

# 中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

月刊 1993 年 6 月创刊

第 30 卷 第 4 期 2022 年 8 月 30 日出版

## 目次

### 研究报告

- 不同条件下建立自身免疫性甲状腺炎小鼠模型比较研究 ..... 丁习, 赵洋, 伍丽萍, 吕宏军, 许华阳, 周一坤, 施秉银 (449)
- 痛转化大鼠模型焦虑样情绪行为探索及其前扣带皮层兴奋性变化研究 ..... 邱梦婷, 席丹宁, 韦乃瑄, 王思思, 易敏, 郭子, 房军帆, 方剑乔, 杜俊英 (459)
- 生物钟蛋白 Rev-erb $\alpha$  激动剂抑制高脂饮食诱导小鼠前列腺组织炎症的实验研究 ..... 何跃, 徐航, 冯德超, 曹德宏, 艾建忠, 杨璐, 魏强 (469)
- C57BL/6 小鼠 Lewis 皮下移植瘤肺转移灶的病理及超微结构观察 ..... 张娜, 刘学芳, 王自闯, 冯素香, 张鹏飞 (476)
- APP/PS1 $\Delta$ E9 阿尔茨海默症小鼠脾免疫细胞以及相关干细胞比例与正常小鼠的差异研究 ..... 栾晶, 胡峰瑞, 郭慧芳, 劳可静, 苟兴春 (482)
- 褪黑素在模拟微重力大鼠体内的药代动力学研究\* ..... 冯利, 陈颖, 彭博, 陈腾飞, 李涛, 孙丽华 (488)
- 黄精多糖对模拟航天狭小空间诱导认知功能损伤的改善作用及机制研究\* ..... 刘雨培, 张瑛毓, 范蓓, 刘新民, 陈颖, 卢聪, 王凤忠 (494)
- 3D 回旋仪模拟微重力效应对小鼠骨骼和代谢组学的影响\* ..... 宋晨晨, 康台生, 张萌, 高凯, 史旭东, 郭建国 (504)
- 电针对抑郁症大鼠海马齿状回亚颗粒区小胶质细胞活化和学习记忆能力的影响 ..... 黄文韬, 李朵朵, 李冰, 陈恒, 李武 (513)
- 急性 PM<sub>2.5</sub> 暴露对 C57BL/6J 小鼠和酒精性脂肪肝病模型小鼠肺组织炎症的影响 ..... 蒋金金, 张国富, 董雅琪, 丁世彬 (520)
- HBV 转基因小鼠肝原代细胞分离纯化及其在肝损伤研究中的应用 ..... 贺云, 黄敏健, 陈艺生 (526)
- 有氧运动对肥胖大鼠内皮功能障碍和内脂素的影响 ..... 谢舟煜, 何艾舟, 李婷, 魏娟, 王爱红, 吴云川, 张洪兵 (533)

### 研究进展

- 代谢组学在航天医学研究中应用的研究进展\* ..... 冯利, 陈颖, 胡晓茹, 刘新民 (540)

航天空间环境对药物代谢动力学影响研究进展\* .....  
..... 李梦婷,陈颖,巩仔鹏,杨庆,翁小刚,李玉洁,朱晓新(547)  
苏俄太空动物实验研究发展历程\* .....  
..... 董李晋川,黄红,刘斌,杨紫玉,彭博,陈善广,姜宁,刘新民,陈颖(557)  
欧日太空动物实验研究概况\* ..... 姜宁,刘斌,张亦文,胡秦,陈善广,李莹辉,刘新民(568)  
失重效应模拟实验方法及对机体功能影响的研究进展\* .....  
..... 黄红,姚彩虹,张亦文,陈善广,李莹辉,姜宁,刘新民(574)  
美国太空动物实验研究发展历程\* ..... 陈天,胡秦,石哲,刘斌,陈善广,刘新民(582)  
模拟太空环境应激损伤及防护相关动物实验研究进展\* ..... 王玲,袁天晨,吴丽瑶(589)  
\*:实验动物与航天专题  
  
广告 ..... (封二、封底、内插)

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

## CONTENTS

|                                                                                                                                                                         |                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Mouse models of experimental autoimmune thyroiditis under different conditions: a comparative study .....                                                               |                                                         |
| ..... DING Xi, ZHAO Yang, WU Liping, LYU Hongjun, XU Huayang, ZHOU Yikun, SHI Bingyin(449)                                                                              |                                                         |
| Exploration of anxiety-like behaviors and excitability changes in the anterior cingulate cortex of the hyperalgesia priming rat model .....                             | QIU Mengting,                                           |
| XI Danning, WEI Naixuan, WANG Sisi, YI Min, GUO Zi, FANG Junfan, FANG Jianqiao, DU Junying(459)                                                                         |                                                         |
| Circadian clock protein Rev-erb $\alpha$ agonist inhibits high-fat diet-induced inflammation of the prostate tissue in mice .....                                       |                                                         |
| ..... HE Yue, XU Hang, FENG Dechao, CAO Dehong, AI Jianzhong, YANG Lu, WEI Qiang(469)                                                                                   |                                                         |
| Pathological and ultrastructural observations of lung metastases from Lewis subcutaneous grafts in C57BL/6 mice .....                                                   |                                                         |
| ..... ZHANG Na, LIU Xuefang, WANG Zichuang, FENG Suxiang, ZHANG Pengfei(476)                                                                                            |                                                         |
| Differences in the proportion of splenic immune cells and related stem cells between Alzheimer's model (APP/PS1 $\Delta$ E9) mice and normal mice .....                 |                                                         |
| ..... LUAN Jing, HU Fengrui, GUO Huifang, LAO Kejing, GOU Xingchun(482)                                                                                                 |                                                         |
| Pharmacokinetics of melatonin in simulated microgravity rats .....                                                                                                      |                                                         |
| ..... FENG Li, CHEN Ying, PENG Bo, CHEN Tengfei, LI Tao, SUN Lihua(488)                                                                                                 |                                                         |
| Protective effect and mechanism of action of <i>Polygonati rhizoma</i> polysaccharide on the cognitive impairment induced by simulating an enclosed space in mice ..... |                                                         |
| ..... LIU Yupei, ZHANG Yingyu, FAN Bei, LIU Xinmin, CHEN Ying, LU Cong, WANG Fengzhong(494)                                                                             |                                                         |
| Effects of microgravity on skeletal and metabolomics of mice simulated by 3D clinostat .....                                                                            |                                                         |
| ..... SONG Chenchen, KANG Taisheng, ZHANG Meng, GAO Kai, SHI Xudong, GUO Jianguo(504)                                                                                   |                                                         |
| Effects of electroacupuncture of the subgranular area of the dentate gyrus on microglia activation, and learning and memory function, in depressed rats .....           | HUANG Wentao, LI Duoduo, LI Bing, CHEN Heng, LI Wu(513) |
| Effects of acute PM <sub>2.5</sub> exposure on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in C57BL/6J mice and alcoholic fatty liver disease model mice ...    | JIANG Jinjin, ZHANG Guofu, DONG Yaqi, DING Shibin(520)  |
| Isolation and purification of primary hepatocytes from HBV transgenic mice and their application in the study of liver                                                  |                                                         |

|                                                                                                                  |                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| injury .....                                                                                                     | HE Yun, HUANG Minjian, CHEN Yisheng(526) |
| Effect of aerobic exercise on endothelial dysfunction and visfatin in obese rats .....                           |                                          |
| ... XIE Zhouyu, HE Aizhou, LI Ting, WEI Juan, WANG Aihong, WU Yunchuan, ZHANG Hongbing(533)                      |                                          |
| Research progress in metabolomics related to aerospace medicine .....                                            |                                          |
| ..... FENG Li, CHEN Ying, HU Xiaoru, LIU Xinmin(540)                                                             |                                          |
| Research progress on the effect of the space environment on pharmacokinetics .....                               |                                          |
| ... LI Mengting, CHEN Ying, GONG Zipeng, YANG Qing, WENG Xiaogang, LI Yujie, ZHU Xiaoxin(547)                    |                                          |
| A review of space animal experiments conducted by the former Soviet Union and Russia .....                       |                                          |
| ..... DONG Lijinchuan, HUANG Hong,                                                                               |                                          |
| LIU Bin, YANG Ziyu, PENG Bo, CHEN Shanguang, JIANG Ning, LIU Xinmin, CHEN Ying(557)                              |                                          |
| Research status of space animal experiments in Europe and Japan .....                                            |                                          |
| ..... JIANG Ning, LIU Bin, ZHANG Yiwu, HU Qin, CHEN Shanguang, LI Yinghui, LIU Xinmin(568)                       |                                          |
| Research progress on the simulation of weightlessness in experimental methods and its influence on body function |                                          |
| HUANG Hong, YAO Caihong, ZHANG Yiwu, CHEN Shanguang, LI Yinghui, JIANG Ning, LIU Xinmin(574)                     |                                          |
| A review of space animal experiments conducted by the United States .....                                        |                                          |
| ..... CHEN Tian, HU Qin, SHI Zhe, LIU Bin, CHEN Shanguang, LIU Xinmin(582)                                       |                                          |
| Research progress on animal experiments simulating stress damage and protection in the space environment .....   |                                          |
| ..... WANG Ling, YUAN Tianchen, WU Liyao(589)                                                                    |                                          |

---

#### Responsible Institution

China Association for Science and Technology

#### Sponsor

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

#### Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

#### Managing Editor

DONG Lingying(董令赢)

#### Editing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

#### Publishing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

#### Distributor

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica  
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021  
Tel: 010-67779337  
Fax: 010-67770690  
E-mail: bjb@cnlas.org  
<http://zgswdw.cnjournals.com/sydwbybjx/ch/index.aspx>

#### CSSN

ISSN 1005-4847  
CN 11-2986/Q

Copyright 2022 by the Chinese Association for Laboratory  
Animal Sciences

丁习,赵洋,伍丽萍,等. 不同条件下建立自身免疫性甲状腺炎小鼠模型的比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 449-458.

Ding X, Zhao Y, Wu LP, et al. Mouse models of experimental autoimmune thyroiditis under different conditions: a comparative study [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 449-458.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.001

# 不同条件下建立自身免疫性甲状腺炎小鼠模型的比较研究

丁习,赵洋,伍丽萍,吕宏军,许华阳,周一坤,施秉银\*

(西安交通大学第一附属医院,西安 710061)

**【摘要】 目的** 观察和比较不同性别、抗原剂量、注射频次结合造模时长对猪甲状腺球蛋白(porcine thyroglobulin, pTg)诱导的小鼠实验性自身免疫性甲状腺炎(experimental autoimmune thyroiditis, EAT)模型建立的影响。**方法** SPF级80只CBA/J小鼠,在不同性别(雌性60只,雄性20只),不同抗原剂量(pTg 50、100、200  $\mu$ g),不同注射频次结合造模时长(28 d内注射2次,28 d内注射3次及35 d内注射3次)条件下构建EAT小鼠模型。通过甲状腺病理评分、血清抗甲状腺球蛋白抗体TgAb滴度、血清总甲状腺素TT4水平、脾Treg及Th17细胞比例及相关转录因子水平比较造模的效果。**结果** (1)相同造模条件下雄性小鼠甲状腺淋巴细胞浸润程度及EAT评分均低于雌鼠,TgAb滴度、Th17细胞比例及IL-17A表达水平均较雌鼠显著降低;(2)50  $\mu$ g造模组TgAb滴度、TT4水平、Th17细胞比例、转录因子ROR $\gamma$ t及IL-17A的表达量均显著低于100  $\mu$ g造模组;200  $\mu$ g造模组Foxp3表达量显著高于100  $\mu$ g造模组;(3)28 d 3次造模组甲状腺病理评分较常规造模组显著升高,TgAb、TT4水平、Th17细胞比例、转录因子ROR $\gamma$ t及IL-17A的表达量均显著升高,Treg细胞比例显著降低。**结论** 选择雌性CBA/J小鼠、增大抗原剂量、短期内增加造模频次对改进EAT造模效果具有重要作用。

**【关键词】** 自身免疫性甲状腺炎;猪甲状腺球蛋白;性别;注射频次;小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0449-10

## Mouse models of experimental autoimmune thyroiditis under different conditions: a comparative study

DING Xi, ZHAO Yang, WU Liping, LYU Hongjun, XU Huayang, ZHOU Yikun, SHI Bingyin\*

(the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Corresponding author: SHI Bingyin. E-mail: shibingy@126.com

**【Abstract】 Objective** To observe and compare the effects of sex, antigen dose, injection frequency, and modeling time on a porcine thyroglobulin (pTg)-induced experimental autoimmune thyroiditis (EAT) mouse model. **Methods** A total of 80 SPF CBA/J mice were selected to establish an EAT model under various conditions: sex (60 females and 20 males), antigen dose (pTg 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g, and 200  $\mu$ g), and injection frequency and modeling duration (two injections in 28 days, three injections in 28 days, or three injections in 35 days). The effects of the different modeling strategies were compared using thyroid pathology scores, serum TgAb titers, serum TT4 levels, proportions of Treg and Th17 cells in the spleen, and the levels of related transcription factors. **Results** (1) Under the same modeling conditions, the degree of thyroid lymphocyte infiltration and EAT scores were lower, and the TgAb titers, proportion of

[基金项目] 国家自然科学基金(81500597)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81500597).

[作者简介] 丁习(1993—),女,在读博士研究生,研究方向:自身免疫性甲状腺疾病。Email:dingdingaixuexi@163.com

[通信作者] 施秉银(1959—),男,主任医师,博士生导师,研究方向:自身免疫性甲状腺疾病,内分泌代谢性疾病。

Email: shibingy@126.com

Th17 cells, and *IL-17A* expression levels were significantly lower, in male mice than female mice. (2) TgAb titers, TT4 levels, proportion of Th17 cells, and expression levels of *ROR $\gamma$ t* and *IL-17A* in the 50  $\mu$ g model group were significantly lower than those in the 100  $\mu$ g model group, and the expression level of Foxp3 in the 200  $\mu$ g model group was significantly higher than that in the 100  $\mu$ g model group. (3) EAT scores, TgAb titers, TT4 levels, proportion of Th17 cells, and expression levels of *ROR $\gamma$ t* and *IL-17A* were significantly increased, and the proportion of Treg cells was significantly decreased, in the three injections in 28 days group. **Conclusions** Selecting female CBA/J mice, increasing the antigen dose, increasing the modeling frequency and reducing the modeling time improved the EAT modeling effect.

**【Keywords】** autoimmune thyroiditis; porcine thyroglobulin; sex; injection frequency; mouse

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

自身免疫性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis, AIT) 是一种器官特异性的自身免疫性疾病, 以甲状腺内淋巴细胞炎性浸润、滤泡结构破坏, 血中甲状腺过氧化物酶抗体 (antithyroperoxidase antibodies, TPOAb) 和甲状腺球蛋白抗体 (antithyroglobulin antibodies, TgAb) 水平升高为特征<sup>[1]</sup>。AIT 是引起甲状腺功能减退最常见的病因, 年患病率约为 0.3 ~ 1.5/1000, 女性居多<sup>[2-3]</sup>。其发病机制仍未完全明确, 可能与遗传易感性及环境 (微量元素摄入、吸烟、饮酒、感染、应激、药物) 等多因素有关<sup>[2,4]</sup>。

在动物活体水平, 建立起能真实反应人类疾病发生发展的疾病动物模型, 对研究疾病的发病机制、病情进展、治疗药物的筛选评估都极为重要。高碘诱导法和免疫介导法是目前最常见的两种建立 AIT 小鼠模型的方法<sup>[5]</sup>。其中, 免疫介导法是指利用抗原 (同种或异种) 配合佐剂免疫易感品系小鼠, 建立实验性自身免疫性甲状腺炎 (experimental autoimmune thyroiditis, EAT) 模型。此种方法因实验小鼠 (CBA/J) 易获得、造模方法简单、造模时长较短、模型成功率较高等优点而被广泛认可及应用。

常用于免疫介导法造模的抗原有两种: 小鼠甲状腺球蛋白 (mouse thyroglobulin, mTg) 及猪甲状腺球蛋白 (porcine thyroglobulin, pTg)。目前没有市售的 mTg 标准试剂, 需实验者自行从粉碎后的小鼠甲状腺中提取并纯化。制备 mTg 尚无规范化流程, 实验者的操作技术水平及各实验室的设备条件均会直接影响到所制备 mTg 的蛋白纯度。而 pTg 已有标准成品试剂, 可直接购买, 便于操作, 实验流程较为简单规范, 利于实验结果复刻。常用的佐剂有完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA), 不完全弗氏佐剂 (incomplete Freund's adjuvant, IFA) 及脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)。CFA 及 IFA 为传统含油佐剂, 需与抗原充分混合制成粘稠的乳化剂, 免疫小鼠时采用皮下多点注射, 能够刺激机体

产生较强的体液及细胞免疫应答, 但副作用也较强, 常在皮下形成不易消退的硬结, 造成注射部分炎症及溃疡。LPS 为细菌内毒素, 通过类脂 A 成分发挥增强免疫的作用, 无色透明, 使用时不需与抗原混合, 采用尾静脉注射法, 副作用较少。

目前比较多见的是采用 mTg 或 pTg, 辅以 CFA 或 LPS 作为佐剂建立 EAT 模型, 但都基于雌性 CBA/J 小鼠, 少有探索雄性小鼠造模的研究。此外, 在抗原剂量选择上, 除郭丹等<sup>[6]</sup>研究了 mTg 不同剂量 (100、200、400  $\mu$ g) 造模效果后, 发现 200  $\mu$ g 为最佳剂量之外, 国内鲜有此类研究。而针对不同注射频次结合造模时长影响 EAT 造模效果的研究更是未见报道。

因此, 本研究使用公认的易感 CBA/J 小鼠, 采用 pTg+LPS 造模法, 分别研究不同性别、不同 pTg 剂量、不同注射频次结合造模时长对 EAT 造模的影响, 进一步探索用 pTg 建立小鼠 EAT 模型最适宜的方案选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 60 只雌性及 20 只雄性 CBA/J 小鼠, 8 周龄, 体重约 17 ~ 25 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK (京) 2019-0008】。小鼠饲养于 IVC 笼内, 自由进食饮水, 昼夜各 12 h 交替光照, 温度 20 ~ 22℃, 湿度 24% ~ 28%, 饲养于西安交通大学实验动物中心【SYXK (陕) 2020-001】。所有操作均符合西安交通大学实验动物中心实验伦理学要求 (审批号: 2021-1457)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

猪甲状腺球蛋白 (Sigma, T1126), 脂多糖 (Sigma, L2630), 磷酸盐缓冲盐溶液 (Hyclone, SH30256), 一次性使用无菌胰岛素注射器 (德国贝

朗公司, 20183142477), TMB 单组分显色液 (Solarbio, PR1200), 碘[125I]甲状腺素放射免疫分析试剂盒 (天津市协和医药科技集团有限公司, RA10102), 逆转录试剂盒 (TaKaRa, RR036A), 荧光定量试剂盒 (TaKaRa, RR820A), 抗小鼠 CD4 FITC 抗体 (eBioscience, 11-0041-82), 抗小鼠 CD25 APC 抗体 (eBioscience, 17-0251-81), 抗小鼠 Foxp3 PE 抗体 (eBioscience, 12-5773-82), 抗小鼠 IL-17 PE 抗体 (eBioscience, 12-7177-81), 破膜固定剂 (eBioscience, 51-9008101)。

PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), 正置光学显微镜 (Olympus, 日本), 流式细胞仪 (BD, 美国), Enspire 多功能酶标仪 (PerkinElmer, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠分组及造模步骤

将 60 只 8 周龄雌性 CBA/J 小鼠随机分成 6 组, 每组 10 只, 将 20 只 8 周龄雄性 CBA/J 小鼠随机分成 2 组, 每组 10 只。分组及实验安排如表 1 所

示。各组小鼠同步开始实验。

本实验主要分为 3 部分: 第 1 部分雌雄小鼠均有; 第 2、3 部分均只在雌性小鼠上实施。第 1 部分 (比较不同性别): F-C、M-C、F-100×2-28 及 M-100×2-28。第 2 部分 (比较不同抗原剂量): F-100×2-28、F-50×2-28 及 F-200×2-28。第 3 部分 (比较不同注射频次结合造模时长): F-100×2-28、F-100×3-28 及 F-100×3-35。

1.2.2 甲状腺病理

小鼠甲状腺用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片, HE 染色, 显微镜下观察甲状腺滤泡破坏及淋巴细胞浸润情况, 用 Image J 软件分析浸润面积, 并按照 EAT 模型评分标准评价<sup>[7]</sup>: 0 为正常、1+ 为 1% ~ 10%、2+ 为 10% ~ 30%、3+ 为 30% ~ 50%、4+ 为 >50%。

1.2.3 血清 TgAb 及总甲状腺素 (TT4) 测定

小鼠血清 TgAb 采用 ELISA 检测。96 孔酶标板每孔加入 100 μL 的 2 μg/mL 的 pTg 溶液, 4℃

表 1 小鼠分组及实验安排 (n = 10)

Table 1 Grouping and experimental arrangement of mice (n = 10)

| 组别代号<br>Group code | 实验安排<br>Experimental arrangement                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F-C                | 第 0、7 天给予 100 μL PBS 尾静脉注射, 3 h 后给予 100 μL PBS 注射, 第 28 天处死。<br>On day 0 and day 7, 100 μL PBS was injected into mice through tail vein, 100 μL PBS was injected 3 h later, and on day 28 the mice were euthanized.                                                                                            |
| M-C                | 与雌性对照组相同。<br>Same as the female control group.                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| F-100×2-28         | 第 0、7 天给予 100 μg pTg 溶解于 100 μL PBS 尾静脉注射, 3 h 后给予 20 μg LPS 溶解于 100 μL PBS 注射, 第 28 天处死。<br>On day 0 and day 7, 100 μg pTg dissolved in 100 μL PBS was injected into mice through tail vein, 20 μg LPS dissolved in 100 μL PBS was injected 3 hours later, and on day 28 the mice were euthanized.            |
| M-100×2-28         | 与雌性常规造模组相同。<br>Same as the female conventional modeling group.                                                                                                                                                                                                                                                 |
| F-50×2-28          | 第 0、7 天给予 50 μg pTg 溶解于 100 μL PBS 尾静脉注射, 3 h 后给予 20 μg LPS 溶解于 100 μL PBS 注射, 第 28 天处死。<br>On day 0 and day 7, 50 μg pTg dissolved in 100 μL PBS was injected into mice through tail vein, 20 μg LPS dissolved in 100 μL PBS was injected 3 hours later, and on day 28 the mice were euthanized.              |
| F-200×2-28         | 第 0、7 天给予 200 μg pTg 溶解于 100 μL PBS 尾静脉注射, 3 h 后给予 20 μg LPS 溶解于 100 μL PBS 注射, 第 28 天处死。<br>On day 0 and day 7, 200 μg pTg dissolved in 100 μL PBS was injected into mice through tail vein, 20 μg LPS dissolved in 100 μL PBS was injected 3 hours later, and on day 28 the mice were euthanized.            |
| F-100×3-28         | 第 0、7、14 天给予 100 μg pTg 溶解于 100 μL PBS 尾静脉注射, 3 h 后给予 20 μg LPS 溶解于 100 μL PBS 注射, 第 28 天处死。<br>On day 0, day 7 and day 14, 100 μg pTg dissolved in 100 μL PBS was injected into mice through tail vein, 20 μg LPS dissolved in 100 μL PBS was injected 3 hours later, and on day 28 the mice were euthanized. |
| F-100×3-35         | 第 0、7、21 天给予 100 μg pTg 溶解于 100 μL PBS 尾静脉注射, 3 h 后给予 20 μg LPS 溶解于 100 μL PBS 注射, 第 35 天处死。<br>On day 0, day 7 and day 21, 100 μg pTg dissolved in 100 μL PBS was injected into mice through tail vein, 20 μg LPS dissolved in 100 μL PBS was injected 3 hours later, and on day 35 the mice were euthanized. |

过夜,次日取出洗涤 3 次后用封闭液封存过夜。洗涤后每孔加入 100  $\mu$ L 按 1:2000 稀释的小鼠血清,密封过夜。取出洗涤之后,加入 100  $\mu$ L 按 1:5000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG,静置 1 h,洗涤后加入 TMB 显色剂室温静置 5 min,加入硫酸终止反应。在酶标仪上读取各孔 450 nm 波长处的 OD 值。

血清总甲状腺素(TT4)测定采用放射免疫法检测:小鼠血清和碘[125I]标记的 T4 与相应抗体反应,结合成抗原抗体复合物,在二抗及聚乙二醇作用下,形成免疫复合物,离心后沉淀,使用  $\gamma$  计数器测定放射性强度。最终通过标准曲线计算出血清 TT4 浓度。

#### 1.2.4 流式细胞检测

分离并研磨脾,收集细胞悬液,裂红洗涤后制成单细胞悬液(细胞浓度为  $5 \times 10^6/\text{mL}$ )。Treg(CD4+CD25+Foxp3+)细胞染色:使用 FITC 标记的 CD4 抗体及 APC 标记的 CD25 抗体进行细胞表面染色,固定破膜后用 PE 标记的 Foxp3 核内染色。Th17(CD4+IL-17A+)细胞染色:取单细胞悬液置于细胞培养板中,加入 RPMI 1640 培养基、胎牛血清及细胞激活剂,37 $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ ,孵箱培养 5 h 后取出。使用 FITC 标记的 CD4 抗体进行表面染色,固定破膜后用 PE 标记的 IL-17A 抗体核内染色。最终使用多通道流式细胞仪进行检测,Cell Quest Pro 软件分析数据。

#### 1.2.5 小鼠脾转录因子检测

TRIzol 法提取小鼠脾总 RNA,用 Prime Script<sup>TM</sup> RT reagent 试剂盒逆转录为 cDNA,加入引物进行 Real time PCR 扩增,引物序列如表 2 所示。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列

| 引物<br>Primer                    | 序列<br>Primer sequences             |
|---------------------------------|------------------------------------|
| <i>Foxp3</i>                    | F:5'-CAGCTGGAGCTGGAAAAGGA-3'       |
|                                 | R:5'-CACACTGCCCTGAGTACTGG-3'       |
| <i>TGF-<math>\beta</math></i>   | F:5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTCTA-3' |
|                                 | R:5'-CGCTGAATCGAAAGCCCTGTA-3'      |
| <i>ROR-<math>\gamma</math>t</i> | F:5'-TCTCTGCAAGACTCATCGACA-3'      |
|                                 | R:5'-CAGGGGATTCAACATCAGTGC-3'      |
| <i>IL-17A</i>                   | F:5'-TGCTACTGTTGATGTTGGGAC-3'      |
|                                 | R:5'-AATGCCCTGTTTGTGTTGAA-3'       |
| <i>GAPDH</i>                    | F:5'-AGCAATGCCTCCTGCACCACCAAC-3'   |
|                                 | R:5'-CCGAGGGGCCATCCACACTCT-3'      |

### 1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 22.0 及 GraphPad Prism 8.0 整理分析。计量资料数据以平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD 法,以  $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 小鼠甲状腺炎病理情况

由图 1 可见,对照组小鼠甲状腺组织中甲状腺滤泡大小较为均一,结构完整无破坏无萎缩,滤泡腔内充满胶质,分布较均匀,未见炎性细胞浸润;造模组小鼠甲状腺滤泡大小不一,可见不同程度的滤泡萎缩及破坏,有明显淋巴细胞浸润表现。F-200 $\times$ 2-28、F-100 $\times$ 3-28 及 F-100 $\times$ 3-35 淋巴细胞浸润程度较其他各组更重。

各组小鼠甲状腺炎病理评分情况如表 3 所示。比较不同性别对 EAT 造模影响,F-100 $\times$ 2-28 与 M-100 $\times$ 2-28 之间无显著性差异;F-50 $\times$ 2-28<F-100 $\times$ 2-

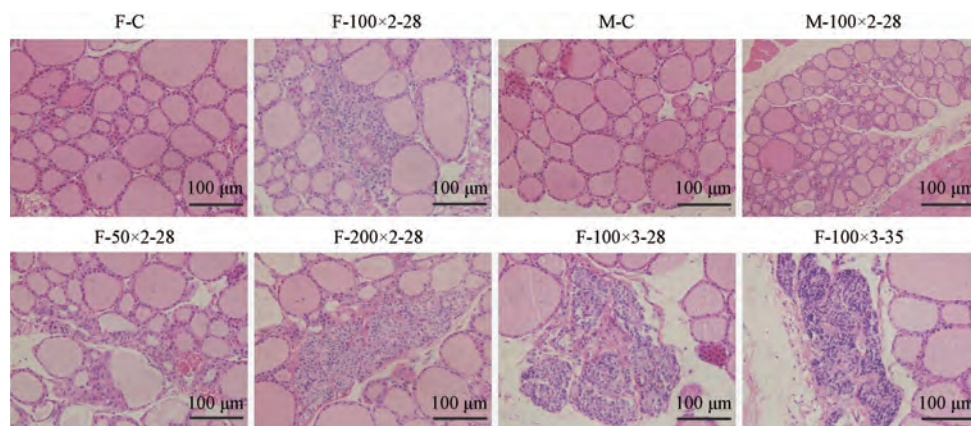


图 1 各组小鼠甲状腺病理切片

Figure 1 Pathological sections of thyroid gland in each groups of mice

28<F-200×2-28, 但 3 组之间无显著性差异 ( $F = 3.135, P = 0.06$ ); F-100×2-28<F-100×3-35<F-100×3-28, 其中 F-100×3-28 显著高于 F-100×2-28 ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 小鼠血清 TgAb 及 TT4 水平

不同性别、抗原剂量、造模频次及时长对小鼠血清 TgAb 相对浓度影响如图 2A 所示。与各自对照组相比, 雌性及雄性任一造模条件组 TgAb 相对浓度均显著性升高 ( $P < 0.05$ )。比较不同性别因素时, F-100×2-28 的 TgAb 相对浓度 ( $15956.72 \pm 2465.47$ ) 较 M-100×2-28 ( $11148.90 \pm 2136.91$ ) 显著升高 ( $P < 0.001$ )。与 F-100×2-28 相比, F-50×2-28 的 TgAb 相对浓度显著降低, F-100×3-28 及 F-100×3-35 均显著升高 ( $P < 0.001$ ), 其中 F-100×3-28 的 TgAb 相对浓度最高 ( $20504.09 \pm 4499.52$ )。

各组小鼠 TT4 水平如图 2B 所示, F-100×2-28、M-100×2-28 虽较各自对照组相比, TT4 水平均显著升高 ( $P < 0.001$ ), 但雌雄两造模组之间未有显著性差异。与 F-100×2-28 比较, F-50×2-28 的 TT4 水平显著降低, F-200×2-28、F-100×3-28 均显著升高。其中 F-100×3-28 的 TT4 水平最高 ( $102.34 \pm 17.69$ )  $\mu\text{g/dL}$ , 较 F-100×3-35 ( $84.16 \pm 11.69$ )  $\mu\text{g/dL}$  也有显著性升高。而 F-100×3-35 与 F-100×2-28 相比, TT4 水平未有明显差异。

## 2.3 小鼠脾 Treg 及 Th17 淋巴细胞比例

如图 3 所示, 与 F-C 相比, F-100×2-28 的 CD4+CD25+Foxp3+Treg 细胞比例降低, 不具有显著性 ( $(12.20 \pm 1.45)\% \text{ vs } (13.13 \pm 2.26)\%$ ), 但 CD4+IL17A+Th17 细胞比例显著升高 ( $(1.03 \pm 0.24)\% \text{ vs } (0.17 \pm 0.14)\%, P < 0.001$ ) (见图 4); 与此同时, 与 M-C 相比, M-100×2-28 的 Treg 细胞比例降

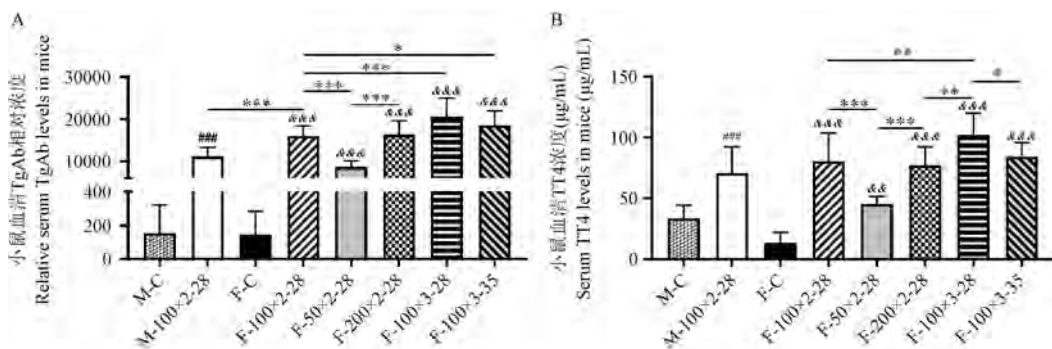
表 3 各组小鼠自身免疫性甲状腺炎病理评分

Table 3 Pathological scores of EAT model in each groups of mice

| 组别<br>Groups | EAT 模型病理评分<br>Pathological scores of EAT model |       |       |       |       |       |       |       |       |        | 平均值 $\pm$ 标准差<br>( $\bar{x} \pm s$ ) |
|--------------|------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------------------------------------|
|              | No. 1                                          | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | No. 7 | No. 8 | No. 9 | No. 10 |                                      |
| F-C          | 0                                              | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0      | 0.00 $\pm$ 0.00                      |
| M-C          | 0                                              | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0      | 0.00 $\pm$ 0.00                      |
| F-100×2-28   | 2                                              | 2     | 2     | 2     | 1     | 2     | 1     | 2     | 2     | 2      | 1.80 $\pm$ 0.42                      |
| M-100×2-28   | 1                                              | 2     | 1     | 1     | 1     | 2     | 1     | 2     | 1     | 2      | 1.40 $\pm$ 0.52                      |
| F-50×2-28    | 1                                              | 1     | 1     | 2     | 2     | 1     | 2     | 1     | 2     | 2      | 1.50 $\pm$ 0.53                      |
| F-200×2-28   | 2                                              | 2     | 3     | 3     | 2     | 2     | 1     | 2     | 2     | 1      | 2.00 $\pm$ 0.67                      |
| F-100×3-28   | 2                                              | 2     | 3     | 2     | 3     | 3     | 2     | 3     | 2     | 2      | 2.40 $\pm$ 0.52*                     |
| F-100×3-35   | 2                                              | 2     | 3     | 3     | 2     | 2     | 2     | 3     | 2     | 2      | 2.30 $\pm$ 0.48                      |

注: 与 F-100×2-28 相比, \*  $P < 0.05$ 。

Note. Compared with F-100×2-28, \*  $P < 0.05$ .



注: 与 M-C 相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ ; 与 F-C 相比, &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ , &&&  $P < 0.001$ ; 其余组之间的比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。(下同)

图 2 各组小鼠血清 TgAb 相对浓度及 TT4 水平

Note. Compared with M-C, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ . Compared with F-C, &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ , &&&  $P < 0.001$ . Compared with the rest of the groups, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . (The same in the following figures)

Figure 2 Serum TgAb relative levels and TT4 levels in each groups of mice

低,但不具有显著性,而 Th17 细胞比例却显著性升高( $P < 0.01$ )。雌、雄小鼠对比,雄鼠 Treg 细胞未见明显差异, Th17 细胞比例显著低于雌鼠( $P < 0.01$ )。此结果可能提示,在本实验条件下,就反映体内免疫学状态而言,小鼠 Th17 细胞较 Treg 细胞或许更具有代表性。

与 F-100×2-28 相比, F-50×2-28 的 Th17 细胞比例显著降低( $P < 0.01$ ), F-100×3-28 及 F-100×3-35 均显著升高( $P < 0.001$ ),其中 F-100×3-28 的 Th17 细胞比例最高( $1.54 \pm 0.32$ )%。而与 F-100×2-28 的 Treg 细胞比例相比, F-200×2-28 及 F-100×3-28 差异不显著, F-100×3-35 显著降低( $P < 0.05$ ), F-100×3-35 的 Treg 细胞比例最低( $10.47 \pm 1.48$ )%。

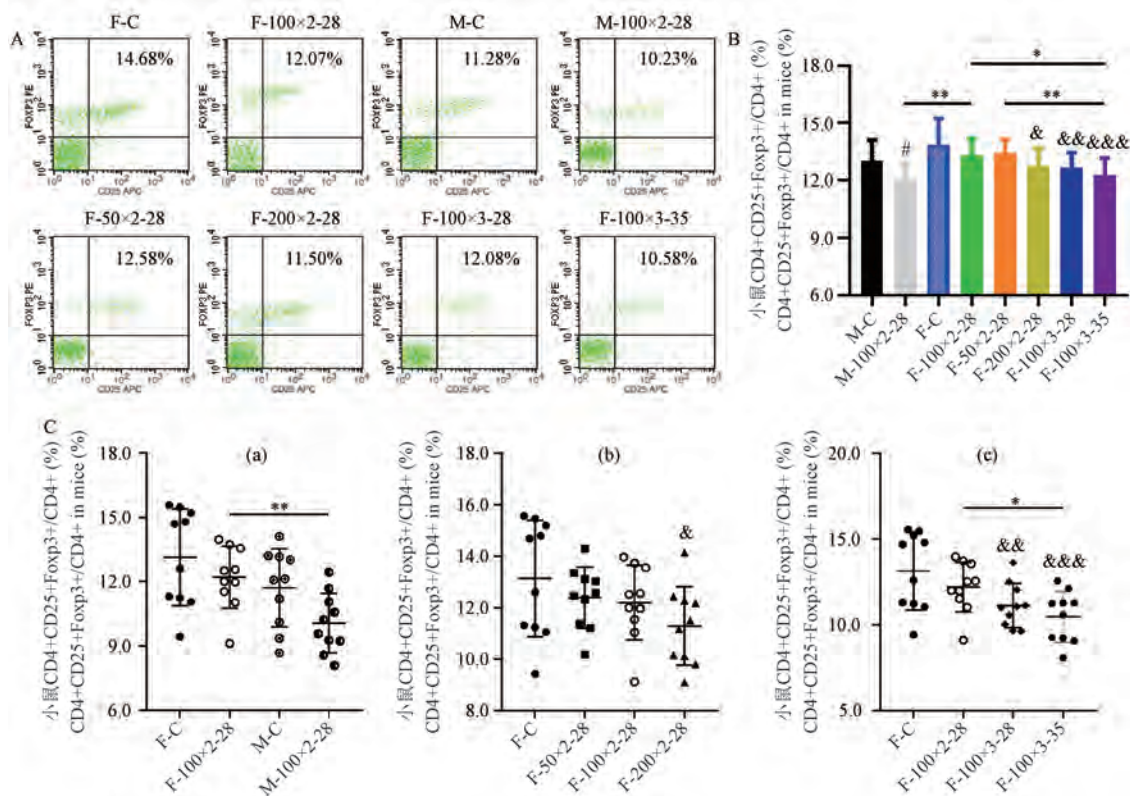
#### 2.4 小鼠脾 Foxp3 mRNA、TGF- $\beta$ mRNA、ROR- $\gamma$ t mRNA 及 IL-17A mRNA 相对表达水平

各组小鼠脾 Treg 细胞特异性转录因子 Foxp3、TGF- $\beta$  及 Th17 细胞特异性转录因子 ROR- $\gamma$ t 与 IL-

17A 的 mRNA 相对表达水平如图 5 所示。

与 F-C 相比, F-100×2-28 的 Foxp3 mRNA 表达量显著性降低( $P < 0.01$ ), TGF- $\beta$  mRNA 表达量无显著性差异, F-100×2-28 的 ROR- $\gamma$ t mRNA 及 IL-17A mRNA 表达量均显著性增高( $P < 0.001$ )。M-100×2-28 与 M-C 相比,只有 IL-17A mRNA 表达量显著性升高( $P < 0.01$ ),而 Foxp3 mRNA、TGF- $\beta$  mRNA 以及 ROR- $\gamma$ t mRNA 表达量未有显著性差异。

与 F-100×2-28 相比, F-50×2-28 的 ROR- $\gamma$ t mRNA 及 IL-17A mRNA 表达量显著性降低( $P < 0.001$ ),而 Foxp3 mRNA、TGF- $\beta$  mRNA 表达量未有显著变化; F-200×2-28 只有 Foxp3 mRNA 表达量显著性降低( $P < 0.05$ )。与 F-100×2-28 相比, F-100×3-28 及 F-100×3-35 在 TGF- $\beta$  mRNA 表达水平上未有明显变化,而 Foxp3 mRNA 表达均显著降低( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), IL-17A mRNA 表达均显著升高( $P < 0.001$ ),其中 F-100×3-28 的 Foxp3 mRNA 表达量最低, IL-17A mRNA 表达量最高。

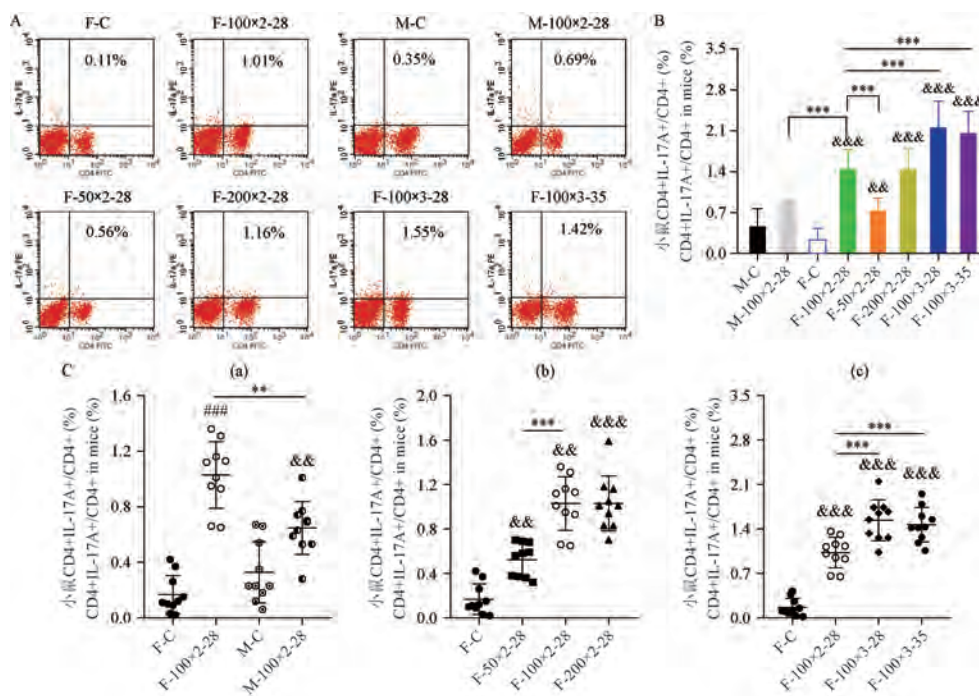


注: A: 各组小鼠 CD4+CD25+Foxp3+T 细胞 (Treg 细胞) 占 CD4+T 细胞比例的流式分析图; B: 整体比较各组小鼠 Treg 细胞比例; C: 在不同性别(a)、不同抗原剂量(b)、不同注射频次结合造模时长(c)条件下比较各组小鼠 Treg 细胞比例。

图 3 各组小鼠 Treg 细胞比例

Note. A. Flow cytometry of the proportion of CD4+CD25+Foxp3+T cells (Treg cells) in CD4+T cells in each group of mice. B. Proportion of Treg cells in each groups of mice. C. Proportion of Treg cells in different groups of mice under the conditions of different genders (a), different antigen doses (b), and different injection frequency and modeling duration under (c).

Figure 3 Proportion of Treg cells in each groups of mice

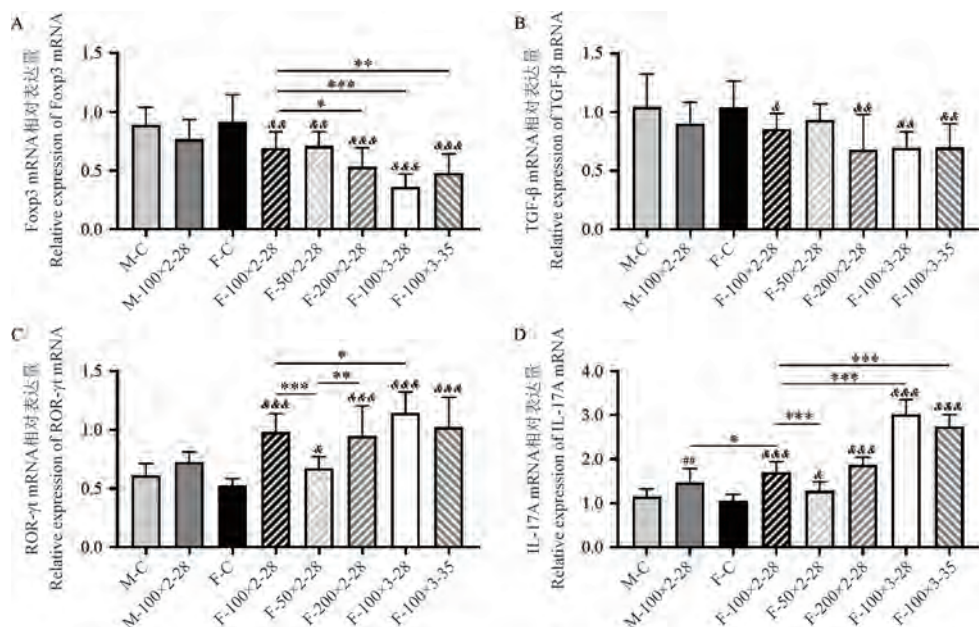


注:A:各组小鼠 CD4+IL-17A+T 细胞(Th17 细胞)占 CD4+T 细胞比例的流式分析图;B:整体比较各组小鼠 Th17 细胞比例;C:在不同性别(a)、不同抗原剂量(b)、不同注射频次结合造模时长(c)条件下比较各组小鼠 Th17 细胞比例。

图 4 各组小鼠 Th17 细胞比例

Note. A. Flow cytometry of the proportion of CD4+IL-17A+T cells (Th17 cells) in CD4+T cells in each group of mice. B. Proportion of Th17 cells in each groups of mice. C. Proportion of Th17 cells in different groups of mice under the conditions of different genders (a), different antigen doses (b), and different injection frequency and modeling duration under (c).

Figure 4 Proportion of Th17 cells in each groups of mice



注:A:Foxp3 mRNA 相对表达水平;B:TGF-β mRNA 相对表达水平;C:ROR-γt mRNA 相对表达水平;D:IL-17A mRNA 相对表达水平。

图 5 各组小鼠脾 Foxp3 mRNA、TGF-β mRNA、ROR-γt mRNA 及 IL-17A mRNA 相对表达水平

Note. A. Relative expression levels of Foxp3 mRNA. B. Relative expression levels of TGF-β mRNA. C. Relative expression levels of ROR-γt mRNA. D. Relative expression levels of IL-17A mRNA.

Figure 5 Relative expression levels of Foxp3 mRNA, TGF-β mRNA, ROR-γt mRNA and IL-17A mRNA in each groups of mice

### 3 讨论

EAT 小鼠模型是研究人类 AIT 的重要手段。成功的 EAT 模型应具备至少 2 个特征:(1)病理检查可见甲状腺组织内出现不同程度的淋巴细胞浸润及滤泡破坏等表现,并可按其严重程度分等级量化评价;(2)血清学检查出现高滴度的甲状腺自身抗体<sup>[5,7]</sup>。目前公认的经典造模方法是采用甲状腺球蛋白联合免疫佐剂,诱导具有 *MHC H<sup>2k</sup>* 及 *H<sup>2s</sup>* 基因遗传背景的免疫易感鼠。由于 AIT 女性高发,因而 EAT 小鼠模型绝大多数以雌性为研究对象。既往曾有给予新生期雄性 AKR 小鼠注射抗 IgM 单抗后再诱导 EAT 的研究<sup>[8]</sup>,也有在雄性 NOD 小鼠上成功诱导 EAT<sup>[9]</sup> 以及使用雄性 BALB/c 小鼠建立 Graves 甲亢模型的研究<sup>[10]</sup>,但少有使用 CBA/J 雄鼠诱导 EAT 的先例。

与此同时,自 1971 年首个 EAT 小鼠模型建立以来<sup>[11]</sup>,许多研究者曾在经典造模方案基础上做过改进。Choi 等<sup>[12]</sup>,Cai 等<sup>[13]</sup> 及 Tan 等<sup>[14]</sup> 均选择在第 0 天、第 14 天各注射 1 次;Gudi 等<sup>[15]</sup> 选择在第 0、10 天各注射 1 次,第 30 天处死小鼠;而 Lin 等<sup>[16]</sup> 则在频次及时长上均有所变化,将方案改为在第 0、14、28、42 天注射,第 56 天处死。以上均属于利用 EAT 模型探索药物等其他干预方式治疗效果的研究,未对改进后的 EAT 模型造模效果有所探讨。

因而,本实验旨在通过比较雌雄 CBA/J 小鼠低、中、高 3 种抗原剂量、以及不同注射频次结合造模时长,对小鼠 EAT 造模效果的影响,继而探讨最佳造模方式,并抛砖引玉为今后 EAT 小鼠模型的建立提供新方法思路。

#### 3.1 本研究中 pTg+LPS 常规造模法的确定

1971 年 Rose 等<sup>[11]</sup> 使用 mTg 联合 CFA 免疫雌性 C3H 小鼠诱导出首个 EAT 模型,之后 1977 年 Esquivel 等<sup>[17]</sup> 采用 mTg 联合 LPS 也成功诱导出 B10. BR 小鼠 EAT 模型,1997 年 Damotte 等<sup>[9]</sup> 也在 NOD 小鼠上分别利用 mTg 及 pTg 成功造模。事实上,有关 mTg 与 pTg 抗原选择的讨论一直存在。一方面,国外 Kong<sup>[5]</sup> 认为 mTg 较 pTg 因具有更高的同源性,可能更适合诱导小鼠的 EAT,但若 EAT 造模实验规模大,则需要制备较大量的 mTg(制备 30 ~ 60 mg 的 mTg 需要约 300 ~ 500 个小鼠甲状腺)。郭丹等<sup>[6]</sup> 发现,相比 pTg 诱导出的 EAT 小鼠甲状腺

滤泡上皮细胞增生显著的特点,mTg 诱导出的小鼠甲状腺病理形态更接近人类甲炎表现,但相同剂量下 pTg 诱导组的小鼠甲炎评分显著高于 mTg 组,同时 EAT 发病率,血清 TgAb 滴度也明显高于 mTg 组,100  $\mu$ g pTg 组效果与 200  $\mu$ g mTg 组相近。这证明 pTg 在诱导 EAT 成模率上并不逊于 mTg;另一方面,由于 mTg 制备目前尚无规范化流程,蛋白纯度受实验者技术水平及实验室硬性设备条件等影响,而 pTg 有现售标准试剂,操作简便,利于实验复刻。故在本次实验中,我们选择了 pTg 作为诱导抗原。

在佐剂的选择上,选择 LPS 而非 CFA/IFA,理由有二:其一,相较 CFA,LPS 不需与抗原乳化混合,可直接从尾静脉注射,诱导 EAT 造模均质性更好,更重要的是其副作用小;其二,Kong<sup>[5]</sup> 研究已表明,LPS 诱导出的 EAT 小鼠模型,免疫学细胞分析更适合使用脾,而 CFA 诱导的 EAT 模型则应选用淋巴结,脾较淋巴结体积更大,更方便摘取,且淋巴细胞数量更为丰富。因而在本实验中,选择了 pTg+LPS 法诱导 8 周龄 CBA/J 小鼠造模。在 pTg 及 LPS 剂量确定,注射频次及造模时长的选择上,延续了经典造模法中 100  $\mu$ g pTg 配比 20  $\mu$ g LPS,第 0、7 天各注射 1 次,28 d 内 2 次造模的方案。

#### 3.2 不同性别 CBA/J 小鼠 EAT 造模

本研究中发现,相同造模条件下,雄性 CBA/J 小鼠甲状腺内滤泡结构较雌鼠更完整,淋巴细胞浸润程度普遍轻于雌鼠,EAT 评分也较雌鼠低。雄鼠血清 TgAb 滴度显著低于雌鼠,TT4 水平未有明显差异。值得注意的是,雄鼠的 Treg 细胞比例与雌鼠相比无明显差异,但 Th17 细胞比例显著降低,Th17 转录因子 IL-17A 表达量也显著低于雌鼠。Treg 细胞在维持外周耐受及免疫稳态中发挥不可或缺的作用,而 Th17 细胞作为促炎性辅助性 T 淋巴细胞,其细胞比例及相关因子表达水平已被证实与多种自身免疫疾病进程正向相关<sup>[18-21]</sup>。据此我们推测,相同抗原诱导条件下,较之雌鼠,雄性 CBA/J 小鼠自身免疫反应较轻,EAT 模型成功率较低。此差异可能与 X 染色体关联基因影响免疫<sup>[22]</sup>,性激素对 B、T 淋巴细胞的作用有关<sup>[23]</sup>,具体机制还需进一步探索。

#### 3.3 不同剂量 pTg 诱导雌性 CBA/J 小鼠 EAT 造模

既往郭丹等<sup>[6]</sup> 曾针对不同剂量(100、200、400  $\mu$ g)的 mTg 诱导雌性 CBA/J 小鼠 EAT 造模进行对

比,发现 200  $\mu\text{g}$  效果最佳。本研究与其相似之处在于也分别设置了低(50  $\mu\text{g}$ )、中(100  $\mu\text{g}$ )、高(200  $\mu\text{g}$ )3 种抗原剂量进行比较,不同之处在于所研究的是 pTg 而非 mTg,佐剂选择 LPS 而非 CFA。相比他们每组仅 5 只样本量的设定,本研究增加了每组只数(10 只),同时在他们原有评价 EAT 造模指标(甲状腺病理、炎症评分、TgAb 滴度)基础上增加了对 Th17、Treg 细胞的流式分析及特异性转录因子表达水平的测定,这也是国内同类型研究中首次对 EAT 小鼠模型进行免疫学指标分析。本研究发现,与常规剂量 100  $\mu\text{g}$  pTg 造模组相比,50  $\mu\text{g}$  低剂量诱导的小鼠其甲状腺炎性浸润程度较轻,TgAb、TT4 水平显著降低;200  $\mu\text{g}$  高剂量组甲状腺炎浸润程度更重,但 TgAb、TT4 水平未有明显差异,此点与郭丹等<sup>[6]</sup>报道的 200  $\mu\text{g}$  组与 400  $\mu\text{g}$  组在 TgAb 水平上无显著性差异的发现一致。值得一提的是,在本研究中我们观察到使用 pTg 造模的小鼠甲状腺淋巴细胞浸润明显,而滤泡上皮增生并不显著,似与郭丹等<sup>[6]</sup>观察到的并不完全一致。特别值得注意的是,50  $\mu\text{g}$  pTg 组小鼠 Treg 细胞比例未有显著差异,而 Th17 细胞比例及其特异性转录因子 ROR $\gamma$ t 及 IL-17A 的表达量较之 100  $\mu\text{g}$  pTg 组均显著降低;200  $\mu\text{g}$  pTg 组小鼠 Treg、Th17 细胞比例均无显著性变化。由此我们判断,在本实验条件下 pTg 50  $\mu\text{g}$  造模效果不如常规 100  $\mu\text{g}$ 。而造成 200  $\mu\text{g}$  造模效果未有显著提升的原因较为复杂:可能是因抗原剂量与 EAT 造模效果并不成简单线性依赖关系,这也与郭丹等<sup>[6]</sup>对 200  $\mu\text{g}$  组与 400  $\mu\text{g}$  组差异不显著的解释一致;也可能是因现有 EAT 模型的评价标准较为简单,在本研究中我们仅通过甲状腺病理评分、TgAb、TT4 及 Treg 与 Th17 细胞比例等指标,仍不能够完全贴合、动态反映、准确描摹出小鼠 EAT 造模过程中的差异变化;抑或是因实验中存在的各项误差而导致的。此现象后续仍值得我们深入研究。

### 3.4 不同注射频次结合造模时长的雌性 CBA/J 小鼠 EAT 造模

在本实验中发现,较之常规造模组,100  $\mu\text{g}$  pTg 在 28 d 3 次注射的条件下效果最优,其在甲状腺病理评分、TgAb、TT4 水平及 Treg、Th17 细胞比例及相应转录因子表达量上均有非常显著的差异。而 35 d 3 次注射造模,TgAb 水平显著升高,TT4 未有明显差异,Treg 细胞比例及 Foxp3 表达显著减少,Th17 细

胞比例及 IL-17A 表达显著增多,但不如 28 d 3 次注射的差异更显著。这可能提示,短期内增加注射造模的频次,比延长每次注射造模的间隔时间、增加造模时长的方案效果更好。

综上所述,本研究是国内首个较为系统地探讨性别、抗原剂量、注射频次结合造模时长因素对 EAT 小鼠造模效果影响的研究。选择雌性 CBA/J 小鼠、增大抗原剂量、短期内增加注射造模频次对改进 EAT 造模效果具有重要作用。

### 参 考 文 献(References)

- [1] Radetti G. Clinical aspects of Hashimoto's thyroiditis [J]. *Endocr Dev*, 2014, 26: 158-170.
- [2] Ragusa F, Fallahi P, Elia G, et al. Hashimoto's thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2019, 33(6): 101367.
- [3] Hiromatsu Y, Satoh H, Amino N. Hashimoto's thyroiditis: history and future outlook [J]. *Hormones (Athens)*, 2013, 12(1): 12-18.
- [4] Pyzik A, Grywalska E, Matyjaszek-Matuszek B, et al. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 979167.
- [5] Kong YC. Experimental autoimmune thyroiditis in the mouse [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2007, 15: 15-17.
- [6] 郭丹, 李丽, 刘苗, 等. 不同种属、不同剂量甲状腺球蛋白诱导 CBA/J 小鼠实验性自身免疫性甲状腺炎的实验研究 [J]. *中国医科大学学报*, 2011, 40(8): 673-675, 695.  
Guo D, Li L, Liu M, et al. Establishment of experimental autoimmune thyroiditis in CBA/J mice by different species and dosages of thyroglobulin [J]. *J Chin Med Univ*, 2011, 40(8): 673-675, 695.
- [7] 杨雪威, 王思源, 徐锦江, 等. 运动联合维生素 D 对实验性自身免疫性甲状腺炎小鼠的保护作用 [J]. *东南大学学报(医学版)*, 2019, 38(2): 323-327.  
Yang XW, Wang SY, Xu JJ, et al. Protective effect of exercise combined with vitamin D on experimental autoimmune thyroiditis mice [J]. *J Southeast Univ (Med Sci Edit)*, 2019, 38(2): 323-327.
- [8] Vladutiu AO. Experimental autoimmune thyroiditis in mice chronically treated from birth with anti-IgM antibodies [J]. *Cell Immunol*, 1989, 121(1): 49-59.
- [9] Damotte D, Colomb E, Cailleau C, et al. Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis [J]. *Eur J Immunol*, 1997, 27(11): 2854-2862.
- [10] Nagayama Y, Kita-Furuyama M, Ando T, et al. A novel murine model of Graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor [J]. *J Immunol*,

- 2002, 168(6): 2789–2794.
- [11] Rose NR, Twarog FJ, Crowle AJ. Murine thyroiditis; importance of adjuvant and mouse strain for the induction of thyroid lesions [J]. *J Immunol*, 1971, 106(3): 698–704.
- [12] Choi EW, Shin IS, Park SY, et al. Characteristics of mouse adipose tissue-derived stem cells and therapeutic comparisons between syngeneic and allogeneic adipose tissue-derived stem cell transplantation in experimental autoimmune thyroiditis [J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(7): 873–887.
- [13] Cai YJ, Wang F, Chen ZX, et al. Hashimoto's thyroiditis induces neuroinflammation and emotional alterations in euthyroid mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 299.
- [14] Tan B, Yuan W, Li J, et al. Therapeutic effect of human amniotic epithelial cells in murine models of Hashimoto's thyroiditis and systemic lupus erythematosus [J]. *Cytotherapy*, 2018, 20(10): 1247–1258.
- [15] Gudi RR, Karumuthil-Melethil S, Perez N, et al. Engineered dendritic cell-directed concurrent activation of multiple T cell inhibitory pathways induces robust immune tolerance [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12065.
- [16] Lin JD, Fang WF, Tang KT, et al. Effects of exogenous melatonin on clinical and pathological features of a human thyroglobulin-induced experimental autoimmune thyroiditis mouse model [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5886.
- [17] Esquivel PS, Rose NR, Kong YC. Induction of autoimmunity in good and poor responder mice with mouse thyroglobulin and lipopolysaccharide [J]. *J Exp Med*, 1977, 145(5): 1250–1263.
- [18] Yang J, Sundrud MS, Skepner J, et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(10): 493–500.
- [19] 胡伟, 王森, 王贤, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血 Th1/Th2/Th17/Treg 的表达水平及其临床意义 [J]. *东南大学学报(医学版)*, 2019, 38(2): 308–312.
- Hu W, Wang S, Wang X, et al. Expression of Th1/Th2/Th17/Treg in peripheral blood of patients with SLE and its clinical significance [J]. *J Southeast Univ (Med Sci Edit)*, 2019, 38(2): 308–312.
- [20] Yan JB, Luo MM, Chen ZY, et al. The function and role of the Th17/Treg cell balance in inflammatory bowel disease [J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 8813558.
- [21] 李丹, 王默, 纪元, 等. Th17/Treg 细胞及相关细胞因子在复发缓解型多发性硬化中的作用及机制 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2019, 26(2): 89–93, 98.
- Li D, Wang M, Ji Y, et al. Role of Th17/Treg cells and related cytokines in patients with relapsing remitting multiple sclerosis [J]. *Chin J Neuroimmunol Neurol*, 2019, 26(2): 89–93, 98.
- [22] Ngo ST, Steyn FJ, Mccombe PA. Gender differences in autoimmune disease [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2014, 35(3): 347–369.
- [23] Moulton VR. Sex hormones in acquired immunity and autoimmune disease [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2279.

[收稿日期] 2021-08-18

邱梦婷,席丹宁,韦乃瑄,等. 痛转化大鼠模型焦虑样情绪行为探索及其前扣带皮层兴奋性变化研究[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 459-468.

Qiu MT, Xi DN, Wei NX, et al. Exploration of anxiety-like behaviors and excitability changes in the anterior cingulate cortex of the hyperalgesia priming rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 459-468.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.002

## 痛转化大鼠模型焦虑样情绪行为探索及其前扣带皮层兴奋性变化研究

邱梦婷,席丹宁,韦乃瑄,王思思,易敏,郭子,房军帆,方剑乔,杜俊英\*

(浙江中医药大学第三临床医学院,浙江省针灸神经病学研究重点实验室,杭州 310053)

**【摘要】 目的** 动态观察痛转化大鼠模型不同时间点机械缩足阈(PWTs)、焦虑样情绪行为及双侧前扣带皮层(ACC)内即刻早期基因(c-Fos)、小清蛋白(PV)的表达变化,探索痛转化大鼠模型诱导焦虑样情绪的时间特征及ACC兴奋性变化。**方法** 所有实验大鼠随机分为假敏化组和敏化组,敏化组于大鼠左后足足底皮下注射1%角叉菜胶(Car)100  $\mu$ L(第1次),待痛阈恢复至基础水平后,于左侧足背中央注射100 ng/25  $\mu$ L前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)25  $\mu$ L(第2次),建立痛转化模型;假敏化组大鼠第1次注射等量生理盐水,第2次注射等量相同浓度PGE<sub>2</sub>。观察痛转化模型大鼠造模前(base)、Car注射后4、24、48、72 h和10 d,PGE<sub>2</sub>注射后1、4、24、48、72 h、7 d和14 d的PWTs,分别观察PGE<sub>2</sub>注射后24 h、7 d、14 d旷场实验(OF),PGE<sub>2</sub>注射后24 h、8 d、15 d高架O迷宫实验(EZM)中大鼠焦虑样行为改变情况。免疫荧光法检测Car注射后10 d,PGE<sub>2</sub>注射后4 h、24 h、8 d和15 d大鼠双侧ACC内c-Fos、PV阳性细胞的表达变化。**结果** 与假敏化组比较,敏化组大鼠Car注射后4、24、48、72 h患侧PWTs均显著降低( $P < 0.01$ ),Car注射后10 d患侧PWTs恢复至基础水平( $P > 0.05$ );PGE<sub>2</sub>注射后4 h患侧PWTs显著降低并持续至14 d( $P < 0.01$ )。PGE<sub>2</sub>注射后24 h,与假敏化组相比,敏化组大鼠在OF中的总运动距离、中央区运动距离、中央区停留时间、中央区进入次数明显减少( $P < 0.05$ );在EZM中的总运动距离、开放臂运动距离、开放臂停留时间、开放臂进入次数明显减少( $P < 0.05$ );PGE<sub>2</sub>注射后7 d(或8 d)和14 d(或15 d),与假敏化组比较,敏化组大鼠在OF、EZM中的各项行为学中均无显著性差异( $P > 0.05$ )。与假敏化组相比,敏化组大鼠双侧ACC内c-Fos阳性细胞表达于Car注射后10 d显著减少( $P < 0.01$ ),而PGE<sub>2</sub>注射后24 h、8 d显著增多( $P < 0.01$ ),PGE<sub>2</sub>注射后4 h、15 d无显著性差异( $P > 0.05$ )。与假敏化组相比,敏化组大鼠双侧ACC内PV阳性细胞表达于Car注射后10 d和PGE<sub>2</sub>注射后4 h、24 h、8 d均无显著性差异( $P > 0.05$ ),而PGE<sub>2</sub>注射后15 d同侧ACC内PV阳性细胞表达显著减少( $P < 0.01$ ),对侧无显著性差异( $P > 0.05$ )。**结论** 痛转化大鼠痛觉敏化状态可持续14 d以上,伴有短暂的应激性焦虑样情绪,不易诱发持续的焦虑样情绪;其ACC兴奋性转化前处于补偿性抑制状态,转化后兴奋性增强,兴奋性增强前期表现c-Fos增多,后期表现PV减少。

**【关键词】** 痛转化;焦虑;前扣带皮层;行为学;小清蛋白

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)04-0459-10

**【基金项目】** 浙江省自然科学基金项目(LY20H270006,LY19H270003),浙江省医药卫生科技项目创新人才项目(2021RC098),国家自然科学基金项目(82174490),浙江中医药大学研究生科学研究基金项目(2021YKJ10),浙江省教师专业发展项目(FX2021030)。

Funded by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China(LY20H270006,LY19H270003), Zhejiang Provincial Medicine Science and Technology Plan Project(Innovative Talent Project)(2021RC098), National Natural Science Foundation of China(82174490), "the Postgraduate Scientific Research Fund" of Zhejiang Chinese Medicine University(2021YKJ10), Zhejiang Provincial Teacher Professional Development Project(FX2021030)。

**【作者简介】** 邱梦婷(1995—),女,在读硕士研究生,研究方向:针灸干预痛情绪的中枢机制研究。Email:qiumengting2022@163.com

**【通信作者】** 杜俊英(1984—),女,副研究员,研究方向:针灸干预痛情绪的中枢机制研究。Email:dujunying0706@163.com

## Exploration of anxiety-like behaviors and excitability changes in the anterior cingulate cortex of the hyperalgesia priming rat model

QIU Mengting, XI Danning, WEI Naixuan, WANG Sisi, YI Min, GUO Zi, FANG Junfan, FANG Jianqiao, DU Junying\*

(the Third School of Clinical Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Key Laboratory of Acupuncture and Neurology of Zhejiang Province, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: DU Junying. E-mail: dujunying0706@163.com

**[Abstract]** **Objective** To explore the temporal characteristics of anxiety-like emotions induced in the hyperalgesia priming rat model and the excitability changes in the anterior cingulate cortex (ACC) via dynamically observing the paw withdrawal thresholds (PWTs), anxiety-like behaviors, and immediate early gene (c-Fos) and paralbumin (PV) expression in the bilateral ACC at different time points. **Methods** The experimental rats were randomly divided into the sham hyperalgesic priming (SHP) group and the hyperalgesic priming (HP) group. In the HP group, 100  $\mu\text{L}$  of 1%  $\lambda$ -carrageenan (Car) was subcutaneously injected into the left hind plantar (first time), and after the PWT returned to the basic level, 25  $\mu\text{L}$  of prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) (100 ng) was injected into the left dorsum (second time). In the SHP group, an equivalent volume of saline was injected (first time), and the same volume of  $\text{PGE}_2$  was then injected (second time). We measured the PWT of the hyperalgesia priming rat model before modeling (base), and at 4, 24, 48, 72 h, and 10 d after Car injection, and at 1, 4, 24, 48, 72 h, 7 d, and 14 d after  $\text{PGE}_2$  injection. Anxiety-like behaviors were observed in an open field (OF) at 24 h, 7 d, and 14 d after  $\text{PGE}_2$  injection, in an elevated zero maze (EZM) at 24 h, 8 d, and 15 d after  $\text{PGE}_2$  injection. Immunofluorescence was used to detect the expression changes in c-Fos and PV-positive cells in the bilateral ACC. **Results** Compared with the SHP group, the PWTs of the HP group were significantly reduced at 4, 24, 48, and 72 h after Car injection ( $P < 0.01$ ) and recovered to the basic level at 10 d after Car injection ( $P > 0.05$ ); whereas, the PWTs significantly decreased at 4 h after  $\text{PGE}_2$  injection and remained low for 14 days ( $P < 0.01$ ). Compared with the SHP group, the total distance, the distance in the central area, the time in the central area, and the number of central zone entries in the OF of the HP group were significantly reduced at 24 h after  $\text{PGE}_2$  injection ( $P < 0.05$ ). The total distance, the distance in the open arm, the time in the open arm, and the number of open arm entries in the EZM of the HP group were significantly reduced compared with the SHP ( $P < 0.05$ ). Interesting, there was no significant difference in anxiety-like behaviors in the OF and EZM at 7 d (or 8 d) and 14 d (or 15 d) after  $\text{PGE}_2$  injection between the SHP and HP groups ( $P > 0.05$ ). Compared with the SHP group, c-Fos positive expression in the bilateral ACC of the HP group was significantly decreased at 10 d after Car injection, while it was significantly increased at 24 h and 8 d after  $\text{PGE}_2$  injection ( $P < 0.01$ ), but there was no significant difference at 4 h and 15 d after  $\text{PGE}_2$  injection ( $P > 0.05$ ). There was no significant difference in PV-positive expression in the bilateral ACC at 10 d after Car injection and 4 h, 24 h, and 8 d after  $\text{PGE}_2$  injection ( $P > 0.05$ ). PV-positive expression on the ipsilateral side of the HP group was significantly decreased at 15 d after  $\text{PGE}_2$  injection compared with that of the SHP group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The hyperalgesia state in the hyperalgesia priming rat model can last for more than 14 days, accompanied by transient stress anxiety-like behaviors; however, it is not easy to induce persistent anxiety-like behaviors. The ACC excitability was in a state of compensatory inhibition before the transition, but was enhanced after the transition, characterized by increasing c-Fos expression in the early transition stage and decreasing PV expression in the later stage.

**[Keywords]** hyperalgesia priming; anxiety; anterior cingulate cortex; behavior; paralbumin

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

痛情绪是由慢性疼痛伴发或诱发的异常情绪反应,其能进一步加重患者的痛感觉,严重影响患者的身心健康和生活质量<sup>[1]</sup>。据流行病学调查显示,慢性疼痛患者中痛情绪的发生率高达 50%<sup>[2]</sup>,两者相互促进,形成恶性循环<sup>[3]</sup>,由于身体和精神状况并存,慢性疼痛患者饱受折磨甚至具有更高的

自杀倾向<sup>[4]</sup>。慢性疼痛和痛情绪之间的相互作用使得慢性疼痛的治疗在临床上具有挑战性,然而两者之间相互作用的时间点及其机制有待研究。

前扣带皮层 (anterior cingulate cortex, ACC) 是边缘系统的关键区域<sup>[5]</sup>,在急性和慢性疼痛中都被激活,且 ACC 中的突触长时程增强有助于维持疼痛

状态的情感成分<sup>[6]</sup>。c-Fos 被认为是伤害性刺激的标志物,已有大量研究表明 c-Fos 的表达水平可以作为前扣带皮层、海马、丘脑、杏仁核等核团兴奋性改变的标志物<sup>[7-10]</sup>。γ-氨基丁酸(GABA)能中间神经元是抑制性中间神经元,其不同脑区中的作用近年来被广泛报道<sup>[11-13]</sup>,而 PV 中间神经元在 GABA 能中间神经元中占比最大,高达 40%<sup>[14]</sup>,其在 ACC 或其他脑区中的作用也有着重要意义<sup>[15-16]</sup>。前期研究发现,弗氏完全佐剂诱导的慢性炎性痛大鼠在模后 4 周产生痛焦虑样行为,其痛焦虑样行为的发生与 ACC 内 PV 阳性中间神经元兴奋性降低有关<sup>[17]</sup>,且特异性调控 ACC 内 PV 阳性中间神经元的表达可以影响 ACC 内 c-Fos 的表达水平<sup>[18]</sup>。近年来有研究指出,当急性痛转化为慢性痛(痛转化)时,疼痛的发生机制产生了巨大的变化<sup>[19-20]</sup>,其变化是否与痛情绪的发生有关,尚未可知。痛转化模型是一个经典的急性痛转慢性痛模型,那么是否可以诱发痛转化模型大鼠的焦虑样情绪,有待研究。本研究旨在探索痛转化模型大鼠的焦虑情绪样行为及研究其 ACC 的兴奋性变化,结合课题组前期研究基础,动态观察角叉菜胶-前列腺素 E<sub>2</sub> 诱导的痛转化模型大鼠不同时间点机械缩足阈及焦虑样情绪行为改变,检测各组大鼠双侧 ACC 内 c-Fos、PV 阳性细胞的表达变化,为痛情绪的进一步研究和机制探讨提供一定的参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

76 只清洁级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重约 200 g,购自上海斯莱克实验动物公司【SCXK(沪)2017-0005】。自由进食和饮水,12 h 昼夜循环光照,室温(23 ± 2)℃,恒定湿度。实验时间:9:00 ~ 17:00,饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心【SYXK(浙)2021-0012】。所有实验操作符合中华人民共和国《实验动物管理条例》,符合浙江中医药大学动物伦理学要求(审批号:IACUC-20200302-06)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

角叉菜胶(λ-Carrageenan, Car, Sigma, 22049),前列腺素 E<sub>2</sub>(prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, Sigma, P 5640),兔抗 c-Fos 抗体(Abcam, ab 190289),兔抗 PV 抗体(Abcam, ab 11427),Alexa Flour-488 标记驴抗兔二抗(Abcam, ab 150061),von Frey 纤维刺激针(Stoelting, 美国),高架 O 迷宫(瑞沃德,中国),旷场(瑞沃德,中国),Smart 3.0 分析软件(Panlab, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分组及造模

分组:大鼠随机分为假敏化组和敏化组,每组分为 Car 注射后 10 d 和 PGE<sub>2</sub> 注射后 4 h、24 h、8 d、15 d(Car 10 d、PGE<sub>2</sub> 4 h、PGE<sub>2</sub> 24 h、PGE<sub>2</sub> 8 d、PGE<sub>2</sub> 15 d)5 个时间点,其中 Car 10 d、PGE<sub>2</sub> 4 h 和 PGE<sub>2</sub> 24 h 每组 6 只,PGE<sub>2</sub> 8 d 和 PGE<sub>2</sub> 15 d 每组 10 只。

造模:参考本课题组以往造模方法<sup>[21-22]</sup>,敏化组大鼠于左后足足底皮下注射 1%角叉菜胶(Car)100 μL,待痛阈恢复至基础水平后,于左足足背中央注射浓度为 100 ng/25 μL 的 PGE<sub>2</sub> 25 μL;假敏化组第 1 次注射 25 μL 生理盐水,第 2 次注射同等 PGE<sub>2</sub>。

#### 1.2.2 机械缩足阈(paw withdrawal thresholds, PWTs)

将大鼠置于铁丝网架透明箱内,适应环境 30 min,待大鼠笼子探索和主要梳理活动停止后,采用 Chaplan 等<sup>[23]</sup>建立的 up and down 法检测 PWTs,选取 0.4、0.6、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、15.0、26.0 g 总计 9 种强度的纤维丝套组,强度从 4.0 g 开始,von Frey 丝垂直刺向大鼠足底中央,稳定持续用力 6 s。如果大鼠有明显的缩足、甩足、抬足及舔足等躲避反应时,记为“X”,更换临近低一强度刺激丝继续检测;如果没有躲避反应,则记为“O”,更换临近高一强度刺激丝继续检测,以第 1 次出现“XO”或“OX”为开始,再连续测 4 次,得到一串以“O”或“X”组合的序列,如“OOXOXOX”。用公式:  $PWTs(g) = (10^{[Xf + \kappa\delta]}) / 10000$ , 计算并记录。Xf 为刺激丝强度的对数值,序列组合查表获得 κ 值,δ 此处为 0.231。若计算得出 PWTs > 26.0 g 或 < 0.4 g,仍以 26.0 g 或 0.4 g 作为最大或最小值。

#### 1.2.3 旷场实验(open field, OF)

参考课题组前期的实验方法<sup>[24]</sup>,测试前将实验大鼠放入实验室中适应环境 30 min,环境安静,室温(23 ± 2)℃,避免直射光线,保持较暗的环境。旷场实验箱长宽均 100 cm,高 50 cm,将大鼠置于旷场中央区域,先适应 30 s,再记录 5 min 的活动情况,结束后取出大鼠,用 10% 乙醇清洗避免气味干扰。Smart 3.0 软件进行数据分析:将旷场等分为 16 个边长为 25 cm 的正方形区域,设置最中心 4 个正方形区域为中央区,其他区域为周围区。分析大鼠的总运动距离、中央区运动距离、中央区停留时间和中央区进入次数。

### 1.2.4 高架 0 迷宫(elevated zero maze, EZM)

环境要求及适应条件同 OF 实验。高架 0 迷宫为直径 100 cm, 高 50 cm 的圆形平台, 圆形平台由两个开放臂和闭合臂组成。将实验大鼠头部面向开放臂, 轻缓地放置于闭合臂和开放臂的交界处, 进行摄像, 先适应 30 s, 再记录 5 min 的活动情况, 结束后取出大鼠, 用 10% 乙醇清洗避免气味干扰。Smart 3.0 软件进行数据分析: 将高架 0 迷宫分为开放臂和闭合臂交替的 4 个区域, 有挡板的为闭合臂, 无挡板的为开放臂。分析大鼠的总运动距离、开放臂运动距离、开放臂停留时间和开放臂进入次数。

### 1.2.5 免疫荧光(immunofluorescence, IF)样本制备

所有行为学实验结束后, 用戊巴比妥钠(80 mg/kg)腹腔注射麻醉, 经主动脉快速灌注生理盐水(4℃预冷), 至大鼠眼球和肝变白。再缓慢灌注 4% 多聚甲醛, 至大鼠身体全身僵硬。将大鼠全脑快速取出, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 15% 和 30% 的蔗糖梯度脱水至脑组织沉底, 液氮速冻, 冰冻切片机切取 30  $\mu$ m 脑组织样本, -80℃ 冰箱保存备用。

### 1.2.6 IF 检测

脑组织切片 TBST 清洗 6 遍, 37℃ 水浴箱内封闭液(10% 驴血清、90% TBST、0.3% Triton X-100)封闭 1 h, 加入兔抗 c-Fos 抗体(1:500)或兔抗 PV 抗体(1:400)4℃ 孵育, 18 h 后于 37℃ 水浴箱复温 2 h, TBST 清洗 6 遍。避光条件下, 加入 Alexa Fluor-488 驴抗兔二抗(1:500), 于 37℃ 水浴箱孵育 1 h, TBST 清洗 6 遍。切片干燥后, 抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)封片。使用蔡司荧光显微镜 20 倍物镜拍摄图像。通过大鼠脑图谱确定 ACC 解剖区域的边界, 手动计数双侧 ACC 区域 PV 阳性细胞数量;

在双侧 ACC 区域分别框选 0.1 mm<sup>2</sup> 矩形选区, 手动计数此区域中 c-Fos 阳性细胞数量。

### 1.3 统计学分析

实验数据用平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, SPSS 20.0 软件统计分析。PWTs、OF、EZM、IF 数据, 均采用独立样本 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

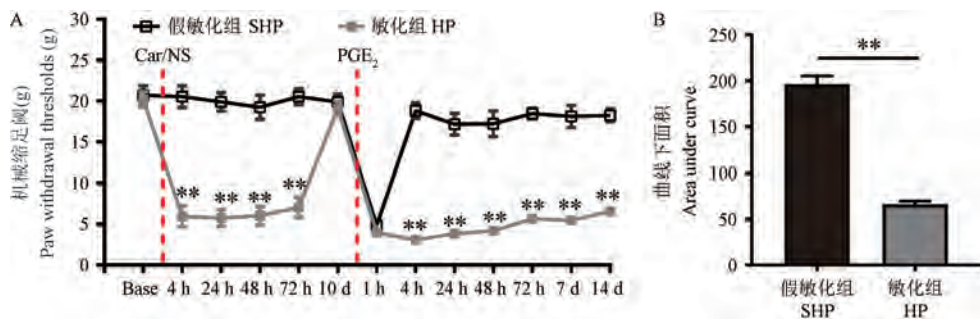
### 2.1 痛转化模型大鼠不同时间点 PWTs

分别检测各组大鼠 Car 注射前(base), Car 注射后 4、24、48、72 h、10 d, PGE<sub>2</sub> 注射后 1、4、24、48、72 h、7 d 和 14 d 的 PWTs。

如图 1A, 与假敏化组比较敏化组大鼠 PWTs 于 Car 注射前无统计学意义( $P > 0.05$ ), 于 Car 注射后 4 h 显著降低( $P < 0.01$ ), 48 h 后逐渐上升, 第 10 天恢复至基础水平( $P > 0.05$ )。PGE<sub>2</sub> 注射后 1 h 两组大鼠 PWTs 均显著降低且两组间无统计学意义( $P > 0.05$ )。PGE<sub>2</sub> 注射后 4 h, 假敏化组大鼠 PWTs 恢复正常, 但敏化组大鼠 PWTs 仍保持在较低水平, 并持续 14 d。如图 1B, 与假敏化组大鼠比较, 敏化组大鼠 PWTs 曲线下面积显著降低( $P < 0.01$ )。以上结果说明痛转化大鼠模型制备成功且大鼠机械痛觉敏化可持续至 PGE<sub>2</sub> 注射后 14 d。

### 2.2 痛转化模型大鼠不同时间点 OF 行为学

分别在 PGE<sub>2</sub> 注射后 24 h、7 d 和 14 d 进行 OF 实验, 观察痛转化模型大鼠焦虑样行为。如图 2A, 2B 所示, PGE<sub>2</sub> 注射后 24 h, 与假敏化组比较, 敏化组大鼠 OF 总运动距离、中央区运动距离、中央区停留时间和中央区进入次数显著减少, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ), 结果表明 PGE<sub>2</sub> 注射后 24 h 敏化组大鼠运动能力减弱且焦虑行为增加, 出现焦虑



注: 与假敏化组相比, \*\*  $P < 0.01$ 。

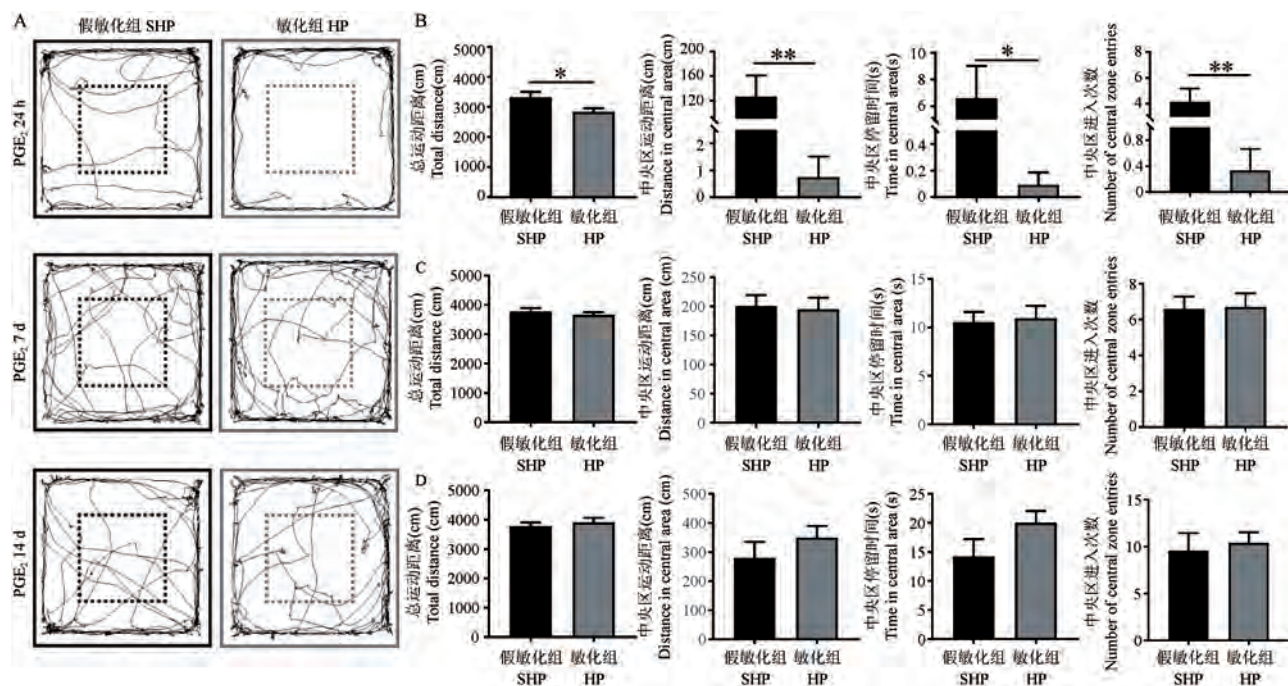
图 1 各组大鼠不同时间点 PWTs

Note. Compared with the SHP, \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 1 PWTs at different time points in each group rats

样情绪。由图 2A, 2C, 2D 可见,  $\text{PGE}_2$  注射后 7 d 和 14 d, 与假敏化组比较, 敏化组大鼠 OF 总运动距离、中央区运动距离、中央区停留时间和中央区进入次

数均无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 结果表明  $\text{PGE}_2$  注射后 7 d 和 14 d 敏化组大鼠运动能力恢复, 未出现明显的焦虑样行为。



注: 与假敏化组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。(下图同)

图 2 各组大鼠不同时间点 OF 行为学

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

Figure 2 OF behavior at different time points in each group rats

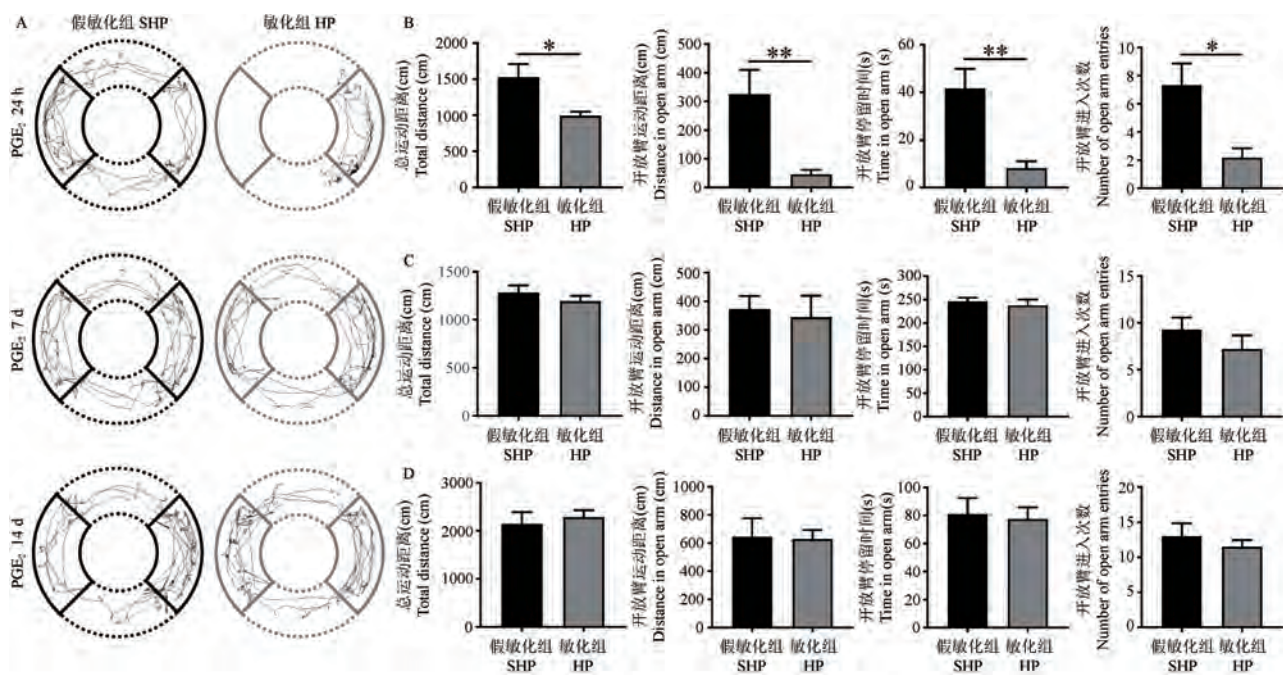


图 3 各组大鼠不同时间点 EZM 行为学

Figure 3 EZM behavior at different time points in each group rats

### 2.3 痛转化模型大鼠不同时间点 EZM 行为学

分别在 PGE<sub>2</sub> 注射后 24 h、8 d 和 15 d 进行 EZM 实验,观察痛转化模型大鼠焦虑样行为。由图 3A,3B 所示,PGE<sub>2</sub> 注射后 24 h,与假敏化组比较,敏化组大鼠 EZM 总运动距离、开放臂运动距离、开放臂停留时间和开放臂进入次数显著减少,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),结果表明 PGE<sub>2</sub> 注射后 24 h 敏化组大鼠运动能力减弱且焦虑行为增加,出现焦虑样情绪。由图 3A,3C,3D 可见,PGE<sub>2</sub> 注射后

8 d 和 15 d,与假敏化组比较,敏化组大鼠 EZM 总运动距离、开放臂运动距离、开放臂停留时间和开放臂进入次数均无显著性差异( $P > 0.05$ ),结果表明 PGE<sub>2</sub> 注射后 8 d 和 15 d 敏化组大鼠运动能力恢复,未出现明显焦虑样行为。

### 2.4 痛转化模型大鼠不同时间点 ACC 中 c-Fos 阳性细胞表达

分别检测 Car 注射后 10 d,PGE<sub>2</sub> 注射后 4 h、24 h、8 d 和 15 d 各组大鼠 ACC 内 c-Fos 阳性细胞

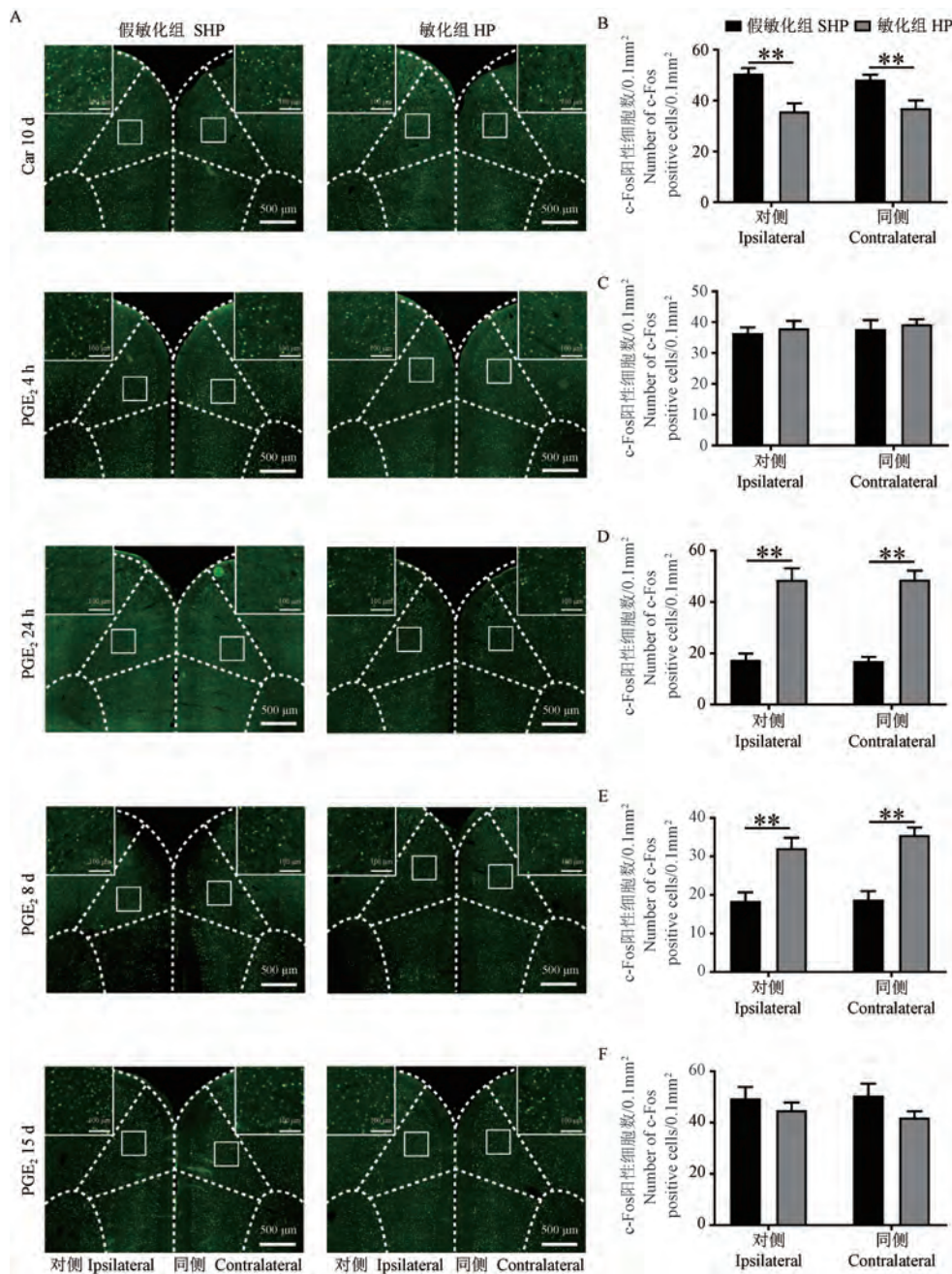


图 4 各组大鼠不同时间点 ACC 内 c-Fos 阳性细胞表达

Figure 4 Expression of c-Fos positive cells in ACC at different time points in each group rats

的表达。如图 4A, 4B 所示, Car 注射后 10 d, 与假敏化组比, 敏化组大鼠双侧 ACC 内 c-Fos 阳性细胞数量显著减少 ( $P < 0.01$ )。如图 4A, 4C 所示, PGE<sub>2</sub> 注射后 4 h, 与假敏化组比较, 敏化组大鼠 ACC 内 c-Fos 阳性细胞数量无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。如图 4A, 4D, 4E 所示, PGE<sub>2</sub> 注射后 24 h 和 8 d, 与假敏化组比较, 敏化组大鼠双侧 ACC 内 c-Fos 阳性细胞数量显著增多 ( $P < 0.01$ )。如图 4A, 4F 所示, PGE<sub>2</sub> 注射后 15 d, 与假敏化组比, 敏化组大鼠 ACC 内 c-Fos 阳性细胞数量无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

## 2.5 痛转化模型大鼠不同时间点 ACC 中 PV 阳性细胞表达

分别检测 Car 注射后 10 d, PGE<sub>2</sub> 注射后 4、24 h、8 d 和 15 d 各组大鼠 ACC 内 PV 阳性细胞的表达。如图 5A ~ 5E 所示, Car 注射后 10 d 和 PGE<sub>2</sub> 注射后 4 h、24 h、8 d, 与假敏化组比, 敏化组大鼠双侧 ACC 内 PV 阳性细胞数量均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。如图 5F 所示, PGE<sub>2</sub> 注射后 15 d, 与假敏化组比, 敏化组大鼠 ACC 内同侧 PV 阳性细胞数量显著减少 ( $P < 0.05$ ), 对侧无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

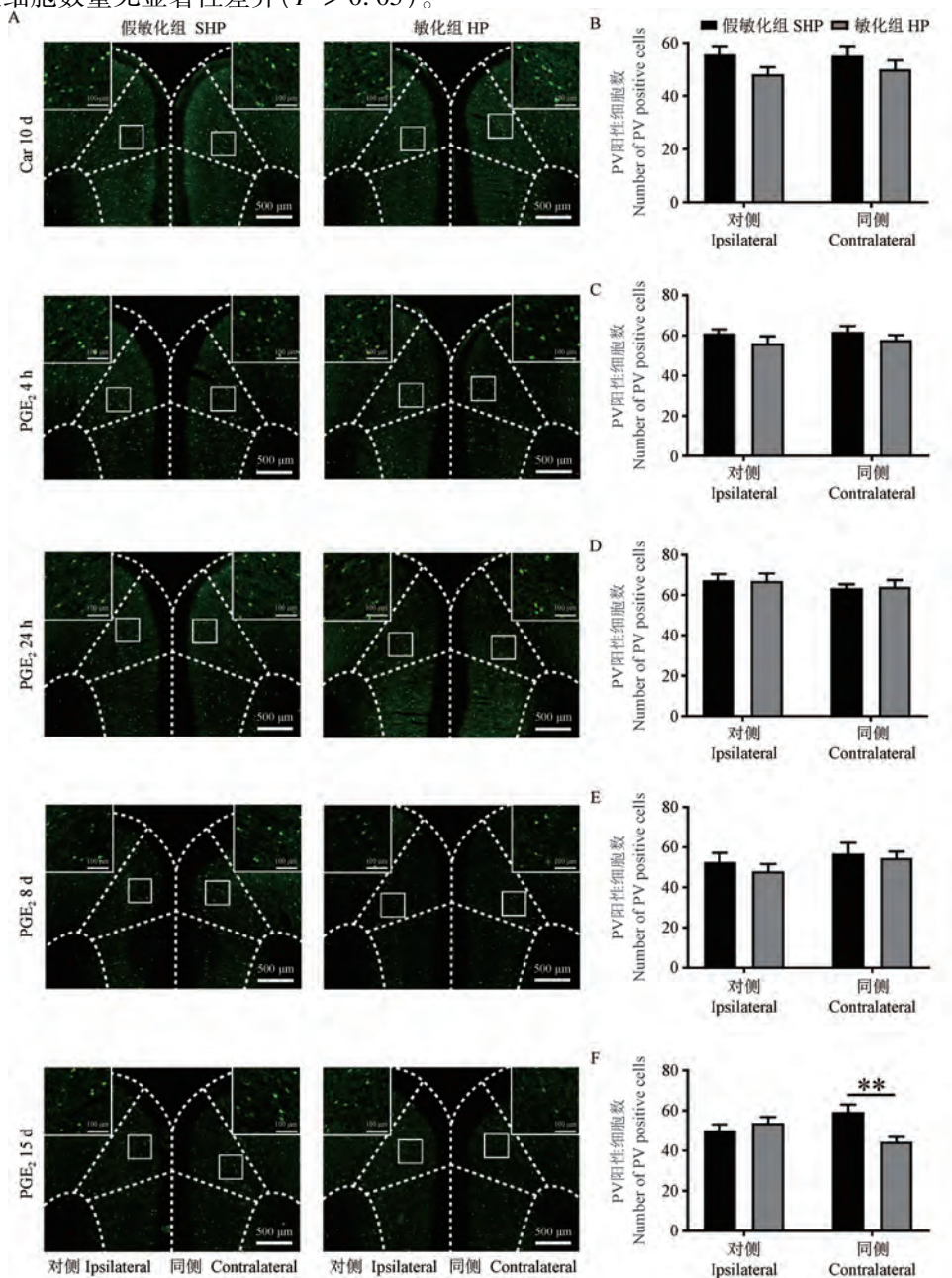


图 5 各组大鼠不同时间点 ACC 内 PV 阳性细胞表达

Figure 5 Expression of PV positive cells in ACC at different time points in each group rats

### 3 讨论

随着疼痛研究的深入,认为疼痛不仅是一种与组织损伤相关的感觉,而且包括情绪、认知等主观体验<sup>[25]</sup>。流行病学研究表明 20% ~ 50% 的慢性疼痛患者伴有负性情绪,如焦虑、抑郁等,使慢性疼痛的临床治疗变得更加困难<sup>[26]</sup>。因此,有效控制痛情绪的产生对慢性疼痛的治疗意义非常。目前一种痛觉敏化诱发模型广泛用于研究从急性疼痛到慢性疼痛转变的潜在机制<sup>[27-29]</sup>,然而急慢性痛转化是否会引起痛相关情绪的变化尚缺少相关研究。

本研究通过二次注射来建立痛觉敏化诱发即急慢性痛转化模型,第 1 次注射角叉菜胶给予大鼠足底炎性刺激,待大鼠痛阈恢复正常第 2 次注射 PGE<sub>2</sub> 再次诱发疼痛,该疼痛与单纯 PGE<sub>2</sub> 诱发的短暂急性痛不同,持续时间超过 14 d,此结果与前人的研究趋势一致<sup>[30]</sup>。本实验在痛觉敏化诱发后不同时间点采用 OF 和 EZM 行为检测大鼠的焦虑样行为,结果显示 PGE<sub>2</sub> 注射后 24 h 敏化组大鼠运动能力下降且产生焦虑样情绪,然而在 PGE<sub>2</sub> 注射后 1 周和 2 周均未出现焦虑样行为的改变。此结果表明痛转化模型大鼠 1 ~ 2 周难以诱发出焦虑样行为,而 PGE<sub>2</sub> 注射后 24 h 出现的短暂性焦虑样情绪,可能是因为疼痛的急剧加重导致的应激行为。前期研究发现 CFA 诱导的慢性炎性痛模型大鼠,在 2 ~ 3 周时并未表现出明显的焦虑样情绪,而在 4 周以后出现明显的焦虑样情绪<sup>[24]</sup>。这提示,慢性疼痛诱发的负面情绪是随着时间的推移而出现的,所采用的痛转化模型大鼠前期出现应激性焦虑样情绪,当慢性疼痛趋于稳定后,其焦虑样情绪反而消失了,若疼痛持续时间延长至 4 周以上,其焦虑样情绪有可能再次诱发。

众所周知,ACC 是疼痛感知和情感控制的关键皮质区域<sup>[31-32]</sup>。本实验检测了急慢性痛转化模型大鼠 ACC 水平不同时间点 c-Fos 和 PV 阳性细胞数变化情况。c-Fos 是一种早期即刻基因,常被认为是神经元活性的标志物<sup>[33]</sup>。PV 阳性中间神经元是 GABA 能中间神经元中占比最大的一种亚型,具有高代谢性和高电活性,是中枢神经抑制系统的重要标志<sup>[34-35]</sup>,在疼痛和焦虑抑郁等精神疾病中表现出重要的调节作用<sup>[36-38]</sup>。研究表明,组织损伤或急性疼痛会诱导持续的神经元可塑性变化,即使组织损伤修护后,其神经元可塑性改变仍然存在,这种现

象称为潜伏性疼痛敏化(latent pain sensitization, LS),通过代偿性疼痛抑制系统(包括阿片类药物、神经肽 Y 和  $\alpha 2$ -肾上腺素能受体信号传导)将疼痛保持在缓解状态<sup>[39-42]</sup>。实验中观察到,注射角叉菜胶后大鼠足底出现急性疼痛,10 d 后疼痛恢复正常,双侧 ACC 内 c-Fos 阳性细胞数显著减少。由此推测敏化组大鼠机械痛阈恢复至正常水平后处于 LS 状态,此时疼痛的缓解可能与 ACC 兴奋性的抑制相关。大量研究表明,当患者或动物处于慢性疼痛或精神障碍时,ACC 的兴奋性会增强<sup>[43-45]</sup>。实验中也观察到类似结果,注射 PGE<sub>2</sub> 后 24 h、8 d,敏化组大鼠双侧 ACC 区域 c-Fos 阳性细胞数显著增加;注射 PGE<sub>2</sub> 后 15 d 双侧 ACC 区域 c-Fos 阳性细胞表达无明显改变,而同侧 ACC 区域 PV 阳性细胞数显著减少。当注射 PGE<sub>2</sub> 后,敏化组大鼠接受二次疼痛刺激,此时 LS 状态失衡,ACC 内神经元兴奋性增强,诱导痛觉敏化的产生;且 ACC 中神经元的兴奋有其时间特异性:前期以 c-Fos 表达增加,兴奋性神经元功能增强为主;而后期以 PV 表达减少,抑制性神经元功能减弱为主。

本实验通过建立急慢性痛转化模型,观察不同时间点疼痛和情绪行为,发现 Car 和 PGE<sub>2</sub> 诱发的痛转化模型大鼠痛觉敏化状态可超过 14 d;此模型可出现短暂的应激性焦虑样行为改变,但在 1 ~ 2 周内未观察到焦虑样行为改变,由此我们认为此模型不易诱发焦虑样情绪或者其情绪改变需要更长时间的观察;通过检测不同时间点 ACC 内 c-Fos 和 PV 阳性细胞的数量,发现痛转化模型大鼠 ACC 兴奋性发生改变,Car 诱导的炎性痛恢复后 ACC 兴奋性处于抑制状态,而注射 PGE<sub>2</sub> 后诱发痛觉敏化后 ACC 兴奋性增强。本研究探讨了急慢性痛转化模型诱发痛焦虑样情绪的情况,为痛情绪的进一步研究提供一定的参考价值。

### 参 考 文 献(References)

- [1] Edge R, Mills R, Tennant A, et al. Do pain, anxiety and depression influence quality of life for people with amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease? A national study reconciling previous conflicting literature [J]. J Neurol, 2020, 267(3): 607-615.
- [2] Feingold D, Brill S, Goor-Aryeh I, et al. Depression and anxiety among chronic pain patients receiving prescription opioids and medical marijuana [J]. J Affect Disord, 2017, 218: 1-7.
- [3] Arango-Dávila CA, Rincón-Hoyos HG. Depressive disorder, anxiety disorder and chronic pain: multiple manifestations of a common clinical and pathophysiological core [J]. Rev Colomb

- Psiquiatr (Engl Ed), 2018, 47(1): 46–55.
- [ 4 ] Kirtley OJ, Rodham K, Crane C. Understanding suicidal ideation and behaviour in individuals with chronic pain: a review of the role of novel transdiagnostic psychological factors [J]. *Lancet Psychiatry*, 2020, 7(3): 282–290.
  - [ 5 ] Xiao X, Ding M, Zhang YQ. Role of the anterior cingulate cortex in translational pain research [J]. *Neurosci Bull*, 2021, 37(3): 405–422.
  - [ 6 ] Bliss TV, Collingridge GL, Kaang BK, et al. Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(8): 485–496.
  - [ 7 ] Xiao CC, Liu DZ, Du JY, et al. Early molecular alterations in anterior cingulate cortex and hippocampus in a rodent model of neuropathic pain [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 166: 82–91.
  - [ 8 ] Lee EH, Park JY, Kwon HJ, et al. Repeated exposure with short-term behavioral stress resolves pre-existing stress-induced depressive-like behavior in mice [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6682.
  - [ 9 ] Joffe ME, Santiago CI, Oliver KH, et al. mGlu<sub>2</sub> and mGlu<sub>3</sub> negative allosteric modulators divergently enhance thalamocortical transmission and exert rapid antidepressant-like effects [J]. *Neuron*, 2020, 105(1): 46–59.
  - [ 10 ] Wilson TD, Valdivia S, Khan A, et al. Dual and opposing functions of the central amygdala in the modulation of pain [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(2): 332–346.
  - [ 11 ] Juarez-Salinas DL, Braz JM, Etlin A, et al. GABAergic cell transplants in the anterior cingulate cortex reduce neuropathic pain aversiveness [J]. *Brain*, 2019, 142(9): 2655–2669.
  - [ 12 ] Xiao Q, Zhou XY, Wei PF, et al. A new GABAergic somatostatin projection from the BNST onto accumbal parvalbumin neurons controls anxiety [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(9): 4719–4741.
  - [ 13 ] Yin WW, Mei LS, Sun TT, et al. A central amygdala-ventrolateral periaqueductal gray matter pathway for pain in a mouse model of depression-like behavior [J]. *Anesthesiology*, 2020, 132(5): 1175–1196.
  - [ 14 ] DeFelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, et al. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(3): 202–216.
  - [ 15 ] Kang SJ, Kwak C, Lee J, et al. Bidirectional modulation of hyperalgesia via the specific control of excitatory and inhibitory neuronal activity in the ACC [J]. *Mol Brain*, 2015, 8(1): 81.
  - [ 16 ] Graham DL, Durai HH, Garden JD, et al. Loss of dopamine D2 receptors increases parvalbumin-positive interneurons in the anterior cingulate cortex [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2015, 6(2): 297–305.
  - [ 17 ] Shao F, Fang J, Qiu M, et al. Electroacupuncture ameliorates chronic inflammatory pain-related anxiety by activating PV Interneurons in the Anterior cingulate cortex [J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 691931.
  - [ 18 ] Shao FB, Fang JF, Wang SS, et al. Anxiolytic effect of GABAergic neurons in the anterior cingulate cortex in a rat model of chronic inflammatory pain [J]. *Mol Brain*, 2021, 14(1): 139.
  - [ 19 ] Huang WY, Dai SP, Chang YC, et al. Acidosis mediates the switching of Gs-PKA and Gi-PKC $\epsilon$  dependence in prolonged hyperalgesia induced by inflammation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125022.
  - [ 20 ] Sun WH, Chen CC. Roles of proton-sensing receptors in the transition from acute to chronic pain [J]. *J Dent Res*, 2016, 95(2): 135–142.
  - [ 21 ] Wang SS, Du JY, Xi DN, et al. Role of GABAAR in the transition from acute to chronic pain and the analgesic effect of electroacupuncture on hyperalgesic priming model rats [J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 691455.
  - [ 22 ] 王思思, 孙海樺, 杜俊英, 等. 电针干预痛转化效应及其对背根神经节中蛋白激酶 C $\epsilon$  表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2018, 43(11): 677–681.  
Wang SS, Sun HJ, Du JY, et al. Effect of electroacupuncture on pain transition and content of protein kinase C $\epsilon$  in dorsal root ganglia in hyperalgesia rats [J]. *Acupunct Res*, 2018, 43(11): 677–681.
  - [ 23 ] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55–63.
  - [ 24 ] 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.  
Shao FB, Fang JF, Wang SS, et al. Observation of the anxiety and depression-like behavior induced by chronic inflammatory pain in rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(2): 167–174.
  - [ 25 ] Raja SN, Carr DB, Cohen M, et al. The revised international association for the study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises [J]. *Pain*, 2020, 161(9): 1976–1982.
  - [ 26 ] Mills SEE, Nicolson KP, Smith BH. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies [J]. *Br J Anaesth*, 2019, 123(2): e273–e283.
  - [ 27 ] Chen WN, Lee CH, Lin SH, et al. Roles of ASIC3, TRPV1, and NaV1.8 in the transition from acute to chronic pain in a mouse model of fibromyalgia [J]. *Mol Pain*, 2014, 10: 40.
  - [ 28 ] Kim JV, Megat S, Moy JK, et al. Neurologin 2 regulates spinal GABAergic plasticity in hyperalgesic priming, a model of the transition from acute to chronic pain [J]. *Pain*, 2016, 157(6): 1314–1324.
  - [ 29 ] Dai SP, Huang YH, Chang CJ, et al. TDAG8 involved in initiating inflammatory hyperalgesia and establishing hyperalgesic priming in mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41415.
  - [ 30 ] Reichling DB, Levine JD. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain [J]. *Trends Neurosci*, 2009, 32(12): 611–618.
  - [ 31 ] Zhuo M. Neural mechanisms underlying anxiety-chronic pain interactions [J]. *Trends Neurosci*, 2016, 39(3): 136–145.

- [32] Gungor NZ, Johansen J. A chronic pain in the ACC [J]. *Neuron*, 2019, 102(5): 903–905.
- [33] Nishi M. Effects of early-life stress on the brain and behaviors; implications of early maternal separation in rodents [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7212.
- [34] Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits [J]. *Neuron*, 2016, 91(2): 260–292.
- [35] Spiegel I. Experience-regulated molecular mechanisms in cortical GABAergic interneurons; from cellular functions to control over circuit plasticity [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2021, 67: 145–154.
- [36] Wang J, Tang J, Liang X, et al. Hippocampal PGC-1 $\alpha$ -mediated positive effects on parvalbumin interneurons are required for the antidepressant effects of running exercise [J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11(1): 222.
- [37] Ruden JB, Dugan LL, Konradi C. Parvalbumin interneuron vulnerability and brain disorders [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2021, 46(2): 279–287.
- [38] Zhang ZZ, Gadotti VM, Chen L, et al. Role of prefrontal GABAergic circuits in sensory and emotional aspects of neuropathic pain [J]. *Cell Rep*, 2015, 12(5): 752–759.
- [39] Custodio-Patsey L, Donahue RR, Fu W, et al. Sex differences in kappa opioid receptor inhibition of latent postoperative pain sensitization in dorsal horn [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 163: 107726.
- [40] Walwyn WM, Chen W, Kim H, et al. Sustained suppression of hyperalgesia during latent sensitization by  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -opioid receptors and  $\alpha$ 2A adrenergic receptors: role of constitutive activity [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(1): 204–221.
- [41] Taylor BK, Corder G. Endogenous analgesia, dependence, and latent pain sensitization [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2014, 20: 283–325.
- [42] Corder G, Doolen S, Donahue RR, et al. Constitutive  $\mu$ -opioid receptor activity leads to long-term endogenous analgesia and dependence [J]. *Science*, 2013, 341(6152): 1394–1399.
- [43] Bushnell MC, Ceko M, Low LA. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(7): 502–511.
- [44] Tian S, Sun YR, Shao JN, et al. Predicting escitalopram monotherapy response in depression: The role of anterior cingulate cortex [J]. *Hum Brain Mapp*, 2020, 41(5): 1249–1260.
- [45] Morris LS, Sprenger C, Koda K, et al. Anterior cingulate cortex connectivity is associated with suppression of behaviour in a rat model of chronic pain [J]. *Brain Neurosci Adv*, 2018, 2: 2398212818779646.

[收稿日期] 2022-01-21

何跃,徐航,冯德超,等. 生物钟蛋白 Rev-erb $\alpha$  激动剂抑制高脂饮食诱导小鼠前列腺组织炎症的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 469-475.

He Y, Xu H, Feng DC, et al. Circadian clock protein Rev-erb $\alpha$  agonist inhibits high-fat diet-induced inflammation of the prostate tissue in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 469-475.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.003

# 生物钟蛋白 Rev-erb $\alpha$ 激动剂抑制高脂饮食诱导小鼠前列腺组织炎症的实验研究

何跃<sup>1,2\*</sup>, 徐航<sup>2</sup>, 冯德超<sup>2</sup>, 曹德宏<sup>2</sup>, 艾建忠<sup>2</sup>, 杨璐<sup>2</sup>, 魏强<sup>2</sup>

(1. 遂宁市中心医院泌尿外科, 四川 遂宁 629000; 2. 四川大学华西医院泌尿外科/泌尿外科研究所, 成都 610041)

**【摘要】** 目的 验证生物钟蛋白 Rev-erb $\alpha$  激动剂是否能够抑制高脂饮食诱导的小鼠前列腺组织炎症,并探讨其机制。方法 C57B/6J 雄性小鼠分为4组:普通饮食组;高脂饮食组;高脂饮食 + SR9009 组;高脂饮食 + control 组。检测小鼠体重、外周血胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)及前列腺重量。前列腺组织 HE 染色并转录组测序,免疫组化评估 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B-P65 和 CCL21 的表达水平。结果 与普通饮食组相比,高脂饮食组小鼠的体重、前列腺指数、血清 TG 和 TC 水平均明显升高,高脂饮食 + SR9009 组小鼠的体重、前列腺指数、血清 TG 和 TC 水平明显低于高脂饮食 + control 组。HE 染色,高脂饮食组小鼠前列腺组织内炎性细胞浸润较普通饮食组增多,SR9009 干预后的高脂饮食小鼠前列腺组织炎性细胞浸润减少。转录组测序差异基因分析 NF- $\kappa$ B 通路中的 Ccl21a、Ccr7、Tlr4、Il6、Il1b、Cxcr2 的表达水平在高脂饮食组较普通饮食组升高,而其表达水平在高脂饮食 + SR9009 组较高脂饮食 + control 组降低。IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B-P65 和 CCL21a 在4组小鼠前列腺中的表达强度差异趋势与测序结果的差异趋势一致。结论 生物钟蛋白 Rev-erb $\alpha$  可能通过 NF- $\kappa$ B 通路调节高脂饮食诱导的前列腺组织炎症水平。

**【关键词】** 组织炎症;生物钟蛋白 Rev-erb $\alpha$ ;前列腺;小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0469-07

## Circadian clock protein Rev-erb $\alpha$ agonist inhibits high-fat diet-induced inflammation of the prostate tissue in mice

HE Yue<sup>1,2\*</sup>, XU Hang<sup>2</sup>, FENG Dechao<sup>2</sup>, CAO Dehong<sup>2</sup>, AI Jianzhong<sup>2</sup>, YANG Lu<sup>2</sup>, WEI Qiang<sup>2</sup>

(1. Department of Urology, Suining Central Hospital, Suining 629000, China. 2. Department of Urology, Institute of Urology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041)

Corresponding author: HE Yue. E-mail: uro\_heyue@163.com

**【Abstract】 Objective** To verify whether Rev-erb $\alpha$  agonists can inhibit the inflammation of prostate tissue in mice induced by a high-fat diet, and to explore the mechanism of action. **Methods** C57B/6J male mice were divided into four groups: normal diet group, high-fat diet group, high-fat diet + SR9009 group, high-fat diet + control group. The body weight, peripheral blood cholesterol, triglyceride level, and prostate weight were measured. The prostate tissue was stained with hematoxylin-eosin (HE), subjected to transcriptome sequencing, and the expression levels of IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B-P65, and CCL21 were evaluated by immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal diet group, the body weight, prostatic index, and the serum TG and TC levels of mice in the high-fat diet group were significantly increased, and

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81974099,81770756),成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划医药专项(YYZX2021110)。Funded by the National Natural Science Foundation of China (81974099, 81770756), “Xinglin Scholars” Disciplinary Talent Research Promotion Plan Medicine Special of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (YYZX2021110)。

**【作者简介】** 何跃(1982—),男,医学博士,研究方向:良性前列腺增生和组织炎症。Email:uro\_heyue@163.com

the body weight, prostatic index, and serum TG and TC levels of the mice in the high-fat diet + SR9009 group were significantly lower than those of the high-fat diet + control group mice. HE staining showed that inflammatory cell infiltration into the prostate tissue of the mice in the high-fat diet group was increased compared with the normal diet group, and inflammatory cell infiltration into the prostate tissue of the mice on the high-fat diet was reduced after intervention with SR9009. The expression levels of Ccl21a, Ccr7, Tlr4, Il6, Il1b, and Cxcr2 were higher in the high-fat diet group than in the normal diet group, as demonstrated by heatmap analysis, but these expression levels were lower in the high-fat diet + SR9009 group than in the high-fat diet + control group. The differences in the expression intensity of IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B-P65, and CCL21a in the prostate of the four groups of mice were consistent with the differences in the sequencing result. **Conclusions** The circadian clock protein Rev-erb $\alpha$  can regulate the inflammation level of prostate tissue induced by a high-fat diet through the NF- $\kappa$ B pathway.

**【Keywords】** tissue inflammation; circadian clock protein Rev-erb $\alpha$ ; prostate; mice

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

良性前列腺增生 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 是中老年男性排尿困难最常见的原因之一, 主要表现为前列腺细胞增生致体积增大<sup>[1]</sup>。BPH 的病理生理仍然不完全清楚<sup>[2]</sup>。以前普遍认为 BPH 的发生是年龄、遗传和种族等不可逆转的危险因素引起的。但是目前研究发现了一些可逆转的危险因素, 包括体力劳动、饮酒、饮食等生活方式, 代谢综合征 (metabolic syndrome, MetS) 及其亚组成分如肥胖、糖尿病、血脂异常等, 性激素紊乱和前列腺组织炎症<sup>[3]</sup>。其中前列腺组织炎症在 BPH 的发生、发展过程中发挥了不可忽视的作用。研究表明以针对前列腺组织炎症为目标的治疗, 可以缓解 BPH 的进展, 提高临床疗效<sup>[4]</sup>。体外细胞实验也证明了炎症因子能够刺激前列腺细胞增生<sup>[5]</sup>。

MetS 是一种自身代谢水平紊乱的病理状态, 包括腹型肥胖、高血压、血脂异常、血糖增高等<sup>[6]</sup>。研究证明 MetS (特别血脂异常) 与前列腺组织炎症程度有关; MetS 及其亚组成分显著增加了前列腺组织标本中的炎症指数<sup>[7]</sup>。高甘油三酯、高血糖是导致较严重的前列腺组织炎症的独立危险因素。因此, 高脂可能促进前列腺组织炎症, 这也是 BPH 发生和发展的关键因素。

生物钟即昼夜节律, 对人体健康的影响越来越受到人们的关注。研究表明昼夜节律紊乱的人患糖尿病、肥胖、抑郁症和癌症等慢性疾病的几率显著增加<sup>[8-9]</sup>。细胞核受体 Rev-erb, 包括 Rev-erb $\alpha$  和 Rev-erb $\beta$ , 它们的编码基因分别为 NR1D1 和 NR1D2, 是生物钟至关重要的组件, 在维持昼夜节律方面起着重要的作用<sup>[10]</sup>。研究证明 Rev-erb $\alpha$  在核心生物钟和免疫炎症通路之间起着关键的桥梁作用<sup>[11]</sup>。生物钟蛋白 Rev-erb $\alpha$  能够调节机体的代谢

活动; 另外研究表明生物钟蛋白 Rev-erb $\alpha$  能够降低组织的炎症水平<sup>[12]</sup>。因此, 利用高脂饮食诱导小鼠前列腺组织产生炎症, 通过 Rev-erb $\alpha$  激动剂 (SR9009) 进行腹腔注射, 验证 Rev-erb $\alpha$  激动剂是否能够降低小鼠前列腺组织的炎症水平, 并探究其可能的信号通路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

40 只 6 周龄健康 SPF 级雄性 C57B/6J 小鼠, 体重 18 ~ 20 g, 购自成都达硕生物有限公司【SCXK (川) 2020-030】。小鼠分笼喂养, 自由进食饮水, 饲养室温度 (22  $\pm$  3)  $^{\circ}$ C, 湿度为 50% ~ 70%, 房间每 12 h 光照/黑暗循环, 饲养于成都达硕生物有限公司【SYXK (川) 2019-189】。操作符合成都达硕公司实验动物伦理要求 (伦理批号: Dossy20200106001)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

Anti-IL-8 (ABclonal, A2541), Anti-CCL21 (Abcam, ab231116), Anti-IL-6 (Servicebio, GB11117), Anti-IL-1 $\beta$  (Abcam, ab234437), Anti-NF- $\kappa$ B P65 (ABclonal, A11202)。动物手术器械 (FST 公司, ZR-FST002, 瑞士), PXS 体视显微镜 (上海普丹光学仪器公司, 中国), 光学显微镜 CH-2 (Olympus 公司, 日本), 石蜡切片机 RM2016 (Leica 公司, 德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验动物分组

将小鼠分为 4 组, 每组 10 只: 普通饮食组; 高脂饮食组; 高脂饮食 + SR9009 组; 高脂饮食 + control 组。高脂饮食饲料购自美国 RESEARCH DEITS 公司 (D12492)。喂养 7 周后高脂饮食 + SR9009 组小鼠开始腹腔注射 SR9009 (100 mg/kg), 每天早晚

8:00 各 1 次,持续 3 周;高脂饮食 + control 组小鼠每天腹腔注射药物对照溶剂(见图 1)。

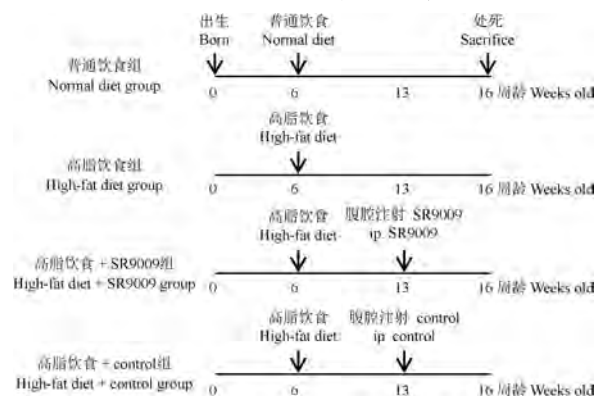


图 1 小鼠分组和饲养处理流程图

Figure 1 Time flow chart of mice grouping and feeding processing

### 1.2.2 小鼠腹腔注射液配制

蓖麻油 100  $\mu\text{L}$  和无水乙醇 100  $\mu\text{L}$  按照 1 : 1 混合后溶解 SR9009 30 mg, 超声超溶见无沉淀。注射前, 生理盐水稀释为总体积 1 mL, SR9009 注射液浓度为 0.03 mg/mL。药物对照溶剂注射液: 蓖麻油 100  $\mu\text{L}$  和无水乙醇 100  $\mu\text{L}$  按照 1 : 1 混合, 注射前生理盐水稀释至总体积 1 mL。每只小鼠每次腹腔注射约 100  $\mu\text{L}$ 。

### 1.2.3 取材及样本处理

小鼠麻醉后, 采血者左手捏住小鼠后颈部皮肤, 将小鼠置于桌面并固定好; 右手用刀片猛扎小鼠两侧耳后颈静脉体表投影处。迅速将小鼠头向下, 使小鼠血液滴入 EP 管内, 静置 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$  4500 rpm 离心 15 min, 取上清液检测血清甘油三酯、总胆固醇。取血后, 将小鼠放平, 腹部向上, 耻骨联合处剪开, 进入腹腔。在耻骨后方用镊子将膀胱及前列腺全部夹出。在体视显微镜下分离前列腺, 仔细清理表明筋膜的脂肪组织, 置于精密电子天平称前列腺重量。前列腺指数 (prostatic index, PI) 是反应小鼠前列腺增生情况的指数, 具体计算方法为前列腺重量/体重。每组前列腺组织分成 3 份: (1) 放入 RNA Later 液后送北京诺禾致源公司完成转录组测序; (2) 放入液氮保存备用; (3) 放入 4% 多聚甲醛液固定后病理切片 HE 染色和免疫组化检测。

### 1.2.4 转录组测序结果分析

分析 4 组小鼠前列腺组织测序结果, 在每组间的差异基因中, 通过富集炎症相关通路基因, 筛选表达水平在高脂饮食组较普通饮食组上调; 而在高

脂饮食 + SR9009 组较高脂饮食 + control 组下调的相关基因。

### 1.2.5 免疫组化

免疫组化使用免疫酶法检测, 其一抗稀释比例分别为 IL-6 (1 : 600), IL-8 (1 : 50), IL-1 $\beta$  (1 : 800), NF- $\kappa$ B-P65 (1 : 200), CCL21 (1 : 100)。具体方法见操作说明书。

### 1.2.6 HE 染色和免疫组化结果判定

按照国际前列腺炎组织学诊断与分度标准<sup>[13]</sup>, 对前列腺组织炎症程度以炎症细胞浸润程度进行分级; 根据 Axiotis 方法<sup>[14]</sup>, 高倍镜 (200 倍) 下染色阳性细胞数百分比, 结合染色强度综合计分。染色强度以多数细胞呈现的染色特性计分: 无着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。阳性细胞百分比即某类细胞 5 个视野 (每高倍视野计数 100 个此类细胞) 的阳性细胞平均数: 0% ~ 5% 为 0 分, 6% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 75% 为 3 分, >75% 为 4 分。染色强度与阳性细胞百分比的乘积: 0 分为阴性, 1 ~ 4 分为弱阳性, 5 ~ 8 分为中度阳性, 9 ~ 12 分为强阳性。

### 1.3 统计学分析

计量资料用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 描述, 多组数据间的差异性分析采用方差分析 (One-way ANOVA); 计数资料采用  $\chi^2$  检验。当  $P < 0.05$  时, 认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠体重变化

6 周龄雄性小鼠连续喂养 7 周, 高脂饲料的小鼠体重明显重于普通饲料的小鼠。喂养第 8 周开始高脂饮食 + SR9009 组和高脂饮食 + control 组小鼠开始分别腹腔注射 SR9009 和溶剂对照, 腹腔注射 3 周后, 高脂饮食 + SR9009 组小鼠与单纯高脂饮食小鼠比, 体重下降明显, 高脂饮食 + control 组小鼠与单纯高脂饮食小鼠比较体重无明显差别 (见表 1)。

### 2.2 前列腺重量和血清甘油三酯 (TG)、胆固醇 (TC) 水平

高脂饮食组小鼠前列腺重量、前列腺指数大于普通饮食组, 而高脂饮食 + SR9009 组小鼠前列腺重量、前列腺指数小于高脂饮食 + control 组。相较于普通饮食组小鼠, 高脂饮食组小鼠血清 TG、TC 明显增高, 高脂饮食 + SR9009 组小鼠血清 TG、TC 明显低于高脂饮食 + control 组 (见表 2)。

表 1 小鼠体重变化表( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )  
Table 1 Body weight of mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别<br>Groups                                      | 6 周龄(g)<br>6 weeks old(g) | 13 周龄(g)<br>13 weeks old(g)   | 16 周龄(g)<br>16 weeks old(g)   |
|---------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 普通饮食组<br>Normal diet group                        | 19.13 $\pm$ 0.43          | 27.23 $\pm$ 0.70              | 28.75 $\pm$ 0.88              |
| 高脂饮食组<br>High-fat diet group                      | 19.05 $\pm$ 0.69          | 30.85 $\pm$ 2.56 <sup>Δ</sup> | 33.29 $\pm$ 3.33 <sup>Δ</sup> |
| 高脂饮食 + SR9009 组<br>High-fat diet + SR9009 group   | 19.10 $\pm$ 0.30          | 32.55 $\pm$ 3.21              | 29.21 $\pm$ 1.62 <sup>*</sup> |
| 高脂饮食 + control 组<br>High-fat diet + control group | 18.90 $\pm$ 0.44          | 32.30 $\pm$ 2.88              | 32.64 $\pm$ 2.72              |

注:与普通饮食组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.01$ ;与高脂饮食 + control 组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal diet group, <sup>Δ</sup> $P < 0.01$ . Compared with the high-fat diet + control group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ .

表 2 4 组实验小鼠的前列腺重量和血脂指标对比表( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )  
Table 2 Comparison of prostate weight and blood lipid indexes of mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别<br>Groups                                      | 前列腺重量(mg)<br>Prostate weight(mg) | 前列腺指数<br>Prostatic index     | 甘油三酯(mmol/L)<br>Triglyceride (mmol/L) | 胆固醇(mmol/L)<br>Cholesterol (mmol/L) |
|---------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 普通饮食组<br>Normal diet group                        | 91.00 $\pm$ 17.00                | 3.09 $\pm$ 0.52              | 1.03 $\pm$ 0.13                       | 2.73 $\pm$ 0.15                     |
| 高脂饮食组<br>High-fat diet group                      | 129.00 $\pm$ 30.81 <sup>Δ</sup>  | 4.06 $\pm$ 0.54 <sup>Δ</sup> | 1.46 $\pm$ 0.09 <sup>#</sup>          | 5.66 $\pm$ 1.01 <sup>ΔΔ</sup>       |
| 高脂饮食 + SR9009 组<br>High-fat diet + SR9009 group   | 131.00 $\pm$ 28.09 <sup>*</sup>  | 3.37 $\pm$ 0.48 <sup>§</sup> | 1.49 $\pm$ 0.16 <sup>&amp;</sup>      | 5.68 $\pm$ 1.22 <sup>§</sup>        |
| 高脂饮食 + control 组<br>High-fat diet + control group | 99.00 $\pm$ 13.00                | 4.30 $\pm$ 0.62              | 0.76 $\pm$ 0.15                       | 4.46 $\pm$ 0.78                     |

注:与普通饮食组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.01$ , <sup>ΔΔ</sup> $P < 0.0001$ ;与高脂饮食 + control 组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与高脂饮食 + control 组比较, <sup>§</sup> $P < 0.05$ ;与高脂饮食 + control 组比较, <sup>&</sup> $P < 0.0001$ 。

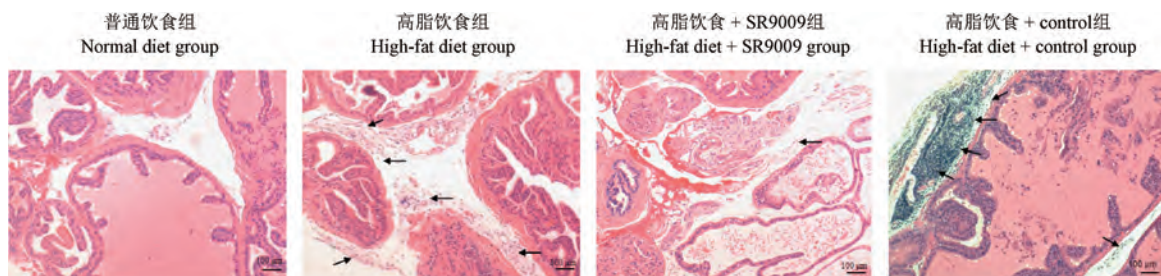
Note. Compared with the normal diet group, <sup>Δ</sup> $P < 0.01$ , <sup>ΔΔ</sup> $P < 0.0001$ . Compared with high-fat diet + control group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ . Compared with the high-fat diet + control group, <sup>§</sup> $P < 0.05$ . Compared with the high-fat diet + control group, <sup>&</sup> $P < 0.0001$ .

### 2.3 前列腺组织炎症情况

小鼠前列腺切片 HE 染色,显微镜下高脂饮食组较普通饮食组小鼠前列腺间质内有更多的炎性细胞浸润。高脂饮食 + SR9009 组较高脂饮食 + control 组小鼠前列腺组织间质内炎性细胞浸润明显减少(见图 2)。

### 2.4 前列腺组织转录组测序

小鼠前列腺组织转录组测序,其中趋化因子 21a(Ccl21a)、趋化因子受体 7(Ccr7)、Toll 样受体 4(Tlr4)、白介素 6(IL6)、白介素 1 $\beta$ (Il1b)、c-x-c 基趋化因子受体 2(Cxcr2, IL-8 受体)在高脂饮食组的表达水平较普通饮食组上调;而其在高脂饮食 +



注:黑色箭头表示炎症细胞。

图 2 小鼠前列腺 HE 染色

Note. Black arrows indicate inflammatory cells.

Figure 2 HE staining of prostate

SR9009 组的表达水平较高脂饮食 + control 组下调 (见图 3)。

2.5 免疫组化 (IHC) 检测前列腺组织 IL-6、IL-8、IL-1β、NF-κB-P65 和 CCL21a 的表达

炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1β 和 NF-κB 家族中的 P65 在普通饮食组小鼠前列腺组织中几乎不表达, 高脂饮食 + SR9009 组小鼠前列腺组织中表达呈弱阳性, 高脂饮食组小鼠前列腺组织中表达呈中等阳性, 高脂饮食 + control 组小鼠前列腺组织中表达呈强阳性 (见图 4, 表 3)。普通饮食组和高脂饮食 + SR9009 组小鼠前列腺间质内黄色颗粒浅淡, CCL21a 表达呈弱阳性; 高脂饮食组和高脂饮食 + control 组小鼠前列腺间质内有大量深染的棕黄色颗粒, CCL21a 表达呈强阳性 (见图 5, 表 3)。

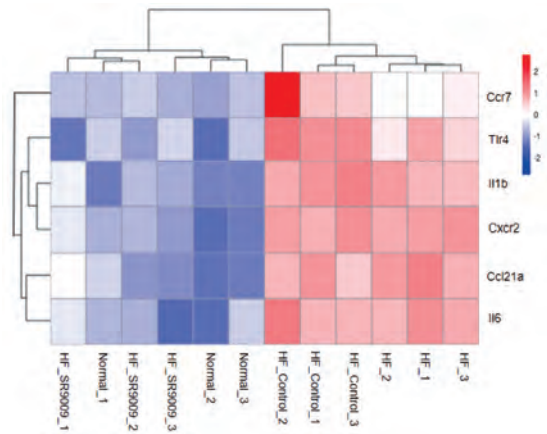


图 3 4 组小鼠前列腺组织 NF-κB 通路中差异基因热图分析  
Figure 3 Heat map analysis of differential genes in NF-κB pathway in prostate tissue of mice

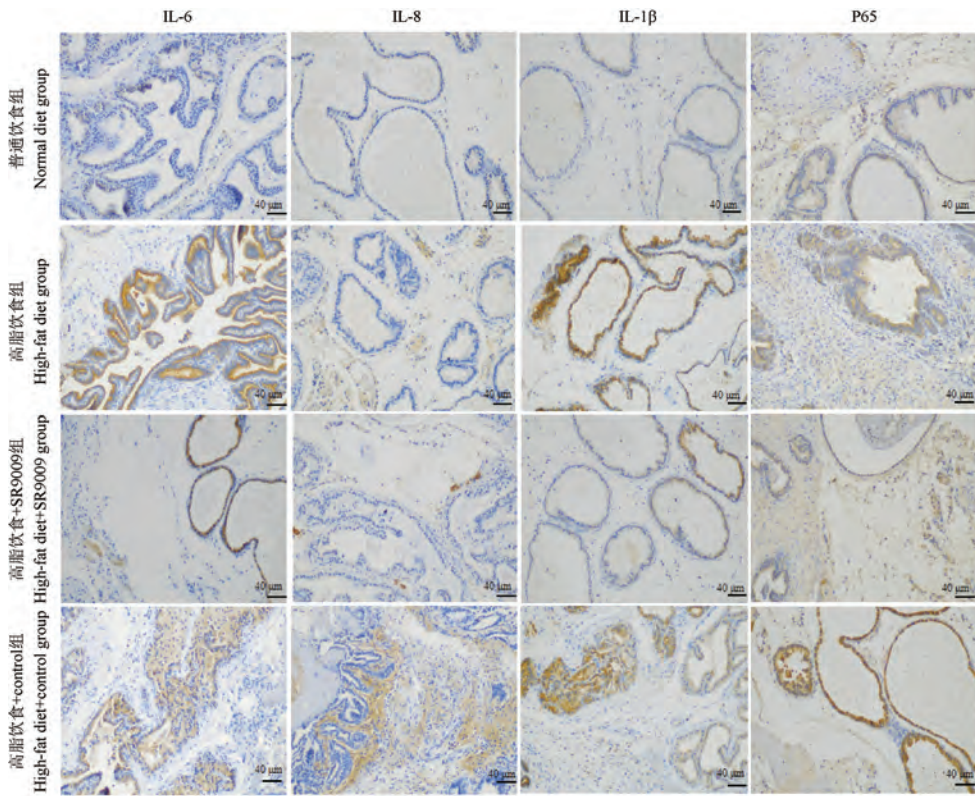


图 4 免疫组化检测小鼠前列腺组织炎症因子 (IL-6、IL-8、IL-1β) 和 NF-κB-P65  
Figure 4 IHC detection of inflammatory factors (IL-6, IL-8, IL-1β) and NF-κB-P65 in prostat

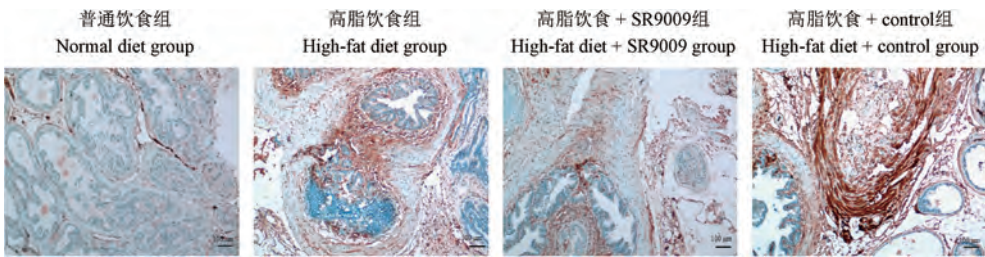


图 5 四组小鼠前列腺组织免疫组化检测 CCL21a  
Figure 5 IHC detection of CCL21a in prostate tissue of four groups of mice

表 3 四组实验小鼠的前列腺组织免疫组化评分结果

Table 3 IHC scoring of prostate tissue in four groups of mice

| 免疫组化表达评分<br>IHC score                                            | IL-6   |   |   |   | IL-8   |   |   |   | IL-1 $\beta$ |   |   |   | P65    |   |   |   | CCL21a |   |   |   |
|------------------------------------------------------------------|--------|---|---|---|--------|---|---|---|--------------|---|---|---|--------|---|---|---|--------|---|---|---|
|                                                                  | 0      | 1 | 2 | 3 | 0      | 1 | 2 | 3 | 0            | 1 | 2 | 3 | 0      | 1 | 2 | 3 | 0      | 1 | 2 | 3 |
| 普通饮食组(例)<br>Normal diet group( <i>n</i> )                        | 8      | 2 | 0 | 0 | 7      | 3 | 0 | 0 | 7            | 2 | 1 | 0 | 5      | 3 | 2 | 0 | 1      | 8 | 1 | 0 |
| 高脂饮食组(例)<br>High-fat diet group( <i>n</i> )                      | 0      | 2 | 6 | 2 | 0      | 1 | 7 | 2 | 0            | 2 | 7 | 1 | 0      | 2 | 5 | 3 | 0      | 2 | 6 | 2 |
| 高脂饮食 + SR9009 组(例)<br>High-fat diet + SR9009 group( <i>n</i> )   | 1      | 7 | 2 | 0 | 2      | 6 | 2 | 0 | 1            | 7 | 2 | 0 | 0      | 8 | 1 | 1 | 0      | 8 | 2 | 0 |
| 高脂饮食 + control 组(例)<br>High-fat diet + control group( <i>n</i> ) | 0      | 1 | 4 | 5 | 0      | 1 | 4 | 5 | 0            | 2 | 3 | 5 | 0      | 2 | 3 | 5 | 0      | 1 | 4 | 5 |
| <i>P</i>                                                         | <0.001 |   |   |   | <0.001 |   |   |   | <0.001       |   |   |   | <0.001 |   |   |   | 0.002  |   |   |   |

注:免疫组化表达强度:0:阴性;1:弱阳性;2:中度阳性;3:强阳性。

Note. IHC detection of protein expression intensity. 0. Negative. 1. Weakly positive. 2. Moderately positive. 3. Strong positive.

### 3 讨论

前列腺炎的动物模型主要是经尿道或者局部注射细菌或者药物引起<sup>[15]</sup>,属于有创操作,对动物的惊扰大,形成的是急性炎症,不能模拟前列腺组织慢性炎症的要求。我们选择高脂饮食喂养诱导小鼠前列腺组织慢性炎症。通过高脂饲料喂养 10 周后,高脂饮食组小鼠的体重明显大于普通饮食组;高脂饮食组小鼠血清内甘油三酯、胆固醇的浓度也明显高于普通饮食组。此外,在高脂饮食的诱导下,高脂饮食组小鼠的前列腺重量、前列腺指数大于普通饮食组。HE 染色提示高脂饮食组小鼠前列腺组织间质内较普通饮食组有更多的炎症细胞浸润。IHC 检测提示高脂饮食组小鼠前列腺组织内炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 的表达水平较普通饮食组高。这说明我们使用高脂饮食喂养小鼠模拟人体肥胖、脂代谢异常致代谢综合征,并发生前列腺组织炎症的模型是成功的。

在 Rev-erb 激动剂的化合物中,SR9009 因为有更有效的有效性和稳定性,认为是目前最适合用于体内的 Rev-erb 激动剂<sup>[16]</sup>。文献报道对葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎小鼠给予 SR9009 药物干预后,能够激活结肠的 Rev-erb $\alpha$  的功能,降低小鼠结肠的炎症水平<sup>[17]</sup>。因此,我们选择 SR9009 作为本次小鼠实验的干预药物。

高脂饮食 + SR9009 组较高脂饮食 + control 组小鼠前列腺重量减轻,前列腺指数减小;前列腺 HE 染色后发现高脂饮食 + SR9009 组较高脂饮食 + control 组前列腺组织的炎症细胞浸润减少;IHC 检测发现高脂饮食 + SR9009 组较高脂饮食 + control 组小鼠前列腺组织中炎症因子 IL-6、IL-8 和 IL-1 $\beta$

的表达水平降低。这说明,使用 SR9009 后,能够降低高脂饮食后小鼠前列腺组织的炎症水平,小鼠前列腺重量和前列腺指数也较对照组减小,说明激动 Rev-erb $\alpha$  功能可以减轻小鼠前列腺组织的炎症水平,通过控制前列腺组织的炎症水平抑制前列腺组织的增生。

CCL21 属于 CC 类趋化因子家族,是一种小分子分泌蛋白,是首个被证明具有介导淋巴细胞归巢的趋化因子<sup>[18]</sup>。研究证实 CCL21 同细胞膜上的 C-C 类趋化因子受体 7 (C-C Motif Chemokine Receptor 7, CCR7) 发生结合,进而参与组织的炎症反应。CCR7 启动子包含了与 NF- $\kappa$ B 的结合位点,两者结合后可激活下游 NF- $\kappa$ B 信号通路引起炎症反应过程<sup>[19]</sup>。小鼠前列腺组织免疫组化提示普通饮食组小鼠和高脂饮食 + SR9009 组小鼠前列腺组织中 CCL21a 的表达低,而高脂饮食组和高脂饮食 + control 组小鼠前列腺组织中 CCL21a 的表达高。说明 SR9009 能够降低前列腺组织 CCL21 的分泌,从而抑制下游的 NF- $\kappa$ B 通路。

4 组小鼠前列腺组织测序的差异基因热图分析,NF- $\kappa$ B 通路中 Ccl21a、Ccr7、Tlr4、Il6、Il1b、Cxcr2 的表达水平存在差异。IHC 检测小鼠前列腺组织 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$  的表达差异与测序结果吻合。课题组前期对 120 例 BPH 患者进行回顾性研究发现,前列腺组织 NF- $\kappa$ B (P50 和 P65) 的表达强度与前列腺组织炎症程度高度一致<sup>[20]</sup>。因此,对 4 组小鼠的前列腺组织进行 IHC 检测 P65,其 P65 的表达强度趋势与组织炎症程度一致,这同样与转录组测序结果吻合。说明 SR9009 通过激活 Rev-erb $\alpha$  活性能够降低前列腺组织 CCL21 的表达,并通过其下游 NF- $\kappa$ B 信号通路调控前列腺组织炎症水平。

## 参 考 文 献(References)

- [1] 黄健. 中国泌尿外科和男科疾病诊断治疗指南 [M]. 北京: 科学出版社; 2020.
- Huang J. Guidelines for diagnosis and treatment of urology and andrology diseases in China [M]. Beijing: Science Press; 2020.
- [2] Sarma AV, Wei JT. Benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms [J]. N Engl J Med, 2012, 367(3): 248–257.
- [3] Chughtai B, Forde JC, Thomas DD, et al. Benign prostatic hyperplasia [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 5(2): 16031.
- [4] Falahatkar S, Mokhtari G, Pourreza F, et al. Celecoxib for treatment of nocturia caused by benign prostatic hyperplasia: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. Urology, 2008, 72(4): 813–816.
- [5] Robert G, Descaseaud A, Nicolaïew N, et al. Inflammation in benign prostatic hyperplasia: a 282 patients' immunohistochemical analysis [J]. Prostate, 2009, 69(16): 1774–1780.
- [6] De Nunzio C, Aronson W, Freedland S, et al. The correlation between metabolic syndrome and prostatic diseases [J]. Eur Urol, 2012, 61(3): 560–570.
- [7] Vignozzi L, Gacci M, Cellai I, et al. Fat boosts, while androgen receptor activation counteracts, BPH-associated prostate inflammation [J]. Prostate, 2013, 73(8): 789–800.
- [8] Imeri L, Opp MR. How (and why) the immune system makes us sleep [J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(3): 199–210.
- [9] Willyard C. Hungry for sleep [J]. Nat Med, 2008, 14(5): 477–480.
- [10] Cho H, Zhao X, Hatori M, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- $\alpha$  and REV-ERB- $\beta$  [J]. Nature, 2012, 485(7396): 123–127.
- [11] Gibbs JE, Blaikley J, Beesley S, et al. The nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(2): 582–587.
- [12] Baxter M, Ray DW. Circadian rhythms in innate immunity and stress responses [J]. Immunology, 2020, 161(4): 261–267.
- [13] Nickel JC, True LD, Krieger JN, et al. Consensus development of a histopathological classification system for chronic prostatic inflammation [J]. BJU Int, 2001, 87(9): 797–805.
- [14] Axiotis CA, Monteagudo C, Merino MJ, et al. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in endometrial adenocarcinoma [J]. Am J Pathol, 1991, 138(4): 799–806.
- [15] 戴应和, 龙小琴, 刘晨琪, 等. 角叉菜胶诱导慢性非细菌性前列腺炎动物模型的制备与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(5): 544–550.
- Dai YH, Long XQ, Liu CQ, et al. Preparation and evaluation of the rat model of chronic nonbacterial prostatitis induced by carrageenan [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(5): 544–550.
- [16] Shin Y, Noel R, Banerjee S, et al. Small molecule tertiary amines as agonists of the nuclear hormone receptor Rev-erb $\alpha$  [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(13): 4413–4417.
- [17] Wang S, Lin YK, Yuan X, et al. REV-ERB $\alpha$  integrates colon clock with experimental colitis through regulation of NF- $\kappa$ B/NLRP3 axis [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4246.
- [18] 陈强达, 吴文川. 趋化因子 CCL21 在抗肿瘤免疫中的研究进展 [J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(7): 1331–1333.
- Chen QD, Wu WC. Progress in research and application of CCL21 in anti-tumor immunity [J]. Chin J Exp Surg, 2019, 36(7): 1331–1333.
- [19] Liu J, Wei Y, Luo Q, et al. Baicalin attenuates inflammation in mice with OVA-induced asthma by inhibiting NF- $\kappa$ B and suppressing CCR7/CCL19/CCL21 [J]. Int J Mol Med, 2016, 38(5): 1541–1548.
- [20] Cao DH, Liu LR, Li L, et al. Pathological characteristics of CD40/CD40L and NF- $\kappa$ B proteins related to inflammation in benign prostatic hyperplasia tissue: a retrospective study of 120 cases [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(11): 10863–10872.

[收稿日期] 2021-12-27

张娜,刘学芳,王自闯,等. C57BL/6 小鼠 Lewis 皮下移植瘤肺转移灶的病理及超微结构观察 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 476-481.

Zhang N, Liu XF, Wang ZC, et al. Pathological and ultrastructural observations of lung metastases from Lewis subcutaneous grafts in C57BL/6 mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 476-481.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.004

# C57BL/6 小鼠 Lewis 皮下移植瘤肺转移灶的病理及超微结构观察

张娜<sup>1</sup>, 刘学芳<sup>2</sup>, 王自闯<sup>3</sup>, 冯素香<sup>2\*</sup>, 张鹏飞<sup>2</sup>

(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; 3. 河南中医药大学第二附属医院, 郑州 450046)

**【摘要】 目的** 构建 C57BL/6 小鼠 Lewis 皮下移植瘤肺转移模型, 观察肺转移灶病理以及超微结构变化。**方法** C57BL/6 小鼠右前肢腋窝皮下接种 Lewis 细胞, 定期测量肿瘤体积, 绘制生存曲线, 对存活期 35 d 以上的小鼠进行解剖学观察, HE 染色检测肺组织病理变化, 透射电镜观察肺组织的超微结构。**结果** 接种 14 d 小鼠右前肢腋窝皮下成瘤率为 100%, 22 d 小鼠开始出现死亡, 平均生存周期  $(33.00 \pm 6.98)$  d; 解剖学可见肺表面出现典型转移灶, 外观呈圆形半透明状, 周围有出血; HE 染色显示肺转移灶染色深, 外观近似圆形, 与周围组织界限明显, 肿瘤细胞排列紧密, 内部可见丰富的毛细血管; 透射电镜下可见肺转移灶内肿瘤细胞具有显著的异型性, 出现巨核、双核和奇异型核, 胞质内含有大量的糖原颗粒和线粒体数量, 肿瘤细胞间可见细胞连接。**结论** 延长存活时间可使皮下移植瘤小鼠形成典型的肺转移灶, 肺转移灶内病理学和超微结构变化符合恶性肿瘤的病变特点。

**【关键词】** Lewis 肺癌; 肺转移; 病理; 超微结构; 细胞连接

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0476-06

## Pathological and ultrastructural observations of lung metastases from Lewis subcutaneous grafts in C57BL/6 mice

ZHANG Na<sup>1</sup>, LIU Xuefang<sup>2</sup>, WANG Zichuang<sup>3</sup>, FENG Suxiang<sup>2\*</sup>, ZHANG Pengfei<sup>2</sup>

(1. College of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Academy of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046. 3. the Second Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

Corresponding author: FENG Suxiang. E-mail: fengsx221@163.com

**【Abstract】 Objective** To establish a lung metastasis model based on Lewis subcutaneously-implanted tumors in C57BL/6 mice, and observe the pathological and ultrastructural changes in lung metastasis. **Methods** C57BL/6 mice were subcutaneously implanted with Lewis cells in the armpit of the right forelimb. The tumor volume was measured regularly and a survival curve was generated. Anatomical observations were performed on mice whose survival time was more than 35 days, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect pathological changes in the lung tissue, and the ultrastructure of the lung tissue was observed by transmission electron microscopy. **Results** The subcutaneous tumor formation rate of the right forelimb axillary was 100% at 14 days after inoculation, and mortality occurred from 22 days, with a mean life span for the mice of  $(33.00 \pm 6.98)$  days. Anatomically, typical metastases were observed on the lung

[基金项目] 国家自然科学基金(82003986)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(82003986)。

[作者简介] 张娜(1982—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 肿瘤动物模型。Email: 616621312@qq.com

[通信作者] 冯素香(1971—), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 中药新药研究。Email: fengsx221@163.com

surface, which had a round translucent appearance and surrounding hemorrhage. HE showed intense staining of the lung metastases, which were nearly round in appearance, with obvious boundaries with the surrounding tissue. The tumor cells were closely arranged and contained abundant capillaries. Under transmission electron microscopy, the tumor cells in the lung metastases showed significant atypia, including meganucleus, dicaryon, and singular nuclei. The cytoplasm of the cells contained a large number of glycogen particles and mitochondria, and cell junctions were evident between tumor cells.

**Conclusions** Prolongation of the survival time resulted in the formation of typical lung metastases in mice with a subcutaneous tumor. The pathological and ultrastructural changes in lung metastases were consistent with the characteristics of malignant tumors.

**【Keywords】** Lewis lung cancer; lung metastasis; pathology; ultrastructure; cell junction

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

肺癌是中国癌症死亡的首要原因,近年来肺癌发病率和死亡率呈上升的趋势<sup>[1]</sup>,肺癌死亡的最主要原因是发生单部位或多部位转移,临床常见的转移部位是骨、脑、对侧肺、淋巴结、肝等<sup>[2]</sup>,广泛肺癌远处转移提示预后差,转移的器官越多,病人生存期越短,因此建立小鼠肺癌转移模型对肺癌研究具有重要意义。C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型是进行肺癌研究的重要工具,以“小鼠 Lewis”和“肺癌”为主题词在中国知网检索,可搜索出 2500 余条文献,该模型广泛应用于肿瘤学、药理学<sup>[3]</sup>、中药学<sup>[4]</sup>等多个领域。Lewis 细胞是从小鼠 Lewis 肺癌中分离的细胞株,在体外传代培养后,仍然在 C57BL/6 小鼠体内保持高致瘤性和肺转移性。目前针对 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型的病理和超微结构的描述多集中在皮下移植瘤<sup>[5]</sup>,而对肺转移灶的病理和超微形态描述较少,本研究制备 C57BL/6 小鼠 Lewis 皮下移植瘤模型后,重点观察肺转移情况,结合光学显微镜和电子显微镜技术,从解剖学水平、组织学水平和超微结构水平对肺癌转移灶进行研究,以期为 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型的更加广泛的应用提供科学的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

12 只 5 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,体重 14 ~ 16 g,购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场【SCXK(豫)2019-0002】。环境温度(20 ± 2)℃,相对湿度 40%,昼夜各半循环照明,饲养于河南中医药大学动物实验中心【SYXK(豫)2020-0004】。所有操作均符合河南中医药大学实验动物伦理学要求(DWLL202003222)。

#### 1.1.2 细胞株

小鼠 Lewis 肺癌细胞株(Lewis lung cancer cell line, LLC)由中国科学院生命科学研究院细胞库提供(上海),细胞目录号:TCM 7。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

胎牛血清(四季青,中国),DMEM 培养液(Hyclone,美国),胰酶(Hyclone,美国)。游标卡尺(上海美奈特,中国),CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo Fisher Scientific,美国),微量移液器(Eppendorff,德国),超净工作台(苏州苏洁净华,中国),分析天平(Mettler toledo,瑞士),石蜡包埋机(Leica,德国),病理组织切片机(Leica,德国),显微镜(Leica,德国),透射电子显微镜(JEM1400,日本电子,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

从液氮中取出 Lewis 细胞冻存管后,立即投入 37℃ 水浴箱中水浴,复苏 Lewis 肺癌细胞,使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基吹散转移至培养瓶中,置于 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养,待细胞生长至对数生长期时,0.25% 胰酶消化收集细胞,离心去上清,加入生理盐水,使细胞悬浮,台盼蓝染色测定细胞活力,并进行细胞计数,制成每毫升 1 × 10<sup>7</sup> 的细胞悬液,接种备用。

#### 1.2.2 小鼠 Lewis 皮下移植瘤模型制备

10 只小鼠右前肢腋下 75% 乙醇消毒,使用无菌注射器吸取上述制备的细胞悬液,沿腋前线斜行刺入皮下,每只注射 0.1 mL,制备 Lewis 皮下移植瘤模型。另外 2 只小鼠按照相同操作注射生理盐水,设为空白组。

#### 1.2.3 移植瘤体积计算

接种后每周使用游标卡尺测量小鼠肿瘤长径(L)和短径(W),计算瘤体积,瘤体积=(L×W<sup>2</sup>/2)。

### 1.2.4 生存曲线的绘制

记录小鼠发生死亡的时间点,绘制生存曲线。

### 1.2.5 解剖学与病理学观察

将自然死亡的小鼠解剖观察肺部病变,将生存期大于 35 d 的小鼠脱颈椎处死,快速分离腋下瘤体与肺,冲洗血污,观察并记录双肺转移灶的形成情况,置入 4% 多聚甲醛中固定,经脱水、透明、石蜡包埋、切片、HE 染色及封片等常规步骤处理,光镜下观察瘤体与肺病理学变化,重点观察肺部转移灶情况。同时取材 2 只空白组小鼠,作为对照。

### 1.2.6 透射电镜标本处理及观察

取出现典型肺转移的小鼠肺,取肺转移灶及周围肺组织,将组织修成体积为  $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  的小块,投入 2.5% 戊二醛固定液中固定 4 h, PBS 漂洗,1% 锇酸后固定 1.5 h, PBS 漂洗,梯度乙醇脱水,渗透、环氧树脂 812 包埋、超薄切片,饱和醋酸双氧钨水溶液染色 20 min,柠檬酸铅溶液染色 5 min,水洗烘干后透射电镜观察拍照。

### 1.3 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量数据用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,统计数据采用 GraphPad Prism 5 软件进行绘图。

## 2 结果

### 2.1 移植瘤体积计算

小鼠皮下移植瘤体积变化如图所示(见图 1),结果显示接种后 7 d 肿瘤体积较小,肉眼不可见,14 d 时肿瘤生长明显,肉眼可见如花生大小的肿瘤,21 ~ 28 d 时肿瘤生长迅速,肿瘤表面皮肤有破损出血现象。

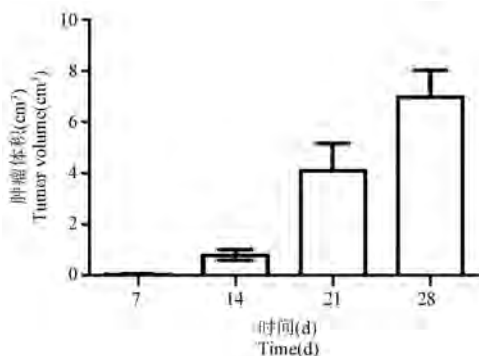


图 1 小鼠 Lewis 皮下移植瘤体积变化曲线

Figure 1 Volume change curve of Lewis subcutaneous transplanted tumor in mice

### 2.2 生存曲线绘制

小鼠的生存曲线如图所示(见图 2)。结果显

示,接种后 22 d 时小鼠出现死亡,22 ~ 25 d 死亡 2 只,26 ~ 30 d 死亡 1 只,30 ~ 35 d 死亡 3 只,36 ~ 40 d 死亡 2 只,截至 40 d 时 2 只存活。平均生存周期( $33.00 \pm 6.98$ )d。

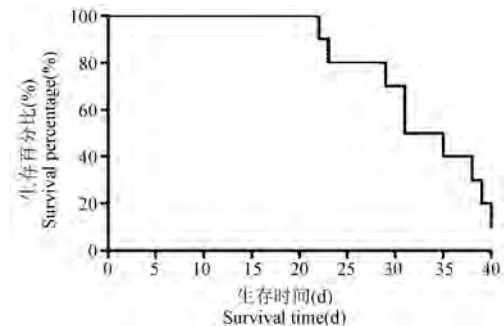
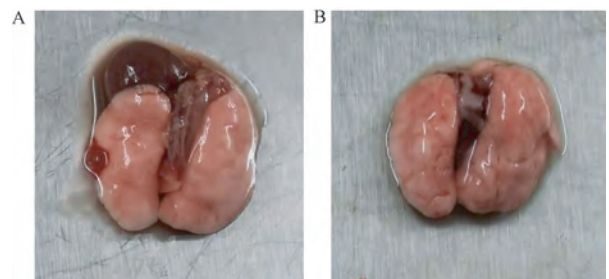


图 2 Lewis 皮下移植瘤小鼠生存曲线

Figure 2 Survival curve of Lewis subcutaneous transplanted tumor in mice

### 2.3 肺转移灶成瘤情况

解剖学观察显示典型的肺转移灶形成时间在接种后 35 ~ 40 d,小鼠外观被毛紊乱无光泽,弓步前行,出现典型肺转移的小鼠数量为 2 只,解剖学病变表现为小鼠肺表面出现暗红色的出血点或出血块,在出血块中央出现圆形半透明状的转移灶(图 3A),而空白小鼠的肺为粉红色(图 3B)。



注:A:皮下移植瘤组小鼠肺;B:空白组小鼠肺。

图 3 小鼠肺解剖学观察

Note. A. Lung of mice in subcutaneous transplanted tumor group. B. Lung of mice in blank group.

Figure 3 Anatomical observation of lung in mice

### 2.4 病理学观察

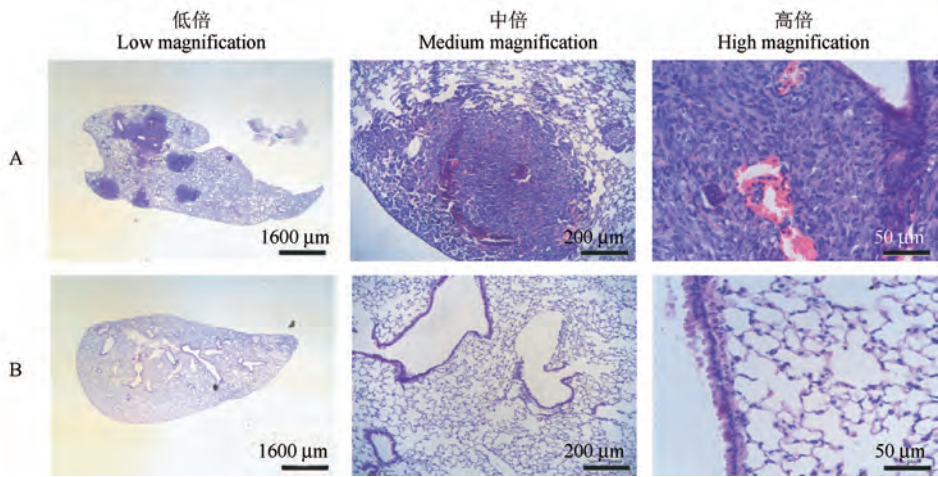
HE 染色显示,在低倍镜下即可观察到肺内多处出现肺转移灶,转移灶形似圆形,或近似圆形,染色深,细胞排列紧密,与周围组织分界清楚(见图 4A 低倍),空白组小鼠肺组织结构正常,肺内支气管及各级分支组织结构明显(见图 4B 低倍)。中倍镜下观察肺转移灶内部肿瘤细胞排列紧密,可见包裹的小气道结构以及大量的新生血管,周围肺泡结构紊乱(见图 4A 中倍),空白组小鼠各级支气管、细支气

管及分支结构组织结构正常,周围肺泡结构正常(见图 4B 中倍)。高倍镜下可见肿瘤细胞排列紧密,呈交织状排列,细胞核染色深,多有病理性核分裂相。转移灶内部可见新生血管,包裹的小气道上皮较矮,结构不清晰(见图 4A 高倍)。空白组小鼠小气道上皮结构清晰,排列紧密,周围肺泡结构正常(见图 4B 高倍)。

2.5 透射电镜观察

电镜下可见肺转移灶内肿瘤细胞排列紧密,细胞具有显著的异型性,大小形态不一,可见瘤巨细胞,细胞核大小、形态各异,出现巨核、双核和奇异性核,呈不对称分裂,此外肿瘤细胞之间多处可

见红细胞(图 5A)。周围肺组织可见典型的肺泡形态,肺泡腔、肺泡壁及肺泡上皮细胞结构清晰,肺泡壁上可见毛细血管(图 5B)。肺转移灶内瘤巨细胞放大可见,细胞核异型性明显,内部出现 2 个核仁,胞质内富集大量的糖原颗粒,线粒体数量多(图 5C)。周围肺组织可见典型的 I 型肺泡上皮细胞和 II 型肺泡上皮细胞(图 5D)。肺转移灶内肿瘤细胞间可见细胞连接,细胞连接是相邻细胞之间的一种致密结构,电子密度高(如图 5E 箭头指示)。肺泡上皮细胞间可观察到大量的典型的细胞连接(如图 5F 箭头指示),保证肺泡壁和气血屏障的完整性。



注:A;皮下移植瘤组小鼠肺;B:空白组小鼠肺;低倍:×12.5,中倍:×100,高倍:×400。

图 4 小鼠肺病理学观察

Note. A. Lung of mice in subcutaneous transplanted tumor group. B. Lung of mice in blank group. Low magnification. ×12.5. Medium magnification. ×100. High magnification. ×400.

Figure 4 Pathological observation of lung in mice

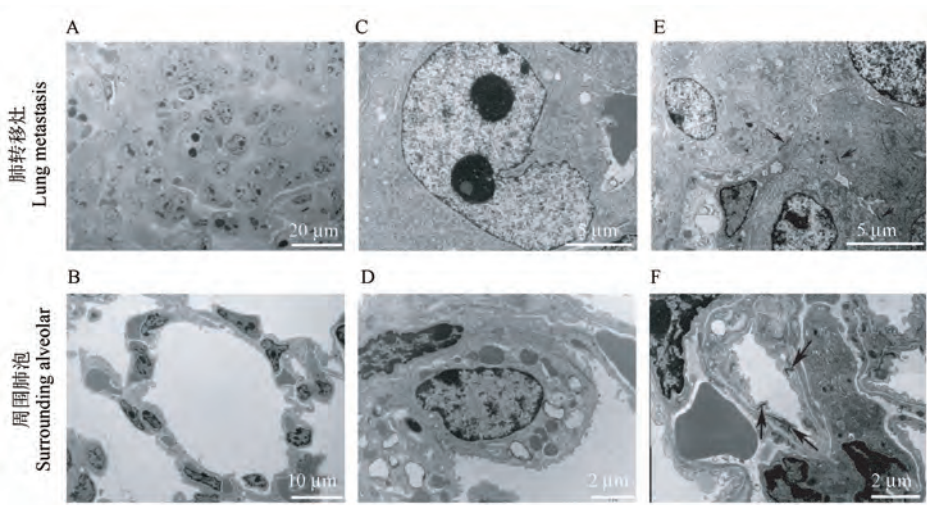


图 5 Lewis 皮下移植瘤小鼠肺透射电镜观察

Figure 5 Transmission electron microscope observation on lung of Lewis subcutaneous transplanted tumor mice

### 3 讨论

皮下注射是 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型常用的接种方法<sup>[6]</sup>。皮下注射包括前肢腋下注射和腹股沟注射,该方法操作简便,在接种部位形成典型的瘤块,可动态检测肿瘤大小,并且小鼠生存周期较长,能够进行一定周期的药理学研究<sup>[7]</sup>。马雪曼等<sup>[8]</sup>右腋下注射和右腹股沟下注射 Lewis 细胞,21 d 时,小动物活体成像结果显示两种方法均可以发生肺转移,肺转移率分别为 70% 和 50%。与右腋下注射比较,右腹股沟注射肿瘤生长较快,容易发生破溃,不适用于观察期较长的研究。尾静脉注射也是制备肺癌转移模型的常用方法,能够模拟肿瘤细胞经血液传播定植在特定器官的过程,具有成瘤时间短,肺转移率高(100%)的特点,缺点是小鼠的死亡率较高,能够为实验留下处理和观察的窗口期较短。故本实验采用前肢腋下注射的方法建立模型。

本实验采用前肢腋下注射 Lewis 细胞的方法成功构建了皮下移植瘤模型,14 d 时成瘤率为 100%,肿瘤 14 ~ 35 d 生长迅速,22 d 时动物开始出现死亡,至 35 d 时死亡率达到 50%,平均生存周期( $33.00 \pm 6.98$ )d,与马雪曼等<sup>[8]</sup>、李春艳等<sup>[9]</sup>的报道基本吻合。针对肿瘤体积不同文献报道略有不同。分析原因可能与注射细胞的活性有关,其中胰酶消化、离心、温度等条件对细胞活性都有影响,操作者在注射前使用台盼蓝染色测定细胞活力,并严格进行细胞计数。以确保结果的一致性。

解剖学研究可见小鼠肺转移灶呈圆形半透明状外观,周围有出血。文献中关于转移灶的表述通常为白色或灰白色隆起<sup>[10]</sup>,与本研究的结果略有不同,分析原因可能与采样时间有关,本研究中观察的接种后 35 d 的小鼠肺,而文献的为接种后 28 d 的病变,采样时间不同,病变程度不同,当然也存在个体差异<sup>[10]</sup>。为了确定解剖学观察的病灶是肺癌转移灶,使用石蜡切片技术结合 HE 染色,对肺标本进行处理,光镜下可见肺转移灶近似圆形,染色深,内部肿瘤细胞排列紧密,细胞核染色深,多有病理性核分裂相,符合恶性肿瘤的特点。

本研究详细报道了肺转移灶的超微结构变化,并与周边肺泡结构进行了对比研究,电镜下肺转移灶内肿瘤细胞具有显著的异型性,细胞核出现巨核、双核和奇异型核,呈不对称分裂,符合恶性肿瘤

的形态特点。此外本研究对转移灶内肿瘤细胞之间的细胞连接进行观察,细胞连接是相邻上皮细胞之间特化的区域,包括:紧密连接、中间连接、桥粒、缝隙连接 4 种,细胞连接使细胞之间能够沟通信息、交换代谢产物、增强细胞之间的牢固性,对细胞的增殖分化具有重要的调节作用<sup>[11]</sup>。此外,靶向细胞连接的药物在抗肺癌脑转移中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。Lewis 细胞是从小鼠肺腺癌中分离得到的体外培养株,肺腺癌是起源于上皮组织的恶性肿瘤<sup>[13]</sup>,故 Lewis 细胞之间也存在细胞连接,如本实验中电镜下观察所见。肿瘤细胞间与肺泡上皮细胞间的细胞连接不同在于,肿瘤细胞间的细胞连接体积小,长度短,电子密度低,肺泡上皮细胞间的细胞连接体积大、长度长、多弯曲及电子密度高。肺癌肿瘤细胞间的细胞连接与上皮-间质转化有密切关系<sup>[14]</sup>,自原发部位发生侵袭转移的癌细胞,细胞连接降低,细胞骨架重组,获得间质细胞的特点,具有迁移性,在到达转移器官后,通过间质-上皮转化播下新的继发肿瘤的种子<sup>[15]</sup>,恢复上皮细胞黏附特性,形成肿瘤细胞之间的细胞连接。本研究观察的肺转移灶内实际为肿瘤细胞从皮下移植瘤脱离远端种植在肺部的肿瘤。

由于肺癌易发生转移的特点,研究 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌转移模型具有非常重要的意义,可以为相关药物的研发提供适合的动物模型,而关于 Lewis 肺转移灶详细的解剖学、病理学以及超微结构的报道可为该模型的应用提供科学参考。

### 参 考 文 献 (References)

- [1] Cao M, Chen W. Epidemiology of lung cancer in China [J]. Thorac Cancer, 2019, 10(1): 3-7.
- [2] 王泽洲, 张扬, 莫森, 等. 以医院登记为基础的初诊未转移肺癌患者的转移部位分布及生存分析 [J]. 中国癌症杂志, 2021, 31(9): 775-782.  
Wang ZZ, Zhang Y, Mo M, et al. Distribution of metastatic sites and survival analysis of patients with non-metastatic lung cancer at initial diagnosis based on hospital registration [J]. Chin Oncol, 2021, 31(9): 775-782.
- [3] Ai M, Li SS, Chen H, et al. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> attenuates sleep disturbance in mouse models of Lewis lung cancer, in silico and in vivo [J]. J Cell Physiol, 2021, 236(11): 7473-7490.
- [4] 陈观平, 汪一帆, 应翔华. 扶肺煎抑制肺癌增殖和转移的体内外研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(5): 1009-1017.  
Chen GP, Wang YF, Ying XH. In vivo and in vitro study on fufei jian inhibiting proliferation and metastasis of lung carcinoma [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2021, 38(5): 1009-

- 1017.
- [ 5 ] 周丽萍, 马科, 马治国, 等. 健脾补肾方协同环磷酰胺对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤细胞抑制作用及超微结构的影响 [J]. 宁夏医科大学学报, 2015, 37(7): 755-758.
- Zhou LP, Ma K, Ma ZG, et al. Effect of jian-pi-bu-shen-fang synergism chemotherapy on mice lewis lung cancer cells and its ultrastructure [J]. J Ningxia Med Univ, 2015, 37(7): 755-758.
- [ 6 ] 张娜, 田燕歌, 刘学芳, 等. 小鼠移植性肺癌转移模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 557-562.
- Zhang N, Tian YG, Liu XF, et al. Research progress in the metastatic model of transplanted lung cancer in mouse [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 557-562.
- [ 7 ] 王青, 阙祖俊, 田建辉. 欣力康胶囊对 Lewis 肺癌模型小鼠生存期的影响及作用机制初探 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2019, 25(2): 182-186.
- Wang Q, Que ZJ, Tian JH. Effects of xinlikang capsule on survival time of Lewis lung cancer model mice and its mechanism of action [J]. Chin J Surg Integr Tradit Western Med, 2019, 25(2): 182-186.
- [ 8 ] 马雪曼, 于明薇, 张甘霖, 等. 小鼠 Lewis 肺癌不同部位皮下移植瘤模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4): 386-390.
- Ma XM, Yu MW, Zhang GL, et al. Comparison of mouse models of Lewis lung carcinoma subcutaneously transplanted at different sites [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(4): 386-390.
- [ 9 ] 李春艳, 王颖, 刘浩, 等. C<sub>57</sub>BL/6 近交系小鼠 Lewis 肺癌动物模型: 建设性描述肺癌损害程度的指标 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(26): 3582-3583.
- Li CY, Wang Y, Liu H, et al. The model of inbred line C<sub>57</sub>BL/6 mice bearing Lewis lung carcinoma: Propose to describe the marker of lung cancer lesion degree [J]. Chin J Clin Rehabil, 2003, 7(26): 3582-3583.
- [ 10 ] 林秋玉, 李文琳, 黎小年, 等. 苏铁叶总黄酮联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠的抑瘤作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(16): 1784-1787.
- Lin QY, Li WL, Li XN, et al. Anti-tumor effect of total flavonoids of cycas leaves combined with cisplatin on Lewis lung cancer mice [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 35(16): 1784-1787.
- [ 11 ] Kim A, Kim EY, Cho EN, et al. Notch1 destabilizes the adherens junction complex through upregulation of the Snail family of E-cadherin repressors in non-small cell lung cancer [J]. Oncol Rep, 2013, 30(3): 1423-1429.
- [ 12 ] Kuramoto K, Yamamoto M, Suzuki S, et al. AS602801, an anti-cancer stem cell drug candidate, suppresses gap-junction communication between lung cancer stem cells and astrocytes [J]. Anticancer Res, 2018, 38(9): 5093-5099.
- [ 13 ] Bertram JS, Janik P. Establishment of a cloned line of Lewis lung carcinoma cells adapted to cell culture [J]. Cancer Lett, 1980, 11(1): 63-73.
- [ 14 ] Tanabe S. EMT mechanism, lung cancer metastasis, and microRNA [J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 731788.
- [ 15 ] 刘扬, 王金佩, 黄国友, 等. 肿瘤上皮-间质转化(EMT)的生物力学特性研究进展 [J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2020, 46(6): 571-577.
- Liu Y, Wang JP, Huang GY, et al. Research advances in biomechanical properties of EMT in tumor cells [J]. J Southwest Minzu Univ (Nat Sci Edi), 2020, 46(6): 571-577.

[收稿日期] 2021-12-07

栾晶,胡峰瑞,郭慧芳,等. APP/PS1 $\Delta$ E9 阿尔茨海默症小鼠脾免疫细胞以及相关干细胞比例与正常小鼠的差异研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 482-487.

Luan J, Hu FR, Guo HF, et al. Differences in the proportion of splenic immune cells and related stem cells between Alzheimer's model (APP/PS1 $\Delta$ E9) mice and normal mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 482-487.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.005

# APP/PS1 $\Delta$ E9 阿尔茨海默症小鼠脾免疫细胞以及相关干细胞比例与正常小鼠的差异研究

栾晶<sup>1</sup>, 胡峰瑞<sup>1</sup>, 郭慧芳<sup>2</sup>, 劳可静<sup>1</sup>, 苟兴春<sup>1\*</sup>

- (1. 陕西省缺血性心血管疾病重点实验室, 陕西省脑疾病重点实验室, 西安医学院基础与转化医学研究所, 西安 710021;  
2. 陕西省感染与免疫疾病重点实验室(西安医学院), 西安医学院基础医学部, 西安 710021)

**【摘要】 目的** 探讨 APP/PS1 $\Delta$ E9 阿尔茨海默症小鼠(AD 小鼠)脾各免疫细胞以及相关干细胞比例与正常小鼠比较是否存在差异。**方法** 取 9 月龄 AD 小鼠与其同窝对照小鼠脾(每组各 6 只), 流式细胞法检测各组小鼠脾中 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞比例;同时,检测上述细胞中具有干细胞特性的细胞(C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>)比例。比较 AD 小鼠脾各免疫细胞比例及相应干细胞比例与正常小鼠的差异。**结果** 9 月龄 AD 小鼠与其同窝对照小鼠相比行为学存在显著性差异;与其同窝对照野生型小鼠相比,9 月龄 AD 小鼠脾中 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞比例无明显差异;AD 小鼠脾 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞以及 B 细胞中 C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>细胞比例高于其同窝对照野生型小鼠,但由于个体差异较大,无统计学意义;单核细胞、巨噬细胞和树突细胞比例中 C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>细胞比例低于其同窝对照野生型小鼠,在巨噬细胞和树突细胞中有明显的统计学意义。**结论** 虽然 9 月龄 AD 小鼠与正常小鼠相比,脾中各免疫细胞比例无明显差异,但 AD 小鼠髓系细胞中具有干细胞特性的细胞储备显著低于正常小鼠,而淋系细胞中具有干细胞特性的细胞比例与正常小鼠相比有升高趋势,说明 AD 小鼠与正常小鼠相比存在免疫衰老加速现象。

**【关键词】** 阿尔茨海默症小鼠;脾免疫细胞;干细胞;比例差异

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0482-06

## Differences in the proportion of splenic immune cells and related stem cells between Alzheimer's model (APP/PS1 $\Delta$ E9) mice and normal mice

LUAN Jing<sup>1</sup>, HU Fengrui<sup>1</sup>, GUO Huifang<sup>2</sup>, LAO Kejing<sup>1</sup>, GOU Xingchun<sup>1\*</sup>

- (1. Shaanxi Key Laboratory of Ischemic Cardiovascular Disease, Institute of Basic and Translational Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China. 2. Shaanxi Key Laboratory of Infection and Immune Disorders, School of Basic Medical Science, Xi'an Medical University, Xi'an 710021)

Corresponding author: GOU Xingchun. E-mail: gouxingchun@189.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate whether the proportion of immune cells and related stem cells in the spleen of APP/PS1 $\Delta$ E9 Alzheimer's mice (AD mice) is different from that of normal mice. **Methods** The spleens of 9-month-old AD mice and their littermate normal control mice (six in each group) were collected. The ratio of CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T

**【基金项目】**陕西省教育厅重点科学研究计划(20JS136),陕西省科技厅自然科学基金基础研究计划一般项目(青年)(2020JQ-877),国家自然科学基金青年项目(81903471),广西自然科学基金(2018GXNSFBA050016)。

Funded by the Research Fund of Shaanxi Provincial Education Department (20JS136), Natural Science Basic Research Plan of Shaanxi Province in China (2020JQ-877), National Natural Science Foundation of China (81903471), Natural Science Foundation of Guangxi Province in China (2018GXNSFBA050016).

**【作者简介】**栾晶(1988—),女,博士,讲师,研究方向:免疫衰老、自身免疫性疾病的发病机制研究。Email:luanjing666@126.com

**【通信作者】**苟兴春(1973—),男,博士,教授,研究方向:神经再生与修复、老年痴呆机制及防治。Email:gouxingchun@189.cn

cells, B cells, monocytes, macrophages, and dendritic cells in the spleens of each group were detected by flow cytometry. At the same time, the ratio of cells with stem cell characteristics (C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>) among the above-mentioned cells was detected and compared. **Results** The AD mice showed significant differences in behavior compared with the control mice. However, there were no significant differences in the proportions of CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, B cells, monocytes, macrophages, and dendritic cells in the spleens of AD mice compared with the control mice. The proportions of C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, and B cells in the spleens of the AD mice were higher than those in the control mice, but because of individual differences, this was not statistically significant; the proportions of C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> cells in monocytes, macrophages, and dendritic cells were lower in AD mice than in the control mice. The difference between macrophages and dendritic cells was statistically significant. **Conclusions** Although the proportion of immune cells in the spleen of 9-month-old AD mice was not significantly different from that of normal control mice, in the myeloid cells of AD mice, the reserve of cells with stem cell characteristics was significantly lower than that of normal mice. Furthermore, compared with normal mice, the proportion of cells with stem cell characteristics among the lymphocytes was generally increased for AD mice. Taken together, these results indicated that AD mice had accelerated immune senescence compared with normal mice.

【**Keywords**】 Alzheimer's disease mouse model; splenic immune cells; stem cells; proportional differences

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

1907 年, Alois Alzheimer 描述了一种疾病, 其特征是严重的认知障碍、定向障碍、失语、妄想以及不可预测的行为表现, 该病病程呈持续性进展, 患者平均在 4.5 年后死亡, 在病理检查中存在脑萎缩和神经原纤维缠结的特征性改变<sup>[1]</sup>。1910 年, Kraepelin 以他的名字命名了这种疾病, 即阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)<sup>[1]</sup>。目前, AD 已经成为老年群体中继心脏病、恶性肿瘤、脑卒中后第 4 位死亡原因<sup>[2]</sup>。据 2014 年报道的一项基于我国人群的横断面调查统计, 65 岁以上人群 AD 发病率为 5.14%, 到 2050 年, 全球 AD 患者将达到 1.315 亿<sup>[3]</sup>。

AD 是一种衰老相关疾病, 因发生在老年期和老年早期, 在国内又被称为老年性痴呆。衰老的特征是机体生理功能和稳定组织内环境的能力持续性下降, 这将导致退行性疾病的发病率及死亡率的增加<sup>[4]</sup>。流行的衰老理论认为, 免疫功能的下降是导致机体衰老的重要因素<sup>[5]</sup>。随着年龄的增长, 机体的免疫功能逐渐减弱, 免疫系统无法产生保护性免疫, 免疫系统的保真度和效率降低, 称为免疫衰老<sup>[6]</sup>。骨髓中的造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 分化为整个免疫系统的免疫细胞。已有研究报道, 免疫系统的老化根源于 HSC 的老化<sup>[7-8]</sup>, 造血系统的老化表现为适应性免疫系统和先天免疫系统功能的下降。人体先天免疫系统和适应性免疫系统会随着年龄增长发生变化, 前者更加活跃, 后者功能下降<sup>[9]</sup>。而 AD 患者的先天免疫系统和适应性免疫系统与同龄健康人比较是否发生结构和比例的变化, 相应干细胞结构和比例是否发生变化, 目前研究较少, 没有明确结果。

前期研究发现, 造血干细胞 (即 C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> 细胞) 遍布 C57BL/6 小鼠的外周血、脾、淋巴结等免疫器官, 并且各免疫器官中不同免疫细胞的比例以及其中造血干细胞的比例随着小鼠月龄的增加出现规律性的变化, 13 月龄以上的小鼠体内 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞以及自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 中 C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> 比例出现显著性上升或下降, 表明在该时间点干细胞的平衡和稳定性被破坏, 可能是 C57BL/6 小鼠免疫和机体衰老的重要时间点<sup>[10]</sup>。基于上述线索, 推测 AD 作为衰老相关疾病, 其小鼠免疫系统比例和结构以及相应的造血干细胞比例可能不同于同月龄正常小鼠。本研究收集了 9 月龄的 AD 小鼠及同窝对照 C57BL/6 小鼠。检测天然免疫和适应性免疫系统的免疫细胞, 包括 NK 细胞、单核细胞、巨噬细胞、CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞、B 淋巴细胞。同时检测相应的具有造血干细胞特性 (C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>) 的细胞比例的变化。由于 AD 发病机制尚不能明确, 一旦发病无法治愈, 现有医疗手段只能延缓病情进展, 暂无有效治疗方法。明确 AD 小鼠先天免疫系统和适应性免疫系统的比例和结构的变化, 以及相应的造血干细胞的分布和变化, 可为 AD 发病机制的解析以及 AD 患者免疫系统的老化提供了更多的研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

9 月龄 SPF 级 AβPP<sup>swe</sup>/PS1ΔE9 (C57BL/6 背

景)阿尔茨海默症小鼠(AD 小鼠)及其同窝对照小鼠,每组各 6 只,雄性,  $(26 \pm 3)$  g, 购自北京维通利华公司【SCXK(京)2016-0011】,小鼠在西安医学院基础与转化医学研究所 SPF 级动物房的独立通风笼(IVC)中饲养,温度  $20 \sim 26^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度  $40\% \sim 70\%$ ,最小静压差  $\leq 10$  Pa,动物光照  $15 \sim 20$  lx,实验场地的使用许可证号【SYXK(陕)2022-04】。饲养方法严格按照 GB14925-2010 执行,实验动物操作按照《实验动物使用及实验规程国家标准》执行。所有操作均符合西安医学院伦理审查委员会要求(批准号 XYLS2019019)。

### 1.1.2 主要试剂与仪器

大鼠抗小鼠流式抗体 CD3-PE-Cy7、CD4-FITC、CD8-PerCP-Cyanine5.5、B220-APC、F4/80-APC、CD11c-PE-Cy7、MHC Class II(I-A/I-E)-FITC、CD115-PerCP-Cyanine5.5、Ly-6A/E-PE-CF594、CD117-PE 均购买于美国 BD 公司。FACS Calibur 流式细胞仪,购自美国贝克曼库尔特有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 小鼠 Y 迷宫检测

Y 迷宫由长 $\times$ 宽 $\times$ 高为  $30\text{ cm} \times 8\text{ cm} \times 15\text{ cm}$  的 3 个长方体拼接而成的,角度互为  $120^{\circ}$ ,背景为白色。基于小鼠喜欢探索新环境的特性,人为在迷宫的 3 个臂内部贴有种不同颜色和不同形状标的记物,以利于小鼠进行空间定位,检测间人员位置与物品摆放位置不变。将小鼠面壁放入起始区,每次每只小鼠按 A、B、C 3 个臂的顺序进入,计时 8 min,记录小鼠探索轨迹。小鼠在 Y 迷宫中,倾向于交替探索 3 个不同臂(分为 A、B、C 3 个臂),例如 ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA 等作为实际转换次数(alternation),BCB,ACA,BAB 等不计入,探索进臂总次数减 2 作为最大转换数。并计算转换率 = [正确交替反应次数/(N-2)] $\times 100\%$ ,此值越高说明记忆力越好。

### 1.2.2 流式检测

小鼠安乐死后摘取脾,200 目筛网中研磨成单个脾淋巴细胞,无血清 1640 或者 PBS 重悬后置于冰上备用。将上述小鼠的脾细胞悬液在离心机中离心 5 min,条件为  $4^{\circ}\text{C}$  2000 rpm,离心后弃上清;加 PBS 重悬后调整细胞浓度至每毫升  $1 \times 10^7$  个,取 200  $\mu\text{L}$  于新的流式管中进行各淋巴细胞染色。

### 1.3 统计学分析

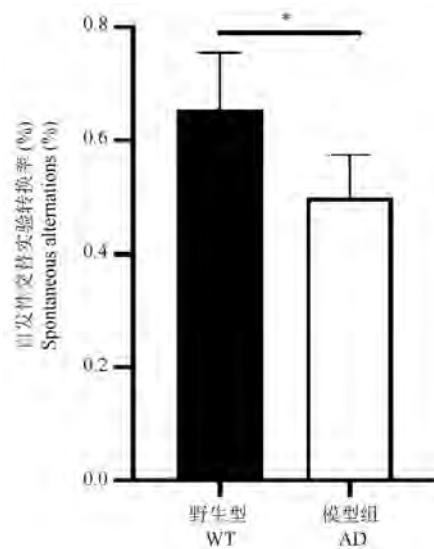
数据采用 GraphPad Prism 8 软件(加利福尼亚

州,美国)进行分析。各组数据在分析前进行 Shapiro-Wilk 正态性检验,正态分布数据以平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组数据比较均采用独立样本  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠 Y 迷宫结果

首先明确了 9 月龄 A $\beta$ PP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta\text{E9}$  阿尔茨海默症小鼠与其同窝对照正常小鼠的行为学表现差异。Y 迷宫实验结果显示,如图 1,AD 小鼠在 Y 迷宫自发性交替实验转换率的表现较其同型对照正常小鼠相比显著降低( $P = 0.0118$ )。以上结果证实了 AD 小鼠模型的可靠性,9 月龄 AD 小鼠已经有明显的行为学表型。



注:与 WT 组相比, \*  $P < 0.05$ 。(下同)

图 1 WT、AD 小鼠在 Y 迷宫自发性交替实验转换率的表现

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

Figure 1 Spontaneous alternation rates of WT and AD mice in the Y maze spontaneous alternating experiment

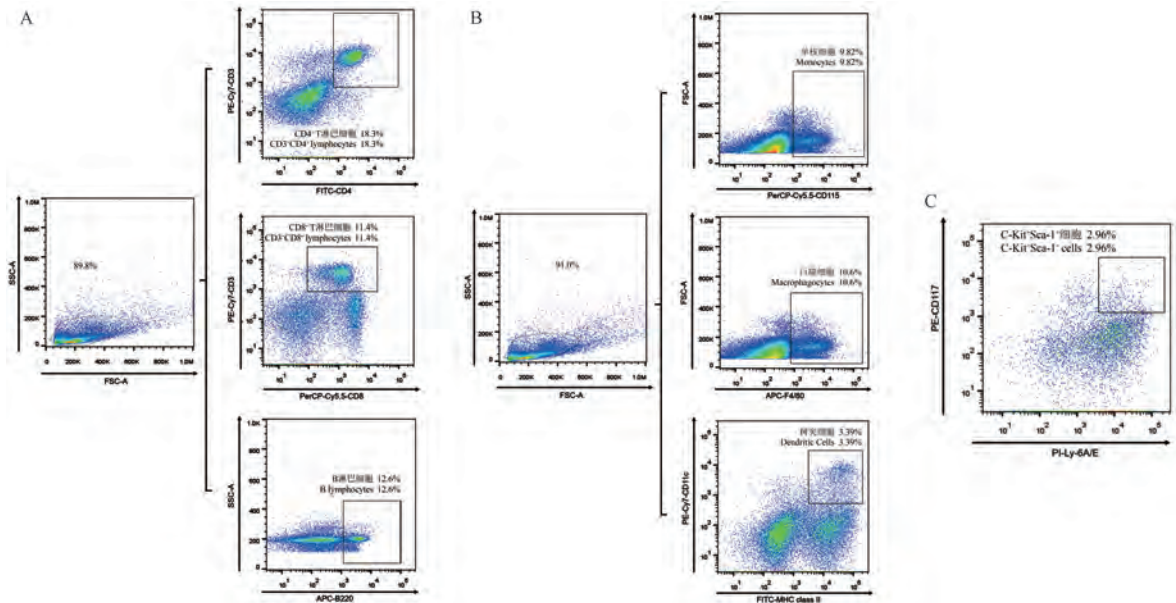
### 2.2 小鼠脾淋巴细胞流式分析

在验证 AD 小鼠模型的可靠性后,将两组小鼠于标准 SPF 环境中(温度  $20 \sim 26^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度  $40\% \sim 70\%$ ),自由饮食饮水条件下继续饲养 1 周。1 周后用 1%戊巴比妥钠麻醉小鼠,摘取小鼠脾,200 目筛网中研磨成单个脾淋巴细胞,用无血清 1640 或者 PBS 重悬后将细胞浓度调整至每毫升  $1 \times 10^7$  个,取 200  $\mu\text{L}$  于新的流式管中进行各淋巴细胞染色。脾各免疫细胞配色方案及流式分析步骤如图 2 所示。

2.2.1 小鼠脾各淋巴细胞比例

按照以上的配色方案以及流式分析步骤,检测了 9 月龄 AD 小鼠以及其同窝对照野生型小鼠脾中

CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞以及树突细胞的比例,结果发现,以上各免疫细胞的比例在野生型小鼠及 AD 小鼠中无明显差异,如图 3 所示。



注:A:CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、B 淋巴细胞分选步骤;B:单核细胞、巨噬细胞、树突细胞分选步骤;C:C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> 细胞分选步骤。

图 2 脾各免疫细胞配色方案及具体流式分析步骤

Note. A. Sorting steps of CD4<sup>+</sup> T, CD8<sup>+</sup> T and B lymphocytes. B. Sorting steps of monocytes, macrophages and dendritic cells. C. Sorting steps of C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> cells.

Figure 2 Color scheme of immune cells in spleen and the procedure of flow cytometry

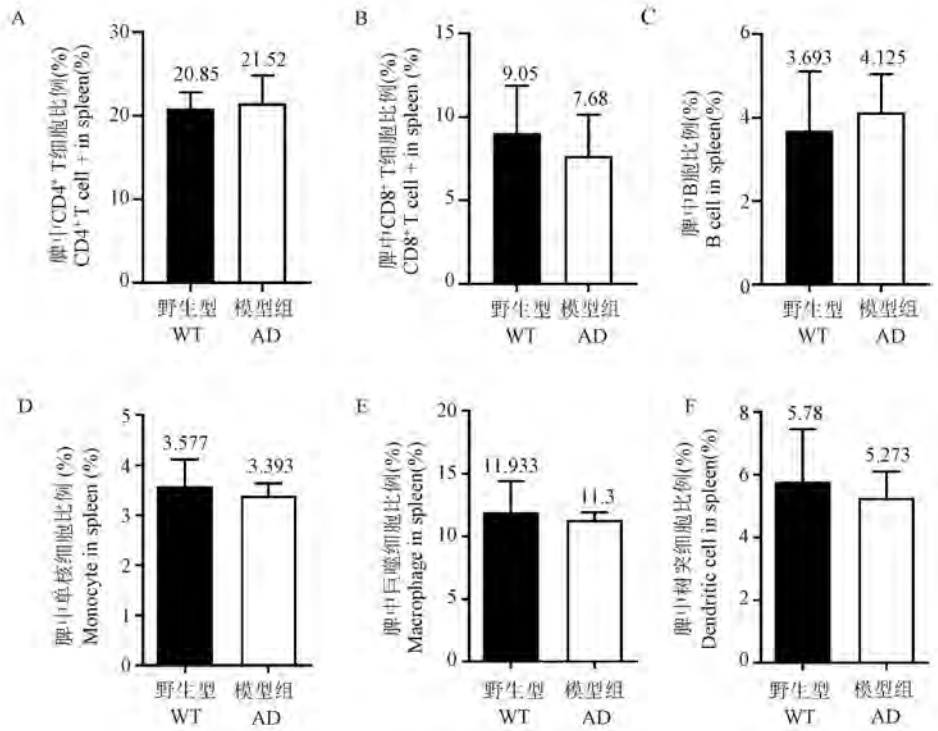


图 3 小鼠脾 CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞以及 DC 细胞比例

Figure 3 Proportion of CD4<sup>+</sup> T, CD8<sup>+</sup> T, B cells, monocytes, macrophages and DC cells in the spleen of mice

### 2.2.2 小鼠脾淋巴细胞中 C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例

检测了 9 月龄 AD 小鼠以及其同窝对照野生型小鼠脾中 CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞以及树突细胞中具有 HSC 特性的细胞比例(即 C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例)。结果发现(见图 4):在 AD 小鼠脾适应性免疫系统 CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、B 细胞中,

C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例均高于其同窝对照正常小鼠,但由于小鼠个体差异较大,结果没有统计学意义。AD 小鼠脾天然免疫系统单核细胞、巨噬细胞以及 DC 细胞中, C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例均低于其同窝对照正常小鼠,结果在巨噬细胞和树突细胞中具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

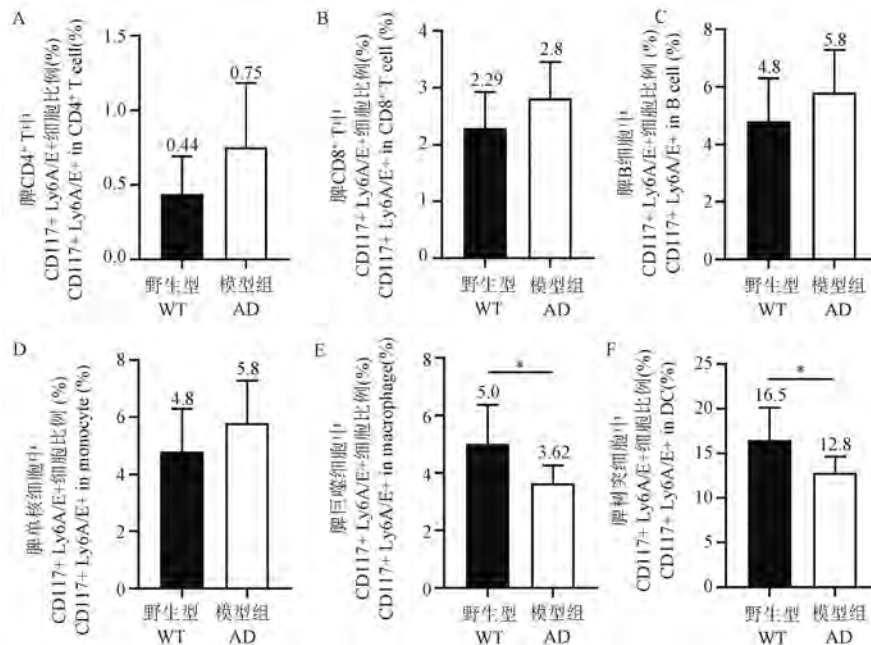


图 4 小鼠脾 CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞以及 DC 细胞中 C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> 细胞比例

Figure 4 Proportion of C-Kit<sup>+</sup> SCA-1<sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup> T, CD8<sup>+</sup> T, B cells, monocytes, macrophages and DC cells in the spleen of mice

## 3 讨论

由于 AD 病理学的主要特征是淀粉样斑块和神经原纤维缠结。在过去的几十年里,淀粉样蛋白级联假说是 AD 研究领域的主流学说<sup>[11]</sup>。然而,最近的研究结果对这一假说提出了挑战,越来越多的研究为免疫衰老在 AD 发病中的重要作用提供了支持证据,认为免疫衰老积极参与 AD 的发病机制并介导炎症损伤<sup>[12]</sup>,AD 是最常见的与年龄相关的一种神经退行性疾病,AD 的发病可能是由免疫系统以年龄依赖性方式进行调控<sup>[13]</sup>,免疫和炎症反应的改变可能在 AD 的进展中起主要作用的观点越来越得到认可。

随着年龄的增长,机体的免疫功能逐渐减弱,免疫系统无法产生保护性免疫,免疫系统的保真度和效率降低,称为免疫衰老。免疫衰老的一个主要特征是炎症和抗炎网络之间的失衡,伴随着持续的低水平炎症和对自身免疫反应的更大易感性<sup>[14]</sup>。

免疫系统的免疫细胞是由骨髓中的 HSC 分化而来,免疫系统的老化根源在于 HSC 的老化<sup>[15]</sup>。研究发现与年轻 C57BL/6 小鼠 HSC 相比<sup>[16-18]</sup>,衰老的 HSC 的竞争性再增殖能力下降了 2 ~ 4 倍,年轻小鼠的干细胞在单细胞水平上产生更成熟的外周血细胞,它们更能平衡地产生髓系细胞和淋巴系细胞。大多数 HSC 在稳态下处于静止状态,自我更新潜力有限<sup>[19]</sup>。造血过程受到内在和外在机制的严格调控,这些机制平衡了静止、自我更新和分化以维持正常生理需要的多谱系重建<sup>[20-21]</sup>。随着每一次细胞分裂,HSC 分化为血细胞的潜能下降,同时,潜能降低的子代造血祖细胞数量增加,以弥补单个干细胞功能的丧失<sup>[22]</sup>。因此,造血干细胞自身的大量增殖,会导致造血干细胞的耗竭;而静息状态有利于维持造血干细胞的功能和干性。

AD 患者的先天性免疫系统和适应性免疫系统与同龄健康人比较是否发生结构和比例的变化,相应干细胞结构和比例是否发生变化,目前研究较

少,没有明确结果。本研究通过检测 9 月龄 AD 小鼠以及其同窝对照野生型小鼠脾中 CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞的比例,以及上述免疫细胞中具有 HSC 特性的细胞比例(即 C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>细胞比例),发现虽然 AD 小鼠脾各免疫细胞的比例与其同窝对照正常小鼠相比无明显差异,但更深入的分析发现:AD 小鼠脾中各免疫细胞比例中具有 HSC 特性的细胞比例存在差异,在 AD 小鼠脾适应性免疫系统 CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、B 细胞中,C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>细胞比例均高于其同窝对照正常小鼠。AD 小鼠脾天然免疫系统单核细胞、巨噬细胞以及 DC 细胞中,C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>细胞比例均低于其同窝对照正常小鼠。说明 AD 小鼠免疫系统存在加速衰老的现象,这有可能是潜在的 AD 发病机制。

值得一提的是,同时检测了 AD 小鼠的外周血、胸腺和淋巴结,但由于 AD 小鼠本身的发病可能与免疫系统有关,加之 AD 小鼠造模本身需要的时间较长(8 个月以上),与正常小鼠相比,AD 小鼠的淋巴结和胸腺的大小等在不同的小鼠个体之间差异较大,研磨后收集到的免疫细胞数较少,包括在外周血中,C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>细胞本身比例较小,C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>细胞数达不到统计学要求,导致流式结果稳定性差。后续更大样本量的验证以及更深入的 AD 免疫细胞变化随年龄增长的动态研究有利于更深入的机制的解析。综上,本研究主要发现在 AD 小鼠和正常小鼠脾中 C-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>细胞比例有明显差异这一明显现象存在,基于本文研究结果,相关机制的深入展开研究更有意义也更有意义。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Small DH, Cappai R. Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: a centennial perspective [J]. J Neurochem, 2006, 99(3): 708-710.
- [ 2 ] Lang L, Clifford A, Wei L, et al. Prevalence and determinants of undetected dementia in the community: a systematic literature review and a meta-analysis [J]. BMJ Open, 2017, 7(2): e11146.
- [ 3 ] Jia JP, Wang F, Wei CB, et al. The prevalence of dementia in urban and rural areas of China [J]. Alzheimers Dement, 2014, 10(1): 1-9.
- [ 4 ] Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation [J]. Nature, 2016, 539(7628): 180-186.
- [ 5 ] Sadighi Akha AA. Aging and the immune system: an overview [J]. J Immunol Methods, 2018, 463: 21-26.
- [ 6 ] Pinti M, Appay V, Campisi J, et al. Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination [J]. Eur J Immunol, 2016, 46(10): 2286-2301.
- [ 7 ] Geiger H, Denking M, Schirmbeck R. Hematopoietic stem cell aging [J]. Curr Opin Immunol, 2014, 29: 86-92.
- [ 8 ] Dykstra B, de Haan G. Hematopoietic stem cell aging and self-renewal [J]. Cell Tissue Res, 2008, 331(1): 91-101.
- [ 9 ] Xu WL, Wong G, Hwang YY, et al. The untwining of immunosenescence and aging [J]. Semin Immunopathol, 2020, 42(5): 559-572.
- [ 10 ] Luan J, Xu H, Jin Z, et al. Analysis of the dynamic changes in the proportion of immune cells and the proportion of cells with stem cell characteristics in the corresponding immune cell population of C57 mice during the natural aging process [J]. Immunol Res, 69(6): 520-532.
- [ 11 ] Martorana A, Bulati M, Buffa S, et al. Immunosenescence, inflammation and Alzheimer's disease [J]. Longev Healthspan, 2012, 1: 8.
- [ 12 ] Ricciarelli R, Fedele E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: it's time to change our mind [J]. Curr Neuropharmacol, 2017, 15(6): 926-935.
- [ 13 ] Jay TR, Hirsch AM, Broihier ML, et al. Disease progression-dependent effects of TREM2 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. J Neurosci, 2017, 37(3): 637-647.
- [ 14 ] Singh SK, Singh S, Gadomski S, et al. Id1 ablation protects hematopoietic stem cells from stress-induced exhaustion and aging [J]. Cell Stem Cell, 2018, 23(2): 252-265.
- [ 15 ] Geiger H, Rudolph KL. Aging in the lympho-hematopoietic stem cell compartment [J]. Trends Immunol, 2009, 30(7): 360-365.
- [ 16 ] Yilmaz OH, Kiel MJ, Morrison SJ. SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity [J]. Blood, 2006, 107(3): 924-930.
- [ 17 ] Chambers SM, Shaw CA, Gatz C, et al. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation [J]. PLoS Biol, 2007, 5(8): e201.
- [ 18 ] Kamminga LM, van Os R, Ausema A, et al. Impaired hematopoietic stem cell functioning after serial transplantation and during normal aging [J]. Stem Cells, 2005, 23(1): 82-92.
- [ 19 ] Nakamura-Ishizu A, Takizawa H, Suda T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells [J]. Development, 2014, 141(24): 4656-4666.
- [ 20 ] Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration [J]. Nat Med, 2014, 20(8): 833-846.
- [ 21 ] Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells [J]. Nature, 2014, 505(7483): 327-334.
- [ 22 ] de Haan G, Lazare SS. Aging of hematopoietic stem cells [J]. Blood, 2018, 131(5): 479-487.

[收稿日期] 2021-10-25

冯利,陈颖,彭博,等.褪黑素在模拟微重力大鼠体内的药代动力学研究[J].中国实验动物学报,2022,30(4):488-493.  
Feng L, Chen Y, Peng B, et al. Pharmacokinetics of melatonin in simulated microgravity rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 488-493.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.006

# 褪黑素在模拟微重力大鼠体内的药代动力学研究

冯利<sup>1</sup>,陈颖<sup>2\*</sup>,彭博<sup>2</sup>,陈腾飞<sup>2</sup>,李涛<sup>2,3</sup>,孙丽华<sup>3</sup>

(1. 国家开放大学医学院,北京 100039;2. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700;3. 北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室,中国中医科学院医学实验中心,北京 100700)

**【摘要】 目的** 研究正常重力和模拟微重力状态下褪黑素在大鼠体内药代动力学的差异。**方法** 建立测定大鼠血浆中褪黑素浓度的超高效液相色谱-质谱联用法(UPLC-MS/MS)。采用21 d尾吊法建立大鼠模拟微重力模型,以正常重力组大鼠为对照,21 d后,两组大鼠均单次灌胃给予褪黑素(0.27 mg/kg),于给药后5、10、15、20、30、40 min以及1、1.5、2、4、6 h颈静脉取血,分离血浆,采用以上建立的UPLC-MS/MS法测定褪黑素在大鼠血浆中的浓度并计算药代动力学参数。**结果** 在0.1~50 ng/mL浓度范围内,血浆中褪黑素的线性关系良好,日内与日间精密度的相对标准偏差(RSD)均小于10.99%,低、中、高3个浓度(0.1、25和50 ng/mL)的加样回收率为99.31%~115.32%。相比正常重力组,褪黑素在模拟微重力组大鼠血浆中的药代动力学参数发生显著变化。其中,达峰时间( $T_{max}$ )、0~6 h的药-时曲线下面积( $AUC_{0-6h}$ )、清除率( $CL$ )和平均滞留时间( $MRT_{0-6h}$ )具有统计学意义( $P < 0.05$ )。模拟微重力组大鼠血浆中褪黑素的 $T_{max}$ 、 $AUC_{0-6h}$ 、 $CL$ 和 $MRT_{0-6h}$ 分别为正常重力组的1.6、3.1、0.34和1.56倍。褪黑素在模拟微重力条件下相对于正常重力条件下的生物利用度为312.5%。**结论** 在模拟微重力条件下褪黑素的药代动力学特征发生显著变化。

**【关键词】** 褪黑素;模拟微重力;药代动力学;尾吊;生物利用度

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)04-0488-06

## Pharmacokinetics of melatonin in simulated microgravity rats

FENG Li<sup>1</sup>, CHEN Ying<sup>2\*</sup>, PENG Bo<sup>2</sup>, CHEN Tengfei<sup>2</sup>, LI Tao<sup>2,3</sup>, SUN Lihua<sup>3</sup>

(1. School of Medicine, the Open University of China, Beijing 100039, China. 2. the Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700. 3. Beijing Key Laboratory of TCM Basic Research on Prevention and Treatment of Major Disease, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

Corresponding author: CHEN Ying. E-mail: ychen@icmm.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To study the pharmacokinetics of melatonin in rat plasma under conditions of normal gravity and simulated microgravity. **Methods** First, an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established to determine the concentration of melatonin in rat plasma. The simulated microgravity model of SD rats was established by 21 days of tail suspension. The rats in the normal gravity group were used as the control. After 21 days, the rats in both groups were administered melatonin (0.27 mg/kg) by single gavage. Blood was taken from the jugular vein at 5, 10, 15, 20, 30, 40 min and 1, 1.5, 2, 4 and 6 hours after administration, and the

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(82074103),中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04905,CI2021B015),国家“载人航天工程航天医学实验领域项目”(HYZHXM05003)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(82074103), Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine(CI2021A04905, CI2021B015), National “Manned Space Engineering Aerospace Medical Experiment Field Project”(HYZHXM05003).

**【作者简介】** 冯利(1982—),男,讲师,博士,研究方向:中药药理学及药代动力学。Email: fengli@ouchn.edu.cn

**【通信作者】** 陈颖(1979—),女,研究员,博士,研究方向:中药药理学及药代动力学。Email: ychen@icmm.ac.cn

plasma was separated. The concentration of melatonin in the rat plasma was analyzed by the above-established UPLC-MS/MS method and the pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** Within the concentration range of 0.1 ~ 50 ng/mL, the linear relationship of melatonin in plasma was good. The relative standard deviation (RSD%) for both intra-day and inter-day precision was < 10.99%. The extraction recoveries of low, medium, and high concentrations (0.1, 25, and 50 ng/mL) were between 99.3% and 115.3%, and there was no obvious matrix effect. Compared with the normal gravity group, the pharmacokinetic parameters of melatonin in the plasma of simulated microgravity rats changed significantly. There were significant differences in time to reach maximum concentration ( $T_{max}$ ), area under the plasma concentration-time curve ( $AUC_{0-6h}$ ), plasma clearance ( $CL$ ), and mean residence time ( $MRT_{0-6h}$ ) ( $P < 0.05$ ). The  $T_{max}$ ,  $AUC_{0-6h}$ ,  $CL$ , and  $MRT_{0-6h}$  values in the plasma of simulated microgravity rats were 1.6, 3.1, 0.34, and 1.56 times those of the normal gravity control rats, respectively. The bioavailability of melatonin in the microgravity rats was 312.5% that of the normal gravity rats. **Conclusions** Compared with normal gravity, the pharmacokinetic characteristics of melatonin changed significantly after 21 days of simulated microgravity.

**【Keywords】** melatonin; simulated microgravity; pharmacokinetics; tail suspension; bioavailability

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

太空飞行中的各种应激源,如微重力、太空辐射、狭小空间、振动、噪声等均会干扰机体的稳态,威胁航天员的身体健康。在多种应激因素存在下,航天员很容易产生焦虑、抑郁、睡眠障碍等症状。目前,针对航天因素导致的睡眠障碍的干预措施主要为给与镇静催眠药物、调节光线、锻炼和使用传统中医药等<sup>[1]</sup>。但是,调节光线和锻炼的作用有限,对睡眠障碍的干预目前仍主要依赖镇静催眠药物。但镇静催眠药物具有嗜睡等副作用,对航天员在轨工作的影响较大。寻找副作用小的改善睡眠障碍的防护措施一直是航天医学研究的热点之一。褪黑素是脑内松果体合成和分泌的一种内源性神经激素,具有诱导自然睡眠的功效。研究发现,除改善睡眠外,褪黑素还具有显著的调节免疫、抗氧化、抗炎、预防骨丢失、保护心血管、降压等<sup>[2-7]</sup>作用。这对航天员尤其有利,因为骨丢失、心脏功能受损、免疫功能下降也是在轨航天员的常见的功能障碍<sup>[8]</sup>。因此,褪黑素是治疗航天员睡眠障碍的一种很具有潜力的化合物。

航天特因环境可通过影响药物的转运、药物代谢酶<sup>[9]</sup>等影响药物的吸收、分布、代谢、排泄过程,导致药物产生不同于地表的药效和毒性改变。已发现其他药物在正常和模拟微重力条件下的药物半衰期、达峰浓度和生物利用度具有显著性差异<sup>[10]</sup>。褪黑素在关节炎模型大鼠体内的药物吸收总量以及平均滞留时间与正常对照组大鼠有显著性差异<sup>[11]</sup>。因此,研究褪黑素在微重力条件下吸收、分布、代谢和排泄的变化,对指导航天员合理、安全用药有重要意义。本研究首先建立了测定大鼠血浆中褪黑素浓度的 UPLC-MS/MS 方法,随后采

用建立的方法研究了在模拟微重力和正常重力条件下,大鼠血浆中褪黑素的药物代谢动力学的差异,为航天员合理使用褪黑素提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

12 只 6 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重( $200 \pm 20$ )g,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。在昼夜各半循环照明,恒湿(59% ~ 62%),恒温(22 ~ 25℃)条件下适应性喂养 4 d 后开始造模。每只大鼠单笼饲养,自由饮食饮水,饲养于中国中医科学院中药研究所【SYXK(京)2019-0003】。实验遵循 3R 原则,本研究中的所有动物实验均经过中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会批准(2021B152)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(批号:20200702),瑞普生物药业有限公司;褪黑素(批号:J19GS155217,纯度>99%),上海源叶生物科技有限公司;盐酸苯海拉明(批号:100066-200807,纯度>99%,内标),中国药品生物制品检定院;乙腈、甲醇为 HPLC 级(Thermo Fisher 公司,美国)。QTRAP5500 LC/MS/MS 质谱仪、ExionLC AC 超高效液相色谱仪器(AB SICEX 公司,美国);Vortex 涡旋混合仪(济南其林贝尔公司,中国);超速离心机(Sigma 公司,德国);电子天平(十万分之一)(梅特勒-托利多公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组及实验干预

将 12 只大鼠按照随机原则分成两组(每组 6

只)。采用文献报道的尾吊法进行模拟微重力<sup>[12]</sup>。简述如下:将大鼠尾部用医用胶带固定,采用一细金属链通过鼠尾将大鼠悬吊于一金属笼,大鼠肢体与笼底呈 30°~35°角,后肢悬空。每只大鼠均单笼饲养,大鼠在笼中可自由活动,正常饮食饮水,正常重力组大鼠除不尾吊外,其他饲养条件同尾吊组大鼠,共建模 21 d。建模结束后,给药前 1 d,在异氟烷麻醉条件下,施行颈静脉插管术。大鼠给与褪黑素前禁食 12 h,饮水不限制。褪黑素的给与剂量为 0.27 mg/kg,灌胃给予。分别在给药前及给药后 5、10、15、20、30、40 min 以及 1、1.5、2、4、6 h 于颈静脉取血 0.2 mL 并置肝素化的 EP 管内,3000 rpm (4℃)离心 10 min 分离血浆,置于-20℃保存备用。

### 1.2.2 样品溶液配制

(1)标准储备液和标准工作液的配制:精密称取褪黑素对照品 5 mg,用 DMSO 溶解并定容至 10 mL,配制成 5 mg/mL 的储备液,再将此溶液用乙腈/甲醇(1:1, v/v)混合液逐级稀释成 1000、500、200、100、50 ng/mL 的系列工作液,然后以大鼠空白血浆再次稀释成浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、1 和 0.1 ng/mL 的标准系列工作液。

(2)内标溶液的配制:精密称取盐酸苯海拉明 10 mg,用乙腈/甲醇(1:1, v/v)混合液稀释定容至 10 mL,配成 1 g/L 的内标储备液,再使用乙腈/甲醇(1:1, v/v)混合液稀释成 100 ng/mL 的工作液。

(3)质控溶液的配制:以 1.2.2 项下(1)中配制的浓度分别为 0.1、25、50 ng/mL 的标准系列溶液作为标准质控工作液进行分析方法的精密度、回收率及稳定性的验证。

### 1.2.3 血浆样品预处理

将大鼠血浆 80 μL 于室温解冻,加入 160 μL 乙腈/甲醇(1:1, v/v)混合液,涡旋混匀,15 000 rpm 离心 3 min,取上清液 180 μL,加入内标盐酸苯海拉明(100 ng/mL)20 μL,涡旋均匀后取上清液 5 μL 进样分析。

### 1.2.4 色谱与质谱条件

(1)色谱条件:色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH Shield RP C<sub>18</sub>(2.1 × 50 mm, 1.7 μm);柱温:30℃;流动相 A:水(含 0.1% 甲酸);流动相 B:乙腈(含 0.1% 甲酸)。洗脱梯度:0~1.0 min, 98% A;1.0~2.0 min, 98% A~2% A;2.0~5.0 min, 2% A;5.0~5.1 min, 2% A~98% A;5.1~7.0 min, 98% A;流速:0.3 mL/min。

(2)质谱条件:电喷雾离子源(ESI);离子喷射

电压:5500 V;干燥气温度 450℃;雾化气压力 45 Psi;流速 20 L/min;正离子多反应监测模式(MRM)检测。定量分析离子对褪黑素  $m/z$  233.3→ $m/z$  174.1,碰撞能 10 eV,裂解电压 80 V;盐酸苯海拉明  $m/z$  256.2→ $m/z$  167.2,碰撞能 16 eV,裂解电压 110 V,扫描时间 200 ms。

### 1.3 统计学分析

采用 Phoenix WinNonlin 软件(版本:5.2.1)对实验数据进行药代动力学拟合并计算相关参数。血药浓度及药代动力学参数用平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用 SPSS 软件 20.0 进行  $t$  检验,比较正常对照组和模拟微重力组大鼠的血浆药代动力学参数的差异, $P < 0.05$  表示差异具有显著性。通过 Origin 软件 8.5 绘制各时间点血样中褪黑素的浓度与时间的关系曲线(药-时曲线)。

## 2 结果

### 2.1 方法学验证

#### 2.1.1 专属性

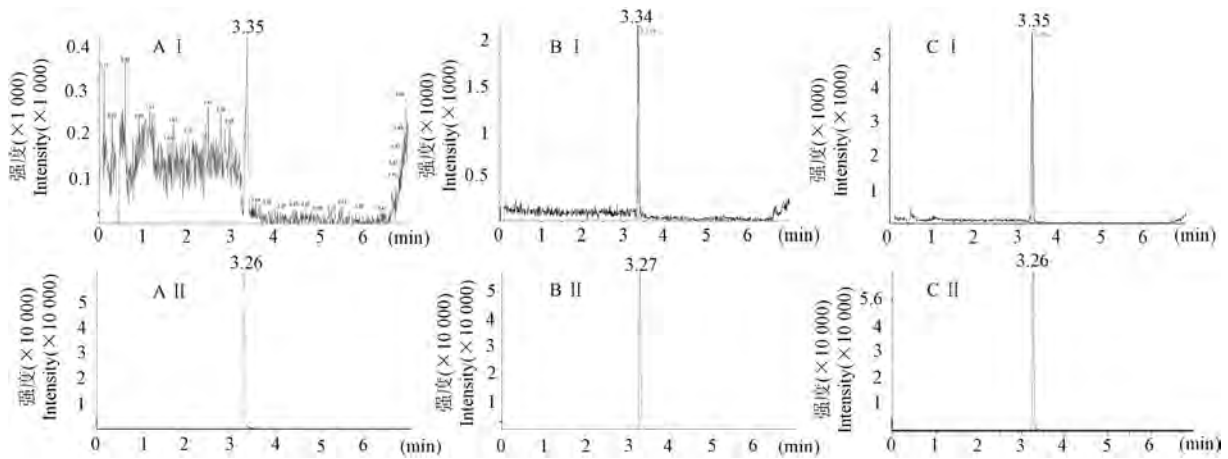
精密量取大鼠空白血浆 80 μL,按 1.2.3 所述方法处理、1.2.4 所述条件分析,得褪黑素的色谱图 1A;将浓度为 1 ng/mL 的褪黑素标准溶液和内标溶液加入空白血浆中,按以上方法进行样品处理和分析,得褪黑素的色谱图 1B;取大鼠给与褪黑素(0.27 mg/kg)10 min 后的血浆样品,按以上方法进行样品处理和分析,得色谱图 1C。由图 1 知,褪黑素的保留时间约为 3.35 min,内标盐酸苯海拉明的保留时间约为 3.26 min,空白血浆中内源性物质不干扰褪黑素的测定,表明所建立的分析方法的专属性良好。

#### 2.1.2 线性关系

以标准系列工作溶液的配制浓度及对应的待测物和内标的质谱峰面积比值进行回归,绘制标准曲线,得回归方程为  $Y = 0.00865X + 0.000647817$ ,权重  $W = 1/X^2$ , $r^2$  为 0.9997,最低定量限( $S/N > 10$ )为 0.1 ng/mL。

#### 2.1.3 精密度与准确度

精密量取按 1.2.2 项下(3)中方法配制的低、中、高 3 个浓度(0.10、25.00、50.00 ng/mL)的标准质控工作液,每个浓度 6 份,按 1.2.3 所述方法处理、1.2.4 所述条件分析,连续分析 3 d,每天重新制作标准曲线并计算质控样品的实测浓度,与配制浓度比较,计算方法的准确度和精密度。结果显示,褪黑素低、中、高 3 个浓度测定结果的精密度和准确度符合生物样品测定要求(表 1)。



注: A I: 大鼠空白血浆中褪黑素的色谱图; B I: 空白血浆加 1 ng/mL 褪黑素后褪黑素的色谱图; C I: 灌胃给与褪黑素 (0.27 mg/kg) 10 min 后血浆中褪黑素的色谱图; A II: 大鼠空白血浆中内标盐酸苯海拉明的色谱图; B II: 空白血浆加 1 ng/mL 褪黑素后内标盐酸苯海拉明的色谱图; C II: 灌胃给与褪黑素 (0.27 mg/kg) 10 min 后血浆中内标盐酸苯海拉明的色谱图。

图 1 大鼠血浆中褪黑素和内标盐酸苯海拉明的代表色谱图

Note. A I. Chromatogram of melatonin in blank plasma of rats. B I. Chromatogram of melatonin after adding 1 ng/mL melatonin to blank plasma. C I. Chromatogram of melatonin in plasma 10 minutes after intragastric administration of melatonin (0.27 mg/kg). A II. Chromatogram of internal standard diphenhydramine hydrochloride in blank plasma of rats. B II. Chromatogram of internal standard diphenhydramine hydrochloride after blank plasma plus 1 ng/mL melatonin. C II. Chromatogram of internal standard diphenhydramine hydrochloride in plasma 10 minutes after intragastric administration of melatonin (0.27 mg/kg).

Figure 1 Representative chromatogram of melatonin and internal standard diphenhydramine hydrochloride in rat plasma

表 1 褪黑素在大鼠血浆中的精密度与准确度 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Precision and accuracy of melatonin in rat plasma ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 浓度 (ng/mL)<br>Concentration (ng/mL) | 日内 Intra-day                          |         |                                 | 日间 Inter-day                          |         |                         |
|-------------------------------------|---------------------------------------|---------|---------------------------------|---------------------------------------|---------|-------------------------|
|                                     | 测量值 (ng/mL)<br>Measured value (ng/mL) | RSD (%) | 准确度 (ng/mL)<br>Accuracy (ng/mL) | 测量值 (ng/mL)<br>Measured value (ng/mL) | RSD (%) | 准确度 (%)<br>Accuracy (%) |
| 0.10                                | 0.10 ± 0.00                           | 3.34    | 98.92                           | 0.09 ± 0.01                           | 10.99   | 89.43                   |
| 25.00                               | 24.46 ± 0.62                          | 2.52    | 97.86                           | 25.20 ± 2.00                          | 7.95    | 100.83                  |
| 50.00                               | 51.99 ± 3.58                          | 6.89    | 103.98                          | 55.27 ± 3.22                          | 5.83    | 110.55                  |

#### 2.1.4 加样回收率和基质效应

取大鼠空白血浆,按 1.2.3 所述方法处理、1.2.4 所述条件分析,带入标准曲线,得褪黑素的量  $m_1$ 。将已知量 ( $m_2$ ) 的褪黑素加入到空白血浆中,制得含褪黑素低、中、高 3 个浓度 (0.10、25.00、50.00 ng/mL) 的标准质控工作液,每个浓度 6 份,同法操作,带入标准曲线,得褪黑素的量  $m_3$ 。通过  $(m_3 - m_1)/m_2$  计算加样回收率。结果显示,低、中、高 3 个浓度的加样回收率分别为  $(99.31 \pm 7.90)\%$ 、 $(103.25 \pm 3.72)\%$  和  $(115.32 \pm 8.50)\%$ , RSD% 分别为 7.95%, 3.58% 和 7.37%, 符合生物样品分析要求。

取大鼠空白血浆,按 1.2.3 所述方法处理、1.2.4 所述条件分析,带入标准曲线,得褪黑素的量  $n_1$ 。将已知量的褪黑素加入到空白血浆中,制得含褪黑素低、中、高 3 个浓度 (0.10、25.00、50.00 ng/

mL) 的标准质控工作液,每个浓度 6 份,同法操作,带入标准曲线,得褪黑素的量  $n_2$ 。将用乙腈/甲醇 (1:1, v/v) 混合液配制成的浓度为 0.10、25.00、50.00 ng/mL 的系列工作液,同法操作,带入标准曲线,得褪黑素的量  $n_3$ 。通过  $(n_2 - n_1)/n_3$  计算基质效应。结果显示,低、中、高 3 个浓度的基质效应分别为  $(92.50 \pm 3.20)\%$ 、 $(105.61 \pm 5.60)\%$  和  $(110.80 \pm 4.21)\%$ , RSD% 分别为 3.46%, 5.30% 和 3.79%, 符合生物样品分析要求。

#### 2.1.5 稳定性考察

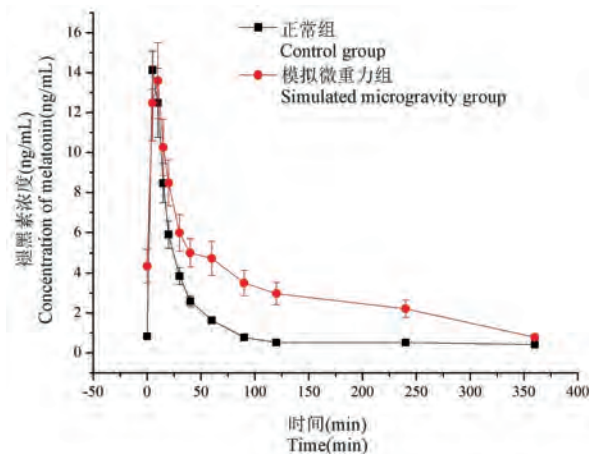
按 1.2.2 项下 (3) 中方法配制低、中、高 3 个浓度 (0.10、25.00、50.00 ng/mL) 的标准质控工作溶液,考察样品在室温放置 0 h 及 12 h、4℃ 放置 24 h、-20℃ 冻存 7 d 及 -80℃ 冻存 1 个月的稳定性。结果如表 2 所示,由表 2 可见,褪黑素在贮存和测定过程中稳定性良好。

表 2 大鼠血浆中褪黑素的稳定性 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )Table 2 Stability of melatonin in rat plasma ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 浓度 (ng/mL)<br>Concentration (ng/mL) | 大鼠血浆中稳定性 (%)<br>Stability in rat plasma (%) |                                  |               |                |                          |
|-------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|---------------|----------------|--------------------------|
|                                     | 室温 0 h<br>Room temperature 0 h              | 室温 12 h<br>Room temperature 12 h | 4℃ 24 h       | -20℃ 7 d       | -20℃ 1 月<br>-20℃ 1 month |
| 0.10                                | 105.82 ± 9.52                               | 100.60 ± 10.20                   | 98.74 ± 9.84  | 102.30 ± 10.54 | 110.22 ± 8.24            |
| 25.00                               | 99.53 ± 7.73                                | 102.93 ± 8.91                    | 98.92 ± 6.92  | 103.92 ± 7.54  | 106.84 ± 8.20            |
| 50.00                               | 103.84 ± 6.42                               | 98.64 ± 7.82                     | 105.41 ± 6.30 | 101.83 ± 7.22  | 99.72 ± 8.22             |

## 2.2 褪黑素在大鼠体内的药代动力学

参考褪黑素的人常用剂量,大鼠按 0.27 mg/kg 灌胃给与褪黑素,给药后的平均血药浓度-时间曲线如图 2 所示,药代动力学分析结果如表 3 所示。由图 2 可见,褪黑素在模拟微重力组大鼠体内的消除较慢。由表 3 可见,两组大鼠血浆中褪黑素的达

图 2 褪黑素在大鼠体内的药-时曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )Figure 2 Concentration-time curve of melatonin in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )表 3 大鼠口服给与褪黑素后的主要药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )Table 3 Main pharmacokinetic parameters of melatonin after oral administration in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 参数<br>Parameters             | 单位<br>Unit | 正常对照组<br>Control group | 模拟微重力组<br>Simulated microgravity group |
|------------------------------|------------|------------------------|----------------------------------------|
| $t_{1/2}$                    | h          | 1.96 ± 1.13            | 3.04 ± 1.34                            |
| $T_{max}$                    | h          | 0.11 ± 0.04            | 0.18 ± 0.03 *                          |
| $C_{max}$                    | ng/mL      | 2.79 ± 1.47            | 3.09 ± 1.70                            |
| $AUC_{0 \rightarrow 6h}$     | ng·h/mL    | 1.36 ± 0.78            | 4.25 ± 2.69 *                          |
| $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ | ng·h/mL    | 1.63 ± 0.97            | 4.59 ± 3.01 *                          |
| $V$                          | L/kg       | 526.60 ± 212.90        | 369.78 ± 177.51                        |
| $CL$                         | L/(h·kg)   | 260.52 ± 179.42        | 89.81 ± 44.39 *                        |
| $MRT_{0 \rightarrow 6h}$     | h          | 1.19 ± 0.62            | 1.86 ± 0.11 *                          |
| $MRT_{0 \rightarrow \infty}$ | h          | 2.31 ± 1.70            | 3.65 ± 1.39                            |

注:与正常对照组相比, \*  $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal gravity group, \*  $P < 0.05$ .

峰时间 ( $T_{max}$ )、0 ~ 6 h 的药-时曲线下面积 ( $AUC_{0 \rightarrow 6h}$ )、清除率 ( $CL$ ) 和平均滞留时间 ( $MRT_{0 \rightarrow 6h}$ ) 的差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。模拟微重力状态下,  $T_{max}$  值是正常重力下的 1.6 倍,  $AUC_{0 \rightarrow 6h}$  值是正常重力下的 3.1 倍,  $CL$  为正常重力下的 0.34 倍,  $MRT_{0 \rightarrow 6h}$  为正常重力下的 1.56 倍。褪黑素在模拟微重力条件下的相对生物利用度为正常重力条件下的 312.5%。

## 3 讨论

前期研究显示,微重力或者模拟微重力对药代动力学有显著影响。在微重力或者模拟微重力状态下,体液头向分布可导致消化道血流减少,消化道内的相关激素、转运蛋白、酶、微生物的水平会发生改变,消化道的排空也会变慢,从而影响药物的吸收<sup>[9,13-17]</sup>。此外,因体液头向分布,肌肉的血流量减少,可导致药物的总体分布减慢。微重力也会影响肝中的药物代谢酶,从而影响药物的代谢和清除<sup>[18]</sup>。研究发现<sup>[19]</sup>,在太空飞行 7 d 后,大鼠肝中 P450 酶的含量较对照组下降 50%。

褪黑素为大鼠体内内源性的一种神经内分泌激素。本研究结果显示,在各个采样点(包括 0 点)正常对照组和模拟微重力组大鼠体内的褪黑素浓度均未表现出显著性差异。

药代动力学研究结果显示,与正常重力组大鼠相比,褪黑素在模拟微重力大鼠血浆中的药代动力学参数具有显著性差异,其中  $T_{max}$ 、 $AUC_{0 \rightarrow 6h}$ 、 $CL$ 、 $MRT_{0 \rightarrow 6h}$  的差异具有显著性。与正常重力组相比,在模拟微重力状态下,大鼠血浆中褪黑素的相对生物利用度显著增加。关于褪黑素在微重力或模拟微重力以及正常重力条件下药代动力学比较的早期研究较少,未检索到相关文献。本研究中的模拟微重力状态下和正常重力条件下褪黑素药代动力学参数的差异推测可能与模拟微重力变了大鼠胃肠道的菌群、肝和肠道的药物代谢酶活性、影响了

褪黑素在胃肠道的转运,从而改变了褪黑素在大鼠体内的吸收、分布、代谢和消除速度,导致褪黑素的代谢及排泄速度减慢,在体内滞留时间延长,吸收增加,其具体机制需进一步研究。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Wu B, Wang X, Wu XR, et al. On-orbit sleep problems of astronauts and countermeasures [J]. Mil Med Res, 2018, 5(1): 17.
- [2] Bondy SC, Campbell A. Melatonin and regulation of immune function: impact on numerous diseases [J]. Curr Aging Sci, 2020, 13(2): 92-101.
- [3] Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers [J]. J Pineal Res, 2016, 61(3): 253-278.
- [4] 李洪洋, 南雪梅, 孙鹏. 褪黑素对脂多糖诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症反应的缓解作用 [J]. 动物营养学报, 2021, 33(8): 4637-4644.
- Li HY, Nan XM, Sun P. Mitigative effects of melatonin on lipopolysaccharide induced inflammation in bovine mammary epithelial cells [J]. Chin J Anim Nutr, 2021, 33(8): 4637-4644.
- [5] Ikegame M, Hattori A, Tabata MJ, et al. Melatonin is a potential drug for the prevention of bone loss during space flight [J]. J Pineal Res, 2019, 67(3): e12594.
- [6] 杨吉平, 费琳, 柴学军, 等. 褪黑素通过抑制程序性细胞坏死对心肌缺血再灌注的保护作用 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(11): 2369-2372.
- Yang JP, Fei L, Chai XJ, et al. Protective effect of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion by inhibiting programmed cell necrosis [J]. Chin J Gerontol, 2021, 41(11): 2369-2372.
- [7] Nagasawa Y, Nanami M, Kuragano T, et al. Melatonin and gestational hypertension [J]. Hypertens Res, 2021, 44(11): 1540-1542.
- [8] Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Pastushkova LK, et al. Spaceflight induced changes in the human proteome [J]. Expert Rev Proteomics, 2017, 14(1): 15-29.
- [9] Kast J, Yu YC, Seubert CN, et al. Drugs in space: pharmacokinetics and pharmacodynamics in astronauts [J]. Eur J Pharm Sci, 2017, 109: S2-S8.
- [10] 刘倩, 郑增娟, 吴红云, 等. 阿莫西林在模拟失重大鼠体内检测方法建立及药代动力学研究 [J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(11): 870-874.
- Liu Q, Zheng ZJ, Wu HY, et al. Detection method establishment and pharmacokinetics of amoxicillin in rats under microgravity conditions [J]. J Int Pharm Res, 2018, 45(11): 870-874.
- [11] 徐婷娟, 魏伟, 徐维平, 等. 褪黑素在正常大鼠和佐剂性关节炎大鼠体内的药动学 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(3): 210-214.
- Xu TJ, Wei W, Xu WP, et al. Pharmacokinetics of melatonin in healthy rats and rats with adjuvant arthritis [J]. Chin J New Drugs, 2008, 17(3): 210-214.
- [12] Feng L, Yue XF, Chen YX, et al. LC/MS-based metabolomics strategy to assess the amelioration effects of ginseng total saponins on memory deficiency induced by simulated microgravity [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 125: 329-338.
- [13] 钟国徽, 李玉恒, 凌树宽, 等. 太空微重力环境对人体的影响及防护措施 [J]. 生物学通报, 2016, 51(10): 1-4.
- Zhong GH, Li YH, Ling SK, et al. Influence of space microgravity environment on human body and protective measures [J]. Bull Biol, 2016, 51(10): 1-4.
- [14] Diedrich A, Paranjape SY, Robertson D. Plasma and blood volume in space [J]. Am J Med Sci, 2007, 334(1): 80-86.
- [15] 沈冬云, 刘丁, 蒋爱萍, 等. 模拟微重力条件下兔胃肠组织脑肠肽的变化 [J]. 中国航天工业医药, 1999, 1(4): 22-24.
- Shen DY, Liu D, Jiang AP, et al. The studies of the changes of peptides of gastrointestinal tissue under microgravity condition [J]. Med J CASC, 1999, 1(4): 22-24.
- [16] Liu HY, Guo JJ, Li YJ, et al. Investigation on intestinal proteins and drug metabolizing enzymes in simulated microgravity rats by a proteomics method [J]. Molecules, 2020, 25(19): 4391.
- [17] 陈英, 杨春敏, 韩全利, 等. 模拟失重对大鼠血浆 ghrelin、VIP 和胃肠动力的影响 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2012, 21(1): 55-58.
- Chen Y, Yang CM, Han QL, et al. The effects of simulated weightlessness on plasma ghrelin, plasma VIP and gastrointestinal motility [J]. Chin J Gastroenter Hepatol, 2012, 21(1): 55-58.
- [18] Moskaleva N, Moysa A, Novikova S, et al. Spaceflight effects on cytochrome P450 content in mouse liver [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0142374.
- [19] Merrill AH Jr, Wang E, Jones DP, et al. Hepatic function in rats after spaceflight: effects on lipids, glycogen, and enzymes [J]. Am J Physiol, 1987, 252(2): 222-226.

[收稿日期] 2022-04-13

刘雨培,张瑛毓,范蓓,等. 黄精多糖对模拟航天狭小空间诱导认知功能损伤的改善作用及机制研究[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 494-503.

Liu YP, Zhang YY, Fan B, et al. Protective effect and mechanism of action of *Polygonati rhizoma* polysaccharide on the cognitive impairment induced by simulating an enclosed space in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 494-503.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.007

## 黄精多糖对模拟航天狭小空间诱导认知功能损伤的改善作用及机制研究

刘雨培<sup>1,2</sup>, 张瑛毓<sup>1</sup>, 范蓓<sup>1</sup>, 刘新民<sup>2,3</sup>, 陈颖<sup>4</sup>, 卢聪<sup>1\*</sup>, 王凤忠<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193; 2. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 3. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100013)

**【摘要】** 目的 探讨黄精多糖(PSP)对模拟航天狭小空间诱导的小鼠认知功能损伤模型的改善作用及可能的分子机制。方法 将72只雄性ICR小鼠按体重随机分成空白组、模型组、阳性药组(石杉碱甲)、黄精多糖(100、200、400 mg/kg)组;除空白组外,其它组别小鼠进行慢性束缚35 d以建立模拟航天狭小空间诱导的认知障碍模型,同时进行体重监测(束缚强度10 h/d, 22:00~次日8:00);随后依次进行空场实验、物体认知实验、Morris水迷宫、避暗等行为学检测实验,取血清、海马并测定小鼠血清和海马组织内超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平,海马组织内氧化氢酶(CAT)水平、海马皮质酮(CORT)及神经递质乙酰胆碱(Ach)含量。结果 空场实验结果表明慢性束缚造模不影响小鼠自主活动能力;认知行为学检测表明,与空白组相比,模型组小鼠在物体认知实验中的相对辨别指数显著降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ),在避暗实验中的入暗潜伏期显著缩短、错误次数显著增加( $P < 0.05$ );水迷宫寻台潜伏期显著延长,穿台次数显著降低( $P < 0.05$ );血清和海马中CAT显著降低、MDA显著增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ),海马组织内SOD显著降低,CORT、Ach含量显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组相比,黄精多糖各给药组灌胃给药后均能显著改善上述指标。结论 黄精多糖可改善模拟航天狭小空间所致小鼠认知障碍,其作用机制可能与改善血清海马氧化应激、调节海马组织内神经递质水平以及HPA轴相关,本研究发现为黄精多糖用于航天应激损伤防护药物的研发奠定理论基础。

**【关键词】** 黄精多糖;航天应激;慢性束缚应激;认知障碍;机制研究

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)04-0494-10

## Protective effect and mechanism of action of *Polygonati rhizoma* polysaccharide on the cognitive impairment induced by simulating an enclosed space in mice

LIU Yupei<sup>1,2</sup>, ZHANG Yingyu<sup>1</sup>, FAN Bei<sup>1</sup>, LIU Xinmin<sup>2,3</sup>, CHEN Ying<sup>4</sup>, LU Cong<sup>1\*</sup>, WANG Fengzhong<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China.

2. School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208. 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193. 4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100013)

Corresponding author: LU Cong. E-mail: lucong198912@126.com; WANG Fengzhong. E-mail: wangfengzhong@sina.com

**【基金项目】** 中国农业科学院基本科研业务费专项院级统筹项目(Y2022LM09),中国农业科学院创新工程所级重点任务-安神助眠类功能性产品精准设计制造(S2020JBKY-20),中国农业科学院农产品加工研究所创新工程(CAAS-ASTIP-2022-IFST)。

Funded by Special Overall Project of Basic Scientific Research Business Expenses of Chinese Academy of Agricultural Sciences(Y2022LM09), Key Task of Innovation Engineering Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences-Precise Design, Manufacture and Industrialization of Functional Neuromodulation Food(S2020JBKY-20), Agricultural Sciences and Technology Innovation Program, Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences(CAAS-ASTIP-2022-IFST),

**【作者简介】** 刘雨培(1998—),女,硕士,研究方向:食药同源功能因子挖掘。Email:w15873392907@126.com

**【通信作者】** 王凤忠(1972—),男,博士,研究员,研究方向:大豆宗及特色农产品综合开发利用。Email:wangfengzhong@sina.com;

卢聪(1989—),女,博士,副研究员,研究方向:食药同源资源神经活性挖掘、功效评价及机制。Email:lucong198912@126.com。

\* 共同通信作者

**【Abstract】 Objective** To study the protective effect and mechanism of action of *Polygonati rhizoma* polysaccharide (PSP) on the cognition deficits induced by simulating an enclosed space in mice. **Methods** Male ICR mice ( $n=72$ ) were randomly divided into four groups: control group, model group, positive control drug treatment group (huperzine-A), and PSP treatment group (100, 200, 400 mg/kg). With the exception of the control group, all other mice were subjected to chronic restraint stress (CRS) for 35 days to establish a mouse model of cognitive impairment (restraint intensity 10 h/d, 22:00 until 8:00 the next day) and body weight monitoring was conducted. Then, behavioral tests were performed, including an open field test, object recognition experiment, Morris water maze task, and a passive avoidance method. The levels of Superoxide dismutase (SOD) and Malondialdehyde (MDA) in the serum and the hippocampus, and the levels of Catalase (CAT), Corticosterone (CORT), and Acetylcholine (Ach) in the hippocampus were measured. **Results** The open field test showed that CRS did not affect the locomotor activities of any of the groups. Compared with the control group, the discrimination index (DI) of the CRS model group in the object recognition experiment was significantly decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), the errors times increased and the latent period decreased in the passive avoidance test ( $P < 0.05$ ), and a longer escape latency in MWM (Morris water maze) was observed in the CRS model group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, in the CRS model group, the SOD and CAT levels were significantly decreased, MDA was increased, and CORT and Ach were significantly increased both in the serum and hippocampus ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ). In comparison with the CRS model group, the above indicators were markedly reversed in the PSP groups. **Conclusions** The result suggested that PSP treatment can improve the cognitive impairment induced by simulating an enclosed space in mice, by mechanisms that involve the amelioration of oxidative stress damage, elevation of neurotransmitter levels, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

**【Keywords】** *Polygonati rhizoma* polysaccharide; aerospace stress; chronic restraint stress (CRS); cognitive impairment; mechanism

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

随着我国航天事业的迅速发展,载人航天开启了新的征程,对于长期生活在空间站的航天员健康维系和保障提出更高的要求<sup>[1]</sup>。长期的航天历史任务表明,在航天员乘坐航天火箭进入太空后,长时间面对复杂的航天环境会影响航天员免疫系统、心血管系统、骨骼等生理功能<sup>[2-4]</sup>,同时还会产生心理压力、焦虑、恐慌等负面情绪,从而影响航天员认知功能及反应判断能力进而可能导致安全事故的发生<sup>[5-6]</sup>;因此寻求安全有效的防护措施一直以来都是国内外航天医学界关注的热点。

慢性束缚应激(chronic restraint stress, CRS)是将实验动物限制在行为限制器中,非直接将力作用于小鼠,其对机体无损伤性刺激,很好地模拟航天员航天状态下因持续狭小空间、恐慌等诱发的心理和生理应激而造成的功能性损伤。功能性损伤无明确的病变部位,靶点不明确,现代医学难以作用,而传统中医药讲究整体观念、天人合一、辩证论治,中医药多成分、多靶点、多途径整体协调的作用特点在防治功能性损伤方面发挥着独特的优势。近年来中医药在航天应激相关的研究逐渐受到关注<sup>[7-9]</sup>,黄精为百合科黄精属多年生草本植物的干燥根茎,相关研究表明,黄精复方、黄精提取物以及黄精主要有效化学成分黄精多糖等均可改善学习

记忆功能性损伤<sup>[10-13]</sup>。然而黄精多糖对于航天特因环境诱导认知障碍的作用鲜有报道,因此本实验采用慢性束缚应激模拟航天狭小空间诱导的认知障碍小鼠模型,探索黄精多糖的认知改善作用,并研究其可能的作用机制,以期黄精多糖用于航天应激防护药物的研发奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

72 只 4 周龄 SPF 级雄性 ICR 小鼠,体重 18 ~ 22 g,购买于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。中国医学科学院药用植物研究所实验动物中心开展【SYXK(京)2017-0020】,动物房环境条件:温度 20 ~ 24℃,湿度(55 ± 10)%,12 h 明暗交替,每笼饲养 6 只,给予充足食物和水,动物房饲养 5 d 进行实验。本实验遵守 3R 原则和国际实验动物伦理学要求,本实验开展前已获得中国农业科学院农产品加工研究所实验动物管理与动物福利委员会(IACUC)的审查(SLXD-2021100123)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

阳性药石杉碱甲购自河南太龙药业有限公司

(型号:H10940156),黄精多糖购自上海源叶生物科技有限公司(纯度 70%,批号 S27804);灌胃给药,小鼠给药体积为 0.1 mL/10 g。ELISA 试剂盒:超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)水平,海马皮质酮(CORT)、神经递质(Ach)购自南京建成生物工程研究所。

行为限制器、小鼠空场实时检测分析系统(KSYY-OP-V4.0)、物体认知检测系统,小鼠 Morris 水迷宫实时在线检测系统(KSYY-MWM-4.0)、小鼠避暗实时检测分析系统(KSYY-AD-V4.0)。本实验中所用行为学仪器均为北京康森益友科技有限公司、中国医学科学院药用植物研究所和中国航天员中心联合研制开发。

## 1.2 方法

### 1.2.1 分组及造模

动物饲养 5 d 后按体重随机分组,每组 12 只,空白组(蒸馏水),模型组(蒸馏水),阳性药组(石杉碱甲),黄精多糖各剂量组(100、200、400 mg/kg);采用束缚器将小鼠束缚在仪器内进行,连续束缚 35 d,每天 10 h(22:00 ~ 8:00);连续灌胃给药,给药体积为 0.1 mL/10 g,造模结束后进行行为学检测。为防止 Day 35 早上解完束缚动物因劳累影响实验数据,次日进行行为学检测,检测期间于检测前 30 min 灌胃给药;行为学检测结束后取材(造模期间存在个别小组小鼠 1 ~ 2 只死亡现象)。

### 1.2.2 行为学检测

造模完成后小鼠采用空场实验、物体认知实验、避暗实验和 Morris 水迷宫实验进行行为学检测评价其药效。

(1)空场实验(open field test, OFT): Day 36 空场实验参照文献进行实验<sup>[14]</sup>。将小鼠从测试箱中央区轻轻放入,适应 3 min 后开始,系统自动统计小鼠 5 min 内活动情况;取总路程与平均速度用于评价小鼠自主活动情况。

(2)物体认知实验(object recognition test):物体认知实验包括新物体识别和物体位置识别两种模式,操作参照本实验室前期研究方法<sup>[15]</sup>;给药 30 min 后进行实验,Day 37 ~ 39 适应箱体环境 3 d(适应期),Day 40 进行新物体识别检测,将两个完全相同物体放入测试箱内固定位置熟悉 5 min(熟悉期),30 min 后将其中一个物体更换成新物体再次探索 5 min(测试期),记录 5 min 内小鼠对各物体探索时间;Day 41 进行物体新位置识别检测(熟悉期

相同,测试期将其中一个物体位置更换致对角)。评价指标采用相对辨别指数(DI):  $DI = (T_n - T_f) / (T_n + T_f)$ 。

(3) Morris 水迷宫实验(Morris water maze, MWM): Day 42 ~ 47 水迷宫实验参照文献检测小鼠长时空间记忆能力<sup>[16]</sup>;分定位航行(5 d)和空间探索(1 d)两阶段。定位航行阶段每只动物每天不同象限分别训练 2 次,除去平台象限顺时针分别为 2、3、4 象限。开始前将动物放在平台上适应 10 s,然后选取平台相邻象限(2 象限)为第一次入水点,将动物面朝池壁放入水中,时间为 90 s,期间无论是否找到平台均让小鼠再次在平台停留 10 s。12 只动物为一组,当第 12 只实验结束后,此组第 1 只动物开始第 2 次寻台训练,入水点为对角象限旁边的象限(3 象限)。实验第 2 天 3、4 象限为每只动物的两次入水点,依此类推,在此期间,系统自动记录每只鼠每天找到平台的时间(未找到则为 90 s)记为寻台潜伏期(两次寻到平台时间的平均数),用于评价小鼠的学习记忆能力。Day 6 撤去平台,进行空间探索阶段。实验时选取原平台象限的对角象限(3 象限)为入水点,观察小鼠在 90 s 内穿台次数,每只动物仅实验 1 次,用于评价小鼠的记忆保持能力。

(4)避暗实验(step-through passive avoidance test, STT): Day 48 ~ 49 避暗实验,实验流程参照文献进行<sup>[16]</sup>;避暗实验检测小鼠短时非空间记忆能力,分为获得和巩固两阶段,历时 2 d。

获得阶段 Day 1:实验开始前为让小鼠更易触电小鼠足部沾上生理盐水,将小鼠背对测试箱放入明室,适应箱体环境 3 min 后,小鼠在暗室时点击开始按钮。获得学习阶段开始,暗室有 0.5 mA(5 s)的电击,小鼠被电击而逃回明室,如此反复形成记忆,5 min 后实验结束,取出小鼠。

巩固阶段 Day 2:24 h 后进行巩固阶段,同样将小鼠足部沾上生理盐水,背朝测试箱由明室放入,直接点击开始,观察小鼠入暗潜伏期及 5 min 内进入暗室的次数。

### 1.2.3 实验取材

行为学检测结束后所有小鼠依次取血后脱颈处死(翌日离心用移液枪转移血清至新试管中),然后迅速取出其大脑,在冰上分离皮层组织,投入液氮,最终转移至-80℃保存。

### 1.2.4 ELISA 试剂盒检测

检测小鼠血清、海马 SOD、MDA、CAT 等氧化应激水平,海马 CORT 水平,神经递质 Ach 水平。检测方法按照相应说明书操作。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析,实验结果用平均值  $\pm$  标准误差 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ )。数据采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),组间差异进行 LSD 分析比较。分析结果用 GraphPad Prism software 8.01 软件绘制图表,  $P < 0.05$  时表示具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 小鼠体重变化

如图 1 各组小鼠体重变化情况,在实验开始时采取随机分组、各组平均体重基本一致。束缚 7 d 后,除空白组外其它各造模组小鼠体重均有所降低,推测小鼠初次进行造模应激反应较大,束缚可能影响小鼠饮食欲望;造模至 14 d 后各束缚组小鼠体重开始回升,推测小鼠开始慢慢适应束缚造模。

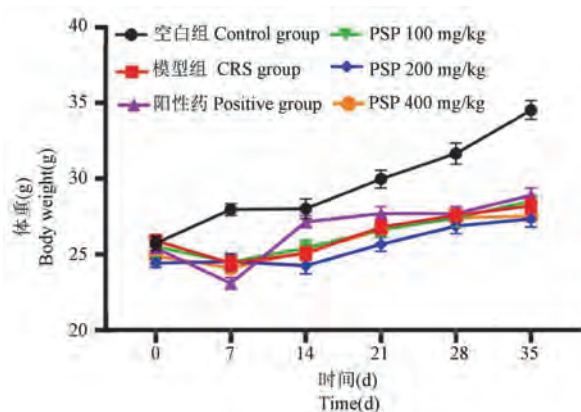


图 1 小鼠体重变化 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

Figure 1 Body weight change in mice ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

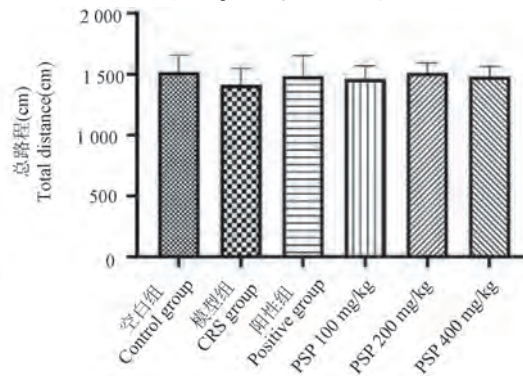
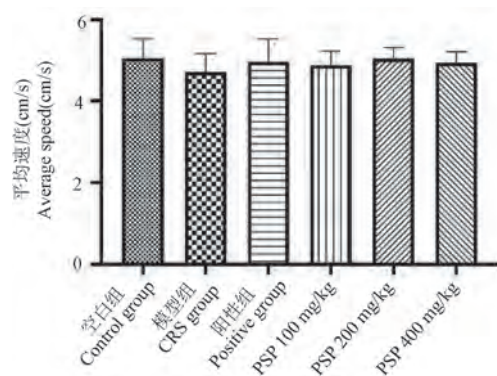


图 2 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠自主活动的影响 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

Figure 2 Effects of PSP the locomotor activities of mice induced by CRS in open field test ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

### 2.2 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠自主活动的影响

造模 35 d 结束后,Day 36 进行空场实验;如图 2 所示,各组小鼠的总路程、平均速度均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。结果表明慢性束缚应激造模以及黄精多糖各给药组不会对小鼠的自主活动造成影响。

### 2.3 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠物体认知实验影响

#### 2.3.1 新物体识别 (NOR)

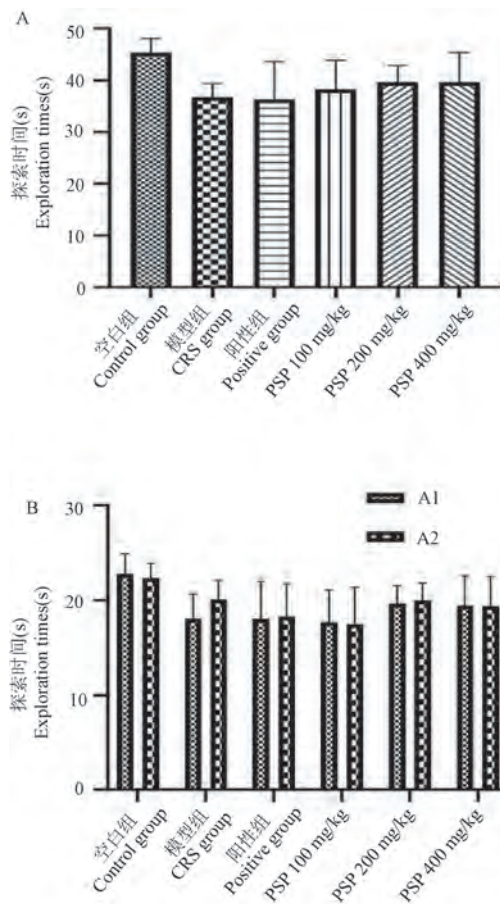
(1)熟悉期:如图 3A 所示,熟悉期内,所有组别小鼠对两物体的探索总时间未显示显著差异 ( $P > 0.05$ ),表明各组小鼠探索能力基本处于同一水平,给药组并无小鼠神经系统兴奋作用。图 3B 结果表明,在对两个物体探索时间上,未出现显著差异 ( $P > 0.05$ ),表明动物对两个物体的探索没有偏好性。

(2)测试期:如图 4 所示,与空白组相比,模型组小鼠相对辨别指数为显著为负值,说明此组小鼠无法辨别原熟悉物体和更换位置物体,且新物体识别能力显著性下降 ( $P < 0.05$ );与模型组相比,阳性药相对辨别指数呈增加趋势,黄精多糖各给药组相对辨别指数均显著性增高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),说明黄精多糖各剂量组给药后可改善模型小鼠对受损的短时、非空间记忆能力。

#### 2.3.2 物体位置认知 (OLR)

(1)熟悉期:如图 5A 所示,物体位置识别实验中,熟悉期内各组小鼠物体的总探索时间均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。图 5B 结果表明,在对两个物体探索时间上,未出现显著性差异 ( $P > 0.05$ ),表明动物没有偏好性。

(2)测试期:如图 6 物体位置识别检测所示,模型组小鼠辨别指数下降 ( $P < 0.05$ ),小鼠难以辨别新旧物体。黄精多糖灌胃给药后可显著提



注:A:表示总探索时间;B:表示对 A1、A2 各物体分别探索时间。

**图 3** 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠新物体认知中探索时间的影响 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

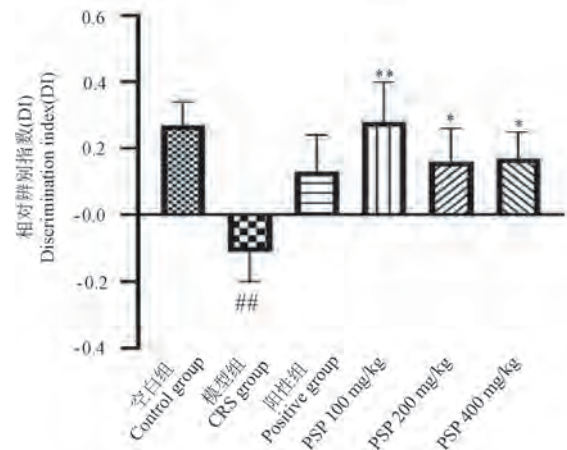
Note. A. Total exploration time. B. Exploration time for the A1 and A2 objects, respectively.

**Figure 3** Effects of PSP on the exploration ability of CRS mice in the familiarization phase of the novel object recognition task ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

高动物位置识别能力 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 表明黄精多糖可明显提高模型小鼠受损的短时、空间记忆能力。

## 2.4 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠物体避暗实验影响

如图 7 所示, 避暗实验检测第 1 天为学习阶段, 除空白组外所有组别小鼠入暗潜伏期均较短; 检测第 2 天, 与空白组对照比较, 模型组小鼠的入暗潜伏期显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 各给药组潜伏期呈增加趋势, 其中黄精多糖 (100、200 mg/kg) 剂量组小鼠的入暗潜伏期显著性升高 ( $P < 0.05$ )。



注:与空白组相比,  $^{##}P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ 。(下同)

**图 4** 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠新物体识别中相对辨别指数的影响 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

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

**Figure 4** Effect of PSP on test phase of novel object recognition task of mice induced by CRS ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

如图 8 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠的错误次数显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 黄精多糖低剂量组 (100、200 mg/kg) 给药后显著减少模型小鼠的错误次数 ( $P < 0.05$ )。

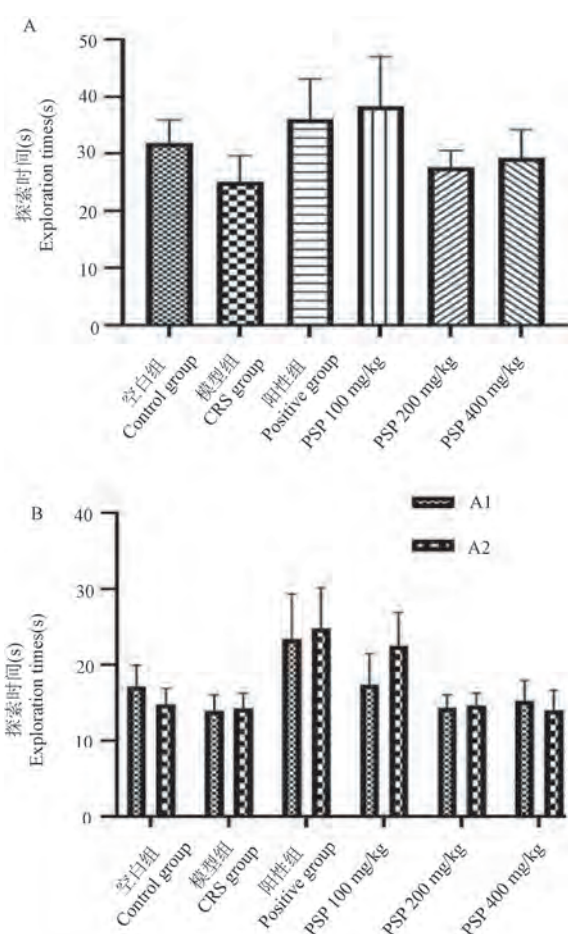
## 2.5 水迷宫实验

### 2.5.1 定位航行阶段

如图 9 小鼠水迷宫定位航行阶段寻台潜伏期所示, 与空白对照组相比, 模型组的寻台潜伏期从第 2 天起呈增加趋势 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 黄精多糖 (100 mg/kg) 组潜伏期在第 5 天显著降低 ( $P < 0.01$ ), 黄精多糖 (400 mg/kg) 组在第 3 天、第 5 天潜伏期显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且在第 5 天黄精多糖 (100 mg/kg) 组相对于黄精多糖 (400 mg/kg) 组潜伏期更短。黄精多糖 (400 mg/kg) 组呈现降低趋势, 但未出现显著性。结果表明慢性束缚应激损害了小鼠的空间学习记忆力, 使其无法学会成功寻台, 而给予石杉碱甲、黄精多糖可缩短模型小鼠的寻台潜伏期, 提高其长时空间记忆能力。

### 2.5.2 空间探索阶段

如图 10 小鼠空间探索阶段穿台次数所示, 与空白组比较, 模型组小鼠的水迷宫穿台次数显著性减少 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 黄精多糖 (400 mg/kg) 组穿台次数显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而黄精多糖 (100、200 mg/kg) 组的穿台次数均有所增加, 但未出现显著性。



注:A:总探索时间;B:对 A1、A2 各物体分别探索时间。

图 5 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠物体位置认知中探索时间的影响 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

Note. A. Total exploration time. B. Exploration time for the A1 and A2 objects, respectively.

**Figure 5** Effects of PSP on the ability of exploration of CRS mice in the familiarization phase of the object location recognition task ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

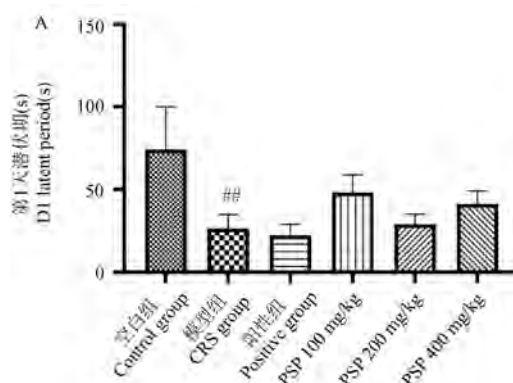
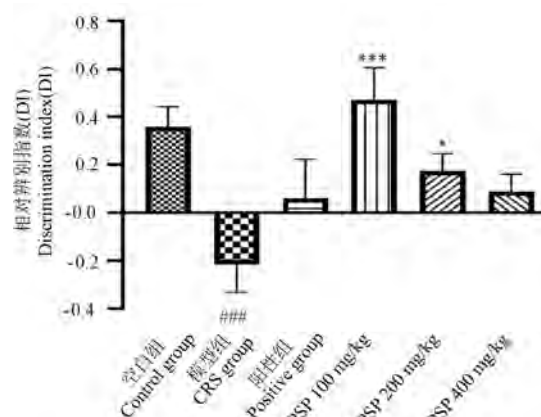


图 7 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠避暗潜伏期的影响 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

**Figure 7** Effect of PSP on mice induced by CRS in passive avoidance test the latent period ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )



注:A:总探索时间;B:对 A1、A2 各物体分别探索时间;与空白组比,  $^{###}P < 0.001$ ;与模型组比,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{***}P < 0.001$ 。(下同)

图 6 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠物体位置认知中相对辨别指数的影响 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )  
Note. A. Total exploration time. B. Exploration time for the A1 and A2 objects, respectively. Compared with control group,  $^{###}P < 0.001$ . Compared with model group,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{***}P < 0.001$ . (The same in the following figures)

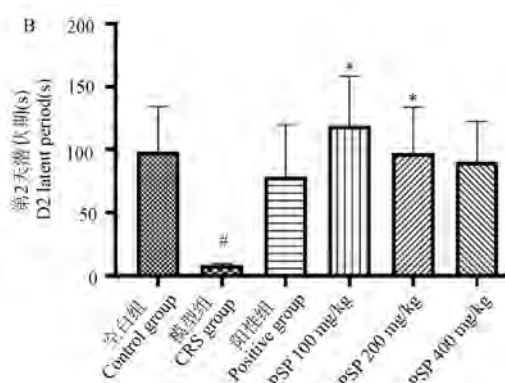
**Figure 6** Effect of PSP on test phase of object location recognition task of mice induced by CRS ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

## 2.6 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠血清内氧化应激水平的影响

如图 11 小鼠血清氧化应激水平所示,与空白组相比,模型组小鼠血清 SOD、CAT 显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ),MDA 显著增加 ( $P < 0.001$ );与模型组相比,黄精多糖各给药组可不同程度逆转上述指标。

## 2.7 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠海马内氧化应激水平的影响

如图 12 小鼠海马氧化应激水平所示,与空白组



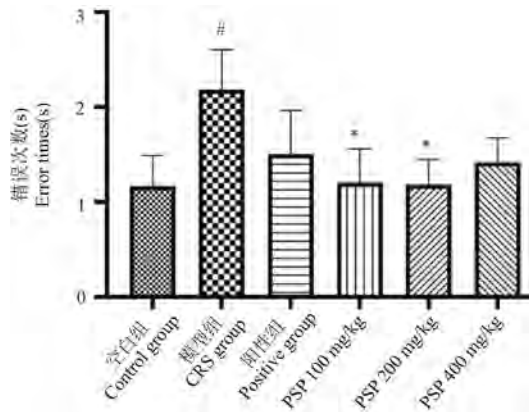


图 8 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠避错误次数的影响( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

Figure 8 Effect of PSP on mice induced by CRS in passive avoidance test the errors times( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

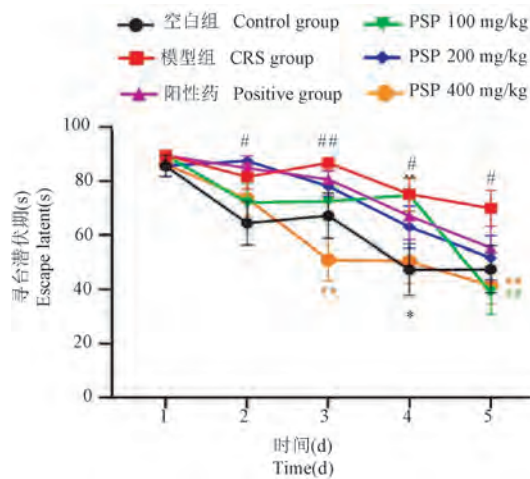


图 9 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠寻台潜伏期的影响( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

Figure 9 Effect of PSP on escape latency in Morris water maze task of mice induced by CRS( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

相比,MDA 水平显著增加,CAT 水平显著降低( $P < 0.001$ );与模型组相比,阳性药组小鼠 MDA、CAT 含

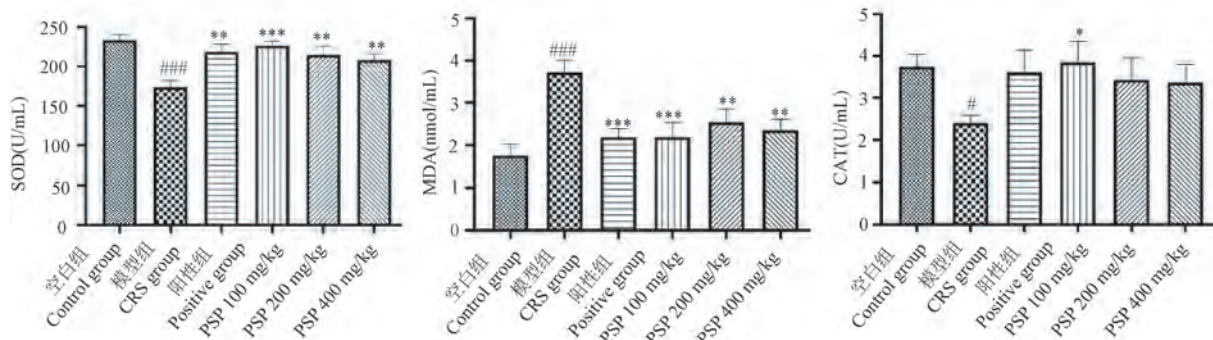


图 11 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠血清氧化应激的影响( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

Figure 11 Effect of PSP on oxidative stress activity in serum of mice induced by CRS( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

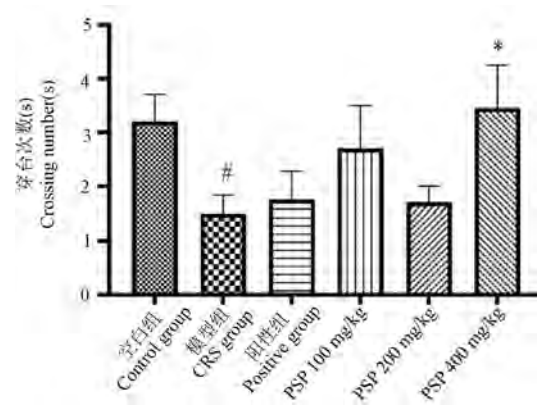


图 10 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠穿台次数的影响( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

Figure 10 Effect of PSP on number of platform crossings in Morris water maze task of mice induced by CRS( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

量均显著逆转,黄精多糖各剂量组,均不同程度逆转了上述模型小鼠的氧化应激指标的异常。

## 2.8 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠海马内 HPA 轴的影响

如图 13 小鼠海马内 CORT 水平所示,与空白组相比,模型组小鼠海马 CORT 水平显著增加( $P < 0.05$ );与模型组相比,各给药组 CORT 水平呈降低趋势,阳性药、黄精多糖(100 mg/kg)水平显著降低( $P < 0.01$ ),黄精多糖(200、400 mg/kg)呈降低趋势。

## 2.9 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠海马内 Ach 水平的影响

如图 14 所示,与空白组相比,模型组小鼠海马内的乙酰胆碱(Ach)含量下降( $P < 0.01$ );与模型组相比,各给药组 Ach 水平均不同程度增高,其中阳性药、黄精多糖(200 mg/kg)组呈极显著增加( $P < 0.001$ ),黄精多糖(100、400 mg/kg)组均呈显著增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

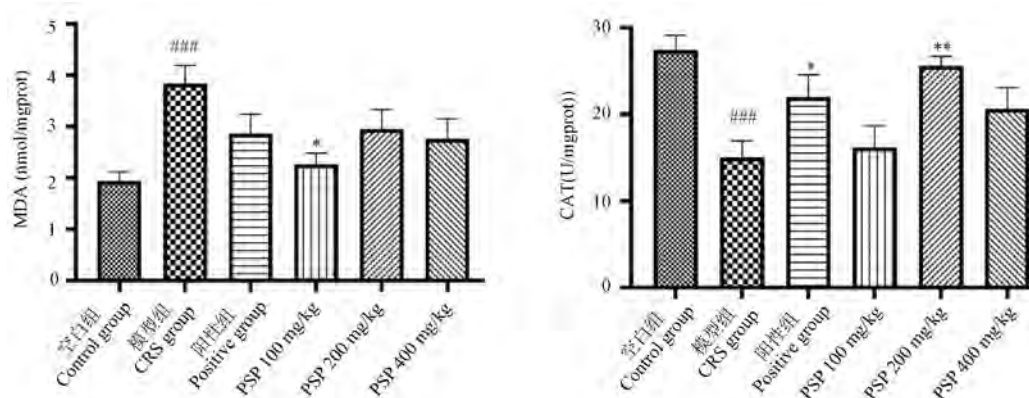


图 12 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠海马氧化应激的影响 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

Figure 12 Effect of PSP on oxidative stress activity in hippocampus of mice induced by CRS ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

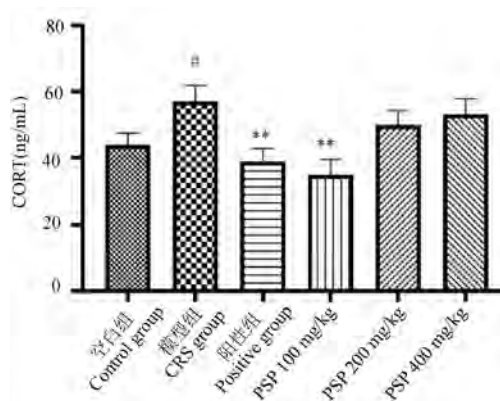


图 13 黄精多糖对慢性束缚应激模型

小鼠海马 HPA 轴的影响 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

Figure 13 Effect of PSP on HPA axis in hippocampus of mice induced by CRS ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

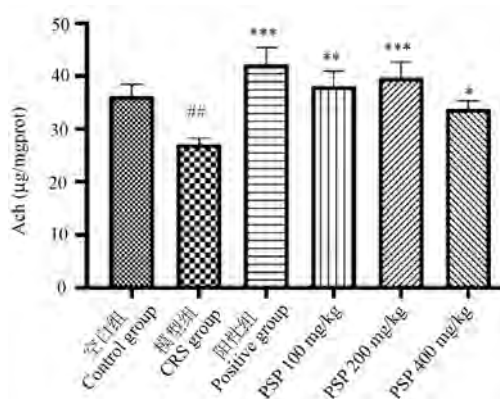


图 14 黄精多糖对慢性束缚应激模型小鼠  
海马乙酰胆碱的影响 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

Figure 14 Effect of PSP on Ach level in hippocampus of mice induced by CRS ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ,  $n = 11 \sim 12$ )

### 3 讨论

研究表明,航天特因环境会影响航天员的认知功能,从而导致航天员工作能力下降,危及其安全及身体健康<sup>[17]</sup>。太空之中长期的隔离和限制可诱发情绪不稳定、过度敏感和精力、动机下降等反应,若无有效的治疗,可能会造成认知缺损、焦虑、抑郁和社会冲突等<sup>[18-19]</sup>。CRS 模型是模拟航天员经长期太空环境后造成认知损伤的经典动物模型,其基本原理是通过行为限制器束缚小鼠,使小鼠的活动因长期受限而产生心理应激导致认知障碍的发生<sup>[14,20-21]</sup>。王玮瑶等<sup>[22]</sup>采用每日束缚 2 h 共 30 d,探讨了 CRS 对老龄大鼠学习记忆能力及海马齿状回区兴奋性氨基酸的影响,发现 CRS 影响了老龄大鼠学习记忆功能;张铮等<sup>[23]</sup>采用每日束缚 3 h,连续束缚 7、21 d 研究逍遥散对慢性束缚应激大鼠学习记忆能力的影响;黄红等<sup>[7]</sup>采用每日 10 h,连续束缚 35 d 研究鲜天麻对慢性束缚小鼠学习记忆力的影响。慢性束缚未对小鼠造成直接伤害,而是通过心理应激诱导小鼠认知障碍,与航天员在太空仓的生活状态较为一致。因此本实验采用慢性束缚建立模拟航天狭小空间诱导小鼠认知功能损伤模型。

此前研究表明,CRS 会造成动物体重下降<sup>[24]</sup>;本实验结果显示,在不同束缚阶段,各造模组小鼠体重均明显降低,表明动物在长期处于狭小空间的应激条件下机体稳态失衡,代谢、消化异常所致,并且此现象持续至束缚结束,检测期间小鼠未进行束缚时体重有所恢复,这与此前研究的 CRS 造模下动物体重、摄食相关研究结果相一致<sup>[25]</sup>。从自主活动

结果来看,所有小组小鼠平均速度和总路程都处在同一水平,表明 CRS 造模未损害小鼠自主运动能力<sup>[26]</sup>。研究发现,黄精多糖可以明显改善 CRS 引起的小鼠物体认知中短时自主空间学习记忆能力、避暗实验中惩罚性短时非空间记忆学习能力、水迷宫实验中长时空间学习记忆能力<sup>[22,27-29]</sup>。从机制结果来看,黄精多糖可改善模型小鼠血清、海马 SOD、MDA、CAT 水平,增强动物抗氧化能力<sup>[30]</sup>;研究表明,HPA 轴功能紊乱可进一步加重认知障碍<sup>[31]</sup>;本研究黄精多糖可以不同程度降低小鼠海马 CORT 水平,调节 HPA 轴。黄精多糖还可增强胆碱能系统,增加海马乙酰胆碱(Ach)的合成和释放,这与报道结果相一致<sup>[32]</sup>;

综上所述,CRS 造模会引起小鼠空间和非空间、长时和短时学习记忆功能损伤,而黄精多糖可显著改善 CRS 造模引起的认知功能损伤,主要表现在黄精多糖可提高学习记忆损伤小鼠的物体辨别能力、被动逃避能力和空间学习记忆能力,其作用机制可能是通过调节脑内氧化应激水平、HPA 轴和胆碱能系统功能,本研究结果可为黄精多糖用于航天应激损伤防护药物的研发奠定理论基础。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] 李莹辉,曲丽娜,陈海龙. 航天应激损伤与防护措施[J]. 生理科学进展, 2013, 44(5): 354-358.  
Li YH, Qu LN, Chen HL. Space stress injury and related protective measures [J]. Prog Physiol Sci, 2013, 44(5): 354-358.
- [2] 袁明,姜世忠. 中国航天医学进展[J]. 空间科学学报, 2005, 25(4): 273-279.  
Yuan M, Jiang SZ. The progress of chinese space medicine [J]. Chin J Space Sci, 2005, 25(4): 273-279.
- [3] Demontis GC, Germani MM, Caiani EG, et al. Human pathophysiological adaptations to the space environment [J]. Front Physiol, 2017, 8: 547.
- [4] Tian Y, Ma X, Yang C, et al. The impact of oxidative stress on the bone system in response to the space special environment [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10): 2132.
- [5] 马静遥,陈铃铃,王琼,等. 模拟航天特因环境下大鼠认知功能的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(10): 58-62.  
Ma JY, Chen LL, Wang Q, et al. Influence of simulated spaceflight environment on cognitive functions in rats [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(10): 58-62.
- [6] Frantzidis CA, Kontana E, Karkala A, et al. Current trends and future perspectives of space neuroscience towards preparation for interplanetary missions [J]. Neurol India, 2019, 67: 182-187.
- [7] 黄红,姜宁,张亦文,等. 鲜天麻对慢性束缚应激诱导小鼠学习记忆损伤的改善作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(9): 653-654.  
Huang H, Jiang N, Zhang YW, et al. Fresh *Gastrodia elata* ameliorates learning and memory impairments in chronic restraint stress induced mice [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2021, 35(9): 653-654.
- [8] 鲍余,陈颖,曾贵荣,等. 人参总皂苷对尾吊模拟微重力大鼠学习记忆损伤和焦虑的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(7): 49-56.  
Bao Y, Chen Y, Zeng GR, et al. Protective effect of total ginsenoside ginseng root on learning and memory impairment and anxiety in rats induced by hindlimb suspension [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(7): 49-56.
- [9] 姜宁,吕静薇,王海霞,等. 人参皂苷 Rg1 对慢性束缚应激大鼠模型的抗抑郁作用(英文)[J]. Digital Chin Med, 2019, 2(4): 207-218.  
Jiang N, Lv JW, Wang HX, et al. Antidepressant-like effects of ginsenoside Rg1 in the chronic restraint stress-induced rat model [J]. Digital Chin Med, 2019, 2(4): 207-218.
- [10] 王威,刘文博,唐伟,等. 黄精多糖对慢性脑缺血大鼠学习记忆及脑组织 PS-1 蛋白表达的影响[J]. 中国中医急症, 2016, 25(3): 408-410.  
Wang W, Liu WB, Tang W, et al. The effects of polygona-polysaccharose on learning and memory and PS-1 protein expression of rats with chronic cerebral hypoperfusion [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2016, 25(3): 408-410.
- [11] 王威,刘文博,唐伟,等. 黄精多糖对慢性脑缺血大鼠学习记忆及脑组织  $\beta$ -淀粉样蛋白表达的影响[J]. 中医药导报, 2016, 22(16): 26-29.  
Wang W, Liu WB, Tang W, et al. Effects of Polygonatum polysaccharides on learning and memory and  $\beta$ -amyloid in brain of rats with chronic cerebral ischemia [J]. Guiding J Tradit Chin Med Pharma, 2016, 22(16): 26-29.
- [12] 唐伟,王威,谭丽阳,等. 黄精多糖对慢性脑缺血大鼠学习记忆能力及脑组织超微结构影响[J]. 中国中医药科技, 2017, 24(2): 173-176.  
Tang W, Wang W, Tang LY, et al. Effects of polygonatum polysaccharides on learning and memory and ultrastructure changes of brain tissue in rats with chronic cerebral ischemia [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2017, 24(2): 173-176.
- [13] 陈毅飞,刘凯菲,吴世敏,等. 黄精多糖对阿尔茨海默病模型斑马鱼 p38MAPK/N-cadherin 的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(9): 659-660.  
Chen YF, Liu KF, Wu SM, et al. Effect of rhynchophylline on p38MAPK/N-cadherin in zebrafish with Alzheimer disease [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2021, 35(9): 659-660.
- [14] Zhou Y, Yan M, Pan R, et al. Radix Polygalae extract exerts antidepressant effects in behavioral despair mice and chronic restraint stress-induced rats probably by promoting autophagy and inhibiting neuroinflammation [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 265: 113317.
- [15] 吕静薇,宋广青,董黎明,等. 物体认知——基于动物自发

- 行为的一种学习记忆评价方法的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(3): 21-27.
- Lyu JW, Song GQ, Dong LM, et al. Object recognition test-a method to assess the learning and memory in mice based on their spontaneous behavior [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(3): 21-27.
- [16] Lu C, Gao RJ, Lv JW, et al. Neuroprotective effects of soy isoflavones on chronic ethanol-induced dementia in male ICR mice [J]. Food Funct, 2020, 11(11): 10011-10021.
- [17] 范全春, 李勇枝, 刘新民. 航天环境因素对学习记忆功能影响及其防护措施研究进展 [J]. 航天医学与医学工程, 2007, 20(5): 385-390.
- Fan QC, Li YZ, Liu XM. Progress and countermeasure of effect of space flight environment factors on learning and memory function [J]. Space Med Med Eng, 2007, 20(5): 385-390.
- [18] Stein TP. The relationship between dietary intake, exercise, energy balance and the space craft environment [J]. Pflugers Arch, 2000, 441(2-3): 21-31.
- [19] Qi XL, Lin WJ, Li JF, et al. The depressive-like behaviors are correlated with decreased phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in rat brain following chronic forced swim stress [J]. Behav Brain Res, 2006, 175(2): 233-40.
- [20] Xu P, Wang KZ, Lu C, et al. Effects of the chronic restraint stress induced depression on reward-related learning in rats [J]. Behav Brain Res, 2017, 321: 185-192.
- [21] Hwang KA, Hwang HJ, Hwang YJ, et al. Mustard leaf extract suppresses psychological stress in chronic restraint stress-subjected mice by regulation of stress hormone, Neurotransmitters, and Apoptosis [J]. Nutrients, 2020, 12(12): 3640.
- [22] 王玮瑶, 陈玲, 岳学玲, 等. 慢性束缚应激对老龄大鼠空间学习和记忆能力及海马齿状回区兴奋性氨基酸水平的影响 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(1): 8-12.
- Wang WY, Chen L, Yue XL, et al. Effects of chronic restraint stress on abilities of spatial learning and memory and levels of excitatory amino acids in hippocampal dentate gyrus in old rats [J]. J Jilin Univ (Med Edit), 2018, 44(1): 8-12.
- [23] 张铮, 洪妙莹, 蓝敏敏, 等. 逍遥散对慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠学习记忆能力及 NGF、p75NTR 表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(5): 718-722.
- Zhang Z, Hong MY, Lan MM, et al. Effects of Xiaoyao powder on learning and memory ability and expression of NGF and p75NTR in rats with chronic restraint stress syndrome of liver depression and spleen deficiency [J]. Chin J Basic Chin Med, 2022, 28(5): 718-722.
- [24] Wang HX, Jiang N, Lv JW, et al. Ginsenoside Rd reverses cognitive deficits by modulating BDNF-dependent CREB pathway in chronic restraint stress mice [J]. Life Sci, 2020, 258: 118107.
- [25] 赵丹, 王少贤, 梁文杰, 等. 慢性应激模型大鼠体重、摄食变化与粪便代谢物的相关性研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(7): 1302-1309.
- Zhao D, Wang SX, Liang WJ, et al. Correlation between fecal metabolites and body weight/food intake in rats after chronic immobilization stress [J]. Chin J Pathophysiol, 2019, 35(7): 1302-1309.
- [26] 韦震, 高荣静, 张瑛毓, 等. 雌马酚对慢性束缚抑郁小鼠模型的改善作用及机制研究 [J]. 大豆科学, 2022, 41(1): 83-90.
- Wei Z, Gao RJ, Zhang YY, et al. Protective effects of S-equol on chronic restraint stress-induced depressive-like behavior in mice [J]. Soybean Sci, 2022, 41(1): 83-90.
- [27] 张忠霞, 邱会卿, 孙美玉, 等. 丹参多酚酸对慢性束缚应激后小鼠认知功能障碍的改善作用及相关机制 [J]. 临床神经病学杂志, 2017, 30(2): 111-115.
- Zhang ZX, Qiu HQ, Sun MY, et al. Improving effect of salvianolic acids on cognitive dysfunction caused by chronic restraint stress and its mechanism in mice [J]. J Clin Neurol, 2017, 30(2): 111-115.
- [28] 黄红, 陈碧清, 姜宁, 等. 鲜天麻对睡眠干扰诱导小鼠学习记忆障碍的改善作用 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2509-2516.
- Huang H, Chen BQ, Jiang N, et al. Fresh *Gastrodia elata* ameliorates learning and memory impairments in sleep interruption induced mice [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2020, 51(9): 2509-2516.
- [29] 张倩, 冯晴霞, 周正乙, 等. 刺五加苷 B 对疲劳小鼠学习记忆能力的改善作用及其激活 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路的机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(4): 771-778.
- Zhang Q, Feng QX, Zhou ZY, et al. Improvement effect of eleutheroside B on the learning and memory abilities of fatigue mice and its mechanism of activating Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway [J]. J Jilin Univ, 2020, 46(4): 771-778.
- [30] 唐寅, 吕晓帆, 王莹, 等. 龙脑樟精油的化学成分、抗氧化活性和认知改善作用研究 [J]. 日用化学工业, 2021, 51(11): 1095-1101.
- Tang Y, Lv XF, Wang Y, et al. Study on chemical components, antioxidant activity and cognitive improvement of borneol essential oil [J]. Chin Surfactant Deterg Cosmet, 2021, 51(11): 1095-1101.
- [31] Ruan L, Du K, Tao M, et al. Phosphodiesterase-2 inhibitor bay 60-7550 Ameliorates A $\beta$ -Induced cognitive and memory impairment via regulation of the HPA Axis [J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13: 432.
- [32] 刘露露, 李洪宇, 苑广信. 黄精多糖对 D-半乳糖诱导衰老小鼠学习和记忆水平的影响 [J]. 北华大学学报(自然科学版), 2021, 22(2): 192-197.
- Liu LL, Li HY, Yuan GX. Effect of *polygonatum sibiricum* polysaccharides on learning and memory in D-galactose-induced aging mice [J]. J Beihua Univ(Nat Sci), 2021, 22(2): 192-197.

宋晨晨,康台生,张萌,等. 3D回旋仪模拟微重力效应对小鼠骨骼和代谢组学的影响[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 504-512.

Song CC, Kang TS, Zhang M, et al. Effects of microgravity on skeletal and metabolomics of mice simulated by 3D clinostat [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 504-512.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.008

## 3D回旋仪模拟微重力效应对小鼠骨骼和代谢组学的影响

宋晨晨,康台生,张萌,高凯,史旭东,郭建国\*

(中国医学科学院医学实验研究动物所,北京协和医学院比较医学中心,北京 100021)

**【摘要】 目的** 3D回旋仪被广泛的应用于植物、细胞和线虫模拟微重力效应的研究中。但是尚未建立相关的啮齿类动物实验模型并探讨其作用机制。**方法** 将30只8周龄的雄性C57BL/J小鼠随机分成3组:独立通风笼组(MC组,  $n = 6$ ),生存盒组(SB组,  $n = 12$ ),3D回旋仪组(CS组,  $n = 12$ )。实验结束后,使用Micro-CT检测小鼠左股骨丢失情况。采用代谢组学检测血清代谢物变化。**结果** 3D回旋仪处理后,CS组小鼠呈现出骨小梁数量减少( $P < 0.05$ )和骨小梁间距增加( $P < 0.05$ )的特征。在代谢组学中发现CS组有86种代谢物具有显著性差异。这些差异代谢物主要参与了蛋白质的消化吸收和矿物质吸收等代谢通路。**结论** 3D回旋仪模拟微重力效应引起了C57BL/J小鼠骨丢失和代谢物及代谢通路改变。

**【关键词】** 3D回旋仪;微重力;代谢组学;Micro-CT;C57BL/J小鼠;骨丢失;动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)04-0504-09

## Effects of microgravity on skeletal and metabolomics of mice simulated by 3D clinostat

SONG Chenchen, KANG Taisheng, ZHANG Meng, GAO Kai, SHI Xudong, GUO Jianguo\*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science (CAMS), Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

Corresponding author: GUO Jianguo. E-mail: mybestguo@163.com

**【Abstract】 Objective** Three-dimensional (3D) clinostat has been widely used to simulate the effect of microgravity effect on plants, cells, and nematodes. Although its mechanism in models other than rodents has been discussed, no rodent model has been established and discussed mechanism. **Methods** Thirty 8-week-old male C57BL/J mice were randomly divided into three groups: independent ventilation cage group (MC,  $n = 6$ ), survival box group (SB,  $n = 12$ ), and 3D clinostat group (CS,  $n = 12$ ). After the study, loss of the left femur was detected using Micro-CT and serum metabolite changes were tested using metabolomics. **Results** After 3D clinostat treatment, the trabecular number decreased ( $P < 0.05$ ) and trabeculae spacing increased ( $P < 0.05$ ) in the CS group. Eighty-six metabolites in the CS group exhibited significant differences in metabolomics. These differential metabolites were mainly involved in protein digestion and absorption, and mineral absorption. **Conclusions** 3D clinostat microgravity induced bone loss and changes in metabolites and metabolic pathways in C57BL/J mice.

**【Keywords】** 3D clinostat; microgravity; metabolomics; Micro-CT; C57BL/J mice; bone loss; animal models

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

[基金项目] 中国医学科学院创新基金(2021-I2M-1-034,2021-I2M-1-036)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences(2021-I2M-1-034,2021-I2M-1-036)。

[作者简介] 宋晨晨(1995—),女,硕士研究生,研究方向:环境与健康。Email: songjixuan0125@163.com

[通信作者] 郭建国(1983—),男,副研究员,研究方向:环境与健康。Email: mybestguo@163.com

太空环境复杂,包括微重力、辐射、昼夜节律的变化和极端温度,导致许多生物过程的变化<sup>[1-8]</sup>。微重力是航天员在太空中必须面对的关键问题之一。大量研究表明,长期失重会导致各种生理和病理变化,包括免疫系统、神经系统、生殖系统、心血管系统和骨骼肌组织的变化<sup>[9-14]</sup>。针对上述生理和病理变化,许多研究者制定了相关干预措施<sup>[15-20]</sup>,例如在失重状态下安排训练,增加肌肉和骨骼强度,增加膳食蛋白质摄入和添加氨基酸、矿物质,探索失重前后膳食能量摄入的不同对下肢最大功率的影响。

既往研究发现,长期的空间飞行会导致航天员骨丢失骨折、肌肉萎缩和代谢紊乱<sup>[21-23]</sup>。骨小梁数量和骨小梁间距是失重条件下研究最多的骨参数<sup>[22,24-27]</sup>。Coulombe 等<sup>[22]</sup>分析了长时间的人类太空飞行导致骨结构质量降低(如骨小梁微结构),并且通过受损的组织矿化、成熟和维持(由骨细胞介导)降低骨材料的质量。骨结构和骨材料都受到了微重力的影响,危及了航天员的骨骼健康,导致在返回地面时增加骨折的风险<sup>[22]</sup>。

在太空中进行微重力实验的成本高、效率低,以及在地面上产生微重力环境的时间太短,无法满足大多数生物实验的要求,对于微重力的研究主要依赖于动物模型<sup>[28-29]</sup>。3D 回旋仪被广泛的应用于植物、细胞和线虫模拟微重力效应的研究中,被认为是模拟微重力效应最佳的办法之一。但是 3D 回旋仪模拟微重力效应对 C57BL/J 小鼠骨骼和代谢组学的影响尚未可知。因此,本研究旨在建立 3D 回旋仪模拟微重力效应的 C57BL/J 小鼠模型,探究 3D 回旋仪对 C57BL/J 小鼠骨骼和代谢的作用,为将来研究微重力效应提供一种小鼠模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

30 只 8 周龄健康雄性 SPF 级 C57BL/J 小鼠,体重 15~25 g,购于北京维通利华公司【SCXK(京)2016-0006】。小鼠被置于 12 h 光照和 12 h 黑暗下,自由给予食物和水。随机分为 3 组:单独通风笼组(MC 组,  $n = 6$ );生存盒组(SB 组,  $n = 12$ );3D 回旋仪组(CS 组,  $n = 12$ )。所有小鼠适应饲养环境 1 周,饲养在中国医学科学院医学实验动物研究所

动物屏障环境【SYXK(京)2019-0014】。本实验研究方法和实验动物均经中国医学科学院医学实验动物研究所伦理委员会批准(审批号:GJG21001)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠,生理盐水,乙腈(Merck,色谱纯,1499230-935),乙酸铵(Fluka,色谱纯,17836-50G),氨水(Sigma,色谱纯,16748-250 mL),Methanol(Fisher Chemical,色谱纯,A452-4),HPLC 流动相 A:水+25 mmol/L 乙酸铵+25 mmol/L 氨水,HPLC 流动相 B:乙腈。

3D 回旋仪购买于中国科学院国家空间科学中心,生存盒(专利号:ZL202022855659.9),Micro-CT 扫描仪(Inveon, Siemens, Berlin, 德国),Triple TOF 6600+质谱仪(AB SCIEX),Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪(Agilent),低温高速离心机(Eppendorf 5430R),色谱柱:Waters, ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm  $\times$  100 mm column,超声破碎仪(宁波新芝 JY92-II),真空离心浓缩仪(Eppendorf Concentrator Plus),Vortex 振荡器(上海琪特 QT-1),MP Fastprep-24 匀浆仪(MP Biomedicals),SIMCA-P 16.1(Umetrics, Umea, Sweden)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 模拟微重力与样本采集

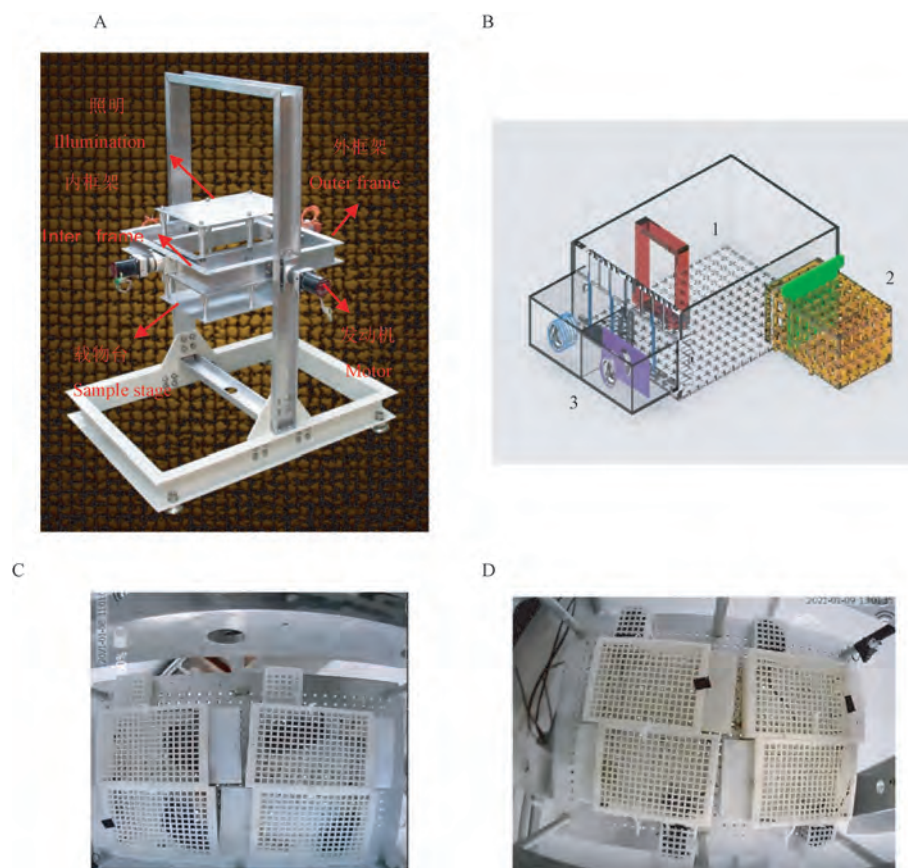
(1)3D 回旋仪参数:旋转框架:2 个,可独立旋转。载物台:面积 400 mm  $\times$  300 mm,承重 0 ~ 3 kg。光照板:面积 400 mm  $\times$  300 mm。旋转模式:恒速旋转: $\pm 0 \sim 10$  rpm,转速分辨率 0.1 rpm,10 ~ 30 rpm,分辨率 1 rpm;随机旋转:转速: $\pm 0 \sim 10$  rpm,转速分辨率:0.1 rpm。可长期连续运行( $\geq 30$  d)。

(2)3D 回旋仪原理:3D 回旋仪从中国科学院国家空间科学中心处购买(图 1A),模拟微重力效应的原理和方法参见文献<sup>[30]</sup>。简单的来说,生物体虽然在回旋器上受到重力的作用,但是由于 360° 旋转,所受到的重力是恒定的矢量作用,方向连续不断的进行着改变,转动 1 周(360°)所产生的矢量和等于“0”,即“零”重力。因此,3D 回旋仪能够模拟微重力效应。

(3)生存盒介绍:为了保证小鼠在 3D 回旋仪上不受限制,设计了使小鼠自由活动的生存盒(图 1B),1 表示小鼠的自由移动区域,2 表示小鼠的休息区域,3 表示食物和固体琼脂(提供水分)供应区域。

(4)适应性训练和样本收集:实验最初待小鼠适应周围环境 1 周后,直接将小鼠放置在 3D 回旋仪上进行处理,观察到有小鼠死亡现象。其次,宇航员在太空中会加强锻炼以克服失重带来的不良反应,增加肌肉和骨骼强度(本研究采用休息 1 d 代替锻炼)。因此,在本研究中将实验操作流程进行了改良。作为初步探究,将 CS 组小鼠放在回旋仪上 1 d,休息 1 d。在整个实验过程中,我们团队有一位专业的兽医每天观察小鼠的状态。幸运的是,并未观察到小鼠有死亡现象,也没有观察到小鼠有应激反应(见图 1C、1D)。

适应性训练过程如下:CS 组小鼠置于 3D 旋转仪上的生存盒中,生存盒内装有食物和固体琼脂。CS 组进行适应性训练 5 d,适应时间为分别为 1、2、4、8、12 h,休息 2 d 后开始研究。CS 组小鼠在回旋仪上模拟微重力 1 d,休息 1 d;SB 组小鼠一直被放置在生存盒里;MC 组一直放置在单独通风笼中。3 组同时进行实验,实验周期为 12 周。实验结束后取小鼠血清和左股骨。样本收集前腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠。左股骨用盐水浸泡纱布包裹,-20℃保存用于 Micro-CT 分析,血清-20℃保存用于代谢组学分析。



注:A:3D 回旋仪;B:生存盒;C:适应性训练时的小鼠;D:3D 回旋仪处理后的小鼠。

图 1 3D 回旋仪和生存盒以及小鼠不同阶段的状态

Note. A. 3D clinostat. B. Survival boxes. C. Mice during adaptive training. D. Mice treated with 3D clinostat.

Figure 1 3D clinostat and survival boxes and the state of mice at different stages

### 1.2.2 Micro-CT 检测

使用 Micro-CT 扫描仪(Inveon, Siemens, Berlin, 德国)对小鼠左股骨进行扫描,扫描参数为:电压:60 kV,电流:400  $\mu$ A,曝光时间 800 ms。使用 Inveon 进行图像重建和数据分析,并进行骨骼参数的统计。

### 1.2.3 代谢组学分析

每 100 g 血清样本取 400  $\mu$ L 至 EP 管中,加入

200  $\mu$ L 提取液(甲醇:乙腈=1:1(v/v),含同位素标记内标混合物),充分涡旋提取血清中的代谢物,样品在冰上孵育 20 min,然后在 4℃ 14 000 r/min 离心 20 min。液相色谱-质谱分析:样品在 100  $\mu$ L 的乙腈/水(1:1, v/v)溶剂中溶解,转移到液相色谱瓶中。对于极性代谢物的非靶向代谢组学,使用四极飞行时间质谱(Sciex

Triple TOF 6600)-电喷雾电离亲水性相互作用色谱法对提取物进行分析。液相色谱分离采用 ACQUITY UPLC BEH Amide 柱 ( $2.1 \times 100$  mm,  $1.7 \mu\text{m}$  粒径), HPLC 流动相 A (25 mm 乙酸铵和 25 mm 铵水溶液) 和 HPLC 流动相 B (乙腈) 梯度洗脱。流速  $0.4 \text{ mL/min}$ , 柱温  $25^\circ\text{C}$ , 自动进样器温度  $5^\circ\text{C}$ , 进样量  $2 \mu\text{L}$ 。质谱仪在负电离和正电离模式下工作。设置 ESI 源条件: 雾化器辅助加热器 (Gas 1) = 60, 辅助加热器 2 (Gas 2) = 60, 气帘气 (CUR) = 30, 离子源温度  $600^\circ\text{C}$ , 离子喷雾电压 (ISVF)  $\pm 5500 \text{ V}$ 。在自动 MS/MS 采集中, 仪器采集的  $m/z$  范围为  $25 \sim 1000 \text{ Da}$ , 生产扫描的积累时间设置为  $0.005 \text{ s/谱}$ 。生产扫描采集采用信息依赖型采集方式, 选择高灵敏度模式。参数设置如下: 碰撞能量固定为  $35 \text{ V}$ , 碰撞能量为  $\pm 15 \text{ eV}$ ; 分簇电势  $60 \text{ v}(+)$  和  $60 \text{ v}(-)$ ; 排除  $4 \text{ Da}$  以内的同位素; 每周期监测的候选离子: 10 个。

### 1.3 统计学分析

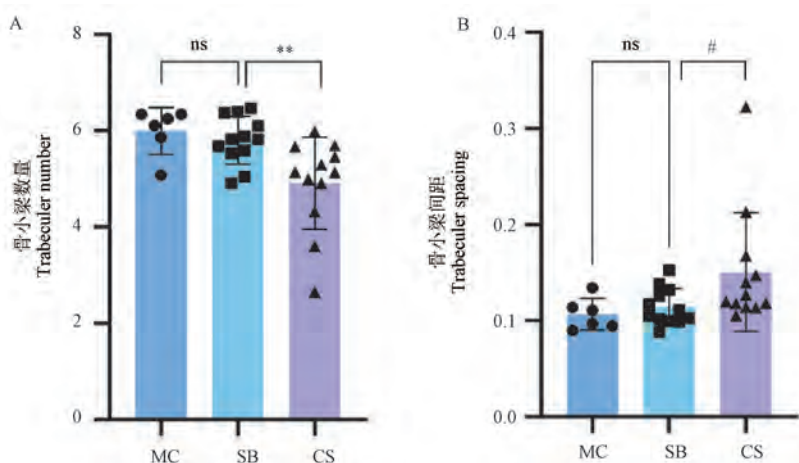
采用 Student's  $t$ -test 单变量统计分析和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis, OPLS-DA) 的多

元变量统计分析, 以  $P < 0.05$  表示具有统计学意义, 并符合变量投影重要度值 (variable importance in the projection, VIP)  $> 1$ , 筛选出现显著差异的代谢物。对显著的差异代谢物进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 注释。使用 Graph Pad Prism 9.0 统计学软件进行数据处理, 两组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示数据具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3D 回旋仪模拟微重力效应对 C57BL/J 小鼠骨小梁数量和间距的影响

整个实验过程中没有观察到小鼠有物理性损伤。图 2 展现了生存盒和 3D 回旋仪对小鼠骨小梁数量和骨小梁间距的作用。与 MC 组小鼠相比, SB 组小鼠的骨小梁数量和骨小梁间距无显著性差异, 提示生存盒不会对 C57BL/J 小鼠的骨参数产生干扰。与 SB 组小鼠相比, CS 组小鼠的骨小梁数量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 骨小梁间距有升高趋势 ( $P < 0.5$ )。提示使用 3D 旋转仪模拟微重力效应导致了 C57BL/J 小鼠骨丢失。



注: A: 骨小梁数量; B: 骨小梁间距; 与 SB 组相比, CS 组骨小梁数量显著性降低,  $** P < 0.05$ ; 与 SB 组相比, CS 组骨小梁间距明显升高,  $\# P < 0.5$ 。

Figure 2 3D 回旋仪模拟微重力效应对 C57BL/J 小鼠骨小梁数量和间距的影响

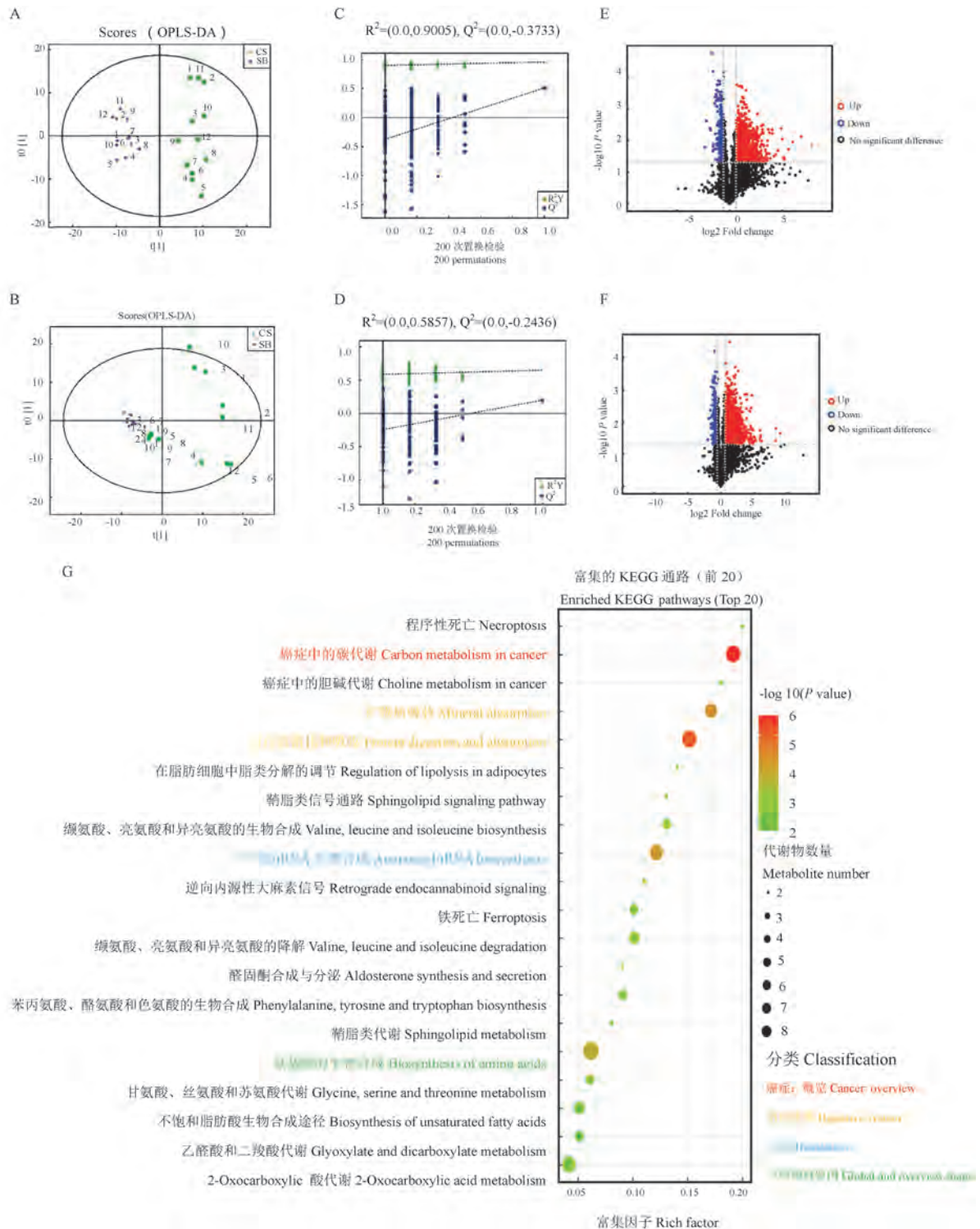
Note. A. Trabecular number. B. Trabecular spacing. Compared with SB, trabecular number decreased significantly in CS,  $** P < 0.05$ . Compared with SB, trabecular spacing increased in CS group,  $\# P < 0.5$ .

Figure 2 Effects of microgravity effect simulated by 3D clinostat on bone parameters of C57BL/J mice

### 2.2 3D 回旋仪模拟微重力对 C57BL/J 小鼠代谢组学的影响

通过 OPLS-DA 分析, 得到 CS 组与 SB 组 C57BL/J 小鼠不同的代谢谱 (图 3)。OPLS-DA 评分图在负向模式 ( $R^2 Y = 0.955$ ,  $Q^2 = 0.511$ ) 和正向

模式 ( $R^2 Y = 0.648$ ,  $Q^2 = 0.198$ ) 下, CS 组和 SB 组表现出明显分离的现象 (图 3A, 3B), 表明该模型可靠、稳定 ( $Q^2 < 0.5$ )。为了避免 OPLS-DA 拟合, 采用排列检验来保证模型的有效性 (图 3C, 3D)。结果表明模型未发生过拟合 ( $R^2 = 0.9005$ ,  $Q^2 =$



注: A, B: 分别为负模式和正模式 OPLS-DA 得分图; C, D: 分别为负模式和正模式 OPLS-DA 置换检验; E, F: 分别为负模式和正模式差异代谢物火山图; G: KEGG 代谢通路。

图 3 模拟微重力对 SB 组和 CS 组代谢模式的影响

Note. A, B. Orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) score in negative mode and positive mode. C, D. Statistical validation of the corresponding OPLS-DA models by permutation tests in negative mode and positive mode. E, F. Volcano plot in negative and positive modes. G. KEGG metabolic pathways.

Figure 3 Effects of simulated microgravity on the metabolic pattern in the SB and CS groups

-0.3733 和  $R^2 = 0.5857$ ,  $Q^2 = -0.2436$ )。从图中可以观察到无论是负模式还是正模式, SB 组和 CS 组之间的分离趋势良好。

火山地图上红点表示上调的代谢物, 蓝点表示下调的代谢物(图 3E, 3F)。黑点显示 SB 组和 CS 组小鼠的代谢物之间没有显著性差异。结果表明与 SB 组相比, CS 组小鼠共有 86 种代谢物发生了显著性变化。为了全面了解在 CS 组小鼠中 86 种差异代谢物所涉及的代谢通路情况, 利用 KEGG 富集分析, 结果以气泡图的形式呈现(图 3G)。结果表明 86 种代谢物参与了多种生化途径。根据差异代谢物富集分析的  $P$  值(气泡所在纵坐标和气泡颜色表示), 观察到显著性差异最强的前 5 个代谢通路分别是: 癌症中的中心碳代谢(central carbon metabolism in cancer), 蛋白质的消化和吸收(protein digestion and absorption), 矿物质吸收(mineral absorption), 氨酰基-tRNA 生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis)和氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)等通路。从图 3G 中, 观察到 86 种差异代谢物主要归属于消化系统。提示 3D 回旋仪模拟微重力效应引起了小鼠代谢产物及其代谢途径的变化。

### 3 讨论

为了探究 3D 回旋仪模拟微重力效应对 C57BL/J 小鼠骨骼和代谢的影响。本实验选择了临床上受微重力影响最大的骨小梁和代谢产物进行了研究。值得注意的是, 在实验最初, 3D 回旋仪上的小鼠在进行实验时有死亡情况。究其原因发现, 小鼠天性胆小, 未经过熟悉的环境, 直接进行 3D 回旋仪处理, 易产生应激反应, 从而导致小鼠的死亡。因此, 本研究为了避免类似情况的发生, 提前对小鼠在 3D 回旋仪上进行了训练。同时, 为了最大程度模拟真实地空间飞行的状态, 本实验设计了生存盒固定在 3D 回旋仪上, 生存盒上的活动区和休息区为小鼠提供活动和休息的场所(图 1)。生存盒可以恢复小鼠的生理状态并进行活动跟踪。为了研究生存盒是否影响小鼠的骨参数, 将 MC 组和 SB 组小鼠的骨参数结果进行了比较。结果表明, 两组间骨小梁数量和骨小梁间距并无显著差异(图 2)。

图 2 的结果表明, 3D 回旋仪模拟微重力效应致使 C57BL/J 小鼠骨小梁数量减少, 间距增加。与真实的微重力引起的结果一致。骨在组织中非常独

特, 它的大部分体积由矿化的细胞外基质组成<sup>[31]</sup>。从结构上看, 骨主要有 2 种类型<sup>[32]</sup>: 皮质骨和松质骨(又称小梁或海绵骨)。由于松质骨的表面积相对于其体积来说非常大, 因此通常首先且最显著的影响是内分泌状态的改变或机械负荷的减少。

越来越多的研究表明骨小梁数量和连接是骨强度和力学能力的关键因素<sup>[33-35]</sup>。研究发现<sup>[36-38]</sup>骨小梁是承担机械载荷的主要结构之一。骨小梁可以增强骨骼的机械强度<sup>[39-41]</sup>。在持续载荷作用下, 骨小梁随时间变化发生力学改变<sup>[42-44]</sup>。在太空飞行后的人类和动物模型中, 骨结构(即骨小梁)减少, 导致在恢复重力载荷时骨折的风险增加<sup>[22]</sup>。在大多数太空飞行研究中观察到骨形成减少, 而在人类和啮齿类动物模型中骨吸收增加<sup>[45-52]</sup>。一项研究发现<sup>[50]</sup>, 在航天飞机 STS-108 飞行过程中, 9 周龄的小鼠在大约飞行 13 d 后, 骨形成显著减少, 骨吸收增加。提示在研究中, 骨小梁数量的减少和骨小梁间距的增加可能是骨形成减少和骨吸收增加共同作用的结果。

图 3 的结果观察到影响最多的代谢通路与消化系统有关。蛋白质消化和吸收是指蛋白质在体内经过消化后被水解成氨基酸再被吸收, 重新合成人体所需的蛋白质<sup>[53-55]</sup>。与此同时, 新的蛋白质不断代谢和分解, 始终处于动态平衡。此前有研究表明<sup>[56]</sup>, 骨量的获得依赖于膳食蛋白质的摄入和消化, 其次是游离氨基酸的吸收。膳食蛋白质摄入促进骨生长, 延缓骨流失<sup>[57]</sup>。Ammann 等<sup>[58]</sup>观察到, 在喂食等热量低蛋白质饲料的去卵巢成年大鼠中, 膳食必需氨基酸补充剂通过影响骨量和骨微结构来增加骨骼强度。钙、磷、镁等矿物质是骨骼和牙齿形成的重要原料<sup>[59-63]</sup>。例如磷是人体内最丰富的矿物质之一<sup>[64]</sup>。如果这种矿物质的含量不够高, 血管的入侵和新骨的生成就会被阻断, 导致佝偻病, 并延迟生长。因此, 长期的太空飞行会影响蛋白质、矿物质的消化和吸收, 导致骨质流失。提示 3D 回旋仪模拟微重力效应引起 C57BL/J 小鼠代谢物和代谢通路的变化, 涉及最多的是与消化系统相关的通路。

目前, 鼠尾悬吊模型是常用的模拟微重力的模型之一。鼠尾悬吊模型采用尾部悬挂, 头朝下倾斜, 推荐角度 30°, 后肢离地不再负重, 前肢承受躯体 50% 的体重<sup>[65]</sup>。例如, Liang 等<sup>[66]</sup>利用尾悬吊小鼠探究了在微重力条件下, 钙蛋白酶激活通过 P38

和 ERK1/2 MAPK 通路介导小鼠心肌异常。但是,该模型让动物身体的一部分仍然处于悬空状态,身体其余部分仍接触笼子,可能对结果产生影响<sup>[67]</sup>。在真实的失重状态下,宇航员整个身体都漂浮在空中,由于失去重力而失重。同时尾悬吊模型的使用时间限制为 2 个月,因此,无法长期对微重力展开研究<sup>[67]</sup>。本实验使用 3D 回旋仪模拟微重力效应建立小鼠模型使得小鼠整体处于失重状态,且无研究时长限制,能够真实的模拟微重力效应。目前本实验研究还在初步探索阶段,3D 回旋仪模拟微重力效应除对小鼠骨小梁和代谢组学的影响外,对其他组织器官是否有病理性影响还值得继续探究。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Sprugnoli G, Cagle YD, Santarnecchi E. Microgravity and cosmic radiations during space exploration as a window into neurodegeneration on earth [J]. JAMA Neurol, 2019, 77(2): 157-158.
- [ 2 ] Kim YJ, Jeong AJ, Kim M, et al. Time-averaged simulated microgravity (taSMG) inhibits proliferation of lymphoma cells, L-540 and HDLM-2, using a 3D clinostat [J]. Biomed Eng Online, 2017, 16(1): 48.
- [ 3 ] Smith K, Mercuri J. Microgravity and radiation effects on astronaut intervertebral disc health [J]. Aerosp Med Hum Perform, 2021, 92(5): 342-352.
- [ 4 ] Krämer BK, Mang JF, Schubert R. The effect of microgravity on central aortic blood pressure [J]. Am J Hypertens, 2018, 31(11): 1180-1182.
- [ 5 ] Bevelacqua JJ, Welsh J, Mortazavi SMJ. Comments on "Prolonged Microgravity Affects Human Brain Structure and Function" [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2020, 41(2): E7.
- [ 6 ] Ma L, Ma J, Xu K. Effect of spaceflight on the circadian rhythm, lifespan and gene expression of *Drosophila melanogaster* [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121600.
- [ 7 ] Brainard GC, Barger LK, Soler RR, et al. The development of lighting countermeasures for sleep disruption and circadian misalignment during spaceflight [J]. Curr Opin Pulm Med, 2016, 22(6): 535-544.
- [ 8 ] Buguet A. Sleep under extreme environments: effects of heat and cold exposure, altitude, hyperbaric pressure and microgravity in space [J]. J Neurol Sci, 2007, 262(1-2): 145-152.
- [ 9 ] Prasad B, Grimm D, Strauch SM, et al. Influence of microgravity on apoptosis in cells, tissues, and other systems *in vivo* and *in vitro* [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9373.
- [ 10 ] Hughson RL, Helm A, Durante M. Heart in space: effect of the extraterrestrial environment on the cardiovascular system [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(3): 167-180.
- [ 11 ] Sprugnoli G, Cagle YD, Santarnecchi E. Microgravity and cosmic radiations during space exploration as a window into neurodegeneration on earth [J]. JAMA Neurol, 2020, 77(2): 157-158.
- [ 12 ] Hupfeld KE, McGregor HR, Reuter-Lorenz PA, et al. Microgravity effects on the human brain and behavior: Dysfunction and adaptive plasticity [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2021, 122: 176-189.
- [ 13 ] Sun YL, Kuang YY, Zuo Z. The emerging role of macrophages in immune system dysfunction under real and simulated microgravity conditions [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2333.
- [ 14 ] Akiyama T, Horie K, Hinoi E, et al. How does spaceflight affect the acquired immune system? [J]. NPJ microgravity, 2020, 6: 14.
- [ 15 ] Nay K, Koechlin-Ramonatxo C, Rochdi S, et al. Simulated microgravity disturbs iron metabolism and distribution in humans: Lessons from dry immersion, an innovative ground-based human model [J]. FASEB J, 2020, 34(11): 14920-14929.
- [ 16 ] Gao R, Chilibeck PD. Nutritional interventions during bed rest and spaceflight: prevention of muscle mass and strength loss, bone resorption, glucose intolerance, and cardiovascular problems [J]. Nutr Res, 2020, 82: 11-24.
- [ 17 ] Rejc E, di Prampero PE, Lazzer S, et al. Maximal explosive power of the lower limbs before and after 35 days of bed rest under different diet energy intake [J]. Eur J Appl Physiol, 2015, 115(2): 429-436.
- [ 18 ] Ploutz-Snyder LL, Downs M, Goetichius E, et al. Exercise training mitigates multisystem deconditioning during bed rest [J]. Med Sci Sports Exerc, 2018, 50(9): 1920-1928.
- [ 19 ] Baba S, Smith T, Hellmann J, et al. Space flight diet-induced deficiency and response to gravity-free resistive exercise [J]. Nutrients, 2020, 12(8): 2400.
- [ 20 ] Zwart SR, Hargens AR, Smith SM. The ratio of animal protein intake to potassium intake is a predictor of bone resorption in space flight analogues and in ambulatory subjects [J]. Am J Clin Nutr, 2004, 80(4): 1058-1065.
- [ 21 ] Nagaraja MP, Risin D. The current state of bone loss research: data from spaceflight and microgravity simulators [J]. J Cell Biochem, 2013, 114(5): 1001-1008.
- [ 22 ] Coulombe JC, Senwar B, Ferguson VL. Spaceflight-induced bone tissue changes that affect bone quality and increase fracture risk [J]. Curr Osteoporos Rep, 2020, 18(1): 1-12.
- [ 23 ] Grimm D, Grosse J, Wehland M, et al. The impact of microgravity on bone in humans [J]. Bone, 2016, 87: 44-56.
- [ 24 ] Dai J, Lin D, Zhang J, et al. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice [J]. J Clin Invest, 2000, 106(7): 887-895.
- [ 25 ] Cosmi F, Steinberg N, Mazzoleni G. A mesoscale study of the degradation of bone structural properties in modeled microgravity conditions [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2015, 44: 61-70.
- [ 26 ] Bi DS, Dai ZQ, Liu DW, et al. Ultrasonic backscatter measurements of human cortical and trabecular bone densities in a

- head-down bed-rest study [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2021, 47 (8): 2404–2415.
- [27] Vico L, Collet P, Guignandon A, et al. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts [J]. *Lancet*, 2000, 355 (9215): 1607–1611.
- [28] Tou JC, Grindeland RE, Wade CE. Effects of diet and exposure to hindlimb suspension on estrous cycling in Sprague-Dawley rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286 (3): 425–433.
- [29] Matsuda C, Kato T, Inoue-Suzuki S, et al. Dietary intervention of mice using an improved Multiple Artificial-gravity Research System (MARS) under artificial 1 g [J]. *NPJ microgravity*, 2019, 5: 16.
- [30] Hoson T, Kamisaka S, Miyamoto K, et al. Vegetative growth of higher plants on a three-dimensional clinostat [J]. *Microgravity Sci Technol*, 1993, 6(4): 278–281.
- [31] Bloomfield SA, Martinez DA, Boudreaux RD, et al. Microgravity stress; bone and connective tissue [J]. *Compr Physiol*, 2016, 6 (2): 645–686.
- [32] Jerban S, Ma Y, Wei Z, et al. Quantitative magnetic resonance imaging of cortical and trabecular bone [J]. *Semin Musculoskelet Radiol*, 2020, 24(4): 386–401.
- [33] Guo XE, Kim CH. Mechanical consequence of trabecular bone loss and its treatment; a three-dimensional model simulation [J]. *Bone*, 2002, 30(2): 404–411.
- [34] Putman MS, Yu EW, Lin D, Darakananda K, et al. Differences in trabecular microstructure between black and white women assessed by individual trabecular segmentation analysis of HR-pQCT images [J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32 (5): 1100–1108.
- [35] Warden SJ, Wright CS, Fuchs RK. Bone microarchitecture and strength adaptation to physical activity: a within-subject controlled HRpQCT study [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2021, 53 (6): 1179–1187.
- [36] Turunen MJ, Le Cann S, Tudisco E, et al. Sub-trabecular strain evolution in human trabecular bone [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 13788.
- [37] Roberts BC, Arredondo Carrera HM, Zanjani-Pour S, et al. PTH(1-34) treatment and/or mechanical loading have different osteogenic effects on the trabecular and cortical bone in the ovariectomized C57BL/6 mouse [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 8889.
- [38] Watson PJ, Fitton LC, Meloro C, et al. Mechanical adaptation of trabecular bone morphology in the mammalian mandible [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7277.
- [39] Fields AJ, Eswaran SK, Jekir MG, et al. Role of trabecular microarchitecture in whole-vertebral body biomechanical behavior [J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(9): 1523–1530.
- [40] Sório ALR, Vargas-Sanchez PK, Fernandes RR, et al. Cell therapy stimulates bone neof ormation in calvaria defects in rats subjected to local irradiation [J]. *Anim Model Exp Med*, 2019, 2(3): 169–177.
- [41] Scalize PH, de Sousa LG, Gonçalves LMN, et al. Low-level laser therapy enhances the number of osteocytes in calvaria bone defects of ovariectomized rats [J]. *Anim Model Exp Med*, 2019, 2(1): 51–57.
- [42] Iyo T, Maki Y, Sasaki N, et al. Anisotropic viscoelastic properties of cortical bone [J]. *J Biomech*, 2004, 37(9): 1433–1437.
- [43] Novitskaya E, Zin C, Chang N, et al. Creep of trabecular bone from the human proximal tibia [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 40: 219–227.
- [44] Draghici AE, Taylor JA, Bouxsein ML, et al. Effects of FES-rowing exercise on the time-dependent changes in bone microarchitecture after spinal cord injury: a cross-sectional investigation [J]. *JBM Plus*, 2019, 3(9): e10200.
- [45] Vico L, Hargens A. Skeletal changes during and after spaceflight [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(4): 229–245.
- [46] Sibonga JD, Zhang M, Evans GL, et al. Effects of spaceflight and simulated weightlessness on longitudinal bone growth [J]. *Bone*, 2000, 27(4): 535–540.
- [47] Vico L, Chappard D, Palle S, et al. Trabecular bone remodeling after seven days of weightlessness exposure (BIOCOSMOS 1667) [J]. *Am J Physiol*, 1988, 255(2): 243–247.
- [48] Wronski TJ, Morey-Holton ER, Doty SB, et al. Histomorphometric analysis of rat skeleton following spaceflight [J]. *Am J Physiol*, 1987, 252(2): 252–255.
- [49] Westerlind KC, Turner RT. The skeletal effects of spaceflight in growing rats; tissue-specific alterations in mRNA levels for TGF- $\beta$  [J]. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(6): 843–848.
- [50] Lloyd SA, Morony SE, Ferguson VL, et al. Osteoprotegerin is an effective countermeasure for spaceflight-induced bone loss in mice [J]. *Bone*, 2015, 81: 562–572.
- [51] Vilas AC, Zernicke RF, Grindeland RE, et al. Effects of spaceflight on rat humerus geometry, biomechanics, and biochemistry [J]. *FASEB J*, 1990, 4(1): 47–54.
- [52] Lafage-Proust MH, Collet P, Dubost JM, et al. Space-related bone mineral redistribution and lack of bone mass recovery after reambulation in young rats [J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(2): 324–334.
- [53] Gwin JA, Church DD, Wolfe RR, et al. Muscle protein synthesis and whole-body protein turnover responses to ingesting essential amino acids, intact protein, and protein-containing mixed meals with considerations for energy deficit [J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2457.
- [54] Zhao JF, Zhang XY, Liu HB et al. Dietary protein and gut microbiota composition and function [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(2): 145–154.
- [55] Prokopenidis K, Cervo MM, Gandham A, et al. Impact of protein intake in older adults with sarcopenia and obesity: a gut microbiota perspective [J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2285.
- [56] Rennie MJ. Exercise- and nutrient-controlled mechanisms involved in maintenance of the musculoskeletal mass [J].

- Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt 5): 1302–1305.
- [57] Rizzoli R, Bonjour JP. Dietary protein and bone health [J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(4): 527–531.
- [58] Ammann P, Laib A, Bonjour JP, et al. Dietary essential amino acid supplements increase bone strength by influencing bone mass and bone microarchitecture in ovariectomized adult rats fed an isocaloric low-protein diet [J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(7): 1264–1272.
- [59] Murshed M. Mechanism of bone mineralization [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018, 8(12): a031229.
- [60] Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone [J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 4743–4763.
- [61] Fleet JC. The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis [J]. Mol Cell Endocrinol, 2017, 453: 36–45.
- [62] Akbari S, Rasouli-Ghahroudi AA. Vitamin K and bone metabolism: a review of the latest evidence in preclinical studies [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 4629383.
- [63] Young MF. Skeletal biology: where matrix meets mineral [J]. Matrix Biol, 2016, 52–54: 1–6.
- [64] Goretti Penido M, Alon US. Phosphate homeostasis and its role in bone health [J]. Pediatr Nephrol, 2012, 27(11): 2039–2048.
- [65] Dai X, Ye S, Chen X, et al. Rodent retinal microcirculation and visual electrophysiology following simulated microgravity [J]. Exp Eye Res, 2020, 194: 108023.
- [66] Liang L, Li H, Cao T, et al. Calpain activation mediates microgravity-induced myocardial abnormalities in mice via p38 and ERK1/2 MAPK pathways [J]. J Biol Chem, 2020, 295(49): 16840–16851.
- [67] Nday CM, Frantzidis C, Jackson G, et al. Neurophysiological changes in simulated microgravity: An animal model [J]. Neurol India, 2019, 67: 221–226.

[收稿日期] 2022-07-11

## 《中国实验动物学报》刊期变更通知

为缩短出版周期,及时反映本学科最新科技动态,应广大读者、作者要求,本刊向主管部门及北京市新闻出版局提出申请变更刊期。经批准《中国实验动物学报》自 2022 年 8 月份起由双月刊变更为月刊。从 2023 年期起全年共 12 期。

欢迎读者积极订阅! 欢迎各位学者踊跃投稿!

黄文韬,李朵朵,李冰,等. 电针对抑郁症大鼠海马齿状回亚颗粒区小胶质细胞活化和学习记忆能力的影响[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 513-519.

Huang WT, Li DD, Li B, et al. Effects of electroacupuncture of the subgranular area of the dentate gyrus on microglia activation, and learning and memory function, in depressed rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 513-519.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.009

# 电针对抑郁症大鼠海马齿状回亚颗粒区小胶质细胞活化和学习记忆能力的影响

黄文韬<sup>1</sup>, 李朵朵<sup>1\*</sup>, 李冰<sup>1</sup>, 陈恒<sup>1</sup>, 李武<sup>2</sup>

(1. 湖南中医药大学第二附属医院, 长沙 410005; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

**【摘要】 目的** 探讨电针对抑郁症大鼠海马齿状回亚颗粒区(SGZ)小胶质细胞活化和学习记忆能力调控机制。**方法** SD大鼠随机分为对照组、模型组、NLRP3阻断剂组、电针组,采用孤养+慢性不可预知性温和刺激建立大鼠抑郁症模型。电针组给予电针刺激“百会”“印堂”穴位,持续20 min/d;NLRP3阻断剂组尾静脉注射MCC950溶液(3 mg/kg),连续21 d。采用旷场实验记录动物造模前后自主活动能力,Morris水迷宫实验检测学习记忆功能,免疫荧光双标法定量和定位SGZ中小胶质细胞标志物离子钙结合衔接分子(Iba-1)和炎性小体NOD样受体3(NLRP3)蛋白表达,实时荧光定量PCR法检测SGZ中半胱天冬酶-1(Caspase-1)和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )基因相对表达量。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠自主活动和学习记忆功能明显减弱,SGZ中小胶质细胞出现明显的活化状态,NLRP3蛋白阳性率明显增加,Caspase-1和IL-1 $\beta$ 蛋白相对表达量也相应升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,电针组和NLRP3阻断剂组可明显改善大鼠的自主活动和学习记忆能力,NLRP3+Iba-1蛋白表达阳性率和Caspase-1 mRNA减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),IL-1 $\beta$  mRNA相对表达量趋势性降低。**结论** 电针可改善抑郁症模型大鼠学习记忆能力,这可能与调控海马亚颗粒区小胶质细胞活化状态和NLRP3/Caspase-1信号通路有关。

**【关键词】** 抑郁症;海马齿状回亚颗粒区;电针;小胶质细胞;NOD样受体3

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)04-0513-07

## Effects of electroacupuncture of the subgranular area of the dentate gyrus on microglia activation, and learning and memory function, in depressed rats

HUANG Wentao<sup>1</sup>, LI Duoduo<sup>1\*</sup>, LI Bing<sup>1</sup>, CHEN Heng<sup>1</sup>, LI Wu<sup>2</sup>

(1. the Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410005, China.

2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208)

Corresponding author: LI Duoduo. E-mail: tcmliuduoduo@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the regulation mechanism of microglia activation, and learning and memory function, by electroacupuncture of the subgranular area of the dentate gyrus (SGZ) of depressed rats. **Methods** SD rats were randomly divided into four groups: the control group, model group, NLRP3 blocker group, and electroacupuncture group. The rat depression model was established by orphan rearing and chronic unpredictable gentle stimulation. The electroacupuncture group was administered electroacupuncture stimulation at the “Baihui” and “Yintang” acupoints for 20 min/d. The NLRP3 blocker group was injected with MCC950 solution (3 mg/kg) through the tail vein for 21 days. An open field experiment was used to record the autonomous activity of animals before and after modeling. The Morris water maze test was used to detect learning and memory function, and the immunofluorescence double-staining method was used

[基金项目] 湖南省自然科学基金(2019JJ50345)。

Funded by the Natural Science Foundation of Hunan Province(2019JJ50345)。

[作者简介] 黄文韬(1982—),男,医学硕士,主治医师,研究方向:针灸治病机理的研究。Email: tcmhwt@163.com

[通信作者] 李朵朵(1987—),女,医学硕士,主治医师,研究方向:针灸治病机理的研究。Email: tcmliuduoduo@163.com

to quantify and locate the protein expression of SGZ microglia marker Iba-1 and inflammasome Nod-like receptor 3. The relative expression levels of Caspase-1 and interleukin-1 $\beta$  in the SGZ were detected by real-time quantitative PCR. **Results** Compared with the control group, autonomous activity and learning and memory function were significantly reduced, the activation of SGZ microglia was obvious, the positive detection of NLRP3 protein was significantly increased, and the relative expression levels of Caspase-1 and IL-1 $\beta$  protein were also increased in the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the electroacupuncture group and the NLRP3 blocker group showed significantly improved autonomous activity and learning and memory function, and decreased positive detection rates of NLRP3+IBA-1 protein expression and relative expression of Caspase-1 mRNA ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) and IL-1 $\beta$  mRNA. **Conclusions** Electroacupuncture improved the learning and memory ability of depressed rats, which may be related to the regulation of the activation state of microglia and the NLRP3/caspase-1 signaling pathway in the subgranular area of the hippocampus.

**【Keywords】** depression; hippocampal dentate gyrus subgranular area; electric acupuncture; microglia; NOD-like receptor 3

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

抑郁症(depression)已经成为最普遍、最致残和最昂贵的神经精神疾病之一,影响着全球 3 亿多的患者<sup>[1]</sup>。其病理生理学发病机制涉及多个方面,慢性神经炎症已成为目前的研究热点,可通过作用于神经发生、血清素代谢、多巴胺能系统等影响抑郁症的发作以及严重程度<sup>[2]</sup>。现有的抗抑郁症的药物治疗作用仅能促使 1/2 的患者得到持续性缓解,约 1/5 的患者存在治疗无效的情况<sup>[3]</sup>。成年海马神经发生是大脑学习记忆、认知和情绪反应的关键过程,海马齿状回亚颗粒区(SGZ)是神经发生的主要部位,而 SGZ 中小胶质细胞是神经炎症反应的主要介质,参与神经发生和神经保护<sup>[4]</sup>。炎性小体 NOD 样受体 3(NOD-like receptor 3, NLRP3)是一种胞质模式识别受体,常结构性表达于小胶质细胞中,可促发一系列免疫炎症反应,抑制神经发生<sup>[5]</sup>。大量报道证实,抑制 NLRP3 炎性小体及其信号通路的激活可发挥明显的抗抑郁作用, NLRP3 已经成为抑郁症神经炎症发生的重要靶点<sup>[6-8]</sup>。电针作为中医学特色治疗方法,已经被证实在临床治疗抑郁症方面有较好的疗效,但是具体作用机制仍有待研究。因此,本研究以 NLRP3 阻断剂为对照,采用免疫荧光双标法观察小胶质细胞的活化状态,联合 RT-PCR 法探讨电针刺激对抑郁症大鼠 SGZ 中 NLRP3/含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1(cysteiny aspartate specific proteinase1, Caspase-1)/白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1, IL-1 $\beta$ )信号通路表达的影响,为临床电针治疗抑郁症提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

选取 32 只 8 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重约

180 ~ 220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供【SCXK(湘)2019-0004】。饲养环境:在恒定温度、湿度和光暗循环(20 ~ 25℃;55% ± 10%;7:00 ~ 19:00 光照循环)下自由饮水和摄食,饲养于湖南省中医药研究院实验动物中心【SYXK(湘)2020-0008】。实验程序根据湖南省中医药研究院实验动物中心管理规定进行(IACU2021-0106)。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

MCC950(批号:CP-456773, Selleckchem), HRP 标记山羊抗大鼠(批号:GB23302, Servicebio), Anti-Iba-1(批号:ab178847, Abcam), Anti-NLRP3(批号:19771-1-AP, Proteintech), Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 GAPDH 引物(上海生物工程有限公司)。SDZ-II B 型华佗牌电子针疗仪(苏州医疗用品厂有限公司, 中国), 动物行为学习记忆系统(Viewpoint, 法国), Eclipse Ti-E 型激光共聚焦显微镜(Nikon, 日本); PANNORAMIC 型全景切片扫描仪(3DHISTECH, 匈牙利); D3024R 台式高速冷冻离心机(DRAGONLAB, 中国); T10+S5N 型电动匀浆器(IKA, 德国); 实时荧光定量 PCR 仪(Thermo, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组与造模

将 SD 大鼠按旷场实验随机分为对照组、模型组、NLRP3 阻断剂(MCC950)组、电针(EA)组, 每组 8 只。除对照组, 其余各组皆采用孤养联合慢性不可预知性温和应激(CUMS)复制大鼠抑郁模型。应激方法包括:昼夜颠倒 12 h/12 h、4℃冰水浴 5 min、禁食 24 h、禁水 24 h、夹尾 1 min、潮湿垫料 24 h、热板 52℃ 5 min, 各组大鼠每天采用同 1 种刺激方式, 每种刺激方式使用 3 ~ 4 次, 且同种刺激不连续出现。

### 1.2.2 干预治疗

在大鼠每天应激后 1 h, 给予 NLRP3 阻断剂 MCC950 和电针组干预治疗。MCC950 组<sup>[9]</sup>: 将 MCC950 粉末溶解在无菌生理盐水中, 制成 3 mg/kg 的 MCC950 溶液, 大鼠放置于固定装置中, 用乙醇擦拭鼠尾, 使用 1 mL 的注射器将 MCC950 溶液缓慢注射入侧尾静脉, 给药体积为 1 mL/kg。电针组: 参考《实验针灸学》<sup>[10]</sup>, 选择“百会”和“印堂”穴, 将 SD 大鼠固定在鼠板上, 采用华佗牌针 (0.25 × 13 mm) 向后平刺 4 ~ 6 mm, 针柄处连接华佗牌 SDZ-II B 型电子针疗仪, 电流输出强度 1 ~ 2 mA, 疏密波型, 刺激 20 min, 每日 1 次, 连续 21 d。对照组给予相同时长的固定。

### 1.2.3 旷场实验

分别于造模前和治疗结束后, 进行旷场实验, 将大鼠放入黑色敞箱 (80 cm × 80 cm × 40 cm) 角落, 观察 4 min, 记录各组大鼠后 3 min 内水平运动格子数 (四爪皆入记 1 次) 和垂直竖立次数 (两爪腾空放下记 1 次), 以总运动量判断大鼠自主活动能力。

### 1.2.4 Morris 水迷宫实验

在治疗结束后, 第 1 ~ 4 天进行定位航行实验检测大鼠学习能力, 每天将大鼠从 4 个不同象限面向池壁放入, 观察 60 s 内大鼠爬上平台的逃避潜伏期 (escape latency, EL)。第 5 天进行空间探索实验检测大鼠记忆能力, 移除平台后大鼠从对立象限放入, 记录 90 s 内大鼠在目标象限的空间探索时间 (space exploration time, SET)。

### 1.2.5 样本采集

行为学检测结束后, 各组中部分大鼠采用戊巴比妥 (2 mg/kg) 麻醉后, 固定在解剖台上, 剖开胸

腔, 从左心室插入灌注针并剪破右心耳, 灌注生理盐水快速冲洗至液体澄清后, 慢速灌注 4% 多聚甲醛溶液 (4℃) 直至四肢僵硬后, 解剖出脑组织, 放入 4% 多聚甲醛溶液固定, 备用。各组剩余大鼠麻醉后, 解剖出全脑后, 分离海马组织齿状回亚颗粒区, 放入液氮中速冻, 待下一步检测。

### 1.2.6 免疫荧光双标检测

采用免疫荧光双标法检测海马齿状回亚颗粒区小胶质细胞 NLRP3 和 Iba-1 蛋白表达情况。取固定好的全脑组织, 石蜡包埋, 制备成 8 μm 切片, 0.3% Triton X-100 室温破膜, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性过氧化物酶, 血清封闭, 分别加入小胶质细胞表面标记物兔抗 Iba-1 (1 : 500) 和鼠抗 NLRP3 (1 : 200), 4℃ 过夜后, 加入对应种属生物素二抗 (1 : 100), 室温避光孵育 1 h, 封片, 激光共聚焦显微镜观察并拍照, 每张切片任选 3 个视野阳性的累积光密度值以及对应的组织像素面积, 并计算出阳性表达率, 取平均值作为测量值。

### 1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测

采用 RT-PCR 法检测海马齿状回亚颗粒区 Caspase-1 和 IL-1β mRNA 表达, 取上述冻存的海马组织, 加入 1 mL TRIzol, 低温下匀浆, 裂解 5 min, 提取样本总 RNA, 核酸蛋白测定仪定量。按照逆转录反应试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA, 反应条件为 2 × SYBR Mix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 8 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, cDNA 1 μL。扩增条件为 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 反应结束后以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算分析目的基因 Caspase-1 和 IL-1β 相对表达水平, 以基因/内参吸光度比值的平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。引物序列见表 1。

表 1 Caspase-1 和 IL-1β 引物序列  
Table 1 Caspase-1 and IL-1β primer sequences

| 引物名称<br>Primer name | 上游引物 (5' - 3')<br>Upstream primer (5' - 3') | 下游引物 (5' - 3')<br>Downstream primer (5' - 3') | 长度 (bp)<br>Length (bp) |
|---------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|
| Caspase-1           | CGCAGATGCCCACT                              | TGCCCACAGACATTCATACAG                         | 96                     |
| IL-1β               | CCCTTGTGCGAGAATGGGCAG                       | GACCAGAATGTGCCACGGTT                          | 242                    |
| GAPDH               | GGCAGACTCAAGGCTGAGAATG                      | ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA                         | 116                    |

### 1.3 统计学分析

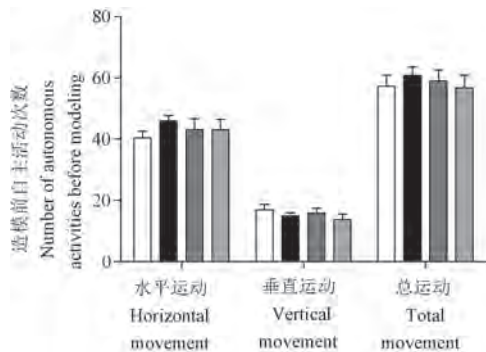
采用统计软件 SPSS 17.0 进行统计分析, 计量资料以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比

较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, 不服从正态分布采用非参数检验,  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 造模前后自主活动变化

旷场实验结果如图 1 所示,造模前各组间大鼠自主活动次数无明显差异( $P > 0.05$ );给药后,与对照组比较,模型组大鼠活动量明显下降,电针刺激或药物干预后,大鼠的自主活动能力明显增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),具有显著性差异,表明电针可明显改善抑郁症大鼠的抑郁样行为。



注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 各组大鼠造模前和给药后自主活动变化

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

Figure 1 Changes in autonomous activities of each group of rats before modeling and after administration

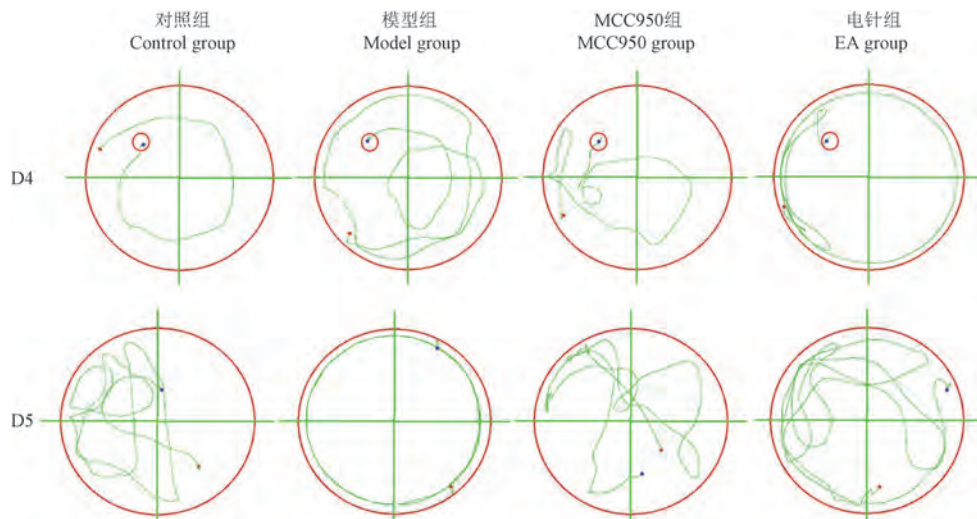
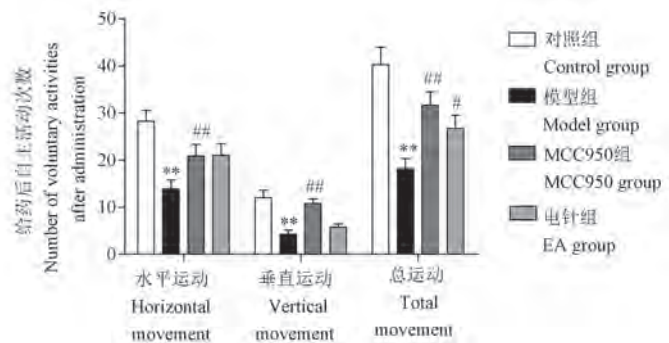


图 2 各组大鼠第 4 天逃避潜伏期和第 5 天空间探索期运动轨迹图

Figure 2 Movement trajectories of rats in each group during the 4th day escape latency and the 5th day space exploration period

### 2.3 海马齿状回亚颗粒区小胶质细胞 NLRP3 和 Iba-1 蛋白表达变化

免疫荧光双标法进行定位和定量检测结果如图 4 所示,激光共聚焦显微镜下观察发现,与对照组比较,模型组海马齿状回亚颗粒区小胶质细胞 NLRP3 和 Iba-1 蛋白荧光强度增强,阳性表达率明

### 2.2 学习记忆能力变化

Morris 水迷宫实验检测结果如图 2,3 所示,给药结束后前 4 d 进行逃避潜伏期测试,第 5 天进行空间探索时间测试,与对照组比较,模型组大鼠逃避潜伏期明显增加,空间探索时间显著减少;与模型组比较,电针组和 NLRP3 阻断剂组大鼠的逃避潜伏期相对减少,空间探索时间有所增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),差异具有显著性;提示,电针应激可以加强抑郁大鼠的学习记忆能力。

显增加,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,电针组大鼠海马齿状回亚颗粒区小胶质细胞 NLRP3 和 Iba-1 蛋白荧光强度减弱,阳性表达率减少,这与 NLRP3 阻断剂组干预趋势一致;提示,电针可明显减少抑郁症模型大鼠亚颗粒区小胶质细胞中炎性小体 NLRP3 蛋白的表达。

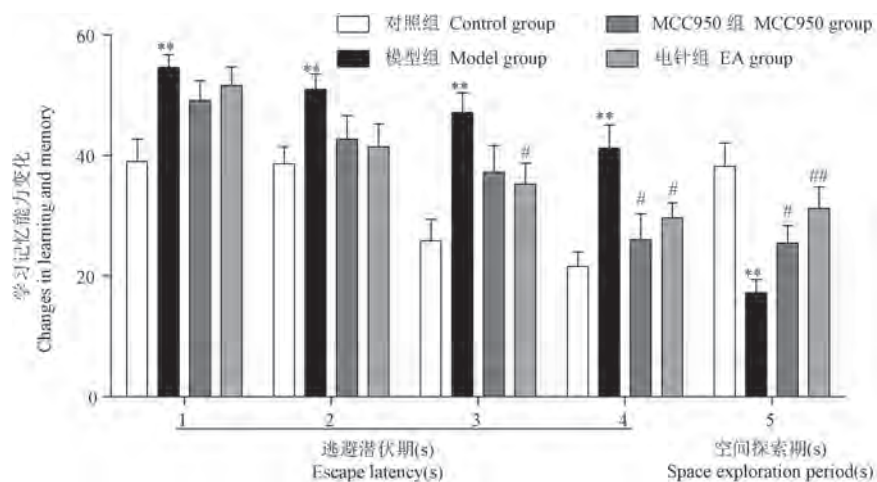


图3 各组大鼠学习记忆能力变化

Figure 3 Changes in learning and memory ability of rats in each group

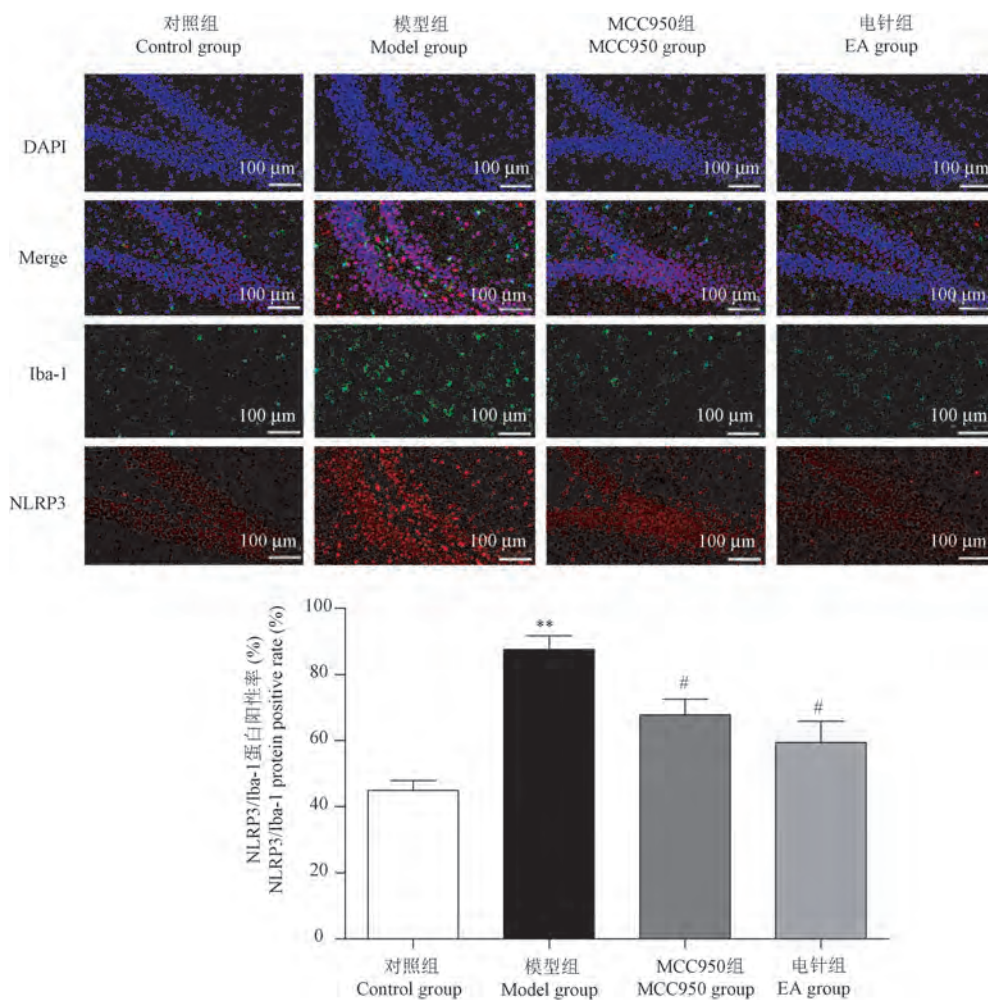


图4 海马齿状回亚颗粒区小胶质细胞 NLRP3/Iba-1 蛋白荧光和阳性表达率

Figure 4 NLRP3/Iba-1 protein fluorescence and positive expression rate of microglia in the subgranular region of the hippocampal dentate gyrus

## 2.4 海马齿状回亚颗粒区 Caspase-1 和 IL-1 $\beta$ mRNA 变化

RT-PCR 法定量检测结果如图 5 所示,与对照比较,模型组大鼠海马齿状回亚颗粒区 Caspase-1 和 IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量显著增加;与模型组比较,电针组和 NLRP3 阻断剂组大鼠海马齿状回亚颗粒区 Caspase-1 mRNA 相对表达量显著减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),电针组齿状回亚颗粒区 IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量有减少趋势,但无显著性差异。

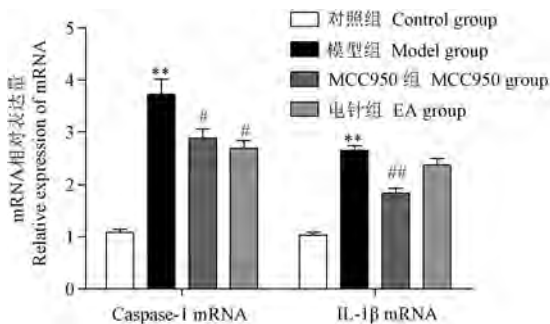


图 5 海马齿状回亚颗粒区 Caspase-1 和 IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量

Figure 5 Relative expression of Caspase-1 and IL-1 $\beta$  mRNA in the subgranular region of the hippocampal dentate gyrus

## 3 讨论

抑郁症主要因情志不达、脑神失养所致,归属于中医“郁证”的范畴,脑为元神之府,而督脉通脑络,针刺隶属督脉之中的“百会”,并配伍精神元气汇聚之处的“印堂”穴,二者作为临床治疗抑郁症的常用腧穴,可通过调节机体的神经内分泌、神经可塑性、免疫等多方面发挥抗抑郁作用<sup>[11]</sup>。免疫应激、炎症反应以及细胞因子活化所致的神经炎症发生是抑郁症发病的重要因素,其神经炎症的发生机制被认为可能是传统抗抑郁药治疗无效的原因之一,物理治疗如针灸可通过抑制神经炎症的产生来达到抗抑郁的作用<sup>[12-13]</sup>。本研究采用行为学评价系统检测证实,电针抑郁症大鼠的百会和印堂穴位可明显改善其抑郁样行为,以及学习记忆能力。

海马是抑郁症发病中的关键区域,海马齿状回亚颗粒区(SGZ)中的神经干细胞是神经元和胶质细胞产生的起源,与大脑正常生理条件下的认知过程如学习记忆等密切相关<sup>[14]</sup>。其中,小胶质细胞是中枢神经系统固有免疫细胞,被激活后可从静息的分支状变成激活的杆状,分泌炎症介质,诱导神经炎症发生,导致 SGZ 结构和功能完整性缺失<sup>[15]</sup>。文献

报道,SGZ 中小胶质细胞密度的增加和形态的改变与抑郁症的发生密切相关<sup>[16]</sup>。我们的研究同样发现,抑郁模型大鼠小胶质细胞的标志物离子钙结合衔接分子 Iba-1 明显增加。NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3),是大脑中先天免疫的传感器,慢性应激状态下,小胶质细胞上 NLRP3 与半胱天冬酶募集结构域(ASC)和前半胱天冬酶-1(pro-Caspase-1)分子组成 NLRP3 炎性小体并被激活,引起认知功能和神经病理学变化<sup>[17]</sup>。NLRP3 炎性小体被激活后可介导自身催化裂解,释放大量的活化的半胱天冬酶-1(Caspase-1),Caspase-1 是白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的转化酶,可特异性的将前体 IL-1 $\beta$ (pro-IL-1 $\beta$ )裂解为成熟活化的 IL-1 $\beta$ ,通过不完整的细胞膜外释,引起相邻神经细胞炎症<sup>[18]</sup>。大鼠脑室注射 IL-1 $\beta$  会显著降低海马齿状回细胞增殖数量,IL-1 $\beta$  受体抑制剂可有效逆转这种作用<sup>[19]</sup>。

有研究发现,抑郁症海马中存在明显的炎性小体 NLRP3 激活现象,已经成为重要的潜在抗抑郁治疗靶点<sup>[6-7]</sup>。小分子化合物 MCC950 是一种有效的选择性 NLRP3 抑制剂,可以特异性抑制 NLRP3 诱导的 ASC 寡聚,从而防止 IL-1 $\beta$  裂解为其活性形式<sup>[9]</sup>。在我们的研究中,通过免疫荧光双标法,给予抑郁症大鼠 MCC950 后,可明显减少小胶质细胞的活化,而且 NLRP3 蛋白表达明显降低。同时,海马 SGZ 中 Caspase-1 基因表达明显减少。电针组表现出相同的趋势,因此,我们推测,电针改善大鼠抑郁样行为和学习记忆能力,可能是通过调控海马齿状回亚颗粒区小胶质细胞活化,和影响炎症信号通路 NLRP3/Caspase-1 表达有关。电针作为一种绿色疗法已经在临床抗抑郁的治疗效果中被肯定,本研究为其提供一定的更加科学和深入的理论支撑。

## 参 考 文 献(References)

- [1] Figueroa-Hall LK, Paulus MP, Savitz J. Toll-Like receptor signaling in depression [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 121: 104843.
- [2] Dantzer R. Neuroimmune interactions: from the brain to the immune system and vice versa [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(1): 477-504.
- [3] Whiteford HA, Degenhardt L, Rehm J, et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2013, 382(9904): 1575-1586.
- [4] 赵祥,魏翠兰,张业廷. 神经发生和炎症环境在运动条件下的改变与调节 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(5): 813-820.

- Zhao X, Wei CL, Zhang YT. Neurogenesis and neuroinflammation under exercise: alteration and regulation [J]. Chin J Tissue Engineering Res, 2021, 25(5): 813-820.
- [ 5 ] Singh S, Jha S. NLRs as helpline in the brain: mechanisms and therapeutic implications [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(10): 8154-8178.
- [ 6 ] Jia KK, Ding H, Yu HW, et al. Huanglian-Wendan decoction inhibits NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome activation in liver and brain of rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 3093516.
- [ 7 ] Zhang YQ, Wang XB, Xue RR, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like effect via regulating NF- $\kappa$ B/NLRP3 pathway in rats [J]. Neuroreport, 2019, 30(13): 893-900.
- [ 8 ] 王红梅, 李晨, 李晓艳, 等. 针刺对抑郁大鼠前额叶皮层 NOD 样受体蛋白 3 炎性小体信号通路的影响 [J]. 针刺研究, 2020, 45(10): 806-811.
- Wang HM, Li C, Li XY, et al. Effect of acupuncture on Nod-like receptor protein 3 inflammatory signal pathway in prefrontal cortex of rat with depression [J]. Acupuncture Res, 2020, 45(10): 806-811.
- [ 9 ] Ward R, Li W, Abdul Y, et al. NLRP3 inflammasome inhibition with MCC950 improves diabetes-mediated cognitive impairment and vasoneuronal remodeling after ischemia [J]. Pharmacol Res, 2019, 142: 237-250.
- [ 10 ] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2007.
- Li ZR. Experimental Acupuncture [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine; 2007.
- [ 11 ] 王珑, 张迪, 田旭升, 等. 电针对慢性应激抑郁大鼠海马 CA3 区突触可塑性的影响 [J]. 中国针灸, 2017, 37(2): 162-168.
- Wang L, Zhang D, Tian XS, et al. Effects of electroacupuncture on synaptic plasticity in hippocampal CA3 area of chronic stress depression rats [J]. Chin Acupunct Mox, 2017, 37(2): 162-168.
- [ 12 ] Kiecolt-Glaser JK, Derry HM, Fagundes CP. Inflammation: depression fans the flames and feasts on the heat [J]. Am J Psychiatry, 2015, 172(11): 1075-1091.
- [ 13 ] 欧雯雯, 张燕, 刘帮杉, 等. 抑郁症神经炎症机制的研究进展 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2020, 45(11): 1372-1377.
- Ou WW, Zhang Y, Liu BS, et al. Research progress in neuroinflammatory mechanism of depression [J]. J Central South Univ (Med Edit), 2020, 45(11): 1372-1377.
- [ 14 ] Lim DA, Alvarez-Buylla A. The adult ventricular-subventricular zone (V-SVZ) and olfactory bulb (OB) neurogenesis [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(5): a018820.
- [ 15 ] Holmes SE, Hinz R, Conen S, et al. Elevated translocator protein in anterior cingulate in major depression and a role for inflammation in suicidal thinking: a positron emission tomography study [J]. Biol Psychiatry, 2018, 83(1): 61-69.
- [ 16 ] Xiao K, Luo YM, Liang X, et al. Beneficial effects of running exercise on hippocampal microglia and neuroinflammation in chronic unpredictable stress-induced depression model rats [J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 461.
- [ 17 ] Zhang CY, Zeng MJ, Zhou LP, et al. Baicalin exerts neuroprotective effects via inhibiting activation of GSK3 $\beta$ /NF- $\kappa$ B/NLRP3 signal pathway in a rat model of depression [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 64: 175-182.
- [ 18 ] Tan Y, Tan SW, Fan BY, et al. Hemin induces the activation of NLRP3 inflammasome in N9 microglial cells [J]. Iran J Immunol, 2018, 15(2): 122-132.
- [ 19 ] Gemma C, Bachstetter AD, Cole MJ, et al. Blockade of Caspase-1 increases neurogenesis in the aged hippocampus [J]. Eur J Neurosci, 2007, 26(10): 2795-2803.

[ 收稿日期 ] 2021-12-31

蒋金金, 张国富, 董雅琪, 等. 急性 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠和酒精性脂肪肝病模型小鼠肺组织炎症的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 520-525.

Jiang JJ, Zhang GF, Dong YQ, et al. Effects of acute PM2.5 exposure on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in C57BL/6J mice and alcoholic fatty liver disease model mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 520-525.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.010

# 急性 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠和酒精性脂肪肝病模型小鼠肺组织炎症的影响

蒋金金<sup>1</sup>, 张国富<sup>2</sup>, 董雅琪<sup>1</sup>, 丁世彬<sup>1\*</sup>

(1. 江苏医药职业学院, 江苏 盐城 224005; 2. 新乡医学院, 河南 新乡 453003)

**【摘要】 目的** 研究急性 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠和酒精性脂肪肝病模型小鼠肺炎症和 NLRP3 炎性小体的影响, 为防治 PM2.5 暴露所致急性肺损伤提供靶点。**方法** 将 40 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、PM2.5 染毒组、酒精性脂肪肝病 (AFLD) 模型组和 AFLD+PM2.5 染毒组 (AFLD+PM2.5)。连续 8 周给予小鼠 Lieber-DeCarli 饮食建立 AFLD 模型, 对照组和 PM2.5 染毒组给予对照饮食。从第 9 周开始, 通过气管滴注法对 PM2.5 组和 AFLD+PM2.5 组小鼠连续 7 d 进行 PM2.5 染毒; 对照组和 AFLD 组小鼠同时气管滴注生理盐水。末次染毒结束 24 h 后将动物处死。测定小鼠血细胞计数水平; 用 HE 染色法观察肺组织的组织病理学改变; 用 ELISA 试剂盒检测 3 组小鼠肺泡灌洗液中白细胞介素 (interleukin, IL-1 $\beta$ ), IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平; 用实时定量 PCR 检测肺组织 NLRP3 炎性小体相关蛋白的 mRNA 表达水平。**结果** PM2.5 急性暴露导致小鼠肺泡间隔增宽。与对照组相比, PM2.5 染毒组和 AFLD-PM2.5 组小鼠血中白细胞和单核细胞百分以及肺泡灌洗液中炎性细胞因子 (IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ ) 含量以及肺组织 NLRP3、Caspase-1 和 ASC 的 mRNA 水平均显著增高 ( $P < 0.01$ )。此外, AFLD + PM2.5 组小鼠肺泡灌洗液中的 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平以及肺组织 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 的 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ) 均显著高于 PM2.5 染毒组。**结论** 急性 PM2.5 暴露可能通过激活肺组织 NLRP3 炎性小体导致小鼠急性肺损伤, 并且 AFLD 加重了 PM2.5 所致急性肺损伤。

**【关键词】** PM2.5; 酒精性脂肪肝病模型; NLRP3 炎性小体; 肺炎症

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0520-06

## Effects of acute PM2.5 exposure on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in C57BL/6J mice and alcoholic fatty liver disease model mice

JIANG Jinjin<sup>1</sup>, ZHANG Guofu<sup>2</sup>, DONG Yaqi<sup>1</sup>, DING Shibin<sup>1\*</sup>

(1. Jiangsu Vocational College of Medicine, Yancheng 224005, China. 2. Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003)

Corresponding author: DING Shibin. E-mail: dingshibin@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of exposure to acute levels of particulate matter (of  $< 2.5 \mu\text{m}$ ; PM2.5) on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in C57BL/6J mice and alcoholic fatty liver disease model mice, and to offer a target for the prevention and treatment of PM2.5 exposure-induced acute lung injury. **Methods**

**【基金项目】** 江苏省自然科学基金青年基金项目 (BK20210141), 江苏省卫生健康委员会医学科研项目 (M2021020)。

Funded by Natural Science Foundation for Young Scholars of Jiangsu Province (BK20210141), Medical Research Project of Jiangsu Commission of Health (M2021020).

**【作者简介】** 蒋金金 (1985—) 女, 博士, 讲师, 研究方向: 空气污染与呼吸系统疾病。Email: jiang\_jinjin1985@163.com

**【通信作者】** 丁世彬 (1982—) 男, 副教授。Email: dingshibin@163.com

Forty male C57BL/6J mice were randomly divided into four groups; control group, PM2.5 group, alcoholic fatty liver disease (AFLD) model group, and AFLD+PM2.5 group. Mice were fed the Lieber-DeCarli diet for eight weeks to establish AFLD; meanwhile, mice in the control group and PM2.5 group were fed a control diet. From the ninth week, mice in the PM2.5 group and AFLD+PM2.5 group were exposed to ambient PM2.5 by tracheal instillation for 7 consecutive days (once daily), and mice in the control group and AFLD+PM2.5 group were instilled with saline at the same time. Animals were euthanized 24 h after the last exposure. Blood cells were measured, and pathological changes in the lung tissue were observed using hematoxylin-eosin (HE) staining. Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  levels in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined using ELISA kits. The mRNA expression levels of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein (NLRP3) inflammasome-associated protein in the lung tissue were measured using real-time PCR. **Results** The lung septum in PM2.5-treated mice was widened compared with the control group. Mice in the PM2.5 group and the AFLD+PM2.5 group had a higher number of white blood cells and a higher percentage of monocytes ( $P < 0.01$ ), significantly higher levels of inflammation cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ) in the BALF ( $P < 0.01$ ), and higher mRNA levels of NLRP3, Caspase-1, and ASC ( $P < 0.01$ ) in the lung tissue compared with mice in the control group. In addition, the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in BALF and the mRNA expression of NLRP3, Caspase-1, and ASC in the lung tissue of the AFLD+PM2.5 group were significantly higher than those in the PM2.5 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Acute PM2.5 exposure may induce acute lung injury via activating the NLRP3 inflammasome in lung tissue, and AFLD aggravates PM2.5-induced acute lung injury.

**【Keywords】** PM2.5; alcoholic fatty liver disease model; NLRP3 inflammasome; lung inflammation

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

空气污染是一个严重威胁人群生命和健康的公共卫生问题,其中空气动力学直径小于或等于 2.5 微米的大气细颗粒物 (particulate matter 2.5, PM2.5) 对人体健康的危害引起越来越多的关注。目前,PM2.5 是我国空气污染物主要组成之一。悬浮在空气中的 PM2.5 随着人体呼吸进入呼吸道的细支气管和肺泡腔表面并沉积<sup>[1]</sup>,因此肺被认为是 PM2.5 暴露的直接靶器官。流行病学数据表明,PM2.5 浓度每增加 10 mg/m<sup>3</sup>,呼吸系统死亡率增加 2%<sup>[2]</sup>;长期 PM2.5 暴露与呼吸系统疾病、肺癌和心血管疾病的死亡率增加显著相关<sup>[3]</sup>。急性 PM2.5 暴露能通过引起肺组织炎症并导致实验动物的肺损伤<sup>[4-5]</sup>;且实验中选用的实验动物为健康动物和哮喘动物模型<sup>[5-6]</sup>。酒精暴露改变了吸入灰尘所致的肺组织炎症应答<sup>[7]</sup>,但 PM2.5 暴露对 AFLD 模型动物肺组织的影响尚无报道。NLRP3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein) 炎性小体是炎症反应的主要参与者,其不但参与颗粒物诱导的呼吸系统炎症<sup>[8-9]</sup>,而且与肝疾病的发生、发展有密切关系<sup>[10]</sup>,但 NLRP3 炎性小体在急性 PM2.5 致肺损伤中的作用尚未阐明。本研究主要观察急性 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠和 AFLD 模型小鼠肺炎症和肺 NLRP3 炎性小体活性的影响,为急性 PM2.5 暴露所致肺损伤的防治提供潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

40 只 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 20 ~ 24 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0002】。室温为 22 ~ 25℃,湿度 60% ~ 70%,实验期间小鼠自由摄食饲料和饮水,饲养在新乡医学院公共卫生学院实验动物房【SYXK(豫)2016-0006】,动物实验操作过程严格遵守新乡医学院实验动物伦理委员会伦理管理要求(实验动物伦理审批号:XXMU-2016-0007)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

白细胞介素 (interleukin, IL)-6, IL-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的商业化 ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司,中国);引物合成 (上海生工生物技术有限公司,中国);RNA 提取试剂盒 (北京鼎国生物技术有限公司,中国);反转录试剂盒和 SYBR 试剂盒 (北京宝生物工程(中国)有限公司,中国);石英纤维滤膜 (PALL, 美国);血细胞检测仪 (Rayto, 美国);离心机 (Eppendorf, 德国);实时荧光定量 PCR 仪 (罗氏,瑞士);全自动酶标仪 (Thermo, 美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 PM2.5 样品采集及处理

在新乡医学院科技楼 7 楼楼顶作为采样点,将石英纤维滤膜安装于大流量颗粒物采样器(Tisch Environmental,美国,TE-6070C),每日连续 24 h 采集大气 PM2.5。PM2.5 收集完成后取出石英纤维滤膜,并置于-20℃保存。将载有 PM2.5 的石英纤维滤膜剪碎,浸泡在超纯水中连续超声 20 min,然后真空干燥后称量 PM2.5 重量,用无菌生理盐水将 PM2.5 配成 7.15 mg/mL 的悬液待用。

### 1.2.2 动物分组及 PM2.5 染毒

实验动物适应性喂养 1 周后,随机分为 4 组:对照组;PM2.5 染毒组;酒精性脂肪肝模型(AFLD)组和 AFLD+PM2.5 染毒组(AFLD+PM2.5)。AFLD 组和 AFLD+PM2.5 组小鼠连续 8 周给予 Lieber-DeCarli 饲料(南通特洛非饲料科技有限公司)以建立 AFLD 模型小鼠;对照组和 PM2.5 染毒组给予对照饲料(南通特洛非饲料科技有限公司)。从第 9 周开始,PM2.5 组和 AFLD+PM2.5 组小鼠通过气管滴注的方式给予 PM2.5 (10 mg/(kg·bw))染毒,小鼠每天染毒 1 次,连续染毒 7 次。对照组和 AFLD 组小鼠同时气管滴注生理盐水。

### 1.2.3 分离小鼠血液和肺组织及检测相关指标

最后 1 次染毒结束 24 h 后,用戊巴比妥(20 mg/kg)将小鼠麻醉后,心脏穿刺取血,然后脱臼处死小鼠,分离肺组织,左肺用低温预冷 PBS 液灌洗,收集肺泡灌洗液(BALF)。用血细胞检测仪检测血细胞计数水平。按 ELISA 检测试剂盒说明书测定 IL-6,IL-1β 和 TNF-α 在 BALF 的水平。

### 1.2.4 肺组织苏木素-伊红(HE)染色

分离肺组织后,迅速将右肺组织放入 4%多聚甲醛溶液进行固定,肺组织切片 HE 染色,在显微镜下观察肺组织组织病理学和炎细胞浸润情况。

### 1.2.5 肺组织 RNA 提取及 NLRP3 炎性小体相关蛋白的 mRNA 水平检测

将 1.2 mL TRIzol 加入称量好的 100 mg 肺组织中,匀浆后按试剂盒说明书的步骤和方法提取肺组织总 RNA。依据 RNA 逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA;然后依据试剂盒说明书采用标准荧光实时定量 PCR 技术方法,扩增目的基因并检测荧光信号。将 β-actin 作为内参基因。用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 mRNA 的相对表达水平。全部引物序列如下: NLRP3 基因引物为 F5'-TGGGTTCTGGTCAGACACGAG-3', R5'-GGCGGTAATCTTCCAAATGC-3';衔接分子凋亡相关斑点样蛋白(ASC)引物为 F5'-GGAGTCGTATGGCTTGGAGC-3', R5'-CGTCCACTTCTGTGACCCTG-3';Caspase-1 引物为 F5'-TGCCGTGGAGAGAAACAAGG-3', R5'-CCCCTGACAGGATGTCTCCA-3';β-actin 引物为 F5'-TTCGTTGCCGGTCCACACCC-3', R5'-GCTTTGCACATGCCGGAGCC-3'。

## 1.3 统计学分析

研究结果用平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,并用 SPSS 25.0 统计软件包对数据统计分析。对于正态分布资料,用单因素方差分析(ANOVA)对多组均数进行比较,组间均数比较采用 Dunnett's T3 检验或 LSD 检验。对于非正态分布资料,采用非参数秩和检验对多组均数进行比较。检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 建立 AFLD 小鼠模型

为建立 AFLD 小鼠模型,在研究中使用国内外通用的 Lieber-DeCarli 饲料喂养小鼠 8 周后,通过肝 HE 染色发现:AFLD 模型组小鼠的肝细胞胞质中出现大量散在的脂肪空泡,呈脂肪变性病理改变,因此确认建模成功。

### 2.2 急性 PM2.5 染毒对 C57BL/6J 小鼠和 AFLD 小鼠血细胞的影响

由表 1 可见,PM2.5 染毒组和 PM2.5+AFLD 组小鼠的血中白细胞和单核细胞百分比显著高于对

表 1 急性 PM2.5 染毒对 C57BL/6J 小鼠和 AFLD 小鼠血细胞的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effect of acute PM2.5 exposure on blood cells in C57BL/6J mice and AFLD mice( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 分组<br>Groups            | 白细胞( $\times 10^6$ /mL)<br>WBC( $\times 10^6$ /mL) | 单核细胞(%)<br>MONO(%) | 中性粒细胞(%)<br>NEUT(%) |
|-------------------------|----------------------------------------------------|--------------------|---------------------|
| 对照组 Control             | 6.00 ± 0.34                                        | 1.49 ± 0.25        | 21.65 ± 2.57        |
| PM2.5 染毒组 PM2.5         | 6.98 ± 0.29*                                       | 2.39 ± 0.38*       | 22.73 ± 2.47        |
| AFLD 组 AFLD             | 6.07 ± 0.40                                        | 1.68 ± 0.25        | 21.26 ± 2.92        |
| AFLD+PM2.5 组 AFLD+PM2.5 | 7.44 ± 0.59**                                      | 2.81 ± 0.40**      | 21.36 ± 2.02        |

注:与对照组相比,\* $P < 0.01$ ;与 AFLD 组相比,# $P < 0.01$ 。

Note. Compared with Control, \* $P < 0.01$ . Compared with AFLD, # $P < 0.01$ .

对照组,有统计学意义( $P < 0.01$ );并且 PM2.5 + AFLD 组小鼠血中白细胞和单核细胞百分比显著高于 AFLD 组,有统计学意义( $P < 0.01$ )。但 4 组小鼠的血中性粒细胞百分比无明显差异( $P > 0.05$ )。

### 2.3 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠和 AFLD 小鼠肺组织 HE 染色的比较

由图 1 的肺组织切片 HE 染色可见,对照组和

AFLD 组小鼠肺组织未见明显异常;与对照组和 AFLD 组相比,PM2.5 染毒组和 AFLD+PM2.5 组小鼠肺泡间隔明显增宽,有明显的炎性细胞浸润;并且与 PM2.5 染毒相比,AFLD+PM2.5 组小鼠肺泡间隔明显增宽;这些结果表明急性 PM2.5 暴露能导致小鼠肺组织炎症,并且 AFLD 小鼠肺组织对 PM2.5 的炎症应答强于 C57BL/6J 小鼠。

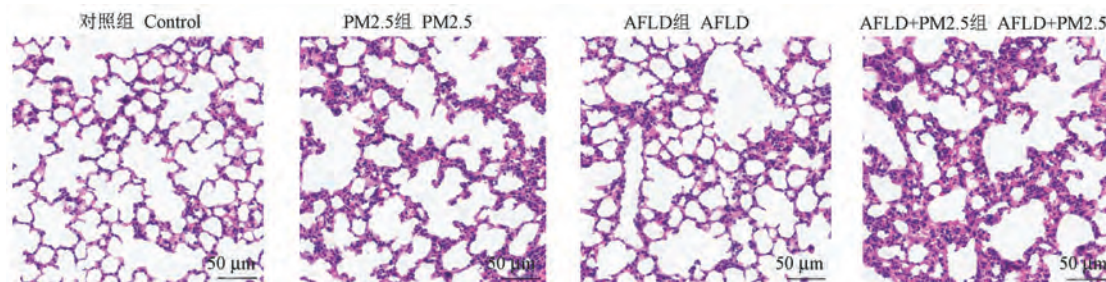


图 1 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠和 AFLD 小鼠肺组织 HE 染色的比较

Figure 1 Comparison of HE staining in the mouse lung tissues of C57BL/6J and AFLD

### 2.4 急性 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠和 AFLD 小鼠 BALF 和血清中促炎细胞因子表达的影响

由图 2 可见,PM2.5 染毒组小鼠 BALF 中 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达明显高于对照组,具有统计学意义( $P < 0.01$ );PM2.5+AFLD 组小鼠 BALF 中 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达明显高于 AFLD 组,有统计学意义( $P < 0.01$ )。此外,与 PM2.5 染毒组相比,PM2.5+AFLD 组小鼠 BALF 和血清中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达显著增高( $P < 0.05$ )。

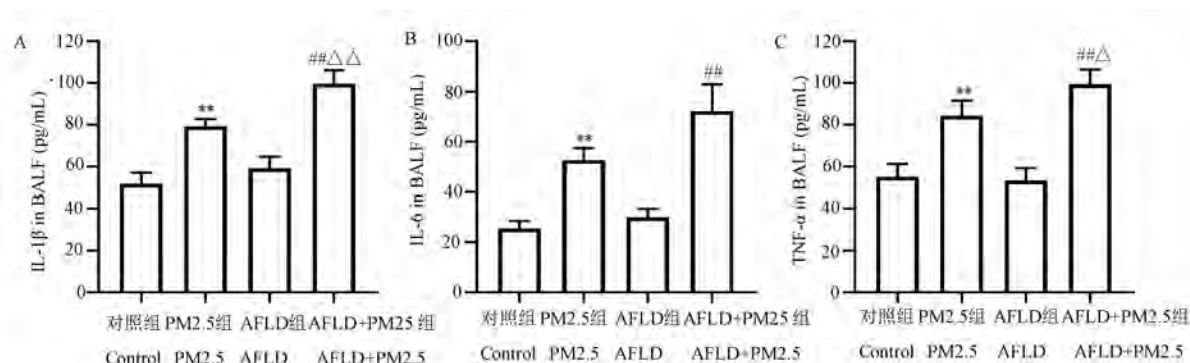
### 2.5 急性 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠和 AFLD 小鼠肺组织 NLRP3 炎症小体组成蛋白 mRNA 的影响

由图 3 可见,PM2.5 染毒组小鼠肺组织中 NLRP3, Caspase-1 和 ASC 的 mRNA 表达均显著高

于对照组,具有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );AFLD+PM2.5 组小鼠肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 的 mRNA 表达均显著高于 AFLD 组,具有统计学意义( $P < 0.01$ )。但 AFLD+PM2.5 组和 PM2.5 组小鼠的肺组织 ASC 的 mRNA 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

流行病学研究已经报道,大气 PM2.5 的增高与呼吸系统疾病(如急性上呼吸道感染、肺炎、哮喘和慢性阻塞性肺疾病)的就诊次数增加密切相关<sup>[11]</sup>。目前,炎症是 PM2.5 暴露导致机体毒性损伤的主要原因之一,但具体分子机制尚待阐明。许多动物实验研究发现,PM2.5 暴露能导致实验动物的肺炎症

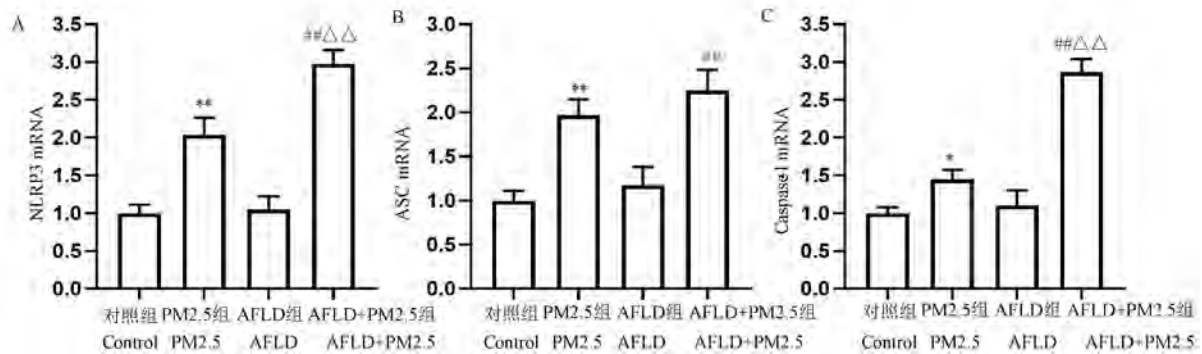


注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与 AFLD 组相比, ##  $P < 0.01$ ; 与 PM2.5 染毒组相比,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 2 急性 PM2.5 暴露对小鼠 BALF 和血清 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达的影响

Note. Compared with Control, \*\*  $P < 0.01$ . Compared with AFLD, ##  $P < 0.01$ . Compared with PM2.5,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ .

Figure 2 Effects of acute PM2.5 exposure on the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the mouse BALF and serum



注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与 AFLD 组相比, ##  $P < 0.01$ ;与 PM2.5 染毒组相比,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 3 急性 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠和 AFLD 小鼠肺组织 NLRP3 炎性小体相关蛋白 mRNA 表达的影响

Note. Compared with Control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared with AFLD, ##  $P < 0.01$ . Compared with PM2.5,  $\Delta\Delta P < 0.01$ .

Figure 3 Effects of acute PM2.5 exposure on the mRNA expression of NLRP3 inflammasome-related proteins in the mouse lung tissues of C57BL/6J and AFLD

和促炎细胞因子增加<sup>[12-13]</sup>,但这些研究大多关注 PM2.5 暴露对健康实验动物肺损伤的影响。近 20 年来我国人群的酒精消费日益增多,随之而来的是 AFLD 的患病率显著上升<sup>[14]</sup>。据我们所知,国内外关于 PM2.5 暴露对饮酒人群及 AFLD 人群肺的毒性效应影响尚无报道。本实验主要比较研究急性 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠和 AFLD 模型小鼠肺炎症和 NLRP3 炎性小体活性的影响,并分析急性 PM2.5 暴露导致肺损伤发生的可能机制。

为应对我国大气污染的严峻形势,切实改善空气质量,自 2013 年开始我国政府发布了《大气污染防治行动计划》,并采取一系列强有力的治理措施控制空气污染,近年来空气质量得到极大改善。然而,受气象条件等多种自然因素影响,目前我国许多地区和城市的 PM2.5 浓度在短期内仍能持续超过世界卫生组织(WHO)公布的关于 PM2.5 水平的第 1 个过渡阶段标准(即 24 平均 PM2.5 浓度为  $75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )。因此,本实验依据该标准并结合实验小鼠的生理参数将  $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{bw})$  的 PM2.5 暴露浓度<sup>[15]</sup>作为开展本次急性 PM2.5 暴露研究的剂量。长期 PM2.5 暴露会导致 Wistar 大鼠肺组织出现不同程度结节,肺组织出现大范围炎性反应病变<sup>[16]</sup>。本研究通过对小鼠肺组织切片 HE 染色观察发现,急性 PM2.5 暴露能导致肺泡间隔增宽,并且 PM2.5 导致 AFLD 模型小鼠的肺泡间隔增宽程度大于 PM2.5 染毒的 C57BL/6J 小鼠。炎症应答是人类对吸入颗粒物的早期反应。之前的一项研究发现,急性 PM2.5 暴露能增加 Balb/c 小鼠肺泡灌洗液和肺组织 IL-1 $\beta$  水平,并导致急性肺炎发生<sup>[17]</sup>。实验

结果显示:急性 PM2.5 暴露能显著增加 BALF 中促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和炎性细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平,并且 PM2.5 染毒的 AFLD 模型小鼠 BALF 中促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和炎性细胞因子 NF- $\alpha$  水平显著高于 PM2.5 染毒的 C57BL/6J 小鼠;以上结果表明急性 PM2.5 暴露引起小鼠肺组织发生了广泛的炎症反应,AFLD 模型小鼠可能对 PM2.5 引起的炎症反应更敏感。此外,观察到急性 PM2.5 暴露能改变白细胞数量和单核细胞百分比。更值得关注的是,PM2.5 染毒的 AFLD 模型小鼠 BALF 中炎性细胞因子及白细胞数量和单核细胞百分比的增加均显著高于 PM2.5 染毒的 C57BL/6J 小鼠,这进一步提示 AFLD 小鼠对 PM2.5 的毒性更易感。基于本课题组的前期研究,发现:慢性 PM2.5 暴露能激活小鼠肺组织 NLRP3 炎性小体,最终导致肺炎发生<sup>[17]</sup>。为探寻急性 PM2.5 暴露导致肺急性损伤的分子机制,本研究进一步评估了急性 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠和 AFLD 小鼠肺组织炎性小体组成蛋白表达水平的影响。NLRP3 炎性小体是先天免疫系统受体(即模式识别受体)的一种,其由 NLRP3 蛋白、丝氨酸蛋白酶 Caspase-1 和衔接分子凋亡相关斑点样蛋白(ASC)组成<sup>[18-19]</sup>。NLRP3 炎性小体经过多步骤过程激活后分泌 IL-1 $\beta$ ;IL-1 $\beta$  会导致发热,促进 T 细胞存活、B 细胞增殖和抗体产生,募集巨噬细胞和中性粒细胞等以诱发炎症过程<sup>[20-22]</sup>。本研究发现,急性 PM2.5 暴露能显著增加 C57BL/6J 小鼠和 AFLD 模型小鼠肺组织 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 的 mRNA 表达水平,并且 PM2.5 染毒的 AFLD 模型小鼠上述关键基因的 mRNA 表达增加的更显著,这表明急性 PM2.5 暴露能激活肺组织

NLRP3 炎性小体,并且 AFLD 模型小鼠肺 NLRP3 炎性小体变化更显著。

综上所述,急性 PM<sub>2.5</sub> 暴露能激活 NLRP3 炎性小体并导致肺组织炎症发生;此外,AFLD 患者对 PM<sub>2.5</sub> 的毒性易感,这提示 AFLD 患者是 PM<sub>2.5</sub> 毒性损伤的易感人群,并且 NLRP3 炎性小体可能是防治 PM<sub>2.5</sub> 所致急性肺损伤的新药物靶点。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Falcon-Rodriguez CI, Osornio-Vargas AR, Sada-Ovalle I, et al. Aeroparticles, composition, and lung diseases [ J ]. Front Immunol, 2016, 7: 3.
- [ 2 ] Zanobetti A, Schwartz J. The effect of fine and coarse particulate air pollution on mortality: a national analysis [ J ]. Environ Health Perspect, 2009, 117(6): 898-903.
- [ 3 ] Pun VC, Kazemiparkouhi F, Manjourides J, et al. Long-Term PM<sub>2.5</sub> exposure and respiratory, cancer, and cardiovascular mortality in older US adults [ J ]. Am J Epidemiol, 2017, 186(8): 961-969.
- [ 4 ] 全国辉,李煜,郑德生,等. PM<sub>2.5</sub> 通过激活 Nlrp3 炎性小体诱导肺炎发生 [ J ]. 毒理学杂志, 2017, 31(3): 176-181.  
Tong GH, Li Y, Zheng DS, et al. PM<sub>2.5</sub> induces inflammation response in lung of mice by activating the Nlrp3 inflammasome [ J ]. J Toxicol, 2017, 31(3): 176-181.
- [ 5 ] 熊程,赵英政,陶映君,等. 壳聚糖对 PM<sub>2.5</sub> 所致小鼠急性肺损伤的干预研究 [ J ]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 600-605.  
Xiong C, Zhao YZ, Tao YJ, et al. Intervention effect of chitosan on acute lung injury induced by PM<sub>2.5</sub> in mice [ J ]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 600-605.
- [ 6 ] Zhang XL, Zhong WQ, Meng QQ, et al. Ambient PM<sub>2.5</sub> exposure exacerbates severity of allergic asthma in previously sensitized mice [ J ]. J Asthma, 2015, 52(8): 785-794.
- [ 7 ] McCaskill ML, Romberger DJ, DeVasure J, et al. Alcohol exposure alters mouse lung inflammation in response to inhaled dust [ J ]. Nutrients, 2012, 4(7): 695-710.
- [ 8 ] Hirota JA, Hirota SA, Warner SM, et al. The airway epithelium nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein 3 inflammasome is activated by urban particulate matter [ J ]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(4): 1116-1125.
- [ 9 ] Bengalli R, Molteni E, Longhin E, et al. Release of IL-1 $\beta$  triggered by Milan summer PM<sub>10</sub>: molecular pathways involved in the cytokine release [ J ]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 158093.
- [ 10 ] 孔德龙,崔洁. NLRP3 炎性小体在肝疾病中的作用 [ J ]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8): 129-134.  
Kong DL, Cui J. Function of NLRP3 inflammasome in liver diseases [ J ]. Chin J Comp Med, 2018, 28(8): 129-134.
- [ 11 ] Zhang ZY, Chai PF, Wang JB, et al. Association of particulate matter air pollution and hospital visits for respiratory diseases: a time-series study from China [ J ]. Environ Sci Pollut Res Int, 2019, 26(12): 12280-12287.
- [ 12 ] He M, Ichinose T, Yoshida S, et al. PM<sub>2.5</sub>-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells [ J ]. J Appl Toxicol, 2017, 37(10): 1203-1218.
- [ 13 ] Mao MQ, Li J, Bi AP, et al. Thymoquinone ameliorates the PM<sub>2.5</sub>-induced lung injury in rats [ J ]. Exp Lung Res, 2020, 46(8): 297-307.
- [ 14 ] 贾艳,付怡静,刘晓阳,等. 我国酒精性脂肪肝病的研究进展 [ J ]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2014, 4(23): 376-379.  
Jia Y, Fu YJ, Liu XY, et al. Research progress of alcoholic fatty liver disease in China [ J ]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2014, 4(23): 376-379.
- [ 15 ] Zhang Y, Hu H, Shi Y, et al. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics study on repeat dose toxicity of fine particulate matter in rats after intratracheal instillation [ J ]. Sci Total Environ, 2017, 589: 212-221.
- [ 16 ] 巨英超,刘亮,贺宇彤,等. 大气细颗粒物 PM<sub>2.5</sub> 致 Wistar 大鼠肺部病变的研究 [ J ]. 肿瘤防治研究, 2017, 44(10): 652-658.  
Ju YC, Liu L, He YT, et al. Pulmonary lesions of wistar rats induced by atmospheric particulate PM<sub>2.5</sub> [ J ]. Cancer Res Prev Treat, 2017, 44(10): 652-658.
- [ 17 ] 丁世彬,高丽云,李玉春,等. 慢性 PM<sub>2.5</sub> 暴露对 C57BL/6J 小鼠肺组织炎症和 NLRP3 炎性小体活性的影响 [ J ]. 中国实验动物学报, 2019, 4(22): 444-449.  
Ding SB, Gao LY, Li YC, et al. Effects of chronic PM<sub>2.5</sub> exposure on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in C57BL/6J mice [ J ]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 4(22): 444-449.
- [ 18 ] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation [ J ]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(12): 1012-1021.
- [ 19 ] Sayan M, Mossman BT. The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases [ J ]. Part Fibre Toxicol, 2016, 13(1): 51-66.
- [ 20 ] dos Santos G, Kutuzov MA, Ridge KM. The inflammasome in lung diseases [ J ]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 303(8): 627-633.
- [ 21 ] Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity [ J ]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(2): 89-102.
- [ 22 ] 顾娜,张桂贤,史鹏程,等. PM<sub>2.5</sub> 致大鼠肺损伤模型中巨噬细胞 NLRP3 炎性小体活化研究 [ J ]. 天津医药, 2018, 46(11): 1171-1175.  
Gu N, Zhang GX, Shi PC, et al. Study of activation of NLRP3 inflammasome in lung macrophages in PM<sub>2.5</sub>-induced lung injury model [ J ]. Tianjin Med J, 2018, 46(11): 1171-1175.

[ 收稿日期 ] 2022-01-15

贺云,黄敏健,陈艺生. HBV 转基因小鼠肝原代细胞分离纯化及其在肝损伤研究中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 526-532.

He Y, Huang MJ, Chen YS. Isolation and purification of primary hepatocytes from HBV transgenic mice and their application in the study of liver injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 526-532.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.011

# HBV 转基因小鼠肝原代细胞分离纯化及其在肝损伤研究中的应用

贺云<sup>1</sup>, 黄敏健<sup>2</sup>, 陈艺生<sup>2\*</sup>

(1. 福建医科大学基础医学院, 消化道恶性肿瘤教育部重点实验室, 福建省肿瘤微生物学重点实验室, 福州 350122;  
2. 福建省立医院临床医学实验研究中心, 福建医科大学, 福州 350001)

**【摘要】 目的** 分离鉴定乙型肝炎病毒(HBV)转基因小鼠肝原代细胞,为HBV体外相关研究提供有利模型。**方法** HBV转基因C57 BL/6小鼠深度麻醉后,通过二步灌注法,首先用不含钙灌注液将肝中的血液冲洗干净,然后用含钙的IV型胶原缓冲液将肝细胞消化下,通过3次低速低温离心法纯化去除杂质,则成功分离提取肝原代细胞。进而通过糖原染色法对提取的细胞进行鉴定,并检测7d内肝细胞的增殖活力,以及第1天和第3天细胞凋亡情况。最后,将提取的肝细胞应用于过氧化氢诱导肝细胞损伤表型检测,包括细胞内活性氧、线粒体膜电位、多个氧化应激因子转录水平检测和LDH泄露情况。**结果** (1)分离的HBV小鼠肝原代细胞为典型性肝细胞形态,并呈现糖原阳性染色结果;(2)肝细胞活性检测发现肝细胞贴壁后,活性增强,第5~6天时活性最高,然后逐渐下降;(3)对比肝细胞提取后第1天和第3天的细胞死亡情况,未发生明显自发性死亡;(4)细胞通过过氧化氢诱导后,发现胞内活性氧积聚,线粒体膜电位改变,氧化应激因子转录水平上调,以及乳酸脱氢酶泄露增加。**结论** 在本实验条件下,成功分离鉴定HBV小鼠肝原代细胞,并应用于肝损伤相关实验。

**【关键词】** 原代细胞;二步灌注法;模型;肝损伤

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)04-0526-07

## Isolation and purification of primary hepatocytes from HBV transgenic mice and their application in the study of liver injury

HE Yun<sup>1</sup>, HUANG Minjian<sup>2</sup>, CHEN Yisheng<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Gastrointestinal Cancer, Ministry of Education, Fujian Key Laboratory of Tumor Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China. 2. Center for Experimental Research in Clinical Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001)

Corresponding author: CHEN Yisheng. E-mail: yisheng0813@126.com

**【Abstract】 Objective** To isolate and identify primary hepatocytes from hepatitis B virus (HBV) transgenic mice, and provide a useful model for the study of HBV *in vitro*. **Methods** HBV transgenic C57 BL/6 mice were anesthetized and primary mouse hepatocytes (PMHs) were isolated and purified via a two-step infusion method. First, the liver was flushed with a calcium-free infusion, then digested with calcium-containing type IV collagen buffer. Hepatocytes were purified by centrifugation at low-speed and low-temperature three times, and the purified PMHs were confirmed by glycogen staining. In addition, the viability of PMHs within 7 days and the apoptotic ratio on days 1 and 3 were detected. Furthermore, PMHs were used to detect the effects of liver injury induced by hydrogen peroxide, including intracellular reactive oxygen species,

**【基金项目】** 福建医科大学启航基金项目(2018QH1006,2020QH1150)。

Funded by the Startup Fund for Scientific Research, Fujian Medical University(2018QH1006, 2020QH1150)。

**【作者简介】** 贺云(1990—),女,硕士,实验师,研究方向:肿瘤微生物学。Email:hey607@126.com

**【通信作者】** 陈艺生(1989—),男,硕士,研究实习员,研究方向:肿瘤与感染。Email:yisheng0813@126.com

mitochondrial membrane potential, oxidative stress factor level detection, and lactate dehydrogenase (LDH) leakage.

**Results** (1) The PMHs isolated from HBV transgenic mice showed typical hepatocyte morphology and positive glycogen staining. (2) The viability of hepatocytes increased after being adhered to a plate, and peaked at days 5 to 6, and then decreased gradually. (3) There was no difference between the apoptosis ratio on day 1 and day 3, with no spontaneous death. (4) Hydrogen peroxide had serious effects, including reactive oxygen accumulation, a loss in mitochondrial membrane potential, upregulation of oxidative stress factors, and LDH leakage. **Conclusions** Taken together, these data indicate that the PMHs of HBV can be successfully isolated and applied to liver injury research.

**【Keywords】** Primary mouse hepatocyte; two-step infusion method; mouse model; liver injury

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

肝是机体重要器官,承担正常生理功能,包括药物、毒物代谢解毒作用。同时,肝也是毒素蓄积靶器官,易于受到损伤。肝损伤是临床常见疾病,也是各类原因所致肝疾病的病理基础和共同表现<sup>[1]</sup>。肝损伤表现为肝细胞氧化应激反应、DNA 损伤、细胞毒性反应、线粒体功能障碍和炎症反应等<sup>[2-3]</sup>。慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染可损害肝,特别是合并外来药物或其他刺激作用下,损伤作用更为明显,严重可导致肝癌发生<sup>[4]</sup>。全世界约有 2.57 亿人慢性感染 HBV<sup>[5]</sup>,中国是 HBV 感染的高发区,每年有 30 万以上的人死于 HBV 相关疾病<sup>[6]</sup>。全球卫生战略部门(Global Health Sector Strategy, GHSS)呼吁到 2030 年消除病毒性肝炎这一公共卫生威胁<sup>[7]</sup>,研究 HBV 相关肝损伤的发病机制开发有效药物刻不容缓,合适的研究载体/模型不可或缺。传统评价肝损伤的模型包括体内和体外模型,其中,体内模型包括大小鼠、兔子、犬类等;体外模型包括各种细胞株,如肝原代细胞、Huh 7 细胞系、HepG2 细胞系等。其中,肝原代细胞来源于体内,携带完整基因组,保持有体内细胞的特性,相较于细胞系,对外界刺激更为敏感,在功能性研究和机制研究中占有极大优势<sup>[8]</sup>。

肝原代细胞提取方法广义上分为两种:组织机械分散法;消化分离法。机械分散法采用剪刀剪碎,吸管吹打等物理方式将原代细胞分离出,相较之下,消化分离法更为温和,采用胰酶将细胞从组织中消化分离出,得到的细胞损伤小。二步灌注法在肝细胞分离提取中的应用极为广泛,本研究采用比胰酶更为温和、效率更高的 IV 型胶原酶,通过灌注,将 HBV 转基因小鼠的肝原代细胞从组织中分离出。分离得到的细胞经低速低温离心法纯化。该方法比传统方法效率更高、操作较为简便,得到的细胞纯度好,活率高<sup>[9]</sup>。

本文试图通过二步灌注法分离纯化得到 HBV

转基因小鼠肝原代细胞(简称肝细胞),并应用于过氧化氢( $H_2O_2$ )诱导的肝损伤研究中,初步探究该方法分离的原代细胞的应用价值,为慢性 HBV 感染的肝细胞生物学研究、药物代谢的评价以及病毒性肝炎的防治研究提供有效研究载体。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

3 只 6 周龄雄性 HBV 转基因 SPF 级 C57BL/6 小鼠,体重约为 14 ~ 16 g,购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司【SCXK(苏)2018-0008】。饲养于福建医科大学实验动物中心【SYXK(闽)2022-0003】。昼夜照明 12 h 交替,保持湿度、温度恒定。高压的纯净水,无菌营养颗粒饲料自由采食。动物实验通过福建医科大学动物伦理委员会审查(FJMU IACUC 2021-0359)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

KRB 缓冲液(索莱宝科技),IV 型胶原酶(Sigma),异氟烷(阿拉丁),DMEM 细胞培养液(Thermo),胎牛血清(FBS, PAN),青霉素和链霉素双抗生素溶液(Gibco),DNAzol(百泰克),TBE 缓冲液(索莱宝科技),DNA marker(杭州博日生物),糖原 Periodic Acid-Schiff 染色液(PAS 染色液,碧云天生物科技), $H_2O_2$ (国药集团),ROS 检测试剂盒(Thermo),线粒体 JC-1 试剂盒(Invitrogen),CCK-8(同仁生物),乳酸脱氢酶 LDH 检测试剂(瑞源生物),凋亡试剂盒(BD),SYBR Green qPCR 试剂盒(TaKaRa)。

自动细胞计数仪(Countstar),PCR 仪(伯乐),凝胶成像仪(伯乐),细胞培养箱(Thermo),流式细胞仪(BD),激光共聚焦显微镜(Leica),荧光定量 PCR 仪(安捷伦),多功能酶标仪(Bio-Tek),全自动生化分析仪(日立)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 HBV 小鼠肝原代细胞分离纯化和培养

使用 1% 浓度的异氟烷对小鼠进行麻醉,小鼠深度麻醉后,固定于操作台。乙醇消毒体表,使用无菌剪刀剪开腹部皮肤,露出腹腔。将肠整理好置于右侧,暴露出下腔静脉和肝沿静脉。取 20 mL 预热的无钙 KRB 缓冲液,由下腔静脉中下段进针,初始速度为 2 mL/min,见肝鼓起,颜色变浅时,立即间断肝沿静脉,使血液流出,灌注速度改为 4 mL/min。第一步灌注结束后,更换含 0.5% (w/v) IV 型胶原酶的含钙 KRB 缓冲液,同速进行第二步灌注。待肝表面呈现龟裂纹理,肝外形不再直立时,停止灌注。用无菌眼科剪去除肝连接的结缔组织,并转移至盛有 DMEM 的洁净培养皿中。用无菌眼科镊撕开肝被膜,释放肝细胞。使用 70 目滤网,过滤杂质。于 4℃, 1000 r/min 条件下,离心 1 min,重复 3 次去除杂质。重悬于含有 10% FBS 的 DMEM 培养液。使用自动细胞计数仪进行计数,记录活细胞率等情况。

细胞以合适的密度种植于鼠尾胶原包被的孔板中,添加含有 10% FBS 和 50 U/mL 青霉素和链霉素双抗生素溶液的 DMEM 细胞培养液,孔板置于 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 培养箱中贴壁培养。

### 1.2.2 鉴定 HBV 小鼠肝原代细胞

(1) 形态学鉴定:肝细胞培养 12 h 初步贴壁后,取出,于显微镜下观察细胞形态,并拍照。后续于提取后第 1, 3, 7 天再次取出观察,拍照。

(2) 糖原 PAS 染色鉴定:细胞爬片培养 48 h 后,按照试剂盒说明书进行操作,首先滴加 50 μL 高碘酸氧化处理 10 min,清洗后,滴加 50 μL Schiff 染色液处理 10 min,清洗后,使用苏木素进行核复染 10 min,清洗后,封片。于显微镜下观察,拍照。

(3) HBV 小鼠肝细胞鉴定:用 1 mL DNAzol 将细胞裂解,12 000 r/min 离心 5 min,取上清。然后,通 0.5 mL 无水乙醇沉淀,再经过 75% 乙醇洗涤 2 次,用 50 μL 水溶解 DNA。取 1 μg DNA 加入聚合酶链式反应(PCR)体系进行分析,以水作为阴性对照,体系为:94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 个循环。最后,于 TBE 缓冲液中进行琼脂糖电泳,凝胶成像仪观察、拍照。其中,HBV 引物序列如下:前引物 5'-TTTGTTCTAGTGGTTCGTAGG-3', 后引物:5'-TGTAAGTTGCGAGAAAGTG-3', 产物长度为 423 bp。

### 1.2.3 HBV 小鼠肝原代细胞活性和凋亡检测

本课题使用 CCK-8 试剂检测细胞增殖活力,即

细胞活性。细胞培养 12 h 初步贴壁后,取出,使用 CCK-8 工作液避光处理 1 h,用酶标仪检测波长为 450 nm 处的吸光度值(OD 值),根据试剂盒提供的公式进行数据处理,计算细胞活性,并以该时间点细胞活性为第 0 天的细胞活性。然后,其他孔的细胞分别于 1 ~ 7 d 同法操作,记录细胞活性情况。

细胞分别于提取后第 1, 3 天取出,胰酶消化下,使用 PBS 清洗 3 次,分别加入 5 μL 凋亡试剂盒中的 Annexin V 染料,于暗处染色 25 min,然后加入 5 μL PI 染料继续染色 5 min 后,用 PBS 清洗 3 次,用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

### 1.2.4 HBV 小鼠肝原代细胞损伤检测

肝损伤实验中,细胞提取、培养 24 h 后,完全贴壁状态,加入 5 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 进行处理,诱导肝细胞损伤。以未加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的细胞作为对照,培养 48 h,进行后续实验。

(1) 活性氧(ROS)检测:细胞预处理后,用 PBS 清洗 2 次,加入 2 mL 含有 25 μmol/L carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA 探针的孵育液,置于培养箱中避光孵育 25 min。然后,用 1 mmol/L Hoechst 染料复染 5 min。PBS 清洗 3 次,保持湿润状态,于激光共聚焦显微镜下观察,拍照。

(2) 线粒体膜电位检测:采用线粒体 JC-1 试剂盒对线粒体膜电位进行检测,操作如下:首先,弃去培养液,用 PBS 清洗 2 次,加入 10 μg/mL JC-1,于培养箱中处理 20 min 进行染色,PBS 清洗后,使用激光共聚焦显微镜观察激发光为 488 nm 处的细胞图像,并拍照。

(3) 实时定量荧光 PCR(RT-qPCR)检测氧化应激相关因子转录水平的表达:细胞从孔板中裂解下来,提取 RNA,逆转录成 cDNA,使用 SYBR Green qPCR 试剂盒,于荧光定量 PCR 仪中反应,以 GAPDH 为内参,检测过氧化氢酶(CAT),超氧化物歧化酶(SOD2)和单胺氧化酶(MAOA)的表达。其中,引物序列如下:GAPDH:前引物 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3', 后引物:5'-GGCATGGACTGTGCTCATGA-3'; CAT:前引物:5'-GCCAATGGCAATTACCCGTC-3', 后引物:5'-GAGTGTCCGGTAGGCAAAA-3'; SOD2:前引物:5'-AGAACCCAAAGGAGAGTTGCT-3', 后引物:5'-AGGCAGCAATCTGTAAGCGA-3'; MAOA:前引物:5'-ATCTCAGGATTGGCTGCTG-3', 后引物:5'-TTCTGTTCTGGGTTGGTCC-3'。CAT, SOD2, MAOA

产物长度分别为 277、158、183 bp。然后,目的基因的相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的方法进行数据处理,其中,  $\Delta Ct(n) = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因})$ ;  $\Delta\Delta Ct(n) = \Delta Ct(n) - \Delta Ct(1)$ 。

(4) LDH 泄露检测:留取细胞培养上清液,8000 r/min 离心去除死细胞。细胞裂解后,12 000 r/min 离心 10 min,取裂解液上清和细胞培养液,采用 LDH 检测试剂,置于全自动生化仪中检测,根据试剂盒提供公式进行换算,计算 LDH 释放量。

### 1.3 统计学分析

每组实验重复 3 次,实验结果数据表达形式为平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )。采用  $t$  检验分析统计实验组与对照组之间的差异,GraphPad Prism 7.0 统计作图,  $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 HBV 小鼠肝原代细胞分离纯化

通过二步灌注法分离纯化得到的肝细胞,经过全自动细胞技术仪计算,每只小鼠可分离得到  $(1.90 \pm 0.12) \times 10^7$  个细胞,细胞活率可达  $82.56\% \pm 0.01\%$ ,细胞直径为  $(20.4 \pm 0.07) \mu\text{m}$ ,平均圆度  $0.63 \pm 0.02$ 。由此说明该方法能够快速、高效将 HBV 转基因小鼠的肝原代细胞分离出,且细胞完整,成活率高。

### 2.2 HBV 小鼠肝原代细胞鉴定

形态学鉴定:如图 1,肝细胞分离纯化 12 h 后(即第 0 天),初步贴壁,可观察到典型的肝原代细胞形态图,细胞呈圆形或类圆形,多数具有双核或者多核。细胞培养 1 d 后,观察到肝细胞已完全贴壁,出现伪足样突起,并开始聚集。3 d 后肝细胞聚集成岛屿状,细胞形态发生变化,细胞膜进一步向外延伸形成伪足,呈现多边形结构,多数细胞多核化。第 7 天细胞形态:细胞形态发生改变,由圆形或多边形结构,变成长梭型,伪足数量减少或消失,胞体变薄,部分细胞的细胞核萎缩,呈现初步死亡状态,另外,培养皿中出现已经萎缩死亡或者已碎片化的细胞。通过这一系列形态学结构,我们可初步判定提取的细胞为肝原代细胞。

糖原 PAS 染色鉴定:提取的肝细胞需要进一步鉴定,采用 PAS 染色法,如图 2,经过 PAS 染色与苏木素复染后,细胞核为蓝色(箭头),细胞质呈浅红色,大量深红色颗粒呈散在或者成片分布于细胞质中。由此确定,所提取的细胞为肝原代细胞。

HBV 小鼠肝细胞鉴定:为了鉴定所提取细胞为 HBV 感染的肝原代细胞(见图 3),本课题将所分离的肝细胞裂解,进行 PCR 扩增,通过琼脂糖凝胶电泳,在 400 bp 上方位置可以观察到分离纯化的肝细胞具有阳性条带,此处阴性对照则无条带。

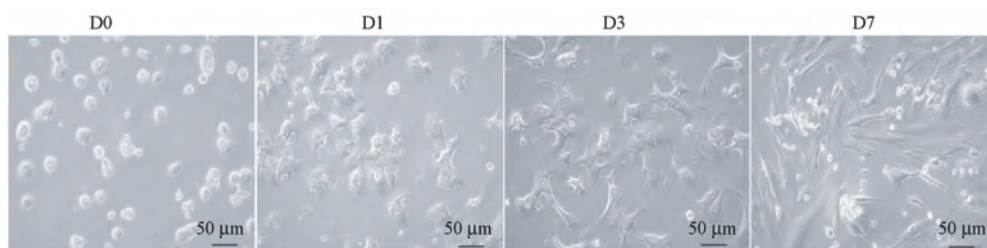


图 1 HBV 小鼠肝原代细胞形态观察

Figure 1 Morphology of cultured primary HBV mouse hepatocytes

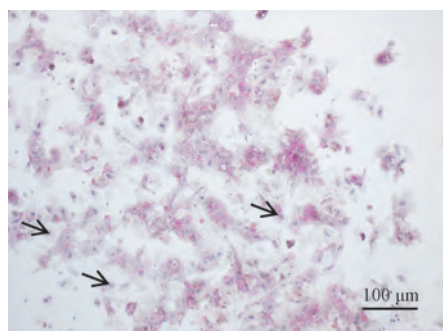


图 2 糖原染色结果

Figure 2 PAS staining

### 2.3 HBV 小鼠肝原代细胞活性和凋亡检测

首先,肝原代细胞种板贴壁,采用 CCK-8 法检测肝细胞活性,以第 0 天时检测所得细胞活性为基点,记为 100%,依次检测连续 7 d 的细胞活性,从图 4A 中可以发现在刚开始的 2 d 内,肝细胞维持刚分离纯化时的活性,但从第 3 天开始,细胞活性成倍递增,在第 5 ~ 6 天时细胞活性最高,然后出现下降趋势。细胞凋亡验证时,本课题组选取细胞增长对数期的时间点(第 3 天),以第 1 天的细胞为对照,检测细胞自发性凋亡情况。流式细胞检测结果发现,第 3 天细胞凋亡率( $11.25\% \pm 4.78\%$ )和第 1 天的

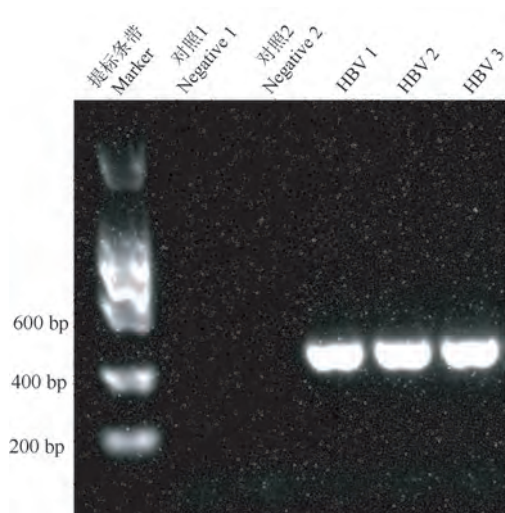


图3 HBV 小鼠肝原代细胞鉴定结果

Figure 3 Identification of cultured primary HBV mouse hepatocytes

细胞凋亡率( $10.25\% \pm 5.14\%$ )无差异( $P < 0.05$ , 图4B)。以上结果说明,肝细胞在第3天具有较高活性,且未发生自发性凋亡,适合应用于相关研究。

#### 2.4 HBV 小鼠肝原代细胞损伤检测

ROS 检测实验中(图5A),观察到对照组细胞中,代表活性氧的绿色荧光定位于细胞质中,荧光强度较弱,而  $H_2O_2$  预处理的肝细胞中,胞质中绿色

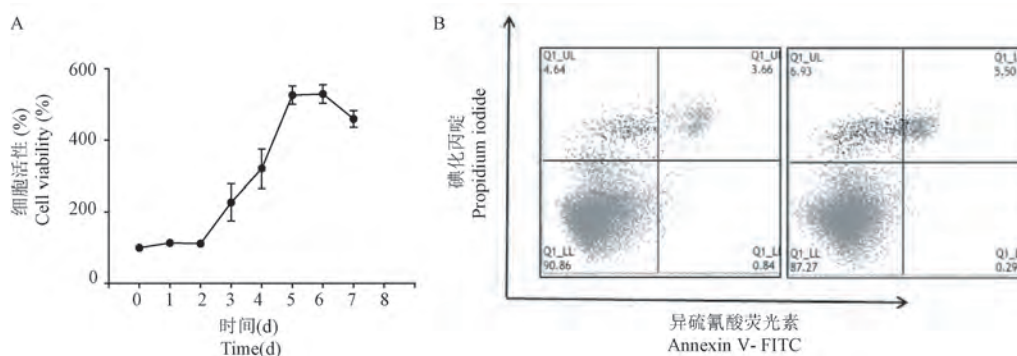
荧光强度明显增强,变亮( $P < 0.05$ ),说明细胞内活性氧积聚,发生氧化应激反应。

氧化应激过程往往伴随着相关因子变化,在氧化应激相关因子 mRNA 水平检测中,与对照组相比, $H_2O_2$  预处理组的肝细胞中,氧化应激反应相关酶 SOD2, CAT 和 MAOA 的 mRNA 表达水平明显上升( $P < 0.05$ ,图5B)。

检测细胞内线粒体膜电位改变情况,由图5C可见,对照组细胞代表高电位聚合物的红色荧光很强,而代表低电位单体的绿色荧光强度较弱,线粒体处于高膜电位状态。相较之下,实验组的红色荧光减弱,绿色荧光增强,聚合物解离成单体,线粒体膜电位去极化,功能受到损害。

细胞发生损伤时,损伤标志物 LDH 从胞内释放致胞外, $H_2O_2$  预处理的肝细胞裂解液和培养液上清分别使用全自动生化分析仪检测,通过计算,LDH 释放情况如下图5D,以对照未处理组 LDH 泄漏率为1, $H_2O_2$  组的 LDH 泄漏量明显增加,达到( $4.35 \pm 0.37$ )倍( $P < 0.05$ )。

以上实验结果表明, $H_2O_2$  造成 HBV 小鼠肝原代细胞内发生氧化应激,线粒体功能紊乱,产生细胞毒性。



注:A:第0~7天肝细胞活性检测;B:细胞凋亡检测,第3天细胞自发性凋亡细胞数。

图4 HBV 小鼠肝原代细胞活性和凋亡检测

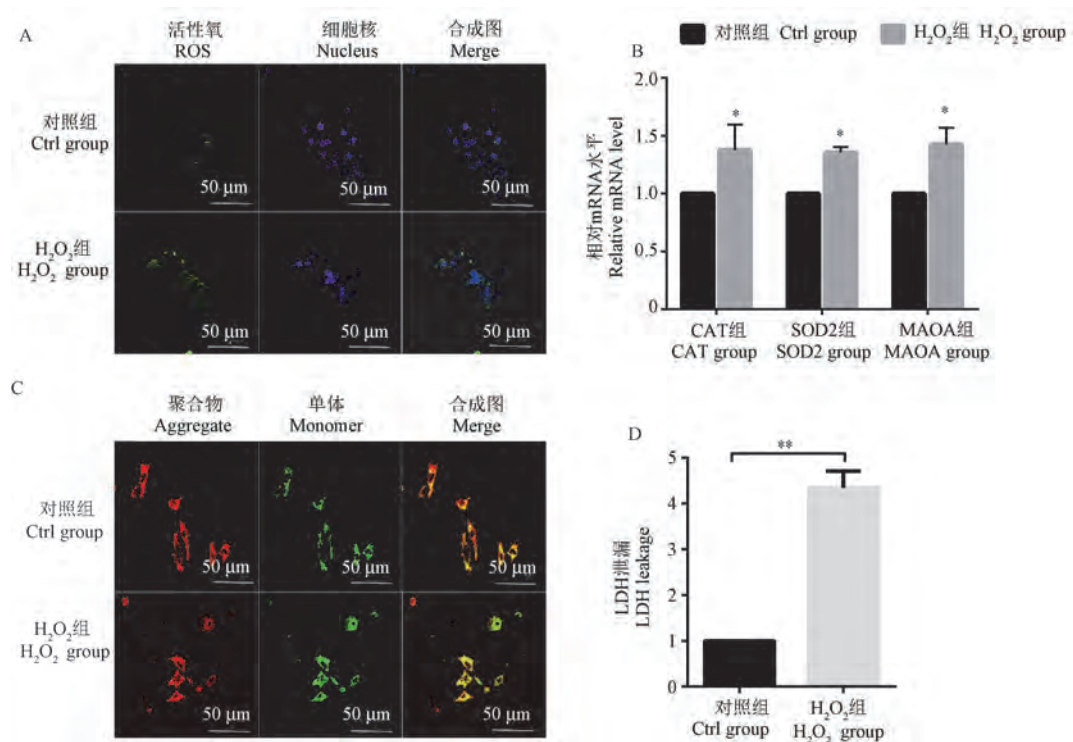
Note. A. Hepatocytes viability was detected within day 0 to day 7. B. Apoptosis of hepatocytes, on day 3.

Figure 4 Cell viability and apoptosis of cultured primary HBV mouse hepatocytes

### 3 讨论

HBV 持续感染是原发性肝癌的致病因素之一,在其发生发展过程中起重要作用<sup>[10]</sup>,对经济发展和人类健康造成极大影响。多年来,为消除这一威胁,国内外研究者致力于 HBV 各方面的研究,在此过程中,合适有效的载体必不可少。体内研究模型适用于表型研究,具有准确、可靠的特性。探究机

制则需用到体外模型,要求载体基因组稳定且可控,能够精准反映体内情况。为寻求优良体外研究载体,本课题使用二步灌注法分离纯化 HBV 转基因小鼠肝原代细胞,其操作简单,技术要求不高,对肝细胞损伤小,且易获得高量优质细胞。肝细胞分离纯化后,使用两种方法进行鉴定。首先,从形态学进行观察,新鲜分离的肝细胞边界清晰、大小均匀,具有典型性双核或多核结构。由于其形态随着培



注:使用  $H_2O_2$  处理肝细胞 48 h 后,检测细胞损伤情况;A:活性氧检测;B:氧化应激相关因子 mRNA 水平;C:线粒体膜电位检测;D:LDH 泄漏检测;与未处理组相比较, \*\*  $P < 0.05$ 。

图 5  $H_2O_2$  致 HBV 小鼠肝原代细胞损伤

Note. Injury effects were detected with  $H_2O_2$  treatment for 48 h. A. ROS detection. B. mRNA levels of oxidative stress related factors. C. Mitochondrial membrane potential detection. D. Ratio of LDH leakage. Compared with untreated group, \*\*  $P < 0.05$ .

Figure 5 Injury effects of cultured primary HBV mouse hepatocytes induced by  $H_2O_2$

养时间增加发生改变,因而简单的形态学鉴定不够严谨,故本课题后续将在培养 48 h 后对肝细胞进行糖原染色。作为糖原的合成与储存场所,肝细胞可被 PAS 染成浅红至深红色。细胞质中存在成片的阳性染色,即可判断分离纯化得到的是具有糖原合成功能的肝细胞。为确定 HBV 小鼠肝原代细胞的应用最佳时间段,检测了第 0 ~ 7 天肝细胞的活性,细胞贴壁后第 2~5 天细胞迅速增殖,处于对数增长期,适合应用于肝细胞功能和机制研究。为多方位验证,选取细胞生长对数期的时间点(第 3 天)进行流式细胞术检测,活细胞数仍可达将近 90%,且未发现自发性凋亡检测,确定第 3 天的肝细胞适用于肝细胞损伤研究。

由于所处生理环境特殊,肝细胞极易受到外界因素影响。为研究分离纯化的肝细胞对药物或外界刺激的敏感度与反应强度,本课题通过使用低浓度  $H_2O_2$  作用于肝细胞,检测细胞内氧化应激反应及相关细胞生物学行为的影响,观察肝细胞的急性损伤。 $H_2O_2$  是一种强氧化剂,可通过胞内谷胱甘肽诱导肝原代细胞损伤<sup>[11]</sup>。氧化应激是评价肝损伤

的重要指标,据报道,体内氧化与抗氧化之间的平衡被破坏可能造成肝损伤,严重可促进细胞发生凋亡<sup>[12-13]</sup>和其他报导一样<sup>[14]</sup>,ROS 探针检测发现肝细胞受到  $H_2O_2$  刺激后,发生氧化应激反应,表现为 ROS 生成增多,蓄积于细胞内。CAT 是体内抗氧化酶之一,SOD2 主要存在于线粒体内,是线粒体中重要的抗氧化酶,ROS 的清除依赖于抗氧化酶的活化<sup>[15]</sup>,因此,当机体发生氧化应激反应时,CAT 和 SOD2 表达应激性增加。MAOA 不仅是胞内活性氧的来源<sup>[16]</sup>,同时介导线粒体 ROS 传递,提高活性氧浓度<sup>[17]</sup>,所以,当  $H_2O_2$  诱发氧化应激时,MAOA 表达水平上升。线粒体是细胞内产生 ROS 的主要场所,然而,这是一个可逆过程,当 ROS 过量蓄积时,线粒体功能受到损害<sup>[18-19]</sup>。同时,线粒体功能障碍可诱发细胞凋亡<sup>[20]</sup>。肝细胞受到  $H_2O_2$  影响时,线粒体膜电位由极化变成去极化状态,揭示线粒体功能异常。产生细胞毒性是肝细胞损伤的另一表现,LDH 是一种广泛表达的酶,其释放已被用作膜损伤的标志物<sup>[21-22]</sup>。本课题通过 LDH 释放测量细胞毒性,高 LDH 泄漏率与  $H_2O_2$  造成的肝细胞损伤有关。

综上,  $H_2O_2$  促 HBV 小鼠肝原代细胞发生氧化应激, 产生细胞毒性, 发生损伤。

相比于各种 HBV 细胞株, HBV 转基因小鼠肝原代细胞来源简单, 保留体内全套遗传信息, 分离步骤简易, 成本低, 获得细胞数量大, 符合医学伦理道德规范, 能够为 HBV 发病机制研究和药物开发提供足够数量的、优质的研究载体。但由于肝原代细胞保持良好体内功能和细胞活性, 需要新鲜分离, 并于短时间内使用, 是原代细胞作为研究载体的弊端。希望今后通过不断摸索和研究, 保持原代细胞的较高增殖活性, 延长其保存期限, 保留良好体内功能, 增强原代细胞的实用性, 为克服 HBV 相关疾病提供裨益。

### 参 考 文 献 (References)

- [1] 李白雪, 张技, 吴疆, 等. 体外肝细胞损伤模型分子机制探讨 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(7): 1786-1789.  
Li BX, Zhang J, Wu J, et al. The molecular mechanism of hepatic cell injury model *in vitro* [J]. Prog Modern Biomed, 2014, 14(7): 786-1789.
- [2] Mo R, Lai R, Lu J, et al. Enhanced autophagy contributes to protective effects of IL-22 against acetaminophen-induced liver injury [J]. Theranostics, 2018, 8(15): 4170-4180.
- [3] 刘丹, 曹硕, 刘阳, 等. 地鳖肽对  $CCl_4$  诱导的慢性肝损伤小鼠的抗氧化保护作用的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 73-80.  
Liu D, Cao S, Liu Y, et al. Protective effects of ESW peptides on carbon tetrachloride induced chronic liver injury in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 73-80.
- [4] Kew MC. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis [J]. Liver Int, 2003, 23(6): 405-409.
- [5] Godoy C, Tabernero D, Sopena S, et al. Characterization of hepatitis B virus X gene quasispecies complexity in mono-infection and hepatitis delta virus superinfection [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(13): 1566-1579.
- [6] Yang FQ, Rao GR, Wang GQ, et al. Phase IIb trial of *in vivo* electroporation mediated dual-plasmid hepatitis B virus DNA vaccine in chronic hepatitis B patients under lamivudine therapy [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(2): 130-141.
- [7] World Health Organization. Global Hepatitis Report 2017 [EB/OL]. [2021-12-15] <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en>, 2017.
- [8] 贺云, 陈艺生, 任岚, 等. 微囊藻毒素-LR 对小鼠原代肝细胞线粒体功能的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 813-822.  
He Y, Chen YS, Ren L, et al. Effects of mitochondrial function in microcystin-LR-induced primary mouse hepatocytes [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 813-822.
- [9] 贾珍容, 邱银生, 王大菊, 等. 三种核苷类抗病毒药物对大鼠原代肝细胞的毒性研究 [A]. 中国畜牧兽医学兽医药理毒理学会第九次学术讨论会论文集 [C]; 2006.  
Jia ZR, Qiu YS, Wang DJ, et al. Study on the toxicity of three anti-virus drugs of nucleosides to primary hepatocytes of rats [A]. Proceedings 9th Symposium of Veterinary Pharmacology and toxicology branch of Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine [C]; 2006.
- [10] Scudellari M. Drug development: try and try again [J]. Nature, 2014, 516(7529): 4-6.
- [11] Saito C, Yan HM, Artigues A, et al. Mechanism of protection by metallothionein against acetaminophen hepatotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 242(2): 182-190.
- [12] Kang MY, Kim HB, Piao C, et al. The critical role of catalase in prooxidant and antioxidant function of p53 [J]. Cell Death Differ, 2013, 20(1): 117-129.
- [13] Samet JM, Wages PA. Oxidative stress from environmental exposures [J]. Curr Opin Toxicol, 2018, 7: 60-66.
- [14] Feng YZ, An ZM, Chen HS, et al. Ulva prolifera extract alleviates intestinal oxidative stress via Nrf2 signaling in weaned piglets challenged with hydrogen peroxide [J]. Front immune, 2020, 11: 599735.
- [15] Wang WG, Li R, Zhu QL, et al. Transcriptomic and physiological analysis of common duckweed Lemna minor responses to  $NH_4^+$  toxicity [J]. BMC Plant Biol, 2016, 16: 92.
- [16] Wu YL, He Y, Shi JJ, et al. Microcystin-LR promotes necroptosis in primary mouse hepatocytes by overproducing reactive oxygen species [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 377: 114626.
- [17] Wu JB, Shao C, Li X, et al. Monoamine oxidase A mediates prostate tumorigenesis and cancer metastasis [J]. J Clin Invest, 2014, 124(7): 2891-2908.
- [18] Voigt A, Berlemann LA, Winklhofer KF. The mitochondrial kinase PINK1: functions beyond mitophagy [J]. J Neurochem, 2016, 139: 232-239.
- [19] Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources [J]. J Endocrinol, 2017, 233(1): 15-42.
- [20] 郭朋璐, 董曼, 严晓红, 等. 雄激素对老年大鼠胃粘膜线粒体功能的影响及机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 31(11): 21-26, 34.  
Guo PL, Dong M, Yan XH. Effect and mechanism of androgens on mitochondrial functions of gastric mucosa in aged rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 31(11): 21-26, 34.
- [21] Yim TW, Perling D, Polez M, et al. A cell permeant phosphopeptide mimetic of Niban inhibits p38 MAPK and restores endothelial function after injury [J]. FASEB J, 2020, 34(7): 9180-9191.
- [22] Simon K, Andrew JP, Yuliya N, et al. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes [M]. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2017.

[收稿日期] 2021-12-20

谢舟煜,何艾舟,李婷,等. 有氧运动对肥胖大鼠内皮功能障碍和内脂素的影响[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 533-539.

Xie ZY, He AZ, Li T, et al. Effect of aerobic exercise on endothelial dysfunction and visfatin in obese rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 533-539.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.012

# 有氧运动对肥胖大鼠内皮功能障碍和内脂素的影响

谢舟煜<sup>1</sup>,何艾舟<sup>1</sup>,李婷<sup>1</sup>,魏娟<sup>1</sup>,王爱红<sup>2</sup>,吴云川<sup>1</sup>,张洪兵<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学针灸推拿学院·养生康复学院,南京 210023;2. 南京中医药大学护理学院,南京 210023)

**【摘要】 目的** 探讨有氧运动对肥胖大鼠内皮功能障碍的影响及作用机制。**方法** 通过8周高脂饲料喂养建立肥胖大鼠模型,分为正常组、模型组和有氧运动组。运动组方案为8周的中强度有氧运动,每周干预6 d,休息1 d。称量大鼠的体重、体长,内脏重量和内脏脂肪重量,并计算 Lee's 指数和脂体比;生化法检测血脂;ELISA 法检测血清血栓调节蛋白(TM)和内脂素;RT-PCR 法检测心外膜脂肪组织内脂素 mRNA 的相对表达量;HE 染色法观察主动脉形态结构的病理变化。**结果** 与正常组相比,模型组大鼠体重、体长、Lee's 指数、内脏重量、内脏脂肪重量、脂体比、血清 TG、TC、LDL、TM 和内脂素水平均明显升高( $P < 0.05$ ),HDL 水平明显降低( $P < 0.01$ ),心外膜脂肪组织中内脂素 mRNA 表达量明显升高( $P < 0.01$ );与模型组相比,有氧运动组体重、Lee's 指数、肝重量、肾周脂肪重量、血清 TG、TC、LDL、TM 和内脂素水平均明显下降( $P < 0.05$ ),HDL 水平明显升高( $P < 0.01$ ),心外膜脂肪组织中内脂素 mRNA 表达量显著降低( $P < 0.05$ )。**结论** 有氧运动能减轻肥胖大鼠的脂肪堆积,改善脂代谢功能,下调心外膜脂肪组织中内脂素的表达量,抑制内脂素分泌,减轻主动脉的病理损伤,从而达到延缓内皮功能障碍的效果。

**【关键词】** 有氧运动;肥胖;内皮功能障碍;内脂素;大鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0533-07

## Effect of aerobic exercise on endothelial dysfunction and visfatin in obese rats

XIE Zhouyu<sup>1</sup>, HE Aizhou<sup>1</sup>, LI Ting<sup>1</sup>, WEI Juan<sup>1</sup>, WANG Aihong<sup>2</sup>, WU Yunchuan<sup>1</sup>, ZHANG Hongbing<sup>1\*</sup>

(1. College of Acupuncture and Tuina and Health and Rehabilitation, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China. 2. College of Nursing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023)

Corresponding author: ZHANG Hongbing. E-mail: 270071@njucm.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of aerobic exercise on endothelial dysfunction in obese rats and determine its mechanism of action. **Methods** An obese rat model was established by feeding with a high-fat diet for 8 weeks, then the rats were divided into three groups: the normal group, model group, and aerobic exercise group. The exercise protocol consisted of 8 weeks of medium-intensity aerobic exercise, six times per week. Body weight, body length, visceral weight, and visceral fat weight were measured, and Lee's index and the liposome ratio were calculated. Blood lipids were detected using a biochemical analyzer. The levels of serum thrombomodulin (TM) and visfatin were detected

**【基金项目】**江苏高校护理学优势学科建设工程资助项目(2019YSHL063),2021年江苏省研究生科研创新计划(KYCX21\_1692)。

Funded by Jiangsu University Nursing Superior Discipline Construction Project Funding Project (2019YSHL063), Jiangsu Postgraduate Research and Innovation Plan in 2021(KYCX21\_1692).

**【作者简介】**谢舟煜(1994—),男,在读硕士研究生,研究方向:心血管病康复。Email: njxzy2019@163.com

**【通信作者】**张洪兵(1969—),男,副教授,副主任医师,博士,研究方向:心血管病的临床与基础研究,康复医学。

Email: 270071@njucm.edu.cn

using an ELISA kit. Visfatin mRNA expression in epicardial adipose tissue was detected by an RT-PCR assay. Pathological changes in aorta morphology and structure were compared using the hematoxylin-eosin staining method. **Results** Compared with the normal group, the body weight, body length, Lee's index, visceral weight, visceral fat weight, liposome ratio, and the levels of TG, TC, LDL, TM, and visfatin in the model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the level of HDL was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the expression of visfatin mRNA in epicardial adipose tissue was significantly upregulated ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, body weight, Lee's index, liver weight, perirenal fat weight, and the levels of TG, TC, LDL, TM, and visfatin in the aerobic exercise group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the level of HDL was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the expression of visfatin mRNA in the epicardial adipose tissue was significantly downregulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Aerobic exercise can reduce fat accumulation in obese rats, improve fat metabolism, downregulate the expression of visfatin in epicardial adipose tissue, inhibit visfatin secretion, and reduce pathological damage of the aorta to delay the process of endothelial dysfunction.

**【Keywords】** aerobic exercise; obesity; endothelial dysfunction; visfatin; rats

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

肥胖是一种以体内脂肪过度积累和储存,伴有体重增长的状态<sup>[1]</sup>。据报道,全球肥胖与超重人数均呈上升趋势,肥胖已成为一个公共健康问题,防治肥胖刻不容缓<sup>[1-2]</sup>。肥胖既是一种多因素的代谢疾病,同样也是心血管等疾病的高危因素<sup>[1,3]</sup>。肥胖患者通常出现血脂代谢紊乱,而脂质代谢障碍可不同程度的损害内皮细胞数量和功能<sup>[3]</sup>。内皮功能障碍作为肥胖发展过程中的一项病理产物,是动脉粥样硬化的早期病理基础<sup>[3-4]</sup>。改善内皮功能障碍是心血管疾病预防和康复的关键环节。

近年来,随着代谢疾病和心血管疾病发病率的不断上升,脂肪因子在人体的作用受到越来越多的关注。其中,内脂素作为脂肪组织的一种分泌物质,参与到动脉粥样硬化的进程中,诱导血管再生,加速斑块的形成<sup>[5]</sup>。此外,心外膜脂肪组织被认为是一个独特的脂肪储存库,通过内分泌和旁分泌功能,对心脏和冠状动脉产生深远的影响<sup>[6]</sup>。

运动疗法在疾病预防康复过程中,受到越来越多的关注,但在代谢疾病的康复治疗与心血管疾病的临床预防中尚未广泛普及。本研究拟通过高脂饮食诱导大鼠形成肥胖模型,进行中等强度有氧运动干预,研究运动对肥胖大鼠内皮功能障碍及心外膜脂肪组织中内脂素的影响,为运动疗法在心血管病早期预防的推广以及后期相关机制的深入研究提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

30 只 7 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体重约 ( $200 \pm 20$ ) g,购自南京市青龙山动物繁殖场【SCXK

(苏)2017-0001】。自由饮食、饮水,常规适应性饲养 1 周后用于实验。饲养环境:12 h 明暗交替环境,温度控制在  $20 \sim 22^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度保持在  $45\% \sim 50\%$ ,大鼠全部饲养于南京中医药大学实验动物中心屏障环境中【SCXK(苏)2018-0049】。所有实验程序均通过南京中医药大学动物实验中心伦理委员会批准(审批号:202011A012)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)测定试剂盒,均购自深圳雷杜生命科学股份有限公司;大鼠血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)和内脂素 ELISA 试剂盒,均购自上海茁彩生物科技有限公司。MICROCL21R 型离心机(Thermo, 美国),Chemray800 型全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技),Epoch 型酶标检测仪(BioTeK, 美国),CFX 型荧光定量 PCR 仪(Appliedbiosystems, 美国),YD-6L2 型生物组织冷冻包埋机(金华市益迪医疗设备有限公司),RM2235 型切片机(Leica, 德国),DM-1000 型显微镜(Leica, 德国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组与造模

适应性饲养 1 周后,先随机将 30 只大鼠分为 2 组:空白组 8 只,造模组 22 只。空白组继续普通饲料喂养;造模组改用高脂饲料喂养<sup>[7]</sup>(高脂饲料:45%脂肪,35%碳水化合物,20%蛋白质),喂养 8 周后称重。造模成功标准<sup>[8]</sup>:高脂饲料喂养的大鼠体重超出空白组大鼠平均体重的 20%。最终,造模组成模 16 只。将成模大鼠分为 2 组:模型组和有氧运动组,每组各 8 只。

### 1.2.2 干预措施

空白组:全程普通饲料喂养,不进行有氧运动干预,饲养 8 周;模型组:全程高脂饲料喂养,不进行有氧运动干预,饲养 8 周;有氧运动组:全程高脂饲料喂养,并进行有氧运动干预。有氧运动:参考 Bedford 的动物运动负荷标准<sup>[9]</sup>,选取中强度有氧运动,采用无负重动物实验跑台进行训练,跑台坡度为 0°。有氧运动初始速度为 15 m/min,时间 15 min,往后每天速度增加 1 m/min,时间增加 5 min,直到速度为 20 m/min,时间为 60 min,每周干预 6 d,休息 1 d,干预 8 周。

### 1.2.3 一般情况

每周日观察并记录各组大鼠的体重、体长(为鼻尖到肛门的距离),并计算 Lee's 指数<sup>[10]</sup>。取材后,称取肝、肾、肾周脂肪和附睾周围脂肪的重量,并计算脂体比<sup>[10-11]</sup>。

Lee's 指数 = [体重(g)<sup>1/3</sup> × 1000]/体长(cm)  
脂体比 = [附睾周围脂肪重量(g) + 肾周脂肪重量(g)]/体重(g) × 100%

### 1.2.4 血脂检测

在末次运动干预结束 24 h 后,各组禁食 12 h 后取材。用 20% 乌拉坦按 7 mL/kg 量对大鼠进行腹腔麻醉,腹主动脉取血,静置 4 h 后,以 3500 r/min 离心 15 min,分离血清并分装,存于 -80℃ 冰箱保存。采用全自动生化仪自动测定 TG、TC、HDL 及 LDL 含量。

### 1.2.5 血清检测

按照 ELISA 试剂盒说明加样、加酶、温育、配液、洗涤、显色、终止,用酶标仪依序测定各样本吸光度,以标准品的浓度为纵坐标,OD 值为横坐标,绘出标准曲线,查出各样本相应的 TM 和内脂素含量。

### 1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测心外膜脂肪组织中内脂素 mRNA 的表达量

取材取血后,分离心外膜脂肪组织,迅速放入液氮罐中。样本采集结束后,从液氮罐中取出组织分装并转移到 -80℃ 冰箱保存。采用 RNA 提取液提取心外膜脂肪组织中的总 RNA,并将 RNA 反转录为 cDNA,根据设计的引物进行 PCR 合成(见表 1)。PCR 反应条件为:95℃ 10 min 预变性,95℃ 15 s 变性,60℃ 30 s 火焰,72℃ 1 min 延伸,40 个循环。每组平行设 3 个复孔,以 GAPDH 作为内参照。按照各目的基因的 CT 值,用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法比较 mRNA 的表达。

表 1 引物序列

| Table 1 Primer sequence |                                |                    |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------|
| 引物<br>Primer            | 序列<br>Sequence                 | 大小(bp)<br>Size(bp) |
| GAPDH                   | F:5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3' | 138                |
|                         | R:5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGCT-3'   |                    |
| 内脂素<br>Visfatin         | F:5'-CTTTGCTTGTGTTGGGTGGG-3'   | 86                 |
|                         | R:5'-GGCAGAAGCCGAGTTCAACA-3'   |                    |

### 1.2.7 主动脉苏木精-伊红(HE)染色

取材取血后,剥离每只大鼠主动脉,存放于 4% 多聚甲醛溶液中固定 1 d。选取主动脉弓部组织 3 mm 进行洗涤、脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色、中性树脂封片,显微镜下观察主动脉形态结构的病理变化。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。数据采用平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间数据比较采用单因素方差分析,两两间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体重、体长和 Lee's 指数的变化

表 2 显示,与正常组比,模型组和有氧运动组大鼠体重、体长干预前后均明显升高( $P < 0.01$ ),Lee's 指数干预前上升显著( $P < 0.05$ ),干预后均有下降趋势,但有氧运动组差异更具有显著性( $P < 0.05$ );与模型组比,有氧运动组大鼠体重、体长、Lee's 指数干预前均无差异( $P > 0.05$ ),干预后体重和 Lee's 指数均下降明显( $P < 0.01$ )。与干预前比,正常组和模型组干预后大鼠的体重、体长和 Lee's 指数均明显升高( $P < 0.01$ ),有氧运动组干预后大鼠的体重变化无统计学意义( $P > 0.05$ )、体长明显变长( $P < 0.01$ )、Lee's 指数明显降低( $P < 0.01$ )。

### 2.2 内脏重量、内脏脂肪重量和脂体比的比较

表 3 显示,与正常组相比,模型组和有氧运动组肝重量、肾重量、肾周脂肪重量和脂体比均明显升高( $P < 0.01$ ),模型组附睾周围脂肪重量明显上升( $P < 0.01$ ),有氧运动组附睾周围脂肪重量升高显著( $P < 0.05$ );与模型组相比,有氧运动组肝重量、肾周脂肪重量均明显降低( $P < 0.01$ )。

### 2.3 血脂、TM 和内脂素的比较

表 4 显示,与正常组相比,模型组的 TG、TC、LDL、TM 和内脂素水平均明显升高( $P < 0.01$ ),有

表 2 各组大鼠干预前后体重、体长和 Lee's 指数的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )Table 2 Changes in body weight, length and Lee's index of rats in each group before and after intervention ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别<br>Groups      | 体重(g) Weight(g)                |                                     | 体长(cm) Length(cm)            |                                   | Lee's 指数 Lee's index          |                                     |
|-------------------|--------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
|                   | 干预前<br>Before                  | 干预后<br>After                        | 干预前<br>Before                | 干预后<br>After                      | 干预前<br>Before                 | 干预后<br>After                        |
| 正常组<br>Normal     | 429.7 $\pm$ 21.8               | 515.5 $\pm$ 31.5 <sup>&amp;</sup>   | 20.1 $\pm$ 0.6               | 25.8 $\pm$ 0.8 <sup>&amp;</sup>   | 375.1 $\pm$ 11.2              | 311.6 $\pm$ 11.8 <sup>&amp;</sup>   |
| 模型组<br>Model      | 570.0 $\pm$ 26.8 <sup>**</sup> | 682.0 $\pm$ 22.3 <sup>**&amp;</sup> | 21.2 $\pm$ 0.4 <sup>**</sup> | 28.6 $\pm$ 0.6 <sup>**&amp;</sup> | 390.8 $\pm$ 12.5 <sup>*</sup> | 308.1 $\pm$ 7.9 <sup>&amp;</sup>    |
| 有氧运动组<br>Exercise | 562.2 $\pm$ 20.8 <sup>**</sup> | 559.2 $\pm$ 19.6 <sup>**##</sup>    | 21.2 $\pm$ 0.5 <sup>**</sup> | 28.0 $\pm$ 0.4 <sup>**&amp;</sup> | 389.9 $\pm$ 10.8 <sup>*</sup> | 294.5 $\pm$ 4.4 <sup>*##&amp;</sup> |
| <i>F</i>          | 91.931                         | 95.324                              | 11.071                       | 45.663                            | 4.669                         | 8.840                               |
| <i>P</i>          | < 0.001                        | < 0.001                             | 0.001                        | < 0.001                           | 0.021                         | 0.002                               |

注:与正常组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ;与干预前相比, &  $P < 0.01$ 。(下表同)

Note. Compared with the normal group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared with the model group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ . Compared with before the intervention, &  $P < 0.01$ . (The same in the following tables)

表 3 各组大鼠内脏重量、内脏脂肪重量和脂体比的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )Table 3 Comparison of visceral weight, visceral fat weight and fat body ratio of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别<br>Groups      | 肝重量(g)<br>Liver weight(g)        | 肾重量(g)<br>Kidney weight(g)    | 附睾周围脂肪重量(g)<br>Epididymal fat weight(g) | 肾周脂肪重量(g)<br>Perirenal fat weight(g) | 脂体比(g)<br>Fat body ratio(%)   |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
|                   |                                  |                               |                                         |                                      |                               |
| 正常组<br>Normal     | 10.44 $\pm$ 1.46                 | 2.61 $\pm$ 0.37               | 3.80 $\pm$ 0.59                         | 4.49 $\pm$ 2.04                      | 1.62 $\pm$ 0.50               |
| 模型组<br>Model      | 28.18 $\pm$ 4.31 <sup>**</sup>   | 3.28 $\pm$ 0.21 <sup>**</sup> | 7.76 $\pm$ 2.38 <sup>**</sup>           | 13.51 $\pm$ 2.63 <sup>**</sup>       | 3.12 $\pm$ 0.67 <sup>**</sup> |
| 有氧运动组<br>Exercise | 22.88 $\pm$ 2.68 <sup>**##</sup> | 3.17 $\pm$ 0.44 <sup>**</sup> | 6.39 $\pm$ 1.86 <sup>*</sup>            | 9.84 $\pm$ 2.93 <sup>**##</sup>      | 2.91 $\pm$ 0.83 <sup>**</sup> |
| <i>F</i>          | 71.350                           | 8.330                         | 10.238                                  | 25.083                               | 11.344                        |
| <i>P</i>          | < 0.001                          | 0.002                         | 0.001                                   | < 0.001                              | < 0.001                       |

氧运动组的 LDL 和 TM 水平均明显升高 ( $P < 0.01$ ), 模型和有氧运动组的 HDL 均明显下降 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 有氧运动组 TG、TC、LDL、TM 和内脂素水平均明显下降 ( $P < 0.01$ ), HDL 水平明显上升 ( $P < 0.01$ )。

#### 2.4 心外膜脂肪组织中内脂素 mRNA 表达量的比较

图 1 显示, 与正常组相比, 模型和有氧运动组心外膜脂肪组织中内脂素 mRNA 的表达量均明显升高 ( $P < 0.01$ ), 模型组增高到 6.5 倍, 有氧运动组增

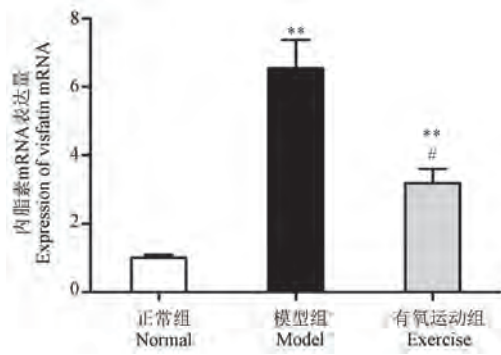
高到 3.2 倍; 与模型组相比, 有氧运动组心外膜脂肪组织中内脂素 mRNA 表达量显著下降 ( $P < 0.05$ )。

#### 2.5 主动脉 HE 染色的比较

图 2 显示, 正常组主动脉形态完整、结构清晰, 细胞排列紧致, 内皮细胞扁平光滑完整, 中膜平滑肌细胞厚薄均匀; 模型组细胞排列紊乱, 内皮细胞出现损伤和坏死脱落, 中膜增生变厚, 管壁松弛, 平滑肌细胞体积增大, 并出现大量泡沫细胞; 有氧运动组细胞排列相对整齐, 内皮细胞较完整, 中膜平滑肌细胞轻度增生, 伴有少许泡沫细胞。

表 4 各组大鼠血脂、TM 和内脂素的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )Table 4 Comparison of blood lipids, TM and visfatin of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别<br>Groups      | TG (mmol/L)                     | TC (mmol/L)                     | HDL (mmol/L)                      | LDL (mmol/L)                      | TM (ng/mL)                        | 内脂 (ng/mL)<br>Visfatin (ng/mL)   |
|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|                   |                                 |                                 |                                   |                                   |                                   |                                  |
| 正常组<br>Normal     | 0.531 $\pm$ 0.076               | 1.431 $\pm$ 0.158               | 1.212 $\pm$ 0.236                 | 0.133 $\pm$ 0.066                 | 5.848 $\pm$ 1.165                 | 20.795 $\pm$ 3.198               |
| 模型组<br>Model      | 0.835 $\pm$ 0.159 <sup>**</sup> | 2.019 $\pm$ 0.218 <sup>**</sup> | 0.389 $\pm$ 0.067 <sup>**</sup>   | 0.578 $\pm$ 0.133 <sup>**</sup>   | 15.825 $\pm$ 1.390 <sup>**</sup>  | 42.129 $\pm$ 6.110 <sup>**</sup> |
| 有氧运动组<br>Exercise | 0.592 $\pm$ 0.192 <sup>##</sup> | 1.470 $\pm$ 0.213 <sup>##</sup> | 0.671 $\pm$ 0.115 <sup>**##</sup> | 0.331 $\pm$ 0.072 <sup>**##</sup> | 8.558 $\pm$ 1.655 <sup>**##</sup> | 23.458 $\pm$ 2.947 <sup>##</sup> |
| <i>F</i>          | 9.171                           | 22.084                          | 57.092                            | 43.507                            | 105.960                           | 57.663                           |
| <i>P</i>          | 0.001                           | < 0.001                         | < 0.001                           | < 0.001                           | < 0.001                           | < 0.001                          |



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

图1 各组大鼠心外膜脂肪组织中内脂素 mRNA 相对表达量的比较

Note. Compared with the normal group, \*\*  $P < 0.01$ . Compared with the model group, #  $P < 0.05$ .

Figure 1 Comparison of the expression of Visfatin mRNA in the epicardial adipose tissue of rats in each group

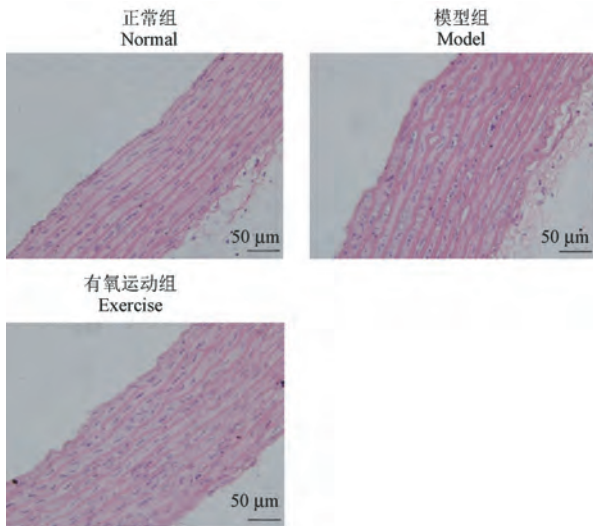


图2 大鼠主动脉形态结构(HE染色, ×400)

Figure 2 Morphology and structure of rat aorta (HE staining, ×400)

### 3 讨论

肥胖作为一种代谢性疾病,也是心血管疾病的高危因素,往往会引起糖脂代谢功能的紊乱,对血管内皮功能造成一定的损伤<sup>[3,7-8,12]</sup>。有氧运动能够改善肥胖,对代谢相关疾病起着治疗作用<sup>[8]</sup>。而运动能否改善肥胖造成的内皮功能障碍,延缓动脉粥样硬化的进程,对心血管疾病的预防和康复有着重要意义。本研究通过高脂饮食诱导肥胖大鼠模型的建立,并进行8周的有氧运动干预,来观察运动对肥胖造成的体重增大、脂代谢紊乱、血管内皮功

能障碍,以及心外膜脂肪组织中内脂素 mRNA 的表达和主动脉形态变化的影响,旨在探究运动对肥胖导致的动脉粥样硬化早期病理基础内皮功能障碍的治疗效果,为心血管疾病的预防和康复提供理论依据。

肥胖形成的脂质堆积,严重损害了血管内皮功能<sup>[3]</sup>。研究发现,肥胖会出现 TC、TG、LDL 的升高和 HDL 的降低,而血管内皮舒张功能与此密切相关<sup>[3,7]</sup>。TM 作为一种血管内重要的凝血抑制因子,大量存在于血管内皮细胞表面,当内皮细胞损伤时,表面的 TM 出现脱落<sup>[13]</sup>。因此, TM 被认为是诊断内皮功能障碍的一个重要指标<sup>[13]</sup>。本研究发现,模型组肥胖大鼠的体重、Lee's 指数、内脏重量、内脏脂肪含量、脂体比和 TM 水平均明显高于正常组,这印证了肥胖诱导的脂代谢紊乱会对内皮功能造成损伤,治疗肥胖、改善内皮功能是心血管疾病早期预防的关键。

心外膜脂肪组织是一个复杂的内分泌器官,它能够通过内分泌、旁分泌和血管分泌等渠道,产生各类细胞因子和脂肪因子,调节血管功能<sup>[6]</sup>。其中,内脂素是一种有促炎反应特性的脂肪因子,能加速斑块的形成,与内皮功能障碍的发生关系密切,可作为预测冠状动脉粥样硬化严重程度的重要参考指标<sup>[5,14-15]</sup>。Romacho 等<sup>[16]</sup>研究发现,内脂素通过 Namp1 依赖性 TLR4 介导的途径,上调 NLRP3 炎症小体的表达,诱导 IL-1 $\beta$  的释放,导致小鼠内皮功能障碍。另有研究发现,内脂素通过 NF- $\kappa$ B 途径促炎性介质诱导内皮祖细胞凋亡,加速了内皮功能的损伤,而通过内脂素拮抗剂的使用,可阻断 NF- $\kappa$ B 信号通路,抑制内脂素诱导的炎症因子表达的上调,从而改善内皮功能障碍<sup>[17-18]</sup>。体外细胞实验发现,内脂素能激活内皮细胞 ERK1/2 通路,产生活性氧并诱导内皮素 1 (ET-1) 的分泌,而 ET-1 的活性增强,会加速内皮功能障碍的发展<sup>[19]</sup>。本研究显示,高脂饮食诱导的肥胖大鼠血清中内脂素水平的显著提高,心外膜脂肪组织中内脂素 mRNA 表达含量的显著升高,以及主动脉形态结构的损伤,都提示肥胖造成的脂质代谢异常,脂肪的堆积,会诱导心外膜脂肪组织中促炎脂肪因子内脂素的释放,进而影响主动脉功能,造成内皮功能障碍的发生。这表明肥胖造成的心外膜脂肪中脂肪因子内脂素的异常分泌,可能与内皮功能障碍的发生以及动脉粥样硬化的形成关系密切。而炎症反应可能是其中重

要的一环,也是我们后期研究的重点。

有研究发现,运动可以显著提高内皮祖细胞的数量,促进血管损伤后的修复,保护内皮功能,抑制动脉粥样硬化的发展<sup>[20-21]</sup>。Kadoglou 等<sup>[15]</sup>发现,6 个月的有氧运动降低了 2 型糖尿病患者血清内脂素的水平,同时改善了颈动脉内中膜的厚度,且二者间呈现相关性。另有研究发现,在急性运动干预后的 3、4、5 和 6 h 内,脂肪组织中内脂素的 mRNA 表达上调,而血浆内脂素水平和骨骼肌中内脂素的 mRNA 表达不受影响,这表明内脂素在运动后的恢复期具有局部代谢作用<sup>[22]</sup>。而 Christensen 等<sup>[23]</sup>也证实,有氧运动可以减少心外膜脂肪组织量,这对心血管疾病的预防十分重要。本研究显示,与模型组肥胖大鼠比,有氧运动组大鼠的体重、Lee's 指数、内脏脂肪重量和脂体比均显著降低,血清 TG、TC、LDL、TM 和内脂素水平均显著下降,HDL 水平显著上升,心外膜脂肪组织中内脂素 mRNA 的表达显著下调,主动脉的病理损伤减轻,这提示有氧运动可以改善肥胖大鼠的内皮功能障碍,其机制可能是通过减少脂肪含量,改善脂代谢功能,下调心外膜脂肪组织中内脂素的基因表达,进而抑制内脂素的分泌,达到延缓内皮功能障碍进程的效果。

## 4 结论

本研究通过观察高脂饮食诱导肥胖大鼠的脂肪堆积、脂代谢功能及主动脉形态结构的变化,发现肥胖诱导的内皮功能障碍可能与脂肪因子内脂素的分泌异常关系密切。而有氧运动能够延缓肥胖大鼠内皮功能障碍的进程,减轻主动脉的病理损伤,抑制动脉粥样硬化的形成与发展,这可能与运动消耗了堆积的脂肪,改善了脂代谢功能的紊乱,下调了心外膜脂肪组织中内脂素的表达,抑制了内脂素的分泌有关。这对心血管疾病的早期预防具有重大指导意义,也为康复运动干预心血管疾病机制的深入研究奠定了一定的理论基础。

### 参 考 文 献(References)

- [1] Atawia RT, Bunch KL, Toque HA, et al. Mechanisms of obesity-induced metabolic and vascular dysfunctions [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019, 24(5): 890-934.
- [2] 刘月皎.《中国居民营养与慢性病状况报告(2020 年)》发布[J]. *中国食物与营养*, 2020, 26(12): 2.  
Liu YJ. "Report on nutrition and chronic disease status of Chinese residents (2020)" released [J]. *Food Nutr Chin*, 2020, 26(12): 2.
- [3] Engin A. Endothelial dysfunction in obesity [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 960: 345-379.
- [4] Gutiérrez E, Flammer AJ, Lerman LO, et al. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(41): 3175-3181.
- [5] Heo YJ, Choi SE, Jeon JY, et al. Visfatin induces inflammation and insulin resistance via the NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling pathways in hepatocytes [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 4021623.
- [6] Ross MD, Wekesa AL, Phelan JP, et al. Resistance exercise increases endothelial progenitor cells and angiogenic factors [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2014, 46(1): 16-23.
- [7] 朱磊, 路瑛丽, 冯连世, 等. 不同配方高脂饲料构建 SD 大鼠肥胖模型的实验研究 [J]. *中国运动医学杂志*, 2016, 35(7): 642-647.  
Zhu L, Lu YL, Feng LS, et al. Experimental study on establishing obese model of male SD rat with different fat percentages in high-fat diet [J]. *Chin J Sports Med*, 2016, 35(7): 642-647.
- [8] 罗勇, 黄金玲. 8 周有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌炎症及运动能力的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(5): 637-643.  
Luo Y, Huang JL. Effects of 8 weeks' aerobic exercise on the skeletal muscle inflammation and exercise ability of obese mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(5): 637-643.
- [9] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures [J]. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1979, 47(6): 1278-1283.
- [10] Xue LJ, Han JQ, Zhou YC, et al. Untargeted metabolomics characteristics of nonobese nonalcoholic fatty liver disease induced by high-temperature-processed feed in Sprague-Dawley rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(46): 7299-7311.
- [11] 陈丽, 杜天玺, 黎绍尹, 等. 儿童单纯性肥胖小鼠模型的制作 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(5): 69-73, 107.  
Chen L, Du TX, Li SY, et al. Establishment of a mouse model of childhood simple obesity [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2013, 21(5): 69-73, 107.
- [12] 李颖, 林文骏, 翁锡全. 不同运动强度干预 2 型糖尿病模型大鼠的内脂素及糖代谢变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(26): 4196-4200.  
Li Y, Lin WT, Weng XQ. Effects of different exercise intensities on visfatin level and glucose metabolism in type 2 diabetic rats [J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*, 2020, 24(26): 4196-4200.
- [13] Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases [J]. *Virulence*, 2013, 4(6): 507-516.
- [14] 王庆丽, 宋成伟, 卢颖, 等. 血清内脏脂肪素、脂肪细胞型脂肪结合蛋白对冠状动脉粥样硬化程度的评估价值 [J]. *山东医药*, 2016, 56(17): 41-43.  
Wang QL, Song CW, Lu Y, et al. The evaluation value of serum visceral fat and adipocyte fatty acid-binding protein for the degree

- of coronary atherosclerosis [J]. Shandong Med J, 2016, 56 (17): 41-43.
- [15] Kadooglou NP, Fotiadis G, Kapelouzou A, et al. The differential anti-inflammatory effects of exercise modalities and their association with early carotid atherosclerosis progression in patients with type 2 diabetes [J]. Diabet Med, 2013, 30(2): e41-50.
- [16] Romacho T, Valencia I, Ramos-González M, et al. Visfatin/eNampt induces endothelial dysfunction *in vivo*: a role for Toll-Like Receptor 4 and NLRP3 inflammasome [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 5386.
- [17] Sun L, Chen S, Gao H, et al. Visfatin induces the apoptosis of endothelial progenitor cells via the induction of pro-inflammatory mediators through the NF- $\kappa$ B pathway [J]. Int J Mol Med, 2017, 40(3): 637-646.
- [18] Shi KL, Qian JY, Qi L, et al. Atorvastatin antagonizes the visfatin-induced expression of inflammatory mediators via the upregulation of NF- $\kappa$ B activation in HCAECs [J]. Oncol Lett, 2016, 12(2): 1438-1444.
- [19] 李杰. 内脂素对人脐静脉内皮细胞内皮素-1 表达的影响及机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学; 2018.
- Li J. Effect and mechanism of visfatin on endothelin-1 expression in human umbilical vein endothelial cells [D]. Shenyang: China Medical University; 2018.
- [20] Cavalcante SL, Lopes S, Bohn L, et al. Effects of exercise on endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Rev Port Cardiol, 2019, 38(11): 817-827.
- [21] Kim K, Ahn N, Jung S. Comparison of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial biogenesis responses after 12 weeks of treadmill running and ladder climbing exercises in the cardiac muscle of middle-aged obese rats [J]. Braz J Med Biol Res, 2018, 51(10): e7508.
- [22] Frydelund-larsen L, Akerstrom T, Nielsen S, et al. Visfatin mRNA expression in human subcutaneous adipose tissue is regulated by exercise [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 292(1): 24-31.
- [23] Christensen RH, Wedell-neergaard AS, Lehrslov LL, et al. Effect of aerobic and resistance exercise on cardiac adipose tissues: secondary analyses from a randomized clinical trial [J]. JAMA Cardiol, 2019, 4(8): 778-787.

[收稿日期] 2021-12-11

冯利,陈颖,胡晓茹,等. 代谢组学在航天医学研究中应用的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 540-546.

Feng L, Chen Y, Hu XR, et al. Research progress in metabolomics related to aerospace medicine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 540-546.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.013

# 代谢组学在航天医学研究中应用的研究进展

冯利<sup>1</sup>, 陈颖<sup>2\*</sup>, 胡晓茹<sup>3</sup>, 刘新民<sup>4</sup>

(1. 国家开放大学医药学院, 北京 100039; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 4. 中国医学科学院 & 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

**【摘要】** 航天员在航天飞行时暴露于微重力、太空辐射、孤独、噪音、震动、狭小空间等, 这些因素会干扰机体的稳态, 引发一系列不适症状。深入了解这些因素对机体影响的机制对确保载人航天任务的顺利实施非常重要。本文从 Pubmed、CNKI 等数据库检索相关文献并总结了航天因素影响人体或实验动物的代谢组学研究以深入了解机体是如何适应航天极端环境以及航天因素对机体影响的分子机制, 为制定个性化防护措施, 提高航天飞行的安全性提供依据。

**【关键词】** 代谢组学; 航天医学; 微重力; 航天飞行因素; 个性化防护

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0540-07

## Research progress in metabolomics related to aerospace medicine

FENG Li<sup>1</sup>, CHEN Ying<sup>2\*</sup>, HU Xiaoru<sup>3</sup>, LIU Xinmin<sup>4</sup>

(1. School of Medicine, the Open University of China, Beijing 100039, China. 2. the Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700. 3. China National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050. 4. the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193)

Corresponding author: CHEN Ying. E-mail: ychen@icmm.ac.cn

**【Abstract】** Astronauts are exposed to microgravity, space radiation, loneliness, noise, vibration, sleep interference, and other negative factors during space flight. These factors interfere with the body's steady state and cause a series of uncomfortable symptoms. An in-depth understanding of the mechanism by which these factors impact on the body is important to ensure the smooth implementation of crewed space missions. This study searched the metabolomics research on the impact of aerospace factors on the human body and experimental animals using the PubMed, CNKI and other databases as resources. The aim of this literature review was to gain a deeper understanding of how the body adapts to the extreme space environment and the molecular mechanisms responsible for the impact of aerospace factors on the body, so as to provide a basis for formulating personalized protective measures and improving the safety of space flight.

**【Keywords】** metabolomics; aerospace medicine; microgravity; spaceflight factors; personalized protection

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

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (82074103), 国家“载人航天工程航天医学实验领域项目” (HYZHXM05003), 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04905)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82074103), National “Manned Space Engineering Aerospace Medical Experiment Field Project” (HYZHXM05003), Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine (CI2021A04905).

**【作者简介】** 冯利 (1982—), 男, 医学博士, 讲师, 研究方向: 中药药理学、药物代谢动力学、代谢组学。Email: fengli@ouchn.edu.cn

**【通信作者】** 陈颖 (1979—), 女, 医学博士, 研究员, 研究方向: 中药药理学、药物代谢动力学。Email: ychen@icmm.ac.cn

随着月球和火星探测任务的成功实施,中国空间站的投入使用,我国已经迈入了太空探索的快车道。以后将有越来越多的航天员在外太空长期驻留、开展相关科学研究并进行深空探索。航天飞行是人类遇到的最极端的环境条件之一,太空辐射、微重力、狭小空间、振动、隔离和噪音等航天飞行因素会扰动机体内环境稳态,比如可引起肌肉萎缩、骨质减少、免疫功能下降、细胞癌变风险增高、心血管疾病、眼部疾病、行为学改变、贫血和代谢性疾病等<sup>[1-9]</sup>。未来长期的太空驻留需要全面、深入了解航天飞行因素对机体的影响,以制定个体化的防护措施和确保航天员的在轨飞行安全。

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一门学科,它致力于研究生物样品或细胞中小分子代谢物水平与机体的病理生理功能之间的关系,结合模式识别方法,可以判断出生物体所处的病理生理状态,并发现与之相关的生物标志物<sup>[10]</sup>。代谢物为细胞代谢调控网络的终产物,对基因、转录产物或蛋白质的微小扰动最终均会在代谢物中放大,因此代谢物的变化相比基因、转录产物和蛋白质更灵敏。代谢组学研究在重大疾病的早期诊断以及了解环境与机体之间复杂相互作用的机制方面具有重要意义,在航天医学研究中的应用也越来越多<sup>[11]</sup>。

本文总结了航天飞行(包括真实的航天飞行和基于地面的模拟航天飞行)对机体(包括人体和实验动物模型)影响的代谢组学相关研究,以深入了解航天飞行因素对机体影响的分子机制,了解机体如何适应航天极端环境,为提升航天员在轨飞行中的安全性和工作状态、制定个体化的防护措施提供依据。航天飞行对机体的影响十分广泛且复杂,本文主要关注微重力和辐射对肌肉骨骼肌系统、行为认知功能、免疫功能、心血管系统、肝、胃肠道等影响的代谢组学研究。

## 1 代谢组学在航天医学研究中的进展

### 1.1 航天飞行对肌肉骨骼系统影响的代谢组学研究

重力是机体生理生化功能调节的重要信号,可作用于肌肉和骨骼的重力感受器,后者可以刺激骨骼和肌肉的不断生长,以对抗重力的作用。在微重力环境下,肌肉和骨骼的生长停滞,表现出肌肉萎

缩和骨质疏松等症状<sup>[12-13]</sup>。

骨骼肌萎缩是航天飞行中的常见症状,但其发生的精确分子机制仍不明确。可能与氨基酸代谢失衡、胰岛素水平异常、能量代谢障碍有关,如在骨骼肌萎缩过程中发现线粒体能量/燃料代谢异常<sup>[14]</sup>。

骨骼肌废用、质量和功能下降和氨基酸代谢关系密切。人大腿肌肉横截面积、肌肉质量均与支链氨基酸的代谢密切相关<sup>[15-17]</sup>。人血清中低水平的支链氨基酸及必需脂肪酸与骨骼肌质量、强度和功能下降密切相关<sup>[18]</sup>。肌肉质量减少且运动能力下降的女性血浆中支链氨基酸水平显著降低<sup>[19]</sup>。血浆中低水平的脯氨酸被认为是肌肉质量减少的独立风险因素<sup>[20]</sup>。

胰岛素在长期太空飞行中对维持肌肉质量也至关重要。在轨航天员体内的胰岛素水平和葡萄糖耐量均发生改变,航天员表现出肌肉萎缩,且更容易罹患肾病、冠状动脉疾病、神经疾病、视网膜疾病<sup>[21]</sup>。在航天飞行中监测胰岛素分泌水平,采取合理的防护措施,对避免或减轻航天飞行造成的肌肉萎缩十分重要。

航天因素导致的肌肉萎缩与骨骼肌葡萄糖氧化代谢以及能量代谢异常有关。人体受试者 84 d 的卧床休息模拟微重力可损害骨骼肌葡萄糖的有氧代谢,但不影响糖酵解途径<sup>[22]</sup>。在国际空间站(International Space Station, ISS)驻留 4 周后,小鼠股四头肌萎缩与其能量代谢障碍有关。ISS 驻留可影响其肌节完整性、免疫适应性和氧化应激反应,导致线粒体 DNA 拷贝数显著减少。能量代谢障碍为航天飞行导致的骨骼肌萎缩和免疫功能下降的重要原因<sup>[23]</sup>。

微重力导致的骨质疏松和骨愈合组织细胞凋亡信号被激活,迁移信号被抑制,生长因子招募困难受阻有密切关系。采用基因和代谢组相互作用网络研究在 ISS 饲养 4 周后的雄性 C57BL/6J 小鼠的后肢骨骼组织发现航天飞行可导致小鼠后肢骨愈合组织细胞凋亡信号被激活,细胞迁移信号被抑制,愈合组织招募生长因子困难,最终导致骨小梁间距增加,骨连接减少,骨质密度降低<sup>[24]</sup>。

综上所述,微重力对肌肉骨骼系统的影响主要和氨基酸、能量和葡萄糖氧化代谢障碍、胰岛素水平异常、细胞调节信号异常,生长因子招募困难有关。

## 1.2 航天因素导致的免疫功能下降的代谢组学研究

长期暴露于微重力对机体免疫系统的影响较大<sup>[25]</sup>。在微重力条件下,免疫细胞的功能、形态和分化均受到影响<sup>[26-31]</sup>。

航天因素导致的机体免疫功能下降与其干扰免疫细胞的正常功能、影响脾和肠道中相关代谢物水平、线粒体正常功能及机体营养状态有关。将 C57BL/6J 小鼠在 ISS 驻留 13 d 后,其脾中大部分白细胞亚群数量降低,活性氧活力增强。同时,小鼠肝葡萄糖合成代谢增强,糖酵解代谢降低,全身脂质向肝再分布,肝脂质代谢紊乱,免疫细胞的生理功能从正常状态下的处理抗原转向处理脂质,从而导致免疫功能下降,感染风险增加<sup>[32]</sup>。将雄性 C57BL/6 小鼠同时暴露于低剂量太空辐射( $\gamma$ 射线、<sup>16</sup>O 和<sup>56</sup>Fe)和微重力后,小鼠脾中的嘌呤、葡萄糖、氨基酸和脂肪酸代谢异常<sup>[33]</sup>。尾吊诱导的模拟微重力大鼠肠道微生物的代谢物和正常对照组差异显著,差异代谢物主要包括木糖、芥子酸、吡啶乙酸和双半乳糖醛酸等,这些代谢物主要参与嘧啶、戊糖和蛋白质代谢,葡萄糖醛酸的相互转化以及支链氨基酸代谢。显著差异代谢物的水平与肠道微生物群失调和模拟微重力导致的免疫功能紊乱密切相关<sup>[34]</sup>。此外,多组学研究发现,免疫功能下降与微重力导致的线粒体功能异常、机体营养状态改变也具有一定相关性<sup>[35-36]</sup>。

航天因素导致的机体免疫功能下降与其干扰肝的脂质代谢、影响脾和肠道中相关代谢物的水平、线粒体的正常功能及机体的营养状态有关。

## 1.3 航天飞行导致的精神神经功能紊乱的代谢组学研究

航天飞行中的孤独、狭小空间、噪音、睡眠障碍、生物节律紊乱、震动等会显著干扰航天员的精神、情绪和认知能力,常导致其出现抑郁样行为和认知功能下降等,干扰其在轨作业能力。

暴露于 14 d 的模拟微重力环境大鼠表现出明显的抑郁样症状。与对照组相比,模拟微重力组大鼠尿液中的柠檬酸、草酰琥珀酸、肌酸、脯氨酸、环腺苷酸、L-二羟基苯丙氨酸、苯乙酰甘氨酸、琥珀酰胆碱、3-羟基马尿酸、谷氨酰胺和 5-羟基色氨酸的水平显著降低,黄嘌呤酸、牛磺酸、犬尿酸、羟脯氨酸、5-羟基吡啶乙酸、2-异丙基-3-氧代琥珀酸和肾上腺素水平显著升高<sup>[37]</sup>。受影响的代谢途径包括

色氨酸、精氨酸、脯氨酸和苯丙氨酸等情绪相关的氨基酸代谢以及能量代谢,这些代谢途径的扰动可能和微重力导致的抑郁症有一定关系。

在模拟微重力存在或不存在情况下采用 5 种离子束照射 WAG/Rij 大鼠,结果显示,离子照射可加重尾吊造成的空间学习损伤和抑郁样行为。大脑皮质和海马中的嘌呤代谢和氨基酸代谢受到影响<sup>[38]</sup>。

笔者采用非靶向和靶向代谢组学相结合的研究发现,模拟微重力诱导的大鼠认知功能下降与血浆及海马中和学习记忆密切相关的代谢物如天冬酰胺、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和胆碱的代谢异常关系密切<sup>[39-40]</sup>。

睡眠不足也是航天飞行中的常见问题,也会对认知功能造成影响。笔者发现 14 d 的睡眠干扰可造成小鼠认知功能的显著下降,在小鼠血清中鉴定到的和睡眠干扰造成的认知功能下降的生物标志物包括胆碱、缬氨酸、尿酸、尿囊酸、肉碱和维甲酸等。受影响的代谢途径包括乙酰胆碱、嘌呤、维甲酸、脂质和氨基酸等<sup>[41]</sup>。

尾吊诱导的模拟微重力大鼠认知损伤还与其海马组织上调的固醇类激素生物合成、脂肪酸代谢、神经活性配体-受体相互作用、花生四烯酸代谢和维生素消化和吸收关系密切。能量代谢和神经系统相关代谢途径异常是认知损伤的重要原因<sup>[42]</sup>。

航天飞行导致的行为认知改变与情绪、认知相关的氨基酸以及能量代谢障碍、应激状态及神经系统相关代谢途径失常有关。

## 1.4 航天飞行导致的肝相关疾病的代谢组学研究

骨骼肌的功能状态和肝代谢关系密切。骨骼肌主要依赖氧化磷酸化过程供能。在航天飞行中,骨骼肌丢失可影响全身多个组织器官的代谢,也会导致肝损伤<sup>[35,43]</sup>。肌肉减少是与肥胖、炎症和胰岛素抵抗无关的导致肝纤维化的一个独立风险因素<sup>[44]</sup>。肌减少症患者的非酒精性脂肪肝和肝纤维化的风险大大增加<sup>[45]</sup>。航天飞行中的肝代谢通量增加可能也与肌肉丢失有一定关系<sup>[35]</sup>。

有学者研究了在 ISS 驻留 13 d 对小鼠肝脂质代谢的影响发现小鼠体重减轻,机体的脂质从全身重新分布到肝,小鼠肝脂质中视黄醇水平降低。代谢物变化提示视黄醇水平降低与肝星状细胞凋亡导致的细胞活化有关,这与胆汁酸水平增加和肝纤维化的早期症状极为相似。视黄醇水平下降与细

胞外基质重塑标志物的变化共同导致了长期暴露在太空环境中的肝损伤,这大大增加了非酒精性脂肪肝的风险<sup>[46]</sup>。

在 ISS 驻留 30 d 后,微重力和航空辐射等应激可显著降低小鼠肝中含硫抗氧化物如谷胱甘肽、半胱氨酸、牛磺酸等及其中间体的水平,导致肝的抗氧化应激能力下降,这可能是航天飞行后肝损伤的重要原因<sup>[47]</sup>。

航天飞行导致的肝相关疾病与骨骼肌丢失、肝脂质代谢异常,以及肝含硫代谢物水平降低导致的肝抗氧化应激能力下降有关。

### 1.5 航天飞行导致的癌症相关疾病的代谢组学研究

癌症是航天员在太空驻留期间质子和高能带电粒子辐射带来的重要风险。充分了解和监测辐射引起的代谢变化有助于制定有效的防护对策。

研究发现,雌性 C57BL/6 小鼠在 ISS 驻留 13 d 后,皮肤中和活性氧相关的氨基酸和碳水化合物代谢,细胞信号转导和转甲基途径均发生改变。细胞抗氧化能力下降、活性氧生成增加,组织重塑调节信号增强最终导致代谢稳态改变,这增加了皮肤组织的病理生理损伤及癌变的风险<sup>[48]</sup>。

一项研究考察了高能质子照射大鼠 4 h 后其尿液代谢物的变化,发现暴露于质子辐射后,大鼠尿液中的色氨酸等氨基酸代谢异常,三羧酸循环受到严重干扰, $\beta$ -氧化磷酸化发生障碍,最终导致细胞凋亡和 DNA 损伤,这是引起癌变的重要风险因素<sup>[49]</sup>。

航天飞行导致的癌症相关疾病可能与和活性氧水平相关的氨基酸和碳水化合物代谢异常,糖代谢障碍以及氧化磷酸化供能失常导致的细胞凋亡及 DNA 损失有关。

### 1.6 航天飞行导致的心血管相关疾病的代谢组学研究

心血管疾病和脂质代谢紊乱密切相关。研究发现,航天特因环境可导致机体脂质代谢全面紊乱<sup>[35]</sup>。脂质积累和活性氧活性相关蛋白质代谢失衡会导致心血管疾病<sup>[50-51]</sup>。太空飞行导致的线粒体功能障碍、心血管去适应和太空辐射一起增加了长期航天任务中的心血管疾病风险<sup>[52]</sup>。

将 C57BL/6J 小鼠的心室组织暴露于<sup>16</sup>O 14 d 后,参与 DNA 甲基化的同型半胱氨酸甲基化代谢物无显著变化,但转硫途径在 90 d 后仍受到辐射影

响,胱硫醚水平大幅增加。心肌组织的 DNA 甲基化过程发生改变是心血管疾病的重要风险因素<sup>[53]</sup>。

航天飞行导致的心血管相关疾病与脂质代谢异常、机体氧化应激状态失衡,线粒体功能障碍以及 DNA 甲基化异常有关。

### 1.7 航天飞行导致的其他疾病或功能异常的代谢组学研究

#### 1.7.1 肠道疾病

研究显示,暴露于  $\gamma$  射线和重离子辐射(<sup>56</sup>Fe)后雌性 C57BL/6J 小鼠肠组织中的核苷酸、氨基酸,细胞炎症相关代谢物水平升高,这可能对航天员在太空驻留期间营养素的吸收产生影响,对航天员炎症性肠病的发病有重要意义<sup>[54]</sup>。

#### 1.7.2 脂肪酸代谢异常

有学者比较了在太空驻留 1 年对 1 对同卵双胞胎机体的影响。结果发现,与地面对照受试者相比,太空飞行受试者几乎所有细胞的脂肪酸代谢均增强,同时,其体重下降,端粒延长,基因组不稳定,颈动脉扩张和内膜-中层厚度增加,眼部结构改变,转录和代谢均变化,免疫和氧化应激相关途径中的 DNA 甲基化改变,胃肠道菌群改变,认知功能下降。大多数指标在 6 个月后逐渐恢复正常,但也有部分指标发生了永久性改变<sup>[11,55]</sup>。

## 2 个体化防护措施

航天飞行不利影响的防护措施主要包括锻炼、加强营养和药物治疗。锻炼可减少骨骼肌萎缩,减少微重力对心血管系统的影响<sup>[56]</sup>,如飞轮阻力锻炼可有效逆转卧床导致的骨骼肌氧化代谢异常<sup>[22]</sup>。但是,锻炼仍不能完全对抗航天因素导致的肌肉质量减少和骨骼丢失,不能减轻动脉内膜中层厚度增加、心脏营养不良和胰岛素抵抗<sup>[52,56]</sup>。急性运动可增强胰岛素抵抗人群体内的糖酵解、三羧酸循环和脂肪酸氧化功能<sup>[57]</sup>。研究在轨航天员的生理功能时发现,在肝中三羧酸循环和脂肪酸代谢增强,但在肌肉中总体表现为减弱,这表明运动不足以抵消航天应激源的影响。此外,在轨航天员运动期间还检测到急性炎症标志物(如 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1-RA 和 IGF-1)的水平增加,这对航天员降低的免疫功能更加不利<sup>[35]</sup>。有学者比较研究了正常人体受试者常氧卧床、低氧卧床和低氧步行后的尿液代谢组后发现,行走,保持站立姿势,控制但有限的活动可以明显抑制航天飞行导致的抑郁等症状的出现<sup>[58]</sup>。

除运动外,摄入足量的碳水化合物、脂肪、蛋白质、新鲜蔬果,增加植物蛋白、钾、双膦酸盐、维生素、不饱和脂肪酸和益生菌的摄取,减少饱和脂肪酸、钠的摄取对预防航天因素导致的各种不利健康影响也非常重要<sup>[59]</sup>。

针对航天员的药物干预也是重要的防护手段。因为航天飞行中线粒体功能全面失调,用于线粒体功能障碍的辅酶 Q10 也被建议作为航天员的营养补充剂<sup>[35,60]</sup>。动物研究显示维生素 K 在预防微重力导致的骨丢失方面效果显著, $\beta_2$  受体激动剂克伦特罗有助于缓解尾吊导致的大鼠肌肉萎缩,这二者有望成为预防微重力导致的肌肉骨骼功能异常的潜在治疗药物<sup>[61-62]</sup>。

### 3 总结与展望

代谢组学具有无偏性和系统性的特点,为了解航天因素对机体影响分子机制提供新视角,具有广阔的应用前景。基于代谢组学研究航天因素对机体的影响已经取得了显著成果,已经发现多种代谢物水平失调与航天因素导致的机体功能紊乱密切相关。深入了解暴露于航天因素后机体的代谢变化将有助于制定个体化的防护措施以确保航天员的健康。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Benavides Damm T, Richard S, Tanner S, et al. Calcium-dependent deceleration of the cell cycle in muscle cells by simulated microgravity [J]. *FASEB J*, 2013, 27(5): 2045-2054.
- [ 2 ] Nabavi N, Khandani A, Camirand A, et al. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion [J]. *Bone*, 2011, 49(5): 965-974.
- [ 3 ] Graebe A, Schuck EL, Lensing P, et al. Physiological, pharmacokinetic, and pharmacodynamic changes in space [J]. *J Clin Pharmacol*, 2004, 44(8): 837-853.
- [ 4 ] Barcellos-Hoffa MH, Blakely EA, Burma S. Concepts and challenges in cancer risk prediction for the space radiation environment [J]. *Life Sci Space Res (Amst)*, 2015, 6: 92-103.
- [ 5 ] Levy JH, Connors JM. More on venous thrombosis during spaceflight [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(14): 1381-1381.
- [ 6 ] Khosravi EA, Hargens AR. Visual disturbances during prolonged space missions [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2021, 32(1): 69-73.
- [ 7 ] Marshall-Goebel K, Damani R, Bershad EM. Brain physiological response and adaptation during spaceflight [J]. *Neurosurgery*, 2019, 85(5): E815-E821.
- [ 8 ] Plett PA, Abonour R, Frankovitz SM, et al. Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells [J]. *Exp Hematol*, 2004, 32(8): 773-781.
- [ 9 ] Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Pastushkova LK, et al. Spaceflight induced changes in the human proteome [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2017, 14(1): 15-29.
- [ 10 ] Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(1-2): 155-71.
- [ 11 ] Schmidt M, Meydan C, Schmidt C, et al. The NASA Twins Study: the effect of one year in space on long-chain fatty acid desaturases and elongases [J]. *Lifestyle Genom*, 2020, 13(3): 107-121.
- [ 12 ] 钟国徽, 李玉恒, 凌树宽, 等. 太空微重力环境对人体的影响及防护措施 [J]. *生物学通报*, 2016, 51(10): 1-4.  
Zhong GH, Li YH, Ling SK, et al. Influence of space microgravity environment on human body and protective measures [J]. *Bull Biol*, 2016, 51(10): 1-4.
- [ 13 ] 罗雅婧. 空间微重力对线虫肌肉运动调控机制的分析 [D]. 大连: 大连海事大学; 2018.  
Luo YJ. Regulatory mechanism of space microgravity on muscle movement of *C. elegans* [D]. Dalian: Dalian Maritime University; 2018.
- [ 14 ] McCormick R, Vasilaki A. Age-related changes in skeletal muscle: changes to life-style as a therapy [J]. *Biogerontology*, 2018, 19(6): 519-536.
- [ 15 ] Moaddel R, Fabbri E, Khadeer MA, et al. Plasma biomarkers of poor muscle quality in older men and women from the baltimore longitudinal study of aging [J]. *J Gerontol A Biol Med*, 2016, 71(10): 1266-1272.
- [ 16 ] Lustgarten MS, Price LL, Chale A, et al. Branched chain amino acids are associated with muscle mass in functionally limited older adults [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2014, 69(6): 717-724.
- [ 17 ] Korostishevsky M, Steves CJ, Malkin I, et al. Genomics and metabolomics of muscular mass in a community-based sample of UK females [J]. *Eur J Hum Genet*, 2015, 24(2): 277-283.
- [ 18 ] Ter Borg S, Luiking YC, van Helvoort A, et al. Low levels of branched chain amino acids, eicosapentaenoic acid and micronutrients are associated with low muscle mass, strength and function in community-dwelling older adults [J]. *J Nutr Health Aging*, 2019, 23(1): 27-34.
- [ 19 ] Yamada M, Kimura Y, Ishiyama D, et al. Plasma amino acid concentrations are associated with muscle function in older Japanese women [J]. *J Nutr Health Aging*, 2018, 22(7): 819-823.
- [ 20 ] Toyoshima K, Nakamura M, Adachi Y, et al. Increased plasma proline concentrations are associated with sarcopenia in the elderly [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185206.
- [ 21 ] Tobin BW, Uchakin PN, Leeper-Woodford SK. Insulin secretion and sensitivity in space flight [J]. *Nutrition*, 2002, 18(10): 842-848.

- [22] Irimia JM, Guerrero M, Rodriguez-Miguel P, et al. Metabolic adaptations in skeletal muscle after 84 days of bed rest with and without concurrent fly wheel resistance exercise [J]. J Appl Physiol (1985), 2017, 122(1): 96–103.
- [23] Chakraborty N, Waning DL, Gautam A, et al. Gen-metabolite network linked to inhibited bioenergetics in association with spaceflight-induced loss of male mouse quadriceps muscle [J]. J Bone Miner Res, 2020, 35(10): 2049–2057.
- [24] Chakraborty N, Zamarioli A, Gautama A, et al. Gene-metabolite networks associated with impediment of bone fracture repair in spaceflight [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2021, 19: 3507–3520.
- [25] Sonnenfeld G. The immune system in space and microgravity [J]. Med Sci Sports Exerc, 2002, 34(12): 2021–2027.
- [26] Prasad B, Grimm D, Strauch SM, et al. Influence of microgravity on apoptosis in cells, tissues, and other systems *in vivo* and *in vitro* [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9373.
- [27] Crucian B, Simpson RJ, Mehta S, et al. Terrestrial stress analogs for spaceflight associated immune system dysregulation [J]. Brain Behav Immun, 2014, 39: 23–32.
- [28] Bradbury P, Wu H, Choi JU, et al. Modeling the impact of microgravity at the cellular level: implications for human disease [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 96.
- [29] Lin X, Zhang KW, Wei DX, et al. The impact of spaceflight and simulated microgravity on cell adhesion [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3031–3051.
- [30] Akiyama T, Horie K, Hinoi E, et al. How does spaceflight affect the acquired immune system? [J]. NPJ Microgravity, 2020, 6: 14.
- [31] Smith JK. IL-6 and the dysregulation of immune, bone, muscle, and metabolic homeostasis during spaceflight [J]. NPJ Microgravity, 2018, 4: 24.
- [32] Pecaute MJ, Mao XW, Bellinger DL, et al. Is spaceflight-induced immune dysfunction linked to systemic changes in metabolism? [J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0174174.
- [33] Laiakis EC, Shuryak I, Deziel A, et al. Effects of low dose space radiation exposures on the splenic metabolome [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6): 3070–3086.
- [34] Jin ML, Wang JJ, Zhang H, et al. Simulated weightlessness perturbs the intestinal metabolomic profile of rats [J]. Front physiol, 2019, 10: 1279–1290.
- [35] da Silveira WA, Fazelina H, Rosenthal SB, et al. Comprehensive multi-omics analysis reveals mitochondrial stress as a central biological hub for spaceflight impact [J]. Cell, 2020, 183(5): 1185–1201.
- [36] Baba S, Smith T, Hellmann J, et al. Space flight diet-induced deficiency and response to gravity-free resistive exercise [J]. Nutrients, 2020, 12(8): 2400–2412.
- [37] Xu T, Lu C, Feng L, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry-based urinary metabolomics study on a rat model of simulated microgravity-induced depression [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 165: 31–40.
- [38] Raber J, Holden S, Sudhakar R, et al. Effects of 5-ion beam irradiation and hindlimb unloading on metabolic pathways in plasma and brain of behaviorally tested WAG/Rij Rats [J]. Front Physiol, 2021, 12: 746509.
- [39] Feng L, Yue XF, Chen YX, et al. LC/MS-based metabolomics strategy to assess the amelioration effects of ginseng total saponins on memory deficiency induced by simulated microgravity [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 125: 329–338.
- [40] Feng L, Liu XM, Cao FR, et al. Anti-stress effects of ginseng total saponins on hindlimb-unloaded rats assessed by a metabolomics study [J]. J ethnopharmacol, 2016, 188: 39–47.
- [41] Feng L, Wu HW, Song GQ, et al. Chronical sleep interruption-induced cognitive decline assessed by a metabolomics method [J]. Behav Brain Res, 2016, 302: 60–68.
- [42] Zhang HY, Chen J, Wang HL, et al. Serum metabolomics associating with circulating microrna profiles reveal the role of miR-383-5p in rat hippocampus under simulated microgravity [J]. Front Physiol, 2020, 11: 939.
- [43] Argilés JM, Campos N, Lopez-Pedrosa JM, et al. Skeletal muscle regulates metabolism via interorgan crosstalk: roles in health and disease [J]. J Am Med Dir Assoc, 2016, 17(9): 789–796.
- [44] Koo BK, Kim D, Joo SK, et al. Sarcopenia is an independent risk factor for non-alcoholic steatohepatitis and significant fibrosis [J]. J Hepatol, 2017, 66(1): 123–131.
- [45] Cai CZ, Song X, Chen YS, et al. Relationship between relative skeletal muscle mass and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis [J]. Hepatol Int, 2020, 14(1): 115–126.
- [46] Jonscher KR, Alfonso-Garcia A, Suhaimi JL, et al. Spaceflight activates lipotoxic pathways in mouse liver [J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0152877.
- [47] Kurosawa R, Sugimoto R, Imai H, et al. Impact of spaceflight and artificial gravity on sulfur metabolism in mouse liver: sulfur metabolomic and transcriptomic analysis [J]. Sci Rep, 11(1): 21786.
- [48] Mao XW, Pecaute MJ, Stodieck LS, et al. Biological and metabolic response in STS-135 space-flown mouse skin [J]. Free Radical Res, 2014, 48(8): 890–897.
- [49] Laiakis EC, Trani D, Moon BH, et al. Metabolomic profiling of urine samples from mice exposed to protons reveals radiation quality and dose specific differences [J]. Radiat Res, 2015, 183(4): 382–390.
- [50] Alam S, Abdullah CS, Aishwarya R, et al. Molecular perspectives of mitochondrial adaptations and their role in cardiac proteostasis [J]. Front physiol, 2020, 11: 1054.
- [51] Arrieta A, Blackwood EA, Stauffer WT, et al. Integrating er and mitochondrial proteostasis in the healthy and diseased heart [J]. Front Cardiovasc Med, 2020, 6: 193.
- [52] Hughson RL, Helm A, Durante M. Heart in space: effect of the extraterrestrial environment on the cardiovascular system [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(3): 167–180.

- [53] Miousse IR, Skinner CM, Sridharan V, et al. Changes in one-carbon metabolism and DNA methylation in the hearts of mice exposed to space environment-relevant doses of oxygen ions ( $^{16}\text{O}$ ) [J]. Life Sci Space Res (Amst), 2019, 22: 8–15.
- [54] Cheema AK, Suman S, Kaur P, et al. Long-term differential changes in mouse intestinal metabolomics after  $\gamma$  and heavy ion radiation exposure [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87079.
- [55] Garrett-Bakelman FE, Darshi M, Green SJ, et al. The NASA twins study: a multidimensional analysis of a year-long human spaceflight [J]. Science, 2019, 364(6436): eaau8650.
- [56] Clément G. Fundamentals of space medicine [M]. Berlin: Springer-Verlag Press; 2011.
- [57] Contrepois K, Wu S, Moneghetti KJ, et al. Molecular choreography of acute exercise [J]. Cell, 2020, 181(5): 1112–1130.
- [58] Šket R, Deutsch L, Prevorsek Z, et al. Systems view of deconditioning during spaceflight simulation in the planhab project; The departure of urine  $^1\text{H}$ -NMR metabolomes from healthy state in young males subjected to bedrest inactivity and hypoxia [J]. Front Physiol, 2020, 11: 532271.
- [59] Tang H, Rising HH, Majji M, et al. Long-term space nutrition: a scoping review [J]. Nutrients, 2021, 14(1): 194–224.
- [60] Rinninella E, Pizzoferrato M, Cintoni M, et al. Nutritional support in mitochondrial diseases; the state of the art [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(13): 4288–4298.
- [61] Sugiyama T, Kawai S. The use of vitamin K may be a good choice for microgravity-induced bone disorder [J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(4): 794–795.
- [62] Dodd SL, Koesterer TJ. Clenbuterol attenuates muscle atrophy and dysfunction in hindlimb-suspended rats [J]. Aviat Space Environ Med, 2002, 73(7): 635–639.

[收稿日期] 2022-03-01

## 中国实验动物学会“猴痘病毒沙龙——One Health 与猴痘防治”成功举办

2022 年 8 月 26 日,“猴痘病毒沙龙——One Health 与猴痘防治”在北京顺利召开。本次沙龙由中国实验动物学会主办,中国科协生命科学学会联合体、Wiley 出版集团协办,《中国实验动物学报》、《中国比较医学杂志》、《动物模型与实验医学(英文)》(*Animal Models and Experimental Medicine*, AMEM)编辑部承办。中国实验动物学会理事长、学会编辑部《中国实验动物学报》、《中国比较医学杂志》及《动物模型与实验医学(英文)》主编秦川教授、中山大学陆家海教授、索尔斯比(Soulsby)基金会董事会主席 Dr. Judy MacArthur Clark、剑桥大学病理学教授 Geoffrey L Smith 出席会议,山东大学基础医学院刘瑞康研究员为本次沙龙主持人。本期猴痘病毒沙龙以“One Health 与猴痘防治”为主题,分为学术报告和访谈两部分。沙龙采用线上形式举行,Wiley 出版社“Wiley 威立”微信视频号同步直播,观看人数超过 1500 余人次。

秦川教授致开幕辞,简述了自 5 月初以来,猴痘在多个非流行国家暴发,已传播到 90 多个国家,感染人数超过 3.5 万。尽管猴痘病毒在传统流行的地区已经传播了几十年,但对猴痘的研究仍有很多未知。“同一健康”的理念强调多学科、多部门、多地域共同协作,达到人类、动物、环境三者的最佳健康状态。猴痘是一个全球公共卫生问题,希望通过本次沙龙,能够促进猴痘等传染病领域研究的国际交流和合作,同时促进“同一健康”策略在猴痘疫情防控中的倡导和实施。

陆家海教授作题为“新发传染病应对策略——One Health”的报告,强调了 One Health 策略是未来新发传染病、抗生素耐药性、环境健康等问题的最佳解决方案。提出了在多学科、多部门和多领域的共同努力下,One Health 理念必将长足发展,共同实现全人类的健康与福祉。Dr. Judy MacArthur Clark 作题为“One Health – Challenges and Opportunities”的报告,介绍了“One Health”是一种综合、统一的方法,旨在可持续地平衡和优化人、动物与生态系统的健康。强调人类、家养动物和野生动物、植物以及更广泛的环境(包括生态系统)的健康是密切联系和相互依赖的。Prof. Geoffrey L Smith 作题为“Monkeypox virus”的报告,介绍了猴痘病毒基因组及变异和当前流行情况。强调了尽管面对猴痘病毒具有挑战,但与新冠肺炎流行不同的是,猴痘是一种易于识别的疾病,可以通过有效的疫苗进行预防,使用抗病毒药物治疗,并通过检测方法进行诊断。

李梦婷,陈颖,巩仔鹏,等. 航空间环境对药物代谢动力学影响研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 547-556.  
Li MT, Chen Y, Gong ZP, et al. Research progress on the effect of the space environment on pharmacokinetics [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 547-556.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.014

# 航空间环境对药物代谢动力学影响研究进展

李梦婷<sup>1,2</sup>, 陈颖<sup>1\*</sup>, 巩仔鹏<sup>2\*</sup>, 杨庆<sup>1</sup>, 翁小刚<sup>1</sup>, 李玉洁<sup>1</sup>, 朱晓新<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心 药学院, 贵阳 550004)

**【摘要】** 随着我国载人航天事业的飞速发展, 航天医学的研究体系也在不断地完善。航空间环境会导致航天员在轨飞行中出现航天运动病、心血管功能失调、睡眠障碍、感染性疾病等健康问题。研究航空间环境下药物在机体的药代动力学过程, 为航空间环境用药提供依据成为亟待解决的问题。本文围绕药物吸收、分布、代谢、排泄过程, 对药物在真实在轨环境和地面模拟失重状态下的药代动力学变化及主要机制进行综述, 以期对航天状态下药物的安全合理使用提供参考。

**【关键词】** 模拟失重模型; 药代动力学; 动物实验; 人体实验

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0547-10

## Research progress on the effect of the space environment on pharmacokinetics

LI Mengting<sup>1,2</sup>, CHEN Ying<sup>1\*</sup>, GONG Zipeng<sup>2\*</sup>, YANG Qing<sup>1</sup>, WENG Xiaogang<sup>1</sup>, LI Yujie<sup>1</sup>, ZHU Xiaoxin<sup>1</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China. 2. Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Corresponding author: CHEN Ying. E-mail: ychen@icmm.ac.cn; GONG Zipeng. E-mail: gzp4012607@126.com

**【Abstract】** With the rapid development of the manned spaceflight industry in China, research into space medicine is also constantly progressing. The space environment can lead to health problems such as space motion sickness, cardiovascular dysfunction, sleep disturbance, decompression sickness, and infectious diseases in astronauts on-orbit. Studies on the pharmacokinetics of drugs in the body in the space environment are urgently needed to provide a basis for effective clinical drug use in the space environment. This article focuses on the processes of drug absorption, distribution, metabolism, and excretion, and summarizes the pharmacokinetic changes and main mechanisms of action of drugs in the real on-orbit environment and during simulated weightlessness on the ground. Our findings provide a reference for the safe and rational use of drugs during spaceflight.

**【Keywords】** simulated weightlessness model; pharmacokinetics; animal experiment; human experiment

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

**【基金项目】** 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04905, CI2021B015), 载人航天工程航天医学实验领域项目资助 (HYZHXM05003), 国家自然科学基金 (82074103, 82174275)。

Funded by Scientific and Technological Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (CI2021A04905, CI2021B015), Space Medical Experiment Project of China Manned Space Program (HYZHXM05003), National Natural Science Foundation of China (82074103, 82174275).

**【作者简介】** 李梦婷 (1999—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药代动力学及其 PK-PD 结合模型的研究。

Email: 2262619473@qq.com

**【通信作者】** 陈颖, 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药药代动力学和中药药理研究。Email: ychen@icmm.ac.cn;

巩仔鹏, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药药代动力学及其 PK-PD 结合模型的研究。Email: gzp4012607@126.com。

\* 共同通信作者

随着国内外载人航天事业的飞速发展<sup>[1-2]</sup>,越来越多的人开启了长期太空飞行探索宇宙的征程<sup>[3]</sup>。航天飞行中失重、辐射、噪声、温差等特殊环境可导致人体产生航天运动病、睡眠障碍、身体疼痛、感染性疾病和神经-视觉综合征等,还将增加患尿路感染、心律失常、肾绞痛等严重疾病的几率<sup>[4-7]</sup>。

为保障航天员的健康状况和太空任务的顺利完成,大多采用体能训练与药物防护结合的方式来降低太空环境带给航天员的损伤<sup>[8]</sup>,但目前航天用药仍主要以地面用药规律为指导<sup>[9]</sup>。为充分保障航天员的用药安全,亟待研究航天空间环境对药物在机体的药代动力学影响,为航天空间环境用药提供依据。因此,本文综述在真实在轨环境和地面模拟失重状态的部分药物的药代动力学变化,为今后研究模拟太空环境下的药代动力学过程<sup>[10]</sup>,建立此类人群的个体化用药方案<sup>[11]</sup>提供依据。

## 1 航天环境下的药代动力学研究概述

航天飞行过程中除了采用物理方法,如体能训练和穴位电刺激<sup>[12-13]</sup>等方式保护航天员之外,药品也是最基本和重要的防护方式之一<sup>[14]</sup>。为保障航天员在太空中使用药品的安全性,了解药品在太空飞行中航天员体内的药动学过程十分必要。有研究者对解热镇痛药(如对乙酰氨基酚<sup>[15]</sup>、布洛芬<sup>[16]</sup>及安替比林<sup>[17]</sup>)、抗菌药(如青霉素<sup>[18]</sup>、环丙沙星<sup>[19]</sup>、头孢曲松<sup>[20]</sup>、庆大霉素<sup>[21]</sup>及盐酸莫西沙星<sup>[22]</sup>)、抗航天运动病药(如异丙嗪<sup>[23]</sup>及东莨菪碱<sup>[24]</sup>)、抗抑郁药(阿米西汀<sup>[25]</sup>)、其他(维生素 B6<sup>[26]</sup>、胆碱受体激动药尼古丁<sup>[27]</sup>、局麻药利多卡因<sup>[28]</sup>、中药龙血竭<sup>[29]</sup>等)在地面模拟航天环境及航天飞行过程中进行了相关研究发现:航天状态下,大多药物的体内药代动力学特征与正常生理状态具有显著性差异。

航天员在太空飞行过程中受到太空特殊环境的影响导致机体的吸收、分布、代谢、排泄(absorption, distribution, metabolism, excretion, 即 ADME 过程)发生变化<sup>[30]</sup>。航天环境使机体胃肠道液、胃肠道运动及血流速度等发生改变,从而影响药物的吸收过程<sup>[31]</sup>。血液流量、血管通透性、药物的血浆蛋白结合率及组织亲和力受航天环境的影响会改变药物在体内的分布<sup>[19]</sup>。航天环境下机体代谢酶及转运体的表达和活性改变将会影响药物

的代谢速率及程度<sup>[28]</sup>。因此,研究航天环境下药物在体内 ADME 的变化及机制对提高药物疗效和减少毒副作用具有十分重要的意义。

药物转运体是具有特定转运药物功能的一类蛋白,对药物的 ADME 过程产生了较大的影响。药物转运体在各个组织器官的分布和表达均不相同<sup>[32]</sup>,根据底物转运方向的不同,可分为内流转运体和外排转运体。在航天飞行中人成纤维细胞中的 P-糖蛋白的表达增加了 2.3 倍<sup>[33]</sup>。在卫星上飞行了 30 d 的小鼠肝中有机阴离子转运蛋白家族成员 1b2 的蛋白水平提高<sup>[4]</sup>。太空微生物中 ABC 转运蛋白基因也明显上调<sup>[34-35]</sup>。航天环境下通过影响机体内药物转运体的表达和活性,有可能改变药物的吸收、分布、消除过程及在靶部位的浓度,最终影响到药物在体内的药理效应<sup>[36-37]</sup>。

## 2 模拟航天失重状态下基于动物的药代动力学研究

常用的地面模拟失重动物模型有慢性离心<sup>[38]</sup>、下身体负压<sup>[39]</sup>、全身束缚<sup>[40]</sup>、后肢固定<sup>[41]</sup>、固定后悬架<sup>[42]</sup>以及大鼠尾吊<sup>[43-46]</sup>等;其中 Musachia 模型<sup>[47]</sup>和 Morey-Holton 模型<sup>[44]</sup>在模拟太空真实环境中应用最为广泛。生理药理学(physiologically based pharmacokinetics, PBPK)模型可将动物和人体的药理学数据联系起来预测当机体生理功能发生变化时体内过程的变化<sup>[48]</sup>;张旸<sup>[49]</sup>探究了叶酸和酒石酸唑吡坦在失重状态下大鼠体内的药动学过程,为建立大鼠 PBPK 模型及推算人体 PBPK 模型奠定了基础。

解热镇痛药对乙酰氨基酚以被动扩散的方式,通过肠粘膜迅速吸收<sup>[15]</sup>。大鼠模拟失重状态服用对乙酰氨基酚后,吸收率( $k_a$ )相比对照组有所增加<sup>[23]</sup>。Somody 等<sup>[50]</sup>利用 Morey-Holton 模型探究了大鼠的局部血流变化,发现大鼠尾吊 14 d 后血管总外周阻力会降低,肠道的血流量增加,导致吸收率增加。随着肠道血流量的增加,对乙酰氨基酚的肠道血浓度会降低,导致肠腔和肠血流量之间的浓度梯度变大,因而增加了对乙酰氨基酚的吸收率;同时体内某些酶的表达增加,因此服用对乙酰氨基酚时应当注意调整用药方案<sup>[26]</sup>。

安替比林常用于评定药物代谢及微粒体的活性<sup>[51]</sup>。Brunner 等<sup>[17]</sup>通过口服或静注的方式给予尾吊模型大鼠 20 mg/kg 的安替比林,发现尾吊 3 d 和 7 d 后该药物的总体清除率显著升高。失重状态

对不同性别大鼠的药动学过程影响不同。Wei 等<sup>[52]</sup>进行了大鼠模拟失重状态的代谢研究,大鼠静脉注射安替比林后,发现肝的氧化代谢酶发生改变,药物在雄性大鼠体内的总清除率下降了 44.7%,平均驻留时间增加 58.7%,而该环境对雌性大鼠的影响较小。安替比林在体内主要经氧化代谢酶代谢排出体外<sup>[53]</sup>,失重状态会引起体内代谢酶发生变化,使安替比林在体内的清除过程发生改变。

头孢曲松在体内不被代谢,主要以原型经尿液或胆汁排泄,其消除半衰期较长,是长效的广谱抗生素<sup>[54]</sup>。Baranov 等<sup>[20]</sup>采用大鼠尾吊实验模拟航天失重状态,给大鼠肌肉注射头孢曲松后测定其药动学过程,发现头孢曲松的  $C_{\max}$  和生物利用度降低,但吸收加快。肾功能对头孢曲松的药动学影响较大<sup>[54]</sup>,失重状态导致机体机能的变化会影响头孢曲松的体内药动学过程。

采用兔进行  $-20^{\circ}$  头低位模拟实验,静脉滴注 3 mg/kg 的庆大霉素,给药后 4 h 测定血药浓度发现庆大霉素分布相速率常数  $\alpha$  值降低,  $T_{1/2}$  延长,转运速率常数  $k_{12}$  降低;可能是由于体液头向转移,引起肌肉血流量下降;血浆容量减少,组织间液积聚,从而使药物的分布减慢<sup>[21]</sup>。

抗菌药盐酸莫西沙星在正常大鼠肠道易吸收,模拟失重会使莫西沙星在肠道的吸收加快<sup>[55]</sup>。井娟等<sup>[55]</sup>对比了正常状态和模拟失重状态下盐酸莫西沙星在大鼠体内的药动学特征,与正常组相比,模拟失重 7 d 后,莫西沙星在模型组大鼠体内的 AUC 显著升高,  $T_{1/2}$  缩短<sup>[22]</sup>。模拟失重状态可能增大肠壁通透性使莫西沙星的吸收速率加快<sup>[55]</sup>,影响大鼠体内代谢酶的活性及表达,使莫西沙星体内代谢过程发生改变,降低其在大鼠尿液中的排泄量<sup>[56]</sup>,该结果提示服用莫西沙星过程中应当注意调整给药剂量。

甘琳等<sup>[57]</sup>对模拟失重 3、7、21 d 和地面组的大鼠单次肌肉注射异丙嗪麻黄碱合剂,发现异丙嗪在尾吊 3 d 和 7 d 的大鼠体内 AUC 和  $C_{\max}$  增加,这可能是模拟状态下血浆容量减少导致药物与血浆蛋白的结合发生改变,从而影响了药物的吸收;麻黄碱在尾吊 3 d 的大鼠体内 AUC 和  $C_{\max}$  减少,在 7 d 和 21 d 的大鼠体内 AUC 和  $C_{\max}$  增加,说明同一药物在不同模拟失重时间下的吸收程度有所不同。

抗抑郁药物阿米西汀在正常组和模拟失重组大鼠体内的药代动力学特征有明显差异<sup>[25]</sup>,其中,

模拟失重大鼠体内的  $C_{\max}$  和 AUC 分别为正常组的 4.8 和 4 倍,胃清除率和表观分布容积与正常大鼠相比显著降低,表明失重状态可能使大鼠血流发生改变,减慢阿米西汀在大鼠体内的排泄速度。

维生素 B6 参与了体内的多种生化反应,采用后肢固定的方式模拟失重状态,维生素 B6 在模型组大鼠体内的  $C_{\max}$ 、AUC、 $T_{\max}$  和  $CL_z/F$  与正常组相比存在较大差异。由于胃排空的减弱,维生素 B6 通过胃肠道的时间增加,在被吸收部位的停留时间延长,使得维生素 B6 在体内的 AUC 增加;模型组受模拟失重状态的影响使药物的  $V_z/F$  和  $CL_z/F$  降低,进而使模型组大鼠  $C_{\max}$  显著高于正常组<sup>[26]</sup>。因此,航天员在航天过程中服用维生素 B6 应调整给药方案,避免产生不良反应。

沈羨云等<sup>[58]</sup>通过悬吊模型发现,悬吊 30 d 的大鼠体内血黏度、纤维蛋白原和红细胞压积增高,红细胞变形能力下降,造成血流速度减慢,药物在体内的分布会发生明显的改变。组织血流的变化会引起药物在不同组织中的含量发生改变,Chowdhury 等<sup>[27]</sup>对大鼠进行了 2 周的尾吊实验,给大鼠静脉注射 3-H 标记的尼古丁,发现尾吊组大鼠不同组织中分布的尼古丁含量不同,其中食道、大动脉、基底、气管、肾上腺、脾和胰腺等组织中分布的尼古丁含量均显著降低。

近年来中药也逐渐应用到航天医学领域<sup>[59]</sup>。有学者研究了龙血竭中药效成分如龙血素 A、龙血素 B 等在模拟失重大鼠体内的药动学过程<sup>[29]</sup>,与正常组相比,龙血素 A 在模拟失重组中  $C_{\max}$  降低,且药时曲线呈现双峰现象<sup>[60]</sup>。失重组<sup>[61]</sup>和地面组<sup>[62]</sup>的龙血素 B 在体内的 AUC 没有显著差异,说明龙血素 B 在大鼠体内不同条件下的吸收总量相近。Li 等<sup>[63]</sup>继续探究了模拟失重状态下龙血竭的酚类成分在大鼠体内的动态变化过程,可能是模拟失重状态下生理条件的改变,导致酚类成分的吸收和排泄有所增加或减少。这些结果表明,中药不同成分在模拟航天大鼠体内的药动学过程不同,且中药研究也存在着一定的局限性<sup>[64]</sup>,为了增加航天员在航天环境服用中药的安全性和可靠性,还需进一步加强中药在航天领域的研究。

失重状态及失重持续周期会使不同器官和不同酶的活性和表达发生改变<sup>[48]</sup>。Lu 等<sup>[65]</sup>通过 21 d 大鼠尾吊模型探究模拟失重状态对药物代谢的影响,发现肝 CYP2C11、2E1 和 P-糖蛋白(P-

glycoprotein) 及肾 CYP4A1 受到明显抑制,肝和小肠上 CYP3A2 无明显变化。失重状态也会改变肠道菌群的状态<sup>[66]</sup>,损伤肠粘膜屏障,导致肠内有害物质会进入到血液循环到达其它组织,会影响机体的代谢功能<sup>[67]</sup>。失重状态也会改变机体转运体的表达<sup>[36]</sup>和离子通道的活性<sup>[37]</sup>,从而影响到药物的代谢情况。

在模拟航天应激状态下,机体胃肠道运动状态和胃肠道血流量会使药物的吸收加快或减缓,药物与蛋白的结合程度及血流速度和血管通透性等因素会导致药物在大鼠体内的分布发生改变,不同代谢酶和肠道菌群活性及表达水平也会受到环境的影响而发生变化,从而改变药物在体内的 ADME 过程。这些变化对阐明药物的体内过程具有重要意义,为研究药物在人体内的药动学过程提供参考。

### 3 航天在轨飞行状态下基于动物的药代动力学研究

太空环境会引起机体生理功能发生改变<sup>[68]</sup>,地面模拟太空实验难以较全面地反映太空真实环境。目前,越来越多的航天员在太空空间站进行在轨实验研究<sup>[69]</sup>,在轨动物实验表明,空间飞行会显著影响肝内代谢酶的活性和含量,使药物在体内的代谢过程发生变化;也会影响动物肝血流量的改变,从而影响到药物的代谢和清除率。飞行期间肠道消化酶和羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶的活性有所增加,太空飞行可能增加肝甘油三酯储存,改变脂质代谢稳态<sup>[70]</sup>。Abraham 等<sup>[71]</sup>研究了搭乘卫星大鼠的肝,发现太空环境下肝中有些脂质代谢酶的活性受影响较大。

航天飞行 9 d 后,CYP450 不同亚型酶的含量、活性会发生不同的改变<sup>[72-74]</sup>。上世纪 80 年代,Merrill 等<sup>[75]</sup>将 6 只大鼠带到太空实验室,分析大鼠体内酶活性的变化,发现航天状态大鼠的肝重量变化不大,但肝 CYP450 的含量下降了 50%。相继有许多在轨研究发现<sup>[76-77]</sup>,飞行后大鼠肝 CYP450 的含量显著降低。Moskaleva 等<sup>[78]</sup>对太空飞行中的小鼠肝 CYP450 进行定量测定,发现飞行组测定的 CYP450 亚型中 CYP1A2、CYP2C29、CYP2E1 的含量显著增加。Hammond 等<sup>[74]</sup>在 2018 年对飞行了 12 d 的小鼠代谢酶进行分析,发现在飞行后 CYP4A1 的表达明显增加,其它 CYP450 酶的表达变化不大。

### 4 模拟航天失重状态下基于人体的药代动力学研究

由于航天员在航天条件下监测其药动学数据不易,因此很难在太空开展药代动力学研究<sup>[10]</sup>。除了从太空真实环境中获取药动学数据之外,还可以利用地面模拟航天实验来探究航天真实环境下的药动学特征。因此,有效的利用地面模拟航天模型,开展地面模拟航天实验,对航天药代动力学的研究具有十分重要的意义<sup>[79]</sup>。

人体最早的地面模拟太空实验为人体浸水实验<sup>[80]</sup>,该方法模拟了人体在太空的失重状态,但该方法使受试者的活动受到限制,且难以长期处于浸泡状态。有研究者发明了干浸水法<sup>[81]</sup>,使受试者处于特殊的浸泡环境,可延长模拟失重状态。随后建立了多种模拟失重方法,如座椅休息<sup>[82]</sup>、水平长期卧床<sup>[83]</sup>、头低位卧床<sup>[84]</sup>等;其中人体卧床是使用最广泛的模型<sup>[85]</sup>。为了获得更真实的模拟失重时的血液动力学的改变,对头低位卧床的角度进行了比较研究,结果表明<sup>[86-87]</sup>, $-6^{\circ}$ 头低位卧床能更好地模拟失重环境下血流动力学和脑循环方面的改变。

对乙酰氨基酚在体内的吸收可作为胃排空的标志,Rumble 等<sup>[88]</sup>和 Renwick 等<sup>[89]</sup>在给药前和给药后采集血样,测定  $C_{max}$ 、 $T_{max}$  和 AUC,探究仰卧位时人体服用药物后体内药物的药动学变化情况,发现吸收率没有明显改变。Rumble 等<sup>[88]</sup>发现受试者卧床休息 7 d 后对乙酰氨基酚的消除没有明显变化。Renwick 等<sup>[89]</sup>发现左侧卧位与右侧和站着相比,左侧卧位时对乙酰氨基酚在体内的  $T_{max}$  增加。不同于前几项的研究发现,志愿者保持头低位仰卧,在服用对乙酰氨基酚前后定期采集血液和唾液,发现血浆  $C_{max}$  升高, $T_{max}$  缩短,表明药物的吸收加快,且随着卧床时间的延长,药物的吸收增加,但唾液样本中药物的总吸收量变化不大<sup>[82,90-95]</sup>。高建议等<sup>[84]</sup>探究了长期(19 d)模拟失重人头低位卧床模型,发现口服对乙酰氨基酚后,唾液中  $T_{max}$  延长, $C_{max}$  和 AUC 显著降低,这种变化可能与头低位卧床状态导致胃排空速度、胃肠道运动和胃肠道血流量变化有关。

Gandia 等<sup>[16]</sup>和 Idkaidek 等<sup>[96]</sup>给予头低位卧床的志愿者口服布洛芬,发现布洛芬在体内的生物利用度变化不大,但因为体液的重新分布,胃排空和肠蠕动减慢,增加了药物在胃肠道内的滞留时间,药物在体内的溶出增多,使其在模拟失重状态下的

吸收速率加快,起效加速。

青霉素口服容易被消化酶和胃酸破坏,通常采用皮下或肌肉注射的形式给药<sup>[97]</sup>。Levy<sup>[18]</sup>在 1967 年最早对头低位卧床体内代谢进行研究,发现与正常组相比,青霉素肌肉注射后模型组的肾清除率增加,代谢降低。1980 年,Kates 等<sup>[83]</sup>探究了卧床休息的受试者静脉注射青霉素,发现青霉素的体内药动学过程没有太大变化,该研究受试者处于水平位,没有准确反映受试者真实的体液流动情况。

Schuck 等<sup>[19]</sup>探究了头低位卧床的志愿者服用环丙沙星后药动学的变化情况,发现药物  $C_{\max}$  在不同状态下差异不大,表明环丙沙星在体内受模拟失重状态的影响较小。

异丙嗪为治疗航天运动病常用药物,Gandia 等<sup>[23]</sup>探究了 $-6^\circ$ 卧床与坐位条件下异丙嗪在体内的变化情况,结果表明 $-6^\circ$ 卧床条件下,口服异丙嗪后该药物的生物利用度增加了 30%,该结果提示对于安全范围较小的药物,模拟失重环境下需谨慎用药,避免血药浓度的增加导致药物中毒。不同的给药途径在模拟失重条件下其吸收程度也会不同。Gandia 等<sup>[98]</sup>利用头低位模拟失重模型探究了不同给药途径下给予人体异丙嗪后的变化情况,发现模拟失重状态下肌肉注射异丙嗪的 AUC 比口服给药高 3 倍。

血浆中药物与蛋白的结合程度会影响到药物的分布。白蛋白占血浆总容量的 60%,胡燕萍等<sup>[99]</sup>通过 $-6^\circ$ 头低位卧床模拟失重人体试验,发现卧床后 11 d 人体血浆中总蛋白水平下降,在 21 d 后回升,在此过程中白蛋白的含量没有明显变化,表明与白蛋白结合的药物分布受失重的影响不大。药物的分布还会受到体内血流的影响,通过影响血管的通透性进而影响药物分布。Schuck 等<sup>[19]</sup>发现,在模拟失重的条件下,血浆药物总浓度与游离药物浓度相差不大,但组织的透过轻微减少。

周环宇等<sup>[100]</sup>对 16 名健康志愿者 $-6^\circ$ 头低位卧床 21 d 的人体肝门静脉血流进行超声观察,发现随着模拟时间的延长,血流量逐渐下降,恢复直立后血流量逐渐恢复至正常水平。肝血流速度会影响药物在体内的清除过程,Saivin 等<sup>[28]</sup>给予头低位卧床的 8 名志愿者局麻药利多卡因,卧床 1 d 后肝血流速度增加,在 4 d 后利多卡因的代谢清除率增加了 30%<sup>[76]</sup>。Feely 等<sup>[101]</sup>也发现卧躺后利多卡因的清除率增加。

综上所述,同种药物在不同的模拟航天人体实验中有不同的体内过程,不同的人体航天模型将会影响到药物在体内的吸收速率及程度。不同药物在模拟航天状态下的体内过程也不尽相同。药物的给药剂量、给药形式及药物剂型等也会影响药物在体内的药动学过程。对于治疗窗较窄的药物,由于航天飞行中机体的生理功能发生变化,导致血药浓度发生改变。因此,我们应当对血药浓度进行监测,获取药动学数据以得到最佳的给药方案。

## 5 航天在轨飞行状态下基于人体的药代动力学研究

航天环境中多以口服给药为主要用药途径。因此,航天状态下人体的胃肠道生理环境对药物的吸收会产生较大的影响<sup>[31]</sup>。通过唾液采样的方式也可用于探究某些药物的药动学过程<sup>[102]</sup>,Cintroń 等<sup>[24]</sup>对 5 名机组人员口服对乙酰氨基酚后进行唾液采样,发现在飞行任务不同天数中,不同个体的达峰浓度( $C_{\max}$ )升高,但达到峰值浓度的时间( $T_{\max}$ )呈不同的变化趋势,这种差异可能是因为机组人员对航天反应的差异及胃肠道功能不同导致的。Cintroń 等<sup>[24]</sup>在 1990 年发现航天员口服对乙酰氨基酚相比飞行前其吸收率显著下降,且  $T_{\max}$  延长。Putcha 等<sup>[103]</sup>发现航天员在飞行期间服用对乙酰氨基酚后不吸收,药物的  $T_{\max}$  延长。Kovachevich 等<sup>[104]</sup>给予 5 名航天员对乙酰氨基酚片剂后,与地面组相比, $T_{\max}$  延长,吸收延迟,AUC 没有明显的变化。当服用对乙酰氨基酚胶囊时, $T_{\max}$  缩短,半衰期缩短。这可能是不同剂型药物在航天环境影响下在胃内滞留和排空方式不同导致。

航天员在太空环境,药物进入体循环后会受到肠道菌群或肝内酶的影响。安替比林在肝由几种 CYP450 同工酶代谢,以安替比林作为肝代谢标记物,Putcha<sup>[105]</sup>发现 2 名航天员在 2 d 的飞行后,其中 1 名航天员的安替比林清除速率与地面相比提高了 30%,另 1 名航天员清除率降低 20%,结束飞行后 2 位航天员的安替比林清除率比在空中降低 20%,说明肝代谢极易受到太空环境的影响。

东莨菪碱为胆碱受体阻滞药,可用于航天运动病的治疗<sup>[106]</sup>。Cintroń 等<sup>[24]</sup>对 4 名志愿者口服东莨菪碱进行研究,在 $-6^\circ$ 条件下,12 h 后东莨菪碱的吸收明显下降,且东莨菪碱的吸收会受到合并用药的影响<sup>[107]</sup>。

## 6 小结和展望

随着人类对宇宙太空的不断探索,越来越多的航天员将在太空环境长期驻留完成飞行作业任务。航天环境下人体的生理状态与地面相差较大,太空特殊的环境会影响口服药物在胃肠道的吸收过程和体内肠道菌群的生存状态,也会改变体内血流的分布和药物与蛋白质的结合率,影响体内药物转运体、药物代谢酶的活性和水平,导致机体处于多种不同于地面的生理状态。

模拟航天模型合理建立是影响航天应激状态下药物药代动力学研究的关键因素之一。在模拟航天动物实验中,需要考虑模型是否能够贴切航天真实状态,以便获得更加准确的数据进行参考。对于模拟航天人体实验,也应当考虑不同人体模型、不同采样方式等对人体产生的影响。航天环境会使机体内多种细胞发生改变<sup>[108-109]</sup>,目前美国国家航空航天局设计的旋转细胞培养系统<sup>[110]</sup>已被用于模拟失重状态的体外药动学及药效学实验<sup>[111]</sup>。近年来提出的细胞药代动力学新理论为探究药物在细胞内的动态变化过程,发现药物在细胞内的作用机制提供参考<sup>[112]</sup>。

航天环境会对机体的生理功能产生较大的影响,使药物在体内的 ADME 过程发生改变。除此之外,药物在航天环境下的稳定性也是我们需要考虑的一个重要因素<sup>[113-114]</sup>。因此,航天员在太空中的用药规律不能简单地按照地面用药方案为指导原则,应根据航天员在太空中的实际情况合理用药。利用模拟航天模型研究药物的药代动力学过程,获取药动学数据,分析航天环境下药动学变化的影响因素及机制,为保障航天员在太空中的安全用药提供实验依据。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] 杨璐茜. 中国载人航天迈入空间站时代 [J]. 国际太空, 2021, 510: 4-5.  
Yang LQ. China's manned spaceflight enters the space station era [J]. Space Int, 2021, 510: 4-5.
- [ 2 ] 方勇. 2020 年国外航天发展重要进展 [J]. 卫星应用, 2021, 1: 15-19.  
Fang Y. Important progress of foreign aerospace development in 2020 [J]. Satellite Appl, 2021, 1: 15-19.
- [ 3 ] 张柏楠. 中国载人航天开启新征程 [J]. 中国航天, 2021, 8: 9-13.  
Zhang BN. New journey of China's manned spaceflight [J]. Aerospace Chin, 2021, 8: 9-13.
- [ 4 ] Eyal S. How do the pharmacokinetics of drugs change in astronauts in space? [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2020, 16(5): 353-356.
- [ 5 ] Santy PA, Bungo MW. Pharmacologic considerations for Shuttle astronauts [J]. J Clin Pharmacol, 1991, 31(10): 931-933.
- [ 6 ] 徐冲, 吴斌, 刘尚昕, 等. 航天飞行人体生理变化与医学问题 [J]. 生物学通报, 2017, 52(5): 1-5.  
Xu C, Wu B, Liu SX, et al. Human physiological changes and medical problems in spaceflight [J]. Bull Biol, 2017, 52(5): 1-5.
- [ 7 ] 石宏志, 郭立国, 许东, 等. 航天飞行中的病症和损伤 [J]. 航天医学与医学工程, 2019, 32(6): 551-557.  
Shi HZ, Guo LG, Xu D, et al. Diseases and injuries in spaceflight [J]. Space Med Med Eng, 2019, 32(6): 551-557.
- [ 8 ] 陈善广, 邓一兵, 李莹辉. 航天医学工程学主要研究进展与未来展望 [J]. 航天医学与医学工程, 2018, 31(2): 79-89.  
Chen SG, Deng YB, Li YH. Major progresses and prospects of space medico-engineering [J]. Space Med Med Eng, 2018, 31(2): 79-89.
- [ 9 ] Bevelacqua JJ, Welsh J, Mortazavi SMJ. Comments on 'An overview of space medicine' [J]. Br J Anaesth, 2018, 120(4): 874-876.
- [ 10 ] 石宏志, 李勇枝, 谢琼. 失重对药物代谢动力学影响的回顾与展望 [J]. 航天医学与医学工程, 2011, 24(6): 419-422.  
Shi HZ, Li YZ, Xie Q. Review and prospect of influences of weightlessness on pharmacokinetics [J]. Space Med Med Eng, 2011, 24(6): 419-422.
- [ 11 ] Eyal S, Derendorf H. Medications in space: in search of a pharmacologist's guide to the galaxy [J]. Pharm Res, 2019, 36(10): 148.
- [ 12 ] 李颖, 李玉环, 章明星, 等. 针灸调节内稳态研究进展及在航天医学中的应用展望 [J]. 航天医学与医学工程, 2020, 33(6): 542-548.  
Li Y, Li YH, Zhang MX, et al. Research progress of acupuncture in regulating homeostasis and prospect of its application in space medicine [J]. Space Med Med Eng, 2020, 33(6): 542-548.
- [ 13 ] 汪德生, 张鹤, 杜芳, 等. 内关穴位刺激对抗模拟失重大鼠心功能变化的研究 [J]. 航天医学与医学工程, 2014, 27(6): 403-407.  
Wang DS, Zhang H, Du F, et al. Research on neiguan acupoint stimulation against cardiac functional changes in simulated weightlessness rats [J]. Space Med Med Eng, 2014, 27(6): 403-407.
- [ 14 ] 刘德福, 朱林, 陈宇洲, 等. 航天员太空药品研究进展 [EB/OL]. (2021-09-28) [2022-07-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1481.R.20220125.1819.008.html>.  
Liu DF, Zhu L, Chen YZ, et al. Research progress of drugs for astronauts in space [EB/OL]. (2021-09-28) [2022-07-09]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1481.R.20220125.1819.008.html>.
- [ 15 ] García-López P, Pérez-Uribe J, Madrazo I, et al. Oral

- paracetamol bioavailability in rats subjected to experimental spinal cord injury [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 1997, 18(3): 203–211.
- [16] Gandia P, Saivin S, Houin G. The influence of weightlessness on pharmacokinetics [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2005, 19(6): 625–636.
- [17] Brunner LJ, DiPiro JT, Feldman S. Antipyrine pharmacokinetics in the tail-suspended rat model [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, 274(1): 345–352.
- [18] Levy G. Effect of bed rest on distribution and elimination of drugs [J]. *J Pharm Sci*, 1967, 56(7): 928–929.
- [19] Schuck EL, Grant M, Derendorf H. Effect of simulated microgravity on the disposition and tissue penetration of ciprofloxacin in healthy volunteers [J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(7): 822–831.
- [20] Baranov MV, Arkhipova EN, Lebedeva MA, et al. Features of the pharmacokinetics of ceftriaxone during the antiorthostatic hypokinesia in rats [J]. *Patol Fiziol Eksp Ter*, 2014, 1: 28–31.
- [21] 郭志峰, 高建义, 王宝珍, 等. 头低位 ( $-20^\circ$ ) 限制活动 7 d 对兔庆大霉素药代动力学的影响 [J]. *航天医学与医学工程*, 1999, 12(5): 333–337.
- Guo ZF, Gao JY, Wang BZ, et al. Effects of 7 d head down tilt ( $-20^\circ$ ) immobilization on pharmacokinetics of gentamicin in rabbits [J]. *Space Med Med Eng*, 1999, 12(5): 333–337.
- [22] 井娟, 王力彬, 盖守昌, 等. 盐酸莫西沙星在正常重力和模拟失重大鼠体内药代动力学比较研究 [A]. 第三届全国药物代谢动力学青年科学家论坛暨刘昌孝人才奖颁奖大会会议资料集 [C]; 2017.
- Jing J, Wang LB, Gai SC, et al. Comparative study on the pharmacokinetics of moxifloxacin hydrochloride in normal gravity and simulated weightlessness rats [A]. The 3rd National Pharmacokinetics Young Scientist Forum and Liu Changxiao Talent Award Conference Data Collection [C]; 2017.
- [23] Gandia P, Saivin S, Lavit M, et al. Influence of simulated weightlessness on the pharmacokinetics of acetaminophen administered by the oral route; a study in the rat [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2004, 18(1): 57–64.
- [24] Cintroñ NM, Lane HW, Leach CS. Metabolic consequences of fluid shifts induced by microgravity [J]. *Physiologist*, 1990, 33(1): 16–19.
- [25] 刘倩, 郑增娟, 吴红云, 等. 阿姆斯特汀在模拟失重大鼠体内检测方法建立及药代动力学研究 [J]. *国际药学研究杂志*, 2018, 45(11): 870–874.
- Liu Q, Zheng ZJ, Wu HY, et al. Detection method establishment and pharmacokinetics of amuxetine in rats under microgravity conditions [J]. *J Int Pharm Res*, 2018, 45(11): 870–874.
- [26] 赵军. 维生素 B6 和对乙酰氨基酚在模拟失重 SD 大鼠体内的药代动力学研究 [D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学; 2018.
- Zhao J. Study on the pharmacokinetics of vitamin B6 and acetaminophen in simulated weightlessness SD rats [D]. Xi'an: People's Liberation Army Air Force Military Medical University; 2018.
- [27] Chowdhury P, Soulsby ME, Pasley JN. Distribution of 3H-nicotine in rat tissues under the influence of simulated microgravity [J]. *Biomed Environ Sci*, 1999, 12(2): 103–109.
- [28] Saivin S, Pavy-Le Traon A, Soulez-LaRivière C, et al. Pharmacology in space: pharmacokinetics [J]. *Adv Space Biol Med*, 1997, 6: 107–121.
- [29] 邓力. 龙抗 I 号在模拟失重大鼠体内药物动力学研究 [D]. 北京: 北京理工大学; 2015.
- Deng L. Pharmacokinetics study of dragon's blood in rats under simulated weightlessness [D]. Beijing: Beijing Institute of Technology; 2015.
- [30] 徐冰心, 刘志国, 吴久鸿, 等. 航天药代动力学研究进展 [A]. 第六届全国中西医结合灾害医学学术会议学术论文集 [C]; 2010.
- Xu BX, Liu ZG, Wu JH, et al. Advances in aerospace pharmacokinetics research [A]. Proceedings of the 6th National Conference on Disaster Medicine of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine [C]; 2010.
- [31] Amidon GL, DeBrincat GA, Najib N. Effects of gravity on gastric emptying, intestinal transit, and drug absorption [J]. *J Clin Pharmacol*, 1991, 31(10): 968–973.
- [32] 栾家杰, 宋建国. 药物转运体与药物体内过程 [J]. *安徽医药*, 2005, 9(10): 721–723.
- Luan JJ, Song JG. Drug transporter and the disposition of drug in the body [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2005, 9(10): 721–723.
- [33] Zhang Y, Lu T, Wong M, et al. Transient gene and microRNA expression profile changes of confluent human fibroblast cells in spaceflight [J]. *FASEB J*, 2016, 30(6): 2211–2224.
- [34] Morrison MD, Fajardo-Cavazos P, Nicholson WL. Comparison of *Bacillus subtilis* transcriptome profiles from two separate missions to the international space station [J]. *NPJ Microgravity*, 2019, 5: 1.
- [35] Crabbé A, Nielsen-Preiss SM, Woolley CM, et al. Spaceflight enhances cell aggregation and random budding in *Candida albicans* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80677.
- [36] Vaquer S, Cuyàs E, Rabadán A, et al. Active transmembrane drug transport in microgravity: a validation study using an ABC transporter model [J]. *F1000Res*, 2014, 3: 201.
- [37] Goldermann M, Hanke W. Ion channel are sensitive to gravity changes [J]. *Microgravity Sci Technol*, 2001, 13(1): 35–38.
- [38] Pitts GC, Bull LS, Oyama J. Effect of chronic centrifugation on body composition in the rat [J]. *Am J Physiol*, 1972, 223(5): 1044–1048.
- [39] Bedford TG, Tipton CM. Lower body negative pressure in the tranquilized rat [J]. *Aviat Space Environ Med*, 1985, 56(8): 786–790.
- [40] Musacchia XJ, Deavers DR, Meininger GA, et al. A model for hypokinesia: effects on muscle atrophy in the rat [J]. *J Appl*

- Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1980, 48(3): 479-486.
- [41] Witzmann FA, Kim DH, Fitts RH. Hindlimb immobilization; length-tension and contractile properties of skeletal muscle [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1982, 53(2): 335-345.
- [42] Wronski TJ, Morey-Holton ER. Skeletal response to simulated weightlessness; a comparison of suspension techniques [J]. Aviat Space Environ Med, 1987, 58(1): 63-68.
- [43] Feldman S, Brunner LJ. Small animal model of weightlessness for pharmacokinetic evaluation [J]. J Clin Pharmacol, 1994, 34(6): 677-683.
- [44] Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model; technical aspects [J]. J Appl Physiol (1985), 2002, 92(4): 1367-1377.
- [45] Morey ER, Sabelman EE, Turner RT, et al. A new rat model simulating some aspects of space flight [J]. Physiologist, 1979, 22(6): 23-24.
- [46] Sun LW, Blottner D, Luan HQ, et al. Bone and muscle structure and quality preserved by active versus passive muscle exercise on a new stepper device in 21 days tail-suspended rats [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2013, 13(2): 166-177.
- [47] Musacchia XJ. An assessment of suspension systems; models that reproduce responses to weightlessness [J]. Physiologist, 1992, 35: 92-95.
- [48] 梁力. 基于生理药理学模型的异丙嗪在模拟失重大鼠体内的处置研究 [D]. 西安: 第四军医大学; 2015.
- Liang L. Application of physiologically based pharmacokinetic models for assessing the disposition of promethazine in simulated weightless rats [D]. Xi'an: Fourth Military Medical University; 2015.
- [49] 张畅. 叶酸和酒石酸唑吡坦在模拟失重 SD 大鼠体内的药代动力学研究 [D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学; 2018.
- Zhang Y. Study on the pharmacokinetics of folic acid and zolpidem in simulated weightlessness SD rats [D]. Xi'an: People's Liberation Army Air Force Military Medical University; 2018.
- [50] Somody L, Fagette S, Blanc S, et al. Regional blood flow in conscious rats after head-down suspension [J]. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1998, 78(4): 296-302.
- [51] 曲亚. 安替比林的唾液与血浆清除率对肝脏功能的评定 [J]. 国外医学. 药学分册, 1983, 4: 254.
- Qu Y. Assessment of liver function by salivary and plasma clearance of antipyrine [J]. Foreign Medicine. Pharmacy Volume, 1983, 4: 254.
- [52] Wei B, Abobo CV, Ma J, et al. Gender differences in pharmacokinetics of antipyrine in a simulated weightlessness rat model [J]. Aviat Space Environ Med, 2012, 83(1): 8-13.
- [53] 徐君辉, 李士敏. 甘草提取液与甘草酸对小鼠安替比林代谢影响的比较研究 [J]. 中成药, 2007, 29(11): 1673-1675.
- Xu JH, Li SM. Comparative study on the effects of licorice extract and glycyrrhizic acid on the metabolism of antipyrine in mice [J]. Chin Patent Med, 2007, 29(11): 1673-1675.
- [54] 朱珠, 王爱霞, 栗岩, 等. 头孢曲松的临床药代动力学研究 [J]. 中国药理学杂志, 1993, 28(9): 543-546, 572.
- Zhu Z, Wang AX, Li Y, et al. Clinical pharmacokinetics of ceftriaxone [J]. Chin Pharm J, 1993, 28(9): 543-546, 572.
- [55] 井娟, 崔敏萱, 屈国涛, 等. 盐酸莫西沙星在正常和模拟失重大鼠中肠吸收特性研究 [J]. 中国药师, 2020, 23(1): 86-90.
- Jing J, Cui MX, Qu GT, et al. Study on the intestinal absorption of moxifloxacin in normal and simulated weightless rats [J]. Chin Pharm, 2020, 23(1): 86-90.
- [56] 刘骅森, 李勇枝, 王佳平, 等. 尾吊模拟失重大鼠灌胃给予莫西沙星的尿液排泄规律研究 [J]. 航天医学与医学工程, 2019, 32(6): 478-483.
- Liu HY, Li YZ, Wang JP, et al. Urinary excretion of moxifloxacin in tail-suspension simulated weightlessness rats after oral administration [J]. Space Med Med Eng, 2019, 32(6): 478-483.
- [57] 甘琳, 郑志芬, 王鲁君, 等. 异丙嗪麻黄碱合剂在模拟失重大鼠体内的药理学研究 [J]. 北京理工大学学报, 2018, 38(2): 216-220.
- Gan L, Zheng ZF, Wang LJ, et al. Pharmacokinetic study of promethazine and ephedrine combination in rats under the simulated microgravity condition [J]. Trans Beijing Inst Technol, 2018, 38(2): 216-220.
- [58] 沈羡云, 崔伟, 马永烈, 等. 30 d 尾吊大鼠血循环、肌肉和骨骼系统的变化 [J]. 航天医学与医学工程, 1999, 12(4): 45-48.
- Shen XY, Cui W, Ma YL, et al. Changes of blood circulation, muscle and skeletal systems in 30 d tail suspended rats [J]. Space Med Med Eng, 1999, 12(4): 45-48.
- [59] 王宝珍, 石宏志, 宋孔智, 等. 卧床模拟失重状态的中医辨证初探 [J]. 航天医学与医学工程, 1997, 10(1): 59-61.
- Wang BZ, Shi HZ, Song KZ, et al. Preliminary study on differentiation of syndromes during HDT-6° bed rest with traditional chinese medicine [J]. Space Med Med Eng, 1997, 10(1): 59-61.
- [60] 邓力, 邓玉林, 李玉娟. 龙血素 A 在模拟失重大鼠体内的药物动力学研究 [A]. 第十届全国生物医药色谱及相关技术学术交流会论文集 [C]; 2014.
- Deng L, Deng YL, Li YJ. Pharmacokinetics of loracerein A in simulated weightless rats [A]. Proceedings of the 10th National Symposium on Biomedical Chromatography and Related Technologies [C]; 2014.
- [61] 李玉娟, 张宇实, 陈博, 等. 龙血素 B 在模拟失重大鼠体内的血浆药动力学研究 [J]. 航天医学与医学工程, 2014, 27(2): 79-83.
- Li YJ, Zhang YS, Chen B, et al. Research on pharmacokinetics of loureirin B in plasma of rats under simulated weightlessness [J]. Space Med Med Eng, 2014, 27(2): 79-83.
- [62] Li J, Li D, Pan Y, et al. Simultaneous determination of ten

- bioactive constituents of Sanjie Zhentong Capsule in rat plasma by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1054: 20–26.
- [63] Li Y, Li GQ, Li Y, et al. Development and application of an UHPLC-MS method for comparative pharmacokinetic study of phenolic components from dragon's blood in rats under simulated microgravity environment [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 121: 91–98.
- [64] 刘昌孝. 中药药代动力学研究的难点和热点 [J]. *药理学学报*, 2005, 40(5): 395–401.
- Liu CX. Difficulty and hot-points on pharmacokinetics studies of traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharma Sin*, 2005, 40(5): 395–401.
- [65] Lu SK, Bai S, Javeri K, et al. Altered cytochrome P450 and P-glycoprotein levels in rats during simulated weightlessness [J]. *Aviat Space Environ Med*, 2002, 73(2): 112–118.
- [66] Brunner LJ, Bai S, Abdus-Salaam H. Effect of simulated weightlessness on phase II drug metabolism in the rat [J]. *Aviat Space Environ Med*, 2000, 71(9): 899–903.
- [67] Rivera CA, Tchamitchi MH, Mendoza L, et al. Endotoxemia and hepatic injury in a rodent model of hindlimb unloading [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2003, 95(4): 1656–1663.
- [68] Levy G. Pharmacodynamic aspects of spaceflight [J]. *J Clin Pharmacol*, 1991, 31(10): 956–961.
- [69] 刘伟波, 陈金盾, 邓一兵. 航天医学工程助推中国空间站建设 [J]. *航天医学与医学工程*, 2018, 31(2): 90–96.
- Liu WB, Chen JD, Deng YB. Support and promotion of space medico-engineering in construction of China's space station [J]. *Space Med Med Eng*, 2018, 31(2): 90–96.
- [70] Jonscher KR, Alfonso-Garcia A, Suhaimi JL, et al. Spaceflight activates lipotoxic pathways in mouse liver [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152877.
- [71] Abraham S, Klein HP, Lin CY, et al. The effects of space flight on some rat liver enzymes regulating carbohydrate and lipid metabolism [J]. *Adv Space Res*, 1981, 1(14): 199–217.
- [72] Andreev-Andrievskiy A, Popova A, Boyle R, et al. Mice in Bion-M 1 space mission: training and selection [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104830.
- [73] Baba T, Nishimura M, Kuwahara Y, et al. Analysis of gene and protein expression of cytochrome P450 and stress-associated molecules in rat liver after spaceflight [J]. *Pathol Int*, 2008, 58(9): 589–595.
- [74] Hammond TG, Allen PL, Birdsall HH. Effects of space flight on mouse liver versus kidney: gene pathway analyses [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 4106.
- [75] Merrill AH Jr, Wang E, Jones DP, et al. Hepatic function in rats after spaceflight: effects on lipids, glycogen, and enzymes [J]. *Am J Physiol*, 1987, 252(2): 222–226.
- [76] Saivin S, Pavy-Le Traon A, Cornac A, et al. Impact of a four-day head-down tilt ( $-6^\circ$ ) on lidocaine pharmacokinetics used as probe to evaluate hepatic blood flow [J]. *J Clin Pharmacol*, 1995, 35(7): 697–704.
- [77] Merrill AH Jr, Hoel M, Wang E, et al. Altered carbohydrate, lipid, and xenobiotic metabolism by liver from rats flown on Cosmos 1887 [J]. *FASEB J*, 1990, 4(1): 95–100.
- [78] Moskaleva N, Moysa A, Novikova S, et al. Spaceflight effects on cytochrome P450 content in mouse liver [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142374.
- [79] 黄丽丽, 武广霞, 张宇实, 等. 航天失重条件下药动学研究进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2017, 34(5): 436–442.
- Huang LL, Wu GX, Zhang YS, et al. Research progress in pharmacokinetics under weightlessness [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2017, 34(5): 436–442.
- [80] Greenleaf JE. Physiological responses to prolonged bed rest and fluid immersion in humans [J]. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1984, 57(3): 619–633.
- [81] Koryak Y. Mechanical and electrical changes in human muscle after dry immersion [J]. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1996, 74(1–2): 133–140.
- [82] Gandia P, Bareille MP, Saivin S, et al. Influence of simulated weightlessness on the oral pharmacokinetics of acetaminophen as a gastric emptying probe in man: a plasma and a saliva study [J]. *J Clin Pharmacol*, 2003, 43(11): 1235–1243.
- [83] Kates RE, Harapat SR, Keefe DL, et al. Influence of prolonged recumbency on drug disposition [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1980, 28(5): 624–628.
- [84] 高建义, 王宝珍, 王静, 等. 模拟失重状态对扑热息痛药代动力学的影响 [J]. *解放军药理学学报*, 2001, 17(6): 310–313.
- Gao JY, Wang BZ, Wang J, et al. Effect of simulated weightlessness on the pharmacokinetic parameters of paracetamol [J]. *Pharm J Chin PLA*, 2001, 17(6): 310–313.
- [85] 阎晓霞. 长期失重的地面模拟——卧床及其生理研究 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1990, 17(3): 181–184.
- Yan MX. Ground simulation of long-term weightlessness: bed rest and its physiological research [J]. *Adv Biochem Biophysics*, 1990, 17(3): 181–184.
- [86] Hargens AR. Recent bed rest results and countermeasure development at NASA [J]. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1994, 616: 103–114.
- [87] 沈羨云, 兰景全, 向求鲁, 等. 模拟失重时兔脑微循环的变化 [J]. *航天医学与医学工程*, 1989, 2(2): 89–93.
- Shen XY, Lan JQ, Xiang QL, et al. Changes of rabbit brain microcirculation during simulated weightlessness [J]. *Space Med Med Eng*, 1989, 2(2): 89–93.
- [88] Rumble RH, Roberts MS, Denton MJ. Effects of posture and sleep on the pharmacokinetics of paracetamol (acetaminophen) and its metabolites [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1991, 20(2): 167–73.
- [89] Renwick AG, Ahsan CH, Challenor VF, et al. The influence of posture on the pharmacokinetics of orally administered nifedipine [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1992, 34(4): 332–336.

- [90] Sanaka M, Koike Y, Yamamoto T, et al. A reliable and convenient parameter of the rate of paracetamol absorption to measure gastric emptying rate of liquids [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1997, 35(11): 509–513.
- [91] Doherty TJ, Andrews FM, Provenza MK, et al. Acetaminophen as a marker of gastric emptying in ponies [J]. *Equine Vet J*, 1998, 30(4): 349–351.
- [92] Lohmann KL, Roussel AJ, Cohen ND, et al. Comparison of nuclear scintigraphy and acetaminophen absorption as a means of studying gastric emptying in horses [J]. *Am J Vet Res*, 2000, 61(3): 310–315.
- [93] Petring OU, Flachs H. Inter- and intrasubject variability of gastric emptying in healthy volunteers measured by scintigraphy and paracetamol absorption [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1990, 29(6): 703–708.
- [94] Heading RC, Nimmo J, Prescott LF, et al. The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying [J]. *Br J Pharmacol*, 1973, 47(2): 415–421.
- [95] Sanaka M, Kuyama Y, Nishinakagawa S, et al. Use of salivary acetaminophen concentration to assess gastric emptying rate of liquids [J]. *J Gastroenterol*, 2000, 35(6): 429–433.
- [96] Idkaidek N, Arafat T. Effect of microgravity on the pharmacokinetics of Ibuprofen in humans [J]. *J Clin Pharmacol*, 2011, 51(12): 1685–1689.
- [97] 张恒玉. 青霉素的药理、作用及其过敏反应研究 [J]. *中国卫生产业*, 2013, 10(22): 56–57.  
Zhang HY. Study on the pharmacology, action and allergic reaction of penicillin [J]. *Chin Health Industry*, 2013, 10(22): 56–57.
- [98] Gandia P, Saivin S, Le-Traon AP, et al. Influence of simulated weightlessness on the intramuscular and oral pharmacokinetics of promethazine in 12 human volunteers [J]. *J Clin Pharmacol*, 2006, 46(9): 1008–1016.
- [99] 胡燕萍, 李建新, 刘仲昌, 等. 模拟失重膳食 Fe 摄入及血清蛋白含量的变化 [J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23(9): 859–861.  
Hu YP, Li JX, Liu ZC, et al. Changes of Fe in diet intakes and serum proteins in weightlessness simulation [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002, 23(9): 859–861.
- [100] 周环宇, 梁会泽, 何薇薇, 等. 模拟失重对门静脉血流动力学影响的彩色多普勒超声研究 [J]. *中华医学超声杂志(电子版)*, 2010, 7(5): 26–29.  
Zhou HY, Liang HZ, He WW, et al. Color doppler ultrasound study of simulated weightlessness on portal vein hemodynamics [J]. *Chin J Med Ultrasound (Electronic Edition)*, 2010, 7(5): 26–29.
- [101] Feely J, Wade D, McAllister CB, et al. Effect of hypotension on liver blood flow and lidocaine disposition [J]. *N Engl J Med*, 1982, 307(14): 866–869.
- [102] Srinivasan RS, Bourne DW, Putcha L. Application of physiologically based pharmacokinetic models for assessing drug disposition in space [J]. *J Clin Pharmacol*, 1994, 34(6): 692–698.
- [103] Putcha L, Cintrón NM. Pharmacokinetic consequences of spaceflight [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1991, 618: 615–618.
- [104] Kovachevich IV, Kondratenko SN, Starodubtsev AK, et al. Pharmacokinetics of acetaminophen administered in tablets and capsules under long-term space flight conditions [J]. *Pharm Chem J*, 2009, 43(3): 130–133.
- [105] Putcha L. Pharmacotherapeutics in space [J]. *J Gravit Physiol*, 1999, 6(1): 165–168.
- [106] 谷福根, 吴春芝, 岳文. 东莨菪碱的临床应用研究进展 [J]. *中国药房*, 2008, 19(11): 870–873.  
Gu FG, Wu CZ, Yue W. Research progress on clinical application of scopolamine [J]. *Chin Pharm*, 2008, 19(11): 870–873.
- [107] Tietze KJ, Putcha L. Factors affecting drug bioavailability in space [J]. *J Clin Pharmacol*, 1994, 34(6): 671–676.
- [108] Grimm D, Wehland M, Corydon TJ, et al. The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(8): 882–894.
- [109] Graebe A, Schuck EL, Lensing P, et al. Physiological, pharmacokinetic, and pharmacodynamic changes in space [J]. *J Clin Pharmacol*, 2004, 44(8): 837–853.
- [110] Schwarz RP, Goodwin TJ, Wolf DA. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity [J]. *J Tissue Cult Methods*, 1992, 14(2): 51–57.
- [111] Kohn FPM, Hauslage J. The gravity dependence of pharmacodynamics: the integration of lidocaine into membranes in microgravity [J]. *NPJ Microgravity*, 2019, 5: 5.
- [112] Zhou F, Zhang JW, Li P, et al. Toward a new age of cellular pharmacokinetics in drug discovery [J]. *Drug Metab Rev*, 2011, 43(3): 335–345.
- [113] Blue RS, Bayuse TM, Daniels VR, et al. Supplying a pharmacy for NASA exploration spaceflight: challenges and current understanding [J]. *NPJ Microgravity*, 2019, 5: 14.
- [114] 李华盛, 鹿金颖, 王思涵, 等. 中药资源空间诱变育种研究进展 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(7): 1036–1040.  
Li HS, Lu JY, Wang SH, et al. Research progress on space mutation breeding of traditional chinese medicine resources [J]. *World Chin Med*, 2021, 16(7): 1036–1040.

[收稿日期] 2022-04-08

董李晋川, 黄红, 刘斌, 等. 苏俄太空动物实验研究发展历程 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 557-567.

Dong LJC, Huang H, Liu B, et al. A review of space animal experiments conducted by the former Soviet Union and Russia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 557-567.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.015

## 苏俄太空动物实验研究发展历程

董李晋川<sup>1</sup>, 黄红<sup>2</sup>, 刘斌<sup>3</sup>, 杨紫玉<sup>1</sup>, 彭博<sup>1</sup>, 陈善广<sup>4</sup>, 姜宁<sup>2</sup>, 刘新民<sup>2\*</sup>, 陈颖<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院·中药研究所, 北京 100700; 2. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193; 3. 燕山大学, 河北 秦皇岛 066004; 4. 中国航天员科研训练中心 人因工程国家重点实验室, 北京 100094)

**【摘要】** 太空动物实验研究是人类航天科技发展中至关重要的一环。二十世纪以来, 前苏联和俄罗斯在人类航天事业取得诸多重大成就, 离不开太空动物实验的巨大贡献。太空动物实验可以评估地球生物深入探索太空的可能性, 加速人类太空探索时代的来临。一批批“动物宇航员”被航天飞行器送上太空, 成为了人类探索太空的“先驱者”以及航天事业发展的里程碑, 为载人航天和空间站建设事业奠基。因此, 本文就二十世纪以来前苏联和俄罗斯的太空动物研究的发展历程进行综述。

**【关键词】** 苏联; 俄罗斯; 航天; 动物实验

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0557-11

### A review of space animal experiments conducted by the former Soviet Union and Russia

DONG Lijinchuan<sup>1</sup>, HUANG Hong<sup>2</sup>, LIU Bin<sup>3</sup>, YANG Ziyu<sup>1</sup>, PENG Bo<sup>1</sup>, CHEN Shanguang<sup>4</sup>, JIANG Ning<sup>2</sup>, LIU Xinmin<sup>2\*</sup>, CHEN Ying<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China. 2. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193. 3. Yanshan University, Qinhuangdao 066004. 4. National Key Laboratory of Human Factors Engineering, China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094)

Corresponding author: Chen Ying. E-mail: ychen@icmm.ac.cn; LIU Xinmin. E-mail: liuxinmin@hotmail.com

**【Abstract】** Animal experiments have always been an important component of space exploration. Since the 20th century, the former Soviet Union and Russia have achieved major advances in the human space industry, which would not have been possible without the knowledge gained from animal experiments. Animal experiments were initially used to evaluate the possibility of humankind exploring space. “Animal astronauts” were sent into space as the “pioneers” of human space exploration. Such events were milestones in the development of the aerospace industry and greatly contributed to the construction of crewed spacecraft and space stations. This article reviews the development of space animal experiments in the former Soviet Union and Russia since the 20th century.

**【Keywords】** former Union of Soviet Socialist Republics; Russia; space flight; animal experiments

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

**【基金项目】** 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04905, CI2021B015), 载人航天工程航天医学实验领域项目资助 (HYZHXM05003), 国家自然科学基金 (82074103)。

Funded by Scientific and Technological Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (CI2021A04905, CI2021B015), Space Medical Experiment Project of China Manned Space Program (HYZHXM05003), National Natural Science Foundation of China (82074103).

**【作者简介】** 董李晋川 (1999—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药代动力学研究。Email: andrea\_dljc@163.com

**【通信作者】** 陈颖, 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药药代动力学和中药药理研究。Email: ychen@icmm.ac.cn; 刘新民, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 神经药理和航天医学研究。Email: liuxinmin@hotmail.com。

\* 共同通信作者

太空动物实验研究为人类开辟探索太空的道路保驾护航。人类太空探索早期,研究人员用太空动物实验评估载人航天的安全性与可能性,之后又利用太空动物实验对宇航员建立空间站的安全可行性和太空长期作业适应性进行预测。“动物宇航员”作为人类探索太空“先驱者”,为载人航天和太空空间站建设事业做出巨大贡献。

上世纪,苏维埃社会主义共和国联盟(以下简称苏联)处于人类航天事业发展领先地位。1957年,苏联成功发射世界第一颗人造地球卫星,拉开了太空航行时代序幕。随后,苏联又成功发射了世界第一个月球探测器、载人飞船和火星探测器。截至1988年,苏联共发射各类航天器2461个,居世界首位,同时也实现了世界首个进入太空的动物、首次载人航天、首位女宇航员、首次太空舱外活动等创造性成就<sup>[1-2]</sup>。1992年俄罗斯联邦航天局(Russian Federal Space Agency, RFSA)成立并承接苏联太空计划,继续在人造卫星和太空航行方面保持领先优势。1998年俄罗斯和美国等16个国家共同参与国际空间站建设工作,并支持建造了“曙光号”功能舱、“星辰号”服务舱、“码头号”对接舱、“黎明号”实验舱等<sup>[3]</sup>。2011年美国航天飞机全部退役后,俄罗斯的“联盟-FG”等运载火箭继续承担国际空间站运输任务。

## 1 太空动物实验发展历程

苏联和俄罗斯的太空探索过程中,实验生物被送往100~500公里亚轨道和近地轨道以及深空“旅行”,用以检验地球生物在航天环境生存的可行性和安全性<sup>[4]</sup>,为载人航天奠定科学基础<sup>[5-6]</sup>, (见表1)。

### 1.1 高空、亚轨道动物实验预演

1917年之前,苏联科学家就开始探讨太空航行的理论和实现途径问题。为评估地球生物太空飞行可能性,自1951年起苏联空军航空医学研究所开展高空物理火箭生物实验,同年7月2只犬跟随R-1V型火箭成功进入亚轨道。其后2个月,苏联共发射6枚火箭搭载犬进行实验。因缺乏动物逃生系统而饱受诟病,苏联多次探索后通过R-1D上弹射逃生系统让2条犬成功返航,标志着第一代航天逃生

系统研制取得重大进展<sup>[6]</sup>。

### 1.2 近地轨道动物实验预演

第二次世界大战后,美、苏“太空竞赛”加速了全球载人航天计划进程<sup>[52]</sup>。为了研究安全的载人航天飞行所必要的客观条件,苏联率先发射搭载“太空犬”Лайка的人造卫星Sputnik 2号穿越“卡门线”,虽然Лайка因加压舱过热而丧生,它仍然标志着空间生物学的开端<sup>[1,6]</sup>。

随着生命维持系统进步,1960年2条犬搭乘Sputnik-5号人造卫星完成了17次环绕地球轨道飞行后安全返回。1966年为研究辐射带对宇航员的影响,2条犬在近地轨道破纪录飞行22d后成功返航<sup>[6]</sup>。

### 1.3 太空在轨生物载荷实验

1973~1997年,前苏联和俄罗斯在11个Bion系列飞船中通过12只猴子和212只大鼠和若干其它生物研究动物的失重和放射生物学实验<sup>[53]</sup>。2005年开始,Bion-M系列生物卫星实验用于研究人造重力和长期辐射对生物健康影响,为建立可长期作业的太空空间站和更远距离星球探测做准备<sup>[5,53]</sup>。俄罗斯计划将恒河猴送往火星,通过前庭-动眼相互作用系统中揭示规律性,用以研究宇航员视线的中心区域部署视觉目标。

## 2 太空动物实验的动物品系

相比于美国使用灵长类动物黑猩猩作为“宇航员”,苏联对太空实验动物的选择首先基于可控性与易得性。苏联在早期测试航天系统安全性与载人航天可行性时选择了雌性健康流浪犬,因为犬类便于训练,18月龄~6岁的小型流浪犬普遍易得,可适应狭小环境,对航天艰苦环境适应性强<sup>[6]</sup>。

随着航天装置与实验科技发展,“动物宇航员”品系更加丰富。啮齿类大鼠、小鼠、沙鼠被广泛用于研究太空环境对代谢、脏器、细胞、骨骼影响<sup>[23-25,54-57]</sup>;日本鹌鹑、非洲爪蟾及大鼠的胚胎主要被用于研究胚胎发育重力感应<sup>[58-60]</sup>;爬行动物如草原龟、海龟、壁虎等主要被用于检测失重适应性<sup>[9-10,30,32-35]</sup>;蝶螈被用于研究细胞增殖变化<sup>[61]</sup>;恒河猴、黑腹果蝇、蚕被用于研究昼夜节律、发育过程、遗传及环境适应等<sup>[6,43-48,62]</sup>。

表 1 前苏联与俄罗斯有公开报道的太空生物运载情况

Table 1 Publicly reported space bio-loading situations in the Soviet Union and Russia

| 太空动物实验阶段<br>Phase of space<br>animal experiments                                          | 研究对象<br>Animal<br>subject | 实验舱运载火箭<br>发射时间(年)<br>Launch time (Years) | 实验舱运载载体<br>Launch vehicle                                                                                                                        | 动物情况<br>Animal information                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 高空、亚轨道动物<br>实验预演阶段<br>High-altitude or suborbital<br>animal experiment<br>rehearsal phase | 犬<br>Dogs                 | 1951 ~ 1957                               | R-1、R-2 系列火箭 <sup>[6]</sup><br>R-1, R-2 series rockets                                                                                           | 20 次(失败 3 次), 每次 2 只犬<br>20 times(failed 3 times), 2 dogs at a time                           |
|                                                                                           |                           | 1957                                      | Sputnik(伴侣)-2/R-7 火箭 <sup>[6]</sup><br>Sputnik-2/R-7 rockets                                                                                     | 雌, Лайка<br>Female, Лайка                                                                     |
|                                                                                           |                           | 1958 ~ 1960                               | R-5A、R-2A、R-7 火箭 <sup>[6]</sup><br>R-5A, R-2A, R-7 rockets                                                                                       | 未进轨道 10 次(失败 1 次), 每次 2 只犬<br>Not in orbit 10 times, failed 1 time, 2 dogs at a time          |
|                                                                                           | 犬<br>Dogs                 | 1960 ~ 1966                               | R-7 火箭; Vostok<br>(东方)-3/Космос(宇宙)-<br>110 卫星式飞船 <sup>[6]</sup><br>R-7 rocket. Voskho-<br>3/Cosmos-110 Sputnik<br>satellite spacecraft          | 轨道飞行 7 次(失败 2 次),<br>每次 1 ~ 2 只犬<br>In orbit 7 times, failed 2 times,<br>1 ~ 2 dogs at a time |
|                                                                                           |                           | 1959                                      | 未知 <sup>[7]</sup><br>Unknown                                                                                                                     | 2 次, 每次 1 只兔<br>2 times, 2 rabbits at a time                                                  |
|                                                                                           |                           | 1960                                      | Sputnik-5 卫星式飞船 <sup>[7]</sup><br>Sputnik-5 satellite spacecraft                                                                                 | 2 只大鼠<br>2 rats                                                                               |
|                                                                                           | 大鼠<br>Rats                | 1960                                      | Sputnik-5 卫星式飞船 <sup>[7-8]</sup><br>Sputnik-5 satellite spacecraft                                                                               | 2 只大鼠<br>2 rats                                                                               |
|                                                                                           |                           | 1960                                      | Sputnik-6 卫星式飞船 <sup>[6-8]</sup><br>Sputnik-6 satellite spacecraft                                                                               | 未知<br>Unknown                                                                                 |
|                                                                                           |                           | 1961                                      | Sputnik-9 卫星式飞船 <sup>[6-8]</sup><br>Sputnik-9 satellite spacecraft                                                                               | 40 ~ 42 只小鼠<br>40 ~ 42 mice                                                                   |
|                                                                                           | 小鼠<br>Mice                | 1960                                      | Sputnik-5 卫星式飞船 <sup>[7-8]</sup><br>Sputnik-5 satellite spacecraft                                                                               | 40 ~ 42 只小鼠<br>40 ~ 42 mice                                                                   |
| 近地轨道动物<br>实验预演阶段<br>Low-earth<br>orbit animal<br>experiment<br>rehearsal phase            | 豚鼠<br>Cavy                | 1960                                      | Sputnik-6 卫星式飞船 <sup>[7-8]</sup><br>Sputnik-6 satellite spacecraft                                                                               | 未知<br>Unknown                                                                                 |
|                                                                                           |                           | 1961                                      | Sputnik-9 卫星式飞船 <sup>[7-8]</sup><br>Sputnik-9 satellite spacecraft                                                                               | 未知<br>Unknown                                                                                 |
|                                                                                           | 爬行动物<br>Reptiles          | 1968                                      | Zond-5 探测器 <sup>[6,9]</sup><br>Zond-5 detectors                                                                                                  | 2 只草原龟<br>2 prairie turtles                                                                   |
|                                                                                           |                           | 1969                                      | Zond-7 探测器 <sup>[10]</sup><br>Zond-7 detectors                                                                                                   | 4 只海龟<br>4 turtles                                                                            |
|                                                                                           |                           | 1960                                      | Sputnik-5 卫星式飞船 <sup>[7-8]</sup><br>Sputnik-5 satellite spacecraft                                                                               | 15 瓶果蝇<br>15 vials of fruit flies                                                             |
|                                                                                           | 昆虫<br>Insects             | 1961                                      | Vostok-2 Sputnik 卫星式飞船 <sup>[11]</sup><br>Voskhod-2 Sputnik satellite spacecraft                                                                 | 酒蝇<br>Wine flies                                                                              |
|                                                                                           |                           | 1968                                      | Zond-5 探测器 <sup>[12]</sup><br>Zond-5 detectors                                                                                                   | 257 个 D-32 系黑腹果蝇卵<br>257 the D-32 Drosophila melanogaster eggs                                |
|                                                                                           | 恒河猴<br>Rhesus monkey      | 1983 ~ 1996                               | Bion 6-11 生物卫星 <sup>[6]</sup><br>Bion 6-11 biosatellites                                                                                         | 6 次, 每次 2 只<br>6 time, 2 monkeys at a time, <i>Macaca mulatta</i>                             |
|                                                                                           |                           | 1973 ~ 1982                               | Космос-605, 690, 936, 1129 号<br>生物卫星 <sup>[6, 13-17]</sup><br>Cosmos-605, 690, 936, 1129 biosatellite                                            | 分别搭载 45, 30, 30, 30 只大鼠<br>Carried 45, 30, 30, 30 rats respectively                           |
|                                                                                           |                           | 1975 ~ 1989                               | Космос-782, 1667, 1887, 2044,<br>1669 生物卫星; Rocmoc-1669 <sup>[6, 18-21]</sup><br>Cosmos-782, 1667, 1887, 2044,<br>1669 biosatellite; Rocmoc-1669 | SPF 级 Wistar 大鼠<br>SPF-Wistar rats                                                            |
| 太空在轨生物<br>载荷实验阶段<br>Space on-orbit bio-loading<br>experiment phase                        | 大鼠<br>Rats                | 1983                                      | Космос-1514 生物卫星 <sup>[6, 22]</sup><br>Cosmos-1514 biosatellite                                                                                  | 10 只 SPF 级 Wistar 孕鼠<br>10 pregnant SPF-Wistar rats                                           |

续表 1

| 太空动物实验阶段<br>Phase of space<br>animal experiments                      | 研究对象<br>Animal<br>subject | 实验舱运载火箭<br>发射时间(年)<br>Launch time (Years) | 实验舱运载载体<br>Launch vehicle                                                                                            | 动物情况<br>Animal information                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 太空在轨生物<br>载荷实验阶段<br>Space on-orbit<br>bio-loading<br>experiment phase | 沙鼠<br>Gerbils             | 2007                                      | Foton-M3 科研卫星 <sup>[23-24]</sup><br>Foton-M3 research satellite                                                      | 35 只雄性蒙古沙鼠<br>35 male Mongolian gerbils                                               |
|                                                                       |                           | 2013                                      | Bion-M1 生物卫星 <sup>[25]</sup><br>Bion-M1 biosatellite                                                                 | 8 只蒙古沙鼠<br>8 Mongolian gerbils                                                        |
|                                                                       | 小鼠<br>Mice                | 2013                                      | Bion-M1 生物卫星 <sup>[26-27]</sup><br>Bion-M1 biosatellite                                                              | 45 只雄性 C57BL/6<br>45 male C57BL/6 mice                                                |
|                                                                       |                           | 2017                                      | 国际空间站俄罗斯段 <sup>[28]</sup><br>The Russian Segment of the ISS                                                          | 21 ~ 24 d C57BL/6J 小鼠<br>21 ~ 24 d C57BL/6J mice                                      |
|                                                                       | 禽类<br>Bird species        | 1979                                      | Kosmos-1129 生物卫星 <sup>[6,29-30]</sup><br>Cosmos-1129 Bion-5 biosatellite                                             | 日本鹌鹑胚胎<br>Japanese quail eggs                                                         |
|                                                                       |                           | 1990 ~ 1999                               | “和平号”空间站 <sup>[6,30-31]</sup><br>“Mir” space station                                                                 | 8 次成功孵化日本鹌鹑<br>8 successful hatchings of Japanese quail                               |
|                                                                       | 爬行动物<br>Crawler           | 2005 ~ 2013                               | Foton-M2、Foton-M3、Bion-M1 科研<br>卫星 <sup>[30,32-35]</sup> Foton-M2,<br>Foton-M3, Bion-M1 research satellite           | 分别搭载 5, 5, 15 只厚趾壁虎<br>Carried 5, 5, 15 thick-toed geckos respectively                |
|                                                                       |                           | 2014                                      | Foton-M4 科研卫星 <sup>[30]</sup><br>Foton-M4 research satellite                                                         | 5 只昼行壁虎<br>5 diurnal geckos, <i>Phelsuma ornata</i>                                   |
|                                                                       |                           | 1971                                      | 联盟-10 航天飞船 <sup>[30]</sup><br>Soyuz-10 space shuttle                                                                 | 青蛙<br>Frogs, <i>Rana temporaria</i>                                                   |
|                                                                       |                           | 1975 ~ 1993                               | 联盟号-礼炮系列火箭 5 次,<br>Bion-10 卫星 <sup>[30]</sup><br>Soyuz, Soyuz-Salyut<br>series rockets 5 times, Bion-10 biosatellite | 非洲爪蟾<br><i>Xenopus laevis</i>                                                         |
|                                                                       | 两栖动物<br>Amphibians        | 1990                                      | “和平号”空间站 <sup>[6]</sup><br>“Mir” space station                                                                       | 6 只青蛙<br>6 Frogs, <i>Litoria caerulea</i>                                             |
|                                                                       |                           | 1992 ~ 1998                               | Kosmos-2229 Bion-11 生物卫星 <sup>[36-37]</sup><br>Cosmos-2229 Bion-11 biosatellite                                      | 成年欧非肋突蟾<br>Adult newts, <i>Pleurodeles waltl</i>                                      |
|                                                                       |                           | 1996 ~ 1999                               | “和平号”空间站 <sup>[38]</sup><br>“Mir” space station                                                                      | 欧非肋突蟾胚胎<br>Newts embryos, <i>Pleurodeles waltl</i>                                    |
|                                                                       |                           | 2005 ~ 2007                               | Foton-M2、Foton-M3 科研卫星 <sup>[39]</sup><br>Foton-M2, Foton-M3 research satellite                                      | 欧非肋突蟾<br><i>Pleurodeles waltl</i>                                                     |
|                                                                       | 鱼类<br>Fish                | 1974~1977                                 | 联盟、联盟-礼炮系列火箭 3 次 <sup>[30]</sup><br>Soyuz, Soyuz-Salyut series rockets 3 times                                       | 斑马鱼<br>Zebrafish, <i>Brachidanio rerio</i>                                            |
|                                                                       |                           | 1975                                      | Kosmos-782 生物卫星 <sup>[30,40]</sup><br>Cosmos-782 biosatellite                                                        | 鲮鱼卵<br>Killifish eggs, <i>Fundulus heteroclitus</i>                                   |
|                                                                       |                           | 1987                                      | Kosmos-1887 生物卫星 <sup>[41]</sup><br>Cosmos-1887 biosatellite                                                         | 藻类-细菌-鱼类系统<br>Algo-bacterial cenosis-fish system                                      |
|                                                                       |                           | 2007                                      | Foton-M3 科研卫星 <sup>[42]</sup><br>Foton-M3 research satellite                                                         | 26 条罗非鱼幼鱼<br>26 Tilapia larvae, <i>Oreochromis mossambicus</i>                        |
|                                                                       |                           | 1971 ~ 1979                               | Coros(联盟号)10, Kosmos-573、<br>782、936、1129 人造卫星 <sup>[43-47]</sup> Soyuz-10,<br>Cosmos-573, 782、936、1129 satellites   | 黑腹果蝇<br><i>Drosophila melanogaster</i>                                                |
|                                                                       |                           | 2014                                      | Foton-M4 科研卫星 <sup>[48]</sup><br>Foton-M4 research satellite                                                         | 第三代 Canton S 黑腹果蝇 The third generation of<br>Canton S, <i>Drosophila melanogaster</i> |
|                                                                       | 昆虫<br>Insects             | 2014                                      | 国际空间站俄罗斯段 <sup>[48]</sup><br>the Russian Segment of the ISS                                                          | 第五代 Canton S 黑腹果蝇 The fifth generation of<br>Canton S, <i>Drosophila melanogaster</i> |
|                                                                       |                           | 1992                                      | Kosmos-2229 生物卫星 <sup>[49]</sup><br>Cosmos-2229 biosatellite                                                         | 蚕<br>Silkworms, <i>Bombyx mori</i> L.                                                 |
|                                                                       |                           | 2007                                      | Foton-M3 科研卫星 <sup>[50]</sup><br>Foton-M3 research satellite                                                         | 缓步动物<br>Macrobiotus richtersi                                                         |
|                                                                       |                           | 2013                                      | Bion-M1 生物卫星 <sup>[51]</sup><br>Bion-M1 biosatellite                                                                 | 甲壳类动物<br>Crustaceans                                                                  |
|                                                                       | 软体动物<br>Mollusks          | 2005 ~ 2014                               | Foton-M2、M3 和 Bion-M1 科研卫星 <sup>[39]</sup><br>Foton-M2, M3 and Bion-M1 research satellite                            | 散大蜗牛和欧洲蜗牛<br><i>Helix lucorum</i> and <i>Helix aspera</i>                             |

### 3 太空动物实验装置

#### 3.1 犬类

“太空犬”会穿上带有密封“犬袖”、树脂玻璃头盔的“太空服”,在环境控制室内设置摄像头、温湿度传感器等进行监测<sup>[2,6]</sup>。发明“弹射车”帮助返回故障时犬及设备通过降落伞逃生。随着绕地飞行时间延长,太空舱开始配备生命维持系统,包括空气再生、自动定时喂食、“太空厕所系统”等<sup>[6]</sup>。

#### 3.2 啮齿动物

生物卫星 Foton-M3 使用自我维持生命支持系统(life support system, LSS)的 Kontur-L 模块装载可录像沙鼠铁笼,供给饲料及水<sup>[63-64]</sup>。生物卫星 Bion-M1 搭载的 Block Obespecheniya Soderzhaniya (BOS)装置由 Bion 计划中大鼠栖息模块改装<sup>[56]</sup>,提供 12 h 明暗循环及糊状饲料,每个单元可饲养 3 只小鼠,需单笼饲养时使用通风笼(GM 500),由中央生命保障系统维持环境<sup>[56-57]</sup>。

#### 3.3 卵生禽类(鹌鹑)

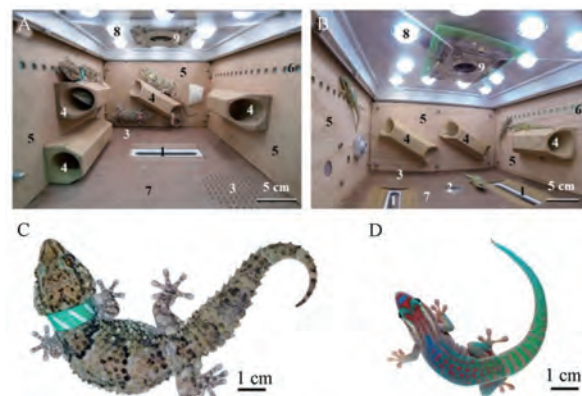
禽类生殖周期研究设备包括孵化器 Slovakian (1M-02 型)、含固定液培养皿和鸟巢<sup>[65]</sup>。生物卫星 Kocmoc-1299 内部安装恒温恒湿孵化箱放置鹌鹑胚胎。“和平号”空间站使用陆地生物群落简化的自主封闭生态系统和胚胎存放装备(refrigerator stowage kit for eggs, RSKE)培养成年鹌鹑和鹌鹑胚胎<sup>[58,65-67]</sup>。

#### 3.4 爬行动物(壁虎)

2005 ~ 2014 年进行了多项壁虎航天轨道实验用于检测其特异适应性<sup>[68]</sup>。Foton-M2 使用未提供再生空气、水与食物,温控 16.5℃ 的壁虎实验舱<sup>[32]</sup>,2007 年 Foton-M3 开始配置维生系统,提供水与食物,提高温控<sup>[35,69]</sup>。Bion-M1 增加了空气再生系统用于更久航行<sup>[21,70]</sup>。Foton-M4 搭载小型壁虎消耗小,未进行空气再生<sup>[71]</sup>见图 1。

#### 3.5 昆虫(果蝇)

“联盟”10 号飞船将带有培养基和 D-32 黑腹果蝇的饲养管放置在小型搭载恒温器(Biotherm II)里<sup>[43]</sup>。Foton-M4 航天飞机搭载的 BB-1F 设备含有 3 个 BB-2 模块(放置被动充氧饲养管,含有用于繁殖果蝇的营养介质:水、琼脂、糖、粗面粉、酵母、丙酸<sup>[48]</sup>)。



注:A:厚趾壁虎及其实验生存舱(搭载于 Bion-M1 飞船);B:花斑昼行壁虎及其实验生存舱(搭载于 Foton-M4 飞船);C:雌性厚趾壁虎;D:雄性花斑昼行壁虎;1:料箱,2:水碗,3:加热区,4:壁虎橡木栖息管,5:生存舱内壁,6:通风口和废料存积处,7:纺织层压板,8:照明灯,9:摄像机和风扇;仅花斑昼行壁虎生存舱提供饲料和水。

图 1 Bion-M1 和 Foton-M4 壁虎及其实验生存舱<sup>[68]</sup>

Note. A. Hardboard RSB with thick-toed geckos (Bion-M1). B. Oak RSB with ornate day geckos (Foton-M4). C. Thick-toed gecko female. D. Ornate day gecko male. 1. Feedbox. 2. Water bowl. 3. Heating zones. 4. Oak tubular shelter. 5. RSB wall. 6. Ventilation and waste collection vents. 7. Textile laminate floors. 8. LEDs. 9. Video camera and a fan. Only the RSB for ornate day geckos was equipped with feedbox and water bowl.

Figure 1 Research and support block (RSB) and geckos for Bion-M1 and Foton-M4

### 4 太空动物实验研究

#### 4.1 犬

候选犬航行前通过模拟实验舱训练适应空间限制、撞击声与离心机旋转及极端情况。“太空犬”Лайка 的皮下、心脏、颈动脉和胸腔内被植入生理监测仪,并通过心电图(胸前导联)、血压、呼吸频率和运动活动监测其生命体征<sup>[3]</sup>。加速升空后 Лайка 多项生理参数下调,心率倍增,入轨后恢复,表明它对发射和太空环境有足够耐受性<sup>[2]</sup>。苏联计划 1 周后对 Лайка 实施安乐死,但由于降温系统故障,惊吓、压力与高温导致 Лайка 脉搏骤增,器官衰竭而亡<sup>[5-6]</sup>。早在此次航行前,国际舆论曾强烈谴责牺牲 Лайка 进行太空生物实验。苏联由此倍加重视实验动物返回舱的建设。随着航天安全设施进步,后续太空舱开始搭载返回系统,并于 1958 年成功让 2 只犬从“卡门线”以上安全返航。1960 年 Strelka 成为第一批绕地飞行后返航的“太空犬”,它返回后

生育的 6 只幼崽中 Pushinka 被送给美国时任总统肯尼迪, 并成功诞下 4 只幼崽<sup>[6]</sup>。

#### 4.2 啮齿动物(大鼠)

生物卫星 Kocmoc-605、782、1129、1667、1887、2044 号上开展大鼠实验研究短期太空暴露骨骼、肌肉、脏器等变化。组织形态学检查发现多个飞行组大鼠出现骨骼钙、磷流失, 基质蛋白质含量下降, 胫骨近端干骺、腰椎海绵体骨减少等骨质疏松症早期迹象<sup>[16, 18, 72-77]</sup>。观察膈肌突触区肌纤维、神经肌肉连接和微血管等超微结构组织, 发现失重对膈肌结构破坏性变化主要出现太空飞行早期<sup>[19, 78]</sup>。Kocmoc-1669 搭载实验发现基于破坏性再生的肌肉突触重组主要表现在比目鱼肌<sup>[79]</sup>。此外, 长期太空飞行、急性应激等因素导致淋巴细胞减少退化, 胸腺中核碎屑积累及脾中性粒细胞浸润, 骨髓中红细胞、粒细胞和巨噬细胞祖细胞数量减少<sup>[18, 21]</sup>。暴露于超负荷重力后, 大鼠胰腺出现血管过度填充, 外分泌细胞减少等代偿适应性和破坏性变化<sup>[80]</sup>。近期国家空间站研究发现失重时皮肤肥大细胞分泌活性增加, 拮抗细胞间信号传导, 减弱胶原纤维形成强度<sup>[28]</sup>。

#### 4.3 啮齿动物(小鼠)

Bion-M1 小鼠实验选用成年雄性 C57BL/6N 小鼠分为飞行、地面对照和两个实验室对照组, 每组包括体内外组<sup>[26, 56]</sup>。采用自动数据采集系统(TSE Pheno Master)和植入式遥测技术监测; 一部分返回后进行记忆和学习、前庭功能、体力活动等行为测试; 一部分即时采集皮肤、血液、大脑、眼部、骨骼、肌肉及脏器进行形态学、免疫组织化学、生物化学等多种分子生物学分析; 一部分恢复期后通过微原子学评估骨微观结构和质量等<sup>[26-27, 56-57, 81-86]</sup>。结果发现在轨飞行诱导关节软骨蛋白聚糖水平降低, 软骨细胞及细胞外基质合成相关基因表达下调, 出现软骨分解早期症状<sup>[81]</sup>, 骨细胞死亡导致骨衰老特征出现, 恢复期后成骨细胞数增加、活性恢复, 但骨恢复不明显<sup>[27]</sup>。椎体骨体积分数、骨密度和小梁厚度显著降低<sup>[82]</sup>。股骨肌肉萎缩严重<sup>[83]</sup>, 诱导肌纤维凋亡<sup>[27, 81]</sup>, 通过  $\alpha$ -肌动蛋白-1、 $\alpha$ -肌动蛋白-4 启动信号通路影响心肌结构等<sup>[84-85]</sup>。同时检测出微重力易感基因<sup>[86]</sup>。胰腺出现外分泌颗粒堆积和胰岛肥大<sup>[57]</sup>。证实了微重力与运动缺乏和糖尿病表现相关。动物在喂食附近出现高度聚集行为, 推测食物供应装置故障导致 50% 小鼠死亡<sup>[56]</sup>。

#### 4.4 啮齿动物(沙鼠)

Foton-M3 任务中沙鼠分为飞行、地面同步对照两组, 采用形态、细胞、组织化学等方法对心肌、肝叶、空肠、胫骨进行分析。12 d 飞行后沙鼠心肌亚型与二级结构改变, 肌联蛋白 N2BA、肌联蛋白磷酸化增加, 对离体肌动球蛋白 ATP 酶激活减少<sup>[87]</sup>。肝小叶各功能区糖原水平降低, 静脉多糖分布降低, 肝细胞高糖原异质性, 细胞内糖原形态改变, 代谢紊乱<sup>[23]</sup>; 肝细胞质扩大, 肝实质细胞质 RNA 含量降低<sup>[88]</sup>, 出现功能代偿性无丝分裂加剧和双核肝细胞增加<sup>[89]</sup>。胃粘膜出现微灶性病变, 腺体营养不良, 粘液屏障、解离功能减退<sup>[90]</sup>。空肠粘液脂质细胞种类减少<sup>[91]</sup>, 粘膜绒毛、棱柱形上皮、杯状细胞结构改变, 间质屏障功能减退<sup>[92]</sup>。胫骨纵向生长抑制和早期骨质减少, 微重力影响骨形成减慢导致骨量损失<sup>[93]</sup>。

#### 4.5 卵生禽类(鹌鹑)

“和平号”空间站搭载实验研究微重力对成年日本鹌鹑和胚胎发育影响。成年鹌鹑能较快适应太空环境并学会无重力飞行和正常进食。检测鹌鹑胚胎发育中期测量飞行组与地面对照组胚胎的胚胎, 眼睛, 骨骼发育情况差异<sup>[65, 94]</sup>。太空飞行没有影响发育胚胎的钙利用<sup>[67, 95]</sup>, 部分正常发育孵化<sup>[66, 94, 96]</sup>, 但矿物质供应不足使软骨细胞钙化以及骨化延迟<sup>[94]</sup>, 甲状腺发育迟缓<sup>[97]</sup>, 肾上腺皮质脂肪积累, 胆固醇转化降低, 类固醇生成受阻<sup>[66]</sup>, 食物摄入减少导致小肠功能发育延迟<sup>[98]</sup>。鹌鹑幼仔无法稳定站立自由吞咽, 最后被执行安乐死<sup>[5, 99]</sup>。

#### 4.6 爬行动物(壁虎)

Foton-M2 到 M4、Bion-M1 均采用 4 : 1 的雌雄比例, Foton-M4 选用小型昼行壁虎进行行为观测, 其他实验选用体型较大的夜行厚趾壁虎研究行为、血液、内脏、中枢神经系统、刚毛、骨骼、排泄物等<sup>[30, 32-35]</sup>。

飞行恢复期后组织学, 免疫组织化学和 X 射线显微计算机断层扫描(micro-computer tomography, MCT)检测骨密度和骨结构等<sup>[33]</sup>。Foton-M 系列和 Bion-M1 卫星上所有实验中壁虎体重均下降, 推断环境温度对新陈代谢影响较大。Foton-M2 飞行组壁虎外肝区出现肝细胞器官萎缩和肝细胞退化, Foton-M3 则无; 与对照组动物相比, Foton-M3 飞行、对照组动物的糖原减少是缺乏营养导致的正常反应<sup>[68]</sup>。Foton-M2 和 M3 粪便糖皮质激素水平升高,

Foton-M3 壁虎大脑中神经胶质破坏主要位于皮质和上丘脑<sup>[33]</sup>。Foton-M2 飞行后,壁虎红细胞和暗核粒细胞减少,小肠高血球细胞含量升高<sup>[33,68]</sup>。推断 Foton-M2 栖息条件导致壁虎骨质变化<sup>[32]</sup>。Foton-M3 飞行组缺乏营养导致小肠壁厚增加<sup>[68]</sup>。Foton-M2 和 M3 飞行壁虎仍保持正常生理情况,其生物学特性帮助它们较好地适应太空飞行条件<sup>[69]</sup>。Bion-M1 飞行组前庭小脑浦肯野细胞发生可逆性变化<sup>[35]</sup>。肝重量与体重比略高,肝细胞糖原减少,部分壁虎外周区有胆汁外流困难并伴有坏死,胆囊中出现粘性实质,但胃肠道结构没有显著改变<sup>[68]</sup>。微重力引起飞行组肺部毛细血管高度充血和内皮细胞空泡化,肺间隔数增加,肺充血等<sup>[33]</sup>。

#### 4.7 昆虫(果蝇)

“联盟”10 号飞船搭载的黑腹果蝇雌性死亡比率大,与性别相关的隐性致死与配子发生阶段有关,卵母细胞阶段对太空飞行因素的敏感性高<sup>[43]</sup>。Zond-5、Kosmos-573 上果蝇也发现性别相关隐性致死性突变<sup>[12,44]</sup>。Foton-M4 上培育的第三代果蝇飞行结束后 0 ~ 1、12、24 h 采集 BB-2 区生物材料,其余培养成虫繁育第四代并在国际空间站孕育第五代。飞行结束进行转录组学研究,发现从缺氧到常氧的转变以及失重增加了果蝇代谢基因和角质层成分转录,减少了形态、分化相关转录,微重力暴露导致以上基因转录变化更显著,从微重力到重力环境转变则情况相反<sup>[48]</sup>。

## 5 结语

太空动物实验在太空探索的安全可行性、太空环境对生物影响、长期太空环境作业影响等方面研究有着突出贡献,在航天事业发展中起着举足轻重的作用。太空动物的牺牲令人惋惜和敬佩,“首位太空乘客”犬 Лайка 意外丧生让苏联和国际航天更加重视动物实验安全及返回舱的建设,随着航天科技发展,人类也越来越重视太空实验动物权利。“太空动物”人文关怀也越来越受重视,前苏联与俄罗斯也通过纪念馆、书籍、邮票、歌曲纪念这些“太空小英雄”。

近年来国际空间站活动中俄罗斯主要进行微生物研究,并计划 2024 年发射“方舟”号生物卫星继续进行航天生物学探索,利用微重力、辐射等太空特殊生物学效应开展更为丰富严谨的空间生物实验和生物安全技术研究。同时,太空动物实验也

将是远程探测和空间站建设过程中的航天医疗、安全保障的重要研究手段。为此,本文综述了俄罗斯太空动物实验发展历程,以期对我国下一阶段在中国空间站开展的动物实验和模拟航天动物研究有所启示。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] West JB. Historical aspects of the early Soviet/Russian manned space program [J]. J Appl Physiol (1985), 2001, 91(4): 1501-1511.
- [2] 林来兴. 苏联航天研究 [J]. 科技导报, 1989, 5: 52-57.  
Lin LX. Soviet space research [J]. Sci Technol Rev, 1989, 5: 52-57.
- [3] 庞之浩. 俄罗斯对国际空间站的贡献 [J]. 航天员, 2011, 6: 65-68.  
Pang ZH. Russia's contribution to the International Space Station [J]. Astronaut, 2011, 6: 65-68.
- [4] 张万周. 俄罗斯航天生物医学研究所及其科研活动 [J]. 中国航天, 1998, 7: 34-37.  
Zhang WZ. Russian Aerospace Biomedical Research Institute and its scientific research activities [J]. Aerospace Chin, 1998, 7: 34-37.
- [5] Morey-Holton ER, Hill EL, Souza KA. Animals and spaceflight: from survival to understanding [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2007, 7(1): 17-25.
- [6] Burgess C, Dubbs C. Animals in space: from research rockets to the space shuttle [M]. U. K.: Praxis Publishing Ltd; 2007.
- [7] Burgess C. The greatest adventure: a history of human space exploration [M]. U. K.: Reaktion Books; 2021.
- [8] Hall R, David S. The rocket men: Vostok & Voskhod. The first soviet manned spaceflights [M]. U. K.: Springer Science & Business Media; 2001.
- [9] Amtinov VV, Gaidamakin NA, Parfenov GP, et al. Pathomorphological and histochemical changes in the organs of tortoises carried onboard the spacecraft Zond 5 (Atrophic changes in tortoises during roundtrip to moon on Zond 5 ascribed to hunger and space flight factors) [J]. Cosmic Res, 1969, 7: 834-841.
- [10] Sutulov IS, Kulkin SG, Saxonov PP, et al. Post-flight histological analysis of turtles aboard Zond 7 [J]. Life Sci Space Res, 1971, 9: 125-128.
- [11] Antipov VV, Kozlov VA, Parfenov GP, et al. The results of biological studies made on board the Voskhod and Voskhod 2 spaceships [J]. Life Sci Space Res, 1967, 5: 119-121.
- [12] Glembozky JL, Grozdova TJ, Parfenov GP. Experiments with Drosophila on board the spacecraft Zond-5 [J]. Life Sci Space Res, 1970, 8: 1-3.
- [13] Ilyin EA, Serova LV, Portugalov VV, et al. Preliminary results of examinations of rats after a 22-day flight aboard the Cosmos-605 biosatellite [J]. Aviat Space Environ Med, 1975, 46(3): 319-321.
- [14] Plakhuta-Plakutina GI. State of spermatogenesis in rats flown

- aboard the biosatellite Cosmos-690 [J]. *Aviat Space Environ Med*, 1977, 48(1): 12–15.
- [15] Gurovsky NN, Gazenko OG, Adamovich BA, et al. Study of physiological effects of weightlessness and artificial gravity in the flight of the biosatellite Cosmos-936 [J]. *Acta Astronaut*, 1980, 7(1): 113–121.
- [16] Prokhonchukov AA, Desiatnichenko KS, Tigranian RA, et al. Sostoianie mineral'noi fazy I belkovogo matriksa kostnoi tkani krysa posle poleta na biosputnike "Kosmos-1129" [Mineral phase and protein matrix status of rat bony tissue after a flight on the Kosmos-1129 biosatellite] [J]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1982, 16(2): 61–64.
- [17] Aizikov GS, Markin AS, Mokrousova AV. Osobennosti liftnoi reaktsii u belykh krysa posle dlitel'no go kosmicheskogo poleta (vlianie nevesomosti i iskusstvennoi sily tiazhesti) [Features of the lifting reflex in the white rat following prolonged space flight (effect of weightlessness and artificial gravity)] [J]. *Biull Eksp Biol Med*, 1981, 92(12): 722–725.
- [18] Durnova GN, Kaplanskiĭ AS, Portugalov VV. Izmeneniia limfoidnykh organov krysa pri kosmicheskikh poletakh [Changes in the lymphoid organs of rats during space flight] [J]. *Arkh Anat Gistol Embriol*, 1977, 72(5): 14–20.
- [19] Il'ina-Kakueva EI. Issledovanie skeletnykh myshts krysa posle kratkovremennogo kosmicheskogo poleta na biosputnike "Kosmos-1667" [Examination of skeletal muscles of rats after a short-term flight on Cosmos-1667] [J]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1987, 21(6): 31–35.
- [20] Il'ina-Kakueva EI. Morfogistokhimicheskoe issledovanie skeletnykh myshts krysa v eksperimente na biosputnike "Kosmos-1887" [Morphohistochemical study of skeletal muscles in rats after experimental flight on "Kosmos-1887"] [J]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1990, 24(4): 22–25.
- [21] Vacek A, Michurina TV, Serova LV, et al. Decrease in the number of progenitors of erythrocytes (BFUe, CFUe), granulocytes and macrophages (GM-CFC) in bone marrow of rats after a 14-day flight onboard the Cosmos-2044 Biosatellite [J]. *Folia Biol (Praha)*, 1991, 37(1): 35–41.
- [22] Serova LV, Denisova LA, Apanasenko ZI, et al. Obshchaia kharakteristika eksperimenta po izucheniiu ontogeneza krysa na biosputnike "Kosmos-1514" [General characteristics of an experiment to study the ontogeny of rats on board the Kosmos-1514 biosatellite] [J]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1985, 19(2): 49–53.
- [23] Atiakshin DA, Bykov EG, Il'in EA, et al. Glycogen content in gerbil's liver following the spacecraft Foton-M3 mission [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2009, 43(5): 18–22.
- [24] Il'in EA, Smirnov IA, Soldatov PE, et al. Gerbil experiment in the flight of spacecraft "Foton-M3" [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2009, 43(4): 21–25.
- [25] Sychev VN, Ilyin EA, Yarmanova EN, et al. The BION-M1 project: overview and first results [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2014, 48(1): 7–14.
- [26] Andreev-Andrievsky AA, Shenkman BS, Popova AS, et al. Experimental studies with mice on the program of the biosatellite BION-M1 mission [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2014, 48(1): 14–27.
- [27] Gerbaix M, Gnyubkin V, Farlay D, et al. One-month spaceflight compromises the bone microstructure, tissue-level mechanical properties, osteocyte survival and lacunae volume in mature mice skeletons [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2659.
- [28] Atiakshin DA, Shishkina VV. Mast cells effect on the condition of skin collagen fibers in microgravity conditions [A]. *AIP Conference Proceedings* [C]; 2021.
- [29] Ilin EA. Main results of the experiments conducted during the flight of the Kosmos-1129 Biosatellite and the status of preparation of studies on the next biosatellite [R]. U. S. : NASA, 1980.
- [30] Proshchina A, Gulimova V, Kharlamova A, et al. Reproduction and the early development of vertebrates in space: problems, results, opportunities [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(2): 109.
- [31] Sychev VN, Shepelev EY, Meleshko GI, et al. Main characteristics of biological components of developing life support system observed during the experiments aboard orbital complex MIR [J]. *Adv Space Res*, 2001, 27(9): 1529–1534.
- [32] Almeida EAC, Roden C, Phillips JA, et al. Development of the gecko (*Pachydactylus turneri*) animal model during Foton M-2 to study comparative effects of microgravity in terrestrial and aquatic organisms [J]. *J Gravit Physiol*, 2006, 13: 193–196.
- [33] Nikitin VB, Proshchina AE, Kharlamova AS, et al. Comparative studies of the thick-toed geckos after 16 and 12 days spaceflights in Foton-M experiments [J]. *J Gravit Physiol*, 2008, 15: 285–288.
- [34] Proshchina A, Gulimova V, Kharlamova A, et al. Cytoskeleton markers in the spinal cord and mechanoreceptors of thick-toed geckos after prolonged space flights [J]. *Life (Basel)*. 2022;12(1):100.
- [35] Alexandra P, Anastasia K, Valeriy B, et al. Vestibular cerebellum of thick-toed geckos (*Chondrodactylus turnery* GRAY, 1864) and C57/BL6N mice after the long-term space flight on the biosatellite BION-M1 [J]. *J Chem Neuroanat*, 2017, 79: 58–65.
- [36] Bautz A, Houillon Ch, Aïmar C, et al. Fate of the grafted ovaries from female salamander *Pleurodeles waltl* embarked on the Cosmos 2229 flight [J]. *Adv Space Res*, 1996, 17(6–7): 269–270.
- [37] Grigorian EN, Tuchkova SA, Poplinskaya VA, et al. Regeneratsiia setchatki posle pererwzki zritel'no go nerva u tritonov, eksponirovannykh na bortu biosputnika "Bion-11" [Retinal regeneration after dissection of the optic nerve in newts exposed on board the Bion-11 biosatellite] [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 1999, 33(3): 15–20.
- [38] Gualandris-Parisot L, Husson D, Foulquier F, et al. *Pleurodeles waltl*, amphibian, Urodele, is a suitable biological model for embryological and physiological space experiments on a vertebrate

- [J]. Adv Space Res, 2001, 28(4): 569–578.
- [39] Ilyin EA. Biological experiments in flights of unmanned space craft Foton-M2 and Foton-M3 [J]. Aviakosm Ekolog Med, 2013, 47(1): 47–54.
- [40] Krasnov IB. Quantitative histochemistry of the vestibular cerebellum of the fish *Fundulus heteroclitus* flown aboard the biosatellite Cosmos-782 [J]. Aviat Space Environ Med, 1977, 48(9): 808–811.
- [41] Levinskikh MA, Sychev VN. Rost i Razvitie odnokletochnykh vodoroslei v usloviakh kosmicheskogo poleta v sostave ékositemy "a 'Igbakteria' lny tsenoz- ryby" [Growth and development of unicellular algae in the algae-bacteria-fish biocenosis system during space flight] [J]. Kosm Biol Aviakosm Med, 1989, 23(5): 32–35.
- [42] Anken R, Brungs S, Grimm D, et al. Fish inner ear otolith growth under real microgravity (spaceflight) and clinorotation [J]. Microgravity Sci Technol, 2016, 28: 351–356.
- [43] Dubinin NP, Glembotsky YL, Vaulina EN, et al. Effects of space flight factors on *Drosophila* [J]. Life Sci Space Res, 1973, 11: 163–165.
- [44] Glembotskiĭ IaL, Vaulina EN, Pal' mbakh LR, et al. Geneticheskie éffekty u drozofily, vyzvannye faktorami kosmicheskogo poleta na "Kosmoc-573" [Genetic effects in *Drosophila* caused by space flight factors in "Kosmoc-573"] [J]. Genetika, 1975, 11(7): 70–77.
- [45] Parfyonov GP, Platonova RN, Tairbekov MG, et al. Biological investigations aboard biosatellite Cosmos-782 [J]. Acta Astronaut, 1979, 6(10): 1235–1238.
- [46] Parfyonov GP, Platonova RN, Tairbekov MG, et al. Biological experiments carried out aboard the biological satellite Cosmos-936 [J]. Life Sci Space Res, 1979, 17: 297–299.
- [47] Tairbekov MG, Parfyonov GP, Platonova RW, et al. Biological investigations aboard the biosatellite Cosmos-1129 [J]. Adv Space Res, 1981, 1(14): 89–94.
- [48] Ogneva IV, Belyakin SN, Sarantseva SV. The development of *Drosophila Melanogaster* under different duration space flight and subsequent adaptation to Earth gravity [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166885.
- [49] Shi Z, Zhuang D, Ilyin EA. Space flight experiment on Chinese silkworm on board the Russian 10th Biosatellite [J]. Adv Space Res, 1998, 21(8–9): 1145–1150.
- [50] Rebecchi L, Altiero T, Guidetti R, et al. Tardigrade resistance to space effects: first results of experiments on the LIFE-TARSE mission on FOTON-M3 (September 2007) [J]. Astrobiology, 2009, 9(6): 581–591.
- [51] Hilbig R, Lebert M. OMEGAHAB-XP a bioregenerative aquatic life support system designed to be used in Bion-M1 long term space flight [J]. 38th COSPAR Scientific Assembly, 2010, 38: 3.
- [52] 何慧东, 张蕊, 苑艺, 等. 世界载人航天 60 年发展成就及未来展望 [J]. 国际太空, 2021, 4: 4–10.
- He HD, Zhang R, Yuan Y, et al. The 60-year development achievements and future prospects of manned spaceflight in the world [J]. Space Int, 2021, 4: 4–10.
- [53] Grigor'ev AI, Il' in EA. Animals in space [J]. Herald Russ Acad Sci, 2007, 77(6): 541–549.
- [54] Popova IA, Grigor'ev AI. Vlianie kosmicheskogo poleta na obmen veshchestv: itogi biokhimicheskikh issledovaniĭ v éksperimentakh s kryсами na biosputnikakh "Kosmoc" [The effect of space flight on metabolism: the results of biochemical research in rat experiments on the Kosmoc biosatellites] [J]. Aviakosm Ekolog Med, 1992, 26(5–6): 4–10.
- [55] Serova LV. Adaptation to new environments; microgravity [J]. Usp Fiziol Nauk, 2005, 36(2): 3–21.
- [56] Andreev-Andrievskiy A, Popova A, Boyle R, et al. Mice in Bion-M1 space mission: training and selection [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104830.
- [57] Proshchina AE, Krivova YS, Saveliev SC. Pancreas of C57 black mice after long-term space flight (Bion-M1 Space Mission) [J]. Life Sci Space Res (Amst), 2015, 7: 22–26.
- [58] Kostal L, Bilcik B, M Juráni, et al. Behaviour of newly hatched and adult Japanese quail and the feasibility of adaptation to weightlessness [J]. Physiologist, 1993, 36(1): 50–52.
- [59] Snetkova E, Chelnaya N, Serova L, et al. Effects of space flight on *Xenopus laevis* larval development [J]. J Exp Zool, 1995, 273(1): 21–32.
- [60] Serova LV. Ontogenesis of mammals and gravity [J]. J Gravit Physiol, 2004, 11(2): 161–164.
- [61] Almeida E, Roden C, Phillips JA, et al. Analysis of cell proliferation in newt (*Pleurodeles waltl*) tissue regeneration during spaceflight in Foton M-2 [J]. J Gravit, Physiol, 2006, 13: 1.
- [62] Shi Z, Zhuang D, Ilyin EA. Space flight experiment on Chinese silkworm on board the Russian 10th Biosatellite [J]. Adv Space Res, 1998, 21(8–9): 1145–1150.
- [63] Soldatov PE, Smirnov IA, Il' in EA, et al. Handling and maintenance of gerbils during the spacecraft Foton-M3 mission [J]. Aviakosm Ekolog Med, 2009, 43(5): 12–18.
- [64] Soldatov PE. Investigation of the main gas-exchange parameters in the Mongolian gerbil in view of a space experiment [J]. Aviakosm Ekolog Med, 2005, 39(4): 53–56.
- [65] Barrett JE, Wells DC, Paulsen AQ, et al. Embryonic quail eye development in microgravity [J]. J Appl Physiol (1985), 2000, 88(5): 1614.
- [66] Tsigankova V, Zibrin M, Kochishova I, et al. Morfologicheskie izmeneniia v nadpochechnikakh pntsov iaponskogo peregela, vylupivshikhsia v usloviakh nevesomosti [Morphological changes in the adrenal gland of Japanese quail chicken hatched out in microgravity] [J]. Aviakosm Ekolog Med, 2002, 36(5): 29–32.
- [67] Orban JJ, Piert SJ, Guryeva TS, et al. Calcium utilization by quail embryos during activities preceding space flight and during embryogenesis in microgravity aboard the orbital space station MIR [J]. J Gravit Physiol, 1999, 6(2): 33–41.

- [68] Gulimova V, Proshchina A, Kharlamova A, et al. Reptiles in space missions; results and perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 3019.
- [69] Nikitin VB, Gulimova VI, Ilyin EA, et al. Comparative analysis of the skeletal changes in tetrapods after brief influence of microgravity [J]. *J Gravit Physiol*, 2007, 14(1): 103–104.
- [70] Barabanov VM, Gulimova VI, Berdiev RK, et al. Individual features of play behavior in thick-toed geckos in weightlessness and normal gravity conditions [J]. *Life Sci Space Res (Amst)*, 2019, 22: 38–46.
- [71] Gulimova VI, Barabanov VM, Berdiev RK, et al. Species differences in the ability of geckos to adapt to the conditions of long-term orbital experiment onboard “BION-M1” and “FOTON-M4” biosatellites [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2016, 50: 55–57.
- [72] Prokhonchukov AA, Tigranian RA, Kolesnik AG, et al. Soderzhanie kal'tsiia, fosfora i vkluchenie  $^{45}\text{Ca}$  v kostiakh i zubakh kryss posle 22-sutochnogo kosmicheskogo orbital'nogo poleta na korable-sputnike “Kosmos-605” [Calcium and phosphorus content and the  $^{45}\text{Ca}$  incorporation into the bones and teeth of rats after a 22-day orbital space flight on board the “Cosmos-605” satellite ship] [J]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1977, 11(1): 26–30.
- [73] Ushakov AS, Vlasova TF, Miroshnikova EB. Studies of amino acid metabolism in the muscles of rats flown aboard the biosatellite Cosmos 782 [J]. *Life Sci Space Res*, 1979, 17: 231–234.
- [74] Rogacheva IV, Stupakov GP, Volozhin AI, et al. Kharakteristika kostnoi tkani kryss posle poleta na biosputnike “Kosmos-1129” [Characteristics of bone tissue of rats after flight aboard biosputnik Kosmos-1129] [J]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1984, 18(5): 39–44.
- [75] Kaplanskiĭ AS, Durnova GN, Sakharova ZF, et al. Gistomorfometricheskĭ analiz kostei kryss, nakhodivshikhsia na bortu biosputnika “Kosmos-1667” [Histomorphometric analysis of the bones of rats on board the Kosmos-1667 biosatellite] [J]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1987, 21(5): 25–31.
- [76] Durnova GN, Kaplanskiĭ AS, Il'ina-Kakueva EI, et al. Gistomorfometricheskĭ analiz kostei kryss, ėksponirovannykh na biosputnike “Kosmos-1887” [Histomorphometric analysis of the bones of rats exposed to “Cosmos-1887” space flight] [J]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1990, 24(5): 42–45.
- [77] Il'ina-Kakueva EI, Burkovskaia TE. Vliianie nevesomosti na techenie reparativnogo protsessa v myshtsakh kryss, ėksponirovannykh na biosputnike “Kosmos-2044” [Effect of weightlessness on the course of the reparative process in the muscles of the biosatellite Kosmos-2044 rats] [J]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1991, 25(5): 24–29.
- [78] Babakova LL, Baranov VM, Pozdnyakov OM. Influence of space flight factors on the ultrastructure of rat diaphragm muscle [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2013, 155(1): 18–21.
- [79] Pozdnyakov OM, Babakova LL, Demorzhii MS, et al. Izmeneniia ul'trastruktury nervno-myshechnykh sinapsov kryss pod vlianiem faktorov kosmicheskogo poleta [Changes in the ultrastructure of neuromuscular synapses in rats under the effects of space flight factors] [J]. *Biull Eksp Biol Med*, 1988, 105(6): 752–755.
- [80] Pashchenko PS, Zakharova IV. Changes in the pancreas structure after exposure of the body to gravitational overloads [J]. *Morfologiya*, 2006, 129(1): 62–67.
- [81] Fitzgerald J, Endicott J, Hansen U, et al. Articular cartilage and sternal fibrocartilage respond differently to extended microgravity [J]. *NPJ Microgravity*, 2019, 5: 3.
- [82] Gerbaix M, White H, Courbon G, et al. Eight days of earth reambulation worsen bone loss induced by 1-month spaceflight in the major weight-bearing ankle bones of mature mice [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 746.
- [83] Radugina EA, Almeida EAC, Blaber E, et al. Exposure to microgravity for 30 days onboard Bion M1 caused muscle atrophy and impaired regeneration in murine femoral Quadriceps [J]. *Life Sci Space Res (Amst)*, 2018, 16: 18–25.
- [84] Ogneva IV, Maximova MV, Larina IM. Structure of cortical cytoskeleton in fibers of mouse muscle cells after being exposed to a 30-day space flight on board the BION-M1 biosatellite [J]. *J Appl Physiol (1985)*, 2014, 116(10): 1315–1323.
- [85] Berg-Johansen B, Liebenberg EC, Li A, et al. Spaceflight-induced bone loss alters failure mode and reduces bending strength in murine spinal segments [J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(1): 48–57.
- [86] Gambaro G, Salanova M, Ciciliot S, et al. Gene expression profiling in slow-type calf soleus muscle of 30 days space-flown mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169314.
- [87] Vikhlyantsev IM, Okuneva AD, Shpagina MD, et al. Changes in isoform composition, structure, and functional properties of titin from Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) cardiac muscle after space flight [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2011, 76(12): 1312–1320.
- [88] Atiashkin DA, Bykov EG, Il'in EA, et al. RNA content of gerbil hepatocytes after the flight aboard space platform Foton-M3 [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2010, 44(3): 28–32.
- [89] Atiashkin DA, Il'in EA, Pashkov AN. Morphofunctional state of hepatocytes nuclear apparatus in Mongolian herbivores after the flight on space apparatus Foton-M3 [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2010, 44(2): 29–34.
- [90] Atiashkin DA, Bykov EG. Morphological changes in gastric wall of mongolian gerbils following the 12-day orbital flight aboard Foton-M3 [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2012, 46(5): 26–33.
- [91] Atiashkin DA, Bykov EG. Population characteristics of mucous tissue basocytes in the Mongolian gerbil's jejunum following the 12-day orbital flight onboard space platform “Foton-M3” [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2013, 47(6): 17–24.
- [92] Atiashkin DA, Bykov EG, Il'in EA, et al. Tissue-specific reaction of the mucous coat of herbivores' small gut under the influence of spaceflight factors on board biosat “Foton M3” [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2011, 45(2): 25–30.

- [93] Durnova GN, Kaplansky AS, Orlov OI, et al. Histomorphometric investigation of the shin bones taken from Mongolian gerbille *Meriones unguiculatus* exposed on satellite "Foton-M" No. 3 [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2008, 42: 27-30.
- [94] Komissarova DV, Dadasheva OA, Gur'eva TS, et al. Histogenesis of Japanese quail bone and cartilage tissues at the final stages of embryonic development in microgravity [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2013, 47(6): 24-28.
- [95] Komissarova DV, Gur'eva TS, Sychev VN. Dynamics of calcium utilization for skeleton formation in Japanese quail embryos under the microgravity condition [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2011, 45(5): 52-53.
- [96] Dadasheva OA, Gur'eva TS, Sychev VN, et al. Characteristics of morphogenesis of the Japanese quail embryos during microgravity [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 1998, 32(3): 38-41.
- [97] Dadasheva OA, Gur'eva TS, Iaglov VV. Razvitie shchitovidnoy zhelezy u émbriionov iaponskogo perepela, inkubirovannykh v usloviakh mikrogravitatsii [Thyroid gland development in Japanese quail embryos incubating in microgravity] [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2000, 34(1): 29-31.
- [98] Lenhardt L, Cigankova V, Zibrin M, et al. Functional development of small intestine of Japanese quail hatched on MIR orbital station [J]. *Acta Vet Brno*, 2001, 70(2): 127-131.
- [99] Meleshko GI, Shepelev EA, Gur'eva TS, et al. Émbrional'noe razvitie ptits v usloviakh nevesomosti [The embryonic development of birds in weightlessness] [J]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1991, 25(1): 37-39.

[收稿日期] 2022-04-08

## 综述:肠道微生物与炎性肠病间的关系

炎性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)是一类病因不明确和难以治愈的慢性肠道炎症性疾病,其临床症状表现为腹痛、腹泻和黏液脓血便等。随着病情发展也可以导致肠道致残性改变,包括肠穿孔、肠梗阻和肠癌等。近年来,IBD的发病率在中国逐年上升,已达到了14/100 000,且患者年龄呈年轻化的趋势。来自中国农业大学、中国医学科学院、中国农业科学院和北京农业职业学院的研究者从实验小鼠模型和肠道微生物区系平衡两方面,对目前炎性肠病的相关发病机理作一综述。文中提到的炎性肠病临床上主要包括溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),两者的主要病症均表现为腹痛、腹胀、腹泻以及便血。目前关于炎性肠病发病机理的研究主要集中肠道微生物、免疫、遗传和环境等因素。研究者考虑到肠道微生物可与遗传易感基因、肠道黏膜免疫和环境因素的相互作用,认为肠道微生物区系与炎性肠病的发生和发展密切相关。

在该综述中,作者首先总结了肠道微生物的分类,主要包括细菌、真菌、病毒和原生动物,其中肠道细菌在肠道微生物占据较大比重。其次,作者阐述了健康机体中肠道微生物的功能和作用,随后介绍了用以模拟炎性肠病的四种小鼠模型,包括三种化学诱导(DSS、TNBS和乙酸)和一种微生物诱导(柠檬酸杆菌)模型。同时,作者对四种小鼠模型的造模方法、剂量、诱导的相关机理做了简要总结,为后续炎性肠病的深入研究提供思路。最后,在探讨肠道微生物区系与炎性肠病的关系时,作者认为肠道微生物区系与炎性肠病之间的关系不是固定的因果关系,而是相互作用的。综上所述,本文首先对炎性肠病的分类、病症和流行病学进行总结,阐明炎性肠病是一种全球性的公共健康问题;同时,剖析影响炎性肠病发病的因素,并表明肠道微生物与炎性肠病的发生和发展密切相关;基于炎性肠病小鼠模型,阐明肠道微生物区系紊乱与炎性肠病的确切关联,为炎性肠病发病机制的深入研究提供思路。

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(4): 311-322; <https://doi.org/10.1002/ame2.12255>)。

姜宁,刘斌,张亦文,等. 欧日太空动物实验研究概况 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 568-573.

Jiang N, Liu B, Zhang YW, et al. Research status of space animal experiments in Europe and Japan [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 568-573.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.016

## 欧日太空动物实验研究概况

姜宁<sup>1</sup>, 刘斌<sup>2</sup>, 张亦文<sup>1</sup>, 胡秦<sup>3</sup>, 陈善广<sup>4</sup>, 李莹辉<sup>4</sup>, 刘新民<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 燕山大学, 河北 秦皇岛 066004;  
3. 北京工业大学, 北京 100024; 4. 中国航天员科研训练中心人因工程重点实验室, 北京 100094)

**【摘要】** 太空动物实验一直是人类航天事业的重要组成部分, 一批一批的实验动物作为“先驱者”被送上了太空。本文综述了二十世纪以来欧盟、日本的空间动物实验研究现状, 对动物实验的装置、结果等内容进行概述, 以为航天生命科学和医学研究提供参考。

**【关键词】** 欧盟; 日本; 太空; 动物实验

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0568-06

## Research status of space animal experiments in Europe and Japan

JIANG Ning<sup>1</sup>, LIU Bin<sup>2</sup>, ZHANG Yiwen<sup>1</sup>, HU Qin<sup>3</sup>, CHEN Shanguang<sup>4</sup>, LI Yinghui<sup>4</sup>, LIU Xinmin<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China. 2. Yanshan University, Qinhuangdao 066004. 3. Beijing University of Technology, Beijing 100024.  
4. National Key Laboratory of Human Factors Engineering, China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094)

Corresponding author: LIU Xinmin. E-mail: liuxinmin@hotmail.com

**【Abstract】** Space animal experiments have always been an important part of human spaceflight. Groups of experimental animals have been sent into space as “pioneers”. This paper reviews the progress in space animal experimental research in the European Union and Japan since the 20th century. It summarizes the devices used for animal experiments and the result of those experiments, to provide a reference for aerospace life science research and medical research.

**【Keywords】** European Union; Japan; space; animal experiments

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

近年来航天事业飞速发展, 美国国家航空航天局 (National Aeronautics and Space Administration, NASA)、欧洲航天局以及中国航天局等陆续宣布了对火星的探索和登陆计划, 人类航天探索已进入中长期载人航天飞行阶段<sup>[1-2]</sup>。在航天航空科学研究中, 鉴于动物与人类在进化上的高度保守性, 利用实验动物特别是啮齿类和非人灵长类动物在不同

层次的响应特征与人类相比具有相似性, 开展动物实验从开始就一直是航天计划的重要组成部分。实验动物作为“先驱者”先于人类, 被送入太空中进行着一系列的实验研究, 以了解太空独特的空间环境对生命机能活动的影响, 同时也为人类太空探索的安全可行性等方面提供了参考, 推动航空航天事业发展。

**【基金项目】** 中国医学科学院创新工程 (2021-I2M-1-034), 载人航天工程航天医学实验领域项目资助 (HYZHXM05003)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (IFMS) grant (2021-I2M-1-034), Space Medical Experiment Project of China Manned Space Program (HYZHXM05003)。

**【作者简介】** 姜宁 (1989—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 动物行为学和神经精神药理研究。Email: jiangning0603@163.com

**【通信作者】** 刘新民 (1962—), 男, 博士, 教授, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 动物行为学和神经精神药理研究。

Email: liuxinmin@hotmail.com

20 世纪 50 年代,人类太空计划的早期,前苏联和美国科学家利用动物(主要是猴子、黑猩猩和狗)来测试各自国家将活体生物体发射到太空并将其完好无损地带回地球的能力,目的是确保宇航员能够在太空生存<sup>[3-4]</sup>。人类成功登上月球后,开展太空动物实验研究的频率开始增加。到 20 世纪 60 年代末,苏联和美国向太空输送了包括水母、乌龟、青蛙卵、微生物、蜘蛛、变形虫和藻类等实验生物,在研究生命能否在太空中生存的同时,开始关注生物如何在太空中活动和生长。自 1993 年美国、俄罗斯、11 个欧洲航天局成员国(法国、德国、意大利、英国、比利时、丹麦、荷兰、挪威、西班牙、瑞典、瑞士)、日本、加拿大和巴西共 16 个国家联合建造的迄今世界上最大的国际空间站(International Space Station, ISS)以来,欧盟和日本的空间动物实验研究也相继增多<sup>[5]</sup>。本文综述了近 30 年欧盟、日本的空间动物实验研究现状,对动物实验的装置,实验的结果等内容进行概述,以期对航天生命科学研究、医学研究提供参考。

## 1 实验装置

1998 年,意大利航天局(Agenzia Spaziale Italiana, ASI)科学委员会选择热那亚大学研究小组提出的 MDS 计划。MDS 计划的最初范围是开发一种在微重力条件下进行骨形成研究的设施,并开发针对骨质疏松症的具体对策。抽屉式小鼠(生存)系统(Mice Drawer System, MDS),是意大利航天局研制的

第一个旨在进行微重力下针对啮齿类动物开展长期(100 ~ 150 d)太空实验的装置(见图 1)<sup>[3]</sup>。其基本尺寸为 421 mm × 480 mm × 516 mm。任务使命:STS-122 等。子系统包括小鼠仓(Mice Chamber, MC),液体处理子系统(Liquid Handling Subsystem, LHS),食品配送子系统(Food Delivery Subsystem, FDS),空调子系统(Air Conditioning Subsystem, ACS),照明子系统(Illumination Subsystem, ILS),观测子系统(Observation Subsystem, OSS),载荷控制单元(Payload Control Unit, PCU)。MDS 可为啮齿类动物太空实验提供生存空间、食品、水、自动化通风和照明,与航天飞机中舱和国际空间站的机柜接口兼容,小鼠可以单独(最多 6 只)或成组(4 对)饲养<sup>[6-8]</sup>。

2008 年 3 月 11 日,日本希望号实验舱(Japanese Experiment Module, JEM)(生物样品的小容器的培养箱),即“希望”号(Kibō, Hope)由美国“奋进”号航天飞机携带先期运往国际空间站<sup>[9]</sup>。科学家利用“希望”号实验舱(圆桶形,全长 11.2 m,外径 4.4 m,内径 4.2 m)培养的细胞、蠕虫、水生生物和植物进行了大量的实验<sup>[10]</sup>,Kibō 实验舱由微重力培养箱和离心机的生物实验设施(Centrifuge Equipped Biological Experiment Facility, CBEF)组成,CEBF 可提供 0.1 ~ 2.0 g 的人工重力环境<sup>[11]</sup>。

2012 年 7 月 20 日,一种水族箱被日本第三艘 H-II 无人自动货运飞船送往太空空间站,日本宇宙航空研究开发机构(JAXA)将这种水族箱称作“水生生物栖息地(Aquatic Habitat, AQH)”。为了研究水生生物在失重环境下受到的影响,AQH 被安放在

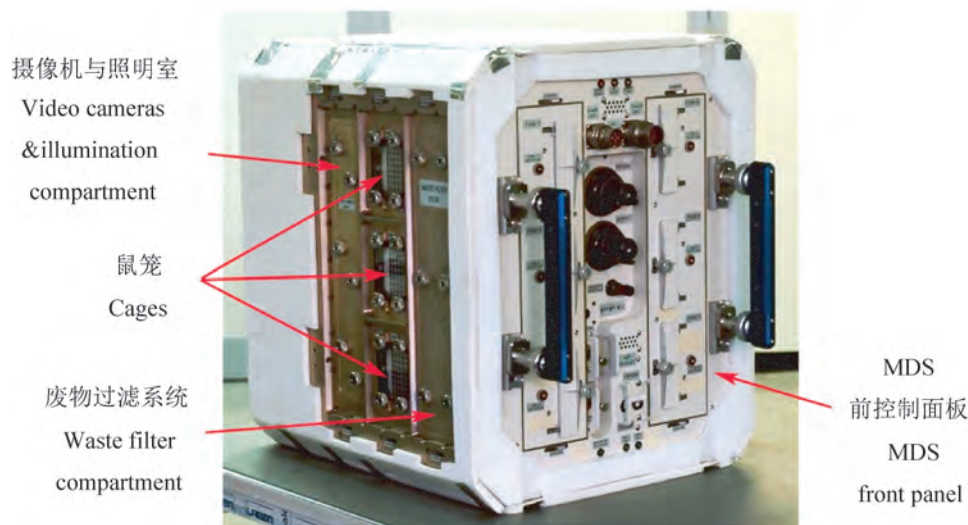


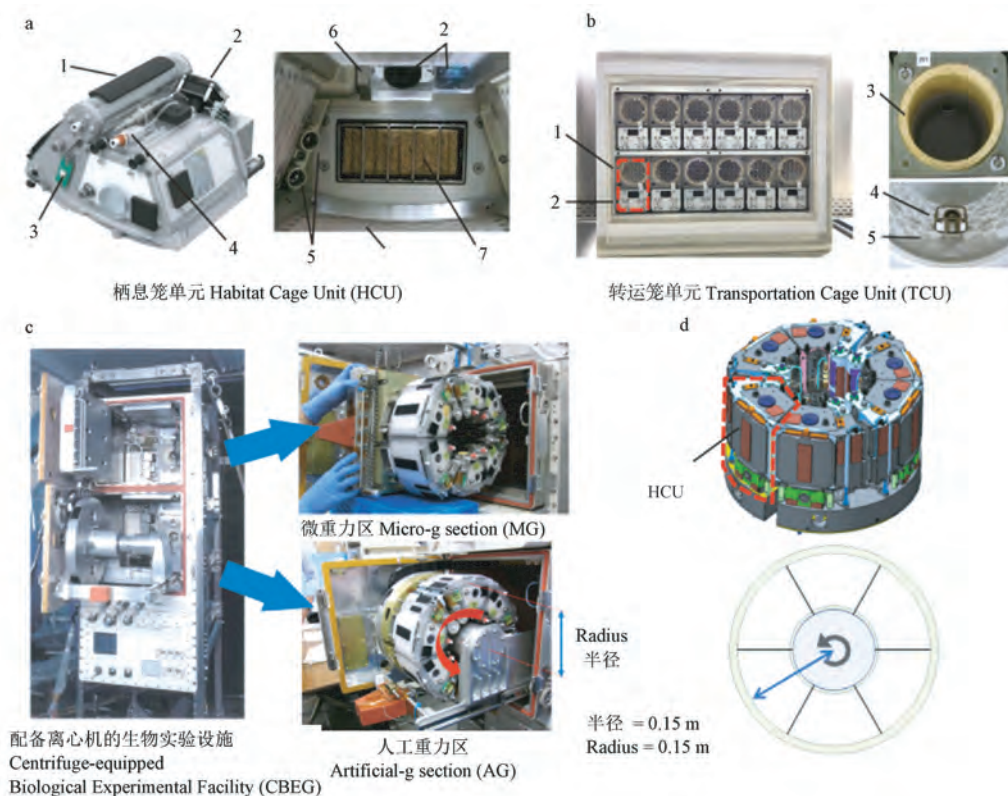
图 1 抽屉式小鼠(生存)系统<sup>[6]</sup>

Figure 1 MDS platform

国际空间站中的日本实验舱内。AQH 装置整体主要由 CCD 相机、水循环单元、鱼类栖息空间单元(2 个)和控制单元共 4 个部分组成,可实现自动喂食、自动注氧、自动控温以及取样功能,其能够饲养小型淡水鱼类,例如斑马鱼等,并使鱼类在太空环境下最长生存 90 d。除此之外,此装置可以根据实验需求改变进料顺序,并检测水环境的各种参数,包括水温、水压、水流速度、氧含量及 pH 值等。水环境系统的质量由气体交换器与生物过滤器维持,一些其他杂质可由特殊细菌过滤器去除。

2016 年,日本宇宙航空研究开发机构(JAXA)

开发了新的动物实验平台-多重人工重力研究系统(Multiple Artificial-gravity Research System, MARS)(图 2)。HCU(Habitat Cage Units, HCU)是 MARS 里面的一个板载居住笼(栖息笼单元),每笼容纳 1 只小鼠,并配备了 1 个食物槽,喂水系统,1 个气味散发器,2 个用于通风口的风扇,一个废物收集设备和 1 个 LED/IR 摄像机。HCU 笼子内还配备有 1 个雨刷,以清洁窗户便于人员观察笼内情况。此外,在笼壁上贴有纸张,用于快速排除笼内的液体(如尿液等)。HCU 的风机产生的气流( $< 0.2 \text{ m/s}$ ),可维持笼内的空气流通。HCU 设置的白天和黑夜的



注:a:栖息笼单元,HCU 每个笼子可容纳一只小鼠,1:水箱,2:摄像头/LED,3:温度传感器,4:洗衣机进水,5:喷嘴,6:摄像头雨刷,7:食品盒,8:聚碳酸酯地板/墙壁,卫生协调中心提供 7 d 的食物和水供应;b:运输笼单元(Transportation Cage Unit,TCU),TCU 在一个单元中包含 12 个圆柱形笼子,每个圆柱形笼子可容纳 1 只小鼠,TCU 在发射和着陆阶段可提供长达 10 d 的食物和水,1:带食物的住房区域,2:水箱,3:食物,4:水喷嘴,5:聚碳酸酯地板/墙壁;c:配备离心机的生物实验设施(Centrifuge-equipped Biological Experiment Facility,CBEF),CBEF 由两部分组成:微重力区和人工重力区;d:AG 部分,该离心机可容纳 6 个 HCU,与地面接触的旋转半径为 0.15 m。

图 2 实验平台-多重人工重力研究系统实验平台<sup>[12]</sup>

Notes. a. Habitat cage unit. The HCU accommodates one mouse per cage. 1. Water tank. 2. Camera/LED. 3. Temperature sensor. 4. Washing machine water inlet. 5. Nozzle. 6. camera wiper. 7. Food box. 8. Polycarbonate floor/wall. The Health Coordination Centre provides a 7 day supply of food and water. b. Transport cage unit (TCU). The TCU contains 12 cylindrical cages in one unit. Each cylindrical cage can accommodate one mouse. The TCU can provide food and water for up to 10 days during the launch and landing phases. 1. Housing area with food. 2. Water tank. 3. Food. 4. Water nozzle. 5. Polycarbonate floor/walls. c. Biological experimental facility equipped with centrifuges (CBEF). CBEF consists of two parts. The micro-g zone and the artificial g-zone. d. Section AG. The centrifuge accommodates 6 HCUs and has a 0.15 m radius of rotation in contact with the ground.

Figure 2 MARS Experimental platform

周期间隔为 12 h。该装置每周需要 1 次饲料和水的补给。第 1 个任务发射 24 个 HCU, 饲养 12 只小鼠; 剩下的 12 个 HCU 是备用的, 以防出现问题<sup>[12-13]</sup>。2018 年 JAXA 针对第 1 次任务中, HCU 在微重力 (MG) 下发生漏水的问题对 MARS 进行改进, 被用于 JAXA 的第 2 次小鼠任务 (SpaceX-12)。

## 2 实验动物

### 2.1 水熊虫

2007 年 9 月, 瑞典的 Ingemar Jönsson 教授通过俄罗斯发射的“光子-M3”科研卫星将水熊虫送入太空, 水熊虫暴露于真空、低温及辐射的太空环境下 10 天后返回地球。科学家对此次历经航天飞行的水熊虫研究发现, 超过 68 % 的水熊虫仍然存活, 甚至能产下后代<sup>[14]</sup>。2011 年 5 月, 意大利科学家通过 STS-134 号航天飞机将其他极端微生物与水熊虫一起送上太空, 证明了水熊虫受到太空环境中的辐射及失重等情况的影响较小, 其在未来的航天研究中可能存在着一定的作用<sup>[15]</sup>。不久后的 2013 年 9 月, 欧洲宇航局利用无人航天飞行器直接将水熊虫暴露于太空舱外的低温和辐射环境 10 d 以测试水熊虫生命力, 而结果发现仍有 3 只小斑熊虫未受太空极端环境影响。经历过失重、低温和辐射的太空极端环境对水熊虫不仅可以存活, 甚至可以正常排卵<sup>[16]</sup>。

### 2.2 秀丽隐杆线虫

2009 年 11 月 16 日, 亚特兰蒂斯号航天飞机在执行 STS-129 任务时从美国宇航局肯尼迪航天中心发射秀丽隐杆线虫虫卵样本进入空间站。科学家们在国际空间站 (ISS) 的日本实验舱 (KIBO) 中, 开始了利用实验动物秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 进行的太空实验<sup>[17]</sup>。分别在微重力 (microgravity, MG) 或 1 G 的人工重力 (artificial gravity, AG) 下, 秀丽隐杆线虫在含细菌食物的液体培养基中同步培养 4 d, 观察蠕虫的健康和运动情况, 然后冷冻。在返回后, 对其体长、脂肪积累、整个基因和蛋白质的表达进行分析。结果显示, 在微重力条件下, 从 L1 幼虫阶段生长到成年的秀丽隐杆线虫, 肌肉粗丝、细胞骨架元件和线粒体代谢酶的基因和蛋白表达水平相对于在 1 G 离心机上平行培养降低, 微重力环境培养的秀丽隐杆线虫运动改变、体长减少和脂肪堆积。提示, 蛋白质表达的变化可能是导致宇航员进行性肌肉萎缩的原因<sup>[18]</sup>。

### 2.3 卵生鱼类动物实验

1994 年 7 月 8 日, 4 条日本青鳉鱼及 300 余颗鱼卵被日本科学家 Ijiri 通过 STS-65 号航天飞机送入 ISS 的国际微重力实验室 2 号 (International Microgravity Laboratory, IML-2) 的鱼箱。通过观察发现在太空环境下, 青鳉鱼仍可以交配甚至产卵, 并再 15 d 后孵出幼鱼<sup>[19-20]</sup>。

1995 年日本首次将蝶螈送入太空, 在平台 SFU 上和任务 IML-2 中进行研究 AstroNewt 项目研究微重力对蝶螈早期发育的影响。2012 年, 科学家们在日本的 Kibo 实验舱内的 AQH 利用显微观察系统对 32 条青鳉鱼展开太空环境下的骨流失问题的实验研究, 为防止宇航员的骨质流失提供参考<sup>[21]</sup>。2015 年, JAXA 利用 Kibo 实验舱的 AQH 对 18 条斑马鱼进行肌肉实验, 给研究制定宇航员在微重力环境下长期执行任务时肌肉无力的对策提供了参考借鉴和指导。

### 2.4 蟑螂

2007 年欧洲宇航局将 54 只蟑螂送入太空, 科学家们为这些特殊的乘客, 配备了独立的蟑螂太空生命系统。科学家们认为, 从理论上来说, 在失重条件下, 动物是不能进行交配的, 即使交配也是不可能正常受孕繁殖后代的。然而进入到太空中的 54 只蟑螂呢, 不仅存活了下来, 还成功的受孕, 并且还成功的繁殖出了 33 只蟑螂, 后来科学家们还惊人地发现这 33 只太空蟑螂, 不仅成长得特别快, 还比普通的蟑螂更加强壮<sup>[22]</sup>。

### 2.5 啮齿类动物

1996 年 11 月 20 日至 12 月 7 日, 在执行第二太空实验室生命科学 (SLS-2) 任务 (哥伦比亚; 空间运输系统 80) 中, 日本科学家将 12 只的 SHR 雄性自发性高血压大鼠 (7 周龄) 送上太空, 在轨飞行 18 d。着陆后 3 h 处死飞行大鼠和对照大鼠, 取骨骼肌。肌肉标本保存至 -80℃, Western Blot 分析 p53 表明, p53 通路在保护基因组稳定抵抗压力空间环境中发挥作用<sup>[23]</sup>。

日本科学家 Hollander 将 SD 雄性大鼠安置在 STS-63 航天飞机的封闭舱中, 太空飞行 8 d, 对大鼠肝抗氧化功能进行观察。航天飞行导致肝谷胱甘肽、谷胱甘肽二硫和总谷胱甘肽含量显著降低, 同时谷氨酰转氨酶活性降低。太空飞行环境的大鼠肝丙二醛浓度比地面的对照组大鼠增加了 47%。飞行对肝蛋白质含量无影响。这些结果表明, 航天

飞行可下调抗氧化防御能力,引起肝氧化应激<sup>[24]</sup>。

2009 年,意大利航天局发送 MDS 到 ISS 执行了 100 d 的飞行任务,创造了当时太空动物实验最长时间记录。研究用的 6 只 PTN 小鼠(雄性)全都存活。虽然它们在 20 d 后体重下降,但在 100 d 之后体重又有所增加,在血液检测分析和剖检中均未发现异常。这些实验表明,MDS 在温度、湿度、食物和水的摄取、空气质量、气味、废物管理等方面均符合有关规定。也说明 MDS 的机械和电气部件可以支持至少 100 d 的动物实验。MDS 可独立自主运行、人-机交互、上长期使用。但容纳的动物数量有限。2014 年完成了当时最长的小鼠太空飞行。这次任务中,6 只小鼠在国际空间站上饲养了 91 d。MDS 小鼠笼需要宇航员定期给食给水。一半的老鼠在实验过程中死亡<sup>[6-7,25]</sup>。

2016 年 7 月 18 日,C57BL/6 雄性小鼠(9 周)12 只在肯尼迪航天中心乘坐 SpaceX-9 进入 ISS 的 JAXA Kibo 实验舱升空,并于 2016 年 8 月 26 日返回,在轨时间为 35 d。动物返回地面 40 h 后进行取材。取眼进行内皮细胞凋亡、免疫组化、TUNEL 和 4-HNE 免疫反应等检测分析。结果显示,航天条件下视网膜内皮细胞的凋亡明显增加,脂质过氧化物升高,视网膜氧化损伤<sup>[13]</sup>。Shiba 等<sup>[12]</sup>采用  $\mu$ CT 检测肱骨和胫骨的骨量进行检测发现,小鼠的股骨骨密度和比目鱼/腓肠肌重量显著降低,失重降低骨量。Matsumura 等<sup>[26]</sup>在 35 d 内将小鼠关在地球上作为“地面”对照。雄鼠仅副腺重量下降;然而,采用 RNA-seq 测序确定没有 1 个生殖器官显示任何明显的微观缺陷或基因表达的变化。此外小鼠附睾尾精子对卵母细胞的体外受精水平与空白雄鼠相当。当受精卵转移到假孕母体内时,精子所产仔数(仔数/转移卵数)无显著性差异。表明在外太空短期停留不会导致男性生殖器官生理功能、精子功能和后代存活能力的明显缺陷。

2018 年 1 月 18 日,JAXA 采用改进后的 MARS 进行第 2 次小鼠任务(SpaceX-12),同时评估人工重力(AG)和饮食对小鼠生物系统的影响。12 只小鼠(雄性,9 周)被分成 4 组,每组 3 只,每组喂食含有或不含低聚果糖的食物,并在国际空间站上单独喂养 1 g 的人工重力或微重力环境下,在轨航天时间 30 d 后安全返回地球。研究人员发现小鼠航天飞行后体重有增加的趋势,微重力环境下的小鼠航天飞行后体重有下降的趋势,但差异不显著。这表明

改进的 MARS 可能有助于评估人工重力和太空飞行小鼠的饮食干预<sup>[27]</sup>。

## 2.6 猫

1963 年 10 月,一只猫的大脑被植入电击阵列以记录神经活动后,由法国宇航局通过“弗农电子”火箭送上太空。此次非轨道飞行高度约为 160 km,整个过程持续了 15 min 左右,这只猫最终顺利完成任务并安全返回地面<sup>[28]</sup>。

## 3 小结与展望

长期的太空探索为人类认识生命的起源、进化、发生和发展规律提供了独特的视角。迄今为止,欧盟和日本在太空动物实验研究中进行了大量的研究,实验动物的种类包括青鳉鱼、斑马鱼、大小鼠及水熊虫等。实验的研究内容主要包括动物在太空的生存观察,太空环境下哺乳动物发育和生殖研究,太空环境下骨代谢、肌肉萎缩的研究,和太空环境下对眼睛视神经的研究等。同时,2016 年至今,日本开发啮齿动物笼具(HCU)和小型动物在轨繁殖实验装置承担其主要的太空动物实验工作,对哺乳动物适应太空环境响应机制,包括骨代谢、肌肉萎缩和大脑功能成为未来的工作重点。

自 2020 年以来,我国成功实施了长征五号 B 运载火箭首飞,空间站天和核心舱,神舟十二号、神舟十三号载人飞船,天舟二号、天舟三号货运飞船共 6 次飞行任务,圆满完成了关键技术验证阶段的任务目标。我国航天进入中长期载人航天飞行阶段,研究长期太空环境对人体功能的影响,提供基于我国原创、国际领先的体系化、自动化和智能化的空间动物实验平台,推动我国脑科学研究和航天医学研究成为未来的研究重点。本文欧盟、日本的空间动物实验研究现状,希望能对我国的航天医学科人员起到借鉴和参考作用。

## 参 考 文 献(References)

- [1] Stepanek J, Blue RS, Parazynski S. Space medicine in the era of civilian spaceflight [J]. N Engl J Med, 2019, 380(11): 1053-1060.
- [2] 张颖一, 张伟. 国外载人深空探测现状及发展趋势分析 [J]. 中国航天, 2019, 11: 54-59.  
Zhang YY, Zhang W. Analysis on the status quo and development trend of foreign manned deep space exploration [J]. Aerospace Chin, 2019, 11: 54-59.
- [3] Morey-Holton ER, Hill EL, Souza KA. Animals and spaceflight: from survival to understanding [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2007, 7(1): 17-25.

- [4] 马驰原, 曹宇静, 段恩奎, 等. 太空环境下哺乳动物胚胎发育和生殖研究进展及展望 [J]. 中国科学: 生命科学, 2021, 51(2): 116-125.  
Ma CY, Cao YJ, Duan EK, et al. The research progress and prospect of mammalian reproduction and embryonic development under space conditions [J]. Sci Sin Vitae, 2021, 51(2): 116-125.
- [5] 国际空间站各舱段命名由来 [EB/OL]. (2011-04-23) [2019-06-13] 中国载人航天工程网. [http://www.cmse.gov.cn/kpjy/htzs/tkjj/201104/t20110423\\_44785.html](http://www.cmse.gov.cn/kpjy/htzs/tkjj/201104/t20110423_44785.html).  
The origin of the names of the modules of the International Space Station [EB/OL]. (2011-04-23) [2019-06-13]. China Manned Space. [http://www.cmse.gov.cn/kpjy/htzs/tkjj/201104/t20110423\\_44785.html](http://www.cmse.gov.cn/kpjy/htzs/tkjj/201104/t20110423_44785.html).
- [6] Cancedda R, Liu Y, Ruggiu A, et al. The Mice Drawer System (MDS) experiment and the space endurance record-breaking mice [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e32243.
- [7] Tavella S, Ruggiu A, Giuliani A, et al. Bone turnover in wild type and pleiotrophin-transgenic mice housed for three months in the International Space Station (ISS) [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33179.
- [8] Sandonà D, Desaphy JF, Camerino GM, et al. Adaptation of mouse skeletal muscle to long-term microgravity in the MDS mission [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33232.
- [9] Ichijo T, Yamaguchi N, Tanigaki F, et al. Four-year bacterial monitoring in the International Space Station-Japanese Experiment Module "Kibo" with culture-independent approach [J]. NPJ Microgravity, 2016, 2: 16007.
- [10] Satoh K, Alshahni MM, Umeda Y, et al. Seven years of progress in determining fungal diversity and characterization of fungi isolated from the Japanese Experiment Module KIBO, International Space Station [J]. Microbiol Immunol, 2021, 65(11): 463-471.
- [11] Clément G. International roadmap for artificial gravity research [J]. NPJ microgravity, 2017, 3: 29.
- [12] Shiba D, Mizuno H, Yumoto A, et al. Development of new experimental platform 'MARS'-Multiple Artificial-gravity Research System-to elucidate the impacts of micro/partial gravity on mice [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 10837.
- [13] Mao XW, Byrum S, Nishiyama NC, et al. Impact of spaceflight and artificial gravity on the mouse retina: biochemical and proteomic analysis [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): 2546.
- [14] 青云. 太空实验中的最牛动物 [J]. 太空探索, 2009, 2: 28-29.  
Qing Y. The most cattle animal in space experiments [J]. Space Exp, 2009, 2: 28-29.
- [15] 陈若颖, Morion Cc. 登上月球的地表最强生物 [J]. 百科探秘, 2020, 3: 28-31.  
Chen RY, Morion C. The strongest creatures on the surface of the moon [J]. Encyclopedia Exp, 2020, 3: 28-31.
- [16] 林焱. 10 种曾到过太空的动物 [J]. 教师博览, 2020, 10: 76-77.  
Lin Y. 10 animals that have been to space [J]. Teacher Exp, 2020, 10: 76-77.
- [17] Higashitani A, Hashizume T, Sugimoto T, et al. *C. elegans* RNAi space experiment (CERISE) in Japanese Experiment Module KIBO [J]. Biol Sci Space, 2009, 23(4): 183-187.
- [18] Higashibata A, Hashizume T, Nemoto K, et al. Microgravity elicits reproducible alterations in cytoskeletal and metabolic gene and protein expression in space-flown *Caenorhabditis elegans* [J]. NPJ Microgravity, 2016, 2: 15022.
- [19] Ijiri K. Development of space-fertilized eggs and formation of primordial germ cells in the embryos of medaka fish [J]. Adv Space Res, 1998, 21(8): 1155-1158.
- [20] 一凡. 动物——航天事业的先行者 [J]. 科技潮, 1999, 10: 57-60.  
Yi F. Animals-pioneers of space industry [J]. Tech Tide, 1999, 10: 57-60.
- [21] 日本将水族箱送上太空以研究失重对鱼类影响 [J]. 航天器工程, 2012, 21(5): 24.  
Japan sends aquariums to space to study effects of weightlessness on fish [J]. Spacecraft Eng, 2012, 21(5): 24.
- [22] 田空. 那些到过太空的动物 [J]. 老友, 2021, 8: 70.  
Tian K. Animals that have been in space [J]. Old Friend, 2021, 8: 70.
- [23] Ohnishi T, Wang X, Fukuda S, et al. Accumulation of tumor suppressor p53 in rat muscle after a space flight [J]. Adv Space Res, 2000, 25(10): 2119-2122.
- [24] Hollander J, Gore M, Fiebig R, et al. Spaceflight downregulates antioxidant defense systems in rat liver [J]. Free Radic Biol Med, 1998, 24(2): 385-390.
- [25] Rizzo AM, Corsetto PA, Montorfano G, et al. Effects of long-term space flight on erythrocytes and oxidative stress of rodents [J]. PLoS One, 2012, 7(3): 32361.
- [26] Matsumura T, Noda T, Muratani M, et al. Male mice, caged in the International Space Station for 35 days, sire healthy offspring [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 13733.
- [27] Matsuda C, Kato T, Inoue-Suzuki S, et al. Dietary intervention of mice using an improved Multiple Artificial-gravity Research System (MARS) under artificial 1 g [J]. NPJ Microgravity, 2019, 5: 16.
- [28] Chatelier G, Ginet J. Reaction of the autonomic and central nervous system in the cat during a rocket flight [J]. Revue des Corps de Sante des Armees Terre, 1964, 5: 579-596.

[收稿日期] 2022-05-15

黄红,姚彩虹,张亦文,等.失重效应模拟实验方法及对机体功能影响的研究进展[J].中国实验动物学报,2022,30(4):574-581.

Huang H, Yao CH, Zhang YW, et al. Research progress on the simulation of weightlessness in experimental methods and its influence on body function [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 574-581.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.017

# 失重效应模拟实验方法及对机体功能影响的研究进展

黄红<sup>1</sup>,姚彩虹<sup>1</sup>,张亦文<sup>1</sup>,陈善广<sup>2</sup>,李莹辉<sup>2</sup>,姜宁<sup>1\*</sup>,刘新民<sup>1,3\*</sup>

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193;2. 中国航天员科研训练中心人因工程重点实验室,北京 100094;3. 宁波大学新药技术研究院,浙江 宁波 315000)

**【摘要】** 我国载人航天已经进入中长期飞行阶段,失重是航天员在长期的航天飞行和空间驻留时面临的一种极端的航天特因环境,除了会对航天员的身体健康产生严重的影响,还极易诱发神经精神功能紊乱,包括反应、判断、决策等认知功能减退。由于航天飞行的特殊性,在地面采用实验模拟航天失重,探究失重对机体的影响,并找到防护措施是至关重要的。因此,本文从失重效应模拟实验方法出发,综述模拟失重对机体功能的影响。

**【关键词】** 失重;实验方法;功能;机制;文献综述

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0574-08

## Research progress on the simulation of weightlessness in experimental methods and its influence on body function

HUANG Hong<sup>1</sup>, YAO Caihong<sup>1</sup>, ZHANG Yiwen<sup>1</sup>, CHEN Shanguang<sup>2</sup>, LI Yinghui<sup>2</sup>,  
JIANG Ning<sup>1\*</sup>, LIU Xinmin<sup>1,3\*</sup>

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China. 2. National Key Laboratory of Human Factors Engineering, China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094. 3. Institute of Drug Discovery Technology, Ningbo University, Ningbo 315000)

Corresponding author: LIU Xinmin. E-mail: liuxinmin@hotmail.com; JIANG Ning. E-mail: jiangning0603@163.com

**【Abstract】** Manned space flight in China has advanced to the stage of medium and long-term flights. During long-term space flight and space residence, weightlessness is an extreme aerospace-specific environment faced by astronauts. Weightlessness can have a serious impact on their physical and mental health, and may induce neuropsychiatric dysfunction, including cognitive decline in responsiveness, judgment, and decision-making. The particularity of space flight means that it is important to develop experiments on the ground to simulate space weightlessness, to explore the influence of space weightlessness, and to find protective countermeasures. This review summarizes experimental method to simulate weightlessness and the effect of weightlessness on body function.

**【Keywords】** weightlessness; experimental methods; function; mechanism; review

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

**【基金项目】** 中国医学科学院创新工程项目(2021-I2M-1-034),载人航天工程航天医学实验领域项目(HYZHXM05003)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) grant (2021-I2M-1-034), Space Medical Experiment Project of China Manned Space Program(HYZHXM05003).

**【作者简介】** 黄红(1993—),女,博士,研究方向:动物行为学和神经精神药理研究。Email: huanghong2012@163.com

**【通信作者】** 刘新民,男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:动物行为学和神经精神药理研究。Email:liuxinmin@hotmail.com;

姜宁,女,博士,助理研究员,研究方向:动物行为学和神经精神药理研究。Email:jiangning0603@163.com。

\* 共同通信作者

随着我国航天事业的发展,我国正进入中长期载人航天飞行阶段。长期驻留空间站的航天员处于失重、密闭(狭小空间)等航天特因环境会导致人体发生相应的适应性变化<sup>[1]</sup>,容易引起空间运动病、心血管功能紊乱、失重性骨丢失、肌萎缩、认知功能减退、情绪改变和免疫功能低下等航天医学问题<sup>[2-4]</sup>。除此之外,有文献报道发现虽然短期的失重对航天员的认知记忆没有显著性损伤,但长期的失重环境,会导致航天员明显的识别功能减退<sup>[5-6]</sup>。为明确失重所致的各种损伤机制及寻找到可能的有效防护药物,在地面建立航天失重模型模拟失重所致生理或心理损伤尤为重要。因此,本文从地面常见模拟失重模型与失重所致机体功能损伤方面进行综述,以期模拟航天失重环境和机能研究提供依据。

## 1 地面模拟失重的方法

### 1.1 尾部悬吊(尾吊)模拟失重法

尾部悬吊 30°被公认为能有效模拟航天失重对动物的各生理系统造成影响的实验方法。尾部悬吊模拟航天失重模型,最早在 1979 年由 Morey 建立<sup>[7]</sup>,该模型的尾吊套由穿孔的硅藻土制成,将这种材料按大鼠背部轮廓剪裁后,粘合在剃光毛的大鼠背部,以使鼠不能抓到自己的尾巴,或者咬坏套具。这种方式可以维持 2 周,2 周后需要拆下尾吊套给大鼠重新剃毛。这套尾吊装置可让大鼠 360°自由旋转,装置底部是塑料网格,大鼠可以抓住网格移动,自由获取食物和水,大鼠后肢卸负荷,但不被束缚住,整个背套通过钓丝固定在悬空的水平铝梁上;尾吊的大鼠保持头低位,可以模拟航天失重时体液头向分布的状态。但由于这个造模方法对动物背部皮肤的损伤性,于是在 1982 年 Morey-Holton 对其进行了改进,建立了对动物刺激性更低的尾部悬吊法<sup>[8]</sup>。为了进一步模拟长期航天失重,1991 年,陈杰等<sup>[9]</sup>在 Morey-Holton 的尾部悬吊方法上又进行了改进,改进后的方法能模拟长期航天失重达 120 d,且动物无死亡,尾巴无坏死现象。具体为:洁净、干燥大鼠尾巴后,先用安息香酊和松香酊喷涂大鼠尾巴,再用胶布粘贴,且 1~2 周后更换胶布粘贴的位置。为了使尾吊过程更为简便,付子豪等<sup>[10]</sup>报道了一种改良的尾吊方法,具体操作为:在医用胶布和纱布制作的大鼠尾套内增加聚乙烯发泡棉隔层以缓冲纱布对尾部的挤压,保证远端血液

循环,该方法可防止尾吊过程中大鼠烂尾。目前,最常用的简化的尾部悬吊模拟航天失重的方法为:鼠单笼饲养,尾部缠绕胶带并通过绳索悬挂,头低位-30°尾悬吊,使后肢卸载,鼠身可 360°旋转,鼠在尾吊箱中可自由进食进水<sup>[11]</sup>。

为了更好的研究失重对机体的影响,除了大小鼠,也有将豚鼠作为模拟航天失重动物的。豚鼠是听觉器官研究中最常用的实验动物,为将其用于模拟失重的研究,韩浩伦等<sup>[12]</sup>用薄层棉片包裹豚鼠两后肢踝关节以上部位,用胶布缠绕,两后肢间加一棉签棒,用于穿线固定豚鼠,使豚鼠身体与地面呈头低位 30°角。此方法被广泛用于豚鼠尾吊。

但仅是啮齿类动物已不能满足科研学者对于航天失重的探索,有学者通过观察大小鼠尾吊法进行改进,设计出了针对比格犬后肢卸载模拟航天失重的方法。其通过将犬套上吊带式尼龙背心,用绳子穿过背心上的挂扣悬挂,使犬后肢-12°悬吊,前肢着地,犬可在一定范围内自由活动,自由进食<sup>[13]</sup>。

### 1.2 贴身笼具模拟失重法

在研究失重对动物微循环的影响时,兔子是最佳的实验动物。为此,孟京瑞等<sup>[14]</sup>设计了贴身笼具法模拟航天失重,将兔子关在狭小的悬吊笼内,使兔子头部外露,卡紧,头低位-20°<sup>[15]</sup>,这种方式便于动物的饲养和给药,这种贴身笼具法和全身悬吊法被普遍用于对兔子的尾吊失重造模。之后,曹亚军<sup>[16]</sup>对其改进,将贴身笼具改为铁丝笼,便于清洁。

### 1.3 水浸模拟失重法

水浸法的原理是利用水的浮力来抵消重力<sup>[17]</sup>,又被称为“中性浮力模拟失重”。有研究对雄性恒河猴水浸(3 d,每天 3 h,水温 35℃)模拟失重发现,造模后可影响猴子的认知功能、体温和血液参数<sup>[18]</sup>,这与航天飞行过程中实验动物和航天员的认知功能、体温和血液等参数相一致<sup>[19-20]</sup>。在航天员训练时也常采用中性浮力和水槽法模拟进行航天操作任务<sup>[21-23]</sup>。

水浸法又分为“湿浸”和“干浸”。在湿浸时,水位通常设置在胸骨上切线位置,受试者常呈坐姿,少有站立,水温为 34~35℃<sup>[24]</sup>。但由于长时间浸泡对皮肤有影响,此模型最多维持 12 h。由于“湿浸法”对人体的伤害,在俄罗斯常用“干浸法”模拟失重。干浸法是在一个超过受试者身长的大水缸中,将一种特殊的高弹性防水织物附着在浴缸外缘的金属边缘上(织物的面积大大超过了水面的面

积),在防水织物上铺一层棉布后,再将受试者缓缓放上去,此时受试者身体逐渐被织物的褶皱和水包裹。织物很薄,且有足够的面积,使受试者在类似于完全缺乏力支撑的情况下“自由悬浮”在水中,水温一般为 32 ~ 34.5℃,也可以根据受试者要求调节温度<sup>[25]</sup>,干浸法实验最长持续了 56 d<sup>[26]</sup>。另外,还有中性浮力水槽法,多用于出舱活动训练,该实验需要较高的保障条件,不适用于防护措施 of 短期验证<sup>[27]</sup>。

#### 1.4 头低位卧床模拟失重法

头低位卧床实验是地面模拟航天失重常用的人体实验方法。人体卧床实验研究了+4°到-15°不同的角度模拟航天失重效应,也有+45°的实验报道<sup>[28]</sup>,研究发现-6°头低位卧床与航天员在太空失重环境下的生理改变更相似<sup>[17,29]</sup>。-6°头低位卧床主要用于模拟长期失重生理效应,验证防护措施效果时多采用该模型。我国开展了 7 ~ 60 d -6°头低位人体卧床实验模拟航天失重效应<sup>[30]</sup>,被试者在实验期间一直保持卧床状态,包括但不限于排泄、就餐、洗漱等,同时要求无枕睡眠。卧床实验期间可绕身体纵轴变换体位,允许读书、看报、看电影,玩游戏等休闲活动,也可以与外界联系。每个卧床实验受试者之间用帘布隔开,室温 23 ~ 27℃。卧床前 10 d 及卧床期间,均保持平衡饮食,以稳定基础营养状态和避免营养因素对实验结果的影响。被试者每日摄入的总热量不超过其近 1 月的日均值,饮水不限量。卧床期间,每日监测血压,心率,呼吸频率、体温、饮水量、排尿量等一般健康状况<sup>[31]</sup>。

除人体实验外,也有研究对 4 ~ 8 岁年龄阶段 5 ~ 8 kg 的恒河猴进行了为期 42 d 的-10°头低位卧床实验来模拟航天失重<sup>[32]</sup>。

## 2 失重所导致的机体功能损伤

### 2.1 骨和肌肉系统

尾吊法(后肢卸载)是一个常用的骨质疏松模型,可以造成动物骨骼肌萎缩,同时组织代谢也相应的改变<sup>[33]</sup>,由于其生理效应与航天失重过程相似,而用于模拟航天失重。对 C57 小鼠尾吊 28 d 后发现,小鼠比目鱼肌单收缩力、强直收缩力和疲劳指数均显著下降,同时伴有快肌纤维亚型的增加和慢肌纤维亚型的减少<sup>[34]</sup>;小鼠肝和骨骼中的铁沉积显著增加,并伴随破骨细胞活性的上调和成骨细胞活性的下调<sup>[35]</sup>。大鼠-30°尾吊 30 d 后,比目鱼肌

指数显著降低<sup>[36]</sup>,通过对比航天飞行后的小鼠和尾吊模型小鼠的半月板发现,两者均能导致胫骨-股骨间软骨降解、半月板体积下降以及腓肠肌的改变,而这种变化能通过运动恢复<sup>[37-38]</sup>。通过对兔模拟失重发现椎间盘退变主要引起椎间盘的细胞外基质(ECM)破坏和凋亡,随着失重的时间延长椎间盘退变加重<sup>[39]</sup>。比格犬-12°后肢去负荷,持续 3 周后,犬后肢肌肉含量显著降低,骨骼肌原肌球蛋白、肌球蛋白、肌动蛋白、肌钙蛋白表达显著下降,血清碱性磷酸酶、骨钙素、总钙含量、甲状旁腺激素含量显著下降、股骨骨量减少、骨密度显著降低<sup>[13]</sup>。

同时,人体浸泡法模拟航天失重也会引起运动能力下降,肌肉纤维萎缩,心脏缩小等<sup>[26]</sup>。研究发现,无论是航天员飞行返回后还是卧床实验对于运动/肌肉性损伤,大部分都可以通过锻炼恢复<sup>[30,40]</sup>。

### 2.2 心血管系统

失重会导致机体血液流变的改变。酪蛋白激酶-2 相互作用蛋白-1(CKIP-1)是压力超负荷诱导的心脏重塑的重要抑制剂,参与微重力诱导的心脏重塑的调节,研究发现,模拟微重力后,小鼠和猴子心脏中 CKIP-1 的表达均降低<sup>[41]</sup>。同样地,在尾吊 28 d 后,小鼠心脏肥大,收缩力降低,并出现室性心律失常,这可能与心脏兰尼碱受体 2 的钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 的磷酸化增加有关<sup>[42]</sup>。兔头低位-20°模拟失重后血流变及循环系统改变,主要表现在红细胞压积减少、变形能力下降,胆固醇和低密度脂蛋白明显增加<sup>[43]</sup>,血液中内皮细胞数增加、畸形红细胞增多,红细胞变形性和膜流动性下降,骨髓造血功能紊乱,血常规指标有变化及血液流变性降低<sup>[15]</sup>。

### 2.3 中枢神经系统

#### 2.3.1 失重对认知的影响

对于失重对认知的影响有不同的说法,俄罗斯“和平”号空间站通过对比航天员在航天飞行前、中、后 3 个阶段,以及和对照组对比,认为失重并未损伤航天员的学习能力<sup>[44]</sup>。但后来研究发现在长时间的在轨飞行后,航天员的记忆行为出现了损伤<sup>[45]</sup>,这也在长时间头低位卧床实验中被证实<sup>[46]</sup>。头低位-6°卧床 45 d 后,受试者的工作记忆受损<sup>[47]</sup>,卧床 50 d 后,发现对决策能力有影响<sup>[48]</sup>。另有学者证实了头低位-6°卧床 70 d 后的感知运动和空间工作记忆发生改变,并且这与神经元可塑性机制高度相关<sup>[49]</sup>。

为了明确造成这种认知损伤的原因,科学家们采用啮齿类动物开展了模拟失重致认知损伤的研究。尾吊模拟失重 7 d 后,发现大鼠避暗实验错误潜伏期缩短、在 Y 迷宫实验中对于正确臂的寻找准确度降低、反应时间延长,神经递质代谢紊乱、血浆 CORT 降低以及胸腺萎缩、海马神经细胞死亡等现象<sup>[50-52]</sup>。Wistar 大鼠尾吊 14 d 后,发现海马 CA1 区神经元的平均面积、周长、突触间隙和活动区长度显著减少,而树突树枝状结构和棘数代偿性增加<sup>[53]</sup>。SD 大鼠尾吊 14 d 以上,在水迷宫实验中的寻台潜伏期显著性延长,并降低穿梭实验中大鼠的主动回避次数,大鼠学习记忆的下降可能与 SOD、MDA、ROS 等氧化应激水平变化以及 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)和 3-硝基酪氨酸(3-NT)的升高有关<sup>[54-55]</sup>。小鼠尾吊 14 d 后,导致物体认知实验的辨别能力下降、脉冲易化(PPF)和长时程增强(LTP)、脊柱密度降低、CREB/BDNF 信号网络相关蛋白的下调<sup>[56]</sup>。尾吊模拟失重 28 d 可导致大鼠在水迷宫实验中寻台潜伏期显著延长,并伴随焦虑样行为<sup>[57]</sup>,其改变可能与海马组织神经元数目减少, NMDAR2A、BDNF 蛋白表达水平降低, BAX、Caspase-3 等细胞凋亡相关蛋白表达水平升高,海马组织中神经递质谷氨酸(Glu)浓度增加,5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、 $\gamma$ -氨基酸丁酸(GABA)和肾上腺素(E)浓度降低等有关<sup>[58-59]</sup>。

### 2.3.2 失重对情绪的影响

尾吊 14 d SD 大鼠出现抑郁样行为,具体表现在空场实验中动物在中央区运动时间减少、强迫游泳不动时间延长、新奇物体实验嗅探潜伏期延长,同时发现 ChAT 和 SOD 活性降低,MDA、AChE、血清皮质酮、促肾上腺皮质激素水平升高,大脑皮层中 BDNF 表达下降<sup>[60-63]</sup>,同时造成色氨酸、精氨酸、脯氨酸和苯丙氨酸代谢以及能量代谢紊乱<sup>[64]</sup>。对小鼠尾吊 14 d 后发现其在高架十字迷宫实验中进入开臂次数百分比减少,动物表现出焦虑状态,其可能与谷氨酸能系统的改变有关<sup>[65]</sup>。

经过人体-6°卧床 45 d 模拟失重模型实验结果来看,个体在卧床前会表现出对未来的担忧情绪,在卧床初期会表现出焦虑情绪的波动,头低位卧床模拟航天失重环境可能更多的是诱发了个体的躯体性焦虑而非焦虑心境<sup>[31]</sup>。通过对男女卧床实验的研究,发现不同性别在卧床实验期间,均出

现了焦虑/抑郁情绪的高-低-高-低的波动,这与航天飞行中情绪变化的 4 阶段模型假设基本一致<sup>[66-67]</sup>。

### 2.4 失重对其他功能的影响

通过航天员身体免疫系统检查和动物实验相关免疫因子的测定,发现航天特因环境造成了免疫系统的紊乱<sup>[68]</sup>,免疫功能失调已成为航天飞行中的危险因素之一<sup>[69]</sup>,并且通过头低位卧床实验发现了女性和男性在立位耐力、外周阻力和亚极量峰值耗氧量等方面存在着生理响应差距<sup>[70-72]</sup>。在微重力环境下可以抑制淋巴细胞的增殖能力,尾吊 7 d 后对 Th1、Th2 细胞免疫功能具有抑制作用<sup>[73-74]</sup>。尾吊还会导致 C57 小鼠 B 细胞生成的减少,其可能与 B 细胞转录因子、早期 B 细胞因子(EBF)和 B 细胞转录因子(Pax5)的表达减少以及 STAT5 介导的 IL-7 信号的改变有关<sup>[75]</sup>。

兔头低位失重模拟时,眼内压明显升高<sup>[76]</sup>; -30°尾部悬吊建立模拟微重力 SD 大鼠模型,连续 14 d 可造成眼压增高<sup>[77]</sup>。更有研究发现 SD 大鼠尾吊 12 周后,造成视神经超微结构改变、功能抑制及视网膜细胞损伤<sup>[78]</sup>。豚鼠尾吊 5 d 后,引起听觉功能和超微结构的损伤,同时发现内耳细胞凋亡蛋白 Caspase-3 的表达<sup>[79-80]</sup>。

## 3 结语

航天失重对于航天员是一大健康威胁因素,开展该条件下产生的航天飞行综合征的发生机制及防护措施研究,提高航天特殊环境下机体适应能力,最大程度保护航天员身心健康是航天医学领域的首要任务。地面模拟失重效应实验方法,常采用人体头低位-6°卧床法或者啮齿类动物尾吊-30°的方法,这两种方法是国内外公认的对机体的影响与空间站在轨相似的地面模拟失重模型。但由于地面的重力环境,不能实现对太空失重环境的完全复制,只能对失重状态下产生的某些生理效应加以模拟。比如,模拟失重尾吊模型可以模拟失重环境下体液头向分布以及后肢卸负荷的生理现象,从而研究失重对骨骼、肌肉、体液循环,以及体液淤积脑内引起的认知、情绪等方面的影响。随着航天事业的发展,我国中长期航天驻留时代即将到来,应用地面模拟航天失重模型,从而寻找有效的防护航天失重效应的措施是极为重要的。

## 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Antonutto G, di Prampero PE. Cardiovascular deconditioning in microgravity: some possible countermeasures [J]. Eur J Appl Physiol, 2003, 90(3-4): 283-291.
- [ 2 ] Nicolas M, Sandal GM, Weiss K, et al. Mars-105 study: time-courses and relationships between coping, defense mechanisms, emotions and depression [J]. J Environ Psychol, 2013, 35: 52-58.
- [ 3 ] Stupakov GP, Kazeikin VS, Morukov BV. Microgravity-induced changes in human bone strength [J]. Physiologist, 1989, 32(1): 41-44.
- [ 4 ] Convertino VA. Consequences of cardiovascular adaptation to spaceflight: implications for the use of pharmacological countermeasures [J]. Gravit Space Biol Bull, 2005, 18(2): 59-69.
- [ 5 ] Benke Th, Koserenko O, Gerstenbrand F. COGIMIR: A study of cognitive functions in microgravity [M]. Austria: Wien: Springer-Verlag; 1992.
- [ 6 ] de Schonen S, Leone G, Lipshits M. The face inversion effect in microgravity: is gravity used as a spatial reference for complex object recognition? [J]. Acta Astronaut, 1998, 42(1-8): 287-301.
- [ 7 ] Morey ER. Spaceflight and bone turnover: correlation with a new rat model of weightlessness [J]. BioScience, 1979, 29(3): 168-172.
- [ 8 ] Morey-Holton E, Wronski TJ. Animal models for simulating weightlessness [J]. Physiologist, 1982, 24(6): 1-2.
- [ 9 ] 陈杰, 马进, 丁兆平, 等. 一种模拟长期失重影响的大鼠尾部悬吊模型 [J]. 空间科学学报, 1993, 13(2): 159-162.  
Chen J, Ma J, Ding ZP, et al. A tail suspension model of rats simulating the effect of long-term weightlessness [J] Chin J Space Sci, 1993, 13(2): 159-162.
- [ 10 ] 付子豪, 王臻, 吴洁, 等. 改良的大鼠模拟失重模型制备方法 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(2): 189-192, 196.  
Fu ZH, Wang Z, Wu J, et al. A modified protocol for generating the simulated weightlessness rat model [J]. Chin J Appl Physiol, 2019, 35(2): 189-192, 196.
- [ 11 ] 吕静薇. 人参皂苷 Rg1 和 Rb1 改善航天失重效应与睡眠干扰所致认知功能减退作用及机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2021.  
Lv JW. Protective effects of ginsenosides Rg1 and Rb1 on cognitive function decline induced by stimulating space weightlessness and sleep deprivation and their mechanism [D]. Beijing: Peking Union Medical College; 2021.
- [ 12 ] 韩浩伦, 吴玮, 薄少军, 等. 豚鼠模拟失重的实验设计与应用 [J]. 总装备部医学学报, 2011, 13(2): 107-108, 125.  
Han HL, Wu W, Bo SJ, et al. Experimental design and application of simulated weightlessness in guinea pigs [J]. Med J Gen Equipment Headquarters, 2011, 13(2): 107-108, 125.
- [ 13 ] 刘书林, 姚永杰, 刘秋红, 等. 犬头低位后肢去负荷模拟失重模型的建立与验证 [J]. 载人航天, 2021, 27(5): 596-602.  
Liu SL, Yao YJ, Liu QH, et al. Establishment and validation of simulated weightlessness model of dog with head down hindlimb unloading [J]. Manned Spaceflight, 2021, 27(5): 596-602.
- [ 14 ] 孟京瑞, 沈湊云, 向求鲁. 兔模拟失重装置的设计及其应用 [J]. 航天医学与医学工程, 1996, 9(1): 57-59.  
Meng JR, Shen XY, Xiang QL. Design and application of apparatus for simulating weightlessness of rabbit [J]. Space Med Med Eng, 1996, 9(1): 57-59.
- [ 15 ] 沈湊云, 陈建和, 孟京瑞, 等. 模拟失重对兔血液系统影响的研究 [J]. 航天医学与医学工程, 1996, 9(3): 44-49.  
Shen XY, Chen JH, Meng JR, et al. Influence of simulated weightlessness on hematological system of rabbit [J]. Space Med Med Eng, 1996, 9(3): 44-49.
- [ 16 ] 曹亚军. 微重力热环境对兔子生理指标影响的实验研究 [D]. 重庆: 重庆大学; 2018.  
Cao YJ. Experimental study on the effect of microgravity thermal environment on physiological parameters of rabbit [D]. Chongqing: Chongqing university; 2018.
- [ 17 ] Watenpugh DE. Analogs of microgravity: head-down tilt and water immersion [J]. J Appl Physiol, 2016, 120(8): 904-914.
- [ 18 ] Klotz IN, Gvozdk TE, Oganessian AO, et al. Water immersion as a model of hypogravity [J]. Bull Exp Biol Med, 2019, 167(2): 284-286.
- [ 19 ] Strangman GE, Sipes W, Beven G. Human cognitive performance in spaceflight and analogue environments [J]. Aviat Space Environ Med, 2014, 85(10): 1033-1048.
- [ 20 ] Shtemberg AS, Lebedeva-Georgievskaia KV, Matveeva MI, et al. Effect of space flight factors simulated in ground-based experiments on the behavior, discriminant learning, and exchange of monoamines in different brain structures of rats [J]. Izv Akad Nauk Ser Biol, 2014, 2: 168-175.
- [ 21 ] 孙海鹏, 王永生. 俄罗斯航天员舱外活动地面模拟训练方法与设备 [J]. 国际太空, 2012, 10: 26-32.  
Sun HP, Wang YS. Ground simulation training method and equipment for extravehicular activities of Russian astronauts [J]. Space Int, 2012, 10: 26-32.
- [ 22 ] 徐水红, 闫利, 马爱军, 等. 航天特因环境影响及有关选拔训练项目和模拟方法 [J]. 航天器环境工程, 2019, 36(1): 1-6.  
Xu SH, Yan L, Ma AJ, et al. The space special environments, the selection & training programs and the environmental simulation method [J]. Spacecraft Environ Eng, 2019, 36(1): 1-6.
- [ 23 ] 韩旭, 石蒙, 董睿, 等. 水下模拟失重试验模型设施发展综述 [J]. 航天器环境工程, 2021, 38(5): 592-598.

- Han X, Shi M, Dong R, et al. The research progress of experimental mockups for underwater weightlessness simulation test [J]. *Spacecraft Environ Eng*, 2021, 38(5): 592-598.
- [24] Duddy JH. The simulation of weightlessness using water immersion techniques; an annotated bibliography [J]. *Hum Factors*, 1969, 11(5): 507-540.
- [25] Kozlovskaja IB. Fundamental and applied objectives of investigations in immersion [J]. *Aviakosm Ekolog Med*, 2008, 42(5): 3-7.
- [26] Navasiolava NM, Custaud MA, Tomilovskaya ES, et al. Long-term dry immersion: review and prospects [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2011, 111(7): 1235-1260.
- [27] 卢来洁, 刘巍, 邱宏伟, 等. 水槽训练航天服生保脐带研制 [J]. *航天医学与医学工程*, 2010, 23(6): 412-415.
- Lu LJ, Liu W, Qiu HW, et al. Development of life support umbilical cord used for underwater training spacesuit [J]. *Space Med Med Eng*, 2010, 23(6): 412-415.
- [28] Wei J, Yan G, Guan Z. Changes of brain response induced by simulated weightlessness [J]. *Acta Astronaut*, 1992, 27: 31-36.
- [29] Katkovskii BS, Georgievskii VS, Machinskii GV, et al. Some physiological effects caused by 30 days of bed rest in different body positions [J]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 1980, 14(4): 55-58.
- [30] 王林杰, 曲丽娜, 李英贤, 等. 我国失重生理学研究进展与展望 [J]. *航天医学与医学工程*, 2018, 31(2): 131-139.
- Wang LJ, Qu LN, Li YX, et al. Progresses and prospects of weightlessness physiology in China [J]. *Space Med Med Eng*, 2018, 31(2): 131-139.
- [31] 赵鑫, 周仁来, 付丽. 45天-6°头低位卧床模拟航天环境对个体焦虑情绪的影响 [J]. *中国临床心理学杂志*, 2014, 22(3): 381-385.
- Zhao X, Zhou RL, Fu L. Investigation on individual's anxiety during 45 days - 6° head-down bed rest [J]. *Chin J Clin Psychol*, 2014, 22(3): 381-385.
- [32] Chen J, Li K, Pang Q, et al. Identification of suitable reference gene and biomarkers of serum miRNAs for osteoporosis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36347.
- [33] Gardell SJ, Zhang X, Kapoor N, et al. Metabolomics analyses of muscle atrophy induced by hind limb unloading [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1996: 297-309.
- [34] 李莉, 刘红菊, 杨明浩, 等. 去负荷小鼠比目鱼肌收缩特性和纤维类型转化 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2012, 28(2): 97-101.
- Li L, Liu HJ, Yang MH, et al. The relationship between contractile characteristics and fiber type conversion in hind-limb unloading mice soleus [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2012, 28(2): 97-101.
- [35] Xu Z, Sun W, Li Y, et al. The regulation of iron metabolism by hepcidin contributes to unloading-induced bone loss [J]. *Bone*, 2017, 94: 152-161.
- [36] 汪德生, 张鹤, 杜芳, 等. 多穴位电针刺激对抗模拟失重大鼠比目鱼肌萎缩作用研究 [J]. *航天医学与医学工程*, 2017, 30(3): 180-184.
- Wang DS, Zhang H, Du F, et al. Research on electroacupuncture stimulation to multiple acupoint against soleus atrophy in simulated weightlessness rats [J]. *Space Med Med Eng*, 2017, 30(3): 180-184.
- [37] Kwok AT, Mohamed NS, Plate JF, et al. Spaceflight and hind limb unloading induces an arthritic phenotype in knee articular cartilage and menisci of rodents [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 10469.
- [38] Sung M, Li J, Spieker AJ, et al. Spaceflight and hind limb unloading induce similar changes in electrical impedance characteristics of mouse gastrocnemius muscle [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2013, 13(4): 405-411.
- [39] Wu D, Zheng C, Wu J, et al. Molecular biological effects of weightlessness and hypergravity on intervertebral disc degeneration [J]. *Aerosp Med Hum Perform*, 2017, 88(12): 1123-1128.
- [40] Wang H, Wan Y, Tam KF, et al. Resistive vibration exercise retards bone loss in weight-bearing skeletons during 60 days bed rest [J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(8): 2169-2178.
- [41] Ling SK, Li YH, Zhong GH, et al. Myocardial CKIP-1 overexpression protects from simulated microgravity-induced cardiac remodeling [J]. *Front Physiol*, 2018, 9(40): 40.
- [42] Respress JL, Gershovich PM, Wang T, et al. Long-term simulated microgravity causes cardiac RyR2 phosphorylation and arrhythmias in mice [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 176(3): 994-1000.
- [43] 石宏志, 李勇枝, 沈羨云, 等. 中药复方对模拟失重兔血流变特性及循环系统的调节作用 [J]. *航天医学与医学工程*, 2005, 18(4): 251-254.
- Shi HZ, Li YZ, Shen XY, et al. Regulative effects of Chinese herb-compound on blood rheology and circulatory system of rabbits under simulated weightlessness [J]. *Space Med Med Eng*, 2005, 18(4): 251-254.
- [44] Leone G, Lipshits M, Gurfinkel V, et al. Is there an effect of weightlessness on mental rotation of three-dimensional objects? [J]. *Brain Res Cogn Brain Res*, 1995, 2(4): 255-267.
- [45] Eddy DR, Schifflett SG, Schlegel RE, et al. Cognitive performance aboard the life and microgravity spacelab [J]. *Acta Astronaut*, 1998, 43(3-6): 193-210.
- [46] Hockey GR. Compensatory control in the regulation of human performance under stress and high workload; a cognitive-energetical framework [J]. *Biol Psychol*, 1997, 45(1-3): 73-93.
- [47] Liu Q, Zhou R, Zhao X, et al. Effects of prolonged head-down bed rest on working memory [J]. *Neuropsych Dis Treat*, 2015, 11: 835-842.

- [48] Lipnicki DM, Gunga HC, Belavy DL, et al. Decision making after 50 days of simulated weightlessness [J]. *Brain Res*, 2009, 1280: 84–89.
- [49] Cassady K, Koppelmans V, Reuter-Lorenz P, et al. Effects of a spaceflight analog environment on brain connectivity and behavior [J]. *Neuroimage*, 2016, 141: 18–30.
- [50] Feng L, Liu XM, Cao FR, et al. Anti-stress effects of ginseng total saponins on hindlimb-unloaded rats assessed by a metabolomics study [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 188: 39–47.
- [51] Feng L, Yue XF, Chen YX, et al. LC/MS-based metabolomics strategy to assess the amelioration effects of ginseng total saponins on memory deficiency induced by simulated microgravity [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2016, 125: 329–338.
- [52] Sun XQ, Xu ZP, Zhang S, et al. Simulated weightlessness aggravates hypergravity-induced impairment of learning and memory and neuronal apoptosis in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2009, 199(2): 197–202.
- [53] Ranjan A, Behari J, Mallick BN. Cytomorphometric Changes in Hippocampal CA1 neurons exposed to simulated microgravity using rats as model [J]. *Front Neurol*, 2014, 5: 77.
- [54] Zhang YL, Wang Q, Chen HL, et al. Involvement of cholinergic dysfunction and oxidative damage in the effects of simulated weightlessness on learning and memory in rats [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 2547532.
- [55] Wang Q, Zhang YL, Li YH, et al. The memory enhancement effect of Kai Xin San on cognitive deficit induced by simulated weightlessness in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 187: 9–16.
- [56] Xiang ST, Zhou Y, Fu JX, et al. rTMS pre-treatment effectively protects against cognitive and synaptic plasticity impairments induced by simulated microgravity in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 359: 639–647.
- [57] 鲍余, 陈颖, 曾贵荣, 等. 人参总皂苷对尾吊模拟微重力大鼠学习记忆损伤和焦虑的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(7): 49–56.
- Bao Y, Chen Y, Zeng GR, et al. Protective effect of total ginsenoside ginseng root on learning and memory impairment and anxiety in rats induced by hindlimb suspension [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formul*, 2021, 27(7): 49–56.
- [58] 王婷梅, 张永亮, 王艳丽, 等. 尾吊对大鼠海马组织学习记忆及凋亡相关蛋白表达的影响 [J]. *航天医学与医学工程*, 2016, 29(4): 235–239.
- Wang TM, Zhang YL, Wang YL, et al. Effects of tail-suspension on memory and apoptosis related protein expression in rat hippocampus [J]. *Space Med Med Eng*, 2016, 29(4): 235–239.
- [59] Wang TM, Chen HL, Lv K, et al. iTRAQ-based proteomics analysis of hippocampus in spatial memory deficiency rats induced by simulated microgravity [J]. *J Proteomics*, 2017, 160: 64–73.
- [60] 陈怡西, 王琼, 张永亮, 等. 模拟失重大鼠的抑郁样行为学表现 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(17): 141–145.
- Chen YX, Wang Q, Zhang YL, et al. Depressive behavioral on rats of simulated weightlessness [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formul*, 2014, 20(17): 141–145.
- [61] 张永亮, 陈海龙, 王婷梅, 等. 尾吊复合隔离导致的大鼠抑郁样行为研究 [J]. *航天医学与医学工程*, 2017, 30(6): 401–405.
- Zhang YL, Chen HL, Wang TM, et al. Study on depression-like behavior induced by tail suspension combined with isolation in rats [J]. *Space Med Med Eng*, 2017, 30(6): 401–405.
- [62] Wang Q, Dong L, Wang M, et al. Dammarane sapogenins improving simulated weightlessness-induced depressive-like behaviors and cognitive dysfunction in rats [J]. *Front Psychiatry*, 2021, 12: 638328.
- [63] Zhai HB, Shang XL, Fu JX, et al. Rapamycin relieves anxious emotion and synaptic plasticity deficits induced by hindlimb unloading in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 677: 44–48.
- [64] Xu T, Lu C, Feng L, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry-based urinary metabolomics study on a rat model of simulated microgravity-induced depression [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 165: 31–40.
- [65] Shang XL, Xu B, Li Q, et al. Neural oscillations as a bridge between glutamatergic system and emotional behaviors in simulated microgravity-induced mice [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 317: 286–291.
- [66] 秦海波, 王峻, 白延强, 等. 60 d -6°头低位卧床对个体情绪的影响 [J]. *航天医学与医学工程*, 2010, 23(3): 163–171.
- Qin HB, Wang J, Bai YQ, et al. Effect of 60 d -6° head-down bed rest on the subjects' emotion [J]. *Space Med Med Eng*, 2010, 23(3): 163–171.
- [67] 陈思佚, 赵鑫, 周仁来, 等. 15 d -6°头低位卧床对女性个体情绪的影响 [J]. *航天医学与医学工程*, 2011, 24(4): 253–258.
- Chen SY, Zhao X, Zhou RL, et al. Effects of 15 d -6° head-down bed rest on emotion of female subjects [J]. *Space Med Med Eng*, 2011, 24(4): 253–258.
- [68] Criswell-Hudak BS. Immune response during space flight [J]. *Exp Gerontol*, 1991, 26(2–3): 289–296.
- [69] Crucian B, Sams C. Immune system dysregulation during spaceflight: clinical risk for exploration-class missions [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(5): 1017–1018.
- [70] 刘炳坤, 祝郁, 李志利, 等. 30 天-6°头低位卧床对男性有氧运动能力的影响及其防护策略(英文) [J]. *航天医学与医学工程*, 2014, 27(4): 235–240.
- Liu BK, Zhu Y, Li ZL, et al. Effects of 30 d -6° head down bed rest on male aerobic capacity and its protection strategy [J]. *Space Med Med Eng*, 2014, 27(4): 235–240.
- [71] 谈诚, 曹毅, 张丽芬, 等. 15 d -6°头低位卧床对女性立位耐

- 力的影响 [J]. 航天医学与医学工程, 2011, 24(4): 246-252.
- Tan C, Cao Y, Zhang LF, et al. Effects of 15 d -6° head-down bed rest on female orthostatic tolerance [J]. Space Med Med Eng, 2011, 24(4): 246-252.
- [72] 刘炳坤, 陈文娟, 李志利, 等. 15 d -6° 头低位卧床对女性运动心肺功能影响及对抗措施效果 [J]. 航天医学与医学工程, 2011, 24(4): 241-245.
- Liu BK, Chen WJ, Li ZL, et al. Effects of 15 d -6° head-down bed rest on female cardiopulmonary function and effectiveness of some countermeasures [J]. Space Med Med Eng, 2011, 24(4): 241-245.
- [73] 宋锦苹, 张洪玉, 钟萍, 等. 尾吊、噪声及两因素复合对小鼠免疫功能的影响及柞木多糖的防护作用 [J]. 航天医学与医学工程, 2013, 26(6): 459-462.
- Song JP, Zhang HY, Zhong P, et al. Effects of tail-suspension and(or) noise exposure on immune function in mice and the protection of cudrapolysaccharide [J]. Space Med Med Eng, 2013, 26(6): 459-462.
- [74] 郝彤, 李俊杰, 杜芝燕, 等. 模拟微重力环境下虫草多糖促进淋巴细胞增殖和 CD 分子表达的实验研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(5): 1212-1215.
- Hao T, Li JJ, Du ZY, et al. Cordyceps sinensis enhances lymphocyte proliferation and CD markers expression in simulated microgravity environment [J]. J Exp Hematol, 2012, 20(5): 1212-1215.
- [75] Lescale C, Schenten V, Djeghloul D, et al. Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging [J]. FASEB J, 2015, 29(2): 455-463.
- [76] Setogawa A, Kawai K. Measurement of intraocular pressure by both invasive and noninvasive techniques in rabbits exposed to head-down tilt [J]. Jpn J Physiol, 1998, 48(1): 25-31.
- [77] 宫玉波, 张文倩, 郭小华, 等. 醋甲唑胺干预尾吊 2 周失重模型大鼠眼压和视网膜、脉络膜厚度的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(14): 2238-2242.
- Gong YB, Zhang WQ, Guo XH, et al. Methazolamide effects on intraocular pressure, retinal and choroidal thickness in rats with tail suspension for 2 weeks [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(14): 2238-2242.
- [78] Zhao HW, Zhao J, Hu LN, et al. Effect of long-term weightlessness on retina and optic nerve in tail-suspension rats [J]. Int J Ophthalmol, 2016, 9(6): 825-830.
- [79] 韩浩伦, 吴玮, 余萌, 等. 雌激素对模拟失重及飞船舱内噪声下豚鼠内耳 Caspase-3 表达的影响 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2013, 21(5): 509-514.
- Han HL, Wu W, Yu M, et al. Effects of estrogen on the expression of Caspase-3 in guinea pigs inner ear under the compound factors of simulated weightlessness and noise in spaceship [J]. J Audiol Speech Pathol, 2013, 21(5): 509-514.
- [80] 韩浩伦, 吴玮, 王鸿南, 等. 头低位模拟失重状态对豚鼠耳蜗听功能与超微结构的影响 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2012, 20(3): 269-271.
- Han HL, Wu W, Wang HN, et al. The effects of simulated weightlessness on auditory function and cochlea ultrastructure in guinea pig [J]. J Audiol Speech Pathol, 2012, 20(3): 269-271.

[收稿日期] 2022-05-09

陈天,胡秦,石哲,等. 美国太空动物实验研究发展历程 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 582-588.

Chen T, Hu Q, Shi Z, et al. A review of space animal experiments conducted by the United States [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 582-588.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.018

# 美国太空动物实验研究发展历程

陈天<sup>1</sup>, 胡秦<sup>1\*</sup>, 石哲<sup>2</sup>, 刘斌<sup>3</sup>, 陈善广<sup>4</sup>, 刘新民<sup>5\*</sup>

(1. 北京工业大学环境与生命学部, 北京 100124; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 3. 燕山大学, 河北 秦皇岛 066004; 4. 中国航天员科研训练中心人因工程重点实验室, 北京 100094; 5. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

**【摘要】** 太空动物实验是人类空间生命科学的重要组成部分。一直以来, 太空动物实验为探索地球生物体在航天环境中的生命现象及活动规律, 支持载人航天的可持续性发展做出了重要贡献。本文主要综述了 20 世纪以来, 美国在太空开展啮齿类动物实验的发展历程和研究成果, 为我国即将开展的太空动物实验提供参考。

**【关键词】** 美国; 太空; 动物实验; 动物实验装置

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0582-07

## A review of space animal experiments conducted by the United States

CHEN Tian<sup>1</sup>, HU Qin<sup>1\*</sup>, SHI Zhe<sup>2</sup>, LIU Bin<sup>3</sup>, CHEN Shanguang<sup>4</sup>, LIU Xinmin<sup>5\*</sup>

(1. Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China. 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208. 3. Yanshan University, Qinhuangdao 066004. 4. China Manned Space Engineering Office, Beijing 100094. 5. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193)

Corresponding author: HU Qin. E-mail: hq07616@bjut.edu.cn; LIU Xinmin. E-mail: liuxinmin@hotmail.com

**【Abstract】** Space animal experiments are an important component of space-related life science research. Space animal experiments have made an important contribution to the exploration of life and to our understanding of how organisms from Earth adapt to space, while supporting the sustainability of human spaceflight. The Chinese space station has achieved in-orbit operation and will imminently carry out large-scale biological experiments. Here, we review the history of rodent experiments conducted in space by the United States since the 20th century, thereby providing a reference for China's future space animal experiments.

**【Keywords】** United States; space; animal experiment; rodent research

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

美国国家航空航天局(National Aeronautics and Space Administration, NASA)采用啮齿类动物进行航天飞行实验始于 1975 年美苏联合开展的生物-3 (Bion-3) 和 1977 年的生物-4 任务 (Bion-4)。自 1981 年 NASA 首次发射航天飞机开始, NASA 先后

开发了可用于航天飞机的动物饲养仓 (Animal Enclosure Module, AEM)、用于空间站实验室的实验动物生命保障设施 (Rodent Research Animal Holding Facility, RAHF) 和啮齿类动物饲养系统 (Rodent Habitat Hardware System, RHHS)<sup>[1]</sup>。

**【基金项目】** 载人航天工程航天医学实验领域项目 (HYZHXM05003)。

Funded by Manned Space Engineering and Aerospace Medical Experiment Field Project (HYZHXM05003)。

**【作者简介】** 陈天, 男, 硕士, 研究方向: 微流控器官芯片研究。Email: chentian@emails.bjut.edu.cn

**【通信作者】** 胡秦, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 抗病毒药物研发及相关免疫机制研究。Email: hq@bjut.edu.cn;

刘新民, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药神经精神药理和肿瘤药理、中药神经精神药理实验方法研究。

Email: liuxinmin@hotmail.com。

\* 共同通信作者

RAHF 系统由洛克希德导弹和空间公司 (Lockheed Missiles Space Company, LMSC) 为 NASA 开发,并于 1985 年 5 月在空间实验任务-3 (Spacelab-3/STS-51b) 中进行工程评估,最初版本的 RAHF 的硬件设计存在微粒污染和动物气味泄露等问题。经过 NASA Ames 研发中心 (ARC) 和 LMSC 公司设计改进后,在空间实验任务-1 (Space Life Science-1/STS-40) 任务中首次使用了 RAHF。此后,RAHF 执行了多次太空实验室生命科学任务,1998 年随着空间实验室 (Spacelab, SL) 组件的退役,再无报道使用 RAHF 进行空间科学实验。

AEM 饲养仓是由 ARC 中心研发的一种啮齿动物饲养设施,可与航天飞机的中层储物柜模块集成,并带有废物收集系统、固体食物栏、水系统、层流气流和照明系统等。AEM 系统于 1983 年首次试飞,截止到 2014 年,国际空间站 (International Space Station, ISS) 上的动物实验通常都是使用 AEM 和 AEM-X 进行,AEM 已经执行了 20 多次航天运输任务 (Space Transportation System, STS)。随着航天飞机时代的结束,此后,NASA 与太空科学发展中心 (The Center for the Advancement of Science in Space, CASIS) 合作,在 AEM、AEM-T、AEM-E 基础之上改良升级研制了 RHHS 系统,从 2014 年开始用于为 NASA 运送动物到国际空间站。一系列验证实验研究表明 RHHS 对啮齿动物生存无负面影响,并优于之前的空间实验平台。迄今为止,NASA 使用 RHHS 已执行多次脊椎动物的飞行实验,主要采用动物为大鼠和小鼠。

## 1 动物实验装置

### 1.1 啮齿动物研究饲养设施 (rodent research animal holding facility, RAHF)

RAHF 是一个应用于空间实验室的多功能动物生命保障系统,由 7 个基本部件组成,包括啮齿类饲养笼、饲养笼模块、环境管理系统 (environmental control system, ECS)、水、电力、数据和控制系统<sup>[2]</sup>。饲养笼模块可放置 12 个啮齿类饲养笼,提供 24 只啮齿类动物饲养的循环供气、食物、水、照明和污染物的管理。其中每个饲养笼可独立饲养 2 只啮齿类动物,饲养笼通过 O 型密封垫片有效的控制气体和固体颗粒物外泄。饲养笼的污染物处理装置为多层纤维结构,外层为 150  $\mu\text{m}$  孔径的不锈钢网,可抑制氨的生成和气味的释放。污染物处理装置中的

排泄物由循环空气干燥后经 ECS 系统收集。水供应组件将 9.5 L 水储存在水罐的丁基橡胶胶囊中。电力、数据和控制系统由高压电子设备箱 (Upper Electronics Box, UEB) 和低压电子设备箱 (Low Electronics Box, LEB) 控制。早期的 RAHF 的硬件设计在使用中暴露了 2 个主要问题:食物及排泄物残渣污染和动物气味泄露。改进后 RAHF 硬件增加了动物饲养笼对固体颗粒的吸附和单通道辅助风机 (Single-Pass Auxiliary Fan, SPAF) 装置用于辅助排除污染物。此后,RAHF 在 SL 和 STS-40/58/89 等多项任务中搭载了大鼠和新生小鼠,并能有效的处理化学和微生物污染物<sup>[3-4]</sup>。

### 1.2 动物围栏组件 (animal enclosure module, AEM)

AEM 是一个自成一体的啮齿类群养生物舱<sup>[5]</sup>。每个 AEM 装置可搭载 6 只 250 g 体重的大鼠 (或 20 只小鼠)。此外,每个 AEM 单位可增加隔板,分离为 2 个独立区域。AEM 装置可为动物提供适宜的光照、饮食饮水并控制空气质量和管理废物等。AEM 装置加上食物、水和动物的总重量约 27.2 kg,包括水箱在内的设备占用面积约 645  $\text{cm}^2$ 。AEM 设计了专用于微重力空间的恒定气流控制装置,将动物尿液和排泄物吹入过滤器。此外,AEM 装置 4 周采用网格状设计便于动物抓握,还可对内部进行观察和摄像<sup>[6]</sup>。在此基础上升级改造的 AEM-T 和 AEM-E 采用了彼此独立但可以组装的模块化结构。AEM-T 最多可养 10 只小鼠,能够提供食物、水、通风、光照、废物和气味管理;AEM-E 控制系统可提供氧气、二氧化碳和湿气的控制。温度和压力控制由运载飞船提供。AEM 饲养舱先后完成了 26 次动物实验,分别观察了飞行时长为 7 ~ 30 d 的大鼠和小鼠,返回陆地后检测了其免疫、前庭和神经系统等指标。Wade 等<sup>[7]</sup>曾分析了 15 次太空实验中大鼠体重、能量摄入和饮水量的变化。飞行持续时间从 4 ~ 17 d 不等。实验结果表明,在 AEM 饲养舱中大鼠与地面对照组相比,其体重、能量摄入和饮水量均无显著性差异。Moyer 等<sup>[5]</sup>在地面使用 AEM 饲养舱,发现 AEM 装置可支持 12 只小鼠或 6 只大鼠的 35 d 长时间饲养。

### 1.3 啮齿动物生活硬件系统 (the rodent habitat hardware system, RHHS)

RHHS 是在 AEM 的基础上改造而来,主要包括:从地球运送至空间站的运输装置、到达空间站

时将啮齿动物从运输装置转移到栖息地单元的动物通道单元以及提供长期空间站上的啮齿动物栖息地模块。RHHS 最多可容纳 10 只小鼠或 5 ~ 6 只大鼠。每个 RHHS 单元含摄像头、金属网笼、温湿度感应器、白光 LED、红外照明和长时间除臭过滤器。RHHS 于 2014 年首次在 SpaceX-4 上发射并投入使用。在空间站为期 1 个月的研究中,其硬件性能和操作都符合在太空进行动物实验研究的需求,迄今已开展了 20 多次啮齿类动物 (rodent research, RR) 研究。从 RR5 次任务开始, RHHS 中加入了多功能区域装置 (enrichment hut), 主要由不锈钢网制成, 可用于动物睡眠等行为, 以减少动物的精神压力<sup>[8]</sup>。

## 2 太空飞行对动物生理功能的影响

### 2.1 免疫系统功能

为研究航天飞行对免疫系统功能的影响, 1993 年在 STS-58/SLS-2 飞行中, 对雄性 SD 大鼠的脾和骨髓组织研究显示, 飞行大鼠脾 T 细胞和 NK 细胞活性降低, IL-1、IL-2、TNF- $\alpha$  等细胞因子表达下降, 表明细胞免疫被显著抑制, 返回地面 14 d 后部分恢复<sup>[9]</sup>。2001 年 Gridley 等<sup>[10]</sup>在 STS-108 飞行中将开

展 C57BL/6J 小鼠实验。结果发现, 小鼠经 12 d 航天飞行后体重下降 10% ~ 12%, 脾和胸腺重量均显著降低。小鼠脾中 CD25<sup>+</sup> 淋巴细胞、CD25<sup>+</sup> 阳性细胞中 CD3<sup>+</sup> T 细胞、NK1.1<sup>+</sup> 细胞比例上升, CD71 表达下降。IFN- $\gamma$ 、IL-2 和 IL-4 表达下调。红细胞和血小板数量增加, 红细胞和血小板体积减少, 网织红细胞比例下降, 表现出脱水样反应。2007 年 Baqai 等<sup>[11]</sup>在 STS-118 飞行任务中开展了为期 13 d 的 C57BL/6NTac 小鼠太空飞行实验, 结果显示飞行组小鼠相较于地面对照组, 脾和胸腺质量明显减少, 脾淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞显著减少, LPS 刺激脾细胞分泌 IL-6 和 IL-10 显著增加, 氧化应激相关基因表达上调。2011 年, Gridley 等<sup>[12]</sup>在 STS-135 航天飞行中将 C57BL/6 小鼠置于 AME 饲养仓中, 飞行 13 d 后返回。结果发现, 地面对照组相比, 飞行小鼠体重和胸腺质量无显著性差异, 但脾质量和相对器官质量显著降低。对小鼠胸腺组织的 TUNEL 染色显示, 飞行组小鼠胸腺细胞 DNA 断裂增多。此外, 飞行组小鼠胸腺组织中 T 细胞功能和癌症相关基因表达与对照组存在显著差异。以上实验结果表明航天飞行显著影响免疫功能, 引起免疫系统异常 (见表 1)。

表 1 航天飞行对免疫系统功能的影响

Table 1 Effects of space flight on immune system

| 飞行任务<br>Flying commission | 研究对象<br>Species | 研究结果<br>Result                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| STS-58                    | 大鼠<br>Rat       | 脾 T 细胞和 NK 细胞活性降低, IL-1、IL-2、TNF- $\alpha$ 等细胞因子表达下降 <sup>[9]</sup><br>The activities of spleen T cells and NK cells decreased, and IL-1, IL-2 and TNF- $\alpha$ .<br>The expression of cytokines decreased <sup>[9]</sup>          |
| STS-108/UF-1              | 小鼠<br>Mouse     | 体重下降, IL-2 和 IL-4 表达下降 <sup>[10]</sup><br>Weight loss, IL-2 and IL-4 expression decreased <sup>[10]</sup>                                                                                                                           |
| STS-118                   | 小鼠<br>Mouse     | 肝、脾和胸腺质量明显减少, 脾淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞显著减少 <sup>[11]</sup><br>The mass of liver, spleen and thymus decreased significantly, and the spleen lymphocytes, monocytes, macrophages and neutrophils decreased significantly <sup>[11]</sup> |
| STS-135                   | 小鼠<br>Mouse     | 脾质量和相对器官质量显著降低 <sup>[12]</sup><br>Spleen mass and relative organ mass decreased significantly <sup>[12]</sup>                                                                                                                       |

### 2.2 神经系统与前庭功能

1993 年, NASA 先后开展了空间生命科学实验 SLS-1/STS40 和 SLS-2/STS-58 (见表 2), Ross 等<sup>[13]</sup>研究显示失重影响了 II 型毛细胞的带状突触数量和分布, 其主要与重力感知相关。为研究带状突触的增加是否具有持久性, 其在 STS-90 飞行的第 2、14 天, 分离 Fisher344 大鼠的内耳组织, 结果表明, 失重可导致内耳毛细胞带状突触数量快速增加, 在后期维持稳定。1994 年和 1995 年, NIH 与 NASA 联合开

展了两项孕鼠飞行试验 (STS-66 和 STS-72), 用以观察航天飞行对新生幼鼠神经发育的影响。实验分别研究 SD 孕鼠 (飞行时间: 孕 9 d ~ 孕 20 d, 孕 11 d ~ 孕 20 d) 的新生幼鼠, 结果显示与对照组相比, 新生幼鼠翻正反射延迟, 70° 直立倾斜实验出现心动过缓等, 提示航天飞行影响新生幼鼠的前庭功能<sup>[14-15]</sup>。1998 年, 在 STS-90 飞行任务中, Pompeiano 等<sup>[16]</sup>研究了 Fisher 344 大鼠脑组织即刻早期基因 (immediate early gene, IEG) 的表达情况,

IEG 通常在神经细胞受到刺激后立即表达,结果显示在发射后 1 d 和着陆后 1 d,与地面对照组相比,飞行组大鼠前庭区域 IEG 基因产物 FOS 蛋白和 FRA 蛋白阳性细胞数量显著增加。Holstein 等<sup>[17]</sup>在 STS-90 飞行任务中对 Fisher344 大鼠的脑组织进行了研究。与对照组相比,太空飞行 24 h 后,大鼠小脑浦肯野细胞线粒体显著增大,结节分子层结构发生改变。2017 年 SpaceX-12 飞行中, Mao 等<sup>[18]</sup>研究了小鼠血脑屏障的影响,经过 35 d 的飞行后,小鼠海马凋亡增加,紧密连接蛋白 ZO-1 表达降低,血管内皮细胞黏附因子 PECAM-1 升高,血脑屏障的完整性被破坏。以上研究表明,太空飞行会显著影响神经系统发育和功能。

### 2.3 骨骼和肌肉功能

1985 年,在 STS-51B/SL-3 飞行任务结束后对 SD 大鼠进行了多项骨形成研究(见表 3),结果显示 7 d 的太空飞行影响抑制前体成骨细胞分化,飞行后 12 h,前体细胞部分或无法恢复<sup>[19]</sup>。大鼠骨钙素含量减少,骨矿化和胶原蛋白代谢损伤<sup>[20]</sup>。1989 年,在为期 7 d 的 STS-29 太空飞行着陆后, Kirchen 等<sup>[21]</sup>发现大鼠腓骨被截断后,其软骨形成缓慢,血管生成缓慢。Zerath 等<sup>[22]</sup>对 STS-78 飞行任务中搭载的 SD 雄性大鼠的研究发现微重力引起的骨形成抑制与内源性糖皮质激素的分泌无关。在 STS-131 的 15 d 飞行结束后, Zhang 等<sup>[23]</sup>发现飞行小鼠的颅骨体积增加,提示微重力引起的液体重新分布可能在头部引起相反的效果。在 STS-90 任务中, Fejteck 等<sup>[24]</sup>和 Adams 等<sup>[25]</sup>分别研究了飞行对大鼠肌肉发育的影响,结果显示与地面对照组相比,飞行大鼠腹直肌和外斜肌的肌纤维横截面积显著下降,腹横肌无显著变化。提示太空飞行会导致腹直肌和外

斜肌萎缩,但不影响腹横肌(主要呼吸肌)。失重诱导正常大鼠的骨骼肌生长损伤,其中对抗重力肌肉生长作用尤为显著。肌肉中类胰岛素 I 型生长因子(insulin-like growth factors-1, IGF-1)表达下降, I 型肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)基因表达下降。结果表明重力对于发育动物的肌肉生长及抗重力相关运动基因表达至关重要。在 SpaceX-4 (2014) 和 SpaceX-10 (2019) 着陆后,对 C57BL/6 N 小鼠的研究发现,较长时间的飞行(14 ~ 33 d)可显著诱导骨骼肌和骨质流失,与骨骼肌和骨平衡相关的多条信号通路改变。此外,与年轻小鼠相比(9 周),成年小鼠(32 周)骨质流失更为显著,且不同部位流失程度不一<sup>[26-27]</sup>。

### 2.4 消化系统和血管功能

Rabot 等<sup>[28]</sup>在 SLS-1/STS-40 和 SLS-2/STS-58 任务中研究太空飞行对 SD 大鼠肠道和肝的影响,结果显示在 9 d 和 14 d 的太空飞行中,大鼠总体健康状况稳定。在 SLS-1 飞行后,大鼠肠道短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)增加,小肠和肝中谷胱甘肽硫基转移酶(glutathione S-transferase, GST)增加。在 SLS-2 飞行中,大鼠肝细胞色素酶 CYP450 显著降低,盲肠内容物轻度酸化, SCFA 降低,杯状细胞减少。提示太空飞行会破坏肠道微生物环境稳态,可能损伤结肠上皮细胞的形态和功能,改变外源性代谢酶系统。1996 年, Hatton 等<sup>[29]</sup>在 STS-80 上进行了为期 18 d 的自发性高血压(SHR)大鼠动物实验,并于飞行结束后探究航天飞行对血压及肠系膜阻力动脉功能的影响。实验结果表明,航天飞行不改变肠系膜血管壁厚度,但导致飞行组大鼠肠系膜动脉内皮依赖性和非依赖型舒缩功能损伤。Behnke 等<sup>[30]</sup>在 STS-131 (15 d)、

表 2 航天飞行对神经系统和前庭功能的影响

Table 2 Effects of space flight on vestibule and nervous system

| 飞行任务<br>Flying commission | 研究对象<br>Species | 研究结果<br>Result                                                                                                                                                                     |
|---------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| STS-90                    | 大鼠<br>Rat       | 内耳带状突触数量迅速增加 <sup>[13]</sup><br>The number of banded synapses in the inner ear increased rapidly <sup>[13]</sup>                                                                   |
| STS-66                    | 大鼠<br>Rat       | 翻正反应频率较低 <sup>[14]</sup><br>The frequency of righting reaction is low <sup>[14]</sup>                                                                                              |
| STS-72                    | 大鼠<br>Rat       | 幼鼠翻正反射延迟, 70°直立倾斜实验出现心动过缓 <sup>[15]</sup><br>The righting reflex of young rats was delayed, and bradycardia occurred in the 70° upright tilt test <sup>[15]</sup>                  |
| STS-90                    | 大鼠<br>Rat       | 大鼠脑组织中 Fos 蛋白和 FRA 蛋白阳性细胞数量增加 <sup>[16]</sup><br>The number of Fos protein and FRA protein positive cells in rat brain increased <sup>[16]</sup>                                   |
| STS-90                    | 大鼠<br>Rat       | Purkinje 细胞线粒体显著增大, 结节分子层结构发生改变 <sup>[17]</sup><br>The mitochondria of Purkinje cells increased significantly and the molecular layer structure of nodules changed <sup>[17]</sup> |
| SpaceX-12                 | 小鼠<br>Mouse     | ZO-1 降低, PECAM-1 升高, 海马凋亡增加 <sup>[18]</sup><br>ZO-1 decreased, PECAM-1 increased and hippocampal apoptosis increased <sup>[18]</sup>                                               |

STS-133(13 d)和 STS-135(13 d)任务中研究航天飞行对 C57BL/6 和 BALB/cJ 雌性小鼠肠系膜血管功能影响。结果显示,与地面对照组相比,航天飞行小鼠肠系膜动脉和静脉血管收缩功能损伤,其机制可能与 Ryanodine 受体介导的胞内钙离子释放有关。2013 年, Taylor 等<sup>[31]</sup>在 STS-135 任务中研究航天飞行对 C57BL/6 小鼠脑血管功能影响,结果显示小鼠脑动脉肌源收缩反应降低,脑动脉最大直径增加,提示航天飞行可能诱导颅内压升高(见表 4)。

## 2.5 动物运动行为功能

在太空飞行中,动物处于不同的饲养环境中,如在 RAHF 系统中,大鼠单独饲养且处于自由漂移状态。而在 AEM 饲养舱中,大鼠群居饲养,动物与动物之间及动物与饲养舱网壁之间存在物理接触。

因此,动物的行为可能受到失重环境和饲养舱环境的共同作用。在以往的 RAHF 和 AEM 饲养系统中,难以可视化的跟踪动物的实时行为。2011 年,在 SpaceX-4 航天飞行中开展的 RR-1 研究中使用了 RHHS 饲养系统,对 30 只小鼠(C57BL/6J 雌鼠、C57BL/6Ntac 雌性小鼠和 MuRF1 基因敲除小鼠各 10 只)进行在轨行为学观察。飞行前后对小鼠的食物和水进行称重,结果发现相较于地面对照组,飞行组小鼠的进食量和饮水量减少,但体重无明显变化。通过视频摄像头对小鼠的动物典型行为(吃、喝、走动、自我梳理毛发等)与社交活动(相互梳理毛发、相互撕咬等)进行 24 h 视频观察。结果显示飞行组小鼠相对于地面对照组小鼠的移动时间增加了 60%,但自我梳理毛发时间显著下降。相较于

表 3 航天飞行对骨骼和肌肉功能的影响

Table 3 Effects of space flight on muscle and bone system

| 飞行任务<br>Flying commission | 研究对象<br>Species | 研究结果<br>Result                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| STS-51b                   | 大鼠<br>Rat       | 成骨细胞分化被抑制,飞行后恢复缓慢或无恢复 <sup>[19]</sup><br>Osteoblast differentiation was inhibited, and the recovery was slow or no after flight <sup>[19]</sup>                                                                          |
| STS-51b                   | 大鼠<br>Rat       | 肱骨和椎骨中骨钙素含量减少,骨矿化和胶原蛋白代谢损伤,骨强度下降 <sup>[20]</sup><br>The content of osteocalcin in humerus and vertebrae decreased, bone mineralization and collagen metabolism were damaged, and bone strength decreased <sup>[20]</sup> |
| STS-29                    | 大鼠<br>Rat       | 软骨形成缓慢 <sup>[21]</sup><br>Slow cartilage formation <sup>[21]</sup>                                                                                                                                                       |
| STS-78                    | 大鼠<br>Rat       | 骨体积降低,骨体积减少,ALP <sup>+</sup> 细胞减少 <sup>[22]</sup><br>Bone volume decreased, bone volume decreased, ALP <sup>+</sup> cells decreased <sup>[22]</sup>                                                                      |
| STS-131                   | 小鼠<br>Mouse     | 颅骨体积增加 <sup>[23]</sup><br>Increased skull volume <sup>[23]</sup>                                                                                                                                                         |
| STS-90                    | 大鼠<br>Rat       | 腹直肌和外斜肌萎缩 <sup>[24]</sup><br>Atrophy of rectus abdominis and external oblique muscle <sup>[24]</sup>                                                                                                                     |
| STS-90                    | 大鼠<br>Rat       | 骨骼肌生长缓慢,运动蛋白 MHC 基因家族的表达降低 <sup>[25]</sup><br>Skeletal muscle grew slowly and the expression of MHC gene family of exercise protein decreased <sup>[25]</sup>                                                            |
| SpaceX-19                 | 小鼠<br>Mouse     | 骨骼肌和骨质流失,体重下降,多条基因通路改变 <sup>[26]</sup><br>Skeletal muscle and bone loss, weight loss, multiple gene pathways change <sup>[26]</sup>                                                                                      |
| SpaceX-4                  | 小鼠<br>Mouse     | 32 周小鼠小梁、皮质骨变化相比 9 周小鼠更显著 <sup>[27]</sup><br>The changes of trabecular and cortical bone in 32 week mice were more significant than that in 9 week mice <sup>[27]</sup>                                                  |

表 4 航天飞行对消化系统和血管功能的影响

Table 4 Effects of space flight on intestinal and vascular system

| 飞行任务<br>Flying commission | 研究对象<br>Species | 研究结果<br>Result                                                                                                                                     |
|---------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SLS-1/SLS-2               | 大鼠<br>Rat       | SCFA 增加或降低,GST 增加,杯状细胞减少 <sup>[28]</sup><br>SCFA increased or decreased, GST increased and goblet cells decreased <sup>[28]</sup>                  |
| STS-80                    | 大鼠<br>Rat       | 肠系膜动脉舒缩功能受损 <sup>[29]</sup><br>Impaired systolic and diastolic function of mesenteric artery <sup>[29]</sup>                                       |
| STS-131/133/135           | 小鼠<br>Mouse     | 肠系膜血管收缩功能受损 <sup>[30]</sup><br>Impaired mesenteric vasoconstriction <sup>[30]</sup>                                                                |
| STS-135                   | 小鼠<br>Mouse     | 肌源性血管收缩反应降低,脑动脉最大直径增加 <sup>[31]</sup><br>Myogenic vasoconstriction decreased and the maximum diameter of cerebral artery increased <sup>[31]</sup> |

32 周小鼠,16 周小鼠在轨 7 ~ 10 d 后沿着饲养笼快速移动,平均速度在 1.16 ~ 1.82 m/s 范围内,出现重复的跑圈行为,并随着时间的增加变成集体行为<sup>[32-33]</sup>。

### 3 小结

太空动物实验为系统探索航天飞行对人体及其他生命系统的影响做出了重大贡献。美国 NASA 近几十年开展的多次啮齿动物航天飞行实验,表明航天飞行对哺乳动物机体的免疫、骨骼、心血管及神经系统等均具有显著影响。近几年来,NASA 采用多种基因敲除动物,对航天飞行引起的蛋白基因表达和代谢改变开展了更深入的探讨。但鉴于动物数量、在轨时间、动物生存保障及废物处理系统等限制,还无法进行大样本的长期监测。此外,由于饲养空间的限制,也难以开展航天环境对动物行为、社交等复杂活动的影响分析。未来开展的人类空间生命科学实验中,还需要进一步探讨航天失重环境下,动物生理病理变化的机制研究,综合分析辐射和微重力等空间环境对动物神经、免疫、行为、代谢等复杂系统功能的影响。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Fukui K, Shimazu T. Animal habitats for space experiments [J]. Biol Sci Space, 2004, 18(3): 106-107.
- [2] Ronca AE, Moyer EL, Talyansky Y, et al. Behavior of mice aboard the International Space Station [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 4717.
- [3] Fast T, Grindeland R, Kraft L, et al. Rat maintenance in the research animal holding facility during the flight of space lab 3 [J]. Physiologist, 1985, 28(6): 187-188.
- [4] Bonting SL. Animal research facility for Space Station Freedom [J]. Adv Space Res, 1992, 12(1): 253-257.
- [5] Moyer EL, Dumars PM, Sun GS, et al. Evaluation of rodent spaceflight in the NASA animal enclosure module for an extended operational period (up to 35 days) [J]. NPJ Microgravity, 2016, 2: 16002.
- [6] Naidu S, Winget CM, Jenner JW, et al. Effects of housing density on mouse physiology and behavior in the NASA Animal Enclosure Module simulators [J]. J Gravit Physiol, 1995, 2(1): 140.
- [7] Wade CE, Miller MM, Baer LA, et al. Body mass, energy intake, and water consumption of rats and humans during space flight [J]. Nutrition, 2002, 18(10): 829-836.
- [8] Beheshti A, Shirazi-Fard Y, Choi S, et al. Exploring the effects of spaceflight on mouse physiology using the open access NASA GeneLab platform [J]. J Vis Exp, 2019, 143: e58447.
- [9] Lesnyak A, Sonnenfeld G, Avery L, et al. Effect of SLS-2 spaceflight on immunologic parameters of rats [J]. J Appl Physiol (1985), 1996, 81(1): 178-182.
- [10] Gridley DS, Nelson GA, Peters LL, et al. Genetic models in applied physiology: selected contribution: effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. II. Activation, cytokines, erythrocytes, and platelets [J]. J Appl Physiol (1985), 2003, 94(5): 2095-2103.
- [11] Baqai FP, Gridley DS, Slater JM, et al. Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression [J]. J Appl Physiol (1985), 2009, 106(6): 1935-1942.
- [12] Gridley DS, Mao XW, Stodieck LS, et al. Changes in mouse thymus and spleen after return from the STS-135 mission in space [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75097.
- [13] Ross MD, Varelas J. Ribbon synaptic plasticity in gravity sensors of rats flown on neurolab [J]. Chalmers Univ Technol, 2003, 1(1): 39-44.
- [14] Ronca AE, Alberts JR. Effects of prenatal spaceflight on vestibular responses in neonatal rats [J]. J Appl Physiol (1985), 2000, 89(6): 2318-2324.
- [15] Ronca AE, Fritzsche B, Bruce LL, et al. Orbital spaceflight during pregnancy shapes function of mammalian vestibular system [J]. Behav Neurosci, 2008, 122(1): 224-232.
- [16] Pompeiano O, d'Ascanio P, Centini C, et al. Gene expression in rat vestibular and reticular structures during and after space flight [J]. Neuroscience, 2002, 114(1): 135-155.
- [17] Holstein GR, Kukiela E, Martinelli GP. Anatomical observations of the rat cerebellar nodulus after 24 hr of spaceflight [J]. J Gravit Physiol, 1999, 6(1): 47-50.
- [18] Mao XW, Nishiyama NC, Byrum SD, et al. Spaceflight induces oxidative damage to blood-brain barrier integrity in a mouse model [J]. FASEB J, 2020, 34(11): 15516-15530.
- [19] Roberts WE, Fielder PJ, Rosenoer LM, et al. Nuclear morphometric analysis of osteoblast precursor cells in periodontal ligament, SL-3 rats [J]. Am J Physiol, 1987, 252(2): 247-251.
- [20] Patterson-Buckendahl P, Arnaud SB, Mechanic GL, et al. Fragility and composition of growing rat bone after one week in spaceflight [J]. Am J Physiol, 1987, 252(2): 240-246.
- [21] Kirchen ME, O'Connor KM, Gruber HE, et al. Effects of microgravity on bone healing in a rat fibular osteotomy model [J]. Clin Orthop Relat Res, 1995, 318: 231-242.
- [22] Zerath E, Holy X, Roberts SG, et al. Spaceflight inhibits bone formation independent of corticosteroid status in growing rats [J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(7): 1310-1320.
- [23] Zhang B, Cory E, Bhattacharya R, et al. Fifteen days of microgravity causes growth in calvaria of mice [J]. Bone, 2013, 56(2): 290-295.
- [24] Fejteck M, Wassersug R. Effects of spaceflight and cage design on abdominal muscles of male rodents [J]. J Exp Zool, 2001, 289(5): 330-334.
- [25] Adams GR, McCue SA, Bodell PW, et al. Effects of spaceflight and thyroid deficiency on hindlimb development. I. Muscle mass

- and IGF-I expression [J]. J Appl Physiol (1985), 2000, 88 (3): 894-903.
- [26] Lee SJ, Lehar A, Meir JU, et al. Targeting myostatin/activin a protects against skeletal muscle and bone loss during spaceflight [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117 (38): 23942-23951.
- [27] Coulombe JC, Sarazin BA, Mullen Z, et al. Microgravity-induced alterations of mouse bones are compartment- and site-specific and vary with age [J]. Bone, 2021, 151: 116021.
- [28] Rabot S, Szylit O, Nugon-Baudon L, et al. Variations in digestive physiology of rats after short duration flights aboard the US space shuttle [J]. Dig Dis Sci, 2000, 45(9): 1687-1695.
- [29] Hatton DC, Yue Q, Chapman J, et al. Blood pressure and mesenteric resistance arterial function after spaceflight [J]. J Appl Physiol (1985), 2002, 92(1): 13-17.
- [30] Behnke BJ, Stabley JN, McCullough DJ, et al. Effects of spaceflight and ground recovery on mesenteric artery and vein constrictor properties in mice [J]. FASEB J, 2013, 27(1): 399-409.
- [31] Taylor CR, Hanna M, Behnke BJ, et al. Spaceflight-induced alterations in cerebral artery vasoconstrictor, mechanical, and structural properties: implications for elevated cerebral perfusion and intracranial pressure [J]. FASEB J, 2013, 27(6): 2282-2292.
- [32] Ronca AE, Moyer EL, Talyansky Y, et al. Behavior of mice aboard the International Space Station [J]. Sci Rep, 2019, 9 (1): 4717.
- [33] Choi SY, Saravia-Butler A, Shirazi-Fard Y, et al. Validation of a new rodent experimental system to investigate consequences of long duration space habitation [J]. Sci Rep, 2020, 10 (1): 2336.

[收稿日期] 2022-05-12

## 中国实验动物学会“猴痘病毒沙龙——One Health 与猴痘防治”成功举办

在访谈环节, Professor Geoffrey L Smith 进一步指出, 猴痘病毒在人类之间的传播需要密切接触, 没有证据表明导致 2022 年疫情的毒株更具传染性。同时总结了猴痘目前预防和治疗的概况。陆家海教授重申了“One Health”的理念, 中国应加强联防联控等机制, 践行“One Health”的理念。中国政府“人民至上、生命至上”的抗疫理念和“内防反弹、外防输入”的防疫策略是一个负责任大国应有的责任与担当。中国将秉持人类卫生健康共同体的理念, 齐心协力、守望相助、携手应对, 坚决遏制疫情蔓延势头, 打赢疫情防控全球阻击战, 护佑世界和人民康宁。Dr. Judy MacArthur Clark 指出, 我们需要更好地教育和培训相关人员接受“One Health”的理念, 更需要全球医学组织和政府更好的合作。同时介绍了索尔斯比基金会如何通过“同一健康”奖学金来支持相关研究。

中国实验动物学会编辑部张钰博士在会议上, 介绍了三本期刊的基本情况以及猴痘专题文章组稿方案, 鼓励以“专家”为主体, 为期刊进行专题组稿。

最后, 理事长秦川教授做沙龙活动总结, 本次沙龙为广大科研工作者搭建了猴痘研究及防控的国际学术交流平台, 学术报告内容丰富, 让我们对猴痘病毒及猴痘的防治有了更深入的了解, 也更加深刻认识到“One Health”策略在传染病防控中的重要作用。访谈部分, 三位嘉宾就科研工作者和社会大众关心的问题, 进行了深入剖析和解答, 让我们受益匪浅。再次感谢各位专家百忙之中, 积极参与此次学术沙龙活动。并表示编辑部将定期举办学术沙龙, 欢迎科研工作者积极提供沙龙主题, 申请成为沙龙主讲者, 与中国实验动物学会共同推进学术交流和合作。

王玲,袁天晨,吴丽瑶. 模拟太空环境应激损伤及防护相关动物实验研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(4): 589-596.

Wang L, Yuan TC, Wu LY. Research progress on animal experiments simulating stress damage and protection in the space environment [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4): 589-596.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.04.019

# 模拟太空环境应激损伤及防护相关动物实验研究进展

王玲<sup>1\*</sup>, 袁天晨<sup>2</sup>, 吴丽瑶<sup>3</sup>

(1. 三峡公共检验检测中心, 湖北 宜昌 443000; 2. 宜昌市中医医院, 湖北 宜昌 443000;  
3. 南方医科大学第三附属医院药学部, 广州 510630)

**【摘要】** 众所周知, 太空复杂的空间环境会对航天员的身体机能产生威胁, 尤其会对中枢神经系统、心血管系统、骨骼肌肉系统、免疫系统、消化系统等产生不利影响, 甚至诱导重要器官重塑。因此, 通过动物实验模拟太空飞行环境以明确太空应激损伤的机制, 了解抵抗损伤的保护措施具有重要意义。本文从动物实验应激损伤及保护机制两方面进行阐述, 旨在为今后的航天探索提供更多参考。

**【关键词】** 太空环境; 动物实验研究; 应激损伤; 防护

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 04-0589-08

## Research progress on animal experiments simulating stress damage and protection in the space environment

WANG Ling<sup>1\*</sup>, YUAN Tianchen<sup>2</sup>, WU Liyao<sup>3</sup>

(1. Three Gorges Public Inspection and Testing Center, Yichang 443000, China. 2. Yichang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yichang 443000. 3. the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630)

Corresponding author: WANG Ling. E-mail: 546698928@qq.com

**【Abstract】** The space environment challenges many of the biological processes in the human body, in particular, the central nervous system, cardiovascular system, skeletal muscle system, immune system, digestive system, and can even induce the remodeling of vital organs. Therefore, simulating the space flight environment through animal experiments is important for elucidating the mechanism of space stress injury and understanding potential protective measures against injury. This article expounds the stress injury and protection mechanisms of animal experiments, to provide a reference for future space exploration.

**【Keywords】** space environment; animal research; stress injury; protection

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

执行长期太空任务时, 其复杂的空间环境会对航天员的身体机能产生威胁, 失重是常见的影响形式, 使体内液体的分布及承重方式发生变化, 目前研究发现, 失重会对中枢神经系统、心血管系统、骨骼肌肉系统、消化系统、免疫系统产生不利影响,

甚至诱导重要器官重塑。此外, 太空中的辐射也是潜在的风险因素之一, 在辐射的影响下, 会加重系统进一步的损伤。通过动物实验全方位模拟太空的空间环境的实验方法, 使实验结果更具准确性及客观性。本文概括了近几年关于太空环境对上述

系统应激损伤机制的研究进展,并对太空环境引起的应激防护研究进展进行总结,期望能为探索空间环境引起的应激损伤发生机制以及对抗防护提供参考。

## 1 模拟太空环境应激损伤动物实验研究

### 1.1 对中枢神经系统的应激损伤

多项实验表明,通过吊尾模拟失重,可使大鼠表现焦虑和抑郁行为,其行为主要表现在主动避险、探究和运动行为减少<sup>[1]</sup>。Gros 等<sup>[2]</sup>最新研究表明,在模拟失重的大鼠中,其空间学习能力减弱,加入模拟辐射照射因素后,能够增加抑郁样行为。

有学者认为大脑神经递质及单胺功能受到了改变,这些改变可引起行为及情绪的变化。如单胺类神经递质如去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、多巴胺(dopamine, DA)、5-羟色胺(serotonin, 5-HT)等参与了行为和情绪的调节,Gros 等<sup>[2]</sup>研究证实在 7 d 的太空飞行后,大鼠大脑的儿茶酚胺和血清素发生了特定的、受限的变化,修改了一些属于前庭/运动系统的大脑区域(下橄榄核、红核、小脑、躯体感觉皮层、黑质和伏隔核壳)NE、DA 组织含量。DA 和 5-HT 含量在前边缘皮层有所降低,并且已经重塑了大脑中单胺能系统的组织,这样的改变并非致病性的,但可能会导致短暂的易感性发展为神经精神疾病,尤其是情绪障碍。Raber 等<sup>[3]</sup>的太空环境模拟实验表明学习能力减弱与中脑  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)含量有关,在仅后肢卸载组以及仅辐射组,海马体 GABA 及谷氨酸(glutamate acid, Glu)的表达量明显降低,而在接受辐射及后肢卸载组中 GABA 含量在皮质组织中低于对照组。Popova 等<sup>[4]</sup>将小鼠置于空中飞行 30 d 后,观察到控制 DA 合成的关键酶酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)表达下降,下丘脑及纹状体中 D1 受体的表达下调。此外,武强强等<sup>[1]</sup>、Wang 等<sup>[5]</sup>在地面进行的尾吊模拟失重实验中也出现类似结果,尾吊模拟失重使大鼠 NE、DA、5-HT、GABA 等表达量下降, Glu 表达增加,其血清中皮质酮(corticosterone, CORT)和促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)等水平升高,大脑皮层中脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达下降,大脑皮层神经元萎缩;小鼠海马区 Glu 水平显著降低,其受体 N-甲基 D-天冬氨酸受体亚型 2A/2B (N-Methyl D-

Aspartate receptor subtype 2A/2B, NR2A/2B)的亚基表达也降低。众多研究均表明,在太空环境下,动物脑部的兴奋神经递质表达降低,受体表达下调,负责行为、情绪的脑部组织发生特定变化<sup>[6]</sup>。

另外脑部组织发生氧化应激及炎症反应,血脑屏障受损也有助于脑部神经的损害。Zhang 等<sup>[7]</sup>研究表明,超过 14 d 的后肢卸载模拟失重导致行为任务表现不佳,实验组大鼠的乙酰胆碱酯酶(acetylcholine esterase, AChE)活性、脑内丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平、活性氧(reactive oxygen species, ROS)和 8-羟基-2-脱氧鸟苷(8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG)浓度显著增加。此外,脑中的胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性显著减弱。在吊尾模拟失重实验中,大鼠海马组织中的锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的基因和蛋白表达被抑制,过氧化氢(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )、MDA 水平明显升高。多数研究表明尾吊模拟失重使动物脑内氧自由基增多, SOD、GSH-Px、CAT 等抗氧化酶的含量减少,导致脂质和 DNA 损伤<sup>[1]</sup>。微重力的条件下也会导致血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)受损, Yan 等<sup>[8]</sup>研究表明血脑屏障受损是由于大鼠脑中的紧密连接(tight junctions, TJs)和粘附连接(adherens junctions, AJs)蛋白表达下调所致,在进一步的在人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cell, HBMECs)实验中, TJs 与 AJs 表达下调是被证实与抑制 Rac1/Wave2/Arp3 通路有关。Mao 等<sup>[9]</sup>另外一项太空飞行实验中,太空飞行会诱导大脑细胞凋亡,海马细胞凋亡增加高达 2.2 倍,海马中水通道蛋白 4(aquaporin4, AQP4)、星形胶质细胞生物标志物 GFAP、血小板内皮细胞粘附分子-1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)表达增加, BBB 相关的紧密连接蛋白 Zonula occludens-1(ZO-1)的表达减少。许多负责细胞功能、细胞凋亡、线粒体功能、神经系统发育、蛋白质/细胞器运输和新陈代谢的蛋白质在太空飞行中发生了显著改变,尤其是具有与脑细胞死亡相关功能的关键蛋白质被显著激活。太空飞行导致的氧化应激、PECAM-1 表达增加、细胞凋亡可能与多种氧化应激

相关的信号通路发生显著改变有关,包括 Hippo 信号通路、Rac 信号通路和多巴胺信号通路。小鼠海马中 ZO-1 的表达降低、PECAM-1 表达增加可能会导致 BBB 处的紧密连接中断,致使通透性增加并导致脑损伤。

脑部血管及颈部血管病变,也会对神经功能产生影响。武强强等<sup>[1]</sup>研究中报道大鼠在模拟失重 2 周后脑动脉平滑肌细胞的 L 型钙通道功能增强,可能导致了大鼠模拟失重后脑动脉血管收缩反应增强。其颈总动脉的血管僵硬增加,血管壁发生纤维化改变,并且胶原蛋白(collagen, COL)的含量增多, COL 构成了胶原纤维,其含量增多使动脉硬化,其颈总动脉的管壁厚度较对照组增大 26%。模拟失重导致大、小鼠颈总动脉、脑血管壁增厚硬化,肌源性紧张度增高,管径缩小,脑血流阻力增高,脑血流速度变慢进而对大脑功能产生一定影响。

## 1.2 对心血管系统的应激损伤

太空飞行将对航天员的心血管系统产生诸多影响,在执行任务期间多名航天员曾报道出现心律失常<sup>[10]</sup>,最近在长期国际空间站(International Space Station, ISS)任务期间对机组人员进行的体内血管研究表明,太空飞行引起的颈动脉和肱动脉的结构和功能变化,这样的改变可能与氧化应激及心血管炎症生物标记物的激活有关<sup>[11]</sup>。余志斌等<sup>[12]</sup>早期模拟失重实验发现大鼠心肌收缩性能与钙反应降低,心内膜亦可能受损。航天飞行大鼠中,可发现线粒体密度下降,众多研究均在提示,长期太空飞行的条件下,对心血管的影响不可忽视,也会造成相对较大的心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)的风险。

针对心血管影响方面的机制研究尚不明确, Walls 等<sup>[13]</sup>研究报道,将果蝇放在 ISS 上出生、发育并成年生活 1 ~ 3 周,微重力条件下,心腔大小和心脏收缩性和输出量显著降低。这些发现与观察到的肌原纤维重塑、肌节计数减少和肌节基因的失调一致,果蝇的心脏功能障碍、心脏受限和肌原纤维紊乱等功能性改变与干扰原肌球蛋白结合的肌钙蛋白突变有密切相关性。离体心脏中的 RNA 测序显示肌节/细胞外基质(extracellular matrix, ECM)基因的表达降低,蛋白酶体基因表达显著增加,表明蛋白质稳态异常,心脏重塑和蛋白质应激可能是心肌对微重力的基本反应。Liang 等<sup>[14]</sup>尾吊法模拟失重实验中,观察到悬尾时间依赖性地诱导钙蛋白酶

激活,从而促进 p38 和 ERK1/2 的激活以及随后响应微重力的心肌细胞中 p47<sup>phox</sup> 上的 Ser345 磷酸化来介导 NADPH 氧化酶的激活,减少心肌细胞大小和心脏重量,并导致小鼠心肌功能障碍及心肌异常。另外一个可能机制与神经压力反射调节有关,有研究证实,长期微重力暴露会减少人类迷走神经心脏传出神经传出和迷走神经压力反射增益<sup>[15-16]</sup>,发生这一现象的原因与具体的机制目前还尚不明确。

太空飞行及失重环境所致的心血管系统的改变,可能是对环境的适应过程,也可能是因环境改变而引起的机体应激反应,具体长期飞行是否与心血管疾病的发生以及相关性研究还有待进一步的证实。

## 1.3 对骨骼肌肉系统的应激损伤

Juhl 等<sup>[17]</sup>研究表明,长期太空飞行会导致航天员骨量丢失,并且随着飞行时长的增加,骨量丢失越严重,丢失速率快于绝经妇女,这一现象的发生与太空特殊的失重及电离辐射环境有相关性。此外,暴露于微重力的航天员在 1 个月内平均骨骼肌质量最多减少 20%,平均骨骼肌强度在最多减少 30%。这种骨骼肌质量和功能的丧失可能会阻碍或阻止航天员执行任务,并增加他们在地球上返回更高重力条件时受伤的风险。因此,借助动物实验来研究微重力如何影响太空飞行期间的骨骼肌肉系统发育和功能,对于抵抗太空飞行导致的骨骼肌肉系统应激损伤至关重要。

与骨质流失相关细胞有 3 类:成骨细胞、破骨细胞、骨细胞,失重状态下骨量丢失的关键在于骨平衡被打破,骨吸收速率大于骨形成,这一现象与上述 3 种细胞在失重状态下的信号响应有关。Dufour 等<sup>[18]</sup>在微重力大鼠模型中发现成骨细胞凋亡增加和成骨细胞总数减少,这与大鼠骨骼中  $\alpha 5 \beta 1$ -PI3K-Bcl-2 存活途径的下调有关。Blaber 等<sup>[19]</sup>将雌性小鼠在 STS-131 穿梭机上暴露于微重力 15 d 发现成骨细胞在微重力状态下,其诱导细胞凋亡因子细胞肿瘤抗原 53(cell tumor antigen 53, Trp53/p53)及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, Cdkn1a/p21)基因表达均显著下调,破坏成骨细胞周期,可能是骨丢失的原因之一。在该研究中还发现破骨细胞覆盖的骨表面显著增加,这表明破骨细胞活性的增加部分是骨量减少的原因。此外,Chatani 等<sup>[20]</sup>将 TRAP-GFP/Osterix-

DsRed 双转基因青鳉鱼饲养于 ISS 中,在饲养的第 56 天,发现破骨细胞被激活,与地面对照相比,其咽骨钙化区域减少,上咽骨与牙齿的矿物密度显著下降。这些研究均证实,在失重状态下的骨失衡,成骨细胞被抑制,破骨细胞被激活,在失重下维持骨平衡是航空飞行的一大预防热点。

根据 Juhl 等<sup>[17]</sup>报道将骨骼成熟的小鼠和大鼠暴露于太空飞行中微重力会导致比目鱼肌和腓肠肌在 2 周内快速损失,并且这一现象在氧化慢肌(如比目鱼肌)比糖酵解快肌(如指长伸肌)中更为明显,伴随比目鱼肌质量下降的是慢肌 I 型纤维的优先损失和快肌 IIB 纤维的增加。而 Gambara 等<sup>[21]</sup>在太空飞行 30 d 小鼠骨骼肌的整体基因分析中也发现,与地面对照相比,太空飞行小鼠比目鱼肌中肌多达 680 个差异表达基因,而指长伸肌中发现了只有 72 个差异表达基因(仅有 24 个共同基因)。在最新的研究中也提出,肌肉力量的丢失与  $\text{Ca}^{2+}$  失调有关。Braun 等<sup>[22]</sup>在太空飞行的小鼠比目鱼肌中发现  $\text{Ca}^{2+}$  摄取严重受损,这可能与比目鱼肌中的肌(内)质网  $\text{Ca}^{2+}$  ATP 酶泵功能障碍有关,但是在胫前肌并未发现该改变,这说明失重对糖酵解快肌与氧化慢肌功能影响的机制存在差异,还需进一步证实。

#### 1.4 对消化系统的应激损伤

据报道,微重力下小鼠唾液蛋白的组成发生了变化,尤其是唾液淀粉酶和富含脯氨酸的蛋白,其含量均有所降低。进一步的研究表明,这可能与 cAMP 信号通路有关,唾液中特定的蛋白质含量可以作为太空飞行中应激事件发生的潜在生物学标志物<sup>[23-24]</sup>。

Lu 等<sup>[25]</sup>指出在失重环境中,胃部间质细胞受到模拟失重的影响,可能导致胃起搏和慢波障碍,导致胃动力障碍。胃黏膜屏障在早期可能遭受局部和全身性应激损伤。具体表现为 SOD、MDA 和一氧化氮(nitric oxide, NO)的表达增加,导致某些胃黏膜腺细胞核收缩变形、线粒体肿胀和内质网扩张,进一步研究认为可能与胃黏膜细胞的核糖体受到显著影响有关,模拟微重力的第 7 天发现 542 种蛋白质表达出现异常(286 种上调和 256 种下调),氧化应激更加明显,同时细胞内出现炎症和连接减弱<sup>[26]</sup>。李彬彬等<sup>[24]</sup>研究报道经历太空飞行的小鼠可观察到肠道杯状细胞数量的减少,盲肠上皮绒毛排列紊乱且稀疏,小肠黏膜通透性增加等现象,这可能与肠道 NF- $\kappa$ B 表达上调,小肠黏膜上皮细胞间

紧密连接蛋白的表达显著降低有关。

在失重环境下,肝细胞的增殖潜能降低,表明增殖标志物 Ki67、PCNA 和 PH3 的表达受到显著抑制,同时细胞周期调节分子(CCNA2、CCND1、CDK1 和 CDK2)在悬尾大鼠肝中下调。Ho 等<sup>[26]</sup>张氏肝细胞(Chang Liver Cells, CCL-13)实验结果也提示细胞周期相关蛋白的下调,例如细胞周期蛋白 A1 和 A2、细胞周期蛋白 D1 和细胞周期蛋白依赖性激酶 6(cyclin-dependent kinase 6, Cdk6),还表现出  $\alpha$ -微管蛋白 3 和  $\beta$ -肌动蛋白的下调,从而诱导细胞骨架重组。这些结果表明,失重环境下肝细胞的抑制增殖可能与主要细胞周期调节分子和主要细胞骨架蛋白的减弱有关。

#### 1.5 对免疫系统的应激损伤

在太空飞行过程中,航天员会受到包括微重力在内的各种身体压力,这可能会导致免疫功能障碍,从而可能使航天员容易感染和生病,但是关于航天飞行免疫抑制的机制现在尚不明确。研究证实,航天飞行环境会抑制单核/巨噬细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞等固有免疫细胞的数量、吞噬、分泌细胞因子等功能,降低机体免疫能力,这可能与单核细胞表面标记物 CD14、吞噬相关受体表达下降,巨噬细胞 TNF $\alpha$  表达下调,精氨酸酶 I 表达上调,自然杀伤细胞细胞表面受体 NKG2A 及 NKG2D 表达下降,树突状细胞表面 MHC I 类分子、MHC II 类分子及 CD86 分子表达减少有关<sup>[27-28]</sup>。韩浩伦等<sup>[29]</sup>在模拟失重与飞船环境的豚鼠实验中,也观察到 T 淋巴细胞增殖抑制。此外航天飞行的免疫功能障碍还可能与内源微生物稳态失衡有关,Wang 等<sup>[30]</sup>研究表明在模拟失重小鼠中,微重力抑制促炎细胞因子介导的对柠檬酸杆菌感染的肠道免疫并诱导肠道微生物群的紊乱,从而诱发肠道感染,失重环境会在感染期间通过抑制巨噬细胞 p38 和 Erk/MAPK 通路从而抑制先天免疫反应。

## 2 模拟太空环境导致应激损伤的防护措施在动物实验中的研究进展

#### 2.1 化学药物治疗

某些抗生素也可以缓解失重引起的脑部应激损伤,Lin 等<sup>[31]</sup>发现四环素类抗生素米诺环素通过抑制小胶质细胞的激活,使海马中神经干细胞的数量恢复到正常水平,有可能成为改善微重力导致的学习和记忆损伤的新治疗靶点。Zhai 等<sup>[32]</sup>发现大环内酯类抗生素雷帕霉素通过改变 NR2A/2B 的表

达,提高失重模拟小鼠海马体总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD) 活性并降低了 MDA 以及羧化蛋白的水平,进一步提高海马体神经元自噬水平,可平息失重小鼠的焦虑情绪并增加其探索行为。

抗骨质疏松治疗相关药物对失重引起的骨量丢失有一定对抗作用,如补充维生素 D 与钙剂能够有效防止骨量丢失;双磷酸盐可抑制骨吸收,减少骨折发生率,但其发热、肌痛、急性肾衰等不良反应仍是人们关注热点;雌激素及选择性雌激素受体调节剂可以抑制破骨细胞激活,但其刺激骨生成能力却有限;微量元素锌及维生素 K 等对骨代谢起着重要作用,是太空重要营养补充物质<sup>[33]</sup>。

## 2.2 中医疗法

龙血是来自中国云南龙血树的红色树脂,具有止血、改变血液流变学、抗氧化自由基、抗炎镇痛、促进表皮修复等药理作用<sup>[34]</sup>。Li 等<sup>[35]</sup>研究证实,龙血通过修复微绒毛和隐窝、抑制炎症因子、降低通透性和上调微重力大鼠回肠中 TJs 和 AJs 的表达来防止肠上皮屏障破坏,而这一保护潜在机制可能是龙血促进由 Rac1/Wave2/Arp3 途径介导的粘着斑 (focal adhesions, FAs) 的形成,并助于肠上皮细胞迁移和上皮屏障修复,这一修复功能可能与龙血中的龙血素 C 有关。

传统中药人参总皂苷 (total ginsenosides, GST) 具有保护海马神经元并恢复小鼠模拟失重造成的记忆损伤,还可恢复与学习记忆相关的物质如酪氨酸、色氨酸、天冬酰胺、苯丙氨酸和胆碱等的含量。Wu 等<sup>[36]</sup>曾报道 GST 的碱性水解产物达玛烷皂苷 (Dammarane sapogenins, DS) 通过激活 MAPK 通路、抑制 PI3K-Akt-mTOR 通路,从而调节脑神经递质的水平,从而抑制了大鼠在长时间模拟太空飞行环境下诱导的神经损伤,增强了认知功能。Wang 等<sup>[37]</sup>最近关于 DS 改善模拟失重诱导的大鼠抑郁样行为和认知功能障碍又有了新进展,DS 通过抑制大鼠海马中 AChE 活性、激活 ChAT、SOD 活性可以改善抑郁样行为和认知障碍,DS 可作为太空飞行任务下预防和/或治疗抑郁样行为和记忆丧失的潜在药物。

尤金枝等<sup>[38]</sup>太空养心丸的研究发现,通关观察各个实验组大鼠的精神状态及疾病相关指标,太空养心丸在一定程度上,可缓解微重力大鼠的应激状态,改善心血管功能紊乱,增强心脏功能。另一项中药制剂开心散可逆转血清中升高的 ROS,提高抗

氧化活性来改善模拟失重大鼠引起的记忆损伤<sup>[1]</sup>。

针灸是传统中医的重要组成部分,将其与电子技术相结合而成的穴位刺激疗法在临床得到广泛应用,孙喜庆等<sup>[39]</sup>研究表明,电刺激内关穴可部分对抗尾悬吊模拟失重引起的大鼠左心功能降低,调节大鼠下丘脑中 5-HT 的含量,抑制丘脑-垂体-肾上腺轴的兴奋状态。还能明显改善模拟失重后人体的心脏收缩功能,对失重引起的心血管功能失调有防护作用。

## 2.3 微生物制剂干预

长期的太空飞行环境会导致机体胃肠道的微生物稳态环境失衡,改变大小鼠肠道微生物,使有害菌的数量增加,益生菌的数量减少,Yim 等<sup>[40]</sup>报道微重力会对益生菌 Nissle 1917 产生影响,使其在微重力下产生较低的抗酸性和粘附能力,这可能使其在通过胃的酸性条件并附着于肠细胞时更难以存活。Wang 等<sup>[30]</sup>给动物喂益生菌可以改善其肠道菌群失调的情况,能有效减轻微重力诱导的对病原菌感染的先天免疫反应的抑制,VSL#3 是一种由 8 种活的冻干细菌组成的高浓度益生菌制剂,含有某些免疫刺激物质,包括 toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 配体 (如脂磷壁酸、核酸和肽聚糖) 和 nod 样受体 (nod-like receptor, NLR) 配体 (如胞壁酰二肽),这些成分可以同时作用于先天和后天免疫系统,从而发挥作用。另外也有研究证实,益生菌的喂养还可以上调海马神经退行性因子及神经营养因子的表达,改善学习记忆和大脑功能损伤<sup>[1]</sup>。

## 2.4 物理治疗

Xu 等<sup>[41]</sup>发现重复性经颅磁刺激 (repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS) 用于模拟失重小鼠可增加 Glu 和 NR2B 的低表达并降低 GABA、谷氨酸脱羧酶 67 (glutamic acid decarboxylase67, GAD67)、海马中的 A 型  $\gamma$ -氨基丁酸  $\alpha 1$  亚基 (GABA type A receptor subunit  $\alpha 1$ , GABAAR $_{\alpha 1}$ ) 的高表达,维持谷氨酸能和  $\gamma$ -氨基丁酸系统的平衡,缓解认知和神经震荡障碍。此外, Yang 等<sup>[42]</sup>证实 rTMS 通过增强神经系统对后肢肌肉的控制还可改善微重力下大鼠的步态障碍。

早期研究发现,在微重力模型小鼠中进行恒定频率 (120 Hz) 的机械振动干预,可有效减缓肌肉萎缩进程<sup>[43]</sup>。近期的研究也表明,5 ~ 90 Hz 变频振动能够在微重力环境下促进成骨细胞增殖,并对其分化具有一定的保护作用<sup>[33]</sup>。这些实验结论,对机

械振动对于骨骼肌肉系统的对抗保护提供了一定的理论及实验基础。

李文苑等<sup>[44]</sup>研究发现低频电磁场对失重引起的骨量丢失有良好的抵抗作用,尤其是较 50 Hz 0.6 mT 低频脉冲电磁场(PEMFs)可防止失重大鼠 50% 的骨密度(bone mineral density, BMD)降低,更好的提高失重大鼠骨量。

王峻等<sup>[45]</sup>认为,在执行飞行任务的过程中,由于失重、工作压力、生理节律紊乱、狭小空间等应激导致心理反应,有些反应对任务执行有着积极影响,但有些反应也会引起任务失败,因此心理训练对于航天员而言至关重要。除了模拟太空飞行的特殊环境进行心理训练外,国际上还认为应该予以社会性及专业心理支持,社会性心理支持应包括提供地面新闻、广播、电视、亲友视频、乐器及刊物等,专业心理支持包括私密天地专业心理密话、心理宜居设计等。此外,运动也是有效保持良好心态的措施。

谭荣等<sup>[33]</sup>研究表明,运动锻炼能有效提高骨密度并且增强有氧运动能力,航天员采取增强阻力运动后,骨量丢失从 1% 下降至 0.3% ~ 0.5%,通过运动能够有效缓解太空飞行引起的骨量丢失。另外, Graham 等<sup>[46]</sup>研究表明,在微重力模拟条件下,适当的运动锻炼能够有效对抗肌肉萎缩。运动锻炼的具体保护机制现在尚不完全明确,并且单一的运动锻炼保护方式并不能完全抵抗骨量丢失与肌肉萎缩,还需与其他的抵抗方法联合使用。

综上所述,化学药物治疗、中医药疗法、微生态制剂干预及物理疗法的应用,对失重模型大小鼠的中枢神经应激损伤、心血管功能障碍、免疫抑制、肠道损伤、骨骼肌肉系统障碍起到一定的改善作用,也得到相应数据的支持,值得进一步的探索研究。

### 3 结语

模拟太空环境引起的应激损伤涉及中枢神经系统、心血管系统、骨骼肌肉系统、消化系统、免疫系统等方面,其机制的探索也有初步成效,但尚不完全明确。在动物模型中进行环境模拟时,如何优化环境模拟措施,设计动物实验,对实验动物进行条件筛选,得到稳定且一致的实验结果至关重要。防护相关研究也取得了新的进展,并补充了相应的防护机制,但在药物治疗方面,对于药物不良反应在太空环境中是否与地面一致,是否有不良反应对

抗的方案也需要进一步探索解决。未来可以从以上多方面着手,将重点放在尚未阐明应激机制的系统领域,进一步来探索太空飞行任务对航天员各个系统的影响机制以及对应的防护措施,从而能够全方位保障航天员的人身安全。

### 参 考 文 献(References)

- [1] 武强强, 张学英, 王德华, 等. 模拟失重对啮齿动物情绪和认知的影响及缓解措施研究进展[J]. 航天医学与医学工程, 2021, 34(2): 183-188.  
Wu QQ, Zhang XY, Wang DH, et al. Research progress in effects of stimulate weightlessness on emotion and cognition of Rodents mitigating measure [J]. Space Med Med Eng, 2021, 34(2): 183-188.
- [2] Gros A, Lavenue L, Morel JL, et al. Simulated microgravity subtly changes monoamine function across the rat brain [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11759.
- [3] Raber J, Holden S, Sudhakar R, et al. Effects of 5-ion beam irradiation and hindlimb unloading on metabolic pathways in plasma and brain of behaviorally tested WAG/Rij rats [J]. Front Physiol, 2021, 12: 746509.
- [4] Popova NK, Kulikov AV, Kondaurova EM, et al. Risk neurogenes for long-term spaceflight: dopamine and serotonin brain system [J]. Mol Neurobiol, 2015, 51(3): 1443-1451.
- [5] Wang TM, Chen HL, Lv K, et al. iTRAQ-based proteomics analysis of hippocampus in spatial memory deficiency rats induced by simulated microgravity [J]. J Proteomics, 2017, 160: 64-73.
- [6] Kharlamova A, Proshchina A, Gulimova V, et al. Cerebellar morphology and behavioural correlations of the vestibular function alterations in weightlessness [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2021, 126: 314-328.
- [7] Zhang Y, Wang Q, Chen H, et al. Involvement of cholinergic dysfunction and oxidative damage in the effects of simulated weightlessness on learning and memory in rats [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 2547532.
- [8] Yan RR, Liu HY, Lv F, et al. Rac1/Wave2/Arp3 pathway mediates rat blood-brain barrier dysfunction under simulated microgravity based on proteomics strategy [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(10): 5165.
- [9] Mao XW, Nishiyama NC, Byrum SD, et al. Spaceflight induces oxidative damage to blood-brain barrier integrity in a mouse model [J]. FASEB J, 2020, 34(11): 15516-15530.
- [10] Baran R, Marchal S, Garcia Campos S, et al. The cardiovascular system in space: focus on *in vivo* and *in vitro* studies [J]. Biomedicine, 2021, 10(1): 59.
- [11] Basirun C, Ferlazzo ML, Howell NR, et al. Microgravity X radiation: a space mechanobiology approach toward cardiovascular function and disease [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 750775.
- [12] 余志斌, 张立藩. 失重/模拟失重对心肌结构与功能的影响

- [J]. 航天医学与医学工程, 1995, 8(4): 295-297.
- Yu ZB, Zhang LP. Effects of weightlessness/simulated weightlessness on myocardial structure and function [J]. Space Med Med Eng, 1995, 8(4): 295-297.
- [13] Walls S, Diop S, Birse R, et al. Prolonged exposure to microgravity reduces cardiac contractility and initiates remodeling in drosophila [J]. Cell Rep, 2020, 33(10): 108445.
- [14] Liang LW, Li HL, Cao T, et al. Calpain activation mediates microgravity-induced myocardial abnormalities in mice via p38 and ERK1/2 MAPK pathways [J]. J Biol Chem, 2020, 295(49): 16840-16851.
- [15] Cooke WH, Ames JE IV, Crossman AA, et al. Nine months in space: effects on human autonomic cardiovascular regulation [J]. J Appl Physiol (1985), 2000, 89(3): 1039-1045.
- [16] Cox JF, Tahvanainen KU, Kuusela TA, et al. Influence of microgravity on astronauts' sympathetic and vagal responses to Valsalva's manoeuvre [J]. J Physiol, 2002, 538(1): 309-320.
- [17] Juhl OJ 4th, Buettmann EG, Friedman MA, et al. Update on the effects of microgravity on the musculoskeletal system [J]. NPJ Microgravity, 2021, 7(1): 28.
- [18] Dufour C, Holy X, Marie PJ. Skeletal unloading induces osteoblast apoptosis and targets  $\alpha 5 \beta 1$ -PI3K-Bcl-2 signaling in rat bone [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(2): 394-403.
- [19] Blaber EA, Dvorochkin N, Lee C, et al. Microgravity induces pelvic bone loss through osteoclastic activity, osteocytic osteolysis, and osteoblastic cell cycle inhibition by CDKN1a/p21 [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61372.
- [20] Chatani M, Mantoku A, Takeyama K, et al. Microgravity promotes osteoclast activity in medaka fish reared at the international space station [J]. Sci Rep, 2015, 5: 14172.
- [21] Gambaro G, Salanova M, Ciciliot S, et al. Gene expression profiling in slow-type calf soleus muscle of 30 days space-flown mice [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e169314.
- [22] Braun JL, Geromella MS, Hamstra SI, et al. Characterizing SERCA function in murine skeletal muscles after 35-37 days of spaceflight [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11764.
- [23] Mednieks M, Khatri A, Rubenstein R, et al. Microgravity alters the expression of salivary proteins [J]. Oral Health Dent Manag, 2014, 13(2): 211-216.
- [24] 李彬彬, 陈正阳, 郭松, 等. 失重环境对消化系统创伤和应激损伤及修复研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(17): 1088-1094.
- Li BB, Chen ZY, Guo S, et al. Progress in research of digestive system trauma and stress injury under microgravity environments [J]. World Chin J Digestol, 2019, 27(17): 1088-1094.
- [25] Lu SY, Guo S, Chai SB, et al. Proteomic analysis of the effects of simulated microgravity in human gastric mucosal cells [J]. Life Sci Space Res (Amst), 2022, 32: 26-37.
- [26] Ho CNQ, Tran MT, Doan CC, et al. Simulated microgravity inhibits the proliferation of Chang liver cells by attenuation of the major cell cycle regulators and cytoskeletal proteins [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4550.
- [27] 王艺璇, 周骅, 陈丽华, 等. 航天飞行环境对固有免疫细胞功能影响的研究进展 [J]. 解放军医学院学报, 2016, 37(10): 916-919.
- Wang YX, Zhou H, Chen LH, et al. Effects of spaceflight environments on innate immune cells [J]. Acad J Chin PLA Med School, 2016, 37(10): 916-919.
- [28] Sun Y, Kuang Y, Zuo Z. The emerging role of macrophages in immune system dysfunction under real and simulated microgravity conditions [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2333.
- [29] 韩浩伦, 吴玮, 王刚, 等. 模拟失重及飞船舱内噪声复合因素对豚鼠免疫功能的影响 [J]. 实用医学杂志, 2011, 27(21): 3842-3843.
- Han HL, Wu W, Wang G, et al. The effects of simulated noise in spaceship with weightlessness on immunologic function of guinea pigs [J]. J Practical Med, 2011, 27(21): 3842-3843.
- [30] Wang J, Han CH, Lu Z, et al. Simulated microgravity suppresses MAPK pathway-mediated innate immune response to bacterial infection and induces gut microbiota dysbiosis [J]. FASEB J, 2020, 34(11): 14631-14644.
- [31] Lin T, Du J, Liu L, et al. Treatment with minocycline suppresses microglia activation and reverses neural stem cells loss after simulated microgravity [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 7348745.
- [32] Zhai BH, Shang XL, Fu JX, et al. Rapamycin relieves anxious emotion and synaptic plasticity deficits induced by hindlimb unloading in mice [J]. Neurosci Lett, 2018, 677: 44-48.
- [33] 谭荣, 顾建文. 航天员中长期飞行骨骼健康管理研究现状 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(6): 932-936.
- Tan R, Gu JW. Current status of skeletal health management in middle and long duration astronauts [J]. Chin J Osteoporos, 2020, 26(6): 932-936.
- [34] 张丽, 王绪平, 黄孝闻, 等. 血竭及龙血竭化学成分、药理作用研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2605-2611.
- Zhang L, Wang XP, Huang XM, et al. Advance of the chemical components and pharmacological effects of *draconis sanguis* and *resina draconis* [J]. Chin J Modern Appl Pharm, 2019, 36(20): 2605-2611.
- [35] Li Y, Liu S, Liu H, et al. Dragon's blood regulates rac1-WAVE2-Arp2/3 signaling pathway to protect rat intestinal epithelial barrier dysfunction induced by simulated microgravity [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2722.
- [36] Wu XR, Li D, Liu JL, et al. Dammarane sapogenins ameliorates neurocognitive functional impairment induced by simulated long-duration spaceflight [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 315.
- [37] Wang Q, Dong L, Wang MD, et al. Dammarane sapogenins improving simulated weightlessness-induced depressive-like behaviors and cognitive dysfunction in rats [J]. Front Psychiatry, 2021, 12: 638328.
- [38] 尤金枝, 范雪梅, 王义明, 等. 太空养心丸对模拟失重大鼠心血管功能的影响 [J]. 中成药, 2021, 43(4): 1041-1045.

- You JZ, Fan XM, Wang YM, et al. Effects of Taikong Yangxinwan on cardiovascular function of simulated weightlessness rats [J]. Chin Tradit Patent Med, 2021, 43(4): 1041-1045.
- [39] 孙喜庆, 孙静, 高原, 等. 穴位刺激对失重心血管效应防护作用及机制研究进展 [J]. 心脏杂志, 2020, 32(5): 513-517.
- Sun XQ, Sun J, Gao Y, et al. Progress in effect of acupoint stimulation on cardiovascular deconditioning induced by weightlessness and its mechanism [J]. Chin Heart J, 2020, 32(5): 513-517.
- [40] Yim J, Cho SW, Kim B, et al. Transcriptional profiling of the probiotic escherichia coli nissle 1917 strain under simulated microgravity [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2666.
- [41] Xu XX, Xiang ST, Zhang QY, et al. rTMS alleviates cognitive and neural oscillatory deficits induced by hindlimb unloading in mice via maintaining balance between glutamatergic and GABAergic systems [J]. Brain Res Bull, 2021, 172: 98-107.
- [42] Yang JJ, Liang R, Wang L, et al. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) improves the gait disorders of rats under simulated microgravity conditions associated with the regulation of motor cortex [J]. Front Physiol, 2021, 12: 587515.
- [43] Falempin M, In-Albon SF. Influence of brief daily tendon vibration on rat soleus muscle in non-weight-bearing situation [J]. J Appl Physiol (1985), 1999, 87(1): 3-9.
- [44] 李文苑, 田永辉, 高玉海, 等. 不同类型低频电磁场抵抗失重引起的骨流失 [J]. 中国医学科学院学报, 2019, 41(1): 11-20.
- Li WY, Tian YH, Gao YH, et al. Different types of low-frequency electromagnetic fields resist bone loss caused by weightlessness [J]. Acta Acad Med Sin, 2019, 41(1): 11-20.
- [45] 王峻, 秦海波, 田立平, 等. 航天心理学研究与实践 [J]. 航天医学与医学工程, 2018, 31(2): 163-171.
- Wang J, Qin HB, Tian LP, et al. Research and practice of space psychology [J]. Space Med Med Eng, 2018, 31(2): 163-171.
- [46] Graham ZA, Lavin KM, O' Bryan SM, et al. Mechanisms of exercise as a preventative measure to muscle wasting [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2021, 321(1): C40-C57.
- [收稿日期] 2022-04-09

## 《中国实验动物学报》稿约

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

### 一、杂志介绍

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

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

### 二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!