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 8 期　2022 年 12 月 30 日出版

目　次

研究报告

β-glucan 诱导训练免疫及其在逆转免疫耐受中的应用…… 钟秋梅,张佳,李林英,郑世进(1013)

有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能的影响……

…… 吉春燕,汪澳哲,吕媛媛,赵丽,李岩(1023)

复合感染脓毒症大鼠模型的构建和评价 ……

…… 段爽,朱瑛,赵茹茹,侯媛璐,李明泓,林青,李奇峰(1034)

苦参碱对胰腺癌吉西他滨耐药细胞化疗敏感性的影响 ……

…… 郭晨博,毛玉宁,张贺,张彩勤,张延英,汪永锋,师长宏(1042)

安儿宁颗粒在幼年大鼠临床前安全性评价研究 ……

…… 徐聪,杨正标,王海苹,李怀平,郑高利,宣尧仙,陈颖(1050)

Mdr2 基因敲除小鼠建立原发性肝癌模型观察 …… 李萌,平键,徐列明(1058)

肺原位移植瘤小鼠模型的建立 …… 杨星九,张文龙,史旭东,李梦媛,张国新,高苒(1064)

两种大鼠下腔静脉移植模型建立方法的比较分析 ……

…… 任章勇,吕少诚,王芳菲,赵昕,郎韧,贺强(1071)

国家动物模型资源共享信息平台的建立 …… 吴玥,薛婧,魏强,向志光,陈禹保,孔琪(1080)

研究进展

Tn5 转座子及其在生物技术领域的应用 …… 高畅,任鹏程,李明格,吕赫喆,胡仪(1087)

四种昼间啮齿类动物的活动模式及其应用进展 …… 邢亦谦,高泓,谢红艳,谢春光(1095)

脑铁沉积动物模型的研究进展 …… 黄一羚,罗嘉强,彭鹏(1102)

fMRI 技术在犬科动物认知领域研究的应用…… 赵禹(1107)

基于中西医理论指导的类风湿关节炎动物模型分析 …… 王珊珊,袁嘉丽,牛海涛(1114)

慢性阻塞性肺疾病相关动物模型研究进展 …… 周利润,崔晓兰(1121)

ApoE4 转基因小鼠在阿尔茨海默病研究中的应用进展 …… 贺云,赵宏伟,齐冬梅,程肖蕊,刘西建(1128)

孤独症谱系障碍动物模型相关神经生物学研究进展 ……

…… 张雪原,孔亚敏,马丙祥,党伟利,周荣易,史文丽(1141)

《中国实验动物学报》2022 年总目次 …… (1150)

广告 …… (封二、内插)

主　管
中国科学技术协会
主　办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所
主　编
秦川
编辑部主任
董令赢
编　辑
《中国实验动物学报》编辑部
出　版
《中国实验动物学报》编辑部
发　行
《中国实验动物学报》编辑部
100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号
电话:010-67779337
传真:010-67770690
E-mail:bjb@ cnilas. org
http://zgsydw. cnjournals. com/sydwybjyx/ch/index. aspx
本期执行主编　谭　毅
本期责任编辑　陈　慧　董令赢
照　排
同方知网(北京)技术有限公司
印　刷
北京博海升彩色印刷有限公司
邮发代号
2-748
广告发布登记
京朝工商广登字 20170142 号
定　价
每期 50. 00 元,全年 300. 00 元
中国标准连续出版物号
ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q
2022 年版权归中国实验动物学会所有
本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网和中国实验动物学会网站等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。
本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www. 183read. com

期刊基本参数:CN11-2986/Q * 1993 * m * A4 * 152 * zh * P * ￥50. 00 * 1000 * 17 * 2022-08

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Monthly, Established in June 1993 **Volume** 30, **Number** 8, **December**, 2022

CONTENTS

β-glucan induces trained immunity and its application in reversing immune tolerance ····· *ZHONG Qiumei*, *ZHANG Jia*, *LI Linying*, *CHENG Shihchin*(1013)

Effects of aerobic exercise on inhibitory synaptic transmission in ventral tegmental area dopamine neurons of mice with nicotine withdrawal ····· *JI Chunyan*, *WANG Aozhe*, *LYU Yuanyuan*, *ZHAO Li*, *LI Yan*(1023)

Construction and evaluation of rat models of multiple-infection sepsis ····· *DUAN Shuang*, *ZHU Ying*, *ZHAO Ruru*, *HOU Yuanlu*, *LI Minghong*, *LIN Qing*, *Li Qifeng*(1034)

Effect of matrine on pancreatic cancer cell chemosensitivity to gemcitabine ····· *GUO Chenbo*, *MAO Yuning*, *ZHANG He*, *ZHANG Caiqin*, *ZHANG Yanying*, *WANG Yongfeng*, *SHI Changhong*(1042)

Safety evaluation of oral administration of An'erning granules in young rats ····· *XU Cong*, *YANG Zhengbiao*, *WANG Haiping*, *LI Huaiping*, *ZHENG Gaoli*, *XUAN Yaoxian*, *CHEN Ying*(1050)

Establishment of a primary liver cancer model in Mdr2 gene knockout mice: an observational study ····· *LI Meng*, *PING Jian*, *XU Lieming*(1058)

Establishment of an orthotopic lung cancer model ····· *YANG Xingjiu*, *ZHANG Wenlong*, *SHI Xudong*, *LI Mengyuan*, *ZHANG Guoxin*, *GAO Ran*(1064)

Comparative analysis of two methods for establishing inferior vena cava transplantation model in rats ····· *REN Zhangyong*, *LYU Shaocheng*, *WANG Fangfei*, *ZHAO Xin*, *LANG Ren*, *HE Qiang*(1071)

Establishment of national infrastructure for an animal model resource platform ····· *WU Yue*, *XUE Jing*, *WEI Qiang*, *XIANG Zhiguang*, *CHEN Yubao*, *KONG Qi*(1080)

Tn5 transposon and its applications in biotechnology ····· *GAO Chang*, *REN Pengcheng*, *LI Mingge*, *LYU Hezhe*, *HU Yi*(1087)

Locomotor activity of four diurnal rodents and their applications ····· *XING Yiqian*, *GAO Hong*, *XIE Hongyan*, *XIE Chunguang*(1095)

Research progress on animal models of brain iron deposition ····· *HUANG Yiling*, *LUO Jiaqiang*, *PENG Peng*(1102)

Progress of research into functional magnetic resonance imaging in the field of domestic dog cognition ····· *ZHAO Yu*(1107)

Analysis of animal models of rheumatoid arthritis based on theories of traditional Chinese and Western medicine ····· *WANG Shanshan*, *YUAN Jiali*, *NIU Haitao*(1114)

Development of an animal model for chronic obstructive pulmonary-related disease ····· *ZHOU Lirun*, *CUI Xiaolan*(1121)

Progress in application of ApoE4 transgenic mice in research into Alzheimer's disease ····· *HE Yun*, *ZHAO Hongwei*, *QI Dongmei*, *CHENG Xiaorui*, *LIU Xijian*(1128)

Research progress in the neurobiology of animal models of autism spectrum disorder ····· *ZHANG Xueyuan*, *KONG Yamin*, *MA Bingxiang*, *DANG Weili*, *ZHOU Rongyi*, *SHI Wenli*(1141)

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

钟秋梅,张佳,李林英,等. β-glucan 诱导训练免疫及其在逆转免疫耐受中的应用［J］. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1013-1022.
Zhong QM, Zhang J, Li LY, et al. β-glucan induces trained immunity and its application in reversing immune tolerance［J］. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1013-1022.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.001

β-glucan 诱导训练免疫及其在逆转免疫耐受中的应用

钟秋梅[1,2],张佳[1,2],李林英[1,2],郑世进[1,2*]

(1. 厦门大学生命科学学院,福建 厦门 361100;2. 厦门大学细胞应激生物学国家重点实验室,福建 厦门 361100)

【摘要】 目的 本研究拟通过在体内和体外诱导训练免疫反应,以探讨诱导训练免疫是否可能逆转免疫耐受状态。**方法** 以 β-glucan 作为训练免疫诱导剂,建立体外小鼠胫骨来源的巨噬细胞(bone marrow derived-macrophages,BMDM)训练免疫模型:40 μg/mL β-glucan 刺激 BMDM 24 h,随后用 PBS 洗涤后让 BMDM 在完全培养基中静息 6 d,在第 3 天的时候补充培养基,第 7 天收集细胞 100 ng/mL LPS 再刺激,4 h 后收集细胞抽提 RNA 和 24 h 后收集细胞上清;建立 β-glucan 体内训练免疫模型:野生型 C57BL/6J 腹腔注射 1 mg β-glucan,对照组腹腔注射 200 μL 的 PBS,7 d 后感染金黄色葡萄球菌(每只 1×10^4/200 μL PBS)。LPS 诱导体外免疫耐受,体外免疫耐受逆转通过在耐受的 BMDM 中加入 40 μg/mL β-glucan 刺激 24 h,随后让细胞静息 1 d,通过促炎因子的恢复水平来反映耐受逆转情况。盲肠结扎穿刺(cecal ligation and puncture,CLP)诱导体内免疫耐受,体内免疫耐受逆转通过向 CLP 组腹腔注射 1 mg β-glucan,通过再次感染非致死剂量的细菌或真菌的生存率反映耐受逆转情况。**结果** (1)经过 β-glucan 训练的 BMDM,在 LPS 再次刺激时产生更高水平的促炎因子 TNF-α、IL-6 和 NO。同时,β-glucan 训练的 BMDM 通过激活 m-TOR 信号通路,导致细胞代谢模式向糖酵解转变,引起细胞内乳酸增多;(2)β-glucan 诱导的体内训练免疫具有保护作用;(3)β-glucan 在体外能够逆转 LPS 诱导的免疫耐受,恢复 BMDM 促炎细胞因子的产生;(4)目前我们的结果尚未证实 β-glucan 在体内可以逆转 CLP 诱导的免疫耐受。**结论** 本研究成功地建立了 β-glucan 体外和体内训练免疫模型,并证明了在体外 β-glucan 能逆转 LPS 诱导的免疫耐受,但是目前结果尚未证实 β-glucan 在体内能够逆转 CLP 诱导的免疫耐受,提高二次感染生存率。

【关键词】 β-葡聚糖;训练免疫;CLP;免疫耐受;耐受逆转
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847 (2022) 08-1013-10

β-glucan induces trained immunity and its application in reversing immune tolerance

ZHONG Qiumei[1,2], ZHANG Jia[1,2], LI Linying[1,2], CHENG Shihchin[1,2*]

(1. Xiamen University School of Life Science, Xiamen 361100, China. 2. Xiamen University State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, Xiamen 361100)

Corresponding author: CHENG Shihchin. E-mail: jamescheng@xmu.edu.cn

【Abstract】 Objective The aim of this study was to examine whether immune tolerance was reversed by trained immunity in both *in vivo* and *in vitro* models. **Methods** Glucan is a prototypical trained immunity inducer. To establish the *in vitro* trained immunity model, BMDMs were stimulated with 40 μg/mL β-glucan for 24 h. BMDMs were washed once with warm PBS. After 24 h, they were incubated for 6 days in culture medium that was changed once at day 3. Trained BMDMs were stimulated with 100 ng/mL LPS at day 7. To establish the *in vivo* trained immunity model, wildtype C57BL/

[基金项目]国家自然科学基金项目面上项目(32070904)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China(32070904).
[作者简介]钟秋梅(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:先天免疫与免疫耐受。Email: 15882263246@163.com
[通信作者]郑世进(1979—),男,教授,博士生导师,研究方向:先天免疫系统功能调控;先天免疫耐受;先天免疫与肿瘤治疗。Email: jamescheng@xmu.edu.cn

6J mice were injected intraperitoneally with 1 mg β-glucan in 200 mL PBS. As a control, intraperitoneal injection of PBS alone was performed. After 7 days, mice were infected with *Staphylococcus aureus* intraperitoneally (1×10^4/200 mL PBS per mice). BMDMs were stimulated with LPS to induce immune tolerance *in vitro*. β-glucan was added at 24 h post-LPS stimulation to reverse immune tolerance. Cytokine production capacity was determined by LPS restimulation. CLP was carried out in mice to induce immune tolerance *in vivo*. Intraperitoneal injection of 1 mg β-glucan was performed to reverse CLP-induced tolerance. The efficacy of tolerance reversal was reflected by the survival rate post-reinfection with non-lethal doses of bacteria or fungi. **Results** (1) Glucan-trained BMDMs produced higher levels of proinflammatory cytokines, such as TNF-α and IL-6, and more nitric oxide. The energy metabolism of trained macrophages shifted to aerobic glycolysis, leading to lactate accumulation and enhanced m-TOR activation. (2) β-glucan-induced trained immunity was protective *in vivo*. (3) β-glucan reversed LPS-induced immune tolerance *in vitro*. (4) Administration of β-glucan did not reverse the CLP-induced immune tolerance in the current experimental setting. **Conclusion** This study successfully established β-glucan trained immune models *in vitro* and *in vivo*, and demonstrated that β-glucan can reverse LPS-induced immune tolerance *in vitro*. However, the current results have not confirmed that β-glucan can reverse CLP-induced immune tolerance *in vivo* and improve secondary infection survival.

【**Keywords**】 β-glucan; trained immunity; CLP; immune tolerance; tolerance reversal

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

免疫记忆指当机体初次刺激时能产生一个免疫反应,当再次遇到同种刺激时机体能产生更强大的免疫反应。1950 ~ 1960 年,免疫学家一直认为只有具有 T/B 淋巴细胞的脊椎动物才具有免疫记忆[1]。后天免疫反应依赖于 T/B 淋巴细胞,特异性识别病原体并建立该特定感染的免疫记忆。在第 2 次遇到相同的病原体时,记忆 T/B 细胞的克隆扩增会诱导快速有效的反应。然而,在后面的研究当中发现在一些植物或非脊椎动物,甚至一些细菌和古细菌中也有免疫记忆,但显然它们的免疫记忆并不是由 T/B 淋巴细胞介导的[1]。研究报道,缺乏 T/B 细胞的 *Rag*1$^{-/-}$小鼠初次感染过非致死剂量的白色念珠菌(*Candida albicans*),当再次感染时能够抵抗感染而存活下来[2]。这说明先天免疫系统也能介导一种免疫记忆的产生,后来免疫学家将这种先天免疫介导的保护作用定义为训练免疫(trained immunity)[3]。训练免疫是指先天免疫系统在首次遇到刺激后,经过急性反应回到稳态后,当再次遇到同源或异源刺激时,机体能产生更快速的免疫应答,从而保护机体。β-葡聚糖(β-glucan)是训练免疫的典型诱导剂,β-glucan 训练免疫模型最开始在人源单核细胞中建立。先天免疫细胞如单核细胞和巨噬细胞,当第 1 次遇到 β-glucan 时,细胞内糖代谢途径向有氧糖酵解转变,同时促进附近的组蛋白甲基化进行重编程,细胞内的 Akt-mTOR 信号通路也会被激活等[4]。当再次遇到同源或异源刺激时,巨噬细胞会产生更迅速和更强大的免疫反应以抵抗感染,保护机体。这表明训练免疫可赋予先天免疫细胞产生免疫记忆,对后续的细菌感染等能做出及时有效的免疫应答[5]。

败血症(sepsis)指致病菌进入血液并在其中繁殖,通过血液循环向全身扩散,从而引发全身性感染。败血症每年造成 20 万 ~ 30 万人死亡,是导致发达国家和发展中国家人口死亡的主要因素之一[6]。败血症的病理进程分为两个部分,主要由细菌感染引发,首先是进入急性期,引发多种组织损伤和多器官衰竭,从而导致全身性功能障碍,该阶段称为全身性炎症反应综合症(systemic inflammatory response syndrome, SIRS);急性期过后机体将产生抗炎因子以限制炎症反应的损害,该阶段称为代偿性抗炎综合征(compensatory anti-inflammatory syndrome, CARS)[7]。在败血症晚期阶段的抗炎反应会压倒宿主,抵消宿主的初始反应,并可能导致全身性的免疫耐受。这种败血症引起的免疫耐受可以持续多年,使患者容易发生持续性和继发性感染,从而增加死亡率。

为了研究败血症的临床发病机制,并开发有效的治疗方式,需要使用一些有效的实验模型来模拟复制临床败血症患者的病症。以下几种模型常用来研究败血症:静脉注射脂多糖(LPS)、腹腔注射大肠杆菌(*E. coli*)以及盲肠结扎穿刺(CLP)[8]。目前使用最广泛的是 CLP 模型,与临床败血症病症具有高度的相容性。在该模型中,败血症起源于腹腔内的多种细菌感染,随后细菌易位进入血液,然后引发全身性的炎症反应[9]。CLP 模型可重复性高,可以通过控制针头尺寸、盲肠穿刺次数和抗生素的使用来改变败血症的严重程度[10]。

目前败血症的治疗仍旧是一个难题,找到确切

的分子机制有效治疗败血症是首要任务。训练免疫和免疫耐受是两种功能状态相反的免疫应答,目前鲜有研究报道通过诱导训练免疫来逆转败血症引发的免疫耐受状态。Novakovic 等[11] 发现 β-glucan 加入到免疫系统不再发挥功能的受试验者的血液样品中,这些单核-巨噬细胞的免疫应答可于体外被重新激活。这表明应用训练免疫逆转免疫耐受状态可能是治疗败血症的可行策略。因此,本研究通过建立 β-glucan 训练免疫模型以及小鼠的 CLP 引起的免疫耐受模型,拟通过诱导训练免疫逆转免疫耐受并阐明其中的分子机制,为败血症治疗提供一种可行策略。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

本论文涉及的所有雄鼠(86 只)均是 SPF 级的 C57BL/6J 背景,平均周龄为 8 周,体重约为 22 g,购买于厦门大学实验动物中心【SCXK(闽)2018-0003】。饲养于厦门大学实验动物中心的屏障环境中【SYXK(闽)2018-0009】,饲养期间各组小鼠自由饮水,保持 pH = 6.0 ~ 8.5,饲喂由厦门大学实验动物中心提供的普通饲料。饲养环境:白光和暗光各 12 h 循环照射,温度恒定,温度控制在 25℃左右,湿度:45% ~ 55%,换气:每小时 6 ~ 15 次。所有小鼠实验操作均通过动物保护与使用委员会审核批准,严格执行厦门大学实验动物中心(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)制定的动物福利保障条例,并履行动物实验伦理承诺(XMULAC20200219)。

1.1.2　主要试剂与仪器

β-glucan(实验室从白色念珠菌中自提),LPS(Invitrogen, tlrl-pb5lps),Mouse TNF-α ELISA 试剂盒(Invitrogen, 88-7324-76),Mouse IL-6 ELISA 试剂盒(Invitrogen, 88-7064-76),SYBR Green 染料(AG, AG11701)。酶标仪(Biotek,美国),凝胶成像仪(赛智,中国),CFX Connect™ 荧光定量 PCR 检测系统(Bio-Rad,美国)。

1.2　方法

1.2.1　β-glucan 在 BMDM 中训练免疫模型的建立

为了在体外建立训练免疫模型,因此分离 C57BL/6J 小鼠的胫骨,外源添加 M-CSF 刺激分化为成熟的巨噬细胞(bone marrow derived-macrophage, BMDM),随后向成熟分化的 BMDM 中加入 40 μg/mL 的 β-glucan,24 h 后换液,加入含 10 ng/mL M-CSF 的 DMEM 再培养 6 d,中间第 3 天需补加一半含 10 ng/mL M-CSF 的 DMEM。6 d 后将细胞消化,用 100 ng/mL LPS 再次刺激 4 h 和 24 h。

1.2.2　β-glucan 诱导的体内训练免疫模型

感染前的第 7 天和第 4 天采用腹腔注射的方式注射 200 μL 体积 1 mg 的 β-glucan,共注射 2 次,在 7 d 的时候感染致死剂量 10^4 CFUs 的金黄色葡糖球菌(*Staphylococcus aureus* 115-69)。

1.2.3　CLP 模型

为了探究如何改善败血症引发的免疫耐受,CLP 手术在本研究用于建立败血症免疫耐受模型,操作与先前文献报道一致[9]。简单来说,手术前给小鼠腹腔注射与体重相适应的 1% 的戊巴比妥钠(50 mg/kg)以麻醉(单位:μL)。腹部的毛发用剃毛器剃除以暴露腹部皮肤,随后依次剪开表皮和内皮,伤口大小为 1 cm 左右,找到盲肠,随后用医用真丝编织线(上海金环医疗用品股份有限公司)结扎,然后用注射器对穿一次后挤出 1 mm 的粪便。结扎的位置和穿刺注射器的大小根据实验所需要的死亡率而定。随后将盲肠还原至腹腔,然后依次缝合内皮和外皮。手术结束,背部皮下注射 1 mL 37℃的生理盐水,以面部朝下的姿势,热照灯照射小鼠 1 ~ 3 h 左右,以恢复麻醉引起的常规体温过低。

1.2.4　抗生素治疗

CLP 手术 2 h 后小鼠接受 1 次抗生素治疗,随后在手术后的第 1 天和第 2 天(共 3 次),背部皮下注射 1 mL 25 mg/kg 的抗生素亚胺培南(源叶,S26289)。对照组注射 1 mL 的含 5% 葡萄糖的乳酸林格氏液(5% dextrose in lactated ringer's solution, D5W)。亚胺培南的使用能够有效减少 CLP 后血液中细菌的数量,其剂量依照先前 CLP 模型和临床使用情况[12-13]。

1.2.5　蛋白质免疫印迹

10^6 个细胞加入 150 μL 蛋白裂解液(1 mmol/L tris-HCl, 0.3 mol/L NaCl, 0.01% SDS, 1.5% NP40, 120 mmol/L deoxycholate, 1 mol/L $MgCl_2$, 含蛋白酶磷酸酶抑制剂),冰上裂解 20 min 后离心取上清。加入上样缓冲液制备蛋白样品,95℃加热使其变性。加入 10 μL 的蛋白样品到 10% 的 SDS-PAGE 凝胶中,90 ~ 130 V 的电压值跑样。湿法转膜,恒压 100 V 转膜 90 min。转膜结束后用 5% BSA 室温封闭 1 h,之后敷上相应一抗于 4℃摇床上,过夜。使用的一抗包括 p70 S6 Kinase Antibody(Rabbit, CST, 9202S), Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) Antibody (Rabbit, CST, 9205S), 4E-BP1 (53H11) Rabbit mAb

(Rabbit, CST, 9644S), Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4) Rabbit mAb (Rabbit, CST, 2855L), m-TOR Antibody (Rabbit, CST, 2972S), Phospho-mTOR (Ser2448) Antibody (Rabbit, CST, 2971S), 稀释比为 1∶1000, β-tubulin (Mouse, SAB, 48352) 的稀释比为 1∶5000。第 2 天室温孵育对应一抗来源的辣根过氧化物 (HRP) 标记的二抗, 最后使用 ECL (四正柏, 4AW012-500) 显色。

1.2.6 细胞因子、乳酸和 NO 测定

细胞上清液中的细胞因子使用商业化的 TNF-α (Invitrogen, 88-7324-76) 和 IL-6 (Invitrogen, 88-7064-76) ELISA 试剂盒, 操作按照说明书。乳酸测定方案中, 乳酸与酶混合物 (乳酸氧化酶和 HRP) 特异性反应生成产物, 该产物与 Amplex red (sigma, 119171-73-2) 相互作用生成颜色和荧光 (Ex/Em = 535/590 nm)。NO 测定按照 Griess 法。

1.2.7 mRNA 的提取和 RT-PCR

在第 6 天, 经训练后的细胞用 100 ng/mL LPS 刺激 4 h 后收集 RNA。mRNA 的提取采用磁珠法, 10^5 个细胞中加入 150 μL 裂解液 (100 mmol/L Tris-HCl pH = 7.5, 0.5 mol/L LiCl, 10 mmol/L EDTA, 1.5% SDS, 5 mmol/L DTT), 取 120 μL 加入 6 μL 磁珠 (Biotin-oligo dT streptavidin magnetic beads) 室温结合 5 min; 置磁力架上待液体澄清, 弃掉上清; 随后用洗涤液 A (10 mmol/L Tris-HCl pH = 7.5, 0.15 mol/L LiCl, 1 mmol/L EDTA, 0.1% SDS) 洗涤 1 次, 洗涤液 B (10 mmol/L Tris-HCl pH = 7.5, 0.15 mol/L LiCl, 1 mmol/L EDTA) 洗 2 次, 最后加入 15 μL Tris-HCl (10 mmol/L, pH = 7.5) 于 80℃ 加热 2 min 洗脱。cDNA 合成使用碧云天 dNTP (D7366), RNase 抑制剂 (AG11608) 和逆转录酶 (AG11605)。RT-PCR 使用 SYBR Green 染料 (AG, AG11701), 操作按照说明书进行。

1.3 统计学分析

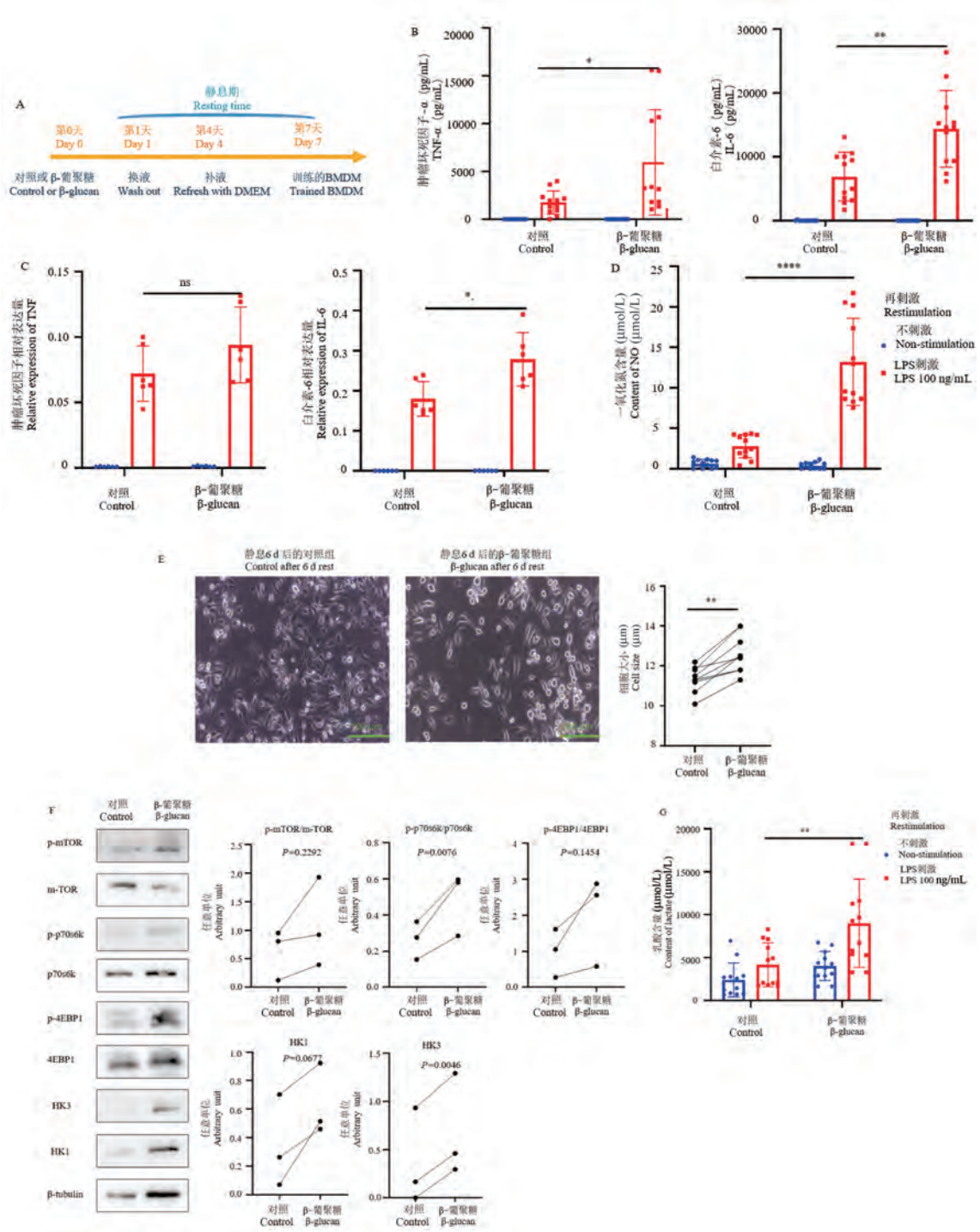
所有实验均采用随机分配的小鼠进行, 不设研究者盲法。实验的细节可以在结果中找到。所有数据点和“n”值反映了生物复制 (即小鼠)。使用 GraphPad Prism 8.0.3.2 软件进行统计分析, 结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 β-glucan 在 BMDM 中训练免疫模型的建立

虽然先前科学家们在人源单核细胞中已成功建立训练免疫模型, 但是为了进一步理清训练免疫模型的机制, 小鼠作为比较好的模式动物, 建立小鼠训练免疫模型能够为研究训练免疫机制带来便利。因此, 首要目标是在 BMDM 中建立一个细胞模型来验证训练免疫反应的形成 (图 1A)。训练免疫能够促进先天免疫细胞炎症因子的表达。先前研究表明, 在败血症的早期阶段, 训练免疫能够促进巨噬细胞发生 M1 型极化[14]。结果表明, β-glucan 训练增强 BMDM 促炎因子 TNF-α 和 IL-6 的产生 (图 1B)。同时, 通过 qPCR 检测 LPS 刺激 4 h 后抽提的 mRNA 在 TNF 和 IL-6 在转录水平上的差异。结果表明, 在转录水平上经 β-glucan 训练的 BMDM 炎症因子 TNF 并没有显著性差异, 然而 IL-6 显著高于未被训练的 BMDM (图 1C)。在先天免疫细胞中, 巨噬细胞使最早观察到产生一氧化氮 (NO) 的细胞, NO 发挥其抗菌抗炎的作用以清除病毒、细菌和真菌等感染[15]。因此, 通过 Griess 法检测了训练前后 BMDM 产生 NO 的水平差异。结果表明, 与未训练的 BMDM 相比, 当 LPS 再次刺激时, 训练后的 BMDM 产生 NO 的水平明显高于未被训练的 BMDM (图 1D)。从形态学上观察, β-glucan 训练后使 BMDM 增大。同时, 将细胞消化下来用自动细胞计数仪 (Automated Cell Counter LUNA II) 检测细胞直径。从数值上看, 经过 β-glucan 训练的 BMDM 直径明显大于对照组 (图 1E)。提示细胞内的 m-TOR 信号通路有可能被活化, 因此通过蛋白质免疫印迹法检测了 m-TOR 及其下游调控蛋白质合成的靶蛋白磷蛋白 70 核糖体蛋白 S6 激酶 (phosphoprotein 70 ribosomal protein S6 kinase-1, p70s6k) 和真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (4EBP1), 该通路的活化表现为 p70s6k 和 4EBP1 磷酸化。结果显示, β-glucan 训练会增强 m-TOR、p70s6k 和 4EBP1 的磷酸化。考虑到训练免疫的代谢基础是有氧糖酵解, 研究也聚焦于糖酵解相关蛋白即己糖激酶-1 (Hexokinase-1, HK1) 和己糖激酶-3 (Hexokinase-3, HK3) 的变化, 结果表明 β-glucan 训练增加 HK1 和 HK3 的表达 (图 1F)。除此之外, 乳酸在免疫调节中也能够发挥重要作用, 研究也关注乳酸的变化。结果表明, β-glucan 训练使 BMDM 产生更多的乳酸分泌于上清中 (图 1G)。

以上结果表明, 在体外 BMDM 中成功建立了训练免疫模型, 并且与先前人源单核细胞训练免疫模型一致[4]。



注：A：体外 β-glucan 训练免疫模式图；B：ELISA 测定细胞上清液中促炎因子 TNF-α 和 IL-6，样品为 LPS 再刺激 24 h 收集；C：qPCR 测定促炎因子 TNF 和 IL-6 的转录水平差异，样品为 LPS 再刺激 4 h 收集；D：Griess 法检测细胞上清液液中 NO 的分泌水平，样品为 LPS 再刺激 24 h 收集的；E：当细胞用 RPMI（阴性对照）、β-glucan 训练时，训练 24 h 并休息 6 d 后的细胞形态。在第 6 天再刺激前拍摄照片，放大倍数为 20 倍；F：Western Blot 检测 m-TOR、4EBP1、p70s6k、HK1 和 HK3 训练后的蛋白水平变化；G：测定细胞上清液中乳酸的分泌水平，样品为 LPS 再刺激 24 h 时收集。

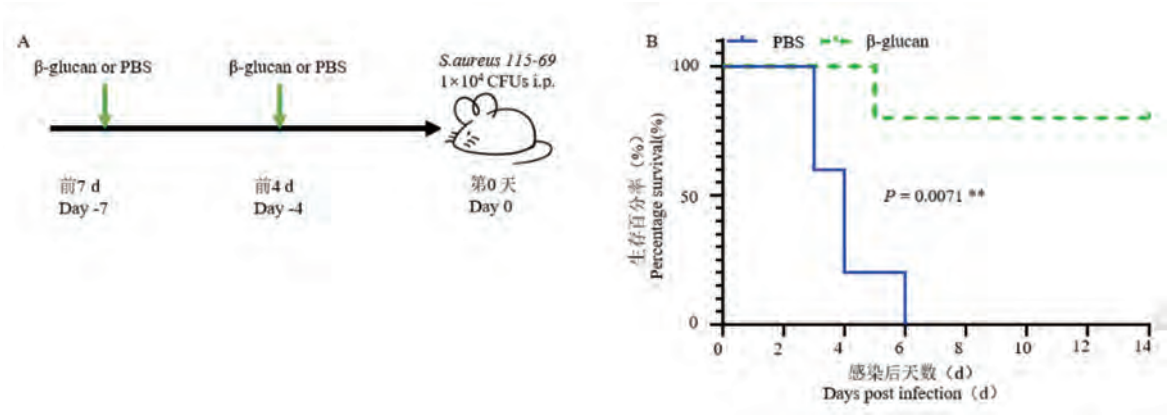
图 1　β-glucan 在 BMDM 中诱导的训练免疫

Note. A. Schematic of *in vitro* β-glucan induced trained immunity experimental setup. B. Supernatant collected from 24 h LPS re-stimulation were measured by TNF-α and IL-6 commercial ELISA kit. C. mRNA level of TNF and IL-6 were measured by qPCR, cells collected from 4 h LPS re-stimulation. D. Supernatant collected from 24 h LPS re-stimulation were measured following Griess assay protocol. E. After RIMI or β-glucan trained, the cell images were snapped by microscope at a 20 fold magnification. F. Western Blot analysis the protein level of m-TOR, 4EBP1, p70s6k, HK1 and HK3. G. Supernatants collected from 24 h LPS re-stimulation were measured following lactate assay protocol.

Figure 1　β-glucan induced trained immunity in BMDM

2.2 β-glucan 体内诱导的训练免疫具有保护作用

先前研究成功在体外建立了训练免疫模型，因此进一步研究拟在体内建立训练免疫模型。以 8 周龄大的野生型 C57BL/6J 雄鼠作为实验对象，在金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus* 115-69，*S. aureus* 115-69）感染的前 7 d 和前 4 d 腹腔注射 β-glucan，每次每只为 1 mg（见图 2A）。结果表明，β-glucan 在体内诱导的训练免疫能保护致病菌 *S. aureus* 115-69 诱导的感染，提高小鼠的生存率（见图 2B）。



注：A：β-glucan 体内训练免疫模式图；B：腹腔感染 *S. aureus* 115-69 的生存曲线图。

图 2 β-glucan 在体内诱导的训练免疫能抵抗 *S. aureus* 的感染（n = 5）

Note. A. The scheme of β-glucan induced trained immunity *in vivo*. B. The survival curve of *S. aureus* 115-69 in abdominal infection.

Figure 2 β-glucan induced trained immunity protected from *S. aureus* infection（n = 5）

2.3 β-glucan 在体外可逆转 LPS 诱导的免疫耐受

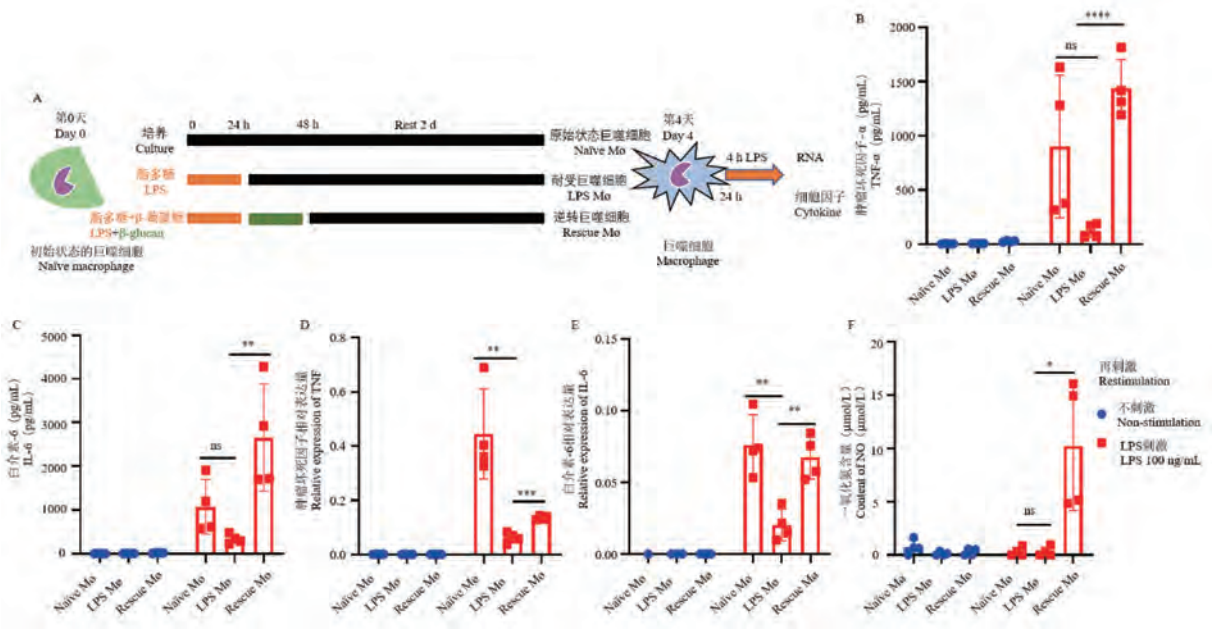
由于训练免疫能够促进免疫应答，因此对诱导训练免疫是否能够逆转免疫耐受进行了研究。首先，LPS 刺激成熟分化的 BMDM 24 h 以引起巨噬细胞产生免疫耐受。随后，再用 β-glucan 刺激 BMDM 24 h，换上含 10 ng/mL M-CSF 的 DMEM 静置培养 BMDM 1 d。最后，再次用 LPS 刺激 BMDM（图 3A）。通过检测促炎细胞因子 TNF-α 和 IL-6 的变化水平来反映耐受的逆转情况。与耐受的 BMDM 相比，β-glucan 逆转组产生的 TNF-α 和 IL-6 更高，甚至比原始状态下的 BMDM 还产生更多的促炎细胞因子（图 3B，3C）。从 RNA 水平分析 TNF 和 IL-6 的变化也观察到一样的趋势，β-glucan 逆转组 TNF 和 IL-6 基因表达在一定程度上得到恢复（图 3D，3E）。同时检测了 NO 的分泌水平，β-glucan 逆转组产生的一氧化氮明显高于耐受组，甚至比原始状态下的 BMDM 还要产生更多（图 3F）。上述结果一致表明，在体外 β-glucan 能够逆转 LPS 诱导的免疫耐受。

2.4 体内免疫耐受模型的建立

鉴于训练免疫能够在体外逆转免疫耐受，因此研究提出假设训练免疫同样能够逆转体内免疫耐受。通过给小鼠实施 CLP 手术引起多种微生物感染导致免疫耐受作为动物模型。在 CLP 手术（25 G，20%）7 d 后，使小鼠感染一个非致死剂量的白色念珠菌（*Candida albicans* ATCC MTA-3573（UC 820）），观察小鼠在此情形下是否处于免疫耐受状态（图 4A）。结果显示，在 CLP 第 7 天感染时，CLP 组的存活率都明显低于 Sham 组（图 4B）。之前的报导显示血液中 IL-6 浓度可作为败血症死亡率的最佳预测因子[16]，因此对术后 6、24 和 48 h 尾静脉采血分离的血清中 IL-6 的水平进行检测。结果表明，CLP 组的 IL-6 会在术后 6 h 立即升高，在 24 h 后这种细胞因子引起的细胞风暴已经减少，直至 48 h 细胞因子风暴消失（图 4C）。考虑到在 CLP 手术 7 d 后，小鼠大约有 20%的致死率（图 4D），因此改变盲肠结扎的位置以降低 CLP 组的致死率，同时 CLP 手术 3 d 后就感染剂量减半的 *C. albicans*，以明确机体免疫耐受出现的最早时间（图 5A）。结果显示，CLP 组的存活率明显低于 Sham 组，而且在术后 3 d 感染减半的 *C. albicans* 致死现象比术后 7 d 感染更严重（图 5B）。因此，CLP 3 d 后的体内免疫耐受模型，可用于免疫耐受逆转的后续研究。

2.5 β-glucan 在体内逆转免疫耐受的功能探索

构建体内免疫耐受模型选择的是在感染前 3 d 进行 CLP 手术，条件是在盲肠 10% 处结扎及用 25 G 的穿刺针对穿。β-glucan 的治疗设为 3 组，分别为术后第 1 天、术后第 2 天、术后第 1 天和第 2 天同时给药，然后在术后的第 3 天进行非致死剂量的

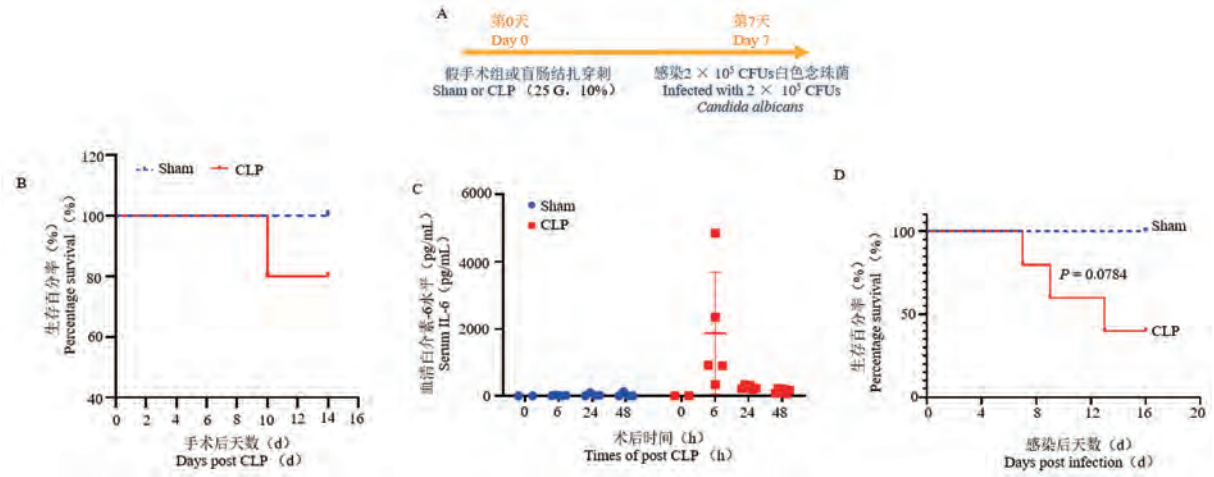


注：A：体外 BMDM 耐受逆转模型，β-glucan 在 100 ng/mL LPS 刺激 24 h 后加入，刺激 24 h 后去除培养基中的 β-glucan，让细胞静息 1 d 再次 100 ng/mL LPS 刺激；B，C：ELISA 测定细胞上清液中促炎因子 TNF-α 和 IL-6，样品为 LPS 再刺激 24 h 收集；D，E：qPCR 测定促炎因子 TNF-α 和 IL-6 的转录水平差异，样品为 LPS 再刺激 4 h 收集；F：Griess 法检测细胞上清液液中 NO 的分泌水平，样品为 LPS 再刺激 24 h 收集。

图 3　β-glucan 逆转 LPS 诱导的免疫耐受

Note. A. The *in vitro* BMDM tolerance reversal model, with β-glucan added therapeutically after 24 h of 100 ng/mL LPS exposure, let BMDM rested for 1 day and re-stimulated with LPS. B, C. Supernatant collected from 24 h LPS re-stimulation were measured by TNF-α and IL-6 commercial ELISA kit. D, E. mRNA level of TNF-α and IL-6 were measured by qPCR, cells collected from 4 h LPS re-stimulation. F. Supernatant collected from 24 h LPS re-stimulation were measured following Griess assay protocol.

Figure 3　β-glucan can reverse LPS-induced immune tolerance

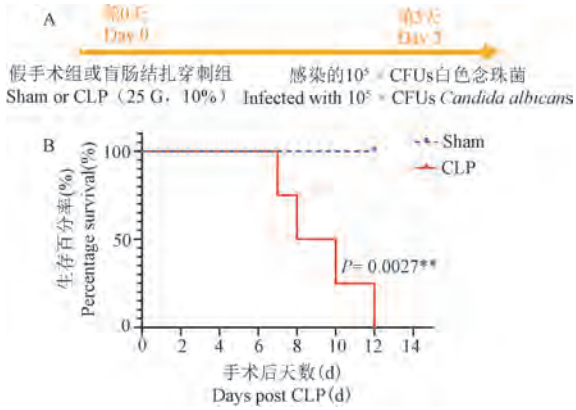


注：A：体内免疫耐受模式图，CLP 手术使用 25 G 的穿刺针穿刺，在盲肠的 20% 处结扎；B：CLP 术后 7 d 内的生存曲线；C：CLP 术后 6、24 和 48 h 尾静脉采血分离血清中的 IL-6 水平测定；D：CLP 手术 7 d 后尾静脉感染 *C. albicans* 的生存曲线。

图 4　体内免疫耐受模型的建立（n = 5，7 d）

Note. A. The scheme of immune tolerance model *in vivo*, cecum was ligated (20%) and punctured once with a 25 G needle. B. The survival curve post CLP. C. The serum IL-6 measured by ELISA, isolated from tail vein blood at 6, 24 and 48 h after CLP. D. The survival curve after infecting with *C. albicans* through tail vein.

Figure 4　Establishment of an *in vivo* immune tolerance model (n = 5, 7 d)



注：A：体内免疫耐受模式图，CLP 手术使用 25 G 的穿刺针穿刺，在盲肠的 10%处结扎；B：CLP 术后 3 d 尾静脉感染 *C. albicans* 的生存曲线。

图 5 体内免疫耐受模型的建立（n = 5，3 d）

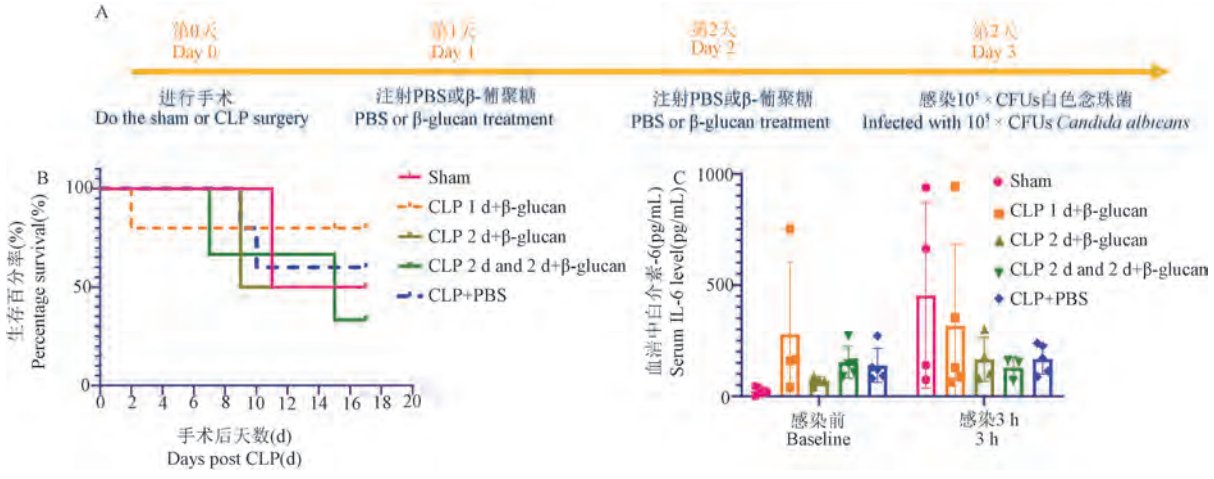
Note. A. The scheme of immune tolerance model *in vivo*, cecum was ligated (10%) and punctured once with a 25 G needle. B. The survival curves of *C. albicans* for tail vein infection 3 days after CLP.

Figure 5 Establishment of an *in vivo* immune tolerance model (n = 5, 3 d)

C. albicans 感染（图 6A）。从感染后的生存状况来看，与 PBS 组相比，β-glucan 治疗组的生存率没有显著改变，并且与 β-glucan 干预治疗的时间前后或者次数没有太大相关性（图 6B）。感染 3 h 后尾静脉采血，检测小鼠体内促炎细胞因子 IL-6 的产生水平，与 PBS 组相比，β-glucan 治疗组的小鼠产生的 IL-6 也没有改变（图 6C）。这个结果与生存曲线一致，说明在体内 β-glucan 的治疗并不能像体外一样通过恢复促炎细胞因子的产生来逆转免疫耐受状态，从而提高抗感染时的生存率。

在败血症患者的急性期，为了控制病情医生会考虑给予抗生素治疗。为了更密切的模拟临床败血症，研究采用了另外一种 CLP 模型。在盲肠 20%处结扎，用 23 G 的穿刺针对穿，致死率大约为 40%的 CLP 模型[17]。然后在 CLP 手术后的 2 h，第 1 天和第 2 天分别给抗生素治疗。抗生素亚胺培南（imipenem）对革兰氏阳性、阴性的需氧和厌氧菌具有抗菌作用，可用于敏感菌引起的败血症等[12]。在该 CLP 模型中亚胺培南的确能够减少死亡率，但对 CLP 引起的体重减轻症状没有缓解（图 7A，7B）。根据 2.2 结果中证明了 β-glucan 在感染前 7 d 和前 4 d 的两次给药，能有效抵抗感染，具有保护作用，所以在感染前 7 d 和前 4 d（即 CLP 手术后的第 5 天和第 8 天）给 β-glucan 治疗，在 CLP 手术后第 12 天时进行再次细菌感染（图 7C）。结果表明，在此模型条件下，β-glucan 的治疗也并不能完全逆转小鼠的免疫耐受状态，提高再次感染时的生存率（图 7D，7E，7F）。

总的来讲，目前探究从 β-glucan 治疗后小鼠的生存情况虽然没有得到改善，但是我们推测训练免疫的诱导可能通过改变体内先天免疫细胞的比例组成，进而改善体内免疫耐受状态，只是不足以从生存率上面体现。因此，关于 β-glucan 在体内是否能够逆转免疫耐受以及逆转耐受的机理还得需要继续探究。

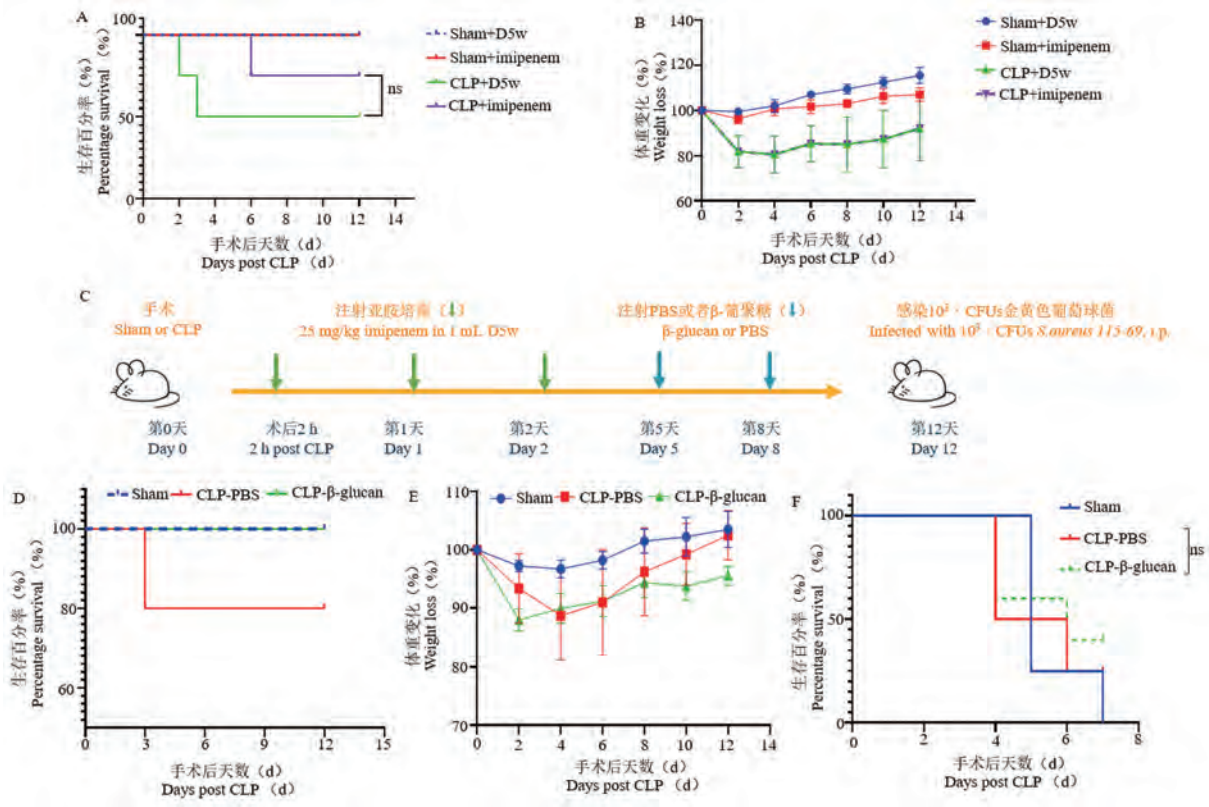


注：A：实验设计模式图；B：CLP 3 d 后尾静脉感染 10^5 *C. albicans* 的生存曲线；C：感染 *C. albicans* 3 h 后的血清 IL-6 水平。

图 6 β-glucan 在体内逆转免疫耐受的功能探索（n=4~5）

Note. A. Diagram of experimental design model. B. The survival curve 3 days post CLP after infected with 10^5 CFUs *C. albicans* through tail vein. C. The serum IL-6 level 3 h after infected with *C. albicans*.

Figure 6 Functional exploration of β-glucan in reversing immune tolerance *in vivo* (n=4~5)



注：A：CLP 术后给 imipenem 治疗后的生存曲线，CLP 手术条件为在盲肠的 20%处结扎，23 G 的穿刺针对穿一次（$n=4$）；B：CLP 术后给 imipenem 治疗后的体重（$n=4$）；C：体内免疫耐受逆转模式图；D：CLP 术后 12 d 内的生存曲线（$n=5$）；E：CLP 术后 12 d 内的体重（$n=5$）；F：CLP 12 d 后腹腔感染 10^3 × CFUs 的 *S. aureus* 的生存线（$n=5$）。

图 7　β-glucan 在体内逆转免疫耐受的功能探索

Note. A. The survival curve after treatment with imipenem, CLP condition was cecum was ligated (20%) and punctured once with a 23 G needle ($n=4$). B. Weight loss after treatment with imipenem($n=4$). C. The *in vivo* tolerance reversal model. D. The survival curve within 12 days after CLP($n=5$). E. Weight loss within 12 days after CLP($n=5$). F. The survival curve of 10^3 × CFUs *S. aureus* in abdominal infection($n=5$).

Figure 7　Functional exploration of β-glucan in reversing immune tolerance *in vivo*

3　讨论

β-glucan 是体外和体内训练免疫的典型诱导剂，其刺激可使巨噬细胞具有长期的促炎表型，从而增强机体对再感染的免疫应答[5,18]。在这项研究结果中，证实了 BMDM 经 β-glucan 训练之后，当二次遇到同源或异源刺激时细胞内能产生更高水平的促炎因子 TNF-α、IL-6，分泌更多的 NO；细胞代谢模式发生重要改变即向糖酵解转变，分泌更多的乳酸；细胞内的 m-TOR 信号通路活化。同时，经过 β-glucan 训练的小鼠能够有效抵抗 *S. aureus* 的感染。

与训练免疫相反的功能状态是免疫耐受，耐受细胞的基因转录处于无法激活的状态，并且再刺激时无法发挥其功能。败血症在细胞因子风暴结束后，进入第二阶段免疫耐受。免疫耐受状态的逆转引起了研究者的关注，因为从炎症阻断治疗方面来降低败血症的整体死亡率的成功案例有限，并且因为大多数败血症的死亡往往发生在耐受阶段期间的医院二次感染[19]。巨噬细胞经训练免疫诱导可以对继发感染产生更强的吞噬反应，这种反应可以由多种微生物相关分子模式（MAMP）诱导，例如白色念珠菌、卡介苗（BCG）和 β-glucan[2,11]。根据训练免疫和免疫耐受的功能特点，想通过在已经处于免疫耐受的细胞中，加入能够诱导训练免疫的物质，探究细胞的免疫耐受状态是否可以被逆转。假设 β-glucan 是可以逆转免疫耐受的。在免疫耐受逆转的体外研究结果中，β-glucan 在一定程度上确实能够逆转 LPS 诱导的免疫耐受。已有研究发现，LPS 诱导耐受的巨噬细胞和 β-glucan 训练过的巨噬细胞具有不同的表观遗传和代谢模式[11]。

有研究表明，IFN-γ 可以部分恢复从败血症患者体内分离的耐受单核细胞的代谢功能[20]。因此，想在体内探究 β-glucan 是否能够改变由 CLP 诱导

的免疫耐受状态,从而提高再次感染时的存活率。进一步用 CLP 模型模拟败血症,在感染金黄色葡萄球菌之前给 β-glucan 治疗,但 β-glucan 并没有提高 CLP 组再感染时的存活率。随之,又重新建立一种联合抗生素亚胺培南治疗的 CLP 模型,在此情形下,β-glucan 治疗的 CLP 组的生存率与 PBS 治疗的 CLP 组相比,没有显著性差异。虽然在体内应用 β-glucan 逆转没有得到预期的实验结果,但是证实了先天免疫"训练者"β-glucan 在体外可以逆转巨噬细胞免疫耐受。

针对进一步体内免疫耐受逆转的研究,考虑是否 β-glucan 改变了一些免疫细胞如单核细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞等的比例组成,以及这些细胞的反应性改变。有研究表明,在由 *E. coli* 感染引起的腹膜炎中,经酵母聚糖训练的小鼠,其腹腔细胞组成由维持稳态的大腹腔巨噬细胞向促炎的小腹腔巨噬细胞转变[5]。此外,宿主的单核细胞数目增多可介导白色念珠菌诱导的训练免疫,增强宿主二次感染免疫应答能力[2]。因此,我们提出假设细胞群表型和特定细胞群数量的改变可能在介导训练免疫反应中起关键作用。

综上所述,成功地在小鼠 BMDM 中用 β-glucan 建立了体外训练免疫模型。之后建立了 CLP 免疫耐受模型,确定一个能够导致免疫耐受但致死率低的条件,以及致死率过半但联合抗生素治疗能够减少死亡率的条件。在体外中证明了 β-glucan 能够逆转 LPS 诱导的免疫耐受,验证了 β-glucan 在体内能够有效抵抗金黄色葡萄球菌的感染。但是目前结果尚未证明 β-glucan 能够逆转 CLP 诱导的免疫耐受,提高二次感染时的存活率。

参 考 文 献(References)

[1] Sharrock J, Sun JC. Innate immunological memory: from plants to animals [J]. Curr Opin Immunol, 2020, 62: 69-78.

[2] Quintin J, Saeed S, Martens JHA, et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes [J]. Cell Host Microbe, 2012, 12(2): 223-232.

[3] Netea MG, Quintin J, van der Meer JWM. Trained immunity: a memory for innate host defense [J]. Cell Host Microbe, 2011, 9(5): 355-361.

[4] Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, et al. mTOR- and HIF-1α-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity [J]. Science, 2014, 345(6204): 1250684.

[5] Ciarlo E, Heinonen T, Théroude C, et al. Trained immunity confers broad-spectrum protection against bacterial infections [J]. J Infect Dis, 2020, 222(11): 1869-1881.

[6] Martin GS. *Sepsis*, severe *Sepsis* and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012, 10(6): 701-706.

[7] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach [J]. Lancet Infect Dis, 2013, 13(3): 260-268.

[8] Sun Z, Qu J, Xia X, et al. 17β-estradiol promotes LC3B-associated phagocytosis in trained immunity of female mice against sepsis [J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(2): 460-474.

[9] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 31-36.

[10] Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis [J]. Infect Immun, 1996, 64(11): 4733-4738.

[11] Novakovic B, Habibi E, Wang SY, et al. β-glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance [J]. Cell, 2016, 167(5): 1354-1368.

[12] Newcomb D, Bolgos G, Green L, et al. Antibiotic treatment influences outcome in murine sepsis: mediators of increased morbidity [J]. Shock, 1998, 10(2): 110-117.

[13] Iskander KN, Vaickus M, Duffy ER, et al. Shorter duration of post-operative antibiotics for cecal ligation and puncture does not increase inflammation or mortality [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0163005.

[14] Sun Z, Pan Y, Qu J, et al. 17β-estradiol promotes trained immunity in females against *Sepsis* via regulating nucleus translocation of RelB [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1591.

[15] Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1988, 157(1): 87-94.

[16] Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, et al. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days [J]. Shock, 2002, 17(6): 463-467.

[17] Bomans K, Schenz J, Sztwiertnia I, et al. *Sepsis* induces a long-lasting state of trained immunity in bone marrow monocytes [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2685.

[18] Dos Santos JC, Barroso de Figueiredo AM, Teodoro Silva MV, et al. β-glucan-induced trained immunity protects against *Leishmania braziliensis* infection: a crucial role for IL-32 [J]. Cell Rep, 2019, 28(10): 2659-2672.

[19] Lee J, Levy MM. Treatment of patients with severe *Sepsis* and septic shock: current evidence-based practices [J]. R I Med J (2013), 2019, 102(10): 18-21.

[20] Cheng SC, Scicluna BP, Arts RJW, et al. Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis [J]. Nat Immunol, 2016, 17(4): 406-413.

[收稿日期] 2022-04-14

吉春燕,汪澳哲,吕媛媛,等. 有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能的影响[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1023-1033.
Ji CY, Wang AZ, Lyu YY, et al. Effects of aerobic exercise on inhibitory synaptic transmission in ventral tegmental area dopamine neurons of mice with nicotine withdrawal [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1023-1033.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.002

有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能的影响

吉春燕[1],汪澳哲[1],吕媛媛[2,3],赵丽[1,2],李岩[1,2*]

(1. 北京体育大学运动人体科学学院,北京 100084;2. 北京体育大学运动与体质健康教育部重点实验室,北京 100084;3. 北京体育大学中国运动与健康研究院,北京 100084)

【摘要】 目的 探究中等强度有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元抑制性突触可塑性的影响,以期为运动减少尼古丁复吸提供一定的实验依据。**方法** 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为生理盐水安静组(SS 组)、生理盐水运动组(SE 组)、尼古丁安静戒断组(NS 组)、尼古丁运动戒断组(NE 组),采用条件性位置偏爱实验建立小鼠尼古丁成瘾模型。之后停止给药,SE 组和 NE 组小鼠进行连续 2 周的中等强度有氧运动干预,SS 组和 NS 组小鼠自由饮食及进水。采用条件性位置偏爱实验检测小鼠尼古丁复吸行为。使用全细胞膜片钳技术记录 VTA 多巴胺神经元的自发抑制性突触后电流(sIPSC)、微小抑制性突触后电流(mIPSC)和抑制性突触后电流配对脉冲比(IPSC PPR)。使用免疫荧光染色检测 VTA γ-氨基丁酸限速酶 GAD67 的表达。**结果** (1)NS 组 CPP 得分高于 SS 组,NE 组 CPP 得分低于 NS 组;(2)NS 组 sIPSC 的平均频率和平均幅度高于 SS 组,NE 组 sIPSC 的平均频率和平均幅度低于 NS 组;(3)NS 组 mIPSC 的平均频率和平均幅度高于 SS 组,NE 组 mIPSC 的平均频率和平均幅度低于 NS 组;(4)20 ms 和 50 ms 刺激间隔时,NS 组的 IPSC PPR 小于 SS 组,NE 组的 IPSC PPR 大于 NS 组;(5)NS 组 VTA GAD67 蛋白表达低于 SS 组,NE 组 VTA GAD67 蛋白表达高于 NS 组。**结论** 2 周的中等强度有氧运动减少尼古丁戒断模型 VTA 多巴胺神经元突触前 GABA 释放,下调突触后 $GABA_A$ 受体的数量和/或功能,减弱抑制性突触传递效能,这可能是有氧运动减少尼古丁复吸的机制之一。

【关键词】 有氧运动;戒断;多巴胺;突触可塑性;小鼠
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2022)08-1023-11

Effects of aerobic exercise on inhibitory synaptic transmission in ventral tegmental area dopamine neurons of mice with nicotine withdrawal

JI Chunyan[1], WANG Aozhe[1], LYU Yuanyuan[2,3], ZHAO Li[1,2], LI Yan[1,2*]

(1. College of Sport Science, Beijing Sport University, Beijing 100084, China. 2. Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing Sport University, Beijing 100084. 3. China Institute of Sport and Health Science, Beijing Sport University, Beijing 100084)
Corresponding author: LI Yan. E-mail: bsuliyan@bsu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of aerobic exercise on the inhibitory synaptic plasticity of the ventral tegmental area (VTA) dopamine neurons of mice with nicotine withdrawal. **Methods** Eight-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into a saline sedentary (SS) group, saline exercise (SE) group, nicotine sedentary (NS)

[**基金项目**]国家自然科学基金(32000838),中国博士后科学基金(2019T120067),中央高校基本科研业务费专项资金(校 2020038)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China (32000838), China Postdoctoral Science Foundation (2019T120067), Chinese Universities Scientific Fund (BSU2020038).
[**作者简介**]吉春燕(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:运动生理学。Email:m18813073517@163.com
[**通信作者**]李岩(1988—),男,副教授,博士,研究方向:运动与神经可塑性,运动与健康促进。Email:bsuliyan@bsu.edu.cn

group, and nicotine exercise (NE) group following the conditioned place preference (CPP) paradigm. During abstinence, SE and NE group mice were subjected to a moderate-intensity treadmill running protocol for 2 weeks. The CPP paradigm was used to test nicotine-seeking behavior of mice after nicotine withdrawal. The whole-cell patch clamp was used to record the spontaneous inhibitory postsynaptic current (sIPSC), the miniature IPSC (mIPSC), and the IPSC paired-pulse ratio (PPR) of dopamine neurons in the VTA. Immunofluorescence staining was used to detect the expression of GAD67 in the VTA. **Results** (1) The CPP score was higher in the NS than SS group and lower in the NE than NS group. (2) The mean frequency and amplitude of the sIPSC were higher in the NS than SS group and lower in the NE than NS group. (3) The mean frequency and amplitude of the mIPSC were higher in the NS than SS group and lower in the NE than NS group. (4) At the 20 ms and 50 ms interstimulus intervals, the IPSC PPR was lower in the NS than SS group and higher in the NE than NS group. (5) The fluorescence intensity of GAD67 was lower in the NS than SS group and higher in the NE than NS group. **Conclusions** 2 weeks moderate intensity aerobic exercise reduces presynaptic GABA release, down-regulates the number and/or function of postsynaptic GABAA receptors in VTA dopamine neurons, and these decreased inhibitory synaptic transmission may represent a potential mechanism by which aerobic exercise attenuates nicotine seeking during abstinence.

【**Keywords**】 aerobic exercise; withdrawal; dopamine; synaptic plasticity; mouse

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

吸烟会增加罹患心脑血管疾病、呼吸系统疾病、精神障碍、恶性肿瘤等多种疾病的发病率,每年导致全球 800 多万人死亡,给全世界造成巨大的经济压力和社会负担[1]。烟草依赖的主要原因是尼古丁成瘾,其主要特征有:用药后的欣快感、撤药后的戒断症状以及对药物持续性的强烈渴求[2]。复吸是治疗成瘾最大的难题。目前国际平均药物复吸率近 91%,我国药物复吸率为 90%[3]。戒断过程中患者会因为突然缺失药物出现戒断症状,包括食欲增加、心率降低等躯体症状和焦虑、快感缺失、认知障碍和工作记忆障碍等情感症状[4]。戒断症状引起的强烈渴求是导致戒烟者复吸率居高不下的重要原因,探究戒断期中枢神经系统的变化,寻找引发强烈药物渴求的中枢机制进而降低复吸率,是治疗和控制成瘾性疾病的重要策略[5]。

由中脑腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)的多巴胺(dopamine, DA)神经元投射至伏隔核(nucleus accumbens, NAc)的奖赏环路的结构异常和功能紊乱是导致成瘾形成和戒断后复吸的重要原因[6]。在成瘾形成过程中,各类成瘾性药物直接或者间接地增强 VTA 的多巴胺神经元在其下游脑区的多巴胺释放,使机体产生强烈的欣快感和正性强化作用从而启动成瘾[7]。在戒断过程中,VTA-NAc 的多巴胺投射会发生相反的变化。戒除各种成瘾药物会导致 NAc 基础多巴胺的减少[8],从而引起快感缺失等负性情绪反应并激发药物渴求。多巴胺的释放受到神经元兴奋水平的影响,吗啡、尼古丁戒断后 VTA 多巴胺神经元放电频率均出现降低[9],从而使 NAc 多巴胺末梢释放的递质减少。多巴胺神经元放电的频率和模式受到 γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)能抑制性突触传入的严格调控[9]。VTA 多巴胺神经元接受来自局部 GABA 能中间神经元和外部 NAc、腹侧苍白球和腹侧背盖区尾侧(the tail of the VTA, tVTA)脑区的 GABA 能输入。关于抑制性输入在戒断期多巴胺神经元兴奋性变化中的作用机制,有以下 3 个方面证据[10-12]:第一,药物戒断期,VTA 局部兴奋性和抑制性神经递质失衡,表现为 GABA 增多而谷氨酸减少;第二,电生理学研究表明药物戒断导致 VTA 区多巴胺神经元抑制性突触传递效能增强;第三,通过光遗传等方法减弱 VTA 区多巴胺神经元的抑制性突触传递效能可以改善成瘾模型的戒断症状、减少复吸。以上诸多证据表明,药物戒断会导致 VTA 区多巴胺神经元抑制性突触传递效能增强,从而降低多巴胺神经元的兴奋性,减少 NAc 多巴胺的释放,触发觅药行为。由此可见,靶向干预 VTA 区多巴胺神经元相关抑制性投射环路的传递效能是改善戒断症状、减少复吸的重要策略。

流行病学及临床研究证实,运动在药物成瘾的各个阶段都具有保护作用。研究表明,戒断阶段进行运动干预能减轻焦虑、情绪低落、抑郁等负面情绪反应,缓解戒断症状并减少复吸[13]。动物研究发现,持续 60 min 的运动 2 h 后,海马的多巴胺释放增加 2 倍[14]。相关研究表明,运动缓解负性情绪、改善戒断症状、减少复吸可能与运动促进多巴胺代谢有关[15]。但是,目前关于运动促进成瘾戒断期多巴

胺释放的神经生物学机制尚不明确,尤其是从功能学的角度探究运动对成瘾戒断期 VTA 区多巴胺神经元接受的抑制性输入的影响更未见报道。因此,本研究观察有氧运动对尼古丁戒断模型 VTA 多巴胺神经元 GABA 能输入的调节作用,以期从突触可塑性的角度为运动减少尼古丁复吸提供一定的实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

本实验以 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠为研究对象,共 40 只,体重约为 22 g,实验动物由北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】提供。动物房内的光照时间由人工控制,白天时间为 6:00 ~ 18:00,环境温度为 22 ~ 24℃,相对湿度维持 50% ~ 65%,饲养于北京体育大学动物房【SYXK(京)2021-0053】。饲养期间,所有小鼠自由摄食及饮水,维持饲料由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。本研究实验方案已获得北京体育大学运动科学实验伦理委员会批准(2019031A)。

1.1.2　主要试剂与仪器

尼古丁酒石酸盐(Tocris Bioscience,美国),CNQX(Sigma,美国),河豚毒素(Sigma,美国),小鼠单克隆谷氨酸脱羧酶 67(glutamic acid decarboxylase 67,GAD67)抗体(Millipore,G5419,美国),荧光素 Alexa Fluor 594 标记的山羊抗小鼠 IgG(Invitrogen,A-11032,美国)。

条件性位置偏爱行为学系统(泰盟,CPP-100,中国),动物跑台(杭州段氏 DSPT-215,中国),振动切片机(LEICA,VT1200S,德国),膜片钳放大器(Axon,700B,美国),数模模数转换器(Axon,1440A,美国),膜片钳数据采集分析软件(Axon,pClamp 10.7,美国),冰冻切片机(LEICA,CM3050S,德国),激光共聚焦显微镜(LEICA,SP8,德国)。

1.2　方法

1.2.1　成瘾模型建立与运动方案

在适应环境 1 周后,将小鼠随机分为生理盐水+安静组(saline sedentary 组,SS 组)、生理盐水+运动组(saline exercise 组,SE 组)、尼古丁+安静戒断组(nicotine sedentary 组,NS 组)、尼古丁+运动戒断组(nicotine exercise 组,NE 组)。采用条件性位置偏爱实验(conditioned position preference,CPP)建立小鼠尼古丁成瘾模型。CPP 实验由以下环节组成[16]:(1)预测试(第 1 天):小鼠被允许自由探索黑箱与黑白条纹箱 20 min 并记录其在两侧箱体所停留时间,剔除单侧停留时间> 65%的小鼠。(2)条件化训练(第 2 ~ 9 天):小鼠接受生理盐水或尼古丁给药。在第 2、4、6、8 天 NS、NE 组小鼠腹腔注射尼古丁(0.5 mg/kg),放入黑箱 20 min;在第 3、5、7、9 天小鼠腹腔注射等量生理盐水并放入黑白条纹箱 20 min。SS、SE 组小鼠每天腹腔注射生理盐水并放入对侧箱体训练。(3)测试(第 10 天):允许各组小鼠在两侧箱体自由探索 20 min,记录小鼠在两个箱体中的停留时间。之后停止给药,SE 组和 NE 组小鼠进行连续 2 周的运动干预,SS 组和 NS 组小鼠自由进食及饮水不进行运动干预。(4)后测:2 周戒断后,各组小鼠再次进行 CPP 测试,方法如测试期,记录小鼠在两侧箱体停留时间。CPP 得分(s)为小鼠在注射尼古丁训练箱的停留时间减去注射生理盐水训练箱的停留时间。实验流程如图 1。

实验的运动方案:使用跑台进行运动干预,小鼠运动强度为 60% ~ 75%最大摄氧量,训练前 10 min 跑速为 12 m/min,后 50 min 跑速为 15 m/min,跑台坡度为 0°,60 min/d,每周 5 d。课题组前期研究发现该运动强度具有调节突触可塑性的作用[17],前期研究也发现 65% ~ 70%最大心率的中等强度运动可以有效降低成瘾患者的主观渴求度[18]。

1.2.2　脑片膜片钳实验

小鼠麻醉(吸入异氟烷),取脑后振动切片,保留含有 VTA 的脑片,脑片厚度为 250 μm。胆碱切

图 1　实验流程图

Figure 1　Timeline of the experiments

片液配方为：23 mmol/L $NaHCO_3$，2.5 mmol/L KCl，1.25 mmol/L NaH_2PO_4，0.5 mmol/L $CaCl_2$，7 mmol/L $MgSO_4$，10 mmol/L 葡萄糖，11.6 mmol/L 抗坏血酸钠，3.1 mmol/L 丙酮酸钠，110 mmol/L 氯化胆碱，20 mmol/L 阿托品。脑片在人工脑脊液（artificial cerebrospinal fluid，ACSF）中室温孵育 1 h 以上，ACSF 配方为：2.5 mmol/L KCl，2.5 mmol/L $CaCl_2$，1.25 mmol/L $MgCl_2$，1.25 mmol/L NaH_2PO_4，119 mmol/L NaCl，23 mmol/L $NaHCO_3$，10 mmol/L 葡萄糖，之后进行脑片膜片钳记录。

采用全细胞电压钳技术记录以下指标：自发性抑制性突触后电流（spontaneous inhibitory postsynaptic current，sIPSC）、微小抑制性突触后电流（miniature inhibitory postsynaptic current，mIPSC）和抑制性突触后电流（inhibitory postsynaptic current，IPSC）配对脉冲刺激比值（paired-pulse ratio，PPR）。记录用玻璃微电极内充灌电极内液，配方为：100 mmol/L K-gluconate，50 mmol/L KCl，2 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L Hepes，0.2 mmol/L EGTA，2 mmol/L Mg-ATP，0.3 mmol/L Na_2GTP，10 mmol/L 磷酸肌酸钠；使用 KOH 调节 pH = 7.2 ~ 7.4。记录诱发指标时，刺激电极置于多巴胺神经元突触前 150 μm 左右位置，用两个连续刺激诱发 PPR（刺激间隔时间：20，50，100，200，400 ms）。整个记录过程，将膜电位钳制在 −70 mV，灌流液中加入 AMPA 受体拮抗剂 CNQX（20 μmol/L）阻断兴奋性突触活动。记录 mIPSC 时，灌流液中加入河豚毒素（tetrodotoxin，TTX，1 μmol/L）阻断动作电位。

1.2.3 免疫荧光染色

小鼠经异氟烷吸入麻醉，灌注 4% 多聚甲醛进行前固定，取脑置于 4℃ 多聚甲醛后固定 24 h，蔗糖脱水后，使用冰冻切片机进行冠状切片，脑片厚度 40 μm。切片经封闭后加入 GAD67 抗体（1∶200），4℃ 孵育 48 h，室温孵育 Alexa Fluor 594 标记的二抗（1∶600）1 h。使用荧光封片剂（DAPI）封片，激光共聚焦显微镜拍照。免疫荧光图片处理使用 Image J 软件进行半定量分析。

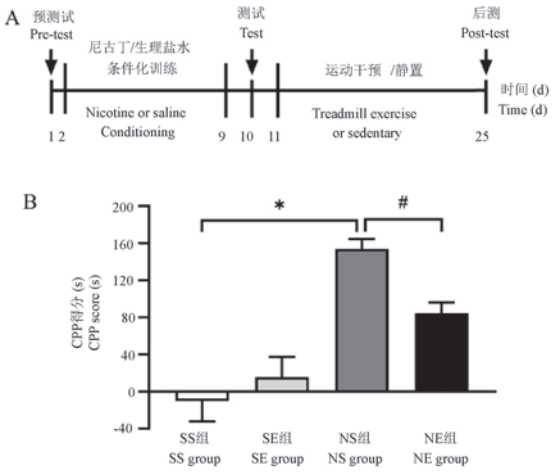
1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析，实验结果以平均值 ± 标准误差（$\bar{x} \pm s\bar{x}$）表示。使用 Clampfit 软件导出 sIPSC 和 mIPSC，再使用 Mini-analysis 软件分析平均频率和平均幅度。使用 pClamp 10.7 软件采集并分析诱发的突触后电流数据 IPSC PPR。使用 Image J 软件分析免疫荧光图片的荧光强度。本研究数据在满足方差齐性检验的条件下，进行双因素方差分析（Two-way ANOVA），采用 Holm-Sidak 法进行多重比较。统计学显著性水平为 $P < 0.05$。

2 结果

2.1 有氧运动对尼古丁戒断小鼠复吸行为的影响

CPP 得分的双因素方差分析结果（见图 2）显示尼古丁戒断和有氧运动对 CPP 得分有显著交互效应（$P < 0.05$）。与 SS 组相比，NS 组得分显著升高（$P < 0.05$）；与 NS 组相比，NE 组得分显著降低（$P < 0.05$）。以上结果提示，有氧运动改善尼古丁戒断小鼠的条件性位置偏爱，即有氧运动减少尼古丁成瘾小鼠戒断期的复吸行为。



注：A：小鼠 CPP 行为学实验时程图；B：各组 CPP 得分统计图；与 SS 组相比，$^{*}P < 0.05$；与 NS 组相比，$^{\#}P < 0.05$。（下图同）

图 2 各组小鼠 CPP 得分

Note. A. Timeline of CPP paradigm. B. CPP scores of mice in each group. Compared with the SS group, $^{*}P < 0.05$. Compared with the NS group, $^{\#}P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 CPP score of mice in each group

2.2 有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元 sIPSC 的影响

各组小鼠 sIPSC 记录原始图见图 3A。对 sIPSC 的平均频率和平均幅度进行双因素方差分析（图 3B，3C），结果显示尼古丁戒断和有氧运动的交互效应显著（平均频率，$P < 0.05$；平均幅度，$P < 0.05$）。多重比较结果显示，与 SS 组相比，NS 组 sIPSC 的平均频率（$P < 0.001$）和平均幅度（$P < 0.01$）显著升

高;与 NS 组相比,NE 组 sIPSC 的平均频率($P < 0.01$)和平均幅度($P < 0.001$)显著降低。以上结果提示,尼古丁戒断增强 VTA 多巴胺神经元接受的 GABA 能输入;有氧运动使尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元接受的 GABA 能输入降低。

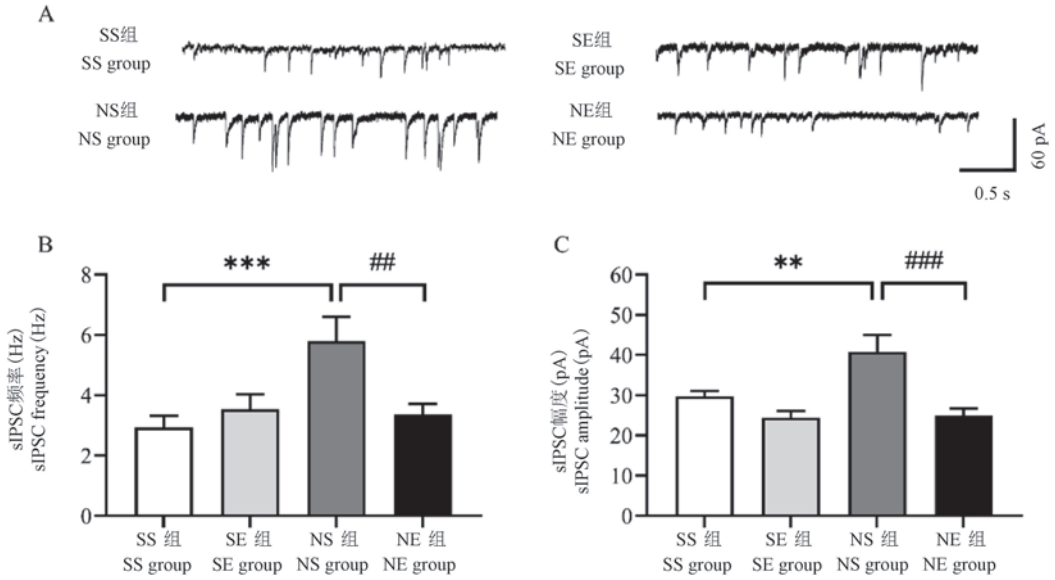
2.3　有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元 mIPSC 的影响

GABA 能输入的变化可能由动作电位驱动突触前 GABA 释放增加和/或突触前囊泡随机释放增加所致。本研究为探究其可能机制,在人工脑脊液中加入 TTX,阻断动作电位,记录由突触前囊泡随机自发地释放 GABA 所产生的抑制性突触后电流。各组小鼠 mIPSC 记录原始图见图 4A。对 mIPSC 的平均频率和平均幅度进行双因素方差分析(图 4B,4C),结果显示尼古丁戒断和有氧运动的交互效应显著(平均频率,$P < 0.05$;平均幅度,$P < 0.05$)。多重比较结果显示,与 SS 组相比,NS 组 mIPSC 的平均频率($P < 0.05$)和平均幅度($P < 0.05$)显著升高;与 NS 组相比,NE 组 mIPSC 的平均频率($P < 0.05$)和平均幅度($P < 0.05$)显著降低。

sIPSC 和 mIPSC 的结果提示,尼古丁戒断导致 VTA 多巴胺神经元突触前的 GABA 以动作电位触发和随机自发的机制释放增加,突触后 $GABA_A$ 受体数量增多和/或功能增强,从而增强抑制性突触传递效能;有氧运动减少尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元突触前动作电位驱动的 GABA 释放和随机自发的 GABA 释放,下调突触后 $GABA_A$ 受体数量和/或功能,从而减弱抑制性突触传递效能。

2.4　有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺能神经元 IPSC PPR 的影响

由于 sIPSC 和 mIPSC 幅度的变化可能导致频率变化,因此单纯通过 sIPSC 和 mIPSC 的频率与幅度判断抑制性传递突触前和突触后机制的变化具有一定局限性[19]。为了进一步区分抑制性突触传递效能的变化是突触前还是突触后的效应,本研究检测了 VTA 多巴胺神经元的抑制性突触后电流(IPSC)配对脉冲比(PPR = $IPSC_2/IPSC_1$),以此反映多巴胺神经元的突触前抑制性递质释放概率。各组小鼠诱发的 IPSC 记录原始图见图 5A。对在 20 ms、50 ms、100 ms 和 200 ms 刺激间隔记录的 IPSC PPR 分别进行双因素方差分析,结果显示在 20 ms(图 5B)和 50 ms(图 5C)刺激间隔时,尼古丁

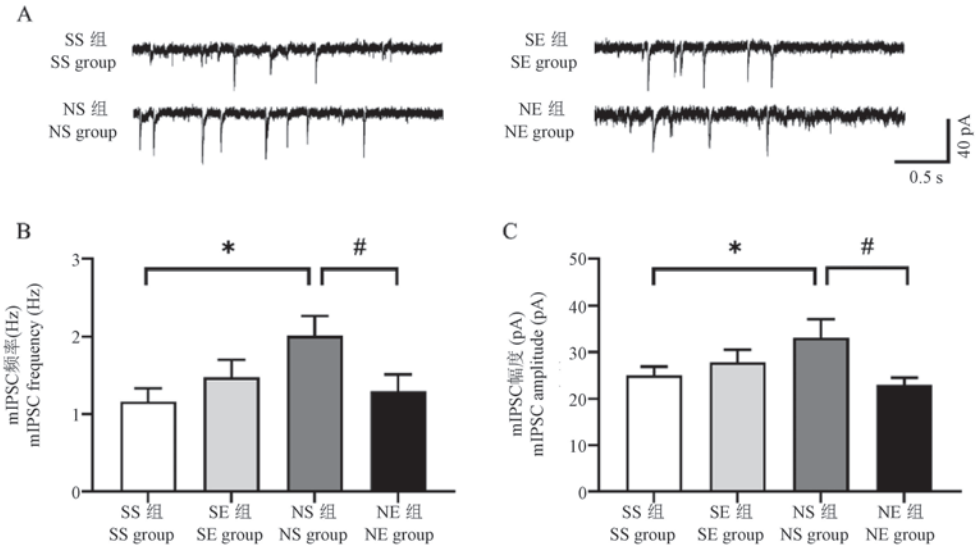


注:A:脑片膜片钳全细胞记录的自发性抑制性突触后电流(sIPSC)图;B:各组 sIPSC 频率统计图;C:各组 sIPSC 幅度统计图;与 SS 组相比,$^{**}P < 0.01$,$^{***}P < 0.001$;与 NS 组相比,$^{\#\#}P < 0.01$,$^{\#\#\#}P < 0.001$。(下图同)

图 3　各组小鼠 VTA 多巴胺神经元 sIPSC

Note. A. Representative sIPSC traces recorded by patch clamp. B. The mean frequency of sIPSC in these four groups. C. The mean amplitude of sIPSC in these four groups. Compared with the SS group, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. Compared with the NS group, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 3　sIPSC from VTA dopamine neurons of mice in each group

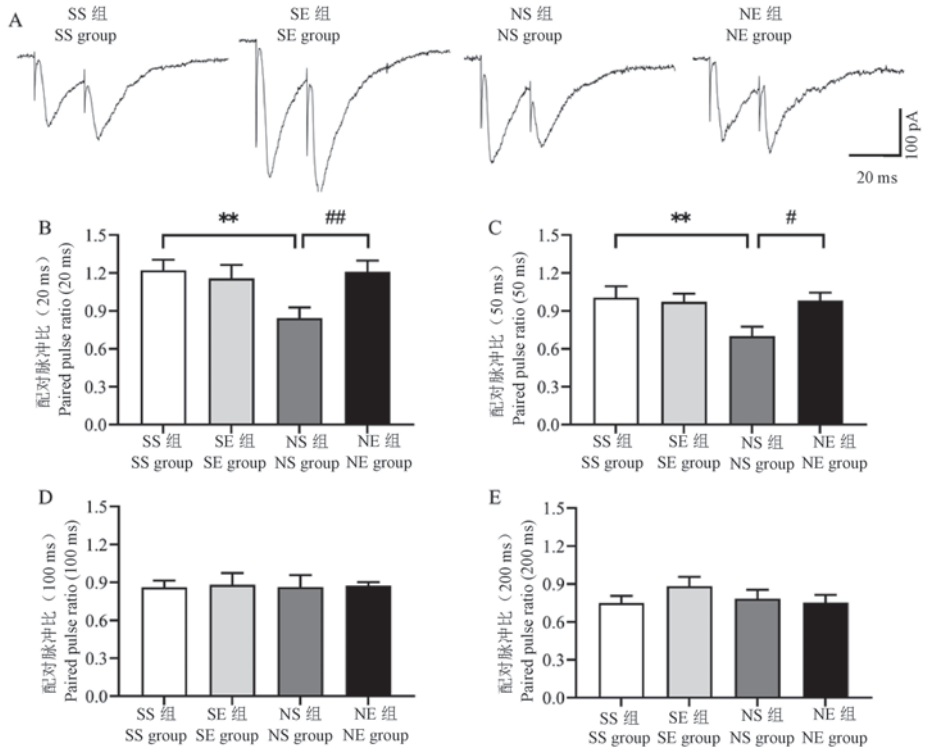


注:A:脑片膜片钳全细胞记录的微小抑制性突触后电流(mIPSC)图;B:各组 mIPSC 频率统计图;C:各组 mIPSC 幅度统计图。

图 4 各组小鼠 VTA 多巴胺神经元 mIPSC

Note. A. Representative mIPSC traces recorded by patch clamp. B. The mean frequency of mIPSC in these four groups. C. The mean amplitude of mIPSC in these four groups.

Figure 4 mIPSC from VTA dopamine neurons of mice in each group



注:A:脑片膜片钳全细胞记录的 IPSC 配对脉冲刺激电流图;B:20 ms 刺激间隔时各组 IPSC PPR 统计图;C:50 ms 刺激间隔时各组 IPSC PPR 统计图;D:100 ms 刺激间隔时各组 IPSC PPR 统计图;E:200 ms 刺激间隔时各组 IPSC PPR 统计图。

图 5 各组小鼠 VTA 多巴胺神经元 IPSC PPR

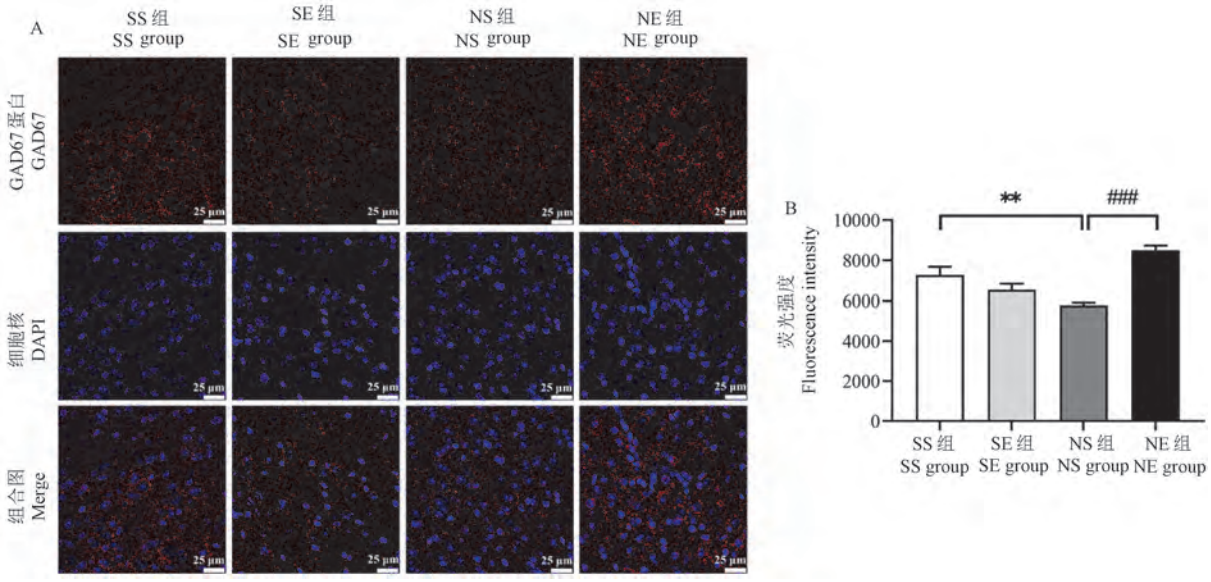
Note. A. Representative IPSC traces at 20 ms interstimulus intervals recorded by patch clamp. B. IPSC PPR at 20 ms interstimulus intervals in these four groups. C. IPSC PPR at 50 ms interstimulus intervals in these four groups. D. IPSC PPR at 100 ms interstimulus intervals in these four groups. E. IPSC PPR at 200 ms interstimulus intervals in these four groups.

Figure 5 IPSC PPR from VTA dopamine neurons of mice in each group

戒断和有氧运动的交互效应显著(20 ms, $P < 0.05$; 50 ms, $P < 0.05$);在 100 ms 和 200 ms 刺激间隔时,尼古丁戒断和有氧运动的交互效应不显著($P > 0.05$)。多重比较结果显示,在 20 ms 和 50 ms 刺激间隔时,同 SS 组相比,NS 组 IPSC PPR 显著降低(20 ms, $P < 0.01$;50 ms, $P < 0.01$);同 NS 组相比,NE 组 IPSC PPR 显著升高(20 ms, $P < 0.01$;50 ms, $P < 0.05$)。其它刺激间隔时各组间 IPSC PPR 均无显著性差异($P > 0.05$,图 5D,5E)。以上结果提示,尼古丁戒断增强 VTA 多巴胺神经元突触前 GABA 释放概率;有氧运动降低尼古丁戒断诱导的 VTA 多巴胺神经元突触前 GABA 释放概率。

2.5　有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA GAD67 表达的影响

VTA GAD67 免疫荧光染色的效果图见图 6A,图中红色荧光为 GAD67 阳性染色,蓝色荧光为细胞核染色。对 VTA 中 GAD67 的荧光强度进行双因素方差分析(图 6B),结果显示尼古丁戒断和有氧运动的交互效应显著($P < 0.001$)。多重比较结果显示,同 SS 组相比,NS 组的荧光强度显著降低($P < 0.01$);同 NS 组相比,NE 组的荧光强度显著升高($P < 0.001$)。以上结果提示,尼古丁戒断下调 VTA GAD67 蛋白表达;有氧运动上调尼古丁戒断小鼠 VTA GAD67 蛋白表达。



注:A:各组小鼠 VTA GAD67 免疫荧光染色图;B:各组小鼠 VTA GAD-67 荧光强度统计图。

图 6　各组小鼠 VTA GAD-67 的表达

Note. A. Immunostaining of GAD67 in VTA. B. Fluorescence intensity of GAD67 in VTA in these four groups.

Figure 6　Expression of GAD67 in VTA of mice in each group

3　讨论

运动干预是一种潜在的治疗和控制成瘾性疾病的新策略,可能发展成为控制成瘾性疾病或毒瘾戒断的独立干预措施或重要辅助方法[20-21],但运动促进成瘾记忆消除、减少复吸的中枢机制远未明了。本研究发现,有氧运动可以减少成瘾模型在戒断期对尼古丁的复吸;有氧运动对尼古丁戒断诱导的 VTA 多巴胺神经元 GABA 能抑制性输入异常具有改善作用,即减少突触前 GABA 释放,下调突触后 $GABA_A$ 受体的数量和/或功能,从而减弱多巴胺神经元接受的抑制性突触传递效能。本研究为运动干预改善成瘾、减少复吸提供了一定的实验依据。

从神经生物学角度来看,成瘾性疾病是一种慢性、高复发性的脑部疾病。戒断后再次复吸是导致成瘾性疾病戒断失败的重要原因,因此减少复吸是治疗成瘾的关键。本研究所使用的 CPP 模型是一种巴甫洛夫条件反射形式,被认为是评价药物精神依赖的简单有效的方法之一[22]。CPP 实验过程中,控制给药与不给药时训练环境的不同,最后在不给药的情况下测试动物是否对给药箱产生偏爱,其对环境的偏爱程度代表动物对药物的渴求与依赖程度。已有文献对不同运动强度和运动方式对药物成瘾复吸渴求度的影响进行了研究。赵琦等[18]的研究发现,中等强度(65% ~ 70%最大心率)和高强度(80% ~ 85%最大心率)运动均能有效降低成瘾

患者的主观渴求度。周跃辉等[23]发现中等强度运动通过上调前额叶皮层 α7 nAChRs 蛋白表达增强尼古丁成瘾大鼠的抑制能力,进而降低尼古丁大鼠的依赖性。Jung 等[24]也发现 2 周中等强度有氧运动改善成瘾模型的行为学变化,其机制与纹状体谷氨酸能突触传递的信号分子表达变化有关。但是信号分子的变化与突触传递的变化并不完全一致,因此以上机制研究并未在功能学层面提供证据。本研究实验结果显示,戒断期 2 周的有氧运动可以减少小鼠对尼古丁箱体的条件性位置偏爱,表明 2 周有氧运动可以减少成瘾模型戒断期对尼古丁的复吸,这一结果与前人的研究一致[25-26]。本研究的结果一方面再次证实运动具有减少复吸、改善成瘾的作用;另一方面也说明 CPP 是研究运动改善成瘾的可靠模型。

GABA 能抑制性输入对 VTA 多巴胺神经元的兴奋性起到重要调控作用[27]。研究发现,VTA 多巴胺神经元接受的 GABA 能突触传递在成瘾形成期和戒断期的变化特征不同。在成瘾的形成期,成瘾物质的暴露以直接或间接的形式减弱 GABA 能输入,从而使多巴胺神经元“去抑制”,表现为兴奋性过度增强。如吗啡通过与阿片受体结合抑制 VTA GABA 能神经元兴奋性,从而增加多巴胺水平[28]。而在戒断期间多巴胺神经元接受的抑制性突触传递又表现为相反的效果,即戒断导致 GABA 能传递增强,从而使得多巴胺分泌减少,最终导致戒断期的负性情绪,触发复吸行为,但这一假设尚缺少充分的功能学证据。Jiang 等[29]最新的研究发现,吗啡戒断导致的负性情绪与奖赏环路功能下调有关;使用电生理学手段发现吗啡戒断使得中央杏仁核(CeA)促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)神经元向 VTA 吗啡奖赏神经元集群的抑制性突触连接增强,而光遗传抑制该神经通路可以缓解戒断模型的药物复吸。本研究发现,尼古丁戒断使 VTA 多巴胺神经元 sIPSC 和 mIPSC 的频率及幅度增加,IPSC PPR 降低,表明尼古丁戒断导致 VTA 多巴胺神经元接受的抑制性传递增强,这种改变涉及突触前与突触后机制,即突触前 GABA 递质释放概率增加、突触后 $GABA_A$ 受体的数量增加和/或功能增强,本研究结果与前人研究结果一致,从功能学的角度再一次证实 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能增强是导致戒断症状的重要机制。

对戒烟人群的研究发现,运动可以减轻戒烟者戒断期间的焦虑等负性情绪,从而减少复吸[20]。动物实验也发现吗啡戒断期进行运动干预可以减轻戒断模型的焦虑程度和压力状态,缓解戒断症状[30]。已有文献表明,运动可以增加多巴胺释放以弥补药物戒断导致的快感缺失,有利于减轻戒断症状[31]。Kami 等[32]的研究发现运动可以增强病理性疼痛大鼠背外侧被盖区和下丘脑外侧区至 VTA 的投射,增强 VTA 多巴胺神经元的兴奋性。Medrano 等[33]的研究发现运动上调 VTA 多巴胺神经元 AMPA/NMDA ratio,增强兴奋性传递效能。但是运动对 VTA 抑制性环路的调节作用目前研究较少。本研究发现,有氧运动降低了由尼古丁戒断引起的小鼠 VTA 多巴胺神经元 GABA 能输入增强;有氧运动导致成瘾模型戒断期 VTA 多巴胺神经元 sIPSC 和 mIPSC 的频率下降、IPSC PPR 比值升高,表明有氧运动降低了突触前动作电位驱动的 GABA 释放(sIPSC 频率降低)和 GABA 随机自发的释放概率(mIPSC 频率降低);同时,有氧运动使 sIPSC 和 mIPSC 的幅度显著下降,表明有氧运动下调了突触后 $GABA_A$ 受体的数量和/或减弱了 $GABA_A$ 受体功能。结合本研究行为学的结果,提示有氧运动降低尼古丁戒断模型 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能可能是有氧运动减少尼古丁复吸的中枢机制之一。但本研究对有氧运动改善 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能只有电生理学的证据,并未阐释运动减少突触前 GABA 释放的分子机制,也未阐明突触后 $GABA_A$ 受体的蛋白表达和亚基组成特征的变化,这是本研究的不足,将在后期研究中进行此方面研究。VTA 多巴胺神经元同时接受来自 VTA 局部 GABA 能输入和外部脑区(伏隔核、腹侧苍白球、吻内侧被盖核等)的 GABA 能输入,不同的 GABA 能投射在药物成瘾形成、戒断等不同阶段的作用机制可能不同,那么运动对多巴胺神经元接受的局部 GABA 输入和外部 GABA 输入是否具有不同调节作用?

GAD67 是 GABA 合成的限速酶,主要位于胞浆中,能反应 VTA 局部 GABA 能神经元 GABA 的合成情况,从而间接反应 VTA 局部的 GABA 能传递情况。本研究发现,尼古丁戒断使 VTA 的 GAD67 表达降低,提示 VTA 局部 GABA 能神经元 GABA 合成减少。结合本研究电生理结果,即尼古丁戒断期间 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能增强,我们推测戒断期 VTA 多巴胺神经元接受的来自外部脑

区的 GABA 输入增强而 VTA 局部的 GABA 输入减弱。尼古丁戒断导致 VTA 局部 GABA 能传递减弱可能和以下两方面原因有关：第一，内源性大麻素介导的负反馈调节。前期研究表明，成瘾物质暴露诱导 VTA 多巴胺神经元过度激活，释放内源性大麻素，与突触前 GABA 神经元上的 CB1 受体结合，激活钾离子通道，直接或间接阻滞钙通道，从而抑制突触前神经元 GABA 的释放[34]，推测这种调节递质释放的突触前机制一直持续至戒断期。第二，神经环路之间的调控。VTA 接受的外部脑区的抑制性输入，如 NAc 和喙内侧被盖核（rostromedial tegmental nucleus，RMTg）等，也和 VTA 局部 GABA 能神经元形成投射关系。戒断使外部脑区的抑制性输入增强，从而抑制 VTA 局部的 GABA 能神经元的递质释放。VTA 局部的 GABA 能神经元兴奋性降低，从而减弱对外侧缰核（lateral habenula，LHb）谷氨酸能神经元的抑制作用，使 LHb 的谷氨酸能神经元兴奋性增强[35]，再通过 LHb→RMTg（tVTA）投射增强 RMTg 的 GABA 能神经元的兴奋性，进而通过 RMTg→VTA 环路抑制 VTA 多巴胺神经元兴奋性[36]，减少多巴胺释放，触发复吸，因此推测 VTA 局部 GABA 能神经元在通过 VTA GABA 神经元→LHb→RMTg→VTA 多巴胺神经元环路降低多巴胺神经元兴奋性过程中起到“正反馈”（图 7），形成恶性循环。Meye 等[37]发现成瘾物质导致 LHb 谷氨酸能神经元兴奋性增强，LHb→RMTg 的兴奋性传递增强。Lyu 等[38]发现使用药理学手段增加 LHb 的 GABA 浓度可以改善帕金森大鼠的抑郁样行为，提示投射至 LHb 的抑制性输入是导致负性情绪的机制之一。以上研究一定程度上支持本文的推测。本研究发现，有氧运动改善尼古丁戒断导致的 VTA GAD67 表达降低，提示有氧运动对上述抑制 VTA 多巴胺神经元的环路具有改善作用。Herrera 等[39]研究发现运动增强大鼠 NAc 的 FosB 表达，提示运动可能增强 NAc 的激活程度，进而增强 NAc 至 VTA GABA 能神经元的传递效能，因此推测本研究中运动增强 VTA GAD67 表达是由于增强了 NAc 等脑区对 VTA GABA 能神经元的抑制性输入所致。结合电生理学的实验结果，我们推测 VTA GABA 合成增加，通过 VTA-LHb-RMTg-VTA 环路增强多巴胺神经元兴奋性，增加多巴胺释放。Kim 等[40]的研究发现应激增强 LHb 的 c-fos 表达，但中等强度的运动并未增强 LHb 的 c-fos 表达，该研究也佐证了本研究的推测，即运动可能抑制 LHb 谷氨酸能神经元的兴奋性，从而缓解负性情绪。综上所述，本研究的结果提示 VTA 多巴胺神经元接受的外部脑区抑制性输入和 VTA 局部的抑制性输入在尼古丁戒断期间变化特征不同，最终共同作用使多巴胺神经元的抑制性传递增强，而运动对此具有改善作用。但本研究使用免疫荧光技术间接反应 VTA 局部 GABA 能传递效能，具有一定局限性，这是本研究的不足，后期将会综合使用神经环路示踪技术、光遗传和电生理技术深入研究运动对戒断模型不同神经环路的调控机制。

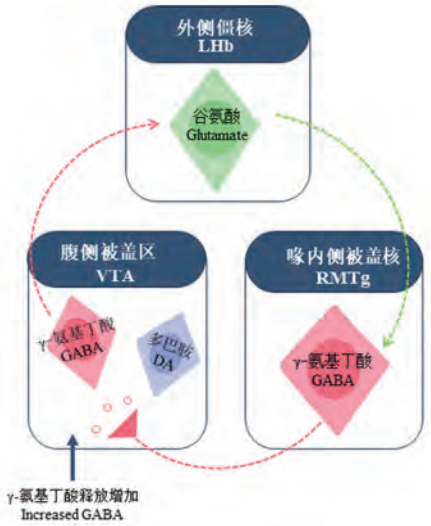


图 7　尼古丁戒断神经环路调控机制假说图

Figure 7　Hypothesis of neural circuits in nicotine withdrawal

4　结论

2 周的中等强度有氧运动减少尼古丁戒断模型 VTA 多巴胺神经元突触前 GABA 释放，下调突触后 $GABA_A$ 受体的数量和/或功能，减弱抑制性突触传递效能，这可能是有氧运动减少复吸的重要机制之一。

参　考　文　献（References）

[1] Gowing LR, Ali RL, Allsop S, et al. Global statistics on addictive behaviours: 2014 status report [J]. Addiction, 2015, 110(6): 904-919.

[2] Picciotto MR, Kenny PJ. Mechanisms of nicotine addiction [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2021, 11(5): a039610.

[3] 欧阳一毅，罗炯，王坤，等. 身体活动对艾滋病强制戒毒人员复吸倾向的影响——内在抑制力、用药渴求的链式中介分析 [J]. 上海体育学院学报，2020，44(10)：48-57，67.
Ouyang YY, Luo J, Wang K, et al. Impact of physical activity on relapse tendency of AIDS patients undergoing compulsory detoxification: a chain mediation analysis of intrinsic restraint and

yearning for drugs [J]. J Shanghai Univ Sport, 2020, 44(10): 48-57, 67.

[4] Wesnes KA, Edgar CJ, Kezic I, et al. Effects of nicotine withdrawal on cognition in a clinical trial setting [J]. Psychopharmacology, 2013, 229(1): 133-140.

[5] Prochaska JJ, Benowitz NL. Current advances in research in treatment and recovery: Nicotine addiction [J]. Sci Adv, 2019, 5(10): eaay9763.

[6] Dong Y, Taylor JR, Wolf ME, et al. Circuit and synaptic plasticity mechanisms of drug relapse [J]. J Neurosci, 2017, 37(45): 10867-10876.

[7] Wise RA, Robble MA. Dopamine and addiction [J]. Annu Rev Psychol, 2020, 71: 79-106.

[8] Zhang L, Dong Y, Doyon WM, et al. Withdrawal from chronic nicotine exposure alters dopamine signaling dynamics in the nucleus accumbens [J]. Biol Psychiatry, 2012, 71(3): 184-191.

[9] Matsui A, Jarvie BC, Robinson BG, et al. Separate GABA afferents to dopamine neurons mediate acute action of opioids, development of tolerance, and expression of withdrawal [J]. Neuron, 2014, 82(6): 1346-1356.

[10] Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction [J]. Neuropsychopharmacology, 2010, 35(1): 217-238.

[11] D'souza MS, Markou A. The stop and go of nicotine dependence: role of GABA and glutamate [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013, 3(6): a012146.

[12] Barrot M. Ineffective VTA disinhibition in protracted opiate withdrawal [J]. Trends Neurosci, 2015, 38(11): 672-673.

[13] Zhang L, Yuan TF. Exercise and substance abuse [J]. Int Rev Neurobiol, 2019, 147: 269-280.

[14] Goekint M, Bos I, Heyman E, et al. Acute running stimulates hippocampal dopaminergic neurotransmission in rats, but has no influence on brain-derived neurotrophic factor [J]. J Appl Physiol (1985), 2012, 112(4): 535-541.

[15] 鲁春霞, 东伟新, 郑澜, 等. 运动干预激活免疫应激和多巴胺水平对苯丙胺类药物成瘾强制隔离戒毒人员心理健康的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2019, 38(9): 762-770.
Lu CX, Dong WX, Zheng L, et al. Effects of activation of immune stress and dopamine level by exercise intervention on the mental health of amphetamines addicts compulsively isolated for rehabilitation [J]. Chin J Sports Med, 2019, 38(9): 762-770.

[16] Henderson BJ, Wall TR, Henley BM, et al. Menthol enhances nicotine reward-related behavior by potentiating nicotine-induced changes in nAChR function, nAChR upregulation, and DA neuron excitability [J]. Neuropsychopharmacology, 2017, 42(12): 2285-2291.

[17] 李翠, 李岩, 赵丽. 有氧运动对 APP/PS1/tau 小鼠海马 gamma 振荡的影响 [J]. 北京体育大学学报, 2018, 41(11): 62-68.
Li C, Li Y, Zhao L. Effect of aerobic exercise on gamma oscillation in APP/PS1/tau mice [J]. J Beijing Sport Univ, 2018, 41(11): 62-68.

[18] 赵琦, 刘佳宁, 陆颖之, 等. 长期有氧运动改善甲基苯丙胺成瘾者对毒品的渴求——来自 alpha 波的证据 [J]. 中国运动医学杂志, 2020, 39(10): 804-809.
Zhao Q, Liu JN, Lu YZ, et al. Effects of long-term aerobic exercise on drug craving of methamphetamine addicts-evidence from alpha wave [J]. Chin J Sports Med, 2020, 39(10): 804-809.

[19] Liu X, Liu Y, Zhong P, et al. CaMKII activity in the ventral tegmental area gates cocaine-induced synaptic plasticity in the nucleus accumbens [J]. Neuropsychopharmacology, 2014, 39(4): 989-999.

[20] 冯俊鹏, 严翊, 路瑛丽, 等. 运动戒毒研究进展 [J]. 中国体育科技, 2019, 55(11): 3-11.
Feng JP, Yan Y, Lu YL, et al. Progress in research of exercise intervention for drug detoxification [J]. Chin Sport Sci Technol, 2019, 55(11): 3-11.

[21] 冯连世, 张雷, 冯俊鹏. 运动戒毒的中国经验:实践与理论 [J]. 中国体育科技, 2021, 57(6): 3-7.
Feng LS, Zhang L, Feng JP. Chinese experience in exercise intervention for drug detoxification: practice and theory [J]. Chin Sport Sci Technol, 2021, 57(6): 3-7.

[22] Sjulson L, Peyrache A, Cumpelik A, et al. Cocaine place conditioning strengthens location-specific hippocampal coupling to the nucleus accumbens [J]. Neuron, 2018, 98(5): 926-934.

[23] 周跃辉, 周成林, 李翠翠. 运动对尼古丁戒断大鼠抑制能力的影响及机制 [J]. 体育科学, 2016, 36(2): 58-65, 71.
Zhou YH, Zhou CL, Li CC. Effect of exercise on inhibition ability during nicotine abstinence period in rat and its mechanism [J]. Chin Sport Sci, 2016, 36(2): 58-65, 71.

[24] Jung S, Kim Y, Kim M, et al. Exercise pills for drug addiction: forced moderate endurance exercise inhibits methamphetamine-induced hyperactivity through the striatal glutamatergic signaling pathway in male sprague dawley rats [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8203.

[25] Sanchez V, Moore CF, Brunzell DH, et al. Effect of wheel-running during abstinence on subsequent nicotine-seeking in rats [J]. Psychopharmacology, 2013, 227(3): 403-411.

[26] Lynch WJ, Piehl KB, Acosta G, et al. Aerobic exercise attenuates reinstatement of cocaine-seeking behavior and associated neuroadaptations in the prefrontal cortex [J]. Biol Psychiatry, 2010, 68(8): 774-777.

[27] van Zessen R, Phillips JL, Budygin EA, et al. Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption [J]. Neuron, 2012, 73(6): 1184-1194.

[28] Jalabert M, Bourdy R, Courtin J, et al. Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(39): 16446-16450.

[29] Jiang C, Yang X, He G, et al. $CRH^{CeA\rightarrow VTA}$ inputs inhibit the positive ensembles to induce negative effect of opiate withdrawal [J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(11): 6170-6186.

[30] Miladi-Gorji H, Rashidy-Pour A, Fathollahi Y. Anxiety profile

in morphine-dependent and withdrawn rats: effect of voluntary exercise [J]. Physiol Behav, 2012, 105(2): 195-202.

[31] Costa KG, Cabral DA, Hohl R, et al. Rewiring the addicted brain through a psychobiological model of physical exercise [J]. Front Psychiatry, 2019, 10: 600.

[32] Kami K, Tajima F, Senba E. Activation of mesolimbic reward system via laterodorsal tegmental nucleus and hypothalamus in exercise-induced hypoalgesia [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 11540.

[33] Medrano MC, Hurel I, Mesguich E, et al. Exercise craving potentiates excitatory inputs to ventral tegmental area dopaminergic neurons [J]. Addict Biol, 2021, 26(3): e12967.

[34] Fattore L, Melis M, Fadda P, et al. The endocannabinoid system and nondrug rewarding behaviours [J]. Exp Neurol, 2010, 224(1): 23-36.

[35] Taylor SR, Badurek S, Dileone RJ, et al. GABAergic and glutamatergic efferents of the mouse ventral tegmental area [J]. J Comp Neurol, 2014, 522(14): 3308-3334.

[36] Yetnikoff L, Cheng AY, Lavezzi HN, et al. Sources of input to the rostromedial tegmental nucleus, ventral tegmental area, and lateral habenula compared: a study in rat [J]. J Comp Neurol, 2015, 523(16): 2426-2456.

[37] Meye FJ, Valentinova K, Lecca S, et al. Cocaine-evoked negative symptoms require AMPA receptor trafficking in the lateral habenula [J]. Nat Neurosci, 2015, 18(3): 376-378.

[38] Lyu S, Guo Y, Zhang L, et al. Blockade of GABA transporter-1 and GABA transporter-3 in the lateral habenula improves depressive-like behaviors in a rat model of Parkinson's disease [J]. Neuropharmacology, 2020, 181: 108369.

[39] Herrera JJ, Fedynska S, Ghasem PR, et al. Neurochemical and behavioural indices of exercise reward are independent of exercise controllability [J]. Eur J Neurosci, 2016, 43(9): 1190-1202.

[40] Kim TK, Han PL. Chronic stress and moderate physical exercise prompt widespread common activation and limited differential activation in specific brain regions [J]. Neurochem Int, 2016, 99: 252-261.

[收稿日期] 2022-02-15

《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》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://zgsydw.cnjournals.com/

期待您的来稿!

段爽,朱瑛,赵茹茹,等. 复合感染脓毒症大鼠模型的构建和评价［J］. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1034-1041.
Duan S, Zhu Y, Zhao RR, et al. Construction and evaluation of rat models of multiple-infection sepsis［J］. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1034-1041.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.003

复合感染脓毒症大鼠模型的构建和评价

段爽[1],朱瑛[1],赵茹茹[1],侯媛璐[1],李明泓[1,3],林青[2,3],李奇峰[1,3*]

(1. 云南中医药大学基础医学院,昆明 650500;2. 云南中医药大学药理教研室,昆明 650500;
3. 云南省高校中医治法与中药药效关系研究科技创新团队,昆明 650500)

【摘要】 目的 着力于解决盲肠穿刺结扎(CLP)模型因水肿肠道封堵结扎穿刺部位随机影响模型动物感染进程的问题,探索通过复合感染支架整合盲肠结扎穿刺法和植入带菌物法,建立感染可持续的脓毒症动物模型。**方法** 将 54 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组,n = 18)、盲肠穿刺结扎组(CLP 组,n = 18)、复合感染脓毒症模型组(MIM 组,n = 18),其中每组 10 只用于考察各组动物一般生存状态、盲肠结扎部位封堵情况和生存率;每组另 8 只用于考察各组脓毒症损伤指标。采用 HE 染色观察大鼠心脏、肝、肺、肾组织病理形态改变;取腹主动脉血检测脂多糖(LPS)、白介素-6(IL-6)、心肌钙蛋白-Ⅰ(cTn-I)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)、乳酸(Lac)和肌酐(Cr)含量;取肝组织检测丙二醛(MDA)和腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)含量。**结果** 造模 96 h 后,Sham 组大鼠无死亡,CLP 组大鼠生存率 70%,MIM 组生存率 0%;MIM 组心脏、肝、肺、肾组织损伤程度较 CLP 模型组更为严重;MIM 组分别与 Sham 组和 CLP 组比,LPS、IL-6、cTn-I、ALT、AST、TBil、Cr、Lac、MDA 含量最高,ATP 含量最低,均具有显著性差异(P < 0.05);MIM 组 LPS、IL-6、TBil、MDA 等指标的变异系数较 CLP 组明显更小。**结论** MIM 组可使肠内容物不断渗漏引发持续感染,反应感染和炎症的关键指标(LPS、IL-6、MDA 等)变异性远低于 CLP 组,病程进展更为一致,其模型的结构效度更好;MIM 组较 CLP 组,术后感染表现更为剧烈、器官损伤程度更深、而死亡率更高且组内死亡时间更为均一,其模型的表面效度更好,因而更符合严重感染导致机体过度反应而产生脓毒症 MODS 的临床实际。

【关键词】 脓毒症;多器官功能障碍综合征;复合感染模型;盲肠结扎穿刺
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847 (2022) 08-1034-08

Construction and evaluation of rat models of multiple-infection sepsis

DUAN Shuang[1], ZHU Ying[1], ZHAO Ruru[1], HOU Yuanlu[1], LI Minghong[1,3], LIN Qing[2,3], LI Qifeng[1,3*]

(1. Department of Basic Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China. 2. Department of Pharmacology, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500. 3. Yunnan Provincial University Traditional Chinese Medicine Treatment and Traditional Chinese Medicine Efficacy Relationship Research Scientific and Technological Innovation Team, Kunming 650500)
Corresponding author: LI Qifeng. E-mail: 375487824@qq.com

【Abstract】 Objective We focused on solving a problem in the infection course of cecum ligation and puncture (CLP) septic model animals, i.e., the random occlusion of ligation and puncture sites due to bowel edema. To establish a septic animal model with a sustainable infection, we combined cecal ligation puncture and bacterial carrier implantation

[**基金项目**]国家自然科学基金(81960815),云南省科学技术厅联合专项(202001A2070001-032),云南中医药大学南药可持续利用研究重点实验室(202105AG070012XS2245)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China (81960815), Joint Special Project of Yunnan Provincial Department of Science and Technology(202001A2070001-032), Key Laboratory of Sustainable Utilization of Southern Medicine of Yunnan University of Chinese Medicine (202105AG070012XS2245).
[**作者简介**]段爽(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治疾病作用机制研究。Email:944765534@qq.com
[**通信作者**]李奇峰(1977—),男,硕士,副教授,研究方向:中西医临床基础。Email:375487824@qq.com

with a compound infection stent. **Methods** Fifty-four male SD rats were randomly divided into three groups: Sham (n = 18), CLP (n = 18), and multiple infect model (MIM, n = 18) groups. In each group, 10 rats were investigated for their survival status, intra-abdominal infection, and survival rate. Another 8 rats were selected for studying related indicators of sepsis multiple organ dysfunction syndrome (MODS) injury. The detected indicators included LPS, IL-6, cTn-I, ALT, AST, TBil, Lac, and Cr abdominal aortic blood contents; MDA and ATP liver tissue contents, and HE staining of pathological changes in heart, liver, lung, and kidney tissue. **Results** 96 h after molding operation, there were no deaths in the Sham group, and survival rates in the CLP and MIM groups were 70% and 0%, respectively. The degrees of injury in the heart, liver, lungs, and kidneys in the MIM group were greater than those in the CLP model group. Compared with the Sham and CLP groups, the MIM group had the highest contents of LPS, IL-6, cTn-I, ALT, AST, TBil, Cr, Lac, and MDA and the lowest of ATP, all of which were significantly different ($P < 0.05$). The coefficients of variation for LPS, IL-6, TBil, and MDA in the MIM group were significantly decreased in relation to those of the CLP group. **Conclusions** The MIM group's intestinal contents leaked continuously to cause persistent infection, which result ed in much lower variability in key infection and inflammation indicators (LPS, IL-6, MDA, etc.) and a more consistent course of disease than in the CLP group. Thus, the structural validity of the MIM model was better. Compared with the CLP group, the MIM group had more severe postoperative infections, deeper organ damage, higher mortality, more consistent within-group death times, and thus had greater face validity. Therefore, the MIM model best fits with the clinical profile of septic-MODS, which is caused by an over-reaction to severe infection.

【**Keywords**】 sepsis; multiple-organ dysfunction syndrome; multiple-infection model; cecum ligation puncture

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

脓毒症是由于严重感染引起机体过度反应而出现危机生命的多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)[1-2]。这一定义凸显了感染是脓毒症的明确诱因,而 MODS 是脓毒症的重要病理特征,也是脓毒症不良结局的决定性因素。由于缺乏有效治疗药物,仅我国严重脓毒症患者病死率高达 50%,每年的医疗费约为 46 亿美元[3-5],由此造成沉重经济和社会负担。缺乏稳定、贴近临床的动物模型,使脓毒症病理生理学和相关药物研究受到较大限制[6-7]。历经数十年的脓毒症药物研发,均以失败告终。因此,建立稳定能够高度模拟人类脓毒症病理生理过程的脓毒症动物模型对脓毒症研究至关重要。目前盲肠结扎穿刺(cecum ligation and puncture, CLP)动物模型是脓毒症研究的经典模型,因具有血流动力学、代谢过程、炎症反应阶段等与人类脓毒症类似的临床表现。然而,良好的脓毒症动物模型除需模拟人类脓毒症的临床表现,还需能够模拟人类脓毒症的病程发展。但实践中发现,经典 CLP 模型脓毒症大鼠由感染造成肠道水肿并封堵盲肠穿刺结扎部位,此过程会受到诸多因素的影响并随机发生,导致部分模型动物的感染过程延缓或终止,进而造成相同造模条件下的模型动物差异性大的结果[8-11]。此外,考察药物对脓毒症的影响,如不能排除 CLP 模型肠道随机封堵穿刺结扎部位的问题,就很难确认药物的实际效用。据此,本研究以 CLP 模型为基础,着力解决 CLP 模型因水肿肠道封堵结扎穿刺部位随机影响模型动物感染进程的问题,探索通过复合感染支架整合盲肠结扎穿刺法和植入带菌物法,建立感染可持续的脓毒症动物模型,即复合感染脓毒症模型(multiple infect model, MIM)。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

54 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重(230 ± 20) g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】,于采光通风良好,温度 20 ~ 26℃,相对湿度 42% ~ 62%的室内适应性饲养 6 d 后进行实验,饲养于云南中医药大学实验动物部【SYXK(滇)K2017-0005】。随机分为假手术组(Sham 组)、盲肠穿刺结扎组(CLP 组)、复合感染模型组(MIM 组)每组各 18 只,以上各组再随机分为生存率组每组 10 只和实验组每组 8 只。研究流程均符合云南中医药大学实验动物伦理委员会要求(R-062021135)。

1.1.2　主要试剂与仪器

10%鼠粪混悬液(10 g 大鼠新鲜粪便 + 0.02 g 连二亚硫酸钠+90 mL 生理盐水,600 r/min 离心 10 min,取上清,-20℃冰箱冷冻保存备用)。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)试剂盒(泉州睿信,20210720);白介素-6(interleukin6, IL-6)试剂盒(泉州睿信,20210809);乳酸(lactic acid, Lac)试剂盒(南京建成,20210707);丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(南京建成,20210524);天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(南京建成,20210518);心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponinI, cTn-I)试剂盒(Elabscience,20210806);肌酐(creatinine, Cr)试剂盒(南京建成,20210708);总胆红素(total bilirubin, TBil)试剂盒(南京建成,20210730);丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成,20210702);腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)试剂盒(碧云天,012521210621);抗凝剂(康卫仕,20201012)。

冰冻切片机*/MEV(莱比信,中国);包埋仪 1100 mm × 500 mm × 380 mm/YD-6L(益迪医疗,中国);玻片扫描影像系统 TeksqraySQS-1000(eksqray,中国);多功能酶标仪 InfiniteM200PR0(TECAN,瑞士)。

1.1.3 主要器材和设备

复合感染支架(自制参见图 1),通过复合感染支架整合盲肠结扎穿刺法和植入带菌物法。盲肠穿刺部位固定于支架通孔一侧,辅助以通孔处呈均匀分布的突起,二者协同可阻碍水肿肠道封堵盲肠结扎穿刺部位;其次通过向固定在支架上的棉球滴加粪便提取液,干扰远端水肿肠道对盲肠结扎部位的封堵。最终达到建立稳定而可持续感染的脓毒症动物模型的目的。

1.2 方法

1.2.1 模型制作

术前 14 h 禁食不禁水。麻醉满意后腹部中下

图 1 复合感染支架图

Figure 1 Multiple infect model stent diagram

部铺放洞巾,75%乙醇消毒,从尿道口上 1 cm 处沿腹中线切开约 2.5 cm 纵行切口,用钝性无菌解剖镊探查腹腔,暴露盲肠,避开血管分离肠系膜,距盲肠末端 1 cm 处用 3/0 型号手术缝合线结扎,将结扎部固定于复合感染模型支架中心部位,然后轻提起结扎盲肠,用 21 G 针在结扎部位从上向下螺旋状穿刺三针六孔,每针旋转 30°,两针之间上下间隔约 3 mm。穿刺盲肠挤出少量粪便,用消毒签擦去挤出的粪便。在复合感染支架预先固定的两个 0.03 g 棉花上各滴加 10%鼠粪混悬液 0.3 mL。轻提腹腔切口,将复合感染支架放入腹腔并尽量至于腹腔底部。最后逐层缝合切口。将术后大鼠置于笼中直至麻醉苏醒,正常饲养。所有动物手术在 20 min 内完成,保持一致性。CLP 组:不安放复合感染支架和滴加鼠粪混悬液,其余同 MIM 组。Sham 组:仅暴露盲肠,其余同 MIM 组。操作过程如图 2 所示。

1.2.2 生存率实验

每隔 2 h 观察,连续观察 96 h 各组大鼠是否出现嗜睡、少动、竖毛、蜷缩、食欲减退;眼睛和口鼻是否有分泌物;上述症状是否随时间发展症状加剧;死前是否出现颤抖、全身僵化、呼吸不畅;动物开腹

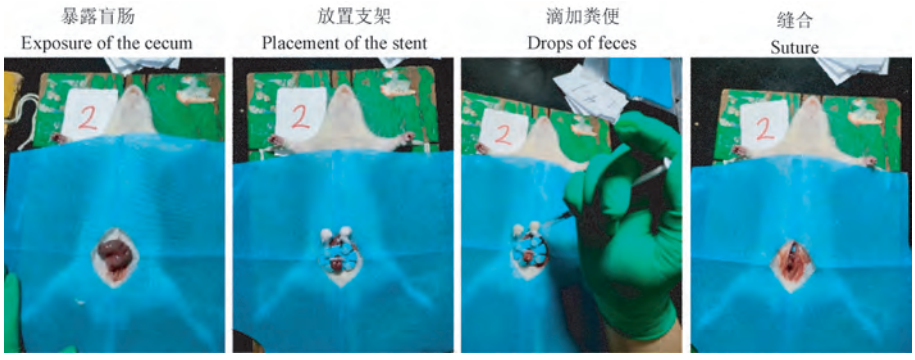


图 2 建立复合感染模型步骤

Figure 2 Steps to establish a multiple infection model

后检查盲肠结扎穿刺部位封堵情况,观察是否有混浊渗出液,肠道肿胀粘连程度,脏器是否有瘀血。记录各组大鼠死亡时间。

1.2.3　炎症和 MODS 损伤指标检测

生存率实验中 MIM 组大鼠在术后 17.5 h 首先出现死亡,因此大鼠统一在 17.5 h 麻醉腹主动脉取血,用枸橼酸钠抗凝,经 2500 r/mim 离心 10 min 后血浆样本按照说明书检测 LPS、IL-6、MDA、Lac、ALT、AST、cTn-I、Cr、TBil、ATP 的含量。取肝组织测定 MDA 和 ATP 含量。

1.2.4　HE 染色形态学检查

取新鲜的脏器组织置于 4%多聚甲醛中固定,依次进行 HE 染色步骤后通过玻片扫描保存分析结果。

1.3　统计学分析

收集并整理数据,以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 SPSS 26.0 进行数据统计分析,使用 Graph Pad Prism 8.0.1 进行图像制作。组间比较采用方差分析,生存研究采用 log-rank 检验。统计标准为:$P < 0.05$ 有统计学意义,$P < 0.01$ 具有显著性差异,$P < 0.001$ 极具显著性差异。

2　结果

2.1　一般情况

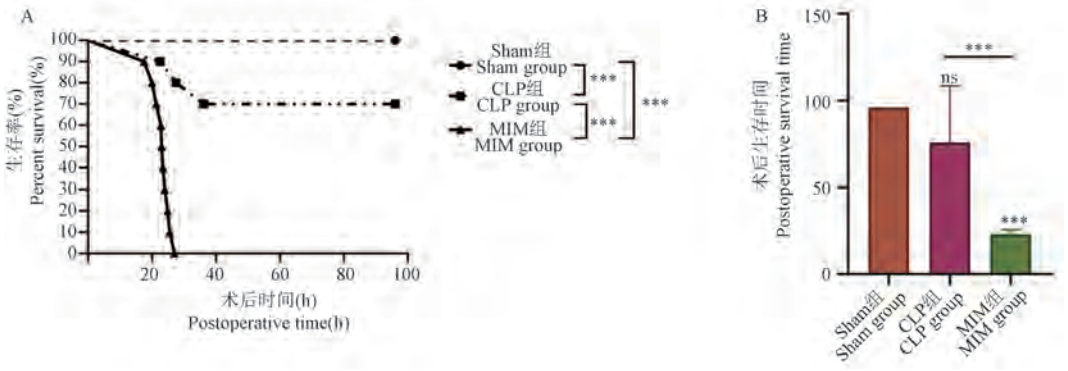
Sham 组:所有大鼠术后 4 h 左右全部麻醉苏醒,醒后能自由活动、正常进食饮水、没有嗜睡及蜷缩状态,受刺激后有规避动作、行动速度稍慢、眼角和鼻尖没有分泌物,无明显不良症状。术后 12 h 左右已经有 9 只大鼠运动速度恢复正常。96 h 解剖未发现腹腔渗出液、肠管扩张和脏器肉眼观察无明显损伤。

CLP 组:所有大鼠术后 4 h 左右全部麻醉苏醒,12 h 左右所有大鼠开始出现嗜睡、进食减少、精神状态不佳、行动缓慢、蜷缩抱团、鼻尖有少量分泌物、尿量减少。22 h 后 3 只大鼠开始出现寒战、呼吸困难、死亡。36 h 后存活大鼠症状逐步改善。死亡大鼠解剖可见:盲肠结扎部位未能完全封堵,穿刺针孔明显,盲肠结扎部位呈暗红色,腹腔有浑浊腹水,肠道粘连,空肠充气。心脏、肝、肺等脏器瘀血明显。而存活大鼠 96 h 解剖可见盲肠结扎部位被水肿肠道严密封堵,盲肠结扎部位与周围肠道较难分离,盲肠末端变灰绿色。腹腔有较少或无清澈腹水,肠道肿胀粘连程度较死亡鼠大幅减轻,心脏、肝、肺和肾未见瘀血。

MIM 组:所有大鼠术后 4 h 左右全部麻醉苏醒,8 h 后所有大鼠开始出现嗜睡、无进食、精神状态不佳、行动缓慢、蜷缩抱团、竖毛、鼻尖有分泌物、尿量减少;大约 12 h 后症状逐步显著,眼角出现红色分泌物,腹胀明显。16 h 后陆续有大鼠出现明显寒战和呼吸困难、有濒死感。27 h 后全部死亡。打开腹腔可见盲肠结扎部位盲肠结扎部位未被完全包裹,穿刺针孔明显,盲肠结扎部位呈暗红色,腹腔有浑浊或血性腹水,肠道粘连,空肠充气。心脏、肝、肺、肾等多个脏器瘀血明显。

2.2　生存率实验结果

观察改良 CLP 模型造模 96 h 期间大鼠生存状况并记录死亡时间(见图 3)。术后 96 h,Sham 组大鼠生存率 100%,CLP 组大鼠生存率 70%,术后 22.5 h,CLP 组首只大鼠出现死亡,其中 3 只死



注:与假手术组及 MIM 组相比,$^{***}P < 0.001$。

图 3　造模后各组生存曲线及死亡时间柱状图($n = 10$)

Note. Compared with the Sham group and the MIM group, $^{***}P < 0.001$.

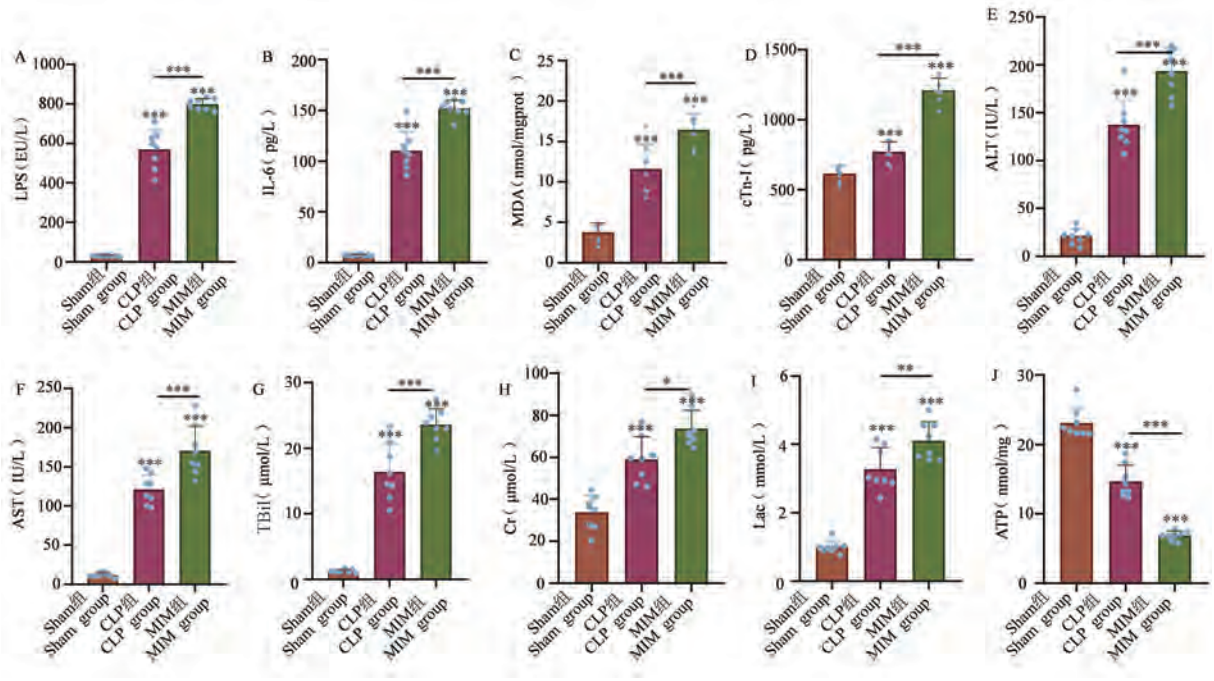
Figure 3　Survival curve and death time histogram of each group after molding($n = 10$)

亡时间集中在(29 ± 7)h 期间,其余存活。MIM 组生存率 0%,术后 17.5 h MIM 组首只大鼠出现死亡,死亡时间集中在(22 ± 5)h 期间。从死亡时间柱状图可知,与 Sham 组相比,CLP 组无统计学意义($P > 0.05$),而 MIM 组统计意义极显著($P < 0.001$)。大鼠生存时间与放置复合感染支架密切相关。

2.3 血清中炎症指标和器官损伤指标变化

通过前期生存率实验结果,对造模 17.5 h 后大鼠进行 LPS、IL-6、MDA、cTn-I、ALT、AST、TBil、Cr、Lac 和 ATP 指标检测。组间比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结果知:LPS、IL-6、MDA、cTn-I、ALT、AST、TBil、Cr 和 Lac 的含量 Sham 组较低,CLP 组和 MIM 组显著升高,MIM 组最高。ATP 含量 Sham 组最高,而 CLP 组和 MIM 组显著降低,MIM 组最低(见图 4)。

从各组变异系数对比表可看出,MIM 组内反映感染与炎症的模型关键指标(LPS、IL-6、MDA)变异性远低于 CLP 组,且大部分指标变异性均较 CLP 组更小(见表 1)。



注:A:各组 LPS 含量的比较;B:各组 IL-6 含量的比较;C:各组 MDA 含量的比较;D:各组 cTn-I 含量的比较;E:各组 ALT 含量的比较;F:各组 AST 含量的比较;G:各组 TBil 含量的比较;H:各组 Cr 含量的比较;I:各组 Lac 含量的比较;J:各组 ATP 含量的比较;与假手术组和 MIM 组相比,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$,$^{***}P < 0.001$。

图 4 造模 17.5 h 后各组指标的变化水平($n = 8$)

Note. A. Comparison of LPS content between groups. B. Comparison of IL-6 content between groups. C. Comparison of MDA content between groups. D. Comparison of cTn-I content between groups. E. Comparison of ALT content between groups. F. Comparison of AST content between groups. G. Comparison of TBil content between groups. H. Comparison of Cr content between groups. I. Comparison of Lac content between groups. J. Comparison of ATP content between groups. Compared with the Sham group and the MIM group. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

Figure 4 Level of change of indicators in each group after 17.5 h of molding($n = 8$)

表 1 造模 17.5 h 后各组变异系数对比表($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison table of coefficients of variation of each group after 17.5 h of mold making($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	LPS (EU/L)	IL-6 (pg/L)	MDA (nmol/mgprot)	cTn-I (pg/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBil (μmol/L)	Cr (μmol/L)	Lac (mmol/L)	ATP (nmol/L)
Sham 组 Sham group	0.111	0.074	0.277	0.080	0.361	0.229	0.187	0.222	0.182	0.088
CLP 组 CLP group	0.159	0.162	0.241	0.084	0.177	0.143	0.292	0.184	0.178	0.156
MIM 组 MIM group	0.032	0.048	0.111	0.066	0.115	0.176	0.095	0.111	0.127	0.091

2.4　大鼠 HE 染色观察脏器组织病理学结果

心脏：Sham 组无炎性细胞浸润，心肌细胞排列整齐，心肌纤维结构完整无断裂，心肌横纹清晰，血管结构完整，无扩张及充血；CLP 组有炎性细胞浸润，心肌细胞排列紊乱，心肌横纹模糊，细胞质空泡化增加，部分区域出现间质水肿，毛细血管扩张；MIM 组可见大量炎性细胞浸润，心肌纤维变性、坏死、心肌横纹几乎消失，可见细胞核固缩或溶解，毛细血管明显扩张充血，周围有红细胞渗出，部分区域呈凝固型坏死改变。

肝：Sham 组汇管区未见炎症性细胞浸润，肝小叶和肝细胞形态正常；CLP 组有炎性细胞浸润，肝窦扩张，肝细胞水肿，细胞核肿胀，气球样变性明显；MIM 组有大量炎性细胞浸润，细胞边界不清，细胞广泛水肿，部分细胞出现凋亡小体，细胞核碎裂、溶解，中央汇管区可见肝细胞出血性坏死。肝窦扩张，肝索结构紊乱，肝小叶结构不清，可见大量红细胞渗出。

肺：Sham 组未见明显炎性细胞浸润，肺组织平整无皱褶，结构正常，肺泡结构清晰，肺泡壁薄；CLP 组出现炎性细胞浸润，部分肺泡壁结构破坏，肺泡周围血管腔扩张，肺泡扩张融合，肺泡数目变少且变大，纤维间隔增厚；MIM 组出现大量炎性细胞浸润，肺泡壁明显增厚，肺间隔明显增厚，肺泡塌陷，部分肺泡腔及呼吸性支气管内出血，毛细血管变少且畸形，大量红细胞渗出。

肾：Sham 组未见明显炎性细胞浸润，肾小球结构正常，肾小管管腔完整齐；CLP 组可见肾皮质及间质有大量炎性细胞浸润，并可见肾小球萎缩、肾小管上皮细胞水肿、空泡变性；MIM 组出可见大量炎性细胞浸润，肾小球及基底膜萎缩、球囊间隙明显增宽，肾小球毛细血管扩张及充血，大量红细胞外渗出，上皮细胞水肿，空泡变性。肾小管壁增厚、血管腔接近闭塞。远曲小管及收集管内可见红细胞（见图 5）。

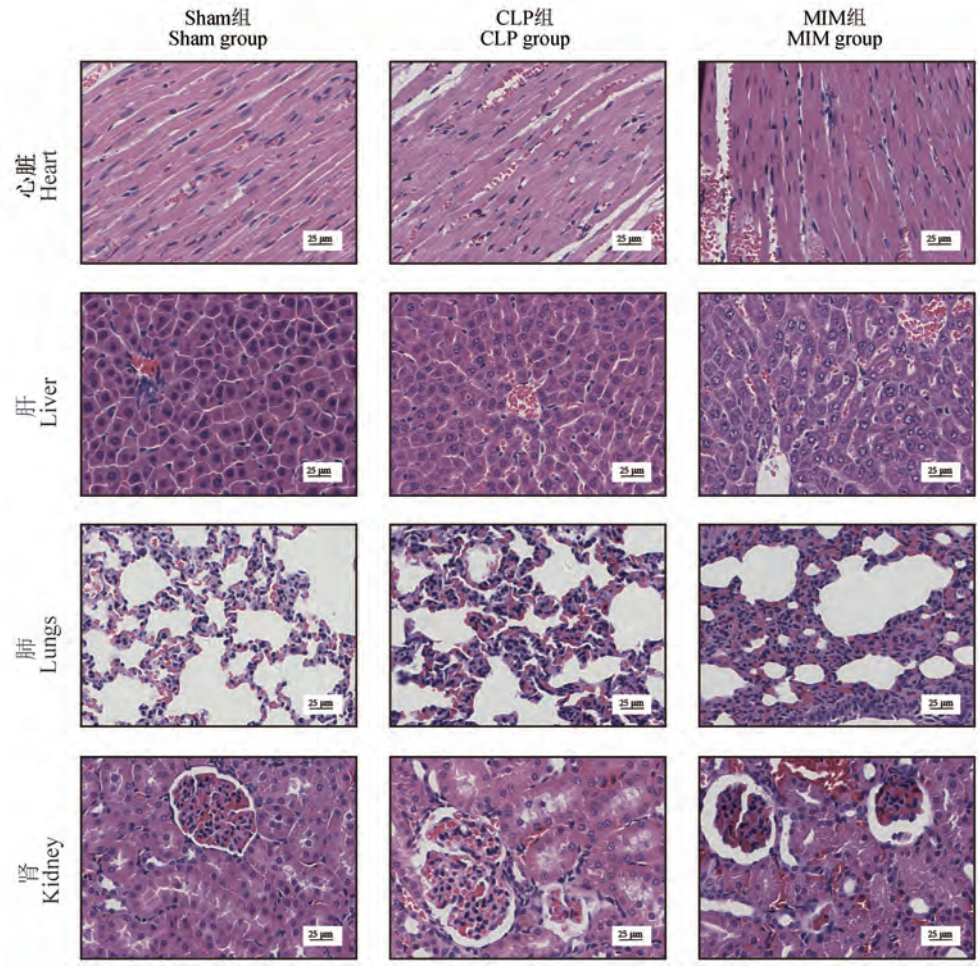


图 5　造模 17.5 h 后脏器组织 HE 染色结果（n = 8）

Figure 5　HE staining results of posterior organ tissues 17.5 h after molding（n = 8）

3 讨论

脓毒症是宿主对感染功能失调反应引起的危急生命的多器官功能障碍综合征[1],是当代重症医学研究的焦点和难点。建立稳定且可较好模拟脓毒症临床复杂病理生理过程的动物模型,无疑是脓毒症病理生理机制研究和治疗药物筛选的基础。

注射内毒素和植入活菌培养物脓毒症模型可控制感染剂量,稳定性和重复性好。但二者仅是对实验动物的急性一次性打击,无法模拟临床患者存在的感染灶持续性地释放病菌和内毒素过程。此外基于注射内毒素模型开发的药物在临床上并未显示出有益效果,这提示模型与临床有较大差距。CLP 模型通过盲肠结扎穿刺,破坏肠道屏障,引起肠内菌群持续性释放,模型动物病情不断发展,具有更好的临床相关性[12-13]。但实际操作中如果盲肠结扎部位稍长、穿刺针孔过大、过多,容易导致动物死于急性损伤,与感染导致机体过度反应的本质不符;而如果结扎部位稍短、穿刺较少,又容易出现水肿肠道随机封堵盲肠结扎穿刺部位,表现为:(1)有的动物不能有效封堵盲肠结扎穿刺部位,病情不断发展至死亡;(2)有的动物部分封堵减少一定肠道菌群释放,生存周期大幅延长;(3)有的动物全面有效封堵,病情不再发展长久存活。由此造成模型动物组间变异性大,进而干扰脓毒症机制研究和药物效果评价。针对 CLP 模型的弊端,有学者做出积极有益的探索[14],如通过静脉采血针套管呈“十”字型固定于盲肠结扎穿刺部位,以阻碍水肿肠道对盲肠结扎穿刺部位的封堵,并能造成较 CLP 模型更为严重的炎症反应和多器官功能障碍。但笔者重复该模型发现,该模型仍不能完全避免结扎盲肠被封堵问题,且模型动物死亡时间不均一,模型动物有相当的存活率。

本实验着力解决 CLP 模型水肿肠道封堵盲肠结扎部位影响感染进程这一核心问题通过在复合感染支架头部棉球滴加鼠粪混悬液,干扰肠道对盲肠结扎部位的封堵;通过植入复合感染支架可物理隔绝水肿的肠道对盲肠结扎穿刺部位封堵;最后通过螺旋均匀的穿刺方法能够在发生封堵的情况下,肠道也很难对盲肠结扎部位完全封堵。实现 MIM 模型能够始终存在持续感染源的目的。本模型亦可手术切除结扎盲肠,将包裹特定细菌的膜性小囊穿刺后固定于复合感染支架中心孔上,在棉球上滴加同种细菌,进而开展特定细菌导致脓毒症发展的机制研究,如革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌致脓毒症差异研究。这是传统 CLP 模型不易实现的。

判断动物模型有效性可从结构效度和表面效度两方面评价,结构效度是理论基础。临床上脓毒症患者一般体内存在感染病灶,感染灶持续性地释放病菌和内毒素,从而引起炎症反应、氧化应激、内皮损伤、循环状态改变、能量代谢低下和器官功能障碍等病理生理改变[15-17],伴有剧烈炎症反应和严重器官损伤症状[18-20]。本模型实验动物为 SPF 级大鼠,其同批大鼠本身无明显感染与炎症,因此 MIM 模型鼠的 LPS、IL-6、MDA 等指标的组内变异系数较小可直接反映该模型的感染与炎症进程更为一致。此外 LPS、IL-6、MDA 指标反映 MIM 模型较 CLP 模型感染、炎症反应更为强烈;cTn-I、AST、ALT、TBil、Cr、Lac 和 ATP 等指标说明 MIM 模型较 CLP 模型更能造成心脏、肝、肾多器官功能障碍[21-23],并伴随能量代谢低下。HE 染色结果也表明造成严重的器官损伤。因此 MIM 模型的结构效度更好。表面效度是动物模型表现症状与人类自然发展的相似性。临床脓毒症最常见症状有疲劳、呼吸短促和精神状态改变等[24]。大鼠有嗜睡、无进食、精神状态不佳、行动缓慢、蜷缩抱团、竖毛等表现可作为类似临床脓毒症的表现。MIM 模型大鼠集中出现类似宏观病理表现。因此 MIM 模型的表面效度更好。

综上,本研究显示放置滴加粪便的复合感染支架,能够实现脓毒症模型核心要求的持续感染,还可人为决定注射感染源种类,实现复合感染,更贴近脓毒症因感染引发的发病机制。该模型的动物死亡时间较 CLP 模型更为集中,多器官高度损伤,且感染与炎症进程更为统一,因此有利于开展脓毒症病理生理和药效评价等相关研究。但此模型需开较大切口放置复合感染支架,易致实验数据偏倚且主观控制盲肠结扎长度在实际操作中有误差,加之没有做血流动力学相关指标,可能与临床实际有一定出入。此次改良模型方法可为今后脓毒症模型提供借鉴意义,并在此基础上继续改良创新。

参 考 文 献(References)

[1] 中华医学会重症医学分会. 中国严重脓毒症/脓毒性休克治疗指南(2014)[J]. 全科医学临床与教育, 2015, 13(4): 365-367.
Chinese Medical Association Severe Medicine Branch. Guidelines for the treatment of severe *Sepsis*/septic shock in China (2014) [J]. Clin Educ Gen Pract, 2015, 13(4): 365-367.

[2] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international *Sepsis* definitions conference[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4): 1250-1256.

[3] Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? [J]. Crit Care Med, 2009, 37: S30-S37.

[4] Xie JF, Wang HL, Kang Y, et al. The epidemiology of *Sepsis* in Chinese *ICUs*: A national cross-sectional survey [J]. Crit Care Med, 2020, 48(3): e209-e218.

[5] Liu YC, Yao Y, Yu MM, et al. Frequency and mortality of sepsis and septic shock in China: A systematic review and meta-analysis [J]. BMC Infect Dis, 2022, 22(1): 564.

[6] Huang M, Cai S, Su J. The pathogenesis of *Sepsis* and potential therapeutic targets [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5376.

[7] 姚咏明, 张艳敏. 脓毒症发病机制最新认识 [J]. 医学研究生学报, 2017, 30(7): 678-683.
Yao YM, Zhang YM. Updated insights into the pathogenesis of sepsis [J]. J Med Postgrad, 2017, 30(7): 678-683.

[8] 李青青, 张宇轩, 徐桂萍. 两种麻醉方法建立大鼠盲肠结扎穿孔术脓毒症模型的比较 [J]. 新疆医学, 2022, 52(2): 121-123, 134.
Li QQ, Zhang YX, Xu GP. Two anesthesia methods in the establishing sepsis model of Cecal ligation-peferation in rats [J]. Xinjiang Med J, 2022, 52(2): 121-123, 134.

[9] 尤金枝, 王捷虹, 高麦仓, 等. 尿激酶、低分子肝素对脓毒症弥散性血管内凝血大鼠模型的影响研究 [J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(9): 1071-1073, 1077.
You JZ, Wang JH, Gao MC, et al. Study of urokinase and low molecular weight heparin on sepsis DIC rats model [J]. Shaanxi Med J, 2020, 49(9): 1071-1073, 1077.

[10] 肖皓亮, 黎满香. 大鼠盲肠结扎穿刺脓毒症模型死亡率影响因素研究 [J]. 湖南畜牧兽医, 2016, 1: 43-45.
Xiao HL, Li MX. Study on the influencing factors of mortality of cecal ligation puncture sepsis model in rats [J]. Hunan J Anim Sci Vet Med, 2016, 1: 43-45.

[11] 李欣, 李景辉. 脓毒症动物模型制备的影响因素及研究进展 [J]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2015, 8(1): 53-57.
Li X, Li JH. Influencing factors and research progress of animal model of sepsis [J]. Chin J Crit Care Med Electron Ed, 2015, 8(1): 53-57.

[12] 黄鑫, 张敏州. 盲肠结扎穿孔术——脓毒症模型研究的金标准 [J]. 医学综述, 2015, 21(3): 392-395.
Huang X, Zhang MZ. Gold standard for the model research of cecal ligation and puncture-*Sepsis* [J]. Med Recapitul, 2015, 21(3): 392-395.

[13] 彭凤辉, 邓晓彬, 吕立文. 脓毒症动物模型的研究进展 [J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(8): 1577-1581.
Peng FH, Deng XB, Lü LW. Research progress in animal models of sepsis [J]. J Guangxi Med Univ, 2020, 37(8): 1577-1581.

[14] 黎李俊, 杨国辉. 一种改良盲肠结扎穿刺致大鼠脓毒症模型的方法 [J]. 中国医学科学院学报, 2020, 42(4): 468-476.
Li LJ, Yang GH. Establishment of an improved rat model of *Sepsis* induced by cecal ligation and puncture [J]. Acta Acad Med Sin, 2020, 42(4): 468-476.

[15] Harrison C. *Sepsis*: calming the cytokine storm [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(5): 360-361.

[16] van der Poll T, Meijers JCM. Systemic inflammatory response syndrome and compensatory anti-inflammatory response syndrome in sepsis [J]. J Innate Immun, 2010, 2(5): 379-380.

[17] Zhou FH, Wang L. Thoughts on the treatment of sepsis [J]. J Pract Shock, 2020, 4(3): 131-135.

[18] 汪浪, 张智琪, 沈雪, 等. 老年脓毒症患者临床特征及预后影响因素 [J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(4): 377-383.
Wang L, Zhang ZQ, Shen X, et al. Clinical characteristics and prognostic factors of elderly patients with sepsis [J]. Chin J Infect Control, 2022, 21(4): 377-383.

[19] 孙航, 赵菊馨, 杨方, 等. TNF-α、IL-10 及 CRP 在脓毒症患者中的表达及其临床意义 [J]. 中国实用医刊, 2021, 48(19): 31-34.
Sun H, Zhao JX, Yang F, et al. Expression and clinical significance of TNF-α, IL-10 and CRP in patients with sepsis [J]. Chin J Pract Med, 2021, 48(19): 31-34.

[20] 邢小康, 李曼, 郭丰. 脓毒症相关肝损伤分析 [J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(27): 87-88.
Xing XK, Li M, Guo F. Analysis of *Sepsis*-associated liver injury [J]. Chin Cont Med Edu, 2018, 10(27): 87-88.

[21] 董权平, 张逸询, 钟振威. 血清 D-二聚体、cTnI 及血压变化在急性心肌梗死和主动脉夹层诊断中的应用价值 [J]. 吉林医学, 2022, 43(1): 103-104.
Dong QP, Zhang YX, Zhong ZW. Application value of serum D-dimer, cTnI and blood pressure changes in diagnosis of acute myocardial infarction and aortic dissection [J]. Jilin Med J, 2022, 43(1): 103-104.

[22] 刘岷念, 肖艳玲, 胡芳. 慢性肾脏病患者血清胆红素、血脂水平变化及其对颈动脉粥样硬化作用的研究 [J]. 临床内科杂志, 2022, 39(3): 192-195.
Liu MN, Xiao YL, Hu F. Changes of serum bilirubin and blood lipid levels in patients with chronic kidney disease and their effects on carotid atherosclerosis [J]. J Clin Intern Med, 2022, 39(3): 192-195.

[23] 杨姗, 李红, 庄惠君, 等. 血清肌酐和肾小球滤过率与代谢综合征患病率相关性的横断面研究 [J]. 重庆医学, 2022, 51(10): 1670-1674.
Yang S, Li H, Zhuang HJ, et al. A cross-sectional study of serum creatinine and glomerular filtration rate with prevalence rate of metabolic syndrome [J]. Chongqing Med, 2022, 51(10): 1670-1674.

[24] 范丽丽. 早期识别和评估脓毒性休克的研究进展 [J]. 临床研究, 2021, 29(9): 196-198.
Fan LL. Advances in the early identification and assessment of septic shock [J]. Clin Res, 2021, 29(9): 196-198.

[收稿日期] 2022-05-10

郭晨博,毛玉宁,张贺,等. 苦参碱对胰腺癌吉西他滨耐药细胞化疗敏感性的影响[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1042-1049.
Guo CB, Mao YN, Zhang H, et al. Effect of matrine on pancreatic cancer cell chemosensitivity to gemcitabine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1042-1049.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.004

苦参碱对胰腺癌吉西他滨耐药细胞化疗敏感性的影响

郭晨博[1,2],毛玉宁[2],张贺[2],张彩勤[2],张延英[1],汪永锋[1*],师长宏[2*]

(1. 甘肃中医药大学,兰州 730030;2. 空军军医大学实验动物中心,西安 710032)

【摘要】 目的 探索苦参碱在胰腺癌吉西他滨(GEM)耐药中的作用,以期为恢复胰腺癌化疗敏感性提供新的治疗手段。**方法** 选择胰腺癌细胞系 AsPC-1,使用吉西他滨诱导构建胰腺癌吉西他滨耐药细胞株 AsPC-1-GEM,通过 CCK-8 实验测试其耐药性,检测细胞活力分析苦参碱对胰腺癌吉西他滨耐药细胞株的作用;进一步通过 RT-PCR 和 Western Blot 检测耐药前后多药耐药蛋白 2(ABCG2)的表达变化以及苦参碱对 ABCG2 的影响;利用裸鼠建立胰腺癌吉西他滨耐药细胞系异种移植模型,观察使用苦参碱治疗后肿瘤体积的变化;通过免疫组化检测苦参碱对 ABCG2 表达的影响。**结果** 耐药细胞 AsPC-1-GEM 中 ABCG2 表达增高($P < 0.01$),苦参碱可有效降低耐药细胞 ABCG2 的表达($P < 0.01$),提高胰腺癌吉西他滨耐药细胞的敏感性($P < 0.01$)。体内实验进一步验证了苦参碱治疗可降低 ABCG2 的表达($P < 0.01$),并减缓肿瘤生长($P < 0.01$)。**结论** 苦参碱通过降低 ABCG2 的表达,提高胰腺癌吉西他滨耐药细胞株的敏感性。

【关键词】 胰腺癌;苦参碱;吉西他滨;耐药
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2022)08-1042-08

Effect of matrine on pancreatic cancer cell chemosensitivity to gemcitabine

GUO Chenbo[1,2], MAO Yuning[2], ZHANG He[2], ZHANG Caiqin[2], ZHANG Yanying[1], WANG Yongfeng[1*], SHI Changhong[2*]

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China. 2. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032)

Corresponding author: WANG Yongfeng. E-mail: wyf@gszy.edu.cn; SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of matrine on gemcitabine (GEM) resistance in pancreatic cancer and to provide a new therapeutic strategy for restoring the chemosensitivity of pancreatic cancer cells. **Methods** The pancreatic cancer cell line AsPC-1 was selected and GEM resistance induced by treatment with gemcitabine. The drug-resistant cell line AsPC-1-GEM was established and confirmed by CCK-8. The effect of matrine on AsPC-1-GEM was analyzed by detecting the cell viability. Expression changes to multidrug resistance protein 2 (ABCG2) and the effect of matrine on ABCG2 were further tested using RT-PCR and Western Blot. We further established a GEM-resistant cell line xenograft model of pancreatic cancer in nude mice and observed the changes in tumor volume after treatment with matrine. The effect of matrine on the expression of ABCG2 was detected by immunohistochemistry. **Results** ABCG2 expression was

[基金项目]国家自然科学基金(31772546),陕西省创新能力支持计划(2021PT-037),军队实验动物专项课题(SYDW201801)。
Funded by National Natural Science Foundation of China(31772546), Shaanxi Innovation Ability Support Program(2021PT-037), Special Topics on Laboratory Animals in the Army(SYDW201801).
[作者简介]郭晨博(1995—),男,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤的生物学性状及中医药防治基础研究。Email:821962209@qq.com
[通信作者]师长宏(1973—),男,教授,研究方向:人类疾病动物模型。Email:changhong@fmmu.edu.cn;
汪永锋(1967—),男,教授,研究方向:医学解剖学研究。Email:wyf@gszy.edu.cn。
*共同通信作者

increased in GEM-resistant AsPC-1 cells ($P < 0.01$), and matrine significantly reduced ABCG2 expression ($P < 0.01$) and improved the sensitivity of AsPC-1-GEM cells ($P < 0.01$). Treatment with matrine reduced the expression of ABCG2 ($P < 0.01$) and retarded tumor growth ($P < 0.01$) in the xenograft models with AsPC-1-GEM tumors. **Conclusions** Matrine increases the sensitivity of GEM-resistant pancreatic cancer cell lines by decreasing the expression of ABCG2.

【**Keywords**】 pancreatic cancer; matrine; gemcitabine; resistance

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

胰腺癌(pancreatic cancer,PC)是最致命的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率分别位于恶性肿瘤的第七位和第六位[1-2],近几年的发病率呈上升趋势[3]。目前手术切除仍是 PC 患者唯一可能治愈的手段,但由于 PC 早期缺乏临床症状和体征,直到晚期才被发现,导致手术效果不佳[4]。虽然近几年免疫疗法在 PC 治疗方面取得了一定进展,但仍然具有一定的局限性,因此化疗依旧是 PC 治疗的最主要手段之一[5]。吉西他滨(gemcitabine,GEM)是治疗 PC 的一线化疗药物[6],但是由于对吉西他滨的耐药性,导致治疗效果并不显著,因此急需深入研究吉西他滨耐药的机制,增强其敏感性[7]。近年来研究发现 ATP 结合盒(ATP binding cassette,ABC)转运体的过表达与肿瘤耐药相关[8]。ABC 转运体是一种介导 ATP 驱动转运的膜蛋白家族[8]。多药耐药蛋白 2(the ATP-binding cassette ABC superfamily gmember 2,ABCG2)是 ABC 膜蛋白家族成员之一,研究发现 ABCG2 通过降低细胞内药物浓度以显著增加化疗药物耐药性[9],但其在胰腺癌吉西他滨耐药中的作用并不明确,因此将 ABCG2 作为改善胰腺癌吉西他滨耐药的治疗靶点[9]。

大部分针对特定基因的分子抑制剂只能延迟癌症的进展,癌细胞最终将通过激活替代途径获得对抑制剂的耐药性。与传统的治疗抑制剂相比,中药单体具有低毒性、高安全性的特点,在改善肿瘤细胞耐药性中发挥着重要的作用。研究表明苦参碱具有改善肿瘤耐药的作用。苦参碱(matrine,MT)是从豆科植物苦豆子的根和茎中分离得到的一种天然生物碱[10-11]。具有诱导细胞凋亡和自噬、抑制细胞增殖、侵袭、转移与 EMT 过程,逆转耐药,细胞周期阻滞等生物学功能,因其高生物活性而被广泛发展为多种制剂[12]。研究发现苦参碱在改善胃癌、结肠癌、乳腺癌、肝癌[13-18]耐药中发挥着重要的作用。目前苦参碱在胰腺癌吉西他滨耐药中的作用并不清楚,并且是否调控 ABCG2 的表达不明确。本研究旨在研究苦参碱在胰腺癌耐药中的作用,探索其调控机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

20 只 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠,6 ~ 7 周龄,体重 22 ~ 25 g,购买自成都药康生物科技有限公司【SCXK(川)2020-034】。环境温度 23 ~ 25℃,相对湿度 40%,光照/黑暗各 12 h,昼夜交替;动物自由摄食和饮水,饲养于空军军医大学实验动物中心 SPF 级屏障设施中【SYXK(陕)2019-001】。细胞异种移植模型分为对照组、苦参组、吉西他滨组、苦参碱和吉西他滨联合组,每组 5 只裸鼠。相关动物实验通过空军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(IACUC-20220427)。

1.1.2　细胞

人类胰腺癌细胞系 AsPC-1 购自国家细胞库-ATCC 细胞资源中心。

1.1.3　主要试剂与仪器

苦参碱购自上海源叶生物科技有限公司,DMEM 培养基和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;0.05%胰酶购自美国 HyClone 公司;荧光定量 PCR 及 RNA 提取试剂盒等酶标仪(Biotek Take,美国),CCK-8 检测试剂盒购自上海七海复泰生物科技有限公司;吉西他滨购自 ELI LILLY 公司。

酶标仪(Bio Tek,美国),超净工作台(Thermo Fisher Scientific,美国),显微镜(Olympus,日本),普通离心机(安徽中佳科学仪器有限公司,中国),恒温水浴锅(上海三发科学仪器有限公司,中国)。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养

AsPC-1 细胞用培养基为含有 10% FBS 及青霉素(100 IU/mL)/链霉素(100 μg/mL)的 DMEM,在 5% CO_2 的 37℃恒温培养箱中培养。

1.2.2　诱导吉西他滨耐药胰腺癌细胞株

采用 96 孔板分不同浓度的吉西他滨进行筛选,最终发现 AsPC-1 细胞系在 4 μg/mL 浓度的吉西他滨作用下可持续增长,因此选用 4 μg/mL 吉西他滨

持续诱导吉西他滨敏感的胰腺癌 AsPC-1 细胞株，持续 6 个月，并观察细胞死亡情况，最终通过 CCK-8 实验验证其耐药性并将胰腺癌吉西他滨耐药株命名为 AsPC-1-GEM。

1.2.3 细胞增殖

通过 CCK-8 测定法检测细胞增殖。将肿瘤细胞铺在 96 孔板（3000 个细胞/孔）中，在细胞贴壁后加入不同浓度的吉西他滨和苦参碱，培育 72 h 后加入 100 μL 培养基/CCK-8 混合物（培养基∶CCK-8，9∶1）孵育 3 h 后，测量 450 nm 处吸光度值，再根据吸光度值算出细胞活力。

1.2.4 实时 RT-PCR 分析

将 AsPC-1 细胞和 AsPC-1-GEM 细胞按照商品化 RNA 提取试剂盒（总 RNA 提取试剂盒，TIANGEN，DP419）说明书提取总 RNA。用微量酶标仪测定 RNA 浓度，根据测定结果，将其浓度调整至 500 ng/μL。根据 TaKaRa 试剂盒说明书（PrimeScript^{RT} Master Mix，TaKaRa，RR036A）将 RNA 逆转录为 cDNA，反转录条件设置为 37℃ 15 min，85℃ 15 s。荧光定量 PCR 反应按照 TaKaRa 试剂盒（SYBR Premix Ex Taq Ⅱ，TaKaRa，RR820A）进行荧光定量 PCR 反应。PCR 反应体系（20 μL）：SYBR Premix Ex Taq Ⅱ 10 μL，上下游引物各 0.5 μL，ROX Reference Dye（50×）0.4 μL，cDNA 模板 1 μL，ddH_2O 7.6 μL。PCR 反应条件：95℃ 预变性 30 s，PCR 反应 95℃ 15 s，60℃ 30 s（荧光测量）40 个循环。测各个样本中的 Ct 值，每组样本检测 3 次，每次检测均做 3 个复孔，最终 Ct 值以平均值表示，扩增的基因有 ABCG2，内参为 β-actin，相关信息见表 1。

1.2.5 免疫印迹分析

将培养瓶中的 AsPC-1 细胞、AsPC-1-GEM 细胞、0.3 mg/mL 苦参碱处理 72 h 的 AsPC-1-GEM、0.02 μg/mL 吉西他滨处理 72 h 的 AsPC-1-GEM、0.3 mg/mL 苦参碱和 0.02 μg/mL 吉西他滨处理 72 h 的 AsPC-1-GEM 的蛋白收集起来用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞。用 BCA 试剂（中国 Beyotime）检测蛋白浓度。液体配置：电泳液和转膜液配置，通过电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育、发光，并用相应抗体 ABCG2（Proteintech，27286-1-AP）、β-actin（Cell Signaling，8H10D10）进行免疫印迹。最终利用 Image J 软件对 Western Blot 结果中各条带灰度值进行半定量分析。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequences of genes

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
ABCG1	F：5'-AAGGATGAAGGCAGAAGGGAAAT-3'
	R：5'-AAGAACATGACTGGAGGGTTGTT-3'
ABCG2	F：5'-GACTTATGTTCCACGGGCCT-3'
	R：5'-GGCTCTATGATCTCTGTGGCT-3'
ABCB1	F：5'-AGCCCAAGACAGAAAGCTTAGTA-3'
	R：5'-TGGTTGCAGGCCTCCATTTATAA-3'
ABCB4	F：5'-AACCGATGGACTTGAAGCAAATG-3'
	R：5'-ACATACTGTTCCCACGACAAAGT-3'
ABCC1	F：5'-CTCAGCAGCTCCTCCTCCTATAG-3'
	R：5'-AGGAAGATGCTGAGGAAGGAGAT-3'
ABCC2	F：5'-TCTTATTCACTGCGGCTCTCATT-3'
	R：5'-TTGGATAGGGTCAATGCCTTCTT-3'
β-actin	F：5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
	R：5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

1.2.6 肿瘤细胞异种移植

将 Aspc-1-GEM 细胞用 0.25%的胰酶消化后制备成细胞悬液，用 PBS 将细胞稀释成每毫升 1×10^6 接种到 6 ~ 7 周龄的免疫缺陷裸鼠皮下，每组 5 只，用游标卡尺测量皮下肿瘤的长度（l）和宽度（w），肿瘤体积（V）计算公式为：$V = 1/2 \times l \times w^2$。每隔 3 d 测定 1 次肿瘤体积，待对照组肿瘤体积接近 1000 mm^3 时，处死裸鼠，并绘制肿瘤生长曲线。

1.2.7 免疫组化

肿瘤组织用 4%多聚甲醛固定，石蜡包埋，切片，用二甲苯和梯度乙醇浸泡，再通过高温抗原修复后，内源性过氧化物酶被阻断。用 37℃封闭山羊血清 10 min。一抗（ABCG2 抗体、Abcam，稀释比 1∶100）在 4℃下孵育过夜。生物素标记的山羊抗兔二抗在室温黑暗中孵育 20 min。在 3，3'-二氨基联苯胺染色、苏木精、盐酸醇分化、脱水、密封、中性胶密封后，使用 Image Pro Plus 6.0 软件定量对视野中阳性细胞的比例进行分析。

1.3 统计学分析

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

2　结果

2.1　构建胰腺癌吉西他滨耐药细胞株

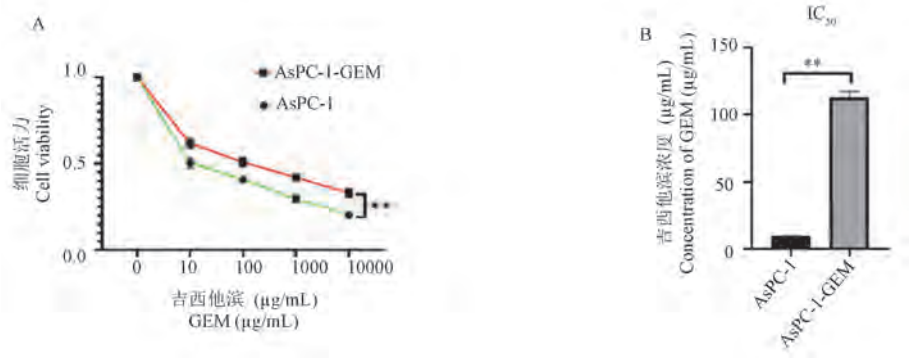
为了探究胰腺癌细胞耐药性的变化，首先通过 4 μg/mL 吉西他滨持续诱导吉西他滨敏感的胰腺癌 AsPC-1 细胞株 6 个月，构建胰腺癌吉西他滨耐药细胞株，并将其命名为 AsPC-1-GEM。采用 CCK-8 检测不同浓度吉西他滨对 AsPC-1 和 AsPC-1-GEM 细胞株的抑制效果，结果显示 AsPC-1-GEM 株对吉西他滨的敏感性降低，AsPC-1 的 IC_{50} 为 10 μg/mL，N 为 8，AsPC-1-GEM 的 IC_{50} 为 110 μg/mL，N 为 8，比较 IC_{50}，发现 AsPC-1-GEM 的 IC_{50} 比 AsPC-1 具有显著性差异（$P < 0.01$）（图 1A，1B）。

2.2　苦参碱提高 AsPC-1-GEM 细胞化疗敏感性

将 AsPC-1-GEM 细胞分成苦参碱组、吉西他滨组、苦参碱和吉西他滨联用组。CCK-8 结果显示，联合组对比其他两组具有显著性差异（图 2A）。为了进一步确定，将苦参碱最小有效剂量 0.3 mg/mL 加入到不同浓度的吉西他滨中，CCK-8 结果显示苦参碱最小有效剂量在不同浓度的吉西他滨作用下都具有提高 AsPC-1-GEM 细胞敏感性的作用（图 2B）。故后续实验苦参碱剂量选择为 0.3 mg/mL，吉西他滨剂量为 0.02 mg/mL。

2.3　AsPC-1-GEM 细胞株 ABCG2 高表达

通过实时 RT-PCR 筛选 ABC 基因，发现 ABCG2 在 AsPC-1 和 AsPC-1-GEM 差异性最大，因此将 ABCG2 作为研究目标（图 3A），再通过文献报道发现 ABCG2 在胰腺癌吉西他滨耐药中发挥着重要作用[19]，因此检测了耐药相关蛋白 ABCG2 的表达，通过实时 RT-PCR 和免疫印迹检测发现 AsPC-1-GEM 对比 AsPC-1 的 ABCG2 具有显著性差异（$P < 0.01$）（图 3B）。

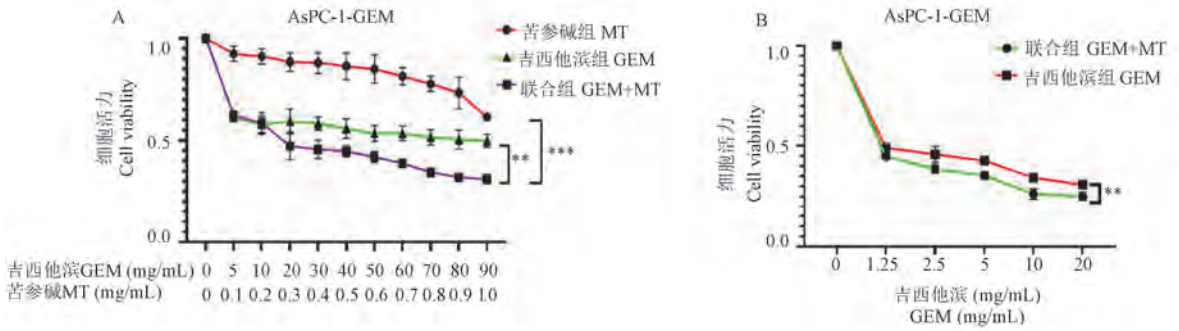


注：A：CCK-8 检测吉西他滨对 AsPC-1 及 AsPC-1-GEM 细胞增殖的影响；B：与 AsPC-1 相比，AsPC-1-GEM 的 IC_{50} 显著升高，$^{**}P < 0.01$。（下图同）

图 1　构建胰腺癌吉西他滨耐药细胞株

Note. A. Analyze the effect of gemcitabine on the pancreatic cancer cell lines AsPC-1 and AsPC-1-GEM by CCK-8. B. Compared with AsPC-1, IC_{50} of AsPC-1-GEM increased significantly, $^{**}P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1　Inducing gemcitabine resistant cell lines by treatment with pancreatic cancer

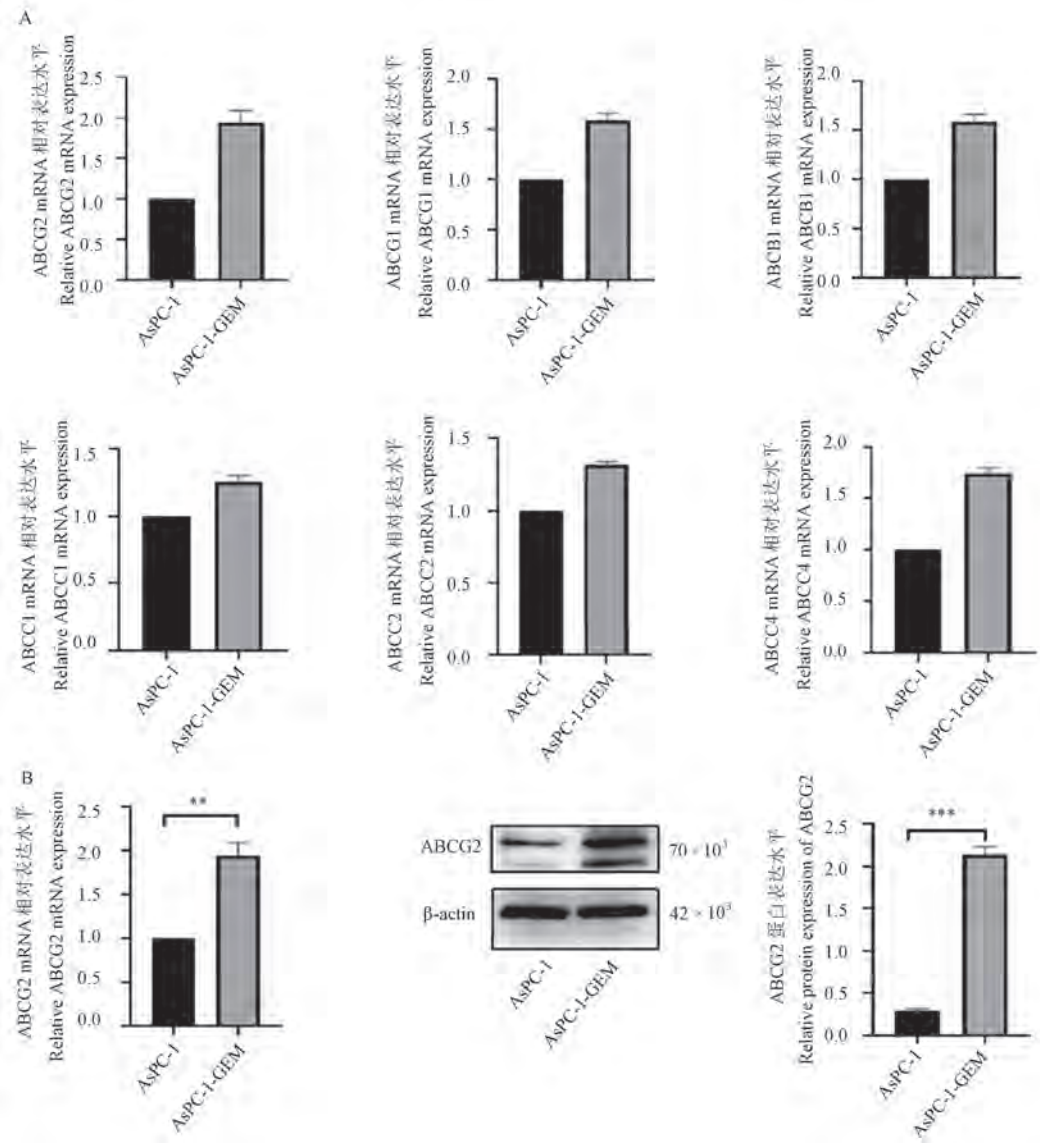


注：A：CCK-8 检测苦参碱对 AsPC-1-GEM 细胞的作用；B：CCK-8 检测苦参碱和不同浓度吉西他滨对 AsPC-1-GEM 细胞的作用；与 AsPC-1 相比，$^{***}P < 0.001$。（下图同）

图 2　苦参碱提高了 AsPC-1-GEM 细胞化疗敏感性

Note. A. Analyze the effect of matrine on AsPC-1-GEM cellsby CCK-8. B. Analysis of the effects of matrine and gemcitabine on AsPC-1-GEM cellsby CCK-8. Compared with AsPC-1, $^{***}P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 2　Treatment with matrine increases the sensitivity of AsPC-1-GEM cells to gemcitabine



注:A:qRT-PCR 筛选 AsPC-1 耐药前后各个 ABC 基因的表达情况;B:qRT-PCR 和 Western Blot 分析 AsPC-1 耐药后 ABCG2 的表达情况。

图 3 AsPC-1 耐药前后 ABCG2 表达情况

Note. A. qRT-PCR screening of expression of individual ABC genes before and after resistance to AsPC-1. B. Analysis ABCG2 expression after AsPC-1 resistance to gemcitabine by Western Blot.

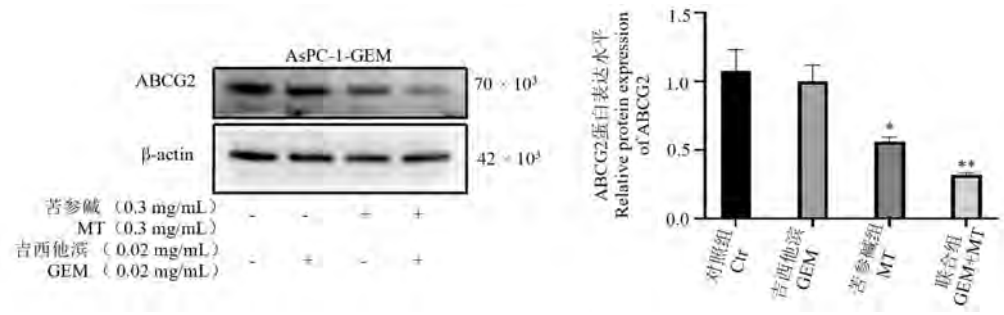
Figure 3 Expression of ABCG2 in AsPC-1 cell and AsPC-1-GEM cell

2.4 苦参碱通过降低 ABCG2 的表达提高 AsPC-1-GEM 的敏感性

为了探索苦参碱的具体分子作用机制,将 AsPC-1-GEM 细胞分成溶剂组、苦参碱组、吉西他滨组、苦参碱和吉西他滨联合处理组,Western Blot 结果显示苦参碱组、苦参碱和吉西他滨联合处理组对比对照组中的 ABCG2 具有显著性差异(图 4)。

2.5 苦参碱降低 ABCG2 表达可延缓肿瘤生长

为了进一步验证苦参碱在体内的作用,将 AsPC-1-GEM 细胞以每毫升 1×10^6 接种到 20 只裸鼠皮下,监测肿瘤生长情况。待肿瘤长至 80 mm^3 左右时,将其分为溶剂组、苦参碱组、吉西他滨组、苦参碱和吉西他滨组 4 组处理,苦参碱用量为 50 mg/kg[20],1 d 1 次,给药方式为腹腔注射,吉西他滨用量为 25 mg/kg,1 周 2 次,给药方式为腹腔注射,待溶剂组肿瘤体积接近 1000 mm^3,处死裸鼠,每 3 d 测量肿瘤最长直径(l),肿瘤最短直径(w),计算体积。结果显示苦参碱和吉西他滨联合组对比其他三组具有显著性差异(图 5A),肿瘤重量也具有显著性差异(图 5B),且肿瘤生长缓慢(图 5C),裸鼠体重并无显著性差异(图 5D),免疫组化发现 MT 组和联合组对比对照组有显著性差异(图 5E)。

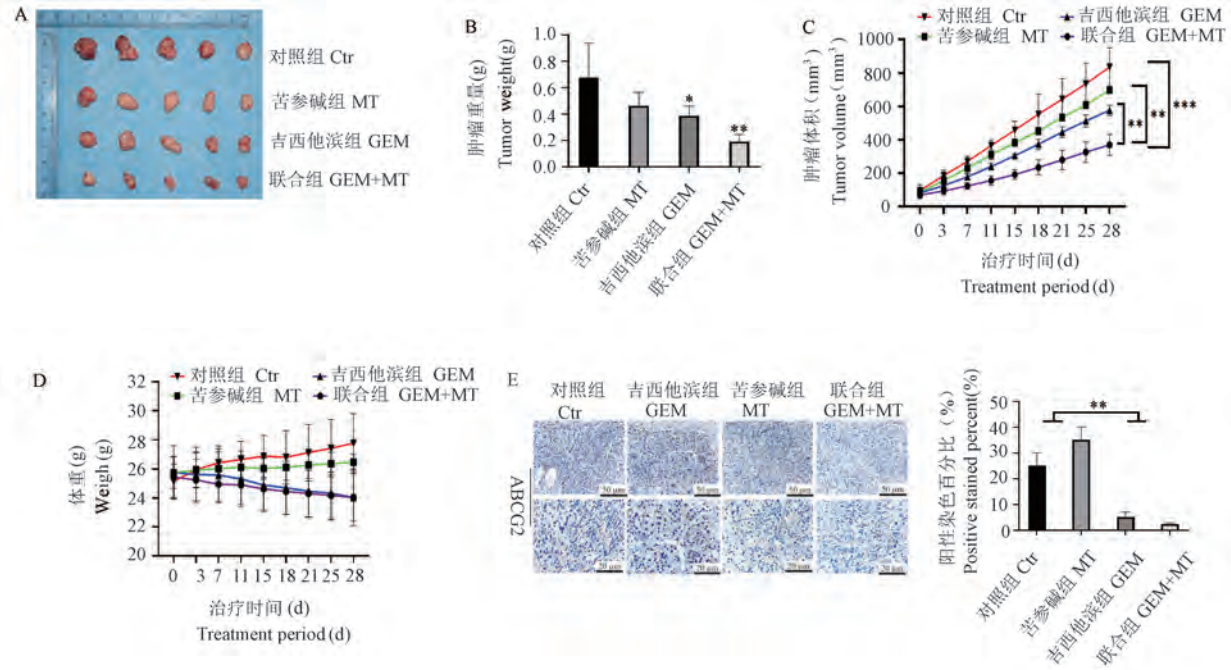


注：Western Blot 检测苦参碱处理后 AsPC-1-GEM 细胞中 ABCG2 表达情况；与 AsPC-1 相比，$^{*}P < 0.05$。

图 4　苦参碱降低 AsPC-1-GEM 细胞中 ABCG2 的表达

Note. The expression of ABCG2 in AsPC-1-GEM cell after treated with matrine was analyzed by Western Blot. Compared with AsPC-1, $^{*}P < 0.05$.

Figure 4　Treatment with matrine reduces the expression of ABCG2 in AsPC-1-GEM cell



注：A：AsPC-1-GEM 细胞体内移植肿瘤生长情况；B：AsPC-1-GEM 细胞移植瘤重量；C：AsPC-1-GEM 细胞移植瘤生长曲线；D：荷瘤小鼠体重变化；E：ABCG2 的表达情况。

图 5　苦参碱和吉西他滨联合组可显著延缓体内肿瘤生长

Note. A. Tumor growth of AsPC-1-GEM cell xenograft tumor in nude mice. B. The tumor weight AsPC-1-GEM cell xenograft. C. Tumor growth curves of AsPC-1-GEM cell l xenograft tumor in nude mice. D. Body weight changes in nude mice with AsPC-1-GEM cellxenograft tumor. E. Expression of ABCG2.

Figure 5　Treatment with matrine and gemcitabine significantly delayed tumor growth

3　讨论

中药单体具有低毒、高安全性的特点，并通过多种途径抑制肿瘤的发生、生长和转移[21-22]。临床实践中发现中药单体可显著增强化疗药物的敏感性，抑制肿瘤的作用[23-24]。苦参是一种传统的中药，具有独特的抗癌作用。苦参碱是苦参的有效成分，近年来发现苦参碱可以通过影响耐药基因从而在肿瘤耐药中发挥着重要作用[25-27]，目前苦参碱在胰腺癌吉西他滨耐药中的作用并无文献报道，因此本研究旨在明确苦参碱是否能够提高胰腺癌吉西他滨耐药株敏感性，并探索其相应的机制。

首先选取吉西他滨敏感的人胰腺癌 AsPC-1 细胞株，采用 4 μg/mL 吉西他滨持续诱导获得人胰腺癌 AsPC-1-GEM 耐药株，发现 AsPC-1 细胞和 AsPC-1-GEM 在 10 000 μg/mL、1000 μg/mL、100 μg/mL、

10 μg/mL 的吉西他滨作用下的细胞活力的对比发现 AsPC-1-GEM 细胞活力显著提高,并且 AsPC-1-GEM 的 IC_{50} 为 110 μg/mL,而 AsPC-1 细胞的 IC_{50} 为 10 μg/mL,AsPC-1-GEM 的 IC_{50} 比 AsPC-1 具有显著性差异,从而证实人胰腺癌 AsPC-1 耐药株建立成功。进一步观察苦参碱在胰腺癌吉西他滨耐药细胞中的作用,图 2 中 CCK-8 实验表明苦参碱具有提高胰腺癌细胞的敏感性的作用,分别设置了不同剂量的苦参碱组和不同剂量的吉西他滨组,观察到最小有效剂量 0.3 mg/mL 的苦参碱可以提高 AsPC-1-GEM 耐药株对吉西他滨的敏感性,因此后续研究中都是选择 0.3 mg/mL 的苦参碱进行实验。

研究发现肿瘤耐药与 ABCG2 相关[27-30],通过文献发现腺癌癌吉西他滨耐药与 ABCG2 有着密切的关系[31],并在实验中发现在胰腺癌细胞耐药前后 ABCG2 具有显著性差异,因此本研究将 ABCG2 和吉西他滨耐药联系起来。通过 qRT-PCR 和 Western Blot 实验发现 ABCG2 在胰腺癌耐药细胞 AsPC-1-GEM 中高表达,并具有显著性差异,ABCG2 可能成为胰腺癌吉西他滨耐药的治疗靶点。将 0.3 mg/mL 的苦参碱加入到胰腺癌吉西他滨耐药细胞株中,Western Blot 实验发现苦参碱具有降低 ABCG2 的表达的作用,量化结果显示具有显著性差异。进一步将耐药肿瘤细胞移植入裸鼠体内建立异种移植模型,发现苦参碱和吉西他滨联合组肿瘤对比其他三组具有显著性差异;苦参碱和吉西他滨联合组肿瘤的体重对比其他三组具有显著性差异;苦参碱和吉西他滨联合组对肿瘤体积对比其他三组有着明显的抑制作用;通过文献报道吉西他滨为 25 mg/kg 为安全剂量[32-33],吉西他滨毒性使吉西他滨组和联合组的裸鼠体重均有下降,这也使得肿瘤窗口期不佳,目前苦参碱可以增加吉西他滨敏感性的作用,对吉西他滨毒性的影响较小;通过组化结果发现苦参碱可有效降低 ABCG2 的表达。因此通过以上实验发现苦参碱通过降低 ABCG2 的表达,进而提高了胰腺癌耐药细胞的吉西他滨敏感性。

总之,本研究表明,苦参碱具有提高胰腺癌吉西他滨耐药细胞敏感性的作用。体内、体外实验均证实苦参碱可以降低 ABCG2 的表达,从而提高胰腺癌吉西他滨耐药株敏感性,提示苦参碱可能成为改善胰腺癌耐药的潜在药物。

参 考 文 献(References)

[1] Ansari D, Tingstedt B, Andersson B, et al. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow [J]. Future Oncol, 2016, 12(16): 1929-1946.

[2] Hosein AN, Brekken RA, Maitra A. Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(8): 487-505.

[3] McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, et al. Pancreatic cancer: a review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(43): 4846-4861.

[4] Karakas Y, Lacin S, Yalcin S. Recent advances in the management of pancreatic adenocarcinoma [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2018, 18(1): 51-62.

[5] Sarvepalli D, Rashid MU, Rahman AU, et al. Gemcitabine: a review of chemoresistance in pancreatic cancer [J]. Crit Rev Oncog, 2019, 24(2): 199-212.

[6] Marasini B, Sahu RP. Natural anti-cancer agents: implications in gemcitabine-resistant pancreatic cancer treatment [J]. Mini Rev Med Chem, 2017, 17(11): 920-927.

[7] Tadros S, Shukla SK, King RJ, et al. *De novo* lipid synthesis facilitates gemcitabine resistance through endoplasmic reticulum stress in pancreatic cancer [J]. Cancer Res, 2017, 77(20): 5503-5517.

[8] Asif M, Usman M, Ayub S, et al. Role of ATP-binding cassette transporter proteins in CNS tumors: resistance-based perspectives and clinical updates [J]. Curr Pharm Des, 2020, 26(37): 4747-4763.

[9] Locher KP. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters [J]. Nat Struct Mol Biol, 2016, 23(6): 487-493.

[10] Nobili S, Lapucci A, Landini I, et al. Role of ATP-binding cassette transporters in cancer initiation and progression [J]. Semin Cancer Biol, 2020, 60: 72-95.

[11] Huang J, Xu H. Matrine: bioactivities and structural modifications [J]. Curr Top Med Chem, 2016, 16(28): 3365-3378.

[12] Li X, Tang Z, Wen L, et al. Matrine: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, toxicity, clinical application and preparation researches [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 269: 113682.

[13] Wei R, Cao J, Yao S. Retraction Note: Matrine promotes liver cancer cell apoptosis by inhibiting mitophagy and $PINK_1$/Parkin pathways [J]. Cell Stress Chaperones, 2021, 26(6): 1009.

[14] Liu ZM, Yang XL, Jiang F, et al. Matrine involves in the progression of gastric cancer through inhibiting miR-93-5p and upregulating the expression of target gene *AHNAK* [J]. J Cell Biochem, 2020, 121(3): 2467-2477.

[15] Liu J, Guo Y, Cao J. Matrine triggers colon cancer cell apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest via mediation of microRNA-22 [J]. Phytother Res, 2020, 34(7): 1619-1628.

[16] Du J, Li J, Song D, et al. Matrine exerts anti-breast cancer activity by mediating apoptosis and protective autophagy via the AKT/mTOR pathway in MCF-7 cells [J]. Mol Med Rep, 2020,

22(5):3659-3666.

[17] Li Z, Wang N, Yue T, et al. Matrine reverses the drug resistance of K562/ADM cells to ADM and VCR via promoting autophagy [J]. Transl Cancer Res, 2020, 9(2): 786-794.

[18] Zhao Z, Zhang D, Wu F, et al. Sophoridine suppresses lenvatinib-resistant hepatocellular carcinoma growth by inhibiting RAS/MEK/ERK axis via decreasing VEGFR2 expression [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(1): 549-560.

[19] Qian Y, Xiong Y, Feng D, et al. *Coix* seed extract enhances the anti-pancreatic cancer efficacy of gemcitabine through regulating ABCB1- and ABCG2-mediated drug efflux: a bioluminescent pharmacokinetic and pharmacodynamic study [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5250.

[20] Liu T, Song Y, Chen H, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(10): 1740-1745.

[21] Huang WJ, Ruan S, Wen F, et al. Multidrug resistance of gastric cancer: the mechanisms and Chinese medicine reversal agents [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 12385-12394.

[22] Zhang Y, Lou Y, Wang J, et al. Research status and molecular mechanism of the traditional Chinese medicine and antitumor therapy combined strategy based on tumor microenvironment [J]. Front Immunol, 2021, 11: 609705.

[23] Zhou BG, Wei CS, Zhang S, et al. Matrine reversed multidrug resistance of breast cancer MCF-7/ADR cells through PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(5): 3885-3891.

[24] Zhao B, Li B, Liu Q, et al. Effects of matrine on the proliferation and apoptosis of vincristine-resistant retinoblastoma cells [J]. Exp Ther Med, 2020, 20(3):2838-2844.

[25] Chen Z, Nishimura N, Okamoto T, et al. Molecular mechanism of matrine from *Sophora alopecuroides* in the reversing effect of multi-anticancer drug resistance in K562/ADR cells [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 1269532.

[26] Hu J, Zhang X, Wang F, et al. Effect of ceritinib (LDK378) on enhancement of chemotherapeutic agents in ABCB1 and ABCG2 overexpressing cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncotarget. 2015;6(42):44643-44659.

[27] Kukal S, Guin D, Rawat C, et al. Multidrug efflux transporter ABCG2: expression and regulation [J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(21): 6887-6939.

[28] Fu L, Wang R, Yin L, et al. A meta-analysis of *ABCG2* gene polymorphism and non-small cell lung cancer outcomes [J]. Genet Mol Biol, 2020, 42(4): e20180234.

[29] Hsu HH, Chen MC, Baskaran R, et al. Oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells is mediated via activation of ABCG2 to alleviate ER stress induced apoptosis [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(7): 5458-5467.

[30] Kim EJ, Kim YJ, Lee HI, et al. NRF_2 knockdown resensitizes 5-fluorouracil-resistant pancreatic cancer cells by suppressing HO-1 and ABCG2 expression [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(13): 4646.

[31] Sun Y, Gu M, Zhu L, et al. Gemcitabine upregulates ABCG2/BCRP and modulates the intracellular pharmacokinetic profiles of bioluminescence in pancreatic cancer cells [J]. Anti Cancer Drugs, 2016, 27(3): 183-191.

[32] Yoshida K, Toden S, Ravindranathan P, et al. Curcumin sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine by attenuating PRC2 subunit EZH2, and the lncRNA PVT1 expression [J]. Carcinogenesis, 2017, 38(10): 1036-1046.

[33] Zhang H, Wu P, Guo C, et al. *Lipocalin* 2 may be a key factor regulating the chemosensitivity of pancreatic cancer to gemcitabine [J]. Biochem Biophys Rep, 2022, 31: 101291.

[收稿日期] 2022-07-07

徐聪,杨正标,王海苹,等. 安儿宁颗粒在幼年大鼠临床前安全性评价研究[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1050-1057.
Xu C, Yang ZB, Wang HP, et al. Safety evaluation of oral administration of An'erning granules in young rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1050-1057.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.005

安儿宁颗粒在幼年大鼠临床前安全性评价研究

徐聪[1,2],杨正标[1,2],王海苹[3],李怀平[3],郑高利[1,2],宣尧仙[1,2],陈颖[1,2*]

(1. 杭州医学院安全性评价研究中心,杭州 310053;2. 浙江省药物安全性评价技术研究重点实验室,杭州医学院,杭州 310053;3. 金诃藏药(山东)健康产业有限公司,济南 250104)

【摘要】 目的 研究安儿宁颗粒单次给药和 3 个月重复给药对幼年大鼠的毒性影响,评估安儿宁颗粒对临床儿童患者的长期使用安全性。**方法** 20 只幼年大鼠(3 ~ 4 周龄),按最大给药量法,单次给予安儿宁颗粒 240 g 生药/kg 体重的剂量,观察大鼠的毒性反应和死亡情况;200 只幼年大鼠(3 ~ 4 周龄)按体重均衡随机分为溶媒对照组、唐古特乌头组、安儿宁颗粒低、中、高剂量组,每组 40 只,雌雄各半,分别灌胃给予纯水、唐古特乌头 5.5 g 生药/kg 体重、安儿宁颗粒 3、11、40 g 生药/kg 体重,每天 1 次,连续 91 d,于给药中期(给药 1.5 个月)、停药(给药 3 个月)和恢复期结束(停药后 4 周)分别抽样剖检大鼠 40 只(每组 10 只,雌雄各半)、80 只(每组 20 只,雌雄各半)和 40 只(每组 10 只,雌雄各半),检测体重、摄食、血液学、血清生化学、凝血、尿液、眼科及组织病理学等相关指标。**结果** 幼年大鼠单次经口给予最大给药量的安儿宁颗粒,未见明显急性毒性;重复经口给予安儿宁颗粒 91 d,仅见高剂量雄鼠摄食量减少和体重增长减缓、唐古特乌头组和给药组雄鼠中性粒细胞和单核细胞数、血清白蛋白均可逆性升高,AST、Na^+、Cl^-可逆性下降,其余指标均未见显著毒性反应。**结论** 安儿宁颗粒对幼年大鼠无显著毒性反应。相对安全剂量为 40 g 生药/kg 体重,未观察到有害作用(NOAEL)剂量为 11 g 生药/kg 体重。

【关键词】 安儿宁颗粒;儿科用药;幼年大鼠;毒性实验
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2022)08-1050-08

Safety evaluation of oral administration of An'erning granules in young rats

XU Cong[1,2], YANG Zhengbiao[1,2], WANG Haiping[3], LI Huaiping[3], ZHENG Gaoli[1,2], XUAN Yaoxian[1,2], CHEN Ying[1,2*]

(1. Center of Safety Evaluation, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China. 2. Key Laboratory of Drug Safety Evaluation and Research of Zhejiang Province, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053. 3. Arura Tibetan Medicine (Shandong) Health Industry Co., Ltd, Jinan 250104)
Corresponding author: CHEN Ying. E-mail: chenyinap@163.com

【Abstract】 Objective To study the toxicity of a single administration and 3-month repeated administration of An'erning (AEN) granules in juvenile SD rats, and evaluate the long-term safety in children. **Methods** 20 juvenile SD rats (3 ~ 4 weeks) were given the maximum administration dosage (240 g crude drug/kg). This was followed by an observation of toxicity reactions and death for 15 days. Juvenile SD rats (200) were divided into vehicle control, *Aconitum tanguticum* control, low-dose, middle-dose, and high-dose groups. Each group was composed of 40 rats (half male and half female), each of which was given purified water, *A. tanguticum* (5.5 g crude drug/kg), and AEN (3, 11, and 40 g crude drug/kg), all in a volume of 10 mL/kg, for 91 days. Food intake and body weight were measured, and hematology,

[**基金项目**]国家科技重大专项(2011ZX0931-003),青海省重大科技专项(2020-SF-A3-2),浙江省医药卫生科技计划项目(2020KY105)。
Funded by the National Science and Technology Major Project of China (2011ZX0931-003), Major Science and Technology Projects in Qinghai Province (2020-SF-A3-2), Medical Health Science and Technology Project of Zhejiang Provincial Health Commission (2020KY105).
[**作者简介**]徐聪(1987—),女,助理研究员,硕士,研究方向:药物毒理学。Email:xiaoxue-87@163.com
[**通信作者**]陈颖(1967—),女,高级实验师,大专,研究方向:药物毒理学。Email:chenyinap@163.com

biochemistry, coagulation, urine, ophthalmologic, and histopathology examinations of 5, 10 and 5 rats for each sex in each group were conducted mid-administration, upon drug withdrawal, and 4 weeks after withdrawal. **Results** No obvious toxic effects or deaths were recorded after the single administration of AEN. After the 3-month repeated administration of AEN, male rats in the high-dose group had decreased body weights, decreased food intake, reversibly increased NEUT count, NEUT ratio, MONO count, MONO ratio, and ALB, and reversibly decreased AST, Na^+, and Cl^-. **Conclusions** There were no obvious toxicity reactions in young rats given AEN granules. The relative safe dosage of AEN was 40 g crude drug/kg, and the no observed adverse effect level (NOAEL) is 11 g crude drug/kg. The clinical administration of AEN is safe.

【Keywords】 An'erning granule; pediatric drugs; juvenilerat; toxicity test

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

安儿宁颗粒为经典藏医儿科用药“久协更卓”的现代剂型，处方由天竺黄、红花、人工牛黄、岩白菜、甘草、高山辣根菜、洪连、檀香、唐古特乌头九味藏药组成[1]。安儿宁颗粒具有清热祛风、化痰止咳功效，临床上主要用于治疗小儿风热感冒、咳嗽有痰、发热咽痛等上呼吸道感染[2-3]。处方中青藏高原特有药材唐古特乌头，为毛茛科乌头属，含有内酯型二帖生物碱，文献报道对小鼠具有一定的急性毒性[4-5]；另红花，为活血化瘀药材，可显著延长凝血酶原和凝血酶时间，可能具有潜在的安全风险[6]。安儿宁颗粒上市近 20 年，据 2018 ~ 2020 年国家药品不良反应数据库数据反馈显示[7]，安儿宁颗粒使用患儿约为 1480 万，其中有 122 例报告发生腹泻或皮疹等不良反应。虽然其不良反应报告率 < 0.01%，但鉴于安儿宁颗粒正逐渐被联合用药用于其他小儿适应症[8-13]，且目前缺少安儿宁颗粒对幼龄动物的相关毒理学数据，本文特开展大剂量安儿宁颗粒在幼年大鼠的单次给药以及 3 个月重复给药的毒性研究，进一步评价其儿科用药安全性。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

240 只 3 ~ 4 周龄健康 SPF 级 SD 大鼠，雌雄各半，体重为 40 ~ 60 g，购自上海市西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2018-0016】。饲养期间各组大鼠自由饮水(经 LAWS-2000 实验动物反渗透纯水机处理纯水和摄食(钴 60 辐照的全价营养颗粒饲料)，给药前大鼠禁食不禁水，温度 20.5 ~ 25.5℃，相对湿度 50% ~ 68%，每小时通风次数≥15 次，12 h 光照明暗交替，饲养于杭州医学院安全性评价研究中心屏障系统【SYXK(浙)2017-0010】。实验机构通过国家 GLP 认证和 AAALAC 认证，实验遵循 GLP 原则。本研究方案获得本机构实验动物伦理委员会的批准(GLP-A-003)。

1.1.2　主要试剂与仪器

安儿宁颗粒(清膏)，黄棕色胶状物，3.1 g 生药/g 清膏，批号：20160201，金诃藏药股份有限公司提供；人工牛黄，批号：150731，青海九康中药饮片有限公司生产；临用前，按处方量比例 1 g 安儿宁颗粒清膏加 34.2 mg 人工牛黄，配制成“安儿宁颗粒”原液，用于高剂量组给药，中、低剂量组受试物取“原液”按比例用纯水配制成相应的给药浓度。唐古特乌头提取清膏(3.57 g 生药/g，金诃藏药股份有限公司，批号：20160201)，棕褐色粘稠液体，用纯水配制成给药浓度。

CA-1500 全自动血凝分析仪(Sysmex，日本)；7100 全自动生化分析仪(Hitachi，日本)；N-600 尿液分析仪(长春迪瑞)；ADVIA2120 全自动血细胞分析仪(Bayer，德国)；IMS-972 电解质分析仪(深圳希莱恒)；YZ6EI 检眼镜(苏州医疗器械厂)。

1.2　方法

1.2.1　单次给药毒性实验

幼年大鼠按体重随机分为给药组和溶媒对照组，每组 20 只，雌雄各半。给药组大鼠灌胃给予安儿宁颗粒 240 g 生药/kg 体重，分 2 次(间隔 4 h)给予最大适用浓度(每毫升 4 g 生药)、最大给药体积(30 mL/kg)；溶媒对照组灌胃等体积纯水。

观察给药后大鼠的一般反应(外观、行为活动、精神状态、食欲、大小便及其颜色、皮毛、鼻、眼、口有无异常分泌物等)及死亡情况，死亡动物及时尸检，若肉眼观察有病变脏器则进行病理组织学检查。给药后第 1、2、3、4、7、9、11、15 天称体重；第 15 天所有大鼠剖检，观察主要脏器的大小、形态、颜色和质地等。

1.2.2　重复给药毒性实验

幼年大鼠按体重随机分为溶媒对照组、唐古特乌头组、安儿宁颗粒低、中、高剂量组，每组 40 只，雌雄各半，分别灌胃给予纯水、唐古特乌头 5.5 g 生药/kg 体重、安儿宁颗粒 3 g/kg 体重、11 g/kg 体重

和 40 g/kg 体重(按生药计),给药体积 10 mL/kg,每天给药 1 次,连续 91 d,停药后恢复观察 4 周。

实验期间每天观察大鼠的一般反应:外观、行为活动、精神状态、食欲、大小便及其颜色、皮毛、鼻、眼、口有无异常分泌物等,每周称体重和摄食量 1 次;给药前、给药中期、停药后 1 d 和恢复期结束检测大鼠眼科和尿液指标。在给药中期(给药 45 d)、停药次日和恢复期结束,每组分别随机取 10、20、10 只大鼠(雌雄各半),进行血液学(RBC、WBC、HGB、PLT、HCT、MCV、MCH、MCHC、MPV、RDW、#NEUT、%NEUT、# LYMPH、% LYMPH、# MONO、% MONO、# EOS、% EOS、# BASO、% BASO、# LUC、% LUC、# RETIC、% RETIC、MCVr、CHr、CHCMr)、血清生化学(含电解质)(AST、ALT、ALP、CK、LDH、BUN、Crea、T. P、ALB、GLU、T. BIL、T. CHO、TG、γ-GT、K^+、Na^+、Cl^-、TCa)、凝血功能(PT、TT、Fbg、APTT)检测,心脏、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、脑、生殖器官(雄性为睾丸和附睾,雌性为卵巢和子宫)等主要脏器的称重、大体观剖检和组织病理学检查。综合评估"安儿宁颗粒"对幼年大鼠的毒性情况。

1.3 统计学分析

选用 SPSS 统计分析软件进行数据统计分析。计量资料采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,选用单因素方差(One-way ANOVA)进行显著性分析;计数资料采用卡方检验(χ^2)进行显著性分析。显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 单次给药毒性实验

溶媒对照组幼龄大鼠未见明显异常反应;给药组幼龄大鼠在给药后约 30 min 陆续出现流涎、活动减少、闭眼,至给药后约 3 h 消失,同时出现着色尿、软便、稀便、肛周污浊,给药后 48 h 所有反应基本消失,未出现死亡或濒死。给药组大鼠体重随实验时间延长而增加,但增长速度低于溶媒对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见图 1。实验结束后剖检显示,给药组和溶媒对照组大鼠各脏器组织的外观形态均未见明显异常。以上反应主要为短时间内空腹给予高浓度、大体积中药混悬液后的常见反应,不排除对大鼠体重增长率有减缓影响。

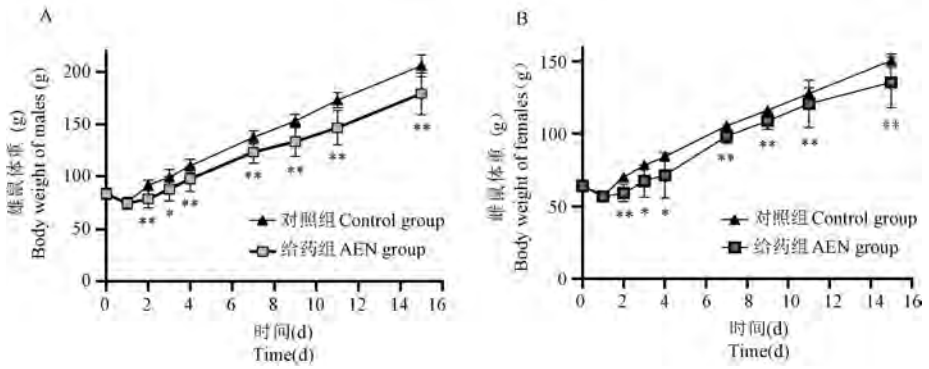
2.2 重复给药毒性实验

2.2.1 一般反应、体重和摄食量

实验期间,各组大鼠外观、行为和活动等一般反应均未见明显异常,无死亡或濒死。安儿宁颗粒高剂量组大鼠给药后第 2 周(♀)、第 1 ~ 7 周(♂)和 13 周(♂)体重均显著低于溶媒对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其余各组大鼠的体重和溶媒对照组无明显差异(见图 2)。安儿宁颗粒低剂量组大鼠给药后第 8、11、12 周(♂)和第 13 周(♀)、中剂量组大鼠给药后第 8、11 周(♂)和第 2、11、12 周(♀)、高剂量组大鼠给药后第 1 ~ 5、7、9、11 ~ 13 周(♂)和第 1 ~ 3、9、12 ~ 13 周(♀)摄食量显著低于溶媒对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其余各组大鼠的摄食量和溶媒对照组无明显差异(见图 2)。唐古特乌头组大鼠的摄食量和体重未见明显影响。

2.2.2 血液学

停药次日,和对照组比,唐古特乌头组、安儿宁颗粒低、中、高剂量组雄鼠的中性粒细胞数显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),唐古特乌头组、安儿宁颗粒低、高剂量组雄鼠的单核细胞数显著升高($P <$



注:与溶媒对照组比,$^*P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$。

图 1 单次经口给予安儿宁颗粒对幼年大鼠体重的影响

Note. Compared with the control group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Figure 1 Effects of single oral administrated AEN on body weight of juvenile SD rats

0.01 或 $P < 0.05$)，上述指标至恢复期结束后均回归正常，说明是可逆的。另出现个别指标波动，停药次日：唐古特乌头组雄鼠和安儿宁颗粒中剂量雌鼠的嗜酸性粒细胞数、高剂量组雌鼠的淋巴细胞数($P < 0.01$)有效幅度的降低，且无剂量相关性，结合实验室背景数据，判断其无毒理学意义(表 1)。

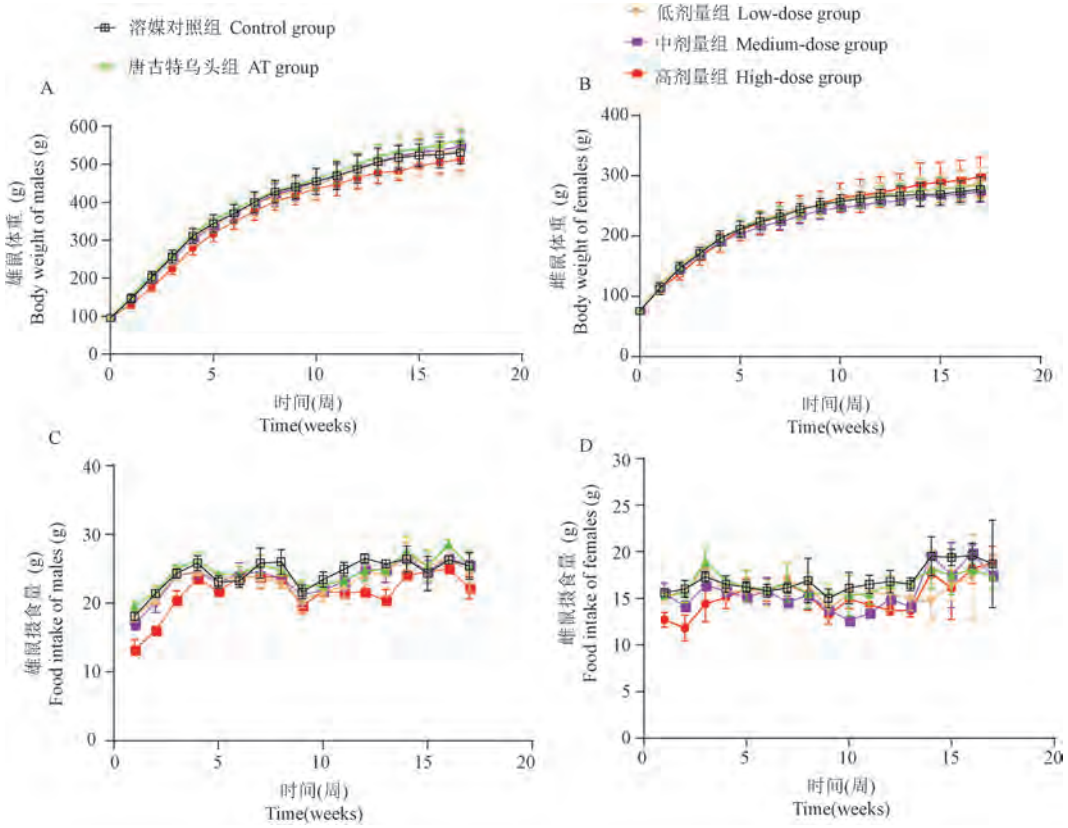


图 2　重复经口给予安儿宁颗粒对幼年大鼠体重和摄食量的影响

Figure 2　Effects of repeated oral administrated AEN on body weight and food intake of juvenile SD rats

表 1　安儿宁颗粒对幼年大鼠血液学指标的影响(停药检查阶段)($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1　Effects of AEN on hematology in juvenile SD rats(Drug withdrawal)($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别 Groups	中性粒细胞($10^3/\mu L$) NEUT($10^3/\mu L$)	单核细胞($10^3/\mu L$) MONO($10^3/\mu L$)	嗜酸性粒细胞($10^3/\mu L$) EOS($10^3/\mu L$)		淋巴细胞($10^3/\mu L$) LYMPH($10^3/\mu L$)
	♂	♂	♂	♀	♀
溶媒对照组 Control group	0.56 ± 0.16	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	2.72 ± 0.52
唐古特乌头组 AT group	1.36 ± 0.57 *	0.13 ± 0.05 **	0.09 ± 0.03 **	0.05 ± 0.02	2.87 ± 0.75
低剂量组 Low-dose group	0.84 ± 0.19 *	0.10 ± 0.03 *	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.02	2.77 ± 0.82
中剂量组 Medium-dose group	0.82 ± 0.26 *	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01 **	2.81 ± 0.40
高剂量组 High-dose group	1.24 ± 0.42 **	0.14 ± 0.08 **	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01	3.55 ± 0.78 **

注：与溶媒对照组比，* $P < 0.05$，** $P < 0.01$。(下表同)

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

2.2.3　血清生化学

停药检查，唐古特乌头组和安儿宁颗粒高剂量组雄鼠的血清白蛋白显著高于溶媒对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)，停药 4 周恢复正常，提示可能与唐古特乌头给药剂量有关；停药时，安儿宁颗粒低、中、高剂量组雄鼠的 AST、Na^+、Cl^- 显著低于溶媒对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)，呈一定的剂量反应关系，停药 4 周后均恢复正常，可能与给药有关；另停药时高剂量雄鼠 ALT 和唐古特乌头组雌鼠 GLU 小幅降低($P < 0.01$)，考虑为无毒理学意义(见表 2)。

表 2 安儿宁颗粒对幼年大鼠血清生化学指标的影响(停药检查阶段)($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of AEN on serum biochemistry in juvenile SD rats(Drug withdrawal)($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别 Groups	血清白蛋白(g/L) ALB(g/L)	钠离子(mmol/L) Na^+(mmol/L)	氯离子(mmol/L) Cl^-(mmol/L)	谷草转氨酶(IU/L) AST(IU/L)	谷丙转氨酶(IU/L) ALT(IU/L)	血糖(mmol/L) GLU(mmol/L
	♂	♂	♂	♂	♂	♀
溶媒对照组 Control group	41.98 ± 1.15	143.6 ± 1.5	105.8 ± 2.2	171.34 ± 24.83	42.55 ± 5.14	5.979 ± 0.602
唐古特乌头组 AT group	43.82 ± 1.42*	143.8 ± 2.8	105.4 ± 1.9	158.06 ± 22.77	41.84 ± 4.27	4.775 ± 0.449**
低剂量组 Low-dose group	42.61 ± 1.10	141.8 ± 1.1*	103.7 ± 1.1**	147.53 ± 30.30	41.63 ± 3.34	5.637 ± 0.520
中剂量组 Medium-dose group	42.77 ± 1.72	141.0 ± 1.0**	103.1 ± 1.5**	136.57 ± 17.55**	39.56 ± 4.39	5.643 ± 0.504
高剂量组 High-dose group	43.95 ± 2.13**	138.9 ± 1.1**	100.8 ± 1.5**	132.04 ± 23.87**	36.84 ± 2.21**	5.670 ± 0.692

2.2.4 凝血功能

停药时高剂量组雄鼠和安儿宁颗粒中、高剂量组雌鼠的 APTT 和 TT 均较溶媒对照组有小幅降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),但均在实验室背景数据范围内,未表现明显的剂量-反应关系,综合考虑其无毒理学意义。具体见表 3。

表 3 安儿宁颗粒对幼年大鼠凝血指标的影响(停药检查阶段)($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of AEN on coagulation index in juvenile SD rats(Drug withdrawal)($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别 Groups	部分活化凝血酶原时间(s) APTT(s)		凝血酶时间(s) TT(s)	
	♂	♀	♂	♀
溶媒对照组 Control group	14.0 ± 0.8	13.7 ± 2.3	64.9 ± 6.1	65.8 ± 7.4
唐古特乌头组 AT group	13.4 ± 1.4	12.5 ± 0.7	64.9 ± 8.3	60.8 ± 5.2
低剂量组 Low-dose group	12.9 ± 0.9	12.2 ± 1.5	64.2 ± 5.2	58.3 ± 11.1
中剂量组 Medium-dose group	14.1 ± 1.1	11.3 ± 1.6**	64.2 ± 5.2	53.1 ± 9.5**
高剂量组 High-dose group	11.0 ± 2.5*	11.4 ± 2.3**	53.1 ± 9.7**	54.9 ± 10.3*

2.2.5 眼科和尿液检查

各检查阶段中,唐古特乌头和安儿宁颗粒各剂量组的眼科检查和尿液检查指标均与对照组大鼠相似($P > 0.05$),无统计学差异。

2.2.6 脏器重量和系数以及组织病理学检查

停药检查时高剂量组雄鼠的肝、肾系数及雌鼠的肝、肾重量和系数均高于溶媒对照组($P < 0.01$),但病理组织学检查未见明显病变,判断为无毒理学意义的无规律个体差异。各组其他脏器的重量和系数均与相应时间的对照组相似($P > 0.05$)(见表 4)。

各组大鼠各脏器的组织病理学检查,均未出现与药物有关的明显的实质性病变(见图 3)。

表 4 安儿宁颗粒对幼年大鼠脏器重量和脏器系数的影响(停药检查阶段)($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effects of AEN on organ weight and coefficient in juvenile SD rats(Drug withdrawal)($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别 Groups	肝重量(g) Liver weight(g)	肾重量(g) Kidney weight(g)	肝系数(%) Liver coefficient(%)		肾系数(%) Kidney coefficient(%)	
	♀	♀	♂	♀	♂	♀
溶媒对照组 Control geroup	6.647 ± 0.497	1.813 ± 0.146	2.514 ± 0.133	2.455 ± 0.107	0.641 ± 0.040	0.668 ± 0.034
唐古特乌头组 AT group	6.583 ± 0.446	1.835 ± 0.134	2.500 ± 0.148	2.421 ± 0.098	0.632 ± 0.021	0.676 ± 0.046
低剂量组 Low-dose group	6.678 ± 0.739	1.824 ± 0.156	2.545 ± 0.154	2.422 ± 0.145	0.649 ± 0.051	0.663 ± 0.024
中剂量组 Medium-dose group	6.291 ± 0.396	1.797 ± 0.174	2.587 ± 0.168	2.436 ± 0.124	0.643 ± 0.051	0.695 ± 0.055
高剂量组 High-dose group	7.665 ± 0.554**	2.015 ± 0.156**	2.971 ± 0.214**	2.786 ± 0.228**	0.735 ± 0.042**	0.731 ± 0.045**

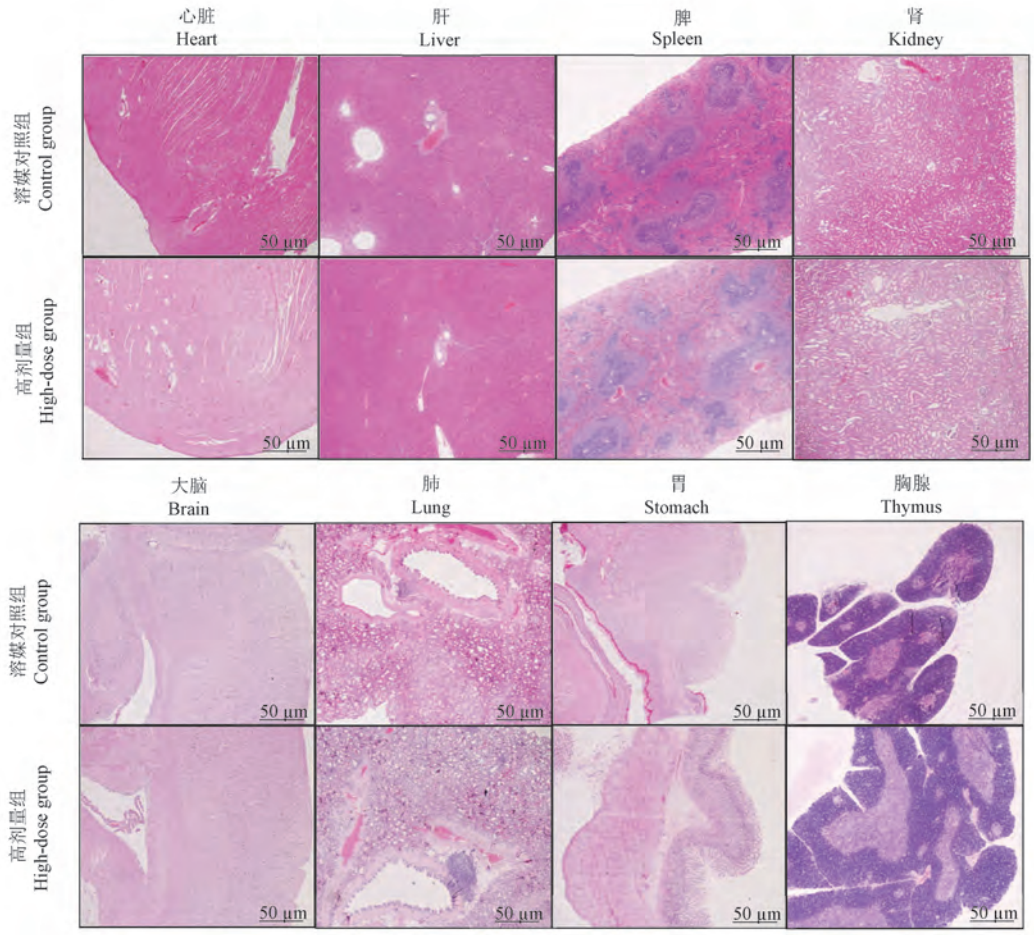


图 3　重复经口给予安儿宁颗粒后幼年大鼠主要脏器的病理学图片(停药检查阶段)

Figure 3　Histopathological images of main organs of juvenile SD rats after repeated oral administrated AEN (Drug withdrawal)

3　讨论

儿童的各器官和系统处于发育过程中,其脏器结构、生理功能与成人存在差别,可能会对药物毒性或对毒性的耐受程度产生不同的影响[14-16]。因此,需要采用幼年动物的非临床试验安全性数据,以充分评估儿科药物的临床长期使用安全性[17]。安儿宁颗粒作为藏医经典儿科用药,方中多含藏医特有药材,其中唐古特乌头为青藏高原特有毛茛科植物唐古特乌头和船盔乌头的干燥全草。传统藏医认为唐古特乌头无毒且具有清热解毒功效,但现代有研究发现唐古特乌头中的总生物碱对小鼠具有一定的心脏毒性[5],且由于唐古特乌头不是内地常用药材,易被认为属于有大毒的乌头类中药(川乌、草乌等)。为明确安儿宁颗粒中唐古特乌头的毒性,并充分评估安儿宁颗粒在临床使用中对儿童患者的安全性,有必要开展安儿宁颗粒对幼年动物的单次给药毒性和重复给药毒性实验。

据《儿科用药非临床安全性研究技术指导原则》,幼龄动物毒理学实验首选啮齿类动物[18],本研究采用传统动物品系 SD 大鼠。重复给药毒性实验中设计 SD 大鼠的起始给药年龄为 3 ~ 4 周,相当于人类的儿童期(2 ~ 12 岁),给药结束年龄为 16 ~ 17 周,相当于已成年,用以支持 2 岁儿童至成年的发育阶段中药物的毒性评价[19-20]。

据 2020 版《中华人民共和国药典》记载,每 1 g 安儿宁颗粒含生药材 0.485 g,临床用量为每次 1.5 g(< 1 岁),3 g/次(1 ~ 5 岁),6 g/次(> 5 岁),每日 3 次,儿童(按标准体重 30 kg 计)临床日用量为 0.144 g 生药/ kg 体重,按体表面积折算成幼年大鼠(按 100 g 体重计)日用量为 0.864 g 生药/ kg 体重。本研究单次给药毒性实验的剂量为临床日用量的 277.8 倍,重复给药毒性实验低、中、高剂量分别为临床日剂量的 3.5、12.7、46.3 倍;唐古特乌头组剂量与安儿宁颗粒高剂量所含唐古特乌头的剂量相同(临床日剂量的 46.3 倍),以充分暴露安儿宁颗粒及唐古特乌头的毒性。

本研究考虑成药颗粒剂含有较多辅料成分,无

法提高动物实验给药剂量,为了加大毒性暴露和保证给药剂量的准确性,故采用特制高浓度安儿宁颗粒(清膏)和人工牛黄临用前按比例配制。研究结果显示,幼年大鼠单次给予最大给药量的安儿宁颗粒,体重随实验时间延长而增加,但增长速率低于溶媒对照组;重复 3 个月给予安儿宁颗粒,一般观察及凝血、尿液、眼科、组织病理学检查等均未见明显毒性反应,可见高剂量雄鼠摄食量小幅减少和体重增长略有减缓,嗜中性粒细胞(%NEUT、# NEUT)和单核细胞数(% MONO、# MONO)、血清白蛋白(ALB)可逆性升高,天门冬氨酸转氨酶(AST)、Na^+、Cl^-可逆性下降,上述变化偏离本实验室背景数据幅度较小,且停药后基本恢复正常,组织病理学检查也未见毒性靶器官。因此,安儿宁颗粒在幼年大鼠的单次给药毒性和重复给药毒性实验中,基本无显著毒理学意义的反应,但由于均可见体重速率的减缓,提示临床上患儿大剂量使用安儿宁颗粒可能会有降低摄食和体重减轻的风险。综合评价,安儿宁颗粒的相对安全剂量为 40.0 g 生药/kg 体重,未观察到有害作用(NOAEL)剂量为 11.0 g 生药/kg 体重。临床上,儿童按每日最大服用量(18 g 成品药),3 ~ 5 d 的临床用药疗效安全。

值得注意的是,本研究中单次给药毒性和重复给药毒性实验古特乌头生药材的剂量分别为 33 g/kg 体重和 5.5 g/kg 体重,相当于标准体重儿童日服用唐古特乌头生药材 156 g 和 26 g,是法定标准日服用量(0.6 ~ 1.2 g)[7] 上限的 120 和 20 多倍。仅表现为重复给药毒性实验中唐古特乌头组嗜中性粒细胞和单核细胞数、血清白蛋白可逆性升高,未出现文献中的毒性反应[5]。考虑文献中总生物碱采用乙醇提取得到,而安儿宁颗粒采用水提取工艺,经加热煎煮,有毒成分可能被降解,毒性显著降低[7]。且有文献指出虽然唐古特乌头与有毒中药乌头均属毛茛科乌头属植物,但其主要活性成分为内酯型生物碱,基本无毒且具有清热解毒功效,其药效物质基础、药理作用、安全性,与传统中药乌头(川乌、草乌、雪上一枝蒿等)完全不同[7]。结合本研究结果,安儿宁颗粒中藏药唐古特乌头的临床使用具有安全性。

本研究充分评估了安儿宁颗粒对幼年动物的毒性反应,更进一步论证其长期使用的安全性,同时也为安儿宁颗粒用于儿童手足口病和哮喘等适应症提供一定的理论基础。

参 考 文 献(References)

[1] 王海苹. 安儿宁颗粒药理作用及临床应用 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(3): 160-161.
Wang HP. Pharmacological effects and clinical applications on Anerning particles [J]. Chin Med Mod Distance Educ Chin, 2014, 12(3): 160-161.

[2] 陈卓. 藏药安儿宁颗粒治疗小儿喉感冒的临床观察 [J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27(4): 7-8.
Chen Z. Clinical observation on the treatment of children's throat cold with Zang an'erning Granule [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2021, 27(4): 7-8.

[3] 刘帆, 张颖颖, 侯林. 安儿宁颗粒的体外抗菌、抗炎和免疫增强活性研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(16): 2221-2225.
Liu F, Zhang YY, Hou L. Study on *in vitro* antibacterial, anti-inflammatory and immunopotentiating activity of an'erning granules [J]. Chin Pharm, 2019, 30(16): 2221-2225.

[4] 杨丽华, 林丽美, 王智民, 等. 藏族药榜嘎研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10): 43-49.
Yang LH, Lin LM, Wang ZM, et al. Research progress on *Aconitum tanguticum* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(10): 43-49.

[5] 吴国泰, 牛亭惠, 刘五州, 等. 藏药唐古特乌头总生物碱的急性毒性及抗炎镇痛作用 [J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(10): 28-32.
Wu GT, Niu TH, Liu WZ, et al. Acute toxicityand anti-inflammatoryor analgesic effects of total alkaloids of *Aconitum tanguticum* in mice [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2017, 26(10): 28-32.

[6] 江山山, 蒋锦燕, 李桥桥, 等. 西红花与红花的抗血栓作用研究 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3584-3590.
Jiang SS, Jiang JY, Li QQ, et al. Anti-thrombotic effect of *Crocus sativus* and *Carthamus tinctorius* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(12): 3584-3590.

[7] 黄海涛, 彭毛卓玛, 程晓辉, 等. 藏成药安儿宁颗粒的历史沿革和中医解读 [J]. 中国民族医药杂志, 2022, 28(2): 57-60.
Huang HT, Peng MZM, Cheng XH, et al. Historical evolution and TCM interpretation of Tibetan medicine Anerning Granules [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2022, 28(2): 57-60.

[8] 时富枝, 唐蕾, 李丹凤. 安儿宁颗粒联合乳糖酸红霉素治疗儿童上呼吸道感染的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(5): 873-876.
Shi FZ, Tang L, Li DF. Clinical study on Anerning Granules combined with erythromycin lactobionate in treatment of upper respiratory tract infection in children [J]. Drugs Clin, 2020, 35(5): 873-876.

[9] 张金华. 藏药安儿宁颗粒联合双黄连口服液治疗小儿风热感冒配合全面护理的效果探析 [J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27(5): 69-71.
Zhang JH. Effect of Zang'an'erning granule combined with Shuanghuanglian oral liquid in treating children's wind-heat cold

and comprehensive nursing [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2021, 27(5): 69-71.

[10] 李晓慧. 安儿宁颗粒联合双歧杆菌四联活菌片治疗儿童肺炎继发性腹泻的临床疗效分析 [J]. 现代诊断与治疗, 2021, 32(20): 3205-3207.
Li XH. Clinical efficacy analysis of Anning Granule combined with *Bifidobacterium* quadruple viable tablets in the treatment of secondary diarrhea of pneumonia in children [J]. Mod Diagn Treat, 2021, 32(20): 3205-3207.

[11] 袁嫣瑛. 安儿宁+顺尔宁联合鼻腔冲洗治疗儿童上呼吸道感染的临床研究 [J]. 中国医学创新, 2020, 17(17): 60-64.
Yuan YY. Clinical study on the treatment of children with upper respiratory tract infection by nasal irrigation combined with anerning and shunerning [J]. Med Innov Chin, 2020, 17(17): 60-64.

[12] 于新巧, 米艳丽. 安儿宁颗粒合阿奇霉素颗粒治疗咳嗽变异性哮喘 20 例临床疗效观察 [J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(22): 36.
Yu XQ, Mi YL. Clinical observation on 20 cases of cough variant asthma treated with Anning Granule and Azithromycin Granule [J]. Chin J Ethnomedicine Ethnopharmacy, 2013, 22(22): 36.

[13] 于祥. 金诃安儿宁颗粒治疗小儿手足口病(普通型)213 例疗效观察 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2012, 4(2): 143-144.
Yu X. Clinical observation on 213 cases of children's hand-foot-mouth disease (common type) treated with Jin He An Er Ning Granule [J]. Chin Pediatr Integr Tradit West Med, 2012, 4(2): 143-144.

[14] Duarte DM. Use of juvenile animal studies to support oncology medicine development in children [J]. Reprod Toxicol, 2015, 56: 97-104.

[15] 周莉, 郭隽, 孙祖越. 儿科用中药发育毒理学研究及评价进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(8): 568-574.
Zhou L, Guo J, Sun ZY. Progress in study and evaluation of developmental toxicology for pediatrics traditional Chinese medicine [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2020, 34(8): 568-574.

[16] 杨娜, 韩玲. 儿科中药新药临床研究安全性考虑 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(11): 811-816.
Yang N, Han L. Safety evaluation of traditional Chinese medicine in pediatric populations [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2020, 34(11): 811-816.

[17] Brent RL. Utilization of juvenile animal studies to determine the human effects and risks of environmental toxicants during postnatal developmental stages [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2004, 71(5): 303-320.

[18] 黄芳华, 王庆利, JIM Ridings, 等. 幼龄动物毒理学研究: 试验设计、实施和结果分析 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(2): 151-161.
Huang FH, Wang QL, Jim R, et al. Juvenile animal toxicity study: design, conduct, and report [J]. Chin J New Drugs, 2017, 26(2): 151-161.

[19] 吕晗莹, 宋翼升, 王汉波, 等. 去壁灵芝孢子粉幼龄大鼠安全性评价研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 21-30.
Lyu HY, Song YS, Wang HB, et al. Safety evaluation of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder in juvenile rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 21-30.

[20] 张城达, 宋翼升, 扈荣, 等. 复方蒲公英制剂幼龄大鼠重复给药毒性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 33-42.
Zhang CD, Song YS, Hu R, et al. Repeated dose toxicity of compound *Taraxacum mongolicum* extract in juvenile rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 33-42.

[收稿日期] 2022-06-02

李萌,平键,徐列明. Mdr2 基因敲除小鼠建立原发性肝癌模型观察［J］. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1058-1063.
Li M, Ping J, Xu LM. Establishment of a primary liver cancer model in Mdr2 gene knockout mice: an observational study［J］. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1058-1063.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.006

Mdr2 基因敲除小鼠建立原发性肝癌模型观察

李萌[1,2],平键[1,2,3*],徐列明[1,2,3]

(1.上海中医药大学附属曙光医院,上海 201203;2.上海中医药大学肝病研究所,上海 201203;3.肝肾疾病病证教育部重点实验室,上海 201203)

【摘要】 目的 观察 C57BL/6 背景的 Mdr2 基因敲除小鼠自发肝肿瘤形成情况。**方法** (11.3 ± 4.2)周龄 Mdr2 基因敲除 C57BL/6-Abcb4^{tm1} 小鼠 9 只和野生型 C57BL/6 小鼠 5 只,连续饲养 65 周后处死小鼠,留取血清及肝标本。检测血清 ALT、AST、AFP 水平,肝组织石蜡切片做 HE、天狼猩红染色,免疫组织化学检测肿瘤及肿瘤旁组织 CK-7、CK-19 表达情况。**结果** 9 只 Mdr2 基因敲除小鼠均自发形成肝肿瘤,血清 ALT、AST、AFP 水平均显著高于野生型小鼠($P < 0.01$),Mdr2 基因敲除小鼠肝肿瘤 CK-7、CK-19 染色均为阴性。**结论** Mdr2 基因敲除小鼠连续饲养至(76.3 ± 4.2)周龄时均自发形成肝肿瘤,其病理组织分型为肝细胞癌。

【关键词】 原发性肝癌;小鼠模型;Mdr2;基因敲除;胆汁淤积
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2022)08-1058-06

Establishment of a primary liver cancer model in Mdr2 gene knockout mice: an observational study

LI Meng[1,2], PING Jian[1,2,3*], XU Lieming[1,2,3]

(1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. 2. Institute of Hepatology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203. 3. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Ministry of Education, Shanghai 201203)
Corresponding author: PING Jian. E-mail: jian_ping@shutcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe spontaneous liver tumor formation in Mdr2 knockout mice with C57BL/6 background. **Methods** Five wild type C57BL/6 mice and nine Mdr2 knockout C57BL/6-Abcb4^{tm1} mice aged (11.3 ± 4.2) weeks were sacrificed after 65 weeks of continuous feeding. Serum and liver samples were collected and serum ALT, AST, and AFP levels were measured. Paraffin-embedded sections of liver tissue were stained with HE and Sirius red. CK-7 and CK-19 expression in tumor and adjacent tissues was detected by immunohistochemistry. **Results** Nine Mdr2 knockout mice formed liver tumors spontaneously. Serum ALT, AST, and AFP levels were significantly higher than those in wildtype mice($P < 0.01$). CK-7 and CK-19 expression was negative in Mdr2 knockout mice. **Conclusions** The Mdr2 knockout mice formed liver tumors spontaneously when continuously fed to (76.3 ± 4.2) weeks of age, and their pathological classification was hepatocellular carcinoma.

【Keywords】 primary liver cancer; mouse model; Mdr2; gene knockout; cholestasis
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目]上海市科委项目(15401902600),上海中医药大学"研究生创新培养"专项科研项目(Y2021070)。
Funded by the Shanghai Science and Technology Commission Project(15401902600), Special Scientific Research Project of "Innovation Training for Postgraduates" of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine(Y2021070).
[作者简介]李萌(1995—),女,在读博士研究生,研究方向:中西医结合肝病防治。Email:limeng95@shutcm.edu.cn
[通信作者]平键(1976—),男,副研究员,博士,研究方向:中西医结合肝病防治。Email:jian_ping@shutcm.edu.cn

原发性肝癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一,不仅严重威胁人民生命健康,也为医疗资源带来重大负担。据统计,肝癌在 2020 年全球新发癌症疾病谱中排名第七位,在癌症致死人数中占第三位[1]。原发性肝癌包括两种主要的组织学类型:肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC),其中 ICC 约占原发性肝癌的 15%[2-3]。研究肝癌发病的机制既是重点也是难点,而选择适宜的原发性肝癌动物模型则是肝癌机制研究的必要条件。

Mdr2(multidrug resistance protein2, Mdr2)基因,又名 ATP-结合盒 B 亚家族成员 4(ATP-binding cassette subfamily B member 4, Abcb4),其编码的 Mdr2 蛋白作为一种脂质转运蛋白,能够将胆汁中磷脂的主要成分——磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)从肝毛细胆管膜的内侧转移到外侧[2]。小鼠 Mdr2 基因敲除后,PC 无法通过 Mdr2 蛋白被分泌到胆汁中,从而造成胆汁中磷脂的缺乏[4]。磷脂缺乏时,胆盐和胆固醇无法与之形成混合胶束,造成胆盐游离,引起胆管细胞损伤并导致胆汁淤积[4-5]。

文献报道显示,小鼠 Mdr2 基因敲除后表现为肝内外胆管的狭窄和狭窄所致的节段性扩张、“洋葱皮样”胆管周围纤维化和胆管局部性增生,并且随时间推进,逐渐发展为肝纤维化、肝硬化,甚至肝癌[6]。因其肝形态学变化与人类原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)相似,$Mdr2^{-/-}$小鼠也是目前最常用的 PSC 转基因动物模型[7]。已有学者使用 $Mdr2^{-/-}$小鼠进行肝癌机制研究,但不同遗传背景的 $Mdr2^{-/-}$小鼠肝癌发生时间存在一定差异。为此,本文观察了 C57BL/6 背景 $Mdr2^{-/-}$小鼠原发性肝癌的发生时间及发生率,并对其组织学类型进行了鉴定。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

9 只 SPF 级 Mdr2 基因敲除小鼠 C57BL/6-$Abcb4^{tm1}$,包括雌 6 只、雄 3 只,(11.3 ± 4.2)周龄,约 22 g。同周龄及体重的 SPF 级野生型小鼠 C57BL/6 野生型小鼠 5 只(雌 3 只,雄 2 只)亦购自苏州赛业实验动物技术有限公司【SCXK(苏)2018-0003】。小鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)2020-0009】,普通饲料饮食,自由饮水,相对湿度(55 ± 5)%,温度 25℃,光照遵循昼夜节律。本实验通过上海中医药大学实验动物中心和实验动物伦理委员会批准(PZSHUTCM190524006),并且严格遵守实验动物使用的 3R 原则。

由苏州赛业实验动物技术有限公司采用 CRISPR/Cas9 技术构建并采用 PCR 和产物测序进行鉴定。Abcb4 基因位于小鼠第 5 号染色体上(NCBI 参考序列:NM_008830),共鉴定出 28 个外显子,选择第 3 ~ 4 外显子作为目标位点,设计 gRNA(gRNA1 : 5'-TACCAAGGGCGGTACCTTCAAGG-3';gRNA2 : 5'-GCTCCTTACCACAATGGTACTGG-3')将此段基因进行剪切(见图 1A)。产生的小鼠进行 PCR 扩增验证(引物 F2 : 5'-CTTTGCAGCTAAATAAAGTGGGAC-3',引物 R1 : 5'-TCCACCCTAGACCCTTATTGTCTC-3'),然后对 PCR 产物进行测序,分析测序结果,确认基因型(见图 1B)。通过杂合子互配进行扩增繁殖,并采用 PCR(引物 F1 : 5'-TGTCATCTGGCAATTTAGGCTG-3',引物 R1 : 5'-TCCACCCTAGACCCTTATTGTCTC-3',612 bp;引物 F2 : 5'-CTTTGCAGCTAAATAAAGTGGGAC-3',引物 R1 : 5'-TCCACCCTAGACCCTTATTGTCTC-3',652 bp;纯合子小鼠仅在 612 bp 处出现条带)筛选出纯合子小鼠用于实验(见图 1C),其反应条件为:94℃ 3 min,(94℃ 30 s,60℃ 35 s,72℃ 35 s)× 35 循环,72℃ 5 min。

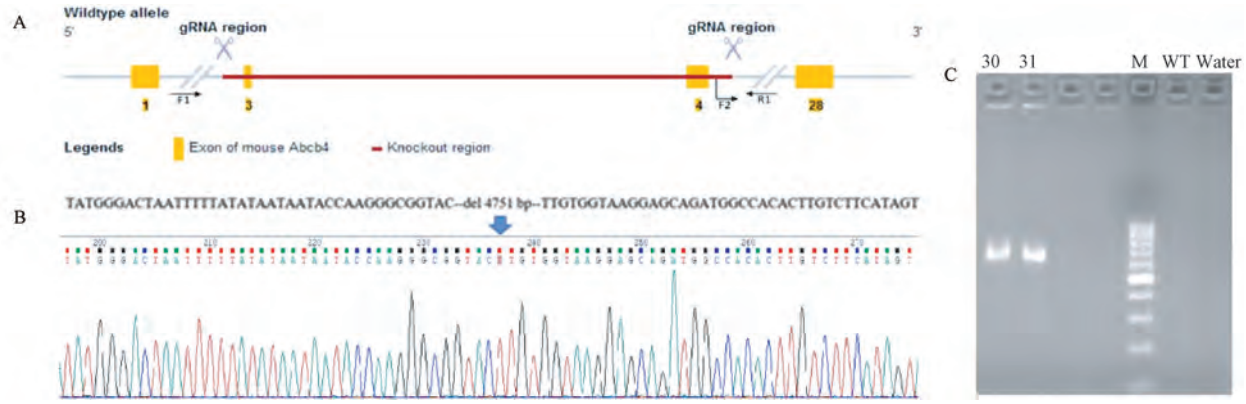
1.1.2　主要试剂与仪器

丙氨酸氨基转移酶(laninne aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)检测试剂盒,均为南京建成科技有限公司产品;甲胎蛋白(alpha fetal protein, AFP)检测试剂盒为酶联生物公司产品;细胞角蛋白 7(cytokeratin-7, CK-7)I 抗购自 Abcam 公司;细胞角蛋白 19(cytokeratin-19, CK-19)I 抗购自 proteintech 公司;通用二步法试剂盒、DAB 显色试剂盒,均购自中杉金桥公司;山羊血清为上海碧云天生物技术有限公司产品。LEICA ASP300 自动脱水机、LEICA EG1160 石蜡包埋机、转轮切片机 RM2035、HI1220 烤片机、均为德国 Leica 公司产品。M5 多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 公司产品。

1.2　方法

1.2.1　血清采集及肝大体观察

小鼠饲养 65 周后,以 20%乌拉坦腹腔注射麻



注：A：gRNA 将 Mdr2 基因第 3 ~ 4 外显子区域进行剪切；B：测序显示目的区域长 4751 bp 的序列已被敲除；C：PCR 鉴定小鼠为纯合子，30，31：小鼠编号，M：Marker，WT：野生型对照，Water：水对照。

图 1 Mdr2$^{-/-}$小鼠构建原理与鉴定

Note. A. gRNA cleaves the exon 3 ~ 4 region of Mdr2 gene. B. Sequencing showed that the 4751 bp sequence in the target region had been knocked out. C. PCR identifies mice as homozygous. 30, 31. Mouse number. M. Marker. WT. Wild type control. Water. Water control.

Figure 1 Construction principle and identification of Mdr2$^{-/-}$ mice

醉，腹主动脉采血，室温静置 1 h，以 4℃、3000 r/min 离心 15 min 并收取血清。摘取肝后观察其肿瘤发生情况并拍照，留取约 0.5 × 0.5 × 0.3 cm^3 大小肝组织、肿瘤及肿瘤旁组织标本，予 10%甲醛固定。

1.2.2 血清 ALT、AST 检测

按照试剂盒说明检测血清 ALT、AST。

1.2.3 血清 AFP 检测

采用 ELISA 法检测小鼠血清 AFP。按照说明书每样本孔加入血清 50 μL，同时设标准品孔、空白孔。各孔中加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体工作液 100 μL，37℃孵育 60 min，弃去液体，每孔加入 350 μL 洗涤液，静置 1 min 后吸弃，重复 5 次。每孔再加入底物 A、B 液 50 μL，37℃避光孵育 15 min 后加入 50 μL 终止液，于 450 nm 波长处测定 OD 值并计算各样本浓度值。

1.2.4 肝组织病理学观察

将留取的肝组织标本 10%甲醛固定 48 h 后逐级脱水、石蜡包埋，切取 4 μm 切片。石蜡切片脱蜡至水后进行苏木精-伊红（HE）染色、天狼猩红染色并在光学显微镜下观察照像。

免疫组化染色：将石蜡切片脱蜡至水后置入柠檬酸盐修复液（pH = 6.0）中沸煮 30 min 进行抗原修复，内源性过氧化物酶阻断剂孵育 10 min、10%山羊血清封闭 0.5 h。分别滴加 CK-7（1 ∶ 8000）或 CK-19（1 ∶ 1000）一抗过夜，洗片后，滴加山羊抗小鼠/兔二抗，孵育 0.5 h，洗片后，加入 DAB 显色液显色，以苏木素染色液复染后封片观察。

1.3 统计学分析

所有计量资料以平均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，用 SPSS 26.0 软件进行统计学处理，两组比较采用 t 检验，以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 两组小鼠肝大体观察比较

小鼠饲养 65 周后取其肝进行观察。正常组小鼠肝形态均正常，色泽红润，质地柔软，表面光滑无肿块。9 只 Mdr2$^{-/-}$小鼠肝表面均可见肿瘤结节，数量不等，形态不一，其余肝组织质地柔韧，各肝叶间偶有黏连（见图 2）。

2.2 两组小鼠肝组织 HE 及天狼猩红染色观察比较

肝组织 HE 染色显示：野生型小鼠肝小叶结构清晰，肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列，无变性坏死，肝窦未见狭窄或扩张。Mdr2$^{-/-}$小鼠肝癌旁组织 HE 染色显示，肝小叶结构紊乱，汇管区明显扩大，可见淋巴细胞、单核细胞等炎性细胞浸润。肝肿瘤组织 HE 染色显示，肿瘤细胞大小不一，细胞形态不规则，排列结构无序，细胞核形态多样或消失（见图 3）。

天狼猩红染色观察：野生型小鼠仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维。Mdr2$^{-/-}$小鼠肝癌旁组织内则胶原增生明显，汇管区有大量胶原纤维形成并向小叶内伸展；肝肿瘤组织天狼猩红染色显示，肝肿瘤内部无明显胶原纤维，而在肿瘤边缘有明显的胶原组织包绕（见图 3）。

2.3　两组小鼠血清 ALT、AST、AFP 水平比较

与野生型小鼠相比，Mdr2$^{-/-}$小鼠的血清 ALT 和 AST 活性均显著升高（$P < 0.01$，见表 1）。ELISA 法检测两组小鼠血清 AFP 水平，结果显示 Mdr2$^{-/-}$小鼠血清 AFP 水平较野生型小鼠显著升高（$P < 0.01$，见表 1）。

2.4　两组小鼠肝组织 CK-7、CK-19 染色观察比较

免疫组化结果显示正常组 CK-7、CK-19 阳性细胞多分布于汇管区，形态规则呈小管状，提示胆管细胞排列规则，未见胆管增生或缺失。Mdr2$^{-/-}$小鼠肝癌旁组织 CK-7、CK-19 阳性细胞数量明显增加，且多聚集于汇管区，有大量结缔组织包绕，提示 Mdr2$^{-/-}$小鼠肝有明显的胆管增生。而在肿瘤组织中，多数样本中均未见 CK-7、CK-19 阳性细胞，个别样本中有散在的 CK-7、CK-19 阳性细胞单个或小管样分布，但染色面积均未达到 5%（见图 4）。结合镜下观察及免疫组化染色结果，所有样本均被判断为原发性肝细胞癌。

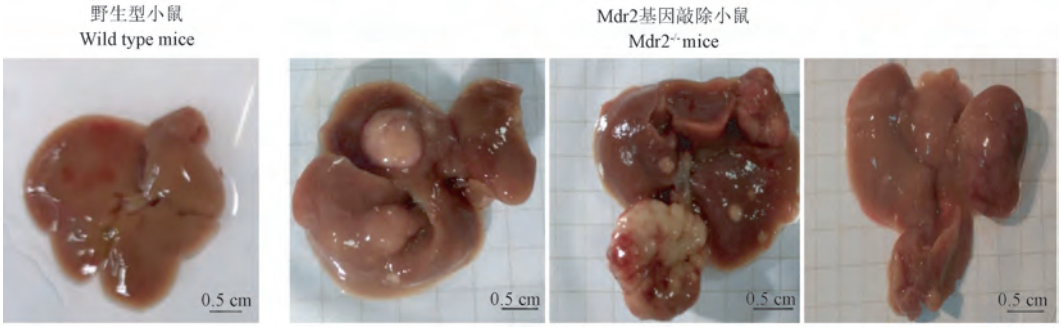


图 2　Mdr2$^{-/-}$小鼠肝肿瘤形态

Figure 2　Morphology of liver tumors in Mdr2$^{-/-}$ mice

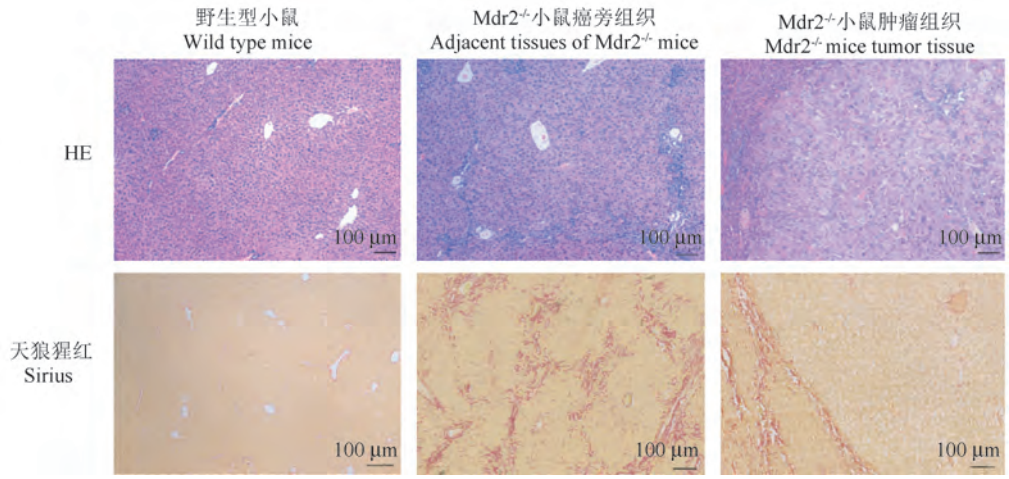


图 3　小鼠肝组织 HE 和天狼猩红染色（×100）

Figure 3　HE and Sirius red staining of mice liver tissue（×100）

表 1　两组小鼠血清 ALT、AST、AFP 水平（$\bar{x} \pm s$）

Table 1　Serum ALT、AST、AFP levels of two groups of mice（$\bar{x} \pm s$）

组别 Groups	n	ALT（U/L）	AST（U/L）	AFP（ng/mL）
野生型 Wild type mice	5	5.85 ± 3.21	4.28 ± 0.60	0.81 ± 0.10
Mdr2$^{-/-}$小鼠 Mdr2$^{-/-}$ mice	9	39.34 ± 19.04**	20.71 ± 7.34**	2.40 ± 0.79**

注：与正常组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

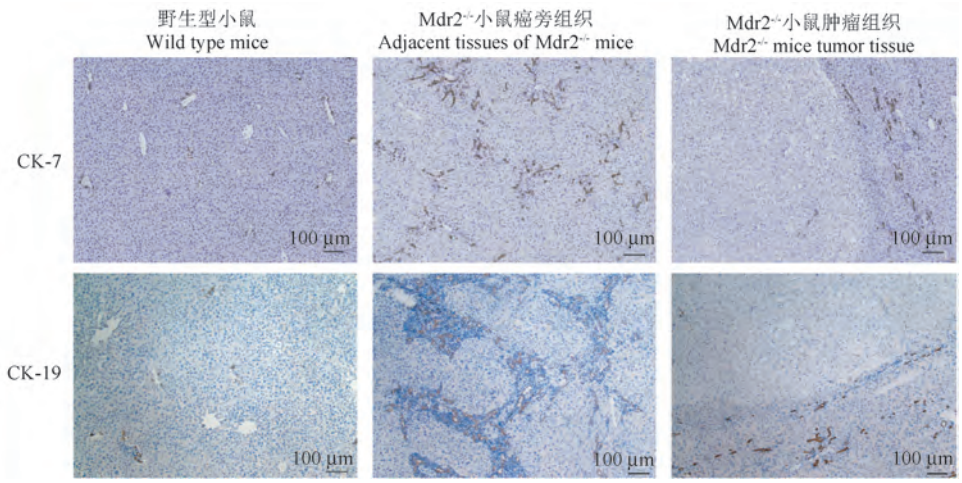


图 4 两组小鼠肝 CK-7、CK-19 染色结果对比(×100)

Figure 4 Comparison of CK-7 and CK-19 staining results in the liver of two groups of mice (×100)

3 讨论

目前常见的小鼠原发性肝癌造模方法有化学诱导法、肿瘤移植法以及采用基因修饰小鼠等。其中化学诱导法多采用硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)或二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)等化学药物长期给药,其建立小鼠原发性肝癌模型的时长多为 6 ~ 12 个月,诱发小鼠肝癌的成功率较高[8-9]。但高剂量染毒存在动物死亡率较高的风险,故在染毒剂量、方法和时长等方面还需不断优化,尚未形成较统一的造模方案。肿瘤移植法通常将肿瘤组织或细胞株移植到裸鼠皮下或肝,使其成为荷瘤动物模型,其优点是成瘤时间快、造模周期短、易于观测。但遗憾的是其无法模拟人类肿瘤的形成过程中组织学及微环境的自然癌变特征[10]。在本实验中,我们构建了 C57BL/6. Mdr2 基因敲除小鼠并观察其自发形成肝肿瘤情况。所观察的 9 只 $Mdr2^{-/-}$小鼠均自发形成肝肿瘤,观察期间未见小鼠死亡,且正常饮食无需染毒,避免了实验操作误差及接触有毒化学品的风险。并且,该小鼠肿瘤的形成机制可能与肝细胞持续存在慢性损伤和炎症相关,经过长期发展最终出现肝癌,此过程无需人为干预,与肿瘤发生的自然特征更为贴近。伴随基因编辑技术的不断进步,基于基因修饰造成肝癌的动物模型已逐渐被重视和采用。例如 Kim 等[11]建立的 HBV 相关的转基因肝癌小鼠模型,HBx 基因转入 CD1 小鼠后,小鼠在 8 ~ 10 月龄时即出现肝肿瘤结节,并在 11 ~ 15 个月时大多数雄性小鼠将死于肝透明细胞癌。而 Engelholm 等[12]则利用 CRISPR/Cas9 技术发现 Dnajb1-Prkaca 基因融合足以诱导一种多发于儿童的肝癌——纤维层状肝细胞癌(fibrolamellar hepatocellular carcinoma, FL-HCC)。本实验结果显示,$Mdr2^{-/-}$小鼠在连续饲养 65 周后均发生了肝肿瘤,此时小鼠的平均月龄为 17.5 个月,其肿瘤表型为肝细胞癌。

细胞角蛋白(cytokeratin, CK)主要分布于上皮细胞,是角质细胞中的主要骨架蛋白。在正常肝中,胆管上皮细胞主要表达 CK-7 和 CK-19,而正常的成熟肝细胞则不表达,故而 CK-7 和 CK-19 对胆管上皮细胞和肝内胆管细胞癌具有特异性染色[13]。本实验中小鼠肝表现出了胆管细胞增生、管腔宽大畸形等胆管病变,但并未在肿瘤样本中发现胆管细胞癌性病变,结合组织病理学观察及 CK-7 和 CK-19 免疫组化结果,判断该小鼠自发肿瘤为肝细胞癌。结果表明 $Mdr2^{-/-}$小鼠适宜作为肝细胞癌的研究模型。

尽管 $Mdr2^{-/-}$小鼠肝癌模型具有造模简便、成瘤率高及死亡率低的特点,但其缺点在于造模周期较长。据报道,基于 BALB/c 背景的 Mdr2 敲除小鼠在 7 月龄时即可观测到肝癌发生,其组织学类型为肝细胞癌[6]。本实验构建了 C57BL/6 小鼠背景的 Mdr2 敲除小鼠,在饲养 55 周时处死的小鼠未观察到肝肿块,而在 65 周观察到本实验 9 只小鼠全部有肝肿块形成,可能与不同品系小鼠的差异有关。此外,已有研究表明,FVB 背景的 $Mdr2^{-/-}$雌性小鼠较雄性疾病进展更快,表现出更严重的胆汁淤积和肝纤维化症状[14-15]。在本实验中雌性和雄性小鼠肿瘤最早发现时间均为 71 周龄,且血清 AFP 水平无

明显差异,其原因除了品系差异外,也可能与样本数量较少有关。因此进一步探究雌性小鼠是否能更快进展为肝癌,或在 Mdr2 基因敲除的基础上联用化学药物干预能否进一步缩短造模时间,这些问题均需要更多的实验证据观察验证。另外,肝癌模型制备的重要用途之一是用于抗癌药物的研发,该模型是否可用于药物疗效评估,也有待于进一步探索。

总之,本实验显示连续饲养至(76.3 ± 4.2)周龄的 C57BL/6. Mdr2$^{-/-}$小鼠可自发形成肿瘤,其表型为肝细胞癌,该肿瘤模型的形成特征及应用前景需继续深入研究。

参　考　文　献(References)

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] Zheng RS, Qu CF, Zhang SW, et al. Liver cancer incidence and mortality in China: Temporal trends and projections to 2030 [J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(6): 571-579.

[3] Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management [J]. Nat Rev Gastro Hepat, 2020, 17(9): 557-588.

[4] Oude Elferink RP, Paulusma CC. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein) [J]. Pflugers Arch, 2007, 453(5): 601-610.

[5] 李萌, 平键, 徐列明. Mdr2 基因敲除小鼠在肝病研究中的应用 [J]. 中华肝脏病杂志, 2021, 29(6): 585-590.
Li M, Ping J, Xu LM. Application of Mdr2 gene knockout mice in the study of liver disease [J]. Chin J Hepatol, 2021, 29(6): 585-590.

[6] Ikenaga N, Liu SB, Sverdlov DY, et al. A new Mdr2$^{-/-}$ mouse model of sclerosing cholangitis with rapid fibrosis progression, early-onset portal hypertension, and liver cancer [J]. Am J Pathol, 2015, 185(2): 325-334.

[7] Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, et al. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice [J]. Gastroenterology, 2004, 127(1): 261-274.

[8] Galicia-Moreno M, Silva-Gomez JA, Lucano-Landeros S, et al. Liver cancer: therapeutic challenges and the importance of experimental models [J]. Can J Gastroenterol, 2021, 2021: 8837811.

[9] 孙振宇, 武鸿彪, 刘宁, 等. 小鼠原发性肝癌模型的建立与优化 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 22-27.
Sun ZY, Wu HB, Liu N, et al. Establishment and optimization of a mouse model of primary liver cancer [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 22-27.

[10] Cho K, Ro SW, Seo SH, et al. Genetically engineered mouse models for liver cancer [J]. Cancers, 2019, 12(1): 14.

[11] Kim C, Koike K, Saito I, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice [J]. Nature, 1991, 351(6324): 317-320.

[12] Engelholm LH, Riaz A, Serra D, et al. CRISPR/Cas9 engineering of adult mouse liver demonstrates that the dnajb1-prkaca gene fusion is sufficient to induce tumors resembling fibrolamellar hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2017, 153(6): 1662-1673.

[13] Chatzipantelis P, Lazaris A, Kafiri G, et al. Cytokeratin-7, cytokeratin-19, and c-Kit: Immunoreaction during the evolution stages of primary biliary cirrhosis [J]. Hepatol Res, 2006, 36(3): 182-187.

[14] van Nieuwerk CM, Groen AK, Ottenhoff R, et al. The role of bile salt composition in liver pathology of mdr2 (-/-) mice: differences between males and females [J]. J Hepatol, 1997, 26(1): 138-145.

[15] Li XY, Liu RP, Yang J, et al. The role of long noncoding RNA H19 in gender disparity of cholestatic liver injury in multidrug resistance 2 gene knockout mice [J]. Hepatology, 2017, 66(3): 869-884.

[收稿日期]　2022-04-19

杨星九,张文龙,史旭东,等. 肺原位移植瘤小鼠模型的建立［J］. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1064-1070.
Yang XJ, Zhang WL, Shi XD, et al. Establishment of an orthotopic lung cancer model［J］. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1064-1070.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.007

肺原位移植瘤小鼠模型的建立

杨星九[1,2],张文龙[1,2],史旭东[1,3],李梦媛[1,3],张国新[1,4],高苒[1,2,3,4*]

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

【摘要】 目的 本研究拟建立一种小鼠肺癌原位移植瘤模型,用于模拟临床患者肺癌的发生及发展。**方法** 构建表达荧光素酶报告基因的小鼠肺癌细胞 LLC-luc,通过手术将 LLC-luc 细胞注射至小鼠左肺,构建原位移植瘤模型。使用 CT 和活体荧光成像系统对原位移植瘤模型进行示踪监测,并于肿瘤移植后第 14 天取材,IHC 检测组织免疫学及免疫微环境特征。**结果** LLC-luc 细胞注射后,原位移植肿瘤成功定植于左肺,可通过 CT 和活体荧光成像示踪监测肿瘤的发展过程,IHC 结果显示肿瘤具备转移潜质,肿瘤内部存在免疫细胞浸润。**结论** 本研究成功建立了一种易于评价,贴近于临床患者肺癌的发展的小鼠肺癌原位移植瘤模型。

【关键词】 肺癌;原位;移植瘤模型;影像学
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847 (2022) 08-1064-07

Establishment of an orthotopic lung cancer model

YANG Xingjiu[1,2], ZHANG Wenlong[1,2], SHI Xudong[1,3], LI Mengyuan[1,3], ZHANG Guoxin[1,4], GAO Ran[1,2,3,4*]

(1. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Science(CAMS), Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College(PUMC), Beijing 100021, China. 2. National Human Disease Animal Model Resource Center, Beijing 100021. 3. NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021.
4. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Disease, Beijing 100021)
Corresponding author: GAO Ran. E-mail: gaoran@cnilas.org

【Abstract】 Objective A mouse orthotopic transplanted tumor model of lung cancer was established to simulate the occurrence and development of lung cancer in clinical patients. **Methods** The LLC cell line expressing a luciferase reporter gene was established (LLC-luc). LLC-luc cells were injected into the left lung of mice to establish an orthotopic tumor model. CT and *in vivo* fluorescence imaging were used for tracer monitoring of the orthotopic tumor model. Lung tumors were collected on day 14 after cell injection. The characteristics of tissue immunology and the immune microenvironment were assessed by IHC. **Results** After LLC-luc cell injection, a tumor had formed in the left lung. The tumor has a metastatic potential and immune cell infiltration was detected. **Conclusions** We successfully established a mouse model of orthotopic lung cancer, which is simple to evaluate and mimics the development of lung cancer in clinical patients.

【Keywords】 lung cancer; orthotopic; grafted tumor model; imaging
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肺癌是目前全球死亡率最高、且发生率第二的癌症[1]。目前肺癌治疗的主要方案是手术结合放疗和系统性化疗,然而在大多数临床病例中,肺癌仍然表现出明显的不良预后,肺癌患者的五年生存

[基金项目]中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-013)。
Funded by the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences(CIFMS)(2021-I2M-1-013).
[作者简介]杨星九(1992—),男,学士,研究方向:肿瘤模型创制。Email:yangxingjiu@cnilas.org
[通信作者]高苒(1980—),女,博士,研究方向:肿瘤模型创制。Email:gaoran@cnilas.org

率明显低于其他癌症患者。对于肺癌研究而言,仍需要不断研究肺癌发展的机制,探索化疗药物对肺癌的治疗作用[2],而理想的肺癌动物模型是肺癌研究中的重要工具和研究桥梁。

肺癌动物模型主要包括化学诱导模型、基因工程模型、移植瘤模型等。相较于前两种模型而言,肺癌移植瘤模型因具备制备周期短、重复性高、易于跟踪等优点,在研究中被广泛应用[3]。

目前肺癌研究中应用较为常用的移植瘤疾病动物模型主要有两种,其一是肺癌的小鼠皮下移植瘤模型,另一种是经小鼠尾静脉注射形成的肺部转移瘤模型。前者操作简便,但是肿瘤发生发展脱离了肺部原本的微环境[3]。后者所构建的模型,相比于原发性肺癌的发生,更近似于模拟临床患者肿瘤的肺部转移而非发生情况。此外,尾静脉途径构建的肺转移瘤模型的肿瘤结节多而随机,难以对转移性肺肿瘤的发生发展过程进行跟踪和评价[4]。这两种模型在模拟临床肺癌病例时,均存在一定缺陷[5]。

为了更好的模拟临床肺癌病例,直接将肿瘤定植于小鼠肺的造模方式应运而生,即肺癌原位移植瘤模型。原位移植瘤的造模方法主要包括通过气道移植和从胸骨外直接注射两种方式。由于缺乏精确定位,其肺癌造模结果依然存在肿瘤结节多发、不易准确跟踪的可能[6-7]。为了解决上述问题,我们对前人方法进行了改进,通过影像学 CT 确认模型所需进针深度及进针位置,采用立体定位仪,精确控制进针位置、进针深度与进针角度,使用微量注射器精确控制细胞注射体积,将肿瘤细胞直接接种于小鼠肺部,建立了一种小鼠肺癌原位移植瘤模型。相较于之前的模型研究,原位移植瘤模型具有原发于肺部、定植位置明确、肿瘤结节单发等优点,更贴近于临床患者肺癌的发生及发展,并可利用分子影像学技术对肿瘤发展过程进行示踪记录。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

6 只 6 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,体重 16 ~ 18 g,购买自北京华阜康生物科技有限公司【SCXK(京)2019-0008】。饲养期间各组小鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由北京华阜康生物科技有限公司提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22 ~ 25℃,饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所动物房【SYXK(京)2019-0039】。所有操作均符合中国医学科学院医学实验动物研究所伦理学要求(IACUC GR21003)。

1.1.2　细胞

LLC 小鼠肺癌细胞(国家实验细胞资源共享平台,中国)。

1.1.3　主要试剂与仪器

Luc 过表达慢病毒(吉凯基因,中国),0.25%胰酶-EDTA(Gibco,美国),PBS(Gibco,美国),Matrigel(BD,美国),D-Luciferin(泛博生化),CD3 抗体(abcam,ab16669),CD19 抗体(abcam,ab245235),F4/80 抗体(abcam,ab16911),Ly6G 抗体(abcam,ab25377),Ki-67 抗体(abcam,ab16667),CD31 抗体(CST,77699),α-SMA 抗体(abcam,ab124964),Vimentin 抗体(CST,5741S),E-cadherin 抗体(CST,14472S)。Inveon 微型 CT 扫描仪(西门子,德国),小鼠立体定位仪(正华生物,中国),30 g 微量注射器(Hamilton,美国)。

1.2　方法

1.2.1　荧光素酶报告基因细胞构建

模型选用 LLC 小鼠肺癌细胞,购买自国家实验细胞资源共享平台,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养,培养条件 37℃,5% CO_2。Luc 过表达慢病毒购买自上海吉凯基因医学科技股份有限公司,将 LLC 细胞制备成浓度为 5×10^4/mL 的细胞悬液,接种 2 mL 于 6 孔细胞培养板中,于 24 h 后进行慢病毒感染。慢病毒的转染严格按照吉凯基因慢病毒使用操作手册进行。病毒感染 72 h 后,用 6 μg/mL puromycin 筛选细胞,并用 3 μg/mL puromycin 维持培养。构建成为 LLC-luc 细胞。

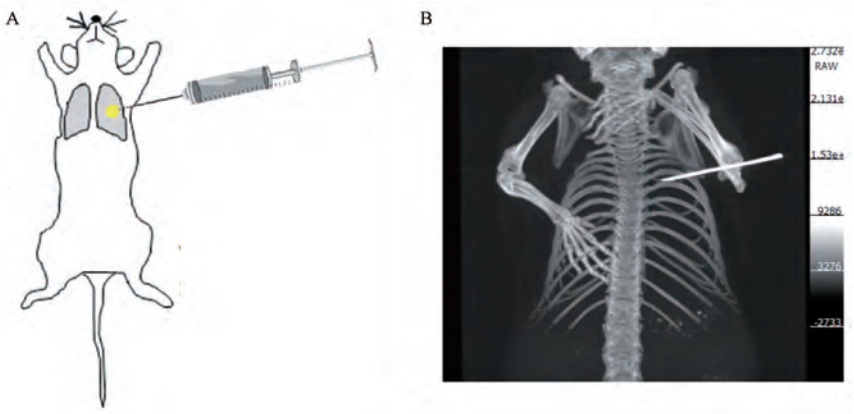
1.2.2　细胞注射悬液制备

将 LLC-luc 细胞培养至汇合度达到 80%,用 0.25%胰酶-EDTA(Gibco,美国)消化成为单细胞悬液。1200 r/min,5 min 离心后保留细胞沉淀,用 PBS(Gibco,美国)吹洗 1 次再离心后,用预冷 PBS 重悬计数,使细胞浓度达到 10^7/mL。Matrigel(BD,美国)提前置于 4℃融化,用预冷枪头按体积比 1∶1 与细胞悬液混合,制备成细胞注射悬液,置于冰上。

1.2.3　肺原位移植瘤模型构建

模型选用 C57BL/6J 小鼠。手术前用 1%戊巴比妥钠注射液麻醉,注射剂量 100 mg/kg。将小鼠左前肢腋下至肋骨下沿处皮肤备皮。小鼠向右侧面位放置于小鼠立体定位仪操作台面上,

用乙醇和碘伏消毒,切开皮肤,肌肉,暴露左侧肋骨。用 30 g 微量注射器吸取细胞注射悬液,于腋下第三、四肋骨间,垂直进针 3.5 mm,缓慢注射 10 μL 细胞注射悬液,细胞注射量为 5×10^4 个。退针后缝合肌肉,皮肤(图 1A)。为确保注射位置正确,对进针小鼠进行 CT 照射,可见注射器针头达胸腔左侧肺位置(图 1B)。将术后小鼠放置于温暖环境,待小鼠清醒后正常饲养。对照组小鼠执行同样手术操作,不注射细胞,仅注射 PBS/Matrigel 混合液 10 μL。



注:A:肺原位肿瘤注射位点;B:CT 影像学下注射器进针位置。

图 1 小鼠肺原位肿瘤造模方法

Note. A. Injection site of the othotopic cancer model. B. Injection site of the othotopic cancer model by CT imaging.

Figure 1 Modeling of the othotopic cancer model

1.2.4 CT 跟踪原位移植瘤生长

分别于模型构建第 7、14、21 天,用含 2%异氟醚的医用氧(1 L/min)麻醉小鼠,置于 Inveon 微型 CT 扫描仪上。采用 360°旋转,240 次旋转,2 次缩小基质尺寸,60 kV 电压,400 μA 电流,曝光时间 800 ms,视场 30 mm × 30 mm,获得小鼠胸部三维显微 CT 图像。采用中,高倍镜采集 18 min,获得了 30 μm 的有效各向同性分辨率,所有后处理分析均采用高速 CT 重建系统(COBRA,SIEMENS 临床前解决方案)进行。

1.2.5 生物素酶活体荧光成像检测

分别于模型构建第 7、14、21 天,小鼠腹腔注射 15 mg/mL 浓度 D-Luciferin,注射量为 10 μL/g 体重。注射 10 min 后,使用含 2%异氟烷的医用氧(1 L/min)诱导麻醉小鼠,使用 PerkinElmer Lumina III 小动物活体光学成像系统检测小鼠体内 LLC-luc 细胞活体荧光。

1.2.6 HE 染色及免疫组化染色

肿瘤移植后第 21 天,小鼠脱颈处死后,取小鼠全肺置于福尔马林中固定。经过脱水浸蜡包埋切片后,对移植瘤肺部进行 HE 染色和免疫组化染色。免疫组化抗体为:CD3,CD19,F4/80,Ly6G+,Ki-67,CD31,α-SMA,vimentin,E-cadherin。

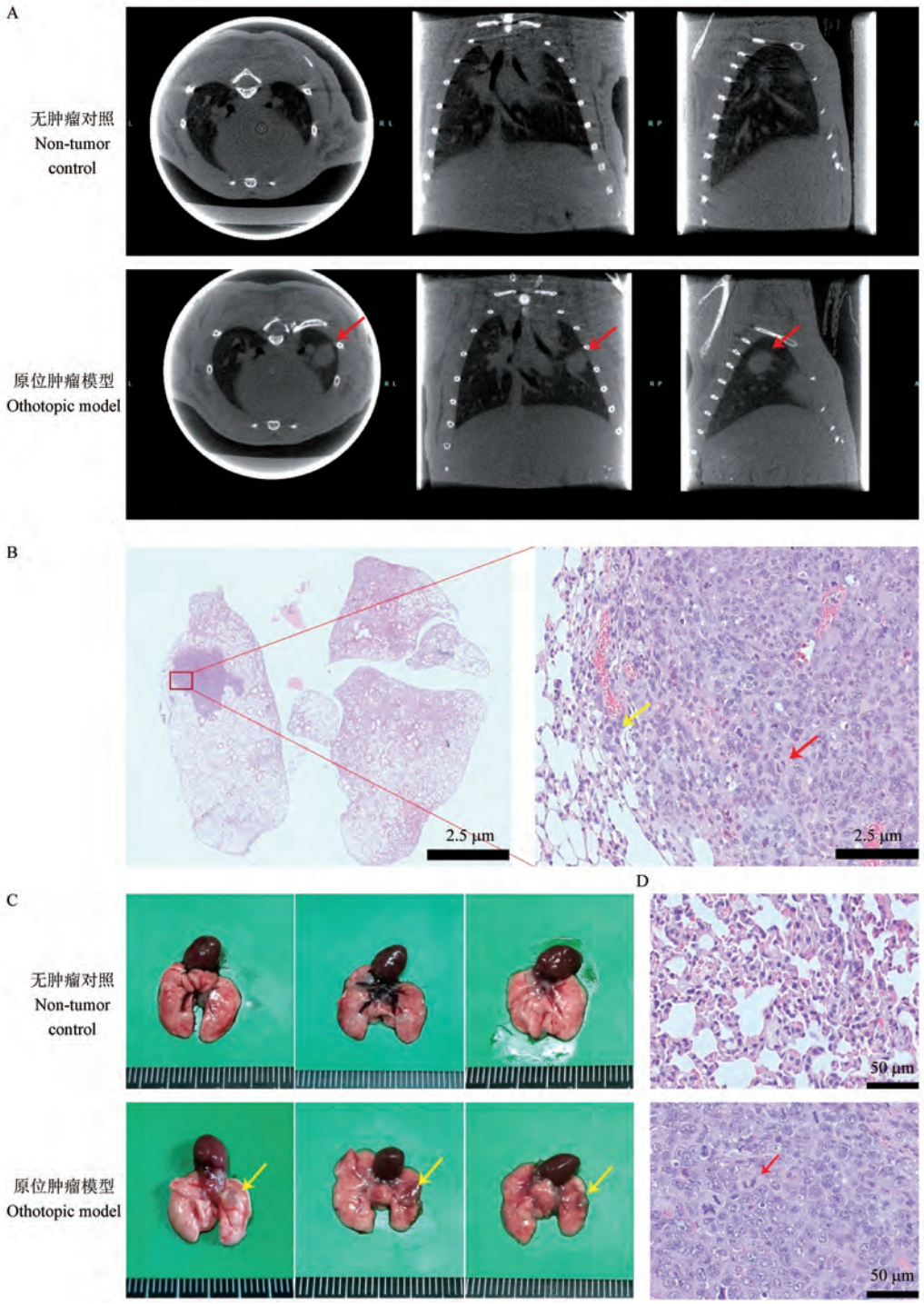
2 结果

2.1 同种原位移植肿瘤成功定植于左肺

LLC-luc 细胞肺原位接种后第 14 天,CT 影像学观察原位移植小鼠胸腔,可见左侧肺部存在单发性结节造影(图 2A),HE 病理可见肿瘤边缘存在一定浸润性生长(图 2B)。解剖后与未接种肿瘤细胞的小鼠肺相比,明显可见小鼠左侧肺部存在单发性结节(图 2C)。HE 病理结果表明,该肺上单发性结节为肿瘤组织,与正常小鼠肺组织相比其细胞核仁明显,可见有丝分裂(图 2D)。LLC-luc 细胞经肺原位接种后成功定植于左肺。

2.2 小鼠肺原位肿瘤分子影像学示踪观察

LLC-luc 细胞肺原位移植后,分别于术后第 7、14、21 天进行 CT 影像学观察(图 3A)。通过高速 CT 重建系统对 CT 造影体积进行计算,绘制出肺原位移植瘤的生长曲线,可观察到肺原位移植瘤体积随时间变化逐渐增长(图 3B)。通过荧光素酶活体荧光成像检测术后第 7、14、21 天的 LLC-luc 细胞肺原位移植瘤模型小鼠,可见 LLC-luc 细胞定植成功后,仅原位定植于肺部,且其发光强度随着时间变化逐渐增强,说明肿瘤体积逐渐增长(图 3C)。

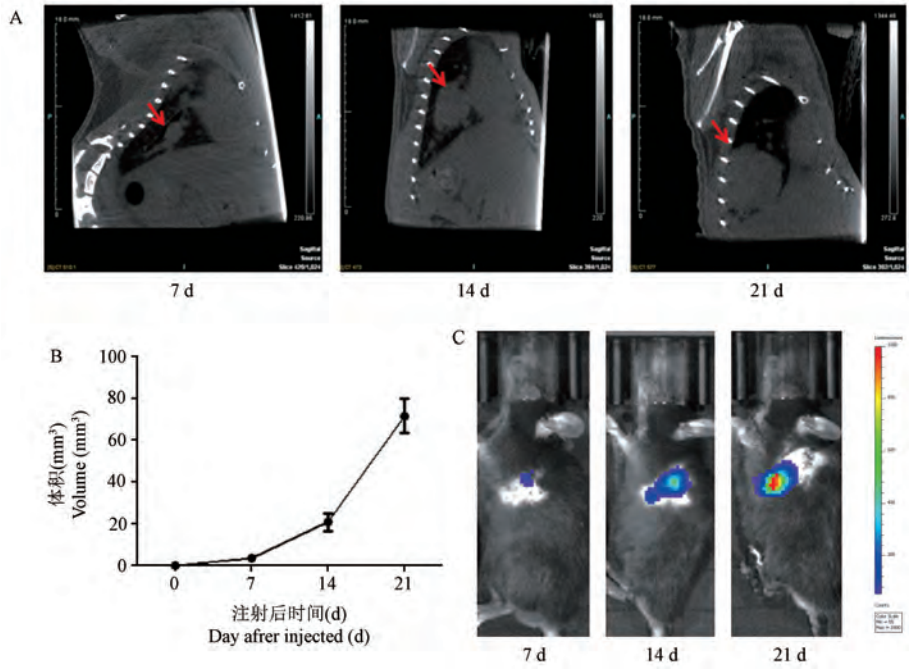


注：A：未接种肿瘤小鼠与肺原位模型的 CT 影像学水平面、冠状面、矢状面成像对比，红色箭头：肿瘤造影；B：肺原位模型 HE 结果，红色箭头：有丝分裂，黄色箭头：肿瘤边缘浸润；C：未接种肿瘤小鼠肺脏与肺原位模型肺对比，黄色箭头：肿瘤结节；D：未接种肿瘤小鼠肺组织 HE 与肺原位模型肺组织 HE 对比，红色箭头：有丝分裂。

图 2　正常肺与肺原位模型肺脏器对比

Note. A. Comparison of horizontal, coronal and sagittal CT images between uninoculated tumor mice and othotopic lung model. Red arrow. Tumor angiography. B. HE results of the lung of the othotopic cancer model. Red arrow. Mitosis. Yellow arrow. Tumor infiltration. C. Comparison of the lungs of the unvaccinated tumor mice and the lungs of the orthotopic cancer model. Yellow arrows. Tumor nodules. D. Comparison of HE in lung tissues of unvaccinated tumor mice and the orthotopic cancer model. Red arrow. Mitosis.

Figure 2　Comparison of the normal lung tissue and the lung tissue of the orthotopic cancer model



注：A：肺原位模型 CT 影像学跟踪肿瘤生长，红色箭头：肿瘤造影；B：肺原位模型 CT 影像学跟踪肿瘤体积曲线；C：活体成像荧光跟踪肿瘤生长。

图 3 对小鼠肺原位肿瘤体积进行跟踪观察

Note. A. Tumor growth of the lung of orthotopic cancer model by CT imaging. Red arrow. Tumor angiography. B. Tumor volume curve by CT imaging in the lung of orthotopic cancer model. C. *In vivo* imaging fluorescence of tumor growth.

Figure 3 Observation of the volume of the othotopic cancer model in mice

2.3 肺原位肿瘤模型的免疫学特征

通过肺原位肿瘤免疫组化实验探究肿瘤的免疫细胞浸润情况，可以观察到与正常肺组织相比，肿瘤内部存在一定量的 T 细胞（图 4）浸润，B 细胞、巨噬细胞及中性粒细胞（图 4）浸润不明显。

2.4 肺原位肿瘤模型增殖及微环境特征

通过对肺原位肿瘤进行免疫组化染色，与正常肺组织相比，可以观察到原位肿瘤组织中 Ki67 呈阳性（图 5），肿瘤组织生长旺盛。通过 CD31 染色可见肿瘤内部分布大量微小血管（图 5）。对肿瘤相关成纤维细胞标志物 α-SMA 染色可见（图 5），肿瘤组织中肿瘤相关成纤维细胞浸润明显。该肿瘤模型在肿瘤上皮间质转化方面，肿瘤组织 E-钙黏蛋白表达缺失（图 5），波形蛋白 Vimentin 表达明显（图 5），表明肿瘤组织在模型构建过程中发生上皮间质转化。文献报道肿瘤的上皮间质转化与肿瘤的转移密切相关，由此肺原位模型的肿瘤组织存在转移的潜质。

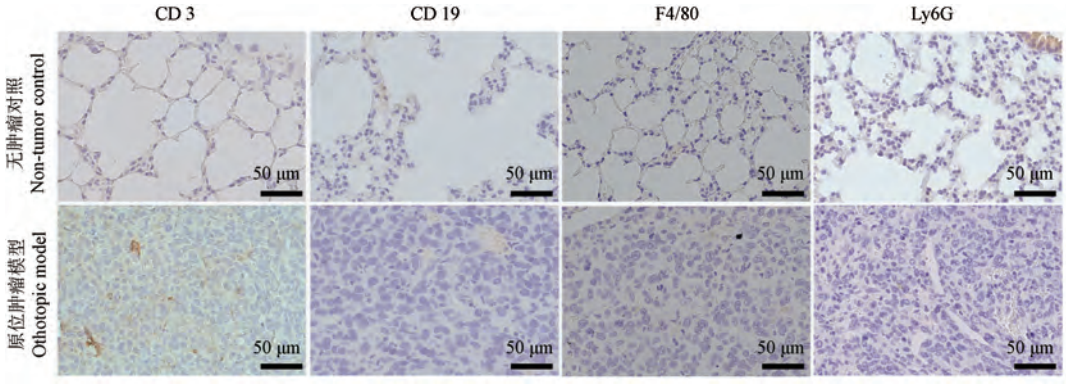


图 4 肺原位模型的免疫学特征

Figure 4 Immunological characteristics of the orthotopic lung cancer model

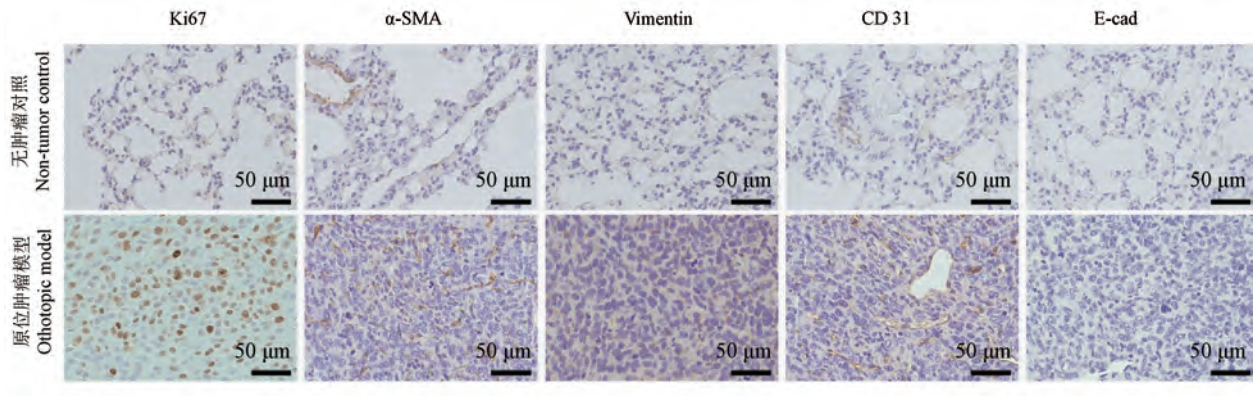


图 5　肺原位肿瘤模型增殖及微环境特征

Figure 5　Characteristics of proliferation and microenvironment of the orthotopic lung cancer model

3　讨论

合适的肿瘤动物模型对于肺癌研究有着不可或缺的作用。与皮下移植瘤肿瘤小鼠模型和肺转移肿瘤模型相比，虽然肺癌原位小鼠模型在构建技术上有一定难度，但是原位模型中肿瘤发生微环境更贴近于临床肺癌的实际情况。不论是肿瘤转移、肿瘤免疫还是药物呈递过程，肺癌原位小鼠模型在模拟临床病程的过程中均有一定的优势[3]。目前研究中常用的肺癌原位小鼠模型主要包括化学诱导模型、基因工程模型、肺原位移植瘤模型等[3]。其中化学诱导模型是通过注射或鼻饲致癌剂的方法，诱发小鼠肺癌。常用的致癌诱变剂有乌拉坦等[8-9]。该模型发病周期长、发生位点不明确、难以跟踪监测，且与大部分临床病例肿瘤发生机制不符；基因工程模型是通过胚胎编辑技术，对小鼠的癌基因进行突变，使得小鼠生长过程中自发肺癌。基因工程模型根据模型设计所需，可以定时定向突变肺部基因，肺癌发生机制与临床相似。如 K-ras 突变肺癌模型是代表性模型之一[10]，其模型与 K-ras 突变的临床病例有着很高的相似性。然而该模型仍存在发病周期长，示踪监测困难等缺点[11]。近年来，肺原位移植瘤模型也逐渐出现在研究中。肺原位移植瘤模型则是通过原位注射或手术移植等方法，直接将肺癌细胞株原位接种定植于小鼠肺部[6-7]。相较于化学诱导模型和基因工程模型，该模型可以快速完成肿瘤的形成，且肿瘤定植位点明确，便于跟踪监测肿瘤生长。本文中的肺原位移植瘤模型，由于小鼠肺叶结构为一叶左肺，四叶右肺，因此将肺癌组织单一接种于小鼠左肺，便于肿瘤生长位点的一致性。免疫组化染色证明，模型中肿瘤组织具有分裂旺盛，血供丰富，上皮间质转化发生等特点。本模型构建方法明确，可重复性好，利用分子影像学手段可对肿瘤生长进行明确地示踪观察，适用于肿瘤生长相关研究或化疗药的探索。因此，肺癌原位小鼠模型是研究肺癌发生发展的有力工具之一。

在肿瘤治疗中，免疫系统起到多方面作用。一方面免疫细胞，包括 T 细胞、M1 型巨噬细胞、DC 细胞等，会对肿瘤组织起到杀伤作用，抑制肿瘤生长[12]。通过抑制免疫检查点，例如 PD-1/PD-L1 的结合，能有效提高免疫细胞对肿瘤的杀伤作用[13]。另一方面，部分免疫细胞，例如 M2 型肿瘤相关巨噬细胞，在肿瘤生长及浸润转移方面会起到趋化效果[14]。因此本文的模型构建选用的是免疫系统健全的 C57BL/6J 小鼠，以及该小鼠同源肺癌细胞系 LLC 细胞。相较于前人研究中，用人源肺癌细胞接种于免疫缺陷小鼠的模型[15]，本模型特点在于免疫系统完全参与到了小鼠肺癌生长过程中，可明确观察到免疫细胞对肿瘤组织的浸润，对于肿瘤生长过程中的免疫系统作用的研究能起到有用的帮助，更好地模拟了临床肺癌病例中遇到的问题和困难。

相较于其他肺癌原位模型，本模型亦存在不足，由于肿瘤细胞来源不是人源细胞，在模型构建过程中，可能会由于人鼠之间的基因差异，导致分子机制存在差别。为了解决这个问题，在未来的研究中，我们将探索利用人源肺癌细胞和人源化小鼠，构建免疫人源化肺原位移植瘤小鼠模型，为临床前研究提供更符合临床病例的研究工具。

参　考　文　献(References)

[1] World Health Organization. World Cancer Report 2020. Cancer [EB/OL]. [2020-02-03] HYPERLINK http://www. who.

int/mediacentre/factsheets/fs297/en/.

[2] Lee SY, Bissell MJ. A functionally robust phenotypic screen that identifies drug resistance-associated genes using 3D cell culture [J]. Bio-protocol, 2018, 8(22): e3083.

[3] Singh AP, Adrianzen Herrera D, Zhang Y, et al. Mouse models in squamous cell lung cancer: impact for drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2018, 13(4): 347-358.

[4] Thies KA, Steck S, Knoblaugh SE, et al. Pathological analysis of lung metastasis following lateral tail-vein injection of tumor cells [J]. J Vis Exp, 2020, 159: 1.

[5] Shrestha N, Lateef Z, Martey O, et al. Does the mouse tail vein injection method provide a good model of lung cancer? [J]. F1000Res, 2019, 8: 190.

[6] Stevens LE, Arnal-Estapé A, Nguyen DX. Pre-conditioning the airways of mice with bleomycin increases the efficiency of orthotopic lung cancer cell engraftment [J]. J Vis Exp, 2018, 136: 56650.

[7] Onn A, Isobe T, Itasaka S, et al. Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(15): 5532-5539.

[8] Doris K, Karabela SP, Kairi CA, et al. Allergic inflammation does not impact chemical-induced carcinogenesis in the lungs of mice [J]. Respir Res, 2010, 11(1): 118.

[9] Parra ER, Bielecki LC, Ribeiro JM, et al. Association between decreases in type V collagen and apoptosis in mouse lung chemical carcinogenesis: a preliminary model to study cancer cell behavior [J]. Clinics (Sao Paulo), 2010, 65(4): 425-432.

[10] Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice [J]. Nature, 2001, 410(6832): 1111-1116.

[11] Cussó L, Musteanu M, Mulero F, et al. Effects of a ketogenic diet on[^{18}F]FDG-PET imaging in a mouse model of lung cancer [J]. Mol Imaging Biol, 2019, 21(2): 279-285.

[12] Baxter D. Active and passive immunization for cancer [J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(7): 2123-2129.

[13] Nasser NJ, Gorenberg M, Agbarya A. First line immunotherapy for non-small cell lung cancer [J]. Pharmaceuticals, 2020, 13(11): 373.

[14] Yunna C, Mengru H, Lei W, et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 877: 173090.

[15] Taromi S, Kayser G, von Elverfeldt D, et al. An orthotopic mouse model of small cell lung cancer reflects the clinical course in patients [J]. Clin Exp Metastasis, 2016, 33(7): 651-660.

[收稿日期] 2022-03-03

任章勇,吕少诚,王芳菲,等. 两种大鼠下腔静脉移植模型建立方法的比较分析[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1071-1079.
Ren ZY, Lyu SC, Wang FF, et al. Comparative analysis of two methods for establishing inferior vena cava transplantation model in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1071-1079.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.008

两种大鼠下腔静脉移植模型建立方法的比较分析

任章勇,吕少诚,王芳菲,赵昕,郎韧,贺强*

(首都医科大学附属北京朝阳医院肝胆外科,北京 100020)

【摘要】 目的 本研究拟通过"套管法"和"吻合法"分别建立大鼠静脉置换模型,评估两种模型建立方法的优缺点,为后续静脉置换相关的病理机制研究提供安全有效的静脉置换模型。**方法** 以无特定病原体(specific pathogen free,SPF)级 BN 大鼠作为供体和受体,分别采用套管法和吻合法构建下腔静脉置换模型,分析两组模型术中所用总手术时间和血流阻断时间,术后 48 h 模型存活率,术后每隔 1 周行腹部血管超声观察置换段血管通畅情况及血流速度变化,于术后 1 周、2 周、4 周处死大鼠获取置换段静脉,观察其管径变化,通过组织病理评估血管移植后病理改变特点、qPCR 检测移植段血管组织中 TGF-β_1 的表达水平,评估两种模型建立方法的优缺点。**结果** 套管法和吻合法各建立大鼠下腔静脉置换模型 18 只,术后 48 h 内成功率无明显差异[100.0%(18/18) vs 94.4%(17/18),$P = 0.310$];套管法的总手术时间和血流阻断时间均较吻合法短[(35.8 ± 3.6) min vs (56.8 ± 4.9) min,$P < 0.05$;(14.6 ± 2.9) min vs (35.1 ± 4.5) min,$P < 0.05$]。腹部血管超声结果显示,移植段静脉血流速度早期血流速度较前有所增大,随着术后时间的延长,血流速度逐渐减小,4 周时套管组明显低于吻合组($P < 0.05$);术后 4 周时,套管组模型移植段静脉周围可见静脉侧枝循环形成,但移植静脉尚通畅,吻合组 4 周内未见明显静脉侧枝循环形成。随着术后时间的延长,两组模型中移植静脉管壁逐渐增厚直径均逐渐缩小,套管组变化较吻合组更为明显,术后各个时间内其直径均小于吻合组($P < 0.05$);套管组术后静脉壁外层可见纤维素沉积形成纤维包壳,肌层和内膜增生,管腔狭窄;吻合组模型术后移植静脉壁中单个核细胞及 $CD4^+$T 淋巴细胞浸润较套管组明显($P < 0.05$);随着术后时间的延长,两组模型移植段静脉壁中 TGF-β_1 的表达逐渐增多,各个时间点内,套管组均高于吻合组($P < 0.05$)。**结论** 套管法和吻合法均能安全有效地建立大鼠下腔静脉置换模型。与套管法相比,吻合法建立的静脉置换模型具有更轻的非特异性验证和管壁重塑,远期通畅率更高,更适用于静脉置换相关实验研究。

【关键词】 静脉置换;静脉移植;内膜增生;动物模型
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 08-1071-09

Comparative analysis of two methods for establishing inferior vena cava transplantation model in rats

REN Zhangyong, LYU Shaocheng, WANG Fangfei, ZHAO Xin, LANG Ren, HE Qiang*

(Department of Hepatobiliary Surgery, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China)
Corresponding author: HE Qiang. E-mail: heqiang349@163.com

【Abstract】 Objective This study intended to establish rat venous replacement models through the "cannula method" and "anastomosismethod" and to identify a safe and effective venous replacement model for studies into the pathological mechanisms related to venous replacement. **Methods** SPF BN rats were used. The venous replacement models were constructed using the cannula or anastomosis method. The total operation time, blood flow blockage time and the 48 h survival rates after surgery were measured and analyzed. Abdominal vascular ultrasound was performed to observe the patency and blood flow velocity changes. The rats were killed to obtain the graft at different timepoint. Pathological changes were evaluated by histopathology, and TGF-β_1 expression was detected by q-PCR. **Results** 36 rats with venous

[作者简介]任章勇(1994—),男,在读博士研究生,研究方向:胰腺恶性肿瘤。Email:13120206720@163.com
[通信作者]贺强(1954—),男,主任医师,教授,博士,研究方向:肝脏移植及肝胆胰恶性肿瘤的治疗。Email:heqiang349@163.com

replacement were established via the cannula method or anastomosis method. There was no significant difference in the 48-hour survival rates [100.0% (18/18) vs 94.4% (17/18), $P = 0.310$]. The total operation time and blood flow blocking time of the cannula method were shorter than that of the anastomosis method [(35.8 ± 3.6) min vs (56.8 ± 4.9) min, $P < 0.05$; (14.6 ± 2.9) min vs (35.1 ± 4.5) min, $P < 0.05$]. The vein blood flow velocity in the transplantation section increased in the early stage and gradually decreased with postoperative time. At 4 weeks, blood flow velocity in the cannula group was significantly lower than that in the anastomosis group ($P < 0.05$). At 4 weeks after the operation, the formation of venous collateral circulation was seen around the vein of the transplanted section of models in the cannula group, but the transplanted vein was still unobstructed. There was no obvious formation of venous collateral circulation in the anastomotic group within 4 weeks. With the advancement of postoperative time, the wall of the transplanted vein thickened and the diameter reduced gradually in the two groups. The vein diameter was smaller in the cannula group than in the anastomosis group at each timepoint after the operation ($P < 0.05$). In the cannula group, cellulose deposition was observed on the outer layer of the vein wall, forming fiber cladding in the muscle layer and intima hyperplasia and lumen stenosis. The degree of infiltration of mononuclear cells and $CD4^+$ T lymphocytes in the transplanted vein wall in the anastomotic group was significantly higher than that in the cannula group ($P < 0.05$). With the advancement of postoperative time, the expression of TGF-β_1 in the vein wall of the transplanted section of the two groups increased gradually. At each timepoint, TGF-β_1 expression in the cannula group was higher than that in the anastomosis group ($P < 0.05$). **Conclusions** Both the cannula and anastomosis method can be used to safely and effectively establish a rat inferior vena cava replacement model. Compared with the cannula method , the vein replacement model established by the anastomosis method has lighter non-specific verification and wall remodeling, and has a higher long-term patency rate, which is more suitable for experimental studies related to vein replacement.

【**Keywords**】 venous replacement; vein transplantation; intimal hyperplasia; animal model

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

随着外科手术器械的改良以及手术技术的提高,血管重建技术在外科手术中的应用越来越广泛[1-4]。目前在血管重建中应用的血管移植物有自体静脉、自体壁层腹膜/镰状韧带、人工血管及同种异体血管等[5]。迄今为止,自体血管仍然被认为是血管重建中最佳的血管移植物,但其来源有限,且在较大的血管重建中难以获得合适的自体血管。人工血管来源广泛,但术后需长期应用抗凝药,增加患者经济负担及出血风险,长期通畅率仍有待提高。同种异体血管具有来源丰富、管径易匹配、组织相容性好、近远期通畅率高等优点,是临床工作中较常选用的静脉移植物[6-8]。但同种异体血管作为异源性血管移植物,术后可能会在特异和非特异炎症反应的共同作用下导致附壁血栓形成、内膜增生及瘢痕形成[5]。因此,研究同种异体血管置换术后具体病理改变及相应机制具有重大意义。由于临床中同种异体血管置换术后病理标本获取困难,大鼠下腔静脉置换模型的建立能为同种异体血管置换后相关病理改变的研究提供模型基础。目前关于静脉移植的实验动物模型报道相对较少,有文章报道[9]可通过双袖套技术构建大鼠静脉置换模型,但其术后会将聚乙烯套管遗留受体鼠体内,其引发机体非特异性炎症是否会对静脉移植后相关病理改变的研究造成干扰尚不明确,本文通过评估“套管法”和“吻合法”两种大鼠下腔静脉移植模型各自优劣势,寻找安全有效的大鼠下腔静脉移植模型的建立方法,为后续静脉置换术后相关病理改变的研究提供模型基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

72 只 6 周龄 SPF 级雄性 Brown-Norway(BN)大鼠,体重为 180 ~ 200 g,购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2021-0006】。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,饲养于首都医科大学附属北京朝阳医院医学研究中心【SYXK(京)2020-0005】。所有操作符合实验动物福利伦理原则,并获得首都医科大学动物实验及实验动物福利委员会的批准(AEEI-2021-147)。

1.1.2 主要试剂与仪器

动物用异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公

司,中国),Anti-CD4 antibody (Abcam, ab237722,英国), RNA 提取液 (Servicebio, G3013, 中国), SweScript^{RT} I First Strand cDNA Synthesis Kit (Servicebio, G3330, 中国), 2 × SYBR Green qPCR Master Mix(None ROX)(Servicebio, G3320, 中国)。

双目外科显微镜(OLYMPUS, SZX16, 日本),动物手术 LED 光纤灯(OLYMPUS, LG-PS2, 日本),小动物麻醉机(SURGIVET, CDS 9000, 美国),外科手术器械包(深圳市瑞沃德生命科技有限公司, SP0011-B MCAO, 中国),正置光学显微镜(尼康, Nikon Eclipse E100, 日本),小动物超声仪(VisualSonics, Vevo 2100, 加拿大),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, CFX Connect, 美国),超微量分光光度计(Thermo, NanoDrop 2000, 美国)。

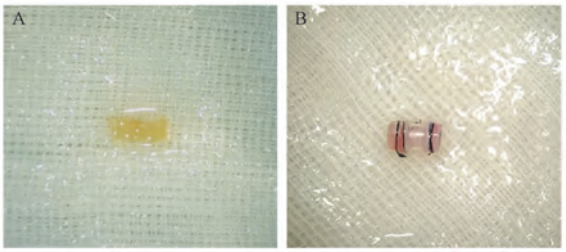
1.2　方法

1.2.1　实验分组

随机分为 2 组,每组 18 只。套管组:采用套管法构建下腔静脉置换模型;吻合组:采用缝合法直接吻合供受体静脉断端,构建下腔静脉置换模型。

1.2.2　供体静脉的获取

选取 36 只 BN 大鼠作为供体大鼠,采用 1%异氟烷吸入麻醉后固定于大鼠手术台,胸腹部备皮、碘伏消毒,铺无菌洞巾。于剑突下作 2 cm 长的切口入腹,剪断肝上下腔静脉放血处死大鼠。左右两侧距前正中线 1.5 cm 剪开肋骨,将前胸壁上翻,暴露胸内下腔静脉,去除静脉周围的脂肪组织,于右心房与膈肌间剪下约 6 ~ 7 mm 长的静脉段,以肝素生理盐水冲去周围血渍后置于 4℃的肝素生理盐水中(如图 1A),可直接作为吻合组的供体血管;将取下的静脉段从一长 5 ~ 6 mm 的薄壁塑料管中穿出,两端反折套与塑料管上,形成静脉套管(如图 1B),作为套管组的供体血管。



注:A:用于“吻合法”的供体静脉段;B:用于“套管法”的供体静脉套管。

图 1　供体静脉

Note. A. Donor vein segments for “anastomosis method”. B. Donor vein cannula for “cannula method”.

Figure 1　Donor vein

1.2.3　“吻合法”构建大鼠下腔静脉置换模型

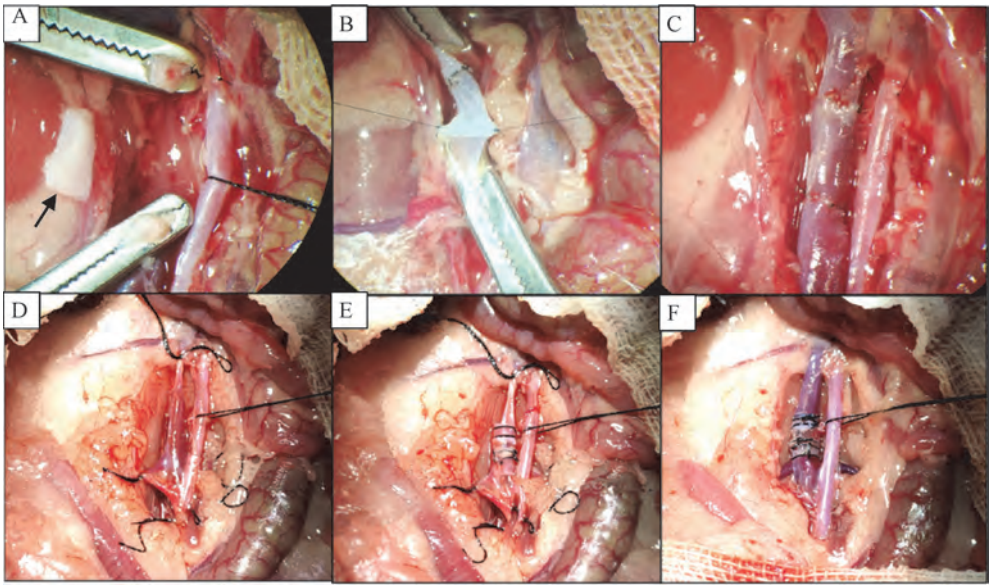
18 只 BN 大鼠作为受体大鼠,随机种子数法分为 1 周组、2 周组和 4 周组,每组各 6 只。所有大鼠腹部备皮,碘伏消毒后铺无菌孔巾;取剑突下 1 cm 至尿道上方 1 cm 处纵行切口入腹,用腹腔牵拉器向两侧拉开腹腔充分暴露术野,盐水纱布包裹肠管并将其推向腹腔左侧,使用棉签钝性分离后腹膜显露腹主动脉及下腔静脉;游离肾静脉下方的下腔静脉至左、右侧腰静脉之间的下腔静脉,结扎离断其周围的属支;于游离段下腔静脉两端以显微血管夹阻断后剪断,以肝素生理盐水冲去周围血渍,根据供体静脉段长度修剪过长的受体静脉断端;于受体静脉和供体静脉 3 点钟和 9 点钟方位各缝合一针作为牵引固定线;采用连续缝合法吻合静脉前壁;翻转动脉夹和牵引线,使静脉前后壁翻转,采用间断缝合法缝合静脉后壁;同法吻合第 2 个吻合口,最后几针时向静脉管腔内注射肝素生理盐水排出静脉腔内空气,预防气体栓塞;先开放静脉近心端血管夹,检查有无漏血,止血确切后再开放远心端血管夹,无活动性出血、血管通畅性良好后,以温生理盐水冲洗腹腔,逐层关腹,手术过程见图 2A,2B,2C。

1.2.4　“套管法”构建大鼠下腔静脉置换模型

选取 18 只 BN 大鼠作为受体大鼠,随机种子数法分为 1 周组、2 周组和 4 周组,每组 6 只。受体大鼠的准备及下腔静脉的游离等步骤同吻合法。由于血管夹具有较大的空间占位而不利于静脉套管的植入,可用丝线系活结替代血管夹用于阻断血流。依次阻断左、右侧腰静脉、远端下腔静脉(左右腰静脉以下)、近端下腔静脉;于游离段静脉中间横向剪开约 2/3 周径的切口,以肝素生理盐水冲去周围血渍;用无损伤镊子提起静脉切缘,将供体静脉套管一端塞进受体下腔静脉;提起受体静脉另一端切缘,再将静脉套管另一端放进受体静脉内,完全放入前以肝素生理盐水排出静脉套管及受体静脉腔内空气,调节供体静脉套至合适位置后以 6-0 丝线环扎固定;将未剪断的 1/3 受体静脉壁完全离断,修剪赘余的受体静脉壁,松开各活结开放静脉;检查无活动性出血、血管通畅性良好后,以温生理盐水冲洗腹腔,逐层关腹,手术过程见图 2D,2E,2F。

1.2.5　术后观察

手术完成后置于 38.5℃复温台上复温至苏醒,移至单笼饲养。术后 24 h 内以浓度为 5%的葡萄糖溶液喂食,24 h 后恢复正常喂食。术后 48 h 存活、



注:A:根据受体静脉两端张力情况修剪供体静脉段(图中黑箭头所示);B:采用前壁连续、后壁间断法依次缝合上下两个吻合口;C:缝合完毕检查无漏血后开放血流;D:游离受体肾下下腔静脉,以丝线系活结依次阻断左、右腰静脉,远端下腔静脉,近端下腔静脉;E:受体静脉中部横行剪断 2/3 周径的静脉壁,将供体静脉套管一端从切口插入受体静脉;F:完全插入供体静脉套管,检查无漏血后开放血流。

图 2 血管置换手术过程

Note. A. The donor vein segment is trimmed according to the tension at both ends of the recipient vein (shown by the black arrow in the figure). B. The upper and lower anastomoses are sutured successively by the continuous anterior wall and interrupted posterior wall method. C. The blood flow is opened after the suture is completed and there is no blood leakage. D. Freeze the recipient infrarenal inferior vena cava and block the left and right lumbar veins, distal inferior vena cava and proximal inferior vena cava in turn with a silk thread tie. E. Transversely cut the venous wall at 2/3 circumference in the middle of the recipient vein and insert one end of the donor venous cannula into the recipient vein from the incision. F. Completely insert the donor venous cannula and open the blood flow after checking that there is no blood leakage.

Figure 2 Procedure of vascular replacement

无后肢瘫痪等并发症发生时定义为建模成功。

1.2.6 术后置换段血管通畅性评估

术后大鼠每隔 1 周做 1 次腹部血管超声。大鼠腹部剃毛,用 1%异氟烷吸入麻醉后将大鼠固定于操作台。使用小动物超声影像系统对其进行成像,脉冲重复频率设置为 2.2 ~ 3.3 kHz,以肾下下腔静脉作为标记找到置换段静脉,以 16 ~ 30 Hz 的帧频获得二维和彩色多普勒图像及流速变化情况。

1.2.7 组织学检测

各组大鼠术后到达观察时间后,经麻醉后开腹探查获取置换段组织,下腔静脉放血处死。测量置换段血管管径后将其分为两段,一段置于 10%福尔马林中固定 48 h,脱水后浸蜡包埋组织标本块,4 μm 切片,并行 HE 染色、CD4 免疫组化染色。另一块标本立即转移至液氮保存,并进行 TGF-β_1 的 RT-PCR 相对定量检测。

引物信息:TGF-β1 primer:F:5'-ATAGCAACAATTCCTGGCGTTACCTT-3'; R: 5'-CCTGTATTCCGTCTCCTTGGTTCAG-3'。

1.3 统计学分析

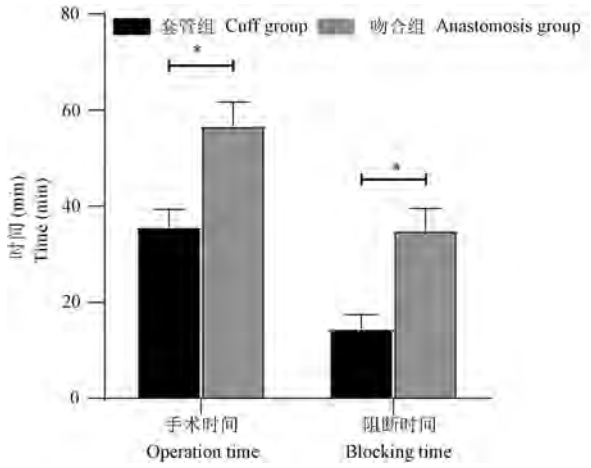
所有检测数据进行汇总后采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,计量资料符合正态分布采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)示,非正态分布采用中位数(四分位间距)表示;计数资料采用百分率表示。两组计量资料之间比较,符合正态分布采用 t 检验,非正态分布采用秩和检验;两组计数资料之间的比较 χ^2 检验。$P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 模型成功率、手术时间及血流阻断时间

套管法和吻合法各建立静脉模型 18 只,套管法术后 48 h 内成功率为 100.0%(18/18),吻合法术后死亡 1 只,死亡原因为术中失血过多,术后 48 h 内成功率为 94.4%(17/18),两组存活率差异无显著性($P = 0.310$)。如图 3 所示,套管组手术时间及血流阻断时间均较吻合组短[(35.8 ± 3.6) min vs

(56.8 ± 4.9) min; (35.8 ± 3.6) min vs (56.8 ± 4.9) min], 差异均具有显著性。



注: 组内比较, $^{*}P < 0.05$。(下图同)

图 3　两种模型建立方法的手术时间和血流阻断时间

Note. Group comparison, $^{*}P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 3　Operation time and blood flow blocking time of the two model establishment methods

2.2　术后不同时间各组移植段血管通畅情况

如图 4 所示, 两组术后 4 周内置换段血管均通畅, 未见血管闭塞及血栓形成。由图 5 可见, 术后 1 周时, 套管法及吻合法的移植段血管血流速度均有所增高, 套管法增加更为明显。随着术后时间的延长, 套管法模型中移植段血管流速逐渐减低, 而吻合法模型中移植段血管先于 2 周时降低, 4 周时逐渐升高。

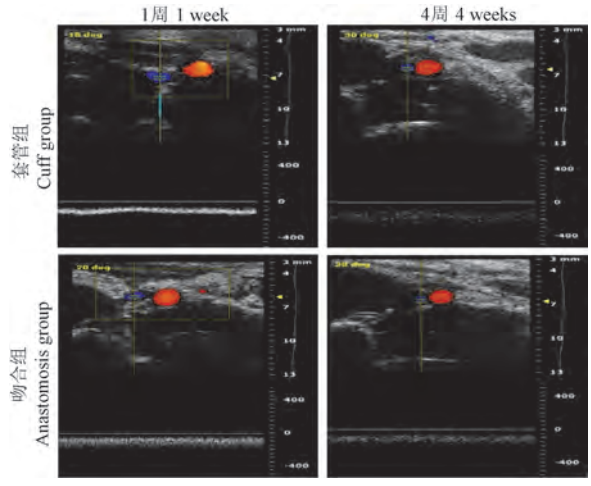


图 4　腹部血管彩色多普勒

Figure 4　Color Doppler of abdominal blood vessels

2.3　术后不同时间各组移植段血管直径变化

如图 6 所示, 套管组 1 周后, 移植段血管周围轻度粘连, 可见周围组织充血等改变, 未见明显静脉侧枝形成, 移植段血管通畅, 未见明显血栓形成, 管壁外可见纤维性渗出。套管组 4 周后, 移植段血管可见明显静脉侧枝形成, 移植段血管管壁外形成纤维包壳, 移植段血管管壁变厚, 管径变细, 但血管腔通畅。吻合法 1 周后, 移植段血管周围未见明显粘连及静脉侧枝, 移植段血管通畅, 未见血栓形成, 管壁正常。吻合法 4 周后, 精索静脉可有增粗改变, 但未见其他明显侧枝形成, 移植段血管通畅, 未见明显血栓, 管壁较强有所增厚, 管径较前变细。如图 7 所示, 随着术后时间的延长, 套管组和吻合法模型的移植段血管管径均逐渐变细, 套管组尤为明显, 各个时期内, 套管组模型的管径均较吻合法小, 差异具有显著性。

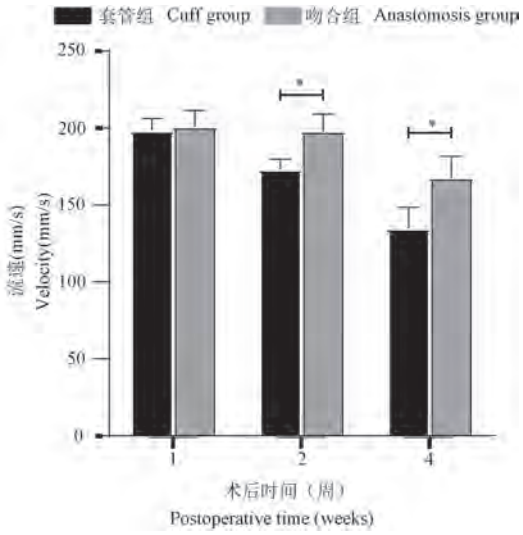


图 5　术后两组置换段血管血流速度比较

Figure 5　Comparison of blood flow velocity of replacement segment between the two groups after operation

2.4　移植段血管病理情况

由图 8 所示, 静脉移植术后 1 周后, 套管组和吻合法模型中均可见淋巴细胞浸润, 淋巴细胞主要聚集与外膜层, 管壁结构均无明显改变; 移植术后 2 周时, 套管组模型中可见肌层增生变厚, 管腔较 1 周时明显变窄, 管壁外可见纤维素沉积形成包壳, 管壁全层均可见淋巴细胞, 吻合法模型中管壁全层可见明显淋巴细胞浸润, 管壁各层均未见明显增生, 管腔无明显狭窄表现; 移植术后 4 周时, 套管组模型组静脉中的内膜层可见增生, 肌层增生较前更为明显, 管腔较前进一步缩窄, 管壁外可见明显纤维包壳形成, 吻合法模型中亦可见内膜层及肌层增生, 淋巴细胞浸润较 2 周时有所减少。

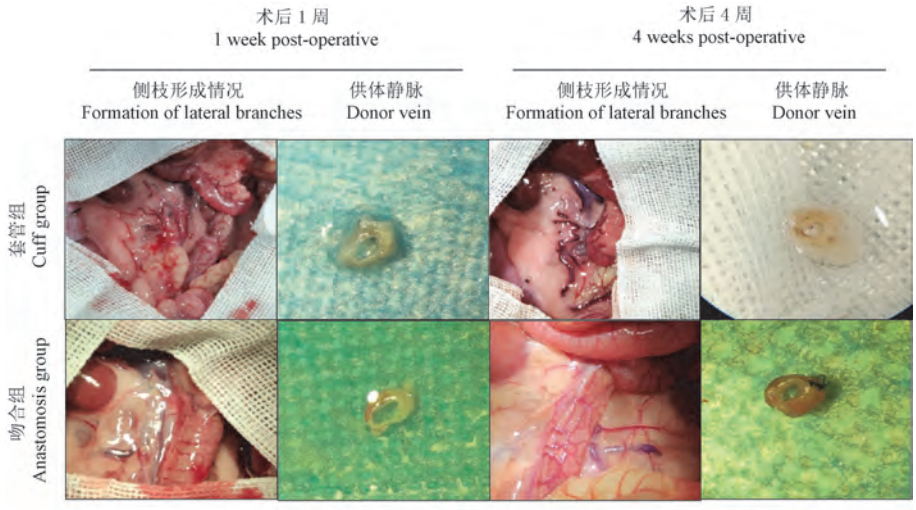


图 6 术后置换段血管周围侧枝形成情况及供体静脉通畅情况

Figure 6 Formation of collateral branches around the blood vessels of the replacement segment and the patency of the donor vein after operation

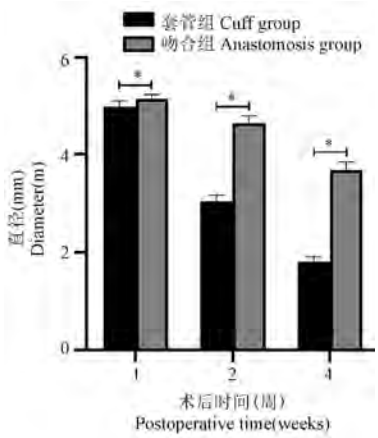


图 7 术后两组置换段血管直径比较

Figure 7 Comparison of the diameter of the replacement segment between the two groups after operation

如图 9、10 所示，静脉移植术后各阶段均可见 $CD4^+$ 淋巴细胞浸润，1 周时套管组和吻合法浸润程度无统计学差异，随着术后时间的延长，套管组模型中 $CD4^+$ 淋巴细胞浸润逐渐减少，而吻合法模型中逐渐增多，术后 2 周后，吻合法模型中 $CD4^+$ 淋巴细胞浸润较套管组严重，其 MOD 值的差异具有显著性。

2.5 置换段血管中 TGF-β_1 的 PCR 相对定量检测

套管组和吻合组在不同时间点置换段血管组织中 TGF-β_1 的 PCR 相对定量结果如图 11 所示。随着术后时间的延长，两组模型中置换段静脉组织内 TGF-β_1 的表达量均逐渐升高，2 周内 2 组间无统计学意义，4 周时，套管组中表达量高于吻合组，差异具有显著性。

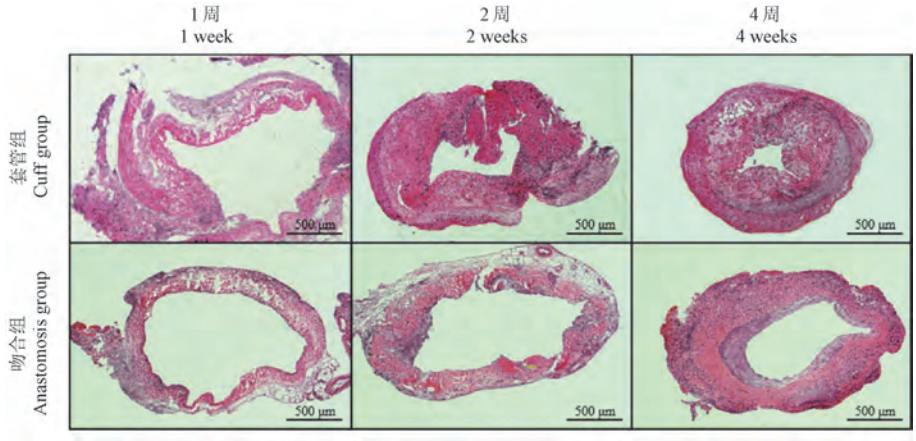


图 8 移植段血管 HE 染色(×50)

Figure 8 HE staining of grafted blood vessels(×50)

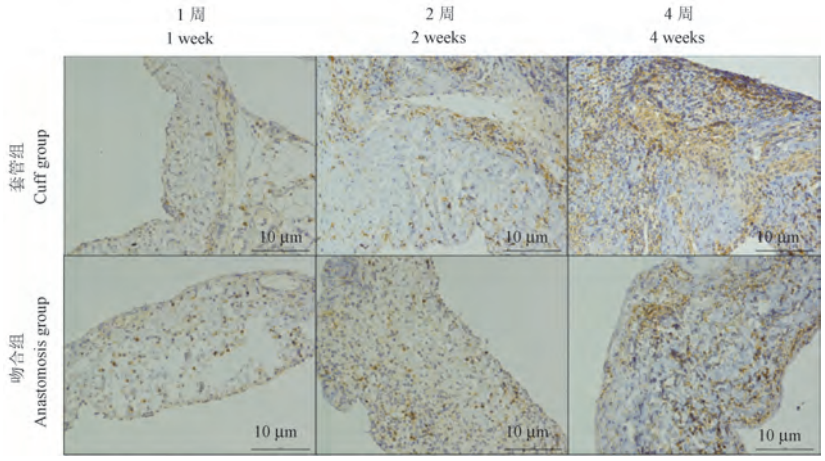


图 9　移植段血管 CD4 免疫组化染色(×200)

Figure 9　CD4 immunohistochemical staining of grafted blood vessels(× 200)

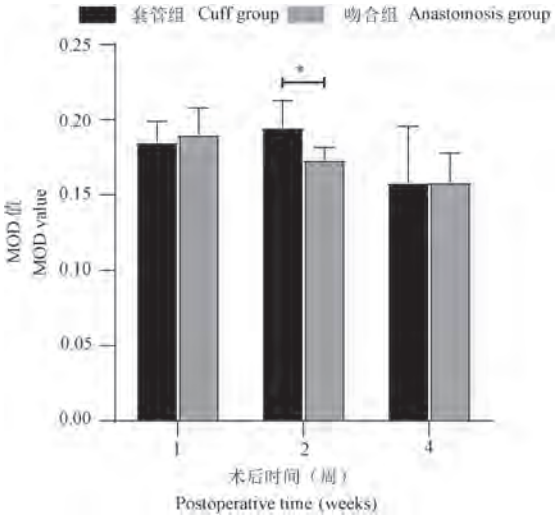


图 10　移植段血管 CD4 免疫组化 MOD 值比较

Figure 10　Comparison of CD4 immunohistochemical MOD values of transplanted blood vessels

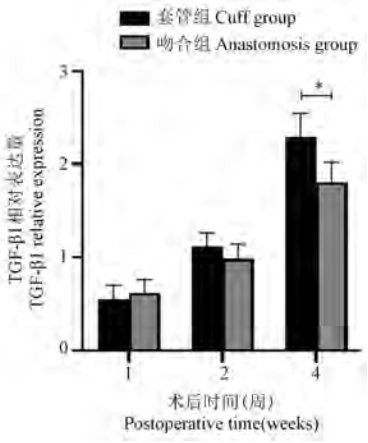


图 11　术后两组置换段血管组织 TGF-β_1 相对表达量

Figure 11　TGF-β_1 in vascular tissue of replacement segment in two groups after operation relative expression

3　讨论

当体内重要组织、脏器的血管因意外损伤,或是因疾病侵犯、波及而无法恢复时,通过切除病变血管,用血管移植物重建局部血流是最佳的治疗方案[10-11]。目前血管重建中常用到的血管置换物有自体血管、人造血管及异体血管。自体血管来源有限,增加患者创伤,并受管径大小、取材长短,以及患者自身血管条件的限制,临床应用前景有限[12]。目前应用于临床的人造血管有涤纶、聚四氟乙烯、聚氨酯等,其优点是来源丰富、能批量生产,可根据临床需要制备特殊口径和形状,但其缺点是生物相容性差,血栓形成率高,达不到小血管置换的要求。同种异体血管首先由 Debakey 等[13]于 20 世纪 50 年代应用于临床血管重建,具有来源丰富、管径易匹配、组织相容性好等优点。起初,同种异体血管主要应用于血管严重感染性疾病中受感染血管的置换[14-15]。随着血管获取及储存技术的不断改进,同种异体血管在临床中的应用逐渐普及。

作为一种异体来源的组织,同种异体血管移植后是否会像其他器官移植一样发生移植排斥反应目前尚无明确结论。有报道血管置换后置换段血管内膜增生、管腔狭窄及闭塞使手术的远期失效率高达 30% ~ 60%[16-17]。由于临床上术后取材困难,通过建立大鼠腹部血管置换模型,观察其术后置换段血管的病理改变及免疫状态的改变,可为后续关于同种异体血管置换后的病理改变机制及干预措施的研究奠定基础。目前已经开发出了多种血管置换模型,Koulack 等[18]报道了用于研究移植物血管病变的主动脉置换模型,其中动脉置换模型

的研究相对较多[19-20]，Zhang 等[21]将供体小鼠的腔静脉移植到受体小鼠的颈动脉循环中，以研究静脉移植后新生内膜的病理改变，然而，动脉与静脉结构层次并非完全一致，管径亦很难匹配，当静脉置换到动脉循环后，管腔在动脉压的作用下逐渐扩张，随着术后时间的延长，静脉壁逐渐重塑变厚以适应动脉循环的高压力，有时血液在连接处形成涡流，纤维蛋白沉着在静脉皱褶上，最终导致闭塞性血栓形成。因此，“静脉到动脉”的置换模型并不能真实地反应静脉置换后的相关病理改变。由于静脉壁薄，缝合较为困难，Yan 等[9]通过“双袖带技术”成功建立了小鼠门静脉置换模型。但采用“双袖带技术”构建的静脉置换模型会将聚乙烯套管遗留与受体体内，该套管是否会形成异物反应对静脉置换后相关病理改变的研究造成干扰尚不明确。本实验采用“套管组”和“吻合法”两种静脉重建方式构建大鼠静脉置换模型，通过观察两组模型术后的相关病理改变，评估其各自的优劣势，为后续静脉置换后相关病理改变机制的研究提供安全、稳定的模型基础。

从手术时间来看，吻合法的总手术时间及血流阻断时间均较套管组长，差异具有显著性，但模型成功率方面无明显差异。两组模型大鼠术后 4 周均能长期存活，置换段血管均未见闭塞，未出现后肢瘫痪等严重并发症。术后腹部血管超声结果与管径变化趋势一致，术后 1 周时两组流速较前稍有增大，考虑与术后吻合口水肿等因素有关，随着术后时间的延长，套管组流速逐渐降低，与吻合组相比差异具有显著性，术后 4 周时，吻合组流速较前稍增大，考虑与置换段血管管壁重塑、管腔变窄有关。从术后大体标本来看，随着术后时间的延长，两组模型置换段静脉直径均逐渐缩小，套管组变化更为明显。4 周内吻合组未见明显静脉侧枝形成，置换段静脉管壁逐渐增厚，但管腔通畅性良好，而套管组可见置换段静脉周围出现静脉侧枝，置换段静脉管腔缩小，管壁外层可见纤维包壳形成。

从术后置换段静脉组织 HE 染色来看，套管组术后管壁出现皱缩，肌层增生，外层可见纤维素沉积形成包壳，内层可见内膜增生，进而导致管壁增厚，管腔狭窄，而吻合组静脉管壁各层次尚清晰，管壁亦随着时间的延长逐渐增厚，4 周时可见肌层及内膜增生，管腔较前缩小。两组模型术后均可见单个核细胞浸润，吻合组较套管组更为明显，可能是聚乙烯套管产生的非特异炎症或纤维素样物质抑制单个核细胞的浸润有关，具体机制还需进一步研究明确。从 CD4 免疫组化染色结果来看，两组模型术后均可见静脉壁肌层及外模型中 $CD4^+$T 淋巴细胞浸润，随着术后时间的延长，套管组中 $CD4^+$T 淋巴细胞逐渐减少，而吻合组中逐渐增多。

TGF-β_1 是目前研究已知与机体的瘢痕形成及组织重塑关系最密切的细胞因子，可以由多种细胞分泌产生，可以通过旁分泌、自分泌等多种生物学途径作用于成纤维细胞参与创伤修复过程[22-23]：一方面能直接刺激成纤维细胞，促进其增殖，进而转换为肌成纤维细胞形成瘢痕；另一方面可以使原本处于静止期的成纤维细胞活化，促进胶原基质的形成；还可以抑制胶原基质的分解，导致瘢痕不断积累增加。TGF-β_1 在组织器官的炎症、损伤、瘢痕以及组织重塑之间起着重要的链接作用[24-25]。本研究当中，两个置换模型组中均可见 TGF-β_1 表达量逐渐升高，4 周时套管组表达量高于吻合组，差异具有显著性。

总之，静脉置换术后，静脉壁中可见单个核细胞及 $CD4^+$T 淋巴细胞浸润，组织中 TGF-β_1 表达量随着术后时间的延长逐渐升高，静脉壁重塑主要表现为肌层及内膜增生，最终导致管腔狭窄。套管组和吻合法均能安全有效地建立静脉置换模型，套管组总的手术时间及下腔静脉阻断时间较吻合法短，但术后模型成功率方面无明显差异。随着术后时间的延长，套管组管腔狭窄更为明显。因此吻合法构建的静脉置换模型更适用于静脉置换术后相关病理改变的研究。

参 考 文 献(References)

[1] Mizuno T, Ebata T, Nagino M. Advanced hilar cholangiocarcinoma: an aggressive surgical approach for the treatment of advanced hilar cholangiocarcinoma: Perioperative management, extended procedures, and multidisciplinary approaches [J]. Surg Oncol, 2020, 33: 201-206.

[2] She WH, Cheung TT, Ma KW, et al. Vascular resection and reconstruction in hilar cholangiocarcinoma [J]. ANZ J Surg, 2020, 90(9): 1653-1659.

[3] Lapergola A, Felli E, Rebiere T, et al. Autologous peritoneal graft for venous vascular reconstruction after tumor resection in abdominal surgery: a systematic review [J]. Updates Surg, 2020, 72(3): 605-615.

[4] Baimas-George MR, Levi DM, Vrochides D. Three possible variations in *ex vivo* hepatectomy: achieving R0 resection by auto-

transplantation [J]. J Gastrointest Surg, 2019, 23(11): 2294-2297.

[5] Labori KJ, Kleive D, Khan A, et al. Graft type for superior mesenteric and portal vein reconstruction in pancreatic surgery-A systematic review [J]. HPB (Oxford), 2021, 23(4): 483-494.

[6] Chakfé N, Diener H, Lejay A, et al. Editor's choice-European society for vascular surgery (ESVS) 2020 clinical practice guidelines on the management of vascular graft and endograft infections [J]. Eur J Vasc Endovascular Surg, 2020, 59(3): 339-384.

[7] Kwon YK, Llore N, Kaufman SS, et al. The use of vascular homografts in pediatric small bowel transplantation: single-center experience over a decade [J]. Pediatr Transplantat, 2018, 22(2): e13137.

[8] Jashari R, Van Hoeck B, Ngakam R, et al. Banking of cryopreserved arterial allografts in Europe: 20 years of operation in the European Homograft Bank (EHB) in Brussels [J]. Cell Tissue Bank, 2013, 14(4): 589-599.

[9] Yan S, Zhang Q, Cai M, et al. A novel model of portal vein transplantation in mice using two-cuff technique [J]. Microsurgery, 2007, 27(6): 569-574.

[10] Bacalbasa N, Balescu I, Vilcu M, et al. Superior mesenteric and portal vein reconstruction with cadaveric allograft during pancreatoduodenectomy-A case report and literature review [J]. In Vivo, 2020, 34(2): 787-791.

[11] Yamamoto M, Akamatsu N, Aoki T, et al. Safety and efficacy of cryopreserved homologous veins for venous reconstruction in pancreatoduodenectomy [J]. Surgery, 2017, 161(2): 385-393.

[12] Elomaa L, Yang YP. Additive manufacturing of vascular grafts and vascularized tissue constructs [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2017, 23(5): 436-450.

[13] Debakey ME, Creech O Jr, Cooley DA. Occlusive disease of the aorta and its treatment by resection and homograft replacement [J]. Ann Surg, 1954, 140(3): 290-310.

[14] Pupka A, Skora J, Janczak D, et al. *In situ* revascularisation with silver-coated polyester prostheses and arterial homografts in patients with aortic graft infection-a prospective, comparative, single-centre study [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2011, 41(1): 61-67.

[15] Niaz OS, Rao A, Abidia A, et al. Surgical and medical interventions for abdominal aortic graft infections [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2020, 8(8): CD013469.

[16] Dianati Maleki N, Ehteshami Afshar A, Parikh PB. Management of saphenous vein graft disease in patients with prior coronary artery bypass surgery [J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2019, 21(2): 12.

[17] Milojevic M, Thuijs DJFM, Head SJ, et al. Life-long clinical outcome after the first myocardial revascularization procedures: 40-year follow-up after coronary artery bypass grafting and percutaneous coronary intervention in Rotterdam [J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2019, 28(6): 852-859.

[18] Koulack J, McAlister VC, Giacomantonio CA, et al. Development of a mouse aortic transplant model of chronic rejection [J]. Microsurgery, 1995, 16(2): 110-113.

[19] Ryll M, Bucher J, Drefs M, et al. Murine cervical aortic transplantation model using a modified non-suture cuff technique [J]. J Vis Exp, 2019, 153: e59983.

[20] Zhu P, Esckilsen S, Atkinson C, et al. A simplified cuff technique for abdominal aortic transplantation in mice [J]. J Surg Res, 2016, 200(2): 707-713.

[21] Zhang L, Hagen PO, Kisslo J, et al. Neointimal hyperplasia rapidly reaches steady state in a novel murine vein graft model [J]. J Vasc Surg, 2002, 36(4): 824-832.

[22] Kim KK, Sheppard D, Chapman HA. TGF-β1 signaling and tissue fibrosis [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(4): a022293.

[23] Sapudom J, Wu X, Chkolnikov M, et al. Fibroblast fate regulation by time dependent TGF-β1 and IL-10 stimulation in biomimetic 3D matrices [J]. Biomater Sci, 2017, 5(9): 1858-1867.

[24] Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, et al. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing [J]. J Dermatol Sci, 2013, 72(3): 206-217.

[25] Xu Y, Sun X, Zhang R, et al. A positive feedback loop of TET3 and TGF-β1 promotes liver fibrosis [J]. Cell Rep, 2020, 30(5): 1310-1318.

[收稿日期] 2022-07-02

吴玥,薛婧,魏强,等. 国家动物模型资源共享信息平台的建立[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1080-1086.
Wu Y, Xue J, Wei Q, et al. Establishment of national infrastructure for an animal model resource platform [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1080-1086.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.009

国家动物模型资源共享信息平台的建立

吴玥,薛婧,魏强,向志光,陈禹保,孔琪*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,国家人类疾病动物模型资源库,
国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,
北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021)

【摘要】 目的 为推动我国实验动物领域资源共享,满足不同层次、不同研究目的的需求,建立国家动物模型资源共享信息平台。**方法** 发布实验动物及动物模型资源征集函,广泛收集实验动物及动物模型资源,并从文献与公共数据库补充相关资源信息。**结果** 国家动物模型资源共享信息平台对实验动物资源、动物模型及相关产品资源信息进行系统采集和整理,涵盖实验动物资源、动物模型资源的研发、鉴定、评价和应用,以及实验动物专属试剂和仪器设备、基于实验动物的科技外包服务等。通过网络平台推动资源共享,为开展药物筛选和治疗等提供平台与数据支撑。**结论** 本研究团队建立了国家动物模型资源共享信息平台,提供实验动物、动物模型及相关资源数据查询、供求单位需求信息发布和详细资料展示等一站式服务,为科技创新和社会发展提供高质量的实验动物与动物模型资源共享服务。

【关键词】 动物模型;实验动物;资源共享;信息平台;数据库
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2022)08-1080-07

Establishment of national infrastructure for an animal model resource platform

WU Yue, XUE Jing, WEI Qiang, XIANG Zhiguang, CHEN Yubao, KONG Qi*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS & PUMC, National Human Diseases Animal Model Resource Center, NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious, Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)
Corresponding author: KONG Qi. E-mail: kongqi@cnilas.org

【Abstract】 Objective To promote resource information sharing in the field of laboratory animals and meet the needs of various levels and research purposes, national infrastructure for an animal model resource platform was established to meet the needs of both the supplier and customer. **Methods** We issued a collection letter for laboratory animal and animal model resources, collected laboratory animals and animal model resources nationwide, and supplemented related resources from the literature and public databases. **Results** The national infrastructure for an animal model resource platform systematically collected and arranged laboratory animal resources, animal models, and related product information, covering the development, identification, evaluation and application of laboratory animals and animal models, as well as exclusive reagents, instruments, and equipment for animal experiments, and science and technology outsourcing services based on animal experiments. We promoted resource sharing through the network platform and provided data support for

[基金项目]中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-034),北京市自然科学基金资助项目(M21027),国家重点研发计划项目(2021YFF0702800)。
Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (2021-I2M-1-034), Beijing Natural Science Foundation (M21027), the National Key Research and Development Program of China (2021YFF0702800).
[作者简介]吴玥(1993—),女,助理研究员,研究方向:比较医学数据库建设。Email:wuyue@cnilas.org
[通信作者]孔琪(1978—),男,研究员,研究方向:比较医学,生物信息学。Email:kongqi@cnilas.org

drug screening and treatment. **Conclusions** In this study, we established national infrastructure for an animal model resource platform to provide one-stop services such as enquiries for laboratory animals and relevant resource information, release of information on supply and demand units, and display of detailed information to provide high-quality scientific and technological laboratory animal and animal model resource sharing services for scientific and technological innovation and social development.

【**Keywords**】 animal model; laboratory animal; resource sharing; information platform; database

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

动物模型(animal model)是基于实验动物建立的模拟人类疾病或满足研究的动物,是人类疾病研究的“技术瓶颈”,也是疫苗、药物从实验室走向临床应用的“试金石”。动物模型是我国科学研究、生物医药和健康产品研发中不可缺少的科技资源,在提高我国自主创新能力、发展医药卫生、健康产业等方面具有重要价值和市场前景[1-3]。

我国实验动物产业处于蓬勃发展阶段,产生了数千种实验动物和动物模型资源。国际上实验动物、动物模型资源更是在数万种以上。动物模型资源的选择和共享一直是实验动物行业亟待解决的问题。动物模型资源的多样化和标准化,既是国家战略资源,也是生物制品、药物研发的支撑性资源,更是生物医药产业又好又快发展的有力保障[4-6]。

为落实创新性国家战略,提高我国科学研究能力,为我国医药卫生健康产业发展和应对新发突发重大传染性疾病提供源自实验动物行业的强大科技支撑,根据科技部工作部署,我们建立了“国家动物模型资源共享信息平台”(本文简称信息平台),助力新冠肺炎疫情攻关,提供数据支持,解决供需双方对动物模型资源的需求。我们建立的国家动物模型资源共享信息平台,可推动我国动物模型相关资源共享,满足不同层次、不同研究目的的需求。

1　方法

1.1　数据来源

本平台的资源数据主要来源于 5 个部分:(1)本单位自有动物模型相关资源;(2)实验动物资源单位汇交的动物模型相关资源;(3)文献采集的动物模型相关资源;(4)国际公共实验动物资源库汇集的动物模型相关资源,例如 Mouse Genome Informatics(MGI)、Rat Genome Database(RGD)等;(5)研究人员个人提交的动物模型相关资源等。

1.2　数据采集

1.2.1　文献采集

采用爬虫的方法对公共数据库及文献中的资源数据进行采集。根据每个资源 URL 中含有的 ID 号,使用 read_html 命令读取对应网页,使用 css 选择器提取每个页面中共有字段,例如 Strain Name、Attributes、Symbol、Type、Source、Origin、Research Usage、MGI ID、RGD ID 等,使用 frame 函数创建数据列表,使用 for 语句循环采集 MGI 与 RGD 数据库资源页面数据字段信息,使用 writexl 函数输出为 Excel 格式。

1.2.2　资源鉴定

通过中国实验动物学会发布“国家动物模型资源共享信息平台实验动物资源/动物模型征集函”在全国范围内征集数据,重点与新冠动物模型研发单位进行联络,全面系统收集了新冠动物模型资源作为平台的特色。联合中国实验动物学会动物模型鉴定与评价工作委员会、中国实验动物学会实验动物资源鉴定与评价工作委员会(简称鉴定委员会)开展动物模型和实验动物资源鉴定工作,并发布经过鉴定或采集的资源信息。

1.3　数据审核及入库

根据《中国实验动物学会实验动物模型鉴定与评价管理办法(试行)》,由实验动物领域权威专家对申请人(单位)提交的材料进行鉴定评价,依据实验动物模型构建的信度和效度(表观效度、预测效度以及结构效度),基于模型制作原理和方法,并结合不同品系动物的特点,对拟开展鉴定和评价的实验动物模型从整体、组织、细胞和分子水平进行鉴定和评价。在前期数据收集阶段,可通过简易申报流程,提供资源基本信息,通过审核后即可入库。

1.4　信息平台的构建及访问

信息平台前端使用 HTML5 和 jQuery1.3,后端采用 Enterprise Java Beans 框架,编程语言采用 Python2.7,中间件使用 Jboss 6.0,部署在 Windows Server 2012 R2 服务器。支持多种通用浏览器,系统具有开放性、易操作性、界面友好性、可靠性和安全性等特点,为用户提供统一的、友好的操作界面。采用 MySQL (v 5.7)作为系统的数据库平台,采用

标准 SQL 语句,以便扩展。数据库网址:https://.namri.cn/。可免费公开访问使用。

2 结果

2.1 信息平台架构与内容

信息平台包含新闻动态、实验动物、动物模型、仪器设备、饲料垫料、专家咨询、供需机构、大事记、数据提交 9 个栏目(图 1)。新闻动态部分按照科技部部署的科研攻关五大方向病原学和流行病学、检测技术和产品、药物和临床救治、疫苗研发、动物模型构建进行分类,共 11 个角度,提供最新全球新冠疫情相关的动态新闻,新闻总量 2825 条(表 1)。

信息平台收录动物模型、实验动物资源总计 19 364 种,包括实验动物资源 18 466 个、动物模型 898 个。大多为科研机构、企业提交,也有一部分为高等院校、医院提交。动物模型样品属性信息见表 2。

2.2 检索方式

信息平台提供全局检索与高级检索两种检索方式,每个页面的右上角含有全局检索框,可对平台的实验动物、动物模型、仪器设备、饲料垫料进行检索。用户选择对应栏目,输入相关检索关键词后,可跳转到相应栏目浏览页面,获取最为可能的匹配结果。

表 1 新闻信息统计

Table 1 News information statistics

新闻栏目 News columns	数量 Number
平台新闻 Platform news	73
行业新闻 Industry news	357
病原学和流行病学 Etiology and epidemiology	229
检测技术和产品 Detection technology and products	123
药物和临床救治 Drugs and clinical treatment	264
疫苗研发 Vaccine development	195
动物模型构建 Animal model construction	75
其他新闻 Other news	280
政策法规 Policies and regulations	62
药物疫苗 Drug and vaccine	256
疫情播报 Epidemic broadcast	911
总计 Total	2825

图 1 平台首页

Figure 1 Homepage of the database

表 2　动物模型信息表

Table 2　Animal model information table

模型字段 Model fields	描述规范 Description specification
动物模型的命名 Nomenclature of animal models	参考国际实验动物命名通用原则,结合动物模型类型的 I、II 和 III 级分类法进行联合命名,即“疾病+动物品种+造模方法”进行命名,命名时应尽量细化。中医药动物模型应体现中医药特点。需用中英两种文字命名。 Referring to the principles of international laboratory animal nomenclature, combined with class I, II and III classification of animal models, i. e. “disease + species + method”, the naming should be as detailed as possible. Animal models of traditional Chinese medicine should reflect the characteristics of traditional Chinese medicine. Animal models need to be named in both Chinese and English.
研究背景 Research background	研究目的及意义;国内外研究进展并附参考文献。 Research purpose and significance; research progress at home and abroad with references.
动物模型的制备方法 Preparation method of animal model	包括实验材料、实验环境、实验操作规程等内容。对涉及的实验动物、实验试剂、检测仪器应标明详细信息,并符合国家相关规定。 Including experimental materials, experimental environment, operation procedures, etc. The laboratory animals, reagents and instruments involved shall be marked with detailed information and comply with relevant national regulations.
动物模型的评价与验证 Evaluation and validation of animal models	基于模型制备三原则(表观效度、预测效度以及结构效度)对模型指标进行评价,其中包括整体行为特征、组织器官、细胞和分子等在内的指标评价体系。评价方法包括以整体实验为主,涵盖行为、影像、生理生化和组织切片等技术方法进行详细介绍。采用的仪器设备、试剂应满足模型评价的要求,指标完善,条件稳定。价值指标包括核心指标(如特异的基因改变、特异的染毒病原株或高载量病毒核酸、特异性免疫抗体);主要指标(模拟人类疾病临床症状和体征、易感器官的特征性改变和特异性生物标志物);重要指标(模拟疾病某些方面的改变的指标)和辅助指标。应包括阳性药物对其指标的证实效应。应说明重复验证的批数。中医药模型应有体现中医药特点的评价指标。 The model indicators were evaluated based on three principles (apparent validity, predictive validity, and structural validity), an indicator evaluation system including overall behavioral characteristics, tissues and organs, cells, and molecules. Evaluation methods include overall experiments, covering behavior, imaging, physiology, biochemistry, tissue sections and other technical methods. The equipment and reagents used should meet the requirements of model evaluation, with perfect indicators and stable conditions. The valence index includes core indicators (such as specific genetic changes, specific viral strains or high-load viral nucleic acids, specific immune antibodies); main indicators (simulation of clinical symptoms and signs of human diseases, characteristic changes of susceptible organs and specific biomarkers); important indicators (metrics that mimic changes in some aspects of the disease) and secondary indicators. Confirmed effects of positive drugs on indicators. The number of batches for repeated validation should be stated. The TCM model should have evaluation indicators that reflect their characteristics.
动物模型的生物安全性 Biosafety of animal models	动物模型的制备和应用实验必须在具备相应资质的实验室开展。动物模型的制备、应用过程中的监督管理、处置措施、对环境和生态影响等应符合国家相关法律规定。 The preparation and application experiments of animal models must be carried out in laboratories with corresponding qualifications. The preparation of animal models, supervision and management during application, disposal measures, environmental and ecological impacts shall comply with relevant national laws and regulations.
讨论和结论 Discussion and conclusion	总结该模型鉴定和评价的技术方法和指标体系;分析该模型与国内外现有模型的异同;讨论该模型的技术难点、创新性和应用价值。 Summarize the methods and index system of the model identification and evaluation; Analyze the similarities and differences between the model and the existing models at home and abroad; The technical difficulties, innovation and application value of the model.
有助于动物模型鉴定和评价的其它材料 Other materials helpful to the identification and evaluation of animal models	其它有助于评价的材料,包括第三方应用机构的证明、在行业一流学术刊物上发表学术论文和引用情况等材料。 Other materials helpful for evaluation, including certificates of third-party application institutions, academic papers published in industry-class academic journals and citations.

实验动物与动物模型栏目提供高级检索功能。用户可自行选择名称、保种单位、应用领域对实验动物资源进行对应检索,选择模型名称、研制单位、用途对动物模型进行对应检索,也可以通过导航栏中的资源分类进一步限定资源范围。

2.3　实验动物

实验动物栏目按照常规实验动物类别进行划分,分为啮齿类动物、兔、犬、猫、小型猪、非人灵长类、禽类、鱼类、两栖类、无脊椎动物、其他动物。其中啮齿类动物细分为小鼠、大鼠、豚鼠、金黄仓鼠、中国地鼠、长爪沙鼠、东方田鼠、灰仓鼠。

详情页包含品系名称、英文名称、疾病名称、相关基因、背景品系、遗传类型、繁殖方式、繁殖代数、主要用途、简介、图片、主要特征描述、培育历程与

方法、遗传信息、相关疾病表型、生物学特性、营养需要、饲养管理要点、饲养环境、培育单位、保种单位、鉴定方法、获取的成果或参考文献信息。通过右侧相关资源可以查看与本资源相关的其他资源，目前资源总量达到 18 466 个(表 3)。

表 3 实验动物资源统计

Table 3 Statistics of laboratory animal resources

实验动物资源 Laboratory animal	数量(个) Number
小鼠 Mouse	14 131
大鼠 Rat	4274
金黄仓鼠 Golden hamster	5
豚鼠 Guinea pig	1
中国地鼠 Chinese hamster	1
长爪沙鼠 Mongolian gerbil	2
东方田鼠 Microtus fortis	3
犬 Dog	7
小型猪 Miniature pig	4
非人灵长类 Nonhuman primates	4
禽类 Birds	2
鱼类 Fish	2
果蝇 Fruit flies	29
树鼩 Tree shrew	1
总计 Total	18 466

2.4 动物模型

综合考虑广度和深度，以及尽可能涵盖目前所知的疾病模型类型，根据实验动物模型的分类原则将动物模型栏目分为传染性疾病动物模型、神经精神疾病动物模型、心脑血管和血液系统疾病动物模型、肿瘤动物模型、代谢性疾病动物模型、呼吸和消化系统疾病动物模型、骨骼运动系统疾病动物模型、生殖系统疾病动物模型、免疫性疾病动物模型、五官和皮肤病动物模型、遗传性疾病动物模型、特因环境动物模型、中医证候动物模型、其他模型。

其中传染性疾病动物模型细分为冠状病毒感染动物模型、艾滋病毒感染动物模型、流感病毒感染动物模型、肠道病毒感染动物模型、结核杆菌感染动物模型、肝炎病毒感染动物模型、狂犬病毒感染动物模型、登革病毒感染动物模型、其他病毒感染动物模型。

根据新型冠状病毒疫情防控科研攻关需要，信息平台第一期重点围绕 SARS、MERS、COVID-19 疾病，将冠状病毒感染动物模型细分为 SARS-CoV-2 感染动物模型、SARS-CoV 感染动物模型、MERS-CoV 感染动物模型、其他冠状病毒感染动物模型，并加入新冠动物模型相关宣传页轮播图，推送热门资源。目前模型总量达到 898 个(表 4)。

表 4 动物模型数量统计

Table 4 Statistics of animal models

疾病动物模型 Animal model of disease	数量(个) Number
SARS-CoV-2 感染动物模型 SARS-CoV-2 infected animal model	108
SARS-CoV 感染动物模型 SARS-CoV infected animal model	83
MERS-CoV 感染动物模型 MERS-CoV infected animal model	71
其他冠状病毒感染动物模型 Other coronaviruses infected animal model	1
艾滋病毒感染动物模型 HIV infected animal model	69
流感病毒感染动物模型 Influenza virus infected animal model	54
肠道病毒感染动物模型 Enterovirus infected animal model	21
结核杆菌感染动物模型 Mycobacterium tuberculosis infected animal model	17
肝炎病毒感染动物模型 Hepatitis virus infected animal model	9
狂犬病毒感染动物模型 Rabies virus infected animal model	6
登革病毒感染动物模型 Dengue virus infected animal model	3
其他病毒感染动物模型 Other viruses infected animal model	13
心脑血管和血液系统疾病动物模型 Cardiovascular, cerebrovascular and hematological diseases animal model	113
肿瘤动物模型 Tumour animal model	76
代谢性疾病动物模型 Metabolic diseases animal model	52
呼吸和消化系统疾病动物模型 Respiratory and digestive diseases animal model	28
骨骼运动系统疾病动物模型 Skeletal motor system diseases animal model	8
五官和皮肤病动物模型 Facial features and skin diseases animal model	21
遗传性疾病动物模型 Hereditary diseases animal model	7
神经精神疾病动物模型 Neuropsychiatric diseases animal model	83
免疫性疾病动物模型 Immune diseases animal model	40
生殖系统疾病动物模型 Reproductive system diseases animal model	2
中医药症候动物模型 TCM Syndrome animal model	1
其他模型 Others animal model	12
总计 Total	898

2.5 数据管理后台

通过信息平台数据管理后台可实现对新闻、资源、用户、订单进行管理。可对新闻、实验动物、动物模型数据进行增添、修改、删除，查看对应资源数量。并且可查看咨询与订购订单，用户注册情况，查看操作日志(见图 2)。

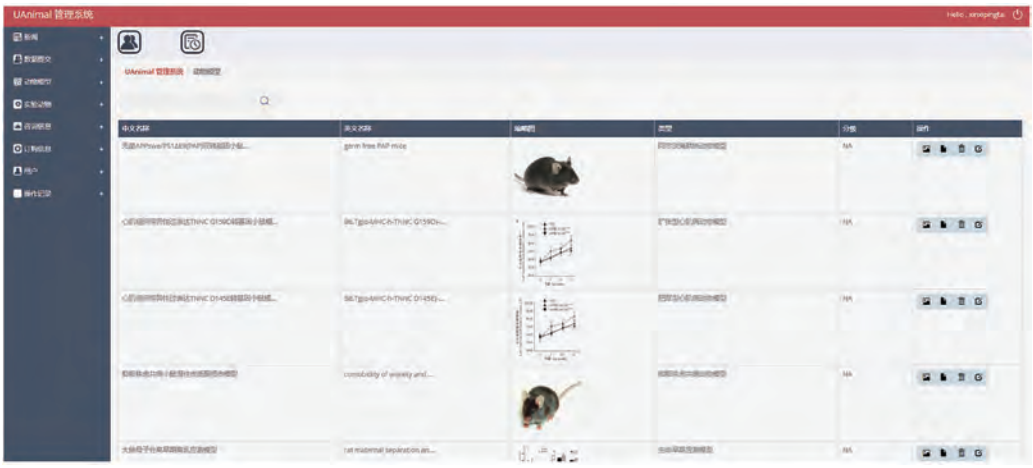


图 2　数据管理后台

Figure 2　Back-end of database

3　讨论

我国实验动物产业总产值在 200 亿元以上，交易量大，适用范围广，小到标签大到核磁都有涉及，市场空间广阔。医药企业在新药的研究和开发阶段，均需要进行动物实验。国内外医药企业研发支出的增长，为实验动物行业的发展提供了有利的需求基础[7]。

2020 年中央公布的第一份关于要素市场化配置的文件《中共中央、国务院关于构建更加完善的要素市场化配置体制机制的意见》中，将数据纳入新型生产要素，并上升到国家战略层面[8]。

随着我国科研水平的提高和生物医药产业的发展，对于实验动物的需求日益增加。特别是在新冠疫情爆发期间，加剧了对实验动物和动物模型的使用需求，甚至产生了供不应求的情况[9]。所以科技部指定我单位建立了信息平台，与各个从事实验动物科研行业单位进行联络，全方位多角度全面收集实验动物/动物模型信息，建成数据量庞大、信息全面、具有全国影响力的国家平台，服务全国对实验动物行业有需求的用户。

作者单位已建立了国内最大的人类疾病动物模型资源库，已纳入科技部资源库，但资源库主要展示本单位自有动物模型资源信息。而信息平台除含有本单位资源信息外，还包括鉴定委员会收集或鉴定过的动物模型资源，以及文献来源、课题汇交、资源单位提交、我们收集的国内外资源等多渠道来源的数据。除实验动物/动物模型信息外还含有实验动物相关产品及相关服务信息，用户可以在线提交咨询及订购订单。本单位也建立了一些数据库性质的平台，例如比较医学大数据平台，含有实验动物/动物模型和比较医学研究相关的生理生化、生物学特性及动物实验等数据，以比较医学科学数据为主体内容，集成生物信息学工具及相关公共数据库，与信息平台在网站定位、功能、性质、内容、数据格式等方面不同。

国内建立了国家遗传工程小鼠资源库、国家犬类实验动物资源库、国家啮齿类实验动物资源库、国家非人灵长类实验动物资源库等 6 个实验动物相关资源库，对其资源库包含的实验动物资源进行展示和共享，含有实验动物资源基本信息及技术服务信息[10-11]。国内外已经建立了一些具有电商属性的实验动物相关供需发布平台，例如国内的广东省实验动物监测所建立的实验动物商城（www.lasmark.cn）、维通利华实验动物商城（https://buy.vitalriver.com/）、喀斯玛商城（www.casmart.com.cn）以及国外的 Jackson Laboratory（https://www.jax.org/cn/）、Charles River（https://www.criver.com/）、Taconic（https://www.taconic.com/）、Envigo（https://www.envigo.com）等。这些平台集本单位内部的实验动物资源管理、交易、资讯为一体，实现实验动物行业资源聚合、快速查询与在线交易[12-16]。而信息平台数据来源广泛，含有从文献中采集的世界范围的模型资源，有些为非实物资源，研究者可通过文献中提供的技术方法进行模型的制备。

信息平台为免费公开的网站，对我国实验动物、动物模型等资源及相关信息进行系统整合，方

便研究人员对信息进行查询,能够在线咨询及订购,将资源拥有者与使用者联系起来,形成供需纽带。为资源的宣传与推广提供平台,助力实验动物行业资源与服务的快速对接,加速资源流通。有助于推动我国实验动物领域动物模型资源信息共享,为科技创新和社会发展提供高质量的科技资源共享服务。

今后将建成规模更大、集约化和高水平的信息平台,向“产业化、规范化”方向发展,提供更为全面、高质量的数据,不断提高信息平台的影响力,充分发挥平台的作用,服务全国,服务相关各方。我们将继续整合国内外的动物模型资源,不断更新和完善动物模型的各类信息,例如模型的评价标准、模型构建技术信息等,发挥国家级信息平台的作用,为科技攻关,生物医药产业提供有力的支撑,更好的服务科研和生物医药行业的需求。

参 考 文 献(References)

[1] Quimby FW. Twenty-five years of progress in laboratory animal science [J]. Lab Anim, 1994, 28(2): 158-171.

[2] Kong Q, Qin C. LasDB: a collective database for laboratory animal strain resources [J]. Anim Model Exp Med, 2018, 1(4): 266-271.

[3] Forni M. Laboratory animal science: a resource to improve the quality of science [J]. Vet Res Commun, 2007, 31(1): 43-47.

[4] Kong Q, Qin C. Analysis of current laboratory animal science policies and administration in China [J]. ILAR J, 2009, 51(1): e1-e11.

[5] Kong Q, Qin C. Laboratory animal science in China: current status and potential for adoption of Three R alternatives [J]. Altern Lab Anim, 2010, 38(1): 53-69.

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

[7] 卢胜明. 国内外实验动物现状及发展趋势 [R]. 北京, 2013.
Lu SM. Current situation and development trend of laboratory animals at home and abroad [R]. Beijing, 2013.

[8] 中共中央国务院关于构建更加完善的要素市场化配置体制机制的意见 [J]. 工程造价管理, 2020, 3: 3-5.
Opinions of CPC Central Committee and the State Council on building a more complete system and mechanism for factor marker-based allocation [J]. Eng Cost Manage, 2020, 3: 3-5.

[9] 贺争鸣. 基于能力提升的我国实验动物资源发展愿景 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(2): 85-90.
He ZM. Development vision of laboratory animal resources in china based on ability improvement [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(2): 85-90.

[10] 李会萍. 实验动物生物学特性数据库管理系统 [D]. 广州: 华南理工大学; 2014.
Li HP. Database management system of biological characteristics of animal experiment [D]. Guangzhou: South China University of Technology; 2014.

[11] 孔琪, 夏霞宇, 秦川. 实验动物品系数据库的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(4): 78-83.
Kong Q, Xia XY, Qin C. Establishment of the laboratory animal strain database [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(4): 78-83.

[12] 李会萍, 王晓明, 刘万策, 等. 基于移动互联网的实验动物商城平台的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(12): 77-80.
Li HP, Wang XM, Liu WC, et al. Discussion on the experimental animal mall platform based on mobile Internet [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(12): 77-80.

[13] 李会萍, 王晓明, 杨锦淳, 等. “互联网+”实验动物资源共享服务平台模式研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 69-73.
Li HP, Wang XM, Yang JC, et al. Research on sharing service patterns of “Internet +” laboratory animal resources [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(9): 69-73.

[14] 蒯鹏州, 赵景, 卢凡. 实验试剂采购平台比较研究 [J]. 实验技术与管理, 2018, 35(12): 270-273.
Kuai PZ, Zhao J, Lu F. Comparative study on procurement platform for experimental reagents [J]. Exp Technol Manag, 2018, 35(12): 270-273.

[15] 吴红月. 喀斯玛商城:为生化试剂耗材采购监管探路 [N]. 科技日报, 2015-01-15(9).
Wu HY. Casmart: Explore the way for the supervision of biochemical reagent consumables procurement [N]. Science and Technology Daily, 2015-01-15(9).

[16] Taconic network brings EMRs to upstate New York practices [J]. Perform Improv Advis, 2005, 9(12): 142-133.

[收稿日期] 2022-04-20

高畅,任鹏程,李明格,等. Tn5 转座子及其在生物技术领域的应用[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1087-1094.
Gao C, Ren PC, Li MG, et al. Tn5 transposon and its applications in biotechnology [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1087-1094.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.010

Tn5 转座子及其在生物技术领域的应用

高畅[1#],任鹏程[1#],李明格[2],吕赫喆[2],胡仪[1*]

(1. 北京师范大学生命科学学院,北京 100875;2. 中国科学院动物研究所,北京 100101)

【摘要】 随着二代测序技术的快速发展,测序及其相关技术愈发成熟并向高精度和高通量的方向深入。传统的测序方式对样本量要求很高,而许多珍贵样本难以满足要求,因此能够降低样本量需求的技术亟待开发。而 Tn5 转座酶在文库构建中可以在片段化 DNA 的同时将接头序列加入到靶序列两侧,大大缩减了实验流程,同时也降低了对样本量的需求。因此,Tn5 转座酶在生物技术领域的应用被逐渐开发,例如 CUT&Tag、stLFR 和 TRACE-seq 等技术就是将 Tn5 转座酶应用于表观测序、长片段测序和转录组测序等领域的研究成果。简单的实验流程和极低的成本使其备受青睐。本文中,我们对 Tn5 转座子及其在生物技术领域的应用进行了综述,以期方便大家理解 Tn5 转座子及其相关技术,为未来 Tn5 转座子相关技术的改进和推广提供参考。

【关键词】 二代测序;Tn5 转座子;生物技术
【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2022)08-1087-08

Tn5 transposon and its applications in biotechnology

GAO Chang[1#], REN Pengcheng[1#], LI Mingge[2], LYU Hezhe[2], HU Yi[1*]

(1. College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China. 2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Corresponding author: HU Yi. E-mail: yi.hu@bnu.edu.cn

【Abstract】 With the rapid advancement of next-generation sequencing (NGS), sequencing and its related technologies are becoming more mature and providing higher accuracy and throughput. Traditional method of sequencing require a large sample quantity that is difficult to obtain for some samples. Thus, techniques with a lower demand on sample quantity are in urgent need. In library construction, the Tn5 transposase cuts DNA and adds an adapter sequence to both sides of the target sequence, which requires fewer steps and a lower sample quantity. Therefore, applications of Tn5 transposase have been gradually developed in biotechnology. For example, CUT&Tag, stLFR, and TRACE-seq are techniques that use Tn5 transposase in epigenomic sequencing, long fragment reading, and transcriptome sequencing. The simple steps and very low cost make the techniques popular. In this review, we summarize the Tn5 transposon and its applications in biotechnology to make it understood more easily and provide a reference for improvement and promotion in the future.

【Keywords】 next-generation sequencing (NGS); Tn5 transposon; biotechnology
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目]国家自然科学基金(32070401)。
Funded by National Natural Science Foundation of China(32070401).
[作者简介]高畅(2000—),女,在读本科生。Email:cherrelle1107@163.com;
任鹏程(2001—),男,在读本科生。Email:tutu_pcr@163.com。
#共同第一作者
[通信作者]胡仪(1985—),女,博士,副教授,博士生导师,研究方向:微生物生态学。Email: yi.hu@bnu.edu.cn

1 Tn5 转座子及转座机制

1.1 Tn5 转座子

Tn5 是一种复合型转座子,其中心序列可表达 3 种抗生素(kan^r、str^r、bleo^r),两侧为高度同源的倒置序列 IS50R 和 IS50L[1](图 1A)。IS50R 可以表达产生转座酶(transposase,Tnp)和抑制转座酶活性的抑制蛋白(inhibitor,Inh),IS50L 表达产生两个非活性蛋白[2-3]。每个 IS50 序列都位于两个 19 bp 的倒置末端(外末端 outside end,OE 和内末端 inside end,IE)之间。倒置末端为转座酶的作用位点,但 OE 和 IE 在序列上略有不同[1,4]。后续的研究发现,转座的发生只需其中的关键成分,即转座酶和两个 19 bp 的倒置末端,内部可以包含任何足够长的 DNA 片段(图 1B)。并且,这两个 19 bp 的末端可以是倒置的 OE 和 IE、两个 OE、两个 IE,也可以是两个马赛克末端(mosaic end,ME)。实际上,ME 是一种人工构建的末端,其序列与 OE 存在 3 个碱基对的不同,且具有比 OE 和 IE 更高的转座速率[5]。

1.2 转座酶结构

由 IS50R 编码的 Tn5 转座酶可以分成 3 个结构域:与转座子末端 DNA 结合的 N 端结构域、具有催化活性的中部结构域和负责蛋白质结合的 C 端结构域。N 端结构域的二级结构仅包含 α-螺旋和转角,用于与转座子末端序列的识别和结合;C 端结构域也仅有 α-螺旋和转角,可以与转座酶结合促进转座过程,也可以同 Inh 结合形成二聚体抑制转座[6]。而转座酶的活性位点则位于由约 300 个氨基酸残基组成的中部结构域内,该结构域内含有一个“核酸酶类 H 模体”起催化作用,且该模体在所有转座酶和逆转录病毒整合酶中都起类似的作用[6-8]。Tn5 转座酶的“核酸酶类 H 模体”活性中心内有 D97、D188、E326 作为保守的氨基酸残基组成 DDE 模体,对转座酶的活性有至关重要的作用。该 DDE 模体与两个 Mn^{2+}结合,两个 Mn^{2+}分别与 OE 末端的 3'-OH 和 5'-P 配位作为催化活性中心[6]。此外,在 DDE 模体的谷氨酸残基后还存在一对保守的赖氨酸残基(E×××K××K),其中,第二个赖氨酸残基与 Y319、R322 及 DDE 模体中的 E326 组成了高度保守的 YREK 模体,该模体使得非转移链的 5'-P 发生位移,为靶 DNA 的结合留下了空间[9]。

1.3 Tn5 转座机制

Tn5 转座需要多个步骤,主要包括转座酶二聚体的形成、供体 DNA 的切割、靶 DNA 的捕获与链转移、链转移复合物的脱离 4 个步骤(见图 2)。首先,在缓冲液中加入 Mg^{2+},两个转座酶分子的 N 端 26~65 位氨基酸残基及活性中心的几个氨基酸残基与 Tn5 转座子末端序列特异性结合,构成两个转座酶-DNA 复合体[6,10]。紧接着,这两个复合体利用转座酶 C 端 α 螺旋交叉,发生剪刀状二聚化,形成一个转座酶二聚体[6-7]。在形成转座酶二聚体后,转座酶启动 DNA 的切割,并且,一侧的转座酶催化另一侧末端的反应,呈现出交叉作用的现象[11]。整个催化反应大致包括 3 个步骤:首先,转座酶活化的水分子与 DNA 链反应,使 OE 末端暴露出游离的 3'-OH;其在接下来的反应中与互补链形成发夹结构,

注:A:Tn5 的天然结构:Tn5 转座子由编码 3 种抗生素(kan^r、str^r、bleo^r)的中心序列和两侧的倒置序列(IS50L 和 IS50R)组成,每个 IS50 都位于一个外末端(OE)和一个内末端(IE)之间,IS50L 编码两个非活性蛋白,IS50R 编码转座酶(Tnp)和转座酶抑制蛋白(Inh);B:Tn5 转座子的简化结构:任意足够长的 DNA 片段在其两侧加上外末端(OE)或者其它末端(IE、ME)都构成一个转座子。

图 1 Tn5 转座子结构

Note. A. Traditional transposon Tn5. It contains two inverted versions of IS50 (IS50L and IS50R) bracketing three antibiotic resistance genes (kan^r, str^r, bleo^r), and the IS50 elements are defined by the outside end (OE) and inside end (IE). IS50L encodes two inactive proteins, while IS50R encodes transposase (Tnp) and an inhibitor of transposition (Inh). B. Simplified transposon Tn5. Two outside ends (OE) or other ends (IE, ME) brackets sufficient DNA.

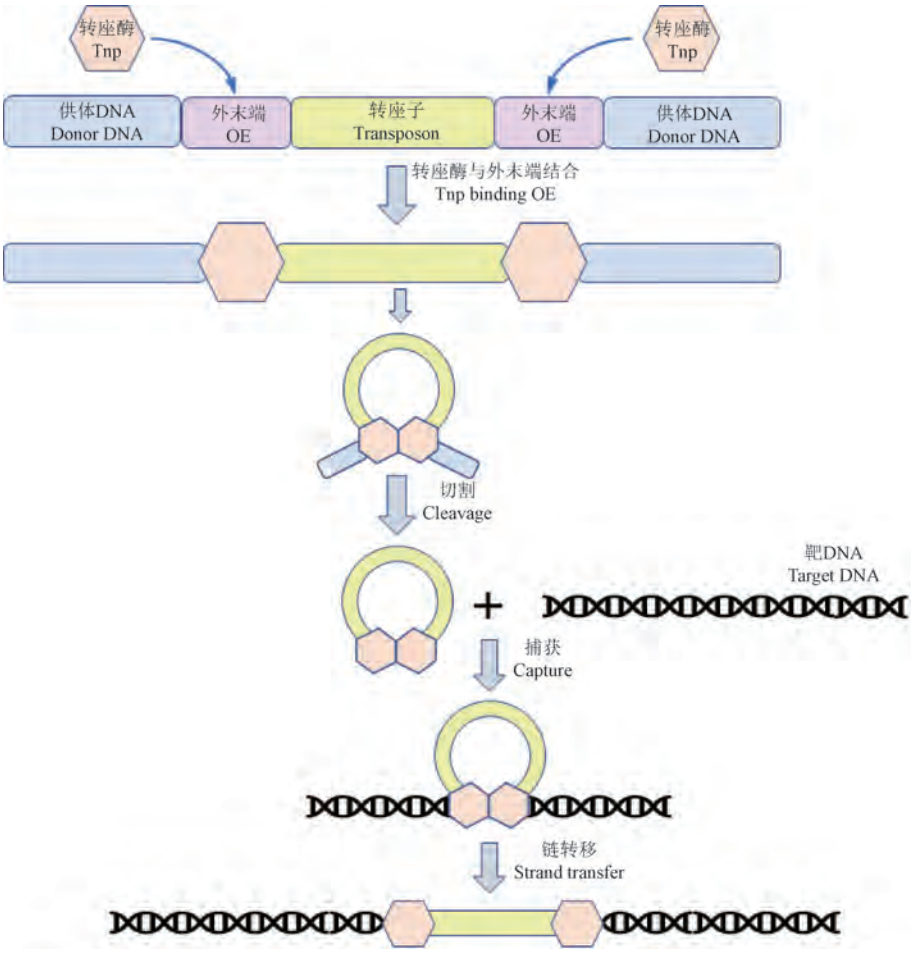
Figure 1 Structure of transposon Tn5

使转座子 DNA 从供体 DNA 骨架中脱离;最后,另一活化的水分子将该发夹结构打开,释放出 3'-OH 为链转移做准备[12]。在整个催化反应完成后,转座酶二聚体捕获靶 DNA 并进行链转移。许多研究表明,Tn5 的链转移插入位点在大范围内是随机的,但是仍然存在优选的 9 bp 插入位点[13]。并且,研究者们发现了非转移链的 5'-P 会导致 5'末端在空间上的运动,进而使得 DNA 构象发生改变,更易于与靶 DNA 结合,并将 3'-OH 暴露在一个空腔中使其更易发生链转移[9]。当转座酶二聚体与靶 DNA 结合后,转座子 DNA 的 3'-OH 分别在 9 bp 靶位点两侧进行亲核攻击完成链转移,并在转座子两端各形成一个 9 bp 的粘性末端。据推测,在体内实现链转移后,链转移复合物可能被宿主的某些功能释放,随后两个粘性末端被补平,形成 9 bp 的正向重复序列。而在体外时,Tn5 链转移复合物十分稳定[14]。

2　Tn5 建库方法

自人类基因组计划以来,DNA 测序技术在生命科学领域的研究不断深入。二代测序技术的发展使大规模并行 DNA 测序成为可能[15]。二代测序技术的流程步骤主要包括样品提取、文库构建与测序及最后的数据处理与分析。其中,文库构建在很大程度上直接影响到数据分析的结果,是整个技术的核心。传统的文库构建流程通常包括 DNA 片段化(机械法或酶促法)、末端补齐、测序接头的连接和 PCR 扩增,在 RNA-seq 中还需要首先合成 cDNA 文库。尽管 barcode 接头的连接可以同时分析多个样本,但是对于开发一种样本起始量低、实验周期短、成本低的文库构建方法的需求越来越强烈[16]。

基于 Tn5 转座酶的文库构建方法大大缩减了传



注:Tn5 的转座机制:两个 Tn5 转座酶结合 OE,形成复合体并发生二聚化。随后,通过亲核反应使转座子 DNA 脱离供体 DNA。最终,Tn5 二聚体捕获靶 DNA,完成链转移。

图 2　Tn5 的转座机制

Note. Mechanism of Tn5 transposition. Two Tn5 transposases bind to the OEs and then dimerize forming the synaptic complex. Then, Nucleophilic reactions occur resulting in cleavage of transposon-donor DNA bonds. Finally, the synaptic complex captures the target DNA and strand transfer occurs.

Figure 2　Mechanism of Tn5 transposition

统方案中文库构建的步骤、时间和成本。在此方法中,Tn5 转座酶的高活性衍生物的运用可以在短时间内将转座序列插入靶 DNA 中,直接引发双链 DNA 的片段化,同时将接头序列加至片段的两端[17]。其流程大致为,首先将测序接头和 OE 序列整合为包被接头,与转座酶在体外孵育,形成结合了 DNA 的转座酶二聚体;随后该复合体与待测序 DNA 共孵育并将其打断,形成可测序的 DNA 片段;最后加入酶将复合体插入时产生的切口补平,并通过 PCR 扩增完成文库的构建。此外,在 PCR 扩增时还可以引入 barcode 以实现大规模并行的 DNA 测序。

但是 PCR 扩增易产生扩增偏差和错误[18],这在细胞异质性研究的单细胞测序中是极为不利的。因此,一种利用 Tn5 转座子插入启动子进行线性扩增的方法(linear amplification via transposon insertion, LIANTI)应运而生。该方法利用 Tn5 转座子将单细胞基因组 DNA 随机打断,同时在每个片段上添加 T7 启动子,再用 DNA 聚合酶补齐片段两端的单链 T7 启动子,最后进行体外转录。随后,再通过逆转录、RNA 酶消化、cDNA 二链的合成,最终形成 LIANTI 文库进行测序[18]。并且,若在 LIANTI 转座子和引物中添加组合 barcode,也可以实现单细胞的高通量测序。此外,虽然 Tn5 偏好于包含鸟苷(G)和胞苷(C)的插入序列,导致插入间隔不够均匀,进而导致测序时的覆盖范围不够均匀,但是 Tn5 转座酶突变体 Tn5-059 可以有效解决这个问题[19]。同时,多种高活性 Tn5 转座酶的高效生产进一步降低了文库构建的时间和成本[20-22]。这些优势都使 Tn5 转座酶在建库领域备受青睐。

3 Tn5 建库在表观测序中的应用

3.1 基于 Tn5 为全基因组亚硫酸氢盐测序建库

表观遗传是指基因序列不变时,通过一些表观修饰影响基因表达情况进而影响表型的现象。胞嘧啶 5-C 位置的酶促甲基化是一种广泛存在的表观遗传修饰,在基因调控方面有着重要作用[23]。全基因组亚硫酸氢盐测序(whole genome bisulfite sequencing, WGBS)是研究胞嘧啶甲基化分辨率较高且较为全面的一种方法[24]。该方法中,亚硫酸氢钠被用来处理基因组 DNA,在 5-甲基胞嘧啶保持非反应性的条件下将单链 DNA 中的胞嘧啶残基转化为尿嘧啶残基,随后用胞嘧啶甲基化处理的引物扩增并测序,序列中剩余的所有胞嘧啶残基代表基因组中先前甲基化的胞嘧啶[25]。随着大规模并行测序成本的下降,WGBS 也越来越普及。但是 WGBS 有一个关键的限制因素是需要较大量的 DNA 样本,这对于许多实验是难以实现的[24,26]。据此,Adey 等[27]开发了 Tn5Mc-seq,该方法将 Tn5 转座系统用于 WGBS 来快速制备亚硫酸氢盐测序文库,先将传统的 Tn5 建库中与 Tn5 结合的接头中的胞嘧啶进行甲基化修饰,将基因组 DNA 片段化后再与亚硫酸氢盐反应。转座酶的使用使 DNA 的片段化、末端的补齐和接头的连接简化为单个反应且将 DNA 更有效地转化为测序兼容材料。因此其减少了建库过程中对 DNA 样本量的损耗,大大降低了 WGBS 所需要的基因组 DNA 起始量[27]。

3.2 基于 Tn5 对蛋白质与染色体的相互作用测定

染色质和蛋白质的相互作用在表观调控中也起到非常重要的作用,因此研究这种相互作用的众多方法相继诞生,染色质免疫沉淀测序(chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq)就是一个十分典型的例子[28]。但 ChIP-seq 需要甲醛来介导 DNA 与蛋白质的交联,往往具有低信号、高背景且样本需求量大等缺点[28]。随后出现的 CUT&RUN 技术就是在此基础上的改进,它的大致思路为在非交联细胞中通过连续使用特定抗体,将蛋白 A-微球菌核酸酶复合物(pA-MNase)导向蛋白质结合位点,随后通过钙离子的释放来激活核酸酶,将所要的片段释放到上清液中,最后进行文库的制备和测序等[29]。该方法可以将背景水平大大降低,也可以在一定程度上降低对样本的需求量,仅在 100~1000 个细胞中就可以产生高质量的数据,但是必须经过 DNA 末端的补齐和接头的连接才能制备测序文库,这会增加整个过程的时间、成本和工作量。紧接着出现的 CUT&Tag 技术是对 CUT&RUN 技术的改进,研究人员将 MNase 替换为 Tn5 转座酶并使用 Mg^{2+} 在特定时期激活 pA-Tn5 融合蛋白组成的转座体,在获取靶 DNA 的同时直接插入测序接头,进一步简化了实验步骤,降低了时间成本[30]。在实际操作中,CUT&RUN 和 CUT&Tag 技术都需要将细胞与磁珠结合,由于磁珠的悬浮性较差等因素,酶的效率往往会下降,于是研究者们又对磁珠进行改良,有效改善了这一问题,提高了检测的灵敏度[31]。最近,研究者们在原有的 CUT&Tag 技术上进一步创新,开发出了 multi-CUT&Tag,可以同时映射同一细胞中的多个染色体蛋白质,直接检测不同蛋白质在同一细

胞中的共定位[32]。与此同时,与 CUT&Tag 技术一样基于抗体将 Tn5 靶向目的位点的技术还有 ACT-seq[33]、CoBATCH[34] 和 ChIL-seq[35] 等,在单细胞表观测序方面都具有深远意义和广阔的发展前景。

通常情况下,染色质可分为松弛型和紧密型两种状态,紧密型染色质往往不易于与蛋白质等调控因子结合,可及性较弱;而松弛型染色质更容易被调控因子等识别并结合,可及性较强,因此染色质可及性的研究也是基因组研究的一大重点。以转座酶为载体研究染色质可及性的技术(assay for transposase accessible chromatin with high-throughput sequencing, ATAC-seq)在这一领域有着极为重要的地位。该技术利用 Tn5 转座酶优先结合 DNA 中未受核小体保护的区域的特点,将测序接头引入染色质的松弛区域进行测序,以测定全基因组的染色质可及性[36]。相比以往染色质可及性的测定方法,ATAC-seq 中 Tn5 的使用使 DNA 的切割和接头的插入同时进行,简化了实验流程,从而大大降低了对样本量的要求。但同时 ATAC-seq 也存在一些问题,例如,由于 Tn5 转座酶在插入测序接头时方向随机,一个片段两端的接头可能相同,导致仅有一半的片段可被测序[37]。此外,当片段过大时,也难以进行体外的 PCR 扩增[37]。

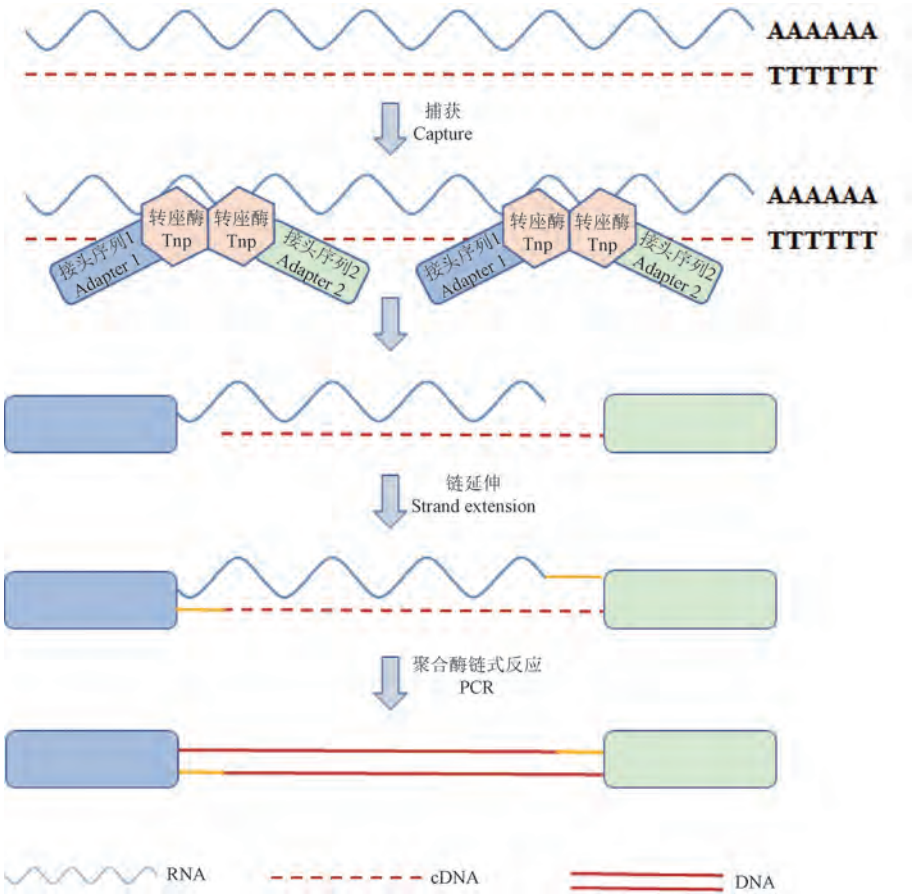
近年来,研究者们对 ATAC-seq 技术进行了多种改进。THS-ATAC-seq 技术是利用类似 LIANTI 技术的方法将 T7 启动子引入染色质可及位点并进行体外转录,随后对转录本进行建库测序。并且,为了解决 ATAC-seq 中片段两端接头相同导致测序效率降低的问题,研究者们还设计了由两套转座体复合物二聚体先后进行转座以分别加入两端测序接头的方法[37]。此外,Single Cell ATAC-seq 技术提供了单细胞染色质可及性的测定方案,使异质性细胞染色质可及性的差异得以检测[38-40]。Omni-ATAC-seq 技术在转座反应中使用 PBS 以增加信噪比,可以消除线粒体的干扰,提高染色质可及性数据的质量[40-41]。UMI-ATAC-seq 技术通过把带有标准 TruSeq 测序接头的 UMI(unique molecular identifiers)应用到 ATAC-seq 中,将 PCR 导致的重复序列与固有的重复序列区分开,能更准确地量化染色质可及性[42]。近期,新开发的 ATAC-MS 技术将 ATAC-seq 与质谱技术相结合,使开放染色质结合蛋白得到更精确的检测,这相比之前在 ATAC-seq 后通过数据分析猜测蛋白质结合位点要更加精准[43]。

4　Tn5 建库在长片段测序中的应用

二代测序技术虽然实现了人们对基因的进一步研究,但是它只能有效读取短片段的特点使得最初的长片段测序往往需要先将长片段打断,测序后进行拼接。这种方法不仅复杂繁琐,而且给基因组中同源序列的辨别和染色体结构变异的鉴定带来困难。Peters 等[44] 利用稀释法将长片段相互分离后打断,并在打断后的每个短片段上添加 barcode 和测序接头,在测序后利用 barcode 区分不同的长片段并完成拼接。但将混合的长片段稀释为单条片段操作复杂,且后续处理成本高。2017 年,stLFR(single-tube long fragment read)的开发解决了这一困难。研究人员利用 Tn5 在被 SDS 去除之前都一直与 DNA 片段结合且不脱落这一特性[45],将 Tn5 转座酶先与长片段 DNA 结合后,再与表面含有不同 barcode 的磁珠共同孵育[46]。由于转座酶上结合的特殊 DNA 片段可以与 barcode 侧翼链杂交并连接,不同的长片段会附着在不同的磁珠上。随后加入 SDS 可打断长片段并将磁珠表面的 barcode 转座到每一个短片段中,最后通过 PCR 加入测序接头即可进行常规测序[47]。该方法弥补了二代测序的不足,相比三代测序成本更低,准确性更高,具有广阔的应用前景。

5　Tn5 建库在转录组测序中的应用

在常规转录组建库中,往往需要先富集目标 RNA 再将其片段化,随后进行一链和二链 cDNA 合成、接头连接和 PCR 扩增等。尽管 Tn5 转座酶建库方法的普及简化了其中的步骤,但是其仍然无法满足对微量 RNA 样本方便、快捷地进行转录组测序及分析的需求。2020 年,Tn5 转座酶被证实可以直接作用于 DNA/RNA 杂交链,基于此,研究者们开发了一种转录组建库新方法,并命名为 TRACE-seq(transposase-assisted RNA/DNA hybrids co-tagmentation)(见图 3),该方法可以简化实验流程,降低建库成本及样本的输入量[48-49]。TRACE-seq 具有广阔的应用前景,它有望用于获取与复杂的宿主背景混合而无法体外培养的低滴度病毒的全基因组[50]。近期,TRACE-seq 也被证明具有获取综合信息的潜力,可用于表征复杂的宿主与微生物组之间的相互作用[51]。



注:基于 TRACE-seq 的建库流程,在 RNA 逆转录后,带有接头序列的 Tn5 转座酶直接结合 DNA/RNA 杂交链,完成链的延伸补齐后利用 DNA 聚合酶进行扩增完成建库。

图 3 TRACE-seq 建库方法

Note. Workflow of the library preparation strategy based on TRACE-seq. After RNA reverse transcription, the DNA/RNA hybrid is tagmented by Tn5 transposase with adapters directly. DNA polymerase then amplifies the cDNA into a sequencing library after end extension.

Figure 3 Library preparation based on TRACE-seq

6 小结与展望

Tn5 转座子独特的转座机制使其可以将文库构建中 DNA 的片段化、末端的补齐和接头的连接 3 个步骤简化为单一且快速的反应,这大大简化了文库的构建流程,同时降低了对样本量的需求,这在疾病的研究中具有深远的意义和广阔的前景。此外,LIANTI 的应用降低了由 PCR 扩增带来的扩增偏差和错误,使得文库中 DNA 的扩增更加保守。在长片段测序中,Tn5 转座酶的应用弥补了二代测序短读长的缺点,相较于三代测序其成本更低,准确性更高,这使得一些染色体疾病的检测变得更加便捷。

除此之外,Tn5 转座酶还被应用在多个领域中。例如 BAT Hi-C 技术利用 Tn5 转座酶进行染色体 3D 构象的捕获[52];FACT-seq 技术利用 Tn5 转座酶开发出有效分析福尔马林固定石蜡包埋组织中组蛋白修饰的方法[53];SorTn-seq 技术利用 Tn5 转座酶高通量筛选细菌基因表达的调节因子[54]。Tn5 转座酶在各种技术中的应用显著降低了对样本量的要求,这使许多稀缺的样本也能够满足各种测序的要求。同时,Tn5 转座酶与 barcode 等技术的结合提高了单细胞测序的可行性。目前,Tn5 转座酶在单细胞测序领域的研究还相当稀缺,对相关技术的开发和改进还有待研究。但 Tn5 转座酶所具有的单细胞测序潜力在细胞分化、肿瘤异质性的研究中备受关注。虽然目前 Tn5 转座酶的使用并未普及,但是随着技术研究的不断深入,Tn5 转座酶有望打开单细胞测序等领域的新局面。

参 考 文 献(References)

[1] Rothstein SJ, Jorgensen RA, Yin JC, et al. Genetic organization

of Tn5 [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1981, 45: 99-105.

[2] Isberg RR, Lazaar AL, Syvanen M. Regulation of Tn5 by the right-repeat proteins: control at the level of the transposition reaction [J]. Cell, 1982, 30(3): 883-892.

[3] Lowe JB, Berg DE. A product of the Tn5 transposase gene inhibits transposition [J]. Genetics, 1983, 103(4): 605-615.

[4] Rothstein SJ, Jorgensen RA, Postle K, et al. The inverted repeats of Tn5 are functionally different [J]. Cell, 1980, 19(3): 795-805.

[5] Zhou M, Bhasin A, Reznikoff WS. Molecular genetic analysis of transposase-end DNA sequence recognition: cooperativity of three adjacent base-pairs in specific interaction with a mutant Tn5 transposase [J]. J Mol Biol, 1998, 276(5): 913-925.

[6] Steiniger-White M, Rayment I, Reznikoff WS. Structure/function insights into Tn5 transposition [J]. Curr Opin Struct Biol, 2004, 14(1): 50-57.

[7] Davies DR, Mahnke Braam L, Reznikoff WS, et al. The three-dimensional structure of a Tn5 transposase-related protein determined to 2.9-Å resolution [J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11904-11913.

[8] Rice P, Mizuuchi K. Structure of the bacteriophage Mu transposase core: a common structural motif for DNA transposition and retroviral integration [J]. Cell, 1995, 82(2): 209-220.

[9] Klenchin VA, Czyz A, Goryshin IY, et al. Phosphate coordination and movement of DNA in the Tn5 synaptic complex: role of the (R)YREK motif [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(18): 5855-5862.

[10] Zhou M, Reznikoff WS. Tn5 transposase mutants that alter DNA binding specificity [J]. J Mol Biol, 1997, 271(3): 362-373.

[11] Naumann TA, Reznikoff WS. Trans catalysis in Tn5 transposition [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(16): 8944-8949.

[12] Bhasin A, Goryshin IY, Reznikoff WS. Hairpin formation in Tn5 transposition [J]. J Biol Chem, 1999, 274(52): 37021-37029.

[13] Goryshin IY, Miller JA, Kil YV, et al. Tn5/IS50 target recognition [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(18): 10716-10721.

[14] Goryshin IY, Reznikoff WS. Tn5 *in vitro* transposition [J]. J Biol Chem, 1998, 273(13): 7367-7374.

[15] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(10): 1135-1145.

[16] Craig DW, Pearson JV, Szelinger S, et al. Identification of genetic variants using bar-coded multiplexed sequencing [J]. Nat Methods, 2008, 5(10): 887-893.

[17] Adey A, Morrison HG, Asan, et al. Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density *in vitro* transposition [J]. Genome Biol, 2010, 11(12): R119.

[18] Chen C, Xing D, Tan L, et al. Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI) [J]. Science, 2017, 356(6334): 189-194.

[19] Kia A, Gloeckner C, Osothprarop T, et al. Improved genome sequencing using an engineered transposase [J]. BMC Biotechnol, 2017, 17(1): 6.

[20] Picelli S, Björklund AK, Reinius B, et al. Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects [J]. Genome Res, 2014, 24(12): 2033-2040.

[21] Hennig BP, Velten L, Racke I, et al. Large-scale low-cost NGS library preparation using a robust Tn5 purification and tagmentation protocol [J]. G3 (Bethesda), 2018, 8(1): 79-89.

[22] Xu T, Xiao M, Yu L. Method for efficient soluble expression and purification of recombinant hyperactive Tn5 transposase [J]. Protein Expr Purif, 2021, 183: 105866.

[23] Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease [J]. J Pathol, 2001, 195(1): 97-110.

[24] Cokus SJ, Feng S, Zhang X, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning [J]. Nature, 2008, 452(7184): 215-219.

[25] Clark SJ, Harrison J, Paul CL, et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(15): 2990-2997.

[26] Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis* [J]. Cell, 2008, 133(3): 523-536.

[27] Adey A, Shendure J. Ultra-low-input, tagmentation-based whole-genome bisulfite sequencing [J]. Genome Res, 2012, 22(6): 1139-1143.

[28] Park PJ. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology [J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(10): 669-680.

[29] Skene PJ, Henikoff JG, Henikoff S. Targeted in situ genome-wide profiling with high efficiency for low cell numbers [J]. Nat Protoc, 2018, 13(5): 1006-1019.

[30] Kaya-Okur HS, Wu SJ, Codomo CA, et al. CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1930.

[31] Fujiwara Y, Tanno Y, Sugishita H, et al. Preparation of optimized concanavalin A-conjugated Dynabeads ® magnetic beads for CUT&Tag [J]. PLoS One, 2021, 16(11): e0259846.

[32] Gopalan S, Fazzio TG. Multi-CUT&Tag to simultaneously profile multiple chromatin factors [J]. STAR Protoc, 2022, 3(1): 101100.

[33] Carter B, Ku WL, Kang JY, et al. Mapping histone modifications in low cell number and single cells using antibody-guided chromatin tagmentation (ACT-seq) [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3747.

[34] Wang Q, Xiong H, Ai S, et al. CoBATCH for high-throughput single-cell epigenomic profiling [J]. Mol Cell, 2019, 76(1): 206-216.

[35] Harada A, Maehara K, Handa T, et al. A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling with lower input

[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(2): 287-296.

[36] Buenrostro JD, Wu B, Chang HY, et al. ATAC-seq: A method for assaying chromatin accessibility genome-wide [J]. Curr Protoc Mol Biol, 2015, 109: 21.29.1-21.29.9.

[37] Sos BC, Fung HL, Gao DR, et al. Characterization of chromatin accessibility with a transposome hypersensitive sites sequencing (THS-seq) assay [J]. Genome Biol, 2016, 17: 20.

[38] Chen X, Miragaia RJ, Natarajan KN, et al. A rapid and robust method for single cell chromatin accessibility profiling [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 5345.

[39] Xu W, Wen Y, Liang Y, et al. A plate-based single-cell ATAC-seq workflow for fast and robust profiling of chromatin accessibility [J]. Nat Protoc, 2021, 16(8): 4084-4107.

[40] Sun Y, Miao N, Sun T. Detect accessible chromatin using ATAC-sequencing, from principle to applications [J]. Hereditas, 2019, 156: 29.

[41] Corces MR, Trevino AE, Hamilton EG, et al. An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues [J]. Nat Methods, 2017, 14(10): 959-962.

[42] Zhu T, Liao K, Zhou R, et al. ATAC-seq with unique molecular identifiers improves quantification and footprinting [J]. Commun Biol, 2020, 3(1): 675.

[43] Zhang H, Qin Z, Yue X, et al. Proteome-wide profiling of transcriptional machinery on accessible chromatin with biotinylated transposons [J]. Sci Adv, 2021, 7(43): eabh1022.

[44] Peters BA, Kermani BG, Sparks AB, et al. Accurate whole-genome sequencing and haplotyping from 10 to 20 human cells [J]. Nature, 2012, 487(7406): 190-195.

[45] Amini S, Pushkarev D, Christiansen L, et al. Haplotype-resolved whole-genome sequencing by contiguity-preserving transposition and combinatorial indexing [J]. Nat Genet, 2014, 46(12): 1343-1349.

[46] Zhang F, Christiansen L, Thomas J, et al. Haplotype phasing of whole human genomes using bead-based barcode partitioning in a single tube [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(9): 852-857.

[47] Wang O, Chin R, Cheng X, et al. Efficient and unique cobarcoding of second-generation sequencing reads from long DNA molecules enabling cost-effective and accurate sequencing, haplotyping, and *de novo* assembly [J]. Genome Res, 2019, 29(5): 798-808.

[48] Di L, Fu Y, Sun Y, et al. RNA sequencing by direct tagmentation of RNA/DNA hybrids [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(6): 2886-2893.

[49] Lu B, Dong L, Yi D, et al. Transposase-assisted tagmentation of RNA/DNA hybrid duplexes [J]. Elife, 2020, 9: e54919.

[50] Zhang Z, Liu D, Wang D, et al. Library preparation based on transposase assisted RNA/DNA hybrid co-tagmentation for next-generation sequencing of human noroviruses [J]. Viruses, 2021, 13(1): 65.

[51] Lu B, Yan Y, Dong L, et al. Integrated characterization of SARS-CoV-2 genome, microbiome, antibiotic resistance and host response from single throat swabs [J]. Cell Discov, 2021, 7(1): 19.

[52] Huang J, Jiang Y, Zheng H, et al. BAT Hi-C maps global chromatin interactions in an efficient and economical way [J]. Methods, 2020, 170: 38-47.

[53] Zhao L, Xing P, Polavarapu VK, et al. FACT-seq: profiling histone modifications in formalin-fixed paraffin-embedded samples with low cell numbers [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(21): e125.

[54] Smith LM, Jackson SA, Gardner PP, et al. SorTn-seq: a high-throughput functional genomics approach to discovering regulators of bacterial gene expression [J]. Nat Protoc, 2021, 16(9): 4382-4418.

[收稿日期] 2022-05-12

邢亦谦,高泓,谢红艳,等. 四种昼间啮齿类动物的活动模式及其应用进展[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1095-1101.

Xing YQ, Gao H, Xie HY, et al. Locomotor activity of four diurnal rodents and their applications [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1095-1101.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.011

四种昼间啮齿类动物的活动模式及其应用进展

邢亦谦[1,2],高泓[1],谢红艳[1],谢春光[1*]

(1. 成都中医药大学附属医院,代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室,成都 610075;
2. 成都中医药大学,成都 610075)

【摘要】 昼间啮齿类动物具有与人类相似的昼夜节律,随着生物钟的发现,近年来此类动物逐渐展露出夜间啮齿类动物所不能替代的优势,以新兴模型的姿态出现在代谢、光反应、神经调节、社会行为等医学研究领域。然而国内尚缺乏此类动物的报道。因此,本文回顾昼间动物时间生态位的调控,着重介绍长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*)、智利八齿鼠(*Octodon degus*)、尼罗河草鼠(*Arvicanthis niloticus*)和羚羊地松鼠(*Ammospermophilus leucurus*)这四种较公认的昼间啮齿类动物的活动模式和应用进展,以期为时间生物学研究提供有力工具。

【关键词】 昼间啮齿类动物;昼夜节律;活动模式;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)08-1095-07

Locomotor activity of four diurnal rodents and their applications

XING Yiqian[1,2], GAO Hong[1], XIE Hongyan[1], XIE Chunguang[1*]

(1. TCM Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China. 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075)

Corresponding author: XIE Chunguang. E-mail: xcg899@163.com

【Abstract】 Diurnal rodents and humans share similar circadian rhythms. Since the discovery of the circadian clock, scientists have gradually recognized that diurnal rodents exhibit irreplaceable advantages over nocturnal rodents. Recently, they have been exploited as novel models in medical fields such as metabolism, light reflection, neurology regulation, and social behavior. However, diurnal rodents are poorly understood in China. In this paper, we discuss the evolution of circadian rhythms in diurnal animals and the mechanisms behind these animals' temporal niches. Moreover, to provide an information source for chronobiology, the locomotor activity and application of four well-defined diurnal rodents, *Meriones unguiculatus*, *Octodon degus*, *Arvicanthis niloticus*, and *Ammospermophilus leucurus*, are reviewed.

【Keywords】 diurnal rodents; circadian rhythm; locomotor activity; animal model

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

昼夜交替是一种不可避免的地球物理现象,在整个进化过程中对生命产生了强烈影响,不同生命形式选择昼间或夜间生态位,与地球昼夜循环一同震荡演化出了昼夜节律。这种内源性节律是真核

[**基金项目**]国家自然科学基金(82004354),国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-C-202209),岐黄学者项目。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82004354), Innovation Team and Talents Cultivation Program of National Administration of Traditional Chinese Medicine (ZYYCXTD-C-202209), Program of Qihuang Scholar.

[**作者简介**]邢亦谦(1994—),女,博士,研究方向:内分泌及代谢性疾病研究。Email:yiqianpb@163.com

[**通信作者**]谢春光,男,博士,主任医师,博士生导师,研究方向:内分泌及代谢性疾病研究。Email:xcg899@163.com

生物生命的基本成分,控制着睡眠-觉醒、体温波动、血压变化、激素分泌,从细胞水平影响着新陈代谢的各个方面[1-3]。既往以大鼠、小鼠为代表的标准化啮齿类动物虽用途广泛,为阐明许多基础研究问题提供了帮助,但是作为夜间动物,它们与人类相反的昼夜节律不容忽视,尤其在模拟能量代谢、神经调节、光反应、社会行为方面存在难以克服的缺陷。昼间啮齿类动物提供了一种更加理想的动物模型,有助于推动生物医学向时间-空间四维领域迈进。本文从昼间动物昼夜节律的演化和时间生态位的调控入手,着重介绍了四种较公认的昼间啮齿类动物的活动模式及其应用进展,以期为生物医学研究提供有力工具。

1 昼间动物时间生态位的调控

遗传学家 Dobzhansky[4] 曾说过:“除了进化的光之外,生物学没有任何意义。”动物的时间生态位除了受到内部昼夜节律系统的驱动外,也受环境光的直接影响,这种作用被称为掩蔽。同时,光还通过一个被称为夹带的过程,使昼夜节律系统不断地调整,与外部世界保持一致。以往对昼间动物时间生态位的调控机制所知甚少,最近这方面取得了突破性进展。

1.1 演化过程

现代哺乳动物的生活模式仍以夜间活动为主,该模式最早诞生于中生代(Mesozoic Era)时期,是躲避白天活动的恐龙的捕食所做出的一系列适应性变化,包括支持寒冷条件下存活的体温调节系统和适于黑暗环境下的视觉系统[5]。这种夜间模式大约在 6500 万年~7500 万年前的中生代末期进入瓶颈期,在鼩和鼹鼠中开始出现活动期延长至白天的动物。白垩纪(Cretaceous period)末,大灭绝发生后诞生了最早的白天活动的哺乳动物[6]。自此,昼间动物与夜间动物各自沿着进化路径逐渐变得多样化。毋庸置疑,昼间动物是从夜间活动的祖先进化而来,因而两者昼夜节律系统的组成相似,由位于下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)的主时钟,和外周组织(如心脏、肝、肌肉、脂肪组织等)中的次级时钟构成。SCN 作为一种可夹带光的振荡器,协调机体代谢节奏与外界明暗周期保持一致,其分子机制涉及多组时钟基因的连锁转录和翻译反馈回路[7]。大量研究显示,昼间动物主时钟的震荡节律和时钟基因表达与夜间动物相似,目前只发现 Clock 基因在绵羊、卷尾猴等几种昼间动物中表达与夜间动物有细微差异[8-9]。

1.2 调控机制

昼间动物与夜间动物相反的活动模式是 SCN 主时钟的震荡节律被下游次级时钟逆转所塑造的。一项以人类近亲橄榄狒狒开展的研究通过每隔 2 h 处死 1 只动物,在 24 h 内对 12 只狒狒的 22 个大脑区域和 42 个外周组织进行转录组检测,结果发现 80%编码蛋白的基因表达是节奏性的,并呈现组织特异性[10]。较夜间活动的小鼠,时钟基因在 SCN 中同步表达,但在其他大脑区域和外周组织中明显不同,其调控机制主要涉及以下两个方面:

(1)体液信号和神经元投射:SCN 输出的昼夜节律信号主要通过体液和神经元投射传递给外周振荡器,其中糖皮质激素在昼间和夜间动物不同步的分泌,可能有助于协调下游振荡器的相位设置。Mahoney 等[11]发现,夜间动物的糖皮质激素分泌在熄灯前达到峰值,而昼间动物的峰值则出现在开灯前。这一现象的深层原因可能是谷氨酸能神经元的脑旁氏核局部回路存在物种差异,例如,将血管加压素注入脑室旁核可促进白天活动的苏丹草鼠释放糖皮质激素,而同样的干预会抑制夜间活动的大鼠分泌糖皮质激素[12]。另外,最近研究发现,在白天活动的尼罗河草鼠侧僵核中存在谷氨酸能神经元,而夜间活动的大鼠则缺乏,提示侧僵核局部回路中的谷氨酸能神经元的明显分布可能有助于 SCN 外脑区从夜间模式向昼间模式转换[13]。此外,肾上腺素在此过程中起辅助作用[14]。

(2)光夹带和光掩蔽:光夹带对物种日节律的调控有两种模型,包括与离散光脉冲对应的非参数模型,以及与连续光照射对应的参数模型[15]。地上生活的昼间动物在白天主要暴露于连续光下,而营地下生活的昼间动物则暴露于离散光脉冲下。对昼间和夜间啮齿类动物而言,早、晚的光脉冲分别产生节律相位提前和推迟两种反向效应。但值得注意的是,当光脉冲出现在白天时,夜间动物不会发生反应,表现为一个“死区”,因此白天的光照对调节昼间动物的昼夜节律更为关键。光掩蔽对调节物种的时间生态位意义非凡,光的直接刺激激发昼间动物的活动,同时削弱夜间动物的活动并诱导睡眠。研究发现,蓝光照射可增加小鼠血浆皮质酮水平,而绿灯照射则诱导睡眠[16]。由鉴于此,

Bourgin 等[16]提出了一个假设,即夜间和昼间动物对光的不同反应源于对特定波长影响的不同敏感性,夜间物种对绿光的敏感性更高,而昼间物种对蓝光更敏感。此外对光刺激的反应差异,还与解剖结构如上丘的体积、视网膜受体对相同刺激投射至不同大脑区域相关,包括外侧下丘脑、膝状体间小叶、腹侧脑室旁区和橄榄体直肠前核,同时也与增食欲素神经元的激活有关[17]。

综上,昼间动物的时间生态位由内源性的昼夜节律推动,受光夹带和光掩蔽效应的加强或者削弱,相互影响,共同决定昼间动物的基本活动模式。

2　昼间啮齿类动物的活动模式及应用进展

昼间啮齿类动物的活动模式与人类高度一致,相较夜间啮齿类动物,其优势如表 1 所示。目前较公认的昼间啮齿类动物主要有:长爪沙鼠、智利八齿鼠、尼罗河草鼠和羚羊地松鼠。

表 1　昼间啮齿类动物相较夜间啮齿类动物在生物医学研究领域的主要优势

Table 1　Major advantages of diurnal rodents for the fields of biomedical research compared to nocturnal rodents

生理方面 Physiological aspect	昼间啮齿类动物的优势 Advantages of diurnal rodents
活动模式 Diurnal activity pattern	睡眠、一般运动、交配行为、体温等活动节律与人类相似,峰值出现在白天 Have the same rhythm of human respect to sleep, general locomotor activity, mating behavior and body temperature, which peak during the day
社会行为学 Social behavior	与人类一样营社会生活,且结构复杂,能模拟社会环境及心理学相关研究 Similar to the human society with complex structure, enabling sociological and psychological research
神经科学 Neuroscience	皮质和边缘区与人类活动节律一致,侧缰核存在谷氨酸能神经元、上丘体积较大 Have the same rhythm of human activity in the cortical and marginal areas, glutamatergic neurons in the lateral habenular nucleus and larger size of the superior colliculus
视觉 Visual sensory	视觉感受器和视神经投射区域与人类相似,视锥细胞发达 Visual receptors and optic nerve projection areas are similar to human beings, and optic cone cells are well developed
内分泌及代谢 Endocrinology and metabolism	内分泌和新陈代谢与人类具有相同的关键性节律特征,如糖皮质激素、肾上腺素、促黄体生成素等的分泌 Have the same key characters with human in endocrinology and metabolism including the secretion of glucocorticoid, adrenaline and luteinizing hormone and so on
衰老 Senescence	与夜间啮齿类动物相比,昼间啮齿类动物寿命较长,可自发出现认知障碍等衰老相关改变 Compared with nocturnal rodents, diurnal rodents live longer and can spontaneously exhibit age-related changes such as cognitive impairment
对光反应 Photic entrainment	对光反应与人类相同,光刺激可激发、加强活动,可供测试光对人体的复杂效应 Similar to the photic entrainment of human, light can stimulate and enhance activities, enabling test the complicated effects of light for human

2.1　长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*)

长爪沙鼠,又称蒙古沙鼠,属于哺乳纲、啮齿目、仓鼠科、沙鼠亚科、沙鼠属,主要分布于中国东北、内蒙古及前苏联布里亚特的荒漠草原[18]。长爪沙鼠在自然状态下有昼间和夜间两个种群,总体以昼间活动为主。早期研究报道了长爪沙鼠的夜间活动,1975 年 Nelissen 等[19]通过接触传感器监测到蒙古沙鼠的活动呈黄昏型,有夜晚活动倾向。随后的研究显示,这种采取接触传感器发现的夜间活动模式非常不稳定,只有微弱的黄昏成分[20]。1999 年 Refinetti[21]采用无线电遥测技术对 4 只长爪沙鼠进行研究,发现其顶相,即每日活动节律的峰值时间介于夜间和昼间物种之间。直到 2006 年通过以跑轮活动的方式记录 29 只长爪沙鼠的活跃模式,发现 24%的长爪沙鼠主要在夜间活动,而剩余 76%则在白天活动[22],揭示出该物种的昼夜节律存在巨大的种内变异性。

长爪沙鼠作为一种“多功能”实验动物,是研究幽门螺旋杆菌、脑缺血和癫痫的标准模型,广泛应用于感染性疾病、肿瘤、神经系统疾病和代谢性疾病的研究[18]。比小鼠,长爪沙鼠的感觉特化和社会模式更接近人类。随着其完整基因序列的破译,长爪沙鼠成为探索体温调节、听觉处理、脑和生殖器发育、学习记忆行为等极具潜力的模型[23-24]。其中,听觉模型进展飞速,通过对长爪沙鼠听觉脑干(梯形体内侧核、外侧丘系背核)和中脑(下丘)的立体定向注射和膜片钳捕捉,基因传递和光遗传工具成功应用于长爪沙鼠,为听觉回路的研究奠定了基础[25];在生殖器官模型中,最新研究发现雌性长爪沙鼠作为一种雌性功能性前列腺炎发病率较高的

啮齿类动物可用来模拟女性前列腺病变[26]；在感知模型中，长爪沙鼠对元音和辅音的感知表征与人类相似，但对声音识别需更高的信噪比，可作为语音识别模型[27]；在行为方面，长爪沙鼠可用以分析社会网络，男女社会属性差异，焦虑、厌恶情绪以及独特的探索行为[28-30]。

总之，长爪沙鼠是一种功能强大的昼间啮齿类动物，但仍有缺陷比如昼间活动稳健性低，种内异质性大，遗传信息呈高度多态性[31]。令人振奋的是，最近已有学者对长爪沙鼠进行了高效的靶向诱变，成功构建了基于 CRISPR/Cas9 系统的基因组编辑平台，相信该手段将成为长爪沙鼠进一步开发的有力工具[32]。

2.2 智利八齿鼠(*Octodon degus*)

智利八齿鼠，也称“刷尾”或“喇叭尾”大鼠，属于哺乳纲、啮齿目、八齿鼠科，是南美洲特有物种，分布于智利北部和中部的灌木丛。智利八齿鼠也有昼间和夜间活动两个种群。Labyak 等[33]通过无线电遥测技术发现了智利八齿鼠个体间夹带相角的巨大差异。与蒙古沙鼠不同，智利八齿鼠两种群间的活动模式可发生转化。比如，Kas 等[34]发现智利八齿鼠中的一些在未配备跑轮的笼中白天活动，但在有跑轮的笼中却变为夜间活动。Refinetti[22]使用红外探测器观察了 25 只智利八齿鼠的活动模式，发现在配有跑轮的笼中 11 只智利八齿鼠白天活动，其余则夜间活动，有趣的是其中 4 只开始表现为夜间活动的智利八齿鼠，在随后几周却转变为昼间活动。这种活动模式的倒转很值得思考，最近有研究指出其机制可能与运动引起的体温调节约束有关[35]。

智利八齿鼠是研究衰老的“自然”模型，寿命长达 7 ~ 8 年。随年龄增长，其牙齿、骨骼、黄斑、视网膜、神经等组织器官相继发生退化，并伴随糖消耗障碍和应激，因此是研究认知障碍、2 型糖尿病、代谢综合征、肿瘤等衰老相关疾病的理想模型[36-37]。其中，阿尔兹海默病(Alzheimer’s disease, AD)模型进展显著，智利八齿鼠作为一种天然的散发性 AD 模型，不仅弥补了以往转基因小鼠模型因寿命短，难以模拟此病晚期的局限性，还为探索 AD 合并症如氧化应激、帕金森病、视网膜病变等开辟了方向[38-41]；在昼夜节律方面，智利八齿鼠用于研究现代生活方式与照明条件变化对人类健康的影响[42]；在社会和行为方面，智利八齿鼠可模拟神经-内分泌调控下的孤立、厌恶、恐惧情绪、父系陪伴、母婴互动、复杂发声等多种行为[43-45]；在营养和免疫方面，智利八齿鼠是一种早熟动物，可用于评估早期饮食状态对免疫系统发育和成熟的影响[46]；在罕见肿瘤方面，可发生胸腺瘤、脊索瘤，其中智利八齿鼠是唯一被报道发生胸腺瘤的啮齿类动物[47-48]。

智利八齿鼠是 AD 最具前景的模型动物，其独特的昼夜节律和转化现象已被用于模拟轮班制评估现代生活方式与人体健康的关系。但该动物主产于南美，目前国内引进较少。另外，智利八齿鼠在圈养环境下繁殖缓慢，发情周期长达 21 d，妊娠期和性成熟期均长达 3 个月[49]。

2.3 尼罗河草鼠(*Arvicanthis niloticus*)

尼罗河草鼠，又称“非洲草鼠”，属于哺乳纲、啮齿目、鼠科、垄鼠属，主要分布于尼罗河三角洲和北非草原。尼罗河草鼠是典型的昼间动物，白天活动强劲，持续时间长。研究发现，尼罗河草鼠的每日活动周期达 13.5 h，与人类的 15.5 h 接近[50]。Refinetti[22]将尼罗河草鼠安置于配有跑轮的笼中，分析其活动数据发现：在 12 h:12 h 的明暗循环中，尼罗河草鼠约 87%的日常活动发生在光照阶段，每日活动的起始时间大约出现在灯亮前 1 h。过去尼罗河草鼠夜间活动的报道应属罕见个例，大量研究证明了尼罗河草鼠的昼间活动模式稳定可靠，使用跑轮可能会增加它们活动的黄昏成分，但其模式仍然以白天活动为主[51-53]。

尼罗河草鼠是高碳水化合物饮食敏感的模型，广泛应用于 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)及其并发症(糖尿病视网膜病变、糖尿病心肌病等)和代谢综合征的研究。其视网膜结构与人类相似，适合感受光刺激，因此在探索光与昼夜节律系统、神经、情绪、行为等方面发挥着关键作用[54]。其中，T2DM 模型最具潜力，尼罗河草鼠无需依靠基因修饰或化学干预，以高碳水化合物饮食短期喂养即可发展为 T2DM。这种发病模式代表了多基因调控下高负荷低纤维饮食。并且，尼罗河草鼠可模拟糖尿病进程中 β 细胞功能障碍的 5 个阶段，为阐明胰岛 β 细胞损伤和衰竭的机制提供了新的视角[55-56]；在研究光照方面，尼罗河草鼠是季节性情感障碍(seasonal affective disorder, SAD)的优良模型，揭示了低强度日光通过复杂的神经和内分泌途径如上调内侧视前区类固醇激素、多巴胺受体扰乱动物的性行为，减弱下丘脑促食欲素分泌诱导焦

虑、抑郁情绪等[57-58]；此外，尼罗河草鼠是研究昼夜节律系统和光掩蔽的重要模型。其海马体中的时钟基因节律与夜间啮齿类动物完全相异，这种昼间啮齿类动物有助于理解昼夜节律系统对人类记忆、认知、行为的操作机制[59-60]。

尼罗河草鼠因昼间活动稳定和对碳水化合物饮食敏感的特性已成为研究昼夜节律和 T2DM 的潜力模型。野外捕获的尼罗河草鼠易携带寄生虫，为该模型的标准化增添了难度。虽然国外研究中已有详尽的 T2DM 的造模报道，最近也有学者确定了可供未来研究尼罗河草鼠肝基因表达的 PCR 内参基因[61]，但该模型在我国罕有研究，故开发推广仍任重道远。

2.4　羚羊地松鼠(*Ammospermophilus leucurus*)

羚羊地松鼠，又称“白尾羚羊松鼠”，属于哺乳纲、啮齿目、松鼠科、羚松鼠属，无需冬眠，营地上生活，分布于北美洲的主要沙漠样带，覆盖纬度轴达 21°，活动范围广泛[50,62]。羚羊地松鼠的昼间活动模式为本文所述四种昼间动物中最强最稳定。研究显示羚羊地松鼠的每日活动周期为 10.5 h，稳健指数为 41%，昼间活动指数为 0.97(即 97%的运动发生在光照阶段)[63]。Refinetti 等[64]发现羚羊地松鼠平均在开灯 1 h 后醒来，40 min 后开始在跑轮活动，10 h 后跑完约 2 km，熄灯 1 h 后入睡，此结果与野外研究一致[65]。特别值得注意的是，羚羊地松鼠奔跑方式呈现出极端多样性，且自由奔跑时间与人类完全匹配[50]。

目前羚羊地松鼠尚未广泛应用于医学研究中。但考虑该物种寿命长，有稳定强烈的昼间活动模式以及营社会生活的特性，有学者指出羚羊地松鼠可能是研究人类活动模式对认知、情绪、冲动、艺术成就、心理健康等的潜力模型[63]。但羚羊地松鼠一年有且只有 1 次短暂的发情期，圈养条件繁殖极为困难，该因素阻碍了其标准化和商品化。

3　小结和展望

生物钟的发现引领生物医学步入时间-空间四维领域，昼夜节律在其中扮演重要角色，调控着生理过程、行为节奏和新陈代谢的各个方面。人们虽已意识到现代生活方式和人工光源可能破坏生物钟而扰乱机体代谢，但由于缺乏适宜的动物模型，阻碍了相关研究的进展。昼间啮齿类动物是一类独特的以白天活动为主的啮齿类动物，经长期演化，其主时钟发出信号通过神经投射和体液传导等方式抵达下游时钟并被逆转，与光刺激共同塑造出与人类相似的昼夜节律，现已成为时间生物学领域不可或缺的模型。

但是，二元分类法(即仅以昼间或夜间活动划分)可能掩盖昼间啮齿动物日活动的多样性，因此，本文介绍了四种最具代表性的昼间啮齿类动物的活动模式，以期为合理选择模型提供借鉴。其中，就昼间活动的稳健性和强度而言，尼罗河草鼠和羚羊地松鼠的昼间模式最强烈，而长爪沙鼠和智利八齿鼠种内变异性较大，少数个体可发生昼间和夜间模式的相互转化。

此外，昼间啮齿类动物的研究尚处于起步阶段。长爪沙鼠在国内应用较多，但主要用于寄生虫、幽门螺旋杆菌等感染性疾病和癫痫、脑缺血病的研究。作为昼间动物，长爪沙鼠独特的感知特点可作为研究人类发音和行为的优良模型。尼罗河草鼠、羚羊地松鼠、智利八齿鼠因产地遥远，尚未引入我国，但相关模型的研究已取得重要进展。其中，尼罗河草鼠作为高碳水化合物诱导的 T2DM 的模型，解决了现有 DM 模型需要依赖基因编辑、化学干预、高脂饲料，造模时间长，且难以模拟多基因和饮食诱导的病理过程的缺陷，为探索胰岛功能、脂肪利用等代谢过程提供与人类相似的遗传代谢背景；智利八齿鼠寿命较长，与人类昼夜节律一致，营复杂社会生活，被认为是研究衰老的理想模型，随年龄增长渐进性功能衰退，可模拟 AD 晚期病变并用于新药研发。

综上，昼间啮齿类动物为时间-空间四维生物医学提供了有力工具，有望弥补以往使用大鼠、小鼠等夜间动物研究时存在的缺陷，包括多相、代谢节律与人体差异大、药物研发后在临床前试验失败率高等，因而极具价值。相信在未来，昼间啮齿类动物模型必会促进人类健康事业进一步发展。

参　考　文　献(References)

[1] Engelmann W. Evolution and selective advantage of circadian rhythms [J]. Acta Physiol Pol, 1988, 39(5-6): 345-356.

[2] Kim YH, Lazar MA. Transcriptional control of circadian rhythms and metabolism: a matter of time and space [J]. Endocr Rev, 2020, 41(5): 707-732.

[3] Dunlap JC, Loros JJ. Yes, circadian rhythms actually do affect almost everything [J]. Cell Res, 2016, 26(7): 759-760.

[4] Dobzhansky T. Biology, molecular and organismic [J]. Am Zool, 1964, 4: 443-452.

[5] Gerkema MP, Davies WIL, Foster RG, et al. The nocturnal

bottleneck and the evolution of activity patterns in mammals [J]. Proc Biol Sci, 2013, 280(1765): 20130508.

[6] Maor R, Dayan T, Ferguson-Gow H, et al. Temporal niche expansion in mammals from a nocturnal ancestor after dinosaur extinction [J]. Nat Ecol Evol, 2017, 1(12): 1889-1895.

[7] Smale L, Nunez A, Schwartz M. Rhythms in a diurnal brain [J]. Biol Rhythm Res, 2008, 39(3): 305-318.

[8] Chakir I, Dumont S, Pévet P, et al. The circadian gene Clock oscillates in the suprachiasmatic nuclei of the diurnal rodent Barbary striped grass mouse, *Lemniscomys barbarus*: a general feature of diurnality? [J]. Brain Res, 2015, 1594: 165-172.

[9] Ikeno T, Yan L. A comparison of the orexin receptor distribution in the brain between diurnal Nile grass rats (*Arvicanthis niloticus*) and nocturnal mice (*Mus musculus*) [J]. Brain Res, 2018, 1690: 89-95.

[10] Mure LS, Le HD, Benegiamo G, et al. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues [J]. Science, 2018, 359(6381): eaao0318.

[11] Mahoney MM, Ramanathan C, Hagenauer MH, et al. Daily rhythms and sex differences in vasoactive intestinal polypeptide, VIPR2 receptor and arginine vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal rodent, *Arvicanthis niloticus* [J]. Eur J Neurosci, 2009, 30(8): 1537-1543.

[12] Kalsbeek A, Verhagen LAW, Schalij I, et al. Opposite actions of hypothalamic vasopressin on circadian corticosterone rhythm in nocturnal versus diurnal species [J]. Eur J Neurosci, 2008, 27(4): 818-827.

[13] Yan L, Smale L, Nunez AA. Circadian and photic modulation of daily rhythms in diurnal mammals [J]. Eur J Neurosci, 2020, 51(1): 551-566.

[14] Leliavski A, Dumbell R, Ott V, et al. Adrenal clocks and the role of adrenal hormones in the regulation of circadian physiology [J]. J Biol Rhythms, 2015, 30(1): 20-34.

[15] Daan S. Tonic and phasic effects of light in the entrainment of circadian rhythms [J]. Ann N Y Acad Sci, 1977, 290: 51-59.

[16] Bourgin P, Hubbard J. Alerting or somnogenic light: pick your color [J]. PLoS Biol, 2016, 14(8): e2000111.

[17] Shuboni DD, Cramm SL, Yan L, et al. Acute effects of light on the brain and behavior of diurnal *Arvicanthis niloticus* and nocturnal *Mus musculus* [J]. Physiol Behav, 2015, 138: 75-86.

[18] 李长龙, 杜小燕, 陈振文. 长爪沙鼠资源开发利用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 106-109, 113.
Li CL, Du XY, Chen ZW. Advances in development and application of Mongolian gerbil resource [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(6): 106-109, 113.

[19] Nelissen M, Nelissen-Joris N. On the diurnal rhythm of activity of *Meriones unguiculatus* (Milne-Edwards, 1867) [J]. Acta Zool Pathol Antverp, 1975, 61: 25-30.

[20] Probst B. An automated method for recording scent marking in Mongolian gerbils [J]. Physiol Behav, 1992, 52(4): 661-663.

[21] Refinetti R. Relationship between the daily rhythms of locomotor activity and body temperature in eight mammalian species [J]. Am J Physiol, 1999, 277(5): R1493-R1500.

[22] Refinetti R. Variability of diurnality in laboratory rodents [J]. J Comp Physiol A, 2006, 192(7): 701-714.

[23] Brekke TD, Supriya S, Denver MG, et al. A high-density genetic map and molecular sex-typing assay for gerbils [J]. Mamm Genome, 2019, 30(3): 63-70.

[24] Cheng S, Fu Y, Zhang Y, et al. Enhancement of *de novo* sequencing, assembly and annotation of the Mongolian gerbil genome with transcriptome sequencing and assembly from several different tissues [J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 903.

[25] Keplinger S, Beiderbeck B, Michalakis S, et al. Optogenetic control of neural circuits in the Mongolian gerbil [J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12: 111.

[26] Sanches BDA, Carvalho HF, Maldarine JS, et al. Differences between male and female prostates in terms of physiology, sensitivity to chemicals and pathogenesis-a review in a rodent model [J]. Cell Biol Int, 2020, 44(1): 27-35.

[27] Jüchter C, Beutelmann R, Klump GM. Speech sound discrimination by Mongolian gerbils [J]. Hear Res, 2022, 418: 108472.

[28] Deng K, Liu W, Wang D. Inter-group associations in Mongolian gerbils: quantitative evidence from social network analysis [J]. Integr Zool, 2017, 12(6): 446-456.

[29] Rico JL, Muñoz-Tabares LF, Lamprea MR, et al. Diazepam reduces escape and increases closed-arms exploration in Gerbils after 5 min in the elevated plus-maze [J]. Front Psychol, 2019, 10: 748.

[30] Hurtado-Parrado C, González-León C, Arias-Higuera MA, et al. Assessing Mongolian gerbil emotional behavior: effects of two shock intensities and response-independent shocks during an extended inhibitory-avoidance task [J]. Peer J, 2017, 5: e4009.

[31] Brekke TD, Steele KA, Mulley JF. Inbred or outbred? genetic diversity in laboratory rodent colonies [J]. G3 (Bethesda), 2018, 8(2): 679-686.

[32] Wang Y, Zhao P, Song Z, et al. Generation of gene-knockout Mongolian gerbils via CRISPR/Cas9 system [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 780.

[33] Labyak SE, Lee TM, Goel N. Rhythm chronotypes in a diurnal rodent, *Octodon degus* [J]. Am J Physiol, 1997, 273(3): R1058-R1066.

[34] Kas MJH, Edgar DM. A nonphotic stimulus inverts the diurnal-nocturnal phase preference in *Octodon degus* [J]. J Neurosci, 1999, 19(1): 328-333.

[35] Bano-Otalora B, Rol MA, Madrid JA. Behavioral and thermoregulatory responses to changes in ambient temperature and wheel running availability in *Octodon degus* [J]. Front Integr Neurosci, 2021, 15: 684988.

[36] Cuenca-Bermejo L, Pizzichini E, Gonzalez-Cuello AM, et al. *Octodon degus*: a natural model of multimorbidity for ageing

research [J]. Ageing Res Rev, 2020, 64: 101204.

[37] Rivera DS, Lindsay CB, Codocedo JF, et al. Long-term, fructose-induced metabolic syndrome-like condition is associated with higher metabolism, reduced synaptic plasticity and cognitive impairment in *Octodon degus* [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(12): 9169-9187.

[38] Cisternas P, Gherardelli C, Salazar P, et al. Disruption of glucose metabolism in aged *Octodon degus*: a sporadic model of Alzheimer's disease [J]. Front Integr Neurosci, 2021, 15: 733007.

[39] Lindsay CB, Zolezzi JM, Rivera DS, et al. Andrographolide reduces neuroinflammation and oxidative stress in aged *Octodon degus* [J]. Mol Neurobiol, 2020, 57(2): 1131-1145.

[40] Cuenca-Bermejo L, Pizzichini E, Gonçalves VC, et al. A new tool to study Parkinsonism in the context of aging: MPTP intoxication in a natural model of multimorbidity [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4341.

[41] Escobar MJ, Reyes C, Herzog R, et al. Characterization of retinal functionality at different eccentricities in a diurnal rodent [J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12: 444.

[42] Bano-Otalora B, Madrid JA, Rol MA. Melatonin alleviates circadian system disruption induced by chronic shifts of the light-dark cycle in *Octodon degus* [J]. J Pineal Res, 2020, 68(1): e12619.

[43] de Schultz T, Bock J, Braun K. Paternal deprivation and female biparental family rearing induce dendritic and synaptic changes in *Octodon degus*: I. medial prefrontal cortex [J]. Front Synaptic Neurosci, 2020, 12: 38.

[44] Rivera DS, Lindsay CB, Oliva CA, et al. Effects of long-lasting social isolation and re-socialization on cognitive performance and brain activity: a longitudinal study in *Octodon degus* [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 18315.

[45] Lidhar NK, Insel N, Dong JY, et al. Observational fear learning in degus is correlated with temporal vocalization patterns [J]. Behav Brain Res, 2017, 332: 362-371.

[46] Ramírez-Otarola N, Maldonado K, Cavieres G, et al. Nutritional ecology and ecological immunology in degus: does early nutrition affect the postnatal development of the immune function? [J]. J Exp Zool A Ecol Integr Physiol, 2021, 335(2): 239-249.

[47] Okumura N, Kondo H, Suzuki S, et al. Thymoma originating from the cervical component of the thymus in a degu [J]. J Vet Diagn Invest, 2022, 34(1): 126-129.

[48] Sautier L, Guillier D, Coste M, et al. Coccygeal chordoma in a degu: case report and review of the literature [J]. J Vet Diagn Invest, 2019, 31(1): 142-145.

[49] Palacios AG, Lee TM. Husbandry and breeding in the *Octodon degu* (*Molina* 1782) [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2013, 2013(4): 350-353.

[50] Refinetti R, Kenagy GJ. Diurnally active rodents for laboratory research [J]. Lab Anim, 2018, 52(6): 577-587.

[51] Blanchong JA, McElhinny TL, Mahoney MM, et al. Nocturnal and diurnal rhythms in the unstriped Nile rat, *Arvicanthis niloticus* [J]. J Biol Rhythms, 1999, 14(5): 364-377.

[52] Refinetti R. Daily activity patterns of a nocturnal and a diurnal rodent in a seminatural environment [J]. Physiol Behav, 2004, 82(2-3): 285-294.

[53] Redlin U, Mrosovsky N. Nocturnal activity in a diurnal rodent (*Arvicanthis niloticus*): the importance of masking [J]. J Biol Rhythms, 2004, 19(1): 58-67.

[54] Ranaei Pirmardan E, Barakat A, Zhang Y, et al. Diabetic cataract in the Nile grass rat: a longitudinal phenotypic study of pathology formation [J]. FASEB J, 2021, 35(6): e21593.

[55] Huang H, Yang K, Wang R, et al. β-cell compensation concomitant with adaptive endoplasmic reticulum stress and β-cell neogenesis in a diet-induced type 2 diabetes model [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2019, 44(12): 1355-1366.

[56] Yang K, Gotzmann J, Kuny S, et al. Five stages of progressive β-cell dysfunction in the laboratory Nile rat model of type 2 diabetes [J]. J Endocrinol, 2016, 229(3): 343-356.

[57] Yan L, Lonstein JS, Nunez AA. Light as a modulator of emotion and cognition: lessons learned from studying a diurnal rodent [J]. Horm Behav, 2019, 111: 78-86.

[58] Lonstein JS, Linning-Duffy K, Yan L. Low daytime light intensity disrupts male copulatory behavior, and upregulates medial preoptic area steroid hormone and dopamine receptor expression, in a diurnal rodent model of seasonal affective disorder [J]. Front Behav Neurosci, 2019, 13: 72.

[59] Martin-Fairey CA, Nunez AA. Circadian modulation of memory and plasticity gene products in a diurnal species [J]. Brain Res, 2014, 1581: 30-39.

[60] Martin-Fairey CA, Ramanathan C, Stowie A, et al. Plastic oscillators and fixed rhythms: changes in the phase of clock-gene rhythms in the PVN are not reflected in the phase of the melatonin rhythm of grass rats [J]. Neuroscience, 2015, 288: 178-186.

[61] Leow SS, Lee WK, Khoo JS, et al. Identification of reference genes for real-time polymerase chain reaction gene expression studies in Nile rats fed Water-Soluble Palm Fruit Extract [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(12): 9409-9427.

[62] Whorley JR, Alvarez-Castañeda ST, Kenagy GJ. Genetic structure of desert ground squirrels over a 20-degree-latitude transect from Oregon through the *Baja* California peninsula [J]. Mol Ecol, 2004, 13(9): 2709-2720.

[63] Refinetti R, Earle G, Kenagy GJ. Exploring determinants of behavioral chronotype in a diurnal-rodent model of human physiology [J]. Physiol Behav, 2019, 199: 146-153.

[64] Refinetti R. Diverse styles of running-wheel behavior in antelope ground squirrels [J]. Behav Processes, 2020, 177: 104149.

[65] Karasov WH. Daily energy expenditure and the cost of activity in a free-living mammal [J]. Oecologia, 1981, 51(2): 253-259.

[收稿日期] 2022-05-18

黄一羚,罗嘉强,彭鹏. 脑铁沉积动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1102-1106.
Huang YL, Luo JQ, Peng P. Research progress on animal models of brain iron deposition [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1102-1106.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.012

脑铁沉积动物模型的研究进展

黄一羚,罗嘉强,彭鹏*

(广西医科大学第一附属医院放射科, 南宁 530021)

【摘要】 铁是大脑中最丰富的金属元素,铁稳态是保证大脑发挥正常生理功能的基础。当脑内铁代谢紊乱引起铁沉积,过量的铁会促进自由基的形成和氧化应激,从而导致神经元死亡。为充分研究脑铁沉积疾病,需要建立动物模型。本文就不同建模方式及其实验鼠品种、铁剂种类进行综述,为脑铁沉积模型建立提供参考。

【关键词】 脑;铁代谢;铁沉积;动物模型
【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2022)08-1102-05

Research progress on animal models of brain iron deposition

HUANG Yiling, LUO Jiaqiang, PENG Peng*

(Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)
Corresponding author: PENG Peng. E-mail: doublep@126.com

【Abstract】 Iron is the most abundant metal element in the brain, and iron homeostasis ensures normal physiological functions occur in this organ. When iron metabolism is disrupted in the brain, excess iron promotes the formation of free radicals and oxidative stress, leading to neuronal death. To fully study cerebral iron deposition diseases, animal models need to be established. This article reviews different modeling method , experimental mouse species, and iron types, and provides a reference for the establishment of brain iron deposition models.

【Keywords】 brain; iron metabolism; iron deposition; animal model
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

铁是大脑中含量最丰富的微量金属元素之一。与所有细胞一样,神经元和胶质细胞在其生理学的许多方面都需要铁,包括电子传递、还原型辅酶 II(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)活性、轴突髓鞘形成,以及作为参与神经递质合成的几种酶的辅助因子[1]。正常情况下,机体内铁主要来源于膳食以及从衰老红细胞中回收[2],由于人体缺乏排泄过多铁的机制,使得脑铁浓度随着年龄逐渐增加(生理性)。

研究表明某些血液病或神经退行性疾病的患者大脑存在铁沉积,如地中海贫血[3-4]、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、Friedreich 共济失调症、神经铁蛋白病、多发性硬化、亨廷顿病(Huntington disease, HD)等[5-7]。但到目前为止,脑铁沉积定量的准确性、铁沉积引起脑功能紊乱的原因及发病机制尚不十分明确,临床对这类疾病尚无有效治愈手段。因此,建立脑铁沉积动物模型是解决以上问题不可或缺的重要环节。

1 脑铁沉积的机制

正常情况下,哺乳动物大脑中的铁稳态受到严

[基金项目]国家自然科学基金(81760305,81641066,81460260),国家卫健委地中海贫血防治重点实验室开放课题(GJWJWDP202209)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81760305, 81641066, 81460260), Open Project of the Key Laboratory of Thalassemia Prevention and Control of the National Health and Medical Commission (GJWJWDP202209).
[作者简介]黄一羚(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:铁代谢疾病影像诊断。Email:1182785507@qq.com
[通信作者]彭鹏(1977—),男,医学博士,主任医师,研究方向:腹部疾病影像研究。Email:doublep@126.com

格调节，它依赖于血—脑脊液屏障（blood-brain barrier，BBB）和许多参与血液循环铁运输的分子[8]。目前，铁如何通过血脑屏障尚不十分清楚，但有研究表明，转铁蛋白-转铁蛋白受体（transferrin/transferrin receptor，Tf/TfR）途径是铁跨越脑毛细血管内皮管腔膜的主要途径[9]，当铁通过血脑屏障后，经转铁蛋白结合铁（transferrin-bound iron，Tf-Fe）和非转铁蛋白结合铁（non-transferrin-boundiron，NTBI）两种转运形式被脑细胞摄取[10]。

由于每天从饮食中摄入的铁量（1 ~ 2 mg）相当于通过消化、皮肤和尿路等排出的铁量[11]，且体内红细胞衰老和破坏不断释放铁，因此，随着年龄的增长，铁逐渐在大脑中沉积，尤其是在皮质、苍白球、红核、齿状核、尾状核和黑质中[7,12]。在脑铁沉积疾病中，不同疾病的铁沉积方式可能不同，如帕金森病可能与 DMT1 表达增加[13-14]、乳铁蛋白受体（LfR）表达增加[15]有关；多发性硬化症可能与炎症过程[16]有关；而铁蛋白病可能与铁蛋白轻链基因突变[17-19]有关。

大量证据表明 PD 患者几种铁转运蛋白的失调（负责铁的流入/吸收或流出/释放）导致异常铁沉积[20]。有研究报道，PD 患者黑质中二价金属转运蛋白 1（recombinant divalent metal transporter 1，DMT1）[13-14] 和脑内乳铁蛋白受体（lactoferrin receptor，LfR）[21] 表达增加促进了神经元内铁沉积以及黑质内多巴胺能神经元变性。此外，PD 患者血脑血管系统中 LfR 表达增高，可能与 PD 患者血脑屏障的改变有关[21]。在生理条件下，过氧化-抗氧化系统处于平衡状态[22]。当脑内发生铁沉积，过多的游离铁诱导氧化应激，可导致神经元过氧化损伤、变性甚至死亡，这是诱发神经退行性疾病的重要原因之一[5]。

2 脑铁沉积动物模型的建立

2.1 实验动物选择

动物与人类不同，有些可以排出体内过多的铁，因此选择的实验动物应与人体生理机制类似，同时遵循 3R 原则。由于人类和其他哺乳动物缺乏控制铁排泄的机制[23]，故在建立脑铁沉积模型时，鼠、恒河猴模型均有报道，但研究者采用鼠模型较为多见。由于建立模型方法不同，鼠的品种选择往往不一。

如在应用腹腔注射铁剂或羰基铁饮食时，研究者使用 SD 大鼠[1,24]、ICR 小鼠[25]较多，原因可能是 SD 大鼠与 ICR 小鼠属于封闭群，具有类似于人类群体遗传异质性遗传组成，在人类遗传研究、药物筛选和毒性实验等方面起着不可替代的作用[26]。此外，SD 大鼠还具有对疾病抵抗力强的特点，在药理学研究如药物排泄速率、蓄积倾向等方面应用广泛[27]。而使用基因敲除法时，研究者多采用 C57BL/6 小鼠[28-30]，原因可能是 C57BL/6 小鼠属于近交系，具有基因纯合、遗传稳定、表现型均一[27]等特性。

2.2 铁剂选择

在目前铁沉积模型研究中，注射用铁剂有：右旋糖酐铁、超微超顺磁性氧化铁纳米颗粒（ultra-micro superparamagnetic iron oxide nanoparticle，USPIO）、蔗糖铁等。与蔗糖铁比，右旋糖酐铁稳定性较好，但氧化应激水平较高[31]。此外，右旋糖酐铁还具有低毒性和肌肉吸收方面性质独特的特点[32]。

据文献报道，在建立脑铁沉积模型时，Gong 等[1]、赵晋英等[25]多采用右旋糖酐铁。也有研究者应用蔗糖铁建立铁过载大鼠模型，但在该研究中实验组大鼠脑组织中并未发现铁沉积，故而推测铁-蔗糖复合物无法穿透血脑屏障[33]。蔗糖铁虽然在脑铁沉积模型建立方面应用较少，但也有其独特之处。Italia 等[32]对 BALB/c 小鼠腹腔注射蔗糖铁，研究表明这种给药方式与 β 地中海贫血患者的输血铁超载途径非常相似。USPIO 是水动力学粒径小于 40 nm[34] 的超顺磁性氧化铁纳米粒子。Fujiwara 等[35]发现 USPIO 也可应用于脑铁沉积模型的建立中。但由于其颗粒小，可通过毛细血管壁、血浆半衰期长等特点，更多应用于中枢神经系统的诊断、治疗、药物运输及探测等方面。因此，在建立不同疾病动物模型时，可根据实际需要选择最适合的铁剂以更符合疾病的发病机制。

2.3 脑铁沉积模型建立方法

2.3.1 注射铁剂法

腹腔[1,25]或肌肉[36-38]注射铁剂是建立铁沉积动物模型的主要方法，具有操作简单、成功率高等优点。此外，还有较为少用的静脉注射法。但在建立动物脑铁沉积模型时，由于研究者普遍采用鼠模型，故更偏向于采用腹腔注射。其原因可能有以下几点：（1）肌肉注射相对于腹腔注射，吸收速度较慢；（2）肌肉注射可能会引起注射部位肌肉痉挛或坏死；（3）静脉注射操作困难，铁剂生物利用度高，

容易造成肝、心脏铁过载导致实验动物死亡。

有研究通过给 SD 大鼠每隔 1 d 腹腔注射右旋糖酐铁 100 mg,共注射 3 d,每只大鼠共注射 300 mg 铁[1]。经原子吸收分光光度计测量总铁表明,铁过载组大鼠大脑中皮质、纹状体、黑质、海马 4 个部位的铁含量显著增加,病理检查也得出了类似的结果。赵晋英等[25]通过给小鼠腹膜腔注射右旋糖酐铁每次 10 mg,隔日注射 1 次,共 28 d,结果显示铁过载小鼠大脑纹状体、脉络丛上皮细胞、软脑膜和脑血管铁染色明显增强。Fujiwara 等[35]给恒河猴静脉注射 USPIO 造影剂 4 次(每 15 min 2.5 mg/kg),累计剂量为 10 mg/kg,结果显示黑质、苍白球、丘脑、皮层铁含量显著增加。

2.3.2 羰基铁饮食法

羰基铁饮食法是给实验动物喂养含有一定量羰基铁的饲料造成脑铁过载。虽然该方法操作简单、动物死亡率低,但对于建立脑铁沉积动物模型来说,造模周期较长。

据文献报道,羰基铁饮食法一般多用于肝铁沉积动物模型的建立,在脑铁沉积模型中应用较少。Chang 等[24]在建立脑铁过载模型时将大鼠分成 3 组,对照组喂食基础纯净膳食(含铁 60 mg/kg)、高铁组喂食添加 2.5%羰基铁的基础纯净膳食、低铁组喂食低铁纯净膳食(含铁 10 mg/kg),共 6 周。结果显示在皮质、海马、纹状体和黑质 4 个脑区中,与对照组相比,低铁组大鼠脑铁浓度显著降低,高铁组大鼠铁浓度明显升高。

由于肠道从食物中吸收的铁较少,因此在建立脑铁沉积动物模型的方法中,采用羰基铁饮食方法相对于注射的铁剂的方法成模过程非常缓慢。为了造模成功,建议研究者在进行造模时应设立多个铁浓度的羰基铁饮食,在保证实验动物不因肝、心脏等器官发生严重铁过载导致死亡的前提下,选择最佳的羰基铁饮食,并合理延长造模时间,使目标器官出现铁过载。

2.3.3 基因敲除法

基因敲除法是将 Cp、Heph、IRP2 等与铁代谢相关基因敲除,使体内铁代谢紊乱从而得到脑铁沉积模型的方法。该方法实验操作复杂,技术要求及动物死亡率高,多用于研究某些特定基因。

如 Jiang 等[28]为研究亚铁氧化酶(Heph)和铜蓝蛋白(CP)在中枢神经系统铁代谢和体内铁平衡中的作用,选取亚铁氧化酶基因敲除(Heph-KO)、铜蓝蛋白基因敲除(Cp-KO)小鼠和野生型(wild type, WT)小鼠进行实验,测量 3 个不同年龄组 Heph-KO、Cp-KO 和 WT 小鼠的大脑铁浓度。研究结果显示,在 4 周龄和 8 周龄的幼鼠中,所检查的大脑区域铁浓度没有显著差异,而在 6 ~ 7 个月大时,与 WT 和 Cp-KO 组小鼠相比,Heph-KO 组小鼠的皮质、海马、脑干和小脑中的铁浓度显著升高,表现出铁蓄积,同时铁蛋白水平也增加。这表明在 Heph-KO 小鼠的大脑中,铁会随着年龄的增长而增加且更易发生脑铁过载。此外,还有研究表明与单独敲除 Cp 或 Heph 基因相比,同时敲除小鼠的 Cp 和 Heph 基因会使小鼠的脑铁积累加速,且具有显著铁积累的区域为黑质(substantianigra, SN)和小脑[29]。

在研究帕金森的发病原因时,Ci 等[30]使用了 IRP2 基因敲除的小鼠进行实验,研究结果表明与 WT 小鼠相比,IRP2 基因缺失诱导了黑质中的铁积累,并加剧了神经元凋亡和帕金森病症状。

地中海贫血是一种由于 β-珠蛋白生成障碍导致血红蛋白生成减少的遗传溶血性疾病,在建立地中海贫血脑铁沉积动物模型时,Yatmark 等[39]将小鼠 β-珠蛋白基因敲除,使小鼠出现与人类地中海贫血相似的病理和临床症状,随后对小鼠腹腔注射每只 20 mg 右旋糖酐铁,为期 5 d,总铁剂量为 100 mg。研究结果显示,与对照组相比,铁超载组小鼠脑铁浓度明显增加。

由此可知,在建立不同疾病所致脑铁沉积模型时,应根据需要敲除不同基因,使动物模型的表现与人类疾病更加相符,从而更有利于某一特定疾病的研究。

3 脑铁沉积模型的应用

3.1 铁代谢相关分子与基因的研究

研究者建立脑铁沉积模型多用于探讨与铁代谢有关的分子与基因,如铁调素、Cp、Heph、IRP2 等。Gong 等[1]利用大鼠脑铁沉积模型证实铁调素可防止大脑中的铁积累及铁诱导的氧化应激,推测铁调素可能在阻断神经退行性疾病病理过程中具有巨大潜力。Jiang 等[28]证实,在 6 ~ 7 个月时,与 WT 和 Cp-KO 组小鼠比,Heph-KO 组小鼠的皮质、海马、脑干和小脑中的铁浓度显著升高,表现出铁蓄积,同时铁蛋白水平也增加,而 Cp KO 小鼠在 12 个月时,大脑铁的积累才会随着年龄的增长而增加。

3.2 脑铁沉积疾病及定量方法的研究

准确定量脑铁沉积对于脑铁沉积疾病诊断及治疗至关重要。在研究 IRP2 基因敲除引起的铁超载对帕金森病症状的影响时,Ci 等[30]发现小鼠

IRP2 基因敲除可以导致黑质铁超载和星形胶质细胞铁代谢改变，从而引起帕金森氏症状加重。Yatmark 等[39]建立 β 型地中海贫血小鼠脑铁超载模型并结合磁共振成像（magnetic resonance imaging，MRI）检查，研究结果显示与对照组相比铁超载小鼠大脑 T2* 值下降，并且病理证实存在铁沉积，从而证实 MRI 技术和 T2* 值对铁积累检测的有用性。Fujiwara 等[35]则证实弥散 MRI 对组织中铁沉积很敏感，可以用来量化铁。

4　总结与展望

建立脑铁沉积模型时，根据疾病种类、研究目的，研究者选择的动物品种、造模方法、铁剂剂量往往不一（见表 1）。对于动物品种的选择，腹腔注射或羰基铁饮食法多选择 SD 大鼠或 ICR 小鼠，而基因敲除多选择 C57BL/6 小鼠。由于动物品种不一，铁剂耐受程度不同，为避免实验过程中因剂量问题导致动物死亡，注射铁剂应在预实验期间设立多个剂量梯度，寻找最合适的剂量。羰基铁饮食法由于经肠道吸收，铁在脑内沉积的过程又非常缓慢，目前研究者多采用 2.5% 或 3% 羰基铁饮食进行造模。无论是注射铁剂还是羰基铁饮食，在造模过程中都可根据需要适当延长造模周期，以达到最佳效果。

表 1　铁沉积动物模型

Table 1　Animal model of iron deposition

研究对象 Animal subject		造模方法 Modeling method		
		方式 Mode	药物 Medicine	基因 Gene
大鼠 Rat	SD 大鼠 SD rat	腹腔注射 Intraperitoneal injection	右旋糖酐铁[1] Iron dextran[1]	-
		羰基铁饮食[24] Carbonyl iron diet[24]	-	-
小鼠 Mouse	ICR 小鼠 ICR mouse	腹腔注射 Intraperitoneal injection	右旋糖酐铁[25] Iron dextran[25]	-
	C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mouse	基因敲除 Gene knock-out	-	Cp、Heph、IRP2 基因[28-30] Cp、Heph、IRP2 genes[28-30]
	恒河猴 Rhesus	静脉注射 Intravenous injection	USPIO[35]	-

目前，脑内铁沉积的诊断多依赖于 MRI 定量技术，但定量的准确性尚不十分明确。脑铁沉积动物模型的建立不仅能了解脑铁沉积引起的疾病发病机理、研究有效治愈手段，还有望进一步提高 MRI 定量脑铁沉积的准确性。

参　考　文　献（References）

[1] Gong J, Du F, Qian ZM, et al. Pre-treatment of rats with ad-hepcidin prevents iron-induced oxidative stress in the brain [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 90: 126-132.

[2] 宋陆茜，常春康. 铁代谢、铁评估指标和补铁治疗策略 [J]. 中国血液净化，2020，19(3)：157-160.
Song LX, Chang CK. A review of iron metabolism, laboratory assessment and strategy for iron management [J]. Chin J Blood Purif, 2020, 19(3): 157-160.

[3] Qiu D, Chan GCF, Chu J, et al. MR quantitative susceptibility imaging for the evaluation of iron loading in the brains of patients with β-thalassemia major [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2014, 35(6): 1085-1090.

[4] Akhlaghpoor S, Ghahari A, Morteza A, et al. Quantitative T2* magnetic resonance imaging for evaluation of iron deposition in the brain of β-thalassemia patients [J]. Clin Neuroradiol, 2012, 22(3): 211-217.

[5] Zhang N, Yu X, Xie J, et al. New insights into the role of ferritin in iron homeostasis and neurodegenerative diseases [J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(6): 2812-2823.

[6] Wimmer I, Scharler C, Kadowaki T, et al. Iron accumulation in the choroid plexus, ependymal cells and CNS parenchyma in a rat strain with low-grade haemolysis of fragile macrocytic red blood cells [J]. Brain Pathol, 2021, 31(2): 333-345.

[7] Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, et al. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders [J]. Lancet Neurol, 2014, 13(10): 1045-1060.

[8] Yu P, Chang YZ. Brain iron metabolism and regulation [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1173: 33-44.

[9] Qian ZM, Ke Y. Brain iron transport [J]. Biol Rev, 2019, 94(5): 1672-1684.

[10] 钱忠明. 脑铁代谢和神经变性性疾病 [J]. 生理科学进展，2002，33(3)：197-203.
Qian ZM. Brain iron metabolism and neurodegenerative diseases [J]. Prog Physiol Sci, 2002, 33(3): 197-203.

[11] Brissot P, Troadec MB, Loréal O, et al. Pathophysiology and classification of iron overload diseases; update 2018 [J]. Transfus Clin Biol, 2019, 26(1): 80-88.

[12] Peng Y, Chang X, Lang M. Iron homeostasis disorder and Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22

(22): 12442.

[13] Salazar J, Mena N, Hunot S, et al. Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(47): 18578-18583.

[14] Devos D, Cabantchik ZI, Moreau C, et al. Conservative iron chelation for neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis [J]. J Neural Transm, 2020, 127(2): 189-203.

[15] Hirsch EC. Altered regulation of iron transport and storage in Parkinson's disease [J]. J Neural Transm Suppl, 2006, 71: 201-204.

[16] Sanai SA, Saini V, Benedict RH, et al. Aging and multiple sclerosis [J]. Mult Scler, 2016, 22(6): 717-725.

[17] Ke Y, Qian Z. Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders [J]. Lancet Neurol, 2003, 2(4): 246-253.

[18] Stankiewicz JM, Neema M, Ceccarelli A. Iron and multiple sclerosis [J]. Neurobiol Aging, 2014, 35: S51-S58.

[19] 杨珍珍, 张媛媛. 铁沉积定量测量在认知功能障碍中的研究进展 [J]. 国际医学放射学杂志, 2021, 44(1): 30-34.
Yang ZZ, Zhang YY. Research progress of quantitative measurement of iron deposition in cognitive dysfunction [J]. Int J Med Radiol, 2021, 44(1): 30-34.

[20] Jiang H, Song N, Jiao Q, et al. Iron pathophysiology in parkinson diseases [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1173: 45-66.

[21] Faucheux BA, Nillesse N, Damier P, et al. Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(21): 9603-9607.

[22] Wang L, Yin YL, Liu XZ, et al. Current understanding of metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Transl Neurodegener, 2020, 9: 10.

[23] Coffey R, Ganz T. Iron homeostasis: an anthropocentric perspective [J]. J Biol Chem, 2017, 292(31): 12727-12734.

[24] Chang Y, Qian Z, Wang K, et al. Effects of development and iron status on ceruloplasmin expression in rat brain [J]. J Cell Physiol, 2005, 204(2): 623-631.

[25] 赵晋英, 刘涛, 刘鹏, 等. 机体铁过载导致小鼠脑铁异常、脉络丛铁沉积和纤维化 [J]. 神经解剖学杂志, 2021, 37(5): 577-583.
Zhao JY, Liu T, Liu P, et al. Systemic iron overload leads to brain iron abnormality, iron deposition and fibrosis in choroid plexus of mice [J]. Chin J Neuroanat, 2021, 37(5): 577-583.

[26] 罗满林, 顾为望. 实验动物学 [M]. 北京: 中国农业出版社; 2002.
Luo ML, Gu WW. Laboratory zoology [M]. Beijing: China Agricultural Press; 2002.

[27] 李凤奎, 王纯耀. 实验动物与动物实验方法学 [M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2007.
Li FK, Wang CY. Laboratory animals and animal experiment methodology [M]. Zhengzhou: Zhengzhou University Press; 2007.

[28] Jiang R, Hua C, Wan Y, et al. Hephaestin and ceruloplasmin play distinct but interrelated roles in iron homeostasis in mouse brain [J]. J Nutr, 2015, 145(5): 1003-1009.

[29] Zhao L, Hadziahmetovic M, Wang C, et al. Cp/Heph mutant mice have iron-induced neurodegeneration diminished by deferiprone [J]. J Neurochem, 2015, 135(5): 958-974.

[30] Ci YZ, Li H, You LH, et al. Iron overload induced by *IRP*2 gene knockout aggravates symptoms of Parkinson's disease [J]. Neurochem Int, 2020, 134: 104657.

[31] Bailie GR, Schuler C, Leggett RE, et al. Oxidative effect of several intravenous iron complexes in the rat [J]. Biometals, 2013, 26(3): 473-478.

[32] Italia K, Colah R, Ghosh K. Experimental animal model to study iron overload and iron chelation and review of other such models [J]. Blood Cells Mol Dis, 2015, 55(3): 194-199.

[33] Vu'o'ng Lê B, Khorsi-Cauet H, Villegier AS, et al. New rat models of iron sucrose-induced iron overload [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2011, 236(7): 790-799.

[34] 张宝林, 张辉阳. 超顺磁性氧化铁纳米粒子在脑磁共振成像中的应用 [J]. 磁共振成像, 2011, 2(5): 377-383.
Zhang BL, Zhang HY. Application of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as contrast agents in brain magnetic resonance imaging [J]. Chin J Magn Reson Imaging, 2011, 2(5): 377-383.

[35] Fujiwara S, Uhrig L, Amadon A, et al. Quantification of iron in the non-human primate brain with diffusion-weighted magnetic resonance imaging [J]. Neuroimage, 2014, 102: 789-797.

[36] 齐国将, 钟德琳, 蓝海梅, 等. 心肌铁过载兔模型的制作及铁沉积规律的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 242-247.
Qi GJ, Zhong DL, Lan HM, et al. Establishment of a rabbit model of cardiac iron overload and its relationship with iron deposition [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 242-247.

[37] 李春燕, 龙莉玲, 黄仲奎, 等. 肝脏铁超负荷动物模型的制作与研究 [J]. 蛇志, 2016, 28(2): 123-127.
Li CY, Long LL, Huang ZK, et al. The manufacture and research of animal models of liver iron overload [J]. J Snake, 2016, 28(2): 123-127.

[38] 龙莉玲, 彭鹏, 黄仲奎, 等. 铁超负荷兔模型 3.0TMRI 定量肝铁沉积可行性研究 [J]. 磁共振成像, 2012, 3(6): 451-455.
Long LL, Peng P, Huang ZK, et al. Liver iron quantification by 3.0TMRI: calibration on a rabbit model [J]. Chin J Magn Reson Imaging, 2012, 3(6): 451-455.

[39] Yatmark P, Huaijantug S, Teerapan W, et al. MRI imaging and histopathological study of brain iron overload of β-thalassemic mice [J]. Magn Reson Imaging, 2019, 61: 267-272.

[收稿日期] 2022-05-21

赵禹. fMRI 技术在犬科动物认知领域研究的应用［J］. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1107-1113.
Zhao Y. Progress of research into functional magnetic resonance imaging in the field of domestic dog cognition［J］. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1107-1113.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.013

fMRI 技术在犬科动物认知领域研究的应用

赵禹*

(中国刑事警察学院警犬技术学院, 沈阳 110034)

【摘要】 家犬(Canis lupus familiaris)与人类社会生态高度融合,已成为人类解析认知进化理论、进行比较认知研究、开展人类认知功能障碍性疾病研究的一种自然模型动物。功能性磁共振成像(functional magnetic resonance imaging,fMRI)是一种非侵入式、安全的能反映生物体大脑神经活动时空分布的神经影像学技术,近年来被应用于家犬行为认知特征神经机制的研究。本文简介了 fMRI 技术;概述了部分研究者使用视觉、嗅觉、听觉等不同的实验范式对家犬大脑开展 fMRI,定位不同实验范式下被激活的大脑功能区,从而揭示家犬认知的神经机制;总结了 fMRI 技术在犬认知研究中技术和方法上的挑战。以期为国内开展家犬等动物认知研究者提供新的技术方法。

【关键词】 功能性磁共振成像;家犬;认知
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2022)08-1107-07

Progress of research into functional magnetic resonance imaging in the field of domestic dog cognition

ZHAO Yu*

(Department of Police-dog Technology, Criminal Investigation Police University of China, Shenyang 110034, China)
Corresponding author: ZHAO Yu. E-mail: zglnlyzhaoyu@163.com

【Abstract】 Domestic dogs are highly integrated into human society and ecology, and have become a natural model animal for analyzing cognitive evolution theory, conducting comparative cognitive research, and conducting human cognitive dysfunction disease research. Functional magnetic resonance imaging (fMRI) is a non-invasive and safe neuroimaging technique that can reveal the temporal and spatial distribution of biological brain neural activities. In recent years, fMRI has been used to study the neural mechanisms of behavioral cognitive characteristics in domestic dogs. This paper provides an introduction to the fMRI technique. We reveal how the neural mechanisms of dog cognition were studied using fMRI of dog brains to locate the activated functional brain areas under different experimental paradigms, such as vision, smell, and hearing. The technical and method ological challenges of fMRI in canine cognitive research are also summarized. This paper provides a theoretical basis and reference for researchers who carry out cognition studies on domestic dogs and other animals.

【Keywords】 functional magnetic resonance imaging; domestic dog; cognition
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

动物认知学可以定义为研究动物思考和行为的过程及机制的一门科学[1]。家犬是第一个被人类驯化的物种[2],尽管起源进化问题一直以来在学术界存在争议[3-5]。但由于其与人类社会生态的深

[基金项目]国家自然科学基金(31702028)。
Funded by National Natural Science Foundation of China(31702028).
[作者简介]赵禹(1983—),男,硕士,研究方向:警犬行为认知遗传研究。Email:zglnlyzhaoyu@163.com

度融合,近年来,已成为继非人灵长类动物、啮齿类动物、鸦科鸟类等动物之后,研究非人类物种行为认知特征的一种新的热门模型动物。家犬被广泛用于比较认知研究、认知进化理论解析及人类认知功能障碍性疾病自然模型动物研究等方向[6-10]。目前,家犬认知领域的研究除了通过设计能体现犬认知能力的各种实验范式,观察分析家犬在各实验范式中的行为表现[11-12],研究其认知表型特征,已发展到使用脑电图(EEG)、眼动追踪(eye-tracking)、功能性磁共振成像(fMRI)等多种技术研究家犬行为认知特征深层次神经机制的研究[13-14]。其中,fMRI 是一种新兴的、非侵入式、安全、无创、能反映生物体大脑神经活动时空分布的神经影像学技术[15]。近年来,fMRI 技术广泛用于家犬(以下简称犬)认知神经机制的研究中。

1 fMRI 技术简介

功能性磁共振成像(fMRI)是一种无侵入、无创的主要用于对生物体大脑活动皮层区域进行准确定位的一种成像技术。20 世纪 90 年代,Belliveau 等[16]使用 fMRI 技术,应用灌注成像,采用视觉刺激范式,观察到了人类视觉皮层区域的大脑活动影像。Ogawa 等[17]开发的血氧水平依赖性成像(Blood Oxygenation Level Dependent, BOLD)的 fMRI 技术广泛应用于大脑皮层功能定位。BOLD-fMRI 也是目前应用最广泛的脑功能成像技术。该技术应用的生理基础是当大脑中某个特定区域的神经元被激活时,该脑区的神经元放电并耗氧,导致局部血氧水平短暂下降。接着含氧血液流向激活神经元所在区域,以满足神经元的局部能量需求,使局部血氧水平很快增加,这种血液中的氧气量超过了神经元活动所消耗的氧气量,因此该区域的含氧血液过多会导致局部磁化率下降(因为氧合血红蛋白是抗磁性的),导致磁共振信号强度增加。

fMRI 技术广泛应用于人脑功能及心理机制的研究。基于 fMRI 技术的人脑功能研究主要在任务态和静息态两种状态下开展。任务态功能磁共振成像(task fMRI, tfMRI)是指受试者通过执行视觉、语言、思维、听觉等特定的任务,根据特定脑区血氧含量的变化从而定位出该任务下大脑活跃区域的数据成像。静息态功能磁共振成像(resting-state fMRI, RS-fMRI)是指在没有明确任务的情况下,语言、注意力、听觉、视觉等各功能脑区在静息状态下表现出的自发低频波动数据成像。

2 基于 fMRI 技术的犬认知研究

MRI 技术用于研究犬脑的解剖结构早于 fMRI 技术用于研究犬脑功能。对犬进行磁共振扫描分析前,一般要对犬进行麻醉,麻醉的目的是使犬在磁共振设备中保持静止,而麻醉不会改变犬的大脑结构,因此兽医领域中将 MRI 技术用于犬脑退行性疾病诊断、认知功能障碍等临床疾病的诊断。由于麻醉的使用必然会改变犬的意识状态、妨碍犬的注意力、并降低血流和呼吸速率。这可能导致参与认知加工的大脑区域的激活模式不被发掘。为了获得正常状态下的犬脑部功能成像数据,研究者们开始尝试不使用麻醉,使用训练有素的犬进行图像采集。Tóth 等[18]通过逐步训练,使犬适应了磁共振仪器的环境和噪音,并在犬清醒、无约束静止的状态下,成功获得了犬脑部磁共振成像的数据。但这项研究只包括了犬脑部的结构扫描。不久后,研究人员就获得了犬清醒状态下的脑部功能扫描成像。Berns 等[19]首次发表了清醒和无约束状态下家犬的 fMRI 数据采集。该小组研究人员通过正强化的方式训练了两头犬在收集 fMRI 高质量成像图像所需的时间内保持静止,实验中犬的头部运动小于 1 mm,无需药物镇定和身体绑定。研究人员采用视觉刺激范式,让犬观看之前形成条件反射的表示食物奖励和无奖励的两种不同的手势信号。通过 fMRI 成像,观察到两头犬对有奖赏手势信号反应的脑部尾状核区域激活更明显。目前为止,世界范围内共有五个独立的研究小组—两个在美国(佐治亚州亚特兰大市和奥尔本市)、两个在欧洲(匈牙利布达佩斯市和奥地利维也纳市)、一个在墨西哥(克雷塔罗),开展了清醒、无约束状态下,通过视觉、嗅觉、听觉等不同的实验范式设计对犬脑部进行 fMRI,定位不同实验范式下犬脑部特定区域的激活状态,进而确定犬的认知神经机制[20]。

2.1 基于视觉范式的认知研究

Berns 等[19]在开发了一套让犬在保持静止、清醒和专注于认知任务的情况下进行 fMRI 的技术后,又在更多的样本犬中实验了该方法的可靠性。Berns 等[21]在 13 头受试犬中发现有 8 头犬对奖励的手势信号在尾状核有激活信号,验证了 fMRI 技术在犬脑功能分析中结果的可靠性,可以在犬清醒的状态下完成。Berns 等[22]使用 fMRI 技术,通过观察

49 头训练中的服务犬对熟悉训导员和陌生人给出的表示奖励或不奖励的手势信号脑部尾状核、杏仁核和视觉皮层区域激活情况，结合犬的训练结果，经过分析发现，成功的服务犬（不管是熟悉的训导员还是陌生人给出的手势信号）都产生了尾状核激活，而杏仁体没有过度激活，得出了使用 fMRI 技术可以预测犬经过训练后能否成为一头合格服务犬的结论。Dilks 等[23]使用 fMRI 技术对 6 头接受过在磁共振扫描仪中保持静止训练的犬进行了视觉面部识别能力研究。在犬的颞叶中发现了一个区域，该区域对人脸和犬脸的反应明显高于对日常物体图像的反应，而这种面部选择性在犬的初级视觉皮层中没有发现。该实验证明了犬颞叶皮质中存在专门的面部选择区域，揭示了专注于面部处理的神经机制并非灵长类动物独有，可能有助于解释犬对人类社会线索的高度敏感。Cook 等[24]收集了犬在观察它们主人喂另外一头逼真的假犬模型时的 fMRI 脑部数据，研究了犬杏仁核激活与通过犬行为评估研究量表（Canine Behavioral Assessment and Research Questionnaire，C-BARQ）测试犬攻击性气质之间的关联。C-BARQ 测试结果显示更具攻击气质的犬，在观察到主人喂假犬时，表现出杏仁核区域更高的激活。这种机制可能与人类的嫉妒有一些相似之处。Cook 等[24]还发现，当犬反复观察到该情景时，杏仁核区域反应惯化，表明基于暴露的干预措施对潜在攻击性犬的价值。

Gillette 等[25]为了研究犬脑中真实世界和二维图像视频刺激是否具有等效性，向犬和人分别展示真实世界的人和物体以及相同人和物体的视频，使用 fMRI 对犬和人进行扫描成像。在犬和人的脑部，发现颞后上沟（犬的外侧裂）和枕外侧复合体（犬的内外侧回）对实时和视频刺激都有显著的激活区域。只有犬的外侧裂区域对活体面部的激活程度明显高于视频面部，而在人类中，梭形面部区域和后颞上沟对活体面部的反应明显高于视频面部。证明了仅使用视频刺激，也可以定位到犬脑部激活区域，尽管真实世界的刺激可能更突出。Karl 等[14]为了研究犬与人的关系，向磁共振设备中保持静止的犬分别展示其主人和陌生人的快乐或者愤怒表情的视频。结果表明，犬主人快乐或愤怒的表情都激活了犬与人类依恋处理的有关大脑区域。相比之下，陌生人的视频主要激活犬视觉和运动加工有关的大脑区域，而熟悉的人总体上激活相对较弱。大多数快乐的刺激会激活与奖赏处理相关的尾状核，而愤怒的刺激会激活边缘区域。结合眼动追踪技术和行为偏好测试数据都支持照主人脸部的优势角色，并且与 fMRI 实验的结果一致。初步为犬与人类互动时假定的依恋系统的参与提供新颖和融合的见解。Cook 等[26]为探究犬对与人社交和食物奖励偏好的神经基础，首先训练 15 头犬对 3 个不同的物品（玩具车、玩具马和梳子）分别与口头表扬、食物奖励和对照（什么都没有）建立联系。3 种物品任务下分别对清醒犬功能磁共振成像，比较腹侧尾状核的激活情况。结果表明，相对于对照刺激，尾状核对奖赏预测刺激更为活跃。15 头犬中有 13 头表现出赞扬奖励与食物奖励大致相当或更大的激活了尾状核。尾状核反应的个体差异表明，对一些犬来说，社会奖励可能比食物奖励更高，这可能有助于解释社会互动在犬训练中的明显功效。

2.2　基于嗅觉范式的认知研究

嗅觉被认为是犬最强大、最重要的感觉。Berns 等[27]使用嗅觉范式研究了犬对人类和同种动物的社会认知。经过训练的犬在磁共振成像仪中保持静止不动。分别对受试犬呈现 5 种气味（自我、熟悉人、陌生人、熟悉犬、陌生犬），分析受试犬脑区的激活情况，重点分析犬脑尾状核区域激活情况（因为该区域的激活与积极期望有关，而且该区域的解剖位置也很明确）。结果表明，犬脑嗅球部被五种气味激活的程度相似，而尾状核区域被熟悉人的气味最大程度激活。犬尾状核的激活表明，犬不仅能从其他气味中分辨出熟悉人的气味，而且与它有着积极的联系。这说明了犬嗅觉的力量，并为人类在犬生活中的重要性提供了重要证据。Jia 等[28]利用 fMRI 技术，通过比较清醒和麻醉状态下犬大脑对不同气味浓度的神经反应，研究犬嗅觉背后的认知过程。结果显示，在出现高浓度和低浓度气味时，清醒和麻醉状态下犬的嗅球和双侧梨状叶均表现出强烈激活。并且，激活强度及空间范围由浓度介导，气味浓度越高，激活强度越大。清醒状态下的犬表现出内侧、上、眶额叶皮质和小脑等区域的激活，所有这些区域都与认知过程有关，而麻醉犬的这些区域没有激活，推测麻醉会降低气味的处理，fMRI 技术的应用可以更真实反映犬嗅觉系统活动的神经基础。Prichard 等[29]通过对 18 头犬分别呈现与食物奖励相关的目标气味（a）、无关联的分心气味（b）以及两种气味的混合物（ab），获得清醒犬

各任务态下的 fMRI 数据,研究犬对 a、b 及混合气味 ab 辨别的神经机制。研究人员获得了每头犬在 3 种气味刺激呈现过程中脑部神经激活情况(主要关注 3 个已知的与气味处理有关的区域,即尾状核、杏仁核和嗅球)数据。研究者使用 SPSS 24(IBM)中的混合模型程序分析发现 3 种气味刺激在尾状核、杏仁核和嗅球中都存在神经差异证据(P = 0.004),这 3 种气味刺激因气味类型而显著不同(P < 0.001)。post-hoc 检验对 3 个模型进行多次比较校正后,尾状核和嗅球这两个结果变得不显著,只有杏仁核区域显示出气味刺激之间的显著差异(P < 0.0001)。犬杏仁核区域激活情况最大限度地区分基于刺激-奖赏关系的气味刺激(a),而混合物(ab)激活与无奖赏刺激(b)相似。Berns 等[27]和 Jia 等[28]进行的研究为犬嗅觉神经成像的有效性提供了证据。嗅球一直与气味的处理有关,麻醉的使用和气味的强度与嗅觉的处理直接相关。此外,尾状核的激活支持基于奖赏的气味处理。而 Prichard 等[29]的结果显示杏仁核区域的激活更能体现基于奖励的气味刺激。鉴于这些研究发现,有明确的证据表明,fMRI 技术可用于探索犬的嗅觉加工。

2.3 基于听觉范式的认知研究

听觉在犬生活的许多方面起着重要作用,对于犬与人类和同类的沟通都非常重要。Bach 等[30]使用简单的高斯噪声和规则的间隔声(regular interval sounds,RIS)两种声音刺激模式,获得了 10 头麻醉比格犬听觉刺激后的解剖图像和功能扫描图像。结果通过组分析,确定与右上橄榄核、外侧丘系和内囊位置相匹配的显著激活。此外,发现了听觉皮层被大量激活的证据。RIS 条件(包括基音)与高斯噪声(无基音)的对比显示,在与左侧内侧膝状体核位置匹配的区域中有显著影响。

Andics 等[31]使用 fMRI 技术对犬和人的声音敏感脑区的功能和位置进行了比较研究。11 头犬和 22 个人参与试验,在扫描过程中呈现了一组相同的听觉刺激,以寻找功能相似的声音敏感皮层区域。证明犬的声音区域存在,并且与人类前颞部的声音区域表现出相似的模式。研究结果表明,在人和犬两个物种中,都发现了大脑对声音情绪效价线索的敏感性,定位在相似的非初级听觉区域。犬的外侧裂周围区域和人的颞上沟和额叶下皮质均显示出皮质声敏感性。这两个物种在内侧膝状体中均表现出敏感性。在犬的大脑中,确定了对犬的发声以及人类的发声和环境声音最为活跃的亚区域。几乎所有人类听觉激活区域对人类发声都是最大的,尽管内侧膝状体对犬的发声表现出最大的激活。

Gábor 等[32]结合犬的行为与 fMRI 数据,研究了犬与说话人的社会关系对犬脑语音处理区域的影响。发现犬对主人的行为依恋得分与犬听到主人声音引起的尾状核神经活动增加程度正相关;次级听觉尾侧外侧裂脑回的活动增加;听到主人赞许后犬尾状核活动增加。通过识别犬依赖于社会关系的神经奖赏反应,揭示了人类婴儿与母亲、犬与主人的依恋调节神经机制的相似性。

Cuaya 等[33]使用 fMRI 研究了犬大脑的语音检测和语言表征。使用多体素模式分析(MVPA)发现,双侧听觉皮层区域代表自然语音和加扰语音的方式不同;在右听觉区域,长头犬的分类器性能更好。这种用于语音检测的神经能力不是基于对语音的优先处理,而是基于对声音自然度的敏感性。此外,在自然语言的情况下,两种语言在次级听觉皮层和皱褶前回都有不同的活动模式;年龄较大的犬对熟悉和不熟悉的语言的反应差异较大,表明语言接触量的作用。在两种语言的混乱版本中,没有区域表现出不同,这表明自然语音中语言之间的活动差异反映了对语言特定规律的敏感性,而不是对光谱语音线索的敏感性。这些表明,不同的皮层区域支持犬大脑中的语音自然性检测和语言表征。

犬认知神经机制的研究领域很广,大部分研究者采用通过犬的视觉、嗅觉、听觉等不同的实验范式设计对清醒状态的犬脑部进行 fMRI,有的研究者根据自己的实验目的在实验中运用了不只一种感觉范式,有的还结合了犬的行为表型及其他一些实验方法(如:脑电图、眼动追踪等)探索反映犬认知的神经机制。本文仅列举了部分研究者的实验成果,为国内开展家犬等动物认知领域研究提供思路参考。

3 fMRI 技术应用于犬认知研究的挑战

在犬 fMRI 研究中,目前使用的 fMRI 硬件设备及脑影像数据采集、统计分析处理的方法标准都是为人类开发的。除了注意犬在磁共振仪中静止的训练方法、犬的安全性等问题外,尤其要重视提升犬 fMRI 方法参数上的改进,从而获取各任务态下犬大脑更为真实、清晰、准确的成像信息,进而反映犬的认知本质。

3.1　犬运动问题

犬在各种实验范式的任务态下保持静止是 fMRI 应用的前提,运动状态下的受试犬无法开展 fMRI 研究。Berns 等[19]开发了正强化训练法,首次获得了清醒和无约束状态下家犬的 fMRI 数据采集。目前为止,并非所有类型的犬都能开展此项研究,这是由犬的训练性能决定的。研究人员认为理想受试犬的气质特征是冷静、具有好奇心、适应新环境快、不惧噪音、不恐高,在封闭环境中具有保持放松的能力,最重要的是在训练期间表现出好的动机驱动力。尽管 Berns 等[19]、Jia 等[28]、Andics 等[31]训练犬的方法略有不同,但都遵循经典的条件反射和操作式条件反射的原理。目前未见有训练方法成功率比较的报道。任何训练方法的首要目标都是减少训练时间,同时保持所需的犬的某种行为。一般经过训练后的犬在磁共振仪中保持静止的时间至少 4 min,保持静止的时间与收集足够数量的 fMRI 所需的时间相对应(实际持续时间取决于成像序列和实验设计)。这期间,即使训练有素的犬也会有摇头、吞咽等影响 fMRI 数据的动作出现。数据分析中应特别强调进行数据处理(舍弃过度移动的图片和去除微小运动产生的伪影)。例如,一些研究人员使用外置红外摄像机跟踪犬头部运动的数据,对数据中的运动相关伪影进行回顾性校正[34]。

3.2　犬安全问题

由于磁共振环境中存在极高的声压级,工作时的声级范围在 65 ~ 95 dB,峰值在 120 ~ 131 dB,噪声可引起犬的不适甚至短期听力损伤[35]。在设计犬 fMRI 实验时,Cook 等[36]给犬佩戴消音耳罩来进行降噪处理,可以降噪高达 28 dB。也有研究者采用或改变扫描参数,从而在扫描过程中衰减声压级[37]。除了噪声水平外,犬的射频比吸收率(SAR)也存在安全问题。尽管没有针对非人类受试者的此类指南,但研究人员有责任在 MRI 实验中使用犬来评估受试者经历的 SAR 水平。犬在扫描设备内时,最好遵守 FDA 对人类的标准[20]。此外,将实验犬放入 MR 环境之前必须确保犬体内没有任何铁磁性材料,体内存在导电材料可能会致过热和烧伤。

3.3　硬件设备及软件参数

犬的大脑与人类的大脑神经解剖学差异明显,脑容积较人类小,血管和神经元生理等许多方面存在差异[38-40]。Huber 等[41]建议为犬开发专门定制的 fMRI 硬件和数据分析方法,以获得犬脑部更清晰的功能图像,提高犬 fMRI 的敏感性和特异性。

3.3.1　线圈选择

犬 fMRI 的图像质量比人类 fMRI 图像质量要低。主要是因为犬进行 fMRI 的射频线圈和成像协议未按照犬的神经解剖学特点定制。犬的大脑最大为人脑的三分之一,大脑区域与人类大脑区域有很大的生理差异。已发表的犬类 fMRI 研究使用的都是不同类型的人类 MRI 线圈。线圈的几何形状没有针对犬的头部进行优化,靠近犬大脑的射频通道数量有限。由于通道数量较少,与人类功能磁共振成像相比,时间和空间分辨率的预期成像性能都很低。专门为特定物种定制的线圈(如绒猴)fMRI 成像质量已显出巨大的优势[41]。

3.3.2　场强参数选择

Martín-Vaquero 等[42]用麻醉犬分析 3T 和 7T 扫描仪两种场强之间图像质量的差异。结果表明,犬脑部的图像在 3T 和 7T 场强的扫描仪中质量相当,由磁化率和化学位移引起的噪声在 7T 扫描仪中更加明显,建议使用 3T 扫描仪。这与预期的场强增加会提升图像的空间分辨率和对比度分辨率结果相反。与 3T 不同,从 7T 获得高质量的功能磁共振成像数据需要选择适当的序列参数(随场强变化)和使用高阶填隙。因此,如果做得好,像 7T 这样的高场强有可能提供更高的信噪比和更小的体素,这在犬类成像中至关重要,因为犬类的大脑结构相对小于人类。Jacqmot 等[43]比较了 1.5T、3T 和 7T 场强下犬脑部 T2 加权图像。结果也显示 7T 超高场图像在不同磁性组织之间的界面容易出现伪影,3T MR 成像在评估犬脑解剖成像综合效果较好,成像伪影较少。

3.3.3　血流动力学响应函数(HRF)

要探究 fMRI 数据与神经活动的关系,研究 HRF 模型是关键。由于不同物种大脑大小、形状及血管和神经元生理特征存在差异,不同物种的 HRF 有所不同。例如,在清醒的啮齿动物中,HRF 峰值的潜伏期为 2 s,而人类使用的标准 HRF 的峰值潜伏期为 6 s[34]。以往犬的功能磁共振成像研究通常使用人类的 HRF。Boch 等[44]揭示了犬在视觉刺激范式下,HRF 峰值比人类更早出现,并表明使用定制的犬的 HRF 对提高犬 fMRI 检测能力具有重要作用。

3.4　实验的严谨性

鉴于犬 fMRI 是一个新兴领域,实验严谨性还有很多需要不断完善的方面。如:犬没有主观性,缺

乏任务刺激传递给犬的时间控制,这在 BOLD 信号的一般线性建模中是一种缺陷[19];关于犬 fMRI 研究的样本量普遍较小,而由于犬的品种、性别及个体的认知差异,可能导致结果分析存在偏差[41];缺乏公认的高质量的犬大脑皮层图谱限制了研究人员对犬脑功能机制的精准研究。最近已有研究人员开展犬大脑皮质图谱的研究制定,以便为今后开展犬脑功能研究的精准区域定位使用[45-46]。

4 展望

使用 fMRI 技术开展犬在清醒、无约束、静止状态下的认知机制研究,除了有从事犬认知研究的研究人员,还需要专业训练犬在磁共振仪中保持静止的训练团队和磁共振操作分析团队通力合作。随着 fMRI 技术在犬认知领域研究工作的不断应用,越来越多的关于犬认知的神经机制被揭秘。这不仅使人类更了解犬,而且在比较认知研究和解析认知进化理论中都取得了不少的成果,也为人类开展认知功能障碍性疾病研究提供了一种新的模型动物。此外,fMRI 技术应用于犬认知领域研究,还可以提高工作犬的选育进程。以往我国工作犬(如:军警犬、导盲犬等)的选择都在犬的行为水平开展。而工作犬能否胜任工作,除了外在的行为表型,内在的认知能力(如:执行能力、工作记忆、社会认知等)至关重要[47-48]。开展工作犬认知水平的研究是工作犬选育的一个新的领域和方向。通过设计科学的任务实验范式,用 fMRI 研究那些经过严格训练并在工作中取得成功的工作犬的脑部激活区域特征模式,从而更好的识别工作犬的认知特征标准。

参 考 文 献(References)

[1] Krichbaum S, Davila A, Lazarowski L, et al. Animal Cognition [M]. New York: USA Oxford University Press; 2020.

[2] Bergström A, Frantz L, Schmidt R, et al. Origins and genetic legacy of prehistoric dogs [J]. Science, 2020, 370(6516): 557-564.

[3] Vilà C, Savolainen P, Maldonado JE, et al. Multiple and ancient origins of the domestic dog [J]. Science, 1997, 276(5319): 1687-1689.

[4] Thalmann O, Shapiro B, Cui P, et al. Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs [J]. Science, 2013, 342(6160): 871-874.

[5] Frantz LAF, Mullin VE, Pionnier-Capitan M, et al. Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs [J]. Science, 2016, 352(6290): 1228-1231.

[6] Boch M, Wagner IC, Karl S, et al. Similarities and differences of face and body perception in the dog (Canis familiaris) and human brain [EB/OL]. [2021-08-18]. https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2021/08/18/2021.08.17.456623.full.pdf.

[7] Karl S, Sladky R, Lamm C, et al. Neural responses of pet dogs witnessing their caregiver's positive interactions with a conspecific: an fMRI study [J]. Cereb Cortex Commun, 2021, 2(3): tgab047.

[8] Sanches FJ, de Melo JC, Ferreira SP, et al. Aging-related episodic-like memory decline in dogs [J]. Behav Brain Res, 2022, 22: 113762.

[9] Mondino A, Gutiérrez M, González C, et al. Electroencephalographic signatures of canine cognitive dysfunction [EB/OL]. [2022-01-28]. https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.01.28.478033v1.full.pdf.

[10] Andics A, Miklósi Á. Neural processes of vocal social perception: Dog-human comparative fMRI studies [J]. Neurosci Biobehav R, 2018, 85: 54-64.

[11] Bensky MK, Gosling SD, Sinn DL. The world from a dog's point of view: a review and synthesis of dog cognition research [J]. Adv Stud Behav, 2013, 45: 209-406.

[12] Lea SEG, Osthaus B. In what sense are dogs special? Canine cognition in comparative context [J]. Learn Behav, 2018, 46(4): 335-363.

[13] Kujala MV, Kauppi JP, Törnqvist H, et al. Time-resolved classification of dog brain signals reveals early processing of faces, species and emotion [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 1-13.

[14] Karl S, Boch M, Zamansky A, et al. Exploring the dog-human relationship by combining fMRI, eye-tracking and behavioural measures [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 1-15.

[15] Buchbinder BR. Functional magnetic resonance imaging [J]. Handb Clin Neurol, 2016, 135: 61-92.

[16] Belliveau JW, Kennedy DN, McKinstry RC, et al. Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging [J]. Science, 1991, 254(5032): 716-719.

[17] Ogawa S, Lee TM, Kay AR, et al. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation [J]. PNAS, 1990, 87(24): 9868-9872.

[18] Tóth L, Gácsi M, Miklósi Á, et al. Awake dog brain magnetic resonance imaging [J]. J Vet Behav, 2009, 4(2): 50.

[19] Berns GS, Brooks AM, Spivak M. Functional MRI in awake unrestrained dogs [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e38027.

[20] Karl S, Boch M, Virányi Z, et al. Training pet dogs for eye-tracking and awake fMRI [J]. Behav Res Methods, 2020, 52(2): 838-856.

[21] Berns GS, Brooks A, Spivak M. Replicability and heterogeneity of awake unrestrained canine fMRI responses [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e81698.

[22] Berns GS, Brooks AM, Spivak M, et al. Functional MRI in awake dogs predicts suitability for assistance work [J]. Sci Rep, 2017, 7: 1-10.

[23] Dilks DD, Cook P, Weiller SK, et al. Awake fMRI reveals a specialized region in dog temporal cortex for face processing [J]. Peer J, 2015, 3: e1115.

[24] Cook P, Prichard A, Spivak M, et al. Awake fMRI reveals covert arousal in aggressive dogs under social resource threat [EB/OL]. [2017-10-14]. https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2017/10/14/203323.full.pdf.

[25] Gillette KD, Phillips EM, Dilks DD, et al. Using live and video stimuli to localize face and object processing regions of the canine brain [J]. Animals, 2022, 12(1): 108.

[26] Cook PF, Prichard A, Spivak M, et al. Awake canine fMRI predicts dogs' preference for praise vs food [J]. Soc Cogn Affect Neurosci, 2016, 11(12): 1853-1862.

[27] Berns GS, Brooks AM, Spivak M. Scent of the familiar: An fMRI study of canine brain responses to familiar and unfamiliar human and dog odors [J]. Behav Process, 2015, 110: 37-46.

[28] Jia H, Pustovyy OM, Waggoner P, et al. Functional MRI of the olfactory system in conscious dogs [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86362.

[29] Prichard A, Chhibber R, King J, et al. Decoding odor mixtures in the dog brain: an awake fMRI study [J]. Chem Senses, 2020, 45(9): 833-844.

[30] Bach JP, Lüpke M, Dziallas P, et al. Auditory functional magnetic resonance imaging in dogs-normalization and group analysis and the processing of pitch in the canine auditory pathways [J]. BMC Vet Res, 2016, 12:32.

[31] Andics A, Gácsi M, Faragó T, et al. Voice-sensitive regions in the dog and human brain are revealed by comparative fMRI [J]. Curr Biol, 2014, 24: 574-578.

[32] Gábor A, Andics A, Miklósi Á, et al. Social relationship-dependent neural response to speech in dogs [J]. Neuroimage, 2021, 243: 118480.

[33] Cuaya LV, Hernández-Pérez R, Boros M, et al. Speech naturalness detection and language representation in the dog brain [J]. NeuroImage, 2022, 248: 118811.

[34] Thompkins AM, Deshpande G, Waggoner P, et al. Functional magnetic resonance imaging of the domestic dog: research, methodology, and conceptual issues [J]. Comp Cogn Behav Rev, 2016, 11: 63-82.

[35] Venn RE, McBrearty AR, McKeegan D, et al. The effect of magnetic resonance imaging noise on cochlear function in dogs [J]. Vet J, 2014, 202(1): 141-145.

[36] Cook PF, Spivak M, Berns GS. One pair of hands is not like another: caudate BOLD response in dogs depends on signal source and canine temperament [J]. Peer J, 2014, 2: e596.

[37] Baker MA. Reduction of MRI acoustic noise achieved by manipulation of scan parameters-A study using veterinary MR sequences [J]. Radiography, 2013, 19(1): 11-16.

[38] Schoenebeck JJ, Ostrander EA. The genetics of canine skull shape variation [J]. Genetics, 2013, 193(2): 317-325.

[39] Hecht EE, Smaers JB, Dunn WD, et al. Significant neuroanatomical variation among domestic dog breeds [J]. J Neurosci, 2019, 39(39): 7748-7758.

[40] Horschler DJ, Hare B, Call J, et al. Absolute brain size predicts dog breed differences in executive function [J]. Anim Cogn, 2019, 22(2): 187-198.

[41] Huber L, Lamm C. Understanding dog cognition by functional magnetic resonance imaging [J]. Learn Behav, 2017, 45(2): 101-102.

[42] Martín-Vaquero P, Da Costa RC, Echandi RL, et al. Magnetic resonance imaging of the canine brain at 3 and 7 T [J]. Vet Radiol Ultrasoun, 2011, 52(1): 25-32.

[43] Jacqmot O, Van Thielen B, Hespel AM, et al. T2-weighted turbo spin-echo magnetic resonance imaging of canine brain anatomy at 1. 5T, 3T, and 7T field strengths [J]. Anat Rec (Hoboken), 2022, 305(1): 222-233.

[44] Boch M, Karl S, Sladky R, et al. Tailored haemodynamic response function increases detection power of fMRI in awake dogs (Canis familiaris) [J]. NeuroImage, 2021, 224: 117414.

[45] Czeibert K, Andics A, Petneházy Ö, et al. A detailed canine brain label map for neuroimaging analysis [J]. Biol Futura, 2019, 70(2): 112-120.

[46] Johnson PJ, Luh WM, Rivard BC, et al. Stereotactic cortical atlas of the domestic canine brain [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 1-16.

[47] MacLean EL, Brian H. Enhanced selection of assistance and explosive detection dogs using cognitive measures [J]. Front Vet Sci, 2018, 5: 236.

[48] Hare B, Ferrans M. Is cognition the secret to working dog success? [J]. Anim Cogn, 2021, 24(2): 231-237.

[收稿日期] 2022-06-21

王珊珊,袁嘉丽,牛海涛. 基于中西医理论指导的类风湿关节炎动物模型分析［J］. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1114-1120.
Wang SS, Yuan JL, Niu HT. Analysis of animal models of rheumatoid arthritis based on theories of traditional Chinese and Western medicine［J］. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1114-1120.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.014

基于中西医理论指导的类风湿关节炎动物模型分析

王珊珊[1,2],袁嘉丽[1*],牛海涛[2*]

(1. 云南中医药大学,云南省中医药分子生物学重点实验室,昆明 650500;2. 暨南大学基础医学与公共卫生学院,广州市无菌动物与微生态转化重点实验室,广州 510632)

【摘要】 类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种以关节炎症、滑膜增生、软骨和骨破坏为主要表现的系统性自身免疫性疾病。本文基于中西医理论对 RA 的认识,对常用 RA 动物模型进行梳理,从发病机制、造模方法、模型评价指标、临床症状吻合度以及模型适用研究方面进行分析,以期为建立更好的 RA 动物模型提供参考。

【关键词】 类风湿关节炎;动物模型;评价标准
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2022)08-1114-07

Analysis of animal models of rheumatoid arthritis based on theories of traditional Chinese and Western medicine

WANG Shanshan[1,2], YUAN Jiali[1*], NIU Haitao[2*]

(1. Yunnan University of Chinese Medicine, Yunnan Provincial Key Laboratory of Molecular Biology for Sinomedicine, Kunming 650500, China. 2. School of Medicine, Jinan University, Guangzhou Key Laboratory of Germ-free Animals and Microbiota Application, Guanzhou 510632)

Corresponding author: NIU Haitao. E-mail: htniu@jnu.edu.cn; YUAN Jiali. E-mail:2748132800@qq.com

【Abstract】 Rheumatoid arthritis (RA) is a complex autoimmune disease characterized by severe joint inflammation, synovial hyperplasia, and cartilage and bone destruction. Based on our understanding of RA and the theories of traditional Chinese and Western medicine, this paper presents the existing RA animal models and analyzes the modeling method, mechanisms, model evaluation indicators, clinical symptom coincidences, advantages and disadvantages, and model applicability to provide a reference for the establishment of better RA animal models.

【Keywords】 rheumatoid arthritis; animal model; evaluation criteria
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种严重的伴有关节炎症、滑膜增生、软骨和骨破坏的系统性自身免疫性疾病[1]。RA 的一系列病症和并发症表现复杂繁多[2],但目前尚未有特效治疗药物,给患者和家庭带来沉重负担。因此,构建与人类疾病模拟度和吻合度高的动物模型,对更好地推

[基金项目]国家重点研发计划项目(2022YFF0710701),广州市重点研发计划项目(202206010157)。
Funded by National Key R&D Programs of China(2022YFF0710701), Guangzhou Key Research and Development Program(202206010157).
[作者简介]王珊珊(1996—),女,硕士,研究方向:中西医结合基础。Email:1846329112@qq.com
[通信作者]牛海涛(1970—),男,教授,博士,研究方向:肠道免疫和微生态方向研究。Email:htniu@jnu.edu.cn;
袁嘉丽(1963—),女,教授,博士,研究方向:中医药抗感染免疫与微生态调节研究。Email:2748132800@qq.com。
*共同通信作者

动 RA 的基础研究和探索临床诊疗手段具有至关重要的作用。本文以相关文献研究为基础，选取广泛使用的模型，从中医和西医对 RA 病因病机和临床诊疗的理论指导角度，对现有 RA 实验动物模型进行评价分析和归纳总结，以期为 RA 的研究提供更多参考。

1　中医对类风湿关节炎的认识

1.1　RA 的中医病因病机

中医文献中没有记载与 RA 相应的病名，但根据 RA 的临床表现，其应当归属于中医“痹证”范畴。《黄帝内经》记载：“风寒湿三气杂至，合而为痹。”指出风寒湿邪侵袭机体而致痹；《金匮要略》曰：“少阴脉浮而弱……风血相搏，即疼痛如掣”认为营卫不足，邪气侵袭筋骨，闭阻血脉而致痹，指出素体虚弱在本病中的作用；后世医家提出“痹久必有淤血”、“淤血致痹”，指出了淤血在痹证中的作用；朱良春、王为兰指出“痰湿”、“痰瘀”在痹证中的重要作用，丰富了痹证的病因病机理论[3-4]。

经过历代医家的认识补充，痹证病因可概括为正气不足，卫外不固；风寒湿热，外邪入侵。痹证的病机根本为邪气痹阻经脉，即风、寒、湿、热、痰、瘀等邪气滞留于肢体筋脉、关节、肌肉，气血痹阻不通，不通则痛。

1.2　RA 的中医诊断标准、临床表现及证治分型

诊断标准参照《中医病证诊断疗效标准》[5]，临床表现可概括为：(1)关节疼痛肿胀、屈伸不利，甚则僵硬变形；(2)痛随寒重，局部紫暗；(3)关节触之热感，局部红热；(4)关节刺痛，局部紫暗，肌肤甲错；(5)发病与季节、气候、饮食有关。参照此标准，RA 的证治分型为：风湿痹阻证、寒湿痹阻证、湿热痹阻证、痰瘀痹阻证、瘀血阻络证、气血两虚证、肝肾不足证、气阴两虚证。

2　现代医学对类风湿关节炎的认识

2.1　RA 的现代病理机制

类风湿性关节炎是一种自身免疫性慢性炎症疾病，以关节肿痛、滑膜增生、炎性浸润、血管翳形、软骨和骨破坏为特征表现[6-7]。遗传因素、环境因素、免疫因素、炎症反应等在 RA 发病中发挥重要作用[8-11]。RA 的发病机制尚不十分明确，目前相关机制研究成果主要包括：(1)B 细胞分泌自身抗体、自身反应性 T 细胞激活、炎症细胞因子异常分泌等途径诱发 RA[12-14]，B 细胞通过抑制成骨细胞分化抑制 RA 的骨形成[15]；(2)外源性刺激如软骨寡聚体基质蛋白(cartilage oligomer matrix protein, COMP)激活 T 细胞免疫，产生细胞因子，诱导炎症反应和骨破坏导致 RA[16-17]；T 细胞异常免疫激活促进 B 细胞分泌自身抗体，促进 RA 进程[18]；T 细胞还与 MHC-Ⅱ类分子共同调控 RA 的进程[19]；(3)细胞因子失衡在 RA 中起着重要作用，如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)通过 NF-κB 和 MAPK 信号通路调控一系列炎症反应，刺激滑膜细胞产生前列腺素和胶原酶[20-21]；TNF 信号传导还可促进谷胱甘肽的胱氨酸摄取和生物合成，以保护成纤维细胞免受铁凋亡的影响[22]；其他细胞因子如 IL-1、IL-6、IL-17 等也参与调控 RA[23]；(4)肠道菌群及其代谢物对 RA 发病起着重要作用[24-25]，如丁酸代谢物促进 RA 自身抗体的产生和骨破坏[26]，肠道菌群可通过促进抗坏血酸降解来促进早期 RA 进展[27]。

2.2　RA 的西医诊断标准与临床表现

诊断标准参照 2010 年美国风湿病协会/欧洲抗风湿联盟制定的类风湿关节炎分类诊断标准，即 ACR/EULAR2010 标准[28]。临床表现概括为：(1)关节受累；(2)血清学检测类风湿因子(rheumatoid factor, RF)或抗环瓜氨酸肽(cyclic citrullinated peptide, CCP)抗体阳性；(3)滑膜炎持续时间大于 6 周；(4)C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)或红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)升高；(5)炎症因子升高。

3　常用类风湿关节炎动物模型分析

3.1　RA 造模依据

根据 RA 病症特点，其造模依据可概括为：(1)外源性抗原诱导自身免疫反应，活化 B 细胞，产生免疫复合物；(2)外源刺激活化 T 细胞免疫，引起强烈炎症和抗体反应；(3)外源性抗原激活免疫与补体系统，产生免疫复合物诱发关节炎症；(4)细胞因子失衡引起炎症反应；(5)风寒湿热等外邪留滞经脉，痹阻气血；(6)脾肾亏虚，湿邪内生，痹阻经脉；(7)寒瘀互结，留滞肌肤，痹阻筋脉。

3.2　RA 模型评价指标

综合 RA 动物模型，其评价指标可概括为：(1)关节肿胀、炎症；(2)血清炎症因子升高；(3)滑膜组织增生，炎性浸润；(4)软骨和骨破坏；(5)$CD4^+$、

$CD8^+$ T 细胞数量上升;(6)神倦毛枯,活动受限。

3.3 常用 RA 动物模型

目前用于 RA 模型制备的动物主要包括啮齿类、兔、非人灵长类动物、犬类、小型猪等,其中啮齿类较为常用[29]。基于西医理论指导的 RA 模型主要根据 RA 的临床特征或致病机制构建而成,包括用外源刺激如牛 II 型胶原(collagen II, CII)、弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)、或血清等诱导的炎症模型及相关转基因动物模型。基于西医理论指导的常用的 RA 动物模型见表 1。中医药研究所用的 RA 模型,主要在西医构建的动物模型基础上,依据中医理论对 RA 的认识增加了环境因素等的影响,进而构建不同证型的模型。基于中医理论指导的常用的 RA 动物模型见表 2。

表 1 基于西医理论指导的类风湿关节炎动物模型分析

Table 1 Animal models for RA based on Western medicine

模型 Models	造模方法 Modeling method	造模依据 Basis	评价指标 Index	疾病症状 Disease symptom	适用研究 Application
胶原诱导性 RA 模型 Collagen induced RA model	间隔 6 d 或 21 d 于大鼠足跖或尾部注射 0.3 mL CII 与弗氏佐剂混合液[30-31] Inject 0.3 mL of a mixture of CII and Freund's adjuvant into the soles or tails of rats at intervals of 6 or 21 days[30-31]	(1)	(1) (2)	符合西医(1)(3)(5) Meet with the Western medicine criteria (1) (3) (5)	RA 的炎症、免疫机制 Inflammation and immune response of RA
弗氏佐剂诱导性 RA 模型 Freund's adjuvant induced RA model	大鼠尾部及足趾多点注射 0.2 mL CFA 乳剂[32];或只于大鼠后肢注射 0.1 mL CFA[33] Inject 0.2 mL of CFA emulsion into the tail and toes of rats at multiple points[32] or 0.1 mL of CFA into the hind limbs of rats only[33]	(2)	(1) (2) (3)	符合西医(1)(2)(3)(5) Meet with the Western medicine criteria (1) (2)(3) (5)	RA 的炎症、免疫机制,炎性药物筛选 Inflammation and immune mechanisms of RA, and drug discovery
卵蛋白诱导的 RA 模型 Ovalbumin induced RA model	前 3 周以 10 g/L 卵蛋白乳化液注射于家兔背部,第 4 周末将 5 mg 卵蛋白注射到家兔膝关节腔内[34] Inject 10 g/L ovalbumin emulsion into the back of the rabbit for 3 weeks, and 5 mg ovalbumin into the knee joint cavity of the rabbit at the end of the fourth week[34]	(3)	(1) (2) (3) (4)	符合西医(1)(3)(5) Meet with the Western medicine criteria (1) (3) (5)	RA 软骨和骨破坏的机制、治疗 RA cartilage and bone destruct
降植烷诱导的 RA 模型 Norphytane induced RA model	在第 0、9、18 周于小鼠腹腔注射 0.5 mL 降植烷[35];或于大鼠尾部注射 150 μL 降植烷[36] Inject 0.5 mL pristine into mice at 0, 9, and 18 weeks, intraperitoneally[35]; or inject 150 μL pristane into tail of rats[36]	(2)	(1) (4) (5)	符合西医(1)(5) Meet with the Western medicine criteria (1) (5)	T 细胞免疫在 RA 的机制研究 T cell in RA
COMP 诱导的 RA 模型 RA model induced by cartilage oligomer matrix protein	在第 1、35 天分别于小鼠尾部注射 CFA 和 COMP 的等量混合乳剂[17] Inject the equal volume mixed emulsion of CFA and COMP into the tail of mice respectively on the 1st and 35th days[17]	(2)	(1) (5)	符合西医(1)(5) Meet with the Western medicine criteria (1) (5)	补体系统激活在 RA 的作用 Complement activation in RA
K/BxN 血清转移性 RA 模型 K/BxN serum metastatic RA model	第 0、2 天于小鼠尾静脉注射 150 μL K/BxN 小鼠血清[37]或 100 μL 血清和 50 μL PBS 混合液[38] 150 μL K/BxN mouse serum[37] or 100 μL serum and 50 μL PBS mixture[38] was injected into mice on day 0 and 2	(1) (2)	(1) (2) (3)	符合西医(1)(3)(5) Meet with the Western medicine criteria (1) (3) (5)	神经、免疫系统及肠道菌群在 RA 的作用 The role of nervous system, immune system and gut microbiota in RA
人 TNF 转基因(Tgtc)小鼠 RA 模型 Human TNF transgenic (Tgtc) mouse RA model	运用转基因技术整合 3'端修饰的 human TNF-α 基因序列获得具有 FVB 背景的转基因小鼠品系[39] Transgenic mouse strains with FVB background obtained by integrating the 3'-end modified human TNF-α gene sequence using transgenic technology[39]	(4)	(1) (2) (3) (4)	符合西医(1)(3)(5) Meet with the Western medicine criteria (1) (3) (5)	TNF-α 在 RA 的作用 The role of TNF-α in RA

注:表中造模依据见"3.1 RA 造模依据",评价指标见"3.2 RA 模型评价指标",疾病症状见"2.2 RA 的西医诊断标准与临床表现"。

Note. See "3.1 RA modeling basis" for basis, "3.2 RA model evaluation indexes" for indexes, and "2.2 Western medical diagnostic criteria and clinical manifestations of RA" for the disease symptoms.

表 2　基于中医理论指导的类风湿关节炎动物模型分析

Table 2　Animal models for RA based on the traditional Chinese medicine

模型 Models	造模方法 Modeling method	造模依据 Basis	评价指标 Index	疾病症状 Disease symptom	适用研究 Application
风寒湿痹证 RA 模型 Wind cold dampness arthralgia syndrome RA model	将大鼠置于风速 5 m/s，温度 0 ~ 2℃，湿度 90% ~ 95%的气候箱 4 h，持续 45 d，并在第 15 天于大鼠尾部注射 0.1 mL CFA[40-41] Put the rats in a climate box with wind speed of 5 m/s, temperature of 0 ~ 2℃, and humidity of 90% ~ 95%, 4 h/d for 45 days, and inject 0.1 mL of CFA into the tail on the 15th day[40-41]	(2) (5)	(1) (4) (5)	符合中医(1)(5) Meet with Chinese medicine (1) (5)	祛风除湿药对 RA 的作用 The effect of "Qufeng Chushi" medicine for RA
风湿热痹证 RA 模型 Rheumatism heat arthralgia syndrome RA model	在第 1、13 天于大鼠注射 0.3 mL、0.1 mL CII 乳剂，并将其置于温度 36 ~ 38℃，风速 5 m/s，相对湿度≥95%的气候箱 30 min/d，持续 18 d[42-43] Inject 0.3 mL and 0.1 mL CII emulsion into the rats respectively on the 1st and 13th days, and place in a climate box with temperature of 36 ~ 38℃, wind speed of 5 m/s, and humidity of ≥95%, 30 min/d for 18 days[42-43]	(1) (5)	(1) (2)	符合中医(1)(5) Meet with Chinese medicine (1) (5)	治疗湿热痹证药物的研究 The effect of "Qingre Chushi" medicine for RA
寒证 RA 模型 Cold syndrome RA model	于家兔注射卵蛋白 21 d 后将后腿置于(-20) ~ (-25)℃环境中冷冻 1.5 h[44]；或将 Tgtc 小鼠置于 8℃、90%湿度的气候箱，每次 2 h，每天 2 次，连续 14 d[45] Inject ovalbumin into rabbit , and place its hind legs in the environment of -20~25℃ and freeze them for 1.5 h[44] or place Tgtc mice in a climate box at 8℃ and 90% humidity for 2 hous per time, twice per day, and for 14 d[45]	(3) (5)	(1) (3) (4)	符合中医(1)(2)(4)(5) Meet with Chinese medicine (1) (2) (4) (5)	乌头等药物改善 RA 关节和骨破坏 Aconitum treatment for RA joint and bone destruction
脾虚证 RA 模型 Spleen deficiency syndrome RA model	大鼠以 0.5 mg/kg 利血平腹腔注射 14 d，并于第 15、21 天尾部注射 0.2 mL 和 0.1 mL CII 乳剂[46] Inject 0.5 mg/kg reserpine into rat for 14 d, and 0.2 mL and 0.1 mL of CII emulsion on the 15th and 21st days[46]	(1) (6)	(1) (2) (5)	符合中医(1)(5) Meet with Chinese medicine (1) (5)	脾虚与免疫在 RA 中的研究 Spleen deficiency and immunity in RA
肾虚证 RA 模型 Kidney deficiency syndrome RA model	切除大鼠双侧卵巢后分别以 200 μg、100 μg 的 CII 乳剂尾部注射[47-48] Inject 200 μg and 100 μg CII emulsion into the rat after bilateral ovariectomy[47-48]	(1) (6)	(1) (3) (4)	符合中医(1)(5) Meet with Chinese medicine (1) (5)	补肾固元药改善 RA 骨破坏 "Bushen Guyuan" medicine improves bone destruction in RA
淤血痹阻证 RA 模型 Congestion and obstruction syndrome RA model	在第 1、15 天于大鼠注射 CII 乳剂，并以 0.1 mg/kg 盐酸肾上腺皮下注射，2 h 后置于 4℃冷水中游泳 5 min，连续 14 d[49] Inject CII emulsion and 0.1 mg/kg adrenal hydrochloride into rat, on the 1st and 15th days and place in cold water at 4℃ for 5 minutes for 14 consecutive day[49]	(1) (5) (7)	(1) (2) (5)	符合中医(1)(4)(5) Meet with Chinese medicine (1) (4) (5)	祛瘀生新药物对 RA 血液流变的研究 Study on blood rheology of RA with "Quyu Shengxin" medicine

注：表中造模依据见"3.1 RA 造模依据"，评价指标见"3.2 RA 模型评价指标"，疾病症状见"1.2 RA 的中医诊断标准、临床表现及证治分型"。
Note. See "3.1 RA modeling basis for basis", "3.2 RA model evaluation indexes" for indexes, and "1.2 traditional Chinese medicine diagnostic criteria, clinical manifestations and evidence-based classification of RA" for the disease symptoms.

4　讨论

目前常用的基于西医理论指导制备的 RA 动物模型可基本满足 RA 研究需求，但存在的主要问题在于所构建的动物模型尚不能完全模拟人类 RA 的临床症状，只能表现部分症状，这是由于 RA 是系统性自身免疫性疾病，涉及多系统、多器官、多组织的病变。中医药研究常用 RA 模型，即病证结合模型，其制备方法是在西医理论构建的模型基础上，再根据中医理论对 RA"风寒湿三气杂至，合而为痹"的基本认识，通过气候模拟等环境因素对动物的影响而构建不同证型的模型；该类模型存在的主要问题在于：(1)中医"证型"是根据患者自身的机体表现而辨别寒热阴阳，而非像现有 RA 病证结合模型依靠环境气候偏驳来辩证；(2)动物模型的四诊合参尚未建立一个可行的标准，且现有的病证结合模

型,病和证实际上是独立开来的。

不论是中医还是西医理论认识的 RA,都是复杂、多因素且具有一系列病理表现的疾病。临床上 RA 在不同的病理阶段都有占主导的病机和病理表现,若依据其不同时空的主要症状,将病程规范划分为不同阶段,结合基因编辑技术、外源性刺激和环境影响等因素,精准构建既满足西医机制探讨,也符合中医理论的 RA 动物模型,将有利于推动 RA 研究进程。

参 考 文 献(References)

[1] Zhang W, Chen Y, Liu Q, et al. Emerging nanotherapeutics alleviating rheumatoid arthritis by readjusting the seeds and soils [J]. J Control Release, 2022, 345: 851-879.

[2] Sapart E, Sokolova T, de Montjoye S, et al. Should we use glucocorticoids in early rheumatoid arthritis? Results at 5 years from the early RA UCLouvain Brussels cohort [J]. Rheumatology (Oxford), 2021, 60(12): 5576-5582.

[3] 高红勤, 朱良春, 朱婉华, 等. 朱良春治疗痛风经验应用体会 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(8): 114-115.
Gao HQ, Zhu LC, Zhu WH, et al. Zhu Liangchun's experience in treating gout [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2014, 21(8): 114-115.

[4] 邵培培, 王北. 王为兰治疗类风湿关节炎临证经验 [J]. 北京中医药, 2017, 36(3): 242-244.
Shao PP, Wang B. Clinical experience of treating rheumatoid arthritis in Wang Weilan [J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2017, 36(3): 242-244.

[5] 姜泉, 王海隆, 巩勋, 等. 类风湿关节炎病证结合诊疗指南 [J]. 中医杂志, 2018, 59(20): 1794-1800.
Jiang Q, Wang HL, Gong X, et al. Guidelines of diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis disease and syndrome combination [J]. J Tradit Chin Med, 2018, 59(20): 1794-1800.

[6] Maijer KI, Gudmann NS, Karsdal MA, et al. Neo-epitopes-fragments of cartilage and connective tissue degradation in early rheumatoid arthritis and unclassified arthritis [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0149329.

[7] Smith MH, Berman JR. What is rheumatoid arthritis? [J]. JAMA, 2022, 327(12): 1194.

[8] Tsuchiya H, Ota M, Sumitomo S, et al. Parsing multiomics landscape of activated synovial fibroblasts highlights drug targets linked to genetic risk of rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2021, 80(4): 440-450.

[9] Rosetti F, Madera-Salcedo IK, Rodríguez-Rodríguez N, et al. Regulation of activated T cell survival in rheumatic autoimmune diseases [J]. Nat Rev Rheumatol, 2022, 18(4): 232-244.

[10] Ge X, Frank-Bertoncelj M, Klein K, et al. Functional genomics atlas of synovial fibroblasts defining rheumatoid arthritis heritability [J]. Genome Biol, 2021, 22(1): 247.

[11] Nayak RR, Alexander M, Deshpande I, et al. Methotrexate impacts conserved pathways in diverse human gut bacteria leading to decreased host immune activation [J]. Cell Host Microbe, 2021, 29(3): 362-377.

[12] Moura RA, Fonseca JE. B cells on the stage of inflammation in juvenile idiopathic arthritis: leading or supporting actors in disease pathogenesis? [J]. Front Med (Lausanne), 2022, 9: 851532.

[13] He J, Ju J, Wang X. The Current status of anti-citrullinated protein antibodies and citrullinated protein-reactive B cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(3): 2475-2485.

[14] Kristyanto H, Blomberg NJ, Slot LM, et al. Persistently activated, proliferative memory autoreactive B cells promote inflammation in rheumatoid arthritis [J]. Sci Transl Med, 2020, 12(570): eaaz5327.

[15] Sun W, Meednu N, Rosenberg A, et al. B cells inhibit bone formation in rheumatoid arthritis by suppressing osteoblast differentiation [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 5127.

[16] Giwa R, Brestoff JR. Mitochondria transfer to $CD4^+$ T cells may alleviate rheumatoid arthritis by suppressing pro-inflammatory cytokine production [J]. Immunometabolism, 2022, 4(2): e220009.

[17] Zhao Y, Urbonaviciute V, Xu B, et al. Cartilage oligomeric matrix protein induced arthritis-a new model for rheumatoid arthritis in the C57BL/6 mouse [J]. Front Immunol, 2021, 12: 631249.

[18] Tahamoli-Roudsari A, Tabatabaei R, Alvandpur N, et al. Peripheral distributions of IL-4-producing CD4 + T cells and CD4 + CD25 + FoxP3 + T cells (Tregs) in rheumatoid arthritis patients with poor response to therapy are associated with HLA shared epitope alleles and ACPA status [J]. Immunol Res, 2022, 70(4): 481-492.

[19] Ge C, Weisse S, Xu B, et al. Key interactions in the trimolecular complex consisting of the rheumatoid arthritis-associated DRB1* 04: 01 molecule, the major glycosylated collagen II peptide and the T-cell receptor [J]. Ann Rheum Dis, 2022, 81(4): 480-489.

[20] Zhao B, Grimes SN, Li S, et al. TNF-induced osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption are inhibited by transcription factor RBP-J [J]. J Exp Med, 2012, 209(2): 319-334.

[21] Wright HL, Chikura B, Bucknall RC, et al. Changes in expression of membrane TNF, NF-κB activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation [J]. Ann Rheum Dis, 2011, 70(3): 537-543.

[22] Wu J, Feng Z, Chen L, et al. TNF antagonist sensitizes synovial fibroblasts to ferroptotic cell death in collagen-induced arthritis mouse models [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 676.

[23] 罗帅, 李小枫, 黄成, 等. 炎症因子在类风湿关节炎中的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(3): 330-338.
Luo S, Li XF, Huang C, et al. Research progress of inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis [J]. Chin

Pharmacol Bull, 2022, 38(3): 330-338.

[24] Gupta VK, Cunningham KY, Hur B, et al. Gut microbial determinants of clinically important improvement in patients with rheumatoid arthritis [J]. Genome Med, 2021, 13(1): 149.

[25] Kishikawa T, Maeda Y, Nii T, et al. Metagenome-wide association study of gut microbiome revealed novel aetiology of rheumatoid arthritis in the Japanese population [J]. Ann Rheum Dis, 2020, 79(1): 103-111.

[26] He J, Chu Y, Li J, et al. Intestinal butyrate-metabolizing species contribute to autoantibody production and bone erosion in rheumatoid arthritis [J]. Sci Adv, 2022, 8(6): eabm1511.

[27] Zhao Y, Cheng M, Zou L, et al. Hidden link in gut-joint axis: gut microbes promote rheumatoid arthritis at early stage by enhancing ascorbate degradation [J]. Gut, 2022, 71(5): 1041-1043.

[28] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(9): 1580-1588.

[29] 惠香香, 白明, 苗明三. 基于数据挖掘的 274 例类风湿关节炎动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 79-86.
Hui XX, Bai M, Miao MS. Analysis of 274 rheumatoid arthritis animal models by data mining [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 79-86.

[30] 陈彩娥, 崔向军, 郑可, 等. 胶原诱导型大鼠类风湿关节炎模型的制备 [J]. 泰山医学院学报, 2012, 33(12): 821-823.
Chen CE, Cui XJ, Zheng K, et al. Preparation of collagen-induced rat rheumatoid arthritis model [J]. J Taishan Med Coll, 2012, 33(12): 821-823.

[31] 裴冰. IL-38 通过 SIRT1/HIF-1α 信号通路调节 Th17/Treg 平衡抑制胶原诱导性关节炎大鼠炎性反应 [D]. 沈阳: 中国医科大学; 2021.
Pei B. IL-38 regulates Th17/treg balance through SIRT1/HIF-1αsignaling pathway and inhibits inflammatory response in collagen-induced arthritis rats [D]. Shenyang: China Medical University; 2021.

[32] 张瑶, 屠莹, 胡占嵩, 等. 祛风舒筋丸对佐剂关节炎大鼠免疫调节及血管内皮生长因子、细胞黏附分子-1 表达的影响 [J]. 安徽医药, 2019, 23(3): 454-458.
Zhang Y, Tu Y, Hu ZS, et al. The effect of Qufengshujin pills on immunoregulation and expression of VEGF and ICAM-1 in rats with adjuvant arthritis [J]. Anhui Med Pharm J, 2019, 23(3): 454-458.

[33] 刘佳钰, 李锐, 周威, 等. 薯蓣皂苷对弗氏佐剂诱导类风湿关节炎大鼠的影响 [J]. 中医学报, 2021, 36(10): 2173-2177.
Liu JY, Li R, Zhou W, et al. Effect of protodioscin on rheumatoid arthritis rats induced by freund's adjuvant [J]. J Chin Med, 2021, 36(10): 2173-2177.

[34] 曹庆勇, 王培源, 王巧云, 等. 通痹胶囊对类风湿性关节炎模型兔关节病变的影响 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5): 1034-1041.
Cao QY, Wang PY, Wang QY, et al. Effects of Tongbi capsule on joint lesions in rabbits with rheumatoid arthritis [J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 43(5): 1034-1041.

[35] 陶云霞, 蔡磊, 沈辉, 等. 降植烷诱导小鼠类风湿关节炎的模型 [J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(11): 1498-1500.
Tao YX, Cai L, Shen H, et al. Pristine-induced rheumatoid arthritis model in mice [J]. Chin J Immunol, 2015, 31(11): 1498-1500.

[36] Tanner MR, Huq R, Sikkema WKA, et al. Antioxidant carbon nanoparticles inhibit fibroblast-like synoviocyte invasiveness and reduce disease severity in a rat model of rheumatoid arthritis [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(10): 1005.

[37] 闫梦真, 余婕, 董甜甜, 等. 由肠道菌群变化研究资木瓜总苷对 K/BxN 小鼠血清转移性关节炎的治疗作用 [J]. 现代免疫学, 2020, 40(4): 265-271.
Yan MZ, Yu J, Dong TT, et al. Therapeutic effect of TSCS on K/BxN mouse serum-transfer arthritis via gut microbiota disturbance [J]. Curr Immunol, 2020, 40(4): 265-271.

[38] Liao YC, Wu SY, Huang YF, et al. NOX2-deficient neutrophils facilitate joint inflammation through higher pro-inflammatory and weakened immune checkpoint activities [J]. Front Immunol, 2021, 12: 743030.

[39] 朱兴旺, 赵文婷, 陈永, 等. 三水白虎汤对类风湿关节炎人 TNF-α 转基因小鼠模型的作用研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(4): 480-484.
Zhu XW, Zhao WT, Chen Y, et al. Effect of Sanshui Baihu Decoction on the human TNF-α alpha transgenic mice with rheumatoid arthritis [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2020, 40(4): 480-484.

[40] 林也, 戴宗顺, 张婷, 等. 基于"以方测证"的类风湿关节炎风寒湿痹证动物模型的构建研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(5): 668-672.
Lin Y, Dai ZS, Zhang T, et al. Construction of animal model of rheumatoid arthritis with wind cold dampness arthralgia syndrome based on the theory of "testing syndrome by formula" [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2021, 41(5): 668-672.

[41] 李鑫, 魏艳霞, 林也, 等. 风寒湿外邪对痹证(佐剂性关节炎)发生发展的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(12): 1496-1501.
Li X, Wei YX, Lin Y, et al. Effect of exogenous evils of wind-cold-damp on the occurrence and development of Bi syndrome (adjuvant-induced arthritis) [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2017, 37(12): 1496-1501.

[42] 马腾茂, 刘飞, 王蓉, 等. 基于主成分分析和聚类分析的秦艽不同配伍药对对风湿热痹类风湿关节炎大鼠的作用研究 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2255-2260.
Ma TM, Liu F, Wang R, et al. Based on principal component analysis and cluster analysis to study effects of gentianae *Macrophyllae radix* in cold and heat compatibility in rheumatic

fever arthralgia rheumatoid arthritis model rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(11): 2255-2260.

[43] 马腾茂, 刘飞, 王蓉, 等. 秦艽寒热不同配伍药对对风湿热痹类风湿关节炎大鼠 MMP-3、TIMP-1 表达及踝关节病理学改变的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1812-1819.
Ma TM, Liu F, Wang R, et al. Effect of Gentianae *Macrophyllae radix* in different combinations on expression of MMP-3, TIMP-1, and ankle pathological changes in wind-damp-heat arthralgia rheumatoid arthritis model rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(9): 1812-1819.

[44] 袁博, 王金海, 方晓丽, 等. 家兔类风湿关节炎寒证模型的建立与病理学研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(7): 3117-3120.
Yuan B, Wang JH, Fang XL, et al. Establishment and pathological study of cold syndrome animal model of rheumatoid arthritis in rabbits [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(7): 3117-3120.

[45] 朱兴旺, 赵文婷, 赵晓峰, 等. 基于人 TNF-α 转基因关节炎小鼠建立寒痹模型及评价 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(4): 448-452, 461.
Zhu XW, Zhao WT, Zhao XF, et al. Establishment and evaluation of cold arthralgia model based on human TNF-α transgenic arthritis mice [J]. Chin J Immunol, 2022, 38(4): 448-452, 461.

[46] 杜中平, 赵宏艳, 肖诚, 等. 类风湿性关节炎脾虚证病证结合动物模型的建立 [J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2012, 14(2): 1384-1392.
Du ZP, Zhao HY, Xiao C, et al. Establishment of disease-syndrome combination rat model of rheumatoid arthritis with spleen deficiency [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2012, 14(2): 1384-1392.

[47] 艾景录, 吕爱平, 徐世杰, 等. 性腺功能异常型肾虚痹证发生机理的实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1995, 1(1): 42-44.
Ai JL, Lyu AP, Xu SJ, et al. Experimental study on pathogenesis of kidney deficiency arthralgia syndrome with gonadal dysfunction [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 1995, 1(1): 42-44.

[48] 陶黎, 刘梅洁, 薛欣, 等. 益肾蠲痹丸对肾虚胶原诱导性关节炎大鼠踝关节骨质破坏的影响 [J]. 中医杂志, 2018, 59(5): 420-426.
Tao L, Liu MJ, Xue X, et al. Impact of yishen juanbi wan on ankle bone destruction of kidney deficiency collagen-induced arthritis rats [J]. J Tradit Chin Med, 2018, 59(5): 420-426.

[49] 李茜, 梁晓东, 曹永仓, 等. 类风湿关节炎血瘀证大鼠模型的制备及评价 [J]. 山东中医药大学学报, 2017, 41(5): 476-481.
Li Q, Liang XD, Cao YC, et al. Preparation and evaluation about rat models with blood stasis syndrome of rheumatoid arthritis [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2017, 41(5): 476-481.

[收稿日期] 2022-05-17

周利润,崔晓兰. 慢性阻塞性肺疾病相关动物模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1121-1127.
Zhou LR, Cui XL. Development of an animal model for chronic obstructive pulmonary-related disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1121-1127.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.015

慢性阻塞性肺疾病相关动物模型研究进展

周利润,崔晓兰*

(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

【摘要】 慢性阻塞性肺疾病急性加重期(acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease,AECOPD)是指在慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)的基础上持续恶化,并超出了日常变异范围,目前尚无标准 COPD 及 AECOPD 动物模型。AECOPD 动物模型是研究 AECOPD 病理机制及寻找有效诊疗手段的基础。COPD 制备方法包括单纯烟熏法、烟熏联合气管滴注脂多糖法、汽车尾气吸入法等。AECOPD 制备方法主要是在 COPD 模型基础上进行细菌病毒感染。该文梳理总结了国内外 COPD 及 AECOPD 动物模型的制备方法、评价指标,力争为科研和医务工作者提供有益参考。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;慢性阻塞性肺疾病急性加重期;动物模型建立
【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2022)08-1121-07

Development of an animal model for chronic obstructive pulmonary-related disease

ZHOU Lirun, CUI Xiaolan*

(Institute of Traditional Chinese Medicine, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)
Corresponding author: CUI Xiaolan. E-mail: xiaolancui2812@163.com

【Abstract】 Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD) refers to the continuous deterioration of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) beyond the scope of daily variation. At present, there are no standard animal models for COPD or AECOPD. The animal model for AECOPD is applied in studying the pathological mechanisms of AECOPD and determining effective diagnosis and treatment method. COPD preparation method include simple passive smoking, passive smoking combined with tracheal instillation of the lipopolysaccharide method, and automobile exhaust inhalation. AECOPD model preparation is usually bacterial or viral infection of the COPD model. This brief review focuses on COPD and AECOPD animal models from the perspectives of model creation and evaluation, providing useful information for researchers and medical practitioners.

【Keywords】 chronic obstructive pulmonary disease; acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease; establishment of animal model
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种进行性、以持续性呼吸症状和气流受限为特征的慢性呼吸系统疾病,并与气道和肺部对氮氧化物颗粒或有害气体的慢性炎症反应增强有关,慢性气流受限由小气道阻塞、慢性支气管炎和肺实质破坏(肺气肿)共同作用所致,可影响日常活动和总体生活质量[1-2]。在全球范围内受影响人口约 3.28 亿,且高龄时患病率更高,约 10%为中年人、25%是大于 70 岁的老年

[基金项目]国家重点研发计划(2018YFE0102300),中国中医科学院科技创新工程(C12021A04606)。
Funded by National Key Research and Development Plan (2018YFE0102300), Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Chinese Medicine Science (C12021A04606).
[作者简介]周利润(1998—),男,硕士,研究方向:中药学。Email:1250414614@qq.com
[通信作者]崔晓兰,女,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药抗病毒及抗感染药理研究。Email:xiaolancui2812@126.com

人[3]。COPD 目前是第三大死亡原因,死亡人数超过 300 万人/年[4]。由于人口老龄化日益严重以及历史和当前的吸烟率较大,导致 COPD 的全球死亡率正在逐年上升,并且世界卫生组织预测到 2030 年 COPD 的患病率和死亡率将总体上升 30%[5-6]。吸烟每年导致约 500 万例死亡,是 COPD 发生的主要内在风险因素,但也有其他外部风险因素,包括暴露于烟草烟雾环境下的二级和三级吸烟,以及职业暴露于灰尘、有毒烟雾和蒸汽、燃烧生物燃料造成的室内空气污染和室外空气污染[7-9]。

COPD 与破坏肺实质组织有关,破坏正常的修复和防御机制,这种肺损伤导致慢性空气潴留、进行性气流受限和对入侵病原体的易感性增加[10]。研究表明,COPD 患者的肺部可能比健康肺部更容易感染更多的致病菌,46% ~ 72%的 COPD 患者的痰液中发现了细菌,并且大约 50%的 COPD 的恶化由细菌引起,细菌过度生长可能是 COPD 加重的诱因[1,11]。气道细菌感染使大多数 COPD 患者的病程复杂化,导致症状加重、肺功能进一步受限、急性发作以及生活质量下降[5]。COPD 的急性加重(AECOPD)是指患者咳嗽、咳痰、呼吸困难持续恶化并超出了日常变异范围,随着病情进展而不断加剧,降低了机体的气体交换能力,导致低血氧症、高碳酸血症、肺组织纤维化等,最终发展为肺源性心脏病,导致全身多器官衰竭,最后造成生活质量下降甚至会引起死亡。在疾病进行过程中可能出现发热、炎痛等明显合并加重症状,其主要诱因是细菌病毒感染[12]。细菌病毒感染 COPD 患者所致 AECOPD 会使病情进一步加重,临床治疗难度进一步加大,死亡率进一步增加[13]。

本文将分析 COPD 以及 AECOPD 动物模型的建立方法,以期为构建适宜稳定的 AECOPD 动物模型,为深入研究 AECOPD 的致病机理、耐药菌感染相关机制及开发新的抗 AECOPD 药物奠定基础。

1 慢性阻塞性肺疾病动物模型建立方法与评价指标

1.1 常见慢性阻塞性肺疾病动物模型

目前 COPD 动物模型常用的实验动物包括:小鼠、大鼠、豚鼠、果蝇、犬、猪、雪貂、猴等,其中应用最为广泛的为啮齿类动物[14]。

1.1.1 慢性阻塞性肺疾病鼠类模型

鼠类与人有大约 90%的相似基因,许多生理通路和过程在临床上是相关的[8]。鼠类品种繁多包括大小鼠、豚鼠、仓鼠、金黄地鼠等[15],繁殖周期短、利于繁殖、饲养简单、成本较低以及目前对鼠类基因组的研究比较透彻[16]。豚鼠的肺部解剖结构类似于人的呼吸道结构,呼吸上皮细胞排列均匀,可建立与人类相似 COPD 的疾病发作特点[17]。临床上 COPD 患者多由于吸烟引起的,大小鼠为专属性用鼻呼吸动物,对烟的滤过效率较低,建模方便快捷[18],炎症反应明显,造模稳定性高。某些品种经过基因修饰后对烟雾更为敏感,可用于研究参与 COPD 病理生理过程性病变的某些特定基因和蛋白的变化[19]。

1.1.2 慢性阻塞性肺疾病小型猪模型

小型猪的肺组织比鼠类动物更为发达,是目前建立 COPD 模型较为理想的动物,其肺叶明显,左二右三的结构与人类类似,具有呼吸性的细支气管,呼吸道黏膜下腺体较为丰富,容易感染呼吸道的相关疾病,气管较为粗大,易于相关操作和评价,诱导 COPD 模型相对容易[20-21]。

1.1.3 慢性阻塞性肺疾病果蝇模型

果蝇的呼吸系统与哺乳动物的肺部系统相似,在发育和功能方面有很多相似之处,可以很清晰地观察到气道的早期结构损伤,可以对其所涉及的信号通路和细胞过程进行相关遗传和药理学操作,其可以关联人类疾病基因,可通过果蝇筛选人 COPD 的相关基因[22]。可以研究气道上皮屏障功能和先天性免疫的异常[23]。

1.1.4 慢性阻塞性肺疾病犬模型

犬极易发生自发性过敏反应,受到刺激后支气管收缩反应的时间过程与患者相似,并且支气管痉挛的程度与刺激的持续时间和强度成正比[24]。人类吸烟是导致 COPD 的主要原因,犬暴露于香烟烟雾后出现的肺部病变与人类 COPD 中出现的病变类似[25-26]。目前犬已被广泛用于 COPD 领域的研究,长期研究显示这些肺功能参数随着时间的推移具有显著的稳定性[27-29]。因此,可以在 COPD 的慢性犬模型中评估肺功能的变化,包括评估气道高反应性。犬像小型猪一样体型相对较大且易于操作。

1.1.5 慢性阻塞性肺疾病雪貂模型

雪貂作为十分适合研究呼吸系统疾病的动物,有数据表明它们与人类气道生理学和粘膜下腺体的分布十分相似。研究表明将雪貂暴露于香烟烟雾中后,发现它们与人类 COPD 的复杂临床特征接近,暴露在烟雾中的雪貂表现出较高水平的气道阻

塞,伴有杯状细胞化生、增生和小气道粘液表达增加[30],具有明显的慢性支气管炎和肺气肿的特征。

1.1.6　慢性阻塞性肺疾病猴模型

灵长类动物在生理学、遗传学、解剖学、肺部免疫系统等方面都与人有着高度的一致性,猴常被用作实验动物,其中恒河猴具有与人类及其相似的肺部结构,具有二分支的细支气管,肺泡分布广泛,纤毛、杯状细胞排列顺序与人类极为类似,在吸入香烟烟雾后可表现出慢性细支性支气管炎、肺气肿以及其他气道病理学改变,所具备的独特优势用于建立 COPD 最为合适[31-33]。

1.2　慢性阻塞性肺疾病动物模型常见建立方法

COPD 临床发病机制复杂,已有多种建立方法,常见的建模方法为将实验动物暴露于香烟烟雾、脂多糖、蛋白酶、菌毒株以及大气颗粒物等。

1.2.1　香烟诱导

香烟是导致 COPD 的主要原因,临床上大约有 90%的患者由吸烟引起,流行病学研究表明吸烟者比不吸烟者更容易患 COPD[34]。香烟烟熏造模的方法主要有两种:(1)直接经鼻烟熏:将烟雾直接输送入动物鼻腔内;(2)全身暴露法:将动物置于连接烟雾发生装置的容器进行全身暴露烟熏。研究表明单纯鼻接触和全身接触烟雾导致肺损伤的机制可能是相同的[35]。香烟烟雾可直接损害气道上皮细胞,使纤毛结构和功能受损,引起支气管平滑肌痉挛收缩和粘液分泌,气道阻力增加,颗粒物会沉积在小气道中,引起慢性炎症反应。这种慢性炎症反应会破坏肺实质、肺泡壁,并永久扩张小气道,从而诱发肺气肿和气道重塑[36]。

单纯的香烟烟熏进行造模,造模时间长、成模慢,持续时间多为 4 ~ 6 个月甚至更长时间[37],且烟熏过程稳定性不易保证,易出现死亡等不良情况。

1.2.2　弹性蛋白酶诱导

COPD 主要临床表现症状为肺气肿,目前蛋白酶作用是肺气肿、急性肺损伤模型建立最常见的方法,蛋白酶—抗蛋白酶失衡也是 COPD 发病机制最经典的学说,所以蛋白酶(弹性蛋白酶或木瓜蛋白酶或猪胰腺弹性蛋白酶)的气管内滴注也可用于研究 COPD 的相关症状的近似表现[38]。木瓜蛋白酶是最常用于诱导肺部肺气肿病变的蛋白水解酶。通过接触性给予蛋白酶可诱导单纯性肺部症状外,还有肌肉萎缩、体重减轻以及全身性炎症反应[39]。有研究表明通过气管内滴注蛋白酶会使模型动物肺泡腔扩大、肺水肿、炎症浸润、血氧饱和度下降等症状,与临床症状具有一致性[40]。

此方法相比于香烟烟熏法具有成模时间短、成本较低以及易于操作等优点,气管滴注弹性蛋白酶仅需要 21 d 即可建立肺气肿模型,用来代替慢性阻塞性肺疾病模型[41]。蛋白酶进行造模虽然具有成模时间短操作方便等优点,但其只能出现部分病理症状改变,与临床 COPD 发病机制仍有差别。

1.2.3　脂多糖诱导

作为内毒素属的一种重要物质,脂多糖是革兰氏阴性菌的细胞壁成分,能刺激炎性细胞产生并释放炎性介质,产生一系列的炎性反应,引起黏液分泌过多、气道高反应、炎性细胞浸润、肺功能下降、肺气肿、肺部纤维化等 COPD 典型症状[42]。目前脂多糖常单独气管注射或香烟烟熏联合气管滴注脂多糖来建立 COPD 动物模型,严重的可出现肺动脉高压等严重症状[43-44]。脂多糖进行造模的缺点与蛋白酶诱导的慢性阻塞性肺疾病模型基本一致。

1.2.4　空气颗粒物诱导

空气中的污染物如 PM2.5、SO_2、NO_2、汽车尾气、臭氧等物质均能对肺部产生不同程度的影响,也是慢性阻塞性肺疾病形成的重要原因。PM2.5 可参与慢阻肺、支气管哮喘等多种呼吸系统疾病的发生和发展,研究表明,PM2.5 的浓度升高可增加慢阻肺的患病率,并且慢阻肺的死亡率随着其浓度的增加而升高,目前常见的 PM2.5 造模方法有吸入和做成混悬液滴鼻或者气管滴注进行[45]。SO_2 是工业烟雾的主要成分,在阻塞性气道疾病的发病机制中起着重要作用。吸入 SO_2 会产生多种病理、炎性以及生理反应,与慢性支气管炎症状相似[46]。同时 NO_2 吸入、香烟尘雾滴鼻、臭氧熏蒸以及汽车尾气的吸入和滴鼻以及与 LPS 联合应用也曾应用于慢性阻塞性肺疾病的模型建立[47-50]。

1.3　慢性阻塞性肺疾病动物模型常见评价方法

1.3.1　一般体征评价

COPD 动物模型建立过程中会出现体重减轻、饮食量减少、饮水量增多的一般表现,还会出现咳嗽、黏液分泌增多、毛色暗淡枯槁无光泽、精神萎靡、运动量下降等表现。有研究表明临床慢性阻塞性肺疾病患者还会出现体重指数下降、皮下脂肪、内部储备脂肪以及白蛋白减少等状况[51]。模型建立动物表现与临床基本一致。

1.3.2　肺功能评价

肺功能检测是 COPD 患者临床诊断的黄金标

准,是检测患者肺容积大小以及是否存在呼吸受限的重要指标,随着技术水平的发展,动物适配的肺功能检测设备应用也越来越广泛。有创无创设备均能实现对于肺功能的检测,有创检测可在麻醉条件下通过呼吸机辅助测量动物每秒用力呼气容积/用力肺活量的比值来表示气道受限情况,与临床基本一致[52]。无创检测可通过相关肺功能仪检测呼吸气峰流速、潮气量、吸气阻力、动态肺顺应性、呼气量、50% 呼气峰流速、呼吸频率等相关肺功能指标[53-55]。

1.3.3 病理组织评价

肺部实质性病理变化能直观表现肺组织的病变情况,测定平均线性间隔、平均肺泡数和支气管壁厚/直径比值能较好的表现出肺部病变情况。COPD 模型动物会出现肺泡管、肺泡囊和肺泡的明显扩张,肺泡结构紊乱,肺泡壁有变薄和破裂的迹象,有些已经融合成肺大疱。并且出现纤毛细胞变性坏死以及纤毛倒伏、断裂、粘连、脱落等情况,上皮细胞脱落、杯状细胞化生、黏液分泌增多等。肺动脉壁增厚,管腔变窄,有不同程度的外周中性粒细胞、淋巴细胞和单核巨噬细胞浸润[56]。

1.3.4 其他评价

血气分析、血氧饱和度、炎性因子、炎性细胞等也可以用来辅助评价慢性阻性肺疾病模型是否建立成功。如肺组织和肺支气管可出现多种炎性细胞浸润,炎性细胞的浸润聚集也是炎症发展过程中的重要环节;各种细胞因子在慢阻肺初期也会有较大变化,对模型的鉴定和评价也有重要意义;在 COPD 后期还会出现血氧饱和度下降、低血氧症和高碳酸症等表现,所以在评价慢性阻塞性肺疾病模型时血氧饱和度也是重要的实验指标[57-59]。

2 慢性阻塞性肺疾病急性加重期动物模型建立方法与评价

AECOPD 模型的建立在 COPD 模型建立的基础上进行,所以 AECOPD 模型建立和 COPD 模型所用动物相互重合。本段只对 AECOPD 模型建立方法和评价进行讨论。

2.1 慢性阻塞性肺疾病急性加重期动物模型建立方法

感染是导致 COPD 急性加重的重要原因,其中细菌感染约占 60%,病毒感染占 30% 左右,其他非典型感染占 10%[60-61]。

在 AECOPD 患者的痰液中分离到的主要细菌株有铜绿假单胞菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌等,分离到的病毒主要有甲型流感病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒等[62-65]。目前临床常见的 AECOPD 模型的建立均是在 COPD 模型的基础上进行滴鼻或者气管滴注细菌病毒来诱导。

如祁海燕等[66]采用弹性蛋白酶气管滴注建立肺气肿大鼠模型,COPD 模型建立成功后第 2 天肺气肿大鼠气管内滴注 0.15 mL 1×10^{12} CFU/mL 的肺炎链球菌琼脂悬液,构建 AECOPD 大鼠模型。Wang 等[67]则通过采用气管内注射 18 单位的猪胰腺弹性蛋白酶建立金黄地鼠肺气肿模型,并在模型建立的基础上右肺内注射含有 3×10^8 CFU/mL 流感嗜血杆菌的琼脂珠 100 μL。张甜甜等[68]采用香烟烟熏法建立慢阻肺大鼠模型,模型建立成功后第 2 天,COPD 大鼠气管内滴注 0.2 mL 浓度为 2.4×10^9 CFU/mL 的肺炎链球菌琼脂悬液或浓度为 6×10^8 CFU/mL 铜绿假单胞菌悬液。Guan 等[69]采用香烟烟熏法建立慢阻肺小鼠模型后鼻腔缓慢滴入 30 μL 10^8 CFU/mL 的流感嗜血杆菌菌液,Roos 等[64]则在 COPD 模型基础上采用 35 μL 10^6 CFU/mL 的流感嗜血杆菌菌液建立模型。Xiao 等[62]采用香烟烟熏法建立慢阻肺小鼠模型后鼻腔缓慢滴入 50 μL 2LD50 的甲型 H1N1 流感病毒感染建立模型。

香烟烟雾和细菌、病毒感染对气道损伤有协同作用,这种损伤可能是通过对弹性蛋白酶活性的影响介导的,且感染性物质的入侵会使气道炎症和全身炎症进一步增加。细菌或病毒感染激活相关信号通路,可调控细胞因子和趋化因子的基因表达,进一步促进疾病的发展,COPD 咳痰困难粘液分泌过度更易于细菌病毒的定植,且细菌感染相关病理变化与 COPD 进行和发展也具有高度一致性[62]。

2.2 慢性阻塞性肺疾病急性加重期动物模型评价方法

有研究表明 AECOPD 动物模型在滴入菌液后会出现活动能力下降、呼吸急促、活动后加剧、出现哮鸣音、咳嗽进一步加重,与临床表现一致[70]。细菌标志物如 C 反应蛋白、降钙素原等因子的急剧增加,呼吸频率、呼吸气峰流速进一步增加,而潮气量和呼气量均减少,50% 呼气峰流速也下降明显[71]。并且可以在肺组织匀浆中培养出相关菌落[72]。

3 小结

临床上吸烟是导致慢性阻塞性肺疾病的主要原因,所以目前最常用的模型为单纯香烟烟熏和烟熏联合气管注射脂多糖来进行造模。但单纯被动

吸烟法具有造模时间长、难度大,饲养过程中动物状态不容易保证,烟熏过程中容易死亡等缺点,而被动吸烟联合气管注射脂多糖虽然能很大程度上节省时间但 LPS 主要是引起急性肺损伤,而临床上 COPD 患者多由吸烟等颗粒物沉积造成的,不能更好的还原临床,所以急需一种能够更好的还原临床发病机制的动物模型来进行药物筛选和评价实验。目前急性加重期模型建立还处于初期阶段,甚至慢性阻塞性肺疾病还未见统一标准,标准的动物模型的缺失仍然是阻碍 COPD、AECOPD 研究发展的关键原因之一。

参　考　文　献(References)

[1] Janjua S, Mathioudakis AG, Fortescue R, et al. Prophylactic antibiotics for adults with chronic obstructive pulmonary disease: a network meta-analysis [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2021, 1(1): CD013198.

[2] Raherison C, Girodet PO. Epidemiology of copd [J]. Eur Respir Rev, 2009, 18(114): 213-221.

[3] Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016 [M]. Geneva: World Health Organization; 2018.

[4] Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2163-2196.

[5] Shukla SD, Walters EH, Simpson JL, et al. Hypoxia-inducible factor and bacterial infections in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respirology, 2020, 25(1): 53-63.

[6] Keely S, Talley NJ, Hansbro PM. Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease [J]. Mucosal Immunol, 2012, 5(1): 7-18.

[7] Fischer BM, Voynow JA, Ghio AJ. COPD: balancing oxidants and antioxidants [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2015, 10: 261-276.

[8] Jones B, Donovan C, Liu G, et al. Animal models of COPD: what do they tell us? [J]. Respirology, 2017, 22(1): 21-32.

[9] López-Campos JL, Tan W, Soriano JB. Global burden of COPD [J]. Respirology, 2016, 21(1): 14-23.

[10] Nseir S, Pompeo CD, Cavestri B, et al. Multiple-drug-resistant bacteria in patients with severe acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: prevalence, risk factors, and outcome [J]. Crit Care Med, 2006, 34(12): 2959-2966.

[11] Parameswaran G, Sethi S. Long-term macrolide therapy in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Can Med Assoc J, 2014, 186: 1148-1152.

[12] 李桂民, 李耀辉, 曾璐. 疏风解毒胶囊治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期的 Meta 分析 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(7): 1513-1522.
Li GM, Li YH, Zeng L. Meta-analysis of Shufeng Jiedu Capsule in treatment of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(7): 1513-1522.

[13] 赵丽芹. 136 例慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者呼吸道深处痰液标本的细菌培养结果及其耐药性分析 [J]. 抗感染药学, 2021, 18(2): 230-232.
Zhao LQ. Bacterial culture results and drug resistance analysis of sputum samples from deep respiratory tract of 136 patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Anti Infect Pharm, 2021, 18(2): 230-232.

[14] 刘迪, 张洪春. 慢性阻塞性肺疾病基因工程动物模型研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(4): 59-68.
Liu D, Zhang HC. Advances in genetically engineered animal models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin Biotechnol, 2020, 40(4): 59-68.

[15] 姜友军, 张培蓓, 叶贤伟. 慢性阻塞性肺疾病鼠类动物模型研究进展 [J]. 医学综述, 2021, 27(7): 1350-1357.
Jiang YJ, Zhang PB, Ye XW. Research progress in rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Med Recapitul, 2021, 27(7): 1350-1357.

[16] 林敏聪, 张胜军. 慢性阻塞性肺疾病动物模型及评价方法研究进展 [J]. 海南医学, 2020, 31(15): 2006-2010.
Lin MC, Zhang SJ. Advances in animal models and evaluation methods of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Hainan Med J, 2020, 31(15): 2006-2010.

[17] 陈美凤, 加慧, 夏书月. 不同 COPD 动物模型特点及应用的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 563-569.
Chen MF, Jia H, Xia SY. Research progress on the characteristics of animal models of chronic obstructive pulmonary disease and related clinical applications [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 563-569.

[18] Rydell-Törmänen K, Johnson JR. The applicability of mouse models to the study of human disease [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1940: 3-22.

[19] Barreiro E, Wang X, Tang J. COPD: preclinical models and emerging therapeutic targets [J]. Expert Opin Ther Targets, 2019, 23(10): 829-838.

[20] 张迪, 管宇, 夏艺, 等. 慢性阻塞性肺疾病动物模型研究进展 [J]. 第二军医大学学报, 2018, 39(3): 302-307.
Zhang D, Guan Y, Xia Y, et al. Advances in animal models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2018, 39(3): 302-307.

[21] Wemyss-Holden SA, Porter KJ, Baxter P, et al. The laryngeal mask airway in experimental pig anaesthesia [J]. Lab Anim, 1999, 33(1): 30-34.

[22] Tanner L, Single AB. Animal models reflecting chronic obstructive pulmonary disease and related respiratory disorders: translating pre-clinical data into clinical relevance [J]. J Innate Immun, 2020, 12(3): 203-225.

[23] Loxham M, Davies DE. Phenotypic and genetic aspects of epithelial barrier function in asthmatic patients [J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 139(6): 1736-1751.

[24] Chapman RW. Canine models of asthma and COPD [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2008, 21(5): 731-742.

[25] Park SS, Kikkawa Y, Goldring IP, et al. An animal model of cigarette smoking in beagle dogs: correlative evaluation of effects on pulmonary function, defense, and morphology [J]. Am Rev Respir Dis, 1977, 115(6): 971-979.

[26] Zwicker GM, Filipy RE, Park JF, et al. Clinical and pathological effects of cigarette smoke exposure in beagle dogs [J]. Arch Pathol Lab Med, 1978, 102(12): 623-628.

[27] House A, Celly C, Young S, et al. Bronchoconstrictor reactivity to NKA in allergic dogs: a comparison to histamine and methacholine [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2001, 14(2): 135-140.

[28] Snapper JR, Drazen JM, Loring SH, et al. Distribution of pulmonary responsiveness to aerosol histamine in dogs [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1978, 44(5): 738-742.

[29] Snapper JR, Drazen JM, Loring SH, et al. Vagal effects on histamine, carbachol, and prostaglandin F_2 alpha responsiveness in the dog [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1979, 47(1): 13-16.

[30] Raju SV, Kim H, Byzek SA, et al. A ferret model of COPD-related chronic bronchitis [J]. JCI Insight, 2016, 1(15): e87536.

[31] Cai Y, Sugimoto C, Arainga M, et al. *In vivo* characterization of alveolar and interstitial lung macrophages in rhesus macaques: implications for understanding lung disease in humans [J]. J Immunol, 2014, 192(6): 2821-2829.

[32] Plopper CG, Hyde DM. The non-human primate as a model for studying COPD and asthma [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2008, 21(5): 755-766.

[33] 蒋超文, 陈琰, 王斌. 慢性阻塞性肺疾病动物模型研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2018, 11(4): 499-501.
Jiang CW, Chen Y, Wang B. Research progress of animal models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin J Lung Dis (Electron Ed), 2018, 11(4): 499-501.

[34] Carraro S, Scheltema N, Bont L, et al. Early-life origins of chronic respiratory diseases: understanding and promoting healthy ageing [J]. Eur Respir J, 2014, 44(6): 1682-1696.

[35] Shu J, Li D, Ouyang H, et al. Comparison and evaluation of two different methods to establish the cigarette smoke exposure mouse model of COPD [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15454.

[36] Caramori G, Kirkham P, Barczyk A, et al. Molecular pathogenesis of cigarette smoking-induced stable COPD [J]. Ann N Y Acad Sci, 2015, 1340: 55-64.

[37] Cloonan SM, Glass K, Laucho-Contreras ME, et al. Mitochondrial iron chelation ameliorates cigarette smoke-induced bronchitis and emphysema in mice [J]. Nat Med, 2016, 22(2): 163-174.

[38] Khedoe PPSJ, Rensen PCN, Berbée JFP, et al. Murine models of cardiovascular comorbidity in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016, 310(11): L1011-L1027.

[39] Lüthje L, Raupach T, Michels H, et al. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model [J]. Respir Res, 2009, 10(1): 7.

[40] Takata F, Tominaga K, Koga M, et al. Elevated permeability of the blood-brain barrier in mice intratracheally administered porcine pancreatic elastase [J]. J Pharmacol Sci, 2015, 129(1): 78-81.

[41] Longhini-dos-Santos N, Barbosa-de-Oliveira VA, Kozma RH, et al. Cell therapy with bone marrow mononuclear cells in elastase-induced pulmonary emphysema [J]. Stem Cell Rev Rep, 2013, 9(2): 210-218.

[42] 李竹英, 田春燕, 高风丽. 单因素诱导的慢性阻塞性肺疾病动物模型研究进展[J]. 中国中医急症, 2018, 27(3): 552-554.
Li ZY, Tian CY, Gao FL. Research progress of animal model of chronic obstructive pulmonary disease induced by single factor [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2018, 27(3): 552-554.

[43] 曹淑花, 玄玲玲, 王冬梅, 等. 腺苷衍生化合物 WS070117M1 对小鼠慢性阻塞性肺疾病的影响及其抗炎机制[J]. 药学学报, 2015, 50(8): 986-992.
Cao SH, Xuan LL, Wang DM, et al. Effect of WS070117M1 on chronic obstructive pulmonary disease in mice and the underling mechanisms of anti-inflammation [J]. Acta Pharm Sin, 2015, 50(8): 986-992.

[44] Kao ST, Liu CJ, Yeh CC. Protective and immunomodulatory effect of flos *Lonicerae* japonicae by augmenting IL-10 expression in a murine model of acute lung inflammation [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 168: 108-115.

[45] 褚旭. $PM_{2.5}$ 加剧慢性阻塞性肺疾病小鼠肺泡巨噬细胞吞噬功能障碍及对免疫炎症反应的影响[D]. 兰州: 兰州大学; 2017.
Chu X. $PM_{2.5}$ in aggravation of defective phagocytosis of alveolar macrophages and its effects on immune inflammation in chronic obstructive pulmonary disease mice [D]. Lanzhou: Lanzhou University; 2017.

[46] Nikula KJ, Green FH. Animal models of chronic bronchitis and their relevance to studies of particle-induced disease [J]. Inhal Toxicol, 2000, 12: 123-153.

[47] 贾敏, 樊文花, 秦巧红, 等. 香烟尘雾颗粒经鼻腔滴入建立小鼠 COPD 肺功能损伤模型[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(10): 1915-1920.
Jia M, Fan WH, Qin QH, et al. Cigarette dust particles induced lung function injury of chronic obstructive pulmonary disease in mice [J]. Chin J Pathophysiol, 2019, 35(10): 1915-1920.

[48] 张子丽. NO_2 对慢性阻塞性肺疾病发病的影响及机制研究[D]. 广州: 广州医科大学; 2018.
Zhang ZL. Effects and mechanisms of MMP16 on chronic obstructive pulmonary diseases based on model induced by NO_2 [D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University; 2018.

[49] Gao W, Yuan C, Zhang J, et al. Klotho expression is reduced in COPD airway epithelial cells: effects on inflammation and oxidant injury [J]. Clin Sci (Lond), 2015, 129(12): 1011-1023.

[50] Shu J, Lu W, Yang K, et al. Establishment and evaluation of chronic obstructive pulmonary disease model by chronic exposure to motor vehicle exhaust combined with lipopolysaccharide

instillation [J]. Exp Physiol, 2018, 103(11): 1532-1542.

[51] Cochrane WJ, Afolabi OA. Investigation into the nutritional status, dietary intake and smoking habits of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Hum Nutr Diet, 2004, 17(1): 3-11.

[52] 毛峪泉. 健脾益肺Ⅱ号对 COPD 大鼠骨骼肌萎缩作用机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2017.
Mao YQ. The study of effect of jianpiyifei-Ⅱ on COPD rat skeletal muscle atrophy [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine; 2017.

[53] Vande Velde G, Poelmans J, De Langhe E, et al. Longitudinal micro-CT provides biomarkers of lung disease that can be used to assess the effect of therapy in preclinical mouse models, and reveal compensatory changes in lung volume [J]. Dis Model Mech, 2016, 9(1): 91-98.

[54] Ramírez-Ramírez E, Torres-Ramírez A, Alquicira-Mireles J, et al. Characteristic plethysmographic findings in a Guinea pig model of COPD [J]. Exp Lung Res, 2017, 43(2): 57-65.

[55] Xu X, Huang H, Yin X, et al. Effect of lentivirus-mediated CFTR overexpression on oxidative stress injury and inflammatory response in the lung tissue of COPD mouse model [J]. Biosci Rep, 2020, 40(1): BSR20193667.

[56] Liu X, Ma C, Wang X, et al. Hydrogen coadministration slows the development of COPD-like lung disease in a cigarette smoke-induced rat model [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2017, 12: 1309-1324.

[57] 龙颖姣, 陈燕, 陈平. 慢性阻塞性肺疾病动物模型构建及评价 [J]. 国际呼吸杂志, 2014, 34(17): 1327-1330.
Long YJ, Chen Y, Chen P. Building and evaluation of COPD animal models [J]. Int J Respir, 2014, 34(17): 1327-1330.

[58] Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD [J]. Chest, 2013, 144(1): 266-273.

[59] 傅玉琼, 周伟. 转化生长因子 β_1 及成纤维细胞生长因子基因敲除对尘肺小鼠肺纤维化的影响 [J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(1): 27-30.
Fu YQ, Zhou W. Effect of TGF-β_1 and *FGF* gene knockout in treatment of pneumoconiosis mice with pulmonary fibrosis [J]. Med Pharm J Chin People's Liberation Army, 2017, 29(1): 27-30.

[60] Pavord ID, Jones PW, Burgel PR, et al. Exacerbations of copd [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2016, 11: 21-30.

[61] Hillas G, Perlikos F, Tzanakis N. Acute exacerbation of COPD: is it the stroke of the lungs? [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2016, 11: 1579-1586.

[62] Xiao C, Cheng S, Li R, et al. Isoforskolin alleviates AECOPD by improving pulmonary function and attenuating inflammation which involves downregulation of Th17/IL-17A and NF-κB/NLRP3 [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 721273.

[63] Gaschler GJ, Bauer CMT, Zavitz CCJ, et al. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations [J]. Contrib Microbiol, 2007, 14: 126-141.

[64] Roos AB, Sethi S, Nikota J, et al. IL-17A and the promotion of neutrophilia in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 192(4): 428-437.

[65] Oostwoud LC, Gunasinghe P, Seow HJ, et al. Apocynin and ebselen reduce influenza A virus-induced lung inflammation in cigarette smoke-exposed mice [J]. Sci Rep, 2016, 6: 20983.

[66] 祁海燕, 封继宏, 李美凤, 等. 肺宁颗粒对 AECOPD 大鼠肺组织肺保护作用和血清 TLR4、NF-κB、SOD 水平的影响 [J]. 陕西中医, 2016, 37(11): 1557-1559.
Qi HY, Feng JH, Li MF, et al. Effects of Feining Granule on lung protection and serum levels of TLR4, NF-κB and SOD in AECOPD rats [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2016, 37(11): 1557-1559.

[67] Wang D, Wang Y, Liu YN. Experimental pulmonary infection and colonization of *Haemophilus influenzae* in emphysematous hamsters [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2010, 23(4): 292-299.

[68] 张甜甜, 王惠琴, 薛佩妮, 等. 铜绿假单胞菌及肺炎链球菌诱发 AECOPD 大鼠血清 PCT 和 IL-6 水平的变化及意义 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(11): 1198-1201, 1206.
Zhang TT, Wang HQ, Xue PN, et al. Levels and significance of serum PCT and IL-6 in AECOPD rats induced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pneumoniae* [J]. J Pathog Biol, 2018, 13(11): 1198-1201, 1206.

[69] Guan X, Yuan Y, Wang G, et al. Ginsenoside Rg3 ameliorates acute exacerbation of COPD by suppressing neutrophil migration [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 83: 106449.

[70] 张甜甜, 田王斌, 李媛媛, 等. 烟熏联合不同细菌建立大鼠慢性阻塞性肺疾病急性加重期动物模型 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(8): 743-746.
Zhang TT, Tian WB, Li YY, et al. Establishment of rat models of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease by fumigation combined with different bacteria [J]. J Chin Pract Diagn Ther, 2018, 32(8): 743-746.

[71] 李建生, 周红艳, 乔翠霞, 等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热证模型的建立与评价 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(7): 553-556.
Li JS, Zhou HY, Qiao CX, et al. Establishment and evaluation of model of chronic obstructive pulmonary diseases with phlegm syndrome during acute exacerbation period [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2010, 16(7): 553-556.

[72] 王东, 王瑛, 刘又宁. 流感嗜血杆菌感染致慢性阻塞性肺病急性发作动物模型的建立 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2011, 10(2): 156-160.
Wang D, Wang Y, Liu YN. A golden hamster model of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease infected by *Haemophilus influenzae* [J]. Chin J Mult Organ Dis Elder, 2011, 10(2): 156-160.

[收稿日期] 2022-05-05

贺云,赵宏伟,齐冬梅,等. ApoE4 转基因小鼠在阿尔茨海默病研究中的应用进展［J］. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1128-1140.
He Y, Zhao HW, Qi DM, et al. Progress in application of ApoE4 transgenic mice in research into Alzheimer's disease［J］. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1128-1140.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.016

ApoE4 转基因小鼠在阿尔茨海默病研究中的应用进展

贺云[1],赵宏伟[2],齐冬梅[2],程肖蕊[2*],刘西建[1*]

(1.山东中医药大学中医学院,济南　250355;2.山东中医药大学中医药创新研究院,济南　250355)

【摘要】 载脂蛋白 E(apolipoprotein E,ApoE)在脑中参与胆固醇和脂质代谢,将胆固醇输送到神经元,并清除脂质碎片以促进髓鞘修复。ApoE4 是 ApoE 三种亚型之一,为散发型阿尔茨海默病(sporadic Alzheimer's disease,SAD)最主要的遗传危险因素。其发病机制可能涉及增加脑内 β-淀粉样蛋白(β-amyloid,Aβ)沉积并减少其清除率、Tau 蛋白过度磷酸化、脂质代谢异常和血脑屏障损伤。ApoE4 转基因小鼠最早在 2 ~ 4 月龄出现 Aβ 相关病理表型,4 月龄时海马总 Tau 蛋白和磷酸化 Tau 蛋白含量增加,且发生神经元丢失、树突损坏及突触减少,9 月龄空间学习记忆能力下降。ApoE4 转基因小鼠广泛用于 AD 防治药物的研究,如胆碱酯酶抑制剂利斯的明、谷氨酰胺酶拮抗剂 JHU-083、GABA 能神经元受体增强剂戊巴比妥、改善脑血管功能障碍的表皮生长因子、二十二碳六烯酸、菊粉和姜黄素等。本综述可为 ApoE4 转基因小鼠在 AD 研究中的应用提供参考与借鉴作用。

【关键词】 阿尔茨海默病;载脂蛋白 E;ApoE4 转基因小鼠;学习记忆;脂质代谢
【中图分类号】Q95-33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1005-4847（2022）08-1128-13

Progress in application of ApoE4 transgenic mice in research into Alzheimer's disease

HE Yun[1], ZHAO Hongwei[2], QI Dongmei[2], CHENG Xiaorui[2*], LIU Xijian[1*]

(1. School of Chinese Medicine, Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250355, China.
2. Chinese Medicine Innovation Research Institute, Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250355)
Corresponding author: CHENG Xiaorui. E-mail: cxr916@163.com; LIU Xijian. E-mail: Liuxijian6500@126.com

【Abstract】 The apolipoprotein E (ApoE) is involved in cholesterol and lipid metabolism in the brain, transporting cholesterol to neurons and removing lipid debris to facilitate myelin repair. ApoE4, one of three subtypes of ApoE, is the most important genetic risk factor for sporadic Alzheimer's disease (AD). ApoE4 increases the deposition and reduces the clearance rate of Aβ, enhances hyperphosphorylation of Tau protein, induces abnormal lipid metabolism in the brain, and impairs the brain and blood-brain barrier. ApoE4 transgenic mice were used to study AD pathogenesis and prevention. ApoE4 transgenic mice showed decreased abilities in spatial learning and memory at the age of 9 months and a pathological phenotype related to β-amyloid at 2 ~ 4 months. At 4 months, total Tau and phosphorylated Tau levels increased, and a loss of neurons and damage to dendrites and synapses occurred in the hippocampus. *ApoE*4 transgenic mice have been used to study the prevention and treatment of AD drugs such as the GABA neuronal receptor agonist pentobarbital, the glutamine antagonist JHU-083, epidermal growth factor, inulin, and curcumin. This review provides a reference for those applying ApoE4 transgenic mice in AD research.

【Keywords】 Alzheimer's disease; ApoE4; ApoE4 transgenic mice; Learning and memory; Lipid metabolism
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[**基金项目**]国家自然科学基金青年基金(82205078)。
Fund by the National Natural Science Foundation Youth Fund (82205078).
[**作者简介**]贺云(1996—),女,在读硕士研究生,神经药理学。Email: hy2020110070@163.com
[**通信作者**]程肖蕊,博士,博士生导师,研究方向:中药药理研究。Email: cxr916@163.com;
刘西建,博士,硕士生导师,研究方向:方剂效用机制及针药结合研究。Email: liuxijian6500@126.com。
*共同通信作者

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的神经退行性疾病,主要表现为渐进性认知功能退化、记忆丧失、人格和行为改变等,AD 患者占 AD 及其他痴呆者的 63% ~ 70%[1-2]。脑内 Aβ 沉积导致的斑块和 Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结及神经元丢失是该病的主要病理特征[3]。AD 发病机制复杂,迄今尚不明确,临床亦无有效治疗药物。大量临床和实验研究结果表明,ApoE4 等位基因是散发型 AD 最强、最主要的遗传危险因素[4-5],但 ApoE4 诱导 AD 发病机制尚不清楚。ApoE4 转基因小鼠也被广泛用于 AD 发病机制和防治药物的研究。本文对 ApoE4 转基因小鼠的 AD 样性状及其在 AD 研究中的应用进行系统综述,为 AD 相关研究提供借鉴。

1　ApoE4 转基因小鼠

1.1　载脂蛋白 E 与 AD 发生的关系

ApoE 是一种由 299 个氨基酸残基组成的糖蛋白,分子量约为 34×10^3,主要在肝合成,通过介导肝清除脂蛋白颗粒而在血浆胆固醇稳态中发挥关键作用[6],同时也在大脑中产生,过去认为主要是在星形胶质细胞中产生[7],近期发现小胶质细胞及神经元中的表达量也增多[8-10]。在大脑中主要是参与胆固醇和脂质代谢,主要作用是将胆固醇输送到神经元,并且清除脂质碎片以促进髓鞘修复[11]。

ApoE 具有 3 种主要亚型:ApoE2、ApoE3 和 ApoE4(表 1)。ApoE2 参与脂蛋白代谢、激活水解脂肪的酶类、免疫调节及神经组织的再生,ApoE2 降低胆固醇,运转脂质到神经胶质细胞;ApoE3 参与脂质和脂蛋白代谢,促进清除循环中残留的富含甘油三酯的脂蛋白,通过促进巨噬细胞胆固醇外排,在脂蛋白代谢中发挥关键作用,降低血浆脂质水平[12],ApoE3 还能促进神经元突起的生长[13];ApoE4 则可以优先富集甘油三酯脂蛋白,在体外培养中,表达 ApoE4 的星形胶质细胞、神经元胆固醇和磷脂的分泌减少,脂质结合能力下降,并且细胞内 ApoE4 降解增加[12]。ApoE4 在体外和体内均有抑制神经元突起生长和脊柱发育的功能[14],ApoE4 激活血管周细胞中亲合素 A 介导的促炎症通路,该通路可导致脑血管完整性丧失和血脑屏障破坏[15]。与 ApoE3 相比,ApoE4 促进了更多的生长素反应因子(ARF6)表达,在晚期内涵体中捕获 ATP 结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1),并阻碍其在细胞膜上的循环,脂质性差的 ApoE4 更倾向于聚集,降低了 ABCA1 膜的循环利用及其脂化 ApoE 的能力[16]。并且,ApoE4 等位基因以剂量依赖的方式增加 AD 的风险,每增加一个拷贝的 ε4,其携带者的 AD 患病风险将会增加 2 ~ 6 倍,AD 的发病年龄提前 7 ~ 9 年[17]。ApoEε2 则是一种保护性等位基因,即使存在 ApoEε4 等位基因也可以降低约 50%的 AD 发生风险[18]。ApoEε4 女性携带者相比男性患 AD 风险更高,研究发现 ApoEε4 基因对女性认知能力影响更大[19]。通过对 5 万多名参与者的分析发现,年龄在 65 ~ 75 岁之间、携带 ApoEε4 基因的人群中,女性患 AD 的风险是男性的 4 倍[20]。

1.2　ApoE4 转基因小鼠的生物学特性

目前,已经建立了几个表达人类 ApoE3 或 ApoE4 的转基因小鼠品系(表 2),主要有:NSE-ApoE3、NSE-ApoE4、ApoE4、ApoE3、GFAP-ApoE4 和 GFAP-ApoE3 品系,其中 NSE-ApoE4 和 GFAP-ApoE4 转基因小鼠在 12 月龄时出现空间学习记忆能力的障碍,而 ApoE4 转基因小鼠则在 9 月龄表现出空间学习记忆缺陷[21]。在这些品系中,ApoE4 转基因小鼠是最常用的,本文主要综述该品系小鼠在 AD 中的应用研究进展。

1.2.1　ApoE4 转基因小鼠的学习记忆功能

Kim 等[30]通过 Morris 水迷宫(morris water maze, MWM)实验对 5 月龄雌性小鼠进行检测发现,ApoE4 转基因小鼠与野生型(wild type, WT)即 C57BL/6J 小鼠空间学习记忆能力无差异,而 Kou 等[21]发现 9 月龄雌、雄性 ApoE4 转基因小鼠相较于 WT 小鼠,其学习期逃避潜伏期延长,检测期穿环次数减少、目标象限停留时间和目标象限运动距离均缩短。Hartman 等[31]、Chouinard-Watkins 等[32]研究显示 12 月龄 ApoE4 转基因小鼠与 WT 小鼠在空间学习记忆方面无差别。Wang 等[33]通过 Morris 水迷宫和放射迷宫(radial maze, RM)实验研究 13 ~ 24 月龄 ApoE4 转基因小鼠均有空间学习记忆功能的损伤。Chouinard-Watkins 等[32]通过新异物体识别(natural object recognition, NOR)实验检测 12 月龄 ApoE4 转基因小鼠发现与 ApoE3 转基因小鼠相比,ApoE4 转基因小鼠运动距离延长、辨识别指数降低,提示其新异物体识别能力发生损伤。Siegel 等[34]通过避暗实验(passive avoidance, PA)发现,10 ~ 13 月龄 ApoE4 转基因小鼠相较于 ApoE2 转基因小鼠,错误次数减少,进入暗室的逃避潜伏期缩短,说明

被动回避反应能力未受到损害。Siegel 等[34]高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)实验结果表明,10 ~ 13 月龄 ApoE4 转基因小鼠相较于 ApoE3 和 ApoE2 转基因小鼠,在开臂停留时间(open-arms time, OE)短,但是 Lin 等[35]也有研究发现 12 月龄 ApoE4 转基因小鼠与 ApoE3 转基因小鼠开臂停留时间和进入开臂的次数(open-arms entries, OT)无差异。明暗箱实验[32](light-dark box, LDB)检测结果中 12 月龄 ApoE4 转基因小鼠相较于 ApoE3 转基因小鼠在明箱停留时间长,说明尚不能肯定 ApoE4 小鼠是否有焦虑情绪。悬尾实验(tail suspension tes, TST)结果表明,3 月龄和 12 月龄小鼠 ApoE4 转基因小鼠与 ApoE3 转基因小鼠僵直不动时间无差异[35],糖水偏好实验(sucrose preference test, SPT)结果 3 月龄 ApoE4 转基因小鼠与 ApoE3 转基因小鼠糖水偏爱指数无差异,说明其没有抑郁情绪。

另外,转棒实验(rota-rod test, RRT)表明 12 ~ 14 月龄 ApoE4 转基因小鼠相较于 WT 小鼠,在转棒上停留时间缩短,说明其运动协调能力差[35]。

这些研究结果表明,ApoE4 转基因小鼠学习记忆功能的显著损伤出现在 13 月龄以后,主要包括空间学习记忆能力和物体识别记忆能力,但其不表现焦虑与抑郁情绪(表 3)。

1.2.2 ApoE4 转基因小鼠的病理特征

对于 AD 的特征性病理变化 Aβ 斑块,有研究采用 DAB 染色的免疫组化(immunohistochemistry, IHC)技术检测雌性 3 月龄 ApoE4 转基因小鼠的皮层,发现 ApoE4 转基因小鼠有少量的 Aβ 沉积,10 月龄 ApoE4 转基因小鼠皮层中有显著 Aβ 沉积[39]。

Tau 蛋白过度磷酸化是形成 AD 另一特征性病理 NFT 的原因,Liraz 等[40]采用 mAb AT8IHC 检测 4 月龄 ApoE4 和 ApoE3 转基因小鼠海马中磷酸化 Tau 蛋白和总 Tau 蛋白含量,发现 CA3 和 CA1 区锥体神经元以及 DG 区颗粒神经元中的磷酸化 Tau 和总 Tau 水平明显高于 ApoE3 转基因小鼠。

对于脑体积变化,通过免疫组化技术检测 9 月龄的小鼠发现,WT 小鼠与 ApoE4 转基因小鼠大脑体积无差异,未出现萎缩[41]。Wang 等[33]使用 7T 磁共振成像检测 12 和 24 月龄小鼠脑体积比例的变化,发现 12 月龄 ApoE4 转基因小鼠与 ApoE3 转基因小鼠海马和皮层体积分别占全脑体积的比例无差异。而与 24 月龄 ApoE3 转基因小鼠相比,同龄

表 1 载脂蛋白 E 各亚型的生物学信息

Table 1 Biological information on subtypes of apolipoprotein E

亚型 Subtypes	基因型 Genotype	碱基对应位点 Base pair site	氨基酸 Amino acids	分子量 ($\times10^3$) Formula weight ($\times10^3$)	表达部位 Express parts	受体 Receptor	表型 Pheno-typic	在人群中的分布 Distribution in the population	参与的疾病 Disease of participation
		Rs429358/ Rs7412	112 158						
ApoE2	ε2/ε2 ε2 /ε3	TT/TT TT/TC	Cys Cys	34.3	神经元、星形胶质细胞、肝、心、肺、脾、胃、小肠、胸腺、膀胱、子宫、血液、动脉 Neurons, astrocytes, liver, heart, lung, spleen, stomach, small intestine, thymus, bladder, uterus, blood, arteries	HDL	降低 AD 发病率 Reduce AD incidence rate	8%	不易患 AD、冠心病,易患黄斑变性 Not susceptible to AD, coronary heart disease, but macular degeneration
ApoE3	ε3 /ε3 ε2 /ε4	TT/CC TC/TC	Cys Arg	34.0	除不在动脉中表达,其余与 ApoE2 相同 It is identical with ApoE2 except that it is not expressed in artery	HDL、LDL	正常基因 Normal gene	77%	常见基因 Common gene
ApoE4	ε3/ε4 ε4/ε4	TC/CC CC/CC	Arg Arg	34.1	神经元、星形胶质细胞、肺、脾、卵巢 Neurons, astrocytes, lung, spleen ovary	LDL VLDL	增加 AD 发病率 Increase incidence rate of AD	15%	易患 AD、冠心病、脑梗塞、视网膜色素变性 Not susceptible to Coronary heart disease、Cerebral infarction、retinitis pigmentosa

表 2　不同品系 ApoE4 转基因小鼠的空间学习记忆能力

Table 2　Spatial learning and memory ability of ApoE4 transgenic mice

基因来源 Crystalsapien	基因型 Genotype	启动子 Promoter	对照小鼠品系 Control mouse strain	月龄 Month ages	检测方法 Testing methog	检测时期 Period of detection	指标 Index	变化 Change
人 Human	ApoE4-TR	ApoE	ApoE3	9[22-25]	ApoE3	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
						检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
					BM	检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
	NSE-ApoE4	NSE	ApoE3	6[26-27]	WMW	检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
				18[26-27]	WMW	检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
	GFAP-ApoE4	GFAP	ApoE3	8[21,28]	YM	学习期后间隔 1 h 检测 1 hour interval after learning period	进入新臂的次数 Number of times to enter the new arm	↓
						学习期后间隔 24 h 检测 24 hour interval after learning period	进入新臂的次数 Number of times to enter the new arm	−
			WT	12[21,29]	WMW	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
						检测期 Detection period	穿环次数、目标象限停留时间、目标象限运动距离 Number of platform crossing Time spent in the targeted quadrant Distance in the targeted quadrant	↓

注：↑：升高或增加；↓：降低或减少；−：无差异。（下表同）

Note. ↑. Indicates increase or extension. ↓. Indicates decrease or decrease. −. Indicates no difference. (The same in the following tables)

ApoE4 转基因小鼠的皮层、海马的体积分别占全脑体积的比例均降低，说明皮层和海马萎缩严重[33]。Dolejší 等[42]进一步通过 IHC 检测 4 月龄 ApoE4 与 ApoE3 转基因小鼠海马突触前囊泡乙酰胆碱转运体（vesicular acetylcholine transporter, VAChT），发现 ApoE4 与 ApoE3 转基因小鼠突触前 VAChT 水平相似，但是对 ApoE4 转基因小鼠 CA3 和 CA1 海马亚区中突触前囊泡谷氨酸转运体（glutamatergic vesicular transporter, VGlut）的染色强度相较于 ApoE3 转基因小鼠低，说明 ApoE4 转基因小鼠海马中谷氨酸能神经元减少[40]。对于 GABA 能神经元，Andrews-Zwilling 等[43]、Li 等[44]通过脑切片 IHC 抗 GAD67 和抗生长抑素染色对 6、12 ~ 13、16 月龄的小鼠海马的 GABAergic 中间神经元定量分析发现，6、12 ~ 13、16 月龄时相较于 ApoE3 转基因小鼠，ApoE4 转基因小鼠齿状回 GABAergic 神经元均显著减少，16 月龄的 ApoE3 转基因小鼠与 ApoE4 转基因小鼠 CA1 区 GABAergic 神经元未出现差异。Sun 等[45]、Klein 等[46]通过生物素染色（biocytin staining, BS）法研究结果显示，相较于 ApoE3 转基因小鼠，ApoE4 转基因小鼠在 4 月龄时其海马神经元的树突分枝少、长度短且树突棘密度低，在 7 月龄时其杏仁核神经元的树突分枝也少且长度短。Li 等[44]通过共聚焦显微镜成像（confocal microscopic images, CMI）研究结果发现，与野生型小鼠相比，6 ~ 7 月龄 ApoE4 转基因小鼠海马新生神经元树突长度短而分枝少。Zhu 等[47]通过免疫荧光（immunofluorescence, IF）染色分别检测 3 月龄和 9 月龄 ApoE3 和 ApoE4 转基因小鼠海马和皮层突触体中突触结合蛋白 1（synaptojanin 1, synj1）发现 3 月龄 ApoE3 和 ApoE4 转基因小鼠海马和皮层 synj1 无差异，但是 9 月龄 ApoE4 转基因小鼠海马和皮层 synj1 表达水平比 ApoE3 转基因小鼠高。这些研究结果提示，谷氨酸能与 GABA 能神经元的丢失、神经元中树突与突触减少是导致 ApoE4 转基因小鼠脑萎缩的原因。

表 3 ApoE4 转基因小鼠的认知功能

Table 3 Cognitive function of ApoE4 transgenic mice

认知类型 Cognitive type	方法 Methods	月龄 Month ages	性别 Sex	对照小鼠品系 Control mouse strain	检测时期 Period of detection	指标 Index	变化 Change
空间学习记忆 Spatial learning and memory	MWM	5[30]	雄 Male	WT	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	–
					检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	–
		9[21]	雄 Male	WT	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
					检测期 Detection period	穿环次数、目标象限停留时间 Number of platform crossing, time in the target quadrant	↓
		12[33,35]	雄 Male	ApoE3	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
						游泳速度 Swimming speed	–
					检测期 Detection period	目标象限停留时间 Time in the target quadrant	↓
		24[33,35]	雄 Male	ApoE3	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
						游泳速度 Swimming speed	–
					检测期 Detection period	目标象限停留时间 Time in the target quadrant	↓
						穿环次数 Number of platform crossing	–
		16[33,35]	雄 Male	ApoE3	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
					检测期 Detection period	目标象限停留时间 Time in the target quadrant	↓
						逃避潜伏期 Escape latency	–
		12[35]	雌、雄 Female, male	ApoE3	学习期 Learning period	逃避潜伏期、游泳速度 Escape latency, swimming speed	–
					检测期 Detection period	目标象限停留时间、穿环次数 Time in the target quadrant, number of platform crossing	–
		13 ~19[36]	雌 Female	ApoE3	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
		15 ~18[37]	雌、雄 Female, male	WT	学习期 Learning period	目标象限游泳距离 Target quadrant swimming distance	↑
					检测期 Detection period	目标象限停留时间 Time in the target quadrant	↓
	RM	12 ~14[38]	雌、雄 Female, male	WT	学习期 Learning period	错误次数、逃避潜伏期 Escape latency, escape latency	↑
					检测期 Detection period	错误次数、逃避潜伏期 Error times, escape latency	↑
	BZ	12[32]	雌、雄 Female, male	ApoE3	学习期 Learning period	逃避潜伏期、错误次数 Escape latency, error times	–
					检测期 Detection period	逃避潜伏期、错误次数 Escape latency, error times	–
新异物体识别能力 New object recognition ability	NOR	12[32]	雌、雄 Female, male	ApoE3	–	运动距离 Moving distance	↑

续表3

认知类型 Cognitive type	方法 Methods	月龄 Month ages	性别 Sex	对照小鼠品系 Control mouse strain	检测时期 Period of detection	指标 Index	变化 Change
被动回避反应能力 Passive avoidance ability	PA	10 ~ 13[34]	雌、雄 Female, male	ApoE2	–	错误次数 Error times	↓
焦虑情绪 Anxiety	EPM	3[35]	雌、雄 Female, male	ApoE3	–	开臂停留时间,进入开臂次数 Open-arms time, open-arms entries	– –
		12[35]	雌、雄 Female, male	ApoE3	–	开臂停留时间, 进入开臂次数 Open-arms time, open-arms entries	– –
		10 ~ 13[34]	雌、雄 Female, male	ApoE3, ApoE2	–	开臂停留时间 Open-arms time	↓
	LDB	12[32]	雌、雄 Female, male	ApoE3	–	明箱停留时间 Open box residence time	↑
	SPT	3[35]	雌、雄 Female, male	ApoE3	–	糖水偏爱指数 Sucrose preference index	–
抑郁情绪 Depression	TST	3[35]	雌、雄 Female, male	ApoE3	–	僵直不动时间 Freezing time	–
		12[35]	雌、雄 Female, male	ApoE3	–	僵直不动时间 Freezing time	–
运动协调能力 Motor coordination ability	RRT	12 ~ 14[35]	雌、雄 Female, male	WT	–	转棒上停留时间 The time stayed on the rod	↓

综合以上研究结果发现,ApoE4 转基因小鼠早在 3 月龄皮层中 Aβ 蛋白就有少量沉积,在 10 月龄 Aβ 蛋白显著增多,4 月龄时海马 Tau 蛋白磷酸化水平就显著升高,谷氨酸能和 GABA 能神经元减少、成熟与新生神经元的树突分枝少长度短且树突棘密度低从而使其在老年时呈现脑萎缩。这些研究表明,ApoE4 转基因小鼠具有 AD 的典型病理特征(表 4)。

1.2.3　ApoE4 转基因小鼠的生理生化表型

ApoE4 转基因小鼠除了呈现 AD 样认知行为学与病理学特征外,其生理生化也表现出一些特有变化(表 5),如:相较于 ApoE3 转基因小鼠,ApoE4 转基因小鼠在 2.3 ~ 3 月龄时,海马星形胶质细胞中 Ca^{2+} 兴奋性增强[48];在 4 和 12 月龄时其海马突触可塑性降低,且 12 月龄与 4 月龄 ApoE4 转基因小鼠相比其突触活性降低[45];7 月龄时,杏仁核中神经元突触传递减弱,锥体样神经元自发兴奋性突触后电流(spontaneous excitatory post-synaptic currents, sEPSCs)间隔时间延长,兴奋性传递损伤[46]。另外,与 ApoE3 转基因小鼠相比,ApoE4 转基因小鼠海马和皮层中 ApoE、ApoER2 的表达(12 月龄)[35]及免疫球蛋白 G(IgG)水平(10 月龄)[39]显著降低,同时海马中的磷酸肌醇二磷酸(phosphoinositol biphosphate, PIP_2)(9 月龄)[47]、胆固醇(12 月龄)[47]、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)(16 月龄)[49]也显著降低,而 $A\beta_{42}$ 水平显著升高(2 ~ 4 月龄)[50]。

2　ApoE4 参与 AD 的发病机制

目前的研究结果表明,ApoE4 参与 AD 的发病机制可能涉及增加脑内 Aβ 沉积并减少其清除率、Tau 蛋白过度磷酸化、血脑屏障损伤及脂质代谢异常,下面对其进行详述。

2.1　ApoE4 参与 AD 中 Aβ 病理的形成

Aβ 从大脑中清除主要通过细胞摄取和酶降解、血脑屏障(blood brain barrier, BBB)和血脑脊液屏障(blood cerebrospinal fluid barrier, BCSFB)运输、间质液(interstitial fluid, ISF)引流通路以及脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)吸收进入淋巴循环系统[51]。LDL 受体相关蛋白 1(LDL receptor related protein1, LRP1)是大脑中 ApoE 的主要受体,该蛋白在多种脑细胞类型特别是神经元中大量表达,通过与其他跨膜蛋白偶联,LRP1 能够识别并高效结合 30 多种结构和功能不同的配体,包括 ApoE、淀粉样前体蛋白和 Aβ[52]。LRP1 已经被证明可以介导神经元[53]、星形胶质细胞[54]、小胶质细胞[55]、血管平滑肌细胞和内皮细胞对[56] Aβ 的清除。ApoE 各个亚型与 LRP1 结合的能力是 ApoE4 > ApoE3 >>

ApoE2,提示 ApoE4 与 Aβ 竞争性结合 LRP1,而导致 Aβ 被细胞清除的几率下降。另有研究表明,高浓度的 ApoE 可以形成高分子量的 Aβ 共聚集体,其中 ApoE4 比 ApoE3 更容易促进 Aβ 聚集,ApoE 还以异构体依赖的方式增加 Aβ 寡聚体的水平(ApoE4 > ApoE3 > ApoE2)[57-58]。此外,ApoE4 比 ApoE3 和 ApoE2 更能稳定 Aβ 寡聚体[59],在携带 ApoE4 基因型的 AD 患者的临床症状出现前几十年,Aβ 就开始沉积在大脑中[60-61]。这些研究表明,ApoE4 可加剧 Aβ 的沉积。

表 4 ApoE4 转基因小鼠的病理特征

Table 4 Pathological characteristics of ApoE4 transgenic mice

指标 Index	方法 Methods	对照小鼠品系 Control mouse strain	月龄 Month ages	部位 Part	变化 Change
Aβ 沉积 Aβ aggregation	IHC	ApoE3	3[39]	皮层 Cerebral cortex	↑
		ApoE3	10[39]	皮层 Cerebral cortex	↑
p-Tau	IHC	ApoE3	4[40]	海马 Hippocampus	↑
	IHC	WT	9[41]	大脑 Brain	–
脑萎缩 Brain atrophy	7T MRI	ApoE3	12[33]	海马、皮层 Hippocampus, cerebral cortex	–
			24[33]	海马、皮层 Hippocampus, cerebral cortex	↑
VAChT	IHC	ApoE3	4[42]	海马 Hippocampus	–
VGlut1	IHC	ApoE3	4[40]	海马 Hippocampus	↓
synj1	IF	ApoE3	3[47]	海马、皮层 Hippocampus, cerebral cortex	–
			9[47]	海马、皮层 Hippocampus, cerebral cortex	↑
GABAergic	IHC	WT	6[43-44]	齿状回 Dentate gyrus	↓
		ApoE3	12 ~ 13[43-44]	齿状回 Dentate gyrus	↓
		ApoE3	16[43-44]	齿状回 Dentate gyrus	↓
			16[43-44]	海马 CA1 区 Hippocampal CA1 region	–
树突长度、树突棘密度 Dendritic length, dendritic spine density	BS	ApoE3	4[46,48]	海马 Hippocampus	↓
突触数量 Number of synapses	BS	ApoE3	7[45-46]	杏仁核 Amygdala	↓
神经元树突 Neuronal dendrites	CMI	WT	6 ~ 7[44]	海马 Hippocampus	↓

表 5 ApoE4 转基因小鼠的生理生化表型

Table 5 Physiological and biochemical phenotypes of ApoE4 transgenic mice

生化指标 Biochemical phenotype	方法 Methods	月龄 Month ages	部位 Part	检测结果 Results
$A\beta_{42}$	ELISA	2 ~ 4[40]	海马 Hippocampus	↑
		18[50]	大脑 Brain	–
突触传递强度 Synaptic transmission intensity	电生理 Electrophysiology	4[45]	海马 Hippocampus	↑
		12[45]	海马 Hippocampus	↓
		7[46]	杏仁核 Amygdala	↑
PIP_2	高效液相色谱法 High performance liquid chromatography	9[47]	海马 Hippocampus	↓
胆固醇 Cholesterol	气相色谱法 Gas chromatography	12[32]	海马 Hippocampus	↓
ATP	ATP 浓度测定 Determination of ATP concentration	16[49]	大脑 Brain	↓
ApoE、ApoER2 的蛋白表达 Protein expression of ApoE and ApoER2	Western Blot	12[35]	海马、皮层 Hippocampus, cerebral cortex	↓
Ca^{2+} 信号 Ca^{2+} signal	钙成像技术 Calcium imaging	2.3 ~ 3[48]	海马 Hippocampus	↑
IgG	ELISA	10[39]	海马、皮层 Hippocampus, cerebral cortex	↓
			丘脑 Hypothalamus	–

2.2　ApoE4 参与 AD 中 Tau 蛋白过度磷酸化病理的形成

Tau 蛋白过度磷酸化可导致 Tau 蛋白自我组装成成对的螺丝状丝，即神经纤维缠结（neurofibrillary tangles，NFTs）。研究发现，在患有原发性 Tau 病变患者中，ApoE 中 ε4 等位基因与大脑区域神经退行性病变严重程度的增加有关[62]。在神经元中表达人类 ApoE4 的转基因小鼠，Tau 蛋白的磷酸化水平升高，而在星形胶质细胞中表达 ApoE4 则没有显示 Tau 蛋白的磷酸化水平升高[63]，这提示 ApoE4 在神经元中对 Tau 蛋白的磷酸化发挥作用。

2.3　ApoE4 参与 AD 中血脑屏障的破坏

最近的研究表明，无论生物标志物 Aβ 和 Tau 如何变化，患有早期认知功能障碍的个体都会在海马体中发生脑毛细血管和 BBB 损伤[64-65]，因此，BBB 损伤被认为是认知功能障碍的早期生物标志物[64]。基于周皮细胞损伤的生物标志物可溶性血小板生长因子受体-β（soluble platelet-derived growth factor receptor-β，sPDGFRβ），研究发现 ApoE4 携带者 CSF 中 sPDGFRβ 水平增加，且其增加与海马和海马旁回中 BBB 通透性的增加相关，提示 CSF 中 sPDGFRβ 基线水平升高与 BBB 和周皮细胞细胞损伤有关[65]。临床痴呆评分（clinical dementia rating，CDR）分析发现 ApoE4 携带者伴认知障碍的 CSF 中 sPDGFRβ 增加，但 ApoE3 携带者却无变化[65]。而且发现 BBB 损伤的分子生物标志物白蛋白 CSF/血浆熵（CSF/plasmaquotient）、以及 CSF 纤维蛋白原和纤溶酶原水平升高。这些研究结果提示，ApoE4 可导致 BBB 损伤和脑毛细血管周皮细胞的退化[66]。

2.4　ApoE4 导致 AD 脂质代谢异常

AD 是一种缓慢进展的疾病，生活方式、习惯和营养模式可以通过影响不同的认知区域导致整体智力退化，脂质代谢失调参与 AD 的发病机制[67]。研究发现，AD 患者和 ApoE4 携带者大脑和脑脊液中二十二碳六烯酸（DHA）水平降低[68-69]。进一步的研究表明，ApoE4 基因可导致血脑屏障的破坏[70]、磷脂和胆固醇的失调[47]。相较于 ApoE3 转基因小鼠，ApoE4 转基因小鼠早在 8 ~ 20 周龄其血浆胆固醇、甘油三酯水平显著升高[71]。与 ApoE3/APP 小鼠相比，12 月龄 ApoE4/APP 小鼠脑中磷脂酰肌醇浓度降低[72]，15 月龄 ApoE4/APP 小鼠脑中磷脂酰甘油较低而鞘磷脂较高，且 12 月龄和 15 月龄的 ApoE4/APP 小鼠的磷脂酰胆碱也较高[72]。另外，高脂饮食（high fat diet，HFD）可增加 ApoE3 和 ApoE4 转基因小鼠的脂质和葡萄糖代谢紊乱，但雄性 HFD-ApoE4 转基因小鼠葡萄糖代谢速度和效率显著低于同性别 HFD-ApoE3 转基因小鼠[36-73]。同时研究发现，标准饮食时，ApoE4 转基因小鼠的 CA1 炎症明显多于 WT 小鼠，而 HFD 降低 ApoE4 转基因小鼠 CA1 中的 CD68 的表达[74]。这些结果提示 ApoE4 可能通过调节脂质与葡萄糖代谢及神经炎症进而影响血浆和脑中低密度膜结构域中的脂质组成。

3　ApoE4 转基因小鼠在 AD 防治药物研发中的应用

由于 ApoE4 转基因小鼠具有 AD 典型的认知行为学与病理特征，并参与 AD 的发病机制，其已被用于各类 AD 防治药物的研究中（见表 6）。

Guardia-Escote 等[75]通过给予 10 日龄大 C57、ApoE3、ApoE4 小鼠毒死蜱（溶于玉米油）灌胃 5 d，同时对照组小鼠给予 5 d 玉米油，2 个月后进行新物体识别检测，ApoE4 转基因小鼠相较于 ApoE3、C57 小鼠，学习记忆能力出现损伤，2 月龄小鼠给药乙酰胆碱酯酶抑制剂利斯的明（0.25 mg/kg），4 个月后 ApoE4 转基因雄性小鼠相较于对照组小鼠学习记忆能力改善，雌性小鼠无改善作用。

已有文献表明 ApoE4 转基因小鼠用于贝沙罗汀、睾酮、谷氨酰胺酶拮抗剂 JHU-083、水杨胺（salicylamide，SA）、戊巴比妥（pentobarbital，PB）等的评价。用类视黄醇 X 受体激动剂贝沙罗汀（100 mg/（kg · d））口服治疗 4 月龄雄性 ApoE4 转基因小鼠 10 d，能够缩短其在 MWM 中的逃避潜伏期[76]。睾酮（160 mg/（kg · d））腹腔注射 6 月龄 ApoE4 转基因小鼠可延长其在 Morris 水迷宫实验中的目标象限停留时间[77]，而皮下注射雄激素受体拮抗剂羟氟他胺却缩短其目标象限停留时间、延长逃避潜伏期[77]。Hollinger 等[78]研究发现 6 月龄雌性 ApoE4 转基因小鼠给予 JHU-083（每周 1.83 mg/kg 共 3 次）灌胃 4 ~ 5 个月，可缩短其在巴恩斯迷宫中学习期和检测期的逃避潜伏期、加快发现目标的速度。Davies 等[38]研究表明在 4 月龄雌、雄 ApoE4 转基因小鼠开始饲喂 1 g/L SA，持续到小鼠 12 ~ 14 月龄，可减少其在六臂放射性水迷宫实验中的错误次数、缩短逃避潜伏期。对 9 月龄雌、雄小鼠分别注

表 6 ApoE4 转基因小鼠用于 AD 防治药物药效评价的研究

Table 6 Study on the efficacy evaluation of apoE4 transgenic mice in the prevention and treatment of AD

药物种类 Drug types	药物名称 Drug name	给药剂量 Administration dosage	给药方式 Administration mode	月龄 Month ages	给药时长 Administration duration	方法 Methods	检测时期 Period of detection	检测结果 Results	变化 Change
	利斯的明 Rivastigmine	0.25 mg/kg	皮下注射 Subcutaneous injections	2[75]	2 月 2 months	NOR	检测期 Detection period	偏爱指数 Preference index	↑
	贝沙罗汀 Bexarotene	100 mg/(kg·d)	灌胃 Gavage	4[76]	10 d	MWM	检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	↓
	睾酮 Testosterone	160 mg/(kg·d)	皮下注射 Subcutaneous injections	6[77]	13 d	MWM	检测期 Detection period	目标象限停留时间 Time in the target quadrant	↑
	羟氟他胺 Hydroxyflutamide	–	–	6[77]	–	MWM	检测期 Detection period	目标象限停留时间、逃避潜伏期 Time in the target quadrant, Escape latency	↑
化学药 Chemical drugs	JHU-083	1.83 mg/(kg·w)×3	灌胃 Gavage	11[78]	4 ~ 5 月 4 ~ 5 months	BM	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↓
							检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	↓
	SA	1 g/L	灌胃 Gavage	12 ~ 14[38]	8 ~ 10 月 8 ~ 10 months	RM	检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	↓
							检测期 Detection period	错误次数、逃避潜伏期 Error times, Escape latency	↓
	BHB ACA	600 mg/(kg·d) 150 mg/(kg·d)	皮下注射 Subcutaneous injections	12[79]	3 月 3 months	MWM	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↓
	PB	20 mg/(kg·d)	BM	16[80]	2 周 2 weeks	MWM	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↓
				8、10[83-84]	2 月 2 months	NOR	检测期 Detection period	新物体识别时间 New object recognition time	↑
生物药 Biological drugs	EGF	300 μg/(kg·w)	皮下注射 Subcutaneous injections			YM	检测期 Detection period	新臂停留时间 Duration of arm visits in the novel	↑
				8.5[84-85]	2 月 2 months	NOR	检测期 Detection period	新物体识别时间 New object recognition time	↑
						YM	检测期 Detection period	新臂停留时间 New object recognition time	↑

续表6

药物种类 Drug types	药物名称 Drug name	给药剂量 Administration dosage	给药方式 Administration mode	月龄 Month ages	给药时长 Administration duration	方法 Methods	检测时期 Period of detection	检测结果 Results	变化 Change
	DHA	0.7 g DHA/100 g feed	–	12[32]	8 月 8 months	NOR	–	新物体偏爱指数 New object preference index	↑
中药 Traditional Chinese medicine	菊粉 Inulin	8% kcal/g	灌胃 Gavage	7[82]	4 月 4 months	MWM	检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	–
	姜黄素 Curcumin	40 mg/(kg·d)	皮下注射 Subcutaneous injections	9[21,81]	1 月 1 months	MWM	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↓

射酮类(β-羟丁酸 600 mg/(kg·d);乙酰乙酸 150 mg/(kg·d))3 个月,可缩短其在 MWM 中的逃避潜伏期、增加穿环次数、延长目标象限停留时间[79]。Tong 等[80]研究发现,给予 15.5 月龄 ApoE4 转基因雌性小鼠 2 周 GABAA 受体增强剂 PB(20 mg/kg),可使其在 Morris 水迷宫测试中逃避潜伏期缩短、目标象限停留时间延长。这些基于 ApoE4 转基因小鼠的研究表明,贝沙罗汀、睾酮、JHU-083、SA、酮类、PB 具有改善空间学习记忆能力的作用,提示它们可能具有防治 AD 的潜能。

文献报道,王明辉[81]研究发现多酚物质姜黄素(40 mg(kg·d))处理 9 月龄 ApoE4 转基因小鼠能缩短其在 Morris 水迷宫实验中的逃避潜伏期缩短、穿环次数增加。而在雌和雄性 $E4FAD^{+}$、$E4FAD^{-}$小鼠 3 月龄时喂养添加菊粉饲料至 7 月龄,发现对其空间学习记忆能力无作用[82]。

另外,Zaldua 等[83]研究发现无论是给 6 月龄 $E4FAD^{-}$和 $E4FAD^{+}$小鼠表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(每周 300 μg/kg)腹腔注射 2.5 个月,还是给与 8 月龄 $E4FAD^{-}$和 $E4FAD^{+}$小鼠 EGF 治疗 2 个月,均可延长其在新物体识别实验中对新物体关注的时间、在 Y 迷宫实验中的新臂停留时间,说明 EGF 具有改善空间学习记忆的能力。Chouinard-Watkins 等[32]喂食 4 月龄 ApoE4 转基因小鼠二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)饲料 8 个月后发现 ApoE4 转基因小鼠在巴恩斯迷宫实验中逃避潜伏期曲线下面积变小,新物体识别实验中,对新物体偏爱指数增加。

4　小结

大量研究证实携带 ApoE4 基因会使 AD 的发生提前,是 SAD 的最大危险因素。本文通过系统综述 ApoE4 转基因小鼠的认知功能损伤、病理特征及生理生化表型,分析 ApoE4 参与 AD 的发病机制途径,列举使用 ApoE4 转基因小鼠进行 AD 防治药物药效的评价研究,以期为利用 ApoE4 转基因小鼠进行 AD 相关研究提供参考。但是就目前文献报道来看,ApoE4 转基因小鼠的空间学习记忆、物体识别记忆、被动回避反应、主动回避反应、恐惧学习记忆等在内的认知能力还缺乏各个月龄的系统性研究,对于 AD 的特征性病理变化也缺乏充实的数据,其用于 AD 防治药物的研究也远不及 AD 其他动物模型如 APP、PS1、Tau 基因修饰类小鼠及快速老化模型小鼠(SAMP8)。但基于 ApoE 的生物学功能,ApoE4 转基因小鼠对于脂质代谢异常相关的 AD 发病机制研究是一个相对理想的工具。

参　考　文　献(References)

[1] Slot RER, Sikkes SAM, Berkhof J, et al. Subjective cognitive decline and rates of incident Alzheimer's disease and non-Alzheimer's disease dementia [J]. Alzheimers Dement, 2019, 15(3): 465-476.

[2] Vinciguerra F, Graziano M, Hagnäs M, et al. Influence of the Mediterranean and ketogenic diets on cognitive status and decline: a narrative review [J]. Nutrients, 2020, 12(4): 1019.

[3] Naseri NN, Wang H, Guo J, et al. The complexity of tau in Alzheimer's disease [J]. Neurosci Lett, 2019, 705: 183-194.

[4] Masterman T, Hillert J. The telltale scan: APOE epsilon4 in multiple sclerosis [J]. Lancet Neurol, 2004, 3(6): 331.

[5] Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families [J]. Science, 1993, 261(5123): 921-923.

[6] Yamazaki Y, Liu CC, Yamazaki A, et al. Vascular ApoE4 impairs behavior by modulating gliovascular function [J]. Neuron, 2021, 109(3): 438-447.e6.

[7] Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, et al. Purification and

characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse [J]. Neuron, 2016, 89(1): 37-53.

[8] Lin YT, Seo J, Gao F, et al. APOE4 causes widespread molecular and cellular alterations associated with Alzheimer's disease phenotypes in human iPSC-derived brain cell types [J]. Neuron, 2018, 98(6): 1294.

[9] Mathys H, Davila-Velderrain J, Peng Z, et al. Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease [J]. Nature, 2019, 570(7761): 332-337.

[10] Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease [J]. Cell, 2017, 169(7): 1276-1290.

[11] Suidan GL, Ramaswamy G. Targeting apolipoprotein E for Alzheimer's disease: an industry perspective [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2161.

[12] Mahley RW. Central nervous system lipoproteins: ApoE and regulation of cholesterol metabolism [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(7): 1305-1315.

[13] Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, et al. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth *in vitro* [J]. Science, 1994, 264(5160): 850-852.

[14] Jain S, Yoon SY, Leung L, et al. Cellular source-specific effects of apolipoprotein (Apo) E4 on dendrite arborization and dendritic spine development [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59478.

[15] Zlokovic BV. Cerebrovascular effects of apolipoprotein E: implications for Alzheimer disease [J]. JAMA Neurol, 2013, 70(4): 440-444.

[16] Rawat V, Wang S, Jian S, et al. ApoE4 alters ABCA1 membrane trafficking in astrocytes [J]. J Neurosci, 2019, 39(48): 9611-9622.

[17] Genin E, Hannequin D, Wallon D, et al. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance [J]. Mol Psychiatry, 2011, 16(9): 903-907.

[18] Nagy Z, Esiri MM, Jobst KA, et al. Influence of the apolipoprotein E genotype on amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease [J]. Neuroscience, 1995, 69(3): 757-761.

[19] Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease [J]. Nat Genet, 1994, 7(2): 180-184.

[20] Neu SC, Pa J, Kukull W, et al. Apolipoprotein E genotype and sex risk factors for alzheimer disease: a meta-analysis [J]. JAMA Neurol, 2017, 74(10): 1178-1189.

[21] Kou J, Wang M, Shi J, et al. Curcumin reduces cognitive deficits by inhibiting neuroinflammation through the endoplasmic reticulum stress pathway in apolipoprotein E4 transgenic mice [J]. ACS Omega, 2021, 6(10): 6654-6662.

[22] Rodriguez GA, Burns MP, Weeber EJ, et al. Young APOE4 targeted replacement mice exhibit poor spatial learning and memory, with reduced dendritic spine density in the medial entorhinal cortex [J]. Learn Mem, 2013, 20(5): 256-266.

[23] Salomon-Zimri S, Boehm-Cagan A, Liraz O, et al. *Hippocampus*-related cognitive impairments in young apoE4 targeted replacement mice [J]. Neurodegener Dis, 2014, 13(2/3): 86-92.

[24] Reverte I, Klein AB, Ratner C, et al. Behavioral phenotype and BDNF differences related to apoE isoforms and sex in young transgenic mice [J]. Exp Neurol, 2012, 237(1): 116-125.

[25] Sullivan PM, Mezdour H, Aratani Y, et al. Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis [J]. J Biol Chem, 1997, 272(29): 17972-17980.

[26] Raber J, Wong D, Buttini M, et al. Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(18): 10914-10919.

[27] Raber J, Wong D, Yu GQ, et al. Apolipoprotein E and cognitive performance [J]. Nature, 2000, 404(6776): 352-354.

[28] Meng FT, Zhao J, Fang H, et al. The influence of chronic stress on anxiety-like behavior and cognitive function in different human GFAP-ApoE transgenic adult male mice [J]. Stress, 2015, 18(4): 419-426.

[29] van Meer P, Acevedo S, Raber J. Impairments in spatial memory retention of GFAP-ApoE4 female mice [J]. Behav Brain Res, 2007, 176(2): 372-375.

[30] Kim JH, Jung H, Lee Y, et al. Surgery performed under propofol anesthesia induces cognitive impairment and amyloid pathology in ApoE4 knock-In mouse model [J]. Front Aging Neurosci, 2021, 13: 658860.

[31] Hartman RE, Wozniak DF, Nardi A, et al. Behavioral phenotyping of GFAP-ApoE3 and-ApoE4 transgenic mice: apoE4 mice show profound working memory impairments in the absence of Alzheimer's-like neuropathology [J]. Exp Neurol, 2001, 170(2): 326-344.

[32] Chouinard-Watkins R, Vandal M, Léveillé P, et al. Docosahexaenoic acid prevents cognitive deficits in human apolipoprotein E epsilon 4-targeted replacement mice [J]. Neurobiol Aging, 2017, 57: 28-35.

[33] Wang C, Wilson WA, Moore SD, et al. Human apoE4-targeted replacement mice display synaptic deficits in the absence of neuropathology [J]. Neurobiol Dis, 2005, 18(2): 390-398.

[34] Siegel JA, Haley GE, Raber J. Apolipoprotein E isoform-dependent effects on anxiety and cognition in female TR mice [J]. Neurobiol Aging, 2012, 33(2): 345-358.

[35] Lin LY, Zhang J, Dai XM, et al. Early-life stress leads to impaired spatial learning and memory in middle-aged ApoE4-TR mice [J]. Mol Neurodegener, 2016, 11(1): 51.

[36] Jones EA, Gillespie AK, Yoon SY, et al. Early hippocampal sharp-wave ripple deficits predict later learning and memory impairments in an Alzheimer's disease mouse model [J]. Cell Rep, 2019, 29(8): 2123-2133.

[37] Bour A, Grootendorst J, Vogel E, et al. Middle-aged human

apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks [J]. Behav Brain Res, 2008, 193(2): 174-182.

[38] Davies SS, Bodine C, Matafonova E, et al. Treatment with a γ-ketoaldehyde scavenger prevents working memory deficits in hApoE4 mice [J]. J Alzheimers Dis, 2011, 27(1): 49-59.

[39] Zhang L, Xu J, Gao J, et al. Decreased immunoglobulin G in brain regions of elder female APOE4-TR mice accompany with Aβ accumulation [J]. Immun Ageing, 2019, 16(1): 2.

[40] Liraz O, Boehm-Cagan A, Michaelson DM. ApoE4 induces Aβ42, tau, and neuronal pathology in the hippocampus of young targeted replacement apoE4 mice [J]. Mol Neurodegener, 2013, 8: 16.

[41] Shi Y, Yamada K, Liddelow SA, et al. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy [J]. Nature, 2017, 549(7673): 523-527.

[42] Dolejší E, Liraz O, Rudajev V, et al. Apolipoprotein E4 reduces evoked hippocampal acetylcholine release in adult mice [J]. J Neurochem, 2016, 136(3): 503-509.

[43] Andrews-Zwilling Y, Bien-Ly N, Xu Q, et al. Apolipoprotein E4 causes age- and Tau-dependent impairment of GABAergic interneurons, leading to learning and memory deficits in mice [J]. J Neurosci, 2010, 30(41): 13707-13717.

[44] Li G, Bien-Ly N, Andrews-Zwilling Y, et al. GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice [J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(6): 634-645.

[45] Sun GZ, He YC, Ma XK, et al. Hippocampal synaptic and neural network deficits in young mice carrying the human APOE4 gene [J]. CNS Neurosci Ther, 2017, 23(9): 748-758.

[46] Klein RC, Mace BE, Moore SD, et al. Progressive loss of synaptic integrity in human apolipoprotein E4 targeted replacement mice and attenuation by apolipoprotein E2 [J]. Neuroscience, 2010, 171(4): 1265-1272.

[47] Zhu L, Zhong M, Elder GA, et al. Phospholipid dysregulation contributes to ApoE4-associated cognitive deficits in Alzheimer's disease pathogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(38): 11965-11970.

[48] Larramona-Arcas R, González-Arias C, Perea G, et al. Sex-dependent calcium hyperactivity due to lysosomal-related dysfunction in astrocytes from *APOE*4 versus *APOE*3 gene targeted replacement mice [J]. Mol Neurodegeneration, 2020, 15(1): 35.

[49] Chin D, Hagl S, Hoehn A, et al. Adenosine triphosphate concentrations are higher in the brain of APOE3-compared to APOE4-targeted replacement mice and can be modulated by curcumin [J]. Genes Nutr, 2014, 9(3): 397.

[50] Morishima-Kawashima M, Han X, Tanimura Y, et al. Effects of human apolipoprotein E isoforms on the amyloid beta-protein concentration and lipid composition in brain low-density membrane domains [J]. J Neurochem, 2007, 101(4): 949-958.

[51] Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease [J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11(8): 457-470.

[52] Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor [J]. J Clin Invest, 2001, 108(6): 779-784.

[53] Kanekiyo T, Zhang J, Liu Q, et al. Heparan sulphate proteoglycan and the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 constitute major pathways for neuronal amyloid-β uptake [J]. J Neurosci, 2011, 31(5): 1644-1651.

[54] Koistinaho M, Lin S, Wu X, et al. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-β peptides [J]. Nat Med, 2004, 10(7): 719-726.

[55] Laporte V, Lombard Y, Levy-Benezra R, et al. Uptake of β1-40- and Abeta 1-42-coated yeast by microglial cells: a role for LRP [J]. J Leukoc Biol, 2004, 76(2): 451-461.

[56] Yamada K, Hashimoto T, Yabuki C, et al. The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid β peptides in an *in vitro* model of the blood-brain barrier cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283(50): 34554-34562.

[57] Castellano JM, Kim J, Stewart FR, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-β peptide clearance [J]. Sci Transl Med, 2011, 3(89): 89ra57.

[58] Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease [J]. Science, 2010, 330(6012): 1774.

[59] Nuriel T, Angulo SL, Khan U, et al. Neuronal hyperactivity due to loss of inhibitory tone in APOE4 mice lacking Alzheimer's disease-like pathology [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 1464.

[60] Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease [J]. N Engl J Med, 2012, 367(9): 795-804.

[61] Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease [J]. Nature, 2009, 461(7266): 916-922.

[62] Wood H. Alzheimer disease: ApoE4 implicated in tau-mediated neurodegeneration [J]. Nat Rev Neurol, 2017, 13(12): 706-707.

[63] Tesseur I, Van Dorpe J, Spittaels K, et al. Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice [J]. Am J Pathol, 2000, 156(3): 951-964.

[64] Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, et al. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction [J]. Nat Med, 2019, 25(2): 270-276.

[65] Montagne A, Nation DA, Sagare AP, et al. APOE4 leads to blood-brain barrier dysfunction predicting cognitive decline [J]. Nature, 2020, 581(7806): 71-76.

[66] Hultman K, Strickland S, Norris EH. The *APOE* ε4/ε4 genotype potentiates vascular fibrin(ogen) deposition in amyloid-laden vessels in the brains of Alzheimer's disease patients [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(8): 1251-1258.

[67] Hirsch-Reinshagen V, Burgess BL, Wellington CL. Why lipids are important for Alzheimer disease? [J]. Mol Cell Biochem, 2009, 326(1): 121-129.

[68] Belkouch M, Hachem M, Elgot A, et al. The pleiotropic effects of omega-3 docosahexaenoic acid on the hallmarks of Alzheimer's disease [J]. J Nutr Biochem, 2016, 38: 1-11.

[69] Nock TG, Chouinard-Watkins R, Plourde M. Carriers of an apolipoprotein E epsilon 4 allele are more vulnerable to a dietary deficiency in omega-3 fatty acids and cognitive decline [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017, 1862(10): 1068-1078.

[70] Yassine HN, Braskie MN, Mack WJ, et al. Association of docosahexaenoic acid supplementation with alzheimer disease stage in apolipoprotein E ε4 carriers: a review [J]. JAMA Neurol, 2017, 74(3): 339-347.

[71] Knouff C, Hinsdale ME, Mezdour H, et al. Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice [J]. J Clin Invest, 1999, 103(11): 1579-1586.

[72] Howard R, McShane R, Lindesay J, et al. Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease [J]. N Engl J Med, 2012, 366(10): 893-903.

[73] Zhao N, Liu CC, Van Ingelgom AJ, et al. Apolipoprotein E4 impairs neuronal insulin signaling by trapping insulin receptor in the endosomes [J]. Neuron, 2017, 96(1): 115-129.

[74] Janssen CIF, Jansen D, Mutsaers MPC, et al. The effect of a high-fat diet on brain plasticity, inflammation and cognition in female ApoE4-knockin and ApoE-knockout mice [J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155307.

[75] Guardia-Escote L, Basaure P, Peris-Sampedro F, et al. APOE genetic background and sex confer different vulnerabilities to postnatal chlorpyrifos exposure and modulate the response to cholinergic drugs [J]. Behav Brain Res, 2019, 376: 112195.

[76] Boehm-Cagan A, Michaelson DM. Reversal of ApoE4-driven brain pathology and behavioral deficits by bexarotene [J]. J Neurosci, 2014, 34(21): 7293-7301.

[77] Raber J, Bongers G, LeFevour A, et al. Androgens protect against apolipoprotein E4-induced cognitive deficits [J]. J Neurosci, 2002, 22(12): 5204-5209.

[78] Hollinger KR, Zhu X, Khoury ES, et al. Glutamine antagonist JHU-083 normalizes aberrant hippocampal glutaminase activity and improves cognition in APOE4 mice [J]. J Alzheimers Dis, 2020, 77(1): 437-447.

[79] Yin J, Nielsen M, Li S, et al. Ketones improves Apolipoprotein E4-related memory deficiency via sirtuin 3 [J]. Aging, 2019, 11(13): 4579-4586.

[80] Tong LM, Yoon SY, Andrews-Zwilling Y, et al. Enhancing GABA signaling during middle adulthood prevents age-dependent GABAergic interneuron decline and learning and memory deficits in ApoE4 mice [J]. J Neurosci, 2016, 36(7): 2316-2322.

[81] 王明辉. 姜黄素抑制 APOE4 介导的神经炎症机制研究 [D]. 开封: 河南大学; 2020.
Wang MH. Study on the anti-inflammatory mechanism of curcumin inhibiting APOE4-mediated neuroinflammation [D]. Kaifeng: Henan University; 2020.

[82] Hoffman JD, Yanckello LM, Chlipala G, et al. Dietary inulin alters the gut microbiome, enhances systemic metabolism and reduces neuroinflammation in an APOE4 mouse model [J]. PLoS One, 2019, 14(8): e0221828.

[83] Zaldua S, Damen FC, Pisharody R, et al. Epidermal growth factor treatment of female mice that express APOE4 at an age of advanced pathology mitigates behavioral and cerebrovascular dysfunction [J]. Heliyon, 2020, 6(5): e03919.

[84] Thomas R, Zuchowska P, Morris AWJ, et al. Epidermal growth factor prevents APOE4 and amyloid-beta-induced cognitive and cerebrovascular deficits in female mice [J]. Acta Neuropathol Commun, 2016, 4(1): 111.

[85] Thomas R, Morris AWJ, Tai LM. Epidermal growth factor prevents APOE4-induced cognitive and cerebrovascular deficits in female mice [J]. Heliyon, 2017, 3(6): e00319.

[收稿日期] 2022-04-11

张雪原,孔亚敏,马丙祥,等. 孤独症谱系障碍动物模型相关神经生物学研究进展［J］. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1141-1149.
Zhang XY, Kong YM, Ma BX, et al. Research progress in the neurobiology of animal models of autism spectrum disorder［J］. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1141-1149.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.017

孤独症谱系障碍动物模型相关神经生物学研究进展

张雪原[1],孔亚敏[2],马丙祥[1,2*],党伟利[2],周荣易[1,2],史文丽[1,2]

(1. 河南中医药大学儿科医学院,郑州 450046;2. 河南中医药大学第一附属医院儿科,郑州 450003)

【摘要】 孤独症谱系障碍(austim spectrum disorder,ASD)是一种以社交和沟通障碍以及重复和限制性行为为特征的神经发育障碍。ASD 的表型异质性使得确定核心症状涉及的确切病因和病理生理机制困难重重,且这些症状通常伴有注意缺陷多动障碍、癫痫发作和感觉运动异常等共患病。动物模型提供了阐明疾病的病因和发病机制的重要平台。越来越多的研究利用如环境暴露、母体免疫激活(maternal immune activation,MIA)等诱导的动物模型进行孤独症谱系障碍病因病机的探讨以及药物治疗靶点的筛选。该文综述常见动物模型的不同神经网络机制、脑组织及相关因子变化、症状表型等方面,为今后进行精准动物实验研究提供针对性的动物模型选择,也可为阐明疾病神经生物学、开发潜在的治疗药物提供参考。

【关键词】 孤独症谱系障碍;动物模型;环境暴露模型;母体免疫激活
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2022)08-1141-09

Research progress in the neurobiology of animal models of autism spectrum disorder

ZHANG Xueyuan[1], KONG Yamin[2], MA Bingxiang[1,2*], DANG Weili[2], ZHOU Rongyi[1,2], SHI Wenli[1,2]

(1. Medical School of Pediatrics, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003)
Corresponding author: MA Bingxiang. E-mail: mbx1963@126.com

【Abstract】 Autism spectrum disorder (ASD) is a range of neurodevelopmental disorders characterized by social and communication problems and repetitive and restrictive behaviors. The phenotypic heterogeneity of ASD makes it particularly difficult to determine the exact etiology and pathophysiology behind the core symptoms, which are usually accompanied by complications such as ADHD, seizures, and sensorimotor abnormalities. Animal models provide important platforms for clarifying the etiology and pathogenesis of diseases. More and more studies are using animal models induced by environmental exposure and maternal immune activation to explore the etiology and pathogenesis of ASD and screen for drug targets. This paper reviews the different neural network mechanisms, changes to brain tissue and related factors, symptom phenotypes, and other aspects of common animal models to provide a reference for those clarifying the neurobiology of ASD and developing potential drugs or therapeutic interventions, and to help with selecting targeted animal models for future precision experimental research.

【Keywords】 autism spectrum disorder; animal model; environmental exposure model; maternal immune activation
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目]河南省特色骨干学科项目(STG-ZYX03-202129,STG-ZYX06-202150)。
Funded by Henan Province Characteristic Backbone Discipline Project(STG-ZYX03-202129,STG-ZYX06-202150).
[作者简介]张雪原(1991—),女,硕士,研究方向:儿童神经系统疾病防治研究。Email:zxy10173421@163.com
[通信作者]马丙祥,男,博士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治小儿神经系统疾病。Email:mbx1963@126.com

孤独症谱系障碍(austim spectrum disorder, ASD)是一组神经发育障碍性疾病,其主要特征是社交互动和交流受损、重复、刻板行为和兴趣受限[1]。ASD 患者还常伴多种共患病,如智力障碍、言语语言障碍、注意缺陷多动障碍、抽动障碍、睡眠障碍、胃肠道功能障碍、焦虑、癫痫发作等。具有高度致残率,患病率为 1% ~ 2.5%,且呈不断上升趋势[2]。因本病为终身性疾病,致患儿难以融入社会,职业和其他功能方面受到影响,给患儿及家庭带来极大困难。ASD 的病因错综复杂,目前仍有争论,尚未鉴定出可用于明确临床诊断的标志物。尽管如此,过去几十年的研究已经确定了导致孤独症的各种风险因素,可分为遗传改变(罕见突变、基因变异、缺失、重复、染色体序列重组)和环境暴露(化学品暴露、产前和围产期因素、自然/社会环境)。然而在了解其确切的病理生理学机制和治疗方法方面仍存在不足,因此,有必要通过现有的 ASD 动物模型进行验证。基于已确定的风险因素和 ASD 的可能病因,创建了两种主要类型的动物模型模拟和了解这种疾病行为异常的病理机制,分别是病变模型和遗传模型。病变模型包括产前免疫激活、产前感染、产前丙戊酸、丙酸及其他药物暴露。ASD 动物模型的种类正在迅速扩大,并且在未来几年将不断增加,但仍需简明扼要地系统性评估其神经生物学意义,这篇综述汇总了 ASD 病变动物模型具备的神经生物学特性和药理学靶向治疗潜力,为今后开展病理生理学及治疗靶点等研究选取模型提供针对性选择(见表 1)。

1 丙戊酸(valproic acid, VPA)诱发模型

丙戊酸(VPA)是一种常用的抗惊厥药和情绪稳定剂,可缓解癫痫发作、偏头痛和躁狂发作等。女性在妊娠期使用可能会使后代出现包括脑组织异常、神经管缺陷、智力障碍和认知行为障碍等许多缺陷[3],与后代患 ASD 的病因和表现出的临床症状具有强烈相关性。从机制上讲,VPA 诱导的 ASD 动物模型增强了 Wnt1 信号通路的表达,GSK-3β/β-catein 通路被激活后并致胚胎脑神经发育增强,降低了 IKBα 的表达水平并激活了 NF-κβ 信号通路,从而导致神经延迟发育[4]。这些揭示了 ASD 中神经前体细胞(neural precursor cells, NPC)增殖和神经元过度生产的潜在的分子途径。还有研究发现,Notch 信号通路异常激活,相关分子 Notch1、Jagged1、Notch 细胞内结构域(notch intracellular domain, NICD)和 Hes1 表达增加,自噬和树突棘生长调节不良从而致 ASD 发病[5]。基因研究方面,VPA 大鼠大脑内存在较多表达基因及可变剪接基因,这些异常基因与神经系统疾病和神经系统发育有关,影响大鼠的社会行为[6]。研究结果还表明,在 ASD 模型中,大鼠大脑皮层中的几个谷氨酸能基因与 γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)能基因表达的平衡变化形成对比[7]。此外,与对照大鼠相比,VPA 诱导的大鼠异常社会行为相关基因的 mRSA 表达显著下调(编码 5-HT、脑内神经营养因子、neuriligin3 的基因)[8]。脑组织结构上,VPA 鼠与对照大鼠脑体积减少,小脑和脑干局灶性灰质密度降低[9],小叶 V1 体积增加,Ⅰ、Ⅳ、Ⅹ体积减小,这影响认知行为[10]。分子机制方面,VPA 诱导的浦肯野细胞(purkinje cell, PC)数量显著减少,在雌雄分别于正中副小叶、小脑后部显著,可能对小脑功能连接的大脑皮质区域产生发育影响[9],因为血氧水平依赖(blood oxygen level dependent, BOLD)反应与 PC 数量之间正相关[11],导致孤独症中观察到运动障碍和行为异常。而室旁核、脑脊液中的 AVP-ir 细胞数量减少,致使与情感和认知方面相关的脑功能减弱[12]。Pax6 通过丙戊酸盐暴露在胚胎皮层中短暂增加,导致谷氨酸能蛋白在后代产后脑中的表达增加[13];海马中 GABA 酶、谷氨酸脱氢酶 GAD67 蛋白降低,结合社会行为相关基因下调诱导了孤独症样行为[8]。海马组织中 Sphk2 和 S1p 上调,影响模型鼠学习及记忆障碍[14]。肝代谢酶下调从而减少血清多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)反应与 PC 数量之间正相关[11],导致孤独症中观察到运动障碍和行为异常。而小脑胶质增生,进一步致神经系统损伤和行为改变。此外,肠道菌群影响大脑正常功能,肠道菌群失调,粪便微生物丰富度降低、组成改变,粪便微生物群落的代谢潜能改变[15],与孤独症谱系障碍(ASD)患者患有胃肠道疾病的微生物改变表现一致。

VPA 诱导的啮齿动物模型目前认为是最适合孤独症的动物模型,也是研究直接或间接参与途径的最有效模型。其模型特点:动物性别、鼠龄使海马兴奋性不同;产前较产后诱导新生鼠死亡率低得多,且 ASD 核心症状及组织病理学变化更显著;VPA 以性别依赖性方式/性别特异性差异导致前额多巴胺系统功能减退;对大脑的影响以特定年龄和

表 1 ASD 动物模型构建概况一览表

Table 1 Overview of ASD anima model construction

试剂 Reagent	动物 Animals	孕龄或日龄 Pregnant age or birth day age	剂量 Dose	给药方式 Administration mode	频次 Frequency	神经生物学特点 Characteristic of neurobiology
丙戊酸 Valproic acid	瑞士小鼠、C57 小鼠、SD 大鼠、Wistar 大鼠 Swiss mice, C57 mice, SD rats, Wistar rats	E 11/12.5 d	600 mg/kg、400 mg/kg	腹腔注射 Intraperitoneal injection	单次 Single dose	最适合、最有效；神经管缺陷；脑在 mpfc 区域中显示出超连接性和超可塑性、增加的 NMDA/AMPA 比率 Most suitable and effective. Neural tube defects. The brain showed hyperconnectivity and superplasticity in the mpfc region, and increased NMDA/AMPA ratio.
丙酸 Propionic acid	大鼠 Rats	PN 21 d	250 mg/(kg·d)(po), 500 mg/(kg·d)(ip)	口服、腹腔注射 Peroral, intraperitoneal injection	3、5、7 次 3, 5, 7 times	双向调控线粒体功能，突触可塑性降低 Bidirectional regulation of the mitochondrial function, reduced synaptic plasticity was observed
脂多糖 Lipopolysacc-haride	Wistar 大鼠、SD 大鼠、C57BL6/J 小鼠 Wistar rats, SD rats, C57BL6/J mice	PN 2/3/5 d E 9.5/12/15 d	50 μg/kg、100 μg/kg	腹腔注射 Intraperitoneal injection	单次 Single dose	肠道微生物种群改变，增加的细胞密度，锥体神经元的兴奋性增加以及突触后谷氨酸能对 NMDA 诱导的突触可塑性的反应 Changes of intestinal microbial population. Increase cell density. Increased excitability of pyramidal neurons and postsynaptic glutamatergic response to NMDA-induced synaptic plasticity
Polyi:C	孕鼠、C57BL6/J 小鼠 Pregnant rat, C57BL6/J mice	E 12.5 d	20 mg/kg	腹腔注射 Intraperitoneal injection	单次 Single dose	肠道微生物种群改变，浦肯野细胞的空间局限性缺陷，PSD 畸形、嘌呤能受体下调以及 ERK1/2 和 CAMKII 磷酸化减少/突触复合物异常 Changes of intestinal microbial population. Spatially localized defects in Purkinje cells. PSD malformation, downregulation of purinergic receptors, and reduced ERK1/2 phosphorylation and CAMKII in the/synaptic complex abnormalities
博尔纳病毒 Borna disease virus	新生大鼠 Neonate rats	PN 1 d	20 μL 感染的脑匀浆（滴度 10^4 TCID50/g 脑组织，CRP3（He-80）BDV 毒株） 20 μL of infected brain homogenate (the titer was 10^4 TCID50/g of brain tissue, CRP3 (He-80) BDV strain) (BDV-infected rats)	颅内注射 Intracranial inoculation	单次 Single dose	中枢神经系统(CNS)神经化学递质的发育和区域异常，海马体损伤和小脑发育异常，BDV 血清阳性率增加 Development and regional abnormalities of neurochemical transmitters in the CNS. Hippocampal injury and cerebellar dysplasia. The BDV seroprevalence was increased
沙利度胺 Thalidomide	孕猴、Wistar 大鼠 Pregnant monkey, Wistar rats	E 9/11 d	500 mg/kg	口服 Peroral	1 次/2 次 Single/double dose	听觉敏感，无典型的 ASD 样行为表型，灵长类动物和啮齿动物之间的不同影响，可能不是 ASD 的合适动物模型 Auditory sensitivity. No typical ASD-like behavioral phenotype occurred. Differential effects between primates and rodents. Probably not a suitable animal model for ASD
米索前列醇 Misoprostol	孕鼠 Pregnant rats	PN 7 d	40 μg/kg	皮下注射 Subcutaneously Injection	单次 Single dose	研究较少，未发现显著的 ASD 样行为和神经功能障碍，大脑形态及神经元未见缺损 Due to few studies, no significant ASD-like behavior and neurological dysfunction were found. No defect in brain morphology and neurons

特定区域的方式;另外自主神经活动从胎儿期开始就已经发生变化。该模型的主要限制是缺乏行为、结构、功能和认知桥接参数,且在孤独症的遗传领域的研究很少。

2 丙酸(propionic acid, PPA)诱发模型

丙酸(PPA)是一种短链脂肪酸,是肠道微生物组的主要发酵产物,是新陈代谢的正常中间体,存在于天然食物或防腐剂中。PPA 和其他短链脂肪酸影响多种生理过程,如细胞信号传导、神经递质合成和释放、线粒体功能,过度暴露可产生类似于孤独症谱系障碍中所展现的大脑、行为变化及神经炎症反应[16]。为了探讨 PPA 在 ASD 病因学中的作用,在 Wistar 大鼠脑室内输注 PPA 后观察到氧化应激、神经炎症、细胞凋亡和神经递质失衡增强,存在兴趣减少、社交行为减弱、行为重复、焦虑等孤独症样表现。脑脂质谱、脑脂肪酸代谢水平在脑室内输注丙酸之后改变,且总单不饱和物、总 ω6 脂肪酸、总磷脂酰乙醇胺缩醛磷脂、ω6:ω3 比例降低,分离磷脂物种的总饱和水平提高。由于 ω6:ω3 脂肪酸的严重失衡使得促炎事件的风险增加导致了神经系统疾病,大鼠表现出刻板重复行进运动的频率显著增加。PPA 建模有剂量和时间依赖性效应[17]。PPA 主要对 ASD 患者的淋巴母细胞系(lymphoblast cell line, LCL)亚群的线粒体功能产生双向调节作用,具体取决于浓度、暴露持续时间和微环境氧化还原状态[18]。

3 母体免疫激活(maternal immune activation, MIA)模型

MIA 由细菌或病毒以不同的方式诱导。细菌内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和合成病毒 RNA 多肌苷酸:多胞苷酸(Poly I:C)通常用于啮齿动物造模,分别模仿细菌和病毒引起的病理过程。Hameete 等[19]提出母体免疫激活可能影响胎儿发育的潜在机制之一可能是胎儿中细胞因子浓度的改变,因为细胞因子在神经和免疫系统的功能和发育中发挥作用。这与 Saghazadeh 等[20]报道的 ASD 患者中促炎细胞因子的荟萃分析结果一致。

3.1 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱发模型

脂多糖是在革兰氏阴性细菌外膜中发现的免疫激活剂,可充当内毒素。妊娠期感染 LPS(模仿细菌感染)诱发母体免疫激活(MIA)与神经发育障碍密切相关。在胚胎发育后期注射 100 μg/(kg·d)的 LPS,检测到孕鼠血液中高于正常水平的 TNF-α 和 IL-6 可确认免疫激活成功[21]。先前的研究表明,产前暴露于 LPS 诱导孕母或后代孤独症样行为[22],如焦虑过度、社交互动减少以及学习和记忆受损。产前 LPS 暴露诱导 MIA,母体血清 IL-17A、IL-6、IL-17A mRNA 表达上调和产生 IL-17A 的 γδ T 细胞在子宫富集致后代 ASD 样行为[23],皮质酮水平升高使胎盘组织受损并导致活胎数减少[24]。注射 LPS 后,发现幼鼠在神经元发育的关键阶段,Nfe2l2 表达上调,增加了 Iba1+和 CD68+细胞数量,并且显著上调了海马体中的促炎细胞因子基因表达,增加了脑内丙二醛水平。在新生 10 日龄(PND 10)时,幼崽的超声发声(ultrasound voice, USV)减少,表明诱导促炎反应和氧化应激引发社会沟通障碍并显著降低了前脉冲抑制(pre-pulse inhibition, PPI)[25]。LPS 激发的幼年雌性表现出与孤独症相关的最显著的神经生物学改变,例如小胶质细胞激活增加和微清蛋白(parvalbumin, PV)损伤[26]。脑功能障碍与促炎细胞因子的改变以及小胶质细胞的数量和/或形态之间存在相关性。产前 LPS 诱导孤独症样效应与多巴胺能系统低活性密切相关[27]。LPS 模型雌鼠表现出基线运动不足和对苯丙胺的反应性降低,成年后社交能力受损、社会互动减少、记忆力差。而 LPS 雄性表现出空间学习(获取实验)和记忆(探针实验)障碍[22]。最近报道人类的 CX3CR1 基因变异导致不规则趋化因子(fractalkine, FKN)信号传导中断与神经发育障碍的风险增加有关。可能解释妊娠晚期的急性免疫损伤可以通过降低小胶质细胞 CX3CR1 蛋白表达来改变压裂素信号传导,突出神经元-小胶质细胞压裂素信号传导是神经发育障碍环境危险因素所致结果的相关靶标[28]。研究发现,产前、产后 LPS 暴露免疫激活可能影响大脑回路中不同的细胞靶点[29]。LPS 激发新生鼠后,雄性表现抑郁、焦虑、行为重复和工作记忆缺陷;雌性有质子泵抑制剂(proton pumump inhibitors PPI)缺陷,表现出性别差异[30]。新生仔鼠 LPS 暴露引发类似于孤独症谱系障碍的性别特异性行为和神经化学改变,构成与该疾病发展相关的性别偏见机制调查的相关模型[31-33],还可用于评估炎症反应性对孤独症相关行为的作用。

3.2 多肌苷:多胞苷酸(Poly(I:C))诱发模型

迄今为止,大多数母体免疫激活(MIA)研究都

是使用 LPS 和多肌苷:多胞苷酸(Poly(I:C))在啮齿动物中进行。Poly(I:C)是一种双链 RNA,模仿病毒感染可诱导 MIA。在怀孕期间注射 Poly(I:C)的大鼠的后代表现出与孤独症相关的表型,包括焦虑增加、刻板重复行为、社交互动和沟通减少、社会偏好、前驱抑制受损和感觉运动协调降低[3]。妊娠中期单次皮下注射 0.5 mg/kg 低剂量的 Poly(I:C)虽然对母体、胎儿或新生儿存活或出生后生长发育没有影响,然而,导致胎儿大脑中 TNF-α 的下调、感觉运动门控异常,后代在非空间记忆和学习任务以及活动方面表现出显著的损害[34]。在怀孕的 C57BL6/J 小鼠 GD 12.5 日接受单次注射 Poly I:C (20 mg/kg),在 MIA 后代海马体和小脑两个大脑区域发现神经炎症反应差异与性别显著相关,仅在雌性中观察到促炎因子 TNF-α、IL-6 和 iNOS 的显著反应。同时观察到,PND 28 时特定微生物群中拟杆菌门的增加和疣状菌门的减少,在青春期和成年早期给予 TNF-α 抑制剂可缓解接受 Poly(I:C)暴露的新生儿质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPI)缺乏[35]。脑组织学检查显示,分泌型糖蛋白 reelin 显著降低,胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达增加,特别是在海马体中小胶质细胞数量增加。这项研究证明产前亚临床感染可以对大脑发育产生深远影响[36]。不同批次的 Poly(I:C)可以诱导不同的免疫反应,并且对母体生理和妊娠结局产生不同的影响[37]。研究提示在使用 Poly(I:C)建立 MIA 模型时考虑所用产品的精确分子组成和免疫原性至关重要,应尽量减少分子量变异性和内毒素污染,以便进行更强大的 MIA 建模[38]。未来可以建立参考数据库,将表型数据与经验获得的高质量信息相结合,这有助于设计、实施和解释基于 poly(I:C)的 MIA 模型。

4　其他

4.1　博尔纳病毒(borna disease virus, BDV)诱发模型

博尔纳病毒(BDV)是一种高度嗜神经性、非节段性、单股负链的 RNA 病毒,是一种可传播的、进行性的、致命的病毒,持续性感染许多哺乳动物的中枢神经系统,可引起马和羊的脑脊髓炎,与人类的神经系统损伤和行为障碍有关[3]。有学者提出了两种可能 BDV 导致神经病理学的新机制,一是异常的胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)信号传导,IGF 信号传导被干扰后诱导 BDV 感染中的浦肯野细胞丢失。另一种是将 BDV 序列整合到宿主基因组中,BDV 整合子可能会使受感染细胞的转录组紊乱,从而影响 BDV 神经病理学[39]。BDV 感染是 ASD 的第一个病毒诱导的动物模型,Lewis 新生大鼠中通过 BDV 颅内接种,产生强大的适应性,可以持续感染中枢神经系统(central nervous system, CNS)的神经元使 CNS 神经化学递质的发育和区域异常而不会引起一般细胞死亡[40]。然而,BDV 感染后,神经元网络活性的活动依赖性增强受到干扰,可能是因为它对蛋白激酶 C 信号通路的影响[41]。Honda 等[42]调研了日本 ASD 儿童血清中博尔纳病毒抗体阳性的患病率为 7.4%,且性别之间无明显差异。此基线数据表明年幼儿童对 BDV 感染的高易感性,为此后的研究提供了有价值的数据支撑。总体来说,BDV 模型独特地结合了系统性脑功能异常(例如:免疫和神经递质紊乱)和选择性损伤(例如:脑病理学和行为缺陷)等特征,可能能够模拟 ASD 中各种假定的致病过程。BDV 模型的未来研究也可能旨在进一步阐明病毒对神经元和神经胶质细胞内分子过程的影响并导致行为缺陷的机制。

4.2　特布他林(trbutaline)诱发模型

特布他林是一种 β2-肾上腺素受体激动剂,超适应症用于早产的长期管理,与双卵双胞胎孤独症的一致性增加有关。免疫组织化学研究表明,PN 2 至 PN 5 时皮下注射特布他林可发现 PN 30 时大鼠大脑皮层以及小脑和脑皮质白质中的小胶质细胞活化强烈增加。在行为测试中,大鼠表现出对新奇和厌恶刺激的高反应模式[43]。Bercum 等[44]研究报道出一种新的孤独症和癫痫(epilepsy, EP)联合动物模型,孕鼠在整个怀孕期间受到轻度施压联合幼崽在出生后第 2 ~ 5 天注射特布他林可导致严重的异常行为症状,以及 45%的大鼠自发复发性惊厥发作和 100%的癫痫样脑电波。这种 ASD 和 EP 联合的新动物模型使得对共患病的细胞机制和潜在干预策略进行实验研究成为了现实。

4.3　米索前列醇(misoprostol)诱发模型

米索前列醇是一种合成的前列腺素 E1 类似物,高剂量给予孕妇引发子宫收缩可提前终止妊娠,低剂量给予妇女可帮助分娩。早前关于孤独症和妊娠期间使用米索前列醇阳性史的报告结果显示,米索前列醇暴露组孤独症发生率较高,为 3/

7[45],表现出孤独症特征的儿童的母亲怀孕期间均有流产药物米索前列醇的暴露史[46]。Koenig 等[47]研究未发现孕期暴露于米索前列醇 40 μg/kg 的 C57BL/6J 小鼠,其后代有显著的 ASD 样行为和神经功能障碍,大脑形态未受严重影响,海马神经元未见缺损,且米索前列醇可以保护神经并减少几种不同细胞类型的凋亡。总之,目前的结果不能支持孕期暴露米索前列醇对小鼠的神经发育毒性,因此,未来应进行对米索前列醇在包括 ASD 在内的神经发育障碍的病因学中是否作用及如何作用作进一步探讨。

4.4 沙利度胺(thalidomide, THAL)诱发模型

沙利度胺是一种治疗多种自身免疫性疾病的新型免疫调节药物,最初作为镇静药物研制,由于严重的致畸性而导致人类、非人类灵长类动物和兔子等多种动物躯体缺陷,如眼睛结构异常。妊娠 9 ~ 10 d 口服 500 mg/kg 沙利度胺可诱导出听觉超敏反应、学习能力受损等行为,未发现其他典型的 ASD 样行为表型[48]。雄性中研究的 Snap25 表达在 VPA 和 THAL 治疗的大鼠的海马和小脑中均升高,致畸物可能通过改变调节大脑正常发育的基因的表达模式来扰乱大脑的个体发育[49]。在孤独症个体中观察到的感觉和知觉异常中,据报道听觉超敏反应很常见。沙利度胺 ASD 动物模型中听觉脑干的异常揭示了人类孤独症的声音定位和听觉过敏的潜在机制。

5 结语

动物模型在阐明如何导致 ASD 病理生理学的不同机制方面发挥了重要作用。基于流行病学调查,ASD 动物模型大致为药物暴露、母体免疫激活两类。其中 MIA 模型和产前 VPA 暴露模型都一致地概括了孤独症的一般症状和表型。博尔纳病毒、特布他林、米索前列醇、沙利度胺等仅作为环境中异常病原生物的代表模型,为孤独症的一些关键特征的神经病理学和相应的行为异常提供了重要线索。

近年来,日益复杂的临床模型在神经化学、神经生理学和神经影像学的研究下使我们对 ASD 的潜在病因、生物学及神经网络机制有了深入的认识,并对开发治疗新方案和预防策略提供强大支撑。啮齿动物 VPA 模型可能适合检验 ASD 的未来干预措施。肠道微生物群与 MIA 模型中行为之间的密切关联,对于深入揭示了特定微生物分类群(主要在 PN 28 d)中的 MIA 变化,以描述 ASD 中肠道微生物群谱的明确趋势也至关重要。

目前的药物暴露研究可以为 ASD 的治疗提供有益的治疗策略参考。实验研究中,非诺贝特[50]、阿戈美拉汀[51]、米诺环素[52]均可显著减弱 VPA 前期诱导的小鼠社会互动减少等孤独症谱系障碍样行为。此外,非诺贝特还降低了产前 VPA 诱导的大脑区域氧化应激和炎症,阿戈美拉汀已被证明对 VPA 暴露前动物的行为、神经化学和血脑屏障改变具有改善作用。米诺环素还减弱脑氧化、亚硝化应激、炎症,增加钙含量和血脑屏障通透性。先前研究分析苏拉明(非选择性嘌呤能拮抗剂)对该模型的免疫学机理[53],另外应用在姜黄素补充改善模型鼠低体重、低脑体积及成熟延迟等方面研究[54]。在该模型鼠的支持下有学者采用不同剂量的右美沙芬分析改善氧化应激和炎症指标的水平,还包括神经元的损伤评分,以及孤独症模型鼠的前额叶皮层和海马中 pERK1/2 和 NMDA 信号的表达[55]。Guggulsterone(GST)是一种法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)拮抗剂,通过改变 JAK-STAT/PPAR γ 信号通路异常表达,从而缓解 PPA 诱导的成年大鼠孤独症实验模型的神经化学、形态学、大脑病理和组织学变化,孤独症行为得到改善[56]。研究证实促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)治疗对 LPS 诱导的孤独症大鼠模型中的 ASD 样症状、学习和记忆过程,神经元损失和神经炎症具有有益作用,通过抑制炎症和神经营养途径发挥作用时存在一些性别特异性[57]。应用艾塞那肽疗法在 LPS 诱导的孤独症模型中显示出对行为障碍的积极影响,可能是通过抑制炎症和氧化应激以及减少海马胶质病变来发挥其作用。此外,艾塞那肽(Ecenpeptide)也被证明对大脑 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)能和 GABA 能作用有积极影响[58]。

尽管存在用于诊断 ASD 的各种脑部成像和神经行为评估工具,但其诊断基础依赖于临床行为。实验动物模型对于了解包括 ASD 在内的一部分人类疾病的病因和发病机制都很重要。目前的研究将动物模型分为遗传和非遗传模型,其中非遗传模型未来还需在药物诱导 ASD 模型过程中制定剂量、给药途径、注射次数和妊娠时间等一系列范式共识。希望下一步研究在母体免疫模型中不仅对母

体免疫反应进行全面评估,还要提高可重复性工作,并提供对产前免疫激发影响胎儿发育的机制的深入见解,以探索针对免疫系统的新兴临床和临床前治疗,作为 ASD 药物发现工作的有前途的研究领域。

参 考 文 献(References)

[1] American Psychiatric Association Committee on Nomenclature and Statistics. Diagnostic and statistical manual of mental disorders [M]. Washington: American Psychiatric Association; 1968.

[2] Pedersen A, Pettygrove S, Meaney FJ, et al. Prevalence of autism spectrum disorders in Hispanic and non-Hispanic white children [J]. Pediatrics, 2012, 129(3): e629-e635.

[3] Kim KC, Gonzales EL, Lázaro MT, et al. Clinical and neurobiological relevance of current animal models of autism spectrum disorders [J]. Biomol Ther (Seoul), 2016, 24(3): 207-243.

[4] Go HS, Kim KC, Choi CS, et al. Prenatal exposure to valproic acid increases the neural progenitor cell pool and induces macrocephaly in rat brain via a mechanism involving the GSK-3β/β-catenin pathway [J]. Neuropharmacology, 2012, 63(6): 1028-1041.

[5] Zhang Y, Xiang Z, Jia Y, et al. The Notch signaling pathway inhibitor Dapt alleviates autism-like behavior, autophagy and dendritic spine density abnormalities in a valproic acid-induced animal model of autism [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2019, 94: 109644.

[6] Zhang R, Zhou J, Ren J, et al. Transcriptional and splicing dysregulation in the prefrontal cortex in valproic acid rat model of autism [J]. Reprod Toxicol, 2018, 77: 53-61.

[7] Lenart J, Augustyniak J, Lazarewicz JW, et al. Altered expression of glutamatergic and GABAergic genes in the valproic acid-induced rat model of autism: a screening test [J]. Toxicology, 2020, 440: 152500.

[8] Win-Shwe TT, Nway NC, Imai M, et al. Social behavior, neuroimmune markers and glutamic acid decarboxylase levels in a rat model of valproic acid-induced autism [J]. J Toxicol Sci, 2018, 43(11): 631-643.

[9] Spisák T, Román V, Papp E, et al. Purkinje cell number-correlated cerebrocerebellar circuit anomaly in the valproate model of autism [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 9225.

[10] Payne M, Mali I, McKinnell ZE, et al. Increased volumes of lobule VI in a valproic acid model of autism are associated with worse set-shifting performance in male Long-Evan rats [J]. Brain Res, 2021, 1765: 147495.

[11] Arafat EA, Shabaan DA. The possible neuroprotective role of grape seed extract on the histopathological changes of the cerebellar cortex of rats prenatally exposed to Valproic Acid: animal model of autism [J]. Acta Histochem, 2019, 121(7): 841-851.

[12] Wu J, Dai YC, Lan XY, et al. Postnatal AVP treatments prevent social deficit in adolescence of valproic acid-induced rat autism model [J]. Peptides, 2021, 137: 170493.

[13] Kim KC, Lee DK, Go HS, et al. Pax6-dependent cortical glutamatergic neuronal differentiation regulates autism-like behavior in prenatally valproic acid-exposed rat offspring [J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(1): 512-528.

[14] Zhao G, Gao J, Liang S, et al. Study of the serum levels of polyunsaturated fatty acids and the expression of related liver metabolic enzymes in a rat valproate-induced autism model [J]. Int J Dev Neurosci, 2015, 44: 14-21.

[15] Mirza R, Sharma B. A selective peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonist benefited propionic acid induced autism-like behavioral phenotypes in rats by attenuation of neuroinflammation and oxidative stress [J]. Chem Biol Interact, 2019, 311: 108758.

[16] Mirza R, Sharma B. Selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor-α protects propionic acid induced autism-like phenotypes in rats [J]. Life Sci, 2018, 214: 106-117.

[17] Meeking MM, MacFabe DF, Mepham JR, et al. Propionic acid induced behavioural effects of relevance to autism spectrum disorder evaluated in the hole board test with rats [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2020, 97: 109794.

[18] Frye RE, Rose S, Chacko J, et al. Modulation of mitochondrial function by the microbiome metabolite propionic acid in autism and control cell lines [J]. Transl Psychiatry, 2016, 6(10): e927.

[19] Hameete BC, Fernández-Calleja JMS, de Groot MWGDM, et al. The poly (I: C)-induced maternal immune activation model; a systematic review and meta-analysis of cytokine levels in the offspring [J]. Brain Behav Immun Health, 2020, 11: 100192.

[20] Saghazadeh A, Ataeinia B, Keynejad K, et al. A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: effects of age, gender, and latitude [J]. J Psychiatr Res, 2019, 115: 90-102.

[21] Batinić B, Santrač A, Divović B, et al. Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not adolescent rat offspring [J]. Behav Brain Res, 2016, 299: 72-80.

[22] Das I, Estevez MA, Sarkar AA, et al. A multifaceted approach for analyzing complex phenotypic data in rodent models of autism [J]. Mol Autism, 2019, 10: 11.

[23] Yasumatsu K, Nagao JI, Arita-Morioka KI, et al. Bacterial-induced maternal interleukin-17A pathway promotes autistic-like behaviors in mouse offspring [J]. Exp Anim, 2020, 69(2): 250-260.

[24] Kirsten TB, Lippi LL, Bevilacqua E, et al. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: relevance to autism [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82244.

[25] Okano H, Takashima K, Takahashi Y, et al. Ameliorating effect of continuous alpha-glycosyl isoquercitrin treatment starting from late gestation in a rat autism model induced by postnatal injection of lipopolysaccharides [J]. Chem Biol Interact, 2022, 351: 109767.

[26] Cristino LMF, Chaves Filho A, Custódio CS, et al. Animal model of neonatal immune challenge by lipopolysaccharide: a study of sex influence in behavioral and immune/neurotrophic alterations in juvenile mice [J]. Neuroimmunomodulation, 2022, 10:1-11.

[27] Kirsten TB, Chaves-Kirsten GP, Chaible LM, et al. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide [J]. J Neurosci Res, 2012, 90(10): 1903-1912.

[28] Fernández de Cossío L, Lacabanne C, Bordeleau M, et al. Lipopolysaccharide-induced maternal immune activation modulates microglial CX3CR1 protein expression and morphological phenotype in the hippocampus and dentate gyrus, resulting in cognitive inflexibility during late adolescence [J]. Brain Behav Immun, 2021, 97: 440-454.

[29] Li Y, Missig G, Finger BC, et al. Maternal and early postnatal immune activation produce dissociable effects on neurotransmission in mPFC-amygdala circuits [J]. J Neurosci, 2018, 38(13): 3358-3372.

[30] Iveta V, Kristyna M, Viera K, et al. Behavioral alterations and decreased number of parvalbumin-positive interneurons in wistar rats after maternal immune activation by lipopolysaccharide: sex matters [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6): 3274.

[31] Foley KA, Ossenkopp KP, Kavaliers M, et al. Pre- and neonatal exposure to lipopolysaccharide or the enteric metabolite, propionic acid, alters development and behavior in adolescent rats in a sexually dimorphic manner [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87072.

[32] Foley KA, MacFabe DF, Kavaliers M, et al. Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to lipopolysaccharide, and prenatal and postnatal exposure to propionic acid, on acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent rats: relevance to autism spectrum disorders [J]. Behav Brain Res, 2015, 278: 244-256.

[33] Custódio CS, Mello BSF, Filho AJMC, et al. Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age-related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(5): 3775-3788.

[34] Ratnayake U, Quinn T, LaRosa DA, et al. Prenatal exposure to the viral mimetic poly I: C alters fetal brain cytokine expression and postnatal behaviour [J]. Dev Neurosci, 2014, 36(2): 83-94.

[35] Tartaglione AM, Villani A, Ajmone-Cat MA, et al. Maternal immune activation induces autism-like changes in behavior, neuroinflammatory profile and gut microbiota in mouse offspring of both sexes [J]. Transl Psychiatry, 2022, 12(1): 384.

[36] Ratnayake U, Quinn TA, Castillo-Melendez M, et al. Behaviour and hippocampus-specific changes in spiny mouse neonates after treatment of the mother with the viral-mimetic Poly I: C at mid-pregnancy [J]. Brain Behav Immun, 2012, 26(8): 1288-1299.

[37] Mueller FS, Richetto J, Hayes LN, et al. Influence of poly (I: C) variability on thermoregulation, immune responses and pregnancy outcomes in mouse models of maternal immune activation [J]. Brain Behav Immun, 2019, 80: 406-418.

[38] Kowash H, Potter H, Edye M, et al. Poly (I: C) source, molecular weight and endotoxin contamination affect dam and prenatal outcomes, implications for models of maternal immune activation [J]. Brain Behav Immun, 2019, 82: 160-166.

[39] Honda T. Neuropathogenesis of persistent infection with Borna disease virus [J]. Uirusu, 2015, 65(1): 145-154.

[40] Taieb O, Baleyte JM, Mazet P, et al. Borna disease virus and psychiatry [J]. Eur Psychiatry, 2001, 16(1): 3-10.

[41] Schwemmle M, Heimrich B. Viral interference with neuronal integrity: what can we learn from the Borna disease virus? [J]. Cell Tissue Res, 2011, 344(1): 13-16.

[42] Honda T, Sofuku K, Matsunaga H, et al. Prevalence of antibodies against Borna disease virus proteins in Japanese children with autism spectrum disorder [J]. Microbiol Immunol, 2018, 62(7): 473-476.

[43] Donovan APA, Basson MA. The neuroanatomy of autism-a developmental perspective [J]. J Anat, 2017, 230(1): 4-15.

[44] Bercum FM, Rodgers KM, Benison AM, et al. Maternal stress combined with terbutaline leads to comorbid autistic-like behavior and epilepsy in a rat model [J]. J Neurosci, 2015, 35(48): 15894-15902.

[45] Bandim JM, Ventura LO, Miller MT, et al. Autism and Möbius sequence: an exploratory study of children in northeastern Brazil [J]. Arq Neuropsiquiatr, 2003, 61(2A): 181-185.

[46] Miller MT, Strömland K, Ventura L, et al. Autism with ophthalmologic malformations: the plot thickens [J]. Trans Am Ophthalmol Soc, 2004, 102: 107-120.

[47] Koenig CM, Walker CK, Qi L, et al. Lack of evidence for neonatal misoprostol neurodevelopmental toxicity in C57BL6/J mice [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38911.

[48] Tsugiyama LE, Ida-Eto M, Ohkawara T, et al. Altered neuronal activity in the auditory brainstem following sound stimulation in thalidomide-induced autism model rats [J]. Congenit Anom, 2020, 60(3): 82-86.

[49] Lenart J, Bratek E, Lazarewicz JW, et al. Changes in the expression of SNAP-25 protein in the brain of juvenile rats in two models of autism [J]. J Mol Neurosci, 2020, 70(9): 1313-1320.

[50] Mirza R, Sharma B. Benefits of Fenofibrate in prenatal valproic acid-induced autism spectrum disorder related phenotype in rats [J]. Brain Res Bull, 2019, 147: 36-46.

[51] Kumar H, Sharma BM, Sharma B. Benefits of agomelatine in

behavioral, neurochemical and blood brain barrier alterations in prenatal valproic acid induced autism spectrum disorder [J]. Neurochem Int, 2015, 91: 34-45.

[52] Kumar H, Sharma B. Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats [J]. Brain Res, 2016, 1630: 83-97.

[53] Hirsch MM, Deckmann I, Santos-Terra J, et al. Effects of single-dose antipurinergic therapy on behavioral and molecular alterations in the valproic acid-induced animal model of autism [J]. Neuropharmacology, 2020, 167: 107930.

[54] Al-Askar M, Bhat RS, Selim M, et al. Postnatal treatment using curcumin supplements to amend the damage in VPA-induced rodent models of autism [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 259.

[55] Singla R, Mishra A, Joshi R, et al. Inhibition of the ERK1/2 phosphorylation by dextromethorphan protects against core autistic symptoms in VPA induced autistic rats: *In silico* and *in vivo* drug repurposition study [J]. ACS Chem Neurosci, 2021, 12(10): 1749-1767.

[56] Khera R, Mehan S, Bhalla S, et al. Guggulsterone mediated JAK/STAT and PPAR-Gamma modulation prevents neurobehavioral and neurochemical abnormalities in propionic acid-induced experimental model of autism [J]. Molecules, 2022, 27(3): 889.

[57] Solmaz V, Erdoğan MA, Alnak A, et al. Erythropoietin shows gender dependent positive effects on social deficits, learning/memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the lipopolysaccharide induced rat model of autism [J]. Neuropeptides, 2020, 83: 102073.

[58] Solmaz V, Tekatas A, Erdoğan MA, et al. Exenatide, a GLP-1 analog, has healing effects on LPS-induced autism model: inflammation, oxidative stress, gliosis, cerebral GABA, and serotonin interactions [J]. Int J Dev Neurosci, 2020, 80(7): 601-612.

[收稿日期] 2022-05-13

一例罕见大熊猫癌症的报道:胰腺导管腺癌(PDAC)

大熊猫为我国特有物种,被誉为“中国国宝”。大熊猫对现生环境适应能力不佳是其濒危的重要内在因素之一,其中,疾病死亡也可能引起大熊猫数量减少。胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)属于胰腺癌中较为常见的一种组织分型,恶性程度极高。在人类中,PDAC 的发生率约占胰腺癌的 90%以上,但 PDAC 在野生动物中并不常见。本文介绍了一例大熊猫 PDAC 病理诊断案例,以期为今后野生动物肿瘤的诊断提供参考意见。

本病例,雌性,死亡时 32 岁。对其进行组织病理学观察,胰腺组织内可见大量泡沫样管状腺癌结构;腺上皮呈透明样,细胞核大小差异明显;腺管结构不规则,呈乳头状生长,乳头表面为单层上皮细胞;部分胰腺导管上皮被高柱状黏液细胞取代,黏液细胞呈假复层样柱状上皮结构。Masson 染色可以更清晰地观察到肿瘤组织中细胞核大小差异明显、核异型性、核分裂像,以及杂乱、不规则的腺管结构。据此初步判定该胰腺为高分化或中分化导管腺癌,伴随胰腺上皮内肿瘤的癌前病变。为进一步进行胰腺导管腺癌与慢性胰腺炎的鉴别诊断,本研究进行了肿瘤特异性标记物 CK7、CK19 免疫组化染色,结果显示胰腺组织 CK7、CK19 呈阳性表达,据此判定该大熊猫患 PDAC。

近年来,关于动物原发性 PDAC 的报道较为少见,且报道以胰腺外分泌肿瘤为主,患病动物多见于犬、牛等。野生动物未见相关报道,这可能与野生动物 PDAC 罕见有关。现阶段关于大熊猫疾病的病理报告也很少见,关于大熊猫肿瘤的文章则更少,大熊猫肿瘤的患病风险至今仍是未知数,导致大熊猫肿瘤发生的因素也不清楚,这方面的工作应当进一步推进。

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(6):582-586; https://doi.org/10.1002/ame2.12269