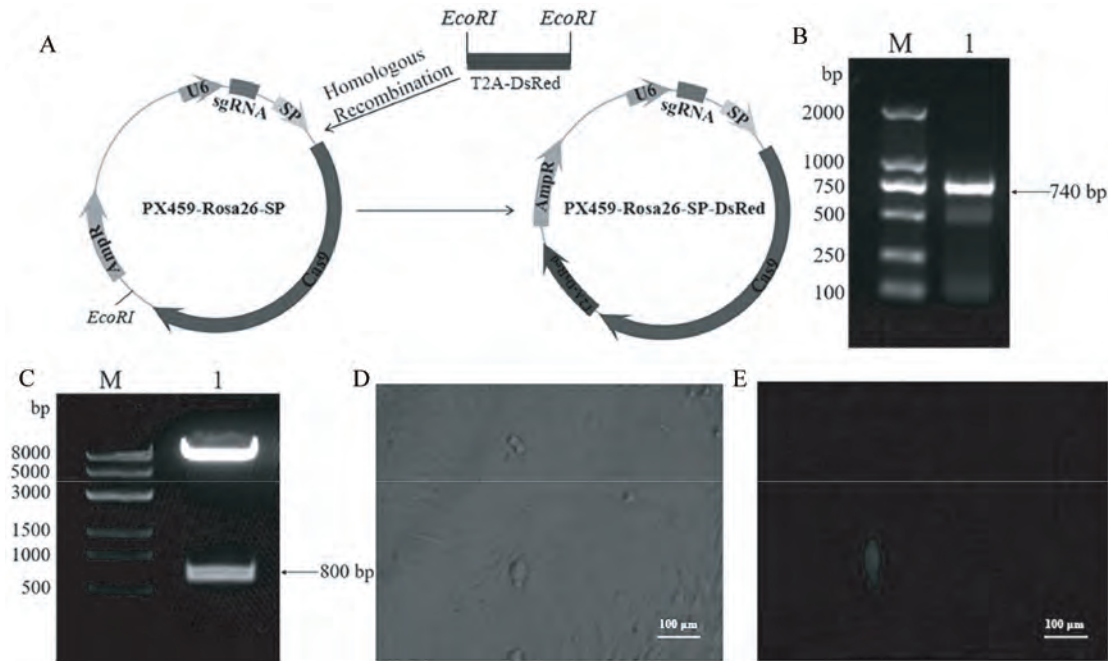


注:A:C2C12 细胞 DNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图,M:DL-2000 Marker,1:转染 PX459-Rosa26-SP 后细胞 DNA PCR 产物,2:转染 PX459-Rosa26 后细胞 DNA PCR 产物,3:未转染的细胞 DNA PCR 产物;B:Xba I 酶切产物琼脂糖凝胶电泳图,M:DL-2000 Marker,1:转染 PX459-Rosa26-SP 的细胞,2:未转染的细胞,3:转染 PX459-Rosa26 的细胞;C:T7E1 酶切产物琼脂糖凝胶电泳图,M:DL-2000 Marker,1:未转染的细胞酶切产物,2:转染 PX459-Rosa26-SP 的细胞酶切产物,3:转染 PX459-Rosa26 的细胞酶切产物。

图 3 PX459-Rosa26-SP 编辑效率检测

Note. A. Results of agarose gel electrophoresis of C2C12 cell DNA PCR products. M. DL-2000 Marker. 1. PCR product of cells transfected with PX459-Rosa26-SP. 2. PCR product of cells transfected with PX459-Rosa26. 3. PCR product of cells without transfected. B. Results of agarose gel electrophoresis of Xba I digestion product. M. DL-2000 Marker. 1. Digestion product of cells transfected with PX459-Rosa26-SP. 2. Digestion product of cells without transfected. 3. Digestion product of cells transfected with PX459-Rosa26. C. Results of agarose gel electrophoresis of T7E1 digestion product. M. DL-2000 Marker. 1. Digestion product of cells without transfected. 2. Digestion product of cells transfected with PX459-Rosa26-SP. 3. Digestion product of cells transfected with PX459-Rosa26.

Figure 3 Editing efficiency detection of PX459-Rosa26-SP



注:A:PX459-Rosa26-SP-DsRed 载体构建示意图;B:T2A-DsRed PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图,M:DL-2000 Marker,1:PCR 产物;C:PX459-Rosa26-SP 酶切产物琼脂糖凝胶电泳图,M:Trans8K DNA Marker,1:酶切产物;D:转染 PX459-Rosa26-SP-DsRed 后的 C2C12 细胞(亮视野);E:转染 PX459-Rosa26-SP-DsRed 后的 C2C12 细胞(激发光视野)。

图 4 PX459-Rosa26-SP-DsRed 构建及表达活性分析

Note. A. The diagram of PX459-Rosa26-SP-DsRed construction. B. Results of agarose gel electrophoresis of T2A-DsRed PCR product. M. DL-2000 Marker. 1. PCR product. C. Results of agarose gel electrophoresis of PX459-Rosa26-SP digestion product. M. Trans8K DNA Marker. 1. Enzyme digestion product. D. C2C12 cells transfected with PX459-Rosa26-SP-DsRed (Brightfield). E. C2C12 cells transfected with PX459-Rosa26-SP-DsRed (Excitation field).

Figure 4 Construction and activity analysis of PX459-Rosa26-SP-DsRed

400 bp 两个片段。酶切产物进行电泳后,结果显示,未转染的细胞 Rosa26 位点被完全切开,转染 PX459-Rosa26 载体和 PX459-Rosa26-SP 载体的两组 Rosa26 位点均未被完全切开(图 3B),这是 *Xba*I 酶切位点发生突变后使酶切效率降低导致的。使用 T7E1 酶对载体编辑效率进行进一步检测,电泳结果显示(图 3C),未转染载体的对照组未发生切割,转染 PX459-Rosa26 载体

和 PX459-Rosa26-SP 载体的酶切不完全。实验结果使用 Image Lab 软件分析。灰度分析显示,转染 PX459-Rosa26 载体的突变概率为 46.42%,转染载体 PX459-Rosa26-SP 的突变概率为 18.38%。

2.3 肌肉特异性表达 Cas9 示踪载体 PX459-Rosa26-SP-DsRed 的构建及表达活性检测

PX459-Rosa26-SP-DsRed 载体构建过程见图

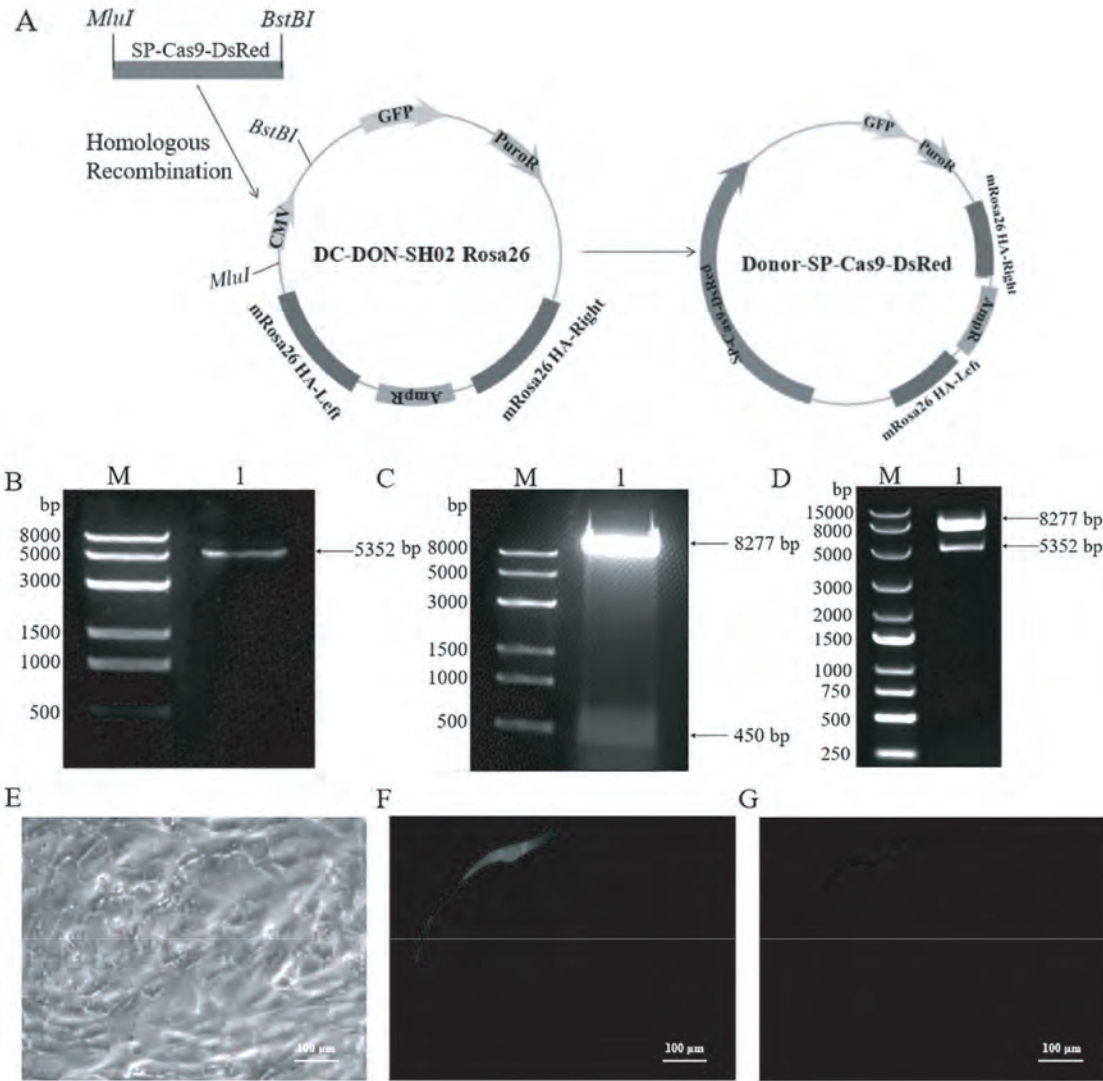


图 5 Donor-SP-Cas9-DsRed 构建及表达活性分析

Note. A. The diagram of Donor-SP-Cas9-DsRed construction. B. Results of agarose gel electrophoresis of SP-Cas9-DsRed PCR product. M. Trans8K DNA Marker. 1. PCR product. C. Results of agarose gel electrophoresis of Donor digestion product. M. Trans8K DNA Marker. 1. Enzyme digestion product. D. Results of agarose gel electrophoresis of Donor-SP-Cas9-DsRed enzyme digestion product. M. 250 bp DNA Ladder. 1. Enzyme digestion product. E. C2C12 cells transfected with Donor-SP-Cas9-DsRed (Brightfield). F. C2C12 cells transfected with Donor-SP-Cas9-DsRed (C2C12 cell expressed GFP). G. C2C12 cells transfected with Donor-SP-Cas9-DsRed (C2C12 cell expressed DsRed).

Figure 5 Construction and activity analysis of Donor-SP-Cas9-DsRed

4A。以实验室保存的连有 T2A-DsRed 的载体为模板,使用含有限制性内切酶 *EcoRI* 酶切位点的引物 T2A-DsRed-F 和 T2A-DsRed-R 进行 T2A-DsRed 的扩增。PCR 产物的电泳结果显示,在约 740 bp 左右处观察到与理论值相符的特异性条带(图 4B),即 T2A-DsRed 扩增成功。用限制性内切酶 *EcoRI* 对载体 PX459-Rosa26-SP 进行酶切,在 800 bp 左右处出现小片段(图 4C)。回收 T2A-DsRed 片段及 PX459-Rosa26-SP 载体大片段进行同源重组,对重组质粒进行测序鉴定,目的片段未发生突变,该重组质粒命名为 PX459-Rosa26-SP-DsRed。将 PX459-Rosa26-SP-DsRed 载体转染至 C2C12 细胞中(图 4D),转染 48 h 后,利用绿光照射 C2C12 细胞,可以观察到红色荧光(图 4E),表明 SP 启动子可带动红色荧光蛋白基因在成肌细胞中表达。

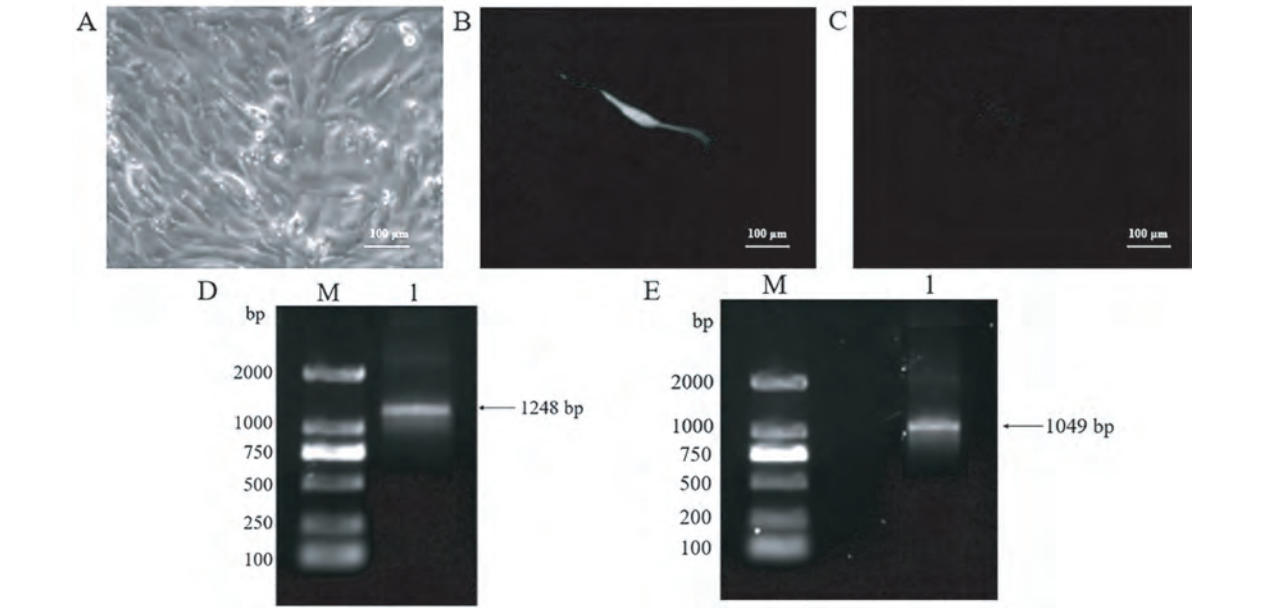
2.4 肌肉特异表达 Cas9 示踪同源打靶载体 Donor-SP-Cas9-DsRed 的构建及检测

Donor-SP-Cas9-DsRed 载体构建过程见图 5A。以 PX459-Rosa26-SP-DsRed 为模板,扩增 SP-Cas9-DsRed 片段,PCR 产物经电泳检测,如图 5B 所示,在约 5300 bp 处观察到与理论值相符的特异性条

带,表明 SP-Cas9-DsRed 扩增成功。用限制性内切酶 *MluI* 和 *BstBI* 对 Donor 载体进行双酶切,电泳结果显示,在 8300 bp 和 500 bp 左右处出现两条条带,与理论值相符(图 5C)。回收 SP-Cas9-DsRed 片段及 Donor 载体大片段进行同源重组,对重组质粒进行酶切鉴定,如图 5D 所示,在约 8300 bp 和 5400 bp 处出现目的条带,与理论值相符。测序结果显示,目的片段未发生突变,该重组质粒命名为 Donor-SP-Cas9-DsRed。将 Donor-SP-Cas9-DsRed 载体转染至 C2C12 细胞中(图 5E),同时转染 293T 细胞作为对照组。48 h 后,C2C12 细胞中观察到红色荧光与绿色荧光(图 5F,5G),而对照组的 293T 细胞只观察到绿色荧光的表达(图略),表明所构建的 Donor-SP-Cas9-DsRed 载体能在细胞中正常表达且具有细胞特异性。

2.5 肌肉特异表达 Cas9 示踪同源打靶载体 Donor-SP-Cas9-DsRed 在 C2C12 细胞中整合

将 PX459-Rosa26 载体和 Donor-SP-Cas9-DsRed 载体共转染至 C2C12 细胞中(图 6A),48 h 后,C2C12 细胞表达绿色荧光和红色荧光(图 6B,6C)。对转染后的细胞进行终浓度为 1.1 μg/μL 的 Puro



注:A:共转染后的 C2C12 细胞(亮视野);B:共转染后的 C2C12 细胞(表达 GFP 的 C2C12 细胞);C:共转染后的 C2C12 细胞(表达 DsRed 的 C2C12 细胞);D:基因组 3' 端 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图,M:DL-2000 Marker,1:PCR 产物;E:基因组 5' 端 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图,M:DL-2000 Marker,1:PCR 产物。

图 6 Donor-SP-Cas9-DsRed 整合检测

Note. A. C2C12 cells after co-transfection (Brightfield). B. C2C12 cells after co-transfection (C2C12 cell expressed GFP). C. C2C12 cells after co-transfection (C2C12 cell expressed DsRed). D. Results of agarose gel electrophoresis of 3' DNA PCR product. M. DL-2000 Marker. 1. PCR product. E. Results of agarose gel electrophoresis of 5' DNA PCR product. M. DL-2000 Marker. 1. PCR product.

Figure 6 Cell intergation detection of Donor-SP-Cas9-DsRed

筛选。7 d 后,细胞表达绿色荧光和红色荧光,提取细胞 DNA 进行 PCR 鉴定。图 6D 为 3' 端插入情况,在约 1200 bp 处出现特异性条带,与理论值相符。图 6E 为 5' 端插入情况,在约 1000 bp 处出现与理论值相符的特异性条带,PCR 产物回收后进行测序,测序结果与理论序列相符,表明构建的 Donor-SP-Cas9-DsRed 载体整合到 C2C12 细胞 Rosa26 位点。

3 讨论

与“锌指核酸内切酶(ZFN)”和“类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)”技术相比^[15-16],第三代“基因组定点编辑技术”CRISPR/Cas9,具有成本低、制作便捷以及快捷高效等优点,并已成为科学研究领域的有效工具^[17-18]。*Rosa26* 位点位于小鼠六号染色体上,被应用于整合转基因构建体以在鼠中实现普遍存在或条件基因表达^[19]。*Rosa26* 由 3 个外显子构成,其转录产物为一种非必需、非编码的 RNA,并且不会翻译成蛋白质^[20]。因此,*Rosa26* 位点也有“安全港”之称。经研究证实,*Rosa26* 基因在大部分组织和细胞中都有表达,因此,在此区域定点插入外源 DNA,在各组织中表达的可能性都会非常高^[21]。*Rosa26* 位点基因编辑技术可以非常有效地建立多用途的条件性转基因动物模型,因此,本研究选取 *Rosa26* 位点作为打靶位点进行研究。

对特定组织进行基因改造时,需要保证个体其它组织器官正常的生长发育不受影响。为实现肌肉特异打靶的同时不损害其它组织器官的生理功能,本研究选用肌肉特异启动子 SP 驱动 Cas9 的表达,并以打靶小鼠 *Rosa26* 位点的 Cas9 载体 PX459-*Rosa26* 为骨架,构建肌肉特异表达 Cas9 载体 PX459-*Rosa26*-SP。C2C12 细胞作为骨骼肌前体细胞,是研究成肌细胞增殖分化的理想模型^[22]。随后,我们对成肌细胞 C2C12 进行转染和基因组编辑效率的检测。转染 PX459-*Rosa26*-SP 后,提取细胞基因组并进行酶切验证,突变的概率为 18.38%,表明 SP 启动子可带动 Cas9 蛋白在 C2C12 细胞中表达。之后,我们在载体 Cas9 后引入 DsRed 红色荧光报告基因,可通过荧光的表达来直观的观察 SP 启动子在不同细胞中的特异表达情况。在去除 *Rosa26* 位点 Donor 载体 ORF 区的 CMV 启动子后,我们在该载体骨架上连接 SP-Cas9-DsRed,构建肌肉特异表达 Cas9 示踪同源打靶载体 Donor-SP-Cas9-

DsRed。将 Donor-SP-Cas9-DsRed 和 PX459-*Rosa26* 共转至 C2C12 细胞后,细胞可表达绿色荧光和红色荧光,且这种现象是肌肉细胞特异性的,即 SP 启动子可启动外源基因的肌肉特异性表达。对转染后的 C2C12 细胞进行 Puro 筛选后得到阳性细胞进行基因组的提取和 PCR 鉴定,该载体成功整合到 C2C12 细胞 *Rosa26* 位点。我们构建的系统可用于肌肉特异表达 Cas9 小鼠模型的制备和肌肉特异性基因编辑的研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Jacox E, Gotea V, Ovcharenko I, et al. Tissue-specific and ubiquitous expression patterns from alternative promoters of human genes [J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12274.
- [2] Draghia-Akli R, Li X, Schwartz RJ. Enhanced growth by ectopic expression of growth hormone releasing hormone using an injectable myogenic vector [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(12): 1285-1289.
- [3] Haase G, Kennel P, Pettmann B, et al. Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors [J]. *Nat Med*, 1997, 3(4): 429-436.
- [4] Tripathy SK, Svensson EC, Black HB, et al. Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(20): 10876-10880.
- [5] Oda T, Maéda Y. Multiple conformations of F-actin [J]. *Structure*, 2010, 18(7): 761-767.
- [6] Liu YL, He YT, Wang Y, et al. Synthetic promoter for efficient and muscle-specific expression of exogenous genes [J]. *Plasmid*, 2019, 106: 102441.
- [7] Li XY, Eastman, EM, Schwartz RJ, et al. Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(3): 241-245.
- [8] Malerba A, Sidoli C, Lu-Nguyen N, et al. Dose-dependent microdystrophin expression enhancement in cardiac muscle by a cardiac-specific regulatory element [J]. *Hum Gene Ther*, 2021, 32(19-20): 1138-1146.
- [9] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea [J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170.
- [10] 张雨, 郭中坤, 付彬, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Bpi* 基因敲除小鼠 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 39-46.
- [11] Zhang Y, Guo ZK, Fu B, et al. Construction of *Bpi* gene-knockout mice using CRISPR/Cas9 [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(6): 39-46.
- [12] Dreano E, Bacchetta M, Simonin J, et al. Characterization of two rat models of cystic fibrosis-KO and F508del CFTR-Generated by Crispr-Cas9 [J]. *Anim Model Exp Med*, 2019, 2(4): 297-311.

- [12] Yao X, Liu Z, Wang X, et al. Generation of knock-in cynomolgus monkey via CRISPR/Cas9 editing [J]. Cell Res, 2018, 28(3): 379-382.
- [13] 赵宣, 张海, 王晓亚, 等. 利用双重 sgRNAs 构建 miR-223 全基因敲除小鼠 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 27-31.
Zhao X, Zhang H, Wang XY, et al. Construction of miR-223 full-sequence-knockout mice with dual sgRNAs [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 27-31.
- [14] Clarke R, Heler R, MacDougall MS, et al. Enhanced bacterial immunity and mammalian genome editing via RNA-polymerase-mediated dislodging of Cas9 from double-strand DNA breaks [J]. Mol Cell, 2018, 71(1): 42-55.
- [15] Meyer M, de Angelis MH, Wurst W, et al. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(34): 15022-15026.
- [16] Wefers B, Panda SK, Ortiz O, et al. Generation of targeted mouse mutants by embryo microinjection of TALEN mRNA [J]. Nat Protoc, 2013, 8(12): 2355-2379.
- [17] Dong W, Zhang L, Sun CX, et al. Knock in of a hexanucleotide repeat expansion in the *C9orf72* gene induces ALS in rats [J]. Anim Model Exp Med, 2020, 3(3): 237-244.
- [18] 徐涛, 顾鹏, 陈傍柱, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建 *HMG2* 敲除肝癌细胞株及其功能鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 23-29.
Xu T, Gu P, Chen BZ, et al. Use of CRISPR/Cas9 system for establishment and characterization of *HMG2* knockout hepatoma carcinoma cell line [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 23-29.
- [19] Chu VT, Weber T, Graf R, et al. Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes [J]. BMC Biotechnol, 2016, 16: 4.
- [20] Ma Y, Yu L, Pan S, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeting of the *Rosa26* locus produces Cre reporter rat strains for monitoring Cre-*loxP*-mediated lineage tracing [J]. FEBS J, 2017, 284(19): 3262-3277.
- [21] Roman AY, Limorenko G, Ustyugov AA, et al. Generation of mouse lines with conditionally or constitutively inactivated *Snaa* gene and *Rosa26-stop-lacZ* reporter located *in cis* on the mouse chromosome 6 [J]. Transgenic Res, 2017, 26(2): 301-307.
- [22] Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle [J]. Nature, 1977, 270(5639): 725-727.

[收稿日期] 2021-12-30

侯雨君,赵映,蒋慧灵,等. 联合法诱导内脏高敏感模型的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 343-349.

Hou YJ, Zhao Y, Jiang HL, et al. Visceral hypersensitivity model of irritable bowel syndrome established by combined methods: a comparative study [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 343-349.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.006

联合法诱导内脏高敏感模型的比较研究

侯雨君¹,赵映¹,蒋慧灵¹,谭玉¹,张薇³,李瑛²,郑倩华^{1*}

(1. 成都中医药大学针灸推拿学院/第三附属医院,成都 610075; 2. 成都中医药大学研究生院,成都 610075;
3. 什邡市人民医院中医科,四川 德阳 618499)

【摘要】 目的 观察母婴分离联合机械刺激法和药物联合慢性应激法建立的肠易激综合征内脏高敏感性模型的效应,并探讨上述两种方法的优劣。**方法** 将SD幼鼠、成年鼠随机分为母婴分离联合机械刺激组(CRD组)和空白对照组(CRD对照组)、药物联合慢性应激组(CUMS组)与空白对照组(CUMS对照组),模型建立后,观察大鼠一般情况与大便情况,采用腹壁撤退反射(AWR)与内脏痛阈值评价大鼠内脏敏感性,十字迷宫实验与旷场实验评价大鼠焦虑抑郁状态,在上述评价后,取大鼠远端结肠进行病理观察。**结果** 与对应对照组相比,两个模型组大鼠AWR评分增高、内脏痛阈值降低、粪便含水量增高。其中,药物联合CUMS组的IBS内脏高敏感大鼠的十字迷宫开臂停留时间缩短,旷场实验活动总距离与中心停留时间减少。**结论** 两种造模方式诱导的模型均出现IBS内脏高敏感性和粪便性状改变,可较好地模拟IBS临床症状,且更趋向于腹泻型IBS;药物联合CUMS能更好地复制IBS的情绪功能障碍。

【关键词】 肠易激综合征;内脏高敏感;母婴分离;结直肠扩张;慢性不可预知轻度应激;模型评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0343-07

Visceral hypersensitivity model of irritable bowel syndrome established by combined methods: a comparative study

HOU Yujun¹, ZHAO Ying¹, JIANG Huiling¹, TAN Yu¹, ZHANG Wei³, LI Ying², ZHENG Qianhua^{1*}

(1. School of Acupuncture-Moxibustion/Third Affiliated Hospital, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610075, China. 2. Graduate School, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610075. 3. Department of Traditional Chinese Medicine, Shifang People's Hospital, Deyang 618499)

Corresponding author: ZHENG Qianhua. E-mail: zhengqianhua@cdutcm.edu.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of a visceral hypersensitivity model in rats with irritable bowel syndrome established by neonatal maternal separation combined with colorectal distension and drugs with chronic stress, and to discuss their features. **Methods** Two-day-old and two-month-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into CRD, control, and CUMS groups. After establishing the model, the general conditions, stools, visceral sensitivity, and anxiety-depression-like behavioral changes were evaluated. Colonic tissue was obtained for pathological examination.

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目(81804207),国家重点研发计划项目(2019YFC1712100,2019YFC1712103),四川省教育厅一般项目(18ZB0198),成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(BSH2018015),成都中医药大学基金项目(ZRYY1740)。

Funded by Youth Program of National Natural Science Foundation of China(81804207), National Key R&D Project(2019YFC1712100, 2019YFC1712103), Science Research Foundation of the Educational Department of Sichuan Province(18ZB0198), Chengdu University of Traditional Chinese Medicine“Xinglin Scholar”Academic Research Talent Upgrade Plan(BSH2018015), Project of University Fund of Chengdu University of Chinese Medicine(ZRYY1740).

【作者简介】 侯雨君(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:功能性肠病的临床及机制研究。Email:meizanbei@163.com

【通信作者】 郑倩华(1984—),女,副教授,博士,研究方向:功能性肠病的临床及机制研究。Email:zhengqianhua@cdutcm.edu.com

Result Both model groups had a higher AWR score, lower visceral pain threshold, and changed fecal characteristics and water content. The CUMS group had a shorter open arm residence time of the elevated plus maze test and shorter total distance and central area residence time of the open field test. **Conclusions** Both models showed visceral hypersensitivity and fecal changes, which agreed with the clinical symptoms of IBS, and are more inclined to the diarrhea type. Additionally, the CUMS group model had emotional changes.

【Keywords】 irritable bowel syndrome (IBS); visceral hypersensitivity; neonatal maternal separation; colorectal distension; chronic unpredictable mild stress; model evaluation

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

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)常以腹部不适以及粪便性状改变为主要临床特征,在全世界发病率约为 11%^[1]。由于其迁延不愈的特点,IBS 严重影响了患者的生活质量,并造成了巨大的医疗与经济负担^[2]。内脏高敏性是肠道对刺激敏感性增强的一种现象,是 IBS 区别于其他功能性肠病的重要特征,主要表现为腹痛和腹胀^[3]。建立稳定、重复性好的 IBS 内脏高敏感模型,对于 IBS 的病因病理研究、临床诊断与治疗有着重要意义。课题组前期研究发现,IBS 内脏高敏感的动物模型制作方法较多,各有优缺点^[4]。目前,常用方法包括幼鼠的母婴分离(neonatal maternal separation, NMS)^[5]与结直肠扩张(colorectal distension, CRD)^[6],成年鼠的慢性不可预知性温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)与灌胃或灌肠给药^[7-9]。由于单一造模方法可能在模型稳定性、持续性和模拟 IBS 亚型方面存在缺陷^[10],本研究通过联合造模方法,即分别采用幼鼠母婴分离联合机械刺激和成年鼠药物联合慢性应激诱导 IBS 内脏高敏感模型。通过评价内脏高敏感状态、粪便特征以及焦虑抑郁状态等指标,比较两种不同联合制作的 IBS 内脏高敏感模型,为 IBS 内脏高敏感动物模型的制备方法及动物选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只 2 日龄清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,体重 5 ~ 7 g;20 只 2 月龄成年清洁级 SD 大鼠,雌性,体重 230 ~ 250 g,均购于成都中医药大学实验动物研究中心【SCXK(川)2019-11】,饲养于成都中医药大学 SPF 级实验动物中心【SYXK(川)2019-049】,昼夜节律与湿度恒定,温度 20 ~ 25℃。实验方案与动物饲养均符合成都中医药大学动物伦理要求(成都中医药大学动物伦理备案号:2019-06)。

1.1.2 主要试剂与仪器

无水乙醇(批号:GB678-90);二甲苯(批号:20210101);苏木素染液(批号:ZH202509);伊红染液(批号:CR2011064);盐酸(批号:20201118);中性树胶(批号:70120150);番泻叶(生产许可证:川 20100094);切片机(徕卡 2016,德国);包埋机(常州郊区中威电子仪器厂,中国);显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

幼鼠与哺乳母鼠共同饲养,出生后第 22 天断奶,第 30 天分笼,并进行雌雄分离。将幼鼠随机分为母婴分离联合结直肠扩张组(CRD 组)和对照组(CRD 对照组),各组 10 只,雌雄各占一半。成年大鼠饲养于金属笼内,随机分为药物联合慢性应激组(CUMS 组)与对照组(CUMS 对照组),各组 10 只,均为雌性。

1.2.2 模型的建立

CRD 组:幼鼠出生后每天与母鼠分离 3 h,持续 21 d,第 8 天将自制球囊插入幼鼠结直肠对其进行直肠扩张,共持续 14 d。CRD 对照组:幼鼠在出生后与母鼠共同饲养,不做任何处理。CUMS 组:CUMS 共包含 7 种应激方式:束缚 120 min;孤养 24 h;拥挤 24 h;距尾端 1 cm 夹尾 20 min;45℃温水游泳 10 min;足底电击 15 min 和震荡摇摆 1 h。以上应激方法每日通过抽签随机选取 1 种进行,每种应激方法出现 2 次并且不连续出现。应激 30 min 后,使用浓度为 0.3 g/mL 番泻叶浸剂予以 10 mL/kg 剂量灌胃,1 次/日,共持续 14 d。CUMS 对照组:以 10 mL/kg 剂量生理盐水每日灌胃。

1.2.3 观察指标

(1)一般情况:分别在造模结束后与造模结束后 14 d 对所有组别的大鼠进行体重测量,评估大鼠的精神状态、毛发光泽度与活动度。

(2)粪便情况:分别在造模结束以及造模结束 14 d 后观测各组大鼠的粪便性状与粪便含水量。采用 Bristol 量表对粪便形状进行评价,评分标准为:1 分,单个的硬团;2 分,表面凹凸干硬的香肠状;3 分,干裂的香肠状;4 分,柔软的香肠状;5 分,团块状;6 分,糊状;7 分,水样便^[11]。对所有组别大鼠进行单笼饲养,自由进食与饮水,共收集 8 h 粪便,每 2 h 收集 1 次。粪便称重后放入 200℃ 烤箱内烘烤 1 h,取出再次称重,计算粪便含水量。粪便含水量为干湿重之差占湿重的百分比。

(3)内脏高敏感程度评价:腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR):参考陈颖等^[12]总结的方法,实验前 24 h 禁食不禁水,麻醉后大鼠将大鼠放入自制透明容器中,将润滑后的自制球囊导管缓慢插入大鼠肛门 4.5 cm 并固定。等待大鼠苏醒后,向球囊中匀速充气,使压力分别达到 20、40、60 和 80 mmHg。每个压力梯度保持 30 s,并由不清楚分组信息的实验人员观察记录 AWR 评分。评分标准:0 分:大鼠情绪基本稳定,无明显行为变化;1 分:大鼠情绪出现不稳定,偶尔转头;2 分:大鼠腹部肌肉轻微收缩,未离开地面;3 分:大鼠腹部强烈收缩,从地面抬起;4 分:大鼠背部弓起,腹壁与会阴完全离开地面。共测量 3 次,最终结果取平均值。

内脏痛阈值:将大鼠放入固定器中并且插入球囊导管(方法同 AWR),向球囊内充气使压力从 0 mmHg 每次匀速递增 5 mmHg,每次扩张持续 30 s 以观察大鼠的反应,待大鼠安静后,加压直至大鼠腹部收缩较强,并抬离地面(即 AWR 评分为 3 分)时的最低压力值作为内脏痛阈值。共测量 3 次,最终结果取平均值。

(4)焦虑抑郁样行为测试:十字迷宫实验(elevated plus maze test, EPMT):参考郭晋良等^[13]的方法,将大鼠放置于仪器一侧开臂的尽头,记录 300 s 大鼠活动情况后得出大鼠进入开放臂时间、进入封闭臂时间以及在中央区域停留时间,计算出 OT%值,OT%值大鼠焦虑水平成反比。OT%值计算方法:(开放臂时间/开放臂时间+封闭臂时间)×100%。

旷场实验(open field test, OFT)参考张传领等^[14]的方法,将大鼠放于旷场实验箱中央区域,记录 300 s 内大鼠的相关活动情况,得到活动总距离

与中央区域活动时间,总距离和中央区域活动时间与大鼠抑郁水平呈反比。

(5)病理观察:检测结束后,处死大鼠,取 1 cm 左右的远端结肠,4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,切片后使用苏木精伊红试剂染色,光镜下观察炎性细胞浸润程度,并按结肠病理组织评价炎症分级^[10]。

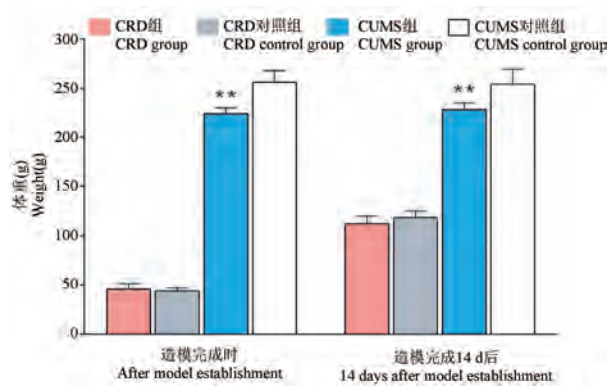
1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行数据分析,正态性分析后,符合正态分布的数据使用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)与单因素方差分析进行描述。不满足正态分布的数据使用中位数(P_{25}, P_{75})与秩和检验进行描述。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 一般情况

如图 1 所示,两个时间点 CRD 组与 CRD 对照组比较,体重无明显差异;CUMS 组与 CUMS 对照组比较,体重明显降低,且差异具有显著性($P < 0.01$)。CUMS 组与 CRD 组大鼠均出现精神较差、毛发枯槁、活动度与饮食减少等情况。



注:与对应对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 1 不同时间点各组体重比较

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

Figure 1 Comparison of body weight at different time points

2.2 粪便情况

如表 1 所示,在造模完成时,CRD 组与 CUMS 组的大便性状与大便含水量($P < 0.05$)均高于对应对照组,且差异具有显著性($P < 0.01$)。造模 14 d 后,CRD 组的大便性状($P < 0.01$)与大便含水量($P < 0.05$)均高于 CRD 对照组,且差异具有显著性;CUMS 组的大便性状与大便含水量均高于 CUMS 对照组,且差异具有显著性($P < 0.01$)。

表 1 不同时间点各组粪便情况比较

Table 1 Comparison of fecal conditions at different time points

组别 Groups	造模完成 After establishing model		造模 14 d 后 14 days after establishing model	
	大便秘状 Stool characters	大便含水量 (%) Water content (%)	大便秘状 Stool characters	大便含水量 (%) Water content (%)
CRD 组 CRD group	4.30 ± 0.48 **	0.61 ± 0.05 **	4.40 ± 0.70 *	0.67 ± 0.07 *
CRD 对照组 CRD control group	2.70 ± 0.95	0.41 ± 0.16	3.30 ± 1.25	0.53 ± 0.20
CUMS 组 CUMS group	5.90 ± 0.32 **	0.78 ± 0.41 **	5.10 ± 0.88 **	0.77 ± 0.09 **
CUMS 对照组 CUMS control group	4.20 ± 0.63	0.59 ± 0.11	4.00 ± 0.00	0.55 ± 0.12

2.3 内脏高敏感情况

2.3.1 腹壁撤退反射评价

如图 2 所示,在造模完成时,与对应对照组相比,两个模型组各梯度 AWR 评分均升高,差异具有显著性。造模 14 d 后,CRD 组与 CRD 对照组低压力梯度(20、40 mmHg)无显著性差异;与 CUMS 对照组相比,CUMS 组各压力梯度明显降低,差异具有显著性。与 CRD 组相比,CUMS 组 AWR 总体评分更高,且可持续到造模完成 14 d 后。

2.3.2 内脏痛阈值

如图 3 所示,在造模完成时与造模 14 d 后,与对应对照组比较,两个模型组内脏痛阈值更低,且差异具有显著性。CUMS 组比 CRD 组阈值更低。

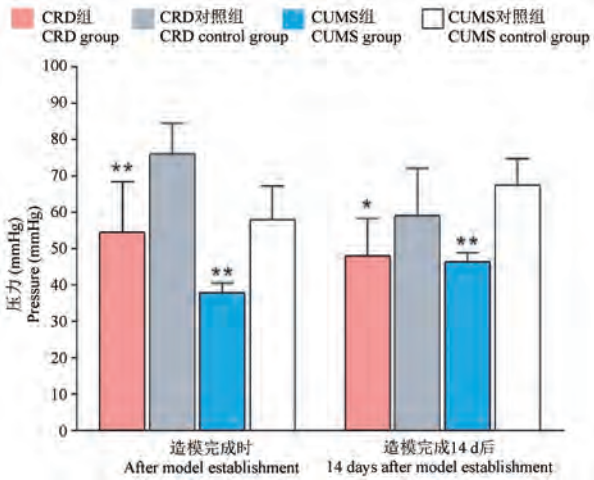


图 3 不同时间点内脏痛阈值比较

Figure 3 Comparison of visceral pain thresholds of rats at different time points

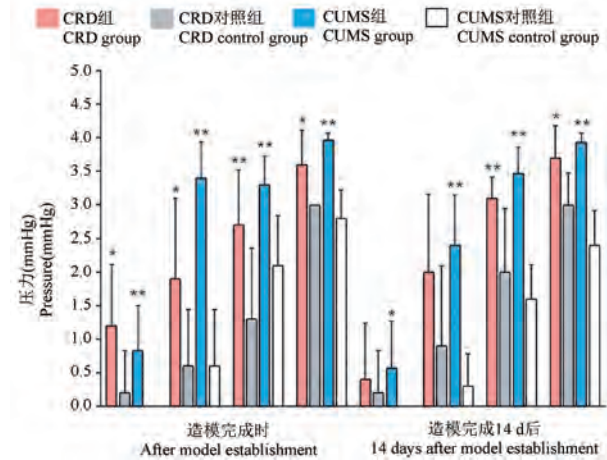


图 2 不同时间点各组 AWR 比较

Figure 2 Comparison of AWR of rats at different time points

2.4 焦虑抑郁情况

2.4.1 十字迷宫实验

如图 4 所示,两个时间点与 CRD 对照组相比,CRD 组 OT%值无显著性差异。与 CUMS 对照组相比,CUMS 组 OT%值降低,在造模完成时,差异具有

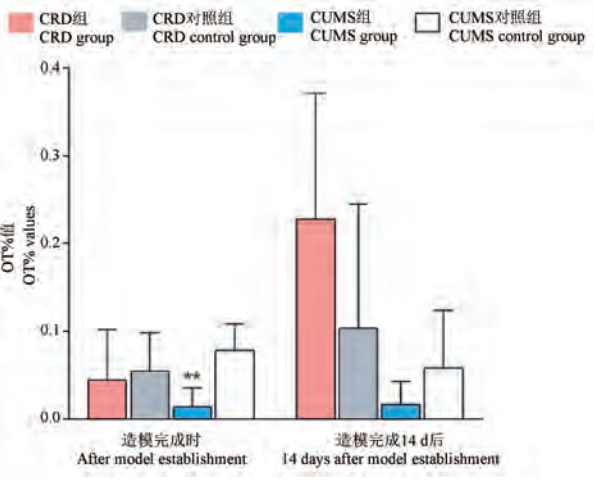


图 4 不同时间点十字迷宫 OT%值比较

Figure 4 Comparison of OT% values of rats at different time points

显著性($P < 0.01$)。CUMS 组 OT%值低于 CRD 组并在造模 14 d 后仍保持较低水平。

2.4.2 旷场实验

如图 5 所示,两个时间点 CRD 组与 CRD 对照组总距离与中心停留时间差异无显著性;与 CUMS 对照组相比,CUMS 组在两个时间点的总距离与中心停留时间缩短,且造模完成时,总距离差异具有显著性($P<0.05$);与对应对照组比较,两模型组中心停留时间差异不具有显著性。与 CRD 组相比,CUMS 组活动总距离与中心停留时间更短。

2.5 病理观察

如图 6 所示,各组结肠组织结构完整,黏膜层、黏膜下层和肌层分层清晰;黏膜层上皮致密,未见明显坏死;固有层内可见大量大肠腺,黏膜下层、肌层和外膜连接紧密,未见明显病理变化;CRD 组周围疏松结缔组织内可见散在分布的淋巴细胞、中性粒细胞或嗜酸性粒细胞,病理评分稍有升高,但无显著性差异。

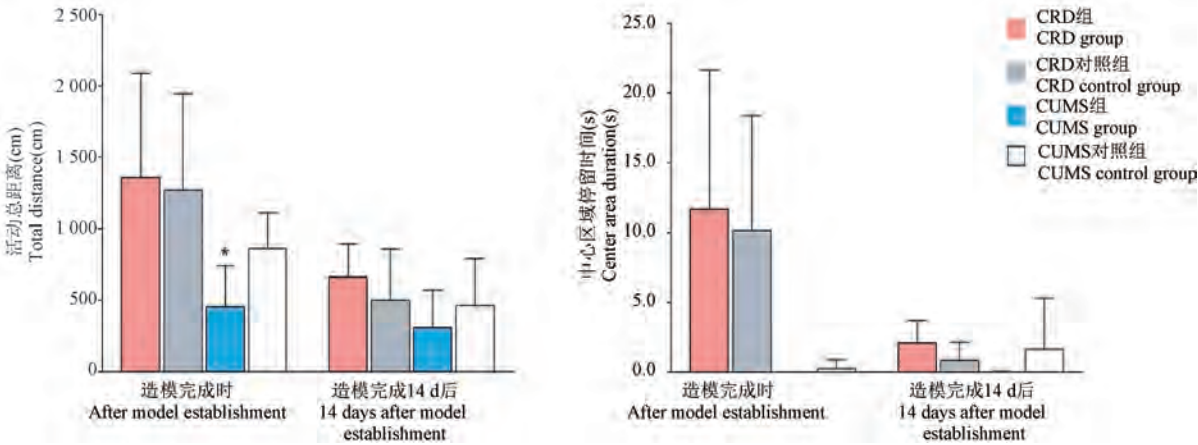
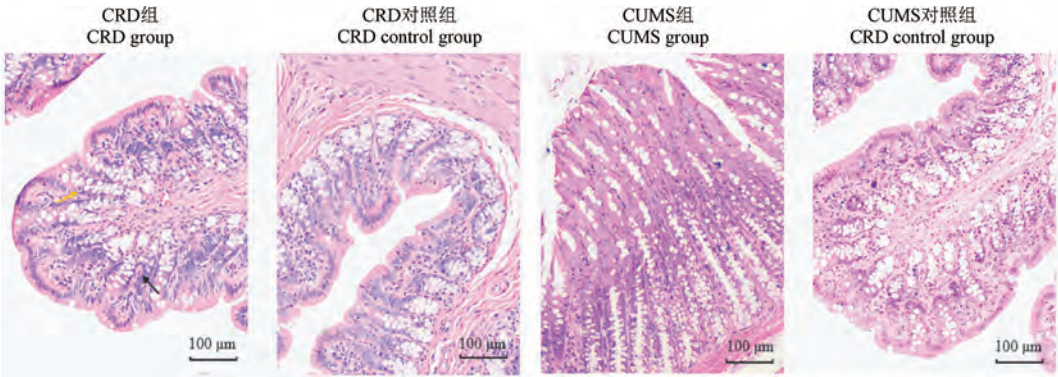


图 5 不同时间点旷场活动总距离与中心区域停留时间比较

Figure 5 Comparison of total distance and center area duration of OFT of rats at different time point



注:黄色箭头:淋巴细胞;黑色箭头:中性粒细胞。

图 6 各组结肠组织病理光镜观察图

Note. Yellow arrow. Lymphocyte infiltration. Black arrow. Neutrophils.

Figure 6 Pathological observation in different groups

3 讨论

母婴分离应激法是模拟临床上 IBS 患者童年生活的缺失而引起模型动物胃肠敏感性增高的常用造模方法,此法在模拟排便次数与粪便性状方面有一定局限性^[4],因此往往需要叠加其他形式的应激;CRD 已被证明可以有效地诱发幼鼠内脏高敏感状态,但造模周期较长^[15],且幼鼠死亡率高;CUMS

运用广泛,不易产生耐受,可使实验动物的内脏敏感性增高并发生焦虑抑郁样行为改变,但影响肠道传输功能不明显^[16];使用番泻叶进行灌胃可以使模型动物敏感性增高,并造成腹泻,且不会产生药物依赖性,但对动物情绪指标影响较小^[17]。因此,采用两种造模方式联合可避免单一造模方式的缺陷,并且能建立更加符合临床特征的 IBS 模型^[18]。

临床上 IBS 患者常出现因内脏感觉异常、胃肠

功能紊乱导致食欲减退,进而出现体重停止增长甚至减轻的情况,且常伴有焦虑、抑郁等情绪变化。因此,本研究从一般情况、粪便情况、内脏高敏感情况、焦虑抑郁样行为变化这几个方面评价模型效应。在造模后 14 d 进行再评价的主要原因是:以针刺为例,目前多数针刺研究的干预周期为 14 d,因此,模型的持续性能维持到干预结束是准确评价针刺效应的先决条件;造模完成时,幼鼠尚未成年,而母婴分离模型存在时间依赖性,随着年龄增长内脏敏感性逐渐降低,在成年后内脏高敏感状态消失^[10],故选择在造模 14 d 再评价,以评估大鼠自愈性对模型效应的影响。

实验结果显示,CUMS 和 CRD 均可使大鼠内脏敏感性增高,CUMS 组增高更明显,持续性更好,并伴有焦虑抑郁样行为改变;两个模型组均有腹泻型肠易激综合征的表现。前期研究发现,使用番泻叶灌胃可使动物肠黏膜屏障功能受损,肠道通透性升高,炎症物质增加刺激肠道初级传入神经,从而引起内脏敏感性升高^[19-20];此外,不可预知的应激可有效防止动物产生耐受,因此 CUMS 组内脏敏感性更加稳定。由于幼鼠死亡率高,操作难度大且造模周期长,因此,选用成年鼠进行联合造模是在节约时间与成本的前提下,建立典型、持续性好、成功率高的模型的最佳选择。

本研究也存在一定的局限性,使用腹壁撤退反射及内脏痛阈值评价内脏高敏感状态存在一定主观性,且评价时间点欠缺,观察模型持续性方面存在一定局限性。因此,本研究采取的 AWR 与三分阈值共同评价内脏敏感性可一定程度上避免主观性,后期可加入腹外斜肌肌电^[21]或脊髓诱发电位^[22]等相对客观指标进行评判;同时增加时间节点并延长观察周期,以便更全面地观察模型持续性效应。

本研究选择联合造模思路,分别制作了母婴分离联合机械刺激与药物联合慢性应激法 2 种 IBS 内脏高敏感模型,并从一般情况、内脏高敏感情况、焦虑抑郁状态几方面评价了模型效应,结果显示,CUMS 组大鼠出现焦虑抑郁样行为变化,粪便形状改变,内脏高敏感持续性较好,而 CRD 组在后期对低压力梯度(20、40 mmHg)敏感性变低,提示大鼠可能存在自愈,内脏高敏感程度仅为轻中度。综上所述,两种造模方式均可制作出较符合临床特征的 IBS 模型,而药物灌胃联合慢性应激建立的大鼠模

型内脏高敏感性稳定,且有明显的焦虑抑郁情绪及腹泻型 IBS 表现,该法能够更好地建立符合 IBS-D 特征的内脏高敏感模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Canavan C, West J, Card T. The epidemiology of irritable bowel syndrome [J]. Clin Epidemiol, 2014, 6: 71-80.
- [2] Enck P, Aziz Q, Barbara G, et al. Irritable bowel syndrome [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16014.
- [3] Larauche M, Mulak A, Taché Y. Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies [J]. Exp Neurol, 2012, 233(1): 49-67.
- [4] 张薇,郑倩华,蒋一路,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.
- [5] Riba A, Olier M, Lacroix-Lamandé S, et al. Early life stress in mice is a suitable model for irritable bowel syndrome but does not predispose to colitis nor increase susceptibility to enteric infections [J]. Brain Behav Immun, 2018, 73: 403-415.
- [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] 罗丹妮,赵妍,陈颖,等. 肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠模型的建立与评价 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(1): 197-201.
Luo DN, Zhao Y, Chen Y, et al. Establishment and evaluation of IBS-D model rats with liver depression and spleen deficiency syndrome [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2019, 46(1): 197-201.
- [8] 张涛,方健松,黄晓燕,等. 束缚-应激联合辣素灌胃建立大鼠腹泻型肠易激综合征模型及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3): 1-7.
Zhang T, Fang JS, Huang XY, et al. Establishment and evaluation of a rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by restraint-stress combined with capsaicin administration [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(3): 1-7.
- [9] 庄肇滕,王霄腾,吕宾. 乙酸联合束缚应激对大鼠内脏敏感性 & 肠道肥大细胞状态的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(10): 73-77, 93.
Zhuang ZM, Wang XT, Lv B. Influence of intra-colonic infusion of acetic acid irritation combined with chronic external bondage stress on the visceral sensitivity and mast cell state in the colon of rats [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(10): 73-77, 93.
- [10] 张薇,赵映,郑倩华,等. 肠易激综合征内脏高敏模型不同制作方法的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 503-509.
Zhang W, Zhao Y, Zheng QH, et al. Methods for establishing rat models of irritable bowel syndrome visceralhypersensitivity

- [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 503-509.
- [11] Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time [J]. Scand J Gastroenterol, 1997, 32(9): 920-924.
- [12] 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 test [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(8): 89-93.
- [13] 郭晋良, 仲启明, 吉海杰, 等. 探讨蛇床子催眠活性组分对 PCPA 失眠大鼠褪黑素合成限速酶 AANAT 的调控作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(14): 47-52.
Guo JL, Zhong QM, Ji HJ, et al. Regulation of hypnotic active components of cnidii fructus on melatonin synthesis rate-limiting enzyme AANAT in rats with PCPA-induced insomnia [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(14): 47-52.
- [14] 张传领, 邸桐, 王文婧, 等. 母婴分离应激对 rd 新生小鼠行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(4): 89-93.
Zhang CL, Di T, Wang WJ, et al. Effect of maternal separation stress on behavior of neonatal rd mice [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(4): 89-93.
- [15] 刘雁冰, 袁耀宗, 陶然君, 等. 大鼠肠道高敏性模型的建立及其内脏敏感性评估 [J]. 中华消化杂志, 2003, 23(1): 30-33.
Liu YB, Yuan YZ, Tao RJ, et al. Establishment of a rat model of gut hypersensitivity and for evaluation of visceral sensitivity [J]. Chin J Dig, 2003, 23(1): 30-33.
- [16] 吕红. 肠易激综合征脑肠交互作用模型的建立及其对内脏敏感性和心理行为影响机制的初步探索 [D]. 北京: 中国协和医科大学; 2003.
Lv H. The establishment of animal model of gut-brain interaction in irritable bowel syndrome and the study of visceral sensation and psychological stress mechanism [D]. Beijing: China Union Medical School; 2003.
- [17] 刘倩, 韩博宇, 苏晓兰, 等. 三种脾肾阳虚证腹泻型肠易激综合征大鼠模型的比较 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(8): 959-965.
Liu Q, Han BY, Su XL, et al. Comparison of three types of diarrhea predominant IBS rat model with Pi-Shen Yang deficiency syndrome [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2021, 41(8): 959-965.
- [18] 张庆业, 范丽霞, 闫雪, 等. 六组肠易激综合征大鼠模型的建立及其症状学评价 [J]. 海峡药学, 2012, 24(9): 20-23.
Zhang QY, Fan LX, Yan X, et al. The establishment and semiological identification in six groups of rat models of irritable bowel syndrome [J]. Strait Pharm J, 2012, 24(9): 20-23.
- [19] 姚俊鹏, 赵妍, 陈颖, 等. 电针对腹泻型肠易激综合征大鼠肠上皮黏膜屏障功能的影响 [J]. 针刺研究, 2020, 45(5): 357-362.
Yao JP, Zhao Y, Chen Y, et al. Effect of electroacupuncture on intestinal epithelial mucosal barrier function in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Acupunct Res, 2020, 45(5): 357-362.
- [20] Ng QX, Soh AYS, Loke W, et al. The role of inflammation in irritable bowel syndrome (IBS) [J]. J Inflamm Res, 2018, 11: 345-349.
- [21] Fan F, Tang Y, Dai H, et al. Blockade of BDNF signalling attenuates chronic visceral hypersensitivity in an IBS-like rat model [J]. Eur J Pain, 2020, 24(4): 839-850.
- [22] 郭玉婷, 李延青, 杨军, 等. 肠易激综合征内脏感觉过敏大鼠脊髓诱发电位的研究 [J]. 胃肠病学, 2004, 9(6): 347-350.
Guo YT, Li YQ, Yang J, et al. Study on spinal evoked potentials of visceral hypersensitivity of rats of irritable bowel syndrome [J]. Chin J Gastroenter, 2004, 9(6): 347-350.

[收稿日期] 2021-09-14

张钰,周澧,张玲,等. 一种啮齿类动物脑内微透析记录的清醒活动装置的设计和应用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30 (3): 350–357

Zhang Y, Zhou L, Zhang L, et al. Design and application of a rodent awake activity device for brain microdialysis recording [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 350–357

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.007

一种啮齿类动物脑内微透析记录的清醒活动装置的设计和应用研究

张钰^{1,2,3,4}, 周澧^{1,2,3,4}, 张玲^{1,2,3,4}, 孙秀萍^{1,2,3,4}, 李祥磊^{1,2,3,4}, 秦川^{1,2,3,4*}

(1. 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;2. 国家人类疾病动物模型资源库,北京 100021;3. 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;4. 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021)

【摘要】 目的 通过自行设计制作啮齿动物脑内微透析记录的清醒活动装置,并进行小鼠清醒活动的脑内微透析采样应用和验证。**方法** 设计并利用相关材料自行制作啮齿动物脑内微透析记录的清醒活动装置,并通过小鼠黑质-纹状体神经环路的多巴胺相关神经递质进行测定和验证。向 C57BL/6 小鼠的黑质、纹状体埋置微透析探针,手术 7 d 后进行小鼠清醒活动下的黑质、纹状体的多巴胺 (DA) 及其代谢中间产物二羟基苯乙酸 (DOPAC) 两种神经递质的微透析采样。微透析流速为 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, 每 20 min 收集一管样品,共收集 200 min,分析两种化学物质浓度随时间的变化。**结果** (1) 啮齿动物脑内微透析记录的清醒活动装置可保证动物在装置内清醒活动的同时可顺利进行微透析采样。(2) 啮齿动物脑内样品的可检测到稳定的神经递质含量,样品测得小鼠的多巴胺浓度为黑质 (0.11 ± 0.01) nmol/L,纹状体 (0.22 ± 0.05) nmol/L;小鼠的 DOPAC 浓度为黑质 (3.38 ± 0.59) nmol/L,纹状体 (20.35 ± 6.87) nmol/L。各记录时段之间无明显差异。**结论** 啮齿动物脑内微透析记录的清醒活动装置设计实用、稳定,具有较好的时间、空间应用效果。已申请并授权获批国家专利两项:发明专利 (202110525342.5),实用新型专利 (202121027247.4)。

【关键词】 神经递质;微透析;清醒活动装置;多巴胺;纹状体;黑质

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 03-0350-08

Design and application of a rodent awake activity device for brain microdialysis recording

ZHANG Yu^{1,2,3,4}, ZHOU Li^{1,2,3,4}, ZHANG Ling^{1,2,3,4}, SUN Xiuping^{1,2,3,4}, LI Xianglei^{1,2,3,4}, QIN Chuan^{1,2,3,4*}

(1. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China. 2. National Human Diseases Animal Model Resource Center, Beijing 100021. 3. NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021. 4. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021)

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

【基金项目】 中国科协第五届青年人才托举计划 (2019QNR001), 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-034), 国家自然科学基金项目 (31970510)。

Funded by Young Elite Scientist Sponsorship Program by CAST (2019QNR001), CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (2021-I2M-1-034), National Natural Science Foundation of China (31970510).

【作者简介】 张钰 (1990—), 女, 医学博士, 助理研究员, 研究方向: 医学神经生物学。Email: zhangyu@cnilas.org

【通信作者】 秦川 (1959—), 女, 北京协和医学院长聘教授, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型创制, 神经系统退行性疾病的病理学与病理生理学。Email: qinchuan@pumc.edu.cn

[Abstract] Objective To design and construct a rodent awake activity device for brain microdialysis recording and achieve the application and verification of brain microdialysis sampling in mice. **Methods** The rodent awake activity device for brain microdialysis recording was designed and constructed using relevant materials. Dopamine-related neurotransmitters in the substantia nigra-striatum neural circuit in mice were measured and verified by this device. Microdialysis probes were implanted into the substantia nigra and striatum. Recording and microdialysis sampling were performed for 7 days after operation. Dopamine and its metabolic intermediate DOPAC were analyzed in the substantia nigra and striatum. The microdialysis flow rate was 2 $\mu\text{L}/\text{minute}$. Samples were collected every 20 minutes for 200 minutes to analyze DA and DOPAC concentration changes over time. **Results** (1) Mouse brain samples showed stable levels of neurotransmitters. (2) Dopamine concentrations were (0.11 ± 0.01) nmol/L in the substantia nigra and (0.22 ± 0.05) nmol/L in the striatum. DOPAC concentrations were (3.38 ± 0.59) nmol/L in the substantia nigra and (20.35 ± 6.87) nmol/L in the striatum. No significant differences were found between each sampling period. **Conclusions** The rodent awake activity device for brain microdialysis recording is practical and stable with good applications in time and space dimensions. Two national patents have been applied for and authorized; Patent for invention (202110525342.5) and Patent for utility models (202121027247.4).

[Keywords] neurotransmitter; microdialysis; awake activity device; dopamine; striatum; substantia nigra
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

实验动物脑内微透析技术是神经系统研究中的一种经典的微量化学采样与检测技术,用于在体检测实验动物特定脑区的化学成分分泌情况。实验原理是局部微透析半透膜探针采样。首先通过脑内立体定位手术向啮齿类动物(大鼠、小鼠)或非人灵长类动物的目标脑区植入微透析探针,探针含有半透膜以及流入、流出两个方向的管路。手术恢复后,进行在体的微透析记录采样。记录过程中缓慢向探针流入管路泵入人工脑脊液,于探针的半透膜处进行物质交换(即“微透析”),目的脑区特定的化学成分可以跨越半透膜。按一定的时间间隔收集流出端样品,记录结束后再对样品进行化学成分的测定和分析,可以检测化学物质分泌的实时变化^[1]。该实验的优势是动物无须麻醉,在一定空间范围内进行清醒、自由活动,可以很好的反应动物在清醒、自由活动的情况下目标脑区的化学物质、神经递质分泌情况,同时也可实时结合动物的认知或行为任务,观测化学物质合成和分泌规律,是研究实验动物脑内化学物质分泌的关键技术方法^[2]。

啮齿动物保持微透析收集阶段清醒活动,不受外界环境应激和刺激,是稳定记录的重要基础。为实现啮齿动物微透析的清醒记录,本研究自行设计制作一种啮齿动物可用的脑内微透析清醒活动装置,结合现有商品化的装置并改进其多种不足^[3]。发明目的是供啮齿类实验动物(大鼠、小鼠)在此装置内进行清醒、自由活动的同时,头部的脑内微透析液体管路不缠绕打结,稳定收集脑内微透析的流出液样品。

为了验证该装置的有效性、科学性和稳定性,进行了小鼠黑质-纹状体的多巴胺神经递质微透析记录实验。向小鼠的黑质、纹状体分别手术植入微透析探针,通过微透析的清醒活动记录收集样品,进行多巴胺神经递质(DA)和代谢产物二羟基苯乙酸(DOPAC)的分析测定。实验结果表明,自行设计制作的微透析清醒活动装置可以实现小鼠的自由活动、线路不缠绕打结,多巴胺和 DOPAC 的采样稳定,可以获得理想实验结果。设计成功后,申请国家发明专利和实用新型专利两项,并顺利获批授权。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

9 只 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体重 20 ~ 25 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)-2020-0004】,饲养于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南纬路啮齿动物行为学设施【SYXK(京)-2018-0019】。动物设施内温度 24 ~ 26℃,光照 12 h 明亮;12 h 黑暗,小鼠自由饮水饮食。本实验中动物的使用已经过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准(ILAS-QC-2017-002)。实验中所有的动物实验操作过程严格按照实验动物使用的 3R 原则和实验动物福利伦理的相关规定进行。

1.1.2 主要仪器

(1)微透析清醒活动装置的制作:双通道不锈

钢转环 (INSTECH, 美国), 液体管路、样品收集管 (CMA, 瑞典), 铁架台, 1 mL 塑料吸头, 小鼠饮水瓶, 塑料桶, 铁丝, 纸胶带, 塑料板等。

(2) 小鼠微透析探针埋置手术: 啮齿动物脑立体定位仪 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 中国), 啮齿动物呼吸麻醉机 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司), 微透析探针 (CMA, 瑞典, 其中纹状体探针半透膜长度 2 mm、黑质探针长度 1 mm), 异氟烷 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司), 生理盐水、医用酒精、牙科水泥、医用棉签、手术器械等。

(3) 小鼠的微透析清醒记录: 四通道微量注射泵, 微透析液体管路 (CMA, 瑞典), 自制记录装置, 啮齿动物腰部塑料固定扎环, 50 μ L EP 管, 高氯酸, 氯化钠, 氯化钾, 氯化钙, 氯化镁, 稀盐酸等。

1.2 方法

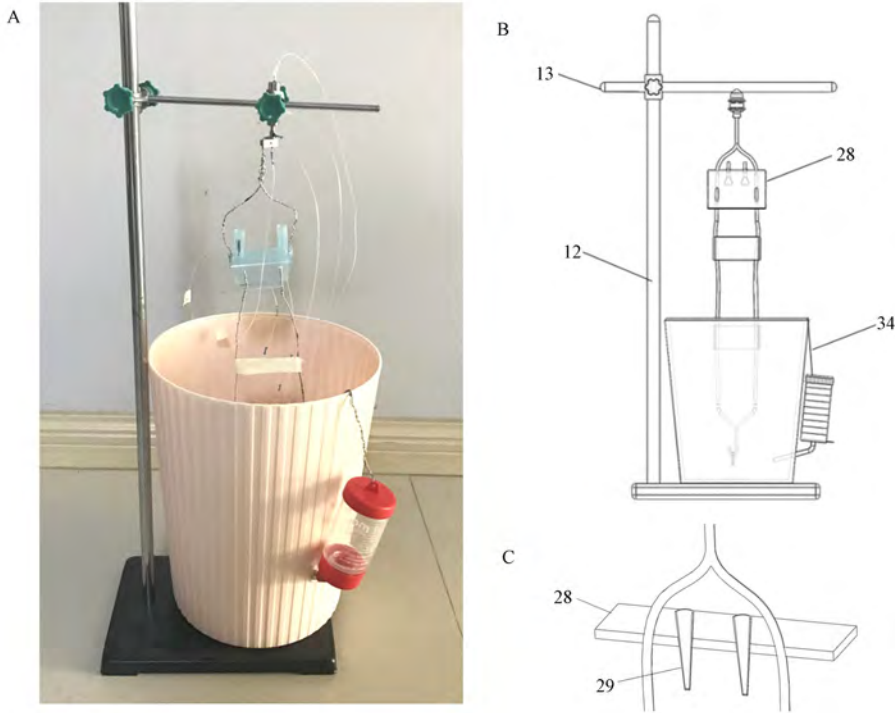
1.2.1 微透析清醒活动装置制作

参考相关文献和国外产品, 根据实验需求和可操作性, 自行设计制作微透析的啮齿动物清醒活动装置^[4-5]。取适量长度铁丝按示意图结构弯折, 将

塑料片打孔连接铁丝, 插入 1 mL 塑料吸头并固定, 用于记录过程中放入样品收集管。将双通道转环、铁丝、塑料片和纸胶带按装置示意图连接固定, 最下端铁丝为弯钩形, 用于记录过程中与小鼠塑料圈勾住固定。铁架台通过直角夹固定横杆, 将装置的双通道转环用直角夹固定在横杆上。塑料桶侧壁打孔, 将小鼠饮水瓶的瓶口插入固定, 放置于铁架台底座上 (图 1)。

1.2.2 动物分组和微透析探针手术埋置

C57BL/6 小鼠 9 只, 分别在右侧黑质、右侧纹状体脑区进行手术埋置微透析探针。小鼠使用异氟烷吸入麻醉, 固定于小鼠脑立体定位仪上, 眼睛涂抹眼药膏, 顶部头皮备皮, 碘伏消毒, 头顶正中切口, 钝性分离组织, 暴露颅骨和前囟, 黑质坐标 (AP = - 3.2 mm; ML = 1.25 mm; DV = 4.6 mm), 纹状体坐标 (AP = 1.0; ML = 1.5; DV = 3.2), 颅骨表面打孔, 按目标脑区坐标颅骨开窗, 旋入颅骨螺丝固定。缓慢垂直植入微透析探针, 用牙科水泥固定。手术过程中注意无菌操作规范, 手术结束后,



注: A: 装置实物图; B: 装置整体示意图; C: 装置局部示意图, 12: 铁架台垂直杆, 13: 铁架台水平杆, 28: 手工切割的塑料片结构, 用于打孔放置两个 1 mL 塑料吸头 (29), 记录过程中放置 EP 管收集管, 34: 动物饮水瓶。

图 1 微透析记录清醒活动装置及示意图

Note. A. Demonstration of the device picture. B. Overall schematic diagram of the device. C. Partial enlarged detail of the device. 12. Vertical rod of the iron frame platform. 13. Horizontal rod of the iron frame platform. 28. Handmade plastic sheet structure, used for drilling holes and placing two 1 mL plastic tips (29). EP collection tubes were inserted during recording. 34. Rodent drinking bottle.

Figure 1 Rodent awake activity device for brain microdialysis recording and schematic diagrams

小鼠腹腔注射非甾体抗炎药美洛昔康(2 mg/kg)。术后恢复 7 d,可进行记录实验。

1.2.3 小鼠微透析清醒记录

将脑内已植入微透析探针的小鼠置于装置内,连接管路,打开微透析泵,以 2 μL/min 流速缓慢泵入人工脑脊液(表 1),平衡 4.5 h,动物在此期间在装置内自由活动。开始正式收集后,先收集 30 min 空白样品,随后每 20 min 更换 1 次收集管,共记录 200 min,收集样品 10 管。记录结束后将样品送样上机,检测其中的神经递质 DA 和 DOPAC 浓度。本次实验样品委托法国波尔多大学 Erwan Bezard 教授实验室进行化学成分检测^[6]。

表 1 微透析用人工脑脊液配方

成分 Ingredients	浓度 (mmol/L) Concentration (mmol/L)
NaCl	147.00
KCl	2.70
CaCl ₂	1.20
MgCl ₂	0.85
溶液 Cl ⁻ 总浓度 Total [Cl ⁻]	153.80

注:pH = 6.5 ~ 7.4,4℃冰箱内可保存两周。
Note. pH = 6.5 ~ 7.4. Solution can be stored in 4℃ refrigerator for two weeks.

1.3 统计学分析

所有数据若无说明均采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据均用 SPSS 19.0 和采用统计软件 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析,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 啮齿动物脑内微透析清醒记录装置的埋置和记录

本实验使用自主设计制作的啮齿动物脑内微透析清醒记录装置,可实现啮齿类动物小鼠或大鼠两个脑区的同时记录。首先检测使用的有效性、科学性、稳定性。通过立体定位手术向小鼠纹状体和黑质分别植入微透析探针。动物术后恢复 7 d 后可在记录收集阶段进行小鼠黑质和纹状体的神经递质微透析采样,可以实现两个脑区同时的记录收集(见图 2)。

啮齿动物脑内微透析记录实验时,动物无须麻醉,腰部用塑料环固定,将动物腰部固定环与装置下方挂钩相连,头部埋置的微透析探针管路末梢与

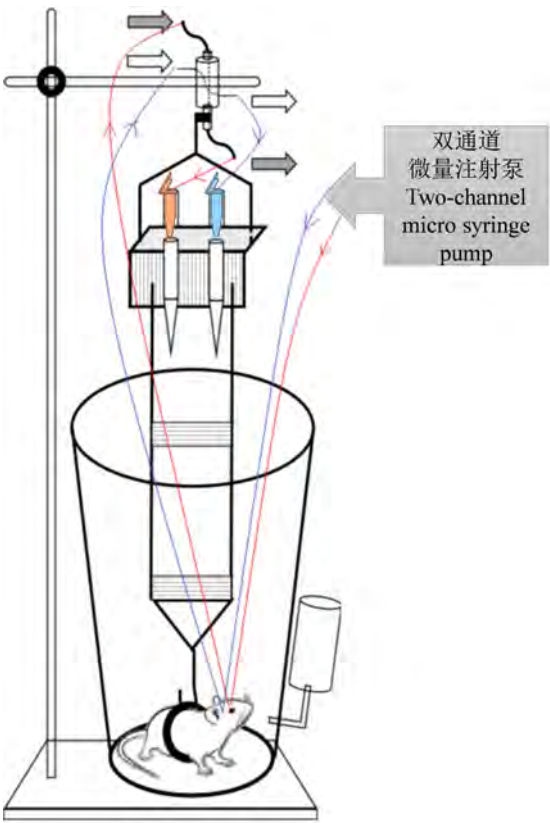


图 2 微透析记录清醒活动装置用法示意图

Figure 2 Schematic diagram of usage of the rodent awake activity device for brain microdialysis recording

装置的液体管路相连,动物置于塑料桶内。连接注射泵、微量进样针、液体管路、转环。在装置上的 2 个 1 mL 塑料吸头中放入样品收集管,将液体管路的末端插入,并用纸胶带稍加固定,分别收集小鼠纹状体、黑质的样品。记录过程中,小鼠在塑料桶内进行清醒活动,自由饮水、饮食,液体管路可随动物的运动旋转,不易拆绕打结。每 20 min 更换 1 次样品收集管,取得小鼠脑内黑质或纹状体的微透析样品。整个记录过程中动物自由运动状态良好,装置使用稳定,取样收集便利。

2.2 脑内在体微透析测定小鼠纹状体、黑质的多巴胺递质

以啮齿动物的多巴胺能神经通路研究为例,定量验证此装置的采样能力。多巴胺(dopamine, DA)是中枢神经系统含量最丰富的儿茶酚胺类神经递质,在中脑-皮层通路(mesocortical system)、中脑边缘通路(mesolimbic system)、黑质-纹状体通路(nigro-striatal system)和结节-漏斗通路(tuberoinfun-dibular system)发挥重要的生理功能^[7],其功能异常与成瘾、帕金森病、精神分裂症

等神经系统疾病息息相关^[8-13]。瑞典科学家阿尔维德·卡尔松 (Arvid Carlsson) 和美国科学家保罗·格林加德 (Paul Greengard) 有关神经递质多巴胺的研究获得 2000 年诺贝尔生理学或医学奖 (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2000/press-release/>)^[14]。多巴胺在神经元内主要通过单胺氧化酶 (MAO) 的作用转化为二羟基苯乙酸 (DOPAC)^[15]。在鼠脑中,多巴胺代谢的最终产物是 DOPAC,而在人或非人灵长类动物中, DOPAC 受到细胞外儿茶酚胺氧位甲基转移酶 (COMT) 的作用还可转化为高香草酸 (HVA) (图 3)。实验研究大多通过啮齿动物多巴胺能神经突触末梢释放神经递质 DA 和 DOPAC 的化学含量研究脑内多巴胺能神经通路功能。本研究对小鼠黑质和纹状体分别手术植入脑内微透析探针,进行自由活动状态下的在体微透析收集。实验结束后,对实验小鼠进行大脑取材和定位验证,纹状体和黑质的微透析探针末梢定位准确,均位于目标脑区 (图 4)。

记录完成后,对收集的样品送样,检测其中神经递质 DA 和 DOPAC 的化学含量。对于小鼠的黑质-纹状体神经通路,神经元胞体位于黑质,在胞体内实现神经递质的合成和传导,神经细胞发出轴突投射到纹状体部位,与其他神经元形成大量突触,通过突触前膜释放大量神经递质成分,通过突触间隙作用于下游神经元。

经测定,DA 在小鼠黑质的含量在记录期间随时间变化基本稳定,绝对浓度为 (0.11 ± 0.01) nmol/L。各时段之间无明显差异,其中最高为 (0.15 ± 0.04) nmol/L,最低为 (0.10 ± 0.00)

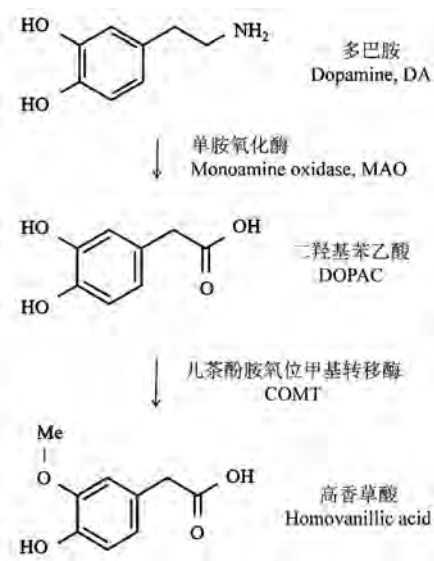


图 3 神经系统多巴胺代谢示意图

Figure 3 Schematic diagram of dopamine metabolism in the nervous system

nmol/L。DA 在小鼠纹状体的含量在记录期间随时间变化基本稳定,绝对浓度为 (0.22 ± 0.05) nmol/L。各时段之间无明显差异,其中最高为 (0.32 ± 0.11) nmol/L,最低为 (0.22 ± 0.04) nmol/L (图 5)。

DOPAC 在小鼠黑质的含量在记录期间随时间变化基本稳定,绝对浓度为 (3.38 ± 0.59) mol/L。各时段之间无明显差异,其中最高为 (3.80 ± 0.73) nmol/L,最低为 (2.41 ± 0.54) nmol/L。DOPAC 在小鼠纹状体的含量为在记录期间随时间变化基本稳定,绝对浓度为 (20.35 ± 6.87) nmol/L。各时段之间无明显差异,其中最高为 (23.86 ± 7.14) nmol/L,最低为 (19.33 ± 6.29) nmol/L (图 6)。

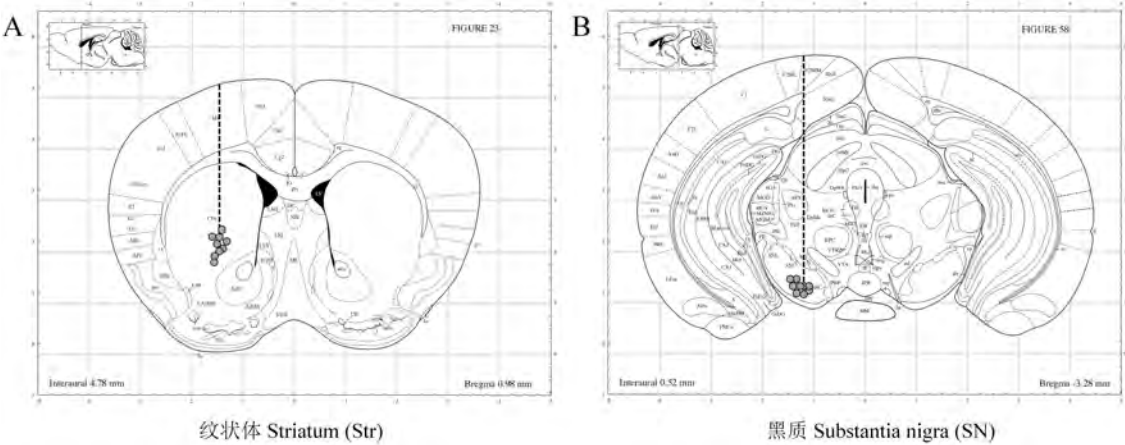


图 4 小鼠脑内微透析探针埋置位点

Figure 4 Sites of microdialysis probe implantation in mice brain

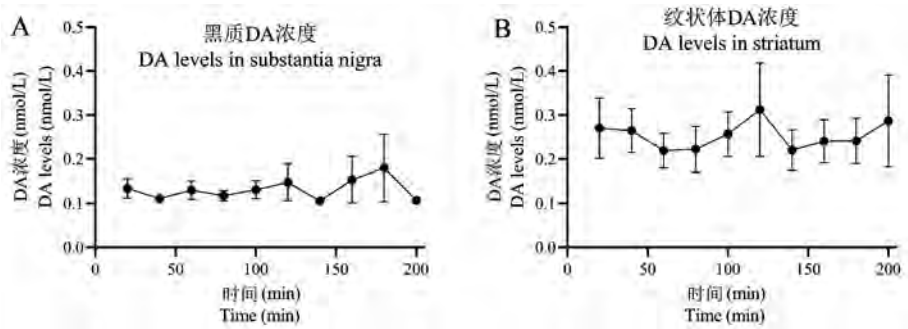


图5 微透析记录清醒活动装置测定小鼠黑质、纹状体多巴胺浓度

Figure 5 Neurotransmitter dopamine levels in the substantia nigra and striatum of mice measured by the rodent awake activity device for brain microdialysis recording

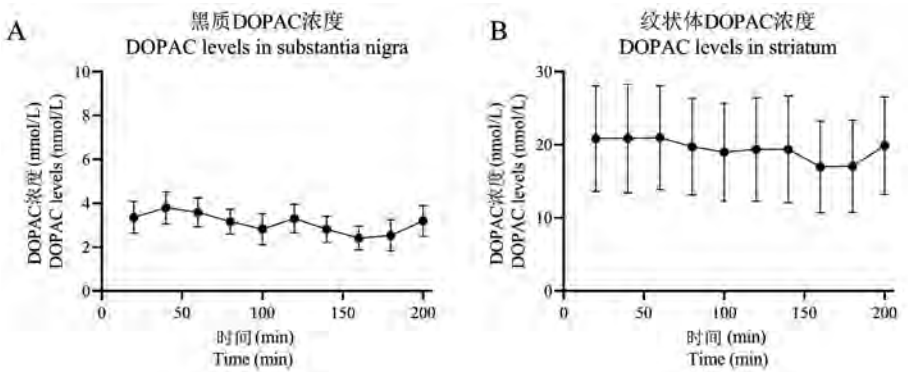


图6 微透析记录清醒活动装置测定小鼠黑质、纹状体 DOPAC 浓度

Figure 6 Neurotransmitter DOPAC levels in the substantia nigra and striatum of mice measured by the rodent awake activity device for brain microdialysis recording

3 讨论

神经递质是神经系统重要的信号传导途径,通过旁分泌的形式在神经元、神经胶质细胞之间实现调控作用。神经递质的合成、分泌、摄取和重吸收是神经系统的重要生理功能,在疾病状态下,神经递质的含量、分泌及重吸收障碍是病理学和病理生理学改变的化学基础。神经系统实验研究中,模型动物的脑内化学物质分泌、浓度和受体的变化是疾病机制研究的几个重要层次^[16]。实现脑内化学递质稳定、可靠的记录是本装置的制作目标。

3.1 装置的设计和使用

国内外现有部分在售的脑内微透析清醒活动装置,最常见的是国外产品,基本由动物活动箱(含动物水瓶)和微透析转环装置两部分组成。动物活动箱大多为立方体的活动空间,在装置的外侧固定有动物水瓶。微透析转环装置从侧方固定在动物活动箱的一个侧壁上缘,使二者一体化。以上产品有两点不足。第一,动物活动箱通常为方形,对动

物的自由活动有所限制,活动箱的边缘和角落不易清洗,容易藏匿污渍、动物尿液等,残留的个体气味会对随后动物的检测产生干扰。动物在不同位置(如长边或角落)会出现生理性的位置偏好,啮齿类动物具有筑巢、避光的习性,在方形空间中更偏爱在角落中运动,因此对动物的自由活动有一定影响。第二,微透析转环装置(金属棒和转环线缆装置)以侧方的上边缘处卡扣的形式固定在活动箱的一侧,虽然装置已经尽量轻便,但该装置的重心在一侧,容易造成整体放置不稳定,而且微透析转环装置结构比较细,受力较易折断,易损耗报废。进口产品在购买和使用过程中存在诸多不便,如进度缓慢、价格较高、维修困难、技术支持难等,本文装置设计通过自主设计改进并制作,力求更好实现啮齿类动物清醒状态下的脑内微透析记录。

本装置的适用范围是啮齿类实验动物,常用的如大鼠、小鼠,根据研究需要也可进行金黄地鼠、豚鼠等动物的脑内微透析采样,动物的自由活动可通过更换相应尺寸的活动圆筒实现。在本文的研究

中,我们实验了清醒、自由活动小鼠的黑质和纹状体微透析采样分析,小鼠在装置内清醒、自由活动,可顺利采样记录,装置圆筒的直径为:底座 17 cm,上缘 20 cm。如使用大鼠开展实验,为实现动物的清醒、自由活动,可将装置的圆筒更换为较大尺寸,并在铁架台上固定;同时在预实验过程中观察采样管路长度是否合适,并进行微调,保证大鼠的自由活动和稳定记录。本实验室现有的大鼠活动装置的圆筒直径为 30 cm 或 45 cm。

3.2 实验动物的化学物质采样和分析应用范围

在体微透析实验可用于多种化学成分的检测,除本文的多巴胺和 DOPAC 神经递质之外,该技术还可检测 GABA、谷氨酸、乙酰胆碱等神经递质,乳酸、尿酸、丙酮酸、组胺、褪黑素、P 物质、缓激肽等代谢产物。该技术适用的实验动物,除啮齿动物大鼠、小鼠以外,还可用于豚鼠、金黄地鼠、兔、狗、猫、猪、羊、非人灵长类等动物。检测的组织或器官包括脑、脊髓、血液、心脏、肝、肾、脂肪组织和肾上腺等^[17-18]。不同实验动物、不同组织的检测根据实验需求选用相应的采样模式,可进行清醒或麻醉记录,利用不同规格、不同实验目的的装置展开研究。

3.3 神经化学分析新技术和展望

脑内微透析实验属于神经化学检测方法,通过在体采样、化学成分分析获得化学物质的浓度数据。在神经系统发挥功能的生理过程中,神经递质常表现为低浓度的实时变化,因此对技术也提出更高的挑战,如要求采样过程的稳定性、化学成分检测的特异性和灵敏度、更高的时间和空间分辨率等。本装置可为实验动物在体神经化学检测提供稳定的采样活动装置。近年来发展的一系列神经递质检测方法,如荧光探针、电化学检测等,具有较好的特异性、灵敏度及时空分辨率,借助微电子、计算机技术的飞速发展也实现了神经递质化学检测的技术更新。

本研究基于脑内微透析清醒记录技术的原理和现状,自行设计制作一种啮齿类动物脑内微透析记录的清醒活动装置,并通过小鼠的黑质-纹状体多巴胺能神经通路进行该装置的记录实验,取得稳定的实验结果。现已申请并授权获批国家专利两项:发明专利(202110525342.5)^[19],实用新型专利(202121027247.4)^[20]。

参 考 文 献(References)

[1] Zhang C, Chen RX, Zhang Y, et al. Reduced GABAergic

transmission in the ventrobasal thalamus contributes to thermal hyperalgesia in chronic inflammatory pain [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41439.

[2] 万金霞,李毓龙. 神经递质检测方法的研究进展 [J]. *分析化学*, 2020, 48(3): 307-315.

Wan JX, Li YL. Recent advances in detection methods for neurotransmitters [J]. *Chin J Anal Chem*, 2020, 48(3): 307-315.

[3] Boschi G, Launay N, Rips R, et al. Brain microdialysis in the mouse [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1995, 33(1): 29-33.

[4] 宋广青,高莉,孙秀萍,等. 大鼠物体识别实验装置的研制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(8): 80-86.

Song GQ, Gao L, Sun XP, et al. Development of an apparatus for object recognition task in rats [J]. *Chin J Comp Med*, 2013, 23(8): 80-86.

[5] König M, Thinnies A, Klein J. Microdialysis and its use in behavioural studies: Focus on acetylcholine [J]. *J Neurosci Methods*, 2018, 300: 206-215.

[6] Thiollier T, Wu C, Porras G, et al. Microdialysis in awake macaque monkeys for central nervous system pharmacokinetics [J]. *Anim Model Exp Med*, 2018, 1(4): 314-321.

[7] Panin F, Cathala A, Piazza PV, et al. Coupled intracerebral microdialysis and electrophysiology for the assessment of dopamine neuron function *in vivo* [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2012, 65(2): 83-92.

[8] Heidbreder C, De Witte P. Ethanol differentially affects extracellular monoamines and GABA in the nucleus accumbens [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1993, 46(2): 477-481.

[9] Dahchour A, Ward RJ. Changes in brain dopamine extracellular concentration after ethanol administration; rat microdialysis studies [J]. *Alcohol Alcohol*, 2021, 57(2): 165-175.

[10] Marti M, Rodi D, Li Q, et al. Nociceptin/orphanin FQ receptor agonists attenuate L-DOPA-induced dyskinesias [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(46): 16106-16119.

[11] Meissner W, Ravenscroft P, Reese R, et al. Increased slow oscillatory activity in substantia nigra pars reticulata triggers abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat in the presence of excessive extracellular striatal dopamine [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 22(3): 586-598.

[12] 李全,吴妹,王琪,等. 脑内神经递质在中医药研究阿尔茨海默病中的进展 [J]. *中医药学报*, 2021, 49(6): 109-111.

Li Q, Wu M, Wang Q, et al. Progress of brain neurotransmitters in TCM research on Alzheimer's disease [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2021, 49(6): 109-111.

[13] 张如意,张丽,吴燕川,等. 不同剂量鱼藤酮对拟帕金森病模型大鼠行为学及纹状体多巴胺含量的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(9): 1-5.

Zhang RY, Zhang L, Wu YC, et al. Impact of different dosage of rotenone on behavior and dopamine content in striatum of Parkinson like model rats [J]. *Chin J Comp Med*, 2013, 23(9): 1-5.

- [14] The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2000. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2022[EB/OL]. [2022-06-17] <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2000/summary/>
- [15] El-Sherbeni AA, Stocco MR, Wadji FB, et al. Addressing the instability issue of dopamine during microdialysis: the determination of dopamine, serotonin, methamphetamine and its metabolites in rat brain [J]. J Chromatogr A, 2020, 1627: 461403.
- [16] Egenrieder L, Mitricheva E, Spanagel R, et al. No basal or drug-induced sex differences in striatal dopaminergic levels: a cluster and meta-analysis of rat microdialysis studies [J]. J Neurochem, 2020, 152(4): 482-492.
- [17] Lasley SM. The use of intracerebral microdialysis to elucidate environmentally induced neurotoxic mechanisms [J]. Curr Protoc Toxicol, 2019, 80(1): e72.
- [18] Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, et al. Overview of brain microdialysis [J]. Curr Protoc Neurosci, 2009, 47(1):20-27
- [19] 秦川, 张钰, 周澧, 等. 一种用于清醒、自由活动运动的动物脑内微透析记录装置: ZL 2021 1 0525342. 5 [P]. 2022-02-18.
- Qin C, Zhang Y, Zhou L, et al. A brain microdialysis recording device for awake and free moving animals. ZL 2021 1 0525342. 5 [P]. 2022-02-18.
- [20] 秦川, 张钰, 周澧, 等. 一种啮齿类动物脑内微透析记录的清醒活动装置: ZL 2021 2 1027247. 4 [P] 2021-06-18.
- Qin C, Zhang Y, Zhou L, et al. A rodent awake activity device for brain microdialysis recording. ZL 2021 2 1027247. 4 [P]. 2021-06-18.

[收稿日期] 2022-02-23

综述:左心疾病相关肺动脉高压动物模型

肺动脉高压是多种原因导致的以肺动脉压力和肺血管阻力进行性升高为特征的心肺血管疾病。其中,右心导管检测平均肺动脉压 ≥ 25 mmHg 且肺动脉楔压 > 15 mmHg 的肺动脉高压被定义为左心疾病相关肺动脉高压(PH-LHD)。根据世界卫生组织分类,PH-LHD 属于第 2 大类肺动脉高压,亦是最为常见的一种类型。来自德国慕尼黑大学及柏林洪堡大学的研究者们总结归纳了目前用于 PH-LHD 研究的 3 大类模型:压力负荷诱导左心衰竭引起的 PH-LHD、缺血性心衰诱导的 PH-LHD、代谢紊乱伴随的 PH-LHD。

压力负荷诱导左心衰竭的造模方式主要包括主动脉束带术、主动脉缩窄术、肺静脉束带术及左心房狭窄。主动脉束带术是目前最常见的研究 PH-LHD 的方法,其操作简单,可重复性强,多适用于大鼠。主动脉缩窄术是另一种常见的 PH-LHD 诱导方式,主要适用于小鼠。这两种方法均易造成急性左心衰甚至死亡,且仅能诱导轻、中度 PH-LHD。肺静脉束带术是最常见的研究大动物 PH-LHD 的方法,造模时间长,操作具有一定难度。前面三种术式均可用于诱导射血分数保留的心力衰竭相关肺动脉高压。左心房狭窄的疾病动物模型可用于模拟二尖瓣病变引起的 PH-LHD,多适用于大鼠。缺血性心衰诱导的 PH-LHD 则主要用于模拟射血分数降低的心力衰竭相关肺动脉高压。该模型既可适用于大、小鼠等啮齿类动物,也可适用于猪,多用于诱导中、重度 PH-LHD。文中还介绍了单纯高脂饮食、高脂饮食或奥氮平联合压力负荷诱导左心衰及肥胖 ZSF1 大鼠联合 Sugen 5416 等多种方式诱导的伴有代谢综合征的 PH-LHD 啮齿类模型,这些模型造模时间大多较长,且多引起轻度 PH-LHD。

综上所述,本文全面概括了目前用于模拟 PH-LHD 的动物模型及其优点和局限性。加深对 PH-LHD 动物模型的了解将有利于研究者选择合适的动物模型,从而助力 PH-LHD 的机制探索等临床前研究的顺利开展。

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(3):197-206; <https://doi.org/10.1002/ame2.12214>)。

张凯玉,王圆,胡燕燕,等. 斑马鱼缓慢性心律失常模型的构建[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 358-369.

Zhang KY, Wang Y, Hu YY, et al. Establishment of a bradycardiac arrhythmia model in zebrafish [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 358-369.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.008

斑马鱼缓慢性心律失常模型的构建

张凯玉¹,王圆¹,胡燕燕¹,张静¹,施雯婷¹,赵外荣^{1,2},唐靖一^{1,2,3*},周忠焱^{1*}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院心血管研究室,上海 200032;2. 上海中医药大学附属龙华医院中西医结合心脏康复中心,上海 200032;3. 上海中医药大学产业发展中心,上海 200032)

【摘要】 目的 建立一种简单易行、重复性好的斑马鱼缓慢性心律失常模型及其评价体系。**方法** 选用 24 hpf 的野生型和心脏标记绿色荧光蛋白的转基因斑马鱼,分别用不同浓度的维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮、美西律干预 48 h,检测斑马鱼生存率、心率、心博量、心输出量、射血分数、心室舒张期和收缩期面积差值、静脉窦与动脉球(SV-BA)间距等心脏功能和心脏毒性评价指标。**结果** 药物毒性的评价中,半数致死浓度(IC₅₀)排序为普罗帕酮 < 美西律 < 胺碘酮 < 美托洛尔和维拉帕米。维拉帕米显著降低斑马鱼心率、心输出量、射血分数及心室舒张期和收缩期面积差值,增加 SV-BA 间距;普罗帕酮降低斑马鱼心率及心输出量;美托洛尔降低斑马鱼心率;胺碘酮降低斑马鱼心率,增加 SV-BA 间距;美西律增加 SV-BA 间距。**结论** 维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮均可制备斑马鱼缓慢性心律失常模型,其中维拉帕米效果最佳。本研究提出运用维拉帕米等抗心律失常药物构建缓慢性心律失常斑马鱼模型,并建立了相应的评价指标,对缓慢性心律失常的研究及药物研发均具有重要的意义。

【关键词】 缓慢性心律失常;斑马鱼;维拉帕米;心脏毒性;抗心律失常药物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0358-12

Establishment of a bradycardiac arrhythmia model in zebrafish

ZHANG Kaiyu¹, WANG Yuan¹, HU Yanyan¹, ZHANG Jing¹, SHI Wenting¹, ZHAO Wairong^{1,2},
TANG Jingyi^{1,2,3*}, ZHOU Zhongyan^{1*}

(1. Cardiovascular Research Laboratory, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. 2. Cardiac Rehabilitation Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032. 3. Industrial Development Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032)

Corresponding author: TANG Jingyi. E-mail: dr_tang@163.com; ZHOU Zhongyan. E-mail: biozzy@126.com

【Abstract】 Objective To establish a simple and reproducible model and its evaluation system for bradycardiac arrhythmia in Zebrafish. **Methods** Wild-type and heart-labeled GFP transgenic zebrafish were employed in this study after 24 h of fertilization. Twenty-four hpf (hour post-fertilization) zebrafish embryos were treated with various concentrations of verapamil, propafenone, metoprolol, amiodarone, and mexiletine for 48 hours, then the cardiac function and cardiotoxicity, including survival rate, heart rate, stroke volume, cardiac output, ejection fraction, area difference between ventricular

【基金项目】上海中医药大学附属龙华医院育苗计划(KY202219),上海中医药大学医养结合示范工程项目(YYKC-2021-01-019),上海中医药大学预算内科研项目(2021LK049),上海市公共卫生三年行动计划(GWIV-28,ZY-(2018-2020)-FWTX-8001)。

Funded by the Research Program of Longhua Hospital affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (KY202219), Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Demonstration Project of Combination of Medical Care (YYKC-2021-01-019), Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (2021LK049), Shanghai Public Health Three-Year Action Plan (GWIV-28,ZY-(2018-2020)-FWTX-8001)。

【作者简介】张凯玉(1995—),女,在读硕士研究生。Email: 690664521@qq.com

【通信作者】唐靖一(1973—),男,主任医师,博士,硕士生导师,研究方向:中西医结合治疗心血管疾病研究。Email: dr_tang@163.com;
周忠焱(1988—)男,副研究员,博士,硕士生导师,研究方向:模式生物斑马鱼在药学研究中的应用。Email: biozzy@126.com。

* 共同通信作者

diastole and systole and the distance between sinus venosus and bulbus arteriosus (SV-BA), were observed in each group.

Results To evaluate drug toxicity, the median lethal concentration (IC_{50}) was ranked as propafenone < mexiletine < amiodarone < metoprolol and verapamil. After treatment with verapamil, the heart rate, cardiac output, ejection fraction and difference between ventricular diastolic and systolic areas significantly decreased in Zebrafish, while the distance of SV-BA increased. Treatment of propafenone reduced the heart rate and cardiac output in Zebrafish. Treatment of metoprolol decreased the heart rate in Zebrafish. Treatment of amiodarone decreased the heart rate and increased the distance of SV-BA in Zebrafish. Treatment of metoprolol increased the distance of SV-BA in Zebrafish. **Conclusions** Verapamil, propafenone, metoprolol and amiodarone all could be used to construct zebrafish models of bradycardiac arrhythmia, among which verapamil had the best efficacy. This study proposes the use of anti-arrhythmic drugs, particularly verapamil, to establish the bradycardiac arrhythmia model using zebrafish as well as the corresponding evaluation indicators. This study is of great significance to the research of bradycardiac arrhythmia and its drug development.

【Keywords】 bradycardiac arrhythmia; zebrafish; verapamil; cardiotoxicity; antiarrhythmic drugs

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

缓慢性心律失常 (bradycardiac arrhythmia) 是以心脏起搏和 (或) 传导功能异常导致心率降低 (低于每分钟 60 次) 为特征的心律失常^[1], 其病因复杂, 受冠心病、心肌病、风湿性心脏病等疾病影响。特发性的传导系统退化、迷走神经兴奋、心脏外科手术和导管射频术造成的损伤, 甲状腺功能紊乱、电解质紊乱、营养不良, 以及一些药物 (如抗心律失常类药物、精神类药物等) 的影响^[2-4] 也可导致缓慢性心律失常的发生。而且缓慢性心律失常能诱发其他系统疾病, 重者可出现晕厥、猝死等危急情况, 严重危害生命健康。《心律失常的紧急处理专家共识》指出, 缓慢性心律失常的治疗以药物^[5] 和非药物治疗^[6-7] 为主。其中药物治疗多以阿托品、肾上腺素、氨茶碱等急救药物为主, 存在副作用大、不能长期应用等不足。非药物治疗主要是心脏起搏器、心脏神经消融术等, 其价格昂贵、普及性差。因此, 研发有效治疗缓慢性心律失常且副作用小、价格低的药物具有重要的意义。

目前特非那定^[8]、阿司咪唑^[9]、乌头碱^[10] 等药物常用于建立心律失常动物模型, 但缓慢性心律失常模型的构建仍缺乏公认的造模方法和全面的评价指标。现有的缓慢性心律失常模型主要以药物 (普萘洛尔、维拉帕米等) 诱导和手术建模为主^[11], 目前用于构建缓慢性心律失常模型动物有小鼠、大鼠、家兔、犬等^[12]。而常规的动物模型饲养周期长、造模时间长、成本高^[13-14], 难以实现大规模高通量药物筛选^[9]。斑马鱼模型实验周期短、成本低、观察方便可实现大规模高通量药物筛选^[15-17], 其与人虽属于不同物种, 蛋白表达存在差异, 但是基因组相似度高达 87%^[18-19]。斑马鱼心脏发育的基因级联与人类心脏发育的基因级联^[20]、心脏结构和功

能、心率和复极时间^[21] 等也存在相似性, 其在心脏疾病研究和新药药效评价方面发挥了重要的作用^[4]。因此, 斑马鱼能够完善现有的缓慢性心律失常动物模型的不足, 为缓慢性心律失常疾病模型的评价提供了一种新方法 (短时、高效、低廉)。研究表明^[2-4], 抗心律失常药物存在心率减慢、心脏毒性等副作用。是否可以应用此类药物在斑马鱼体内成功建立稳定的缓慢性心律失常模型, 本文做出了一定探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

野生型斑马鱼系 Tuebingen 和心脏标记绿色荧光蛋白的转基因斑马鱼系 Tg(cmlc2: GFP) 由上海中医药大学附属龙华医院斑马鱼实验室提供。参照第五版 The Zebrafish Book^[22], 斑马鱼的养殖在全封闭循环系统进行, 鱼房内光照/黑暗 (14 h 光照/10 h 黑暗交替循环)、室内温度、水温、pH 值、电导率以及各项水质指标均符合饲养要求, 每日定时两次喂食丰年虾。所有操作均在上海中医药大学附属龙华医院斑马鱼实验室进行, 该实验室具备标准化的斑马鱼养殖和实验技术, 并在国内外发表了多篇论文^[15-17]。

1.1.2 主要试剂与仪器

盐酸美西律片 (批号: 55191101)、盐酸普罗帕酮片 (批号: 144191001), 购自上海上药信谊药厂有限公司; 琥珀酸美托洛尔缓释片 (批号: SWNWA), 购自阿斯利康制药有限公司; 盐酸胺碘酮片 (批号: 9HG0436), 购自赛诺菲制药有限公司; 盐酸维拉帕米 (批号: 20201117), 购自国药集团试剂有限公司;

4%甲基纤维素(批号:M0512-100G),购自 Sigma 公司;0.9%生理盐水(批号:21032602),购自华裕有限公司。

斑马鱼养殖单元(北京爱生公司,中国);恒温培养箱(上海三腾仪器有限公司,PTC-300,中国);荧光倒置显微镜(尼康,Ti-U,日本;配置 Nikon DIGITAL SIGHT DS-Ri1 摄像头和 NIS Elements BR 软件);体视显微镜(尼康,SMZ18,日本;配置 Nikon DIGITAL SIGHT DS-Fi1C 摄像头和 NIS Elements F 软件);超纯水机(密理博,Milli-Q Direct 8,美国)。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼生存情况观察

选择发育良好的受精后 24 h(24 hpf)的野生型斑马鱼胚胎,用显微镊将其外层卵膜拆去,放入 24 孔板中,每孔 10 条,分别按照空白对照组、维拉帕米、美西律、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮不同浓度组(1、3、10、30、100、1000 μmol/L)给药干预,连续观察 5 d,每天记录斑马鱼的生存情况。

1.2.2 斑马鱼给药处理

选择发育良好 24 hpf 的转基因斑马鱼 Tg(cmlc2:GFP),放入 24 孔板中,每孔 10 条,分别按照空白对照组、维拉帕米不同浓度组(20、40、50、80、100 μmol/L)、美西律不同浓度组(3、10、30 μmol/L)、普罗帕酮不同浓度组(3、10、30 μmol/L)、美托洛尔不同浓度组(10、30、100 μmol/L)、胺碘酮不同浓度组(10、30、100 μmol/L)给药干预 48 h。

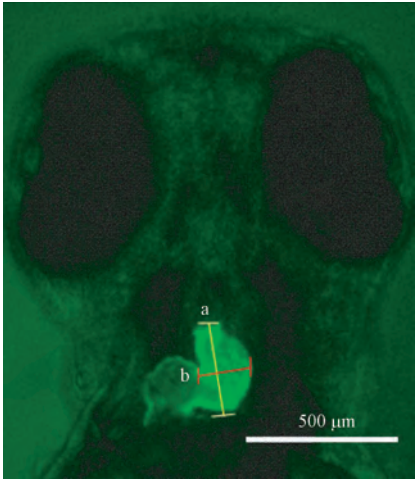
1.2.3 斑马鱼心脏形态观察

给药处理后,将斑马鱼放于载玻片上,用 4%的甲基纤维素进行固定,调整为侧卧位或俯卧位进行观察。侧卧位使两侧眼、体节重合,尾部和身体处于同一水平面。俯卧位使斑马鱼心室、心房充分暴露,在显微镜下进行观察拍照和视频记录。

1.2.4 斑马鱼心脏结构和功能的评价

给药处理后,按照文献的方法^[23-24]使斑马鱼处于俯卧位(图 1),在荧光倒置显微镜下视频记录 15 s,具体参数如下:曝光时间 25 ms;每秒帧数(Fps):> 50 fps;时长(Duration):15 s;分辨率(Resolution):1280 × 1024 像素(Pixel)。从视频文件中找到心室的舒张期末期和收缩期末期对应的图片,测量心室的长轴(a)和短轴(b)。用椭圆形的体积公式计算心室的体积: $V = \frac{4}{3}\pi \times (\frac{a}{2}) \times (\frac{b}{2})^2$;心搏量的计算:stroke volume = $V_{舒张期} - V_{收缩期}$;心输出量:cardiac output = stroke volume × heart rate;射血分数

(ejection fraction, EF) = (心室舒张末容积-心室收缩期容积)/心室舒张末容积×100%;心室舒张期和收缩期面积差值: $\Delta S_{心室} = S_{舒张期} - S_{收缩期}$ 。

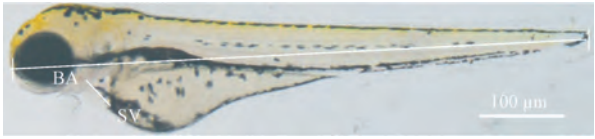


注:a:长轴;b:短轴。
图 1 斑马鱼心室长轴和短轴的测量方法
Note. a. Long axis. b. Short axis.

Figure 1 Measurement methods of the long axis and short axis of the ventricle in zebrafish

1.2.5 斑马鱼静脉窦与动脉球间距测量

给药处理后,参考文献^[25]使斑马鱼处于侧卧位(图 2),在体视显微镜下拍照观察斑马鱼心脏形态、静脉窦(sinus venosus, SV)、动脉球(bulbus arteriosus, BA),具体参数如下:分辨率(Resolution):1280 × 1024 像素(Pixel)。用 Image J 软件测量斑马鱼身长(height distance)、SV-BA 间的距离。以 SV-BA 间距/斑马鱼身长对不同的斑马鱼进行归一化比较。



注:SV:静脉窦;BA:动脉球。
图 2 斑马鱼身长、静脉窦-动脉球间距测量
Note. SV. Sinus venosus. BA. Bulbus arteriosus.

Figure 2 Measurement of the height distance and distance between SV and BA in zebrafish

1.3 统计学分析

多组间数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。所有实验均独立重复 ≥ 3 次,数据均采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并使用 GraphPad Prism 软件作图。

2 结果

2.1 药物对斑马鱼生存率的影响

如图 3 所示,维拉帕米的半数致死浓度 (IC_{50}) 值为 $291.0\ \mu\text{mol/L}$, 95% 的置信区间为 $[286.2, 295.9]$; 普罗帕酮的 IC_{50} 值为 $47.08\ \mu\text{mol/L}$; 美托洛尔的 IC_{50} 值为 $291.0\ \mu\text{mol/L}$, 95% 的置信区间为 $[286.2, 295.9]$; 胺碘酮的

IC_{50} 值为 $140.6\ \mu\text{mol/L}$, 95% 置信区间为 $[58.63, 337.4]$; 美西律的 IC_{50} 值为 $104.7\ \mu\text{mol/L}$ 。因此,以上 IC_{50} 的排序为普罗帕酮 < 美西律 < 胺碘酮 < 美托洛尔和维拉帕米,说明美托洛尔和维拉帕米毒性较低。

2.2 维拉帕米对斑马鱼心脏结构和功能的影响

2.2.1 维拉帕米对斑马鱼心脏功能的影响
如图 4 所示,与空白对照组相比,维拉帕米 40、

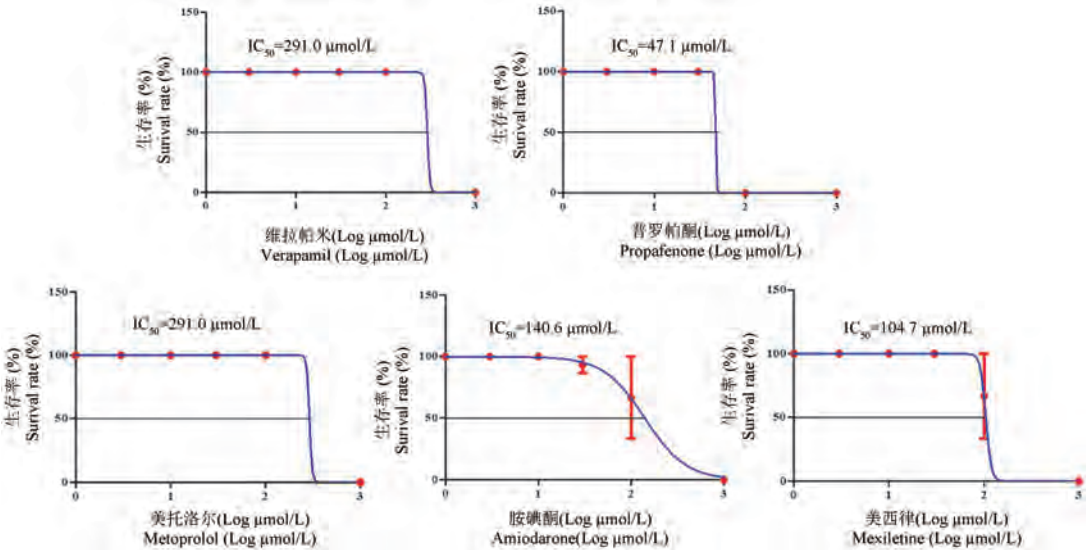
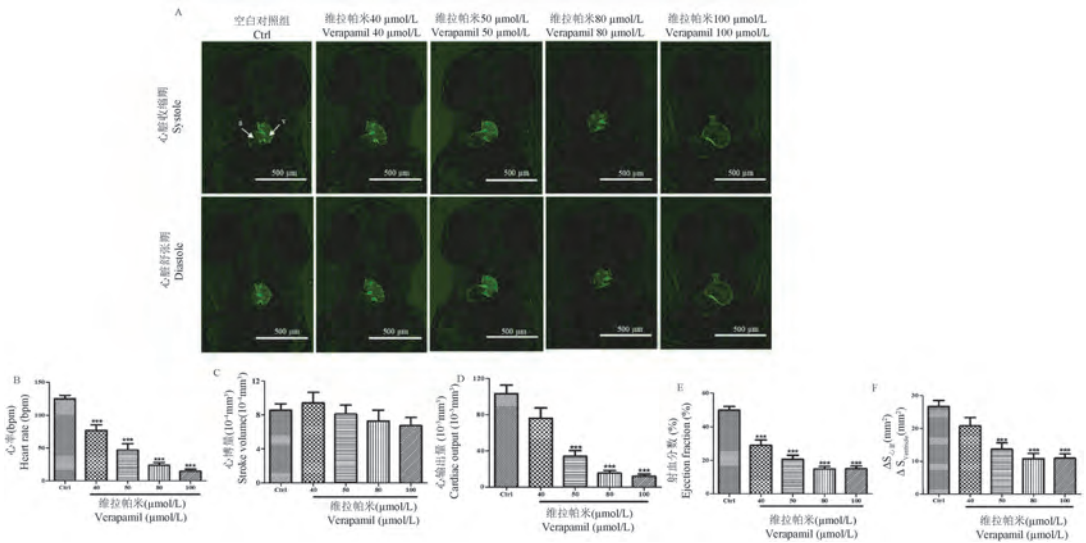


图 3 药物对斑马鱼生存率的影响
Figure 3 Effects of drugs on the survival rate in zebrafish



注: A: 斑马鱼心脏收缩和舒张形态图, a: 心房, v: 心室; B: 心率; C: 心博量; D: 心输出量; E: 射血分数; F: 斑马鱼的心室舒张期和收缩期面积差值 $\Delta S_{\text{心室}}$; 与 Ctrl 组相比, *** $P < 0.001$; 放大倍数: 10X。(下图同)

图 4 维拉帕米对斑马鱼心脏功能的影响

Note. A. Cardiac systolic and diastolic morphology of zebrafish. a. Atrium. v. Ventricle. B. Heart rate. C. Stroke volume. D. Cardiac output. E. Ejection fraction. F. Area difference between diastole and systole in zebrafish $\Delta S_{\text{ventricle}}$. Compared with Ctrl group, *** $P < 0.001$. Magnification. 10X. (The same in the following figures)

Figure 4 Effects of verapamil on the cardiac functions in zebrafish

50、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心率 (heart rate) 均明显降低 ($P < 0.001$)。同时维拉帕米干预后,与空白对照组相比,斑马鱼的心输出量 (cardiac output) 分别降低了约 26%、67%、85%、88%;射血分数 (ejection fraction) 分别降低了约 42%、59%、70%、70%;斑马鱼的心室舒张期和收缩期面积差值 ($\Delta S_{\text{心室}}$) 分别降低了约 22.1%、48.7%、59.6%、59%,差异均具有显著性 ($P < 0.001$),且具有一定的量效关系。但与空白对照组相比,维拉帕米干预后斑马鱼的心博量 (stroke volume) 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2.2 维拉帕米对斑马鱼 SV-BA 间距的影响

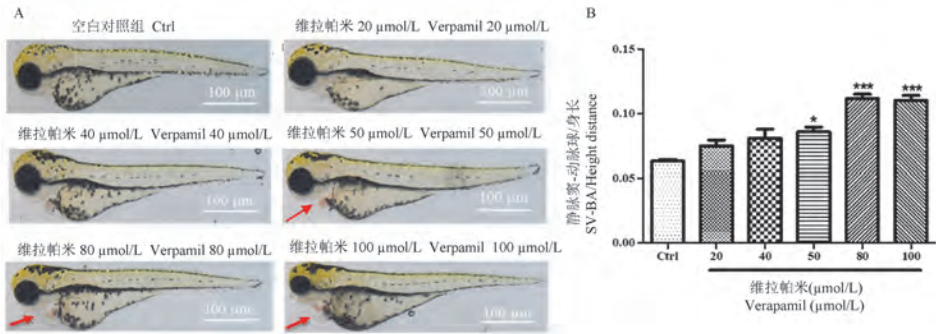
如图 5 所示,与空白对照组相比,维拉帕米 50、

80、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组静脉窦-动脉球/身长 (SV-BA/Height distance) 均明显增加 ($P < 0.05$),提示高浓度维拉帕米有一定的心脏毒性,且具有一定的剂量依赖性。

2.3 普罗帕酮对斑马鱼心脏结构和功能的影响

2.3.1 普罗帕酮对斑马鱼心脏功能的影响

如图 6 所示,与空白对照组相比,普罗帕酮 10、30 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心率显著降低 ($P < 0.001$),且具有一定的量效关系;普罗帕酮 30 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心输出量降低了约 56% ($P < 0.05$);斑马鱼的心博量、射血分数、心室舒张期和收缩期面积差值 ($\Delta S_{\text{心室}}$) 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

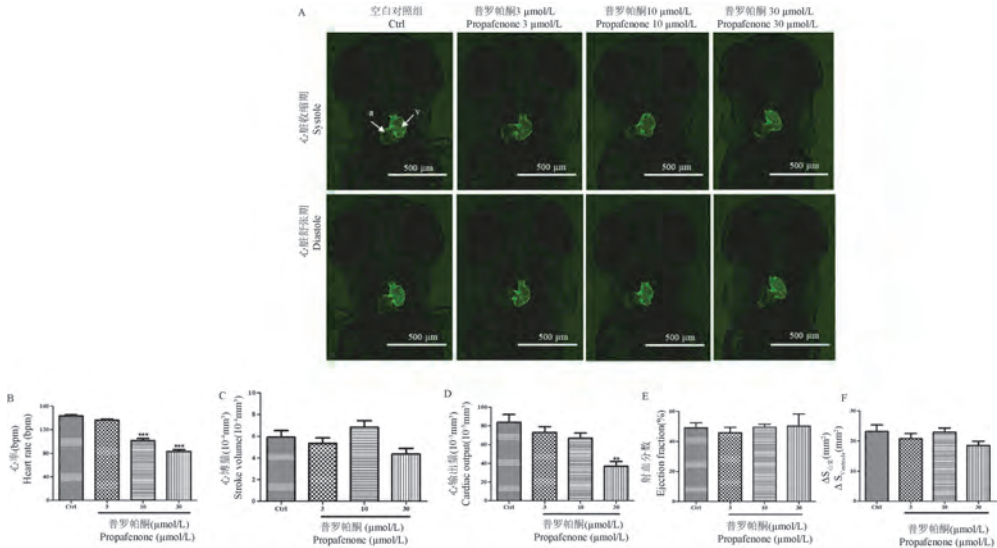


注:A:斑马鱼侧面心脏形态;B:静脉窦-动脉球距离与斑马鱼身长的比例;与 Ctrl 组相比,*** $P < 0.001$,* $P < 0.05$;放大倍数:2X。(下同)

图 5 维拉帕米对斑马鱼身长、SV-BA 间距的影响

Note. A. The lateral heart shape of zebrafish. B. Ratio of the distance between SV and BA to the height distance of zebrafish. Compared with group Ctrl, *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$. Magnification. 2X. (The same in the following figures)

Figure 5 Effect of verapamil on the height distance and distance between SV and BA in zebrafish



注:A:斑马鱼心脏收缩和舒张形态图,a:心房,v:心室;B:心率;C:心博量;D:心输出量;E:射血分数;F:心室舒张期和收缩期面积差值 $\Delta S_{\text{心室}}$ 。

图 6 普罗帕酮对斑马鱼心脏功能的影响

Note. A. Cardiac systolic and diastolic morphology of zebrafish. a. Atrium. v. Ventricle. B. Heart rate. C. Stroke volume. D. Cardiac output. E. Ejection fraction. F. Area difference between diastole and systole in zebrafish $\Delta S_{\text{ventricle}}$.

Figure 6 Effects of propafenone on the cardiac functions in zebrafish

2.3.2 普罗帕酮对斑马鱼 SV-BA 间距的影响

如图 7 所示,与空白对照组相比,普罗帕酮 3、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 干预组斑马鱼静脉窦-动脉球/身长(SV-BA/Height distance)的比值无显著性差异($P > 0.05$)。

2.4 美托洛尔对斑马鱼心脏结构和功能的影响

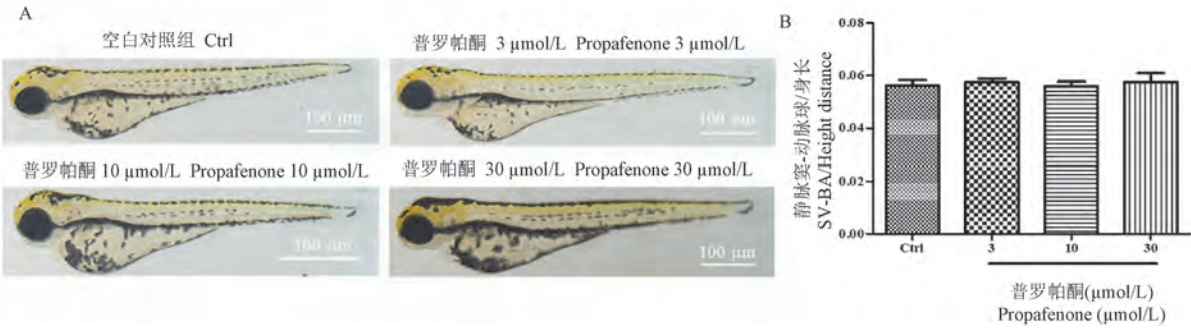
2.4.1 美托洛尔对斑马鱼心脏功能的影响

如图 8 所示,与空白对照组相比,美托洛尔 100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心率降低了约 23%,且差异

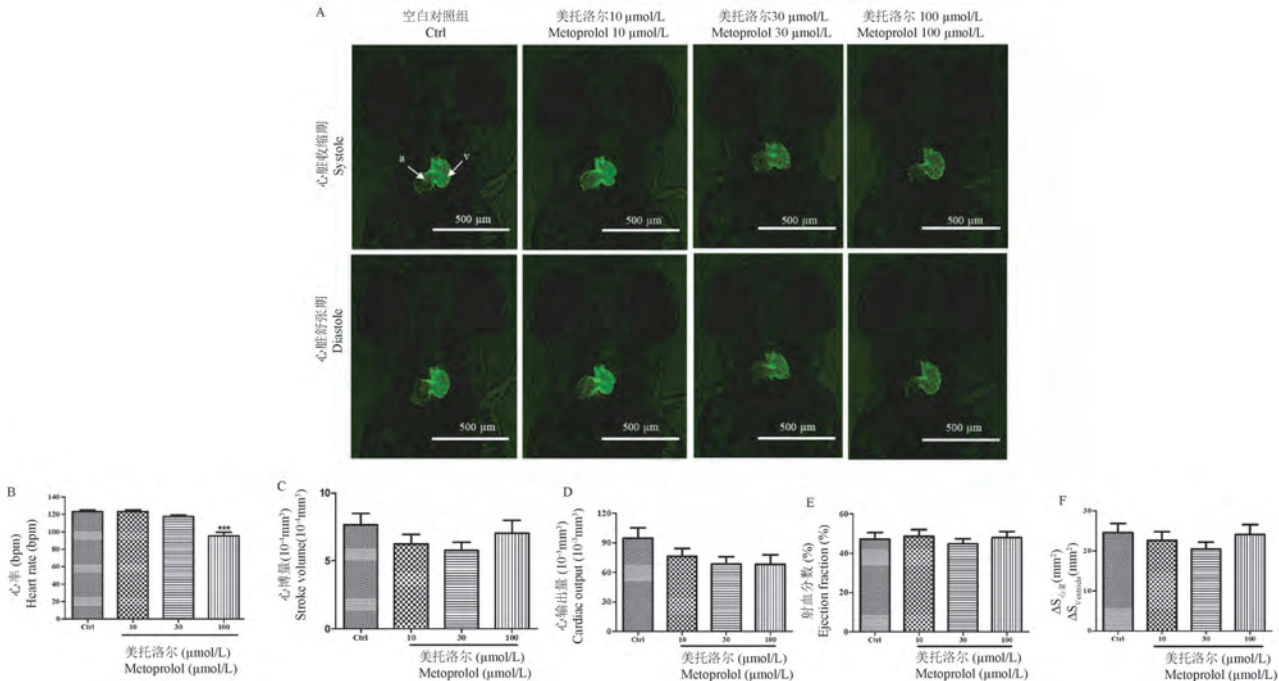
具有显著性($P < 0.001$);美托洛尔 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心输出量、心博量、射血分数、心室舒张期和收缩期面积差值($\Delta S_{\text{心室}}$)无显著性差异($P > 0.05$)。

2.4.2 美托洛尔对斑马鱼 SV-BA 间距的影响

如图 9 所示,与空白对照组相比,美托洛尔 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼静脉窦-动脉球/身长(SV-BA/Height distance)的比值无显著性差异($P > 0.05$)。



注:A:斑马鱼侧面心脏形态;B:静脉窦-动脉球距离与斑马鱼身长的比例。
图 7 普罗帕酮对斑马鱼身长、SV-BA 间距的影响
Note. A. The lateral heart shape of zebrafish. B. Ratio of the distance between SV and BA to the height distance of zebrafish.
Figure 7 Effect of propafenone on the height distance and distance between SV and BA in zebrafish



注:A:斑马鱼心脏收缩和舒张形态图,a:心房,v:心室;B:心率;C:心博量;D:心输出量;E:射血分数;F:心室舒张期和收缩期面积差值 $\Delta S_{\text{心室}}$ 。
图 8 美托洛尔对斑马鱼心脏功能的影响
Note. A. Cardiac systolic and diastolic morphology of zebrafish. a. Atrium. v. Ventricle. B. Heart rate. C. Stroke volume. D. Cardiac output. E. Ejection fraction. F. Area difference between diastole and systole in zebrafish $\Delta S_{\text{Ventricle}}$.
Figure 8 Effects of metoprolol on the cardiac functions in zebrafish

2.5 胺碘酮对斑马鱼心脏结构和功能的影响

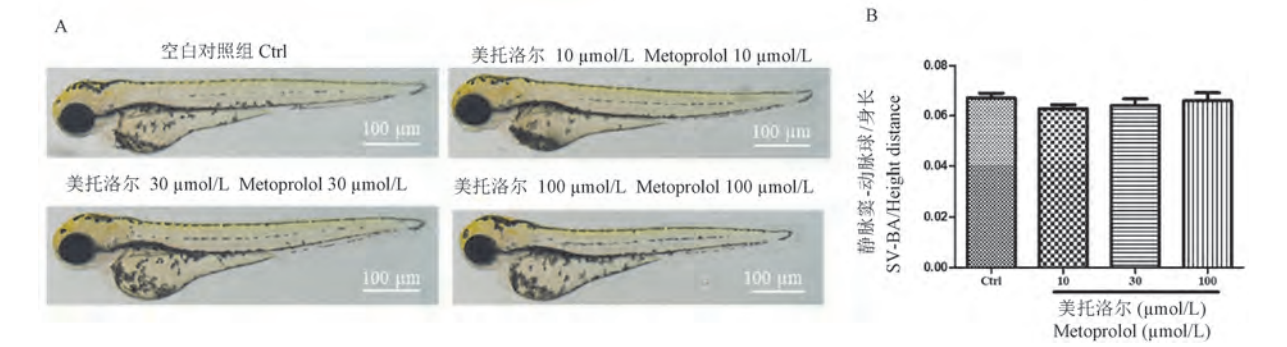
2.5.1 胺碘酮对斑马鱼心脏功能的影响

如图 10 所示,与空白对照组相比,胺碘酮 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心率分别降低了约 23%、24%、48%,具有统计学意义 ($P < 0.001$);胺碘酮各剂量处理组斑马鱼的心输出量、心博量、射血分数、心室舒张期和收缩期面积差值 ($\Delta S_{\text{心室}}$) 无

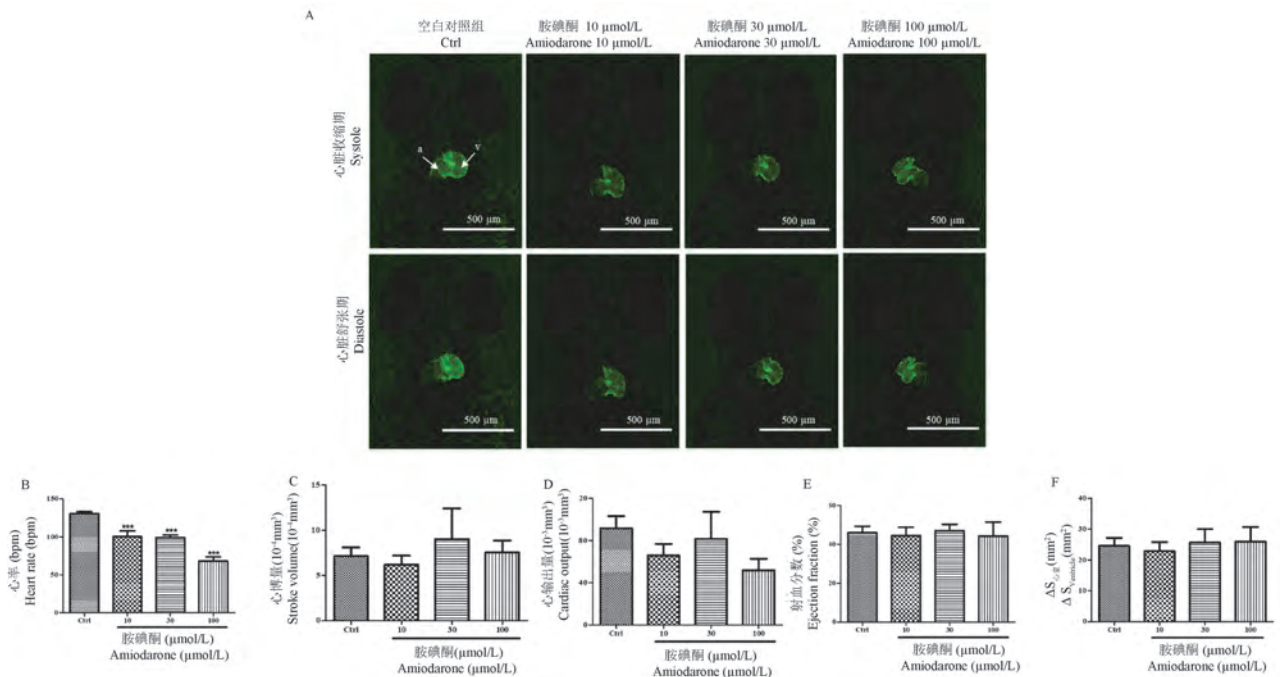
显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.5.2 胺碘酮对斑马鱼 SV-BA 间距的影响

如图 11 所示,与空白对照组相比,胺碘酮 30、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组静脉窦-动脉球/身长 (SV-BA/Height distance),具有显著性差异 ($P < 0.05$),提示胺碘酮有一定的心脏毒性,且具有一定的剂量依赖性。



注:A:斑马鱼侧面心脏形态;B:静脉窦-动脉球距离与斑马鱼身长的比例。
图9 美托洛尔对斑马鱼身长、SV-BA 间距的影响
Note. A. The lateral heart shape of zebrafish. B. Ratio of the distance between SV and BA to the height distance of zebrafish.
Figure 9 Effect of metoprolol on the height distance and distance between SV and BA in zebrafish



注:A:斑马鱼心脏收缩和舒张形态图,a:心房,v:心室;B:心率;C:心博量;D:心输出量;E:射血分数;F:心室舒张期和收缩期面积差值 $\Delta S_{\text{心室}}$ 。
图10 胺碘酮对斑马鱼心脏功能的影响
Note. A. Cardiac systolic and diastolic morphology of zebrafish. a. Atrium. v. Ventricle. B. Heart rate. C. Stroke volume. D. Cardiac output. E. Ejection fraction. F. Area difference between diastole and systole in zebrafish $\Delta S_{\text{Ventricle}}$.

Figure 10 Effects of amiodarone on the cardiac functions in zebrafish

2.6 美西律对斑马鱼心脏结构和功能的影响

2.6.1 美西律对斑马鱼心脏功能的影响

如图 12 所示,与空白对照组相比,美西律 10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼的心率、心输出量、心搏量、射血分数、心室舒张期和收缩期面积差值($\Delta S_{\text{心室}}$)均无显著性差异($P > 0.05$)。

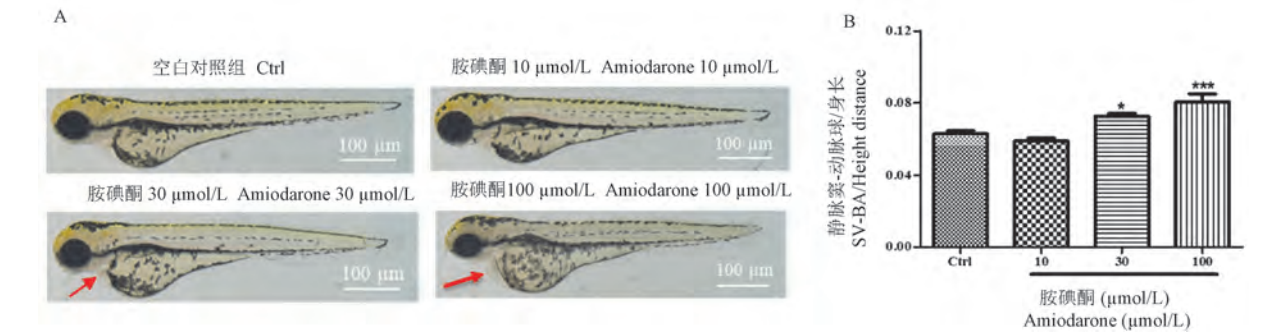
2.6.2 美西律对斑马鱼 SV-BA 间距的影响

如图 13 所示,与空白对照组相比,美西律 30 $\mu\text{mol/L}$ 处理组斑马鱼静脉窦-动脉球/身长(SV-BA/Height distance)明显增加,具有显著性差异(P

< 0.05),提示高浓度美西律有一定的心脏毒性。

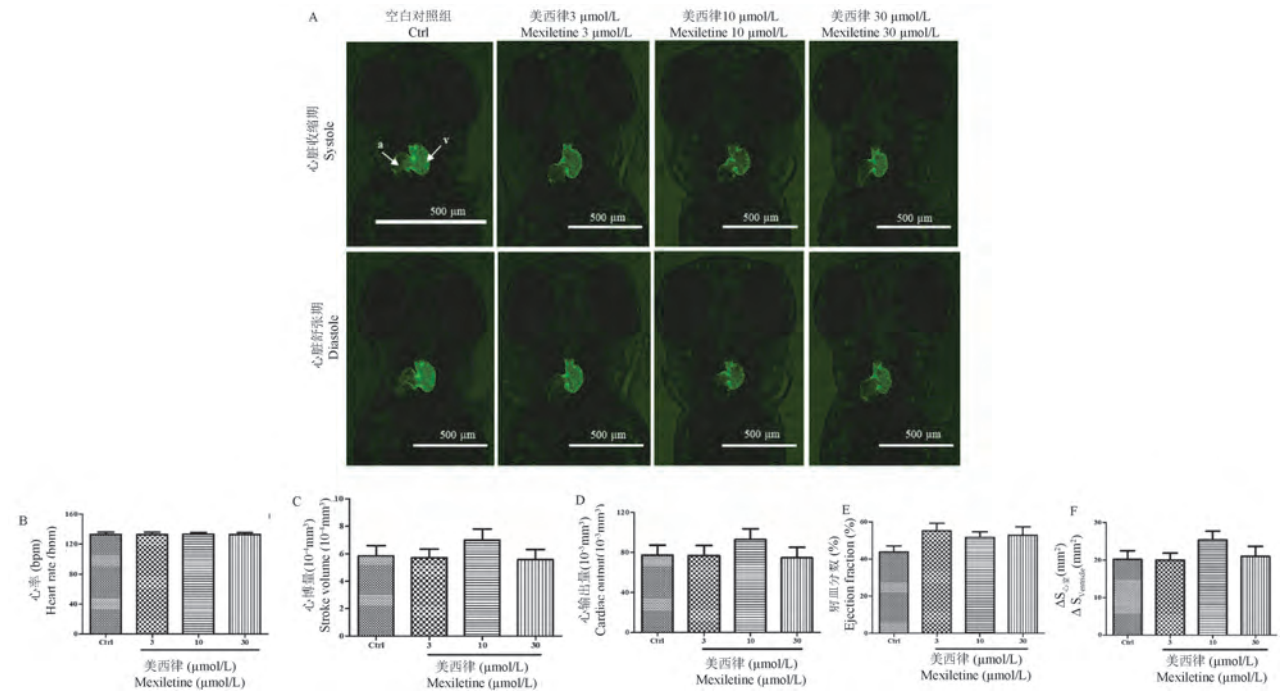
2.7 缓慢性心律失常斑马鱼模型构建的综合评价

维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮均可显著降低斑马鱼心率,用于制备斑马鱼的缓慢性心律失常模型。然而,基于心搏量、心输出量、射血分数、SV-BA 间距等斑马鱼心脏功能和毒性的评价指标,维拉帕米诱导的斑马鱼缓慢性心律失常模型,心功能变化更为明显(表 1),并且呈现剂量依赖性。因此,维拉帕米诱导的斑马鱼缓慢性心律失常模型更加适合应用于抗缓慢性心律失常药物的研发。



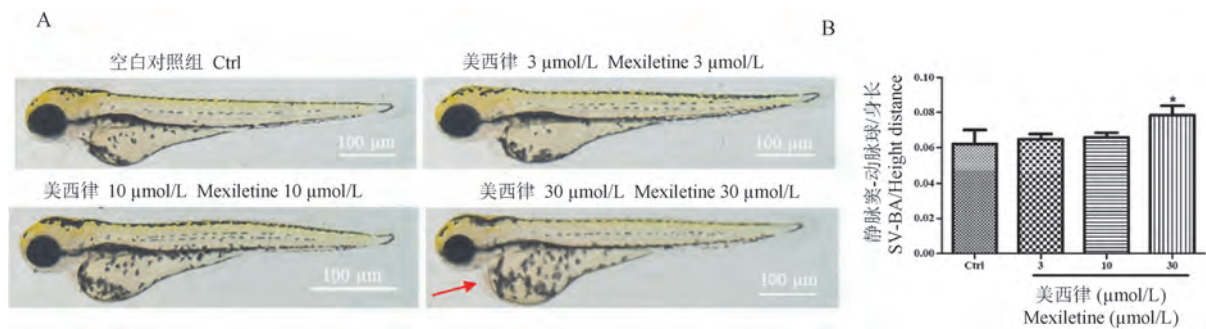
注:A:斑马鱼侧面心脏形态;B:静脉窦-动脉球距离与斑马鱼身长的比例。
图 11 胺碘酮对斑马鱼身长、SV-BA 间距的影响
Note. A. The lateral heart shape of zebrafish. B. Ratio of the distance between SV and BA to the height distance of zebrafish.

Figure 11 Effect of amiodarone on the height distance and distance between SV and BA in zebrafish



注:A:斑马鱼心脏收缩和舒张形态图,a:心房,v:心室;B:心率;C:心搏量;D:心输出量;E:射血分数;F:心室舒张期和收缩期面积差值 $\Delta S_{\text{心室}}$ 。
图 12 美西律对斑马鱼心脏功能的影响
Note. A. Cardiac systolic and diastolic morphology of zebrafish. a. Atrium. v. Ventricle. B. Heart rate. C. Stroke volume. D. Cardiac output. E. Ejection fraction. F. Area difference between diastole and systole in zebrafish $\Delta S_{\text{ventricle}}$.

Figure 12 Effects of mexiletine on the cardiac functions of zebrafish



注:A:斑马鱼侧面心脏形态;B:静脉窦-动脉球距离与斑马鱼身长的比例。

图 13 美西律对斑马鱼身长、SV-BA 间距的影响

Note. A. The lateral heart shape of zebrafish. B. Ratio of the distance between SV and BA to the height distance of zebrafish.

Figure 13 Effect of mexiletine on the height distance and distance between SV and BA in zebrafish

表 1 缓慢性心律失常斑马鱼模型疗效评价表

Table 1 Efficacy evaluation table of the zebrafish model with bradycardiac arrhythmia

心脏结构功能评价指标 Evaluation index of cardiac structure and function	维拉帕米 Verapamil	普罗帕酮 Propafenone	美托洛尔 Metoprolol	胺碘酮 Amiodarone	美西律 Mexiletine
心率 Heart rate	++	++	+	++	-
心搏量 Stroke volume	-	-	-	-	-
心输出量 Cardiac output	++	+	-	-	-
射血分数 Ejection fraction	++	-	-	-	-
$\Delta S_{\text{心室}}$ $\Delta S_{\text{ventricle}}$	++	-	-	-	-
静脉窦-动脉球 Sinus venosus-bulbus arteriosus	++	-	-	++	+

注:+:有效;+:有效且具有剂量依赖性;-:无效。
Note. +. Effective. ++. Effective and dose-dependent. -. Ineffective.

3 讨论

缓慢性心律失常是由心脏窦房结、房室结或传导束支功能障碍导致的疾病^[26],以心率减慢为特征,严重时可出现阿斯综合征甚至猝死,严重影响患者的生活质量和生命安全。缓慢性心律失常的病因多种多样,抗心律失常药物是诱发缓慢性心律失常的一个重要原因^[2]。常用于构建缓慢性心律失常模型的药物有普萘洛尔、维拉帕米、特非那定、阿司咪唑等^[8-9]。然而目前尚缺乏与临床病症一致、操作简单、重复性好,并可系统全面评价缓慢性心律失常的动物模型^[27],同时现有缓慢性心律失常动物模型存在实验周期长、成本高,不利于高通量药物筛选等缺点,迫切需要利用新技术和新方法,为缓慢性心律失常研究和药物筛选开发新的动物模型和快速检测方法。

本研究运用斑马鱼模型评价抗心律失常药物对斑马鱼幼鱼心脏功能的影响。斑马鱼卵黄囊以及心脏发育过程中出现的畸形可能和低氧环境^[28]有关,本实验分组中设立了空白对照组排除斑马鱼

本身发育畸形等情况,造模前期进行药物毒性实验排除药物本身毒性作用。基于抗心律失常药物对斑马鱼的 IC₅₀ 值,发现本研究所选抗心律失常药物毒性的排序为普罗帕酮 < 美西律 < 胺碘酮 < 美托洛尔和维拉帕米。同时,实验中也观察发现维拉帕米、胺碘酮、美西律干预后斑马鱼出现不同程度的身体短小、心包水肿、心房和心室狭长、卵黄囊出血等毒性表现。

通过检测斑马鱼心率,我们发现抗心律失常药物 Ca²⁺通道阻滞剂维拉帕米、I c 类普罗帕酮、β 肾上腺素能受体阻滞剂美托洛尔、K⁺通道阻滞剂胺碘酮均能显著降低斑马鱼心率。心搏量、心输出量、射血分数是用于评价循环系统效率高低、心脏收缩能力等心脏功能的重要指标^[29]。同样,在斑马鱼的心脏功能评估上,我们发现维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮干预后,损伤斑马鱼的心脏功能,表现为心搏量、心输出量、射血分数的不同程度降低。同时,实验中观察发现斑马鱼心脏传导异常,出现心脏传导阻滞、心跳缓慢甚至停跳现象,血流缓慢等现象。

斑马鱼只存在一个体循环系统,心脏由一心房、一心室、一个房室瓣膜和一个流出瓣膜组成,血液从动脉球流出心室流至全身,最后通过静脉窦流回心房^[30]。通过测量静脉窦-动脉球的距离改变,可以用于判断药物对斑马鱼心脏发育程度和心脏毒性的影响^[31-32]。维拉帕米、胺碘酮、美西律干预后,斑马鱼心脏心房和心室位置发生变化,静脉窦-动脉球的距离增大,且随着药物浓度增大,静脉窦-动脉球与身长的比例逐渐增大。说明在斑马鱼模型上,维拉帕米、胺碘酮、美西律随着浓度的增加,表现出不同程度的心脏毒性,这与临床上抗心律失常药物可能存在一定的心脏毒性相一致。

抗心律失常药物导致的心动过缓可能与药物诱发的长 QT 综合征密切相关。而药物导致的心脏 QT 间期延长是 hERG 钾通道阻断的结果^[33-36]。与 hERG 基因相关的抗心律失常药物主要包括 I a 类和 III 类心律失常, I b 类药物未引起 QT 间期变化或轻微下降^[3]。研究表明 I c 类代表药物普罗帕酮对 hERG 电流具有抑制作用,是一种开放通道的钾通道阻滞剂^[4]。普罗帕酮一方面可以导致药物诱发的长 QT 综合征,另一方面可通过延长难治期起到抗心律失常的效果。II 类抗心律失常药物为 β 肾上腺素能受体阻滞剂(普萘洛尔)被证明可预防先天性长 QT 综合征。III 类抗心律失常药物索他洛尔主要电生理效应是通过延长复极时间,延长动作电位间期和有效不应期^[2]。胺碘酮用于治疗室性、室上性快速心律失常,被证实有明显的 QT 间期延长。第 IV 类抗心律失常药物为钙离子通道阻滞剂,通过阻断慢钙通道的开放,来减低传导速度及延长有效不应期。硝苯地平、维拉帕米、地尔硫卓不会导致 QT 间期延长,也未被确定为尖端扭转,其导致心脏功能损伤的机制仍需进一步研究^[36]。以上研究为维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮、美西律等抗心律失常药物诱发心律失常的机制提供了参考。

目前的缓慢性心律失常模型主要有化学药物(胺碘酮、普萘洛尔^[37]、维拉帕米^[11])诱发动物模型、冠状动脉结扎动物模型^[38]、化学消融动物模型^[39]等,造模后分别检测大、小鼠心脏收缩压、心率、心输出量、左室射血分数、呼吸、肛温水平等指标。虽然大小鼠模型与人类心脏结构和功能更相似,但模型制备过程中死亡率高,操作复杂,并且实验周期长。因此,现有的缓慢性心律失常动物模型均存在优势与不足^[11]。本研究充分发挥斑马鱼模

型实验周期短、成本低、观察方便等优势,通过检测心率、心博量、心输出量、射血分数等指标,评价斑马鱼心脏功能,建立缓慢性心律失常模型。在抗缓慢性心律失常药物研发过程中,可以利用斑马鱼模型做前期的药物筛选,发现有潜在活性的药物后,再进入大小鼠动物实验进一步评价药效。本研究制备的斑马鱼缓慢性心律失常模型,可以为抗缓慢性心律失常前期的潜在活性药物发现提供便利。

因此,维拉帕米、普罗帕酮、美托洛尔、胺碘酮均可以作为制备斑马鱼的缓慢性心律失常模型。然而,基于心博量、心输出量、射血分数、SV-BA 间距等斑马鱼心脏功能和毒性的评价指标,维拉帕米诱导的斑马鱼缓慢性心律失常模型,其心功能变化更为明显,并且呈现剂量依赖性。维拉帕米诱导的斑马鱼缓慢性心律失常模型可能更适合应用于抗缓慢性心律失常药物的发现。

然而,本研究具有一定的局限性,主要包括:(1)没有对维拉帕米等抗心律失常药物引起的缓慢性心律失常的机制做深入的研究;(2)与传统动物相比,斑马鱼体型小,解剖器官需要更专业的技术和精密仪器^[40],没有对心脏组织病理进行观察和研究;(3)心电图是心脏功能的重要检测方法,而斑马鱼胚胎目前很难进行心电测量,基于成像的模拟心电图也没有在本研究中体现。

综上所述,本研究建立了维拉帕米等缓慢性心律失常斑马鱼模型及心功能评价指标,对于缓慢性心律失常模型的构建和抗缓慢性心律失常药物的研发均具有重要意义。

参 考 文 献 (References)

- [1] The Task Force on cardiac pacing and resynchronization therapy of the European Society of Cardiology (ESC), Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association (EHRA), Brignole M, et al. 2013 ESC Guidelines on cardiac pacing and cardiac resynchronization therapy [J]. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2014, 67(1): 58.
- [2] Stratmann HG, Kennedy HL. Torsades de pointes associated with drugs and toxins: Recognition and management [J]. Am Heart J, 1987, 113(6): 1470-1482.
- [3] Krikler DM, Curry PV. Torsade De Pointes, an atypical ventricular tachycardia [J]. Br Heart J, 1976, 38(2): 117-120.
- [4] Mergenthaler J, Haverkamp W, Hüttenhofer A, et al. Blocking effects of the antiarrhythmic drug propafenone on the HERG potassium channel [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2001, 363(4): 472-480.
- [5] 杨艳敏,朱俊. 心律失常的紧急处理——《心律失常紧急处

- 理专家共识》解读 [J]. 中华心脏与心律电子杂志, 2013, 1(1): 17-19.
- Yang YM, Zhu J. Emergency management of arrhythmia-interpretation of expert consensus on emergency management of arrhythmia [J]. Chin J Heart Heart Rhythm (Electronic Edition), 2013, 1(1): 17-19.
- [6] 黄大革. 心脏起搏器植入术治疗老年人缓慢性心律失常的研究 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(1): 78, 93.
- Huang DP. Study on cardiac pacemaker implantation in elderly patients with bradyarrhythmia [J]. Cardiovasc Dis J Integr Tradit Chin Western Med, 2020, 8(1): 78, 93.
- [7] 胡锋, 郑黎晖, 刘尚雨, 等. 心脏神经消融术对神经反射性缓慢性心律失常的治疗价值 [J]. 中华心律失常学杂志, 2021, 25(4): 306-310.
- Hu F, Zheng LH, Liu SY, et al. Therapeutic value of cardiac nerve ablation in patients with reflexbradyarrhythmia [J]. Chin J Cardiac Arrhyth, 2021, 25(4): 306-310.
- [8] 王明亮, 丁永芳, 印鑫, 等. 斑马鱼在毒理学中的应用研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 390-396.
- Wang ML, Ding YF, Yin X, et al. Research progress regarding the application of zebrafish in toxicology [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 390-396.
- [9] 薛迪. 斑马鱼血管抑制和心脏损伤模型的构建及研究 [D]. 太原: 山西医科大学; 2016.
- Xue D. Construction and study of model of vascular inhibition and heart injury in zebrafish [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University; 2016.
- [10] 石亚楠, 王佑华, 李强, 等. 黄芪甲苷对乌头碱诱导的斑马鱼心脏损伤保护作用的研究 [J]. 中医药导报, 2019, 25(7): 26-28.
- Shi YN, Wang YH, Li Q, et al. Study on the protective effect of astragaloside IV on aconitine-Induced zebrafish heart injury [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 25(7): 26-28.
- [11] 王哲, 刘艳飞, 王娅, 等. 缓慢性心律失常动物模型的研究进展 [J]. 实用心电图学杂志, 2019, 28(6): 447-450.
- Wang Z, Liu YF, Wang Y, et al. Research progress of animal model of bradyarrhythmia [J]. J Prac Electrocardiol JS, 2019, 28(6): 447-450.
- [12] 吴晶晶. $I_{Na,L}$ 导致 SAN 功能紊乱和心内传导障碍——病理生理机制及治疗方向 [D]. 武汉: 华中科技大学; 2009.
- Wu JJ. $I_{Na,L}$ Lead to SAN dysfunction and intracardiac conduction disorder: pathophysiological mechanism and treatment direction [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology; 2009.
- [13] Mcgrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity [J]. Drug Discovery Today, 2008, 13(9-10): 394-401.
- [14] Sukardi H, Chng HT, Chan EC, et al. Zebrafish for drug toxicity screening: bridging the *in vitro* cell-based models and *in vivo* mammalian models [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2011, 7(5): 579-589.
- [15] Zhou ZY, Huan LY, Zhao WR, et al. Spatholobi Caulis extracts promote angiogenesis in HUVECs *in vitro* and in zebrafish embryos *in vivo* via up-regulation of VEGFRs [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 200: 74-83.
- [16] Zhou ZY, Huang B, Li S, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate promotes endothelial integrity via regulating VE-cadherin dynamics and RhoA/ROCK-mediated cellular contractility and prevents atorvastatin-induced intracerebral hemorrhage in zebrafish [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2018, 350: 32-42.
- [17] Huang B, Zhou ZY, Li S, et al. Tanshinone I prevents atorvastatin-induced cerebral hemorrhage in zebrafish and stabilizes endothelial cell-cell adhesion by inhibiting VE-cadherin internalization and actin-myosin contractility [J]. Pharmacol Res, 2017, 128: 389-398.
- [18] Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes [J]. Genome Res, 2000, 10(9): 1351-1358.
- [19] Santos-Ledo A, Jenny A, Marlow FL. Comparative gene expression analysis of the fmnl family of formins during zebrafish development and implications for tissue specific functions [J]. Gene Expr Patterns, 2013, 13(1-2): 30-37.
- [20] Kitambi SS, Nilsson ES, Sekyrova P, et al. Small molecule screening platform for assessment of cardiovascular toxicity on adult zebrafish heart [J]. BMC Physiol, 2012, 12: 3.
- [21] Milan DJ, Peterson TA, Ruskin JN, et al. Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish [J]. Circulation, 2003, 107(10): 1355-1358.
- [22] Westerfield M. The zebrafish book, 5th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. Eugene: University of Oregon Press; 2007.
- [23] Zhang YY, Wang CG, Huang LX, et al. Low-level pyrene exposure causes cardiac toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Aquat Toxicol, 2012, 114-115: 119-124.
- [24] Chen ZY, Huang W, Dahme T, et al. Depletion of zebrafish essential and regulatory myosin light chains reduces cardiac function through distinct mechanisms [J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(1): 97-108.
- [25] 张利军. 斑马鱼心脏毒性评价模型的建立及美托洛尔心脏毒性作用机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院; 2012.
- Zhang LJ. Development of the zebrafish as an animal model for cardiotoxicity screening and cardiac risk assessment of Metoprolol [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences; 2012.
- [26] 许姝雯, 王振涛. 王振涛教授从“虚”“滞”论治缓慢性心律失常病机分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(11): 1835-1838.
- Xu SW, Wang ZT. Professor Wang Zhentao from "deficiency" and "stagnation" on the treatment of chronic arrhythmia pathogenesis analysis [J]. Chin J Integr Med Cardio -/Cerebrovascuar Dis, 2020, 18(11): 1835-1838.
- [27] 陈瑞哈, 方永煌, 曹静桦, 等. 不同心律失常模型应用的探

- 讨 [J]. 医学理论与实践, 2016, 29(1): 20–22.
- Chen RH, Fang YH, Cao JH, et al. Research on the application of different arrhythmia models [J]. J Med Theory Practice, 2016, 29(1): 20–22.
- [28] 楚璐萌, 田子颖, 崔蕊, 等. 低氧对斑马鱼胚胎发育和红细胞生成的抑制作用 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 1–8.
- Chu LM, Tian ZY, Cui R, et al. Inhibition effects of hypoxia on embryonic development and erythropoiesis in rebrfish [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 1–8.
- [29] Wang L, Zhang XJ, Chan JY, et al. A novel danshensu derivative prevents cardiac dysfunction and improves the chemotherapeutic efficacy of doxorubicin in breast cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2016, 117(1): 94–105.
- [30] Salman HE, Yalcin HC. Advanced blood flow assessment in zebrafish via experimental digital particle image velocimetry and computational fluid dynamics modeling [J]. Micron, 2020, 130: 102801.
- [31] Antkiewicz DS, Burns CG, Carney SA, et al. Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish [J]. Toxicol Sci, 2005, 84(2): 368–377.
- [32] Lin CC, Hui MN, Cheng SH. Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 222(2): 159–168.
- [33] Curran ME, Splawski I, Timothy KW, et al. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome [J]. Cell, 1995, 80(5): 795–803.
- [34] 冉凯凯, 郑瑞芳, 夏青, 等. 模式生物斑马鱼在心功能评价中的应用 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1581–1587.
- Ran KK, Zheng RF, Xia Q, et al. Application of model organism-zebrafish in cardiac function evaluation [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(8): 1581–1587.
- [35] Taglialatela M, Castaldo P, Pannaccione A, et al. Human ether-a-gogo related gene (HERG) K⁺ channels as pharmacological targets: present and future implications [J]. Biochem Pharmacol, 1998, 55(11): 1741–1746.
- [36] Langheinrich U, Vacun G, Wagner T. Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, 193(3): 370–382.
- [37] Lei H, Zhu JJ, Zhang XX, et al. Therapeutical effect of Radix Aconiti and Astragalus extracts on models of experimental bradycardia animal [J]. Pak J Pharm Sci, 2014, 27(3): 439–444.
- [38] Zhang WT, Zhu BC, Ren JX, et al. Two methods for modeling of sick sinus syndrome in rats: Ischemia reperfusion and sodium hydroxide induced injury [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 778–784.
- [39] 张志辉. 兔缓慢性心律失常模型建立与 MSCs 同种异体心脏移植后细胞整合及功能研究 [D]. 重庆: 第三军医大学; 2012.
- Zhang ZH. Study on cell integration and function after rabbit bradyarrhythmia model and MSCs allograft heart transplantation [D]. Chongqing: Third Military Medical University; 2012.
- [40] Benchoula K, Khatib A, Jaffar A, et al. The promise of zebrafish as a model of metabolic syndrome [J]. Exp Anim, 2019, 68(4): 407–416.

[收稿日期] 2022-01-11

张源,武慧渊. 小鼠室管膜细胞体外培养及多纤毛形成过程分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 370-375.
Zhang Y, Wu HY. Primary culture of mouse ependymal cells and analysis of the multicilia formation process [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 370-375.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.009

小鼠室管膜细胞体外培养及多纤毛形成过程分析

张源,武慧渊*

(天津大学药物科学与技术学院,天津 300072)

【摘要】 目的 利用体外原代培养小鼠室管膜细胞 (MEPC), 表征其分化过程形态特征, 纤毛的形成及摆动方式。方法 通过将分离的新生小鼠端脑组织细胞进行特殊培养和分化, 获得具有生理功能的 MEPC。利用免疫组化方法跟踪 MEPC 分化过程中纤毛的形成, 并在活细胞状态观察其纤毛摆动模式。结果 分离的端脑细胞在特殊的培养条件下快速增殖, 经过诱导分化可以得到具有多纤毛结构的 MEPC。结论 本研究利用改进的原代 MEPC 培养方案, 成功获得具有免疫组化特征及正常多纤毛摆动特性的 MEPC, 并揭示了分化各个时期纤毛及相关结构的形态特征, 为以 MEPC 为模型的研究奠定了基础。

【关键词】 室管膜细胞; 动纤毛; 小鼠; 原代培养

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0370-06

Primary culture of mouse ependymal cells and analysis of the multicilia formation process

ZHANG Yuan, WU Huiyuan*

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Corresponding author: WU Huiyuan. E-mail: huiyuan.wu@tju.edu.cn

【Abstract】 Objective To use a modified protocol to obtain *in vitro*-cultured mouse ependymal cells (MEPCs) and to assess the morphological change of MEPCs during differentiation, the process of cilia formation, and the ciliary motility of mature MEPCs. **Methods** MEPCs with physiological functions were obtained by specialized culture and induced differentiation from isolated neonatal mouse telencephalon cells. Cilia formation and maturation of MEPCs were confirmed by immunocytochemistry. The ciliary beating pattern was recorded using a microscope equipped with a high-speed camera. **Results** The isolated telencephalon cells proliferated rapidly under culture conditions, and MEPCs with functional multicilia were obtained through induced differentiation. **Conclusions** Using a modified *in vitro* culture protocol, MEPCs with proper immunohistochemical characteristics and normal multicilia motility were successfully obtained. The process of multicilia formation at various stages of MEPC differentiation was revealed, providing a benchmark for further study using MEPCs as a model.

【Keywords】 ependymal cells; multicilia; mouse; primary culture

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

脑室的室管膜细胞表面存在许多动纤毛, 它们的协调摆动确保了脑脊液的正常流动^[1]。室管膜细胞缺陷可导致严重的神经系统疾病, 如脑积水^[2-3]。在发育过程中, 室管膜细胞在小鼠出生后

由室管膜祖细胞放射状胶质细胞 (radial glia) 分化^[4]。在这个分化过程中, 中心粒由次胞质体在细胞顶端大量复制、聚集, 而后迁移并固定在细胞质膜, 在质膜上成熟成为基体^[5]。动纤毛由九对在外

【基金项目】 天津市自然科学基金 (17JCYBJC41900), 天津大学自主创新基金 (2021XT-0003)。
Funded by Tianjin Natural Science and Technology Foundation Grant (17JCYBJC41900), Tianjin University Innovation Initiative (2021XT-0003).
【作者简介】 张源 (1997—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 分子与细胞生物学。Email: 531635344@qq.com
【通信作者】 武慧渊 (1973—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 蛋白翻译后修饰, 神经系统疾病。Email: huiyuan.wu@tju.edu.cn

周排列的微管束以及一组在中心的中央微管束(9+2)组成,外周微管上由于动力蛋白的存在可以使纤毛运动^[6]。原代培养的室管膜细胞是研究脑部动纤毛和相关疾病的重要体外模型^[7]。本文参考相关文献,通过条件优化,提供了一种稳定、高效在体外培养小鼠室管膜细胞的方法^[8-9]。同时通过免疫荧光染色的方法表征体外培养室管膜细胞分化及动纤毛形成不同时期的特点。通过活细胞成像观察了培养室管膜的纤毛运动,为以 MEPC 为模型的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

1 ~ 3 只 SPF 级 C57BL/6 健康小鼠,新生 1 d,体重约 1.5 g,雌雄比均衡,购于北京斯贝福生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。饲养于天津市中国医学科学院放射医学研究所动物房【SYXK(津)2019-0002】。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22 ~ 25℃,湿度为 40% ~ 70%。所有操作均符合放射医学研究所实验动物实验伦理学要求(审批号:IRM-DWLL-2021094)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(Corning, 10013050), L15 培养基(Solarbio, LA9510), 青霉素/链霉素(Penicillin / streptomycin, Solarbio, P1400), 胎牛血清(FBS, Newzerum, FBS-S500), 磷酸盐缓冲液(D-PBS, Solarbio, D1040), 平衡盐溶液(D-Hank's, Solarbio, H1045), 木瓜蛋白酶(Papain, Solarbio, G8430), 脱氧核糖核酸酶(DNaseI, Solarbio, D8071), L-半胱氨酸(L-Cysteine, Solarbio, C0012), 胰蛋白酶抑制剂(Trypsin inhibitor, Solarbio, T8031), 多聚 L-赖氨酸(poly-L-Lysine, Solarbio, P8130), 胰蛋白酶(Trypsin-EDTA, Solarbio, T1320), 抗荧光淬灭封片液(Fluoromount-G, SouthernBiotech, K2820), DAPI(Solarbio, ID2250), 细胞培养小瓶(T25, Corning, 430639)。

抗体:anti-acetylated tubulin(Sigma, T6793, 1 : 500), anti- γ -tubulin(Sigma, T6557, 1 : 500), anti- β -catenin(Proteintech, 51067-2-AP, 1 : 500), 用于免疫荧光分析的二抗为与 Alexa Fluor 488 偶联的山羊抗鼠或与 Alexa Fluor 568 偶联的山羊抗兔抗体(Invitrogen, 1 : 750)。

倒置生物显微镜(DMI3000 B, 德国 Leica 公司), 超高分辨共聚焦显微镜(SP8, 德国 Leica 公司), 生物安全柜(2000LC, 中国力康公司), 二氧化碳培养箱(3111 型, 美国 ThermoFisher 公司), 配以 4 × 4 × 15 mL(圆/尖底)转子的台式低速离心机(L600, 中国湘仪公司)

1.2 方法

1.2.1 25 cm² 培养瓶和 14 mm 玻片包被

为了增加培养小瓶对细胞的粘附性,采用多聚赖氨酸将小瓶底部包被,多聚赖氨酸可以增加培养皿表面正电荷从而加强细胞的贴壁生长。将多聚赖氨酸(poly-L-Lysine)粉末用无菌去离子水配制成 10 mg/mL 的浓缩液,而后稀释成 0.005% 的工作液。每个 25 cm² 培养小瓶加入 3 mL 多聚赖氨酸溶液, 37℃ 包被 1 h 或室温过夜包被。包被结束后吸出多聚赖氨酸工作液,用无菌去离子水冲洗 3 次并晾干。包被好的培养瓶在 4℃ 条件下可存放 4 周左右。

1.2.2 消化工作液及终止工作液的配置

消化工作液的配制:取 DMEM 培养基中加入木瓜蛋白酶(2 mg/mL), DNaseI(0.15 mg/mL), L-半胱氨酸(0.3 mg/mL), 1% 青霉素/链霉素, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后 4℃ 保存备用。终止工作液的配制:取 L15 培养基中加入胰蛋白酶抑制剂(1 mg/mL), DNaseI(0.2 mg/mL), 10% 胎牛血清, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后 4℃ 保存备用。

1.2.3 小鼠室管膜细胞的分化培养

以下操作步骤以 1 只小鼠为例,将新生小鼠颈椎脱位处死后,用剪刀剪取小鼠头部、镊子剥离小鼠头部皮肤,小心剔除头骨,并去除附着的组织与血管。将分离的小鼠脑组织放入含有 1% 青霉素/链霉素的 Hank's 溶液中,置于冰上。用眼科剪剪去嗅球和小脑,用 5 号镊子剥去端脑表面的脑膜,并用弹簧剪将其剪切成 0.5 ~ 1 mm 大小的碎片。用 1000 μ L 移液器将所有脑组织碎片连同 Hank's 溶液一同转移至 15 mL 无菌离心管中, 800 r/min 离心 1 min;吸出上清液,加入配制好的消化工作液 1 mL 重悬细胞, 37℃ 孵育 30 min。消化结束后以 800 r/min 离心 1 min,吸出上清液,加入配制的终止工作液 2 mL 重悬细胞静置 2 min。800 r/min 离心 1 min 后;吸出上清液,并以 2 mL L15 培养基重悬细胞, 800 r/min 离心 1 min;吸出上清液,用 1 mL L15 培养基重悬细胞,并用 1000 μ L 移液枪吹打悬液 5 次。800 r/min 离心 5 min 后;移除上清液,并加入

3 mL 含有 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 完全培养基重悬细胞,较少体积的重悬液是为了让细胞更好的吸附。将细胞悬液小心接种到包被了多聚赖氨酸的 25 cm² 培养瓶中,放入 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,此时记为 d1。第 2 天(d2)吸弃旧培养基,加入 8 mL 新鲜预热过的 DMEM 完全培养基,随后每隔 2 d 更换 1 次培养基至第 7 天(d7)。

第 7 天细胞铺满整个培养瓶底部,室温下将培养瓶放置在摇床上以 100 rpm 摇动培养 4 h 以去除粘附较差的神经元细胞。吸弃旧培养基,加入 3 mL DPBS 清洗 1 次,再加入 1 mL Trypsin-EDTA 于 37℃ 消化 6 min,然后加入 4 mL 的 DMEM 完全培养基终止消化。将细胞悬液收集至 15 mL 离心管中,于 800 r/min 离心 5 min;吸出上清液,加入 500 μL 的 DMEM 完全培养基重悬细胞。1 只小鼠端脑大约可收集 200 ~ 300 万个细胞,以细胞计数板计数后,按照每孔 2 × 10⁵ 个细胞的数量滴加到玻片上,此时滴加的液滴应在玻片上形成球形水珠,放入培养箱中培养 30 min;待细胞粘附后,补加 DMEM 完全培养基;24 h 后吸弃旧培养基,更换为含有 1% 青霉素/链霉素的 DMEM,开始诱导细胞分化成室管膜细胞,记为 D0,每 3 ~ 4 d 更换培养基。

1.2.4 免疫荧光标记方法

吸弃培养基,用 500 μL DPBS 清洗 1 次,加入 4% PFA 于室温固定 10 min 或以冷甲醇在 -20℃ 固定 10 min。固定后的细胞用 DPBS 清洗 2 次,用含有 0.5% Triton-X 100 和 10% 马血清的 PBS 室温封闭 1 h,然后以按照比例稀释在含有 1% 马血清的

PBS 的一抗孵育 4℃ 过夜。第 2 天用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,用含有 1% 马血清的 PBS 稀释的荧光二抗室温避光孵育 90 min。孵育结束后用含有 DAPI 的 PBS 清洗 1 次,再用 PBS 清洗两次,封片后在共聚焦显微镜下观察。

1.2.5 活细胞动纤毛摆动拍摄

按照上述操作流程在体外将胶质细胞进行增殖培养 7 d 后,重新铺板到 35 mm 共聚焦小皿中进行无血清培养并诱导分化为 MEPC,在饥饿培养 12 d 后进行观察。将培养有 MEPC 的共聚焦小皿转移至配有活细胞培养系统的显微镜中,设置温度为 37℃,5% CO₂,采用徕卡 DMI8 倒置荧光显微镜与 DFC9000 高速摄像机,在相差模式下将分辨率设置为 1024 × 1024,拍摄帧率为每秒 90 帧。

2 结果

2.1 MEPC 培养不同时期细胞形态特征

小鼠胶质细胞消化分离后均匀铺板,铺板后(D2)换无血清培养基诱导分化,此时细胞进入分化阶段 D0(图 1),通过倒置相差显微镜观察细胞生长状况,细胞培养至 D3,细胞完全贴壁平铺在培养皿上,细胞形态变大变圆(图 2a);饥饿培养 D6 时,部分细胞开始进行纤毛发生,并有极少数细胞形成可快速摆动的纤毛(图 2b);D9 时细胞边界变得清晰可见,约有 1/3 的细胞形成了多纤毛结构(图 2c);分化培养进行到 D12 后,培养的 MEPC 细胞基本成熟,可观察到 MPEC 快速摆动的多纤毛(图 2d)。



图 1 室管膜细胞原代培养时间示意图

Figure 1 Schematic diagram of primary culture of ependymal cells

2.2 免疫荧光法鉴定 MEPC 分化不同时期纤毛形成的特点

纤毛的主要结构由微管组成。乙酰化微管蛋白(acetylated tubulin)在多纤毛轴丝上富集,常用于标记多纤毛^[10-11]。γ-微管蛋白(γ-tubulin)为中心粒/基体的结构蛋白,用于标记 MEPC 分化过程中中心粒到基体的变化^[12]。β-连环蛋白(β-catenin)是由 CTNNB1 基因编码的多功能蛋白质,具有介导细胞间黏附与信号转导功能,用于标记

细胞边界^[13]。对不同分化时期的 MEPC 进行免疫荧光标记,可以清晰展示细胞分化各时期的不同形态和免疫组化特征(图 3,图 4)。在饥饿培养后 D0,分离培养细胞基本检测不到乙酰化微管蛋白的信号,此时细胞较小密集排布(图 3a, 3e, 3m)。随着诱导分化的进行,乙酰化微管蛋白的信号逐渐增强,同时细胞形态变大变圆(图 3b, 3n)。D3 时,γ-微管蛋白标记显示少数细胞的基体也开始分裂增多(图 4a, 4j)。D7 时,乙酰化微管蛋白标

记可见部分细胞已经形成明显的多纤毛结构,同时伴随着基体数量的增加和分布范围的扩大(见图 3c, 3o, 4b, 4k)。

分化培养 D14, MEPC 分化状态良好, 纤毛形态

清晰, 成簇状分布在细胞的表面, 具有明显的多纤毛细胞特征(图 3d, 3p), 同时由 γ -微管蛋白标记的基体分布范围收缩, 表明多纤毛成熟后聚集移动到特定位置(图 3d, 图 4c)。

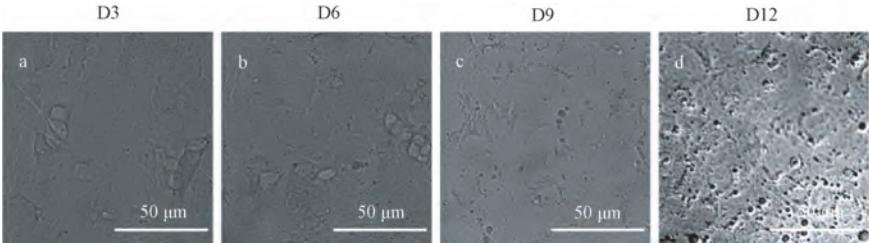


图 2 倒置相差显微镜观察不同培养时间的室管膜细胞

Figure 2 Morphological changes of cultured ependymal cells were observed using light microscopy

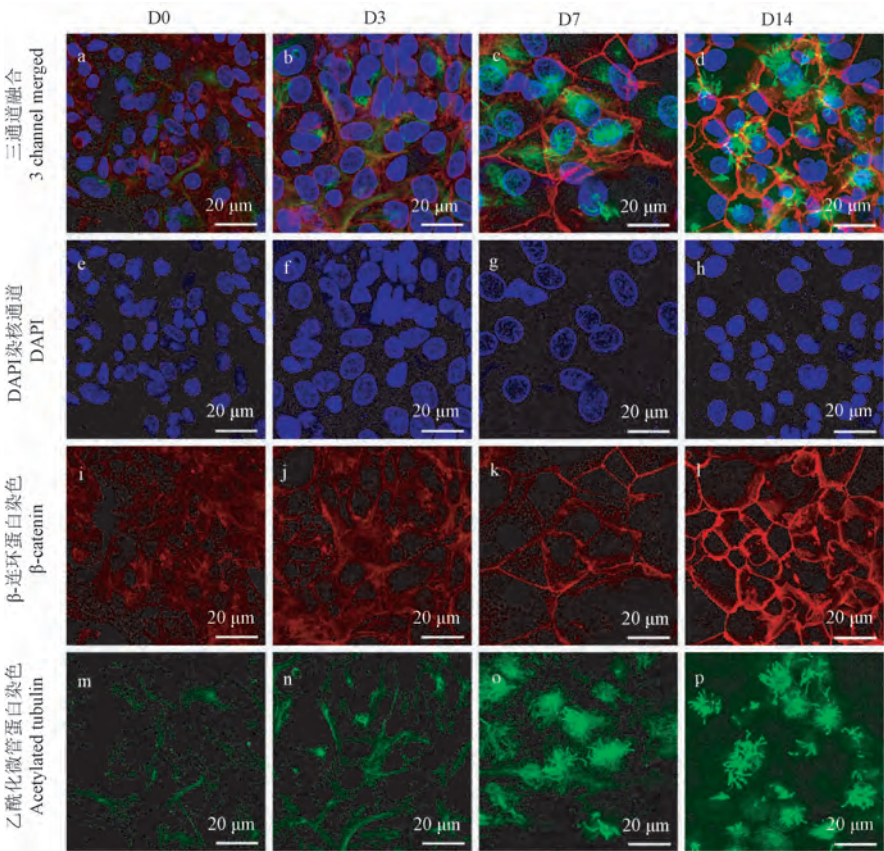


图 3 共聚焦显微镜检测不同培养时间的室管膜细胞的动纤毛免疫荧光染色

Figure 3 Immunofluorescence staining revealed multicilia formation during differentiation of cultured ependymal cells

2.3 MEPC 多纤毛摆动观察结果

在饥饿培养 12 d 后 (D12), 大部分细胞已经完全分化, 细胞排列整齐, 其表面的动纤毛清晰可见 (图 2d, Movie1)。通过高速摄像机拍摄小鼠室管膜细胞动纤毛运动状态, 结果显示细胞的动纤毛分化状态良好, 纤毛清晰可见, 成簇分布在细胞表面。动纤毛细胞在整体细胞中分布均匀且数量较多 (Movie 1)。正常小鼠的动纤毛摆动速率很快, 成簇的动纤毛运动呈现协同、规律的往复摆动模式。

3 讨论

目前常用研究哺乳动物纤毛的细胞模型主要为经过饥饿培养后可生长初级纤毛的细胞, 如永生化的视网膜色素上皮细胞, 小鼠成纤维细胞等。然而这些生长初级纤毛的细胞模型在动纤毛研究中有很多局限性, 一方面初级纤毛的结构与动纤毛差异很大, 在形成和功能方面所涉及的分子机理不尽相同, 另一方面也无法观察动纤毛特有的运动特

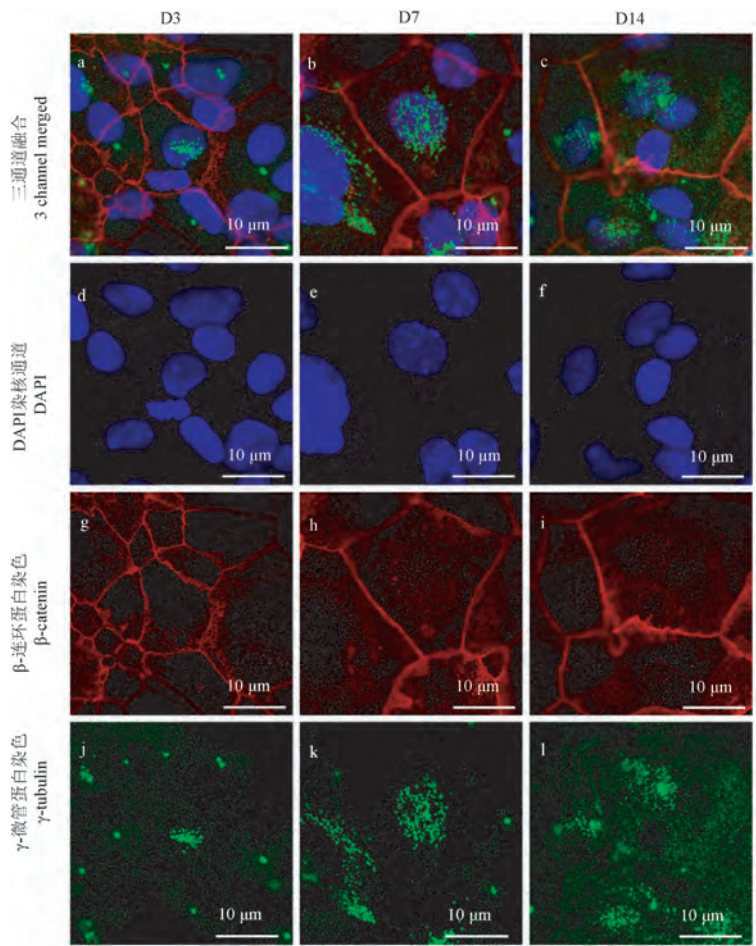


图 4 共聚焦显微镜检测不同培养时间的室管膜细胞的基体免疫荧光染色

Figure 4 Immunofluorescence staining revealed changes in basal bodies of cultured ependymal cells during differentiation

性^[5,14]。在本报告中,我们描述了一种简单、快速且相对经济的方法,从新生小鼠中获得具有动纤毛的室管膜细胞。并在体外培养过程中,跟踪检验室管膜细胞各发育阶段的形态特点及动纤毛的形成过程和运动状态,为研究大脑动纤毛的形成、维持、以及病变提供有效模型和基础。

室管膜细胞原代培养主要有以下步骤:首先取出生 1 ~ 3 d 内的小鼠端脑组织,此时的小鼠大脑内的神经胶质细胞分化程度低,利用此阶段的端脑提取诱导分化室管膜细胞可以获得较高的成功率;再者注意将脑膜和内部小血管剥离干净,若剥离不完全,后续血管膜细胞生长速度会快过室管膜细胞,严重干扰实验结果;同时,分离过程中保持在冰上且冰浴的缓冲溶液中进行,可以大大提高胶质细胞的存活率。Hank's 溶液的无糖体系也可以降低培养中端脑神经元的活力。在后续培养过程中,端脑组织经破碎消化得到单细胞悬液,将悬液全部接种至 25 cm² 的细胞小瓶中,此时胶质细胞进一步分裂铺满。7 d 后用胰蛋白酶将其消化,以 2 × 10⁵ 个

细胞/孔的高密度接种到 24 孔板中进行培养,此时细胞的密度与后续诱导分化的成功直接相关,因此将细胞以液珠的方式种植在培养皿上 30 min 后进行补充培养基可有效增加细胞密度,1 d 后将接种液换成不含血清的培养基进行分化培养,大约 12 d (D12)后可以观察到成熟的室管膜细胞。分化成熟的室管膜细胞具有几十根多纤毛,为不同于胶质细胞的显著特征;其多纤毛可以正常摆动(频率 25 ~ 35 Hz)。这些特征可以作为室管膜细胞原代培养是否成功的鉴定标准^[14]。

室管膜细胞提取培养过程繁琐,操作要求精细,目前国内尚未见这一方法的报道。本研究在总结其他研究者经验的基础上,不断摸索比较,对新生小鼠室管膜细胞提取培养的操作步骤进行了优化,首先将木瓜蛋白酶的消化过程进行了明确,采用 2 mg/mL 的较高浓度的蛋白酶进行消化 30 min 可以更好地得到均匀且具有较高活性的单细胞悬液^[8]。同时将胶质细胞培养时间延长至 7 d,一方面更长的时间有利于胶质细胞的分裂,为后续高密

度种植提供方便,另一方面长时间的血清培养也可以进一步减少培养环境内神经元的活力和比例。在后续分化培养这一步骤中经尝试发现室温下在 100 rpm 的摇床培养 4 h 可以有效的减少附着神经元,同时也不影响后续胶质细胞的分化活性。

利用上述的培养条件,本文进一步通过免疫荧光染色的方法,以乙酰化微管蛋白和 γ -微管蛋白分别标记并观察室管膜细胞发育不同时期动纤毛和纤毛基体的典型免疫组化特征。室管膜细胞的动纤毛在饥饿培养 7 d(D7)后开始大量形成,并在饥饿培养 14 d(D14)左右成熟并形成可协同摆动的动纤毛。在室管膜细胞分化前期,纤毛的基体随着增殖分布范围扩大,而在室管膜细胞成熟时收缩至细胞表面特定区域。在活细胞状态利用超高速摄影机可以记录成熟室管膜细胞动纤毛摆动的方式以及频率。进一步显示本文报道的提取培养方法可获得大量,生长状态良好的动纤毛细胞。

动纤毛形成于呼吸道上皮细胞,大脑中的脑室内的室管膜细胞和输卵管的表面上,其正常协调的运动保证呼吸道内颗粒的清除,脑室内流体的流动和卵子的正常排出,因纤毛运动功能障碍导致的疾病统称为原发性纤毛运动障碍(PCD),患者常患有慢性气管炎、肺癌、脑积水和生育能力下降等疾病^[15]。由于该疾病涉及基因缺陷且目前无根治手段,构建一个适合研究动纤毛的细胞模型将有助于研究动纤毛形成、发育的分子机理及探索治疗 PCD 的方法。以往利用新生大鼠建立的室管膜细胞培养的方法,虽然可以从单只动物中获得更多的室管膜细胞,但培养过程复杂并需要特定的培养条件^[16]。采用成年大鼠进行培养的室管膜细胞则会在培养过程中丢失动纤毛,不适于动纤毛发育的研究^[17]。此外,与小鼠相比,小鼠为更加常用的基因操纵模式生物。本文介绍的方法不仅过程相对简单,可以追踪动纤毛发育过程,也可以更广泛地用于基因操纵动物模型中室管膜细胞发育的研究。本文所提供的方法,可以从 1 只小鼠的端脑细胞诱导分化获得大约 15 组的室管膜细胞,为一些以不易获得的基因操纵纯合子小鼠进行室管细胞体外培养的研究提供了实验方案。

参 考 文 献(References)

- [1] Sharma N, Berbari NF, Yoder BK. Ciliary dysfunction in developmental abnormalities and diseases [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2008, 85: 371–427.
- [2] Karunakaran KB, Chaparala S, Lo CW, et al. Cilia interactome with predicted protein-protein interactions reveals connections to Alzheimer's disease, aging and other neuropsychiatric processes [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 15629.
- [3] Banizs B, Pike MM, Millican CL, et al. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus [J]. *Development*, 2005, 132(23): 5329–5339.
- [4] Spassky N, Merkle FT, Flames N, et al. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(1): 10–18.
- [5] Liu Z, Nguyen QPH, Nanjundappa R, et al. Super-resolution microscopy and FIB-SEM imaging reveal parental centriole-derived, hybrid cilium in mammalian multiciliated cells [J]. *Dev Cell*, 2020, 55(2): 224–236.
- [6] Marshall WF, Kintner C. Cilia orientation and the fluid mechanics of development [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(1): 48–52.
- [7] Abdi K, Lai CH, Paez-Gonzalez P, et al. Uncovering inherent cellular plasticity of multiciliated ependyma leading to ventricular wall transformation and hydrocephalus [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1655.
- [8] Delgheyr N, Meunier A, Faucourt M, et al. Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated cells [J]. *Methods Cell Biol*, 2015, 127: 19–35.
- [9] Zhang YR, Chen YW, Zheng JQ, et al. Vertebrate Dynein-f depends on Wdr78 for axonemal localization and is essential for ciliary beat [J]. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11(5): 383–394.
- [10] LeDizet M, Piperno G. Detection of acetylated alpha-tubulin by specific antibodies [J]. *Methods Enzymol*, 1991, 196: 264–274.
- [11] Levilliers N, Fleury A, Hill AM. Monoclonal and polyclonal antibodies detect a new type of post-translational modification of axonemal tubulin [J]. *J Cell Sci*, 1995, 108(9): 3013–3028.
- [12] Breslow DK, Holland AJ. Mechanism and regulation of centriole and cilium biogenesis [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 691–724.
- [13] Wozniak J, Floege J, Ostendorf T, et al. Key metalloproteinase-mediated pathways in the kidney [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(8): 513–527.
- [14] O'Callaghan C, Sikand K, Chilvers MA. Analysis of ependymal ciliary beat pattern and beat frequency using high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods [J]. *Cilia*, 2012, 1(1): 8.
- [15] Gadadhar S, Alvarez Viar G, Hansen JN, et al. Tubulin glycylation controls axonemal dynein activity, flagellar beat, and male fertility [J]. *Science*, 2021, 371(6525): eabd4914.
- [16] Weibel M, Pettmann B, Artault JC, et al. Primary culture of rat ependymal cells in serum-free defined medium [J]. *Brain Res*, 1986, 390(2): 199–209.
- [17] Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P, et al. A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents [J]. *Histochem Cell Biol*, 2013, 139(1): 205–220.

李卫杰,梁冬丽,刘永忠,等. 生殖细胞条件性敲除 Usp16 基因小鼠的建立、鉴定及表型分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 376-383.

Li WJ, Liang DL, Liu YZ, et al. Establishment, identification and phenotyping of a germ cell-specific deubiquitinating enzyme 16 conditional knockout mouse [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 376-383.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.010

生殖细胞条件性敲除 Usp16 基因小鼠的建立、鉴定及表型分析

李卫杰¹, 梁冬丽², 刘永忠³, 王朝霞², 乔中东¹, 徐汪节^{2*}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; 2. 上海交通大学实验动物中心, 上海 200240; 3. 上海交通大学医学院仁济医院上海肿瘤研究所癌基因与相关基因国家重点实验室, 上海 200240)

【摘要】 目的 建立生殖细胞特异性敲除去泛素化酶 Usp16 小鼠, 并分析其生殖表型, 探究 Usp16 是否在精子发生过程发挥功能。**方法** 首先, 将 Vasa-cre 转基因小鼠与 Usp16 条件性小鼠 (Usp16^{flox/flox}) 杂交获得生殖细胞特异性敲除 Usp16 小鼠; 其次, 利用 qPCR、Western Blot 和免疫荧光检测睾丸中 Usp16 表达; 并通过合笼交配、计算机辅助精子分析和 HE 染色法进行生殖表型分析。**结果** 成功获得了生殖细胞特异性敲除 Usp16 纯合子 (Usp16^{flox/flox}/Vasa-cre⁺), 及杂合子小鼠 (Usp16^{flox/wt}/Vasa-cre⁺)。与野生型相比, Usp16^{flox/wt}/Vasa-cre⁺ 雄鼠生殖表型没有显著性变化, 但与纯合子雄鼠交配的雌鼠受孕率仅为 7%, 精子数量减少约 79%, 活力下降约 87%, 精子畸形率高达 83%, 睾丸曲细精管中出现多核细胞, 附睾中早熟精子数增多了约 3 倍。**结论** 小鼠睾丸内生殖细胞 Usp16 纯合敲除会严重降低精子质量, 从而降低雄性生育能力。

【关键词】 精子发生; Usp16; 生殖力; Cre-loxP

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0376-08

Establishment, identification and phenotyping of a germ cell-specific deubiquitinating enzyme 16 conditional knockout mouse

LI Weijie¹, LIANG Dongli², LIU Yongzhong³, WANG Zhaoxia², QIAO Zhongdong¹, XU Wangjie^{2*}

(1. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China. 2. Laboratory Animal Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240. 3. State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200240)

Corresponding author: XU Wangjie. E-mail: hover_xwj@sjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the role of deubiquitinating enzyme 16 (Usp16) in spermatogenesis by establishing a mouse model of conditional Usp16 knockout in germ cells. **Methods** Vasa-cre transgenic mice were crossed with Usp16 transgenic mice (Usp16^{flox/flox}) to obtain germ cell-specific Usp16 knockout mice. To confirm that Usp16 had been conditionally inactivated in germ cells, genotyping by PCR and western blotting was performed to evaluate Usp16 expression. Initial characterization of the phenotype of conditional knockout (CKO) mice was then conducted by co-cage mating, computer-assisted sperm analysis, and HE staining. **Results** We confirmed that Usp16 expression was appropriate in the conditional knockout mouse. Compared with the wild type, the conception rate of female mice mated with

[基金项目] 上海市自然科学基金 (20ZR1427400), 上海交通大学决策咨询课题 (JCXSJA-02)。
Funded by Natural Science Foundation of Shanghai (20ZR1427400), Shanghai Jiao Tong University Decision-Making Consultation Project (JCXSJA-02).

[作者简介] 李卫杰 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 精子发生。Email: lwj897586647@sjtu.edu.cn

[通信作者] 徐汪节 (1976—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 环境因素对生殖发育的影响和人类疾病动物模型。
Email: hover_xwj@sjtu.edu.cn

CKO mice had decreased to only 7%, while no significant difference was observed in heterozygous knockout mice male mice. The sperm count of CKO mice was decreased by approximately 79%, motility was decreased by approximately 87%, and the rate of sperm deformity was as high as 83%. Multinucleated cells appeared in the seminiferous tubules of the testes and the number of precocious sperm in the epididymis had increased by approximately 76%. **Conclusions** Homozygous mutation of *Usp16* in germ cells severely reduces sperm quality, thereby reducing male fertility.

[Keywords] spermatogenesis; *Usp16*; fertility; Cre-loxP

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

精子发生是一个由一系列基因的精细调控完成的复杂过程,其间经历剧烈的形态与功能的变化。我们前期发现,不育患者精子中的 *Usp16* 表达下调^[1],提示 *Usp16* 可能与精子质量有关。

去泛素化酶 *Usp16* 可特异性去除组蛋白 H2A 的泛素化修饰,调节 *Hox* 基因表达^[2]、影响胚胎干细胞和造血干细胞分化^[3-4]、对 DNA 损伤修复起着负调控作用^[5]。*Usp16* S552 的磷酸化是细胞正常增殖和细胞周期 G2/M 期进程的基础^[6-8]。此外,*Usp16* 参与 Wnt 途径的调节^[9]、参与 T 细胞介导的自身免疫病的发展^[10]、还影响肿瘤的生长^[11]。但是 *Usp16* 在精子发生中相关的功能研究较少。

由于 *Usp16* 全身性敲除导致动物胚胎死亡^[3],所以本研究拟通过 Cre-loxP 系统^[12]构建生殖细胞特异性(*Vasa-cre*)敲除 *Usp16* 小鼠,并分析其生殖表型来初步探究 *Usp16* 在小鼠生精过程中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

3 只野生型雄鼠(WT)、3 只杂合敲除 *Usp16* 雄鼠(*Usp16*^{flox/wt}/*Vasa-cre*⁺)和 3 只纯合敲除 *Usp16* 雄鼠(*Usp16*^{flox/flox}/*Vasa-cre*⁺)为 4 月龄,体重约为 28 g,用于表型分析。5 只野生型雄鼠(WT)、27 只野生型雌鼠(WT)和 2 只纯合敲除 *Usp16* 雌鼠(*Usp16*^{flox/flox}/*Vasa-cre*⁺)用于生育实验,3 月龄,体重约为 26 g(雄鼠)和 22 g(雌鼠)。1 只 *Vasa-cre* 转基因雄鼠(B6. FVB-Tg(*Ddx4-cre*)1Dcas/KnwJ)购自赛业模式生物研究中心(太仓)有限公司【SCXK(苏)2018-0003】,6 月龄,约 29 g。1 只 *Usp16*^{flox/flox}雌鼠由上海市肿瘤研究所刘永忠课题组【SYXK(沪)2018-0028】赠送,4 周龄,约 15 g。以上小鼠均为 SPF 级,遗传背景均为 C57BL/6 N,饲养于上海交通大学实验动物中心【SYXK(沪)2018-0028】,温度为 20 ~ 25℃,湿度为 40% ~ 70%,昼夜各半循环照明,笼具、饲料、垫料和饮水经高压灭菌处理。繁

殖采用雌雄比 1 : 1 或 2 : 1 合笼,小鼠出生 21 ~ 28 d 后分笼,至 8 周龄性成熟。所有操作均符合上海交通大学实验动物伦理与使用委员会要求(审批号:A2021025)。

1.1.2 主要试剂与仪器

引物合成(上海桑尼生物科技有限公司)、血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304,天根生化科技(北京)有限公司)、2 × Es Taq MasterMix(Dye)(CW0690,北京康为世纪生物科技有限公司)、RNAiso plus(9109, TaKaRa)、PrimeScript™ RT Reagent Kit(RR037A, TaKaRa)、FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)(04913850001, Roche)、兔抗小鼠 *Usp16* 抗体(14055-1-AP,武汉菲恩生物科技有限公司)、β-actin 抗体(ab6276, Abcam)、Alexa Fluor 594 山羊抗兔荧光二抗(A-11012, 赛默飞世尔科技公司)、山羊抗小鼠 IgG(H+L)-HRP(CW0102S,北京康为世纪生物科技有限公司)、山羊抗兔 IgG(H+L)-HRP(CW0103S,北京康为世纪生物科技有限公司)、抗荧光淬灭封片液(含 Hoechst 33342)(P0133-5 mL,上海碧云天生物技术有限公司)、ECL 发光试剂(C510043,生工生物工程(上海)股份有限公司)、Diff-Quick 染色液(G1541,北京索莱宝科技有限公司)。

迈朗精子分析仪(南宁松景天伦生物科技有限公司,中国)、电泳仪、PCR 扩增仪、实时荧光定量 PCR 仪和凝胶成像仪(Bio-Rad, 美国)、荧光显微镜(Zeiss, 德国)。

1.2 方法

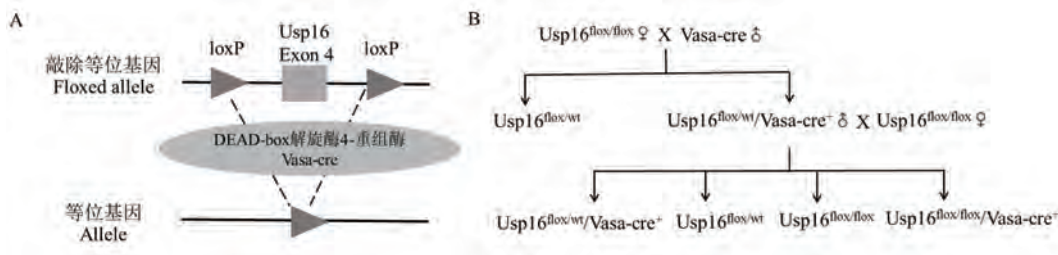
1.2.1 小鼠的繁殖与筛选鉴定

应用 Cre-loxP 基因编辑技术(图 1A),将 *Vasa-cre* 转基因雄鼠与雌鼠 *Usp16*^{flox/flox} 杂交,得 F1 代雄鼠 *Usp16*^{flox/wt}/*Vasa-cre*⁺ 为杂合敲除组,继续与雌鼠 *Usp16*^{flox/flox} 回交得 F2 代雄鼠 *Usp16*^{flox/flox}/*Vasa-cre*⁺ 为纯合敲除组(图 1B)。

剪取 7 日龄左右小鼠脚趾,按照 TIANGEN 试剂盒提取 DNA,通过 PCR 扩增并进行 2% 琼脂糖凝胶

电泳的方法确定小鼠基因型。PCR 扩增 10 μ L 体系为 2 $\times$ Es Taq MasterMix (Dye) 5 μ L, ddH₂O 4 μ L, 10 μ mol/L 引物各 0.25 μ L, 模板 DNA 0.5 μ L。Vasa-cre 基因扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C

45 s, 33 个循环; Usp16-wt 基因扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 38 个循环; Usp16-loxP 基因扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 33 个循环。所使用的引物信息见表 1。



注: A: Cre-loxP 敲除原理; B: 繁殖策略。

图 1 条件性敲除 Usp16 小鼠的构建与繁殖

Note. A. Cre-loxP knockout principle. B. Reproductive strategy.

Figure 1 Construction and reproduction of Usp16 conditional knockout mice

表 1 小鼠基因型鉴定引物信息

Table 1 Primers for mouse genotyping

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')	扩增片段(bp) Amplified fragment(bp)
Vasa (cre)	CACGTCAGCCGTTTAAAGCCGCGT	TTCCCAATTCTAAACAACACCCTGAA	240
Usp16 (wt)	CTGTATTGCTCTTGCTAGTTG	CTACTGTACTTTCCAGTCC	607
Usp16 (loxP)	GGCGCATAACGATACCACGAT	ACTGATGGCGAGCTCAGACC	961/170

1.2.2 小鼠组织总 RNA 提取及 qPCR

新鲜组织经液氮研磨后,用 RNAiso plus 提取组织总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 按反转录试剂盒合成 cDNA。cDNA 为模板,依照 Roche 荧光定量试剂盒说明书,用 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪进行 qPCR。目的基因 Usp16 上游引物: 5'-CTGCCAAGACT GTAAGACTGAC-3', 下游引物: 5'-GGTGTCTGTG TAGTGCTTCAAG-3', 内参基因 GAPDH 上游引物: 5'-TGGCCCTTCCGTGTTCTAC-3', 下游引物: 5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA-3'。反应体系: FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 10 μ L, ddH₂O 6.8 μ L, 上下游引物各 0.6 μ L, cDNA 2 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析结果。

1.2.3 Western Blot

用 RNAiso plus 提取组织总蛋白后,加入 5 $\times$ 蛋白质凝胶电泳上样缓冲液后煮沸 10 min,取 30 μ L 上样,恒压 60 V 浓缩蛋白,恒压 120 V 分离蛋白 (8%分离胶),恒流 300 mA 湿转 90 min,将蛋白转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗 (1:2000 稀释) 于 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜后加入相应 HRP 偶联二抗 (1:20 000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜后 ECL 化学发光显色于成像仪成像,结果用软件 Image J 进行灰度分析, β -actin 为内参。

1.2.4 HE 染色和免疫荧光

组织于 4%多聚甲醛中固定,常规石蜡切片, HE 染色,显微镜下拍照。免疫荧光: 切片脱蜡至水,放入预热的柠檬酸钠抗原修复液中微波加热 30 min 自然冷却后, 0.5% Triton X-100 通透 20 min, PBS 洗后 5%山羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 90 min, PBS 洗后一抗 (1:200 稀释) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗后二抗 (1:200 稀释) 室温孵育 1 h, PBS 洗后滴加抗荧光淬灭封片液封片, 荧光显微镜下拍照。

1.2.5 精液分析及精子涂片

取小鼠一侧附睾,剪开小口使精液置于精子获能液 HTF 中,放入二氧化碳培养箱 10 min,稀释 100 倍后用迈朗精子分析仪分析。其中取 10 μ L 精液涂片风干后, Diff-Quick 快速染色,显微镜下拍照。

1.3 统计学分析

独立重复实验 3 次,结果用 GraphPad Prism 8 软件统计分析,以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间平均值比较采用 Student's *t* 检验,多组间平均数比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 Usp16 在野生型成年雄鼠不同组织中表达情况

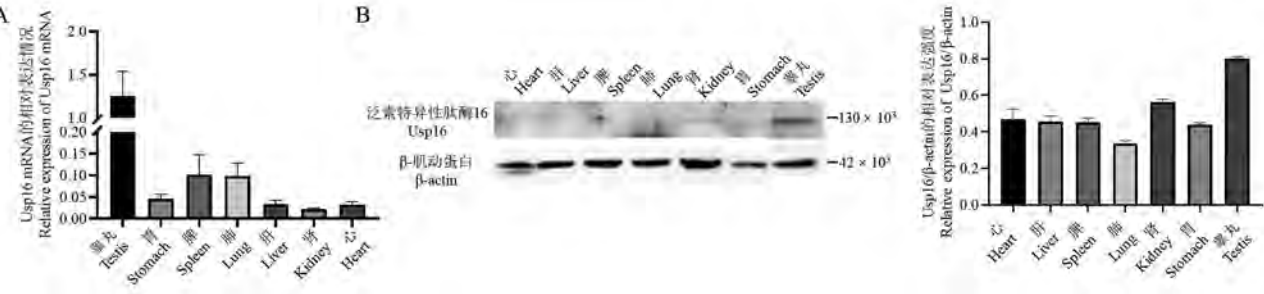
qPCR 和 Western Blot 结果显示 Usp16 在成年

雄鼠睾丸组织表达量最高,在其他组织中(心、肝、脾、肺、肾和胃)表达量较低(图 2)。

2.2 Usp16 条件性小鼠的建立及验证

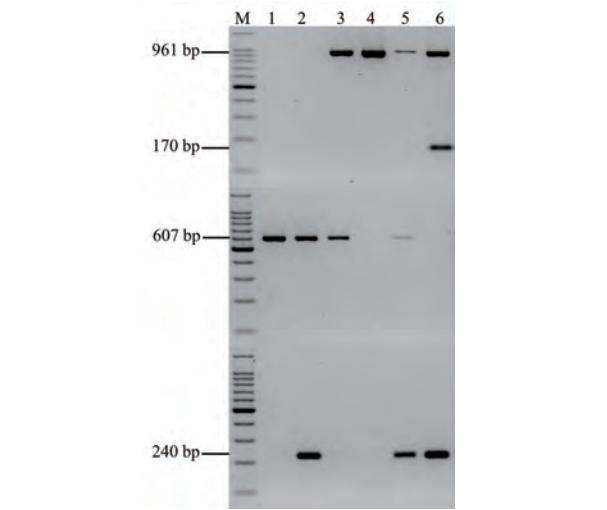
Usp16 条件性小鼠是在 Usp16 基因第 4 个外显子两端插入 loxP 位点,PCR 条带大小为 961 bp,若被 Vasa-cre 重组酶敲除则为 170 bp,野生型和 Vasa-

cre 阳性条带大小分别为 607 bp 和 240 bp, Usp16^{fllox/wt} 小鼠可见 607 bp 和 961 bp 条带, Usp16^{fllox/fllox} 小鼠只可见 961 bp,杂合子 Usp16^{fllox/wt}/Vasa-cre⁺小鼠可见 961、607 和 240 bp 条带,纯合子 Usp16^{fllox/fllox}/Vasa-cre⁺小鼠可见 961、170 和 240 bp 条带(图 3)。



注:A;qPCR 检测 Usp16 mRNA 表达水平;B:Western Blot 检测 Usp16 蛋白表达水平。
图 2 Usp16 在野生型成年雄鼠不同组织中的表达情况
Note. A. Usp16 mRNA expression level detected by qPCR. B. Usp16 protein expression level detected by Western Blot.

Figure 2 Expression of Usp16 in different tissues of wild-type adult male mice



注:1:野生型;2:Vasa-cre;3:Usp16^{fllox/wt};4:Usp16^{fllox/fllox};5:Usp16^{fllox/wt}/Vasa-cre⁺;6:Usp16^{fllox/fllox}/Vasa-cre⁺。
图 3 小鼠脚趾 DNA 经 PCR 扩增后电泳条带
Note. 1. Wild type. 2. Vasa-cre. 3. Usp16^{fllox/wt}. 4. Usp16^{fllox/fllox}. 5. Usp16^{fllox/wt}/Vasa-cre⁺. 6. Usp16^{fllox/fllox}/Vasa-cre⁺.

Figure 3 Electrophoresis band of PCR amplification of mouse toe DNA

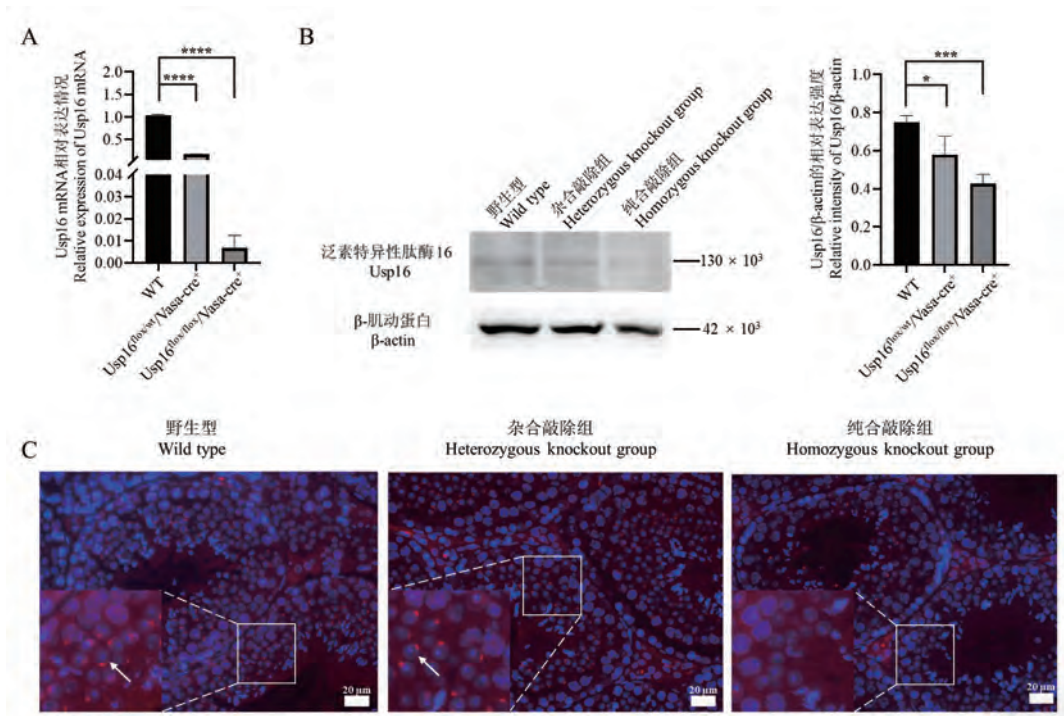
Usp16^{fllox/wt}/Vasa-cre⁺雄鼠与 Usp16^{fllox/fllox} 雌鼠杂交共产仔 80 只(雄鼠 43 只,雌鼠 37 只)。其中 Usp16^{fllox/wt} 基因型小鼠 26 只,Usp16^{fllox/fllox} 基因型小鼠 21 只,Usp16^{fllox/wt}/Vasa-cre⁺ 基因型小鼠 27 只,Usp16^{fllox/fllox}/Vasa-cre⁺ 基因型小鼠 6 只(雌鼠 3 只,雄

鼠 3 只)。
qPCR 结果显示:相较于野生型,杂合敲除组和纯合敲除组雄鼠睾丸中 Usp16 mRNA 表达显著降低,分别降低了约 83%和 99%(Mean 0.17 SD 0.01 vs Mean 1.03 SD 0.03, $P < 0.0001$; Mean 0.01 SD 0.01 vs Mean 1.03 SD 0.03, $P < 0.0001$)(图 4A)。Western Blot 结果显示相较于野生型,杂合敲除组和纯合敲除组雄鼠睾丸中 Usp16 蛋白表达显著降低,分别降低了约 22%和 43%(Mean 0.58 SD 0.10 vs Mean 0.75 SD 0.03, $P = 0.0445$; Mean 0.43 SD 0.05 vs Mean 0.75 SD 0.03, $P = 0.0007$)(图 4B)。免疫荧光结果显示 Usp16 高表达于圆形精子,在体细胞中弱表达,纯合敲除组雄鼠睾丸中 Usp16 阳性圆形精子明显少于野生型(图 4C)。这些结果从基因和蛋白水平证明生殖细胞特异性敲除 Usp16 小鼠建立成功。

2.3 Usp16 条件性敲除小鼠表型分析

2.3.1 Usp16 敲除对睾丸组织形态的影响

野生型、杂合敲除组和纯合敲除组的睾丸中曲细精管排列紧密,结构完整,直径大小没有明显变化,管腔空腔化明显,管壁至管腔的各类生精细胞层次分明,但纯合敲除组睾丸中部分管腔中含有少量圆形精子相融形成的多核细胞(见图 5)。

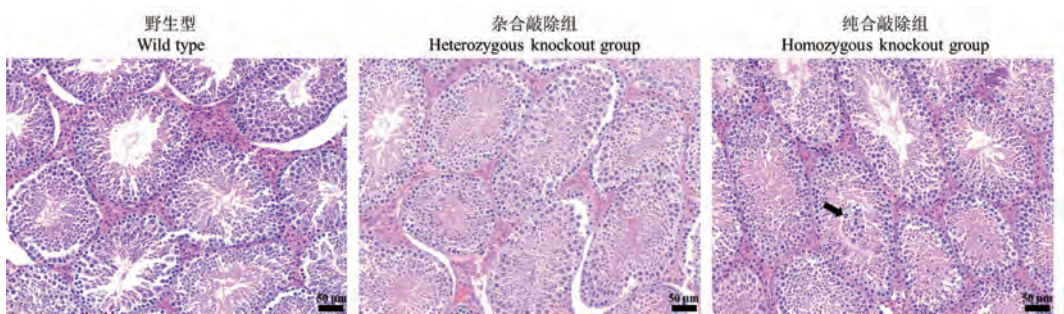


注:A;qPCR 验证野生型、杂合敲除组和纯合敲除组睾丸中 Usp16 mRNA 表达水平,与野生型对比,**** $P < 0.0001$;B:Western Blot 验证野生型、杂合敲除组和纯合敲除组睾丸中 Usp16 蛋白表达水平,与野生型对比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;C:睾丸中 Usp16 的免疫荧光,红色荧光代表 Usp16,蓝色荧光代表细胞核,箭头:阳性圆形精子。

图 4 条件性敲除 Usp16 小鼠验证

Note. A. The expression of Usp16 mRNA levels in the testis of the wild type, heterozygous knockout and homozygous knockout group detected by qPCR. Compared with the wild type, **** $P < 0.0001$. B. The expression of Usp16 protein levels in the testis of the wild type, heterozygous knockout and homozygous knockout group detected by Western Blot. Compared with the wild type, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. C. Immunofluorescence detection of Usp16 in the testis. Red fluorescence represents Usp16 and blue fluorescence represents cell nucleus. Arrow. Positive germ cells.

Figure 4 Verification of Usp16 conditional knockout mice



注:箭头:多核细胞。

图 5 睾丸 HE 染色

Note. Arrow. Multinucleated cell.

Figure 5 HE staining of the testis

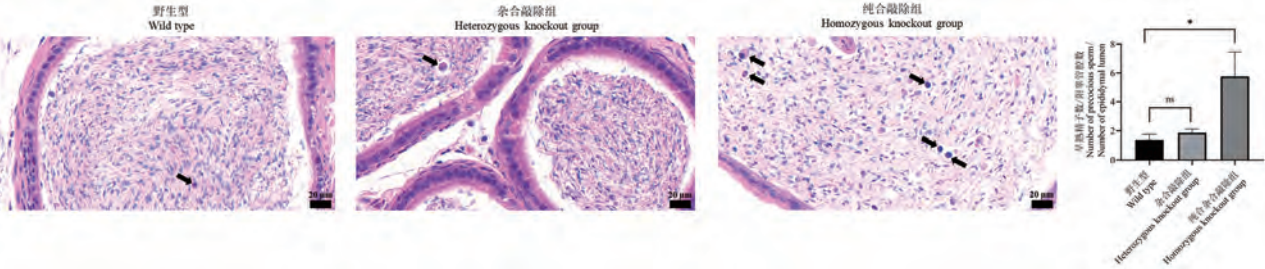
2.3.2 Usp16 敲除对附睾组织形态的影响

相较于野生型,纯合敲除组附睾中精子密度减小,且附睾中早熟精子数显著增加了约 3 倍 (Mean 5.77 SD 1.68 vs Mean 1.40 SD 0.36, $P = 0.0117$),而杂合敲除组无明显差异 (图 6)。

2.3.3 Usp16 敲除对精子质量及出生率的影响

野生型和杂合敲除组雄鼠生育能力正常,纯合敲除雌鼠也能正常生育产仔。而纯合敲除组雄鼠仅与其交配的 15 只雌鼠中的 1 只成功生育鼠仔,受孕率约 7% (表 2)。

纯合敲除组雄鼠的精子数量、活率和活力相较于野生型显著下降,分别下降了约 79%、81% 和 87%,精子运动速度(VSL、VCL、VAP)与精子空间位移程度(ALH、BCF、MAD)也显著降低,分别降低了约 80%、80%、80%、80%、78% 和 78%,而杂合敲除组精子各参数没有显著差异(表 3)。



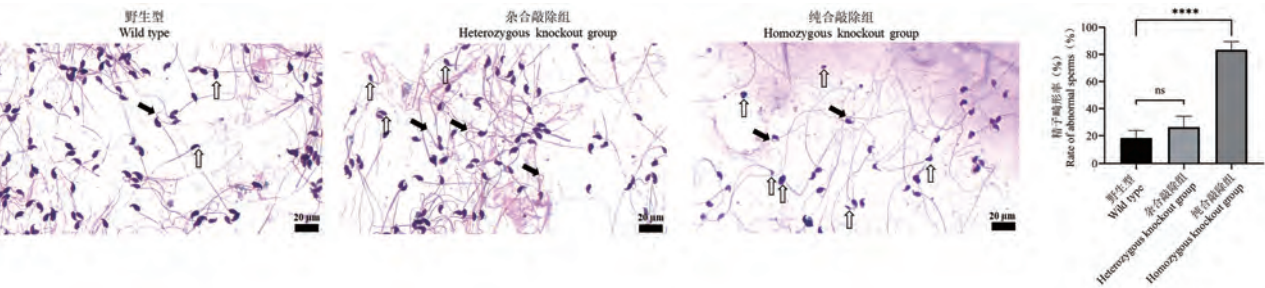
注:实心箭头:早熟精子;与野生型相比, ^{ns}*P* > 0.05, * *P* < 0.05。

图 6 附睾 HE 染色

Note. Solid arrow. Precocious sperm. Compared with the wild type, ^{ns}*P* > 0.05, * *P* < 0.05.

Figure 6 HE staining of the epididymis

表 2 生育能力测试		
Table 2 Fertility test		
雄鼠基因型	受孕雌鼠数/配繁雌鼠数	产仔数
Genotype of male mice	Pregnant female mice/mating female mice	Number of litter
WT#1	2/2 (WT)	8,9
WT#2	2/2 (WT)	11,9
WT#3	2/2 (WT)	9,10
WT#4	1/1 (Usp16 ^{flox/flox} /Vasa-cre ⁺)	7
WT#5	1/1 (Usp16 ^{flox/flox} /Vasa-cre ⁺)	8
Usp16 ^{flox/wt} /Vasa-cre ⁺ #1	2/2 (WT)	8,9
Usp16 ^{flox/wt} /Vasa-cre ⁺ #2	2/2 (WT)	7,9
Usp16 ^{flox/wt} /Vasa-cre ⁺ #3	2/2 (WT)	7,8
Usp16 ^{flox/flox} /Vasa-cre ⁺ #1	0/4 (WT)	0
Usp16 ^{flox/flox} /Vasa-cre ⁺ #2	0/4 (WT)	0
Usp16 ^{flox/flox} /Vasa-cre ⁺ #3	1/5 (WT)	6



注:实心箭头:精子颈部或尾部异常弯曲;空心箭头:精子头部异常;与野生型相比, ^{ns}*P* > 0.05, **** *P* < 0.0001。

图 7 精子涂片染色

Note. Solid arrow. Curved neck and tail. Hollow arrow. Abnormal head. Compared with the wild type, ^{ns}*P* > 0.05, **** *P* < 0.0001.

Figure 7 Staining of sperm smear

表 3 计算机辅助精子分析

Table 3 Computer-aided sperm analysis			
精子参数 Parameter of sperm	野生型 Wild type	杂合敲除组 Heterozygous knockout group	纯合敲除组 Homozygous knockout group
密度(10 ⁶ /mL) Density(10 ⁶ /mL)	30.27 ± 1.39	29.93 ± 1.09 ^{ns}	6.27 ± 0.96 ^{****}
活率(%) Viability(%)	92.06 ± 7.00	91.93 ± 2.71 ^{ns}	17.54 ± 3.94 ^{***}
活力(%) Motility(%)	85.85 ± 9.36	81.96 ± 4.85 ^{ns}	11.23 ± 2.15 ^{***}
直线速度(μm/s) VSL(μm/s)	82.13 ± 3.15	82.28 ± 4.48 ^{ns}	16.32 ± 4.89 ^{****}
曲线速度(μm/s) VCL(μm/s)	88.50 ± 3.82	87.66 ± 3.15 ^{ns}	17.62 ± 5.36 ^{***}
平均路径速度(μm/s) VAP(μm/s)	62.13 ± 2.68	61.55 ± 2.22 ^{ns}	12.37 ± 3.76 ^{***}
侧摆幅度(μm) ALH(μm)	26.37 ± 1.14	26.12 ± 0.94 ^{ns}	5.25 ± 1.60 ^{***}
鞭打频率(Hz) BCF(Hz)	15.08 ± 2.32	15.47 ± 1.38 ^{ns}	3.34 ± 0.65 ^{**}
平均移动角度(°) MAD(°)	16.52 ± 1.76	16.46 ± 1.30 ^{ns}	3.61 ± 0.74 ^{***}
摆动性 WOB	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^{ns}	0.00 ± 0.00 ^{ns}
直线性 LIN	0.93 ± 0.03	0.94 ± 0.02 ^{ns}	0.93 ± 0.02 ^{ns}
前向性 STR	1.33 ± 0.04	1.34 ± 0.03 ^{ns}	1.32 ± 0.03 ^{ns}

注:与野生型相比,^{ns} $P > 0.05$,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$,^{****} $P < 0.0001$ 。
Note. Compared with the wild type,^{ns} $P > 0.05$,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$,^{****} $P < 0.0001$.

3 讨论

本研究通过 Vasa-cre 转基因小鼠与 Usp16 条件性小鼠(Usp16^{flox/flox})杂交成功获得生殖细胞特异性敲除 Usp16 小鼠,并从基因和蛋白水平得到证实。Vasa 蛋白从 12.5 dpc 开始表达持续至减数分裂后的精子细胞,通过与 Vasa-cre 小鼠杂交,雄鼠睾丸中生殖细胞中的 Usp16 被定向敲除,而除了睾丸中生殖细胞外,Usp16 在支持细胞和间质细胞中也有表达,故敲除后 Western Blot 中仍能看到条带,在免疫荧光中也有荧光表达。

精子发生是一个复杂而有序的过程,从精原细胞分化、精母细胞减数分裂至精子成熟,任何一个环节出现问题都有可能造成生殖缺陷。杂合敲除组相对于野生型,Usp16 表达量也显著降低,但生殖细胞中还存在 Usp16,可能降低的 Usp16 表达量不足以影响精子发生,故其精子质量和数量与野生型相比没有明显差异。纯合敲除雄鼠(Usp16^{flox/flox}/Vasa-cre⁺)附睾中精子浓度明显减少,曲细精管管腔中出现更多的早熟精子被释放入附睾中,可能是

由于精子释放过程异常^[13],使得精细胞未能完成重塑形成成熟精子而被释放入附睾中。而纯合敲除雄鼠睾丸中出现的少量多核细胞可能是由于圆形精子相融来抵抗细胞凋亡^[14]。此外,精子变态形成过程包含顶体发生、鞭毛形成和多余胞质脱落,其中生殖细胞染色质重塑^[15]和组蛋白与鱼精蛋白的交换^[16]对精子形成至关重要,此过程的异常往往导致精子畸形,精子质量下降。例如,E3 泛素连接酶 RNF8 的缺失^[17]或是 Miwi 的杂合突变^[18]都导致组蛋白上泛素化修饰的缺失,使得组蛋白和鱼精蛋白无法完全交换造成精子少弱畸形症,而纯合敲除 Usp16 雄鼠的生殖表型与其类似。去泛素化酶 Usp16 可特异性去除组蛋白 H2A 泛素化修饰,且它在圆形精子细胞中表达上调^[19],推测其可能参与圆形精子至精子成熟的变态过程,其是否在此过程中调节组蛋白的泛素化修饰使得组蛋白和鱼精蛋白交换异常,从而造成精子畸形、精子活力低和精子数量少等,还需进一步研究。此外,纯合敲除雌鼠能正常生育产仔,推测 Usp16 对其卵子形成没有明显影响。

综上所述,本文从基因和蛋白层面证实了成功构建了生殖细胞特异性敲除 *Usp16* 小鼠。通过对其生殖表型进行分析,发现纯合敲除雄鼠精子数量和活力严重下降,大量精子形态出现异常,这些表型提示,去泛素化酶 *Usp16* 可调节精子生成过程来影响精子质量和数量,最终对雄性生殖能力产生作用,具体作用机制还需进一步研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Xu W, Hu H, Wang Z, et al. Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(17): 5426–5436.
- [2] Joo HY, Zhai L, Yang C, et al. Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination [J]. *Nature*, 2007, 449(7165): 1068–1072.
- [3] Yang W, Lee YH, Jones AE, et al. The histone H2A deubiquitinase *Usp16* regulates embryonic stem cell gene expression and lineage commitment [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 3818.
- [4] Gu Y, Jones AE, Yang W, et al. The histone H2A deubiquitinase *Usp16* regulates hematopoiesis and hematopoietic stem cell function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(1): 51–60.
- [5] Zhang Z, Yang H, Wang H. The histone H2A deubiquitinase *USP16* interacts with *HERC2* and fine-tunes cellular response to DNA damage [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(47): 32883–32894.
- [6] Cai SY, Babbitt RW, Marchesi VT. A mutant deubiquitinating enzyme (Ubp-M) associates with mitotic chromosomes and blocks cell division [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(6): 2828–2833.
- [7] Xu Y, Yang H, Joo HY, et al. Ubp-M serine 552 phosphorylation by cyclin-dependent kinase 1 regulates cell cycle progression [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(19): 3219–3227.
- [8] Zhuo X, Guo X, Zhang X, et al. *Usp16* regulates kinetochore localization of *Plk1* to promote proper chromosome alignment in mitosis [J]. *J Cell Biol*, 2015, 210(5): 727–735.
- [9] Adorno M, di Robilant BN, Sikandar SS, et al. *Usp16* modulates Wnt signaling in primary tissues through *Cdkn2a* regulation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17506.
- [10] Zhang Y, Liu RB, Cao Q, et al. *USP16*-mediated deubiquitination of calcineurin A controls peripheral T cell maintenance [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(7): 2856–2871.
- [11] Yang YL, Li J, Geng YH. Exosomes derived from chronic lymphocytic leukaemia cells transfer miR-146a to induce the transition of mesenchymal stromal cells into cancer-associated fibroblasts [J]. *J Biochem*, 2020, 168(5): 491–498.
- [12] 李端, 刘亚坤, 段冰霞, 等. 少突胶质细胞条件性敲除 *FGF9* 基因小鼠模型的建立、鉴定及初步表型 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(4): 455–460.
- Li D, Liu YK, Duan BX, et al. Establishment, identification and preliminary phenotyping of an oligodendrocyte-specific fibroblast growth factor 9 conditional knockout mouse [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(4): 455–460.
- [13] O'donnell L, Nicholls PK, O'bryan MK, et al. Spermiation: The process of sperm release [J]. *Spermatogenesis*, 2011, 1(1): 14–35.
- [14] Pryor WA, Houk KN, Foote CS, et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 291(3): R491–R511.
- [15] Rajender S, Avery K, Agarwal A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility [J]. *Mutat Res*, 2011, 727(3): 62–71.
- [16] Oliva R. Protamines and male infertility [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(4): 417–435.
- [17] Lu LY, Wu J, Ye L, et al. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis [J]. *Dev Cell*, 2010, 18(3): 371–384.
- [18] Gou LT, Kang JY, Dai P, et al. Ubiquitination-deficient mutations in human *piwi* cause male infertility by impairing histone-to-protamine exchange during spermiogenesis [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 1090–1104.
- [19] Jung Hoon P, Kye Sung K, Soo Kyung K, et al. Gene expression profiles in mouse pachytene spermatocytes and round spermatids revealed by cDNA microarray [J]. *Genes Genom*, 2005, 27(2): 169–177.

[收稿日期] 2021-09-24

李懿,曾莉,何丽雯,等. 不同风格音乐对 CUMS 抑郁大鼠行为的影响及机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 384-391.

Li Y, Zeng L, He LW, et al. Effects of different style music on behavior in CUMS depression rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 384-391.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.011

不同风格音乐对 CUMS 抑郁大鼠行为的影响及机制研究

李懿,曾莉,何丽雯,谭冬梅,张倩,谭毅*

(重庆医科大学实验动物中心,重庆 400016)

【摘要】 目的 通过慢性温和不可预知刺激(chronic unpredictable and mild stress,CUMS)建立 SD 大鼠抑郁模型,初步探讨不同风格音乐改善 SD 大鼠抑郁样行为的效果和机制。

方法 通过孤养后持续 4 周慢性不可预知刺激来构建 CUMS 大鼠,以糖水偏好实验(sucrose preference test,SPT)和强迫游泳实验(forced swimming test,FST)筛选出 39 只 CUMS 抑郁大鼠,随机均分为模型组、轻音乐组、古典音乐组,并另设一组不做任何刺激的对照组作空白对照。轻音乐组,古典音乐组各自每天播放久石让音乐、莫扎特音乐 4 h,持续 3 周后立即进行 SPT,FST 和 O 迷宫实验(O-maze)测试。测试结束后立即取材。HE 染色观察海马组织的结构变化、免疫组化和 Western Blot 检测脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor,BDNF)的表达水平、液相色谱串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry,LC-MS/MS)检测海马组织中皮质酮(corticosterone,CORT)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)含量。ELISA 法检测外周血 BDNF、CORT、5-HT 和 IL-1 β 的浓度变化。结果 与模型组相比,轻音乐组与古典音乐组大鼠的糖水偏好百分比均上升($P < 0.05$)、FST 不动时间均缩短($P < 0.01$)、进入 O 迷宫开放臂的次数与停留时间均增加($P < 0.05$)。与模型组相比,轻音乐组和古典音乐组的海马组织结构完整、排列整齐,BDNF 表达水平均升高($P < 0.01$)。两组音乐干预后,血清 BDNF 水平均显著升高($P < 0.01$)。两音乐组海马中 CORT 含量均降低($P < 0.01$),古典音乐组血清 CORT 含量在古典音乐组显著降低($P < 0.01$)。血清 5-HT 含量在轻音乐组升高($P < 0.01$),但在古典音乐组无显著性差异。两音乐组血清 IL-1 β 浓度均显著降低($P < 0.01$)。结论 古典音乐和轻音乐均可以在一定程度上改善抑郁模型大鼠的行为。

【关键词】 音乐;抑郁模型;行为学;海马

【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2022)03-0384-08

Effects of different style music on behavior in CUMS depression rats

LI Yi, ZENG Li, HE Liwen, TAN Dongmei, ZHANG Qian, TAN Yi*

(Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Corresponding author: TAN Yi. E-mail: tanyee66@126.com

【Abstract】 Objective To explore the effects and mechanism of different styles of music on the depression-like behavior of rats induced by chronic unpredictable and mild stress (CUMS).

Methods We selected 39 depressed rats by sucrose preference tests (SPT) and forced swimming tests (FST). They were randomly divided into Control (no music), Light music, and Classical music groups. The Light music and Classical music groups were introduced to music by Hisaishi and Mozart, respectively, for 4 hours per day for 3 weeks, after which SPT, FST, and O-maze tests were conducted. A pathological change in the hippocampus was observed with HE staining. The expression level of hippocampal BDNF protein was detected by Western blot and immunohistochemical staining. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-

【基金项目】重庆市科技局社会民生专项(cstc2017shmszdyfX0048, cstc2017shmsA00007)。

Funded by Social Welfare Project of Chongqing(cstc2017shmszdyfX0048, cstc2017shmsA00007)。

【作者简介】李懿(1996—),男,研究生。Email:740818590@qq.com

【通信作者】谭毅(1966—),男,研究员,研究方向:实验动物模型。Email:tanyee66@126.com

MS/MS) was used to measure the content of hippocampal CORT and 5-HT. BDNF, CORT, 5-HT, and IL-1 (interleukin-1 β , IL-1 β) levels in serum were determined by ELISA. **Results** Compared with the Control group, the percentage of sucrose preference was significantly greater ($P < 0.05$), the immobile time in FST was significantly less ($P < 0.01$), and the time and staying time in the open arms of the O-maze were significantly greater ($P < 0.05$) in the Light and Classical music groups. The hippocampal tissue of rats in the Light and Classical music group was relatively intact. The BDNF expression level in the hippocampus ($P < 0.01$) and serum was significantly greater ($P < 0.01$) in the music groups. The CORT content in the hippocampus was significantly less in the music groups ($P < 0.01$) and in the serum of only the Classical music group. The 5-HT content in the serum of the Light music group was greater ($P < 0.01$) than the other groups. The content of IL-1 β in the serum in both music groups was less than the Control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Light and classical music improve the behavior of depressed rats, indicating the potential value of music therapy in mental disease treatments.

【**Keywords**】 music; depression model; behavior; hippocampus

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

抑郁症是情感、情绪表达和调节紊乱的一类精神疾病,常伴有焦虑症状,有高患病率、高复发率、高致残率、高致死率等特点,严重危害人类身心健康^[1]。抑郁症的发病机制迄今尚未完全阐明,主要包括单胺递质失调、下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)激素紊乱、神经营养因子学说和炎症因子上调等学说。目前抑郁症治疗方式主要包括药物治疗与心理治疗^[2]。然而,迄今为止,没有一种抗抑郁药能够覆盖临床的抑郁症状谱,且长期服用会造成一系列副作用。因此,抑郁症的预防和治疗手段的优化正成为我国医疗卫生工作的重点之一。

国内外已有研究显示,音乐因具有调节生理和心理的双重功效而成为抑郁治疗的潜在方法^[3-4],但仍存在很多挑战。与常规治疗最大的区别在于音乐治疗所使用的媒介即音乐是不可定量的,以“聆听音乐的时间长短”作为音乐治疗的剂量没有科学依据,而且音乐的风格、节奏、音色、旋律等特征都可以影响个体的感知和治疗效果^[5]。音乐治疗具有一定程度的经验性和主观性,需要更加深入的实证研究来探索音乐中各种元素的效应。因此,本研究利用抑郁症研究使用最广泛的 CUMS 动物模型,通过采取不同风格的音乐进行干预,初步探讨音乐改善大鼠的抑郁样行为及其相关机制,为音乐治疗抑郁的临床应用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

52 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6 ~ 8 周龄,体重 220 ~ 280 g,购买并饲养观察于重庆医科大学实验

动物中心【SCXK(渝)2018-003】【SYXK(渝)2018-0003】。饲养环境:相对湿度 40% ~ 70%,温度控制在(22 ± 3)℃。光照周期为 12 h 明暗交替,自由采食、饮水。实验方案已获得重庆医科大学医学伦理委员会审批通过(伦理审批号:2021047)。

1.1.2 主要试剂与仪器

山羊抗大鼠 BDNF 多克隆抗体(PB9075,武汉博士德生物工程有限公司)、NT-3 多克隆抗体(BA1293,武汉博士德生物工程有限公司)、小鼠抗 β -actin 单克隆抗体(AB8226,美国 Abcam)、过氧化物酶标记兔抗山羊二抗(ZB2303,北京中山金桥公司)、免疫组化试剂盒(PV9001,北京中山金桥公司)、大鼠 5-HT ELISA 试剂盒(RX303050,莫纳生物科技生物有限公司)、大鼠 BDNF ELISA 试剂盒(RX302461R,莫纳生物科技生物有限公司)、大鼠 CORT ELISA 试剂盒(RX302425R,莫纳生物科技生物有限公司)、大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(RX302869R,莫纳生物科技生物有限公司)。R12U 台式音箱(漫步者,中国)、液相色谱串联质谱(Agilent,美国)、Thermo 高速离心机(Thermo Scientific,美国)、石蜡切片机(Leica,德国)、光学显微镜(Leica,德国)、凝胶成像仪(Gene,美国)、行为学分析软件(Anymaze,美国)。

1.2 方法

1.2.1 音乐曲目的选取

根据音乐的风格类型,筛选出 10 首音乐。通过音乐的结构、和弦、乐理将音乐分为轻音乐组(Light)和古典音乐组(Classical),轻音乐组包含《龙猫》《能看见海的街道》《伴随着你》《晴朗的日子》《鸟人》《风之谷》曲目,古典音乐组包含《Piano Conceto No. 23 in Major, K488(I II III)》。轻音乐

组完整播放 1 次 26 min 38 s, 古典音乐组完整播放 1 次 24 min 50 s。轻音乐组中的 6 首曲目列表循环播放。

1.2.2 CUMS 抑郁模型的建立方法

SD 大鼠于实验前适应性饲养 1 周, 依据 SPT 结果剔除糖水偏好百分比小于 80% 的个体。CUMS 刺激方式包括空笼盒 (24 h)、潮湿垫料 (24 h)、禁食 (12 h)、禁水 (24 h)、频闪 (12 h)、4℃ 冷水游泳应激 (5 min)、45℃ 热水游泳应激 (5 min)、白噪音 (24 h)、鼠笼倾斜 45° (24 h)、夹尾 (1 min)、束缚 (4 h)、明暗交替 (12 h)、昼夜颠倒。为避免大鼠对单一或有规律的刺激产生耐受性, 每天随机选取两种刺激, 且相同刺激不连续出现, 持续刺激 4 周。刺激结束后, 通过 SPT 和 FST 实验筛选出糖水偏好百分比降低与强迫游泳不动时间增加的 CUMS 模型大鼠, 共 39 只。对照组 13 只大鼠不给予任何刺激。

1.2.3 音乐干预

抑郁模型大鼠随机分为模型组 (Model)、轻音乐组 (Light)、古典音乐组 (Classical), 每组 13 只。模型组每天继续给予刺激, 轻音乐组、古典音乐组除了给予与模型组相同的刺激外, 还每天分别给予轻音乐和古典音乐 4 h (21:00 ~ 23:00, 2:00 ~ 4:00), 鼠笼距播放源 1 m 左右, 呈弧形散开, 音量 60 ~ 70 dB, 持续 3 周。

1.2.4 行为学测试

(1) SPT: 在第 0 周 (即环境适应后)、第 4 周末 (即造模结束后) 和第 7 周末 (即音乐干预完成后) 进行。实验前进行 4 d 的适应性训练, 第 1、2 天提供两瓶纯水, 第 3 天提供两瓶 1% 蔗糖水, 第 4 天提供纯水和 1% 蔗糖水各 1 瓶。正式实验时, 白天禁食禁水 12 h (8:00 ~ 20:00), 随后给予纯水和 1% 蔗糖水 12 h (20:00 ~ 8:00), 记录 12 h 溶液的消耗量。糖水偏好百分比 (%) = 蔗糖溶液饮用量 (g) / [蔗糖溶液饮用量 (g) + 纯水饮用量 (g)] × 100%。

(2) FST: 在第 4 周末和第 7 周末进行。每只大鼠在实验前 24 h 进行 15 min 的适应性游泳。泳桶高 80 cm, 直径 15 cm, 水面高度 30 cm, 水温 22 ~ 26℃ 左右。实验持续 6 min, 用数码相机记录实验过程, any-maze 视频分析软件统计 6 min 内小鼠不动总时间。

(3) O-maze: 将大鼠放进迷宫中央的封闭臂中, any-maze 视频分析软件分析其行走路程、进入开放臂次数和在开放臂内的停留时间。

(4) OFT: 将大鼠置于 100 cm × 100 cm × 40 cm 的黑色旷场箱的中心, 自由探索环境 5.5 min, 安装在旷场中心上方的摄像机记录大鼠的运动轨迹, 前 30 s 用于适应环境, 后 5 min 用于分析大鼠在旷场箱的运动情况, 包括大鼠在旷场箱运动的总距离、进入中心区域 (中心 30 cm × 30 cm 的正方形区域) 的次数和时间。每次测试后, 用 75% 的乙醇擦拭旷场箱的内壁和底面, 以消除大鼠的气味。

1.2.5 取材

第 7 周末行为学实验结束后, 麻醉大鼠, 经眼眶后静脉丛取血之后, 二氧化碳过量吸入安乐死处死大鼠, 分离头身。在冰袋上剪开头皮, 打开颅腔取出全脑。每组取 3 只大鼠全脑固定于 4% 多聚甲醛液中, 其余大鼠脑组织分离海马组织, 冰冻保存。

1.2.6 HE 染色

取多聚甲醛中固定的组织样本, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡, 制作石蜡包埋块, 4 μm 切片并经过脱蜡水化后, 将切片浸入苏木精染液染色 5 min, 缓流自来水冲洗 3 min, 再用 1% 盐酸乙醇溶液分色 30 s, 自来水冲洗后, 浸入伊红染液染色 2 min, 经脱水封片后光镜观察。

1.2.7 免疫组化

将切片 37℃ 烘烤 30 min, 二甲苯梯度脱蜡。每个组织滴加 3% 过氧化氢, 消除过氧化氢酶活性。抗原修复、封闭, 与抗 BDNF 一抗 (1:500 稀释) 4℃ 孵育过夜, 清洗后与生物素标记的羊抗兔二抗孵育、DAB 显色、苏木素复染, 封片。光镜下观察海马 CA1, CA3 和 DG 区神经元细胞中 BDNF 的表达情况, 并进行图像采集。

1.2.8 Western Blot

按照 1:9 (W/V) 比例在匀浆管中加入冰冷的 RIPA 裂解液 (含 100 μg/mL PMSF), 充分研磨, 形成 10% 的组织匀浆液, 4℃, 11 200 r/min 离心 10 min, 取上清液, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。使用 SDS-PAGE 胶试剂盒配置 PAGE 胶, 在样品槽中加入 5 × Loading Buffer 预处理的蛋白样本, 恒压电泳后将蛋白转到 PVDF 膜上, 经封闭、TBST 清洗 3 次后, 与 BDNF 一抗 (1:1000 稀释) 4℃ 孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 加二抗 (1:5000) 室温孵育 2 h 后进行 ECL 显色。Image J 分析各条带灰度值, 用光密度比值表示其相对表达。

1.2.9 ELISA

用 ELISA 试剂盒测定血清 BDNF、CORT、5-HT

和 IL-1 β 水平,检测灵敏度为 pg/mL。同一指标的重复检测使用同一批次产品,以避免批间变异。

1.2.10 液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)

按照 1 : 3 (W/V) 比例在匀浆管中加入冰冷的超纯水,充分研磨,形成 25% 的组织匀浆液,4℃,4600 r/min 离心 10 min,取上清液,按照 1 : 9 比例加入冰冷的乙腈,混匀后 4℃,15 000 r/min 离心 10 min,取 60 μ L 上清液,加入 110 μ L 乙腈和 10 μ L IS 溶液,混匀后 4℃,15 000 r/min 离心 10 min,取 2 μ L 上清液上机检测。所有蛋白均在正离子模式下扫描,实验数据用 MassLynx (4.1) 软件进行处理。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 23 进行统计学分析,所有测试计量资料以平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,每个实验至少重复 3 次。两组数据比较使用独立样本 *t* 检验。多组数据比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),使用 Levene 做方差齐性检验,事后两两比较,使用 LSD 法进行检验,*P* < 0.05 被认为具有

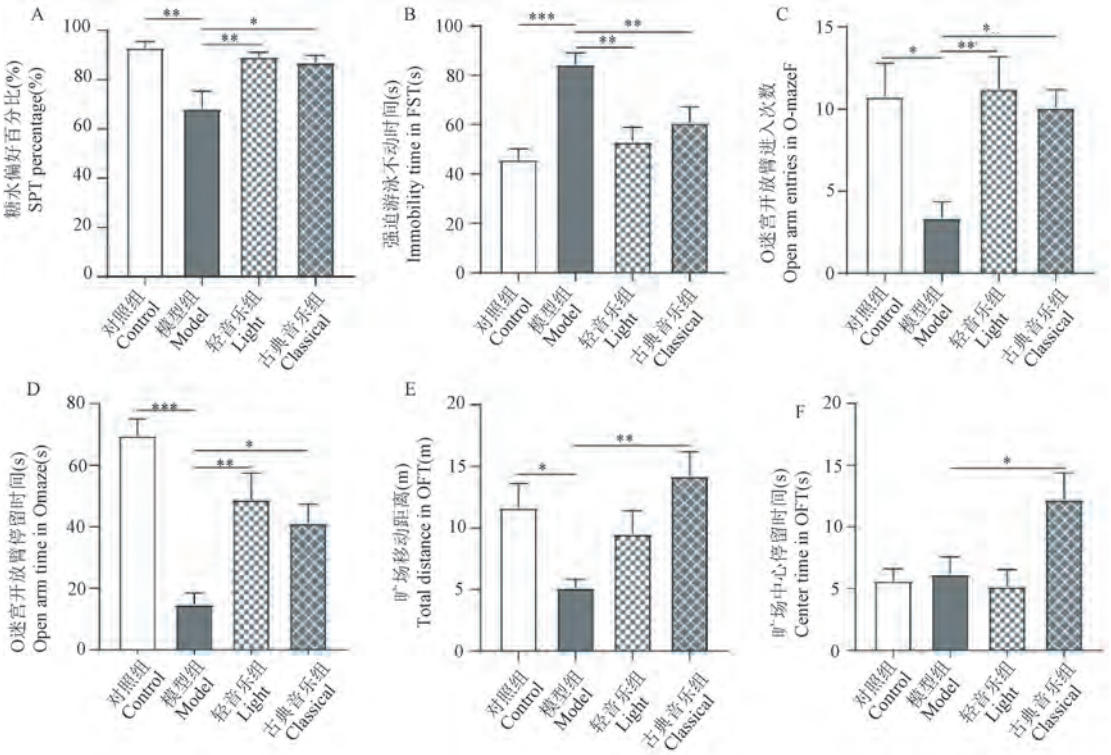
统计学意义。

2 结果

2.1 音乐干预改善 CUMS 模型大鼠的抑郁样行为

糖水偏好百分比和强迫游泳不动时间是评价抑郁模型快感缺失的有效客观指标。实验结果表明:(1)模型组较对照组大鼠的糖水偏好百分比显著降低(*P* = 0.0023),模型组强迫游泳不动时间极显著延长(*P* < 0.001),提示模型组大鼠保持了抑郁状态(图 1A,1B)。(2)轻音乐组与古典音乐组大鼠的糖水偏好百分比模型组均明显增加,其差异均具有显著性(*P*=0.0060, *P*=0.0211)。轻音乐和古典音乐组大鼠强迫游泳不动时间较模型组也均显著缩短(*P*=0.0017, *P*=0.0058)(图 1A,1B),提示轻音乐与古典音乐均能有效改善 CUMS 模型大鼠的抑郁样行为。

抑郁症常伴有焦虑等情绪改变,高架 O 迷宫和旷场实验可进一步评价大鼠的焦虑和自主活动等



注:A:大鼠糖水偏好百分比;B:大鼠强迫游泳的不动时间;C,D:大鼠进入高架 O 迷宫开放臂的次数和停留时间;E、F:大鼠在旷场箱内移动的总距离和在中心区域的停留时间;与模型组相比,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001。

图 1 不同风格音乐干预对抑郁模型大鼠行为的影响

Note. A. Percentage of sucrose preference test. B. Immobile time of forced swimming test. C, D. Times and staying time into the open arms of elevated O maze. E, F. Total moving distance and staying time in the central area in the open field test. Compared with model group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

Figure 1 Effects of different styles of music intervention on behavior of depressed rats

状况。音乐干预 3 周后,与正常对照组相比,模型组大鼠进入 O 迷宫开放臂的次数和停留时间均显著减少($P = 0.0109, P < 0.0001$) (图 1C, 1D),在旷场箱内移动的总距离减少($P = 0.0391$) (图 1E, 1F),提示模型组大鼠伴有焦虑情绪,自主活动能力和探索能力均下降。与模型组相比,轻音乐和古典音乐组大鼠进入 O 迷宫开放臂次数($P = 0.0049, P = 0.0012$)和停留时间($P = 0.0280, P = 0.0156$)均显著增多(图 1C, 1D)。同时,在旷场实验中,两两比较发现古典音乐组大鼠与模型组相比,在旷场箱内移动的总距离和在旷场中心区域停留的时间均显著增加($P = 0.0023, P = 0.0104$) (图 1E, 1F)。提示轻音乐与古典音乐改善了抑郁大鼠的焦虑行为,古典音乐明显增强了大鼠的活动能力与探索行为。

此外,随着时间增长,大鼠体重均表现出明显增加;其中对照组增加明显,模型组增加缓慢。与模型组相比,轻音乐组和古典音乐组大鼠的体重增加显著($P = 0.0065, P = 0.0057$)。轻音乐组增加幅度较古典音乐组较大,但相互之间差异无显著性($P > 0.05$)。表 1 提示轻音乐与古典音乐能

拮抗 CUMS 刺激导致的体重降低,使其恢复到正常水平。

表 1 音乐干预后大鼠体重变化($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

Table 1 Effects of music intervention on weight gain and growth rate of rats($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

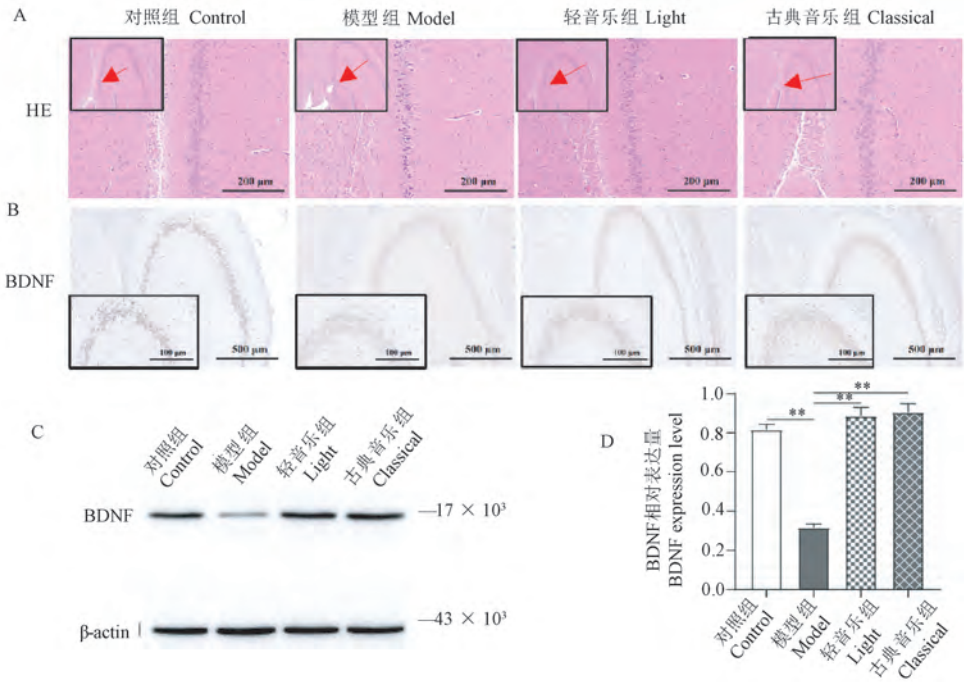
组别 Groups	3 周总增重量(g) Total weight gain in 3 weeks(g)	体重增长率(%) Growth rate of body mass(%)
对照组 Control	64.93 ± 4.86	17.41 ± 1.12
模型组 Model	39.45 ± 4.17 ^{##}	10.53 ± 1.13 ^{##}
轻音乐组 Light	59.34 ± 4.60 ^{**}	16.96 ± 1.36 ^{**}
古典音乐组 Classical	54.87 ± 4.26 [*]	16.26 ± 1.22 ^{**}

注:与对照组比, ^{##} $P < 0.01$;与模型组比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with control group, ^{##} $P < 0.01$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

2.2 音乐改善 CUMS 抑郁大鼠行为的机制

2.2.1 音乐刺激对海马形态结构以及 BDNF 的影响

大鼠脑组织的 HE 结果显示,对照组海马锥体细胞排列整齐、密度较高、数量多、细胞核完整正常。模型组海马锥体细胞出现排列不齐,呈松散状,胞体固缩、深染,胞质溶解。音乐干预 3 周后,轻音乐组与古典音乐组中海马神经细胞与对照组类



注:A:HE 染色结果;B:海马 BDNF 免疫组化染色;C:BDNF 的免疫印迹结果;D:BDNF 表达的半定量分析。

图 2 不同风格音乐干预对海马形态与 BDNF 表达的影响

Note. A. HE staining. B. Immunohistochemical staining of BDNF. C. Western Blot of hippocampal BDNF. D. Semi-quantitative analysis of BDNF expression level.

Figure 2 Effects of different styles of music intervention on hippocampal morphology and BDNF expression level

似(图 2A)。免疫组化检测发现,模型组大鼠海马 CA3 区神经细胞的 BDNF 蛋白呈弱阳性,古典音乐组与轻音乐组则为中强度阳性(图 2B)。Western Blot 结果显示,与对照组相比,模型组 BDNF 蛋白表达显著低于对照组($P = 0.001$),经轻音乐和古典音乐干预后,BDNF 蛋白表达水平较模型组均明显回升($P = 0.0044, P = 0.0022$)(图 2C, 2D)。以上结果说明,音乐一定程度改善了由于 CUMS 造模带来的神经元损伤。

对照组和模型组的 BDNF 浓度分别为(163.92 ± 4.68)pg/mL, (88.13 ± 6.40)pg/mL,其差异具有显著性($P = 0.0001$)。经过音乐干预后,轻音乐组为(123.55 ± 9.93)pg/mL,古典音乐组为(124.31 ± 5.72)pg/mL,与模型组比较,两组 BDNF 含量均显著升高($P = 0.0055, P = 0.0035$)。

2.2.2 音乐刺激对 HPA 轴的影响

HPA 轴的 CORT 变化是判断动物是否处于应激状况的常见指标。表 2 显示,较对照组,模型组血清与海马的 CORT 含量均显著升高($P = 0.006, P = 0.0029$)。音乐干预后,轻音乐组的血清 CORT 含量较模型组无显著变化($P = 0.9278$),但海马 CORT 含量显著降低($P = 0.0023$)。古典音乐组血清和海马 CORT 含量均显著降低($P = 0.045, P = 0.0029$)。提示古典音乐减轻了抑郁大鼠的应激状态。

表 2 大鼠 CORT 含量比较($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 10$)
Table 2 Comparison of CORT content in hippocampus and serum($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 10$)

组别 Groups	海马 CORT 含量 (ng/mL) CORT content in hippocampus (ng/mL)	血清 CORT 含量 (pg/mL) CORT content in serum (pg/mL)
对照组 Control	45.57 ± 8.38	1915.54 ± 36.75
模型组 Model	88.52 ± 10.86 ^{##}	2069.47 ± 26.86 ^{##}
轻音乐组 Light	27.66 ± 6.79 ^{**}	2096.31 ± 23.38
古典音乐组 Classical	25.21 ± 4.63 ^{**}	1944.73 ± 35.99 [*]

2.2.3 音乐刺激对血清单胺类神经递质的影响

单胺类神经递质浓度水平下降是抑郁症的生物学基础之一。表 3 显示,与对照组相比,模型组大鼠血清的 5-HT 含量降低($P = 0.0016$)。音乐干预后,轻音乐组较模型组的 5-HT 含量显著增加($P = 0.0033$)。各组大鼠血清 DA 含量无显著差异。提升轻音乐提高了抑郁大鼠的单胺神经递质的水平。

2.2.4 音乐刺激对血清炎症因子的影响

细胞炎症因子可通过调节细胞间相互作用,进

而影响中枢神经系统。根据检验结果发现模型组大鼠血清 IL-1 β 含量为(22.86 ± 2.18)ng/mL,对照组的 IL-1 β 含量为(6.88 ± 1.25)ng/mL,两组差异有显著性($P = 0.0001$)。音乐干预后,轻音乐组与古典音乐组的血清 IL-1 β 含量为(11.99 ± 1.99)ng/mL, (10.31 ± 2.48)ng/mL 均显著低于模型组($P = 0.0028, P = 0.0005$)。提示音乐可以调整机体的免疫平衡,减轻机体的炎症反应。

表 3 大鼠血清单胺神经递质含量比较($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 10$)
Table 3 Comparison of amine neurotransmitter content in serum($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 10$)

组别 Groups	5-HT 含量 (ng/mL) 5-HT content (ng/mL)	DA 含量 (pg/mL) DA content (pg/mL)
对照组 Control	3038.44 ± 61.89	1750.07 ± 194.07
模型组 Model	2464.48 ± 133.61 ^{##}	1700.71 ± 88.15
轻音乐组 Light	3013.39 ± 140.86 ^{**}	1687.14 ± 51.97
古典音乐组 Classical	2799.15 ± 43.78	1587.03 ± 11.32

3 讨论

CUMS 抑郁模型是研究抑郁症的常见动物模型,可连续给予大鼠 3 ~ 5 周的多种温和性应激因子,致其出现情绪低落、快感缺失、绝望无助和体重减轻等^[6]人类抑郁症相似的表现,且这种症状会持续 3 个月左右^[7]。本实验中,每天给予 2 种不同的应激刺激,连续 4 周后,CUMS 模型组的糖水偏好百分比显著下降、强迫游泳不动时间明显延长,与报道一致^[8-10]。证实 CUMS 抑郁模型建模成功,随后 3 周的音乐治疗阶段,除正常组大鼠外,其余组仍给予 CUMS,第 7 周的 SPT 和 FST 证实,模型组大鼠仍保持抑郁状态。

音乐可能通过即时性提高体内特定激素、调节神经内分泌系统活动,以调节人体节律并影响心理、情绪^[11]。音乐治疗在阿尔兹海默症^[12]、疼痛减缓^[13]、抑郁^[14-16]、肿瘤^[16]、癫痫^[17]等临床疾病已有一些探索性实践。但使用的音乐常为单曲,音乐风格各不相同。大部分研究表明古典音乐对动物会产生积极影响。其中莫扎特的作品在研究中应用较多,具有纯净、新鲜、明亮、节奏稳定、有独立周期性的特点,符合人体内部特有的生理规律,这种音乐结构可能是产生莫扎特效应的主要原因^[18-19]。在本研究中,我们的研究结果与先前对古典音乐的研究结果一致,所筛选的古典音乐能明显改善 CUMS 大鼠的抑郁和焦虑行为。我们选择的另一组

久石让的轻音乐具有结构小巧简单、节奏明快舒展、旋律优美动听、轻快、轻松和轻盈的特点,CUMS 抑郁大鼠经 3 周的干预后,抑郁和焦虑行为得到明显缓解。体重减轻是抑郁动物常见的症状之一,有研究认为体重减轻可能是因为建模过程长时间禁食导致^[20]。课题组前期已证实,夜间禁食 12 h 会极大降低大鼠体重,而白天禁食 12 h 则不会,这与大鼠昼伏夜动的生活习性有关^[21]。本研究中采用白天禁食 12 h 的策略,因此古典音乐和轻音乐干预后,大鼠体重较模型组明显增加,是音乐改善抑郁的证据之一。此外,古典音乐还能增强大鼠的自主活动和探索能力。不同风格的音乐对动物抑郁行为具有相同的效果,但在探索活动行为上效果不同。有文献报道,在其他条件相同情况下,快节奏音乐比慢节奏音乐更能唤起兴奋情绪^[22]。所以我们推测这可能是导致音乐对动物产生不同行为反应的原因。

研究表明,大脑海马体对情绪有着至关重要的调节功能^[23]。抑郁症患者经常伴有海马体缩小、神经元形态改变等病变^[24]。BDNF 在神经元存活、分化及参与神经可塑性调节、改善学习记忆具有重要作用^[25]。动物实验证明,慢性应激会导致海马部位 BDNF 表达减少^[26],临床试验也发现抑郁症患者的海马和前额皮质 BDNF 表达水平较正常人降低^[27]。本研究中 CUMS 模型大鼠的海马锥体细胞排列分布不均,出现明显的核固缩。海马 BDNF 含量较正常组明显下降,但经轻音乐与古典音乐干预后,海马的形态学病变得以改善,BDNF 含量明显高于模型组,提示音乐可直接对机体产生生理作用。BDNF 可通过 5-HT 能神经系统调节 5-HT 表达。本研究中我们也发现模型组大鼠 5-HT 的表达明显降低,与文献报道相符。而轻音乐干预后,5-HT 的含量升高到正常组水平。此外,模型组因为应激反应,海马和血清 CORT 的含量较对照组均显著升高,古典音乐干预 3 周后,二者含量均显著下降,而轻音乐组仅海马 CORT 的含量下降,这可能与音乐风格差异有关^[28]。在应激状态时,IL-1 β 活性增强以诱发神经炎症反应过度激活,使突触间隙单胺递质含量减少以及 CORT 分泌增多,参与抑郁症的发生^[29-30]。在应激状态下本研究中轻音乐与古典音乐干预明显降低了血清 IL-1 β 含量,提示音乐可以调节机体的免疫平衡,减轻机体的炎症反应,进而参与抑郁情绪的调节。

综上所述,本研究证实了轻音乐与古典音乐能够调节 BDNF、CORT、5-HT 和 IL- β 等多种抑郁相关因子的表达,改善大鼠焦虑和抑郁样行为,特定音乐可作为抑郁症机制和抑郁症治疗研究策略的新方向,为音乐治疗提供了一定的实验数据。不过,音乐治疗应用于临床还需要广泛深入的研究,音乐的各个要素如节奏、频率、情绪等,以及音乐给予的时长和频率等方式都可能会影响音乐对特定疾病患者的干预效果。同时,中枢神经系统感受音乐刺激的信号通路,以及音乐诱导情绪心理、行为及生理变化的分子机制都还值得深入研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Liang YD, Wang YL, Li Z, et al. Caregiving burden and depression in paid caregivers of hospitalized patients: a pilot study in China [J]. BMC Public Health, 2018, 18(1): 53.
- [2] 杨敏, 康洪钧, 戴晓畅. 抑郁症的发病机制与治疗进展 [J]. 四川生理科学杂志, 2015, 37(3): 146-150.
Yang M, Kang HJ, Dai XC. Research advance on mechanisms and treatments of depression [J]. Sichuan J Physiol Sci, 2015, 37(3): 146-150.
- [3] Cui YH, Yan Y, Ni ZY, et al. Astroglial-Kir4.1 in Lateral habenula drives neuronal bursts to mediate depression [J]. Nature, 2018, 554(7692): 323-327.
- [4] Yang Y, Cui Y, Sang K, et al. Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression [J]. Nature, 2018, 554(7692): 317-322.
- [5] 张书鸣, 王津涛, 邓伟. 音乐治疗的临床应用与挑战 [J]. 医学与哲学, 2017, 38(9): 69-74.
Zhang SM, Wang JT, Deng W. The clinical application and challenges of music therapy. [J]. Med Philos, 2017, 38(9): 69-74.
- [6] Helitzer DL, Sussman AL, Hoffman RM, et al. Along the way to developing a theory of the program: A re-examination of the conceptual framework as an organizing strategy [J]. Eval Program Plann, 2014, 45: 157-163.
- [7] D'Aquila PS, Newton J, Willner P. Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference [J]. Physiol Behav, 1997, 62(2): 421-426.
- [8] Zhao YN, Cao YF, Zhang YH, et al. *Nelumbo nucifera* gaertn stems (Hegeng) improved depression behavior in CUMS mice by regulating NCAM and GAP-43 expression [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 3056954.
- [9] Wang S, Xu X, Ju X, et al. Melatonin ameliorated CUMS-induced depression-like behavior via restoring endoplasmic reticulum stress in rat hippocampus [J]. Neuroreport, 2021, 32(8): 8-15.
- [10] Li K, Si S, Ji YT, et al. Melatonin augments the effects of fluoxetine on depression-like behavior and hippocampal BDNF-TrkB signaling [J]. Chin Sci Bull, 2018, 34(2): 303-311.

- [11] Lee WP, Wu PY, Lee MY, et al. Music listening alleviates anxiety and physiological responses in patients receiving spinal anesthesia [J]. *Complement Ther Med*, 2017, 31: 8–13.
- [12] Gómez Gallego M, Gómez García J. Music therapy and alzheimer's disease: cognitive, psychological, and behavioural effects [J]. *Neurologia*, 2016, 32(5): 300–308.
- [13] Nelson K, Adamek M, Kleiber C. Relaxation training and postoperative music therapy for adolescents undergoing spinal fusion surgery [J]. *Pain Manag Nurs*, 2017, 18(1): 16–23.
- [14] Van Assche E, De Backer J, Vermote R. Music therapy and depression [J]. *Tijdschr Psychiatr*, 2015, 57(11): 823–829.
- [15] Zhao K, Bai ZG, Bo A, et al. A systematic review and meta-analysis of music therapy for the older adults with depression [J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2016, 31(11): 1188–1198.
- [16] Lesiuk T. The development of a mindfulness-based music therapy (MBMT) program for women receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer [J]. *Healthcare (Basel)*, 2016, 4(3): 53.
- [17] Coppola G, Toro A, Operto FF, et al. Mozart's music in children with drug-refractory epileptic encephalopathies [J]. *Epilepsy Behav*, 2015, 50: 18–22.
- [18] Bangertner A, Heath C. The mozart effect: tracking the evolution of a scientific legend [J]. *Brit J Soc Psychol*, 2010, 43(4): 605–623.
- [19] 项爱嵩, 张云亭, 张权, 等. 音乐刺激激活人脑情感系统的 fMRI 研究 [J]. *中国临床心理学杂志*, 2006, 14(2): 214–217.
- Xiang AZ, Zhang YT, Zhang Q, et al. The activation of human affective system during passive music listening a preliminary fMRI study [J]. *Chin J Clin Psychol*, 2006, 14(2): 214–217.
- [20] Willner P. Reliability of the chronic mild stress model of depression: a user survey [J]. *Neurobiol Stress*, 2017, 6: 68–77.
- [21] He LW, Zeng L, Tian N, et al. Optimization of food deprivation and sucrose preference test in SD rat model undergoing chronic unpredictable mild stress [J]. *Anim Model Exp Med*, 2020, 3(1): 69–78.
- [22] Mansouri FA, Acevedo N, Illiparampil R, et al. Interactive effects of music and prefrontal cortex stimulation in modulating response inhibition [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 18096.
- [23] Joëls M. Functional actions of corticosteroids in the hippocampus [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 583(2–3): 312–321.
- [24] 王小雪, 岳广欣, 巫鑫辉, 等. 抑郁症海马神经可塑性改变及中药调控作用研究现状 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(4): 80–84.
- Wang XX, Yue GX, Wu XH, et al. Change of depression hippocampal neural plasticity and research status of traditional Chinese medicine regulation [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2017, 19(4): 80–84.
- [25] Martinotti G, Pettorosso M, De Berardis D, et al. Agomelatine increases BDNF serum levels in depressed patients in correlation with the improvement of depressive symptoms [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2016, 19(5): 1–6.
- [26] Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression [J]. *Nature*, 2008, 455(7215): 894–902.
- [27] Liu W, Xue XL, Xia J, et al. Swimming exercise reverses CUMS-induced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins [J]. *J Affect Disorders*, 2017, 277: 126–135.
- [28] Jafari Z, Kolb BE, Mohajerani MH. Chronic traffic noise stress accelerates brain impairment and cognitive decline in mice [J]. *Exp Neurol*, 2018, 308: 1–12.
- [29] Oldehinkel AJ, Bouma EM. Sensitivity to the depressogenic effect of stress and HPA-axis reactivity in adolescence: a review of gender differences [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2011, 35(8): 1757–1770.
- [30] Catena-Dell'Osso M, Bellantuono C, Consoli G, et al. Inflammatory and neurodegenerative pathways in depression: a new avenue for antidepressant development [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(2): 245–255.

[收稿日期] 2022-01-27

张百荣,李梦秋,范华娜,等. 慢性皮肤溃疡大鼠模型的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 392-399.

Zhang BR, Li MQ, Fan HN, et al. Rat models of chronic skin ulcers: a comparative study [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 392-399.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.012

慢性皮肤溃疡大鼠模型的比较研究

张百荣^{1#}, 李梦秋^{1#}, 范华娜¹, 沈志滨¹, 尹永芹¹, 陶曙红¹, 郑芳昊², 陈艳芬^{1*}

(1. 广东药科大学中药学院, 广州 510006; 2. 佛山市中医院, 广东 佛山 528000)

【摘要】 目的 采用不同方法构建大鼠慢性皮肤溃疡模型,通过多种指标比较评价不同模型的差异和各自特征。**方法** 大鼠随机分为4组,在建立全层皮肤缺损的开放性创面基础上施加不同因素,分别为:皮肤缺损组(皮损组)、皮肤缺损+激素干扰组(皮损+激素组)、皮肤缺损+激素干扰+细菌感染组(皮损+激素+菌组)、皮肤缺损+异物组(皮损+异物组);实验期间测量大鼠的体重,观察其活动状态及创面愈合情况,第14天取材,进行溃疡组织局部病理形态学观察,并检测免疫器官脏器指数、血液白细胞水平、肉芽组织中羟脯氨酸(Hyp)、总蛋白和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。**结果** 实验期间各组大鼠体重没有显著性差异,造模后皮损组大鼠创面愈合较快,皮损+激素组的“难愈”现象维持时间相对较短,皮损+异物组前期新生肉芽颜色灰白,但后期肉芽生长速度较快,而皮损+激素+菌组创面出现黄脓、肉芽组织生长速度较慢的特征;病理形态学观察显示,皮损+激素+菌组、皮损+异物组的炎症细胞浸润现象明显;与皮损组比较,其他3个模型组表现出脾指数增加、白细胞水平增加、创面组织羟脯氨酸含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而且皮损+激素+菌组的总蛋白含量明显降低($P < 0.05$),TNF- α 含量明显增加($P < 0.05$)。**结论** 在全层皮肤切除基础上叠加不同干预因素后,大鼠皮肤溃疡的愈合速度不同程度减慢,其中又以皮损+激素+细菌模型病理特征较稳定、持续时间长,可作为慢性难愈性皮肤溃疡的首选模型;皮损+激素、皮损+异物模型可能更适合短期难愈创面的有关研究,后者还可用于观察创面早期单纯肉芽生长情况的实验。

【关键词】 慢性皮肤溃疡模型;大鼠;比较研究;糖皮质激素;金黄色葡萄球菌;异物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0392-08

Rat models of chronic skin ulcers: a comparative study

ZHANG Bairong^{1#}, LI Mengqiu^{1#}, FAN Huana¹, SHEN Zhibin¹, YIN Yongqin¹, TAO Shuhong¹,
ZHENG Fanghao², CHEN Yanfen^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China.
2. Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528000)
Corresponding author: CHEN Yanfen. E-mail: xwnai@163.com

【Abstract】 Objective To establish rat models of chronic skin ulcers by various methods and compare the differences and characteristics of the different models through various indexes. **Methods** Male SD rats were randomly divided into four groups and treated with various factors after creating a wound surface by removing back skin: skin defect, hydrocortisone (skin excision + hydrocortisone intervention), hydrocortisone plus bacterial interference (skin excision + hydrocortisone + bacterial intervention), and implantation of a foreign body (skin excision + embedded foreign body) groups. The body weight and wound healing of rats were measured each day and the wound state was observed. Materials were drawn from all groups at 14 days after the operation to assess histological changes, the immune organ index, blood leukocyte level, hydroxyproline (Hyp), total protein, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) content in the skin ulcer. **Results** No significant difference in

[基金项目] 佛山市军民融合及可持续发展科技项目(2018AG100091)。
Foshan Military-Civilian Integration and Sustainable Development Technology Project(2018AG100091)。
[作者简介] 张百荣(1998—),男,硕士研究生,研究方向:中药药效评价与应用研究。Email: 1653481437@qq.com;
李梦秋(1997—),女,硕士研究生,研究方向:中药药效评价与应用研究。Email: 786514668@qq.com。
#共同第一作者
[通信作者] 陈艳芬(1977—),女,教授,研究方向:中西医结合药理研究方法及动物模型研究,中药药效评价及作用机制研究。
Email: xwnai@163.com

the body weight of rats in each group was found during the experimental period. The skin wounds of rats in the skin defect group healed faster, the symptom duration of chronic skin ulcers in the hydrocortisone group was shorter, and the color of granulation tissues in the implantation of the foreign body group was gray in the early stage, but the granulation grew faster in the later stage, while the hydrocortisone plus bacterial interference group had yellow pus in wounds and slow growth of granulation tissue. Pathomorphological observation showed severe inflammatory cell infiltration in hydrocortisone plus bacterial interference and implantation of foreign body groups. Moreover, compared with the skin defect group, the model groups showed increases in the spleen index, leukocyte level, and hydroxyproline content in wound tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and in the skin lesion + hormone + bacteria group, total protein content was decreased obviously ($P < 0.05$), while TNF- α content was increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** After applying various intervention factors based on full-thickness skin resection, the healing speed of rat skin ulcers was slower than that of simple skin resection. Among them, the pathological characteristics of the skin lesion + hormone + bacteria model were more stable and long lasting. It can be used as the preferred model of chronic refractory skin ulcers, whereas the skin excision + hydrocortisone intervention and skin excision + foreign body embedded models may be more suitable to study short-term refractory wounds, and the embedded foreign body can be used to observe the growth of simple granulation in the early stage.

【**Keywords**】 chronic skin ulcers model; rat; comparative study; glucocorticoid; *staphylococcus aureus*; foreign body

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

皮肤作为人体最大的器官,保护机体内各种器官和组织免受外界环境中机械性、物理性、化学性和生物性等有害因素的损伤,但同时也容易由各种内、外因素引起皮肤疾患^[1]。皮肤溃疡是临床的常见病、多发病,指各种原因引起的局部皮肤组织缺损,创口暴露容易感染,尤其是慢性皮肤溃疡长期不能愈合或易复发,治疗比较棘手,严重影响患者的生活质量,并带来一定的社会负担^[2-3],临床上亟需更多安全、有效、经济的治疗方式及药物的研究开发^[1,4]。优质的动物模型是开展皮肤病病因病机及治疗药物研究的重要工具,由于慢性皮肤溃疡的病因及发病机制不尽相同,虽有多种动物造模方法供研究选择^[5],但与人体慢性皮肤溃疡过程仍然有一定差距,且不同模型之间缺乏横向比较,难以为研究者选择合适的动物模型提供参考。因此,为了建立操作便捷且创面愈合速度较慢的皮肤溃疡模型,本研究在全层皮肤切除模型的基础上叠加不同处理条件,如细菌感染、激素干预、埋置异物等,多因素模拟皮肤溃疡病症,并从动物体征、创面愈合情况、炎症等病理变化、局部组织生化指标等综合比较各模型的特点,构建符合临床病理特征的慢性难愈性皮肤溃疡模型,以期对相关研究提供实验动物模型方法学借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

28 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重 200 ~

240 g,购于广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2018-0002】。于广东药科大学实验动物中心 SPF 级动物房饲养【SYXK(粤)2017-0125】,饲养环境室温为 24 ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 60%,12 h 光照、12 h 黑暗循环饲养,喂食普通饲料,自由进食、饮水。实验内容和过程符合广东药科大学实验动物中心动物伦理审查委员会批准。(审批号:gd pulacCVF2017103)。

1.1.2 实验菌株

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,临床菌株, MSSA23),由广东莱恩医药研究院赠与。

1.1.3 主要试剂与仪器

注射用氢化可的松琥珀酸钠(HSS),批号:011910032,天津生物化学制药有限公司;4%多聚甲醛溶液,批号:70110900,广州赛国生物科技有限公司;白细胞稀释液,批号:20201215,Phygene;羟脯氨酸试剂盒,批号:20210108,南京建成生物工程研究所;BCA 蛋白浓度试剂盒,批号:P0012,上海碧云天生物技术有限公司;Rat TNF- α Elisa 试剂盒,批号:GR2021-06,武汉基因美生物科技有限公司。

分析天平(SHIMADZU,日本);医用离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);全自动酶标仪(BioTek Instruments,美国);包埋机(武汉俊杰电子有限公司);病理切片机(上海莱卡仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模

大鼠适应性饲养 3 d,造模前 1 d 进行大鼠背部脱毛。28 只大鼠按照体重随机分组:皮肤缺损组

(皮损组)、皮肤缺损+激素干扰组(皮损+激素组)、皮肤缺损+激素干扰+菌感染组(皮损+激素+菌组)、皮肤缺损+异物组(皮损+异物组),每组 7 只。

造模方法:首先,所有大鼠建立全层皮肤缺损的开放性创面模型,麻醉后用直径为 20 mm 的塑料瓶盖在造模区(腰椎正中偏上)标记造模面积,乙醇棉球皮肤消毒,沿标记线剪去皮下组织至肌筋膜,止血。皮肤缺损组不做其他处理;皮肤缺损+激素干扰组在创面模型建立后,即刻予以氢化可的松琥珀酸钠单次肌肉注射,剂量为 80 mg/kg^[6-7];皮损+激素+菌组在筋膜下注入 1 mL(每毫升 10 亿个)金黄色葡萄球菌悬液,3 层医用纱布覆盖创面,即刻单次肌肉注射氢化可的松琥珀酸钠,剂量为 80 mg/kg^[8];皮肤缺损+异物组在皮肤剪开后,将 1 个内径为 20 mm,高度 5 mm,长度约 63 mm 的硅胶管埋入背部,深达肌筋膜深层^[9],造模时放置硅胶管于造模区域皮下,使用手术缝线将皮肤与硅胶管进行对角固定,一共固定 4 处。待大鼠自然苏醒后分笼饲养至实验结束。

1.2.2 观察指标

(1)一般体征:造模后,每日观察并记录各组大鼠的体重、进食量、饮水量、损伤部位局部温度等。

(2)创面愈合率及外观观察:造模次日起,每日观察大鼠创面愈合情况,计算愈合率。创面溃疡愈合率(%)=(原始创面面积-第 n 天创面面积)/原始创面面积×100%,使用 NIH Image J 图像分析软件测量创面面积^[7],计算创面愈合率,参考文献并进行调整,大鼠皮肤溃疡外观评分细则如下^[10],3 个指标的评分之和为各大鼠的综合评分:a:溃疡面颜色,0 分:红润;2 分:暗红;4 分:灰白;6 分:紫黑;b:溃疡皮损表面分泌物及气味,0 分:无分泌物;2 分:少量,略带腥味;4 分:中等量,腥味明显;6 分:大量,腥秽恶臭;c:新生肉芽组织生长情况,0 分:生长迅速;2 分:生长较快;4 分:生长缓慢;6 分:无生长。

(3)病理组织学观察:模型建立后第 14 天,麻醉大鼠,剪取每只大鼠约 3 ~ 5 cm² 创面肉芽组织,生理盐水清洗后,4%多聚甲醛溶液固定。经过不同浓度乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋切片;脱蜡后以苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin)染色,中性树脂胶封片,常规光镜观察(100×)溃疡创面炎性细胞、肉芽组织、胶原纤维、新生血管生长等病理变化。

(4)大鼠白细胞水平:大鼠眼眶采血,移液枪吸取 20 μ L 血液,加入 0.38 mL 白细胞稀释液,立即反

复吹打混匀血液,后滴加到计数板上,在光学显微镜下计数。

(5)免疫器官脏器指数:摘取大鼠胸腺及脾脏,精密称重并计算脏器指数。脏器指数计算公式如下:胸腺指数(%)=胸腺重量(g)/大鼠体重(100 g);脾脏指数(%)=脾脏重量(g)/大鼠体重(100 g)。

(6)ELISA 法检测溃疡组织 TNF- α 水平:剪取新生肉芽组织,生理盐水清洗后,转至-20℃保存;择日取肉芽组织制备 10%匀浆液,按照 TNF- α 试剂盒进行检测,计算肉芽组织中 TNF- α 含量。

(7)生化法测定组织总蛋白和 Hyp 含量:取肉芽组织制备 10%匀浆液,按照 BCA 蛋白试剂盒进行检测,计算肉芽组织中总蛋白含量。采用碱水解法测定 Hyp,严格按试剂盒说明书操作,计算肉芽组织中 Hyp 含量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本间的比较采用单因素方差分析,根据方差齐性检验,方差齐及不齐时分别使用 LSD 法和 Tamhane's T2 分析。 $P < 0.05$ 说明差异具有显著性, $P < 0.01$ 说明差异极具显著性。

2 结果

2.1 大鼠体征变化

造模后第 1 天,各组大鼠体重有所下降,进食量减少,出现尾冷、蜷卧等症状,但随后各组大鼠体重逐渐上升,造模期间各组大鼠体重之间无统计学差异(见图 1A)。造模期间,各组大鼠进食量均无明显差异;而在造模前 7 d,皮损+激素+菌组大鼠饮水量相对其他 3 组上升(见图 1B)。动物体内发生感染性炎症时,机体温度可能会升高,因此,与其他 3 组比较,造模前 7 d 皮损+激素+菌组大鼠的局部体温相对较高,但统计无显著差异(见图 1C)。

2.2 皮肤溃疡外观评分和愈合率变化

造模后,皮损组大鼠创面红润,分泌物较少,愈合速度快。皮损+激素组创面色泽暗,愈合速度略低于正常组。皮损+激素+菌组大鼠创面在第 1 ~ 4 天表现出干燥、凹陷症状,第 5 天开始出现黄脓,肉芽组织生长速度慢。皮损+异物组前 3 d 新生肉芽湿润,第 4 天开始肉芽颜色灰白,第 8 天开始肉芽生长速度加快,创面红润平整。评分结果如图 2A,各组创面愈合情况如图 2B。

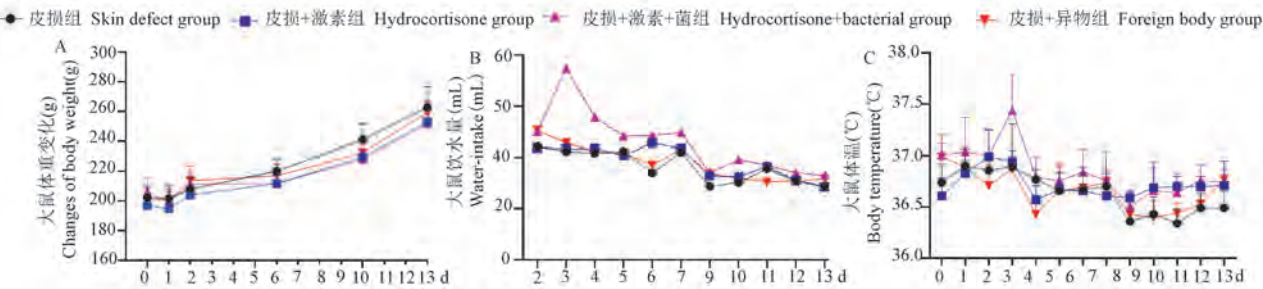
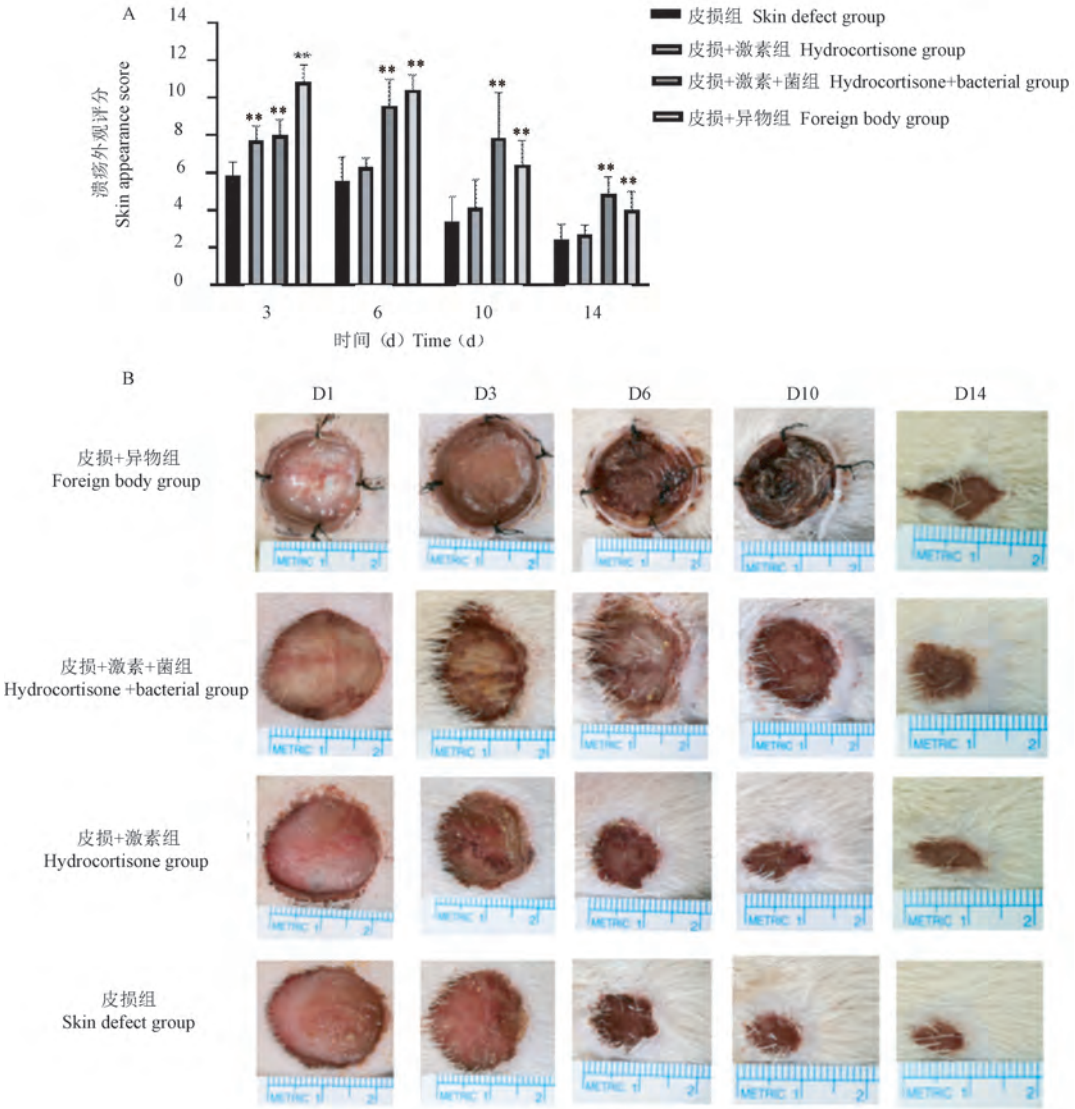


图 1 大鼠体征变化(n = 7)
Figure 1 Changes in physical signs of rats(n = 7)



注:与皮损组相比, ** $P < 0.01$ 。
图 2 大鼠创面愈合变化情况(n = 7)

Note. Compared with skin defect group, ** $P < 0.01$.
Figure 2 Changes of wounds healing of rats(n = 7)

对大鼠创面的愈合率进行动态观察发现,与单纯皮损组相比,造模第 3 天,可观察到激素、激素+菌、异物干扰组大鼠的创面愈合率明显较低($P < 0.05$) (见表 1)。但造模第 6 天开始,激素组的愈合开始加快,创面愈合率在 6 ~ 14 d 和单纯皮损组比较均无明显

差异。而皮损+激素+菌组、异物组的愈合率与单纯皮损组比较,仍具有显著差异($P < 0.01, P < 0.05$)。结果表明不同叠加因素确实可以显著减慢大鼠皮肤溃疡的愈合速度,但尤以皮损+激素+菌组和异物组更能体现慢性难愈性皮肤溃疡模型的特点。

表 1 大鼠的创面愈合率($\bar{x} \pm s, n = 7, \%$)
Table 1 Wound healing rate of rats($\bar{x} \pm s, n = 7, \%$)

组别 Groups	D3	D6	D10	D14
皮损组 Skin defect group	16.14 $\pm$ 5.90	55.82 $\pm$ 4.32	83.56 $\pm$ 3.57	91.23 $\pm$ 2.97
皮损+激素组 Hydrocortisone group	7.29 $\pm$ 3.98 *	50.29 $\pm$ 3.88	82.83 $\pm$ 6.41	90.71 $\pm$ 4.65
皮损+激素+菌组 Hydrocortisone+bacterial group	7.27 $\pm$ 8.62 *	8.74 $\pm$ 16.52 **	54.27 $\pm$ 17.17 **	81.26 $\pm$ 7.57 *
皮损+异物组 Foreign body group	4.94 $\pm$ 6.71 *	8.46 $\pm$ 9.23 **	59.45 $\pm$ 13.57 *	82.85 $\pm$ 6.38 *

注:与皮损组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with skin defect group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following tables)

2.3 皮肤溃疡形态学观察

用 100 倍光学显微镜观察 HE 染色病理切片,结果显示:皮损组创面炎症细胞浸润较少,毛细血管含量丰富,成纤维细胞数目较多。皮损+激素组肉芽组织中炎症细胞浸润现象明显,创面结构不完整,可见新生血管。皮损+激素+菌组肉芽组织中炎症细胞浸润现象明显,创面结构不完整。皮损+异物组炎症细胞浸润现象明显,成纤维细胞数目少(见图 3)。

2.4 大鼠脏器指数

胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官,胸腺指数和脾脏指数其数值高低可在一定程度上反应机体免疫功能的状态。与单纯皮损组相比,模型组各组脾脏指数增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示由于慢

性炎症反应的存在可能导致这些大鼠的免疫系统处于失衡状态见表 2。

2.5 大鼠炎症反应水平

如表 3 所示,与单纯皮损大鼠相比,其余 3 组大鼠的血液白细胞水平有所增加,尤以皮损+激素组、皮损+激素+菌组大鼠比较明显。TNF- α 作为机体重要的免疫、炎症调控因子,在创伤愈合过程中发挥着重要作用。结果显示,与单纯皮损大鼠比,3 个模型组肉芽组织的 TNF- α 含量均比单纯皮损组高,且皮损+激素+菌组、皮损+异物组具有显著性差异。上述结果表明激素、细菌感染、异物等施加因素可能通过增强创面组织的炎症反应造成创面难愈,甚至可能引发全身性反应。

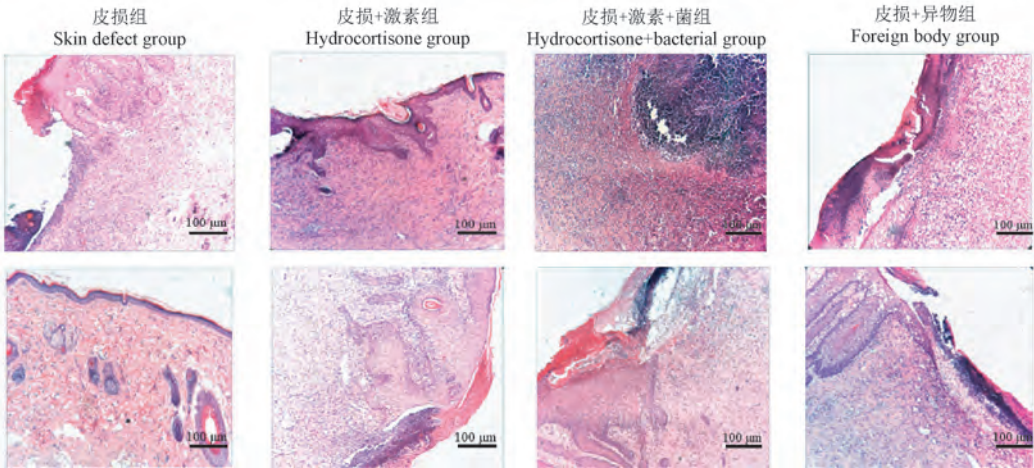


图 3 大鼠创面皮肤形态学
Figure 3 Morphology of wound skin in rats

表 2 各组大鼠免疫器官脏器指数($\bar{x} \pm s, n = 7, \%$)

Table 2 Wound healing rate of rats($\bar{x} \pm s, n = 7, \%$)		
组别 Groups	胸腺指数 Thymus index	脾指数 Spleen index
皮损组 Skin defect group	0.24 ± 0.04	0.37 ± 0.06
皮损+激素组 Hydrocortisone group	0.23 ± 0.03	0.50 ± 0.06 *
皮损+激素+菌组 Hydrocortisone+bacterial group	0.25 ± 0.02	0.52 ± 0.11 **
皮损+异物组 Foreign body group	0.21 ± 0.01	0.42 ± 0.14

表 3 各组大鼠炎症水平($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Inflammation level of rats($\bar{x} \pm s, n = 7$)		
组别 Groups	血 WBC 水平 ($\times 10^9/L$) WBC levels in blood($\times 10^9/L$)	组织 TNF- α (pg/mL) TNF- α content in tissues(pg/mL)
皮损组 Skin defect group	10.14 ± 1.35	301.70 ± 28.89
皮损+激素组 Hydrocortisone group	15.59 ± 2.92 **	303.80 ± 23.93
皮损+激素+菌组 Hydrocortisone+bacterial group	17.25 ± 2.79 **	340.13 ± 18.02 *
皮损+异物组 Foreign body group	11.54 ± 2.33	333.11 ± 37.45 *

2.6 大鼠肉芽组织中羟脯氨酸和总蛋白含量

与单纯皮损组相比,其余 3 个模型组的创面组织羟脯氨酸、总蛋白含量均有所降低,其中尤以皮损+激素+菌组更为明显,与皮损组比较均有极显著差异($P < 0.01$)(见表 4)。

表 4 各组大鼠创面组织羟脯氨酸和总蛋白含量($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 4 Content of hydroxyproline and total protein in wound tissue($\bar{x} \pm s, n = 7$)		
组别 Groups	羟脯氨酸 ($\mu g/mg$) Hyp($\mu g/mg$)	总蛋白(mg/mL) Total protein (mg/mL)
皮损组 Skin defect group	2.11 ± 0.35	5.61 ± 1.38
皮损+激素组 Hydrocortisone group	1.73 ± 0.22 *	4.46 ± 0.70 *
皮损+激素+菌组 Hydrocortisone+bacterial group	1.37 ± 0.24 **	4.02 ± 1.00 **
皮损+异物组 Foreign body group	1.47 ± 0.23 **	4.82 ± 0.61

3 讨论

临床上皮肤溃疡的发病机制复杂,通常可由外伤、感染以及糖尿病等多种原因诱发^[11],因为创面溃烂而长时间不能愈合,病程很长,往往给病人带

来很大的痛苦,因此其治疗方法的研究一直是医学研究中的热点和难点。虽然目前尚未有一种统一共识或指南治疗慢性溃疡^[12],但在基础研究中,一种合适的溃疡动物模型是首当其冲要考虑的关键问题。鉴于皮肤病理生理学的特殊性,针对皮肤溃疡模型的研究并不多,徐凝等^[5]对慢性皮肤溃疡模型进行分类归纳,认为主要分为全层皮肤切除模型和复合损伤溃疡模型,目前远不能满足实验研究的需要,而且各类模型之间缺乏横向比较,特征不清晰。考虑到糖尿病溃疡模型是复合损伤溃疡模型的一种特殊病理情况,是糖尿病动物模型的叠加效应^[5],操作稍显复杂,因此,本实验主要比较研究糖皮质激素、金黄色葡萄球菌、异物三种干预方式建立的大鼠复合损伤慢性皮肤溃疡模型。文献研究表明叠加法建立的模型与中、西医有较高的吻合度^[13],具有临床参考价值。其中,糖皮质激素能抑制蛋白质合成,造成负氮平衡,延缓肉芽组织的形成,诱发或加重感染,使伤口愈合延长及感染^[14],此外,大剂量外源性糖皮质激素造成动物的“耗竭”现象还被认为和中医的阴虚、阳虚状态想接近,因此也有学者认为此动物模型符合肾阳虚疮疡的特点;在皮肤形成创面的基础上使用不同的细菌感染,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌可以模拟伤口感染,可用于研究生物膜的形成^[15-16],且伤口被细菌感染后,皮下中性粒细胞活性被影响,动物模型表现出类似中医“阳证”疮疡特点;异物埋置能影响创伤组织的血液循环和增加物理刺激,从而延迟其愈合时间。因此在造模过程中使用这几种因素分别叠加处理,更能贴近慢性皮肤溃疡的发病机制和病理特征。

根据创面愈合率结果显示,3 种叠加干预因素组的创面愈合速度虽然比单纯皮损组缓慢,但在本研究中发现,单用糖皮质激素对延缓大鼠创面愈合时间作用不明显,这可能和大鼠皮肤的自愈性、激素的使用剂量都有关,而异物埋置或糖皮质激素叠加细菌感染更能有效地延长创面愈合时间。实验中观察到,单纯皮损组大鼠创面红润,且恢复较快,其余 3 组部分出现黄脓、干燥、颜色灰白等现象,肉芽组织的生长速度较慢,创面愈合延长,尤以皮损+激素+菌组比较明显。病理检测结果和外观观察也比较吻合。金黄色葡萄球菌是一种临床上皮肤感染最常见的致病菌,它能够造成局部化脓感染,通过利用分泌毒素、黏附素、胞外酶等物质,对正常的

组织进行摧毁并侵入而引起感染,经常用作构建大鼠的溃疡模型^[17]。实验证明在糖皮质激素的处理基础上再叠加金黄色葡萄球菌感染,能明显延长溃疡愈合时间造成溃疡难以痊愈,是一种难愈性皮肤感染模型。也有文献表明,金黄色葡萄球菌在伤口感染时具有双重作用,小剂量感染时能够加快伤口愈合,大剂量感染时则延缓愈合,因此需要确定感染菌的浓度,避免模型的重复性差^[18]。

皮肤是机体与自然界之间的第一道屏障,创伤后,皮肤组织的完整性被破坏,正常功能也被损坏,创面修复过程也随之启动。伤口的愈合包括止血、炎症、增殖和重塑 4 个阶段,任何一个阶段出现异常,都可能导致伤口愈合时间延长^[19]。血液白细胞水平可以从宏观上反映机体炎症水平,TNF- α 作为炎症介质,主要由活跃的巨噬细胞和单核细胞分泌,具有广泛的生物学活性,在皮肤创面中的含量可以反应出体内炎症的变化情况。与单纯皮损大鼠相比,其余 3 个模型组肉芽组织的白细胞水平、TNF- α 含量有所升高,尤其以皮损+激素+菌组变化明显,统计均具有显著性差异,表明激素、细菌感染、异物等施加因素可能主要通过影响创面愈合过程中的炎症阶段造成创面难愈。皮肤创面中肉芽组织的填充是愈合的重要条件,其中存在大量的成纤维细胞和巨噬细胞。在肉芽的形成过程中由随机排列的胶原蛋白纤维构成骨架,羟脯氨酸是胶原合成的重要原料,它能间接反映胶原的含量,是较好的创面评价指标。肉芽组织的生长过程伴随着蛋白质的合成,而蛋白质的合成受细胞内基因的调控,因此肉芽组织中蛋白质的含量可反映出细胞的增殖速度,进一步反映出创面的愈合速度^[20]。与单纯皮损组相比,其余 3 个模型组的创面组织羟脯氨酸、总蛋白含量均有所降低,尤以皮损+激素+菌组更为明显。此外,在实验期间还对大鼠的体重、进食量、饮水量、局部温度进行了动态观察记录,结果显示造模期间各组大鼠体重、进食量之间无统计学差异,但皮损+激素+菌组的饮水量、局部温度在造模前 7 d 呈现偏高的趋势,这也符合中医“阳证”疮疡特点。

现代医学研究的一个重要手段是建立疾病动物模型,有利于研究人类疾病产生、发展、预防^[21]。综上,本研究结果表明,由于实验动物皮肤的自愈性,在造模后期,单纯激素的干扰并不能长时间维持难愈创面;而激素+菌的干预使动物创面脓性分

泌物较多,感染现象明显,创面维持时间可达 20 d,更符合慢性难愈性溃疡防治研究,尤其是抗感染类的药物研发;异物干预由于造模是使用塑料圆环缝合的方式进行,在前期通过限制周围正常皮肤的收缩造成难愈,创面肉芽色泽暗淡,后期随着皮肤逐渐愈合可能会出现塑料圆环的破坏,新生肉芽组织增殖较快,实验中第 10 天愈合率开始超越“皮损+激素+菌”组,因此异物埋置模型可能更适合短期难愈创面有关研究以及创面早期单纯观察肉芽生长情况的实验,上述研究结果将为皮肤疾病相关研究模型的选取及临床病因病机研究提供参考依据。在后续的工作中,还可以结合行为学指标、生化指标、病理特征、药物反证等继续探讨不同的因素对慢性皮肤溃疡病证结合动物模型的影响。

参 考 文 献(References)

- [1] 王晖. 皮肤外用药物研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2017 年.
Wang H. Research methodology for topical derma medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2017.
- [2] 甘丽莉, 熊娜, 刘燕飞. 水凝胶药物支架修复皮肤创面: 临床应用可能性的挑战 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(22): 3578-3583.
Gan LL, Xiong N, Liu YF. Hydrogel as drug scaffold in skin wound repair: challenges of clinical application possibilities [J]. Chin J Tis Eng Res, 2021, 25(22): 3578-3583.
- [3] Järbrink K, Ni G, Sönnergren H, et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review [J]. Syst Rev, 2017, 6(1): 15.
- [4] Powers JG, Higham C, Broussard K, et al. Wound healing and treating wounds: chronic wound care and management [J]. J Am Acad Dermatol, 2016, 74(4): 607-625.
- [5] 徐凝, 吴闽枫, 段彦娟. 慢性皮肤溃疡动物模型的研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(5): 704-707.
Xu N, Wu MF, Duan YJ. Research progress of animal models of chronic skin ulcer [J]. J Basic Chin Med, 2020, 26(5): 704-707.
- [6] 朱桂松. 黄蜀葵花总黄酮对慢性难愈性创面修复作用及其效应机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学; 2018.
Zhu GS. Research into the repair effect and mechanism of total flavone of abelmoschus manihot on chronic and refractory wound healing [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine; 2018.
- [7] 李利青, 林也, 葛斌, 等. 湿润暴露疗法/湿润烧伤膏干预 PI3K-Akt-mTOR 信号通路促进体表慢性难愈合创面修复的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(5): 583-590.
Li LQ, Lin Y, Ge B, et al. MEBT/MEBO promoted chronic non-healing cutaneous wound by modulating the PI3K-Akt-mTOR

- signaling pathway [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2019, 39(5): 583-590.
- [8] 朱朝军, 张朝晖, 张杨, 等. 基于药疮交互作用探讨假脓长肉法对大鼠慢性皮肤溃疡肉芽物质变化的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(6): 877-881.
- Zhu CJ, Zhang ZH, Zhang Y, et al. Effects of therapy of wound pus promoting granulation tissue growth on related factors of granulation tissue in rat chronic skin ulcers based on drug-wound Interaction [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2017, 34(6): 877-881.
- [9] 席建元, 贺春辉, 左和宁, 等. 象皮生肌散对实验大鼠慢性皮肤溃疡表皮生长因子表达影响的研究 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2010, 9(4): 213-215.
- Xi JY, He CH, Zuo HN, et al. Effect of xiangpi shengji powder on the expression of epidermal growth factor on chronic skin ulcer of rat [J]. Chin J Dermatol Integr Tradit West Med, 2010, 9(4): 213-215.
- [10] 陈明岭, 耿福能, 沈咏梅, 等. 康复新液治疗慢性皮肤溃疡多中心随机对照临床研究 [J]. 中医杂志, 2019, 60(15): 1308-1311.
- Chen ML, Geng FN, Shen YM, et al. A multi-center, randomize-controlled clinical trial of kangfuxin solution for patients with chronic skin ulcer [J]. J Tradit Chin Med, 2019, 60(15): 1308-1311.
- [11] Gomes A, Teixeira C, Ferraz R, et al. Wound-healing peptides for treatment of chronic diabetic foot ulcers and other infected skin injuries [J]. Molecules, 2017, 22(10): 1743.
- [12] Lindholm C, Searle R. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency [J]. Int Wound J, 2016, 2(2): 5-15.
- [13] 吴瑞, 李秀敏, 苗明三. 基于中西医临床病症特点的慢性皮肤溃疡动物模型分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 782-785.
- Wu R, Li XM, Miao MS. Analysis of animal models of chronic skin ulcers based on characteristics of clinical symptoms of traditional Chinese and Western medicine [J]. Chin J Chin Mater Med, 2021, 46(4): 782-785.
- [14] 夏正坤. 糖皮质激素临床应用再认识 [J]. 医学研究生学报, 2018, 31(2): 113-117.
- Xia ZK. The recognition of clinical application of glucocorticoids [J]. J Med Postgrad, 2018, 31(2): 113-117.
- [15] Haisma EM, Rietveld MH, de Breij A, et al. Inflammatory and antimicrobial responses to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro wound infection model [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82800.
- [16] Serra R, Grande R, Butrico L, et al. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015, 13(5): 605-613.
- [17] Deng Z, Liu F, Li C. Therapeutic effect of ethylenediaminetetraacetic acid irrigation solution against wound infection with drug-resistant bacteria in a rat model: an animal study [J]. Bone Joint Res, 2019, 8(5): 189-198.
- [18] 李媛. 糖尿病慢性皮肤溃疡阴证模型建立与回阳生肌膏对糖尿病阴证溃疡创面不同时相的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2014.
- Li Y. Establishment of Yin syndrome model of diabetic chronic skin ulcer and effect of Huiyang shengji ointment on different phases of diabetic Yin syndrome ulcer wound [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2014.
- [19] Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, et al. Wound healing: a cellular perspective [J]. Physiol Rev, 2019, 99(1): 665-706.
- [20] 房志锐, 陈璐, 李春晓, 等. 芍药苷促进糖尿病创面愈合 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(8): 1084-1091.
- Fang ZR, Chen L, Li CX, et al. Paeoniflorin accelerates diabetic wound healing [J]. Chin Pharmacol Bull, 2019, 35(8): 1084-1091.
- [21] 刘志学, 余琛琳, 蔡丽萍, 等. 人类疾病动物模型制备效果评价软件应用评测 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(10): 28-32.
- Liu ZX, Yu CL, Cai LP, et al. Application evaluation of assessment software for replication effect of human disease model [J]. Chin J Comp Med, 2010, 20(10): 28-32.

[收稿日期] 2021-10-12

常品,张胜辉,陈童彤,等. 经宫颈机械损伤联合脂多糖灌注法构建小鼠宫腔黏连模型[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 400-407.

Chang P, Zhang SH, Chen TT, et al. Establishment of a mouse intrauterine adhesion model by transcervical mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 400-407.

Doi:10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2022. 03. 013

经宫颈机械损伤联合脂多糖灌注法构建小鼠宫腔黏连模型

常品^{1,2},张胜辉^{1,2},陈童彤^{2,3},孙钰棕^{2,4},张花¹,潘莹^{1*},刘彦礼^{2,3},林俊堂^{2,4}

(1. 新乡医学院第三附属医院,河南 新乡 453003;2. 新乡医学院干细胞与生物治疗技术研究中心,河南 新乡 453003;
3. 新乡医学院生命科学技术学院,河南 新乡 453003;4. 新乡医学院医学工程学院,河南 新乡 453003)

【摘要】 目的 通过微创的方式,利用机械损伤联合脂多糖灌注法构建符合临床损伤特征的宫腔黏连(intrauterine adhesion,IUA)动物模型,为深入研究 IUA 的发病机制、病理变化及探索临床治疗方案提供支持。**方法** 取雌性 ICR 小鼠 20 只随机分为 2 组($n = 10$),间苯三酚松弛宫颈后,造模组动物经宫颈给予宫腔内机械损伤+脂多糖(LPS)灌注(0.5 mg/kg),假手术组动物仅接受等体积生理盐水灌注。分别于术后 7、14、21 d 收集子宫标本,常规 HE 和 Masson 染色,检测子宫内膜形态及纤维化情况;免疫荧光检测子宫内膜中巨噬细胞(F4/80)分布,qPCR 及 Western Blot 检测造模 14 d 小鼠子宫内膜中炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-10 和 IL-6)及子宫内膜容受性相关标志物(Integrin β 3 和 LIF)的表达变化。随后,取 20 只小鼠随机分为经宫颈机械损伤+脂多糖灌注组($n = 10$)为造模组和假手术组($n = 10$),造模 2 周后合笼,记录妊娠母鼠数量;妊娠约 18 d 处死母鼠,记录胚胎数量。**结果** 机械损伤+脂多糖灌注后小鼠子宫中炎症反应和纤维化程度显著增加。其中模型组小鼠子宫内膜厚度较假手术组显著降低,子宫内膜细胞坏死明显,腺体缺失,腔上皮和腺上皮细胞结构不完整,组织纤维化严重。随后,检测发现巨噬细胞标志物 F4/80 在模型组小鼠子宫内膜中表达显著上升($P < 0.05$),并且模型组小鼠子宫内膜中促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 、和 IL-6 表达显著升高($P < 0.05$),而抑炎因子 IL-4、IL-10 表达明显下降($P < 0.05$)。进一步研究发现子宫内膜容受性标志物 LIF 和 Integrin β 3 表达量显著下降($P < 0.05$),且生育实验结果发现妊娠母鼠及胎鼠数量均显著下降($P < 0.05$)。**结论** 本研究通过微创的方式经宫颈机械损伤+脂多糖灌注,成功建立小鼠 IUA 模型构建方法,符合临床 IUA 损伤特征,可为后续针对 IUA 发病机制及治疗方法研究提供稳定的动物模型。

【关键词】 宫腔粘连;机械损伤;脂多糖;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0400-08

Establishment of a mouse intrauterine adhesion model by transcervical mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion

CHANG Pin^{1,2}, ZHANG Shenghui^{1,2}, CHEN Tongtong^{2,3}, SUN Yuliang^{2,4}, ZHANG Hua¹, PAN Ying^{1*},
LIU Yanli^{2,3}, LIN Juntang^{2,4}

(1. the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China. 2. Stem Cell and Biotherapy Technology Research Center, Xinxiang 453003. 3. College of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003. 4. College of Medical Engineering, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003)

Corresponding author: PAN Ying. E-mail: panying@xxmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a stable animal model of intrauterine adhesion (IUA) using a minimally invasive method that recapitulates the clinicopathologic characteristics of IUA. **Methods** Overall, 20 female ICR mice

【基金项目】新乡市科技攻关项目(GG2019045)。
Funded by Science and Technology Project of Xinxiang City(GG2019045).
【作者简介】常品(1990—),女,在读硕士研究生,研究方向:宫腔粘连。Email:pin282669919@163.com
【通信作者】潘莹(1970—),女,博士,研究方向:妇产科学。Email:panying@xxmu.edu.cn

were randomly divided into two groups ($n = 10$). After the cervix was relaxed with phloroglucinol, the uterine horn of mice in the model group was subjected to mechanical injury and lipopolysaccharide perfusion (0.5 mg/kg) through the cervix to induce endometrial injury, while mice in the sham operation group only received the same volume of normal saline perfusion. Uteri of the mice were collected at 7, 14 and 21 days after the procedure. HE and Masson staining were used to assess uterine morphology and fibrosis. Immunofluorescence was performed to evaluate macrophage infiltration into the endometrium. qPCR and Western Blot were used to detect the expression of inflammatory factors (IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 and IL-6) and endometrial receptivity-related markers (integrin β 3 and LIF) in mice at 14 days after modeling. Furthermore, mouse fertility was evaluated in model and sham operation groups. **Results** Compared with the sham operation group, endometria in the model group were significantly thinner and exhibited severe necrosis, glandular loss, and incomplete luminal epithelial and glandular epithelial cell structures. Subsequently, severe tissue fibrosis was observed in endometria in the model group. Additionally, increased macrophage infiltration and upregulated expression of proinflammatory factors demonstrated an activated inflammatory response in endometria of the model group. Moreover, endometrial receptivity was significantly decreased after mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion. Finally, significant decreases in pregnancy and the number of fetuses were observed in the model group. **Conclusions** This study demonstrated successful establishment of an IUA mouse model through a minimally invasive transcervical mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion, which was consistent with the clinical characteristics of severe IUA. This model might support in-depth study of IUA pathogenesis and promote the development of IUA therapies.

【Keywords】 intrauterine adhesion; mechanical injury; lipopolysaccharide; animal model

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

子宫内膜作为具有高度再生能力的组织,是由上皮细胞(包括管腔上皮细胞和腺上皮细胞)和支持间质细胞构成,其在女性育龄期内经历约 400 多个周期性的再生与脱落^[1]。子宫内膜被划分为功能层和基底层,内膜表面约 2/3 厚度为致密层和海绵层统称功能层,受卵巢性激素影响发生周期性增殖和脱落;而基底层为靠近子宫肌层的约 1/3 厚度内膜,不受卵巢性激素影响,无周期性变化^[2]。宫腔粘连(intrauterine adhesion, IUA)是指子宫内膜间质大部分被纤维组织取代,功能层被单层上皮细胞取代,由于单层柱状上皮细胞对雌激素刺激无反应,子宫内膜无法正常再生,形成纤维性瘢痕组织^[3]。已知 IUA 的发生主要由不完全流产后的扩张刮除术、产后出血及选择性流产引起,其他少见诱发因素包括子宫肌瘤切除术、诊断刮除术、剖宫产术、生殖道结核和子宫填塞等^[4]。随着宫腔镜和妇科手术的普及,IUA 的发生率不断上升,患者主要表现为月经紊乱,如闭经、痛经和月经过少,上述变化均显著影响胚胎着床,导致患者出现反复流产或不孕等生育功能障碍^[5]。并且 IUA 患者常规宫腔镜手术后所引起的妊娠并发症如:早产、胎盘植入及产后出血等,严重影响患者的生理和心理健康^[6]。

因此,建立符合临床损伤特征的 IUA 动物模型,可为深入研究 IUA 的发病机制和病理变化,探

索临床治疗方法提供重要工具和保障。前期研究大多通过动物开腹后,利用机械、电凝及酒精等对模型动物子宫内膜进行损伤,引发模型动物产生类似临床 IUA 症状^[7-9]。但通过开腹方式构建 IUA 模型,必须经子宫外侧浆膜层及肌层进入,会造成子宫局部全层的损伤,与临床常见原因造成 IUA 的损伤特点存在差异。因此,本构建方法采用小鼠作为模型动物,通过微创的方式保留子宫全层结构,经宫颈机械损伤+脂多糖灌注法构建宫腔粘连模型,为后续机制及治疗方法研究提供稳定的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究采用 40 只 10 ~ 12 周龄 SPF 级性成熟未交配的 ICR 雌鼠,体重 28 ~ 32 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。所有实验动物均饲养于新乡医学院 SPF 级实验动物中心【SYXK(豫)2020-0011】,温度 20 ~ 25℃,相对湿度 35% ~ 65%,12 h/12 h 明暗交替。研究中所涉及动物实验操作均获得新乡医学院动物保护委员会批准(审批号:XYLL-20210215)。每日 8:00 行阴道涂片,显微镜观察阴道上皮细胞的形态,确定小鼠动情周期。选取正常发情周期为 5 d 的小鼠进行后续 IUA 模型构建,所有后续操作均在

发情期进行。

1.1.2 主要试剂与仪器

脂多糖(SIGMA,美国)、HE 染色试剂盒(碧云天,中国)、Masson 染色试剂盒(南京凯基生物,中国)、兔抗鼠 F4/80 单克隆抗体(Abcam,CI:A3-1,美国)、兔抗鼠 Integrin $\beta 3$ 多克隆抗体(CST,4702,美国)、兔抗鼠 LIF 多克隆抗体(Proteintech,26757-I-AP,中国)、兔抗鼠 IL-1 β 单克隆抗体(CST,D3U3E,美国)、兔抗鼠 IL-6 单克隆抗体(Proteintech,66146-1-Ig,中国)、兔抗鼠 GAPDH 单克隆抗体(Abcam,D16H11,美国),所需引物由金唯智生物科技有限公司合成。荧光显微镜(SDPTOP,中国),qPCR 仪(伯乐 Bio-Rad CFX96,美国),Western Blot 免疫印迹电泳仪(伯乐 BIO-RAD Powerpac Universal,美国)。

1.2 方法

1.2.1 IUA 模型构建

本模型构建方法以机械搔刮引起的物理损伤,以及脂多糖诱导的急性炎症反应为基础^[10],以灌胃针损伤联合脂多糖灌注,模拟临床 IUA 的发病原因,构建小鼠 IUA 模型。所有模型构建操作均由同一实验人员进行,具体步骤:使用呼吸麻醉机,2%~3%浓度异氟烷麻醉小鼠,1.5%~2%浓度异氟烷维持麻醉效果,操作过程中小鼠保持自然呼吸与心跳;麻醉成功后,4%间苯三酚(0.02 mg/g)肌肉注射松弛宫颈肌肉,2 min 后使用连接注射器的小鼠灌胃针从小鼠阴道进入,探查宫颈松弛后进入小鼠右侧子宫角约 1 cm。造模组实验动物分别从 4 个不同方向(前、后、左、右)反复搔刮 30 次小鼠子宫内膜,然后灌注 0.5 mg/kg 的脂多糖溶液(体积为 50 μ L);假手术组实验动物接受等体积(50 μ L)生理盐水灌注。实验动物分别于术后 7、14、21 d 在全处死取材,取右侧受损子宫组织,部分组织经多聚甲醛固定后,常规石蜡包埋,取损伤区中央部位组织连续切片(4 μ m),用于形态观察及组化实验。

1.2.2 HE 染色

石蜡切片常规脱蜡,将载玻片浸入二甲苯中(3 min,2 次),苏木素染核 5 min,伊红染细胞质 3 min,随后分别在不同浓度的乙醇中脱水(100%,100%,95%,95%,75%和 0%),中性树胶封片。使用正置生物显微镜观察组织形态并拍照,随后利用显微镜的测微标尺测量子宫内膜厚度,每组随机选取 5 个切片,每个切片随机选取 5 个视野进行测量,计算子宫内膜厚度,求取平均值;同时,在显微镜下统计视

野中腺体数量,求取平均值。

1.2.3 Masson 染色

石蜡切片常规脱蜡,苏木精染核 5 min,水洗,丽春红酸性复红液染 10 min,1%磷钼酸水溶液分化 2 min,苯胺蓝液染 2 min。弱酸工作液冲洗 1 min,无水乙醇脱水,中性树胶封片。随后,随机采集 Masson 染色切片中 5 个视野,用 IPP(Image-Pro Plus 6.0 Software)软件量化每个视野下子宫内膜纤维化面积比例,即内膜间质纤维化面积占子宫内膜面积的百分比。

1.2.4 免疫荧光

石蜡切片常规脱蜡、酒精梯度孵育复水,抗原修复;使用封闭缓冲液封闭标本 60 min,4℃一抗(F4/80,1:200)孵育过夜;使用荧光二抗,室温下孵育 1 h 后,ddH₂O 冲洗 3 次;用 DAPI 复染 5 min 后,荧光显微镜观察并拍照。进一步,随机采集 F4/80 免疫荧光切片中各 5 个视野,用 IPP 软件对阳性染色区域的累计光密度进行量化,比较组间平均光密度差异。

1.2.5 qPCR

收集小鼠子宫样本,按 RNA 的提取试剂(RNAiso plus)说明提取样本总 RNA,所提取的样品 RNA A260/A280 > 1.8。取 500 ng 定量后总 RNA 样品,利用反转录试剂盒(All-In-One 5X RT MasterMix)合成 cDNA。采用 All-In-One 5X RT MasterMix Kit 推荐的 20 μ L 体系,引物(10 pmol/L)用量为 1 μ L,相关引物见表 1^[11]。实时 PCR 反应在 CFX Connect(Bio-Rad)上完成,反应条件为:94℃预变性 30 s,40 个循环(94℃变性 15 s,60℃退火 45 s,72℃延伸 45 s),72℃后延伸 5 min。数据处理使用较常见的 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法,以小鼠 β -actin 为内参基因,假设对照组 mRNA 表达量为 1,样本中相关 mRNA 表达量以倍数变化表示。

1.2.6 Western Blot

收集造模 14 d 小鼠子宫组织,使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度;取 25 μ g 总蛋白每孔在 10%~12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,300 mA 恒流转模 1 h,5% BSA 室温封闭 2 h,4℃一抗(GAPDH、Integrin $\beta 3$ 、LIF、IL-1 β 和 IL-6)分别孵育过夜,室温二抗孵育 2 h;ECL 发光后凝胶成像仪采集图片。Image J 软件分析目的条带灰度值,以 GAPDH 为内参标准分析目的蛋白的表达水平。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences used in PCR

引物名称 Primer name	寡核苷酸序列(5'-3') Oligonucleotide sequence(5'-3')	大小(bp) Size(bp)
白细胞介素-1β IL-1β	F:TCATGGGATGATGATGATAACCTGCT R:CCCATACTTTAGGAAGACACGGATT	502
肿瘤坏死因子-α TNF-α	F:GCGAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC R:ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCCG	307
白细胞介素-4 IL-4	F:CGAAGAACACCACAGAGACTGAGCT R:GACTCATTCATGGTGCAGCTTATCG	180
白细胞介素-10 IL-10	F:ACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA R:CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAA	237
β-肌动蛋白 β-actin	F:TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC R:TAAACGCGAGCTCAGTAACAGTCCG	348

1. 2. 7 生育力检测

取 20 只实验小鼠随机分为造模组和假手术组 ($n = 10$)。造模结束 2 周后与 8 周龄已确定过生育能力的成年雄鼠合笼 30 d, 实验周期从合笼第 1 天开始, 持续观察至 60 d。以合笼后阴道涂片见精子为妊娠第 1 天, 同时观察雌鼠体重及腹形变化, 于妊娠约第 18 天开腹探查受试雌鼠双侧子宫的受孕情况, 统计每组孕鼠及胚胎数量。

1. 3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 数据用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间均值比较采用独立样本 t 检验; 多组间均值比较采用单因素 ANOVA 中的 Dunnett 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

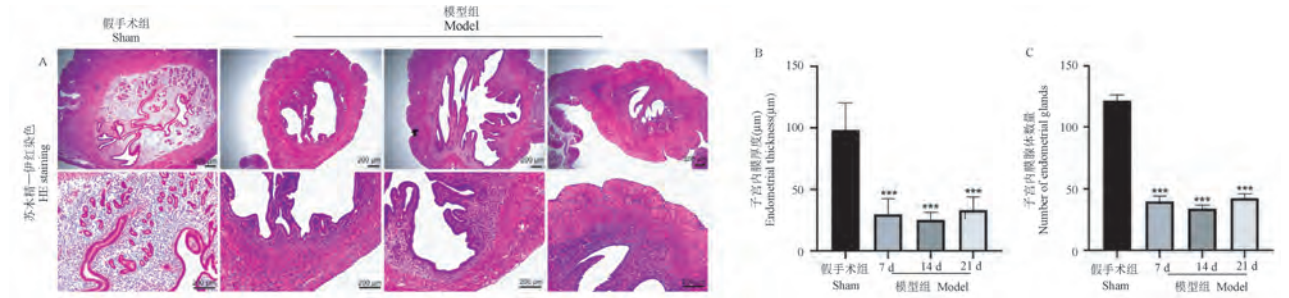
2. 1 机械损伤联合脂多糖灌注显著损坏小鼠子宫内膜形态

HE 染色结果显示子宫内膜的形态明显改变,

如图 1A, 1B 和 1C 所示: 假手术组小鼠子宫内膜结构整齐, 上皮细胞结构完整, 间质中腺体丰富。而造模组小鼠在损伤 7 d 后子宫内膜变薄, 腺体分布稀疏, 且腺体数量显著减少 ($P < 0.05$), 同时间质细胞增生、水肿, 并存在明显炎性细胞浸润。而损伤 14 d 的造模组小鼠子宫内膜明显变薄 ($P < 0.05$), 腺体数显著减少 ($P < 0.05$), 腔上皮和腺上皮细胞结构不完整, 纤维细胞和成纤维细胞的数量增加, 同时炎症细胞浸润增强, 宫腔被异常增生组织分割为多个腔体。进一步, 损伤 21 d 的造模组小鼠子宫内膜腺体数显著减少 ($P < 0.05$), 腺腔内有较多蛋白性分泌物, 腺腔扩张, 多灶微脓肿形成, 同时炎症反应严重, 粘膜层及子宫壁肌层有大量炎性细胞浸润, 部分子宫内膜腺体凝固性坏死, 可见宫腔粘连的形成。

2. 2 机械损伤联合脂多糖灌注显著增加小鼠子宫内膜纤维化程度

Masson 染色用来检测 IUA 模型中受损子宫内膜的纤维化程度, 结果如图 2A 所示: 假手术组子宫



注: A: HE 染色后显微镜观察显微形态; B、C: 定量子宫内膜厚度及子宫内膜腺体数; 与假手术组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 1 机械损伤联合脂多糖灌注对小鼠子宫形态学改变的影响

Note. A. Micromorphology was observed by microscopy after HE staining. B, C. Quantification of the endometrial thickness and number of glands in the endometrium. Compared with sham group, *** $P < 0.001$.

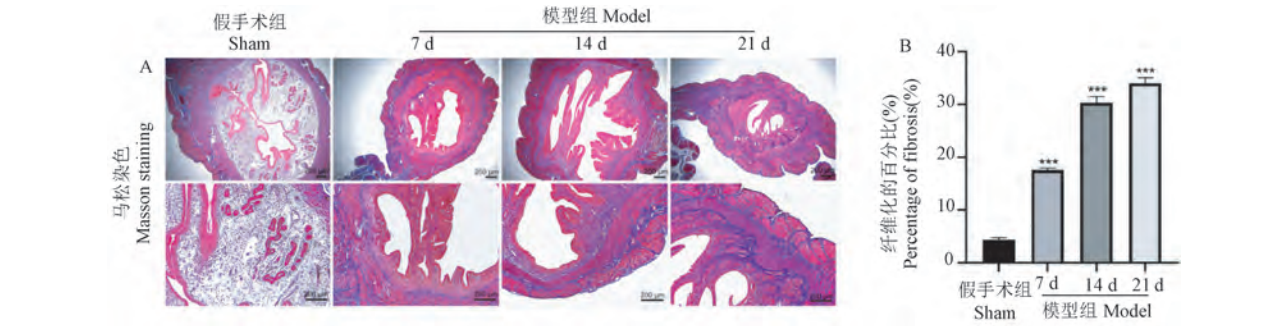
Figure 1 Morphological changes in the uterus of mice induced by mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion

内膜完整,粘膜及粘膜下层,血管和平滑肌被染成深红色,基质胶原纤维呈蓝色,梭状排列,小鼠子宫组织纤维化程度较低。而造模组小鼠子宫纤维化程度随损伤时间延长而显著增加(图 2B, $P < 0.05$),间质纤维组织增加,胶原蛋白聚集,且明显可见因间质细胞过度修复而发生的宫腔粘连。

2.3 机械损伤联合脂多糖灌注显著引起小鼠子宫内膜炎症反应

F4/80 作为经典的巨噬细胞特异性表面抗原,在组织发育、创面愈合、血管生成等方面发挥重要作用,且与组织炎症反应密切相关^[12]。免疫荧光结果如图 3 所示:与假手术组相比,造模组小鼠子

宫内膜中 F4/80 阳性表达率显著增加 ($P < 0.05$);随后相关炎症因子在基因(图 4A)及蛋白(图 4B,4C)水平上的变化结果也肯定了模型组小鼠子宫内膜中炎症反应显著增加。其中,造模 14 d 后模型组小鼠子宫内膜组织中促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 的基因表达显著升高,而抑炎因子 IL-4 和 IL-10 基因表达则明显下降 ($P < 0.05$),与基因表达结果一致,造模组小鼠子宫内膜中 IL-1 β 和 IL-6 蛋白表达水平也显著上调 ($P < 0.05$)。上述结果表明机械损伤联合脂多糖灌注后所引发的细胞损伤可显著募集炎症细胞,大量释放炎症因子,加剧炎症反应。

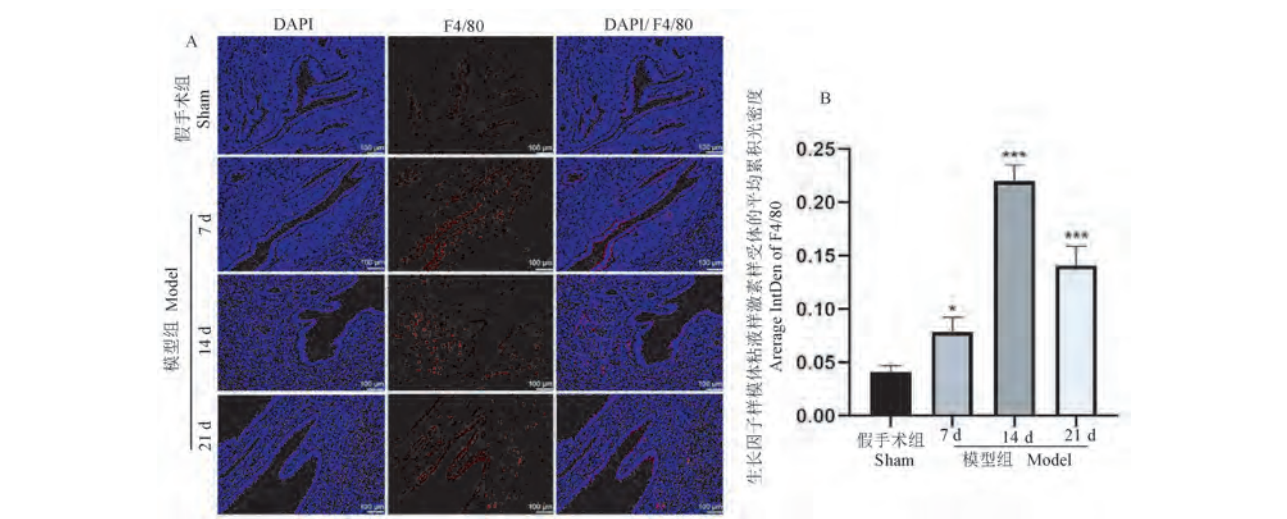


注:A:Masson 染色评估纤维化;B:用 IPP 软件定量子宫纤维化百分率(蓝色染色);与假手术组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 2 机械损伤联合脂多糖灌注对小鼠子宫组织纤维化的影响

Note. A. Fibrosis was evaluated by Masson staining. B. The percentage of fibrosis (blue staining) in the uterus was quantified by IPP software. Compared with sham group, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Effect of mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion on mouse uterine tissue fibrosis

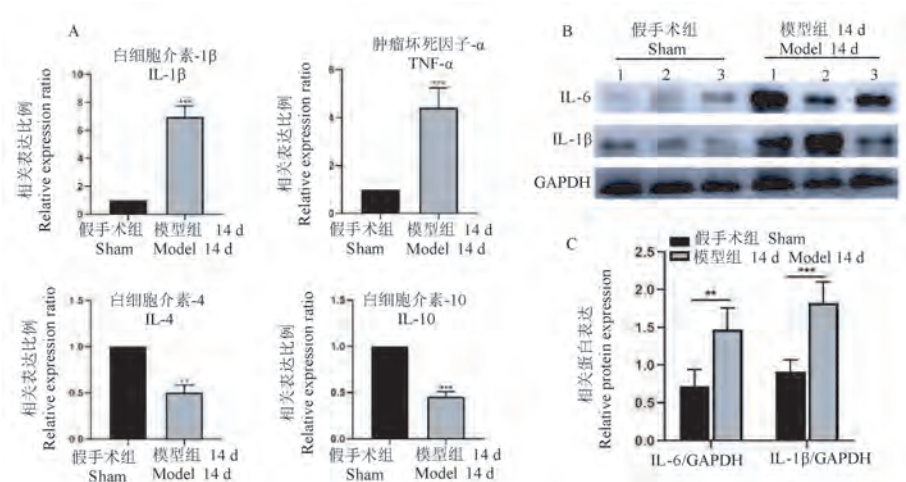


注:A:采用常规免疫荧光法检测机械损伤联合脂多糖灌注小鼠子宫内 F4/80 的表达;B:用 IPP 软件定量子宫内 F4/80 的表达;与假手术组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ 。

图 3 机械损伤联合脂多糖灌注对小鼠子宫巨噬细胞的激活作用

Note. A. Conventional immunofluorescence was performed to detect the expression of F4/80 in the uteri of mice induced by mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion. B. Expression of F4/80 in the uterus was quantified by IPP software. Compared with sham group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Activation of macrophages in the uterus of mice induced by mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion



注:A:qPCR 检测机械损伤联合脂多糖灌注小鼠子宫内 IL-1β、TNF-α、IL-4 和 IL-10 的表达;B:Western Blot 检测机械损伤联合脂多糖灌注小鼠子宫内 IL-6、IL-1β 的表达;C:用 Image J 软件定量 IL-6、IL-1β 在子宫中的表达;与假手术组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 机械损伤联合脂多糖灌注对小鼠子宫中炎症相关因子的表达的影响

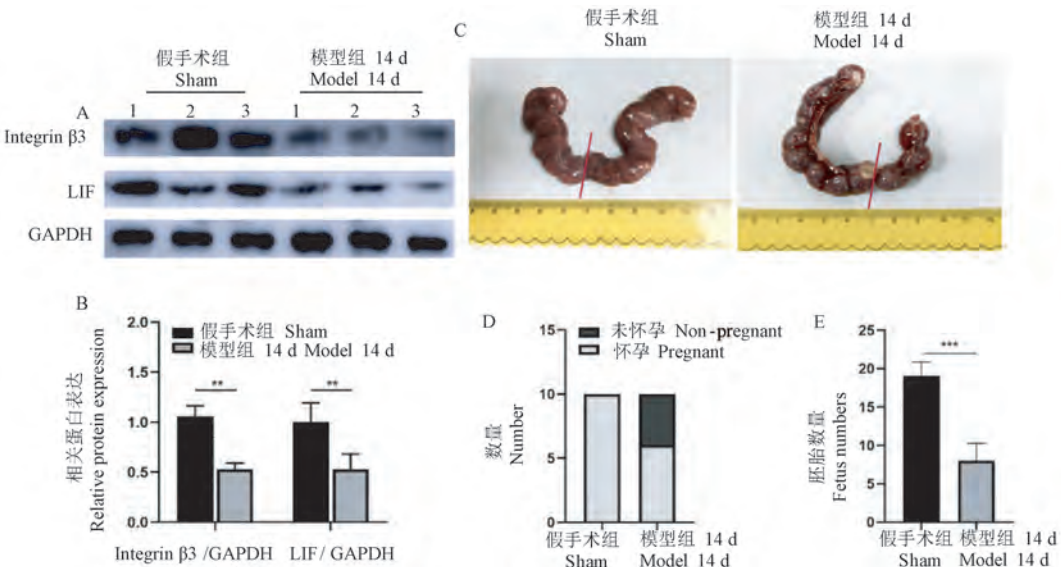
Note. A. qPCR was used to detect the expression of IL-1β、TNF-α、IL-4 and IL-10 in the uterus of mice induced by mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion. B. Western Blot was performed to detect the expression of IL-6 and IL-1β in the uterus of mice induced by mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion. C. Expression of IL-6 and IL-1β in the uterus was quantified by Image J software. Compared with sham group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4 Expression of inflammatory factors in the uterus of mice induced by mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion

2.4 机械损伤联合脂多糖灌注显著降低小鼠生育能力

蛋白水平检测发现造模组小鼠子宫组织中与

子宫内膜容受性相关蛋白(Integrin β3 和 LIF)的表达较假手术组显著降低(图 5A,5B)。随后的生育力检测结果(图 5C,5D)显示,与假手术组相比,造



注:A:Western Blot 检测机械损伤联合脂多糖灌注小鼠子宫内 Integrin β3、LIF 的表达;B:用 Image J 软件定量 IL-6、IL-1β 在子宫中的表达;C:假手术组与模型组小鼠生育效果;D,E:记录并分析妊娠小鼠及胚胎数量;与假手术组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 机械损伤联合脂多糖灌注对小鼠生育能力的影响

Note. A. Western Blot was performed to detect the expression of Integrin β3 and LIF in the uterus of mice induced by mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion. B. Expression of Integrin β3 and LIF in the uterus was quantified by Image J software. C. The fertility results of the mice in sham operation group and model group. D, E. The number of pregnant mice and embryos were recorded and analyzed. Compared with sham group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Effect of mechanical injury combined with lipopolysaccharide perfusion on the fertility of mice

模组小鼠妊娠率及子宫内胎鼠数量均显著减少($P < 0.05$),并且部分造模组小鼠子宫局部损伤过度,导致宫腔封闭,妊娠失败;而假手术组小鼠子宫两侧均有胚胎植入,胚胎排列紧凑,植入数量较多。该结果表明机械损伤联合脂多糖灌注后严重影响母鼠生育能力,使妊娠母鼠及胎鼠数量均显著下降。

3 讨论

IUA 所引起盆腔疼痛、月经异常、反复妊娠损失和不孕,对患者的生活造成严重影响^[12]。因此,为深入研究 IUA 的发病机制及临床预防和治疗措施,各种制备 IUA 动物模型的方法相继被建立。早在 1973 年,Shenker 等^[13]将 10%福尔马林溶液注入子宫腔,引起子宫内膜损伤,纤维组织增生和子宫腔闭塞。随后,Polishuk^[14]以家兔为模型动物,用器械刮取子宫内膜,模拟临床常见的不完全流产后的刮宫术,可以观察到子宫内膜在不使用雌激素和孕激素的情况下在 3 d 内完全修复,该研究表明对于单纯机械损伤的非妊娠动物,很难建立理想的 IUA 动物模型。Xu 等^[15]通过对 21 只新西兰兔进行子宫内膜电凝损伤,虽然在造模后 7 ~ 14 d 内能有效引起子宫内膜的破坏,但造模后 28 d 的组织病理学检查显示子宫内膜已部分再生并且纤维化程度不明显。尽管上述物理或化学方法可对子宫内膜造成不同程度的损害,但由于子宫内膜较强的再生能力,单纯损伤后难以建立符合临床特征的 IUA 模型动物模型^[16]。

而临床上 IUA 的发生通常是由于创伤加感染联合导致的,任何破坏子宫内膜基底层的创伤均可能导致 IUA 的发生,包括流产、刮宫和宫腔镜手术等^[17]。已知子宫内膜基底层受损后,若子宫内膜不能有效再生,宫腔将出现瘢痕粘连等;并且研究表明炎症反应在子宫内膜损伤后的异常修复中扮演着重要角色,促进 IUA 的发生发展^[18]。而巨噬细胞作为免疫应答的第一道防线,可通过识别清除病原体、杀伤靶细胞、抗原提呈、免疫调节等功能维持机体的稳态,但其过度的聚集和活化会导致机体的免疫紊乱,引发组织损伤^[19]。目前,脂多糖常被用于构建诸如肺炎,败血症和子宫内膜炎等疾病的动物实验模型,其诱导的巨噬细胞等释放的促炎因子造成的级联反应可引起组织细胞的损伤^[20]。本研究表明造模组动物子宫内膜损伤后巨噬细胞在子宫内膜损伤中大量聚集及活化。并且,脂多糖与

可通过与 Toll 样受体 4 结合后激活细胞旁分泌途径,促进 IL-1 及 IL-6 等促炎因子的分泌^[21-22]。此外,前期报道中 IUA 造模方法大多需要开腹手术,造成子宫内膜全层损伤,而该造模方法与多数引起 IUA 的临床发病原因具有明显差异;并且造模过程中增加实验人员操作难度的同时,开腹手术及子宫内膜全程损伤所引起的炎症反应对后续实验结果的可靠性存在不确定因素。

因此,基于前期研究结果和经验,本研究通过微创的方式经药物(间苯三酚)松弛宫颈后,利用机械损伤联合脂多糖灌注来模拟临床上 IUA 的发生。后续组织水平实验结果显示:造模组小鼠子宫内膜厚度明显变薄,腺体数量显著减少;且纤维化程度随着取材时间的延长而显著加重,同时宫腔被间质增生组织分隔为多个腔隙;进一步检测结果表明造模组小鼠子宫内膜组织中巨噬细胞数量显著增加,而且在损伤 14 d 后子宫内膜中促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 表达水平显著上调,而抑炎因子 IL-4 和 IL-10 表达水平明显下调,表明机械损伤联合脂多糖灌注后造模组小鼠子宫内膜出现明显的炎症反应。此外,回顾性研究显示子宫相关手术其与不孕之间存在因果关系^[23-25]。而 Integrin β 3 及其受体和 LIF 表达水平是生殖功能的重要指标,其与子宫内膜容受性低引起的反复不孕及妊娠损伤密切相关^[26-27]。因此,本模型除观察统计子宫内膜形态和腺体的数量外,对造模组小鼠的子宫内膜容受性及生育力进行评估,作为动物模型构建成功的重要参数,进一步生育力检测结果也显示机械损伤联合脂多糖灌注后严重影响母鼠生育能力,使妊娠母鼠及胎鼠数量均显著下降。

综上,本研究通过微创的方式,经机械损伤联合脂多糖灌注成功诱导 IUA 的发生发展,随后的体外及体内实验结果证明本方法所构建模型特征符合临床上 IUA 病理特征,为深入研究 IUA 的发病机制、病理变化以及探索临床治疗方案提供支持。

参 考 文 献 (References)

- [1] Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, et al. Endocrine regulation of menstruation [J]. *Endocr Rev*, 2006, 27(1): 17-46.
- [2] Lebovitz O, Orvieto R. Treating patients with "thin" endometrium-an ongoing challenge [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2014, 30(6): 409-414.
- [3] Evans J, Salamonsen LA, Winship A, et al. Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(11): 654-667.

- [4] Schenker JG. Etiology of and therapeutic approach to synechia uteri [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1996, 65(1): 109–113.
- [5] Yu D, Wong YM, Cheong Y, et al. Asherman syndrome-one century later [J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(4): 759–779.
- [6] Hanstede MM, van der Meij E, Goedemans L, et al. Results of centralized asherman surgery 2003–2013 [J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(6): 1561–1568.
- [7] Zhang SS, Xu XX, Xiang WW, et al. Using 17 β -estradiol heparin-poloxamer thermosensitive hydrogel to enhance the endometrial regeneration and functional recovery of intrauterine adhesions in a rat model [J]. *FASEB J*, 2020, 34(1): 446–457.
- [8] Liu F, Zhu ZJ, Li P, et al. Creation of a female rabbit model for intrauterine adhesions using mechanical and infectious injury [J]. *J Surg Res*, 2013, 183(1): 296–303.
- [9] Xiao L, Song Y, Huang W, et al. Expression of SOX2, NANOG and OCT4 in a mouse model of lipopolysaccharide-induced acute uterine injury and intrauterine adhesions [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017, 15(1): 14.
- [10] Lin J, Li J, Shu M, et al. The rCC16 protein protects against lps-induced cell apoptosis and inflammatory responses in human lung pneumocytes [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1060.
- [11] Ulett GC, Ketheesan N, Hirst RG. Cytokine gene expression in innately susceptible BALB/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent burkholderia pseudomallei [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(4): 2034–2042.
- [12] Hamidzadeh K, Christensen SM, Dalby E, et al. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 567–592.
- [13] Schenker JG, Polishuk WZ. Regeneration of rabbit endometrium following intrauterine instillation of chemical agents [J]. *Gynecol Invest*, 1973, 4(1): 1–13.
- [14] Polishuk WZ. Endometrial regeneration and adhesion formation [J]. *S Afr Med J*, 1975, 49(12): 440–442.
- [15] Xu XX, Cao LB, Wang Z, et al. Creation of a rabbit model for intrauterine adhesions using electrothermal injury [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2018, 19(5): 383–389.
- [16] 祖珍玉, 罗敏, 申东翔, 等. 四种新西兰大白兔宫腔粘连模型的建立与评价及其对子宫内膜容受性的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(9): 30–38.
- Zu ZY, Luo M, Shen DX, et al. Establishment and evaluation of four models of intrauterine adhesion and its effects on endometrial receptivity in New Zealand white rabbits [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(9): 30–38.
- [17] Deans R, Abbott J. Review of intrauterine adhesions [J]. *J Minim Invasive Gynecol*, 2010, 17(5): 555–569.
- [18] Khan Z, Goldberg JM. Hysteroscopic management of Asherman's syndrome [J]. *J Minim Invasive Gynecol*, 2018, 25(2): 218–228.
- [19] Chen YQ, Liu LX, Luo YN, et al. Prevalence and impact of chronic endometritis in patients with intrauterine adhesions: a prospective cohort study [J]. *J Minim Invasive Gynecol*, 2017, 24(1): 74–79.
- [20] Tang PM, Zhang YY, Xiao J, et al. Neural transcription factor pou4f1 promotes renal fibrosis via macrophage-myofibroblast transition [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(34): 20741–20752.
- [21] Wang Q, Zhang HW, Mei HX, et al. MCTR1 enhances the resolution of lipopolysaccharide-induced lung injury through STAT6-mediated resident M2 alveolar macrophage polarization in mice [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(17): 9646–9657.
- [22] Sheldon IM, Roberts MH. Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium [J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12906.
- [23] Mu E, Ding R, An X, et al. Heparin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting nitric oxide synthase and TGF- β /Smad signaling pathway [J]. *Thromb Res*, 2012, 129(4): 479–485.
- [24] Schenker JG, Margalioth EJ. Intrauterine adhesions: an updated appraisal [J]. *Fertil Steril*, 1982, 37(5): 593–610.
- [25] Cenksoy PO, Ficicioglu C, Yesiladali M, et al. The diagnosis and management of Asherman's syndrome developed after cesarean section and reproductive outcome [J]. *Case Rep Obstet Gynecol*, 2013, 2013: 450658.
- [26] Dorostghoal M, Ghaffari HO, Shahbazian N, et al. Endometrial expression of β 3 integrin, calcitonin and plexin-B1 in the window of implantation in women with unexplained infertility [J]. *Int J Reprod Biomed*, 2017, 15(1): 33–40.
- [27] Hajipour H, Sambrani R, Ghorbani M, et al. Sildenafil citrate-loaded targeted nanostructured lipid carrier enhances receptivity potential of endometrial cells via LIF and VEGF upregulation [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2021, 394(11): 2323–2331.

孙路,付函君,刘云鹏,等. 转基因人源化 ACE2 裸小鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 408-415.
Sun L, Fu HJ, Liu YP, et al. Establishment of transgenic humanized ACE2 nude mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 408-415.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.014

转基因人源化 ACE2 裸小鼠模型的建立

孙路,付函君,刘云鹏,武婧,林凯丽,石桂英,王敬竹,孙井江,高虹*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021)

【摘要】 目的 建立 BALB/c-Nude 裸小鼠为背景的人源化 ACE2 (hACE2) 转基因裸小鼠动物模型。**方法** 利用 hACE2 转基因小鼠与雄性 BALB/c-Nude 裸小鼠杂交获得 F1 代,将 F1 代 hACE2 小鼠与 BALB/c-Nude 裸小鼠回交获得 F2 代,再将 F2 代 hACE2 小鼠互交获得 F3 代 hACE2 转基因裸小鼠。对 F3 代中 hACE2 转基因裸小鼠的生长发育、生理指标及免疫指标与 C57BL/6J 野生型小鼠、hACE2 小鼠和 BALB/c-Nude 裸小鼠对比分析。**结果** (1)hACE2 转基因裸小鼠生长发育指标与 C57BL/6J 野生型小鼠、hACE2 小鼠和 BALB/c-Nude 裸小鼠无明显差异。(2)hACE2 转基因裸小鼠生理指标中,建立的 hACE2 转基因裸小鼠与 BALB/c-Nude 裸小鼠相似,病理解剖观察发现,小鼠体内均无胸腺。脏器系数结果与 BALB/c-Nude 裸小鼠比较,脾系数和肝系数出现显著性差异($P < 0.05$)。血常规检测指标与 C57BL/6J 野生型小鼠、hACE2 小鼠比较,中性粒细胞百分比(NEU)、淋巴细胞百分比(LYM)和单核细胞百分比(MONO)均出现显著性差异($P < 0.01$)。(3)hACE2 转基因裸小鼠免疫指标中,与 C57BL/6J 野生型小鼠和 hACE2 小鼠比较,CD45+CD3+、CD45+CD3+CD4+、CD45+CD11B+和 CD45+NK+均出现显著差异($P < 0.01$),与 BALB/c-Nude 裸小鼠无明显差异。**结论** 成功建立了 BALB/c-Nude 为背景的 hACE2 转基因免疫缺陷裸小鼠动物模型。

【关键词】 宿主血管紧张素转换酶 2;转基因;人源化;裸小鼠
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0408-08

Establishment of transgenic humanized ACE2 nude mouse model

SUN Lu, FU Hanjun, LIU Yunpeng, WU Jing, LIN Kaili, SHI Guiying, WANG Jingzhu, SUN Jingjiang, GAO Hong*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Beijing 100021, China)

Corresponding author: GAO Hong. E-mail: gaohongdws@aliyun.com

【Abstract】 Objective To establish a transgenic humanized ACE2 nude mouse model against a BALB/c-nude mouse background. **Methods** Female human ACE2 (hACE2) transgenic mice were hybridized with male BALB/c-nude mice to produce an F1 generation. An F2 generation was then obtained by backcrossing the F1 generation hACE2 mice with BALB/c-nude mice, and F3 generation hACE2 transgenic nude mice were obtained by intercrossing the F2 generation hACE2 mice. Finally, F3 hACE2 transgenic nude mice were compared with C57BL/6J wild-type mice, hACE2 mice, and BALB/c-nude mice in terms of their phenotypes, and physiological and immunological characteristics. **Results** (1)There were no significant differences between hACE2 transgenic nude mice and C57BL/6J wild-type mice, hACE2 mice, or BALB/c-nude mice in terms of their phenotypes. (2)hACE2 transgenic nude mice had similar physiological indexes to BALB/c-nude mice and lacked thymuses. However, the spleen and liver indexes differed significantly between hACE2 transgenic nude mice and BALB/c-nude mice ($P < 0.05$). Routine blood indexes also showed that the neutrophil, lymphocyte, and monocyte percentages differed significantly between hACE2 transgenic nude mice and C57BL/6J wild-type mice and hACE2 mice ($P < 0.01$). (3)There were also significant differences in immunological indexes between hACE2 transgenic nude mice and C57BL/6J wild-type mice and hACE2 mice in terms of the percentages of CD3, CD4, CD11B, and natural killer cells ($P < 0.01$), but no significant differences between hACE2 transgenic nude mice and BALB/c-nude

[作者简介] 孙路(1994—),男,研究方向:动物模型制作。Email:Suluuuuu@outlook.com
[通信作者] 高虹(1968—),女,研究员,研究方向:动物模型制作。Email:gaohongdws@aliyun.com

mice. **Conclusions** We successfully established a line of hACE2 transgenic nude mice with a BALB/c-nude mouse background.

[Keywords] angiotensin-converting enzyme 2; transgenic; humanization; nude mouse

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

宿主血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 是一种锌金属蛋白酶,在肺、肠胃及大脑等组织中广泛表达^[1]。ACE2 是 SARS-CoV2 及 SARS-CoV 的受体,在研究 SARS 发病机制和抗病毒药物的评价具有重要作用,也是本次新型冠状病毒的药物治疗及疫苗研发靶点^[2-5]。早在 2003 年,研究者建立了人源化 ACE2 (hACE2) 转基因小鼠动物模型^[6]。由于裸小鼠具有 T 细胞缺乏的免疫缺陷等特点,本研究试图建立一种携带 hACE2 基因的免疫缺陷啮齿类模型,为研发抗 SARS-Cov2 病毒药物和疫苗提供具有免疫缺陷的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 只 SPF 级 BALB/c-Nude 裸小鼠,雄性,10 周龄,23 ~ 25 g,购买于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。SPF 级 C57BL/6J 野生型小鼠,10 周龄,23 ~ 25 g,6 只;SPF 级 BALB/c-Nude 裸小鼠,10 周龄,23 ~ 25 g,6 只,购买于斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。SPF 级 K18-hACE2 转基因小鼠,雌性,10 周龄,23 ~ 28 g,10 只,由中国医学科学院医学实验动物所【SCXK(京)2019-0011】提供。

实验动物饲养于中国医学科学院医学实验动物所动物屏障环境【SYXK(京)2019-0014】,设施温度为 21 ~ 26℃、相对湿度为 40% ~ 70%、最小静压差 ≤ 10 Pa、动物光照为 15 ~ 20 lx。实验动物饲养于该设施独立通风笼(IVC)中,实验动物饲养方法严格按照 GB14925-2010 执行,实验动物操作按照《实验动物使用及实验规程国家标准》执行。所有操作均通过中国医学科学院医学实验动物所实验动物福利伦理审查委员会的批准(GH20017)。

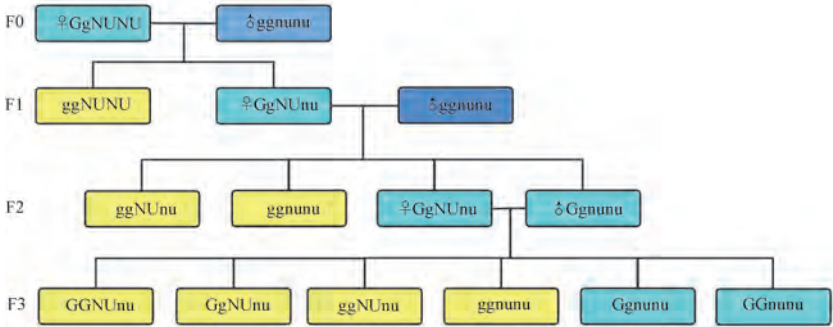
1.1.2 主要仪器

本研究中主要仪器为全自动血液分析仪(西门子 SG9000/ADV7A2120i)、流式细胞仪(BD LSR II Fortessa)、离心机(Thermo Pico17)、动物多功能麻醉机(合浦工贸 HOPE-MED 8160)、小鼠独立回风饲养系统 IVC(苏州顾创 FM1-108)、分析天平(赛多利斯 GL323i-ISCN)。

1.2 方法

1.2.1 hACE2 转基因裸小鼠的建立

hACE2 转基因裸小鼠的培育方式如图 1。首先,采用雌性 hACE2^{+/+}小鼠与雄性 BALB/c-Nude 裸小鼠按照 1 : 1 的比例杂交获得 F1 代小鼠;筛选 F1 代雌性 hACE2^{+/+}小鼠与雄性 BALB/c-Nude 裸小鼠按照 1 : 1 的比例回交获得 F2 代;筛选 F2 代 hACE2^{+/+}小鼠中雄性裸小鼠与雌性 hACE2^{+/+}有毛小鼠互交获得 F3 代,在 F3 代中获得稳定遗传的



注:Gg:hACE2 杂合子;GG:hACE2 纯合子;nunu;裸鼠纯合子。

图 1 hACE2 转基因裸小鼠培育方案

Note. Gg. hACE2 heterozygosis. GG. hACE2 homozygote. nnun. Nude homozygote.

Figure 1 Cultivation scheme of hACE2 transgenic nude mice

hACE2 转基因裸小鼠。各代仔鼠出生 21 d 后断奶分笼饲养。

1.2.2 hACE2 转基因裸小鼠的筛选

对各代 6 ~ 7 日龄小鼠进行剪趾顺序编号,取 2 ~ 5 mm 鼠尾于 1.5 mL EP 管中,通过高盐法提取 DNA,通过 PCR 反应扩增 DNA,琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 鉴定 (PCR 引物为 h-ACE2-MA-s1: 5'-GGACAAGTTTAACCAAGCC-3'; h-ACE2-MA-as1: 5'-CAGCTGAAGCTTGACTGTGAGAT-3')。根据以上结果筛选出 hACE2 基因为阳性的 hACE2 转基因裸小鼠。

1.2.3 实验分组

实验中,取 2 月龄、5 月龄的 F3 代 hACE2 转基因裸小鼠 (Nude-hACE2) 6 只作为实验组;取 2 月龄、5 月龄的 C57BL/6J 野生型小鼠 (C57BL/6J-WT)、K18-hACE2 小鼠 (hACE2)、BALB/c-Nude 裸小鼠 (BALB/c-Nude) 各 6 只作为对照组。

1.2.4 hACE2 转基因裸小鼠生理指标的测定

(1)hACE2 转基因裸小鼠表型及生长指标的测定:自 F2 代雌鼠见栓起,对孕鼠状态进行记录。F3 代小鼠出生后对 hACE2 转基因裸小鼠的体重、身长、尾长等生长发育指标进行记录。

(2)hACE2 转基因裸小鼠脏器系数的测定:取 F3 代 hACE2 转基因裸小鼠 (Nude-hACE2) 作为实验组,取 C57BL/6J 野生型小鼠 (C57BL/6J-WT)、BALB/c-Nude 裸小鼠 (BALB/c-Nude) 作为对照组。小鼠称量体重后,由眼眶静脉丛采血,随后进行病理解剖观察,采取肝、脾、肾、心脏、肺、脑等脏器并称重。脏器系数计算公式:脏器系数 = $\frac{\text{脏器重量}}{\text{体重}}$ (mg/g)。通过统计学分析,与对照组进行脏器系数间差异比较。

(3)hACE2 转基因裸小鼠血常规检测:取 F3 代 hACE2 转基因裸小鼠 (Nude-hACE2) 作为实验组,取 C57BL/6J 野生型小鼠 (C57BL/6J-WT)、K18-hACE2 小鼠 (hACE2)、BALB/c-Nude 裸小鼠 (BALB/c-Nude) 作为对照组。通过血液分析仪进行血样血细胞分析,与对照组进行差异比较。

(4)hACE2 转基因裸小鼠免疫指标的测定:取 F3 代 hACE2 转基因裸小鼠 (Nude-hACE2) 作为实验组,取 C57BL/6J 野生型小鼠 (C57BL/6J-WT)、K18-hACE2 小鼠 (hACE2)、BALB/c-Nude 裸小鼠 (BALB/c-Nude) 作为对照组。通过流式细胞术检测 T 细胞总量占白细胞总量百分比 (CD45+CD3+),辅

助 T 细胞量占 T 细胞总量百分比 (CD45+CD3+CD4+),细胞毒 T 细胞量占 T 细胞总量百分比 (CD45+CD3+CD8+),单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞总量占白细胞总量百分比 (CD45+CD11B+) 等指标。

1.3 统计学分析

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

2 结果

2.1 hACE2 转基因裸小鼠的筛选

F3 代共有小鼠 44 只,通过 PCR 反应和琼脂糖凝胶电泳进行基因型鉴定,hACE2 基因阳性率为 50%。hACE2 基因阳性小鼠中,不同肤色的裸小鼠共占 36.3%。

2.2 hACE2 转基因裸小鼠表型

hACE2 转基因小鼠 (F0 代) 与雄性 BALB/c-Nude 裸小鼠杂交获得的 F1 代小鼠被毛均表现为棕色毛发;F2 代小鼠被毛共有 4 种表型,分别为白色毛发小鼠、棕色毛发小鼠、裸色裸小鼠、黑色裸小鼠 (见图 2)。F3 代表型与 F2 代相同,其中 hACE2 转基因裸小鼠共有 2 种表现型,被毛肤色为裸色裸小鼠和黑色裸小鼠。

F3 代 hACE2 转基因裸小鼠哺乳期生长情况见图 3,新生 hACE2 转基因裸小鼠为粉红色,双眼未睁,耳廓与皮肤相连,脚趾粘连在一起,四肢和躯干向腹部蜷缩。仔鼠在 3 日龄前后耳廓张开,7 日龄前后脚趾完全张开、皮肤变厚部分出现褶皱,9 日龄前后下门齿生长,15 日龄前后睁眼,21 日龄前后活动自如,可自行采食饮水。黑色裸小鼠 7 日龄前后肤色由粉红色逐渐转变为暗黑色,8 周龄时四肢及面部出现暗黑色变淡的现象,16 周龄前后全身颜色退至裸色,其余表型无差异。

2.3 hACE2 转基因裸小鼠生理指标

2.3.1 hACE2 转基因裸小鼠生长发育指标

F3 代 hACE2 转基因裸小鼠由阳性 F2 代 hACE2 转基因小鼠互交繁殖获得。在实验期间,F2 代母鼠妊娠期为 (17.8 $\pm$ 1.7) d,哺乳期为 21 d。F2 代母鼠共产 5 胎次,产仔数量共计为 44 只,每只产胎 (8.8 $\pm$ 1.5) 只,其中裸色裸小鼠出生率为 54.5%,黑色裸小鼠出生率为 6.8% (见表 1)。

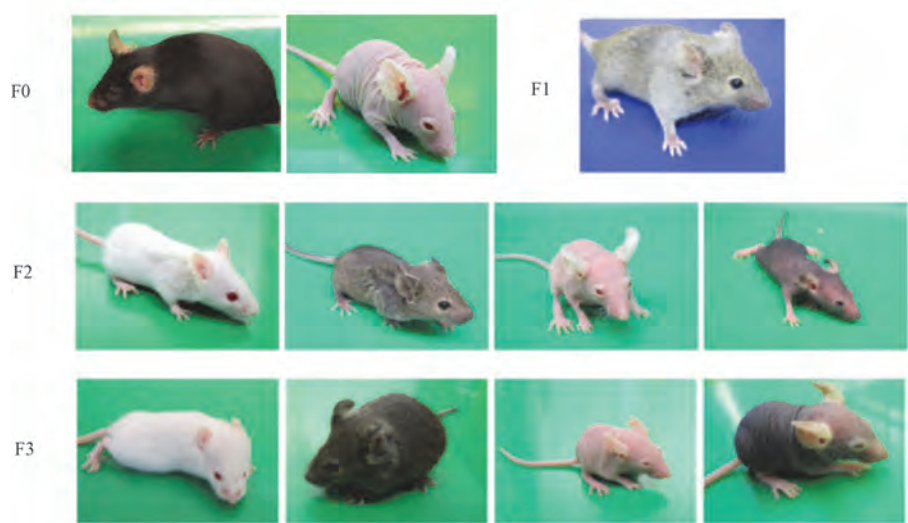


图 2 F0/F1/F2/F3 代 hACE2 转基因小鼠表型
Figure 2 Phenotype of hACE2 transgenic mice of F0/F1/F2/F3

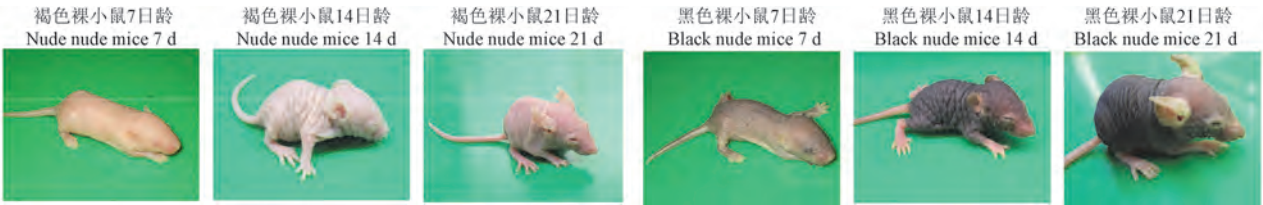


图 3 hACE2 转基因裸小鼠哺乳期生长情况
Figure 3 Growth of hACE2 transgenic nude mice during lactation

表 1 hACE2 转基因裸小鼠生长发育指标测定结果 Table 1 Measurement results of growth and development indexes of hACE2 transgenic nude mice								
组别 Groups	妊娠期(d) Gestation period(d)	出生率(%) Natality (%)	出生身长 (cm) Height of born(cm)	离乳身长 (cm) Height of weaning(cm)	出生尾长 (cm) Tail length of Born(cm)	离乳尾长 (cm) Tail length of weaning(cm)	出生体重 (g) Weight of born(g)	离乳体重 (g) Weight of weaning(g)
裸色裸小鼠 Nude nude mice	17.8 ± 1.7	54.5	2.6 ± 0.1	5.7 ± 0.2	1.3 ± 0.1	5.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	7.8 ± 0.6
黑色裸小鼠 Black nude mice	17.8 ± 1.7	6.8	2.9 ± 0.3	5.7 ± 0.3	1.1 ± 0.1	4.8 ± 0.4	1.4 ± 0.1	7.7 ± 1.2

hACE2 转基因裸小鼠身长、尾长测量结果如下,裸小鼠出生时,裸色裸小鼠身长为(2.58 ± 0.13)cm、尾长为(1.30 ± 0.13)cm,黑色裸小鼠身长为(2.85 ± 0.29)cm、尾长为(1.14 ± 0.06)cm。裸小鼠离乳时,裸色裸小鼠身长为(5.72 ± 0.24)cm、尾长为(5.54 ± 0.19)cm,黑色裸小鼠身长为(5.66 ± 0.31)cm、尾长为(4.83 ± 0.37)cm(见图 4)。

hACE2 转基因裸小鼠体重测量结果如下, hACE2 转基因裸小鼠出生时,裸色裸小鼠体重为(1.5 ± 0.1)g,黑色裸小鼠体重为(1.4 ± 0.1)

g。hACE2 转基因裸小鼠离乳时,裸色裸小鼠体重为(7.8 ± 0.6)g,黑色裸小鼠体重为(7.7 ± 1.2)g。hACE2 转基因裸小鼠性成熟时,裸色裸小鼠体重为(7.8 ± 0.6)g,黑色裸小鼠体重为(7.7 ± 1.2)g。两种不同表型的 hACE2 转基因裸小鼠相比较,身长、尾长和体重均无显著性差异(见图 5)。

2.3.2 hACE2 转基因裸小鼠脏器系数

hACE2 转基因裸小鼠解剖,该鼠体内无胸腺,与 BALB/c-Nude 裸小鼠解剖后情况相似,其他器官解剖时眼观无明显差异。

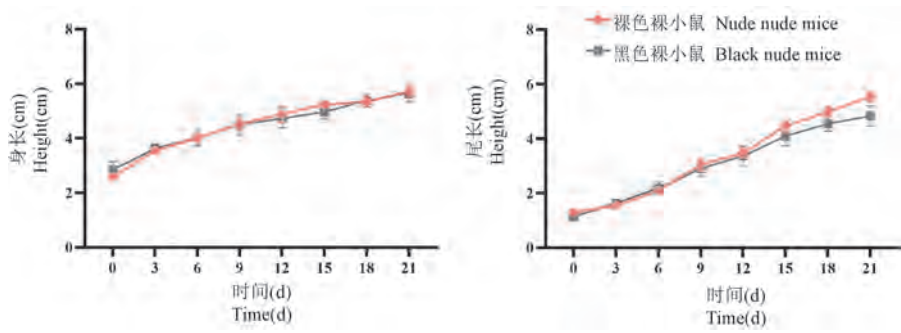


图 4 hACE2 转基因裸小鼠哺乳期身长、尾长

Figure 4 Body length & tail length of hACE2 transgenic nude mice during lactation

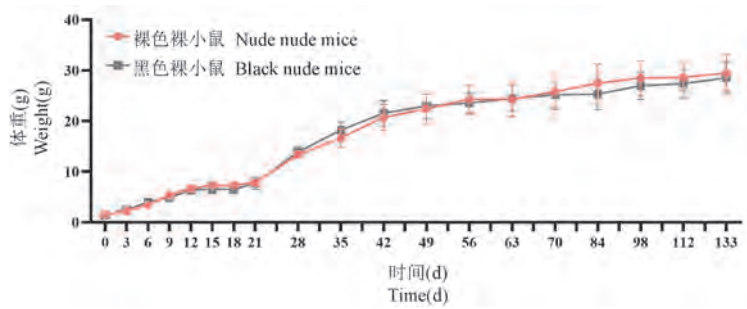


图 5 hACE2 转基因裸小鼠 0 ~ 133 日龄体重

Figure 5 Weight of hACE2 transgenic nude mice at 0 ~ 133 days

根据 hACE2 转基因裸小鼠体重及脏器系数结果比较显示,2 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 BALB/c-Nude 相比,脾系数出现显著性差异($P < 0.05$),其余各项均无明显差异。5 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 BALB/c-Nude 相比,肝系数出现显著性差异($P < 0.05$),其余各项均无明显差异(见表 2 ~ 3)。

2.3.3 hACE2 转基因裸小鼠血常规

血常规检测结果所示,2 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 C57BL/6J-WT 相比,NEU、LYM、MONO 出现极显著性差异($P < 0.01$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 hACE2 相比,NEU、LYM、MONO 出现极显著性差异($P < 0.01$),BASO、RBC 出现显著性差异($P < 0.05$);实验组 Nude-hACE2

表 2 C57BL/6J-WT、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 体重及脏器系数结果比较(2 月龄)($n = 6$)

组别 Groups	体重(g) Weight (g)	肝(mg/g) Liver (mg/g)	脾(mg/g) Spleen (mg/g)	肾(mg/g) Kidney (mg/g)	肺(mg/g) Lung (mg/g)	心脏(mg/g) Cardiac (mg/g)	胸腺(mg/g) Thymus (mg/g)	脑(mg/g) Brain (mg/g)
C57BL/6J-WT	24.70 ± 2.20	50.22 ± 5.64	3.69 ± 0.84	12.51 ± 0.61	5.92 ± 0.92	6.11 ± 0.42	1.62 ± 0.54	16.37 ± 3.35
BALB/c-nude	24.80 ± 1.30	62.97 ± 6.54	6.98 ± 1.32	19.01 ± 3.02	6.37 ± 0.51	6.96 ± 0.79	—	16.71 ± 1.90
Nude-hACE2	24.60 ± 3.70	57.06 ± 6.84	4.83 ± 1.84 ^Δ	15.96 ± 2.55	6.10 ± 0.85	6.37 ± 0.70	—	17.15 ± 2.83

注:与 BALB/c-nude 相比,^Δ $P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with BALB/c-nude,^Δ $P < 0.05$, (The same in the following tables)

表 3 C57BL/6J-WT、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 体重及脏器系数结果比较(5 月龄)($n = 6$)

组别 Groups	体重(g) Weight (g)	肝(mg/g) Liver (mg/g)	脾(mg/g) Spleen (mg/g)	肾(mg/g) Kidney (mg/g)	肺(mg/g) Lung (mg/g)	心脏(mg/g) Cardiac (mg/g)	胸腺(mg/g) Thymus (mg/g)	脑(mg/g) Brain (mg/g)
C57BL/6J-WT	30.00 ± 3.96	54.22 ± 3.67	3.10 ± 0.85	13.85 ± 0.37	5.93 ± 0.81	6.24 ± 0.30	5.40 ± 9.00	12.33 ± 2.23
BALB/c-nude	29.05 ± 1.46	62.68 ± 4.32	7.08 ± 3.02	18.63 ± 2.36	6.03 ± 0.66	6.05 ± 0.48	—	8.71 ± 11.54
Nude-hACE2	28.33 ± 3.41	54.49 ± 2.59 ^Δ	5.63 ± 1.87	16.41 ± 2.71	6.12 ± 0.77	6.55 ± 0.84	—	12.88 ± 1.51

与对照组 BALB/c-Nude 相比,LYM 出现极显著性差异($P < 0.01$),HGB、EOS 出现显著性差异($P < 0.05$)。5 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 C57BL/6J-WT 相比,NUE、LYM、MONO、PLT 出现极显著性差异($P < 0.01$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 hACE2 相比,NUE、LYM、MONO 出现极显著性差异($P < 0.01$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 BALB/c-Nude 相比,NUE、LYM 出现极显著性差异($P < 0.01$)。(见表 4 ~ 5)

2.4 hACE2 基因裸小鼠免疫指标检测

流式细胞术检测小鼠血液中 CD19、CD3、CD4、CD8、CD11B 以及 NK 细胞占比的结果如表 4 所示。2 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 C57BL/6J-

WT、hACE2 相比,CD45+CD3+、CD45+CD3+CD4+、CD45+CD3+CD8+和 CD45+CD11B+出现极显著性差异($P < 0.01$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 C57BL/6J-WT、hACE2 相比,CD45+NK+出现显著性差异($P < 0.05$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 BALB/c-Nude 相比均无显著性差异(见图 6)。5 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 C57BL/6J-WT、hACE2 相比,CD45+CD3+、CD45+CD3+CD4+和 CD45+NK+均出现极显著性差异($P < 0.01$),CD45+CD11B+均出现显著性差异($P < 0.05$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 BALB/c-Nude 相比各项指标均无显著性差异(见图 7)。

表 4 C57BL/6J-WT、hACE2、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 血常规结果比较(2 月龄)($n = 6$)

Table 4 Comparison of blood routine results between C57BL/6J-WT, hACE2, BALB/c-Nude and Nude-hACE2(2 months)($n = 6$)

组别 Groups	WBC($10^9/L$)	NEU(%)	LYM(%)	MONO(%)	EOS(%)	BASO(%)	RBC($10^{12}/L$)	HGB(g/dL)	PLT($10^9/L$)
C57BL/6J-WT	6.34 ± 1.49	7.33 ± 2.19	87.90 ± 1.96	0.92 ± 0.31	2.15 ± 0.58	0.25 ± 0.08	10.53 ± 0.27	13.88 ± 0.44	861.50 ± 194.52
hACE2	6.69 ± 1.07	8.83 ± 3.30	85.20 ± 3.90	1.08 ± 0.31	3.52 ± 2.27	0.08 ± 0.04	10.77 ± 0.60	13.58 ± 0.89	918.00 ± 420.78
BALB/c-Nude	6.04 ± 2.16	25.93 ± 5.28	64.55 ± 4.16	2.17 ± 0.55	4.93 ± 1.61	0.32 ± 0.12	10.55 ± 0.40	14.65 ± 0.56	848.83 ± 131.91
Nude-hACE2	4.58 ± 1.40	20.03 ± 4.24 ^{**###}	73.43 ± 4.91 ^{**###ΔΔ}	2.38 ± 0.78 ^{**###}	2.45 ± 0.92 ^Δ	0.32 ± 0.18 [#]	9.92 ± 0.43 [#]	13.57 ± 0.48 ^Δ	1098.50 ± 80.93

注:C57BL/6J-WT 相比,^{**} $P < 0.01$;与 hACE2 相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 BALB/c-Nude 比较,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Note. Compared with C57BL/6J-WT, ^{**} $P < 0.01$. Compared with hACE2, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$. Compared with BALB/c-Nude, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

表 5 C57BL/6J-WT、hACE2、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 血常规结果比较(5 月龄)($n = 6$)

Table 5 Comparison of blood routine results between C57BL/6J-WT, hACE2, BALB/c-Nude and Nude-hACE2(5 months)($n = 6$)

组别 Groups	WBC($10^9/L$)	NEU(%)	LYM(%)	MONO(%)	EOS(%)	BASO(%)	RBC($10^{12}/L$)	HGB(g/dL)	PLT($10^9/L$)
C57BL/6J-WT	6.63 ± 0.75	11.10 ± 2.01	85.23 ± 2.02	0.80 ± 0.31	1.78 ± 0.21	0.08 ± 0.04	10.66 ± 0.32	16.22 ± 1.13	1524.67 ± 205.42
hACE2	6.15 ± 1.67	10.47 ± 1.96	85.75 ± 1.89	1.15 ± 0.26	1.55 ± 0.23	0.10 ± 0.06	9.38 ± 1.53	14.40 ± 1.71	1116.67 ± 138.25
BALB/c-Nude	5.03 ± 1.98	34.83 ± 4.96	57.27 ± 4.96	2.10 ± 0.49	3.85 ± 1.73	0.87 ± 0.59	10.12 ± 0.71	15.55 ± 0.94	826.5 ± 338.53
Nude-hACE2	5.30 ± 1.05	22.90 ± 5.83 ^{**###ΔΔ}	68.73 ± 5.51 ^{**###ΔΔ}	2.03 ± 0.53 ^{**###}	4.97 ± 4.76	0.45 ± 0.58	10.76 ± 0.36	16.15 ± 0.67	1032.67 ± 161.91 ^{**}

3 讨论

本研究成功建立了 BALB/c-Nude 为背景的 hACE2 转基因免疫缺陷裸小鼠动物模型。

hACE2 转基因裸小鼠(Nude-hACE2)表现为无毛裸小鼠,生长发育情况与 BALB/c-Nude 裸小鼠相近。通过病理解剖观察,hACE2 转基因裸小鼠与 BALB/c-Nude 裸小鼠相同,均缺少胸腺组织。胸腺作为机体重要的淋巴组织,来自骨髓的淋巴干细胞在胸腺中分化为 T 细胞,成熟的 T 细胞再分化为辅助 T 细胞和细胞毒性 T 细胞,随后输出胸腺,进入外周淋巴器官。hACE2 转基因裸小鼠胸腺的缺少导致其无法正常分化 T 细胞,进而造成机体细胞免疫缺陷。血常规指标检测结果显示,hACE2 转基因裸小鼠血液血细胞分布情况与 BALB/c-Nude 裸小

鼠相近,与 C57BL/6J 野生型小鼠、hACE2 小鼠比较,LYM 偏低主要与 hACE2 转基因裸小鼠先天性免疫缺陷有关;NEU、MONO 偏高则可能是由于在环境中饲养中因免疫缺陷造成的某些细菌感染有关。

免疫指标检测结果显示,hACE2 转基因裸小鼠的 CD45+CD3+、CD45+CD3+CD4+以及 CD45+CD3+CD8+低于 C57BL/6J 野生型小鼠,hACE2 转基因裸小鼠的 CD45+CD3+、CD45+CD3+CD4+以及 CD45+CD3+CD8+均与 BALB/c-Nude 裸小鼠相近,反映 hACE2 转基因裸小鼠体内 T 细胞无法正常表达且在免疫水平上与 BALB/c-Nude 裸小鼠具有很高的相似性,无胸腺导致缺乏成熟的 T 细胞,进而导致细胞免疫功能的缺失。

衰老对免疫系统有着深远的影响,免疫系统的固有和适应性免疫应答都随着年龄增长而呈现功

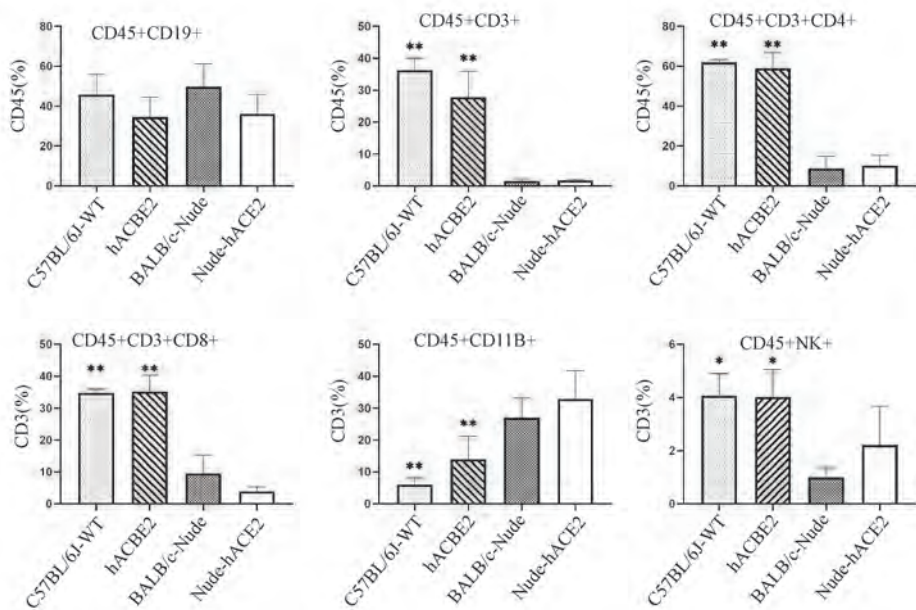


图 6 C57BL/6J-WT、hACE2、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 血细胞免疫水平比较(2 月龄)

Figure 6 Comparison of immune levels between C57BL/6J-WT, hACE2, BALB/c-Nude and Nude-hACE2 (2 months)

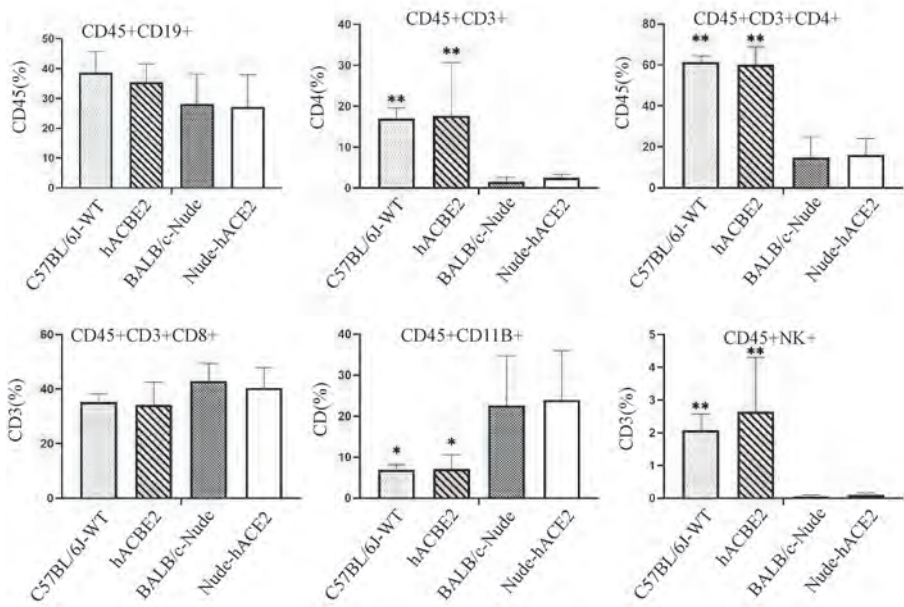


图 7 C57BL/6J-WT、hACE2、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 血细胞免疫水平比较(5 月龄)

Figure 7 Comparison of immune levels between C57BL/6J-WT, hACE2, BALB/c-Nude and Nude-hACE2 (5 months)

能下降^[7-8]。在老龄化过程中,由于胸腺的萎缩导致小鼠体内 T 细胞数量明显减少,其分化增殖能力下降,诱生新的 T 细胞记忆反应能力也受损,导致 T 细胞库的多样性减少^[9-10]。根据不同月龄的免疫指标结果,裸小鼠因具有胸腺退化的缺陷,自身的细胞免疫功能缺失,故 hACE2 转基因裸小鼠与 BALB/c-Nude 裸小鼠相似,免疫能力自始至终都处于较弱

的水平且免疫能力不随年龄增长而发生改变。同时,hACE2 转基因裸小鼠由于其自身的免疫能力低下,在日常饲养的过程中,随着年龄增加还需对其提供清洁的生活环境、富含营养的饲料等,防止因环境问题或饲养不当而导致动物产生细菌感染或死亡。

hACE2 转基因小鼠作为啮齿类 COVID-19 动物

模型,可应用于 SARS-CoV2 发病机理、疫苗及治疗效果等方面的研究,其主要的优势表现在遗传背景清晰,繁殖周期短,饲养条件可控以及伦理问题较少^[11]。通过与裸小鼠繁育出的 hACE2 转基因裸小鼠不仅具有以上优点,还具有裸小鼠先天性细胞免疫缺陷等特点,作为携带 hACE2 基因的免疫缺陷动物模型,或许可以为 SARS-CoV2 疫苗研究过程中安全性和免疫原性评价等方面提供一些支持。

参 考 文 献(References)

[1] Imai Y, Kuba K, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome [J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(15): 2006–2012.

[2] Ren LL, Wang YM, Wu ZQ, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 133(9): 1015–1024.

[3] Lo AW, Tang NL, To KF. How the SARS coronavirus causes disease: host or organism? [J]. J Pathol, 2006, 208(2): 142–151.

[4] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-NCoV spike in the prefusion conformation [J]. Science, 2020, 367(6483): 1260–1263.

[5] Zhu N, Zhang DY, Wang DL, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. N Engl J Med, 2020, 382(8): 727–733.

[6] 杨秀红. 人 ACE2 转基因小鼠对 SARS-CoV 的易感性及 SARS

发病机制的实验研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学; 2007.

Yang XH. Susceptibility of hACE2 transgenic mice to SARS-Cov and experimental study on SARS pathogenesis [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College; 2007.

[7] Decman V, Laidlaw BJ, Dimenna LJ, et al. Cell-intrinsic defects in the proliferative response of antiviral memory CD8 T cells in aged mice upon secondary infection [J]. J Immunol, 2010, 184(9): 5151–5159.

[8] Jiang J, Fisher EM, Murasko DM. Intrinsic defects in CD8 T cells with aging contribute to impaired primary antiviral responses [J]. Exp Gerontol, 2013, 48(6): 579–586.

[9] Bektas A, Schurman SH, Sen R, et al. Human T cell immunosenescence and inflammation in aging [J]. J Leukoc Biol, 2017, 102(4): 977–988.

[10] Maue AC, Yager EJ, Swain SL, et al. T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging [J]. Trends Immunol, 2009, 30(7): 301–305.

[11] 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.

[收稿日期] 2021–11–26

刘诗成,张瑞,唐景峰,等. 斑马鱼黑色素瘤模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 416-422.

Liu SC, Zhang R, Tang JF, et al. Research progress in zebrafish melanoma model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 416-422.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.015

斑马鱼黑色素瘤模型研究进展

刘诗成^{1,2}, 张瑞^{1,2}, 唐景峰^{1,2*}, 陈兴珍^{1,2*}

(1. 湖北工业大学 生物工程与食品学院, 武汉 430068; 2. 湖北工业大学 科技部/教育部细胞调控与分子药物“111”引智基地, 武汉 430068)

【摘要】 斑马鱼作为一种新型模式动物已广泛应用于肿瘤疾病的相关研究,例如异种移植观察肿瘤转移、抗肿瘤药物高通量筛选和安全性评价,此模型能够使我们更好的认识肿瘤与机体活动的关系。恶性黑色素瘤是皮肤和其他器官的黑色素细胞产生的一种恶性肿瘤,致死率高且转移性强,且近年来,患病人数激增且呈年轻化趋势。斑马鱼与人类的黑素细胞发育和功能具有高度的保守型和一致性,同时恶性黑色素瘤发生和转移涉及到的信号通路在斑马鱼上高度保守,因此斑马鱼是研究黑色素瘤的发病机理和转移的新型常用模型。本文论述最新的斑马鱼模型运用于黑色素瘤疾病机制的研究的相关成果,及利用斑马鱼进行小分子化合物/药物筛选和研发的现状,最后总结了斑马鱼模型在黑色素瘤研究中的重要价值,将为黑色素瘤发病发生机制、寻找疾病治疗方法提供新的方法和思路。

【关键词】 斑马鱼;黑色素瘤;异种移植;转移

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0416-07

Research progress in zebrafish melanoma model

LIU Shicheng^{1,2}, ZHANG Rui^{1,2}, TANG Jingfeng^{1,2*}, CHEN Xingzhen^{1,2*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China. 2. HBUT National “111” Center for Cellular Regulation and Molecular Pharmaceutics, Hubei University of Technology, Wuhan 430068)

Corresponding author: CHEN Xingzhen. E-mail: xzchen@ualberta.ca; TANG Jingfeng. E-mail: tangjingfeng@hbut.edu.cn

【Abstract】 Zebrafish are commonly used as model animals, and recent developments in techniques such as xenotransplantation for observation of tumor metastasis, and high-throughput screening and safety evaluation of drugs have furthered the study and understanding of diseases. Malignant melanoma is a common malignant skin tumor with high mortality and strong metastasis, and a low 5-year survival rate. In addition, the incidence rate of melanoma has been gradually increasing and the onset age has been getting younger. Zebrafish and human melanocyte development have certain similarities, and the signaling pathways involved in the occurrence and metastasis of malignant melanoma are highly conserved in zebrafish, making zebrafish a common model for studying the pathogenesis and metastasis of melanoma. In this paper, we summarize the application of new zebrafish models and analyze their value for melanoma research.

【Keywords】 zebrafish; melanoma; xenograft; metastasis

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

【基金项目】 国家自然科学基金(32000523)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32000523).

【作者简介】 刘诗成(1995—),男,硕士,研究方向:细胞自噬与代谢调控相关方面研究。Email: 623797978@qq.com

【通信作者】 陈兴珍,男,教授/博导,研究方向:膜蛋白方面研究。Email:xzchen@ualberta.ca;

唐景峰,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:细胞自噬与代谢调控,蛋白工程及分子药物方向研究。

Email: tangjingfeng@hbut.edu.cn。

* 共同通信作者

斑马鱼 (*Danio rerio*) 是生活在印度和南亚的热带淡水鱼, 成年野生型雄性斑马鱼身体细长, 雌性斑马鱼腹部有微微隆起, 长度 3 ~ 6 cm, 背部有深色条纹纵横类似斑马, 寿命约为 3 ~ 5 年。斑马鱼具有其他模式动物 (如小鼠) 所不具备的天然优势, 例如体外受精、体外发育、性成熟快、繁殖力强及饲养成本低。斑马鱼最独特的优势是斑马鱼胚胎发育在体外进行, 早期胚体透明, 适用于整体成像和实时活体观察^[1]。

斑马鱼在生命科学研究领域发挥着越来越明显的作用, 因为其基因组与人类基因组有着高度同源性, 在调控疾病的一些信号通路高度保守, 在血液、视觉、神经系统等方面与人类有着相似的机制^[2-4]。使得其本身可以作为模式生物应用于大部分人类的生态和疾病研究。同时, 因为现阶段各种针对性基因下调技术或者敲除技术的发展, 更高效的异种移植技术, 极大程度地推进了斑马鱼在各种疾病机制与病理上的研究进度。

恶性黑色素瘤是较为常见的恶性皮肤癌的一种, 是目前全球增速最快的恶性肿瘤, 且具有高度转移性以及强致死性。它们遍布全身, 通常存在于皮肤中, 部分还可渗透进葡萄膜, 脑膜和粘膜组织等组织^[5]。中国黑色素瘤患者在不断增多且呈年轻化, 5 年生存率仅为 65%, 远低于欧美发达国家的 80%。目前对于黑色素瘤的治疗主要还是外科手术, 早期黑色素瘤患者经过手术治疗可以获得较好的控制^[6]。然而, 近几十年来对中晚期黑色素瘤的治疗尚未有效果明显的治疗方法。除大剂量注射 IL-2 和达卡巴嗪以外, 世界各国还未批准过任何一种新药用于晚期黑色素瘤患者的治疗。黑色素瘤发生受到多种基因的调控, 比如黑色素细胞诱导转录因子 (melanocyte inducing transcription factor, Mitf)、B-Raf 原癌基因 (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase, BRAF)、细胞质多聚腺苷酸化原件结合蛋白 4 (cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4, CPEB4) 等^[7]。黑色素瘤极易发生转移, 初期进入到皮下组织。之后色素瘤细胞会通过血管系统和淋巴系统扩散至继发部位^[8]。

当前, 利用斑马鱼模型研究黑色素肿瘤, 有一系列的报道。

1 斑马鱼作为动物模型研究黑色素瘤的优势

目前常用的模式生物有果蝇、酵母、小鼠、斑马

鱼等。黑色素瘤是皮肤癌的一种, 黑色素前体细胞的胚胎发育在小鼠上高度保守, 这使得小鼠更适合模拟人黑色素瘤的病理特征。目前主要是小鼠黑色素瘤模型, 通常是将黑色素瘤细胞注入裸鼠体内来观察成瘤情况。恶性黑色素瘤的高转移性一直是棘手的问题, 肿瘤的转移以及微环境间的相互作用对肿瘤的治疗有着很大的影响, 小鼠模型在实时追踪肿瘤以及观测微环境变化这一方面还是有一定的限制^[9-10]。

斑马鱼作为在机体内研究黑色素肿瘤发生和发展的模型具有独特的优势。斑马鱼与人类黑色素细胞相关的信号通路高度保守, 透明的转基因斑马鱼可以应用活体成像帮助我们更好的观察体内的黑色细胞变化。斑马鱼和哺乳动物的黑色素细胞高度相似。在这两个类群中, 黑色素细胞前体 (黑素母细胞, 起源于背部的神经嵴细胞的一个子集) 迁移到它们在动物皮中的最终目的地。调节黑素细胞的规格, 增殖, 存活, 迁移。参与分化成黑素细胞这一过程的蛋白质在序列和功能上高度保守。恶性黑色素瘤的发生和转移, 涉及到 Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) 和 PI3K/AKT 多种信号通路的调控, 斑马鱼为这类研究提供了一个可靠的载体^[11]。

斑马鱼作为黑色素瘤的模式生物, 在黑色素瘤的相关调控途径中与哺乳动物具有高度同源性, 例如小眼症相关转录因子 Mitf。Raf/Ras/PI3K-AKT 等多种黑色素瘤发生相关信号通路高度保守^[12]。相较于小鼠模型, 斑马鱼因其通体透明可以更好地观察色素的沉积, 血管内的细胞流动, 同时也可以实时观察黑色素瘤的转移, 这一直是肿瘤研究的热点。并且早期的胚胎没有成熟的自体免疫系统, 可通过异种移植肿瘤, 达成更快的成瘤速度, 使得用更短的实验周期来检测药物效果。同时斑马鱼所需要的实验面积相较于小鼠需要的更少, 以及遗传易操作性等多方面优势使得斑马鱼模型为疾病的研究提供了更好的帮助。

2 斑马鱼黑色素瘤模型的建立

当前, 已利用斑马鱼模型建立了多种人类疾病模型 (图 1)^[9,13]。科学家已开发出多种实验技术以建立斑马鱼黑色素瘤模型。主要方法包括化学诱变方法, 利用基因编辑技术构建特异的转基因模型和异种移植的方法。

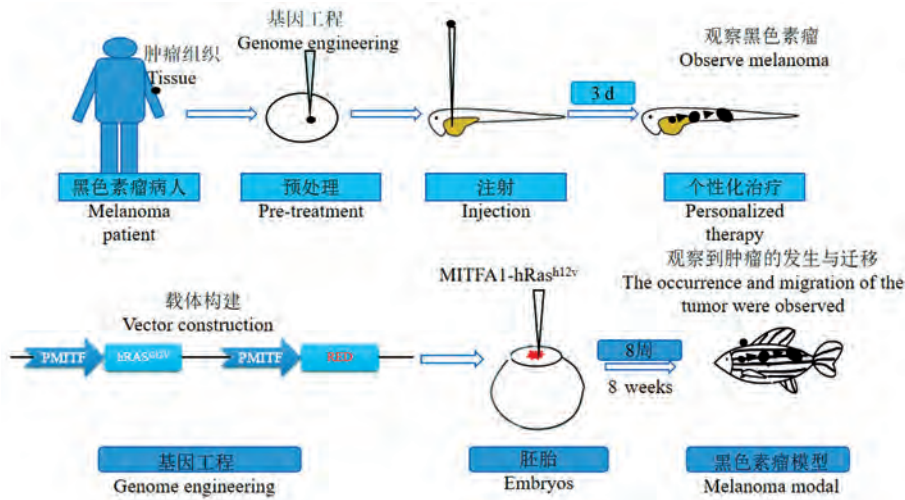


图 1 斑马鱼黑色素瘤模型的建立流程图
Figure 1 Flow chart of zebrafish melanoma model

2.1 异种移植斑马鱼模型的建立

斑马鱼在早期的时候尚未形成成熟的免疫系统,肿瘤异种移植的成功率较高,利用这个优势可以在短时间内让斑马鱼获得人类肿瘤细胞,模拟肿瘤在体内环境的“运动”。运用斑马鱼异种移植模型可以在初期对药物进行筛选,同时可以利用这个特点来观察肿瘤细胞的转移。

Casper 品系的斑马鱼敲除了线粒体内膜蛋白 (mitochondrial inner membrane protein, ROY) 和黑色素细胞诱导转录因子 (melanocyte inducing transcription factor a, NACRE),使其色素生成能力缺失^[14], 通体透明,易于观察。Zhang 等^[15] 基于转基因技术使黑色素瘤细胞系与基因敲除的透明斑马鱼相结合,将斑马鱼特异性黑色素瘤细胞系 (ZMEL1-GFP) 通过不同部位注射入 Casper 斑马鱼体内,观察黑色素瘤与脂肪细胞相关作用。

建立斑马鱼异种移植模型,可以将荧光标记好的人类转移性黑色素瘤细胞移植到囊胚期斑马鱼卵黄囊中。移植的卵细胞表现出存活,增殖,运动性,能够分裂但不发展肿瘤,也没有整合进入器官。细胞散布在整个囊胚的间隙中,通常被定义为原发肿瘤细胞。之前有发现一种从在牛肝菌蘑菇中提取出的新型凝集素 (boletus edulis lectin β -trefoil, BEL β -Trefoil) 存在着抗肿瘤的作用,为了研究 BEL β -Trefoil 对黑素瘤迁移能力的影响,Valenti 等^[16] 在胚胎受精 2 d 后用 Tricaine (三卡因) 麻醉,将培养好的肿瘤细胞与 BEL β -Trefoil 孵育,后经显微注射技术,注射到麻醉后的斑马鱼幼虫卵黄囊中,在不同的注射时间后观察,发现 BEL β -Trefoil 可以有效地

降低黑素瘤在斑马鱼体内的扩散和转移。Ogryzko 等^[17] 建立斑马鱼异种移植黑色素瘤模型,使用电脑软件在斑马鱼体内对黑色素瘤细胞与巨噬细胞之间的相互作用进行成像处理,发现了巨噬细胞会与黑色素瘤相互作用,通过血管内运输,从而转移到更远的地方。

斑马鱼的适宜温度为 28℃,而肿瘤细胞的适宜温度为 37℃。这种差异使得异种移植技术不能长久的观察肿瘤细胞变化,肿瘤细胞生长受到影响。最近新发现了 1 种敲除了 DNA 依赖性蛋白激酶的催化亚基 (protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit, PRKDC) 和白细胞介素 2 受体 (interleukin 2 receptor, gamma a, il2rga) 的斑马鱼模型^[18],可以让斑马鱼适应人体温度 37℃,并利用该模型结合 Casper 鱼系。直接从患者处得到肿瘤细胞,在斑马鱼体内观察生长发育的研究,为个性化治疗提供一种有效思路。

2.2 斑马鱼黑色素瘤转基因模型的建立

在斑马鱼中,有两个 Mitf 基因 (Mitfa 和 Mitfb), Mitfa 对于神经 C 衍生的黑素细胞的发育至关重要。基于转基因技术,将特异性黑色素瘤细胞系与基因敲除的透明斑马鱼相结合, Kim 等^[19] 建立了一个由神经特异性 Mitfa 启动子驱动的人 BRAF^{V600E} 基因,并融合荧光蛋白的转基因斑马鱼品系,从而获得了带绿色荧光标记的斑马鱼特异性黑色素瘤细胞系——ZMEL1-GFP。将 ZMEL1-GFP 癌细胞注射到斑马鱼体内。21 dpf, 100% 的局部植入的皮肤肿瘤出现色素异常堆积,黑色素瘤出现转移并表现出了分化特征^[19]。绿色荧光追踪了黑色素瘤的转移,肿

瘤色素沉积的表型标志了黑素瘤的分化,利用该模型可以实时观察肿瘤转移过程中的分化状态,帮助我们更好的认识黑色素瘤细胞在机体内迁移的过程,因此,此模型可以更好的帮助医疗人员了解疾病发生的进程。在人类黑色素瘤细胞中经常发现 BRAF 和 NRAS 的激活突变。Mitfa 驱动的 NRAS^{Q61K},在 P53 缺失的情况下,也可以稳定的观察到黑色素瘤的生成。Kita 在发育中的黑素细胞组细胞中表达,在 Kita 启动子下表达致癌基因 HRAS^{G12V}。2 ~ 4 周后黑色素细胞在尾部积累,并逐渐形成黑色素瘤^[13]。目前使用的各种斑马鱼黑色素瘤模型都与人类黑色素瘤模型有一定的相似性,都在黑色素瘤的研究中取得了一定的进展。对比各个模型发现影响黑色素瘤的更高的渗透率和更早的发作可能是由于癌基因表达的水平 and 持续性,而不是由于 Kita 和 Mitfa 两个启动子的细胞特异性不同。Scahill 等^[20]发现 7 个月大的赖氨酸 (K) 特异性脱甲基酶 2Aa (lysine (K)-specific demethylase 2Aa, kdm2aa) 缺陷型的鱼可以生成肿瘤,同时发现了黑色素细胞的异常沉积,也是目前发现的第 1 个单基因敲除的黑色素瘤动物模型。

3 斑马鱼在黑色素瘤研究中的应用

3.1 黑色素瘤药物安全性评价模型

斑马鱼因其体型小,胚胎透明,一次繁殖可以多达几百条。同时斑马鱼和哺乳动物在药物毒性评估上具有高度一致性^[21]。这些优势使得斑马鱼可以在多孔板内进行高通量的药物安全性测试,测试各种药物浓度的危险范围及其可能的副作用,一方面可以检查药物对动物发育表型的不利影响,另一方面通过荧光显微镜观察肿瘤的动态。根据各种药物的性质不同,给药方式可以采用水溶,卵黄注射或血液循环注射等方式。一般来说,判断药物毒性可以通过观察心跳变化,生长发育变化等方法。

Fisetin 是一种膳食类黄酮,在抗关节炎和抗癌活性都有一定的作用,为了探究 Fisetin 对黑色素细胞的作用,使用 24 hpf 的斑马鱼,用不同浓度的 Fisetin 进行处理,同时用立体显微镜观察幼虫的体形与心率,算出每组的每分钟平均心跳数,可以发现心率与对照组无差,但同时黑色素细胞有增多。再用 FH535 (WNT/ β -catenin 抑制剂) 处理后加入 Fisetin 发现 FH535 显著下调了 Fisetin 诱导的斑马鱼幼虫中黑色素的生成,同样无明显心脏变化。证

实了 Fisetin 可以在没有毒性的情况下作用于 Gsk-3 β ,抑制其活性,阻断对于 β -catenin 的降解,来促进斑马鱼幼虫黑色素的生成^[22]。茛菪酰胺 (piperlongumine, PL),一种天然生物碱,可以通过增加活性氧水平,来选择性杀死癌细胞。对 6 hpf 的斑马鱼胚胎进行了不同浓度的药物处理,虽然 PL 在一定程度上对斑马鱼胚胎黑色素产生有抑制作用,可高浓度的 PL 使斑马鱼幼虫有明显的脊柱弯曲,PL 表现出了极大的发育毒性^[23],高通量的斑马鱼药物筛选实验大大提高了人类药物的安全性。

传统的肿瘤药物往往带有强烈的副作用,药物到达患处也会受到多种生物学阻碍^[24]。纳米治疗技术的发展,可以将药物靶向到患病部位,减少药物副作用,这将对癌症治疗提供更高效安全的方法。斑马鱼模型的无创实时成像技术将为这项技术提供一个很好的帮助。Kocere 等^[25]验证了载药纳米颗粒在斑马鱼体内的功能。在显微镜下可以看到斑马鱼体内纳米颗粒协助药物聚集到了血管周围的肿瘤区域,并有效减少了癌细胞的增殖与凋亡,保证了更高的存活率,大大降低了肿瘤药物的毒性。

针对不同的药物,要采取不同的给药方式,以达到最好的效果。TLD1433 化合物作为光敏剂可以治疗结膜黑色素细胞^[26],使用 3 种不同的给药方式:水溶暴露、静脉注射和眼后注射,观察各个部位的最大耐受剂量,同时在高剂量下评判该药物的治疗效果,发现在经眼后注射中,该药物对眼部的异位肿瘤有着明显的抑制作用。硫磺粉菌凝集素 (laetiporus sulphureus lectin, LSL) 被发现广泛存在于传统药物中,与其同类型的乙醇提取物 (ethanol extract, LSE) 共同作用能有效抑制肿瘤生长发育,为了验证 LSL 的发育毒性,将 6 hpf 的斑马鱼胚胎暴露在不同浓度的 LSL 和 LSE 中,120 hpf 后检查存活胚胎的心率无异常,在 400 mg/mL 的高剂量下仍没有诱导出毒性。目前,骨髓抑制和中性粒细胞减少是目前多数抗癌药会让患者引起的副作用。使用转基因型斑马鱼胚胎 Tg (mpx:GFP) 进行了 LSL 和 LSE 的骨髓毒性评测,处理后使用荧光显微镜观察,相较于目前市面上的一些抗肿瘤药物,没有发现中性粒细胞减少等副作用,证实了 LSL 和 LSE 不是影响中性粒细胞减少的原因,证明了 LSL 和 LSE 无毒性^[27],为 LSL 用作抗黑色素瘤的安全佐药作出了一定贡献。

3.2 黑色素瘤生成机制的研究

Mitf 是黑色素瘤整个调节网络的中心位置^[28], 且 Mitfa 是黑色素存活和分化的主要调节因子。同时 Mitf 影响了多条黑色素瘤相关的信号通路, 例如 bmp 信号通路的抑制会影响到 Mitfa 表达, 导致黑色素细胞的降低^[29]。之前也有发现低 Mitf 活性加上 P53 突变可以导致黑素瘤的发生^[30]。Santoriello 等^[31]在斑马鱼珍珠母突变型 (Mitfa^{-/-}) 中培养了 Kita-GFP-Ras 鱼系, 9 个月后观察到没有黑素瘤的形成。足以发现 Mitfa 表达对于黑素细胞存活的重要性, 而致癌因子 HRAS^{V12} 的突变不足以使黑色素瘤生成。Lister 等^[32]使用条件性 Mitfa 温度敏感的斑马鱼突变体 (Mitfa^{trc7}) 模型揭示了 Mitf 在黑素瘤中的作用, 该模型会因为温度的不同调节体内 Mitf 的活性, 通过控温将温度控制在 32℃ 时关闭 Mitfa 活性发现黑素瘤消退, 但在将水温重新调回到 26℃ 以下时, 黑色素瘤仍旧会出现, 这一现象表明靶向 Mitf 活性可能是一种有效的抗黑色素瘤机制。Taylor 等^[33]用色素作为标记, 从胚胎头部观察黑色素细胞的发育。再结合热敏感斑马鱼突变体 Mitfa^{trc7}, 观察斑马鱼胚胎发育出黑色素细胞后追踪不同的 Mitf 活性下的斑马鱼黑色素细胞分化生长, 发现 Mitf 的活性变化可以使黑色素细胞分裂的增加, 进一步说明了 Mitf 在黑色素瘤中的重要地位。

BRAF 作为 Raf 家族中的一员, 有超过 80% 的黑色素瘤患者存在 BRAF 或 RAS 突变^[13], 且在 MAPK 信号通路中有着一定的影响。从数据上看, 很大一部分黑色素瘤患者有发生 BRAF^{V600E} 的突变^[34]。目前, 针对 BRAF 突变患者的治疗也是以抑制 MAPK 和 BRAF 为主, 尽管有很好的效果, 但耐药性的发展使得效果不持久也一直是研究的重点。Das 等^[35]发现 AXL 受体酪氨酸激酶 (AXL receptor tyrosine kinase, AXL) 和细胞质膜小凹蛋白 (caveolin-1, CAV-1) 与蛋白耐药性有关, 同时受到 TH1579 (MTH1 抑制剂) 的影响。利用斑马鱼异种移植模型, 观察药物联合 TH1579 可以有效增强对黑素瘤的抑制作用, 为药物治疗的耐药性提供了一种解决方案。

3.3 黑色素瘤转移机制的研究

黑色素瘤是皮肤癌中转移能力较强的一种, 其高致死性也是因为转移所导致的。肿瘤的转移通常包括了血管内, 淋巴道等途径, 恶性黑色素瘤常常表现出较强的血管倾向性^[36]。转移性黑色素瘤

的患者治愈后存活率低, 癌症的转移问题也一直是国内癌症研究的热点。斑马鱼被认为是最好的观察肿瘤转移过程的模式生物, 因为其体态透明。利用斑马鱼黑色素瘤模型可以很好的在显微镜下实时观察到肿瘤由原发到继发的整个转移过程, 这在小鼠肿瘤模型中很难办到, 大量的数据可以更直观的评估肿瘤转移的能力。为了评估细胞的扩散, 通常将分散在整个鱼体内的细胞被定义为转移细胞, 而聚集在注射部位卵黄囊间隙的细胞为非转移细胞。利用斑马鱼模型可以更好的揭示肿瘤转移方式, 帮助我们更好的研究肿瘤运动。

将 BEL β -Trefoil 与肿瘤细胞一同注射到斑马鱼体内明显可以看到对细胞扩散和转移形成有一定的抑制作用^[16], 最后, 通过分析总的 RNA 水平, 以及 RUNX 家族转录因子 2 (RUNX family transcription factor 2, RUNX2) 的表达水平, 发现 BEL β -Trefoil 可以通过抑制 RUNX2 (其 Hunt 结构域与黑色素瘤的增殖和迁移有关) 来达到抑制肿瘤细胞扩散转移的作用^[37-38]。

丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1, Spint1) 突变存在于 10% 的皮肤黑色素瘤患者中。用 Spint1a^{hi2217/hi2217} 的母鱼^[39]分别与 Spint1a^{+/+} (野生型) 和 Spint1a^{hi2217/hi2217} 的公鱼杂交, 对比与野生型杂交, 发现 Spint1 缺陷型会显著增加皮肤黑色素瘤的发生率, 对成年斑马鱼注射 Spint1a 缺失的皮肤黑色素瘤细胞也能观察到更强的侵袭性。用斑马鱼模型揭示了 Spint1 对黑素瘤的调节^[34]。Bcl-2 家族中的 Bcl-xl 是一种常见的抗凋亡蛋白。有研究指出葡萄膜黑色素瘤细胞逃避治疗诱导的凋亡的主要手段之一是通过上调生存 Bcl-2 家族蛋白中的 Bcl-XI^[40-41]。除了抗凋亡外, Gabellini 等^[42]还发现 Bcl-xl 可以调节肿瘤转移的过程, 通过 NF- κ B 途径来影响白细胞介素-8 (C-X-C motif chemokine ligand 8, CXCL8) 的分泌, CXCL8 可以通过激活 CXCR1 与 CXCR2 受体来影响黑色素瘤的进展, 将稳定表达 Bcl-xl 蛋白的黑色素细胞异种移植到斑马鱼卵黄囊中, 对比干扰 CXCL8 细胞表面受体 CXCR1, 发现在干扰 CXCR1 后斑马鱼黑色素瘤未发生明显侵袭, 说明 Bcl-xl 调控肿瘤侵袭依赖 CXCL8 的分泌, 进一步揭示了 Bcl-xl 调控黑色素瘤转移机制。

4 总结与展望

目前, 已利用斑马鱼建立了多种黑色素瘤模型

用于相关的研究。近年来,更多的研究定位于通过可视化的斑马鱼体内,观察肿瘤形成与治疗,同时随着新型转基因型斑马鱼模型的出现,给人类移植细胞提供了一个合适的观察场所。同时,斑马鱼作为黑色素瘤模型,基因编辑后的成年鱼也能保持全身透明,便于观察。纳米治疗技术的发展,可以靶向到患病部位,更好的减少药物副作用,这将对癌症治疗提供更有效更安全的方法,斑马鱼模型的无创实时成像技术将为这项技术提供一个很好的帮助。相信随着科学进步,斑马鱼的应用将会更多的被开发,也将为疾病的解决提供更多的可能性。

参 考 文 献(References)

- [1] Osmani N, Goetz JG. Multiscale imaging of metastasis in Zebrafish [J]. Trends Cancer, 2019, 5(12): 766-778.
- [2] 李志操, 黄波, 向文碧, 等. 红系祖细胞在造血缺陷斑马鱼体内的移植 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 84-89.
Li ZC, Huang B, Xiang WB, et al. Transplantation of erythroid progenitor cell in hamatopoietic deficient zebrafish [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 84-89.
- [3] 邸亚男, 朱丽英, 沈婕, 等. 四种有机溶剂对斑马鱼眼睛发育的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 75-80.
Di YN, Zhu LY, Shen J, et al. Effects of four organic solvents on eye development of zebrafish [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 75-80.
- [4] Gore AV, Pillay LM, Veneor Galanternik M, et al. The zebrafish: A fintastic model for hematopoietic development and disease [J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2018, 7(3): e312.
- [5] Idilli AI, Precazzini F, Mione MC, et al. Zebrafish in translational cancer research: insight into leukemia, melanoma, glioma and endocrine tumor biology [J]. Genes, 2017, 8(9): 236.
- [6] 高原, 商冠宁. 皮肤黑色素瘤的外科治疗现状及研究进展 [J]. 中国肿瘤外科杂志, 2020, 12(2): 100-104.
Gao Y, Shang GN. Research progress of surgical treatment for cutaneous melanoma [J]. Chin J Surg Oncol, 2020, 12(2): 100-104.
- [7] 李治, 张林梦, 斯越秀, 等. 恶性黑色素瘤的研究进展 [J]. 药物生物技术, 2018, 25(1): 70-74.
Li Z, Zhang LM, Si YX, et al. Research progress of malignant melanoma [J]. Chin J Pharm Biotec, 2018, 25(1): 70-74.
- [8] Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment [J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(11): 1366-1379.
- [9] 周斌, 盛哲津, 冯琛卓, 等. 一种体内实时观察黑色素瘤的斑马鱼模型 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(1): 22-28.
Zhou B, Sheng ZJ, Feng CZ, et al. A melanoma zebrafish model for real-time imaging *in vivo* [J]. Lab Anim Comp Med, 2018, 38(1): 22-28.
- [10] Pérez-Guijarro E, Day CP, Merlino G, et al. Genetically engineered mouse models of melanoma [J]. Cancer, 2017, 123(S11): 2089-2103.
- [11] Michailidou C, Jones M, Walker P, et al. Dissecting the roles of Raf- and PI3K-signalling pathways in melanoma formation and progression in a zebrafish model [J]. Dis Model Mech, 2009, 2(7-8): 399-411.
- [12] Hamilton N, Diaz-De-Cerio N, Whitmore D. Impaired light detection of the circadian clock in a zebrafish melanoma model [J]. Cell Cycle, 2015, 14(8): 1232-1241.
- [13] van Rooijen E, Fazio M, Zon LI. From fish bowl to bedside: The power of zebrafish to unravel melanoma pathogenesis and discover new therapeutics [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2017, 30(4): 402-412.
- [14] White RM, Sessa A, Burke C, et al. Transparent adult zebrafish as a tool for *in vivo* transplantation analysis [J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 183-189.
- [15] Zhang MM, Di Martino JS, Bowman RL, et al. Adipocyte-derived lipids mediate melanoma progression via FATP proteins [J]. Cancer Discov, 2018, 8(8): 1006-1025.
- [16] Valenti MT, Marchetto G, Perduca M, et al. BEL β -trefoil reduces the migration ability of RUNX2 expressing melanoma cells in xenotransplanted zebrafish [J]. Molecules, 2020, 25(6): 1270.
- [17] Ogryzko N, Feng Y. Helping hand for melanoma invasion: Transparent zebrafish can catch macrophages in the act [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2018, 31(4): 459-460.
- [18] Yan C, Brunson DC, Tang Q, et al. Visualizing engrafted human cancer and therapy responses in immunodeficient zebrafish [J]. Cell, 2019, 177(7): 1903-1914. e14.
- [19] Kim IS, Heilmann S, Kansler ER, et al. Microenvironment-derived factors driving metastatic plasticity in melanoma [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14343.
- [20] Seahill CM, Digby Z, Sealy IM, et al. Loss of the chromatin modifier Kdm2aa causes BrafV600E-independent spontaneous melanoma in zebrafish [J]. PLoS Genet, 2017, 13(8): e1006959.
- [21] 钟健, 朱佳瑞, 何欣宇, 等. 斑马鱼模型在纳米毒理学中的研究应用与进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 107-113, 118.
Zhong J, Zhu JR, He XY, et al. Application and progress of zebrafish model in nanotoxicology [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 107-113, 118.
- [22] Molagoda IMN, Karunaratne WAHM, Park SR, et al. GSK-3 β -targeting fisetin promotes melanogenesis in B16F10 melanoma cells and zebrafish larvae through β -catenin activation [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(1): 312.
- [23] Jeon HJ, Kim K, Kim YD, et al. Antimelanogenic activities of piperlongumine derived from Piper longum on murine B16F10 melanoma cells *in vitro* and zebrafish embryos *in vivo*: its molecular mode of depigmenting action [J]. Appl Biol Chem,

- 2019, 62(1): 1–7.
- [24] Tran S, Degiovanni PJ, Piel B, et al. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery [J]. Clin Transl Med, 2017, 6(1): 44.
- [25] Kocere A, Resseguier J, Wohlmann J, et al. Real-time imaging of polymersome nanoparticles in zebrafish embryos engrafted with melanoma cancer cells: Localization, toxicity and treatment analysis [J]. EBioMedicine, 2020, 58: 102902.
- [26] Chen Q, Ramu V, Aydar Y, et al. TLD1433 photosensitizer inhibits conjunctival melanoma cells in zebrafish ectopic and orthotopic tumour models [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(3): 587.
- [27] Petrović J, Glamočak J, Ilić-Tomić T, et al. Lectin from *Laetiporus sulphureus* effectively inhibits angiogenesis and tumor development in the zebrafish xenograft models of colorectal carcinoma and melanoma [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 148: 129–139.
- [28] 马家芳, 孔燕, 郭军. MITF 在黑素瘤中的研究现状及进展 [J]. 肿瘤, 2013, 33(12): 1130–1134.
- Ma JF, Kong Y, Guo J. Research status and progress of MITF in melanoma [J]. Cancer, 2013, 33(12): 1130–1134.
- [29] Gramann AK, Venkatesan AM, Guerin M, et al. Regulation of zebrafish melanocyte development by ligand-dependent BMP signaling [J]. eLife, 2019, 8: e50047.
- [30] Travnickova J, Wojciechowska S, Khamseh A, et al. Zebrafish MITF-low melanoma subtype models reveal transcriptional subclusters and MITF-independent residual disease [J]. Cancer Res, 2019, 79(22): 5769–5784.
- [31] Santoriello C, Gennaro E, Anelli V, et al. Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish [J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15170.
- [32] Lister JA, Capper A, Zeng Z, et al. A conditional zebrafish MITF mutation reveals MITF levels are critical for melanoma promotion vs. regression *in vivo* [J]. J Invest Dermatol, 2014, 134(1): 133–140.
- [33] Taylor KL, Lister JA, Zeng Z, et al. Differentiated melanocyte cell division occurs *in vivo* and is promoted by mutations in Mitf [J]. Development, 2011, 138(16): 3579–3589.
- [34] Gómez-Abenza E, Ibáñez-Molero S, García-Moreno D, et al. Zebrafish modeling reveals that SPINT1 regulates the aggressiveness of skin cutaneous melanoma and its crosstalk with tumor immune microenvironment [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 405.
- [35] Das I, Gad H, Bräutigam L, et al. AXL and CAV-1 play a role for MTH1 inhibitor TH1579 sensitivity in cutaneous malignant melanoma [J]. Cell Death Differ, 2020, 27(7): 2081–2098.
- [36] Bentolila LA, Prakash R, Mihic-Probst D, et al. Imaging of angiotropism/vascular Co-option in a murine model of brain melanoma: implications for melanoma progression along extravascular pathways [J]. Sci Rep, 2016, 6: 23834.
- [37] Perduca M, Dalle Carbonare L, Bovi M, et al. Runx2 downregulation, migration and proliferation inhibition in melanoma cells treated with BEL β -trefoil [J]. Oncol Rep, 2017, 37(4): 2209–2214.
- [38] Deiana M, Dalle Carbonare L, Serena M, et al. New insights into the runt domain of RUNX2 in melanoma cell proliferation and migration [J]. Cells, 2018, 7(11): 220.
- [39] Mathias JR, Dodd ME, Walters KB, et al. Live imaging of chronic inflammation caused by mutation of zebrafish Hai1 [J]. J Cell Sci, 2007, 120(19): 3372–3383.
- [40] Némati F, de Montron C, Lang G, et al. Targeting Bcl-2/Bcl-XL induces antitumor activity in uveal melanoma patient-derived xenografts [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e80836.
- [41] Bush JA, Li G. The role of Bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma [J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(6): 531–539.
- [42] Gabellini C, Gómez-Abenza E, Ibáñez-Molero S, et al. Interleukin 8 mediates bcl-xL-induced enhancement of human melanoma cell dissemination and angiogenesis in a zebrafish xenograft model [J]. Int J Cancer, 2018, 142(3): 584–596.

[收稿日期] 2021-08-24

李国华,李鹤龄,陈智岗,等. 酒精性肝病与肠道微生物群落研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 423-427.
Li GH, Li HL, Chen ZG, et al. Research progress on alcoholic liver diseases and gut microbiota [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 423-427.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.016

酒精性肝病与肠道微生物群落研究进展

李国华^{1,2#}, 李鹤龄^{1,2#}, 陈智岗^{1,2}, 刘海原¹, 王宏^{1,2*}

(1. 昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室, 昆明 650500;
2. 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

【摘要】 酒精性肝病与肠道微生物群落密切相关。酒精性肝病会导致肠道微生物群落失调, 而微生物群落失调又可进一步加重肝病进程。本文综述了酒精性肝病与肠道微生物群落间的关系及作用机制, 以及益生菌、益生元、合生元、后生元和噬菌体等肠道微生物及其相关产物改善或治疗肝病的研究前景。

【关键词】 酒精性肝病; 肠道微生物群落; 研究进展

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0423-05

Research progress on alcoholic liver diseases and gut microbiota

LI Guohua^{1,2#}, LI Heling^{1,2#}, CHEN Zhigang^{1,2}, LIU Haiyuan¹, WANG Hong^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China. 2. Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500)
Corresponding author: WANG Hong. E-mail: wangh@lpbr.cn

【Abstract】 Alcoholic liver diseases are closely related to gut microbiota. Alcoholic liver diseases can cause dysbiosis of gut microbiota that can affect the severity of liver disease progression. This review summarizes the research on the relationship and mechanism of gut microbiota and alcoholic liver diseases. Research of gut microbes, such as probiotics, prebiotics, synbiotics, postbiotics, and bacteriophages, and related products may improve or cure liver diseases.

【Keywords】 alcoholic liver diseases; gut microbiota; research progress

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

酒精性肝病(alcoholic liver diseases, ALD)是一类从无症状肝细胞脂肪变性发展为肝纤维化、肝硬化, 或者发展为酒精性肝炎的疾病^[1]。ALD 是慢性肝病的主要病因之一, 占美国肝硬化相关疾病死亡病例数的 48%^[2]。我国也因酗酒人数激增, 产生了大量酒精性肝病患者。寻找酒精性肝病的治疗方法和早期干预是当前需要解决的问题。

近年来的研究发现肝疾病与肠道微生物群落有密切的相关性。国内外以小鼠、大鼠及非人灵长类动物为模型进行了关于肠道菌群失调在肝损伤

中的发生发展机制的相关研究。随着对两者关系研究的不断深入, 逐渐明晰了其作用机制。本文从酒精性肝病与肠道微生物群落相关性研究进展, 存在问题及未来发展趋势几个方面进行综述, 为利用微生物治疗酒精性肝病探索有效方法。

1 酒精性肝损伤

酒精是最常见的能导致肝损伤的物质。酒精一般指乙醇, 乙醇主要利用细胞质中的醇脱氢酶代

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31960121)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(31960121).

【作者简介】 李国华(1987—), 男, 讲师, 博士, 研究方向: 人兽共患传染病。Email: ligh@lpbr.cn;

李鹤龄(1990—), 女, 兽医师, 本科, 研究方向: 动物医学。Email: lihl@lpbr.cn。

#共同第一作者

【通信作者】 王宏(1975—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 实验动物学与人类疾病动物模型研究。Email: wangh@lpbr.cn

谢为乙醛,乙醛再由乙醛脱氢酶代谢为二氧化碳和水。过量饮酒后中间产物乙醛不能及时代谢为水和二氧化碳,会与多种蛋白和 DNA 结合形成加合物,干扰多种酶活性,影响脂质代谢、DNA 复制等,导致肝损伤甚至癌变^[3]。乙醇可诱导肝细胞内质网应激,经 STING-IRF3 等信号传导通路导致肝细胞凋亡^[4]。长期摄入酒精能产生脂质过氧化物,如丙二醛、4-羟基壬烯醛等,过氧化物能与蛋白结合形成蛋白加合物,作为抗原能激活适应性免疫应答,增加肝中 T 细胞数量^[3]。乙醇能破坏肠道紧密连接完整性,使肠道通透性增强,导致内毒素容易进入血液中损伤肝^[3]。酒精性肝病也与肠道细菌过度增殖,拟杆菌和益生菌比例变低有关^[5]。

酒精性肝损伤模型是研究酒精对肝病及与肠道微生物关系的有力工具。本课题组建立了猕猴酒精肝模型,研究酒精对肝的致病机制,探索治疗酒精性肝病的新药和方法^[6],阐述了酒精性肝病和肠道微生物群落之间的相关性^[7]。

2 肠道微生物群落与酒精性肝病

肠道微生物群落与酒精性肝病密切相关,并参与肝细胞脂肪变性、脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌等病理进程。肠道微生物群落和肝互相作为彼此的物质基础,共同促进疾病的发生发展过程。

2.1 肠道微生物群落与酒精性肝病 (ALD)

酗酒是导致肝病的常见原因。临床研究表明摄入酒精影响肠道菌群的组成。而且,肠道菌群对酒精性肝损伤的发病机制也有重要作用。酗酒能诱导肠道菌群组成发生改变,虽然确切改变机制还不清楚,但菌群产物通过门静脉入血对肝损伤有重要影响^[8]。酒精具有肝毒性,因酒精导致的肝病仍是世界上最常见的疾病之一^[9]。一方面酒精通过毒性中间代谢产物乙醛刺激肝细胞,导致肝细胞脂肪变性和炎症。另一方面,肠道菌群在 ALD 中也发挥了重要作用。滥用酒精导致某些肠道菌群过度增殖,菌群失调和肠道屏障失去功能,继而细菌产生的产物(如 LPS)通过门静脉进入肝并刺激其发生炎症和代谢紊乱^[8]。

ALD、细菌的过度增殖与拟杆菌、益生菌(乳酸菌)有关,病因包括小肠运动障碍和胆酸池改变。乙醇破坏小肠紧密连接的完整性,长期滥用酒精的人肠道通透性增高,根据血浆内毒素水平较健康对照组高可以判定。动物模型中,通过基因突变、抗

生素或表达非功能性 TLR4 受体,可以降低酒精导致的肝损伤^[3]。而 Petrasek 等^[4]发现乙醇诱导内质网(ER)应激并通过干扰素基因刺激因子(STING)活化 IRF3 相关通路使肝细胞发生凋亡,STING 缺乏或 IRF3 缺乏均可防止肝细胞凋亡,说明乙醇本身也对肝病发生发展起作用。

以上研究证实肝病与肠道微生物群落密切相关。

2.2 肠道和肝相互作用的物质基础

肠道和肝通过与胆管、门静脉和循环系统紧密连接沟通,形成肠-肝轴。肝通过分泌胆酸到胆管,以及分泌许多生物活性物质到体循环中,与肠道相互作用。宿主和微生物在肠道代谢胆酸、氨基酸等内源性物质和摄入的食物等外源性物质,消化吸收后再经门静脉转运到肝进而影响功能^[10]。

胆酸与肠道微生物群落相互作用相互调节。胆酸直接控制肠道微生物群落,通过与肠细胞中的法尼醇受体(FXR)结合,诱导产生抗微生物肽,从而抑制肠道微生物过度生长,保护肠道屏障功能^[10]。胆碱在维持肝功能、脑功能、神经功能、肌肉运动和正常新陈代谢方面发挥重要作用。胆碱能被机体加工成磷脂酰胆碱,然后协助肝分泌极低密度脂蛋白(VLDL),避免肝积聚甘油三酯,防止肝细胞脂肪变性。胆碱还可以被肠道细菌转化成三甲胺(TMA),TMA 随肝门静脉到肝被转变成氧化三甲胺(TMAO),TMAO 增多会降低磷脂酰胆碱水平,进而导致甘油三酯在肝积聚,诱发肝细胞脂肪变性等一系列非酒精性脂肪肝^[10]。

游离脂肪酸(FFA)是保护肠道健康的另一类物质。游离脂肪酸包括短链脂肪酸(SCFA)和饱和长链脂肪酸(LCFA)。丁酸和丙酸是大肠中的主要短链脂肪酸,而且丁酸是肠细胞的能量来源并参与维持肠道屏障功能,保护肝不受肠道有害菌侵袭。乙醇的不完全代谢产物乙醛增加会降低肠道屏障功能,诱导肠道细菌等微生物或抗原转入肝增加损伤。以三丁酸甘油的形式补充丁酸可以减少乙醇诱导的肠道通透性增加和肝损伤,但作用机制还不清楚^[10]。

肠道屏障的主要组成是肠细胞。肠细胞间通过顶端连接蛋白紧密连接在一起,限制肠管内微生物和分子穿过,只允许营养物质通过选择性渗透或主动运输的方式穿过。黏蛋白、抗菌凝集素、sIgA 抗体和共生菌是另外几种重要的肠道屏障成分,破

坏其中 1 ~ 2 种即可损伤肠道屏障完整,使肠道发炎,菌群失调及通透性增加。阿克曼嗜黏蛋白菌 (*Akkermansia muciniphila*) 是一种定殖在肠道黏液层的革兰氏阴性厌氧菌,它通过降解黏蛋白增加肠道黏液层厚度。该菌丰度降低会使肠道黏液层变薄、炎症增强,进而促进酒精性和非酒精性肝损伤^[10-11]。

综上所述,肠道菌群与肝损伤的相关机制复杂,其发生发展是一个相互影响、相互促进的过程。肝功能受损后,肝可通过改变胆汁分泌,减少肠道血液供应及蠕动等,导致肠黏膜破坏和肠道菌群失衡。肠道菌群可通过产生毒性代谢产物如内毒素等,增加肠壁通透性、激活肝免疫应答,诱发炎症反应,进而加重肝损伤。

3 微生物治疗现状

目前肝病治疗除了用各种化药外,微生物及其代谢产物疗法也是热门方案。包括益生菌 (probiotics)、益生元 (prebiotics)、合生元 (synbiotics) 及后生元 (postbiotics) 等,使用后能不同程度改善有益微生物菌群数量、调节肠道菌群比例、增强肠道粘膜完整性、抑制有害微生物产生酒精等,发挥保肠护肝等作用。小鼠模型中,使用阿克曼嗜黏蛋白菌 (*Akkermansia muciniphila*) 和鼠李糖乳酸杆菌 GG 株 (*L. rhamnosus* GG) 能提高肠道屏障功能,降低炎症反应,改善酒精性肝损伤^[5,11]。Kirpich 等^[12] 用分叉双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) 和植物乳杆菌 8PA3 (*Lactobacillus plantarum* 8PA3) 治疗改善了患者肝损伤水平。Han 等^[13] 用含有枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 的益生菌治疗酒精性肝炎患者,结果显示粪便大肠杆菌丰度减少,内毒素血症和肝功能相关的酶水平均有改善,但炎症因子水平没有变化^[14]。果聚糖和半乳聚糖是典型的益生元,主要刺激肠道有益菌乳酸杆菌和双歧杆菌的增殖。小鼠研究显示果聚糖通过改变肠道微生物组成减少了饮食造成的肥胖、糖尿病、肝细胞脂肪变性和炎症^[15]。大鼠研究显示果聚糖使大鼠的胰岛素耐受趋于正常,并减少了子代肥胖^[16]。2017 年国际益生菌和益生元科学协会 (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP) 更新了益生元概念,定义为能被宿主微生物选择性利用并有益宿主健康的物质,拓宽了益生元的范围,如

对人来说不是益生元的纤维素却是反刍动物的益生元^[17]。利用益生菌和益生元的混合物也可促进宿主机体健康,这种益生菌-益生元的混合物被称为合生元^[18],如双歧杆菌 (*Bifidobacteria*) 和低聚果糖 (fructooligosaccharides, FOS)、双歧杆菌和低聚半乳糖 (galactooligosaccharides, GOS)、鼠李糖乳杆菌 GG 株 (*Lactobacillus rhamnosus* GG) 和菊粉 (inulins) 等。2019 年 ISAPP 更新了合生元概念,即能够促进宿主机体健康的微生物及其底物 (能被微生物利用的) 混合物,该含义为合生元的研发提供了更广阔的空间^[19]。粪菌移植 (fecal microbiota transplantation, FMT) 是将健康人粪便微生物群落移植到菌群失调患者肠道的一种疗法。FMT 最初用作艰难梭菌 (*Clostridioides difficile*) 感染患者的治疗,大量治疗案例表明 FMT 有良好治疗效果,移植菌群能稳定存在于患者肠道发挥作用^[20]。Ferrere 等^[21] 给酒精敏感小鼠移植酒精耐受性高的小鼠的新鲜粪便,饮酒结束后酒精敏感小鼠获得了与耐酒精小鼠相似的肠道微生物群落,预防了肝细胞脂肪变性、肝炎,维持了肠道平衡,显示通过粪菌移植调控肠道微生物群落可以预防酒精性肝损伤。Philips 等^[22] 选用 ALD 病人做粪菌移植预实验,结果显示肝病程度明显改善。后续针对重度酒精性肝炎患者,采用 FMT、营养疗法、皮质类固醇或己酮可可碱疗法对比治疗,结果显示 3 个月后 FMT 生存率 75%,远高于其它治疗组 (29% ~ 38%),显示 FMT 具有良好治疗优势^[23]。由于印度患者的重度酒精性肝炎患者死亡率较高,而欧美地区的死亡率较低,Schnabl^[24] 认为 Philips 的 FMT 疗法对欧美重度酒精肝患者疗效还有待进一步观察。扩大不同地区患者样本数量或者建立灵长类酒精肝疾病模型用 FMT 治疗,应是衡量 FMT 疗法的有力手段。FMT 疗法在西方世界并不是新概念,Brandt 等^[25] 和 Borody 等^[26] 记载这种方法最早在 17 世纪用于兽医治疗。古代中国也有类似的治疗方式,公元 4 世纪,东晋著名中医葛洪就描述了用人的粪汁口服治疗了病人食物中毒或严重腹泻,该方法被收录到《肘后备急方》中。公元 16 世纪,明朝医学家李时珍在中医专著《本草纲目》里也介绍了用发酵粪便悬液、新鲜粪便悬液、干粪便或婴儿粪便等有效治疗重度腹泻、发热、呕吐、便秘等病症^[27]。

微生物疗法是已被古今中外证实有效的治疗方法,这些疗法是前人丰富实践经验的总结。取得

这样的成果离不开前人善于发现,勇于尝试,善于总结的务实精神。这些疗效显著的治疗方法提示我们传统中医药中有很多宝贵经验有待发掘。我们不仅要学习前人行之有效的验方,更要学习古人善于观察,善于向大自然学习的探索精神。

4 存在问题及下一步发展趋势

肠道微生物群落与肝病之间有密切关系,科研人员从多方面证实了两者之间的相互作用,但仍有诸多问题有待研究。如大多数益生菌不能持久定殖在肠道,其机制仍不清楚,不同种类益生菌菌种间的组合对慢性肝病的效果没有系统性评价等^[28]。通过粪菌移植传播肠道病原(如诺如病毒),或者通过粪菌移植感染未知病原导致慢性病(如丙型肝炎、艾滋病等),打乱肠道微生物群落平衡(诱导肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化)等都存在潜在风险^[20]。深入研究益生菌定殖机制,以及实现体外培养有益微生物群落,避免通过粪菌移植感染有害微生物,应是益生菌治疗需要解决的几个主要问题。

后生元(postbiotics)和噬菌体(bacteriophage)是近年比较热门的研究治疗肝病的方向,有可能成为未来发展趋势。后生元是益生菌(probiotics)发酵加工后的多种代谢产物,包括短链脂肪酸(SCFAs)、细胞碎片、功能蛋白、胞外脂多糖、细胞裂解物、磷脂酸、肽聚糖源胞壁肽、菌毛类结构等^[29]。2019年,ISAPP给后生元定义为“有益宿主机体健康的灭活微生物和/或微生物体成分”^[30]。而且越来越多证据显示后生元是推动益生菌发挥保健作用的关键^[31]。后生元能调节微生物群落,增强肠上皮细胞的屏障功能,调节机体免疫应答,调节机体代谢,向神经系统传递信号来调节行为和认知功能等。后生元相比益生菌有诸多优点,如不需要考虑在肠道定殖,是无生命体,稳定性高等^[30]。

利用噬菌体调节肠道菌群也是近年来研究比较热门的方向。Duan等^[32]利用粪肠球菌噬菌体杀灭了酒精性肝病小鼠中的粪肠球菌菌群,改善了酒精性肝病。噬菌体具有感染特异性,只感染特定致病菌而不影响其它共生菌,同样是治疗肠道菌群失调非常有前景的方向。

5 总结与展望

肠道微生物群落与肝病之间的密切关系,提示我们需摆脱肝病只关注肝的局限研究思路,而应转

向全面观察相关脏器系统的整体观思路。肠-肝轴、肠-脑轴等理论的提出即是整体观最有力的表现。围绕肠-肝轴,研究人员开发了一系列动物模型来探索肝病对肠道、肠道及其微生物群落对肝的相互作用。

随着整体观的发展,我们研究和看待疾病的思路也逐渐转向把机体调整到平衡状态,而不是直接把病原微生物全部杀灭。例如,艰难梭菌在肠道过度增殖导致的腹泻,采用粪菌移植的效果就比抗生素效果好。每一个个体都是一个相对稳定的平衡体系,艰难梭菌过量表现的腹泻只是一个平衡被打破后表现出来的结果,真正的原因有可能是肠道菌群失调(制约其过度增殖的微生物群落比例太低)或机体稳态平衡被打破,如果采用抗生素杀灭艰难梭菌,而肠道菌群没有恢复平衡,依然会有别的病原微生物群落递补进来成为优势菌群,导致疾病迁延不愈。采用健康人的粪便微生物进行粪菌移植,即是借助外力来重建肠道平衡状态,健康人肠道微生物群落中有足以制衡艰难梭菌的微生物,肠道菌群逐渐平衡后艰难梭菌占比下降,腹泻即逐渐痊愈。病毒细菌等微生物早于人类亿万年就已存在,灭绝它们不现实也无必要。我们与微生物共生了很久,双方互利共赢,它们在维持人类健康过程中发挥了重要作用。即便有害微生物,在不同的环境条件下也可能转变成有益微生物造福人类,它们的存在为人类适应自然变化提供了多种可能。

参 考 文 献(References)

- [1] Bajaj JS. Alcohol, liver disease and the gut microbiota [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(4): 235-246.
- [2] Singal AK, Bataller R, Ahn J, et al. ACG clinical guideline: alcoholic liver disease [J]. Am J Gastroenterol, 2018, 113(2): 175-194.
- [3] Dunn W, Shah VH. Pathogenesis of alcoholic liver disease [J]. Clin Liver Dis, 2016, 20(3): 445-456.
- [4] Petrasek J, Iracheta-Vellve A, Csak T, et al. STING-IRF3 pathway links endoplasmic reticulum stress with hepatocyte apoptosis in early alcoholic liver disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(41): 16544-16549.
- [5] Bull-Otterson L, Feng W, Kirpich I, et al. Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of Lactobacillus rhamnosus GG treatment [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53028.
- [6] Wang H, Tan T, Wang JF, et al. Rhesus monkey model of liver disease reflecting clinical disease progression and hepatic gene expression analysis [J]. Sci Rep, 2015, 5: 15019.
- [7] Wang H, Yan Y, Yi X, et al. Histopathological features and

- composition of gut microbiota in rhesus monkey of alcoholic liver disease [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 165.
- [8] Vassallo G, Mirijello A, Ferrulli A, et al. Review article: Alcohol and gut microbiota-the possible role of gut microbiota modulation in the treatment of alcoholic liver disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015, 41(10): 917-927.
- [9] Seitz HK, Bataller R, Cortez-Pinto H, et al. Alcoholic liver disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 16.
- [10] Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, et al. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(7): 397-411.
- [11] Grander C, Adolph TE, Wieser V, et al. Recovery of ethanol-induced *Akkermansia muciniphila* depletion ameliorates alcoholic liver disease [J]. *Gut*, 2018, 67(5): 891-901.
- [12] Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, et al. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study [J]. *Alcohol*, 2008, 42(8): 675-682.
- [13] Han SH, Suk KT, Kim DJ, et al. Effects of probiotics (cultured *Lactobacillus subtilis*/*Streptococcus faecium*) in the treatment of alcoholic hepatitis: randomized-controlled multicenter study [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 27(11): 1300-1306.
- [14] Bajaj JS. Alcohol, liver disease and the gut microbiota [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(4): 235-246.
- [15] Everard A, Lazarevic V, Gaia N, et al. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity [J]. *ISME J*, 2014, 8(10): 2116-2130.
- [16] Paul HA, Bomhof MR, Vogel HJ, et al. Diet-induced changes in maternal gut microbiota and metabolomic profiles influence programming of offspring obesity risk in rats [J]. *Sci Rep*, 2016, 12(6): 20683.
- [17] Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(8): 491-502.
- [18] Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics [J]. *J Nutr*, 1995, 125(6): 1401-1412.
- [19] Swanson KS, Gibson GR, Hutkins R, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(11): 687-701.
- [20] Kelly CR, Kahn S, Kashyap P, et al. Update on fecal microbiota transplantation 2015: indications, methodologies, mechanisms, and outlook [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(1): 223-237.
- [21] Ferrere G, Wrzosek L, Cailleux F, et al. Fecal microbiota manipulation prevents dysbiosis and alcohol-induced liver injury in mice [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(4): 806-815.
- [22] Philips CA, Pande A, Shasthry SM, et al. Healthy donor fecal microbiota transplantation in steroid-ineligible severe alcoholic hepatitis: a pilot study [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2017, 15(4): 600-602.
- [23] Philips CA, Phadke N, Ganesan K, et al. Corticosteroids, nutrition, pentoxifylline, or fecal microbiota transplantation for severe alcoholic hepatitis [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2018, 37(3): 215-225.
- [24] Schnabl B. Update on the role of the gut microbiota on alcohol-associated liver disease [J]. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 2021, 17(8): 381-383.
- [25] Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, et al. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection [J]. *Am J Gastroenterol*, 2012, 107: 1079-1087.
- [26] Borody TJ, Warren EF, Leis SM, et al. Bacteriotherapy using fecal flora: toying with human motions [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2004, 38: 475-483.
- [27] Zhang FM, Luo WS, Shi Y, et al. Should we standardize the 1, 700-year-old fecal microbiota transplantation? [J]. *Am J Gastroenterol*, 2012, 107(11): 1755.
- [28] Yu LX, Schwabe RF. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(9): 527-539.
- [29] Weh CAM, Geerlings SY, Knol J, et al. Postbiotics and Their Potential Applications in early life nutrition and beyond [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4673.
- [30] Salminen S, Collado MC, Endo A, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(9): 649-667.
- [31] Mosca F, Gianni ML, Rescigno M. Can postbiotics represent a new strategy for NEC? [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1125: 37-45.
- [32] Duan Y, Llorente C, Lang S, et al. Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease [J]. *Nature*, 2019, 575(7783): 505-511.

[收稿日期] 2021-10-12

夏天吉,闫明珠,王智,等. 大小鼠失眠模型和评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 428-435.

Xia TJ, Yan MZ, Wang Z, et al. Research progress on animal models of insomnia and evaluation methods [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 428-435.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.017

大小鼠失眠模型和评价方法研究进展

夏天吉,闫明珠,王智,靳苏维,刘新民,潘瑞乐,常琪*

(中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193)

【摘要】 中国睡眠研究会 2021 年发布的数据显示我国超过 3 亿人存在睡眠障碍,而失眠是最常见的睡眠障碍。有关失眠发生机制和治疗药物的研究需涉及失眠动物模型及其相关的评价方法。本文结合文献,总结了近十年国内外常用的失眠动物模型,从物理因素、化学因素、病理因素和复合因素进行分类,分析总结其原理和特点,整理收集失眠模型的评价方法,为失眠的研究提供基础。

【关键词】 失眠;动物模型;评价方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0428-08

Research progress on animal models of insomnia and evaluation methods

XIA Tianji, YAN Mingzhu, WANG Zhi, JIN Suwei, LIU Xinmin, PAN Ruile, CHANG Qi*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Corresponding author: Chang Qi. E-mail: qchang@implad.ac.cn

【Abstract】 Data released by the Chinese Sleep Medicine Congress in 2021 showed that more than 300 million people in China have sleep disorders, of which insomnia is the most common. Research into the mechanisms of insomnia and candidate therapeutic drugs needs to involve insomnia animal models and appropriate evaluation method. This article summarizes aspects of the insomnia animal models commonly used in the past 10 years and classifies them from the perspective of physical, chemical, pathological, and multiple factors. The method used to evaluate the insomnia models are also outlined. This paper provides a resource for studies of insomnia.

【Keywords】 insomnia; animal models; evaluation methods

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

睡眠是维持机体正常功能的重要生理活动,充足、良好的睡眠可以使人恢复精力和体力。随着人们生活节奏的加快以及人口老龄化的加剧,失眠已成为当今社会普遍存在的健康问题。

失眠是指患者对睡眠时间和(或)质量不满足并影响日间社会活动的一种主观体验,主要表现为入睡困难、睡眠难以维持、过早苏醒、醒后伴有烦躁、意识不清或疲劳等^[1],长期失眠可能会引起记

忆减退、免疫功能降低、情绪障碍,甚至引发抑郁症、焦虑症、糖尿病、高血压、肥胖症、心脑血管疾病等。我国 2017 年大于 10 万样本量的流行病学统计^[2-3],失眠患病率为 15%,其中老年人患病率为 35.9%。失眠问题日益显著,因此研发能够改善睡眠的药物或保健品已成为当今热点,而相关研究需涉及动物实验,主要包括失眠动物模型的建立和评价方法。目前文献中使用较多的动物模型为大鼠

【基金项目】 国家重点研发计划(2018YFC1602105)。

Funded by National Key Research and Development Program of China (2018YFC1602105).

【作者简介】 夏天吉(1997—),女,博士研究生,研究方向:神经药理学。Email: xiatj718@163.com

【通信作者】 常琪(1962—),女,研究员,博士生导师,研究方向:神经药理、药代动力学。Email: qchang@implad.ac.cn

和小鼠。针对大小鼠失眠模型,构建方法甚多,各具特点,可应用不同角度的评价方法判断造模是否成功,同时可采用这些评价方法进行镇静催眠药物药效学的评价。本文将对常用的大小鼠失眠模型和评价方法进行综述,以期为失眠的研究提供参考。

1 失眠模型的文献分析

利用中国知网和 PubMed 数据库对近 10 年(2010.01 ~ 2021.06)发表的文献进行检索,关键词为“失眠动物模型(insomnia animal model)”、“失眠(insomnia)”、“睡眠障碍(sleep disorders)”、“睡眠剥夺(sleep deprivation)”和“睡眠干扰(sleep disturbance)”合并“大鼠(rats)”或“小鼠(mice)”,搜索后得到中文文献 1145 篇、英文文献 3470 篇。在共计 4615 篇的文献中,大部分是利用失眠动物模型进行认知、焦虑、抑郁、血压、血糖等方面的研究,而与睡眠直接相关的文献仅 506 篇,约占 11%。在 506 篇研究睡眠相关的文章中,应用物理因素造模共 213 篇,主要通过轻柔刺激法(83 篇)和平台水环境法(69 篇);化学因素造模有 227 篇,其中采用最多的是对氯苯丙氨酸(190 篇),也可利用咖啡因(20 篇)干扰睡眠;病理因素造模的文章较少,仅 20 篇;亦有采用上述多个因素相结合的造模方法,即复合因素法,有 38 篇。下面对用于睡眠相关研究的大小鼠失眠模型进行总结介绍。

2 大小鼠失眠模型的构建方法

2.1 物理因素

2.1.1 触碰法

触碰法指通过轻柔触碰动物、晃动或拍打鼠笼以干扰动物的睡眠造成动物失眠的方法。触碰的方式可为人工手动触碰,也可利用仪器,选取毛刷、杠杆或木棒进行自动触碰^[4]。晃动笼具既可手动摇晃,也可将其放在摇床或可移动的平面上以达到使动物保持清醒的目的。该方法具有刺激强度小、对动物干扰小的优点,且无持续性压力。人工干预的方法较易实施,但对实验者的专注力、体力要求较高,只适合短时间造模。若采用仪器进行自动干扰,短期或长期造模均可。Wallace 等^[5]利用此方法研究睡眠碎片化对小鼠的影响。动物放入含杠杆的鼠笼中,杠杆每 2 min 自动转动 10 s,当触碰到动物时,动物被唤醒。脑电监测结果显示,这一过程中动物的非快眼睡眠(nonrapid eye movements

sleep, NREM)和快眼睡眠(rapid eye movement sleep, REMS)时间显著减少,觉醒次数明显增加。研究多利用此方法观察不同处理的小鼠在短时睡眠剥夺后,睡眠恢复的差异性。现已成为最常用的睡眠剥夺方法。

2.1.2 平台水环境法

平台水环境法的原理是动物进入 REM 睡眠后肌肉张力消失,从平台掉落水中惊醒,造成 REM 睡眠剥夺。造模方法为将动物放在实验箱内直径较小的平台上,平台对于小鼠多设定为直径约 2 cm、高约 5 cm;对于大鼠直径约 6.5 cm,高约 8 cm。实验箱内注入自来水,水面高度距离平台面约 0.5 ~ 1 cm。此方法包括:(1)单平台法即实验笼内仅设置一个平台,可避免动物相互干扰,但会造成单笼饲养的隔离应激,甚至出现社交障碍;(2)多平台法可同时进行多只动物的 REM 睡眠剥夺^[6],并且动物可在各平台上自由活动。故多平台法应用较广泛。该方法可针对性剥夺 REM 睡眠,缺点是若造模时间过长或强度过大,可能出现动物掉落水中因体力不支无法返回平台而死亡的现象。故不适合长期且高强度造模^[7]。Machado 等^[8]应用直径为 6.5 cm 的平台,对大鼠进行单平台法和多平台法的睡眠剥夺,发现在造模期间,两种方法不仅能基本完全剥夺动物的 REM 睡眠,更显著减少慢波睡眠。

2.1.3 滚筒法

滚筒法(转轮法)的原理是将动物放入滚筒等装置中,装置自动旋转,动物被迫随装置转动而运动,导致无法入睡或短暂睡眠后觉醒。实验除设有对照组和睡眠剥夺组外,常增加强迫运动组,目的在于排除运动对动物睡眠相关指标的影响。强迫运动组的装置转速多设置为睡眠剥夺组的两倍,时间减少一半,保证充足的睡眠^[9]。此方法的特点为造模强度大,可实现完全睡眠剥夺,重复性和可靠性高,但对动物的体力消耗大,对仪器的稳定性要求较高。Dispersyn 等^[10]将小鼠放入滚筒(外径 35.6 cm,内径 20.9 cm)中,滚筒以 3 m/min 转 3 s,停 12 s 的方式自动旋转,以探究睡眠剥夺 24 h 和恢复期 48 h 内小鼠睡眠的变化。结果表明小鼠 24 h 内觉醒时间达 97%,恢复期第 1 天 7:00 ~ 19:00,小鼠 NREM 和 REM 睡眠明显反弹。

除触碰法、平台水环境法和滚筒法外,水上网格法、水上转盘法等也可应用于失眠动物的造模,但据近十年文献统计发现已较少应用。

2.1.4 慢性不可预知温和应激

慢性不可预知温和应激模型 (chronic unpredictable mild stress, CUMS), 早期又名慢性温和应激模型 (CMS), 由 Katz 等^[11] 于 1981 年首先建立。造模期间动物历经潮湿垫料、空瓶、禁食、冰水游泳、热水游泳、夹尾、昼夜颠倒、电击等操作, 最终造成快感缺失、焦虑、抑郁和学习记忆障碍等^[12]。此模型大多用于焦虑、抑郁、认知等方面的研究, 也有研究显示其会对睡眠造成影响。Mou 等^[13] 对 SD 大鼠进行 28 d 的慢性不可预知温和应激后, 向大鼠腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠, 观察到模型大鼠的睡眠时间显著缩短。Nollet 等^[14] 对小鼠进行 9 周的 CUMS 造模, 并间隔进行脑电监测。结果显示, 造模仅 3 d 即可使小鼠的 REMS 时间显著增加, 并持续至造模结束; NREMS 在整个周期内时长无显著变化, 但呈碎片化。

2.1.5 慢性束缚

束缚是将动物放入狭小的束缚装置中, 限制动物的运动空间和范围, 造成心理和生理的双重压力, 具有简单易操作、无痛且持久的特点^[15]。慢性束缚不仅使动物情绪、学习记忆等行为学指标、炎症指标发生变化^[16-17], 也可造成睡眠障碍。陆婷婷^[18] 将 ICR 小鼠放入 50 mL 离心管制成的束缚器中, 进行 3、5 或 7 d 的束缚造模, 每天 9 h 或 12 h, 并于束缚结束后腹腔注射戊巴比妥钠诱导动物入睡, 观察睡眠潜伏期和睡眠时间。束缚后的各组小鼠睡眠潜伏期均延长, 睡眠时间均缩短, 以每天束缚 9 h, 持续 7 d 最为显著。Yasugaki 等^[19] 对 C57BL/6J 小鼠进行 3 周的浸水和束缚实验, 将小鼠放入束缚管内, 垂直放入水中。每天 2 h, 每周 6 d, 并于每周第 7 天进行脑电监测。小鼠在给予 1、2 和 3 周的压力刺激后 24 h 内均显示出觉醒时间减少, NREMS 和 REMS 时间增加, 其中第 1 周结果最显著, 同时伴随 REMS 次数明显增加。

2.1.6 慢性社会挫败

慢性社会挫败动物模型模拟人在社会环境中因社会地位等问题产生的心理压力, 最终导致社交恐惧和兴趣缺失^[20]。动物模型常采用 C57BL/6J 小鼠, 将其放入 CD1 小鼠的笼中, 因 CD1 小鼠的领地中突然出现其他动物, 会攻击 C57BL/6J 小鼠。造模一般采用每天攻击 10 min, 其余时间用透明隔板隔开的方式。该方法不仅会引起动物的社交障碍, 同时会改变其睡眠节律。Henderson 等^[21] 对

C57BL/6J 小鼠进行 10 d 慢性社会挫败造模, 在第 1、3、10 天进行脑电监测。结果显示 1、3、10 d 社会挫败后 3 h 内觉醒时间显著增加, REMS 时间显著减少, NREM 睡眠减少; 造模后 10 ~ 22 h 出现睡眠反弹, 觉醒时间极显著减少, NREM 睡眠极显著增加, REM 睡眠增加。Wells 等^[22] 同样用 C57BL/6J 小鼠造成社会挫败模型, 并每日监测脑电变化。发现造模期间, 模型组 REMS 平均时间显著增加, 在第 4、5、6、7、9 天与对照组有显著性差异, REMS 次数对应增加。慢波睡眠时间也呈上升趋势, 同时伴随觉醒时间减少。

2.1.7 空瓶刺激

空瓶刺激模型由林文娟等^[23] 建立, 指动物经过定时喂水训练后, 形成条件反射, 随后进行不定时空瓶刺激, 1 d 内 1 ~ 2 次, 以诱发其情绪应激。于鑫^[24] 应用慢性情绪应激造大鼠失眠模型。大鼠经历 10 d 定时喂水训练后, 进行 14 d 空瓶刺激, 应激后大鼠睡眠总时间、慢波睡眠、REM 睡眠均缩短。

2.1.8 电击

电击是可使动物产生恐惧的压力源, 大量研究表明其会对动物的睡眠产生影响。王芳等^[25] 通过电刺激造大鼠失眠模型, 参数为电流 0.5 mA, 频率 1 Hz, 刺激 30 s 间隔 30 min, 观察到 8 h 电刺激后 SD 大鼠睡眠总时间、慢波睡眠、REM 睡眠均减少, 觉醒时间增加。Yan 等^[26] 也应用相同参数电击造模, 观察大鼠经受刺激前后睡眠的变化, 结果与上述研究一致。

触碰法、平台水环境法和滚筒法模拟因为外界环境干扰所致的睡眠不足, 根据造模时间可造成完全睡眠剥夺或部分睡眠剥夺, 使动物表现出以睡眠时间减少为特征的失眠症状。慢性不可预知温和应激、慢性束缚、慢性社会挫败、空瓶刺激和电击是通过心理和生理的双重应激, 造成动物睡眠障碍, 普遍表现为觉醒时间增加, 睡眠时间减少。然而, 经历慢性社会挫败应激的动物多表现为睡眠时间增加。此外, 创伤后应激、冲突性心理应激也可造成动物睡眠障碍, 出现失眠症状^[27-28]。

2.2 化学因素

2.2.1 对氯苯丙氨酸诱导失眠模型

对氯苯丙氨酸 (4-chloro-DL-phenylalanine, PCPA) 是色氨酸羟化酶的选择性和不可逆性抑制剂, 色氨酸羟化酶是合成 5-HT 的起始酶和限速酶。5-HT 已被证实参与睡眠-觉醒的调节中发挥重

要作用,而 PCPA 可有效阻断 95% 以上 5-HT 合成^[29]。腹腔注射 PCPA 造成失眠模型,常用的剂量为 300 ~ 500 mg/(kg · d),连续注射 1 ~ 3 d。注射 PCPA 后,动物体内 5-HT 在至少 7 d 内维持较低水平,9 d 后可基本恢复正常^[30]。该方法造模

成功率高,稳定性好,动物出现的失眠症状与人类相似,目前已广泛用于失眠动物实验的研究。本文从动物品系、周龄或体重、给药剂量和方式等方面总结近几年 PCPA 造成大小鼠失眠模型的方法,见表 1。

表 1 PCPA 造大/小鼠失眠模型的方法

Table 1 Methods of insomnia models of rats and mice caused by PCPA

类型 Type	品系 Strains	性别 Gender	周龄或体重 Age or weight	给药方式 Administration	剂量 (mg/kg) Dose (mg/kg)	给药时间 Administration time	造模结果 Results of the model	参考文献 References
小鼠 Mice	KM	雄 M	8 周 8 weeks	腹腔注射 i. p.	350	2 d	5-HT 含量下降,睡眠潜伏期延长,睡眠时间减少,慢波睡眠减少,REMS 减少,昼夜节律消失,烦躁,精神亢奋,毛发竖起且无光泽,摄食量少于正常动物。 Animals showed that the content of 5-HT, the duration of sleep, slow-wave sleep, REMS reduced. Their sleep latency prolonged and circadian rhythm disappeared. Animals were irritability and hyperactive. Erect and dull hair and less food intake of the animals were observed.	[31]
小鼠 Mice	ICR	雄 M	18 ~ 22 g	皮下注射 i. h.	350	检测前 24 h 24 h before test		[32]
小鼠 Mice	ICR	雄 M	5 周 5 weeks	皮下注射 i. h.	200	2 d		[33]
小鼠 Mice	ICR	雄/雌 M /F	6 ~ 8 周 6 ~ 8 weeks	腹腔注射 i. p.	300	2 d		[34]
大鼠 Rats	SD	雄 M	230 ~ 270 g	腹腔注射 i. p.	300	1 d		[35]
大鼠 Rats	SD	雄 M	8 ~ 9 周 8 ~ 9 weeks	腹腔注射 i. p.	300	2 d		[36]
大鼠 Rats	SD	雄 M	180 ~ 220 g	腹腔注射 i. p.	350	6 d		[37]

2.2.2 咖啡因诱导失眠模型

咖啡因是腺苷 A₁ 和 A_{2A} 受体的拮抗剂,其对二者的亲和力相似,无选择性。咖啡因在体内进一步被代谢为黄嘌呤和茶碱,其代谢物可更有效地拮抗 A₁ 和 A_{2A} 受体^[38]。腺苷通过与 A₁ 和 A_{2A} 受体结合发挥促进睡眠的作用,故摄入咖啡因后会对睡眠造成影响。该方法非常经典,具有安全性高、成本低、作用明确的优点。但腺苷 A_{2A} 受体基因的功能多态性会导致咖啡因损害睡眠质量的个体差异^[39],造成实验数据波动较大。咖啡因的造模剂量多选用 5 ~ 15 mg/kg,也可使用 25、30 或 50 mg/kg 等较高剂量。在睡眠实验检测前 30 ~ 60 min 腹腔注射咖啡因,可成功影响动物的睡眠。总结近几年采用咖啡因造模的文献,如表 2 所示。

PCPA 和咖啡因造模都会导致动物觉醒时间增加,入睡潜伏期延长和睡眠时间减少,其中 REMS、NREMS 均减少。除腹腔注射 PCPA 和咖啡因外,给予动物乙醇,形成乙醇依赖,戒断后可造成动物觉醒时间增加,REM、NREM 睡眠时间显著减少^[46]。

中枢微量注射去甲肾上腺素、食欲素或促肾上腺皮质激素释放激素等,皮下注射阿朴吗啡、氟西汀或育亨宾等同样可导致动物失眠^[47]。

2.3 病理因素

慢性疼痛常引发失眠,现常采用坐骨神经部分结扎造神经痛模型,研究动物睡眠的变化。模型动物表现出觉醒时间、次数增加,NREM、REM 睡眠时间及次数减少^[48-49]。

此外,精神类疾病如抑郁症、焦虑症、创伤后应激综合症、癫痫、自闭症等也会引发失眠,高血压、缺血性中风同样会抑制睡眠。

2.4 复合因素

根据研究目的不同,常采用多种诱因的复合因素造成失眠模型。应用线栓法(MCAO)和 PCPA 联合造模研究脑缺血后睡眠障碍,双侧颈总动脉闭塞(BCCAO)和平台水环境法造模研究慢性脑缺血伴发失眠,去势或卵巢切除联合电刺激或触碰等方法研究激素水平降低导致的失眠。负重游泳和 PCPA 模拟运动性失眠大鼠。

表 2 咖啡因造大/小鼠失眠模型的方法

Table 2 Methods of insomnia models of rats and mice caused by caffeine								
类型 Type	品系 Strains	性别 Gender	周龄或体重 Age or weight	给药方式 Administration	剂量(mg/kg) Dose(mg/kg)	给药时间 Administration time	造模结果 Results of the model	参考文献 References
小鼠 Mice	ICR	雄 M	18 ~ 22 g	腹腔注射 i. p.	7. 5	检测前 30 min 30 min before test		[32]
小鼠 Mice	ICR	雄 M	4 周 4 weeks	腹腔注射 i. p.	10、50	检测前 Before test	觉醒时间增加,睡眠潜伏期延长,总睡眠时间减少,NREMS 减少,空场实验运动路程增加。	[40]
小鼠 Mice	C57BL/6N	雄 M	11 周 11 weeks	灌胃 i. g.	25	检测前 Before test	Animals showed that the duration of wake and sleep latency prolonged,	[41]
小鼠 Mice	C57BL/6	雄 M	6 周 6 weeks	腹腔注射 i. p.	15	检测前 10 min 10 min before test	the sleep time and NREM sleep time reduced. In open field test, the animals ' movement distance increased.	[42]
小鼠 Mice	KM	雄 M	23 ~ 27 g	腹腔注射 i. p.	7. 5	检测前 30 min 30 min before test		[43]
大鼠 Rats	SD	雄 M	8 周 8 weeks	灌胃 i. g.	10	检测前 Before test		[44]
大鼠 Rats	SD	雄 M	260 ~ 320 g	腹腔注射 i. p.	7. 5	检测前 Before test		[45]

此外,郅红利等^[50]采用母乳鼠分离、多种焦虑刺激和注射 PCPA 造心肾不交大鼠失眠模型,动物表现为睡眠时间减少,血象水平降低,下丘脑-垂体-肾上腺轴紊乱。何博赛^[51]通过对 Wistar 大鼠连续 5 d 腹腔注射 50 mg/(kg·d) 氢化可的松,再连续 4 d 腹腔注射 300 mg/(kg·d) PCPA,动物出现弓腰无力、毛发少光泽、睡眠减少等现象,造成肝阴虚-失眠模型。林腊梅^[52]建立肝血虚失眠模型,切除 SD 大鼠全肝的 70%且恢复后,利用平台水环境法进行 72 h REM 睡眠剥夺,动物呈现口唇、爪甲淡粉色,爪甲欠光滑,目光呆滞、反应迟钝等状态。黄攀攀等^[53]对动物连续 28 d 皮下注射 D-半乳糖 60 mg/(kg·d),叠加 8 d 腹腔注射咖啡因 30 mg/(kg·d),再利用多平台水环境法进行 7 d 睡眠剥夺,造成大鼠的睡眠时间减少、心率加快、血压升高、耳温升高,成功建立老年阴虚失眠动物模型。朱洁等^[54]采用夹尾和注射 PCPA 复合法造大鼠肝郁证失眠模型,连续 20 d 每天夹尾 45 min,叠加连续 2 d 腹腔注射 400 mg/(kg·d) PCPA。何林熹等^[55]采用慢性束缚法复合夹尾 15 d 造成肝郁化火证失眠大鼠模型。

3 评价方法

常用的评价方法为巴比妥类药物协同睡眠实验,空场实验和脑电、肌电或眼动监测。这些方法既可用于评价失眠模型,也可用于药效学评价。巴比妥类药物协同睡眠实验可初步判断动物的睡眠情况,实验操作简单、成本低,但结果指标较少。空场实验是通过观察动物一定时间内的运动参数,判断其生理状态,多用于镇静催眠药物的评价。脑电

和肌电监测可直接将动物的睡眠状态通过波形、波频率等指标呈现,但实验操作复杂,对实验环境要求高。

3.1 巴比妥类药物协同睡眠实验

巴比妥类药物是常用的催眠药物,可应用其来诱导动物入睡,通过观察动物的行为得到有效结果。实验分为 3 类:戊巴比妥钠阈下剂量协同睡眠实验观察动物的入睡率、戊巴比妥钠阈上剂量协同睡眠实验观察睡眠时间、巴比妥钠(或戊巴比妥钠)实验观察入睡潜伏期。阈下剂量指 80% ~ 90% 动物翻正反射不消失的戊巴比妥钠最大剂量,阈上剂量指动物 100% 入睡的戊巴比妥钠最小剂量。此外,巴比妥类药物硫喷妥钠等也可用于该实验。

动物入睡以翻正反射消失为判断标准。给药后待动物基本停止运动时,对其体位进行翻转,即呈仰卧位,若动物 30 min 内仰卧位达 60 s 以上,判断其翻正反射消失进入睡眠状态。一段时间后,当翻正反射首次恢复时,立即将其翻转成仰卧位,30 s 内若再次恢复,判断为动物觉醒,并记录首次恢复翻正反射的时间为睡眠终止时间;若 30 s 内未恢复,则在动物翻正反射再次恢复后重复翻转,直至判定为睡眠结束^[56]。

3.2 空场实验

空场实验是将动物放入实验箱的中心,适应 2 ~ 5 min 后,记录并分析动物在一段时间内(一般为 5 ~ 15 min)的运动路程、运动时间、站立次数和运动轨迹等指标,或对动物穿越网格数或直立次数进行水平、垂直评分以反映动物的自主活动情况。失眠动物常表现为自主活动增加,而给予动物镇静催

眠药物后,则表现为自主活动减少。

3.3 脑电图、肌电图、眼点图

脑电图(EEG)和肌电图(EMG)监测是将动物麻醉,插入电极,恢复 7 ~ 14 d 后,通过 EEG、EMG 观察并统计动物觉醒、REM 睡眠、NREM 睡眠时长,时相出现次数、持续时间、转换次数等指标。失眠动物常表现为睡眠总时间缩短,觉醒增加,各相睡眠时间不同程度缩短;睡眠呈碎片化,即时相出现次数、转换次数增多,持续时间缩短;波形与正常动物存在差异。脑电图(EEG)和肌电图(EMG)可准确反映睡眠过程,为最直接、可靠的评价方法,同时也可应用眼点图(EOG)进行辅助研究。

4 小结和展望

理想的动物模型需遵循以下原则,动物疾病模型与人类疾病具有相似的发生、发展过程,具备该疾病的主要症状和体征,针对药物治疗,与人类疾病具有相似的反应,模型可重复。常用的大鼠、小鼠失眠模型从不同角度模拟人类失眠特征。物理因素造模模拟外界环境刺激,例如触碰、滚筒、束缚和社会挫败等模拟心理生理压力造成的失眠;化学因素造模针对特异性靶点,使动物出现失眠症状;病理、复合因素模拟各种原因伴发的失眠。然而,人类的失眠原因复杂,失眠动物模型仍存在一定局限性,需进一步研发和摸索。仅应用物理因素或化学因素造模,无法全面模拟人类失眠的特征,可依据不同的实验要求选择复合因素造模。复合因素造模应明确各个因素的意义,避免盲目选择。针对方法学研究,应进一步详细和清晰造模方法的时间和强度以及影响睡眠的程度,为今后的科学研究提供有力的理论依据。

常用的评价方法为巴比妥类药物协同睡眠实验、空场实验和脑电、肌电监测。目前的评价手段较单一,且存在诸多问题。巴比妥类药物协同睡眠实验中,关键的判断指标为翻转反射消失,但手动翻转动物这一操作对实验数据有一定主观影响。空场实验中,若采用常规实验时长 5 ~ 15 min,无法全面反映动物在整个睡眠周期中的行为学改变,无法真实反映动物的睡眠情况。脑电、肌电监测需在动物脑内插入电极,会造成创伤而影响实验结果。故针对现存的问题,需研发新型仪器设备或改进实验方法。例如通过仪器对动物进行翻转以判断是否入睡,进行长时间睡眠监测;研究新的实验方法,

通过动物的行为学指标判断睡眠情况,避免造成创伤,更加科学地进行评价,为失眠动物模型、新型镇静催眠药物的研发和睡眠的相关研究奠定基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Cunnington D, Junge MF, Fernando AT. Insomnia: Prevalence, consequences and effective treatment [J]. Med J Aust, 2013, 199(8): 36-40.
- [2] Cao XL, Wang SB, Zhong BL, et al. The prevalence of insomnia in the general population in China: A meta-analysis [J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0170772.
- [3] Li L, Wang SB, Rao W, et al. The prevalence of sleep disturbances and sleep quality in older chinese adults: a comprehensive meta-analysis [J]. Behav Sleep Med, 2019, 17(6): 683-697.
- [4] Lemons A, Saré RM, Beebe Smith C. Chronic sleep deprivation in mouse pups by means of gentle handling [J]. J Vis Exp, 2018, 140: 58150.
- [5] Wallace E, Kim DY, Kim KM, et al. Differential effects of duration of sleep fragmentation on spatial learning and synaptic plasticity in pubertal mice [J]. Brain Res, 2015, 1615: 116-128.
- [6] Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Comparison of the sleep pattern throughout a protocol of chronic sleep restriction induced by two methods of paradoxical sleep deprivation [J]. Brain Res Bull, 2006, 70(3): 213-220.
- [7] Mehta R, Khan S, Mallick BN. Relevance of deprivation studies in understanding rapid eye movement sleep [J]. Nat Sci Sleep, 2018, 10: 143-158.
- [8] Machado RB, Hipólido DC, Benedito-Silva AA, et al. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery [J]. Brain Res, 2004, 1004(1-2): 45-51.
- [9] Roman V, Van der Borght K, Leemburg SA, et al. Sleep restriction by forced activity reduces hippocampal cell proliferation [J]. Brain Res, 2005, 1065(1-2): 53-59.
- [10] Dispersyn G, Sauvet F, Gomez-Merino D, et al. The homeostatic and circadian sleep recovery responses after total sleep deprivation in mice [J]. J Sleep Res, 2017, 26(5): 531-538.
- [11] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1981, 5(2): 247-251.
- [12] Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage [J]. Neurobiol Stress, 2017, 6: 78-93.
- [13] Mou Z, Huang Q, Chu SF, et al. Antidepressive effects of ginsenoside Rg1 via regulation of HPA and HPG axis [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92: 962-971.
- [14] Nollet M, Hicks H, McCarthy AP, et al. REM sleep's unique associations with corticosterone regulation, apoptotic pathways, and behavior in chronic stress in mice [J]. Proc Natl Acad Sci U

- S A, 2019, 116(7): 2733–2742.
- [15] Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2009, 33(7): 1089–1098.
 - [16] Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, et al. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2012, 39(1): 112–119.
 - [17] Ngoupaye GT, Yassi FB, Bahane D, et al. Combined corticosterone treatment and chronic restraint stress lead to depression associated with early cognitive deficits in mice [J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(2): 421–431.
 - [18] 陆婷婷. 佩兰和远志精油的镇静催眠功效研究 [D]. 上海: 上海交通大学; 2017.
Lu TT. Sedative-hypnotic efficacy of *Eupatorium Fortunei* Turcz. and *Polygala tenuifolia* Willd. essential oil research [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University; 2017.
 - [19] Yasugaki S, Liu CY, Kashiwagi M, et al. Effects of 3 weeks of water immersion and restraint stress on sleep in mice [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1072.
 - [20] Berton O, McClung CA, Dileone RJ, et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress [J]. *Science*, 2006, 311(5762): 864–868.
 - [21] Henderson F, Vialou V, El Mestikawy S, et al. Effects of social defeat stress on sleep in mice [J]. *Front Behav Neurosci*, 2017, 11: 227.
 - [22] Wells AM, Ridener E, Bourbonnais CA, et al. Effects of chronic social defeat stress on sleep and circadian rhythms are mitigated by kappa-opioid receptor antagonism [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(32): 885–817.
 - [23] 林文娟, 王玮雯, 邵枫. 慢性情绪应激对大鼠行为、神经内分泌和免疫反应的影响: 一个新的情绪应激模型 [J]. *科学通报*, 2003, 48(9): 926–929.
Lin WX, Wang WW, Shao F. The effect of chronic emotional stress on rat behavior, neuroendocrine and immune response: a new emotional stress model [J]. *Sci Bull*, 2003, 48(9): 926–929.
 - [24] 于鑫. 慢性情绪应激所致大鼠睡眠剥夺模型复制及酸枣仁的干预作用研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2012.
Yu X. Replicate the rats sleep deprivation model induced by chronic emotional stress and study on the interventional effect of *Semen Ziziphi Spinosae* [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2012.
 - [25] 王芳, 刘子冬, 张星, 等. 柴桂安神胶囊治疗失眠的药效学研究 [J]. *西北药学杂志*, 2014, 29(3): 270–272.
Wang F, Liu ZD, Zhang X, et al. Pharmacodynamic study of Chaigui Anshen Capsules in the treatment of insomnia [J]. *Northwest Pharm J*, 2014, 29(3): 270–272.
 - [26] Yan X, Zhang Z, Xu F, et al. Effect of Sini San Freeze-dried powder on sleep-waking cycle in insomnia rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(5): 572–575.
 - [27] Philbert J, Pichat P, Beeské S, et al. Acute inescapable stress exposure induces long-term sleep disturbances and avoidance behavior: A mouse model of post-traumatic stress disorder (PTSD) [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 221(1): 149–154.
 - [28] 徐瑞鑫. 冲突性心理应激所致大鼠睡眠障碍的中枢 5-HT 的机制研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2013.
Xu RX. The mechanism of 5-HT in conflictive psychological stress on rats' sleep phrase and sleep rhythm [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2013.
 - [29] Khanna JM, Kalant H, Le AD, et al. Effect of modification of brain serotonin (5-HT) on ethanol tolerance [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1979, 3(4): 353–358.
 - [30] 郭海波, 王慧. 对氯苯丙氨酸在动物失眠模型中的应用概述 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(6): 135–140.
Guo HB, Wang H. Application of para-chlorophenylalanine in animal models of insomnia [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(6): 135–140.
 - [31] Lv YB, Zhou Q, Yan JX, et al. Enzymolysis peptides from *Mauremys mutica* plastron improve the disorder of neurotransmitter system and facilitate sleep-promoting in the PCPA-induced insomnia mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 274: 114047.
 - [32] Shi R, Han Y, Yan Y, et al. Loganin exerts sedative and hypnotic effects via modulation of the serotonergic system and GABAergic neurons [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 409.
 - [33] Oh DR, Kim Y, Jo A, et al. Sedative and hypnotic effects of *Vaccinium bracteatum* Thunb. through the regulation of serotonergic and GABAergic systems: Involvement of 5-HT_{1A} receptor agonistic activity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2218–2227.
 - [34] Zhong Y, Zheng Q, Hu P, et al. Sedative and hypnotic effects of *Perilla frutescens* essential oil through GABAergic system pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 279(6): 113627.
 - [35] He W, Liu G, Cai H, et al. Integrated pharmacokinetics of five protoberberine-type alkaloids in normal and insomnic rats after single and multiple oral administration of Jiao-Tai-Wan [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(3): 635–644.
 - [36] 曾雪爱, 周春权, 张一帆, 等. 松郁安神方镇静催眠作用及对失眠模型大鼠前列腺素 D₂ 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(9): 4646–4648.
Zeng XA, Zhou CQ, Zhang YF, et al. Hypnotic effect of Songyu Anshen Formula and effect on levels of hypothalamic PGD₂ in insomnia rats [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(9): 4646–4648.
 - [37] 石鹏, 滕柳, 郭海波, 等. PCPA 对大鼠大脑皮质 P450_{sec}、CB1R、MAP2 基因表达的影响及酸枣仁汤的干预作用研究 [J]. *亚太传统医药*, 2021, 17(2): 14–17.
Shi P, Teng L, Guo HB, et al. The effect of PCPA on the expression of P450_{sec}, CB1R, MAP2 genes in the cerebral cortex of rats and the intervention of Suanzaoren decoction [J]. *Asia Pac Tradit Med*, 2021, 17(2): 14–17.

- [38] Lazarus M, Chen JF, Huang ZL, et al. Adenosine and sleep [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2019, 253: 359–381.
- [39] Landolt HP. Individuelle Koffeinempfindlichkeit: Implikationen für eine personalisierte Schlafmedizin? [Self-rated Caffeine Sensitivity; Implications for Personalized Sleep Medicine?] [J]. *Praxis (Bern 1994)*, 2016, 105(10): 563–568.
- [40] Ko YH, Shim KY, Lee SY, et al. Evodiamine reduces caffeine-induced sleep disturbances and excitation in mice [J]. *Biomol Ther*, 2018, 26(5): 432–438.
- [41] Kwon S, Yoon M, Lee J, et al. A Standardized phlorotannin supplement attenuates caffeine-induced sleep disruption in mice [J]. *Nutrients*, 2019, 11(3): 556.
- [42] Lin A, Shih CT, Huang CL, et al. Hypnotic effects of lactobacillus fermentum PS150TM on pentobarbital-induced sleep in mice [J]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2409.
- [43] Zhang C, Zhao X, Mao X, et al. Pharmacological evaluation of sedative and hypnotic effects of schizandrin through the modification of pentobarbital-induced sleep behaviors in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 744: 157–163.
- [44] Kim S, Jo K, Hong KB, et al. GABA and l-theanine mixture decreases sleep latency and improves NREM sleep [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 65–73.
- [45] Jang HS, Jung JY, Jang IS, et al. L-theanine partially counteracts caffeine-induced sleep disturbances in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012, 101(2): 217–221.
- [46] Sharma R, Engemann S, Sahota P, et al. Role of adenosine and wake-promoting basal forebrain in insomnia and associated sleep disruptions caused by ethanol dependence [J]. *J Neurochem*, 2010, 115(3): 782–794.
- [47] Hajnik T, Tóth A, Szalontai Ö, et al. Sleep loss and recovery after administration of drugs related to different arousal systems in rats [J]. *Physiol Int*, 2016, 103(3): 271–289.
- [48] Wu YE, Li YD, Luo YJ, et al. Gelsemine alleviates both neuropathic pain and sleep disturbance in partial sciatic nerve ligation mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(11): 1308–1317.
- [49] 王天笑. 普瑞巴林对神经病理性疼痛模型小鼠镇痛催眠作用的影响 [D]. 芜湖: 皖南医学院; 2014.
- Wang TX. Antinociceptive and hypnotic activities of pregabalin in a neuropathic pain-like model of mice [D]. Wuhu: WanNan Medical College; 2014.
- [50] 郜红利, 涂星, 卢映, 等. 心肾不交所致失眠大鼠模型 [J]. *中成药*, 2014, 36(6): 1138–1141.
- Gao HL, Tu X, Lu Y, et al. Rat model for insomnia caused by heart-kidney imbalance [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2014, 36(6): 1138–1141.
- [51] 何博赛. 基于内源性物质的酸枣仁汤有效部位确定与相关成分药动力学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学; 2013.
- He BS. Screening of active fractions in Suanzaoren decoction according to endogenous substance and study on pharmacokinetics in rats [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University; 2013.
- [52] 林腊梅. 酸枣仁汤对肝血虚失眠模型大鼠神经递质的影响 [D]. 武汉: 湖北中医药大学; 2014.
- Lin LM. Effects of Suanzaorentang on neurotransmitters expression in the Liver blood deficiency insomnia model rats [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine; 2014.
- [53] 黄攀攀, 王平, 李贵海, 等. 老年阴虚失眠动物模型的建立与评价 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(8): 1719–1723.
- Huang PP, Wang P, Li GH, et al. Establishment and evaluation on a Yin-weakness syndrome model of insomnia in senile rats [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2010, 28(8): 1719–1723.
- [54] 朱洁, 申国明, 汪远金, 等. 肝郁证失眠大鼠模型的建立与评价 [J]. *中医杂志*, 2011, 52(8): 689–692.
- Zhu J, Shen GM, Wang YJ, et al. Establishment and evaluation of insomnia rat model with liver depression syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2011, 52(8): 689–692.
- [55] 何林熹, 诸毅晖, 杨翠花, 等. 失眠肝郁化火证大鼠模型的建立及其评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(9): 3890–3894.
- He LX, Zhu YH, Yang CH, et al. Establishment and evaluation of insomnia rat model with syndrome of liver depression transforming into fire [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(9): 3890–3894.
- [56] Crabbe JC, Metten P, Ponomarev I, et al. Effects of genetic and procedural variation on measurement of alcohol sensitivity in mouse inbred strains [J]. *Behav Genet*, 2006, 36(4): 536–552.

李惠,赵菊梅,师长宏. 基于肠道菌群的免疫调节策略用于结直肠癌联合治疗研究的进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30 (3): 436-443.

Li H, Zhao JM, Shi CH. Research progress of intestinal flora immunomodulation combined therapy for colorectal cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 436-443.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.018

基于肠道菌群的免疫调节策略用于结直肠癌联合治疗研究的进展

李惠^{1,2}, 赵菊梅^{1*}, 师长宏^{2*}

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

【摘要】 肠道菌群可形成特殊的免疫微环境,通过免疫调节机制影响结直肠癌的发生、发展和治疗。本文综述了肠道菌群用于结直肠癌免疫调节治疗的研究进展,回顾了肠道菌群与宿主免疫、肿瘤免疫的关系,重点分析了相关动物实验和临床试验的结果,总结了基于肠道菌群免疫调节联合疗法用于结直肠癌治疗的机制和策略,期望为结直肠癌的治疗提供新的参考。

【关键词】 肠道菌群;结直肠癌;免疫调节;联合治疗;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0436-08

Research progress of intestinal flora immunomodulation combined therapy for colorectal cancer

LI Hui^{1,2}, ZHAO Jumei^{1*}, SHI Changhong^{2*}

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

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

【Abstract】 Intestinal flora form a specialized immune microenvironment that affects the occurrence and development of colorectal cancer through immunoregulation. Here, we review the research progress of intestinal flora in immune regulation therapy for colorectal cancer and summarize the relationship between intestinal flora and host or tumor immunity. Moreover, we analyzed the result of related animal experiments and clinical trials and introduce the mechanism and strategy of combination therapy based on intestinal flora immunomodulation for the treatment of colorectal cancer. Thus, this review may provide a reference for the treatment of colorectal cancer.

【Keywords】 intestinal flora; colorectal cancer; immunoregulation; combined treatment; animal models

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

人类肠道菌群由 $10^{13} \sim 10^{14}$ 种微生物组成,基因组包含的基因数约是人类自身基因组的 100 倍,被称为人类的“第二基因组”,它们与宿主细胞以多种方式相互作用,例如代谢、免疫调节等^[1]。肠道菌群通过诱导结肠组织的异常免疫反应削弱肠道上皮屏障,形成特殊的免疫微环境,在疾病的发生、

【基金项目】 陕西省科技资源开放共享平台项目(2021PT-037),实验动物专项课题(SYDW2017-02)。
Funded by Scientific and Technological Resources Open Sharing Platform Project of Shaan Xi Province (2021PT-037), Special Subject of Experimental Animals(SYDW2017-02).

【作者简介】 李惠(1994—),女,硕士,研究方向:人类疾病动物模型。Email:1228559790@qq.com

【通信作者】 师长宏,男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型研究。Email:changhong@fmmu.edu.cn;
赵菊梅,女,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。Email:jmz2003.stu@163.com。
* 共同通信作者

发展中发挥非常重要的作用。研究证明具核梭杆菌、产肠毒素脆弱拟杆菌和大肠杆菌等均与结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的发生、发展有一定的相关性^[2]。Yang 等^[3]最新研究发现,肠道菌群以脂多糖(LPS)作为触发器,以趋化因子依赖的方式调节单核细胞样巨噬细胞的积累,产生癌前炎症环境,促进肿瘤发生。肠道菌群免疫调节联合免疫治疗、放化疗等手段在 CRC 的治疗中也获得了较好的效果。在免疫治疗中,生菌群通过激活 TLR4(Toll-like receptor 4),刺激肿瘤相关髓系细胞产生炎症细胞因子,从而改善患者的预后^[4]。除此之外,已证明含有链球菌、乳杆菌和双歧杆菌属的制剂具有抗辐射保护作用^[5]以及肠道菌群对化疗药物疗效和毒性具有调节作用^[6]。总之,这些研究阐明了肠道菌群可以影响结直肠癌的发生和治疗。

随着菌群测序和组学技术的发展,肠道菌群逐渐成为 CRC 筛查和预测的生物标志物。此外,肠道菌群联合疗法还可提高 CRC 治疗疗效和减少毒副作用。本文就肠道菌群的免疫调节作用进行综述和讨论,包括肠道菌群与宿主免疫;肠道菌群与肿瘤免疫;重点分析了相关动物实验和临床试验的结果;讨论了肠道菌群联合疗法在 CRC 治疗中的作用机制和策略,并提出了肠道菌群应用于临床前面临的挑战,期望为 CRC 联合肠道菌群免疫调节治疗提供良好的策略。

1 肠道菌群与宿主免疫

哺乳动物肠道内寄居的菌群大多数与宿主互利共生,宿主为肠道菌群提供了生长和繁殖所必须的场所和营养,并参与调节宿主正常发育^[7]。最新研究发现孕中期的胎儿组织器官中存在免疫细胞,通过组织培养分离出葡萄球菌和乳杆菌等菌属的细菌,这些细菌能在体外诱导胎儿肠系膜淋巴结记忆 T 细胞活化,提示胎儿体内的细菌在早期免疫发育中的潜在作用^[8]。Bouskra 等^[9]研究发现,无菌小鼠的肠道相关淋巴组织(隐窝结节和孤立淋巴滤泡)发育不成熟,而肠道菌群可促进孤立淋巴滤泡发育,其中革兰氏阴性菌对孤立淋巴滤泡的发育起重要作用。

肠道菌群及其代谢物可影响免疫系统的功能。Schaupp 等^[10]研究发现肠道菌群在稳定状态下控制浆细胞样树突状细胞产生 I 型干扰素(interferon-I, IFN-I),而无菌动物的 pDCs 无法启动适应性免疫反

应。肠道菌群代谢物短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)可以调节固有免疫细胞和适应性免疫细胞的产生和功能,其中丁酸可直接作用于肠道粘膜免疫细胞,主要抑制巨噬细胞、中性粒细胞、树突细胞和效应 T 细胞的活性,增加调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)的数量及活性^[11]。肠道菌群代谢物丁酸盐可通过作用于短链脂肪酸受体 1(GPR41)及短链脂肪酸受体 3(GPR43)促进活化 CD8⁺ T 细胞的代谢,增强其记忆潜能。无菌小鼠中抗原活化后的 CD8⁺ T 细胞则无法分化成为记忆性 T 细胞^[12]。SCFA 还可减少巨噬细胞、中性粒细胞及树突细胞的募集和迁移,并抑制 T 细胞和 B 细胞的分化,以调节免疫应答和炎症^[13]。更多有关肠道菌群及其代谢物影响免疫系统的研究见表 1。

肠道菌群对宿主免疫系统发育及功能维持至关重要,然而有些细菌可导致免疫失衡,从而诱发 CRC。产肠毒素脆弱拟杆菌会增加上皮细胞的通透性、破坏黏膜屏障,产生炎症,诱发肿瘤^[24]。Kostic 等^[25]研究发现,具核梭杆菌(Fn)喂养 8 周后的 Apc^{Min/+}小鼠能够选择性的增加 CD11b⁺髓样细胞,包括骨髓抑制细胞(MDSCs)、肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)和 DCs,这些细胞能够抑制 T 细胞功能,从而促进肿瘤发展。James 等^[26]第一个详细的人类结肠免疫细胞和肠道细菌图谱,显示了结肠中肠道菌群和免疫细胞的变化,该图谱可作为“人类细胞图谱”计划的其中一部分,将推进对结肠特定区域病变的研究,例如溃疡性结肠炎和结直肠癌。

2 肠道菌群与肿瘤免疫

肠道免疫环境中存在着大量淋巴细胞和髓系来源的免疫细胞,在肠道局部免疫平衡和系统免疫平衡的维持中具有重要作用^[27]。当肠道菌群失衡时,人体免疫稳态也会产生紊乱,这些免疫环境的改变可能与 CRC 发生有一定关系。科学家们试图将特定的菌群与 CRC 相联系,然而至今,肠道菌群影响 CRC 发生和发展的机制仍待继续研究。在此,本节将汇总分析与 CRC 发生和发展有关的菌群及相应的免疫机制。

2.1 产肠毒素脆弱拟杆菌

产肠毒素脆弱拟杆菌(*Enterotoxin-producing Bacteroides fragilis*, ETBF)可通过释放毒素,导致肠上皮脱落和 γ 依赖的 E-钙黏蛋白裂解^[28]。ETBF 除了作用于上皮屏障外,还可作用于免疫细胞和免

表 1 肠道菌群及其代谢物对免疫系统的影响

Table 1 Role of intestinal microbiota and metabolites on immune system

免疫应答 Immune response	肠道菌群及其代谢物 Bacteria/bacterial metabolites	免疫系统 Immune system components	主要研究成果 Major findings
固有免疫 Innate immunity	共生菌群 Commensal microbiota	固有免疫系统 Innate immunity	分解吲哚衍生物促进芳烃受体 (AhR) 介导的屏障功能 ^[14] Decomposition of indole-derivatives by commensals promote barrier functions mediated by AhR ^[14]
	分节丝状菌 Segmented filamentous bacteria	先天淋巴细胞 Innate lymphoid cells	提高先天性淋巴细胞 3 (ILC3) 产生 IL-22 ^[15] Increased production of IL-22 by congenital lymphocyte 3 (ILC3) ^[15]
	短链脂肪酸 SCFAs	肠上皮细胞 Intestinal epithelial cells	通过孕烷 X 受体 (PXR) 强化上皮屏障功能 ^[16] SCFAs intensify epithelial barrier function through PXR ^[16]
		肠上皮细胞 Intestinal epithelial cells	丁酸盐可使促炎细胞因子在肠上皮细胞中的表达下调 ^[17] Butyrate can down-regulate the expression of pro-inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells ^[17]
	艾克曼菌和海氏肠球菌 Eckman and Enterococcus hirshii	树突状细胞 Dendritic cells	诱导 DC 释放 IL-12 ^[18] Induced DC to release IL-12 ^[18]
	梭状芽孢杆菌 Clostridia	调节性 T 细胞 Tregs	诱导 Treg 分化及 IL-10 的表达 ^[19] Clostridium induces Treg differentiation and their expression of IL-10 ^[19]
适应性免疫 Adaptive immunity	脆弱拟杆菌 Bacteroides fragilis	调节性 T 细胞 Tregs	通过 TLR2 诱导 Foxp3 ⁺ Tregs, 并抑制 TH17 反应 ^[20] B. fragilis requires TLR2 to induce Foxp3 ⁺ Tregs and actively suppresses TH17 responses ^[20]
		CD4 ⁺ T 细胞和 Th1 细胞 CD4 ⁺ T cells and Th1 cells	产生多聚糖 A 诱导 CD4 ⁺ T 和 Th1 细胞在体循环中积累 ^[21] Production of PSA by B. fragilis induces accumulation of CD4 ⁺ T and Th1 cells in circulation ^[21]
	双歧杆菌 Bifidobacterium	Th17 细胞 Th17 cells	诱导 Th17 细胞的积累 ^[22] B. adolescentis induces accumulation of Th17 cells ^[22]
		树突状细胞 Dendritic cells	改善肿瘤特异性 CD8 ⁺ T 细胞的效应功能 ^[23] Bifidobacterium can improved effector function of tumor-specific CD8 ⁺ T cells ^[23]

疫分子。ETBF 通过激活 TLR, 增加白介素 - 6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 并进一步激活转录因子 3 (STAT3) 和核因子- κ B (NF- κ B), 抑制抗肿瘤免疫, 促使肿瘤发生^[29]。动物实验发现, ETBF 感染的 APC^{min/+} 小鼠在 2 周内发生肿瘤, 进一步研究发现, ETBF 是通过激活小鼠体内 STAT3 诱导促癌 Th17 细胞产生 IL-17, 进而诱导黏膜应答, 抑制抗肿瘤免疫, 导致肿瘤发生^[30]。

2.2 具核梭杆菌

具核梭杆菌 (Fusobacterium nucleatum, Fn) 在 CRC 高度富集, 其能诱导局部炎症, 增加 IL-6、IL-8、IL-12、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、TNF- α 等炎性细胞因子, 导致结直肠癌的发生。Fn 及其组分允许肿瘤浸润骨髓细胞上的 TLRs 参与和激活 myd88 介导的炎症细胞因子的

产生, 最明显的是 IL-23 的产生。IL-23 通过诱导 IL-17A、IL-6 和 IL-22 的产生促进 CRC 的发展^[31]。Fn 通过促进肿瘤免疫逃逸、抑制自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 或 T 细胞抗肿瘤防御、调节 E-cadherin/ β -catenin 来支持 CRC 的发展和转移^[32], 也有研究报道大肠癌组织中 Fn 会随着癌细胞转移而转移^[33]。

2.3 粪肠球菌

粪肠球菌 (Enterococcus faecalis, EF) 激活黏膜巨噬细胞产生旁观者效应, 当未转化的原代上皮细胞暴露于粪肠球菌极化的巨噬细胞时, 肠上皮细胞发生染色体不稳定 (chromosome instability, CIN), 然后转化为癌细胞^[34]。TNF- α 作为巨噬细胞诱导的旁观者效应的扩散介质, 这种炎性细胞因子由粪肠杆菌触发, 并通过神经突起导向因子 Netrin-1 的抗凋亡作用导致结肠上皮细胞增殖^[34]。粪肠球菌可诱

导肠上皮细胞内超氧化物的形成可增强巨噬细胞中 COX-2 的表达,促进肠上皮细胞中 CIN 的形成导致结肠上皮细胞损伤。动物实验研究发现,产超氧化物粪肠球菌感染的无菌 IL-10^{-/-}小鼠产生结肠炎和结肠癌;不产生超氧化物的粪肠球菌感染的无菌 IL-10^{-/-}小鼠仅产生结肠炎^[35]。

肠道菌群通过调节免疫微环境促进肿瘤发生、发展。将肠道菌群作为一种生物学指标,可用于健康状态的评估和 CRC 的发病风险及其预后的预测。同时以肠道菌群为靶点,选择性的清除致癌菌群,深入研究其致癌机制可为 CRC 治疗提供参考依据。此外,破译更多具有特异性的致癌肠道菌群并表征其潜在机制也十分必要。

3 肠道菌群免疫调节联合疗法治疗结直肠癌的机制

癌症治疗会干扰宿主的免疫反应,并导致免疫系统功能异常,进而影响治疗效率。动物实验表明,肠道菌群及其代谢物可激活抗肿瘤免疫反应,从而提高药物疗效、减轻毒副作用。双歧杆菌通过干扰素刺激基因(STING)和 T 细胞表面腺苷 2A 受体(A2AR)信号通路以及鼠李糖乳杆菌(LGG)通过 DC 中 cGAS/STING/TBK1/IRF7 轴均可增强免疫治疗疗效^[36-38];LGG 通过激活小肠隐窝周围巨噬细胞 TLR2 通路来减轻放疗造成的小肠损伤^[39];肠道菌群代谢物丁酸可通过提高 CD8⁺T 细胞中 ID2 的表达来增强 CD8⁺T 细胞的抗肿瘤免疫应答,从而改善化疗药物奥沙利铂的疗效^[40]。

3.1 肠道菌群免疫调节联合免疫治疗的机制

肿瘤免疫治疗是通过激活机体自身免疫机能对肿瘤细胞或组织进行识别并杀伤,已证实肠道菌群通过改变肿瘤免疫微环境从而改善肿瘤免疫治疗效果^[41]。2015 年发表的 2 篇意义重大的文章,首次将肠道菌群与免疫检查点抑制剂(immun checkpoint inhibitors, ICIs)疗效联系起来^[23,32]。其中来自法国团队的研究表明抗细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4)不能抑制无菌小鼠的肿瘤生长,而多形拟杆菌(*B. thetaiotaomicron*)和脆弱类杆菌(*B. fragilis*)可增加辅助性 T 细胞 1(T helper cells1, Th1)免疫应答,促进瘤内 DC 的成熟,增强小鼠对抗 CTLA-4 的抗癌反应^[23]。来自美国团队以类似的方法证明了双歧杆菌增强 DC 的活化,提高抗 PD-L1 的治疗效果^[32]。2019 年,首次表征了中国人

群肠道菌群与免疫治疗响应之间的关联,发现肠道菌群的多样性与患者外周 CD8⁺T 细胞和 NK 细胞以及颗粒酶 B 的水平呈正相关^[42]。

研究表明在大肠癌模型小鼠中,LGG 与抗 PD-1 联合治疗后小鼠肠道疣微菌门减少、拟杆菌门增加,并使鼠乳杆菌和单形拟杆菌富集,这两种细菌分别与肠道 DC 的活化和 CD8⁺T 细胞的肿瘤浸润相关;口服 LGG 活菌能通过增加肿瘤内 DC 和 T 细胞来增强抗 PD-1 免疫治疗的抗肿瘤效果,其机制是 LGG 通过 DC 中 cGAS/STING/TBK1/IRF7 轴诱导其产生 IFN- β ,从而增强抗肿瘤 CD8⁺T 细胞活化以及肿瘤浸润^[38]。有研究表明,肠道菌群还可以促进 CD47 单抗的抗肿瘤疗效。不同肠道菌群背景的 Jax 小鼠与 Tac 小鼠对 CD47 单抗的反应有明显差别。两种小鼠共饲养后,对 CD47 单抗均可产生应答;静脉或瘤内注射双歧杆菌属可在原来无应答的 Tac 小鼠的肿瘤内富集,并对 CD47 单抗产生应答。分析机制发现瘤内的双歧杆菌可通过激活 STING 信号以增强 IFN-I,从而促进 DC 的交叉呈递,增强了肿瘤组织内抗 CD47 免疫治疗的抗肿瘤效果^[36]。Mager 等^[37]发现了 1 种新的微生物代谢物相关免疫通路。在 CRC 小鼠模型中,假长双歧杆菌(*B. pseudolongum*)代谢产物肌苷在特定环境下(CpG 和树突状细胞分泌的 IL-12 的协同刺激)通过 T 细胞特异性腺苷 2A 受体(A2AR)信号刺激 cAMP-PKA-pCREB 通路,在肿瘤抗原激活 T 细胞受体(TCR)的协同作用下,IL-12 受体(IL-12R)表达上调。随后,DC 衍生的 IL-12 刺激促进了肌苷诱导 CD4⁺T 细胞中 TH1 基因的表达,加入免疫检查点抑制剂可促进 IFN- γ 的产生,从而提高了 ICI 疗效。研究人员还揭示艾克曼菌(*Akkermansia muciniphila*)同样也可产生肌苷,具有相似的抗肿瘤效果。在 MC38 结直肠癌小鼠模型中,屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)表达并分泌肽聚糖水解酶分泌抗原 A(SagA),能降解细菌的胞壁肽聚糖成分,生成有免疫活性的胞壁肽(如胞壁酰二肽 MDP),从而通过激活 NOD2 信号来增强免疫治疗效果。此外,通过转基因技术使乳酸菌(*Lactococcus lactis*)表达 SagA,也能增强 ICI 抗肿瘤疗效^[43]。

3.2 肠道菌群介导免疫调节联合放化疗治疗结直肠癌的机制

放射疗法(RT)是通过破坏肿瘤细胞 DNA 来杀伤肿瘤细胞的有效方法^[44],超过 50%的实体瘤患者

在治疗期间的某个时间点接受了放疗,通常与化疗联合使用^[45],然而,放化疗引起的某些毒副作用通常限制了其广泛应用^[46-47]。最近的研究发现肠道菌群免疫调节可以降低毒副作用,提高放化疗的治疗效果。

最新研究揭示了肠道菌群代谢产物在辐射防护中的关键作用,为减轻辐射暴露的副作用提供了有前景的治疗靶点^[48]。接受高剂量电离辐射后幸存的小鼠拥有特殊的肠道菌群及其代谢物,其中毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*) 和肠球菌科 (*Enterococcaceae*) 成员的丰度以及下游以丙酸和色氨酸途径为代表的代谢物能够保护造血系统和胃肠道系统免受辐射伤害^[49]。腹部放疗治疗结肠癌时,主要的毒副作用是小肠损伤。LGG 通过释放脂壁酸 (LTA) 激活小肠隐窝周围巨噬细胞 TLR2 通路,从而诱导趋化因子 CXCL12 表达;小肠固有层中 COX-2⁺ 间充质干细胞 (MSC) 表达的 CXCR4 与 CXCL12 结合,激活 MSC 向肠隐窝上皮干细胞附近迁移,使辐射损伤得以迅速修复。此外, MSC 释放前列腺素 E2 保护上皮干细胞免受辐射诱导的凋亡,减轻腹部放疗造成的小肠损伤^[39]。在肿瘤小鼠模型中,肠道菌群衍生的吲哚 3-丙酸 (IPA) 处理可以抑制辐照诱导的小鼠死亡、体重减轻、造血系统损伤及胃肠道毒性。其中孕烷 X 受体/酰基辅酶 A 结合蛋白 (PXR/ACBP) 信号在 IPA 介导的辐射保护中发挥关键作用^[48]。最新研究发现肠道菌群代谢产物丁酸盐可通过抑制其组蛋白去乙酰化酶活性诱导 ID2 的表达,促进 IL-12 信号通路,从而在体内及体外直接增强小鼠 CD8⁺T 细胞的增殖和功能,促进化疗药物奥沙利铂的抗癌疗效;同时分离自健康人的 CD8⁺T 细胞体外培养中,丁酸盐也可增加 CD8⁺T 细胞的 ID2 及 IFN- γ 表达^[40]。

4 肠道菌群免疫调节联合疗法治疗结肠癌的策略

肠道菌群通过免疫调节影响 CRC 免疫治疗、放疗和化疗的分子机制逐渐被阐明,为利用肠道菌群联合治疗策略提供参考。部分动物实验和临床研究已证明肠道菌群干预策略能一定程度上能提高免疫检查点抑制剂治疗、放化疗的敏感性或减轻不良反应。

4.1 肠道菌群免疫调节联合免疫治疗的策略

基础研究方面,在小鼠模型中,调节肠道菌群可提高肿瘤免疫疗法的疗效以及缓解毒副作用^[50]。

CD8⁺T 细胞介导抗肿瘤免疫反应,增强免疫治疗疗效。正常小鼠灌胃 LGG 两周后,小肠 CD8⁺T 和 CD4⁺T 细胞数量扩增,结肠 CD8⁺T 细胞特异性反应升高。转基因肿瘤模型小鼠和 DSS-AOM 诱导的结肠癌模型小鼠灌胃 LGG 后,CD8⁺T 细胞数量增加,肿瘤被显著抑制^[51]。肠道菌群还可以有效增强过继转移的自身/肿瘤特异性 CD8⁺T 细胞的抗肿瘤功能,抑制肿瘤生长;用抗生素处理宿主肠道菌群,会显著降低肿瘤抑制作用;实验小鼠输注含微生物配体血浆或者超纯脂多糖可增强 CD8⁺细胞活化,抑制肿瘤生长^[52]。双歧杆菌以 CD4⁺Treg 依赖性方式改变肠道菌群组成,缓解 CTLA-4 单抗诱导的小鼠结肠炎,并鉴定出短双歧杆菌及 LGG 在结肠炎的缓解中发挥了关键作用^[53]。

临床研究方面,法国 Gustave Roussy 癌症中心对接受过 ICI 治疗的 249 例患者进行分析,发现艾克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*) 普遍存在于对 ICI 治疗反应良好的患者体内,而使用抗生素 (氨苄青霉素+黏菌素+链霉素) 的患者肠道菌群紊乱,在接受 ICI 治疗后,癌症很快复发,无进展生存期和中位总生存期皆短于前者^[18]。有研究表明,对 74 名接受 PD-1/PD-L1 单抗治疗的晚期胃肠道癌症 (包括 CRC、胃癌、食管癌等) 患者在治疗前及治疗期间的粪便菌群进行分析,发现普氏菌属与拟杆菌属的比值升高与更好的临床应答相关^[54]。基于特定细菌分类构建模型可较准确地预测患者的应答。

4.2 肠道菌群介导免疫调节影响结直肠癌放化疗的策略

基础研究方面,辐射会导致造血和胃肠道等多组织器官损伤,肠道菌群与抗辐射损伤存在关联。一项关于富氢水 (hydrogen-water) 改善放射治疗副作用的研究表明,小鼠中口服富氢水可提高小鼠小肠组织中靶向 MyD88 的 miR-1968-5p 水平,有利于保护肠道菌群,进而缓解放射治疗引起的胃肠道毒性^[55]。粪菌移植 (fecal microbiota transplantation, FMT) 也可缓解急性辐射综合征, FMT 增加外周血白细胞计数并改善胃肠道功能和保护肠上皮完整性,增加了辐照小鼠的生存率,是减轻放射毒性的有效方法^[56]。通过高通量测序技术发现不同性别小鼠的胃肠道细菌群落组成不同,并与对辐射 (放射性) 毒性的敏感度有关。口服辛伐他汀仅能在雄性小鼠中改善造血系统损伤、胃肠道功能和上皮完整性,而喂食高脂饮食仅对雌性小鼠有效,明显减

轻骨髓和胃肠道毒性。使用抗生素或移植另一性别的肠道菌群,会消除上述治疗效果。不同治疗方法(口服辛伐他汀或高脂饮食)对辐射损伤的治疗效果具有性别差异性,这种差异为治疗策略提供新的思路^[57]。

临床研究方面,有研究分析了 45 例结肠癌患者同步放化疗(concurrent chemoradiation, CCRT)前的粪便样品,发现完全缓解(complete response, CR)和非 CR 患者之间的 α -多样性无显著差异,而 β -多样性差异显著,非 CR 患者粪菌中的拟杆菌目(拟杆菌科、理研菌科和拟杆菌属)多于 CR 患者^[58]。在大肠癌患者化疗后复发的癌组织中,发现 Fn 的丰度占优势,并与病人的临床病理特征相关,通过生物信息学和功能分析发现 Fn 可促进大肠癌化疗耐药^[59]。未来通过靶向 Fn 及相关信号通路,对大肠癌患者的预后进行准确评价。在一些临床研究中,已证明益生菌有助于预防与辐射有关的肠病,含有双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、酪乳杆菌和链球菌等的制剂可减少放化疗引起的肠道毒性,例如腹泻^[5,60]。

越来越多的研究证明肠道菌群在 CRC 精准治疗策略中发挥着关键作用。因此,有针对性地干预患者肠道菌群,制定具有患者个性化的治疗方案,对提高免疫治疗、放疗以及化疗疗效,减少不良反应有很大参考意义。

5 结论与展望

综上所述,大量研究证实了肠道菌群以免疫调节的方式影响 CRC 的治疗。如果在 CRC 治疗之前或者治疗初期对肠道菌群进行靶向调控,可以增加抗肿瘤作用,并且降低毒副作用。随着新一代测序技术和代谢组学的发展,将会发现更多与肿瘤特异性相关的肠道菌群,并逐渐阐明其确切分子机制。利用这些研究成果,可以直接或间接调节肠道菌群及其代谢产物来达到精准治疗目标。尽管肠道菌群为 CRC 的治疗开辟了一个新的途径,但要实现临床应用仍存在诸多挑战。

(1)肠道菌群是否可以作为结直肠癌的生物标志物需要进一步明确

在 CRC 患者中检测到特异性菌群的变化可作为疾病筛查和预后预测的生物标志物,例如,具核梭杆菌与 CRC 患者的发病和不良预后相关。此外,检测粪便微生物标记物具有补充现有检测方法或提供非侵入性诊断 CRC 的替代方案的潜力。然而

其难以检测到与 CRC 相关的息肉、腺瘤等早期病变,且也难以应用于炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)、II 型糖尿病等肠道菌群已经发生异常的人群。

(2)肠道菌群样本采集及测序和分析的方法亟需标准化

标准化的菌群取样方法不仅局限于粪便样本,还应包括组织样本、肠道内黏液等,不同类型的标本取样方式不同,影响因素不同,亟需规范操作流程。此外,癌症患者之间的菌群差异也可能源于各自研究小组应用的检测和分析技术的差异,需要建立一个测序和生物信息学分析的统一标准。

(3)基础研究如何与临床研究协同发展促进临床前转化

目前尚不清楚在 CRC 患者治疗中到底哪些微生物对哪一类免疫检查点抑制剂、放疗和化疗药物起关键作用,以及个体间菌群组成及功能的不同是否导致的药物应答的差异,动物试验结果需要与临床研究数据进行系统比对,协同推进,从而可以有效地将肠道菌群靶向治疗临床前模型转化为临床应用。

总而言之,基于肠道菌群免疫调节联合免疫治疗和放化疗已经在 CRC 的治疗中取得了初步成效。但需要克服上述挑战,从广度和深度上来探索肠道菌群的功能,从而为 CRC 患者制定个性化的干预措施,提高抗癌疗效,减少不良反应。

参 考 文 献(References)

- [1] Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome [J]. Science, 2006, 312(5778): 1355-1359.
- [2] Si H, Yang Q, Hu H, et al. Colorectal cancer occurrence and treatment based on changes in intestinal flora [J]. Semin Cancer Biol, 2021, 70: 3-10.
- [3] Yang YB, Li LL, Xu CJ, et al. Cross-talk between the gut microbiota and monocyte-like macrophages mediates an inflammatory response to promote colitis-associated tumorigenesis [J]. Gut, 2020, 70(8): 1495-1506.
- [4] Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment [J]. Science, 2013, 342(6161): 967-970.
- [5] Toucheffeu Y, Montassier E, Nieman K, et al. Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy-or radiation-induced gastrointestinal mucositis-current evidence and potential clinical applications [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2014, 40: 409-421.
- [6] Cheng WY, Wu CY, Yu J. The role of gut microbiota in cancer

- treatment: friend or foe? [J]. *Gut*, 2020, 69 (10): 1867–1876.
- [7] Kamada N, Seo SU, Chen GY, et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(5): 321–335.
 - [8] Mishra A, Lai GC, Yao LJ, et al. Microbial exposure during early human development primes fetal immune cells [J]. *Cell*, 2021, 184(13): 3394–3409.
 - [9] Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis [J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 507–510.
 - [10] Schaupp L, Muth S, Rogell L, et al. Microbiota-induced type I interferons instruct a poised basal state of dendritic cells [J]. *Cell*, 2020, 181(5): 1080–1096.
 - [11] Gonçalves P, Araújo JR, Di Santo JP. A cross-talk between microbiota-derived short-chain fatty acids and the host mucosal immune system regulates intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(3): 558–572.
 - [12] Bachem A, Makhlof C, Binger KJ, et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote the memory potential of antigen-activated CD8⁺ T Cells [J]. *Immunity*, 2019, 51(2): 285–297.
 - [13] Yao Y, Cai X, Fei W, et al. The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 62(1): 1–12.
 - [14] Stockinger B, Di Meglio P, Gialitakis M, et al. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 403–432.
 - [15] Atarashi K, Tanoue T, Ando M, et al. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells [J]. *Cell*, 2015, 163(2): 367–380.
 - [16] Venkatesh M, Mukherjee S, Wang H, et al. Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and toll-like receptor 4 [J]. *Immunity*, 2014, 41(2): 296–310.
 - [17] Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Bourreille A, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease [J]. *Gut*, 2000, 47(3): 397–403.
 - [18] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. *Science*, 2018, 359(6371): 91–97.
 - [19] Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of clostridia strains from the human microbiota [J]. *Nature*, 2013, 500(7461): 232–236.
 - [20] Round JL, Lee SM, Li J, et al. The toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota [J]. *Science*, 2011, 332(6032): 974–977.
 - [21] Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system [J]. *Cell*, 2005, 122(1): 107–118.
 - [22] Tan TG, Sefik E, Geva-Zatorsky N, et al. Identifying species of symbiont bacteria from the human gut that, alone, can induce intestinal Th17 cells in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(50): E8141–E8150.
 - [23] Vetizou M, Pitt JM, Daillere R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota [J]. *Science*, 2015, 350(6264): 1079–1084.
 - [24] Sears CL. Enterotoxigenic bacteroides fragilis: a rogue among symbiotes [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(2): 349–369.
 - [25] Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment [J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 14(2): 207–215.
 - [26] James KR, Gomes T, Elmentaite R, et al. Distinct microbial and immune niches of the human colon [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(3): 343–353.
 - [27] Brown EM, Sadarangani M, Finlay BB. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(7): 660–667.
 - [28] Yu YN, Fang JY. Gut microbiota and colorectal cancer [J]. *Gastrointest Tumors*, 2015, 2(1): 26–32.
 - [29] Song XY, Gao HC, Lin YY, et al. Alterations in the microbiota drive interleukin-17C production from intestinal epithelial cells to promote tumorigenesis [J]. *Immunity*, 2014, 40(1): 140–152.
 - [30] Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1263–1271.
 - [31] Wang X, Huycke MM. Colorectal cancer: role of commensal bacteria and bystander effects [J]. *Gut Microbes*, 2015, 6(6): 370–376.
 - [32] Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. Commensal bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy [J]. *Science*, 2015, 350(6264): 1084–1089.
 - [33] Bullman S, Pedamallu CS, Sicinska E, et al. Analysis of fusobacterium persistence and antibiotic response in colorectal cancer [J]. *Science*, 2017, 358(6369): 1443–1448.
 - [34] Yang Y, Wang X, Moore DR, et al. TNF-α mediates macrophage-induced bystander effects through Netrin-1 [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(20): 5219–5229.
 - [35] Winters MD, Schlinke TL, Joyce WA, et al. Prospective case-cohort study of intestinal colonization with enterococci that produce extracellular superoxide and the risk for colorectal adenomas or cancer [J]. *Am J Gastroenterol*, 1998, 93(12): 2491–2500.
 - [36] Shi Y, Zheng W, Yang K, et al. Intratumoral accumulation of gut microbiota facilitates CD47-based immunotherapy via STING signaling [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(5): e20192282.
 - [37] Mager LF, Burkhard R, Pett N, et al. Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy

- [J]. Science, 2020, 369(6510): 1481–1489.
- [38] Si W, Liang H, Bugno J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG induces cGAS/STING- dependent type I interferon and improves response to immune checkpoint blockade [J]. Gut, 2021, 71(3): 521–533.
- [39] Riehl TE, Alvarado D, Ee X, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG protects the intestinal epithelium from radiation injury through release of lipoteichoic acid, macrophage activation and the migration of mesenchymal stem cells [J]. Gut, 2019, 68(6): 1003–1013.
- [40] He Y, Fu L, Li Y, et al. Gut microbial metabolites facilitate anticancer therapy efficacy by modulating cytotoxic CD8⁺ T cell immunity [J]. Cell Metab, 2021, 33(5): 988–1000.
- [41] 郭文文, 乔天运, 张彩勤, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的构建及其在肿瘤治疗研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 98–104.
- Guo WW, Qiao TY, Zhang CQ, et al. Establishment of mouse models with a humanized immune system and applications for tumor immunotherapy [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 98–104.
- [42] Jin Y, Dong H, Xia L, et al. The diversity of gut microbiome is associated with favorable responses to anti-programmed death 1 immunotherapy in Chinese patients with NSCLC [J]. J Thorac Oncol, 2019, 14(8): 1378–1389.
- [43] Griffin ME, Espinosa J, Becker JL, et al. Enterococcus peptidoglycan remodeling promotes checkpoint inhibitor cancer immunotherapy [J]. Science, 2021, 373(6558): 1040–1046.
- [44] Formenti SC, Demaria S. Radiation therapy to convert the tumor into an in situ vaccine [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012, 84(4): 879–80.
- [45] Watts K, Wills C, Madi A, et al. Genome-wide association studies of toxicity to oxaliplatin and fluoropyrimidine chemotherapy with or without cetuximab in 1800 patients with advanced colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2021, 149(9): 1713–1722.
- [46] Hauer-Jensen M, Denham JW, Andreyev HJ. Radiation enteropathy-pathogenesis, treatment and prevention [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014, 11(8): 470–479.
- [47] Uribe-Herranz M, Rafail S, Beghi S, et al. Gut microbiota modulate dendritic cell antigen presentation and radiotherapy-induced antitumor immune response [J]. J Clin Invest, 2020, 130(1): 466–479.
- [48] Xiao HW, Cui M, Li Y, et al. Gut microbiota-derived indole 3-propionic acid protects against radiation toxicity via retaining acyl-CoA-binding protein [J]. Microbiome, 2020, 8(1): 69.
- [49] Guo H, Chou WC, Lai Y, et al. Multi-omics analyses of radiation survivors identify radioprotective microbes and metabolites [J]. Science, 2020, 370(6516): eaay9097.
- [50] Snyder A, Pamer E, Wolchok J. Could microbial therapy boost cancer immunotherapy? [J]. Science, 2015, 350(6264): 1031–1032.
- [51] Owens JA, Saeedi BJ, Naudin CR, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG orchestrates an anti-tumor immune response [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 12(4): 1311–1327.
- [52] Paulos CM, Wrzesinski C, Kaiser A, et al. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8⁺ T cells via TLR4 signaling [J]. J Clin Invest, 2007, 117(8): 2197–2204.
- [53] Sun S, Luo LJ, Liang WH, et al. *Bifidobacterium* alters the gut microbiota and modulates the functional metabolism of T regulatory cells in the context of immune checkpoint blockade [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(44): 27509–27515.
- [54] Peng Z, Cheng S, Kou Y, et al. The gut microbiome is associated with clinical response to Anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in gastrointestinal cancer [J]. Cancer Immunol Res, 2020, 8(10): 1251–1261.
- [55] Xiao HW, Li Y, Luo D, et al. Hydrogen-water ameliorates radiation-induced gastrointestinal toxicity via MyD88's effects on the gut microbiota [J]. Exp Mol Med, 2018, 50(1): e433.
- [56] Cui M, Xiao HW, Li Y, et al. Faecal microbiota transplantation protects against radiation-induced toxicity [J]. EMBO Mol Med, 2017, 9(4): 448–461.
- [57] Cui M, Xiao HW, Li Y, et al. Sexual dimorphism of gut microbiota dictates therapeutics efficacy of radiation injuries [J]. Adv Sci (Weinh), 2019, 6(21): 1901048.
- [58] Jang BS, Chang JH, Chie EK, et al. Gut microbiome composition is associated with a pathologic response after preoperative chemoradiation in patients with rectal cancer [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2020, 107(4): 736–746.
- [59] Yu TC, Guo FF, Yu YA, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy [J]. Cell, 2017, 170(3): 548–563.
- [60] Blanarova C, Galovicova A, Petrasova D. Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea [J]. Bratisl Lek Listy, 2009, 110(2): 98–104.

韩壤乐,胡琼丹,王丽. 慢性肾病相关性瘙痒症的动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 444-448.

Han RL, Hu QD, Wang L. Advances in animal models of pruritus associated with chronic kidney disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 444-448.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.019

慢性肾病相关性瘙痒症的动物模型研究进展

韩壤乐¹,胡琼丹^{1,2},王丽^{1*}

(1. 西南医科大学附属中医医院中西医结合研究中心,四川 泸州 646000;2. 西南医科大学附属中医医院肾病内科,四川 泸州 646000)

【摘要】 慢性肾病(chronic kidney disease,CKD)是各种原因引起的慢性肾结构和功能障碍(肾损害病史大于3个月)。慢性肾病相关性瘙痒症(chronic kidney disease-associated pruritus,CKD-aP)曾被称为尿毒症相关性瘙痒(uremic pruritus,UP),是全球晚期慢性肾疾病和终末期肾病患者的常见症状,透析患者的发生率为28%~70%。患者常因瘙痒而致皮肤损害、寝食难安,严重影响患者的生活质量和睡眠质量,甚至引起抑郁及自杀倾向,因此迫切需要加强CKD-aP发病机制及治疗研究。目前围绕CKD-aP相关的动物模型研究较为少见,建立一种可靠、有效的CKD-aP动物模型尤为重要。本文就CKD-aP的病因病理、相关慢性瘙痒模型及动物瘙痒行为评估展开综述。

【关键词】 慢性肾病相关性瘙痒症;尿毒症相关性瘙痒;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0444-05

Advances in animal models of pruritus associated with chronic kidney disease

HAN Rangyue¹, HU Qiongdan^{1,2}, WANG Li^{1*}

(1. Research Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated Traditional Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. 2. Department of Nephrology, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

Corresponding author: WANG Li. E-mail: wangli120@swmu.edu.cn

【Abstract】 Chronic kidney disease (CKD) is defined as a chronic structural and functional disorder of the kidney (history of kidney damage >3 months) with various causes. CKD-associated pruritus, previously known as uremic pruritus, is a common symptom in patients with advanced CKD and end-stage renal disease worldwide, with an incidence of 28% to 70% in dialysis patients. Pruritus can cause skin damage and sleep disturbances, which can in turn seriously affect patient quality of life and sleep quality, and may even lead to depression and suicidal tendencies. There is thus an urgent need to investigate the pathogenesis of and develop new treatments for CKD-associated pruritus. However, animal models of CKD-associated pruritus are rare, and a reliable and effective animal model is urgently required. In this paper, we review the etiopathology of CKD-associated pruritus, consider chronic pruritus models, and assess pruritus behavior in animals.

【Keywords】 chronic kidney disease-associated pruritus; uremia-associated pruritus; animal model

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

【基金项目】 四川省科技厅项目(21ZDYF0348),四川省卫健委重点实验室建设项目(川卫办发[2018]53号),泸州市-西南医科大学科技战略合作平台建设项目(2021LZXNYD-P04),西南医科大学附属中医医院创新团队(2022-CXTD-03)。

Funded by Science and Technology Department of Sichuan Province (21ZDYF0348), Key Laboratory Construction Project of Health Commission of Sichuan Province ([2018]53), Luzhou-Southwest Medical University Science and Technology Strategic Cooperation Project (2021LZXNYD-P04), the Project of Southwest Medical University (2022-CXTD-03).

【作者简介】 韩壤乐(1995—),女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合肾病防治。Email:1472249660@qq.com

【通信作者】 王丽(1976—),女,教授,博士生导师。Email: wangli120@swmu.edu.cn

相关研究表明,CKD-aP 与皮肤干燥、继发性甲状旁腺功能亢进、血浆组胺水平增高、皮肤中二价阳离子浓度增高、周围神经病变、促炎细胞因子升高、免疫功能障碍及内源性阿片类激素失衡相关^[1]。但有研究表明,组胺受体拮抗剂及肥大细胞稳定剂对 CKD-aP 患者的止痒效果并不明显^[2]。虽然,甲状旁腺切除术可减轻继发性甲状旁腺功能亢进患者的瘙痒^[3],但关于磷和甲状旁腺激素等常见临床实验室参数的证据也相互矛盾^[4]。故 CKD-aP 的发病机制至今尚不完全清楚,并且缺乏公认有效的手段缓解及消除瘙痒,因此建立可靠、有效的 CKD-aP 动物模型至关重要,以下就近年来的 CKD-aP 相关的动物模型展开论述。

1 皮内注射诱导模型

1.1 磷酸钙皮肤沉积模型

相关临床研究表明,尿毒症患者口服的碳酸钙或醋酸钙将通过皮肤内沉积促进瘙痒,并在表皮层中产生对瘙痒的周围敏感性^[5]。为了模拟透析患者的磷酸钙(CaP)皮肤沉积,Keshari 等^[6]将 CaP 溶解于双蒸水中,通过多次皮内注射 5 mg/mL 的 CaP 至 ICR 小鼠的背部皮肤中以诱发慢性瘙痒,同时通过计算后爪搔抓注射部位的次数来评估小鼠对 CaP 的反应。由此验证了 CaP 皮内沉积诱导的瘙痒中的信号传导通路为白介素 6-磷酸化布鲁顿酪氨酸激酶-磷酸化细胞外调节蛋白激酶(IL-6/p-BTK/p-ERK)^[6]。皮内注射 CaP 导致小鼠轻度至重度瘙痒呈现为剂量依赖性。目前在 ICR、C57BL/6 和 C57BL/6 野生型(WT)小鼠品系中均已成功制造出 CaP 皮肤沉积模型。尽管此模型模拟出皮肤内钙离子沉积,且表现出与透析患者相同的皮肤瘙痒,为人类对 CKD-aP 的机制及 CaP 沉积诱导的瘙痒信号传导的研究提供了较理想的实验模型,但该动物模型仅模拟了 CKD-aP 皮肤 CaP 的沉积,与人的 CKD-aP 发病机制并不完全一致。

1.2 β 2-微球蛋白诱发小鼠瘙痒模型

β 2-微球蛋白是体内有核细胞包括淋巴细胞、血小板、多形核白细胞产生的一种小分子球蛋白。相关研究表明, β 2-微球蛋白水平在透析患者的血浆中明显升高^[7],且皮肤组织中的 β 2-微球蛋白会随着透析时间延长而增加^[8]。在 5/6 肾切除术 NPCT 小鼠的皮肤中也明显增加^[9]。Andoh 等^[10]先将 4 ~ 8 周雄性 ICR 小鼠的颈背部毛发剔除,随后

在颈背部皮内注射 50 μ L β 2-微球蛋白可观察到小鼠搔抓行为。研究表明,通过 β 2-微球蛋白诱导的小鼠的搔抓行为呈现剂量依赖性,且可通过 TRPV1 表达的初级感觉神经元引起瘙痒相关的反应^[10]。虽然目前使用该动物模型的研究较少,可供参考的具体实验经验匮乏,但该造模方法简便,造模周期短,成功率较高,动物死亡率低,可为透析患者瘙痒症的发病及治疗研究提供较好的实验动物模型。

1.3 组胺诱发小鼠瘙痒模型

组胺存在于肥大细胞和嗜碱性粒细胞内,是介导瘙痒的重要物质之一。Stockenhuber 等^[11]通过临床研究发现,与没有瘙痒的透析患者相比:瘙痒患者的血浆组胺水平明显升高。推测组胺水平的增高与尿毒症患者皮肤柱状细胞数量增加有关。具体造模方法为:首先剔除小鼠颈背部毛发,暴露约 2 cm $\times$ 2 cm 皮肤,然后再在小鼠的脱毛部位皮下注射组胺。组胺在小鼠中引起的搔抓行为为剂量依赖性^[12]。相对于其他品系的小鼠,ICR 小鼠对组胺引起瘙痒更为敏感^[13]。在使用相同剂量的组胺时,D75 小鼠比 D45 小鼠搔抓时间更长,由此推测不同年龄组的小鼠对组胺诱导的瘙痒感存在不同的感知水平^[14]。但此模型的瘙痒持续时间过短,故多用于急性瘙痒动物模型。尽管抗组胺药物可在一定程度上缓解 CKD-aP 患者瘙痒,但相关临床研究发现 CKD-aP 与血浆组胺浓度并无相关性^[15]。

1.4 磷酸氯喹诱发小鼠瘙痒模型

磷酸氯喹(CQ)是一种抗疟药,已知对人和动物有瘙痒的副作用。CQ 通过其对分子受体 Mas 相关 G 蛋白偶联受体 C11(MrgprC11)的作用引起严重瘙痒^[16],这与组胺诱发的瘙痒中涉及的组胺 H1 和 H4 受体不同。该模型常用于诱导非组胺依赖型瘙痒。Aman 等^[17]将 CQ 稀释至生理盐水中(3.2 mg/mL),并以 32 mg/Kg 的剂量注射到雌性 BALB/c 小鼠皮下诱发瘙痒。研究表明,在治疗人类疟疾过程中发现氯喹导致瘙痒的严重程度与患者年龄呈正相关,即老年患者比年轻患者瘙痒更频繁、更严重^[18],但这一观点尚未在动物实验中得到证实。CQ 诱发的瘙痒和慢性肾病相关性瘙痒均有内源性阿片类受体参与^[19],由此猜测两者间有共同的病理生理机制。但氯喹所致瘙痒是一种急性瘙痒,通常仅能维持 2 ~ 7 d。

2 物理介导

CKD 患者通常伴有皮肤干燥的现象,且皮肤干

燥与瘙痒的发生率存在显著的相关性^[20]。2002 年 Miyamoto 等^[21]首次采用丙酮/乙醚-蒸馏水 (acetone-ether-water, AEW) 贯序涂抹法制备小鼠皮肤干燥症瘙痒模型。在造模 3 d 前需将 ICR 小鼠背部毛发剔除,随后将丙酮和乙醚(1:1)的混合物涂抹于 ICR 小鼠背部已脱毛的特定区域(约 15 mm × 15 mm)15 s,然后立即用蒸馏水浸泡 30 s,每天 2 次,共 8 d。丙酮/乙醚可有效破坏皮肤的脂质屏障,蒸馏水浸泡可使水分随着有机溶剂的挥发进一步减少,从而模拟人类皮肤干燥症瘙痒。相对于其他品系的小鼠,C57BL/6 小鼠更易诱发出搔抓行为^[22]。根据相关研究报道,使用 AEW 处理后的小鼠搔抓行为至少会持续 2 周^[23],当经 AEW 处理后皮肤出现角化过度、表皮明显增厚时即提示干性皮肤瘙痒模型造模成功^[22]。Miyamoto 等^[21]分别将阿片类受体拮抗剂纳洛酮和纳曲酮皮下注射于 AEW 处理 5 d 的 ICR 小鼠后发现其自发性搔抓明显减少,由此证实了 AEW 小鼠的抓挠是由瘙痒导致的。目前皮肤干燥症瘙痒的机制尚不完全清楚。研究表明,AEW 使缺乏肥大细胞小鼠和正常小鼠均增加了自发抓挠,由此认为肥大细胞可能并不参与 AEW 处理后的自发性瘙痒^[21],这与临床观察中,H1 组胺受体拮抗剂通常对皮肤干燥症瘙痒无效一致。使用 AEW 贯序涂抹法能高效地制造慢性皮肤干燥症瘙痒模型,虽然该造模方法较为繁琐,但实验药品易获得,成功率高,可为慢性皮肤干燥症瘙痒症的发病及治疗研究提供较好的疾病动物模型。

3 自发病变

3.1 ICR 源性肾小球肾炎小鼠模型(ICGN 小鼠)

ICGN 小鼠是一种涉及张力蛋白 2 基因突变并具有遗传性肾病综合征的近交系小鼠^[24],因其在幼年时表现出蛋白尿,随后出现低蛋白血症、高脂血症、贫血和全身水肿^[25],所以是研究特发性肾病综合征的良好模型。Miyamoto 等^[26]发现,ICGN 小鼠在 21 周或 27 周时即可出现持续或间歇性搔抓,伴随部分小鼠肌酐明显升高,故考虑 ICGN 小鼠的搔抓行为也许与肾功能障碍相关。由此认为小鼠肌酐升高是 ICGN 小鼠瘙痒模型成功的关键。相关研究表明,雄性 ICGN 小鼠的肌酐值升高得更为显著^[27]。ICGN 小鼠在后期可出现促红细胞生成素代谢紊乱、肾性贫血、肾间质纤维化等与人类慢性肾病相似的病理表现^[28]。该模型造模时间较长,产生

搔抓行为具有一定不确定性,且到目前为止无关于使用 ICGN 小鼠瘙痒的研究报告,故该模型应用于 CKD-aP 的研究还应开展进一步研究。

3.2 MRL/lpr 小鼠瘙痒模型

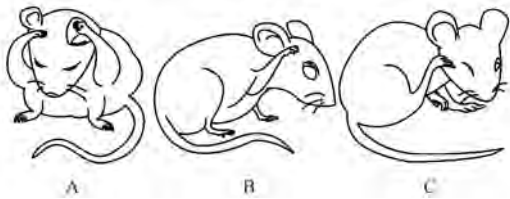
MRL/lpr 小鼠是携带 Fas 缺失突变基因 lpr 的 MRL/Mp 小鼠^[29],能自发地发展出各种自身免疫性疾病,包括肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、多动脉炎、关节炎和唾液腺炎等^[30]。常用于研究类似于人类狼疮性肾炎的免疫复合物肾小球肾炎。Umeuchi 等^[31]发现 18 ~ 20 周的 MRL/lpr 小鼠在无病原体环境中自发持续搔抓行为,由此猜测,此类抓挠行为与人类自身免疫性疾病相关瘙痒类似。其搔抓行为会随着小鼠年龄的增长而增加。MRL/lpr 小鼠中出现 IgG3 抗体是导致自发性肾小球破坏和功能障碍原因之一^[32]。此模型的优势在于演绎了慢性肾病相关性瘙痒症的免疫机制,但其具体机制有待进一步研究。

4 CKD-aP 动物模型中搔抓行为的评估

人类感受到瘙痒刺激时会引起两种反应,一种是与感觉有关,如用语言表达出“我感受到了轻微的瘙痒”,另一种是对瘙痒的反应,即用动作来缓解或消除瘙痒(例如抓挠)。因此,痒通常被定义为一种令人不快的感觉,并引起抓挠的欲望^[33]。梳理毛发是小鼠用于清洁皮肤或皮毛的常见行为,其动作常常与搔抓反应非常相似(见图 1A)。同时,不同种类动物、性别及诱导瘙痒介质的剂量均对动物的搔抓反应具有不同影响^[34]。如 Klein 等^[35]发现,在 SD 大鼠的颈背部注射组胺后并未引起明显的后肢抓挠。在 SLIGRL-NH₂ 诱导的瘙痒中,雌性小鼠的抓挠次数明显高于雄性小鼠^[36]。除此之外,Yu 等^[37]研究表明小鼠的搔抓行为与人类打哈欠类似,均具有传染性,即小鼠在观察到同种搔抓行为后会出现模仿性抓挠。由此可见,建立准确评估动物搔抓行为机制尤为重要。

辣椒素和组胺通常分别被作为致痛剂与致痒剂用于小鼠。Shimada 等^[38]通过相关实验表明,小鼠对脸颊疼痛刺激表现为前肢擦拭面部(见图 1B),而小鼠通过后肢搔抓脸颊(见图 1C)通常表明小鼠瘙痒所致行为。同时他们发现,当在雄性 CD-1 小鼠的脸颊分别注射辣椒素和组胺时,小鼠分别表现出用前肢擦拭脸颊和用后肢搔抓脸颊,但当在小鼠的颈背部分别注射辣椒素和组胺时,小鼠均表现

为后肢搔抓。故相对于颈背部皮肤注射,脸颊的注射更有利于区分小鼠的瘙痒和疼痛。所以,在造模时,除了要谨慎选择造模方法,更要严格选择合适的致痒部位以将实验误差降到最低。通常将一次搔抓行为定义为:小鼠后肢从抬起到着地或放嘴里之间的搔抓为一次搔抓,无论在此期间小鼠搔抓多少次^[39]。目前常用的评估小鼠瘙痒的方法包括肉眼观察、声学检测和搔抓运动产生的感应电流检测^[40-42]。但是肉眼观察费时费力,而声学检测及感应电流检测方法需要专业设备与分析软件。最近, Kobayashi 等^[43]研究出的一种卷积递归神经网络(CRNN)可以精确检测出小鼠的抓挠,并且准确地区分动物的搔抓与梳理毛发行为。



注:A:小鼠因清洁皮肤而产生的梳理毛发的行为;B:小鼠因脸颊局部疼痛而用前肢擦拭面部;C:小鼠因瘙痒而用后肢搔抓面部。

图1 小鼠梳理毛发、疼痛及瘙痒的行为

Note. A. Mice grooming behavior due to clean skin. B. Mice rubbing their faces with their forelimbs due to localized pain in the cheeks. C. Mice scratching their faces with their hindlimbs due to itching.

Figure 1 Grooming, painful and itchy behavior in mice

5 总结与展望

慢性肾病相关性瘙痒症的发病机制在近 20 年的研究中得到越来越多的证实,但其动物模型建立仍然面临极大的挑战与困难。慢性肾病相关性瘙痒症是由多方面因素导致,但目前的动物模型均采用单一的致痒因素建立,未能综合反应慢性肾疾病的病理过程。同时,不同种类动物、性别及致痒介质的剂量均对动物的搔抓反应具有不同影响。鉴于当前的 CKD-aP 发病机制的主要假设,建立一个免疫系统功能障碍和内源性阿片类激素失衡的动物模型也许能更完善地开展相关研究。除此之外,在慢性肾病的动物模型上再加以多种致痒因素共同致痒也许更为适用。

参 考 文 献(References)

[1] Manenti L, Tansinda P, Vaglio A. Uraemic pruritus: clinical characteristics, pathophysiology and treatment [J]. *Drugs*, 2009, 69(3): 251-263.
[2] Shirazian S, Aina O, Park Y, et al. Chronic kidney disease-

associated pruritus: impact on quality of life and current management challenges [J]. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 2017, 10: 11-26.
[3] Zhang Y, Lu Y, Feng S, et al. Evaluation of laboratory parameters and symptoms after parathyroidectomy in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism [J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1): 921-929.
[4] Rayner HC, Larkina M, Wang M, et al. International comparisons of prevalence, awareness, and treatment of pruritus in people on hemodialysis [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12(12): 2000-2007.
[5] Momose A, Kudo S, Sato M, et al. Calcium ions are abnormally distributed in the skin of haemodialysis patients with uraemic pruritus [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(8): 2061-2066.
[6] Keshari S, Sipayung AD, Hsieh CC, et al. IL-6/p-BTK/p-ERK signaling mediates calcium phosphate-induced pruritus [J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 12036-12046.
[7] Teruel-Briones JL, Fernández-Lucas M, Rivera-Gorriñ M, et al. Progression of residual renal function with an increase in dialysis: haemodialysis versus peritoneal dialysis [J]. *Nefrologia*, 2013, 33(5): 640-649.
[8] Spiegel DM, Costante N, Janiga AM, et al. Deposition and removal of cutaneous β 2-microglobulin [J]. *Am J Nephrol*, 1992, 12(5): 330-335.
[9] Li S, Andoh T, Zhang Q, et al. β 2-microglobulin, interleukin-31, and arachidonic acid metabolites (leukotriene B4 and thromboxane A2) are involved in chronic renal failure-associated itch-associated responses in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 847: 19-25.
[10] Andoh T, Maki T, Li S, et al. β 2-microglobulin elicits itch-related responses in mice through the direct activation of primary afferent neurons expressing transient receptor potential vanilloid 1 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 810: 134-140.
[11] Stockenhuber F, Sunder-Plassmann G, Balcke P. Increased plasma histamine levels in chronic renal failure [J]. *N Engl J Med*, 1987, 317(6): 386.
[12] Akiyama T, Merrill AW, Zanutto K, et al. Scratching behavior and Fos expression in superficial dorsal horn elicited by protease-activated receptor agonists and other itch mediators in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329(3): 945-951.
[13] Inagaki N, Nagao M, Igeta K, et al. Scratching behavior in various strains of mice [J]. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2001, 14(2): 87-96.
[14] Ji Y, Jang Y, Lee WJ, et al. Different perception levels of histamine-induced itch sensation in young adult mice [J]. *Physiol Behav*, 2018, 188: 188-193.
[15] De Filippi C, Regazzini R, Piazza V, et al. Uraemic pruritus is not related to plasma histamine concentrations [J]. *Clin Exp Dermatol*, 1995, 20(4): 294-296.
[16] Liu Q, Tang Z, Surdenikova L, et al. Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced

- pruritus [J]. *Cell*, 2009, 139(7): 1353–1365.
- [17] Aman N, Rauf K, Khan SA, et al. Effect of commercial and green synthesized ZnO NPs in murine model of chloroquine-induced pruritus [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 3103–3110.
- [18] Ajayi AA, Oluokun A, Sofowora O, et al. Epidemiology of antimalarial-induced pruritus in Africans [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1989, 37(5): 539–540.
- [19] Hercz D, Jiang SH, Webster AC. Interventions for itch in people with advanced chronic kidney disease [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020, 12(12): Cd011393.
- [20] Hu TH, Wang B, Liao XH, et al. Clinical features and risk factors of pruritus in patients with chronic renal failure [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(2): 964–971.
- [21] Miyamoto T, Nojima H, Shinkado T, et al. Itch-associated response induced by experimental dry skin in mice [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2002, 88(3): 285–292.
- [22] 金锦花, 李科岩, 王玉慧, 等. 皮肤干燥症瘙痒小鼠模型的建立 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2020, 34(3): 246–249.
- Jin JH, Li KY, Wang YH, et al. Establishment of xerosis-itch mice models [J]. *J Chin Prac Diagn Ther*, 2020, 34(3): 246–249.
- [23] Akiyama T, Carstens MI, Carstens E. Enhanced responses of lumbar superficial dorsal horn neurons to intradermal PAR-2 agonist but not histamine in a mouse hindpaw dry skin itch model [J]. *J Neurophysiol*, 2011, 105(6): 2811–2817.
- [24] Nagasu H, Sogawa Y, Kidokoro K, et al. Bardoxolone methyl analog attenuates proteinuria-induced tubular damage by modulating mitochondrial function [J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 12253–12263.
- [25] Tatsumi H, Satoh S, Okamoto M, et al. Morphological studies on the kidney of the spontaneous nephrotic (ICGN) mice in the late stage [J]. *Kaibogaku Zasshi*, 1995, 70(2): 96–106.
- [26] Miyamoto Y, Umeuchi H, Kurokawa T, et al. Scratching behavior of ICR-derived glomerulonephritis (ICGN) mice [J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72(9): 1243–1245.
- [27] Ogura A, Asano T, Matsuda J, et al. Characteristics of mutant mice (ICGN) with spontaneous renal lesions: a new model for human nephrotic syndrome [J]. *Lab Anim*, 1989, 23(2): 169–174.
- [28] Miyamoto Y, Myomoto A, Sakaguchi Y, et al. Localization of tissue transglutaminase (tTG) in kidney of ICR-derived glomerulonephritis (ICGN) mice [J]. *Exp Anim*, 2009, 58(4): 375–382.
- [29] Okamoto M, Takagi M, Kutsuna M, et al. High expression of interleukin-1 β in the corneal epithelium of MRL/lpr mice is under the control of their genetic background [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 136(2): 239–244.
- [30] Sharma J, Collins TD, Roach T, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 mimetic peptides attenuate lymphocyte activation in the MRL/lpr mouse autoimmune model [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 6354.
- [31] Umeuchi H, Kawashima Y, Aoki CA, et al. Spontaneous scratching behavior in MRL/lpr mice, a possible model for pruritus in autoimmune diseases, and antipruritic activity of a novel kappa-opioid receptor agonist nalfurafine hydrochloride [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 518(2–3): 133–139.
- [32] Greenspan NS, Lu MA, Shipley JW, et al. IgG3 deficiency extends lifespan and attenuates progression of glomerulonephritis in MRL/lpr mice [J]. *Biol Direct*, 2012, 7: 3.
- [33] LaMotte RH, Shimada SG, Sikand P. Mouse models of acute, chemical itch and pain in humans [J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(10): 778–782.
- [34] Green AD, Young KK, Lehto SG, et al. Influence of genotype, dose and sex on pruritogen-induced scratching behavior in the mouse [J]. *Pain*, 2006, 124(1–2): 50–58.
- [35] Klein A, Carstens MI, Carstens E. Facial injections of pruritogens or algogens elicit distinct behavior responses in rats and excite overlapping populations of primary sensory and trigeminal subnucleus caudalis neurons [J]. *J Neurophysiol*, 2011, 106(3): 1078–1088.
- [36] Yamaura K, Tomono A, Suwa E, et al. Sex-related differences in SLIGRL-induced pruritus in mice [J]. *Life Sci*, 2014, 94(1): 54–57.
- [37] Yu YQ, Barry DM, Hao Y, et al. Molecular and neural basis of contagious itch behavior in mice [J]. *Science*, 2017, 355(6329): 1072–1076.
- [38] Shimada SG, LaMotte RH. Behavioral differentiation between itch and pain in mouse [J]. *Pain*, 2008, 139(3): 681–687.
- [39] Yamanoi Y, Kittaka H, Tominaga M. Cheek injection model for simultaneous measurement of Pain and itch-related behaviors [J]. *J Vis Exp*, 2019, 151: e58943.
- [40] Inagaki N, Igeta K, Kim JF, et al. Involvement of unique mechanisms in the induction of scratching behavior in BALB/c mice by compound 48/80 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 448(2–3): 175–183.
- [41] Inagaki N, Igeta K, Shiraishi N, et al. Evaluation and characterization of mouse scratching behavior by a new apparatus, MicroAct [J]. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2003, 16(3): 165–175.
- [42] Elliott P, G' Sell M, Snyder LM, et al. Automated acoustic detection of mouse scratching [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0179662.
- [43] Kobayashi K, Matsushita S, Shimizu N, et al. Automated detection of mouse scratching behaviour using convolutional recurrent neural network [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 658.