

杜冯,梁李钺,邹坤,等. 两种 C57BL/6J 小鼠酒精性脂肪肝模型建立方法及比较 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 557-566.
Du F, Liang LC, Zou K, et al. Establishment and comparison of two alcoholic fatty liver models in C57BL/6J mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 557-566.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.001

两种 C57BL/6J 小鼠酒精性脂肪肝模型 建立方法及比较

杜冯¹, 梁李钺², 邹坤¹, 马明华³, 黄文峰^{4*}

(1. 天然产物研究与利用湖北省重点实验室 三峡大学基础医学院, 湖北 宜昌 443002;
2. 三峡大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室 三峡大学基础医学院, 湖北 宜昌 443002;
3. 宜昌市森林火灾预防中心, 湖北 宜昌 443000; 4. 湖北三峡职业技术学院 康养与护理学院, 湖北 宜昌 443000)

【摘要】 目的 短期内建立以酒精液体饲料和酒精加高脂饲料所诱导的两种 C57BL/6J 小鼠酒精性脂肪肝模型,并基于生物化学及组织病理学等方法进行比较,以筛选出较为高效的小鼠酒精性脂肪肝模型。**方法** 24 只健康 C57BL/6J 雄性小鼠,适应性饲养 2 周后,随机分为维持饲料组、液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组共 4 个组($n = 6$)。各组记录每日饲料消耗量及体重变化情况。第 16 天处死后测定血清转氨酶活性及血清血脂、血糖含量。制备肝石蜡切片及冰冻切片,分别进行 HE 染色和油红 O 染色。**结果** 根据统计学分析,相比其他三组酒精液体饲料组小鼠体重呈明显的下降趋势且体重增长率为负增长。高脂饲料组饮食热量摄入明显低于其他三组。液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组三组肝质量与肝质量系数明显低于维持饲料组。生化结果显示,酒精液体饲料组 ALT、AST、TC 水平显著高于维持饲料组,血糖水平高于维持饲料组;酒精液体饲料组 ALT、AST、TC、血糖也高于液体饲料对照组。高脂饲料组血清 TC 显著高于维持饲料组,AST、血糖高于维持饲料组;高脂饲料组血糖显著高于液体饲料对照组。病理染色结果显示,酒精液体饲料组小鼠肝中有大量脂质沉积,高脂饲料组次之。**结论** 短期 Gao-Binge 模型与酒精加高脂饲料模型都能成功诱导 C57BL/6J 小鼠出现 AFL 的相应生化与病理特征,且 Gao-Binge 模型组的相应病理指标比后者更加显著,适合于急性 AFL 模型的建立。

【关键词】 酒精性肝病;酒精性脂肪肝;Gao-Binge 模型;酒精肝模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0557-10

Establishment and comparison of two alcoholic fatty liver models in C57BL/6J mice

DU Feng¹, LIANG Licheng², ZOU Kun¹, MA Minghua³, HUANG Wenfeng^{4*}

(1. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Utilization, College of Basic Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, China. 2. State Administration of Traditional Chinese Medicine Third-Level Research Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology, College of Basic Medicine, Three Gorges University, Yichang 443002. 3. Yichang Forest Fire Prevention Center, Yichang 443000. 4. College of Health Care and Nursing, Hubei Three Gorges Polytechnic, Yichang 443000)

Corresponding author: HUANG Wenfeng. E-mail: huangwenfeng@tgc.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish models of an alcoholic fatty liver induced by a alcohol liquid diet and alcohol combined with a high fat diet in C57BL/6J mice in a short time and assess a more efficient model of an alcoholic fatty liver in mice by biochemical and histopathological method. **Methods** Twenty-four healthy male C57BL/6J mice acclimated for 2

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82204237)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(82204237).

【作者简介】 杜冯(1990—),男,硕士,研究方向:天然产物药理活性评价。Email: 348376607@qq.com

【通信作者】 黄文峰(1975—),男,医学博士,副教授,硕士导师,研究方向:中药的活性评价与应用。Email: huangwenfeng@tgc.edu.cn

weeks were randomly divided into four groups ($n = 6$): maintenance diet group, liquid diet control group, alcohol liquid feed group and high fat diet group. Daily feed consumption and body weight were recorded. On day 16, the animals were sacrificed and serum transaminase activity, serum lipids, and blood glucose were measured. Paraffin-embedded sections and frozen sections of the liver were prepared and stained with HE and oil red O, respectively. **Results** Compared with the other three groups, the body weight of mice in alcohol liquid feed group showed a significant downward trend and the growth rate was negative. The caloric intake of high fat diet group was significantly lower than that of the other three groups. The liver weight and liver weight index of the liquid diet control group, alcohol liquid diet group and high fat diet group were significantly lower than those of the maintenance diet group. The biochemical results showed that the levels of ALT, AST and TC in the alcohol liquid diet group were significantly higher than those in the maintenance diet group, and the blood glucose level was higher than that in the maintenance diet group. ALT, AST, TC and blood glucose in the alcohol liquid diet group were also higher than those in the liquid diet control group. Serum TC in the high fat diet group was significantly higher than that in the maintenance diet group, and AST and blood glucose were higher than those in the maintenance diet group. The blood glucose of high fat diet group was significantly higher than that of liquid diet control group. Pathological staining results showed that there was a large amount of lipid deposition in the liver of mice in the alcohol liquid diet group, followed by the high fat diet group. **Conclusions** The short-term Gao-Binge model and alcohol plus high fat diet model can successfully induce the corresponding biochemical and pathological characteristics of AFL in C57BL/6J mice, and the corresponding pathological indexes of Gao-Binge model group are more significant than the latter, which is suitable for the establishment of acute AFL model.

[Keywords] alcoholic liver disease; alcoholic fatty liver disease; Gao-Binge model; alcoholic liver model

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

酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 是由于过量摄入酒精导致的肝病, 酒精性脂肪肝 (alcoholic fatty liver, AFL) 是酒精性肝病最早期的病理学改变, 早期脂肪肝通常没有明显的临床症状^[1]。AFL 可进一步发展为肝炎、肝纤维化及肝硬化甚至肝癌^[2]。早期的肝细胞脂肪变性对后续酒精性肝病的进一步发展及转归具有极重要的影响^[3]。AFL 可通过控制酒精摄入和药物干预而逆转, 因而是阻断 ALD 进展的最佳干预阶段。同时针对药理学研究, 早期 AFL 模型成功的建立, 能帮助早期 ALD 患者有效地筛选药物, 防止后续疾病的恶化。

目前建立动物 ALD 模型的方法多种多样^[4], 如急性酒精灌胃模型^[5]、Lieber-DeCarli 模型^[6-7]、Gao-Binge 模型^[8]等。在动物的选择方面, 目前 C57BL/6J 小鼠因其酒精偏好性较高及经济性较好成为 ALD 模型建立的首选^[9-11]。因此, 针对早期 ALD 动物模型的特点, 筛选出死亡率低、建模周期相对较短、有标准病理表现的建模方式非常必要。

在 Lieber-DeCarli 模型基础上改进建立的 Gao-Binge 模型, 是当前 ALD 模型中广泛应用的模型, 该模型具有造模时间短、病死率低、符合人类饮酒模式等特点^[12]。同时, 酒精加高脂饮食饲养模型由于致死率低、成本低、操作难度低且短期内能达到

ALD 早期 AFL 的标准, 也被广泛应用于 AFL 模型的建立^[13-15]。以上两种模型都是目前较为常用的能降低甚至消除酒精醇强制性摄入, 如灌胃、胃部置管等方式影响的脂肪肝模型建立手段。

但是, 酒精性肝病动物模型各有利弊, 并不能完全复制且体现 ALD 各阶段的病理学特点, 也无科学详尽的模型供建立与比较参考, 特别是相关 ALD 研究在前期模型的选择时困惑较大^[16], 同时存在建立周期较长、模型动物死亡率过高等问题^[17]。因此, 提供常见 ALD 模型的比较数据就显得极为必要, 本研究基于生物化学、组织学等相应指标, 对不同的模型进行比较, 为早期酒精性脂肪肝模型的应用及建立提供更多理论和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 6 ~ 8 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 购自三峡大学实验动物中心【SCXK (鄂) 2022-0012】。正常饮食, 实验正式开展前适应性喂养 2 周, 使雄性小鼠体重尽量大于 20 g 以符合后期实验要求^[12]。饲养环境: 室温 25 ~ 27℃, 湿度 50% ~ 60%, 昼夜灯光控制周期为 12 h, 每周 2 次更换垫料, 饲养于三峡大学实验动物中心【SYXK (鄂)

2022-0061】。动物实验操作过程严格遵守三峡大学医学院实验动物伦理委员会伦理管理要求(2022B10A01)。

1.1.2 主要试剂与仪器

丙氨转移酶(ALT)测定试剂盒(雷杜, S03030);谷草转移酶(AST)测定试剂盒(雷杜, S03040);甘油三酯测定试剂盒(雷杜, S03027);总胆固醇测定试剂盒(雷杜, S03042);葡萄糖测定试剂盒(雷杜, S03039);95%玉米食用酒精(河南鑫河阳酒精有限公司, 20211220)。全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技, Chemray 800);脱水机(Leica, 德国);病理组织切片机(Leica, 德国);多功能显微镜及图像分析系统(Leica, 德国);摊片烤片机(湖北宏业医用仪器有限公司)。

1.1.3 饲料选择及配方

大小鼠维持饲料:普通维持饲料。粗蛋白 $\geq 18\%$ 、粗脂肪 $\geq 4\%$ 、粗纤维 $\leq 5\%$ 、粗灰分 $\leq 8\%$ 。购自三峡大学实验动物中心。该饲料热量为 3.4 kcal/g。

TP 4030C:酒精肝模型饲料的液体对照饲料。脂肪 35%、蛋白质 18%、碳水化合物 47%,购自江苏特洛菲饲料科技有限公司。该液体饲料热量为 1 kcal/mL。

TP 4030D:酒精热量 28%(酒精含量:5% V/V, 100 U 体积的酒精溶液中含有 5 U 体积的酒精)脂肪 35%、蛋白质 18%、碳水化合物 19%、酒精 28%。用于小鼠酒精性脂肪肝造模的 Gao-Binge 法,购自江苏特洛菲饲料科技有限公司。该液体饲料热量为 1 kcal/mL。

60%高脂饲料(MD12033):蛋白质 20%、脂肪 60%、碳水化合物 20%,购自江苏美迪森生物医药有限公司。该饲料热量为 4.75 kcal/g。

1.2 方法

1.2.1 分组与动物模型建立

将 24 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为维持饲料组、液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组 4 个组($n = 6$)。维持饲料组为阴性对照组,普通大小鼠维持饲料饲养、自由进食进水。液体饲料对照组为液体饲料阴性对照,按 TP 4030C 液体对照饲料指导说明饲养、禁水;酒精液体饲料组按照 Gao-Binge 模型^[12]建立及 TP 4030D 酒精液体饲料指导说明饲养、禁水。第 16 天 7:00 ~ 9:00, 31.5% (V/V)酒精溶液灌胃,9 h 后动物标本取材。高脂

饲料组:60%高脂饲料饲养自由进食,20% (V/V)酒精溶液自由饮用,每日更换。第 16 天 7:00 ~ 9:00, 31.5% (V/V)酒精溶液灌胃,9 h 后动物标本取材。

1.2.2 动物体征及行为观察

每天观察小鼠的活动、进食、精神状态、毛发、排泄物及死亡情况。

1.2.3 动物体重及进食量变化

每天观察记录小鼠的进食量,酒精液体饲料及其对照饲料换算成热量单位记录。每 2 d 记录小鼠体重的变化情况。

1.2.4 肝质量及质量指数计算

小鼠取血完毕后,固定小鼠,开腹腔,取肝进行称量,计算其质量指数。

肝质量指数 = 肝质量(g)/体重(g) $\times 100\%$

1.2.5 血清生化指标含量测定

取血后,血浆 4℃ 静置 30 min, 3500 r/min 离心 15 min,得到分离血清, -80℃ 保存。按照试剂盒中说明书介绍的方法上机进行血清生化指标检测。

1.2.6 肝组织病理形态学分析

取血完毕后,取部分小鼠肝组织,并将其分为两部分:①用 4%多聚甲醛溶液固定,乙醇梯度脱水,常规石蜡包埋,连续 4 μm 切片,经 HE 染色后,在光镜下观察肝组织病理学变化;②用 4%多聚甲醛溶液固定后,依次用 20% 及 30% 蔗糖溶液脱水 24 h,脱水后经 OCT 包埋进行冰冻切片,切片时温度为 -18℃,厚度为 6 ~ 8 μm 。肝冰冻切片经油红染色后,显微镜进行观察脂质沉积情况。

1.3 统计学分析

计量资料用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据均使用 GraphPad Prism 8 分析,对于符合正态性和方差齐性的计量资料,用单因素方差分析检验(LSD 进行两两比较),两组间差异比较,采用两独立样本的 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 C57BL/6J 小鼠体征及行动观察

如图 1 所示,维持饲料组、液体饲料对照组小鼠各状态良好,皮毛顺亮,行动灵敏且迅速,精神良好。酒精液体饲料组、高脂饲料组小鼠小鼠毛色暗淡,毛发凌乱显疏松,部分小鼠显消瘦,活动状态较维持饲料组和液体饲料对照组减弱,扎堆喜蜷卧。

实验后期,液体饲料对照组、酒精液体饲料组小鼠出现背部脱毛的现象。4 个组的 C57BL/6J 小鼠均未出现小鼠死亡情况。

2.2 C57BL/6J 小鼠体重及进食量变化情况

2.2.1 体重变化情况

每间隔 2 d 称重小鼠体重情况并记录,比较各组小鼠体重变化差异。如图 2A 所示,维持饲料组体重变化呈明显上升趋势;液体饲料对照组体重呈

上升趋势但较为平缓;酒精液体饲料组体重呈明显的下降趋势;高脂饲料组前期至第 7 天体重呈下降趋势,自第 7 天开始上升。

体重增长率如图 2B 所示,酒精液体饲料组、高脂饲料组相比维持饲料组体重增长率变化具有显著性差异($P < 0.01$),且酒精液体饲料组出现明显的负增长情况。酒精液体饲料组相比液体饲料对照组体重增长率变化也呈现显著性差异($P < 0.01$)。

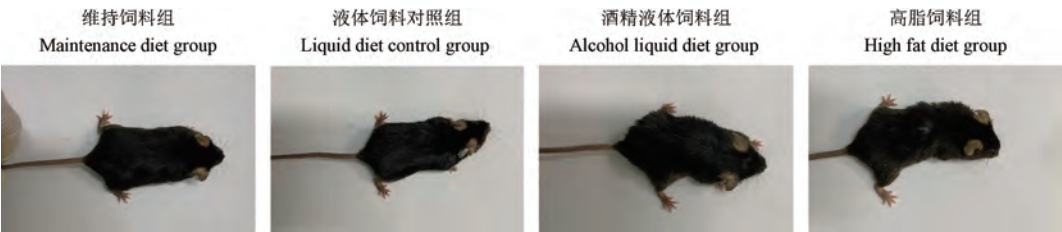
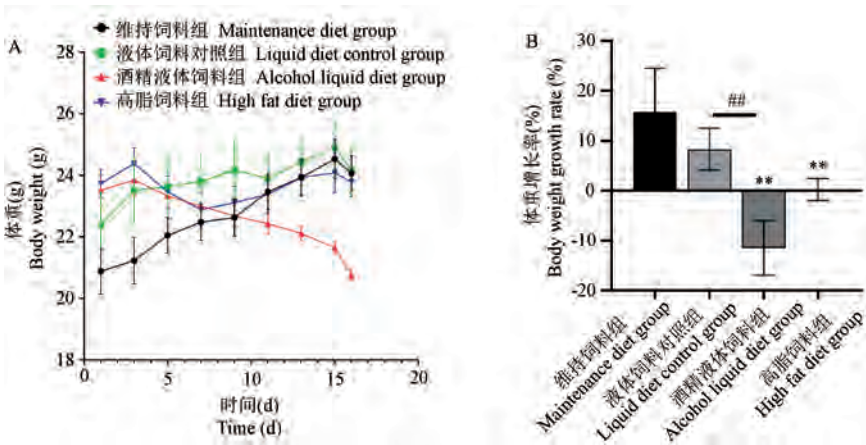


图 1 小鼠体征情况
Figure 1 Physical sign of mice



注:A:四组小鼠平均体重变化情况;B:四组小鼠体重分别相较初始体重变化情况;与维持饲料组相比, ** $P < 0.01$;与液体饲料对照组相比, ## $P < 0.01$ 。(下图同)

图 2 小鼠体重变化及增长率

Note. A. Changes in average body weight of mice in the 4 groups. B. Changes in body weight of mice in the 4 groups compared with the initial body weight. Compared with maintenance diet group, ** $P < 0.01$. Compared with the liquid diet control group, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes and growth rate of body weight in mice

2.2.2 进食量

如图 3A ~ 3D 所示,依次为维持饲料组、液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组小鼠平均进食量。各组在前期 1 ~ 5 d 基本呈现出进食量下降的现象,预计与其正处于适应期有关。5 d 后,逐渐趋于平稳。

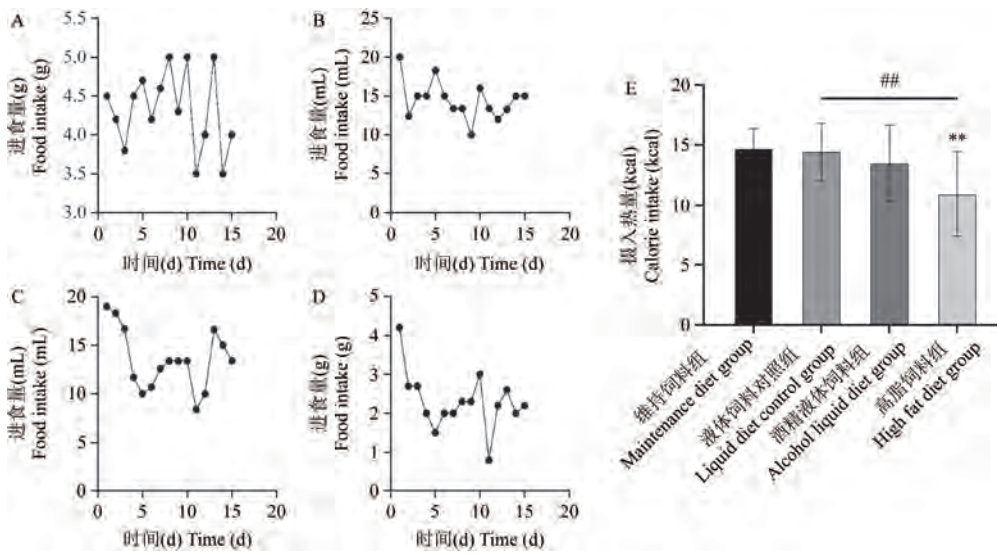
如图 3E 所示,维持饲料组与高脂饲料组平均热量摄入具有显著性差异($P < 0.01$),高脂饲料组

的平均热量摄入明显低于维持饲料组。液体饲料对照组与高脂饲料组平均热量摄入也具有显著性差异($P < 0.01$)。

2.3 C57BL/6J 小鼠肝质量及质量指数

2.3.1 肝质量

如图 4A 所示,与维持饲料组相比液体饲料对照组、酒精液体饲料组两组的小鼠肝质量存在显著性差异性($P < 0.01$),同时高脂饲料组与维持饲料



注:A ~ D:分别对应维持饲料组、液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组小鼠平均每日进食量情况;E:四组小鼠平均每日饲料热量摄取情况。

图3 小鼠各组平均进食量及热量摄入情况

Note. A ~ D. Correspond to the average daily food intake of mice in the four groups of maintenance diet group, liquid diet control group, alcohol liquid diet group and high fat diet group, respectively. E. The average daily feed calorie intake of the four groups of mice.

Figure 3 Average food intake and caloric intake of mice in each group

组比较也存在差异($P < 0.05$)。酒精液体饲料组与高脂饲料组之间亦存在差异($P < 0.05$)。

2.3.2 肝质量指数

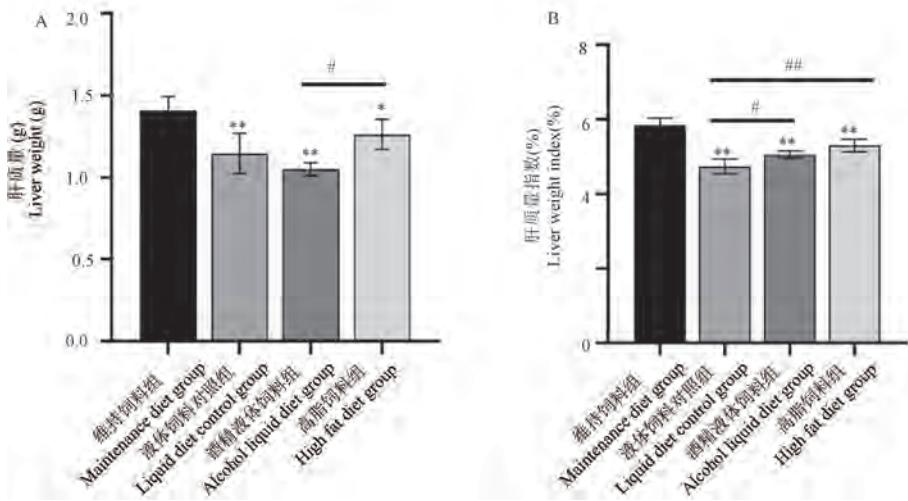
如图4B所示,除维持饲料组外其余三组肝质量指数明显降低,具有显著性差异($P < 0.01$)。同时酒精性脂肪肝模型组中酒精液体饲料组、高脂饲

料组与液体对照饲料组相比肝质量指数具有显著性差异性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.4 C57BL/6J 小鼠血清学指标

2.4.1 肝功能

如图5A所示,各组血清谷丙转氨酶(ALT)水平情况。与维持饲料组相比,酒精液体饲料组 ALT



注:与维持饲料组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与液体饲料对照组相比,# $P < 0.05$ 。(下图同)

图4 小鼠肝质量及质量指数

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

Figure 4 Mouse liver weight and liver weight index of mice

值明显增高($P < 0.01$),酒精液体饲料组与液体饲料对照组相比,ALT 值也明显增高($P < 0.01$)。如图 5B 所示,各组血清 AST(谷草转氨酶)水平情况。与维持饲料组相比,其余三组明显增高($P < 0.05$)。酒精液体饲料组 AST 值也明显高于液体对照组饲料组($P < 0.05$)。

2.4.2 血脂

如图 6A 所示,各组血清甘油三酯(TG)水平情况。各组之间 TG 值未存在显著性差异。如图 6B 所示,各组血清总胆固醇(TC)水平情况:液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组三个组 TC 值明显高于维持饲料组且具有显著性差异($P < 0.01$)。酒精液体饲料组 TC 值明显高于液体饲料对照组($P < 0.01$)。

2.4.3 血糖

如图 7 所示,各组血糖葡萄糖(GLU)水平情况

酒精液体饲料组、高脂饲料组血糖水平明显高于维持饲料组且存在显著差异性($P < 0.05$)。同时,酒精液体饲料组、高脂饲料组两组血糖水平与液体饲料对照组相比也明显增高($P < 0.05, P < 0.01$)。

2.5 C57BL/6J 小鼠肝病理学及组织学染色

2.5.1 肝外观

如图 8 所示,维持饲料组及液体饲料对照组小鼠肝均呈现鲜红色且脏器边缘锐利。酒精液体饲料组小鼠肝边缘圆润,肝表面发黄、有大量黄白色小点。高脂饲料组小鼠肝边缘圆润,表面轻微发黄,未见大量黄白色小点。

2.5.2 HE 染色

如图 9 所示,维持饲料组小鼠肝组织细胞形态正常,边界清晰,排列整齐,细胞胞质未见溶解和空泡;液体对照饲料组小鼠肝组织细胞形态正常,边界清晰,排列整齐,但细胞胞质见极少许小脂质空

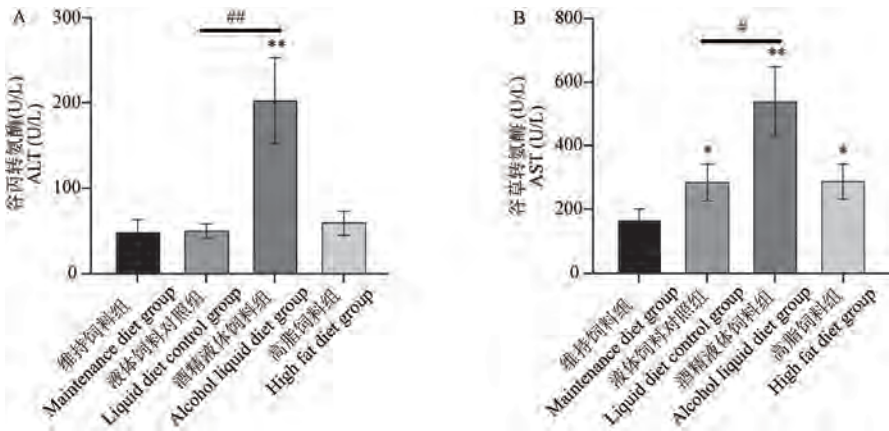


图 5 小鼠血清转氨酶
Figure 5 Mouse serum transaminase

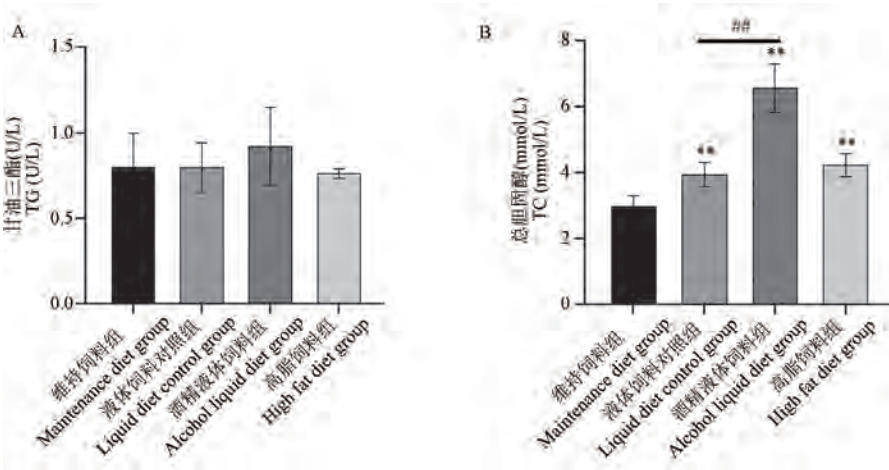


图 6 小鼠血脂
Figure 6 Blood lipid in mice

泡;酒精液体饲料组小鼠肝组织可见大量肝细胞弥漫性的脂质空泡,肝小叶有炎症发生且细胞肿胀,大量的脂肪滴积聚呈气球样变。高脂饲料组小鼠肝组织部分肝细胞含小脂质空泡,肝索排列较整齐,肝组织炎症浸润现象轻微。

2.5.3 油红 O 染色

小鼠肝组织经油红 O 染色后肝细胞中脂质着色呈红色,细胞核呈蓝色。如图 10 所示,维持饲料组肝细胞排列整齐,肝细胞核、质均匀,偶见极细微小脂肪颗粒,且无脂质沉积;液体饲料对照组肝细胞排列整齐,见部分小脂肪颗粒,有脂质沉积;酒精液体饲料组肝组织细胞质及其细胞间隙有密集红色脂肪滴聚集,有严重的脂质沉积,且大量脂质充满细胞质中;高脂饲料组肝组织细胞中,大量红色脂质液滴沉积于肝小叶中央静脉周围肝

细胞,远离肝小叶中央静脉的肝细胞脂质沉积相对较为轻微。

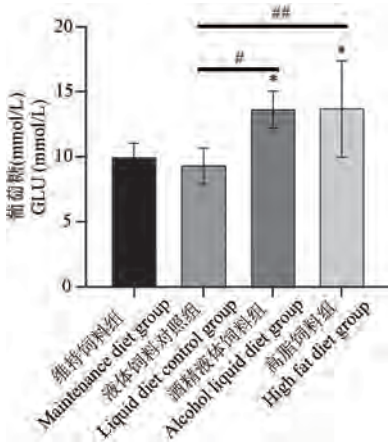


图 7 小鼠血糖
Figure 7 Mouse serum glucose

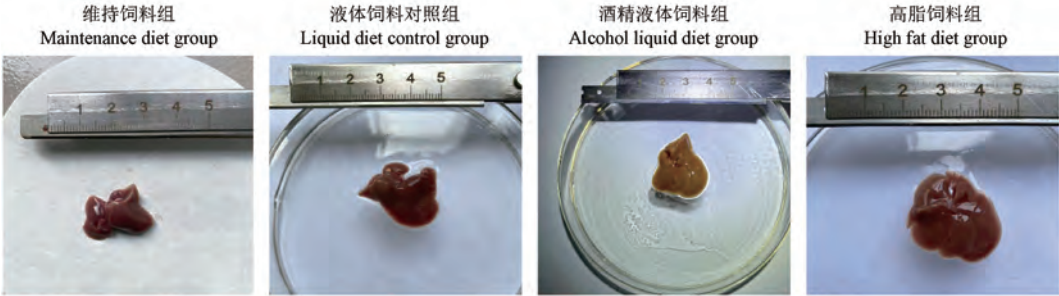


图 8 小鼠肝情况
Figure 8 Appearance of mouse liver

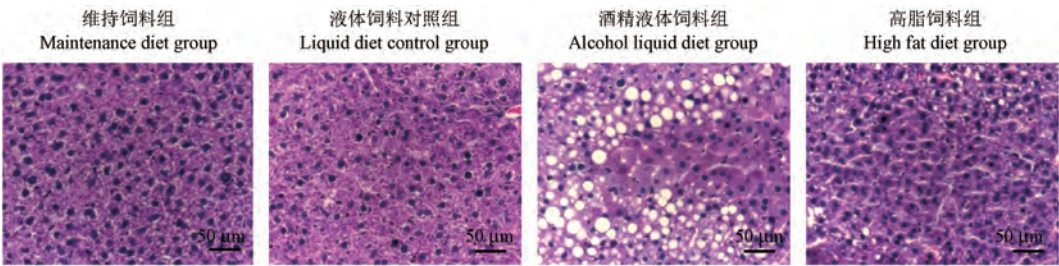


图 9 肝组织 HE 染色
Figure 9 HE staining of liver tissue

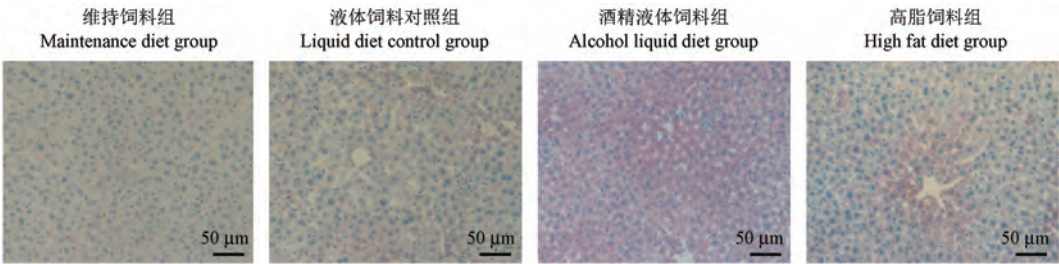


图 10 肝组织油红 O 染色
Figure 10 Oil red O staining of liver tissue

3 讨论

Gao-Binge 模型和酒精加高脂饮食模型作为非强制性酒精摄入的代表性模型,因能高度模仿与复制人类的饮酒模式与习惯而被广泛应用^[17-18]。

Gao-Binge 模型是通过将酒精加入完全流质的饮食中,让实验动物自由饮用的方式来建立 ALD 模型的方法,主要是为了降低或消除实验动物对酒精的厌恶性,从而维持血液中酒精浓度的相对恒定^[12]。为模仿人类短期酗酒的情景,于第 16 天进行 1 次高浓度酒精灌胃。作为让实验动物自主饮用含酒精的液体饲料,该模型养成率高、稳定性好,可复制酒精性脂肪肝和肝炎,并通过改变其喂养周期及高浓度酒精灌胃次数从而控制其表现出 ALD 不同阶段的病理学特征。其主要优点是能够主动控制热量的摄入,保持各组间的能量平衡,排除营养摄入因素对实验结果的影响^[19]。酒精加高脂饮食模型也是常用的非强制性酒精摄入的建模方式,是实验动物通过 2 ~ 7 周,以 20% 的乙醇溶液自由饮用和 60% 的高脂饲料自由食用而建立的 ALD 模型,该模型操作难度低且可达到 AFL 的相应病理标准^[15]。酒精加高脂饮食模型可以较好地模拟人类高脂饮食和慢性酒精饮用所造成的脂肪性肝损伤。但目前,在区分乙醇的摄入与外源性脂质摄入两者在 AFL 形成中所起的作用与影响仍然存在争议^[1,20]。

本研究中,为更加全面及科学地比较,设置了两组阴性对照组,即维持饲料组与液体饲料对照组。维持饲料组为正常饮食饲料与正常饮水,模拟正常饮食环境。而针对非正常饮食饲料,设立酒精液体饲料对照组,该组为酒精液体饲料组(Gao-Binge 模型组)的对照组,液体饲料对照组、酒精液体饲料组两组同为液体饲料且每单位提供的热量一致。两种饲料的区别在于,相比液体饲料对照组,酒精液体饲料组 28% 的热量由酒精提供,而液体饲料对照组由碳水化合物提供。两组阴性对照的设置是为了更好地与两组模型组互为比较。

本研究中,参照相关文献及饲料供应商提供方法,以 16 d 为周期建立并比较两种 C57BL/6J 小鼠 AFL 模型。实验结束时,酒精液体饲料组小鼠平均体重是唯一明显低于其初始平均小鼠体重且体重增长率为负的组别,表明含酒精的液体饲料会影响 C57BL/6J 小鼠的体重与生长,导致 C57BL/6J 小鼠

体重减轻。酒精液体饲料组与高脂饲料组的能量摄入情况也间接证实了这一点,短期持续性的酒精摄入会导致小鼠的进食量降低从而导致体重减轻^[21]。同时,维持饲料组与液体饲料对照组从能量摄入角度比较来看,说明液体饲料不会导致小鼠体重减轻。液体饲料对照组、酒精液体饲料组、高脂饲料组三个组肝质量与肝质量系数明显低于空白组,表明液体饲料及 60% 的高脂饲料,这些病态的饲料短期喂养(16 d)会造成小鼠肝萎缩或退行性改变。有文献表明,酒精、营养不良等相关因素会导致肝细胞凋亡^[22-24]。肝细胞的凋亡会导致肝内细胞数量减少,肝萎缩而导致肝体积及相对质量减小^[25]。

ALT 主要分布于肝细胞浆内,当肝损伤时肝细胞内的 ALT 能进入血中引起血清 ALT 升高。AST 也存在于肝细胞浆内线粒体中。当肝细胞损伤时,线粒体内 AST 释放入血,使血清中 AST 升高。当肝细胞膜通透性增加时即使无肝细胞坏死,细胞内的转氨酶也可以顺浓度差而释放入血。所以,血清中转氨酶的含量是肝细胞损伤的敏感标志^[26-28]。酒精液体饲料组、高脂饲料组两组与维持饲料组、液体饲料对照组两个对照组相比较,酒精液体饲料组小鼠血清中转氨酶的活性较高脂饲料组显著高于维持饲料组、液体饲料对照组两对照组水平。

小鼠血清 TG、TC、GLU 含量升高,这些都是小鼠酒精性脂肪性肝损伤的变化特点之一^[28-31]。但维持饲料组、液体饲料对照组、酒料液体饲料组及高脂饲料组四组小鼠在血清 TG 水平上并无显著性差异;在 TC 的差异上,酒精液体饲料组小鼠较高脂饲料组显著高于两个对照组水平。血糖方面,酒精液体饲料组、高脂饲料组两组血糖水平明显高于维持饲料组、液体饲料对照组两个对照组且差异具有显著性,可能与脂质沉积导致肝胰胰岛素抵抗有关^[32]。

肝组织病理学检查是酒精性脂肪肝判别的黄金标准,由于脂质大量沉积于肝细胞内,故病理切片结果呈现出大量脂质空泡及肝组织气球样变情况^[31]。肝外观及肝病理学染色结果显示,酒精液体饲料组小鼠肝中有大量的脂质沉积,高脂饲料组也有一定的脂质沉积于肝小叶中央静脉周围肝细胞,但较酒精液体饲料组程度轻。液体饲料对照组虽然喂养中未给予酒精,但也出现少许的脂质沉积,呈现出非酒精性脂肪肝(NASH)早期的病理特

征^[33],但严重程度较酒精液体饲料组及高脂饲料组轻。液体饲料对照组与酒精液体饲料组在肝病理组织学的比较结果,较好地证明了同等热量摄入的情况下酒精能促进 AFL 的发生。

以上这些结果表明,在短期 16 d 的 ALD 建模周期内,酒精液体饲料组即 Gao-Binge 模型组和高脂饲料组都较为成功地诱导出 C57BL/6J 小鼠 AFL 的模型,但酒精液体饲料组即 Gao-Binge 模型组无论是从生化指标水平及肝病理组织学等各项参数上都显著优于酒精加高脂饲料模型。同时作为对照组之一的液体饲料对照组,经过短期 16 d 液体高脂饲料的喂养表现出非酒精性脂肪肝(NASH)早期的病理特征但程度较轻,若延长相应的建模时间,相信 NASH 的相应病理及生化特征更为明显。

综上所述,就酒精液体饲料组、高脂饲料组两组模型组而言,参照 Gao-Binge 模型的方法以酒精液体饲料喂养 C57BL/6J 小鼠相较酒精加高脂饲料的喂养方式,两者都能在短期(16 d)内成功诱导 C57BL/6J 小鼠出现 AFL 的相应病理特征,且 Gao-Binge 模型组的相应指标比后者更加显著。Gao-Binge 模型建立的方法,时间短、经济性好、效率高,作为急性模型能较好地复制 AFL 病理特征,但短期内会引起模型动物体重持续减轻,对实验动物的生理功能甚至存活是一个考验,适合成熟期实验动物短期建模应用。酒精加高脂饲料模型建立方法,虽在短期内 AFL 相应病理特征弱于 Gao-Binge 模型法,但体重未出现持续性减轻,相对而言较为温和,延长建模时间也能较好地复制 AFL 相应病理特征,因此更适合慢性 AFL 模型的建立。以上两组非强制性酒精摄入模型各有优劣,研究人员可以根据研究目的合理选取适当的模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1572–1585.
- [2] Yang L, Yang C, Thomes PG, et al. Lipophagy and alcohol-induced fatty liver [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 495.
- [3] Cioarca-Nedelcu R, Atanasiu V, Stoian I. Alcoholic liver disease-from steatosis to cirrhosis-a biochemistry approach [J]. *J Med Life*, 2021, 14(5): 594–599.
- [4] 吕超,石清兰,覃倩,等.小鼠实验性肝损伤模型的研究进展[J].*中国比较医学杂志*, 2019, 29(1): 107–113.
Lyu C, Shi QL, Qin Q, et al. A review of experimental liver injury models in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(1): 107–113.
- [5] 林晓晖,黄玲,王一铮,等.小鼠急性酒精性肝损伤模型的制备及观察[J].*北方药学*, 2014, 11(6): 67–69.
Lin XH, Huang L, Wang YZ, et al. The establishment and observation of alcohol-induced acute liver injury model in mice [J]. *J North Pharm*, 2014, 11(6): 67–69.
- [6] 方志红,崔剑巍,曹健美,等. Lieber-DeCarli 酒精性肝损伤模型的复制[J].*中西医结合学报*, 2006, 4(6): 596–600.
Fang ZH, Cui JW, Cao JM, et al. Preparation of Lieber-DeCarli liquid diet induced alcoholic hepatic injury model in rats [J]. *J Chin Integr Med*, 2006, 4(6): 596–600.
- [7] 蒋金金,张国富,董雅琪,等.急性 PM_{2.5}暴露对 C57BL/6J 小鼠和酒精性脂肪肝病模型小鼠肺组织炎症的影响[J].*中国实验动物学报*, 2022, 30(4): 520–525.
Jiang JJ, Zhang GF, Dong YQ, et al. Effects of acute PM_{2.5} exposure on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in C57BL/6J mice and alcoholic fatty liver disease model mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(4): 520–525.
- [8] 周珂,王华. Gao-Binge 模型在酒精性肝病研究领域应用现状及未来前景[J].*临床肝胆病杂志*, 2019, 35(3): 485–488.
Zhou K, Wang H. Application status and future prospect of the Gao-Binge model in alcoholic liver disease [J]. *J Clin Hepatol*, 2019, 35(3): 485–488.
- [9] Wei VL, Singh SM. Genetically determined response of hepatic aldehyde dehydrogenase activity to ethanol exposures may be associated with alcohol sensitivity in mouse genotypes [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1988, 12(1): 39–45.
- [10] Belknap JK, Crabbe JC, Young ER. Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1993, 112(4): 503–510.
- [11] 杜宪. PDEs 在 C57BL/6J 和 DBA/2J 小鼠脑内表达的比较及其与饮酒行为的关联性分析[D]. 济南: 山东第一医科大学; 2019.
DU X. Comparison of PDEs expression in the brains of C57BL/6J and DBA/2J mice and its correlation with drinking behavior [D]. Jinan: Shandong First Medical University; 2019.
- [12] 高斌,常彬霞,徐明江.慢性酒精喂养加急性酒精灌胃的酒精性肝病小鼠模型(NIAAA 模型或 Gao-Binge 模型)[J].*传染病信息*, 2013, 26(5): 307–311.
Gao B, Chang BX, Xu MJ. Mouse model of chronic plus binge ethanol feeding(NIAAA model or Gao-Binge model) [J]. *Infect Dis Inf*, 2013, 26(5): 307–311.
- [13] Meadows GG, Blank SE, Duncan DD. Influence of ethanol consumption on natural killer cell activity in mice [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1989, 13(4): 476–479.
- [14] Cook RT, Schlueter AJ, Coleman RA, et al. Thymocytes, pre-B cells, and organ changes in a mouse model of chronic ethanol ingestion-absence of subset-specific glucocorticoid-induced immune cell loss [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2007, 31(10): 1746–1758.
- [15] Chang B, Xu MJ, Zhou Z, et al. Short-or long-term high-fat diet feeding plus acute ethanol binge synergistically induce acute liver

- injury in mice: an important role for CXCL1 [J]. *Hepatology*, 2015, 62(4): 1070–1085.
- [16] Mathews S, Xu M, Wang H, et al. Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306(10): G819–G823.
- [17] 其乐木格, 张娟, 段海婧, 等. 酒精性肝病动物模型建立方法的比较与评价 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(5): 153–161.
- Qi LMG, Zhang J, Duan HJ, et al. Comparison and evaluation of methods for establishing animal models of alcoholic liver disease [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2022, 38(5): 153–161.
- [18] Guo F, Zheng K, Benedé-Ubieto R, et al. The lieber-DeCarli diet-a flagship model for experimental alcoholic liver disease [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2018, 42(10): 1828–1840.
- [19] 曾涛, 姜璐璐, 张翠丽, 等. 两种 Lieber-DeCarli 液体饲料诱导的小鼠酒精性肝损伤模型的建立 [J]. *毒理学杂志*, 2012, 26(4): 258–262.
- Zeng T, Jiang LL, Zhang CL, et al. Establishment of two kinds of Lieber-DeCarli liquid diet-induced alcoholic liver diseases in mice [J]. *J Toxicol*, 2012, 26(4): 258–262.
- [20] 王保伟, 李俊, 程文明, 等. 野菊花总黄酮对酒精性脂肪肝大鼠的防治作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(10): 1022–1025.
- Wang BW, Li J, Cheng WM, et al. The protective and therapeutic effects of total flavonoids of *Chrysanthemum indicu* on alcoholic steatohepatitis [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2011, 46(10): 1022–1025.
- [21] Matsumoto A, Vasilou V, Kawamoto T, et al. Ethanol reduces lifespan, body weight, and serum alanine aminotransferase level of aldehyde dehydrogenase 2 knockout mouse [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014, 38(7): 1883–1893.
- [22] Singhal PC, Reddy K, Ding G, et al. Ethanol-induced macrophage apoptosis: the role of TGF- β [J]. *J Immunol*, 1999, 162(5): 3031–3036.
- [23] Cohen JJ, Roychowdhury S, McMullen MR, et al. Complement and alcoholic liver disease: role of C1q in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury in mice [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(2): 664–674, 674.
- [24] Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger [J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(3): 1165–1194.
- [25] 任成山, 钱桂生. 细胞凋亡和胀亡及其与多器官功能障碍综合征关系的研究进展 [J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(4): 247–250.
- Ren CS, Qian GS. Research progress of apoptosis, swelling and death and their relationship with multiple organ dysfunction syndrome [J]. *Chin Crit Care Med*, 2005, 17(4): 247–250.
- [26] Qin X, Zhang J, Lin Y, et al. Identification of miR-211-5p as a tumor suppressor by targeting ACSL4 in hepatocellular carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 326.
- [27] 赵稳兴, 杨举伦, 胡秀英. 小鼠酒精性肝损伤模型的建立及五味子提取物对其作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(5): 274–277, 254.
- Zhao WX, Yang JL, Hu XY. Model establishment of alcohol liver injury in mouse and effects of the extract from *Schisandra* on the injury [J]. *Chin J Comp Med*, 2006, 16(5): 274–277, 254.
- [28] Silva-Santana G, Bax JC, Fernandes DCS, et al. Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 *Mus musculus* [J]. *Anim Model Exp Med*, 2020, 3(4): 304–315.
- [29] 肖娟, 张瑞芬, 黄菲, 等. 两种不同的酒精摄入方式诱导的小鼠酒精性肝损伤模型比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(6): 11–17.
- Xiao J, Zhang RF, Huang F, et al. Comparison of two mouse models of alcoholic liver disease induced by oral ethanol gavage or Lieber-De Carli ethanol liquid diet [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(6): 11–17.
- [30] Schwartz JM, Reinus JF. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease [J]. *Clin Liver Dis*, 2012, 16(4): 659–666.
- [31] Seitz HK, Bataller R, Cortez-Pinto H, et al. Alcoholic liver disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 16.
- [32] Wiedemann MS, Wueest S, Item F, et al. Adipose tissue inflammation contributes to short-term high-fat diet-induced hepatic insulin resistance [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 305(3): E388–E395.
- [33] Yahaghi L, Ebrahim-Habibi A, Hayati-Roodbari N, et al. A simple method for inducing nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis [J]. *Anim Model Exp Med*, 2019, 2(4): 282–290.

[收稿日期] 2022-11-02

张格第,刘庚鑫,郭敏,等. 肾衰方干预 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬治疗 CKD 心肌损伤的作用机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 567-575.

Zhang GD, Liu GX, Guo M, et al. Mechanism of Shenshuai recipe in PINK1/Parkin-mediated mitochondrial autophagy for treatment of CKD myocardial injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 567-575.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.002

肾衰方干预 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬治疗 CKD 心肌损伤的作用机制研究

张格第¹,刘庚鑫¹,郭敏¹,罗富里²,晏子友^{2*}

(1. 江西中医药大学,南昌 330000;2. 江西中医药大学附属医院,南昌 330000)

【摘要】 目的 探究 PINK1/Parkin 介导线粒体自噬在慢性肾病(chronic kidney disease,CKD)心肌损伤中的作用及肾衰方干预 CKD 心肌损伤大鼠的作用机制。**方法** 将 48 只大鼠随机分成 6 组,分别为假手术组,模型组,贝那普利组,肾衰方低、中、高剂量组,采用 5/6 肾切除建立 CKD 心肌损伤模型,模型建立给予相应的干预 2 周,然后处死大鼠,取材进行相应的检测:用 ELISA 法测定大鼠的肌酸激酶同工酶(CK-MB)、高敏肌钙蛋白(hs-cTnI);对心脏组织进行 HE 染色后,光镜下观察组织变化;透射电镜观察自噬小体和自噬溶酶体;RT-PCR 测定 PINK1、Parkin、P62、LC3B mRNA 水平;Western Blot 测定肾切大鼠 PINK1、Parkin、P62、LC3B 蛋白水平。**结果** 与假手术组相比,模型组 CK-MB、hs-cTnI 明显提升($P < 0.01$),与模型组相比,贝那普利组,肾衰方低、中、高剂量组均有明显降低($P < 0.05$);与假手术组相比,模型组肾切大鼠心肌组织明显紊乱、间质增生、血管壁增厚,呈玻璃样改变,贝那普利组和肾衰方低、中、高剂量组尚未见明显异常;与模型组相比,肾衰方低、中、高剂量组中电镜的自噬小体及自噬溶酶体的数量明显增多($P < 0.01$);与假手术组相比,模型组 PINK1、Parkin、P62、LC3B mRNA 明显下降($P < 0.05$),与模型组相比,贝那普利组和肾衰方低、中、高剂量组 PINK1、Parkin、P62、LC3B mRNA 明显升高($P < 0.05$);与假手术组相比,模型组大鼠 PINK1、Parkin、P62、LC3B 蛋白明显降低($P < 0.01$),与模型组相比,贝那普利组和肾衰方低、中、高剂量组的 PINK1、Parkin、P62、LC3B 蛋白明显升高($P < 0.01$)。**结论** 5/6 肾切 CKD 心肌损伤大鼠心肌细胞 PINK1/Parkin 线粒体自噬通路受到了抑制,肾衰方可以通过激活 PINK1/Parkin 线粒体自噬通路,增强线粒体自噬,发挥心肌细胞保护作用,其中肾衰方高剂量组线粒体自噬强度相关指标最为显著。

【关键词】 PINK1/Parkin;线粒体自噬;肾衰方;CKD 心肌损伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0567-09

Mechanism of Shenshuai recipe in PINK1/Parkin-mediated mitochondrial autophagy for treatment of CKD myocardial injury

ZHANG Gedi¹, LIU Gengxin¹, GUO Min¹, LUO Fuli², YAN Ziyou^{2*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China. 2. Affiliated

Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000)

Corresponding author: YAN Ziyou. E-mail: 13970025368@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of the PINK1/Parkin mitochondrial autophagy pathway in myocardial injury of chronic kidney disease, and the mechanism of Shenshuai recipe in the treatment of 5/6 nephrectomy CKD myocardial injury in rats. **Methods** Overall, 48 nephrectomized rats were randomly divided into six groups: sham

【基金项目】 国家自然科学基金(81960843)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81960843).

【作者简介】 张格第(1990—),男,在读博士研究生,研究方向:中医内科学。Email:zhanggedi1990@163.com

【通信作者】 晏子友(1963—),男,教授,主任中医师,博士生导师,医学博士,研究方向:中医肾病的临床和实验研究。

Email:13970025368@163.com

operated, model, benazepril, and low, medium, and high dose Shenshuai recipe groups. Rats were treated for 2 weeks and then sacrificed. Heart tissue was collected, stained with HE, and observed under a light microscope. Autophagosomes and autophagic lysosomes were observed by transmission electron microscopy. PINK1, Parkin, P62, and LC3B mRNA levels were measured by RT-PCR. PINK1, Parkin, P62, and LC3B protein levels in nephrectomized rats were measured by Western Blot. **Results** Compared with the sham-operated group, CK-MB and hs-cTnI were significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, benazepril group, low, medium, and high dose Shenshuai recipe groups were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the sham operated group, myocardial tissue in the model group after nephrectomy was obviously disordered and displayed interstitial hyperplasia, vascular wall thickening, and glassy changes. There were no obvious abnormalities in Benazepril and low, medium, and high dose Shenshuai Recipe groups. Compared with the model group, the numbers of autophagosomes and autophagic lysosomes were increased significantly in low, middle, and high dose Shenshuai recipe groups ($P < 0.01$). Compared with the sham operated group, PINK1, Parkin, P62, and LC3B mRNA levels were significantly decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, PINK1, Parkin, P62, and LC3B mRNA levels were significantly increased in benazepril and high, medium, and low dose Shenshuai recipe groups ($P < 0.05$). Compared with the sham operated group, PINK1, Parkin, P62, and LC3B protein levels were significantly decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, PINK1, Parkin, P62, and LC3B protein levels were significantly increased in Benazepril and low-, medium-, and high-dose Shenshuai recipe groups ($P < 0.01$). **Conclusions** The PINK1/Parkin mitochondrial autophagy pathway in myocardial cells of rats with myocardial injury caused by 5/6 nephrectomy was inhibited. Shenshuai recipe enhanced mitochondrial autophagy by activating the PINK1/Parkin mitochondrial autophagy pathway, and played a protective role in myocardial cells. Among the groups, the highest dose of Shenshuai recipe had the most significant effects on mitochondrial autophagy intensity.

[Keywords] PINK1/Parkin; mitochondrial autophagy; Shenshuai recipe; CKD myocardial injury

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

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 常见并发症之一, 是终末期肾病患者主要死因^[1]。CKD 心肌损伤是由 CKD 导致的心肌损伤, 主要特点为血管钙化、左心室肥厚、纤维化及心室重塑, 易致心源性猝死、心律失常及心功能不全等^[2-4]。研究证实线粒体自噬与心肌损伤密切相关^[5-8], 值得注意的是, 目前研究最为广泛的是 PTEN 诱导假定激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/帕金森病蛋白 (Parkinsons disease protein, Parkin) 依赖性线粒体自噬途径, 但尚未有报道证实 PINK1/Parkin 介导线粒体自噬是否参与 CKD 心肌损伤发生。

肾衰方是由晏子友教授参与研制的江西中医药大学附属医院肾内科院内制剂, 已经在临床中应用 20 多年, 有着良好的临床疗效, 前期研究证实肾衰方可改善患者心功能、抗肾纤维化、延缓 CKD 进展^[9-11]。为进一步明确肾衰方干预 CKD 心肌损伤具体机制, 本研究从以 5/6 肾切除建立尿毒症心肌损伤模型, 意从整体、器官、细胞、分子等多层次观察 CKD 心肌损伤的发生发展, 探讨 PINK1/Parkin 介导的心肌细胞线粒体自噬在 CKD 心肌损伤中作用机制及肾衰方干预效应, 为“虚、毒、瘀”中医病机学创新理论奠

定客观依据, 为临床中医药治疗 CKD 心肌损伤提供新的可能途径及干预靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 7 ~ 8 周龄, 体重 280 ~ 300 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。饲养条件为恒定室温 (23 ± 1) °C、相对湿度 $55\% \pm 3\%$ 、昼夜 12 h/12 h 循环的动物房中, 随意获取饮用水和钴 60 辐照灭菌大小鼠维持饲料, 并饲养在北京唯尚立德生物科技有限公司屏障动物房【SYXK(京)2021-0056】。本实验经江西中医药大学动物伦理委员会批准 (JZLLSC2019-216) 后进行, 实验全程遵循 3R 原则。

1.1.2 实验用药

肾衰方组 (生黄芪 30 g、生地 10 g、党参 15 g、山萸肉 10 g、淮山药 15 g、丹参 20 g、泽泻 10 g、土茯苓 20 g、白花蛇舌草 20 g、六月雪 20 g、生大黄 (后下) 10 g、淫羊藿 15 g 共 12 味中药), 所有中药均由江西中医药大学中药饮片厂专家鉴定后提供, 常规方法水煎, 分别浓缩含生药 0.975 g/mL、1.95 g/mL、

3.90 g/mL 共 3 种剂量,含生药均相当成人剂每千克的 5 倍、10 倍、20 倍,即肾衰方低、中、高剂量。阳性药物组选用盐酸贝那普利片(北京诺华制药有限公司 洛丁新),按照 1.5 mg/(kg·d)的剂量灌胃。

1.1.3 主要试剂与仪器

肌酸激酶心肌同工酶(江苏雨桐生物科技有限公司 MM-0625R1);超敏心肌高蛋白(武汉华美生物工程公司 J26038325,江苏雨桐生物科技有限公司 MM-70339R1);TRNzol 总 RNA 提取试剂(天根生化科技(北京)有限公司 DP424);ProtoScript Firsr Strand cDNA Synthesis Kit (NEB, # E6300);LunaUniversal qPCR Master Mix (NEB, # M3003);Nuclease-Free Water(Invitrogen™, 4387936);氯仿(AR 洛阳昊华);异丙醇(AR 国药集团化学试剂);显微镜(日本奥林巴斯 BX51);成像系统(日本奥林巴斯 DP72);数字病理切片扫描仪(日本滨松 NanoZoomer S210 C13239-01)。超薄切片机(Leica Leica UC7);钻石切片刀(Daitome Ultra 45°);透射电子显微镜(FEI 公司 Tecnai G 20 TWIN)。Nano Drop(Thermo);凝胶成像系统(Carestream Gel Logic 212 PRO);实时荧光定量 PCR 仪(酷搏科技, Quantagene q225);High speed refrigerated centrifuge (XIANGYI);Multiskan Mirco-plate reader (Thermo);VE180 Mini-protean 3 Dodeca (Tanon);VE186 TBC (Tanon);PowerPac HC Power Supply (BioRad);PH meter (Sartorius);Shaker (Kylin-Bell);Homogenizer (Fluko)。

1.2 方法

1.2.1 造模方法

5/6 肾切除大鼠模型建立:动物侧卧位绑缚于手术台上,术区备皮碘酒常规消毒,用戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉。做腰部斜行切口,切开皮肤及皮下组织,钝性游离肾,切除左肾上下两极约 2/3 后,用吸收性明胶海绵止血,切口处放入少量头孢曲松,用 0 号、4 号丝线逐层间断缝合,1 周后行右肾结扎后全切除术。假手术组只切开皮肤,不作其他特殊处理。造模完成并固定模型后,选取存活的大鼠进行相应的灌胃治疗。将造模成功的共 40 只大鼠随机分为模型组,贝那普利组,肾衰方低、中、高剂量组,每组 8 只,另选 8 只大鼠组成假手术组。

1.2.2 给药方法

造模手术后 1 周(稳定大鼠动物模型,减少大鼠死亡率)开始给药,各中药组及贝那普利组大鼠

给药均按照沈映君教授主编《中药药理学》中药实验用药选择换算大鼠用药剂,10 倍于临床用药剂折算为等效剂给药,即肾衰方低、中、高剂量组,大鼠分别按 0.975 g/mL、1.95 g/mL、3.90 g/mL 肾衰方浓缩剂给药,即给药剂分别 9.75 g/(kg·d)、19.50 g/(kg·d)、39.00 g/(kg·d) 体重灌胃;予贝那普利组大鼠给贝那普利 1.50 g/(kg·d) 体重灌胃,假手术组和模型组大鼠给等量生理盐水灌胃。

1.2.3 动物取材

各组大鼠分别于灌胃后第 2 周处死,采用戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,迅速剪开腹部皮肤,快速拨开腹部脏器,暴露大鼠腹主动脉,用注射器抽取大鼠血液将血液注入含 0.4 mL 4% EDTA-Na2 抗凝管中,2000 r/min 离心 15 min,分离血清,分别标记好后于-80℃冰箱中保存备用。取血后立即开胸取出心脏,取心尖处 1 mm³ 小块放入固定液,用于电镜检测。切取左心室壁,一部分心脏组织经多聚甲醛固定后用于制作石蜡切片。组织经石蜡包埋后,于石蜡切片机切取 6 μm 厚的石蜡切片待用。一部分心脏组织经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,在试管中加入 1 mL 蛋白提取液,将心肌组织超声匀浆化,离心取上清液备测。

1.2.4 检测方法

(1) 用 ELISA 法检测肌酸激酶心肌同工酶(creatine kinase myocardial isoenzyme, CK-MB)、超敏心肌肌钙蛋白 I(hypersensitivity cardiac troponin I, hs-cTnI)浓度:从-80℃冰箱中取出血清后,常温下解冻,采用武汉华美生物工程有限公司和江苏雨桐生物科技有限公司 ELISA 试剂盒检测,详细步骤见说明书。

(2) 心脏组织学检测:为进行光镜检测,心脏组织标本经 10% 甲醛固定、脱水、石蜡包埋、切片,分别做 HE 染色,光镜下观察组织学变化。为进行透射电镜检测,取一块 0.5 mm³ 心肌组织经 2.5% 戊二醛固定,1% 锇酸后固定, Epon812 包埋,醋酸铀-枸橼酸铅双染色,然后在电镜下每个样本随机截取 1 张图片,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件统计观察自噬小体及自噬溶酶体,人工计数自噬小体和自噬溶酶体的数量。

(3) RT-PCR 检测 PINK1、Parkin、选择性自噬接头蛋白(sequestosome 1, SQSTM1/P62)、微管相关蛋白 1 轻链 3-II(light chain 3-II, LC3B)mRNA 表达:心脏组织经 TRIzol 法提取总 RNA 后, Real-time PCR 行反转录, RT-PCR 检测,得到扩增曲线和溶解曲

线。引物:PINK1(F:5'-TCCAGCGAGAGGCCAACAAGA-3',R:5'-TGGAGGAGCCAGGCAATCATCT-3');Parkin(F:5'-CAGCTAAACCCACCTACCACAG-3',R:5'-CATCCGGTTTGAATTAAGACA-3');P62(F:5'-ACCCATCCACAGGTGAACTC-3',R:5'-GTGGGAGATGTGGGTACAGG-3');LC3B(F:5'-TTGGTCAAGATCATCCGGCG-3',R:5'-TCAGCGATGGGTGTGGATAC-3')。

(4)Western Blot 检测 PINK1、Parkin、P62、LC3B 蛋白表达:取各组左心室组织,称量确定每个 50 mg 的重量,加入蛋白裂解液并剪碎组织、超声、离心,取上清,利用 BCA 蛋白质定量试剂盒对蛋白质定量测定,根据蛋白浓度,每组取 50 μg 总蛋白上样。10% SDS-PAGE 分离蛋白质,用半干转膜仪 25 V 60 min 将蛋白转到 PVDF 膜上,漂洗之后,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。封闭结束后再漂洗,然后与浓度为 1:1000 的一抗反应,4℃ 过夜,用 TBST 液洗 3 次后与 1:10 000 二抗反应 2 h,充分漂洗后曝光。利用用 Image J 软件进行图像采集和定量分析。所需抗体:PINK1 (A11435 ABclonal);Parkin (A0968 ABclonal);LC3B (A19665 ABclonal);P62 (A19700 ABclonal)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 CK-MB、hs-cTnI 相对表达量的比较

如表 1 所示,模型组 CK-MB 和 hs-cTnI 均明显高于假手术组,提示模型组心肌受损明显,造模成功,5/6 肾切大鼠确实可以发生心肌损伤,经贝那普利和肾衰方低、中、高剂量治疗后,干预各组 CK-MB 和 hs-cTnI 均有明显下降,提示有良好的心肌保护作用。

2.2 各组大鼠心肌形态结构病理变化结果

2.2.1 各组大鼠心肌组织 HE 染色病理变化结果

如图 1 所示:假手术组心脏组织心内膜、心肌膜及心外膜结构清晰,心壁及心腔未见明显异常,心肌纤维着色均匀,细胞分界清楚,走行一致,心肌细

表 1 各组大鼠血清 CK-MB 和 hs-cTnI 相对表达量的比较(比值, $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Comparison of the relative expression of CK-MB and hs-cTnI in serum of rats in each group(Ratio, $\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	CK-MB	hs-cTnI
假手术组 Sham operated group	1.00 ± 0.05	1.03 ± 0.09
模型组 Model group	2.16 ± 0.33 **	1.50 ± 0.01 **
贝那普利组 Benazepril group	1.14 ± 0.05 ##	1.15 ± 0.24 ##
低剂量组 Low dose group	1.11 ± 0.03 ##	1.19 ± 0.13 ##
中剂量组 Medium dose group	1.24 ± 0.14 ##	1.31 ± 0.07 #
高剂量组 High dose group	1.14 ± 0.15 ##	1.31 ± 0.15 #

注:CK-MB 和 hs-cTnI 的相对表达量是各组数值与假手术组的比值;与假手术组相比,***P* < 0.01,与模型组相比,#*P* < 0.05,##*P* < 0.01。(下图/表同)

Note. The relative expression of CK-MB and hs-cTnI is the ratio of each group's value to the sham operated group. Compared with the sham operated group, ***P* < 0.01. Compared with the model group, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01. (The same in the following figures and tables)

胞横纹清楚,明、暗相间,间质未见异常,未见明显病理性改变。模型组大鼠心脏组织心内膜、心肌膜及心外膜结构清晰,心壁及心腔未见明显异常;心肌纤维着色均匀,细胞分界清楚,结构紊乱(黑色箭头),心肌细胞横纹清楚,明、暗相间,间质未见异常;局部血管壁增厚,管腔玻璃样变性(绿色箭头)。与假手术组相比,贝那普利组和肾衰方低、中、高剂量组病理图片心肌纤维排布稍显紊乱,心肌纤维间隙稍增宽,未出现明显的心肌病理变化,与模型组相比,贝那普利组和肾衰方低、中、高剂量组心肌组织病理损害有所改善。

2.2.2 各组大鼠心肌超微结构、自噬小体及自噬溶酶体电镜变化结果

如图 2 和表 2 所示:假手术组心肌组织超微结构基本正常,可见线粒体嵴排列整齐,数量较多,可见自噬小体(橙色箭头)和自噬溶酶体(蓝色箭头);模型组大鼠心肌线粒体肿大、不规则,颜色明显变浅,呈团絮状,线粒体外膜出现破裂;贝那普利组和肾衰方低、中、高剂量组较模型组有所改善;观察自噬小体和自噬溶酶体的数量,模型组自噬小体和自噬溶酶体较假手术组有所减少;给予贝那普利及肾衰方低、中、高剂量处理后可见自噬小体和自噬溶酶数量均明显增加(*P* < 0.01),但较肾衰方高剂量处理后自噬小体和自噬溶酶数量增加更加明显,且

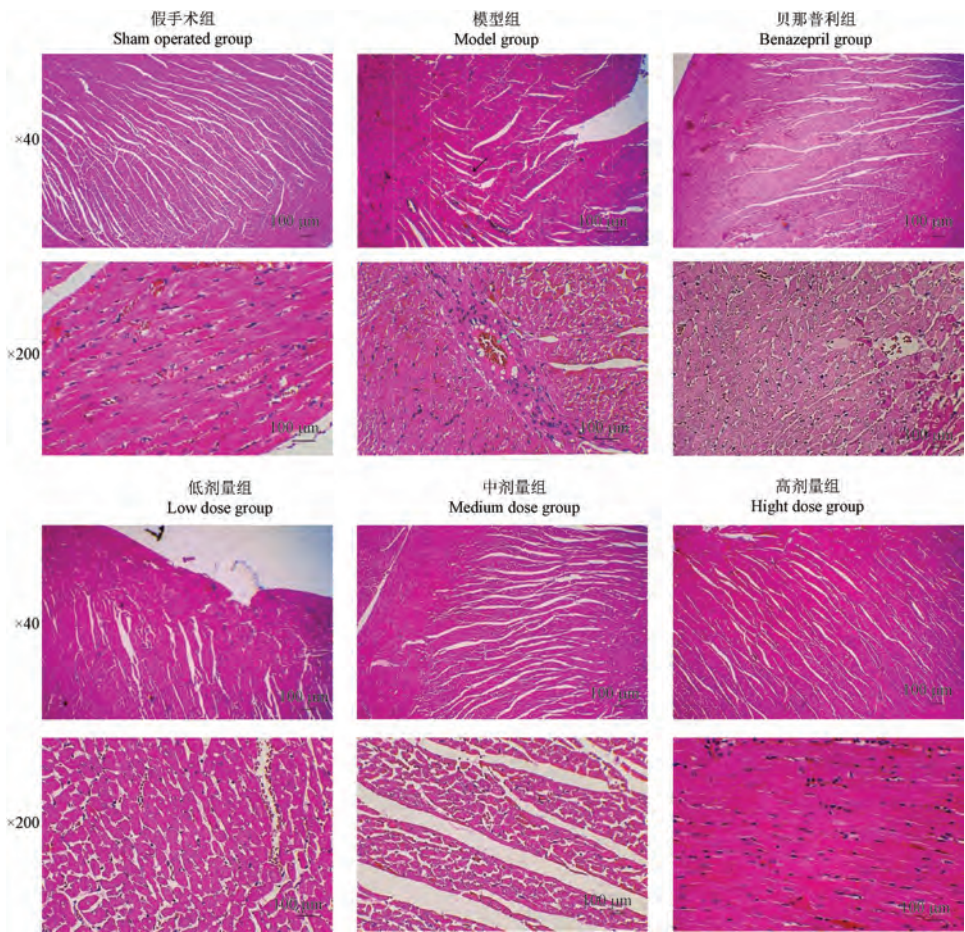
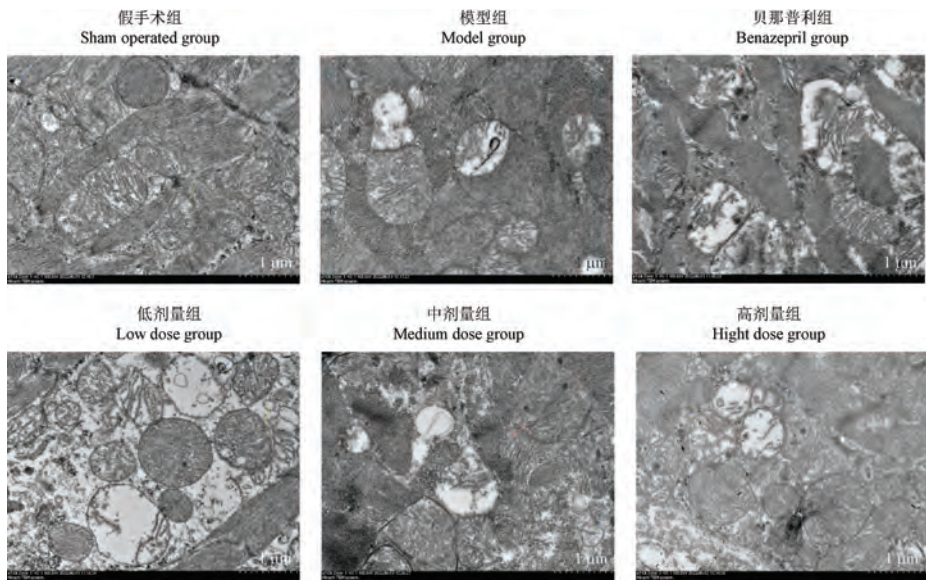


图 1 各组大鼠心肌组织 HE 病理变化

Figure 1 Pathological changes of myocardial morphology and structure of rats in each group after HE staining



注: 电镜放大倍数和截取长度数据在图片下方。

图 2 各组大鼠电镜心肌超微结构病理变化

Note. The data of magnification and intercept length of the electron microscope are at the bottom of the picture.

Figure 2 Ultrastructural pathological changes of myocardium in rats of each group

中、高剂量组自噬小体和自噬溶酶体的数量的平均值高于贝那普利组。

表 2 各组大鼠自噬小体和自噬溶酶体数量的比较(个, $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison of the number of autophagic bodies and autophagiclysosomes of rats in each group(Individual,

$\bar{x} \pm s, n = 8$)		
组别 Groups	自噬小体 Autophagosome	自噬溶酶体 Autophagolysosome
假手术组 Sham operated group	13.00 ± 1.00	2.00 ± 1.00
模型组 Model group	9.67 ± 1.52 *	1.67 ± 0.58
贝那普利组 Benazepril group	22.67 ± 2.51 ^{##}	12.00 ± 3.00 ^{##}
低剂量组 Low dose group	14.00 ± 2.65 ^{##}	10.00 ± 2.00 ^{##}
中剂量组 Medium dose group	24.33 ± 1.53 ^{##}	16.67 ± 1.53 ^{##}
高剂量组 High dose group	31.00 ± 1.00 ^{##}	16.33 ± 2.52 ^{##}

注:与假手术组相比, * $P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with the sham operated group, * $P < 0.05$. (The same in the following tables)

表 3 各组大鼠心肌组织 PINK1、Parkin、LC3B、P62 mRNA 相对表达量的比较(比值, $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Comparison of the relative expression of PINK1, Parkin, LC3B and P62 mRNA in myocardial tissue of rats in each group(Ratio, $\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	PINK1	Parkin	LC3B	P62
假手术组 Sham operated group	0.89 ± 0.18	0.99 ± 0.12	0.94 ± 0.55	0.78 ± 0.55
模型组 Model group	0.60 ± 0.09 *	0.14 ± 0.10 **	0.22 ± 0.08 *	0.14 ± 0.06 *
贝那普利组 Benazepril group	1.35 ± 0.18 ^{##}	3.15 ± 2.21 [#]	1.23 ± 0.49 [#]	1.33 ± 0.85 [#]
低剂量组 Low dose group	1.19 ± 0.30 [#]	1.45 ± 0.35 ^{##}	0.39 ± 0.08 [#]	3.27 ± 1.65 ^{##}
中剂量组 Medium dose group	1.26 ± 0.10 ^{##}	1.08 ± 0.26 ^{##}	0.95 ± 0.60 [#]	2.78 ± 1.44 [#]
高剂量组 High dose group	1.61 ± 0.26 ^{##}	3.39 ± 2.31 [#]	0.97 ± 0.42 [#]	1.74 ± 0.48 ^{##}

表 4 各组大鼠心肌组织 PINK1、Parkin、LC3B、P62 蛋白相对表达量的比较(比值, $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Comparison of the relative expression of PINK1, Parkin, LC3B and P62 proteins in myocardial tissue of rats in each group(Ratio, $\bar{x} \pm s, n = 8$)

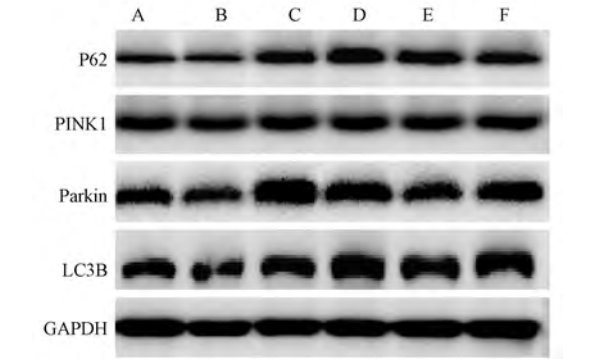
组别 Groups	PINK1	Parkin	LC3B	P62
假手术组 Sham operated group	0.60 ± 0.16	0.56 ± 0.05	0.52 ± 0.09	0.77 ± 0.12
模型组 Model group	0.34 ± 0.06 **	0.40 ± 0.04 **	0.37 ± 0.03 **	0.42 ± 0.05 **
贝那普利组 Benazepril group	0.58 ± 0.06 ^{##}	1.13 ± 0.16 ^{##}	0.56 ± 0.05 ^{##}	0.65 ± 0.06 ^{##}
低剂量组 Low dose group	0.56 ± 0.04 ^{##}	0.86 ± 0.08 ^{##}	0.72 ± 0.03 ^{##}	0.82 ± 0.08 ^{##}
中剂量组 Medium dose group	0.55 ± 0.04 ^{##}	0.54 ± 0.06 ^{##}	0.51 ± 0.02 ^{##}	0.73 ± 0.06 ^{##}
高剂量组 High dose group	0.74 ± 0.04 ^{##}	0.78 ± 0.14 ^{##}	0.81 ± 0.08 ^{##}	0.58 ± 0.04 ^{##}

2.3 各组大鼠心肌组织 PINK1、Parkin、P62、LC3B mRNA 相对表达量的比较

如表 3 所示,与假手术组相比较,模型组 PINK1、Parkin、P62、LC3B 的 mRNA 相对表达量明显降低,模型组相比,贝那普利组和肾衰方低、中、高剂量组的表达量明显升高,表明模型组的线粒体自噬受到了抑制,经过干预后,自噬功能明显得到了加强,其中综合比较各组 PINK1、Parkin、P62、LC3B mRNA 相对表达量,其中高剂量组的表达量增加最为明显。

2.4 各组大鼠心肌组织 PINK1、Parkin、LC3B、P62 蛋白相对表达量的比较

如表 4 和图 3 所示,与假手术组相比,模型组 PINK1、Parkin、P62、LC3B 的蛋白相对表达量明显降低,模型组相比,贝那普利组和肾衰方低、中、高剂量组的表达量明显升高,表明肾衰方可以增强 5/6 肾切大鼠的线粒体自噬,从整体上看,高剂量组指标体现出自噬增强更加明显,与 qPCR 结果趋势一致。



注:A:假手术组;B:模型组;C:贝那普利组;D:低剂量组;E:中剂量组;F:高剂量组。

图 3 心肌组织线粒体自噬标志物 Western Blot 图
Note. A. Sham operated group; B. Model group; C. Benazepril group;
D. Low dose group; E. Medium dose group; F. High dose group.

Figure 3 Western Blot of mitophagy markers in myocardial tissues

3 讨论

CKD 心肌损伤的病位在心肾,肾病日久多累及心,是心肾阴阳协同失宜而导致的心肾同病,具体来说,当肾病日久,久病及心,而致虚实夹杂,虚多见气阴两虚、心肾阳虚、阴阳俱虚和阳虚水泛,邪实则如湿阻气滞,血络瘀阻,或气虚血瘀,血行不畅,或水液代谢失常,酝酿成毒,均可加重心肾功能失调,发为心肾同病,因此其基本病机是本虚标实,本虚以肾心亏虚为主,日久可累及他脏,邪实以水湿、浊毒、瘀血积聚体内,致病有“虚、毒、瘀”的特点。肾衰方的配伍,黄芪、党参补脾益心、以强中焦,生地、山药、淫羊藿阴阳并补、以助下元,泽泻、土茯苓、白花蛇舌草、生大黄利湿降浊解毒,以泻邪实,丹参活血化瘀,以通血脉,全方配伍,攻补兼施,共收补益心肾、泻浊解毒、活血化瘀之功,切中 CKD 心肌损伤的病机,是其能够显效的中医理论基础。既往研究也证实肾衰方的确具有降低肌酐和尿素氮、改善钙磷代谢、降低血管低度炎症、抗动脉粥样硬化、保护心脏、改善心功能等作用。

线粒体是细胞的能量来源,是细胞的“发动机”,因此维持线粒体自身功能的完整和稳定就显得尤为重要,而线粒体自噬能够清除损伤、衰老和功能不完整的线粒体,因此具有十分重要的意义^[12-13]。目前公认的线路通路主要有 4 条:分别为 PINK1/Parkin 信号通路、BINP3/NIX 信号通路、FUNDCl 信号通路和 Cardiolipin 信号通路,其中 PINK1/Parkin 信号通路是研究的热点^[14-17]。

正常状态下,PINK1 可以通过线粒体膜内外的电位差进入膜内,但当线粒体损伤或功能不全时,膜电位下降甚至消失,PINK1 不能进入线粒体膜内而聚集在线粒体外膜;聚集在膜外的 PINK1 吸引、募集并激活 Parkin;被激活的 Parkin 催化线粒体成分蛋白分子泛素化,并募集信号接头蛋白 P62;接头蛋白通过桥连泛素和 LC3B 相结合,形成线粒体自噬小体;最后自噬小体与溶酶体融合,启动自噬清除线粒体^[18-19]。

多项研究表明,PINK1/Parkin 信号路线粒体自噬在心脏疾病中发挥着重要作用,但是这些研究多集中在心肌缺血/再灌注损伤上^[20-22],具体到 CKD 心肌损伤,却鲜有研究成果发表,鉴于 CVD 和 CKD 之间密切的关系,并且线粒体自噬在心肌损伤中发挥的重要作用,提出了线粒体自噬导致 CKD 心肌损伤的假说。结合肾衰方的心肾保护作用及 PINK1/Parkin 线粒体自噬通路在心肌损伤中的作用,认为肾衰方发挥治疗作用的机制之一可能是调控 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬。

本研究发现,肾衰方通过增加 PINK1/Parkin 线粒体自噬通路活性,增强 5/6 肾切大鼠的心肌细胞线粒体自噬活性,清除受损的线粒体,肾衰方低、中、高剂量组的 HE 染色后的病理结果和血清 CK-MB、hs-cTnI 均明显优于模型组,提示这种增强的线粒体自噬发挥肾衰大鼠的心肌保护作用。在具体结果上,PINK1、Parkin、LC3B 的表达水平均有明显的升高,提示 PINK1/Parkin 线粒体自噬通路被激活,且大鼠电镜结果亦显示,肾衰方低、中、高剂量组的自噬小体和自噬溶酶体的数量明显增加,这些指标均符合线粒体自噬增强的指标表现。进一步分析肾衰方低、中、高剂量组的量效关系,PINK1、Parkin、LC3B mRNA 的相对表达量中,肾衰方高剂量组的增加量最为显著,Western Blot 蛋白检测结果与 qPCR 结果趋势基本一致,提示肾衰方高剂量组中的线粒体自噬能力最优。因此,可以得出结论:5/6 肾切 CKD 心肌损伤大鼠心肌细胞 PINK1/Parkin 线粒体自噬通路受到抑制,肾衰方可以通过激活 PINK1/Parkin 线粒体自噬通路,增强线粒体自噬,发挥心肌细胞保护作用,其中肾衰方高剂量组线粒体自噬强度相关指标最为显著。

目前存在争议的是理论上应降低的 P62 水平却有明显升高,P62 的蛋白表达水平与线粒体自噬水平呈负相关^[23-24],而本实验发现 P62 的水平也明

显升高,查阅相关文献,发现其他研究者也有类似的发现^[25],另外,P62 能参与 Keap1/Nrf2/P62 信号通路而发挥出抗氧化应激的作用,这可能是 P62 升高的原因,将做进一步验证^[26];有文献报道,线粒体自噬在心肌缺血再灌注损伤中的模型组表现为增强,而本实验结果中模型组线粒体自噬处于抑制状态,是否矛盾?首先二者研究的疾病不同,前者模拟的是心肌梗死后血管再通造成的缺血再灌注损伤,属于急性起病,而本实验研究的是 CKD 心肌损伤,属于慢性起病,二者有显著不同。除此之外,有国外研究^[27]发现线粒体自噬在不同疾病的时段,发挥的作用不同,早期可以促进线粒体自噬,随着时间的延长,在 72 h 后转为明显抑制,这与本实验结果中模型组 PINK1、Parkin、LC3B 的表达量明显下降相符,但本实验仅设置单个时间点,未能揭示线粒体自噬情况的时间差异,将进一步深入研究。

参 考 文 献(References)

- [1] 陈胜男, 李宁, 申燕. 2 种风险预测模型在慢性肾脏病患者动脉粥样硬化风险预测中的价值 [J]. 中南大学学报(医学版), 2021, 46(9): 966-973.
Chen SN, Li N, Shen Y. Value of 2 risk prediction models in predicting the risk of atherosclerosis in patients with chronic kidney disease [J]. J Central South Univ Med Sci, 2021, 46(9): 966-973.
- [2] Rangaswami J, Bhalla V, Blair JEA, et al. Cardiorenal syndrome: classification, pathophysiology, diagnosis, and treatment strategies: a scientific statement from the American heart association [J]. Circulation, 2019, 139(16): e840-e878.
- [3] 于舟洪, 杨巍. 心肾综合征病理生理机制及治疗研究的进展 [J]. 心血管康复医学杂志, 2021, 30(5): 606-609.
Yu ZQ, Yang W. Progress of research on pathophysiological mechanism and treatment of cardiorenal syndrome [J]. Chin J Cardiovasc Rehabil Med, 2021, 30(5): 606-609.
- [4] 孟彦, 张豪, 贺宁, 等. 腺嘌呤诱导慢性肾脏病大鼠模型的骨与矿物质代谢异常 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(1): 8-15.
Meng Y, Zhang H, He N, et al. Mineral and bone metabolism disorder in an adenine-induced rat model of chronic kidney disease [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(1): 8-15.
- [5] 苏文晓, 卢珺, 甘晓雯, 等. 基于 LncRNA MIAT/miR-384-5p 研究九龙藤黄酮抑制自噬抗心肌缺氧损伤的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5701-5711.
Su WX, Lu J, Gan XW, et al. Anti-myocardial hypoxia injury effect of *Bauhinia championii* flavones by inhibiting autophagy based on LncRNA MIAT/miR-384-5p [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(18): 5701-5711.
- [6] 尧青, 李勇, 陈晓, 等. 姜黄素对糖尿病大鼠心肌自噬、凋亡及 AMPK-mTOR 信号通路的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(10): 1004-1008.
- [7] Yao Q, Li Y, Chen X, et al. Effects of curcumin on autophagy, apoptosis and AMPK/mTOR signaling pathway in the heart of diabetic rats [J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(10): 1004-1008.
- [8] Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L. Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease [J]. Circ Res, 2017, 120(11): 1812-1824.
- [9] Ling Y, Ma J, Qi X, et al. Novel rat model of multiple mitochondrial dysfunction syndromes (MMDS) complicated with cardiomyopathy [J]. Anim Model Exp Med, 2021, 4(4): 381-390.
- [10] 晏子友, 杨芸琪, 沈金峰, 等. 肾衰方及其拆方对肾间质纤维化 VEGF、VEGFR2、 α -SMA 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(10): 10-15, 260.
Yan ZY, Yang YQ, Shen JF, et al. Effects of Shenshuai formula and its decomposed formulae on VEGF, VEGFR2 and α -SMA in renal interstitial fibrosis [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(10): 10-15, 260.
- [11] 沈金峰, 罗富里, 黄伟, 等. 肾衰方及其拆方对肾间质纤维化 Wnt4、 β -catenin 蛋白表达的影响 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34(24): 4050-4055.
Shen JF, Luo FL, Huang W, et al. Effects of Shen Shuai Fang and its disassembly formula on the expression of renal interstitial fibrosis Wnt4 and β -catenin [J]. J Pract Med, 2018, 34(24): 4050-4055.
- [12] 晏子友, 何紫阳, 王婷, 等. 肾衰方对慢性肾脏病患者超敏 C 反应蛋白、左心结构和功能的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(12): 1084-1086.
Yan ZY, He ZY, Wang T, et al. Effect of Shenshuai recipe on high-sensitivity C-reactive protein, left ventricular structure and function in patients with chronic kidney disease [J]. Chin J Integr Tradit West Nephrol, 2016, 17(12): 1084-1086.
- [13] 张文静, 李晓峰, 孙明明, 等. 线粒体自噬在心肌梗死中的作用及研究进展 [J]. 中华全科医学, 2022, 20(7): 1194-1198.
Zhang WJ, Li XF, Sun MM, et al. Research progress and function of mitophagy in myocardial infarction [J]. Chin J Gen Pract, 2022, 20(7): 1194-1198.
- [14] 赵高远, 苗玉芳, 侯润苏, 等. 线粒体损伤与慢性阻塞性肺疾病骨骼肌功能障碍及中医药治疗进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 133-137, 144.
Zhao GY, Miao YF, Hou RS, et al. Progress on mitochondrial injury in skeletal muscle induced by chronic obstructive pulmonary disease and treatment with traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 133-137, 144.
- [15] Tanaka K. The PINK1-parkin axis: an overview [J]. Neurosci Res, 2020, 159: 9-15.
- [16] Wu X, Wu FH, Wu Q, et al. Phylogenetic and molecular evolutionary analysis of mitophagy receptors under hypoxic conditions [J]. Front Physiol, 2017, 8: 539.

- [16] Wang C, Dai X, Wu S, et al. FUNDC1-dependent mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes are involved in angiogenesis and neovascularization [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2616.
- [17] Panov AV, Dikalov SI. Cardiolipin, perhydroxyl radicals, and lipid peroxidation in mitochondrial dysfunctions and aging [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1323028.
- [18] Malpartida AB, Williamson M, Narendra DP, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in parkinson's disease: from mechanism to therapy [J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46(4): 329-343.
- [19] Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy [J]. *Nature*, 2015, 524(7565): 309-314.
- [20] Su X, Zhou M, Li Y, et al. Mitochondrial damage in myocardial ischemia/reperfusion injury and application of natural plant products [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 8726564.
- [21] Xing Y, Sui Z, Liu Y, et al. Blunting TRPML1 channels protects myocardial ischemia/reperfusion injury by restoring impaired cardiomyocyte autophagy [J]. *Basic Res Cardiol*, 2022, 117(1): 20.
- [22] 叶永才, 陈哲璇, 李想, 等. 环氧二十碳三烯酸通过线粒体途径保护缺血/再灌注损伤机制的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(11): 105-110.
- Ye YC, Chen ZX, Li X, et al. Advances in understanding the mechanism by which epoxyeicosatrienoic acids protect against ischemia/reperfusion injury through the mitochondrial pathway [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(11): 105-110.
- [23] 陆麒麟, 李佳钰, 蔡义思, 等. 当归拈痛汤对风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠自噬蛋白 LC3, Beclin1, p62 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(1): 41-49.
- Lu QJ, Li JY, Cai YS, et al. Effect of Danggui Niantongtang on expression of autophagy-related proteins LC3, Beclin1 and p62 in rats with adjuvant arthritis differentiated into wind-damp-heat impediment [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(1): 41-49.
- [24] 杨根梦, 洪仕君, 王一航, 等. Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP3 炎性小体与自噬调节作用的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(3): 103-107.
- Yang GM, Hong SJ, Wang YH, et al. Progress of research in the regulation of Keap1/Nrf2/p62, NLRP3 inflammasome and autophagy [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(3): 103-107.
- [25] 柯诗文. 温肺化饮汤对氧化应激环境下小鼠肺间充质干细胞线粒体质量的调控及分子机制初探 [D]. 南昌: 江西中医药大学; 2020.
- Ke SW. Regulation and molecular mechanism of mitochondria quality of murine lung mesenchymal stem cells under oxidative stress by Wenfei Huaxian Decoction: a preliminary study [D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine; 2020.
- [26] 吴杰连. p62/Keap1-Nrf2 途径介导自噬促进贝类抗氧化应激研究 [D]. 南昌: 南昌大学; 2021.
- Wu JL. p62/Keap1-Nrf2 pathway mediated autophagy promotes antioxidant stress in shellfish [D]. Nanchang: Nanchang University; 2021.
- [27] Shirakabe A, Zhai P, Ikeda Y, et al. Drp1-dependent mitochondrial autophagy plays a protective role against pressure overload-induced mitochondrial dysfunction and heart failure [J]. *Circulation*, 2016, 133(13): 1249-1263.

[收稿日期] 2022-10-28

曹晓静,武国富,侯佳睿,等. 人源化更年期抑郁小鼠模型构建及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 576-582.
Cao XJ, Wu GF, Hou JR, et al. Establishment and evaluation of a humanized depression mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 576-582.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.003

人源化更年期抑郁小鼠模型构建及评价

曹晓静¹, 武国富², 侯佳睿³, 宋雷³, 王小云^{1*}

(1. 广州中医药大学第二附属医院, 广州 510405; 2. 山西省针灸医院, 太原 030006;
3. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510120)

【摘要】 目的 通过粪菌移植技术构建人源化抑郁小鼠模型, 并对模型进行评价。**方法** 将更年期抑郁人群和健康人群的粪便移植给“模拟无菌”小鼠, 先将 60 只 C57BL/6 小鼠分为空白组、抑郁粪菌移植 FMT-P 组和健康粪菌移植 FMT-H 组。空白组 ($n = 20$) 仅予普通饲料喂养; FMT-P 组 ($n = 20$) 采用抗生素鸡尾酒疗法预处理, 再进行抑郁人群粪菌移植制作模型; FMT-H 组 ($n = 20$) 则给予抗生素鸡尾酒疗法, 再进行健康人群粪菌移植制作模型, 均持续 28 d。观察大鼠的一般情况和行为学检测 (悬尾实验、新环境进食实验、糖水偏爱实验), ELISA 测定血清多巴胺 (DA)、去甲肾上腺素 (NE)、5-羟色胺 (5-HT)、 γ 氨基丁酸 (GABA) 的水平, HE 染色观察结肠组织病理。**结果** 与空白组及 FMT-H 组相比, FMT-P 组小鼠体重增长较慢, 绝望时间明显延长, 摄食时间及糖水偏好率明显下降, 并伴有活动减少、毛发蓬乱发黄无泽、易掉落、精神萎靡倦怠等抑郁症状; 其血清 GABA 含量、5-HT 含量、DA 含量显著降低, 镜下可见结肠组织排列紊乱, 腺体增多, 局部炎性细胞浸润。**结论** 抗生素鸡尾酒疗法结合粪菌移植技术可建立人源化抑郁小鼠模型。

【关键词】 粪菌移植; 抗生素鸡尾酒疗法; 人源化抑郁模型; 模型评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0576-07

Establishment and evaluation of a humanized depression mouse model

CAO Xiaojing¹, WU Guofu², HOU Jiarui³, SONG Lei³, WANG Xiaoyun^{1*}

(1. the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China.
2. Acupuncture and Moxibustion Hospital of Shanxi Province, Taiyuan 030006. 3. the Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120)
Corresponding author: WANG Xiaoyun. E-mail: wangxiaoyun@gzucm.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a humanized mouse model of depression by fecal bacteria transplantation and evaluate the model. **Methods** The feces of depressed and healthy people in the climacteric period were transplanted into simulated sterile mice. Sixty C57BL/6 mice were divided into blank group, depressed fecal bacteria transplantation (FMT-P) and healthy fecal bacteria transplantation (FMT-H) groups. The blank group (20 mice) was only fed an ordinary diet. The FMT-P group (20 mice) was pretreated with an antibiotic cocktail, and then the model was established by fecal bacteria transplantation in the depressed population. The FMT-H group (20 mice) was administered the antibiotic cocktail, and then the model was established by fecal bacteria transplantation in the healthy population. Each group was continuously

【基金项目】 国家自然科学基金 (82004411), 国家中医药管理局王小云全国名老中医药专家传承工作室建设项目 ([2016]42), 中国民族医药学会科研项目 (2021Z1084-340103), 广东省中医院朝阳人才科研专项资助 (ZY2022KY02), 广东省中医院岭南妇科流派传承工作室建设项目 ([2013]233)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82004411), State Administration of Traditional Chinese Medicine ([2016]42), Scientific Research Project of Chinese Society of Ethnic Medicine (2021Z1084-340103), Research Fund for Zhaoyang Talents of Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine (ZY2022KY02), Construction Project of Lingnan Gynecology Genre Inheritance Studio of Guangdong Hospital of TCM ([2013]233).

【作者简介】 曹晓静 (1987—), 女, 副主任医师, 博士, 博士后, 研究方向: 中西医结合治疗妇科内分泌疾病。Email: butterfly7120@163.com

【通信作者】 王小云 (1954—), 女, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合治疗妇科疾病。Email: wangxiaoyun@gzucm.edu.cn

fed for 28 days. The general conditions and behavioral tests of mice were observed by tail suspension and new environment feeding tests, the serum levels dopamine (DA), norepinephrine (NE), 5-hydroxytryptamine (5-HT), and γ -aminobutyric acid (GABA) were determined by ELISA, and colon histopathology was observed by HE staining. **Results** Compared with the blank control group, the body mass of the FMT-P group was increased slowly, the time of depression was significantly prolonged, the feeding time was significantly decreased, and there were depression symptoms such as decreased activity, disheveled and yellow hair, shedding fur easy to fall off, and mental fatigue. The serum levels of GABA, 5-HT, and DA in FMT-P group the group were significantly lower than those in the blank control group. Microscopically, colonic tissue was disordered, glands enlarged glands were increased, and local inflammatory cells had infiltrated. **Conclusions** The combination of antibiotic cocktail therapy and fecal bacteria transplantation establishes a humanized mouse model of depression.

[Keywords] fecal bacteria transplantation; antibiotic cocktail therapy; humanized depression model; model evaluation

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

围绝经期抑郁症 (perimenopausal major depressive disorder, PMDD) 是发生在围绝经期的以情绪低落、思维迟缓、意志活动减退为主要表现的精神类疾病, 目前其患病率为 20.9% ~ 47.0%, 且有逐渐增高的趋势^[1]。PMDD 的确切病因尚不清楚, 研究认为一般与单胺耗竭假说、受体敏感假说、神经内分泌假说、神经营养假说及第二信使失调、免疫系统失调、神经回路假说等有关, 但仅仅处于探索性研究阶段, 随着研究的不断深入及微生物组学的兴起, 近些年的研究发现肠道菌群能够通过脑-肠轴的双向调节作用, 影响情绪和行为, 造成如抑郁、焦虑、自闭症等精神疾病的出现^[2]。

为了解肠道菌群在精神疾病中所起的作用及脑-肠轴的调节作用机制, 本研究采用粪菌移植 (fecal depression microbiota transplantation, FMT) 技术制作 PMDD 模型^[3], 并对造模结果进行评价, 现将模型制作和评价的方法整理报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选择 12 周龄的清洁级雌性 C57BL/6 小鼠 60 只, 体重 (20 ± 3) g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供【SCXK(湘)2019-0004】。饲养环境: 昼夜各半循环照明 (即保持 12 h 昼夜交替), 饲养温度 (22 ± 2) °C, 湿度保持 $55\% \pm 5\%$ 。饲养环境安静且干净整洁, 饲养期各组小鼠可自由获得食物和水, 饲养于湖南斯莱克景达实验动物中心清洁级环境【SYXK(湘)2019-0004】。本实验经广州中医药大学实验动物福利与伦理委员会批准 (20210714011)。

1.1.2 主要试剂与仪器

无菌 PBS (Cytiva, 美国), 甘油 (信泰生物, 中国), 生理盐水、氨苄西林 (西格玛-奥尔德里奇, 美国)、万古霉素 (Teva, 美国)、甲硝唑 (赛诺菲, 法国)、两性霉素 B (赛诺菲, 法国)、琼脂 (BioFroxx), RIPA 强裂解液 (威佳生物, 中国), 小鼠多巴胺 (DA) 试剂盒 (晶美生物, 中国); 小鼠去甲肾上腺素 (NE) 试剂盒 (晶美生物, 中国); 小鼠 5-羟色胺 (5-HT) 试剂盒 (晶美生物, 中国); 小鼠 γ 氨基丁酸 (GABA) 试剂盒 (晶美生物, 中国)。

行为录像系统 (EthoVision XT, Ugo Basile, 意大利), Top Scan 行为分析系统 (TopScan3D, 西门子, 德国), 高速离心机 (DT5-22, 西门子, 德国), 组织研磨仪 (SCIENTZ-48L, Scientz, 中国), 酶标仪 (DNM-9606, 博科, 美国), 灌胃针, 1 mL 注射器, 采血管, 滤纸。

1.2 方法

1.2.1 实验设计

小鼠适应性饲养 1 周后, 建立“模拟无菌”小鼠模型, 随后将小鼠随机分为抑郁粪菌移植组 (FMT-P 组) 和健康粪菌移植组 (FMT-H 组), 两组各 20 只小鼠, 并设空白组 20 只。

FMT-P 组移植 PMDD 患者肠道菌群, FMT-H 组移植健康人肠道菌群, 空白组正常喂养, 共干预 4 周, 在 FMT 结束后观察大鼠的一般情况和行为学检测 (悬尾实验、新环境进食实验、糖水偏爱实验), ELISA 测定血清多巴胺 (DA)、去甲肾上腺素 (NE)、5-羟色胺 (5-HT)、 γ 氨基丁酸 (GABA) 的水平, HE 染色观察结肠组织病理。

1.2.2 抗生素鸡尾酒建立“模拟无菌”模型

抗生素鸡尾酒是国际公认的制作“模拟无菌”

模型^[4],由 4 种抗生素和 1 种抗真菌药组成,具体做法是将氨苄西林(100 mg/kg)、万古霉素(50 mg/kg),甲硝唑(100 mg/kg),新霉素(100 mg/kg)、两性霉素 B(1 mg/kg)混合。小鼠先正常喂养 1 周,经过适应期后,每 12 h 灌胃 1 次抗生素。每天 1 次灌胃,连续 2 周。抗生素鸡尾酒每 36 h 更换 1 次。

1.2.3 FMT 操作步骤

选择 2021 年 1 月 ~ 2022 年 12 月广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)就诊的 PMDD 患者,参照指南^[5-6]:①《围绝经期抑郁的评估和治疗》;②《中国绝经管理与绝经激素治疗指南 2023 版》纳入符合诊断标准的 PMDD 患者。

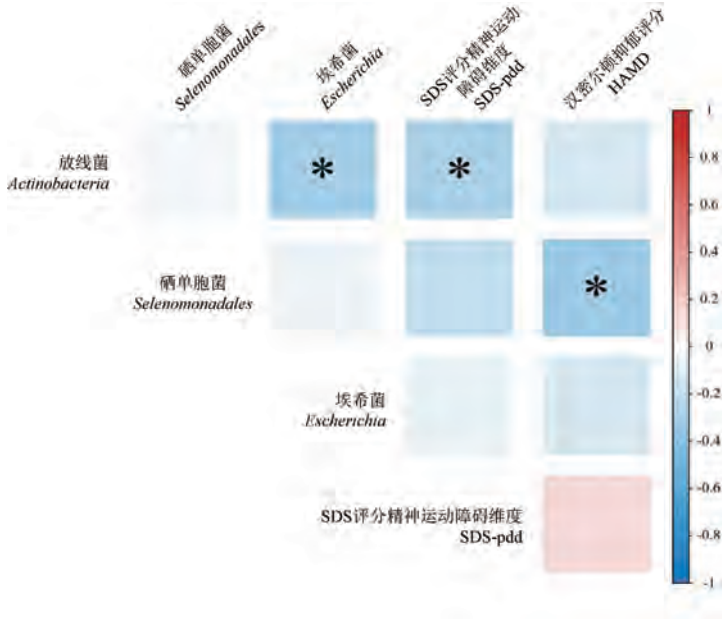
健康人群纳入标准:纳入 40 ~ 65 岁的健康女性,未患任何精神障碍疾病,无酒精或药物依赖,未曾接受过抗生素或益生菌治疗。

本研究方案通过广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)医学伦理委员会审批【批件号:BF2020-039-01】。所有纳入人群表示理解并签署知情同意书后收取其粪便样本。

参照《欧洲粪菌移植共识》要求^[7],将 PMDD 患者及健康人群的粪便样本在采集后 2 h 内进行处理,首先以无菌生理盐水或磷酸盐缓冲盐溶液稀释粪便样本,溶剂体积为 3 ~ 5 倍,均匀搅拌 15 min 使粪便均匀化,达到液体浆液浓度;接着使用物理方

法过滤、离心粪便匀浆液,去除较大的颗粒物,最后将粪便悬液置于密闭容器中,在-80℃冰箱冷冻保存。因为粪便微生物主要是厌氧菌,所以减少粪便制备过程中的氧气暴露时间对于确保粪便微生物的生存能力至关重要。

采用 16S rDNA 测序技术检测 PMDD 患者和健康对照人的肠道菌群,物种累积曲线末端逐渐趋于平缓,代表样本量足够反映出文库样本绝大部分的物种信息,生物信息学分析可靠。研究显示,PMDD 组和健康对照组菌群组成具有较明显差异,就菌群物种组成来说,在门水平,PMDD 组的拟杆菌门、变形菌门等丰度较健康对照组相对较高,而厚壁菌门、梭菌门等丰度相对较低;在属水平,PMDD 组的拟杆菌属、埃希菌属等丰度较健康对照组高,而普雷沃菌属、粪杆菌属等丰度相对较低;就多样性分析来说,健康对照组的菌群丰度指数(ACE 指数、Chao1 指数)、菌群多样性指数(Shannon 指数)均大于 PMDD 组,提示 PMDD 组较健康对照组肠道菌群的物种丰度降低,生物多样性降低。LefSe 分析显示,放线菌、埃希菌及拟杆菌是 PMDD 组与健康对照组间差异最显著的菌属,为探索三种差异物种的丰度与 PMDD 患者的临床症状是否存在相关性,因此,采用 Spearman 相关性分析探索组间差异菌属丰度与临床症状指标的相关性,如图 1 所示,放线菌



注:颜色的深浅代表相关性的大小,* $P < 0.05$ 。

图 1 差异物种与临床症状表型评分的 Spearman 相关性热图

Note. The depth of color represents the magnitude of the correlation, * $P < 0.05$.

Figure 1 Spearman correlation heat map of different species and clinical symptom phenotypic scores

与埃希菌、SDS 评分精神运动障碍维度呈负相关($P < 0.05$), 痢单胞菌与 HAMD 量表呈负相关($P < 0.05$)。

待“模拟无菌”小鼠模型建立成功后, 将小鼠随机分为 FMT-P 组和 FMT-H 两组, 分别灌胃 PMDD 患者及健康对照组的肠道菌群混悬液($10\ \mu\text{L/g}$), 每天 1 次灌胃, 持续 2 周以重建肠道微生物群。

1.2.4 行为学实验

(1) 悬尾实验: 将动物尾部悬吊, 胶布粘在离小鼠尾尖部 1/3 处, 将其悬于悬尾箱内, 使其头部正对离箱底约 10 cm, 采用 Top Scan 行为学分析系统记录动物 6 min 内不动状态潜伏期及 4 min 内不动状态持续时间。

(2) 新环境抑食实验: 箱体高 15 cm, 底边长 60 cm 内壁涂黑, 在箱底 1/3 处放置小块食物于白纸上。实验前禁食 24 h (不禁水), 实验时从另 2/3 处的箱角将小鼠放入箱中并开始计时, 以开始咀嚼食物为标准记录时间, 即摄食潜伏期, 观察 5 min, 记录从放入小鼠到小鼠开始探索食物的潜伏时间, 并观察小鼠新环境进食的活动量 (探索食物的时间)。

(3) 糖水偏爱实验: 小鼠单笼饲养, 进行 48 h 的蔗糖饮水训练。全程给予 1% ~ 2% 蔗糖水和饮用水 (中途交换两个水瓶位置)。实验期结束后, 禁水 (不禁食) 9 ~ 16 h, 测定 8 ~ 15 h 内 (中间宜交换两瓶位置 1 次) 小鼠对两瓶水的饮用量 (g), 测量蔗糖和饮用水的消耗量, 计算蔗糖偏好率。蔗糖偏好率 = $[\text{蔗糖消耗量} / (\text{蔗糖消耗量} + \text{饮用水消耗量})] \times 100\%$ 。

1.2.5 标本采集与处理

行为学实验结束后麻醉小鼠后, 进行腹主动脉采血, 采血管室温静置 2 h, 离心 ($3000\ \text{r/min}$, 10 min) 后, 吸取上层血清, 放入 -80°C 冰箱备用; 后处死小鼠, 迅速剥离其结肠组织, 一侧结肠组织用包埋纸固定投入多聚甲醛溶液中; 另一侧组织投入液氮罐中冻存。

1.3 统计学分析

本实验所得数据采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 计量资料符合正态分布的使用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行统计描述, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较方差齐采用 LSD (Least-significant difference) 法, 方差不齐采用 Dunnet's 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 说明差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异极具有显著性。

2 结果

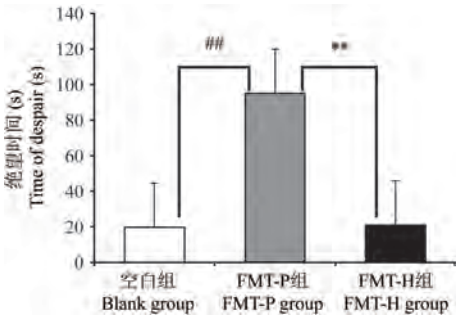
2.1 一般情况

与空白组及 FMT-H 组比, FMT-P 组小鼠体重增长较慢, 并伴有活动减少、毛发蓬乱发黄无泽、易掉落、精神萎靡倦怠等抑郁症状。

2.2 行为学实验结果

2.2.1 对小鼠悬尾实验结果的影响

由图 2 可知, 与空白组及 FMT-H 组比, FMT-P 组的绝望时间显著延长 ($P < 0.01$)。



注: 与空白组相比, $##P < 0.01$; 与 FMT-H 组相比, $**P < 0.01$ 。(下图同)

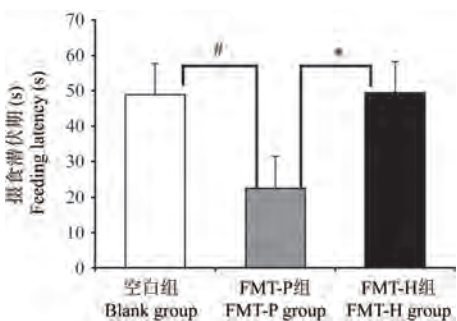
图 2 小鼠悬尾实验绝望时间 ($n = 20$)

Note. Compared with blank group, $##P < 0.01$. Compared with FMT-H group, $**P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Despair time in mice tail suspension experiment ($n = 20$)

2.2.2 对小鼠新环境进食实验结果的影响

由图 3 可知, 与空白组及 FMT-H 组比, FMT-P 组的摄食潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$)。



注: 与空白组相比, $#P < 0.05$; 与 FMT-H 组相比, $*P < 0.05$ 。(下图同)

图 3 小鼠新环境进食实验摄食潜伏期 ($n = 20$)

Note. Compared with blank group, $#P < 0.05$. Compared with FMT-H group, $*P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 3 Feeding latency in the new environment feeding experiment of mice ($n = 20$)

2.2.3 对小鼠糖水偏爱实验结果的影响

由图 4 可知,与空白组及 FMT-H 组比,FMT-P 组的糖水摄入量显著下降($P < 0.05$)。

2.3 对小鼠神经递质水平的影响

由图 5 结果得知,与空白组及 FMT-H 组相比较,FMT-P 组小鼠血清中去甲肾上腺素(NE)水平、 γ 氨基丁酸(GABA)水平、5-羟色胺(5-HT)水平均降低($P < 0.05$),其中多巴胺(DA)水平下降明显($P < 0.01$)。

2.4 小鼠结肠组织病理结果

与空白组及 FMT-H 组比较,FMT-P 组小鼠结肠

组织镜下可见结构排列紊乱,腺体增多,局部炎性细胞浸润(见图 6)。

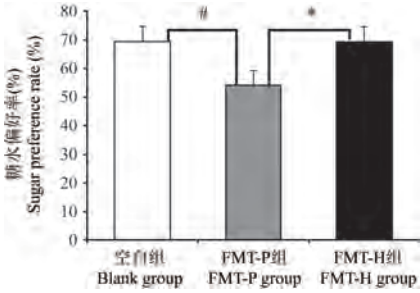


图 4 小鼠糖水偏爱实验($n = 20$)

Figure 4 Sugar preference rate in mice($n = 20$)

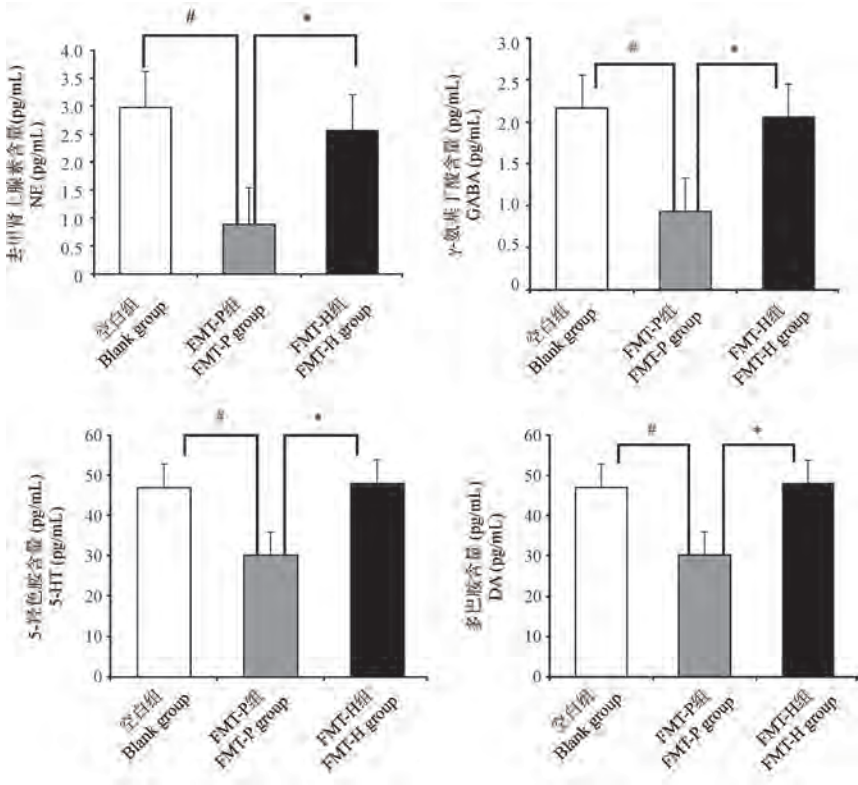


图 5 小鼠去甲肾上腺素、 γ -氨基丁酸、5-羟色胺、多巴胺水平($n = 20$)

Figure 5 Levels of NE, GABA, 5-HT, and DA in mice($n = 20$)

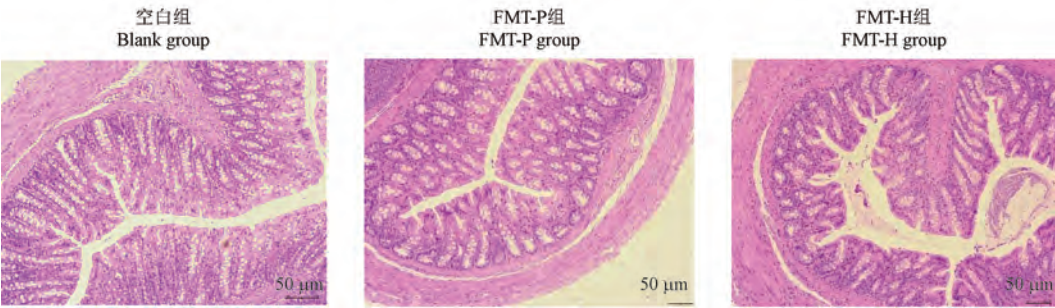


图 6 小鼠结肠组织病理切片(HE 染色)

Figure 6 Pathological section of mouse colon(HE staining)

3 讨论

围绝经期女性由于卵巢功能开始衰竭,正经历着一系列极其复杂而痛苦的心身症状,如月经紊乱、潮热出汗、睡眠障碍、情绪变化及全身肌肉关节痛等;这些症状加重了围绝经期女性的心理负担和精神压力,并且随着激素水平波动导致的神经功能紊乱症候群,如情绪低落消沉、严重失眠、莫名的周身疼痛等都使该期女性心理出现剧烈地变化,而既往有抑郁症病史的女性则在围绝经期抑郁症更易加重或复发,因此 PMDD 已成为亟待解决的公共卫生问题^[8]。

目前,有关 PMDD 机制研究的动物模型主要有^[9]:双侧卵巢切除 + 慢性不可预知性温和应激(OVX + CUMS)动物模型、不完全去势 + CUMS 动物模型、两步卵巢切除术 + CUMS 动物模型、CUMS + 睡眠剥夺 + 去势动物模型、自然围绝经期 + CUMS 动物模型等,但机制单一,整体影响的阐述不够,均无法很好地贴切 PMDD 女性内分泌功能衰退过程中伴发的情绪抑郁等诸多不适症状,同时,随着微生物组学研究的发展,肠道菌群对脑功能的影响越来越受到关注,肠道菌群对行为和情绪的调控方式有了全新和更全面的认识。大量研究发现,围绝经期综合征女性肠道有益菌群与腐败菌比例改变,存在肠道微生态群失调现象^[10-11]。有学者发现,围绝经期抑郁大鼠存在肠道微生态群紊乱,肠道菌群多样性明显减低,而肠道微生态失调会进一步加重机体生理失衡,形成恶性循环,引起情绪障碍持续存在并加重^[12]。大量研究证明,肠道微生物区系紊乱作为 PMDD 发生的潜在病因,通过微生物-肠-脑轴影响大脑的功能和行为,调节压力、焦虑和认知。因此,本研究通过小鼠灌胃抗生素构建“模拟无菌”环境,再利用 FMT 技术成功构建了人源化抑郁小鼠模型。

研究表明,脑内的单胺神经递质包括 NE、DA、5-HT 和 GABA 等,是一类调节机体生理活动的重要物质^[13],这些物质在体内的含量可反映神经系统功能变化;GABA 是中枢神经系统中的主要抑制性神经递质,其信号地改变与重度抑郁症高度相关通过与相应离子通道受体结合,引起氯离子通道开启,使氯离子内流,细胞膜出现超极化,从而抑制动作电位的发生,进而抑制了神经传导,当 GABA 缺乏时,会产生焦虑、不安、疲倦、忧虑等兴奋性情绪,这

与本研究一致。研究显示,NE 和 5-HT 能神经细胞体均位于脑干,且两者的轴突通过基底节及丘脑至额叶皮质,若病灶累及基底节、丘脑、额叶皮质,则会影响区域内去甲肾上腺素能和 5-HT 能的神经通路,降低 5-HT、NE,继而导致抑郁^[14],也与本研究一致;DA 是大脑中含量最丰富的儿茶酚胺类神经介质,作为一种神经递质,调节中枢神经系统的多种生理功能,DA 的缺失会导致锥体外系活动障碍,情绪低落,甚至会出现抑郁。本研究中抑郁小鼠 DA 水平降低,神经递质含量减少,可能是导致小鼠抑郁发生的机制。同时,抑郁小鼠结肠组织结构排列紊乱,腺体增多,局部炎性细胞浸润,这也证实了,大脑与肠道之间存在一种双向调节通道,病理状态下二者亦相互影响^[15]。

综上所述,研究发现 PMDD 患者肠道菌群移植可诱导小鼠产生抑郁样行为,显著降低小鼠 GABA、5-HT、DA、NE 水平表达,并对小鼠肠道组织有影响,且人源化粪菌移植抑郁实验动物模型更加贴合抑郁症的临床表型,在阐明发病机制方面具有明显的优势和广泛的应用前景。

参 考 文 献(References)

- [1] 中国妇幼保健协会妇女保健专科能力建设专业委员会. 更年期女性心理健康管理专家共识 [J]. 中国妇幼健康研究, 2021, 32(8): 1083-1089.
Capacity Building Committee of Women's Health of China Maternal and Child Health Association. Professional consensus on mental health management of menopausal women [J]. Chin J Woman Child Health Res, 2021, 32(8): 1083-1089.
- [2] Chu Y, Sun S, Huang Y, et al. Metagenomic analysis revealed the potential role of gut microbiome in gout [J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 2021, 7(1): 66.
- [3] 王雪雪, 陶柱萍, 厉颖, 等. 抑郁动物模型的研究进展及在中医药中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(11): 2473-2480.
Wang XX, Tao ZP, Li Y, et al. Study advance of depressive animal models and its application in traditional Chinese medicines [J]. Chin J Chin Mater Med, 2020, 45(11): 2473-2480.
- [4] 李建香, 王君君, 黄天马, 等. 无菌鼠模型制作方法与评价 [J]. 实验动物科学, 2022, 39(3): 67-69.
Li JX, Wang JJ, Huang TM, et al. Methods and evaluations of making germ-free rats and mice model [J]. Lab Anim Sci, 2022, 39(3): 67-69.
- [5] Maki PM, Kornstein SG, Joffe H, et al. Guidelines for the evaluation and treatment of perimenopausal depression: summary and recommendations [J]. J Womens Health, 2019, 28(2): 117-134.
- [6] 中华医学会妇产科学分会绝经学组. 中国绝经管理与绝经激

素治疗指南 2023 版 [J]. 中华妇产科杂志, 2023, 58(1): 4-21.

Menopause Group, Gynecology and Obstetrics Branch. The 2023 Chinese menopause symptom management and menopausal hormone therapy guidelines [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2023, 58(1): 4-21.

[7] 李超, 谈路轩, 张馨梅, 等. 2016 年欧洲粪菌移植共识介绍 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2017, 26(9): 961-965.

Li C, Tan LX, Zhang XM, et al. Introduction to the European consensus on fecal bacteria transplantation in 2016 [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2017, 26(9): 961-965.

[8] 杨艳青, 赵伟田, 李灿委, 等. 围绝经期抑郁症的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(5): 85-92.

Yang YQ, Zhao WT, Li CW, et al. Research progress in perimenopausal depression [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(5): 85-92.

[9] 杨颖雯, 周瑾, 黄菲. 不同年龄段小鼠抑郁及焦虑样行为的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 248-253.

Yang YW, Zhou J, Huang F. Comparison of depression-like and anxiety-like behaviors in mice of different ages [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 248-253.

[10] 曹雯雯, 刘子维, 赵小萱, 等. 基于“心与小肠相表里”理论探讨脑肠轴与围绝经期抑郁 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(12): 2991-2993.

Cao WW, Liu ZW, Zhao XX, et al. Based on the theory of “heart and small intestine are exterior and interior”, this paper discusses the brain-intestine axis and perimenopausal depression [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(12): 2991-2993.

[11] 陈文璐, 闫晓如, 高继萍, 等. 肠道菌群在抑郁症发生中的调控机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 130-135.

Chen WL, Yan XR, Gao JP, et al. Research progress on the regulatory mechanism of intestinal flora in the occurrence of depression [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 130-135.

[12] 张巧利, 王妍, 贾婵维, 等. 围绝经期抑郁大鼠肠道微生物菌群的研究 [J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(10): 1344-1349.

Zhang QL, Wang Y, Jia CW, et al. Study on intestinal microflora in rats with peri-menopausal depression [J]. J Reprod Med, 2020, 29(10): 1344-1349.

[13] 王奕丹, 张磊, 王建楠, 等. FTY720 对卒中后抑郁大鼠单胺类神经递质影响的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 38-43.

Wang YD, Zhang L, Wang JN, et al. Effects of FTY720 on monoamine neurotransmitters in rats with post-stroke depression [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 38-43.

[14] 沈蓉, 周华, 赵中. 脑卒中后抑郁西医治疗的研究进展 [J]. 医学综述, 2021, 27(24): 4883-4887.

Shen R, Zhou H, Zhao Z. Research progress of western medicine in treatment of patients with post-stroke depression [J]. Med Recapitul, 2021, 27(24): 4883-4887.

[15] 肖钰雯, 吴林, 江家乔, 等. 基于脑-肠轴理论探讨中医从肝脾论治抑郁症研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(5): 196-200.

Xiao YW, Wu L, Jiang JQ, et al. Discussion on the Treatment of Depression from the liver and spleen based on the theory of brain-gut axis [J]. Asia Pac Tradit Med, 2021, 17(5): 196-200.

[收稿日期] 2023-03-02

《中国实验动物学报》刊期变更通知

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

欢迎读者积极订阅! 欢迎各位学者踊跃投稿!

杜冰玉,尹燕燕,岳昭娣,等. 异丙肾上腺素诱导慢性心衰模型的方法优化 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 583-589.
Du BY, Yin YY, Yue ZD, et al. Method optimization of an isoproterenol-induced chronic heart failure model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 583-589.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.004

异丙肾上腺素诱导慢性心衰模型的方法优化

杜冰玉¹, 尹燕燕¹, 岳昭娣¹, 常万鹏¹, 阚梦凡¹, 于少泓^{2,3*}

(1. 山东中医药大学康复医学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学医学院, 济南 250355;
3. 山东中医药大学第二附属医院, 济南 250001)

【摘要】 目的 目前对于慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 发病机制的研究和治疗手段均具有局限性,为了更好地研究其发病机理,本文对异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 诱导慢性心力衰竭大鼠模型的制备方法进行了优化研究。**方法** 将SD雄性大鼠分为4组,模型A组大鼠连续以5 mg/(kg·d)注射ISO 10 d;模型B组大鼠前3 d注射ISO 2.5 mg/(kg·d),后9 d注射5 mg/(kg·d);模型C组大鼠第1天被给予15 mg/kg的戊巴比妥钠,注射ISO 1.25 mg/kg,第2、3天以2.5 mg/(kg·d)注射,后9 d以5 mg/(kg·d)注射,从第2天开始每天分2次注射间隔30 min。对照组给予等量生理盐水。通过超声心动图、病理学检测和荧光定量PCR等方法来验证模型的建立。**结果** 模型A、B和C组的死亡率分别为80%、60%和40%。与对照组相比,模型C组大鼠的左心室短轴缩短率和射血分数显著降低 ($P < 0.001$);心肌细胞排列紊乱, I、Ⅲ型胶原表达显著增加 ($P < 0.05$);COL1A1、COL3A1、FN1和ACTA2 mRNA表达水平显著上调 ($P < 0.05$);血清氨基末端脑钠肽前体 (N-terminal pro-B type natriuretic peptide, NT-pro BNP)与甘油三酯的水平显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 注射麻醉剂使大鼠处于半清醒状态,梯度增加每日注射剂量和减少单次注射量均可降低死亡率,为建立CHF大鼠模型提供新思路与新方式。

【关键词】 异丙肾上腺素;慢性心力衰竭;大鼠;模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0583-07

Method optimization of an isoproterenol-induced chronic heart failure model

DU Bingyu¹, YIN Yanyan¹, YUE Zhaodi¹, CHANG Wanpeng¹, KAN Mengfan¹, YU Shaohong^{2,3*}

(1. College of Rehabilitation Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China.
2. College of Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355. 3. the Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001)
Corresponding author: YU Shaohong. E-mail: sutcm2006@163.com

【Abstract】 Objective Current research and treatments for the pathogenesis of chronic heart failure (CHF) are limited. In order to better study its pathogenesis, this paper optimized the preparation method of isoproterenol (ISO)-induced chronic heart failure rat model. **Methods** SD male rats were divided into 4 groups, and rats in model A were injected with ISO 5 mg/(kg·d) continuously for 10 days; rats in model B were injected with ISO 2.5 mg/(kg·d) on the first 3 days and 5 mg/(kg·d) on the last 9 days; rats in model C were given 15 mg/kg of pentobarbital sodium on day 1 and ISO 1.25 mg/kg on day 2 and 3, and 2.5 mg/(kg·d) on day 2 and 3, and 5 mg/(kg·d) on the last 9 days, with

【基金项目】国家自然科学基金青年项目(82000788),广东省基础与应用基础研究基金项目(2019A1515110023),中国博士后科学基金项目(2021M702040)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China, Youth Program (82000788), the Guangdong Basic and Applied Basic Research Fund Program (2019A1515110023), the China Postdoctoral Science Foundation Program (2021M702040).

【作者简介】杜冰玉(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:心脑血管疾病中医康复。Email: dby19980730@163.com

【通信作者】于少泓(1975—),男,副教授,博士,研究方向:心脑血管疾病中医康复;糖脂代谢基础。Email: sutcm2006@163.com

30 min interval between 2 injections per day from day 2. The control group was given equal amounts of saline. The successful establishment of the model was verified by echocardiography, pathology testing and fluorescence quantitative PCR. **Results** Mortality rates were 80%, 60%, and 40% in model groups A, B, and C, respectively. Compared with the control group, the left ventricular short axis shortening and ejection fraction were significantly lower in model group C ($P < 0.001$). Rats in group C had disturbed myocardial cell arrangement, significantly increased collagen type I and III expression ($P < 0.05$), and significantly upregulated expression levels of fibrosis indexes COL1A1, COL3A1, FN1 and ACTA2 mRNA ($P < 0.05$), while the levels of serum N-terminal pro-B type natriuretic peptide (NT-pro BNP) and triglycerides were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Injecting anesthetics to keep the rats in a semi-conscious state, increasing the daily injection dose and decreasing the single injection dose in a gradient can reduce the mortality rate, which can provide a new idea and a new approach for establishing a CHF rat model.

[Keywords] isoproterenol; chronic heart failure; rats; model

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

近年来,我国的心血管疾病发病率呈逐年上升趋势,对人们的身体健康构成了极大的威胁,而慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是多种心血管疾病的共同转归,是各种器质性心脏病的终末阶段,并且容易复发^[1]。为了更深入研究 CHF 的病因及治疗方法,构建严谨的 CHF 动物模型是必不可缺的实验环节。在多种 CHF 造模方法中,注射异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)造模法成模较快,诱导时间短且无创伤^[2]。然而目前关于构建 CHF 模型所用 ISO 的有效注射剂量、注射方式和成模时间等条件虽有多种报道,但成模率高且死亡率低的方法仍需不断探索。本研究参考国内外学者的研究方法,并经过不断摸索进行改良,通过大鼠腹腔注射 ISO 的方法成功地构建 CHF 动物模型,为进一步的动物实验奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选择 36 只 SPF 级健康的 8 ~ 10 周龄 SD 雄性大鼠,体重 240 ~ 260 g,购于北京维通利华生物科技股份有限公司【SCXK(京)2021-0006】,控制温度(22 ± 3)℃,湿度(60 ± 5)%,12 h 光照/12 h 黑暗,普通饲料喂养,自由获取纯净水,饲养于山东第一医科大学第一附属医院动物房【SYXK(鲁)2018-0009】。实验开展获得了山东第一医科大学第一附属医院伦理委员会审核批准(2021S942)。

1.1.2 主要试剂与仪器

异丙肾上腺素(I5627, Sigma),伊红、苏木素染液(G1120,北京索莱宝科技有限公司),Masson 染色试剂盒(G1006,武汉赛维尔生物科技有限公司),免

疫组化试剂盒(SP-9001,北京中杉金桥生物技术有限公司),Collagen I (COL1)抗体(ab270993, Abcam)、Collagen III (COL3)抗体(ab7778, Abcam)、Fibronectin 抗体(ab268020, Abcam),甘油三酯检测试剂盒(ml095104,上海酶联生物科技有限公司),氨基末端脑钠肽前体(N-terminal pro-B type natriuretic peptide, NT-pro BNP)的酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(ml-E2785, 上海酶联生物科技有限公司),SYBR® Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒(AG11701,湖南艾科瑞生物科技有限公司)。

Vevo3100 小动物超声仪(VisualSonics, 加拿大),CFX 96 Real-Time System (Bio-Rad, 德国),显微镜(徕卡,德国)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模及分组

将 ISO 用 0.9% 的生理盐水配制成 1.25 mg/mL 的注射液,根据大鼠体重腹腔注射 ISO 进行 CHF 模型制备。SD 雄性大鼠适应性喂养 2 周后被随机分为 4 组:正常对照组($n = 6$):注射生理盐水 10 d;模型 A 组($n = 10$):腹腔注射 ISO 5 mg/(kg·d),连续注射 10 d^[3];模型 B 组($n = 10$):前 3 d 腹腔注射 ISO 2.5 mg/(kg·d),后 9 d 腹腔注射 5 mg/(kg·d),累计总量约 50 mg/kg;模型 C 组($n = 10$):第 1 天给予戊巴比妥钠(15 mg/kg),在其半清醒状态下皮下注射 ISO 1.25 mg/kg,第 2、3 天腹腔注射 ISO 2.5 mg/(kg·d),间隔 30 min 分 2 次注射,后 9 d 腹腔注射 ISO 5 mg/(kg·d),间隔 30 min 分 2 次注射,累计总量约为 50 mg/kg。

1.2.2 超声心动图检测

分别于建模开始前 1 d,建模完成后 1 d 进行超声心动图检测,注射戊巴比妥钠麻醉大鼠,应用

Vevo 3100 高分辨率小动物超声系统, B 超确定位置, 胸骨旁左室长轴切面, 旋转 90° 获得短轴切面, M 型超声心动图测量如下指标: 左心室收缩末期容积 (left ventricular end-systolic volume, LVESV)、左心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic dimension, LVESD)、左心室舒张末期容积 (left ventricular end-diastolic volume, LVEDV) 和左心室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD), 由 Vevo LAB 软件计算得知左心室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS) 和左心室射血分数 (left ventricular ejection fractions, LVEF)。

1. 2. 3 样本采集及心脏质量指数测定

用戊巴比妥钠麻醉大鼠, 从心尖取血, 离心后将血清存放于-80℃冰箱中。取血后处死大鼠并分离心脏, 称量心脏湿质量, 心脏质量指数 = 心脏湿质量/体质量。将一部分放于 4% 多聚甲醛中固定, 后续用于组织学检测, 另外一部分储存在-80℃冰箱中, 后续荧光定量 PCR 检测 (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 使用。

1. 2. 4 组织病理学检查

取大鼠心脏组织, 4% 甲醛固定 48 h, 组织脱水, 石蜡包埋, 石蜡切片 (4 μm)。常规脱蜡后按说明书

进行 HE、Masson 染色。封片后显微镜观察并拍照。

1. 2. 5 免疫组织化学检测

将石蜡切片脱蜡至水后置入柠檬酸盐修复液 (pH = 6.0) 中煮沸进行抗原修复, 内源性过氧化物酶阻断剂孵育 10 min、10% 山羊血清封闭 30 min。分别滴加一抗 COL1 (1 : 150)、COL3 (1 : 700) 和 Fibronectin (1 : 1000) 过夜, 滴加山羊抗兔二抗, 孵育 20 min, PBS 冲洗后, 加入 DAB 显色液显色, 以苏木素染色液复染后封片观察。

1. 2. 6 血清甘油三酯和 NT-proBNP 检测

应用氧化酶法测定对照组及模型 C 组大鼠血清甘油三酯水平, 采用 ELISA 检测大鼠血清 NT-proBNP 水平, 具体实验步骤严格按说明书进行操作。

1. 2. 7 纤维化指标 COL1A1、COL3A1、FN1 和 ACTA2 mRNA 表达检测

研磨大鼠心肌组织, TRIzol 法提取总 RNA, 反转录试剂盒获取 cDNA, RT-qPCR 测定 COL1A1、COL3A1、FN1 和 ACTA2 mRNA 含量。以 β-actin 为内参, 运用 PCR 仪分析实验结果, 得到样品的 Ct 值, 并计算 ΔCt, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer names and sequences

基因 Gene	上游 Forward	下游 Reverse
COL1A1	5'-CCCAGCGGTGGTTATGACTT-3'	5'-TCGATCCAGTACTCTCCGCT-3'
COL3A1	5'-CGAGGTAACAGAGGTGAAAGAGG-3'	5'-TTTCACCTCCAACCTCCAGCAAT-3'
FN1	5'-AAACCTCTACGGGTCGCTG-3'	5'-GCGCTGGTGCTGAAGTCAAA-3'
ACTA2	5'-CAGGGAGTGATGGTTGGAATG-3'	5'-CCGTTAGCAAGGTCGGATG-3'
β-actin	5'-TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3'	5'-GTTGCCATAGAGGTCTTTACGG-3'

1. 3 统计学分析

应用 GraphPad Prism 8 软件, 用 *t* 检验对相关信息进行统计处理, 所有数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2. 1 死亡率及一般情况观察

实验结束后, 对照组无大鼠死亡; 模型 A 组死亡 8 只, 死亡率为 80%; 模型 B 组死亡 6 只, 死亡率为 60%; 模型 C 组死亡 4 只, 死亡率为 40%。对照组大鼠活泼好动, 毛发整齐有光泽; 模型组大鼠抓取反应变差, 出现口唇发紫、进食量较少、蜷卧聚堆、活动较少、反应迟钝、精神萎靡等心衰表现, 尤其是在注射 ISO 后的 1 h 内, 且大鼠死亡大多数发生在注射

ISO 的前 2 d, 随着时间推移死亡数目逐渐减少。

2. 2 超声心动图结果

注射 ISO 后, 与对照组比, 模型 C 组的 LVEDV (*P* < 0.05)、LVESV (*P* < 0.01)、LVESD (*P* < 0.001) 和 LVEDD (*P* < 0.05) 显著升高, 发生明显的心室扩张, 心室容积增加, 心室壁变薄, 且 LVEF 和 LVFS 显著降低 (*P* < 0.001)。表明模型 C 组大鼠心脏发生了结构变化和功能障碍 (图 1, 表 2)。

2. 3 病理学改变

2. 3. 1 HE 染色结果

对照组心肌细胞排列整齐, 而与对照组相比, 模型 C 组心肌细胞排列紊乱并且间隙增宽, 松散破碎, 出现明显的炎症细胞浸润, 心肌出现大面积变性和坏死 (图 2A)。

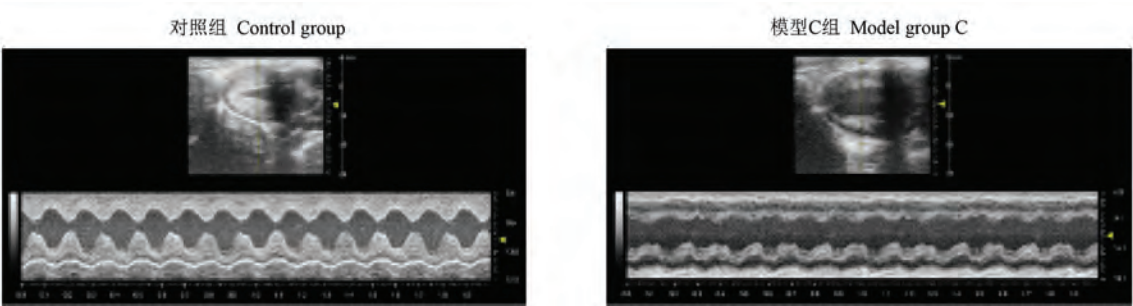


图 1 各组大鼠超声心动图代表图像

Figure 1 Representative echocardiographic images of each group of rats

表 2 超声心动图指标比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Comparison of echocardiographic indices($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	LVEF(%)	LVFS(%)	LVESD(mm)	LVEDD(mm)	LVESV(μL)	LVEDV(μL)
对照组 Control group	88.79 ± 1.56	60.94 ± 2.23	2.34 ± 0.14	5.97 ± 0.09	20.22 ± 2.98	178.70 ± 5.89
模型 C 组 Model group C	72.43 ± 3.69***	44.21 ± 3.59***	3.90 ± 0.37***	6.97 ± 0.44*	75.77 ± 15.22**	267.00 ± 35.59*

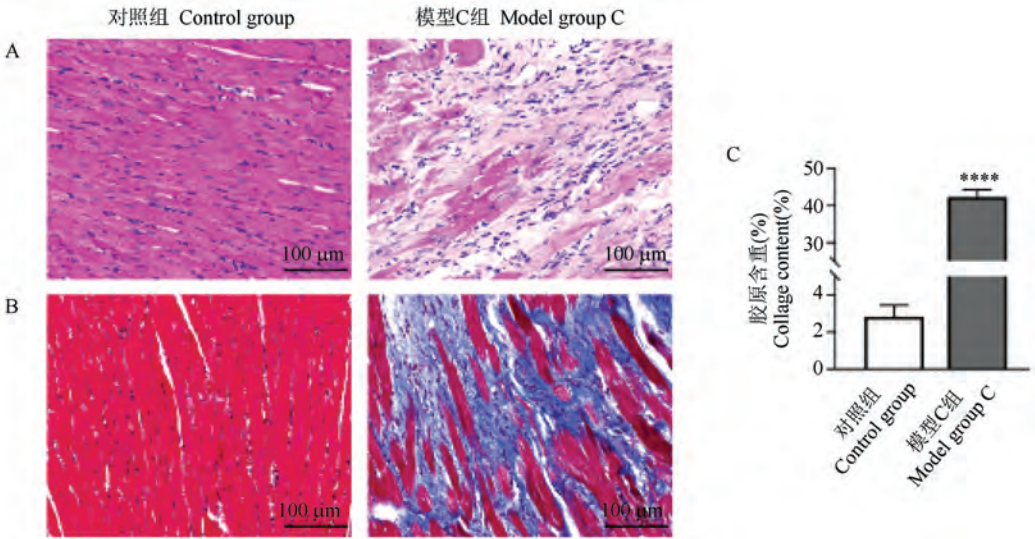
注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下同)
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

2.3.2 Masson 染色结果

对照组大鼠心肌组织纤维排列规则,而模型 C 组大鼠心肌细胞高度坏死并被胶原纤维取代,残留的心肌细胞排列松散紊乱,与对照组相比较,模型 C 组胶原纤维含量显著增加($P < 0.0001$)(见图 2B,2C)。

2.3.3 免疫组化检测结果

I、Ⅲ型胶原蛋白和纤连蛋白在心肌纤维横纹中呈棕色颗粒为阳性。与对照组相比,模型 C 组 COL1、COL3 和 Fibronectin 阳性表达产物显著增加($P < 0.001, P < 0.0001$)(见图 3)。

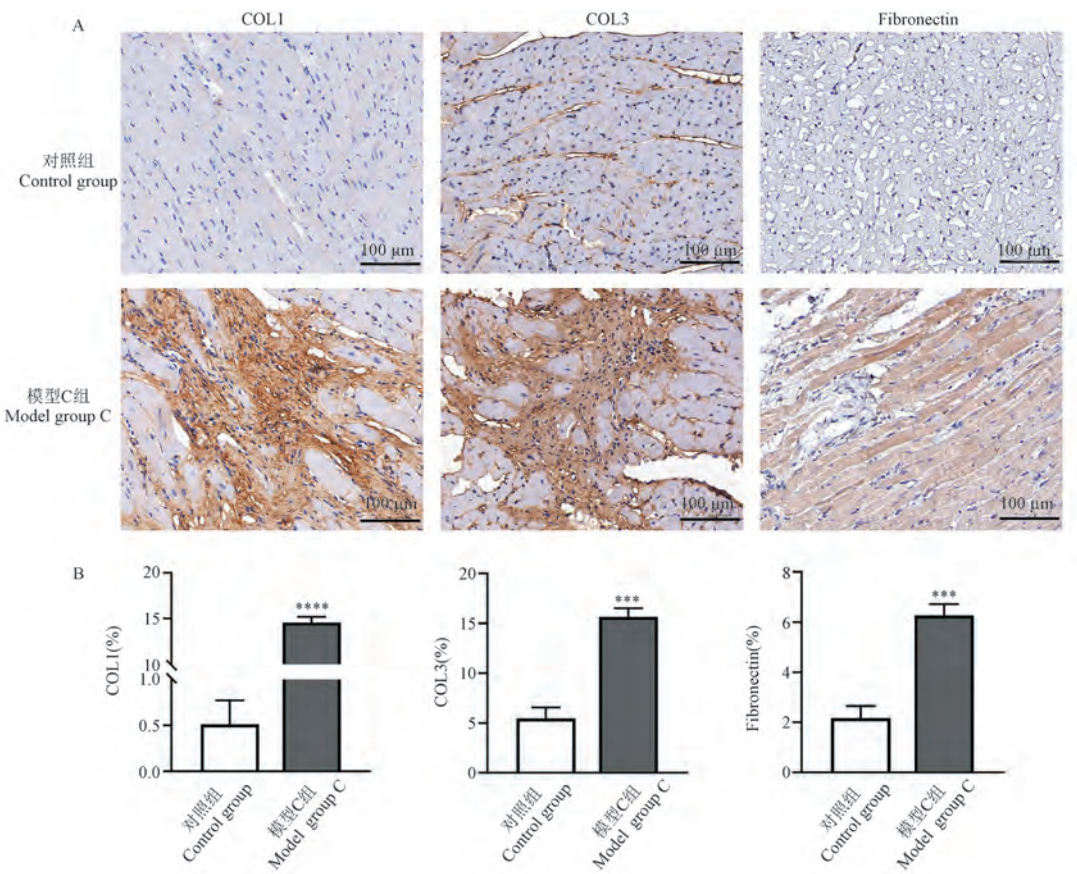


注:A:代表性 HE 染色图像;B:代表性 Masson 染色图像;C:胶原蛋白沉积的定量分析;与对照组相比, **** $P < 0.0001$ 。(下同)

图 2 病理组织学变化

Note. A. Representative HE stained images. B. Representative Masson stained images. C. The quantitative analysis of collagen deposition. Compared with the control group, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

Figure 2 Pathological histological changes



注:A:COL1、COL3 和 Fibronectin 染色代表图像;B:COL1、COL3 和 Fibronectin 阳性表达的定量分析。

图 3 大鼠心肌组织免疫组化检测

Note. A. Representative images of COL1, COL3 and Fibronectin staining. B. The quantitative analysis of COL1, COL3 and Fibronectin positive expression.

Figure 3 Immunohistochemical detection of rat myocardial tissue

2.4 心脏质量指数比较

与对照组相比,模型 C 组心脏质量指数显著增大($P < 0.05$)(见图 4)。

2.5 血清 NT-pro BNP 和甘油三酯水平变化

与对照组比,模型 C 组血清 NT-pro BNP 与甘油三酯的水平显著升高($P < 0.01, P < 0.05$)(图 4)。

2.6 纤维化指标 COL1A1、COL3A1、FN1 和 ACTA2 的 mRNA 表达水平变化

与对照组相比,模型 C 组的纤维化指标 COL1A1($P < 0.05$)、COL3A1($P < 0.05$)、FN1($P < 0.001$)和 ACTA2($P < 0.0001$)的 mRNA 表达均显著上调(图 5)。

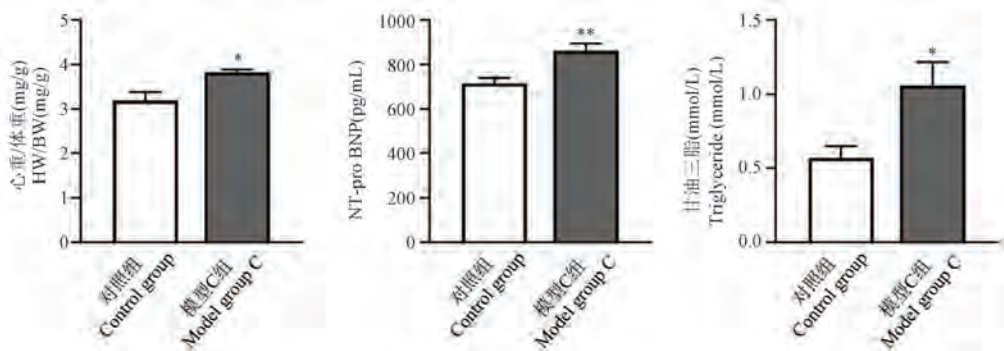


图 4 心脏质量指数、血清 NT-pro BNP 和血清甘油三酯水平的变化

Figure 4 Changes in cardiac mass index, serum NT-pro BNP and serum triglyceride levels

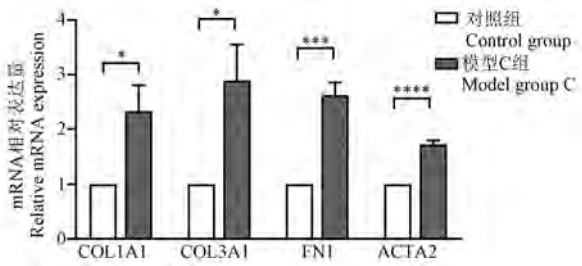


图 5 COL1A1、COL3A1、FN1 和 ACTA2 mRNA 表达水平变化

Figure 5 Changes in COL1A1, COL3A1, FN1 and ACTA2 mRNA expression levels

3 讨论

ISO 是一种 β 受体激动剂,其能够使心肌持续强烈的收缩加重心脏负荷进而导致心衰^[4],广泛应用于动物研究中心肌损伤模型的建立^[5]。当 ISO 持续输注时,会发生心肌缺血和损伤,过量的肾上腺素活性会破坏心脏的稳态,并诱导心肌细胞凋亡和间质纤维化^[6]。在国内外的研究中利用 ISO 建立 CHF 动物模型的方法不尽相同,如注射剂量、注射部位及注射时间长短的不同等^[3,7-8],且因其中一个条件的不同,动物存活率和造模成功率可能就会有所不同。找到一种成模率高,同时又能够降低死亡率的造模方法是本研究的主要目的。

在实验初期,采取了 10 d 腹腔注射 ISO 5 mg/(kg·d)的方法,死亡率高达 80%,死亡多发生在注射后的 1 h 和注射的前 2 d,死亡数目随着时间推移不断减少,当大鼠建立耐受后,在给药的后半段时间内基本没有死亡的情况。通过减少给药初期的剂量来让大鼠建立耐受以避免初期的高死亡率,结果显示死亡率可以维持在 60%左右。在进行药物注射时,清醒状态下,大鼠会剧烈挣扎,增强交感神经的紧张性,容易发生猝死,全麻时动物各种生理机能发生明显变化,耐受力也会降低,而半麻醉大鼠不至于过分挣扎,各种生理功能及反射尚且完整,也易于护理,故采取半麻醉大鼠的方式来提高其耐受力,并进一步在前期减少剂量,在此基础上使死亡率降低至 40%。

不仅要关注动物存活率,模型成功率也是实验开始前必须要关注的指标。心功能的检测是评估造模成功的关键^[9],已有证据显示,用 ISO 诱导的慢性心衰大鼠模型的 LVEF 和 LVFS 水平显著降低^[10],本研究中模型 C 组大鼠的左心室收缩功能明显受损,出现心功能障碍。组织学检测发现模型 C

组大鼠心肌细胞排列紊乱,心肌胶原沉积增加,心肌纤维化明显,这与 Xu 等^[11]的研究发现相一致。NT-pro BNP 是评估大鼠慢性心衰模型的重要手段,CHF 患者血清 NT-pro BNP 水平显著高于对照组^[12]。由以上结果可以得知,经过摸索改良后的造模方法成功建立了 CHF 模型。此外用 ISO 诱导的 CHF 大鼠模型的心脏质量指数会显著增加^[7],非空腹血清甘油三酯浓度逐步升高与心力衰竭风险增加有关^[13],COL1、COL3 过表达后在心肌组织中累积是造成心肌纤维化的原因之一^[14]。本研究结果与以往报道趋势均相吻合。

本研究通过注射 ISO 溶液制备大鼠 CHF 模型,根据造模的效果思考总结,得出了造模过程中的注意事项:(1)在造模开始之前开展抓取大鼠训练,尽可能减低正式注射时大鼠的应激反应,降低动物意外死亡风险。(2)半清醒状态可以提高大鼠对药物耐受力,故选择在半清醒状态下进行注射最为合适。(3)大鼠腹腔注射 ISO 后,死亡大多发生在建模前 2 d,而且大多发生在注射后 30 min ~ 1 h 内。注射后的 1 h 内要注意观察大鼠体征情况。(4)注射时需注意缓慢多点注射,避免药物对动物的刺激性过强,并且注意回抽,避免药物注射至血液或膀胱中使模型无效。(5)避免单次注射药物过多而引起的死亡,可以采取剂量梯度增加、多次注射及增加多次注射的间隔等手段降低死亡率。(6)掌握好麻醉剂量也极其重要,麻醉过深易致大鼠死亡,过浅则达不到麻醉效果。

经过不断探索,通过实施给予大鼠麻醉处理,梯度增加每日注射剂量和减少单次注射量改进方案,显著降低了大鼠死亡率,并且成功构建 CHF 大鼠模型,为今后研究 CHF 的发病机制和诊疗措施提供了一种可靠易行的造模方法。

参 考 文 献(References)

[1] 师幸伟,程冕,白融,等.阿霉素诱导兔心衰模型的建立与评价[J].动物医学进展,2013,34(3):44-47.
Shi XW, Cheng M, Bai R, et al. Establishment and evaluation of doxorubicin induced rabbit heart failure model [J]. Prog Vet Med, 2013, 34(3): 44-47.
[2] 陈明,魏易洪,侯玉鸣,等.心力衰竭动物模型研究进展[J].医学理论与实践,2021,34(7):1103-1105.
Chen M, Wei YH, Hou YM, et al. Research progress of animal models of heart failure [J]. J Med Theory Pract, 2021, 34(7): 1103-1105.
[3] Liu M, Ai J, Feng J, et al. Effect of paeoniflorin on cardiac remodeling in chronic heart failure rats through the transforming

growth factor $\beta 1$ /Smad signaling pathway [J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2019, 9(3): 272–280.

[4] 李明聪, 廖菲, 吴儒杰, 等. 慢性心力衰竭动物及细胞模型的研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(16): 141–145.

Li MC, Liao F, Wu RJ, et al. Research progress of animal and cell models with chronic heart failure [J]. Chin Med Mod Distance Educ Chin, 2020, 18(16): 141–145.

[5] Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol [J]. Gen Physiol Biophys, 2012, 31(2): 141–151.

[6] Cheng H, Wu X, Ni G, et al. Citri Reticulatae Pericarpium protects against isoproterenol-induced chronic heart failure via activation of PPAR γ [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(21): 1396.

[7] 罗时珂, 李萍, 程晓曙. 异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型的建立 [J]. 重庆医学, 2012, 41(4): 352–354.

Luo SK, Li P, Cheng XS. Establishment of model of isoprenaline-induced chronic heart failure in rats [J]. Chongqing Med, 2012, 41(4): 352–354.

[8] Peng DF, Tang SY, Hu YJ, et al. Pathophysiological model of chronic heart failure complicated with renal failure caused by three-quarter nephrectomy and subcutaneous injection of isoprenaline [J]. Exp Ther Med, 2013, 5(3): 835–839.

[9] 李卫虹, 张少衡, 李昭屏, 等. 利用超声心动图评定大鼠心脏功能的可行性研究 [J]. 中国心血管杂志, 2003, 8(3): 165–167.

Li WH, Zhang SH, Li ZP, et al. Validity of Echocardiography in assessment of cardiac function in the rat [J]. Chin J Cardiovasc Med, 2003, 8(3): 165–167.

[10] Keihanian F, Moohebat M, Saeidinia A, et al. Therapeutic effects of medicinal plants on isoproterenol-induced heart failure in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 134: 111101.

[11] Xu GR, Zhang C, Yang HX, et al. Modified citrus pectin ameliorates myocardial fibrosis and inflammation via suppressing galectin-3 and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 126: 110071.

[12] An Y, Wang Q, Wang H, et al. Clinical significance of sFRP5, RBP-4 and NT-proBNP in patients with chronic heart failure [J]. Am J Transl Res, 2021, 13(6): 6305–6311.

[13] Halldin AK, Lissner L, Lernfelt B, et al. Cholesterol and triglyceride levels in midlife and risk of heart failure in women, a longitudinal study: the prospective population study of women in Gothenburg [J]. BMJ Open, 2020, 10(6): e036709.

[14] Yu BT, Yu N, Wang Y, et al. Role of miR-133a in regulating TGF- $\beta 1$ signaling pathway in myocardial fibrosis after acute myocardial infarction in rats [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(19): 8588–8597.

[收稿日期] 2022–12–29

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11–2986/Q 国际刊号 ISSN 1005–4847 邮局代号 2–748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgxydw.cnjournals.com/>
期待您的来稿!

欧梁, 卢敏, 张永辉, 等. 基于“虚、瘀、毒”病机理论的膝痹病病证结合模型的建立及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 590–597.

Ou L, Lu M, Zhang YH, et al. Establishment and evaluation of a combination of disease and syndrome model of knee osteoarthritis based on the pathogenesis theory of “Deficiency, Stasis, and Toxicity” [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 590–597.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.005

基于“虚、瘀、毒”病机理论的膝痹病病证结合模型的建立及评价

欧梁¹, 卢敏², 张永辉³, 邝高艳², 谭旭仪¹, 匡建军^{1*}

(1. 湖南省中医药研究院, 长沙 410006; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 3. 漯河市中心医院, 河南 漯河 462000)

【摘要】 目的 基于膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)“虚、瘀、毒”病机理论, 探讨 KOA 病证结合模型的建模方法。**方法** 将 24 只新西兰大白兔随机分为正常对照(SHAM)组、KOA 模型(MODEL)组、KOA 病症结合模型(TCM + MODEL)组, 每组 8 只。SHAM 组正常喂养; MODEL 组采用石膏固定法建立 KOA 模型; TCM + MODEL 组在石膏固定法的基础上, 联合氢化可的松灌胃和中医病因因素(风、寒、湿)干预。造模 6 周后, 对各组动物进行综合评价, 包括中医证候及体征评分、膝关节影像学、关节面大体观察、番红 O-固绿染色、血液及关节液 IL-6 和 TNF- α 表达水平、血液流变学、血清皮质醇(CORT)、睾酮(T)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)表达水平。**结果** TCM + MODEL 组兔在中医证候及体征评分、影像学评分、大体观察评分、Mankin 评分、关节液中 IL-6、TNF- α 表达水平、血液流变学指标中的血浆黏度(PV)和红细胞聚集指数(RCAI)、血清 MDA 方面, 均明显高于 SHAM 组和 MODEL 组($P < 0.05$); 与 MODEL 组比较, TCM + MODEL 组血清 CORT、T、SOD 明显降低($P < 0.05$), 而血清 IL-6、TNF- α 含量无明显差异($P > 0.05$)。**结论** 采用石膏固定法, 再结合以氢化可的松灌胃的肾虚证造模方式和中医风、寒、湿病因干预, 可复制出具有“虚、瘀、毒”病机特点的 KOA 病证结合模型, 为进一步开展中医药对膝痹病的辨证论治研究提供实验基础。

【关键词】 骨关节炎; 虚; 瘀; 毒; 病证结合

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0590-08

Establishment and evaluation of a combination of disease and syndrome model of knee osteoarthritis based on the pathogenesis theory of “Deficiency, Stasis, and Toxicity”

OU Liang¹, LU Min², ZHANG Yonghui³, KUANG Gaoyan², TAN Xuyi¹, KUANG Jianjun^{1*}

(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China. 2. the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007. 3. Luohe Central Hospital, Luohe 462000)

Corresponding author: KUANG Jianjun. E-mail: 13786165656@163.com

【Abstract】 Objective To explore a modeling method of the combination of disease and syndrome of knee osteoarthritis KOA based on the pathogenesis theory of “Deficiency, Stasis and Toxicity” in (KOA). **Methods** Overall, 24 New Zealand white rabbits were randomly divided into a SHAM group ($n = 8$), MODEL group ($n = 8$), and TCM +

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81874476, 82174414), 贵州省科技厅基础研究项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 479)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81874476, 82174414), Project of Guizhou Science and Technology Department (ZK [2022] general 479).

【作者简介】 欧梁(1989—), 男, 副主任医师, 博士, 研究方向: 中医药防治骨关节病。Email: ouliang2020@163.com

【通信作者】 匡建军(1973—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 中医药防治骨关节病。Email: 13786165656@163.com

MODEL group ($n = 8$). The SHAM group was fed normally. The MODEL group was established by plaster fixation. In the TCM + MODEL group, we hydrocortisone gavage and TCM etiological factors (wind, cold, and wet) were combined based on plaster fixation. After 6 weeks of modeling, each group was comprehensively evaluated, including the TCM syndrome and sign score, knee imaging, articular surface gross observation, Saffron O-solid green staining, blood and articular fluid IL-6 and TNF- α levels, hemorheology, and serum CORT, T, SOD, and MDA levels. **Results** The TCM symptom and sign score, imaging score, gross observation score, Mankin score, levels of IL-6 and TNF- α in joint fluid, hemorheology indexes (PV and RCAI), and serum MDA in the TCM + MODEL group were significantly higher than those in SHAM and MODEL groups ($P < 0.05$). Compared with the MODEL group, serum CORT, T, and SOD were significantly decreased in the TCM + MODEL group ($P < 0.05$), while serum IL-6 and TNF- α were not significantly different ($P > 0.05$). **Conclusions** By plaster fixation combined with the model of kidney deficiency syndrome gavage with hydrocortisone and etiological treatment with traditional Chinese medicine, including wind, cold, and wet, we reproduced the combination of disease and syndrome model of KOA with the characteristics of “Deficiency, Stasis and Toxicity”, which provides an experimental basis for further research on syndrome differentiation and treatment of KOA by traditional Chinese medicine.

[Keywords] osteoarthritis; Deficiency; Stasis; Toxicity; combination of disease and syndrome

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

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是以关节软骨和软骨下骨的变性、破坏、增生和滑膜炎为特征的慢性关节疾病,是临床上最常见的关节炎形式和致残原因^[1]。KOA 属中医“痹证”范畴,针对其复杂的病机,课题组概述了 KOA“虚、瘀、毒”的病机特点,并以“虚、瘀、毒”理论论治本病^[2-6]。“虚”即因脾、肝、肾脏腑虚损,致关节筋骨、肌肉失养,髓枯骨痿,发为本病,即“因虚致痹”;“瘀”即气血亏虚,瘀血内生,即“因瘀致痹”;“毒”即因风、寒、湿等外毒侵袭,以及因机体正气不足,内毒即生,内外之邪毒,痹着筋骨,即“因毒致痹”。其中,“虚”为发病根本,并贯穿疾病始终,“瘀、毒”为致病之标,导致疾病进展,三者可相互影响。

动物模型是深入开展 KOA 病因病机、药物防治等相关研究不可或缺的工具。目前用于研究中药治疗 KOA 的动物模型大多是单一的病理生理模型,而模拟中医证候的病证结合模型的报道较少。因此,本研究在“虚、瘀、毒”病机理论的指导下,采用复合造模方法,即石膏固定法,结合氢化可的松灌胃及中医病因因素干预,诱导出具有“虚、瘀、毒”病机特点的膝痹病病证结合模型,并对模型进行综合评价,使模型符合人类自然发生的 KOA 病变特点及兼具中医症候特征,为进一步进行 KOA 的中医证候研究及辨证施治提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 3 月龄普通级雌性新西兰大白兔,体重

2.5 ~ 3.0 kg, 购于湖南太平生物科技有限公司【SCXK(湘)2020-0005】。单笼喂养,室内温度 22 ~ 26℃,相对湿度 45% ~ 60%,饲养于湖南中医药大学动物实验中心【SYXK(湘)2019-0009】。该研究方案经湖南中医药大学动物实验伦理委员会监管和批准实施(202006190001)。

1.1.2 主要试剂与仪器

IL-6 ELISA 试剂盒(森贝伽, SBJ-T0196), TNF- α ELISA 试剂盒(森贝伽, SBJ-T0289), 皮质酮(CORT)试剂盒(三抒, MZ095945), 睾酮(T)试剂盒(三抒, MZ095981), 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(百奥莱博, SK046-2), 丙二醛(MDA)试剂盒(联迈, LM-OX8006), 台式高速冷冻离心机(湘立, 长沙), 全自动震动切片机(LEICA, 德国), 全自动自清洗血流变仪(普利生, 北京), 倒置相差显微镜(Olympus, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

24 只新西兰大白兔按随机数字表法分为 3 组: 正常对照(SHAM)组、KOA 模型(MODEL)组、KOA 病症结合模型(TCM + MODEL)组, 每组 8 只, 适应性喂养 1 周后开始造模处理。SHAM 组: 正常喂养。MODEL 组: 采取石膏固定法复制模型^[7]: 截取高分子夹板适量长度, 约从兔腹股沟下 1 cm 至踝关节上 1 cm 处, 用石膏从前向后将兔右后肢包裹, 松紧宜适度, 并固定膝关节于 0°伸直位, 待石膏变硬后将兔放回笼中, 观察固定后 30 min 内兔脚掌有无肿胀、瘀紫等症状, 若有, 则立即拆掉石膏待消肿后重新固定, 最后, 用细铁丝在大腿近段和踝关节处的

石膏外进行捆扎,以防止石膏被啃脱落。每日检查石膏固定情况,连续观察 6 周。TCM + MODEL 组:在 MODEL 组处理方法的基础上,再复合氢化可的松灌胃和中医风、寒、湿病因干预。先根据《中药药理研究方法学》中肾阳虚的造模方法,并参考戴冰等^[8]的研究结果,采用长期大剂量的糖皮质激素灌胃,致使兔出现“肾阳虚损”的表现。具体方法:在伸直位石膏固定 1 周后,以氢化可的松 10 mg/kg,每天 1 次,连续 10 d 灌胃。待氢化可的松灌胃结束后,再于第 2 天结合中医“风寒湿三邪杂至,合而为痹”的病因因素干预,即每日上午定时用喷雾瓶通过石膏间隙处向兔患侧膝关节喷 4℃ 冰水约 10 mL,

使局部皮毛微微湿润,再置于距离电风扇前约 10 cm 处吹干(1200 r/min,约 5 min),连续 25 d。以上整个造模周期为 6 周。

1. 2. 2 动物行为和体征观察

观察动物的精神状态、体重、大便、觅食、毛发、爪甲、舌象、唇周等情况。根据《中药新药临床指导原则(试行)》^[9]中肾虚证和血瘀证的中医症候诊断标准,并参考程志清等^[10]方法制定相应的动物症状及体征评分量表进行评估,见表 1,其中,评分中精神状态、毛发、爪甲、舌象、唇周至少 2 分,缩肩拱背至少 1 分,方可认为模型具有“虚、瘀、毒”的中医证候特点。

表 1 动物行为和体征评分量表

Table 1 Animal behavior and physical rating scale				
项目 Items	评分准则 Scoring criterion			
	0 分 0 point	1 分 1 point	2 分 2 points	3 分 3 points
精神状态 Mental state	活泼好动 Lively and active	动作散漫、缺乏灵性 Lazy, slovenly, and ack of flexibility	倦怠乏力、反应不灵敏 Lethargy and unresponsive	精神萎靡、嗜睡 Energielos and somnolence
皮肤毛发 Skin and hair	皮肤紧密、毛发干净柔顺 Tight and the hair is clean and smooth	皮肤略松弛、毛发少光泽 Slightly loose and hair less luster	皮肤松弛明显 背部毛发干枯,无光泽 Loose and the hair on the back is dry and dull	皮下无脂肪、 毛发枯槁脱落 No fat under the skin, and the hair fallen off
体重 Body mass	均匀增长 Grow equally	无明显增长 No significant increased	不增反减 Shrinking, rather than growing	明显消瘦 Severe weight loss
觅食 Foraging	食量正常 Normal	食量减少 1/3 A third of the reduction in intake	食量减少 1/2 Reducing intake by half	不欲食 Don't want to eat
爪甲 Onyx	有光泽 Glossy	无光泽 Lackluster	瘀紫 Stasis purple	枯槁 Withered
大便 Excrement	大便干、成形 Dry and forming	大便粘软有形 Soft and shape	大便不成形 Unformed	大便稀溏 Sloppy
舌象 Tongue	正常 Normal	舌淡 Pale tongue	舌紫暗 Dark-purple tongue	瘀斑 Petechia
唇周 Lip	红润 Ruddy	色淡 Pale	暗红 Dull-red	瘀紫 Stasis purple
缩肩拱背 Arch shoulder and shrink back	无 None	有 Exist	颤抖明显 Shaking noticeably	

1. 2. 3 兔膝关节影像学检查

造模结束后,按体重给予 3%戊巴比妥钠进行耳缘静脉麻醉后,仰卧于检查床,使用沙袋分别固定,伸直患肢,行膝关节正位数字 X 线摄影术(digital radiography, DR),观察膝关节影像学变化。摄片参数设置如下:42 kV, 250 mA, 32 ms 和 80 cm 胶片焦距。X 线结果使用 Kellgren-Lawrence(KL)分级量表进行评估^[11],评级标准如下:0 级:无改变(正常);I 级:轻微骨赘;II 级:明显骨赘,但未累及

关节间隙;III 级:关节间隙中度狭窄;IV 级:关节间隙明显变窄,软骨下骨硬化。

1. 2. 4 关节软骨大体观察

处死后,打开关节囊,充分显露关节腔,观察关节面大体情况,并依据 Pelletier 评分标准进行评估^[12]。评分标准:0 分:关节面光滑,色泽如常;1 分:关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰;2 分:关节面糜烂,软骨缺损深达软骨表层或中层;3 分:关节面溃疡形成,缺损深达软骨深层;4 分:软骨下骨暴露。

1.2.5 关节软骨病理学观察

将兔关节软骨置于 10% 甲醛溶液中固定,脱钙,石蜡包埋,切片,番红 O-固绿染色后,光镜下观察,并参考改良 Mankin 病理评分进行评定^[13]。评分标准如下:(1)软骨结构:光整如常、表面出现不规则裂隙、裂隙深达移行层、裂隙深达辐射层、裂隙深达钙化层、软骨层脱落依次计 0、1、2、3、4、5 分;(2)软骨细胞:数量如常、数量弥散性增多、出现大量簇集样细胞团、数量明显减少依次计 0、1、2、3 分;(3)基质染色:染色正常、染色轻度减退、染色中度减退、染色重度减退、染色完全消失依次计 0、1、2、3、4 分;(4)潮线完整:潮线完整、多重潮线、软骨下血管侵入潮线依次计 0、1、2 分。

1.2.6 血清及关节液 IL-6 和 TNF-α 测定

采用双抗体两步夹心酶联免疫吸附法(ELISA)进行检测,按照说明书操作。

1.2.7 血清 CORT、T 检测

采用放射免疫分析法测定血清中皮质酮(CORT)、睾酮(T)的含量,按说明书操作。

1.2.8 血液流变学检测

经心脏采血 5 mL,置于肝素管中,摇匀,置于全自动自清洗血液流变仪中检测,检测项目包括以下 3 项:血浆黏度(plasma viscosity, PV)、全血低切黏度(whole blood low shear viscosity, WBLSV)和红细胞聚集指数(red cell assembling index, RCAI)。

1.2.9 血清 SOD、MDA 检测

采用分光光度法测定血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的含量,按照说明书操作。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。计量资料采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,若满足正态性和方差齐性检验,多组比较采用单因素方差分析,具有统计学意义则用 LSD-*t* 法进行多重比较;否则采用非参数检验;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物行为及体征评分比较

SHAM 组兔精神良好,反应灵敏,毛发致密,干净有光泽,爪甲、唇色明亮润泽。MODEL 组兔在精神稍差,缺乏灵性,体型适中,背部毛发有光泽,爪甲、唇色均暗红。TCM + MODEL 组兔在给予氢化可的松后,逐渐出现精神倦怠、缩肩拱背、怕冷等症

状,随之体型消瘦,毛发蓬乱无光泽,易脱落,后期出现不同程度的舌质瘀紫,爪甲枯槁等症状,见图 1。造模结束后,MODEL 组和 MODEL + TCM 组的症状及体征评分明显高于 SHAM 组和 MODEL 组($P < 0.05$),见表 2。说明通过多因素(制动 + 药物 + 风、寒、湿环境因素)复合方法造模后,实验兔出现了“虚、瘀、毒”证候特点的表现。



图 1 各组兔一般状态

Figure 1 General state of rabbits in each group

2.2 兔膝关节 DR 片观察

造模 6 周后,SHAM 组兔 X 线显示膝关节间隙均匀,关节面平整。MODEL 组关节间隙稍有变窄,明显骨赘形成。TCM + MODEL 组关节间隙明显变窄,关节面硬化,大量骨赘形成,见图 2A。KL 评分结果显示,与 SHAM 组比较,两模型组关节影像学退变明显加重($P < 0.05$),且 TCM + MODEL 组比 MODEL 组更严重,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.3 关节面大体观察

SHAM 组关节面光整,色泽如常,呈淡蓝色。MODEL 组关节面无光泽,呈淡白色,部分软骨部分糜烂。TCM + MODEL 组软骨呈浅黄色,色泽枯槁,关节软骨破坏明显,大量骨赘增生,见图 2B。Pelletier 评分结果显示,与 SHAM 组比较,两模型组评分显著增高($P < 0.05$),且 TCM + MODEL 组明显高于 MODEL 组($P < 0.05$),见表 2。

2.4 关节软骨组织病理学观察

SHAM 组软骨表面平整,基质着色均匀,软骨细胞数量正常,排列整齐,结构层次清晰。MODEL 组软骨厚度较薄,表面存在不规则裂隙,基质染色稍减退,细胞数量弥漫性增多,深层软骨细胞排列不整齐。TCM + MODEL 组软骨层变薄,细胞外基质着色不均,部分区域软骨全层缺失,细胞形态排列紊乱,见图 3。Mankin 评分结果显示,与 SHAM 组比较,两模型组的 Mankin 评分明显升高($P < 0.05$),且 TCM + MODEL 组高于 MODEL 组($P < 0.05$),见表 2。提示多因素复合造模方法会加重关节软骨病理破坏程度。

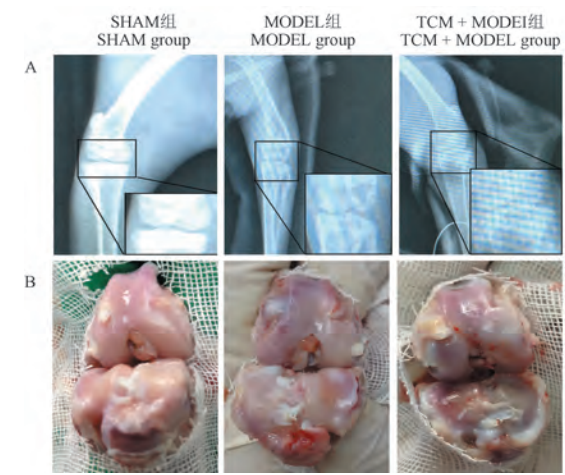


图2 造模后兔膝关节 DR 片和大体观察结果

Figure 2 DR and gross observation results of rabbits' knee after model establishment

2.5 血清及关节液 IL-6、TNF-α 含量

与 SHAM 组比较,两模型组血清和关节液 IL-6、TNF-α 含量升高 ($P < 0.05$);与 MODEL 组比较,TCM + MODEL 组关节液 IL-6、TNF-α 含量明显升高

($P < 0.05$),而血清 IL-6、TNF-α 含量无明显差异 ($P > 0.05$),见表 3。提示多因素复合造模方法可加重关节内炎症反应。

2.6 血清 CORT、T 含量

与 SHAM 组比较,MODEL 组血清 CORT、T 含量无明显差异 ($P > 0.05$),TCM + MODEL 组血清 ACTH、T 含量明显降低 ($P < 0.05$),见表 4。提示多因素复合造模方法可引起反映“肾虚”物质基础的细胞因子含量下降。

2.7 血液流变学指标

与 SHAM 组和 MODEL 组比较,TCM + MODEL 组 PV、RCAI 均明显升高 ($P < 0.05$),见表 4。提示通过复合多因素复合方法造模后,实验动物出现血瘀证的病理改变。

2.8 血清 SOD、MDA 含量

与 SHAM 组和 MODEL 组比较,TCM + MODEL 组血清 SOD 降低 ($P < 0.05$),血清 MDA 增加 ($P < 0.05$),见表 4。提示多因素复合造模方法可引起氧化应激反应产物增加。

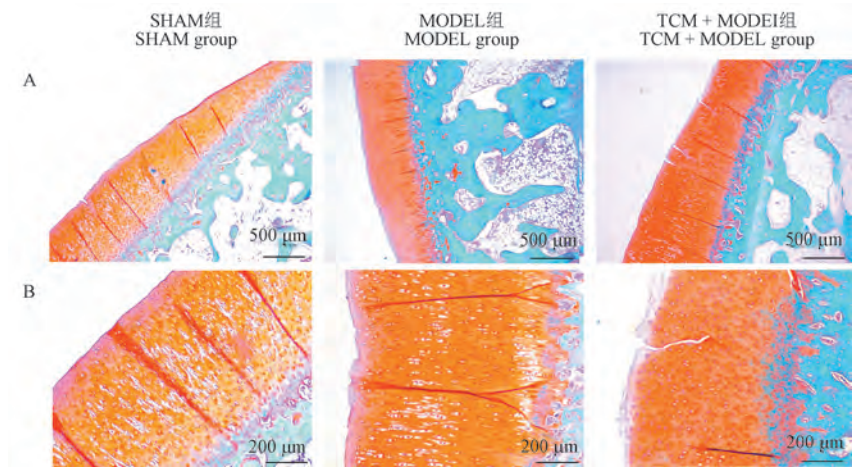


图3 HE 染色观察各组兔关节软骨病理变化

Figure 3 Pathological changes of the articular cartilage in rabbit in each group observed hematoxylin-eosin staining

表 2 各组兔中医证候、KL、Pelletier 和 Mankin 评分($\bar{x} \pm s$,分, $n = 8$)

组别 Groups	中医证候评分 TCM syndrome score	KL 分级 KL grade	Pelletier 评分 Pelletier score	Mankin 评分 Mankin score
SHAM 组 SHAM group	1.25 ± 0.71	0.87 ± 0.46	1.00 ± 0.38	1.75 ± 0.70
MODEL 组 MODEL group	7.88 ± 0.99 *	2.00 ± 0.75 *	2.00 ± 0.75 *	6.50 ± 0.75 *
TCM + MODEL 组 TCM + MODEL group	15.63 ± 1.41 **	3.00 ± 0.75 **	3.25 ± 0.71 **	9.13 ± 0.83 **

注:TCM:中医药;KL:Kellgren-Lawrence;与 SHAM 组比较,* $P < 0.05$;与 MODEL 组比较,# $P < 0.05$ 。(下表同)

Note. TCM. Traditional Chinese medicine. KL. Kellgren-Lawrence. Compared with the SHAM group, * $P < 0.05$. Compared with the MODEL group, # $P < 0.05$. (The same in the following tables)

表 3 各组兔血清及关节液 IL-6、TNF-α 含量($\bar{x} \pm s$, pg/mL, $n = 8$)

Table 3 IL-6 and TNF-α in serum and synovial fluid in different groups of rabbits($\bar{x} \pm s$, pg/mL, $n = 8$)

组别 Groups	血清 Serum		关节液 Synovial fluid	
	IL-6	TNF-α	IL-6	TNF-α
SHAM 组 SHAM group	68.82 ± 5.15	25.92 ± 2.39	65.19 ± 3.69	26.35 ± 3.16
MODEL 组 MODEL group	87.38 ± 4.36 [*]	47.50 ± 4.04 [*]	87.92 ± 3.04 [*]	47.79 ± 3.98 [*]
TCM + MODEL 组 TCM + MODEL group	89.38 ± 5.23 [*]	49.13 ± 4.40 [*]	93.03 ± 3.44 ^{*#}	52.80 ± 6.43 ^{*#}

表 4 各组兔血清中 CORT、T、PV、WBLSV、RCAI、SOD、MDA 含量($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 4 CORT, T, PV, WBLSV, RCAI, SOD and MDA in serum in different groups of rabbits($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别 Groups	CORT(μg/dl)	T(μg/L)	PV(mPa.s)	WBLSV(mPa.S)	RCAI(%)	SOD(ng/mL)	MDA(ng/mL)
SHAM 组 SHAM group	53.40 ± 7.66	7.40 ± 2.55	1.48 ± 0.24	17.37 ± 1.16	4.84 ± 0.42	16.18 ± 0.53	2.72 ± 0.62
MODEL 组 MODEL group	48.85 ± 11.08	6.73 ± 2.42	1.78 ± 0.45 [*]	22.09 ± 1.26 [*]	7.11 ± 0.43 [*]	14.90 ± 0.55 [*]	13.69 ± 1.19 [*]
TCM + MODEL 组 TCM + MODEL group	9.19 ± 6.13 ^{*#}	2.53 ± 1.61 ^{*#}	1.93 ± 0.47 ^{*#}	22.35 ± 1.18 [*]	7.87 ± 0.52 ^{*#}	10.75 ± 0.97 ^{*#}	19.56 ± 1.88 ^{*#}

注:T:睾酮;PV:血浆黏度;WBLSV:全血低切黏度;RCAI:红细胞聚集指数;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛。
Note. T. Testosterone. PV. Plasma viscosity. WBLSV. Whole blood low shear viscosity. RCAI. Red cell assembling index. SOD. Superoxide dismutase. MDA. Malondialdehyde.

3 讨论

传统及现代中医临床研究已表明,肾虚血瘀是 KOA 的基本病机^[14]。《张氏医通》谓:“膝痛无不有因肝肾虚者,虚则风寒湿气袭之”,《医林改错》中明确提出了“痹有瘀血”,提示痹症日久,可致使脉络瘀阻。导师在多年临证及研习中医理论的基础上,认为 KOA 错综复杂的病机除了“虚”和“瘀”两个根本点之外,“毒”也占据着较为重要的位置,尤其是在疾病的进展阶段。“毒”既是一种致病因素,又是一种病理产物,起着致病的始动与导致复发加重的双重作用。中医“毒”的含义极其广泛,如《金匱要略心典》曰:“毒,邪气蕴结不解之谓”,刘完素谓:“邪盛谓之毒”等。具体到膝骨关节炎之“毒”的认识,笔者主要从以下 4 个方面进行思考;其一是致病之外邪为毒,众所周知,风寒湿邪的侵袭是 KOA 发病及病情加重的重要刺激因素,当风寒湿邪过于亢盛且蕴结难解之时便已升级成了风毒、寒毒、湿毒、甚至转化成热毒等;其二是内生之病理产物为毒, KOA 患者因肝肾亏虚和气血运行失常,代谢产物未能及时、有效排出,郁积而成病理产物,对机体造成损害,如瘀血痹阻日久则成瘀毒,痰湿凝滞日久则成痰毒;其三是代谢异常之细胞因子也为毒,如 IL-6、TNF-α、SOD、MDA 等,这些因子可介导多种分子机制加重关节软骨的退变,促进 KOA 的病理进程,

在此过程中已转化成致病因子,可视为“毒”;其四是临床上 KOA 患者多见关节肿胀、积液甚多、关节灼热之“毒”的表现。综上所述,从“虚、瘀、毒”论治 KOA 具有切实可行的理论根据。

病证结合动物模型结合了现代医学“病”和中医“证”的优势,是当前应用较广泛的中医药科研动物模型^[15-16]。目前,KOA 病证结合动物模型的构建模式主要有以下 3 种^[17]:其一,西医“病”模型在宏观体征中体现了中医证候特点,如摆雪等^[7]利用石膏固定法建立的膝痹病兔模型,由于关节制动致使血流瘀滞,具备血瘀证的特征。其二,西医“病”模型复合中医“证”模式,即在西医疾病模型基础上,如刘振峰等^[18]先利用卵巢去势法建立肾虚模型,8 周后再同时分别复加肾上腺皮质激素和肾上腺素法建立血瘀模型、及 Hulth 法建立膝骨关节炎模型,通过上述“1 + 1 + 1”的方法复合而成的模型既有中医肾虚证及血瘀证的证候特点,又有 KOA 的病理变化。其三,自然形成的中医“证”模型再复合西医“病”模式,如在老年动物的身上,利用其身衰老而表现出来的肾虚症候,再进行西医疾病模型干预^[19]。以上 3 种模式不同之处主要是受研究者思维方式的影响,都具有一定借鉴意义。

本研究采用石膏固定法,结合氢化可的松灌胃与中医风、寒、湿病因多因素复合方式建立兔 KOA 病证结合模型,并以肾虚血瘀证的表征为基础,结

合影像学、大体观察、病理切片、血瘀流变学、细胞因子检测等多种方法对模型进行评判。首先,与空白组比较,两模型组反应 KOA“病模型”的相关指标,如影像学、大体观察、HE 染色、血清及关节液中 IL-6 和 TNF- α 等,均有统计学意义,且复合模型组的退变程度较单纯的石膏固定更严重,说明“虚、瘀、毒”等因素加重了关节的退变。同时,造模过程中观察到复合模型组动物出现明显的精神萎靡,毛发稀疏、脱落明显,爪甲、口唇、舌质瘀紫等症状,符合肾虚血瘀证的证候表现。此外,在复合模型组中,反应肾虚证物质基础的下丘脑-垂体-靶腺轴的功能出现紊乱,如血清中 CORT、T 等激素的含量降低^[8],反应血瘀证病理学改变的血液流变学指标升高,提示血液处于高黏、高聚的状态^[20],反应代谢异常的细胞毒性因子如 SOD 含量降低,MDA 含量升高^[21]。

在本研究中,石膏固定法和大剂量的糖皮质激素灌胃都为西医病理学造模因素,前者是目前公认较好的 KOA 疾病建模方法^[22],后者是经大量研究证实的可靠的肾阳虚造模方法。同时,关节制动和环境干预属中医病因病机造模因素,关节长期制动致脉络运行不畅,脉络瘀滞,形成“瘀积”的病理基础,配合每日给予患侧膝关节周围喷洒 4℃ 冰水,再置于电风扇前吹干,此措施主要是模拟在痹症发病中具有重要作用的外感风寒湿邪。实际上,笔者所构建的病证结合模型涵盖了前面提及的 3 种建模方式。其一,西医“病”模型复合中医“证”模式,体现于在石膏固定法复制 KOA 模型基础上,再用大剂量糖皮质激素法建立肾虚证模型;其二,西医“病”模型本身在宏观体征中体现了中医“证”的特征,体现在血瘀证上,石膏固定法所诱导出来的 KOA 模型,在动物体征表现及血液流变学指标检测方面均符合血瘀证的评判标准,究其发生机制可能是关节长期制动、气机郁滞、血脉运行不畅所致,符合中医病因病机理论;其三,随着疾病的发展而形成的中医“证”模型,体现于模型中“毒”的理解,“毒”既是 KOA 发病过程中产生的病理产物,更是发病后机体存在的一种病理状态。基于上述建模思路所建立的病证结合模型不仅具有 KOA“病”模型的核心病理变化,同时还表现出“虚、瘀、毒”等中医证候特征。因此,该复合造模方法不仅体现中医理论、症候特点,还具有操作相对简单,可靠性和稳定性较好等优点。

综上所述,在 KOA“虚、瘀、毒”病机理论的指导下,采用石膏固定法,再结合以氢化可的松灌胃的肾虚证造模方式和中医风、寒、湿病因干预,可复制出具有“虚、瘀、毒”病机特点的 KOA 病证结合模型,为课题组进一步开展中医药对膝痹病的辨证论治研究提供实验基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Hunter DJ, March L, Chew M. Osteoarthritis in 2020 and beyond: a lancet commission [J]. Lancet, 2020, 396(10264): 1711-1712.
- [2] 邝高艳,严可,陈国茜,等.从“虚、瘀、毒”论治膝关节骨性关节炎的临床研究[J].辽宁中医杂志,2017,44(2):334-336.
Kuang GY, Yan K, Chen GQ, et al. Treatment for knee osteoarthritis under theory of the deficiency, blood stasis and toxin [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2017, 44(2): 334-336.
- [3] 谭旭仪,邝高艳,卢敏.膝骨关节炎的“虚、瘀、毒”病机特点探析[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(24):201-206.
Tan XY, Kuang GY, Lu M. Pathogenesis characteristics of “deficiency, stagnation and toxin” in knee osteoarthritis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(24): 201-206.
- [4] 邝高艳,谭旭仪,卢敏,等.基于虚、瘀、毒理论构建慢性筋骨疾病防治体系[J].湖南中医药大学学报,2021,41(2):196-199.
Kuang GY, Tan XY, Lu M, et al. Construct the prevention and treatment system of chronic muscles and bones diseases based on the theory of deficiency, blood stasis and toxicity [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2021, 41(2): 196-199.
- [5] 方仁杰,卢敏,段航.基于虚瘀毒理论探讨从脾论治膝关节炎[J].中医药临床杂志,2020,32(6):1019-1022.
Fang RJ, Lu M, Duan H. Discussion on treating knee osteoarthritis from spleen based on theory of deficiency and stasis [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2020, 32(6): 1019-1022.
- [6] 谭旭仪,邝高艳,卢敏.从“虚、瘀、毒”论治膝骨关节炎的研究进展[J].中医药导报,2019,25(19):127-130.
Tan XY, Kuang GY, Lu M. Research progress in the treatment of knee osteoarthritis based on deficiency, stagnate and toxin [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 25(19): 127-130.
- [7] 摆雪,张洪平,刘俊昌,等.石膏铁丝固定法建立兔膝痹模型[J].中国组织工程研究,2016,20(18):2603-2608.
Bai X, Zhang HP, Liu JC, et al. Establishing a rabbit model of knee paralysis by the knee fixation with plaster casts and wire [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2016, 20(18): 2603-2608.
- [8] 戴冰,张嘉妮,杨梦琳,等.氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价[J].中国实验动物学报,2017,25(1):70-73.
Dai B, Zhang JN, Yang ML, et al. Establishment of a mouse model of kidney deficiency induced by oral administration of

- hydrocortisone and evaluation of related factors [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(1): 70-73.
- [9] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则: 试行 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2002.
- Zheng XY. Guidelines for clinical research of new Chinese medicines: trial implementation [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2002.
- [10] 程志清, 吴玉芙, 唐烨霞, 等. SD 大鼠心气虚证动物模型的建立与评价 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(3): 1-6.
- Cheng ZQ, Wu YF, Tang YX, et al. Establishment and evaluation of the animal model of heart qi deficiency syndrome of SD rats [J]. Lab Anim Sci Mgt, 2003, 20(3): 1-6.
- [11] Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 1957, 16(4): 494-502.
- [12] Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(7): 1275-1286.
- [13] Sluijs JA, Geesink RG, Linden AJ, et al. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis [J]. J Orthop Res, 1992, 10(1): 58-61.
- [14] 余伟杰, 刘爱峰, 陈继鑫, 等. 中医药治疗肾虚血瘀型膝骨关节炎研究进展 [J]. 天津中医药, 2022, 39(2): 266-272.
- Yu WJ, Liu AF, Chen JX, et al. Research progress of traditional Chinese medicine in treating knee osteoarthritis of kidney deficiency and blood stasis [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2022, 39(2): 266-272.
- [15] 王瑾茜, 蔺晓源, 刘侃, 等. 冠心病气虚血瘀证病证结合大鼠模型的建立研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 602-609.
- Wang JX, Lin XY, Liu K, et al. Study on the establishment of a rat model of coronary heart disease with qi deficiency and blood stasis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 602-609.
- [16] 张译心, 王鑫, 刘博, 等. 2 型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 219-229.
- Zhang YX, Wang X, Liu B, et al. Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi-Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 219-229.
- [17] 杨威, 郭斯印, 易志勇, 等. 膝关节关节炎证结合动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 139-143.
- Yang W, Guo SY, Yi ZY, et al. Research progress on animal models of a combination of diseases and syndromes of knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 139-143.
- [18] 刘振峰, 方锐, 艾力江·阿斯拉, 等. 肾虚血瘀型膝骨性关节炎大鼠模型的建立 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 270-274.
- Liu ZF, Fang R, Ailijiang ASL, et al. Establishment of a rat model of knee osteoarthritis with kidney deficiency and blood stagnation [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2013, 17(2): 270-274.
- [19] 何兴鹏, 郑利钦, 李鹏飞, 等. 两种肾虚证型去势模型大鼠胫骨小梁微观结构及骨代谢的差异 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(23): 3768-3772.
- He XP, Zheng LQ, Li PF, et al. Differences of trabecular microstructure and bone metabolism in two types of kidney-deficiency ovariectomized rats [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(23): 3768-3772.
- [20] 李祥, 张悦, 张文智, 等. 气虚血瘀证动物模型的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 228-234.
- Li X, Zhang Y, Zhang WZ, et al. Animal model of qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(2): 228-234.
- [21] 朱静. 益肾通络解毒汤对气阴两虚兼毒瘀互结型糖尿病肾病疗效及氧化应激的影响 [J]. 实用中医内科杂志, 2020, 34(2): 39-42.
- Zhu J. Effect of yishen Tongluo Jiedu Decoction on clinical efficacy and oxidative stress of qi and Yin deficiency and toxic and malignant diabetic nephropathy [J]. J Practical Tradit Chin Inter Med, 2020, 34(2): 39-42.
- [22] 陈人智, 王明磊, 朱凯, 等. 管型石膏伸直位固定法对兔 KOA 模型膝关节 X 线及 MRI 检查改变的研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2019, 41(5): 446-449.
- Chen RZ, Wang ML, Zhu K, et al. X-ray and MRI changes of knee joint in rabbit KOA model by tubular plaster extension fixation [J]. J Ningxia Med Univ, 2019, 41(5): 446-449.

[收稿日期] 2022-11-29

关开明,钟德琳,罗朝天,等. 铁过载致心肌纤维化小型猪模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 598-604.

Guan KM, Zhong DL, Luo CT, et al. Establishment of a miniature pig model of myocardial fibrosis induced by iron overload [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 598-604.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.006

铁过载致心肌纤维化小型猪模型的建立

关开明¹,钟德琳⁴,罗朝天¹,彭飞¹,方培荣²,韦力琪²,彭鹏^{1,3*}

(1. 广西医科大学第一附属医院放射科,南宁 530021;2. 广西医科大学,南宁 530021;
3. 国家卫健委地中海贫血防治重点实验室,南宁 530021;4. 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司
昆明分公司,昆明 650051)

【摘要】 目的 建立铁过载致心肌纤维化的小型猪模型,探讨铁过载致心肌纤维化的作用机制/病理生理特征。**方法** 选取巴马小型猪 18 只,随机分为实验组 15 只、对照组 3 只。每隔 7 d 经肌内注射右旋糖酐铁溶液 1 次,首次剂量为 400 mg/kg,其余剂量为 200 mg/kg,对照组注射与实验组相同剂量生理盐水,于注射铁剂 6 d 后随机处死 1 ~ 2 只巴马小型猪;取部分心脏组织切片进行心肌胶原容积分数(CVF)测定和心肌铁半定量测定,剩余心脏组织用于测量心脏铁浓度(CIC)。**结果** 随注射次数增多,实验组巴马猪 CIC 呈上升趋势,心肌胶原纤维及铁颗粒占视野面积比例增多。注射铁总量与 CIC、心肌铁病理半定量、CVF 之间高度正相关($r = 0.957, r = 0.971, r = 0.957, P < 0.001$),CIC 与 CVF 之间高度正相关($r = 0.924, P < 0.001$),心肌铁半定量与 CIC、CVF 之间高度相关($r = 0.973, P < 0.001; r = 0.944, P < 0.001$)。**结论** 通过肌内注射首次剂量为 400 mg/kg,后续剂量为 200 mg/kg 的右旋糖酐铁,共 15 次,可以建立心肌纤维化小型猪模型,心肌铁颗粒沉积越多提示心肌纤维化程度越严重。

【关键词】 小型猪;心肌纤维化;铁过载;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0598-07

Establishment of a miniature pig model of myocardial fibrosis induced by iron overload

GUAN Kaiming¹, ZHONG Delin⁴, LUO Chaotian¹, PENG Fei¹, FANG Peirong², WEI Liqi², PENG Peng^{1,3*}

(1. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China.
2. Guangxi Medical University, Nanning 530021. 3. NHC Key Laboratory of Thalassemia Medicine, Nanning 530021.
4. Kunming Branch of Shenzhen Mindray Biomedical Electronics Company Limited, Kunming 650051)
Corresponding author: PENG Peng. E-mail: doublep@126.com

【Abstract】 Objective To establish an animal model of myocardial fibrosis induced by iron overload.
Methods Eighteen Bama minipigs were randomly divided into an experimental group ($n = 15$) or control group ($n = 3$). An iron dextran solution was intramuscularly injected every seven days. The first dose was 400 mg/kg, and the other doses were 200 mg/kg. The control group was injected with the same volume of normal saline. One to two Bama minipigs were randomly euthanized 6 days after injection of iron. Cardiac tissue sections were used for myocardial collagen volume fraction (CVF), semiquantitative myocardial iron, cardiac iron concentration (CIC) measurements. **Results** With the increase in the number of injections, CIC in the experimental group showed an upward trend, and the proportions of

[基金项目] 国家自然科学基金(81641066,81760305),国家级大学生创新创业计划项目(202210598039,202210598041),国家卫健委地中海贫血防治重点实验室开放课题(GJWJWDP202208,GJWJWDP202209),广西研究生教育创新计划项目(YCSW2022203)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81641066, 81760305), National College Students' Innovation and Entrepreneurship Program (202210598039, 202210598041), Open Project of NHC Key Laboratory of Thalassemia Medicine (GJWJWDP202208, GJWJWDP202209), Innovation Project of Guangxi Graduate Education (YCSW2022203)。
[作者简介] 关开明(1997—),男,在读硕士研究生,研究方向:血液病及铁代谢疾病影像。Email:353909595@qq.com
[通信作者] 彭鹏(1977—),男,主任医师,博士,研究方向:血液病及铁代谢疾病影像。Email:doublep@126.com

myocardial collagen fibers and iron particles were increased. The total amount of injected iron was highly correlated to CIC, myocardial iron, and CVF ($r = 0.957$, $r = 0.971$, $r = 0.957$, $P < 0.001$). CIC was highly correlated to CVF ($r = 0.924$, $P < 0.001$), and myocardial iron was highly correlated to CIC and CVF ($r = 0.973$, $P < 0.001$; $r = 0.944$, $P < 0.001$). **Conclusions** A miniature pig model of myocardial fibrosis was established by intramuscular injection of 400 mg/kg iron dextran as the first dose and 200 mg/kg iron dextran as the other doses. More iron particles deposited in the myocardium led to more severe myocardial fibrosis.

【**Keywords**】 minipigs; myocardial fibrosis; iron overload; animal models

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

铁是人类必需的微量元素之一^[1],在红细胞功能及许多生理过程所需的蛋白质和酶中起着关键作用^[2],铁稳态对维持生命健康至关重要^[3]。一些血液性疾病患者由于长期输血、无效造血及胃肠铁吸收增多等原因,造成过量铁在器官沉积,使机体处于铁过载状态^[4-5],最终诱发各个系统的疾病^[6-7]。铁过载导致心功能障碍,最终进展为心力衰竭,是该人群主要死亡原因之一^[8]。研究表明,弥漫性心肌纤维化可能与铁过载和心力衰竭相关^[9],进一步探索心肌铁过载与弥漫性心肌纤维化之间的关系,具有重要意义。既往通过皮下注射右旋糖酐铁成功诱导心肌铁过载家兔模型^[10],但尚未探讨铁过载导致心肌纤维化的机制。相比家兔,小型猪因其与人类相似的血流动力学及解剖生理学特点被广泛用于心血管疾病动物模型的建立^[11],对比其他小型动物,具有耐受性高、较大体型便于病理取材观察等优势^[12]。Jensen 等^[13]利用小型猪成功制作了铁过载动物模型,但其主要研究目的为探讨肝、心脏铁过载规律,并未对铁过载致心肌纤维化进一步探讨。目前,针对心肌纤维化的动物模型,多通过压力超负荷、外源性活性因子、缺血、高糖环境进行诱导^[14],尚未见报道通过铁过载进一步诱导心肌纤维化动物模型的建立。因此,本研究目的为建立铁过载致心肌纤维化的小型猪模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级 26 ~ 30 周龄巴马小型猪 18 只,雄性,体重为 20 ~ 22 kg,由广西大学动物科学技术学院巴马小型猪繁育基地提供【SCXK(桂)2018-0003】。温度 21 ~ 24℃,相对湿度为 50% ~ 70%。饲喂全价营养饲料和自由饮水,12 h/12 h 明暗交替,饲养于广西医科大学动物实验研究中心【SYXK(桂)2020-0004】。所有巴马小型猪操作程序均符合广西医科大学第一附属医院医学伦理委员会要求

(2022-E380-01)。

1.1.2 主要试剂与仪器

右旋糖酐铁(铁浓度 150 mg/mL)购自广西化工研究院兽药厂;电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9140A 型,上海柏欣仪器设备厂,中国);火焰原子吸收分光光度计(ZA3000,日立公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

选取巴马小型猪 18 只,随机分为实验组 15 只、对照组 3 只。

1.2.2 各组实验动物处理方法

实验组 15 只巴马小型猪间隔 7 d 称重后经两侧后腿深部肌肉轮流注射右旋糖酐铁溶液,首次注射剂量为 400 mg/kg,后续剂量为 200 mg/kg。于注射铁剂 6 d 后随机选取实验组小型猪 1 只处死。对照组注射与实验组相同剂量生理盐水,处死时间从首次注射后 1 ~ 15 周随机抽取 3 周,并与实验组同一时间点处死。处死方法为经耳缘静脉注射过量的 2.5% 戊巴比妥钠溶液致巴马小型猪安乐死。待小型猪呼吸运动停止、瞳孔扩大、对光反射消失,且无法触及心跳后固定于手术台。手术刀沿胸骨纵向切割离断皮肤,组织剪、手术镊、止血钳逐层分离皮下脂肪、肌肉、筋膜并暴露肋骨,肋骨钳剪断心脏周围肋骨,完整取下胸骨及肋骨,充分暴露心包,用组织剪沿纵隔胸膜分离心包并经心底主动脉离断血管,取出心脏,去掉心包、心内膜、脂肪等组织,用生理盐水冲洗干净,手术刀垂直心脏左心室长轴,切厚约 0.5 cm 横断面,放入 10% 的福尔马林溶液(100 mL)中固定 24 h 后送广西医科大学第一附属医院病理科,经病理科医师行蜡埋、切呈 5 μm 厚的组织切片用于苦味酸天狼星红染色(Picrosirius red staining)和普鲁士蓝染色(Prussian blue)。剩余心肌室间隔组织切成数块,用双蒸水反复冲洗 8 ~ 10 次,至无法挤出残留血液,放置于 60℃ 恒温烤箱烘干,烘干时间为 5 ~ 7 d,至心脏组织重量不再改变。

1.2.3 观察项目、时间点及观察方法

分别于 1 ~ 15 周观察组织切片的心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)、心肌铁半定量及心脏铁浓度(cardiac iron concentration, CIC)。使用 Olympus CKX41SF 光学显微镜观察切片,放大 200 倍后拍摄并测量不相连的视野(共计 15 个),运用 Image J 软件,系统计算胶原纤维及铁颗粒占视野面积的百分比,即 CVF 和心肌铁半定量。将烘干心脏组织粉碎,称重后送广西分析测试研究中心经硝酸硝化处理后,利用原子发射光谱(inductively coupled plasma, ICP)法测量 CIC, 计量认证标准: 国标食品理化项目 GB/T 5009. 90-2003。

1.3 统计学分析

使用 IBM SPSS 24.0 软件进行统计学分析,由于实验采用梯度设计,数据不成正态分布,通过秩和检验比较对照组与实验组个体之间 CIC、CVF、心肌铁半定量的差异,采用 Spearman 相关分析评价 CIC、CVF、心肌铁半定量和注射铁总量之间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $r > 0.70$ 为两变量之间高度相关。

2 结果

2.1 一般情况

经过 15 周, 18 只实验动物均完成实验, 实验组巴马小型猪分别于注射铁剂后每周处死 1 只, 共进行 15 周, 注射铁剂总量分别为: 400、600 ~ 3000、3200 mg/kg, CIC 范围为 0.51 ~ 2.90 mg/g, CVF 范围为 10.17% ~ 27.70%, 心肌铁半定量范围为 0.19% ~ 3.42%, 未出现因铁剂注射致死的情况。对照组巴马小型猪共 3 只分别于 1 周、11 周、15 周后处死, CIC 范围为 0.24 ~ 0.28 mg/g, CVF 范围为 10.89% ~ 11.21%, 心肌铁半定量测定均为 0%。

2.2 病理

2.2.1 大体病理

对照组与实验组小型猪心脏大小、形态无明显差异, 对照组小型猪心脏呈鲜红色, 实验组第 10 周后小型猪心脏呈棕褐色(图 1)。

2.2.2 镜下病理

经普鲁士蓝染色的心肌组织病理切片显示, 对照组巴马小型猪心肌内未见蓝染色颗粒(图 2A); 实验组注射铁剂 1 周后, 心肌可见散在细小的铁染色颗粒(占视野面积比为 0.19%, 图 2B); 注射铁剂 5 周后, 心肌可见较多颗粒状散在分布的蓝染色颗

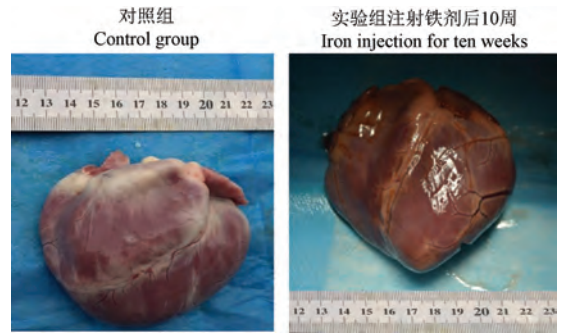


图 1 巴马小型猪心脏的大体病理

Figure 1 Gross pathology of the hearts of Bama miniature pigs

粒(占视野面积比为 1.00%, 图 2C); 注射铁剂 15 周后, 心肌可见大量颗粒状、团块状蓝染色颗粒(占视野面积比 3.42%, 图 2D); 实验组蓝染色颗粒占心肌视野面积最高为 3.42%, 平均为 $1.86\% \pm 1.58\%$ 。经天狼星红染色的心肌组织病理切片显示, 对照组巴马小型猪心肌内胶原纤维呈正常分布(CVF = 10.89%, 图 2E); 实验组注射铁剂 1 周后, 心肌内胶原纤维较为正常(CVF = 10.17%, 图 2F); 注射铁剂 5 周后, 心肌内胶原纤维可见明显增多(CVF = 13.82%, 图 2G); 注射铁剂 15 周后, 心肌内胶原纤维大量增多(CVF = 27.70%, 图 2H)。其中, 心肌细胞形态各异, 存在横向、纵向走行(图 2I, 红、蓝箭头), 胶原纤维分布不均匀, 以血管周围分布较多(图 2J)。对照组 CVF 平均为 10.89%; 实验组 CVF 最高达 27.70%, 平均为 $14.70\% \pm 8.21\%$ 。

2.3 巴马小型猪的 CIC、心肌铁半定量、CVF 和注射铁总量之间的关系

通过 Spearman 相关分析, 注射铁总量与 CIC、心肌铁半定量、CVF 之间高度相关($r = 0.957$, $r = 0.971$, $r = 0.957$, $P < 0.001$, 图 3A ~ 3C); CIC 与 CVF 之间高度相关($r = 0.924$, $P < 0.001$, 图 3D); 心肌铁半定量与 CIC 之间高度相关($r = 0.973$, $P < 0.001$, 图 3E); 心肌铁半定量与 CVF 之间高度相关($r = 0.944$, $P < 0.001$, 图 3F)。

2.4 实验组巴马小型猪与对照组巴马小型猪 CIC、CVF、心肌铁半定量的关系

15 只实验组巴马小型猪随着注射铁剂时间的增加, CIC、CVF、心肌铁半定量总体呈上升趋势。3 只正常对照组巴马小型猪 CIC、CVF、心肌铁半定量不随实验周数的增加而上升。与对照组巴马小型猪相比, 实验组巴马小型猪 CIC、CVF、心肌铁半定量明显增加(表 1)。

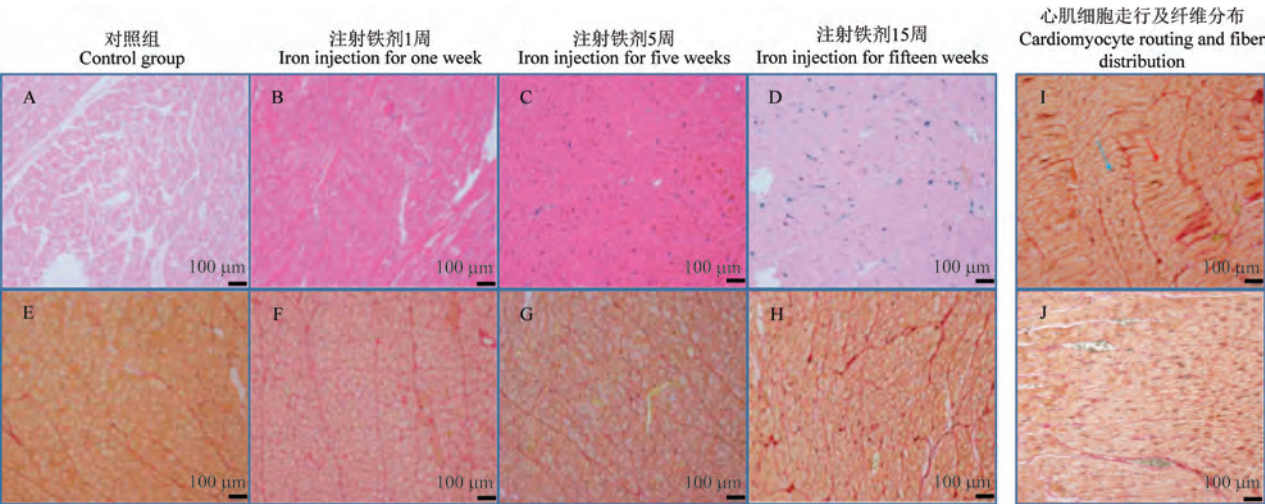


图 2 巴马小型猪心肌组织普鲁士蓝染色、天狼星红染色(× 400)

Figure 2 Prussian blue staining and Sirius red staining of myocardial tissue of Bama miniature pigs(× 400)

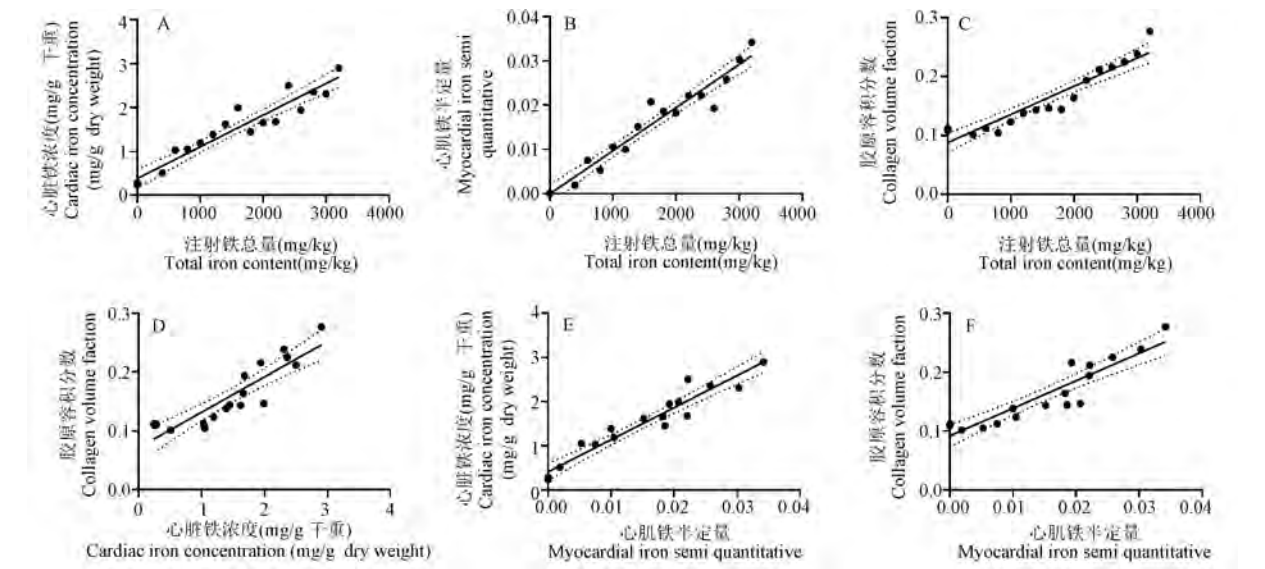


图 3 巴马小型猪的 CIC、CVF、普鲁士蓝染色心肌铁半定量和注射铁总量之间的散点图

Figure 3 Scatter plot of CIC, CVF, Prussian blue and total injected iron of Bama miniature pigs

表 1 实验组与对照组 CIC、心肌铁半定量、CVF 测定的比较

观察项目/ 数值	心脏铁浓度 (mg/g 干重) Cardiac iron concentration (mg/g dry weight)		心肌铁半定量 Myocardial iron semi quantitative		胶原容积分数 Collagen volume fraction	
	实验组 (n = 15)	对照组 (n = 3)	实验组 (n = 15)	对照组 (n = 3)	实验组 (n = 15)	对照组 (n = 3)
	Experimental group (n = 15)	Control group (n = 3)	Experimental group (n = 15)	Control group (n = 3)	Experimental group (n = 15)	Control group (n = 3)
中位数 Median	1.660	0.260	0.0186	0	0.1466	0.1115
最大值 Maximum	2.900	0.280	0.0342	0	0.2770	0.1121
最小值 Minimum	0.510	0.240	0.0019	0	0.1017	0.1089
Z	-2.666		-2.671		-1.955	
P	< 0.05		< 0.05		0.051 (≈ 0.05)	

3 讨论

3.1 铁过载致心肌纤维化模型动物的选择

合适的动物模型能够提供更好的研究材料,从而更好地配合临床工作进行研究。小型啮齿动物常用于人类主要疾病模型的建立,小体型使其易于操作,病理取材后能够在一个切片上对完整的组织或器官进行观察。但用于建立心血管疾病模型则存在许多问题。啮齿类动物和人类之间在心脏特征方面存在显著性差异^[15],这会导致所研究的结果在人体上往往得不到验证。

本课题组既往研究中,通过每周皮下注射剂量为 200 mg/kg 右旋糖酐铁溶液的方法成功建立了心肌铁过载兔模型^[10],但在实验过程中发现家兔耐受性较差,往往未出现心肌纤维化,就已经出现死亡的情况。相似的方法,黄璐等^[16]通过每周肌内注射剂量为 50 mg/kg 右旋糖酐铁的方法建立心肌铁过载兔模型,但该研究并未对注射铁剂后的 CVF 进行测定,和对铁过载所致心肌纤维化进一步探讨,且心肌铁过载兔模型的心血管系统与成人相比,体积、比例均存在差异,临床意义仍有待考究^[17]。

目前,心血管疾病动物模型多使用大型动物^[18]。猪在心血管系统的发生、发展、结构、生理机制与人类相似^[19],此外,与非人类灵长类动物等大型动物相比,猪在伦理和经济上更容易被接受,使它们成为心血管疾病研究的首选模型^[20],许多心血管疾病模型运用猪得以建立^[21-22]。小型猪能够弥补传统大型猪体积大、不便搬运、操作困难等不足^[23]。本研究采用的是广西地区特有的巴马小型猪,具有稳定的遗传特性,能够避免一些由实验动物导致的非特异因素的影响,其比小型啮齿类动物具有与人体更为相似的解剖与生理,比家兔具有更强的心脏耐受性^[12]。因此,巴马小型猪是铁过载诱导心肌纤维化动物模型建立的最佳动物选择。

3.2 注射铁剂剂量的选择

既往研究证明,通过注射铁剂可实现铁过载猪模型的建立^[13],且对比其他铁过载动物模型的方法成功率高,操作简单^[24-25]。本研究通过深部肌内注射过量右旋糖酐铁溶液,使实验动物血液循环的游离铁增加,随剂量和时间的推移不断沉积于心脏,减少了因铁过载脏器分布与肝等网状内皮系统及肾排泄等因素导致实验动物心肌铁过载程度较低的干扰。

采用注射铁剂的方法建立铁过载动物模型,注射铁剂剂量的选择是关键。少量的每周注射铁剂剂量,通常需要较长时间才能成模,实验周期过长往往又会造成动物非正常生理状态持续时间的增加,从而导致过高的动物死亡率。早期预实验采用的首次剂量为 200 mg/kg,后续剂量为 100 mg/kg,注射 8 周后取心肌切片染色,发现当前剂量诱导心肌纤维化的程度不高,甚至与正常对照组比较未见明显差异。铁过载主要沉积于肝、脾等网状内皮系统,心肌铁过载相对较轻,为了较快达到铁过载负荷的状态并诱导心肌纤维化,本研究增加首次注射右旋糖酐铁剂量,可以迅速达到铁过载状态,使循环血液中的转铁蛋白逐渐饱和,非转铁蛋白结合铁(non-transferrin-bound iron, NTBI) 出现。NTBI 是一种不稳定、有高度细胞毒性的物质,其进入心肌细胞,导致心肌的可变铁水平增高,最后以铁蛋白及含铁血黄素形式沉积存在,造成心肌纤维化。

3.3 巴马小型猪铁过载致心肌纤维化的病理改变

此前针对铁过载导致的心肌纤维化动物模型研究少见,目前,临床应用中通过测定 CIC 可评估患者铁负荷情况^[26],心肌纤维化的组织病理学分析常采用测定 CVF 的方法^[27],故铁过载及心肌纤维化严重程度将通过测定 CIC、CVF 进行评价。CIC 测定结果显示,随着注射铁剂次数增多,实验组的注射铁总量增多,CIC 总体呈逐渐上升趋势,证实了整个实验过程中游离铁不断沉积于心肌。因此,通过本实验肌内注射铁剂的方法,可造成小型猪心肌铁过载,实验过程中观察到心脏解剖后颜色的加深很有可能是心肌铁过载颗粒所致。

普鲁士蓝染色的心肌组织病理切片显示随着注射铁剂剂量的增加,心肌蓝染色颗粒占心肌视野的面积逐渐增加,且铁颗粒多沉积于细胞间质,少量进入细胞内。与既往课题组铁过载家兔模型^[10]及 Jensen 等^[13]以每周最大注射右旋糖酐铁剂量为 140 mg/kg、平均随访时间为 13 个月的 13 只铁过载小型猪模型的心肌普鲁士蓝染色切片结果显示一致。

天狼星红染色的心肌组织病理切片显示,随着注射铁剂剂量的增加,胶原纤维占心肌视野面积逐渐增加。

3.4 铁过载心肌纤维化模型评估

注射铁总量与 CIC、心肌铁半定量、CVF 之间高度相关($r = 0.957$, $r = 0.971$, $r = 0.957$, $P <$

0.001),提示通过肌内注射铁剂的方法可以造成巴马小型猪心脏铁过载及心肌纤维化。CIC 与 CVF 之间高度相关($r = 0.924, P < 0.001$),说明心脏铁过载越重,心肌纤维化程度越重。心肌铁半定量与 CIC 之间高度相关($r = 0.973, P < 0.001$),说明实际心铁过载越严重,普鲁士蓝染色中铁颗粒占面积视野的比例越大。心肌铁半定量与 CVF 之间高度相关($r = 0.944, P < 0.001$),说明心肌细胞间质内铁颗粒沉积越多,心肌纤维化程度越重。

在统计分析结果中,实验组与对照组 CVF 值的差异无统计学意义,分析导致 P 值稍大的可能原因为:(1)动物个体之间 CVF 值存在差异,部分对照组小型猪的 CVF 值偏大;(2)在造模的前期过程中部分实验组心肌纤维化程度较轻,导致实验组与对照组的 CVF 值差异不明显。

综上,通过肌内注射铁剂可以造成心肌铁过载,进而引起心肌纤维化的形成。因注射铁总量不足或铁过载持续时间较短,未能造成更为严重的铁过载及心肌纤维化是本研究的不足之处,后续将进一步探讨增大注射铁剂剂量、加长注射铁剂持续时间对铁过载及心肌纤维化严重程度的影响。

3.5 建立铁过载致心肌纤维化动物模型的意义

铁参与了红细胞生成、循环氧气输送和各种器官的转移、生长、发育等许多生理过程^[28]。正常人体处于铁稳态的状态,铁稳态失调可能会发展为铁过载,损害正常的心脏功能^[29]。

铁过载会导致弥漫性心肌纤维化,弥漫性心肌纤维化改变了细胞外基质的生物学作用并扭曲了心肌结构和生理学,这种病变损害心脏功能,因此在心衰的发展中至关重要,并导致患者的不良临床结局。在研究过程中,从开始注射铁剂时,便发现有铁颗粒沉积于心肌组织,但早期的心肌纤维化程度不明显,提示铁过载与心肌纤维化在时间上出现不一致。心肌纤维化要稍落后于铁过载,这与 CIC、CVF 的分析结果相一致,即心肌纤维化不仅受铁过载程度影响,还受铁过载的持续时间影响。因此,在发生心功能减退之前,及早检出心肌纤维化并及时的祛铁治疗,减少铁过载的程度和持续时间,将有助于预防、延缓心肌纤维化,从而实现心功能的逆转^[30]。该动物模型可为今后探讨及时祛铁治疗逆转心肌纤维化提供必要的研究工具。

目前,心内膜心肌活检(endomyocardial biopsy, EMB)是确诊心肌纤维化的“金标准”,但其为有创

伤性检查,不仅操作复杂还存在多种并发症,且因仅能对小面积心肌进行采样,活组织检查容易产生采样误差^[31]。利用该动物模型可以解决影像学检查手段中对于小型动物无法使用常规的心电门控扫描、常规 MRI 扫描序列分辨率不足、无法进行准确定位定量等问题,从而为影像学检查方法探讨无创性心肌纤维化的定量评估提供一种重要工具。

综上所述,通过首次肌内注射剂量为 400 mg/kg,后续剂量为 200 mg/kg 的右旋糖酐铁,共 15 次可以成功建立铁过载致心肌纤维化巴马小型猪模型,为铁过载所致的心肌纤维化疾病的发病机制、诊断治疗等提供一种重要的研究工具。

参 考 文 献(References)

- [1] Sousa L, Oliveira MM, Pessôa MTC, et al. Iron overload: Effects on cellular biochemistry [J]. Clin Chim Acta, 2020, 504: 180-189.
 - [2] Zeidan RS, Han SM, Leeuwenburgh C, et al. Iron homeostasis and organismal aging [J]. Ageing Res Rev, 2021, 72: 101510.
 - [3] Mu Q, Chen L, Gao X, et al. The role of iron homeostasis in remodeling immune function and regulating inflammatory disease [J]. Sci Bull, 2021, 66(17): 1806-1816.
 - [4] Weber S, Parmon A, Kurrel N, et al. The clinical significance of iron overload and iron metabolism in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia [J]. Front Immunol, 2021, 11: 627662.
 - [5] Ali S, Mumtaz S, Shakir HA, et al. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies [J]. Mol Genet Genomic Med, 2021, 9(12): e1788.
 - [6] Zhang L, Meng Z, Jiang Z, et al. Indicators of glucose dysregulation and the relationship with iron overload in Chinese children with beta thalassemia major [J]. Pediatr Diabetes, 2022, 23(5): 562-568.
 - [7] Koohi F, Kazemi T, Miri-Moghaddam E. Cardiac complications and iron overload in beta thalassemia major patients-a systematic review and meta-analysis [J]. Ann Hematol, 2019, 98(6): 1323-1331.
 - [8] Dimitroglou Y, Anagnostopoulos F, Aggeli C, et al. Severity of heart failure and health-related quality of life in beta-thalassemia patients: a cross-sectional study [J]. Ann Hematol, 2020, 99(9): 2037-2046.
 - [9] Meloni A, Pistoia L, Positano V, et al. Increased myocardial extracellular volume is associated with myocardial iron overload and heart failure in thalassemia major [J]. Eur Radiol, 2023, 33(2): 1266-1276.
 - [10] 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.
- [11] Liu J, Xie CM, Liu Q, et al. Dynamic alteration in myocardium creatine during acute infarction using MR CEST imaging [J]. NMR Biomed, 2022, 35(7): e4704.
- [12] 邹迪莎, 于健. 巴马小型猪动物模型在医学领域的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(4): 1128–1134.
- Zou DS, Yu J. Research progress on animal models of *Bama* miniature pigs in the field of medicine [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2017, 44(4): 1128–1134.
- [13] Jensen PD, Nielsen AH, Simonsen CW, et al. Consequences of parenteral iron-dextran loading investigated in minipigs. A new model of transfusional iron overload [J]. Blood Cells Mol Dis, 2020, 83: 102440.
- [14] 潘建衡, 曹占鸿, 李娜, 等. 常见心肌纤维化模型的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(1): 84–88.
- Pan JH, Cao ZH, Li N, et al. Current situation of common myocardial fibrosis model [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(1): 84–88.
- [15] Haghighi K, Kolokathis F, Pater L, et al. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human [J]. J Clin Invest, 2003, 111(6): 869–876.
- [16] 黄璐, 韩瑞, 周舒畅, 等. 心肌铁过载兔模型心功能的 MR 评价 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2018, 47(5): 520–525.
- Huang L, Han R, Zhou SC, et al. Assessment of cardiac function of rabbit models of myocardial iron overload: an MR study [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2018, 47(5): 520–525.
- [17] 叶鹏飞, 郭应坤, 张怡, 等. 构建兔颈总动脉粥样硬化斑块模型的新方法及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 301–306.
- Ye PF, Guo YK, Zhang Y, et al. Establishment and evaluation of a rabbit model of carotid atherosclerotic plaque [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 301–306.
- [18] Tsang HG, Rashdan NA, Whitelaw CBA, et al. Large animal models of cardiovascular disease [J]. Cell Biochem Funct, 2016, 34(3): 113–132.
- [19] Zhao Y, Hou Y, Xu Y, et al. A compendium and comparative epigenomics analysis of cis-regulatory elements in the pig genome [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2217.
- [20] Fang B, Ren X, Wang Y, et al. Apolipoprotein E deficiency accelerates atherosclerosis development in miniature pigs [J]. Dis Model Mech, 2018, 11(10): dmm036632.
- [21] Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, et al. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine [J]. Diabetes, 2001, 50(7): 1654–1665.
- [22] Zhai X, Han W, Wang M, et al. Exogenous supplemental NAD⁺ protect myocardium against myocardial ischemic/reperfusion injury in swine model [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 6066–6074.
- [23] 李艳君, 宋少锐, 郭亚芬, 等. 广西巴马小型猪动脉粥样硬化模型的制作 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(7): 1770–1776.
- Li YJ, Song SR, Guo YF, et al. Preparation of atherosclerosis model using Guangxi *Bama* mini-pig [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2015, 42(7): 1770–1776.
- [24] Santos M, Schilham MW, Rademakers LH, et al. Defective iron homeostasis in beta 2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man [J]. J Exp Med, 1996, 184(5): 1975–1985.
- [25] Asare GA, Paterson AC, Kew MC, et al. Iron-free neoplastic nodules and hepatocellular carcinoma without cirrhosis in Wistar rats fed a diet high in iron [J]. J Pathol, 2006, 208(1): 82–90.
- [26] DivakarJose RR, Delhikumar CG, Ram Kumar G. Efficacy and safety of combined oral chelation with deferiprone and deferasirox on iron overload in transfusion dependent children with thalassemia-A prospective observational study [J]. Indian J Pediatr, 2021, 88(4): 330–335.
- [27] Foussier C, Barral PA, Jerosh-Herold M, et al. Quantification of diffuse myocardial fibrosis using CMR extracellular volume fraction and serum biomarkers of collagen turnover with histologic quantification as standard of reference [J]. Diagn Interv Imaging, 2021, 102(3): 163–169.
- [28] Bi Y, Ajoolabady A, Demillard LJ, et al. Dysregulation of iron metabolism in cardiovascular diseases: from iron deficiency to iron overload [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 190: 114661.
- [29] Vela D. Keeping heart homeostasis in check through the balance of iron metabolism [J]. Acta Physiol, 2020, 228(1): e13324.
- [30] López B, Ravassa S, Moreno MU, et al. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(7): 479–498.
- [31] Raafs AG, Verdonschot JAJ, Henkens MTHM, et al. The combination of carboxy-terminal propeptide of procollagen type I blood levels and late gadolinium enhancement at cardiac magnetic resonance provides additional prognostic information in idiopathic dilated cardiomyopathy—a multilevel assessment of myocardial fibrosis in dilated cardiomyopathy [J]. Eur J Heart Fail, 2021, 23(6): 933–944.

[收稿日期] 2023-03-01

丁月,周荧,刘景艳,等. 不同病理因素诱导的大鼠心肌肥大模型心肌表型特征及表达谱 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 605-617.

Ding Y, Zhou Y, Liu JY, et al. Phenotypic characteristics and gene expression profiles of myocardial cells in rat cardiac hypertrophy models induced by various pathological factors [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 605-617.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2023. 05. 007

不同病理因素诱导的大鼠心肌肥大模型 心肌表型特征及表达谱

丁月¹,周荧¹,刘景艳²,周江峰¹,吕东颖¹,蔡兆伟¹,王德军^{1*}

(1. 浙江中医药大学动物实验研究中心,杭州 310053;2. 西湖大学实验动物中心,杭州 310023)

【摘要】 目的 建立主动脉弓缩窄(TAC)、异丙肾上腺素(ISO)诱导及自发性高血压(SHR)3种大鼠心肌肥大(cardiac hypertrophy, CH)模型,比较各模型病理特点及其心肌转录组差异。**方法** 选择雄性SD和SHR大鼠(对照组为WKY)建立3种模型。TAC诱导模型分为假手术组($n = 5$)和TAC组($n = 14$),TAC组进行TAC手术,假手术组进行假手术操作,术后饲养5周;ISO诱导模型分为正常对照组($n = 5$)和ISO组($n = 11$),ISO组颈背部皮下多点连续注射ISO 5 mg/(kg·d),正常对照组注射等量生理盐水,每日2次,连续10 d;SHR诱导模型分为WKY组($n = 5$)和SHR组($n = 5$),正常饲喂至16周龄。通过检测大鼠超声心动图和血浆ANP含量以判定成模,统计大鼠存活率并进行血压、血流动力学以及心脏质量指数测定。取大鼠心脏组织进行HE、Masson和麦胚凝集素(WGA)病理学染色,进行心肌转录组测序,筛选差异基因并分析其通路,以实时荧光定量PCR验证测序结果。**结果** 各模型组大鼠血浆ANP含量较其对照组均显著性升高($P < 0.05$),TAC和ISO模型大鼠IVSd、IVSs、LVPWd和LVPWs均显著增加($P < 0.05$),SHR大鼠LVsD显著增厚,而LVIDd、LVIDs却显著降低($P < 0.05$)。各模型组大鼠存活率为:SHR(100%)、ISO(81.82%)和TAC(35.71%)。TAC组、ISO组大鼠血压较对照组均显著下降($P < 0.05$),而SHR大鼠则显著升高($P < 0.01$)。各模型组大鼠HW/BW、LVW/BW比值均显著增大($P < 0.05$)。血流动力学结果显示,TAC和ISO模型大鼠HR、LVESP、LVEDP、dP/dtmax显著降低($P < 0.01$),而SHR大鼠各指标均显著性增加($P < 0.01$)。TAC和SHR模型大鼠心肌组织均形成不均匀网状的反应性间质纤维化,ISO大鼠心肌组织有大面积修复性间质纤维化。TAC和ISO组大鼠心肌横截面积均显著性增加($P < 0.05$),SHR大鼠无显著性差异。TAC、ISO、SHR模型测序分别获得175、568和279个差异表达基因,自噬体、癌症相关信号通路和PI3K/AKT通路在3种模型共同富集,而药物反应、松弛素信号和JAK/STAT信号等通路则是模型特异性富集,实时荧光定量PCR验证结果与测序结果基本一致。**结论** 本研究成功建立了TAC、ISO诱导和自发性高血压大鼠CH模型,不同诱导因素对模型的存活率、血压、血流动力学、心肌肥大程度、组织病理特征及基因表达谱等有着不同程度的影响。

【关键词】 心肌肥大模型;主动脉弓缩窄;异丙肾上腺素;自发性高血压;转录组分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0605-13

Phenotypic characteristics and gene expression profiles of myocardial cells in rat cardiac hypertrophy models induced by various pathological factors

DING Yue¹, ZHOU Ying¹, LIU Jingyan², ZHOU Jiangfeng¹, LYU Dongying¹, CAI Zhaowei¹, WANG Dejun^{1*}

(1. Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.

2. Laboratory Animal Resources Center, Westlake University, Hangzhou 310023)

Corresponding author: WANG Dejun. E-mail: wdj@zcmu.edu.cn

【基金项目】浙江省基础公益技术应用研究计划项目(LGD20C040011)。
Funded by the Zhejiang Province Basic Public Welfare Technology Application and Research Plan Project(LGD20C040011).
【作者简介】丁月(1992—),女,在读硕士研究生,研究方向:临床检验诊断学。Email:616668358@qq.com
【通信作者】王德军(1975—),男,硕士,正高级实验师,研究方向:实验动物与比较药理。Email:wdj@zcmu.edu.cn

[Abstract] Objective To compare the pathological characteristics and transcriptome differences among three rat models of myocardial hypertrophy (CH) induced by transverse aortic constriction (TAC), isoproterenol (ISO), and spontaneous hypertension (SHR). **Methods** Male SD and SHR rats (control group: WKY) were used to establish three models. For the TAC experiment, SD rats were divided into a sham group ($n = 5$) and TAC group ($n = 14$). Rats in the TAC group underwent TAC surgery and the sham group underwent a sham operation. Each group of rats were fed for 5 weeks after the operation. For the ISO experiment, SD rats were randomly divided into a control group (C) ($n = 5$) and ISO group ($n = 11$). Rats in the ISO group received multiple subcutaneous injections of $5 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ISO on the back of the neck, whereas the control group was injected with the same dose of saline twice daily for 10 days. For the spontaneous hypertension-mediated CH experiment, SHR rats were considered as the model group ($n = 5$) and WKY rats as the control group ($n = 5$). All rats were normally fed to 16 weeks of age. Echocardiography was performed and plasma ANP levels were measured to determine whether the CH rat model was established successfully. Then, survival rates, blood pressure, hemodynamics, and the cardiac mass index were calculated. Heart tissues were stained with HE, Masson, and wheat germ agglutinin (WGA). Transcriptome sequencing was performed in myocardial tissue to screen differentially expressed genes and analyze their pathways. The sequencing result were verified by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** Plasma ANP in each model group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). IVSd, IVSs, LVPWd, and LVPWs in TAC and ISO model rats and LVSD in SHR rats were significantly increased ($P < 0.05$), while LVId and LVIdS were significantly decreased ($P < 0.05$) compared with those in the control group. The survival rates of model rats in each group were 100% for SHR, 81.82% for ISO, and 35.71% for TAC. Compared with control groups, the blood pressure of model rats in TAC and ISO groups was significantly decreased ($P < 0.05$), whereas that of the SHR group was significantly increased ($P < 0.01$). HW/BW and LVW/BW ratios in each model group were increased significantly ($P < 0.05$). Hemodynamics showed that HR, LVESD, LVEDP, and dP/dtmax were significantly decreased in model rats of TAC and ISO groups ($P < 0.01$), whereas all indexes in SHR rats were significantly increased ($P < 0.01$). The myocardial tissue of TAC and SHR model rats showed a heterogeneous network of reactive interstitial fibrosis, whereas ISO rat myocardial tissues had a large area of repaired interstitial fibrosis. The cross-sectional area of the myocardium in TAC and ISO groups was increased significantly ($P < 0.05$), but there was no significant difference in SHR rat. In total, 175, 568, and 279 differentially expressed genes were identified by transcriptome sequencing in TAC, ISO, and SHR models, respectively. Autophagosome, cancer-related signaling pathway, and PI3K/AKT pathway were co-enriched in the three model groups, while drug response, relaxin signaling, and JAK/STAT signaling pathways were only enriched in TAC, ISO, and SHR model groups. qRT-PCR result were consistent with the transcriptome sequencing data. **Conclusions** CH was successfully established in TAC- and ISO-treated rats and spontaneously hypertensive rats. The survival rate, blood pressure, hemodynamics, degree of myocardial hypertrophy, histopathological characteristics, and gene expression profiles in CH model rats were influenced by various induced factors.

[Keywords] cardiac hypertrophy model; TAC; isoproterenol; SHR; transcriptome analysis

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

心肌肥大(cardiac hypertrophy, CH)是心脏对持续病理性刺激产生的一种代偿反应,来弥补受损的心功能,长期的病理刺激会使代偿阶段转变为不可逆的失代偿阶段,导致心衰甚至死亡^[1-2]。CH是导致心血管疾病患者心力衰竭和死亡的主要原因,但迄今无有效抑制CH的治疗方法^[3]。建立有效的动物模型对深入研究CH发病机制具有重要作用。近年来,多种CH疾病动物模型被相继建立^[4],但现有模型之间的共性特性并不明确,因此有针对性地研究CH动物模型的发病机制,并阐明其异同点,对寻找特定有效的防治心衰等疾病的治疗靶点具有重

要的参考意义和实践价值。

本实验选择和建立了目前使用较广的3种CH大鼠模型:主动脉弓缩窄术(transverse aortic constriction, TAC)、异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导和自发性高血压大鼠(spontaneous hypertension rat, SHR),通过比较多种CH表型,分析不同病理因素建立的大鼠CH模型的发病特点,进一步采用转录组测序技术分析3种CH大鼠模型心肌组织mRNA表达差异,分析转录组表达的共性和特性,既为发掘治疗CH的靶标提供实验依据,也为不同CH动物模型的应用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

35 只 8 ~ 10 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 190 ~ 250 g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供【SCXK (沪) 2022-0004】。11 周龄 SPF 级 SHR 大鼠 5 只, WKY 大鼠 5 只, 雄性, 200 ~ 240 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK (京) 2021-0006】。饲养环境: 环境温度控制在 22℃, 温度变化不超过 2℃, 相对湿度恒定, 光照 12 h 明暗交替, 饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心【SYXK (浙) 2021-0012】。实验经浙江中医药大学动物福利与伦理审查委员会批准 (IACUC-20190826-02)。所有动物均适应性饲养 1 周后进行实验。

1.1.2 主要试剂与仪器

ISO 干粉 (SIGMA, I5627-5G); 异氟烷 (苏恒丰强生物技术有限公司, 20190902), ANP 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究有限公司, H80); 乌拉坦 (上海国药集团化学试剂有限公司, 20130609), Masson 三色染色液试剂盒 (珠海贝索生物技术有限公司, 20181026); WGA 染色液 (Thermo Fisher, W11261); RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa 公司, AJ11051A); mRNA 逆转录试剂盒 (PrimeScript™ RT Master Mix) (TaKaRa 公司, AJ60588A、AIG1952A); 荧光定量试剂盒 (SYBR Premix Taq™ II) (TaKaRa 公司, AJ613332A; AJ20706A)。

Vevo2100 小动物超声影像系统 (Visual Sonics, 加拿大); 智能无创血压计 (鼠仪) (北京软隆生物技术有限公司, 中国); Fresco17 台式冷冻离心机 (Thermo Fisher 公司, 美国); ALC-NIBP (8 道) 无创血压心率测量仪 (上海奥尔科特生物科技有限公司, 中国); HM340E 型轮转切片机、HistoStar 组织包埋机 (Thermo Fisher 公司, 美国); Nana Zoomer 数字切片扫描设备 (2.0RS, 滨松公司, 日本); StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 美国); PTC-200 型 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 建立 TAC 模型

雄性 SPF 级 SD 大鼠 19 只, 适应性饲养 1 周后, 按体重随机分组为假手术组 (5 只) 和 TAC 组 (14 只)。TAC 组根据文献报道进行手术操作^[5],

简而言之, 将大鼠用异氟烷进行麻醉, 随后气管插管维持麻醉, 去除大鼠胸部毛发裸露皮肤, 大鼠左侧第二根肋骨下缘开胸后分离胸腺、主动脉弓, 用 3-0 号缝线绕过主动脉弓后壁, 将外径 0.9 mm 的“L”形细针连同主动脉弓一起结扎, 结扎后将针缓慢取出, 关闭胸腔。假手术组除不结扎主动脉弓以外, 其余操作均同 TAC 组。每只大鼠术后 3 d 内连续肌肉注射青霉素 100 000 U, 术后饲养 5 周。

1.2.2 建立 ISO 模型

雄性 SPF 级 SD 大鼠 16 只, 适应性饲养 1 周后, 按体重随机分组为: 正常对照组 (5 只) 和 ISO 组 (11 只)。ISO 组颈背部皮下多点连续注射异丙肾上腺素 5 mg/(kg·d)^[6], 正常对照组注射等量生理盐水, 每日 2 次, 连续 10 d。

1.2.3 建立 SHR 模型

11 周龄 WKY 和 SHR 大鼠, 适应性饲养 1 周后, 分组为 WKY 组 (5 只) 和 SHR 组 (5 只)。正常饲养 5 周。

1.2.4 大鼠血浆 ANP 含量测定

各组大鼠在处死前 2 d 颌下取血后离心取血浆待用, 使用 ELISA 试剂盒检测大鼠血浆心房排钠肽 (atrium natriuretic peptide, ANP) 含量。

1.2.5 大鼠心脏超声和血流动力学测定

大鼠胸部去毛, 1.5% 异氟烷混合气体诱导麻醉后, 使用 Vevo2100 超声影像系统进行心脏超声测量, 取得左室长轴 M 型图。记录左室舒张末期室间隔厚度 (left ventricular end-diastolic interventricular septal thickness, IVSd)、左室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVIDd)、左室后壁舒张末期厚度 (left ventricular end-diastolic posterior wall thickness, LVPWd)、左室收缩末期室间隔厚度 (left ventricular end-systolic interventricular septal thickness, IVSs)、左室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVIDs)、左室后壁收缩末期厚度 (left ventricular end-systolic posterior wall thickness, LVPWs)、每搏输出量 (cardiac output, CO)、射血分数 (ejection fraction, EF) 和短轴率 (fraction shortening, FS) 等指标。

大鼠腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉 (5 mg/kg) 后固定, 颈中开口后, 近心端插入微型导管至左心室。生理信号记录仪测量大鼠心率 (heart rate, HR)、左室收缩末压 (left ventricular end-systolic pressure, LVESP)、左室舒张末压 (left ventricular end diastolic

pressure, LVEDP)、左心室最大收缩速率(left ventricular pressure maximal rate of rise, + dp/dtmax)、左心室最大舒张速率(left ventricular pressure maximal rate of fall, -dp/dtmax)的变化。

1.2.6 鼠尾无创血压测量

轻柔抓取大鼠束缚带固定,待大鼠血压稳定后,使用尾套法进行血压测量。每只大鼠测量 5 次,以不超过 5 mmHg 差异的平均值,作为应测血压值。记录大鼠收缩压(systolic blood pressure,SBP)、舒张压(diastolic blood pressure,DBP)。TAC 组术后 5 周、ISO 在注射 10 d 后、SHR 饲养 5 周后分别进行血压测量。

1.2.7 心脏重量指数测定和组织病理学观察

处死大鼠并取出心脏,去除心房后称取全心重量(heart weight,HW),去除右心室后,称取左心室的重量(left ventricular weight,LVW)并计算游离右心室重量(right ventricular weight,RVW,RVW = HW-LVW)、全心质量指数(HW/BW)、左心室质量指数(LVW/BW)、右心室质量指数(RVW/BW)。

取大鼠非心尖部分,10%中性甲醛固定后,经脱水、透明、浸蜡后制成石蜡切块,通过 HE 染色、Masson 染色、WGA 染色观察病理变化。

1.2.8 转录组测序及分析

使用 TRIzol 法提取大鼠心肌组织总 RNA,采用安基伦 2100 生物分析仪(Agilent,美国)和

NanoDrop 2000(Thermo Scientific,美国)检测所提 RNA 的质量。待样品质检合格后,分别将每组 3 个个体的 RNA 样品等量混合,构建 cDNA 测序文库,使用 Illumina Hiseq 4000 测序平台进行高通量测序,测序读长为双端 2 × 150 bp(PE150)。文库构建及测序工作由杭州联川生物技术股份有限公司完成。

利用 Hisat 软件将测序数据比对于参考基因组上,利用比对结果来组装转录本,采用百万映射读取的外显子模型的每千碱基片段数(fragments per kilobase of exon model of million mapped reads,FPKM)来度量统计基因在不同样本中的表达丰度。采用 edgeR 软件进行差异基因表达分析,筛选阈值为差异倍数(fold change,FC) ≥ 2.0 且 P-value < 0.05。利用基因本体(gene ontology,GO)和京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)数据库对筛选出的差异表达基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。

1.2.9 qRT-PCR 验证

用 TRIzol 法提取各对照组和模型组大鼠心肌组织总 RNA,测定 RNA 纯度和浓度后逆转录为 cDNA,用 StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 扩增。基因的相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 法计算。PCR 引物序列均由生工生物工程(上海)有限公司设计并合成,各引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
24383	<i>GAPDH</i>	F:GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG;R:ATGGTGCTGAAGACGCCACTA
25728	<i>ApoE</i>	F:AGACAAACTAAGATCGTGAGACTGG;R:AGCAATGGGACCAACAGCAG
24482	<i>Igf1</i>	F:TACCTGGCACTCTGCTTGCT;R:ATAGCCTGTGGGCTTGTGAAG
56817	<i>Kcnip2</i>	F:CTCGGTGACAATTGCTCTCC;R:TCCTCTACGCTGTCTGGGTC
24602	<i>NPPa</i>	F:TGGGGAAGTCAACCCGTCTCAG;R:GCGAGCAGAGCCCTCAGTTTG
25105	<i>NPPb</i>	F:GATCTCCAGAAGGTGCTGCC;R:GCAGCTTCTGCATCGTGGA
29437	<i>Acta1</i>	F:GCTATTACGGCGGTGCTGTCTC;R:GGCGTGTGGCAGGGCATAAC
114851	<i>Cdkn1a</i>	F:TCCTGGTGATGTCCGACCTGTTC;R:CGCGCTCAACTGCTCACTGTC
25317	<i>Fgf1</i>	F:GACAGGAGCGACCAGCACATTC;R:TGCGAGCCGTATAAAAGCCCTTC
29237	<i>Penk1</i>	F:CAACTCTCCGACCTGCTGAAAG;R:CCATACCTCTTGCTCGTGTGTC
25211	<i>Lyz2</i>	F:CCTCTGCTCTCTGCCTCTGTC;R:TCTGCCAGGCTGACTCCATAGTAG
266766	<i>Rcan1</i>	F:CACGCAGCGACAGACACCAC;R:TCCTCTCTTCTCTCTCTCTCTC
100188937	<i>Cox7c</i>	F:CGTCGCAGCCACTATGAGGA;R:AGGAGCAGCAATCCAGATCCA
25661	<i>Fn1</i>	F:AGGCACAAGTCCGAGAAGAGG;R:CATGAGTCATCCGTAGGCTGGTTC
362429	<i>Mfap5</i>	F:CTTGCTGTGGCACTCAGCATCC;R:ATGTCTGGGTACGTCATCTCCTC
84032	<i>Col3a1</i>	F:AGTCGGAGGAATGGGTGGCTATC;R:CAGGAGATCCAGGATGTCCAGAGG
292949	<i>Perp</i>	F:AGCGGCTCTACGACGATGG;R:GGCGAAGAACGAGAGGATGAAGC

1.3 统计学分析

所有数据均用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用多功能数据图像分析软件 Graphpad Prism 8 进行统计分析,结果采用 Mann-Whitney 非参检验法检验,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),生存率采用 Log-rank test 检验比较对照组与模型组的指标差异,转录组数据在线分析工具使用联川生物云工具 (<https://www.omicstudio.cn/index>), $P < 0.05$ 为差异有统计学差异意义。

2 结果

2.1 存活率

实验发现,不同 CH 模型大鼠存活率不同。TAC 组术中和术后出现大量死亡,存活率为 35.71%,与假手术组相比,存活率显著性降低 ($P < 0.05$),结果如图 1A 所示。ISO 组存活率为 81.82%,与正常对照组相比无显著性差异 ($P >$

0.05),结果如图 1B 所示。16 周龄的 SHR 大鼠在本次实验中无死亡。

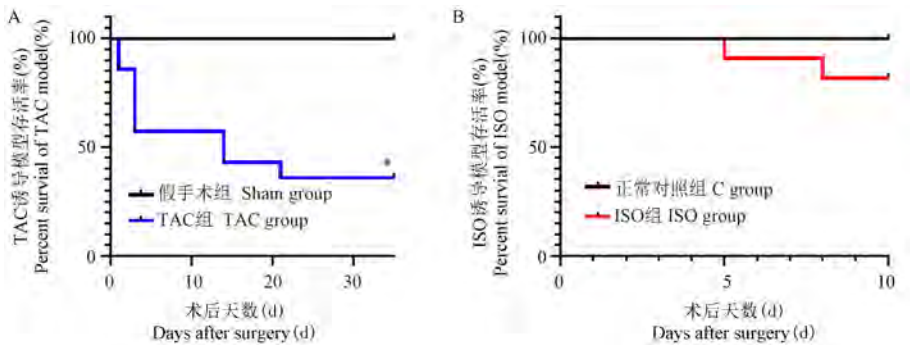
TAC 组饲养过程中部分大鼠胸前和口唇发生青紫,精神状态逐渐萎靡。ISO 模型建立过程中观察到,大鼠在注射 ISO 后表现为气喘、活动减少、饮水量增加,口、鼻处有血性分泌物,亦有少数动物在注射后 15 ~ 35 min 内发生猝死。

2.2 血浆 ANP 含量

如图 2 所示,分别与假手术组、正常对照组和 WKY 组相比,TAC 组、ISO 组和 SHR 组大鼠血浆 ANP 含量均显著升高 ($P < 0.05$)。

2.3 超声心动图变化

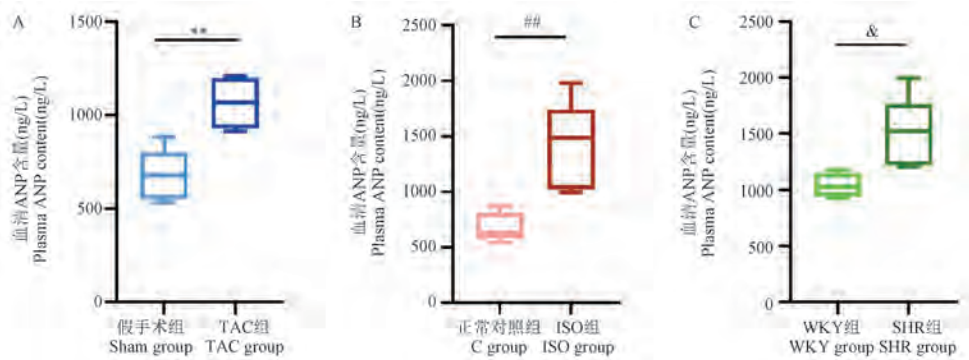
在 3 种模型中,TAC 组和 ISO 组大鼠 IVSd、IVSs、LVPWd 和 LVPWs 较假手术组和正常对照组均显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$);与 WKY 组相比,SHR 大鼠 LVSD 显著增厚 ($P < 0.01$),而 LVIDd 和 LVIDs 显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),见表 2。



注:与假手术组相比, * $P < 0.05$ 。(下图/表同)
图 1 TAC 和 ISO 诱导模型大鼠的生存曲线($\bar{x} \pm s, n \geq 5$)

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

Figure 1 Survival rate of TAC and ISO induced model rats($\bar{x} \pm s, n \geq 5$)



注:与假手术组相比, ** $P < 0.01$;与正常对照组相比, ## $P < 0.01$;与 WKY 组相比, & $P < 0.05$ 。(下图/表同)
图 2 各组大鼠血清 ANP($\bar{x} \pm s, n \geq 5$)

Note. Compared with sham group, ** $P < 0.01$. Compared with C group, ## $P < 0.01$. Compared with WKY group, & $P < 0.05$ (The same in the following figures and tables)

Figure 2 Plasma ANP of rats in each group($\bar{x} \pm s, n \geq 5$)

表 2 各组大鼠左心室超声参数的变化($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

Table 2 Changes of ultrasonic indexes of left ventricle of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)								
组别 Groups	左室舒张末期 室间隔厚度 (mm) IVSd (mm)	左室收缩末期 室间隔厚度 (mm) IVSs (mm)	左室舒张末 期内径 (mm) LVIDd (mm)	左室收缩末 期内径 (mm) LVIDs (mm)	左室后壁舒 张末期厚度 (mm) LVPWd (mm)	左室后壁收 缩末期厚度 (mm) LVPWs (mm)	射血分数(%) EF (%)	短轴缩 短率(%) FS (%)
假手术组 Sham group	1.68 ± 0.11	2.96 ± 0.31	7.61 ± 0.52	4.35 ± 0.61	2.34 ± 0.33	3.60 ± 0.41	76.30 ± 8.33	47.29 ± 8.25
TAC 组 TAC group	2.66 ± 0.16**	4.09 ± 0.46**	7.07 ± 0.29	3.36 ± 0.59	3.01 ± 0.26*	4.50 ± 0.40**	84.04 ± 4.19	54.81 ± 4.96
正常对照组 C group	1.81 ± 0.11	3.27 ± 0.30	6.93 ± 0.27	3.48 ± 0.31	2.05 ± 0.25	3.45 ± 0.20	81.20 ± 4.09	51.36 ± 4.51
ISO 组 ISO group	2.83 ± 0.27###	4.13 ± 0.36##	6.60 ± 0.47	3.52 ± 0.47	2.65 ± 0.30#	3.83 ± 0.34#	80.31 ± 4.70	50.55 ± 4.90
WKY 组 WKY group	1.62 ± 0.23	2.94 ± 0.59	7.03 ± 0.49	4.08 ± 0.70	2.08 ± 0.28	3.12 ± 0.43	74.43 ± 8.07	45.14 ± 7.41
SHR 组 SHR group	2.31 ± 0.23&&	3.20 ± 0.36	5.86 ± 0.74&&	3.53 ± 0.74&	2.68 ± 0.61	3.65 ± 0.51	76.88 ± 6.60	46.90 ± 6.30

注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$;与 WKY 组相比,&& $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Note. Compared with C group, * $P < 0.05$. Compared with WKY group, && $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

2.4 尾动脉血压

各组大鼠血压测量结果如图 3 所示,与假手术组比,TAC 模型组大鼠 SBP 显著降低($P < 0.05$),DBP 有下降趋势,但差异并不显著($P > 0.05$)。与正常对照组比,ISO 组大鼠 SBP、DBP 均显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。与 WKY 组比,SHR 组大鼠 SBP 和 DBP 则均显著升高($P < 0.01$)。

2.5 心脏重量参数

如表 3 所示,分别与假手术组、正常对照组和 WKY 组相比较,TAC 组、ISO 组和 SHR 组大鼠 HW/BW、LVW/BW 比值均显著增大($P < 0.05, P < 0.01$),而 ISO 组大鼠 RVW/BW 比值也显著增大($P < 0.01$)。

2.6 血流动力学

各组大鼠血流动力学结果见表 4。分别与假手

术组和正常对照组相比,TAC 组和 ISO 组大鼠 HR、LVEDP、+ dP/dtmax 以及 ISO 组和 TAC 组 -dP/dtmax 均显著性降低($P < 0.05$)。而与 WKY 组相比,SHR 组大鼠 HR、LVESP、+ dP/dtmax、-dP/dtmax 和 MSHR 组 LVEDP 均显著性增加。

2.7 左心室病理组织学观察

对各组大鼠进行心脏病理切片分析(图 4),HE 染色结果显示,假手术组、正常对照组和 WKY 组大鼠心脏形态正常,心肌细胞排列整齐,细胞间隙清晰,TAC 组、ISO 组和 SHR 组大鼠心肌细胞排列紊乱,心肌纤维明显增粗、增厚,与 M 型超声结果一致。Masson 染色结果显示,各模型组可见大量蓝色纤维化阳性着色不同的是,TAC 组和 SHR 组大鼠心肌组织纤维化呈不均匀的网状分布,呈现的是反应性间质纤维化,而 ISO 组大鼠心内膜有大量散在斑

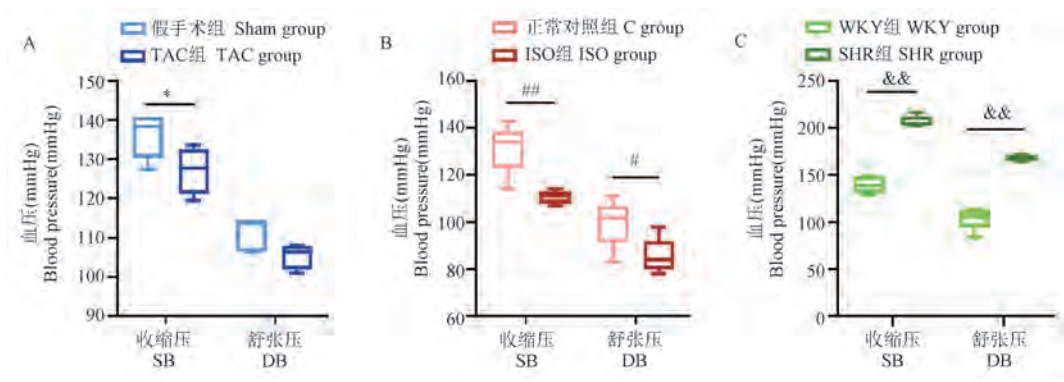


图 3 各组大鼠血压变化($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

Figure 3 Blood pressure change of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

表 3 各组大鼠体重以及心脏重量参数变化($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

Table 3 Change of body weight and heart weight parameters in each group($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

组别 Groups	体重(g) Body weight(g)	心重/体重(mg/g) HW/BW (mg/g)	左心室重量/体重(mg/g) LVW/BW (mg/g)	右心室重量/体重(mg/g) RVW/BW (mg/g)
假手术组 Sham group	459.40 ± 22.21	2.62 ± 0.13	2.16 ± 0.11	0.46 ± 0.02
TAC 组 TAC group	449.25 ± 9.22	3.07 ± 0.12 *	2.64 ± 0.09 *	0.43 ± 0.03
正常对照组 C group	281.40 ± 5.02	2.95 ± 0.05	2.04 ± 0.04	0.55 ± 0.01
ISO 组 ISO group	266.80 ± 1.85	4.25 ± 0.08 ##	3.49 ± 0.08 ##	0.77 ± 0.01 ##
WKY 组 WKY group	307.40 ± 7.53	2.90 ± 0.05	2.41 ± 0.06	0.49 ± 0.01
SHR 组 SHR group	286.40 ± 3.91 &&	3.37 ± 0.04 &&	2.84 ± 0.04 &&	0.53 ± 0.01

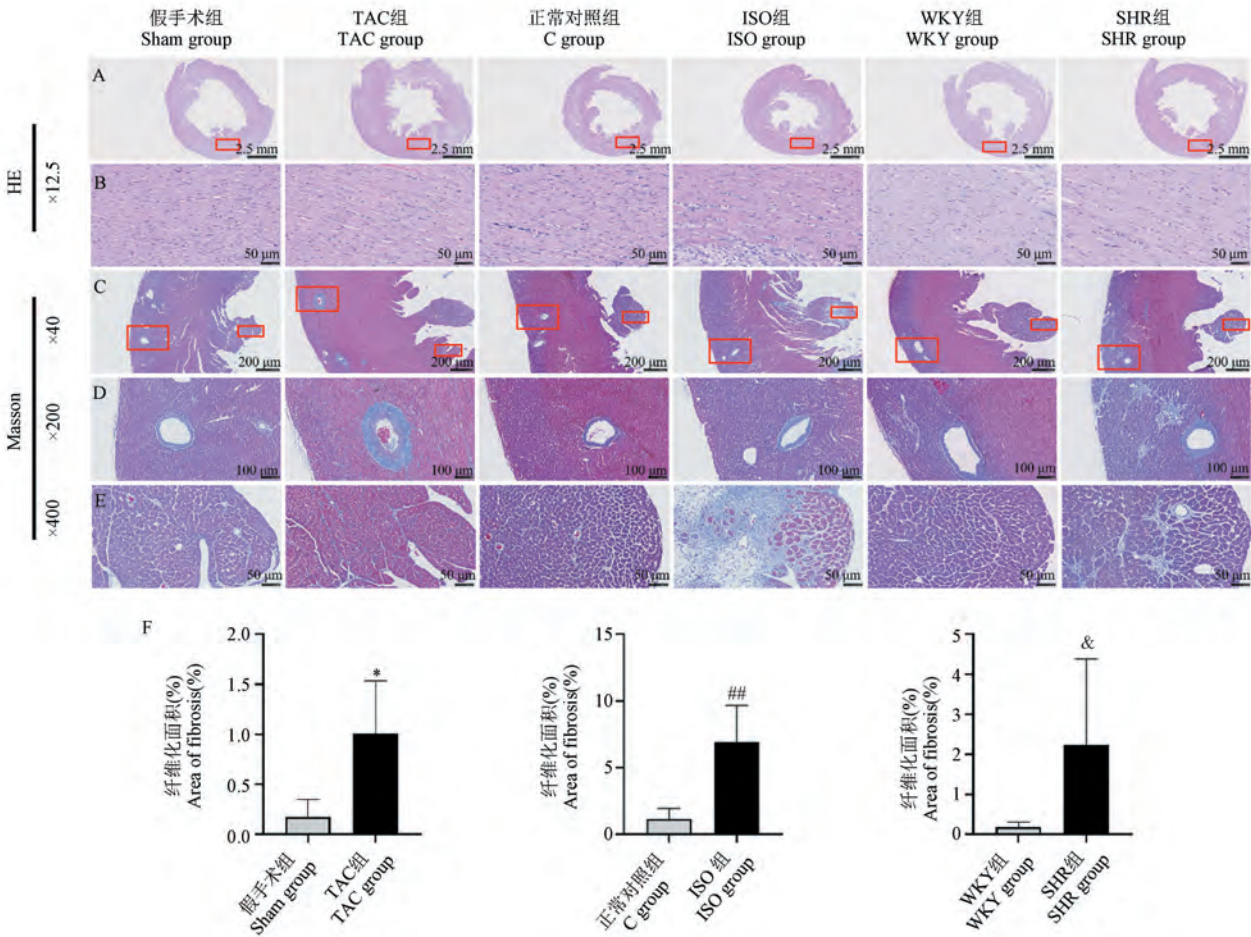


图 4 各组大鼠心肌 HE 染色和 Masson 染色

Figure 4 HE staining and Masson staining of myocardial tissue of rats in each group

片状及条索状坏死,呈现修复性间质纤维化特点。分别与假手术组、正常对照组和 WKY 组相比,TAC 组、ISO 组和 SHR 组大鼠心肌组织胶原纤维化面积均显著性增加($P < 0.05, P < 0.01$)。

WGA 染色统计心肌细胞横截面积结果如图 5 所示,与假手术组和正常对照组相比,TAC 组和 ISO 组大鼠心肌细胞横截面积均显著性增大($P < 0.01$),而 SHR 组大鼠心肌细胞相较于 WKY 组未

表 4 各组大鼠左心室功能变化($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

Table 4 Changes of left ventricular function of rats in each model($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

组别 Groups	心率 (bpm) HR (bpm)	左心室收缩 末压 (mmHg) LVESP (mmHg)	左心室舒张 末压 (mmHg) LVEDP (mmHg)	左心室最大 收缩速率 (mmHg/s) + dP/dtmax (mmHg/s)	左心室最大舒 张速率 (mmHg/s) -dP/dtmax (mmHg/s)
假手术组 Sham group	434.20 ± 2.13	194.50 ± 6.00	22.00 ± 0.69	10 293.74 ± 445.02	5993.91 ± 16.89
TAC 组 TAC group	334.20 ± 3.98**	175.30 ± 2.15	14.83 ± 1.07**	9144.87 ± 222.35*	6741.25 ± 624.59
正常对照组 C group	429.83 ± 7.52	164.42 ± 5.38	7.49 ± 0.75	6842.79 ± 309.83	4972.00 ± 215.74
ISO 组 ISO group	324.00 ± 9.88##	132.23 ± 4.44##	3.94 ± 0.18##	4195.11 ± 217.89##	3653.95 ± 205.87##
WKY 组 WKY group	270.40 ± 21.06	119.23 ± 4.38	12.68 ± 0.81	5555.89 ± 118.31	4504.28 ± 163.54
SHR 组 SHR group	412.60 ± 6.37&&	191.75 ± 0.80&&	19.26 ± 0.52&&	13 102.66 ± 110.10&&	7768.69 ± 168.08&&

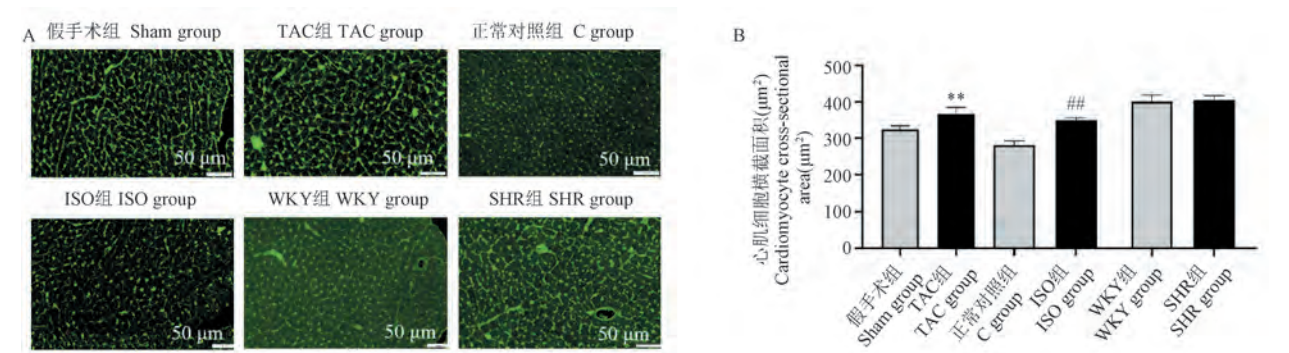


图 5 各组大鼠心肌组织 WGA 染色

Figure 5 WGA staining of myocardial tissue of rats in each group

见显著性变化。

2.8 各模型差异 mRNA 的筛选

与假手术组、正常对照组和 WKY 组相比,TAC 组、ISO 组和 SHR 组大鼠心脏中分别鉴定出 175 个 (106 个上调,69 个下调)、568 个 (408 个上调,160

个下调)和 279 个 (172 个上调,107 个下调)差异表达基因 (DEGs)。将各组 DEGs 进行 Venn 分析,发现 *Postn*、*Plcl2*、*Ltbp2*、*Tnc*、*Ncam1*、*Fibin* 等基因在 3 个 CH 模型中均同时上调,而 *Sertad2*、*Vps37b* 和 *Dcdc5* 等基因均同时下调 (图 6)。

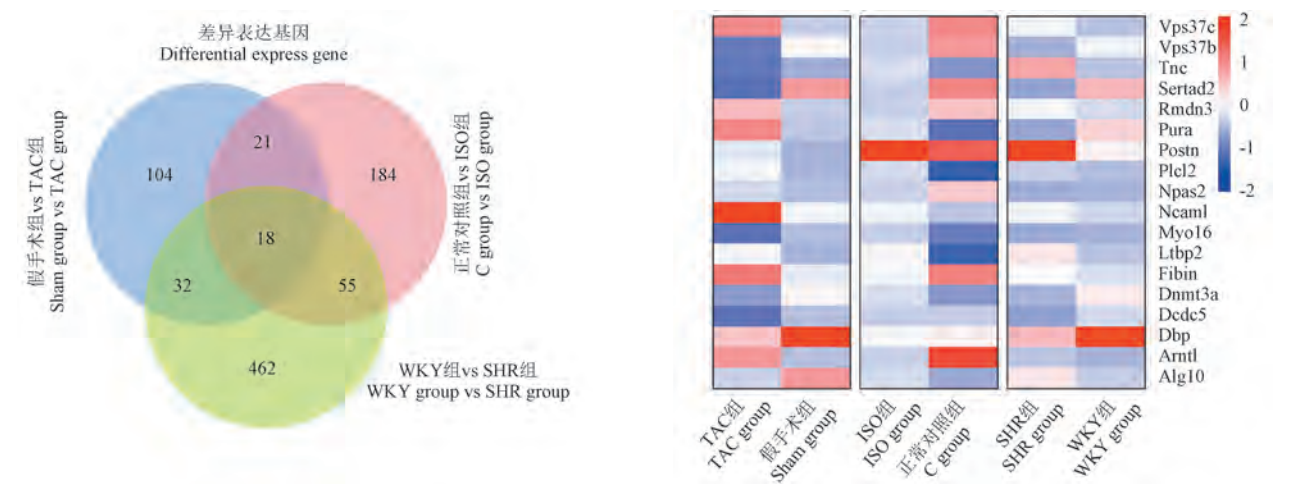


图 6 各组模型差异表达基因的 Venn 图和热图

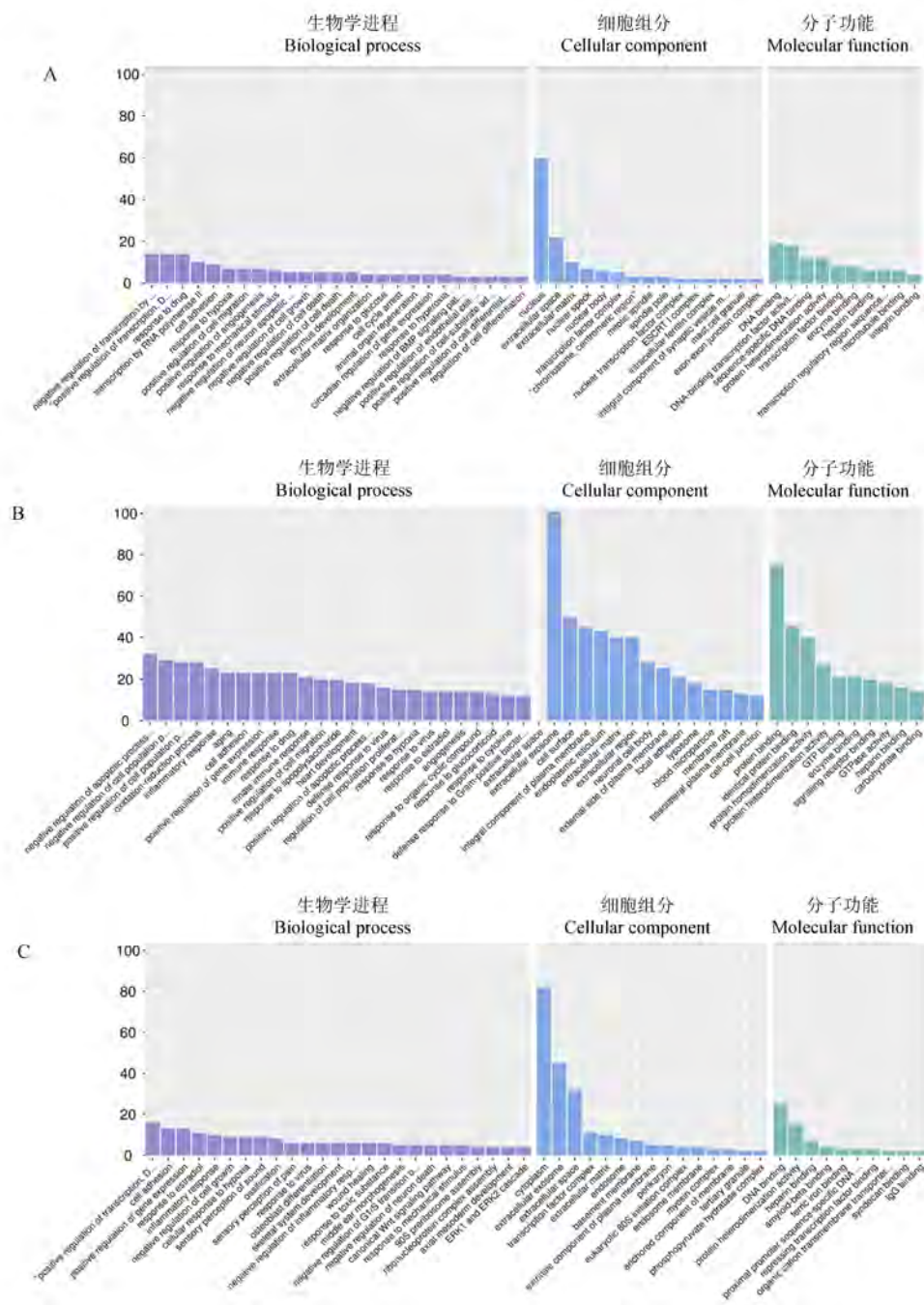
Figure 6 Venn plots and heat maps of common DEGs in each model

2.9 GO 和 KEGG 分析

将各组筛选到的 DEGs 提交 GO 和 KEGG 数据库进行富集分析。GO 分析显示,TAC 模型 DEGs 主要富集在药物反应、血管生成和细胞死亡的正向调节、机械刺激反应、丙酮酸氧化、细胞外基质、DNA 结合转录因子活性等生物学过程(图 7A)。ISO 模型 DEGs 主要富集在炎症反应、胶原原纤维组织

Toll 样受体信号通路、自噬、肥大细胞激活、胶原蛋白三聚物、胞外基质结合等途径(图 7B)。SHR 模型 DEGs 主要在细胞生长负调控、有丝分裂细胞周期 G1/S 转换负调控、细胞对缺氧反应负调控、缺氧诱导的凋亡信号通路以及蛋白质和 DNA 等小分子活动等过程显著富集(图 7C)。

经 KEGG 途径富集分析,TAC 模型 DEGs 主要



注:A:假手术组 vs TAC 组; B:正常对照组 vs ISO 组; C:WKY 组 vs SHR 组。

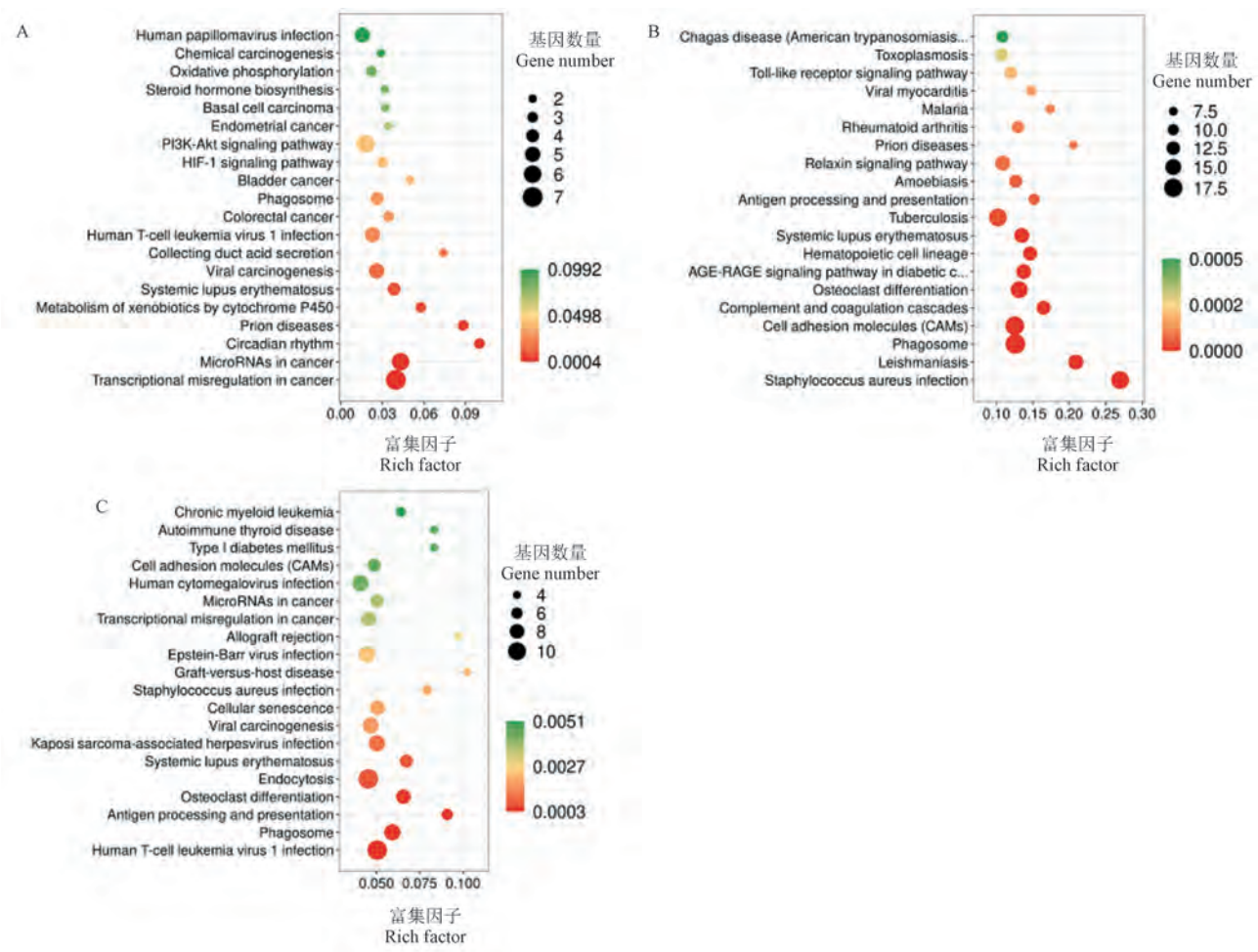
图7 各组模型差异表达基因的GO富集结果

Note. A. Sham group vs TAC group. B. C group vs ISO group. C. WKY group vs HR group.

Figure 7 GO enrichment results of DEGs in each model

富集在细胞色素 P450 对外源物质的代谢、自噬体、癌症信号转录失调、HIF-1 信号和 PI3K-Akt 信号等通路(图 8A)。ISO 模型 DEGs 主要涉及吞噬体、黏着斑、细胞粘附分子、松弛素受体信号、癌症信号通

路、PI3K-Akt 信号和 Toll 样受体信号等通路有关(图 8B)。SHR 模型 DEGs 主要富集在自噬体、JAK-STAT 信号、癌症信号转录失调、Toll 样受体信号和 PI3K-Akt 信号等通路(图 8C)。



注:A:假手术组 vs TAC 组;B:正常对照组 vs ISO 组;C:WKY 组 vs SHR 组。

图 8 各组模型差异表达基因的 Top 20 KEGG 富集通路

Note. A. Sham group vs TAC group. B. C group vs ISO group. C. WKY group vs HR group.

Figure 8 Top 20 KEGG enrichment pathway of DEGs model

2.10 qRT-PCR 验证

为了验证测序结果的可靠性,随机在各模型 DEGs 中选取共 15 个 mRNAs 进行 qRT-PCR 验证。结果如图 9 所示,除 TAC 组中 *Fgf1* 基因表达变化达到显著变化($P > 0.05$),与测序结果不一致外,其余基因上下调趋势均与测序结果一致。

3 讨论

在本研究中,建立了 3 种目前应用较为广泛的 CH 大鼠模型:TAC、ISO 和 SHR。通过比较不同模型间病理特征差异,发现 3 种模型动物均表现出血

浆 ANP 含量升高,心脏质量指数和心室壁厚度显著增加及左室舒缩功能障碍,其中 ISO 成模效果尤为明显。心肌组织病理学分析结果也显示 3 种 CH 模型都存在不同程度的心肌细胞纤维化和心肌重构。然而,3 种 CH 模型大鼠存活率不同,组织病理学特征也存在一定差异,特别是 TAC 组和 SHR 组大鼠心肌呈现反应性间质纤维化,而 ISO 组大鼠呈现修复性间质纤维化。在 TAC、ISO 和 SHR 三种模型中,分别筛选获得 175、568 和 279 个差异表达基因。3 种模型差异表达基因所富集的 KEGG 通路存在共性,但也显示各自偏好性。例如,吞噬体、癌症相关

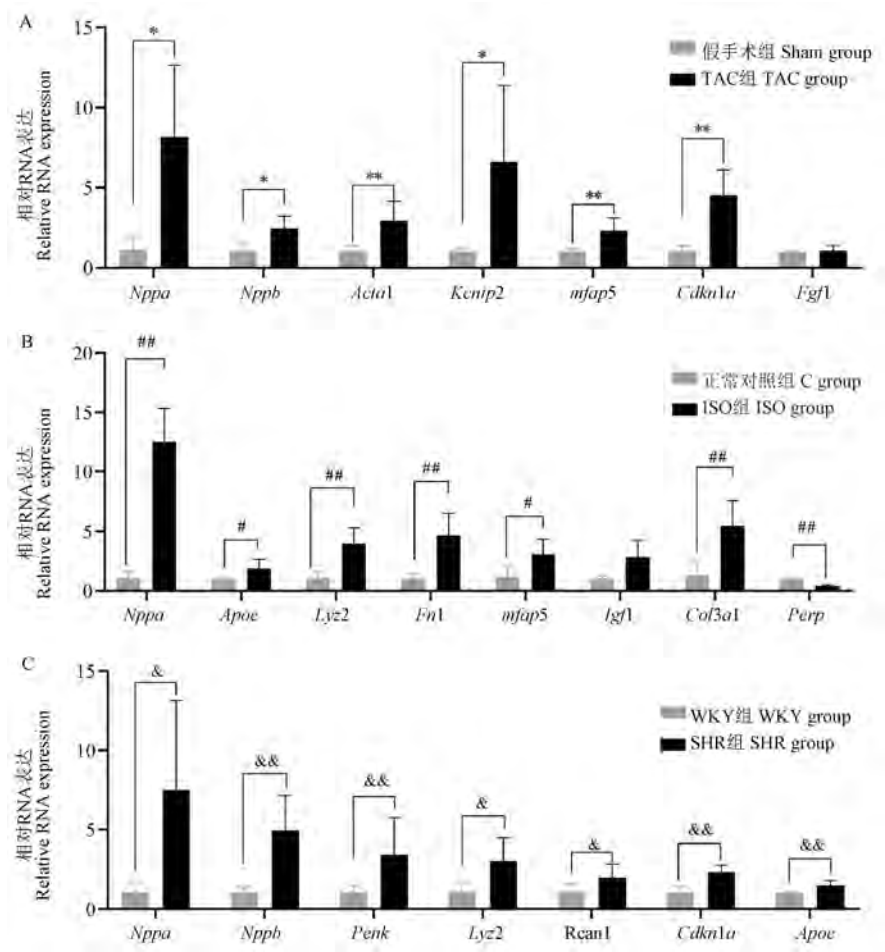


图 9 差异 mRNA 的 qRT-PCR 验证结果
Figure 9 qRT-PCR validation results of DEGs

信号通路和 PI3K/AKT 信号通路是 3 种模型共同富集途径,而 TAC 模型能富集 P450 对外源物质的代谢和 HIF-1 信号通路,ISO 模型则富集到松弛素受体信号通路、Toll 样受体信号通路和细胞黏附分子。SHR 模型不仅富集到 Toll 样受体信号通路,也富集到了 JAK/STAT 信号通路。

自噬是细胞清除多余、受损或衰老的细胞器及蛋白质来维持自身稳态的自我保护机制^[7]。心脏在病理情况下,随着内部环境和外界代谢压力等变化,心肌细胞自噬将增强^[8]。心肌细胞自噬水平升高会引起细胞器功能障碍,如线粒体钙离子积累,从而导致心肌功能紊乱和肥大^[9]。先前研究证实,许多信号途径参与细胞自噬调控,其中 PI3K/AKT 作为经典的自噬相关信号通路,与心肌肥大的发生发展关系密切^[10]。该通路的激活会抑制自噬的上游蛋白活化,进而阻止自噬过程的启动。本研究发现,自噬(吞噬体)和 PI3K/AKT 信号通路在上述 3 种模型大鼠心肌中均被显著富集,说明 TAC 组、

ISO 组和 SHR 大鼠心肌肥大发生与 PI3K/AKT 通路调控心肌细胞自噬有关,这和既往研究结果相似^[11-13]。上述研究结果也说明,PI3K/AKT 信号及其诱导的自噬在不同因素诱导的心肌肥大发病过程中作用较为保守,靶向 PI3K/AKT 信号及其诱导的自噬很有可能成为有价值的治疗心肌肥大疾病的策略。

近年来,许多临床资料显示,心衰可能增加了患癌风险,而癌症反过来同样增加心衰相关死亡率^[14-16]。动物实验发现,TAC 手术引起的 Postn 升高促进小鼠肿瘤的生长和迁移^[17]。与此一致的是,在本研究中,发现 TAC、ISO 和 SHR 三种 CH 模型动物心肌 *Postn* 表达均显著上调,并且癌症相关的信号通路显著富集,这进一步证实心血管疾病或与癌症发生密切相关。

研究还表明,松弛素受体信号在 ISO 模型中被特异激活。松弛素与心血管保护作用相关,并直接发挥抗凋亡、抗纤维化等作用^[18]。上调松弛素表达

可以减弱 ISO 诱导的心肌细胞凋亡^[19],外源性松弛素治疗同样可以改善 ISO 诱导的 CH 和心肌纤维化^[20]。还有研究表明,松弛素治疗可以逆转 SHR 大鼠的心脏纤维化和心房颤动^[21-22],但对 TAC 诱导的心脏功能障碍无保护作用^[23],这与本研究结果基本一致。当前松弛素信号保护心肌肥大的作用机制尚未完全明确,不过结果提示,ISO 模型用于研究松弛素受体信号与心肌肥大关系可能优于 SHR 模型和 TAC 模型。

炎症仍然是心脏疾病发展的关键因素。Toll 样受体属于模式识别受体,通过识别病原微生物及其特殊结构等相关分子模式,诱导细胞产生炎症反应,在机体免疫调节中发挥重要作用^[24]。Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 作为一种重要的炎症调节因子,被细菌脂多糖和纤维蛋白原等内源性配体激活,并活化转录因子核转录因子 κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) 等,最终引起促炎因子的释放^[25]。以往研究证实,TLR4 介导纤维蛋白原的识别对诱导心肌肥大的影响^[26]。最近研究发现,抑制 TLR4 能够不仅能够减轻 ISO 诱导的大鼠心肌氧化应激和线粒体功能,也可以改善 SHR 大鼠心肌重塑和肥大^[27-28],这与 ISO 和 SHR 模型中发现的结果也相符。JAK-STAT 信号是调节细胞炎症反应的另一个关键途径。STAT 是 JAK 的直接底物,负责将应激信号从质膜传递到细胞核内,并且 STAT 蛋白可调节许多炎症编码基因的表达。Fu 等^[29]在 18 周龄的雄性 SHR 大鼠心肌中观察到总的和磷酸化的 JAK2 和 STAT3 信号被激活。另外的研究表明,JAK/STAT 信号在腹主动脉缩窄及 ISO 诱导的大鼠心脏组织中同样被激活^[30-31]。虽然本研究中 JAK/STAT 信号是 SHR 大鼠模型特异性富集通路,但可能仅表示该模型中参与 JAK/STAT 通路有关的差异表达基因相对较多。不过尽管如此,本研究结果仍提示在开展 CH 发病机制或药物筛选研究时,模型选择最好考虑到基因表达的偏好性。

综上所述,本研究从血压、血流动力学、心肌肥大程度、组织病理特征及模型存活率等方面评价了 TAC、ISO 诱导和自发性高血压大鼠 3 种 CH 模型间病理特征存在的差异,并通过转录组测序分析明确了不同病理因素诱导的 CH 发病基因表达的共性和偏好性,为今后发掘治疗 CH 的靶标以及动物模型的应用提供实验依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, et al. Epidemiology of heart failure [J]. Eur J Heart Fail, 2020, 22(8): 1342-1356.
- [2] Yancy C W, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(16): e147-239.
- [3] Yu Q, Kou W, Xu X, et al. FND5/Irisin inhibits pathological cardiac hypertrophy [J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(5): 611-627.
- [4] 游月婷, 黄刚, 张小刚, 等. 心力衰竭动物建模的进展 [J]. 心血管病学进展, 2021, 42(12): 1105-1109.
You YT, Huang G, Zhang XG, et al. Animal models establishment of heart failure [J]. Adv Cardiovasc Dis, 2021, 42(12): 1105-1109.
- [5] Fu D, Zhou J, Xu S, et al. *Smilax glabra* Roxb. flavonoids protect against pathological cardiac hypertrophy by inhibiting the Raf/MEK/ERK pathway: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 292: 115213.
- [6] 刘景艳, 朱亮, 蔡月琴, 等. 不同因素对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥大模型建立影响的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 651-667.
Liu JY, Zhu L, Cai YQ, et al. A comparative study on the effects of different factors on isoproterenol-induced myocardial hypertrophy model in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 651-667.
- [7] Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L. Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease [J]. Circ Res, 2017, 120(11): 1812-1824.
- [8] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 97: 245-262.
- [9] Ljubojević-Holzer S, Kraler S, Djalalinac N, et al. Loss of autophagy protein ATG5 impairs cardiac capacity in mice and humans through diminishing mitochondrial abundance and disrupting Ca^{2+} cycling [J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(6): 1492-1505.
- [10] Aoyagi T, Matsui T. Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(18): 1818-1824.
- [11] Wang W, Wang H, Geng QX, et al. Augmentation of autophagy by atorvastatin via Akt/mTOR pathway in spontaneously hypertensive rats [J]. Hypertens Res, 2015, 38(12): 813-820.
- [12] Ba L, Gao J, Chen Y, et al. Allicin attenuates pathological cardiac hypertrophy by inhibiting autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK/mTOR signaling pathways [J]. Phytomedicine, 2019, 58: 152765.
- [13] Zhou WW, Dai C, Liu WZ, et al. *Gentianella acuta* improves TAC-induced cardiac remodelling by regulating the Notch and PI3K/Akt/FOXO1/3 pathways [J]. Biomed Pharmacother,

- 2022, 154: 113564.
- [14] Hasin T, Gerber Y, Weston SA, et al. Heart failure after myocardial infarction is associated with increased risk of cancer [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(3): 265–271.
- [15] Akyea RK, Iyen B, Georgiopoulos G, et al. Cardiovascular outcomes and mortality after incident ischaemic stroke in patients with a recent cancer history [J]. *Eur J Intern Med*, 2023, 109: 50–57.
- [16] Zhang H, Gao Y, Wang L, et al. Does heart failure increase the risk of incident cancer? A meta-analysis and systematic review [J]. *Heart Fail Rev*, 2020, 25(6): 949–955.
- [17] Avraham S, Abu-Sharki S, Shofti R, et al. Early cardiac remodeling promotes tumor growth and metastasis [J]. *Circulation*, 2020, 142(7): 670–683.
- [18] Aragón-Herrera A, Feijóo-Bandín S, Anido-Varela L, et al. Relaxin-2 as a potential biomarker in cardiovascular diseases [J]. *J Pers Med*, 2022, 12(7): 1021.
- [19] You X, Guo ZF, Cheng F, et al. Transcriptional up-regulation of relaxin-3 by Nur77 attenuates β -adrenergic agonist-induced apoptosis in cardiomyocytes [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(36): 14001–14011.
- [20] Sun J, Hao W, Fillmore N, et al. Human relaxin-2 fusion protein treatment prevents and reverses isoproterenol-induced hypertrophy and fibrosis in mouse heart [J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(24): e013465.
- [21] Parikh A, Patel D, McTiernan CF, et al. Relaxin suppresses atrial fibrillation by reversing fibrosis and myocyte hypertrophy and increasing conduction velocity and sodium current in spontaneously hypertensive rat hearts [J]. *Circ Res*, 2013, 113(3): 313–321.
- [22] Lekgabe ED, Kiriazis H, Zhao C, et al. Relaxin reverses cardiac and renal fibrosis in spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 2005, 46(2): 412–418.
- [23] Xu Q, Lekgabe ED, Gao XM, et al. Endogenous relaxin does not affect chronic pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(2): 476–482.
- [24] Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(1): 12–19.
- [25] Cole JE, Georgiou E, Monaco C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 393946.
- [26] Li T, Wang Y, Liu C, et al. MyD88-dependent nuclear factor-kappaB activation is involved in fibrinogen-induced hypertrophic response of cardiomyocytes [J]. *J Hypertens*, 2009, 27(5): 1084–1093.
- [27] Echem C, Bomfim GF, Ceravolo G, et al. Anti-toll like receptor 4 (TLR4) therapy diminishes cardiac remodeling regardless of changes in blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 187: 243–245.
- [28] Katare PB, Bagul PK, Dinda AK, et al. Toll-like receptor 4 inhibition improves oxidative stress and mitochondrial health in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 719.
- [29] Fu YL, Tao L, Peng FH, et al. GJA1-20k attenuates Ang II-induced pathological cardiac hypertrophy by regulating gap junction formation and mitochondrial function [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(4): 536–549.
- [30] Fan Z, Gao Y, Huang Z, et al. Protective effect of hydrogen-rich saline on pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rats: possible role of JAK-STAT signaling [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2018, 18(1): 32.
- [31] Zhang J, Wei X, Zhang W, et al. miR-326 targets MDK to regulate the progression of cardiac hypertrophy through blocking JAK/STAT and MAPK signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 872: 172941.

[收稿日期] 2023-01-20

张远哲,赵罗娜,简胜男,等. 3 种方法建立阳虚型慢传输型便秘大鼠模型的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 618-628.

Zhang YZ, Zhao LN, Jian SN, et al. Establishment of a yang-deficiency slow transit constipation rat model by three methods: a comparative study [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 618-628.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.008

3 种方法建立阳虚型慢传输型便秘大鼠模型的比较研究

张远哲¹,赵罗娜¹,简胜男²,李中正^{3*},黎豫川^{4*}

(1. 贵州中医药大学,贵阳 550025;2. 成都中医药大学,成都 620005;3. 吉首大学,湖南 湘西土家族苗族自治州 416000;4. 贵州中医药大学第二附属医院,贵阳 550025)

【摘要】 目的 采用病证结合评价方法对比研究 3 种阳虚型 STC 大鼠模型建立方法,为中医药防治提供理想的实验动物模型。**方法** 64 只 SD 大鼠,分为空白组和模型组,采用盐酸洛哌丁胺结合 0℃ 冰水复合灌胃法(M-1 组)、盐酸洛哌丁胺联合大黄水煎液灌胃法(M-2 组)、白醋与 0℃ 冰水交替灌胃 + 盐酸洛哌丁胺灌胃法(M-3 组),各 16 只,分别建立阳虚型 STC 大鼠模型,空白组(16 只)给予等体积蒸馏水灌胃,造模期间观察大鼠一般情况,每周固定时间测定肛温、饮水量、自主活动量、粪便 Bristol 评分及含水率,模型建立后检测各组大鼠首粒黑便排出时间、肠道推进率,HE 染色法观察大鼠结肠病理改变,PAS 染色检测大鼠结肠黏液变化,ELISA 法、免疫组化法检测结肠 5-HT、VIP、SP 含量及蛋白表达。**结果** 造模后各模型组大鼠均出现精神萎靡、倦怠懒动、弓背蜷缩等表现。造模期间各模型组大鼠出现死亡,死亡率依次为 M-3 组 > M-2 组 > M-1 组。与空白组相比,M-1 组在造模第 3 周进食量、自主运动量明显降低($P < 0.01$),造模第 4 周肛温、粪便含水率明显降低($P < 0.01$),造模第 5 周粪便 Bristol 评分明显降低($P < 0.01$);M-2 组在造模第 3 周肛温明显下降($P < 0.01$),进食量、自主运动量明显降低($P < 0.01$),第 6 周粪便 Bristol 评分、含水率明显降低($P < 0.01$);M-3 组在造模第 1 周自主运动量明显降低($P < 0.01$),造模第 2 周进食量明显降低($P < 0.01$),造模第 4 周肛温、粪便 Bristol 评分、粪便含水率明显下降($P < 0.01$);HE 染色显示各模型组大鼠结肠无明显病理改变;与空白组相比,PAS 染色发现各模型组大鼠结肠黏液层厚度明显减少,排序依次为 M-3 < M-1 < M-2,同时各造模组大鼠首粒黑便排出时间增加、肠道推进率显著降低($P < 0.01$),结肠 5-HT、SP 含量及蛋白表达显著下降($P < 0.01$),M-1 组结肠 VIP 含量及蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。**结论** 3 种造模方法均能建立阳虚型 STC 大鼠模型,但以盐酸洛哌丁胺联合 0℃ 冰水灌胃法建立的大鼠模型具有死亡率低、安全性较好、阳虚证候表现稳定,大便性状改变明显,肠道动力障碍病理变化显著的优点,是阳虚型 STC 发病机制及相关中医药药物作用实验研究的理想模型。

【关键词】 阳虚型慢传输型便秘;大鼠模型;病证结合

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0618-11

Establishment of a yang-deficiency slow transit constipation rat model by three methods: a comparative study

【基金项目】 贵州省省级科技计划项目资助(黔科合基础[2020]1Y362,黔科合基础-ZK[2022]一般 510),贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项课题项目(QZYY-2021-016),贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2022]261 号)。

Funded by Guizhou Provin Science and Technology Projects([2020]1Y362, ZK[2022]General 510), Special Project of Science and Technology Research of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine in Guizhou Province(QZYY-2021-016), Guizhou Provincial Department of Education Youth Science and Technology Talents Growth Proiect (KY[2022]261).

【作者简介】 张远哲(1990—),女,博士,讲师,研究方向:肠道疾病证治与方剂配伍运用。Email:zhangyuanzhe043@gzy.edu.cn

【通信作者】 黎豫川(1987—),男,博士,副主任药师,研究方向:方剂配伍规律及临床应用。Email:liyuchuan192@gzy.edu.cn;

李中正(1985—),男,博士,副教授,研究方向:中医病证结合动物模型建立。Email:lizhongzhengyxy@jsu.edu.cn。

* 共同通信作者

ZHANG Yuanzhe¹, ZHAO Luona¹, JIAN Shengnan², LI Zhongzheng^{3*}, LI Yuchuan^{4*}

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China. 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 620005. 3. Jishou University, Xiangxi Tujia and Miao Autonomous Prefecture 416000.

4. the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550025)

Corresponding author: LI Yuchuan. E-mail: liyuchuan192@gzy.edu.cn; LI Zhongzheng.

E-mail: lizhongzhengxy@jsu.edu.cn

【Abstract】 Objective To compare three kinds of yang-deficiency STC rat models by a combination of disease and syndrome evaluation to provide an ideal experimental animal model for TCM prevention and treatment of this disease. **Methods** Sixty-four SD rats were divided into blank and model groups. The rats were treated with loperamide hydrochloride combined with 0℃ ice water by gavage (M-1 group), loperamide hydrochloride combined with dahuang decoction (M-2 group), and white vinegar and 0℃ ice water by gavage alternately + loperamide hydrochloride by gavage (M-3 group) (16 rats in each group) to establish the three yang-deficiency slow transit constipation rat models. The blank group ($n = 16$) was administered the same volume of distilled water by gavage. Model groups were established by the corresponding method. The general condition of rats was observed during modeling. Rectal temperature, food intake, voluntary activity, stool Bristol score, and water content were measured at fixed times every week. After establishing the model, the discharge time of the first black stool and the intestinal propulsion rate were measured. Rat colon pathological changes were observed by HE staining. Colon mucous changes were assessed by PAS staining. Colon 5-HT, VIP, and SP were analyzed by ELISA and IHC. **Results** Blank group rats before and after building without exception. After modeling, rats in each model group showed listlessness, lethargy, and crouching. Some rats died during modeling. Mortality was in the order of M-3 group > M-2 group > M-1 group. Compared with the blank group, the anal temperature, food intake, and voluntary activity of each model group showed a downward trend during modeling. The model groups were compared with the blank group as follows: M-1 group: building 3 weeks of food intake, autonomous activity was obviously decreased ($P < 0.01$), building 4 weeks of rectal temperature and fecal water content were significantly decreased ($P < 0.01$), building 5 weeks of Bristol stool scale was significantly decreased ($P < 0.01$). M-2 Group: building 3 weeks of rectal temperature, food intake, and autonomous activity were significantly decreased ($P < 0.01$), building 6 weeks of the Bristol stool scale and fecal water content were significantly decreased ($P < 0.01$). M-3 Group: building 1 week of autonomous activity was decreased significantly ($P < 0.01$), building 2 weeks of food intake significantly decreased ($P < 0.01$), building 4 weeks of rectal temperature, Bristol stool scale, and fecal water content were significantly decreased ($P < 0.01$). HE staining showed no obvious pathological changes in the colon of rats in each group after modeling. PAS staining showed that the mucus layer thickness in the colon of rats in each model group was significantly reduced (M-3 < M-1 < M-2). Compared with the blank group, the first black stool excretion time in the model groups was increased, and the intestinal propulsion rate, and 5-HT and SP in the colon were significantly decreased ($P < 0.01$). VIP in the colon of M-1 group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusions** The STC model of yang-deficiency can be established by the three modeling method. The rat model established by intragastric administration of loperamide hydrochloride combined with 0℃ ice water has the advantages of low mortality, good safety, stable yang-deficiency syndrome, obvious changes in stool characteristics, and significant pathological changes in intestinal motility. It is an ideal model to study the STC pathogenesis of yang-deficiency and the effect of traditional Chinese medicines.

【Keywords】 yang-deficiency slow transit constipation; rat model; disease combined traditional Chinese medicine evidence

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

慢传输型便秘(slow transit constipation,STC)属于功能性便秘,是多种原因导致结肠传输运动能力减弱、粪便通过结肠时间延长而引起。STC 是慢性便秘最常见也是最难治疗的亚型之一^[1],在我国发病率逐年升高。现代医学治疗 STC 主要采用缓泻

剂、促动力剂、生物反馈和手术等方法,但均有一定的禁忌证和副作用^[2]。本病属于中医学便秘范畴,阳虚证是 STC 临床常见证型^[3],中医药治疗本病临床疗效显著,为了使中医中药更好地推广应用,明确中药药理机制尤为重要。而动物模型的制备作

为现代药理学研究的基础,是中医药基础研究的基石,因此建立与之相关的阳虚证 STC 实验动物模型是阐释中医药作用机制的重要基础。本研究选择现有研究常用的 3 种阳虚型 STC 大鼠模型的造模方法^[4-6],分别为:①盐酸洛哌丁胺结合 0℃ 冰水复合灌胃法;②盐酸洛哌丁胺联合大黄水煎液灌胃;③白醋与 0℃ 冰水交替灌胃联合盐酸洛哌丁胺灌胃法,从中医病因病机理论出发,通过中西医临床病症(证)角度进行对比研究,以期对相关药理学实验研究提供理想的阳虚型 STC 动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

64 只 6 ~ 8 周龄 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重(200 ± 20)g,购买于斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。饲养于屏障环境,采用分笼饲养,每笼 4 只大鼠,自由饮食、饮水,保持温度 20 ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 70%,昼夜光照,实验操作在贵州中医药大学 SPF 级实验设施中进行【SYXK(黔)2021-0005】。本实验经过贵州中医药大学实验动物伦理委员会审批(20210042)。

1.1.2 药物

盐酸洛哌丁胺(生产厂家:西安杨森制药有限公司,产品批号:LLJ0727,规格:每粒 2 mg),用蒸馏水配制成 0.2 mg/mL 混悬液,现用现配。

山西白醋(生成厂家:山西省尧都泉酿造有限公司),总酸度 6%,测定方法:(1)将已配备好的邻苯二甲酸氢钾溶液中各滴 1 ~ 2 滴酚酞,用氢氧化钠标准溶液滴定至溶液呈微红,且 30 s 不褪色即结束。平行 3 次,记下结果。(2)准确吸取白醋 10 mL 置于 100 mL 容量瓶中,用新蒸馏水稀释至刻度摇匀。用移液管吸取 25 mL 稀释后的试液于 250 mL 锥形瓶中,加入 25 mL 蒸馏水及 2 滴酚酞指示剂,终点同步步骤(1),平行 3 次,根据氢氧化钠标准溶液的用量,计算白醋的总酸度。计算公式如下: $C_1V_1 = C_2V_2 = m_2/M_2$ (C_1 :氢氧化钠标准溶液浓度; V_1 :消耗氢氧化钠标准溶液的体积; C_2 :醋的浓度; V_2 :试样的体积; M_2 :醋的式量; m_2 :未知量)。

大黄(生产厂家:贵州同济堂中药饮片有限公司,生产批号:210916,产地:四川)。大黄水煎液制备方法:加纯化水 1000 mL 煮沸,下大黄 57.6 g 文火煎煮 5 min 即得 640 mL,分装成每瓶 32 mL。

1.1.3 主要试剂与仪器

多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司,货号:20190408);无水乙醇(四川西陇科学有限公司,货号:220609);二甲苯(四川西陇科学有限公司,货号:220609);苏木素染液(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号:CR22002071);伊红染液(合肥博美生物科技有限责任公司,货号:YE2080);中性树胶(Biosharp 生物公司,货号:BL704A);PAS 染色液(武汉赛维尔生物技术有限责任公司,货号:CR2111178);PBS 冲洗液(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:ZLI-9062);DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司,货号:ZLI-9018);正常山羊血清(北京中杉金桥生物有限公司,货号:SP9002);5-HT1A(ABcam 公司,货号:ab85615);SP 一抗(北京博奥森生物技术公司,货号:Bs-0065r);VIP 一抗(Bioworld,货号:Bs07153);二抗(Servicebio,货号:GB23303);印度墨水 PH1714(PHYGENE,货号:20220712)。

转轮式切片机(德国徕卡,型号:徕卡-2016);脱水机(常州市中威电子仪器有限公司,型号:TSJ-II);包埋机(常州郊区中威电子仪器厂,型号:BMJ-III);高速低温组织研磨仪(武汉塞维尔科技有限公司,型号:KZ-III-F);病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司,型号:PHY-III);掌上离心机(美国 SCLOGEX,型号:S1010E);显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司,型号:BA410)。

1.2 方法

1.2.1 造模与分组

所有大鼠适应性饲养 1 周,随机分为空白组(16 只)和模型组(48 只)。模型组根据不同造模方法分为阳虚 STC 模型 1 组(M-1 组)、阳虚 STC 模型 2 组(M-2 组)、阳虚 STC 模型 3 组(M-3 组)。M-1 组采用 8 mg/kg 盐酸洛哌丁胺联合 20 mL/kg 0℃ 冰水灌胃造模法,两种药物灌胃间隔 1 h,每日 1 次,连续给药 45 d。M-2 组给予 8 mg/kg 盐酸洛哌丁胺联合 0.9 g/kg 大黄水煎液灌胃,两种药物灌胃中间间隔 1 h,每日 1 次,连续给药 45 d。M-3 组采用白醋与 0℃ 冰水交替灌胃 + 盐酸洛哌丁胺灌胃法建立模型:首次给予白醋剂量为每只 5 mL,第 2 天用 0℃ 冰水灌胃,第 3 天用 15 mL/kg 剂量的白醋灌胃,第 4 天用 0℃ 冰水灌胃,第 5 ~ 20 天均采用第 3、4 天的方法进行,第 21 天开始用 8 mL/(kg·d)的盐酸洛哌丁胺混悬液灌胃,连续给药 25 d,共给药 45 d。空白组给予蒸馏水灌胃,

单只 8 mL/(kg·d),每天灌胃 2 次,两次灌胃间隔 1 h,连续给药 45 d。

1.2.2 模型评估标准

根据《中医内科学》^[7]中便秘阳虚证候表现如下:大便秘结,倦怠乏力,畏寒肢冷、喜暖,腹胀纳

差,面色无华,舌质淡,体胖大,苔白润,脉沉迟。结合阳虚证临床表现,采集大鼠相应证候表现作为模型评价标准,具体见表 1。同时通过大鼠毛稀疏、反应迟钝、精神倦怠、喜静喜蜷缩、活动减弱、不欲饮食等表现观察阳虚证候。

表 1 大鼠阳虚证候表现采集内容

临床表现 Clinical manifestations	大鼠对应表现 Rat signs	模型评价指标 Evaluation index
畏寒肢冷、喜暖 Fear cold and like warm	大鼠体温 Body temperature of rats	肛温温度 Anal temperature
腹胀纳差 Bloating and tolerance	饮食情况 Eating state	进食量 Food intake
精神倦怠 Mental burnout	精神状态、运动情况 Mental state and exercise conditions	自主运动量 Voluntary exercise

1.2.3 大鼠一般情况及死亡率观察

造模期间观察大鼠粪质干湿情况,记录各组大鼠活动量、反应、蹠卧弓背、扎堆、掉毛、毛发枯黄、爪甲颜色变浅等脾肾阳虚表现及大鼠死亡数。

1.2.4 大鼠肛温测定

造模期间每周固定时间采用电子肛温仪测量各组大鼠的直肠温度并记录,结合大鼠蹠卧、弓背、扎堆情况评价是否出现“畏寒肢冷”的表现。

1.2.5 大鼠进食量测定

造模期间每周固定时间以笼为单位监测大鼠摄食量,计算各组大鼠日平均食量,计算方法如下:大鼠 24 h 进食量 = (每笼新加后饲料量 24 h 后剩余饲料量)/每笼鼠数,评价大鼠是否出现“纳差”表现。

1.2.6 大鼠自主活动量测定

造模期间每周固定时间于 13:00 进行旷场实验以测定各组大鼠自主活动量,实验室背景噪声控制在 65 dB 以下,旷场光照为全人工照明模拟白天环境,旷场规格为 100 cm × 100 cm × 40 cm,正上方 2 m 处放置数码摄像头,其视野可覆盖整个旷场内部,将大鼠置于场地内适应 5 min,实验开始后将大鼠迅速放置旷场中央,开启视频,每只大鼠测量时间为 5 min,每只大鼠记录水平运动总距离,结合喜静喜蜷缩、活动减弱情况评价大鼠“精神倦怠乏力”表现。测试结束后用乙醇清洁场地环境,待乙醇挥发后,再开始下一组^[6]。

1.2.7 粪便布里斯托性状(Bristol stool scale)评分

造模期间每周固定时间取各组大鼠粪便,根据以下标准进行 Bristol 评分:1 分:分散的硬块,似坚果;2 分:腊肠状,但成块;3 分:腊肠状,但表面有裂

缝;4 分:似腊肠或蛇,光滑柔软;5 分:软团,边缘清楚;6 分:绒状物,边缘不清,糊状便;7 分:水样,无固状物^[6]。

1.2.8 粪便含水率检测

造模期间每周固定时间取各组大鼠 24 h 粪便,先称其湿重,后放入干燥箱中烘干后称粪便干重,计算粪便含水率:(粪便湿重-粪便干重)/粪便湿重 × 100%^[8]。

1.2.9 首粒黑便排出时间检测

造模结束后各组随机选择 4 只大鼠,分别灌胃印度墨水(每只 2 mL),记录并计算从灌胃时间至首粒黑便排出的时间,计算首粒黑便排出时间:首粒黑便排出时间点-印度墨水灌胃时间点^[8]。

1.2.10 肠道推进率检测

各组大鼠分别于造模结束后禁食不禁水 12 h,随机选择 4 只大鼠灌胃印度墨水(每只 2 mL),2 h 后采用 20%乌拉坦麻醉,脱颈处死大鼠,迅速解剖取出肠道,用直尺记录幽门至回盲部总长度和墨汁在肠道中推进的距离(幽门到墨汁推进前端的距离)。按照“推进距离/幽门至回盲部总长度 × 100%”计算肠推进率^[9]。

1.2.11 HE 染色观察结肠病理变化

造模结束后采用 20%乌拉坦麻醉大鼠,脱颈处死后取结肠组织进行石蜡包埋。石蜡切片脱蜡至水,苏木精染色,自来水冲洗,盐酸乙醇分化 5 ~ 10 s,自来水冲洗后放入 50℃ 的温水中或弱碱性水溶液返蓝,直到出现蓝色为止;自来水冲洗后放入 85%的乙醇,伊红染色 3 ~ 5 min;水洗 3 ~ 5 s,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。采用 3DHISTECH(Hungary)生产的 Pannoramic 250 数字

切片扫描仪对切片进行图像采集,观察病变。

1.2.12 PAS 染色观察结肠粘液分泌变化

石蜡切片脱蜡至水,依次自来水洗和蒸馏水洗;加入高碘酸溶液,氧化 5 min;加入雪夫试剂,浸染 10 ~ 20 min;倾去雪夫试剂,流水冲洗 10 min;入苏木素染色液,染核 1 ~ 2 min;用盐酸分化液分化 2 ~ 5 s,水洗;用 Scott 蓝化液返蓝,水洗 3 min;逐级常规乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。采用麦克奥迪实业集团有限公司生产的 BA210Digital 数码三目摄像显微摄像系统对切片进行图像采集,观察病变。

1.2.13 ELISA 法检测结肠 5-HT、VIP、SP 表达

造模结束后采用 20%乌拉坦麻醉大鼠,后脱颈处死大鼠,从肛门上约 3 cm 处向上剪取约 3 cm 结肠组织,挤出残留粪便,立即用 0.9%氯化钠溶液清洗血液及杂物。取部分结肠组织准确称取质量,除去残留血液,按质量体积比 1:9 加入 PBS,使用组织研磨仪进行组织匀浆,匀浆液在 7250 r/min 条件下,离心 10 min,取上清液待测,常规 ELISA 法检测血清、结肠 5-羟色胺(5-hydroxy-tryptamine, 5-HT)、P 物质(substance P, SP)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)含量。

1.2.14 免疫组化检测结肠 5-HT、VIP、SP 表达

石蜡切片脱蜡至水,将切片浸入柠檬酸盐缓冲液(pH = 6.0),微波炉高火加热 10 min,停火 8 min,中高火再加热 10 min;冷却后,PBS 洗 3 次,每次 5 min 进行抗原修复。阻断内源性过氧化物酶后进行血清封闭;滴加一抗,4℃过夜;PBS 冲洗后滴加二抗;DAB 显色;配制新鲜的 DAB 显色液,滴加到组织上,室温显色,显微镜下控制显色时间,阳性为棕黄色,蒸馏水洗涤切片终止显色;复染细胞核后将切片依次置于 75%、85%、95%、无水乙醇、二甲苯中分别浸泡 10 min,中性树胶封片。使用显微摄像系统对切片进行图像采集,每张切片先于 100 倍下观察全部组织,再分别采集 200 倍及 400 倍显微图像。使用 Halo 数据分析系统计算每张图像阳性面积占比(% DAB positive tissue)。

1.3 统计学分析

各组数值均用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,采用 Graphpad prism 8.0 软件进行绘图。各组采用单因素方差分析,两两比较方差齐采用 LSD 法比较,方差不齐用 Tamhane's 比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

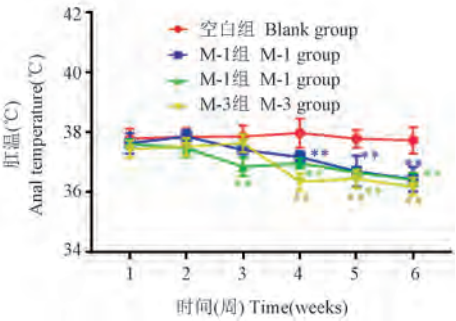
模型建立期间,空白组大鼠活动自如、反应迅速、抓爬有力、毛发光泽、胡须粗壮、饮食饮水正常、大小便正常。模型建立后各阳虚型 STC 模型组大鼠出现活动减少、反应迟缓、爪甲青紫、弓背蜷缩、毛发干枯脱落、大便先稀溏、而后干硬减少的表现。造模期间各组大鼠出现死亡,其中以 M-3 组大鼠死亡率最高,M-1 组大鼠死亡率最低(见表 2)。

表 2 各组大鼠死亡率($n = 16$)

组别 Groups	死亡数 Number of deaths	死亡率 Mortality rate
空白组 Blank group	2	13%
M-1 组 M-1 group	3	19%
M-2 组 M-2 group	4	25%
M-3 组 M-3 group	8	50%

2.2 各组大鼠肛温变化

造模期间空白组肛温无明显变化,与空白组相比,各造模组在造模期间肛温开始呈现下降趋势,M-1 组在造模第 4 周开始肛温明显下降($P < 0.05$),M-2 组在造模第 3 周开始肛温明显下降($P < 0.01$),M-3 组在造模第 4 周开始肛温明显下降($P < 0.01$),具体见图 1。



注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 1 各组大鼠肛温比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

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

Figure 1 Comparison of rectal temperature of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.3 大鼠进食量变化

造模期间,空白组大鼠进食量无明显变化。与

空白组相比,各造模组进食量呈现下降趋势,其中 M-1 组、M-2 组在造模第 3 周进食量明显降低($P < 0.01$),M-3 组在造模第 2 周进食量明显降低($P < 0.01$),具体见图 2。

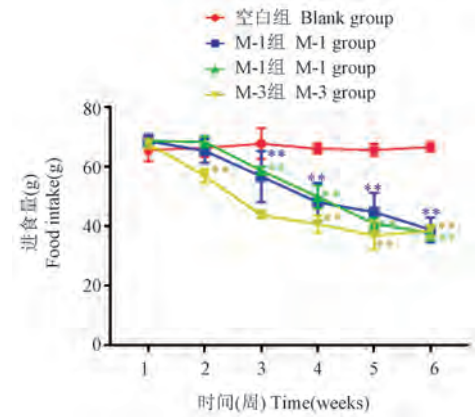


图 2 各组大鼠进食量比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Figure 2 Comparison of food intake of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.4 大鼠自主活动量情况比较

造模期间,空白组大鼠自主运动量无明显变化。与空白组相比,各造模组自主运动量呈现下降趋势,其中 M-1 组、M-2 组在造模第 3 周自主运动量明显降低($P < 0.01$),M-3 组在造模第 1 周自主运动量明显降低($P < 0.01$),具体见图 3。

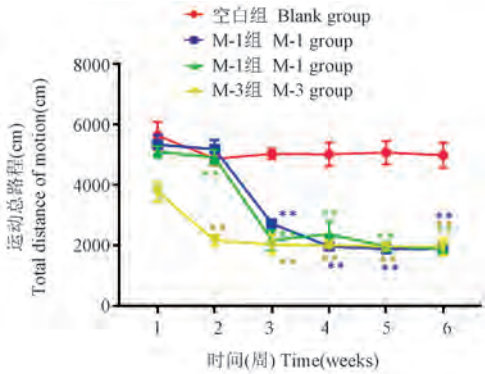


图 3 各组大鼠自主活动量比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Figure 3 Comparison of autonomous activity of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.5 各组粪便布里斯托性状 (Bristol stool scale) 评分变化

Bristol 评分用于评估肠道准备期间肉眼观察下的粪便性状,造模期间空白组大鼠粪便 Bristol 评分无明显变化,M-1 组大鼠粪便 Bristol 评分呈现先升高后下降的趋势,M-2 组、M-3 组大鼠粪便 Bristol 评分呈现下降趋势。与空白组比较,M-1 组、M-2 组大鼠粪

便 Bristol 评分在造模第 2 周明显升高($P < 0.01$),M-1 组、M-3 组大鼠粪便 Bristol 评分在造模第 5 周明显降低($P < 0.01$),M-2 组大鼠粪便 Bristol 评分在造模第 6 周明显降低($P < 0.01$)(见图 4)。

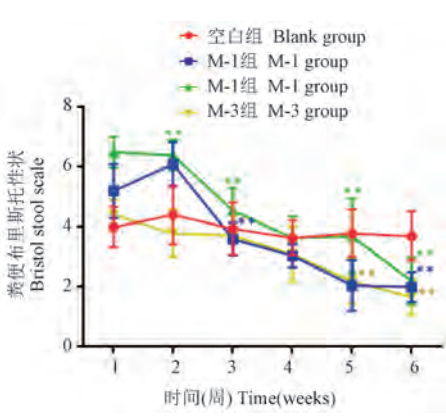


图 4 各组大鼠粪便性状评分比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Figure 4 Comparison of Bristol stool scale of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.6 各组大鼠粪便含水率变化

造模期间空白组大鼠粪便含水率无明显变化,M-1 组、M-2 组大鼠粪便含水率呈现先升高后下降的趋势,M-3 组大鼠粪便含水率呈现下降趋势。与空白组比较,M-1 组在造模 1 ~ 2 周粪便含水率明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),在造模第 4 周明显下降($P < 0.01$);M-2 组在造模 1 ~ 4 周粪便含水率升高($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$),在造模第 6 周明显下降($P < 0.01$);M-3 组大鼠粪便含水率在造模第 2 周明显降低($P < 0.01$)(见图 5)。

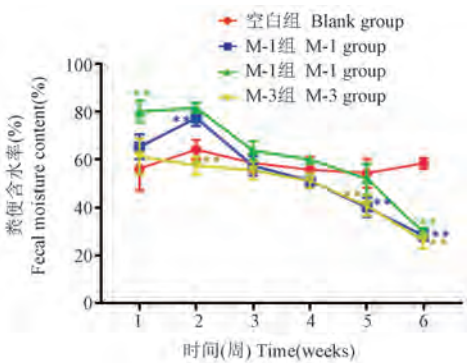


图 5 各组大鼠粪便含水率比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Figure 5 Comparison of fecal moisture content of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.7 各组大鼠首粒黑便排出时间、肠推进率变化

与空白组相比,造模后各造模组大鼠鼠黑便排出时间明显增加($P < 0.01$)。与空白组相比,造模

后各造模组大鼠肠道推进率明显降低($P < 0.01$) (见图 6)。

2.8 各组大鼠结肠病理变化

HE 染色结果显示,造模后,空白组大鼠结肠组织黏膜层、黏膜下层、肌层及浆膜层结构较完整;黏膜表面被覆单层柱状上皮,柱状上皮细胞形态正常,未见明显病理改变。各模组大鼠偶见结肠黏膜上皮细胞脱落、黏膜固有层变性坏死、黏膜固有层炎性细胞浸润及杯状细胞数量减少等病理改变,90%大鼠结肠未见明显病理改变(见图 7)。

2.9 各组大鼠结肠黏液层厚度变化

通过 PAS 染色发现,造模后,与空白组相比,各模组黏液层厚度明显减少,差异具有统计学意义

($P < 0.01$) (见图 8、图 9)。

2.10 各组大鼠结肠 5-HT、VIP、SP 含量变化

ELISA 检测结果显示,与空白组比较,造模后各模组大鼠结肠 5-HT、SP 浓度明显降低,VIP 浓度明显升高,差异具有显著性($P < 0.01$),其中以 M-1 组 5-HT、SP 浓度最低,VIP 浓度最高(见表 3)。

2.11 各组大鼠结肠 5-HT、VIP、SP 表达变化

免疫组化检测结果显示,与空白组比,各造模组大鼠结肠 5-HT、SP 蛋白表达降低,具有统计学意义($P < 0.05$)。与空白组相比,M-1 组大鼠肠道 VIP 蛋白表达明显升高,具有统计学意义($P < 0.05$),M-2 组、M-3 组大鼠肠道 VIP 蛋白表达升高,但不具有统计学意义($P > 0.05$) (见表 4,图 10)。

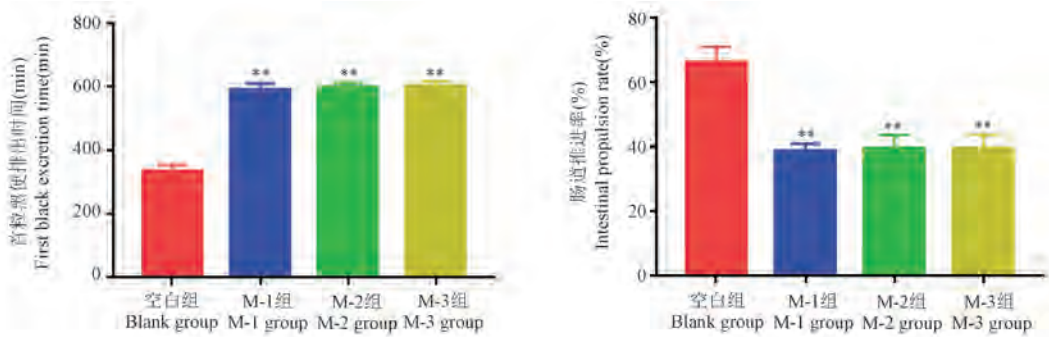


图 6 各组大鼠肠道动力学比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Figure 6 Comparison of intestinal motility of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

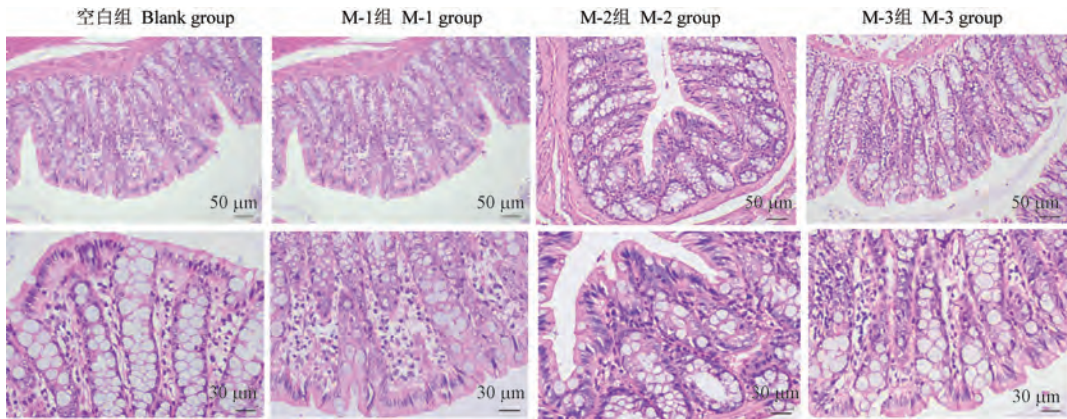


图 7 各组部分大鼠结肠 HE 染色
Figure 7 HE staining of colon of rats in each group

表 3 各组大鼠结肠 5-HT、VIP、SP 含量($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Contents of 5-HT, VIP and SP in colon of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	5-HT(ng/mL)	VIP(pg/mL)	SP(ng/mL)
空白组 Blank group	3.62 ± 0.18	6.73 ± 1.07	9.12 ± 0.86
M-1 组 M-1 group	1.22 ± 0.31 **	15.15 ± 1.24 **	5.37 ± 0.49 **
M-2 组 M-2 group	1.54 ± 0.25 **	8.47 ± 0.98 **	6.02 ± 0.68 **
M-3 组 M-3 group	1.38 ± 0.13 **	7.33 ± 1.12 **	5.88 ± 0.49 **

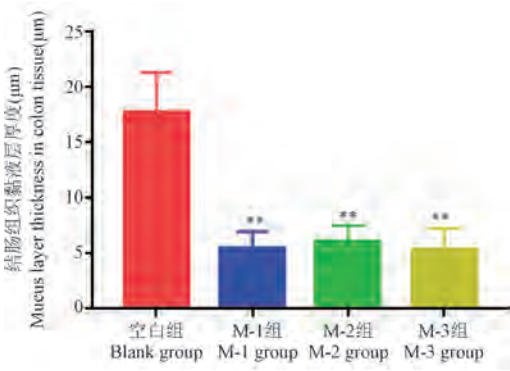


图 8 各组大鼠结肠组织黏液层厚度变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Figure 8 Changes of mucus layer thickness in colon tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

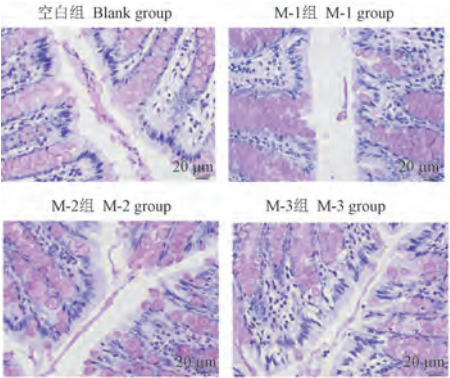


图 9 各组大鼠部分结肠 PAS 染色

Figure 9 PAS staining was performed in part of the colon of rats in each group

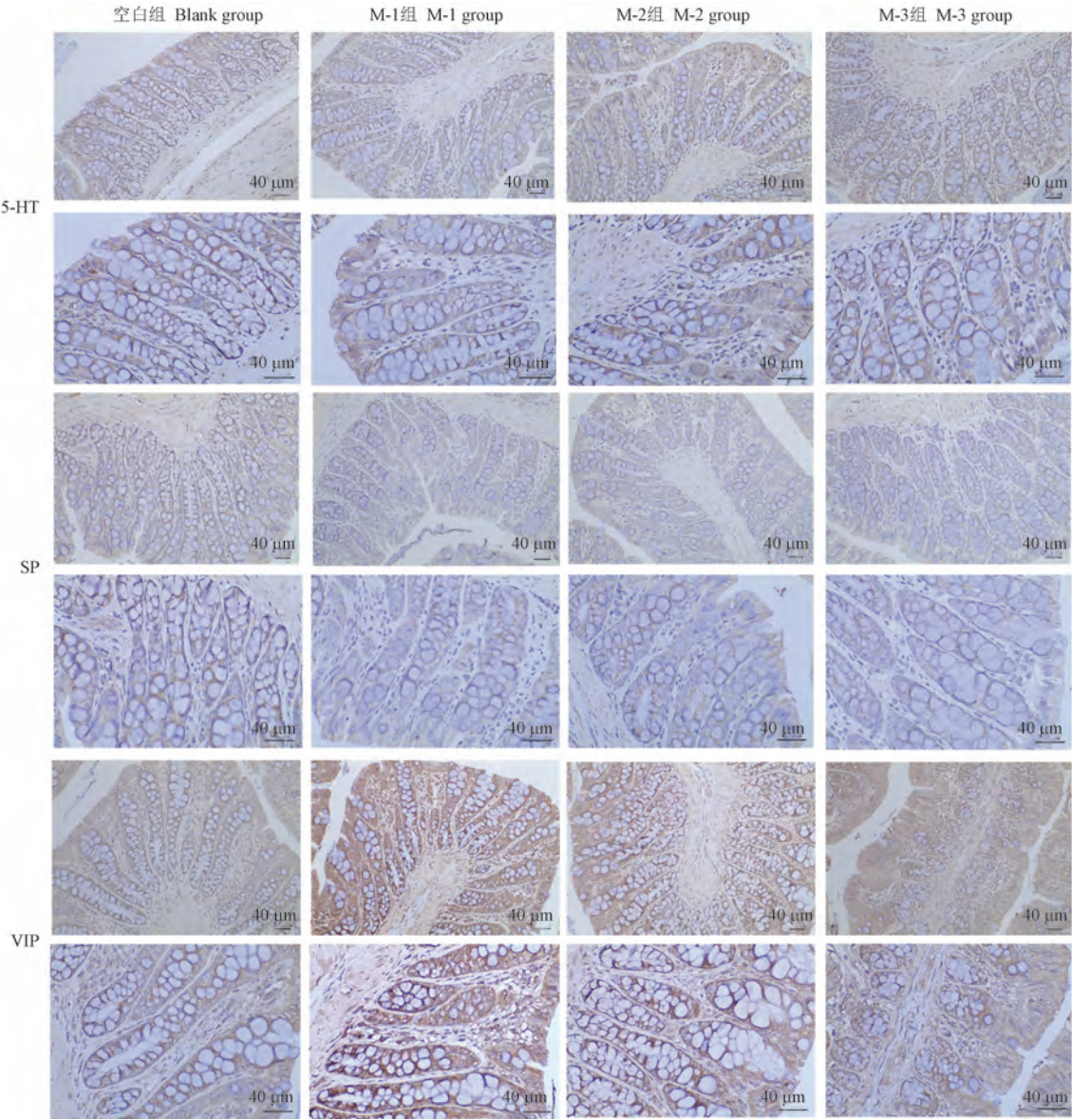


图 10 各组大鼠结肠 5-HT、SP 和 VIP 表达

Figure 10 Expression of 5-HT, SP and VIP in colon of rats in each group

表 4 各组大鼠结肠 5-HT、SP、VIP 表达($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Expression of 5-HT, SP and VIP in colon of rats in

组别 Groups	each group($\bar{x} \pm s, n = 4$)		
	阳性面积占比(%) DAB positive tissue(%)		
	5-HT	VIP	SP
空白组 Blank group	7.74 $\pm$ 0.87	4.86 $\pm$ 0.58	4.39 $\pm$ 1.40
M-1 组 M-1 group	5.38 $\pm$ 0.65 *	9.05 $\pm$ 4.09 **	2.42 $\pm$ 0.41 *
M-2 组 M-2 group	5.96 $\pm$ 1.21 *	5.86 $\pm$ 1.63	2.54 $\pm$ 0.40 *
M-3 组 M-3 group	5.21 $\pm$ 1.39 *	5.29 $\pm$ 1.31	2.33 $\pm$ 0.98 **

3 讨论

STC 是由各种非器质原因导致结肠动力减弱,内容物在结肠中传输缓慢而引起的排便困难^[9]。STC 属于中医学“便秘”范畴,临床上阳虚型为常见证型。现有研究存在多种阳虚型 STC 动物模型的建立方法^[4-6],本研究从病证结合动物模型制备角度,以中医学理论为基础,将现代医学的疾病复制到模型动物中,将模型动物置于致病因素中,将中医“证”的临床表现复制于动物模型上^[10-12],以期体现中医学的特点。本实验所选择的 3 个造模方法分别采用不同寒凉饮食/药物联合盐酸洛哌丁胺复制阳虚型 STC 大鼠模型。盐酸洛哌丁胺是临床上常用抗腹泻药物,是 μ -阿片受体的激动剂,可阻止乙酰胆碱和前列腺素的释放,从而抑制肠道水分分泌减缓肠道蠕动并延长其内容物通过时间^[13-14],盐酸洛哌丁酸符合临床 STC 患者的生理病理特点,可诱导便秘动物模型,是目前公认的 STC 模型制备药物^[15]。各造模组在采用盐酸洛哌丁胺的同时,各组分别联合不同的寒凉饮食物灌胃,拟建立 STC 的阳虚证型。临床研究表明阳虚证 STC 患者多由于劳累耗气或贪凉饮冷,过度使用寒凉药物,特别滥用泻剂及大黄、芒硝等苦寒泻下药物,导致脾肾阳气虚弱,阳虚则肠道失于温煦,阴寒内结,便下无力,使排便时间延长,形成便秘。病机主要在于下焦阳虚、大肠推导无力、阴寒凝滞而致糟粕不行,具有病程长、发病缓慢的特点^[16]。本实验 M-1 组采用盐酸洛哌丁胺联合 0℃ 冰水灌胃法、M-2 组采用盐酸洛哌丁胺联合大黄水煎液灌胃法、M-3 组采用白醋与 0℃ 冰水交替灌胃 + 盐酸洛哌丁胺灌胃法,各组造模时间均在 45 d,符合阳虚型 STC 的病因病机及临床特点。实验结果显示,造模前后空白组大鼠活动自如、反应迅速、抓爬有力、毛发光泽、胡须粗壮、饮

食饮水正常、大小便正常,而各造模组大鼠在造模后均出现精神萎靡、倦怠懒动、爪甲青紫、弓背蜷缩等畏寒怕冷等表现,以及肛温下降、饮食量减少、自主活动量减少,符合中医阳虚证临床表现,同时各模型组大鼠均出现首粒黑便排出时间增加、肠道推进率显著下降、粪便含水率减少表现,与现有研究结果一致^[17],表明 3 种造模方式均能够成功复制阳虚型 STC 大鼠模型。

本实验在研究过程中发现,虽然 3 种方法均能成功复制阳虚型 STC 大鼠模型,但在中医学相应证候表现和西医学病症出现时间及稳定性上有一定差异。实验结果表明,M-1 组、M-2 组在 3 ~ 4 周出现阳虚证候表现,M-3 组在第 1 周即出现阳虚证候表现,但自主运动量在第 3 ~ 4 周有小幅升高,提示 M-3 组阳虚证候表现出现时间早,但证候表现不稳定。M-1 组、M-2 组阳虚证候出现时间晚于 M-3 组,但证候表现稳定,无明显波动。在西医病症表现上,M-1 组大鼠在造模第 1 ~ 2 周粪便 Bristol 评分、粪便含水率明显升高,造模第 4 周粪便含水率明显下降,第 5 周粪便 Bristol 评分明显降低;M-2 组大鼠在造模第 1 ~ 2 周粪便 Bristol 评分明显升高,在造模第 1 ~ 4 周大鼠粪便含水率明显升高,在第 6 周粪便 Bristol 评分和含水率明显降低。以上实验结果提示 M-1、M-2 组大鼠粪便呈现先稀后干的趋势,可能是由于灌胃 0℃ 冰水和大黄水煎液导致的,而在持续造模过程中 M-1 组粪质变干早于 M-2 组。M-3 组大鼠造模前期粪质无明显改变,粪质变干时间和 M-1 组一致。造模第 6 周各造模组大鼠首粒黑便排出时间明显增加、肠道推进率明显降低,其中以 M-1 组大鼠首粒黑便排出时间最长、肠道推进率最低。此外,实验过程中显示在 3 种造模方式下,M-3 组大鼠死亡率最高,其次为 M-2 组,死亡率最低为 M-1 组,对死亡大鼠解剖后发现 M-3 组死亡大鼠均有不同程度的肠道胀气、胃出血、肺淤血现象,而 M-1 组、M-2 组死亡大鼠未出现异常病理发现。以上结果提示在 3 种造模方式中,以盐酸洛哌丁胺联合 0℃ 冰水灌胃(M-1 组)法建立的阳虚型 STC 大鼠模型具有死亡率低,中医阳虚证较为稳定,干硬粪便出现时间较早且结肠动力障碍表现明显的优点。

现有研究表明 STC 没有结肠器质性和结构改变^[18-19],肠道运输能力降低、结肠传输时间延长是其主要病理特点,神经递质作为胃肠道神经和胃肠

道平滑肌的中介介质,在调节肠动力中发挥重要作用,如 5-HT、VIP、SP 等。5-HT 具有调节胃肠道动力及肠道细胞分泌的功能,研究显示 STC 大鼠结肠 5-HT 表达降低^[20]。SP 是胃肠道的兴奋性神经递质,具有收缩平滑肌、促进肠道蠕动的的作用,研究显示 STC 患者血清 SP 含量降低^[21]。VIP 属于肽能神经递质之一,具有舒张平滑肌而减慢结肠运动的作用^[22],属于抑制性神经递质,其含量高低与结肠动力呈负相关。研究显示 STC 大鼠 VIP 表达升高^[8]。本实验通过对各组大鼠结肠 HE 染色发现,各造模组大鼠结肠未见明显病理改变,与现有研究结果一致,提示 3 种造模方式未对大鼠结肠造成器质性损伤。但对结肠 PAS 染色发现,各造模组大鼠黏液层厚度明显减少,排序依次为 M-3 < M-1 < M-2,但三者并无统计学差异,结合各组大鼠粪便含水率及粪便性状评分结果,提示 3 种造模方法均能造成大鼠结肠黏液分泌降低而出现粪质干硬的表现。本实验进一步对各造模组大鼠结肠 5-HT、VIP、SP 检测发现,各造模组 5-HT、SP 表达明显降低,排序依次为 M-3 < M-1 < M-2。各造模组 VIP 表达虽有升高,但以 M-1 组升高明显,其余两组变化无统计学意义。提示 3 种造模方式均能在不同程度上造成大鼠肠道动力障碍的病理变化,但以盐酸洛哌丁胺联合 0℃冰水灌胃(M-1 组)法建立的阳虚型 STC 大鼠结肠动力传输障碍的病理变化最为显著。

综上所述,本研究在病证结合评价方法的基础上,对在 3 种阳虚型 STC 大鼠造模方式进行对比研究,发现以盐酸洛哌丁胺联合 0℃冰水灌胃(M-1 组)法建立的大鼠模型具有死亡率低、安全性较好,阳虚证候稳定,大便性状改变明显,肠道动力障碍病理变化显著的优点,可作为阳虚型 STC 发病机制及相关中医药药物作用实验研究的理想模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Patton V, Balakrishnan V, Pieri C, et al. Subtotal colectomy and ileorectal anastomosis for slow transit constipation: clinical follow-up at Median of 15 years [J]. Tech Coloproctol, 2020, 24(2): 173-179.
- [2] 彭军良,姚向阳,陆金根,等.益气开秘方治疗气阴两虚型慢传输型便秘的临床研究[J].上海中医药杂志,2018,52(11): 50-53.
- Peng JL, Yao XY, Lu JG, et al. Clinical study on Yiqi Kaimi Formula in the treatment of slow transit constipation with syndrome of qi and yin deficiency [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2018, 52(11): 50-53.
- [3] 黄璇.慢传输型便秘与出口梗阻型便秘的中医证型分布研究[J].内蒙古中医药,2016,35(2): 159-160.
- Huang X. Study on TCM syndrome distribution of Slow transit constipation and Outlet obstruction constipation [J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med, 2016, 35(2): 159-160.
- [4] 蔡华艳.麻子仁丸和济川煎对阴虚证和阳虚证 STC 大鼠模型干预的实验研究[D].北京:北京中医药大学;2013.
- Cai HY. Experimental study on intervention of Maziren pill and Jichuan decoction on STC rat model with syndrome of Yin deficiency and Yang deficiency [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2013.
- [5] 王岚,彭成,郭力.附子大黄配伍对阳虚便秘动物的治疗作用及其机制研究[J].中国中西医结合消化杂志,2006,14(2): 82-85.
- Wang L, Peng C, Guo L. Experimental study on compatibility of Radix et Rhizoma Rhei and Radix Aconiti Lateralis Praeparata in mice or rats with constipation of yang-deficiency type [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2006, 14(2): 82-85.
- [6] 杜丽东,任远,牛亭惠,等.3 种模拟中医体征的体虚便秘大鼠模型建立及效果观察[J].中国应用生理学杂志,2017,33(2): 140-145.
- Du LD, Ren Y, Niu TH, et al. Establishment and effect observation on three kinds of Ti-Xu with constipation rat models [J]. Chin J Appl Physiol, 2017, 33(2): 140-145.
- [7] 吴勉华,石岩.中医内科学[M].北京:中国中医药出版社;2021.
- Wu MH, Shi Y. Internal medicine of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: Traditional Chinese Medicine Publishing; 2021.
- [8] 路越.化瘀通便汤对慢传输型便秘大鼠 PI3K/Akt/eNOS 信号通路及血管活性肽的影响[J].山东中医药大学学报,2020,44(4): 429-433.
- Lu Y. Effect of Huayu Tongbian Decoction on PI3K/Akt/eNOS signal pathway and vasoactive peptide in rats with slow transit constipation [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2020, 44(4): 429-433.
- [9] 刘春强,黄业保.六磨汤对慢传输型便秘大鼠结肠肌电及肌间神经丛内一氧化氮合成酶的影响[J].时珍国医国药,2019,30(4): 808-810.
- Liu CQ, Huang YB. Effects of Liumo decoction on colonic electromyography and Intramuscular nerve plexus-nitric oxide synthase in slow transit Constipation rat model [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(4): 808-810.
- [10] 黄烨,殷惠军,陈可冀.病证结合的基础研究[J].中国中西医结合杂志,2012,32(3): 299-303.
- Huang Y, Yin HJ, Chen KJ. Basic research on the combination of disease and syndrome [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2012, 32(3): 299-303.
- [11] 李中锋,王雨榕,邓强,等.脾肾阳虚型骨质疏松症动物模型造模方法及模型评价[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(12): 4476-4482.
- Li ZF, Wang YR, Deng Q, et al. Methods and evaluation of animal model of osteoporosis with spleen-kidney Yang deficiency

- [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2021, 23(12): 4476-4482.
- [12] 苗明三, 马林纳, 彭孟凡, 等. 中医药动物模型研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 141-146.
Miao MS, Ma LN, Peng MF, et al. Animal model research and applications intraditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 141-146.
- [13] Wang L, Hu L, Xu Q, et al. Bifidobacterium adolescentis exerts strain-specific effects on constipation induced by loperamide in BALB/c mice [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 318.
- [14] Hughes S, Higgs NB, Turnberg LA. Loperamide has antisecretory activity in the human jejunum *in vivo* [J]. Gut, 1984, 25(9): 931-935.
- [15] 郭莎, 张娟娟, 梁兴禹, 等. 基于数据挖掘及动物实验探讨维持洛哌丁胺诱导便秘小鼠模型稳定性的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 47-56.
Guo S, Zhang JJ, Liang XY, et al. Stability of mouse models of loperamide-induced constipation based on data mining and animal experiments [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 47-56.
- [16] 赵雨欣, 刘海慧, 梁超. 功能性便秘“久秘必温”论 [J]. 陕西中医药大学学报, 2018, 41(3): 8-9, 18.
Zhao YX, Liu HH, Liang C. On functional constipation “Keeping secret for a long time will keep warm” [J]. J Shaanxi Univ Chin Med, 2018, 41(3): 8-9, 18.
- [17] 王萍, 方晓艳, 苗明三. 基于中西医临床病证特点的便秘动物模型分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20): 200-205.
Wang P, Fang XY, Miao MS. Analysis of animal model of constipation based on the characteristics of clinical diseases and syndromes of traditional Chinese and western medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(20): 200-205.
- [18] Jeong JJ, Choi MG, Cho YS, et al. Chronic gastrointestinal symptoms and quality of life in the Korean population [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(41): 6388-6394.
- [19] Jun DW, Park HY, Lee OY, et al. A population-based study on bowel habits in a Korean community: prevalence of functional constipation and self-reported constipation [J]. Dig Dis Sci, 2006, 51(8): 1471-1477.
- [20] 贡钰霞, 王浩, 侯毅, 等. 大剂量生白术配伍枳实对慢传输型便秘大鼠结肠 5-HT₃R、5-HT₄R 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(8): 988-992.
Gong YX, Wang H, Hou Y, et al. Effects of large dose of raw *Atractylodes macrocephala* and fructus aurantii Immaturus on the expression of 5-HT₃R and 5-HT₄R in colon of rats with slow transit constipation [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2019, 39(8): 988-992.
- [21] 张喻然, 王波. 济川煎加味联合腹针对慢传输型便秘(脾肾阳虚型)疗效及对血清 SP 和 NO 水平的干预影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(3): 238-242.
Zhang YR, Wang B. Therapeutic effect of Jichuan Decoction combined with abdominal acupuncture on slow transit constipation (spleen and kidney Yang deficiency type) and its intervention effect on serum SP and NO levels [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2018, 26(3): 238-242.
- [22] Black CJ, Ford AC. Chronic idiopathic constipation in adults: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and clinical management [J]. Med J Aust, 2018, 209(2): 86-91.

[收稿日期] 2023-01-20

郭默然,贾晓琼,杜娟,等. 塞来昔布和己酮可可碱对小鼠 Lewis 肺癌的抑瘤作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 629-634.

Guo MR, Jia XQ, Du J, et al. Anti-tumor effects of celecoxib and pentoxifylline on Lewis lung carcinoma in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 629-634.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.009

塞来昔布和己酮可可碱对小鼠 Lewis 肺癌的抑瘤作用研究

郭默然^{1*}, 贾晓琼², 杜娟², 张劭然¹, 官家玉²

(1. 河北医科大学第二医院, 石家庄 050000; 2. 河北森朗生物科技有限公司, 石家庄 050000)

【摘要】 目的 通过研究塞来昔布和己酮可可碱对小鼠 Lewis 肺癌细胞的抑瘤作用, 探讨联合用药的作用机制。**方法** 建立小鼠皮下移植 Lewis 肺癌模型, 分为对照组和实验组, 分别给予溶剂或塞来昔布和己酮可可碱, 测量小鼠肿瘤大小, 观察塞来昔布和己酮可可碱对小鼠肿瘤的抑制作用; 通过免疫组化观察病理学的变化, 通过 Western Blot 法检测 COX-2、Bid、Caspase-9 等蛋白的表达水平。**结果** 塞来昔布和己酮可可碱对小鼠 Lewis 肺癌具有一定的抑瘤作用, 实验组生存中位数也高于对照组, 与抑制血管生成及诱导 LLC 肿瘤细胞凋亡相关。**结论** 塞来昔布和己酮可可碱联合使用可以通过抑制血管生成及诱导肿瘤细胞凋亡来抑制 Lewis 肺癌肿瘤生长。

【关键词】 塞来昔布; 己酮可可碱; Lewis 小鼠肺癌细胞; 抑瘤作用

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0629-06

Anti-tumor effects of celecoxib and pentoxifylline on Lewis lung carcinoma in mice

GUO Moran^{1*}, JIA Xiaoqiong², DU Juan², ZHANG Shaoran¹, GONG Jiayu²

(1. the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China.

2. Hebei Senlang Biological Technology Co., Ltd., Shijiazhuang 050000)

Corresponding author: GUO Moran. E-mail: guowanpiaopeng0823@163.com

【Abstract】 Objective To study the anti-tumor effects and mechanisms of celecoxib and pentoxifylline on Lewis lung carcinoma (LLC) in mice. **Methods** Mouse tumor models were established by subcutaneously injecting cultured LLC cells, which were divided into two groups. The control group was administered solvent, and the experimental group was administered celecoxib and pentoxifylline. The tumor size and volume were measured twice a week to observe the tumor inhibitory effect of celecoxib and pentoxifylline. Pathological changes were observed by immunohistochemistry, and the expression levels of COX-2, Bid and Caspase-9 proteins were measured by Western Blot. **Results** Celecoxib and pentoxifylline had an inhibitory effect on LLC in mice. The median survival of the experimental group was higher than that of the control group, which was related to inhibition of angiogenesis and induction of LLC cell apoptosis. **Conclusions** Combined celecoxib and pentoxifylline inhibited LLC growth in mice by suppressing angiogenesis and inducing tumor cell apoptosis.

【Keywords】 celecoxib; pentoxifylline; Lewis lung carcinoma cells; anti-tumor effect

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

【基金项目】 河北省自然科学基金 (H2020206390), 河北医学科学研究课题 (20200880)。

Funded by the Natural Science Foundation of Hebei Province (H2020206390), Hebei Medical Science Research Project (20200880).

【作者简介】 郭默然 (1986—), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向: 神经病学研究。Email: guowanpiaopeng0823@163.com

肺癌的死亡率和发病率在所有癌症中位居前列^[1-2],其中非小细胞肺癌(nonsmall-cell lung cancer, NSCLC)约占所有肺癌的 85%。虽然目前有手术、放化疗及靶向治疗等多种手段,但是Ⅲ期及以上的 NSCLC 五年生存率仅为 30% ~ 40%^[3]。因此,寻找提高治疗有效性的新方法仍然是一项紧迫的科学和医学挑战。

环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是环氧合酶的一种诱导酶,近些年来通过研究发现 COX-2 可诱导肿瘤血管的生成,促进肿瘤细胞的增殖并抑制凋亡、增加侵袭力,在肿瘤的发生发展、转移中起重要的促进作用^[4]。塞来昔布(Celecoxib)作为新一代高选择性 COX-2 抑制剂,具有诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管形成和增强放、化疗敏感性等抗肿瘤效应,最近已通过 FDA 批准用于家族性肠癌息肉的辅助治疗^[5]。但是临床试验中,在标准辅助化疗中加入 Celecoxib 治疗 3 年并无显著提高无病生存率^[6]。己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)是一种甲基黄嘌呤衍生物,可降低血液和血浆黏度、血浆纤维蛋白原,并能通过增强红细胞的扩张性和减少中性粒细胞的活化来改善血液在组织中的通透性^[7]。目前,有报道证实 PTX 能够通过抑制 c-Rel 转录因子的功能延迟黑色素瘤的生长^[8]。目前,有关 Celecoxib 和 PTX 联合使用能否抑制肿瘤的生长未见报道。

肺癌皮下移植瘤模型具有简便、可重复性高、方便观察肿瘤大小等优点,是目前运用最为广泛的动物模型。因此,本文中在皮下植入的 Lewis 肺癌(LLC)模型小鼠上,探索 Celecoxib 和 PTX 联合用药能否增强对其抑瘤作用及机制,为临床寻找治疗肺癌的新药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本实验中使用的 24 只 SPF 级的 C57BL/6J 小鼠,雌雄不限,6 ~ 8 周龄,体重约为 20 ~ 25 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。室内温度控制在 20 ~ 25℃,湿度控制在 40% ~ 70%,光暗循环为 12 h/12 h,换气次数由 IVC 主机控制为每小时 10 ~ 20 次,在整个实验过程中观察小鼠的繁殖和生长情况状况,饲养于河北医科大学第二医院 SPF 级动物饲养间【SYXK

(冀)2021-003】。所有操作均符合河北医科大学第二医院实验伦理要求(2020-R155)。

1.1.2 细胞株

Lewis 小鼠肺腺癌株细胞(LLC,购自中国科学院干细胞库)。LLC 细胞株使用含 10%胎牛血清和 1%青链霉素的高糖 DMEM 培养基,5% CO₂、37℃ 条件下进行培养传代^[8]。

1.1.3 主要试剂与仪器

己酮可可碱和塞来昔布购自 sigma、高糖 DMEM 购自美国 Gibco、青链霉素混合液购自北京索莱宝科技有限公司、胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司,其他生化试剂购自 Sigma。CO₂ 培养箱(美国 Thermo371 型)、超低温冰箱(日本 SANYO 公司)、倒置荧光显微镜(日本 Olympus)、自动包埋机、切片机均为河北医科大学第二医院神经病学实验室所有。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

取出细胞在 37℃ 的浴锅中解冻,完全解冻后放入超净工作台,用吸管移至离心管中,1000 r/min 离心 5 min 去上层冻存液,加入 1 mL 的培养基重悬,吸至已加入 4 mL 培养基的培养瓶中,培养 24 h 后在荧光显微镜下观察该细胞的形态。在荧光显微镜下观察到细胞融合度达 80% ~ 90% 时,进行传代。加入 0.25%胰蛋白酶恒温培养箱中消化,移至 15 mL 离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃掉上清后加入 5 mL 培养基,制备细胞悬液。

1.2.2 构建皮下 LLC 肺癌小鼠模型及分组

选择周龄 6 ~ 8 周、体型大小近似的小鼠,在皮下注射约 2×10^6 个培养好的 LLC 细胞悬液^[9]。在建模 2 周后测量肿瘤的长度(L)和宽度(W),根据公式:体积(V) = $0.5 \times L \times W^2$ 计算肿瘤体积^[10]。依此将构建的模型小鼠分为对照组和实验组($n = 12$),每组肿瘤平均大小为 130 ~ 140 mm³。对照组给予 PBS 溶液(溶剂);实验组 12 只小鼠口服 Celecoxib(75 mg/kg)及腹腔注射 PTX(60 mg/kg),药物浓度基于参考文献选择^[10-11],每周对小鼠的肿瘤测量 2 次并计算其体积,整理并记录。

1.2.3 取材及免疫组织化学染色

实验小鼠给药完成 2 周后,从对照组和实验组中分别选取 3 只小鼠解剖取出肿瘤,称重测量其体积,之后用于蛋白提取。分别从对照组和实验组选取 3 只小鼠使用 4%多聚甲醛进行灌注,取出肿瘤

置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h。梯度乙醇脱水后,石蜡包埋切片,烤片脱蜡后用于 HE 染色和免疫组织化学染色。染色方法参考苏木素-伊红(HE)染色试剂盒免疫组化试剂盒使用说明书。对每组剩下的小鼠($n = 6$)进行生存期观察。

1.2.4 Western Blot

从处死的小鼠中收集对照组及处理组的肿瘤并转移至试管中,使用总蛋白质提取试剂盒提取蛋白质,通过 SDS-PAGE 胶分离,然后转移到 PVDF 膜上。将膜与一抗在 4℃ 孵育 12 h,洗涤 3 次,持续 15 min,然后与二抗在 37℃ 孵育 1 h。在 Odyssey 红外成像系统(LI-COR,NE)上进行扫描分析及定量。

1.3 统计学方法

数据的统计处理采用 GraphPad Prism5 软件分析,Western Blot 结果用 Image-Pro Plus 5.1 分析灰度值。对照组和实验组的肿瘤体积比较采用 Student's t 检验,生存期比较用 Log-rank 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺癌 LLC 细胞生长状态良好

利用光学显微镜观察细胞生长状态,LLC 细胞镜下可见不规则多边形、条索状贴壁生长,轮廓清楚,生长旺盛,折光率高(图 1)。

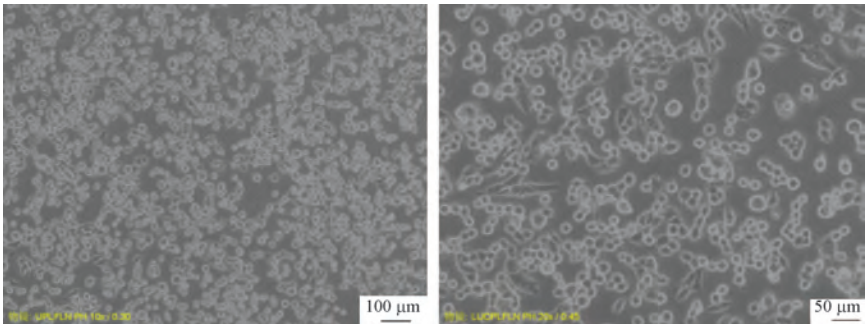
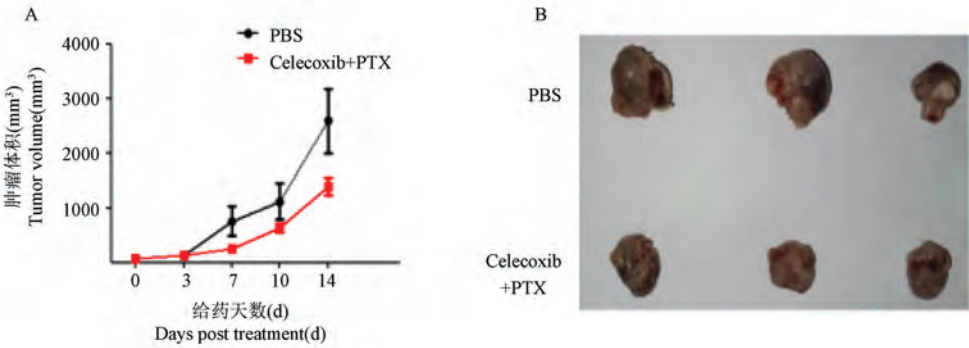


图 1 光学显微镜观察细胞生长状态
Figure 1 Light microscope observation of cell growth state

2.2 Celecoxib 和 PTX 联合使用能够延缓 LLC 肿瘤的生长

造模前 1 周,小鼠皮毛光亮滑顺,精神状态良好。造模 1 周左右,接种部分出现瘤块,随着肿瘤逐渐增大,部分小鼠出现行动迟缓、皮毛失去光泽、形体消瘦等症状,后期小鼠因肿瘤体积较大,出现行动不便、形体消瘦等现象。

在建模 2 周后测量计算肿瘤体积进行分组,每组肿瘤平均为 $130 \sim 140 \text{ mm}^3$,对照组和实验组分别给予 PBS 或 Celecoxib 和 PTX 联合治疗。每周测量 2 次肿瘤大小,计算体积,绘制肿瘤生长曲线。给药 14 d 时,与对照组肿瘤比,实验组明显小于对照组(图 2)。Celecoxib 和 PTX 联合使用能够有效延缓 LLC 肿瘤的生长。



注:A:肿瘤体积变化;B:3 组最大肿瘤。
图 2 Celecoxib 和 PTX 抑制小鼠 LLC 肿瘤的生长

Note. A. Tumor volume changes. B. The largest tumors in three groups.
Figure 2 Treatment of Celecoxib and PTX inhibit LLC tumor growth in mice

2.3 Celecoxib 和 PTX 联合使用能够有效延长 LLC 荷瘤小鼠的生存期

对照组和实验组的 LLC 荷瘤小鼠生存期进行统计,即小鼠肿瘤最大直径达到 20 mm 或者其自然死亡(两个条件满足其一,即认为达到实验终点)。对照组小鼠的中位生存期为 13 d,实验组小鼠的中位生存期为 21.5 d(图 3),延长 8.5 d($P = 0.0146$)。实验结果证实 Celecoxib 和 PTX 能够减缓 LLC 小鼠肿瘤的生长,有效延长 LLC 荷瘤小鼠的生存期。

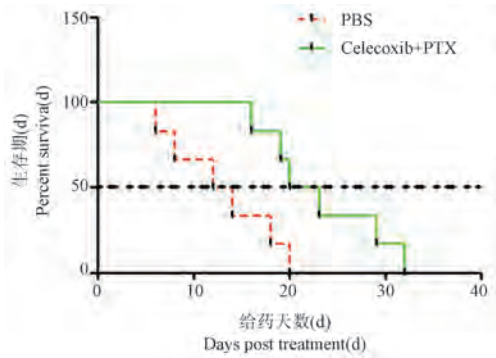


图 3 Celecoxib 和 PTX 延长 LLC 荷瘤小鼠的中位生存期
Figure 3 Treatment of celecoxib and PTX prolong median survival in LLC tumor-bearing mice

2.4 Celecoxib 和 PTX 联合使用对 LLC 小鼠肿瘤细胞病理形态学变化

对照组和实验组的石蜡包埋肿瘤组织进行切片及 HE 染色(图 4)。病理结果发现:对照组细胞核大,异质性强,分裂相多。与对照组相比,实验组核浓缩深染,核形态有条形、半月形、圆形、圆环形、多边形等,分裂相较少。病理结果证实:实验组肿瘤组织部分出现凋亡现象。

2.5 Western Blot 法检测 Bid、Caspase-9、COX-2 表达

检测细胞凋亡相关蛋白 Bid 及 Caspase-9 的表达情况。促细胞凋亡因子 Bid 及促凋亡蛋白 Caspase-9,以级联放大的方式对胞内蛋白进行高效切割,最终导致细胞凋亡^[12]。实验组 Caspase-9 和 Bid 的表达显著高于对照组。此外,COX-2 还证实具有促进肿瘤新生血管生成和增加侵袭力,是预后不良的独立预测指标^[13]。结果发现:Celecoxib 和 PTX 联合给药组中 COX2 的表达含量均低于对照组的表达含量(图 5)。这些结果表明, Celecoxib 和 PTX 联合用药通过促进凋亡蛋白表达及抑制肿瘤血管生成,从而诱导 LLC 细胞的凋亡。

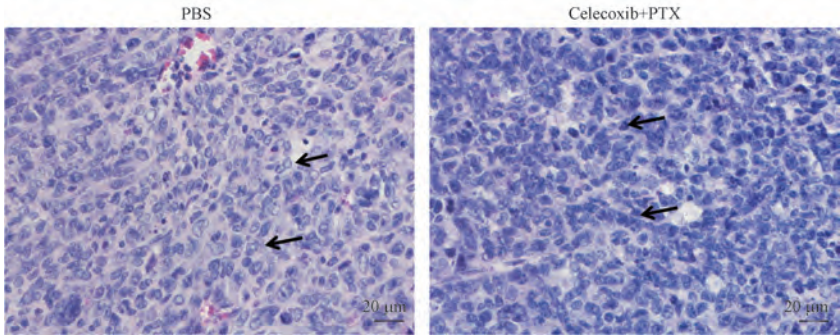
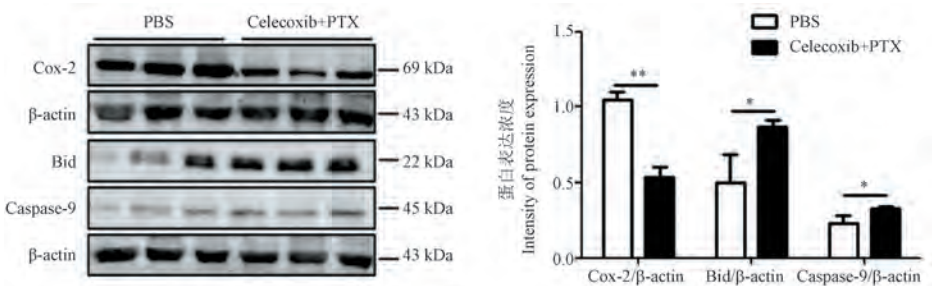


图 4 对照组和实验组的 HE 染色
Figure 4 HE staining of control and experimental groups



注:与 PBS 相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 Celecoxib 和 PTX 联合使用促进了 Lewis 肺癌细胞凋亡

Note. Compared with PBS, * $P < 0.05$ 。

Figure 5 Combination of Celecoxib and PTX promotes LLC cell apoptosis

2.6 Celecoxib 和 PTX 联合使用抑制了肿瘤中血管的形成

应用血管标记物 CD34 检测了 Celecoxib 和 PTX 对 LLC 肿瘤组织血管形成的抑制作用。对照组肿瘤组织中 CD34 阳性血管密度高,管腔扩张,在较大

的血管腔内常可见癌细胞及其碎片。而实验组中 CD34 阳性血管密度明显减少,阳性血管分布稀疏,呈散状,点状分布,染色较浅(图 6)。这些结果说明;Celecoxib 和 PTX 对 LLC 荷瘤小鼠肿瘤血管的形成有抑制作用。

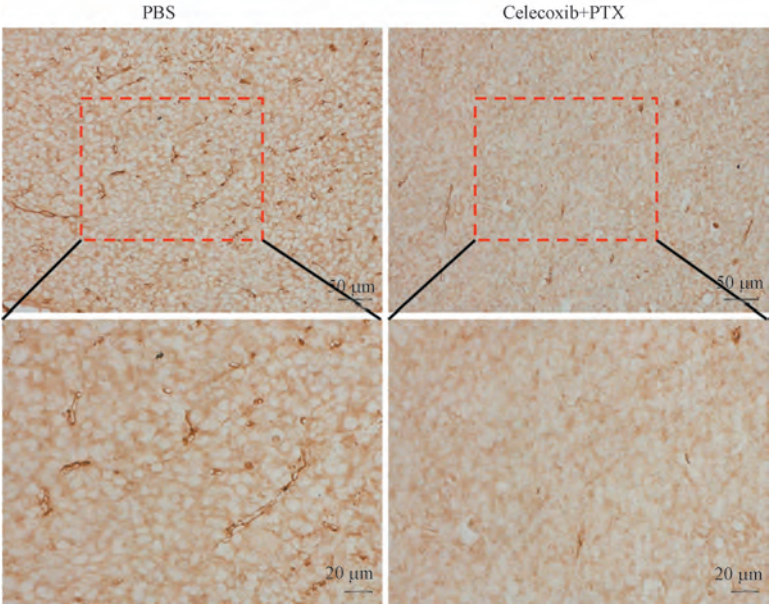


图 6 对照组和实验组的血管标记物 CD34 的免疫组化染色

Figure 6 Immunohistochemical staining of the vascular marker CD34 in the control and experimental groups

3 讨论

目前,尽管人们在肺癌的治疗方面取得了巨大的成就,建立了多种治疗手段包括外科治疗、放化疗、靶向治疗、免疫治疗等^[14],但肺癌仍然是导致人类死亡的重要因素。因此,迫切需要临床研究和开发治疗肺癌的新药。其中,Celecoxib 主要通过抑制环氧合酶-2/前列腺素 E2 信号轴来调节肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,以及 PTX 可以通过抑制 c-Rel 转录因子的功能延缓肿瘤进展,成为研究治疗肿瘤的新靶点药物。本文中利用构建的 LLC 肺腺癌小鼠模型研究了 Celecoxib 和 PTX 联合应用对小鼠 LLC 肿瘤的生长抑制研究。

研究结果显示:给予 Celecoxib 和 PTX 治疗的实验组肿瘤明显小于对照组,同时实验组小鼠的中位数生长周期较对照组增加 8.5 d,表明 Celecoxib 和 PTX 对小鼠 LLC 肿瘤生长起到了一定的抑制作用。对 Celecoxib 和 PTX 抑制肿瘤的作用机制进行初步研究,发现 Celecoxib 和 PTX 对 LLC 肿瘤中 COX-2 的表达及血管的生成有明显的抑制作用,可能通过抑制肺癌组织中 COX-2 的表达,抑制肿瘤中血管内

皮细胞的生成。同时,文献报道抑制内皮细胞增殖可以增加肿瘤细胞凋亡并抑制肿瘤生长,凋亡相关蛋白 Bid、Caspase-9 等在其中发挥重要作用^[15]。Bid 经内源性 Caspase-8 酶切后可移位到线粒体上引发细胞凋亡,Caspase-9 作为一种促凋亡因子,可自我活化级联放大凋亡效应^[16-17]。使用 Celecoxib 和 PTX 联合治疗能够提高 Bid、Caspase-9 蛋白的表达水平,表明 Celecoxib 和 PTX 联合使用诱导 LLC 肺癌细胞凋亡也发挥一定的作用。

本研究结果为 Celecoxib 和 PTX 作为治疗肺癌的辅助药物提供了一定的实验基础,以及对抑制肺癌血管生成和诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制进行了初步研究,但是如何提高抑制肿瘤的效果及对其机制进行更深入的研究,待于进一步探索。

参 考 文 献(References)

[1] 赵扬, 陈亮. 塞来昔布联合地佐辛对肺癌围术期患者疼痛、炎症反应和肺功能的影响 [J]. 西北药学杂志, 2019, 34 (5): 661-666.
Zhao Y, Chen L. Effects of celecoxib and dezocine on analgesia, inflammatory response and lung function in lung cancer patients during perioperative period [J]. Northwest Pharm J, 2019, 34 (5): 661-666.

- [2] 明海霞. 黄芪多糖联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠的抑瘤作用及机制研究 [D]. 兰州:甘肃农业大学; 2016.
Ming HX. Research on mechanisms of antitumor effect on APS combining cisplatin for lewis tumor-bearing mice [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University; 2016.
- [3] Skurikhin EG, Pershina O, Ermakova N, et al. Cell therapy with human reprogrammed CD8⁺ T-cells has antimetastatic effects on lewislungcarcinoma in C57BL/6 mice [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(24): 15780.
- [4] 张亚, 陈露. 结直肠癌 COX-2 的表达及其与临床病理特征的相关性 [J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(21): 16-19.
Zhang Y, Chen L. Expression of COX-2 in colorectal cancer and its correlation with clinicopathological features [J]. Clin Res Pract, 2022, 7(21): 16-19.
- [5] Guarrant W, Kota S, Troutman S, et al. YAP mediates tumorigenesis in neurofibromatosis type 2 by promoting cell survival and proliferation through a COX-2-EGFR signaling axis [J]. Cancer Res, 2016, 76(12): 3507-3519.
- [6] Meyerhardt JA, Shi Q, Fuchs CS, et al. Effect of celecoxib vs placebo added to standard adjuvant therapy on disease-free survival among patients with stage III colon cancer: the CALGB/SWOG 80702 (alliance) randomized clinical trial [J]. JAMA, 2021, 325(13): 1277-1286.
- [7] 郑刚, 任广翔, 赵智勇. 己酮可可碱对心血管疾病的药理学作用机制及其研究进展 [J]. 世界临床药物, 2020, 41(11): 905-909.
Zheng G, Ren GX, Zhao ZY. Pharmacological mechanism and research advance of pentoxifylline on cardiovascular disease [J]. World Clin Drugs, 2020, 41(11): 905-909.
- [8] Confino H, Dirbas FM, Goldshtein M, et al. Gaseous nitric oxide tumor ablation induces an anti-tumor abscopal effect [J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 405.
- [9] Sun H, Feng F, Xie H, et al. Quantitative examination of the inhibitory activation of molecular targeting agents in hepatocellular carcinoma patient-derived cell invasion via a novel *in vivo* tumor model [J]. Anim Models Exp Med, 2019, 2(4): 259-268.
- [10] Grinberg-Bleyer Y, Oh H, Desrichard A, et al. NF- κ B c-Rel is crucial for the regulatory T cell immune checkpoint in cancer [J]. Cell, 2017, 170(6): 1096-1108.
- [11] Chen C, Guan J, Gu X, et al. Prostaglandin E2 and receptors: insight into tumorigenesis, tumor progression, and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 834859.
- [12] Li L, He J, Zhang G, et al. Role of caspase family in intervertebral disc degeneration and its therapeutic prospects [J]. Biomolecules, 2022, 12(8): 1074.
- [13] Markosyan N, Li J, Sun YH, et al. Tumor cell-intrinsic EPHA2 suppresses anti-tumor immunity by regulating PTGS2 (COX-2) [J]. J Clin Invest, 2019, 129(9): 3594-3609.
- [14] Bonner SN, He C, Clark M, et al. Understanding racial differences in lung cancer surgery through a statewide quality collaborative [J]. Ann Surg Oncol, 2023, 30(1): 517-526.
- [15] Guo Y, Li Q, Xia R, et al. Farrerol exhibits inhibitory effects on lung adenocarcinoma cells by activating the mitochondrial apoptotic pathway [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022, 36(10): e23157.
- [16] Wu G, Li X, Zhan Y, et al. BID- and BAX-mediated mitochondrial pathway dominates A-1331852-induced apoptosis in senescent A549 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 627: 160-167.
- [17] Kaya MM, Kaya İ, Nazıroğlu M. Transient receptor potential channel stimulation induced oxidative stress and apoptosis in the colon of mice with colitis-associated colon cancer: modulator role of *Sambucus ebulus* L. [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(3): 2207-2220.

[收稿日期] 2022-08-27

李晓栋,李金国,游素君. 联合磷酸肌酸钠和曲美他嗪对酒精性心肌病大鼠的超声心动图及心脏血清学相关指标的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 635-642.

Li XD, Li JG, You SJ. Effects of combined creatine phosphate sodium and trimetazidine on echocardiography and cardiac serology-related indexes in rats with alcoholic cardiomyopathy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 635-642.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.010

联合磷酸肌酸钠和曲美他嗪对酒精性心肌病大鼠的超声心动图及心脏血清学相关指标的影响

李晓栋,李金国*,游素君

(福建医科大学附属协和医院心脏彩超室,福州 350001)

【摘要】 目的 探讨联合磷酸肌酸钠和曲美他嗪对酒精性心肌病大鼠的超声心动图及心脏血清学相关指标的影响。**方法** 通过慢性酒精灌胃法建立酒精性心肌病大鼠模型,将成功建模后的大鼠随机分为:磷酸肌酸钠组(CPS组)、曲美他嗪组(TMZ组)、磷酸肌酸钠+曲美他嗪组(CPS+TMZ组)、生理盐水组(NS组)、酒精组(AL组),实验共为期8周。运用超声心动图测量大鼠左室舒张末期内径(LVEDd)、室间隔舒张末期厚度(IVSDd)、左室后壁舒张末期厚度(LVPWDd)、左心室射血分数(EF),并检测血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)、高敏肌钙蛋白I(Hs-TnI)、乳酸脱氢酶(LDH)以及氨基末端脑钠尿肽(Nt-proBNP)。**结果** (1)较AL组及NS组,CPS组与TMZ组的LVEDd降低,EF升高,CK-MB、Hs-TnI及LDH均降低;(2)较CPS组与TMZ组,CPS+TMZ组的LVEDd降低,EF升高,CK-MB、Hs-TnI、LDH及Nt-proBNP均降低;(3)CPS组与TMZ组间的各指标均无统计学差异。**结论** 磷酸肌酸钠与曲美他嗪均对酒精性心肌病具有一定的治疗效果,且二者联合应用的效果优于二者单用。

【关键词】 酒精性心肌病;磷酸肌酸钠;曲美他嗪;超声心动图;血清学指标

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0635-08

Effects of combined creatine phosphate sodium and trimetazidine on echocardiography and cardiac serology-related indexes in rats with alcoholic cardiomyopathy

LI Xiaodong, LI Jinguo*, YOU Sujun

(Cardiac Ultrasound Room, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

Corresponding author: LI Jinguo. E-mail: lxy1990@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of combined sodium creatine phosphate and trimetazidine on echocardiography and cardiac serology in rats with alcoholic cardiomyopathy. **Methods** A rat model of alcoholic cardiomyopathy was established by chronic alcohol gavage. After successful modeling, rats were randomly divided into creatine phosphate (CPS), trimetazidine (TMZ), creatine phosphate + trimetazidine (CPS + TMZ) group, normal saline group (NS), and alcohol (AL) groups. The study was conducted for 8 weeks. Echocardiography was used to measure left ventricular end-diastolic diameter (LVEDd), ventricular septal end-diastolic thickness (IVSDd), left ventricular posterior wall end-diastolic thickness (LVPWDd), and left ventricular ejection fraction (EF). Serum creatine kinase CK-MB, high-

[基金项目] 福建省财政专项经费资助(2016B042)。
Funded by Fujian Provincial Financial Special Funding (2016B042).

[作者简介] 李晓栋(1992—),男,硕士,研究方向:心血管超声。Email: m15960126717@163.com

[通信作者] 李金国(1963—),男,主任,教授,主任医师,博士,研究方向:心血管超声。Email: lxy1990@163.com

sensitivity troponin I (Hs-TnI), lactate dehydrogenase (LDH), and amino-terminal brain natriuretic peptide (Nt-proBNP) were also measured. **Results** (1) Compared with AL and NS groups, LVEDd was decreased, EF was increased, and CK-MB, Hs-TnI, and LDH were decreased in CPS and TMZ groups. (2) Compared with CPS and TMZ groups, LVEDd was decreased, EF was increased, and CK-MB, Hs-TnI, LDH, and Nt-proBNP were decreased in the CPS + TMZ group. (3) There was no statistical difference in each index between CPS and TMZ groups. **Conclusions** Both creatine phosphate and trimetazidine have a therapeutic effect on alcoholic cardiomyopathy, and their combined effect is better than that of either alone.

【Keywords】 alcoholic cardiomyopathy; creatine phosphate sodium; trimetazidine; echocardiography; serological indicators

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

酒精性心肌病(alcoholic cardiomyopathy, ACM)是由慢性大量酗酒导致的心肌损伤,由 Mirijello 等^[1]和 Münzinger 等^[2]最先提出,其发病程度常常与酒精摄入量及持续时间相关:酒精的摄入量在每天 80 g、并且持续 5 年以上,可显著提高 ACM 发生的风险^[3]。ACM 可导致左室内径增大、左心室收缩功能减弱,如未及时发现并控制常常会导致包括心肌功能障碍在内的多器官损伤^[4]。若未尽早戒酒,4 年内 ACM 的死亡率将高达 50%^[5]。早期通过戒断酒精可让患者受损的心脏功能得到很大程度的恢复,一旦发生心力衰竭则常常要辅以药物治疗,而目前尚无针对 ACM 的特效药物,临床上对 ACM 应用的药物治疗大部分基于经验治疗^[6]。目前,磷酸肌酸钠与曲美他嗪均能改善受损的心肌细胞的能量代谢,对心肌具有一定的保护作用,是目前临床上用于改善心肌功能较常用的药物,但是单用这两种药物有时候对部分较重的患者所起的效果并不显著,因此,需探讨联用两种药物是否能产生一加一大于二的效果。同时,已有研究表明联用磷酸肌酸钠和曲美他嗪对患者的治疗具有良好的安全性^[7]。本研究旨在通过联合应用磷酸肌酸钠与曲美他嗪,来观察其对酒精性心肌病大鼠的超声心动图及心脏血清学相关指标的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

79 只 8 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重约为 200 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】提供。饲养期间各组大鼠自由饮水,食用普通柱状饲料,由福建医科大学实验动物中心提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒

定,室温控制在 23 ~ 26℃,在实验室适应环境 1 周后用于实验,饲养于福建医科大学动物实验中心【SYXK(闽)2022-0001】。本实验所有操作均经过福建医科大学实验动物管理和伦理委员会批准(FJMU IACUC 2021-0491)。

1.1.2 主要试剂与仪器

注射用磷酸肌酸钠(生产厂家:海口奇力药品有限公司,批准文号:国药准字 H20053430,规格:0.5 g/支);曲美他嗪(生产厂家:天津施维雅药品有限公司,批准文号:国药准字 H201000770,规格:20 mg/片);60°红星清香型二锅头(生产厂家:北京红星公司,批准文号:SC110015010349,规格:5 L/瓶);兔抗小鼠 CK-MB 抗体(生产厂家:INVUTROGEN 公司,批号:CK1553093086);ELISA 试剂盒(生产厂家:上海西唐生物科技有限公司,批号:F15213(rat CK-MB)、批号:F15151(rat NT-proBNP)、批号:F16113(rat LDH));Hs-TnI 检验试剂(生产厂家:ABBOTT 公司,批号:42237 M200);超声诊断仪(GE VIVID-7 DIMENSION);自动分析仪(美国亚培 ABBOTT AXSYM SYSTEM);全自动生化分析仪(日立 7170A 型);透射电镜(PHILIPS EM208 型)等。

1.2 方法

1.2.1 酒精性心肌病大鼠模型的制备及动物分组

ACM 大鼠模型制作参照文献^[8]介绍的建模方式,即采用慢性酒精灌胃法。建模成功的标准是:模型组大鼠出现精神萎靡、反应迟钝、食欲减退,超声心动图指标左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDd)明显增大、左心室射血分数(ejection fraction, EF)明显减退、而心脏血清学指标中血清肌酸激酶同工酶(serum creatine kinase, CK-MB)、高敏肌钙蛋白 I(high-sensitivity troponin I, Hs-TnI)、氨基末端脑钠尿肽(amino-

terminal brain natriuretic peptide, Nt-proBNP)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)均明显升高。由于目前磷酸肌酸钠及曲美他嗪对大鼠心肌缺血保护作用的最佳剂量还有待进一步研究,然而沈继龙等^[9]的研究表明 20 mg/(kg·d)磷酸肌酸钠便对大鼠心肌缺血具有较好的保护作用,为了获得更好的实验效果,本实验采用 30 mg/(kg·d)的磷酸肌酸钠以及相同剂量的曲美他嗪进行研究。随机挑选出成功建模的 60 只酒精性心肌病大鼠,将其随机分成磷酸肌酸钠组(CPS 组)、曲美他嗪组(TMZ 组)、磷酸肌酸钠 + 曲美他嗪组(CPS + TMZ 组)、生理盐水组(NS 组)及酒精组(AL 组)共 5 个组,每组各 12 只。其中 CPS 组予磷酸肌酸钠 30 mg/(kg·d)腹腔注射 + 30 mg/(kg·d)等渗生理盐水灌胃;TMZ 组予等渗生理盐水 30 mg/(kg·d)腹腔注射 + 30 mg/(kg·d)曲美他嗪灌胃;CPS + TMZ 组予磷酸肌酸钠 30 mg/(kg·d)腹腔注射 + 30 mg/(kg·d)曲美他嗪灌胃;NS 组予等渗生理盐水 30 mg/(kg·d)腹腔注射 + 30 mg/(kg·d)等渗生理盐水灌胃;AL 组予等渗生理盐水 30 mg/(kg·d)腹腔注射 + 30 mg/(kg·d)50%酒精灌胃,灌胃频次为每天 1 次,共 8 周。

1.2.2 超声诊断仪测量大鼠的超声心动图指标

应用 GE VIVID-7 DIMENSION 超声诊断仪,配备 10S 型号超声探头,将探头的频率调到 11.5 MHz,超声扫描速度改为 200 cm/s,图像深度调到 2.5 cm。麻醉方式是用 3%戊巴比妥钠(0.15 mL/100 g)腹腔注射。大鼠进入麻醉状态后,除净胸前的毛,然后绑定于恒温加热板上,呈仰卧位,使恒温加热板左倾 30°左右。探头涂适量耦合剂后放于大鼠的胸骨左缘处,通过适当的调整,直至二维超声显示清晰的左室短轴乳头肌水平切面,在此切面上运用 M 型超声获取室间隔舒张末期厚度(ventricular septal end-diastolic thickness, IVSDd)、左室后壁舒张末期厚度(left ventricular posterior wall end-diastolic thickness, LVPWDd)、左室舒张末期内径 LVEDd、左心室射血分数 EF 等数据。所有超声心动图数值均测量 3 个连续心动周期后取平均值。

1.2.3 取材及制样

将大鼠麻醉后,经腹主动脉取血 8 mL 放置于抗凝管中,放入离心机中,转速调至 2500 r/min,离心完成后取上清液待检。用下腔静脉内注射 10% KCl 的方式处死大鼠后,立即开胸取出大鼠心脏,迅速留取心内膜下心肌组织置于电镜固定液中,大小约

1 mm × 1 mm × 1 mm,存放在 4℃的环境中,剩余心脏组织用 10%福尔马林溶液中进行保存。

1.2.4 心脏血清学指标检测

(1)酶联免疫吸附实验法检测大鼠 CK-MB、NT-proBNP、LDH 表达水平

将备检的大鼠血清取出,置于室温下 5 ~ 10 min 使其解冻,从室温平衡 20 min 后的铝箔袋中取出板条,标准品孔中加入不同浓度标准品 50 μL,样本孔加入血清 10 μL,然后加入标本稀释液 40 μL;除空白孔外,标准品孔和样本孔各加入不同的检测抗体 100 μL,用封板膜封住反应孔,37℃水浴锅温育 60 min。弃去液体,吸水纸拍干,每孔加入洗涤液,静置 1 min 后甩去洗涤液,重复洗板 5 次。加入底物 100 μL,37℃避光孵育 15 min,最后加入终止液 100 μL 在 15 min 内测定各孔的值,以此来检测大鼠 CK-MB、NT-proBNP、LDH 的表达水平。

(2)化学发光法检测大鼠 Hs-TnI 表达水平

将试剂条放入全自动化学发光分析仪中进行开孔处理,取 200 μL 大鼠血清样本放入高敏肌钙蛋白高、低值校准品中,进行 10 min 的混匀,然后将高低值校准品以每孔 40 μL 分别加入试剂条样品孔中进行检测后校准。再取 200 μL 混匀的样本放到高敏肌钙蛋白的 6 种不同浓度的校准品内,重复上述混匀步骤 10 min。选取经过开孔处理的试剂条,将大鼠血清标本以每孔 40 μL 加至浓度相当的试剂孔 1 中,从洗涤孔中吸取 96 μL 液体至试剂孔 1 中,用移液器吸 120 μL 洗涤液分别移至试剂孔 2、3 中,最后输入高敏肌钙蛋白项目的运行参数,并启动机器,检测大鼠血清样本中 Hs-TnI 表达水平。

1.2.5 心肌组织透射电镜检查

先将标本在 3%戊二醛-1.5%多聚甲醛-0.1 mol/L 磷酸缓冲液配成的固定液中固定 120 min,经清洗液漂洗后,在 1%锇酸-1.5%亚铁氰化钾配成的固定液中继续固定 90 min,经过递增浓度的乙醇多次脱水处理后,用环氧树脂 618 包埋剂制作成包埋块,再用切片机制成厚度约 70 nm,横切面约 1 mm²大小的切片,最后经醋酸双氧铀柠檬酸铅染色后,用 PHILIPS EM208 型透射电镜进行观测、摄片。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 22.0 统计软件包对数据进行统计学分析处理。所有数据均运用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,各组组间比较采用单因素方差分析,采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 空白组大鼠与模型组大鼠超声心动图及心脏血清学指标比较

模型组大鼠与空白组大鼠的超声心动图指标相比,模型组 LVEDd 较空白组增大 ($P < 0.05$),

IVSDd、LVPWDd 及 EF 较空白组减小 ($P < 0.05$)。模型组与空白组大鼠的心脏相关生化指标相比,CK-MB、Hs-TnI、Nt-proBNP、LDH 较空白组增大 ($P < 0.05$)。其中 6 只模型组大鼠在建模过程中死亡,死亡率约 8.5 % (6/71),尸检发现 4 只死于灌胃时灌入气管,2 只死于肠胀气 (表 1,表 2)。

表 1 空白组大鼠与模型组大鼠的超声心动图指标比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Comparison of echocardiographic indexes of rats in blank group and model group($\bar{x} \pm s, n = 8$)				
组别 Groups	左室舒张末期内径(mm) LVEDd(mm)	室间隔舒张末期厚度(mm) IVSDd(mm)	左室后壁舒张末期厚度(mm) LVPWDd(mm)	射血分数(%) EF(%)
空白组 Blank group	6.15 ± 0.24	1.67 ± 0.03	1.65 ± 0.04	82.74 ± 3.53
模型组 Model group	7.49 ± 0.31*	1.40 ± 0.03*	1.41 ± 0.05*	60.46 ± 7.14*

注:与空白组比较,* $P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with blank group, * $P < 0.05$. (The same in the following tables)

表 2 空白组大鼠与模型组大鼠的心脏血清学指标比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison of cardiac serological indexes between rats in blank group and rats in model group($\bar{x} \pm s, n = 8$)				
组别 Groups	肌酸激酶同工酶(μg/L) CK-MB(μg/L)	高敏肌钙蛋白 I(ng/L) Hs-TnI(ng/L)	氨基末端脑钠尿肽(ng/L) Nt-proBNP(ng/L)	乳酸脱氢酶(ng/L) LDH(ng/L)
空白组 Blank group	112.37 ± 15.23	20.14 ± 6.21	100.42 ± 22.74	134.74 ± 23.33
模型组 Model group	508.59 ± 59.84*	83.67 ± 18.86*	394.26 ± 59.26*	483.92 ± 54.50*

2.2 各实验组大鼠的超声心动图指标比较

各实验组大鼠超声心动图指标比较,与 AL 组相比,NS 组、CPS 组、TMZ 组及 CPS + TMZ 组的 LVEDd 均减小 ($P < 0.05$),IVSDd、LVPWDd 及 EF 均增大 ($P < 0.05$);与 NS 组相比,CPS 组、TMZ 组及 CPS + TMZ 组的 LVEDd 均减小 ($P < 0.05$),EF

均增大 ($P < 0.05$);与 CPS 组相比,CPS + TMZ 组的 LVEDd 减小 ($P < 0.05$),EF 增大 ($P < 0.05$);与 TMZ 组相比,CPS + TMZ 组的 LVEDd 减小 ($P < 0.05$),EF 增大 ($P < 0.05$),其中 AL 组 3 只大鼠在实验过程中因心力衰竭增大竭死亡 (表 3),各组大鼠 M 型超声心动图图像比较如图 1 所示。

表 3 各组大鼠的超声心动图指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of echocardiographic indexes of rats in each group($\bar{x} \pm s$)					
组别 Groups	<i>n</i>	左室舒张末期内径(mm) LVEDd(mm)	室间隔舒张末期厚度(mm) IVSDd(mm)	左室后壁舒张末期厚度(mm) LVPWDd(mm)	射血分数(%) EF(%)
AL 组 AL group	9	8.17 ± 0.51	1.35 ± 0.09	1.34 ± 0.10	49.50 ± 6.95
NS 组 NS group	12	7.50 ± 0.25 [#]	1.61 ± 0.10 [#]	1.62 ± 0.07 [#]	67.41 ± 5.43 [#]
CPS 组 CPS group	12	7.29 ± 0.31 ^{#△}	1.55 ± 0.12 [#]	1.58 ± 0.12 [#]	72.43 ± 5.37 ^{#△}
TMZ 组 TMZ group	12	7.30 ± 0.36 ^{#△}	1.58 ± 0.07 [#]	1.58 ± 0.08 [#]	73.13 ± 4.79 ^{#△}
CPS+TMZ 组 CPS + TMZ group	12	6.85 ± 0.30 ^{#△▲○}	1.61 ± 0.09 [#]	1.60 ± 0.08 [#]	79.11 ± 4.42 ^{#△▲○}

注:与 AL 组比较,[#] $P < 0.05$;与 NS 组比较,[△] $P < 0.05$;与 CPS 组比较,[▲] $P < 0.05$;与 TMZ 组比较,[○] $P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with AL group, [#] $P < 0.05$. Compared with NS group, [△] $P < 0.05$. Compared with CPS group, [▲] $P < 0.05$. Compared with TMZ group, [○] $P < 0.05$. (The same in the following tables)

2.3 各实验组大鼠的心脏血清学指标比较

各实验组大鼠心脏血清学指标比较,与 AL 组

相比,NS 组、CPS 组、TMZ 组及 CPS + TMZ 组的 CK-MB、Hs-TnI、Nt-proBNP 及 LDH 均减小 ($P < 0.05$);

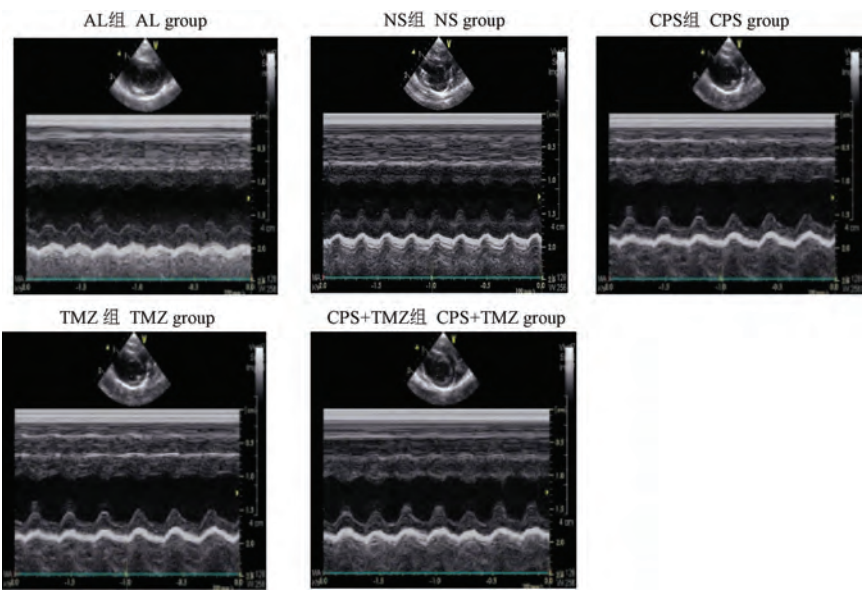


图 1 各组大鼠 M 型超声心动图比较

Figure 1 Comparison of M-mode echocardiographic images of rats in each group

与 NS 组相比,CPS 组、TMZ 组及 CPS + TMZ 组的 CK-MB、Hs-TnI、Nt-proBNP 及 LDH 均减小 ($P < 0.05$);与 CPS 组相比,TMZ 组及 CPS + TMZ 组的 CK-MB、Hs-TnI 及 LDH 均减小 ($P < 0.05$),CPS + TMZ 组的 Nt-proBNP 减小 ($P < 0.05$);与 TMZ 组相比,CPS + TMZ 组的 CK-MB、Hs-TnI、Nt-proBNP 及 LDH 均减小 ($P < 0.05$) (表 4)。

2.4 各组大鼠心肌透射电镜的比较

AL 组大鼠心肌细胞线粒体大小不一,肿胀,可

见空泡样变(→),结构不完整,部分线粒体嵴溶解断裂(*),肌纤维水肿,排列紊乱,甚者断裂(▲);NS 组大鼠心肌细胞线粒体肿胀较明显,有变形,线粒体嵴排列稍紊乱,肌纤维排列欠整齐,存在轻度溶解断裂;TMZ 组及 CPS 组大鼠心肌细胞线粒体轻微肿胀,线粒体嵴排列稍紊乱,肌纤维排列较整齐;CPS + TMZ 组大鼠心肌细胞线粒体大小较均匀,结构较完整,线粒体嵴较清晰(+),肌纤维排列较整齐(#) (图 2)。

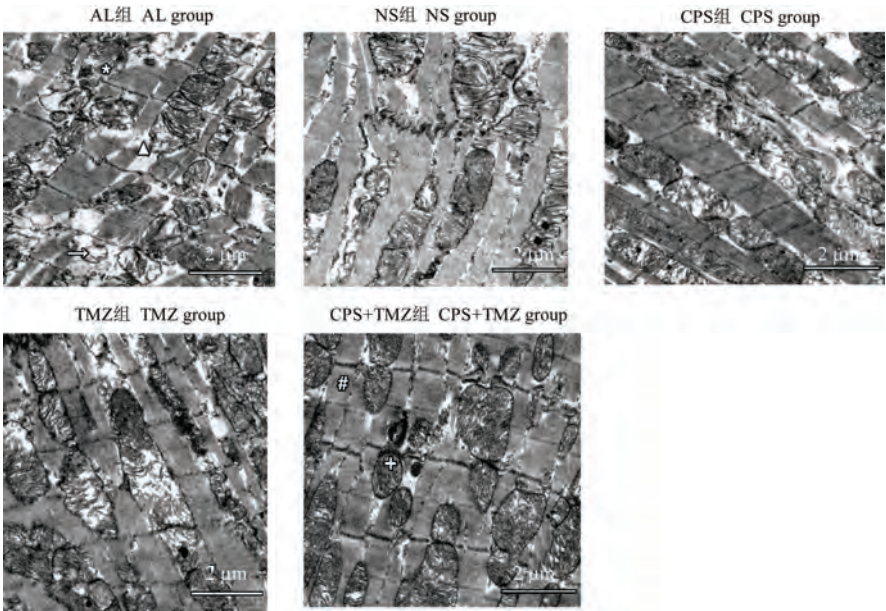


图 2 各组大鼠心肌电镜比较

Figure 2 Comparison of myocardial electron microscope in each group of rats

表 4 各实验组大鼠的心脏血清学指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of cardiac serological indexes of rats in each experimental group($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	<i>n</i>	肌酸激酶同工酶($\mu\text{g/L}$) CK-MB($\mu\text{g/L}$)	高敏肌钙蛋白 I(ng/L) Hs-TnI(ng/L)	氨基末端脑钠肽尿肽(ng/L) Nt-proBNP(ng/L)	乳酸脱氢酶(ng/L) LDH(ng/L)
AL 组 AL group	9	744.74 $\pm$ 86.82	223.40 $\pm$ 44.21	504.92 $\pm$ 54.86	724.80 $\pm$ 77.79
NS 组 NS group	12	412.14 $\pm$ 61.43 [#]	55.64 $\pm$ 16.31 [#]	261.64 $\pm$ 51.31 [#]	377.43 $\pm$ 57.91 [#]
CPS 组 CPS group	12	279.58 $\pm$ 63.35 ^{#Δ}	34.94 $\pm$ 12.33 ^{#Δ}	191.88 $\pm$ 50.17 ^{#Δ}	278.25 $\pm$ 68.57 ^{#Δ}
TMZ 组 TMZ group	12	309.62 $\pm$ 52.06 ^{#Δ}	39.88 $\pm$ 11.93 ^{#Δ}	239.32 $\pm$ 67.40 [#]	261.79 $\pm$ 45.51 ^{#Δ}
CPS+TMZ 组 CPS + TMZ group	12	150.65 $\pm$ 38.25 ^{#$\Delta$$\blacktriangle$$\bigcirc$}	22.73 $\pm$ 8.85 ^{#$\Delta$$\bigcirc$$\blacktriangle$}	126.06 $\pm$ 44.07 ^{#$\Delta$$\blacktriangle$$\bigcirc$}	184.19 $\pm$ 56.19 ^{#$\Delta$$\blacktriangle$$\bigcirc$}

3 讨论

ACM 患者早期无明显临床症状^[10], 不及时治疗往往会导致房颤等心律失常甚至是心力衰竭^[11], 后期还可合并其他脏器酒精性中毒反应, 如肝病、营养不良和其他神经系统疾病(如韦尼克-科萨科夫综合征)的表现等^[12]。长期酗酒会直接造成线粒体结构破坏、心肌细胞受损、肌球蛋白与肌动蛋白功能异常及钙离子泵失衡等改变, 进而导致心脏收缩功能减退。除此之外, 酒精产生的代谢产物乙醛也会导致心肌细胞炎性因子含量激增, 引起蛋白质等物质结构及功能的损害, 而这些反应会激活人体内的代偿机制来保护心肌细胞的正常功能^[13], 而氧化应激可能是其中的始动机制^[14], 目前研究普遍认为肾素-血管紧张素-醛固酮系统在其中发挥了极其关键的作用^[15], 长期的酒精刺激导致机体产生氧化应激, 引起血管紧张素 II 水平明显提高, 血管紧张素 II 与血管紧张素受体 I 相互反应, 使氧化酶激活, 从而导致氧自由基大量合成, 而氧自由基大量蓄积会导致心肌细胞损伤、细胞膜结构破坏、细胞内钙离子运转障碍、线粒体功能异常、肌纤维钙敏感性减弱、收缩蛋白受损及排列紊乱等, 上述反应最终导致心肌细胞肥大、左心室扩大、心肌收缩力减退等改变^[16], 而 NS 组由于中断了酒精对心肌细胞的损害, 因此相较于持续酒精损害的 AL 组而言, 其超声心动图指标以及血清学指标也有了较大的改善, 这也证实了戒断酒精对酒精性心肌病的治疗有较为明显的效果。

酒精性心肌病常常导致心肌缺血缺氧, 此时血清心肌酶含量往往明显升高, 而 CK-MB、LDH、Hs-TnI 等共同构成心肌酶谱, 可以作为反映心肌损伤的生化指标。CK-MB、LDH、Hs-TnI 均是心肌细胞所

分泌的特征因子, 参与心肌收缩功能的调节^[17]。为了排除单一指标的假阳性升高或消失对结果的影响, 本研究对心肌 3 项指标联合检测, 以保证对心肌损伤的诊断的准确性。

氨基末端脑钠肽前体(Nt-proBNP)与脑钠肽(BNP)均是如今临床上的评估心力衰竭的关键指标。当心脏压力负荷或者容量负荷增加时, 心肌细胞开始合成脑钠肽前体蛋白(pre-proBNP), 接着合成脑钠肽前体肽(proBNP), 而 proBNP 通过内切酶的催化, 裂解成无生物活性的 NT-proBNP 以及有生物活性的 BNP^[18]。随着 ACM 患者病情的加重, 其心脏压力负荷抑或是容量负荷也会随之加重, NT-proBNP 及 BNP 的含量随之增加, 因此 NT-proBNP 水平与 BNP 可以用来评价 ACM 患者心力衰竭的严重程度。而 NT-proBNP 与 BNP 相比, 其中 NT-proBNP 具备更长的半衰期, 当患者出现心功能异常时, NT-proBNP 升高比 BNP 更明显, 具有更好的稳定性及实用性^[19], 为此本研究运用 NT-proBNP 来评估 ACM 大鼠的心脏功能。

在本实验中, 成功建模的 ACM 模型大鼠的超声心动图指标 LVEDd 明显增大, IVSDd、LVPWDd 及 EF 明显降低, 符合 ACM 的类似于扩张性心肌病的心脏改变^[20], 而心脏血清学相关指标 CK-MB、Hs-TnI、Nt-proBNP、LDH 均明显升高表明 ACM 大鼠心肌细胞损伤及心力衰竭的存在。

ACM 患者的心肌细胞长时间缺血缺氧容易导致心肌能量供应不足, 从而加剧了心肌细胞的重构, 引起患者的心力衰竭。因此, 给心肌提供充分的能量供应能明显改善心肌缺血缺氧的状态, 逆转心肌细胞的重构, 从而心脏功能得到很好地改善。目前临床上常用的优化心肌能量代谢药物主要包括曲美他嗪、辅酶 Q10 及维生素 C 等^[21]。其中曲

美他嗪是目前临床用于改善心力衰竭患者心功能的主要药物,具有良好的疗效。本研究表明, TMZ 组的大鼠的心功能较 NS 组及 AL 组明显改善,左心室的内径也明显缩小,且心肌酶指标均较其他两组改善,证实了曲美他嗪在治疗 ACM 过程中具有一定的疗效。曲美他嗪是一种哌嗪类衍生物,作用原理主要是通过选择性地限制线粒体中特定酶的反应,把氧化代谢反应生成的游离脂肪酸转化成葡萄糖,并抑制由交感神经兴奋导致的脂肪酸代谢,增加对葡萄糖的利用率,改善心肌能量供应;还能加快脂肪酸合成磷脂,促进细胞膜的形成,来保障细胞内环境稳定,维持跨膜 Na-K^+ 泵功能正常,保护细胞正常的收缩及舒张功能;不仅如此,曲美他嗪可抑制心肌细胞中氧自由基的产生,并通过减轻炎症和抑制细胞凋亡等机制,减少氧化应激及其代谢产物对心肌细胞的造成的损伤,从而达到降低炎症反应及修复受损细胞的作用^[22]。综上所述,曲美他嗪能对 ACM 的心肌缺血状态及心功能异常起到很好的治疗作用,不但可以保护心肌功能、不影响血流动力学,而且还没有明显的副性肌力作用。

磷酸肌酸是人体内一种极为关键的供应能量的物质,专门为三磷酸腺苷的合成提供能量,而三磷酸腺苷是人体内所有组织和细胞生命活动所需能量的直接来源^[23]。ACM 患者心肌细胞缺氧时,细胞代谢迅速转化为无氧代谢的模式,心肌能源物质三磷酸腺苷含量大幅度减少,而磷酸肌酸的减少幅度却大大多于三磷酸腺苷的减少水平,这就进一步导致心肌能量缺乏,心肌收缩功能障碍,最终造成心力衰竭程度的加重。磷酸肌酸钠作为近期兴起的治疗心力衰竭的药物,不但能迅速提高机体内磷酸肌酸的水平,对心肌细胞具有显著的保护作用,而且其药物不良反应发生率较低^[24]。本研究中 CPS 组大鼠的心功能与 NS 组及 AL 组两组大鼠相比较具有明显改善,左心室的内径也明显缩小,同时 CPS 组的血液血清学指标也较 NS 组及 AL 组明显改善,说明磷酸肌酸钠可以改善 ACM 大鼠的心脏功能,其作用的机制主要是因为磷酸肌酸钠可保护心肌细胞膜,减少心肌细胞损伤,能很大程度减少缺血心肌部位磷脂的降解反应,并可让心肌细胞保持高磷酸肌酸的水平状态^[25];同时,磷酸肌酸还能明显减缓血小板的聚集,加快血液流动,促进缺血心肌细胞微循环,从而发挥保护心肌的作用;此外,磷酸肌酸还可透过受损心肌细胞的细胞膜进入,直

接为损伤的心肌细胞供应能量,减少细胞水肿与凋亡的发生,达到保护心肌细胞的作用。

曲美他嗪与磷酸肌酸钠均能通过直接提供能量给心肌细胞对酒精性心肌病起到一定的治疗作用,然而本研究的 CPS 组与 TMZ 组之间的超声心动图指标及心脏相关生化指标的差异均无明显统计学意义,说明二者在治疗酒精性心肌病的过程中可能存在相似的疗效,但是由于本实验用药时间的限制,暂时无法考究在长期使用曲美他嗪与磷酸肌酸钠治疗酒精性心肌病的过程中,这两种药物的治疗效果是否一致,还需要进一步研究。

而在联合曲美他嗪与磷酸肌酸钠来治疗酒精性心肌病时,本研究的联合组 CPS + TMZ 组心功能及左室内径均较 CPS 组及 TMZ 组改善,且心脏相关血清学指标也均较 CPS 组及 TMZ 组降低,说明联合曲美他嗪与磷酸肌酸钠对酒精性心肌病的治疗有显著的效果,且两种药物联合的治疗效果优于这两种药物单独使用,其原因可能在于这两种药物可发挥协同作用,不但能直接为心肌细胞提供能量,优化心肌的能量代谢,以此保障心肌细胞的正常功能;而且还能稳定心肌的细胞膜,保障其内环境的稳定,减少炎症因子或代谢产物对心肌细胞的破坏。

综上所述,联合曲美他嗪与磷酸肌酸钠能明显改善酒精性心肌病大鼠超声心动图与心脏血清学指标,具有较好的疗效,而且其疗效优于曲美他嗪单用及磷酸肌酸钠单用,为临床上治疗酒精性心肌病提供一个新的思路,但是其二者剂量配对的最优化还需要进一步的相关研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Mirijello A, Tarli C, Vassallo GA, et al. Alcoholic cardiomyopathy: what is known and what is not known [J]. Eur J Intern Med, 2017, 43: 1-5.
- [2] Münzinger W, Das Tübinger Herz. Ein Beitrag zur Lehre von der Überanstrengung des Herzens [J]. Dtsch Arch Klin Med, 1877, 19: 449.
- [3] Rehm J, Hasan OSM, Imtiaz S, et al. Quantifying the contribution of alcohol to cardiomyopathy: a systematic review [J]. Alcohol, 2017, 61: 9-15.
- [4] Klatsky AL. Alcohol and cardiovascular diseases: where do we stand today? [J]. J Intern Med, 2015, 278(3): 238-250.
- [5] Fang W, Luo R, Tang Y, et al. The Prognostic Factors of Alcoholic Cardiomyopathy: a single-center cohort study [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(31): e11744.
- [6] Ribeiro TL, Otto CM. Heartbeat: alcohol and the heart [J]. Heart, 2018, 104(20): 1639-1640.
- [7] 陈桂坚, 彭志坚, 章少波. 曲美他嗪联合磷酸肌酸钠治疗冠

- 心病合并慢性左心功能不全的临床观察 [J]. 中国医药科学, 2018, 8(5): 82-84, 107.
- Chen GJ, Peng ZJ, Zhang SB. Clinical observation of trimetazidine combined with creatine phosphate sodium in the treatment of coronary heart disease with chronic left heart insufficiency [J]. Chin Med Pharm, 2018, 8(5): 82-84, 107.
- [8] 柳波. 酒精性心肌病大鼠超声心动图心肌损伤标志物及病理对照研究 [D]. 福州: 福建医科大学; 2017.
- Liu B. A case-control study on echocardiographic markers of myocardial injury in alcoholic cardiomyopathy rats [D]. Fuzhou: Fujian Medical University; 2017.
- [9] 沈继龙, 朱克军, 周情太, 等. 不同剂量磷酸肌酸钠预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(15): 23-27.
- Shen JL, Zhu KJ, Zhou QT, et al. Protective effect of different doses of creatine phosphat preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Mod Med, 2013, 23(15): 23-27.
- [10] Piano MR, Phillips SA. Alcoholic cardiomyopathy: pathophysiologic insights [J]. Cardiovasc Toxicol, 2014, 14(4): 291-308.
- [11] Voskoboinik A, Prabhu S, Ling LH, et al. Alcohol and atrial fibrillation: a sobering review [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(23): 2567-2576.
- [12] Guzzo-Merello G, Dominguez F, González-López E, et al. Malignant ventricular arrhythmias in alcoholic cardiomyopathy [J]. Int J Cardiol, 2015, 199: 99-105.
- [13] Wang S, Ren J. Role of autophagy and regulatory mechanisms in alcoholic cardiomyopathy [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864: 2003-2009.
- [14] Piano MR. Alcohol's effects on the cardiovascular system [J]. Alcohol Res, 2017, 38(2): 219-241.
- [15] 沈彬倩. 酒精性心肌病的发病机制与临床 [J]. 心血管病学进展, 2018, 39(3): 459-462.
- Shen BQ. Pathogenesis and clinical manifestations of alcoholic cardiomyopathy [J]. Adv Cardiovasc Dis, 2018, 39(3): 459-462.
- [16] 胡军, 于波. 酒精性心肌病发病机制研究新进展 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2014, 6(2): 236-238.
- Hu J, Yu B. New progress in pathogenesis of alcoholic cardiomyopathy [J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2014, 6(2): 236-238.
- [17] 王建中, 钟海平, 贺春辉. 心肌肌钙蛋白 I、心肌酶谱、血清 B 型钠尿肽检测在心力衰竭患者中的应用价值 [J]. 中国当代医药, 2018, 25(36): 134-136.
- Wang JZ, Zhong HP, He CH. Application value of cTnI, myocardial enzyme spectrum and serum B-type natriuretic peptide in heart failure patients [J]. Chin Mod Med, 2018, 25(36): 134-136.
- [18] 李燕, 刘大军. BNP、NT-proBNP 研究状况及进展 [J]. 实用药物与临床, 2021, 24(12): 1133-1136.
- Li Y, Liu DJ. Current research situation and progress of BNP and NT-proBNP [J]. Pract Pharm Clin Remedies, 2021, 24(12): 1133-1136.
- [19] 刘薇拉, 刘丹丹. BNP/NT-proBNP 检测在冠心病中的应用研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(22): 3796-3798.
- Liu WL, Liu DD. Research progress on the application of BNP/NT-proBNP detection in coronary heart disease [J]. Chin J Integr Med Cardio/cerebrovascular Dis, 2020, 18(22): 3796-3798.
- [20] Fernández-Solà J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption [J]. Nat Rev Cardiol, 2015, 12(10): 576-587.
- [21] 王华, 梁延春. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(10): 760-789.
- Wang H, Liang YC. China guidelines for diagnosis and treatment of heart failure 2018 [J]. Chin J Cardiol, 2018, 46(10): 760-789.
- [22] 熊挺淋, 张丽莎, 刘涛, 等. 曲美他嗪对缺血性心肌病伴心力衰竭患者心功能的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(18): 4382-4384.
- Xiong TL, Zhang LS, Liu T, et al. Effect of trimetazidine on cardiac function in patients with ischemic cardiomyopathy and heart failure [J]. Chin J Gerontol, 2019, 39(18): 4382-4384.
- [23] 李慧婷, 薛恩忠. 心脉隆注射液联合磷酸肌酸钠治疗慢性心力衰竭的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(11): 2116-2119.
- Li HT, Xue EZ. Clinical study on Xinmailong Injection combined with creatine phosphate sodium in treatment of chronic heart failure [J]. Drugs Clin, 2017, 32(11): 2116-2119.
- [24] 张云燕, 林威钢, 杨晓鸿, 等. 磷酸肌酸钠联合辅酶 Q10 治疗病毒性心肌炎的效果 [J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(10): 2265-2268.
- Zhang YY, Lin WG, Yang XH, et al. Effect of creatine phosphate sodium combined with coenzyme Q10 in the treatment of viral myocarditis [J]. Matern Child Health Care Chin, 2021, 36(10): 2265-2268.
- [25] 赵德萍, 李永东. 磷酸肌酸钠在冠心病介入治疗后心肌保护中的研究进展 [J]. 医学综述, 2016, 22(6): 1149-1152.
- Zhao DP, Li YD. Research development of creatine phosphate sodium in myocardial protection after interventional therapy of coronary heart disease [J]. Med Recapitul, 2016, 22(6): 1149-1152.

[收稿日期] 2022-08-20

熊翱,魏小雨,许建中,等. 碘乙酸单钠诱导 SD 大鼠膝关节炎后 HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 蛋白表达及意义 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 643-652.

Xiong A, Wei XY, Xu JZ, et al. Expression and significance of HIF-1 α , OPN, IL-1 β , TNF- α , MMP-13 and NGF proteins after MIA-induced KOA in SD rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 643-652.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2023. 05. 011

碘乙酸单钠诱导 SD 大鼠膝关节炎后 HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 蛋白表达及意义

熊翱^{1,2}, 魏小雨¹, 许建中², 罗飞^{1*}

(1. 陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院骨科, 重庆 400038;
2. 郑州大学第一附属医院骨科, 郑州 450042)

【摘要】 目的 探讨碘乙酸单钠(monosodium iodoacetate, MIA)诱导 SD 大鼠膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)后 HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 蛋白表达及意义。**方法** 采用 SD 大鼠(4 周龄, 80 ~ 120 g)为研究对象, 随机分为假手术(Sham)组和模型(KOA)组。第 0 天, 大鼠用戊巴比妥钠麻醉, 模型组经右膝关节腔下韧带向关节腔内注射含 2 mg MIA 生理盐水 50 μ L, Sham 组大鼠给予 50 μ L 灭菌生理盐水。SD 大鼠分别于第 0、3、7、10、14 天测量右膝关节直径和检测负重能力后, 麻醉安乐死, 切取软骨和分离滑膜组织。同时, 原代培养假手术组和模型组滑膜组织, 鉴定成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)的纯度和活性后, 采用地塞米松处理 FLS。通过 Western Blot 检测缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)蛋白的表达。**结果** 与假手术组比较, 大鼠膝关节腔被注入 MIA 3 d 后, HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达升高, 呈不断增加趋势。大鼠膝关节腔横径, 在 MIA 造模后第 7 天和第 14 天, 显著大于假手术组。MIA 注入大鼠膝关节腔第 3 天起, 大鼠右后肢的负重能力持续在 26% 以下, 显著低于假手术组。采用 0.2% I 型胶原酶消化法, 成功培养了 FLS 原代细胞。使用地塞米松对模型组大鼠体外 FLS 干预后, 显著降低了促炎因子分泌、NGF 和 MMP-13 蛋白的表达。**结论** HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 蛋白在滑膜炎、软骨降解及基质破坏和关节疼痛等方面起着重要作用, 既是关节疼痛管理、炎症反应调节和抑制软骨降解和基质破坏的重要靶点, 也是开发新型 OA 镇痛药物的蛋白靶点。

【关键词】 骨关节炎; 碘乙酸单钠; 疼痛; 骨桥蛋白; 炎症因子; 神经生长因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0643-10

Expression and significance of HIF-1 α , OPN, IL-1 β , TNF- α , MMP-13, and NGF proteins after MIA-induced KOA in SD rats

XIONG Ao^{1,2}, WEI Xiaoyu¹, XU Jianzhong², LUO Fei^{1*}

(1. First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing 400038, China.
2. Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450042)

Corresponding author: LUO Fei. E-mail: luofly1009@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), OPN, IL-1 β , TNF- α , MMP-13, and NGF proteins in SD rats with knee osteoarthritis KOA induced by monosodium

[基金项目] 陆军军医大学优秀人才库重点扶持对象(XZ-2019-505-021)。

Funded by Key Supporters of the Excellent Talent Pool of the Army Medical University (XZ-2019-505-021)

[作者简介] 熊翱(1995—), 男, 在读博士研究生, 研究方向: 骨科相关疾病的临床与基础, 创伤基础与临床。Email: 2528359578@qq.com

[通信作者] 罗飞(1976—), 男, 教授, 博士, 博士研究生导师, 骨科主任, 研究方向: 骨科疾病, 尤其擅长脊柱外科。

Email: luofly1009@hotmail.com

iodoacetate(MIA). **Methods** SD rats (4 weeks old, 80 ~ 120 g) were randomly divided into sham operation (Sham) and model (KOA) groups. On day 0, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital, and 50 μ L of normal saline containing 2 mg of MIA was injected into the joint cavity of the KOA group through the infrapatellar ligament of the right knee. In the sham group, 50 μ L sterile saline was injected into the knee joint cavity. SD rats were euthanized by overdosed anesthesia on days 0, 3, 7, 10, and 14 after measuring the diameter of the right knee joint and the weight-bearing capacity. Cartilage and synovial tissue were collected. Synovial tissues were primary cultured, and the purity and activity of fibroblast-like synoviocytes (FLSs) were assessed, and FLSs were treated with dexamethasone. Western Blot was used to detect HIF-1 α , osteopontin (OPN), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), and nerve growth factor (NGF) proteins. **Results** Compared with the Sham group, HIF-1 α , OPN, IL-1 β , and TNF- α expression was increased at 3 days after injection of MIA into the knee cavity and showed an increasing trend. The transverse diameter of the knee cavity in the MIA group was significantly larger than that in the Sham group on days 7 and 14 after palpation. On day 3 after injection of MIA into the knee cavity of rats, the weight bearing capacity of the right hind limb continued to be < 26%, which was significantly lower compared with the Sham group. Primary FLSs were successfully isolated by 0.2% type I collagenase digestion. After treatment of FLSs from KOA rats with dexamethasone, secretion of proinflammatory factors and expression of MMP-13 and NGF proteins were decreased significantly. **Conclusions** HIF-1 α , OPN, IL-1 β , TNF- α , MMP-13, and NGF play major roles in cartilage and synovial inflammation, cartilage degradation, matrix destruction, and joint pain. They are important targets for joint pain management, regulation of inflammatory responses, and inhibition of cartilage degradation and matrix destruction, and the development of novel OA analgesics.

【**Keywords**】 osteoarthritis; monosodium iodoacetate; pain; osteopontin; proinflammatory factor; nerve growth factor
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是临床常见的中老年性关节退行性疾病,主要累及膝、髋、脊柱等负重关节^[1-2]。在全世界 65 岁以上的总人口中,有 50% 的老年人具有疼痛、僵硬和关节功能丧失等 OA 症状^[3-5]。关节疼痛是 OA 患者的主诉症状,在治疗上,采用非甾体抗炎药 (NSAIDs) 和皮质类固醇进行常规镇痛和抗炎。NSAIDs 的不良反应较多,可引起胃食管反流、胃溃疡及出血或穿孔、心血管不良反应^[6-7]。糖皮质激素虽对 OA 具有镇痛和抗炎作用,且临床疗效确切,但运用不当,会加剧关节软骨破坏,加重病情^[6-7]。由于这些镇痛药物的副作用大,迫切需要寻找副作用小的镇痛药物。目前,对 OA 疼痛的分子病理机制了解甚少,阻碍了 OA 相关疼痛抑制剂的开发研究。

本研究采用碘乙酸单钠 (monosodium iodoacetate, MIA) 诱导 SD 大鼠膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA), 通过检测 MIA 注入膝关节腔后 0、3、7、10、14 d 的缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 蛋白表达,同时,体外原代培养正常大鼠和 MIA 诱导 KOA 大鼠膝关节滑膜组织成纤维样滑

膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS), 采用地塞米松 (dexamethasone, DEX) 处理 FLS, 检测 IL-1 β 、TNF- α , 基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13) 和 NGF 蛋白表达变化。通过分析 MIA 使膝骨关节软骨、滑膜和体外 FLS 分泌和释放细胞因子和生长因子的变化情况,探讨其与 OA 关节疼痛的分子病理机制,为研究新型 OA 镇痛药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

50 只 4 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 80 ~ 120 g,购自陆军军医大学 (中国重庆) 大坪医院野战外科研究所实验动物中心【SCXK (军) 2017-0025】。实验前 1 周,于采光通风良好,温度 20 ~ 26 $^{\circ}$ C,相对湿度 42% ~ 62% 的室内适应环境,大鼠可以随意进食和饮水,按照 GB14925-2010 标准进行实验动物的环境控制。将动物饲养在陆军军医大学陆军特色医学中心的标准实验室【SYXK (军) 2017-0058】。本研究中使用的所有程序均严格按照美国国立卫生研究院实验动物护理和使用指南进行。所有动物程序均经陆军军医大学实验动物指南事务管理局批准 (AMUWEC20181430)。

1.1.2 主要试剂与仪器

MIA (Sigma 公司, 美国), 多克隆兔抗 HIF-1 α (Abcam 公司, 中国香港), 单克隆小鼠抗 OPN (Invitrogen Ltd, 美国), 鼠抗 IL-1 β 抗体 (Cell Signaling, 美国), 兔抗 TNF- α 抗体 (Cell Signaling, 美国), 单克隆兔抗 NGF (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 vimentin (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 PCNA (Abcam 公司, 中国香港), 单克隆小鼠抗 β -actin (Sigma 公司, 美国), 抗兔 IgG-HRP 抗体 (Sigma 公司, 美国), 抗鼠 IgG-HRP 抗体 (Sigma 公司, 美国), Western Blot 实验系统和试剂 (Bio-Rad 公司, 美国), Western Blot 底物发光试剂盒 (Bio-Rad 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 KOA 模型制备和实验分组

将大鼠随机分为两组: 假手术 (Sham) 组 ($n = 25$)、模型 (KOA) 组 ($n = 25$)。模型组大鼠采用单次注入膝关节腔 MIA (2 mg/knee) 诱导 KOA 模型^[8-9]。主要步骤: 第 0 天, 大鼠用戊巴比妥钠麻醉, 模型组动物经右膝关节髌下韧带向关节腔内注射含 2 mg MIA 生理盐水 50 μ L, 假手术组大鼠给予 50 μ L 灭菌生理盐水。SD 大鼠分别于第 0 (注入 MIA 或生理盐水后 1 h 内)、3、7、10、14 天测量右膝关节直径和检测负重能力后, 麻醉安乐死, 切取软骨和分离滑膜组织存储于 -80°C 冰箱, 用于蛋白质表达检测。各组每个时间点 5 只 SD 大鼠。

1.2.2 检测负重能力

负重能力的变化, 是判定 OA 大鼠关节不适和疼痛的重要指标^[10]。在注射 MIA 后的第 0、3、7、10 和 14 天, 采用失能测试仪 (英国诺福克林顿仪器公司) 测量后爪重量分布, 评估 SD 大鼠右后肢的力量。分布在右后肢的重量百分比。使用下式计算: 负重率 (%) = (右后肢重量 / (左后肢重量 + 右后肢重量)) $\times 100\%$ 。

1.2.3 测量右后膝关节直径

关节直径的变化, 是衡量 OA 大鼠关节肿胀和关节不适的重要指标^[10-12], 大鼠膝关节腔被注入 MIA 后, 在第 0、3、7、10 和 14 天用游标卡尺测量右膝的横向直径。本研究获得的是膝盖弯曲 90° 时右膝之间的水平距离。每个膝关节测量 3 次并计算平均值^[8]。

1.2.4 滑膜组织的获取分离、滑膜细胞的原代培养及其纯度与增殖鉴定

研究表明, 滑膜细胞可以作为 OA 早期干预靶

点^[13], FLS 是滑膜组织的主要功能细胞^[9], 因此, 本研究按熊翱等^[9]和陈芳等^[14]已建立的实验方法加以完善进行滑膜细胞的原代培养, 通过分离注入 MIA 或生理盐水 14 d 后的 SD 大鼠滑膜组织进行原代 FLS 培养。主要步骤如下: SD 大鼠被麻醉后, 将其浸泡在 75% 乙醇中进行无菌处理 10 ~ 20 min, 在无菌条件下取 SD 大鼠膝关节。将盛有含双抗的 PBS 平皿置于超净工作台中, 分离滑膜组织。将分离的滑膜组织剪碎至 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 的块状, 移至 10 mL 无菌离心管, 短暂低速离心, 留取沉淀, 0.2% I 型胶原酶重悬滑膜组织, 转移至 25 cm^2 培养瓶, 用 0.2% I 型胶原酶定容至 2 ~ 3 mL, 轻轻晃动培养瓶, 使其底部滑膜组织均匀分布。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 消化滑膜组织 4 ~ 6 h。待滑膜组织变成棉絮状, 10% FBS 终止消化, 短暂低速离心, 弃上清, 加入完全培养基重悬洗涤 1 次后, 移至 25 cm^2 培养瓶中, 用完全培养基定容至 2 ~ 3 mL, 轻轻晃动培养瓶, 使滑膜组织在底部均匀分布。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养滑膜组织, 每天观察细胞游出情况。第 2 天可见梭形细胞游出, 2 ~ 3 d 换液 1 次。滑膜细胞的原代培养的纯度与增殖鉴定详见《脂多糖诱导 SD 大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析》^[9]。

1.2.5 体外滑膜 FLS 的地塞米松处理

滑膜炎症是整个关节 OA 综合病理变化的主要事件^[13], 故本研究对体外 FLS 进行抑炎效果观察并探讨其与镇痛的关系。采用纯度超过 98% 的原代 SD 大鼠 KOA 滑膜 FLS, 将细胞数调整至每毫升 4×10^4 。再按每孔 0.2 mL 接种至腹腔小室 (Millicell® EZISLIDE), 培养 12 ~ 24 h。共分 3 组: MIA- 和 DEX-、MIA + 和 DEX-、MIA + 和 DEX +, 每组 5 孔, 使 DEX 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。在培养箱培养 24 h 后, 采用胰酶 (0.25%) 消化 FLS 2 ~ 5 min。终止消化采用 10% 胎牛血清, 收集细胞, 贮于 -80°C , 待用于蛋白质表达检测。

1.2.6 蛋白质印迹分析

根据文献报道的蛋白质印迹分析方法进行^[9], 主要步骤: 使用考马斯亮蓝法测定总蛋白浓度。然后, 通过十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 对总蛋白样品进行电泳分离, 并转移到硝酸纤维素 (nitrocellulose, NC) 膜上。然后, 将 NC 膜与下列一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜: ①多克

隆兔抗 HIF-1 α (1:1000); ②单克隆小鼠抗 OPN (1:1000); ③多克隆兔抗 IL-1 β (1:1000); ④多克隆兔抗 TNF- α (1:1000); ⑤多克隆兔抗 MMP-13 抗体 (1:1000); ⑥单克隆兔抗 NGF 抗体 (1:1000); ⑦单克隆小鼠抗 β -actin (1:10000)。最后,用 TPBS 清洗 NC 膜,并与相对应的辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 结合的二抗一起孵育。使用底物发光试剂对 NC 膜进行可视化,并使用图像分析程序分析印迹图像。通过测量每个样品中的 β -actin 表达用以验证目的蛋白质含量的变化规律。

1.3 统计学分析

所有实验的数据采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有指标数据先进行正态分布评估,符合正态分布的数据,使用 t 检验来分析假手术组和模型

组之间差异的显著性。单因素方差分析 (ANOVA) 方法用于一个变量和多个条件数据处理。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

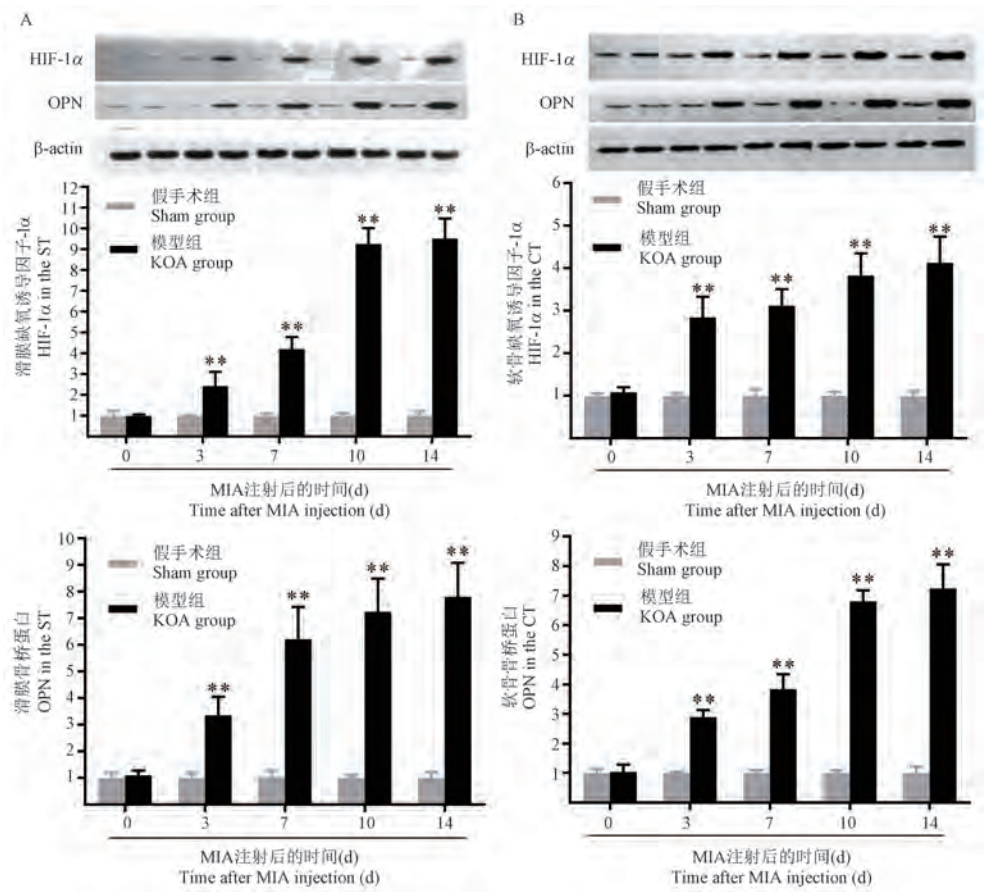
2 结果

2.1 MIA 注入大鼠膝关节, HIF-1 α 和 OPN 蛋白表达变化

与假手术组比,大鼠膝关节腔被注入 MIA 3 d 后软骨细胞和滑膜组织 HIF-1 α 和 OPN 蛋白含量呈不断增加的趋势 (图 1)。

2.2 MIA 注入大鼠膝关节, IL-1 β 和 TNF- α 蛋白质表达变化

与假手术组比较, MIA 注入关节腔第 3 天起, 软骨细胞和滑膜组织 IL-1 β 和 TNF- α 呈现高表达 (见图 2A, 2B)。

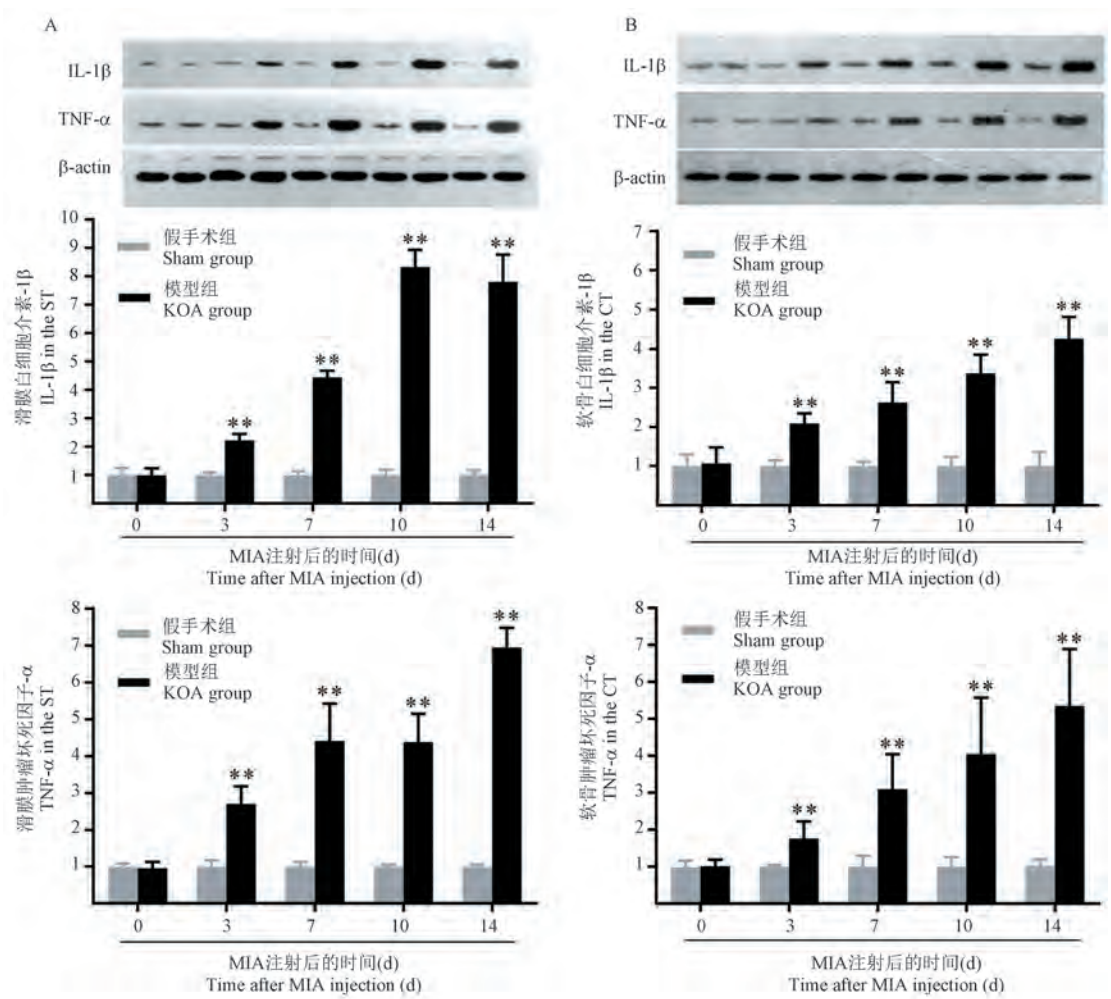


注:A;SD 大鼠膝关节滑膜组织中 HIF- α 和 OPN 蛋白表达的 Western Blot;B;SD 大鼠膝关节软骨组织中 HIF-1 α 和 OPN 的蛋白表达的 Western Blot;检测指标的积分光密度值经过内参指标校正后,假手术组归一;与假手术组相比, ** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 MIA 对大鼠膝关节中 HIF-1 α 和 OPN 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Western Blot assay of the protein expression of HIF-1 α and OPN in the synovial tissue of SD rat knee joints. B. Western Blot assay of the protein expression of HIF-1 α and OPN in SD rat knee cartilage tissue. The integrated optical density value of the detection index is corrected by the internal reference index, normalized by sham. Compared with sham group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effects of MIA on HIF-1 α and OPN in rat knee joints($\bar{x} \pm s, n = 5$)



注:A;SD 大鼠关节滑膜组织中 IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达的 Western Blot;B;SD 大鼠膝关节软骨组织 IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达的 Western Blot;检测指标的积分光密度值经过内参指标校正后,假手术组归一。

图 2 MIA 对大鼠膝关节中 IL-1β 和 TNF-α 的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Western Blot analysis of the protein expression of IL-1β and TNF-α in the synovial tissue of SD rat knee joint. B. Western Blot analysis of the protein expression of IL-1β and TNF-α in SD rat knee cartilage tissue. The integrated optical density value of the detection index is corrected by the internal reference index, normalized by sham.

Figure 2 Effect of MIA on IL-1β and TNF-α in rat knee joint($\bar{x} \pm s, n = 5$)

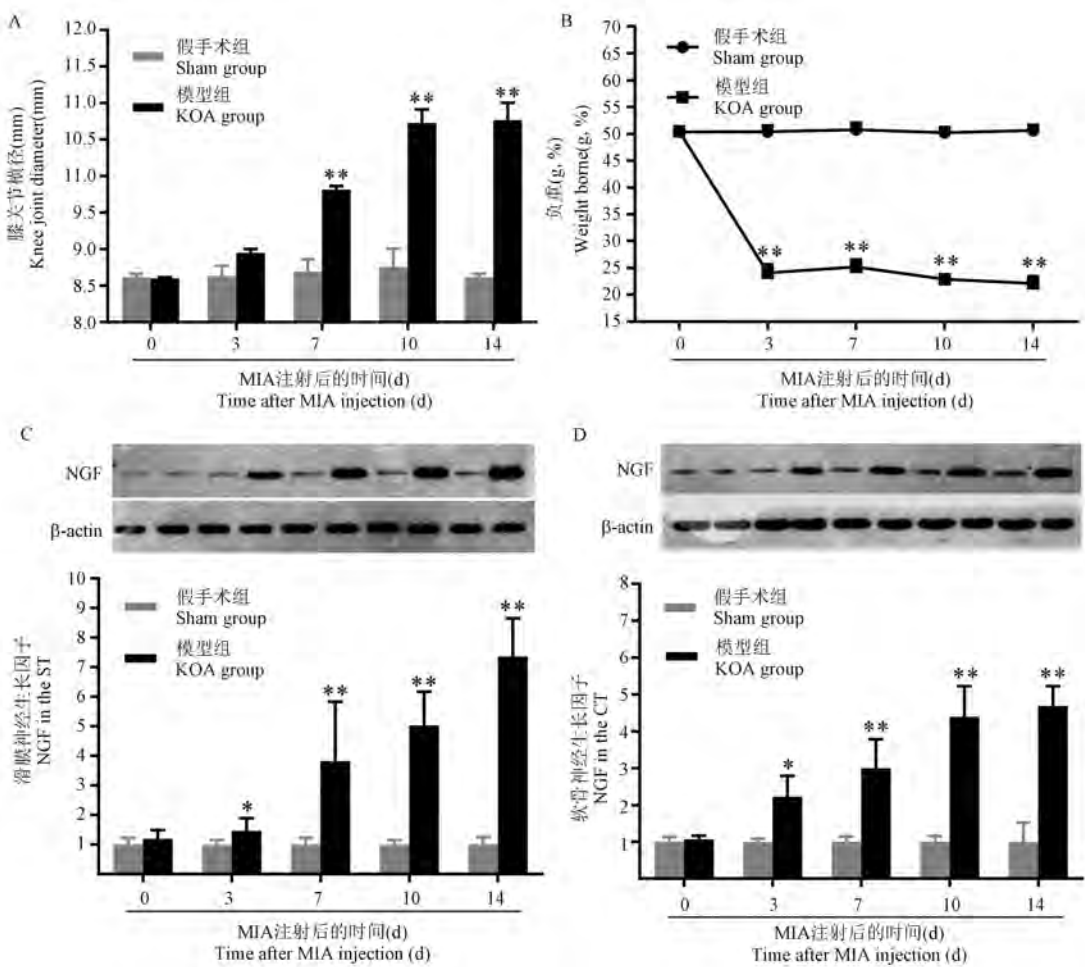
2.3 MIA 对大鼠右后膝关节横径和右后肢负重的影响及 NGF 在膝关节滑膜和软骨中的表达

与假手术组比较,大鼠右后膝关节,在 MIA 造模后的第 3 天开始肿胀,第 7 天后,肿胀明显。因此,导致膝关节横径,在 MIA 造模后的第 7 天、第 10 天和第 14 天显著高于假手术组(图 3A)。MIA 注入大鼠膝关节第 3 天起,大鼠右后肢的负重量持续在 26% 以下,显著低于假手术组(图 3B)。通过负重能力和膝关节横径的检测评估,表明 MIA 注入大鼠膝关节第 3 天起,大鼠膝关节不适和疼痛明显。检测了 NGF 的蛋白质水平,发现与假手术组比较, MIA 注入大鼠膝关节第 3 天起,滑膜(图 3C)和软

骨(图 3D)组织的 NGF 蛋白表达增加。滑膜和软骨 NGF 增加,与疼痛关系密切^[13]。

2.4 SD 大鼠滑膜细胞的原代培养及其 FLS 的纯度和增殖功能

分离的 SD 大鼠滑膜组织培养至第 6 天,原代细胞的融合度达 70% ~ 80%,细胞贴壁生长,但在观察视野中,仍有极少的圆形、椭圆形细胞(图 4A)。细胞传代至第 3 代(第 12 ~ 14 天),细胞形态基本上为梭形,核位于中央,细胞生长良好(图 4B)。细胞在第 8 代增长缓慢,而且细胞形态改变,梭形较少,多为近似椭圆形,细胞间隙增大,细胞有空泡坏死老化(图 4C)。免疫荧光化学观察到:第 3



注:A:用游标卡尺测量右膝关节的横向直径;B:MIA 注射后大鼠右后肢负重比的变化;C:Western Blot 分析 SD 大鼠膝关节滑膜组织中 NGF 的蛋白表达;D:Western Blot 分析 NGF 在 SD 大鼠膝关节软骨组织中的蛋白表达;检测指标的积分光密度值经过内参指标校正后,假手术组归一;与假手术组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下同)

图 3 MIA 对大鼠膝关节横向直径、后肢负重能力和 NGF 的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. The transverse diameter of the right knee joint was measured with a vernier caliper. B. Changes in the weight-bearing ratio of left and right hindlimbs of rats after MIA injection. C. Western Blot assay to analyze the protein expression of NGF in the synovial tissue of SD rat knee joints. D. Western Blot assay to analyze the protein expression of NGF in SD rat knee cartilage tissue. The integrated optical density value of the detection index is corrected by the internal reference index, normalized by sham. Compared with sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

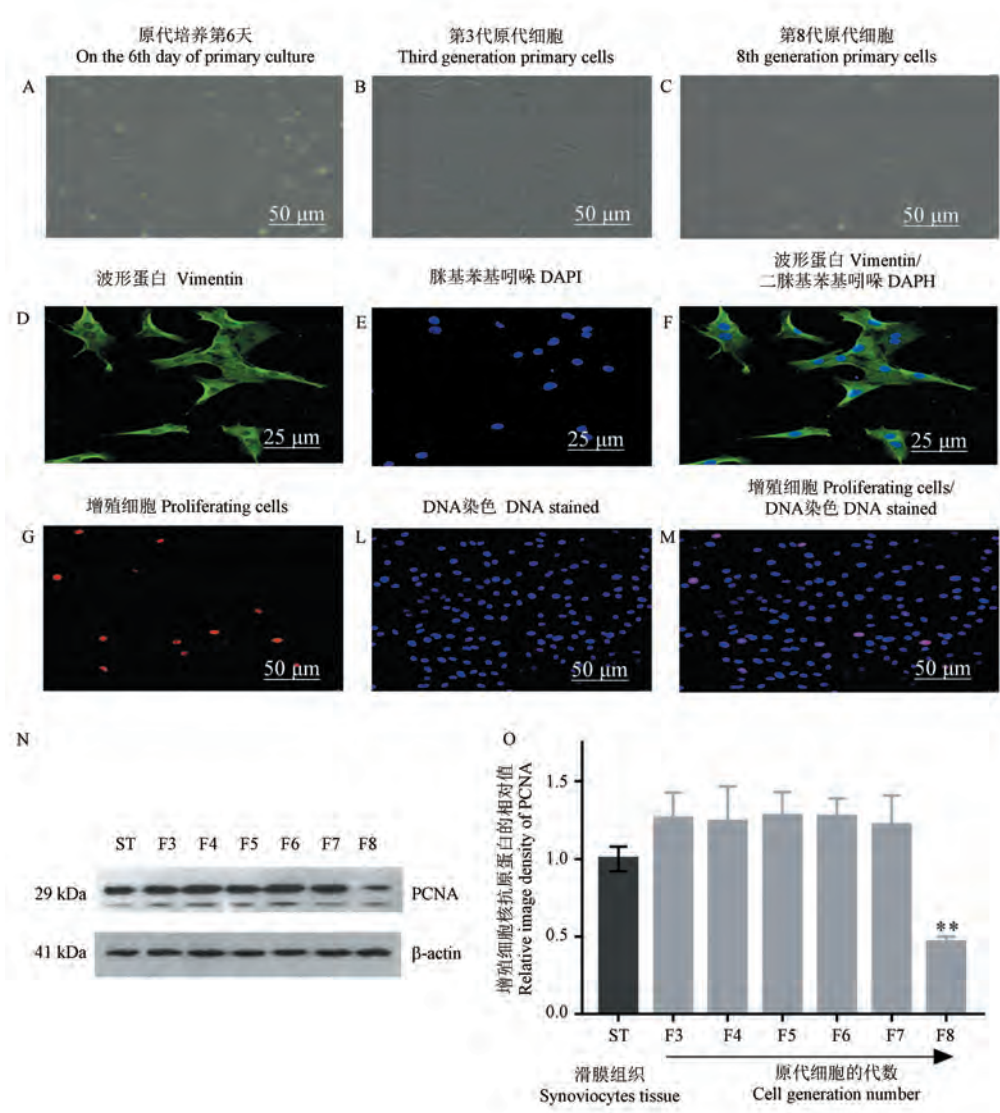
Figure 3 Effects of MIA on the transverse diameter of the knee joint, weight-bearing capacity of hind limbs and NGF in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

代滑膜细胞形态规则,呈梭形,其细胞核位于细胞中央,其形状为卵圆形;FLS 标志蛋白波形蛋白(Vimentin)的阳性染色率超过 98%(图 4D ~ 4F),提示培养的原代滑膜细胞为 FLS。EdU 增殖实验显示第 7 代 FLS 细胞仍有增殖能力(图 4G ~ 4M)。第 3 ~ 8 代 FLS 的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)蛋白的 Western Blot 表明,第 4 ~ 7 代 FLS 的 PCNA 蛋白表达与第 3 代差异不显著(图 4N,4O)。同时第 8 代 PCNA 蛋白表达降低

且与第 3 代 PCNA 蛋白的表达存在显著差异(图 4N,4O)。以上表明:第 3 代到第 7 代原代培养的 FLS 可以用作后续实验材料。

2.5 地塞米松抑制 OA 大鼠体外 FLS 的炎症反应

与假手术组比较,MIA 注入关节腔诱导 KOA 模型后,原代培养的 FLS 促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 、NGF 和 MMP-13 蛋白表达上调。使用地塞米松对 KOA 大鼠体外 FLS 干预后,降低促炎因子的分泌、NGF 和 MMP-13 蛋白的表达(图 5)。



注:A:滑膜细胞培养第6天第1次传代前;B:滑膜细胞培养至第3代;C:滑膜细胞培养至第8代;D~F:滑膜细胞培养至第3代进行波形蛋白荧光化学鉴定;G~M:第7代滑膜细胞EdU增殖实验;N:滑膜组织和原代培养成纤维样滑膜细胞(第3~8代)的增殖细胞核抗原蛋白Western Blot结果;O:滑膜组织和各代细胞中增殖细胞核抗原蛋白的相对含量;组间单因素方差分析, $F_{(6,28)}=45.936, P<0.001$,与第3代细胞相比,只有第8代细胞的增殖细胞核抗原蛋白表达明显下调。

图4 OA大鼠膝关节FLS的原代培养、纯度和增殖

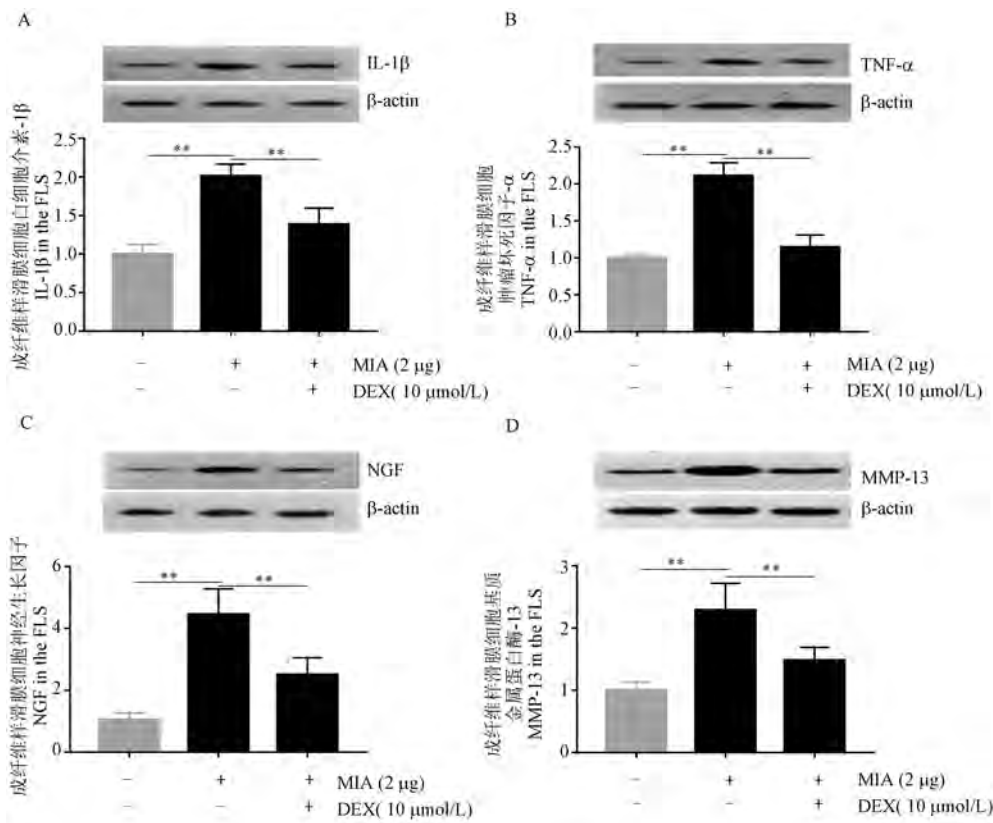
Note. A. Before the first passage on the 6th day of synovial cell cultur. B. Synovial cells cultured to the third generation. C. Synovial cells cultured to the 8th generation. D ~ F. Synovial cells were cultured to the third generation for vimentin fluorescence chemical identification. G ~ M. Seventh generation synovial cell EdU proliferation experiment. N. Western Blot results of PCNA protein of ST and primary cultured FLS (3rd ~ 8th generation). O. The relative content of PCNA protein in ST and cells of each generation. Single factor analysis of variance between groups, $F_{(6,28)}=45.936, P<0.001$. Compared with the third generation cells, only the eighth generation cells had significantly decreased PCNA protein expression.

Figure 4 Primary culture, purity and proliferation of knee joint FLS of OA rats

3 讨论

在本研究中,SD大鼠膝关节腔注入2 mg MIA后,破坏了软骨细胞的有氧糖酵解能量代谢,造成炎症和软骨损伤^[10,15],导致HIF-1 α 蛋白质表达上调,进而促进OPN升高。OPN是骨关节炎标志

物^[15-16],OPN蛋白的表达升高激活了滑膜组织和软骨细胞的促炎因子IL-1 β 和TNF- α ^[17],使其分泌和释放增加。显著增加的IL-1 β 和TNF- α ,致使NGF蛋白质表达上调。在这些细胞因子的共同作用下,诱导了SD大鼠的疼痛反应。表现为SD大鼠被注入MIA后,从第3天起,膝关节肿胀,负重率降低至



注:A:SD大鼠关节滑膜FLS中IL-1 β 蛋白表达;B:SD大鼠关节滑膜FLS中TNF- α 蛋白表达;C:SD大鼠关节滑膜FLS中NGF蛋白表达;D:SD大鼠关节滑膜FLS中MMP-13蛋白表达。

图5 Western Blot检测体外FLS细胞经过DEX干预后促炎因子、MMP-13和NGF蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Note. A. IL-1 β protein expression in joint synovial FLS of SD rats. B. TNF- α protein expression in the synovial FLS of SD rats. C. NGF protein expression in the synovial FLS of SD rats. D. MMP-13 protein expression in the synovial FLS of SD rats.

Figure 5 Western Blot was used to detect the expression of proinflammatory factors, MMP-13 and NGF protein in FLS cells after DEX intervention($\bar{x} \pm s, n = 5$)

26%以下。滑膜炎被^{认为是}OA早期最重要的特征^[13],为此,本研究不但检测了MIA诱导的KOA大鼠膝关节患处软骨和滑膜组织促炎因子的表达,也检测了MIA诱导的KOA大鼠膝关节患处滑膜组织体外原代培养的FLS中的促炎因子、MMP-13和NGF的蛋白表达。结果显示:IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13和NGF的蛋白表达异常增高,经DEX治疗后,显著下调。

通过行为测试(也称为失能实验),观察大鼠肢体的负重能力的变化被广泛认为是衡量MIA大鼠痛苦行为的有效方法,因为啮齿类动物感到疼痛时后肢承受的重量较少^[10]。对MIA诱导的OA大鼠进行14 d的失能实验,观察到MIA注射大鼠膝关节第3天后,负重能力下降,关节肿胀,关节横径增加,关节不适和疼痛。MIA诱导的实验性OA早期以巨噬细胞浸润和滑膜炎为特征;MIA诱导的OA,进一步发展则发生严重的软骨破坏和丢失直至软骨

下骨重建,使疼痛明显且持久。
OA是一种以软骨破坏和滑膜炎为特征的全关节退行性疾病^[13,18]。骨质破坏是以软骨降解为先兆,以OPN为标志^[12]。OPN既是一种细胞外多功能基质糖蛋白^[12],又是一种潜在的炎性细胞因子,在OA关节软骨、滑液及滑膜组织中的表达水平增高,并且与OA的严重程度呈正相关^[12,15]。OA关节软骨和滑膜糖酵解障碍,缺氧引起OPN蛋白质表达上调和炎症因子释放^[16]。OPN可以激活多种促炎因子(如IL-1 β 和TNF- α)和趋化因子的表达,OPN对滑膜炎的放大和维持具有重要意义^[19]。促炎性IL-1 β 和TNF- α 可以刺激NGF释放,而NGF又可以调节TNF- α 的释放^[13]。OA患者关节中OPN、IL-1 β 、TNF- α 和NGF通过分子级联,相互作用,使其蛋白表达上调,再通过一定的分子病理机制,导致关节患处促炎因子聚集,关节肿胀、不适,上调的NGF增加关节患处的痛觉神经敏感性,患处

关节疼痛,使关节失能(肢体负重能力下降)。

OPN 可促进 OA 软骨细胞增殖,但这在一定程度上是代偿性增殖。其增殖程度与 OA 软骨退变、软骨细胞衰老呈正相关^[16]。国内学者利用 OPN shRNA 干预 OA 的软骨细胞增殖,有一定治疗作用^[15]。促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 是引起关节炎症性疼痛的主要原因。IL-1 β 可刺激 COX-2、iNOS 等产生,进一步激活炎症途径,诱导炎症性疼痛^[10],降低肢体负重能力。利用合欢提取液^[10]、木香根提取物^[20]和穿心莲提取物^[21]对 MIA 诱导的 OA 有一定的镇痛抗炎作用,而且提高了大鼠负重能力,这可能与抑制炎症反应有关。据报道,NGF 通过增加伤害感受器敏感性和促进感觉神经生长,加强疼痛^[13],使关节失能。目前,已有多种人源化 NGF 单克隆抗体在进行临床试验,用于治疗骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 疼痛及神经病理性疼痛等慢性疼痛^[22]。但 NGF 单克隆抗体 (例如: fulranumab、tanezumab 等),因其存在致患者关节损伤的潜在风险而被暂停研究。

滑膜 NGF 增加是膝关节 OA 的一个特征^[15],本研究对 KOA 大鼠滑膜原代培养的体外 FLS 进行分子蛋白检测,其结果提示 NGF 表达显著升高,而且与其关联的 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-13 蛋白分子也升高明显^[22],说明 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 在 OA 的分子病理和疼痛发生中发挥着重要作用。这些 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-13 蛋白在滑膜产生,并通过滑液扩散到软骨中,这是导致软骨细胞凋亡的原因之一^[23-25]。IL-1 β 和 TNF- α 启动软骨降解,MMP-13 直接降解软骨基质。IL-1 β 和 TNF- α 直接刺激 FLS 释放 NGF,进而 NGF 诱导感觉神经生长和增加痛觉敏感性^[13],导致疼痛相关行为病理改变。经过 DEX 抑炎处理,使 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 的蛋白表达负增长,证明抑炎对降低 OA 关节感觉神经生长速度和神经敏感性是有效的。这也说明 FLS 是一个研究痛觉的靶点。

综上所述,OA 的细胞因子 (HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF),在滑膜炎症、软骨降解及基质破坏和关节疼痛等方面起着重要作用,将其作为靶点,采取干预剂或 shRNA 或相应抗体用于关节疼痛的管理、炎症反应调节和抑制软骨降解和基质破坏等,这也许是今后的研究方向。

参 考 文 献 (References)

[1] Chen D, Shen J, Zhao W, et al. Osteoarthritis: toward a

comprehensive understanding of pathological mechanism [J]. Bone Res, 2017, 5: 16044.

[2] Lu K, Ma F, Yi D, et al. Molecular signaling in temporomandibular joint osteoarthritis [J]. J Orthop Translat, 2022, 32: 21-27.

[3] 张晋宁, 杨天翔, 张博文, 等. 转化生长因子- β 信号转导通路与骨关节炎 [J]. 国际骨科学杂志, 2021, 42(2): 97-101. Zhang JN, Yang TX, Zhang BW, et al. Transforming growth factor- β signal transduction pathway and osteoarthritis [J]. Int J Orthop, 2021, 42(2): 97-101.

[4] Duan D, Derynck R. Transforming growth factor- β (TGF- β)-induced up-regulation of TGF- β receptors at the cell surface amplifies the TGF- β response [J]. J Biol Chem, 2019, 294(21): 8490-8504.

[5] 乔虎军, 王国祥, 郝鑫. 转化生长因子 β /Smad 信号通路和骨关节炎研究进展 [J]. 中国运动医学杂志, 2019, 38(2): 143-151.

Qiao HJ, Wang GX, Hao X. Research progress of transforming growth factor β /Smad signaling pathway and osteoarthritis [J]. Chin J Sports Med, 2019, 38(2): 143-151.

[6] 中华医学会骨科学分会关节外科学组, 中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组, 国家老年疾病临床医学研究中心 (湘雅医院), 等. 中国骨关节炎诊疗指南 (2021 年版) [J]. 中华骨科杂志, 2021, 41(18): 1291-1314.

The Joint Surgery Branch of the Chinese Orthopaedic Association, The Subspecialty Group of Osteoarthritis, Chinese Association of Orthopaedic Surgeons, The National Clinical Research Center for Geriatric Disorders (Xiangya Hospital), et al. Chinese guideline for diagnosis and treatment of osteoarthritis (2021 edition) [J]. Chin J Orthop, 2021, 41(18): 1291-1314.

[7] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 骨关节炎诊疗指南 (2018 年版) [J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(12): 705-715. Joint Surgery Group of Orthopaedic Branch of Chinese Medical Association. Guidelines for diagnosis and treatment of osteoarthritis (2018 edition) [J]. Chin J Orthop, 2018, 38(12): 705-715.

[8] Zhang L, Zhang L, Huang Z, et al. Increased HIF-1 α in knee osteoarthritis aggravate synovial fibrosis via fibroblast-like synoviocyte pyroptosis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 6326517.

[9] 熊翱, 熊仁平, 彭艳, 等. 脂多糖诱导 SD 大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 436-446.

Xiong A, Xiong RP, Peng Y, et al. Establishment and characteristic analysis of a model of knee fibroblast-like synoviocytes in lipopolysaccharide-induced Sprague-Dawley rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 436-446.

[10] Lee D, Ju MK, Kim H. *Commiphora* extract mixture ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis [J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1477.

[11] Chien, Huang SK, Lee CJ, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of zerumbone against mono-iodoacetate-

- induced arthritis [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(2): 249.
- [12] Gao S, Li K, Zeng K, et al. Elevated osteopontin level of synovial fluid and articular cartilage is associated with disease severity in knee osteoarthritis patients [J]. Osteoarthr Cartil, 2009, 18(1): 82–87.
- [13] Liao L, Zhang S, Zhao L, et al. Acute synovitis after trauma precedes and is associated with osteoarthritis onset and progression [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(6): 970–980.
- [14] 陈芳, 刘琴, 王丽平, 等. 改良组织块法分离培养兔成纤维样滑膜细胞 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(4): 75–78, 85.
- Chen F, Liu Q, Wang LP, et al. Primary culture of rabbit fibroblast-like synoviocytes using an improved explant culture method [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(4): 75–78, 85.
- [15] Huang J, Zhao L, Chen D. Growth factor signalling in osteoarthritis [J]. Growth Factors, 2018, 36(5–6): 187–195.
- [16] 姜未, 林博文, 张轩, 等. 骨桥蛋白可促进骨关节炎软骨细胞增殖 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(24): 3773–3777.
- Jiang W, Lin BW, Zhang X, et al. Osteopontin promotes chondrocyte proliferation in osteoarthritis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2017, 21(24): 3773–3777.
- [17] Gross TS, King KA, Rabaia NA, et al. Upregulation of osteopontin by osteocytes deprived of mechanical loading or oxygen [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(2): 250–256.
- [18] 杨威, 郭斯印, 易志勇, 等. 膝关节关节炎病证结合动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 139–143.
- Yang W, Guo SY, Yi ZY, et al. Research progress on animal models of a combination of diseases and syndromes of knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 139–143.
- [19] Xu G, Nie H, Li N, et al. Role of osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis [J]. J Clin Invest, 2005, 115(4): 1060–1067.
- [20] Lee D, Baek CY, Hwang JH, et al. *Andrographis paniculata* extract relieves pain and inflammation in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis and acetic acid-induced writhing in animal models [J]. Processes, 2020, 8(7): 873.
- [21] Jo HG, Lee GY, Baek CY, et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Aucklandia lappa* root extracts on acetic acid-induced writhing in mice and monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats [J]. Plants (Basel), 2020, 10(1): 42.
- [22] 张常建, 陈秀秀, 周丽君. 抗体治疗疼痛的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(2): 130–133.
- Zhang J, Chen YY, Zhou LJ. Research progress of antibody therapy for pain [J]. Chin J Pain Med, 2022, 28(2): 130–133.
- [23] 赵军, 褚亚君, 梁晋裕, 等. 跑台运动对糖尿病大鼠学习记忆及海马炎症因子和 NGF 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 65–71.
- Zhao J, Chu YJ, Liang JY, et al. Effects of treadmill exercise on learning, memory, inflammation, and NGF expression in the hippocampus of diabetic rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 65–71.
- [24] Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(6): 1237–1247.
- [25] 孙尚, 邹达, 赵振达, 等. 基于大鼠 OVX 模型研究雌激素缺乏对终板软骨细胞退变的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 16–22.
- Sun S, Zou D, Zhao ZD, et al. Degeneration of chondrocytes in cartilage endplate due to estrogen deficiency based on rat OVX model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 16–22.

[收稿日期] 2022-09-19

王婵,杨根梦,刘柳,等. HIV 动物模型在毒品滥用研究中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 653-659.

Wang C, Yang GM, Liu L, et al. Application of a HIV animal model in drug abuse research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 653-659.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.012

HIV 动物模型在毒品滥用研究中的应用

王婵^{1#}, 杨根梦^{1,3#}, 刘柳¹, 王浩伟¹, 苗霖¹, 李怡¹, 李娟^{2,3*}, 曾晓锋^{1,3*}

(1. 昆明医科大学法医学院法医学系, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学基础医学院病原生物学与免疫学系, 昆明 650500; 3. 国家卫健委毒品依赖和戒治重点实验室, 昆明 650500)

【摘要】 目前, 毒品滥用及人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染的共病问题备受关注。毒品滥用是 HIV 传播的促发因素之一, 其同样可加重 HIV 感染者中枢神经系统的病毒载量水平和加速 HIV 相关神经认知障碍 (HIV-associated neurocognitive disorders, HAND) 的疾病进展速度。本文着重介绍了目前常用的 HIV 感染相关动物模型, 如非人灵长类动物、啮齿类动物及猫科动物, 分析了其局限性和优势性, 并对 HIV 感染相关动物模型在毒品滥用研究中的应用进行了综述。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒; 毒品滥用; 非人灵长类动物模型; HIV 感染相关啮齿类动物模型; FIV/家猫动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0653-07

Application of a HIV animal model in drug abuse research

WANG Chan^{1#}, YANG Genmeng^{1,3#}, LIU Liu¹, WANG Haowei¹, MIAO Lin¹, LI Yi¹,
LI Juan^{2,3*}, ZENG Xiaofeng^{1,3*}

(1. Department of Forensic Medicine, School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China. 2. Department of Pathogen Biology and Immunology, Faculty of Basic Medical Science, Kunming Medical University, Kunming 650500. 3. NHC Key Laboratory of Drug Addiction Medicine, Kunming 650500)

Corresponding author: LI Juan. E-mail: 121093258@qq.com; ZENG Xiaofeng. E-mail: zxf2004033@163.com

【Abstract】 The comorbidity of drug abuse and human immunodeficiency virus (HIV) infection has attracted much attention. Drug abuse is a promoter of HIV transmission. It also aggravates the viral load in the central nervous system and accelerates the progression of HIV-associated neurocognitive disorders. This article focuses on the commonly used animal models related to HIV infection, such as non-human primates, rodents, and felines, analyzes their limitations and advantages, and summarizes the latest research progress of animal models related to HIV infection in drug abuse.

【Keywords】 human immunodeficiency virus; drug abuse; non-human primate model; rodent model associated with HIV infection; FIV/feline model

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

【基金项目】 国家自然科学基金 (82160325, 82060382, 82202081), 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项 (重点项目) (202201AY070001-020)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82160325, 82060382, 82202081), Yunnan Provincial Department of Science and Technology-Kunming Medical University Applied Basic Research Joint project (Key Project) (202201AY070001-020)。

【作者简介】 王婵 (1996—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 毒品滥用与艾滋病协同神经系统损害及干预机制。Email: 231060597@qq.com;
杨根梦 (1992—), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 毒品滥用与艾滋病协同神经系统损害及干预机制。Email: 1223984885@qq.com。
#共同第一作者

【通信作者】 李娟 (1980—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 毒品滥用与艾滋病协同神经系统损害及干预机制。Email: 121093258@qq.com;
曾晓锋 (1977—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 毒品滥用与艾滋病协同神经系统损害及干预机制。Email: zxf2004033@163.com。

* 共同通信作者

迄今为止,全球约有 38 万人感染人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV),并且艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)成为主要的公共卫生问题^[1]。HIV 在感染早期进入中枢神经系统(central nervous system, CNS),其本身不会直接损伤神经元,而是通过 HIV 相关蛋白,如 Tat、Gp120、Nef 和 Vpr 蛋白等,改变神经元结构和功能,引起 HIV 相关神经认知障碍(HIV-associated neurocognitive disorders, HAND)^[2]。目前,抗逆转录病毒疗法(anti-retroviral therapies, ART)的治疗使得 HIV 感染者(people with HIV, PWH)的生存时间延长和生存质量提高,事实上 ART 在大脑中的渗透率相对较低,导致 PWH 仍然出现 HAND^[3]。另外,根据联合国艾滋病规划署统计^[1],注射毒品的人员感染 HIV 的可能性是不注射毒品的人员的 35 倍。近些年研究发现,长期吸食毒品还会造成 PWH 脑部结构和功能的不可逆的损伤,并且可增加 HIV 在 PWH 大脑中的病毒载量水平和炎症因子的释放量,进而加快 PWH 的 HAND 疾病进程^[4-5]。但遗憾的是,目前对于毒品滥用合并 HIV 感染的致病机制仍未阐明并且缺乏有效的治疗手段。因此, HIV 相关动物模型的开发,有助于进一步了解 HIV 感染合并毒品滥用的具体发病机制。鉴于此,本文针对 HIV 动物模型构建、优缺点以及其在毒品滥用研究中的应用进行简单综述,以期为 HIV 感染合并毒品滥用的研究提供参考。

1 HIV 动物模型的建立

1.1 HIV 相关非人灵长类动物模型的建立

1983 年,在恒河猴群中出现了与 PWH 相似的机会性感染。研究者们根据病毒基因核苷酸序列发现非洲非人灵长类动物携带的猿猴类免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)与 HIV 整体结构具有一定的同源性,同时 HIV-1 源自野生黑猩猩的 SIVcpz 和野生大猩猩的 SIVgor,而 HIV-2 源自非洲乌黑白眉猴 SIVsmm,由此认为,人类的 HIV 起源是来自非洲非人灵长类动物的 SIV 向人类的跨物种传播^[6]。截至目前,非人灵长类动物也被称为“SIV 天然宿主”,而在长期的 SIV 病毒-非人灵长类宿主动物协同进化中通过刺激先天免疫反应和抑制全身免疫激活,使其具备感染 SIV 但不出现 AIDS 相关综合征的特点,但某些 SIV 病毒株易感染亚洲猕猴——恒河猴、食蟹猴、猪尾猕猴,并在数月内猕

猴出现消瘦、淋巴结肿大、外周 CD4⁺ T 细胞减少、高病毒血症、适应性免疫和固有免疫异常激活以及肠道屏障功能障碍等症状^[7]。但由于两者 *Env* 基因不同以及 SIV 缺乏 HIV 的 *Vpu* 基因,为克服 SIV 的差异性,以 SIVmac239 病毒为骨架,通过基因工程手段将 HIV-1 HCBc2 的 *Rev*、*Tat*、*Env* 以及 *Vpu* 基因与 SIV 进行基因重组,构建出以 CCR5 和 CXCR4 为共受体的人猴免疫缺陷嵌合病毒(simian-human immunodeficiency virus, SHIV)^[8]。SHIV 病毒通过静脉注射、直肠或者阴道途径感染猕猴后,猕猴体内出现感染症状与 HIV 感染较为接近。

SIV、SHIV 通过趋化因子感染淋巴细胞和单核细胞透过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB),一旦进入大脑,就会在小胶质细胞中进行复制,这些细胞也成为病毒储存库。另外,过多激活小胶质细胞会引起中枢炎症反应,从而导致神经元变性,并在 150 d 内迅速发展为猴免疫缺陷病毒脑炎(simian immunodeficiency virus encephalitis, SIVE)^[9]。一项针对患有 SIVE 猕猴的研究表明,猕猴的下丘脑出现小胶质细胞活化以及高病毒载量,进而引起猕猴昼夜节律出现异常。另外,在感染早期阶段,猕猴出现异常的皮层诱发电位、严重的认知功能障碍以及共济失调等症状^[10-11]。

基于非人灵长类动物拥有与人类相似的遗传物质、病理生理学特性以及脑部结构,同时具有易感 HIV 病毒的优势,其在 HIV 感染研究中有不可替代的作用,以该模型为研究基础,可以实现从科研实验室到临床治疗的成功转化。然而,该模型动物具有认知和情感能力,这就使得动物伦理审查更为严格。再者,动物资源不容易获得,普通实验室难以达到饲养管理条件,并且动物个体差异、本身质量以及猴类常见疾病等因素容易影响研究结果。此外,以非人灵长类动物为研究对象,存在实验周期长、缺乏可重复性、成本昂贵等缺点。

1.2 HIV 相关猫科动物模型的建立

猫免疫缺陷病毒(feline immunodeficiency virus, FIV)是一种逆转录病毒科慢病毒,其主要宿主为猫科动物。FIV 病毒颗粒包含囊膜、衣壳及核芯,其中有 3 个开放阅读框(open reading frame, ORF)与病毒的成熟、反转录、整合和基因组修复相关,分别为 *Gag*、*Pol* 和 *Env*,还有 3 个辅助 ORFs 与病毒基因的表达、复制相关,分别为 *Vif*、*Orf-A* 和 *Rev*^[12]。FIV 与 CD4⁺ T 淋巴细胞表面的 CD134 发生特异性结

合^[13]。这种相互作用诱导 SU 蛋白的构象变化,然后 Env 蛋白的 V3 环中暴露出与共受体 CXCR4 紧密结合的表位。随后, FIV 与宿主细胞膜发生融合,其核芯进入宿主细胞进行转录表达。FIV 感染有 3 个“经典”阶段:第一阶段为急性感染期,持续时间约 4 ~ 8 周,在此期间动物出现短暂发热,出现 CD4⁺ T 淋巴细胞急剧增加,伴有 FIV 病毒 RNA 和前病毒的高表达;第二阶段为无症状感染期,持续时间较长,动物体内出现 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比值倒置,同时表达 FIV 抗体,此时血液中病毒受到抑制,PCR 检测呈假阴性;第三阶段为继发性感染期,动物表现为慢性口腔炎、机会性感染诱发的皮炎和呼吸道疾病等一系列的免疫缺陷和机会性感染^[14]。

受感染的单核-巨噬细胞携带 FIV 透过脉络丛的 BBB 和/或血脑脊液屏障进入 CNS,引起大脑结构和功能的广泛改变,如血管周围淋巴细胞和巨噬细胞的浸润和蓄积、小胶质细胞和星形胶质细胞的活化以及神经元变性。另外,炎症细胞的浸润和免疫异常激活会导致 CNS 功能异常,动物出现异常的刻板运动行为、攻击性增加、脑干诱发电位的潜伏期延长、矫正和瞳孔反射延迟、神经传导速度降低以及认知运动功能缺陷等症状^[15]。

另外, FIV/家猫动物模型是唯一自然发生并引起免疫缺陷综合症的非灵长类慢病毒动物模型,且因价格便宜、体型小、数量多,近些年来该模型已被用于研究 HIV-1 发病机制、抗逆转录病毒药物的开发和测试。除此之外, FIV/家猫动物模型也可用于探索宿主限制因子的潜力,这对于解析 FIV 的复制机制以及改进 HIV 研究的 FIV/家猫动物模型具有重要意义。但是, FIV/家猫动物模型也有自身的局限性:CD134 是 FIV 主要的结合受体,从而使 FIV 能够感染 T 细胞和巨噬细胞。因此, FIV 与 HIV、SIV 的靶受体是不同的,为此 HIV 相关猫科动物模型在 HIV 治疗研究中的适用性可能受到限制。

1.3 HIV 相关啮齿类转基因动物模型的建立

1.3.1 HIV 全病毒基因转基因大鼠模型的建立

HIV 全病毒基因转基因大鼠模型也称 HIV-1 转基因大鼠,主要由前病毒质粒(pNLS-3)克隆体发展而来,因其删除 *Gag* 和 *Pol* 基因,为此 HIV-1 转基因大鼠不具备传染性,但是其体内仍然能编码 *Env*、*Tat*、*Rev*、*Vif*、*Vpr*、*Nef* 和 *Vpu* 基因^[16]。此外, HIV-1 转基因大鼠不仅会出现严重的免疫缺陷、不透明性

白内障、消瘦、皮肤损伤、呼吸疾病和肾病等症状,还会出现严重的神经系统功能障碍,主要表现为认知障碍、执行功能障碍和听觉系统功能障碍^[17]。

1.3.2 HIV 病毒蛋白转基因小鼠的建立

HIV Tat 转基因小鼠模型的建立方法主要是依赖于四环素调控基因表达系统来控制 *Tat* 基因表达。首先,构建 *TRE-Tat86* 转基因小鼠和 *GFAP-rtTA* 转基因小鼠,再将两种转基因小鼠进行杂交后,可获得含有 *TRE-Tat86* 和 *GFAP-rtTA* 基因的小鼠。这种转基因小鼠通过体内是否存在四环素来特异性调控脑内 *Tat* 蛋白基因的表达^[18]。用四环素诱导的 HIV Tat 转基因小鼠早期会出现发育迟缓、驼背、震颤、共济失调、癫痫发作以及认知障碍等行为改变,同时模型鼠大脑中出现反应性星形胶质细胞增生、神经元树突数量减少、神经元死亡以及胶质细胞形态改变等神经病理学变化^[18-19]。

HIV gp120 转基因小鼠模型是在 *GFAP* 启动子的下游插入 HIV *Env* 基因,进而形成 HIV gp120 转基因小鼠。gp120 蛋白在转基因小鼠的新皮层、嗅球、海马体、顶盖、特定的白质束以及其他与星形胶质细胞相关的脑区中表达最高^[20]。虽然 gp120 转基因小鼠仅表达 gp120 蛋白,但体内与 HAND 有着相似的神经理病理学特征。3 月龄的模型鼠大脑皮层中会出现突触缺失和树突密度降低、小胶质细胞过度活化、反应性星形胶质细胞增生以及神经元死亡^[21-22]。在学习记忆方面,6 月龄的模型鼠出现游泳速度降低、空间学习受损、焦虑样行为和记忆缺陷等行为缺陷,并且电生理学实验检测到模型鼠的海马 CA5 区域出现长时程增强效应的波动幅度降低^[21]。

然而,目前最常见的模拟 HIV 感染动物模型仍然是啮齿类动物,该类动物体型小、较易饲养、繁殖力强、自身有清晰遗传背景。为此采用基因工程技术特异性插入突变基因,有利于特定基因在疾病进展中机制研究和防治药物的筛选。尽管使用啮齿类转基因动物模型围绕 HIV 致病机制、药物治疗、疾病防控机制和疫苗研发等方面开展了卓有成效的研究工作,但由于啮齿类动物与人的种属和个体之间存在较大的生物学差异,导致该模型无法完全复制 HIV 感染某些复杂症状如成瘾相关记忆、HAND 等。同时,基于某一病毒蛋白构建的动物模型存在抗病性差、生存率低,且只能呈现特定的表型,不能诠释多种病毒蛋白的联合作用引起的病理

效应。该模型还需要在特定组织或者细胞内才能稳定表达目的基因,因而需要先构建稳定表达的单转基因小鼠,再通过杂交、回交等方式才能获得所需的多转基因小鼠,同时这也就意味着需要耗费大量的人力、物力、财力进行饲养和维护。根据现有文献,本文总结了 HIV 相关动物模型的构建方法、优缺点以及主要疾病症状(见表 1)。

2 HIV 动物模型在毒品滥用研究中的应用

2.1 HIV 相关非人灵长类动物模型在毒品滥用研究中的应用

对于 PWH 来说,毒品滥用可能会增加 PWH 脑内 HIV 病毒载量,加快 HIV 的疾病进展以及艾滋病相关死亡率等风险,而目前常见的毒品主要有可卡因、阿片类药物和苯丙胺类药物等。

在吗啡给药的 SIV/猕猴动物模型中观察到猕猴体重下降、CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞数量减少、死亡率增加,同时血浆和脑脊液中检测到 SIV 病毒载量显著增加^[23]。在长期吗啡给药伴 SIV 感染的猕猴体内,Acharya 等^[24]发现猕猴淋巴结的 SIV 病毒载量出现下降,同时观察到 CNS 中小胶质细胞数量增多以及 SIV 病毒载量显著增高。由此可见吗啡可以增加 SIV 在受感染动物大脑中的病毒载量。另外,吗啡和 SIV 能协同上调猕猴纹状体中突触小体的 HSPA5 蛋白表达水平,导致突触小体功能障碍,进而加速 HAND 恶化速度^[25]。一项研究表明,与吗啡单独处理组或者 SIV 组相比,慢性吗啡给药伴 SIV 感染的猕猴出现运动技能任务显著下降,出现显著的行为障碍^[11]。甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)同样会增加 SIV 感染的猕猴大脑中平均病毒载量水平,但不会改变血浆中平均病毒载量水平。Najera 等^[26]进一步发现 METH 给药后会显著增加恒河猴脑中 CCR5 受体的表达含量,这可能是猕猴脑中病毒载量水平增加的原因。此外,在 SIV 感染条件下 METH 可增加星形胶质细胞的 IL15 表达水平,并诱导 T 细胞过度增殖,进而加重猕猴的神经炎症^[27]。与吗啡、METH 不同,可卡因并不会改变猕猴脑脊液、血浆中 SIV 的病毒载量水平。Weed 等^[28]也发现相似的研究结果,可卡因处理后并未增加 SIV 感染后猕猴脑中炎症因子表达水平以及对猕猴的执行性功能并没有任何影响,这表明可卡因并不会加重 SIV 感染所致认知障碍的症状。

2.2 HIV 相关猫科动物模型在毒品滥用研究中的应用

早期研究中发现急性吗啡处理可以延缓早期 FIV 感染家猫的病程进展,并且在 FIV 感染家猫的血浆中检测到其病毒载量降低,同时延迟淋巴结肿大出现的时间。2003 年, Barr 等^[29]以感染 FIV 的家猫为研究对象,静脉注射吗啡后发现吗啡具有拮抗 FIV 诱导家猫脑干听觉诱发电位潜伏期延长的作用,这表明在 FIV/家猫动物模型中吗啡具有保护作用。与吗啡不同, METH 暴露可增加 CNS 中的 FIV 病毒复制程度^[30]。研究表明, METH 给药后,家猫纹状体内多巴胺(dopamine, DA)和多巴胺转运蛋白(dopamine transporter, DAT)的含量显著减少,同时 5-HIAA/5-HT 比率显著增加,由此可见, METH 合并 FIV 不仅能够改变神经递质浓度和神经递质特异性蛋白的含量,同时还会造成家猫的脑干听觉诱发电位延迟^[11]。上述结果表明了 METH 滥用极大地加重了 FIV 诱导 CNS 功能障碍的程度,同时 FIV 可增加了 METH 的神经毒性作用。

2.3 HIV 相关啮齿类转基因动物模型在毒品滥用研究中的应用

毒品滥用会加剧 HIV 感染对神经系统损害作用,可导致行为和认知障碍以及记忆力受损,加重 HAND 的病情进展,最终加速 HIV 感染患者的死亡。HIV 相关啮齿类转基因动物已广泛应用于 HIV 相关神经认知功能及行为研究。在老年雄性 gp120 转基因小鼠身上观察到, METH 给药后小鼠的前脉冲抑制出现缺失,使大脑不能准确去除干扰信息,导致重要认知信息无法被大脑正常加工处理,表现出认知缺陷^[31]。研究表明, HIV Tat 转基因小鼠海马 CA1 区的锥体神经元树突棘数量减少且出现树突棘脱落、扩张和萎缩等形态变化,巴恩斯迷宫测试可观察到 HIV Tat 转基因小鼠的空间记忆出现受损,同时吗啡可放大上述效应^[32]。研究表明,可卡因暴露通过阻断 HIV Tat 转基因小鼠脑内 DAT,进而诱导 DA 再摄取障碍,加强 DA 自氧化的神经毒性作用,导致小鼠出现识别记忆障碍^[33]。

除此之外,反复间歇性 METH、可卡因给药, HIV 相关啮齿类转基因动物会产生持续的行为致敏作用,具体表现为自主活动增加、出现刻板行为等^[11,16,34-35]。此外, Soontornniyomkij 等^[36]证实给予低剂量 METH 后, HIV gp120 转基因小鼠脑内“奖赏效应”更为明显。通过吗啡连续给药成功建立

表 1 HIV 动物模型的构建方法、优越性、局限性以及临床症状

Table 1 Construction method, advantages, limitations and clinical symptoms of HIV animal models

感染物种 Species of infection		构建方法 Construction method	优越性 Advantages	局限性 Limitations	临床症状 Clinical symptoms	参考文献 References	
非人灵长类动物 Non-human primates	SIV 感染非人灵长类动物 SIV infects Non-human primates	-	从非人灵长类动物体内分离出来 Isolated from non-human primates	实验动物数量少、个体差异大、实验成本高、动物伦理审查要求严格 The number of experimental animals is small, the individual variation is large, the experimental cost is high, and the ethical review of animals is strict	淋巴结肿大、高病毒血症、猴免疫缺陷病毒脑炎 Lymphadenopathy, high viremia, simian immunodeficiency virus encephalitis	[8]	
	SHIV 感染非人灵长类动物 SHIV infects Non-human primates	-	以 SIVmac239 病毒为骨架,插入 HIV-1 的 <i>Rev</i> 、 <i>Tat</i> 、 <i>Env</i> 以及 <i>Vpu</i> 基因 SIVmac239 virus was used as skeleton to insert <i>Rev</i> , <i>Tat</i> , <i>Env</i> and <i>Vpu</i> genes of HIV-1	接近人类的病理生理学 Close to the pathophysiology of humans			
猫科动物 Felines	-	-	唯一自然发生的 HIV 跨物种感染的动物、实验动物数量多 The only naturally occurring cross-species HIV infection in animals, the number of experimental animals is large	FIV 感染细胞的靶受体不同,不能完全模拟人类 AIDS The target receptors of FIV-infected cells are different, which cannot completely simulate human AIDS	发热、外周淋巴结肿大、慢性口腔炎、皮炎、呼吸道疾病、中枢神经系统疾病 Fever, peripheral lymphadenopathy, chronic stomatitis, dermatitis, respiratory disease, central nervous system disease	[14]	
啮齿类动物 Rodent	HIV-1 转基因大鼠 HIV-1 transgenic rats	-	删除 <i>Gag</i> 和 <i>Pol</i> 基因的 pNLS-3 克隆体 pNLS-3 clones with deletion of <i>Gag</i> and <i>Pol</i> genes	繁殖力强、易饲养、发病原因和症状明确,有利于特定基因在疾病进展中机制研究 Strong fecundity, easy feeding, clear etiology and symptoms of disease, which is conducive to the mechanism research of specific genes in disease progression	无传染性,无法模拟 HIV 病毒复制 Non-infectious, it is unable to simulate HIV replication	严重的神经系统功能障碍、免疫缺陷、不透明性白内障、消瘦、皮肤损伤、呼吸疾病和肾病 Severe neurological dysfunction, immunodeficiency, opaque cataracts, wasting, skin lesions, respiratory disorders, and nephropathy	[16]
	HIV Tat 转基因小鼠 HIV Tat transgenic mice		基于四环素调控系统构建含 <i>TRE-Tat</i> 86 和 <i>GFAP-rtTA</i> 基因的小鼠 Mice containing <i>TRE-Tat</i> 86 and <i>GFAP-rtTA</i> genes were constructed based on the tetracycline regulatory system	抗病性差,不能说明多种病毒蛋白共同引起的病理效应 Poor disease resistance, it is unable to explain the pathological effect caused by multiple viral proteins	发育迟缓、驼背、震颤、共济失调、缓慢的认知和运动、癫痫发作、过早死亡以及认知障碍 Developmental retardation, hunchback, tremor, ataxia, slow cognition and movement, seizures, premature death, and cognitive impairment	[18]	
	HIV 病毒蛋白转基因小鼠 Transgenic mice with HIV viral proteins		HIV gp120 转基因小鼠 HIV gp120 transgenic mice				
			在 GFAP 启动子的下游插入 HIV <i>Env</i> 基因 The HIV <i>Env</i> gene was inserted downstream of the GFAP promoter				[21]

HIV-1 转基因大鼠的条件位置偏爱, Vigorito 等^[16]证明了啡在 HIV-1 转基因大鼠 CPP 实验中的增强作用,且对于啡啡相关的记忆至少可持续 344 d。Zhu 等^[33]则通过 HIV Tat 转基因小鼠可卡因给药模

型进行成瘾机制研究,发现可卡因可显著增强 HIV Tat 转基因小鼠条件位置偏爱,但提前给予 DAT 的新型变构剂——SRI-32743 可显著降低可卡因诱导的条件位置偏爱。根据现有文献,本文总结了 HIV 动物模型在毒品滥用研究中的应用、不同点以及优缺点(见表 2)。

表 2 HIV 动物模型在毒品滥用研究中的应用、不同点以及优缺点

Table 2 Application, differences, advantages and disadvantages of HIV animal models in drug abuse research				
动物模型 Animal models	应用 Application	不同点 Differences	优缺点 Advantages and disadvantages	参考文献 References
HIV 相关非人灵长类动物模型 HIV-associated nonhuman primate models	①学习、记忆和认知障碍研究 ②病毒感染及复制机制研究 ① Researches of learning, memory, and cognitive disorders ②Researches of viral infection and replication mechanism	可卡因不会增加 SIV 感染后的病毒载量水平以及认知障碍。 Cocaine does not increase viral load levels or cognitive impairment after SIV infection.	优点:最为接近人类 HIV 感染合并毒品滥用情况下的病理表征。 缺点:实验周期长;个体差异大等。 Advantages: It is the closest pathological characterization of human HIV infection with drug abuse. Disadvantages: The experimental period is long and the individual variation is large.	[11,23,28]
	HIV 相关猫科动物模型 HIV-associated feline models	神经损伤研究 Researches of nerve injury	吗啡对感染 FIV 的家猫具有神经保护作用。 Morphine has a neuroprotective effect in domestic cats infected with FIV.	
HIV 相关啮齿类转基因动物模型 HIV-associated rodent transgenic animal models	①学习、记忆和认知障碍研究 ②毒品成瘾性研究 ③HIV 相关病毒蛋白具体病理机制研究 ① Researches of learning, memory, and cognitive disorder s ②Researches of drug addiction ③ Researches of the specific pathological mechanisms of HIV-associated viral proteins	吗啡、可卡因均能加重 HIV 相关啮齿类转基因动物学习、记忆和认知障碍。 Morphine and cocaine can aggravate learning, memory and cognitive impairment in HIV-related transgenic rodents.	优点:可以为 HIV 感染合并毒品滥用提供理论支持。 缺点:FIV 感染细胞的靶受体不同。 Advantages: It can provide theoretical support for HIV infection combined with drug abuse. Disadvantages: The target receptors of FIV infected cells are different.	[11,29-30]
			优点:在 HIV 感染合并毒品滥用研究中应用最多以及较为成熟的动物模型。 缺点:无法用于毒品滥用合并 HIV 感染后病毒感染及复制的机制研究。 Advantages: The most widely used and mature animal model has been used in the study of HIV infection combined with drug abuse. Disadvantages: It cannot be used to study the mechanism of HIV infection and replication in drug abuse patients with HIV infection.	

3 小结

随着越来越多的 HIV 相关动物模型的出现,大大加快了科研工作者对 HIV 合并毒品滥用的致病机制的认知进程,但现有的动物模型仅能表现 HIV 感染的部分病理表现,这也是对全面研究 HIV 致病机制的局限性之一。因此,未来将继续研究并建立更贴近 HIV 发病特征的动物模型,再探索 HIV 感染相关动物模型在毒品滥用研究中的合理性。为此,构建理想的 HIV 动物模型,要求动物能支持 HIV 病毒自主复制,具有与人类相似的发病症状和传播方式,与人类相同的靶细胞和靶器官。此外,理想的动物模型需要符合共同发病机制,以作为合适的工具用于未来治疗方式的研究。

参 考 文 献(References)

[1] UNAIDS. Global HIV statistics [EB/OL]. [2023-5-4]. https://www.unaids.org/en.

[2] Rojas-Celis V, Valiente-Echeverria F, Soto-Rifo R, et al. New challenges of HIV-1 infection; how HIV-1 attacks and resides in the central nervous system [J]. Cells, 2019, 8(10): 1245.

[3] Buckley S, Byrnes S, Cochrane C, et al. The role of oxidative stress in HIV-associated neurocognitive disorders [J]. Brain Behav Immun Health, 2021, 13: 100235.

[4] Sil S, Thangaraj A, Oladapo A, et al. Role of Autophagy in HIV-1 and drug abuse-mediated neuroinflammaging [J]. Viruses, 2022, 15(1): 44.

[5] Aung HL, Alagaratnam J, Chan P, et al. Cognitive health in persons with human immunodeficiency virus; the impact of early treatment, comorbidities, and aging [J]. J Infect Dis, 2023, 227: S38-S47.

[6] Peeters M, D' Arc M, Delaporte E. Origin and diversity of human retroviruses [J]. AIDS Rev, 2014, 16(1): 23-34.

[7] Jasinska AJ, Apetrei C, Pandrea I. Walk on the wild side; SIV infection in African non-human primate hosts-from the field to the laboratory [J]. Front Immunol, 2023(13): 1060985.

[8] Hassounah SA, Mesplède T, Wainberg MA. Nonhuman primates

- and humanized mice for studies of HIV-1 integrase inhibitors: a review [J]. *Pathog Immun*, 2016, 1(1): 41–67.
- [9] Moretti S, Virtuoso S, Sernicola L, et al. Advances in SIV/SHIV non-human primate models of neuroAIDS [J]. *Pathogens*, 2021, 10(8): 1018.
- [10] Obregon-Perko V, Bricker K, Chahroudi A. The brain retains: nonhuman primate models for pediatric HIV-1 in the CNS [J]. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2020, 17(4): 343–353.
- [11] Sil S, Thangaraj A, Chivero ET, et al. HIV-1 and drug abuse comorbidity: Lessons learned from the animal models of NeuroHIV [J]. *Neurosci Lett*, 2021(754): 135863.
- [12] González SA, Affranchino JL. Properties and functions of feline immunodeficiency virus gag domains in virion assembly and budding [J]. *Viruses*, 2018, 10(5): 261.
- [13] Power C. Neurologic disease in feline immunodeficiency virus infection: disease mechanisms and therapeutic interventions for NeuroAIDS [J]. *J Neurovirol*, 2018, 24(2): 220–228.
- [14] Westman ME, Coggins SJ, van Dorsselaer M, et al. Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in domestic pet cats in Australia and New Zealand: Guidelines for diagnosis, prevention and management [J]. *Aust Vet J*, 2022, 100(8): 345–359.
- [15] Meeker RB, Hudson L. Feline immunodeficiency virus neuropathogenesis: a model for HIV-induced CNS inflammation and neurodegeneration [J]. *Vet Sci*, 2017, 4(1): 14.
- [16] Vigorito M, Connaghan KP, Chang SL. The HIV-1 transgenic rat model of neuroHIV [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 48: 336–349.
- [17] McLaurin KA, Booze RM, Mactutus CF. Evolution of the HIV-1 transgenic rat: utility in assessing the progression of HIV-1-associated neurocognitive disorders [J]. *J Neurovirol*, 2018, 24(2): 229–245.
- [18] Langford D, Oh Kim B, Zou W, et al. Doxycycline-inducible and astrocyte-specific HIV-1 Tat transgenic mice (iTat) as an HIV/neuroAIDS model [J]. *J Neurovirol*, 2018, 24(2): 168–179.
- [19] Fan Y, He JJ. HIV-1 Tat promotes lysosomal exocytosis in astrocytes and contributes to astrocyte-mediated Tat neurotoxicity [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(43): 22830–22840.
- [20] Toggas SM, Masliah E, Rockenstein EM, et al. Central nervous system damage produced by expression of the HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice [J]. *Nature*, 1994, 367(6459): 188–193.
- [21] Thaney VE, Sanchez AB, Fields JA, et al. Transgenic mice expressing HIV-1 envelope protein gp120 in the brain as an animal model in neuroAIDS research [J]. *J Neurovirol*, 2018, 24(2): 156–167.
- [22] Hoefer MM, Sanchez AB, Maung R, et al. Combination of methamphetamine and HIV-1 gp120 causes distinct long-term alterations of behavior, gene expression, and injury in the central nervous system [J]. *Exp Neurol*, 2015, 263: 221–234.
- [23] Buch S, Periyasamy P, Thangaraj A, et al. Opioid-mediated HIV-1 Immunopathogenesis [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2020, 15(4): 628–642.
- [24] Acharya A, Olwenyi OA, Thurman M, et al. Chronic morphine administration differentially modulates viral reservoirs in SIVmac251 infected rhesus macaque model [J]. *J Virol*, 2021, 95(5): e01657–20.
- [25] Pendyala G, Periyasamy P, Callen S, et al. Chronic SIV and morphine treatment increases heat shock protein 5 expression at the synapse [J]. *J Neurovirol*, 2015, 21(5): 592–598.
- [26] Najera JA, Bustamante EA, Bortell N, et al. Methamphetamine abuse affects gene expression in brain-derived microglia of SIV-infected macaques to enhance inflammation and promote virus targets [J]. *BMC Immunol*, 2016, 17(1): 7.
- [27] Bortell N, Morsey B, Basova L, et al. Phenotypic changes in the brain of SIV-infected macaques exposed to methamphetamine parallel macrophage activation patterns induced by the common gamma-chain cytokine system [J]. *Front Microbiol*, 2015(6): 900.
- [28] Weed M, Adams RJ, Hienz RD, et al. SIV/macaque model of HIV infection in cocaine users: minimal effects of cocaine on behavior, virus replication, and CNS inflammation [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2012, 7(2): 401–411.
- [29] Barr MC, Huitron-Resendiz S, Sanchez-Alavez M, et al. Escalating morphine exposures followed by withdrawal in feline immunodeficiency virus-infected cats: a model for HIV infection in chronic opiate abusers [J]. *Drug Alcohol Depend*, 2003, 72(2): 141–149.
- [30] Huitron-Resendiz S, Henriksen SJ, Barr MC, et al. Methamphetamine and lentivirus interactions: reciprocal enhancement of central nervous system disease [J]. *J Neurovirol*, 2010, 16(4): 268–278.
- [31] Jordan Walter T, Minassian A, Perry W, et al. Combined prior chronic methamphetamine treatment and gp120 expression reduce PPI in aged male but not female mice [J]. *Neurosci Lett*, 2022, 780: 136639.
- [32] Marks WD, Paris JJ, Barbour AJ, et al. HIV-1 tat and morphine differentially disrupt pyramidal cell structure and function and spatial learning in hippocampal area ca1: continuous versus interrupted morphine exposure [J]. *eNeuro*, 2021, 8(3): ENEURO.0547–20. 2021.
- [33] Zhu J, Quizon PM, Wang Y, et al. SRI-32743, a novel allosteric modulator, attenuates HIV-1 Tat protein-induced inhibition of the dopamine transporter and alleviates the potentiation of cocaine reward in HIV-1 Tat transgenic mice [J]. *Neuropharmacology*, 2022, 220: 109239.
- [34] Kesby JP, Najera JA, Romoli B, et al. HIV-1 TAT protein enhances sensitization to methamphetamine by affecting dopaminergic function [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 65: 210–221.
- [35] Moran LM, Booze RM, Webb KM, et al. Neurobehavioral alterations in HIV-1 transgenic rats: evidence for dopaminergic dysfunction [J]. *Exp Neurol*, 2013, 239: 139–147.
- [36] Soontornniyomkij V, Kesby JP, Morgan EE, et al. Effects of HIV and methamphetamine on brain and behavior: evidence from human studies and animal models [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2016, 11(3): 495–510.

安庆玲,谭邓旭,师长宏. 结直肠癌基因工程小鼠模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 660-667.
An QL, Tan DX, Shi CH. Genetically engineered mouse models of colorectal cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 660-667.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.013

结直肠癌基因工程小鼠模型研究进展

安庆玲,谭邓旭,师长宏*

(空军军医大学实验动物中心,西安 710032)

【摘要】 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是我国发病率排名第二的恶性肿瘤,其发病机制复杂,预防和治疗研究需要持续深入。为深入揭示结直肠癌发生机制,建立相应的临床前体内模型非常重要。相比较于致癌诱导模型和异种移植模型,基因工程动物模型是模拟结直肠癌患者基因突变的一种有力实验工具。自发性结直肠癌模型 *Apc*^{Min/+} 小鼠制备成功以来,研究者不断地尝试构建与临床相似性更高的结直肠癌基因工程小鼠模型。本文综述了以抑癌基因结直肠腺瘤性息肉病(adenomatous polyposis coli, *Apc*)基因为代表的各种基因突变在结直肠癌发生和进展中的作用,重点关注了不同基因突变组合构建的小鼠结直肠癌模型在病理形态和侵袭转移能力方面的特征,以便为结直肠癌的研究提供理想的实验工具。

【关键词】 结直肠癌;小鼠模型;基因突变;侵袭性;临床相似性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0660-08

Genetically engineered mouse models of colorectal cancer

AN Qingling, TAN Dengxu, SHI Changhong*

(Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Colorectal cancer has the second highest incidence in China. The pathogenesis of colorectal cancer is complex, and prevention and treatment require improvement. To reveal the tumorigenesis mechanism of colorectal cancer, a preclinical animal model should be established. Compared with carcinogenic induction and xenograft models, the genetically engineered animal model is a powerful experimental tool to simulate the genetic mutations of colorectal cancer patients. Since establishment of *Apc*^{Min/+} mice, the most representative spontaneous colorectal cancer model, researchers have been attempting to establish genetically engineered mouse models of colorectal cancer with high clinical similarity. In this review, we discuss the role of *Apc* gene mutations in tumorigenesis of colorectal cancer, and focus on the characteristics of mouse colorectal cancer models established by various combinations of genetic mutations in terms of pathological morphology, invasion, and metastasis. This will provide a reference for colorectal cancer research to select ideal experimental models.

【Keywords】 colorectal cancer; mouse model; genetic mutation; invasiveness; clinical similarity

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

国家癌症中心于2022年2月发布的全国癌症统计数据显示,我国结直肠癌(colorectal cancer, CRC)发病人数40.8万,恶性肿瘤发病率中排名第二,死亡人数19.6万,死亡率在恶性肿瘤中排名第

四。随着国人饮食习惯趋于西方化,CRC的发病率呈现上升趋势^[1]。由于CRC发病机制的复杂性,预防和治疗研究需要持续深入,对深入揭示CRC发生机制,建立相应的动物模型非常重要。

【基金项目】 国家自然科学基金(31572340),陕西省创新能力支撑计划(2021PT-037)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31572340), Shaanxi Innovation Capability Support Plan (2021PT-037).

【作者简介】 安庆玲(1994—),女,硕士,研究方向:肿瘤免疫治疗。Email: 821543157@qq.com

【通信作者】 师长宏,男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病的动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn

CRC 动物模型通常包括致癌诱导模型,异种移植模型和基因工程模型。常用的致癌诱导模型是通过氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)或葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)等化学诱导剂诱发结肠炎发生,进而再发展成结肠癌,此方法需持续诱导,作用时间长,且少有转移灶形成^[2]。异种移植模型是用肿瘤细胞或者患者来源的肿瘤组织块进行皮下或者原位移植,造模时间短、成瘤率高^[3],皮下移植便于观察肿瘤生长情况,适合评价药物治疗效果,但是缺乏肿瘤发生原位的肿瘤微环境和侵袭转移条件;原位移植虽然满足这两个条件,但是操作难度大,难以监测肿瘤生长,适合肿瘤侵袭转移机制与阻断研究。基因工程模型是通过现代生物技术将外源基因导入受体基因组中,并且可稳定遗传,其特点是高度模仿了结直肠癌患者常见的基因突变,这种模型适用于基因在 CRC 发生发展中的功能研究。

随着对 CRC 发生机制的深入了解,其相应的基因工程动物模型的肿瘤形态和分布位置与临床患者的相似性越来越高。同时,由于 CRISPR-Cas9 技术不断成熟与完善,制备基因工程动物模型的成本降低、周期缩短,从而推动了 CRC 基因工程动物模型的应用研究。本文综合探讨各种基因突变在结直肠癌发生和进展中的作用,重点关注不同基因突变组合构建的 CRC 基因工程小鼠模型,期望为结直肠癌的研究提供理想的实验工具。

1 基于 *Apc* 单基因突变的基因工程小鼠模型

Apc 基因位于 5 号染色体长臂 2 区 2 带 2 号亚带,编码一种多功能蛋白,可能参与细胞粘附和迁移、信号转导、微管组装和染色体分离等多个细胞过程^[4]。超过 80% 的 CRC 表现出 *Apc* 突变,*Apc* 突变在腺瘤癌序列的早期阶段被发现,被称为异常隐窝病灶^[5]。APC 是 WNT 途径的重要负调节因子,是 Axin-APC 降解体复合物的一个组成部分,促进 WNT 效应子 β -catenin 的蛋白酶体降解,若该复合物由于 *Apc* 突变失活而存在缺陷,则过量的 β -catenin 会积聚在细胞质内并易位到细胞核中,操作转录开关,导致 *Myc* 和许多其他基因的激活^[6]。

Moser 等^[7]1990 年发现诱变剂 N-乙基-N-亚硝基脒(N-ethyl-N-nitrosourea, ENU)可以诱导小鼠 *Apc* 基因在 850 位氨基酸处发生点突变,由 TTG 转变成

终止密码子 TAG,丧失其抑癌功能,这种 *Apc*^{Min/+} 小鼠 15 周龄就在整个肠道中发展出多发性腺瘤,突变基因具有优势表达和完全渗透性。30 年来,*Apc*^{Min/+} 小鼠被广泛用于化学预防、肠道肿瘤发生的基因功能测试和肿瘤治疗等研究,但是与人类 *Apc* 基因突变导致的疾病表型有明显区别,人类 *Apc* 基因突变主要发生结肠病变,并且可能进展为浸润性癌;而小鼠的突变只是在小肠中发展出更多的息肉。因此,1997 年,Shibata 等^[8]基于 Cre-loxP 重组系统,在 *Apc* 基因 13 和 14 号内含子两侧插入 loxP 位点,并将所得突变等位基因(*Apc*^{580S})引入小鼠种系中,构建 *Apc*^{580S/580S} 小鼠,再将腺病毒 Cre(AxCANCre)递送到结肠,完成在结肠中第 1 次条件性的 *Apc* 缺失,小鼠最终在 4 周内发生腺瘤。整个肠道中 *Apc* 的急性缺失导致隐窝祖细胞表型,其中整个隐窝被转化。该模型规避了 *Apc* 完全敲除的胚胎致死性,并将 *Apc* 失活特异性地引导到结直肠上皮,在此之后许多结肠特异性 Cre(如 Villin-Cre)被用来删除结直肠的相关基因从而促进结肠腺瘤发生,改善了 *Apc*^{Min/+} 小鼠肿瘤分布与临床差异的问题^[9]。为了使 *Apc*^{Min/+} 小鼠息肉的恶性程度更相似于临床患者,研究者们尝试将 *Apc*^{Min/+} 小鼠联合化学诱导,如 AOM、DSS 或其他致癌化合物,最终证实可以增加所得肿瘤的恶性程度,同时缩短肿瘤进展时间^[10]。除联合化学诱导剂,还构造了许多其他 *Apc* 等位基因截断的模型,包括 *Apc*^{1322T} 小鼠,非常接近于人类癌症 *Apc* 基因 1309 处密码子中发生的突变,APC 蛋白完全丧失,相比较 *Apc*^{Min/+} 小鼠息肉明显更严重,发病较早、息肉更大、数量更多,甚至可以发育为不良腺瘤,肿瘤也具有更明显的潘氏细胞分化和更高的隐窝裂变频率^[11]。这些突变的另一个值得提起的例子是 *Apc*^{1638N},其在 15 号外显子内以反义方向携带新霉素盒,导致密码子 1638 处密码子对应的蛋白质被不稳定截断,虽然这种小鼠最终形成的肿瘤数量较少(< 10),且潜伏期较长,但是可能随着粘膜和粘膜下层的浸润而发展为腺癌^[12]。直接删除 14 号外显子的 *Apc* ^{Δ 14/+} 小鼠肿瘤分布转移,表型更严重,伴有肌肉侵袭、致死性增加和结肠肿瘤负荷更高^[13]。

2 联合 *Apc* 基因突变的基因工程小鼠模型

2.1 *Kras* 突变相关动物模型

Kras 是所有恶性肿瘤中最常突变的癌基因之一。在 CRC 病例中, *Kras* 突变的患病率约为

40%^[14]。一旦发生 *Kras* 突变, GTP 的水解被破坏和/或核苷酸交换增强, 然后 *Kras* 以活性状态积累, 有助于下游信号通路的持续激活, 从而促进肿瘤细胞增殖。携带 *Kras* 突变的结直肠肿瘤与患者的晚期疾病状态、肿瘤分化不良、远处转移和较差生存率相关^[15]。

AhCre Apc^{fl/+} Kras^{+/LSLV12} 小鼠证明 *Apc* 丢失后 *Kras* (V12) 的激活导致肿瘤发生增加, 动力学明显, 说明 *Kras* (V12) 的表达加速了肠道肿瘤的发生, 并长期赋予 *Apc* 丢失后的侵袭性^[16]。*Kras^{G12V} Apc^{1638N/+}* 小鼠的肿瘤多样性增加 10 倍, 肿瘤增殖更快、进展加速, 导致发病率和死亡率显著提高并显示出细胞凋亡水平降低^[17]。在表达 *Kras* (G12D) 的小鼠中去除 *Ink4a/Arf* 的 *VillinCre Kras^{G12V/+} Ink4a/Arf^{-/-}* 可防止衰老并在 12 周就以 76% 的概率导致侵袭性转移性癌, 其形态和分子改变可与人类 *Kras* 突变锯齿状肿瘤相似, 但仅位于近端结肠中。2018 年, Sakai 等^[18] 构建了肠上皮细胞中关键的结直肠癌驱动突变 (*Apc*、*Kras*、*Tgfb2*、*Trp53*、*Fbxw7*) 的不同组合的小鼠模型, *Apc^{Δ716} Kras^{G12D}* 组合增加肠道肿瘤的多重性, *Apc^{Δ716} Kras^{G12D} Fbxw7^{-/-}* 小鼠的肿瘤分布显著增加。这些结果表明, *Kras* 活化和 *Fbxw7* 破坏的组合除了诱导上皮-间质转化外, 还加速了肿瘤生长, 并且这些性质与侵袭能力无关, *Apc^{Δ716} Kras^{G12D} Tgfb2^{-/-}* 组合实现高效肝转移, 这些结果表明, Wnt 激活、*Kras* 激活和 AKT 突变抑制 TGFβ 是有效肝转移的核心组合。

2.2 p53 突变相关动物模型

p53 是一个关键的肿瘤抑制基因, CRC 的 *p53* 突变发生在 34% 的近端结肠肿瘤和 45% 的远端结直肠肿瘤中^[19]。研究证明, *p53* 突变在肿瘤病理过程中的腺瘤-癌转化中起关键作用。不同类型的 *p53* 突变在确定 CRC 的生物学行为中起着关键作用, 如侵袭深度、转移部位甚至患者的预后。*p53* 突变与近端结肠癌的淋巴浸润有关, 并与远端 CRC 的淋巴和血管浸润有显著相关性^[20]。

早期, 将 *Apc* 突变与纯合 *p53* 敲除相结合的 *Apc^{Min/+} p53^{-/-}* 小鼠胃肠道恶性肿瘤略有增加^[21]。2017 年, Nakayama 等^[22] 证明 *p53* 的另一个核积累的突变体 *p53^{R270H}* 通过复杂的肿瘤腺体形成和获得侵袭性从而诱导肠道肿瘤的恶性进展, 基质中肌原纤维细胞数量增加。*p53* 活化后 FBXW7 蛋白表达增加, 经常在各种人类癌症中显示 *Fbxw7* 突变和等

位基因丢失, FBXW7 蛋白的缺失会抑制细胞分裂、干细胞分化、增强染色体不稳定性, 并可能导致造血细胞癌变^[23]。另外, 有研究显示 *Fbxw7* mRNA 在结直肠癌中的表达显著降低, 采用比较基因组杂交阵列, 超过 20% 的 CRC 患者 ($n = 130$) 的 *Fbxw7* 拷贝数丢失, 证明这与疾病进展相关^[24]。与野生型 *Fbxw7* 患者相比, *Fbxw7* 错义突变的转移性 CRC 患者的总生存期更短^[25]。*Fbxw7* 的单独缺失不会引起肠道肿瘤发生, 但是 *Fbxw7^{-/-} p53^{-/-}* 小鼠可引起高度渗透性、侵袭性和转移性腺癌 (淋巴结和肝脏)^[26]。*Trim67* 在大约 80% 的结直肠癌中表观遗传沉默, 其沉默与预后不良相关。Wang 等^[27] 证实 *Trim67* 具有肿瘤抑制因子的功能, *TRIM67* 能够抑制结直肠癌细胞生长, 并通过激活 *p53* 途径诱导细胞凋亡, 其敲除促进 *Apc^{Min/+}* 小鼠的结直肠肿瘤发生, 肿瘤多重性和肿瘤负荷显著更高。

2.3 Pik3ca/Pten 突变相关动物模型

磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 通路主要是通过磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 (phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate, PIP2) 转化为磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸 (phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-trisphosphate, PIP3) 磷酸化磷脂酰肌醇, 参与细胞增殖、分化和存活的调节, PIK3CA 和 PTEN 是该通路关键激酶^[28]。*Pik3ca* 基因编码 PI3K p110 催化亚基, 它的突变被认为是诱导致癌 PI3K 信号通路的创新机制^[29]。*Pik3ca* 基因在 10% ~ 20% 的 CRC 肿瘤中发生突变, 与 *Pik3ca* 野生型肿瘤患者相比, *Pik3ca* 突变肿瘤患者的结肠癌特异性死亡率增加^[30]。PTEN 是一种通过去磷酸化 PIP3 抑制过活化 AKT, 以拮抗 PI3K/AKT 通路的磷酸酶, 可以防止基因组不稳定。在 CRC 中, *Pten* 基因发生各种等位基因丢失, 增强子区域的高甲基化, 失活突变^[28]。

在成体或胚胎上皮细胞群中特异性的 *Pten* 丢失不会影响肠道上皮的正常结构或体内平衡。然而, 在 *Apc* 缺乏的基础上, *Pten* 的丢失可以通过增加 Akt 的活化加速肿瘤发生, 从而导致腺癌的快速进展^[31]。*Pten* 丢失和 *Kras* 激活导致 *VillinCreER^T-Apc^{fl/+} Pten^{fl/β} Kras^{LSL/+}* 小鼠肠上皮稳态紊乱以及增生性息肉, 促进发育不良的无柄锯齿状腺瘤和具有锯齿状特征的转移性腺癌的发展^[32]。Leystra 等^[33] 通过 FC PIK3ca* 小鼠证明 PI3K 蛋白在小鼠肠道中显性活性形式的表达导致上皮细胞增生和晚期肿瘤, 在小肠远端和结肠的上皮细胞中表达组成性活性

PI3K 的小鼠在结肠中迅速发展为侵袭性腺癌,并扩散到肠系膜和邻近器官。*Apc^{fl/fl} Pik3ca^{p110*}* 小鼠, *Apc^{fl/fl} Kras^{G12D/+} Pik3ca^{p110*}* 小鼠中位生存期约 200 d, 肿瘤从小的息肉样病变发展为浸润性腺癌,其填充了大部分结肠管腔,这些小鼠中 80% 的肿瘤是浸润性腺癌,其中许多肿瘤有很大一部分延伸到固有肌层之外,累及浆膜,还发现了转移到腹膜后主动脉旁淋巴结和肝内的转移性癌症^[34]。

2.4 Smad/Tgfr 突变相关动物模型

在正常细胞中,转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 信号通路成员, TGF- β I 型和 II 型受体 (TGFBR1、TGFBR2) 以及这些受体的底物 SMAD 蛋白,能够促进细胞分化、凋亡,抑制细胞非正常增殖,被视为肿瘤抑制因子,83% 的结肠癌至少有一个 TGF- β 信号通路成员突变^[35]。相比较 *Apc^{+/-}* 小鼠, *Smad2^{+/-} Apc^{+/-}* 小鼠息肉在数量、大小或组织病理学上没有差异,这说明在人类染色体 18q21 上, *Smad2* 杂合性丢失不足以引起结肠息肉的恶性进展^[36]。*Apc^{Min/+} Smad3^{-/-}* 导致高多重性和快速发作的侵袭性肿瘤发生,发生位置几乎完全在远端结肠中^[37]。*Apc^{+/-} Smad4^{+/-}* 小鼠肿瘤多发性增加,恶性程度升高,表现出广泛的基质细胞增殖、粘膜下侵袭、细胞异质性和体内转移^[38]。Oshima 等^[39] 证实炎症微环境中抑制上皮再生中的 TGF β 信号传导足以引起浸润性肠癌, *Apc^{Δ16} Tgfr2^{ΔIEC}* 小鼠发展具有黏膜下浸润的腺癌,而简单的 *Apc^{Δ16}* 小鼠仅具有无侵袭性腺瘤。另外, TGF- β 受体失活伴随 *Kras* 突变的 *LSL-Kras^{G12D} Tgfr2^{IEKO}* 小鼠通过 β -catenin 非依赖性途径诱导小鼠肠道肿瘤^[40]。*Tgfr2^{E2flx/E2flx} Villin-Cre Apc^{163N}* 小鼠转化生长因子 β 受体 II 型失活诱导由 *Apc* 突变引发的肠道肿瘤恶性转化^[41]。

2.5 细菌相关动物模型

越来越多的研究证明,口腔和肠道微生物对结直肠癌的发生发展有着不可或缺的作用^[42],研究者将基因工程小鼠与微生物联合以探索结直肠癌发生进展。在结直肠癌发生过程中,具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*) 的丰度逐渐增加,口服 *F. nucleatum* 的 *Apc^{Min/+}* 小鼠可以通过体内和体外的自噬途径促进肿瘤转移,相较于对照组的肿瘤数量增加、侵袭性更强^[43]。结直肠癌患者牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 的丰度较高,并且与结直肠癌患者的总生

存期呈负相关,将 *P. gingivalis* 引入 *Apc^{Min/+}* 小鼠中可以招募肿瘤浸润的骨髓细胞,激活 NLRP3 炎症小体并产生促炎微环境,增加了结肠肿瘤的发作次数,这些小鼠表现出更高的多重性结肠肿瘤和较大的总结肠肿瘤体积^[44]。

3 其它类型的基因工程小鼠模型

3.1 Braf 突变相关动物模型

MAPK 级联反应是人类癌细胞存活、传播和对药物治疗耐药性的关键途径^[45]。BRAF 属于细胞外信号调节 MAPK/ERK 途径下游激酶,基因突变可导致蛋白质扩增并改变肿瘤微环境,从而过度激活该途径^[46]。2013 年 Rad 等^[47] 首先构建了 *VillinCre Braf^{LSL-V637E/+}* 小鼠,发展出终生持续的全身性隐窝增生,几乎影响每个隐窝,导致小肠和大肠明显伸长和增厚,启动肠道肿瘤发生的锯齿通路。后又分别加入 *p53* 和 *p16* 失活,56% 的 *Vil-Cre Braf^{Δ637E/+} p53^{LSL-R172H/+}* 小鼠在 10 ~ 20 月龄患癌,肿瘤平均数量比 *Vil-Cre Braf^{Δ637E/+}* 小鼠高出 5.2 倍,容易转移到局部淋巴结、胰腺或肺。*Vil-Cre Braf^{Δ637E/+} p16^{Ink4a*}* 同样加速高级别浸润性肿瘤的发生。

3.2 炎症相关动物模型

慢性炎症在几种癌症的发生和恶性进展中起着关键作用,miRNA 可以调节炎症反应的大小,miRNA 中的多态性 miR-146a 与 CRC 的易感性有关^[48]。*miR-146a^{-/-}* 小鼠给予 AOM 和 DSS 诱导的结肠肿瘤数量更多、体积更大,在结肠中向近端延伸得更远^[49]。N-myc 下游调节基因 2 (N-myc downstream-regulated gene 2, *NDRG2*) 是一种新的肿瘤抑制基因,在调节多种类型恶性肿瘤的增殖、分化和转移方面发挥作用,肠上皮细胞特异性敲除的 *Ndr2^{ΔIEC}* 小鼠发展为轻度自发性结肠炎,再给予 DSS 或 AOM 处理,促进炎症细胞浸润,趋化因子和细胞因子表达以及脂多糖通透性,破坏了正常上皮的粘附连接完整性并增加结肠通透性,从而促进结肠炎和结肠炎相关肿瘤进展。趋化因子受体 4 (chemokine (c-x-c motif) receptor 4, *CXCR4*) 属于 G 蛋白偶联受体超家族,也称为 CXCL12,可以促进癌症转移, *CXCR4^{+/-}* 小鼠联合 AOM/DSS 处理通过增加炎症细胞因子、招募免疫抑制细胞、促进上皮间充质转变和 Wnt/ β -catenin 激活来增强 CRC 进展^[50]。

4 讨论与展望

随着精准医学的发展,越来越需要高度转化的实验动物模型辅助医学研究。相比较于化学诱导和肿瘤细胞移植模型,基因工程动物可以更好地模拟肿瘤细胞、基质和免疫系统之间的动态相互作用以及对治疗的反应,更适合基因功能的研究。基于 *Apc* 突变的小鼠在结直肠癌研究中最为常见,但该

类模型以息肉腺瘤为主,并且分布位置主要在小肠而不是结肠,这与大多数 *Apc* 突变的临床患者不同。另外,在 *Braf* 突变基础上叠加其它基因突变构建的小鼠可以发展为侵袭性更高的锯齿状结直肠癌,但是肿瘤形成时间非常长(表 1)。于是推测,如果肿瘤发展的潜伏期更长,允许小鼠获得进一步的突变来驱动肿瘤进展,则小鼠可能会发展出更接近人类 CRC 的肿瘤。

表 1 结直肠癌基因工程小鼠模型
Table 1 Genetically engineered mouse models of colorectal cancer

模型 Model	发病时间 Disease time	特征 Characteristics	生存期 Survival time	参考文献 Reference
<i>Apc</i> ^{Min/+}	15 周 15 weeks	模型成熟,多发性息肉腺瘤,恶性程度不高,主要分布在小肠 The model was mature with multiple polyposis adenoma, which was not highly malignant and mainly distributed in the small intestine	22 周左右 At around 22 weeks	[9]
<i>Apc</i> ^{1638N}	20 周 20 weeks	纯合子胚胎致死,肿瘤少(<10),潜伏期长,并且随着浸润到粘膜下面发展为腺癌 Homozygous embryos of this model are lethal. It have few tumors (<10), a long latency period, and develop adenocarcinoma with submucosal invasion	32 周 32 weeks	[14]
<i>Apc</i> ^{Min/+} <i>p53</i> ^{-/-}	90 d 以内 Within 90 days	致密的结缔组织,局部侵袭,肿瘤侵入潜在的肌肉粘膜 This mice has dense connective tissue, local invasion, tumor invasion into the underlying musculature	122 d	[18]
<i>AhCre</i> <i>Apc</i> ^{fl/+} <i>Pten</i> ^{fl/fl}	诱导后 7 d 7 days after induction	大多数为侵袭性腺癌,由严重发育不良的腺瘤引起,恶性侵犯粘膜下层明显 Most of them are invasive adenocarcinomas caused by severely dysplastic adenomas. Malignant invasion of the submucosa is obvious	99 d	[28]
<i>Apc</i> ^{fl/fl} <i>Pik3ca</i> ^{p110*} <i>Apc</i> ^{fl/fl} <i>Kras</i> ^{G12D/+} <i>Pik3ca</i> ^{p110*}	Cre 诱导后 3 周 3 weeks after Cre induction	80%的肿瘤是浸润性腺癌,其中许多肿瘤延伸到固有肌层之外,累及浆膜,出现少量腹膜后主动脉旁淋巴结和肝转移 80% of tumors in these mice were invasive adenocarcinomas, many of which extended beyond the muscularis propria to involve the serosa. There were few retroperitoneal para-aortic lymph nodes and liver metastases	中位生存期 200 d The median survival time was 200 d	[31]
<i>Apc</i> ^{Min/+} <i>Smad3</i> ^{-/-}	60 d	肿瘤侵袭通过粘膜下并进入局部肌肉 The tumor invades through the submucosa into the local muscle	10 个月 10 months	[34]
<i>Apc</i> ^{+/+1638N} <i>Smad4</i> ^{+/+E65ad}	反式模型最早 3 个月;顺式最早 3 周 Trans model as early as 3 months; Cis model at the earliest 3 weeks	反式模型肿瘤主要为绒毛状或管状绒毛状腺瘤,异型增生和恶性程度更强,主要分布在十二指肠;顺式模型明显贫血和脾肿大、肿瘤数量更多、生存期更短 The trans model tumors were mainly villous or tubular villous adenomas, with more severe dysplasia and malignancy, which mainly distributed in the duodenum. The cis-type model had obvious anemia and splenomegaly with more tumors, and shorter survival	反式模型 7 个月;顺式模型 5 周 The survival time of trans model was 7 months. The survival time in cis model was 5 weeks	[35]
<i>LSL-Kras</i> ^{G12D} <i>Tgfb2</i> ^{IEKO}	22 周以内 Within 22 weeks	大多为腺癌,大约 15%的小鼠在区域淋巴结或肺部中发展出明显转移性病变 Most of them were adenocarcinomas. Approximately 15% of mice develop significant metastatic lesions in regional lymph nodes or lungs	22 周以上 More than 22 weeks	[37]
<i>VillinCre</i> <i>Braf</i> ^{LSL-V637E/+}	10 个月 10 months	锯齿状腺瘤,包括隐窝伸长和锯齿状嗜酸性粒细胞腺瘤上皮 Serrated adenomas are predominant, including crypt elongation and serrated eosinophil adenoma epithelium	2 年 2 years	
<i>Vil-Cre</i> ; <i>Braf</i> ^{A637E/+} <i>p53</i> ^{LSL-R172H/+}	10 ~ 20 个月 10 ~ 20 months	锯齿状肿瘤,25%小鼠的癌症已经转移到局部淋巴结、胰腺或肺 Serrated tumors are predominant. Twenty-five percent of the mice had cancer that had metastasized to the local lymph nodes, pancreas or lung	2 年 2 years	[43]
<i>Vil-Cre</i> <i>Braf</i> ^{LSL-V637E/+} <i>p16</i> ^{Ink4a*}	10 ~ 20 个月 10 ~ 20 months	锯齿状肿瘤,12%的小鼠出现转移性肿瘤 This is a model of a serrated tumor. Metastatic tumors developed in 12% of the mice	2 年 2 years	

续表 1

模型 Model	发病时间 Disease time	特征 Characteristics	生存期 Survival time	参考文献 Reference
<i>Apc</i> ^{Δ716} <i>Kras</i> ^{G12D}		Kras 激活增加了肿瘤的多样性, 息肉数量显著增加, 未发现侵袭性肿瘤 Kras activation increases tumor diversity. The number of polyps increased significantly and no invasive tumor was found	160 d	
<i>Apc</i> ^{Δ716} <i>Kras</i> ^{G12D} <i>Fbxw7</i> ^{-/-}	13 ~ 16 周 13 ~ 16 weeks	发生上皮间质转化, 加速了肿瘤生长 Epithelial-mesenchymal transition occurs and accelerates tumor growth	150 d	[49]
<i>Apc</i> ^{Δ716} <i>Kras</i> ^{G12D} <i>Tgfb2</i> ^{-/-}		表达 αSMA 的肌成纤维细胞数量增加, 淋巴管浸润和肝脏转移的发生率和多样性显著更高 The number of αSMA expressing myofibroblasts increased. The incidence and diversity of lymphatic infiltration and liver metastasis were significantly higher	100 d	

动物疾病模型构建过程中,疾病的发生进展和预防治疗效果需要有可靠的评估技术。结直肠癌基因工程动物模型的肿瘤进展大多数是根据传统经验判断,或是处死动物后,解剖观察肿瘤数量和大小,再进行组织形态学染色以确定病理改变,这种依靠经验决定动物实验时间终点的方法不稳定,无法进行动态监测。小鼠内窥镜成像技术利于观察肠壁黏膜变化,直观地了解肿瘤生长情况,但是操作过程中容易对小鼠产生刺激或创伤,专业技术难度较高。小动物磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)技术适用于软组织病变的监测,能够无创、实时、动态地进行肿瘤监测和疗效评估,故对于动物模型中结直肠癌进展的评估优选 MRI 技术。

结直肠癌的发生与进展是不良生活习惯、化学物质诱导和基因突变多种因素综合作用的结果,本文主要关注基因突变在结直肠癌中的作用,不同基因突变组合构建出来的小鼠模型在病理形态和侵袭转移能力具有很大差异。尽管研究者们将结直肠癌相关突变基因进行不同组合,或者将基因突变与化学诱导相结合,不断尝试缩短造模时间,提高临床相似性,但由于多基因突变小鼠随着基因突变种类的增加,繁育难度也大幅度升高,从而限制了结直肠癌多基因突变动物模型的发展。综上所述,构建出造模时间统一,肿瘤分布位置与临床患者相似,肿瘤大小与数量均匀,具有侵袭性的结直肠癌模型仍然是转化医学需要探索的难题。

参 考 文 献(References)

[1] Zheng R, Zhang S, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016 [J]. J National Cancer Center, 2022, 2(1): 1-9.

[2] Schepelmann M, Kupper N, Gushchina V, et al. AOM/DSS induced colitis-associated colorectal cancer in 14-month-old female Balb/C and C57/Bl6 mice-a pilot study [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9): 5278.

[3] Yu T, Guo F, Yu Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy [J]. Cell, 2017, 170(3): 548-563.

[4] Fang X, Svitkina TM. Adenomatous Polyposis Coli (APC) in cell migration [J]. Eur J Cell Biol, 2022, 101(3): 151228.

[5] Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer [J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 479-507.

[6] Ranesh M, Zaleska M, Sakalas S, et al. Reconstitution of the destruction complex defines roles of AXIN polymers and APC in β-catenin capture, phosphorylation, and ubiquitylation [J]. Mol Cell, 2021, 81(16): 3246-3261.

[7] Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse [J]. Science, 1990, 247(4940): 322-324.

[8] Shibata H, Toyama K, Shioya H, et al. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene [J]. Science, 1997, 278(5335): 120-123.

[9] Vu T, Datta A, Banister C, et al. Serine-threonine kinase receptor-associated protein is a critical mediator of APC mutation-induced intestinal tumorigenesis through a feed-forward mechanism [J]. Gastroenterology, 2022, 162(1): 193-208.

[10] Yang J, Wei H, Zhou Y, et al. High-fat diet promotes colorectal tumorigenesis through modulating gut microbiota and metabolites [J]. Gastroenterology, 2022, 162(1): 135-149.e2.

[11] Mieszczanek J, van Tienen LM, Ibrahim AEK, et al. Bcl9 and Pygo synergise downstream of Apc to effect intestinal neoplasia in FAP mouse models [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 724.

[12] Ecker J, Benedetti E, Kindt ASD, et al. The colorectal cancer lipidome: identification of a robust tumor-specific lipid species signature [J]. Gastroenterology, 2021, 161(3): 910-923.e19.

[13] Okumura S, Konishi Y, Narukawa M, et al. Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumourigenesis via butyrate secretion [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5674.

[14] Yun J, Mullarky E, Lu C, et al. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH [J]. Science, 2015, 350(6266): 1391-1396.

[15] Zhu G, Pei L, Xia H, et al. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer [J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 143.

- [16] Sansom OJ, Meniel V, Wilkins JA, et al. Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(38): 14122–14127.
- [17] Janssen KP, Alberici P, Fsihi H, et al. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression [J]. Gastroenterology, 2006, 131(4): 1096–1109.
- [18] Sakai E, Nakayama M, Oshima H, et al. Combined mutation of *Apc*, *kras*, and *Tgfb2* effectively drives metastasis of intestinal cancer [J]. Cancer Res, 2018, 78(5): 1334–1346.
- [19] Liebl MC, Hofmann TG. The role of p53 signaling in colorectal cancer [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(9): 2125.
- [20] López I, P Oliveira L, Tucci P, et al. Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer [J]. Gene, 2012, 499(1): 81–87.
- [21] Halberg RB, Katzung DS, Hoff PD, et al. Tumorigenesis in the multiple intestinal neoplasia mouse; redundancy of negative regulators and specificity of modifiers [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3461–3466.
- [22] Nakayama M, Sakai E, Echizen K, et al. Intestinal cancer progression by mutant p53 through the acquisition of invasiveness associated with complex glandular formation [J]. Oncogene, 2017, 36(42): 5885–5896.
- [23] Sancho R, Jandke A, Davis H, et al. F-box and WD repeat domain-containing 7 regulates intestinal cell lineage commitment and is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. Gastroenterology, 2010, 139(3): 929–941.
- [24] Yeh CH, Bellon M, Nicot C. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 115.
- [25] Fan J, Bellon M, Ju M, et al. Clinical significance of FBXW7 loss of function in human cancers [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 87.
- [26] Grim JE, Knoblaugh SE, Guthrie KA, et al. Fbw7 and p53 cooperatively suppress advanced and chromosomally unstable intestinal cancer [J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(11): 2160–2167.
- [27] Wang S, Zhang Y, Huang J, et al. TRIM67 activates p53 to suppress colorectal cancer initiation and progression [J]. Cancer Res, 2019, 79(16): 4086–4098.
- [28] Yang J, Nie J, Ma X, et al. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 26.
- [29] Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer [J]. Ann Oncol, 2020, 31(3): 377–386.
- [30] Jin J, Shi Y, Zhang S, et al. PIK3CA mutation and clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and Meta-analysis [J]. Acta Oncol, 2020, 59(1): 66–74.
- [31] Howe C, Kim SJ, Mitchell J, et al. Differential expression of tumor-associated genes and altered gut microbiome with decreased *Akkermansia muciniphila* confer a tumor-preventive microenvironment in intestinal epithelial Pten-deficient mice [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(12): 3746–3758.
- [32] Davies EJ, Marsh Durban V, Meniel V, et al. PTEN loss and KRAS activation leads to the formation of serrated adenomas and metastatic carcinoma in the mouse intestine [J]. J Pathol, 2014, 233(1): 27–38.
- [33] Leystra AA, Deming DA, Zahm CD, et al. Mice expressing activated PI3K rapidly develop advanced colon cancer [J]. Cancer Res, 2012, 72(12): 2931–2936.
- [34] Hadac JN, Leystra AA, Paul Olson TJ, et al. Colon tumors with the simultaneous induction of driver mutations in APC, KRAS, and PIK3CA still progress through the adenoma-to-carcinoma sequence [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2015, 8(10): 952–961.
- [35] Itatani Y, Kawada K, Sakai Y. Transforming growth factor- β signaling pathway in colorectal cancer and its tumor microenvironment [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): 5822.
- [36] Takaku K, Wrana JL, Robertson EJ, et al. No effects of Smad2 (*madh2*) null mutation on malignant progression of intestinal polyps in *Apc* (Δ 716) knockout mice [J]. Cancer Res, 2002, 62(16): 4558–4561.
- [37] Sodir NM, Chen X, Park R, et al. Smad3 deficiency promotes tumorigenesis in the distal colon of *ApcMin*/+ mice [J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8430–8438.
- [38] Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, et al. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both *Dpc4* (*Smad4*) and *Apc* genes [J]. Cell, 1998, 92(5): 645–656.
- [39] Oshima H, Nakayama M, Han TS, et al. Suppressing TGF β signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer [J]. Cancer Res, 2015, 75(4): 766–776.
- [40] Trobridge P, Knoblaugh S, Washington MK, et al. TGF- β receptor inactivation and mutant *Kras* induce intestinal neoplasms in mice via a β -catenin-independent pathway [J]. Gastroenterology, 2009, 136(5): 1680–1688.
- [41] Muñoz NM, Upton M, Rojas A, et al. Transforming growth factor β receptor type II inactivation induces the malignant transformation of intestinal neoplasms initiated by *Apc* mutation [J]. Cancer Res, 2006, 66(20): 9837–9844.
- [42] Chen J, Domingue JC, Sears CL. Microbiota dysbiosis in select human cancers: evidence of association and causality [J]. Semin Immunol, 2017, 32: 25–34.
- [43] Chen Y, Chen Y, Zhang J, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes metastasis in colorectal cancer by activating autophagy signaling via the upregulation of CARD3 expression [J]. Theranostics, 2020, 10(1): 323–339.
- [44] Wang X, Jia Y, Wen L, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes colorectal carcinoma by activating the hematopoietic *NLRP3* inflammasome [J]. Cancer Res, 2021, 81(10): 2745

-2759.

[45] Hepworth EMW, Hinton SD. Pseudophosphatases as regulators of MAPK signaling [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22) : 12595.

[46] Subbiah V, Baik C, Kirkwood JM. Clinical development of BRAF plus MEK inhibitor combinations [J]. Trends Cancer, 2020, 6(9) : 797-810.

[47] Rad R, Cadiñanos J, Rad L, et al. A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention [J]. Cancer Cell, 2013, 24(1) : 15-29.

[48] Chae YS, Kim JG, Lee SJ, et al. A miR-146a polymorphism

(rs2910164) predicts risk of and survival from colorectal cancer [J]. Anticancer Res, 2013, 33(8) : 3233-3239.

[49] Garo LP, Ajay AK, Fujiwara M, et al. microRNA-146a limits tumorigenic inflammation in colorectal cancer [J]. Nat Commun, 2021, 12(1) : 2419.

[50] Yu X, Wang D, Wang X, et al. CXCL12/CXCR4 promotes inflammation-driven colorectal cancer progression through activation of RhoA signaling by sponging miR-133a-3p [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1) : 32.

[收稿日期] 2022-08-30

神经元特异性 Isca1 敲除多发性线粒体功能障碍综合征 大鼠模型建立和机制研究

线粒体是真核生物中至关重要的细胞器,当线粒体 DNA 或者由核 DNA 编码的线粒体相关蛋白的基因发生突变,就会导致一系列严重的临床疾病。多发性线粒体功能障碍综合征 (multiple mitochondrial dysfunction Syndrome, MMDS) 是一种在临床上死亡率极高的遗传性线粒体疾病,与线粒体铁硫簇合成缺陷相关,可造成线粒体结构、代谢、功能的损伤。临床症状为神经系统损伤、肌肉张力下降、呼吸功能不全等。MMDS 发病机制复杂且并未被阐明,目前没有有效的治疗方案。Isca1 基因编码蛋白参与线粒体铁硫簇生物合成中铁的募集和传递,该基因的纯合突变是 MMDS5 的致病突变,临床病例发现患者携带 Isca1 突变。

来自中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物资源研究中心基因工程技术课题组的研究人员,通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 Isca1^{fllox/fllox} 与 NeuN-Cre 两种大鼠并进行杂交,繁育得到能在神经元中特异性敲除 Isca1 基因的 Isca1^{fllox/fllox}-NeuN-Cre (CKO) 大鼠。通过 Racine's scale 评价敲除大鼠的癫痫表型。通过步态分析、旷场实验、Y 迷宫实验和食物迷宫实验分析其行为异常和认知记忆障碍。核磁共振成像观察 CKO 大鼠的大小脑结构变化。通过 H&E 染色、尼氏染色、高尔基染色分析神经元结构和病理变化。通过透射电镜 (TEM)、免疫印迹和 ATP 含量检测判断线粒体结构和分子损伤情况。通过小麦胚芽凝集素的免疫荧光法标记神经元胞膜形态,检测神经元死亡情况。

结果显示,Isca1 缺失后导致大鼠发育迟缓,Isca1 缺失后导致大鼠在 4 周龄出现癫痫、痉挛,并随年龄恶化。Isca1 缺失后的大鼠出现运动障碍和记忆受损。MRI 显示小脑严重萎缩,侧脑室扩张明显。大、小脑切片中空泡数量明显增加,核固缩、胞体肿胀;Nissl 体减少,大量神经元丢失;神经元树突棘数量减少;线粒体超微结构异常,空泡化、膜碎裂、嵴断裂等病变。在线粒体中,呼吸链复合物蛋白 NDUFA9、NDUFS3、SDHB 含量降低、ATP 生成减少等症状。

综上,本研究建立了 MMDS5 神经系统症状的大鼠模型,可以较好地模拟临床病例中的痉挛、癫痫、发育迟缓、记忆受损、小脑萎缩等症状。同时,与人 MMDS5 相比,大鼠模型可存活至 8 周龄,有效延长了临床治疗的窗口期,也可用于其他线粒体疾病的神经症状的研究和治疗。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学 (英文)》期刊 (Animal Model Exp Med. 2023,6(2) :156-167, doi: 10.1002/ame2.12318)。

廖媛,陈方兵. 线粒体 DNA 编辑技术及其在生物医学中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 668-675.

Liao Y, Chen FB. Mitochondrial DNA editing technologies and their applications in biomedicine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 668-675.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.014

线粒体 DNA 编辑技术及其在生物医学中的应用

廖媛¹, 陈方兵^{2*}

(1. 西南大学资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 重庆 400715;
2. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510530)

【摘要】 线粒体拥有一套独立的基因组,参与维持线粒体功能。对线粒体 DNA(mitochondrial DNA,mtDNA)进行编辑,可以为其基因功能、相关疾病机理和治疗研究提供重要线索。但由于 mtDNA 所处环境和损伤修复机制的特殊性,可用于 mtDNA 编辑的工具较为有限。近年来,随着核酸酶技术和碱基编辑技术的快速发展,可靶向线粒体的核酸酶工具和碱基编辑器相继问世,为 mtDNA 编辑提供了有力工具。本文总结了近年来针对动物 mtDNA 而开发的一系列靶向基因编辑工具的主要进展及其在生物医学领域的应用,重点围绕 mtDNA 碱基编辑器 DdCBE,并对 mtDNA 编辑目前存在的问题与应用前景做了初步展望,以期在线粒体基因编辑新工具的开发,及其在基础研究、疾病模拟和临床治疗等场景中更广泛的应用提供有益参考。

【关键词】 线粒体 DNA;mtDNA 编辑;核酸酶技术;碱基编辑器;MitoZFN;MitoTALEN;DdCBE

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0668-08

Mitochondrial DNA editing technologies and their applications in biomedicine

LIAO Yuan¹, CHEN Fangbing^{2*}

(1. State Key Laboratory of Resource Insects, Southwest University, Chongqing 400715, China.
2. Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530)
Corresponding author: CHEN Fangbing. E-mail: chen_fangbing@gibh.ac.cn

【Abstract】 Mitochondria possess their own genome to maintain mitochondrial functions. Modification of mitochondrial DNA (mtDNA) provides important insights into gene functions, disease mechanisms, and therapeutics. However, the available tools for mtDNA editing are relatively limited because of the nature of the unique environment where mtDNA resides and the mechanism of DNA damage repair in mitochondria. With the rapid progress of nuclease and base-editing technologies in recent years, mitochondrially targeted nuclease tools and base editors have been developed, providing powerful tools for mtDNA editing. In this review, we summarize the recent progress of a series of tools developed for targeted editing of animal mtDNA and their applications in biomedicine, focusing on DdCBE (DddA-derived cytosine base editor), and provide a brief outlook on the existing problems and application prospects of mtDNA editing to provide a useful reference for the development of novel tools for mitochondrial genome editing and their wider applications in basic research, disease modeling, and clinical therapeutics.

【Keywords】 mitochondrial DNA (mtDNA); mtDNA editing; nuclease technology; base editor; MitoZFN; MitoTALEN; DdCBE

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

[基金项目] 国家自然科学基金(32100410),广州市科技计划项目(202201010409)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (32100410), Science and Technology Program of Guangzhou (202201010409).

[作者简介] 廖媛(1994—),女,硕士,助理实验师,研究方向:基因修饰动物培育研究。Email:liao_yuan@foxmail.com

[通信作者] 陈方兵,男,助理研究员,博士后,研究方向:基因编辑技术开发与动物模型培育研究。Email:chen_fangbing@gibh.ac.cn

动物细胞拥有两套相对独立的基因组:细胞核基因组和线粒体基因组。这两套基因组在功能上密切联系,共同维持细胞正常生理功能,对其进行编辑,对于基因功能和疾病机制研究以及疾病治疗等均具有重要意义。近年来,基因编辑技术蓬勃发展,人工核酸酶及其衍生的碱基编辑器等新技术迅速迭代更新,应用场景不断拓展^[1]。但是,基因编辑技术目前主要聚焦于细胞核 DNA 的修饰,而线粒体由于结构特殊及 DNA 损伤修复机制和遗传方式等方面与细胞核基因组存在差异,当前所建立的大部分基因编辑工具通常难以直接用于线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的编辑,因而可用的 mtDNA 编辑工具较为有限,对于线粒体基因组功能的研究相对不足^[2]。虽然广泛使用的成簇的规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关 (CRISPR-associated, Cas) 系统目前在 mtDNA 编辑中的效果较差,但通过对其他基因编辑系统进行特定改造或优化,如锌指核酸酶 (zinc-finger nuclease, ZFN) 和转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 等人工核酸酶,研究者也已经建立了靶向切割 mtDNA 技术以及衍生的 mtDNA 碱基编辑技术^[3],为更灵活操纵线粒体基因组提供了重要保障。

1 线粒体 DNA 编辑的特殊性

线粒体作为细胞内重要的细胞器,拥有一套独立于细胞核的基因组。人类线粒体基因组长约 16.6 kb,其所包含的 37 个基因中,13 个蛋白编码基因能够编码呼吸链复合物的 13 个多肽亚基,剩余 22 个转运 RNA (transfer ribonucleic acid) 和 2 个核糖体 RNA (ribosomal RNA) 负责线粒体内蛋白的翻译,这些基因对于线粒体的氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 等功能至关重要^[4]。

一直以来,操纵动物的 mtDNA 都具有较大挑战,主要原因包括:(1)线粒体内膜由于质子泵作用形成的强跨膜电位,阻碍外源核酸进入线粒体基质,加上当前对核酸分子进入线粒体的转运机制尚不清楚,使外源核酸难以被有效递送到线粒体内,这导致需要向导 RNA (guide RNA, gRNA) 的 CRISPR/Cas 系统无法实现对 mtDNA 的有效编辑^[5-6];(2)线粒体的 DNA 损伤修复机制与细胞核内存在较大差异,其以碱基切除修复通路为主,而

DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB) 修复较为低效,导致核酸酶介导 mtDNA 发生 DSB 后,线性化的 mtDNA 分子倾向于被快速降解而非触发 DSB 修复通路,造成核酸酶对 mtDNA 的编辑结果与在细胞核内并不相同^[7-9];(3)细胞内包含大量线粒体,而线粒体内 DNA 呈多拷贝形式存在,这对编辑效率影响较大,使编辑难度增加;(4)线粒体主要以母系遗传方式传递到子代且存在遗传瓶颈效应^[10],一方面导致通过体细胞基因编辑和克隆获得基因修饰动物的常规路径难以用于 mtDNA 突变动物的培育,另一方面导致获得足够数量的种群耗时更长,且突变 mtDNA 载荷在传代过程中也存在较大变异性。

线粒体 DNA 的这些独特性质,导致目前广泛应用于细胞核 DNA 编辑的工具或策略,难以直接用于 mtDNA 的编辑。开发可用于线粒体的基因编辑工具,需要建立线粒体特异的靶向系统进行高效递送,并充分利用线粒体的损伤修复机制,以实现 mtDNA 的有效编辑。

2 线粒体 DNA 靶向编辑技术

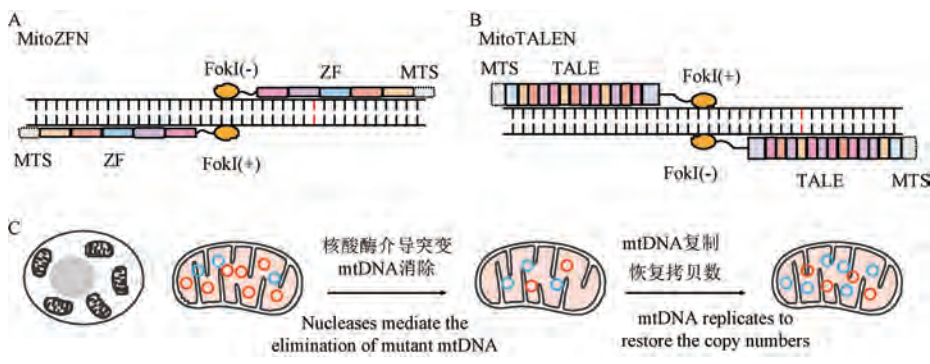
2.1 人工核酸酶介导的线粒体 DNA 编辑

线粒体 DNA 的多拷贝特征造成突变 mtDNA 和野生型 mtDNA 共存的异质性现象,而且线粒体内总的 mtDNA 拷贝数受到精细调控^[9]。因此,当核酸酶靶向切割突变或者野生型 mtDNA 导致其被特异性降解,残余 mtDNA 随即通过复制进行数量补充,从而改变野生型和突变型 mtDNA 比例,被称为“异质性转换 (heteroplasmy shifting)”。通过这种方式,可以利用核酸酶实现 mtDNA 的靶向编辑。并且,当核酸酶蛋白附加一段线粒体靶向信号肽 (mitochondrial targeting signal, MTS) 序列,可以使其被有效转运到线粒体内发挥功能,能够解决递送的问题。

早期,限制性核酸内切酶 (restriction endonuclease, RE) 或归巢核酸酶 (homing endonuclease/meganuclease) 被改造用于 mtDNA 靶向切割 (如 MitoRE 和 mitoARCUS),虽然其特异性较高、载体尺寸小,但是可编程性差,应用非常受限^[11]。人工核酸酶问世后,由于其可编程特性强,不但被用于核 DNA 的编辑,也被开发用于 mtDNA 的编辑。例如,ZFN 和 TALEN 等纯蛋白系统通过添加 MTS 序列,可以靶向线粒体切割 mtDNA,分别被命名为 MitoZFN^[12] 和 MitoTALEN^[13],在细胞水平可以实现点突变和大片段删除等不同类型变异

mtDNA 的特异性消除(图 1)。后续利用这些工具,进一步在小鼠成体水平成功实现了突变 mtDNA 的靶向降解^[14-15],显示出其未来在基因治疗应用中的巨大潜能。相比之下,CRISPR/Cas 系统由于存在 gRNA 难以递送到线粒体的局限性,虽然也有相关报道,但目前尚无法实现对 mtDNA 的有效

编辑^[5,16]。
核酸酶介导的 mtDNA 特异性消除,首次实现了对 mtDNA 的直接靶向编辑。而人工核酸酶可以针对不同的 mtDNA 靶位点,进行特异的靶向切割,其设计和应用更为灵活。表 1 总结了当前主要的线粒体 DNA 编辑工具的特征。



注: A: MitoZFN 示意图; B: MitoTALEN 示意图; C: 靶向线粒体的人工核酸酶介导突变 mtDNA 消除, 实现异质性转换, 蓝色圆环表示野生型 mtDNA, 红色圆环表示突变 mtDNA; MTS: 线粒体靶向信号肽; ZF: 锌指蛋白; TALE: 转录激活因子样效应物; mtDNA: 线粒体 DNA。

图 1 靶向线粒体的人工核酸酶介导线粒体内突变 mtDNA 消除

Note. A. Schematic diagram of MitoZFN. B. Schematic diagram of MitoTALEN. C. Mitochondrially targeted artificial nucleases mediate the elimination of mutant mtDNA, resulting heteroplasmy shifting. Blue circles indicate wild-type mtDNA and red circles indicate mutant mtDNA, respectively. MTS. Mitochondrial targeting signal. ZF. Zinc finger protein. TALE. Transcription activator-like effector. mtDNA. Mitochondrial DNA.

Figure 1 Mitochondrially targeted artificial nucleases mediate the elimination of mutant mtDNA

2.2 线粒体 DNA 碱基编辑系统

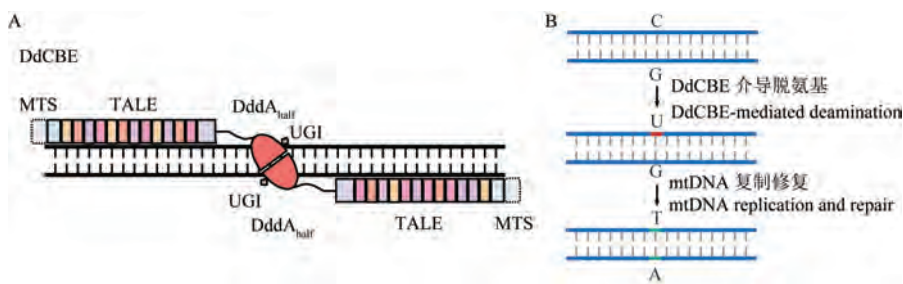
核酸酶介导的 mtDNA 编辑,主要是特异性消除某种突变 mtDNA,但无法在 mtDNA 中引入新的特定突变,而碱基编辑器为此提供了一个有力的工具。David R. Liu 团队在 CRISPR/Cas 系统基础上开发的胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor),是借助 CRISPR/Cas 系统的靶向功能,引导胞嘧啶脱氨酶或腺嘌呤脱氨酶对靶位点的目标碱基进行脱氨,实现碱基类型变换^[17-18]。但是,如上所述,CRISPR/Cas 系统当前并不适用于靶向线粒体基因组。虽然之前 Yang 等^[19]尝试利用 ZF 或 TALE 的 DNA 结合域与胞嘧啶脱氨酶(AID 等)融合,用于人类细胞的碱基编辑,但编辑效率仅有 2.5%。这很可能是因为这些脱氨酶仅能作用于单链 DNA,而 ZF 和 TALE 仅有结合 DNA 能力,靶位点难以形成可供脱氨酶作用的单链 DNA 环境。因此,虽然碱基编辑技术在核 DNA 编辑中的应用已经非常广泛,但很长一段时间都缺乏高效的 mtDNA 碱基编辑器。

直到 2020 年,David R. Liu 团队和合作者利用一个细菌(*Burkholderia cenocepacia*) 来源的胞嘧啶脱

氨酶 DddA_{tox} 与 TALE 联合,构建了新型碱基编辑器 DdCBE(DddA-derived cytosine base editor),可以实现对 mtDNA 的高效编辑^[20],这是 mtDNA 编辑领域的一个里程碑式进展。DddA_{tox} 具有双链 DNA 脱氨活性,但全长序列具有较强的细胞毒性,因此其被分裂为无活性的两半(DddA_{half}-N 和 DddA_{half}-C),分别与一条 TALE 融合,当一对 TALE 同时靶向基因组的邻近位置,分裂的 DddA_{half}-N/C 可以重新组装形成具有脱氨酶活性的完整蛋白,实现对靶位点的 C 到 T 碱基编辑(图 2)。DdCBE 在细胞水平表现出非常高的碱基编辑效率,当借助添加的 MTS 序列靶向线粒体,可有效实现对 mtDNA 的碱基编辑。DdCBE 的成功开发,首次为 mtDNA 碱基编辑提供了有力工具,使得高效定点突变 mtDNA 成为现实(表 1)。

凭借 DdCBE 在高效诱导 mtDNA 碱基替换上的强大功能,自问世以来,研究者围绕其优化与升级开展了一系列工作,在编辑效率、可编辑范围、载体尺寸、碱基变换类型和特异性等方面均取得了重要进展。

通过蛋白进化方法,成功获得的 DddA 变体不仅在编辑效率上有所提高,而且减小了原始 DddA



注:A:DdCBE 示意图;B:DdCBE 介导靶位点碱基 C 到 T 编辑示意图;MTS:线粒体靶向信号肽;TALE:转录激活因子样效应物;mtDNA:线粒体 DNA;UGI:尿嘧啶糖苷酶抑制蛋白;DddA_half:DddA 脱氨酶半体

图 2 线粒体碱基编辑器 DdCBE

Note. A. Schematic diagram of DdCBE. B. Schematic diagram illustrating C-to-T base editing mediated by DdCBE at the target. MTS. Mitochondrial targeting signal. TALE. Transcription activator-like effector. mtDNA. Mitochondrial DNA. UGI. Uracil glycosylase inhibitor. DddA_half. Splitted DddA deaminase half.

Figure 2 Mitochondrial base editor DdCBE

对 TC 序列的偏好性,扩展了 DdCBE 的靶向范围^[21]。Lee 等^[22]通过添加核输出信号和联合 MitoTALEN,也提高了 DdCBE 的碱基编辑效率。而 Wei 等^[23]发现在胚胎水平的 mtDNA 编辑中,人类 8 细胞期卵裂胚胎注射 mRNA 的编辑效率显著高于常规的合子期注射。另外,Lim 等^[24]和 Willis 等^[25]将 DdCBE 中的 TALE 替换为 ZF 而构建的碱基编辑器 ZFD (zinc finger deaminase) 和 ZF-DdCBE,同样可以实现高效的碱基编辑,其载体尺寸更小,更利于病毒包装与递送;而且 ZF 与 TALE 相比,在 N 端和 C 端均没有大块的结构域,DddA 可以融合到 ZF 的任何一端,增加了载体构建灵活性;ZF 作为人类细胞中广泛存在的蛋白类型,被认为具有更低免疫原性,在治疗性应用中更安全。为了更有效减小 DdCBE 尺寸,Mok 等^[26]对 DddA 进行氨基酸突变,获得了无细胞毒性的全长 DddA 变体,仅需要将其与单个 TALE 融合即可发挥功能,从而成功构建了单体 DdCBE 版本(mDdCBE)。但单体 DdCBE 的编辑效率有一定程度降低,特异性是否降低也有待进一步分析。

DdCBE 仅能实现 C 到 T (或 G 到 A) 的碱基编辑,类型较为单一。Choi 等^[27]在 DdCBE 系统的基础上,通过失活 DddA 并巧妙引入腺嘌呤脱氨酶 TadA-8e,成功构建了一系列新的 mtDNA 碱基编辑器 TALED (TALE-linked deaminase)。TALED 借助失活的 DddA 打开 DNA 双链,使得 TadA-8e 可以对单链 DNA 的腺嘌呤进行脱氨,从而有效实现了 A 到 G (或 T 到 C) 的碱基编辑,为 mtDNA 碱基编辑提供了新的有力工具,是相关领域的又一次重要突破。

特异性是基因编辑工具很重要的性质,对 DdCBE 等碱基编辑器的特异性进行系统分析与改善,对于其后续在临床中的应用至关重要。虽然 DdCBE 总体的脱靶编辑活性较低,但应用更灵敏的检测方法也发现,DdCBE 不但可造成线粒体基因组脱靶编辑,也可能产生核基因组的脱靶编辑,因此不同的策略也已被用于提高 DdCBE 的特异性^[22,28-30]。而对于 DdCBE 衍生的编辑器(如 ZFD、mDdCBE 和 TALED),其特异性也还需要进行更系统的评估^[24,26-27]。此外,目前的 mtDNA 碱基编辑器存在目标碱基附近的碱基也被额外编辑的旁观者效应,并且靶位点正、反两条链均能被编辑,这严重影响了其特异性,有待后续改进。

3 线粒体 DNA 编辑工具在生物医学中的应用

当细胞内突变 mtDNA 超过一定比例(阈值),可影响线粒体功能,导致多种线粒体相关疾病。因此,对 mtDNA 进行编辑,不但可以模拟相应的致病突变,用以构建合适的动物模型研究疾病机理(见表 2);也能直接用于消除或纠正突变 mtDNA,实现基因治疗的目标。mtDNA 编辑工具在生物医药领域中的应用前景广阔。靶向线粒体的人工核酸酶工具(如 MitoZFN 和 MitoTALEN)以及碱基编辑工具(如 DdCBE)相继开发后,已被用于不同动物以及人类的 mtDNA 编辑。特别是 mtDNA 碱基编辑器,能够有效产生新突变,通过多种策略进行优化与改造,显著推动了其广泛应用。

表 1 主要的线粒体 DNA 编辑工具特征总结

Table 1 Summary of mtDNA editing technologies				
编辑工具 Editing tools	主要组分 Major components	尺寸 Size	可编程性 Programmability	编辑结果 Editing effect
MitoRE ^[11] 或 MitoARCUS ^[31] MitoRE or MitoARCUS	MTS + RE 或 MTS + 归巢核酸酶 MTS + RE or MTS + meganuclease	小(同型二聚体或单体) Small (Homodimer or monomer)	低(改造难度大, 靶向范围受限) Difficult (Engineering is challenging, limited targeting scope)	mtDNA 特异性消除 Elimination of specific mtDNA
MitoZFN ^[12]	MTS + ZF + FokI	相对大(异型二聚体) Relatively large (Heterodimer)	相对高 Relatively easy	mtDNA 特异性消除 Elimination of specific mtDNA
MitoTALEN ^[13]	MTS + TALE + FokI	大(异型二聚体) Large (Heterodimer)	高(灵活性好) Easy (High flexibility)	mtDNA 特异性消除 Elimination of specific mtDNA
DdCBE ^[20]	MTS + TALE + DddA + UGI	大(异型二聚体) Large (Heterodimer)	高(灵活性好) Easy (High flexibility)	mtDNA 点突变(C-to-T) mtDNA point mutation (C-to-T)
ZFD ^[24] 或 ZF-DdCBE ^[25] ZFD or ZF-DdCBE	MTS + ZF + DddA + UGI	相对大(异型二聚体) Relatively large (Heterodimer)	相对高 Relatively easy	mtDNA 点突变(C-to-T) mtDNA point mutation (C-to-T)
TALED ^[27]	MTS + TALE + DddA + TadA8e	大(异型二聚体或单体) Large (Heterodimer or monomer)	高(灵活性好) Easy (High flexibility)	mtDNA 点突变(A-to-G) mtDNA point mutation (A-to-G)

表 2 利用线粒体 DNA 编辑工具建立的动物模型

Table 2 Animal models generated by mtDNA editing tools					
动物 Animals	靶位点 Target sites	编辑工具 Editing tools	构建策略 Strategies	人类相关疾病 Human diseases	参考文献 References
果蝇 Fruit fly	<i>mt;CoI</i> ^{R301S}	MitoRE	生殖系表达 <i>mitoXhoI</i> Expression of <i>mitoXhoI</i> in germline	Leigh 综合征、MELAS Leigh syndrome and MELAS	[32]
	大片段删除 Large mtDNA deletions	MitoRE	骨骼肌表达 <i>MitoPstI</i> Expression of <i>MitoPstI</i> in muscle	线粒体肌病 Mitochondrial myopathy	[33]
	<i>MT-Nd5</i> ^{G12918A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	Leigh 综合征、MELAS、LHON Leigh syndrome, MELAS, LHON	[22, 34]
	<i>MT-Nd1</i> ^{G2820A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	Leigh 综合征、LHON、肌病 Leigh syndrome, LHON, myopathy	[35]
小鼠 Mouse	<i>MT-Trnk</i> ^{G7763A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	Leigh 综合征、LHON、肌病 Leigh syndrome, LHON, myopathy	[35]
	<i>MT-Nd3</i> ^{G9576A/G9577A}	DdCBE	AAV 递送 AAV delivery	未知 Unknown	[36]
	<i>MT-Trnk</i> ^{G7743A}	ZF-DdCBE	AAV 递送 AAV delivery	线粒体肌病、视网膜病变 Mitochondrial myopathy and retinopathy	[25]
	<i>MT-Nd1</i> ^{G3177A}	ZF-DdCBE	AAV 递送 AAV delivery	LHON	[25]
大鼠 Rat	<i>MT-Trne</i> ^{G14098A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	线粒体肌病 Mitochondrial myopathy	[37]
	<i>MT-Trnk</i> ^{G7755A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	MERRF、心肌病、Leigh 综合征 MERRF, cardiomyopathy, Leigh syndrome	[37]
斑马鱼 Zebrafish	<i>mt-nd1</i> ^{G4247A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	LHON	[38]
	<i>mt-nd5</i> ^{G14076A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	Leigh 综合征、MELAS Leigh syndrome, MELAS	[38]

注: MELAS: 线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作; LHON: Leber 遗传性视神经病变; MERRF: 肌阵挛癫痫伴破碎红纤维病。
Note. MELAS. Mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes. LHON. Leber Hereditary Optic Neuropathy. MERRF. Myoclonic epilepsy and ragged red fibers.

3.1 靶向线粒体的核酸酶技术的应用

核酸酶通过靶向降解变异 mtDNA 实现异质性转换, 为 mtDNA 变异的基因治疗提供了一种独特策略^[39]。线粒体 m.8993T> G 突变与多种线粒体疾病

相关(如 NARP 和 MILS 综合征), 早期尝试利用限制性内切酶 MitoRE-SmaI 或 MitoRE-XmaI 在含有该致病突变的杂交细胞中特异性消除突变 mtDNA, 挽救了部分表型^[40-41]。Bayona-Bafaluy 等^[42] 也尝试

将 MitoRE 用于小鼠成体水平的 mtDNA 异质性转换,但由于其靶位点十分有限,在基因治疗中的应用非常局限。基于归巢核酸酶的 MitoARCUS 平台,能够进行一定的定制化改造,也已经被用于小鼠成体水平的线粒体 tRNA 突变(m.5024C>T)的靶向消除^[31]。MitoARCUS 的小尺寸、单体形式和高特异性在基因治疗等应用中具有优势;而人工核酸酶在靶向设计上更简单、灵活,应用范围更广。利用靶向线粒体的人工核酸酶(如 MitoZFN 和 MitoTALEN),研究者在体外培养的人类细胞中成功实现了靶向消除多种常见的致病突变 mtDNA,包括 mtDNA 大片删除和点突变^[12-13]。随后,在一个携带 mtDNA 致病突变(m.5024C>T)的小鼠模型上,利用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)递送 MitoZFN 或 MitoTALEN,均在成体的心脏和骨骼肌等多种组织中有效降低了突变 mtDNA 水平而提高了野生型 mtDNA 比例,从而一定程度恢复了线粒体功能^[14-15]。

这些在体外培养的人类杂交细胞或小鼠成体水平的研究,初步证实了靶向线粒体的核酸酶工具在基因治疗应用中的有效性。但是由于核酸酶介导的 mtDNA 编辑依赖于 mtDNA 的异质性状态,而可用的细胞或动物模型较为缺乏,相关研究也仅针对少数几种致病性突变进行了初步验证,未来还有待更多的评估。

3.2 mtDNA 碱基编辑技术的应用

mtDNA 碱基编辑技术能够诱导特异位点产生新 mtDNA 突变,为构建 mtDNA 突变模型提供了有力工具,可以弥补当前相关模型缺乏的现状(表 2)。Lee 等^[34]最早利用靶向线粒体的 DdCBE 碱基编辑器,构建 m.12918G>A 突变小鼠模型,模拟人类 *MT-ND5* 基因的一个致病突变(m.13513G>A),该突变与 Leigh 综合征、MELAS 和 LHON 综合征等多种疾病相关。虽然所获得的 F0 代小鼠模型刚出生时没有明显表型^[34],推测可能是因为尚未到发病时间或者是 mtDNA 突变比例偏低,有待后续研究,但该研究首次证明了利用 DdCBE 能够快速获得 mtDNA 突变动物模型。随后,DdCBE 被用于斑马鱼和大鼠等其他不同动物的 mtDNA 编辑,成功模拟了相关 mtDNA 突变病人的一些特征性临床表型^[37-38]。这些结果证实了 mtDNA 碱基编辑工具能够快速、高效构建 mtDNA 突变线粒体疾病动物模型,这在过去是难以实现的。最近,Silva-Pinheiro 等^[43]基于 DdCBE

系统构建了一个碱基编辑器文库(MitoKO),其可以靶向敲除小鼠线粒体基因组的全部蛋白编码基因,将为后续研究线粒体功能和构建 mtDNA 基因失活模型奠定基础。而另一项在大鼠的研究中,将 DdCBE 与 Cre/loxP 系统相结合,能够实现大鼠 mtDNA 编码蛋白的条件性敲除^[44]。

同时,mtDNA 碱基编辑工具在 mtDNA 突变疾病的基因治疗中也具有广阔应用前景。虽然由于可用模型的缺乏,目前的报道主要是利用 DdCBE 诱导野生型 mtDNA 产生突变,而非纠正致病性 mtDNA 突变,但已有的研究结果在编辑效率、特异性、递送策略等方面均能为将来的基因治疗应用提供重要线索。比如,Silva-Pinheiro 等^[36]尝试利用 AAV 递送 DdCBE,在成年和新生小鼠中均实现了心脏的在体 mtDNA 编辑,目标碱基的编辑效率分别高达 20%和 30%,而且延长 DdCBE 的作用时间能够提高靶向编辑效率。DdCBE 也已被用于人类非整倍体胚胎或正常二倍体胚胎 mtDNA 的编辑,但不同胚胎间编辑效率差异较大(如 m.3733G 位点在 2.77% ~ 58.97%之间),而卵裂期注射 mRNA(特别是 8 细胞期)的编辑效率显著高于合子期注射^[23,45]。这些探索性研究,可以为未来基因治疗中的编辑时期选择、载体递送策略、胚胎或在体编辑效率评估以及进一步优化提供有效参考。此外,在细胞和胚胎水平的研究结果显示,这些 mtDNA 碱基编辑工具存在线粒体基因组和核基因组水平的脱靶风险^[28-29,45],提示其临床应用中的潜在风险,未来需要更系统的评估。而通过一些优化策略,例如改造脱氨酶 DddA_{lox} 提高其保真性、共表达 DddA 的抑制蛋白或调控 DdCBE 的亚细胞定位等^[29-30],可以有效降低 DdCBE 的脱靶活性,为这些工具在基因治疗中的应用奠定了基础。

4 展望

长期以来,对线粒体基因组的编辑较为困难,缺乏有效策略。随着近年来基因编辑技术的飞速发展,多种 mtDNA 编辑工具被相继开发,但总体来说,可用的工具以及可实现的基因编辑类型还是很有限。核酸酶介导的 mtDNA 靶向消除和碱基编辑器介导的 mtDNA 碱基突变作为两类代表性技术,为 mtDNA 的靶向编辑提供了有效策略。值得注意的是,CRISPR/Cas 系统以其简单、灵活和高效等优势,在细胞核基因编辑中应用最为广泛,但目前难

以用于 mtDNA 编辑。解决 gRNA 难以递送到线粒体内的瓶颈问题,使 CRISPR/Cas 系统能有效用于 mtDNA 编辑,对该领域会有显著推动作用,值得更多的探索与突破。

过去由于技术限制,可用的 mtDNA 突变动物模型相当缺乏^[46],严重阻碍了相关疾病机制研究和治疗方法的开发。以 DdCBE 为代表的碱基编辑器,可以诱导产生 mtDNA 突变,能够有效用于模拟人类致病性 mtDNA 突变,从而构建相关疾病模型。但是,目前已构建的 mtDNA 突变动物模型仅有少数几种(表 2),未来还有很大的空白有待填补。此外,由于线粒体的遗传瓶颈效应,获得的动物模型在传代过程中突变 mtDNA 的比例可能产生很大变异,导致后代模型间难以达到一致,影响其应用^[10]。

mtDNA 突变相关线粒体疾病目前尚无有效治疗手段,mtDNA 编辑工具有望成为未来基因治疗的利器。但由于编辑效率、编辑类型、潜在的脱靶和旁观者效应等方面尚存在很多不足,还有待进一步改善。同时,由于 mtDNA 的多拷贝特征,很难实现 100% 的突变 mtDNA 消除或纠正,残留的突变 mtDNA 可能成为隐患。如果将 mtDNA 编辑联合线粒体替代技术^[47],可能在临床应用中更有利于降低残留突变 mtDNA 传递到后代的危险。

参 考 文 献(References)

- [1] Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors [J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(7): 824-844.
- [2] Silva-Pinheiro P, Minczuk M. The potential of mitochondrial genome engineering [J]. Nat Rev Genet, 2022, 23(4): 199-214.
- [3] Tan J, Forner J, Karcher D, et al. DNA base editing in nuclear and organellar genomes [J]. Trends Genet, 2022, 38(11): 1147-1169.
- [4] Rackham O, Filipovska A. Organization and expression of the mammalian mitochondrial genome [J]. Nat Rev Genet, 2022, 23(10): 606-623.
- [5] Yin T, Luo J, Huang D, et al. Current progress of mitochondrial genome editing by CRISPR [J]. Front Physiol, 2022, 13: 883459.
- [6] Gammage PA, Moraes CT, Minczuk M. Mitochondrial genome engineering: the revolution may not be CRISPR-ized [J]. Trends Genet, 2018, 34(2): 101-110.
- [7] Peeva V, Blei D, Trombly G, et al. Linear mitochondrial DNA is rapidly degraded by components of the replication machinery [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1727.
- [8] Nissanka N, Bacman SR, Plastini MJ, et al. The mitochondrial DNA polymerase gamma degrades linear DNA fragments precluding the formation of deletions [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2491.
- [9] Fu Y, Tigano M, Sfeir A. Safeguarding mitochondrial genomes in higher eukaryotes [J]. Nat Struct Mol Biol, 2020, 27(8): 687-695.
- [10] Stewart JB, Freyer C, Elson JL, et al. Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease [J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(9): 657-662.
- [11] Srivastava S, Moraes CT. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease [J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(26): 3093-3099.
- [12] Gammage PA, Rorbach J, Vincent AI, et al. Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations [J]. EMBO Mol Med, 2014, 6(4): 458-466.
- [13] Bacman SR, Williams SL, Pinto M, et al. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs [J]. Nat Med, 2013, 19(9): 1111-1113.
- [14] Gammage PA, Viscomi C, Simard ML, et al. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation *in vivo* [J]. Nat Med, 2018, 24(11): 1691-1695.
- [15] Bacman SR, Kauppila JHK, Pereira CV, et al. MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA^{Ala} levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation [J]. Nat Med, 2018, 24(11): 1696-1700.
- [16] Bi R, Li Y, Xu M, et al. Direct evidence of CRISPR-Cas9-mediated mitochondrial genome editing [J]. Innovation, 2022, 3(6): 100329.
- [17] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. Nature, 2016, 533(7603): 420-424.
- [18] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. Nature, 2017, 551(7681): 464-471.
- [19] Yang L, Briggs AW, Chew WL, et al. Engineering and optimising deaminase fusions for genome editing [J]. Nat Commun, 2016, 7: 13330.
- [20] Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing [J]. Nature, 2020, 583(7817): 631-637.
- [21] Mok BY, Kotrys AV, Raguram A, et al. CRISPR-free base editors with enhanced activity and expanded targeting scope in mitochondrial and nuclear DNA [J]. Nat Biotechnol, 2022, 40(9): 1378-1387.
- [22] Lee S, Lee H, Baek G, et al. Enhanced mitochondrial DNA editing in mice using nuclear-exported TALE-linked deaminases and nucleases [J]. Genome Biol, 2022, 23(1): 211.
- [23] Wei Y, Xu C, Feng H, et al. Human cleaving embryos enable efficient mitochondrial base-editing with DdCBE [J]. Cell Discov, 2022, 8(1): 7.

- [24] Lim K, Cho SI, Kim JS. Nuclear and mitochondrial DNA editing in human cells with zinc finger deaminases [J]. Nat Commun, 2022, 13: 366.
- [25] Willis JCW, Silva-Pinheiro P, Widdup L, et al. Compact zinc finger base editors that edit mitochondrial or nuclear DNA *in vitro* and *in vivo* [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 7204.
- [26] Mok YG, Lee JM, Chung E, et al. Base editing in human cells with monomeric DddA-TALE fusion deaminases [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 4038.
- [27] Cho SI, Lee S, Mok YG, et al. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases [J]. Cell, 2022, 185(10): 1764–1776.e12.
- [28] Wei Y, Li Z, Xu K, et al. Mitochondrial base editor DdCBE causes substantial DNA off-target editing in nuclear genome of embryos [J]. Cell Discov, 2022, 8(1): 27.
- [29] Lei Z, Meng H, Liu L, et al. Mitochondrial base editor induces substantial nuclear off-target mutations [J]. Nature, 2022, 606(7915): 804–811.
- [30] Lee S, Lee H, Baek G, et al. Precision mitochondrial DNA editing with high-fidelity DddA-derived base editors [J]. Nat Biotechnol, 2023, 41(3): 378–386.
- [31] Zekonyte U, Bacman SR, Smith J, et al. Mitochondrial targeted meganuclease as a platform to eliminate mutant mtDNA *in vivo* [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 3210.
- [32] Xu H, Deluca SZ, O'farrell PH. Manipulating the metazoan mitochondrial genome with targeted restriction enzymes [J]. Science, 2008, 321(5888): 575–577.
- [33] Srivastava S, Moraes CT. Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans [J]. Hum Mol Genet, 2005, 14(7): 893–902.
- [34] Lee H, Lee S, Baek G, et al. Mitochondrial DNA editing in mice with DddA-TALE fusion deaminases [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1190.
- [35] Guo J, Zhang X, Chen X, et al. Precision modeling of mitochondrial diseases in zebrafish via DdCBE-mediated mtDNA base editing [J]. Cell Discov, 2021, 7(1): 78.
- [36] Silva-Pinheiro P, Nash PA, van Haute L, et al. *In vivo* mitochondrial base editing via adeno-associated viral delivery to mouse post-mitotic tissue [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 750.
- [37] Qi X, Chen X, Guo J, et al. Precision modeling of mitochondrial disease in rats via DdCBE-mediated mtDNA editing [J]. Cell Discov, 2021, 7(1): 95.
- [38] Guo J, Zhang X, Chen X, et al. Precision modeling of mitochondrial diseases in zebrafish via DdCBE-mediated mtDNA base editing [J]. Cell Discov, 2021, 7(1): 78.
- [39] Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches [J]. EMBO Rep, 2020, 21(3): e49612.
- [40] Tanaka M, Borgeld HJ, Zhang J, et al. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria [J]. J Biomed Sci, 2002, 9(6): 534–541.
- [41] Alexeyev MF, Venediktova N, Pastukh V, et al. Selective elimination of mutant mitochondrial genomes as therapeutic strategy for the treatment of NARP and MILS syndromes [J]. Gene Ther, 2008, 15(7): 516–523.
- [42] Bayona-Bafaluy MP, Blits B, Battersby BJ, et al. Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(40): 14392–14397.
- [43] Silva-Pinheiro P, Mutti CD, Van Haute L, et al. A library of base editors for the precise ablation of all protein-coding genes in the mouse mitochondrial genome [J]. Nat Biomed Eng, 2023, 7(5): 692–703.
- [44] Tan L, Qi X, Kong W, et al. A conditional knockout rat resource of mitochondrial protein-coding genes via a DdCBE-induced premature stop codon [J]. Sci Adv, 2023, 9(15): eadf2695.
- [45] Chen X, Liang D, Guo J, et al. DdCBE-mediated mitochondrial base editing in human 3PN embryos [J]. Cell Discov, 2022, 8(1): 8.
- [46] Stewart JB. Current progress with mammalian models of mitochondrial DNA disease [J]. J Inherit Metab Dis, 2021, 44(2): 325–342.
- [47] Chinnery PF. Mitochondrial replacement in the clinic [J]. N Engl J Med, 2020, 382(19): 1855–1857.

[收稿日期] 2022-11-28

郭亚茜,杜晓鹏,朱华. 金黄地鼠生物净化及其应用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 676-682.

Guo YX, Du XP, Zhu H. Biological purification and application of golden hamster [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 676-682.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.015

金黄地鼠生物净化及其应用

郭亚茜,杜晓鹏,朱华*

(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,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)

【摘要】 金黄地鼠被用于研究人类相关疾病已有 60 多年,广泛应用于新型冠状病毒、代谢性疾病发病机制、疫苗和治疗性药物效果评价的研究中。WTO 规定用于疫苗生产和检定的金黄地鼠必须达到无特定病原体 (specific pathogen free,SPF) 级,而目前国内使用的多为普通级。通过生物净化提升金黄地鼠种群微生物等级势在必行。本文概述了金黄地鼠在新型冠状病毒、代谢性疾病研究中的应用及相关生物净化技术工作进展。

【关键词】 金黄地鼠;生物净化;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0676-07

Biological purification and application of golden hamster

GUO Yaxi, DU Xiaopeng, ZHU Hua*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical Collage, PUMC, NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China)

Corresponding author: ZHU Hua. E-mail: zhuh@cnilas.org

【Abstract】 The golden hamster has been used as an animal model to study human diseases for more than 60 years, such as COVID-19 and metabolic diseases, and for safety evaluation of vaccines and therapeutic drugs. In accordance with the regulations of the WTO, golden hamsters used for vaccine production and verification must have a microbe control grade of specific pathogen free, but conventional animals are commonly used domestically. Therefore, it is imperative to improve the microbial grade of golden hamsters through sterile Cesarean section. In this review, we broadly discuss the applications of golden hamsters in the study of COVID-19 and metabolic diseases, and the research progress of sterile Cesarean section.

【Keywords】 golden hamster; biological purification; animal models

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

金黄地鼠 (Golden hamster; *Mesocricetus auratus*) 又称叙利亚地鼠,属哺乳纲、啮齿目、金黄地鼠科动物,来源于 1930 年从叙利亚 Aleppo 地区捕获的 3 只野生地鼠。世界上育成的金黄地鼠近交系 38 个,部分近交系 8 个,突变系 17 个,封闭群 38 个,目前使用的金黄地鼠大部分属于封闭群。我国使用的金黄地鼠最早由兰春霖于 1947 年从国外引入。

金黄地鼠繁殖能力强、生长发育快、生殖周期

短、有颊囊,已广泛应用于医学及生物学等研究领域,约占地鼠使用总量的 90%。但这些金黄地鼠多为普通级,常有腹泻、肺炎等疾病,严重影响实验结果的可靠性。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 和世界贸易组织 (World Trade Organization, WTO) 关于疫苗生产和检定规程中明确规定:用于疫苗生产和检定的金黄地鼠必须达到 SPF 级^[1]。进一步提高金黄地鼠的微生物等级,建

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2022-12M-1-020)。
Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (2022-12M-1-020).

【作者简介】 郭亚茜 (1989—),女,主管技师,本科,研究方向:无菌动物技术。Email: GYX409@163.com

【通信作者】 朱华 (1971—),女,主任技师,硕士,研究方向:疾病与肠道微生态。Email: zhuh@cnilas.org

立清洁级、SPF 级甚至无菌级金黄地鼠种群是生命科学事业发展的需求。本文就金黄地鼠的生物学特性及自被开发以来的应用和有关生物净化技术进行综述,为金黄地鼠资源开发利用提供参考。

1 金黄地鼠生物学特性

雌性金黄地鼠通常 8 ~ 10 周龄时达到生殖成熟,此时平均体重为 90 ~ 100 g^[2]。性周期 4 ~ 5 d,属全年发情动物,发情持续时间 4 ~ 12 h,一般分为 4 期:动情前期(约 3 h)、动情期(约 12 h)、动情后期(约 4 h)和动情间期(约 76 h)^[3]。金黄地鼠子宫类型为 Y 型双子宫。妊娠期 15 ~ 17 d(平均 16 d),是妊娠期最短的哺乳类实验动物。每年可产 7 ~ 8 胎,每胎 6 ~ 8 只。幼仔出生时仅 2 ~ 3 g,出生后生长发育快,3 ~ 4 d 耳壳开始突出体外,并逐渐张开,4 日龄开始长被毛,12 日龄可爬出窝外觅食,14 日龄睁眼。一边觅食一边靠母鼠乳汁哺育,哺乳期 19 ~ 21 d。前期体重迅速增加达到生长转折点(5 周龄)后,体重增长逐渐变缓慢^[4]。

2 金黄地鼠在人类疾病研究中的应用

2.1 新冠肺炎研究

金黄地鼠是研究病毒性疾病的理想小动物模型。研究表明,一些人类特有的病毒可以感染金黄地鼠并引起类似的病理改变^[5]。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)是通过与人肺部细胞的 ACE2 受体结合,引发感染机制。金黄地鼠凭借其具有与人类相同的病毒发病机制、免疫反应以及能够传播病毒的特点,成为比小鼠更理想的 SARS-CoV-2 动物模型^[6]。与小鼠 ACE2 相比,SARS-CoV-2 的 spike 蛋白与金黄地鼠 ACE2 的相互作用更有效。Chan 等^[7]发现金黄地鼠与人类的 ACE2 高度相似,在界面上仅有 3 ~ 4 个突变。Imai 等^[8]又进一步评估了 SARS-CoV-2 分离株在金黄地鼠中的复制能力和发病机制,发现 SARS-CoV-2 分离株在金黄地鼠肺部有效复制,鼻内感染可造成严重的肺部病理病变,与 SARS-CoV-2 引起的人类肺部感染特征相同。金黄地鼠感染 SARS-CoV-2 后可诱导中和抗体产生,并对随后的 SARS-CoV-2 再次感染起到保护作用。Sia 等^[9]研究发现 SARS-CoV-2 可以通过气溶胶在金黄地鼠之间传播,这对于研究 SARS-CoV-2 的传播动力学具有重要意义。

SARS-CoV-2 感染者除肺部症状外,还有部分伴

发消化道症状^[10-11]。肠道菌群作为消化道最大和重要的功能器官,参与了这些症状的发生发展。Tang 等^[12]研究发现,SARS-CoV-2 感染者肠道菌群发生显著改变,益生菌及抑炎菌丰度降低,条件致病菌丰度增加,同时这些菌群的变化与疾病严重性密切相关。此外,研究人员通过比对新冠病毒感染者与健康对照者的肠道菌群发现 23 种菌群丰度与 COVID-19 疾病的严重程度显著相关^[13]。Chan 等^[7]研究发现金黄地鼠感染 SARS-CoV-2 后,除肺部发生病变外,在肠道也检测到病毒 N 蛋白。这些研究结果表明肠道菌群失衡可能与新冠病毒感染发病相关。而金黄地鼠可成为研究新冠病毒感染与肠道微生态相关性的良好模型。

2.2 代谢性疾病

代谢性疾病是指葡萄糖、蛋白质及脂质在体内代谢异常引起的一类疾病。金黄地鼠是最早被用作动脉粥样硬化研究的动物模型。1987 年,Nistor 等^[14]发现给予金黄地鼠高胆固醇饮食(3%胆固醇)会使其血清胆固醇和 LDL 浓度及 LDL/HDL 比值增加。10 个月金黄地鼠出现胆固醇晶体沉积、钙沉积和坏死,与人的临床表现类似。江春迎等^[15]用高脂饲料喂饲法复制金黄地鼠动脉粥样硬化模型。通过血样分析发现不仅脂质代谢发生紊乱,还伴有糖代谢、氨基酸代谢紊乱及炎症和氧化应激的出现。金黄地鼠与其他啮齿类动物相比脂蛋白合成、加工、配体结合和循环利用等脂蛋白代谢过程更接近于人类,是较为理想的 II 型糖尿病动物模型。朱颖等^[16]利用金黄地鼠成功建立胰岛素抵抗和 II 型糖尿病模型,成模率可达 80%,且病理特征与人类类似。

代谢性疾病是最早发现与肠道菌群相关的慢性退行性疾病之一^[17-18]。肠道菌群可通过多种方式参与动脉粥样硬化的进展,如直接参与胆固醇和甘油三酯代谢;其代谢产物 TMAO 促进斑块发育,从而影响动脉粥样硬化^[19];同时还可以通过动脉粥样硬化的风险因素(肥胖、II 型糖尿病、血压等)间接影响动脉粥样硬化的发生和发展^[20]。Qin 等^[21]发现 II 型糖尿病患者肠道菌群中,一些对新陈代谢有益的产丁酸盐细菌减少,条件致病菌数量增加。2018 年 Koh 等^[22]介绍了糖尿病患者肠道菌群中丙酸咪唑浓度较高,可以降低糖耐量,影响信号通路,减少胰岛素受体底物的产生,破坏胰岛素信号,加速糖尿病的发生。

以上结果提示,在新型冠状病毒肺炎、代谢性疾

病的发病机理、菌群与疾病关系研究中,金黄地鼠具有不可替代的作用。但目前,只有少数国家拥有小规模 SPF 级种群,未见无菌金黄地鼠的相关报道。实际应用中多为普通级,常导致腹泻、肺炎等疾病的发生,严重影响了实验结果的准确性和可靠性。建立高等级,特别是无菌级金黄地鼠种群,解决研究工具的可靠性问题,是生命科学事业发展的需求。

3 金黄地鼠生物净化

生物净化是建立高等级动物种群唯一经济有

效的方法。目前国内普遍采用的技术是剖腹产净化,其方法是通过剖腹产手术(子宫摘除术)获得仔鼠后,由同种或异种动物代乳或人工哺乳。

3.1 人工哺乳

人工哺乳是通过剖腹产手术获得仔鼠后,用人工乳经强饲法或自主吮吸法人工饲育的过程。人工哺乳工作费时费力,操作复杂,且离乳率较低(见表 1)。即使成功建立种群,单次净化的成活动物数量有限,需要通过配种方式扩大种群,容易近造成亲繁殖,给远交群带来瓶颈效应。

表 1 人工哺乳情况
Table 1 Artificial feeding

方法 Method	工作内容 Work content	离乳率(%) Survivalrate of weaning pups(%)	技术难点 Technical difficulties
强饲法 Gavage	每 24 h 饲喂 5 ~ 6 次 Feed 5 ~ 6 times every 24 h	5. 7 ^[23]	
	每天刺激排便 3 ~ 4 次 Stimulate defecation 3 ~ 4 times a day	40. 0 ^[24]	损伤食道粘膜 误入气管或刺穿食管 Damage esophageal mucosa Entered the trachea or pierced the
	制作不同规格灌胃针 Make different specifications of gavage needles	65. 0 ^[25]	esophagus by mistake
	配制不同日龄人工乳 Preparation of artificial milk with different age		
	吮吸法 Sucking	每 24 h 饲喂 5 ~ 6 次 Feed 5 ~ 6 times every 24 h	0 ^[24]
每天刺激排便 3 ~ 4 次 Stimulate defecation 3 ~ 4 times a day		0 ^[25]	易吸入气体造成胀气 不易控制人工乳流速、摄入量 Easily inhaled gas causes flatulence Difficult to control the flow rate and
制作不同日龄所需人工乳头 Make artificial nipples for mice of different age		67. 0 ^[26]	intake of artificial milk
配制不同日龄人工乳 Preparation of artificial milk for mice of different			

3.2 代乳净化

代乳净化是指通过剖腹产手术获得仔鼠,使用微生物等级高的母鼠进行代乳哺乳,分同种代乳和

异种代乳。多使用同种代乳,偶见异种代乳。代乳净化方式更接近自然哺乳,不仅离乳率提高,而且获得仔鼠数量也远超人工哺乳(见表 2)。

表 2 同种代乳情况
Table 2 Homologous feeding

供胎母鼠 Donor mice	代乳母鼠 Fostermothers	代乳只数 Number of pups been fostered	离乳只数 Survival number of weaning pups	离乳率(%) Survival rate of weaning pups(%)
金黄地鼠 Golden hamster	金黄地鼠 Golden hamster	473	252	53 ^[27]
ICR 小鼠 ICR mice	ICR 小鼠 ICR mice	140	120	85 ^[28]
KM 小鼠 KM mice	KM 小鼠 KM mice	509	460	90 ^[29]
PAP 转基因小鼠 PAP transgenic mice	ICR 小鼠 ICR mice	66	60	95 ^[30]
AD 转基因小鼠 AD transgenic mice	PD 转基因小鼠 PD transgenic mice	75	55	73 ^[31]
C56BL/6 小鼠 C56BL/6 mice	ICR 小鼠 ICR mice	72	56	77 ^[32]
Wistar 大鼠 Wistar rat	Wistar 大鼠 Wistar rat	158	125	79 ^[33]

为进一步提高我国金黄地鼠等级,刘殿峰等^[34]通过剖腹产净化,使用 SPF 级金黄地鼠进行代乳,繁育建立了清洁级金黄地鼠种群。张华琼等^[1]使用国外引入的 SPF 级金黄地鼠作为代乳母鼠,采用剖腹产净化后代乳方式,率先在国内培育出 SPF 金黄地鼠种群,剖腹产存活率稳定在 40% 以上。但未见有建立无菌级金黄地鼠种群的报道。

在没有高级别同种代乳母鼠时,也可以选择异种代乳。张锐虎等^[35]、乔欣等^[36]、卢领群等^[37]、潘思丹等^[38]、柏熊等^[39]对不同动物的异种代乳进行研究(见表 3)。成功建立了相应的高级别动物种群。

通过表 3 可以看出,ICR 小鼠因母性良好、性情温顺、易于发情、产仔率高、哺乳能力强和能较好地呵护幼仔等优点,可以在异种代乳中广泛应用。

对于异种代乳过程中常出现的代乳母鼠拒哺、食仔等现象,均进行了相关地探讨。布氏田鼠的净化过程中,在代乳 18 ~ 21 d,仔鼠陆续出现死亡,研究者通过固定合笼时间、扩大代乳母鼠和供胎母鼠数量,选择分娩相隔时间近的仔鼠实施代乳等方法,缩短两种动物妊娠期和哺乳期的时间差,缩小种间差异,显著提高异种代乳的离乳率。在东方田鼠净化中,由于 ICR 代乳母鼠体型较小、乳汁量小,不能满足东方田鼠仔鼠整个哺乳期的需求;SD 大鼠体型较大、乳汁量充足,但初期即采用 SD 大鼠代乳,会因为体型差异大而拒绝哺乳甚至将其踩死。故将东方田鼠仔鼠代乳分 2 个阶段进行:1 ~ 5 日龄,仔鼠吮吸力弱、乳汁的需求量小,由 ICR 母鼠代乳;6 ~ 15 日龄,仔鼠逐渐长大、乳汁需求量大,由 SD 母鼠进行代乳。

表 3 不同动物异种代乳情况

Table 3 Heterogeneous feeding in different animals				
供胎母鼠 Donor mice	代乳母鼠 Fostermothers	代乳只数 Number of pups been fostered	离乳只数 Survival number of weaning pups	离乳率(%) Survival rate of weaning pups(%)
中国地鼠 Chinese hamster	ICR 小鼠 ICR mice	104	56	53 ^[35]
长爪沙鼠 Meriones unguiculatus	ICR 小鼠 ICR mice	212	124	58 ^[36]
长爪沙鼠 Meriones unguiculatus	ICR 小鼠 ICR mice	48	46	95 ^[37]
布氏田鼠 Brandt's voles	ICR 小鼠 ICR mice	38	6	15 ^[38]
东方田鼠 Microtus fortis	ICR 小鼠和 SD 大鼠 ICR mice and SD rats	186	125	67 ^[39]

3.3 影响代乳成功率的因素

为提高剖腹产代乳净化的成功率,胡秀兰等^[40]、隋世燕等^[41]对金黄地鼠、小鼠剖腹产手术适宜时间、技术方法及代乳母鼠的选择等影响代乳成功率的因素进行研究。

3.3.1 母鼠的选择

代乳母鼠选择经产、母性好、不食仔、温顺、健康无疾病的母鼠。待净化母鼠选择经产 2 ~ 3 胎、有良好繁育史、遗传背景清晰、个体大、健康的母鼠,特别是不能有可以通过胎盘屏障垂直传播的疾病。代乳母鼠合笼时间应早于待净化母鼠 1 ~ 2 d,以保证代乳母鼠提前分娩,做好代乳准备。

3.3.2 分娩时间的判断

临产前是胎仔生长迅速、体重增长最明显的时期。准确掌握孕鼠分娩时间,及时进行剖腹产手

术,获得足月、健康的仔鼠十分重要。避免由于过早剖腹产,获得体弱早产胎仔,或者错过分娩时间,母鼠自然分娩,导致剖腹产代乳净化失败^[42]。结合推算法、观察法、触诊法、参照同期等方法,综合判断剖腹产手术时机,越接近自然分娩时间越好。

(1)推算法:固定合笼时间,按雌雄比例 1 : 1 进行交配,并准确记录交配时间,根据交配时间结合妊娠期(见表 4)推算预产期范围。

(2)观察法:待净化孕鼠临产时腹部异常膨大,肌肉松弛,提起母鼠可观察到下腹凸起、下垂明显,进食减少,活动增加,烦躁不安,堆积垫料,有明显的坐窝行为。外阴潮红湿润、稍有肿胀,有少量分泌物。

(3)触诊法:触摸后腹,当胎仔头和躯干粗细一致或发现胎仔头部已进入骨盆时即将分娩;触及乳

表 4 啮齿类动物妊娠期

Table 4 Gestation period of rodents

动物 Animal	妊娠期(d) Gestation period(d)	平均妊娠期(d) Mean gestation period(d)
小鼠 Mouse	19 ~ 21	20
大鼠 Rat	19 ~ 23	22
金黄地鼠 Golden hamster	15 ~ 17	16
中国地鼠 Chinese hamster	19 ~ 21	20
长爪沙鼠 Merionesunguiculatus	24 ~ 26	25
布氏田鼠 Brandt's voles	22 ~ 23	22
东方田鼠 Microtus fortis	20 ~ 21	20

房,有膨胀感;乳头周围少毛,并能挤出少量乳汁;触摸耻骨联合,成开口状态。

(4)参照同期:同时期交配的孕鼠出现分娩时,预示其他孕鼠进入分娩期。

3.3.3 仔鼠的选择、代乳

剖宫产手术完成后,选择个体大、手术过程中无外伤的仔鼠,用代乳母鼠的粪便、尿液、垫料等充分混味后放入代乳母鼠原盒内进行代乳,保留 1 ~ 2 只亲仔。观察剖腹产仔鼠腹部有月牙形白色乳液,表示代乳母鼠接受代乳,此时可弃除所有亲仔。

除上述影响因素外,还有很多技术细节需要注意:如全程严格无菌操作。颈椎脱臼处死孕鼠时,避免伤及胎仔。剖宫产手术时要熟练进行各项操作,过程控制在 3 min 内完成,避免离体子宫收缩,导致胎仔不易剥离,缺氧或呛羊水死亡。手术过程中适宜的温度也是剖腹产手术成功的必要条件,需要在 36 ~ 38℃ 环境中进行,除保温外,保持环境安静也很重要。

4 总结

随着生命科学的发展,标准化的实验动物是保障实验结果准确性、可靠性的关键因素。金黄地鼠虽然已广泛应用于新型冠状病毒、代谢性疾病发病机制、疫苗和治疗药物评价等领域,但尚未完全达到实验动物标准化,在一定程度上存在缺陷,影响了其应用效果和使用范围。普通级金黄地鼠,容易受到沙门菌、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒等侵害,即便是清洁级金黄地鼠也会受到多杀巴斯德杆菌、

支气管鲍特杆菌、泰泽病原体和仙台病毒等病原体的侵害,这些病原体不仅影响金黄地鼠正常的繁殖、生产,还严重影响实验的准确性和可重复性,造成动物死亡,干扰实验的顺利进行,引起生物制品的污染,对人类健康产生危害。利用生物净化技术建立高等级尤其是无菌级金黄地鼠种群,让更多的科研工作者合理地开发利用这一宝贵实验动物资源,是相关从业人员今后工作的发展方向之一。

参 考 文 献(References)

[1] 张华琼, 黄麟, 罗素兰, 等. 剖腹产建立 SPF 金黄地鼠种群 [J]. 四川动物, 2005, 24(1): 85-87.
Zhang HQ, Huang L, Luo SL, et al. Establishment of SPF golden *Hamster* colony by cesarean section [J]. *Sichuan J Zool*, 2005, 24(1): 85-87.

[2] Fitzgerald K, Zucker I. Circadian organization of the estrous cycle of the golden hamster [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73(8): 2923-2927.

[3] Chanut FJA, Williams AM. The Syrian golden *Hamster* estrous cycle: unique characteristics, visual guide to staging, and comparison with the rat [J]. *Toxicol Pathol*, 2016, 44(1): 43-50.

[4] 任东波, 王光新, 郭宗达, 等. 雌雄清洁级金黄地鼠生长发育规律的比较研究 [J]. 经济动物学报, 2007, 11(4): 213-214, 219.
Ren DB, Wang GX, Guo ZD, et al. Comparative study on the rule of growth and development of clean-class female and male *Hamster* [J]. *J Econ Animal*, 2007, 11(4): 213-214, 219.

[5] Walker DL, Padgett BL, ZuRhein GM, et al. Human papovavirus (JC): induction of brain tumors in hamsters [J]. *Science*, 1973, 181(4100): 674-676.

[6] Gruber AD, Firsching TC, Trimper J, et al. *Hamster* models of COVID-19 pneumonia reviewed; how human can they be? [J]. *Vet Pathol*, 2022, 59(4): 528-545.

[7] Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian *Hamster* model: implications for disease pathogenesis and transmissibility [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(9): 2428-2446.

[8] Imai M, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(28): 16587-16595.

[9] Sia SF, Yan LM, Chin AWH, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters [J]. *Nature*, 2020, 583(7818): 834-838.

[10] Xiao F, Tang M, Zheng X, et al. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2 [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(6): 1831-1833.

[11] Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected

- pneumonia in Wuhan, China [J]. JAMA, 2020, 323(11): 1061-1069.
- [12] Tang L, Gu S, Gong Y, et al. Clinical significance of the correlation between changes in the major intestinal bacteria species and COVID-19 severity [J]. Engineering (Beijing), 2020, 6(10): 1178-1184.
- [13] He LH, Ren LF, Li JF, et al. Intestinal flora as a potential strategy to fight SARS-CoV-2 infection [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1388.
- [14] Nistor A, Bulla A, Filip DA, et al. The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 1987, 68(1-2): 159-173.
- [15] 江春迎, 杨康敏, 杨柳, 等. 金黄地鼠动脉粥样硬化发展过程中的 NMR 代谢组学研究 [J]. 药学学报, 2013, 48(4): 495-502.
- Jiang CY, Yang KM, Yang L, et al. A ^1H NMR based metabolomics approach to progression of coronary atherosclerosis in a hamster model [J]. Acta Pharm Sin, 2013, 48(4): 495-502.
- [16] 朱颖, 严晓伟, 陈连凤, 等. 金黄地鼠胰岛素抵抗和糖尿病动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(2): 104-107, 71, 73.
- Zhu Y, Yan XW, Chen LF, et al. Establishment of an insulin-resistant and type 2 diabetic model in golden Hamster [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2007, 15(2): 104-107, 71, 73.
- [17] Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease [J]. Genome Med, 2016, 8(1): 42.
- [18] Scheithauer TPM, Rampanelli E, Nieuwdorp M, et al. Gut microbiota as a trigger for metabolic inflammation in obesity and type 2 diabetes [J]. Front Immunol, 2020, 11: 571731.
- [19] Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(2): 79-87.
- [20] Komaroff AL. The microbiome and risk for atherosclerosis [J]. JAMA, 2018, 319(23): 2381-2382.
- [21] Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. Nature, 2012, 490(7418): 55-60.
- [22] Koh A, Molinaro A, Ståhlman M, et al. Microbially produced imidazole propionate impairs insulin signaling through mTORC1 [J]. Cell, 2018, 175(4): 947-961.
- [23] 刘连生, 聂嘉伍, 王国良, 等. 金黄仓鼠生物净化研究 [J]. 上海实验动物科学, 1991, 11(1): 1-7.
- Liu LS, Nie JW, Wang GL, et al. Study on biological purification of golden hamster [J]. Shanghai Lab Anim Sci, 1991, 11(1): 1-7.
- [24] 涂新明, 寿克让, 高虹, 等. 无菌小鼠的人工哺乳培育 [J]. 中国实验动物学报, 1999, 7(1): 55-60.
- Tu XM, Shou KR, Gao H, et al. Production of germfree Kun Ming(KM) mice with artificial milk by hand [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 1999, 7(1): 55-60.
- [25] 朱祥宇, 刘君芳, 周淑佩, 等. 无菌大鼠培育的技术创新及其繁育探讨 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(1): 57-61.
- Zhu XY, Liu JF, Zhou SP, et al. Technical innovation and breeding research in germ-free rats [J]. Lab Anim Sci, 2017, 34(1): 57-61.
- [26] 王荫槐, 蒋观成, 寿克让. 无菌大鼠的开发与应用研究 [J]. 中国实验动物学杂志, 1995, 5(2): 119-123.
- Wang YH, Jiang GC, Shou KR. Development and application of aseptic rats [J]. Chin J Lab Anim Sci, 1995, 5(2): 119-123.
- [27] 夏放, 张华琼, 黄麟, 等. SPF 仓鼠种群的建立及规模化生产 [J]. 实验动物与比较医学, 2005, 25(3): 165-167.
- Xia F, Zhang HQ, Huang L, et al. Establishment of SPF golden hamsters breeding colony by cesarean [J]. Shanghai Lab Anim Sci, 2005, 25(3): 165-167.
- [28] 范薇, 马静, 蔡进芬, 等. 使用超净工作台实施子宫摘除术净化 ICR 小鼠的研究 [J]. 青海畜牧兽医杂志, 2007, 37(4): 11-12.
- Fan W, Ma J, Cai JF, et al. Study on the purification of ICR mouse strain by hysterectomy *in situ* ation of bacteria free [J]. Chin Qinghai J Anim Vet Sci, 2007, 37(4): 11-12.
- [29] 卢笑丛, 徐国景, 戴涌, 等. 使用超净工作台实施子宫摘除术净化 KM 小鼠的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(4): 208-210.
- Lu XC, Xu GJ, Dai Y, et al. Study on the purification of Kunming mouse strain by hysterectomy in the situation of bacteria free [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2003, 11(4): 208-210.
- [30] 朱华, 郭亚茜, 杜晓鹏, 等. 无菌 APPswe/PS1 ΔE9 双转基因小鼠模型建立及脑内斑块变化初步观察 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 521-526.
- Zhu H, Guo YX, Du XP, et al. Establishment of germ free APPswe/PS1 ΔE9 transgenic mice and changes of amyloid plaques in the brain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 521-526.
- [31] 张辰子, 杨林, 夏冠玲, 等. APPswe/PS1 ΔE9 转基因小鼠的剖腹产净化技术研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(7): 50-54.
- Zhang CZ, Yang L, Xia GL, et al. Study of decontamination technique among APPswe/PS1 ΔE9 transgenic mice using Caesarian section [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(7): 50-54.
- [32] 张梅英, 秦英, 王太一. 清洁级 C57BL/6 剖腹产和正常产仔鼠成活率和生长的比较观察 [J]. 中国实验动物学杂志, 1999, 9(2): 94-97.
- Zhang MY, Qin Y, Wang TY. Comparative and observation on the survival Rate and growth of cleaning C57BL/6 young mice in Caesarean birth and normal birth [J]. Chin J Comp Med, 1999, 9(2): 94-97.
- [33] 李正昌, 尹才渊, 雷培琪, 等. 封闭群大鼠种群的生物净化研究 [J]. 四川动物, 1993, 12(4): 39-40.
- Li ZC, Yin CY, Lei PQ, et al. Study on biological purification of closed group rat population [J]. Sichuan J Zool, 1993, 12(4): 39-40.
- [34] 刘殿峰, 刘秀霞, 李贵财, 等. 清洁级金黄地鼠种群的建立

[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(10): 909-910.

Liu DF, Liu XX, Li GC, et al. Establishment of clean golden *Hamster* population [J]. Chin J Biol, 2008, 21(10): 909-910.

[35] 张锐虎, 王晨阳, 王璐, 等. 中国地鼠的剖宫产净化 [J]. 实验动物科学, 2020, 37(4): 1-4, 9.

Zhang RH, Wang CY, Wang L, et al. Caesarian purification of Chinese *Hamster* [J]. Lab Anim Sci, 2020, 37(4): 1-4, 9.

[36] 乔欣, 李胜利, 焦昆, 等. ICR 母鼠代乳在长爪沙鼠剖腹产净化中的应用 [J]. 实验动物科学, 2011, 28(2): 37-39, 43.

Qiao X, Li SL, Jiao K, et al. Foster nursing by ICR mice in the cleaning of gerbils through cesarotomy [J]. Lab Anim Sci, 2011, 28(2): 37-39, 43.

[37] 卢领群, 宋晓明, 戴方伟, 等. 长爪沙鼠的生物净化技术 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4): 62-66.

Lu LQ, Song XM, Dai FW, et al. Biological cleaning technologies for Mongolian gerbils [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(4): 62-66.

[38] 潘思丹, 张曼, 施海霞, 等. 布氏田鼠剖腹产净化技术的建立 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(3): 352-354.

Pan SD, Zhang M, Shi HX, et al. Study on cesarean section purification method of Brandt's vole [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(3): 352-354.

[39] 柏熊, 王晓东, 谢建云, 等. 东方田鼠种群的生物净化方法 [J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(3): 215-217.

Bai X, Wang XD, Xie JY, et al. Biological purification method of *MICROTUS fortis* population [J]. Lab Anim Comp Med, 2011, 31(3): 215-217.

[40] 胡秀兰, 陈均华, 胡政. 金黄地鼠剖腹产子宫摘取适宜条件的研究 [J]. 河南职工医学院学报, 2006, 18(6): 429-430.

Hu XL, Chen JH, Hu Z. Study on the optimum conditions of Caesarean operation for golden *Hamster* [J]. J Henan Med Coll Staff Work, 2006, 18(6): 429-430.

[41] 隋世燕, 王林刚, 赖仲辉, 等. 小鼠剖腹产净化方法研究 [J]. 大理学院学报, 2010, 9(10): 46-49.

Sui SY, Wang LG, Lai ZH, et al. Studies on purification method of Caesarean section in mouse [J]. J Dali Univ, 2010, 9(10): 46-49.

[42] 王荫槐, 王钜. 悉生动物学 [M]. 沈阳: 辽宁大学出版社; 2007.

Wang YH, Wang J. Gnotobiotic animals [M]. Shenyang: Liaoning University Press; 2007.

[收稿日期] 2022-11-11

《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R 国际刊号 ISSN 1671-7856 邮局代号 82-917

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)。征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。栏目设置包括研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等栏目。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、被《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》、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、中国生物医学期刊数据库等数据库收录。

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。文章正文字数在 5000 字左右。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/zgbyjxzz/ch/index.aspx>

期待您的来稿!

王贵平,周正宇. 关于我国实验动物福利伦理的思考及建议 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 683-689.

Wang GP, Zhou ZY. Reflections and suggestions on the ethics and welfare of laboratory animals in China [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 683-689.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.016

关于我国实验动物福利伦理的思考及建议

王贵平,周正宇*

(苏州大学实验动物中心,江苏 苏州 215123)

【摘要】 实验动物作为“替难者”为人类的医学生命科学发展做出了重要贡献。尽管全世界范围内针对实验动物福利伦理的各种举措和法规不断被提出和应用,但随着实验动物的需求量和使用寿命的持续增加,实验动物的福利伦理矛盾和争议更加凸显。我国实验动物福利伦理工作起步较晚,具有亟需发展的必要性和紧迫性。现阶段需在参考国际标准和要求的基础上,结合我国的文化和现状,完善我国的法律法规。从实验动物行业出发,加快推进实验动物福利伦理认证和评价工作、完善伦理审查并逐步实现全程监督、提升兽医的工作地位和水平、加强从业人员的教育培训和意识建立等多方面着手,从而对践行实验动物的福利和权益产生实际效益。

【关键词】 实验动物;伦理;福利;评估

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0683-07

Reflections and suggestions on the ethics and welfare of laboratory animals in China

WANG Guiping, ZHOU Zhengyu*

(Laboratory Animal Center, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

Corresponding author: ZHOU Zhengyu. E-mail: zacharyzhou@suda.edu.cn

【Abstract】 Laboratory animals, as substitutes for suffering, have made important contributions to the development of medical life sciences for humans. Although various initiatives and regulations of the welfare and ethics of laboratory animals are continually being proposed and applied worldwide, because the demand and use of laboratory animals have been continuously increasing, the contradictions and controversy of laboratory animal welfare and ethics have become more prominent. Laboratory animal welfare ethics in our country were carried out relatively late. Therefore, the development of these ethics is necessary and urgent. At present, the laws and regulations of our country should be improved by referring to international standards and requirements, and combining them with our culture and current situation. Accelerating promotion of welfare ethics certification and evaluation starting from the laboratory animal industry, improving ethical review and evaluation, realizing the supervision of the whole process gradually, promoting the work responsibilities and status of veterinarians, and strengthening the education and awareness of practitioners will implement practical benefits for the welfare and rights of laboratory animals.

【Keywords】 laboratory animals; ethics; welfare; assessment

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

实验动物在教学、科研、生物制品开发和非临床安全测试等中的作用是无可替代的。随着科学

技术的不断进步,全世界的实验动物使用量与日俱增。最近 10 年诺贝尔生理学或医学奖获得者也大

【基金项目】 江苏省高等学校自然科学面上项目(21KJB310021),国家自然科学基金面上项目(31970505)。

Funded by the University Science Research Project of Jiangsu Province (21KJB310021), the National Natural Science Foundation of China (31970505).

【作者简介】 王贵平(1987—),女,博士,实验师,研究方向:非医疗健康干预。Email: gpwang1@suda.edu.cn

【通信作者】 周正宇(1973—),男,博士,教授,研究方向:动物模型与比较医学。Email: zacharyzhou@suda.edu.cn

多以实验动物作为研究对象。据估算,仅 2015 年一年全球用于科学研究的实验动物数量高达 1.921 亿只^[1];2021 年,全球实验动物市场规模约达 200 亿美元,仅 2017 ~ 2018 年间,美国实验动物的使用量可能高达 10 亿只^[2]。近几年我国实验动物需求量持续攀升,2015 年我国实验动物年使用量为 1159.54 万只^[3]。而据智研咨询产业研究报告显示,2021 年我国仅实验大小鼠需求量已达 4982.34 万只,已经成为全球第二大实验动物生产和使用国。

1 实验动物的福利伦理争议

伦理通常被定义为社会的各种道德准则,但伦理与道德不能混为一谈,因为道德更偏重于个体对自我的要求规范和探索感悟,而伦理则强调为促进社会秩序的优化,各种实体间发生交互关系时的价值原则(公平、正义以及和谐)^[4],是对文明生存方式的理性关照。脊椎动物具有复杂的中枢神经系统(相较于无脊椎动物)。已有许多研究证实动物是存在自我意识的^[5-6]。因为如果自我意识是人类所独有的,那么达尔文的进化论则无法成立了。人类思维如此丰富和复杂,不可能凭空而来或转瞬既得。2004 年神经科学家雅克·潘克谢普在《情感神经科学》一书中提出动物拥有丰富的情感。那么它们就可能和人类一样会经历痛苦、快乐和悲伤^[7]。如果每个人都认为实验动物可以被当作新生儿、智力障碍人士或古稀老人(众所周知这些人拥有与其他人同等的道德地位),那么实验动物是否需要被关怀被尊重?答案不言而喻。根据“5F 自由理论”,实验动物应享有不受饥渴,免于不适、恐惧和焦虑,表达天性,以及不受痛苦、伤害和疾病的自由^[8]。这体现在适宜的居住和营养条件及管理方法、对疾病的预防和及时治疗、有责任的关怀爱护、人道的操作及人道的安乐死等方面,统称为实验动物福利。

随着实验动物使用量的增加,关于实验动物福利伦理的矛盾和争议更加凸显。实验动物应该享受上述的五大基本权利,但实际上它们在被使用时可能遭受着或多或少的干涉或伤害。更有甚者,科研实验中还不乏存在着某些人对实验动物不合理、不人道的使用,甚至是故意伤害和折磨实验动物,反映出人类对实验动物的义务和实验动物自身权利之间的严重不平等。有质疑声音提出,已知存在多种替代方法,但每年仍有数以亿计的实验动物牺牲,是否有必要牺牲如此多的动物才能推动人类的

科技进步?

当然,不分青红皂白地全权捍卫实验动物权利,认为实验动物应该被视作与人类无区别的生命体,这种所谓的“伸张正义”也不能被广为接受。前国际伦理学学会主席彼得·辛格在他著名的《动物解放》一书中提出:不同物种之间存在不同程度的道德地位^[9]。尽管这乍一听可能与动物解放有些自相矛盾。但由于人类的心智能力,无疑高于其他物种,因此,笔者也认同对于实验动物的道德地位必须有不同的考量,重视实验动物的福利,而不是将它们与人类一视同仁,更利于不同物种的利益。因此如何更好地保障和落实实验动物福利或许才是化解实验动物福利伦理问题的有效抓手。

2 国内外实验动物福利伦理的法律法规现状

由于道德不具有强制属性,因此仅从道义论的角度或用道德标准来讨论实验动物福利伦理远远不够,而相关的法律法规正是规范和制约人们行为的有力工具。

国际上的实验动物福利伦理法规已发展了两百年,并已建立较完整的法律体系。1822 年英国的马丁提出了世界上第一部关于实验动物福利伦理的法案《禁止虐待动物法令》。直到 1947 年英国发布了第一部规定科学研究中实验动物福利伦理的《科学研究动物法案》。自 1959 年英国动物学家威廉·罗素和微生物学家雷克斯·博奇提出 3R(替代,减少,改进)原则以来,近几十年实验动物福利伦理工作在国际上已经取得了较大进步。1966 年美国出台了世界上第一部《实验室动物福利法》,此后日本、英国、法国、德国等众多国家都陆续建立了实验动物福利法律体系。此外,一些国际机构,诸如国际实验动物评估和认证协会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC)等也为保证实验动物福利做出了一定的贡献^[10]。

我国的实验动物福利立法起步较晚,仍待逐步与国际接轨。1988 年我国的第一部实验动物法规《实验动物管理条例》发布,其中仅第二十七条“从事实验动物工作的人员对实验动物必须爱护,不得戏弄或虐待”涉及了实验动物福利的内容;虽在修改后增加了“禁止虐待动物,减少动物不必要的痛苦,开展动物替代方法研究等”,但总体上内容模

糊,缺乏可操作性,仅为原则性的规定^[11]。科技部 2006 年发布《关于善待实验动物的指导性意见》,指出应善待动物,避免伤害和痛苦;保证动物能够实现自然行为,受到良好的管理和照料。但该指导性意见的内容过于宏观笼统,并未包含在实验动物饲养和使用过程中的福利和保护的具体规定,同样缺乏实操性。2018 年发布并实施的中华人民共和国国家标准《实验动物福利伦理审查指南》,进一步从人员资质、设施条件、动物来源、饲养、使用、运输和职业健康与安全的角度对动物福利伦理提出了规范要求。但该指南未在动物实验的科学性规范性方面做出详尽具体的要求,而是更注重了对动物质量和饲养环境的要求,缺乏在动物使用过程中的福利规范化要求。2021 年发布的《实验动物安乐死指南》对不同品种年龄的动物应用安乐死的方法和剂量进行了规定,但未提及执行安乐死的条件判断方法及评估细节,在判断是否需要执行安乐死方面缺乏可操作性。此外,2020 年两会期间已有委员提交《关于建立动物福利保护法律体系的提案》,但目前我国除野生动物保护法外,其他动物的福利和保护相关的法律仍十分缺乏。总体而言,我国实验动物福利立法还存在如下诸多问题:①立法以人类中心主义价值观为导向,强调动物质量和生物安全的功利性,动物福利的立场不足;②福利的条款内容较为模糊,缺乏可操作性;③立法层次低,权威性不足,尤其缺乏为虐待或残忍对待实验动物人员的处罚力度^[11]。

对实验动物福利伦理的维护,不仅彰显出社会文明程度的提升,和公民的仁慈敬畏之心,也关乎着我国对外贸易壁垒的消除和科学技术的长足发展。因此,在实验动物福利伦理法律法规方面,我国亟需完善立法,探索人的利益和动物福利的法律平衡点,细化相关法律条款,明确违反者的行政责任甚至刑事责任,同时借鉴国际组织和认证体系的经验,切实提高实验动物福利伦理的水平。

3 推进实验动物福利伦理实践的具体建议

我国上述法规存在权威性和可操作性不足的问题,而且在实验动物的使用主体(如实验、科研和教学人员)中的实施情况也十分有限,并未得到充分地监督。除需要完善法律法规外,我国实验动物福利伦理工作还存在如下问题:①缺少可执行的伦

理审查制度,伦理审查提前性不够、内容笼统宽泛、流于形式,且科研工作中的学位论文和中文期刊大多对伦理审查不做强制要求^[12];②科研和实验人员对实验动物福利伦理的观念不够、意识淡薄;③伦理审查申请获批后,缺乏对后续实操的全程监督和制约功能。因此笔者对于推进我国实验动物福利伦理实践提出如下建议。

3.1 全面成立实验动物使用与管理委员会并保证其职责规范地履行

为避免宏观模糊的管理现状,我国的各实验动物使用和生产机构应依据各自的研究领域和行业的具体情况制定详细的规范细则和指南;并成立各自的实验动物使用与管理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC),作为实验动物福利伦理实施的管理者,负责本机构的实验动物福利伦理工作,具体包括实验动物的生产和使用的规范化管理、监督与指导;伦理审查的组织与实施;对实验动物的管理和福利伦理提供符合本机构实际情况的意见和建议;以及对本机构所有实验动物从业人员进行监督、培训和考核。

与成立相比,如何保证 IACUC 规范地履行其职责更为重要。首先, IACUC 必须与本机构的行政管理体系保持一定的独立性,避免其在行使职权时可能出现的利益冲突状况,保证 IACUC 在本机构实验动物使用和管理工作中的权威性和话语权;其次, IACUC 的委员组成必须包括科技专家、兽医和社会人士,且各委员的每种职务具备其相应的职能、不得身兼数职,保证委员间相互制衡机制的有效性;再次,为避免 IACUC 在伦理审查中缺乏专业度和流于形式,需要对福利伦理委员会成员及实验动物使用人员进行系统化培训并颁发证书,并在后期不定期组织学习和考核;且伦理审查制度及标准操作规程也需要不断地更新完善。最后, IACUC 除制定和实施伦理审查制度外,还应建立伦理审查相关配套制度,如麻醉和安乐死指南、人道终点指南等指导性文件,从而进一步保障伦理审查的规范化;并重视对实验过程的检查和监督, IACUC 委员组成应在现有规定的基础上,增加跟踪审查委员至少两名,及时上报跟踪审查情况,对实际操作与伦理审查申请不符的情况,尤其是违反实验动物福利伦理的情况进行处罚,并撤销已批准的伦理审查申请。

3.2 提升兽医的地位和工作水平

实验动物机构中,兽医具有举足轻重的重要

性,是各机构中直接负责和监管实验动物福利和权益的专业主体,既需要拟定实验动物管理和使用的计划、方案和监管办法、又是伦理审查申请的审核人和福利伦理的监督人。其工作职责贯穿于实验动物环境维护、饲养、运输、使用和安乐死的全过程。因此兽医的专业度和工作能力直接影响着本机构实验动物福利伦理的实施情况。

首先,兽医应具备相关专业背景,经过系统培训具有良好的专业技能;并在与实验动物工作中,始终秉持着关爱和怜悯的原则,和同情呵护实验动物的职业操守;其次,兽医需要在实验动物的伦理审查、采购运输、隔离检疫、预防和治疗临床疾病及其护理、手术及术中监护、疼痛和应激、麻醉及止痛、安乐死等过程中监督实验动物的管理和使用,例如:在确认实验用的动物种类数量是否与获批方案一致,在实验操作监管麻醉和止痛剂的种类和使用剂量是否合理,以及无菌手术、生理监测及术后护理等操作是否符合福利伦理的要求;再次,兽医还承担着对实验动物饲养设施条件 and 环境指标的监测,以及对饲养人员和实验人员进行专业培训和指导;并在实验动物饲养和使用过程中发生的疾病、伤害或不正常行为的观察和及时干预治疗;对污染动物及环境及时安乐死和消杀,防止生物安全危害事件的发生等;最后,保障兽医职责顺利并高效地履行,离不开各部门各岗位的人员相互配合,更需要管理者对兽医的支持和授权,提高兽医群体的工作地位和话语权。在出现利益冲突时,使兽医可以有充足的底气站在实验动物“代言人”的角度,为实验动物谋取充足的福利和尊重。

3.3 加强从业人员教育培训和意识建立

实验动物从业人员包括研究人员、高校教师、技术人员、学生以及相关的饲养和维保人员。定期对所有实验动物从业人员进行生命和伦理文化素养培训,提高其敬畏生命的意识,避免其久而久之将实验动物视作研究工具,忽视实验动物的利益和权利的现象^[13]。

在国际化大背景下,要增加实验动物从业人员操作技术培训,尤其是关于动物麻醉、镇痛、手术、安乐死和人道终点等的培训,使其在饲养管理和使用实验动物过程中,从福利和权益的角度为实验动物提供关怀,在不同情境下采取各种保障动物福利的有效措施。在实验过程中,熟练的抓取、保定、给药以及手术等操作技术,不仅可以避免或减少实验

动物遭受不必要的不适、应激甚至痛苦,也有利于规范实验操作,提高科研成功度和国际化认可度。

此外,科研人员进行动物实验设计通常以是否符合统计方法的需求为出发点,如动物数量是否满足群体规模、随机化分组和统计方法所需,因而在一定程度上容易存在过多使用实验动物的情况^[14]。通过对其伦理道德意识的培养和强化,促进科研人员在实验设计过程中,以实验动物的伦理和福利为共同立足点,考虑减少或替代方案,并改进实验动物的使用,从而在一定程度上保护实验动物的权利和福利。

3.4 有效地实践实验动物福利伦理要求,保障科研结果的可靠性

作为科学研究的关键要素,实验动物的健康状况、遗传背景和微生物状态都对科研实验的结果产生重要影响,尤其是当实验动物们的健康和福利受到损害时,实验动物的生理、免疫功能及其行为都可能发生负面改变、产生的实验数据偏差,进而导致科研结果的不可信或重复性不佳。

已有研究发现,灵长类和啮齿类实验动物如果在研究环境和操作实践中受到明显的应激刺激,可能会降低实验的重复性,并降低动物模型的代表性。例如,如果拽住小鼠尾巴对其进行固定并进行采血时,测得的血糖水平比使用采血固定装置(让小鼠钻进一个圆筒里)时显著升高^[15];对未经驯化或训练的实验猴进行采血时,测得的血糖水平也会不正常地显著升高^[16];而丰富环境可以延缓小鼠结肠癌细胞的生长^[17]。上述例子提示应用实验动物模拟人类的疾病时,维护动物的福利虽然不是疾病的治疗方法,但却可以提高动物模型的代表性。因此,认识到伦理审查的必要性,更好地关注积极的动物福利从而提高科学研究的可重复性,应该是严谨的科研工作者们的重要目标。

3.5 从实验动物的立场出发,落实福利评估和全程监督,并建立惩戒机制

从实验动物的立场出发,伦理审查在详述实验目的、意义和方法时,更需要关注实验全过程中实验动物的福利状况,尤其是:①说明动物使用量是否存在合理性,避免滥用;②在动物饲养和实验以及人道终点时给予的关怀和尊重的具体表现;③因实验造成的动物疼痛和痛苦的预期强度和持续时间,以及为缓解疼痛和痛苦而采取的具体行动(除了提供有关镇痛和其他减轻痛苦的麻醉手段外,还

表 1 加拿大动物保护委员会建议的小鼠福利评估指标^[19]

Table 1 Indicators to be considered for inclusion in welfare assessment tool generation for mice^[19]

因素 Consideration	指标 Indicator
环境条件 Environment	满足重要自然行为所需身体活动的条件 Environment allows physical performance of important natural behaviors
	适宜的居住条件和管理 Provision of appropriate housing and husbandry
	可能不利于动物福利的负面环境特征 Presence of negative environmental features that might impair welfare
	摄食和饮水量改变 Altered food and water intake
	体重改变 Weight change
	姿势或体态改变 Altered posture
	梳理行为变化 Altered grooming behavior
	皮毛状况、毛皮或皮肤损坏 Coat condition, damage to the fur or skin
	血泪症 Chromodacryorrhea
	异常刻板行为 Abnormal repetitive behaviors
动物的应激、疾病、疼痛或不适的一般指标 General animal-based indicators of stress, illness, pain or discomfort	社交行为或活动水平改变 Altered social behavior or activity levels
	眼睛微睁、下陷或呆滞 Partially closed, sunken, or dull eyes
	与人类的互动行为改变 Altered interactions with humans
	生理参数改变 Altered physiological parameters
	发声频率约为 20 kHz 20 kHz vocalization
	粪便中皮质酮含量 Fecal corticosterone
	探索行为 Exploratory behavior
	梳理 Grooming
	玩耍 Play
	发声频率约为 50 kHz 50 kHz vocalizations
中性或积极的福利状态指标 Animal-based indicators of neutral or positive welfare states	坐窝行为及其测试得分 Nest building and time to integrate into nest test (TINT test) and nesting consolidation test scoring
	面部表情状态 Facial grimace scale
	综合疼痛评分 Composite pain score
	挖洞任务 Burrowing task
	步态评分 Gait score
	侧偏行为 Cornering behavior
特定环境中的福利评估 Indicators for assessing welfare in specific contexts	

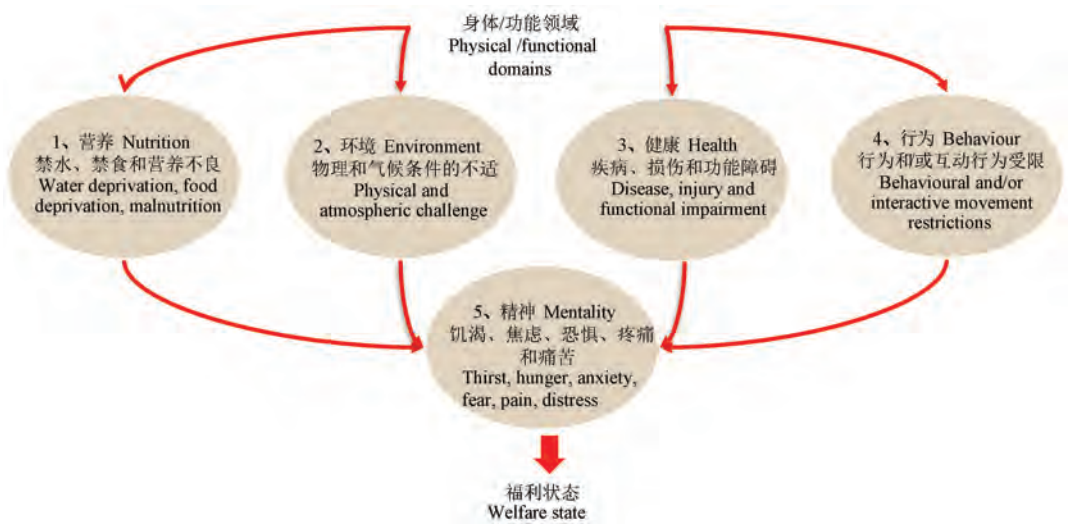


图 1 实验动物福利评估五领域模型^[18]

Figure 1 Five domains model of assessments of animal welfare^[18]

需承诺全程对实验动物的福利伦理进行评估,有效调整实验手段和方案);④对承受超出最大痛苦量(将福利和痛苦进行分级评分很有必要),或者发生了一些不可预见后果(如并发症等)的实验动物,是否及时执行必要的人道终点——安死术(时机),以及安死术的具体方法。

笔者在这里推荐将宠物和畜牧业的“五领域法”(见图 1)应用于实验动物福利进行全过程的评估和管理。营养、环境、健康和行为对动物来说可以作为积极和消极的影响最终影响精神领域,而精神领域的整体情感体验可等同于动物的福利状况^[18]。因此,对实验动物的福利评估可通过直接观察行为反应,合并评估神经内分泌、免疫学和心血管参数来完成。

以加拿大动物保护委员会建议使用的小鼠福利评估指标为例(见表 1),说明通过对环境、一般指标、中立或积极指标、以及特定条件指标,包括了营养、环境、健康、行为以及相关生理参数,从而实现实验过程中小鼠处于不同状态下的福利状况进行综合评估。

实验动物机构应建立违反福利伦理的惩戒制度,在伦理审查申请得到批准后,IACUC 仍需要对实验方案的实施全过程的福利伦理进行跟踪审查,并应对违反实验动物福利伦理的单位和个人予以惩戒:①对于违反实验动物福利伦理的单位,可责令暂停其相关的产品生产或项目开展;②对于违反实验动物福利伦理的人员,可直接暂停其所有动物实验或科研工作(如停止其进入实验动物设施权限

等);③对于严重违反实验动物福利伦理或屡教不改者的单位,则应取消其实验动物相关的产品生产或项目开展的资质;④对于严重违反实验动物福利伦理或屡教不改者的个人,应对其实验或科研数据的真实性有效性提出质疑,并取消其发表文章、申请课题或结题的资格,甚至要求其承担相应的法律责任。

4 小结

实验动物的福利伦理与医学生命科学的进步并不是完全对立的。既然人类社会承认了实验动物的道德地位,实验动物从业人员则不能仅将实验动物视作实验工具,而是要倾注关爱和理性,重视并保护其福利和权利,从而进一步推进医学生命科学更深入的发展。

参 考 文 献(References)

[1] Taylor K, Alvarez LR. An estimate of the number of animals used for scientific purposes worldwide in 2015 [J]. Altern Lab Anim, 2019, 47(5-6): 196-213.

[2] Kinter LB, DeHaven R, Johnson DK, et al. A brief history of use of animals in biomedical research and perspective on non-animal alternatives [J]. ILAR J, 2021, 62(1-2): 7-16.

[3] 王锡乐, 巩薇, 贺争鸣, 等. 中国大陆地区实验动物使用现状分析 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(6): 42-48, 54.

Wang XL, Gong W, He ZM, et al. Analysis on the current situation of laboratory animals in Chinese mainland [J]. Lab Anim Sci, 2017, 34(6): 42-48, 54.

[4] 陈化, 马永慧. 从常识道德到专业伦理: 生命伦理学理论进

- 路的变迁 [J]. 中州学刊, 2021, 10: 93-100.
- Chen H, Ma YH. From common sense morality to professional ethics: the change of bioethics theory approach [J]. Acad J Zhongzhou, 2021, 10: 93-100.
- [5] Gallop GG Jr. Chimpanzees: self-recognition [J]. Science, 1970, 167(3914): 86-87.
- [6] Martin-Ordas G, Call J, Colmenares F. Tubes, tables and traps: great apes solve two functionally equivalent trap tasks but show no evidence of transfer across tasks [J]. Anim Cogn, 2008, 11(3): 423-430.
- [7] Adolphs R. What does the amygdala contribute to social cognition? [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1191(1): 42-61.
- [8] 苏达, 高利红. 实验动物伦理新原则的框架分析与我国相关立法发展方向 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 107-112.
- Su D, Gao LH. Framework analysis of new principles of experimental animal ethics and the development direction of relevant legislation in China [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 107-112.
- [9] 林红梅. 动物解放论与以往动物保护主义之比较 [J]. 西南师范大学学报: 人文社会科学版, 2006, 4(32): 100-103.
- Lin HM. A Contrastive study between animal liberation theory and animal protectionism [J]. J Southwest Univ (Soc Sci Edit), 2006, 4(32): 100-103.
- [10] Gettayacamin M, Retnam L. AAALAC international standards and accreditation process [J]. Toxicol Res, 2017, 33(3): 183-189.
- [11] 王伟. 我国实验动物福利立法问题探赜 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 12: 275-277.
- Wang W. Discussion on the legislation of laboratory animal welfare in China [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2017, 12: 275-277.
- [12] 王亚辉. 医学期刊稿约中动物实验伦理标准的现状及完善建议 [J]. 编辑学报, 2022, 34(1): 48-52.
- Wang YH. Present situation and suggestions on improving the ethical standards of animal experiments in manuscripts of medical journals [J]. Acta Editologica, 2022, 34(1): 48-52.
- [13] 李闪闪, 郑小兰, 张新庆. 我国医学科研人员对实验动物伦理认知和态度分析 [J]. 科学与社会, 2021, 11(2): 110-122.
- Li SS, Zheng XL, Zhang XQ. Analysis of medical researchers' ethical cognition and attitude towards experimental animals in China [J]. Sci Soc, 2021, 11(2): 110-122.
- [14] 高建峰, 汤宏斌, 杨四军, 等. 医学生实验动物福利与伦理实践教学的思考 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(11): 115-118.
- Gao JF, Tang HB, Yang SJ, et al. Thoughts on experimental animal welfare and ethical practice teaching for medical students [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(11): 115-118.
- [15] Nakamura Y, Suzuki K. Tunnel use facilitates handling of ICR mice and decreases experimental variation [J]. J Vet Med Sci, 2018, 80(6): 886-892.
- [16] Lapin BA, Gvozdk TE, Klots IN. Blood glucose levels in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) and cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) under moderate stress and after recovery [J]. Bull Exp Biol Med, 2013, 154(4): 497-500.
- [17] Cao L, Liu X, Lin EJ, et al. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition [J]. Cell, 2010, 142(1): 52-64.
- [18] Mellor DJ, Beausoleil NJ, Littlewood KE, et al. The 2020 five domains model: including human-animal interactions in assessments of animal welfare [J]. Animals (Basel), 2020, 10(10): 1870.
- [19] Canadian Council on Animal Care (CCAC) Guidelines: mice appendix 6-indicators that may be used to assess the welfare of mice [EB/OL]. [2019-09-01] https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/CCAC_Guidelines_Mice.pdf (accessed on 6 June 2022).

[收稿日期] 2023-01-13

刘可,郭文文,王颖花,等. 脑类器官在创伤性脑损伤研究中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 690–696.
Liu K, Guo WW, Wang YH, et al. Application of brain organoids in the study of traumatic brain injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 690–696.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.017

脑类器官在创伤性脑损伤研究中的应用

刘可^{1,2}, 郭文文^{1,2}, 王颖花^{2,3}, 张延英¹, 汪永锋¹, 赵亚^{2*}, 师长宏^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学第一临床医学院, 兰州 730000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 3. 延安大学医学院, 陕西 延安 716000)

【摘要】 创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是由外力引起的脑正常功能破坏和/或脑组织病理性损伤。由于发生功能神经元不可逆的丧失和神经组织损伤, 中枢神经系统在创伤后很难修复和再生, 造成 TBI 患者预后存在严重后遗症。由于缺乏概括人脑特征的 TBI 模型, 虽然有大量成功的临床前研究用于 TBI 治疗, 但少有转化应用。脑类器官作为一种自我组装的 3D 组织, 具有来自干细胞和器官特异性细胞类型的集合, 能够在一定程度上模拟天然脑器官的结构和功能, 应用于 TBI 研究, 能够有效地解决人中枢神经系统组织获取的局限性以及人和动物之间的生物学特征不匹配问题。因此, 本文通过对脑类器官的产生、特性及其在 TBI 模型中的应用进行综述, 重点讨论了基于人多能干细胞 (hPSCs) 的脑类器官模拟体外 TBI 模型和嵌合动物 TBI 模型研究进展, 以期对脑类器官应用于 TBI 损伤的研究及治疗提供新思路。

【关键词】 脑类器官; 创伤性脑损伤; 移植

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0690-07

Application of brain organoids in the study of traumatic brain injury

LIU Ke^{1,2}, GUO Wenwen^{1,2}, WANG Yinghua^{2,3}, ZHANG Yanying¹, WANG Yongfeng¹, ZHAO Ya^{2*}, SHI Changhong^{1,2*}

(1. the First Clinical Medical College, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China.

2. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032.

3. School of Medicine, Yan'an University, Yan'an 716000)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn; ZHAO Ya. E-mail: 15702954323@163.com

【Abstract】 Traumatic brain injury (TBI) is the destruction of normal brain functions and/or pathological injury of brain tissue caused by external force. Because of the irreversible loss of functional neurons and nerve tissue damage, the central nervous system has difficulty repairing and regenerating after trauma, and the prognosis of TBI patients has serious sequelae. The existing TBI models cannot represent the characteristics of the human brain. Although many preclinical studies of TBI therapy have been successful, few have led to clinical translation. As a self-assembled 3D tissue with a collection of stem cells and organ-specific cell types, brain organoids simulate the structure and function of the natural brain to a certain extent. They effectively resolve the limitations of tissue acquisition in the human central nervous system and the mismatch of biological characteristics between humans and animals in TBI research. Therefore, in this review, we summarize the generation, characteristics, and application of brain organoids as TBI models and focus on the research

【基金项目】 陕西省创新能力的支持计划 (2021PT-037), 军队实验动物专项课题 (SYDW2018-01)。

Funded by Shaanxi Province Innovation Capacity Support Plan (2021PT-037), Special Topic of Military Experimental Animals (SYDW2018-01).

【作者简介】 刘可 (1993—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 神经嵌合小鼠模型制备及应用。Email: 1367723799@qq.com

【通信作者】 师长宏 (1973—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 疾病动物模型的制备与评价。Email: changhong@fmmu.edu.cn;

赵亚 (1992—), 女, 硕士, 助教, 研究方向: 疾病动物模型制备与评价。Email: 15702954323@163.com。

* 共同通信作者

progress of brain organoids simulated *in vitro* and chimeric animal models with TBI based on human pluripotent stem cells to provide new ideas for the application of brain organoids in the research and treatment of TBI injuries.

[Keywords] brain organoids; traumatic brain injury; transplantation

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

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是一种由外力冲击导致的包括血脑屏障破坏、大量神经炎症、轴突损伤和病变等一系列复杂的脑组织病理性改变^[1]。据估计,全球每年有 5000 万 ~ 6000 万患者被诊断出患有 TBI,已成为严重的公共卫生负担^[2]。尽管几十年来已经有大量成功的临床前研究用于 TBI 治疗,但大多数 TBI 相关研究都是使用啮齿类动物模型,这类模型可以再现 TBI 的某些生理物理特征以及各种细胞之间的相互作用,但与人类相比,啮齿动物在脑几何形状、白质与灰质比例、细胞形态等脑结构以及细胞活性、损伤后促炎因子释放等脑功能方面均存在显著差异^[3-5]。因此,少有转化为临床应用^[6],凸显了人类和动物模型 TBI 之间的生物学差异,迫切需要一种能更好地概括人脑特征的新模型。目前,已有研究者构建人神经系统嵌合动物模型,用于相关研究^[7-8]。但这些模型大多是向动物模型脑内移植人胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs)/诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 来源的神经干细胞 (neural stem cells, NSCs)、神经元、神经胶质细胞等构建^[9-11]。虽然,这些细胞移植可部分重建动物模型神经回路,减少脑损伤,增强神经修复,是 TBI 的有效治疗方法^[7-11]。然而,细胞移植面临着移植后存活率低和神经分化不充分,且分散的细胞不能在受损区域聚集等一系列问题^[12-13],如何解决这些问题成为优化 iPSCs 诱导分化的重点。

同样来源于人 ESCs/iPSCs 的脑类器官由于可以模拟人脑生理组织结构和在一定程度上模拟人脑的功能,在生物学研究和医学应用领域引起了极大的关注^[14]。与传统的细胞移植比,脑类器官移植具有更多优势:具有皮质板状组织细胞排列可提供保护屏障,存在神经前体细胞池可作为神经发生和干细胞衍生营养因子的来源,已有 3D 结构利于指导神经元分化并防止异常增殖,具有更高的细胞存活率,拥有更好的多系神经分化,形成更强大的血管网络,以及对损伤区域有效的组织填充^[13-15]。相比神经干细胞,脑类器官可能更适合作为 TBI 后修复受损脑组织的移植供体。而且,脑类器官应用于 TBI 研究,能够有效解决人类中枢神经系统组织获

取的局限性以及人和动物之间的生物学特征不匹配问题^[16-17]。本文通过对脑类器官的产生、特性及其在 TBI 模型中的应用进展进行综述,以期对脑类器官用于创伤性脑损伤的治疗研究提供新思路。

1 脑类器官的产生及其应用

脑类器官是由人 ESCs/iPSCs 衍生的类器官,其自我更新和多向分化形成有组织性的结构,主要由神经祖细胞 (neural progenitor cell, NPC)、神经元和神经胶质细胞组成,类似于人类胎儿大脑^[18]。与传统的 2D 细胞培养相比较,脑类器官在细胞水平、组织结构和发育轨迹方面可以再现人的大脑发展过程,提供了模拟人脑发育和功能的独特机会^[19]。

1.1 脑类器官的建立

Lancaster 等^[20]在 2013 年报道了第一例 3D 人类脑器官的生成,该研究团队将来自人胚胎组织的 ESCs 和来自成人组织的 iPSCs 首先聚集成拟胚体后,置于神经诱导培养基中诱导神经外胚层形成,待神经外胚层形成后,转移到基质胶中以扩张神经上皮。最后,将这些组织在旋转生物反应器中培养,以增强营养吸收,用于进一步成熟和保存。目前,研究者已在体外成功建立人中脑类器官、人小脑类器官、人皮质类器官等,可再现人脑特定区域之间的结构和功能以及相互作用的 3D 脑类器官,并用这些 3D 脑类器官研究大脑发育过程以及神经网络连接,探索神经系统疾病发病机制并寻找其治疗方法^[21-23]。研究人员共同培养了内侧神经节神经元和皮质类器官,产生了融合的皮质类器官,单细胞 RNA 测序和 ATAC 序列分析证明了这些融合的皮质类器官与胎儿脑组织在转录组方面具有较高的相似性^[24]。内侧神经节隆起和皮质神经元之间的人类中间神经元迁移过程可以在这些融合的各类器官中重现,从而为人脑发育中人类中间神经元的迁移提供了更深入的了解^[25-26]。上述结果均说明 3D 脑类器官在神经功能通路探索和中枢神经系统疾病的研究方面有着巨大的潜力。

1.2 脑类器官在脑类疾病研究中的应用

已有研究证实,脑类器官可模拟遗传缺陷或感染性疾病引起的先天性脑畸形,以及神经退行性疾

病相关表征^[27-31]。例如,脑类器官暴露于寨卡病毒导致细胞增殖抑制、死亡增加、类器官大小急剧减小,并且表现出包括神经元变薄、顶面粘附连接中断和脑室腔扩张等一系列先天性寨卡综合征特征^[27]。还有研究者在由家族性阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)患者的 iPSCs 衍生的脑类器官中检测到了包括淀粉样斑块和神经原纤维缠结等病理异常特征,这一结果的发现证明了使用患者体细胞开发患者特异性体外 AD 模型的可行性^[28-29]。LRRK2 G2019S 基因突变与帕金森病(Parkinson's disease, PD)病理过程中多巴胺能神经元的进行性缺失有关,在由 iPSCs 诱导的具有 LRRK2 G2019S 突变的脑类器官中检测到了包括 pS129 突触核蛋白囊泡的异常定位和具有自噬标记的有丝分裂吞噬等在内的 PD 样病理学特征。并且, LRRK2 激酶抑制剂的治疗能够缓解磷酸化 α -突触核蛋白的积聚和多巴胺能神经元死亡^[30]。这些研究,为脑类器官在发现靶向药物和有效的治疗干预等方面提供了新平台。

总之,3D 脑类器官在生理组织结构及神经功能方面一定程度上可以模拟正常及疾病状态下的人脑发育及功能,培养大量一致性高的 3D 脑类器官,为进一步探究脑类疾病的发病机制以及寻找其治疗策略提供可能。

2 脑类器官在 TBI 模型中的应用

TBI 作为一种致死率和致残率均较高的脑组织损伤疾病,由于药物治疗难以逆转创伤后的神经元丢失和神经组织病理性改变,重度 TBI 患者存在后遗症多、生活质量低等问题^[32]。目前已有动物模型难以高度还原人脑损伤的变化。最近有研究者将人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSCs)衍生的 3D 脑类器官移植到控制性皮质冲击模型(cortical impact injury, CCI)的重度联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiencies, SCID)小鼠病变脑中,改善了模型小鼠空间学习能力和记忆缺陷^[15],为 TBI 治疗提供了崭新的思路——3D 脑类器官治疗重度 TBI。人脑类器官可再现正常神经发育,并在很大程度上模仿了大脑的结构,用于 TBI 治疗及研究有着独特优势^[14]。建立体外 TBI 脑类器官模型,为直观研究复杂三维结构下多种细胞类型的相互作用以及损伤条件下引起的分子变化提供可能^[33-34]。TBI 模型在体移植脑类器官,诱导脑类

器官分化,与宿主脑组织发生整合,迁移到不同脑区,并与宿主神经元建立突触连接,获得电生理成熟,可减轻 TBI 脑损伤带来的危害,促进 TBI 后神经功能的恢复^[14-15,35]。

2.1 体外培养 3D 脑类器官模拟 TBI

由于早期体外研究使用的永生化细胞系或原代细胞,不能再现不同类型细胞间相互作用,也无法模拟细胞外基质环境。并且从模型动物中获取的离体组织,由于物种差异,并不能真实反应人脑^[36-37]。而 hPSCs 衍生的脑类器官技术的出现无疑在一定程度上解决了早期体外研究的缺陷,为研究神经疾病的发展提供了新策略,可更好地模拟人类疾病。

目前,可以通过向体外培养 3D 脑类器官施加剪切变形、压缩和重力下落等刺激制备 TBI 模型,这些体外模型可再现某些与 TBI 临床患者及动物模型相关的反应,说明利用体外培养的 3D 脑类器官有望应用于 TBI 病理机制及治疗方法研究^[38-39]。有研究者开发了一种基于 3D 培养的人 iPSCs 衍生 NPCs 的体外轻度 TBI 建模系统,以通过 3D 打印的微型重物下落冲击装置来评估单次和重复轻度 TBI 损伤后的效果。研究发现,人类小胶质细胞与神经球的 3D 共培养模型在经历两次冲击后,小胶质细胞活化引起慢性神经炎症,星形胶质细胞呈现出胞质肥大的反应性星形胶质细胞形态。许多分泌的趋化因子和细胞因子在撞击后上调,包括巨噬细胞游走抑制因子、趋化因子配体 5、白细胞介素 18、巨噬细胞炎性蛋白-1 α/β 、白细胞介素 6 和白细胞介素 8,这与临床 TBI 患者和动物实验结果高度一致^[33]。

CCI 是啮齿类动物中应用最成熟、最广泛的 TBI 模型之一,能够通过控制与冲击相关的参数,如接触速度、停留时间和深度,以调节损害的严重程度。Ramirez 等^[34]开发一种基于人脑类器官的 CCI 模型,作为一种改进的体外系统来研究 TBI。研究人员使用一个空的小鼠颅骨作为支撑,颅骨内部填充的琼脂糖-明胶混合物模拟脑实质,脑类器官通过颅骨窗口放置在脑实质顶部。小鼠颅骨被安装在立体定位框架中,按照速度(4 m/s)、停留时间(200 ms)和深度(1 mm),对 CCI 设备进行校准,以产生一定程度的冲击。CCI 后导致脑类器官神经元特异性烯醇化酶显著累积、裂解胱天蛋白酶 3 增加、微管关联蛋白 2 免疫反应性降低,以及星形胶质细胞反

应性肥大状态的转变,证明了优化的 CCI 方法可以诱导脑类器官中 TBI 的标志性特征,包括神经元损伤、神经元丢失和星形胶质细胞增生,再现了与人 TBI 相关的各种大脑异常。

尽管体外培养的 3D 脑类器官模拟体外 TBI 模型的建立已经取得了初步成功,但是同其他体外模型一样,存在一定的局限性。首先,TBI 的复杂性不能在体外完全模拟。大脑中不仅存在神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞,也存在许多其他免疫细胞,如中性粒细胞和巨噬细胞,以及脑微血管内皮细胞也同样参与了疾病的进展^[4]。其次,体外模型也无法模拟血脑屏障被破坏后导致的免疫细胞渗透和疾病的恶化,以及受损神经元或星形胶质细胞与其他成分之间的相互作用^[40]。并且,行为学评价对于评估 TBI 后的认知、感觉运动和情绪功能的短期和长期影响至关重要,然而以目前的研究手段还无法实现体外模型的行为学评估^[33]。由于脑类器官体外模拟 TBI 模型存在的各种局限性,建立体内 3D 脑类器官嵌合动物 TBI 模型显得尤为重要。

2.2 在体移植 3D 脑类器官治疗 TBI

最近关于人脑类器官移植啮齿动物的报道为建立人脑类器官嵌合动物体内 TBI 模型提供了可能。研究表明,将 3D 人脑类器官移植到小鼠的表层皮质,人脑类器官表现出进行性神经元分化和成熟、胶质生成以及轴突向宿主大脑多个区域的生长^[14]。移植后定期观察 3D 人脑类器官与小鼠的表层皮质功能性神经元网络和血管形成,开发了内源性血管化的脑类器官体内模型,克服了体外培养的 3D 人脑类器官缺乏血液循环的限制^[16]。研究人员将优化培养后产生的小体积(少于 5 个神经管)人脑类器官注射到 SCID 小鼠内侧前额叶皮层,移植的脑类器官存活,并在 1 个月内将超过 4.5 mm 长的投射延伸到基底脑区,在 3 个月内获得脑细胞特性,在 5 个月内获得电生理成熟。移植脑类器官产生的神经元经历快速分化,并通过与宿主神经元形成相互突触连接而在功能上整合到小鼠神经回路中^[14]。移植脑类器官不同类型细胞在宿主脑中持续分化成熟和移植区域外神经元广泛的轴突延伸以及区域特异性的长投射的成功,为人脑类器官嵌合小鼠体内 TBI 模型的建立以及脑损伤修复治疗提供了重要条件。

TBI 导致了神经组织的永久性缺损,鉴于损伤后仅有限的内源性神经干细胞能够增殖分化到受

损部位,因此通过人脑类器官移植为大脑损伤部位输送外源性脑细胞,有望成为潜在的 TBI 后脑修复疗法^[41]。具体来说,植入的脑类器官不仅能够取代丢失的神经细胞群,还能提供神经营养支持,有望重建和修复受损的大脑。Wang 等^[35]利用活栓冲头在大鼠大脑的右侧运动皮质形成直径 3 mm、深度 2 mm 的空腔,成功制备 TBI 运动功能障碍模型,并将人脑类器官移植到受损的运动皮质内,以探讨脑类器官移植治疗脑损伤的可行性、有效性和潜在机制。移植后,来自脑类器官中的细胞具有多系分化的潜力,能够模拟体内大脑皮质发育,支持运动皮质区域特异性重建,形成神经递质释放相关神经元,同时沿胼胝体广泛迁移到皮质、丘脑和海马等不同大脑区域。此外,脑类器官移植介导的同侧海马中突触后膜蛋白(postsynaptic density protein 95, PSD-95)和突触素(synapsin, SYN)神经连接蛋白以及脑源性神经营养因子 BDNF、神经生长因子 NGF 和表皮生长因子 EGF 等神经营养因子上调,有助于脑损伤后神经发生和外源性神经修复的增强^[35]。Bao 等^[15]报道了一种在 CCI 诱发的病变区域植入脑类器官的新方法。移植 2 个月后,植入的脑类器官已整合到损伤小鼠的脑周围,受损区域的脑类器官同样表现出神经分化、电生理活动以及血小板内皮细胞黏附分子 PECAM-1/CD31 标记的血管化。此外,还观察到胶质瘢痕的减少。胶质瘢痕形成是影响神经纤维和神经元再生的重要因素之一,撞击后,尤其是损伤区域存在大量胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)标记的星形胶质细胞。移植 2 个月后观察到脑类器官与宿主小鼠脑交界区 GFAP 表达的降低,显示移植有助于改善局部状况,可减轻轴突生长和再生障碍,促进神经修复。Morris 水迷宫和被动回避测试证实了 CCI 后小鼠的记忆和空间学习能力的改善^[15]。因此,脑类器官移植被认为是一种逆转创伤后神经元丢失、提高学习记忆能力的潜在疗法。

TBI 后在体移植的脑类器官,神经干细胞相关标记物 SOX2、Nestin 表达降低,成熟神经元标记物 NeuN、星形胶质细胞标记物 GFAP、前板/深层神经元标记物 TBR1 和表层神经元标记物 SATB2 表达升高,证明了移植脑类器官的皮质分化与成熟。并生成胆碱能神经元和谷氨酸能神经元等神经递质相关神经元,增强 PSD-95 和 SYN 的神经连接^[14-16]。因此,脑类器官移植后,可在体内进一步分化成熟,

并产生有功能的神经元、神经胶质细胞并分泌相关神经营养因子,进而改善 TBI 引起的神经元丢失,促进神经网络恢复,降低神经炎症,有助于 TBI 后学习记忆、情感以及运动功能恢复^[35,41]。尽管脑类器官移植对于 TBI 导致的脑损伤有一定的治疗及修复作用,但与人神经干细胞移植入啮齿类动物大脑类似,3D 脑类器官仍存在发育成熟缓慢、虽有整合但功能缺陷等问题^[41],应用于 TBI 后治疗还有很长一段路需要走。

3 前景及挑战

随着干细胞技术的发展,从人 ESCs/iPSCs 产生的各种类器官获得了越来越多的关注。产生的类器官既可以模拟体内器官的细胞结构、细胞间相互作用和发育,也可以用于相关疾病研究^[42]。与特定干细胞衍生单一细胞类型的传统细胞培养不同,由 ESCs/iPSCs 衍生的脑类器官包含多种细胞类型,能够形成类似人类大脑的组织形态,显示出强大的神经连接性和功能性,以模拟体内大脑发育并表现体内大脑区域的特征^[43]。创伤性脑损伤研究同样受益于脑类器官的发展。但现有 3D 脑类器官应用于 TBI 有关研究,仍存在一些问题。例如,在体外培养的 3D 脑类器官因缺乏免疫细胞以及脑微血管内皮细胞等非神经干细胞来源细胞,导致无法完整模拟 TBI 的复杂性,并且不能评估 TBI 后行为学改变,限制其应用^[44]。在体移植 3D 脑类器官可有效地填充病变缺失部位并恢复病变区域中宿主神经元的功能,但其治疗及修复效果仍然有限^[41]。

因此,3D 脑类器官应用于 TBI 相关研究,还有一系列问题待进一步探索:(1)脑类器官与小胶质细胞联合作用。TBI 后,由小胶质细胞参与的大脑神经炎症反应是引起神经元变性和功能性脑缺陷的主要原因之一,但脑类器官在体外诱导产生的多种细胞类型并不包括小胶质细胞,导致中枢神经系统免疫环境难以建立^[45]。如何将小胶质细胞与脑类器官体外共培养或者在体共移植,使小胶质细胞更好地迁移到脑类器官中以精确模拟 TBI 后损伤反应,并为寻找 TBI 治疗新方案提供良好模型,是未来研究热点之一。(2)如何与基因编辑技术有效结合。在 TBI 相关研究中,由于遗传多态性的不同可能与 TBI 预后结果相关,将携带特定多态性或突变的脑类器官用于 TBI-类器官模型,进而剖析特定基因变体在 TBI 病理学中的作用,有希望使用个性化

医学方法预测 TBI 病情发展^[46]。而且是否可以通过引入遗传操作,增强移植细胞对内源信号的反应性和敏感性继而提高移植有效性,同样值得深入探究。(3)TBI 后脑类器官移植时间。与阿尔茨海默病、帕金森病等其他中枢神经系统疾病模型不同,TBI 诱导的急性损伤期的快速炎症反应会影响脑类器官增殖、分化和成熟,小胶质细胞活化也会干扰神经发生^[47]。因而避免 TBI 后的快速炎症风暴对于脑器官移植是必要的。但也有研究表明在 TBI 后立即移植,脑类器官与宿主脑同样可以很好地整合^[35]。因此,合适的植入时间有待进一步的研究。(4)移植类器官的大小。早期产生的脑类器官体积较大,导致移植治疗应用困难,甚至脑类器官在宿主脑内有过度生长风险^[14]。将脑类器官剪切成体积更小且大小均匀的球体后进行移植,可能会获得更好的移植效果。(5)如何更好模拟 TBI 进展并在体观察人脑类器官发育。现有的体内研究都是将体外培养的脑类器官移植到 TBI 后受损动物大脑皮质中,探讨治疗脑损伤的可行性、有效性和潜在机制,还未有报道在脑类器官移植后的嵌合动物基础上再给予 TBI,研究大脑损伤对人脑类器官体内的直接作用。但由于移植后脑类器官存活并经历分化成熟,能够与宿主神经元形成相互突触连接而在功能上整合到宿主神经回路中,并通过不同的脑区延伸长投射^[35],因而建立移植后脑类器官嵌合小鼠模型,可为今后研究 TBI 对人来源细胞的原发性损伤、继发性损伤以及神经炎症的体内直接作用开辟新的途径,为脑类器官移植治疗脑损伤提供第一手临床前证据。

参 考 文 献(References)

- [1] Jean A, Nyein MK, Zheng JQ, et al. An animal-to-human scaling law for blast-induced traumatic brain injury risk assessment [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(43): 15310-15315.
- [2] Hawryluk GWJ, Rubiano AM, Totten AM, et al. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury: 2020 update of the decompressive craniectomy recommendations [J]. *Neurosurgery*, 2020, 87(3): 427-434.
- [3] Li L, Luo Q, Shang B, et al. Selective activation of cannabinoid receptor-2 reduces white matter injury via PERK signaling in a rat model of traumatic brain injury [J]. *Exp Neurol*, 2022, 347: 113899.
- [4] Hamm RJ. Neurobehavioral assessment of outcome following traumatic brain injury in rats: an evaluation of selected measures [J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(11): 1207-1216.
- [5] Adembi C, Selmi V, Vitali L, et al. Minocycline but not

- tigecycline is neuroprotective and reduces the neuroinflammatory response induced by the superimposition of sepsis upon traumatic brain injury [J]. Crit Care Med, 2014, 42(8): e570-e582.
- [6] Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research [J]. Lancet Neurol, 2017, 16(12): 987-1048.
- [7] Dunkerson J, Moritz KE, Young J, et al. Combining enriched environment and induced pluripotent stem cell therapy results in improved cognitive and motor function following traumatic brain injury [J]. Restor Neurol Neurosci, 2014, 32(5): 675-687.
- [8] 王颖花, 赵亚, 郭文文, 等. 神经干细胞应用于 CCI 创伤性脑损伤模型修复的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 867-872.
- Wang YH, Zhao Y, Guo WW, et al. Research progress of neural stem cells in repairing CCI traumatic brain injury model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 867-872.
- [9] Kawai M, Imaizumi K, Ishikawa M, et al. Long-term selective stimulation of transplanted neural stem/progenitor cells for spinal cord injury improves locomotor function [J]. Cell Rep, 2021, 37(8): 110019.
- [10] Barker RA, TRANSEURO consortium. Designing stem-cell-based dopamine cell replacement trials for Parkinson's disease [J]. Nat Med, 2019, 25(7): 1045-1053.
- [11] Kirkeby A, Parmar M, Barker RA. Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: a European approach (STEM-PD) [J]. Prog Brain Res, 2017, 230: 165-190.
- [12] Tang H, Sha H, Sun H, et al. Tracking induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells in the central nervous system of rats and monkeys [J]. Cell Reprogram, 2013, 15(5): 435-442.
- [13] Daviaud N, Friedel RH, Zou H. Vascularization and engraftment of transplanted human cerebral organoids in mouse cortex [J]. eNeuro, 2018, 5(6): ENEURO.0219-ENEURO.0218. 2018.
- [14] Dong X, Xu SB, Chen X, et al. Human cerebral organoids establish subcortical projections in the mouse brain after transplantation [J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(7): 2964-2976.
- [15] Bao Z, Fang K, Miao Z, et al. Human cerebral organoid implantation alleviated the neurological deficits of traumatic brain injury in mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6338722.
- [16] Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, et al. An *in vivo* model of functional and vascularized human brain organoids [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(5): 432-441.
- [17] Lancaster MA. Brain organoids get vascularized [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(5): 407-408.
- [18] Velasco S, Kedaigle AJ, Simmons SK, et al. Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex [J]. Nature, 2019, 570(7762): 523-527.
- [19] Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells [J]. Nat Protoc, 2014, 9(10): 2329-2340.
- [20] Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly [J]. Nature, 2013, 501(7467): 373-379.
- [21] Jo J, Xiao Y, Sun AX, et al. Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons [J]. Cell Stem Cell, 2016, 19(2): 248-257.
- [22] Qian X, Nguyen HN, Song MM, et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure [J]. Cell, 2016, 165(5): 1238-1254.
- [23] Qian X, Jacob F, Song MM, et al. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor [J]. Nat Protoc, 2018, 13(3): 565-580.
- [24] Xiang Y, Tanaka Y, Patterson B, et al. Fusion of regionally specified hPSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration [J]. Cell Stem Cell, 2017, 21(3): 383-398.
- [25] Miura Y, Li MY, Birey F, et al. Generation of human striatal organoids and cortico-striatal assembloids from human pluripotent stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(12): 1421-1430.
- [26] Andersen J, Revah O, Miura Y, et al. Generation of functional human 3D cortico-motor assembloids [J]. Cell, 2020, 183(7): 1913-1929.
- [27] Ming GL, Tang H, Song H. Advances in zika virus research: stem cell models, challenges, and opportunities [J]. Cell Stem Cell, 2016, 19(6): 690-702.
- [28] Jorfi M, D'Avanzo C, Tanzi RE, et al. Human neurospheroid arrays for *in vitro* studies of Alzheimer's disease [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2450.
- [29] 李少创, 韩诚, 秦亚莉, 等. 阿尔茨海默病实验动物模型评述 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 131-145.
- Li SC, Han C, Qin YL, et al. A review of experimental animal models of Alzheimer's disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 131-145.
- [30] Kim H, Park HJ, Choi H, et al. Modeling G2019S-LRRK2 sporadic parkinson's disease in 3D midbrain organoids [J]. Stem Cell Rep, 2019, 12(3): 518-531.
- [31] 郭文文, 赵亚, 白敏, 等. 神经干细胞移植在神经退行性疾病中的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 274-282.
- Guo WW, Zhao Y, Bai M, et al. Research progress of neural stem cell transplantation in neurodegenerative diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 274-282.
- [32] Golub VM, Reddy DS. Post-traumatic epilepsy and comorbidities: advanced models, molecular mechanisms, biomarkers, and novel therapeutic interventions [J]. Pharmacol Rev, 2022, 74(2): 387-438.
- [33] Shi W, Dong P, Kuss MA, et al. Design and evaluation of an *in vitro* mild traumatic brain injury modeling system using 3D printed mini impact device on the 3D cultured human iPSC derived neural progenitor cells [J]. Adv Healthc Mater, 2021, 10(12): e2100180.

[34] Ramirez S, Mukherjee A, Sepulveda S, et al. Modeling traumatic brain injury in human cerebral organoids [J]. Cells, 2021, 10 (10): 2683.

[35] Wang Z, Wang SN, Xu TY, et al. Cerebral organoids transplantation improves neurological motor function in rat brain injury [J]. CNS Neurosci Ther, 2020, 26(7): 682–697.

[36] Cater HL, Gitterman D, Davis SM, et al. Stretch-induced injury in organotypic hippocampal slice cultures reproduces *in vivo* post-traumatic neurodegeneration: role of glutamate receptors and voltage-dependent calcium channels [J]. J Neurochem, 2007, 101(2): 434–447.

[37] Wang HC, Ma YB. Experimental models of traumatic axonal injury [J]. J Clin Neurosci, 2010, 17(2): 157–162.

[38] Bar-Kochba E, Scimone MT, Estrada JB, et al. Strain and rate-dependent neuronal injury in a 3D *in vitro* compression model of traumatic brain injury [J]. Sci Rep, 2016, 6: 30550.

[39] Tang-Schomer MD, White JD, Tien LW, et al. Bioengineered functional brain-like cortical tissue [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(38): 13811–13816.

[40] Hamilton KA, Santhakumar V. Current *ex vivo* and *in vitro* approaches to uncovering mechanisms of neurological dysfunction after traumatic brain injury [J]. Curr Opin Biomed Eng, 2020, 14: 18–24.

[41] Bao Z, Liu Y, Chen B, et al. Prokineticin-2 prevents neuronal cell deaths in a model of traumatic brain injury [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4220.

[42] Yang Q, Hong Y, Zhao T, et al. What makes organoids good models of human neurogenesis? [J]. Front Neurosci, 2022, 16: 872794.

[43] Jacob F, Schnoll JG, Song H, et al. Building the brain from scratch: engineering region-specific brain organoids from human stem cells to study neural development and disease [J]. Curr Top Dev Biol, 2021, 142: 477–530.

[44] LaMontagne E, Muotri AR, Engler AJ. Recent advancements and future requirements in vascularization of cortical organoids [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 1048731.

[45] Zhang W, Jiang J, Xu Z, et al. Microglia-containing human brain organoids for the study of brain development and pathology [J]. Mol Psychiatry, 2023, 28(1): 96–107.

[46] Cortes D, Pera MF. The genetic basis of inter-individual variation in recovery from traumatic brain injury [J]. NPJ Regen Med, 2021, 6(1): 5.

[47] Srinivasan G, Brafman DA. The emergence of model systems to investigate the link between traumatic brain injury and Alzheimer’s disease [J]. Front Aging Neurosci, 2021, 13: 813544.

[收稿日期] 2022-12-28

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2020 年版(即第 9 版)生物科学类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为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。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友们的厚爱与信任。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,严谨办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。



清华大学图书馆

《中文核心期刊要目总览》入编通知

《中国实验动物学报》主编(女)女士:

我们谨此郑重通知,依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,贵刊《中国实验动物学报》入编《中文核心期刊要目总览》2020年版(即第9版)生物科学类的核心期刊。该刊由北京大学出版社出版,由本报《中国图书情报》杂志、刊名、并刊杂志、主办单位、出版年、出版频率、中图分类号、ISSN号、C刊号、邮发代号、编辑地址、电话、网址、内部发行等。

评价核心期刊的工作是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动,研究工作量大,北京地区十几所高校图书馆、中国科学文献情报中心、重庆维普资讯有限公司、中国人民大学书报资料中心、中国学术期刊(光盘版)电子杂志社、中国科学技术信息研究所、北京万方数据股份有限公司、国家图书馆和北京世纪超星信息技术发展有限责任公司等相关部门的百余名专家和期刊工作者参加了研究。

项目组对核心期刊的评价理论、评价方法等问题进行了深入研究,进一步改进了核心期刊评价方法,使之更趋科学合理,力求使评价结果符合客观实际。对核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评价相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量(全文、摘要)、被引量(全文、摘要)、被引量、他引量(期刊、博士论文)、影响因子、被影响因子、5年影响因子、5年他影响因子、特征因子、论文影响因子、论文被引指数、互引指数、重要文献重要参考文献收录、基金论文比(国家、省部级)、Web下载量、Web下载率16个评价指标。该评价指标和统计源数据库及文摘刊物达46种,统计到的文献数量共计142亿条,涉及期刊1376种,参加核心期刊评审的学科专家1万多位。经过定量评价和专家定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1990种核心期刊。

需要特别指出的是,该研究成果只是一种参考工具书,主要是为图书馆、出版界等需要期刊进行评价的用户提供参考,例如为图书馆各部门的中文期刊采购和选编等决策并提供参考依据,不应作为评价标准。谨此说明。

原稿
陈安



《中文核心期刊要目总览》2020年版编委会
2021年5月