

罗娟,楼迪栋,肖巧巧,等. 橙皮素通过 Nrf2/HO-1 信号通路对非酒精性脂肪肝体外模型氧化应激的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 1-6.

Luo J, Lou DD, Xiao QQ, et al. Protective effect of hesperidin against oxidative stress via the Nrf2/HO-1 signaling pathway in an *in vitro* model of non-alcoholic fatty liver [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 1-6.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.001

橙皮素通过 Nrf2/HO-1 信号通路对非酒精性脂肪肝体外模型氧化应激的保护作用

罗娟^{1,2},楼迪栋³,肖巧巧³,李晓洁¹,李毅^{4*},周谊霞^{1,2*}

(1. 贵州中医药大学护理学院, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学护理学院, 贵阳 550001; 3. 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025; 4. 贵州医科大学分子生物学重点实验室, 贵阳 550001)

【摘要】 目的 探讨橙皮提取物橙皮素对非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 体外模型中氧化应激的保护作用。**方法** CCK-8 法筛选油酸 (OA) 及橙皮素 (HES) 的药物浓度。通过 OA 作用于 LO2 细胞建立体外 NAFLD 模型, 设正常对照组 (NC 组)、模型组 (Model 组)、低剂量组 (L-HES)、中剂量组 (M-HES)、高剂量组 (H-HES 组)。低中高剂量组用 HES 干预 24 h, 行油红 O 染色, 检测细胞内 ROS、MDA、SOD、CAT 的含量, Western blot 检测 LO2 细胞内 Nrf2、HO-1、NQO1、GCLC 蛋白的表达。**结果** 与 NC 组相比, Model 组细胞内脂滴大量形成 ($P<0.05$); ROS、MDA 表达增加, SOD、CAT 表达减少 ($P<0.05$); Nrf2、HO-1、NQO1、GCLC 表达均下调 ($P<0.05$); 与 Model 组相比, HES 低中高组脂滴逐渐减少 ($P<0.05$); ROS、MDA 生成减少, SOD、CAT 含量增加 ($P<0.05$); Nrf2、HO-1、NQO1、GCLC 蛋白的表达均上调 ($P<0.05$)。**结论** HES 通过抗氧化应激对 NAFLD 体外模型具有保护作用, 可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

【关键词】 NAFLD; 橙皮素; 氧化应激; Nrf2; HO-1; ROS

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0001-06

Protective effect of hesperidin against oxidative stress via the Nrf2/HO-1 signaling pathway in an *in vitro* model of non-alcoholic fatty liver

LUO Juan^{1,2}, LOU Didong³, XIAO Qiaoqiao³, LI Xiaojie¹, LI Yi^{4*}, ZHOU Yixia^{1,2*}

(1. School of Nursing, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China.
2. School of Nursing, Guizhou Medical University, Guiyang 550001. 3. School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025. 4. Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550001)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of hesperidin extract from orange peel on oxidative stress in an *in vitro* model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** CCK-8 method was used to screen the drug concentrations of oleic acid (OA) and hesperidin (HES). An *in vitro* NAFLD model was established by OA action on LO2 cells, with a normal control group (NC group), model group (Model group), low-dose group (L-HES), medium-dose group (M-HES) and high-dose group (H-HES group). The groups were treated with HES for 24 h; oil red O staining

[基金项目] 国家自然科学基金(81860089,82160099); 贵州省省级科技计划项目资助, 黔科合基础-ZK[2021]一般 356; 贵州中医药大学博士启动项目(2021[02])。

[作者简介] 罗娟(1998—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 脂代谢护理临床疾病与基础研究。E-mail: luojuan20210911@126.com

[通信作者] 周谊霞(1979—), 女, 教授, 博士, 研究方向: 脂代谢与动脉粥样硬化疾病研究。E-mail: zhouyixia2014@126.com

李毅(1978—), 男, 本科, 研究方向: 分子生物学。E-mail: 84275758@qq.com * 共同通信作者

was performed to detect intracellular ROS, MDA, SOD and CAT, and Western blot was used to detect the expression of Nrf2, HO-1, NQO1 and GCLC proteins in LO2 cells. **Results** Compared with result in the NC group, numerous intracellular lipid droplets were formed in the Model group ($P<0.05$); ROS and MDA expression increased, SOD and CAT expression decreased ($P<0.05$) and Nrf2, HO-1, NQO1 and GCLC expression were all down-regulated ($P<0.05$). Compared with observations the Model group, fewer lipid droplets were observed in the HES low-medium-high group ($P<0.05$). ROS and MDA production decreased, SOD and CAT contents increased ($P<0.05$) and Nrf2, HO-1, NQO1 and GCLC protein expressions were all upregulated ($P<0.05$). **Conclusions** HES has a protective effect on the NAFLD *in vitro* model through anti-oxidative stress, which may be related to the activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway.

[Keywords] NAFLD; hesperidin; oxidative stress; Nrf2; HO-1; ROS

我国是世界上非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)患病率增长最快的国家,也是亚洲患病率、发病率、死亡率最高的国家^[1-2]。NAFLD 发病机制复杂^[3],且目前尚无特异性治疗药物。氧化应激是 NAFLD 的主要发病机制,肝发生氧化应激后会触发肝炎症,增加肝受损程度^[4-5]。因此,减轻肝的氧化应激水平,可能为防治 NAFLD 带来新思路。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)是机体重要的抗氧化因子^[6],可调节下游血红素加氧酶-1(HO-1)、谷氨酰半胱氨酸连接酶催化亚基(GCLC)以及醌氧化还原酶(NQO1),发挥抗氧化作用^[7-8]。已有多项研究报道 Nrf2 信号通路对 NAFLD 具有保护作用^[9-10]。橙皮素(hesperetin, HES)是一种富含于柑橘类水果中的生物类黄酮,是对抗超氧化物和羟基自由基的有效药物^[11-12],但是其能否通过影响 Nrf2/HO-1 信号通路缓解 NAFLD 尚不明确,本研究旨在通过体外 NAFLD 模型探讨 HES 是否缓解 NAFLD,并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

人正常肝细胞 LO2 购自上海中乔新舟生物科技有限公司,货号 ZQ0031。

1.2 主要试剂与仪器

CCK-8、油酸(OA)购于大连美仑生物技术有限公司,货号 MA0218-2、MB2405;HES 购于上海麦克林生化科技有限公司,纯度 97%,货号 C10358475;饱和油红 O 染液,购于索莱宝科技有限公司,货号 G1260;丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA 法)购于万类生物科技,货号为 WLA048a;ROS、SOD、CAT 测试试剂盒购于南京建成科技有限公司,货号 E004-1-1、A001-3、A007-1-1;Nrf2、GCLC、NQO1、HO-1、 β -actin 以及羊抗兔 IgG 均购于 Affinity 公司,货号 AF0639、

DF8550、DF6437、AF5393、S0001。冷冻离心机,美国 Thermo Fisher 公司,型号 Heraeus Fresco 21;多功能酶标仪,美国 Bio-Tek 公司,型号 ELX800UV;正置光学显微镜,日本 Nikon 公司,型号 Nikon Eclipse E100;倒置荧光显微镜,日本 Nikon 公司;电泳仪,武汉赛维尔生物科技有限公司,型号 BV-2。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

LO2 细胞培养于含 10% FBS 及 1% 双抗的 DMEM 培养基中,将其置于含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中,2~3 d 换液 1 次,当细胞密度达 80%~90% 时用胰酶消化,按 1:3 进行传代。

1.3.2 细胞活力分析

以每孔 1.0×10^4 个细胞接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,将 OA 和 HES 以浓度梯度分组给药,继续培养 24 h,采用 CCK-8 法测定细胞活力。

1.3.3 细胞分组

将 LO2 细胞分为正常对照组(NC,正常培养基培养)、模型组(Model,0.125 mmol/L 的 OA 造模)、HES 低、中、高剂量组(L-HES、M-HES、H-HES,10、100、200 μ mol/L 的 HES 干预 24 h)。

1.3.4 油红 O 染色及定量

4% 多聚甲醛固定 30 min,60% 异丙醇快速浸洗,油红 O 染液室温染色 10 min,60% 异丙醇分化 10 s,洗去多余染料,苏木素复染细胞核 10 s,PBS 清洗两遍,于倒置显微镜观察细胞脂质蓄积情况。每孔加入 500 μ L 异丙醇,于脱色摇床上振荡 10 min,取 100 μ L 上清液于 96 孔板中,在 500 nm 处测 OD 值。

1.3.5 抗氧化指标(ROS、MDA、SOD、CAT)测定

收集细胞于 EP 管中,加入 PBS,超声裂解细胞,4℃,12000 r/min,离心 10 min,取上清液测定。具体操作步骤按测定试剂盒说明书进行,ROS 染色后置于荧光显微镜下拍摄。

1.3.6 Western blot 检测

将 LO2 细胞收集至 EP 管中,加入 RIPA 裂解液,超声裂解细胞,4℃,12000 r/min,离心 20 min,提取细胞总蛋白。蛋白样品用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳结束进行转膜、封闭,一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h。最后用化学发光检测系统进行蛋白显影。蛋白密度值用 Image J 软件进行分析。

1.4 统计学方法

用 SPSS 22.0 进行统计学分析,用 Graphpad Prism 8 绘制统计图。符合正态分布的数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,组间比较用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活力分析结果

与 0 mmol/L 相比,当 OA 浓度在 0.5~2.0 mmol/L 时细胞活力下降($P<0.01$);与 0 μmol/L 相比,当 HES 浓度达到 250 μmol/L 时,抑制细胞活力($P<0.05$)。因此,后续实验选用 0.125 mmol/L 的 OA,10、100、200 μmol/L 的 HES。见图 1。

2.2 HES 呈剂量依赖性减少 LO2 细胞内脂滴的形成

与 NC 组相比,Model 组细胞内的脂滴形成明显增多,可见细胞内大面积红染;与 Model 组相比,各 HES 组脂滴形成均明显减少,随着剂量的增加,各 HES 组内的红染面积逐渐减少。油红 O 定量结果与上述结果一致。见图 2。

2.3 HES 减轻 LO2 细胞的氧化应激

与 NC 组相比,Model 组 ROS、MDA 生成增加,

SOD、CAT 生成减少($P<0.01$);与 Model 组相比,高、中、低剂量 HES 组 MDA、ROS 生成逐渐减少,SOD、CAT 生成增多($P<0.05$)。见图 3。

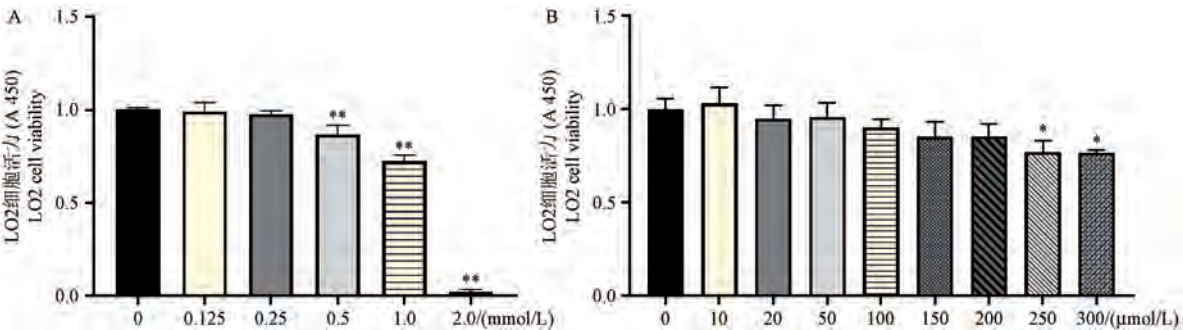
2.4 HES 对增加 Nrf2/HO-1 信号通路表达

与 NC 组相比,Model 组 HO-1、NQO1、GCLC、Nrf2 表达减少($P<0.05$);与 Model 组相比,HES 低、中、高剂量组上述蛋白表达水平逐渐升高($P<0.05$)。见图 4。

3 讨论

目前 NAFLD 仍无特异性治疗药物,“二次打击学说”指出了氧化应激在 NAFLD 发病机制中的重要性,因此控制氧化应激有助于延缓 NAFLD 进程。HES 可以抗氧化和清除自由基,在 NAFLD 防治方面具有广阔前景^[13],但是目前还没有其他研究报道过 HES 对 NAFLD 模型脂质氧化及对 Nrf2/HO-1 信号通路的影响。本研究利用 LO2 细胞作为 NAFLD 体外模型,研究 HES 对 NAFLD 的作用及其机制。结果表明,模型组中脂滴大量形成,ROS 和 MDA 生成增加,SOD 和 CAT 含量减少,Nrf2/HO-1 信号通路蛋白表达水平减少,提示 NAFLD 体外氧化应激模型成功建立。

MDA 是机体脂质过氧化的主要代谢产物,具有细胞毒性;ROS 可以诱导多不饱和脂肪酸启动细胞内的脂质过氧化,扩大氧化应激影响范围^[14],两者生成量增多会损伤肝。SOD 是生物体内最重要的抗氧化酶^[15],CAT 参与活性氧代谢过程,二者与 POD 组成清除自由基的反应体系^[16]。本研究发现,HES 呈剂量依赖性减少 NAFLD 模型脂滴的形成,降低 MDA 和 ROS 的生成,增加抗氧化酶 SOD、



注:A:不同浓度 OA 对 LO2 细胞活力的影响;B:不同浓度 HES 对 LO2 细胞活力的影响。与 0 mmol/L 比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 1 不同浓度 OA 及 HES 对 LO2 细胞活力的影响

Note. A, Effect of different concentrations of OA on LO2 cell viability. B, Effect of different concentrations of HES on LO2 cell viability. Compared with 0 mmol/L, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 1 Effect of different concentrations of OA and HES on the viability of LO2 cells

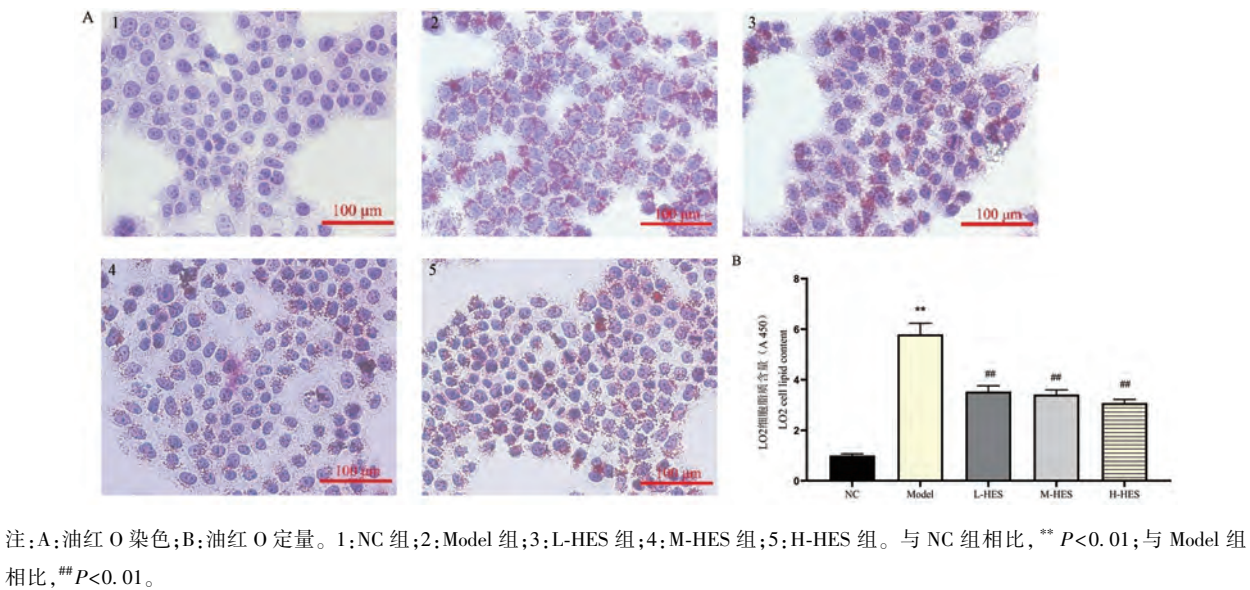


图 2 HES 对 LO2 细胞内脂质蓄积的影响(油红 O)
Note. A, Oil red O staining. B, Oil red O quantification. 1, Normal control group. 2, Model group. 3, Hesperidin low dose group. 4, Hesperidin medium dose group. 5, Hesperidin high dose group. Compared with NC group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, ## $P<0.01$.

Figure 2 Effect of HES on intracellular lipid accumulation in LO2 cells (Oil Red O)

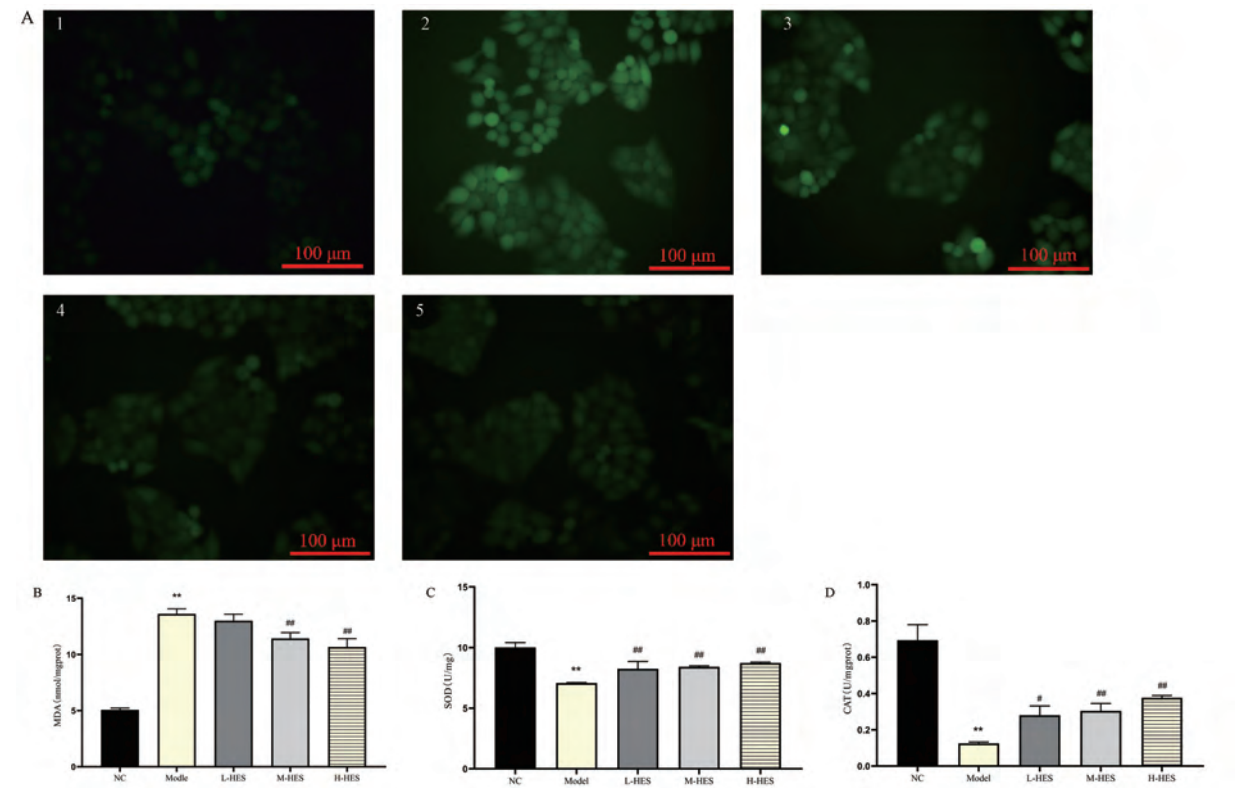
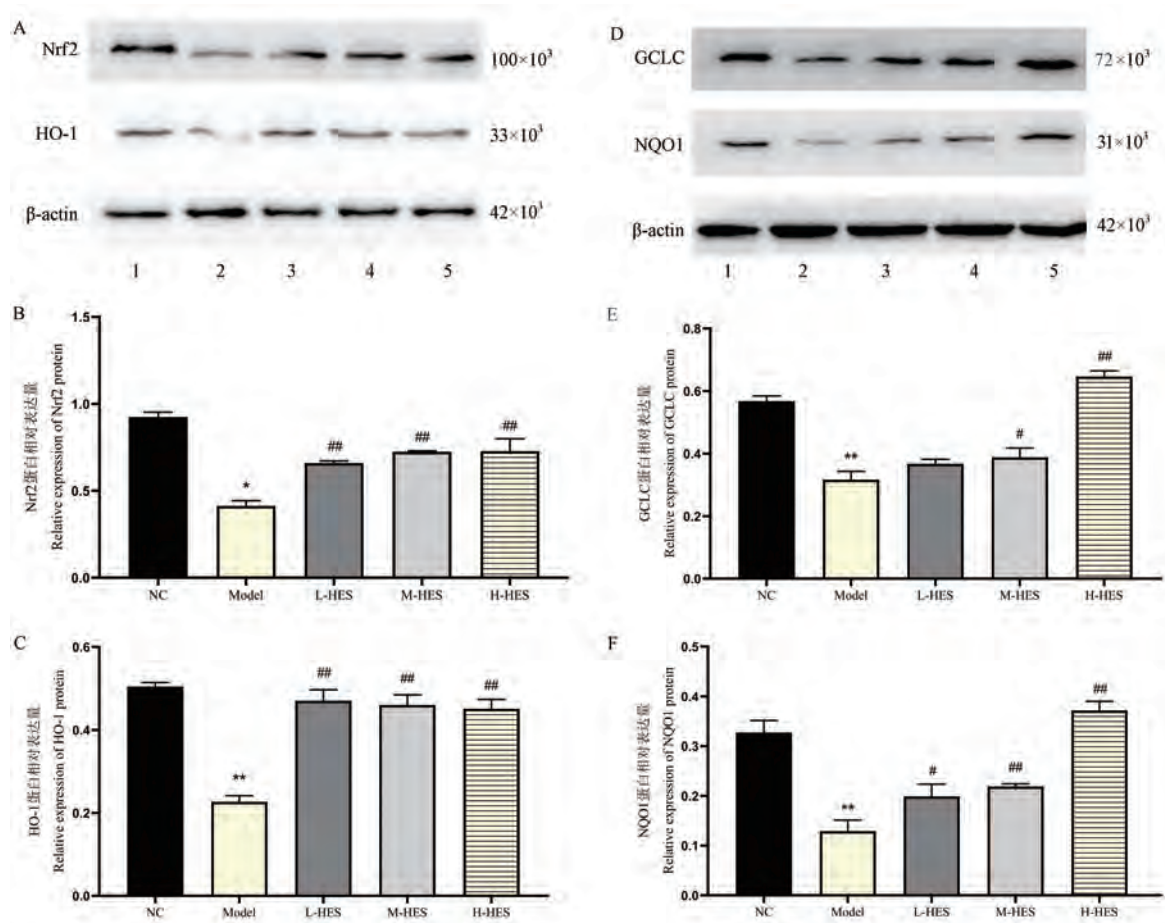


图 3 HES 对 LO2 细胞内 ROS、MDA、SOD、CAT 生成的影响
Note. A, Effect of HES on ROS. B, Effect of HES on MDA. C, Effect of HES on SOD. D, Effect of HES on CAT. 1, NC group. 2, Model group. 3, L-HES group. 4, M-HES group. 5, H-HES group. Compared with NC group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 Effect of HES on the production of ROS, MDA, SOD and CAT in LO2 cells



注:A:Nrf2、HO-1 的蛋白条带;B:Nrf2 的蛋白表达量;C:HO-1 的蛋白表达量;D:GCLC、NQO1 的蛋白条带;E:GCLC 的蛋白表达量;F:NQO1 的蛋白表达量。1:NC 组;2:Model 组;3:L-HES 组;4:M-HES 组;5:H-HES 组。与 NC 组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 Model 组比,# $P<0.05$,### $P<0.01$ 。

图 4 HES 对 LO2 细胞 HO-1、NQO1、GCLC、Nrf2 蛋白表达的影响

Note. A, Protein bands of Nrf2, HO-1. B, Protein expression of Nrf2. C, Protein expression of HO-1. D, Protein bands of GCLC, NQO1. E, Protein expression of GCLC. F, Protein expression of NQO1. 1, NC group. 2, Model group. 3, L-HES group. 4, M-HES group. 5, H-HES group. Compared with NC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$, ### $P<0.01$.

Figure 4 Effect of HES on HO-1, NQO1, GCLC, Nrf2 protein expression in LO2 cells

CAT 的含量,抵抗 NAFLD 体外模型的氧化应激,发挥保护作用。Kheradmand 等^[17]、Chen 等^[18]的研究也表明 HES 在阿尔兹海默病和肾损伤模型中具有减少 ROS、MDA,增加 SOD、CAT 生成的作用,这与我们的研究结果一致。以上的实验结果提示,HES 可能通过减轻 NAFLD 体外模型的氧化应激水平,发挥肝保护作用。

Nrf2/HO-1 信号通路是机体抵御氧化应激的重要信号通路,其激活可以促进下游多个抗氧化因子的表达^[19],可以治疗多种氧化损伤疾病。Nrf2 是氧化应激的中枢细胞感受器;HO-1 可以将血红素分解为具有抗氧化能力的胆绿素、一氧化碳和游离铁^[20];NQO1 可以催化醌类及其衍生物还原,降解

其毒性,从而阻止氧化还原反应和 ROS 生成^[21];GCLC 是 GCL 的组成亚单位,而 GCL 是细胞 GSH 的合成限速酶,可以调控 GSH 生成的量和速度,从而保护细胞免受氧化应激伤害。为进一步研究 HES 的在 NAFLD 体外模型中的抗氧化作用机制,进行蛋白免疫印迹实验检测 Nrf2/HO-1 信号通路的表达情况。Parhiz 等^[22]、Wan 等^[23]及 Prema 等^[24]的研究分别在药物肝损伤模型和心脏肥大模型中探讨 HES 对 Nrf2、HO-1、GCLC、NQO1 表达的影响,他们的研究结果均表明 HES 可以增加上述蛋白的表达并对疾病起到保护作用。本研究对 HES 在体外 NAFLD 模型中的抗氧化作用进行研究,证明了 HES 可以降低脂质蓄积,减少氧化应激产物的生

成,并发现 HES 可以增加 Nrf2、HO-1、GCLC、NQO1 的蛋白表达量,这表明 HES 对 NAFLD 的体外氧化应激模型具有保护作用。

综上所述,HES 对 NAFLD 的体外氧化应激模型具有保护作用,其作用机制可能与增加 Nrf2/HO-1 信号通路表达有关。

参考文献:

- [1] Zhou J, Zhou F, Wang W, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China [J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1851-1864.
- [2] Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, et al. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study [J]. *J Gastroenterol*, 2012, 47(5): 586-595.
- [3] Zhang W, Sun Y, Liu W, et al. SIRT1 mediates the role of RNA-binding protein QKI 5 in the synthesis of triglycerides in non-alcoholic fatty liver disease mice via the PPAR α /FoxO1 signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(3): 1271-1280.
- [4] Arroyave-Ospina JC, Wu Z, Geng Y, et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: implications for prevention and therapy [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(2): 174.
- [5] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842-845.
- [6] 景亮, 祁永章. 红景天苷对糖尿病足溃疡大鼠 Nrf2/Keap1 信号通路及伤口愈合的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(8): 48-54.
- [7] McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, et al. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(24): 21592-21600.
- [8] Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(1): 76-86.
- [9] Mohs A, Otto T, Schneider KM, et al. Hepatocyte-specific NRF2 activation controls fibrogenesis and carcinogenesis in steatohepatitis [J]. *J Hepatol*, 2021, 74(3): 638-648.
- [10] Zhang MH, Li J, Zhu XY, et al. Physalin B ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by stimulating autophagy and NRF2 activation mediated improvement in oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 164: 1-12.
- [11] Salomone F, Godos J, Zelber-Sagi S. Natural antioxidants for non-alcoholic fatty liver disease: molecular targets and clinical perspectives [J]. *Liver Int*, 2016, 36(1): 5-20.
- [12] Tirkey N, Pilkhwai S, Kuhad A, et al. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney [J]. *BMC Pharmacol*, 2005, 5: 2.
- [13] Salomone F, Godos J, Zelber-Sagi S. Natural antioxidants for non-alcoholic fatty liver disease: molecular targets and clinical perspectives [J]. *Liver Int*, 2016, 36(1): 5-20.
- [14] 喻青青. 二氢姜黄素对油酸诱导的非酒精性脂肪肝体外模型的预防和治疗作用与机制研究 [D]. 武汉: 湖北大学, 2018.
- [15] 刘元刚, 张晨, 程欲, 等. 局部应用 PTD-SOD、SOD 对小鼠皮肤创伤的抗氧化应激损伤保护效果及其比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(6): 514-519, 446.
- [16] 田美杰, 孙英健, 官佳懿, 等. 橙皮苷对小鼠抗氧化作用及抗氧化酶基因表达的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(2): 150-157.
- [17] Kheradmand E, Hajizadeh MA, Zare M. Neuroprotective effect of hesperetin and nano-hesperetin on recognition memory impairment and the elevated oxygen stress in rat model of Alzheimer's disease [J]. *Biomed Pharmacothex*, 2018, 97: 1096-1101.
- [18] Chen X, Wei W, Li Y, et al. Hesperetin relieves cisplatin-induced acute kidney injury by mitigating oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 308: 269-278.
- [19] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [20] Ryter SW. Heme Oxygenase-1, a cardinal modulator of regulated cell death and Inflammation [J]. *Cells*, 2021, 10(3): 515.
- [21] Zhu H, Li Y. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and its potential protective role in cardiovascular diseases and related conditions [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2012, 12(1): 39-45.
- [22] Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(3): 323-331.
- [23] Wan J, Kuang G, Zhang L, et al. Hesperetin attenuated acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibiting hepatocyte necrosis and apoptosis, oxidative stress and inflammatory response via upregulation of heme oxygenase-1 expression [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106435.
- [24] Prema V, Thangarajeswari M, Bhavani RD, et al. Targeting the Nrf2/ARE signalling pathway to mitigate isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: plausible role of hesperetin in redox homeostasis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9568278.

范仕郡,吴丹,夏林,等. 小鼠烧伤创面脓毒症模型的建立与评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 7-13.
Fan SJ, Wu D, Xia L, et al. Establishment and evaluation of a murine burn wound sepsis model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 7-13.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.002

小鼠烧伤创面脓毒症模型的建立与评价

范仕郡,吴 丹,夏 林,魏 燕,陈 倩,彭 曦*

(陆军军医大学第一附属医院临床医学研究中心,重庆 400038)

【摘要】 目的 建立一种稳定的小鼠烧伤创面脓毒症模型,检测其病理生理指标,为烧伤脓毒症相关研究提供标准化的动物模型。**方法** 将小鼠背部侵入 90℃ 水面接触 8 s 建立小鼠Ⅲ度烫伤模型,烫伤面积约 15%~20%。2 h 后痂下注射 100 μL 浓度为 0.75×10⁵ CFU/mL 的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)造伤后创面脓毒症。连续 12 d 观测记录小鼠的体重、采食量、生存率和一般状态指标。在注射后 1、2、3、5、7 d 取小鼠外周血和肝组织,测定血清生化和炎症因子指标,观察肝组织病理改变。**结果** 模型组建模后 12 d 的死亡率为 30.2%。血清生化指标中 ALT、AST、UREA 和 CREA 均较建模前显著上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),TP 和 TBIL 指标无明显变化。血清炎症指标中 TNF-α、IL-6 在建模后第 1 天升至最高值($P<0.01$),随后逐日递减,分别至第 3、7 天恢复至造模前水平。肝组织病理切片结果显示在各个时相点均出现肝损伤表现。**结论** 建立了操作简便可控、严重程度适宜的烧伤脓毒症模型,符合烧伤脓毒症的病理生理特点,可为相关机制研究和药物研发提供标准化的实验动物模型。

【关键词】 烧伤脓毒症模型;病理生理;生化;炎症因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0007-07

Establishment and evaluation of a murine burn wound sepsis model

FAN Shijun, WU Dan, XIA Lin, WEI Yan, CHEN Qian, PENG Xi*

(Clinical Medicine Research Center, First Affiliated Hospital, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable mouse burn wound sepsis model, determine its pathophysiological indicators, and provide a standardized animal model for the study of burn sepsis. **Methods** The back of a mouse was exposed for 8 s to water with a temperature of 90℃ to establish a third degree scald model, and the scald area was about 15%~20%. Two hours later, 100 μL of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) with a concentration of 0.75×10⁵ colony-forming units/mL was injected under the eschar to create wound sepsis. The bodyweight, feed intake, survival rate and general status of the mice were observed and recorded for 12 days. Peripheral blood and liver tissues were collected from the mice on post-infection days 1, 2, 3, 5 and 7, the serum biochemical and inflammatory factors were measured, and the pathological changes of liver tissues were observed. **Results** The mortality of the model mice on the twelfth day post-infection was 30.2%. The levels of the serum biochemical indexes ALT, AST, UREA and CREA were significantly increased from baseline ($P<0.05$ or $P<0.01$), whereas the levels of TP and TBIL exhibited no obvious changes. The serum inflammatory indexes TNF-α and IL-6 increased to their highest values on the first day after infection ($P<0.01$) and then decreased daily, recovering to their baseline levels on the third and seventh days post-infection, respectively. The histopathological sections of liver revealed liver injury at all tested timepoints. **Conclusions** A simple burn sepsis model with a manageable protocol and appropriate severity was established; the model characteristics are in line with the pathophysiological characteristics of burn sepsis; and this approach can provide a standardized experimental animal model both for relevant mechanism research and for drug research and development.

【Keywords】 burn sepsis model; pathophysiology; biochemistry; inflammatory factor

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81971838)。
[作者简介] 范仕郡(1983—),男,助理研究员,研究方向:烧伤代谢营养的基础与临床研究。E-mail: 574472439@qq.com
[通信作者] 彭曦(1968—),男,教授,研究方向:烧伤代谢营养的基础与临床研究。E-mail: pxlmm@163.com

烧伤是由高温、化学物质或电引起的组织损伤。其严重程度主要与烧伤深度、面积、伤前疾病、合并伤有关。患者还可能伴随系列严重并发症如休克、吸入性损伤、感染、多器官功能障碍、应激性溃疡等^[1]。感染是烧伤患者的常见并发症,一旦进展为全身性感染,极易引发全身性炎症反应和脏器功能障碍,导致烧伤脓毒症的发生,致死率居高不下^[2]。烧伤患者可经多种途径引发全身感染,其中又以经皮肤创面感染为最主要的途径。烧伤直接破坏皮肤的完整性,打破了局部组织炎症和免疫平衡,因而极易发生皮肤创面感染,并导致创面脓毒症的发生^[3-6]。自 1962 年 Teplitz 等^[7]首次提出该概念以来,烧伤创面脓毒症作为烧伤特有的脓毒症,一直是烧伤研究领域的核心和热点问题。

建立稳定、可靠且贴近临床病情的动物模型,是研究疾病发生发展和评价治疗手段的重要依托。常规的烧伤模型或脓毒症模型仅能部分模拟烧伤脓毒症的病理生理特点。烧伤创面脓毒症模型则是在上述基本模型的基础上,通过制作深度烧伤模型造成创面局部组织损伤,并在伤后一定时间内通过涂布或注射等方式接种细菌,造成重度的创面感染,在模型动物中诱导创面脓毒症的发生^[8-9]。该模型既保留了烧伤本身的致伤作用,又通过引入创面感染并造成脓毒症发病,较好的模拟了烧伤创面脓毒症的病理生理过程^[10]。

尽管烧伤创面脓毒症模型已得到广泛应用,但已有研究往往关注特点的病理生理改变或疗效指标,而缺乏对模型本身的规范化和标准化操作的研究,对于反映烧伤脓毒症的动态变化特点和发生发展规律等指标的关注也较少。为此,本研究旨在建立一种操作简便可控、严重程度适宜的创面脓毒症模型,符合烧伤脓毒症的病理生理特点,为脓毒症发病机制和防治研究提供了有意义的基础数据。同时为开展不同程度的创面脓毒症的机制研究、临床药物研发、临床治疗等提供一种标准化动物模型的有效探索路径。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

健康 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 135 只(体重 22 ~ 24 g),购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008]。饲养于陆军军医大学第

一附属医院实验动物中心[SYXK(渝)2017-0011],饲养于万级屏障环境(温度:22℃~24℃;湿度:50%~60%;饲料为钴 60 辐照实验鼠维持饲料;饮水为纯净水)。本课题经第三军医大学实验动物福利伦理委员会审核批准(AMUWEC20191840),符合 3R 原则。

1.1.2 菌株

铜绿假单胞菌(ATCC 27853)。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(瑞沃德生命科技有限公司,批号:217181101);生理盐水(四川科伦药业股份有限公司,批号:M18082105-2);TNA- α 试剂盒(Invitrogen, LOT227846-005);IL-6 试剂盒(Invitrogen, LOT218546-001)。保温箱(LyonTechno,EWIDE);水浴锅(上海瑞稳仪器设备厂,DK-8AD);电子天平(sartorius,QUINTIX2102-1CN);小动物麻醉机(MATRX,VMR);动物全自动生化仪(Beckman Coulter,AU480)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备方法

(1)假烫伤组 10 只(以下简称 S 组)

小鼠吸入麻醉后,小鼠背部备皮脱毛后放入自制烫伤模具。将背部侵入 37℃ 水面接触 8 s(接触面积约 15%)。后转入 IVC 笼具继续饲养观察。

(2)烧伤+铜绿假单胞菌 125 只(以下简称 Sepsis 组)

小鼠吸入麻醉后,小鼠背部备皮脱毛后放入自制烫伤模具。将背部侵入 90℃ 水面接触 8 s(烫伤深度:Ⅲ度,烫伤面积约 15%)。按 50 mL/kg 体积腹腔补液后放入 30℃ 保温箱保温。2 h 后痂下注射 100 μ L 铜绿假单胞菌(PA)0.75 $\times$ 10⁵ CFU/mL,造成烧伤脓毒症模型。48 h 后转入 IVC 笼具继续饲养观察。

1.3.2 存活率观察、体重称量、动物状态评分、采食量记录

实验中每 12 h 记录一次各组动物存活情况;每日定时称量小鼠的体重及每组剩余饲料重量,同时为动物状态评分,评价指标共 6 项(1~5 分/项)。分别是外观及被毛(竖毛、脱毛、耳壳曲折、口腔有无流涎、肛门处有无腹泻/血便/脱肛)、活动状况(自主活动频率、步态)、神经反应(震颤、痉挛)、呼吸状态(呼吸频率、深浅的异常)、精神反应(精神是否活泼,外界反应是否正常)、姿势和步态(立、卧、

坐的姿势有无异常)。

1.3.3 检测指标

模型建立完成后分别在 1、2、3、5、7 d 五个时相点取外周血及肝,每个时相点取 5 只。

(1) 血液取材

血液标本取材:小鼠吸入麻醉后仰卧位。用碘伏消毒胸部区域后眼科剪剪开表皮,使用 1 mL 一次性注射器行心尖无菌采血。

(2) 病理取材

病理标本取材:碘伏消毒腹部区域。眼科剪剪开腹部后,取肝放入组织固定液中。经组织脱水、石蜡包埋处理制作石蜡标本切片,HE 染色后在光学显微镜下观察组织病变情况。

1.3.4 检测方法

血清炎症因子采用 ELISA 法检测,具体操作按照 TNA- α 和 IL-6 试剂盒检测说明书。血清生化采用动物全自动生化仪检测。

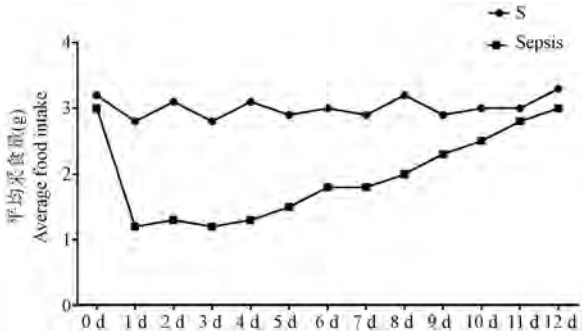
1.4 统计学方法

实验数据平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,采用 GraphPad Prism 6 作图。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较方差齐时采用 Bonferroni 检验,方差不齐时用 Dunnett's T3 检验, $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 死亡率

建模 12 d 内死亡率为 30.2%,其中第 2~6 天死亡率为 27.9%,第 7~12 天死亡率为 2.3%,说明该模型死亡情况符合脓毒症模型的发病规律。



注:与 S 组相比,Sepsis 组采食量呈先下降后缓慢上升趋势。

图 1 两组平均采食量情况

Note. Compared with the S group, the food consumption in the sepsis group decreased rapidly and then restored slowly.

Figure 1 Average food intake in two groups

2.2 平均采食量

S 组与 Sepsis 组的平均采食量见图 1,可见 Sepsis 组在实验后的采食量呈先下降后上升的趋势,至第 4 天开始逐渐上升,至第 12 天达到 S 组平均采食量。

2.3 动物状态评分

S 组与 Sepsis 组的状态评分见图 2,Sepsis 组在实验后的状态逐步变差,主要表现为眼睛分泌物增多、竖毛、弓背、活动度降低等。至第 5 天开始逐步恢复,至第 12 天接近对照组。

2.4 体重变化

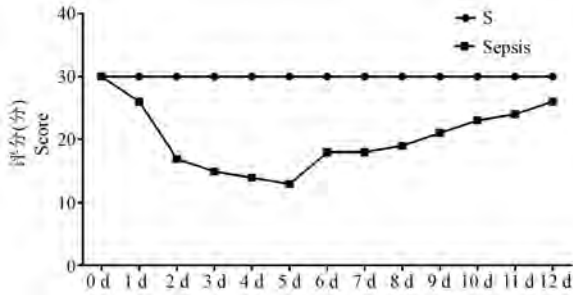
S 组与 Sepsis 组的体重变化见图 3,可见 Sepsis 组在实验后的体重逐步下降,至第 5 天下降至最低日趋稳定,一周后体重开始缓慢上升,至第 12 天仍低于对照组。说明该模型的高代谢、高消耗特征。

2.5 建模前后小鼠创面变化情况

建模前后小鼠创面情况如图 4 所示,假烫伤组小鼠创面均无明显变化;烫伤后 24 h 小鼠创面呈痂状,创面干燥,表层组织变厚,创周略红肿无渗液,皮温稍低。痂下给菌后 24 h 创面整体呈黄绿色,中心及周边出现部分溃疡呈红褐色,出现出血点或坏死斑。创周有少量分泌物,皮温偏高。创面周围略肿胀。小鼠活动明显减少,对外界刺激反应迟钝,走路呈蜷缩弓背状。

2.6 炎症因子(TNF- α 、IL-6)

炎症因子如图 5,TNF- α 在第 1 天升至最高值后呈递减趋势,至第 3 天恢复至正常。与 S 组相比,Sepsis 组第 1、2 天表达明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$);IL-6 第 1 天升至最高值后



注:与 S 组相比,Sepsis 组动物状态逐步下降后缓慢回升接近正常。

图 2 两组动物状态情况

Note. Compared with the S group, the status of animals in the sepsis group became deteriorated quickly and then recovered gradually approaching to the normal status.

Figure 2 Animal status in two groups

呈递减趋势,至第 7 天恢复至正常。与 S 组相比, Sepsis 组第 1、2 天表明明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.7 肝功

如图 6 所示 Sepsis 组 TBIL、TP 在第 1、2、3、5、7 天与 S 组比较均无显著差异; Sepsis 组 AST 在第 5 天升至最高值后呈递减趋势,与 S 组相比,AST 在第 1、2、3、5、7 天均明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$); ALT 在第 3 天升至最高值后呈递减趋势,且与 S 组相比差异具有统计学意义($P<0.01$)。

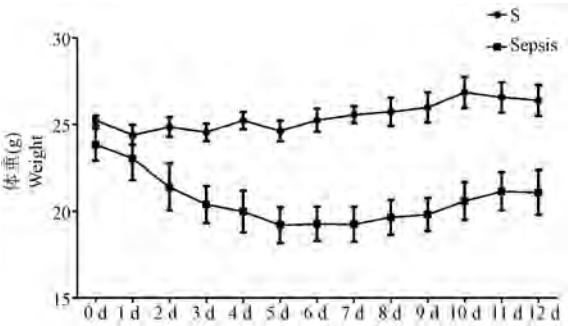
2.8 肾功

如图 7 所示 Sepsis 组 CREA 在第 3 天升至最高值后呈递减趋势,与 S 组相比,CREA 在第 1、2、3、5、7 天均明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);同时 UREA 在第 3 天升至最高值后呈递减趋势,与 S 组相比,第 1、2、3、5、7 天均明显升高,

差异均具有统计学意义($P<0.01$)。

2.9 肝病理

肝 HE 染色结果如图 8 所示, S 组小鼠肝细胞未

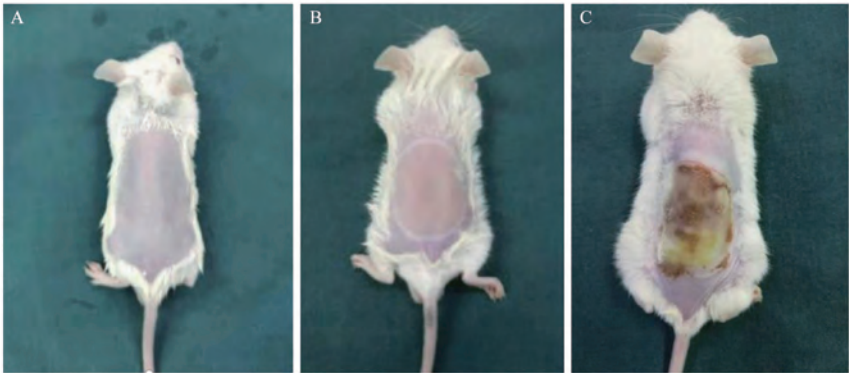


注:与 S 组相比, Sepsis 组体重逐步下降后缓慢回升。

图 3 两组动物体重情况

Note. Compared with the S group, the weight of mice in the sepsis group was quickly reduced and then recovered slowly.

Figure 3 Animal weight in two groups

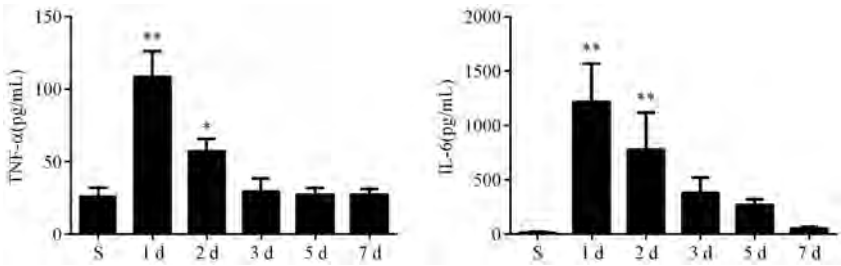


注: A:假烫伤组; B:烫伤后; C:给菌后。

图 4 建模前后小鼠创面变化情况

Note. A, Sham burn group. B, Post burn. C, After PA inoculation.

Figure 4 Changes of wound surface conditions in mice before and after model establishment

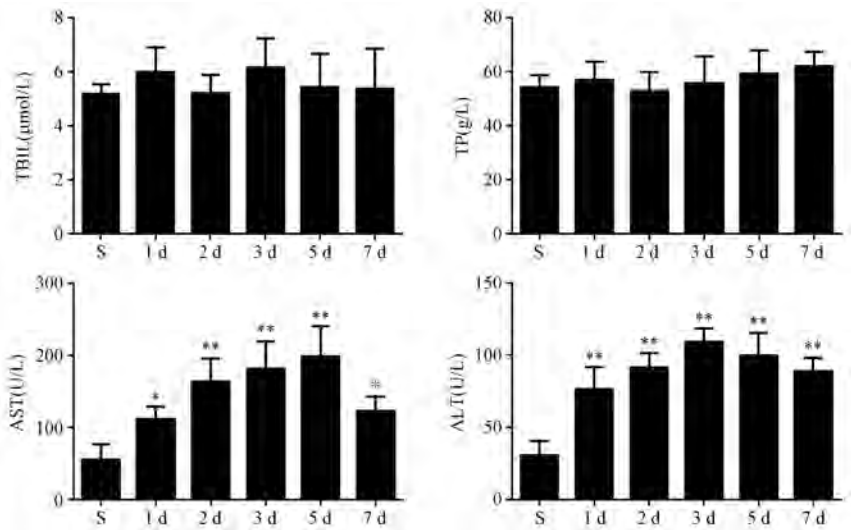


注:与 S 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 5 不同时相点 TNF-α、IL-6 的表达与 S 组比较

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

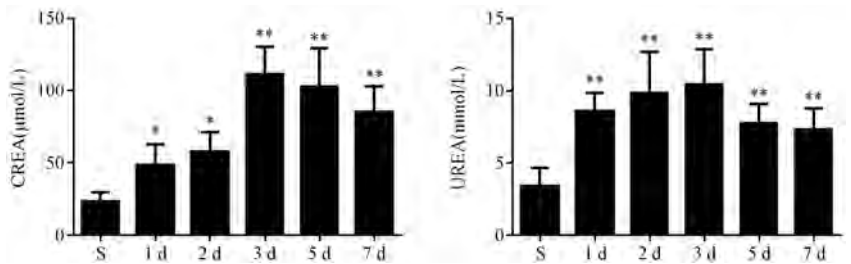
Figure 5 Comparison of TNF-α, IL-6 with S group at different time points



注:与 S 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
图 6 不同时相点肝功与 S 组比较

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

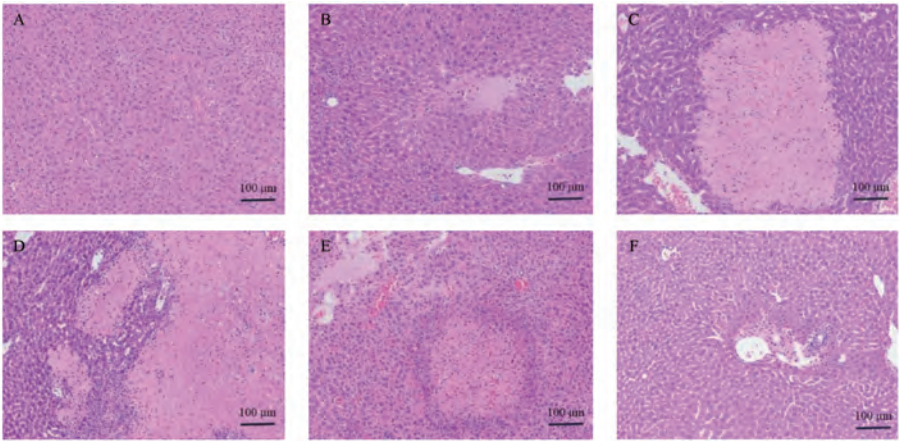
Figure 6 Comparison of liver function with the S group at different time points



注:与 S 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
图 7 不同时相点肾功与 S 组比较

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

Figure 7 Comparison of renal function with the S group at different time points



注:A:S 组;B、C、D、E、F:Sepsis 组第 1、2、3、5、7 天。
图 8 不同时相点肝 HE 染色与 S 组比较

Note. A, S group. B, C, D, E and F, Sepsis group at 1, 2, 3, 5, 7 days.

Figure 8 Comparison of HE staining in liver with the S group at different time points

见变形和坏死,肝窦清晰,未见炎症浸润。Sepsis 组小鼠肝织在各个时相点均可见炎性细胞浸润、肝细胞水肿和部分坏死。且第 2、3、5 天肝部分面积结构紊乱,中央静脉存在变形,并伴有充血。肝切片病理显示,第 2、3、5 天肝损伤程度明显高于第 1 天和第 7 天。

3 讨论

规范化操作流程的建立是确保实验动物模型稳定稳定可靠的关键。为此,本研究以 BALB/c 小鼠这一广泛使用的小鼠品种作为研究对象,结合既往制作轻中度烫伤模型(15%,Ⅲ度)的工作基础,进一步对痂下接种铜绿假单胞菌的剂量和接种方法等进行摸索,主要经验要点如下:第一,为避免烫伤后小鼠早伤后早期因发生休克导致死亡,进而对后续实验产生干扰,在烫伤后我们对小鼠采取快速保温、液体复苏等模拟临床的综合治疗措施,保证模型小鼠均可稳定顺利度过烧烫伤早期休克期^[11-14]。第二,我们对痂下接种铜绿假单胞菌的方法进行了标化和规范,如细菌培养条件(温度、转速时间)及痂下接种位置(创面中心)进行了统一。流行病学资料显示,导致创面脓毒症的常见致病菌为金葡菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌等^[15],其中铜绿假单胞菌既是创面感染的常见菌种^[16],又在脓毒症继发性感染中具有重要意义^[17],因而在建模中应用最为广泛。

第三,经多次实验结果证实,模型动物的 12 d 死亡率也稳定在 30%~40% 以内,表明此方法具有良好的可操作性,既保证死亡率符合重度脓毒症动物模型的相关标准,同时也避免了因死亡率过高或过低造成模型指标的波动。本研究结合前期相关报道,进一步对小鼠烧伤创面脓毒症模型的规范化建模方法进行了探索,建立了标准化操作方法。

为进一步评价模型小鼠在建模后的病理生理变化规律,我们对假烫伤组和烫伤合并细菌感染组小鼠进行了包括基本生理状态和脓毒症相关指标在内的综合性对比研究。首先,既往较少有研究关注模型小鼠的基本状态,我们在本研究中采用长时相点观测动物体重、采食量、动物状态等指标^[18-20],结果显示模型组小鼠以上指标在建模后均长时间低于对照组,虽然进食量在伤后 1 d 即开始缓慢上升,但体重和状态在 7 d 之前一直持续下降,提示烫伤和感染均造成模型小鼠长期处于高代谢、高消耗状态。伤后 7 d 后,虽然进食量仍未恢复到伤前水

平,但因模型小鼠病情显著改善,故体重和状态均得到恢复。其次,我们对脓毒症相关的炎症和脏器功能指标进行检测。既往研究主要对单一时相点或 7 d 内的炎症和脏器功能指标检测^[21]。同样采用烫伤+铜绿假单胞菌感染,观察发现,伤后 7 d 小鼠炎症指标虽有下降,但仍处于高位。我们的结果则与单独注射细菌模型的研究结果更为接近,即注射后 24 h 内达到峰值,随后逐渐下降,7 d 基本恢复。该差异可能与我们的模型死亡率偏低,而该作者的研究中细菌菌量偏高有关。对于脏器功能指标而言,我们发现模型组小鼠肝织在各个时相点可见大量炎性细胞浸润和显著的肝细胞水肿和坏死此外模型小鼠血清 ALT、AST、UREA 和 CREA 等反映急性肝、肾功能损伤的指标也持续升高,且在伤后 7 d 仍高于对照小鼠,表明肾功及肝功能在该模型中影响显著。我们前期在单独脓毒症模型小鼠中并未观察到肝出现显著的坏死现象,但在本模型中肝组织坏死非常显著,提示多重打击下,机体脏器功能可能发生叠加损伤效应,该现象值得进一步研究探讨。既往多次研究结果表明,脓毒症模型组的小鼠死亡集中发生在建模后 2~6 d(占死亡数的 90%左右),这期间的死亡无明显的趋势。模型组死亡情况均发生于 24 h 以后(烫伤后感染期),符合当前国际通用的“二次打击”模型(two-hit model)的特点和基本要求^[22],即一次打击(创伤)导致亚致死性伤情,二次打击(感染)引发模型动物死亡。同时也与当前临床烧伤患者多能度过早期休克期,但易并发后续感染,引发脓毒症并导致预后不佳的病理生理特点较为一致^[23]。

常用的脓毒症模型包括:(1)盲肠结扎穿孔术(CLP)造成单纯的腹腔感染。该模型是应用较广泛,具代表意义的一种模型,更类似于人类脓毒症的进展和特点。但该模型对施术者手法和动物个体差异的影响较大,不易操作。(2)采用细菌(内毒素)对机体的直接损伤。该模型易于控制,模型重现性较好。但并不完全模拟脓毒症的发病过程。更为重要的是,上述模型与烧烫伤后创面感染所致脓毒症具有一定的差异,并不能有效模拟其临床病程^[24]。此外,目前已有的创面脓毒症动物模型缺乏标准化的操作方法,同时尚未进行长时段的指标检测。为此,本实验在规范制作烫伤创面和标化痂下细菌接种的同时,对模型小鼠各项指标进行了长时段观测。结果显示,该模型可以提供了一个较好的

讨论烫伤创面与烫伤脓毒症关系的感染模型,同时较好的反应其病理发展过程中的休克期、感染期及修复期的阶段性变化规律,为研究轻度烫伤合并创面感染提供了一种良好的动物模型,较其他模型可能更适于临床轻度创面烫伤脓毒症的相关研究,也为开展不同类型的脓毒症临床药物、临床治疗、机制研究等提供合适的动物模型。

创面脓毒症的发生机制及治疗方法的研究一直是研究的热点与重点。建立标准化的脓毒症动物模型是探索全身性感染、感染性休克和多器官功能障碍综合症的病理生理学机制和防治措施的需要。

参考文献:

- [1] Brans TA, Dutrieux RP, Hoekstra MJ, et al. Histopathological evaluation of scalds and contact burns in the pig model [J]. Bums, 1994, 20(1): 48-51.
- [2] 王大鹏, 孙笑非, 徐华彪, 等. 烧伤合并人工海水浸泡后对实验兔肾脏病理形态学的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(9): 533-536.
- [3] Lemay AC, Antonio A, Restrepo MI, et al. Predictors of long-term mortality after severe sepsis in the elderly [J]. Am J Med Sci, 2014, 347(4): 282-288.
- [4] Zang Q, Maass DL, White J, et al. Cardiac mitochondrial damage and loss of ROS defense after burn injury: the beneficial effects of antioxidant therapy [J]. J Appl Physiol, 2007, 102(1): 103-112.
- [5] 褚锋, 刘建国, 唐帆, 等. 小鼠Ⅲ度烧伤模型的复制及皮肤病理形态改变的动态观察 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(3): 213-215.
- [6] 于晟, 薛晓东, 杨生兰, 等. 大鼠高原严重烧伤后早期多脏器损伤的病理观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(6): 343-345.
- [7] Teplitz C, Davis D, Manson AD, et al. Pseudomonas burn wound sepsis (I): pathogenesis of experimental pseudomonas burn wound sepsis [J]. J Surg Res, 1964, 4(5): 200-216.
- [8] 彭程, 贺全勇, 彭浩. 烧伤创面脓毒症大鼠肺组织细胞凋亡的研究 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(14): 2223-2225.
- [9] 万义福, 许宝华, 张玉珍, 等. 大鼠严重烧伤后心肌细胞 GRP94 表达变化及其意义 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(2): 43-47.
- [10] Sheu SY, Wang WL, Fu YT, et al. The pig as an experimental model for mid-dermal burns research [J]. Bums, 2014, 40(8): 1679-1688.
- [11] Lavrentieva A, Kontakiotis T, Lazaridis L, et al. Inflammatory markers in patients with severe burn injury [J]. Bums, 2007,

- 33(2): 189-194.
- [12] Shen WC, Wang X, Qin WT, et al. Exogenous carbon monoxide suppresses *Escherichia coli* vitality and improves survival in an *Escherichia coli*-induced murine sepsis model [J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35: 1566-1576.
- [13] Rech MA, Mosier MJ, McConkey K, et al. Outcomes in burn-injured patients who develop sepsis [J]. J Burn Care Res, 2019, 40(3): 269-273.
- [14] Fitzwater J, Purdue GF, Hunt JL, et al. The risk factors and time course of sepsis and organ dysfunction after burn trauma [J]. J Trauma, 2003, 54: 959-966.
- [15] Li W, Wang M, Zhu B, et al. Prediction of median survival time in sepsis patients by the SOFA score combined with different predictors [J]. Burns Trauma, 2020, 8: tkz006.
- [16] Hill DM, Percy MD, Velamuri SR, et al. Predictors for identifying burn sepsis and performance vs existing criteria [J]. J Burn Care Res, 2018, 39(6): 982-988.
- [17] Zhou ZH, Sun B, Lin K, et al. Prevention of rabbit acute lung injury by surfactant, inhaled nitric oxide and pressure support ventilation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(3): 581-588.
- [18] Takagi K, Suzuki F, Barrow RE, et al. Growth hormone improves the resistance of thermally injured mice infected with herpes simplex virus type1 [J]. J Trauma, 1998, 44(3): 517-522.
- [19] Nader Meyer T, Lázaro Da Silva A. Ketamine reduces mortality of severely burnt rats when compared to midazolam plus fentanyl [J]. Bums, 2004, 30(5): 425-430.
- [20] Zheng B, Shen C, Sun J, et al. Developing a simple burn model in rats of different ages [J]. J Burn Care Res, 2019, 40(5): 639-647.
- [21] Xiao M, Li L, Li C, et al. Role of autophagy and apoptosis in wound tissue of deep second-degree burn in rats [J]. Acad Emerg Med, 2014, 21(4): 383-391.
- [22] Liu Y, Zhou Q, Wang Y, et al. Negative pressure wound therapy decreases mortality in a murine model of burn-wound sepsis involving *Pseudomonas aeruginosa* infection [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e90494.
- [23] Beffa DC, Fischman AJ, Fagan SP, et al. Simvastatin treatment improves survival in a murine model of burn sepsis: role of interleukin 6 [J]. Burns, 2011, 37(2): 222-226.
- [24] Jing F, Li M, Ren H, et al. Effects of atorvastatin combined with low-molecular-weight heparin on plasma inflammatory cytokine level and pulmonary pathophysiology of rats with sepsis [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(2): 1048-1054.

[收稿日期] 2021-08-04

赵嘉宁,梁惠玲,杨炯,等. 天门冬水提取物对人结肠癌细胞增殖、凋亡、迁移的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 14-22.

Zhao JN, Liang HL, Yang X, et al. Effects of aqueous extract of asparagus on the proliferation, apoptosis and migration of colon cancer HCT116 cell [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 14-22.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.003

天门冬水提取物对人结肠癌细胞增殖、凋亡、迁移的影响

赵嘉宁¹,梁惠玲¹,杨 炯¹,李艳菊²,王飞清^{1,3},陶奕汐³,王 琨³,
严雪梅³,刘 洋^{1,3*}

(1. 贵州中医药大学,贵阳 550025;2. 贵州医科大学,贵阳 550004;3. 贵州中医药大学第一附属医院,贵阳 550001)

【摘要】 目的 本实验研究天门冬水提取物对人结肠癌 HCT116 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。**方法** 本研究利用结晶紫染色法观察结肠癌 HCT116 细胞形态学变化,采用 CCK-8 法、集落形成实验、EdU/Hoechst 33258 荧光染色检测天门冬水提取物对 HCT116 细胞增殖的影响,AnnexinV-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡率,伤口愈合实验和 Transwell 侵袭实验检测细胞的迁移和侵袭情况,Real-time PCR 检测基因 *p53* 和 *Bax* 的 mRNA 水平。**结果** 天门冬水提取物处理 HCT116 细胞 24 h 后,细胞数目较对照组明显减少,贴壁不牢,出现不同程度核固缩。天门冬水提取物以剂量依赖的方式抑制 HCT116 细胞活性,促进细胞凋亡。集落形成实验、EdU/Hoechst 33258 荧光染色法、伤口愈合实验、Transwell 侵袭实验结果提示天门冬水提取物抑制细胞增殖、迁移和侵袭。Real-time PCR 的结果显示天门冬组凋亡基因 *p53* 和 *Bax* mRNA 高表达。**结论** 天门冬水提取物可导致凋亡基因 *p53* 和 *Bax* 的 mRNA 高表达从而抑制结肠癌 HCT116 细胞的增殖、迁移和侵袭,促进其凋亡。

【关键词】 天门冬水提取物;HCT116 细胞;增殖;凋亡;迁移;侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0014-09

Effects of aqueous extract of asparagus on the proliferation, apoptosis and migration of colon cancer HCT116 cell

ZHAO Jianing¹, LIANG Huiling¹, YANG Xu¹, LI Yanju², WANG Feiqing^{1,3}, TAO Yixi³, WANG Kun³,
YAN Xuemei³, LIU Yang^{1,3*}

(1. GuiZhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China. 2. Guizhou Medical University, Guiyang 550004. 3. the First Hospital Attached to GuiZhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001)

【Abstract】 Objective To study the effects of water extract of asparagus on the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of human colorectal cancer cell line HCT116. **Methods** A CCK-8 assay, colony-forming experiment and EdU/Hoechst 33258 fluorescent dye test were performed to detect the inhibitory effect of water extract of asparagus on the proliferation of human colorectal cancer HCT116 cells. The apoptosis rate was observed via Annexin V-FITC/PI flow cytometry. The detection of cell migration and invasion were investigated by a wound healing test and

【基金项目】 国家自然科学基金(82160519);贵州省科技厅项目([2017]7140、[2018]2759、黔科合支撑[2022]一般 181);贵阳市科技局项目(筑科合[2019]9-2-2);贵中医科学院内(2019)44、45、46 号。

【作者简介】 赵嘉宁(1996—),男,在读硕士研究生,研究方向:民族医药防治肿瘤研究。E-mail:zhaojianinghao@126.com

【通信作者】 刘洋(1978—),男,硕士生导师,博士,研究方向:民族医药防治肿瘤研究。E-mail:ly7878@163.com

Transwell invasion test, respectively. Real-time PCR was used to detect the mRNA levels of genes *p53* and *Bax*. **Results** Compared with the control group cells, the HCT116 cells that had been treated with water extract of asparagus for 24 h were significantly fewer in number, adhered to the wall less firmly, and exhibited different degrees of nuclear pyknosis. The water extract of asparagus could inhibit the activity of HCT116 cells and promote apoptosis in a dose-dependent manner. The result of a colony formation test, EdU/Hoechst 33258 fluorescence staining, wound healing test, and Transwell invasion test reveal that the water extract of asparagus inhibited cell proliferation, migration, and invasion. The Real-time PCR result show that the water extract of asparagus could upregulate the expression of apoptosis genes *p53* and *Bax*. **Conclusions** The water extract of asparagus can inhibit the proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer HCT116 cells, promote their apoptosis, and lead to the high expression of apoptosis genes *p53* and *Bax*.

【Keywords】 asparagus; HCT116 cells; proliferation; apoptosis; migration; invasion

结直肠癌是消化系统高发的恶性肿瘤,由于其起病较隐匿、发病时多已属中晚期,预后较差。据最新全球癌症数据统计显示,结直肠癌是男性第三、女性第二高发肿瘤,一般人群累计终生风险为 5%,恶性致死率排名第三^[1-2]。在中国,结直肠癌死因排位上升到第 5 位,且呈年轻化趋势^[3],这给患者、家庭乃至整个国家带来了巨大的身体和经济负担^[4]。众所周知,化学疗法的毒副反应较大,而新兴的靶向治疗方法面临耐药性和价格昂贵的严峻挑战,因此,开发具有多种化学结构和药理作用的天然抗肿瘤药物与治疗肿瘤疾病需求的殷切期盼不谋而合^[5]。天门冬是百合科植物天冬(*asparagus cochinchinensis* (Lour) Merr)的块根^[6],是我国一种传统中草药,《神龙本草经》将其归为上品,记载此药主风湿偏痹,强骨髓,杀三虫,去浮尸,言久服轻生益气延年,当代临床常用于治疗阴虚发热、咳嗽吐血、肺癰、咽喉肿痛、消渴、便秘等病症。近年来国内外研究从天门冬分离出天门冬素、甾体皂苷、低聚糖和多糖类等多种成分^[7-8],据文献报道这些成分具有抗炎、抗氧化、增强免疫力、抗肿瘤活性等药理作用,且几乎对人体没有毒副反应^[9-11]。目前有关天门冬抗肿瘤作用的研究主要集中在单体及粗提物通过诱导肿瘤细胞凋亡、周期阻滞,抑制其增殖、迁移、肿瘤生长,延长荷瘤小鼠生存期等方面^[12-15],然而有关天门冬对人结直肠癌 HCT116 细胞的影响报道尚属空白。本研究评价了天门冬水提取物对人结肠癌 HCT116 细胞的增殖、迁移、侵袭的抑制及促进凋亡等作用效果,旨为天门冬的开发和应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人结肠癌 HCT116 细胞系由中国科学院上海细

胞生物所提供。

1.2 主要试剂与仪器

天门冬(贵阳济仁堂药业有限公司);高糖 DMEM 细胞培养基(美国 GIBCO 公司,批号 2200905);胎牛血清(以色列 BI 公司,批号 1706126);PBS 缓冲液(北京索莱宝公司,批号 422R023);青/链霉素混合液(北京索莱宝公司,批号 20201023);胰酶细胞消化液(南京碧云天公司,批号 70120500);二甲基亚砜(北京索莱宝公司,批号 710N0317);4%多聚甲醛(北京索莱宝公司,批号 70085400);结晶紫染料(北京索莱宝公司,批号 20191119);细胞增殖-毒性检测试剂盒 CCK-8(日本同仁公司);EdU/Hoechst 33342 试剂盒(广州锐博公司,批号 S0626);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司,批号 20210727);逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 检测试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);氯仿、异丙醇、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);引物合成、DEPC 处理水(上海生物工程有限公司)。

CO₂ 恒温培养箱、酶标仪(美国 Thermo 公司);超净工作台(上海博讯实业有限公司);低速离心机、微量移液器(德国 Eppendorf 公司);流式细胞分析仪(美国 BD 公司);倒置显微镜、荧光显微镜 BX53(日本 Olympus 公司);PCR 扩增仪(北京东胜创新生物科技有限公司);6 孔培养板、48 孔培养板、96 孔培养板、Transwell 小室(美国 Corning 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 天门冬水提取物制备

精密称取天门冬饮片 50 g,加 10 倍体积水称重,浸泡 2 h,回流提取 2 次,每次 1 h,抽滤,合并滤液,用水补足减少的重量,药液在 70℃ 减压浓缩,浓缩至含生药 1 g/mL 浓度,取浓缩液 2 mL 加水稀释

至 10 mL, 1000 r/min 离心 5 min, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 滤液分装于无菌离心管, 置于 -20°C 冰箱中保存备用。天门冬水提取物的制备方法参考了先前的研究^[16-17]。

1.3.2 细胞培养

将人结肠癌 HCT116 细胞培养于添加 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素、10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 置于 37°C 、5% CO_2 的恒温加湿培养箱中培养, 2~3 d 以 1:3 的比例传代 1 次。取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.3.3 CCK-8 检测天门冬水提取物对人结肠癌细胞 HCT116 增殖的影响

取生长状态良好的 HCT116 细胞接种于 96 孔板中, 接种密度为 6×10^3 个/孔, 置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养, 待细胞完全贴壁生长后, 去除原培养基, 添加含不同浓度的天门冬水提取物的完全培养基, 各组对应浓度分别为 25、50、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$, 并设置空白对照组 (control), 每个药物浓度设 6 个复孔, 96 孔板周围一圈均每孔加入 200 μL PBS 溶液, 培养 24、48 或 72 h, 换液, 每孔加入含 10% CCK-8 的完全培养基 100 μL , 培养箱中继续孵育 4 h。用酶标仪测定 450 nm 波长处的 OD 值。实验重复 3 次, 记录每块板的数值, 并计算 IC_{50} 及抑制率。

细胞增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组吸光度值} / \text{对照组吸光度值}) \times 100\%$

1.3.4 结晶紫染色

待细胞生长至 70%~90% 融合度时, 消化收集细胞, 按细胞密度为每毫升 1×10^5 个的要求在 6 孔细胞培养板进行接种, 37°C 、5% 的 CO_2 细胞培养箱培养 24 h, 待细胞融合度达 50% 时开始加药, 以完全培养基作为空白对照组, 分别加入 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ (依据 CCK-8 实验结果确定此浓度为余下实验设计浓度) 天门冬水提取物的完全培养基作用 24 h。PBS 洗涤 2 遍, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤 2 遍, 1% 结晶紫染色 15 min, 自来水洗去多余结晶紫染料, 室温自然晾干后在倒置显微镜下对细胞形态变化进行观察分析、拍照。

1.3.5 集落形成实验

将细胞密度为 700 个/孔生长状态良好的 HCT116 细胞接种到 6 孔板中, 37°C 、5% 的 CO_2 细胞培养箱培养 24 h, 吸弃旧培养基, 给药组分别加入含 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度天门冬水提取物培养基, 对

照组加入完全培养基, 每 3 d 换液 1 次, 待细胞集落形成合适大小时 (药物处理 14 d), 吸弃条件培养基, PBS 洗涤 2 次, 然后将细胞集落固定在 4% 多聚甲醛中 20 min, 弃液后 PBS 洗涤 2 次, 结晶紫溶液染色 15 min, 吸弃染色液, PBS 洗涤 2~3 次, 室温自然晾干, 用光镜计数含有 50 个以上细胞的集落数。实验重复 3 次。

1.3.6 EdU 染色检测细胞 DNA 合成率

将生长对数期细胞按每毫升 2×10^4 个细胞悬液接种在 48 孔板中, 待细胞贴壁且融合度达 50% 时, 吸弃旧培养基, 添加含 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 天门冬水提取物的完全培养基, 对照组添加完全培养基, 继续培养 24 h, 加入 1000:1 浓度的 EdU 标记液在 37°C 温箱内孵育 2 h。PBS 洗涤细胞 2 次, 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 2 $\mu\text{g/mL}$ 甘氨酸溶液中摇床孵育 5 min, PBS 洗涤 5 min, 0.5% TritonX-100 摇床 10 min, PBS 洗涤 5 min, 荧光染料避光孵育 30 min, PBS 每次洗涤 10 min, 共 3 次。然后用倒置荧光显微镜成像。实验重复 3 次, 并对每个孔中至少 10 个来自 3 个位置的细胞进行拍照、分析。

$\text{DNA 合成率} = (\text{红色荧光细胞数} / \text{蓝色荧光细胞数}) \times 100\%$

1.3.7 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率

选取生长状态良好的 HCT116 细胞消化并计数, 按为每毫升 1×10^5 个细胞密度求接种于 6 孔板中, 放入 CO_2 孵箱中培养 24 h。根据实验分组设计加入相应药物浓度的条件培养基, 药物作用 24 h 后使用不含 EDTA 的胰酶消化, 消化时间不宜过长, 2000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 并用预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 每个样品管加入 500 μL Binding Buffer 重悬细胞, 加入 Annexin V-FITC/PI 荧光染料, 避光反应 5 min 后, 利用流式细胞仪分析结果。实验重复 3 次, FlowJo 10.0 软件分析细胞凋亡率。

1.3.8 伤口愈合试验

用伤口愈合法测定细胞迁移率, 将 2×10^5 个/孔细胞接种到 6 孔板上, 在 37°C 温箱、完全培养基中培养 24 h。天门冬水提取物与不含 FBS 的新鲜培养基配置成实验设计浓度, 将单层划伤, 分别在不同药物浓度环境中孵育 24 h。在倒置显微镜下拍摄了 6 个不同的位置, 实验重复 3 次。用 Image J 软件分析伤口面积。

1.3.9 Transwell 侵袭试验

将各浓度组处理 24 h 并饥饿 24 h 的 HCT116 细胞(5×10^4 个/孔)重悬于 200 μL 的无 FBS 高糖 DMEM 培养基中,接种到上室内(有基质凝胶涂层膜),下室加入 600 μL 含 20%FBS 完全培养基,孵育 24 h 后,用棉签从膜上表面取出未侵入的细胞,侵入细胞固定,结晶紫染色,倒置显微镜拍照,每组随机 6 各视野。实验重复 3 次,Image J 软件计数。

1.3.10 Real-time PCR 检测 *p53*、*Bax* 基因表达

取生长对数期 HCT116 细胞按实验设计药物浓度组接种细胞于 6 孔板中,每组 3 个复孔,处理 24 h。用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,TRIzol 法提取总 RNA,按 TRIzol 试剂说明书进行操作,紫外分光光度计测定 RNA 溶液浓度和纯度。取总 RNA 1 μL 按要求逆转录为 cDNA 循环进行扩增。再以此为模版,按 25 μL 体系进行 PCR 反应。以 GAPDH 基因为内参,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,40 cycles。Melt curve: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 cycles。结果通过 PCR 仪记录的 Ct 值对起始模板相对定量分析,每个样本设 3 个复孔,重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理,用 Graph Pad Prism 8 软件进行统计作图。数据结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,获得数据分析为正态性分布,多组间比较采用单因素方差分析,当 $P<0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 天门冬水提取物抑制 HCT116 细胞的增殖

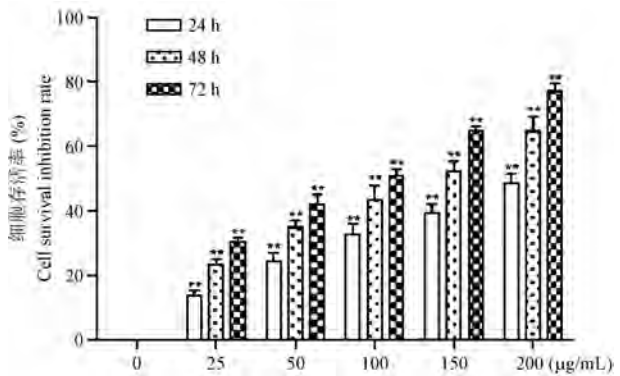
CCK-8 法检测天门冬水提取物对 HCT116 细胞活性的影响,结果如(图 1)所示,天门冬水提取物以浓度和时间依赖性方式抑制 HCT116 细胞的活性,且差异均具有统计学意义($P<0.01$)。通过 Graph

Pad Prism 8 软件计算其 24 h 半抑制浓度 IC_{50} 为 (200.17 ± 12.08) $\mu\text{g/mL}$,结果表明天门冬水提取物在 24 h 已发挥抑制 HCT116 细胞生长的作用,接下来我们的实验均采用天门冬水提取物浓度为 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$,以 0 $\mu\text{g/mL}$ 作为空白对照组,处理时间为 24 h 的干预条件。

结晶紫染色观察到随着天门冬水提取物浓度的增加,细胞数量逐渐减少,贴壁不牢,细胞皱缩,出现不同程度的核固缩,细胞核内空泡化(图 2)。

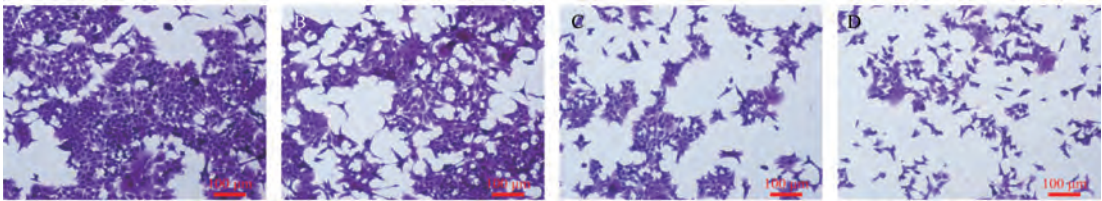
集落形成试验结果表明,药物组的集落数明显低于空白对照组(图 3),且差异均具有统计学意义($P<0.01$),提示天门冬水提取物对 HCT116 细胞的集落形成能力有明显抑制作用。

EdU/Hoechst 33342 荧光双染法结果如(图 4)所示,在天门冬水提取物中培养 24 h 的细胞数量与对照组相比随浓度梯度显著减少,EdU 相对荧光强度百分率随浓度增加显著降低,且差异均具有统计学意义($P<0.05$)。表明天门冬水提取物对 HCT116 细胞的 DNA 合成能力有明显抑制作用。



注:与对照组比较, ** $P<0.01$ 。
图 1 各组细胞 12~72 h 细胞存活率
Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 1 12~72 h cell survival rate of cells in each group

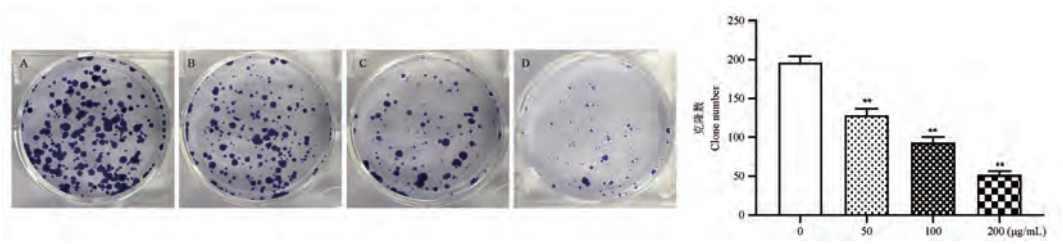


注:A:对照组;B:天门冬 50 $\mu\text{g/mL}$;C:天门冬 100 $\mu\text{g/mL}$;D:天门冬 200 $\mu\text{g/mL}$ 。

图 2 天门冬水提取物对 HCT116 细胞形态的影响

Note. A, Control group. B, Asparagus 50 $\mu\text{g/mL}$. C, Asparagus 100 $\mu\text{g/mL}$. D, Asparagus 200 $\mu\text{g/mL}$.

Figure 2 Effect of the water extract of asparagus on HCT116 cells morphology

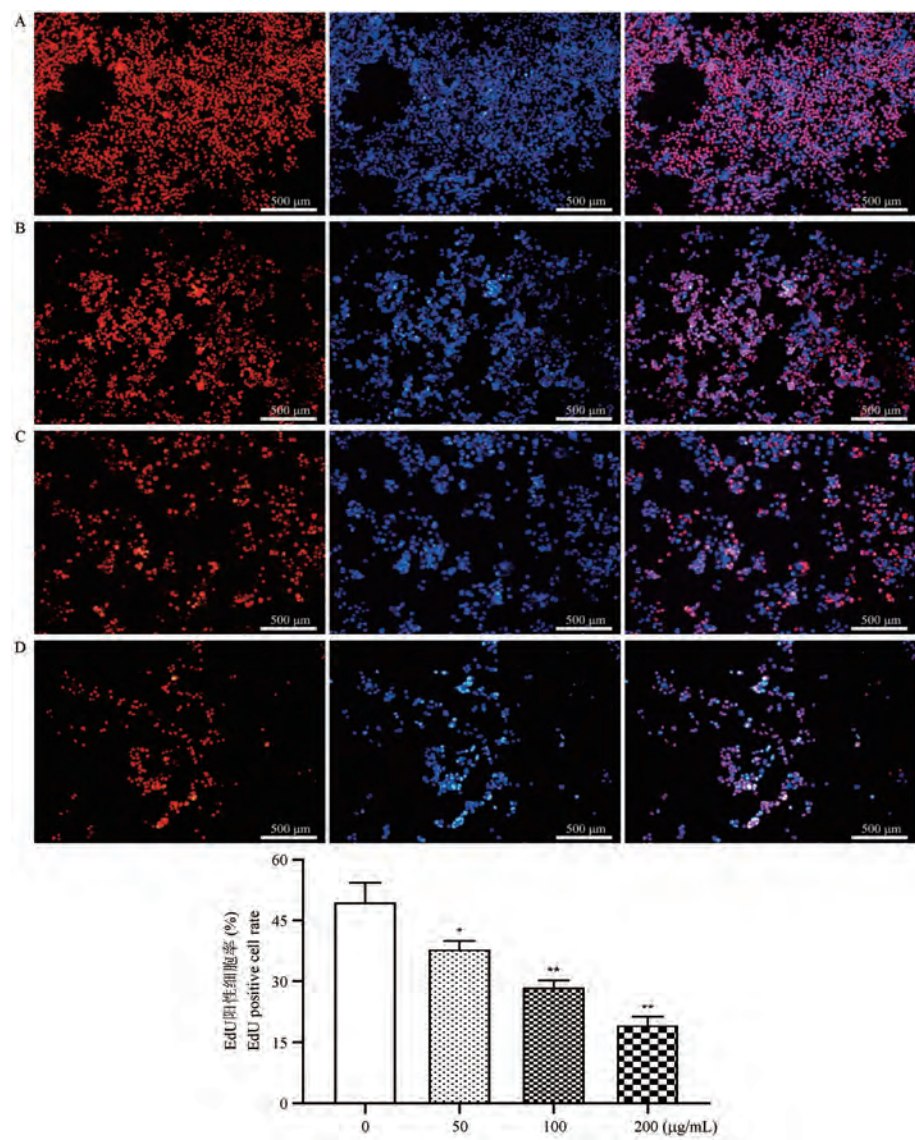


注:A:对照组;B:天门冬 50 μg/mL;C:天门冬 100 μg/mL;D:天门冬 200 μg/mL。与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 3 各组细胞克隆形成能力比较

Note. A, Control group. B, Asparagus 50 μg/mL. C, Asparagus 100 μg/mL. D, Asparagus 200 μg/mL. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Comparison of cell clone formation ability in each group



注:A:对照组;B:天门冬 50 μg/mL;C:天门冬 100 μg/mL;D:天门冬 200 μg/mL。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 4 各组 EdU 阳性细胞率比较

Note. A, Control group. B, Asparagus 50 μg/mL. C, Asparagus 100 μg/mL. D, Asparagus 200 μg/mL. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 4 Comparison of EdU positive cell rate in each group

2.2 天门冬水提取物促进 HCT116 细胞的凋亡

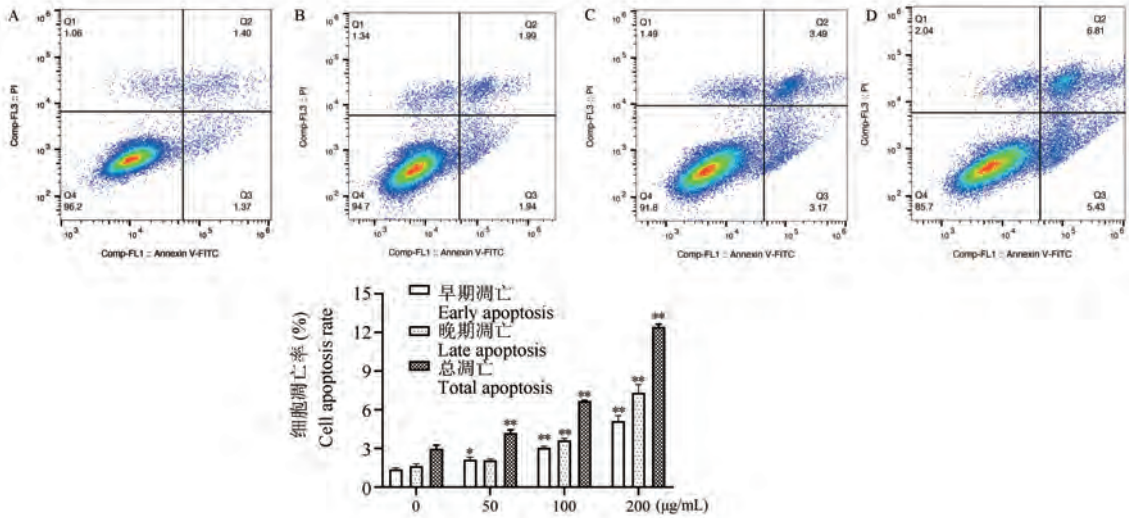
流式细胞术检测分析结果表明,50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的天门冬水提取物均可促进 HCT116 细胞凋亡,且呈浓度依赖性,总凋亡率分别为 $(4.20 \pm 0.19)\%$ 、 $(6.68 \pm 0.04)\%$ 、 $(12.45 \pm 0.17)\%$,与对照组比较差异均具有统计学意义($P<0.01$),其中早期凋亡率较对照组增加,且差异均具有显著统计学意义($P<0.05$),晚期凋亡率与对照组相比,100、200 $\mu\text{g/mL}$ 组差异具有统计学意义($P<0.01$) (图 5)。

Real-time PCR 结果表明,随着天门冬水提取物浓度的增加,凋亡相关基因 *p53*、*Bax* 的 mRNA 表达水平升高,与空白对照组比较,100、200 $\mu\text{g/mL}$ 组差异具有显著的统计学意义($P<0.01$) (图 6)。

2.3 天门冬水提取物抑制 HCT116 细胞的迁移和侵袭

天门冬水提取物处理 HCT116 细胞 24 h 后,伤口愈合实验检测结果显示,划伤 24 h 后,随着药物浓度的增加,其迁移率逐渐降低,具体结果如(图 7)所示,各浓度组与 control 组比较均具有统计学差异($P<0.01$)。提示天门冬水提取物能抑制 HCT116 细胞的迁移能力。

Transwell 侵袭试验结果表明,不同浓度的天门冬水提取物均能抑制 HCT116 细胞的侵袭能力,且呈现剂量依赖关系。统计学分析显示在 HTC116 细胞侵袭能力方面,各天门冬水提取物浓度组与 control 组之间比较存在统计学差异($P<0.01$) (图 8)。

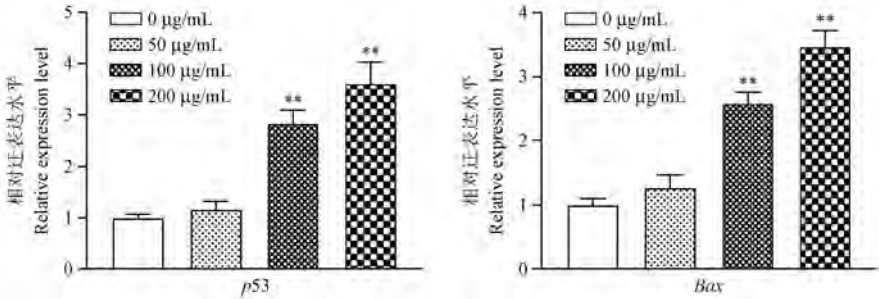


注:A:对照组;B:天门冬 50 $\mu\text{g/mL}$;C:天门冬 100 $\mu\text{g/mL}$;D:天门冬 200 $\mu\text{g/mL}$ 。与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 5 各组细胞凋亡比较

Note. A, Control group. B, Asparagus 50 $\mu\text{g/mL}$. C, Asparagus 100 $\mu\text{g/mL}$. D, Asparagus 200 $\mu\text{g/mL}$. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Comparison of apoptosis of cells in each group

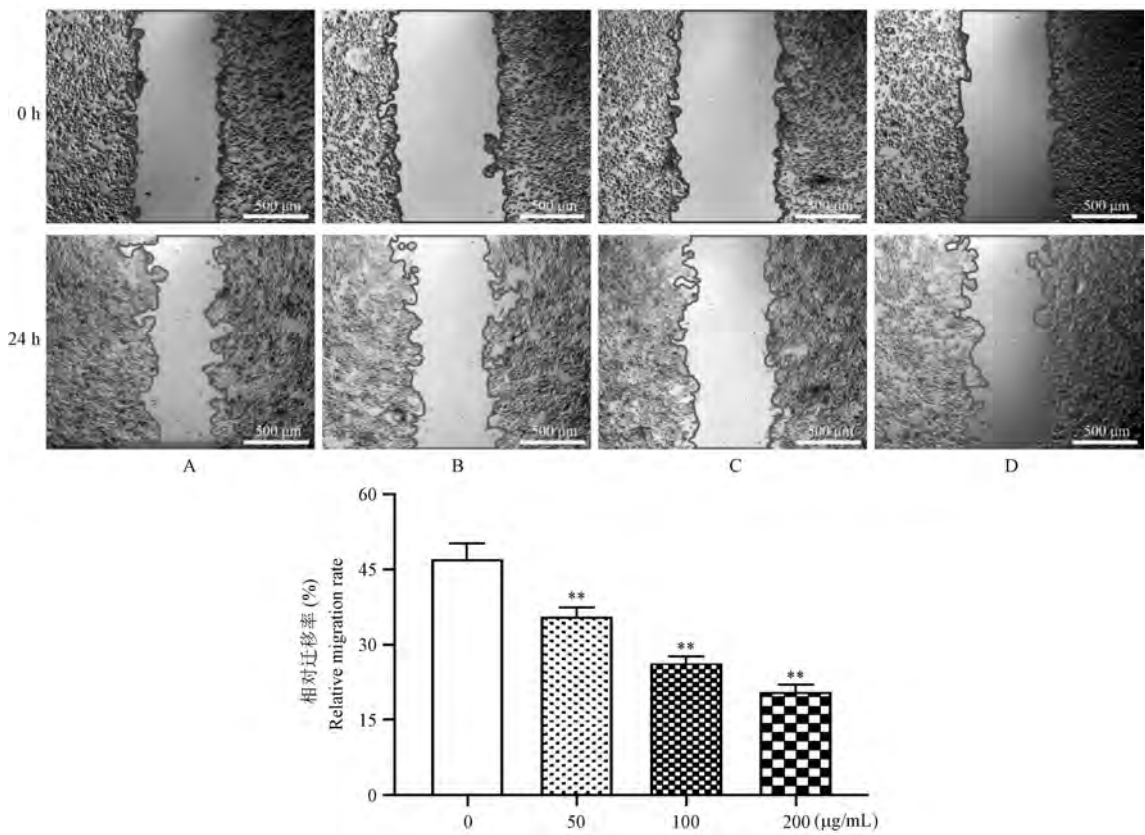


注:与对照组比较,** $P<0.01$ 。

图 6 各组细胞中 *p53*、*Bax* 基因 mRNA 表达水平变化

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

Figure 6 Changes in the expression of mRNA levels of *p53* and *Bax* genes in cells of each group changed

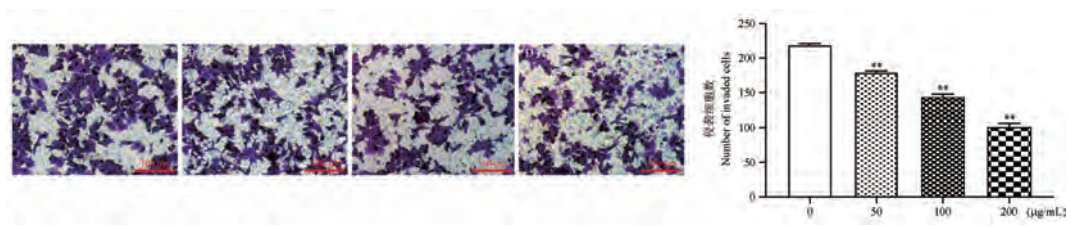


注:A;对照组;B;天门冬 50 μg/mL;C;天门冬 100 μg/mL;D;天门冬 200 μg/mL。与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 7 天门冬水提取物对 HCT116 细胞迁移能力的影响

Note. A, Control group. B, Asparagus 50 μg/mL. C, Asparagus 100 μg/mL. D, Asparagus 200 μg/mL. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 7 Effect of asparagus on the migration ability of colon cancer HCT116 cell



注:A;对照组;B;天门冬 50 μg/mL;C;天门冬 100 μg/mL;D;天门冬 200 μg/mL。与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 8 天门冬水提取物对 HCT116 细胞侵袭能力的影响

Note. A, Control group. B, Asparagus 50 μg/mL. C, Asparagus 100 μg/mL. D, Asparagus 200 μg/mL. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 8 Effect of asparagus on the invasion ability of colon cancer HCT116 cell

3 讨论

结直肠癌的形成是一个复杂的过程,中医学认为,大抵是患者正气亏损,邪毒侵袭,导致气滞、痰凝、湿聚等病理变化所致,是一个整体为虚,局部为实的全身性疾病。临床研究发现结直肠癌患者大多出现免疫抑制^[18],这种免疫功能紊乱可对应中医

“正气虚损”的微环境。基于此,扶正法是中医理论中非常重要的治疗大法,刘嘉湘教授主张^[19]“扶正治癌”,认为准确辨证、严守病机,立足扶正,据实祛邪,把握疾病的主要矛盾和矛盾的主要方面,让扶正与祛邪有机结合,如此可掌握治疗肿瘤的主动权。所以近年来益气扶正类中药在恶性肿瘤治疗中的研究与应用越来越受到重视^[20-22]。

天冬始载于《神农本草经》,包含天门冬素、甾体皂苷、低聚糖和多糖类等多种成分^[6-7],具有清热、养肺肾阴的功效。天冬除了显著的抗炎、抗氧化、增强免疫力等作用,亦被发现具有抗癌活性。临床常采用以天门冬等中药组成的复方治疗恶性肿瘤性疾病^[23],其能够发挥稳定病灶、改善生存质量及延长生存期等功效。研究发现天门冬皂苷提取物对结直肠癌细胞^[24]有显著的细胞毒性作用,Bousserouel 等^[13]结果更详细地表明,ASP 的甲醇提取物可以通过激活人结肠腺癌细胞 SW480 和 SW620 的 TRAIL 死亡受体通路诱导细胞凋亡。程伟^[25]研究表明天冬多糖体在外常氧和缺氧下可抑制人肝癌细胞 (SK-Hep1 和 Hep-3B) HIF1 α 和 VEGF 表达,从而抑制人肝癌细胞 (SK-Hep1 和 Hep-3B) 增殖、迁移、侵袭和血管形成。本课题以天门冬水提物为研究对象,因前期药物分析发现,天门冬水提物主要活性成分包括总皂苷、多糖、槲皮素、 β -谷甾醇和 7-甲氧基-2-甲基异黄酮,故天门冬水提物可能具有多效协同抑制结直肠癌增殖的作用,且天门冬水提物获取程序较简化,易于临床广泛推广^[26]。

本研究采用人结直肠癌 HCT116 细胞为载体,通过 CCK-8 法、集落形成实验、EdU 荧光染色法检测天门冬水提取物对 HCT116 细胞增殖的影响,结果表明,天门冬水提取物可有效抑制 HCT116 细胞增殖,并呈一定的时间和浓度依赖性。

细胞凋亡又称细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD),在大多数恶性肿瘤发病学上占有重要地位。Liu 等^[27]用流式细胞术进行细胞凋亡分析,评价天门冬皂苷 G(7)对细胞凋亡的影响,结果显示,随着天门冬皂苷浓度的增加,肺癌细胞 NCI-H460 的凋亡细胞的百分比增加,天门冬皂苷可呈剂量依赖性地促进人大细胞肺癌细胞系 NCI-H460 的凋亡,从而发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用。本研究采用流式细胞术检测天门冬水提物对 HCT116 细胞的抑制作用,结果显示经天门冬水提物处理后,细胞凋亡率随浓度升高而升高。另外,通过伤口愈合实验和 Transwell 侵袭实验模拟 HCT116 细胞的侵袭迁移状况,结果显示天门冬水提取物干预 HCT116 细胞后,迁移距离减少,细胞侵袭穿过小室的细胞数目明显减少。提示天门冬水提物可诱导 HCT116 细胞发生凋亡,并以浓度依赖方式明显抑制人结肠癌 HCT116 细胞增殖、迁移和侵袭。

p53 基因是肿瘤领域研究最为广泛的基因之一,大多数人类肿瘤与其变化有关^[28]。Bax 是 Bcl-2 基因家族的成员,通过剪切露出 BH3 结合域,释放细胞色素 C,激活细胞内 Caspase 酶原,其表达量增多往往导致细胞凋亡加速^[29]。近年研究发现,Bax 基因是 p53 的转录靶标^[30],Bax 基因表达上调可能是由激活的 p53 诱导的。薯蓣皂苷元是天冬抗肿瘤的活性成分,有研究表明其能抑制乳腺癌生存和增殖,主要是通过增强 p53 蛋白表达,抑制核因子- κ B (NF- κ B) 与 DNA 结合和 p38 有丝分裂原活化的蛋白激酶 (MAKP) 的活化,诱导细胞凋亡^[31]。本研究发现,天门冬水提物可上调 HCT116 细胞 p53 和 Bax 的 mRNA 表达水平,提示天门冬水提物可调控凋亡相关因子,促进 HCT116 细胞的凋亡,且其对信号分子的调控具有一定的剂量依赖性趋势。

中药复方现代研究中,由于水与乙醇的极性不同,醇提取物和水提取物有效成分的含量、种类存在差异^[32],考虑到醇提法的成本及对工人的毒性,本研究以水作为提取溶剂,提高提取效率的同时的保留了天冬中的多糖和总氨基酸等活性成分,在诱导结肠癌肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖方面,取得了较好的结果^[33-35]。本实验以人结肠癌肿瘤细胞系 HCT116 为研究对象,通过 CCK-8 实验、细胞凋亡率及凋亡相关基因 p53、Bax 表达的检测,发现:一定浓度的天门冬水提取物能够上调 HCT116 结肠癌细胞 p53、Bax mRNA 的表达、诱导 HCT116 结肠癌细胞凋亡,降低其迁移、侵袭能力,具有较好的抗肿瘤潜力,其机制可能与上调 Bax、p53 的表达有关,进而为扶正类中药水提物治疗结肠癌提供一定的实验依据,为其后期的研究与开发奠定基础。

参考文献:

- [1] Zhu J, Tan Z, Hollis-Hansen K, et al. Epidemiological trends in colorectal cancer in China: an ecological study [J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(1): 235-243.
- [2] Siegel RL, Medhanie GA, Fedewa SA, et al. State variation in early-onset colorectal cancer in the United States, 1995-2015 [J]. J Natl Cancer Inst, 2019, 111(10): 1104-1106.
- [3] Siegel RL, Jakubowski CD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer in the young: epidemiology, prevention, management [J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2020, 40: 1-14.
- [4] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [5] Lam KS. New aspects of natural products in drug discovery [J]. Trends Microbiol, 2007, 15(6): 279-289.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医

药科技出版社, 2015.

- [7] 徐从立, 陈海生, 谭兴起, 等. 中药天冬的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 2: 128-130.
- [8] Zhu XL, Li CX, Zhang L, et al. Research advance in bioactive constituents and major biological activities of *Asparagus officinalis* L [J]. *Hans J Food and Nutrition Sci*, 2020, 9(1): 74-81.
- [9] Zhao Q, Xie B, Yan J, et al. *In vitro* antioxidant and antitumor activities of polysaccharides extracted from *Asparagus officinalis* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(1): 392-396.
- [10] Samad NB, Debnath T, Abul Hasnat M, et al. Phenolic contents, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Asparagus cochinchinensis* (Loureiro) Merrill [J]. *J Food Biochem*, 2014, 38(1): 83-91.
- [11] Thakur M, Connellan P, Deseo MA, et al. Characterization and *in vitro* immunomodulatory screening of fructo-oligosaccharides of *Asparagus racemosus* Willd [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(1): 77-81.
- [12] Park M, Cheon MS, Kim SH, et al. Anticancer activity of *Asparagus cochinchinensis* extract and fractions in HepG2 cells [J]. *Appl Biol Chem*, 2011, 54(2): 188-193.
- [13] Bousserouel S, Le Grandois J, Gossé F, et al. Methanolic extract of white asparagus shoots activates TRAIL apoptotic death pathway in human cancer cells and inhibits colon carcinogenesis in a preclinical model [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(2): 394-404.
- [14] Cheng W, Cheng Z, Xing D, et al. *Asparagus* polysaccharide suppresses the migration, invasion, and angiogenesis of hepatocellular carcinoma cells partly by targeting the HIF-1 α /VEGF signalling pathway *in vitro* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 3769879.
- [15] Chun JM, Cheon MS, Moon BC, et al. Anti-tumor activity of the ethyl acetate fraction from *Asparagus cochinchinensis* in HepG2-xenografted nude mice [J]. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2011, 54(4): 538-543.
- [16] 刘洋, 李艳菊, 李红日, 等. 天门冬对氟中毒大鼠学习记忆能力干预作用 [J]. 中国公共卫生, 2017, 33(6): 922-925.
- [17] 刘洋, 李艳菊, 唐东昕, 等. 天门冬对氟中毒大鼠认知行为能力的影响及机制 [J]. 山东医药, 2017, 57(42): 37-39.
- [18] Guo L, Wang C, Qiu X, et al. Colorectal cancer immune infiltrates: significance in patient prognosis and immunotherapeutic efficacy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1052.
- [19] 顾军花, 刘嘉湘. 刘嘉湘教授“扶正治癌”理论核心及运用方法 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(4): 495-499.
- [20] 刘平, 李雁, 徐静, 等. 扶正祛邪治则在大肠癌治疗中的应用 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(15): 1692-1696.
- [21] Wang T, Xuan X, Li M, et al. Astragalus saponins affect proliferation, invasion and apoptosis of gastric cancer BGC-823 cells [J]. *Diagn Pathol*, 2017, 12(1): 67.
- [22] Li TF, Lin CC, Tsai HP, et al. Effects of Kuan-Sin-Yin decoction on immunomodulation and tumorigenesis in mouse tumor models [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 488.
- [23] 董杰, 夏茂, 季明德, 等. 基于数据挖掘探讨中药治疗中晚期非小细胞肺癌的组方用药规律分析 [J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(2): 76-81.
- [24] Jaramillo-Carmona S, Guillén-Bejarano R, Jiménez-Araujo A, et al. *In vitro* toxicity of asparagus saponins in distinct multidrug-resistant colon cancer cells [J]. *Chem Biodivers*, 2018, 15(11): e1800282.
- [25] 程伟. 基于 HIF1 α /VEGF 信号通路研究天冬多糖抑制肝癌细胞迁移、侵袭和血管形成的机制 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [26] Almatroodi SA, Alsahli MA, Almatroudi A, et al. Potential therapeutic targets of quercetin, a plant flavonol, and its role in the therapy of various types of cancer through the modulation of various cell signaling pathways [J]. *Molecules*, 2021, 26(5): 1315.
- [27] Liu B, Li B, Zhou D, et al. Steroidal saponins with cytotoxic effects from the rhizomes of *Asparagus cochinchinensis* [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 115: 105237.
- [28] Lahalle A, Lacroix M, De Blasio C, et al. The p53 pathway and metabolism: the tree that hides the forest [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(1): 133.
- [29] Naseri MH, Mahdavi M, Davoodi J, et al. Up regulation of *Bax* and down regulation of *Bcl2* during 3-NC mediated apoptosis in human cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15: 551-610.
- [30] Liao JM, Cao B, Deng J, et al. TFIIS. h, a new target of p53, regulates transcription efficiency of pro-apoptotic *Bax* gene [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23542.
- [31] Looby E, Abdel-Latif MM, Athié-Morales V, et al. Deoxycholate induces COX-2 expression via Erk1/2-, p38-MAPK and AP-1-dependent mechanisms in esophageal cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 190.
- [32] 汤小刚, 洪汝涛. 水提乌药与醇提乌药对急性酒精性肝损伤模型大鼠的保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(8): 703-706.
- [33] 杜芳权, 颜继忠. 超声提取天冬多糖和总皂苷工艺研究 [J]. 科技资讯, 2011, 21(7): 96-97.
- [34] 吴飞, 刘梦迪, 李月侠, 等. 天冬中总氨基酸及多糖的提取工艺研究 [J]. 池州学院学报, 2017, 31(3): 60-63.
- [35] 刘亮, 刘英波, 周英信, 等. 天冬中总氨基酸的水提取工艺研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 2013, 30(1): 59-60.

[收稿日期] 2021-10-10

李淑敏,蒋海强,齐冬梅,等. 基于代谢组学技术筛选与血压升高相关的差异性代谢物 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (6): 23-30.

Li SM, Jiang HQ, Qi DM, et al. Screening of differential metabolites related to elevated blood pressure according to metabolomics technology [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 23-30.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.004

基于代谢组学技术筛选与血压升高相关的差异性代谢物

李淑敏¹, 蒋海强^{2,4,5}, 齐冬梅^{3,4,5*}, 杨雯晴^{2,5*}

(1. 山东中医药大学, 中医学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学, 中医药创新研究院, 济南 250355;
3. 山东中医药大学, 实验中心, 济南 250355; 4. 山东省中医药基础研究重点实验室, 济南 250355;
5. 教育部中医药经典理论重点实验室, 济南 250355)

【摘要】 目的 探讨与自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR) 血压升高相关的潜在差异性代谢物及代谢通路。**方法** 采用非靶向代谢组学技术, 研究 5、7、9 周龄的 SHR 与正常组血清代谢物的变化并筛选出不同周龄中共同存在的代谢物, 结合 SIMCA-P 软件进行代谢组学数据与血压的相关性分析, 发现其对血压升高的影响, 利用 MetaboAnalyst 平台对相关代谢物进行通路分析, 发现与血压变化相关的通路。**结果** 经数据库查询鉴定出 10 个同时存在于不同周龄的差异性代谢物, 分别是: 胆碱、花生四烯酸、二十二碳六烯酸、血栓烷 B₂、尿酸、16-羟基十六烷酸、十二烷二酸、胆酸、12(13)-DiHOME、牛磺鹅去氧胆酸。7 周时血栓烷 B₂ 与血压正相关, 二十二碳六烯酸、尿酸、十二烷二酸、胆酸、花生四烯酸与血压呈负相关; 9 周时十二烷二酸、二十二碳六烯酸、胆酸与血压呈正相关, 血栓烷 B₂、尿酸、花生四烯酸与血压呈负相关。花生四烯酸通路是高血压中血压升高的主要影响通路。**结论** 以花生四烯酸为主的脂质代谢通路是高血压发生发展的主要影响通路, 从整体来看二十二碳六烯酸、胆汁酸发挥一定的降压作用, 尿酸促进了血压的升高, 而血栓烷 B₂、花生四烯酸在血压升高过程中与血压的相关性尚不统一, 但对血压的升高有重要影响。

【关键词】 高血压; 代谢组学; 相关性分析

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0023-08

Screening of differential metabolites related to elevated blood pressure according to metabolomics technology

LI Shumin¹, JIANG Haiqiang^{2,4,5}, QI Dongmei^{3,4,5*}, YANG Wenqing^{2,5*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, School of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China.
2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Institute of Traditional Chinese Medicine Innovation, Jinan 250355. 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Experimental Center, Jinan 250355.
4. Shandong Province Key Laboratory of Basic Research of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355.
5. Key Laboratory of Classical Theory of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jinan 250355)

【Abstract】 Objective To explore the potential differential metabolites related to blood pressure changes in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** We applied non-targeted metabolomics technology to study the differences in serum metabolites between SHR and normal groups at 5, 7 and 9 weeks of age, screening out metabolites that co-existed in rats of different ages. We then used SIMCA-P software to analyze the correlation between the metabolomics

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81974555)。

【作者简介】 李淑敏(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 方剂的组分配伍与作用机制研究。E-mail: 878954819@qq.com

【通信作者】 齐冬梅(1965—), 女, 教授, 研究方向: 方剂的组分配伍与作用机制研究。E-mail: Dongmei.Qi@hotmail.com

杨雯晴(1987—), 女, 副教授, 研究方向: 中医药治疗心血管疾病的研究。E-mail: winnie0416q@163.com * 共同通信作者

data and blood pressure and to discover its impact on blood pressure elevation. Finally, we used the MetaboAnalyst platform to conduct a pathway analysis of related metabolites and to identify the related pathways that cause blood pressure changes.

Results Through database query, the following 10 differential metabolites that were present at different ages were identified: choline, arachidonic acid, docosahexaenoic acid, thromboxane B₂, uric acid, 16-hydroxyhexadecanoic acid, dodecanedioic acid, cholic acid, 12(13)-DiHOME, and taurochenodeoxycholic acid. At 7 weeks of age, thromboxane B₂ was positively correlated with blood pressure, while docosahexaenoic acid, uric acid, dodecanedioic acid, cholic acid, and arachidonic acid were negatively correlated with blood pressure; at 9 weeks, docosahexaenoic acid, dodecanedioic acid and bile acids were positively correlated with blood pressure, while thromboxane B₂, uric acid, and arachidonic acid were negatively correlated with blood pressure. **Conclusions** The arachidonic acid pathway is the main influencing pathway for the occurrence of hypertension. From overall view, docosahexaenoic acid and bile acids have a certain antihypertensive effect. Uric acid promotes the increase of blood pressure, while the correlation of thromboxane B₂ and arachidonic acid with blood pressure is not uniform in the process of blood pressure increase, but they have important effects on the increase of blood pressure.

【**Keywords**】 hypertension; metabolomics; correlation analysis

高血压是全球性危害较大的心血管疾病,也是引起心脏、肾等器官损害等的主要因素,具有较高的发病率和致死率^[1],而在发展中国家对血压的控制并不理想^[2]。近年来 SHR 血清的代谢组学研究发现在高血压病理状态下存在多种代谢紊乱,如脂质代谢(甘油磷脂、鞘磷脂和花生四烯酸)、氨基酸(色氨酸、酪氨酸)、三羧酸循环、尿素代谢、5-羟色胺突触传导通路等^[3-5]。

针对代谢紊乱的研究,代谢组学是近二十年来发展的系统生物学方法,旨在识别生物系统内源性代谢物在内在外在因素影响下的变化,通过非靶向、半靶向及靶向方式揭示人体在生理病理状态下的整体的、动态的代谢变化,是医学药学研究的重要手段^[6-7]。为进一步筛选在血压升高过程中与血压变化相关联的代谢物,本研究采用非靶向代谢组学技术,将筛选出处于血压升高阶段的不同周龄 SHR 大鼠与正常组大鼠的差异代谢物与血压值进行相关性分析,从而阐明高血压发病过程中的代谢模式和代谢标志物变化,以期为高血压的防治提供指导。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只 4 周龄 SPF 级雄性 Wistar 京都种大鼠(Wistar-Kyoto rats, WKY)分为 3 个正常组(C1、C2、C3)和 24 只 4 周龄 SPF 级雄性 SHR 分为 3 个模型组(M1、M2、M3)每组均为 8 只,WKY 大鼠体重约 45~60 g,SHR 体重约 40~55 g,购自北京维通利华实验动物科技有限公司[SCXK(京)2021-0006],所有大鼠喂以标准饲料,饲养在山东中医药大学实验

中心[SYXK(鲁)2017 0022]SPF 设施中,温度为(23±1)℃,相对湿度环境为 55%±5%,标准的 12 h/12 h(光/暗)循环,每笼 4 只,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。实验方案及过程经山东中医药大学实验动物中心动物伦理委员会批准(SDUTCM20201019003)。

1.2 主要试剂与仪器

乙腈、甲醇、甲酸(批号:190268、172071、186935,色谱级,美国 Fisher 公司);超纯水(屈臣氏,屈臣氏(中国有限公司));2-氯-L-苯丙氨酸(批号:C10007806,MACCLIN,上海麦克林生化科技有限公司)。

智能无创血压计(BP-2010A, Softron, 北京, 中国);高速台式离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Vortex-Genie2 型涡旋振荡器,美国 SI 公司;静电场轨道阱质谱仪(QE)和 Ultimate 3000 UPLC 系统(Thermo Fisher, CA, USA);Halo-C18 色谱柱(2.1×100 mm, 2.7 μm; AMT, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 血压测量

采用无创套尾法检测大鼠安静状态下的血压,打开电源,选取安静、无人、温暖的环境,将温度调至 38℃,敏感度设置为 2,预热 5 min,控制测定时笼内温度保持不变,将大鼠前半身用鼠网网住并置入保温筒中,配合鼠袋包裹住,暴露尾巴在鼠袋外,将尾部穿过加压感应装置,加压感应器标志的尖端与鼠尾尖端方向保持一致,将加压感应器置于大鼠尾根处,待大鼠稳定 5~10 min 后,点击血压测定,图像波动平稳时记录数据,每周同一时间测量血压 3 次取平均值。

1.3.2 血清非靶向代谢组学分析

(1) 样本准备

5 周龄时取 C1、M1 组,7 周龄时取 C2、M2 组,9 周龄时取 C3、M3 组,按照 30 mg/kg 剂量的腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠麻醉后采集腹主动脉血。将血样置于 Eppendorf 管中,室温凝固 30 min,离心 (4500 r/min, 4℃) 15 min,得到血清样品。将血清样品储存在 -80℃ 直至下次检测。

血清样品在冰上 4℃ 解冻,加入 400 μL 预冷甲醇,涡旋 1 min,以 2-氯-L-苯丙氨酸 (60 μg/mL) 作为内标,取 100 μL 血清样品。将混合物在 4℃ 下以 15 000 r/min 的速度离心 15 min。将上清液 (400 μL) 置于 2 mL Eppendorf 管中,用氮气吹干,然后加入 100 μL 初始流动相重新溶解。随后,将上清液转移到 LC-MS 小瓶中。为确保代谢分析的数据质量,通过混合来自每个样品的 5 μL 上清液制备混合质量控制样品 (quality control, QC)。

(2) 血清非靶向代谢组学分析

使用 UltiMate3000 超高效液相色谱仪和四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱联合分析。应用 Halo-C18 色谱柱进行分析,柱温:45℃,进样量:10 μL。流动相由溶剂 A (0.05% 甲酸水溶液) 和溶剂 B (0.05% 甲酸乙腈溶液) 组成。线性梯度程序如下:0 min, 2% B; 3 min, 40% B; 9 min, 98% B; 18 min, 98% B; 18.1 min, 2% B; 3.0 min 的平衡。流速为 0.3 mL/min。运行样品前,运行 6 个 QC 样品以平衡仪器,然后每运行 6 个样品后运行 1 个 QC 样品。质谱条件:毛细管温度 350℃;正离子模式和负离子模式毛细管电压:3.5 kV 和 3.5 kV;鞘气 45 arb;辅助气 10 arb;质量扫描范围:80~1200 Da;质量分辨率:70000;S-Lens RF Level 为 55。

(3) 血清非靶向代谢组学数据处理

LC-MS 色谱数据的整体分析通过使用 CD3.1 (Compound Discoverer, Thermo Fisher, CA, USA) 软件对数据进行预处理,包括峰值检测、峰值对齐和数据清洗,从 CD 中筛选出各周龄中 $P < 0.05$ 的差异性代谢物,通过 SIMCA-P (13.0 版;Umetrics, Umea, 瑞典) 对不同周龄的正常组和模型组分别采用无监督的主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及有监督的偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 以寻找正常组与模型组之间及不同周龄的模型组间的差异,对数据进行 100 次随机排列实验,根据 R2 和 Q2 检验数

学模型建立的准确性。筛选投影变量重要性 (Projected Variable Importance, VIP) > 1 的变量为潜在生物标记物。通过 MS/MS、HMDB 数据库 (<http://www.hmdb.ca/>) 和 KEGG (<https://www.kegg.jp/>) 分析鉴定内源性代谢物的鉴定和确认的代谢物。

使用 MetaboAnalyst 5.0 软件^[8] (<http://www.metaboanalyst.ca>) 进行通路分析。Coefficients 是代谢表征与小分子代谢物相关联程度,将血压值设置为 Y 变量与非靶向代谢数据相关联,通过 Coefficients 值筛选差异代谢物与血压变化的相关性。原始数据经过 CD 软件数据处理后可得到具体的生物标志物,包含 mass 值、保留时间、相对峰面积在内的数据矩阵,将同周龄的正常组模型组分析后与不同周龄相比较,观察不同周龄相对峰面积的变化趋势。

1.4 统计学方法

计量资料表示为平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$),统计学采用 t 检验比较两组数据, $P < 0.05$ 为有差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 不同周龄下大鼠血压的变化

由表 1 发现与正常组相比,模型组各周龄的收缩压与舒张压在五周龄时具有显著差异性,且随着周龄的增大模型组血压显著升高尤以收缩压变化最为明显,而正常组各周龄之间的收缩压变化无明显差异性。

2.2 血清代谢组学结果

2.2.1 代谢组学图谱

在各周龄正、负离子模式下正常组与模型组的总离子流图有一定的差异,以 5 周龄正常组与模型组大鼠为例说明两组之间存在不同的代谢物 (图 1)。

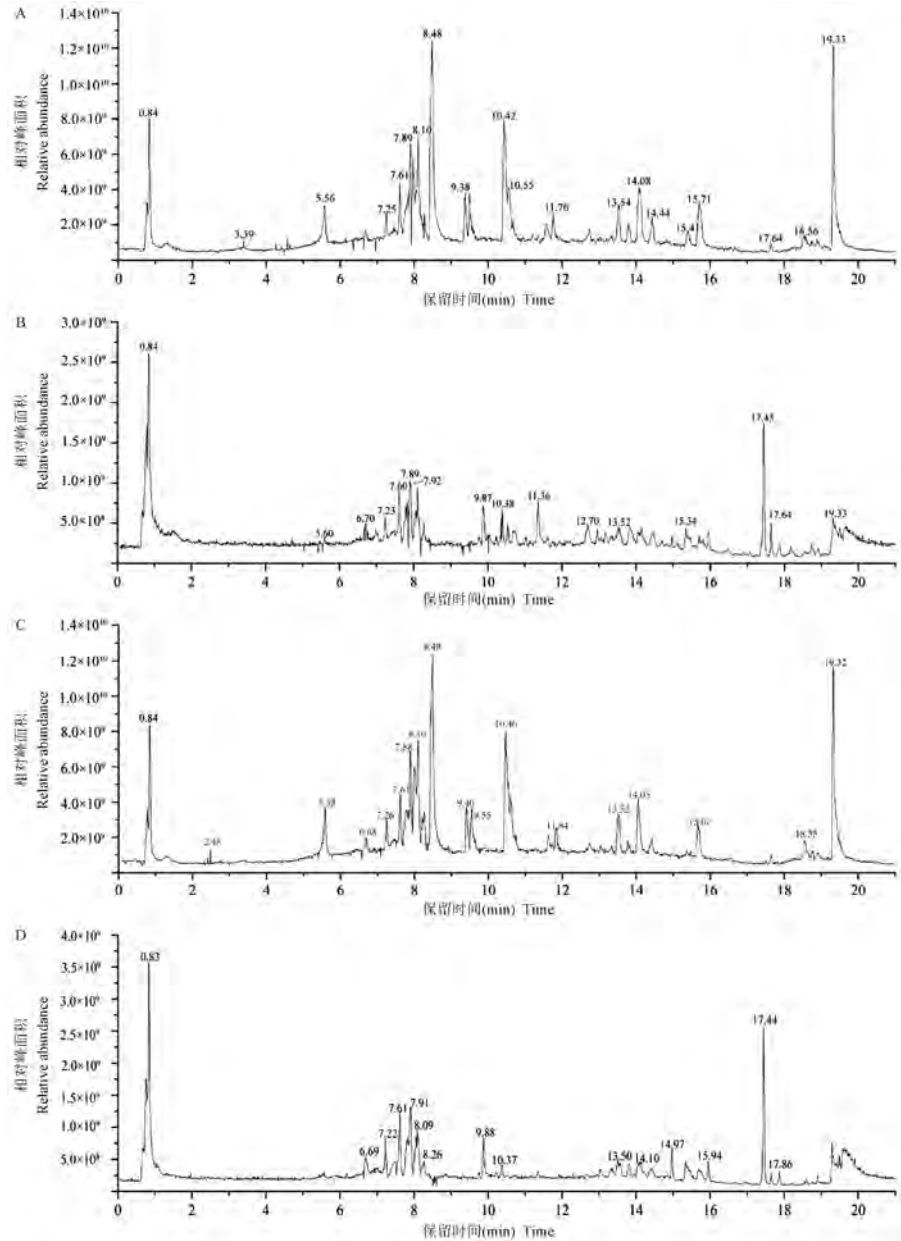
2.2.2 潜在代谢物及代谢趋势

将质谱获得的原始数据导入 CD 软件进行分析,以 $P < 0.05$ 为条件分别筛选出各周龄的差异性代谢物。在将以上数据导入 SIMCA-P 软件中进行下一步分析,采用有监督的 PLS-DA 进行模式识别发现在正负离子下两组大鼠分离较好,各周龄的模型的拟合能力和预测能力指数分别为:5 周龄正离子: $R^2Y = 0.998$, $Q^2 = 0.985$; 负离子: $R^2Y = 0.994$, $Q^2 = 0.956$, 7 周龄正离子: $R^2Y = 0.994$, $Q^2 = 0.989$; 负

表 1 不同周龄的正常组与模型组收缩压和舒张压的变化($\bar{x}\pm s$)

周龄 Weeks	模型组 SHR		正常组 WKY	
	收缩压 SBP (mmHg)	舒张压 DBP (mmHg)	收缩压 SBP (mmHg)	舒张压 DBP (mmHg)
4	139±6	80±3	135±6	76±5
5	154±2 *	88±8 *	140±3	85±6
7	160±3 *	95±6 *	154±2	86±3
9	174±4 *	107±7 **	156±6	84±5

注:与正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.



注:A:正离子模式下正常组;B:负离子模式下正常组;C:正离子模式下模型组;D:负离子模式下模型组。

图 1 正常组和模型组在正负离子模式下的总离子流图

Note, A, Normal group in positive ion mode. B, Normal group in negative ion mode. C, Model group in positive ion mode. D, Model group in negative ion mode.

Figure 1 Total ion current diagram of normal group and model group in positive and negative ion mode

离子: $R^2Y=0.996, Q^2=0.977$, 9 周龄正离子: $R^2Y=0.993, Q^2=0.948$; 负离子: $R^2Y=0.989, Q^2=0.901$ 表明模型预测能力较好, 且不同周龄下 100 次随机排列实验验证模型成功, 在此模型下进一步通过 $VIP>1$ 筛选重要的差异性代谢物, 通过比对 HMDB 及 KEGG 数据库找出在 5、7、9 周大鼠正负离子模式下共有的 10 个差异性代谢物(图 2), 分别是: 胆碱、花生四烯酸(arachidonic acid, AA)、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)、血栓烷 B_2 (thromboxanes B_2 , TXB_2)、尿酸、16-羟基十六烷酸、十二烷二酸、12(13)-DiHOME、胆酸、牛磺鹅去氧胆酸, 详细信息见表 2。

对代谢物进行动态分析(见图 3), 结果显示在 5 周龄时 10 种代谢物在正常组与模型组大鼠均无明显变化, 7 周龄时胆碱、AA、DHA、尿酸、16-羟基十六烷酸、十二烷二酸、12(13)-DiHOME、牛磺鹅去氧胆酸相对含量与正常组相比升高($P<0.01$), TXB_2 在 7 周龄时相对含量较 5 周龄下降($P>0.05$); 在 9 周龄时十二烷二酸、尿酸、胆酸与 7 周龄及正常组相比相对含量相比降低($P<0.01$)。在上述 10 种代谢物中胆碱、16-羟基十六烷酸、12(13)-DiHOME、牛磺鹅去氧胆酸在 5、7、9 周中相对含量持续上升($P<0.01$)与正常组无明显差异。

2.3 代谢通路分析及相关性分析

代谢通路代表一组代谢物通过生物化学方式联系在一起的生物途径, 从代谢物异常到代谢通路的变化可以深入了解在生理及病理条件下的机制, 通常用来表示从非靶向代谢组学中获得的表示病理状态下受到干扰的常见通路, 为下一步疾病中的生物学联系的验证提供依据^[6]。通过 MetaboAnalyst 将上述代谢物输入, 筛选影响值大于

0.1 的代谢通路(图 4), 发现花生四烯酸通路 & 血压的升高密切相关。进一步进行与血压相关性分析如图 5, 5 周时尿酸与血压成负相关, DHA、 TXB_2 、十二烷二酸、胆酸、AA 与血压呈正相关, 由于 5 周时 10 种差异性代谢物两组相比均无差异性; 7 周时 TXB_2 与血压正相关, DHA、尿酸、十二烷二酸、胆酸、AA 为负相关; 9 周时十二烷二酸、DHA、胆酸与血压呈正相关, TXB_2 、尿酸、AA 与血压呈负相关。

3 讨论

SHR 高血压模型与人类高血压病高度类似, 是目前研究高血压病发病机制的理想动物模型^[9]。SHR 模型血压值在大鼠出生后随着鼠龄增大而升高, 大量研究表明 2~4 月为高血压的确立期^[10], 在 4 周时 SHR 和 WKY 血压无明显差异, 在 6 周时高血压的病理状态仍不稳定, 在 9~11 周时血压值逐渐达到稳定状态^[11-12], 根据我们的实验数据分析发

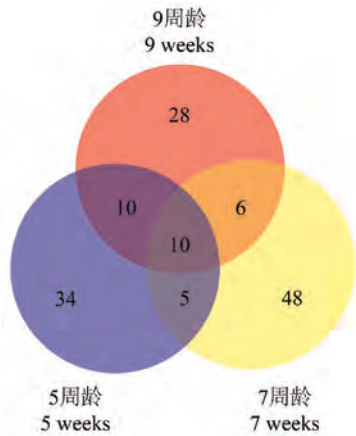
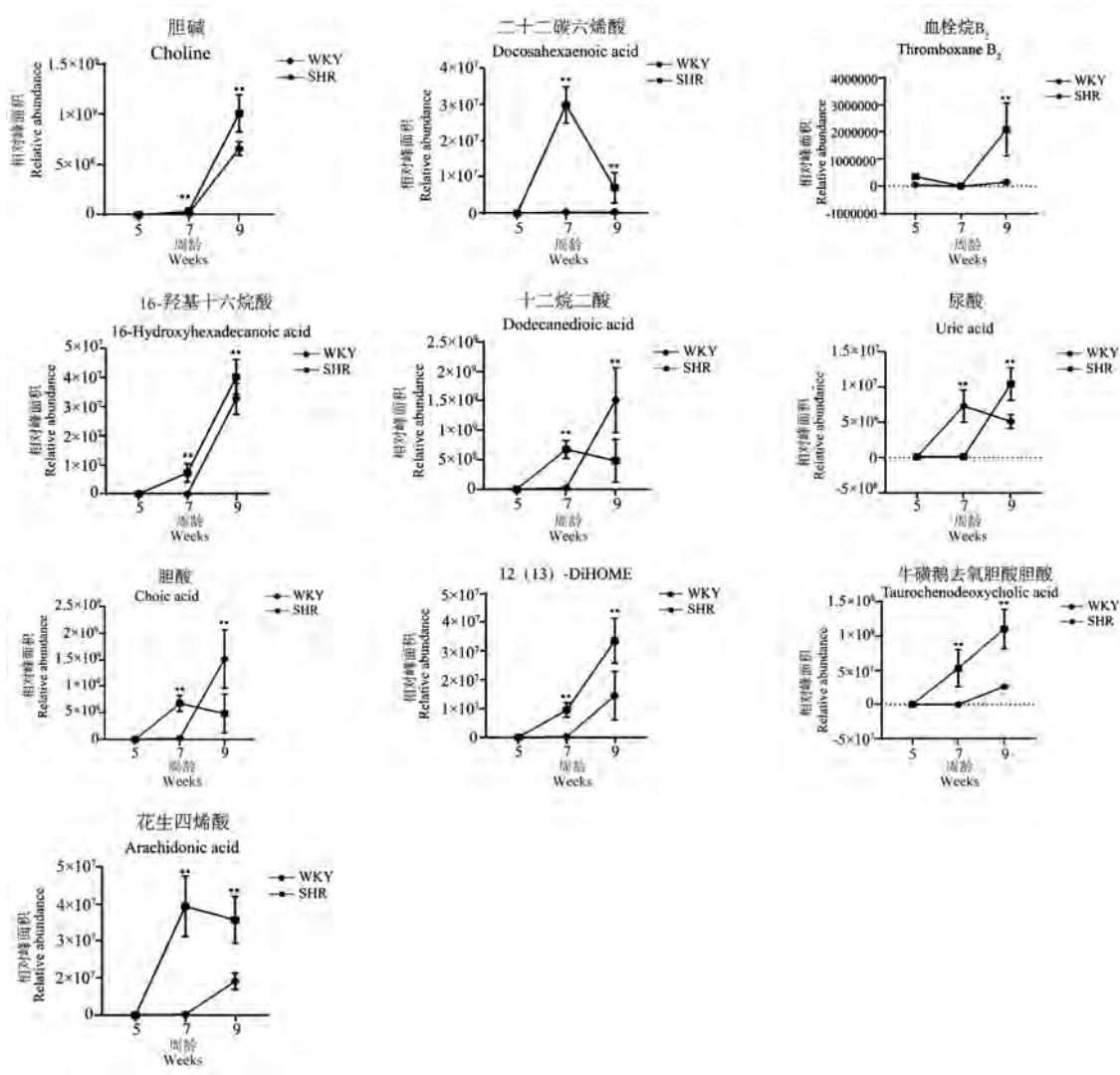


图 2 5、7 及 9 周下差异性代谢物韦恩图
Figure 2 Venn diagram of differential metabolites at 5, 7 and 9 weeks

表 2 不同周龄大鼠共有的 10 中差异性代谢物
Table 2 10 different metabolites shared by rats of different ages

编号 No.	名称 Name	质荷比 M/Z	保留时间(min) Rt	结构式 Formula
1	胆碱 Choline	103.1002	12.658	C ₅ H ₁₃ N O
2	花生四烯酸 Arachidonic acid	304.2401	17.646	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
3	二十二碳六烯酸 Docosahexaenoic acid	328.2401	17.381	C ₂₂ H ₃₂ O ₂
4	血栓素 B ₂ Thromboxane B ₂	370.2357	10.557	C ₂₀ H ₃₄ O ₆
5	尿酸 Uric acid	168.0272	1.145	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃
6	16-羟基十六烷酸 16-Hydroxyhexadecanoic acid	272.2354	13.911	C ₁₆ H ₃₂ O ₃
7	十二烷二酸 Dodecanedioic acid	230.1514	9.493	C ₁₂ H ₂₂ O ₄
8	胆酸 Cholic acid	408.2879	10.003	C ₂₄ H ₄₀ O ₅
9	12(13)-DiHOME	314.2461	12.725	C ₁₈ H ₃₄ O ₄
10	牛磺鹅去氧胆酸 Taurochenodeoxycholic acid	499.2973	10.434	C ₂₆ H ₄₅ N O ₆ S



注：与正常组相比，** $P < 0.01$ 。
图 3 不同周龄大鼠体内生物标志物相对含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Note. Compared with the normal group, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Comparison of the relative content of biomarkers in rats of different ages

现在第 9 周时血压已经是较稳定的高血压状态。综合以上我们选取了高血压确立期内的 5、7、9 周为研究对象,在高血压前期阶段分析血压升高过程中的代谢紊乱,有利于准确发现与血压升高相关的生物标志物。高血压的发生发展与早期的代谢紊乱密切相关,代谢紊乱进一步引起代谢综合症的发生,最终导致高血压、高尿酸血症、动脉粥样硬化等疾病及心脏、肾脏等靶器官损伤的发生,因此我们选用早期 SHR 大鼠,探究高血压早期的代谢紊乱,以期在早期恢复正常代谢,从而达到降低血压延缓靶器官损害的目的^[13-14]。本研究运用代谢组学对不同周龄大鼠体内小分子代谢物持续观察,筛选出在血压升高过程中共有的 10 种代谢物,进一步与血压

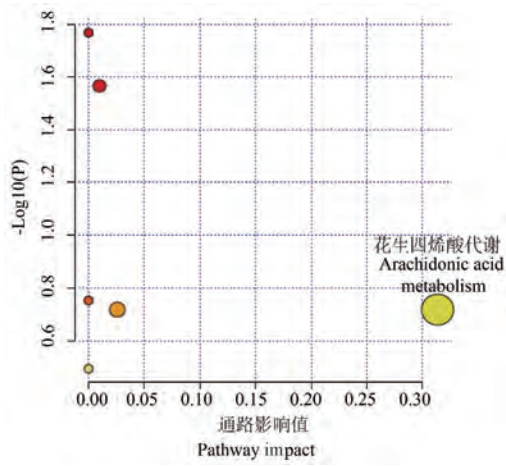
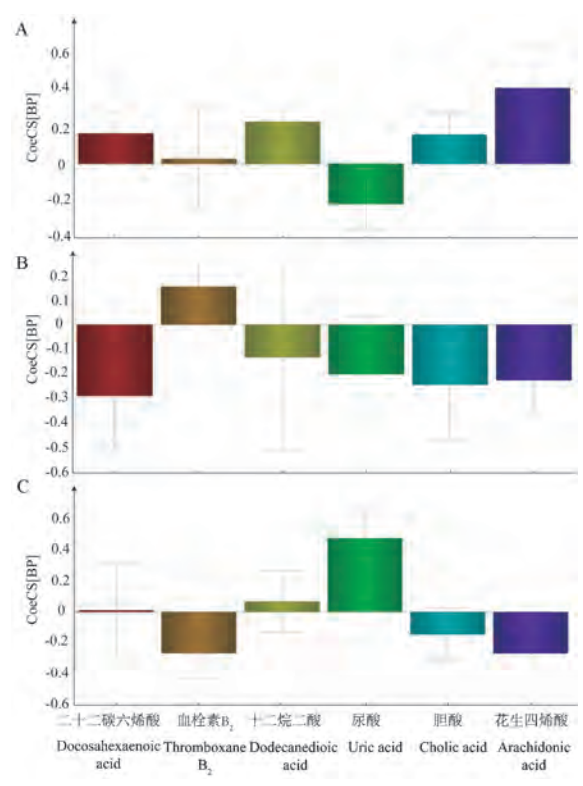


图 4 10 种差异代谢物的通路分析

Figure 4 Pathway analysis of 10 different metabolites



注:A:5 周龄;B:7 周龄;C:9 周龄。
图 5 与血压的相关分析
Note. A, 5 weeks old. B, 7 weeks old. C, 9 weeks old.

Figure 5 Correlation analysis with blood pressure

进行相关性分析,结果表明花生四烯酸代谢通路与血压的升高密切相关,同时发现脂质类代谢物密切影响血压的变化,如 AA、TXB₂、DHA。

在正常组和模型组大鼠中有差异性变化的代谢物中包括多种脂类化合物,如 TXB₂、DHA、AA 等,脂质代谢物的异常与血管炎症、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生发展密切相关^[15]。DHA 是一种长链、高度不饱和的 omega-3 (n-3) 脂肪酸,存储在脂肪组织中以转化为甘油三酯释放到血液中^[16],omega-3 脂肪酸通过激活内皮型一氧化氮合酶,增加一氧化氮的可用性改善内皮功能,此过程只发生在心血管疾病人群中^[17],在本研究中发现 5 周时无显著性差异,在 7、9 周时模型组的 DHA 相对峰面积高于正常组,尽管在 9 周低于 7 周,通过相关性分析发现,7 周时 DHA 与血压呈负相关,9 周时虽然呈正相关,但 7 周时候相关系数绝对值远大于 9 周时相关系数的绝对值,说明 DHA 的升高不能引起血压的升高,符合上述结论,并由此推测 DHA 在血压升高中仍发挥抑制作用。

AA 也属于一种 omega-6 多不饱和脂肪酸,广泛存在于各种组织结构中^[18],在磷脂酶 A₂ 的作用下

从细胞膜磷脂中释放出游离的花生四烯酸^[19]。AA 也是多种常见脂质代谢产物的前体,在环氧合酶 (cyclooxygenase, COX)、脂氧合酶和细胞色素 P450 途径下产生多种生物活性的代谢衍生物,如前列腺素 (prostaglandins, PGs) 及血栓素 (thromboxane, TXs)、白三烯及环氧二十二烷基类化合物。其中前列腺素类代谢物,如 PGD₂、PGF_{2α} 等,具有改变血管张力、促进血小板的聚集作用,与高血压、动脉粥样硬化及糖尿病等心血管疾病密切相关^[20]。在本研究中发现 5 周龄时正常组与模型组 AA 相对丰度值无差异性,在 7、9 周时模型组的 AA 相对丰度值迅速增加且与血压呈负相关,可能与 AA 释放具有血压调节作用的代谢物相关。

在高血压状态下,COX 的表达增加促进了 AA 向前列腺素类代谢物的转化,促进前列腺素类及血栓烷类代谢物的释放,其中血栓烷类代谢物发挥重要的血压调节作用,TXA₂、TXB₂ 作为前列腺素类物质是一种有效的血管收缩物质,它在高血压动物的内皮细胞中合成增加,TXA₂ 半衰期较短,半小时内可代谢成更稳定无活性的 TXB₂,引起血管收缩升高血压^[20]。在本研究中 TXB₂ 在 5、7 周时无差异性且与血压的升高呈正相关,在 9 周时相对丰度高于正常组,且在 9 周时与血压的升高呈负相关,通过研究表明补充 DHA 能够减少大鼠前列腺素和活性氧的释放,增加一氧化氮的产生和抗氧化能力,改善脂质代谢,且激活钾离子并恢复血管超极化机制参与血管扩张反应,在一定程度上减少 SHR 大鼠中 TXA₂、PGI₂ 和 PGE₂ 释放的增加,改善血管内皮功能障碍^[21],因此发生这种变化的原因根据以上研究猜测 7 周时 TXB₂ 的下降可能与同时期 DHA 的升高有关。

众多研究表明尿酸与高血压密切相关,尿酸主要通过引起对肾的损害引起的血压升高,包括肾脏中肾素-血管紧张素系统的激活和尿腔内尿酸盐晶体沉积,尿酸盐在血管中的沉积能进一步引发促炎因子的转录,从而更直接的导致血管内皮功能障碍,促进了心血管疾病的发生^[22]。另外尿酸在缺氧条件下通过降低内皮型一氧化氮合酶磷酸化而损伤血管内皮功能^[23]。有研究表明尿酸可以上调内皮中的醛糖还原酶的表达^[24],醛糖还原酶的表达上调可以阻断一氧化氮和内源性果糖的产生,这一机制是高血压状态下血压升高的重要发病机制^[25]。本研究在 5 周时正常组与模型组无差异性,7 周

时正常组高于模型组同时相关分析为负相关,9 周时模型组尿酸相对丰度值高于正常组,且与血压升高具有正相关性,证明尿酸含量的增多与血压的升高相关,符合上述结果。

本研究在高血压自然发展状态下将外在血压表征与小鼠体内小分子代谢物相关联,发现花生四烯酸通路代谢异常是引起高血压发生发展的主要通路,由于 DHA、TXB₂ 等脂质类代谢物及尿酸等的异常对血压的变化起到主要的调控作用,因此可以依据这一结果指导我们从改善生活饮食方式来减少胰岛素抵抗、尿酸水平等方面精准的发挥对血压的调节作用。然而,本实验中与血压升高相关代谢物对高血压发生发展具体的促进或抑制作用仍需通过设计全面的实验加以阐明,并以公认的降压药作为对照药物进一步明确上述代谢物对高血压发生发展的具体作用,为阐明高血压的发生发展机制做出新的探索,以期延缓高血压的发生发展提供可靠的实验依据。

参考文献:

- [1] Schwalm JD, McCready T, Lopez-Jaramillo P, et al. A community-based comprehensive intervention to reduce cardiovascular risk in hypertension (HOPE 4): a cluster-randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2019, 394(10205): 1231-1242.
- [2] Chow CK, Gupta R. Blood pressure control: a challenge to global health systems [J]. *Lancet*, 2019, 394(10199): 613-615.
- [3] Wang H, Wang X, Qi D, et al. Establishment of the circadian metabolic phenotype strategy in spontaneously hypertensive rats: a dynamic metabolomics study [J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 38.
- [4] Tian Y, Jiang F, Li Y, et al. Evaluation of the anti-hypertensive effect of Tengfu Jiangya tablet by combination of UPLC-Q-exactive-MS-based metabolomics and iTRAQ-based proteomics technology [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 100: 324-334.
- [5] 吴佳芸, 李玲玲, 乔佳君, 等. 持续高血压状态自发性高血压大鼠血清代谢组学研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(4): 428-439.
- [6] Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(7): 451-459.
- [7] 汤喜兰, 徐国良, 董伟, 等. 异丙肾上腺素诱导心脏肥大大鼠的血清代谢组学研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(4): 486-493.
- [8] 谢雅革, 沈克平, 卢艳琳, 等. 基于代谢组学的中医血瘀证研究概述 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(6): 2598-2601.
- [9] 方震, 杨雪, 蒯晓源, 等. 高血压病及其中医病证结合动物模型的研究进展 [J]. *中医学报*, 2021, 49(10): 94-97.
- [10] 张英展. 自发性高血压大鼠血压发展过程中血管内皮依赖性收缩的变化及机制研究 [D]. 汕头: 汕头大学, 2021.
- [11] 林琳, 凌亚豪, 范潇予, 等. 不同周龄 SHR、Wistar 大鼠血压及心电图背景数据的建立 [J]. *实验动物科学*, 2017, 34(5): 48-52.
- [12] 赵健清, 丁露, 曾俊义, 等. 自发性高血压大鼠心肌纤维化时序动态变化 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(6): 724-729.
- [13] Del Gaudio I, Rubinelli L, Sasset L, et al. Endothelial Spns2 and ApoM regulation of vascular tone and hypertension via sphingosine-1-phosphate [J]. *J Am Heart Assoc*, 2021, 10(14): e021261.
- [14] 鲁婕雨, 石文翔, 孔祥清. 高血压代谢组学研究进展 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(2): 286-291.
- [15] 张世明, 齐冬梅, 曹艺明, 等. 钩藤干预自发性高血压大鼠肝脏代谢紊乱的脂质组学研究 [J]. *药学报*, 2019, 54(9): 1636-1644.
- [16] Richard C, Calder PC. Docosahexaenoic acid [J]. *Adv Nutr*, 2016, 7(6): 1139-1141.
- [17] Bercea CI, Cottrell GS, Tamagnini F, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and hypertension: a review of vasodilatory mechanisms of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(4): 860-877.
- [18] 赖金胜, 陈琛. 花生四烯酸的细胞色素 P450 酶代谢途径产物 EETs 和 20-HETE 在血管功能调控中的作用 [J]. *生理学报*, 2021, 73(4): 631-645.
- [19] 鲍乾坤, 张栩, 朱毅. 类二十烷酸代谢组学在心血管疾病研究中的应用与进展 [J]. *生理学报*, 2021, 73(4): 606-616.
- [20] Edwards JM, McCarthy CG, Wenceslau CF. The obligatory role of the acetylcholine-induced endothelium-dependent contraction in hypertension: can arachidonic acid resolve this inflammation? [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(30): 3723-3732.
- [21] Villalpando DM, Navarro R, Del Campo L, et al. Effect of Dietary docosahexaenoic acid supplementation on the participation of vasodilator factors in aorta from orchidectomized rats [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142039.
- [22] Albu A, Para I, Porojan M. Uric acid and arterial stiffness [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2020, 16: 39-54.
- [23] Otani N, Toyoda S, Sakuma M, et al. Effects of uric acid on vascular endothelial function from bedside to bench [J]. *Hypertens Res*, 2018, 41(11): 923-931.
- [24] Sanchez-Lozada LG, Andres-Hernando A, Garcia-Arroyo FE, et al. Uric acid activates aldose reductase and the polyol pathway for endogenous fructose and fat production causing development of fatty liver in rats [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(11): 4272-4281.
- [25] Lanaspas MA, Andres-Hernando A, Kuwabara M. Uric acid and hypertension [J]. *Hypertens Res*, 2020, 43(8): 832-834.

石惊涛,张晓宁,曹婉萦,等. 弗氏完全佐剂肌肉注射诱发炎症性痛敏及免疫应答的转录组测序分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 31-40.

Shi JT, Zhang XN, Cao WY, et al. RNA-sequencing analysis of inflammatory pain hypersensitivity and immune response induced by complete Freund's adjuvant intramuscular injection [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 31-40.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.005

弗氏完全佐剂肌肉注射诱发炎症性痛敏及免疫应答的 转录组测序分析

石惊涛¹, 张晓宁¹, 曹婉萦¹, 何伟¹, 刘一寒¹, 王睿², 宿杨帅¹, 万红叶¹,
曲正阳¹, 景向红¹, 王晓宇^{1*}

(1. 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700; 2. 北京理工大学, 北京 100081)

【摘要】 目的 观察弗氏完全佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 肌肉注射后 1~15 d 的炎症反应, 明确免疫应答反应的发生, 通过分析转录组学的差异, 为肌肉炎症反应及其诱发的痛觉敏化研究提供重要的参考。**方法** 90 只 Wistar 大鼠随机分为正常组和 CFA 注射后第 1 天 (MD1)、第 3 天 (MD3)、第 5 天 (MD5)、第 7 天 (MD7)、第 9 天 (MD9)、第 11 天 (MD11)、第 13 天 (MD13) 和第 15 天 (MD15) 模型组。在模型组大鼠左侧股二头肌肌腹注入 200 μ L 的 CFA, 观察各组大鼠左侧足底的机械痛阈值和热痛阈值变化; 采用电化学发光法检测各组大鼠肌肉组织和外周血中炎症因子的含量; 使用 HE 染色对正常组、MD3 和 MD13 组大鼠注射侧局部肌肉组织进行形态学观察; 采用基因组学的方法, 分析这两组大鼠差异基因的表达。**结果** (1) 股二头肌肌肉注射 CFA 可诱发同侧足底持续的机械痛敏和热痛敏。(2) CFA 肌肉注射后 24 h 后, 外周血和局部组织中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的含量明显升高, 局部组织中促炎因子含量在注射后第 13 天再次明显升高。(3) 在 CFA 注射后第 3 天局部组织以中性粒细胞浸润为主, 在 CFA 注射后第 13 天则以单核细胞浸润为主。(4) 与 MD3 组相比, MD13 组大鼠局部组织中与免疫反应相关的差异表达基因上调, 其中涉及到 Th 细胞的分化、细胞因子受体相互作用等与适应性免疫相关的生物学通路。(5) CFA 注射后局部组织中痛敏相关基因的表达水平升高, 包括 *Ccl3*、*Cxcl1*、*Cxcl2*、*Cxcl9*、*Cxcl10* 等基因。**结论** CFA 的注射可有效刺激固有免疫和适应性免疫的发生, 诱导炎症性痛敏, 其中不同趋化因子家族基因在不同的免疫应答中发挥了重要的作用。

【关键词】 弗氏完全佐剂; 肌肉炎症性痛; 细胞因子; 固有免疫反应; 适应性免疫反应; 转录组测序

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0031-10

RNA-sequencing analysis of inflammatory pain hypersensitivity and immune response induced by complete Freund's adjuvant intramuscular injection

SHI Jingtao¹, ZHANG Xiaoning¹, CAO Wanying¹, HE Wei¹, LIU Yihan¹, WANG Rui², SU Yangshuai¹,
WAN Hongye¹, QU Zhengyang¹, JING Xianghong¹, WANG Xiaoyu^{1*}

(1. Institute of Acupuncture and Moxibustion CACMS, Beijing 100700, China. 2. Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

【Abstract】 Objective To observe 1~15 days of local inflammatory responses after an intramuscular injection of complete Freund's adjuvant (CFA), clarify the result ing immune response, analyze transcriptomics differences amongst

【基金项目】 科技部重点研发计划 (2019YFC1709002); 国家自然科学基金 (81674083)。

【作者简介】 石惊涛 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 针刺镇痛机理研究。E-mail: 909208703@qq.com

【通信作者】 王晓宇 (1978—), 女, 副研究员, 研究方向: 针灸的效应及机制研究。E-mail: xiaorain_wang@hotmailcom

different immune responses, and provide a reference for studies of muscle inflammatory responses. **Methods** Ninety Wistar rats were randomized into control and model groups at day 1 (MD1), 3 (MD3), 5 (MD5), 7 (MD7), 9 (MD9), 11 (MD11), 13 (MD13) and 15 (MD15) after CFA injection after CFA injection. The 200 μ L of CFA was injected in the left femoral biceps abdomen of the mice in the model groups. The changes in mechanical pain and heat pain thresholds were observed in the left hindpaw of mice in each group. The levels of inflammatory factors were measured in the muscle tissue and peripheral blood of each group by electrochemiluminescence. Morphological observations of the local muscle tissue on the injection side of rats in the control, MD3 and MD13 groups were performed using HE staining. The differential expression of genes in the control and model groups was analyzed using genomics. **Results** (1) Intramuscular CFA injection induced sustained mechanical and heat hyperalgesia of the hindpaw. (2) At 24 h after CFA intramuscular injection, the levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α were significantly elevated in the peripheral blood and local tissues, and the pro-inflammatory factor content in the local tissue was significantly elevated again at day 13 after CFA injection. (3) Local tissue was infiltrated mainly by neutrophils on day 3 after CFA injection and mainly by monocytes on day 13 after CFA injection. (4) The differentially expressed genes associated with the immune response are upregulated in local tissues in MD13 group as compared with their levels in MD3 group; These genes are involved in biological pathways related to adaptive immunity, such as Th-cell differentiation and cytokine-cytokine receptor interaction. (5) The expression levels of pain-related genes, including *Ccl3*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl9* and *Cxcl10*, were elevated in local tissues after CFA injection. **Conclusions** An injection of CFA can effectively stimulate innate and adaptive immune responses and induce inflammatory pain sensitization, in which different chemokine family genes play important roles in the different immune responses.

【Keywords】 complete Freund's adjuvant; muscle inflammatory pain; cytokines; innate immune response; adaptive immune response; RNA-sequencing

将弗氏完全佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 注射到实验动物不同组织中 (如关节^[1]、足底^[2]、尾根^[3]、肌肉^[4]) 是基础研究中最常用的炎症模型造模方法。它能够诱导局部发生强烈而持久的炎症反应, 并伴随着剧烈疼痛^[5], 同时 CFA 也是许多自身免疫性疾病实验动物模型诱导方案中不可替代的组成部分^[6]。CFA 注射部位中较常见的是足底注射, 用于观察急性和慢性炎症所带来的痛觉过敏和原发痛行为^[7], 以及慢性炎性痛诱发的焦虑抑郁样情绪行为^[8]。其次是关节腔内或尾根部皮下注射 CFA^[1,3,9], 常用于类风湿关节炎的基础研究^[10]。肌肉注射 CFA 则较多的运用于抗体的制备^[11]。近几年来, 在肌肉中注射 CFA 并观察肌肉炎性疼痛和反应的研究逐渐增多, 相关研究较多的聚焦于 CFA 诱发的肌肉炎性反应所带来的实验动物行为学上的改变^[12-13], 而对肌肉炎性反应中免疫应答的病理生理过程及其痛敏相关基因组学的观察和研究仍较少。

细胞因子参与不同免疫细胞亚群的发育、成熟、分化、活化、效应过程, 能直接调节免疫应答的过程。基于 Meso Scale Discovery (MSD) 的微孔板电化学发光的多重免疫测定法是目前细胞因子检测中灵敏度和准确度最高的技术, 并可同时检测疾病组织模型样本中多种细胞因子的含量^[14-15]。RNA

测序 (RNA-sequencing, RNA-Seq) 是近年来发展迅速的高通量测序技术, 具有分辨率高、应用广泛等特点, 可从转录组水平揭示疾病模型的基因表达模式^[16]。本研究通过观察股二头肌 CFA 注射后 1~15 d 痛行为学、局部组织结构细胞形态的变化, 使用电化学发光法测量局部组织和外周血中炎性因子含量, 对 CFA 肌肉炎性模型进行系统的观察; 采用 RNA-Seq 技术比较炎症前期和炎症后期局部肌肉中的基因表达变化, 分析差异基因的功能, 为在此模型上进行的基础实验研究提供重要的参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验选用 7 周龄清洁级 Wistar 大鼠 90 只, 体重 (209.47 $\pm$ 4.86) g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供 [SCXK (京) 2019-0010]。实验动物均饲养于中国中医科学院基础研究所 [SYXK (京) 2021-0017]。实验动物的喂养遵守《实验动物照料和使用指南》的要求, 室温在 (24 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 室温维持照明 12 h、黑暗 12 h 交替的昼夜光照节律。Wistar 大鼠随机分为正常组和 CFA 注射后第 1 天 (MD1)、第 3 天 (MD3)、第 5 天 (MD5)、第 7 天 (MD7)、第 9 天 (MD9)、第 11 天 (MD11)、第 13 天 (MD13) 和第 15 天 (MD15) 模型组。每组 10 只大鼠, 观察各组大鼠

左侧足底的机械痛和热痛阈值变化、各组大鼠随机选择其中 8 只进行局部组织和外周血中炎症因子表达水平的检测;从正常组、MD3 组和 MD13 组大鼠中每组选取 6 只,用于转录组测序进行差异表达基因分析,2 只大鼠用于局部组织的形态学观察。全部实验内容经中国中医科学院针灸研究所伦理委员会审查批准(中科针伦 D2018-04-13-1),实验过程严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

弗氏完全佐剂(货号:F5881, Sigma, 美国);异氟烷(宁芬, 中国);高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液(货号:R0010, 索莱宝, 中国);10%福尔马林固定液(货号:G2160, 索莱宝, 中国);二甲苯(货号:CAS1330-20-7 国药集团, 中国);V-PLEX Pro-inflammatory Panel 2 Rat Kit(货号:K153A0H, Meso Scale Discovery, 美国);TRIzol(货号:15596026, 赛默飞, 美国)。

大(小)鼠热辐射痛测定仪(Ugo Basile, 意大利);动态足底触觉仪(Ugo Basile, 意大利);大鼠呼吸麻醉机(瑞沃德, 中国);Thermo 4℃低温高速离心机(Thermo, 美国);EG1150H 组织包埋机(徠卡, 德国);RM2235 石蜡切片机(徠卡, 德国);光学显微镜(奥林巴斯, 日本);多因子检测仪(Meso Scale Discovery, 美国);Agilent 2100(Agilent, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 炎症痛模型的建立

在异氟烷吸入麻醉下,将大鼠固定于俯卧位,对左侧后肢进行备皮。在左侧股二头肌肌腹注入 200 μ L 的 CFA,注射深度约 0.5 cm,注射时间大于 30 s,缓慢出针防止药液渗漏。

1.3.2 足底机械痛阈和热痛阈的测量

测试前将大鼠放入玻璃板面上的围箱,适应环境 30 min。测机械痛阈时,匀速上升的金属探针穿过网眼垂直刺激大鼠左、右侧足底,当出现明显缩腿反应时,计时器计时结束,记录大鼠缩足潜伏期(paw withdraw latency, PWL)。左、右侧各测 3 次,每次间隔 10 min,分别记录双侧缩足潜伏期数值平均后为机械痛的缩足潜伏期。

测试前将大鼠放入玻璃板面上的围箱内,适应环境 30 min,测热痛阈时,将红外光源移至玻璃板下方,对准大鼠左右侧足底,按下红外光发射器的按钮,测试即开始,直至大鼠感觉到疼痛,缩回后爪致使发热反射突然下降并切断红外光源,计时器计时

结束,此时记录大鼠 PWL。左、右侧各测 3 次,每次间隔 10 min,分别记录双侧缩足潜伏期数值平均后为热痛的缩足潜伏期。

1.3.3 局部肌肉组织石蜡切片的观察

随机选取正常组、MD3 组和 MD13 组中 2 只大鼠进行灌流固定,取左侧股骨头至踝关节的肌肉组织,使用 4%的多聚甲醛溶液进行固定,组织修块后进行石蜡包埋、切片并进行 HE 染色,染色完成后使用中性和树脂封片进行观察。

1.3.4 外周血及局部肌肉组织中炎症因子含量的测量

大鼠在异氟烷麻醉状态下经心脏采血,使用含抗 EDTA 的采血管收集血液,然后将大鼠放入二氧化碳箱内处死。用 12 mm 取皮器取炎症部位的肌肉组织并放入液氮中冷冻,研磨称量后置于-80℃冰箱保存。收集到的血浆静置 15 min 后离心取上清液,而组织则加入 10 倍质量体积的高效 RIPA 裂解液进行裂解,提取蛋白。根据说明书,使用 V-PLEX Pro-inflammatory Panel 2 Rat Kit 测量组织和血浆中炎症因子含量。利用多因子检测仪对样本进行分析,以量化电化学发光信号,测定各细胞因子的浓度。

1.3.5 转录组测序分析

随机挑选正常组、MD3 组和 MD13 组大鼠每组 6 只,采集 CFA 注射部位的肌肉组织进行转录组测序分析。TRIzol 法提取各组样本总 RNA,并在北京奥维森基因科技有限公司完成 RNA 测序分析。用 Nanodrop 和 Agilent 2100 分别检测 RNA 纯度和完整性。样品检测合格后,使用带有 Oligo(dT)的磁珠富集得到 mRNA,再加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段。随后,用六碱基随机引物(random hexamers)以 mRNA 为模板进行反转录合成 cDNA,并进行末端修复、加 A、加接头。通过 AMPure XP beads 对双链 cDNA 进行片段大小选择,最后进行 PCR 扩增以构建 cDNA 文库。

建好的文库先进行文库质检,质检合格的文库使用 Illumina 高通量测序平台,采用 PE150 测序策略。对下机的原始数据 Raw reads 质控后,获得 Clean reads。分别利用 star 和 Cufflinks 软件完成比对和转录本拼接分析,然后对所有基因进行定量分析。获得基因表达量后,使用 DESeq 进行差异表达分析,以 Q value<0.05 为标准,筛选出 MD3 组和 MD13 组大鼠与正常组之间显著差异表达的基因。

利用 GOseq 软件对差异表达的基因进行 GO (Gene Ontology) 功能及利用 KOBAS 软件进行 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路富集分析, 帮助了解差异表达基因的功能。将得到的差异表达基因互作网络数据文件导入 Cytoscape 软件, 进行蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析。计算每个基因的连通性连接程度, 即其连接的基因数量, 以评估其在该网络中的重要性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理, 计量资料以平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x}\pm s\bar{x}$) 表示。符合正态分布且方差齐者, 采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验; 不满足方差齐性或正态分布则采用 Dunnett's T3 检验, 以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义的标准。配对样本数据采用配对样本 *t* 检验, 以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 肌肉注射 CFA 对大鼠患侧足底机械痛阈值和热痛阈值的影响

CFA 肌肉注射 1 d 后, 模型组大鼠患侧足底对于机械刺激的缩足潜伏期为 (10.94 ± 1.71) s, 与正常组大鼠 (23.69 ± 4.21) s 相比明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。CFA 注射 3、5、7、9、11、13 和 15 d 后大鼠机械痛缩足潜伏期分别为 (9.57 ± 2.88) s、(11.69 ± 3.01) s、(9.70 ± 3.48) s、(10.17 ± 2.56) s、(8.98 ± 2.10) s、(10.13 ± 4.30) s 和 (10.54 ± 1.77) s, 与正常组相比均显著降低 ($P<0.05$) (见图 1A)。在注射 CFA 1 d 后, 模型组大鼠对热刺激的缩足潜伏期为 (9.54 ± 2.15) s, 与正常组大鼠 (17.03 ± 3.81) s 相比明显降低, 差异具有显著的统计学意义 ($P<0.05$)。CFA 注射 3、5、7、9、11、13 和 15 d 后大鼠热痛缩足潜伏期分别为 (8.65 ± 2.01) s、(9.07 ± 1.19) s、(7.89 ± 1.96) s、(7.47 ± 0.94) s、(7.27 ± 1.28) s、(7.52 ± 1.7) s 和 (6.09 ± 0.76) s, 与正常组相比均显著降低 ($P<0.05$) (见图 1B)。说明肌肉注射 CFA 造成的炎症反应可诱导大鼠同侧足底产生持续的机械和热痛敏。

2.2 肌肉注射 CFA 对大鼠局部组织中细胞因子含量的影响

CFA 肌肉注射 1 d 后, 模型组大鼠局部组织中 IL-6、IL-1 β 含量分别为 (103.76 ± 29.69) ng/mg、(9615.42 ± 3941.95) pg/mg, 与正常组大鼠 ($4.51\pm$

1.00) ng/mg、(269.81 ± 96.07) pg/mg 相比明显升高, 具有极显著的统计学差异 ($P<0.01$)。造模后不同时间大鼠局部肌肉组织中 IL-6、IL-1 β 均高于正常组 ($P<0.05$), 其中 CFA 肌肉注射 13 d 后, 模型组大鼠局部组织中 IL-6、IL-1 β 含量分别为 (36.76 ± 22.54) ng/mg、(5134.07 ± 2955.51) pg/mg, 与正常组大鼠相比均明显升高, 具有极显著统计学差异 ($P<0.01$) (图 2A、2B)。CFA 肌肉注射 1 d 后, 模型组大鼠局部组织中 TNF- α 含量为 (644.33 ± 208.81) pg/mg, 与正常组大鼠 (52.71 ± 11.41) pg/mg 相比明显升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。造模后不同时间大鼠局部肌肉组织中 TNF- α 均高于正常组 ($P<0.05$), 其中 CFA 肌肉注射 13 d 后, 模型组大鼠局部组织中 TNF- α 含量达到最高值 (1110.99 ± 541.99) pg/mg, 与正常组大鼠相比明显升高, 具有极显著统计学差异 ($P<0.01$) (图 2C)。造模后第 1 天组大鼠局部组织中抗炎因子 IL-10 含量为 (90.60 ± 13.19) pg/mg, 与正常组大鼠 (141.35 ± 41.42) pg/mg 相比明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。造模后不同时间大鼠局部肌肉组织中抗炎因子 IL-10 含量均明显低于正常组大鼠, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 2D)。提示肌肉注射 CFA 后, 注射局部的肌肉组织分别在注射后第 1~3 天和第 13 天发生两次明显的炎症反应。

2.3 肌肉注射 CFA 对大鼠外周血中细胞因子含量的影响

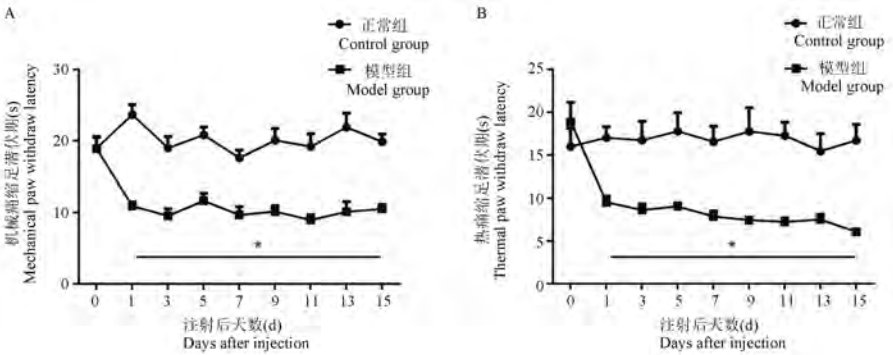
CFA 肌肉注射 1 d 后, 模型组大鼠外周血中 IL-6、IL-1 β 含量分别为 (570.45 ± 225.86) pg/mL、(14.30 ± 3.40) pg/mL, 与正常组大鼠 (83.20 ± 22.92) pg/mL、(7.96 ± 5.05) pg/mL 相比明显升高, 差异具有显著的统计学意义 ($P<0.05$)。造模后不同时间大鼠局部外周血中 IL-6、IL-1 β 与正常组相比无统计学差异 (图 3A、3B)。CFA 肌肉注射 1 d 后, 模型组大鼠外周血中 TNF- α 含量为 (45.92 ± 7.19) pg/mL, 与正常组大鼠 (26.65 ± 2.63) pg/mL 相比明显升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。造模后不同时间大鼠局部外周血中 TNF- α 与正常组相比无统计学差异 (图 3C)。而外周血中 IL-10 的含量在局部肌肉注射 CFA 后, 随着时间的变化逐渐降低。在造模后的第 7、9、11、13、15 d, 外周血中 IL-10 的含量分别为 (7.04 ± 1.86) pg/mL、(5.68 ± 2.98) pg/mL、(6.10 ± 2.96) pg/mL、(6.59 ± 1.67) pg/mL、(5.07 ± 0.92) pg/mL, 与正常组大鼠 (9.69 ± 3.28)

pg/mL 相比明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3D)。提示肌肉注射 CFA 后,在注射后第 1 天可诱导发生全身性的炎症反应。

2.4 CFA 注射后对炎症局部组织结构、细胞形态的影响

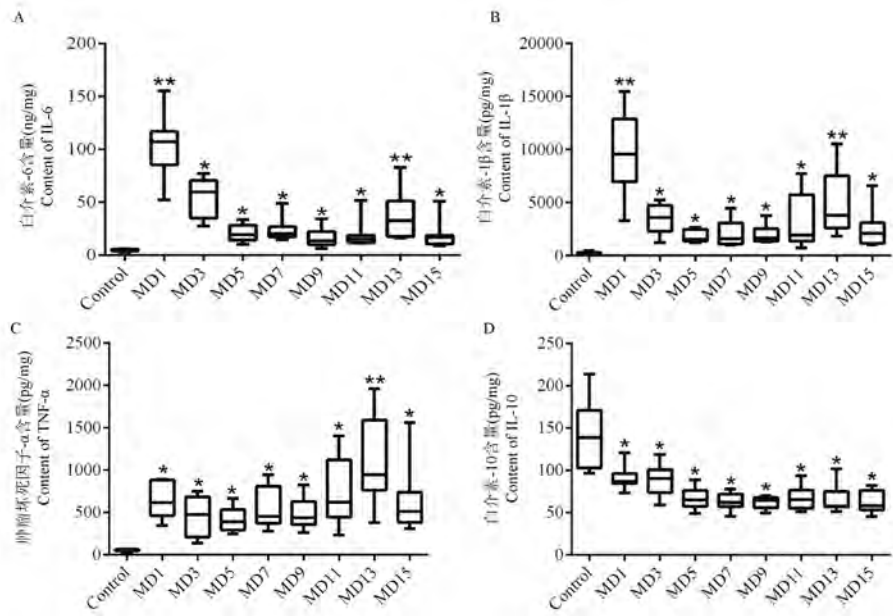
基于细胞因子的结果,我们选择 CFA 注射后第 3 天(去除 CFA 注射后第 1 天全身性炎症反应对局部炎症的影响)和第 13 天的大鼠作为观察对象,使用 HE 染色方法对局部组织结构、细胞形态进行观察。

正常组大鼠股二头肌肌肉组织纹理清晰,结构正常,未见炎性细胞浸润。造模后第 3 天,可观察到注射 CFA 后肌肉组织被大量中性粒细胞浸润,并出现一定数量的脓性空泡和肉芽肿。CFA 注射后第 13 天,浸润在肌肉组织中的细胞种类主要为以淋巴细胞为主的单核细胞,及少量的中性粒细胞(图 4)。通过细胞形态的差异推测发生于 CFA 注射后第 3 天的炎症反应是由固有免疫所介导的,而发生于 CFA 注射后第 13 天的炎症反应是由适应性免疫所介导的。



注:A:对机械刺激的缩足潜伏期变化;B:对热刺激的缩足潜伏期变化。与正常组相比, * $P < 0.05$ 。
图 1 肌肉注射 CFA 对大鼠足底机械和热痛阈的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 10$)
Note. A, Changes of PWL for mechanical stimulation. B, Changes of PWL for heat stimulation.
Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Effects of plantar mechanical and thermal pain thresholds in rats after injection of CFA in muscle



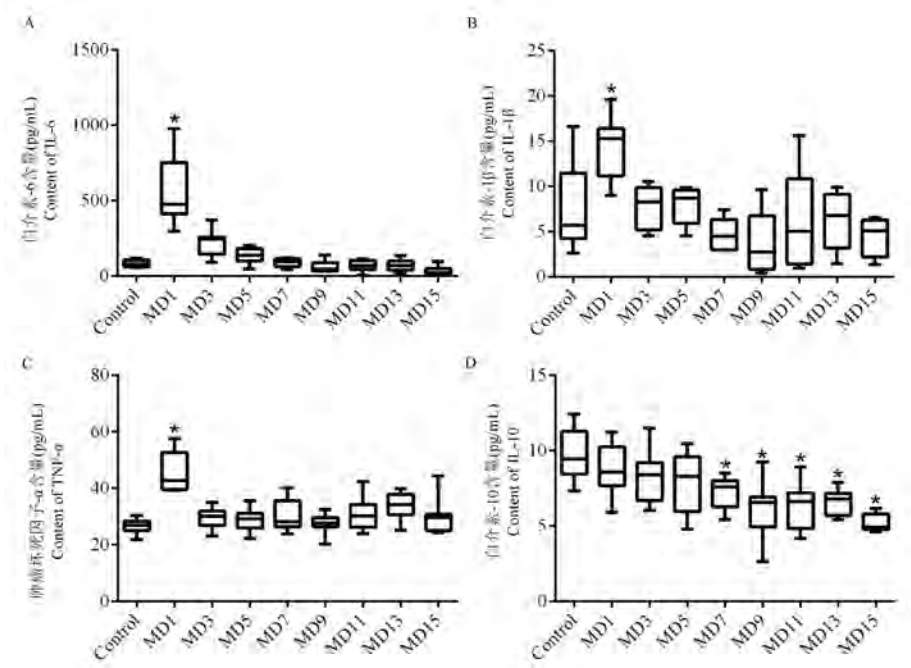
注:与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
图 2 CFA 注射对大鼠局部组织中炎症因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 8$)
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Effect of CFA injection on the inflammatory factors levels in the local tissues of rats

2.5 CFA 诱导大鼠肌肉炎症中固有免疫和适应性免疫基因表达的比较

为了进一步比较 CFA 诱导大鼠肌肉炎症中固有免疫和适应性免疫基因表达的差异,我们将取材于 CFA 注射后第 3 天和第 13 天的组织样本进行了转录组测序分析。首先为了证明实验的可重复性及评估结果的可靠性,我们对样本间 RNA 相关性进

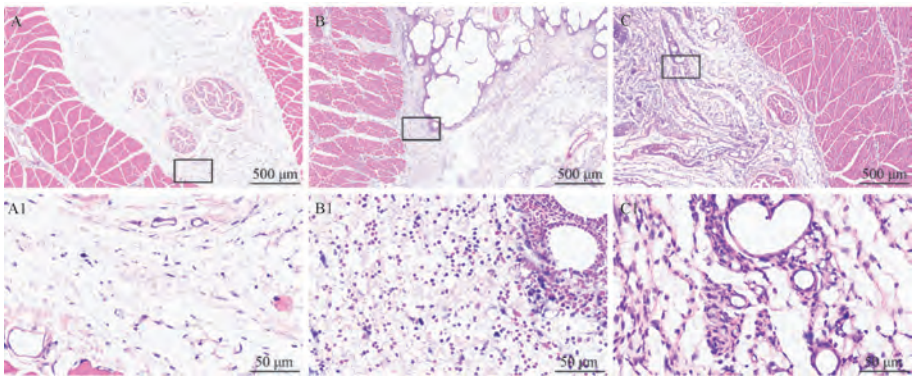
行了分析。由图 5A 可见组内样本之间的表达模式相似度高,差异性小,具有可重复性。在转录组中,获得基因表达量后,以 $Q\ value<0.05$ 标准对差异基因进行筛选。在 MD3 组大鼠与 MD13 组大鼠之间确定了 5661 个差异表达基因,包括 2950 个上调基因和 2711 个下调基因。绘制火山图以展示差异显著性基因的整体分布情况(图 5B)。



注:与正常组相比,* $P<0.05$ 。
图 3 CFA 注射对血浆中炎症因子含量的影响($\bar{x}\pm s\bar{x}$, $n=8$)

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

Figure 3 Effect of CFA injection on the inflammatory factors levels in plasma



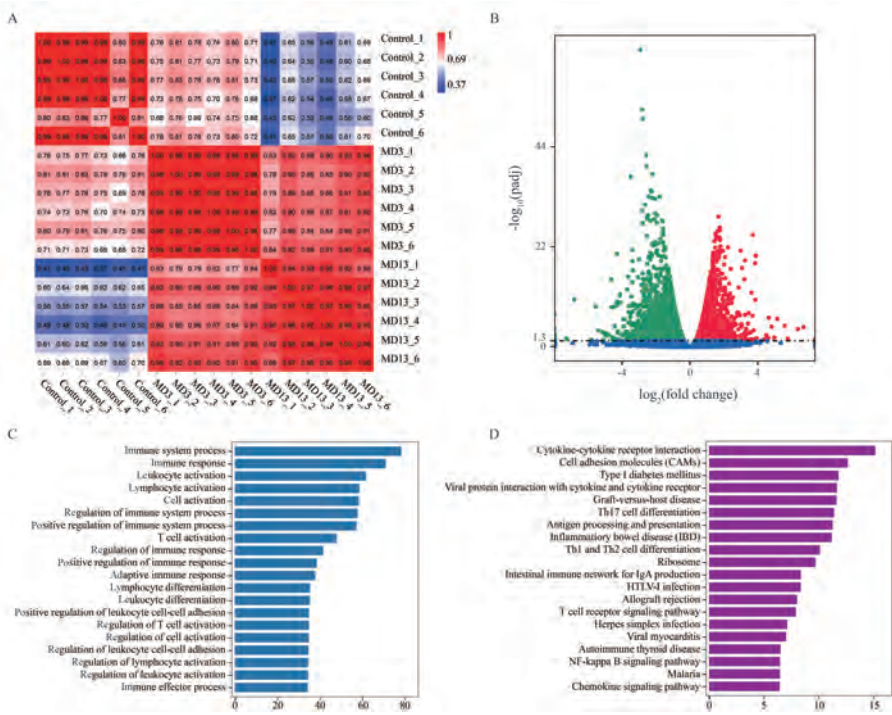
注:A:正常组;B:MD3组;C:MD13组。A1、B1、C1分别为A、B、C图中黑色方框区的放大图。
图 4 各组大鼠局部组织病理改变(HE 染色)
Note. A, Control group. B, MD3 group. C, MD13 group. A1, B1, C1 is the enlarged diagram of the black block area in the A, B, C diagram respectively.

Figure 4 Local histopathological changes in rats in each group (HE staining)

之后我们对差异基因集进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,进一步揭示差异表达基因所参与的生物学功能。由图可见,与 CFA 注射后第 3 天的炎症组织相比,第 13 天的炎症组织中上调基因 GO 富集的生物过程主要有免疫系统对抗原刺激的防御反应和处理过程、白细胞的激活等(图 5C)。KEGG 富集分析结果显示差异基因参与了核糖体、细胞粘附分子、抗原加工和呈递、细胞因子-细胞因子受体相互作用、Th1 和 Th2 细胞分化、T 细胞受体信号通路、NF- κ B 信号通路、趋化因子信号通路等(图 5D)。说明第 13 天的炎症组织中存在明显的抗原呈递、淋巴细胞分化并发挥效应的现象,这与适应性免疫的功能相符。

2.6 CFA 注射诱导的固有和适应性免疫应答中与痛敏相关基因表达的差异

研究人员继续对既往文献中确认炎性机械和热痛敏相关 *Ccl3* 基因^[17-18],进行蛋白质互作(protein protein interaction, PPI)网络分析。在正常组与 MD3 组和 MD13 组相比的差异表达基因网络图中,分别鉴定出 24 和 30 个基因。通过 PPI 分析得到主要枢纽基因包括 *Ccl3*、*Cxcl1*、*Cxcl2*、*Cxcl9*、*Cxcl10* 等(图 6A、6B)。利用上述基因定量分析所获得的 FPKM(Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped reads)值,绘制热图以展示目的基因在各组的表达水平(图 6C)。由图可见 CFA 注射后上述基因的表达水平均高于正常组大鼠。其

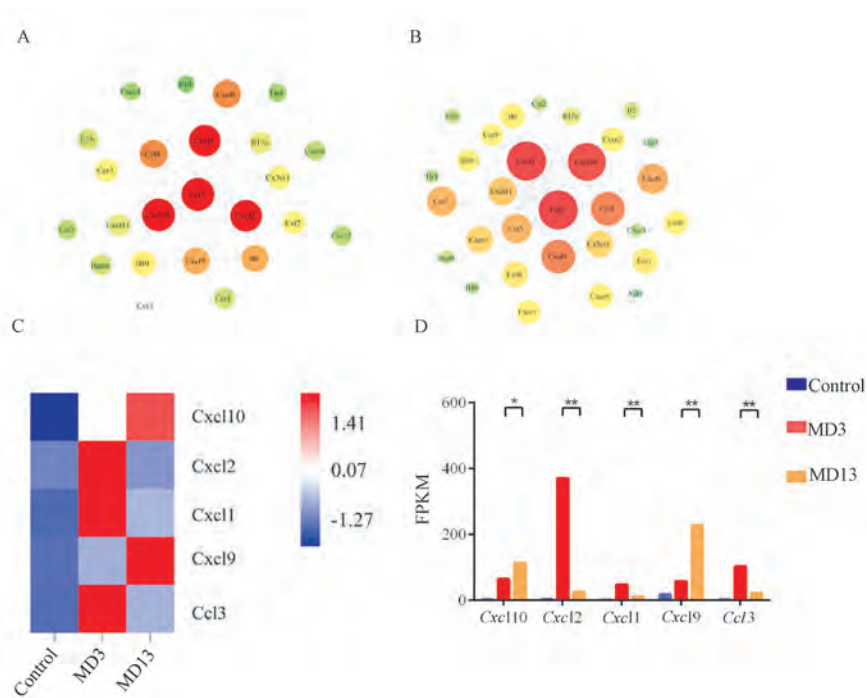


注:A:样本间 RNA 相关性分析;方格里数值为两个样本间的相关系数 R^2 值; R^2 越接近 1,表明样品之间表达模式的相似度越高;B:差异表达基因火山图。横坐标表示基因在不同样本中的表达倍数变化($\log_2$ fold change),纵坐标表示表达差异的显著性水平($-\log_{10}$ Padj);C:GO 富集分析;与 MD3 组相比,MD13 组中上调的差异表达基因所参与的生物过程;D:KEGG 富集分析。

图 5 RNA-Seq 分析

Note. A, RNA correlation analysis between samples. Value within the square represent the correlation coefficient R^2 between the two samples. The closer R^2 value is to 1, higher the similarity of expression patterns between the samples. B, Heatmap of differential expressed genes. Abscissa indicates the expression of multiple genes in different samples ($\log_2$ fold change) and the ordinate indicates the significance of the difference in expression ($-\log_{10}$ Padj). C, GO enrichment analysis. Biological process involved in upregulated differentially expressed genes in the MD13 group compared to the MD3 group. D, KEGG enrichment analysis.

Figure 5 RNA-Seq analysis



注:A:MD3 组中 *Ccl3* 相关的 PPI 网络分析;B:MD13 组中 *Ccl3* 相关的 PPI 网络分析。体积越大反映基因连接点越多;C:热图中红色表达高表达,蓝色表示低表达。D:与 MD3 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 6 PPI 网络分析与聚类热图

Note. A, PPI network analysis of the *Ccl3*-related in the MD3 group. B, PPI network analysis of the *Ccl3*-related in the MD13 group. Larger volume indicates more gene junction points. C, High expression is shown in red, while low expression is shown in blue. D, Compared with the MD3 group, * $P<0.05$. ** $P<0.01$.

Figure 6 PPI network analysis and heatmap

中与 MD3 组大鼠相比,MD13 组大鼠局部组织中 *Cxcl9*、*Cxcl10* 基因的表达水平明显升高,而 *Ccl3*、*Cxcl1* 和 *Cxcl2* 基因表达水平明显降低(图 6D)。固有和适应性免疫应答中与痛敏相关基因表达的差异,说明不同的免疫应答通过调节不同的趋化因子基因表达对疼痛的敏化发挥作用。

3 讨论

本研究观察到肌肉注射 CFA 可引起足底持续性的机械和热痛敏,造成局部组织明显的炎症反应。其具体表现为外周血和炎症组织中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的水平在注射后 24 h 显著升高,局部组织中此类促炎因子在注射后第 13 天再次升高,说明在这两个时间均出现了明显的免疫反应^[19]。我们通过观察浸润在炎症组织中的细胞形态差异推测 CFA 注射后第 3 天的炎症反应是由固有免疫所介导的,而发生于注射后第 13 天的炎症反应是由适应性免疫所介导的。通过转录组测序分析,观察到相

对于注射后第 13 天,在 CFA 注射后第 3 天局部组织中与免疫反应相关的差异表达基因上调并增强免疫系统对抗原的处理和反应,其中涉及到 Th 细胞的分化、细胞因子受体相互作用等重要生物学通路。CFA 注射后局部组织中痛敏相关基因的表达水平升高,包括 *Ccl3*、*Cxcl1*、*Cxcl2*、*Cxcl9*、*Cxcl10* 等基因。

在 CFA 所诱导的固有免疫反应中,外周血和炎症组织中促炎因子主要由聚集到损伤部位的中性粒细胞所释放。前哨白细胞(如巨噬细胞和树突状细胞)与病原体接触时表面 toll 样受体识别并激活,从而产生炎症介质,包括血管活性物质(如组胺、5-羟色胺)和趋化因子^[19]。组织驻留和招募的免疫细胞在炎症局部分泌大量炎症介质(如 IL-6、IL-1 β 、TNF- α),与伤害性感受神经末梢上相应的受体结合,激发伤害性感受神经元动作电位和降低动作电位阈值,导致疼痛敏感性或“痛觉过敏”^[20]。有研究表明足底内注射 CFA 可明显降低后足对机械刺

激和热刺激的痛阈值(3 h),同时炎症足中 TNF- α 、IL-1 β 和 NGF 水平显著升高。在注射 CFA 前 1 h,足底注射抗 TNF- α 血清能显著延迟炎症性痛觉过敏^[21]。随后激活的中性粒细胞释放出颗粒蛋白,促进单核-巨噬细胞向炎症病灶的募集与浸润^[22],共同发挥以中性粒细胞为主导的吞噬、杀菌作用,来限制损伤或感染的范围,完成固有免疫反应^[23]。随着中性粒细胞的吞噬凋亡以及脓疱的形成^[24],巨噬细胞对凋亡中性粒细胞的摄取促进脂质蛋白的产生,进而降低中性粒细胞活性,减少促炎趋化因子和细胞因子的合成^[25]。脂质蛋白抑制中性粒细胞进入炎症部位,防止白细胞的进一步浸润,并促进单核-巨噬细胞迁移,增强对凋亡细胞的摄取和清除,从而促使炎症的消退^[26]。这也解释了本研究观察到炎症组织中 IL-6、IL-1 β 含量在注射 CFA 24 h 后逐渐降低的现象。而组织中 TNF- α 水平保持升高,则是因为炎症部位的 TNF- α 主要来源于巨噬细胞。

除了清除凋亡的中性粒细胞外,吞噬细胞(以及密切相关的树突状细胞)对病灶中的抗原进行摄取、吞噬和处理后,迁移到引流淋巴结并发育成熟,将抗原成分呈递给 T 淋巴细胞^[27]。Th 细胞表面受体被 DC 细胞以 MHC II 类分子途径递呈的抗原性多肽激活,开始增值分化产生相同的 Th 效应细胞^[28-29],促进适应性免疫的发生。本研究针对 CFA 诱导的肌肉炎性痛模型大鼠在固有免疫和适应性免疫应答中基因表达水平的变化,对差异表达基因进行 GO 功能和 KEGG 富集分析。研究结果表明,差异表达基因主要参与了 Th 细胞分化、Rap1 信号通路、NF- κ B 信号通路和细胞因子受体相互作用等重要生物学通路。随着免疫应答的进展,Th1 细胞受趋化因子诱导迁移到外周炎症部位,分泌细胞因子(主要为 IL-2、IFN- γ 和 LT),使巨噬细胞高度活化、吞噬作用增强,并上调附近其他抗原呈递细胞 MHC II 类分子的表达^[6]。NK 细胞作为天然免疫细胞,能够通过释放细胞毒蛋白杀死感染和恶性细胞,以及产生细胞因子(IFN- γ 和 TNF- α)来终止炎症^[30]。Th 细胞以特异性识别抗原,辅助 NK 细胞、巨噬细胞清除并吞噬被感染的细胞宿主,发挥细胞免疫反应。在炎症后期组织中 TNF- α 主要来源于巨噬细胞和 NK 细胞,而 TNF- α 的释放增加又可以诱导组织中 IL-6、IL-1 β 水平升高^[21]。

在 CFA 诱导的不同免疫反应时期,免疫系统通

过对调整基因的差异性表达来控制疼痛。痛觉的感知依赖于伤害性信息从外周伤害性感受器神经元到脊髓二级中间神经元的有效传递。其中脊髓背角是这些神经元之间发生联系的区域,对疼痛强度起着至关重要的控制作用^[31]。由于持续的炎性刺激使得伤害性感受器通过其中枢神经末梢表达和释放炎症介质到脊髓,包括三磷酸腺苷、降钙素基因相关肽和集落刺激因子 1 等。这些介质激活了中枢神经系统的常驻免疫细胞-小胶质细胞,使其产生炎症介质(如 TNF- α 、IL-1 β 和前列腺素 E2),从而诱导初级痛觉感受器神经元和二级疼痛介导的中间神经元过度兴奋(中枢敏化)^[32]。有研究观察到紫杉醇诱导的周围神经病变模型大鼠在后爪出现持久的机械痛和热痛超敏反应,同时伴随着脊髓背角中星形胶质细胞和小胶质细胞的激活,并在模型组大鼠的脊髓背角中鉴定出 *Ccl3* 基因表达水平显著增加^[33]。小胶质细胞中 *Ccl3* 基因的表达与紫杉醇诱导的机械性异常性疼痛有关,鞘内注射 CCL3 中和抗体可显著减轻大鼠机械性痛觉超敏^[18]。在本研究中通过差异表达基因网络图分析 *Ccl3* 基因,得到参与 CFA 诱导的炎性痛敏机制的趋化因子家族基因。我们注意到趋化因子家族基因在 CFA 诱导的固有和适应性免疫应答中表达水平有所差异,将会在下一步的研究工作中继续关注。综上所述 CFA 的注射可有效刺激免疫反应的发生,诱导炎性痛敏,其中趋化因子家族基因发挥了重要的作用。

参考文献:

- [1] Parvathy SS, Masocha W. Gait analysis of C57BL/6 mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis using the CatWalk system [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2013, 14: 14.
- [2] Walker SM, Meredith-Middleton J, Cooke-Yarborough C, et al. Neonatal inflammation and primary afferent terminal plasticity in the rat dorsal horn [J]. Pain, 2003, 105(1-2): 185-195.
- [3] 施佳君,陈方明,马全鑫,等. 胶原诱导 Wistar 和 Lewis 大鼠类风湿关节炎模型病理特点的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(4): 19-26, 37.
- [4] Schomburg ED, Steffens H, Pilyavskii AI, et al. Long lasting activity of nociceptive muscular afferents facilitates bilateral flexion reflex pattern in the feline spinal cord [J]. Neurosci Res, 2015, 95: 51-58.
- [5] Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, et al. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures [J]. J Pain, 2013, 14(11): 1255-1269.
- [6] Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in

- experimental models of autoimmune diseases [J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 70(6): 849-860.
- [7] 何晓芬, 蒋永亮, 尹小虎, 等. μ 型阿片受体参与 CFA 大鼠慢性炎性痛的外周调控 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(1): 30-34, 4.
- [8] 邵芳冰, 房军帆, 王思思, 等. 慢性炎性痛模型大鼠诱发焦虑抑郁样情绪行为观察 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(2): 167-174.
- [9] 张敏娜. 类风湿关节炎的实验动物模型及其评价 [J]. *实验动物科学*, 2011, 28(4): 57-59.
- [10] Vincent TL, Williams RO, Maciewicz R, et al. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, 51(11): 1931-1941.
- [11] Sanchez-Pescador L, Burke RL, Ott G, et al. The effect of adjuvants on the efficacy of a recombinant herpes simplex virus glycoprotein vaccine [J]. *J Immunol*, 1988, 141(5): 1720-1727.
- [12] Simonic-Kocijan S, Zhao X, Liu W, et al. TRPV1 channel-mediated bilateral allodynia induced by unilateral masseter muscle inflammation in rats [J]. *Mol Pain*, 2013, 9: 68.
- [13] Lei J, Ye G, Pertovaara A, et al. Effects of intramuscular heating-needle stimulation in controlling adjuvant-induced muscle nociception in rats; differential roles of thalamic purinergic P2X3 receptors [J]. *Neuroscience*, 2020, 433: 81-93.
- [14] Keustermans GC, Hoeks SB, Meerding JM, et al. Cytokine assays: an assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples [J]. *Methods*, 2013, 61(1): 10-17.
- [15] McKay HS, Margolick JB, Martínez-Maza O, et al. Multiplex assay reliability and long-term intra-individual variation of serologic inflammatory biomarkers [J]. *Cytokine*, 2017, 90: 185-192.
- [16] 史长华, 张玲, 陈巍, 等. RNA-Seq 技术筛选 APP/PS1 阿尔茨海默病模型小鼠差异表达基因及功能分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(10): 1-7.
- [17] Zhang N, Inan S, Cowan A, et al. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(12): 4536-4541.
- [18] Ochi-ishi R, Nagata K, Inoue T, et al. Involvement of the chemokine CCL3 and the purinoceptor P2X7 in the spinal cord in paclitaxel-induced mechanical allodynia [J]. *Mol Pain*, 2014, 10: 53.
- [19] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response [J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 819-826.
- [20] Pinho-Ribeiro FA, Verri WA Jr, Chiu IM. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation [J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(1): 5-19.
- [21] Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha [J]. *Br J Pharmacol*, 1997, 121(3): 417-424.
- [22] Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation [J]. *Microbes Infect*, 2003, 5(14): 1317-1327.
- [23] Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(6): 427-439.
- [24] Wiedemann F, Link R, Pumpe K, et al. Histopathological studies on the local reactions induced by complete Freund's adjuvant (CFA), bacterial lipopolysaccharide (LPS), and synthetic lipopeptide (P3C) conjugates [J]. *J Pathol*, 1991, 164(3): 265-271.
- [25] Chiang N, Serhan CN, Dahlén SE, et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions *in vivo* [J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(3): 463-487.
- [26] Maddox JF, Hachicha M, Takano T, et al. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(11): 6972-6978.
- [27] Bellingan GJ, Caldwell H, Howie SE, et al. *In vivo* fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes [J]. *J Immunol*, 1996, 157(6): 2577-2585.
- [28] Halpert MM, Konduri V, Liang D, et al. MHC class I and II peptide homology regulates the cellular immune response [J]. *FASEB J*, 2020, 34(6): 8082-8101.
- [29] Jung HJ, Park SH, Cho KM, et al. Threonyl-tRNA synthetase promotes T helper type 1 cell responses by inducing dendritic cell maturation and IL-12 production via an NF- κ B pathway [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 571959.
- [30] Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects [J]. *Immunology*, 2014, 141(4): 483-489.
- [31] Foster E, Wildner H, Tudeau L, et al. Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch [J]. *Neuron*, 2015, 85(6): 1289-1304.
- [32] Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? [J]. *Pain*, 2013, 154(1): S10-S28.
- [33] Li Y, Yin C, Liu B, et al. Transcriptome profiling of long noncoding RNAs and mRNAs in spinal cord of a rat model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy identifies potential mechanisms mediating neuroinflammation and pain [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 48.

赵亚,吴亚运,刘丽娟,等. 咪喹莫特致不同免疫状态小鼠银屑病模型比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 41-47.

Zhao Y, Wu YY, Liu LJ, et al. Comparative study on imiquimod-induced psoriasis models in mice with different immune states [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 41-47.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.006

咪喹莫特致不同免疫状态小鼠银屑病模型比较研究

赵 亚¹, 吴亚运^{1,3}, 刘丽娟¹, 赵瑞芝^{1,2,3*}

(1. 广州中医药大学第二附属医院, 广州 510006; 2. 省部共建中医湿证重点实验室, 广州 510006;
3. 广东省中医症候研究重点实验室, 广州 510006)

【摘要】 目的 通过建立不同免疫状态小鼠银屑病模型探讨不同免疫细胞及非免疫因素对银屑病发病的影响。**方法** Balb/c 小鼠、裸鼠、NOG 小鼠各 20 只, 分别分为空白组和模型组, 每组 10 只。模型组均采用咪喹莫特涂抹小鼠背部皮肤诱导类银屑病模型, 末次造模后取材, 检测皮肤、脾病理组织, 皮肤炎症因子, 以及皮肤和脾能量代谢因子等指标。**结果** 与正常组相比, 3 种模型动物小鼠皮肤表观状态及病理组织均表现出银屑病样病变, 炎症因子 (IL6、IL17、IL22、IL23) 水平均显著升高, 脾均出现肿大, 脾病理切片显示 Balb/c 小鼠, 裸鼠白髓区增大, 淋巴细胞显著增多, 皮肤及脾中的 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶}$ 和 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP 酶}$ 活性均下降, 3 种模型成模的严重程度为 Balb/c 小鼠 > 裸鼠 > NOG 鼠。**结论** 多种免疫细胞活化特别是 T 细胞活化在银屑病发病中具有关键作用, 但免疫细胞严重缺失的动物仍能诱发银屑病, 其中非免疫因素 ATP-ATP 酶活性下降可能也是银屑病发病的诱导因素之一。

【关键词】 银屑病; 动物模型; 免疫细胞; ATP 酶

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0041-07

Comparative study on imiquimod-induced psoriasis models in mice with different immune states

ZHAO Ya¹, WU Yayun^{1,3}, LIU Lijuan¹, ZHAO Ruizhi^{1,2,3*}

(1. the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China.
2. State Key Laboratory of Dampaness Syndrome of Chinese Medicine, Guangzhou 510006.
3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510006)

【Abstract】 Objective To explore the effects of different immune cells and nonimmune factors on the pathogenesis of psoriasis. **Methods** Balb/c mice, nude mice and NOG mice were each divided into a blank group and model group, with 10 mice in each group. In the model groups, imiquimod was applied to the back skin of the mice to induce a psoriasis-like model, and samples of the skin and spleen were taken after the last application of imiquimod. The pathological changes to the skin and spleen induced by imiquimod were observed, and skin inflammatory factors and energy metabolic factors of the skin and spleen were detected. **Results** Compared with the normal group, the skin appearance and pathological tissue of the model group in all three mouse types showed psoriasis-like lesions, and the levels of inflammatory factors (IL6, IL17, IL22 and IL23) were significantly higher. In the model groups, the spleen was swollen for all three mouse types, and the pathological spleen section exhibited a larger white pulp area and higher amount of lymphocytes compared with the

【基金项目】 广东省中医症候研究重点实验室项目 (ZH2019ZZ05); 省部共建中医湿证重点实验室项目 (SZ2021ZZ51)。

【作者简介】 赵亚 (1982—), 女, 博士, 研究方向: 药效机制及中药分析研究。E-mail: 13423631120@163.com

【通信作者】 赵瑞芝 (1968—), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 药效机制及中药分析研究。E-mail: 13610241754@163.com

blank groups in the Balb/c mice and nude mice. The activities of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ in the skin and spleen were lower in the model groups. The relative severity of the three models was as follows: Balb/c mice > nude mice > NOG mice. **Conclusions** Immune cell activation, especially T-cell activation, plays a key role in the pathogenesis of psoriasis, but psoriasis can still be induced in animals with a severe immune deficiency. A decrease in ATPase activity, which is a non-immune factor, may also be an inducing factor of psoriasis.

【Keywords】 psoriasis; animal model; immune cells; ATPase

银屑病是一种常见的慢性、炎症性表皮增殖性、无传染性的红斑鳞屑性皮肤病,其发病率高,是目前国内外皮肤科领域内的研究热点^[1]。然而,银屑病发病机制不清,导致银屑病的治疗目前主要还是对症治疗,复发率极高,且无法预防^[2-3]。目前普遍认为其发病机制主要是与 T 细胞异常活化相关,其中辅助 T 细胞 Th1、Th17 及其相关因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL6、IL23、IL17 和 IL22 等以及调节性 T 细胞 Treg 已先后发现成为影响银屑病的关键因子,然而,这些因子在银屑病中的具体作用机制并未完全阐明或存在争议^[4-5]。此外目前也有报道认为 B 细胞、NK 细胞、中性粒细胞等其他免疫细胞介导的免疫功能紊乱在银屑病疾病进展过程中起着重要作用^[6-7]。然而其他免疫细胞是否与 T 细胞对银屑病发病起着同样重要的作用,是否存在其他非免疫因素对银屑病发病有影响也值得深入探讨。

近年来,大量研究表明,不同疾病机体状态的单一或多种组织器官中 ATP 酶活性能被疾病状态所影响,生理及病理的变化在一定程度上会影响机体内的 ATP 酶的改变,从而影响 ATP 酶催化 ADP 氧化磷酸化成 ATP,进而影响机体的能量供给^[8-10]。因此,研究疾病状态下 ATP 酶活性有助于研究疾病的发病机制及临床用药。ATP 酶与细胞功能,繁殖密切相关,而皮肤细胞过度增生是银屑病表现之一,且前期有文献报道银屑病病人红细胞中 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性下降,提示非免疫因素 ATP 酶活性改变可能与银屑病发病相关^[11]。

因此本文拟通过比较不同免疫状态小鼠 Balb/c 鼠(免疫细胞正常)、裸鼠(T 免疫细胞缺陷)和 NOG 小鼠(重度免疫细胞缺陷)在咪喹莫特诱导下皮肤和脾外观及组织病理变化的不同,及其 ATP 酶活性变化研究探讨不同免疫细胞及非免疫因素对银屑病发病的影响,为银屑病发病机制的阐明提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 Balb/c 小鼠、裸鼠、NOG 小鼠各 20

只,体重 18~22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011]提供,大鼠饲养于广东省中医院 SPF 级动物实验中心[SYXK(粤)2018-0094],饲养温度为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 $(60 \pm 10)\%$,采用 12 h:12 h 昼夜间断照明,动物自由饮食饮水。动物实验方案通过广东省中医院广东省中医药科学院试验动物伦理委员会审批(2014001),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

咪喹莫特(四川明欣药业有限责任公司,20030128);超微量 Na^+K^+ 、 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 、总 ATP 酶测试盒(南京建成生物工程研究所,20170228);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo scientific 公司,ML166920);IL6、IL17、IL22、IL23 ELISA 试剂盒(美国 Raybiotech 公司,EKL54698-BM, EKL54533-BM, EKL58293-BM, EKL58298-BM);氯化钠(天津市富宇精细化工有限公司,20160524)。Saturius BS224S 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);VICTOR X5 酶标仪(美国 PerkinElmer 公司);T10 匀浆机(德国 IKA 公司);Centrifuge 5430 离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及药物诱导银屑病动物模型的建立

Balb/c 小鼠、NOG 小鼠、裸鼠各 20 只适应性饲养 1 周后均无异常后纳入实验。每种小鼠随机分为模型和空白 2 组,每组 10 只,称重标记。将鼠尾根部以上长 3 cm、宽 2 cm 长方形皮肤上被毛除去,模型组每日上午于小鼠背部涂抹 5%咪喹莫特乳膏(每只 50 mg),空白组不做任何处理。

1.3.2 取材及处理

每日拍照观察皮肤皮损情况,参照银屑病样皮损面积和疾病严重程度(PASI)评分标准进行评分。造模 5 d 后,小鼠禁食不禁水 12 h,称重,麻醉后处死。取小鼠背部皮肤、脾,脾拍照称重,生理盐水冲洗皮肤和脾后分为 2 份,1 份置于 10%甲醛溶液固

定于 HE 染色,另 1 份置于 -80°C 保存,备用。

1.3.3 皮肤中炎症因子的测定

取皮肤 50 mg,精密称定,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入预冷的 9 倍体积蛋白裂解液,匀浆机下机械匀浆 12000 r/min 离心 5 min,取上清液,精密吸取 100 μL 样品加入包被好抗体的 96 孔板,在室温下孵育 2.5 h,弃孔中废液后洗涤;加入 100 μL 二抗,孵育 1 h,弃废液后洗涤;加入 100 μL streptavidin-HRP 溶液,孵育 45 min 后弃废液洗涤;加入 100 mL TMB 后避光孵育 30 min;加入终止液后使用酶标仪在 450 nm 下检测,根据制作好的标准曲线计算各组蛋白表达量差异。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测小鼠皮肤中 IL6、IL17、IL22 及 IL23 蛋白表达水平。

1.3.4 皮肤、脾中 ATP 酶活力的测定

取皮肤和脾组织 50 mg,精密称定,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入预冷的 9 倍体积的生理盐水,匀浆机下机械匀浆,低温高速离心机中 2000 r/min 离心 10 min,取上清液(即 10%的匀浆上清液),再用生理盐水 10 倍稀释成 1%,制得组织混悬液。严格按照超微量 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATP 酶}$ 、 $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+} \text{-ATP 酶}$ 、总 ATP 酶试剂盒说明书测定酶活力。

1.4 统计学方法

数据使用 SPSS 20.0 统计软件处理,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 表示具有显著性差异,两均数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 皮肤外观、病理组织切片比较

由图 1A 可见,空白组动物均皮肤光滑,颜色正常;而造模组在涂抹咪喹莫特 5 d 后,Balb/c 小鼠出现皮肤粗糙、红色,起皱,触之变硬伴斑片、严重起皮、脱屑;裸鼠粗糙、红色,起皱,触之变硬,部分起皮;NOG 小鼠皮肤红色,起皱,皮肤稍硬,少量起皮。3 种小鼠造模组 PASI 评分均显著高于空白对照组($P<0.05$, $P<0.01$),且按评分从高到低排序为 Balb/c 小鼠>裸鼠>NOG 鼠(见图 1B)。

皮肤 HE 染色结果显示空白组颗粒层完整,棘层较薄、基底整齐,真皮层小血管正常;3 种模型小鼠均出现角化过度或角化不全,棘层明显增厚,颗粒层细胞减少或排列异常,真皮层小血管增生、扩张,真皮乳头向下突出,炎细胞浸润现象,且 Balb/c 小鼠角质层中可见 Munro 小脓疡,按病理严重程度

排序为 Balb/c 小鼠>裸鼠>NOG 鼠(见图 2)。

2.2 皮肤中炎症因子水平比较

与空白组比较,Balb/c 小鼠、裸鼠、NOG 小鼠模型组皮肤中 IL6 蛋白表达水平均显著升高,依次为 81.7%、39.4%和 37.5%($P<0.05$, $P<0.01$)(见图 3A);IL17A 蛋白表达水平也均显著升高,依次为 41.0%、43.8%和 46.4%($P<0.05$, $P<0.01$)(见图 3B);IL22 蛋白表达水平均有升高,依次为 41.0%、24.4%和 18.9%,但仅 Balb/c 小鼠模型组差异具有显著性($P<0.05$)(见图 3C);IL23 蛋白表达水平也均显著升高,增加幅度依次为 53.3%、63.7%、66.4%($P<0.05$)(见图 3D)。

2.3 脾外观、脾指数和病理组织切片比较

我们接着观察了 3 种小鼠造模前后脾外观和病理学变化。如图 3A 所示,我们观察到与正常组比较,Balb/c 小鼠、裸鼠、NOG 小鼠模型组的脾均明显增大,脾指数结果显示其脾指数增加幅度依次为 200.0%、102.2%、118.2%($P<0.01$)(见图 4A、4B)。脾病理学结果显示正常 Balb/c 小鼠脾红、白髓结构清晰,生发中心清晰可见。与 Balb/c 小鼠比较,正常裸鼠脾白髓中中央动脉周围淋巴细胞大量减少,白髓区相对变小,正常 NOG 小鼠脾白髓萎缩,淋巴细胞严重缺失。与正常组比较,Balb/c 小鼠和裸鼠模型组脾中白髓均明显增大,生发中心不可见,红髓区扩张充血,NOG 小鼠模型组白髓区无明显变化,红髓区扩张充血(见图 4C)。

2.4 皮肤和脾中 ATP 酶活力比较

与空白组比较,Balb/c 小鼠、裸鼠模型组皮肤中 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATP 酶}$ 活力显著下降,下降幅度依次为 41.7%和 20.0%($P<0.05$)(见图 5A);Balb/c 小鼠、裸鼠、NOG 小鼠模型组皮肤中 $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+} \text{-ATP 酶}$ 活力均显著下降,下降幅度依次为 40.7%、34.3%和 14.2%($P<0.05$, $P<0.01$)(见图 5B)。

与空白组比较,Balb/c 小鼠、裸鼠、NOG 小鼠模型组脾中 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATP 酶}$ 活力均略有降低,但无显著性(见图 5C);但 3 种小鼠模型组脾中 $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+} \text{-ATP 酶}$ 活力均显著下降,下降幅度依次为 55.6%、6.8%和 17.5%($P<0.05$)(见图 5D)。

3 讨论

银屑病是常见的以鳞屑性红斑为临床特点的慢性复发性炎症性皮肤病,通常认为其为免疫介导的器官特异性自身免疫性疾病。本研究采用咪喹

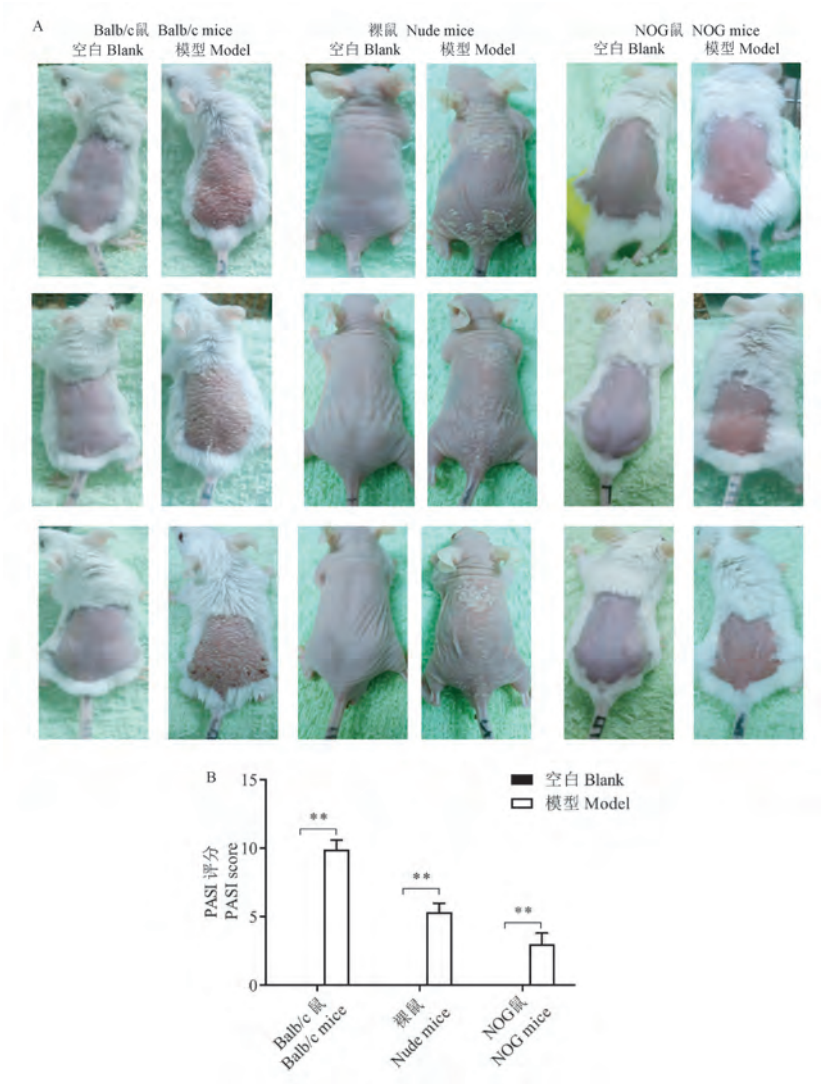


图 1 咪喹莫特诱导银屑病 3 种动物模型皮肤形态学改变及 PASI 评分

Note. Compared with the blank group, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Skin morphological changes and PASI score of three animal models of psoriasis induced by imiquimod

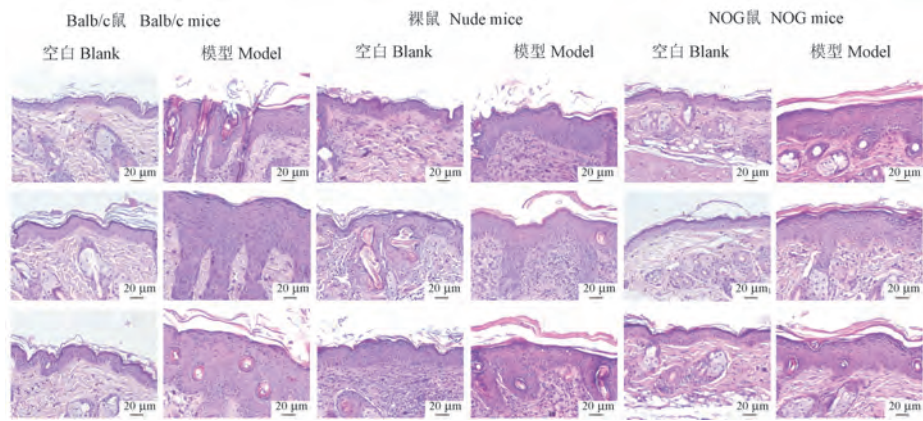
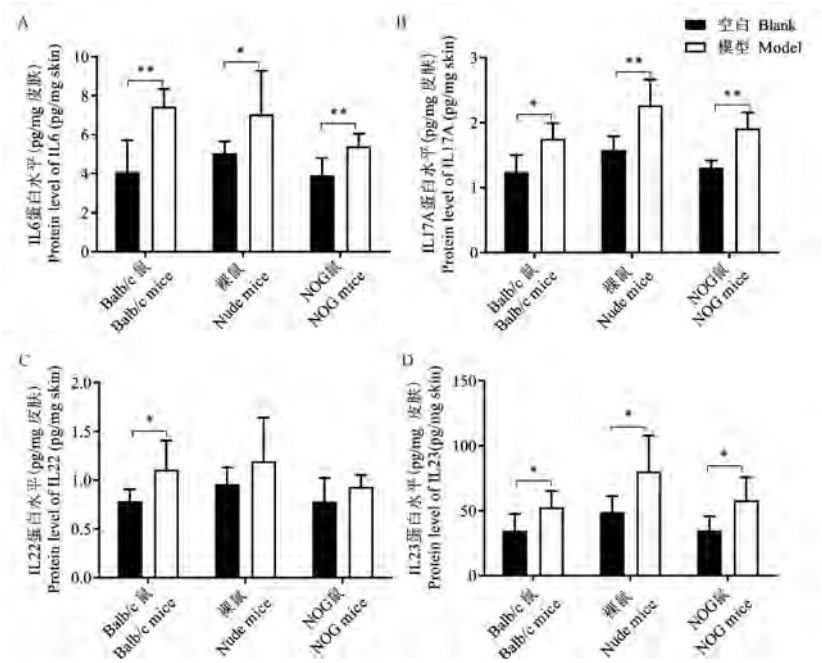


图 2 咪喹莫特诱导银屑病 3 种动物模型组织病理改变(HE 染色)

Figure 2 Histopathological changes of three animal models of psoriasis induced by imiquimod(HE staining)

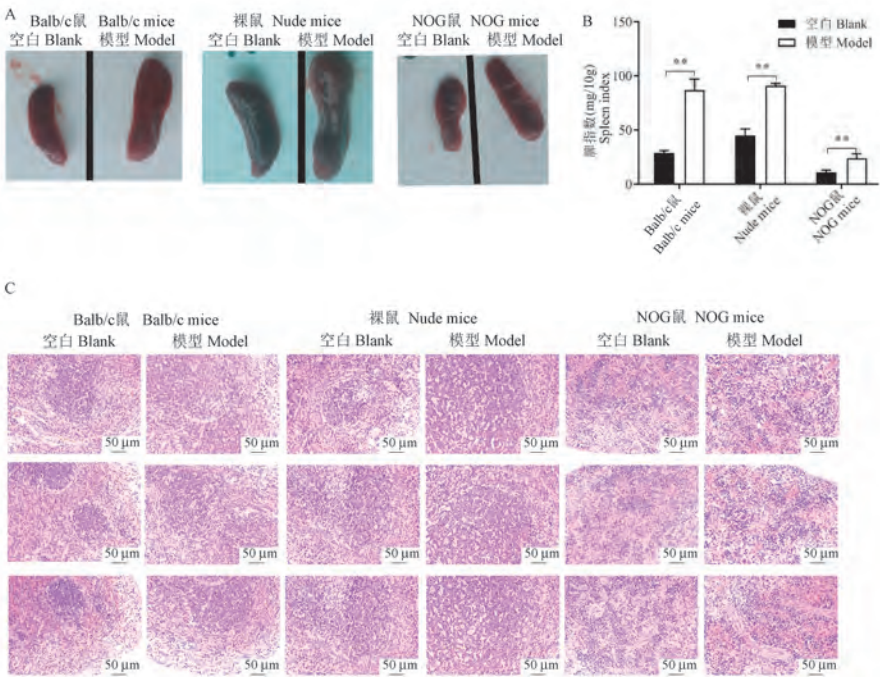


注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 3 咪喹莫特诱导银屑病 3 种动物模型皮肤中 IL6、IL17A、IL22 和 IL23 蛋白水平比较

Note. Compared with the blank control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Comparison of IL6, IL17A, IL22 and IL23 protein levels in the skin of three animal models of psoriasis induced by imiquimod

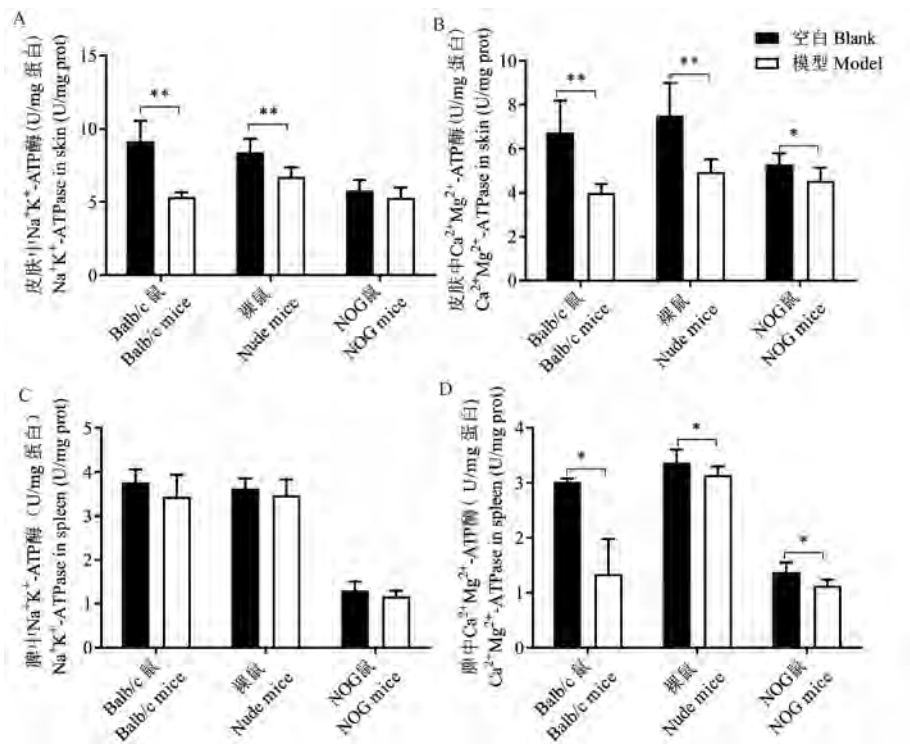


注:与空白对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 4 咪喹莫特诱导银屑病 3 种动物模型脾外观、脾指数和病理组织切片比较

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

Figure 4 Comparison of spleen appearance, spleen index and pathological sections in three animal models of psoriasis induced by imiquimod



注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图5 咪喹莫特诱导银屑病3种动物模型皮肤和脾中ATP酶活力比较

Note. Compared with the blank control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Comparison of ATPase activities in skin and spleen of three animal models of psoriasis induced by imiquimod

莫特对3种不同免疫状态小鼠诱导银屑病模型由结果可知,3种小鼠都出现了银屑病病变现象,皮肤外观显示3种小鼠均出现皮肤红色,起皱,但免疫细胞无缺失的Balb/c小鼠模型组皮肤还显著变硬伴斑片、严重起皮、脱屑;T细胞缺失的裸鼠皮肤变硬,部分起皮,重度免疫缺陷的NOG小鼠皮肤稍变硬,仅少量起皮或不起皮。3种动物比较,Balb/c小鼠银屑病样模型症状更严重,银屑病样皮损更典型,其次为裸鼠,再次为NOG小鼠。PASI评分比较,Balb/c小鼠远高于裸鼠和NOG小鼠,裸鼠稍高于NOG小鼠。病理切片结果显示3种动物模型均出现角化过度或不全,棘层增厚,真皮乳头向下突出,炎细胞浸润等现象,但与皮肤外观形态改变一致,Balb/c小鼠的各项病理指标变化较裸鼠和NOG小鼠更显著。3种模型动物各炎症因子水平均升高,3种动物之间IL17和IL23因子水平差异不明显,但IL6和IL22变化趋势与外观形态和病理切片结果一致,Balb/c小鼠>裸鼠>NOG小鼠,以上结果均表明体内有T细胞的Balb/c小鼠比体内T细胞缺失的裸鼠和NOG小鼠更易诱导为典型的银屑病样症状,提示T细胞在银屑病发病中起最为关键的作用,且银屑病的诱发是多种T细胞相关因子综合作用的

结果。此外仅T细胞缺失的裸鼠比重度免疫缺陷的NOG小鼠银屑病样症状显著,提示其它免疫细胞活化也对银屑病发病有促进作用。而由于重度免疫缺陷NOG小鼠仍然可以诱发出银屑病,提示在银屑病发病过程中还存在一些非免疫因素的刺激因素。脾是体内最大的免疫器官,主要由白髓和红髓组成,其中白髓由密集的淋巴细胞构成,特别是T细胞和B细胞,分别占25%和55%,是机体发生特异性免疫的主要场所^[12]。本实验结果显示3种小鼠的脾均明显变大,病理结果显示造模后Balb/c小鼠和裸鼠的白髓区明显增大,其中淋巴细胞明显增多,进一步证实免疫细胞特别是T、B细胞活化是银屑病发病的重要因素。但是NOG模型小鼠的白髓与正常组相比无明显差异,但与其余2种模型小鼠一样出现了红髓扩张充血现象,红髓储血、滤血的主要场所,当滤血功能异常时,机体内异物与毒素的排出受到阻碍,该结果也进一步提示存在一些非免疫细胞活化因素与银屑病发病有关。

ATP是体内组织细胞一切生命活动所需能量的直接来源,被誉为细胞内能量传递的“分子货币”,用来储存和传递化学能。ATP酶是一类介导主动转运的膜蛋白,可将细胞内的ATP水解为

ADP,利用高能磷酸键贮存的能量完成离子的跨膜转运,其中重要的是 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶}$ 和 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP 酶}$ ^[13]。当 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶}$ 和 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP 酶}$ 活性降低时,细胞内 Na^+ 和 Ca^{2+} 外流减少,胞浆内 Na^+ 和 Ca^{2+} 大量积累它打破了生物膜上跨膜转运的平衡,进而影响物质的交换和毒素的排出^[14]。我们的研究显示 3 种银屑病模型小鼠皮肤和脾中 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP 酶}$ 和 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶}$ 活性均降低,提示机体内物质交换以及毒素排出受到了阻碍,该结果与脾病理结果中红髓功能可能存在异常的结果相符,而其中深入的内在机制有待进一步研究。

综上所述,本实验通过采用咪喹莫特对 3 种不同免疫状态小鼠诱导银屑病模型,整体直观的验证了 T 细胞异常活化在银屑病发病中关键性的作用,但其他多种免疫细胞活化也在银屑病发病中有重要作用,此外在后续研究中我们还需关注可能诱导银屑病发病的非免疫因素,有助于银屑病发病机制的全面深入阐明。

参考文献:

[1] Greb JE, Goldminz AM, Elder JT, et al. Psoriasis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16082.

[2] Tseng JC, Chang YC, Huang CM, et al. Therapeutic development based on the immunopathogenic mechanisms of psoriasis [J]. Pharmaceutics, 2021, 13(7): 1064.

[3] 吴剑平, 谢倩, 陈林, 等. 咪喹莫特对 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠银屑病样皮损诱导作用的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 1-6.

[4] 魏政, 苏慧琳, 王秋红, 等. 银屑病免疫异常的分子机制

[J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(1): 145-150.

[5] 吴玥, 王宏林. 银屑病的免疫学机制与治疗靶点 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(11): 1281-1288.

[6] Abdou AG, Maraee AH, Shoeib MAEM, et al. Cathepsin D expression in chronic plaque psoriasis: an immunohistochemical study [J]. Acta Dermatovenereol Croat, 2011, 19(3): 143-149.

[7] Alshenawy HA, Hasby EA. Immunophenotyping of dendritic cells in lesional, perilesional and distant skin of chronic plaque psoriasis [J]. Cellular Immunology, 2011, 269(2): 115-119.

[8] Arzola-Martínez L, Benavente R, Vega G, et al. Blocking ATP releasing channels prevents high extracellular ATP levels and airway hyperreactivity in an asthmatic mouse model [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2021, 321(2): L466-L476.

[9] 许云姣, 吴文笛, 蔡悦青, 等. 基于补土伏火法的四逆汤及其拆方对肾阳虚证模型大鼠肝脏组织 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶}$ 及 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP 酶}$ 表达影响的研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(11): 2620-2622.

[10] 朱子煜. 血浆钠钾-ATP 酶活性与脑膜瘤预后相关性分析 [J]. 医学理论与实践, 2021, 34(3): 364-366.

[11] 李冠勇, 刘华昌, 季建梅, 等. 银屑病患者红细胞变形能力及膜 ATP 酶活性的检测 [J]. 中国病理生理杂志, 1995, 2: 202, 210.

[12] Leuenberger M, Sartori C. The spleen: between mysteries and discoveries [J]. Rev Med Suisse, 2010, 6(269): 2080-2085.

[13] 宾东华, 何清湖, 韩忠, 等. 知柏地黄汤对解脲脲原体感染模型大鼠精子线粒体 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP 酶}$ 及 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{-ATP 酶}$ 活性的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1528-1531.

[14] 陈振兴, 赵瑞芝. 醋柴胡不同部位对肝郁模型大鼠肝脏 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP 酶}$ 、 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{ATP 酶}$ 活性及 P-糖蛋白 mRNA 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3721-3724.

[收稿日期] 2021-10-09

邓伟,金亮子,奎秀莹,等. 树鼩睾丸间质细胞的分离培养及寨卡病毒感染特性的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (6): 48-54.

Deng W, Jin LZ, Kui XY, et al. Isolation and culture of Leydig cells from tree shrews and studies on the characteristics of Zika virus infection [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 48-54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.007

树鼩睾丸间质细胞的分离培养及寨卡病毒感染特性的研究

邓伟^{1,2},金亮子^{1,3},奎秀莹¹,王文广¹,李娜¹,全品芬¹,代解杰^{1*}

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所,昆明 650031;2. 云南大学生命科学学院,昆明 650091;
3. 昆明医科大学,昆明 650500)

【摘要】 目的 建立树鼩原代睾丸间质细胞分离培养方法,探究寨卡病毒(Zika virus,Zikv)对该细胞的感染特性,为 Zikv 感染导致的睾丸损伤及不育提供研究基础。**方法** 3 月龄的雄性树鼩 0.4 mL 3%戊巴比妥钠麻醉处死后采集睾丸,采用 IV 胶原酶和胰蛋白酶联合消化法获得单细胞悬液,通过 percoll 密度梯度离心结合差异贴壁法对细胞进行纯化,3 β -羟类固醇脱氢酶(3 β -HSD)对细胞荧光染色鉴定,ELISA 检测细胞分泌睾酮的能力;用 Zikv 感染树鼩睾丸间质细胞,并用对寨卡病毒易感的非洲绿猴肾细胞(Vero)作为对比参照,测定感染不同时间点的细胞及其培养上清液中病毒载量,镜下观察细胞病变,ELISA 检测睾酮含量。**结果** 分离培养的睾丸间质细胞经 3 β -HSD 鉴定阳性率高达 98%以上,且增殖迅速,能够连续分泌睾酮,第 4 代睾丸间质细胞在 0~24 h 和 24~48 h 睾酮分泌量分别为 1.253 ng/mL 和 1.163 ng/mL;用 Zikv 感染树鼩睾丸间质细胞,6 h 内病毒拷贝数可达 2.15 $\times$ 10⁵ copies/mL,且感染 48 h 后基本丧失睾酮分泌能力,感染第 3 天可见明显的细胞病变。**结论** 成功建立树鼩睾丸间质细胞的分离培养方法,Zikv 可感染树鼩睾丸间质细胞并能导致该细胞睾酮分泌功能缺失,为 Zikv 入侵生殖系统机制研究提供基础。

【关键词】 树鼩;睾丸间质细胞;3 β -HSD;睾酮水平;Zikv

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0048-07

Isolation and culture of Leydig cells from tree shrews and studies on the characteristics of Zika virus infection

DENG Wei^{1,2}, JIN Liangzi^{1,3}, KUI Xiuying¹, WANG Wenguang¹, LI Na¹, TONG Pinfen¹, DAI Jiejie^{1*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650031, China. 2. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091.
3. Kunming Medical University, Kunming 650500)

【Abstract】 Objective To establish a method for the isolation and culture of primary Leydig cells in tree shrew, to explore the infection characteristics of Zika virus (Zikv) on these cells, and to provide a basis for research on the damage and sterility of testis caused by Zikv infection. **Methods** A 3-month-old male tree shrew was sacrificed with 0.4 mL of 3% sodium pentobarbital anesthetized and the testis was collected. A single-cell suspension was obtained by combined digestion

[基金项目] 云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019);昆明市科技创新团队(2019-1-R-24483)。

[作者简介] 邓伟(1996—),男,硕士研究生,研究方向:病原生物学。E-mail: 1639817334@qq.com

[通信作者] 代解杰(1961—),男,研究员,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型建立与应用研究。E-mail: dj@imbcams.com.cn

with collagenase IV and trypsin. After purification, cells were identified by fluorescent staining with 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and the ability of cells to secrete testosterone was detected by ELISA. Tree shrew Leydig cells were infected with Zikv, as were kidney cells from African green monkeys susceptible to Zika virus for comparison. The viral loads in the cells and their culture supernatants at different time points of infection were determined, cytopathic changes were observed under a microscope, and testosterone content was determined by ELISA. **Results** The positive rate of isolated and cultured Leydig cells identified by 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase was as high as 98%. They proliferated rapidly and continuously secreted testosterone. The forth-generation Leydig cells secreted 1.253 and 1.163 ng/mL testosterone at 0~24 h and 24~48 h, respectively. Upon infection of Leydig cells of tree shrew with Zikv, the virus copy number reached 2.15 $\times 10^5$ copies/mL within 6 h, the cells' ability to secrete testosterone was basically lost after 48 h of infection, and cytopathic effects were seen on the third day of infection. **Conclusions** A method for isolating and culturing Leydig cells from tree shrew was successfully established. The findings showed that Zikv could infect Leydig cells of tree shrew and lead to the loss of their testosterone secretion function, providing a basis for research on the mechanism by which Zikv affects the reproductive system.

【Keywords】 tree shrew; Leydig cell; 3 β -HSD; testosterone level; Zikv

寨卡病毒(Zika virus, Zikv)为单股正链 RNA 病毒,属于黄病毒的一种,研究表明 Zikv 感染可导致睾丸发生炎症,引起睾丸内部结构受损及细胞大量死亡^[1],对男性生殖健康带来潜在威胁。研究发现 Zikv 感染可导致小鼠睾丸间质充血、睾酮水平下降、睾丸间质细胞(Leydig cells, LCs)产生大量炎症因子及趋化因子,说明 LCs 与 Zikv 感染睾丸密切相关,但具体感染机制尚不明确。

LCs 主要分布于生精小管之间,是睾丸主要细胞类型之一^[2],在毒理学、药理学及生殖遗传学等研究方面具有十分重要的应用意义,是睾丸中唯一能够分泌睾酮的细胞^[3],可促进精子的发生和男性生殖器官发育,以及维持第二性征和性功能,大约 95% 的雄性激素由其分泌^[4]。研究发现 LCs 数量缺少会导致雄性激素缺乏^[5],体外分离培养纯度高、活性强的 LCs 可更好的研究其相关机制和特性。

LCs 占睾丸细胞总数的 2%~4%^[6],数量较少且纯化难度较大,目前对于 LCs 的分离培养主要有机械分离法^[7]、组织块贴壁法^[8]、酶消化法^[9]、percoll 密度梯度离心法^[10]等几种方法,机械分离法对细胞损伤较大,组织块贴壁法杂细胞太多且周期较长,percoll 密度梯度离心法得到的细胞仍存在其他杂细胞,并且采用单一方法难以实现 LCs 分离培养。

树鼩(*Tupaia belangeri*, tree shrew)在生理、生化、新陈代谢、解剖结构以及基因组^[11]等生物学特性比啮齿类更接近于非人灵长类,已广泛应用于人类疾病模型的研究,包括病毒感染模型^[12]、肿瘤模型^[13]、呼吸系统疾病模型^[14]和神经系统疾病模型^[15]等。本文旨在参考其他动物 LCs 培养与纯化

方法的基础上,采用酶消化、percoll 密度梯度离心及差异贴壁等分离纯化方式结合,建立树鼩 LCs 原代培养和纯化方法,为利用树鼩开展相关研究提供新的实验材料;通过 Zikv 对 LCs 的感染特性研究,建立 Zikv 感染的睾丸细胞模型,为研究 Zikv 感染雄性生殖系统的相关研究提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

2 只 3 月龄普通级雄性滇西亚种树鼩,体重 95~110 g,由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心饲养繁殖[SCXK(滇)K2018-0002];所有实验均在中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心进行[SYXK(滇)K2018-0002],本实验经中国医学科学院医学生物学研究所审批(DWSP202008014),并遵循实验动物使用的 3R 和福利伦理原则。

1.1.2 病毒株

Zikv GZ01 株,由军事医学科学院秦成峰教授馈赠。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(FBS,以色列 Biological Industries);IV 型胶原酶(北京索莱宝);PBS(美国 Hyclone);0.25% trypsin-EDTA 胰蛋白酶、青-链霉素(美国 Gibco);无血清冻存液(美国 Cyagen);Testosterone ELISA kit(上海碧云天);3 β -HSD 小鼠单克隆 IgG 抗体(Santacruz);荧光标记的羊抗鼠 IgG(英国 Abcam);病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp® Viral RNA Mini Kit(德国 Qiagen);One

Step Prime Script™ RT-PCR Kit(日本 TaKaRa)。生物安全柜和 CO₂ 恒温培养箱(美国 Forma);台式高速离心机(美国 Beckman);细胞计数仪(美国 Bio-Rad);倒置荧光相差显微镜(日本 Nikon)。

1.3 实验方法

1.3.1 树鼩 LCs 分离、纯化

取 3 月龄的雄性树鼩,腹腔注射 0.4 mL 3%戊巴比妥钠麻醉处死后,无菌取出睾丸,75%乙醇中浸泡 20 s,取出后用 PBS 冲洗两遍去乙醇。移入 Heraguard ECO 超净工作台,用眼科剪和镊子去除睾丸的白膜、附睾及血管,小心取出睾丸实质组织,置于装有 D-Hanks 液的无菌培养皿中,洗涤 2 遍。用眼科剪将其剪碎后转入离心管内。加入 1 mg/mL IV 胶原酶,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 30 min,1000 r/min 离心 5 min,加入 0.25%胰酶消化 10 min 后,用含血清的培养基终止消化,吸管吹打混匀,将细胞悬液放入 40 目细胞筛网中过滤,使之分散成单个细胞。收集到 15 mL 离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 DMEM/F12 培养液重悬细胞,重复离心 1 次。

纯化方法采用 percoll 密度梯度离心法^[16]:将分离得到的细胞悬液加于不同密度梯度的 Percoll 分离液上,从分离管底部向上密度依次为 60%、37%、26%、21%,4℃、3000 r/min 离心 30 min。收集 37%和 60%之间的细胞,后用 DMEM/F12 培养液稀释,再将悬液以 1500 r/min 离心 10 min,沉淀加入含胎牛血清的培养液,摇匀得细胞悬液。将分离纯化得到的细胞悬液计数,后稀释成每毫升 1×10^6 个浓度的细胞悬液,接种于培养瓶或培养板中 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,培养基配方为 DMEM/F12 培养基加 10% FBS、1%青-链霉素。此时细胞中还含有少量支持细胞和其他杂细胞,根据间质细胞和支持细胞贴壁时间不同,在传代后 6 h 更换培养液以去除杂细胞达到纯化目的,第 2 代和第 3 代的细胞仍按此步骤进一步纯化。

1.3.2 树鼩 LCs 免疫荧光鉴定

间质细胞鉴定采用 3 β -羟类固醇脱氢酶(3 β -HSD)鉴定法^[17]。将纯化后的第 3 代细胞接种在 24 孔板中,待细胞长满 70%~80%时,吸去培养基,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入 4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min,加入 0.5% Triton X-100 室温孵育 20 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min;5%山羊血清封闭 30 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min,加入稀释好的鼠源性 3 β -HSD 一抗(稀释比例 1:50),同时设置对照孔(加 PBS),4℃孵育过夜,将孔板用

PBS 清洗 3 次,每次 3 min;避光条件下加入羊抗鼠荧光二抗(1:400)室温孵育 1 h,PBS 清洗 3 次,每次 3 min;加入 DAPI 染色液孵育 2 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min,置于荧光显微镜下拍照观察。

1.3.3 树鼩 LCs 增殖曲线测定

将纯化后的第 3 代 LCs 消化成细胞悬液,按每孔 1×10^5 个接种于 48 孔板,设置 1~7 d 共 7 个组,每组设置 2 个副孔,从接种时间起每隔 24 h 吸去培养液并消化计数,取平均值,以培养时间为横坐标、细胞密度为纵坐标绘制增殖曲线。

1.3.4 树鼩 LCs 分泌睾酮水平测定

采用 Testosterone ELISA kit 检测睾酮水平,将培养第 4 代至第 7 代的 LCs 按 1×10^5 个每孔接种于 12 孔板的培养皿上,之后每 24 h 更换培养液,分别在培养 24、48 h 后收取培养液,每个时间点收取 3 个样本测定睾酮含量,取平均值。

1.3.5 寨卡病毒感染实验

将对数生长期的第 3 代树鼩 LCs 用 0.25%胰蛋白酶消化重悬,以密度为每毫升 1×10^5 个每孔接种于 24 孔板内,24 h 后将寨卡病毒(滴度 1×10^6 copies/mL)以 MOI=1 感染细胞,在感染后 2、6、12、24、36、48、72 和 96 h 时间点收集细胞和上清液,QIAamp® Viral RNA Mini Kit 试剂盒提取核酸,RT-qPCR 检测病毒载量,显微镜下观察细胞形态变化,并以对寨卡病毒易感的 Vero 细胞按相同步骤作对比实验。

感染细胞后睾酮水平测定:以上述方法感染细胞 2 h 后,PBS 洗掉未吸附的病毒,添加 1 mL 细胞培养液,分别在 12、24、36、48 h 收集感染组和对照组培养液(不同时间段感染组和对照组样品收集均为相应的同一个孔,每个时间点收取 3 个样本),同时补加 1 mL 培养液,竞争法酶联免疫吸附测定检测睾酮水平,取平均值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据处理。数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用两两独立样本的 *t* 检验分析。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

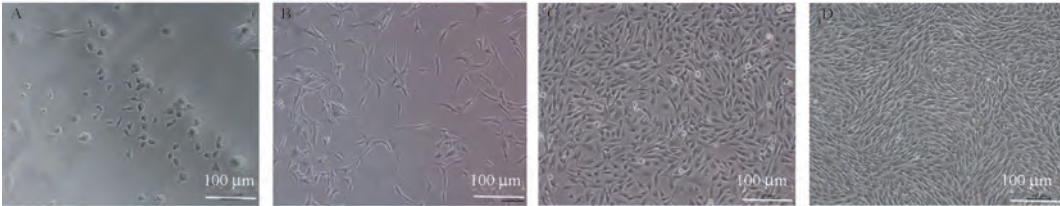
2 结果

2.1 树鼩 LCs 形态学观察和鉴定

经 percoll 密度梯度离心分离后的细胞 6 h 后开始贴壁,呈不规则的形态,培养至第 3 天后细胞开始长出触角(图 1A),培养至 7 d 进行第 1 次传代,待传代细胞培养 6 h 后换液,去除未贴壁的杂细胞;传至第 3 代后细胞活性开始增高,能够快速增殖,细胞

呈典型的拉网状(图 1B),之后根据密度 1 : 3~5 传代即可。传至第 6 代后,细胞形态略微有点变化,细胞长度稍微变短,宽度增加,但仍有触角伸出(图 1C)。随着细胞数量的增多,细胞间的界限和触角不在明显,从无序状变为纹理状(图 1D),细胞可稳定传至 15 代以上。

细胞鉴定:3 β -羟类固醇脱氢酶是睾酮合成的关键酶之一,是公认的 LCs 鉴定指标。3 β -HSD 免疫荧光鉴定显示,细胞均为阳性表达,证明所分离培养的细胞为 LCs,且细胞纯度高达 98% 以上,见图 2。

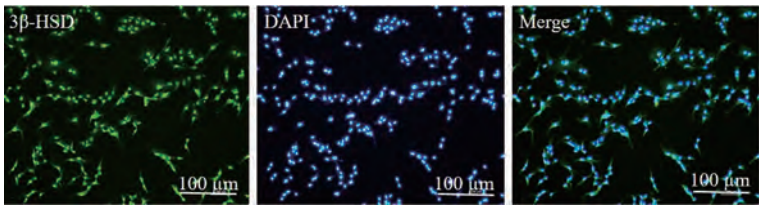


注:A:LCs 培养第 3 天;B:培养第 3 代;C:培养第 6 代;D:培养第 15 代。

图 1 树鼯睾丸间质细胞形态学观察

Note. A, 3rd day of LCs culture. B, 3rd generation of culture. C, 6th generation of culture, D, 15th generation of culture.

Figure 1 Morphological observation of Leydig cells in tree shrew

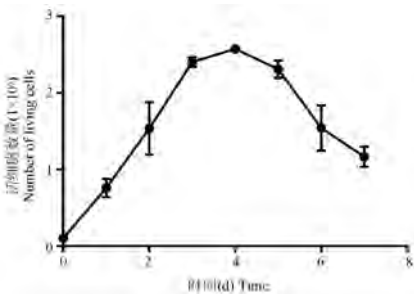


注:3 β -HSD:3 β -羟类固醇脱氢酶;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吲哚;Merge:3 β -HSD 和 DAPI 的结合。

图 2 树鼯睾丸间质细胞 3 β -HSD 免疫荧光鉴定

Note. 3 β -HSD, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole. Merge, Combination of 3 β -HSD and DAPI.

Figure 2 3 β -HSD Immunofluorescence Identification of Leydig cells in tree shrew



注:LCs 接种后第 0、1、2、3、4、5、6、7 天的细胞数量。

图 3 树鼯睾丸间质细胞增殖曲线

Note. Number of cells on days 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 after LCs inoculation.

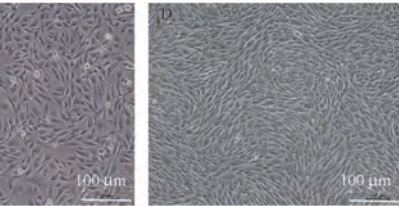
Figure 3 Tree shrew testicular Leydig cells proliferation curve

2.2 树鼯 LCs 增殖曲线的测定

睾丸间质细胞生长曲线结果显示,在培养前 3 d 增殖迅速,活力较强,为对数增长期,3~5 d 为增殖平台期。提示可选择第 3 天的细胞进行后续实验,见图 3。

2.3 树鼯 LCs 分泌睾酮活性检测

酶联免疫吸附测定法检测结果显示,第 4 代至第 7 代的 LCs 在培养 48 h 内能够分泌睾酮,分泌量在 1.1~1.3 ng/mL 左右,说明分离的 LCs 具有持续分泌睾酮的能力,见图 4。



注:P4、P5、P6、P7 分别表示树鼯 LCs 第 4 代、第 5 代、第 6 代和第 7 代。第 4 代至第 7 代 LCs 在 0~24 h 和 24~48 h 内睾酮分泌量的比较。

图 4 不同代次树鼯睾丸间质细胞睾酮分泌能力测定

Note. P4, P5, P6, and P7 represent the 4th, 5th, 6th and 7th generations of tree shrew LCs, respectively. Comparison of testosterone secretion in 0~24 h and 24~48 h from the 4th generation to the 7th generation LCs.

Figure 4 Determination of testosterone secretion capacity of tree shrew LCs at different passages

2.4 树鼩 LCs 感染寨卡病毒后形态学观察

感染结果表明,36 h 时 LCs 已经大量病变,96 h 几乎观察不到活细胞,而 96 h 时对照组细胞形态正常;Vero 细胞在感染 96 h 后才能观察到轻微的细胞病变,初步说明 LCs 比 Vero 更易感染 Zikv,见图 5。

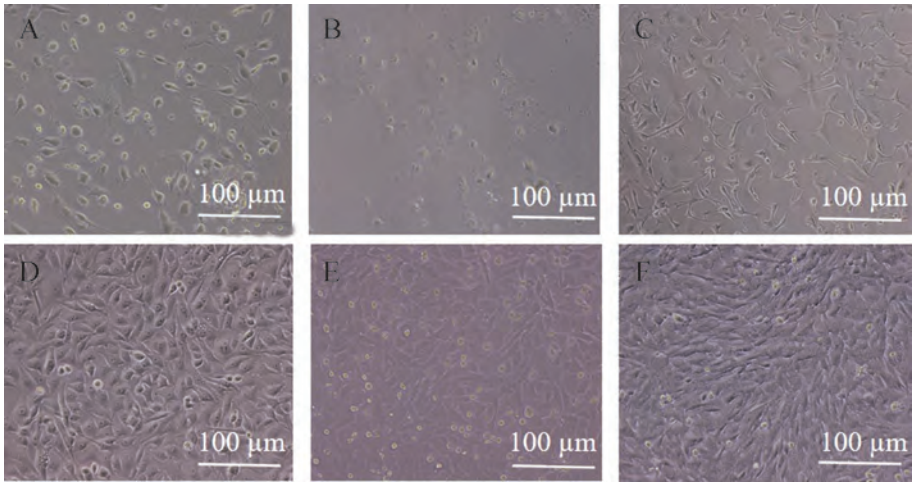
2.5 细胞和上清液病毒载量测定

RT-qPCR 结果表明,感染 2 h 后 LCs 细胞中病毒载量可达 1.93×10^5 copies/mL,且 6 h 内持续上升到峰值 2.15×10^5 copies/mL,36 h 后由于细胞死亡裂解病毒载量逐渐下降,细胞上清液中病毒载量在感染 12 h 后迅速上升,在 48 h 后达到峰值 1.3×10^5 copies/mL;Vero 细胞在感染 36 h 后细胞中病毒载量才开始增加,到 96 h 病毒载量仍在上升,但病

毒拷贝数小于同期的 LCs,表明 Zikv 能够在 LCs 中迅速增殖并释放出子代病毒,见图 6。

2.6 Zikv 感染树鼩睾丸间质细胞睾酮分泌能力测定

ELISA 睾酮水平测定结果显示,正常培养的 LCs 在前 36 h 内,其睾酮分泌量为 1.168~1.352 ng/mL,而感染寨卡病毒 36 h 内细胞睾酮分泌量为 1.051~1.156 ng/mL,略低于正常培养的细胞,并且在感染 36~48 h 内睾酮分泌量下降到 0.122 ng/mL,而正常培养的细胞仍然具有正常分泌睾酮的能力,分泌量为 1.133 ng/mL。并且细胞数量测定结果显示,感染组和对照组的活细胞数量在测定时间内无显著差异,表明 Zikv 感染树鼩 LCs 能够使其睾酮分泌能力下降甚至缺失,见图 7、8。

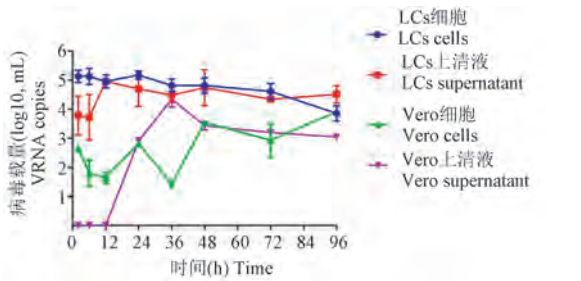


注:A;LCs 感染寨卡病毒 36 h;B;LCs 感染 96 h;C;LCs 96 h 对照组;D;Vero 感染寨卡病毒 36 h;E;Vero 感染 96 h;F;Vero 96 h 对照组。

图 5 寨卡感染树鼩睾丸间质细胞和 Vero 细胞后形态学观察

Note. A, LCs were infected with Zikv for 36 h. B, LCs infected for 96 h. C, LCs 96 h control group. D, Vero infected with Zikv for 36 h. E, Vero infection 96 h. F, Vero 96 h control group.

Figure 5 Morphological observation of testicular Leydig cells and Vero cells in tree shrews infected by Zikv

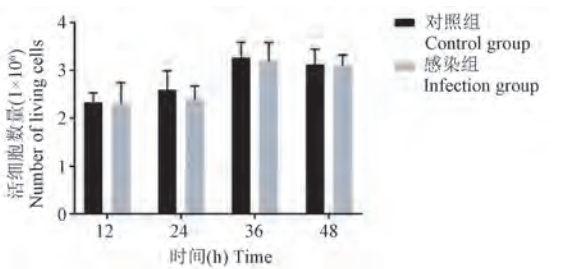


注:LCs 和 Vero 在感染 Zikv 后 2、6、12、24、36、48、72、96 h 细胞和上清中病毒载量。

图 6 寨卡病毒感染睾丸间质细胞和 Vero 细胞后病毒增殖曲线

Note. Viral loads in cells and supernatants of LCs and Vero at 2, 6, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h after infection with Zikv.

Figure 6 Virus proliferation curve after Zikv infection of testicular Leydig cells and Vero cells

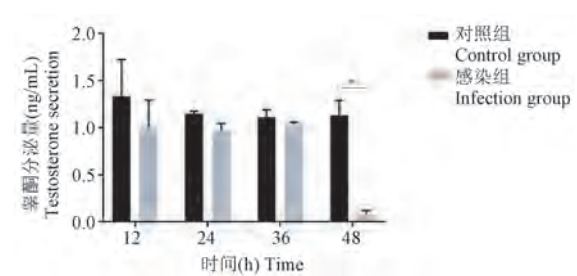


注:LCs 在感染 Zikv 后 12、24、36、48 h 活细胞数量与正常对照组的比较。

图 7 感染组与对照组活细胞数量的测定

Note. Comparison of the number of viable cells of LCs with the normal control group at 12, 24, 36 and 48 h after infection with Zikv.

Figure 7 Determination of the number of viable cells in the infected group and the control group



注:LCs 在感染 Zikv 后 0~12、12~24、24~36、36~48 h 睾酮分泌含量。与正常对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 8 细胞感染后睾酮水平测定

Note. Comparison of testosterone secretion content of LCs at 0~12, 12~24, 24~36, 36~48 h after infection with Zikv. Compared with the normal control group, * $P<0.05$.

Figure 8 Determination of testosterone levels after cell infection

3 讨论

Zikv 不仅能够感染神经系统,研究表明睾丸也是 Zikv 感染的主要靶器官,Zikv 病毒能够在睾丸中大量增殖和复制,引起睾丸结构破坏及大量细胞死亡,从而导致雄性性功能受损。本实验利用分离培养的树鼯 LCs 作为 Zikv 感染的细胞模型,研究其感染特性,为探讨 Zikv 入侵雄性生殖系统的作用机制提供基础。

树鼯睾丸中 LCs 的数量稀少,其分离纯化方法尤为关键。实验使用 3~4 月龄的树鼯作为实验材料,这段时期正处于树鼯的青春期,细胞活力旺盛,具备良好的睾酮分泌能力;其次,此时树鼯的睾丸白膜,血管易分离,能有效去除原代培养中成纤维细胞和血管内皮细胞污染,更容易成功分离细胞。

传统的 percoll 密度梯度法虽然能够去除大部分杂细胞,但仍然有支持细胞存在,本研究多次实验发现在支持细胞和 LCs 共同培养时,支持细胞为优势细胞,单一的 percoll 密度梯度法虽然能够成功得到大部分 LCs,但培养后期纯度逐渐降低,差异贴壁法能够有效去除杂细胞而达到进一步纯化目的。本实验通过 percoll 密度梯度离心得到较为纯化的 LCs,根据 LCs 和支持细胞的贴壁速率不同,睾丸间质细胞先贴壁^[18],待原代细胞培养 6~7 d 时可进行第 1 次差速贴壁纯化,在传代 6 h 后换一次液去除还没贴壁的细胞,按此操作传至第 3 代后基本无杂细胞,并且活力旺盛,增殖迅速,3 β -HSD 免疫荧光鉴定细胞结果表明纯度高达 98%。此外,酶联免疫吸附测定结果表明所得到的 LCs 具备连续分泌睾酮能力,与 Risberidge 等^[19]报道的结果一致。

本实验结合 Percoll 密度梯度离心和差速贴壁法对 LCs 进行纯化,此方法与传统的 Percoll 密度梯度纯化方法相比更能达到纯化目的,有效去除了杂细胞,使 LCs 在培养过程有效避免了优势贴壁细胞(支持细胞)的排挤,实现了 LCs 的长期培养;培养基采用 DMEM/F12 培养基加 10% FBS、1%青-链霉素,该培养基配制方法简单,与传统的 LCs 培养基相比无需添加生长因子及其他成分,节约了培养时间和成本。

临床资料表明 Zikv 可感染男性生殖系统中的多个器官并长期潜伏,其中睾丸是主要的靶器官,有研究人员曾以人类睾丸组织进行 Zikv 感染实验,但因多方面原因导致该项研究失败。目前用于 Zikv 研究的动物模型主要有小鼠、鸡胚、恒河猴、树鼯等,鸡胚与人类结构相差甚远,恒河猴是较为理想的实验动物,但在恒河猴感染 Zikv 的研究主要集中在神经系统方面,当前关于 Zikv 感染睾丸的研究主要以小鼠为主,但小鼠大多需要干扰素拮抗处理后才能成功感染 Zikv。研究表明树鼯对 Zikv 易感,且不需要拮抗处理,在 Zikv 感染树鼯的研究中发现病毒能够在睾丸中大量复制,免疫组化实验结果表明 Zikv 主要集中在 LCs^[20],但未进一步在细胞水平上进行验证。

多项研究表明 LCs 是 Zikv 感染的主要靶细胞^[21],Zikv 感染免疫缺陷型小鼠可导致雄性小鼠睾丸萎缩、LCs 数量减少、睾酮水平及与睾酮产生相关的基因表达水平下降,阻碍精子成熟、睾丸萎缩;Zikv 也能够体外培养的小鼠 LCs 中高效复制。本实验首次使用 Zikv 感染树鼯 LCs,发现 6 h 内病毒迅速增殖和复制,36 h 后细胞开始大量死亡,证明树鼯 LCs 对 Zikv 易感;ELISA 结果表明感染后能导致 LCs 睾酮分泌能力下降甚至缺失。这些实验结果与已报道的 Zikv 感染睾丸的研究结论相辅证,提示 Zikv 感染 LCs 可能是引起睾丸损伤及不育的主要原因之一,表明树鼯 LCs 可作为 Zikv 感染的体外细胞模型。

综上所述,本实验采用两步酶消化、percoll 密度梯度离心结合差速贴壁法能够获得产量高、活性强、可连续传代和稳定增殖的树鼯 LCs,为树鼯 LCs 体外分离培养进行了实验性探索,成功建立树鼯 LCs 体外分离培养方法;并利用寨卡病毒感染树鼯 LCs,定量检测病毒增殖情况和睾酮分泌水平,证明 Zikv 可成功感染树鼯 LCs,可建立寨卡病毒感染树鼯间质细胞模型,为寨卡病毒感染导致雄性睾丸损伤及不育的致病机制提供研究基础。

参考文献:

- [1] Ma W, Li S, Ma S, et al. Zika virus causes testis damage and leads to male infertility in mice [J]. *Cell*, 2016, 167(6): 1511–1524.
- [2] Lacombe A, Lelievre V, Roselli CE, et al. Delayed testicular aging in pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) null mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(10): 3793–3798.
- [3] Dobashi M, Fujisawa M, Yamazaki T, et al. Inhibition of steroidogenesis in Leydig cells by exogenous nitric oxide occurs independently of steroidogenic acute regulatory protein (star) mRNA [J]. *Arch Androl*, 2001, 47(3): 203–209.
- [4] Sharpe RM, Maddocks S, Millar M, et al. Testosterone and spermatogenesis. Identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules [J]. *J Androl*, 1992, 13(2): 172–184.
- [5] Neaves WB, Johnson L, Porter JC, et al. Leydig cell cytoplasmic mass, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984, 59(4): 756–763.
- [6] 刘建中, 郭海彬, 邓春华, 等. 大鼠睾丸 Leydig 细胞的培养和鉴定 [J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(1): 14–17.
- [7] 黄洋, 靳辉, 曹霞, 等. 一种简便的机械法分离绵羊睾丸间质细胞的研究 [J]. *黑龙江动物繁殖*, 2014, 2(5): 13–14, 36.
- [8] 卿利娟, 魏泓, 李婧, 等. 仔猪睾丸间质细胞培养方法的比较 [J]. *中国兽医杂志*, 2013, 49(11): 29–31, 35.
- [9] 李阳, 王宇, 程康, 等. 低浓度 II、IV 型胶原酶联合消化法分离幼年 SD 大鼠睾丸间质细胞 [J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2017, 11(14): 2033–2037.
- [10] 谢天承, 许云飞. 小鼠睾丸间质细胞分离培养方法的研究进展 [J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(4): 569–572.
- [11] Fan Y, Ye MS, Zhang JY, et al. Chromosomal level assembly and population sequencing of the Chinese tree shrew genome [J]. *Zool Res*, 2019, 40(6): 506–521.
- [12] Yan RQ, Su JJ, Huang DR, et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996, 122(5): 283–288.
- [13] Xia HJ, Wang CY, Zhang HL, et al. Characterization of spontaneous breast tumor in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. *Dongwuxue Yanjiu*, 2012, 33(1): 55–59.
- [14] 周顺长, 吴健鸿, 张景辉, 等. 香烟烟雾暴露对中国树鼩 CXCR4、MHC-1、TNF- α 、MCP mRNA 表达的影响 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2011, 40(4): 463–467.
- [15] 张志成, 袁圆, 王璇, 等. 帕金森疾病动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(5): 21–27.
- [16] Li D, Sekhon P, Barr KJ, et al. Connexins and steroidogenesis in mouse Leydig cells [J]. *Can J Physiol Pharm*, 2013, 91(2): 157–164.
- [17] El-Alfy M, Luu-The V, Huang XF, et al. Localization of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(3): 1481–1491.
- [18] 宋晓峰, 魏光辉, 邓永继, 等. 小鼠胚胎睾丸 Leydig 细胞培养、纯化及其功能研究 [J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(1): 6–9.
- [19] Risbridger GP, Hedger MP. Adult rat Leydig cell cultures: minimum requirements for maintenance of luteinizing hormone responsiveness and testosterone production [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1992, 83(2–3): 125–132.
- [20] 张莉. 寨卡病毒在云南的发生风险及树鼩动物模型的建立 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2019.
- [21] 杨威, 盛子洋, 吴艳花, 等. 寨卡病毒与男性(雄性)生殖健康 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(6): 545–551.

[收稿日期]2022-02-10

闫祎炜,江莲,李梅,等. MMP-9、TIMP-1 水平变化参与 FIRS 早产儿心肌损伤的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (6): 55-61.

Yan YW, Jiang L, Li M, et al. Study on the mechanism by which MMP-9 and TIMP-1 levels are involved in myocardial injury in premature infants with FIRS [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 55-61.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.008

MMP-9、TIMP-1 水平变化参与 FIRS 早产儿心肌损伤的机制研究

闫祎炜¹, 江 莲^{1*}, 李 梅¹, 张文浩¹, 张文婷¹, 王晓玲², 张原苏¹, 张会芬¹

(1. 河北医科大学第四医院儿科, 石家庄 050000; 2. 河北医科大学第四医院病理科, 石家庄 050000)

【摘要】 目的 通过临床研究及构建小鼠胎儿炎症反应综合征(fetal inflammatory response syndrome, FIRS)模型,探究早产儿 FIRS 体内 MMP-9/TIMP-1 表达水平变化参与 FIRS 引发心肌损害的可能机制及其潜在药物的发掘。**方法** 本研究分为临床观察和动物实验两部分。临床部分:纳入 2018 年 5 月至 2019 年 12 月于河北医科大学第四医院生产的全部早产儿 118 例作为研究对象,根据是否诊断 FIRS 分为 FIRS 组($n=61$)和非 FIRS 组($n=57$),比较两组患儿 IL-6、MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1(M/T)比值水平及心肌损伤发生情况。动物部分:构建 FIRS 小鼠模型,根据不同药物干预方式,分为 FIRS 组、RA 组、对照组,留取 3 组小鼠心脏及胎盘组织,观察心脏及胎盘组织病理改变及心脏组织中 IL-6、MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1(M/T)比值水平变化。**结果** 临床部分:FIRS 组 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值分别为(38.53 ± 9.01) pg/L、(42.27 ± 12.53) ng/L、(110.48 ± 17.06) ng/L、(38.30 ± 9.93)%,显著高于非 FIRS 组,差异具有统计学意义($P<0.05$);FIRS 组心肌损伤率(27.87%)显著高于非 FIRS 组(5.26%),差异具有统计学意义($P=0.001$)。动物部分:FIRS 组小鼠心肌组织明显水肿、心室壁变薄,RA 干预后心脏结构变化程度减轻。不同时间点 FIRS 组小鼠 IL-6、MMP-9、TIMP-1 mRNA 表达量及 M/T 比值显著高于对照组($P<0.05$);RA 干预后,相同时间节点 IL-6、MMP-9 mRNA 表达量及 M/T 比值显著高于对照组($P<0.05$),但是低于 FIRS 组($P<0.05$)。**结论** FIRS 可通过释放 IL-6,调节 MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值水平,介导早产儿心肌损伤的发生,应用 MMP-9 抑制类药物可在心肌损伤过程中发挥保护作用,为发掘临床潜在治疗药物提供线索。

【关键词】 胎儿炎症反应综合征;心肌损伤;金属基质蛋白酶-9;金属蛋白酶组织抑制因子-1;白介素-6

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0055-07

Study on the mechanism by which MMP-9 and TIMP-1 levels are involved in myocardial injury in premature infants with FIRS

YAN Yiwei¹, JIANG Lian^{1*}, LI Mei¹, ZHANG Wenhao¹, ZHANG Wenting¹, WANG Xiaoling²,
ZHANG Yuansu¹, ZHANG Huifen¹

(1. Department of Pediatrics, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China.
2. Department of Pathology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

【基金项目】 2017 年河北省政府资助临床医学优秀人才培养和基础课题研究项目(冀财社[2017] 46 号);2016 年河北省医学科学研究重点课题计划(20160163)。

【作者简介】 闫祎炜(1990—),女,硕士研究生,研究方向:儿科学。E-mail:yanyiwei2012@126.com

【通信作者】 江莲(1961—),女,主任医师,研究方向:儿科学。E-mail:jianglianerke@163.com

[Abstract] Objective To explore, by constructing a mouse fetal inflammatory response syndrome (FIRS) model, the possible mechanism by which MMP-9/TIMP-1 expression in premature infants with FIRS induces myocardial damage and potential drugs against this. **Methods** This study was divided into two parts: clinical observation and animal experiment. In part 1, a total of 118 premature infants who were in the Fourth Hospital of Hebei Medical University during the period from May 2018 to December 2019 were included as the study participants. According to whether FIRS was diagnosed, they were divided into the FIRS group ($n=61$) and control group ($n=57$). The levels of IL-6, MMP-9 and TIMP-1, the MMP-9/TIMP-1 (M/T) ratio, and the occurrence of myocardial injury were compared between the two groups. For part 2 (the animal experiment), FIRS mice were constructed and divided into the following three drug intervention groups; FIRS group, RA(retinoic acid)group, and control group. Heart tissue was collected from the mice in these groups and used to detect the IL-6, MMP-9 and TIMP-1 levels and the M/T ratio. **Results** The IL-6, MMP-9 and TIMP-1 levels and M/T ratio in the FIRS group were: (38.53 ± 9.01) pg/L, (42.27 ± 12.53) ng/L, (110.48 ± 17.06) ng/L and (38.30 ± 9.93)%, respectively; these values were significantly higher ($P<0.05$) than those in the non-FIRS group. The myocardial injury rate was significantly higher ($P=0.001$) in the FIRS group (27.87%) than in the non-FIRS group (5.26%). In the myocardial tissue of mice in the FIRS group, there were significant levels of edema, the ventricular wall became thinner, and the degree of cardiac structure changes was reduced by RA intervention. The IL-6, MMP-9 and TIMP-1 mRNA expression levels and M/T ratios in the FIRS group at different timepoints were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), whereas the the mRNA expression of IL-6, MMP-9 levels and M/T ratios in the RA group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$) but were lower than those in the FIRS group ($P<0.05$). **Conclusions** FIRS can mediate the occurrence of heart injury in premature infants by releasing IL-6 and by regulating the levels of MMP-9 and TIMP-1 and the M/T ratio. The application of RA can play a protective role in the process of heart injury and could be a potential drug for providing clinical treatment of FIRS.

[Keywords] FIRS; myocardial damage; MMP-9; TIMP-1; IL-6

心肌损害是胎儿炎症反应综合征 (fetal inflammatory response syndrome, FIRS) 的并发症之一,在成人研究中近 40%脓毒症患者可出现不同程度心肌损伤^[1]。心肌损伤起病隐匿,临床表现多样,早期无特异性预测指标,容易漏诊,以致延迟治疗、预后不良。心肌损伤在早产儿中发病率约 30%左右,而在 FIRS 早产儿中可上升至 46.8%,严重者可并发心律失常(发生率约 4.28%),死亡率 0.6%~1%^[2]。因此,FIRS 患儿心肌损伤的早期诊断尤为重要,部分学者积极探寻高诊断效能的心肌损伤标志物^[3]。但是,FIRS 所致心肌损伤具体机制及特异性治疗药物尚无明确结论。既往文献表明,脓毒症大鼠模型中,可检测到心脏组织基质金属蛋白酶(matrix metalloprotein 9, MMP-9)水平显著升高,并上调肌钙蛋白酶,过度降解肌钙蛋白,诱发心肌损伤^[4]。虽然 FIRS 与全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的病程进展相近,但是 MMP-9 及其抑制剂金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)的水平变化是否参与 FIRS 介导的心肌损伤尚不明确。本研究临床验证 MMP-9 及 TIMP-1 表达水平,并构建 FIRS 小鼠模型,探寻 FIRS 诱发心肌损害的

具体机制,为临床诊治提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

采用清洁级 10 周龄 KM 小鼠 45 只购自河北省实验动物中心[SCXK(冀)2018-004],雄鼠 15 只,体重分布 35~40 g,雌鼠 30 只,体重分布 30~35 g。饲养和实验于河北医科大学第四医院动物实验中心[SYXK(冀)2018-001],本实验符合 3R 原则,经河北医科大学第四医院实验动物伦理委员会审核通过(IACUC-4th Hos Hebmu-2019006)。

1.1.2 研究人群

本临床部分研究人群和作者既往发表论文《FIRS 早产儿脐血 MMP-9、TIMP-1 水平变化及其与肺损伤关系的研究》相同,但是研究方向不同^[5]。研究人群纳入连续生产的早产儿共 118 例,纳入时间区间为 2018 年 5 月到 2019 年 12 月。依据是否符合 FIRS 诊断标准^[6]分为 FIRS 组($n=61$)和非 FIRS 组($n=57$)。其中 FIRS 组男性 32 人,女性 29 人,平均孕周为(29.35 ± 1.44)周,出生体重为(1489 ± 178)g,1 min Apgar 评分为($7.28\pm$

1.42) 分, 5 min Apgar 评分为 (8.59±1.39) 分, 10 min Apgar 评分为 (9.01±1.26) 分; 非 FIRS 组男性 30 人, 女性 27 人, 平均孕周为 (29.29±1.51) 周, 出生体重为 (1482±169) g, 1 min Apgar 评分为 (7.32±1.34) 分, 5 min Apgar 评分为 (8.72±1.26) 分, 10 min Apgar 评分为 (9.12±1.32) 分。两组新生儿基线资料无统计学差异 ($P>0.05$)。研究方案经河北医科大学医学伦理委员会审核通过 (2020004)。

1.2 主要试剂与仪器

人血清 ELISA 试剂盒 (IL-6、MMP-9、TIMP-1、CRP), 来源中国艾莱萨生物科技有限公司; 维甲酸 (retinoic acid, RA), 来源中国山东良福制药; 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 来源美国 Sigma 公司; 瑞姬氏染色液, 来源中国温州康泰生物科技有限公司。离心机 (YXI-2), 来源日本三洋公司, 超低温冰箱购 (-80℃), 来源日本 SANYO 公司; 显微镜 (CX-21) 来源日本 OLYMPUS 公司; 荧光定 PCR 仪 (型号: Mx3000P), 来源美国 Agilent 公司; 全自动酶标检测仪, 来源美国 VERS Amax 公司; 电热恒温水浴箱 (型号: JY-17-1), 来源中国上海森信实验有限公司; 蛋白分析 (型号: Au2700), 来源日本 OLYMPUS 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 临床实验部分

通过 ELLSA 法检测脐血中的白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、金属蛋白酶组织抑制因子-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloprotein-9, MMP-9) 水平。所有入组新生儿通过病房治疗及门诊定期随访, 每周随访 1 次, 随访至出生后 28 d, 明确是否发生心肌损伤结局。

新生儿心肌损伤诊断标准参照^[7]执行, 共纳入包括心肌酶、肌钙蛋白在内的两个必要诊断指标, 以及心电图、超声心动图两个辅助诊断指标。详见如下: ①心肌酶升高 (天冬氨酸转移酶>25 U/L 和/或乳酸脱氢酶>407 U/L 和/或肌酸激酶>725 U/L 和/或肌酸激酶同工酶>39 U/L); ②肌钙蛋白升高 (心肌肌钙蛋白 I>1.12 μg/L 和/或心肌肌钙蛋白 T>0.14 μg/L); ③心电图异常 (心动过缓、心律不齐等改变); ④超声心动图异常 (心脏收缩功能和射血功能减退等)。

1.3.2 动物实验部分

(1) 实验分组

实验分组根据是否为 FIRS 小鼠及不同药物干预, 随机分为 3 组, 详细如下: FIRS 组为 LPS 构建 FIRS 小鼠 (模型构建详见下文) 组、RA 组为 FIRS 小鼠+RA 组、NS 组为非 FIRS 组 (空白对照, 生理盐水)。

(2) 构建 FIRS 小鼠动物模型

FIRS 小鼠动物模型构建 FIRS 小鼠模型构建参考国外学者^[8-9]进行。饲养 1 周将雌雄小鼠按 2:1 合笼, 次日观察到阴栓的雌鼠视为怀孕第 1 天。孕 15 d 时对 FIRS 组及 RA 组小鼠进行羊膜囊内注射 LPS (USA, sigma, 0.25~2.5 μg/sac), 总量不超过 100 μg/kg, NS 组注射等量生理盐水。注药后观察孕鼠感染、流产等征象, 其中流产率 10.00%。建模成功标志: 孕鼠分娩后进行胎盘组织镜下观察, 可见炎细胞大量浸润、正常绒毛结构消失, 伴随水肿及部分纤维化。本实验小鼠建模成功建模成功率为 83.73%。

(3) 药物干预

药物干预对上述 3 组小鼠进行不同干预, RA 组建模成功后于孕 17 d 开始, 通过 MMP-9 抑制剂维甲酸 (retinoic acid, RA) (山东良福制药) 灌胃, 剂量 50 μg/(kg·d), 至分娩。FIRS 组、NS 组在孕 17 d 使用和 RA 组等量生理盐水 (normal saline, NS) 灌胃, 至分娩。

(4) 留取标本

组织留取及指标观察从 3 组中各随机取 3 只孕 19 d 孕鼠, 行剖宫产手术, 留取胎鼠的胎盘、心脏组织, 余孕鼠待自然分娩, 分别于产后 1、7、14 d 处死仔鼠 (每组每时间点 $n=10$ 只), 均留取心脏组织, 部分甲醛溶液中固定后石蜡包埋用于 HE 染色, 余于液氮中迅速冷冻后置 -80℃ 保存用以 RT-PCR 检测。

(5) HE 染色观察心肌病理损伤

胎盘及小鼠心脏组织 HE 染色镜检: 采集的胎盘及心脏组织中性甲醛中固定 4 h 后进行制片、HE 染色。

(6) RT-PCR 检测 IL-6、MMP-9 及 TIMP-1 表达量

小鼠心脏组织中 IL-6、MMP-9 及 TIMP-1 表达量的 RT-PCR 测定: 将留取的心脏组织中提取总 RNA, 并进行 RNA 纯度及完整性测定。样本进行反转录, 其中引物设计如表 1。并进行实时荧光定量 PCR 扩增, 读取相对表达量。

1.4 统计学方法

数据通过 SPSS (21.0, IBM) 及 R 软件

(RStudio 2021.09.0 Build 351) 进行统计分析, 相关矩阵图通过 R 软件 (RStudio 2021.09.0 Build 351) 进行绘制。计量资料采用 *t* 检验进行分析, 多组均数的比较采用重复测量方差分析, 相关性分析采用 Spearman's 线性相关。计数资料比较采用卡方检验或 Fisher 确切概率法进行。 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 早产儿脐血中 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值表达水平

FIRS 组 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值分别

表 1 相关指标扩增引物序列

Table 1 Amplification primer sequence of related indicators		
名称 Name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	扩增片段长度 (bp) Amplified fragment length
内参 β-Action	F:GGGAAATCGTCGCTGAC R:AGGCTGGAAGAGCCT	176
白介素-6 IL-6	F:GCCTTCCTACTTCACAA R:CAACTCTTTTCTCATTTCCAC	138
基质金属 蛋白酶-9 MMP-9	F:TCACTTTCCTTCACCTTC R:ATTGCGCTCCTTATCGT	113
基质金属蛋白 酶抑制剂-1 TIMP-1	F:TCTGGCATCCTCTTGTG R:GGTGTCTCGTTGATTCT	144

表 2 不同组别脐血 IL-6、MMP-9、TIMP-1、M/T 比值水平比较 (n=118)				
Table 2 Comparison of cord blood IL-6, MMP-9, TIMP-1, M/T ratio levels in different groups				
组别 Groups	IL-6 (pg/L)	MMP-9 (ng/L)	TIMP-1 (ng/L)	M/T 比值 (%) M/T rate
非 FIRS 组 (n=57) Non-FIRS group	4.45±1.00	3.43±1.95	39.72±24.86	10.48±4.49
FIRS 组 (n=61) FIRS group	38.53±9.01 *	42.27±12.53 *	110.48±17.06 *	38.30±9.93 *

注: 与非 FIRS 组比较, * *P*<0.05。
Note. Compared with non-FIRS group, * *P*<0.05.

表 3 不同组别新生儿心肌损伤发生率比较 (n=118)				
Table 3 Comparison of incidence rates of neonatal myocardial injury in different groups				
组别 Groups	心肌损害 Occurrence	无心肌损害 Nonoccurrence	总例数 Total	比值 (%) Rate
非 FIRS 组 (n=57) No-FIRS group	3	54	57	5.26
FIRS 组 (n=61) FIRS group	17	44	61	27.87 *

注: 与非 FIRS 组比较, * *P*<0.05。
Note. Compared with non-FIRS group, * *P*<0.05.

为 (38.53±9.01) pg/L、(42.27±12.53) ng/L、(110.48±17.06) ng/L、(38.30±9.93)% 和非 FIRS 组 (对照组) 比较, 均高于对照组, 差异具有统计学意义 (*P*<0.05), 详见表 2。

2.2 不同组别早产儿心脏损伤结局比较

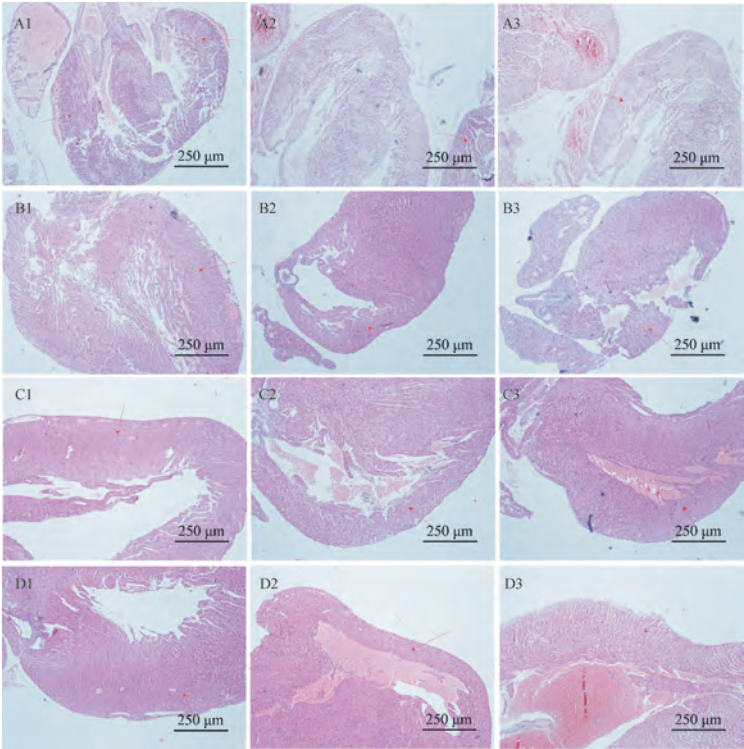
随访期间, FIRS 组患儿心肌损害发生 17 例, 非 FIRS 组心肌损伤发生 3 例, FIRS 组心肌损伤率 (27.87%) 显著高于非 FIRS 组 (5.26%), 差异具有统计学意义 (*P*=0.001), 详见表 3。

2.3 胎/仔鼠心脏病理组织改变

分别在小鼠孕 19 d、产后 1 d、产后 7 d、产后 14 d 4 个时间节点获取胎/仔鼠心脏标本, 制备 HE 染色组织切片。结果显示: 结果可见 FIRS 组心肌组织可见明显出血灶及水肿, 心室壁变薄; RA 干预后与 FIRS 组病变相似心脏结构变化, 但是程度明显减轻, NS 组未见明显心脏组织结构改变, 见图 1。

2.4 不同日龄组别胎/仔鼠心脏组织 IL-6、MMP-9、TIMP-1 表达水平

FIRS 组小鼠在孕 19 d、产后 1 d、产后 7 d、产后 14 d 4 个时间节点 IL-6、MMP-9、TIMP-1 mRNA 表达量及 M/T 比值显著高于对照组, 差异具有统计学意义, *P*<0.05。RA 组通过 RA 干预后, 相同时间节点 IL-6、MMP-9 mRNA 表达量及 M/T 比值显著高于对照组 (*P*<0.05), 但是低于相同时间节点的 FIRS 组 (*P*<0.05), 详见表 4。



注: A1~D1; 对照组 (NS 组) 孕 19 d、产后 1、7、14 d 小鼠心脏组织; A2~D2; FIRS 组孕 19 d、产后 1、7、14 d 小鼠心脏组织; A3~D3; RA 组孕 19 d、产后 1、7、14 d 小鼠心脏组织。红色箭头所标注的位置: 病理表现典型部位; 其中 A2 和 A3 箭头所指的为同一张载玻片上两枚不同的心脏, A2; FIRS 组, A3; RA 组。

图 1 不同时间点胎/仔鼠心脏组织切片图 (HE 染色)

Note. A1~D1, Control group (NS group) mouse heart tissue at 19 days of gestation, 1, 7, and 14 days after delivery. A2~D2, FIRS group at 19 days of gestation, 1 after delivery heart tissue of mice at day 7, 14 days after delivery. A3~D3, RA group mouse heart tissue at 19 days of gestation, 1, 7, and 14 days after delivery. The positions marked by the red arrows, Typical parts of pathological manifestations. Arrows of A2 and A3 point to two different hearts on the same slide, A2, FIRS group. A3, RA group.

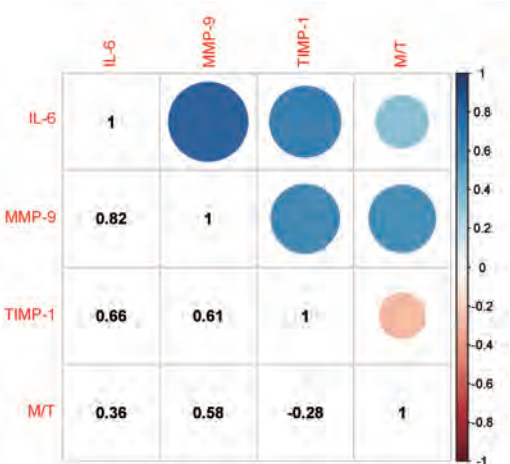
Figure 1 Tissue sections of fetal/offspring hearts at different time points (HE staining)

2.5 FIRS 小鼠心脏组织 IL-6 与 MMP-9、TIMP-1 及 M/T 的相关性分析

对 FIRS 小鼠心脏组织中 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 进行相关性分析, 结果显示: IL-6 与 MMP-9 [$r_{MMP-9} = 0.82, 95\% \text{ CI} (0.69, 0.90)$]、TIMP-1 [$r_{TIMP-1} = 0.66, 95\% \text{ CI} (0.44, 0.81)$] 及 M/T [$r_{M/T} = 0.36, 95\% \text{ CI} (0.06, 0.61)$] 呈正相关, 见图 2。

3 讨论

FIRS 是胎儿时期较为严重的炎症反应疾病, 其主要机制为胎儿体内大量炎症因子释放, 并激活体内不可控炎症级联反应, 最终可能导致患儿的不同脏器损伤^[10]。Tang 等^[11]人进行的一项纳入了 10 项研究共计 1116 例患者的 Meta 分析, 评价了 FIRS 导致的新生儿不良结局, 结果显示: FIRS 可导致新生儿早发败血症 (neonatal early-onset sepsis, EOS)、支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia,



注: 蓝色圆点: 正相关; 红色圆点: 负相关; 坐下角数字: 相关系数。

图 2 小鼠心脏组织中 IL-6 与 MMP-9、TIMP-1 及 MMP-9 / TIMP-1 比值相关矩阵图

Note. Blue dot, Positive correlation. Red dot, Negative correlation. Number of sitting angles, Correlation coefficient.

Figure 2 Correlation matrix of IL-6 with MMP-9, TIMP-1 and MMP-9 / TIMP-1 ratio in mouse heart tissue

表 4 不同组别不同胎龄下指标表达量比较($n=10$)

Table 4 Comparison of index expression in different groups and gestational ages

组别 Groups		IL-6 mRNA	MMP-9 mRNA	TIMP-1 mRNA	MMP-9/TIMP-1
G19	NS 组 NS group	1.05±0.40	0.70±0.15	1.57±0.41	0.47±0.17
	FIRS 组 FIRS group	10.49±1.10 [*]	15.85±0.67 [*]	4.90±0.55 [*]	3.28±0.25 [*]
	RA 组 RA group	6.98±0.96 ^{*#}	6.43±0.83 ^{*#}	3.52±0.49 ^{*#}	1.85±0.27 ^{*#}
P1	NS 组 NS group	0.51±0.24	0.63±0.22	2.11±0.56	0.33±0.14
	FIRS 组 FIRS group	9.53±1.10 [*]	13.09±1.54 [*]	5.40±0.79 [*]	2.46±0.40 [*]
	RA 组 RA group	4.07±0.78 ^{*#}	3.69±0.65 ^{*#}	2.84±0.76 ^{*#}	1.36±0.32 ^{*#}
P7	NS 组 NS group	0.53±0.11	0.50±0.13	1.24±0.24	0.40±0.08
	FIRS 组 FIRS group	7.44±0.68 [*]	10.48±0.98 [*]	4.20±0.44 [*]	2.52±0.35 [*]
	RA 组 RA group	3.58±0.94 ^{*#}	3.53±0.31 ^{*#}	2.74±0.53 ^{*#}	1.34±0.32 ^{*#}
P14	NS 组 NS group	0.46±0.09	0.44±0.11	0.96±0.10	0.45±0.11
	FIRS 组 FIRS group	6.74±0.69 [*]	9.09±0.40 [*]	3.46±0.57 [*]	2.69±0.44 [*]
	RA 组 RA group	2.87±0.89 ^{*#}	3.36±0.59 ^{*#}	2.06±0.46 ^{*#}	1.67±0.98 ^{*#}

注:与 NS 组比较,^{*} $P<0.05$;与 FIRS 组比较,[#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with NS group, ^{*} $P<0.05$. Compared with FIRS group, [#] $P<0.05$.

BPD)等相关疾病。此外,尚有报道证实 FIRS 可诱导新生儿的心肌损伤^[2,12]。本研究结果也证实 FIRS 新生儿心肌损伤发生率为 27.87%,显著高于非 FIRS 组(5.26%)。

但是截至目前,FIRS 介导的心肌损伤具体分子机制,尚不明确。Mitchell 等^[13]通过构建灵长类宫内感染模型,来探求 FIRS 患者所致心肌损伤的具体机制,结果显示:通过 PCR 技术共 609 个分子探针来鉴别心脏组织中差异表达的分子,其中 FIRS 组心脏组织中 IL-6 和白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)显著高于对照组。此外,炎症因子作为 FIRS 重要的致病机制已经成为共识,IL-6 水平变化值已经成为重要的诊断依据^[7,14-17]。因此,炎症因子 IL-6 的升高,可能是 FIRS 导致心肌损伤的潜在病因。

但是 IL-6 是直接导致 FIRS 介导的心肌损伤,还是通过其他分子途径进行调节,其机制尚不明确。既往研究表明,炎性细胞因子 IL-6 可在炎症感染后发生结构改变,成为活化的前体物质并上调 MMP-9 表达。而 MMP-9 可促进炎性细胞的趋化、聚集,加速血管内皮 IV 型胶原纤维的降解,破坏脏器结构并加重炎症损伤^[18]。本研究首先对 FIRS 新生儿和对照组进行了 IL-6、MMP-9 水平的检测,结果显示,FIRS 组中 IL-6 和 MMP-9 水平显著增加。笔者基于此,进一步设计动物实验,来探讨 IL-6 通过调节 MMP-9 表达水平介导 FIRS 所致心肌损伤的可能机制。

本研究通过羊膜囊注射 LPS 来构建小鼠 FIRS 模型。结果通过胎盘组织学检测,来判定建模的成功率,本研究建模成功率为 83.73%,和既往研究报

道相仿^[19-21]。本研究中,FIRS 组心脏组织 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值显著高于对照组, $P<0.05$ 。此外,人体内存在 MMP-9 天然抑制剂 TIMP-1,而结果显示 FIRS 组 M/T 比值显著高于对照组,这提示 MMP-9 在心肌损伤的结局中起到了关键性作用。而进一步的相关性分析结果显示,IL-6 水平的表达和 MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值呈正相关,进一步验证了 IL-6 通过调节 MMP-9 发挥 FIRS 心肌损伤的机制。

维甲酸(RA)是维生素 A 的代谢中间产物,是已经上市获批肿瘤治疗的药物,研究表明 RA 具有抑制 MMP-9 表达的作用^[22]。Axel 等^[23]研究表明 RA 可显著降低血管内皮细胞 MMP-9 的表达水平,可逆转心血管疾病的发展。此外,阳双健等^[24]研究发现维甲酸可下调 MMP-9 的表达,并进一步增强滋养层细胞侵袭及促血管形成能力。本研究通过应用 RA 来干预 FIRS 小鼠,结果显示 IL-6、MMP-9、TIMP-1 及 M/T 比值相较于 FIRS 组均有不同程度下降, P 均 <0.05 。结果提示,RA 能减轻小鼠体内的炎症反应,对炎症所致的心肌损伤起保护作用,MMP-9 抑制剂相关的药物有可能成为治疗 FIRS 早产儿心肌损伤的潜在药物。

综上所述:FIRS 可通过释放 IL-6,调节 MMP-9、TIMP-1 水平及 M/T 比值,介导早产儿心肌损伤的发生,应用 MMP-9 抑制剂相关药物可在心肌损伤过程中发挥保护作用,为临床提供潜在治疗药物。

参考文献:

[1] 甄军海,李莉,严静.脓毒症心肌损伤生物标志物的研究进展[J].中华危重病急救医学,2018,30(7):699-702.

- [2] Zanotti-Cavazzoni SL, Hollenberg SM. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2009, 15(5): 392-397.
- [3] Lund A, Giil LM, Slettom G, et al. Antibodies to receptors are associated with biomarkers of inflammation and myocardial damage in heart failure [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 250: 253-259.
- [4] 张召才, 严静, 蔡国龙, 等. 脓毒症大鼠心脏基质金属蛋白酶及其抑制物基因的表达变化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(8): 1641-1643.
- [5] 闫祎炜, 江莲, 李梅, 等. FIRS 早产儿脐血 MMP-9、TIMP-1 水平变化及其与肺损伤关系的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(11): 35-41.
- [6] Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, et al. The fetal inflammatory response syndrome [J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2007, 50(3): 652-683.
- [7] 薛丹, 陈贻骥. 新生儿心肌损伤诊断的研究进展 [J]. *临床儿科杂志*, 2012, 30(9): 891-894.
- [8] Rounioja S, Räsänen J, Glumoff V, et al. Intra-amniotic lipopolysaccharide leads to fetal cardiac dysfunction. A mouse model for fetal inflammatory response [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 60(1): 156-164.
- [9] Liu SF, Yan Y. Animal models of pulmonary hypertension due to left heart disease. *Anim Model Exp Med* [EB/OL]. [2022-2-9]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ame2.12214>.
- [10] 唐秦, 邵勇. 胎儿炎症反应综合征研究进展 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2019, 46(1): 48-52.
- [11] Tang Q, Zhang L, Li H, et al. The fetal inflammation response syndrome and adverse neonatal outcomes: a meta-analysis [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2021, 34(23): 3902-3914.
- [12] Fukumoto K, Pierro A, Spitz L, et al. Differential effects of neonatal endotoxemia on heart and kidney carnitine palmitoyl transferase I [J]. *J Pediatr Surg*, 2002, 37(5): 723-726.
- [13] Mitchell T, MacDonald JW, Srinouanpranchanh S, et al. Evidence of cardiac involvement in the fetal inflammatory response syndrome: disruption of gene networks programming cardiac development in nonhuman primates [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2018, 218(4): 438.
- [14] Helmo FR, Alves EAR, Moreira RAA, et al. Intrauterine infection, immune system and premature birth [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2018, 31(9): 1227-1233.
- [15] Vaisbuch E, Romero R, Gomez R, et al. An elevated fetal interleukin-6 concentration can be observed in fetuses with anemia due to Rh alloimmunization: implications for the understanding of the fetal inflammatory response syndrome [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2011, 24(3): 391-396.
- [16] Jung E, Romero R, Yeo L, et al. The fetal inflammatory response syndrome: the origins of a concept, pathophysiology, diagnosis, and obstetrical implications [J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2020, 25(4): 101146.
- [17] Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study [J]. *JAMA*, 1995, 273(2): 117-123.
- [18] Jeong S, Ledee DR, Gordon GM, et al. Interaction of clusterin and matrix metalloproteinase-9 and its implication for epithelial homeostasis and inflammation [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(5): 2028-2039.
- [19] Ueda K, Cho K, Matsuda T, et al. A rat model for arrest of alveolarization induced by antenatal endotoxin administration [J]. *Pediatr Res*, 2006, 59(3): 396-400.
- [20] Cao L, Wang J, Tseu I, et al. Maternal exposure to endotoxin delays alveolarization during postnatal rat lung development [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 296(5): L726-L737.
- [21] 房晨阳, 周霞, 杨艳珍, 等. 重组 CC16 蛋白对慢性阻塞性肺疾病小鼠肺组织结构及 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(2): 222-228.
- [22] Schoenemark MP, Mitchell TI, Rutter JL, et al. Retinoid-mediated suppression of tumor invasion and matrix metalloproteinase synthesis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 878: 466-486.
- [23] Axel DI, Frigge A, Dittmann J, et al. All-trans retinoic acid regulates proliferation, migration, differentiation, and extracellular matrix turnover of human arterial smooth muscle cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 49(4): 851-862.
- [24] 阳双健, 钟黎黎, 盛莹, 等. 全反式维甲酸通过调控 sFlt-1 表达对滋养层细胞侵袭及促血管形成能力的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(15): 1928-1933.

[收稿日期] 2021-12-13

朱淑敏,宁为民,董明国,等. 新冠肺炎寒湿疫小鼠模型的建立及其评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 62-68.
Zhu SM, Ning WM, Dong MG, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of COVID-19 as “cold-dampness epidemic” [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 62-68.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.009

新冠肺炎寒湿疫小鼠模型的建立及其评价

朱淑敏¹, 宁为民², 董明国², 欧健钊², 黄海阳², 侯少贞^{1,3}, 高洁^{1*}

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 东莞市中医院, 广东 东莞 523000;
3. 东莞广州中医药大学研究院, 广东 东莞 523808)

【摘要】 目的 为中医理论下新冠肺炎归属“寒湿疫”提供病理模型, 本实验通过脂多糖诱导小鼠引发细胞因子风暴, 结合寒湿刺激, 旨在建立合理、实用的寒湿疫小鼠模型。**方法** 24 只雄性 KM 小鼠随机分为两个造模组和正常组。造模组 1 (脂多糖组) 为腹腔注射 5 mg/kg 脂多糖生理盐水溶液, 造模组 2 (脂多糖+寒湿刺激组) 为腹腔注射 5 mg/kg 脂多糖生理盐水溶液+寒湿刺激, 正常组给予等量生理盐水。造模 8 d 后, 评价模型小鼠在中医理论下的相关外观行为表征, 以及肺指数、脾指数、胸腺指数, ELISA 检测肺组织细胞因子的水平, 检测环氧化酶 2 (COX-2)、瞬时受体电位通道蛋白 V1 和 A1 (TRPV1 和 TRPA1) 的表达量。**结果** 与正常组比较, 脂多糖+寒湿刺激组小鼠的外在状态和行为表现与中医理论定义的寒湿证相一致, 包括活跃程度下降、精神状态不佳。模型组的肺指数、胸腺指数、脾指数高于正常组; 脂多糖+寒湿刺激组 TNF- α , IFN- γ , IL-6 和 PGE2 的水平明显高于正常组及脂多糖组; HE 染色显示, 模型组肺组织损伤明显。模型组中 COX-2 和 TRPA1 蛋白表达显著升高, TRPV1 蛋白表达显著降低。**结论** 脂多糖+寒湿刺激小鼠模型可作为构建中医理论下新冠肺炎引起的“寒湿疫”病证较为理想的方法, 模型组小鼠指标变化符合文献报导的新冠肺炎造成的机体损伤。

【关键词】 脂多糖+寒湿刺激模型; 中医药; 模型评价; 病证结合模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0062-07

Establishment and evaluation of a mouse model of COVID-19 as “cold-dampness epidemic”

ZHU Shumin¹, NING Weimin², DONG Mingguo², OU Jianzhao², HUANG Haiyang², HOU Shaozhen^{1,3}, GAO Jie^{1*}
(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China.
2. Dongguan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dongguan 523000. 3. Dongguan Institute of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808)

【Abstract】 Objective To establish a reasonable and practical pathological mouse model for the attribution of coronavirus disease 2019 (COVID-19) as “cold-dampness epidemic” under the theory of Traditional Chinese Medicine (TCM). **Methods** Twenty-four male KM mice were randomly divided into three groups: normal group and two model groups. The mice in model group 1 (lipopolysaccharide [LPS] group) were intraperitoneally injected with 5 mg/kg of LPS saline solution, those in model group 2 (“LPS + cold-dampness stimulation” syndrome group) were intraperitoneally injected with 5 mg/kg of LPS saline solution and cold dampness stimulation, and those in the normal group were injected with the same amount of normal saline. After 8 days, the appearance and behavior of model mice were evaluated under the theory of TCM; additionally, the lung index, spleen index, and thymus index were evaluated, and the levels of inflammatory factors in the lung tissues were detected by ELISA, and the protein expression levels of COX-2, TRPV1 and

【基金项目】 2020 年东莞市新型冠状病毒肺炎防疫防治技术研究及推广应急攻关专项项目 (202071715002124)。
【作者简介】 朱淑敏 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 方剂配伍及中药复方药理药效研究。E-mail: zsm2020ky@163.com
【通信作者】 高洁 (1971—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 方剂配伍及中药复方药理药效研究。E-mail: gj@gzucm.edu.cn

TRPA1 were detected. **Results** Mice in the LPS + “cold-dampness stimulation” syndrome group exhibited an appearance and behavior similar to those of cold-dampness syndrome, e. g., decreased activity and poor mental state. The lung index, thymus index, and spleen index of model groups were higher than those of the normal group. The levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6 and PGE2 in the LPS + “cold-dampness stimulation” syndrome group were significantly higher than those in the normal group or the LPS group. HE staining revealed that the extent of injury in the model groups were more severe than that in the normal group. The expression levels of COX-2 and TRPA1 protein were significantly higher in the model groups, whereas the expression level of TRPV1 protein was significantly lower. **Conclusions** The LPS + “cold-dampness stimulation” syndrome mouse model can be used as an ideal method to construct the syndrome of “HanShiYi” caused by COVID-19 under the theory of TCM, and the changes of indexes of mice in the LPS + “cold-dampness stimulation” syndrome model group are consistent with the body damage caused by COVID-19 reported in the literature.

[Keywords] LPS+cold-dampness stimulation syndrome; Traditional Chinese Medicine; model evaluation; disease-syndrome combination model

在中医理论中,新冠肺炎的病因属于中医“疫病”的范畴,具有发病急骤、症状相似、传染性强、病情较重的特点^[1]。COVID-19 发病状态与疫毒侵袭能力、地域环境,人群状态密切相关。有研究文章称为“寒湿疫”,病位在肺、脾,可波及心、肝、肾^[2]。岭南是我国南方五岭以南地区的概称,受亚热带季风海洋性气候影响,全年雨水丰富,空气湿度高,具有温暖、潮湿的特点^[3]。温病学家叶天士提到“粤地潮湿,长夏涉水,外受之湿下起”,此描述体现了岭南地区气候潮湿的特点^[4]。根据中医药治疗的思路,对于病毒导致的疾病,不针对其本身治疗,而是先确定疾病的病因病机,然后进行辨证论治,重点关注机体整体状态和机体免疫转化调节方面^[5]。故而对于新冠肺炎,建立符合岭南地区特点的中医药理论的动物模型十分重要。目前,关于新冠肺炎模型报道中医科学院的模型,耿子涵等^[6]将 BALB/c 幼龄小鼠放置于寒湿环境的人工气候箱中结合滴鼻感染 hCoV-229E 的方法建立小鼠模型,此方法建造模型与新冠肺炎临床表现有一致性。本研究依据实验平台本身条件,考虑到实验的普适性,简化相关的操作,从更基础的实验造模方向模拟新冠肺炎导致的细胞因子风暴,以及根据中医理论,增加寒湿刺激。

本研究基于中医理论对岭南地区新冠肺炎病因的认识,对小鼠采取注射脂多糖引起细胞因子风暴叠加寒湿刺激的造模方法,建立符合中医病因的证候模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 KM 小鼠 24 只,体重 18~22 g,购于珠海百试通生物科技有限公司[SCXK(粤)2020-

0051]。自由饮水饮食,自然光照,在广州中医药大学中药学院动物房[SYXK(粤)2019-0202],室温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(55 ± 5)%的 SPF 级环境中饲养。本实验通过广州中医药大学伦理要求(ZYD-2021-126),符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 北京索莱宝科技有限公司,批号:325D031); ELISA 试剂盒购自江苏酶免实业有限公司:TNF- α (批号:202107), IFN- γ (批号:202107), IL-6(批号:202107), IL-10(批号:202108), PGE2(批号:202108); TRPV1 抗体(Affinity, 批号:#66k4063); TRPA1 抗体(SAB, 批号:20211019); COX-2 抗体(SAB, 批号:2609)。冷冻高速离心机(赛默飞世尔科技,批号:75002420); 光学显微镜(奥林巴斯(中国)有限公司,批号:CKC2000); 1510 型全波长酶标仪(赛默飞世尔科技,批号:1510-01208)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

动物分笼适应性饲养 4 d 后,脂多糖+寒湿刺激组在笼底铺与笼底面积相当的冰袋制造寒湿刺激,进行温度及湿度监测。脂多糖+寒湿刺激组小鼠第 5 天到第 8 天,每天进行寒湿刺激造模,在 8 h 内处于温度为 $0^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$,湿度为 90%~55%的环境,其余时间处于正常饲养环境。脂多糖组和脂多糖+寒湿刺激组于第 5 天上午注射 5 mg/kg 的脂多糖生理盐水溶液,于第 8 天下午 2 点进行解剖。取材前所有动物禁食 12 h,禁水 2 h。

1.3.2 标本留取

血清分装后放置于 -80°C ,需要时取出进行测定。肺组织一部分装于组织固定液中固定,后石蜡包埋;一部分保存于液氮中。

1.3.3 炎症因子检测

称量保存在液氮中的小鼠左肺组织 50 mg 于离心管中,加 800 μL PBS 后于匀浆机进行匀浆,取匀浆上清,按酶联免疫吸附试剂盒说明书步骤测定匀浆中前列腺素 E2(PGE2)水平、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、γ 干扰素(IFN-γ)的含量。

1.3.4 病理检测及分析

将在 4%多聚甲醛中固定后的小鼠肺组织用 75%,90%,95%,100%的乙醇和二甲苯在室温下进行脱水,并用组织包埋机进行包埋。用切片机将蜡块切为 5 μm 的薄片放置于载玻片上,于烘箱中烘干。用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)将石蜡切片染色后,于显微镜下观察肺组织病理变化情况并拍照。

1.3.5 造模后小鼠相关行为表征评价

造模完成后,观察第 2、4、6、8 天各组小鼠的行为状态和精神状态,并进行评分,评分标准如表 1。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示,采用 SPSS Statistics 22 或 GraphPad Prism 8 软件分析各组之间差异。组间比较采用 One-way ANOVA 进行统计学分析,当方差齐时,采用 LSD 法比较,当方差不齐时,采用 Tamhane's T2 比较,当 $P<0.05$ 时表示差异具有统计学意义。小鼠脾指数和胸腺指数计算公式如下:脾指数=脾重量/体重×100,胸腺指数=胸腺重量/体重×100。

2 结果

2.1 动物模型的行为表征观察

小鼠的行为状态、精神状态观察结果如图 1 所示。结果发现,在造模第 2 天,脂多糖+寒湿刺激组小鼠行为状态较为活跃,精神状态较为焦躁;造模第 4 天,增加寒湿刺激小鼠行为状态评分降低,精神状态评分也相应降低;随造模时间推移,相较

于第 4 天的情况,在造模第 6 天时脂多糖+寒湿刺激组小鼠的行为状态和精神状态明显下滑。在造模第 8 天,脂多糖组与脂多糖+寒湿刺激组小鼠行为状态和精神状态与正常组的水平差距极大。总结以上结果,小鼠能够表现出与中医理论下寒湿证相似的行为表征,说明增加寒湿刺激造模相对成功。

2.2 各组小鼠脏器指数变化

由图 2 可知,与正常组比较,脂多糖组和脂多糖+寒湿刺激组肺湿干重比(W/D)、脾指数、胸腺指数均有明显上升趋势,且两组间脾指数、胸腺指数具有显著性差异($P<0.05$);与脂多糖组比较,脂多糖+寒湿刺激组的 W/D 数值增加,说明寒湿刺激加重小鼠肺组织的损伤;与脂多糖组相比,脂多糖+寒湿刺激组的胸腺指数增加,脾指数下降,说明寒湿刺激加重小鼠免疫组织的损伤。

2.3 小鼠肺组织细胞因子水平变化

采用酶免吸附法对各组小鼠肺组织匀浆中细胞因子的水平变化情况进行检测。由图 3、4 可知,与正常组比较,脂多糖组和脂多糖+寒湿刺激组小鼠肺组织匀浆中 TNF-α、IFN-γ、IL-6 升高,IL-10 降低。与脂多糖组相比,增加寒湿刺激组小鼠肺组织中 TNF-α、IFN-γ、IL-6 水平均显著升高,且 TNF-α 的差异具有统计学意义($P<0.01$)。IL-10 的水平呈下降趋势,脂多糖+寒湿刺激组与脂多糖组相比有显著性差异。($P<0.01$)。

2.4 病理结果

小鼠肺组织病理结果显示(图 5),正常组小鼠的肺组织结构完整,无渗出液,肺泡间隔正常;脂多糖组小鼠与正常组小鼠比较,发现肺组织结构出现紊乱的情况,且肺泡的间隔增厚,出现明显的间质水肿和炎性浸润的病理现象;而脂多糖+寒湿刺激组小鼠肺泡支架塌陷,肺组织结构更加紊乱,肺泡间隔增厚程度更加明显,且肺组织间质水肿和炎性浸润的现象比脂多糖组小鼠更加严重。

表 1 评分标准
Table 1 Standard for evaluation

分值标准 Score standard	1 分 1 Score	2 分 2 Score	3 分 3 Score	4 分 4 Score	5 分 5 Score
行为状态 Behavior	缩聚成团 Gather	少动 Less activity	正常活动 Normal activity	活跃 Active	兴奋多动 Excited to move more
精神状态 Mental state	迟滞 Sluggish	倦怠 Accidie	适度 Normal	易激惹 Be easily angered	焦躁 Anxious

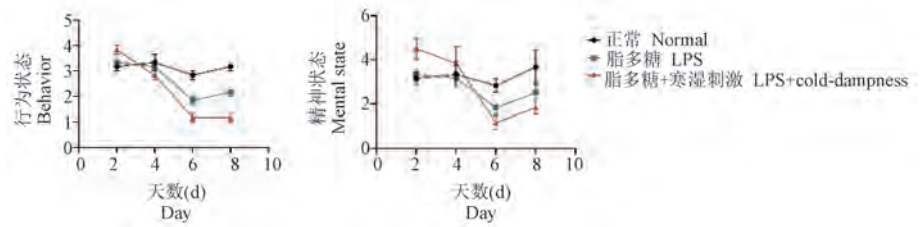
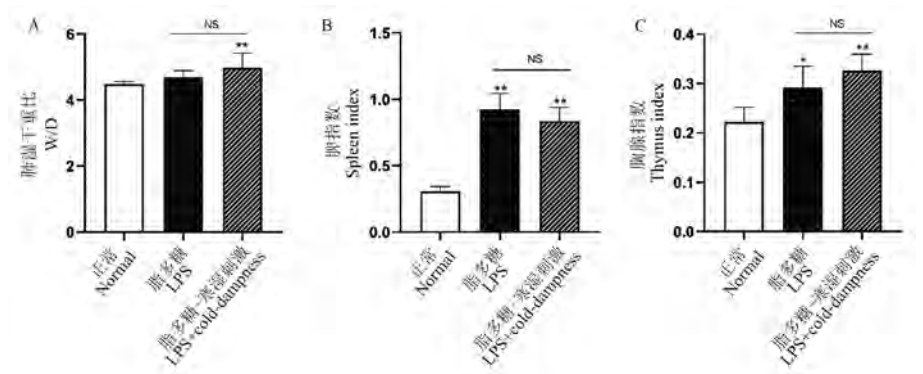


图 1 各组小鼠第 2、4、6、8 天的行为表征评分($\bar{x}\pm s, n=8$)
Figure 1 Evaluation of behavior scores at the 2nd, 4th, 6th and 8th day



注:A:肺湿干重比(W/D);B:脾指数;C:胸腺指数。与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与脂多糖组比较,^{NS} $P>0.05$ 。

图 2 造模对小鼠脏器指数的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Note. A, Weight and dry ratio (W/D) in lung. B, Changes in mice spleen weight. C, Changes in mice thymus weight. Compared with normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with LPS group, ^{NS} $P>0.05$.

Figure 2 Effect of modeling on organ index in mice

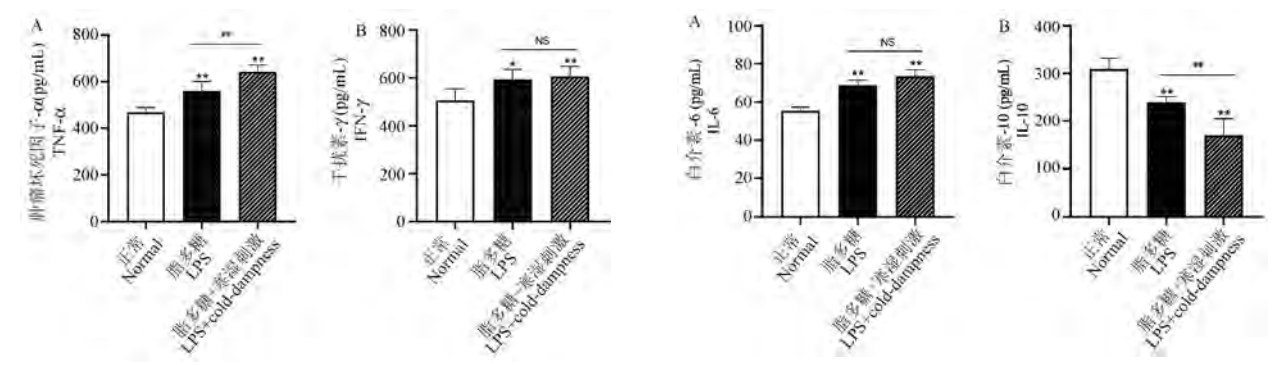


图 3 各组肺组织匀浆中 TNF-α 和 IFN-γ 的水平($\bar{x}\pm s, n=6$)
Note. Compared with normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with LPS group, ^{NS} $P>0.05$, ^{##} $P<0.01$.

Figure 3 Levels of the TNF-α and IFN-γ in lung tissue

图 4 各组肺组织匀浆中 IL-6 和 IL-10 的水平($\bar{x}\pm s, n=6$)
Note. Compared with normal group, ** $P<0.01$. Compared with LPS group, ^{NS} $P>0.05$, ^{##} $P<0.01$.

Figure 4 Levels of the IL-6 and IL-10 in lung tissue

2.5 COX-2/PGE2 通路结果

如图 6 所示,与正常组相比,脂多糖组和脂多糖+寒湿刺激组肺组织中 COX-2 蛋白表达上升,且寒湿刺激增加了 COX-2 蛋白表达水平($P<0.05$)。与正常组相比,脂多糖组和脂多糖+寒湿刺激组肺组织中 PGE2 的水平上升,且加了寒湿刺激后,与脂多糖组相比,PGE2 的水平有显著性差异($P<0.05$)。

2.6 各组小鼠肺组织中 TRPV1 和 TRPA1 蛋白表达情况

与正常组相比,脂多糖组小鼠肺组织 TRPV1 蛋白表达水平明显下调;增加寒湿刺激后,与脂多糖组相比,TRPV1 蛋白表达水平明显下调。见图 7。与对照组比,脂多糖组和脂多糖+寒湿刺激组小鼠肺组织 TRPA1 蛋白表达水平显著上调($P<0.05$),且经寒湿刺激后,TRPA1 蛋白表达水平上升。

3 讨论

在此次新冠肺炎的临床治疗中,岭南地区在中医药使用上,表现出积极的疗效,然而,大部分临床使用处方缺乏动物实验数据支持。其中的主要原因是缺乏相应的动物模型。而中医药治疗病毒性肺炎的方式,重点在于根据疾病证候特点,从而进行辨证论治,在机体整体状态调节上有更多关注^[7-8]。因此,构建符合中医证候、适用于中医药药效评价的动物模型极其重要。相关研究表明,新冠肺炎与细胞因子风暴密切相关^[9]。故而在本研究中,采用脂多糖诱导小鼠产生细胞因子风暴及根据中医理论增加寒湿刺激来模拟新冠肺炎的生理及病理变化。

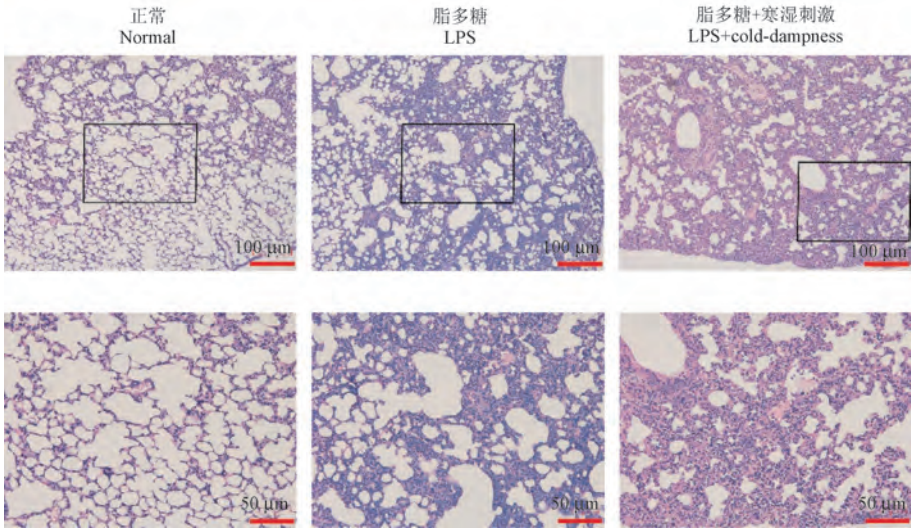
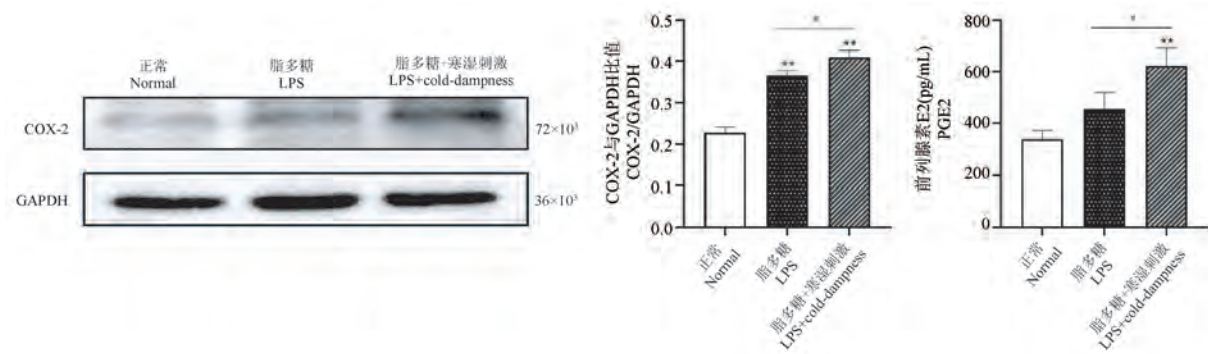
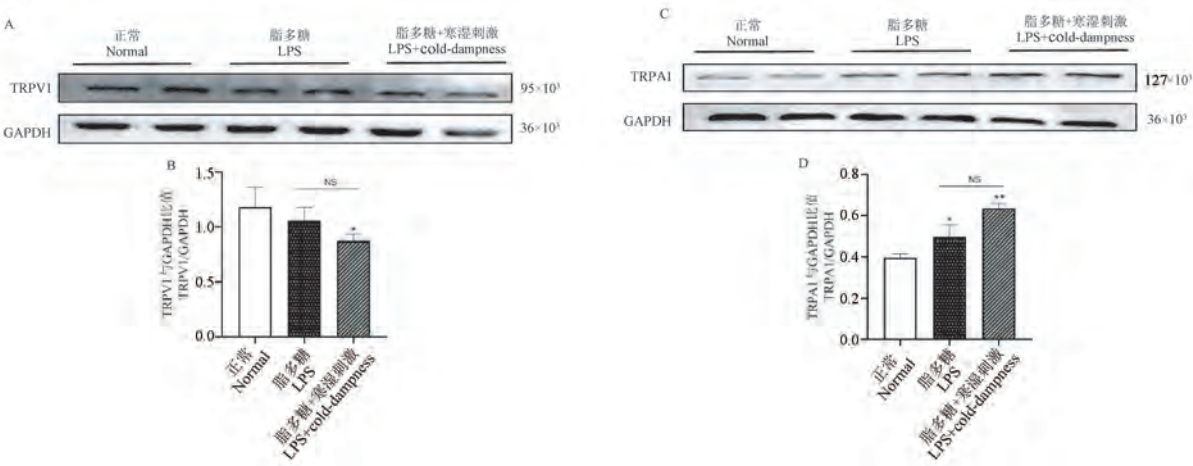


图 5 小鼠肺组织 HE 染色情况
Figure 5 HE staining of mice lung tissues



注:与正常组比较, ** $P<0.01$; 与 LPS 组比较, # $P<0.05$ 。
图 6 各组小鼠肺组织中 COX-2 蛋白表达情况和 PGE2 水平
Note. Compared with normal group, ** $P<0.01$. Compared with LPS group, # $P<0.05$.

Figure 6 COX-2 protein expression and PGE2 level in lung tissues of mice in each group



注:A:TRPV1 蛋白印记条带图;B:TRPV1 蛋白表达量;C:TRPA1 蛋白印记条带图;D:TRPA1 蛋白表达量。与正常组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与 LPS 组比较,^{NS}*P*>0.05。

图 7 各组小鼠肺组织中 TRPV1 和 TRPA1 蛋白表达情况

Note. A, Western blot strip of TRPV1. B, Protein expression of TRPV1. C, Western blot strip of TRPA1. D, Protein expression of TRPA1. Compared with normal group, **P*<0.05, ***P*<0.01. Compared with LPS group, ^{NS}*P*>0.05.

Figure 7 Protein expression of TRPV1 and TRPA1 in lung tissues of mice in each group

本研究中,在中医寒湿证表现方面,脂多糖+寒湿刺激模型小鼠从造模第 6 天开始,小鼠出现扎堆不动、蜷卧笼角、减少活动、精神状态颓唐等这些表现均符合文献报道中寒湿证动物模型的特征^[10-11],且与临床患者状态相似^[12]。

实验结果表明,造模后,脂多糖+寒湿刺激组的 W/D 值与正常组相比有统计学差异,说明小鼠的肺水肿比较严重。对于脾指数和胸腺指数,因为胸腺和脾是重要的免疫器官,检测其脏器指数可间接在一定程度上反映机体免疫功能的状态。实验中脂多糖+寒湿刺激组小鼠脾指数和胸腺指数明显高于正常组,可能是免疫功能紊乱,使胸腺、脾代偿性增生。与脂多糖组相比,脂多糖+寒湿刺激组的脾指数有下降趋势,说明寒湿刺激可能会降低脾的免疫功能。

本实验通过 HE 染色直观展现小鼠肺组织损伤情况,发现脂多糖组小鼠和脂多糖+寒湿刺激组小鼠肺组织明显出现水肿、肺泡结构发生破坏、炎性细胞浸润等病理学现象,这些病理学现象的改变与临床中肺炎的病理学表现一致。模型小鼠 TNF-α、IFN-γ 和 IL-6 显著升高,与冠状病毒感染的肺炎临床表现一致^[13-14]。

TNF-α、IL-6 等细胞因子可诱导 COX-2 表达,导致 PGE2 水平增高,PGE2 对肺泡细胞发挥细胞抑制和毒性效应^[15]。本研究发现寒湿刺激能够明显增

加肺 COX-2 蛋白表达水平,提示寒湿刺激可能通过激活 COX-2/PGE2 通路的表达来加重肺损伤。

对于实验数据中,脂多糖+寒湿刺激小鼠模型比脂多糖模型的炎症更加严重,猜测与瞬时受体电位通道有关。相关研究表明,TRPV1、TRPA1 属于瞬时受体电位通道家族成员,TRPV1 可被辣椒素激活,也能被伤害性热刺激(>43℃)和低 pH (pH < 6.0)活化,而 TRPA1 主要参与 18℃ 以下的损伤性冷感受,两者在呼吸系统也有较为广泛的表达^[16-17]。有研究发现,TRPV1 能够通过降低 CD11b 的表达,从而降低大鼠肺组织中单核及中性粒细胞炎症趋向性,抑制炎症扩散^[18]。

通过实验数据,可以知道寒湿环境因素可能通过上调 TRPA1 蛋白的表达水平来加重炎症反应。此外,蛋白印迹法结果显示,相比于脂多糖组,增加寒湿刺激后可下调 TRPV1 蛋白表达,提示寒湿刺激可能通过抑制 TRPV1 蛋白表达来加重小鼠的肺损伤。

本研究显示,脂多糖+寒湿刺激模型小鼠能够模拟新冠肺炎的临床变化,包括外观和行为表征、肺部病理学变化、肺部炎性细胞因子水平,为中医理论下岭南地区的新冠肺炎病证提供可能的动物模型。且在瞬时受体电位方向为寒湿环境如何加重小鼠肺组织损伤提供浅显的证明,具体的机制机理还需要更加深入的研究。

参考文献:

[1] 陈光敏. 新型冠状病毒性肺炎的病因病位病机、治法方药 [J]. 中医临床研究, 2020, 12(8): 24-27.

[2] 仝小林, 李修洋, 赵林华, 等. 从“寒湿疫”角度探讨新型冠状病毒肺炎的中医药防治策略 [J]. 中医杂志, 2020, 61(6): 465-470, 553.

[3] 李健东, 苏楚音, 郑黎明, 等. 岭南地区中医药预防新型冠状病毒肺炎临床思路与探讨 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(8): 11-13.

[4] 欧健钊. 扶正宣肺化湿方对新型冠状病毒肺炎的临床观察 [J]. 中国处方药, 2021, 19(3): 127-130.

[5] 樊启猛, 潘雪, 贺玉婷, 等. 中药及其复方对病毒性肺炎的免疫调节作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2065-2074.

[6] 耿子涵, 包蕾, 郭姗姗, 等. 人冠状病毒 229E 寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠模型的建立及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 3-12, 67.

[7] 王月, 孙丹, 孙婉莹, 等. “扶正祛邪”在新型冠状病毒肺炎治疗中的应用 [J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37(6): 1223-1225.

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

[9] Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19 [J]. J Infect, 2020, 80(6): 607-613.

[10] 王常松, 吴同玉, 陈学习, 等. 寒湿困脾证动物模型的建立和评价 [J]. 上海中医药大学学报, 2011, 25(5): 75-78.

[11] 章敏, 陈刚, 王勇, 等. 外湿致病动物模型研制探讨 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(4): 748-750.

[12] 陈一晖, 李武. 新冠肺炎 (Covid-19) 的临床症状、临床分类与诊断 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(8): 3904-3907.

[13] Li X, Xu S, Yu M, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan [J]. J Allergy Clin Immunol, 2020, 146(1): 110-118.

[14] Wang J, Jiang M, Chen X, et al. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts [J]. J Leukoc Biol, 2020, 108(1): 17-41.

[15] 归改霞. 贝母素甲对急性肺损伤小鼠 COX-2、PGE2 以及 NO 时间表达的影响 [J]. 中医临床研究, 2016, 8(34): 11-13.

[16] 胡方媛, 范玉浩, 范欣生, 等. 厚朴麻黄汤对哮喘小鼠气道炎症及 TRPA1、TRPV1 mRNA 与蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1): 37-42.

[17] Zhang Y, Zhang D, Qin C. Animal models and experimental medicine and the nobel prize in physiology or medicine 2021-TRPV and PIEZO receptors for temperature and touch sensation [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 297-299.

[18] Monneret G, Arpin M, Venet F, et al. Calcitonin gene related peptide and N-procalcitonin modulate CD11b upregulation in lipopolysaccharide activated monocytes and neutrophils [J]. Intensive Care Med, 2003, 29(6): 923-928.

[收稿日期] 2022-03-03

赵崙机,樊圃. 精氨酸加压素 1b 受体敲除对雌性大鼠焦虑和社交行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 69–75.
Zhao YJ, Fan P. Effects of arginine vasopressin 1b receptor knockout on anxiety behavior and social behavior in female rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 69–75.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.010

精氨酸加压素 1b 受体敲除对雌性大鼠焦虑和社交行为的影响

赵崙机,樊圃*

(中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室,北京 100005)

【摘要】 目的 探究精氨酸加压素 1b 受体(arginine vasopressin 1b receptor, *Avpr1b*)基因敲除对雌性大鼠血浆皮质酮含量、焦虑和社交行为的影响。**方法** 以精氨酸加压素 1b 受体敲除(*Avpr1b*^{KO})和野生型(wild type, WT)的 SD 雌性大鼠为研究对象,首先采用原位杂交技术检测 WT 和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠大脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)与视上核(supraoptic nucleus, SON)中精氨酸加压素 1b 受体的表达水平;采用高效液相色谱串联高分辨质谱分析 WT 和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠静息状态下血浆皮质酮含量;通过旷场实验中 WT 和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠进入中心区域的时间、次数,以及高架十字迷宫实验中 WT 和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠进入开放臂的时间和次数来评价大鼠的焦虑水平;通过三箱实验中 WT 和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠探索陌生大鼠的时间来评价大鼠社交能力;并根据 WT 和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠探索熟悉程度不同陌生大鼠的时间来评价大鼠社交新颖性。**结果** 在 *Avpr1b*^{KO} 大鼠室旁核与视上核脑区精氨酸加压素 1b 受体均无表达;静息状态下, *Avpr1b*^{KO} 大鼠血浆中皮质酮含量较 WT 大鼠无差异($P>0.05$);旷场实验中 *Avpr1b*^{KO} 大鼠进入中心区域的时间、次数与 WT 大鼠无差异($P>0.05$);高架实验中 *Avpr1b*^{KO} 大鼠进入开放臂区域的时间、次数与 WT 大鼠无差异($P>0.05$);在三箱实验中 *Avpr1b*^{KO} 大鼠的社交能力指数与 WT 大鼠的社交能力指数无显著差异($P>0.05$);同时 *Avpr1b*^{KO} 大鼠的社会新颖指数与 WT 大鼠的社会新颖指数无显著差异($P>0.05$)。**结论** 精氨酸加压素 1b 受体敲除不影响雌性大鼠静息状态下血浆中皮质酮含量、焦虑水平、社交能力以及社交新颖性。

【关键词】 精氨酸加压素 1b 受体;雌性大鼠;焦虑水平;社交行为
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0069-07

Effects of arginine vasopressin 1b receptor knockout on anxiety behavior and social behavior in female rats

ZHAO Yinji, FAN Pu*

(State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of arginine vasopressin 1b receptor (*Avpr1b*) gene knockout on the plasma corticosterone level, anxiety, and social behaviors in female rats. **Methods** Female *Avpr1b* knockout (*Avpr1b*^{KO}) and wildtype (WT) SD rats were used. First, the expression levels of *Avpr1b* in the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON) of the brains of WT and *Avpr1b*^{KO} rats were examined by performing *in situ* hybridization. The basal plasma corticosterone levels of WT and *Avpr1b*^{KO} rats were then analyzed by conducting high-

[基金项目] 中国医学科学院与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-034);国家重点实验室专项(2060204);中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2017RC31010)。
[作者简介] 赵崙机(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:神经生物学。E-mail:18730277187@163.com
[通信作者] 樊圃(1985—),女,助理研究员,博士,研究方向:共情行为的神经环路机制研究。E-mail:pu.fan@ibms.edu.cn

performance liquid chromatography tandem high-resolution mass spectrometry. Additionally, the anxiety levels of rats were evaluated by using an open field test and elevated plus maze test. Finally, the social ability and social novelty of WT and *Avpr1b*^{KO} rats were measured by performing a three-chamber experiment. **Results** There was no expression of *Avpr1b* in paraventricular nucleus or supraoptic nucleus of *Avpr1b*^{KO} rats. The basal plasma corticosterone level of *Avpr1b*^{KO} rats was not significantly different from that of WT rats ($P>0.05$). The duration and bouts of *Avpr1b*^{KO} rats entering the central area in the open field experiment were not different from those of WT rats ($P>0.05$). Similarly, the duration and bouts of *Avpr1b*^{KO} rats entering the open arm area in the elevated plus maze were not different from those of WT rats ($P>0.05$). In the social interaction experiment, the sociability index of *Avpr1b*^{KO} rats was not different from that of WT rats ($P>0.05$). In the social novelty experiment, the social novelty index of *Avpr1b*^{KO} rats was not different from that of WT rats ($P>0.05$). **Conclusions** A knockout of *Avpr1b* in female SD rats does not affect their basal plasma corticosterone level, anxiety level, sociability, or interest in social novelty.

[Keywords] arginine vasopressin 1b receptor; female rats; anxiety level; social behavior

精氨酸加压素 (arginine vasopressin, AVP), 简称为加压素, 也称为抗利尿激素。加压素主要在下丘脑室旁核和视上核中合成^[1], 经由神经垂体后叶释放于血液中, 通过作用于动脉血管和肾的 *Avpr1a* 和 *Avpr2* 受体来调节动脉压和水的再吸收。同时精氨酸加压素也会通过作用于垂体前叶的 *Avpr1b* 受体来促进促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotropin-releasing-hormone, CRH) 和促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 的分泌以及通过激活位于肾上腺髓质的 *Avpr1b* 受体释放儿茶酚胺 (catecholamine, CA), 在应激和焦虑中发挥多重调节作用^[2]。

研究表明, 在哺乳类中枢神经系统中仅存在 *Avpr1a* 和 *Avpr1b* 受体, 其中 *Avpr1b* 受体不仅参与调控下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) 的活性^[3], 还通过调控其它脑区来影响啮齿动物的焦虑水平及多种行为。如向基底外侧杏仁核 (basolateral amygdala, BLA) 注射 *Avpr1b* 受体拮抗剂之后, 发现大鼠焦虑程度降低, 向中央杏仁核 (central amygdala, CEA) 注射 *Avpr1b* 受体拮抗剂之后有抗抑郁的作用^[4]。此外 *Avpr1b* 受体还调节社会行为, 如 *Avpr1b* 受体缺失导致攻击性增强^[5], 并且 *Avpr1b* 受体在控制情绪识别^[6]、社会动机^[7]、母婴照顾^[8] 等方面都起到了重要作用。

研究表明, 室旁核加压素神经元缺失会使雄性小鼠焦虑水平升高, 但不影响雌性小鼠的焦虑行为^[9]。研究表明, 向侧间隔 (lateral septal nucleus, LS) 脑区注射 AVP, 可增强幼年雄性大鼠的社会认知, 但对雌性大鼠社会认知没有影响^[10]。并且 AVP 调控攻击行为具有性别特异性^[11], 提示 AVP 在调节焦虑水平和社会行为方面存在性别差异。大脑

中的 AVP 发挥功能依赖于 AVP 在大脑中的受体, 这暗示着精氨酸加压素的受体在调节焦虑以及社会行为方面也可能存在着性别差异。已有文献报道在 *Avpr1a* 受体敲除小鼠中焦虑水平存在性别差异^[12], 但 *Avpr1b* 受体对焦虑水平的调控是否存在性别差异并无研究报道, 以往研究多针对雄性中 *Avpr1b* 受体敲除的对焦虑以及社会行为的影响, 对于 *Avpr1b* 受体敲除在雌性中对焦虑以及社会行为造成影响的研究较少。一些精神疾病的发病率存在性别差异, 例如女性被诊断出患有焦虑症的频率是男性的 2.25 倍^[13], 关注雌性动物可能会解释发病率中的性别差异, 并提供针对不同性别的治疗方法。但目前多数研究缺乏对雌性动物的关注, 因此, 本研究采用雌性大鼠作为模式动物研究敲除 *Avpr1b* 受体对雌性大鼠焦虑以及社会行为的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 10 周龄的 *Avpr1b*^{KO} 雌性 SD 大鼠和野生型雌性 SD 大鼠各 12 只, 体重 210~230 g。SPF 级 SD 大鼠, 购于北京维通利华 [SCXK (京) 2021-0006], 使用 CRISPR/Cas9 技术构建了 *Avpr1b*^{KO} 的 SD 大鼠, 由北京大学饶毅实验室惠赠。后进行扩大繁殖, 通过 *Avpr1b*^{+/-} 杂合子交配得 WT 和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠。大鼠饲养和行为实验均在中国军事医学研究院国家蛋白质科学中心 SPF 级动物房 [SYXK (军) 2020-0002] 进行, 饲养温度为 (25±2) °C, 湿度控制在 40%~60%, 暗周期为中午 12:00-24:00。本实验所有动物饲养和行为实验均符合实验动物“3R”原则, 经中国医学科学院基础医学研究所动物伦理委员会批准 (IACUC-A01-2021-048)。

1.2 主要试剂与仪器

Denharts(赛默飞,美国,批号:2191092);Yeast RNA(罗氏,美国,批号:50678421);Herring sperm DNA(赛默飞,美国,批号:2149750);DIG RNA Labeling Mix(罗氏,美国,批号:39354521);Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments(罗氏,美国,批号:32871922)。Bond Elut Plexa 柱(安捷伦,美国,批号:6588422-02);冰冻切片机(徠卡,德国,型号:CM3050s);三重四极杆液质联用系统(安捷伦,美国,型号:6495C);正置显微镜(徠卡,德国,型号:DM6B);旷场装置(上海欣软,中国,型号:XR-XZ301);高架十字迷宫装置(上海欣软,中国,型号:XR-XG201)。

1.3 实验方法

1.3.1 *AvpR1b*^{KO} 大鼠鉴定

剪取出生第 10 天左右的大鼠脚趾,进行加入蛋白酶 K 进行裂解。根据 NCBI 中 *AvpR1b* 基因序列设计引物,引物序列为:F:5'-CTCCTTTCATTGTCCTTTCATC-3';R:5'-CAGGTTCTGTAGATCTC GTGGC-3'。反应程序为:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 25 s,72℃ 延伸 60 s,进行 35 个循环,72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存,扩增产物使用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳。

1.3.2 原位杂交

根据 NCBI 中的 *AvpR1b* 基因序列设计并制备探针。*AvpR1b*^{KO} 和 WT 大鼠各 3 只,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(4 mL/kg)后进行心脏灌流,剥离脑组织。于 4℃ 环境下利用多聚甲醛灌注液固定 24 h,后利用蔗糖对组织进行梯度脱水。取出脱水组织,用冷冻切片剂包埋,进行冠状切片。贴片后将干燥的脑片在 50℃ 烘箱中烘烤 20~30 min。加入 4% 多聚甲醛溶液,室温放置 20 min。浸入磷酸缓冲盐溶液中 5 min。加蛋白酶 K 缓冲液,室温放置 10 min。浸入磷酸缓冲盐溶液中 5 s。加 4% 多聚甲醛溶液,室温放置 10 min。浸入磷酸缓冲盐溶液中 5 min。加入三乙胺缓冲液,室温放置 10 min。浸入磷酸缓冲盐溶液中 5 min。加入预杂交液,室温放置 1 h。加入制备好的探针,混匀后置于 85℃ 金属浴锅中 5 min,随后立即放入冰水混合物中 3 min,震荡混匀后,将混合均匀的杂交液加入到载玻片,盖上盖玻片,置于 65℃ 水浴锅中孵育 12~16 h。划掉盖玻片,在 65℃ 的缓冲液中浸泡 60 min。在室温的缓冲溶液中分别浸泡 5 min。加入含有羊血清的缓冲液室

温放置 1 h。加入抗地高辛并携带碱性磷酸酯酶标记的探针,在湿盒中 4℃ 孵育过夜。在室温的缓冲液中浸泡 20 min。脑片加入碱性磷酸酯酶显色反应液,湿盒中孵育 2 h。后用磷酸缓冲盐溶液冲洗,停止反应后封片。使用徠卡正置显微镜 DM6B 显微镜的 20 倍镜头拍摄。

1.3.3 高效液相色谱法测皮质酮含量

用皮质酮标准品制备 10、20、30、40、50 ng/mL 的标准品,进行标准曲线的绘制。测试样品为静息状态下 *AvpR1b*^{KO} 和 WT 雌性大鼠经尾静脉取血得到的血清。使用安捷伦公司 Agilent Bond Elut Plexa 30 mg,1 mL 小柱进行样品前处理。处理后样品使用高效液相色谱串联高分辨质谱检测血清中皮质酮含量。测试参数为:C₈ 色谱柱,柱温为 35℃,流动相 A 为水+1% 甲酸,流动相 B 为甲醇+1% 甲酸,流速为 0.3 mL/min,液相梯度为:80%~0% A,20%~100% B,0~4 min;100% B,4~6 min;0%~80% A,100%~20% B,6~8 min。

1.3.4 旷场实验

旷场测试箱尺寸为 100 cm×100 cm×50 cm,将大鼠放入测试箱的中心区域,摄像机记录其探索旷场过程 5 min,利用 Anymaze 软件分析其进入中心区域的时间和次数。

1.3.5 高架十字迷宫实验

高架十字迷宫由两个开放臂、两个闭合臂和中央平台组成,将大鼠头部正对开放臂放入高架十字迷宫。摄像记录其 5 min 内运动轨迹,利用 Anymaze 软件分析其进入开放臂区域的时间和次数。

1.3.6 位置偏好实验

三箱实验设备为 100 cm×40 cm×30 cm,由一个中央室和左右两个侧室组成,大鼠可以通过中央室和侧室的开口自由探索整个设备,在左右侧室中各有一个空的束缚器,将大鼠放入中央室。使大鼠自由地探索 10 min,记录并分析其进入左右侧室的时间。将大鼠进入左右侧室的总时间作为分母,大鼠进入左侧室的时间作为分子,计算位置偏好指数。

1.3.7 社交能力测试实验

将大鼠放入中央室,此时一侧室的束缚器中有一只同年龄同性别的陌生大鼠 1,另一侧室中的束缚器没有大鼠。使大鼠自由地探索 10 min,记录并分析其探索陌生大鼠和空束缚器的时间。将大鼠探索空束缚器和陌生大鼠 1 的总时间作为分母,将

大鼠探索陌生大鼠 1 的时间作为分子,计算社交能力指数。

1.3.8 社会新颖性测试实验

将大鼠放入中央室,此时左右侧室中其中一侧室束缚器中是陌生大鼠 1 保持不变,另一侧室中的束缚器中有一只新的同年龄同性别的陌生大鼠 2。使大鼠自由探索 10 min,记录并分析其探索陌生大鼠 1 和陌生大鼠 2 的时间。将大鼠探索陌生大鼠 2 和陌生大鼠 1 的总时间作为分母,将大鼠探索陌生大鼠 2 的时间作为分子,计算社交新颖性指数。

1.4 统计学方法

本研究所得数据采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析并作图,计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。使用 *t* 检验进行组间数据比较, $P<0.05$ 表示具有显著差异, $P<0.01$ 表示具有极显著差异。

2 结果

2.1 *Avpr1b*^{KO} 大鼠的鉴定

PCR 鉴定结果如图 1 所示,WT 大鼠 PCR 产物大小为 883 bp,而 *Avpr1b*^{KO} 大鼠 PCR 产物大小为 786 bp,PCR 表明 *Avpr1b*^{KO} 大鼠中 *Avpr1b* 基因第一外显子中 97 bp 序列被成功敲除。利用探针大鼠室旁核与视上核脑区的 *Avpr1b* 受体进行原位杂交,结果如图 2 所示,*Avpr1b*^{KO} 雌性大鼠室旁核与视上核不表达 *Avpr1b* 受体。

2.2 *Avpr1b* 基因敲除对大鼠静息状态下皮质酮含量的影响

静息状态下的 WT 大鼠和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠血浆中皮质酮含量如图 3 所示。WT 雌性大鼠在静息状态下血浆皮质酮含量与 *Avpr1b*^{KO} 雌性大鼠在静息状态下血浆皮质酮含量无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 *Avpr1b* 基因敲除对大鼠焦虑水平的影响

在旷场实验中,WT 大鼠和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠进入中心区域的时间和次数如图 4 所示。与 WT 雌性大

鼠相比,*Avpr1b*^{KO} 大鼠探索中心区域的时间和次数无显著性差异($P>0.05$)。

在高架十字迷宫实验中,WT 雌性大鼠和 *Avpr1b*^{KO} 雌性大鼠进入开放臂区域的时间和次数如图 5 所示。与 WT 雌性大鼠相比,*Avpr1b*^{KO} 大鼠进入开放臂区域的次数无显著性差异($P>0.05$),进入开放臂区域的时间也无统计学上的差异($P>0.05$)。

2.4 *Avpr1b* 基因敲除对大鼠社交能力的影响

在位置偏好实验中,如图 6 所示,WT 大鼠和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠进入左室和右室的时间总和和无显著性差异($P>0.05$)。同时,WT 和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠的位置偏好指数无显著性差异($P>0.05$),证明 *Avpr1b*^{KO} 大鼠具有正常的位置偏好。

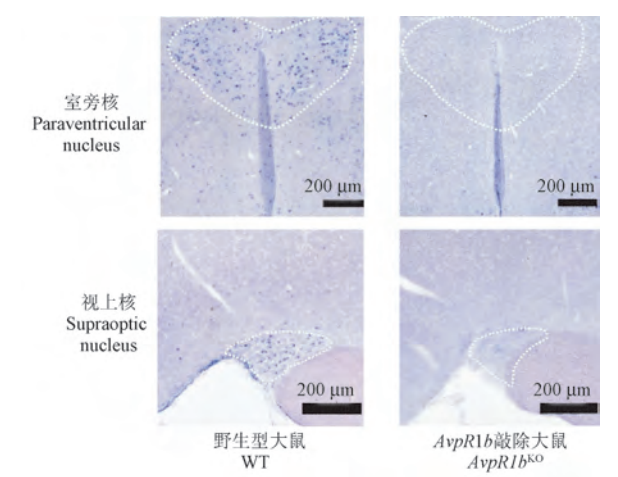


图 2 *Avpr1b* 基因敲除对大鼠室旁核和视上核精氨酸加压素 1b 受体表达的影响
Figure 2 Effect of *Avpr1b* gene knockout on *Avpr1b* expression level in PVN and SON

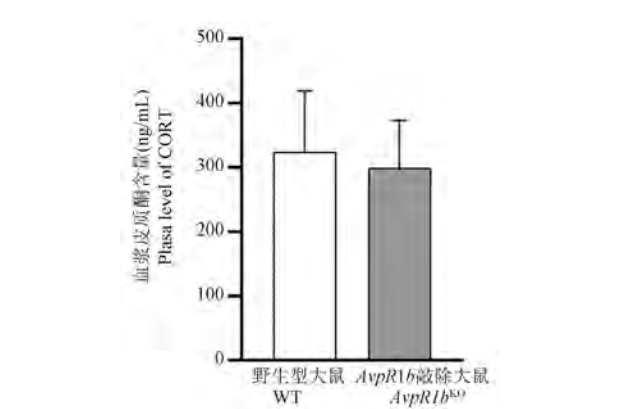


图 3 *Avpr1b* 基因敲除对大鼠静息状态下皮质酮含量的影响
Figure 3 Effect of *Avpr1b* gene knockout on basal corticosterone (CORT) content in rats

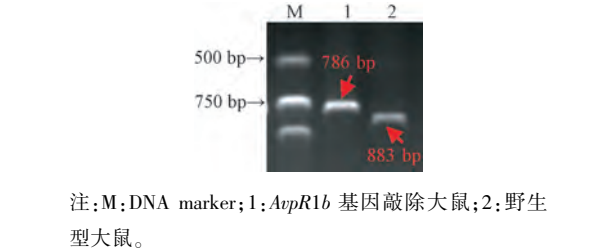


图 1 *Avpr1b*^{KO} 大鼠的鉴定
Note. M, DNA marker. 1, *Avpr1b*^{KO} rats. 2, WT rats.
Figure 1 Identification of *Avpr1b*^{KO} rats

在社会互动能力实验中,如图 7 所示,WT 大鼠和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠探索空室和陌生大鼠 1 的时间总和和无显著性差异 ($P>0.05$)。同时,WT 大鼠和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠的社交能力指数无显著性差异 ($P>0.05$),证明 *Avpr1b*^{KO} 雌性大鼠具有正常的社交能力。

2.5 *Avpr1b* 基因敲除对大鼠社会新颖性的影响

在社会新颖性的测试中,如图 8 所示,WT 大鼠和 *Avpr1b*^{KO} 大鼠探索熟悉程度高的陌生大鼠 1 和熟悉程度低的陌生大鼠 2 的时间总和和无差异 ($P>0.05$)。同时 WT 和 *Avpr1b*^{KO} 雌性大鼠的社会新颖性指数无显著性差异 ($P>0.05$),证明 *Avpr1b*^{KO} 雌性大鼠的具有正常的社会新颖性。

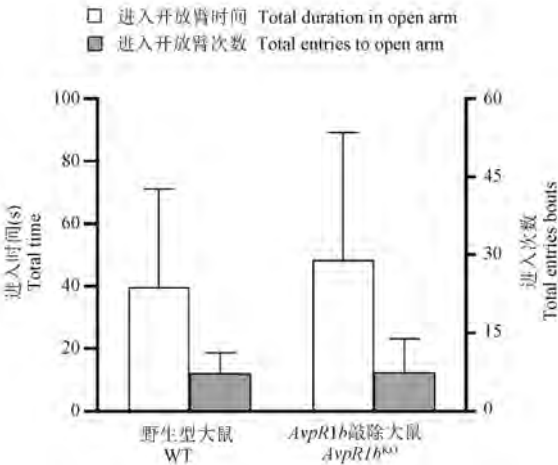


图 5 *Avpr1b* 基因敲除对大鼠探索高架十字迷宫开放臂时间和次数的影响
Figure 5 Effects of *Avpr1b* gene knockout on open arm exploring duration and entries in EPM in rats

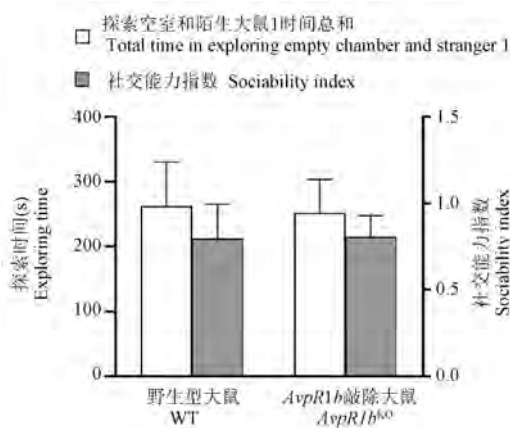


图 7 *Avpr1b* 基因敲除对大鼠社交能力的影响
Figure 7 Effects of *Avpr1b* gene knockout on sociability in rats

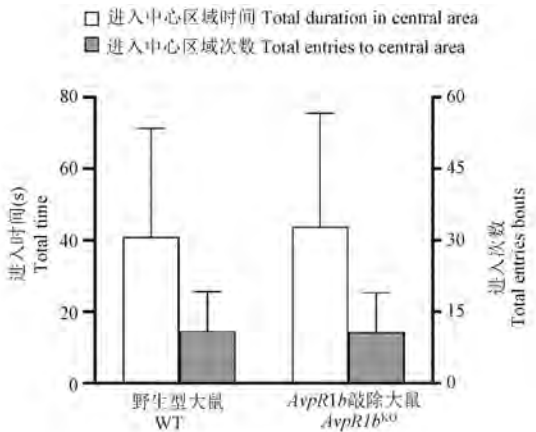


图 4 *Avpr1b* 基因敲除对大鼠探索旷场中心区域时间和次数的影响
Figure 4 Effects of *Avpr1b* gene knockout on central zone exploring duration and entries in OFT in rats

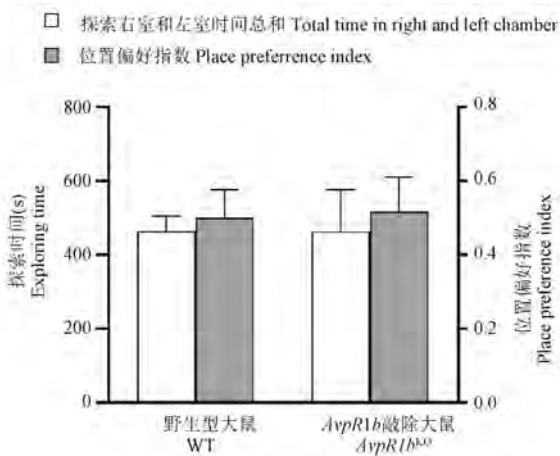


图 6 *Avpr1b* 基因敲除对大鼠位置偏好的影响
Figure 6 Effects of *Avpr1b* gene knockout on location preference in rats

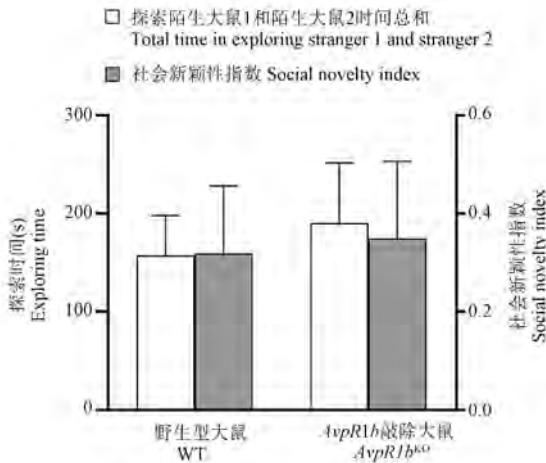


图 8 *Avpr1b* 基因敲除对大鼠社会新颖性的影响
Figure 8 Effects of *Avpr1b* gene knockout on social novelty in rats

3 讨论

AvpR1b 受体在大脑中分布广泛,研究表明 AvpR1b 受体存在于室旁核、视上核以及海马等区域^[14]。本研究利用原位杂交方法验证了在 WT 大鼠室旁核和视上核脑区存在 AvpR1b 受体,而 *AvpR1b*^{KO} 雌性大鼠的室旁核和视上核脑区不存在 AvpR1b 受体,并且 PCR 结果显示 *AvpR1b* 第一外显子 97 bp 敲除成功。因而 *AvpR1b*^{KO} 鼠可用于研究 *AvpR1b* 的缺失对雌性大鼠静息状态下血浆中皮质酮含量、焦虑水平以及社交能力的影响。

下丘脑-垂体-肾上腺轴在维持基础和应激状态下的内环境平衡中起着重要作用。在 HPA 轴中,AvpR1b 受体表达于垂体前叶和肾上腺髓质,有调控激素释放的作用。本研究发现,在静息状态下 WT 雌性大鼠与 *AvpR1b*^{KO} 雌性大鼠血浆中的皮质酮含量没有差异。在雄鼠的研究中,WT 雄性小鼠与 *AvpR1b*^{KO} 雄性小鼠在静息状态下的皮质酮含量也无显著性差异^[15],表明 AvpR1b 受体的缺失不影响 HPA 轴的基础调节能力。但在面临长期压力或有害刺激的情况下,AvpR1b 受体的缺失会损害 HPA 轴的反应,例如在强迫游泳以及束缚压力后,*AvpR1b*^{KO} 雄性小鼠血浆中促肾上腺皮质激素水平较 WT 雄性小鼠血浆中促肾上腺皮质激素水平显著下降^[16]。提示着 AvpR1b 受体在 HPA 轴应对刺激中起到调控作用。

旷场与高架十字迷宫实验可以测试动物焦虑水平,进入旷场中央区域和开放臂区域的时间和次数显示焦虑程度,进入时间越长、次数越多表明焦虑程度越低。在本实验中,与 WT 组相比,*AvpR1b*^{KO} 大鼠未表现出焦虑样表型。这与 *AvpR1b*^{KO} 雄性小鼠焦虑水平不变的结论相符合^[5,17]。但在向雄性小鼠腹腔注射 AvpR1b 受体拮抗剂会降低焦虑水平^[18],转基因大鼠和药理学数据之间的差异可能由于转基因大鼠 AvpR1b 受体在其整个发育过程中的缺失,引起了代偿作用。

三箱行为实验中,啮齿类动物通常花费更多时间去探索同类,而在陌生鼠和熟悉鼠之间,更偏向于选择探索陌生大鼠^[19]。本实验中 *AvpR1b*^{KO} 和 WT 大鼠都具有正常的社交能力与社交新颖性。符合雄性小鼠具有正常的社会互动性^[20]和社交新颖性^[5]的研究。本实验中 *AvpR1b*^{KO} 大鼠在短期内能够识别出与其进行互动过的鼠,证明 *AvpR1b*^{KO} 大鼠

短期社交记忆正常。更多关于 AvpR1b 受体的研究则聚焦于长期的社交记忆形成中,研究报道 *AvpR1b*^{KO} 雄性小鼠的长期社交记忆受到了损伤^[5],具体表现为 *AvpR1b*^{KO} 雄性小鼠不能识别出 30 min 之前进行过社会互动的鼠。特异性激活海马 AvpR1b 神经元延长了社交记忆的维持时间^[21]。这些研究结果提示,AvpR1b 受体在长期社交记忆形成中起到了重要作用,而对社交能力与社交新颖性无显著影响。

综上所述,*AvpR1b* 基因敲除降低了 AvpR1b 受体在室旁核与视上核的表达,不影响雌性大鼠的焦虑行为、社会互动能力与社交新颖性。

本研究测试了 *AvpR1b*^{KO} 雌性大鼠基础焦虑水平与社交水平,结果表明缺失 *AvpR1b* 基因并不影响这些行为,为深入研究 *AvpR1b*^{KO} 雌性的社会记忆、攻击行为、应激等复杂行为提供了参考依据。本研究聚焦于静息状态下的焦虑与社交水平,而 AvpR1b 受体还参与 HPA 轴的动态活动的调控,并且 HPA 轴在应激与压力的调节中也起到重要作用^[22]。这提示 AvpR1b 受体有可能参与应激、压力、恐惧状态下的行为调控。所以本研究下一步要对应激、压力状态下 *AvpR1b*^{KO} 大鼠进行行为研究,能帮助我们进一步理解 AvpR1b 受体在调控啮齿类动物行为中的作用。本研究弥补了对 *AvpR1b*^{KO} 大鼠基础焦虑和社交行为研究中的雌性空缺,与 *AvpR1b*^{KO} 雄性小鼠表现出类似的行为特征。但大鼠与小鼠之间存在物种差异,为排除物种差异对行为的影响,后续需要测试 *AvpR1b*^{KO} 雄性大鼠的基础焦虑以及社交行为进行后,再对性别差异进行比较。

参考文献:

- [1] Iovino M, Giagulli VA, Licchelli B, et al. Synaptic inputs of neural afferent pathways to vasopressin- and oxytocin-secreting neurons of supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2016, 16 (4): 276-287.
- [2] Demissele J, Fage N, Radermacher P, et al. Vasopressin and its analogues in shock states: a review [J]. *Ann Intensive Care*, 2020, 10(1): 9.
- [3] Koshimizu TA, Nakamura K, Egashira N, et al. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems [J]. *Physiol Rev*, 2012, 92(4): 1813-1864.
- [4] Salomé N, Stemmelin J, Cohen C, et al. Differential roles of amygdaloid nuclei in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of the V1b receptor antagonist, SSR149415, in rats [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2006, 187(2): 237-244.

- [5] Wersinger SR, Ginns EI, O'carroll AM, et al. Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice [J]. *Mol Psychiatry*, 2002, 7(9): 975-984.
- [6] Wu N, Shang S, Su Y. The arginine vasopressin V1b receptor gene and prosociality: Mediation role of emotional empathy [J]. *Psych J*, 2015, 4(3): 160-165.
- [7] Wersinger SR, Kelliher KR, Zufall F, et al. Social motivation is reduced in vasopressin 1b receptor null mice despite normal performance in an olfactory discrimination task [J]. *Horm Behav*, 2004, 46(5): 638-645.
- [8] Bayerl DS, Klampfl SM, Bosch OJ. Central V1b receptor antagonism in lactating rats; impairment of maternal care but not of maternal aggression [J]. *J Neuroendocrinol*, 2014, 26(12): 918-926.
- [9] Rigney N, Whylings J, De Vries GJ, et al. Sex Differences in the control of social investigation and anxiety by vasopressin cells of the paraventricular nucleus of the hypothalamus [J]. *Neuroendocrinology*, 2021, 111(6): 521-535.
- [10] Veenema AH, Bredewold R, De Vries GJ. Vasopressin regulates social recognition in juvenile and adult rats of both sexes, but in sex- and age-specific ways [J]. *Horm Behav*, 2012, 61(1): 50-56.
- [11] Terranova JJ, Ferris CF, Albers HE. Sex differences in the regulation of offensive aggression and dominance by arginine-vasopressin [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017, 8: 308.
- [12] Bielsky IF, Hu SB, Young LJ. Sexual dimorphism in the vasopressin system; lack of an altered behavioral phenotype in female V1a receptor knockout mice [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 164(1): 132-136.
- [13] Bekker MH, Van Mens-Verhulst J. Anxiety disorders; sex differences in prevalence, degree, and background, but gender-neutral treatment [J]. *Gend Med*, 2007, 4: 178-193.
- [14] Corbani M, Marir R, Trueba M, et al. Neuroanatomical distribution and function of the vasopressin V1B receptor in the rat brain deciphered using specific fluorescent ligands [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2018, 258: 15-32.
- [15] Lolait SJ, Stewart LQ, Jessop DS, et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in mice lacking functional vasopressin V1b receptors [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(2): 849-856.
- [16] Stewart LQ, Roper JA, Young WS 3rd, et al. Pituitary-adrenal response to acute and repeated mild restraint, forced swim and change in environment stress in arginine vasopressin receptor 1b knockout mice [J]. *Neuroendocrinol*, 2008, 20(5): 597-605.
- [17] Egashira N, Tanoue A, Higashihara F, et al. Disruption of the prepulse inhibition of the startle reflex in vasopressin V1b receptor knockout mice; reversal by antipsychotic drugs [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2005, 30(11): 1996-2005.
- [18] Griebel G, Simiand J, Serradeil-Le Gal C, et al. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(9): 6370-6375.
- [19] 孙秀萍, 杨久山, 张楠, 等. 慢性皮质酮处理对小鼠学习记忆和突触相关蛋白的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(3): 253-257.
- [20] Yang M, Scattoni ML, Zhodzishsky V, et al. Social approach behaviors are similar on conventional versus reverse lighting cycles, and in replications across cohorts, in BTBR T+tf/J, C57BL/6J, and vasopressin receptor 1B mutant mice [J]. *Front Behav Neurosci*, 2007, 1(1): 1-9.
- [21] Smith AS, Williams Avram SK, Cymerblit-Sabba A, et al. Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory [J]. *Mol Psychiatry*, 2016, 21(8): 1137-1144.
- [22] Stephens MA, Wand G. Stress and the HPA axis; role of glucocorticoids in alcohol dependence [J]. *Alcohol Res*, 2012, 34(4): 468-483.

[收稿日期] 2022-01-21

王蕾,吴旭颖,高玉龙,等. 两个 CBA 亚系流产模型数据比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 76-79, 92.
Wang L, Wu XY, Gao YL, et al. Comparison of abortion model data between two CBA mouse sub-strains [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 76-79, 92.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.011

两个 CBA 亚系流产模型数据比较

王 蕾¹,吴旭颖¹,高玉龙¹,张文明¹,李 斌¹,刘云波^{1,2*}

(1. 北京华阜康生物科技股份有限公司,北京 102202;2. 中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021)

【摘要】 目的 观察了 CBA/J 和 CBA/Ola 两个亚系流产模型数据。10~16 周龄 CBA/J 胚胎吸收率为 12.8%~22.2%高于 10~16 周龄 CBA/Ola 胚胎吸收率的 11.4%~13.0%。**方法** 设计 CBA/J 和 CBA/Ola 两个亚系的流产模型实验,每个亚系分别 6 组动物互配并进行观察。六组中三组为 10 周龄 CBA 组,另外三组为 16 周龄 CBA 组。每个周龄三组包括 CBA 自交组,BALB/c 和 CBA 互配组和 DBA2 和 CBA 互配组。**结果** CBA/J 比 CBA/Ola 成模率高,且 16 周雌性 CBA/J 造模成功率比 10 周雌性 CBA/J 高。CBA/J 和 CBA/Ola 亚系本品系互配都存在胚胎吸收问题,原因还有待于进一步研究。**结论** 16 周 CBA/J 雌鼠更适用于流产模型造模。

【关键词】 CBA/Ola;CBA/J;CBA;流产模型;亚系

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0076-04

Comparison of abortion model data between two CBA mouse sub-strains

WANG Lei¹, WU Xuying¹, GAO Yulong¹, ZHANG Wenming¹, LI Bin¹, LIU Yunbo^{1,2*}

(1. Beijing HFK Bioscience CO., LTD, Beijing 102202, China.
2. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Beijing 100021)

【Abstract】 Objective To observe the abortion model data of the CBA/J and CBA/Ola sub-strains of mice. The Embryo resorption rate of 10~16 weeks CBA/J mice was 12.8%~22.2% higher than 11.4%~13.0% of 10~16 weeks CBA/Ola mice. **Methods** Abortion model experiments on CBA/J and CBA/Ola mice were designed. Each murine subline was matched with six groups of animals and observed. Three of the six groups are 10-week-old female CBA groups and three are 16-week-old female CBA groups. Three groups for each week of age include the mutual mating of CBA, BALB/c and CBA, DBA2 and CBA. **Results** CBA/J mice have a higher Embryo resorption rate compared with CBA/Ola mice, and the Embryo resorption rate of 16-week-old female CBA/J mice is higher than the rate of 10-week-old female CBA/J. Both the CBA/J and CBA/Ola murine sublines have embryo absorption problems in their mutual mating, the reasons for which need to be further studied. **Conclusions** 16-week-old CBA/J female mice are more suitable for the establishment of abortion models.

【Keywords】 CBA/ola; CBA/J; CBA; abortion model; sub-strains

CBA 和 DBA/2 是较常用的两个小鼠近交品系。CBA(雌性)和 DBA/2(雌性)交配组合具有易患反复自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)的特点。近年来这一组为 RSA 动物模型,其重要价值在国际上正逐步引起重视,近些年在国内逐渐引起关注^[1],参考文献报道 CBA(雌性)和 DBA/2(雄性)

[作者简介]王蕾(1978—),女,高级兽医师,研究方向:实验动物学。E-mail: wanglei@hfkbio.com
[通信作者]刘云波(1962—),男,研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: liuyunbo@hfkbio.com

交配胚胎吸收率 21%~56%^[2],各家文献差异较大。

本公司有两种 CBA 品系,一种 CBA/J,一种 CBA/Ola。CBA/J 小鼠是 1920 年由 Strong 用 Bagg 白化雌鼠与 DBA 雄性鼠交配后进行近交培育,1947 年引到 Andervont 处,1948 年引到 JAX^[3]。CBA/Ola 小鼠是 1983 年从 JAX 引到 OLAC,1985 年由 OLAC 引到 IMLAS^[4]。CBA/Ola 亚系虽然来源于 CBA/J,但是通过长期的选育形成不同的亚系。

本研究对 CBA/J 和 CBA/Ola 小鼠的自然流产模型造模情况进行观察比较。自然流产是指胚胎或胎儿因某种原因自动脱离母体,终止妊娠而排出。胚胎吸收是由于小鼠子宫的特殊结构,由于某种原因胎儿停育,而不会出现出血和流产,但是胎儿被母体吸收,却不影响其他胚胎的妊娠。根据小鼠这种特殊生理情况,研究小鼠自然流产模型造模情况主要观察胚胎吸收率、胚胎吸收数量、胎盘直径大小和体积等^[5]。

1 材料和方法

1.1 实验动物

流产模型实验动物为 SPF 级,详见表 1,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供[SCXK(京)2019-0008]。实验小鼠均饲养在北京华阜康生物科技股份有限公司屏障环境(隔离器)内[SYXK(京)2019-0022],隔离环境为洁净度 5 级,温度(24±2)℃,相对湿度(50±10)%,换气次数为每小时 20 次,明暗周期为 12 h:12 h,动物自由采食和饮水,饲料为华阜康生产的⁶⁰Co 辐照灭菌的鼠繁殖料 1035。所有动物实验均经过北京华阜康实验动物伦理委员会审批(HFKIACUC-20190321),符合动物伦理学要求和实验动物保护的相关规定,实验动物饲养和实验过程中做到实验动物使用的 3R 原则,并给予实验动物人道关怀。

饮用水为酸化过滤自来水(pH=2.7~3.0)并经高压蒸汽灭菌 30 min(121℃)。所用笼具、垫料、水瓶等物品均经过高压蒸汽灭菌 30 min(132℃),每周更换垫料 1 次,进出隔离器的物品均应进行消毒处理,操作严格遵守隔离系统规程。

1.2 主要试剂与仪器

75%乙醇购自山东利尔康医疗科技股份有限公司,批号 20210101。

Canon 单反数码相机,型号 EF-S 18-55 mmU;上匠游标卡尺(0~150 mm),型号 SJ455515,用于测量胎盘的直径;手术器械,用于解剖怀孕 14 d 小鼠。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

为了研究两个 CBA 亚系(CBA/J 和 CBA/Ola)流产模型的造模情况,分别对 2 个周龄(10 周和 16 周)雌鼠的造模情况进行研究。每个周龄又设计 3 组,分别为 1 组:本品系互配组 CBA♂×CBA♀;2 组:流产模型对照组 BALB/c♂×CBA♀;3 组:流产模型实验组 DBA2♂×CBA♀。

1.3.2 实验步骤

雌性 CBA 小鼠饲养在雄鼠脏垫料中,2~3 d 后挑选发情的雌性小鼠按照上述分组合笼。详细操作为:实验当天下午挑选发情的 CBA/J 和 CBA/Ola 雌鼠,17:00 放入雄鼠的笼盒中,互配 10~12 h 检查阴道栓。见栓为怀孕 0.5 d。继续按照互配分组饲养 13.5 d 后,进行解剖、拍照、胎盘直径测量。对各组动物见栓及怀孕、胚胎吸收情况进行统计;对各组胎盘直径进行测量和统计分析及胚胎吸收的判定。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析。数值以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

表 1 流产模型实验动物
Table 1 Experimental animals of abortion model

品系 Strain of mice	性别 Sex of mice	周龄(周) Age of mice(week)	小鼠数量 Number of mice	体重(g) Weight of mice
CBA/J	♂	10	10	28.14±1.34
	♀	10	50	20.85±1.35
	♀	16	30	25.46±2.56
CBA/Ola	♂	10	10	28.20±1.31
	♀	10	50	21.02±1.40
	♀	16	30	25.58±2.67
DBA2	♂	10	20	23.10±2.01
BALB/c	♂	10	20	25.12±1.63

2 结果

2.1 各实验组见栓、怀孕、胚胎吸收情况

由于挑选发情雌鼠时间跨度长(本实验从 2021 年 3 月 24 日开始,2021 年 5 月 20 日结束),所以 10 周组数据为 9~15 周雌鼠数据,16 周组数据为 15~21 周雌鼠数据。各组配动物见栓及怀孕、胚胎吸收情况见表 2。

2.2 各实验组胚胎直径及体积数据分析

解剖观察 CBA/J 与 CBA/Ola 各周龄雌鼠胚胎吸收外观特征相似。剖开可见未完全吸收的胎盘,胚胎已经消失。正常 14 d 胚胎全部大小基本一致(长:0.8~1 cm;宽 0.4~0.5 cm),但是胚胎长

和宽也会随着胎儿数量的多少而稍微有些变化,观察到如果胎儿数量多则胚胎偏小,数量少则胚胎偏大。

用游标卡尺测量胎盘直径,并做好记录,用组间单因素方差分析检验对各组胎盘的直径数据进行测量和统计分析,各组之间比较,10 周 CBA/Ola 2 组胎盘直径显著长于 10 周 CBA/Ola 1 组和 3 组($P<0.05$);16 周 CBA/Ola 2 组胎盘直径显著长于 16 周 CBA/Ola 1 组和 3 组($P<0.05$)。其余组间未见显著差异(见表 3)。有报道胎盘体积= $\pi d^3/6$,小于同孕龄胎鼠胎盘单位平均体积减去 2 个标准差者判为体积明显缩小,判定为胚胎丢失^[5]。按照上述公式计算出胎盘体积(见表 3)。

表 2 各组配动物见栓及怀孕、胚胎吸收情况
Table 2 Embolism, pregnancy and embryo absorption in each group of mice

流产模型组 Abortion model groups		共配只数 Total number of breeding	怀孕只数 Number of pregnancies	见栓只数 Number of mice with vaginal plug	14 d 胚胎数 Number of embryos of 14 days	胚胎吸收数 Number of absorbed embryos	胚胎吸收率(%) Embryo absorption rate
10 周 CBA/J 10 weeks CBA/J	1 组 First group	17	6	0	38	4	10.5
	2 组 Second group	25	5	5	31	4	12.9
	3 组 Third group	31	6	1	39	5	12.8
16 周 CBA/J 16 weeks CBA/J	1 组 First group	9	4	1	34	8	23.5
	2 组 Second group	28	4	4	34	3	8.8
	3 组 Third group	14	4	0	36	8	22.2
10 周 CBA/Ola 10 weeks CBA/Ola	1 组 First group	28	3	1	27	1	3.7
	2 组 Second group	27	7	6	57	4	7.0
	3 组 Third group	19	8	2	54	7	13.0
16 周 CBA/Ola 16 weeks CBA/Ola	1 组 First group	19	3	0	23	0	0
	2 组 Second group	27	8	2	56	4	7.1
	3 组 Third group	13	5	1	35	4	11.4

表 3 各组正常胎盘直径及体积数据
Table 3 Nomal placenta diameter and volume datas of each group

流产模型组 Abortion model groups		正常胎盘直径(mm) Nomal placenta diameters	正常胎盘体积(mm ³) Nomal placenta volume
10 周 CBA/J 10 weeks CBA/J	1 组 First group	6.38±0.50	138.17±35.29
	2 组 Second group	6.59±0.51	152.68±36.75
	3 组 Third group	6.75±0.59	165.00±42.92 *
16 周 CBA/J 16 weeks CBA/J	1 组 First group	6.86±0.86	177.02±62.71
	2 组 Second group	6.73±0.45	161.96±33.97
	3 组 Third group	6.67±0.43	156.98±31.28
10 周 CBA/Ola 10 weeks CBA/Ola	1 组 First group	6.40±0.65	141.54±39.95
	2 组 Second group	6.90±0.53 *	175.96±42.08 *
	3 组 Third group	6.14±0.33	122.19±20.41
16 周 CBA/Ola 16 weeks CBA/Ola	1 组 First group	6.37±0.50	138.15±34.66
	2 组 Second group	6.73±0.60 *	163.13±48.01 *
	3 组 Third group	6.39±0.56	139.48±38.32

注:同组比较,* $P<0.05$ 。
Note. Compared with the mice of the same group, * $P<0.05$.

表 4 各组胚胎吸收胎盘直径及胎盘体积数据
Table 4 Absorbed placenta diameter and volume datas of each group

流产模型组 Abortion model groups		胚胎吸收胎盘直径 (mm) Absorbed placenta diameters	胚胎吸收胎盘体积 (mm ³) Absorbed placenta volume
10 周 CBA/J 10 weeks CBA/J	1 组 First group	3.68±0.81	30.07±24.77
	2 组 Second group	3.09±0.41	16.24±6.82
	3 组 Third group	3.26±0.40	18.91±8.52
16 周 CBA/J 16 weeks CBA/J	1 组 First group	3.24±0.47	18.92±8.23
	2 组 Second group	3.13±0.17	16.24±3.12
	3 组 Third group	3.97±1.08 *	40.15±33.05 *
10 周 CBA/Ola 10 weeks CBA/Ola	1 组 First group	5.22 (一个 One)	74.44 (一个 One)
	2 组 Second group	3.21±0.25	17.63±4.90
	3 组 Third group	3.12±0.56	17.35±9.48
16 周 CBA/Ola 16 weeks CBA/Ola	1 组 First group	/	/
	2 组 Second group	2.97±0.32	14.18±5.05
	3 组 Third group	2.75±0.48	11.87±7.45

注:同组比较, **P*<0.05。
Note. Compared with the mice of the same group, **P*<0.05.

通过胎盘体积计算和统计,10 周 CBA/J 3 组显著高于本组其他两组 (*P*<0.05),10 周 CBA/Ola 2 组显著高于本组其他两组 (*P*<0.05),16 周 CBA/Ola 2 组显著高于本组其他两组 (*P*<0.05) (见表 3)。有报道指出新生儿出生体重正常者较低体重者,其胎盘体积较大^[6]。胎盘体积可能与胎儿数量及体重有关。

对吸收胎盘的直径进行数据分析,只有 16 周 CBA/J 3 组胚胎吸收胎盘直径显著高于本组其他组 (*P*<0.05),其他各组间差异不显著 (见表 4)。对胚胎吸收胎盘平均体积进行数据分析,只有 16 周 CBA/J 3 组胚胎吸收胎盘体积显著高于本组其他组 (*P*<0.05)。

从表 4 数据可以看出,参考文献^[5]中的判断方法可取。但是发现 10 周 CBA/Ola1 组胚胎吸收胎盘直径数据计算的胎盘体积按照文献判断方法,体积大于平均值减去两个标准差,本品系互配发现的胚胎吸收情况,原因可能与 CBA 品系的背景基因有关,还需要进一步研究。

3 讨论

与雄性 DBA/2 小鼠 (H-2d) 交配后的雌性 CBA 小鼠 (H-2k) 的流产率高达 20%~30%,而且这种流产具有隐性、反复性和父系特异性的特征;在同为 H-2k×H-2d 交配方式的 CBA×BALB/c 中,孕鼠的胚胎吸收率仅为 5%~10%。这个发现为深入研究妊娠这一复杂生理现象提供了两个经典的动物模型^[1]。

大多关于自然流产模型的一般认为母胎界面的免疫异常导致的^[7-13]。而且通过观察发现,CBA/J 雌鼠比 CBA/Ola 雌鼠造模率高。CBA/J 16 周雌鼠比 CBA/J 10 周雌鼠造模率高,这与相关文献报道一致^[14]。此外有报道指出环境越洁净,造模率越高^[15]。造模第一胎流产率小,第二胎流产率增加^[2]。但是一般实验很少用二胎来进行。

还有报道指出 DBA2 存在天然的 Klr1 (CD94) 缺失,笔者认为与流产模型的造模机理有一定的关系^[14]。

本研究进一步探讨两个 CBA 两个亚系流产模型数据比较,流产模型的造模机理较复杂,还需要进一步研究,本文为科学研究提供快速建模的数据支持。

参考文献:

[1] 朱晓勇, 李大金, 孙晓溪. 正常妊娠与自然流产小鼠模型母胎界面细胞因子表达特征的比较 [J]. 生殖医学杂志, 2003, 12(5): 283-287.

[2] Bobé P, Kiger N. Immunogenetic studies of spontaneous abortion in mice. III. Non-H-2 antigens and gestation [J]. J Immunogenet, 1989, 16(3): 223-231.

[3] The Jackson Laboratory. CBA Strain (000656) Details [EB/OL]. [2021-04-26]. <https://www.jax.org/strain/000656>.

[4] 中国生物科技信息. 常用实验动物信息 [EB/OL]. [2006-08-26]. <http://www.bioon.com.cn/protocol/showarticle.asp?newsid=2203>.

[5] 赵爱民, 林其德, 鲍世民, 等. 自然流产小鼠模型的胚胎丢失率 [J]. 上海实验动物科学, 1999, 19(4): 220-221.

李庆妮,陈云丰,刘元浪,等. 非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统运行效果评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 80-86.

Li QN, Chen YF, Liu YL, et al. Evaluation of an oral and nasal aerosol exposure system for non-human primates [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 80-86.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.012

非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统运行效果评价

李庆妮^{1,2}, 陈云丰^{1,2}, 刘元浪^{1,2}, 唐 定^{1,2}, 华婉璐^{1,2}, 张瑞安^{1,2},
卢 佳^{1,2*}, 李新国^{1,2*}

(1. 武汉生物制品研究所有限责任公司新发传染病研究室, 武汉 430207;
2. 武汉生物制品研究所有限责任公司生物安全三级实验室, 武汉 430207)

【摘要】 目的 利用流感病毒作为模式病毒评价非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统的运行效果, 为非人灵长类动物气溶胶吸入研究奠定实验基础。**方法** 在生物安全三级实验室中, 使用非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统产生流感病毒气溶胶, 以此评价该装置能否正常运行并产生特定粒径大小的气溶胶颗粒, 同时评价装置运行过程中病毒气溶胶输出均一性、稳定性、气密性以及装置的消毒效果。**结果** 该装置产生的气溶胶颗粒中值直径为 $(1.04 \pm 0.03) \mu\text{m}$, 不同浓度气溶胶发生液产生的病毒气溶胶均能达到头罩, 且 6 个头罩间气溶胶浓度无显著性差异 ($P > 0.05$); 流感病毒雾化 30 min 后存活率 $> 50\%$; 病毒气溶胶浓度与发生器病毒浓度的线性相关良好 ($R^2 = 0.9989$); 装置易泄漏处未检测到感染性病毒, 使用过氧化氢消毒剂对气溶胶暴露系统管道及负压柜腔体消毒后无指示菌生长。**结论** 非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统运行效果良好, 装置管道气密性好, 可消毒完全, 为将来建立 SARS-CoV-2 及其它病毒气溶胶感染非人灵长类动物模型奠定了基础。

【关键词】 非人灵长类动物; 气溶胶; 暴露; 均一性; 稳定性; 气密性; 流感病毒

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0080-07

Evaluation of an oral and nasal aerosol exposure system for non-human primates

LI Qingni^{1,2}, CHEN Yunfeng^{1,2}, LIU Yuanlang^{1,2}, TANG Ding^{1,2}, HUA Wanlu^{1,2}, ZHANG Ruian^{1,2}, LU Jia^{1,2*}, LI Xinguo^{1,2*}

(1. Laboratory of Emerging Infectious Diseases of Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd., Wuhan 430207, China.
2. Biosafety Level III laboratory of Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd., Wuhan 430207)

【Abstract】 Objective To evaluate the operation of an oral and nasal aerosol exposure system for non-human primate (NHP) models using influenza virus and establish the experimental basis for aerosol inoculation of NHPs with SARS-CoV-2. **Methods** In a biosafety level 3 laboratory, we generated influenza virus B/Phuket/3073/2013 aerosol using an oral and nasal aerosol exposure system for NHP models and evaluated whether the device could run normally and produce aerosol particles of a specific size. Furthermore, the uniformity of distribution and stability of the aerosol particles

[基金项目] 国家重点研发计划 (2020YFC0842100)。

[作者简介] 李庆妮 (1984—), 女, 硕士, 研究方向: 感染性疾病非人灵长类动物模型制备。E-mail: liqingni@qq.com

[通信作者] 卢佳 (1984—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 多价手足口病疫苗研制工作。E-mail: johnsonchau@163.com

李新国 (1973—), 男, 副研究员, 研究方向: 细菌类疫苗及联合疫苗。E-mail: xyleee@qq.com * 共同通信作者

were analyzed. Influenza virus was collected at sites where leakage could easily occur. A solution of 35% H_2O_2 was run through the nebulizer to disinfect the system. **Results** The mass median aerodynamic diameter of aerosol particles was $(1.04 \pm 0.03) \mu m$. The viral aerosols produced by different concentrations of influenza virus reached the hood. There was no significant difference in aerosol concentration among the 6 hoods ($P > 0.05$). The survival rate of influenza virus was greater than 50% after atomization for 30 min. A linear relationship was observed ($R^2 = 0.9989$) with an average difference of $2.4 \log_{10} CCID_{50}/mL$ between input (Collison Nebulizer) and output (All Glass Impinger-30) virus titers. No influenza virus was detected at potential leakage sites of the device. There was no indication of bacterial growth after sterilizing the pipeline of the aerosol exposure system and the cavity of the negative pressure cabinet with hydrogen peroxide disinfectant. **Conclusions** Our result suggest that the oral and nasal aerosol exposure system for non-human primates is useable and effective. This study provides a foundation for establishing SARS-CoV-2 and other viral aerosol infection models using NHPs in the future.

[Keywords] non-human primates; aerosol; exposure; uniformity; stability; air tightness; influenza virus

对于呼吸道病原微生物而言,气溶胶吸入是其感染宿主的重要途径^[1-2]。鉴于非人灵长类动物(non-human primates, NHP)与人类密切的基因相关性,因此在候选疫苗、治疗性药物的临床前研究中,NHP 具有独特而重要的作用^[3-9]。非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统可以通过装有细菌、病毒等病原微生物悬浮液的雾化器雾化产生微生物气溶胶,NHP 吸入气溶胶后,在感染过程中避免了消化道、皮肤等其他暴露途径感染,可以模拟呼吸道病原自然感染途径,为致病性病原微生物吸入感染、疫苗气溶胶免疫、肺给药、气溶胶攻毒评价疫苗或药物效果的研究提供了良好的评价技术平台^[10]。本研究选择流感病毒作为模式病毒,在生物安全三级实验室中使用非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统装置产生病毒气溶胶,评价了病毒气溶胶粒径、气溶胶输出均一性、稳定性、气密性等重要参数,以及装置的消毒效果验证,为将来建立 SARS-CoV-2 及其它病毒气溶胶感染 NHP 模型奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

MDCK 细胞由武汉生物制品研究所有限责任公司国家联合疫苗工程技术研究中心提供。

1.1.2 病毒株

流感病毒 B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage)由武汉生物制品研究所有限责任公司国家联合疫苗工程技术研究中心提供。

流感病毒 B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage)是 WHO 推荐并经国家药品监督管理部门批准的乙型流行性感冒病毒的疫苗株,属于《人间传染的病原微生物名录》中的第三类病原微生物,

不属于高致病性病原。由于其致病性较弱,属囊膜病毒,对消毒剂较敏感,易于在三级生物安全实验室操作,其细胞培养物病毒滴度较高可达 $10^8 CCID_{50}/mL$,可满足实验需要,因此被本研究选作 SARS-CoV-2 的代替病毒。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);新生牛血清(杭州四季青公司);青链霉素(美国 HyClone 公司);TPCK-胰酶(美国 Sigma 公司);1% 鸡红血球(自制)。

非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统(北京慧荣和科技有限公司);TSI 3321 气溶胶粒径分析仪(美国 TSI 公司);B2 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司);汽化过氧化氢灭菌器(杭州美卓生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统

非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统如图 1 所示,主要由气溶胶发生模块(过滤器、流量控制器、Collison 气溶胶发生器、正交稀释器)、染毒模块(口鼻罩、头罩、猴椅)、分析模块(AGI-30 采样器)、控制模块(调节阀、流量控制器)、废气处理模块(过滤器)组成。整体采用分布式动态气溶胶口鼻暴露技术。实验室的洁净压缩空气进入系统后分成两路,一路经过流量控制器后进入气溶胶发生器用于气溶胶发生,然后进入正交稀释器,另一路经过流量控制器后作为稀释气流直接进入正交稀释器。两路气流经过涡旋混合后形成特定浓度的气溶胶进入气溶胶静压腔,并经过顶部的 6 路分流管路分别输送到 6 个实验猴口鼻罩的进气口处,实验猴吸入后产生的废气经口鼻罩出口处排出,汇流过滤后经过流量控制器由抽气泵排出。

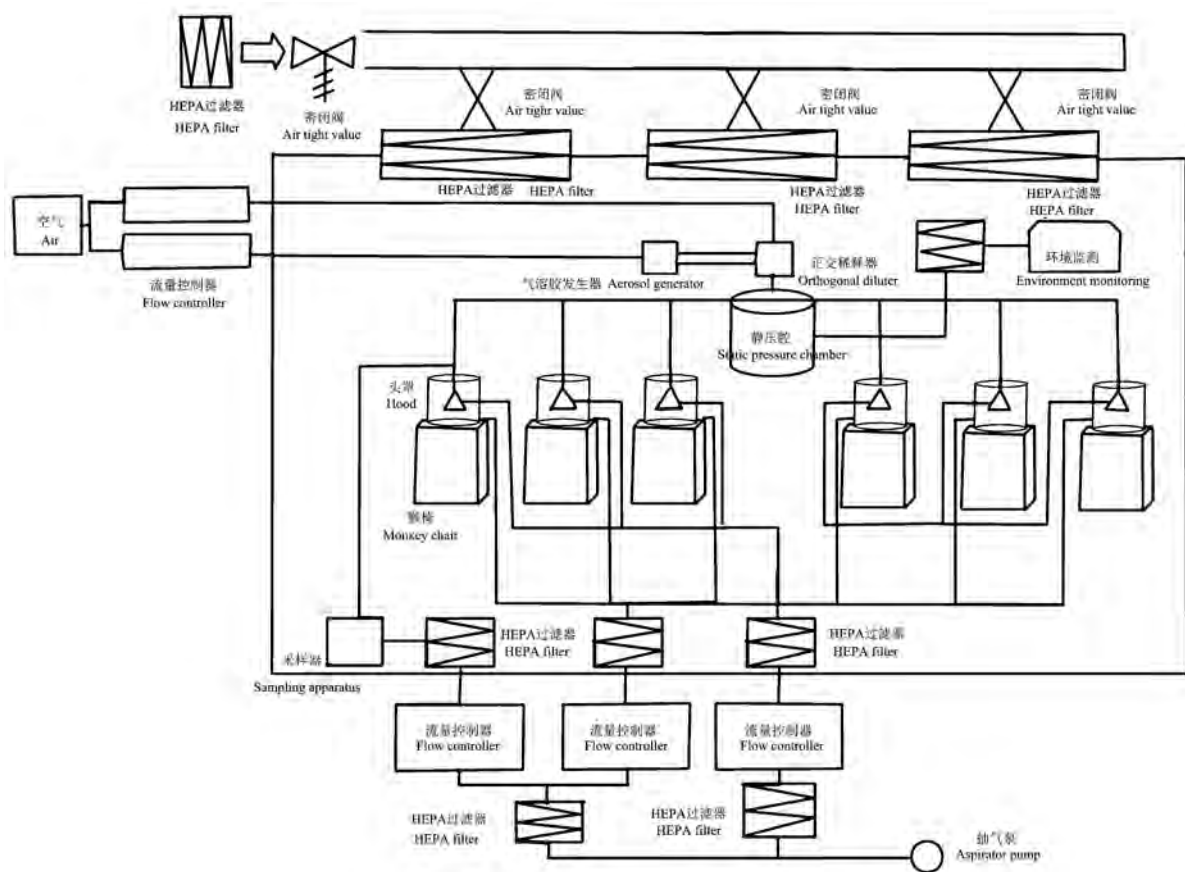


图 1 非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统示意图

Figure 1 Schematic figure of the oral and nasal aerosol exposure system in non-human primates

1. 3. 2 流感病毒滴度测定

使用微量细胞病变法进行病毒滴度的测定,胰酶消化 MDCK 细胞制备细胞悬液,接种至 96 孔细胞培养板中,每毫升 $2.0 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^4$ 个,每孔 100 μL 。将流感病毒样本 10 倍系列梯度稀释后接种至 96 孔板中,每个稀释度 8 个复孔,33℃ 二氧化碳培养箱中培养 6 d。观察出现细胞病变的孔数,使用 Kaber 法计算病毒滴度。

1. 3. 3 气溶胶发生参数和采样参数设定

将 20 mL 一定浓度的流感病毒加入六孔 Collison 气溶胶发生器中,设置气溶胶发生流量为 12 L/min,稀释流量为 40 L/min,抽气流量为 55 L/min,维持头罩负压,气溶胶稳定发生 5 min 后使用 AGI-30 液体冲击式采样器连接头罩采样口采样,采样溶液为 30 mL 的 DMEM 培养基,采样流量为 10 L/min,采样时间 5 min。

1. 3. 4 气溶胶粒径大小、均一性和稳定性评价

将 30 mL 气溶胶发生液加入六孔 Collison 气溶胶发生器中,按照 1. 3. 3 设定气溶胶发生参数,分别

在静压腔和头罩采样处接入 TSI 3321 气溶胶粒径分析仪检测气溶胶总粒子的中值直径,检测时间点分别为气溶胶发生后 5、10、20、30 和 40 min,评价气溶胶粒径大小、均一性和稳定性。

1. 3. 5 流感病毒气溶胶达到头罩评价

将 20 mL 3.5×10^6 CCID₅₀/mL 流感病毒液加入到六孔 Collison 气溶胶发生器中产生气溶胶,将 AGI-30 液体冲击式采样器连接至头罩采样口处进行采样,测定样品中流感病毒滴度,评价气溶胶是否能到达供气静压腔和头罩。

1. 3. 6 流感病毒气溶胶头罩分布均一性评价

非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统染毒模块共包含 6 个头罩,分别向六孔 Collison 气溶胶发生器中分别加入 20 mL 低浓度 (3.5×10^6 CCID₅₀/mL) 和高浓度 (7.1×10^7 CCID₅₀/mL) 流感病毒液产生气溶胶,并将 AGI-30 液体冲击式采样器连接头罩采样口进行采样,测定样品中流感病毒滴度,评价不同病毒浓度的气溶胶发生液产生的气溶胶能否均匀分布达到至 6 个头罩。

1.3.7 流感病毒的耐雾化能力评价

向六孔 Collison 气溶胶发生器中加入 20 mL 7.1×10^7 CCID₅₀/mL 的流感病毒液产生气溶胶,分别在气溶胶发生 0、3、5、8、10、15、20、25、30、35 和 40 min 时采集发生器中流感病毒样品,测定样品中流感病毒滴度,测定气溶胶发生状态下流感病毒存活率。

1.3.8 气溶胶发生器和采样器中流感病毒浓度的线性关系

将 1.3×10^7 CCID₅₀/mL 的流感病毒液 10 倍系列梯度稀释,分别取 1.3×10^7 CCID₅₀/mL、 1.3×10^6 CCID₅₀/mL、 1.3×10^5 CCID₅₀/mL、 1.3×10^4 CCID₅₀/mL 各 20 mL 加入到六孔 Collison 气溶胶发生器中产生气溶胶,用 AGI-30 液体冲击式采样器采集头罩处的气溶胶样品,测定样品中流感病毒滴度,评价 Collison 发生器 (Input) 和 Impinger 采样器 (Output) 中流感病毒浓度的线性关系。

1.3.9 装置气密性评价

在 1.3.6 中使用高滴度流感病毒作为气溶胶发生液产生气溶胶时,在非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统易发泄露的管道连接处 (如气溶胶发生器出口、静压腔入口、6 个口鼻罩出口、预实验采样器进口、预实验采样器出口、采样器进气口、采样器出气口) 使用拭子涂抹采样 30 s,将采样拭子放入 2 mL DMEM 培养基中,充分混匀后,加入到生长致密的 MDCK 细胞中,33℃ 二氧化碳培养箱培养 72 h,观察是否发生细胞病变,评价装置在运行过程中是否发生气溶胶泄露。

1.3.10 装置消毒效果评价

采用 35% 过氧化氢及气体发生器分批次对气溶胶暴露系统管道及负压柜腔体进行消毒,使用嗜热脂肪芽孢杆菌菌片 (ATCC 7953, 菌种浓度为每片 $5\times10^5\sim5\times10^6$ cfu) 作为生物指示剂。消毒前,分别在管道和负压柜腔体布置生物指示剂。消毒完成后,及时取出指示剂,放入加有 0.5% 中和剂硫代硫酸钠的溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基中,56℃ 培

养 7 d 后进行结果判定。

1.4 统计学方法

本研究数据采用 GraphPad Prism 9.0.0 统计分析软件,对结果进行 *t* 检验和方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义, $P<0.001$ 为差异有极显著统计学意义。

2 结果

2.1 气溶胶粒径大小、均一性和稳定性评价

气溶胶发生后,使用 TSI 3321 气溶胶粒径分析仪在不同时间点分别检测静压腔和头罩处的气溶胶总粒子的中值直径,结果如表 1 所示,非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统产生的气溶胶颗粒中值直径为 $(1.04\pm0.03)\mu\text{m}$,对应安德森采样器的 6 级 $(0.65\sim1.1)\mu\text{m}$,气溶胶发生后 40 min 内,静压腔和头罩处的气溶胶的中值直径的均一性和稳定性良好。

2.2 流感病毒气溶胶达到头罩评价

使用 AGI-30 冲击式采样器采集静压腔和头罩处的气溶胶,通过微量细胞病变法检测静压腔和头罩处病毒气溶胶浓度,结果如图 2 所示,静压腔和头罩中都能检测到一定滴度的流感病毒,表明该装置能正常运行并能产生病毒气溶胶,产生的气溶胶能经静压腔途径管道到达头罩处,且传递过程中气溶胶浓度无显著差异 ($P>0.05$)。

2.3 流感病毒气溶胶头罩分布均一性评价

分别使用低浓度 (3.5×10^6 CCID₅₀/mL) 和高浓度 (7.1×10^7 CCID₅₀/mL) 流感病毒进行气溶胶发生,使用 AGI-30 冲击式采样器收集 6 个头罩气溶胶并进行病毒滴度检测,结果见图 3 所示。实验结果表明同一滴度流感病毒产生的气溶胶在 6 个头罩的浓度无显著差异 ($P>0.05$),说明气溶胶在 6 个头罩分布均匀,且气溶胶浓度与发生器病毒滴度有关。

2.4 流感病毒的耐雾化能力评价

为评价气溶胶发生过程中流感病毒的耐雾化能力,分别检测气溶胶发生 3、5、8、10、15、20、25、30、35 和 40 min 时气溶胶发生器中流感病毒存活

表 1 气溶胶粒子中值直径、均一性和稳定性
Table 1 Median diameter, uniformity and stability of aerosol particles

采样时间点 Sampling time points	T5 5 th minute	T10 10 th minute	T20 20 th minute	T30 30 th minute	T40 40 th minute	平均中值直径 (μm) Mean median diameter
静压腔 (μm) Air supply static pressure chamber	1.00±0.04	1.03±0.02	1.03±0.01	1.04±0.01	1.05±0.01	1.04±0.03
头罩 (μm) Hood	1.02±0.01	1.03±0.01	1.04±0.01	1.07±0.03	1.06±0.01	

率,见图 4。实验结果表明气溶胶发生 0~5 min,流感病毒存活率迅速下降,5~30 min 流感病毒存活率较为稳定,存活率高于 50%,30 min 后流感病毒活性继续迅速下降。根据上述结果,气溶胶发生后 5~30 min 可作为 NHP 感染的窗口期,约为 25 min。

2.5 发生器和采样器中流感病毒气溶胶浓度的线性关系

根据“2.3 流感病毒气溶胶头罩分布均一性评价”实验结果,流感病毒气溶胶浓度和气溶胶发生器中流感病毒滴度有关。为进一步确定二者之间的关系,在气溶胶发生器中加入不同滴度的流感病毒溶液,检测对应流感病毒气溶胶浓度,结果如图 5 所示,实验结果表明流感病毒气溶胶浓度与发生器病毒滴度的对数值具有良好的线性关系,标准曲线方程为 $y=0.8625x-2.4173(R^2=0.9989)$ 。

2.6 装置气密性评价

使用拭子在非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴

露系统中病毒气溶胶易发生泄露部位(气溶胶发生器出口、静压腔入口、6 个头罩出口、预实验采样器进口、预实验采样器出口、采样器进气口和采样器出气口)涂抹采样,将采集样本接种到 MDCK 细胞中,培养后 12 个采样点样本接种的细胞均未发生病变。提示非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统在气溶胶发生过程中未发生气溶胶泄露,装置气密性良好。

2.7 装置消毒效果评价

嗜热脂肪芽孢杆菌生物指示剂培养 7 d 后,对指示剂逐支进行检查,实验组接种生物指示剂的培养基均未变色(呈现紫色),阳性对照培养基颜色变色(紫色变黄色),阴性对照培养基未变色(呈现紫色)。实验结果表明使用 35%过氧化氢采用汽化方式对非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统可以有效地消毒,消毒效果完全。

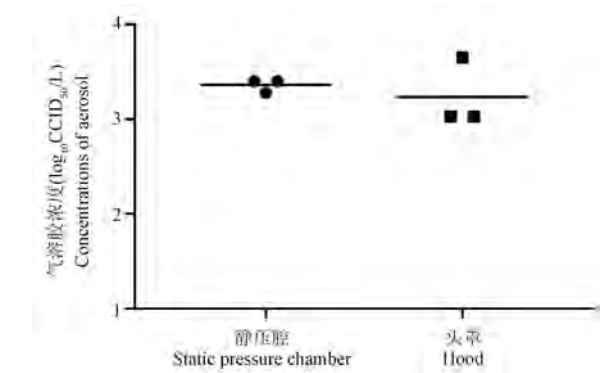


图 2 采样器采集静压腔和头罩处的气溶胶浓度
Figure 2 Aerosol concentrations of samplers which collect in the static pressure chamber and the hood

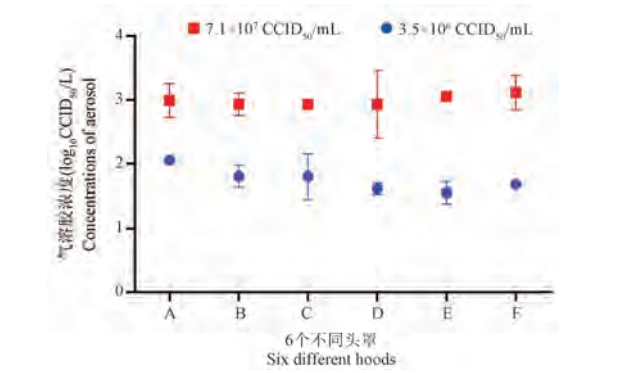


图 3 不同头罩处的流感病毒气溶胶浓度
Figure 3 Aerosol concentrations of samplers which collect in the six hoods

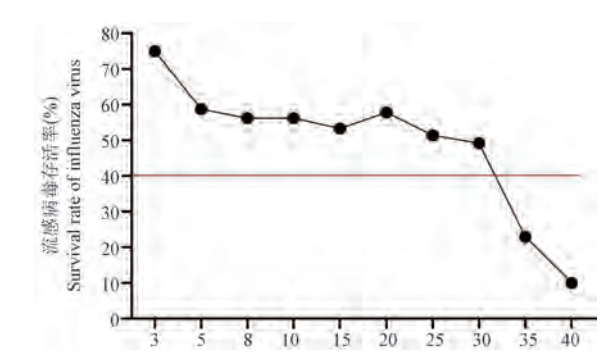


图 4 流感病毒的耐雾化能力
Figure 4 Atomization resistance of influenza virus

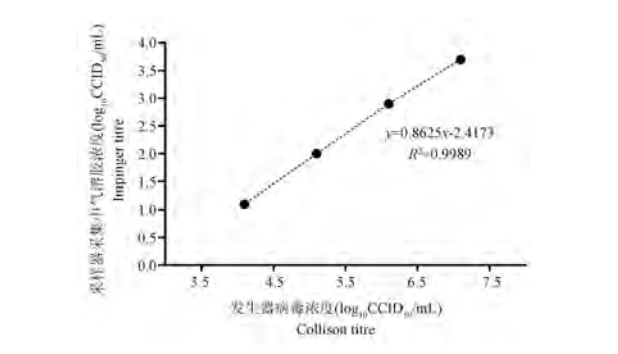


图 5 流感病毒 Input (Collision) 和 Output (Impinger) 的线性关系
Figure 5 Correlation between input (Collision) and output (Impinger) virus titres of influenza virus when aerosolized using the oral and nasal aerosol exposure system for non-human primates

3 讨论

非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统能正常运行,产生具有感染性的气溶胶颗粒,气溶胶颗粒的中值直径为 $(1.04 \pm 0.03) \mu\text{m}$,颗粒大小可直接进入肺泡。

在气溶胶暴露感染实验动物时,基于动物的氧气消耗,推荐气溶胶气体流量为每分钟呼吸体积的 1.5 倍,使用动物呼吸量 2.5~4 倍的气溶胶气体流量可将气溶胶浓度保持在目标浓度的 90%^[11]。2~4 岁恒河猴呼吸量为 $1.5 \sim 3.8 \text{ L/min}$ ^[12]。美国陆军传染病医学研究所和匹兹堡大学疫苗研究中心进行不同种类的 NHP 气溶胶暴露感染时,提供给每只 NHP 的气体流量为 7.5 L/min 左右^[13-14]。本系统装置可同时进行 6 只 NHP 的气溶胶暴露感染,在本研究中使用 6 孔 Collison 气溶胶发生器,将气溶胶流量设为 12 L/min ,稀释流量设为 40 L/min ,提供给每只试验猴的气溶胶气体流量为 8.7 L/min 左右,为恒河猴呼吸量的 2.3~5.8 倍,同时本生物安全三级实验室前期进行恒河猴适应性模拟气溶胶感染时,采用此染毒程序参数进行气溶胶感染,恒河猴在整个 20 min 感染过程中呼吸均匀状态良好。

Collison 气溶胶发生器使用压缩空气使液体雾化产生气溶胶颗粒,雾化过程由于剪切力、撞击力、浓缩作用等的影响,会导致部分微生物衰亡或失去活性^[15];同时 AGI-30 液体撞击式采样器在采样过程中存在微生物粒子撞击时的损伤、逃逸及再次气溶胶化等问题^[16],因此本研究中采集到的气溶胶中流感病毒滴度比气溶胶发生液中滴度低 $2.4 \log_{10} \text{CCID}_{50}$ 。采用 Collison 发生器 (Input) 发生 SARS-CoV-2 气溶胶或东方马脑炎病毒,采用 AGI-30 液体撞击式采样器 (Output) 采集病毒气溶胶,Input 和 Output 病毒滴度之间具有良好的线性关系,分别损失 $2 \log_{10} \text{pfu}$ ^[17] 和 $3.4 \log_{10} \text{pfu}$ ^[18],这与本研究的实验结果相一致。

本研究中,在气溶胶发生 30 min 内,Collison 气溶胶发生器中流感病毒的存活率高于 50%,这与噬菌体 D29 的存活率基本相符^[19],Mainelis 等^[20]也报道了荧光假单胞菌经 Collison 气溶胶发生器雾化 90 min 后,活力损伤了 50%,然而 Hermann 等^[21]指出病毒在机械上比细菌更容易雾化,Ibrahim 等^[22]研究显示用 Collison 气溶胶发生器连续雾化 60 min 的过程中,H1N1 流感病毒活力出现轻微的损失,Kim

等^[23]报道有囊膜的冠状病毒在雾化 30 min 后,病毒存活率仅下降了 15%。高致病性禽流感、SARS-CoV-2、尼帕病毒、埃博拉病毒等重大呼吸道病毒性传染病有可能通过气溶胶传播,SARS-CoV-2 气溶胶吸入暴露剂量在 $3.7 \sim 4.2 \log_{10} \text{pfu}$ 可以感染非洲绿猴^[17], $2.6 \sim 4.7 \log_{10} \text{pfu}$ 的埃博拉病毒可以通过气溶胶感染恒河猴^[24], $2.0 \sim 3.0 \log_{10} \text{pfu}$ 的尼帕病毒可以通过气溶胶感染非洲绿猴^[25],这些呼吸道病毒对 NHP 的气溶胶暴露剂量在 $2.0 \sim 4.7 \log_{10} \text{pfu}$ 即可成功建立感染模型,因此尽管本研究中使用的我国自主研发的气溶胶暴露系统在气溶胶发生过程中流感病毒存活率方面与先进国际水平相比仍然存在较大差距,但若使用高浓度 ($10^7 \text{CCID}_{50}/\text{mL}$ 以上) 病毒发生液产生气溶胶时,在 5~30 min 的感染窗口期内,实验猴吸入气溶胶 10~20 min,可以达到 10^4CCID_{50} 左右的感染剂量,理论上可以成功建立病毒气溶胶 NHP 感染模型。

使用高浓度流感病毒液产生气溶胶进行装置气密性测试评价时,未检测到具有感染性的流感病毒,表明该暴露装置没有发生气溶胶泄露,对生物安全三级实验室保护良好。嗜热脂肪芽孢杆菌对各种消毒方式具有较强的抵抗力,可以作为消毒效果验证的直接指标^[26]。以嗜热脂肪芽孢杆菌作为消毒指示菌的效果验证,表明使用 35% 过氧化氢采用汽化方式可对该系统进行有效地消毒,消毒效果完全。

综上所述,本研究在生物安全三级实验室中以流感病毒评价了非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统运行中病毒气溶胶的重要参数,包括气溶胶粒径、气溶胶输出气密性、均一性、稳定性等。这些广泛的基础性数据使我们能够对非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统的基本情况有客观深入的认识,并为有效地利用这一系统建立 SARA-CoV-2 和其它病毒气溶胶感染 NHP 模型提供了可能。

参考文献:

- [1] Wimer-Mackin S, Hinchcliffe M, Petrie CR, et al. An intranasal vaccine targeting both the Bacillus anthracis toxin and bacterium provides protection against aerosol spore challenge in rabbits [J]. Vaccine, 2006, 24(18): 3953-3963.
- [2] 郝新彦, 向志光, 高虹. 动物鼻式气溶胶暴露装置的运行效果评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 83-89.
- [3] Woolsey C, Borisevich V, Prasad AN, et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection [J]. Nat Immunol, 2021, 22(1): 86-98.

- [4] Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 585(7824): 268–272.
- [5] Rockx B, Kuiken T, Herfst S, et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model [J]. *Science*, 2020, 368(6494): 1012–1015.
- [6] Shan C, Yao YF, Yang XL, et al. Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in Rhesus macaques [J]. *Cell Res*, 2020, 30(8): 670–677.
- [7] Pandrea I, Apetrei C, Dufour J, et al. Simian immunodeficiency virus SIVagm. sab infection of Caribbean African green monkeys; A new model for the study of SIV pathogenesis in natural hosts [J]. *J Virol*, 2006, 80(10): 4858–4867.
- [8] Deng W, Bao L, Liu J, et al. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques [J]. *Science*, 2020, 369(6505): 818–823.
- [9] Deng W, Bao L, Gao H, et al. Ocular conjunctival inoculation of SARS-CoV-2 can cause mild COVID-19 in rhesus macaques [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4400.
- [10] 温占波, 李娜, 李劲松, 等. 动物口鼻动态气溶胶暴露系统的建立与效果评价 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2012, 30(6): 402–405.
- [11] Wong BA. Inhalation exposure systems: design, methods and operation [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(1): 3–14.
- [12] 许定泽, 石伟平, 许宏伟, 等. 猕猴体温、心率和呼吸率的测定结果 [J]. *上海实验动物科学*, 1992, 12(4): 230–231.
- [13] Reed DS, Bethel LM, Powell DS, et al. Differences in aerosolization of Rift Valley fever virus resulting from choice of inhalation exposure chamber; implications for animal challenge studies [J]. *Pathog Dis*, 2014, 71(2): 227–233.
- [14] Totura A, Livingston V, Frick O, et al. Small particle aerosol exposure of African green monkeys to MERS-CoV as a model for highly pathogenic coronavirus infection [J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(12): 2835–2843.
- [15] May KR. The Collison nebulizer: description, performance, and application [J]. *J Aerosol Sci*, 1973, 4(3): 235–243.
- [16] Haddrell AE, Thomas RJ. Aerobiology: experimental considerations, observations, and future tools [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(17): e00809–e00917.
- [17] Hartman AL, Nambulli S, McMillen CM, et al. SARS-CoV-2 infection of African green monkeys results in mild respiratory disease discernible by PET/CT imaging and shedding of infectious virus from both respiratory and gastrointestinal tracts [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(9): e1008903.
- [18] Phelps AL, O'Brien LM, Eastaugh LS, et al. Aerosol infection of Balb/c mice with eastern equine encephalitis virus; susceptibility and lethality [J]. *Virol J*, 2019, 16(1): 2.
- [19] 温占波. 分枝杆菌噬菌体 D29 气溶胶特性和动物气溶胶暴露系统的初步研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2008.
- [20] Mainelis G, Berry D, An HR, et al. Design and performance of a single-pass bubbling bioaerosol generator [J]. *Atmos Environ*, 2005, 39(19): 3521–3533.
- [21] Hermann JR, Hoff SJ, Yoon, KJ, et al. Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(7): 4811–4818.
- [22] Ibrahim E, Harnish D, Kinney K, et al. An experimental investigation of the performance of a Collison nebulizer generating H1N1 influenza aerosols [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2015, 29(6): 1142–1148.
- [23] Kim SW, Ramakrishnan MA, Raynor PC, et al. Effects of humidity and other factors on the generation and sampling of a coronavirus aerosol [J]. *Aerobiologia*, 2007, 23(4): 239–248.
- [24] Johnson E, Jaax N, White J, et al. Lethal experimental infections of Rhesus monkeys by aerosolized ebola virus [J]. *Int J Exp Pathol*, 1995, 76(4): 227–236.
- [25] Sarji SA, Abdullah BJ, Goh KJ, et al. MR imaging features of Nipah encephalitis [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2000, 175(2): 437–442.
- [26] 中华人民共和国卫生部. 消毒与灭菌效果的评价方法与标准: GB 15981–1995 [S]. 1995.

[收稿日期] 2021–08–06

黎国安,钟望涛,张晶晶. 多物种中非肌肉肌球蛋白 IIA 相关功能的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 87-92.
Li GA, Zhong WT, Zhang JJ. Research progress on the function of non-muscle myosin IIA in distinct species [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 87-92.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.013

多物种中非肌肉肌球蛋白 IIA 相关功能的研究进展

黎国安,钟望涛,张晶晶*

(广东医科大学附属医院,广东 湛江 524001)

【摘要】 非肌肉肌球蛋白 IIA(non-muscle myosin IIA, NM IIA)由非肌肉肌球蛋白重链 9(*Non-muscle myosin heavy chain 9, MYH9*)基因编码,是非肌肉肌球蛋白 II 的家族成员,在多种细胞中表达,参与调控细胞收缩、细胞迁移和细胞形状维持等细胞生理过程。NM IIA 对脑、肾、血管等发育至关重要,其基因突变导致 *MYH9* 相关疾病(*MYH9*-related disease, *MYH9*-RD)。此外,近年来有研究表明 NM IIA 还参与其他生理和病理过程的调节,如血管新生和肿瘤进展等。本文将对人、小鼠和斑马鱼中 NM IIA 相关功能的研究进展进行综述。

【关键词】 非肌肉肌球蛋白 IIA;非肌肉肌球蛋白重链 9;小鼠;斑马鱼;*MYH9* 相关疾病

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2022) 06-0087-06

Research progress on the function of non-muscle myosin IIA in distinct species

LI Guoan, ZHONG Wangtao, ZHANG Jingjing*

(Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

【Abstract】 The non-muscle myosin IIA (NM IIA), encoded by *non-muscle myosin heavy chain 9 (MYH9)*, is a member of the non-muscle myosin II family. NM IIA is expressed in a variety of cell types and plays a critical role in cellular physiological processes, such as cell contraction, cell migration, and cell shape maintenance. NM IIA is essential for the development of the brain, kidney, vessels, and other organs. A mutation of NM IIA causes *MYH9*-related disease (*MYH9*-RD). Recently, it has been shown that NM IIA is also involved in the regulation of other physiological and pathological processes, such as angiogenesis and tumor progression. Here, we summarize the recent progress of research on NM IIA functions in humans, mice, and zebrafish.

【Keywords】 non-muscle myosin IIA (NM IIA); non-muscle myosin heavy chain 9 (MYH9); mice; zebrafish; *MYH9*-related disease

肌球蛋白超家族是三大主要动力蛋白超家族之一,其分类超过 30 种,主要与肌动蛋白结合,并以镁离子依赖的方式水解 ATP 获得能量从而发挥动力作用^[1-3]。肌球蛋白 II 是其中的一种,包括肌肉肌球蛋白 II 和非肌肉肌球蛋白 II。非肌肉肌球蛋白 II 几乎在所有细胞都有表达,参与细胞的多种生理活动,如细胞迁移、极化和粘附、细胞形状维持和信号转导等^[2]。在脊椎动物中,非肌肉肌球蛋白 II 有 3 个亚型:非肌肉肌球蛋白 IIA(NM IIA)、非肌肉肌球蛋白 IIB(NM IIB)和非肌肉肌球蛋白 IIC(NM IIC),分别由 *MYH9*、*MYH10* 和 *MYH14* 基因编码^[4-5]。本文将对人、小鼠和斑马鱼中 NM IIA 相关功能的研究进展进行综述。

1 人类发育与疾病中 NM IIA 相关功能的研究

人 NM IIA 的结构包括氨基端的头部结构域和

【基金项目】国家自然科学基金项目(31970777)。

【作者简介】黎国安(1994—),男,硕士研究生,研究方向:斑马鱼发育生物学。E-mail: liguoan306@163.com

【通信作者】张晶晶,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:斑马鱼脑血管发育与生理功能维持。E-mail: jingjing.zhang@live.com

羧基末端的尾部结构域。头部结构域由动力蛋白(由 *MYH9* 的 1 到 19 号外显子编码)和颈部区域(由 *MYH9* 的 20 号外显子编码)组成。尾部结构域包含长卷曲螺旋结构(由 *MYH9* 的 21 到 40 号外显子编码)和短非卷曲螺旋区域(由 *MYH9* 的 41 号外显子编码)^[2]。*MYH9* 基因突变引起的 *MYH9*-RD, 是一种常染色体显性遗传性疾病,主要表现为巨大血小板减少、粒细胞 NM IIA 分布异常,且可能同时并发肾脏疾病、耳聋和白内障^[6]。

1.1 人类多系统器官组织中 NM IIA 功能的研究

NM IIA 在人类中的研究主要涉及血液系统、肾和听觉系统等。报道指出,*MYH9*-RD 在血液系统的异常表现主要是巨大血小板减少、中性粒细胞 NM IIA 分布异常和粒细胞有包涵体等^[6-7]。除此之外, NM IIA 动力蛋白结构域的突变将导致患者出现异常形态的红细胞,主要表现为细胞形态细长^[8]。研究表明这可能与 NM IIA 动力蛋白无法产生维持红细胞形状的膜表面张力有关^[9]。在肾方面, Arrondel 等^[10]通过原位杂交和免疫荧光技术发现 *MYH9* 的 mRNA 和蛋白在胚胎期和成人肾的小动脉、肾小球和肾小管周围的毛细血管内皮细胞中表达,同时在近端小管的刷状缘和足细胞中也有表达。有研究表明欧裔美国人、尼日利亚人和西班牙人的 NM IIA 遗传变异可导致非糖尿病肾病的发病率上升^[11-13],而汉族人的 NM IIA 遗传变异则导致糖尿病肾病发病率的升高^[14]。进一步研究发现,糖尿病肾病患者的肾小球和足细胞的 NM IIA 表达减少,足细胞内肌动蛋白应力纤维缩短且数量减少,细胞间紧密连接蛋白 ZO-1 表达下调。这些病理生理改变导致肾小球蛋白滤过率上升,肾功能受损。而实验证实过表达 NM IIA 可使血管紧张素 II 诱导的肾功能损害得到恢复^[15]。这提示 NM IIA 可能与肾发育与肾功能维持有关。而在听觉系统中, NM IIA 突变还与听力障碍有关,有研究发现 *MYH9* 的 p. D1424N 突变将导致成年发病和进行性恶化的听力损伤^[16],而 p. R705H 位点的突变除导致患者肝功能异常和血细胞缺陷外,还导致神经性耳聋^[7,17]。Verver 等^[18]指出,不同的位点突变可导致不同程度的神经性耳聋,而同一位点的不同突变类型也会有不同的影响,如 p. R702C 位点的突变导致的耳聋比 p. R702H 严重, p. R1165L 突变导致耳聋的程度比 p. R1165C 严重。对于有 *MYH9* 突变家族史的幼儿,可在早期进行此基因突变位点的筛查,

以便在发病初期实施治疗,以改善患者生活质量。

1.2 人类肿瘤中 NM IIA 功能的研究

NM IIA 与多个瘤种的发生发展有关,在不同瘤种中分别扮演促癌或抑癌的角色。Coaxum 等^[19]研究发现抑制 NM IIA 的表达可增加 P53 野生型头颈部鳞状细胞癌的侵袭能力,提示了其在头颈鳞状细胞癌中起到抑癌作用。而更多的研究表明 NM IIA 在肿瘤中起到促癌作用。在一项关于胃癌的研究中发现,肿瘤组织高表达 NM IIA,且与患者病情进展和不良预后相关^[20]。体外实验研究表明抑制 NM IIA 的表达导致 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)水平的降低从而抑制胃癌细胞的迁移和侵袭^[21]。此外,有研究表明结直肠癌组织高表达 NM IIA,且与患者的低生存率相关,这可能与它激活 AMPK/mTOR 信号通路有关^[22]。Zhou 等^[23]发现 NM IIA 在胰腺癌中高表达,其主要通过激活 Wnt/ β -catenin 信号而促进胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。在肺癌的研究中表明,通过 DT-13(一种从麦冬中分离得到的具有生物活性的皂苷单体)下调 NM IIA 的表达可激活 Raf-ERK1/2 信号通路进而有效抑制肺癌细胞的迁移^[24]。Gao 等^[25]研究表明,通过 DT-13 靶向抑制 NM IIA 的表达可显著抑制乳腺癌细胞的迁移。综上所述, NM IIA 通过作用于不同的分子机制在不同的瘤种中发挥促癌或抑癌作用。除了上述的瘤种外,其是否参与其他肿瘤的发生发展尚不明确,有待进一步研究。阐明 NM IIA 在不同瘤种中的作用机制可为其在未来的临床应用提供理论支撑。

2 小鼠中 NM IIA 相关功能的研究

小鼠 NM IIA 主要在肝、肾、肺和脾表达,在心脏和大脑中有低表达,而在骨骼肌中不表达,与人类 NM IIA 同源度达 98%^[26]。近年来有研究表明 NM IIA 参与脑卒中病理生理过程的调节,与肾疾病的发生发展密切相关。其突变除了导致肾和血管的发育异常外,还影响血细胞的成熟和形态。

2.1 小鼠脑卒中中 NM IIA 功能的研究

NM IIA 与脑卒中的发病机制有关。体内外研究表明,脑卒中导致脑血管内皮细胞紧密连接蛋白 occludin, claudin-5, ZO-1 表达下调,引起血脑屏障通透性增加,而特异性敲降或者使用 NM II 的抑制剂 Blebbistatin 抑制脑血管内皮细胞的 NM IIA 的表达可恢复紧密连接蛋白的表达水平,降低血脑屏障通透性,减轻脑损伤^[27-28]。此外, NM IIA 还通过其他

机制调节脑卒中的发生发展。Wang 等^[29-30]发现,抑制 NM IIA 的表达可通过抑制神经元凋亡和促进神经元自噬发生而改善缺血性脑损伤。综上说明, NM IIA 可以通过多个途径参与调节脑卒中病理生理过程,而靶向抑制 NM IIA 的表达有望成为卒中治疗的新策略。

2.2 小鼠肾发育与疾病中 NM IIA 功能的研究

NM IIA 与肾的发育和疾病相关。研究表明小鼠 NM IIA 的 *R702C*、*D1424 N* 和 *E1841K* 位点突变会导致肾小球硬化和肾功能进行性下降,表现为足细胞消失和蛋白尿逐渐加重^[31]。除了点突变外, NM IIA 的缺失突变也会导致肾的发育异常。Recuenco 等^[32]研究发现条件性敲除肾间质细胞 NM IIA 不影响小鼠存活至成年但可导致小鼠肾功能衰竭,并出现肾小囊和肾小管扩张、肾囊肿等病理改变;而同时敲除肾间质细胞的 NM IIA 和 NM IIB 则会导致小鼠出生不久后死亡,表现为双肾体积减小,皮质的肾单位缺失和凋亡等病理变化。除了调控肾发育外, NM IIA 还与足细胞分离和缺失相关的肾疾病有关。Fan 等^[33]指出神经导向因子-2 (SLIT2) 及其受体 (ROBO2) 的激活可以抑制肾足细胞 NM IIA 的活性,从而引起足细胞间黏着斑形成的减少、细胞间黏附力减弱,导致蛋白尿等肾功能下降的表现。NM IIA 的突变导致肾异常发育的机制尚不明确,有待进一步研究。而 NM IIA 活性的抑制导致足细胞分离和缺失相关的肾疾病的发生,提示我们靶向激活 NM IIA 有利于提高足细胞的存活,从而恢复肾小球滤过屏障功能,最终实现对这类肾疾病的有效治疗。

2.3 小鼠血细胞成熟和凝血机制中 NM IIA 功能的研究

NM IIA 参与调控血小板形成、止血与凝血、红细胞成熟与形态维持等生理过程。研究发现 NM IIA 在巨核细胞和血小板表达^[34],且与小鼠巨核细胞中血小板形成和释放过程有关^[35-36],其缺失会导致小鼠的血小板减少症^[37]。另外, NM IIA 缺失通过影响巨核细胞肌动蛋白的结构,而影响细胞器分布,进而导致成熟的血小板细胞器含量的异常^[38]。NM IIA 在止血和血栓形成过程中具有重要作用, Li 等^[39]发现条件性敲除血管内皮细胞 NM IIA 导致分泌性细胞器 WPB (Weibel-Palade body) 释放障碍,即影响 vWF (von Willebrand factor) 的释放,导致凝血时间延长。NM IIA 除了与血小板形成和促凝血机

制有关,还与网织红细胞的成熟和红细胞双凹圆盘状形态的维持有关^[40-41]。而 Kanematsu 等^[42]发现 NM IIA 突变导致小鼠血红蛋白减少,促红细胞生成素升高和巨脾症。但因其突变并不影响红细胞的分化过程,故作者认为这可能与 NM IIA 突变导致造血微环境异常有关,具体机制有待进一步研究。

2.4 小鼠血管发生中 NM IIA 功能的研究

NM IIA 在小鼠血管发育方面具有不可替代的作用。Ma 等^[43]发现条件性敲除血管内皮细胞 NM IIA 将导致胚胎小鼠背部皮肤的血管密度减少、血管异常聚集成团等,而同时敲除 NM IIA 和 NM IIB 则会加重血管异常的程度。新近的研究认为,血管发生由内皮细胞上的丝状伪足来源的指状突起介导,指状突起与胞外无血管基质联系紧密,从而引导血管发生,丝状伪足与指状突起的数量平衡在调节血管发生中起重要作用。体外实验表明, NM IIA 在尖细胞中的表达水平明显高于茎细胞,且通过调节指状突起和丝状伪足之间的数量平衡从而调控血管出芽,引导血管发生^[44]。综上表明 NM IIA 是维持血管正常发育中的重要因子,其缺失是导致血管发生缺陷的重要原因,但其中的调控机制尚未完全明确,有待进一步研究。

3 斑马鱼中 NM IIA 相关功能的研究

斑马鱼是新兴的模式生物。斑马鱼的 *myh9* 有两个亚型, *myh9a* 和 *myh9b*, 与人类 *MYH9* 基因同源度分别为 77% 和 79%, 其中 *myh9a* 位于 6 号染色体的反义链, 而 *myh9b* 位于 3 号染色体的反义链^[45]。 *myh9a* 和 *myh9b* 在斑马鱼幼鱼表皮层表达, 此外, *myh9b* 还在脑组织表达^[46-47]。研究表明 NM IIA 对斑马鱼脑、肾、颅面发育至关重要。

3.1 斑马鱼脑发育中 NM IIA 功能的研究

在斑马鱼脑形态发生过程中, NM IIA 具有重要作用。Gutzman 等^[46]利用斑马鱼来研究调节脊椎动物高度保守的中脑-后脑边界 (midbrain-hindbrain boundary, MHB) 首次折叠的分子机制, 发现 NM IIA 可通过调节细胞缩短从而促进 MHB 收缩, 形成正常的脑形态。利用 *myh9b* 特异性吗啉代寡核苷酸 (morpholino oligonucleotide, MO) 抑制 NM IIA 的表达导致斑马鱼 MHB 收缩区域上的细胞明显变长, 引起 MHB 收缩减弱、MHB 交角变大, 脑形态异常。综上表明 NM IIA 对细胞形状的维持和脑形态的发育至关重要。

3.2 斑马鱼肾发育中 NM IIA 功能的研究

在斑马鱼前肾的研究中,利用 *myh9* 特异性 MO 抑制 NM IIA 的表达除了可观察到幼鱼肾小球形态发育异常、肾小球的毛细血管数量减少和畸形、肾小囊囊腔增大和系膜细胞数量减少等现象外,还可观察到肾小球基膜不均匀增厚、内皮窗孔减少等超微结构改变。通过肾功能评价实验表明,抑制 NM IIA 的表达将导致肾小球滤过率下降^[48]。因此,NM IIA 对维持斑马鱼肾的正常发育及功能至关重要,但其在肾发育中的分子机制尚不明确,有待进一步研究。

3.3 斑马鱼其他组织中 NM IIA 功能的研究

除了调控斑马鱼脑和肾发育外,NM IIA 还参与其他组织器官发育。研究表明,NM IIA 通过与 Trio (Rho-GEF 家族成员之一)相互作用来调控神经嵴细胞迁移和分化从而维持颅面结构的正常发育^[49]。Casalou 等^[50]证实,NM IIA 在 Arl13b(一种 Arf 样蛋白)的介导下参与斑马鱼圆形背部皱褶形成。在血液系统中,抑制 NM IIA 的表达后并未发现血小板聚集和血栓形成^[48],但抑制 NM IIA 是否影响血小板形态尚不明确。此外 NM IIA 是否参与其他血液细胞的形态和功能调控也有待进一步研究。

4 结语

NM IIA 在物种间是保守的,几乎在所有细胞中表达,参与调控细胞黏附、细胞迁移、极化和粘附、细胞形状维持和信号转导等细胞生理过程。NM IIA 对器官发育至关重要,其突变可导致脑、肾和血管的发育异常。近年来有研究报导 NM IIA 通过多个途径参与调控脑卒中的病理生理过程,抑制 NM IIA 表达通过上调紧密连接蛋白从而减少脑卒中的血脑屏障渗漏,同时,抑制 NM IIA 的表达可减少神经元凋亡和促进神经元自噬发生进而减轻脑损伤,但其是否还通过其他途径参与脑卒中的发生发展的调控尚不明确,有待进一步研究。此外,有研究表明,NM IIA 在肿瘤的发生发展中表现出双面性,例如在头颈鳞癌中表现出抑癌作用,而在胃癌和胰腺癌中表现出促癌作用。但目前仍有多多个瘤种未见其报道,明确其在其他瘤种中的具体作用机制,可为 NM IIA 在肿瘤诊断和治疗方面的应用提供理论支撑。

参考文献:

[1] Sebé-Pedrós A, Grau-Bové X, Richards TA, et al. Evolution

and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach [J]. *Genome Biol Evol*, 2014, 6(2): 290–305.

[2] Pecci A, Ma X, Savoia A, et al. MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease [J]. *Gene*, 2018, 664: 152–167.

[3] Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1496 (1): 3–22.

[4] Marigo V, Nigro A, Pecci A, et al. Correlation between the clinical phenotype of MYH9-related disease and tissue distribution of class II nonmuscle myosin heavy chains [J]. *Genomics*, 2004, 83(6): 1125–1133.

[5] Golomb E, Ma X, Jana SS, et al. Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (4): 2800–2808.

[6] Seri M, Pecci A, Di Bari F, et al. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2003, 82(3): 203–215.

[7] Verver E, Pecci A, De Rocco D, et al. R705H mutation of MYH9 is associated with MYH9-related disease and not only with non-syndromic deafness DFNA17 [J]. *Clin Genet*, 2015, 88 (1): 85–89.

[8] Smith AS, Pal K, Nowak RB, et al. MYH9-related disease mutations cause abnormal red blood cell morphology through increased myosin-actin binding at the membrane [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(6): 667–677.

[9] Peniä S, Fošnariä M, Mesarec L, et al. Active forces of myosin motors may control endovesiculation of red blood cells [J]. *Acta Chim Slov*, 2020, 67(2): 674–681.

[10] Arrondel C, Vodovar N, Knebelmann B, et al. Expression of the nonmuscle myosin heavy chain IIA in the human kidney and screening for MYH9 mutations in Epstein and Fechtner syndromes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(1): 65–74.

[11] O’Searghdha CM, Parekh RS, Hwang SJ, et al. The MYH9/ APOL1 region and chronic kidney disease in European-Americans [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(12): 2450–2456.

[12] Tayo BO, Kramer H, Salako BL, et al. Genetic variation in APOL1 and MYH9 genes is associated with chronic kidney disease among Nigerians [J]. *Int Urol Nephrol*, 2013, 45(2): 485–494.

[13] Tavira B, Coto E, Gómez J, et al. Association between a MYH9 polymorphism (rs3752462) and renal function in the Spanish RENASTUR cohort [J]. *Gene*, 2013, 520(1): 73–76.

[14] Zhao H, Ma L, Yan M, et al. Association between MYH9 and APOL1 gene polymorphisms and the risk of diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes in a Chinese han population [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 5068578.

[15] Kang JS, Lee SJ, Lee JH, et al. Angiotensin II-mediated MYH9 downregulation causes structural and functional podocyte injury in diabetic kidney disease [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7679.

- [16] Wasano K, Matsunaga T, Ogawa K, et al. Late onset and high-frequency dominant hearing loss in a family with MYH9 disorder [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2016, 273(11): 3547–3552.
- [17] Lalwani AK, Goldstein JA, Kelley MJ, et al. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9 [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67(5): 1121–1128.
- [18] Verver EJ, Topsakal V, Kunst HP, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutation predicts severity and progression of sensorineural hearing loss in patients with MYH9-related disease [J]. *Ear Hear*, 2016, 37(1): 112–120.
- [19] Coaxum SD, Tiedeken J, Garrett-Mayer E, et al. The tumor suppressor capability of p53 is dependent on non-muscle myosin IIA function in head and neck cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14): 22991–23007.
- [20] Liu D, Zhang L, Shen Z, et al. Clinicopathological significance of NMIIA overexpression in human gastric cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(11): 15291–15304.
- [21] Liu T, Ye Y, Zhang X, et al. Downregulation of non-muscle myosin IIA expression inhibits migration and invasion of gastric cancer cells via the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1639–1644.
- [22] Wang Z, Zhu Z, Li C, et al. NMIIA promotes tumorigenesis and prevents chemosensitivity in colorectal cancer by activating AMPK/mTOR pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2021, 398(1): 112387.
- [23] Zhou P, Li Y, Li B, et al. NMIIA promotes tumor growth and metastasis by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in pancreatic cancer [J]. *Oncogene*, 2019, 38(27): 5500–5515.
- [24] Wei XH, Lin SS, Liu Y, et al. DT-13 attenuates human lung cancer metastasis via regulating NMIIA activity under hypoxia condition [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(2): 991–999.
- [25] Gao Y, Khan GJ, Wei X, et al. DT-13 inhibits breast cancer cell migration via non-muscle myosin II-A regulation in tumor microenvironment synchronized adaptations [J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(9): 1591–1602.
- [26] D'Apolito M, Guarnieri V, Boncristiano M, et al. Cloning of the murine non-muscle myosin heavy chain IIA gene ortholog of human MYH9 responsible for May-Hegglin, Sebastian, Fechtner, and Epstein syndromes [J]. *Gene*, 2002, 286(2): 215–222.
- [27] Gong S, Cao G, Li F, et al. Endothelial conditional knockdown of NMMHC IIA (nonmuscle myosin heavy chain IIA) attenuates blood-brain barrier damage during ischemia-reperfusion injury [J]. *Stroke*, 2021, 52(3): 1053–1064.
- [28] Lv Y, Liu W, Ruan Z, et al. Myosin IIA regulated tight junction in oxygen glucose-deprived brain endothelial cells via activation of TLR4/PI3K/Akt/JNK1/2/14–3–3epsilon/NF- κ B/MMP9 signal transduction pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(2): 301–319.
- [29] Wang G, Wang T, Zhang Y, et al. NMMHC IIA inhibition ameliorates cerebral ischemic/reperfusion-induced neuronal apoptosis through Caspase-3/ROCK1/MLC pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 13–25.
- [30] Wang G, Wang T, Hu Y, et al. NMMHC IIA triggers neuronal autophagic cell death by promoting F-actin-dependent ATG9A trafficking in cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 428.
- [31] Zhang Y, Conti MA, Malide D, et al. Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A [J]. *Blood*, 2012, 119(1): 238–250.
- [32] Recuenco MC, Ohmori T, Tanigawa S, et al. Nonmuscle myosin ii regulates the morphogenesis of metanephric mesenchyme-derived immature nephrons [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(5): 1081–1091.
- [33] Fan X, Yang H, Kumar S, et al. SLIT2/ROBO2 signaling pathway inhibits nonmuscle myosin IIA activity and destabilizes kidney podocyte adhesion [J]. *JCI Insight*, 2016, 1(19): e86934.
- [34] Badirou I, Pan J, Souquere S, et al. Distinct localizations and roles of non-muscle myosin II during proplatelet formation and platelet release [J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(5): 851–859.
- [35] Chen Z, Naveiras O, Balduini A, et al. The May-Hegglin anomaly gene MYH9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by the Rho-ROCK pathway [J]. *Blood*, 2007, 110(1): 171–179.
- [36] Aguilar A, Pertuy F, Eckly A, et al. Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation [J]. *Blood*, 2016, 128(16): 2022–2032.
- [37] Pal K, Nowak R, Billington N, et al. Megakaryocyte migration defects due to nonmuscle myosin IIA mutations underlie thrombocytopenia in MYH9-related disease [J]. *Blood*, 2020, 135(21): 1887–1898.
- [38] Pertuy F, Eckly A, Weber J, et al. Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets [J]. *Blood*, 2014, 123(8): 1261–1269.
- [39] Li P, Wei G, Cao Y, et al. Myosin IIA is critical for cAMP-mediated endothelial secretion of von Willebrand factor [J]. *Blood*, 2018, 131(6): 686–698.
- [40] Moura PL, Hawley BR, Mankelov TJ, et al. Non-muscle myosin II drives vesicle loss during human reticulocyte maturation [J]. *Haematologica*, 2018, 103(12): 1997–2007.
- [41] Alimohamadi H, Smith AS, Nowak RB, et al. Non-uniform distribution of myosin-mediated forces governs red blood cell membrane curvature through tension modulation [J]. *PLoS Comput Biol*, 2020, 16(5): e1007890.
- [42] Kanematsu T, Suzuki N, Tamura S, et al. Myh9 R702C is associated with erythroid abnormality with splenomegaly in mice [J]. *Nagoya J Med Sci*, 2021, 83(1): 75–86.
- [43] Ma X, Uchida Y, Wei T, et al. Nonmuscle myosin 2 regulates cortical stability during sprouting angiogenesis [J]. *Mol Biol Cell*, 2020, 31(18): 1974–1987.
- [44] Figueiredo AM, Barbacena P, Russo A, et al. Endothelial cell

invasion is controlled by dactylopodia [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(18): e2023829118.

[45] Flicek P, Ahmed I, Amode MR, et al. Ensembl 2013 [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41: 48–55.

[46] Gutzman JH, Sahu SU, and Kwas C. Non-muscle myosin IIA and IIB differentially regulate cell shape changes during zebrafish brain morphogenesis [J]. Dev Biol, 2015, 397(1): 103–115.

[47] Huang Y, Wang X, Wang X, et al. Nonmuscle myosin II-B (myh10) expression analysis during zebrafish embryonic development [J]. Gene Expr Patterns, 2013, 13 (7): 265–270.

[48] Müller T, Rumpel E, Hradetzky S, et al. Non-muscle myosin IIA is required for the development of the zebrafish glomerulus [J]. Kidney Int, 2011, 80(10): 1055–1063.

[49] Guo S, Meng L, Liu H, et al. Trio cooperates with Myh9 to regulate neural crest-derived craniofacial development [J]. Theranostics, 2021, 11(9): 4316–4334.

[50] Casalou C, Seixas C, Portelinha A, et al. Arl13b and the non-muscle myosin heavy chain IIA are required for circular dorsal ruffle formation and cell migration [J]. J Cell Sci, 2014, 127 (12): 2709–2722.

[收稿日期]2022-01-24

(上接第 79 页)

[6] 钟惠敏, 李霞, 王销颖, 等. 胎盘体积及胎盘血流灌注的变化与胎儿发育的关系 [J]. 广东医学, 2018, 39(4): 559–561.

[7] 米亚英. 原因不明自然流产发病机制的研究 [J]. 中国医药科学, 2011, 1(1): 24–25, 54.

[8] 姜培娟, 林其德, 赵爱民, 等. IL-4 与 IL-10 联合免疫对趋化因子受体 CCR3、CCR5、CXCR 3 的选择性诱导对自然流产模型小鼠胚胎丢失率的影响 [J]. 现代妇产科进展, 2009, 18 (5): 354–358.

[9] 林羿, 曾耀英, 狄静芳. 自发性流产 CBA/J×DBA/2 小鼠母-胎界面 DX5+CD69⁺细胞的浸润 [J]. 暨南大学学报, 2005, 26(4): 508–512, 529.

[10] 林羿, 曾耀英, 曾山, 等. 在反复自然流产模型 CBA/J×DBA/2 小鼠血清中未检测出抗精子抗体 [J]. 暨南大学学报, 2002, 23(3): 121–124.

[11] 徐慧, 王玉兰, 宋晓晖, 等. 维生素 D3 对自然流产模型小鼠胚胎丢失率及外周血免疫细胞的影响 [J]. 解剖学报, 2017, 48(5): 595–599.

[12] Xu WM, Xiao ZN, Wang XB, et al. IL-17 induces fetal loss in a CBA/J×BALB/c mouse model, and an anti-IL-17 antibody prevents fetal loss in a CBA/J×DBA/2 Mouse Model [J]. Am J Reprod Immunol, 2016, 75(1): 51–58.

[13] Brown LY, Bonney EA, Raj RS, et al. Generalized disturbance of DNA methylation in the uterine decidua in the CBA/J×DBA/2 mouse model of pregnancy failure [J]. Biol Reprod, 2013, 89 (5): 120.

[14] Shin DL, Pandey AK, Ziebarth JD, et al. Segregation of a spontaneous klr1 (CD94) mutation in DBA2 mouse substrain [J]. G3 (Bethesda), 2014, 5(2): 235–239.

[15] Ho HN, Chen SU, Yang YS, et al. Age, environment, and lymphocyte immunization influence the spontaneous resorption rate in the CBA/J×DBA/2J mouse model [J]. Am J Reprod Immunol, 1994, 31(1): 47–51.

[收稿日期]2021-09-03

赵治鹏,李善刚. DMD 的肌膜损伤机制及其修复治疗的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 93-99.

Zhao ZP, Li SG. Research progress on the mechanism of sarcolemma damage and repair treatment of Duchenne muscular dystrophy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 93-99.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.014

DMD 的肌膜损伤机制及其修复治疗的研究进展

赵治鹏^{1,2}, 李善刚^{1,2*}

(1. 昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 昆明 650500; 2. 省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室, 昆明 650500)

【摘要】 杜氏肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种严重的致死性肌肉疾病, 定位于肌膜的抗肌萎缩蛋白 dystrophin 功能缺失是其致病因素。目前 DMD 研究的热点聚焦于如何对疾病进行治疗, 其中膜功能的恢复已经成为临床治疗的密切关注点。本综述将着重总结 dystrophin 异常引起肌膜损伤的机制及膜修复治疗的研究进展, 通过从肌膜的角度理解 DMD 的病理机制来促进干预治疗的研究进程。

【关键词】 杜氏肌营养不良症; 肌膜损伤; 肌膜修复治疗

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856 (2022) 06-0093-07

Research progress on the mechanism of sarcolemma damage and repair treatment of Duchenne muscular dystrophy

ZHAO Zhipeng^{1,2}, LI Shangang^{1,2*}

(1. Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China.
2. State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500)

【Abstract】 Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a fatal muscle disease caused by the loss of dystrophin protein, which is localized in the sarcolemma. Currently, DMD research concentrates on how to treat the disease, and the restoration of membrane function has become a promising therapeutic approach. This review focuses on the mechanism by which muscle membrane damage is caused by dystrophin abnormality and summarizes the research progress regarding membrane repair therapy toward its clinical application.

【Keywords】 Duchenne muscular dystrophy; sarcolemma damage; sarcolemma repair treatment

杜氏肌营养不良症 (DMD) 是由抗肌萎缩蛋白 (dystrophin) 基因突变造成的一种 X 染色体连锁的隐性遗传病^[1], 在世界上新生男婴的发病率约为 1/3500~1/5000^[2]。患者会在 2~3 岁时开始发病, 表现出肌肉退化, 行走困难等症状, 随着年龄的增长基本丧失行动能力, 生活不能自理, 在 20~30 岁, DMD 患者会发展为严重的扩张型心肌病, 出现心律失常, 最终会因心脏或呼吸衰竭而亡^[3-4]。Dystrophin 作为 DMD 的靶蛋白定位于肌膜内表面, 包含四个结构域: N-末端结构域、血影样棒状结构

域, 半胱氨酸丰富域及 C-末端结构^[5]。在肌细胞内, N-末端结构域与 F-actin 结合, C-末端结构域与肌纤维膜上的抗肌萎缩蛋白相关糖蛋白 (DAGs) 结合^[5], DAGs 与 dystrophin 共同组成 DAPC (dystrophin associated protein complex), 这样的结合使 dystrophin 作为分子缓震器对肌细胞胞内基质与肌细胞膜的连接及细胞膜的稳定起着至关重要的作用^[6]。DAGs 作为多种蛋白质的复合物, 包含以下成份: dystroglycans (α 、 β)、sarcoglycans (α 、 β 、 γ 、 δ 、 ε)、sarcospan、 α -dystrobrevins、syntrophins (α_1 、

【基金项目】 国家自然科学基金 (81930121)。

【作者简介】 赵治鹏 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 发育生物学。E-mail: zzpps15122@163.com

【通信作者】 李善刚 (1970—), 男, 副教授, 研究方向: 遗传性疾病的基因治疗。E-mail: lisg@lpbr.cn

β_1)、syncoilin、nNOS、Laminin-2、caveolin-3、sodium channels。同样,其中部分蛋白质的缺失也与许多肌肉疾病有关,这说明了该复合物在维持肌膜完整性方面的重要作用^[7]。因为 dystrophin 定位在膜上,所以有相当一部分研究关注膜的变化,虽然我们早已发现 DMD 会发生肌膜损伤,但是具体的损伤机制还需进一步的探讨。肌膜的完整性对于肌肉功能维持具有重要作用,本文将对 DMD 肌膜损伤的机制和功能修复治疗的研究进行综述和分析。

1 DMD 肌膜损伤的机制

正常的肌肉组织具有完整的保护和修复机制。肌肉在离心收缩,也即发生拉伸的收缩时更容易引起肌肉损伤。例如,在正常的下坡过程中,股四头肌肌群反复拉伸,会导致立即无力,随后几天又会引起疼痛、肿胀和发炎(迟发性肌肉酸痛)。这种轻度的肌肉损伤通常在 1~2 周后即可完全恢复,当损伤严重时,肌纤维会发生损坏,然后激活的卫星细胞分裂产生肌细胞,从而融合并替换肌纤维的受损区域^[8]。

但是,在 DMD 患者中,由于 dystrophin 的缺乏以及相关 DAGs 的丢失,肌细胞的稳态发生失衡,而对于 DMD 肌膜完整性受损的探究,定然是从 dystrophin 本身或者是 dystrophin 缺失引起的一系列次级反应着手。dystrophin 连接到多个机械转导和信号通路,这些通路共同起作用以感知和传递肌肉收缩力和膜完整性的信号。到目前为止,对肌膜脆性和通透性增加的原因有以下 4 种假设:(1) DAPC 在肌肉收缩过程中为肌膜提供了机械稳定性^[9-10];(2) dystrophin 作为拉伸激活离子通道的支架蛋白,影响了其对钙的渗透性^[11];(3) 与 dystrophin 连接的信号复合物神经元型一氧化氮合酶(nNOS)的缺失影响血管舒张和向工作肌肉的血流^[12];(4) 由于再生不完全导致的纤维分支引起肌肉变性和再生的恶性循环^[13]。

1.1 肌膜的完整性需要 DAPC 的支持

从结构的角度来看,单纯的磷脂双分子层不足以抵消肌肉收缩过程中施加在膜上的显著作用力,肌膜的结构完整性还需要各种细胞骨架蛋白的参与,比如 dystrophin、F-actin 等^[14]。dystrophin 作为肌细胞中重要的膜蛋白,它直接或者间接地与各种细胞骨架蛋白相联系,这种结构组成能够有效地将肌细胞收缩产生的压力传递出去,从而保护其免受肌肉收缩过程中产生的膜应力的影响^[15]。目前,被

广泛接受的解释膜通透性增加的理论是:dystrophin 缺乏使膜更易破碎,收缩应力导致膜撕裂,从而增加了膜通透性。作为判断肌膜是否出现破裂最为直观的方式就是进行电镜观察,早在 1975 年,Mokri 等^[16]就通过透射电镜分析直接显示了 DMD 病人股外侧肌中肌膜的破损,并将其称为 delta 损伤。在 DMD 的秀丽隐杆线虫模型中,电镜结果同样揭示了肌膜完整性的丧失^[17]。实际上,在 DMD 的临床诊断中,一般通过检测肌细胞“泄露”到血清中的可溶性肌酸激酶来判断肌肉损伤^[18]。

总之,dystrophin 在保护肌膜免受机械损伤中起着重要的作用。虽然细胞膜自身具有修复能力,但是对于 DMD 病人,由于 dystrophin 的缺失,膜破损的频率更高,反复的膜破损和修复只会加速肌细胞的稳态失调,最终导致肌肉的损伤。

1.2 Ca^{2+} 稳态失调增加肌膜透性

肌膜破损只是膜通透性增加的原因之一。为了更好的将其与膜通透性增加的其他原因区分开来,2003 年,Bansal 等^[19]直接利用激光人工破膜,通过荧光标记实时观测肌膜的自动修复过程。实验结果发现,在不到 1 min 的时间内肌膜就完成了自我修复,而且,mdx 小鼠的肌膜修复能力表现正常,与对照组相比没有差异。通过以上实验我们可以合理假设,由离心收缩引起的肌膜破损会同步导致膜通透性增加并在 1 min 左右后恢复正常。然而,Yeung 等^[20]和 Sonobe 等^[21]对 mdx 小鼠肌纤维的研究发现,细胞内钙浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)在拉伸收缩后缓慢增加,并在 10~20 min 后达到最大值,并且离子浓度的增加可被拉伸激活通道的阻断药物所消除,另一项实验发现 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 没有显示出与损伤一致的近膜局部升高,这些证据表明 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高是由通道激活而不是膜损伤引起的。

拉伸激活通道最初是由 Guharay 和 Sachs 在 1984 年提出^[22],这些通道可渗透大多数阳离子,并在正常条件下允许 Na^+ 和 Ca^{2+} 进入。这类拉伸激活通道(SAC)对非特异性阳离子(NSC)具有渗透性,因此称为 SAC_{NSC} 。已有研究表明, SAC_{NSC} 在 mdx 小鼠肌肉中更活跃^[23-24]。 SAC_{NSC} 本身的分子结构目前尚不明确,TRPC1、TRPC6 和 TRPV2(瞬时受体电位)是其潜在的分子组成。针对 SAC_{NSC} 的膜片钳实验发现, SAC_{NSC} 并不是通过拉伸收缩直接激活的,进一步的研究后,Allen 等^[25]提出了如下通路:拉伸收缩引起 ROS(活性氧)的产生,ROS 可激活 src 激酶,该激酶的活性导致 SAC_{NSC} 的开放进而增加了

Ca^{2+} 的内流。为了支持通道激活理论, Allen 团队已证明对 mdx 肌肉拉伸收缩后, 肌细胞对染料的摄入可逐渐增加并持续 60 min 以上, 并且使用 SAC_{NSC} 阻滞剂能阻止大部分这种增加的膜渗透性。另外, 使用 ROS 清除剂也可减少膜渗透性。

Ca^{2+} 稳态对肌细胞正常的生理功能至关重要, 对于缺乏 dystrophin 的肌纤维来说, 拉伸收缩将会引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的异常升高, 同时造成胞内 Ca^{2+} 相关通路的异常激活和扰动, 最终导致肌细胞结构改变和功能失调。线粒体作为细胞的能量供应中心, 当线粒体 Ca^{2+} 过载时, 会引起线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 不可逆打开, 最终导致线粒体功能失调甚至细胞死亡。此外, 线粒体产生的 ROS 可以导致肌膜上相应通道开放和膜脂的过氧化, 这些均会增加肌膜的通透性^[26]。

1.3 神经元型一氧化氮合酶 (nNOS) 的缺失间接加剧肌膜的损伤

nNOS 是 NO 合成的关键酶, 在肌肉中, nNOS 作为 DAPC 之一定位于肌膜上。nNOS 产生的 NO 可以释放到肌细胞外引起血管扩张, 确保肌肉在运动过程中能获得大量血液输送来的葡萄糖和氧气^[27]。因为 DMD 病人中 nNOS 缺失, 所以其肌肉的运动并不会引起血管的扩张, 继而会导致运动部位缺血, 加重肌膜损伤, 诱发局部坏死^[28]。

在 mdx 小鼠中 nNOS 也同样丢失, 当恢复肌膜上 nNOS 的表达后, 可以显著改善 mdx 小鼠的病理表型。在对 min-dystrophin 进行设计时, 保留 nNOS 的结合位点对后续的治疗疗效至关重要^[29-30]。这些实验结果都说明 nNOS 在肌肉当中充当着重要的角色。总之, nNOS 虽然不是 DMD 病理的基础, 但它在活动肌肉中可以对血管收缩进行调节, 保证肌肉的正常工作, nNOS 的缺失间接加剧了肌膜的损伤^[12]。

1.4 肌纤维分支增加诱发损伤的易感性

很多研究已经发现, 离心收缩后, mdx 小鼠的肌肉比野生型小鼠的更易受损。然而, 事实并非总是如此, 当使用年轻的小鼠 (≤ 8 周) 进行实验时, 肌肉损伤就不再具有差异性^[31]。这两组实验的区别在于实验对象年龄的不同, 那么 mdx 小鼠的年龄对其肌肉有什么影响呢?

通常纤维分支是肌纤维再生期间肌管异常融合的结果^[32], 早期研究发现, 随着年龄的增加, mdx 小鼠肌纤维的分支数量和复杂性均增加^[33]。同时, 我们也能看到肌肉的损伤程度与纤维分支的扩张

存在明显的相关性^[31]。为了直接分析分支纤维的影响, Head 等^[34] 分离出 mdx 小鼠单个的 EDL 纤维, 并对分支纤维进行检测, 发现分支纤维在相同收缩力下更易受损, 事实上, 纤维分支是肌肉萎缩症的典型病理表现。我们不难发现, 分支纤维的易损性导致肌肉退化, 而这又会刺激新的肌肉再生和肌管的异常融合, 由此造成了一个恶性循环, 加重肌肉的损伤和肌膜的不完整性。

目前来看, DMD 肌膜损伤主要来自运动的直接机械损伤、膜上离子通道的异常激活, 以及肌肉缺血和纤维分支引起的间接膜损伤。随着疾病进程的发展, 多种损伤途径均会加重肌肉负荷, 肌膜发生撕裂不仅造成胞内物质发生泄漏, 同时也促进了 Ca^{2+} 的内流, 受损的肌膜同样需要 Ca^{2+} 参与激活修复途径, 再加上本身就异常激活的 SAC_{NSC} , 这就导致了肌膜损伤的恶性循环, 另外, 肌肉缺血和纤维分支也只会加剧膜的损伤。因此, 针对 DMD 肌膜不同的损伤途径开展相应的治疗措施具有重要意义。

2 基于改善 DMD 肌膜透性的干预治疗策略

DMD 的肌膜损伤会引起一系列的 DMD 病理表型, 因此从肌膜损伤机制的阐述到治疗方式的探索研究是改善 DMD 的重要一步。不同的肌膜损伤机制需要不同的修复策略: 直接的膜破损需要膜稳定剂来维持膜的完整性, 肌膜通透性增加需要对应的抑制剂来调节细胞内外离子的稳态, 肌肉缺血需要提高 NO 的含量来增加血管扩张, 而纤维分支的增加则需要对肌纤维进行修复。

2.1 合成的膜稳定剂

因为 DMD 患者肌细胞最明显的病理特征就是肌膜破损, 所以针对破损肌膜使用合成的膜稳定剂来防止膜损伤是一种独特的治疗方法。

泊洛沙姆 188 (P188) 是聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯 (PEO-PPO-PEO) 三嵌段共聚物, 它作为一种非离子型表面活性剂, 主要用作乳化剂、增溶剂、基因药物载体等药用辅料, 并且是目前应用于静脉注射唯一人工乳化剂。另外, P188 在细胞膜的保护方面也有重要应用^[35-38]。P188 第一次在肌肉中的应用是在 1992 年, 研究人员使用 P188 显著减少了由电穿孔引起的肌细胞破损^[35]。在 DMD 领域, 具有开创性研究的是 Yasuda 等^[36] 在 2005 年证明对于分离的 mdx 小鼠心肌细胞, P188 可以通过阻断被动拉伸介导的 Ca^{2+} 过载, 改善心肌细胞的功能。体内实验同样取得了良好的结果, 使用 mdx 小鼠全身给

药 P188 能够改善心室构型并预防急性心力衰竭^[36]。在经典的 DMD 狗模型 (golden retriever muscular dystrophy, GRMD) 中,长期的 P188 注射可以预防左心室重塑、减少心肌纤维化、阻止心肌肌钙蛋白 I 的释放^[39]。对于 DMD 骨骼肌,早期研究并未看到 P188 的保护效果^[40],直到最近一项研究发现给药方式在其中起着重要作用。他们通过皮下给药,便能显著改善 mdx 小鼠后肢肌肉功能,降低伊文思蓝染料的吸收^[41],此外,皮下长期注射 P188 也能改善 mdx:utr^{-/-}小鼠的膈肌功能^[42]。对应的,腹腔给药或静脉注射就无法达到这样的治疗效果^[40,43]。2015 年,Phrixus 和 Ethicor 公司就 Carmeseal-MD (P-188NF) 的欧洲准入计划 (EAP) 进行合作,将 Carmeseal-MD 作为未经许可的医药产品提供给 DMD 呼吸和心脏缺陷患者。据报道,一名治疗长达 15 个月的患者具有良好的耐受性并观察到肌酸激酶和心肌肌钙蛋白 I 的降低。在未来,需要更大规模的人类临床数据来充分评估膜稳定剂对 DMD 患者的治疗效果。

2.2 肌膜上离子通道的抑制

对于 DMD,除了肌膜破损,肌膜上拉伸激活通道的过度激活同样会引起肌膜通透性增加、Ca²⁺ 大量内流和过载。链霉素可用作 Ca²⁺ 通道的非特异阻滞剂^[44],链霉素治疗延缓了年轻 mdx 小鼠肢体肌营养不良症状的发作,但不能阻止疾病进展。而长期使用链霉素治疗 mdx 小鼠可减少肢体肌肉病理,但在膈肌和心肌的治疗中并没有效果^[44]。另外一种 SAC_{NSC} 的阻滞剂 GsMTx-4 能够改善肌力、减少肌肉退化^[20],降低心肌细胞的静息 [Ca²⁺]_i^[45]。在 DMD 骨骼肌中,TRPC 家族已被证明可以作为靶点减少胞外 Ca²⁺ 的内流。通过反义寡核苷酸抑制 TRPC1 和 TRPC4 的表达能够降低 mdx 小鼠肌纤维中 Ca²⁺ 的进入^[46]。此外,转基因抑制 TRPC3 在 mdx 和 Scgd^{-/-}小鼠中的表达,可以减少纤维化、血清肌酸激酶和核中心化等肌营养不良表型^[47]。

钠氢离子交换蛋白 1 (Na⁺/H⁺ exchanger-1, NHE-1) 是一种跨膜蛋白,它不仅能够控制细胞体积而且参与调节胞内离子浓度^[48]。在 mdx 小鼠和 DMD 病人的骨骼肌中,胞内 Na⁺ 浓度增加,而 Na⁺ 过载往往会引起肌肉水肿和肌肉的退化^[49-50]。Rimeporide 是一种 NHE-1 的抑制剂,它在 mdx 小鼠上显示出了抗炎和抗纤维化的效果^[51],也在 GRMD 狗模型上看到了对心脏的保护作用^[52]。在 2016 年开展的 Ib 期临床试验中,Rimeporide 显示出良好

的剂量耐受性,同时作为一种心脏保护治疗表现出了对 DMD 的治疗潜力,这为进一步的疗效研究提供了依据^[51]。离子通道抑制剂能够针对特定的膜通道改善离子稳态,但是仍需要临床的检验来确定其疗效和安全性。另外,由于骨骼肌和心肌之间存在差异,抑制剂的具体作用也需进一步的研究。

2.3 血管扩张

肌肉收缩过程中,NO 合酶产生 NO,它激活鸟苷酸环化酶合成 cGMP,NO-cGMP 通路可以引起血管扩张,增加血液流动,为运动中的肌肉提供足够的氧气和营养^[53]。因为 DMD 患者缺乏 NO 合酶,相应的 cGMP 形成也减少,所以 DMD 的一个潜在治疗策略是放大 NO-cGMP 信号来改善血管舒张^[54]。

磷酸二酯酶 5 (Phosphodiesterase 5, PDE5) 抑制剂可以抑制 cGMP 的降解,从而放大 NO-cGMP 信号通路^[55]。西地那非和他达拉非是 PDE5 的两种抑制剂,这两种药物具有血管舒张作用,最初是用于治疗勃起功能障碍和心力衰竭^[56]。通过对 mdx 小鼠使用,能够显著改善小鼠的肌营养不良病理表型^[57-58]。但是一项 III 期临床试验证明他达拉非并不能改善 DMD 病人的活动能力 (NCT01865084),因此目前已停止关于他达拉非的相关研究^[59]。同样,另外一种抑制剂西地那非在一项临床试验中未显示出对心脏功能的改善,而且由于较多的副作用,此项试验也已停止^[60]。

在正常肌肉组织中,L-精氨酸可以转化为 NO,但是 DMD 病人中高合成的非对称性二甲基精氨酸和低合成的高精氨酸导致 NO 合酶转化率降低^[61]。因此,通过提高 L-精氨酸水平也是一种治疗策略。实验证明,L-精氨酸可以减轻 mdx 小鼠的炎症、增强肌肉再生^[62]。最近的一项 III 期临床试验显示,L-精氨酸和二甲双胍联合用药能够减缓 DMD 病人肌肉功能的下降^[63]。

总的来说,通过放大 NO-cGMP 信号通路的 PDE5 抑制剂对 DMD 病人的肌肉功能改善没有积极作用,而利用 L-精氨酸向 NO 的转化,不仅在 mdx 小鼠中看到了病理表型的改善,而且临床试验也取得了良好的效果,这为将来减轻 DMD 病人的肌肉缺血提供了新方案。

2.4 肌纤维分支的降低

肌纤维分支增加属于 DMD 后期的病理表型,随着肌肉不断地再生和坏死,脆弱的分支纤维只会加剧肌膜的损伤,而降低纤维分支的发生是预防和改善 DMD 肌肉病理的一项有效措施。

嗅觉受体 (olfactory receptor, OR) 是 G 蛋白偶联

受体,主要存在于嗅觉上皮的神经元中,但它们也在大脑,舌头,睾丸,脾脏,前列腺,肾脏以及平滑肌和骨骼肌等非嗅觉组织中表达^[64-65]。早在 2009 年,Griffin 等^[66]就发现小鼠嗅觉受体 23 (mOR23, olfr16) 是小鼠肌肉中调节肌纤维分支的分子,2016 年他们通过在骨骼肌中特异性表达 mOR23,发现能够降低肌肉损伤后肌纤维分支的发生率^[67]。肌肉细胞内的 mOR23 信号通路可以作为改善 DMD 患者肌肉结构功能的有效药物靶标,不过,目前需要进一步的研究来确定 mOR23 及其相关分子的途径,才能为后续使用小分子激活信号通路提供实验基础。

DMD 肌膜损伤的修复治疗策略主要以对应信号通路的抑制或激活为切入点,或者是使用膜稳定剂直接进行膜密封。我们可以看到,针对肌膜的损伤修复能够大大改善 DMD 的病理表型,这体现了肌膜完整性对延缓 DMD 疾病进程的重要性。但是,不论是哪种治疗方法,既要验证其在动物模型上的作用,也要走上临床,保证其安全性和有效性,这是漫长的一步,但也是疾病研究到临床转化的必经之路。

3 总结与展望

杜氏肌营养不良症作为一种严重的神经肌肉疾病,虽然我们早已确定 dystrophin 缺失是该疾病的发生原因,但是目前还没有完全治愈的方法。dystrophin 是肌细胞中重要的膜结构蛋白,它的缺失直接影响了肌膜的稳态并触发下游多种病理途径。DMD 肌膜破损和 Ca^{2+} 稳态失调是引起肌膜损伤的直接原因,除此之外,nNOS 的缺失和纤维分支的增加也间接加剧了膜损伤。根据不同的损伤机制,我们可以采取相应的药物来改善肌膜的功能,不论是使用 P188 直接稳定肌膜还是使用 Rimeporide 等改善胞内外离子稳态,相比于基因疗法,这些药理学的治疗策略不用考虑患者的突变类型,适用于所有的 DMD 患者。目前,关于 DMD 肌膜修复的研究发展迅速,比如最近徐浩新团队利用小分子激活溶酶体上的 TRP 通道,促进溶酶体胞吐来修复肌膜损伤,改善了 mdx 小鼠的病理表型^[68-69]。此外,有关肌细胞损伤修复的研究也在不断发展,除了依赖于肌卫星细胞,Roman 等^[70]最近还发现肌细胞损伤后可以触发钙离子、Cdc42 和磷酸激酶 C 的信号级联反应,通过微管和动力蛋白,肌核能够迁移到损伤区域在局部递送 mRNA 加快肌细胞的修复。由此我们可以看到肌膜的损伤修复机制仍在不断完善中,肌膜本身的复杂性以及 dystrophin 这个重要膜

蛋白的缺失使得 DMD 中的膜损伤受到多方面的影响,因此在未来需要更多的研究去探索新的 DMD 肌膜损伤机制。同时我们可以看到,DMD 肌膜完整性的维持与整体组织健康之间有着重要的联系,DMD 病理的开始和进展也以膜损伤为特征,因此膜修复机制的调节具有巨大的治疗潜力。

参考文献:

- [1] Mercuri E, Muntoni F. Muscular dystrophies [J]. Lancet, 2013, 381 (9869) : 845-860.
- [2] Crisafulli S, Sultana J, Fontana A, et al. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis [J]. Orphanet J Rare Dis, 2020, 15 (1) : 141.
- [3] Meyers TA, Townsend D. Cardiac pathophysiology and the future of cardiac therapies in duchenne muscular dystrophy [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (17) : 4098.
- [4] Silva IS, Pedrosa R, Azevedo IG, et al. Respiratory muscle training in children and adults with neuromuscular disease [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2019, 9 (9) : 11711.
- [5] Nakamura A, Takeda S. Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications [J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011 : 184393.
- [6] Whitmore C, Morgan J. What do mouse models of muscular dystrophy tell us about the DAPC and its components? [J]. Int J Exp Pathol, 2014, 95 (6) : 365-377.
- [7] Dowling JJ, Weihl CC, Spencer MJ. Molecular and cellular basis of genetically inherited skeletal muscle disorders [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22 (11) : 713-732.
- [8] Almada AE, Wagers AJ. Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17 (5) : 267-279.
- [9] Clafflin DR, Brooks SV. Direct observation of failing fibers in muscles of dystrophic mice provides mechanistic insight into muscular dystrophy [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294 (2) : 651-658.
- [10] Ervasti JM. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772 (2) : 108-117.
- [11] Allen DG, Whitehead NP, Froehner SC. Absence of dystrophin disrupts skeletal muscle signaling: roles of Ca^{2+} , reactive oxygen species, and nitric oxide in the development of muscular dystrophy [J]. Physiol Rev, 2016, 96 (1) : 253-305.
- [12] Timpani CA, Hayes A, Rybalka E. Therapeutic strategies to address neuronal nitric oxide synthase deficiency and the loss of nitric oxide bioavailability in Duchenne Muscular Dystrophy [J]. Orphanet J Rare Dis, 2017, 12 (1) : 100.
- [13] Kiriaev L, Kueh S, Morley JW, et al. Branched fibers from old fast-twitch dystrophic muscles are the sites of terminal damage in muscular dystrophy [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 314 (6) : C662-C674.
- [14] Sitarska E, Diz-Muñoz A. Pay attention to membrane tension: Mechanobiology of the cell surface [J]. Curr Opin Cell Biol,

- 2020, 66: 11–18.
- [15] Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, et al. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(8): 3710–3714.
 - [16] Mokri B, Engel AG. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber [J]. *Neurology*, 1975, 25(12): 1111–1120.
 - [17] Brouilly N, Lecroisey C, Martin E, et al. Ultra-structural time-course study in the *C. elegans* model for Duchenne muscular dystrophy highlights a crucial role for sarcomere-anchoring structures and sarcolemma integrity in the earliest steps of the muscle degeneration process [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(22): 6428–6445.
 - [18] De Freitas Nakata KC, Da Silva Pereira PP, Salgado Riveros B. Creatine kinase test diagnostic accuracy in neonatal screening for Duchenne Muscular Dystrophy: A systematic review [J]. *Clin Biochem*, 2021, 98: 1–9.
 - [19] Bansal D, Miyake K, Vogel SS, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy [J]. *Nature*, 2003, 423(6936): 168–172.
 - [20] Yeung EW, Whitehead NP, Suchyna TM, et al. Effects of stretch-activated channel blockers on $[Ca^{2+}]_i$ and muscle damage in the mdx mouse [J]. *J Physiol*, 2005, 562(2): 367–380.
 - [21] Sonobe T, Inagaki T, Poole DC, et al. Intracellular calcium accumulation following eccentric contractions in rat skeletal muscle in vivo: role of stretch-activated channels [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(4): R1329–R1337.
 - [22] Guharay F, Sachs F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle [J]. *J Physiol*, 1984, 352: 685–701.
 - [23] Franco-Obregón A, Lansman JB. Changes in mechanosensitive channel gating following mechanical stimulation in skeletal muscle myotubes from the mdx mouse [J]. *J Physiol*, 2002, 539(2): 391–407.
 - [24] Ducret T, Vandebrouck C, Cao ML, et al. Functional role of store-operated and stretch-activated channels in murine adult skeletal muscle fibres [J]. *J Physiol*, 2006, 575(3): 913–924.
 - [25] Allen DG, Gervasio OL, Yeung EW, et al. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(2): 83–91.
 - [26] Zabłocka B, Górecki DC, Zabłocki K. Disrupted calcium homeostasis in duchenne muscular dystrophy: a common mechanism behind diverse consequences [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20): 11040.
 - [27] Meconell GK, Rattigan S, Lee-Young RS, et al. Skeletal muscle nitric oxide signaling and exercise: a focus on glucose metabolism [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 303(3): E301–E307.
 - [28] Tidball JG, Wehling-Henricks M. Nitric oxide synthase deficiency and the pathophysiology of muscular dystrophy [J]. *J Physiol*, 2014, 592(21): 4627–4638.
 - [29] Lai Y, Thomas GD, Yue Y, et al. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(3): 624–635.
 - [30] Zhang Y, Yue Y, Li L, et al. Dual AAV therapy ameliorates exercise-induced muscle injury and functional ischemia in murine models of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(18): 3720–3729.
 - [31] Chan S, Head SI, Morley JW. Branched fibers in dystrophic mdx muscle are associated with a loss of force following lengthening contractions [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293(3): C985–C992.
 - [32] Pichavant C, Pavlath GK. Incidence and severity of myofiber branching with regeneration and aging [J]. *Skelet Muscle*, 2014, 4: 9.
 - [33] Head SI, Williams DA, Stephenson DG. Abnormalities in structure and function of limb skeletal muscle fibres of dystrophic mdx mice [J]. *Proc Biol Sci*, 1992, 248(1322): 163–169.
 - [34] Head SI. Branched fibres in old dystrophic mdx muscle are associated with mechanical weakening of the sarcolemma, abnormal Ca^{2+} transients and a breakdown of Ca^{2+} homeostasis during fatigue [J]. *Exp Physiol*, 2010, 95(5): 641–656.
 - [35] Lee RC, River LP, Pan FS, et al. Surfactant-induced sealing of electroporabilized skeletal muscle membranes *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(10): 4524–4528.
 - [36] Yasuda S, Townsend D, Michele DE, et al. Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer [J]. *Nature*, 2005, 436(7053): 1025–1029.
 - [37] Maskarinec SA, Wu G, Lee KY. Membrane sealing by polymers [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1066: 310–320.
 - [38] Moloughney JG, Weisleder N. Poloxamer 188 (p188) as a membrane resealing reagent in biomedical applications [J]. *Recent Pat Biotechnol*, 2012, 6(3): 200–211.
 - [39] Townsend D, Turner I, Yasuda S, et al. Chronic administration of membrane sealant prevents severe cardiac injury and ventricular dilatation in dystrophic dogs [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(4): 1140–1150.
 - [40] Quinlan JG, Wong BL, Niemeier RT, et al. Poloxamer 188 failed to prevent exercise-induced membrane breakdown in mdx skeletal muscle fibers [J]. *Neuromuscul Disord*, 2006, 16(12): 855–864.
 - [41] Houang EM, Haman KJ, Filaretto A, et al. Membrane-stabilizing copolymers confer marked protection to dystrophic skeletal muscle *in vivo* [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2015, 2: 15042.
 - [42] Markham BE, Kernodle S, Nemzek J, et al. Chronic dosing with membrane sealant poloxamer 188 NF improves respiratory dysfunction in dystrophic Mdx and Mdx/Utrophin^{-/-} mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134832.
 - [43] PLOS ONE Staff. Correction: poloxamer 188 has a deleterious effect on dystrophic skeletal muscle function [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119252.

- [44] Jørgensen LH, Blain A, Grealley E, et al. Long-term blocking of calcium channels in mdx mice results in differential effects on heart and skeletal muscle [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(1): 273–283.
- [45] Ward ML, Williams IA, Chu Y, et al. Stretch-activated channels in the heart: contributions to length-dependence and to cardiomyopathy [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2008, 97(2–3): 232–249.
- [46] Vandebrouck C, Martin D, Colson-Van Schoor M, et al. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers [J]. *J Cell Biol*, 2002, 158(6): 1089–1096.
- [47] Millay DP, Goonasekera SA, Sargent MA, et al. Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(45): 19023–19028.
- [48] Chen L, Chen CX, Gan XT, et al. Inhibition and reversal of myocardial infarction-induced hypertrophy and heart failure by NHE-1 inhibition [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286(1): H381–H387.
- [49] Weber MA, Nagel AM, Wolf MB, et al. Permanent muscular sodium overload and persistent muscle edema in Duchenne muscular dystrophy: a possible contributor of progressive muscle degeneration [J]. *J Neurol*, 2012, 259(11): 2385–2392.
- [50] Mijares A, Altamirano F, Kolster J, et al. Age-dependent changes in diastolic Ca^{2+} and Na^{+} concentrations in dystrophic cardiomyopathy: Role of Ca^{2+} entry and IP_3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(4): 1054–1059.
- [51] Previtali SC, Gidaro T, Díaz-Manera J, et al. Rimeporide as a first-in-class NHE-1 inhibitor: Results of a phase Ib trial in young patients with Duchenne Muscular Dystrophy [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104999.
- [52] Ghaleh B, Barthélemy I, Wojcik J, et al. Protective effects of rimeporide on left ventricular function in golden retriever muscular dystrophy dogs [J]. *Int J Cardiol*, 2020, 312: 89–95.
- [53] Percival JM, Adamo CM, Beavo JA, et al. Evaluation of the therapeutic utility of phosphodiesterase 5A inhibition in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2011, 204: 323–344.
- [54] Ennen JP, Verma M, Asakura A. Vascular-targeted therapies for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Skelet Muscle*, 2013, 3(1): 9.
- [55] Dombrowsky NW, Ölmestig JNE, Witting N, et al. Role of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in Duchenne and Becker muscular dystrophies-Still a possible treatment modality? [J]. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28(11): 914–926.
- [56] Barroso F, Ribeiro JC, Miranda EP. Phosphodiesterase type 5 inhibitors and visual side effects: a narrative review [J]. *J Ophthalmic Vis Res*, 2021, 16(2): 248–259.
- [57] Khairallah M, Khairallah RJ, Young ME, et al. Sildenafil and cardiomyocyte-specific cGMP signaling prevent cardiomyopathic changes associated with dystrophin deficiency [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(19): 7028–7033.
- [58] Kobayashi YM, Rader EP, Crawford RW, et al. Sarcolemma-localized nNOS is required to maintain activity after mild exercise [J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 511–515.
- [59] Victor RG, Sweeney HL, Finkel R, et al. A phase 3 randomized placebo-controlled trial of tadalafil for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Neurology*, 2017, 89(17): 1811–1820.
- [60] Leung DG, Herzka DA, Thompson WR, et al. Sildenafil does not improve cardiomyopathy in Duchenne/Becker muscular dystrophy [J]. *Ann Neurol*, 2014, 76(4): 541–549.
- [61] Hafner P, Bonati U, Erne B, et al. Improved muscle function in duchenne muscular dystrophy through L-arginine and metformin: an investigator-initiated, open-label, single-center, proof-of-concept-study [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147634.
- [62] Hnia K, Gayraud J, Hugon G, et al. L-arginine decreases inflammation and modulates the nuclear factor- κB /matrix metalloproteinase cascade in mdx muscle fibers [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(6): 1509–1519.
- [63] Hafner P, Bonati U, Klein A, et al. Effect of combination l-citrulline and metformin treatment on motor function in patients with duchenne muscular dystrophy: a randomized clinical trial [J]. *JAMA Netw Open*, 2019, 2(10): e1914171.
- [64] Kang N, Koo J. Olfactory receptors in non-chemosensory tissues [J]. *BMB Rep*, 2012, 45(11): 612–622.
- [65] Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(11): 4410–4415.
- [66] Griffin CA, Kafadar KA, Pavlath GK. MOR23 promotes muscle regeneration and regulates cell adhesion and migration [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(5): 649–661.
- [67] Pichavant C, Burkholder TJ, Pavlath GK. Decrease of myofiber branching via muscle-specific expression of the olfactory receptor mOR23 in dystrophic muscle leads to protection against mechanical stress [J]. *Skelet Muscle*, 2016, 6: 2.
- [68] Cheng X, Zhang X, Gao Q, et al. The intracellular Ca^{2+} channel MCOLN1 is required for sarcolemma repair to prevent muscular dystrophy [J]. *Nat Med*, 2014, 20(10): 1187–1192.
- [69] Yu L, Zhang X, Yang Y, et al. Small-molecule activation of lysosomal TRP channels ameliorates Duchenne muscular dystrophy in mouse models [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(6): 2736.
- [70] Roman W, Pinheiro H, Pimentel MR, et al. Muscle repair after physiological damage relies on nuclear migration for cellular reconstruction [J]. *Science*, 2021, 374(6565): 355–359.

唐定,张瑞安,卢佳,等. 新型冠状病毒非人灵长类动物感染模型的评价指标 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 100–104, 154.
Tang D, Zhang RA, Lu J, et al. Evaluation index for non-human primate SARS-CoV-2 infection models [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 100–104, 154.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.015

新型冠状病毒非人灵长类动物感染模型的评价指标

唐 定,张瑞安,卢 佳*,李新国*

(武汉生物制品研究所有限责任公司生物安全三级实验室,武汉 430207)

【摘要】 随着新型冠状病毒肺炎疫情的爆发,新型冠状病毒(新冠病毒,SARS-CoV-2)发病机制、功能结构、相关疫苗和药物的研究步伐迅速加快,动物感染模型对 SARS-CoV-2 的相关研究不可或缺,非人灵长类动物在生理上与人类非常相似,因此新冠病毒非人灵长类动物感染模型是新冠病毒研究中最重要动物模型之一。然而,基于伦理道德、研究资质和成本等条件限制,新冠病毒的非人灵长类动物感染模型数量相对较少,所以保证每次动物试验结果的有效性就显得尤为关键。本文结合现已发表的新冠病毒动物感染模型相关文献和人类患者临床数据对新冠病毒非人灵长类动物感染模型的评价指标进行总结分析,包括临床表现指标、影像学诊断、血液学指标、病原学指标、病理学指标、免疫学指标等,为新冠病毒非人灵长类动物感染模型的成功建立提供参考。

【关键词】 新型冠状病毒;非人灵长类动物;感染模型;评价指标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0100-05

Evaluation index for non-human primate SARS-CoV-2 infection models

TANG Ding, ZHANG Ruian, LU Jia*, LI Xinguo*

(Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd, Biosafety Level 3 Laboratory, Wuhan 430207, China)

【Abstract】 With the outbreak of the novel coronavirus pneumonia, coronavirus disease 2019 (COVID-19), research on the pathogenesis and functional structure of the causative virus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), as well as on COVID-19-related vaccines and drugs, has accelerated rapidly. Animal infection models, especially those using non-human primates, are indispensable for research on COVID-19. Owing to their physiological similarity to humans, non-human primate models are among the most important animal models in SARS-CoV-2 research. However, there are relatively few studies using non-human primate infection models for COVID-19 owing to various constraints, including ethics, research qualifications, and cost; therefore, it is particularly critical to ensure the validity of each animal test result. This article summarizes and analyzes evaluation indicators for the non-human primate model of SARS-CoV-2 infection, including clinical scores, imaging diagnosis, hematology indicators, and pathogens, from the published literature on SARS-CoV-2-infected animal models and clinical data, which could provide a useful reference for the successful establishment of more effective non-human primate models of SARS-CoV-2 infection.

【Keywords】 SARS-CoV-2; non-human primates; infected animal model; evaluation index

一种被命名为 SARS-CoV-2 的新型冠状病毒爆发,导致呼吸系统疾病,病死率约为 2.2%^[1]。我国将 SARS-CoV-2 按照第二类病原微生物进行管理,涉及病毒培养和动物感染实验则必须在生物安全三级或以上级别实验室进行^[2-3]。尽管人类患者的数量非常的庞大,但 SARS-CoV-2 某些方面的发病

【基金项目】 国家重点研发计划(2020YFC0842100)。
【作者简介】 唐定(1996—),男,硕士,研究方向:感染性疾病非人灵长类动物模型制备。E-mail: 17830913706@163.com
【通信作者】 李新国(1973—),男,副研究员,研究方向:细菌类疫苗及联合疫苗。E-mail: Lixinguo@sinopharm.com
卢佳(1984—),女,副研究员,研究方向:多价手足口病疫苗研制工作。E-mail: johnsonchau@163.com * 共同通信作者

机制和疫苗的前期评估只能在动物感染模型中才能够实现反复采样和病理解剖。因为非人灵长类动物(non-human primates, NHP)在亲缘关系上与人类非常接近,并且生理结构和解剖病理结构等都与人类十分类似,所以疫苗或药物一般会选择 NHP 进行临床前研究^[4-5]。在非人灵长类动物新冠病毒感染模型研究中发现,SARS-CoV-2 能够导致恒河猴的呼吸系统疾病,但 NHP 感染新冠病毒后大多表现为轻度到中度的临床症状,并且在感染后 1 周左右开始恢复^[6]。因此,单一的评价指标难以准确判断实验猴的感染阶段和感染模型的建立是否成功,正确选择能观察或检测表现疾病关键特征性的指标不仅能够节省人力、物力和时间,也更能保证实验结果的有效性。新冠病毒非人灵长类动物感染模型关键特征性评价指标包括临床表现指标、影像学诊断、血液学指标、病原学指标、病理学指标、免疫学指标等,结合这些指标综合判断动物感染模型的建立是否成功对后续实验结果的分析至关重要^[7-8]。

1 临床表现指标

临床评分是对实验动物的一些主要症状、体征和生理参数等进行加权或赋值,从而量化评价疾病的严重程度,预测后续发展,也能控制研究时的组间可比性^[9]。实验表明,非人灵长类动物在感染新冠病毒后会产生与人类患者相似的临床症状,主要表现为呼吸模式的变化、弓背姿势、体表苍白、脱水、食欲下降、偶尔咳嗽和体温变化等^[6]。对 NHP 感染新冠病毒后的临床症状进行赋值,建立临床评分标准,再根据标准对实验猴进行临床评分,其结果可以有效评估实验猴的感染阶段,有助于判断实验进程和实验终点(见表 1)^[6]。

2 影像学诊断

计算机断层扫描(CT)和 X 射线检查是影像学检查中非常重要的检查方法。在新冠病毒感染早期,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)方法很容易出现假阴性^[10],因此,识别该病的早期影像表现及临床特征在新冠肺炎诊断方面具有重要意义。临床诊断结果也证明使用 CT 或胸部 X 射线检查能对新冠病毒患者进行有效诊断,其中 CT 通常会产生更准确的结果。人类患者的影像特征包括单发或散在磨玻璃密度阴影,病变部位主要分布在胸膜下缘或肺中央,伴随征象包括胸腔积液、纵隔及肺门

区淋巴结增大等^[11]。通过制定新冠病毒非人灵长类动物感染模型的肺部 CT 评分方法,能够半定量分析肺内病变程度,评分标准为:无异常密度影,0 分;存在少量异常密度影,累及面积<5%,1 分;累及面积<25%,2 分;累及面积<50%,3 分;累及面积<75%,4 分;累及面积>75%,5 分^[12]。根据 CT 评分结果能够客观的评价实验猴的感染阶段,及时调整实验方案,取得更加理想的实验结果。

3 血液学指标

3.1 血常规检验

血常规是临床检测中应用最普遍的检测项目,其中外周白细胞计数、中性粒细胞与淋巴细胞比率(NLR)、衍生 NLR 比率(d-NLR,中性粒细胞计数除以白细胞计数减去中性粒细胞计数的结果)、血小板与淋巴细胞比率(PLR)和淋巴细胞与单核细胞比率(LMR)是炎症反应的指标^[13]。对动物感染模型临床检查中收集的血液进行血常规分析显示,大多数实验猴的单核细胞和中性粒细胞计数都在感染后短暂上升,然后恢复到基线水平;淋巴细胞则短暂下降再恢复;所有动物都观察到红血细胞压积、红细胞计数和血红蛋白下降,网织红细胞的百分比和计数也有所下降^[6]。淋巴细胞数量的下降与 COVID-19 感染的严重程度成正比,并且该疾病的存活率与淋巴细胞尤其是 T 淋巴细胞的更新能力有关,这对摧毁受感染的细胞至关重要^[14]。近年来,有研究表明平均血小板体积(MPV)可能是预测肺炎患者病情发展及预后的一个指标^[15]。研究发现 NLR 也可用作评估 COVID-19 患者的预后情况和临床症状的严重程度,NLR 与 COVID-19 的严重程度呈正相关^[12]。

3.2 血液生化检测

通过对临床病例分析发现,部分新冠患者的肝功能指标出现异常,主要表现为谷草转氨酶升高,谷丙转氨酶升高,谷草转氨酶和谷丙转氨酶比例异常,乳酸脱氢酶升高;但这不是普遍现象,与感染的毒株和患者年龄有较大关系^[16]。血尿素氮和血清肌酐都是肾损伤的常规指标,现有数据表明,新冠患者中急性肾损伤(AKI)的患病率相对较低,各项研究结果显示在 0.5%~19.1%之间^[17]。但是,在新冠病毒非人灵长类动物感染模型中,生化指标的变化较小,肾功能和肝功能的标志物基本保持不变^[18]。

表 1 临床评分表
Table 1 Clinical scoring sheet

动物编号 Animal number	评分日期 Scoring date	评分人 Rater	分值 Points	得分 Score
总体外观 General appearance	正常、警觉 Normal, alert		0	
	弓背姿势、眼神呆滞 Hunched posture, dull appearance to eyes		5	
	脱水、体重减轻、明显肿胀、组织肿块 Dehydration, notable weight loss, obvious swelling, tissue mass		10	
	任何天然孔出血(非生理性) Bleeding from any orifice (not related to routine procedures or menstruation)		15	
	被毛杂乱、脏污 Ruffled fur, unkept appearance		5	
皮肤、毛发 Skin, haircoat	皮疹、苍白、发红、出血点、瘀斑、伤口、脓肿、溃疡 Rash, pallor, redness, icterus, ecchymoses, wound, abscess, ulcer		10	
五官 Facial features	流鼻涕、流涎、流泪、眼发红、眼分泌物增多、上睑下垂 Nasal discharge, salivation, lacrimation, reddened eyes, ocular discharge, ptosis		5	
呼吸 Respiration	呼吸增加或减少、咳嗽 Increased or decreased respiration, cough		5	
	呼吸困难、张口呼吸、发绀 Dyspnea, open mouth breathing, cyanosis		15	
粪便、尿液 Feces, urine	粪便减少、粪便干或糊状、水样便、尿液减少 Decreased feces, dry, wet and pasty, watery feces, decreased urine		5	
	无粪便、无尿、血便、血尿、 Feces absent, urine absent, blood in feces or urine		10	
	下降(进食少于一半) Decreased(eating less than half the biscuits)		3	
食欲 Appetite	吃了水果,但没吃饲料 Eating fruit but no biscuits		5	
	食欲废绝 Severely decreased		10	
	多动症(盘旋、攻击性增加)、活动减少 Hyperactivity(circling, increased aggression), hypoactivity		5	
	共济失调、神经系统症状(震颤、头部倾斜)、对零食失去兴趣 Ataxia, neurological signs(tremors, head tilt), loss of interest in treats		10	
活力 Activity	不愿意移动、长期靠在笼子上、对人反应减弱 Reluctant to move, cage for support, decreased response to human presence		15	
	对人接近基本没有反应、昏迷 Minimal response to human approach, coma		35	
			总分 Total score	

注:分值达到 35 分则执行安乐死。
Note. Euthanasia will be performed if the score reaches 35.

4 病原学指标

Real-time PCR 是世界卫生组织(WHO)、中国国家卫生健康委员会等单位推荐的新冠肺炎确诊的标准之一,能够高效处理较大数量样本^[19]。在恒河猴的新冠感染模型中,鼻拭子、咽拭子和支气管肺泡灌洗液中的病毒载量都很高,并且能够从感染早期的鼻拭子、咽拭子和肺泡灌洗液中分离出新冠

病毒,也能从肺组织匀浆上清中分离出新冠病毒^[6];在呼吸系统及其附近的淋巴结中不仅检测到了高病毒载量,还检测到了新冠病毒的 mRNA,这表明新冠病毒在呼吸系统中具有较高的复制活性^[20-21]。通过新冠病毒的核酸检测,可以有效指示新冠病毒能够侵入的组织器官以及其中的病毒载量,这对疫苗的免疫保护力评价、病毒感染模型的构建和其它相关生物或化学制剂的作用研究都至关重要。

5 病理学指标

常用的病理学技术有苏木精-伊红(HE)染色和免疫组化技术,HE 染色可以观察细胞结构、组织层次,对组织器官的病理学诊断非常重要;免疫组化染色技术能对新冠病毒抗原进行定位、定性及相对定量的研究^[22-23]。迄今为止描述的 COVID-19 肺组织病理学表现在很大程度上是非特异性的,包括水肿、蛋白质渗出物、伴有透明膜形成的弥漫性肺泡损伤(DAD)、反应性肺细胞增生、以淋巴细胞为主的间质单核炎性浸润和多核巨细胞,通常没有出现病毒致细胞病变的变化或特性核内或胞浆内病毒包涵体^[24-30]。然而,血管血栓形成似乎在 COVID-19 患者的肺中更为常见^[31]。研究发现,非人灵长类动物新冠病毒感染模型中的病理学变化主要表现为以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润,形成间质性肺炎;同时在多个组织器官中检测到新冠病毒抗原,包括整个呼吸道、扁桃体、纵膈淋巴结、肠系膜淋巴结、颈部淋巴结、胃肠道,在部分实验动物的心脏中也检测到了新冠病毒抗原^[6,20]。

6 免疫学指标

6.1 细胞免疫

细胞因子风暴被认为是急性呼吸窘迫综合征和多器官衰竭的主要原因之一,它在疾病加重过程中起着重要的作用。临床研究已经证实 COVID-19 的危重症患者体内存在细胞因子风暴^[32]。研究发现,与非重症患者相比,重症监护病房患者血浆中 IL-2、IL-7、IL-10、GCSF、IP-10、MCP-1、MIP-1a 和 TNF- α 的水平更高,提示重症患者体内可能存在细胞因子风暴^[33-34]。尽管呼吸道中的病毒滴度相似,但感染 SARS-CoV-2 的老年非人灵长类动物比受感染的年轻非人灵长类动物更容易出现免疫失调,导致更严重的临床症状,可能是过度的炎症反应而不是高病毒滴度导致老年非人灵长类动物的死亡^[35-38]。以上研究结果表明,细胞因子风暴与疾病严重程度呈正相关,因此在新冠病毒非人灵长类动物感染模型建立过程中监测实验猴的细胞因子水平有助于判断感染情况和疾病发展阶段。

6.2 体液免疫

大多数 COVID-19 患者在出现症状后 1~2 周内可检测到抗体反应^[39]。具体而言,在出现临床症状的第 2 天能够检测到 IgA 抗体,在临床症状出现后

的第 5 天能够检测到 IgM 和 IgG 抗体^[40-43]。最近的研究表明,中和抗体水平与 COVID-19 患者的严重程度密切相关,并且抗体反应在感染后数周内消退^[44]。此外,与有症状的个体相比,无症状个体的中和抗体水平下降得更快,并且水平较低^[45]。在新冠病毒恒河猴感染模型中,血清中 IgG 抗体水平在感染后第 7 天快速上升,在感染后第 14 天达到峰值;中和抗体水平在感染后第 10 天开始迅速上升,在感染后第 15 天左右达到峰值^[6]。监测实验动物血清中抗体水平的变化有助于判断其感染阶段和评估疫苗的免疫保护力。

6.3 固有免疫

固有免疫,即非特异性免疫,包括皮肤、粘膜、血脑屏障、固有免疫细胞等。作为基础保护屏障,虽然不存在病原特异性,但稳定性强,同时涉及到的免疫细胞种类繁多,因此同样具有重要的检测意义。采集黏膜拭子是对固有免疫系统指标监测的最常见途径,同时对相关免疫细胞,如单核-巨噬细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞等的变化趋势检测也尤为重要。研究发现 SARS-CoV-2 能够侵入大脑并感染脑血管内皮细胞,导致动物模型中的脑损伤,但是病毒如何进入大脑的机制尚未可知^[46]。

7 总结

非人灵长类动物对大多数人类致病性病毒都具有易感性,可以很好地模拟人类感染病毒后的临床症状和病理变化等,非人灵长类动物感染模型对研究疾病的发病机制,疫苗、药物的评价都发挥着非常重要的作用。但是非人灵长类动物繁殖周期长,资源比较稀缺,并且成本高昂,所以选择合适的评价指标以正确评估动物模型是否成功建立,从而获得准确、有效的实验结果才能减少不必要的重复实验。临床表现指标、影像学诊断、血液学指标、病原学指标、病理学指标、免疫学指标对评价新冠病毒非人灵长类动物感染模型的建立具有重要作用。

参考文献:

- [1] Mallah SI, Ghorab OK, Al-Salmi S, et al. COVID-19: breaking down a global health crisis [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2021, 20(1): 35.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版) [J]. 中国实用乡村医生杂志, 2020, 27(3): 4-5.
- [3] 魏强. 动物实验中的生物安全问题 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(6): 75-78.

- [4] Friedman H, Ator N, Haigwood N, et al. The critical role of nonhuman primates in medical research [J]. *Pathog Immun*, 2017, 2(3): 352-365.
- [5] 周小青, 唐成程, 邹庆剑. SARS-CoV-2 易感实验动物研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 128-134.
- [6] Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 585(7824): 268-272.
- [7] 秦川, 魏强, 袁志明, 等. 新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 动物模型制备指南: GB/Z 39502-2020 [S]. 2020.
- [8] 中国实验动物学会. 人类感染性疾病动物模型评价指南: T/CALAS 30-2017 [S]. 2018.
- [9] Khan AA, Parekh D, Cho Y, et al. Improved prediction of outcome in patients with severe acute pancreatitis by the APACHE II score at 48 hours after hospital admission compared with the APACHE II score at admission. *acute physiology and chronic health evaluation* [J]. *Arch Surg*, 2002, 137(10): 1136-1140.
- [10] Deng H, Li X. AI-Empowered Computational examination of chest imaging for COVID-19 treatment: a review [J]. *Front Artif Intell*, 2021, 4: 612914.
- [11] Xu X, Yu C, Qu J, et al. Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2 [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2020, 47(5): 1275-1280.
- [12] 马培旗, 袁玉山, 张磊, 等. 75 例新型冠状病毒肺炎病人首诊 CT 表现与检验结果分析 [J]. *国际医学放射学杂志*, 2020, 43(2): 127-130.
- [13] Yang A, Liu J, Tao W, et al. The diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106504.
- [14] Henry BM. COVID-19, ECMO, and lymphopenia: a word of caution [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(4): e24.
- [15] 孙虹佳, 姚立琼, 张磊, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情下血常规指标 NLR、MLR、MPV 在发热门诊患者筛查中的价值研究 [J]. *甘肃科技*, 2021, 37(11): 168-172.
- [16] 田婧琴, 王寅, 张军, 等. 新型冠状病毒肺炎患者早期血生化指标分析 [J]. *江苏预防医学*, 2020, 31(3): 275-276, 279.
- [17] Bohn MK, Lippi G, Horvath A, et al. Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2020, 58(7): 1037-1052.
- [18] Woolsey C, Borisevich V, Prasad AN, et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(1): 86-98.
- [19] 张礼堃, 邹秉杰, 宋沁馨, 等. PCR 技术在新冠病毒核酸检测中的应用 [J]. *医学研究生学报*, 2021, 34(5): 539-544.
- [20] Pandey K, Acharya A, Mohan M, et al. Animal models for SARS-CoV-2 research: A comprehensive literature review [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68(4): 1868-1885.
- [21] Chandrashekar A, Liu JY, Martinot AJ, et al. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques [J]. *Science*, 2020, 369(6505): 812-817.
- [22] 张晓云. 苏木精-伊红染色用于临床病理诊断的价值探究 [J]. *实用医技杂志*, 2021, 28(2): 247-248, 297.
- [23] 秦永亨. 提高免疫组化染色质量的经验总结 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2020, 7(1): 193-198.
- [24] Tian S, Hu W, Niu L, et al. Pulmonary pathology of early-phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(5): 700-704.
- [25] Zhang H, Zhou P, Wei Y, et al. Histopathologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19 [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 172(9): 629-632.
- [26] Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(4): 420-422.
- [27] Menter T, Haslbauer JD, Nienhold R, et al. Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction [J]. *Histopathology*, 2020, 77(2): 198-209.
- [28] Barton LM, Duval EJ, Stroberg E, et al. COVID-19 autopsies, oklahoma, USA [J]. *Am J Clin Pathol*, 2020, 153(6): 725-733.
- [29] Wichmann D, Sperhake JP, Lutgehetmann M, et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 173(4): 268-277.
- [30] Lax SF, Skok K, Zechner P, et al. Pulmonary arterial thrombosis in COVID-19 with fatal outcome: results from a prospective, single-center, clinicopathologic case series [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 173(5): 350-361.
- [31] Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(2): 120-128.
- [32] Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis [J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(5): 517-528.
- [33] Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression [J]. *Lancet*, 2020, 395(10229): 1033-1034.
- [34] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [35] Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19 [J]. *J Infect*, 2020, 80(6): 607-613.
- [36] Yu P, Qi F, Xu Y, et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19 [J]. *Animal Model Exp Med*, 2020, 3(1): 93-97.
- [37] Cleary SJ, Pitchford SC, Amison RT, et al. Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(21): 4851-4865.

秦聖乐,王玉涛,蔡雪君,等. 抗冠状病毒药物研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 105-110.
Qin SL, Wang YT, Cai XJ, et al. Research progress on anti-coronavirus drugs [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 105-110.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.016

抗冠状病毒药物研究进展

秦聖乐,王玉涛,蔡雪君,王新华*,杨子峰*

(广州医科大学附属第一医院,广州呼吸健康研究院,呼吸疾病国家重点实验室,广州 510182)

【摘要】 新冠疫情持续至今,对人类健康、经济及社会发展造成深远影响。由于其感染性强,传播速度快,以及变异株的不断出现,导致防控难度极大。药物是防治病毒性感染疾病的重要措施之一,目前尚无批准用于临床的抗新冠病毒特效药物。根据冠状病毒的致病特点和发病机制,已有较多关于抗病毒药物靶点研究,本文对以冠状病毒刺突蛋白,核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)依赖性 RNA 聚合酶,3C 样蛋白酶(3C-like proteinase, 3CLPro)等为靶点的药物研究以及抗冠状病毒中药的体内研究现状进行综述,为冠状病毒感染,尤其是新冠病毒感染防治提供药效学依据,并为其后续的临床应用提供参考。

【关键词】 冠状病毒;抗病毒药物;作用靶点

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0105-06

Research progress on anti-coronavirus drugs

QIN Shengle, WANG Yutao, CAI Xuejun, WANG Xinhua*, YANG Zifeng*

(State Key Laboratory of Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Health, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China)

【Abstract】 The ongoing coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic is having a profound impact on human health, economics, and social development. This disease has been extremely difficult to prevent and control because of its strong infectivity and rapid transmission, along with the constant emergence of mutant strains of the causative virus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Drugs are an important measure for the prevention and treatment of viral infectious diseases. At present, there are no specific anti-SARS-CoV-2 drugs approved for clinical use. There have been many studies on antiviral drug targets guided by present understanding of the characteristics and mechanism of coronavirus pathogenesis. This review discusses the current research status of drugs targeting coronavirus Spike protein, ribonucleic acid (RNA)-dependent RNA polymerase and 3C-like proteinase, as well as Traditional Chinese Medicine against coronaviruses; it details the pharmacodynamic basis for the prevention and treatment of coronaviruses, especially SARS-CoV-2, by these drugs and provides a reference for their subsequent clinical application.

【Keywords】 coronavirus; antiviral drugs; targets

新冠疫情已在世界范围大流行,死亡人数超过 520 万, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) 是一种新型的人类感染性 β 冠状病毒^[1]。迄今为止,已发现 7 种冠状病毒

[基金项目] 国家重点研发计划(2020YFA0708002);国家自然科学基金(82074311)。
[作者简介] 秦聖乐(1996—),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合研究。E-mail:qinshengle2020@163.com
[通信作者] 杨子峰(1977—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:抗病毒药物研究。E-mail:jeffyah@163.com
王新华(1960—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中西医结合研究。E-mail:xinhua@gzhu.edu.cn * 共同通信作者

可引起人类呼吸道疾病。冠状病毒是有包膜、单股正链 Ribonucleic Acid (RNA) 病毒,分为 α 、 β 、 γ 、 δ 4 个属,其中 α 、 β 冠状病毒属与人类疾病有关。目前引起人类呼吸道疾病的冠状病毒 Human coronavirus 229E (HCoV-229E)、Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63) 属于 α 属, Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43)、Human coronavirus HKU-1 (HCoV-HKU-1)、SARS-CoV、Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)、SARS-CoV-2 属于 β 属。HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-OC43、HCoV-HKU-1 冠状病毒可引起轻度呼吸道疾病,在免疫力低下人群中,还会引起肺炎和下呼吸道疾病^[2]。SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 病毒有高变异性 and 传染性,可引起严重急性呼吸道综合征。由于 RNA 病毒的高变异性,使得药物研究困难重重。本文对以冠状病毒刺突蛋白, RNA 依赖性 RNA 聚合酶, 3C 样蛋白酶以及抗冠状病毒中药的体内研究现状进行综述,为抗冠状病毒药物研究提供理论依据。

1 冠状病毒复制周期

吸附与进入:冠状病毒是有包膜、单股正链 RNA 病毒。病毒的膜表面有 3 种蛋白,分别是刺突蛋白 (spike protein, S 蛋白)、包膜蛋白 (envelope protein, E 蛋白)、膜蛋白 (membrane protein, M 蛋白),其中 S 蛋白是病毒入侵宿主细胞的关键^[3]。病毒进入人体后,其 S 蛋白被宿主蛋白酶切割成 S1 和 S2 两个亚基, S1 亚基的受体结合区域与受体结合,病毒黏附在宿主细胞表面, S2 构象发生改变。病毒进入细胞包括膜融合和内存两种方式, S2 的两个串联域七肽重复序列 1 (heptad repeat domains, HR1) 和七肽重复序列 2 (heptad repeat domains, HR2), 介导病毒与细胞之间膜融合途径,使病毒进入宿主细胞^[4], 如 MERS-CoV 病毒^[5]; 此外,低 pH 值和 pH 依赖性的内质体半胱氨酸蛋白酶等组织蛋白酶协助冠状病毒由内存途径进入宿主细胞,如 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 病毒^[6-7]。

复制与转录:病毒基因组的复制和转录主要是由病毒的复制酶介导。病毒进入宿主细胞并脱壳,病毒基因组 RNA 释放到细胞质中后, Open Reading Frame 1a (ORF 1a)、ORF 1b 翻译多聚蛋白 (polyprotein, pp) pp1a 和 pp1ab, pp1a 和 pp1ab 随后被木瓜蛋白酶样蛋白酶 (papain-like protease, PLpro) 和 3C 样蛋白酶 (chymotrypsin-like protease,

3CLpro) 切割,产生 15 ~ 16 个非结构蛋白 (nonstructure protein, NSPs), NSPs 组装成复制-转录复合物 (replicase-transcriptase complex, RTC), 负责病毒 RNA 的复制和多个亚基因组 RNA (subgenomic RNAs, sgRNAs) 的转录。冠状病毒复制以其正链 RNA 为模板,通过 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 生成全长的反义负链模板,用于合成新的基因组 RNA 和重叠的亚基因组负链模板。

蛋白翻译:亚基因组 mRNAs 的翻译产生病毒的结构蛋白和辅助蛋白,如刺突蛋白 (S)、核衣壳磷酸蛋白 (N)、血凝素-酯酶糖蛋白 (HE)、膜糖蛋白 (M)、外膜蛋白 (E) 在内质网进行翻译,并转运至高尔基体^[8]。

组装与释放:病毒颗粒组装过程主要是在内质网-高尔基体中间体中发生, N 蛋白与新生的基因组 RNA 在胞浆内组成螺旋核衣壳,核衣壳首先与 M 蛋白结合, E 蛋白与 M 蛋白相互作用引发芽生,包装核衣壳。S 蛋白与 HE 蛋白在翻译时形成三聚体,包装到成熟的病毒颗粒,最后通过胞吐释放到胞外。

2 基于病毒蛋白靶点的抗冠状病毒药物

病毒复制周期中的酶和蛋白都是抗冠状病毒药物潜在的作用靶点,目前对于抗冠状病毒药物的研究热点主要集中在 S 蛋白、RdRp、3CLpro、PLpro 等。

2.1 靶向于病毒刺突 (S) 蛋白

刺突 (S) 蛋白属于病毒的结构蛋白,成熟的 S 蛋白为稳定的三聚体,具有受体及膜融合活性, S1 和 S2 之间存在蛋白酶的裂解位点, S 蛋白的裂解活化是病毒入侵宿主细胞的关键^[3]。S 蛋白上的受体结合域 (receptor-binding domain, RBD) 与细胞表面受体结合,使病毒黏附于细胞表面,不同的冠状病毒其受体不同,亲和力也有区别, MERS-CoV 以人细胞表面蛋白二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP4) 作为进入受体,而 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 以血管紧张素转化酶 II (angiotensin-converting 2, ACE2) 作为受体,由于 SARS-CoV-2 的 S 蛋白与 ACE2 受体亲和力比 SARS-CoV 高 20 倍,导致该病毒在人类中的传播速度更快^[9]。

SARS-CoV-2 不仅需要 ACE2 作为进入受体,还须同时结合位于细胞表面上的硫酸乙酰肝素

(heparan sulfate, HS) 才能进入宿主细胞,肝素结构上类似于 HS,可结合并诱导 SARS-CoV-2 S 蛋白受体结合域构象变化,抑制 SARS-CoV-2 对 Vero 细胞的感染^[10],此外,肝素是一种硫酸多糖,有研究证实海参硫酸多糖 (SCSP) 可能通过抑制 HS 和 S 蛋白结合,阻止 SARS-CoV-2 进入宿主细胞^[11]。

部分药物可通过直接与病毒 S 蛋白结合,如单克隆抗体 7D10 与 MERS-CoV S 蛋白的 N 端结构域 (amino terminal domain, NTD) 结合,与 DPP4 竞争性结合病毒 S 蛋白,抑制了 S 蛋白融合前到融合后的构象变化,从而阻止 MERS-CoV 进入宿主细胞^[12]。或通过其他方式作用于 S 蛋白,如重组蛋白 Griffithsin 与 SARS-CoV 的 S 蛋白存在多个具有高亲和力结合位点,但其并不抑制 S 蛋白与 ACE2 结合,研究表明 Griffithsin 在体外可预防 SARS-CoV 感染,预处理可预防小鼠致命性的肺部感染,减轻小鼠肺部病理改变,降低小鼠肺部炎症因子 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、G-CSF、MCP-1 和 IL-12 的表达^[13]。化合物阳离子改性壳聚糖 N-(2-羟丙基)-3-三甲基铵壳聚糖氯 (HTCC) 通过与病毒 S 蛋白之间的静电相互作用,有效地阻断了 MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 进入宿主细胞,且通过微调 HTCC 可以靶向其他冠状病毒,但目前该化合物尚未用于人类,需要进一步深入研究^[14]。

冠状病毒 S 蛋白与受体结合后,通过破坏融合前 S 蛋白三聚体的稳定性,引起 S1 亚基脱落并从 S2 亚基过渡到稳定的融合后构象,Arbidol 就通过阻断 SARS-CoV-2 刺突蛋白的三聚反应,从而抑制病毒的感染性^[15],但其有效性和安全性需要进一步的临床研究。

S2 的两个串联域七肽重复序列 1 (HR1) 和七肽重复序列 2 (HR2) 可形成一个 6-HB 的螺旋结构,协助 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 与细胞之间膜融合途径^[4,16],SARS-CoV-2 的 HR1 比 SARS-CoV 具有更高的螺旋度和热稳定性,与对应的 HR2 亲和性也更强^[17],丹参的亲水化合物丹参酚酸 C,通过结合 SARS-CoV-2 的 HR1 区域中处于融合中间状态的保守疏水囊,阻断 HR1 和 HR2 之间 6-HB 的形成,从而抑制 SARS-CoV-2 感染^[18]。通过 SARS-CoV-2 蛋白 HRC 结构域设计出的 SARS-CoV-2 HRC 脂肽,可通过抑制 SARS-CoV-2、SARS-CoV 和 MERS-CoV 的 S 蛋白介导的细胞膜融合,从而有效地抑制病毒感染^[19]。

Furin 裂解位点在 S 蛋白融合活性中至关重要,有助于病毒合胞体形成,其抑制剂 CMK 和 Naphthofluorescein 在体外可抑制 SARS-CoV-2 的复制,该类抑制剂可作为先导化合物,进一步开发为抗病毒药物^[20],此外,组织蛋白酶 L (CTSL) 切割 SARS-CoV-2 刺突蛋白,协助病毒进入宿主细胞,有研究表明 COVID-19 患者的组织蛋白酶 L (CTSL) 水平升高,且与疾病的严重程度呈正相关,因此组织蛋白酶 L (CTSL) 有望开发成为抗 SARS-CoV-2 病毒药物的靶标^[21]。

2.2 靶向于 RNA 依赖性 RNA 聚合酶

RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp, Nsp12) 是冠状病毒 RTC 的重要组成部分,冠状病毒在复制过程需自身编码的 RdRp 参与,主要负责病毒复制过程中链引发和链延伸两个阶段,是研究抗冠状病毒的主要靶标^[22]。

瑞德西韦 (remdesivir) 是一种新型核苷类似物,靶向于 RdRp,通过掺入到 RNA 复制过程中,添加 3 个核苷酸从而诱导 RdRp 遇到易位屏障,终止链延伸,抑制病毒复制^[23],因此瑞德西韦也具有广谱性,对 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 均有抗病毒活性^[24],临床上瑞德西韦副作用小,多用于治疗呼吸道病毒感染,但对于 COVID-19 重症患者没有显著的临床和抗病毒效果^[25]。苏拉明 (suramin) 在酶水平上,是瑞德西韦的三磷酸活性形式的 20 倍以上,通过与 RdRp 活性位点结合,抑制病毒 RNA 模板与引物和底物结合,同时抑制了 RdRp 聚合酶活性^[26]。而利托那韦可与 SARS-CoV-2 RdRp 蛋白结合,可能通过抑制 RdRp 蛋白 3' 到 5' 外切酶活性,可提高药物治疗 COVID-19^[27]。利巴韦林多被用于治疗由呼吸道合胞病毒 (RSV) 引起的呼吸道相关疾病,其在宿主细胞内磷酸化后,可能通过竞争性地抑制病毒的三磷酸鸟苷合成,或是抑制病毒 mRNA 合成和抑制 RdRp 实现抗病毒作用^[28],有研究提出干扰素- α 2b 和利巴韦林联合使用可有效减少 MERS-CoV、SARS-CoV 的体外复制^[29],且能改善被 MERS-CoV 感染后恒河猴体内病毒载量和肺组织病理变化^[30],对于严重的 MERS-CoV 感染患者,干扰素- α 2b 和利巴韦林联合治疗可改善 14 d 生存率^[31]。

2.3 靶向于 3C 样蛋白酶

3C 样蛋白酶 (3CLpro, Nsp5) 负责切割病毒基因组翻译的蛋白前体,是冠状病毒复制的重要酶。

3CLpro 在 β 属冠状病毒中保守性较高^[32], 其相关的抑制剂对于 MERS-CoV、SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 有广泛的抗病毒活性^[33]。

目前有许多化合物通过靶向 3CLpro 显示抗病毒活性, 如吡啶-氯吡啶基酯衍生物 GRL-0820 和 GRL-0920 可与 SARS-CoV-2 的 3CLpro 共价结合, 在体外具有抑制 SARS-CoV-2 作用。GRL-0820 吡啶氮上有一个额外的丙烯取代基, 相比之下 GRL-0920 对 SARS-CoV-2 具有更强的抗病毒活性^[34]。针对 3CLpro 设计出的 TG-0205221 能够减少 SARS-CoV 和 HCoV-229E 病毒滴度, 显示出一定的抗病毒活性^[35]。GC-376 和钙蛋白酶抑制剂 II、XII 则具有双重作用机制, 在 Vero 细胞中同时抑制病毒 3CLpro 和宿主组织蛋白酶 L 的活性, 对 SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS-CoV 以及 HCoV-229E、OC43 和 NL63 均有抗病毒活性^[36]。阿扎那韦与 3CLpro 氢键结合, 可抑制 SARS-CoV-2 的 3CLpro 酶活性, 与利托那韦联用还可以下调病毒诱导的 IL-6 和 TNF- α 水平^[37]。洛匹那韦是 HIV-1 蛋白酶抑制剂, 常与利托那韦联合使用提高血药浓度, 其靶向于 3CLpro, 对冠状病毒有一定的抗病毒活性, 预防性给予洛匹那韦/利托那韦可降低 MERS-CoV 在小鼠体内病毒载量, 治疗性使用可改善肺功能, 但不减少病毒复制和严重的肺病理改变^[38], 早期的洛匹那韦/利托那韦治疗可缩短 SARS-CoV-2 病毒在病人体内的排毒时间^[39]。

通过体外分子筛查, 筛选出槲皮素有望成为靶向于 3CLpro 的抗 SARS-CoV-2 候选药物^[40]。肉桂硫胺可能通过抑制 3CLpro 来抑制 SARS-CoV 复制^[41]。表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 和 Nsubstited Isatin 可抑制 3CLpro, 具有作为抗冠状病毒药物的潜力^[32,42]。中药双黄连制剂靶向于 SARS-CoV-2 3CLpro, 抑制病毒在 VERO-E6 细胞中复制, 成剂量依赖关系, 其活性成分黄芩苷和黄芩素在体外也显示较好抗病毒活性^[43]。

3 抗冠状病毒中药的体内研究

传统中药在我国已广泛使用, 其成本低, 疗效好, 能有效缓解症状, 减少从轻度到中度或重度的发展, 改善治愈率, 降低死亡率, 促进患者的康复等。新冠病毒流行期间, 以“三药三方”为代表的中药在新冠病毒的防治方面发挥了重大作用^[44], 基于中药多成分、多靶点、多通路的特点, 因此体内模型

验证其有效性具有重要意义, 由于冠状病毒受体限制, 因此中药抗冠状病毒的动物模型评价研究有限。

3.1 甘草干燥根和山茶水提物的小鼠体内抗新冠病毒研究

GB-2 主要由甘草干燥根和山茶通过水提获得, 为了研究 GB-2 的体内抗 SARS-CoV-2 效应, 以小鼠为实验动物模型每天口服 200 mg/kg 的 GB-2。在 GB-2 治疗 1 周后, 小鼠未有死亡, 且小鼠活动或体重都没有显著变化。此外, GB-2 组与对照组比较, 血清肌酐、谷氨酸草酰乙酸转氨酶和谷氨酸-丙酮酸转氨酶水平没有显著升高, 表明 GB-2 没有明显的肾毒性或肝毒性。肺和肾是 ACE2 相对高表达的重要器官, 是 SARS-CoV-2 的潜在靶点, 因此研究了 GB-2 对 ACE2 和 TMPRSS2 蛋白在两个器官组织中的表达影响。GB-2 治疗 1 周 (200 mg/kg, 口服), 肺和肾的免疫组织化学 (IHC) 数据显示, GB-2 组的 ACE2 和 TMPRSS2 与对照组比较明显减少。结果表明, GB-2 可能阻断 ACE2 和 ACE2TMPRSS2 在肺和肾组织中的表达且无副作用, 包括肾毒性和肝毒性^[45]。

3.2 通过建立人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠模型, 该研究评价热炎宁合剂、复方芩兰口服液、柴银颗粒、金柴抗病毒胶囊的有效性

热炎宁合剂由蒲公英、虎杖、北败酱、半枝莲 4 味中药组成, 结果显示热炎宁合剂能显著降低人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠的肺指数, 提高小鼠外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞和 CD4⁺ T 淋巴细胞百分比, 其低剂量组 (14.67 mL/(kg·d)) 能提高总 B 淋巴细胞百分比, 降低小鼠肺组织中冠状病毒载量和炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-10 含量, 提示热炎宁合剂对人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证具有较好疗效, 主要表现在改善肺部病变, 增强小鼠免疫机能, 降低体内炎症因子等方面^[46]。

复方芩兰口服液由金银花、黄芩、连翘、板蓝根 4 味中药组成, 其高 (22 mL/(kg·d))、低剂量 (11 mL/(kg·d)) 可降低人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠的肺指数, 抑制率分别为 59.01%、47.72%, 此外, 复方芩兰口服液可降低人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠的肺组织病毒载量, 提升其外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞及总 B 淋巴细胞百分比, 降低肺组织中炎症因子 IL-6、IL-10、TNF- α 及 IFN- γ 表达, 明显改善肺组织炎症^[47]。

柴银颗粒是由柴葛解肌汤和银翘散化裁, 由柴胡、金银花、黄芩、葛根、荆芥、青蒿、连翘、桔梗、苦杏仁、薄荷、鱼腥草 11 味中药组成, 其高 (8.8 g/(kg

·d))、低剂量(4.4 g/(kg·d))能降低人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠的肺指数,抑制率分别为 61.02%,55.45%,提高小鼠外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞、总 B 淋巴细胞百分比,降低小鼠肺组织炎症因子 IL-10、TNF- α 、IFN- γ 含量^[48]。

金柴抗病毒胶囊由金银花、柴胡、连翘、黄芩、清半夏、西洋参、绵马贯众等中药组成,可增加寒湿疫毒袭肺证小鼠的活动度和反应能力,改善小鼠皮毛和大便状态,金柴抗病毒胶囊高(1.76 g/(kg·d))、低剂量组(0.88 g/(kg·d))可以显著降低肺指数,明显提升 CD4⁺ T 细胞,CD8⁺ T 细胞,B 细胞含量,低剂量组显著降低血清中 MTL 含量,降低肺组织中病毒载量和炎症因子 IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 表达,改善肺组织病理损伤^[49]。

4 结语

新冠病毒感染具有潜伏期长、传染性强等特点,且不断出现变异株,导致传播性增强,免疫逃逸,增加疾病严重性以及降低疫苗的有效性^[50]。目前尚无有效的抗新冠病毒药物批准用于临床,现有药物研究主要集中在病毒相关靶蛋白,由于冠状病毒为 RNA 病毒,易发生突变,因此单靶点药物极易产生耐药性。因此,针对冠状病毒及可能的新出现毒株的药物治疗,应根据其致病特点,深入研究病毒复制周期及病毒-宿主相互作用的特点,不断探索新靶点,将不同靶点药物联合使用降低耐药性及减少毒副作用,此外,“老药新用”及中西医并重的治疗策略都为抗病毒药物研究提供了新思路。

参考文献:

- [1] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. Lancet, 2020, 395(10224): 565-574.
- [2] Gorse GJ, O'Connor TZ, Hall SL, et al. Human coronavirus and acute respiratory illness in older adults with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Infect Dis, 2009, 199(6): 847-857.
- [3] Yuan Y, Cao D, Zhang Y, et al. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains [J]. Nat Commun, 2017, 8: 15092.
- [4] Zhang N, Jiang S, Du L. Current advancements and potential strategies in the development of MERS-CoV vaccines [J]. Expert Rev Vaccines, 2014, 13(6): 761-774.
- [5] Qing E, Hantak MP, Galpalli GG, et al. Evaluating MERS-CoV entry pathways [J]. Methods Mol Biol, 2020, 2099: 9-20.
- [6] Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, et al. Entry from the cell

surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein [J]. J Virol, 2008, 82(23): 11985-11991.

- [7] Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(21): 11727-11734.
- [8] V'Kovski P, Kratzel A, Steiner S, et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(3): 155-170.
- [9] Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, et al. The proximal origin of SARS-CoV-2 [J]. Nat Med, 2020, 26(4): 450-452.
- [10] Mycroft-West CJ, Su D, Pagani I, et al. Heparin inhibits cellular invasion by SARS-CoV-2: structural dependence of the interaction of the spike S1 receptor-binding domain with heparin [J]. Thromb Haemost, 2020, 120(12): 1700-1715.
- [11] Song S, Peng H, Wang Q, et al. Inhibitory activities of marine sulfated polysaccharides against SARS-CoV-2 [J]. Food Funct, 2020, 11(9): 7415-7420.
- [12] Zhou H, Chen Y, Zhang S, et al. Structural definition of a neutralization epitope on the N-terminal domain of MERS-CoV spike glycoprotein [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3068.
- [13] O'Keefe BR, Giomarelli B, Barnard DL, et al. Broad-spectrum *in vitro* activity and *in vivo* efficacy of the antiviral protein griffithsin against emerging viruses of the family Coronaviridae [J]. J Virol, 2010, 84(10): 2511-2521.
- [14] Milewska A, Chi Y, Szczepanski A, et al. HTCC as a polymeric inhibitor of SARS-CoV-2 and MERS-CoV [J]. J Virol, 2021, 95(4): e01622-e01720.
- [15] Vankadari N. Arbidol: A potential antiviral drug for the treatment of SARS-CoV-2 by blocking trimerization of the spike glycoprotein [J]. Int J Antimicrob Agents, 2020, 56(2): 105998.
- [16] Xia S, Zhu Y, Liu M, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein [J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(7): 765-767.
- [17] Zhu Y, Yu D, Yan H, et al. Design of potent membrane fusion inhibitors against SARS-CoV-2, an emerging coronavirus with high fusogenic activity [J]. J Virol, 2020, 94(14): e00635-e00720.
- [18] Yang C, Pan X, Xu X, et al. Salvianolic acid C potently inhibits SARS-CoV-2 infection by blocking the formation of six-helix bundle core of spike protein [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 220.
- [19] Outlaw VK, Bovier FT, Mears MC, et al. Inhibition of coronavirus entry *in vitro* and *ex vivo* by a lipid-conjugated peptide derived from the SARS-CoV-2 spike glycoprotein HRC domain [J]. mBio, 2020, 11(5): e01935-e02020.
- [20] Cheng YW, Chao TL, Li CL, et al. Furin inhibitors block SARS-CoV-2 spike protein cleavage to suppress virus production and cytopathic effects [J]. Cell Rep, 2020, 33(2): 108254.
- [21] Zhao MM, Yang WL, Yang FY, et al. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development [J]. Signal

- Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 134.
- [22] Wang M, Li R, Shu B, et al. Stringent control of the RNA-dependent RNA polymerase translocation revealed by multiple intermediate structures [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2605.
- [23] Kokic G, Hillen HS, Tegunov D, et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 279.
- [24] Malin JJ, Suárez I, Priesner V, et al. Remdesivir against COVID-19 and other viral diseases [J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 34(1): e00162-e00220.
- [25] Wang Y, Zhang D, Du G, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial [J]. Lancet, 2020, 395(10236): 1569-1578.
- [26] Yin W, Luan X, Li Z, et al. Structural basis for inhibition of the SARS-CoV-2 RNA polymerase by suramin [J]. Nat Struct Mol Biol, 2021, 28(3): 319-325.
- [27] Narayanan N, Nair DT. Ritonavir may inhibit exoribonuclease activity of nsp14 from the SARS-CoV-2 virus and potentiate the activity of chain terminating drugs [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 168: 272-278.
- [28] Ferron F, Subissi L, Silveira De Moraes AT, et al. Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(2): E162-E171.
- [29] Falzarano D, de Wit E, Martellaro C, et al. Inhibition of novel β coronavirus replication by a combination of interferon- α 2b and ribavirin [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1686.
- [30] Falzarano D, de Wit E, Rasmussen AL, et al. Treatment with interferon- α 2b and ribavirin improves outcome in MERS-CoV-infected rhesus macaques [J]. Nat Med, 2013, 19(10): 1313-1317.
- [31] Omrani AS, Saad MM, Baig K, et al. Ribavirin and interferon alfa-2a for severe Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study [J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(11): 1090-1095.
- [32] Liu P, Liu H, Sun Q, et al. Potent inhibitors of SARS-CoV-2 3C-like protease derived from N-substituted isatin compounds [J]. Eur J Med Chem, 2020, 206: 112702.
- [33] Rathnayake AD, Zheng J, Kim Y, et al. 3C-like protease inhibitors block coronavirus replication *in vitro* and improve survival in MERS-CoV-infected mice [J]. Sci Transl Med, 2020, 12(557): eabc5332.
- [34] Hattori SI, Higshi-Kuwata N, Raghavaiah J, et al. GRL-0920, an indole chloropyridinyl ester, completely blocks SARS-CoV-2 infection [J]. mBio, 2020, 11(4): e01833-e01920.
- [35] Yang S, Chen SJ, Hsu MF, et al. Synthesis, crystal structure, structure-activity relationships, and antiviral activity of a potent SARS coronavirus 3CL protease inhibitor [J]. J Med Chem, 2006, 49(16): 4971-4980.
- [36] Hu Y, Ma C, Szeto T, et al. Boceprevir, calpain inhibitors II and XII, and GC-376 have broad-spectrum antiviral activity against coronaviruses [J]. ACS Infect Dis, 2021, 7(3): 586-597.
- [37] Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, Ribeiro Lima C, et al. Atazanavir, alone or in combination with ritonavir, inhibits SARS-CoV-2 replication and proinflammatory cytokine production [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(10): e00825-e00920.
- [38] Sheahan TP, Sims AC, Leist SR, et al. Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon β against MERS-CoV [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 222.
- [39] Yan D, Liu XY, Zhu YN, et al. Factors associated with prolonged viral shedding and impact of lopinavir/ritonavir treatment in hospitalised non-critically ill patients with SARS-CoV-2 infection [J]. Eur Respir J, 2020, 56(1): 2000799.
- [40] Abian O, Ortega-Alarcon D, Jimenez-Alesanco A, et al. Structural stability of SARS-CoV-2 3CLpro and identification of quercetin as an inhibitor by experimental screening [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 164: 1693-1703.
- [41] Chen L, Gui C, Luo X, et al. Cinanserin is an inhibitor of the 3C-like proteinase of severe acute respiratory syndrome coronavirus and strongly reduces virus replication *in vitro* [J]. J Virol, 2005, 79(11): 7095-7103.
- [42] Du A, Zheng R, Disoma C, et al. Epigallocatechin-3-gallate, an active ingredient of Traditional Chinese Medicines, inhibits the 3CLpro activity of SARS-CoV-2 [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 176: 1-12.
- [43] Su HX, Yao S, Zhao WF, et al. Anti-SARS-CoV-2 activities *in vitro* of Shuanghuanglian preparations and bioactive ingredients [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(9): 1167-1177.
- [44] Li C, Wang L, Ren L. Antiviral mechanisms of candidate chemical medicines and traditional Chinese medicines for SARS-CoV-2 infection [J]. Virus Res, 2020, 286: 198073.
- [45] Wu CY, Lin YS, Yang YH, et al. GB-2 inhibits ACE2 and TMPRSS2 expression: *In vivo* and *in vitro* studies [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132: 110816.
- [46] 包蕾, 时宇静, 耿子涵, 等. 热炎宁合剂在评价人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(7): 1465-1472.
- [47] 鲍岩岩, 时宇静, 郭姗姗, 等. 复方芩兰口服液对人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证的治疗作用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(7): 1473-1480.
- [48] 鲍岩岩, 时宇静, 郭姗姗, 等. 基于对免疫功能的调节探讨柴银颗粒对人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证的治疗作用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(13): 3020-3027.
- [49] 郭姗姗, 李丹, 时宇静, 等. 基于冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证病证结合模型的金柴抗病毒胶囊疗效评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13): 1-7.
- [50] Boehm E, Kronig I, Neher RA, et al. Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic [J]. Clin Microbiol Infect, 2021, 27(8): 1109-1117.

王晨曦,王秀宏. 膳食乳化剂对结直肠癌影响的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 111-116.
Wang CX, Wang XH. Research progress on the effect of dietary emulsifiers on colorectal cancer [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 111-116.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.017

膳食乳化剂对结直肠癌影响的研究进展

王晨曦,王秀宏*

(哈尔滨医科大学,哈尔滨 150081)

【摘要】 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的诊断癌症之一,已成为癌症相关死亡的主要原因。最近的研究显示,广泛使用的食品添加剂——膳食乳化剂羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose, CMC)和聚山梨酯 80(polysorbate 80, P80)能影响肠道菌群,改变肠道菌群代谢产物及促进结肠炎症。而且目前对 CRC 的研究显示, CRC 的发生发展与肠道菌群、肠道菌群代谢产物、炎症等密切相关。故本综述将主要围绕这些影响因素去探讨膳食乳化剂 CMC 和 P80 促进 CRC 发生发展的可能性,为研究 CMC 和 P80 对 CRC 发生发展的影响提供参考。

【关键词】 羧甲基纤维素钠;聚山梨酯 80;肠道菌群;炎症;结直肠癌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0111-06

Research progress on the effect of dietary emulsifiers on colorectal cancer

WANG Chenxi, WANG Xiuhong*
(Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

【Abstract】 Colorectal cancer (CRC) is one of the most commonly diagnosed cancers in the world, and it has become the leading cause of cancer-related deaths. Recent studies have shown that the dietary emulsifiers carboxymethylcellulose (CMC) and polysorbate 80 (P80), which are widely used food additives, can affect the gut microbiota, change the metabolites of intestinal flora, and promote colon inflammation. The current research on CRC indicates that the occurrence and development of CRC are closely related to gut microbiota, intestinal flora metabolites, and inflammation. Therefore, this review focuses on these influencing factors to explore the possibility of whether dietary emulsifiers CMC and P80 promote the occurrence and development of CRC, and it provide references for studying the influences of CMC and P80 on the occurrence and development of CRC.

【Keywords】 carboxymethylcellulose; polysorbate 80; gut microbiota; inflammation; colorectal cancer

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)在全球是位于第三位最常见的恶性肿瘤和第二位致死性癌症,但发病率的原因尚不完全明确^[1]。在影响 CRC 的危险因素中,饮食是一个可改变的危险因素^[2]。随着加工食品的出现,人们接触到越来越多的食品添加剂,虽然可以通过选择食物来限制某些食品添加剂的食用,但完全避免摄入食品添加剂可能做不到^[3]。最近有研究表明,食品添加剂中的膳食乳化剂羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose, CMC)和聚山梨酯 80(polysorbate 80, P80)可能促进 CRC 的发生发展^[4-5]。在一项动物实验中,CMC 和 P80 被报道能影响小鼠肠道菌群,改变肠道菌群代谢产物,促进结肠炎症^[6]。同时,越来越多的证据表明,肠道菌群与 CRC 的发生发展密切相关^[7]。而且持

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81703232)。
【作者简介】 王晨曦(1994—),女,硕士研究生,研究方向:肠道菌群与结直肠癌。E-mail:18471359829@163.com
【通信作者】 王秀宏(1970—),女,教授,研究方向:肠道微生态紊乱与疾病的相关机制研究。E-mail:wangxiuhon@hrbmu.edu.cn

续的慢性炎症^[8]和一些肠道菌群代谢产物的改变^[9-10]是 CRC 发生发展的重要危险因素。故本综述根据现有的研究,将从这些方面去探讨 CMC 和 P80 可能对 CRC 发生发展的影响。

1 肠道菌群失调与 CRC 发生发展的相关性

肠道菌群失调与人类多种疾病有关,比如炎症肠病、癌症等。CRC 患者的粪便经灌胃给予无菌小鼠、*Apc*^{min/+}小鼠和偶氮甲烷诱导的小鼠,发现 CRC 患者的肠道菌群能促进肿瘤的发生^[11-12],这表明与 CRC 有关的肠道菌群在其中发挥了作用。在过去的十几年里,几种细菌因其与 CRC 发生的关系和潜在作用而受到关注,如大肠杆菌、产毒素的脆弱拟杆菌、具核梭杆菌等^[13]。此外,在一项涉及中国和丹麦 CRC 患者的宏基因组关联研究中,发现了两个与 CRC 相关的新物种,即 *Parvimonas micra* 和 *Solobacterium moorei*^[14],而且 *Parvimonas micra* 检测 CRC 的特异性达到了 87.3%^[15], *Solobacterium moorei* 从致癌的早期到晚期阶段的丰度显示出逐渐增加^[7]。而且对 526 份粪便宏基因组分析确定了 7 种 CRC 的富集细菌,这些富集的细菌与 CRC 中减少的有益细菌呈负相关关系^[16]。

有研究显示,食品中的 P80 会影响肠道菌群组成^[17]。而且利用人体肠道菌群生态系统的粘膜模拟器(M-SHIME)模型显示,P80 和 CMC 都直接改变了肠道菌群组成^[18]。在吡啶美辛诱导的小鼠模型中,P80 的添加会导致小鼠小肠菌群组成发生变化,其中产生硫化物的肠杆菌增加以及奇异变形杆菌的“变群”行为增强^[19],而结肠肿瘤的形成与奇异变形杆菌的存在相关^[20]。在野生型小鼠中,P80 会导致空肠弯曲菌、梭菌属等增加^[21]。最近的研究发现,空肠弯曲菌能通过基因毒素 CDT 的作用促进 CRC 的发生^[22],而且粪便中的共生梭菌可能作为一种用于 CRC 早期检测的生物标志物^[23]。此外,用 CMC 和 P80 喂养野生型小鼠、*IL-10*^{-/-}小鼠及 *TLR5*^{-/-}小鼠 12 周,发现 CMC 和 P80 都极大地改变了这 3 种模型中小鼠粪便和粘膜粘附的菌群组成。而在 *IL-10*^{-/-}小鼠中,CMC 和 P80 均引起 α -多样性降低和稳定性降低,疣微菌门中的 *Akkermansia muciniphila* 和与粘膜相关的具有促炎性的变形菌门增加^[6]。值得注意的是,用 CMC 和 P80 喂养野生型小鼠 9 周后,就导致了肠道菌群多样性显著降低,拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门发生显著变

化^[5]。而拟杆菌门与肿瘤易感性和促进作用密切相关^[24]。此外,有研究显示,厚壁菌门中的厌氧消化链球菌能增加活性氧的水平^[25]、影响肿瘤微环境及激活 PI3K-Akt-NF- κ B 信号通路^[26],从而促进细胞增殖。厚壁菌门中的解链食子酸链球菌通过激活 Wnt/ β -catenin 信号进而促进细胞增殖^[27-28],而且还通过招募肿瘤浸润免疫细胞,形成免疫抑制微环境,有利于 CRC 的肿瘤生长^[29]。

虽然有些与 CRC 有关的肠道菌群改变与 CRC 的发生发展机制尚不明确,但现有的研究提示我们肠道菌群的变化与 CRC 密切相关,一些特殊肠菌的富集和肠道益生菌的减少可能会促进 CRC 的发生发展。因此,随着研究的进展,在 CRC 中富集的特殊肠菌阐明,它们可能成为该病早期诊断的重要标志。

2 肠道菌群代谢产物对 CRC 发生发展的影响

肠道菌群参与代谢过程,其种类和比例决定了宿主的能量平衡。维持肠道平衡是维持宿主正常健康,预防多种疾病的必要条件^[30]。当肠道菌群失调时,其产生代谢产物的水平也会发生相应变化,对机体产生影响。在野生型小鼠中,CMC 和 P80 显著降低了短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)中丁酸盐的产生量及改变了胆汁酸的水平,但在无菌小鼠中未发生变化^[6],表明肠道菌群参与其中。而且用 P80 喂养的小鼠,其粪便中的乙酸盐、丙酸盐等水平也降低^[21]。这些结果表明,膳食乳化剂 CMC 和 P80 影响了肠道菌群代谢产物的水平。

2.1 SCFAs 对 CRC 发生发展的影响

食物消化吸收后产生的食物残渣经结肠时,它们被肠道菌群分解,产生 SCFAs,其中丁酸盐是肠道菌群和肠上皮细胞的主要能量来源,其可以发挥抗肿瘤特性,对结肠的健康发挥重要作用^[31]。但在 CRC 患者血浆中 SCFAs 含量明显降低,说明降低 SCFAs 可能促进 CRC 的进展^[32],而且在 CRC 患者中已观察到产生丁酸盐的细菌显著减少。对于产丁酸的丁酸梭菌,其能抑制肠道肿瘤的发生^[33]。在免疫方面,SCFAs 诱导 CD4⁺ T 细胞和先天性淋巴样细胞产生 IL-22,从而保护肠道免受炎症的影响以维持肠道稳态^[34]。SCFAs 可通过抑制 IL-6、TNF- α 和 IL-17 等细胞因子的表达,改善结肠炎症,显著降低了肿瘤的发生率和大小,对 CRC 具有保护作用^[35]。

总的来说, SCFAs 发挥着有益的作用, 但当 SCFAs 含量减少时, 对结肠的保护作用减弱, 可能会增加 CRC 的风险。

2.2 胆汁酸对 CRC 发生发展的影响

最近有研究表明, 肠道菌群失调可能改变胆汁酸的代谢, 促进结肠炎相关的结直肠癌 (colitis-associated colorectal cancer, CAC) 的发生^[36]。在 *Apc*^{min/+} 小鼠模型中, 脱氧胆酸 (deoxycholic acid, DCA) 破坏了肠道屏障, 诱导肠道低度炎症, 促进 M2 型巨噬细胞的极化, 从而促进肠道肿瘤的发生^[37-38]。而且将 DCA 处理的小鼠粪便转移到 *Apc*^{min/+} 小鼠中, 同样出现了上述情况, 还激活了肿瘤相关的 Wnt/ β -catenin 信号通路^[38], 说明 DCA 诱导肠道菌群的改变促进了肠道癌变。在 CAC 小鼠模型中, 胆酸促进肿瘤的发生^[39]。而在 *Apc*^{min/+} 小鼠模型中, 当使用抗生素耗尽肠道菌群时, 会减弱胆酸导致的肠道致癌作用^[40], 表明肠道菌群在该过程中起主导作用。从机制上, 胆汁酸在相关核受体的作用下, 与肠道菌群相互作用, 可能通过扰乱细胞增殖/凋亡信号、促进炎症、导致 DNA 损伤等促进 CRC 的发生发展^[9]。以上研究说明, 胆汁酸可能促进肠道肿瘤的发生发展, 这其中会与肠道菌群相互作用。而由 CMC 和 P80 引起胆汁酸水平的变化, 可能会增加 CRC 的风险。

3 CMC 和 P80 促进炎症发生进而促进 CRC 的发生

3.1 CMC 和 P80 破坏肠道屏障从而增加细菌侵袭

肠道菌群和人体肠道被一道物理屏障隔开。物理屏障是由一层肠上皮细胞和一层黏液层构成, 肠上皮细胞通过紧密连接、粘连连接和桥粒紧密排列在单层中^[41]。肠腔外面有一层由杯状细胞分泌的黏液所包裹, 分为内外两层。外层黏液层可以建立起排除病原体的生物膜, 内层黏液层含有一些细胞所分泌的抗菌物质, 抵制病原菌^[42]。黏液层是抵御微生物的第一道防线, 保护人类肠道免受微生物和炎症的侵袭^[43-44]。用 CMC 和 P80 处理野生型小鼠和 *IL-10*^{-/-} 小鼠, 黏液层厚度降低到一定程度, 以至于某些细菌入侵肠上皮, 而细菌和肠上皮细胞之间的距离比正常饮水组缩短了 50% 以上, 但在无菌小鼠中, CMC 和 P80 引起的黏液变薄并没有发生^[6]。这表明 CMC 和 P80 对黏液厚度的影响是由肠道菌群所驱动的。最新的动物实验研究表明, 母

体摄入 P80 后, 黏液蛋白 2 的表达水平下降, 紧密连接蛋白中的闭合蛋白 3 和闭合小环蛋白 1 表达下降^[45], 这表明母体摄入 P80 后, 破坏了子代小鼠肠道屏障。

使用多粒子跟踪技术对黏液中的荧光纳米颗粒和大肠杆菌进行跟踪, 结果显示, 当用 CMC 处理时, 黏液孔径减小, 导致大肠杆菌和颗粒通过黏液的扩散速度显著减慢。而接触 P80 时, 最低限度地影响了黏液的微观结构和颗粒扩散, 但增加了黏液中大肠杆菌的运动速度^[46]。此外, 相对于正常饮水组, 浓度为 0.1% 的 P80 导致大肠杆菌跨 M 细胞的转运能力提高了 59 倍, 而 P80 的浓度与大肠杆菌跨 M 细胞的转运能力之间存在着剂量依赖性关系^[47]。值得注意的是, CMC 也会作为一种纤维加入到商业食品中, 经常食用膳食纤维有助于防止肠道菌群对肠道黏液屏障的侵蚀, 减少病原体感染, 降低结肠炎的发病率^[48]。但克罗恩病患者会增加 CMC 的摄入量而限制其他膳食纤维的摄入量, 这可能会加剧现有的肠道生态失调, 使其向更多黏液蛋白降解的方向发展, 从而提高对黏液相关病原体的敏感性^[49]。

最近的研究显示, CMC 和 P80 可提高粘附性侵袭性大肠杆菌 (AIEC) 的活性以及粘附肠上皮细胞的能力^[4]。而且野生型小鼠和 *IL-10*^{-/-} 小鼠在摄入 CMC 或 P80 后, 血清中鞭毛蛋白和脂多糖的表达量增加, 这表明肠道通透性增加以及有相关的微生物易位^[5-6, 21]。值得注意的是, 在 CRC 人群中, 脂多糖的循环水平显著升高^[50]。在人体内, 血清抗鞭毛蛋白和抗脂多糖抗体浓度与 CRC 风险呈正相关^[51]。

综上, CMC 和 P80 会破坏肠道屏障, 导致肠道通透性和细菌易位的变化, 这可能会影响微生物群与肠上皮之间的相互作用, 促进炎症的发生。而与细菌/细菌产物的直接接触会导致固有层中 TLR4/MyD88 信号传导途径通过与肠道细菌衍生的脂多糖相互作用, 进而激活免疫细胞, 导致促炎性介质的分泌, 从而使局部炎症长期存在^[36]。

3.2 CMC 和 P80 促进炎症的发生

用 CMC 和 P80 喂养野生型小鼠, 小鼠粪便和血清中的脂质运载蛋白 2 水平增加, 表现出肠道炎症^[6, 21]。而在 *IL-10*^{-/-} 小鼠中, 炎症更加严重 (结肠长度进一步缩短, 组织学评分进一步增加及粪便中脂质运载蛋白 2 表达升高), 这其中伴随着肠道菌群的变化^[6]。用 CMC 和 P80 处理后的 M-SHIME

悬浮液灌胃无菌小鼠时,促进了低度炎症相关表型^[18],这表明由 CMC 和 P80 引起的肠道菌群变化促进了低度炎症反应。在 *IL-10*^{-/-} 小鼠模型中,用 CMC 处理后,发现白细胞向肠腔内迁移,表现出炎症,并伴随着肠道菌群的变化,这些变化与克罗恩病患者中观察到的变化相似^[52]。最新的动物实验研究表明,母体摄入 P80 后,可促进子代小鼠肠道低度炎症反应,这是由肠道菌群所介导的。而且还加重了子代小鼠成年后葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎症^[45]。根据最近的研究发现,炎症性肠病患者中 CRC 的发展风险是时间依赖性的,10 年增加 2%,20 年增加 8%,30 年增加 18%^[53]。

此外,CMC 和 P80 显著增加了趋化因子配体 1 的表达,说明 CMC 和 P80 促进了肠道低度炎症的发展。而在 CAC 小鼠模型中,炎症因子和趋化因子的水平进一步增加,炎症更加严重,同时促进了肿瘤的发生发展^[5]。即使只单独使用偶氮甲烷诱导的小鼠模型,CMC 和 P80 也能够导致肠道炎症,而 CMC 导致的肠道炎症足以诱导动物癌变^[5]。最新的研究显示,在 AIEC 定植的相关小鼠模型中,CMC 和 P80 能改变肠道菌群,直接诱导细菌毒力基因的表达来介导炎症反应,促进 CRC 的发生发展^[4]。而且在一项跟踪调查的研究结果显示,在 20 年的随访中,饮食中含有最促炎性食物的 25% 个体与饮食中含最少炎性食物的 25% 个体相比,患 CRC 的可能性要高 21%^[54]。

2014 年,McAllister 等^[55]得出结论,与肿瘤相关性炎症是肿瘤的第七个标志。临床和流行病学证据也表明,慢性炎症是几个胃肠道恶性肿瘤(CRC、胃癌、食管癌等)的主要危险因素^[56]。此外,动物和人类研究发现促癌性肠道菌群可能通过多种潜在机制(包括诱导炎症反应)促进 CRC 的发展^[57]。有研究显示,在慢性肠道炎症状态下,肠道菌群改变可促进肝癌进展^[58]。根据以上相关研究,本综述推测由 CMC 和 P80 导致的肠道炎症和肠道菌群的紊乱可能会促进 CRC 的发生发展。

3.3 CMC 和 P80 改变肠上皮细胞增殖/凋亡水平

在野生型小鼠中,CMC 和 P80 摄入后,CyclinD1、CyclinD2 和 Ki67 编码基因的表达显著失调,而在 CAC 小鼠模型中,这些基因的表达进一步失调。但在无菌小鼠中,这些基因的表达都未改变^[5]。值得注意的是,将小鼠(用 CMC 和 P80 喂养 12 周的野生型小鼠)的粪便悬液经灌胃给予正常的

无菌小鼠,发现 CyclinD1 和 CyclinD2 编码基因的表达发生改变^[5]。这表明 CMC 和 P80 诱导的肠道菌群组成改变在促进癌变中起着中心和直接的作用。以上这些结果表明,CMC 和 P80 以微生物依赖的方式改变肠上皮细胞的增殖/凋亡水平,进而促进 CRC 的发生发展。

根据最近的研究显示,在 CAC 小鼠模型中,CMC 和 P80 的摄入会增加肿瘤的大小和数量,促进 CRC 的发展。同时,在野生型小鼠中,CMC 和 P80 摄入后会增加 Ki67 和 TUNEL 阳性细胞的数量。而在 CAC 小鼠模型中,CMC 和 P80 会进一步显著增加这两种阳性细胞的数量^[5]。这表明在炎症状态下,CMC 和 P80 的摄入更易扰乱肠上皮细胞的增殖/凋亡平衡,从而增加细胞的更新,为肿瘤的发生创造一个合适的环境。

维持慢性增殖的能力是癌细胞最基本的特性之一,某些抗癌药物(如洛铂)可能是通过抑制细胞增殖以及诱导细胞凋亡而作为的一种抗结肠癌的药物^[59]。而 CMC 和 P80 促进肠上皮细胞增殖,扰乱了肠上皮细胞增殖/凋亡水平,可能对 CRC 的发生发展有一定影响。

4 小结与展望

本课题组前期研究表明,食品添加剂中的三氯蔗糖会导致肠道菌群失调和肠道屏障受损,并加剧肠道炎症以及促进结肠肿瘤的发生^[60]。结合以上研究,本综述推测膳食乳化剂 CMC 和 P80 可能导致肠道菌群失调,改变肠道菌群代谢产物水平或通过破坏肠道屏障,增加细菌入侵,从而导致肠道炎症和/或改变肠上皮细胞增殖/凋亡水平,促进 CRC 的发生发展。但 CMC 和 P80 驱动肠道炎症和 CRC 的关键细菌种类尚不明确以及改变肠道菌群导致炎症和 CRC 的确切机制也尚不清楚,这都值得进一步深入探索。我们或许可以通过宏基因组分析和粪菌移植的方法来寻找 CMC 和 P80 影响 CRC 的关键细菌,从该细菌的特点出发去研究其促进 CRC 发生发展的机制等。此外,我们平时需要注意健康饮食,营造一个良好的肠道环境以减少肠道相关疾病的发生,期望将来可能通过饮食指导以达到预防 CRC 的发生或降低 CRC 的发病率。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

- worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249.
- [2] Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors [J]. Prz Gastroenterol, 2019, 14(2): 89–103.
 - [3] Partridge D, Lloyd KA, Rhodes JM, et al. Food additives: Assessing the impact of exposure to permitted emulsifiers on bowel and metabolic health-introducing the FADiets study [J]. Nutr Bull, 2019, 44(4): 329–349.
 - [4] Viennois E, Bretin A, Dubé PE, et al. Dietary emulsifiers directly impact adherent-invasive *E. coli* gene expression to drive chronic intestinal inflammation [J]. Cell Rep, 2020, 33(1): 108229.
 - [5] Viennois E, Merlin D, Gewirtz AT, et al. Dietary emulsifier-induced low-grade inflammation promotes colon carcinogenesis [J]. Cancer Res, 2017, 77(1): 27–40.
 - [6] Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome [J]. Nature, 2015, 519(7541): 92–96.
 - [7] Yachida S, Mizutani S, Shiroma H, et al. Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer [J]. Nat Med, 2019, 25(6): 968–976.
 - [8] Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences [J]. Immunity, 2019, 51(1): 27–41.
 - [9] Liu T, Song X, Khan S, et al. The gut microbiota at the intersection of bile acids and intestinal carcinogenesis: An old story, yet mesmerizing [J]. Int J Cancer, 2020, 146(7): 1780–1790.
 - [10] Ohara T, Mori T. Antiproliferative effects of short-chain fatty acids on human colorectal cancer cells via gene expression inhibition [J]. Anticancer Res, 2019, 39(9): 4659–4666.
 - [11] Li L, Li X, Zhong W, et al. Gut microbiota from colorectal cancer patients enhances the progression of intestinal adenoma in Apc^{min/+} mice [J]. EBioMedicine, 2019, 48: 301–315.
 - [12] Wong SH, Zhao L, Zhang X, et al. Gavage of fecal samples from patients with colorectal cancer promotes intestinal carcinogenesis in germ-free and conventional mice [J]. Gastroenterology, 2017, 153(6): 1621–1633.
 - [13] Garrett WS. The gut microbiota and colon cancer [J]. Science, 2019, 364(6446): 1133–1135.
 - [14] Yu J, Feng Q, Wong SH, et al. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer [J]. Gut, 2017, 66(1): 70–78.
 - [15] Lowenmark T, Löfgren-Burström A, Zingmark C, et al. *Parvimonas micra* as a putative non-invasive faecal biomarker for colorectal cancer [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 15250.
 - [16] Dai Z, Coker OO, Nakatsu G, et al. Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers [J]. Microbiome, 2018, 6(1): 70.
 - [17] Nielsen CK, Kjems J, Mygind T, et al. Effects of Tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1878.
 - [18] Chassaing B, Van de Wiele T, De Bodt J, et al. Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression *ex vivo* potentiating intestinal inflammation [J]. Gut, 2017, 66(8): 1414–1427.
 - [19] Furuhashi H, Higashiyama M, Okada Y, et al. Dietary emulsifier polysorbate-80-induced small-intestinal vulnerability to indomethacin-induced lesions via dysbiosis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2020, 35(1): 110–117.
 - [20] Gaines S, van Praagh JB, Williamson AJ, et al. Western diet promotes intestinal colonization by collagenolytic microbes and promotes tumor formation after colorectal surgery [J]. Gastroenterology, 2020, 158(4): 958–970.
 - [21] Singh RK, Wheildon N, Ishikawa S. Food additive P-80 impacts mouse gut microbiota promoting intestinal inflammation, obesity and liver dysfunction [J]. SOJ Microbiol Infect Dis, 2016, 4(1): 10.
 - [22] He Z, Gharaibeh RZ, Newsome RC, et al. *Campylobacter jejuni* promotes colorectal tumorigenesis through the action of cytolethal distending toxin [J]. Gut, 2019, 68(2): 289–300.
 - [23] Xie YH, Gao QY, Cai GX, et al. *Fecal clostridium symbiosum* for noninvasive detection of early and advanced colorectal cancer: test and validation studies [J]. EBioMedicine, 2017, 25: 32–40.
 - [24] Konstantinov SR, Kuipers EJ, Peppelenbosch MP. Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(12): 741–745.
 - [25] Tsoi H, Chu ESH, Zhang X, et al. *Peptostreptococcus anaerobius* induces intracellular cholesterol biosynthesis in colon cells to induce proliferation and causes dysplasia in mice [J]. Gastroenterology, 2017, 152(6): 1419–1433.
 - [26] Long X, Wong CC, Tong L, et al. *Peptostreptococcus anaerobius* promotes colorectal carcinogenesis and modulates tumour immunity [J]. Nat Microbiol, 2019, 4(12): 2319–2330.
 - [27] Aymeric L, Donnadieu F, Mulet C, et al. Colorectal cancer specific conditions promote *Streptococcus gallolyticus* gut colonization [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(2): E283–E291.
 - [28] Kumar R, Herold JL, Schady D, et al. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* promotes colorectal tumor development [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(7): e1006440.
 - [29] Zhang Y, Weng Y, Gan H, et al. *Streptococcus gallolyticus* conspires myeloid cells to promote tumorigenesis of inflammatory bowel disease [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 506(4): 907–911.
 - [30] Markowiak-Kopeć P, Śliżewska K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome [J]. Nutrients, 2020, 12(4): 1107.
 - [31] Wu X, Wu Y, He L, et al. Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer [J].

- J Cancer, 2018, 9(14): 2510–2517.
- [32] Yusuf F, Adewiah S, Fatchiyah F. The level short chain fatty acids and hsp 70 in colorectal cancer and non-colorectal cancer [J]. Acta Inform Med, 2018, 26(3): 160–163.
- [33] Chen D, Jin D, Huang S, et al. *Clostridium butyricum*, a butyrate-producing probiotic, inhibits intestinal tumor development through modulating Wnt signaling and gut microbiota [J]. Cancer Lett, 2020, 469: 456–467.
- [34] Yang W, Yu T, Huang X, et al. Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4457.
- [35] Tian Y, Xu Q, Sun L, et al. Short-chain fatty acids administration is protective in colitis-associated colorectal cancer development [J]. J Nutr Biochem, 2018, 57: 103–109.
- [36] Liu L, Yang M, Dong W, et al. Gut dysbiosis and abnormal bile acid metabolism in colitis-associated cancer [J]. Gastroenterol Res Pract, 2021, 2021: 6645970.
- [37] Cao H, Xu M, Dong W, et al. Secondary bile acid-induced dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis [J]. Int J Cancer, 2017, 140(11): 2545–2556.
- [38] Liu L, Dong W, Wang S, et al. Deoxycholic acid disrupts the intestinal mucosal barrier and promotes intestinal tumorigenesis [J]. Food Funct, 2018, 9(11): 5588–5597.
- [39] Zhang Y, Kang C, Wang XL, et al. Dietary factors modulate colonic tumorigenesis through the interaction of gut microbiota and host chloride channels [J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(5): 10.
- [40] Wang S, Dong W, Liu L, et al. Interplay between bile acids and the gut microbiota promotes intestinal carcinogenesis [J]. Mol Carcinog, 2019, 58(7): 1155–1167.
- [41] Ahmad Kendong SM, Raja Ali RA, Nawawi KNM, et al. Gut dysbiosis and intestinal barrier dysfunction: potential explanation for early-onset colorectal cancer [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 744606.
- [42] Thoo L, Noti M, Krebs P. Keep calm: the intestinal barrier at the interface of peace and war [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11): 849.
- [43] Lu S, Catalano C, Huhn S, et al. Single nucleotide polymorphisms within MUC4 are associated with colorectal cancer survival [J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0216666.
- [44] Gan GL, Liu J, Chen WJ, et al. The diverse roles of the mucin gene cluster located on chromosome 11p15.5 in colorectal cancer [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 514.
- [45] Jin G, Tang Q, Ma J, et al. Maternal emulsifier P80 intake induces gut dysbiosis in offspring and increases their susceptibility to colitis in adulthood [J]. mSystems, 2021, 6(2): e01337–e01420.
- [46] Lock JY, Carlson TL, Wang CM, et al. Acute exposure to commonly ingested emulsifiers alters intestinal mucus structure and transport properties [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10008.
- [47] Roberts CL, Keita AV, Duncan SH, et al. Translocation of Crohn's disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers [J]. Gut, 2010, 59(10): 1331–1339.
- [48] Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, et al. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility [J]. Cell, 2016, 167(5): 1339–1353.
- [49] Martino JV, Van Limbergen J, Cahill LE. The role of carrageenan and carboxymethylcellulose in the development of intestinal inflammation [J]. Front Pediatr, 2017, 5: 96.
- [50] de Waal GM, de Villiers WJS, Forgan T, et al. Colorectal cancer is associated with increased circulating lipopolysaccharide, inflammation and hypercoagulability [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 8777.
- [51] Kong SY, Tran HQ, Gewirtz AT, et al. Serum endotoxins and flagellin and risk of colorectal cancer in the european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) cohort [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2016, 25(2): 291–301.
- [52] Swidsinski A, Ung V, Sydora BC, et al. Bacterial overgrowth and inflammation of small intestine after carboxymethylcellulose ingestion in genetically susceptible mice [J]. Inflamm Bowel Dis, 2009, 15(3): 359–364.
- [53] Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis [J]. Gut, 2001, 48(4): 526–535.
- [54] Printz C. Study finds link between inflammation and colorectal cancer [J]. Cancer, 2018, 124(1): 13.
- [55] McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(8): 717–727.
- [56] Wang D, Cabalag CS, Clemons NJ, et al. Cyclooxygenases and prostaglandins in tumor immunology and microenvironment of gastrointestinal cancer [J]. Gastroenterology, 2021, 161(6): 1813–1829.
- [57] Janney A, Powrie F, Mann EH. Host-microbiota maladaptation in colorectal cancer [J]. Nature, 2020, 585(7826): 509–517.
- [58] 易宏淦, 臧梦雅, 吴志远, 等. 慢性肠道炎症促进肝癌的发展 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(5): 1–4.
- [59] 刘友强, 王贵英, 胡冀陶, 等. 洛铂对结肠癌细胞的抗肿瘤活性及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 89–94.
- [60] Li X, Liu Y, Wang Y, et al. Sucralose promotes colitis-associated colorectal cancer risk in a murine model along with changes in microbiota [J]. Front Oncol, 2020, 10: 710.

[收稿日期]2021-07-02

赵振荣,史洺,刘继红,等. 线粒体动力相关蛋白 1 与帕金森病相关性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 117-121.
Zhao ZR, Shi M, Liu JH, et al. Mitochondrial dynamin-related protein 1 and Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 117-121.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.018

线粒体动力相关蛋白 1 与帕金森病相关性研究

赵振荣¹, 史洺¹, 刘继红¹, 邵思迈¹, 游言文¹, 张紫娟¹, 郝莉¹, 张振强^{2*}

(1. 河南中医药大学医学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046)

【摘要】 线粒体动力学包括融合和分裂。动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein1, Drp1) 是线粒体分裂的关键蛋白。帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 中 Drp1 表达增加, 其导致的线粒体碎片化和功能障碍参与 PD 病理过程。本文就线粒体动力学、线粒体动力相关蛋白 1 及其与 PD 中异常表达的 α -突触核蛋白、LRRK、PINK1、Parkin 等的病理关系进行综述。

【关键词】 线粒体动力学; 线粒体; Drp1; 帕金森病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0117-05

Mitochondrial dynamin-related protein 1 and Parkinson's disease

ZHAO Zhenrong¹, SHI Ming¹, LIU Jihong¹, SHAO Simai¹, YOU Yanwen¹, ZHANG Zijuan¹, HAO Li¹,
ZHANG Zhenqiang^{2*}

(1. School of Medical Science, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.
2. College of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Mitochondrial dynamics include fusion and division. Dynamic-related protein 1 (Drp1) is a key protein in mitochondrial division. The expression of Drp1 is increased during Parkinson's disease (PD), which leads to mitochondrial fragmentation and dysfunction and participates in the pathological process of PD. This paper reviews mitochondrial dynamics, Drp1 and their pathological relationships with the abnormal expression of α -synuclein, LRRK, PINK1 and Parkin in PD.

【Keywords】 mitochondrion dynamics; mitochondria; Drp1; Parkinson's disease

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 的主要症状是运动迟缓、静止性震颤和肌强直^[1]。PD 主要神经病理改变是中脑黑质多巴胺能神经元变性死亡, 由此引起纹状体多巴胺含量减少和 α -突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 沉积。这些病理改变可能与神经元氧化应激、炎症反应和线粒体功能障碍等有关。线粒体功能障碍可由多种原因引起, 如线粒体生物发生障碍、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成增加及线粒体动力学异常等^[2]。近年来, PD 中线粒体动力学异常引起了广泛关注。所以, 本文就线粒体动力学、线粒体动力相关蛋白 1 及其与 PD 中异常表达的 α -syn、LRRK、PINK1、Parkin 等的病理关系进行综述。

【基金项目】 河南省科技创新领军人才项目 (204200510022); 河南省科技攻关项目 (202102310078, 212102310828, 172102310286, 222102310280); 河南省高校重点科研项目 (19A310012)。

【作者简介】 赵振荣 (1997—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治神经退行性疾病。E-mail: 344581494@qq.com

【通信作者】 张振强 (1971—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合防治脑病。E-mail: zhang_zhenqiang@126.com

1 线粒体动力学

线粒体是存在于大多数真核细胞中的细胞器^[3], 是一系列细胞生命过程如三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 的产生、关键代谢物的合成、内源性 ROS 的产生等, 并且是细胞程序性和非程序性死亡发生的场所^[4]。线粒体动力学是指线粒体通过不断的分裂和融合, 为细胞提供能量, 调节细胞自噬和凋亡的过程^[5]。其中, 线粒体分裂有利于新线粒体的生物发生和通过自噬清除功能异常的线粒体, 动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein1, Drp1) 参与的线粒体分裂异常可引起神经退行性病变、心血管疾病和癌症等^[6]; 线粒体融合包括线粒体融合蛋白 1 (mitofusion 1, Mfn1) 和线粒体融合蛋白 2 (mitofusion 2, Mfn2) 介导的外膜融合和由视神经萎缩症蛋白 1 (optic atrophy 1, OPA1) 介导的内膜融合, 融合缺陷可引起线粒体 DNA 丢失^[7]。分裂与融合的动态平衡有助于维持线粒体的正常功能^[8]。

2 线粒体动力相关蛋白 1

Drp1 又名 DNM1L (dynamin-1 like)^[9], 正常情况下, Drp1 主要分布于细胞质内, 可维持线粒体动力学平衡, 调节分裂和融合。线粒体分裂时, 细胞质内的 Drp1 被募集到分裂处, 水解 GTP 释放能量, 微管环收缩继而切断线粒体。随着 Drp1 的表达水平降低, 分裂逐渐停止, 转向融合^[10]。因此, Drp1 水平的上调或下调可用于检测线粒体动力学的变化。

Drp1 由 Shin 等^[11] 首先报道, 分布于人的 12p11.21, 小鼠的 16 和大鼠的 11q23^[12]。人 Drp1 有六个剪接变体: 变体 1 编码 736 个氨基酸, 分子量为 81.6×10^3 ; 变体 2 外显子 15 被剪切; 变体 3 编码 699 个氨基酸, 外显子 15 和 16 被剪切; 变体 4 编码 725 个氨基酸; 变体 5 编码 710 个氨基酸; 变体 6 编码 749 个氨基酸^[13]。与人 Drp1 相似, 小鼠也存在 Drp1 的多种变体。变体 1 编码 712 个氨基酸组成, 分子量为 78.3×10^3 ; 变体 2 的外显子 3 被剪接掉; 变体 3 的外显子 15 和 16 被剪接掉^[13]。

Drp1 是一种高度保守的 GTP (Guanosine triphosphate) 酶, 包括 4 个结构域^[12]。不同结构域的不同位点可以与线粒体外膜上的受体结合, 其中 GTP 酶结构域与线粒体外膜上的受体结合; 中间结构域主要介导 Drp1 的寡聚化, 裂变过程由 Drp1 在

分裂点周围形成环状螺旋结构, 然后由 GTP 酶依赖性收缩; C 末端 GTP 酶效应结构域刺激 GTP 酶的活性并介导 Drp1 同源二聚体复合物的形成和稳定^[14]。

Drp1 翻译后修饰主要包括磷酸化、小泛素相关修饰物 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 化、泛素化和 S-亚硝基化, 它们调控着 Drp1 的活性。Ser637 的磷酸化抑制 Drp1 活性, 而 Ser616 的磷酸化激活 Drp1 活性。当 SUMO 蛋白附着在 Drp1 上时, 有助于 Drp1 修饰, 尤其是在线粒体外膜 (outer mitochondrial membrane, OMM)。然而, Drp1 在 OMM 的 SUMO 化结果尚不明确。定位于线粒体外膜的 E3 泛素连接酶可使从胞质转移到线粒体的 Drp1 发生泛素化, 并被蛋白酶体降解, 同时诱导线粒体自噬。Drp1 中 Cys644 半胱氨酸残基的 S-亚硝基化增强 Drp1 活性, 促进线粒体分裂^[15]。

3 Drp1 参与 PD 的病理过程

PD 是仅次于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的第二大神经退行性疾病^[16]。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 促进 Drp1 表达, 继而引起 ATP 减少和 ROS 产生增多^[17]。MPTP 可选择性引起多巴胺神经元变性损伤^[18]。由于 1-甲基-4-苯基-吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺) 是 MPTP 的活性代谢物, 被选择性地吸收到 DA 神经元中, 抑制线粒体复合物 I 的活性, 减少 ATP 合成^[19]。研究发现, MPP⁺ 可使 Drp1 表达增加, 导致处于融合、分裂平衡的线粒体趋向于过度分裂, 出现线粒体碎片化并伴有线粒体功能障碍, 这些改变的出现早于神经元自噬和死亡^[20]。所以在 PD 神经毒素模型中, Drp1 在介导 MPP⁺ 毒性中发挥了重要作用^[21]。

PD 黑质中残存的神经元胞质内不溶性 α -syn 聚集形成路易小体。PD 模型发生机制研究表明, α -syn 通过调节分裂、融合蛋白影响线粒体动力学^[22]。 α -syn 定位于线粒体膜, 影响线粒体分裂, 直接或间接影响着 Drp1 活性。 α -syn 促进 Drp1 从细胞质移位至线粒体外膜, 与相应受体结合, 形成螺旋寡聚体, 包裹线粒体使其分裂^[23], 同时还可引起线粒体自噬减少^[22]。实验发现 α -syn 聚集形成的毒性可被 Drp1 抑制剂降低, 这进一步说明 α -syn 聚集与 Drp1 介导的线粒体分裂相关^[24]。但是, PD 中线粒体分裂主要是由 α -syn 触发还是由 α -syn 与 Drp1 之间的相互作用引起的仍不清楚^[25]。

LRRK2(Leucine-rich repeat kinase 2) 是 PD 的致病基因^[26],具有调控囊泡运输、自噬、氧化应激、神经毒性和线粒体动力学等功能。LRRK2 基因编码的蛋白包含功能性激酶和 GTP 酶结构域。LRRK2 在多巴胺能神经元表达高于其他神经元,促使 Drp1 从胞质向线粒体转移和募集^[27]。LRRK2 通过转移磷酸盐来增加线粒体自噬,从而激活 Drp1。Ho 等^[28]等发现 LRRK2 通过 Drp1 以激酶依赖性方式引起神经元线粒体分裂和动力学失衡,继而参与 PD 病理过程。LRRK2 基因突变与 PD 相关,G2019S 是 LRRK2 家族中最常见的致病突变,它可增加激酶活性。PD 模型中,野生型 LRRK2 直接与 Drp1 相互作用,导致线粒体分裂,这在 G2019S LRRK2 突变中更加明显^[29]。

PINK1(PTEN induced putative kinase 1)与 PD 相关,是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,主要位于 OMM,促进 PD 中受损的线粒体通过自噬被清除^[30]。PINK1 可在 Ser616 位点磷酸化 Drp1,缺乏 PINK1 的细胞和小鼠组织中 Drp1 Ser616 磷酸化明显降低。在 PINK1 突变的 PD 患者成纤维细胞中检测到 Drp1 Ser616 磷酸化降低^[31]。PINK1 通过抑制 Drp1 从胞质移位线粒体,恢复线粒体功能,减少线粒体分裂,保护神经细胞免受损伤^[32]。PD 线虫模型中,ROS 的产生和线粒体膜电位的丢失上调 Drp1 表达,进行 PINK1 依赖的线粒体分裂和自噬^[33]。PINK1 缺陷果蝇的线粒体复合体 I 的功能受影响,引起线粒体膜电位降低和 ATP 减少^[34]。在 PINK1 基因敲除小鼠中,Drp1 抑制剂可促进多巴胺的释放,改善线粒体功能障碍和缓解氧化应激。

Parkin 是一种 E3 泛素连接酶,也是 PD 相关蛋白。Parkin 可在体内外与 Drp1 相互作用并泛素化 Drp1,促进其蛋白酶体降解。若 Parkin 突变或敲低可使 Drp1 泛素化和降解均减少,Drp1 活性增强和线粒体分裂增加,最终导致 PD^[35]。Parkin 在神经元过度表达不仅会增加线粒体数量还能延长果蝇的寿命。

PINK1 对底物的磷酸化有利于 Parkin 从胞质移位到线粒体和参与后续的线粒体自噬^[36]。PINK1 和 Parkin 突变的果蝇体内,过表达 Drp1 引起线粒体过度分裂,分裂后形成的碎片通过线粒体自噬消除^[37]。PINK1 或 Parkin 功能缺失会增加 Drp1 依赖的线粒体片段化^[38]。在 PD 的 Drp1 敲低或敲除模型中,PINK1/Parkin 调节的线粒体自噬在黑质中受到明显抑制,这提示 Drp1 参与了 PINK1/Parkin 调节的线粒体自噬,Drp1 在其中除了依赖性线粒体

分裂作用以外,是否还有其他的作用方式还需进一步的实验证实。

4 Drp1 作为治疗靶点的相关研究

诱发 PD 的神经毒素和相关蛋白与线粒体动力学有关。神经毒素如 6-羟基多巴胺、鱼藤酮和 MPP⁺可诱导 Drp1 从胞质转移至线粒体,引起线粒体分裂,从而导致多巴胺能神经元缺失。PD 相关蛋白如 Pink1、Parkin 和 α -syn 可通过 Drp1 调控线粒体融合/分裂来影响线粒体形态和功能。另外,条件性敲除 Drp1 的小鼠黑质和纹状体多巴胺能神经元容易受到分裂蛋白缺失的影响。因此,PD 中靶向 Drp1 介导的线粒体分裂对抑制神经变性非常重要。

十余年来,线粒体分裂抑制剂的开发取得了一定的进展。第一个线粒体分裂抑制剂 1 (mitochondrial division inhibitor 1, Mdivi-1)可透过血脑屏障、特异性降低 Drp1 活性。2008 年, Cassidy-Stone 等^[39]在酵母中发现 Mdivi-1 可明显减弱线粒体分裂,是 DNMI 的 GTP 酶特异性抑制剂。随后, Mdivi-1 逐渐被证实可阻止人和哺乳动物细胞中的 Drp1 从胞质转移到 OMM 聚集,可防止 GTP 酶激活水解 GTP 和 Drp1 寡聚化,从而抑制线粒体分裂,增加线粒体网络稳定。此外, Reddy 等^[40]研究表明, Mdivi-1 在降低 Drp1 的同时,增加线粒体融合蛋白水平,这说明 Mdivi-1 在抑制分裂的同时可促进融合。

Mdivi-1 在 Pink1 基因敲除和 MPTP 处理的 PD 小鼠模型中具有神经保护作用^[41]。在过表达人 A53T 突变 α -syn 基因的 PD 大鼠模型体内的实验结果显示 Mdivi-1 减少了神经变性、 α -syn 聚集,并使模型大鼠运动功能正常化,这可能与 Mdivi-1 减少线粒体过度分裂、改善氧化应激有关^[24]。PD 中, Pink1 突变促进线粒体分裂并阻止融合,而 Mdivi-1 明显减轻了 Pink1 突变诱导的线粒体缺陷^[42]。这些结果表明 Drp1 是一种治疗 PD 的潜在靶点,特异性抑制 Drp1 活性可直接减少线粒体分裂和片段化,进而缓解或逆转 PD 症状。截至目前, Mdivi-1 是研究最多的 Drp1 抑制剂,但是,实验结果尚未显示 Mdivi-1 在 PD 中如何影响 Drp1 的 GTP 酶活性及其机制,因此,需要进一步研究 Mdivi-1 如何靶向 PD 中神经元 Drp1 和线粒体分裂。

另一种 Drp1 选择性抑制剂是 P110,它是一种能透过血脑屏障的生物可利用肽。P110 通过减少线粒体碎片和 ROS 产生来改善线粒体膜电位,减少 PD 细胞模型中多巴胺能神经元的丢失^[43]。在加入

MPP+的神经元中,P110 通过抑制 Drp1 介导的线粒体功能障碍来减少多巴胺能神经元变性^[44]。LRRK2 G2019S 突变是 PD 最常见的遗传原因。P110 减少了携带 LRRK2 G2019S 的 PD 患者成纤维细胞的线粒体分裂,并降低了自噬水平。LRRK2 G2019S 在 Ser595 直接结合并磷酸化 Drp1,而 P110 可消除这种磷酸化,抑制了 Drp1 活性^[45]。除了磷酸化,目前尚不清楚 P110 是否还能通过其他修饰方式起作用。

另外,Dynasore 是一种细胞渗透分子,它不仅会产生一种构象来阻止 Drp1 聚合,还会阻止 Drp1 的 GTP 水解^[46]。Mitoquinone 是一种线粒体靶向抗氧化剂,它通过抑制 Drp1 从胞质转向线粒体,明显减轻由 PD 相关神经毒素诱导的线粒体分裂^[47]。

5 结语

Drp1 对于线粒体分裂至关重要,PD 中 Drp1 表达水平升高,增加的 Drp1 会导致线粒体过度分裂、融合减少以及线粒体功能缺陷。降低 Drp1 表达水平可减少线粒体分裂,有助于维持线粒体稳态,这对于治疗 PD 起到了重要作用。

目前,在 Drp1 抑制剂 Mdivi-1、P110 和 Dynasore 等的体内外研究中已初步取得了一些成果^[48]。因此以 Drp1 为切入点开发线粒体分裂的抑制剂有望成为治疗 PD 等神经退行性疾病的新靶标。但是,现有的 Drp1 抑制剂在不同 PD 模型中作用机制尚不十分明确,进一步深入研究其中的作用机制是当务之急。从而为 Drp1 抑制剂应用于 PD 等神经退行性疾病的临床治疗奠定坚实的理论和实验基础。

参考文献:

- [1] Raza C, Anjum R, Shakeel NUA. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies [J]. Life Sci, 2019, 226: 77-90.
- [2] Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease [J]. J Neurochem, 2016, 139: 216-231.
- [3] 郑义鹏,魏学敏,周庆彪. 线粒体分裂融合与细胞氧化还原交互调控作用的研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30(3): 239-241, 247.
- [4] Moraes CR, Meyers S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions [J]. Anim Reprod Sci, 2018, 194: 71-80.
- [5] Chan DC. Mitochondrial dynamics and its involvement in disease [J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 235-259.
- [6] Kleele T, Rey T, Winter J, et al. Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis [J]. Nature, 2021, 593(7859): 435-439.
- [7] Yu C, Zhao J, Yan L, et al. Structural insights into G domain dimerization and pathogenic mutation of OPA1 [J]. J Cell Biol, 2020, 219(7): e201907098.
- [8] 程婧,魏林,李苗. 线粒体动力学及线粒体自噬调控机制的研究进展 [J]. 生理学报, 2020, 72(4): 475-487.
- [9] Xie X, Wang Y, Yu D, et al. DNM1, a Dynamin-related protein that contributes to endocytosis and peroxisome fission, is required for the vegetative growth, sporulation, and virulence of *metarhizium robertsii* [J]. Appl Environ Microbiol, 2020, 86(17): e01217-e01220.
- [10] Wenger J, Klinglmayr E, Fröhlich C, et al. Functional mapping of human dynamin-1-like GTPase domain based on x-ray structure analyses [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71835.
- [11] Shin HW, Shinotsuka C, Torii S, et al. Identification and subcellular localization of a novel mammalian dynamin-related protein homologous to yeast Vps1p and Dnm1p [J]. J Biochem, 1997, 122(3): 525-530.
- [12] Qi Z, Huang Z, Xie F, et al. Dynamin-related protein 1: A critical protein in the pathogenesis of neural system dysfunctions and neurodegenerative diseases [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 10032-10046.
- [13] Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, et al. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases [J]. Brain Res Rev, 2011, 67(1-2): 103-118.
- [14] Hogarth KA, Costford SR, Yoon G, et al. DNM1L variant alters baseline mitochondrial function and response to stress in a patient with severe neurological dysfunction [J]. Biochem Genet, 2018, 56(1-2): 56-77.
- [15] Rizza S, Filomeni G. Denitrosylate and live longer: how ADH5/GSNOR links mitophagy to aging [J]. Autophagy, 2018, 14(7): 1285-1287.
- [16] Cabreira V, Massano J. Parkinson's disease: clinical review and update [J]. Acta Med Port, 2019, 32(10): 661-670.
- [17] Bajpai P, Sangar MC, Singh S, et al. Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine by mitochondrion-targeted cytochrome P450 2D6; implications in Parkinson disease [J]. J Biol Chem, 2013, 288(6): 4436-4451.
- [18] Lee E, Hwang I, Park S, et al. MPTP-driven NLRP3 inflammasome activation in microglia plays a central role in dopaminergic neurodegeneration [J]. Cell Death Differ, 2019, 26(2): 213-228.
- [19] Haga H, Matsuo K, Yabuki Y, et al. Enhancement of ATP production ameliorates motor and cognitive impairments in a mouse model of MPTP-induced Parkinson's disease [J]. Neurochem Int, 2019, 129: 104492.
- [20] Yang SH, Huang CY, Hsieh CY, et al. CDK4 and CDK5 inhibition have comparable mild hypothermia effects in preventing Drp1-dependent mitochondrial fission and neuron death induced by MPP [J]. Mol Neurobiol, 2020, 57(10): 4090-4105.
- [21] Geng J, Liu W, Gao J, et al. Andrographolide alleviates Parkinsonism in MPTP-PD mice via targeting mitochondrial fission mediated by dynamin-related protein 1 [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(23): 4574-4591.
- [22] Martinez JH, Alaimo A, Gorjod RM, et al. Drp-1 dependent

- mitochondrial fragmentation and protective autophagy in dopaminergic SH-SY5Y cells overexpressing α -synuclein [J]. Mol Cell Neurosci, 2018, 88:107–117.
- [23] Fan RZ, Guo M, Luo S, et al. Exosome release and neuropathology induced by α -synuclein: new insights into protective mechanisms of Drp1 inhibition [J]. Acta Neuropathol Commun, 2019, 7(1): 184.
- [24] Bido S, Soria FN, Fan RZ, et al. Mitochondrial division inhibitor-1 is neuroprotective in the A53T- α -synuclein rat model of Parkinson's disease [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 7495.
- [25] Feng ST, Wang ZZ, Yuan YH, et al. Dynamin-related protein 1: A protein critical for mitochondrial fission, mitophagy, and neuronal death in Parkinson's disease [J]. Pharmacol Res, 2020, 151: 104553.
- [26] Tolosa E, Vila M, Klein C, et al. LRRK2 in Parkinson disease: challenges of clinical trials [J]. Nat Rev Neurol, 2020, 16(2): 97–107.
- [27] Luo Y, Hoffer A, Hoffer B, et al. Mitochondria: A therapeutic target for Parkinson's disease? [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 20704–20730.
- [28] Ho DH, Je AR, Lee H, et al. LRRK2 kinase activity induces mitochondrial fission in microglia via Drp1 and modulates neuroinflammation [J]. Exp Neurol, 2018, 27(3): 171–180.
- [29] Nickels SL, Walter J, Bolognin S, et al. Impaired serine metabolism complements LRRK2-G2019S pathogenicity in PD patients [J]. Parkinsonism Relat Disord, 2019, 67: 48–55.
- [30] Reddy PH, Oliver DM. Amyloid beta and phosphorylated tau-induced defective autophagy and mitophagy in Alzheimer's disease [J]. Cells, 2019, 8(5): 488.
- [31] Han H, Tan J, Wang R, et al. PINK1 phosphorylates Drp1 (S616) to regulate mitophagy-independent mitochondrial dynamics [J]. EMBO Rep, 2020, 21(8): e48686.
- [32] Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, et al. Parkin and PINK1: much more than mitophagy [J]. Trends Neurosci, 2014, 37(6): 315–324.
- [33] Kim H, Perentis RJ, Caldwell GA, et al. Gene-by-environment interactions that disrupt mitochondrial homeostasis cause neurodegeneration in *C. elegans* Parkinson's models [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(5): 555.
- [34] Liu W, Acín-Peréz R, Geghman KD, et al. Pink1 regulates the oxidative phosphorylation machinery via mitochondrial fission [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(31): 12920–12924.
- [35] Wang H, Song P, Du L, et al. Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease [J]. J Biol Chem, 2011, 286(13): 11649–11658.
- [36] Wang X, Winter D, Ashrafi G, et al. PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility [J]. Cell, 2011, 147(4): 893–906.
- [37] Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease [J]. Neuron, 2015, 85(2): 257–273.
- [38] Lutz AK, Exner N, Fett ME, et al. Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation [J]. J Biol Chem, 2009, 284(34): 22938–22951.
- [39] Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingeman E, et al. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization [J]. Dev Cell, 2008, 14(2): 193–204.
- [40] Reddy PH, Manczak M, Yin X. Mitochondria-division inhibitor 1 protects against amyloid- β induced mitochondrial fragmentation and synaptic damage in Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2017, 58(1): 147–162.
- [41] Rappold PM, Cui M, Grima JC, et al. Drp1 inhibition attenuates neurotoxicity and dopamine release deficits *in vivo* [J]. Nat Commun, 2014, 5: 5244.
- [42] Cui M, Tang X, Christian WV, et al. Perturbations in mitochondrial dynamics induced by human mutant PINK1 can be rescued by the mitochondrial division inhibitor mdivi-1 [J]. J Biol Chem, 2010, 285(15): 11740–11752.
- [43] Fu P, Epshtein Y, Ramchandran R, et al. Essential role for paxillin tyrosine phosphorylation in LPS-induced mitochondrial fission, ROS generation and lung endothelial barrier loss [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 17546.
- [44] Qi X, Qvit N, Su YC, et al. A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity [J]. J Cell Sci, 2013, 126(3): 789–802.
- [45] Su YC, Qi X. Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation [J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(22): 4545–4561.
- [46] Macia E, Ehrlich M, Massol R, et al. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin [J]. Dev Cell, 2006, 10(6): 839–850.
- [47] Chen XJ, Wang L, Song XY. Mitoquinone alleviates vincristine-induced neuropathic pain through inhibiting oxidative stress and apoptosis via the improvement of mitochondrial dysfunction [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 110003.
- [48] Oliver D, Reddy PH. Dynamics of dynamin-related protein 1 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases [J]. Cells, 2019, 8(9): 961.

[收稿日期] 2021-09-14

刘宏,凌子旭,张净,等. SARS-CoV-2 奥密克戎变异株的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 122-127.
Liu H, Ling ZX, Zhang J, et al. Research progress on the SARS-CoV-2 Omicron mutant [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 122-127.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.019

SARS-CoV-2 奥密克戎变异株的研究进展

刘 宏¹,凌子旭²,张 净²,李思雨²,白天科²,李 剑^{3*}

(1. 河北医科大学第二医院,石家庄 050000;2. 河北医科大学临床学院,石家庄 050031;
3. 河北医科大学基础医学院,石家庄 050017)

【摘要】 严重急性呼吸道综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2)的新变异株奥密克戎(Omicron,B.1.1.529)因其传染性强和对疫苗的逃逸突变在世界各地引起了广泛关注。SARS-CoV-2 变异株的易感染性和抗体抗性主要由病毒刺突(S)蛋白受体结合域(RBD)上的突变决定。然而,对奥密克戎变异株的完整实验评估可能需要数周甚至数月才能完成。在此,研究人员将对奥密克戎株的传染性、疫苗策略以及血清抗体中和活性等方面进行分析,以期为尽快科学了解奥密克戎变异株的关键特性,提早制定长远对策提供思路。

【关键词】 奥密克戎株;SARS-CoV-2;新型冠状病毒肺炎;变异株

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0122-06

Research progress on the SARS-CoV-2 Omicron mutant

LIU Hong¹, LING Zixu², ZHANG Jing², LI Siyu², BAI Tianke², LI Jian^{3*}

(1. the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China. 2. Clinical College of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031. 3. Basic Medicine College of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

【Abstract】 The latest severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) variant Omicron (B.1.1.529) has incited panic responses around the world owing to its higher level of contagiousness and vaccine-escape mutations. The susceptibility of potential hosts to the SARS-CoV-2 mutant and the antibody resistance of this virus are determined mainly by the mutation in the receptor-binding domain (RBD) of its spike (S) protein. However, a complete experimental evaluation of Omicron may take weeks or even months. Here, we analyze the infectivity, vaccine strategy, and serum antibody neutralization activity of Omicron, the result of which are expected to provide a basis for scientifically understanding the key characteristics of the Omicron mutant as soon as possible and for formulating appropriate long-term countermeasures against SARS-CoV-2.

【Keywords】 Omicron; SARS-CoV-2; COVID-19; variant

2021 年 11 月 26 日世界卫生组织(WHO)将新型严重急性呼吸道综合征冠状病毒(SARS-CoV-2)变异株 B.1.1.529 命名为奥密克戎(Omicron)——一种需要高度关注的变异株(variant of concern, VOC)^[1-2]。不论是病毒感染或疫苗接种产生抗体的主要靶标都是 SARS-CoV-2 的刺突(spike, S)蛋白^[3],在 S 蛋白上有 5 个突变位点的德尔塔(Delta)突变株已经造成了全球范围的传播^[4],而奥密克戎

【基金项目】 河北省自然科学基金(C2021206004);河北省高等学校科学技术研究项目(QN2021098);河北省中医药管理局科研计划项目(2021118);河北省大学生创新性实验计划项目(CXSY2020002);河北医科大学“春雨计划”项目(CYCZ2021002)。

【作者简介】 刘宏(1982—),女,硕士,研究方向:感染性疾病研究。E-mail:liuyx14@163.com

【通信作者】 李剑(1982—),女,副教授,博士,硕士生导师,研究方向:病原生物学研究。E-mail:834036516@qq.com

株在 S 蛋白上的突变位点高达 30 余个^[5], 因此奥密戎变异株的出现, 在世界范围内按下了“紧急按钮”, 许多国家都颁布了旅行限制令, 以防止奥密戎株的迅速蔓延。

计算机分析表明, 奥密戎株的感染性可能比原病毒高 10 倍以上, 大约是德尔塔株的 2 倍。根据 NICD (south Africa's national institute for communicable diseases) 的数据, 德尔塔株是南非 8 月、9 月和 10 月的主要流行毒株。序列分析显示德尔塔株在 11 月仅占 23% (72/312), 而 73% (228/312) 是奥密戎株。从 11 月 30 日到 12 月 3 日, 南非确诊的奥密戎变异株感染病例从 4373 例增加到 16055 例^[6]。这些数据表明, 奥密戎株已经成为南非的主要流行毒株, 并在南非引发新一波疫情。在其他国家, 奥密戎毒株也展现了更快、更广的传播特点。截至 2021 年 1 月 20 日, 全球共有百余个国家报道了超过 190000 例奥密戎确诊病例^[7]。奥密戎变异株正在逐渐取代德尔塔株, 成为多数国家的主要流行毒株^[8]。本文将分析奥密戎变异株的传染性、疫苗策略和血清中和抗体活性等特点, 以期为今后新冠疫情的防控工作提供参考依据。

1 奥密戎变异株的进化来源及传染性

新冠病毒变异株奥密戎 (B. 1. 1. 529) 最早于 2021 年 11 月初在非洲博茨瓦纳的一名实验室确诊病例中发现^[1], 在 2021 年 11 月 24 日于南非等地报道, 仅仅 2 d 该毒株就被世界卫生组织判定为“需要高度关注的变异株 (VOC)”^[2]。截至 2021 年 12 月 22 日, 全球 110 个国家和地区已经发现感染奥密戎变异株的确诊病例^[2], 且该变异株的传染速度明显快于德尔塔毒株^[9-10]。在南非出现奥密戎变异株的地区, SARS-CoV-2 检测呈阳性的病例相对增加, 为此当地流行病学家正着力研究其混杂因素。目前, 与南非旅行史有关的奥密戎株阳性病例几乎遍布全球, 但在美国^[11]或欧洲^[12]的个别病例却没有南非的旅行史。

在病毒的生物学特征中, 我们对可以促进其增殖的特征知之甚少。研究发现, SARS-CoV-2 奥密戎变异株具备 32 个位点的基因突变, 这些基因突变会导致病毒刺突的氨基酸序列发生变化, 其中有 15 个突变位点位于受体结合域 (receptor-binding domain, RBD), 而 RBD 正是 ACE-2 受体介导的病毒

-细胞相互作用的关键位置^[13-14]。由于自然选择, 病毒通过突变来增强 ACE2-RBD 亲和力, 或通过突变逃避抗体, 进而增强其在 RBD 的进化优势^[15]。据报道, 人们已经试图通过奥密戎变异株刺突的基因序列推断病毒的传播速率。有数据显示, 有一组突变出现在 S1-S2 弗林蛋白酶切割位点, 这可能会增强病毒的传染性。此外, RBD 中的突变组合将导致奥密戎变异株与人类 ACE2 产生高度亲和力^[10]。今后这些假设仍需要体外研究的佐证。如果奥密戎株具备高感染性的特点, 它将有可能取代德尔塔株成为主要的流行变异株。

2 奥密戎变异株的检测方法

在检测新冠病毒的过程中, 除了使用 Thermo Fischer TaqPath 时观测到的一个特异性 S 基因靶向失效 (specific S-gene target failure, SGTF) 外^[16], Real-time PCR 测试 (NAAT 测试) 的结果并没有受到奥密戎基因变异的影响^[17], 这是由于新变异株与先前检测的阿尔法 (Alpha) 变异株一样具有病毒刺突基因序列 69~70 位点的基因缺失^[18]。所以这也提示了针对 SARS-CoV-2 的检测至少需要测试两个不同的基因组区域, 以防止由于其中一个目标区域发生变异而导致的假阴性结果。

变异筛选是检测和防止一种新的 VOC 扩散的最快方法。所以与检测阿尔法变异株类似, 目前 SGTF 可以作为疑似奥密戎变异株感染的检测指标^[16]。根据这些病毒之间刺突基因序列的差异, 有针对性地检测某变异株特异性的突变序列, 可以揭示德尔塔或奥密戎变异株的存在^[19]。截至目前, 人们已经实现了对于一些突变株的特异性检测, 例如检测 E484K/Q、L452R、N501Y 等, 从而可以快速完成对奥密戎株的筛选。此外, 对所有可疑感染者进行病毒全基因测序, 对于在全球范围监测这一新变种至关重要。该工作是通过在数据库 (如 GISAID) 上收集、比对序列来实现的^[20]。这种监测还可能观察到新出现的病毒进化株或亚系。

在检测新冠病毒抗原时, 为了避免因刺突蛋白变异而导致的假阴性结果, 多数实验室是开展基于核衣壳 (nucleocapsid, N) 抗原的快速试验。需要注意的是, 人们已经在奥密戎株核衣壳序列上检测到了一些突变位点, 而目前尚不清楚这些突变是否会对快速检测新冠病毒造成影响。总体而言, 抗原试验不如 Real-time PCR 试验敏感^[21]。通常, 在高

度怀疑感染的情况下,抗原试验的阴性结果必须通过 Real-time PCR 试验再次确认。所以在疑似奥密戎变异株感染时(如根据旅行史或接触史)建议首选 Real-time PCR 检测。

3 预防奥密戎的疫苗策略与血清中和抗体活性分析

3.1 疫苗策略

疫苗接种已被证明是预防和控制新冠病毒感染的最有效手段。目前已经有四种疫苗,即病毒灭活疫苗、病毒载体疫苗、DNA/RNA 疫苗和蛋白疫苗^[22]。这些疫苗主要针对刺突蛋白^[23]。然而奥密戎变异株出现的 32 个氨基酸的变化,包括 3 个小的基因缺失和 1 个小的基因插入,可能会极大地提高其逃避当前疫苗的能力。

一种人工智能(AI)模型已经对 SARS-CoV-2 进行过数万次实验数据分析^[24],该模型显示奥密戎株的传染性可能是原始病毒的十倍以上,或者是德尔塔变异株的两倍左右。研究者通过对 132 个抗体-RBD 复合物的三维(3D)结构进行分析,揭示了奥密戎株逃避当前疫苗免疫的可能性是德尔塔变异株的两倍。因此,美国食品和药品管理局(FDA)批准的 Eli Lilly 公司单克隆抗体(monoclonal antibody, MAb)的作用效果可能会严重受损。奥密戎株也可能降低 Celltrion 和 Rockefeller 大学单克隆抗体的效力。然而,它对 Regeneron 单克隆抗体“鸡尾酒”的影响甚微^[24]。

由于现在已证实疫苗诱导的抗病毒免疫会随时间的推移逐渐下降^[25],因此无论正在流行哪种变异株,目前最重要的是进行加强免疫接种,以应对持续存在且可能倍速增加的病例^[26]。因为氨基酸发生改变的位点已经涵盖了参与免疫逃逸的位置,如 E484(E484A 代表奥密戎变异株,E484K 代表贝塔和伽马变异株),所以奥密戎变异株潜在的免疫逃逸现象,可能与该变异株的刺突序列突变频率较高有关^[27]。到目前为止,人们尚未对奥密戎株刺突序列中所有突变位点的组合或协同作用进行研究,所以这些突变对免疫逃逸的影响仍有待确定。多数制药公司已经开始评估疫苗对这种新变种的效力(如莫德纳、辉瑞和阿斯利康),其中一些公司的实验室表示,他们可以根据需要调整疫苗设计方案。

另一个关键问题是,异种疫苗能否对新变种产生有效的保护力。所以,对感染不同 SARS-CoV-2

变异株的患者,以及接种不同疫苗(包括异源疫苗)人群的血清进行体外中和试验时,必须同时检测奥密戎变异株。由于细胞免疫直接针对不同的病毒刺突表位,所以我们可以认为病毒进化对细胞免疫的影响可能不如体液免疫那么大。目前有目共睹的是 COVID-19 疫苗能降低感染率,并且对预防重症 COVID-19 有很好的效果。

2022 年 4 月 26 日,中国国家药品监督管理局正式批准了科兴控股生物、国药集团中国生物基于奥密戎变异株研制的新冠病毒灭活疫苗进入临床研究,用以评价新冠病毒变异株疫苗在各类人群中的安全性和免疫原性^[28]。2022 年 5 月 1 日下午,由国药集团中国生物北京生物制品研究所研发的奥密戎变异株新冠病毒灭活疫苗临床研究,正式在浙江省杭州市完成第一剂接种,这也是全球首支针对奥密戎变异株进入临床试验的新冠病毒灭活疫苗^[29]。

3.2 血清中和抗体活性分析

目前有 5 种需要高度关注的新冠病毒变异株(Alpha、Beta、Gamma、Delta、Omicron),另外还有 2 种待观察的变异株(Lambda、Mu)。人类对新冠病毒的免疫反应因人而异^[30]。王佑春团队利用假病毒技术,设计构建了 SARS-CoV-2 变异株奥密戎的假病毒,对 28 份恢复期患者的血清样品进行了中和抗体检测,并与其他 VOCs(Alpha、Beta、Gamma、Delta)和 VOIs(Lambda、Mu)毒株进行了比较^[31],结果表明这些恢复期血清对奥密戎株的平均中和活性 ED50 降低约 8.4 倍,而对其他 VOCs 和 VOIs 假病毒的中和活性仅降低约 1.2~4.5 倍。而且血清中和抗体水平不同,对奥密戎株的中和活性降低倍数也不同。这一体外假病毒研究结果表明奥密戎株能显著逃逸新冠病毒既往感染引起的免疫保护,逃逸效果远超其它 VOC 和 VOI 变异株。

此外,新冠康复者、接种两剂新冠疫苗、接种 3 剂新冠疫苗、新冠康复者接种两剂新冠疫苗、新冠康复者接种 3 剂疫苗等人群产生的抗体对奥密戎变异株的中和活性可能存在差异。了解不同群体的血清对奥密戎株的中和活性和结合能力,对于评估疫苗对新冠轻症患者、重症患者的保护水平至关重要。Carreño 等^[32]收集了不同免疫状态人群的血清 85 份,其中包括:新冠康复者、接种两剂 BNT162b2(辉瑞 mRNA 疫苗)、接种两剂 mRNA-1273(莫德纳 mRNA 疫苗)、接种 3 剂 BNT162b2(辉

瑞 mRNA 疫苗)、接种 3 剂 mRNA-1273 (莫德纳 mRNA 疫苗)、新冠康复者接种两剂 BNT162b2、新冠康复者接种两剂 mRNA-1273、接受 3 剂 BNT162b2 的人群。通过体外试验评估对野生株、贝塔株 (Beta, B. 1. 351)、奥密克戎株的中和活性和结合能力差异。研究发现,新冠康复者的血清标本对野生株和贝塔株的中和活性普遍较低,对奥密克戎株的中和活性降低超过 11.1 倍;对于接种两剂 BNT162b2 和 mRNA-1273 疫苗的样本,对奥密克戎株的中和活性分别降低了 23 倍和 42 倍,但大多数个体还是保留了低水平但可检测到的中和抗体活性;与仅接种两针疫苗的个体相比,接种疫苗加强针的个体血清对奥密克戎株的中和抗体活性明显升高。接种两针 BNT162b2、两针 mRNA-1272 或 3 针 BNT162b2 疫苗的新冠康复者血清都保持了相对稳定的中和活性。这些数据都证明接种疫苗对新冠康复者同样具有保护意义。

总体来讲,虽然中和抗体滴度明显下降,但总抗体滴度水平变化较小,对奥密克戎株仍有较好的结合力。各组人群血清对奥密克戎变异株的 RBD 结合能力下降 2.4 倍、NTD 结合能力下降 1.4 倍、S 蛋白结合能力下降 5.2 倍。这进一步说明新冠变异株逃逸的很可能是中和抗体。这些数据阐释了新冠康复者仍需接种疫苗的意义,以及接种第三针 (加强针) 对提升中和抗体水平的重要作用。但由于样本量有限,疫苗对变异株的保护作用究竟如何、能持续多长时间等问题还需进一步探讨。

4 奥密克戎变异株的治疗方案

对流行病学监测数据的回顾性分析表明,奥密克戎突变株可能会增加原发感染后再次感染的风险^[33]。这一结果是通过实验室确认的 2796982 例 SARS-CoV-2 感染者中 35670 例疑似再感染病例的监测数据得出的^[34],它表明奥密克戎变异株具有逃避先前免疫记忆的能力。因为在研究期间,南非的疫苗接种率非常低,所以该结果不适用于疫苗研究。在每个新的变异体中,都有可能出现 COVID-19 的严重性增加或减少的情况。所以,有太多的混杂因素使人们目前无法将南非的奥密克戎株感染者与其他变异株感染者进行比较。事实上,COVID-19 的严重程度和死亡率在很大程度上取决于疫苗接种率、人口特征 (包括年龄、社会经济水平或合并症)、医疗管理水平以及导致卫生系统饱和的同时

病例数等多种因素^[34]。所以,在深入调查临床病例的严重程度时,对以上这些影响因素进行尽可能多的控制是至关重要的。

感染奥密克戎变异株确诊病例的治疗方案预计不会随着病毒变异而出现较大改变。与皮质类固醇相关的氧疗可能仍然是主要的治疗手段^[35]。在最严重的病例中,如 IL-6 抑制剂 (托西利珠单抗)^[36] 或 JAK 抑制剂 (巴利西替尼)^[37] 等靶向抗炎药,可能会发挥作用。

4.1 单克隆抗体

新冠病毒的单克隆抗体 (MAbs) 是较有效的抗病毒药物。现在一些国家无论是在感染前预防还是感染后治疗,尤其是对于新冠肺炎重症患者,都推荐使用 MAbs。这些疗法中使用的大多数单克隆抗体,都是针对 SARS-CoV-2 刺突蛋白的 RBD,而该蛋白在奥密克戎变异株出现了多处突变。目前科研人员已经探究了每个单一突变对单克隆抗体效力的影响,并通过体外实验证实几种突变的组合会使假病毒对单克隆抗体产生耐药性^[38]。在体内实验中,我们可以通过抗体的效价预测奥密克戎变异株对单克隆抗体的敏感性^[39]。针对奥密克戎单突变体的数据初步表明,VIR-7831 (索曲单抗) 和 VIR-7832 可能仍具备抵抗病毒的活性。此外,目前关于 Casirivimab/Imdevimab 的数据鲜有报道^[40];由于人们已经证明 Bamlanivimab/Etesevimab 对德尔塔株疗效甚微^[41],所以预计它们也不会对奥密克戎株有明显效果。当然,这需要结合变异株的中和试验来得出结论。

4.2 直接抗病毒药物

关于口服药抗病毒疗法,人们发现目前有两种药物可能对 SARS-CoV-2 发挥有限的疗效,它们是抑制 SARS-CoV-2 复制的核糖核苷类似物^[42] 和蛋白酶抑制剂^[43]。由于新冠病毒的两个非结构基因 (NSP14 和 NSP5) 分别编码两种蛋白酶,而基因突变仅会出现在这些基因的某一个位点,所以这两种酶不会同时受到突变的影响,这在一定程度上保证了作为蛋白酶抑制剂的口服抗病毒药不易脱靶,但目前这两种药物的效力在感染奥密克戎变异株的病例中仍未得到证实。

5 总结与展望

SARS-CoV-2 的突变是一个连续的过程,会导致多种变异株的出现。高度关注变异株是造成严重

感染背后的原因,这种感染会随着新变种奥密克戎的出现而持续下去。尽管最新变异株的传染性、流行率和致病机制仍不得而知,但涉及这些方面的科研工作仍需持续跟进,以获得有关奥密克戎变异株的每一个细节,从而提出有效的方法来防止即将到来的病例数量激增。奥密克戎变异株的出现实际上增强了全球对疫苗接种重要性的认知。因为病毒会在非疫苗接种人群中自由传播,会直接导致新冠肺炎重症及死亡病例数攀升;其次,病毒的基因变异会迅速积累起来,从而提升病毒的传染性和传播速度,甚至在全球引发新毒株的致命浪潮。

目前关于奥密克戎变异株的研究正在继续。以往关于阿尔法和德尔塔变异株的研究经验使我们相信,只有长时间的严密监测才能为我们提供更多关于这种新变种的信息,例如它引起疾病的传播特点、疫苗效力和严重性等。我们已经可以肯定,科学的防疫措施和疫苗接种仍将是遏制新毒株传播和防止出现新冠肺炎重症和死亡病例的关键因素。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Classification of Omicron (B. 1.1.529): SARS-CoV-2 variant of concern [R]. Geneva; WHO, 2021.
- [2] World Health Organization. Enhancing readiness for Omicron (B. 1.1.529): technical brief and priority actions for memberstates [R]. Geneva; WHO, 2021.
- [3] Qu XX, Hao P, Song XJ, et al. Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy [J]. J Biol Chem, 2005, 280(33): 29588-29595.
- [4] Tian D, Sun Y, Zhou J, et al. The global epidemic of the SARS-CoV-2 Delta variant, key spike mutations and immune escape [J]. Front Immunol, 2021, 12: 751778.
- [5] Global Initiative of Sharing All Influenza Data. 3D structure of spike with amino acid changes [R]. Germany: GISAID, 2021.
- [6] Zwelini M. Latest confirmed cases of COVID-19 in south Africa [EB/OL]. [2021-12-4]. <https://www.nicd.ac.za/latest-confirmed-cases-of-covid-19-in-south-africa/>.
- [7] European Centre for Disease Prevention and Control. Weekly epidemiological update: Omicron variant of concern (VOC-week 2 (data as of 20 January 2022) EU/EEA [R]. Sweden: ECDC, 2022.
- [8] Tian D, Sun Y, Xu H, et al. The emergence and epidemic characteristics of the highlymutated SARS-CoV-2 Omicron variant [J]. J Med Virol, 2022, 94(6): 2376-2383.
- [9] Callaway E. Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert [J]. Nature, 2021, 600(7887): 21.
- [10] Kumar S, Thambiraja TS, Karuppanan K, et al. Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of spike protein [J]. J Med Virol, 2021, 94(4): 1641-1649.
- [11] Centers for disease control and prevention. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) [R]. America: CDC, 2021.
- [12] Epidemiological update: Omicron variant of concern (VOC)-data as of 4 December 2021 [R]. Sweden: ECDC, 2021.
- [13] Xiao X, Chakraborti S, Dimitrov AS, et al. The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(4): 1159-1164.
- [14] Dimitrov DS. The secret life of ACE2 as a receptor for the SARS virus [J]. Cell, 2003, 115(6): 652-653.
- [15] Wang R, Chen J, Hozumi Y, et al. Emerging vaccine-breakthrough SARS-CoV-2 variants [J]. ACS Infect Dis, 2022, 8(3): 546-556.
- [16] Li A, Maier A, Carter M, et al. Omicron and S-Gene target failure cases in the highest COVID-19 case rate region in Canada - December 2021 [J]. J Med Virol, 2021, 94(5): 1784-1786.
- [17] Lan L, Xu D, Ye G, et al. Positive RT-PCR test results in patients recovered from COVID-19 [J]. JAMA, 2020, 323(15): 1502-1503.
- [18] Miguieres M, Lhomme S, Tremieux P, et al. Evaluation of two RT-PCR screening assays for identifying SARS-CoV-2 variants [J]. J Clin Virol, 2021, 143: 104969.
- [19] Majumdar S, Sarkar R. Mutational and phylogenetic analyses of the two lineages of the Omicron variant [J]. J Med Virol, 2021, 94(5): 1777-1779.
- [20] Ito K, Piantham C, Nishiura H. Relative instantaneous reproduction number of Omicron SARS-CoV-2 variant with respect to the Delta variant in Denmark [J]. J Med Virol, 2021, 94(5): 2265-2268.
- [21] Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2021, 3(3): CD013705.
- [22] Callaway E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide [J]. Nature, 2020, 580(7805): 576-577.
- [23] Dai L, Gao GF. Viral targets for vaccines against COVID-19 [J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(2): 73-82.
- [24] Chen J, Wang R, Gilby NB, et al. Omicron (B. 1.1.529): Infectivity, vaccine breakthrough, and antibody resistance [J]. J Chem Inf Model, 2022, 62(2): 412-422.
- [25] Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, et al. Waning immunity after the BNT162b2 vaccine in israel [J]. N Engl J Med, 2021, 385(24): e85.
- [26] Kherabi Y, Fiolet T, Rozenecwajg S, et al. COVID-19 vaccine boosters: What do we know so far? [J]. Anaesth Crit Care Pain Med, 2021, 40(6): 100959.
- [27] Gong SY, Chatterjee D, Richard J, et al. Contribution of single mutations to selected SARS-CoV-2 emerging variants spike

- antigenicity [J]. *Virology*, 2021, 563: 134–145.
- [28] 季媛媛. 国产奥密克戎变异株疫苗接连获批临床力筑“免疫屏障”遏阻隐匿传播 [N]. 21 世纪经济报道, 2022-04-27 (12).
- [29] 詹媛. 奥密克戎新冠病毒灭活疫苗临床研究加速 [N]. 光明日报, 2022-05-21 (3).
- [30] Garcia-Beltran WF, Lam EC, St Denis K, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity [J]. *Cell*, 2021, 184(9): 2372–2383.
- [31] Zhang L, Li Q, Liang Z, et al. The significant immune escape of pseudotyped SARS-CoV-2 variant Omicron [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11(1): 1–5.
- [32] Carreño JM, Alshammery H, Tcheou J, et al. Activity of convalescent and vaccine serum against SARS-CoV-2 Omicron [J]. *Nature*, 2021, 602(7898): 682–688.
- [33] Kupferschmidt K, Vogel G. How bad is Omicron? Some clues are emerging [J]. *Science*, 2021, 374(6573): 1304–1305.
- [34] Marina K, Martin M. How comparable is COVID-19 mortality across countries? [J]. *Eurohealth*, 2020, 26(2): 45–50.
- [35] van Paassen J, Vos JS, Hoekstra EM, et al. Corticosteroid use in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis on clinical outcomes [J]. *Crit Care*, 2020, 24(1): 696.
- [36] Tleyjeh IM, Kashour Z, Damla M, et al. Efficacy and safety of tocilizumab in COVID-19 patients: a living systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2021, 27(2): 215–227.
- [37] Kalil AC, Patterson TF, Mehta AK, et al. Baricitinib plus remdesivir for hospitalized adults with Covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(9): 795–807.
- [38] Schmidt F, Weisblum Y, Rutkowska M, et al. High genetic barrier to SARS-CoV-2 polyclonal neutralizing antibody escape [J]. *Nature*, 2021, 600(7889): 512–516.
- [39] Barnes CO, Jette CA, Abernathy ME, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies [J]. *Nature*, 2020, 588(7839): 682–687.
- [40] An EUA for casirivimab and imdevimab for COVID-19 [J]. *Med Lett Drugs Ther*, 2020, 62(1614): 201–202.
- [41] Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, et al. Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2021, 325(7): 632–644.
- [42] Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(541): eabb5883.
- [43] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271–280.

〔收稿日期〕2022-01-11

葛沐子,伍一军. 伊维菌素用于新型冠状病毒肺炎防治的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 128-136.
Ge MZ, Wu YJ. Can ivermectin be used in the prevention and treatment of COVID-19? — A review study [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 128-136.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.020

伊维菌素用于新型冠状病毒肺炎防治的研究

葛沐子,伍一军*

(中国科学院动物研究所分子毒理学实验室,北京 100101)

【摘要】 新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 是由新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 感染引发的高传染性和高感染率的疾病,导致全球数百万人死亡。除了利用疫苗进行预防外,研发能够治疗或缓解新型冠状病毒肺炎的有效药物极为迫切。但病毒的高突变率导致目前研发的疫苗和药物有效性降低甚至完全无效。大环内酯类化合物伊维菌素 (ivermectin) 是一种常用的抗寄生虫药物,但它具有包括抗炎、抗病毒、抗肿瘤在内的多种药理作用。近期研究表明,伊维菌素有抑制 SARS-CoV-2 感染及缓解症状的作用。本文基于对伊维菌素和 SARS-CoV-2 互作的生物信息学分析、实验室细胞模型验证和动物实验研究结果以及流行病学数据研读,分析伊维菌素用于抗 SARS-CoV-2 感染的可行性与改进策略,认为有必要深入开展相关动物实验研究和临床应用疗效评价,并考虑采用联合用药策略提高其防治效果。

【关键词】 伊维菌素;新型冠状病毒;新型冠状病毒肺炎;联合用药;预防;治疗
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0128-09

Can ivermectin be used in the prevention and treatment of COVID-19? — A review study

GE Muzi, WU Yijun*

(Laboratory of Molecular Toxicology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

【Abstract】 Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an extremely infectious disease with a high infection rate that is caused by infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). This disease, which can cause severe respiratory symptoms and lung damage, has killed millions of people worldwide since the COVID-19 pandemic began. In addition to the necessity for vaccine prevention to control this pandemic, there is also an extremely urgent need to develop drugs that can effectively inhibit SARS-CoV-2 infection or treat symptomatic COVID-19. However, the high mutation rate of the SARS-CoV-2 virus has led to frequent failures of the vaccines and drugs that have been developed to date. Ivermectin, a macrolide compound, is a commonly used anti-parasitic drug, and it also has a variety of pharmacological effects, including anti-inflammatory, anti-viral, and anti-tumor effects. Recent studies have shown that ivermectin may inhibit SARS-CoV-2 infection or relieve COVID-19 symptoms. The feasibility of an improved strategy of ivermectin use against SARS-CoV-2 infection, based on a bioinformatics analysis of the interaction between ivermectin and SARS-CoV-2 receptors, cell model validation, animal infection model studies, and epidemiological data, is discussed in this review article. The existing research data are insufficient, so it remains necessary to perform a clinical efficacy evaluation for determining whether ivermectin can be used clinically for the treatment of COVID-19 caused by SARS-CoV-2

[作者简介] 葛沐子 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子毒理学。E-mail: gmz8k8k@126.com
[通信作者] 伍一军 (1963—), 男, 博士, 博士生导师, 教授, 研究方向: 分子毒理学。E-mail: wuyj@ioz.ac.cn

infection. In addition, a strategy of drug combination could be adopted to improve the effect of ivermectin on the inhibition of SARS-CoV-2 and the treatment of COVID-19.

【Keywords】 ivermectin; SARS-CoV-2; COVID-19; drug combination; prevention; therapy

新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) (以下简称“新冠肺炎”), 是由新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染引发的高传染性疾病。其感染的初始症状主要包括发烧、咳嗽、肌痛、疲劳, 疾病后期出现呼吸困难, 严重的会发展为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 或多脏器衰竭 (multiple organ failure, MOF)^[1]。研究发现, SARS-CoV-2 感染可加重已有的基础性疾病 (如心血管疾病、糖尿病), 并导致更严重的靶器官损伤^[2]。在病理方面, 新冠肺炎患者的尸检和活检报告显示肺部表现为严重水肿, 并伴有组织渗出液, 局灶性反应性增生, 肺细胞和肺泡巨噬细胞受损以及片状细胞浸润^[3]。由于新冠肺炎的高传染性, 需要采取有效措施抑制其传播。

目前应对新冠肺炎主要是依靠疫苗预防以及药物治疗。在预防方面, 由于疫苗研发周期较长且作用滞后, 以及新毒株的不断出现, 疫苗的有效性难以保证。在治疗方面, 暂无确证有效的药物被研发出用于新冠肺炎的治疗。此外, 疫苗研发由于病毒株的突变导致疫苗实际效用呈现降低趋势^[4], 这些使得全球疫情控制遭遇困难, 迫切需要新的药物防治策略。

1 新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的药物治疗现状

1.1 新冠肺炎的防治策略

针对新冠肺炎的防治措施主要有以下几个方面: 预防其病原 SARS-CoV-2 的感染; 阻断 SARS-CoV-2 在患者体内的增殖; 对因 SARS-CoV-2 感染导致的组织器官损伤给予对症治疗。在预防病毒感染方面, 开展了 SARS-CoV-2 的基础生物学的研究, 已知该病毒属于单链正向 RNA 病毒, 其基因组序列与其他冠状病毒种类相似, 与重症急性呼吸综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) 约有 80% 的相似性, 与中东呼吸综合征冠状病毒 (middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 有 50% 左右的相似性^[5]。由于 RNA 病毒具有易突变的特性, SARS-CoV-2 目前已出现大量的变异株。由于 SARS-CoV-2 的刺突蛋白中的 D614 G 位点突变、ORF7a 基因的

缺失、nsp1 基因缺失等突变, 导致现在的流行病毒株从基因组水平到蛋白质结构都已发生了改变^[6-7]。

在阻断 SARS-CoV-2 体内增殖方面, 早期开发的抗体药物在新冠肺炎发展初期使用可以降低重症率和死亡率, 例如: 中和抗体 LY-CoV555 对降低新冠肺炎的死亡率有一定效果^[8], 但后期病毒基因组变异, 德尔塔株 (delta strain) 流行 (目前又出现 omicron 变种), 抗体药物治疗新冠肺炎的有效率显著下降。实际上, 抗体疗法同疫苗一样, 亦受限于病毒变异性的影响。

当因感染 SARS-CoV-2 导致组织器官出现损伤时, 临床上常根据损伤器官的特点给予对症治疗, 例如: 用糖皮质激素治疗肺部乃至全身的炎症^[9]、用已获治愈新冠肺炎患者康复期血浆治疗 SARS-CoV-2 感染的重症患者^[10]、用体外膜肺氧合技术 (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) 救治急性呼吸衰竭患者^[11]等。但这些措施的效果并不十分确切, 甚至会让患者留下严重的后遗症 (例如, 大剂量激素治疗引起骨质疏松症、库欣综合征等)^[12], 临床上迫切需要更为有效的化疗药物, 以便在病毒造成严重损伤之前将其从体内清除或使其失活。

采用相对广谱的抗病毒药物是应对新冠肺炎传染的重要策略之一^[13-14]。新冠肺炎治疗的化学药物的研发目前主要有两种途径: 一是从头研发新药, 但新药研发周期长, 能否应对不断突变的流行毒株存疑。另外, 新药研发难度大, 失败风险高。有报道美国默沙东公司研发的药物莫努匹拉韦 (molnupiravir) 可使新冠肺炎患者住院/死亡率降低 50%^[15], 但其代谢物 β -d-N4-羟基胞苷 (β -d-N4-hydroxycytidine) 可被宿主细胞通过核糖核苷酸还原酶代谢为 2'-脱氧核糖核苷形式进而掺入宿主细胞的 DNA^[16], 其安全性存在很大隐患, 且售价高昂。此外, 先后有包括瑞德西韦 (remdesivir) 和利巴韦林 (ribavirin) 在内的多种药物已经完成测试或尚在测试中^[17-18]。这些化疗药物在理论上可以通过不同机制来抑制病毒的感染和增殖, 但遗憾的是, 到目前为止, 所得到的实验结果都不太理想 (对大多数患者无效或者存在严重的副作用等)^[17-18]。除了研

发新药外,“老药新用”的概念也同样适用于新冠肺炎的治疗药物的开发。一种曾经被美国 FDA 批准用于抗寄生虫病的“老药”伊维菌素(ivermectin)从一开始就受到(不同寻常的)关注,有研究者报道了伊维菌素对抗 SARS-CoV-2 的相关实验效果^[19-21],体外药物实验显示伊维菌素对新流行的奥密克戎变异株也有较好的抑制作用^[22]。这些研究给出的结果虽然是比较初步的研究数据,但提示伊维菌素有可能用于新冠肺炎的防治。

2 伊维菌素药物的特点及其用于新冠肺炎防治的可行性

2.1 伊维菌素简介

伊维菌素是一种十六元大环内脂化合物,它是阿维菌素(avermectin)家族的一员。阿维菌素来源于土壤中的放线菌 *Streptomyces avermitilis* 的发酵产物,并非单一化合物,目前在医学及动物医学临床上应用的阿维菌素类药物有 8 种,分别是伊维菌素(ivermectin)、阿维菌素(abamectin)、多拉菌素(doramectin)、依普菌素(eprinomectin)、莫西菌素(moxidectin)和司拉菌素(selamectin)。这 8 种药物通常是含不同比例的 4 种主要成份(A1a、A2a、B1a 和 B2a)和 4 种次要成分(A1b、A2b、B1b 和 B2b)的混合物^[23],其中伊维菌素是 22,23-二氢阿维菌素 B1a 和 B1b 的混合物,已经被美国 FDA 批准用于抗寄生虫病的治疗。除了作为驱虫剂和杀虫剂,伊维菌素也被认为具有抗病毒和抗疟等多种药理作用^[24-26]。伊维菌素的作用谱广、效用高且较为安全,自 1987 年以来,该药物在动物疾病与人类疾病的治疗中一直被广泛应用^[27]。

2.2 伊维菌素作为药物的作用特点

伊维菌素的抗寄生虫作用机制研究最为透彻,它能够与谷氨酸门控氯离子通道特异性结合,使氯离子大量流入细胞,细胞处于持续超极化状态,导致动作电位形成减少,从而导致进一步功能阻断。最终表现为全身运动麻痹,进食也会受到影响,从而使寄生虫死亡^[28]。由于谷氨酸门控氯离子通道只存在于无脊椎动物中,而脊椎动物体内无此作用靶点,所以对哺乳动物的毒性较小^[23]。

除了抗寄生虫作用以外,伊维菌素还被证明具有治疗癌症的潜在用途^[29]。其通过诱导癌细胞程序性死亡(主要是凋亡),在处理 HeLa 细胞后,直接能检测到细胞色素 c 从线粒体的释放^[30],凋亡相关的形态变化也伴随发生,包括染色质凝聚、核断裂、

DNA 断裂和凋亡小体形成等。而凋亡的诱发能够使得受病毒感染的细胞死亡,破坏病毒复制周期^[31]。前期 FDA 批准的 12 种抗新冠药物中,就有多种可作用于调节程序性细胞死亡的过程^[32]。这暗示着伊维菌素或具备抗 SARS-CoV-2 感染的潜力。FDA 批准伊维菌素作为抗寄生虫化疗药使用时,成人的使用剂量为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$,有报道伊维菌素的最高使用剂量达 1700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[33],半衰期约 18 h。这些数据表明,伊维菌素对人体的毒性低,使用安全。

3 伊维菌素应用于新冠肺炎防治的实验研究

3.1 伊维菌素抗 SARS-CoV-2 感染的研究

已知伊维菌素具有广谱抗病毒活性^[19],可通过抑制靶向宿主核转运蛋白(importin α/β 1 protein, IMP α/β 1)的功能抑制病毒的胞内复制^[34]。病毒通过其表面的刺突蛋白(spike protein)与宿主细胞膜上的血管紧张素转化酶 2 号(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)受体蛋白结合进入细胞后,可利用胞内“非结构蛋白 5 号(non-structural protein 5, NS5)”抑制宿主的抗病毒反应以增强自身感染能力。理论上,如果可以抑制或者阻断 NS5 入核,就可以有效地减少病毒增殖^[35]。IMP α/β 1 核转运蛋白是核转运过程的关键蛋白。伊维菌素可以解离预先形成的 IMP α/β 1 异二聚体,并通过与 IMP α 重复序列结合来影响 IMP α 的热稳定性和 α -螺旋度,导致 IMP α 蛋白无法形成^[34]。由于缺少核转运蛋白 IMP α/β 1,整合酶和 NS5 等无法入核,缺少相应的组件,RNA 病毒就无法在胞内进行有效增殖,进而可被宿主的抗病毒反应清除,具体详见图 1。

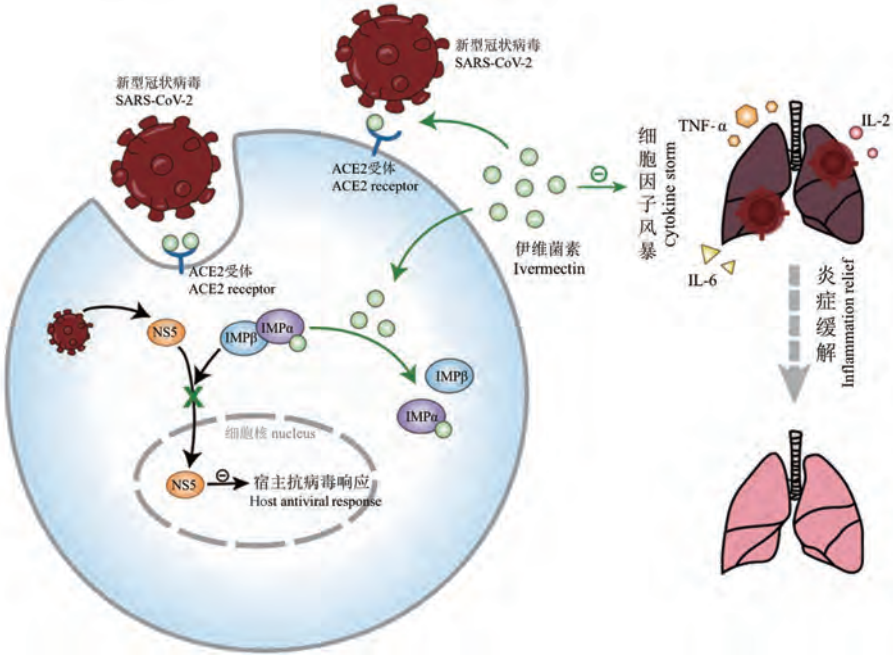
除了直接抑制病毒的有效增殖外,伊维菌素还可能通过间接作用产生广谱抗病毒活性。已知伊维菌素是细胞内核法尼酯 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)的配体,与后者特异性结合,以依赖于 FXR 的方式改变细胞对胰岛素的敏感性,导致血清中的胆固醇和葡萄糖水平降低^[36],而后者作为重要的细胞能量供给组成,其含量降低可影响病毒增殖效率。最近的相关研究揭示,SARS-CoV-2 在复制过程中如果抑制细胞糖酵解途径的限速酶,复制可被完全阻断,而抑制 ATP 合成却达不到相同的效果,说明该病毒在宿主细胞内复制过程中主要利用糖酵解途径供给能量^[37],提示伊维菌素有可能通过

抑制细胞葡萄糖水平从而间接抑制 SARS-CoV-2 的增殖。

生物信息学分析也证明伊维菌素很可能有抑制 SARS-CoV-2 的作用。利用生物信息技术对 SARS-CoV-2 重要药物靶点受体结合区 (receptor binding domain, RBD) 和伊维菌素结构的结合能力的预测分析发现, 伊维菌素可停靠在细胞膜上 ACE2 蛋白的第 91 位亮氨酸和第 378 位组氨酸区域。伊维菌素与 SARS-CoV-2 的刺突蛋白和细胞膜的 ACE2 蛋白复合物 (spike-ACE2 complex) 的结合能值为 -18 kcal/mol , 结合常数为 5.8×10^{-8} ^[38]。已知 ACE2 是可以与 SARS-CoV-2 结合的主要靶点, 所以伊维菌素很可能干扰 SARS-CoV-2 刺突蛋白与细胞膜的附着, 阻止病毒感染 (参见图 1)。另一项研究用伊维菌素 (20 $\mu\text{mol/L}$) 处理人卵巢癌细胞株后通过蛋白质组学分析发现, 有 52 个与 SARS-CoV-2 相关的蛋白表达水平受到调控^[21], 提示伊维菌素可通过扰动病毒的响应而抑制病毒感染。但这只是

从组学层面的分析, 实际对 SARS-CoV-2 的作用效果还需要进一步实验验证。

通过对伊维菌素抗 SARS-CoV-2 的体外抑制实验发现, 伊维菌素确实具有抗 SARS-CoV-2 的效果。例如: 利用表达细胞表面信号淋巴细胞激活分子 (signaling lymphocytic activation molecule, SLAM) 的猴肾细胞进行的体外抗病毒测试的结果显示, 单剂量伊维菌素能够使 SARS-CoV-2 (澳大利亚分离株) 在 Vero/hSLAM 细胞中的复制总量降低 5000 倍^[20]。然而, 这一研究结果的临床应用存在疑问。经测试, 伊维菌素对 SARS-CoV-2 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 比该药物的最大血浆浓度 (C_{max}) 高 35 倍, 若要在 SARS-CoV-2 的主要侵染器官肺部达到 IC_{50} 所需的药物浓度, 则必须将伊维菌素的使用剂量提高到目前推荐使用剂量的 25 倍以上^[39], 这很可能会出现严重的副作用甚至导致机体的损伤。此外, 该研究测试所用细胞系为肾细胞, 并不是 SARS-CoV-2 侵染的主要靶细胞。到目前为止, 尚未见有关伊维



注:伊维菌素与细胞表面 ACE2 受体结合抑制 SARS-CoV-2 病毒进入细胞,并通过抑制靶向宿主核转运输入蛋白 IMP α/β 抑制病毒 NS5 蛋白入核,阻止其发挥抑制宿主抗病毒响应的功能;此外,伊维菌素可通过抑制细胞因子风暴缓解炎症反应。

图 1 伊维菌素抗新冠肺炎的可能机制

Note. Ivermectin binds to the receptor ACE2 on the cell surface to inhibit SARS-CoV-2 entry into the cell, and blocks the translocation of viral NS5 protein to nucleus by inhibiting host IMP α/β heterodimer which is responsible for protein nuclear import to prevent the inhibitory action of the virus on the host antiviral response. In addition, ivermectin alleviates the inflammatory response by inhibiting the so-called cytokine storm induced by the virus.

Figure 1 Mechanisms of action of ivermectin against COVID-19

菌素抗 SARS-CoV-2 的效果在肺细胞系中的测试报道^[20]。

3.2 伊维菌素可能具有防治新冠肺炎的作用

有报道伊维菌素可以有效降低轻症和重症新冠肺炎患者的死亡率^[40-41]。相较于安慰剂组和药物联用组(解热药和抗组胺药及抗生素联合使用),伊维菌素组的患者鼻拭子转阴时间较短,中位数为 4 d,而药物联用组中位数为 7 d;且伊维菌素组的患者死亡率同样显著低于药物联用组,在随机回访出院 20 d 的病人中未发现明显并发症患者^[41]。提示伊维菌素对新冠肺炎的治疗具有一定的效果。

已有研究表明,伊维菌素很可能对 SARS-CoV-2 感染有预防作用。研究者从使用包括伊维菌素在内的药物进行常规预防性化疗(prophylactic chemotherapy, PCT)的国家收集数据,并将这些国家分为 3 个类别:不使用任何 PCT 的国家;使用不含伊维菌素 PCT 的国家;以及使用含伊维菌素 PCT 的国家,比较新冠肺炎在不同组别之间的发病率。结果表明,伊维菌素使用组新冠肺炎的发病率明显低于其他两组,提示伊维菌素很可能有预防 SARS-CoV-2 感染的作用^[42]。此外,在这个研究中有一个很有趣的现象,使用含伊维菌素 PCT 的国家总人口百分比范围广泛(30%~90%),但这些国家新冠肺炎发病率却没有明显差异,即使是较低治疗覆盖率的国家,新冠肺炎的发病率也没有显著上升,且任何一国给药时间范围或间隔不同也没有导致明显差别。即便是在不同剂量(150~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的接受者中,新冠肺炎的发病率也未见显著差异^[40]。这说明伊维菌素很有可能在较低的血药浓度下就能发挥作用,这个浓度远低于其他研究认为的对患者具有较大副作用的药物浓度。如果这项实验的结论正确,将给伊维菌素应用于新冠肺炎的预防提供非常好的思路,但是这个推测缺乏有力的实验证据和具体机制分析。如果后续的研究能够证明较低的伊维菌素血药浓度就能抑制 SARS-CoV-2 的复制水平,将进一步证实这种假设。

3.3 伊维菌素可在新冠肺炎治疗中发挥其抗炎作用

新冠肺炎的发展分为 3 个阶段:首先是早期 SARS-CoV-2 感染阶段,而后是病毒增殖导致肺部局部炎症阶段,少数患者会过渡到最后的全身性炎症阶段,其中最后阶段病症最为严重,会引起肺外全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response

syndrome, SIRS),在这一阶段,肺组织产生大量的炎症因子,如:IL-1、IL-6、IL-12、IFN- γ 和 TNF- α 等。这些炎症因子在病情较重的患者中显著升高,并导致全身组织器官损伤^[43]。在此过程中,SARS-CoV-2 表面的刺突蛋白可以通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进炎症发生和细胞凋亡^[44]。

研究表明,伊维菌素具有抗炎作用,在体内和体外均可以减少 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 的产生^[21],并抑制脂多糖诱导的 NF- κB ^[45],减轻炎症反应(参见图 1)。在小鼠实验中,剂量为 2 mg/kg 的伊维菌素可抑制气道中的粘液分泌过多的症状,并减少免疫细胞的募集以及支气管肺泡中细胞因子和 IgE/IgG1 的产生^[39]。这表明伊维菌素不仅在整体水平上具有抗炎作用,而且在 SARS-CoV-2 的主要感染器官肺部组织也具有抗炎作用。相关作用机理的研究显示,伊维菌素在胶质瘤细胞中可作为 AMPK 激活剂抑制 AKT/mTOR 通路^[46]。mTOR 通路调控先天性免疫反应,在炎症因子的产生中起至关重要的作用^[47]。伊维菌素很可能通过该机制下调炎症因子的表达,减少 SIR 损伤。这一推测也得到实验证实:对特异性皮炎模型小鼠给予伊维菌素可以降低 T 细胞激活、增殖和细胞因子的产生^[48]。

在由 SARS-CoV-2 感染诱导产生的诸多炎症因子中,只有 TNF- α 和 IFN- γ 的组合能诱导炎症细胞自噬,而采用二者的特异性中和抗体治疗可减少感染小鼠的淋巴组织增生和细胞因子休克。伊维菌素可以有效下调 TNF- α 因子生成,减少炎症细胞自噬,而在治疗寄生虫感染时,伊维菌素可以诱导体内 IFN- γ 水平上调^[49]。TNF- α 和 IFN- γ 需要以组合形式起作用的特性使得伊维菌素很容易呈现抑制炎症的效果。

4 伊维菌素用于新冠肺炎防治存在的问题及应对措施

4.1 目前研究的局限

关于伊维菌素在新冠肺炎的防治方面已有一些研究报道,但仍然有很多问题未得到答案。首先是伊维菌素用于新冠肺炎治疗的临床实验调查存在不足,例如:病例样本量小,一个实验组只纳入 3~4 个患者;设计对照不完善,未将老年患者和青年患者区别统计。另外,由于临床上大部分患者都会同时接受多种药物治疗,或者同时存在其他的辅助治疗方式,所以即使伊维菌素单变量组显现出一定的优势,也很难排除是由于伊维菌素与其他药物治疗

方式相互作用或共同作用导致的结果。同时,相关报道都是回溯性研究,研究者通过医院提供的数据进行分析,而对具体操作的实际情况可能不够了解,这也降低了分析结果的可信度。

其次是药物使用剂量方面的问题。有报道证明伊维菌素在体外对 SARS-CoV-2 有抑制效果,所用浓度为 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ ^[20],如果要在人体中达到这一浓度,则需要口服约 1000~1200 mg 伊维菌素,而在人体(健康志愿者)中测试的剂量(单次剂量)仅为 100~120 mg^[50]。大剂量给予伊维菌素会导致不良反应,甚至可能引发严重副作用,如:共济失调或癫痫发作等^[50]。虽然有研究表明伊维菌素在低剂量下也可能具有较高药理活性^[42],但还缺少进一步的实验数据的支持。然而,一项对 280 名新冠肺炎患者的回顾性研究给出了伊维菌素临床用量的参考,调查发现,接受伊维菌素治疗的患者总体死亡率明显低于对照组^[51],所用剂量($200\text{ }\mu\text{g/kg}$)为该药被推荐用于寄生虫病治疗的安全剂量。但这项调查中患者也同时接受其他药物治疗,所以伊维菌素应用于新冠肺炎治疗的剂量仍有待进一步研究,就现有数据来看,更高的剂量并不增加安全风险但可能有助于改善伊维菌素的防治效果^[52-54]。

目前的研究进展已可以通过改进给药途径来提高有效血药浓度。由于呼吸道是 SARS-CoV-2 感染的主要部位,可以通过改进肺部给药途径,使伊维菌素药物在呼吸道和肺部沉降^[55]。但这种想法的应用很大程度上受药代动力学参数限制,如:高细胞毒性和低溶解性等。针对这些问题,可以采用新的给药策略来提高伊维菌素的生物利用度,如:采用脂质体系统并用纳米材料作载体递送伊维菌素,可有效降低过高血药浓度造成的细胞毒性^[19]。已有研究将伊维菌素制成脂质体和聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)纳米粒子,后者在通过口服途径给药时可以穿过肠上皮屏障^[56]。这种策略原本是针对寨卡病毒设计的,但在对新冠肺炎治疗中同样具有应用价值^[57]。伊维菌素有广谱抗病毒的药理活性,这在其他冠状病毒感染的动物实验中已有研究报道^[58],预期在阻止 SARS-CoV-2 感染方面也有较好效果,甚至有可能对 SARS-CoV-2 的变种都有效。

在实验动物研究方面,主要是在金仓鼠(Syrian hamster)上做的研究,发现伊维菌素虽然不能减少感染鼠的肺部病毒载量,但可降低肺部炎症反应,

减轻肺部病理损伤及缓解相关症状^[59]。另一个也是在金仓鼠上的实验显示,伊维菌素不能减少 SARS-CoV-2 的 beta 变异株(B. 1. 351)在感染鼠的肺部病毒载量也不能减轻肺部病理损伤^[60]。需要注意的是实验中伊维菌素给药方式为 0.4 mg/kg 皮下注射而不是灌胃。目前可能由于 SARS-CoV-2 的高危特性及研究条件的限制(例如:需要 P3 实验室^[61]等),还未见有在常规实验动物(例如:小鼠、豚鼠等)上开展的伊维菌素抗 SARS-CoV-2 的实验研究报告。为了避开 SARS-CoV-2 的操作条件限制,有研究者尝试以小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)^[62]及蝙蝠冠状病毒(bat coronavirus RaTG13)^[63]等作为抗新冠肺炎研究的替代模型,但这并未得到大多数学者认可。期待 SARS-CoV-2 的动物实验以更合适的方式进行,以便获得的研究数据更可靠且更具有临床应用价值。

4.2 联合用药或可更有效应对新冠肺炎

SARS-CoV-2 的高突变性使其容易产生对所用药物的抵抗。近年来,越来越多的研究表明,联合用药的策略有利于延缓机体对药物耐受性的发生^[64]。所以,伊维菌素与其他具有抗冠状病毒作用的药物,如:氯喹(chloroquine)或羟氯喹(hydroxychloroquine)联用,可望在获得更好治疗效果的同时能够抑制耐药毒株的产生。已知羟氯喹是一种抗疟疾药,是氯喹的类似物,也是一种免疫调节剂。有报道称羟氯喹和氯喹均能在体外抑制 SARS-CoV-2^[65],研究发现,羟氯喹比氯喹更加有效,且急性毒性更低^[66]。事实上,羟氯喹可通过抑制病毒进入宿主细胞而起到一级屏障作用,而伊维菌素可以减少细胞内的病毒复制,有可能因此加强羟氯喹的抗病毒作用^[67]。羟氯喹的生产成本低廉且药物安全性高;伊维菌素同样安全性高、耐受性良好且没有严重的药物不良反应^[68]。二者对 SARS-CoV-2 突变株都可能起到良好的抑制作用。此外,到目前为止,尚未发现这两种药物存在药物间相互作用使药效降低的现象^[50]。综上,伊维菌素与羟氯喹/氯喹联合用于抗 SARS-CoV-2 感染很可能会有良好效果,但其可行性需要进一步验证。

除氯喹外,多西环素(doxycycline)也可与伊维菌素联用发挥更好的作用。前已述及伊维菌素的体外实验有效剂量为体内最大允许使用浓度的 35 倍,但如果将伊维菌素与多西环素联用,则可以在二者较低的剂量(浓度)下使轻中症患者较快康复^[69]。

5 总结与展望

本文从新冠肺炎的发生与发展特征出发,综述了伊维菌素抗 SARS-CoV-2 感染和用于新冠肺炎防治的实验研究进展,并对将伊维菌素应用于新冠肺炎防治的可能性、相关实验研究的局限性及联合用药的预期效果进行了分析和讨论。

到目前为止,新冠肺炎尚未得到有效遏制。尽管已经有大量的实验和临床研究开展,但由于病原 SARS-CoV-2 的高突变率导致变异株不断出现,疫苗防效降低,新疫苗的开发及新药的研发遇到困难。而在应对真菌和细菌感染时采用的“老药新用”和“多药联用”策略也使得我们更多关注对已有药物的筛选。伊维菌素由于其安全性、有效性、作用机制多样性、价格相对低廉等特性成为很好的抗新冠肺炎的候选药物,如何进一步开展伊维菌素抗 SARS-CoV-2 的动物实验和临床药效试验以及研究如何让伊维菌素与其他药物合理联用以产生更好的防治新冠肺炎的效果是摆在相关研究者面前亟待解决的问题。在应用动物实验时,或应考虑采用非人灵长类实验动物^[70]代替小鼠进行进一步的药物研究,以促进实验药物更加快速地进入临床,减少直接对病人联合用药造成的潜在不良影响。

参考文献:

[1] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.

[2] Ma Y, Lu D, Bao L, et al. SARS-CoV-2 infection aggravates chronic comorbidities of cardiovascular diseases and diabetes in mice [J]. *Animal Model Exp Med*, 2021, 4(1): 2-15.

[3] Soleimanpour S, Yaghoubi A. COVID-19 vaccine: where are we now and where should we go? [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2021, 20(1): 23-44.

[4] Jia Z, Gong W. Will mutations in the spike protein of SARS-CoV-2 lead to the failure of COVID-19 vaccines? [J]. *J Korean Med Sci*, 2021, 36(18): e124.

[5] Rahimi A, Mirzazadeh A, Tavakolpour S. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: a review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection [J]. *Genomics*, 2021, 113(1): 1221-1232.

[6] Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus [J]. *Cell*, 2020, 182(4): 812-827.

[7] Benedetti F, Snyder GA, Giovanetti M, et al. Emerging of a SARS-CoV-2 viral strain with a deletion in nsp1 [J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 329.

[8] Chen P, Nirula A, Heller B, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody LY-CoV555 in outpatients with COVID-19 [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(3): 229-237.

[9] Almeida MQ, Mendonca BB. Adrenal insufficiency and glucocorticoid use during the COVID-19 pandemic [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2020, 75: e2022.

[10] Rajendran K, Krishnasamy N, Rangarajan J, et al. Convalescent plasma transfusion for the treatment of COVID-19: systematic review [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(9): 1475-1483.

[11] Kowalewski M, Fina D, Słomka A, et al. COVID-19 and ECMO: the interplay between coagulation and inflammation-a narrative review [J]. *Crit Care*, 2020, 24(1): 205.

[12] Guarnotta V, Ferrigno R, Martino M, et al. Glucocorticoid excess and COVID-19 disease [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2020, 22(4): 703-714.

[13] Kaptein SJF, Jacobs S, Langendries L, et al. Favipiravir at high doses has potent antiviral activity in SARS-CoV-2-infected hamsters, whereas hydroxychloroquine lacks activity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(43): 26955-26965.

[14] Hussien MA, Abdelaziz AEM. Molecular docking suggests repurposing of brincidofovir as a potential drug targeting SARS-CoV-2 ACE2 receptor and main protease [J]. *Netw Model Anal Health Inform Bioinforma*, 2020, 9(1): 56.

[15] Gordon CJ, Tchesnokov EP, Schinazi RF, et al. Molnupiravir promotes SARS-CoV-2 mutagenesis via the RNA template [J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(1): 100770.

[16] Zhou S, Hill CS, Sarkar S, et al. β -d-N4-hydroxycytidine inhibits SARS-CoV-2 through lethal mutagenesis but is also mutagenic to mammalian cells [J]. *J Infect Dis*, 2021, 224(3): 415-419.

[17] Agostini ML, Andres EL, Sims AC, et al. Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exonuclease [J]. *mBio*, 2018, 9(2): e00221-e00318.

[18] Omrani AS, Saad MM, Baig K, et al. Ribavirin and interferon alfa-2a for severe Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(11): 1090-1095.

[19] Croci R, Bottaro E, Chan KW, et al. Liposomal systems as nanocarriers for the antiviral agent ivermectin [J]. *Int J Biomater*, 2016, 2016: 8043983.

[20] Caly L, Druce JD, Catton MG, et al. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 *in vitro* [J]. *Antiviral Res*, 2020, 178: 104787.

[21] Li N, Zhao L, Zhan X. Quantitative proteomics reveals a broad-spectrum antiviral property of ivermectin, benefiting for COVID-19 treatment [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(4): 2959-2975.

[22] Delandre O, Gendrot M, Jardot P, et al. Antiviral activity of repurposing ivermectin against a panel of 30 clinical SARS-CoV-2 strains belonging to 14 variants [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(4): 445.

[23] El-Saber Batiha G, Alqahtani A, Ilesanmi OB, et al.

- Avermectinderivatives, pharmacokinetics, therapeutic and toxic dosages, mechanism of action, and their biological effects [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2020, 13(8): 196.
- [24] Martin RJ, Robertson AP, Choudhary S. Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more [J]. Trends Parasitol, 2021, 37(1): 48–64.
- [25] Tang M, Hu X, Wang Y, et al. Ivermectin, a potential anticancer drug derived from an antiparasitic drug [J]. Pharmacol Res, 2021, 163: 105207.
- [26] Foley DH, Bryan JH, Lawrence GW. The potential of ivermectin to control the malaria vector *Anopheles farauti* [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000, 94(6): 625–628.
- [27] González Canga A, Sahagún Prieto AM, Díez Liébana MJ, et al. The pharmacokinetics and interactions of ivermectin in humans-a mini-review [J]. AAPS J, 2008, 10(1): 42–46.
- [28] Arena JP, Liu KK, Paress PS, et al. The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity [J]. J Parasitol, 1995, 81(2): 286–294.
- [29] Jiang L, Wang P, Sun YJ, et al. Ivermectin reverses the drug resistance in cancer cells through EGFR/ERK/Akt/NF- κ B pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 265.
- [30] Kobayashi Y, Banno K, Kunitomi H, et al. Current state and outlook for drug repositioning anticipated in the field of ovarian cancer [J]. J Gynecol Oncol, 2019, 30(1): e10.
- [31] Shojaei S, Suresh M, Klionsky DJ, et al. Autophagy and SARS-CoV-2 infection: a possible smart targeting of the autophagy pathway [J]. Virulence, 2020, 11(1): 805–810.
- [32] WHO. Table of therapeutics against COVID-19 as 21st March 2020 WHO [EB/OL]. https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/keyaction/Table_of_therapeutics_Appendix_17022020.pdf?ua=1, 2020–05–21/2021–11–20.
- [33] Guzzo CA, Furtek CI, Porras AG, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects [J]. J Clin Pharmacol, 2002, 42(10): 1122–1133.
- [34] Jans DA, Wagstaff KM. The broad spectrum host-directed agent ivermectin as an antiviral for SARS-CoV-2? [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 538: 163–172.
- [35] Yang SNY, Atkinson SC, Wang C, et al. The broad spectrum antiviral ivermectin targets the host nuclear transport importin α / β 1 heterodimer [J]. Antiviral Res, 2020, 177: 104760.
- [36] Jin L, Feng X, Rong H, et al. The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1937.
- [37] Bojkova D, Klann K, Koch B, et al. Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets [J]. Nature, 2020, 583(7816): 469–472.
- [38] Lehrer S, Rheinstein PH. Ivermectin docks to the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain attached to ACE2 [J]. In Vivo, 2020, 34(5): 3023–3026.
- [39] Portmann-Baracco A, Bryce-Alberti M, Accinelli RA. Antiviral and anti-inflammatory properties of ivermectin and its potential use in COVID-19 [J]. Arch Bronconeumol (Engl Ed), 2020, 56(12): 831.
- [40] Schmith VD, Zhou JJ, Lohmer LRL. The approved dose of ivermectin alone is not the ideal dose for the treatment of COVID-19 [J]. Clin Pharmacol Ther, 2020, 108(4): 762–765.
- [41] Khan MSI, Khan MSI, Debnath CR, et al. Ivermectin treatment may improve the prognosis of patients with COVID-19 [J]. Arch Bronconeumol (Engl Ed), 2020, 56(12): 828–830.
- [42] Hellwig MD, Maia A. A COVID-19 prophylaxis? Lower incidence associated with prophylactic administration of ivermectin [J]. Int J Antimicrob Agents, 2021, 57(1): 106248.
- [43] Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal [J]. J Heart Lung Transplant, 2020, 39(5): 405–407.
- [44] Li F, Li J, Wang PH, et al. SARS-CoV-2 spike promotes inflammation and apoptosis through autophagy by ROS-suppressed PI3K/AKT/mTOR signaling [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2021, 1867(12): 166260.
- [45] Zhang X, Song Y, Ci X, et al. Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice [J]. Inflamm Res, 2008, 57(11): 524–529.
- [46] Liu J, Liang H, Chen C, et al. Ivermectin induces autophagy-mediated cell death through the AKT/mTOR signaling pathway in glioma cells [J]. Biosci Rep, 2019, 39(12): BSR20192489.
- [47] Weichhart T, Hengstschläger M, Linke M. Regulation of innate immune cell function by mTOR [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(10): 599–614.
- [48] Ventre E, Rozières A, Lenief V, et al. Topical ivermectin improves allergic skin inflammation [J]. Allergy, 2017, 72(8): 1212–1221.
- [49] Shimogawara R, Hata N, Schuster A, et al. Hookworm-related cutaneous larva migrans in patients living in an endemic community in Brazil: immunological patterns before and after ivermectin treatment [J]. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2013, 3(4): 258–266.
- [50] Carlosama-Rosero Y. Ivermectin in COVID-19. Argumentum ad ignorantiam? [J]. Rev Clin Esp (Barc), 2020, 220(7): 457–458.
- [51] Rajter JC, Sherman MS, Fatteh N, et al. Use of ivermectin is associated with lower mortality in hospitalized patients with coronavirus disease 2019: The ivermectin in COVID nineteen study [J]. Chest, 2021, 159(1): 85–92.
- [52] Mayer MA, Krolewiecki A, Ferrero A, et al. Safety and efficacy of a MEURI program for the use of high dose ivermectin in COVID-19 patients [J]. Front Public Health, 2022, 10: 813378.
- [53] Behera P, Patro BK, Padhy BM, et al. Prophylactic role of ivermectin in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection among healthcare workers [J]. Cureus, 2021, 13(8):

- e16897.
- [54] Buonfrate D, Chesini F, Martini D, et al. High-dose ivermectin for early treatment of COVID-19 (COVER study): a randomised, double-blind, multicentre, phase II, dose-finding, proof-of-concept clinical trial [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2022, 59(2): 106516.
- [55] Formiga FR, Leblanc R, de Souza Rebouças J, et al. Ivermectin: an award-winning drug with expected antiviral activity against COVID-19 [J]. *J Control Release*, 2021, 329: 758–761.
- [56] Surnar B, Kamran MZ, Shah AS, et al. Orally administrable therapeutic synthetic nanoparticle for zika virus [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(10): 11034–11048.
- [57] Surnar B, Kamran MZ, Shah AS, et al. Clinically approved antiviral drug in an orally administrable nanoparticle for COVID-19 [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, 3(6): 1371–1380.
- [58] Arévalo AP, Pagotto R, Pórfido JL, et al. Ivermectin reduces *in vivo* coronavirus infection in a mouse experimental model [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 7132.
- [59] de Melo GD, Lazarini F, Larrous F, et al. Attenuation of clinical and immunological outcomes during SARS-CoV-2 infection by ivermectin [J]. *EMBO Mol Med*, 2021, 13(8): e14122.
- [60] Foo CS, Abdelnabi R, Vangeel L, et al. Ivermectin does not protect against SARS-CoV-2 infection in the Syrian hamster model [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(3): 633.
- [61] 林凯丽, 刘梅轩, 麻昊然, 等. 动物生物安全三级实验室应急管理经验交流 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(9): 76–79.
- [62] Körner RW, Majjouti M, Alcazar MAA, et al. Of mice and men: the coronavirus MHV and mouse models as a translational approach to understand SARS-CoV-2 [J]. *Viruses*, 2020, 12(8): 880.
- [63] Liu K, Pan X, Li L, et al. Binding and molecular basis of the bat coronavirus RaTG13 virus to ACE2 in humans and other species [J]. *Cell*, 2021, 184(13): 3438–3451.
- [64] Fischbach MA. Combination therapies for combating antimicrobial resistance [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14(5): 519–523.
- [65] Yao X, Ye F, Zhang M, et al. *In vitro* antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(15): 732–739.
- [66] Choudhary R, Sharma AK. Potential use of hydroxychloroquine, ivermectin and azithromycin drugs in fighting COVID-19: trends, scope and relevance [J]. *New Microbes New Infect*, 2020, 35: 100684.
- [67] Patrì A, Fabbrocini G. Hydroxychloroquine and ivermectin: A synergistic combination for COVID-19 chemoprophylaxis and treatment? [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2020, 82(6): e221.
- [68] Sanz-Navarro J, Feal C, Dauden E. Treatment of human scabies with oral ivermectin. Eczematous eruptions as a new non-reported adverse event [J]. *Actas Dermosifiliogr*, 2017, 108(7): 643–649.
- [69] Mahmud R, Rahman MM, Alam I, et al. Ivermectin in combination with doxycycline for treating COVID-19 symptoms: a randomized trial [J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(5): 3000605211013550.
- [70] 黄涛, 张海涛, 李志雄, 等. 非人灵长类动物在病毒感染模型中的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(2): 248–255.

[收稿日期]2021-12-10

刘江宁. 猴痘病毒感染动物模型研究及应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 137-147.
Liu JN. Research progress on the development and application of animal models for Monkeypox [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 137-147.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.021

猴痘病毒感染动物模型研究及应用进展

刘江宁*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京 100021)

【摘要】 2022 年 5 月世界多个国家发生超过百例人猴痘病例,引发世界卫生组织的疫情爆发预警。猴痘病毒与天花病毒同属,临床典型特征为皮疹,死亡率 1%~10%。突发疫情引起了世人的担忧,现有疫苗的有效性、应急药物的筛选,以及猴痘病毒学、免疫学与病理学机制的阐述,均对动物模型提出重大需求。本文就常用的食蟹猴模型、土拨鼠模型、松鼠模型、冈比亚袋鼠模型、睡鼠模型、狨猴模型、小鼠模型和兔模型等,针对模型研制中的动物选择、感染途径与剂量、模型病毒学和病理学特征等进行了详细的评述,并介绍了动物模型在致病与传播研究、药物与疫苗评价中的应用,希望可为研究人员研制及应用动物模型提供参考。

【关键词】 人猴痘;动物模型;病毒复制;病理表现;应用

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0137-11

Research progress on the development and application of animal models for Monkeypox

LIU Jiangning*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences and Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 In May 2022, more than 100 cases of Monkeypox were identified in several countries, triggering an outbreak warning by the World Health Organization. Monkeypox virus and Smallpox virus belong to the same genus, and the typical clinical manifestation is a rash and a mortality rate of 1%~10%. The sudden outbreak of Monkeypox has aroused concern worldwide, and the demand for an animal model for evaluating the efficiency of vaccines and drugs, as well as understanding its mechanisms of virology, immunology, and pathology, is urgent. In this paper, the common models using cynomolgus monkey, prairie dogs, squirrel, Gambian pouched rats, dormouse, marmoset, mouse, and rabbit were reviewed by focusing on the selection of animal species, infection route and dose, and characteristics of virology and pathology. The application of these animal models in studies on pathogenesis, transmission, and the evaluation of vaccines and drugs are introduced to provide references for the development and application of animal models for Monkeypox.

【Keywords】 Monkeypox; animal model; virus replication; histopathology; application

2022 年 5 月,世界上多个国家发生人感染猴痘病毒(Monkeypox)病例,确诊和疑似病例在 1 个月内超过百例,患者主要来自欧洲和美洲^[1-2]。同年 5 月 21 日,世界卫生组织(WHO)发布猴痘病毒疫情

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康创新工程(2021-1-I2M-035)。
【作者简介】 刘江宁(1981—),男,博士,研究员,研究方向:传染病动物模型。E-mail: liujn@cnilas.org

爆发预警。猴痘病毒最早发现于 1958 年,猴痘病毒感染人病例最早于 1970 年发现于刚果^[3],通常在西非和中非国家出现猴痘散发病例,病例通过直接接触感染动物的血液、体液、皮肤或粘膜损伤而被病毒感染。因密切接触感染者的呼吸道分泌物、皮肤损伤或病人污染物可导致人际间的二次传播^[4]。猴痘主要症状为发热、头痛、肌肉疼痛,典型特征为不同程度的皮疹。猴痘通常是一种自限性疾病,持续 14~21 d 多可自愈。猴痘病毒主要包括西非和刚果盆地两个分支,其中西非分支的致死率约 1%,刚果盆地分支的致死率约 10%,儿童、青年和免疫缺陷者感染后致死率较高^[4]。

猴痘病毒属于痘病毒科(Poxviridae),痘病毒为病毒颗粒最大的一类 DNA 双链线性病毒,病毒颗粒呈砖形或椭圆形,大小为 200~400 nm,病毒在感染细胞的细胞质中复制。痘病毒科包括两个病毒亚科:脊椎动物痘病毒亚科(Chordopoxvirinae)和昆虫痘病毒亚科(Entomopoxvirinae)。脊椎动物痘病毒亚科包含 9 个属:正痘病毒属(Orthopoxvirus)、副痘病毒属(Parapoxvirus)、猪痘病毒属(Suipoxvirus)、山羊痘病毒属(Capripoxvirus)、鹿痘病毒属(Cervidopoxvirus)、兔痘病毒属(Leporipoxvirus)、鸡痘病毒属(Avipoxvirus)、雅塔痘病毒属(Yatapoxvirus)和软疣病毒属(Molluscipoxvirus),猴痘病毒、牛痘病毒(Cowpoxvirus)与著名的天花病毒(Smallpox)同属于正痘病毒属。其中,可导致人类疾病的主要是正痘病毒和副痘病毒,包括天花病毒、猴痘病毒、牛痘病毒、骆驼痘病毒(Camelpox virus)和痘苗病毒(Vaccinia virus)^[5]。由于亲缘关系相近,接种天花疫苗可有效抵抗猴痘病毒感染^[6],但自 1980 年停止接种天花疫苗后,猴痘病毒感染病例呈上升趋势^[7-8]。

动物模型是研究传染病的病原学、免疫学和病理学机制的工具,也是评价疫苗、抗体和药物有效性的工具,基于动物模型开展传染病基础研究和防治策略转化是控制疫情扩散和临床救治的基础。传染病动物模型构建的主要难点是非人兽共患病的人类病原的宿主范围窄,导致人类病原对大部分动物的嗜性较差,表现为动物对病原感染不敏感,病原难以在动物体内复制并引发病理损伤。对于猴痘动物模型研制来说,幸运的是,据报道多种动物对猴痘病毒敏感,包括松鼠、树松鼠、跳鼠、冈比亚袋鼠、负鼠、刺猬、土拨鼠、睡鼠、豪猪、家猪、食蚁

兽、象鼯,以及各种非人灵长类动物如恒河猴与食蟹猴等^[8-9],为猴痘动物模型的研制带来了便利,而豚鼠和金黄地鼠等则对猴痘病毒敏感性较差。本文将综述猴痘病毒感染不同物种动物模型的研究进展,并比较不同动物模型的病原学和病理学特征,以及动物模型的应用情况。

1 人猴痘临床表现及诊断

人感染猴痘病毒后的疾病潜伏期为 7~14 d,前 4 d 可出现头痛和疲劳症状,随后出现发热症状,面部出现丘疹、水泡和脓疱,皮疹从面部向全身扩散,包括四肢、手部和脚部,以及生殖器,进而形成结痂病变,并出现淋巴结病。猴痘的并发症包括呕吐和腹泻、结膜炎和角膜瘢痕、败血症、脑炎和支气管肺炎。疾病一般持续 4 周,随后皮疹脱落自愈,常见的后遗症包括持续性细菌感染导致的永久性瘢痕^[10]。孕妇感染后易流产和出现更严重的疾病^[11]。皮肤病变的组织病理学特征为表皮增生、角化细胞球囊变性并伴有包浆内包涵体、表皮内小泡和脓疱,皮肤水肿并伴随淋巴细胞与巨噬细胞浸润,角质细胞内可见痘病毒颗粒^[12]。人感染猴痘病毒与天花病毒最主要的区别之一是前者会导致淋巴结病,但缺乏淋巴结病及其它脏器病理的临床报道。

猴痘病毒的实验室诊断主要采用实时荧光定量 PCR 法检测病毒 DNA^[13-14],采用猴肾细胞(Vero 或者 Vero E6)进行分离培养,并辅助以电镜观察^[15]。免疫学检测方法包括 ELISA 检测病毒特异的 IgG 和 IgM,以及免疫组化方法检测病毒抗原^[16]。临床检测可见白细胞增多、轻度至中度的低蛋白血症和血小板减少^[17]。

2 猴痘动物模型

非人灵长类动物对猴痘病毒天然敏感,此外,地松鼠、冈比亚袋鼠、睡鼠和绳松鼠等啮齿类动物在猴痘病毒从非洲向美洲的传播中起到了中间宿主作用,这些动物将病毒传播至圈养的美国土拨鼠,从而导致人感染猴痘病毒疫情的发生^[18]。因此,非人灵长类动物和啮齿类动物常被用于猴痘感染动物模型的研究。

2.1 非人灵长类动物模型

2.1.1 食蟹猴模型

最具有猴痘特征的是静脉感染食蟹猴(*Macaca fascicularis*)为代表的非人灵长类动物模型^[19]。但

是, 静脉感染方式绕过了潜伏期和原发性病毒血症阶段, 人工导致了继发性病毒血症, 直接导致主要器官和皮肤感染病毒。而在临床上, 猴痘病毒被普遍认为是通过密切接触或吸入液滴。由于静脉感染途径不同于临床感染途径, 且没有潜伏期, 不适用于评价抗气溶胶暴露感染的疫苗和药物^[20]。Goff 等^[20]与 Zaucha 等^[21]先后采用气溶胶感染途径, 建立了猴痘病毒感染食蟹猴模型。动物感染后出现皮肤和黏膜损伤、轻度厌食、发热、咳嗽和流鼻涕症状, 随后出现呼吸困难, 9~17 d 死亡。感染动物的肺、脾内病毒滴度最高, 同时可从肝、肾和肾上腺内分离到病毒。动物尸检均见肺重、充血和实变, 出现深红色的小叶斑驳水肿、肺失张和坏死, 偶尔可见纤维蛋白性胸膜炎和内脏胸膜多灶性白色斑块样增厚, 组织病理学表现为支气管肺炎、肺水肿、坏死性血管炎, 可观察到坏死性淋巴结炎和淋巴滤泡坏死, 巨噬细胞和中性粒细胞浸润的脾炎, 上皮细胞肿胀、坏死、溃疡和增生, 可见胞质包涵体。此外, 可观察到胃肠道、气管、喉部、纵膈、扁桃体、胸腺、生殖系统和肝的病变(见表 1)。食蟹猴模型的特点是模拟临床症状, 但静脉感染对病毒剂量要求高, 且与自然感染途径不吻合, 气溶胶感染模型较好的解决了该问题, 适合于阻断型疫苗和药物的评价。

2.1.2 狨猴模型

食蟹猴模型对猴痘病毒的感染剂量要求高, 研究报道中使用的感染剂量一般超过每只 10^4 PFU, 甚至达到每只 10^6 PFU^[20], 如此高的感染剂量不同于自然感染方式。Mucker 等^[22]发现狨猴(*Callithrix jacchus*)对猴痘病毒十分敏感, 分别采用不同剂量的猴痘病毒静脉注射感染狨猴后, 发现接种超过 48 PFU 即可导致部分动物死亡, 而超过 510 PFU 可导致动物全部死亡。动物感染后出现嗜睡、活动度下降和皮肤红斑等症状, 部分动物全身出血, 并出现淋巴结病。动物感染后 3 d 出现明显的病毒血症, 上皮细胞、肝、粘膜和淋巴结可检测到病毒。尸检可见外周淋巴结增大并呈深红色、皮下水肿、肝和肺病变, 以及膀胱、睾丸、肾、胃、结肠和结膜等出血, 多个组织可见广泛的巨噬细胞浸润(见表 1)。狨猴模型与睡鼠模型类似, 均出现了严重的出血症状, 与出血型天花类似。狨猴模型的特点是对猴痘病毒十分敏感, 低剂量致死, 且可出现出血症状, 适合于研究感染机制和重症机制。

2.2 啮齿类动物模型

2.2.1 土拨鼠模型

土拨鼠(*Cynomys ludovicianus*)被认为是 2003 年美国感染猴痘病毒疫情的中间宿主^[18], 由于其对猴痘病毒的易感性, 被不同的研究团队用于构建动物模型。Xiao 等^[23]分别通过滴鼻和腹腔注射两种途径, 对土拨鼠感染西非分支的猴痘病毒, 感染 4 d 后动物出现嗜睡和厌食症状, 唇部和舌部出现水泡, 伴随鼻塞和脓性鼻涕, 并在 8~14 d 内死亡, 其中滴鼻感染动物存活时间较长。感染 5~6 d 后咽部和血液可检测到病毒, 肝和脾内病毒滴度最高, 肾和肺内较低, 滴鼻感染动物的病毒滴度相对较低。尸检可见肺水肿、出血和坏死, 滴鼻感染动物肺部病变相对严重, 腹腔注射感染动物脾呈中度至重度坏死和肝小叶坏死, 脂肪组织呈多灶性坏死(见表 1)。

Hutson 等^[24]通过滴鼻和皮内注射两种途径, 分别对土拨鼠感染西非分支和刚果盆地分支的猴痘病毒, 6~12 d 后, 动物头部、四肢和躯干出现典型的黄斑、水泡和脓疱, 部分动物死亡。血液、口、鼻和眼部分泌物、粪便中可检测到病毒, 除血液外, 上述样品均可分离到病毒。尸检时病变部位、心、肺、肝、脾、肾、皮肤、淋巴结和脑内可检测到病毒, 但未进行组织病理学观察。在该模型中, 动物在囊泡和脓疱病变、口腔病变、呼吸道症状、嗜睡和厌食等方面与人感染猴痘病毒症状相似。此外, 猴痘病毒与天花病毒的典型区别之一是前者感染会导致淋巴结病, 土拨鼠模型虽然未出现淋巴结病, 但可在淋巴结中检测到猴痘病毒(见表 1)。

土拨鼠模型的特点是可出现典型的猴痘症状, 且高剂量排毒, 适用于发病机制和病毒传播研究。

2.2.2 松鼠模型

松鼠是猴痘病毒的敏感物种之一^[9]。Marennikova 等^[25]和 Hutson 等^[26]分别采用滴鼻、经口和皮肤划痕等方式对成年普通松鼠(*Sciurus vulgaris*)感染猴痘病毒。滴鼻和经口感染的动物疾病进程快于皮肤划痕感染动物, 症状包括发热、活动度下降、厌食、鼻炎、咳嗽和呼吸困难, 7~8 d 后死亡率达 100%, 但动物未出现皮肤病变。

Tesh 等^[27]应用地松鼠(*Spermophilus tridecemlineatus*)进行了猴痘病毒感染模型的探索研究。腹腔注射或滴鼻感染后, 动物均在 4~5 d 出现嗜睡和厌食症状, 并在 5~7 d 内死亡, 未见皮肤损

伤、呼吸窘迫或其它症状。感染 3 d 后可在血液中检测到病毒,其中肝和脾内病毒滴度最高,肾和肺内其次,心和脑内最低。组织病理学改变主要为肝细胞变性或坏死,细胞质中可见包涵体,脾出现中度至明显的坏死,肺实变和间质性肺炎,淋巴结局灶性坏死等(见表 1)。与土拨鼠模型相比,地松鼠感染后的存活时间更短,病变程度更重,提示其适用于研究人感染猴痘病毒重症的发病机制。

研究人员曾在刚果民主共和国发现 1 只濒死的绳松鼠(*Funisciurus* sp.),在其体内分离到猴痘病毒^[28]。随后,在绳松鼠、太阳松鼠和非人灵长类动物血清内检测到病毒抗体,其中绳松鼠的血清阳性率最高^[29],流行病学研究推测绳松鼠与几起人猴痘病毒疫情相关^[30]。因此,Falendysz 等^[31]分别采用皮内注射和滴鼻途径对绳松鼠感染猴痘病毒,动物出现皮肤和口腔痘样病变和脓疱、鼻涕等症状,部分动物死亡。大部分动物可检测到病毒血症,皮内注射可导致皮肤和口腔部位较高的病毒含量,而滴鼻感染后病毒主要分布于唇部和舌部,肺、脾和唾液腺可检测到病毒,动物口腔排毒。组织病理学改变为上皮增生和坏死,皮内中性粒细胞和巨噬细胞浸润,肺水肿和间质性肺炎,肾、心脏和胃可见炎症(表 1)。绳松鼠模型表现出与感染途径无关的较强排毒能力,因此,绳松鼠有可能作为病毒的放大宿主,增加了猴痘病毒向人类更可能接触的其他物种动物传播的可能性,适用于病毒学和传播研究。

2.2.3 冈比亚袋鼠

2003 年,由于进口了几种啮齿类动物,猴痘病毒传播至美国,最初感染了圈养的北美土拨鼠,随后传播至人类,当时在环尾鼠(*Hybomys* sp.)、树松鼠(*Heliosciurus* sp.)、冈比亚袋鼠(*Cricetomys gambianus*)、睡鼠(*Graphiurus kelleni*)、帚尾豪猪(*Atherurus* sp.)和绳松鼠(*Funisciurus* sp.)等 6 种非洲啮齿类动物体内分离到了活病毒^[18],其中,冈比亚袋鼠存在持续性病毒感染^[32]。Falendysz 等^[33]使用冈比亚袋鼠进行了猴痘病毒滴鼻感染实验,动物无明显症状,而皮内注射感染后动物出现嗜睡、厌食和体重减轻等症状,并出现皮肤损伤和口腔水泡。两种感染途径均可在眼、鼻、口和颈部浅表淋巴结检测到病毒,动物的口、鼻、肛和结膜部位排毒。皮内注射感染可在唾液腺、肺、小肠、睾丸、卵巢、脑、皮肤、舌和腹股沟淋巴结中分离到滴度较高的病毒,颌下淋巴结和肾内含活病毒。滴鼻感染后

肺、脾、食管和肾内病毒核酸阳性,但未分离到活病毒(见表 1)。冈比亚袋鼠较强的排毒能力,提示其可能为潜在的猴痘病毒传播宿主,适用于病毒传播研究。Huston 等^[34]分别用西非分支和刚果盆地分支猴痘病毒经皮内注射感染冈比亚袋鼠,结果与前者研究结果一致,动物症状较轻,绝大多数动物存活,且排出大量活病毒,验证了其作为潜在传播动物的可能性。遗憾的是,两个研究团队均没有观察动物组织病理学改变。

2.2.4 睡鼠模型

虽然土拨鼠和松鼠是较为理想的猴痘病毒感染动物模型,但由于这两种动物每年仅繁育 1 胎,因此导致动物供应有限,部分实验用动物来自野外栖息地捕获,动物的微生物背景和健康状况难以控制。睡鼠是产自非洲的一种体型与小鼠相似的啮齿类动物,也是 2003 年非洲猴痘病毒传播至美国的疑似元凶之一^[18]。Schultz 等^[35]使用非洲睡鼠建立了猴痘病毒感染模型,足垫注射感染后,动物在 7~11 d 内死亡。滴鼻感染剂量每只大于 200 PFU 时致死率也达到 100%,且动物感染 3 d 后出现脱水和结膜炎症状,可在鼻腔灌洗液、脾、肝、肺和血液中检测到病毒,其中肝内病毒滴度最高。尸检可见消化道出血、肝肿大和淋巴结病,组织病理学表现为鼻炎、淋巴结坏死、肝细胞坏死、多器官出血,多组织胞浆内可见病毒包涵体(见表 1)。猴痘病毒感染睡鼠模型的许多表现与天花病人类似,尤其是出血型的天花病。出血型天花病人占比为 10%,但死亡率接近 100%^[36],睡鼠模型的多器官出血特性使其适用于做为研究天花出血机制的参比模型,且由于睡鼠的繁育特点,以及对猴痘病毒的敏感性,可批量用于评价疫苗和药物的有效性。

2.2.5 小鼠模型

除上述特色的动物模型之外,Osorio 等^[37]对猴痘病毒改造并引入荧光标记,随后通过灌胃感染 BALB/c 小鼠和 SCID 免疫缺陷小鼠,实时观察了病毒在小鼠体内的分布。BALB/c 小鼠感染后,5 d 出现竖毛、厌食和或动物下降等症状,10 d 后恢复正常,可在腹腔内一过性的观察到病毒复制,偶尔可在腋窝淋巴结观察到病毒,BALB/c 小鼠仅表现为症状较轻的自限性感染。SCID 小鼠感染后初期症状与 BALB/c 小鼠相似,但在 9 d 内死亡,可在卵巢、肠肌壁和足部皮肤观察到病毒,肺、心、肝、肾和胰腺中也可观测到病毒。主要组织病理学表现为

卵巢严重坏死、中性粒细胞和巨噬细胞浸润,皮肤过度角化、棘皮病和炎症,皮内大疱水肿和气球样变性(表 1)。免疫缺陷小鼠虽然感染后出现全身性疾病,并在多个组织和器官内检测到病毒,但是没有观察到类似于人和猴感染猴痘病毒后的皮疹症状,表明该模型在研究皮疹发生机制方面有所欠缺。随后, *Huston* 等^[38] 分别采用西非分支和刚果盆地分支猴痘病毒,经足垫注射或滴鼻感染了 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠,动物仅在 6 d 后出现了一过性的竖毛、体重下降等症状,足垫注射组动物出现了注射部位水肿,无其它明显的疾病表现。BALB/c 小鼠与 C57BL/6 小鼠相比,对猴痘病毒感染更加敏感,表现为体重下降更明显。*Sergeev* 等^[39] 对 ICR 小鼠经滴鼻感染了猴痘病毒,并与兔和小型猪做了致病力比较。结果发现成年兔与小型猪对病毒感染不敏感,ICR 小鼠感染后 7~13 d 内出现化脓性结膜炎、眼睑炎和竖毛等症状,随后逐渐康复。2~9 d 为病毒复制高峰期,血液、鼻腔粘膜、肺、脾、十二指肠、脑、气管、肝和肾内均可检测到较高的病毒滴度,9 d 后病毒滴度逐渐下降。主要组织病理变化发生在肺部和气管,表现为肺间隔增宽和水肿、毛细血管渗出。电镜观察可见气管和支气管上皮细胞损坏、细胞核变形、血管内皮细胞凋亡等(表 1)。上述研究表明,免疫功能健全的成年小鼠对猴痘病毒敏感性低,不适用于病毒学、免疫学、病理学和药效学研究。

虽然成年小鼠对猴痘病毒敏感性低,但研究发现感染结果可受动物日龄和接种途径的影响。*Marennikova* 等^[9] 发现成年小鼠颅内接种猴痘病毒的死亡率是 100%,与此类似,乳鼠滴鼻感染猴痘病毒的死亡率也是 100%。8 日龄小鼠经足垫注射、腹腔注射和滴鼻接种猴痘病毒后,死亡率也可达 100%,而皮内注射或灌胃感染的致死率分别为 50% 与 40%。随着小鼠日龄增长,对病毒敏感性下降,灌胃感染 14 日龄小鼠的死亡率下降至 14%。但滴鼻感染 15 日龄小鼠的死亡率依然为 100%^[9]。同样,1~3 日龄大鼠滴鼻感染猴痘病毒死亡率达 100%。但是,低日龄大小鼠在评价药物和疫苗有效性方面存在操作和实验设计上的困难,且由于其免疫系统尚未发育完全,限制了其应用范围。

近年来随着技术发展,人源化小鼠成为研究传染病的有力模型。*Huston* 等^[40] 应用 NSG 小鼠分别进行人的外周血单核细胞、造血干细胞和胎肝的移

植,研制了不同类型的人源化小鼠模型,随后对动物滴鼻接种天花病毒。感染后部分动物出现了皮肤病变,主要症状为体重下降,高剂量组发生死亡。病理表现为多灶性合并肝坏死,皮肤呈表皮增生和过度角化,其它多个器官也可见病变。与猴痘病毒较为广泛的宿主范围不同,天花病毒只感染人类,给天花动物模型构建带来困难,人源化小鼠模型是天花动物模型研制的一次成功尝试,也对研究猴痘病毒与人免疫系统互作有一定的借鉴意义。

2.3 兔模型

Sergeev 等^[39] 发现兔对滴鼻接种猴痘病毒不敏感。但是, *Marennikova* 等^[9] 研究发现兔对猴痘病毒的敏感性与日龄和感染途径相关。

静脉接种猴痘病毒可导致成年兔发生急性疾病,出现发热、结膜炎和鼻炎,以及皮肤与粘膜部位广泛的皮疹。皮疹在感染后 5~6 d 出现,并从丘疹进展为脓疱,甚至出血,仅极少数动物死亡。感染之初可从血液中分离到病毒,7 d 后可从部分淋巴结和肾分离到活病毒,甚至部分动物睾丸内也可分离到病毒^[9]。该研究表明静脉接种成年兔是较为成功的猴痘感染动物模型,但由于接种方式不同于自然感染途径,限制了其在病毒入侵机制研究方面的应用。

年幼兔对猴痘病毒更敏感。10 日龄兔经口感染猴痘病毒后,4~6 d 出现症状,包括皮疹、食欲不振和腹泻,皮疹在耳朵内侧、鼻部和唇部出现,继发化脓性结膜炎和鼻炎,皮疹进而扩散至全身,体重下降并在 4~14 d 内死亡。可从感染动物的血液、肺、肝、肾和脾内分离到病毒。10 日龄兔对滴鼻接种同样敏感,表现为厌食和体重下降,动物在 4~5 d 内死亡,但未出现皮疹^[9]。10 日龄兔模型可作为非人灵长类动物模型和土拨鼠模型等的补充,适用于病毒性核病理学研究,以及药物评价,但由于其日龄低、免疫系统尚未发育成熟,限制了其在免疫学研究 and 疫苗评价方面的应用。

3 猴痘动物模型的应用

猴痘动物模型被应用于药物筛选与评价、西非分支与刚果盆地分支致病力比较研究、猴痘病毒传播研究、疫苗保护效果评价,以及免疫学、病理学等研究,本文主要介绍其在前四个方面的应用情况。

3.1 药物筛选与评价

在感染途径、感染剂量、病毒复制水平和症状

等方面接近临床的动物模型可以用于药物评价,目前,土拨鼠、睡鼠、地松鼠和小鼠模型曾被用于评价猴痘药物。Schultz 等^[35]在构建猴痘病毒感染非洲睡鼠模型的基础上,用该模型评价了西多福韦(Cidofovirb)对猴痘的抗感染效果。作者发现在感染前 4 h 内给予一次西多福韦治疗,可将干预组动物的死亡率降低至 19%,而安慰剂组的死亡率为 100%。Smith 等^[41]应用土拨鼠模型评价了 ST246 对猴痘的治疗效果,对土拨鼠滴鼻接种猴痘病毒后,分别选择感染后 0、3 d 或出现皮疹后 3 个时间点,开始每日给予 ST246 治疗,与安慰剂组相比,0 d 和 3 d 开始给药组动物未出现明显的疾病症状或死亡,而出现皮疹后给药组动物体重依然下降,症状与安慰剂组相似但是相对较轻,且病变很快恢复。但 3 种治疗方式都未能阻止动物排毒。在猴痘药物的动物模型评价方面,Huston 等^[26]进行了较为系统的概括总结。

3.2 不同分支毒株致病力比较

根据临床表现、流行病学特征、地理位置和基因分型,猴痘病毒包含刚果盆地和西非两个分支。其中,刚果盆地分支感染致死率显著高于西非分支,可达到 10%,且可以在人间传播,而西非分支感染症状相对温和,且少见人间传播的报道。针对这一特性,研究人员在构建动物模型的过程中,经常会对两个分支的致病力进行比较研究,以期揭示导致症状差异的发病机制区别。Saijo 等^[42]使用食蟹猴模型比较了两个猴痘病毒分支的致病力,发现刚果盆地分支在感染动物的皮肤、淋巴结和网状内皮系统、生殖泌尿系统、呼吸系统和消化系统中广泛复制,而西非分支仅在皮肤、淋巴结和网状内皮系统中复制,表明刚果盆地分支在内脏器官中的复制效率远高于西非分支,且刚果盆地分支感染猴的肺受到严重影响,胃肠和生殖泌尿器官功能障碍,提示刚果盆地分支的食蟹猴毒力高于西非分支。

Huston 等^[43]基于土拨鼠模型,比较了西非分支和刚果盆地分支的致病力,作者分别采用滴鼻和皮内注射两种途径,对动物分别接种西非分支和刚果盆地分支病毒,两种病毒感染后大体症状一致,但刚果盆地分支感染动物发热的比例较高、体重下降幅度较大、致死率高^[24]。在此基础上,作者进一步采用不同剂量病毒滴鼻接种土拨鼠,深入比较了两种分支病毒的致病力,发现刚果盆地分支的 LD₅₀ 比西非分支低近百倍。与西非分支相比,刚果盆地分

支感染动物口腔病毒滴度更高,排毒时间更长。后续,作者基于土拨鼠模型深入比较了两个分支毒株感染动物的病毒学和病理学差异,发现可从刚果盆地分支感染动物的粘膜、口咽部淋巴结和脾中相对较早的分离到病毒,两个分支感染动物组织病理学差异不明显,但刚果盆地分支感染动物的脾内发生更多的细胞凋亡^[44]。这些研究表明,刚果盆地分支的体内复制效率高于西非分支,但毒力差异的病理学机制还有待深入研究。

3.3 病毒传播研究

2003 年猴痘病毒自非洲传播至美国,其途径首先是非洲啮齿类动物将病毒传播至美国的土拨鼠,土拨鼠再将病毒传播至人,从而爆发猴痘疫情^[18]。不同于其它动物,土拨鼠是常见的宠物,分布在家庭、宠物店和公园等环境中,猴痘病毒在土拨鼠间的传播风险值得关注。因此,Huston 等^[45]使用土拨鼠模型,对土拨鼠滴鼻接种猴痘病毒后,采用 3 种策略评估了传播风险。第一种策略为间接接触,将未感染动物置于感染动物生活过的笼具和垫料中;第二种策略为密切接触,将未感染动物与感染动物合笼饲养;第三种策略为呼吸道传播,未感染动物与感染动物饲养在 1 英寸间隔且带有通风孔的生物安全柜内,气流单向从感染动物向未感染动物流动,允许呼吸道飞沫传播或空气传播。间接接触组的 3 只未感染动物暴露后均被感染,可从口腔内检测到病毒 DNA,后续在血液中检测到病毒 DNA,动物感染后体重下降,出现腹泻和口腔病变;直接接触组的 3 只未感染动物暴露后均被感染,可从口腔内检测到病毒 DNA,动物腹泻和口腔病变较为严重。呼吸道传播组的未感染动物出现眼部感染,可在眼部和口腔分离到病毒,腹部和腿部出现病变,体重下降。暴露后濒死动物的舌部、脾、皮肤和病变部位都分离到了活病毒,且肝功指标显著提高,提示出现了严重的肝疾病。

3.4 疫苗保护效果评价

天花病毒、猴痘病毒和牛痘病毒均属于痘病毒科的正痘病毒属,研究认为天花疫苗可对猴痘病毒感染提供保护^[6]。1977 年以后未发生过天花病毒自然感染病例,1980 年 WHO 宣布在全球范围内成功消灭了天花,随后,停止了广泛的天花疫苗接种,此后出生的人群(儿童和青年)缺乏对天花病毒和猴痘病毒的免疫力^[6]。Schultz 等^[35]用非洲睡鼠模型研究了天花疫苗对猴痘病毒感染的保护效果,发

表 1 猴痘病毒感染动物模型比较分析

Table 1 Comparison analysis on different animal models of Monkey pox

动物 Animal	感染方式 Inoculation route	病毒复制 Virus replication	病理损伤 Pathological changes	动物症状 Symptoms	参考文献 Reference	
非人灵 长 类 动物 Nonhuman Primates	食蟹猴 Cynomolgus monkey	每 只 $10^4 \sim 1.4 \times 10^5$ PFU, 气溶胶	未检测到病毒血症; 肺、脾内病毒滴度最高; 可从肝、肾和肾上腺分离到病毒。	肺重、充血和实变, 深红色小叶斑驳水肿、肺失张和坏死, 纤维蛋白性胸膜炎和内脏胸膜多灶性白色斑块样增厚, 胃肠道病灶; 支气管肺炎、肺水肿、坏死性血管炎; 气管炎、喉炎和纵隔炎; 坏死性淋巴结炎; 巨噬和中性粒细胞浸润脾炎; 扁桃体炎、胸腺炎; 上皮肿胀、坏死、溃疡、增生和胞质包涵体; 坏死性涎腺炎; 消化系统粘膜坏死、糜烂或溃疡; 阴道炎、卵巢炎、子宫炎、附睾炎和睾丸炎; 弥漫性肿大肝细胞病灶。	6~7 d 皮疹、黏膜损伤、轻度厌食、发烧、咳嗽和鼻涕, 白细胞增多; 腹部、胸部、腹股沟、会阴和面部皮疹; 口腔病变或溃疡; 8 d 呼吸困难; 9~17 d 死亡。	[20–21]
	狨猴 Marmoset	每 只 ≥ 48 PFU, 静脉注射	3 d 出现明显的病毒血症; 上皮细胞、肝、粘膜和淋巴结内可检测到病毒。	白细胞增多, 血小板减少; 外周淋巴结增大呈深红色; 皮下水肿; 肝肿大和弥漫性苍白; 肺叶扁平白色/棕褐色病灶; 淋巴结淋巴细胞耗竭; 肝细胞变性或消失, 嗜酸性胞浆内包涵体; 骨髓白细胞前体减少并坏死; 轻度上皮增生伴空泡变性和多合胞体细胞, 及水泡性和出血性皮炎伴坏死; 肾上腺轻度空泡变性到坏死和出血; 肺、心脏、胃肠道、泌尿生殖系统和脑膜出血和水肿。	嗜睡、活动减少; 面部、下巴、胸部、腹部、腋窝和腹股沟出现红斑性皮疹; 部分动物全身出血; 淋巴结病; 大多数动物死亡。	[22]
		每 只 $10^{5.1}$ PFU, 腹腔注射	5~6 d 咽部和血液可检测到病毒; 病毒滴度在肝、脾内最高, 肾、脾内较低。	脂肪组织多灶性坏死, 血管炎, 成纤维细胞增生、巨噬和其它炎细胞浸润; 脾中度至重度坏死; 肝小叶坏死, 炎细胞浸润, 病毒抗原阳性包涵体; 肺间隔轻度至重度增宽, 单核细胞浸润。	4 d 嗜睡和厌食; 8~11 d 死亡; 皮肤和粘膜未见损伤。	
	土拨鼠 Prairie dogs	每 只 $10^{5.1}$ PFU, 滴鼻感染	咽部最早检测到病毒, 随后是血液; 肝、脾、肾和心脏内可检测到少量病毒。	无明显肝或脾病变或坏死, 观察到大量病毒阳性包涵体; 脂肪组织和骨骼肌炎症及坏死, 成纤维细胞和巨噬细胞增生; 淋巴结和胸腺的淋巴坏死, 炎细胞浸润; 肺水肿、出血和坏死。	4 d 嗜睡和厌食; 部分动物 11~14 d 死亡; 唇和舌部水泡, 鼻塞和脓性鼻涕。	[23–24]
	啮 齿 类 动物 Rodents	每 只 $10^{5.1}$ PFU, 皮内注射	病毒 DNA 最初可在血液检测到, 9~15 d 咽、鼻、结膜和肛拭子检测到病毒 DNA, 可分离到活病毒; 病变部位、心、肺、肝、脾、肾、皮肤、淋巴结、脑和可检测到病毒 DNA。	未检测	6~12 d 头部、四肢和躯干出现典型的黄斑、水泡和脓疱; 部分动物死亡。	
	每 只 $10^{5.1}$ PFU, 腹腔注射	3 d 后血液内检测到病毒; 病毒滴度在肝、脾内最高, 肾、脾内较高, 心、脑内最低。	肝细胞变性或坏死, 细胞质中可见包涵体; 脾中度至明显的坏死, 包括骨髓淋巴细胞核破裂, 红髓中纤维蛋白样坏死、充血和内皮细胞肿胀、碎裂; 肺间隔多灶性增宽或实变。	4 或 5 d 嗜睡和厌食, 5~7 d 死亡, 未见皮肤损伤、呼吸窘迫或其它症状。		
地松鼠 Ground squirrels	每 只 $10^{5.1}$ PFU, 滴鼻感染	2~4 d 咽拭子可检测到病毒; 病毒滴度在肝、脾内最高, 肾、脾内较高, 心、脑内最低。	肝多灶性脂肪变性, 弥漫性细胞坏死, 细胞质可见包涵体; 脾中度至重度坏死; 肺实变和间质性肺炎; 淋巴结局灶性坏死。	4 或 5 d 嗜睡和厌食; 2 d 开始死亡; 未见皮肤损伤、呼吸窘迫或其它症状。	[27]	

续表 1

动物 Animal	感染方式 Inoculation route	病毒复制 Virus replication	病理损伤 Pathological changes	动物症状 Symptoms	参考文献 References
绳松鼠 African rope squirrels	每只 10 ⁶ PFU, 皮内 注射	大部分动物可检测到病毒血症;皮肤和口腔病变部位病毒含量最高;舌部、胃、肺、颌下淋巴结、脾和唾液内可检测到病毒;11~13 d 口腔排毒。	皮肤皮增生和坏死,基底层和深层棘层上皮内脓疱和血管周围多发性淋巴浆细胞炎症,表皮海绵状增生、棘皮病、棘皮松懈和偶尔细胞坏死,导致溃疡;口腔上皮增生、细胞水肿、坏死和溃疡,以及相邻粘膜下层混合炎症,散在嗜酸性胞浆内包涵体;轻度淋巴浆细胞性间质性肺炎,支气管周围相关淋巴组织增生,肺泡隔轻度增厚,水肿和巨噬细胞浸润;肾小管变性以及皮质和肾盂血管周围淋巴和浆细胞炎;多灶性淋巴和浆细胞性心包炎、心肌炎和心内膜炎,心房血管周围淋巴浆细胞浸润。	6 d 皮肤和口腔明显的痘样病变和鼻涕,皮肤丘疹发展到脓疱,再结痂,50%死亡率。	[31]
	每只 10 ⁶ PFU, 滴鼻 感染	大部分动物可检测到病毒血症;唇部和舌部病毒含量最高;肺、膀胱、颌下淋巴结、脾、唾液和脑部可检测到病毒;11~13 d 口部排毒	浅表皮肤中性粒细胞和巨噬细胞浸润,血管反应性内皮细胞和血管壁水肿、纤维蛋白和急性炎症浸润;中度至重度肺泡组织细胞增多症,伴大量多核巨细胞;轻度淋巴浆细胞性间质性肺炎,支气管周围相关淋巴组织增生,肺泡隔轻度增厚,水肿和巨噬细胞浸润;肾小管变性以及皮质和肾盂血管周围淋巴和浆细胞炎症;多灶性淋巴和浆细胞性心包炎、心肌炎和心内膜炎,心房血管周围淋巴浆细胞浸润;淋巴细胞性胃炎和食管炎。	6 d 部分动物眼部病变,8 d 口腔病变,9 d 呼吸频率和鼻涕增加,11~13 d 痘病毒型皮肤病变,死亡率 75%。	
	每只 10 ⁶ PFU, 皮内 注射	7 d 在眼、鼻、口和皮肤内检测到病毒,8~14 d 达高峰并排毒,21 d 消失;唾液腺、肺、小肠、睾丸、卵巢、脑、皮肤、舌和腹股沟淋巴结病毒较高。	未检测	嗜睡、厌食、体重减轻,大量皮肤损伤,口腔内出现水泡。	
冈比亚 袋鼠 Gambian pouched rats	每只 10 ⁶ PFU, 滴鼻 感染	在鼻腔、口腔、颈部浅表淋巴结和皮肤检测到病毒,8~14 d 达高峰并排毒,21 d 后消失;肺、脾、食管和肾病毒核酸阳性,但未分离到活病毒。	未检测	未见皮肤或口腔病变。	[33-34]
	每只 1.4×10 ⁴ PFU, 足垫注射	/	未检测	7~10 d 死亡率 92%。	
睡鼠 Dormouse	每只 2×10 ⁴ PFU, 滴鼻感染	2 d 在鼻腔、脾、肝、肺和血液中检测到病毒,肝内最高;肺内病毒来自病毒血症或淋巴结。	消化道出血、肝肿大和淋巴结病。鼻炎,颌下淋巴结、脾和胸腺的淋巴结坏死,肝细胞坏死,肺、胃和小肠出血,间或鼻腔、胆囊和大脑出血,鼻粘膜上皮细胞可见胞浆内病毒包涵体。	剂量大于 200 PFU 时致死率达到 100%,3 d 后脱水 and 结膜炎。	[34]

续表 1

	动物 Animal	感染方式 Inoculation route	病毒复制 Virus replication	病理损伤 Pathological changes	动物症状 Symptoms	参考文献 References
小鼠 Mouse	成年 BALB/c 小鼠 Adult BALB/c	每只 10 ⁵ PFU, 灌胃感染	病毒一过性的在腹腔 内器官中原位复制, 偶尔可感染腋窝淋 巴结。	未检测	5 d 竖毛、厌食和 活动度下降,10 d 后可康复。	[37]
	成年 SCID 小鼠 Adult SCID mouse	每只 10 ⁵ PFU, 灌胃感染	病毒可在卵巢、肠肌 壁和足部皮肤中检测 到;肺、心、肝、肾和胰 腺中也存在少量 病毒。	卵巢严重坏死,卵巢壁中性粒细胞和巨噬细 胞浸润;肠浆膜轻度增生,伴随下层平滑肌 坏死;皮肤过度角化、棘皮病和炎症,嗜酸性 细胞质内病毒包涵体;皮内大疱水肿、散在 碎片、上皮呈气球样变性。	5 d 后竖毛、厌食 和活动度下降,9 d 内死亡。	
	ICR 小鼠 ICR mouse	每只 10 ^{3.8} ~ 10 ⁵ PFU, 滴鼻感染	2 d 血液、鼻腔、肺、脾 和十二指肠可检测到 病毒;5 d 脑、气管、 肝、肾和血清内检测 到病毒,肺和鼻腔病 毒滴度最高;7 d 脑和 肝病毒急剧增加;9 d 病毒滴度下降。	肺和气管呈局部或弥散性肺间隔增宽、水 肿,毛细血管渗出;电镜可见气管和支气管 上皮细胞损坏,细胞核变形,上皮细胞、粘膜 固有层结蹄组织和下层血管内皮细胞可见 病毒颗粒;气管和支气管粘膜的坏死蔓延至 固有层;粘膜及下层毛细血管内皮细胞核浓 缩凋亡,可见病毒颗粒。	7~13 d 出现化脓 性结膜炎、眼睑炎 和竖毛。	[39]
兔 Rabbit	成年兔 Adult rabbit	每只 10 ⁷ PFU, 静 脉 注射	感染初期可从血液中 分离到病毒,7 d 后可 从淋巴结和肾分离到 病毒,部分动物睾丸 可分离到病毒。	未检测	发热、结膜炎、鼻 炎,5~6 d 皮疹, 发展为脓疱,甚至 出血,极少数动物 死亡(1/12)。	[9, 39]
	10 日龄兔 10-day- old Rabbit	每只 10 ⁶ ~ 10 ⁷ PFU, 经 口感染	可从血液、肺、肝、肾 和脾内分离到病毒。	未检测	4~6 d 皮疹、厌食 和腹泻,继发化脓 性结膜炎和鼻炎, 皮疹扩散至全身, 体重下降,4~14 d 内死亡。	
		每只 10 ⁶ ~ 10 ⁷ PFU, 滴 鼻感染	未检测	未检测	厌食和体重下降, 4~5 d 内死亡,但 未出现皮疹。	

现对动物接种一次疫苗,4 周后再进行猴痘病毒感染时存活率为 100%,而安慰剂对照组动物死亡率为 100%。传统的天花疫苗和第二代疫苗接种依赖于病毒的复制,此类疫苗虽然效果较好,但存在一定的副反应。第三代疫苗是复制缺陷型的减毒疫苗,但由于天花已经被消灭,无法通过 III 期临床试验来证实其有效性,Hatch 等^[46]用食蟹猴模型评价了第三代天花疫苗对猴痘病毒感染的有效性,从而评估其对天花病毒的有效性,实验证实单次接种第三代疫苗不能完全避免严重/致死性的感染,而加强接种则可有效保护动物。

参考文献:

[1] Kozlov M. Monkeypox goes global; why scientists are on alert [J]. Nature, 2022, 606(7912): 15–16.

[2] Mahase E. Seven monkeypox cases are confirmed in England [J]. BMJ, 2022, 377: o1239.

[3] Jezek Z, Gromyko AI, Szczeniowski MV. Human monkeypox [J]. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1983, 27(1): 13–28.

[4] Mahase E. Monkeypox: What do we know about the outbreaks in Europe and North America? [J]. BMJ, 2022, 377: o1274.

[5] Mccollum AM, Damon IK. Human monkeypox [J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(2): 260–267.

[6] Jezek Z, Grab B, Szczeniowski MV, et al. Human monkeypox: secondary attack rates [J]. Bull World Health Organ, 1988, 66(4): 465–470.

[7] Nguyen PY, Ajisegiri WS, Costantino V, et al. Reemergence of human monkeypox and declining population immunity in the context of urbanization, Nigeria, 2017–2020 [J]. Emerg Infect Dis, 2021, 27(4): 1007–1014.

[8] Alakunle E, Moens U, Nchinda G, et al. Monkeypox virus in nigeria; infection biology, epidemiology, and evolution [J]. Viruses, 2020, 12(11): 1257.

[9] Marennikova SS, Seluhina EM. Susceptibility of some rodent species to monkeypox virus, and course of the infection [J]. Bull World Health Organ, 1976, 53(1): 13–20.

[10] Jezek Z, Szczeniowski M, Paluku KM, et al. Human

- monkeypox; clinical features of 282 patients [J]. J Infect Dis, 1987, 156(2): 293–298.
- [11] Mbala PK, Huggins JW, Riu-Rovira T, et al. Maternal and fetal outcomes among pregnant women with human monkeypox infection in the democratic republic of congo [J]. J Infect Dis, 2017, 216(7): 824–828.
 - [12] Bayer-Garner IB. Monkeypox virus; histologic, immunohistochemical and electron-microscopic findings [J]. J Cutan Pathol, 2005, 32(1): 28–34.
 - [13] Li Y, Olson VA, Laue T, et al. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays [J]. J Clin Virol, 2006, 36(3): 194–203.
 - [14] Li Y, Zhao H, Wilkins K, et al. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA [J]. J Virol Methods, 2010, 169(1): 223–227.
 - [15] Keasey S, Pugh C, Tikhonov A, et al. Proteomic basis of the antibody response to monkeypox virus infection examined in cynomolgus macaques and a comparison to human smallpox vaccination [J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15547.
 - [16] Weaver JR, Isaacs SN. Monkeypox virus and insights into its immunomodulatory proteins [J]. Immunol Rev, 2008, 225: 96–113.
 - [17] Huhn GD, Bauer AM, Yorita K, et al. Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease [J]. Clin Infect Dis, 2005, 41(12): 1742–1751.
 - [18] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update; multistate outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2003, 52(27): 642–646.
 - [19] Cann JA, Jahrling PB, Hensley LE, et al. Comparative pathology of smallpox and monkeypox in man and macaques [J]. J Comp Pathol, 2013, 148(1): 6–21.
 - [20] Goff AJ, Chapman J, Foster C, et al. A novel respiratory model of infection with monkeypox virus in cynomolgus macaques [J]. J Virol, 2011, 85(10): 4898–4909.
 - [21] Zaucha GM, Jahrling PB, Geisbert TW, et al. The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. Lab Invest, 2001, 81(12): 1581–1600.
 - [22] Mucker EM, Chapman J, Huzella LM, et al. Susceptibility of marmosets (*Callithrix jacchus*) to monkeypox virus; a low dose prospective model for monkeypox and smallpox disease [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e131742.
 - [23] Xiao SY, Sbrana E, Watts DM, et al. Experimental infection of prairie dogs with monkeypox virus [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(4): 539–545.
 - [24] Hutson CL, Olson VA, Carroll DS, et al. A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus [J]. J Gen Virol, 2009, 90(2): 323–333.
 - [25] Marennikova SS, Shelukhina EM, Zhukova OA. Experimental infection of squirrels *Sciurus vulgaris* by monkey pox virus [J]. Acta Virol, 1989, 33(4): 399.
 - [26] Hutson CL, Damon IK. Monkeypox virus infections in small animal models for evaluation of anti-poxvirus agents [J]. Viruses, 2010, 2(12): 2763–2776.
 - [27] Tesh RB, Watts DM, Sbrana E, et al. Experimental infection of ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) with monkeypox virus [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(9): 1563–1567.
 - [28] Khodakevich L, Jezek Z, Kinzanka K. Isolation of monkeypox virus from wild squirrel infected in nature [J]. Lancet, 1986, 1(8472): 98–99.
 - [29] Khodakevich L, Szczeniowski M, Manbu-Ma-Disu, et al. The role of squirrels in sustaining monkeypox virus transmission [J]. Trop Geogr Med, 1987, 39(2): 115–122.
 - [30] Hutson CL, Lee KN, Abel J, et al. Monkeypox zoonotic associations: insights from laboratory evaluation of animals associated with the multi-state US outbreak [J]. Am J Trop Med Hyg, 2007, 76(4): 757–768.
 - [31] Falendysz EA, Lopera JG, Doty JB, et al. Characterization of Monkeypox virus infection in African rope squirrels (*Funisciurus sp.*) [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11(8): e0005809.
 - [32] Hutson CL, Lee KN, Abel J, et al. Monkeypox zoonotic associations: insights from laboratory evaluation of animals associated with the multi-state US outbreak [J]. Am J Trop Med Hyg, 2007, 76(4): 757–768.
 - [33] Falendysz EA, Lopera JG, Lorenzsonn F, et al. Further assessment of monkeypox virus infection in gambian pouched rats (*crictomys gambianus*) using *in vivo* bioluminescent imaging [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(10): e0004130.
 - [34] Hutson CL, Nakazawa YJ, Self J, et al. Laboratory investigations of African pouched rats (*crictomys gambianus*) as a potential reservoir host species for monkeypox virus [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(10): e0004013.
 - [35] Schultz DA, Sagartz JE, Huso DL, et al. Experimental infection of an African dormouse (*Graphiurus kelleni*) with monkeypox virus [J]. Virology, 2009, 383(1): 86–92.
 - [36] Martin DB. The cause of death in smallpox; an examination of the pathology record [J]. Mil Med, 2002, 167(7): 546–551.
 - [37] Osorio JE, Iams KP, Meteyer CU, et al. Comparison of monkeypox viruses pathogenesis in mice by *in vivo* imaging [J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6592.
 - [38] Hutson CL, Abel JA, Carroll DS, et al. Comparison of West African and Congo Basin monkeypox viruses in BALB/c and C57BL/6 mice [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8912.
 - [39] Sergeev AA, Kabanov AS, Bulychev LE, et al. The possibility of using the ICR mouse as an animal model to assess antimonkeypox drug efficacy [J]. Transbound Emerg Dis, 2016, 63(5): e419–e430.
 - [40] Hutson CL, Kondas AV, Ritter JM, et al. Teaching a new mouse old tricks: Humanized mice as an infection model for Variola virus [J]. PLoS Pathog, 2021, 17(9): e1009633.
 - [41] Smith SK, Self J, Weiss S, et al. Effective antiviral treatment of

systemic orthopoxvirus disease: ST-246 treatment of prairie dogs infected with monkeypox virus [J]. J Virol, 2011, 85(17): 9176-9187.

[42] Saijo M, Ami Y, Suzuki Y, et al. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates [J]. J Gen Virol, 2009, 90(9): 2266-2271.

[43] Hutson CL, Carroll DS, Self J, et al. Dosage comparison of Congo Basin and West African strains of monkeypox virus using a prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease [J]. Virology, 2010, 402(1): 72-82.

[44] Hutson CL, Carroll DS, Gallardo-Romero N, et al. Comparison of monkeypox virus clade kinetics and pathology within the prairie dog animal model using a serial sacrifice study design [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 965710.

[45] Hutson CL, Carroll DS, Gallardo-Romero N, et al. Monkeypox disease transmission in an experimental setting: prairie dog animal model [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28295.

[46] Hatch GJ, Graham VA, Bewley KR, et al. Assessment of the protective effect of Imvamune and Acam2000 vaccines against aerosolized monkeypox virus in cynomolgus macaques [J]. J Virol, 2013, 87(14): 7805-7815.

[收稿日期] 2022-06-05

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 研究的三大类模型: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>)。

刘柏东,申高,邱宏,等. 医用激光设备动物试验的决策与审评要求探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 148-154.
Liu BD, Shen G, Qiu H, et al. Discussion on the decision and evaluation requirements of animal experiment of medical laser equipment [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 148-154.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.022

医用激光设备动物试验的决策与审评要求探讨

刘柏东¹, 申 高¹, 邱 宏¹, 陈民利^{2*}

(1. 国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心, 北京 100081;
2. 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】 医用激光设备是向人体靶组织输出能量的电气设备,动物试验是激光设备开展非临床/临床评价的重要手段之一,也可作为该类设备在临床试验前提供安全性和有效性的证据。本文通过参考现有医疗器械动物试验相关的法规、标准、指南,分析医用激光设备的作用机理;结合常见激光治疗设备的审评经验,概述了激光治疗设备决策开展动物试验研究的考量因素及规范要求;并举例分析了开展动物试验的目的、方案设计要求和评价指标;为医用激光治疗设备的动物试验研究提供参考,也可供该类医疗器械相关的技术审评人员及注册人员参考。

【关键词】 医用激光设备;临床前动物试验;审评要求

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0148-07

Discussion on the decision and evaluation requirements of animal experiment of medical laser equipment

LIU Bodong¹, SHEN Gao¹, QIU Hong¹, CHEN Minli^{2*}
(1. Center for Medical Device Evaluation. NMPA, Beijing 100081, China.
2. Laboratory Animal Research Center/Institute of Comparative Medicine, Hangzhou 310053)

【Abstract】 Medical laser equipment is an electrical equipment that outputs energy to human target tissues. Animal experiment is one of the important method for preclinical/clinical evaluation of laser equipment, and it can also be used as evidence of safety and effectiveness of such equipment before clinical trials. This article analyzes the mechanism of action of medical laser equipment by referring to existing regulations, standards, and guidelines related to animal experiment of medical equipment. Based on the evaluation experience of common laser therapy equipment, the factors and standard requirements for the decision making of animal experiments with laser therapy equipment were summarized. In addition, design requirements and evaluation indexes of animal tests were analyzed with examples. The purpose of this paper is to provide a reference for the animal experimental study of medical laser therapy equipment, as well as for the technical reviewers and registrants related to this medical device.

【Keywords】 medical laser equipment; animal experiment; evaluation requirements

随着激光技术的进步,激光医学也发展成新型交叉学科^[1]。在临床活动中,激光作为电气设备的光源,主要应用于诊断和治疗。典型的用于诊断的

产品有光学相干断层扫描设备^[2]、激光扫描检眼镜等^[3];激光治疗分为强激光治疗、弱激光治疗、光动力治疗^[4]。弱激光治疗是指激光作用于生物组织

[作者简介] 刘柏东(1982—),男,硕士,助理研究员,研究方向:医疗器械技术审评。E-mail:liubd@cmde.org.cn
[通信作者] 陈民利(1963—),女,教授,博士生导师,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail:cmli991@zcmu.edu.cn

时不造成不可逆的损伤,但刺激机体产生一系列的生理生化反应,对组织或机体起到调节、增强或抑制作用来达到治疗疾病的目的^[5]。光动力治疗主要通过光敏剂在特定波长激光的激活下,产生光物理化学反应,生成具有生物毒性的活性氧物质作用于靶组织,进而实施靶向治疗^[6]。强激光治疗是利用激光的光热效应,对生物组织进行凝固、汽化或切割来达到消除病变的目的。强激光治疗因具有出血少、操作定位精确、非接触、无菌、对周围组织损伤小等优点,已广泛应用于皮肤科、眼科、泌尿外科、口腔科、耳鼻喉科等。常见的获得医疗器械注册证的产品有半导体激光脱毛仪^[7]、眼科倍频 Nd:YAG 激光光凝仪、钬激光治疗仪^[8]、半导体激光治疗仪^[9]、二氧化碳激光治疗仪^[10]等。本文概述医用激光设备的工作原理和使用功能,并对激光治疗类产品决策开展动物试验和规范要求进行探讨。

1 医用激光设备概述

1.1 注册单元

根据 2017 版《医疗器械分类目录》^[11],医用激光治疗类设备包括:(1)激光手术设备,参考分类编码 01-02-01,管理类别三类;预期用途为对机体组织进行汽化、碳化、凝固,以达到手术治疗的目的。(2)眼科激光治疗设备,参考分类编码 16-05-02,管理类别三类;预期用途为屈光矫正、角膜切割、青光眼、白内障、或视网膜病变等眼科疾病的手术治疗。(3)激光治疗设备:参考分类编码 09-03-01,管理类别三类;预期用途为用于皮肤浅表性病变、烧伤等整形科、皮肤科的治疗或辅助治疗。一般情况下,激光手术设备用于手术室,分类属于 01;激光治疗设备用于门诊手术,分类属于 09。

1.2 工作原理与用途

按照注册单元中三种不同预期用途的情况,分别以钬激光治疗仪(分类编码 01-02-01)、眼科激光光凝仪(分类编码 16-05-02)、Nd:YAG 皮秒激光治疗仪(分类编码 09-03-01)举例说明产品的工作原理与使用功能。

1.2.1 钬激光治疗仪

钬激光治疗仪是由主机(含钬激光激光器、激光电源、冷却装置、防护装置)、脚踏开关、光纤、激光防护眼镜等组成,可用于泌尿系结石和泌尿系肿瘤的汽化、切割、凝固,皮肤科尖锐湿疣、肉芽肿、肿瘤的汽化、切割、凝固^[12-17]。激光发生的原理,以

2.1 μm 激光器为例,激光腔包括一个激光发生单元、一个高反射镜和一个输出耦合镜。激光发生单元包含钬铝石榴石(Ho:YAG)晶体棒、一个激光激励源闪光灯和一个聚光腔。聚光腔将闪光灯的光线聚焦到晶体棒上,被反射镜引入光路,再将瞄准光耦合进主光束中,通过聚焦透镜引入到光纤,用于照射治疗部位。钬激光碎石的原理是 2.1 μm 的激光主要被结石中的水分吸收,能量蓄积到一定程度,局部结石温度上升,直至达到临界。在该临界值下,结石成分可能会脱水、分解成小结石,或者结石中的间隙水可能会发生爆裂汽化,达到治疗的目的^[9-10]。

1.2.2 眼科激光光凝仪

眼科激光光凝仪是由激光器、裂隙灯显微镜、脚踏开关、裂隙灯适配器、激光防护眼镜、支架台等组成,可用于眼科的视网膜激光光凝术、激光小梁成形术、虹膜切开术、虹膜成形术,以及治疗开角型青光眼和闭角型青光眼等^[18-22]。激光发生的原理,以 577 nm 为例,在激光腔中,半导体泵浦源发射泵浦光,经过准直后照射到工作物质 OPS 芯片,在 OPS 芯片内发生受激辐射;辐射出的光子在 OPS 芯片内的反射层和激光腔的反射镜之间谐振放大,形成 1154 nm 激光震荡;1154 nm 激光,经过激光腔内 LBO 晶体倍频后,产生二次谐波效应,转化为 577 nm 激光,透过 OC 镜(输出耦合镜)输出,再经过聚焦等光学处理,从激光耦合口输出,通过裂隙灯适配器将激光引导到患者眼中。光凝的原理是 577 nm 的激光主要被脉络膜血管中的氧化血红蛋白和视网膜色素上皮层的黑色素吸收,黄斑区的叶黄素几乎不吸收,通过激光的热效应,导致组织温度升高,蛋白质变性,达到光凝的效果^[10,23]。

1.2.3 Nd:YAG 皮秒激光治疗仪

Nd:YAG 皮秒激光治疗仪是由主机(含激光器、激光电源、控制面板、冷却装置)、导光臂、脚踏开关、治疗手具(532 nm、1064 nm)、激光防护眼镜等组成,可用于治疗真皮和表皮色素性病变,如激光祛红血丝、激光祛斑、皮秒激光、激光去文身、洗眉、洗眼线等^[24-27]。激光发生的原理,以半导体泵浦的固体 532 nm 激光为例,激光二极管发射 810 nm 泵浦光,泵浦光经过聚焦准直后照射至激光工作物质 Nd:YAG),发生受激辐射后激发出 1064 nm 光子;1064 nm 光子在前镜和输出镜之间反射,互相之间不断发生相干放大形成 1064 nm 激光;1064 nm 激

光经过倍频晶体后,发生非线性光学效应中的二次谐波效应,一部分转化为 532 nm 激光,透过输出镜形成 532 nm 激光输出;532 nm 激光经过偏振片和分光镜,小部分被发射至能量探测器,转化为电信号反馈至控制及安全电路,大部分输出至光纤聚焦镜,经过光纤聚焦镜后,与调节至同光路的瞄准光,一起从激光耦合口输出,通过手具将激光引导到治疗部位。Nd:YAG 皮秒激光治疗仪去除文身、治疗雀斑的原理是基于激光选择性的光热作用,针对表皮和真皮中的黑色素特异性较高,可用于治疗良性色素性病变^[28-29]。

2 决策开展动物试验

在临床上,在一定条件下,利用激光设备作用于同一组织的能量恒定,如果功率提高,手术时间就减少,手术效率也会提高。但不同靶组织特性不同,如利用眼科激光光凝仪对视网膜进行光凝时,眼内组织厚度值较低,尤其是视网膜组织,功率提高也许会伤害视神经细胞,增加视野范围减小、视功能减退的风险;若调整脉宽、脉冲间隔,延长手术时间,会导致热能量累积,增加传导至周边组织的风险,也会影响视野范围、视功能。理论上,组织的温升由热传导效率和热弛豫时间决定,如果激光作用于组织的时间小于热弛豫时间,组织中的热量积累不会因热传导损伤靶组织的周边组织。因此,衡量激光设备安全有效性的关键证据之一是量效关系及热损伤的研究资料。量效关系及热损伤研究应为申报产品临床前的体内外试验(离体及在体的动物试验、台架试验等)、临床试验等一项或多项研究所获得数据的分析和总结。

根据《医疗器械动物试验研究技术审查指导原则第一部分:决策原则》,当体外试验不能充分评估激光设备在临床应用中的安全有效性风险时,需要开展体内动物试验。通过动物试验,可为产品设计定型提供相应的证据支持,也可开展临床试验前,评估医疗器械能否用于人体研究提供支持,降低临床试验受试者及使用者的风险以及为临床试验设计提供参考。

在申报产品的研发早期,设计输入及输出的阶段时,激光产品的性能评估可选择台架试验或离体组织试验,如钬激光治疗仪可开展体外试验,模拟体内使用环境或情形,验证在不同工作模式/能量参数设置的情况下产品用于碎石的效率,然后再开

展动物试验;如已有类似的初步研究或证据时,也可直接开展动物试验研究。

激光设备可以通过动物试验评价在不同波长下的各种工作模式、激光输出方式等对临床使用(包括各种适应症或各种类型的组织)的影响。应当对申报产品能量参数的设置、激光与靶组织的作用机理、适用范围及适应症等因素进行综合考量,结合已有的研究或证据,开展适当的风险分析评估后,决策是否需要开展动物试验。决策时至少应当评估以下几种情形:

(1)相比于成熟已上市的产品,选择一种新的激光波长作用于原适用范围中的靶组织或增加新的适应症。例如:已上市的产品中,Nd:YAG 皮秒激光治疗仪的激光传输装置为手柄,532 nm 用于治疗雀斑、1064 nm 用于去除黑色和蓝色文身。根据皮肤分层及分级,同样作用于黑色素,由于不同波长的激光穿透深度不同,靶组织也不同。常见的良性色素增加性皮肤病包括:色素分界线、雀斑、黄褐斑、蒙古斑(皮肤青、蓝色胎记)、咖啡斑、单纯雀斑样痣(单纯黑子、痞子)、老年性雀斑样痣(老年性黑子、寿斑)、太田痣、伊藤痣、文身等及其他原因引起的色素沉着等。根据皮肤科常见的应用情况,532 nm 作用于表皮层黑色素,694 nm 和 755 nm 可作用于真皮层、表皮层黑色素,1064 nm 进而作用于真皮深部的黑色素。若申报产品的 730 nm 用于治疗良性色素性增加性皮肤病,属于新的激光波长增加新的适应症;若 730 nm 用于治疗良性表皮色素性增加性皮肤病、恶性黑素瘤,属于选择一种新的激光波长作用于原适用范围中的靶组织。

(2)相比于成熟已上市的产品,选择一种新的作用机理作用于原适用范围中的靶组织或增加新的适应症。以输出 577 nm 的眼科激光光凝仪为例,成熟已上市产品采用的是连续波及脉冲波的情况,通过激光的热效应,针对视网膜微血管缺血区或毛细血管无灌注区进行治疗,阻止眼内新生血管的发生和发展,改变视网膜区域的缺氧状态。可用于治疗糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞等。新的激光输出方式是通过软件控制调制出阈值下的脉冲波,通过激光的热效应产生生物学效应,产生“阈值”(激光凝固组织所需的能量的临界值)下的脉冲波,作用于视网膜色素上皮层,视网膜色素上皮细胞产生中等程度损伤,引起部分因子发生变化,可以减少新生血管及改变血管通透性,用于治疗中心

性浆液性脉络膜视网膜病变,糖尿病视网膜病变以及视网膜静脉阻塞引起的黄斑水肿,属于选择一种新的激光输出方式增加新的适应症。

(3)相比于成熟已上市的产品,选择一种新的能量参数范围作用于原适用范围中的靶组织或增加新的适应症,如申报产品设置的治疗参数(功率、脉宽、脉冲间隔、光斑大小等)与已上市产品有明显差异的情形。以钬激光治疗仪为例,已批准的产品关键性能参数是最大单脉冲能量为 4.6 J,最大重复频率为 42 Hz,终端最大平均输出功率为 80 W,脉宽为 200~500 μ s,适用范围是用于治疗泌尿系结石,泌尿系肿瘤的汽化和凝固。新的能量参数设置是最大单脉冲能量为 6 J,最大重复频率为 50 Hz,终端最大平均输出功率为 90 W,若适用范围不变,属于选择一种新的能量参数范围作用于原适用范围中的靶组织;若适用范围增加了皮肤科用于尖锐湿疣、肉芽肿、浅表肿瘤的汽化和凝固,属于选择一种新的能量参数范围增加新的适应症。

3 动物试验审评要求

3.1 动物试验规范基本要求

依据《医疗器械动物试验研究注册审查指导原则第二部分:试验设计、实施质量保证》,医用激光设备的动物试验要根据试验目的,选用符合试验要求的动物,在预先设计研究方案规定下,进行产品可行性和/或安全性和/或有效性研究,观察、记录动物的反应过程及结果,以评估医用激光设备对生命活动的作用与影响,动物试验数据应具有重复性和再现性。为保障动物试验结果的真实、可靠、可追溯,应参照相关国家标准(GB/T 35823)动物试验的通用要求进行,并要注意以下几个方面。

3.1.1 人员

动物试验研究人员应具备相应的技能且涵盖不同学科的专业知识,如相关的临床医学、动物学、兽医学、激光学、病理学、医学检验学、影像学等。

3.1.2 设施

开展动物试验的环境应避免对试验结果造成干扰的因素,如噪音刺激、光污染、化学污染、辐射污染等,同时,应能模拟临床使用场景。

3.1.3 动物

应根据不同的试验目的选择使用质量合格的试验动物或检疫合格的试验用动物。建议详细说明选择试验动物模型的依据。如选择的试验动物

模型对于产品应用于人体的安全有效性分析具有局限性,应对研究结果的影响进行详细说明。试验动物数量应保证试验结果具有可靠性,且符合 3R 原则。

3.1.4 操作规范

动物试验应严格按照研究方案和相应的操作规范,记录试验产生的所有数据包括任何偏离试验方案和操作规范的情况,并保证数据记录及时、直接、准确、清晰和不易消除。确保动物试验记录、数据的完整性和可追溯性。

3.2 动物试验设计基本要求

开展决策评估时,当已有数据不能充分评估激光设备在临床应用中的安全有效性的风险时,需要开展体内动物试验。动物试验的方案设计及结果应能反映激光设备在不同波长下的各种工作模式或激光输出方式与作用于靶组织位点的量效关系,根据不同的适应症可进行相应的典型性试验。还应验证申报产品不同能量参数对靶组织及周边非治疗区域热扩散情况。动物试验的研究结果应可以更客观、完整地提供支持激光产品作用于靶组织的可行性、安全性、有效性的证据。

3.2.1 动物试验目的

根据决策评估的情形,开展动物试验设计前,明确试验目的。例 1:钬激光治疗仪,通过调节脉宽或提高功率,输出新的能量参数(终端最大平均输出功率、单脉冲最大能量、最大重复频率等)作用于原适用范围中的靶组织,试验目的为通过观察猪的膀胱组织表面损伤及愈合情况、碎石残留情况,评估量效关系及热损伤范围,考核产品用于泌尿系碎石,汽化和凝固泌尿系肿瘤的安全性和有效性。例 2:眼科激光光凝仪,选择一种新的激光波长增加新的适应症,试验目的为通过观察兔的视网膜光凝反应,热损伤范围,并评估量效关系,考核产品治疗视网膜疾病的安全性。例 3:二氧化碳激光治疗仪,增加超脉冲的激光输出方式,新适应症为治疗良性表皮色素性增加性皮肤病。试验目的为观察棕色豚鼠的皮肤组织中的黑色细胞及黑素颗粒去除情况,观察皮肤组织损伤及愈合情况,评估量效关系及热损伤范围,考核产品用于治疗良性表皮色素性增加性皮肤病的安全性和有效性。

3.2.2 试验方案设计基本要求

选择已在中国获准上市、具有相同或更宽的适用范围、市场反应良好的激光设备进行随机平行对

照。应设置可反映申报产品量效关系的能量参数进行试验,且应当能够涵盖产品技术要求中的性能参数范围,如波长、光斑大小、激光输出方式、功率、脉宽及脉冲间隔、占空比等关键参数。试验组及对照组的能量参数设置应相同/相似且应满足临床需求。确保每次试验前,动物/靶组织都处于相同的生理状态,且能证明可用于开展动物试验。

3.2.3 评价方法及指标

安全性,主要通过观察激光设备对治疗区域内靶组织及周边组织的热损伤范围。可以采用组织病理学或 OCT 等方法对对急性及慢性热损伤情况进行评估,应评估不同时间点,试验组与对照组的凝固带最大宽度及最大深度、水肿、细胞空泡化等情况,提供对比表并附图并分析热损伤范围对临床使用的影响。

有效性,通常应分析试验组和对照组的激光仪治疗相同/相近/相似的靶组织,使用能量的差异。试验结果应给出梯度能量与治疗靶组织的量效关系图,应至少包含组别、波长、工作模式、治疗能量参数的范围、靶组织的变化,并给出有效能量参数范围。

例 1:应分析试验组和对照组的钬激光治疗仪治疗相同大小的结石,比较能量参数、碎石效果、碎石时间、碎石残留量的差异并进行组间分析。有效性评价指标至少应包含:碎石能量、碎石时间、碎石效果及残留量、损伤膀胱组织能量;安全性评价指标至少应包含:膀胱组织病理学、动物存活率、血及尿生化指标、其它生理状况、与术前相比是否存在尿路感染、膀胱穿孔、继发性血尿等。有些钬激光治疗仪的适用范围还包括汽化和凝固泌尿系肿瘤,考虑动物模型的经济性及便利性,可通过比较治疗仪作用于正常尿路上皮组织,给出梯度能量与汽化、凝固组织厚度的量效关系图,分析试验结果对临床使用的影响。

例 2:利用 Nd:YAG 皮秒激光治疗仪/二氧化碳激光治疗仪治疗良性色素性增加性皮肤病。有效性,评价试验组和对照组的激光仪治疗相同区域的黑色素,比较能量参数、治疗时间、色素沉着、黑色素颗粒的差异并进行组间分析。安全性评价,观察并分析术后动物存活率、皮肤组织病理学、术后并发症。有效性评价指标应至少包含:治疗能量、治疗时间、色素沉着评分、黑色素颗粒计数等;安全性评价指标应至少包含:皮肤组织病理学、皮肤感染、

红肿、出血、出现疤痕等。

例 3:由于动物与人眼组织的差异,眼科激光光凝仪的评价指标应体现可行性及安全性。通过观察光凝反应分析术前、术后的视网膜厚度、脉络膜厚度、光斑大小及形态变化情况,给出能量(梯度功率)与术前后视网膜、脉络膜厚度变化的量效关系图;通过检眼镜/裂隙灯显微镜观察视网膜损伤斑,计算损伤发生率(损伤斑数/照射斑数),给出光凝仪不同波长、不同激光输出方式下对试验动物的视网膜热损伤阈值的评价,按照梯度功率绘制损伤发生率与能量的关系表。主要评价指标应包含:视网膜组织形态学及组织病理学变化。次要评价指标应包含:与激光光凝术前相比,是否存在视网膜前和视网膜下的纤维化及增殖、视网膜出血、新生血管形成、激光斑扩大、视网膜水肿等。

4 讨论

医用激光设备是通过向人体输出能量达到治疗目的的高风险设备,临床前动物试验的目的是通过动物模型来考察激光产品的可行性、安全性和有效性,可为制定临床方案选择合理治疗参数提供建议,并观察潜在的不良事件,降低临床活动中的风险。目前,我国医疗器械临床前的安全性评价现状是无相关的质量管理规范,无试验室资质要求。建议申请人根据申报产品的实际情况,决策开展动物试验的情形,通过选择合理的动物试验方案,验证激光产品的可行性、有效性和安全性,保证研究数据的科学性、真实性和可追溯。

4.1 动物模型的考量

申请人可根据产品的实际预期用途,开展动物试验的目的综合评估后决策。眼科研究的常用实验动物包括小鼠、大鼠、兔、比格犬、小型猪、猴等^[30-31],但普遍存在生理结构及功能与人眼有不同差异的情形,如小鼠、大鼠、兔、犬、小型猪等动物不存在类似于人眼的黄斑区^[32],无法验证激光产品治疗黄斑区疾病的有效性,只能通过试验组与对照组的产作用于试验动物眼后,比较视网膜厚度的变化情况评估激光产品的可行性及安全性。此外,还需考虑开展动物试验的经济性、便利性等因素,恒河猴眼与人眼相似度较高,但动物试验成本较高。因此,本文动物试验举例仅作参考。

4.2 研究观察时间点

动物试验应能观察到产品作用于动物之前、之

后不同时间点的组织状态,研究中选择的观察时间点,应有合理依据。由于试验动物模型和人体之间组织损伤与愈合应答存在差异,且不同激光产品能量参数设置也存在差异性,因此,应合理设置最终观察时间点。同时,尽可能对临床相关的安全性事件进行观察,分析对临床使用的影响。

4.3 决策方案中的试验与对照组

按照《医疗器械临床试验质量管理规范》、《医疗器械临床评价指导原则》,医用激光治疗设备可以通过同品种医疗器械临床试验或临床试用获得的数据开展评价(同品种比对)。若需要开展临床试验,动物试验应在临床试验前完成,可为临床试验的方案设计提供依据,并可预测在临床试验中可能出现的不良事件,降低临床试验受试者和临床使用者承担的风险。如果只有试验组无对照组的数据,可以作为申报产品开展临床试验前的研究资料;如果同时有试验组及对照组的数据,可以作为开展临床试验前的研究资料,也可作为通过同品种比对开展临床评价时用于证明安全性和有效性的支持性资料。

综上所述,本文在参考《药物非临床研究质量管理规范》、《医疗器械动物试验研究技术审查指导原则第一部分:决策原则》、《医疗器械动物试验研究注册审查指导原则第二部分:试验设计、实施质量保证》等规范性文件基础上,结合审评经验,分析医用激光设备的作用机理,归纳强激光治疗类产品决策开展动物试验的情形,并举例分析开展动物试验的目的、方案设计要求和评价指标等,为医疗器械相关技术审评人员、研发人员及注册人员提供参考。

参考文献:

- [1] 邱海霞,李布洪,马辉,等.我国激光技术医疗应用和产业发展战略研究[J].中国工程科学,2020,22(3):14-20.
- [2] Swanson EA, Fujimoto JG. The ecosystem that powered the translation of OCT from fundamental research to clinical and commercial impact [J]. Biomed Opt Express, 2017, 8(3): 1638-1664.
- [3] Guitera P, Menzies SW, Longo C, et al. *In vivo* confocal microscopy for diagnosis of melanoma and basal cell carcinoma using a two-step method: Analysis of 710 consecutive clinically equivocal cases [J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(10): 2386-2394.
- [4] Niemz NH. Laser-Tissue Interaction [M]. Berlin: Springer; 2007.
- [5] Avci P, Gupta A, Sadasivam M, et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: Stimulating, healing, restoring [J]. Semin Cutan Med Surg, 2013, 32(1): 41-52.
- [6] Allison RR, Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms [J]. Clin Endosc, 2013, 46(1): 24-29.
- [7] Peng Q, Juzeniene A, Chen JY, et al. Lasers in medicine [J]. Rep Prog Phys, 2008, 71(5): 1-28.
- [8] Tracey J, Gagin G, Morhardt D, et al. Ureteroscopic high-frequency dusting utilizing a 120W holmium laser [J]. J Endourol, 2018, 32(4): 290-295.
- [9] Blackmon RL, Irby PB, Fried NM. Comparison of holmium: YAG and thulium fiber laser lithotripsy: ablation thresholds, ablation rates, and retropulsion effects [J]. J Biomed Opt, 2011, 16(7): 071403.
- [10] Lavinsky D, Sramek C, Wang J, et al. Subvisible retinal laser therapy: titration algorithm and tissue response [J]. Retina, 2014, 34(1): 87-97.
- [11] 国家食品药品监督管理总局关于发布医疗器械分类目录的公告(2017年第104号)[EB/OL]. [2017-08-31]. <https://www.nmpa.gov.cn/ylqx/ylqxggtg/ylqxqtgg/20170904150301537.html>.
- [12] Kronenberg P, Somani B. Advances in lasers for the treatment of stones-a systematic review [J]. Curr Urol Rep, 2018, 19(6): 45.
- [13] Jin P, Jing W, Zhan W, et al. Efficacy and safety of laparoscopic holmium laser lithotripsy in the treatment of complicated biliary calculus: A PRISMA-compliant systematic reviews and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(4): e14286.
- [14] Scoffone CM, Cracco CM. Prostate enucleation better with low or high-power holmium laser? A systematic review [J]. Arch Esp Urol, 2020, 73(8): 745-752.
- [15] 任秀朋,崔微微.宫腔镜下钬激光治疗子宫黏膜下肌瘤的效果及对性激素、性生活质量的影响[J].解放军医药杂志, 2021, 33(2): 70-74.
- [16] 王振誉,朱华,张冰,等.经尿道钬激光整块切除手术治疗非肌层浸润性膀胱癌的疗效分析[J].临床泌尿外科杂志, 2021, 36(10): 789-791, 795.
- [17] 江杰,顾志波,陈建刚,等.高低功率钬激光剜除治疗不同体积良性前列腺增生的疗效分析[J].中国临床医学, 2021, 28(5): 846-852.
- [18] Cohn AC, Wu Z, Jobling AI, et al. Subthreshold nano-second laser treatment and age-related macular degeneration [J]. J Clin Med, 2021, 10(3): 484.
- [19] Evans JR, Michelessi M, Virgili G. Laser photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2014, 2014(11): CD011234.
- [20] Eng VA, Leng T. Subthreshold laser therapy for macular oedema from branch retinal vein occlusion: focused review [J]. Br J Ophthalmol, 2020, 104(9): 1184-1189.
- [21] Yoshihiro T, Shogo A, Seiji M, et al. Panretinal photocoagulation using short-pulse laser induces less inflammation and macular thickening in patients with diabetic retinopathy [J].

J Ophthalmol, 2017, 2017: 8530261.

[22] Findlay Q, Jobling AI, Vessey KA, et al. Prophylactic laser in age-related macular degeneration: the past, the present and the future [J]. Eye, 2018, 32(5): 972-980.

[23] Szymanska J, Goralczyk K, Klawe JJ, et al. Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growthbeta secretion [J]. J Physiol Pharmacol, 2013, 64(3): 387-391.

[24] 韩玉, 关欣, 苏明山. 1064/532nm 皮秒激光和纳秒激光治疗文身的疗效对比观察 [J]. 临床皮肤科杂志, 2021, 50(6): 360-363.

[25] Heidari Beigvand H, Razzaghi M, Rostami-Nejad M, et al. Assessment of laser effects on skin rejuvenation [J]. J Lasers Med Sci, 2020, 11(2): 212-219.

[26] 杨雅娇, 郑佳兴, 杨高云. Nd:YAG 皮秒激光治疗黄褐斑临床疗效及安全性研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(5): 552-555.

[27] Santos MOD, Latrive A, De Castro PAA, et al. Multimodal evaluation of ultra-short laser pulses treatment for skin burn injuries [J]. Biomed Opt Express, 2017, 8(3): 1575-1588.

[28] Anderson RR, Parrish JA. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation [J]. Science, 1983, 220(4596): 524-527.

[29] Major A, Brazzini B, Campolmi P, et al. Nd:YAG 1064 nm laser in the treatment of facial and leg telangiectasias [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2001, 15(6): 559-565.

[30] 裴超. 激光光凝法和光动力疗法诱导视网膜静脉阻塞动物模型新进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(7): 621-624.

[31] Struebing FL, Geisert EE. What animal models can tell us about glaucoma [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015, 134: 365-380.

[32] Khayat M, Lois N, Williams M. Animal models of retinal vein occlusion [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(14): 6175-6192.

[收稿日期]2021-11-29

(上接第 104 页)

[38] Pekow C. Commentary on two reports on animal models of COVID-19 [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3(2): 115-116.

[39] Thevarajan I, Nguyen THO, Koutsakos M, et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19 [J]. Nat Med, 2020, 26(4): 453-455.

[40] Yu H, Sun B, Fang Z, et al. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients [J]. Eur Respir J, 2020, 56(2): 2001526.

[41] Padoan A, Sciacovelli L, Basso D, et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study [J]. Clin Chim Acta, 2020, 507: 164-166.

[42] Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics, correlates of protection, and association of antibody responses with severity of disease [J]. medRxiv, 2020, 2020:20065771.

[43] Guo L, Ren L, Yang S, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19) [J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(15): 778-785.

[44] Seow J, Graham C, Merrick B, et al. Longitudinal evaluation and decline of antibody responses in SARS-CoV-2 infection [J]. Nat Microbiol, 2020, 5(12): 1598-1607.

[45] Long Q, Tang X, Shi Q, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections [J]. Nat Med, 2020, 26(8): 1200-1204.

[46] Zhang L, Zhou L, Bao L, et al. SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier accompanied with basement membrane disruption without tight junctions alteration [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 337.

[收稿日期]2021-09-29