

韩昊,李惠,张彩勤,等. MAOA/FOXA1在前列腺癌神经内分泌化进展中的动态变化特征[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 683-690.

HAN H, LI H, ZHANG C Q, et al. Characterisation of the dynamics of MAOA/FOXA1 in the progression of neuroendocrine differentiation in prostate cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 683-690.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.001

MAOA/FOXA1在前列腺癌神经内分泌化进展中的动态变化特征

韩昊^{1,2}, 李惠², 张彩勤², 赵菊梅¹, 魏晓丽^{1*}, 师长宏^{2*}

(1. 延安大学基础医学院, 陕西 延安 716000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 探索前列腺癌神经内分泌分化(neuroendocrine differentiation, NED)进展中单胺氧化酶A(monoamine oxidase A, MAOA)和叉头框蛋白A1(forkhead box A1, FOXA1)的动态变化特征,为临床神经内分泌型前列腺癌(neuroendocrine prostate cancer, NEPC)的治疗提供新的策略。方法 通过恩杂鲁胺(enzalutamide, ENZ)长期持续诱导的方式建立NED的细胞模型和小鼠移植模型;采用Western Blot和Real-time PCR方法检测MAOA、FOXA1在NED中的动态表达;选用GEO数据库分析在多种NED模型中MAOA与FOXA1的动态变化趋势;构建前列腺癌细胞系小鼠移植模型,通过免疫组化分析体内模型中MAOA、FOXA1在NED中的动态表达;通过慢病毒转染干预MAOA,检测MAOA对FOXA1的调控作用。结果 MAOA与FOXA1在NED过程中均呈现先升高后降低的动态变化特征;敲低前列腺癌细胞中MAOA可以导致FOXA1的表达降低,这可能是MAOA通过FOXA1在NED的不同阶段发挥不同作用。结论 MAOA和FOXA1在NED过程中呈先升高后降低的趋势,MAOA的表达能影响FOXA1的水平,MAOA/FOXA1可能在NED过程中发挥动态调控的作用。

【关键词】 神经内分泌分化;恩杂鲁胺;MAOA;FOXA1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)06-0683-08

Characterisation of the dynamics of MAOA/FOXA1 in the progression of neuroendocrine differentiation in prostate cancer

HAN Hao^{1,2}, LI Hui², ZHANG Caiqin², ZHAO Jumei¹, WEI Xiaoli^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China; 2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Corresponding author: WEI Xiaoli. E-mail: weixiaoli3754@163.com; SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the dynamic changes in monoamine oxidase A (MAOA) and forkhead box A1 (FOXA1) levels during neuroendocrine differentiation (NED) in prostate cancer, providing new strategies for the treatment of neuroendocrine prostate cancer. **Methods** Cell models and mouse transplantation models of NED were established through long-term sustained induction with enzalutamide (ENZ). Dynamic expression of MAOA and FOXA1 in NED was detected by Western Blot and Real-time PCR. GEO database data were selected to analyze the dynamic trends in MAOA and FOXA1 levels in multiple NED models. We constructed a mouse transplantation model of human prostate cancer cell

【基金项目】 国家自然科学基金(32070532, 32270566)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (32070532, 32270566).

【作者简介】 韩昊,男,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤分子病理与药物。Email: hanhao95@126.com

【通信作者】 师长宏,男,博士生导师,教授,研究方向:肿瘤模型的制备与评价。Email: changhong@fmmu.edu.cn;

魏晓丽,女,硕士生导师,教授,研究方向:肿瘤病理。Email: weixiaoli3754@163.com。

* 共同通信作者

lines and analyzed the dynamic expression of MAOA and FOXA1 in the *in vivo* NED model by immunohistochemistry. MAOA expression was disrupted with lentiviral transfection, and the impact on FOXA1 was detected. **Results** Both MAOA and FOXA1 concentrations showed dynamic characteristics, increasing and then decreasing during the NED process. Knockdown of MAOA in prostate cancer cells led to decreased expression of FOXA1. This MAOA may play different roles at different stages of NED by acting through FOXA1. **Conclusions** Both MAOA and FOXA1 levels showed increasing, then decreasing, trends during NED. The expression of MAOA affected the level of FOXA1, and MAOA/FOXA1 may play a dynamic regulatory role in the NED process.

[Keywords] neuroendocrine differentiation; enzalutamide; MAOA; FOXA1

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

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是世界范围内男性发病率第二高的恶性肿瘤^[1],是由雄激素及雄激素受体 (androgen receptor, AR) 驱动的癌症^[2]。异质性是 PCa 最主要的临床特征,通过药物或手术进行的雄激素剥夺 (androgen deprivation therapy, ADT) 虽然能有效控制雄激素敏感性前列腺癌 (hormone-sensitive prostate cancer, HSPC) 的进展,但大多数患者会以去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC) 的形式复发^[3]。CRPC 患者的血清雄激素水平虽然降低,但 AR 仍会被重新激活发挥主要作用,此时第二代雄激素受体抑制剂,如恩杂鲁胺 (enzalutamide, ENZ),成为治疗的主要策略^[4]。但随着恩杂鲁胺耐药的产生,部分肿瘤会发生神经内分泌分化,进展为恶性程度更高、预后更差的神经内分泌前列腺癌。其特征是神经内分泌分化标志物,如突触素 (synaptophysin, SYP)、人神经元特异性烯醇化酶 (human neurone specific enolase, ENO2) 等表达,减少对 AR 的依赖,以及前列腺特异抗原 (prostate specific antigen, PSA) 表达为阴性。目前前列腺癌神经内分泌分化的具体原因仍然不明,因此急需寻找有价值的治疗靶点。

单胺氧化酶 A 是一种与线粒体外膜相连的酶,由于存在于神经元和星形胶质细胞中,因此,被发现之初主要被当作精神类疾病的治疗靶点。然而近年来,单胺氧化酶 A (monoamine oxidase A, MAOA) 广泛被报道与多种癌症有关,其中与前列腺癌相关的报道最多^[5]。LIAO 等^[6] 研究报道,MAOA 表达升高能增强细胞干性,促进 PCa 的发生发展。WU 等^[7] 研究报道,MAOA 与侵袭性 PCa 之间存在关联,MAOA 的敲除甚至消除了前列腺癌移植模型中肿瘤的生长和转移。WEI 等^[8] 发现靶向 MAOA 结合 AR 抑制剂对于前列腺癌治疗具有巨大的潜力,且 GAUR 等^[9] 证明使用 MAOA 抑制剂还能有效抑制 ENZ 耐药的产生。本研究团队前期的实验证

实^[10] MAOA 能驱动前列腺癌的神经内分泌分化,且 MAOA 在前列腺癌的各阶段均发挥重要作用。但也有研究发现,神经内分泌分化的 PC3 细胞中 MAOA 表达反而很低^[11]。结合前期报道,研究人员推测前列腺癌在由 CRPC 转分化为神经内分泌型前列腺癌 (neuroendocrine prostate cancer, NEPC) 的过程中,MAOA 可能会存在动态变化。因此,本研究拟通过 ENZ 诱导建立神经内分泌分化 (neuroendocrine differentiation, NED) 细胞模型和动物模型,探索 MAOA 在 NED 过程中的变化趋势及潜在机制,旨在揭示 NEPC 的发生机制,为 PCa 的治疗提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 15 只 5 ~ 6 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠,体重 18 ~ 22 g,购自成都药康生物科技有限公司【SCXK(川)2020-034】。实验小鼠饲养于空军军医大学实验动物中心 SPF 级屏障设施中【SYXK(陕)2019-001】。饲养室温为 22 ± 2 °C,相对湿度维持 40% ~ 70%,光/暗循环 12 h/12 h,饮用水经高压蒸汽灭菌,小鼠自由饮水、摄食。本动物实验获空军军医大学实验动物福利及伦理委员会批准 (IACUC-20231055)。

1.1.2 细胞株

人前列腺癌细胞株 C4-2 和 22Rv1 均购自国家实验细胞资源共享平台,用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基,培养于温度 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中。换液间隔时间为 2 ~ 3 d,待细胞生长至对数期时,进行细胞传代、扩增培养。

1.1.3 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清购自 Biological Industries;0.25%

胰蛋白酶-EDTA 和青链霉素混合液购自北京索莱宝科技有限公司;慢病毒购自苏州吉玛基因股份有限公司;免疫组化染色试剂盒购自康为世纪有限公司;Western Blot 制胶试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;荧光定量 PCR 相关分子生物试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司;MAOA 抗体购自 Novus Biologicals;FOXA1、PSA、SYP 抗体均购自 Abcam;ENO2 抗体购自 ProMab Biotechnologies;GAPDH 抗体购自 Engibody Biotechnology;二抗购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;ENZ 购自 Selleck。酶标仪购自 BioTek;基因扩增仪购自 Eppendorf;实时荧光定量 PCR 仪购自 Thermo Fisher Scientific;化学发光成像仪购自 Syngene。

1.2 方法

1.2.1 Western Blot

使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液提取细胞蛋白,冰上裂解 25 min,在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 10 min 收集上清液,蛋白浓度用 BCA 蛋白质测定法进行定量。使用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离等量蛋白样品,转移至 PVDF 膜并用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。将膜在 4 °C 条件下与特异性一抗孵育 8 h 以上,用 TBST 洗涤条带 3 次,再用酶标二抗室温孵育 2 h。最后通过与 ECL 发光液孵育后,用发光成像仪检测条带。

1.2.2 Real-time PCR

细胞的总 RNA 提取使用北京天根公司的 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒,用逆转录酶逆转录 PCR 以获得 cDNA。之后使用 PrimeScript™ RT 试剂盒以及 TB Green® Fast qPCR Mix 通过实时荧光定量 PCR 仪进行扩增,反应条件为 95 °C 30 s,60 °C 30 s,共 40 个循环,结果以 GAPDH 作为内参,并使用比较 CT 值 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 表达的相对水平。

1.2.3 生物信息学数据

选用 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),下载 GSE59986 (PMID: 29757368) 以及 GSE8702 (PMID: 18302219) 的 RAW 文件,通过 R 语言对其进行标准化处理,并注释。本研究还使用 TIMER 2.0 (<http://timer.cistrome.org>) 在线工具分析了前列腺癌组织中 MAOA 表达水平与 FOXA1 表达水平间的相关性。

1.2.4 细胞模型的构建及处理

选用前列腺癌细胞 C4-2,诱导药物为 ENZ。实

验起始诱导浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$,而当诱导 1 个月后细胞在含 15 $\mu\text{mol/L}$ ENZ 的 RPMI-1640 培养基中已无明显死亡,最终诱导浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$,诱导时间达 6 个月。研究人员选择了 3 组细胞进行观察,分别是对 ENZ 敏感的野生型 C4-2 细胞 (WT),未表现出 NED 特点的 ENZ 诱导 1 个月的 C4-2 耐药细胞 (1 月),以及出现 NED 分化特征的 ENZ 诱导 6 个月的 C4-2 耐药 (6 月) 细胞进行观察。

1.2.5 小鼠模型的建立及处理

本实验将 15 只小鼠随机分为 3 组,每组 5 只,分别为未给药的对照组 P0,给药 20 mg/kg 诱导的 P4 组,以及给药 30 mg/kg 诱导的 P8 组。每代均选用 SPF 级 BALB/c 雄性裸鼠,且均在适应性饲养及手术去势后建立异种移植模型。去势时首先通过腹腔注射戊巴比妥钠 (0.3%) 将小鼠麻醉,然后在无菌环境下小鼠阴囊正中纵行切口逐层切开皮肤及深部筋膜,挤压下腹部可见睾丸,于外环口处离断并采用可吸收丝线双重结扎,完整切除睾丸及附睾,检查创面无明显活动性出血后,关闭创面,两侧睾丸需分别操作。P0 代每只接种 1×10^7 个 22Rv1 细胞,待肿瘤体积到达 100 mm^3 后,将小鼠随机分为传代组与对照组,传代组每日给予 10 mg/kg ENZ 灌胃诱导 NED,对照组灌胃同体积生理盐水。待肿瘤体积增长至 800 ~ 1000 mm^3 后对照组取肿瘤组织,冻存并制备组织切片,传代组将肿瘤接种至下一代去势后的小鼠。P0 代是指亲本 22Rv1 细胞接种于裸鼠后未经 ENZ 处理的小鼠。P4、P8 代是指 P0 代小鼠经 ENZ 处理后收集瘤块再接种至小鼠,此时的小鼠为 P1 代;收集 P1 代小鼠瘤块,再接种至小鼠,此时为 P2 代;以此类推,得到 P4 和 P8 代小鼠。研究人员所用的方法为取出 P3 代小鼠瘤块接种至去势小鼠,经 ENZ 诱导后得到 P4 代肿瘤组织进行实验。同理得 P8 代小鼠肿瘤组织。

1.2.6 免疫组化

收集 P0、P4 和 P8 组小鼠肿瘤组织,用 4% 多聚甲醛固定,并用石蜡包埋后制备成 4 μm 切片。经过二甲苯脱蜡、梯度乙醇水合及抗原修复后,按照链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法进行组化染色,实验过程严格参考 DAB 试剂盒说明书进行。显色后经苏木精复染,梯度乙醇与二甲苯脱水后封片,用蔡司电子显微镜采集图像。

1.2.7 细胞转染

本研究采用 1/2 小体积感染法,基因转染增强

剂采用 polybrene, 实验分为对照组和 MAOA 敲低组。首先将状态良好的 C4-2 细胞接种至 24 孔板, 每孔 2×10^5 个细胞, 待细胞完全贴壁且细胞汇合率为 60% 时, 每组分别将培养基更换为 250 μL 含有 20 μL 病毒和 1 μL 凝聚胺的无抗生素培养基, 感染 4 h 后将培养基体积补足至 500 μL , 待转染 24 h 后更换含嘌呤霉素的培养基持续筛选, 并用 Real-time PCR 及 Western Blot 进行转染效果验证。

1.3 统计学分析

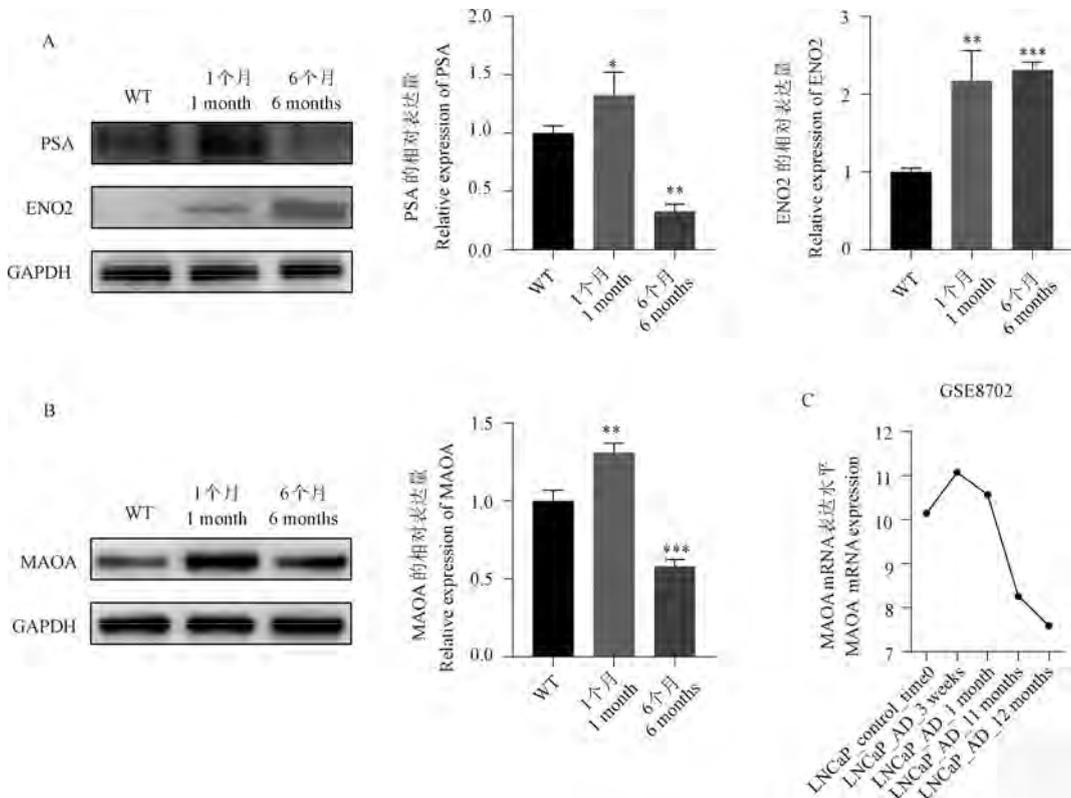
本研究使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据统计学分析, 实验数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用 Student's *t*-test 检验法进行差异分析, 多组间比较采用 One-way ANOVA 检验法, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 MAOA 在 NED 细胞模型构建中的动态变化

为了研究 MAOA 在神经内分泌分化过程中的

变化情况, 研究人员利用浓度逐渐升高的 ENZ 诱导原本对 ENZ 敏感的 C4-2 细胞, 以模拟前列腺癌细胞神经内分泌分化的过程。发现随着诱导的进行 NE 标志物 ENO2 的 mRNA 和蛋白表达逐渐升高, 而前列腺癌特异性标志物 PSA 在诱导耐药 1 个月后较野生型 C4-2 细胞显著升高 (图 1A), 表明其仍处于 CRPC 阶段, 耐药导致恶性程度升高, 而诱导耐药 6 个月后野生型 C4-2 细胞与 ENZ 诱导 1 个月的 C4-2 耐药细胞显著降低, 符合神经内分泌分化特点, 表明诱导 6 个月的 C4-2 耐药细胞 NED 模型构建成功^[12]。在该过程中, 研究人员发现, 随着 ENZ 持续作用, MAOA 的表达呈现先升高后降低的动态变化趋势 (图 1B)。这与数据库 GSE8702 中将前列腺癌 LNCaP 细胞进行去雄处理, MAOA 的变化趋势一致 (图 1C)。经诱导的 C4-2 耐药细胞可以进行正常的冻存、复苏、传代, 并且经过实验验证, 复苏后耐药细胞的 MAOA 变化趋势较野生型细胞仍符合动态变化, 可用于后续实验。



注: 与 WT 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 1 NEPC 细胞模型的建立与 MAOA 的动态变化

Note. Compared with WT, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 NEPC cell modeling and the dynamics of MAOA expression

2.2 MAOA 在 NED 动物模型中的动态变化特征

在体外细胞模型发现该动态变化特征后,为了在体内确认 MAOA 是否随着 NED 的进展也存在动态变化趋势。利用 22Rv1 细胞的 CDX 模型模拟去势抵抗性前列腺癌的发生,通过 ENZ 给药逐代诱导模拟 NED 的产生。起始诱导浓度为 10 mg/kg,至第四代时 ENZ 给药浓度提高至 20 mg/kg,最终诱导浓度达 30 mg/kg,诱导代次为八代。研究人员发现随着 NE 标志物 SYP 的升高(图 2A),MAOA 在体内也呈现先升高后降低的变化趋势(图 2B)。而在另一个模拟 NEPC 产生的模型中,也出现了 MAOA 的动态变化特征(图 2C),进一步证实了研究人员的体外研究结果。

2.3 FOXA1 在 NED 中动态变化

明确 MAOA 动态变化的规律后,需要进一步探索 MAOA 出现动态变化的原因。ZHANG 等^[13]报道,叉头框蛋白 A1 (forkhead box A1, FOXA1) 在 CRPC 阶段促进癌症的发生发展,而根据 KIM 等^[14]报道,FOXA1 下调后可促进 NEPC 形成。这与发现的 MAOA 变化趋势相似,且通过生物信息学分析发

现,MAOA 与 FOXA1 存在显著相关性(图 3A)。进一步通过 Real-time PCR 和 Western Blot 分析,在构建的细胞模型和动物模型中分别确认 FOXA1 的表达情况,发现也是呈现先升高后降低的动态变化(图 3B,3C),与 MAOA 趋势一致。利用已有的数据库分析了 FOXA1 的相关数据,发现均与 MAOA 的动态变化趋势符合(图 3D)。因此,研究人员推测 MAOA 或许通过调控 FOXA1 实现在 NED 过程中的动态变化。

2.4 MAOA 通过调控 FOXA1 实现动态变化

为了进一步阐明在 NED 过程中具有同样变化趋势的两种分子存在何种联系,通过转染慢病毒的方式敲低前列腺癌细胞 C4-2 中 MAOA 的表达,结果显示随着 MAOA 的敲低,FOXA1 的蛋白质和 mRNA 水平也随之降低(图 4)。综上所述,研究人员推测,MAOA 或许作为 FOXA1 的上游,通过调控 FOXA1 实现动态变化,在 NED 的过程中发挥先促进神经内分泌分化的进程,后期随着病程的进展,AR 的表达降低^[15],作用逐渐变为抑制神经内分泌分化。

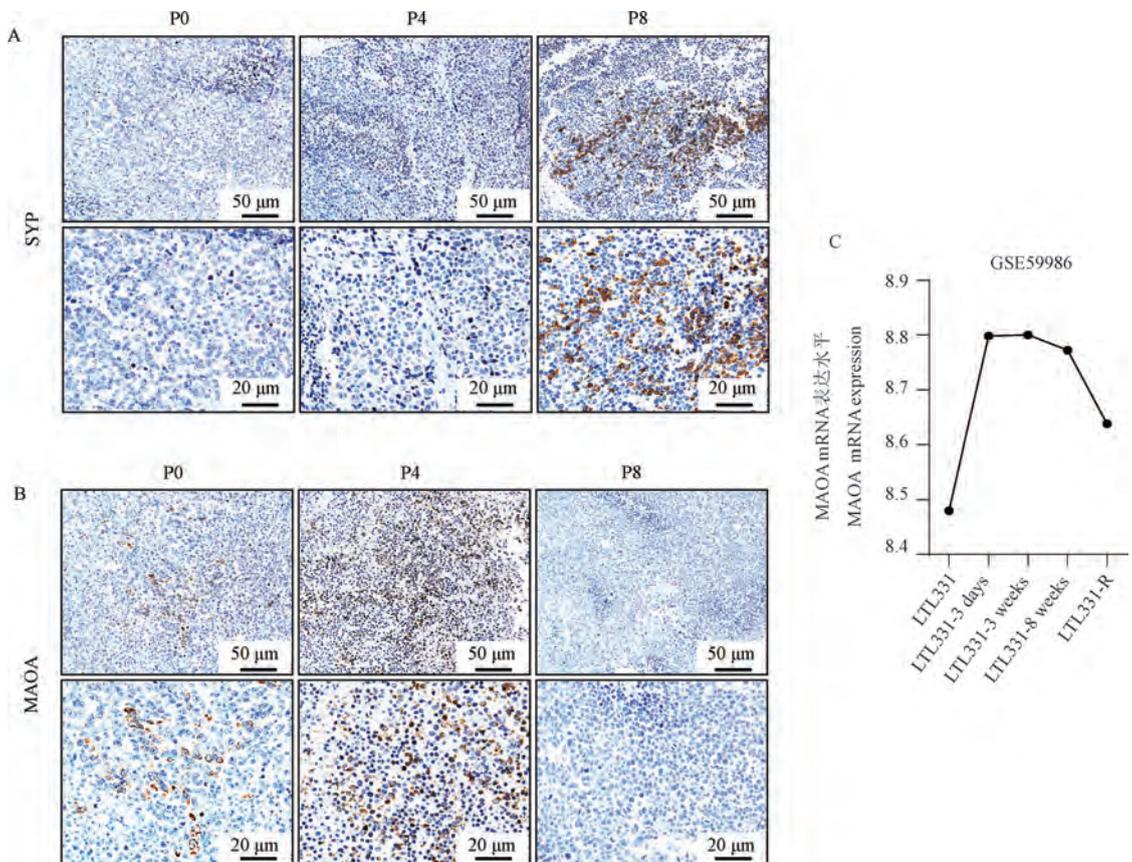


图 2 NEPC 小鼠模型的建立与 MAOA 表达的动态变化

Figure 2 NEPC mice modeling and the dynamics of MAOA expression

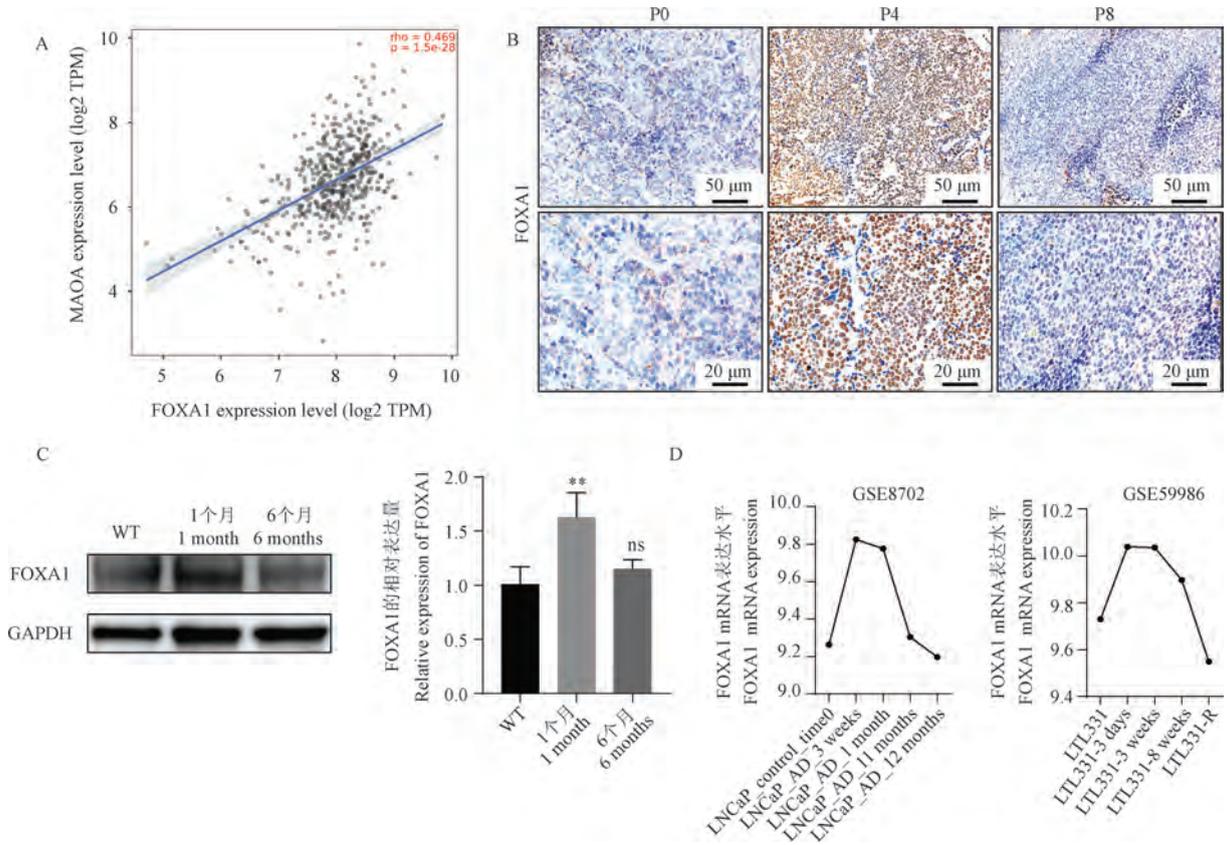


图 3 FOXA1 在 NED 过程中动态变化

Figure 3 FOXA1 expression dynamics during the NED process

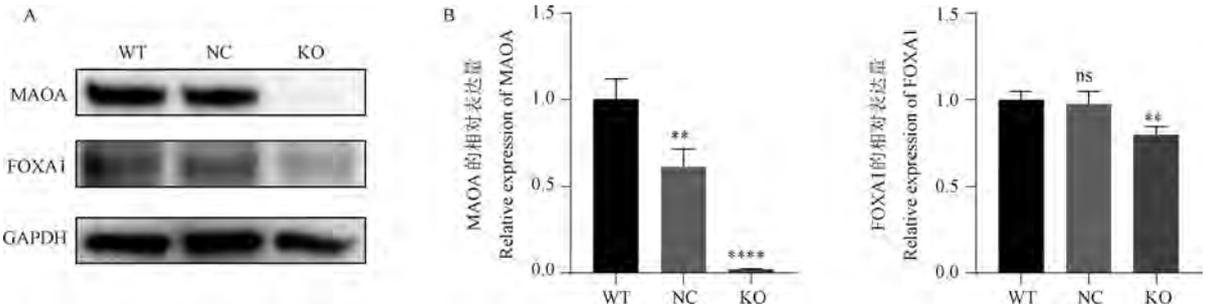


图 4 FOXA1 的表达受 MAOA 调控

Figure 4 FOXA1 is regulated by MAOA

3 讨论

MAOA 对 PCa 的促进作用已被广泛报道,靶向 MAOA 抑制 PCa 进展^[16],MAOA 抑制剂与 AR 抑制剂联合使用延缓 AR 抑制剂耐药的产生^[8],甚至与化疗药多西紫杉醇联合使用能降低其诱导凋亡的能力^[17],目前多种 MAOA 抑制剂在前列腺癌治疗方面的可能均已被提出。GROSS 等^[18]已经将 MAOA 抑制剂苯乙肼用于治疗前列腺癌并推向了二

期临床试验,可以预想到的是,未来 MAOA 抑制剂将很可能应用于 PCa 临床治疗。但研究发现,神经内分泌前列腺癌在疾病进展中,其 MAOA 的表达呈现先升高后降低的动态变化特征。因此,本实验可能对未来 MAOA 抑制剂的使用提出指导性意见,临床上使用 MAOA 抑制剂时应及时检测 MAOA 的表达水平,当 MAOA 表达开始减低,或许就应该停用 MAOA 抑制剂,可能更有益于依据前列腺癌的异质性特征进行精准化治疗。

注:与 WT 相比,**** $P < 0.0001$ 。

Note. Compared with WT, **** $P < 0.0001$.

前列腺癌的 NE 样分化常见于疾病晚期,通常是治疗耐药导致的,其具有转移能力强、致死率高的特点,是导致 PCa 患者死亡的主要原因之一^[19]。目前导致 NED 的具体机制尚未研究清楚, NIE 等^[20]最新的研究发现 ASCL1 重组蛋白 (achaete-scute complex-like 1, ASCL1) 通过抵抗铁死亡增强了 CRPC 向 NEPC 的进展。本研究团队曾经也报道过 MAOA 能驱动前列腺癌的神内分泌分化,表明可能的机制是通过改变下游缺氧信号通路实现的^[21]。提示 MAOA 或许在 NED 过程中发挥重要作用。本研究关注了前列腺癌异质性转化过程中 MAOA 的变化特征,揭示了 MAOA 在 NED 过程中发挥的作用不是一成不变的。根据 KIM 等^[14]报道 FOXA1 能与白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8) 启动子结合导致 FOXA1 缺失,使得 ERK 磷酸化进而使前列腺癌神内分泌分化。因此,本研究发现 MAOA 为 FOXA1 的上游调控分子,这提示 MAOA 或许也能通过 MAPK 通路动态调控 NE 化进程。

神内分泌分化的前列腺癌是临床难治的前列腺癌亚型,目前尚无特效药物,仍以化疗为主要治疗手段。目前针对 DDL3 的抑制剂 SC16LD6.5^[22],以及使用 177Lu-PSMA 和 177Lu-DOTATATE 进行放射素疗法^[23]等都被证明能对 NE 样前列腺癌起治疗效果,但多数仍处于临床前试验阶段。根据本实验结果,在 NED 的末期诱导 MAOA 或 FOXA1 的表达也许是潜在的治疗方案。而 FOXA1 是一种转录因子,是一种较难用小分子激动的蛋白质,因此认为使用 MAOA 的激动剂或寻找可以激动 MAOA 的因素,或许是更值得期待的治疗 NED 的新方案。

在模型构建方面,课题组前期采用 ENZ 诱导 4 个月的方式建立了 NEPC 细胞模型;通过裸鼠移植前列腺癌细胞系并辅助 ENZ 诱导 2 周建立了 NEPC 动物模型^[21],重点关注了 NEPC 初期 MAOA 升高的特征。而本文为了探索 MAOA 在驱动 NEPC 进展中的动态变化规律,尝试建立动态变化的 NEPC 细胞模型 (ENZ 诱导 6 个月以上) 和动物模型 (ENZ 浓度逐渐递增诱导至 P8 代),重点明确这种动态变化是否也伴随 FOXA1 的变化,从而揭示其相关机制,为针对不同临床进展阶段的前列腺癌治疗提供有效策略。在诱导中保存了不同诱导时间的细胞,并通过 Western Blot 比较了不同诱导时间的耐药细胞,发现 C4-2 耐药细胞中 MAOA 在诱导

1 个月时表达最高,而在 6 个月时表达已经明显下调,再结合 NE 标志物蛋白的表达情况。研究人员认为 1 个月和 6 个月这两个时间点最具有代表性,分别体现了 C4-2 耐药细胞的 CRPC 阶段和 NEPC 阶段,最能够指征细胞的动态变化特征。而在动物移植模型中 P0、P4 和 P8 分别代表了 NEPC 进展的不同阶段,同样也体现了 MAOA 和 FOXA1 的动态变化特征。

综上所述,本研究证实 MAOA 在前列腺癌神内分泌分化过程中呈动态变化,即先升后降的特征,其机制可能是通过调控 FOXA1 实现的。这为 NED 的治疗提供了新的思路,并能更合理地指导 MAOA 抑制剂在临床上应用于 PCa 患者。

参 考 文 献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] AURILIO G, CIMADAMORE A, MAZZUCHELLI R, et al. Androgen receptor signaling pathway in prostate cancer: from genetics to clinical applications [J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2653.
- [3] NEVEDOMSKAYA E, BAUMGART S J, HAENDLER B. Recent advances in prostate cancer treatment and drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1359.
- [4] FERRALDESCHI R, WELTI J, LUO J, et al. Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects [J]. *Oncogene*, 2015, 34(14): 1745-1757.
- [5] HAN H, LI H, MA Y, et al. Monoamine oxidase A (MAOA): a promising target for prostate cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2023, 563: 216188.
- [6] LIAO C P, LIN T P, LI P C, et al. Loss of MAOA in epithelia inhibits adenocarcinoma development, cell proliferation and cancer stem cells in prostate [J]. *Oncogene*, 2018, 37(38): 5175-5190.
- [7] WU J B, SHAO C, LI X, et al. Monoamine oxidase A mediates prostate tumorigenesis and cancer metastasis [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(7): 2891-2908.
- [8] WEI J, YIN L, LI J, et al. Bidirectional cross-talk between MAOA and AR promotes hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(16): 4275-4289.
- [9] GAUR S, GROSS M E, LIAO C P, et al. Effect of monoamine oxidase A (MAOA) inhibitors on androgen-sensitive and castration-resistant prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2019, 79(6): 667-677.
- [10] SHUI X, REN X, XU R, et al. Monoamine oxidase A drives neuroendocrine differentiation in prostate cancer [J]. *Biochem*

- Biophys Res Commun, 2022, 606: 135–141.
- [11] WU J B, YIN L, SHI C, et al. MAOA-dependent activation of Shh-IL6-RANKL signaling network promotes prostate cancer metastasis by engaging tumor-stromal cell interactions [J]. Cancer Cell, 2017, 31(3): 368–382.
- [12] SREEKUMAR A, SAINI S. Role of transcription factors and chromatin modifiers in driving lineage reprogramming in treatment-induced neuroendocrine prostate cancer [J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1075707.
- [13] ZHANG C, WANG L, WU D, et al. Definition of a FoxA1 cistrome that is crucial for G1 to S-phase cell-cycle transit in castration-resistant prostate cancer [J]. Cancer Res, 2011, 71(21): 6738–6748.
- [14] KIM J, JIN H, ZHAO J C, et al. FOXA1 inhibits prostate cancer neuroendocrine differentiation [J]. Oncogene, 2017, 36(28): 4072–4080.
- [15] ABIDA W, CYRTA J, HELLER G, et al. Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(23): 11428–11436.
- [16] FLAMAND V, ZHAO H, PEEHL D M. Targeting monoamine oxidase A in advanced prostate cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(11): 1761–1771.
- [17] GORDON R R, WU M, HUANG C Y, et al. Chemotherapy-induced monoamine oxidase expression in prostate carcinoma functions as a cytoprotective resistance enzyme and associates with clinical outcomes [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e104271.
- [18] GROSS M E, AGUS D B, DORFF T B, et al. Phase 2 trial of monoamine oxidase inhibitor phenelzine in biochemical recurrent prostate cancer [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2021, 24(1): 61–68.
- [19] YAMADA Y, BELTRAN H. Clinical and biological features of neuroendocrine prostate cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2021, 23(2): 15.
- [20] NIE J, ZHANG P, LIANG C, et al. ASCL1-mediated ferroptosis resistance enhances the progress of castration-resistant prostate cancer to neurosecretory prostate cancer [J]. Free Radic Biol Med, 2023, 205: 318–331.
- [21] 税雪, 许荣, 谢清华, 等. MAOA 在诱导前列腺癌神经内分泌分化中的作用 [J]. 实验动物科学, 2021, 38(4): 40–46. SHUI X, XU R, XIE Q H, et al. The function of MAOA in inducing the neuroendocrine differentiation of prostate cancer [J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(4): 40–46.
- [22] PUCA L, GAVYERT K, SAILER V, et al. Delta-like protein 3 expression and therapeutic targeting in neuroendocrine prostate cancer [J]. Sci Transl Med, 2019, 11(484): eaav0891.
- [23] ASSADI M, PIRAYESH E, REKABPOUR S J, et al. ¹⁷⁷Lu-PSMA and ¹⁷⁷Lu-DOTATATE therapy in a patient with metastatic castration-resistant prostate cancer and neuroendocrine differentiation [J]. Clin Nucl Med, 2019, 44(12): 978–980.

[收稿日期] 2023–12–27

王凯瑜, 雷雪裴, 黄艺滢, 等. *Ifitm3* 敲除抑制小鼠神经干细胞增殖和分化 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 691-701.
WANG K Y, LEI X P, HUANG Y Y, et al. *Ifitm3* knockout inhibits the proliferation and differentiation of neural stem cells in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 691-701.
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.002

Ifitm3 敲除抑制小鼠神经干细胞增殖和分化

王凯瑜, 雷雪裴, 黄艺滢, 石桂英, 乐涵薇, 王杰, 林羿凡, 汤家鸣, 白琳*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,
国家人类疾病动物模型资源库, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立干扰素诱导跨膜蛋白3基因(*Ifitm3*)敲除小鼠模型, 探究*Ifitm3*对小鼠神经干细胞增殖和分化的影响。方法 利用CRISPR/Cas9技术, 建立*Ifitm3*敲除小鼠模型, 通过基因型鉴定和Western Blot检测IFITM3的敲除效果; 利用苏木素-伊红(HE)染色和流式细胞术等方法分析*Ifitm3*敲除小鼠和野生型小鼠的表型差异。分离并培养野生型和*Ifitm3*敲除小鼠成体神经干细胞, 统计神经球数量和大小, qRT-PCR、Western Blot、免疫荧光技术检测神经干细胞增殖和分化的能力。结果 成功建立*Ifitm3*敲除小鼠模型, *Ifitm3*敲除小鼠发育正常, 组织病理学及免疫系统未见明显异常。体外实验显示*Ifitm3*敲除抑制小鼠神经干细胞的自我更新潜能, 导致神经干细胞增殖能力下降, 并且抑制神经干细胞向未成熟神经元和星形胶质细胞分化。结论 IFITM3缺失导致神经干细胞增殖和分化能力下降, IFITM3可能参与了神经干细胞的功能调节。

【关键词】 干扰素诱导跨膜蛋白3; 基因敲除; 神经干细胞; 增殖; 神经分化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)06-0691-11

Ifitm3 knockout inhibits the proliferation and differentiation of neural stem cells in mice

WANG Kaiyu, LEI Xuepei, HUANG Yiyi, SHI Guiying, YUE Hanwei, WANG Jie, LIN Yifan,
TANG Jiaming, BAI Lin*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS & PUMC, NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Human Diseases Animal Model Resource Center, Beijing 100021, China)

Corresponding author: BAI Lin. E-mail: bailin49@163.com

【Abstract】 Objective To establish interferon-induced transmembrane protein 3 (*Ifitm3*) knockout mice and to explore the effects of *Ifitm3* on the proliferation and differentiation of adult neural stem cells of mice (aNSCs). **Methods** *IFITM3* knockout mice were established by the CRISPR/Cas9 method and identified by genotype identification and Western Blot. The differences between *Ifitm3*-knockout mice and wild-type mice were analyzed by hematoxylin-eosin(HE) staining and flow cytometry. The aNSCs of wild-type mice and *Ifitm3*-knockout mice were isolated and cultured, the number and size of neurospheres were detected, The ability of aNSCs to proliferate and differentiate were detected by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction, Western Blot, and immunofluorescence. **Results** *Ifitm3*-knockout mice were successfully established. The mice developed normally, and there were no obvious abnormalities either histopathologically or the immune system. *In vitro* experiments showed that *Ifitm3* knockout inhibited the self-renewal

【基金项目】 中国医学科学院创新项目(2021-I2M-1-035), 国家重点研发计划(2022YFA1103803)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (2021-I2M-1-035), National Key Research and Development Project (2022YFA1103803)。

【作者简介】 王凯瑜, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 细胞生物学。Email: wangkaiyu_wky@163.com

【通信作者】 白琳, 女, 研究员, 博士, 研究方向: 干细胞转化。Email: bailin49@163.com

potential of aNSCs, led to a decrease in the proliferation ability of aNSCs, and inhibited the differentiation of aNSCs into immature neurons and astrocytes. **Conclusions** This study finds that a lack of IFITM3 result in the ability of aNSCs to proliferate and differentiate decreased, IFITM3 may regulate the function of aNSCs.

【Keywords】 interferon-induced transmembrane protein 3; gene knockout; neural stem cells; proliferation; neural differentiation

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

干扰素诱导跨膜蛋白 3 (interferon-induced transmembrane protein 3, IFITM3) 属于干扰素 (interferon, IFN) 诱导的跨膜蛋白家族成员, 其主要定位于内吞囊泡及溶酶体^[1], 是脊椎动物重要的先天免疫效应因子。IFITM3 在抑制炎症^[2]、调节衰老^[3]、调控肿瘤生长和转移^[4] 等生物过程中发挥重要作用。研究表明 IFITM3 在神经胶质瘤、口腔鳞状细胞癌、肝细胞癌、结肠癌等众多肿瘤细胞中表达上调^[5-8], 通过介导包括 TGF- β ^[5]、ERK1/2^[7]、PI3K-AKT^[9] 等多种信号通路, 调控肿瘤细胞增殖及迁移。乳腺癌中 IFITM3 通过影响细胞周期调控肿瘤细胞增殖和形成集落^[10]。小鼠视网膜祖细胞中 IFITM3 通过分子伴侣介导的自噬途径 (chaperone-mediated autophagy, CMA) 调控视网膜祖细胞的增殖和细胞活力^[11]。在小鼠胚胎的发育阶段, IFITM3 参与调节生殖细胞的迁移和成熟^[12]。综上所述研究表明 IFITM3 在调节细胞活力、增殖、分化等过程中发挥重要作用。

IFITM3 可能参与调节神经炎症以及包括阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、精神分裂症、双相情感障碍、自闭症等神经疾病的发病机制^[13]。研究表明, 在 AD 患者中神经炎症诱导 IFITM3 表达上调, 其作为 γ -分泌酶的调节蛋白通过 IFITM3- γ -分泌酶复合物促进 β 淀粉样斑块的产生。IFITM3 和 AD 的高风险基因具有高度的表达相关性^[14]。此外, 在 5 \times FAD 小鼠模型的大脑中, IFITM3 在星形胶质细胞和小胶质细胞中的表达水平上调^[15]。

神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 具有自我更新与分化成为神经元和胶质细胞的潜能, 其对于大脑的正常发育至关重要, NSCs 功能的异常与多种神经退行性疾病相关, 阐明 NSCs 增殖和分化的调控机制, 有利于明确神经退行性疾病的发病机理。NSCs 主要位于侧脑室的脑室下区 (subventricular zone, SVZ) 与海马齿状回颗粒下层 (subgranular zone, SGZ)^[16]。在哺乳动物的大脑中, NSCs 以对称分裂方式扩增干细胞库, 并通过不对称分裂形成

化细胞^[17]。NSCs 的增殖和分化受到细胞内在遗传因素和外在环境信号的共同调控^[18]。研究表明, NSCs 的增殖与分化由 Notch 通路^[19]、Wnt 通路^[20] 等多种信号通路调控。

基于 IFITM3 在已有研究中显示与细胞增殖、细胞迁移和细胞分化相关, 并且参与了 AD 等神经退行性疾病的发病进程。因此, 本研究拟采用 CRISPR/Cas9 的方法制备 *Ifitm3* 基因敲除小鼠, 探究 *Ifitm3* 基因对 NSCs 自我更新、增殖和分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (雌性, 2 月龄, 18 ~ 23 g, 30 只; 6 月龄, 23 ~ 29 g, 6 只; 雄性, 2 月龄, 20 ~ 25 g, 30 只; 6 月龄, 31 ~ 37 g, 6 只) 及 SPF 级 ICR 小鼠 (雌性, 4 月龄, 35 ~ 40 g, 4 只), 购买于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK (京) 2020-0004】, 在中国医学科学院医学实验动物研究所 SPF 级动物屏障环境中【SYXK (京) 2024-0012】长期饲养繁殖。小鼠动物设施饲养环境温度: 20 ~ 26 $^{\circ}$ C, 相对湿度为 50% ~ 60%, 光照周期明暗比 12 h:12 h。小鼠在 IVC 笼盒中饲养, 饲喂全价营养颗粒饲料, 自由进食饮水, 动物鼠盒、水瓶以及垫料、饲料等均经过高温高压灭菌处理。研究中涉及的动物使用及实验操作程序已通过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会批准 (BL18003, BL23005)。

1.1.2 主要试剂与仪器

神经干细胞增殖培养基配制: 47.5% Neurobasal, 47.5% DMEM/F12, 2% 不含维生素 A 的 B27 添加剂, 1% 双抗, 1% GlutaMAX, 1% 非必需氨基酸, 10 ng/mL bFGF, 10 ng/mL EGF; 神经干细胞分化培养基配制: 93% DMEM 低糖培养基, 2% B27 添加剂, 2% 胎牛血清, 1% 双抗, 1% GlutaMAX, 1% 非必需氨基酸。

鼠尾直接 PCR 试剂盒 (Bimake, B40015); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (新赛美, WB6501A); RIPA 裂解液 (碧云天, P0013B); Omni-Easy™ PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (雅酶, PG213); 反转录试剂盒 (TaKaRa, RR036A); 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa, RR820A); 胎牛血清 (Gibco, 10099141C); Neurobasal (Gibco, 21103049); DMEM/F12 培养基 (Gibco, 11320033); DMEM 低糖培养基 (Gibco, 11885084); 青霉素-链霉素混合液 (Gibco, 15140122); GlutaMAX (Gibco, 35050061); 非必需氨基酸溶液 (Gibco, 11140050); B27 添加剂 (Gibco, 17504044); 不含维生素 A 的 B27 添加剂 (Gibco, 12587010); EGF (Stemcell, 78016); bFGF (PeproTech, AF-100-18B-50UG); Laminin (Gibco, 23017015); Poly-L-Ornithine (Sigma, P4957); StemPro Accutase 细胞解离试剂 (Gibco, A1110501)

PCR 仪 (美国, Bio-Rad); Bead Ruptor 24 Elite 多样品研磨珠均质仪 (美国, OMNI); 台式高速冷冻型微量离心机 (中国, 大龙兴创); StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪 (美国, Applied biosystems); 流式细胞仪 (美国, BD FACSAria™); OdysseyCLx 双色红外激光成像系统 (美国, LI-COR); CO₂ 细胞培养箱 (美国, Thermo Scientific); 生物安全柜 (新加坡,

ESCO); 荧光显微镜 (德国, Leica)。

1.2 方法

1.2.1 *Ifitm3* 敲除小鼠制备

按照实验方案 (图 1), 利用 CRISPR/Cas9 技术建立 *Ifitm3* 敲除小鼠模型。小鼠 *Ifitm3* 基因位于第七号染色体 7F5 区段, 针对 *Ifitm3* 基因设计两条 sgRNA, 分别为靶点 1: 5'-CGGCACCATGAACCACACTTCT-3' (寡核苷酸序列为: mouse-*Ifitm3*-gRNA UP1: 5'-TAGGAGAAGTGTGGTTCATGGTG-3' 和 mouse-*Ifitm3*-gRNA DOWN1: 5'-AAACCACCATGAAC CACTTCT-3') 以及靶点 2: 5'-TGAGTGTGCTAGA ATGGGGGG-3' (寡核苷酸序列为: mouse-*Ifitm3*-gRNA UP2: 5'-TAGGTGAGTGTGCTAGAATGGG-3' 和 mouse-*Ifitm3*-gRNA DOWN2: 5'-AAACCCATTCTAG CACTCA-3')。将 *Ifitm3*-sgRNA 单链引物退火合成小片段, 酶切 pUC57-sgRNA 表达载体, 将 *Ifitm3*-sgRNA 退火片段与线性化 pUC57-sgRNA 表达载体连接。将构建完成的 *Ifitm3*-sgRNA 载体体外转录为可注射的 sgRNA。Cas9 载体构建: 使用转录试剂盒将 pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 载体体外转录为可注射的 Cas9-RNA。将 *Ifitm3*-sgRNA 与 Cas9-RNA 混合, 用显微注射法注射于 C57BL/6J 小鼠受精卵中。具体操作步骤依据 MA 等^[21] 实验方法。

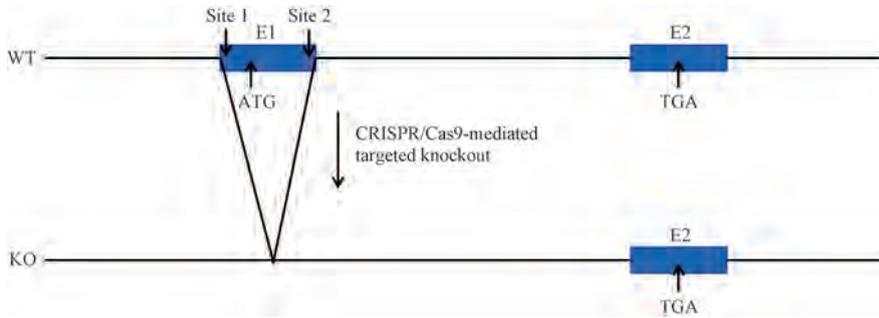


图 1 *Ifitm3* 基因敲除小鼠的建立方案

Figure 1 Establishment of *Ifitm3* knockout mice

1.2.2 基因型鉴定

小鼠出生后剪取脚趾编号并提取脚趾 DNA 进行基因型鉴定。根据序列信息设计一对基因敲除检测引物, 使用试剂盒提取基因组 DNA, 并进行 PCR 检测小鼠基因型。*Ifitm3* 基因敲除检测引物为: M-*Ifitm3*-KO-F: 5'-GCCAGCCTCTACTTCTCTGTTCTC-3' 和 M-*Ifitm3*-KO-R: 5'-GGAAGTCGGAATCCTCTATTAAGTGTG-3'。反应的程序为: 95 °C 预变性 15 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 从变性到延伸重复 30 个循环, 72 °C 延伸

10 min, 使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并紫外成像, 野生型小鼠表示为 *Ifitm3*^{+/+}, *Ifitm3* 敲除杂合子小鼠表示为 *Ifitm3*^{+/-}, *Ifitm3* 敲除纯合子小鼠表示为 *Ifitm3*^{-/-}。

1.2.3 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色

选取 2 月龄的 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠及其同窝 *Ifitm3*^{+/+} 小鼠, 取心脏、肝、脾、肺、肾组织于 10% 福尔马林中固定 48 h 以上, 经过乙醇梯度脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、贴片后, 做 HE 染色, 在光学显微镜下观察并分析组织病理变化。

1.2.4 流式细胞术

选取 6 月龄 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠及其同窝 *Ifitm3*^{+/+} 小鼠,取脾、骨髓及外周血的细胞加入 PBS,将细胞悬液过滤后离心,PBS 重悬取 10 μL 于 Ep 管中,免疫细胞分析使用的抗体标记为:FITC CD4(RM4-5)、PE CD45(30-F11)、PerCP-Cy5.5 CD3(145-2C11)、PE-Cy7 B220(RA3-6B2)、APC CD8(53-6.7)、APC-Cy7 CD11b(M1/70)。操作步骤同李欣悦等^[22]的研究,FlowJo 9.9.6 软件进行流式结果分析。

1.2.5 小鼠 NSCs 的分离培养和收集

选用 2 月龄 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠及其同窝 *Ifitm3*^{+/+} 小鼠,全脑放于预冷的含双抗 PBS 中,分离脑室下区和海马齿状回于含双抗的 DMEM 基础培养基中,使用 Accutase 细胞解离试剂 37 °C 消化 30 min,用 70 μm 细胞筛网过滤细胞悬液,DMEM 洗涤细胞,最后用 NSCs 增殖培养基重悬细胞,并取 10 μL 细胞悬液与台盼蓝混匀,细胞计数仪计数,接种细胞于 6 孔板用于收取细胞样品,接种细胞于 96 孔板用于获得 NSCs 体外成球数量及尺寸数据。在 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养细胞,隔天半量换培养基,培养至 5 ~ 8 d 收取数据并消化传代。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

收取增殖培养或分化培养的第 3 代 NSCs,用 TRIzol 提取总 RNA,并使用反转录试剂盒合成 cDNA。根据序列信息设计目的基因 *Ifitm3*、内参基因 *β-actin* 及神经干细胞增殖和分化相关基因检测引物,序列信息如表 1 所示。

表 1 qRT-PCR 的引物序列信息

基因名 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
<i>Ifitm3</i>	F:GCCTACTCGTGAAGTCTAGG R:AATGGTGATAACAACCATCAGGA
<i>β-actin</i>	F:TGCTGTCCCTGTATGCCTCT R:TTGATGTCACGCACGATTTTC
<i>Pcna</i>	F:TACAGCTTACTCTGCGCTCC R:TTGGACATGCTGGTGAGGTT
<i>Tuj1</i>	F:GCCAAGTTCTGGGAGGTCAT R:GGGCACATACTTGTGAGAGGA
<i>Gfap</i>	F:ACCCTGGCTCGTGTGGAT R:GCCACATCCATCTCCACG
<i>S100β</i>	F:TGTCTFCCACCAGTACTCCG R:CCTGCTCCTTGATTTCTCCAG

1.2.7 Western Blot

检测 IFITM3 蛋白在各组织及细胞中的表达;选

取 2 月龄 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠及其同窝 *Ifitm3*^{+/+} 小鼠,取心脏、肝、脾、肺、肾和各脑区以及细胞样品于研磨管中,加入适量 RIPA 蛋白裂解液及蛋白酶抑制剂,使用均质仪研磨,冰上裂解 30 min,4 °C 12 000 r/min 离心 20 min,并收集上清液为总蛋白,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度并计算上样体积,蛋白变性后上样,制备 15% SDS-PAGE 凝胶,经蛋白电泳、转膜、封闭后 4 °C 过夜孵育一抗,一抗:IFITM3(1 : 1000)、β-actin(1 : 10 000)、GAPDH(1 : 1000)、PCNA(1 : 1000)、TUJ1(1 : 1000)、GFAP(1 : 1000)、S100β(1 : 1000)。次日室温孵育二抗 1 h,二抗:山羊抗兔(1 : 10 000)和驴抗小鼠(1 : 10 000),使用 Odyssey CLx 红外荧光扫描成像系统扫描成像。

1.2.8 免疫荧光染色

将细胞爬片置于 24 孔板中,使用含 Laminin 和 Poly-L-Ornithine 的包被液于培养箱中提前 12 h 包被细胞爬片,接种 NSCs 增殖或分化培养,将细胞爬片用 PBS 润洗,使用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,使用含 0.3% Triton-100 的 PBST 润洗细胞,5% BSA 室温封闭 60 min,0.3% PBST 润洗后 4 °C 过夜孵育相应一抗,一抗:PCNA(1 : 250)、TUJ1(1 : 500)、GFAP(1 : 500)、S100β(1 : 100)。次日用 0.3% PBST 润洗后,用相应二抗室温摇床避光孵育 60 min,二抗:山羊抗小鼠(TRITC)(1 : 500)和山羊抗兔(Alexa Fluor 488)(1 : 500),1 μg/mL DAPI 室温孵育 5 min,用 PBS 漂洗细胞爬片,加抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜观察并拍照。

1.3 统计学分析

实验数据用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。各结果数据用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组样本比较,采用独立样本 *t* 检验进行组间比较,*P* < 0.05 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 *Ifitm3* 敲除小鼠模型的鉴定

剪取 5 ~ 7 日龄乳鼠的脚趾,提取 DNA 并通过 PCR 进行基因型鉴定,通过与野生型小鼠 *Ifitm3* 基因序列比较,鉴定确认 *Ifitm3* 基因第一外显子成功敲除。经 PCR 鉴定野生条带为 1633 bp,敲除条带为 1365 bp,杂合小鼠同时在 1633 bp 和 1365 bp 处有条带(图 2A),可稳定传代。利用 Western Blot 检测 2 月龄小鼠心脏、肝、脾、肺、肾及嗅球(olfactory

bulb, OB)、脑室下区(subventricular zone, SVZ)、纹状体(striatum, STR)、海马区(hippocampus, Hippo)、皮层(cortex, Cort)、黑质(substantia nigra, SN) 6 个脑区 IFITM3 的蛋白表达(图 2B)。结果可见, 在 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾及各脑区中, IFITM3 蛋白表达水平显著低于野生型小鼠, 表明 *Ifitm3* 敲除小鼠模型构建成功。

2.2 *Ifitm3* 敲除对小鼠主要器官的影响

在饲养繁殖过程中未发现 *Ifitm3* 敲除对小鼠生长和繁殖的显著性影响。通过对 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾组织的 HE 染色结果分析, 各脏器病理检查未发现明显异常(图 3A)。利用流式细胞术检测 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠脾、骨髓及外周血中不同免疫细胞的比例, 结果如图 3B ~ 3D 所示, *Ifitm3*^{-/-} 小鼠只有外周血中性粒细胞比例稍有降低, 其他脾、骨髓、外周血中各免疫细胞与 *Ifitm3*^{+/+} 小鼠相比均无显著性差异。

2.3 *Ifitm3* 敲除对 NSCs 体外成球能力的影响

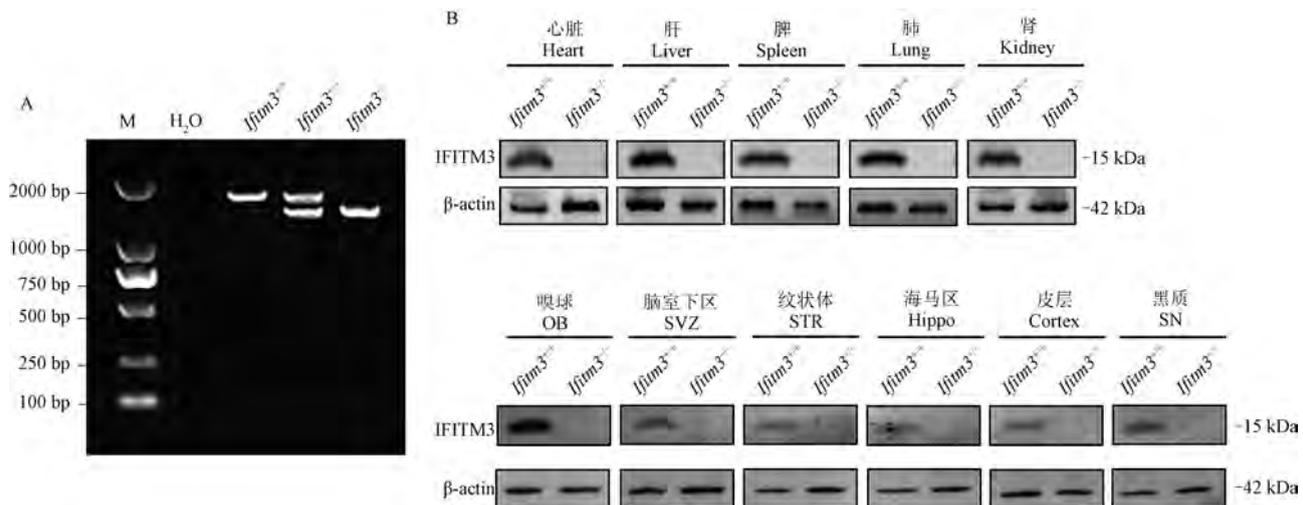
为了探究 *Ifitm3* 对 NSCs 自我更新的影响, 分离培养 2 月龄小鼠 SVZ 和 SGZ 的 NSCs, 增殖培养基体外培养 7 d 后, 发现与 *Ifitm3*^{+/+} 小鼠相比, *Ifitm3* 敲除导致小鼠初级神经球数量显著减少, 而对初级神经球大小无显著性影响(图 4A)。将原代 NSCs 传代后继续增殖培养 7 d, 发现与 *Ifitm3*^{+/+} 相比, *Ifitm3* 敲除对小鼠次级神经球数量无显著影响, 但

是次级神经球显著减小(图 4B)。以上结果表明, *Ifitm3* 敲除抑制小鼠 NSCs 的自我更新潜能。

2.4 *Ifitm3* 对 NSCs 体外增殖、分化能力的影响

为了明确 *Ifitm3* 对 NSCs 增殖能力的影响, 收集 NSCs 体外增殖培养至第 5 天的细胞样品, 通过 qRT-PCR 和 Western Blot 检测增殖标记物增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达, 结果显示 *Ifitm3* 敲除导致 NSCs 中 PCNA 的 mRNA 和蛋白质表达水平均显著降低(图 5A ~ 5C)。利用免疫荧光检测 PCNA 的表达(图 5D, 5E), 与 *Ifitm3*^{+/+} 相比, *Ifitm3*^{-/-} 小鼠 NSCs 中 PCNA 阳性细胞的比例显著减低。结果表明, *Ifitm3* 敲除导致 NSCs 增殖能力降低。

为了探究 *Ifitm3* 对 NSCs 分化能力的影响, 收集 NSCs 体外分化培养至第 5 天的细胞样品, 通过 qRT-PCR 和 Western Blot 检测神经元标记物 β III 微管蛋白(class III β -tubulin, TUJ1) 和星形胶质细胞标记物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP) 和 S100 钙结合蛋白 B(S100 calcium-binding protein B, S100 β) 的表达, 结果显示与 *Ifitm3*^{+/+} 相比, *Ifitm3*^{-/-} 组样品中 TUJ1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著下调(图 6A ~ 6C)。免疫荧光结果显示, *Ifitm3*^{-/-} 组 TUJ1 阳性细胞的比例显著减低(图 6D, 6E)。此外, 与 *Ifitm3*^{+/+} 相比, *Ifitm3*^{-/-} 组样品中 GFAP 的 mRNA 和蛋白表达水平无明显变化(图 7A ~ 7C)。

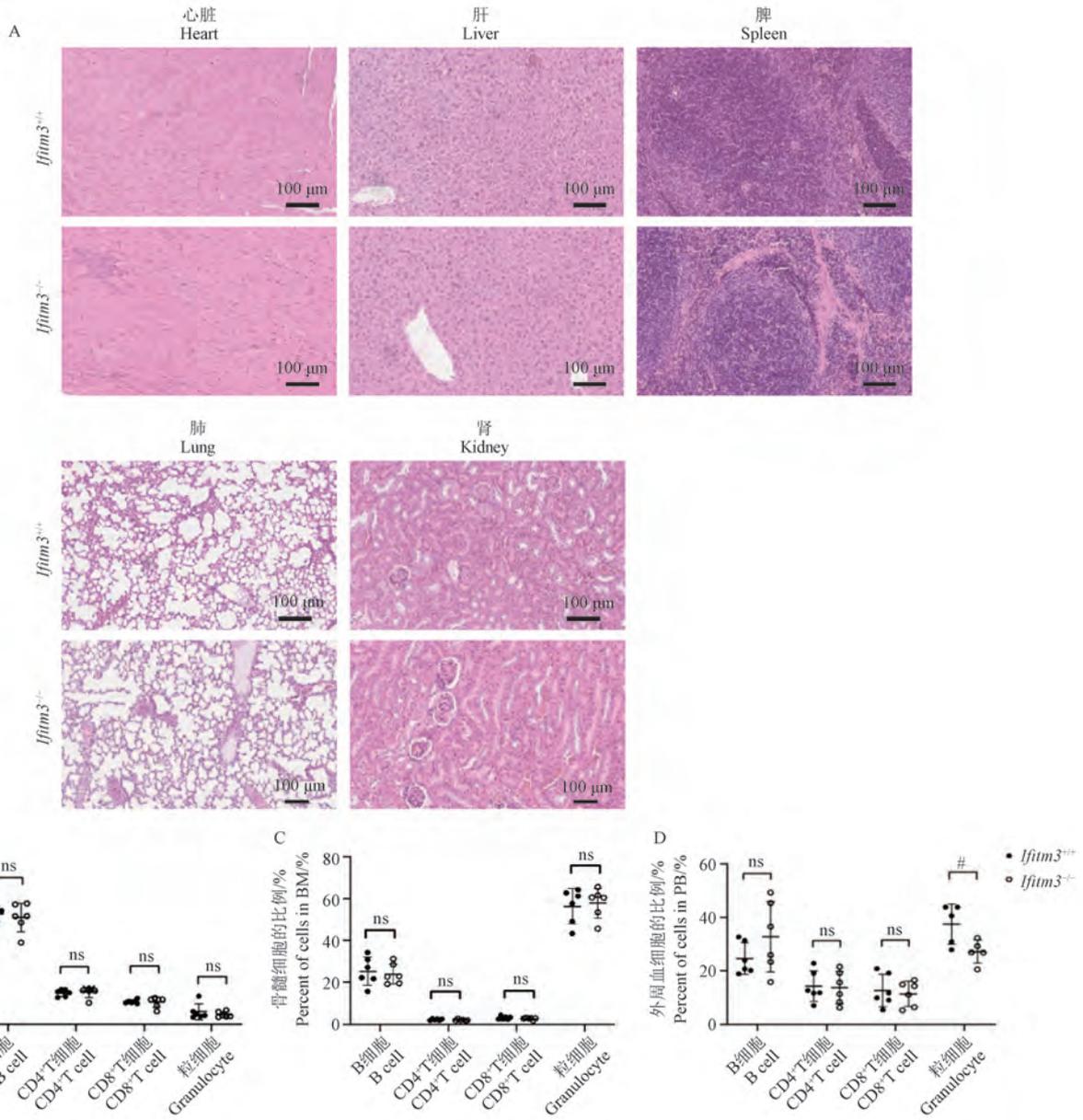


注: A: PCR 鉴定基因敲除小鼠基因型; B: Western Blot 检测 IFITM3 蛋白在心脏、肝、脾、肺、肾以及 6 个脑区中的表达。

图 2 *Ifitm3* 基因敲除鉴定和 IFITM3 蛋白表达

Note. A. Genotypes of knockout mice were identified by PCR. B. Western Blot analysis of IFITM3 expression level in heart, liver, spleen, lungs, kidney and six brain regions.

Figure 2 Identification of *Ifitm3* knockout mice and the protein expression of IFITM3



注: A:小鼠主要脏器组织 HE 染色; B:不同免疫细胞在小鼠脾脏中的比例; C:不同免疫细胞在小鼠骨髓中的比例; D:不同免疫细胞在小鼠外周血中的比例;与 *Ifitm3^{+/+}* 相比, # $P < 0.05$ 。(下图同)

图 3 *Ifitm3^{+/+}* 和 *Ifitm3^{-/-}* 小鼠组织 HE 染色及不同免疫细胞的比例 ($n = 6$)

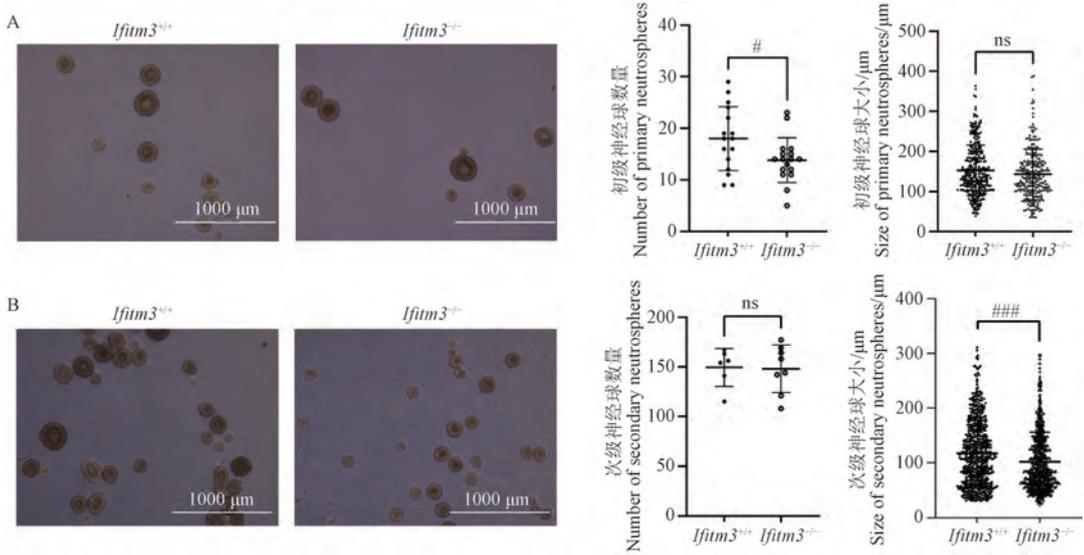
Note. A. HE staining of the major organ of mice. B. Proportion of different immune cells in spleen of mice. C. Proportion of different immune cells in bone marrow of mice. D. Proportion of different immune cells in peripheral blood of mice. Compared with *Ifitm3^{+/+}*, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 3 Tissue HE staining and proportion of different immune cells of *Ifitm3^{+/+}* and *Ifitm3^{-/-}* mice ($n = 6$)

免疫荧光结果显示, *Ifitm3^{-/-}* 组 GFAP 阳性细胞的比例与 *Ifitm3^{+/+}* 组无显著性差异 (图 7D, 7E)。然而, *Ifitm3^{-/-}* 组样品中 S100 β 的 mRNA 和蛋白表达水平显著下调 (图 8A ~ 8C)。免疫荧光结果显示, *Ifitm3^{-/-}* 组 S100 β 阳性细胞的比例显著减低 (图 8D, 8E)。这些结果表明, *Ifitm3* 敲除后 NSCs 向未成熟神经元和星形胶质细胞分化的数量减少。

3 讨论

IFITM3 在细胞信号传导、细胞粘附和细胞迁移等多种生物学过程中发挥重要作用^[23-24]。IFITM3 在脑组织中随着衰老等相关炎症刺激而表达量增加^[25]。本研究利用 CRISPR/Cas9 方法构建了 *Ifitm3^{-/-}* 小鼠。研究其在 NSCs 中的调节作用, 本研

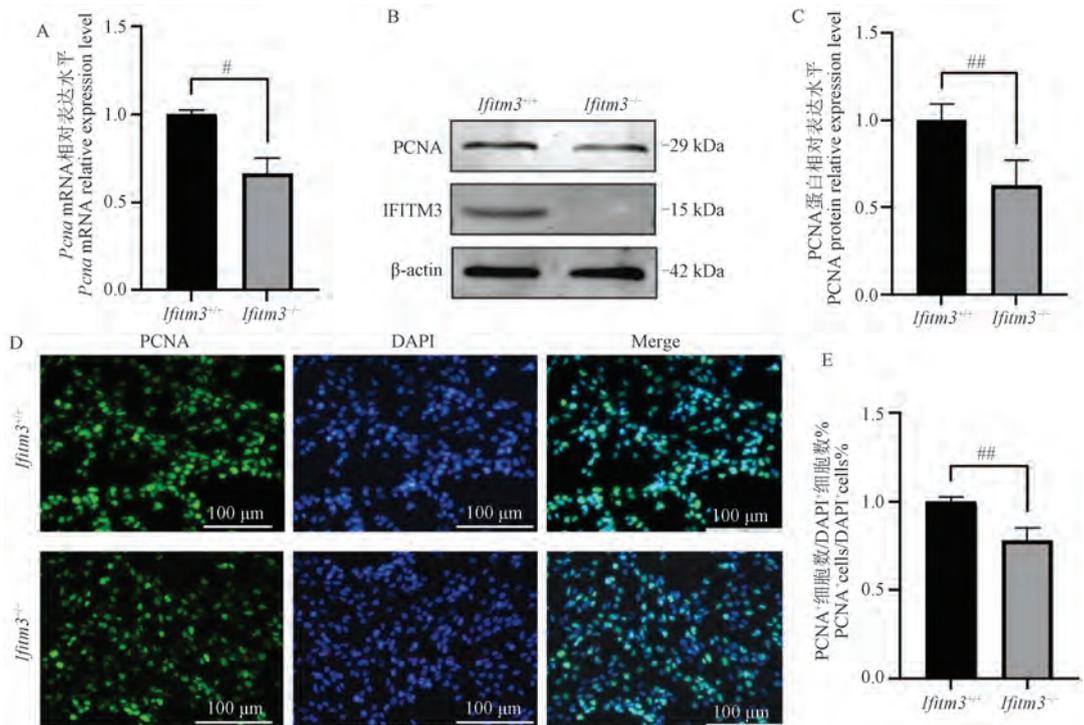


注: A: 初级神经球及初级神经球数量和大小统计图; B: 次级神经球及次级神经球数量和大小统计图; 与 *Ifitm3*^{+/+} 相比, ### $P < 0.001$ 。

图 4 *Ifitm3*^{+/+} 和 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠 NSCs 的体外成球能力 ($n \geq 3$)

Note. A. Primary neurospheres derived and the statistical chart showing the number and size of primary neurospheres. B. Secondary neurospheres derived from and the statistical chart showing the number and size of secondary neurospheres. Compared with *Ifitm3*^{+/+}, ### $P < 0.001$.

Figure 4 Neurospheres-forming ability of *Ifitm3*^{+/+} and *Ifitm3*^{-/-} mice NSCs *in vitro* ($n \geq 3$)

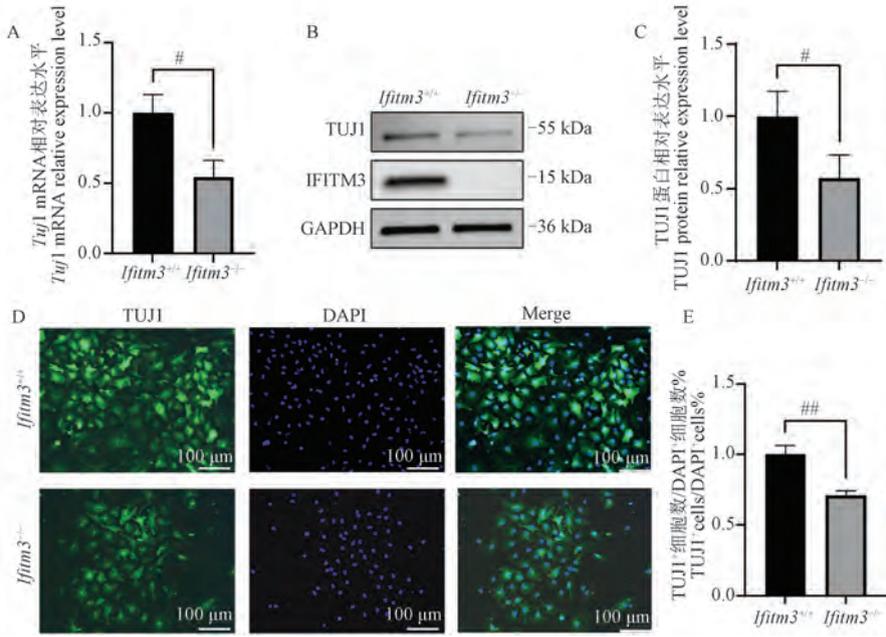


注: A: *Pcna* 的 mRNA 表达水平; B: PCNA 的蛋白表达水平; C: PCNA 蛋白相对表达水平统计图; D: PCNA 的免疫荧光; E: PCNA 阳性细胞占 DAPI 阳性细胞的比例; 蓝色: DAPI; 绿色: PCNA; 与 *Ifitm3*^{+/+} 相比, ## $P < 0.01$ 。(下图同)

图 5 *Ifitm3*^{+/+} 和 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠 NSCs 增殖样品中增殖标志物的表达 ($n = 3$)

Note. A. mRNA expression level of *Pcna*. B. Protein expression level of PCNA. C. Statistical chart of PCNA protein relative expression level. D. Immunofluorescence of PCNA. E. Proportion of PCNA positive cells in DAPI positive cells. Blue. DAPI. Green. PCNA. Compared with *Ifitm3*^{+/+}, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 5 Expression of proliferation marker in NSCs proliferation samples of *Ifitm3*^{+/+} and *Ifitm3*^{-/-} mice ($n = 3$)

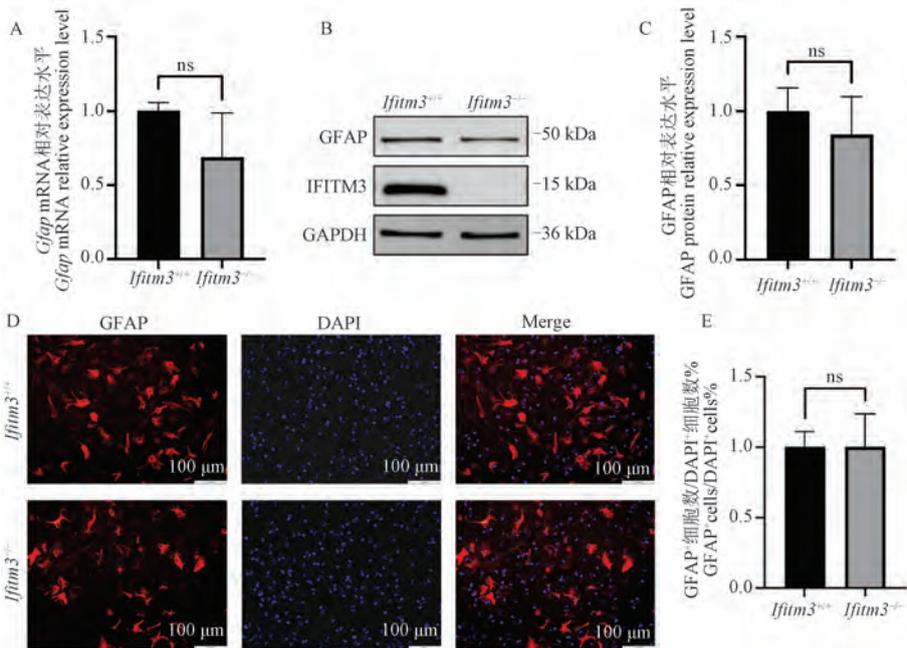


注:A: *Tuj1* 的 mRNA 表达水平;B:TUJ1 的蛋白表达水平;C:TUJ1 蛋白相对表达水平统计图;D:TUJ1 的免疫荧光;E:TUJ1 阳性细胞占 DAPI 阳性细胞的比例;蓝色:DAPI;绿色:TUJ1。

图 6 *Ifitm3*^{+/+} 和 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠 NSCs 分化样品中神经元标志物的表达 ($n = 3$)

Note. A. mRNA expression level of *Tuj1*. B. Protein expression level of TUJ1. C. Statistical chart of TUJ1 protein relative expression level. D. Immunofluorescence of TUJ1. E. Proportion of TUJ1 positive cells in DAPI positive cells. Blue. DAPI, Green. TUJ1.

Figure 6 Expression of neuron marker in NSCs differentiation samples of *Ifitm3*^{+/+} and *Ifitm3*^{-/-} mice ($n = 3$)

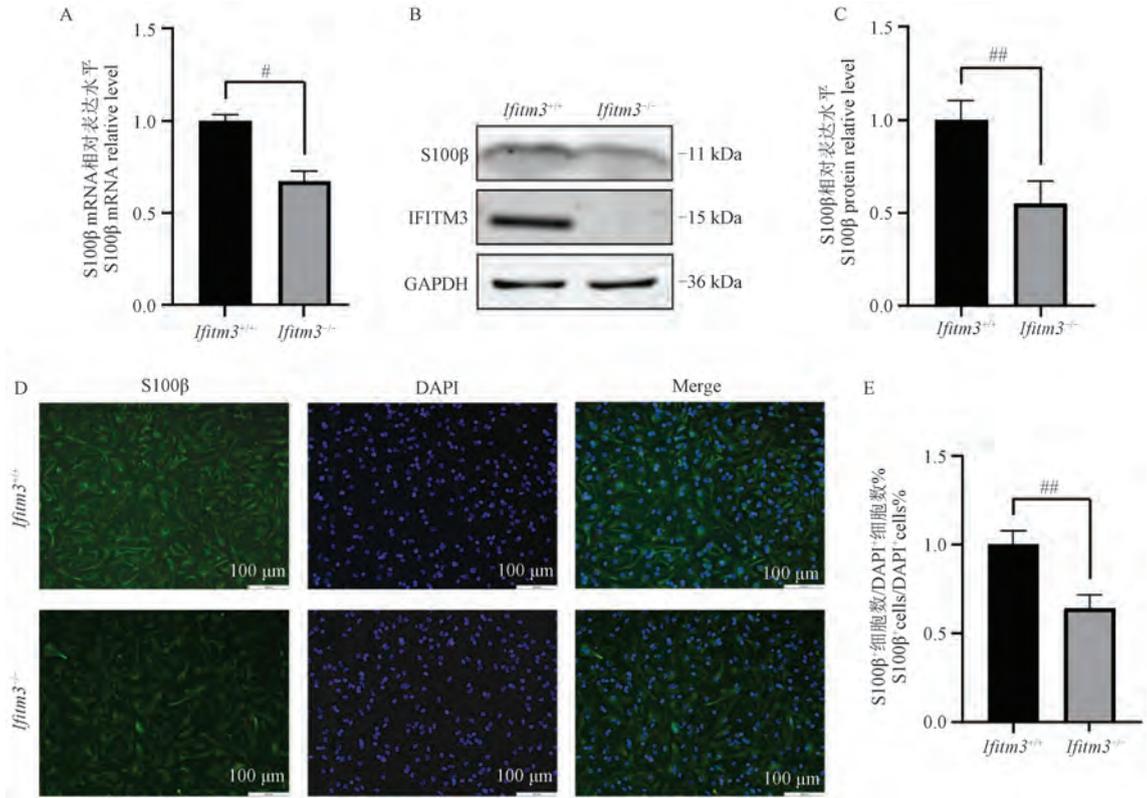


注:A: *Gfap* 的 mRNA 表达水平;B:GFAP 的蛋白表达水平;C:GFAP 蛋白相对表达水平统计图;D:GFAP 的免疫荧光;E:GFAP 阳性细胞占 DAPI 阳性细胞的比例;蓝色:DAPI;红色:GFAP。

图 7 *Ifitm3*^{+/+} 和 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠 NSCs 分化样品中星形胶质细胞标志物 GFAP 的表达 ($n = 3$)

Note. A. mRNA expression level of *Gfap*. B. Protein expression level of GFAP. C. Statistical chart of GFAP protein relative expression level. D. Immunofluorescence of GFAP. E. Proportion of GFAP positive cells in DAPI positive cells. Blue. DAPI. Red. GFAP.

Figure 7 Expression of astrocytes marker GFAP in NSCs differentiation samples of *Ifitm3*^{+/+} and *Ifitm3*^{-/-} mice ($n = 3$)



注:A:S100β 的 mRNA 表达水平;B:S100β 的蛋白表达水平;C:S100β 蛋白相对表达水平统计图;D:S100β 的免疫荧光;E:S100β 阳性细胞占 DAPI 阳性细胞的比例;蓝色:DAPI,绿色:S100β。

图 8 *Ifitm3*^{+/+} 和 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠 NSCs 分化样品中星形胶质细胞标志物 S100β 的表达 (n = 3)

Note. A. mRNA expression level of S100β. B. Protein expression level of S100β. C. Statistical chart of S100β protein relative expression level. D. Immunofluorescence of S100β. E. Proportion of S100β positive cells in DAPI positive cells. Blue. DAPI, Green. S100β.

Figure 8 Expression of astrocytes marker S100β in NSCs differentiation samples of *Ifitm3*^{+/+} and *Ifitm3*^{-/-} mice (n = 3)

究发现 *Ifitm3* 敲除造成小鼠 NSCs 自我更新和增殖能力下降,并且抑制 NSCs 向未成熟神经元和星形胶质细胞分化。

本研究分离培养小鼠脑室下区和海马区的 NSCs,发现 *Ifitm3* 敲除导致初级神经球的数量降低,次级神经球减小,表明 *Ifitm3* 敲除抑制 NSCs 的自我更新能力。检测 PCNA 表达发现 *Ifitm3* 敲除后 NSCs 增殖能力显著下降。已有研究表明,ZHAO 等^[26]发现在胶质母细胞瘤细胞系 U251 细胞中敲低 IFITM3 显著抑制细胞增殖和集落形成。JIN 等^[11]研究表明敲低 IFITM3 显著抑制视网膜祖细胞的增殖能力和细胞活力。本研究进一步揭示了 *Ifitm3* 缺失抑制 NSCs 的增殖能力。IFITM3 可通过调节细胞周期蛋白的表达影响细胞周期,从而调控细胞增殖^[6,10,26],推测 NSCs 增殖能力受损可能与细胞周期停滞相关。

此外,本研究表明 *Ifitm3* 敲除导致 NSCs 分化能力受损。实验结果显示 *Ifitm3* 敲除导致分化培养的

神经细胞中 TUJ1 的表达下调,提示 NSCs 分化为未成熟神经元的能力下降。已有研究表明 STING 信号通路在脑发育过程中对 NSCs 的分化和增殖起到重要的调控作用,STING 的缺失抑制神经元的分化^[27],而 IFITM3 与 STING 具有相互作用^[28]。因此推测 IFITM3 可能通过 STING 信号通路对小鼠神经元的分化产生影响。进一步检测星形胶质细胞标志物 GFAP 和 S100β,结果显示,GFAP 在 *Ifitm3*^{-/-} 小鼠 NSCs 体外分化的细胞中表达与 *Ifitm3*^{+/+} 小鼠无显著性差异,而 S100β 的表达显著降低。GFAP 是一种 III 型中间丝蛋白,主要在反应性星形胶质细胞中表达^[29]。表达 GFAP 的细胞包括未成熟的星形胶质细胞,其功能介于放射状胶质细胞和成熟星形胶质细胞之间,具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞前体细胞的多谱系潜能^[30-31]。而 S100β 是一种钙结合蛋白,在较成熟的星形胶质细胞中表达^[32]。MAPK 通路参与包括细胞增殖、分化、凋亡等多种细胞过程。研究表明 MAPK 通路在

调控星形胶质细胞凋亡过程中发挥重要作用^[33], 且已有研究表明 IFITM3 敲低后 ERK1/2 的表达同时降低^[11], 因此推测 IFITM3 可能通过调控 MAPK 信号通路抑制 NSCs 向成熟星形胶质细胞分化, 具体机制需进一步研究。

综上所述, 本研究发现 *Ifitm3* 敲除造成小鼠 NSCs 的增殖能力下降, 并且抑制 NSCs 向未成熟神经元和成熟星形胶质细胞分化。IFITM3 作为膜蛋白通过膜信号转导调节细胞增殖与分化的机制需要进一步探究^[34]。本研究揭示了 IFITM3 对 NSCs 自我更新潜能和分化能力的影响, 为揭示 NSCs 的增殖及分化调控机制提供理论基础, 对阐明 IFITM3 的生物学功能提供见解。

参 考 文 献 (References)

- [1] JIA R, XU F, QIAN J, et al. Identification of an endocytic signal essential for the antiviral action of *Ifitm3* [J]. Cell Microbiol, 2014, 16(7): 1080–1093.
- [2] PODDAR S, HYDE J L, GORMAN M J, et al. The interferon-stimulated gene *Ifitm3* restricts infection and pathogenesis of arthritogenic and encephalitic alphaviruses [J]. J Virol, 2016, 90(19): 8780–8794.
- [3] BORGHESEAN M, FAFIÁN-LABORA J, ELEFTHERIADOU O, et al. Small extracellular vesicles are key regulators of non-cell autonomous intercellular communication in senescence via the interferon protein *Ifitm3* [J]. Cell Rep, 2019, 27(13): 3956–3971.
- [4] LEE J, ROBINSON M E, MA N, et al. *Ifitm3* functions as a PIP3 scaffold to amplify PI3K signalling in B cells [J]. Nature, 2020, 588(7838): 491–497.
- [5] WANG H, TANG F, BIAN E, et al. *Ifitm3*/STAT3 axis promotes glioma cells invasion and is modulated by TGF- β [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(1): 433–441.
- [6] GAN C P, SAM K K, YEE P S, et al. *Ifitm3* knockdown reduces the expression of CCND1 and CDK4 and suppresses the growth of oral squamous cell carcinoma cells [J]. Cell Oncol, 2019, 42(4): 477–490.
- [7] MIN J, HU J, LUO C, et al. *Ifitm3* upregulates c-myc expression to promote hepatocellular carcinoma proliferation via the ERK1/2 signalling pathway [J]. Biosci Trends, 2020, 13(6): 523–529.
- [8] LI D, PENG Z, TANG H, et al. KLF4-mediated negative regulation of *Ifitm3* expression plays a critical role in colon cancer pathogenesis [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(11): 3558–3568.
- [9] YANG R, YANG L, LONG M, et al. Taurodeoxycholic acid-YAP1 upregulates OTX1 in promoting gallbladder cancer malignancy through *Ifitm3*-dependent AKT activation [J]. Oncogene, 2023, 42(18): 1466–1477.
- [10] YANG M, GAO H, CHEN P, et al. Knockdown of interferon-induced transmembrane protein 3 expression suppresses breast cancer cell growth and colony formation and affects the cell cycle [J]. Oncol Rep, 2013, 30(1): 171–178.
- [11] JIN C, OU Q, CHEN J, et al. Chaperone-mediated autophagy plays an important role in regulating retinal progenitor cell homeostasis [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 136.
- [12] TANAKA S S, YAMAGUCHI Y L, TSOI B, et al. IFITM/Mi/fragilis family proteins IFITM1 and *Ifitm3* play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion [J]. Dev Cell, 2005, 9(6): 745–756.
- [13] IBI D, NAGAI T, NAKAJIMA A, et al. Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice [J]. Glia, 2013, 61(5): 679–693.
- [14] HUR J Y. Innate immunity protein *Ifitm3* in Alzheimer's disease [J]. DNA Cell Biol, 2021, 40(11): 1351–1355.
- [15] HUR J Y, FROST G R, WU X, et al. The innate immunity protein *Ifitm3* modulates γ -secretase in Alzheimer's disease [J]. Nature, 2020, 586(7831): 735–740.
- [16] VIEIRA M S, SANTOS A K, VASCONCELLOS R, et al. Neural stem cell differentiation into mature neurons: Mechanisms of regulation and biotechnological applications [J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(7): 1946–1970.
- [17] FINKEL Z, ESTEBAN F, RODRIGUEZ B, et al. Diversity of adult neural stem and progenitor cells in physiology and disease [J]. Cells, 2021, 10(8): 2045.
- [18] BOND A M, MING G L, SONG H. Adult mammalian neural stem cells and neurogenesis: five decades later [J]. Cell Stem Cell, 2015, 17(4): 385–395.
- [19] SALAZAR J L, YANG S A, YAMAMOTO S. Post-developmental roles of Notch signaling in the nervous system [J]. Biomolecules, 2020, 10(7): 985.
- [20] GAO J, LIAO Y, QIU M, et al. Wnt/ β -catenin signaling in neural stem cell homeostasis and neurological diseases [J]. Neuroscientist, 2021, 27(1): 58–72.
- [21] MA Y, ZHANG L, HUANG X. Building cre knockin rat lines using CRISPR/Cas9 [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1642: 37–52.
- [22] 李欣悦, 石桂英, 雷雪裴, 等. 血清剥夺反应因子(Sdpr)敲除及转基因小鼠的建立与表型分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 7–15.
- [23] LI X Y, SHI G Y, LEI X P, et al. Establishment and phenotypic analysis of Sdpr-knockout mice and transgenic mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 7–15.
- [24] CHUTIWITONCHAI N, HIYOSHI M, HIYOSHI-YOSHIDOMI Y, et al. Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins [J]. Microbes Infect, 2013, 15(4): 280–290.
- [25] DIAMOND M S, FARZAN M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(1): 46–57.
- [26] JIMÉNEZ-MUNGUÍA I, BEAVEN A H, BLANK P S, et al. Interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) and its

- antiviral activity [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2022, 77: 102467.
- [26] ZHAO B, WANG H, ZONG G, et al. The role of *Ifftm3* in the growth and migration of human glioma cells [J]. *BMC Neurol*, 2013, 13: 210.
- [27] ZHANG D, LIU C, LI H, et al. Deficiency of STING signaling in embryonic cerebral cortex leads to neurogenic abnormalities and autistic-like behaviors [J]. *Adv Sci*, 2020, 7 (23): 2002117.
- [28] MOTANI K, KOSAKO H. BioID screening of biotinylation sites using the avidin-like protein Tamavidin 2-REV identifies global interactors of stimulator of interferon genes (STING) [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(32): 11174–11183.
- [29] ENG L F, GHIRNIKAR R S, LEE Y L. Glial fibrillary acidic protein; GFAP-thirty-one years (1969–2000) [J]. *Neurochem Res*, 2000, 25(9/10): 1439–1451.
- [30] LIU X, BOLTEUS A J, BALKIN D M, et al. GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes [J]. *Glia*, 2006, 54(5): 394–410.
- [31] GUO Z, WANG X, XIAO J, et al. Early postnatal GFAP-expressing cells produce multilineage progeny in cerebrum and astrocytes in cerebellum of adult mice [J]. *Brain Res*, 2013, 1532: 14–20.
- [32] RAPONI E, AGENES F, DELPHIN C, et al. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage [J]. *Glia*, 2007, 55(2): 165–177.
- [33] XU D, KONG T, SHAO Z, et al. Orexin-a alleviates astrocytic apoptosis and inflammation via inhibiting OX1R-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867 (11): 166230.
- [34] SEYFRIED N T, HUYSENTRUYT L C, ATWOOD J A 3rd, et al. Up-regulation of NG2 proteoglycan and interferon-induced transmembrane proteins 1 and 3 in mouse astrocytoma: a membrane proteomics approach [J]. *Cancer Lett*, 2008, 263 (2): 243–252.

[收稿日期] 2023-03-18

《中国比较医学杂志》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,《中国比较医学杂志》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)综合性医药卫生类的核心期刊!

《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。



马钺延,杨星九,史旭东,等. 双光子显微镜技术下胶质瘤-壁细胞在体多荧光示踪小鼠模型的建立及应用[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 702-711.

MA C Y, YANG X J, SHI X D, et al. Establishment and utilization of a living genetically engineered mouse model for examination of fluorescently labeled glioma cells and mural cells using two-photon microscopy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 702-711.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.003

双光子显微镜技术下胶质瘤-壁细胞在体多荧光示踪小鼠模型的建立及应用

马钺延^{1,2,3,4}, 杨星九^{1,2,3,4}, 史旭东^{1,2,3,4}, 高菁^{1,2,3,4*}

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

【摘要】 目的 建立双光子显微镜下可视化胶质瘤、壁细胞和血管的活体自发荧光的基因小鼠模型并进行评价。方法 以 PDGFR β -Cre^{+/-};Rosa26-tdTomato^{+/-} 基因工程小鼠为观察壁细胞和血管结构的载体,接种 GL261-CFP 小鼠胶质瘤细胞并对颅骨进行透明化,通过双光子显微镜动态跟踪观察胶质瘤增殖侵袭过程中血管与壁细胞的动态变化。结果 通过基因鉴定证实 PDGFR β -Cre^{+/-};Rosa26-tdTomato^{+/-} 基因工程小鼠成功繁育。对比 C57BL/6 小鼠,基因工程小鼠的形态外观和繁殖等无显著性差异,组织苏木素-伊红(HE)染色切片分析显示脏器发育无异常。Tamoxifen 诱导下基因工程小鼠的 Cre 重组酶活性至第 7 天作用完全。接种 GL261-CFP 后观察到胶质瘤增殖侵袭的动态过程及肿瘤内血管形态结构紊乱、游离壁细胞增多。结论 成功构建了荧光可视化壁细胞的基因工程小鼠,分别利用异硫氰酸荧光素-葡聚糖标记血管和青色荧光标记肿瘤细胞,使用玻璃圆片与固定环替代小鼠颅骨,实现了活体状态下长期稳定地动态跟踪小鼠接种脑肿瘤后血管及血管支持细胞的形态结构变化,为研究脑胶质瘤提供了病理可视化的动物模型。

【关键词】 双光子显微镜;胶质瘤;壁细胞;基因工程小鼠;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 06-0702-10

Establishment and utilization of a living genetically engineered mouse model for examination of fluorescently labeled glioma cells and mural cells using two-photon microscopy

MA Chengyan^{1,2,3,4}, YANG Xingjiu^{1,2,3,4}, SHI Xudong^{1,2,3,4}, GAO Ran^{1,2,3,4*}

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

Corresponding author: GAO Ran. E-mail:gaoran@cnilas.org

【Abstract】 Objective This study was performed to develop and assess a genetically engineered mouse model for visualizing *in vivo* fluorescence of glioma cells, mural cells, and blood vessels using two-photon microscopy. **Methods** PDGFR β -Cre^{+/-};Rosa26-tdTomato^{+/-} genetically engineered mice underwent skull clearance and were injected

【基金项目】国家重点研发计划(2022YFF0710700)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF0710700).

【作者简介】马钺延,男,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤转移与肿瘤动物模型。Email:m17761940482@163.com

【通信作者】高菁,女,研究员,博士,研究方向:肿瘤转移与肿瘤动物模型。Email:gaoran@cnilas.org

with GL261-CFP. This was performed to study the dynamic alterations in blood vessels and mural cells during the progression and invasion of glioma using two-photon microscopy. **Results** PDGFR β -Cre^{+/-}; Rosa26-tdTomato^{+/-} mice were successfully bred and subjected to hematoxylin-eosin section analysis of functional organ tissues. The mice exhibited no discernible differences from C57BL/6 mice in terms of appearance and morphology. Cre recombinase activity was fully induced following tamoxifen treatment on day 7. Subsequent GL261-CFP inoculation demonstrated the dynamic progression of glioma proliferation and invasion, as well as vascular abnormalities and increased mural cell detachment within the tumor. **Conclusions** Genetically engineered mice expressing fluorescent mural cells were successfully bred. Blood vessels labeled with fluorescein isothiocyanate-dextran and blue fluorescent tumor cells were utilized. Glass discs and fixed rings were employed to replace the skulls of the mice. This allowed for the tracking of morphological and structural changes in blood vessels and vascular supporting cells following the development of brain tumors *in vivo* over an extended period. This model offers a valuable tool for studying brain diseases through pathological visualization.

[Keywords] two-photon microscopy; glioma; mural cells; genetically engineered mice; animal models

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

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是最常见的颅内原发性肿瘤,致死率高、预后差,急需探索新的治疗手段^[1-2]。GBM 的恶性增殖往往伴随着血管的病变及增生。血管主要由基底膜内的内皮细胞和基底膜外的壁细胞(血管平滑肌细胞和周细胞)组成^[3]。壁细胞作为血脑屏障的重要组成部分,除了维护生理状态下血管的结构与稳态,还在调节功能性血流量^[4]、启动新生血管形成和促进血管成熟中发挥重要作用^[5-6]。胶质瘤干细胞能够生成壁细胞来促进肿瘤增殖^[7];壁细胞作为肿瘤微环境中的一部分,与肿瘤干细胞的相互转分化促进了肿瘤的转移与定植^[8];壁细胞在胶质瘤中参与形成血肿瘤屏障,过滤了大多数抗癌药物和免疫细胞对肿瘤的浸润,靶向敲除后能够促进化疗药物的浸润^[9]。然而壁细胞在胶质瘤中的动态变化和作用机制尚不明确,因此,建立可视化追踪胶质瘤-壁细胞变化的动物模型是研究和治疗胶质瘤的重要工具。

血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 由内皮细胞分泌,并与壁细胞上的同源受体 (PDGFR β) 结合^[10],是负责内皮细胞-壁细胞相互作用的分子^[11-13]。此外,血管生成和血管重塑过程中壁细胞的募集依赖于 PDGF/PDGFR 信号^[14]。PDGFR β 能有效识别所有的血管壁细胞,而神经胶质抗原 2 (neural/glial antigen 2, NG2)、黑色素瘤细胞粘附分子 (CD146) 等其他标志物在不同的壁细胞表型中呈现异质性分布,特异性不高^[15-16]。NG2 于血管生成期间的壁细胞表面表达,主要用于标记幼鼠大脑的壁细胞,同时也在少突胶质细胞祖细胞和施万细胞上表达^[17-19];CD146 参与 PDGFR β 的激活与血脑屏障的完整性,可用作脑壁细胞的标记物,但 CD146 在大血管中的表达显著高于小血

管,而且也在血脑屏障发育中的内皮细胞上表达^[20-21]。因此,选用介导 Cre 重组酶表达的 PDGFR β -Cre^{+/+}小鼠与 Rosa26-tdTomato^{+/+}繁育的后代作为载体,其在 Tamoxifen 诱导下,壁细胞可特异性表达红色荧光蛋白。

目前在影像学方面研究胶质瘤的方法主要有两类:一类是构建能稳定表达荧光素酶的胶质瘤细胞株,通过传统小动物活体荧光成像 (small animal optical *in vivo* imaging) 观察肿瘤的生长及转移,发光强度与肿瘤细胞的数目呈线性相关;另一类是核磁共振成像技术 (magnetic resonance imaging, MRI),MRI 使用强磁场、磁场梯度和无线电波来生成体内器官的图像,但无法跟踪胶质瘤具体的动态变化。而双光子显微技术不仅可以观察胶质瘤的增殖和脑转移,还可以跟踪显示目的区域的动态变化^[22]。根据瑞利散射定理:散射量与波长的四次方成反比^[23]。双光子显微镜使用两个光子激发荧光,散射减少,可以提高信噪比,从而激发更深位置的生物组织荧光。基于此,本研究选用 CFP 荧光蛋白标记胶质瘤细胞系 GL261, FITC-dextran 标记血管,壁细胞自发红色荧光的基因小鼠,建立通过双光子显微成像技术长期动态跟踪观察的胶质瘤-壁细胞荧光活体基因小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只 8 ~ 12 周龄 SPF 级雄性 B6. Cg-*Pdgfrb*^{tm1.1(cre/ERT2)Csln}/J 小鼠 (简称为 PDGFR β -Cre^{+/+}),体重 18 ~ 24 g,购自美国杰克逊实验室 (stock no. 030201);8 ~ 12 周龄 SPF 级雌性 B6.

Cg-Gt(*ROSA*)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)^{Hze}/J}小鼠 30 只(简称为 Rosa26-tdtomato^{+/+}),体重 18 ~ 24 g,购自美国杰克逊实验室(stock no. 007914)。PDGFRβ-Cre^{+/+}与 Rosa26-tdTomato^{+/+}配种繁育的子代用于实验研究。所有小鼠均饲养在中国医学科学院医学实验动物研究所动物房 SPF 级屏障环境中【SYXK(京)2019-0014】,提供不受限制的食物和水;温度控制在 22 ~ 25 °C;相对湿度控制在 40% ~ 70%;明暗周期为 12 h/12 h,以建立昼夜节律。所有动物实验均按照《北京市动物实验福利条例》进行,并经中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会批准(IACUC: GR20005)。

1.1.2 细胞系

GL261 小鼠胶质瘤细胞系来源于北京协和医学院细胞资源中心(PCRC)。采用 DAPI 染色法检测细胞的支原体感染情况。在含 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养细胞系。

1.1.3 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;麻醉剂异氟烷(isoflurane)购自瑞沃德公司;异硫氰酸荧光素-葡聚糖(fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran, HY-1288681);CFP 慢病毒(吉凯基因);复方氯胺酮注射液(中牧倍康);青霉素(AMRESCO, 69-57-8);脱毛膏(薇婷);眼膏(Bepanthen, 87419290);牙科水泥乙基氰基丙烯酸酯液体(DW6993443, HAGER);美洛昔康注射液(美康,保定阳光本草药业有限公司)。

手术器械(FST 公司,德国);立体定位仪(瑞沃德,中国);Hamilton 注射针筒(瑞沃德,7635-01,中国);注射器针头-6 cm 尖头 31 G(瑞沃德,7803-03,中国);台式双目体视显微镜(瑞沃德,77001,中国);微型手持颅钻(瑞沃德,78001,中国);钻头 0.5 mm HM1005-圆头(瑞沃德,78040,中国);300 g 热玻璃珠灭菌器(瑞沃德,RS3002,中国);Cover Slips 玻璃圆片(Avantor, 631-0168,美国);TCS SP8 DIVE 双光子共聚焦显微镜(徕卡,德国)。

1.2 方法

1.2.1 基因工程小鼠的繁殖与鉴定

将壁细胞特异性 PDGFRβ-Cre^{+/+}小鼠与 Rosa26-tdTomato^{+/+}小鼠杂交,产生 Tamoxifen 诱导下壁细胞特异性表达 tdTomato 红色荧光蛋白的 PDGFRβ-Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+}小鼠用于实验。

PDGFRβ-Cre PCR 引物:野生型引物:5'-AGCT TGTGGCAGTGTAGCTG-3';突变型引物:5'-ACATG TCCATCAGGTTCTTTCG-3'。共用引物:5'-CCACCTT GAATGAAGTCAACAC-3'。Rosa26-tdTomato PCR 引物:野生型正向引物:5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAG TA-3',反向引物:5'-CCGAAAATCTGTGGGAAGTC-3'。突变正向引物:5'-CTGTTCTGTACGGCATGG-3',反向引物:5'-GGCATTAAAGCAGCGTATCC-3'。所有引物根据杰克逊实验室官网的序列订购自生物工程股份有限公司(Sango Biotech)。

PCR 反应在 20 μL 反应中分别加入 10 μL PreMix TaqTM(TaKaRa 2.0 plus dye)、2 μL 鼠尾基因组 DNA、1 μL 10 nmol/L 前向引物和反向引物,最后加入 6 μL ddH₂O。PCR 程序在 95 °C 初始变性 5 min, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s 的 35 个循环中运行,最后在 72 °C 延长 10 min。

1.2.2 慢病毒感染实验

用完全培养基制备 5 × 10⁴/mL 的 GL261 细胞悬液,并于 6 孔板中每孔接种 2 mL。37 °C 培养 24 h,在 MOI = 100 的条件加入 CFP 慢病毒,继续培养 16 h,中途换液保持细胞活性。感染约 72 h 后,加入 500 μg/mL G418 筛选至稳定。

1.2.3 器官组织形态学观察

各取 3 只 8 周龄的 C57BL/6 和 PDGFRβ-Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+}小鼠的脑、心脏、肺、肝、脾和肾等器官于 4% 多聚甲醛中固定,24 h 换固定液 1 次,固定 48 h,脱水、透明、石蜡包埋。苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下拍照。

1.2.4 玻璃颅窗动物模型的手术制备方法

提前 4 周准备颅窗,小鼠使用异氟烷气体麻醉诱导,术中麻醉采用腹腔注射氯胺酮、甲苯噻和盐酸苯甲酸盐(注射剂量 0.0375、0.0375、0.000 125 mg/g)麻醉小鼠。皮下注射青霉素(40 mg/kg)减少感染。小鼠麻醉完全后,使用脱毛膏除净小鼠头部的毛发。随后将小鼠固定在立体定位仪上。使用眼膏以避免小鼠眼部脱水和刺激。剪去头皮,使用颅钻轻轻磨去颅骨,用镊子挑去硬脑膜。用直径 6 mm 的透明颅窗覆盖大脑,并用牙科水泥乙基氰基丙烯酸酯液体(简称牙科水泥)密封。术后皮下注射 4 剂镇痛药:每隔 6 h 注射一剂美洛昔康注射液(0.1 mg/kg)。第-2、-1、0 天每天腹腔注射一剂他莫昔芬(75 mg/kg),在第 3、5、7、14 天使用双光子活体动态跟踪观察,见图 1。

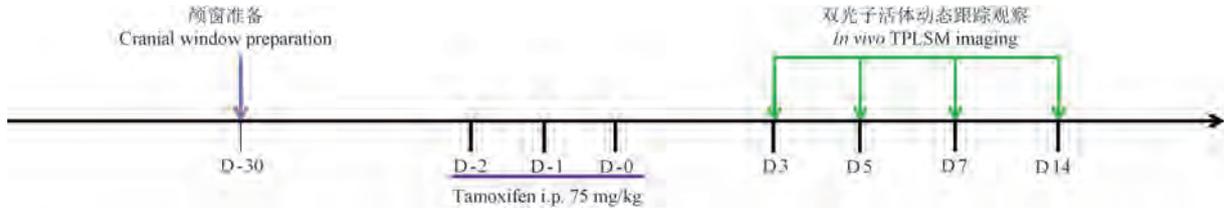


图 1 生理状态下小鼠模型制备与观察的时间轴

Figure 1 Timeline of mouse model preparation and observation in a physiological state

1.2.5 胶质瘤活体动物模型制备方法

首先制备使用玻璃颅窗替代颅骨的小鼠,4 周后除去小鼠脑表的玻璃片与固定环,用 2500 μL PBS 制备 GL261-CFP 细胞悬液,使用 10 μL 的汉密尔顿微量注射器和 6 cm-31 G 针头,与水平面成 60° 的方向将含 5×10^3 GL-261-CFP 的细胞悬液以 0.5 mm/min 的速度立体定向到小鼠脑内,进针深度 1.5 mm,停留 2 min 后,退至 1 mm 深度,以 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 注射 2 μL 肿瘤细胞悬液,注射完停针 5 min 后缓慢退针。注射点位于矢状窦外侧约 1 mm,前囱前方约 2 mm,脑实质内深度 1 mm。注射完毕后停留 5 min 后,以 1 mm/min 的速度退针。使用生理盐水清洁脑表,使用牙科水泥粘住玻璃圆片与固定环。术后皮下注射 4 针镇痛药:每隔 6 h 注射一剂美洛昔康注射液(0.1 mg/kg),见图 2。

1.2.6 双光子显微镜观察

图像采集使用徕卡 TCS SP8 DIVE 共聚焦显微镜,配备变色龙超激光系统(680 ~ 1300 nm)和 $25 \times$

水浸物镜(数值孔径 0.95)。单幅图像采集深度为 0 ~ 300 μm ,深度 z :间隔为 3 μm 。FITC-dextran 与 TdTomato 的激发波长为 975 nm, GL261-CFP 的激发波长为 860 nm, 1024×1024 像素。为了显示脑血管,通过小鼠尾静脉注射 10 mg/mL 的 FITC-dextran (2×10^6 分子量,绿色)0.2 mL。TdTomato 的发射波长为 570 ~ 640 nm, FITC-dextran 的发射波长为 500 ~ 550 nm, GL261-CFP 肿瘤细胞的发射波长为 450 ~ 490 nm。用异氟醚麻醉小鼠,以 0.8% ~ 2.0% (根据小鼠身体状况尽可能低的流量)恒定流量(1 mL/min)维持。激光功率也限制在最低百分比,尽量避免光毒性。

1.3 统计学分析

通过双光子显微镜获取到的 IMS 文件,由 Imaris x64 9.7.2 软件量化分析。计量资料均以平均值 \pm 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 描述,采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

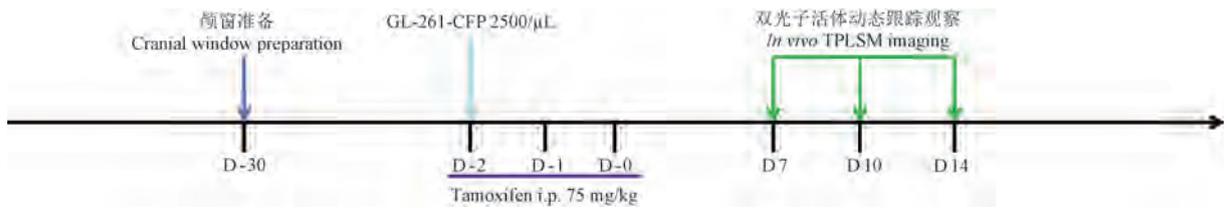


图 2 双光子显微镜技术下胶质瘤-壁细胞在体多荧光示踪小鼠模型制备的时间轴

Figure 2 Timeline of the mouse model preparation of fluorescently labeled glioma cells and mural cells using two-photon microscopy

2 结果

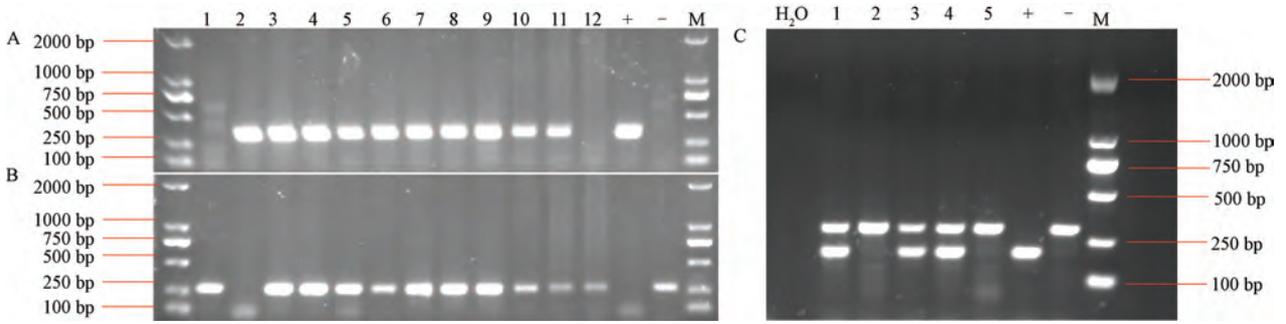
2.1 PDGFR β -Cre $^{+/-}$: Rosa26-tdTomato $^{+/-}$ 基因鉴定

通过试剂盒提取鼠尾基因组 DNA 并进行 PCR 扩增,使用凝胶电泳实验鉴定产物。PDGFR β -Cre 野生型等位基因的条带大小为 272 bp, PDGFR β -Cre 突变型等位基因的条带大小约为 320 bp。Rosa26-tdTomato 突变等位基因条带大小约 200 bp, 野生型

等位基因条带大小约为 297 bp。经鉴定,图 3A ~ 3B 中的 1 号、12 号样品为 PDGFR β -Cre $^{-/-}$, 2 号样品为 PDGFR β -Cre $^{+/+}$, 3 ~ 11 号样品为 PDGFR β -Cre $^{+/-}$ 。图 3C 中的 1 号、3 号、4 号样品为 Rosa26-tdTomato $^{+/-}$, 2 号、5 号样品为 Rosa26-tdTomato $^{-/-}$ 。

2.2 PDGFR β -Cre $^{+/-}$: Rosa26-tdTomato $^{+/-}$ 小鼠表型分析

C57BL/6 遗传背景的 PDGFR β + 细胞特异性携带红色荧光的小鼠与 C57BL/6 小鼠的外观形态、



注:A:PDGFR β -Cre 突变型产物;B:PDGFR β -Cre 野生型产物;+ :PDGFR β -Cre 突变型对照;-:野生型对照;C:Rosa26-tdTomato 的基因鉴定产物;+ :Rosa26-tdTomato 阳性对照;-:Rosa26-tdTomato 阴性对照。

图 3 小鼠的基因鉴定

Note. A. PDGFR β -Cre mutant product. B. PDGFR β -Cre wild type product. +. PDGFR β -Cre mutant control. -. Wild type control. C. Gene identification products of Rosa26-tdTomato. +. Positive control of Rosa26-tdTomato. -. Negative control of Rosa26-tdTomato.

Figure 3 Genetic identification of mice

生长速度、繁殖能力无显著性差异。HE 结果显示, PDGFR β -Cre^{+/-};Rosa26-tdTomato^{+/-}小鼠与 C57BL/6 小鼠的脑、肺、心脏、肝、脾和肾等无显著性差异(图 4)。

2.3 PDGFR β -Cre^{+/-};Rosa26-tdTomato^{+/-}小鼠手术颅窗

准备 8 ~ 12 周龄的 PDGFR β -Cre^{+/-};Rosa26-tdTomato^{+/-}小鼠,以矢状缝与冠状缝焦点(前囟)为

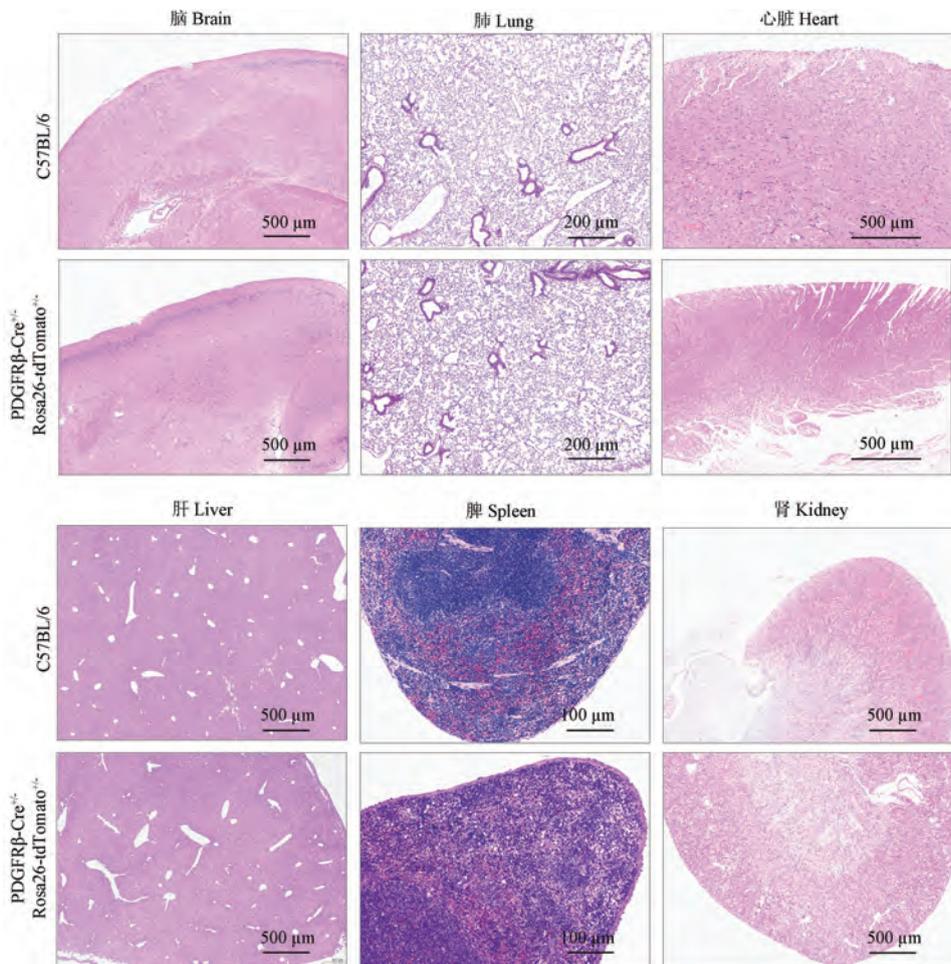


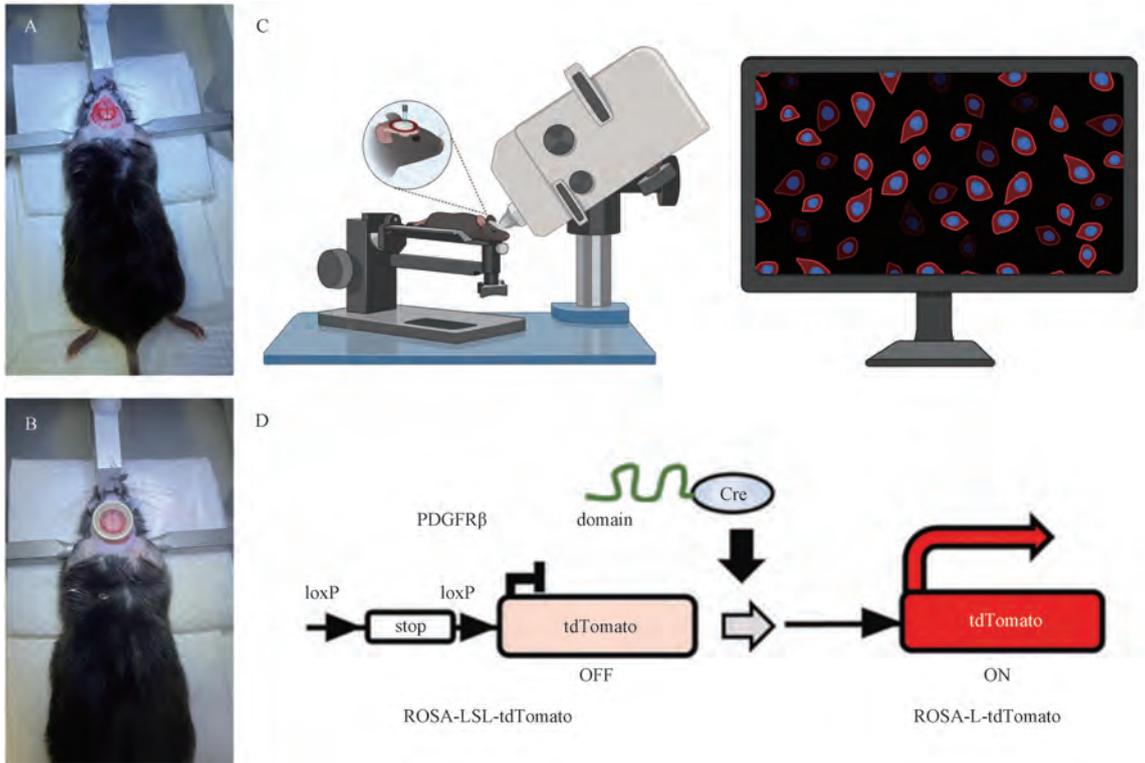
图 4 主要器官组织形态学

Figure 4 Histomorphology of the principal organs

圆心,使用颅钻轻柔地磨去直径 6 mm 的颅骨,在脑表贴上 6 mm 的玻璃圆片(图 5A)。围绕玻璃圆片在干燥的颅骨表面填涂牙科水泥,立刻放置固定环,在固定环与颅骨的间隙补充涂满牙科水泥使之粘牢(图 5B),等待 4 周使小鼠大脑中因手术造成的炎症消退后,使用异氟烷麻醉小鼠固定于双光子显微镜下,尾静脉注射 200 μ L FITC-dextran,进行活体

双光子显微镜图像采集(图 5C)。

在无 Tamoxifen 诱导的情况下,PDGFR β -CreERT2 在细胞质内处于无活性状态;当 Tamoxifen 诱导后,Tamoxifen 的代谢产物 4-OHT(雌激素类似物)与 ERT 结合,可使 PDGFR β -CreERT2 进核发挥 Cre 重组酶活性,切掉 LoxP 位点之间的终止子,诱导 tdTomato 红色荧光蛋白表达(图 5D)。



注:A:磨去小鼠颅骨的效果图;B:借助牙科水泥使用固定环与玻璃圆片替代小鼠的颅骨;C:在双光子显微镜下获取图像;D:PDGFR β -Cre 切割 LoxP 的原理图。

图 5 PDGFR β -Cre^{+/−}; Rosa26-tdTomato^{+/−}小鼠的长期颅窗制备

Note. A. All illustration of mouse skull that grinded. B. Skulls of mice were replaced with fixation rings and glass discs using dental cement. C. Observed under a two-photon microscope. D. Schematic diagram of PDGFR β -Cre cutting LoxP.

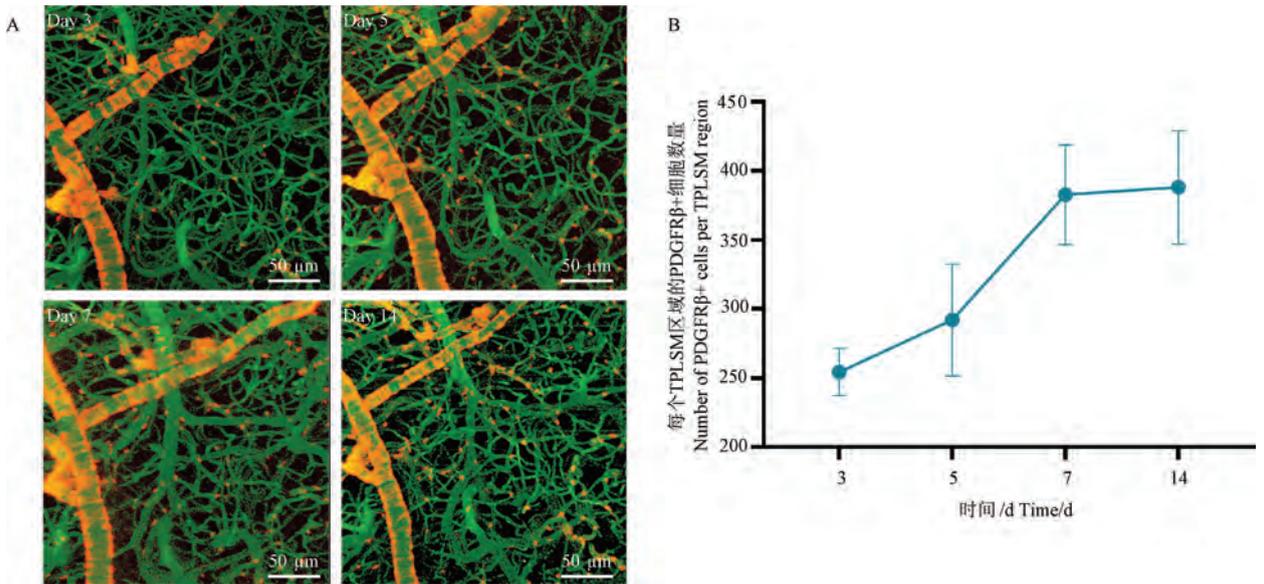
Figure 5 Long-term cranial window preparation in PDGFR β -Cre^{+/−}; Rosa26-tdTomato^{+/−} mice

2.4 PDGFR β -Cre^{+/−}; Rosa26-tdTomato^{+/−}小鼠模型的活体双光子显微成像

第 -30 天取 3 只 PDGFR β -Cre^{+/−}; Rosa26-tdTomato^{+/−}小鼠手术制备颅窗,第-2、-1、0 天每只每天以 75 mg/kg 剂量腹腔注射 1 针 Tamoxifen。第 3 天开始进行双光子动态跟踪拍摄(图 6A),可以观察到,从第 3 ~ 7 天,PDGFR β -Cre 诱导的 tdTomato 红色荧光蛋白表达逐渐增加(图 6B),至第 7 天以后 PDGFR β + 细胞中红色荧光表达趋于稳定(图 6B)。证明 Tamoxifen 诱导下,所有 PDGFR β + 的细胞表达红色荧光蛋白需要 7 d 左右的代谢期。

2.5 构建基于 PDGFR β -Cre^{+/−}; Rosa26-tdTomato^{+/−}小鼠的胶质瘤模型

使用 CFP 慢病毒感染 GL261 细胞 72 h 后,通过 500 μ g/mL G418 筛选至稳定。GL261-CFP 在荧光显微镜下发出青蓝色荧光(图 7A)。将 5×10^3 个 GL261-CFP 细胞缓慢注射到大脑皮层(图 7B)。注射点选在前囟两侧 1 mm,前方 2 mm 处(图 7C)。注射完毕后使用生理盐水温柔地清洁脑表,贴上玻璃圆片,沿着玻璃圆片涂上牙科水泥,立刻放置固定环。胶质瘤的 HE 染色(虚线所示)可见多形性胶质瘤细胞,细胞核增大深染,胞浆嗜酸性染色阳性

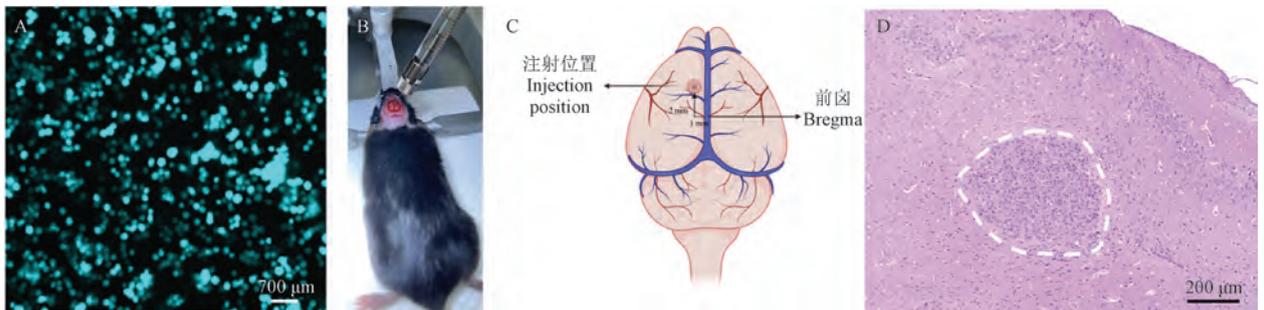


注:A:动态跟踪拍摄生理条件下血管(绿色)与壁细胞的(红色)的变化;B:拍摄区域壁细胞数量变化曲线。

图 6 使用 PDGFRβ-Cre^{+/+};Rosa26-tdTomato^{+/+}小鼠模型观察壁细胞与血管的效果($n = 3$)

Note. A. Dynamic tracking of changes in blood vessels (green) and parietal cells (red) under physiological conditions. B. Curve of mural cell number change in the photographed area.

Figure 6 Effects of mural cells and blood vessels observed by a PDGFRβ-Cre^{+/+};Rosa26-tdTomato^{+/+} mouse model($n = 3$)



注:A:GL261 细胞系携带青色荧光;B:在 PDGFRβ-Cre^{+/+};Rosa26-tdTomato^{+/+}大脑皮层中接种胶质瘤;C:胶质瘤接种的位置;D:HE 染色显示多形性胶质瘤细胞,细胞核增大深染,胞浆嗜酸性染色阳性。

图 7 基因小鼠大脑内接种 GL261-CFP 细胞

Note. A. GL261 cell line was transfected with cyan fluorescence. B. Gliomas were seeded in PDGFRβ-Cre^{+/+};Rosa26-tdTomato^{+/+} cerebral cortex. C. Location of glioma inoculation. D. HE staining showed pleomorphic glioma cells with enlarged nucleus and positive eosinophilic staining in the cytoplasm.

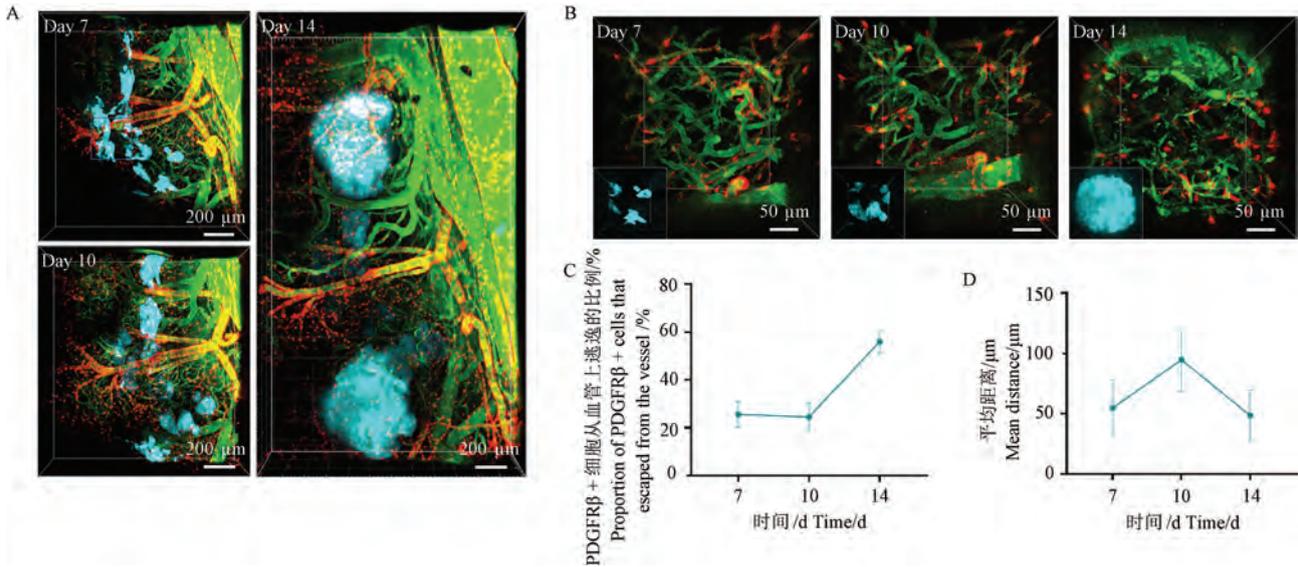
Figure 7 GL261-CFP cells were inoculated into the brains of transgenic mice

(图 7D)。

2.6 胶质瘤内壁细胞及血管形态结构异常

如图 2 所示的时间线所示,第 -30 天于 PDGFRβ-Cre^{+/+};Rosa26-tdTomato^{+/+}小鼠准备颅窗,第 -2 天接种 5×10^3 个 GL261-CFP 细胞,第 -2、-1、0 天每天以 75 mg/kg 腹腔注射 1 针他莫昔芬。如图 8A 所示,第 7 天通过双光子显微镜观察到胶质瘤侵袭增殖,第 10 天观察到胶质瘤形成多发性病灶,第 14 天观察到胶质瘤占位明显,肿瘤内血管失

去正常形态。选取 3 只小鼠第 7 ~ 14 天的 $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$ 的区域跟踪分析统计(图 8B),第 7 天 25.65% 的 PDGFRβ + 壁细胞游离出血管壁,第 14 天多达 56.11% 的 PDGFRβ + 壁细胞游离出血管壁(图 8C)。从第 7 ~ 10 天,壁细胞与血管表面的平均距离由 $54.87 \mu\text{m}$ 上升为 $94.86 \mu\text{m}$,证明有更多的壁细胞游离出血管;第 14 天,破碎的血管脉络增多、新生血管形成,造成血管与游离的壁细胞平均距离降低,为 $48.51 \mu\text{m}$ (图 8D)。综上,双



注: A: 动态跟踪拍摄胶质瘤(青色)增殖侵袭过程中血管(绿色)与壁细胞(红色)的变化; B: 跟踪统计分析相同大小区域的肿瘤中血管与壁细胞的变化; C: 量化统计区域中游离出血管的壁细胞比例变化折线图; D: 量化统计区域中壁细胞与血管表面距离的变化折线图。

图 8 双光子胶质瘤-壁细胞荧光活体基因小鼠模型建立与评价($n = 3$)

Note. A. Dynamic tracking of the changes of blood vessels (green) and mural cells (red) during the proliferation and invasion of glioma (cyan), depth. B. Statistically analyze alterations in blood vessels and mural cells within tumors of equivalent area. C. Line graph illustrating variations in the percentage of mural cells that detached from blood vessels within the statistical region. D. Quantifying the distance between mural cells and the surface of blood vessels within the statistical area.

Figure 8 Establishment and evaluation of a two-photon glioma-mural cell fluorescent *in vivo* genetically engineered mouse model($n = 3$)

光子胶质瘤-壁细胞荧光活体基因小鼠能够精确地从细胞层面上观察到胶质瘤侵袭增殖的过程,以及肿瘤内血管结构的变化。

3 讨论

研究胶质瘤与壁细胞的相互作用离不开有效的动物模型,借助双光子荧光显微镜可以在活体水平形象化、数据化胶质瘤、血管和壁细胞的动态变化,为研究大脑微环境中肿瘤与壁细胞的生物学特征提供了高效的工具。传统小动物活体荧光成像只能从二维层面上半定量肿瘤的生长及转移,无法具体到三维立体的细胞层面;核磁成像技术虽然能够精确地测量肿瘤的增殖大小,但由于价格高、时间长、操作繁琐以及无法展现肿瘤内具体的血管结构等原因,并不适合长期频繁地跟踪肿瘤的动态变化。在本研究中,研究人员借助 CFP 荧光蛋白标记胶质瘤细胞系 GL261,小鼠尾静脉注射 FITC-dextran 标记血管,壁细胞条件性表达 tdTomato 红色荧光的小鼠,构建了在双光子显微镜下能够良好地模拟胶质瘤增殖中血管和壁细胞动态变化并且可以观察量化、统计参数的小鼠模型。

第一个双光子显微镜系统由 DENK 等^[24]于 1990 年开发。与共聚焦成像相比,其提供高分辨率成像(亚微米),具有更低的光毒性和更深的组织穿透力。双光子显微镜能够在活组织内长时间成像(几百微米),光漂白几乎可以忽略不计,是迄今为止长时程在体观察生物组织的最佳选择。双光子显微镜是用于全景式解析脑图谱和功能动态图谱的最广泛的研究工具之一^[25],例如学习记忆、原发性和转移性脑肿瘤、阿尔茨海默病等脑疾病。与大多数类型的荧光显微镜一样,可视化需要外源导入表达荧光蛋白的信号源,这可能会限制应用的细胞范围,目前转基因小鼠品系的名单有限,可供研究者选择的较少,但随着如 CRISPR/Cas9、Cre-Loxp 等基因编辑工具的引入,相信可供双光子显微镜成像的动物模型会越来越多。在选择多种荧光时,发射波相近的荧光蛋白之间的串色问题也会困扰研究者。应用的动物模型方面,除了在脑部疾病的示踪观察应用外,在皮肤、肺、肾等方面也获得了应用,但由于胸腔负压与腹腔脏器移动的原因,限制了肺窗、肾窗等技术下对肺、肾的长期示踪观察。临床应用方面,许多研究已经将双光子显微镜用于人体

成像和疾病诊断,包括眼部成像、血管和心血管成像、药物递送成像、肝或其他器官纤维化诊断、皮肤病诊断等^[26-27]。例如,在皮肤黑色素瘤的诊断上,研究人员检查了 83 例患者的色素皮肤,区分痣和黑色素瘤的准确率高达 97%^[28-30]。

本实验采用 Cre-LoxP 系统构建了 Tamoxifen 诱导下壁细胞特异性表达 tdTomato 红色荧光蛋白的基因工程小鼠,通过提取鼠尾 DNA、PCR 扩增和凝胶电泳等实验验证 PDGFR β -Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+}的成功繁育构建;组织 HE 染色显示基因工程小鼠与 C57BL/6 小鼠的脑、肺、心脏、肝、脾和肾等功能性脏器间无显著性差异;通过正常 PDGFR β -Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+}小鼠的颅窗观察到 PDGFR β + 的细胞表达红色荧光蛋白需要 7 d 左右的代谢期;小鼠颅内接种 GL261-CFP 后,观察到胶质瘤内血管紊乱,壁细胞变形游离增多,游离比例由第 7 天的 25.65% 增到第 14 天的 56.11%,完整地示踪了胶质瘤与壁细胞的动态变化。目前尚未有使用双光子活体成像技术对该类模型进行相关研究的报道。

原发性脑肿瘤,尤其是胶质母细胞瘤,是治疗耐药性最强的肿瘤之一,同时化疗药物难以透过血脑屏障,造成了大部分疗法都难以阻止它们的快速增殖。壁细胞作为血脑屏障的一部分,在胶质瘤增殖过程中发挥着巨大的作用。因此本研究构建壁细胞自发荧光的 PDGFR β -Cre^{+/+}; Rosa26-tdTomato^{+/+}基因小鼠,分别借助异硫氰酸荧光素-葡聚糖标记血管和青色荧光肿瘤细胞,在双光子显微活体成像技术下,为研究胶质瘤的发病、侵袭、转移和治疗等提供了一种具备高对比度、高穿透深度、低光毒性的动物模型。该模型有望为胶质瘤治疗药物的开发和疗效评价提供有力的工具。

参 考 文 献(References)

[1] MUIR M, GOPAKUMAR S, TRAYLOR J, et al. Glioblastoma multiforme: novel therapeutic targets [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(7): 605-614.

[2] LI M, LI G, KIYOKAWA J, et al. Characterization and oncolytic virus targeting of FAP-expressing tumor-associated pericytes in glioblastoma [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8(1): 221.

[3] VANLANDEWIJCK M, HE L, MÄE M A, et al. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature [J]. *Nature*, 2018, 554(7693): 475-480.

[4] HARTMANN D A, BERTHIAUME A A, GRANT R I, et al. Brain capillary pericytes exert a substantial but slow influence on

blood flow [J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(5): 633-645.

[5] NEHLS V, DENZER K, DRENCKHAHN D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis *in situ* [J]. *Cell Tissue Res*, 1992, 270(3): 469-474.

[6] YONEKURA H, SAKURAI S, LIU X, et al. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(49): 35172-35178.

[7] CHENG L, HUANG Z, ZHOU W, et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth [J]. *Cell*, 2013, 153(1): 139-152.

[8] HUANG Q, LIU L, XIAO D, et al. CD44⁺ lung cancer stem cell-derived pericyte-like cells cause brain metastases through GPR124-enhanced trans-endothelial migration [J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(9): 1621-1636.

[9] ZHOU W, CHEN C, SHI Y, et al. Targeting glioma stem cell-derived pericytes disrupts the blood-tumor barrier and improves chemotherapeutic efficacy [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(5): 591-603.

[10] SENNINO B, FALCÓN B L, MCCAULEY D, et al. Sequential loss of tumor vessel pericytes and endothelial cells after inhibition of platelet-derived growth factor B by selective aptamer AX102 [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(15): 7358-7367.

[11] DORE-DUFFY P, KATYCHEV A, WANG X. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(5): 613-624.

[12] DORE-DUFFY P, MEHEDI A, WANG X, et al. Immortalized CNS pericytes are quiescent smooth muscle actin-negative and pluripotent [J]. *Microvasc Res*, 2011, 82(1): 18-27.

[13] DORE-DUFFY P, CLEARY K. Morphology and properties of pericytes [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 686: 49-68.

[14] SEMELA D, DAS A, LANGER D, et al. Platelet-derived growth factor signaling through ephrin-b2 regulates hepatic vascular structure and function [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(2): 671-679.

[15] RUSTENHOVEN J, JANSSON D, SMYTH L C, et al. Brain pericytes As mediators of neuroinflammation [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(3): 291-304.

[16] PAYNE L B, ZHAO H, JAMES C C, et al. The pericyte microenvironment during vascular development [J]. *Microcirculation*, 2019, 26(8): e12554.

[17] HUGHES S, CHAN-LING T. Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina *in vivo* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(8): 2795.

[18] SCHULTZ N, BYMAN E, FEX M, et al. Amylin alters human brain pericyte viability and NG2 expression [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(4): 1470-1482.

[19] NARANJO O, OSBORNE O, TORICES S, et al. *In vivo* targeting of the neurovascular unit: challenges and advancements [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2022, 42(7): 2131-2146.

[20] SMYTH L C D, RUSTENHOVEN J, SCOTTER E L, et al.

- Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells [J]. *J Chem Neuroanat*, 2018, 92: 48–60.
- [21] GUEZGUEZ B, VIGNERON P, LAMERANT N, et al. Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor [J]. *J Immunol*, 2007, 179(10): 6673–6685.
- [22] HARTMANN D A, UNDERLY R G, GRANT R I, et al. Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice [J]. *Neurophotonics*, 2015, 2(4): 041402.
- [23] FRANK K H, KESSLER M, APPELBAUM K, et al. Measurements of angular distributions of Rayleigh and Mie scattering events in biological models [J]. *Phys Med Biol*, 1989, 34(12): 1901–1916.
- [24] DENK W, STRICKLER J H, WEBB W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73–76.
- [25] DE GIORGI V, MASSI D, SESTINI S, et al. Combined non-linear laser imaging (two-photon excitation fluorescence microscopy, fluorescence lifetime imaging microscopy, multispectral multiphoton microscopy) in cutaneous tumours: first experiences [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2009, 23(3): 314–316.
- [26] GUO H, ALEYASIN H, HOWARD S S, et al. Two-photon fluorescence imaging of intracellular hydrogen peroxide with chemoselective fluorescent probes [J]. *J Biomed Opt*, 2013, 18(10): 106002.
- [27] CAMPAGNOLA P. Second harmonic generation imaging microscopy: applications to diseases diagnostics [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(9): 3224–3231.
- [28] KOEHLER M J, SPEICHER M, LANGE-ASSCHENFELDT S, et al. Clinical application of multiphoton tomography in combination with confocal laser scanning microscopy for *in vivo* evaluation of skin diseases [J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(7): 589–594.
- [29] WANG B G, KÖNIG K, HALBHUBER K J. Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research [J]. *J Microsc*, 2010, 238(1): 1–20.
- [30] DIMITROW E, RIEMANN I, EHLERS A, et al. Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis [J]. *Exp Dermatol*, 2009, 18(6): 509–515.

[收稿日期] 2023-03-13

利用小鼠模型、细胞平台和人类临床数据对头颈部鳞状细胞癌进行系统遗传学分析

肺癌是全世界严重威胁人类生命的癌症死亡原因。尽管手术和化疗提供了生存可能,但复发性晚期肺癌患者经常加重,且预后仍然很差。近年来,随着免疫检查点抑制剂(ICIs)治疗复发性和难治性肺癌的突破,深入了解肿瘤免疫系统越来越受到重视。诱导性 T 细胞共刺激剂(T-cell co-stimulator, ICOS)属于 B7-CD28 免疫球蛋白家族,通过与唯一配体(inducible T-cell co-stimulator and its ligand, ICOSL)结合,在调节 T 细胞激活和分化中发挥重要作用。ICOS 或 ICOSL 在各种癌症类型中失调,并有助于肿瘤免疫逃逸。然而,ICOS/ICOSL 在肺癌中的作用尚不十分清楚。本文开展了关于 ICOS 和 ICOSL 在中国患者肺癌中的表达和预后的综合性探索研究。借助 TCGA 数据挖掘探讨了人类 NSCLC 中 ICOS 和 ICOSL 的表达及其与临床结果的相关性,同时使用选定的肺癌患者新鲜切除的肿瘤组织进行免疫组织化学分析。结果表明 ICOS/ICOSL 轴激活可能影响肿瘤分期、总生存期(overall survival, OS)和无病生存期(disease-free interval, DFS)。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(5):464-473. doi: 10.1002/ame2.12355)。

王婕,陈雯佳,林文武,等. 围绝经期综合征肾阴虚证大鼠汗液分泌及其生化指标的变化[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 712-720.

WANG J, CHEN W J, LIN W W, et al. Sweat secretion and biochemical indexes in Yin-deficient ovariectomized rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 712-720.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.004

围绝经期综合征肾阴虚证大鼠汗液分泌及其生化指标的变化

王婕,陈雯佳,林文武,王颖峥,王英豪,黄美霞*

(福建中医药大学药学院,福州 350122)

【摘要】 目的 评估围绝经期综合征肾阴虚证“病证结合”模型大鼠的汗液分泌情况,并探讨其生化指标的变化。方法 将18只SD雌性大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性药组,每组6只。假手术组行假手术,模型组和阳性药组大鼠行双侧去卵巢手术,术后第7天给予L-甲状腺素(92 mg/kg),每天1次,连续给药7 d建立围绝经期综合征肾阴虚证“病证结合”模型。阳性药组每日灌胃清骨散汤剂(7.3 g/kg),假手术组和模型组灌胃等量蒸馏水,每天1次,共14 d。采用和田-高垣试剂着色法测定大鼠足趾部汗液分泌。酶联免疫吸附实验(ELISA)检测大鼠血清cAMP、cGMP、LH、GnRH、E₂水平。蛋白免疫印迹(Western Blot)法测定大鼠足趾肉垫组织的激动M₃胆碱能受体(M₃R)、激动β₂肾上腺素能受体(β₂AR)、水通道蛋白5(aquaporin, AQP₅)表达水平。结果 (1)与假手术组相比,模型组出现体温升高、双耳发红、易激惹、毛发干枯等阴虚证的典型行为学表现,且大鼠汗液分泌显著增多。(2)模型组血清cAMP水平显著升高,cGMP水平显著降低,cAMP/cGMP比值显著升高,LH、GnRH水平显著升高,E₂水平显著降低。(3)大鼠足趾组织的M₃R表达下调,β₂AR、AQP₅表达水平上调。与模型组相比,阳性药组体温降低、毛发脱落减少等阴虚证典型行为学表现缓解;血清cAMP水平显著下降,cAMP/cGMP比值显著降低,LH、GnRH水平降低,但不影响血清E₂水平。大鼠足趾组织的M₃R上调,β₂AR、AQP₅表达水平下调。结论 去势联合L-甲状腺素建立的围绝经期综合征肾阴虚证“病证结合”模型大鼠汗液分泌显著增多,其机制可能与cGMP、cAMP及其在汗腺上调控汗液分泌的关键蛋白M₃R、β₂AR、AQP₅的变化有关。

【关键词】 去势;肾阴虚证;汗液分泌;生化指标

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)06-0712-09

Sweat secretion and biochemical indexes in Yin-deficient ovariectomized rats

WANG Jie, CHEN Wenjia, LIN Wenwu, WANG Yingzheng, WANG Yinghao, HUANG Meixia*

(College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

Corresponding author: HUANG Meixia. E-mail: 2008009@fjtc.edu.cn

【Abstract】 Objective To assess the sweat secretion of Yin-deficient ovariectomized rats and investigate the changes in biochemical indexes. **Methods** Eighteen SD female rats were randomly divided into a sham operation group, model group, and positive control group of six rats each. The rats in the sham operation group underwent a sham operation,

【基金项目】 国家中医药管理局临床中药学高水平中医药重点学科建设项目(国中医药人教函[2022]226号),福建省自然科学基金资助项目(2023J01857),福建中医药大学基础类学科科研提升项目(XJC2022013)。

Funded by High-Level Key Discipline Construction Project of Clinical Traditional Chinese Medicine of the State Administration of Traditional Chinese Medicine (Guo Zhong Yao Ren Jiao Han [2022] No. 226), Fujian Natural Science Foundation Funded Project (2023J01857), Fujian University of Traditional Chinese Medicine Basic Discipline Research Enhancement Project (XJC2022013).

【作者简介】 王婕,女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理研究。Email: 1156947746@qq.com

【通信作者】 黄美霞,女,副教授,硕士生导师,研究方向:中药药理与毒理研究。Email: 2008009@fjtc.edu.cn

and those in the model group and positive control group underwent bilateral ovariectomy. L-Thyroxine (92 mg/kg) was given once a day for 7 consecutive days starting on the 7th postoperative day to establish a Yin-deficient ovariectomized model. The rats in the positive control group were orally administered Qinggu San Tang (7.3 g/kg) once a day, while those in the sham operation group and model group were orally administered an equal amount of distilled water once a day for a total of 14 days. Sweat secretion from the plantar region of the foot was measured using the Wada-Takagaki reagent coloring method. At the end of the experiment, blood was taken from the abdominal aorta and the tissue of the paw pads was separated. The serum levels cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), luteinizing hormone (LH), gonadotropin-releasing hormone (GnRH), and estradiol (E_2) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Western Blot was used to determine the expression levels of M_3R , β_2AR , and aquaporin-5 (AQP₅) in the paw pad. **Results** The three main findings of this study were as follows. (1) Compared with the rats in the sham operation group, those in the model group were more irritable and aggressive, and their body weights decreased while their average temperature and sweat secretion significantly increased. (2) Serum cAMP level and cAMP/cGMP ratio increased, the LH and GnRH levels significantly increased, and the E_2 level decreased. (3) M_3R expression was down-regulated and β_2AR and AQP₅ expression was up-regulated in the paw pads of the rats. After 2 weeks of positive control treatment, the serum cAMP level and cAMP/cGMP ratio significantly decreased and the LH and GnRH levels decreased; however, no statistically significant difference was observed in the serum E_2 level. The expression levels of M_3R were increased-regulated in paw pads of the rats, and reduced expression of β_2AR and AQP₅. **Conclusions** Sweat secretion significantly increased in this “combined disease and evidence” model of perimenopausal syndrome kidney yin deficiency established by desiccation combined with thyroxine. The underlying mechanism may be related to the changes in cGMP, cAMP, and key proteins M_3R , β_2AR , and AQP₅ in sweat glands that regulate sweat secretion.

[Keywords] castration; syndrome of deficiency of kidney yin; sweat secretion; biochemical indexes

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

盗汗是围绝经期综合征的常见症状之一,现代医学将围绝经期出现潮热、盗汗称为血管舒缩症^[1]。全球围绝经期女性中 50% ~ 75% 出现血管舒缩症^[2-3],对围绝经期女性的健康和生活造成巨大困扰。现代医学主要采用激素治疗等方法对围绝经期综合征的症状进行支持治疗,但长期的激素治疗存在乳腺、子宫肿瘤等风险^[4-5]。中医采用辨证论治的方法对围绝经期综合征的治疗获得肯定^[6-9],然而,由于缺乏针对性的实验模型,相关的病因病理理论、方药作用机制的研究无从下手,严重阻碍了中医基础理论和中药作用机制的进一步阐述,建立符合中医药理论和思想的动物模型迫在眉睫。

近年来的研究表明,西医辨病和中医辨证相结合的现代“病证结合”型动物模型更符合中医药的基本理论与实践^[10-11]。采用健康大鼠去势联合 L-甲状腺素复制围绝经期综合征肾阴虚证模型,已被应用于研究病证结合的骨小梁微观结构和骨代谢^[12-14],然而未见病证结合模型的汗液分泌变化研究。为此,本研究拟评估去势术联合灌胃 L-甲状腺素法造围绝经期综合征肾阴虚证“病证结合”模型大鼠的汗液分泌情况,并探讨其相关生化指标的变

化情况,以期为进一步丰富围绝经期综合征肾阴虚证动物模型的观察指标提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

18 只 8 ~ 10 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠,体重 200 ± 20 g,购自杭州医学院【SCXK(浙)2019-0002】。环境温度维持在 $21 \sim 25$ °C,相对湿度为 $(50 \pm 5)\%$,12 h 明暗循环,自由标准饮食饮水,饲养于福建中医药大学实验动物中心【SYXK(闽)2019-0007】。所有实验方案均经福建中医药大学实验动物福利伦理委员会批准(FJTCM IACUC 2022167)。

1.1.2 药物及制备

清骨散(银柴胡 12 g、胡黄连 8 g、秦艽 8 g、鳖甲 10 g、地骨皮 10 g、青蒿 10 g、知母 9 g、甘草 6 g),购自福建中医药大学附属第三人民医院。采用水煎煮 2 次,每次 30 min,合并滤液,减压浓缩制成生药量为 7.3 g/kg(临床等效量)的浓缩液。L-甲状腺素购自索莱宝有限公司(货号:T9621),溶解于蒸馏水,超声制成浓度为 92 mg/kg 的混悬液。

1.1.3 主要试剂与仪器

大鼠环磷酸腺苷 (cAMP) ELISA 检测试剂盒 (货号: ml002907-2)、大鼠环磷酸鸟苷 (cGMP) ELISA 检测试剂盒 (货号: ml003133-2)、大鼠雌二醇 (E_2) ELISA 检测试剂盒 (货号: ml002871-J)、大鼠黄体生成激素 (LH) ELISA 检测试剂盒 (货号: ml470613-J)、大鼠促性腺激素释放激素 (GnRH) ELISA 检测试剂盒 (货号: ml003038-J) 均购自上海酶联生物科技有限公司, 兔多克隆抗 AQP₅ (货号: ab78486, Abcam), 兔多克隆抗体抗 M₃R (货号: ab87199, Abcam), 兔单克隆抗 β_2 AR (ab182136, Abcam)。

电子天平 (型号: AR4201CN, 奥豪斯仪器 (上海) 有限公司); 动物体温计 (型号: FT3400, 南京卡尔文生物科技有限公司); 酶标仪 (型号: Infinite 200 Pro, 瑞士 TECAN); 凝胶成像分析仪 (型号: Chemi Doc XRS +, 美国 Bio-Rad); 电泳仪 (型号: PowerPac Basic, 美国 Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、造模与给药

将 18 只 SD 雌性大鼠随机分为假手术组、模型组 (去势 + L-甲状腺素 (92 mg/kg))、阳性药组 (模型 + 清骨散汤剂 (7.3 g/kg)), 每组 6 只。适应性喂养 7 d 后, 以 2% 戊巴比妥钠 (2 mL/kg) 腹腔注射麻醉, 模型组和阳性药组行双侧去卵巢手术。假手术组造成同样的手术创口, 不切除卵巢。各组大鼠术后肌注青霉素生理盐水 (每只 40 000 U/d), 连用 3 d。各组大鼠于术后第 7 天, 进行阴道涂片检查, 每天 1 次, 连续 5 d 均无情动周期则去势模型造模成功。从第 13 天开始, 除假手术组给等体积生理盐水, 其余两组大鼠上午灌胃 L-甲状腺素 (92 mg/kg), 每日 1 次, 连续 7 d, 以建立围绝经期综合征肾阴虚证“病证结合”模型。采用边造模边给药的方式, 在灌胃 L-甲状腺素造模的同时, 阳性药组每天下午灌胃给予清骨散汤剂 (7.3 g/kg), 假手术组和模型组灌胃等量蒸馏水, 每日 1 次, 共 14 d。实验期间每天监测大鼠体温、体重, 隔天测定大鼠足跖部汗液分泌情况。末次给药 1 h 后, 腹主动脉取血分离血清, 并分离大鼠足跖肉垫组织。

1.2.2 尾温测定

采用热敏电阻式数字温度计贴合大鼠尾部腹面, 距离尾根部 2 cm 左右, 并用隔热泡沫隔绝外界温度的干扰, 每 2 d 测 1 次, 每只测 3 次取平均值。

1.2.3 汗斑着色法测定大鼠足跖部汗液分泌

配置和田-高垣氏试剂 A、B 液, A 液为 2 g 碘溶于 100 mL 无水乙醇, B 液为 50 g 可溶性淀粉与 100 mL 蓖麻油混匀。每次测定在灌胃清骨散汤剂 30 min 后进行, 将大鼠固定, 轻轻擦干大鼠足跖部因挣扎导致的汗液, 随即于足跖部皮肤涂上和田-高垣氏试剂 A 液, 待充分干燥后, 再薄薄抹上 B 液, 即可观察到深紫色汗点, 重复测定 3 次, 拍照并记录。拍摄照片后, 经图像软件 Image Java 8 处理, 计算深紫色汗点面积与足跖部面积的比值^[15]。

1.2.4 ELISA 法测定血清 cAMP、cGMP、 E_2 、GnRH、LH 水平

腹主动脉取血后静置 2 ~ 3 h, 3000 r/min 离心 15 min, 吸取上层血清, 严格按照试剂盒的使用说明检测血清中 cAMP、cGMP、 E_2 、GnRH、LH 水平。

1.2.5 Western Blot 测定大鼠足趾组织汗液分泌关键蛋白表达水平

称取少量足趾组织每块约 100 mg, 置于研磨介质匀浆小管中, 加入 1 mL 预冷的含 PMSF 裂解液 (1 mL 裂解液加 10 μ L PMSF) 提取蛋白, 利用 BCA 法对蛋白进行定量。蛋白变性 10 min 后上样, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 用 PVDF 膜转膜, 快速封闭液封闭 20 min 后, 分别加入水通道蛋白 5 (aquaporin, AQP₅) (稀释至 0.05 ~ 0.10 μ g/mL)、 β_2 AR (稀释比例 1 : 1000)、M₃R (稀释比例 1 : 1000) 和 β -actin (稀释比例 1 : 1000) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日用 TBST 于摇床上洗 3 次, 每次 5 min, 将膜放入相应二抗中, 室温孵育 1 h 后, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min。用 ECL 发光液显色, 成像显影分析。以 β -actin 为内参对照, 计算 AQP₅、 β_2 AR、M₃R 蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析

所有数据均以均 3 次独立实验平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计分析。采用单因素方差分析确定不同组之间的差异显著性, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况观察

与假手术组相比, 模型组大便干硬、小便发黄、饮水量增加、自主活动增加、易被激惹, 此外, 大鼠的体重减轻、毛色枯槁易脱落、耳朵发红。与模型组相比, 阳性药组显著改善上述指标 (见图 1)。实

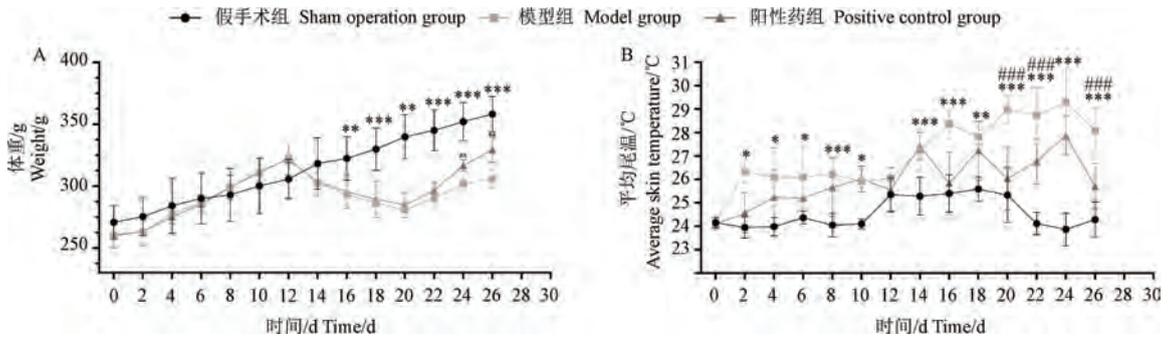
验结束时,与假手术组相比,模型组体重显著降低,体温升高($P < 0.01, P < 0.001$);与模型组相比,阳

性药组体重显著回调,体温降低($P < 0.01, P < 0.001$)(见图 2)。



图 1 各组大鼠外观

Figure 1 Rats of the each group



注:与假手术组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与模型组相比,#### $P < 0.001$ 。(下图同)

图 2 各组大鼠体重与体温变化情况($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with model group, #### $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 2 Body weight and tail skin temperature in each group of rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.2 去势造模后阴道脱落细胞涂片观察结果

大鼠动情前期以有核细胞为主,动情期以无核角化细胞为主,动情后期则有核上皮细胞、角化细胞、白细胞 3 种细胞共存,动情间期以白细胞为主。

假手术组保持规律的情动周期变化(见图 3A ~ 3D),去势术后连续 5 d 的检测显示大鼠失去规律的情动周期变化,保持在动情间期,提示去势模型造模成功(见图 3E ~ 3H)。

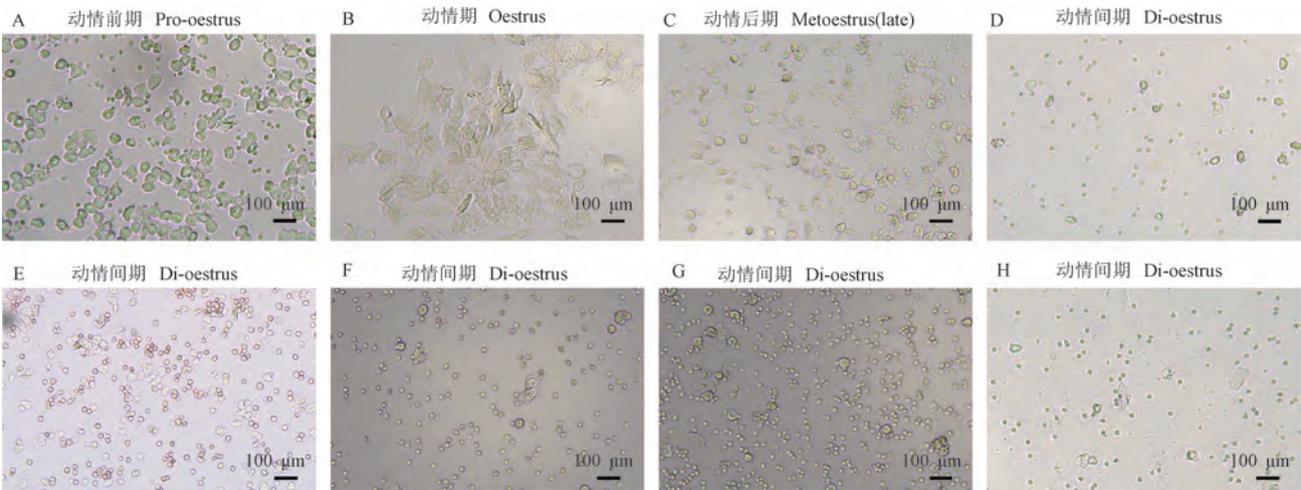


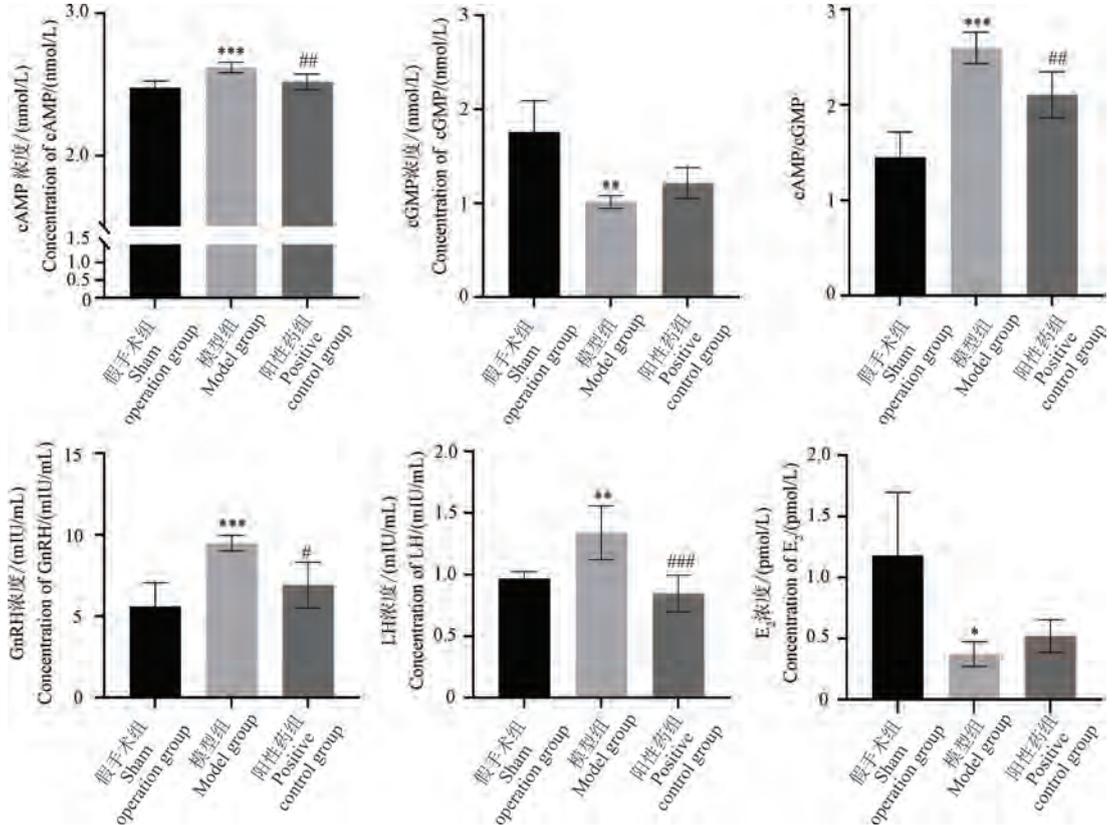
图 3 阴道脱落细胞涂片

Figure 3 Vaginal cell smear of rats

2.3 血清 cAMP、cGMP、LH、GnRH、E₂ 水平

实验结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠血清中 cAMP 水平显著升高($P < 0.001$), cGMP 显著降低($P < 0.01$), cAMP/cGMP 的比值显著升高($P < 0.001$),这与阴虚证的研究结果一致,表明阴虚证模型成功。与假手术组相比,模型组血清

GnRH、LH 水平升高($P < 0.001, P < 0.01$), E₂ 水平降低($P < 0.05$)。通过阳性药干预后,阴虚证的 cAMP、cAMP/cGMP 显著逆转($P < 0.01$)。血清 GnRH、LH 水平下调($P < 0.05, P < 0.001$),循环 E₂ 水平虽有升高,但与模型组相比,无统计学意义(见图 4)。



注:与模型组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。(下图同)

图 4 各组大鼠 cAMP、cGMP、cAMP/cGMP、GnRH、LH、E₂ 比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

Figure 4 Serum level of cAMP, cGMP, cAMP/cGMP, GnRH, LH, E₂($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.4 汗液分泌情况

为测定各组大鼠足跖部出汗情况,使用和田-高垣氏试剂溶液对大鼠的足跖进行汗斑着色实验,各组大鼠出汗情况的典型代表图如图 5 所示。进一步采用 Image Java 8 对汗点面积进行定量计算。统计结果显示,在去势造模阶段,与假手术组相比,模型组大鼠足跖上的汗点数量具有显著性差异($P < 0.05$),见图 6A。进一步给予 L-甲状腺素造模 7 d 后,模型组大鼠的汗液显著增多($P < 0.001$),如图 6B 所示。在造模结束的随后 7 d 内,未给予药物干预的模型大鼠的汗液分泌进一步增多,但阳性药干预的实验组汗液显著减少,与模型组相比,差异具有极显著性($P < 0.001$),见图 6C。

2.5 足趾组织汗液分泌关键蛋白表达水平

模型组足趾肉垫组织的 β_2AR 、AQP₅ 表达水平显著上调($P < 0.05, P < 0.01$), M₃R 表达显著下调($P < 0.01$)。阳性药治疗 2 周后,大鼠足趾肉垫组织的 β_2AR 、AQP₅ 表达水平下调($P < 0.05, P < 0.01$), M₃R 上调($P < 0.05$)(见图 7)。

3 讨论

中医认为潮热、盗汗常见于肾阴虚证。围绝经期妇女因肾气衰竭,冲任虚损出现的围绝经期诸证,当中尤其以肾阴虚证居多。采用健康大鼠行去势手术是目前国内外公认的围绝经期动物模型,已被广泛应用于潮热、抑郁、骨质退化等围绝经期相

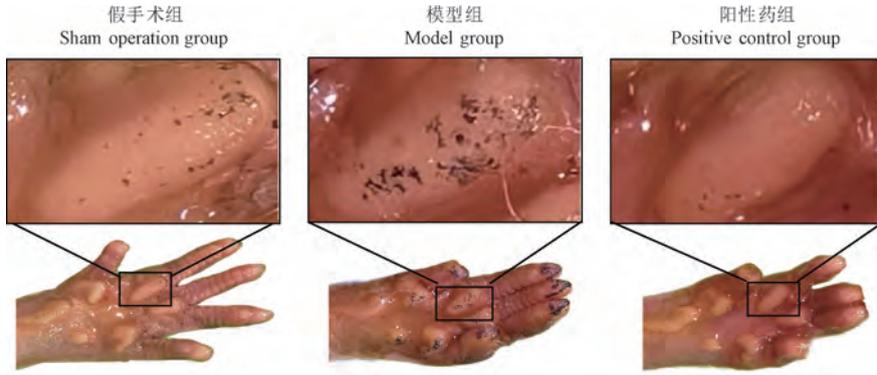


图 5 实验终点时各组大鼠汗液分泌情况典型代表图

Figure 5 Sweat secretion of rats at the end point of the experiment

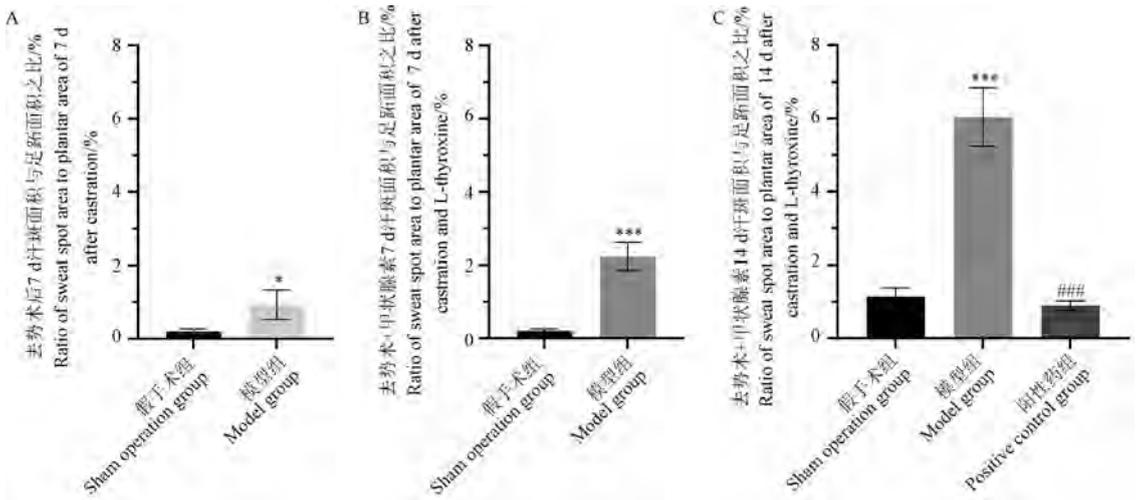


图 6 模型不同阶段各组大鼠汗液分泌情况统计结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Figure 6 Sweat test in different groups of rats at different stages of the model($\bar{x} \pm s, n = 6$)

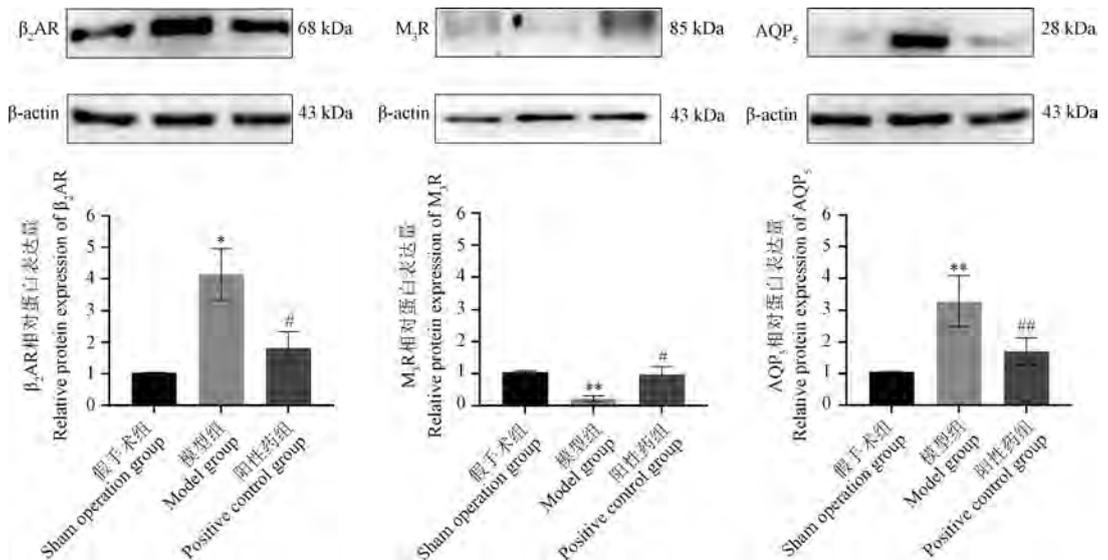


图 7 各组大鼠足跖组织中 β_2AR 、 M_3R 与 AQP_5 的蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 7 β_2AR , M_3R and AQP_5 protein expression of each group rats($\bar{x} \pm s, n = 3$)

关疾病的研究^[16-17]。以 L-甲状腺素或 L-甲状腺素联合利血平造模是中医现代研究阴虚证的经典模型^[18]。在本课题组前期的研究中观察到,给予正常大鼠 L-甲状腺联合利血平建立阴虚证模型后,除出现阴虚证的典型症状,大鼠的足跖肉垫汗斑显著增多。在本研究中,采用汗斑着色对各组大鼠出汗情况进行客观量化与比较,并采用 ELISA、Western Blot 等方法检测大鼠外周循环和足组织中的分子生物学指标,以客观衡量模型大鼠汗液分泌的生物学基础。

大鼠双侧去卵巢术后,血清 LH、GnRH 和阴道脱落细胞涂片结果显示围绝经期综合征的模型成功。在此基础上给予 L-甲状腺素 7 d 诱导阴虚证模型,模型大鼠血清 cAMP/cGMP 比值升高,提示围绝经期综合征肾阴虚证模型诱导成功。

大鼠的全身覆被皮毛,足趾肉垫是研究汗液分泌的经典部位。对大鼠行去卵巢术后,OVX 大鼠的汗液分泌有所增多,给予 L-甲状腺素后,汗液极显著增多。清骨散是中医临床上治疗围绝经期综合征肾阴虚证潮热、盗汗的有效方剂^[19-20]。本研究中设立清骨散给药作为阳性药组,探查该病证结合模型大鼠汗液分泌异常在经典临床方剂干预后的变化情况,这与中医临床对潮热盗汗的辨证论治思想相契合。实验结果表明,模型大鼠的汗液分泌和血清生化指标被清骨散显著逆转。

现代研究表明,当体温升高时,下丘脑的体温调节中心通过出汗来响应升高的体温,并参与体温调节^[21]。AQP₅ 是汗腺中唯一表达的水通道蛋白^[22],在汗腺中,有两条调控汗液分泌的受体通路,分别是:(1)生理条件下,M₃R 介导的信号通路调控 AQP₅ 表达并分泌汗液,介导热出汗^[23-25];(2)应激条件下,β₂AR 介导应激性出汗^[26-27]。近年来有关阴虚证的研究成果及本研究均表明,阴虚证模型的 M₃R 受体表达下降,但 AQP₅ 的表达显著上调,表明在模型中大量的汗液分泌与生理条件 M₃R 所介导的热出汗不同,β₂AR 表达显著上调提示阴虚证的出汗与 β₂AR 激活有关^[28]。

下丘脑弓状核 kisspeptin 神经元表达神经激肽 B (neurokinin B, NKB) 和强啡肽 A (dynorphin, Dyn), 这些神经元也被称为 KNDy 神经元。下丘脑弓状核 kisspeptin 神经元兴奋被认为促性腺激素释放激素 (GnRH) 的脉冲释放的起点,并由此激活下游 LH 的脉冲生成^[29-30]。LH 的脉冲与去卵巢大鼠的血管舒

缩症(潮热与盗汗)的发生同步,因此 KNDy 神经元尤其是 NK₃B 的抑制剂为治疗潮热的重要靶点^[31]。全球首款 NK₃B 抑制剂 Veozah (fezolinetant) 于 2023 年 5 月 12 日获美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于治疗围绝经期女性中重度血管舒缩症状^[32]。Fezolinetant 可以直接抑制 KNDy 神经元过度兴奋,降低循环 GnRH、LH 水平,而不影响雌激素的水平,然而 fezolinetant 存在潜在肝转氨酶升高(肝损伤)的风险^[33]。本研究发现中医治疗阴虚盗汗的经典方剂可降低大鼠血清中 GnRH、LH 水平,且不影响去卵巢大鼠的循环雌激素水平,但中药复方具有多成分、多靶点的特点,因此其作用靶点与作用机制尚值得进一步深入研究。

综上,本研究客观量化围绝经期综合征肾阴虚证病证结合动物模型的汗液分泌变化,考查其分子生物学指标的变化情况,为围绝经期综合征肾阴虚证动物模型的观察指标提供实验依据,为相关药物的药效评价、机制研究提供评价指标。

参 考 文 献 (References)

- [1] VRSELJA A, LATIFI A, BABER R J, et al. Q-122 as a novel, non-hormonal, oral treatment for vasomotor symptoms in women taking tamoxifen or an aromatase inhibitor after breast cancer: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2022, 400(10364): 1704-1711.
- [2] 韩茹雪, 杨欣. 围绝经期血管舒缩症状的非激素治疗 [J]. *实用妇产科杂志*, 2022, 38(1): 29-32.
HAN R X, YANG X. Non-hormonal treatment of vasomotor symptoms in perimenopausal period [J]. *J Pract Obstet Gynecol*, 2022, 38(1): 29-32.
- [3] LEDERMAN S, OTTERY F D, CANO A, et al. Fezolinetant for treatment of moderate-to-severe vasomotor symptoms associated with menopause (SKYLIGHT 1): a phase 3 randomised controlled study [J]. *Lancet*, 2023, 401(10382): 1091-1102.
- [4] CRANDALL C J, MEHTA J M, MANSON J E. Management of menopausal symptoms: a review [J]. *JAMA*, 2023, 329(5): 405-420.
- [5] MEHTA J M, MANSON J E. The menopausal transition period and cardiovascular risk [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2024, 21: 203-211.
- [6] 陈凌燕, 胡丽莎. 滋肾安年汤治疗肾阴虚证围绝经期综合征的临床效果 [J]. *中国当代医药*, 2021, 28(32): 14-18.
CHEN L Y, HU L S. Clinical effect of Zishen Annian Decoction in treatment of perimenopausal syndrome with kidney-Yin deficiency [J]. *Chin Mod Med*, 2021, 28(32): 14-18.
- [7] 权兴苗, 时菁静, 宋春侠, 等. 自拟平肝补肾方联合常规治疗肝肾阴虚证围绝经期综合征患者的临床疗效 [J]. *中成药*, 2021, 43(4): 918-922.

- QUAN X M, SHI J J, SONG C X, et al. Clinical effects of Self-made Pinggan Bushen Decoction combined with conventional treatment on patients with perimenopausal syndrome due to Yin Deficiency of liver and kidney [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2021, 43(4): 918-922.
- [8] 许咏思. 浅刺头针配合体针治疗围绝经期综合征肾阴虚证文献及临床研究 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2020.
- XU Y S. Literature and clinical study on the treatment of renal yin deficiency syndrome of perimenopausal syndrome with shallow acupoint acupuncture combined with body acupuncture [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine; 2020.
- [9] 吴宏进, 张志枫, 许家侗, 等. 围绝经期综合征肝肾阴虚证中医治疗前后脉图参数及性激素水平变化 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(4): 1870-1873.
- WU H J, ZHANG Z F, XU J T, et al. Changes of pulse diagram parameter and sex hormone level before and after the Chinese medicine treatment in perimenopausal syndrome with syndrome of Yin deficiency of liver and kidney [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2017, 32(4): 1870-1873.
- [10] 王华富, 许惠琴, 陈敏敏, 等. 百合知母汤不同配比对去势围绝经期综合征肾阴虚证大鼠子宫系数及血清性激素的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(4): 531-533.
- WANG H F, XU H Q, CHEN M M, et al. Effect of Baihe Zhimu Decoction on serum sex hormone and uterus index of ovariectomized rats with kidney-Yin deficiency [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2010, 25(4): 531-533.
- [11] 王华富, 蔡宝昌, 高钦, 等. 百合知母汤对自然衰老型围绝经期综合征肾虚证大鼠中枢神经递质含量的影响 [J]. *江西中医学院学报*, 2009, 21(3): 53-55.
- WANG H F, CAI B C, GAO Q, et al. Effect of bai-he-zhi-mu-Tang on the level of central neurotransmitter in hypothalamus of natural-aging Shenxu Zheng climacteric syndrome rats [J]. *J Jiangxi Univ Tradit Chin Med*, 2009, 21(3): 53-55.
- [12] 何兴鹏, 郑利钦, 李鹏飞, 等. 两种肾虚证型去势模型大鼠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 X P, ZHENG L Q, LI P F, 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.
- [13] GUO M, LIU H, YU Y, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG ameliorates osteoporosis in ovariectomized rats by regulating the Th17/Treg balance and gut microbiota structure [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2190304.
- [14] 林楚彬, 何兴鹏, 丘育辉, 等. 病证结合骨质疏松模型大鼠骨骼的生物力学性能分析 [J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(23): 3636-3641.
- LIN C B, HE X P, QIU Y H, et al. Biomechanical analysis of the bones in a rat model of osteoporosis based on the combination of disease and syndrome [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2024, 28(23): 3636-3641.
- [15] CUI C Y, NOH J H, MICHEL M, et al. STIM1, but not STIM2, is the calcium sensor critical for sweat secretion [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(3): 704-707.
- [16] LI M, YU Y, XUE K, et al. Genistein mitigates senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via ERR α -mediated mitochondrial biogenesis and mitophagy in ovariectomized rats [J]. *Redox Biol*, 2023, 61: 102649.
- [17] CHEN L, LIU Y, TANG Z, et al. *Radix angelica dahuricae* extract ameliorates oestrogen deficiency-induced dyslipidaemia in ovariectomized (OVX) rats by modulating the gut microbiota and bile acid signalling [J]. *Phytomedicine*, 2022, 107: 154440.
- [18] 张启春, 卞慧敏. 生津润燥颗粒对阴虚甲亢大鼠的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2009, 25(6): 82-83.
- ZHANG Q C, BIAN H M. The effect of Shengjin Runzao granules on rats with yin deficiency and hyperthyroidism [J]. *Chin Pharmacol Clin*, 2009, 25(6): 82-83.
- [19] 颜丽亚, 侯秀环. 清骨散治疗围绝经期综合征肾阴亏虚型的临床观察 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2008, 32(6): 764-765.
- WANYAN Y L, HOU X H. Qinggu powder treat peri-climacteric syndrome of kidney Yin deficiency type [J]. *J Zhejiang Univ Tradit Chin Med*, 2008, 32(6): 764-765.
- [20] 曾令先, 陈润林. 清骨散加减配合针刺治疗中风阴虚盗汗疗效观察 [J]. *实用中医药杂志*, 2018, 34(7): 758-759.
- ZENG L X, CHEN R L. Observation on therapeutic effect of Qinggu Powder combined with acupuncture on night sweats due to Yin deficiency in stroke [J]. *J Pract Tradit Chin Med*, 2018, 34(7): 758-759.
- [21] OLIVEIRA M A, LIMA W G, SCETTINI D A, et al. Is calcitonin gene-related peptide a modulator of menopausal vasomotor symptoms? [J]. *Endocrine*, 2019, 63(2): 193-203.
- [22] HU Y, CONVERSE C, LYONS M C, et al. Neural control of sweat secretion: a review [J]. *Br J Dermatol*, 2018, 178(6): 1246-1256.
- [23] DU L, ZHANG L, ZHAO J, et al. Autophagy, not apoptosis, plays a role in lumen formation of eccrine gland organoids [J]. *Chin Med J*, 2022, 135(3): 324-332.
- [24] ABE S, TSUBOI H, KUDO H, et al. M3 muscarinic acetylcholine receptor-reactive Th17 cells in primary Sjögren's syndrome [J]. *JCI Insight*, 2020, 5(15): e135982.
- [25] VERVOESSEM T, YULE D I, BULTYNCK G, et al. The type 2 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, emerging functions for an intriguing Ca²⁺-release channel [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(9): 1992-2005.
- [26] SANCHEZ-COLLADO J, LOPEZ J J, JARDIN I, et al. Cross-talk between the adenylyl cyclase/cAMP pathway and Ca²⁺ homeostasis [J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2021, 179: 73-116.
- [27] WATSON M J, LEE S L, MARKLEW A J, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) uses its C-terminus to regulate the A2B adenosine receptor [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27390.

- [28] 崔荣兴, 战丽彬, 孙晓霞, 等. 阴虚津亏模型小鼠颌下腺 AQP5 及 cAMP/PKA-CREB 信号通路的表达与意义 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 149-153, 288.
CUI R X, ZHAN L B, SUN X X, et al. Expression and significance of AQP5 and cAMP/PKA-CREB signaling pathway in submandibular gland of mice with Yin-deficiency and fluid consumption [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(6): 149-153, 288.
- [29] MITTELMAN-SMITH M A, WILLIAMS H, KRAJEWSKI-HALL S J, et al. Role for kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons in cutaneous vasodilatation and the estrogen modulation of body temperature [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(48): 19846-19851.
- [30] SZELIGA A, CZYZYK A, PODFIGURNA A, et al. The role of kisspeptin/neurokinin B/dynorphin neurons in pathomechanism of vasomotor symptoms in postmenopausal women: from physiology to potential therapeutic applications [J]. Gynecol Endocrinol, 2018, 34(11): 913-919.
- [31] PRAGUE J K, ROBERTS R E, COMNINOS A N, et al. Neurokinin 3 receptor antagonism as a novel treatment for menopausal hot flashes: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Lancet, 2017, 389(10081): 1809-1820.
- [32] LEE A. Fezolinetant; first approval [J]. Drugs, 2023, 83(12): 1137-1141.
- [33] DEPYPERE H, LADEMACHER C, SIDDIQUI E, et al. Fezolinetant in the treatment of vasomotor symptoms associated with menopause [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2021, 30(7): 681-694.

[收稿日期] 2023-11-29

《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》2023 年版(即第 10 版)动物学/人类学类的核心期刊!

《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。



沈婷婷,李亚,李素云,等. 宣肺解毒方对多重耐药铜绿假单胞菌肺炎的作用机制探讨[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 721-732.

SHEN T T, LI Y, LI S Y, et al. Mechanism of Xuanfei Jiedu Formula in treating multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 721-732.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.005

宣肺解毒方对多重耐药铜绿假单胞菌肺炎的作用机制探讨

沈婷婷^{1,2}, 李亚², 李素云^{3,4*}, 李高峰^{1,2}, 韩冰洋^{1,2}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院中心实验室中药药理(呼吸)实验室河南省呼吸病防治中医药重点实验室, 郑州 450000; 3. 河南中医药大学第一附属医院呼吸科, 郑州 450000; 4. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450046)

【摘要】 **目的** 探究宣肺解毒方对多重耐药铜绿假单胞菌肺炎的机理研究。**方法** 除空白组外,其余组采用气管插管的方法建立 MDR-PA(9×10^8 CFU/mL, 0.5 mL)肺炎大鼠模型,造模成功后随机分为模型组、宣肺解毒方低剂量组、宣肺解毒方中剂量组、宣肺解毒方高剂量组以及亚胺培南西司他丁组,每组 12 只;以上除空白组与模型组外,剩余给药组统称为干预治疗组。造模 1 d 后,宣肺解毒方低、中、高剂量组分别给予相应剂量的宣肺解毒方(Xuanfei Jiedu Formula, XFJDF)灌胃,亚胺培南西司他丁组给予亚胺培南西司他丁(imipenem, IPM)腹腔注射,空白组和模型组给予生理盐水灌胃,每天 2 次,持续 7 d。观察大鼠的一般状态、体重变化、肺湿重/肺干重(W/D),采用苏木素-伊红(HE)染色法于光镜下观察大鼠肺组织病理学改变,采用酶免疫吸附测定法检测大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 、IL-6 炎症因子水平,采用比色法检测大鼠血清中 GSH 含量与 MPO 活性,采用 TBA 法检测大鼠血清中 MDA 含量,试剂盒法检测总抗氧化能力 T-AOC;采用免疫组化法对肺组织中 TLR4、Myd88、NF- κ Bp65 蛋白进行定位与半定量观察,采用 qPCR 和 Western Blot 技术检测大鼠肺组织中 TLR4、Myd88、NF- κ Bp65 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 与空白组比,模型组大鼠反应迟缓,呼吸频率加快、呼吸杂音增多且出现不同程度寒颤,饮食饮水减少,体重下降;肺 W/D($P < 0.01$)显著升高,肺组织的肺泡腔以及肺支气管周围存有大量炎性细胞浸润,部分肺泡壁出现断裂融合形成气腔并伴有炎性渗出,肺间质增厚,局部可见肺纤维形成等;血清中 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 、IL-6 水平明显升高($P < 0.01$),MDA 含量增加、MPO 活性增强、GSH 含量与 T-AOC 能力降低($P < 0.01$),肺组织中 TLR4、Myd88、NF- κ Bp65 mRNA 和蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,干预治疗组均不同程度改善上述指标变化($P < 0.05$, $P < 0.01$),以宣肺解毒方高剂量组以及亚胺培南西司他丁组最为显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 宣肺解毒方能够显著改善 MDR-PA 大鼠的一般状态、体重、肺 W/D 以及肺病理,降低炎症与氧化应激反应,其作用机制可能与宣肺解毒方抑制肺组织中 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路表达有关。

【关键词】 多重耐药菌;铜绿假单胞菌;肺炎;宣肺解毒方

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 06-0721-12

Mechanism of Xuanfei Jiedu Formula in treating multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia

【基金项目】 河南省中医药科学研究专项(2023ZYZD03, 2022JDZX124), 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20220573), 中医药传承创新专项(2022CCCX011), 河南省科技研发计划联合基金(14207908)。

Funded by Henan Special Research Project of Traditional Chinese Medicine (2023ZYZD03, 2022JDZX124), Henan Medical Science and Technology Research Project (LHGJ20220573), Special Project on TCM Inheritance and Innovation (2022CCCX011), Henan Province Science and Technology Research and Development Program Joint Fund (14207908).

【作者简介】 沈婷婷,女,在读博士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病方向。Email:shenting208@163.com

【通信作者】 李素云,女,主任医师,研究方向:中医药防治呼吸疾病临床与基础研究。Email:lisuyun2000@126.com

SHEN Tingting^{1,2}, LI Ya², LI Suyun^{3,4*}, LI Gaofeng^{1,2}, HAN Binyang^{1,2}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Chinese Medicine Pharmacology (Respiratory) Laboratory, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for the Prevention and Treatment of Respiratory Diseases, Zhengzhou 450000, China; 3. Respiratory Department of the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 4. Co-Construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Corresponding author: LI Suyun. E-mail: lisuyun2000@126.com

[Abstract] Objective Study on mechanism of Xuanfei Jiedu Formula in treating multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Methods** Except the Control group, the MDR-PA (9×10^8 CFU/mL, 0.5 mL) pneumonia rat model was established by tracheal intubation, and an un-modeled control group was used. After successful modeling, rats were randomly divided into model group, XFJDF-low dose group, XFJDF-medium dose group, XFJDF-high dose group and IPM group, with 12 animals in each group; In addition to the blank group and the model group, the remaining drug administration groups were collectively referred to as the intervention treatment group. One day after modeling, the XFJDF-low dose, XFJDF-medium dose, and XFJDF-high dose groups were given the corresponding doses by gavage. The imipenem and cilastatin group was given Imipenem intraperitoneal injection, and the control and model groups were given saline gavage twice a day for 7 days. The rats' general status, body weight changes, and wet-dry weight ratio (W/D) of the lung tissue were observed. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes to the lung tissue of rats in each group under a light microscope. The serum levels of IL-1 β , TGF- β , TNF- α , and IL-6 were detected by enzyme immunosorbent assay. Serum GSH content and MPO activity of rats were detected by colorimetry. The serum content of MDA was detected by TBA method. The total antioxidant capacity (T-AOC) was detected by kit method. The protein levels of TLR4, Myd88, and NF- κ Bp65 in lung tissues were determined by immunohistochemistry. The mRNA and protein levels of TLR4, Myd88, and NF- κ Bp65 in the lung tissues of each group were detected by qPCR and Western Blot. **Results** Compared with the control group, the model groups had delayed responses, increased respiratory frequency, increased respiratory noise, and appeared to have different degrees of chills, as well as decreased diet and water intake and decreased body weight. The W/D of lung tissue was significantly increased ($P < 0.01$), and a large number of inflammatory cells had infiltrated the alveolar cavity and around the lung bronchus. Some alveolar walls were fractured and fused to form air cavities, with inflammatory exudation, pulmonary interstitial thickening, and local lung fiber formation. The serum levels of IL-1 β , TNF- α , TGF- β , and IL-6 were significantly increased ($P < 0.01$), MDA content was increased, MPO activity was enhanced, GSH content and T-AOC capacity were decreased ($P < 0.01$), and the mRNA and protein levels of TLR4, Myd88, and NF- κ Bp65 in lung tissue were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model groups, the intervention group and the treatment group showed improvements in the above indexes ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the Xuanfei Jiedu Formula high-dose group and IPM group had the most significant improvements ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** Xuanfei Jiedu can significantly improve the general state, body weight, lung tissue W/D, and lung tissue pathology, and the reduce inflammation and oxidative stress, of MDR-PA rats. The mechanism may be related to its inhibition of the expression of TLR4/Myd88/NF- κ B pathway proteins in lung tissue.

[Keywords] multidrug-resistant bacteria; *Pseudomonas aeruginosa*; pneumonia; Xuanfei Jiedu Formula

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

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 是引起医院内感染的最常见多耐药机会性病原体, 具有高度的侵袭性和毒性, 对患有慢性阻塞性肺病、囊性纤维化、脓毒症和呼吸相关性肺炎的免疫功能低下患者造成严重威胁, 可引起危及生命的急/慢性感染^[1-2]。多种毒力因子、广泛的抗生素耐药性和生物膜的形成, 使 PA 成为顽固和棘手的病原

体^[3-4]。根据我国 2014 ~ 2019 年细菌耐药监测网统计数据显示, 肺泡灌洗液中的标本分离菌中 PA 的检出率排在首位; 且耐药率呈增长趋势, 耐药现状日益严峻^[5-7]。

多重耐药铜绿假单胞菌 (multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDR-PA) 肺炎住院率高、死亡率高、治疗难度大, 严重危害人类健康; 其发病机

制复杂,且缺乏有效防治手段,给临床抗感染治疗带来了巨大挑战。因此,寻找更有效的治疗策略显得尤为迫切。

炎症和免疫反应是多重耐药(multidrug resistant, MDR)肺炎的重要特征,在 PA 感染的发生发展中起着重要作用^[8]。PA 可通过产生脂多糖(lipopolysaccharides, LPS),激活 Toll-样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)信号传导通路引发炎症与抗炎反应失衡,激发炎症“瀑布样效应”,从而导致机体一系列的免疫炎性损伤。髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)是具有 TIR 结构域的 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)信号通路途径重要的接头蛋白^[9-10], MyD88 依赖性 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号转导通路可通过调节多种炎症细胞因子如白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达参与炎症免疫反应^[11-12],这些炎症介质的分泌进一步加重炎症过程并导致氧化应激^[13]。氧化应激则增加丙二醛(malondialdehyde, MDA)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的形成,降低谷胱甘肽(glutathione, GSH)的产生^[14],加重肺部损伤。因此抑制炎症反应是治疗多重耐药肺炎的关键,调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路可能是预防和治疗 PA 感染的一种有前景的策略。

中医药在抗感染治疗中具有独特的优势,近年来关于中医药抗炎、抑菌、杀菌方面的研究和临床证据越来越多。宣肺解毒方(Xuanfei Jiedu Formula, XFJDF)由蜜麻黄、浙贝母、黄芪、金银花、败酱草等组成,是课题组根据多年治疗耐药菌感染的临床经验总结出来的有效中药复方。本研究拟建立 MDR-PA 肺炎大鼠模型,基于 TLR4/Myd88/NF- κ B 信号通路深入探索宣肺解毒方对 MDR-PA 肺炎的作用机制,为临床多重耐药菌感染治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 8 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 72 只,体重 200 ± 20 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】,饲养于河南中医药大学第一附属医院中心实验室【SYXK(豫)2022-0004】。

饲养环境:12 h 照明与 12 h 黑暗交替,相对湿度 40% ~ 70%,温度控制在 25 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ 。本实验通过河南中医药大学实验动物伦理委员会审查(YFYDW2022009),整个实验过程严格遵循“3R”原则。

1.1.2 菌株

多重耐药铜绿假单胞菌(编号:220629052)由河南中医药大学第一附属医院检验科鉴定和提供。将 MDR-PA 菌株接种于培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱过夜培养,培养至对数期生长期用无菌生理盐水将 MDR-PA 悬浮液调整为 9×10^8 CFU/mL 的新鲜菌液备用。

1.1.3 药物

宣肺解毒方由蜜麻黄、浙贝母、黄芪、金银花、败酱草等组成,干粉制剂由河南中医药大学药学院药物分析实验室提供,1 g 干粉里含生药量 8 g;亚胺培南西司他丁(Imipenem, IPM),每盒 1.0 g(国家准字 H20067765),购自瀚晖制药有限公司。亚胺培南西司他丁配置:选用等渗氯化钠注射液作溶剂,每 0.5 g 药物用 10 mL 溶剂,制成 50 mg/mL 液体。

1.1.4 主要试剂与仪器

TNF- α (Elabscience, E-EL-R2856c)、IL-6 (Elabscience, E-EL-R0015c)、IL-1 β (Proteintech, KE20005)、MDA (碧云天, S0131S)、GSH (Elabscience, E-BC-K030-M)、MPO (Elabscience, E-BC-K074-M)、TLR4 鼠单克隆抗体(SNATA, SC-293072)、Myd88 兔抗多克隆抗体(Affinity, AF5195)、NF- κ Bp65 兔单克隆抗体(CST, 8242)、总 RNA 提取试剂盒(Servicebio, G3640)、SweScript^{RT} I First Strand cDNA Synthesis Kit(Servicebio, G3330)、2 \times SYBR Green q-PCR Master Mix(Servicebio, G3321-15)、Water Nuclease-Free (Servicebio, G4700)。

PM-10AD 光学显微镜及照相系统(Olympus optical, 日本),7500 型实时荧光定量 PCR 仪(ABI, 美国),核酸蛋白定量检测仪(NanoVuePlus, 美国),ChemiDoc MP 全能成像系统(Bio-Rad, 美国),病理切片机(上海徠卡仪器有限公司, RM2016),BS210S 电子天平(赛多利斯, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备

采用气管插管的方法建立 MDR-PA 所致肺炎大鼠模型,通过腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(30 mg/

kg)对大鼠进行麻醉,以静脉套管针作为气管内管,取其仰卧位呈 $30^{\circ} \sim 45^{\circ}$ 倾斜固定于操作台,暴露声门,以导管插入气管约 $0.5 \sim 0.6$ cm,拔出导管丝,以1 mL注射器将0.5 mL浓度为 9×10^8 CFU/mL菌液经导管缓慢匀速注入大鼠气管,最后加注少量空气,防止菌液外流。抽出导管后,将大鼠保持头高脚低位,并轻轻左右摇晃,使菌液均匀分布于大鼠两肺。空白组注入等体积的无菌生理盐水。

1.2.2 分组

将SD大鼠随机分为6组,每组12只,依次为空白组(Control group)、模型组(Model group)、宣肺解毒方低剂量组(XFJDF-low dose group)、宣肺解毒方中剂量组(XFJDF-medium dose group)、宣肺解毒方高剂量组(XFJDF-high dose group)以及亚胺培南西司他丁组(IPM group);以上除空白组与模型组外,剩余给药组统称为干预治疗组。

1.2.3 给药

造模1 d后,宣肺解毒方低、中、高剂量组大鼠分别给予灌胃宣肺解毒方(1.725 g/(kg·d)、 3.45 g/(kg·d)、 6.9 g/(kg·d)),亚胺培南西司他丁组大鼠给予IPM腹腔注射(180 mg/(kg·d)),每天2次,间隔 $6 \sim 8$ h,连续7 d;对照组和模型组大鼠给予等量生理盐水。药物剂量采用体表面积换算,具体换算方法参考《中药药理实验方法学》^[15]。

1.2.4 指标检测

(1)大鼠一般情况:造模后每天观察大鼠的一般状态,包括呼吸频率、精神状态、皮毛光泽度及活动灵敏度、进食情况等,并在第1、3、5、7天记录体重。

(2)肺组织苏木素-伊红(HE)染色:取肺,用10%中性甲醛灌注左肺20 min、固定72 h,制作 $4 \mu\text{m}$ 石蜡切片,常规HE染色,观察小气道和肺泡病理变化。分离右肺上叶,计算肺湿重与干重比(W/D)。

(3)血清炎症因子测定:末次灌胃1 h后,腹主动脉采血, 4°C 下放置 $3 \sim 4$ h, 3000 r/min离心10 min,收集血清,采用酶联免疫试剂盒检测大鼠血清中IL- 1β 、TGF- β 、TNF- α 炎症因子水平。

(4)氧化应激水平测定:按照试剂盒说明书,采用比色法检测血清中GSH含量、MPO活性、T-AOC能力,TBA法检测大鼠血清中MDA含量。

(5)免疫组化:制备石蜡切片,一抗加入鼠抗TLR4(1:200)、兔抗Myd88(1:200)、兔抗NF- κB

(1:500) 4°C 孵育过夜。加入二抗室温孵育50 min,DAB显色,复染细胞核,脱水,封片。

(6)qPCR检测肺组织TLR4、Myd88、NF- $\kappa\text{Bp}65$ 的mRNA水平:称取肺组织40 mg,按QIAzol Lysis Reage法提取肺组织总RNA,按操作进行逆转录和PCR反应。按照mRNA相对表达量 $= 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算mRNA相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primers sequence

基因 Genes	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
TLR4	F:CCAGGTGTGAAATFGAGACAATTG R:AAGCTGTCCAATATGGAACCC
NF- $\kappa\text{Bp}65$	F:CAGATACCACTAAGACGCCACC R:CTCCAGGTCTCGCTTCTCACA
Myd88	F:CGAGGAGGACTGCCAGAAATAC R:CAGTAGCAGATGAAGGCGCTCG
GAPDH	F:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG R:GTTGAAGAATGGGAGTTGCT

(7)Western Blot检测肺组织TLR4、Myd88、NF- $\kappa\text{Bp}65$ 蛋白水平:称取肺组织40 mg,采用Western Blot技术并按照试剂盒说明书进行相关操作。一抗抗体TLR4 1:400、Myd88 1:1000、NF- $\kappa\text{Bp}65$ 1:1000稀释, 4°C 摇床上振摇过夜, $1 \times$ TBST洗涤3次,每次10 min。再加入二抗,ECL试剂显色、曝光,并用Image J 1.5软件分析。

1.3 统计学分析

采用SPSS 21.0统计学软件进行数据分析,对计量资料的组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。所有数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。方差齐者采用最小显著差法(LSD),方差不齐者采用Dunnett's T_3 法,显著性水准取 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空白组大鼠状态良好。模型组大鼠状态较差,反应迟缓、呼吸频率加快、呼吸杂音增多且出现不同程度的寒颤、饮食饮水减少、体重下降。与模型组相比,干预治疗组均可改善MDR-PA大鼠的一般状态,大鼠精神状态明显好转,反应灵敏度增强、体重增加,其中以宣肺解毒方高剂量组以及亚胺培南西司他丁组最为显著。见表2。

2.2 肺湿重/肺干重(W/D)

与空白组相比,模型组大鼠肺W/D($P < 0.01$)

表 2 大鼠体重变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Changes of body weight in the rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

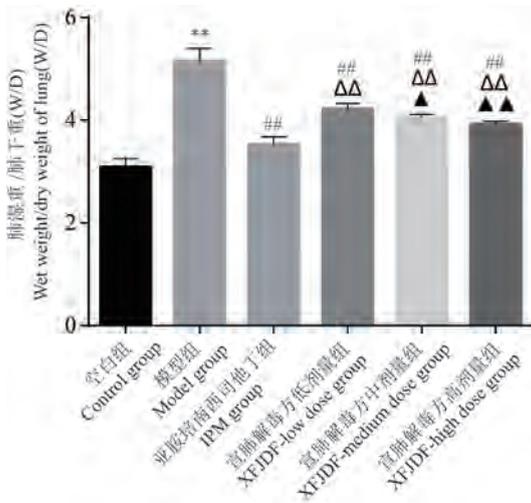
组别 Groups	第 0 天 D0	第 1 天 D1	第 3 天 D3	第 5 天 D5	第 7 天 D7
空白组 Control group	270.12 ± 12.93	270.25 ± 15.58	288.37 ± 14.80	301.12 ± 16.46	307.12 ± 15.04
模型组 Model group	275.37 ± 9.39	269.12 ± 6.37	264.25 ± 8.01**	262.00 ± 10.48**	262.12 ± 10.82**
亚胺培南西司他丁组 IPM group	270.87 ± 12.46	263.25 ± 9.85	282.87 ± 8.85 [#]	295.87 ± 7.07 [#]	301.12 ± 7.31 [#]
宣肺解毒方低剂量组 XFJDF-low dose group	270.00 ± 7.67	258.37 ± 11.47	275.00 ± 7.25	287.62 ± 11.40 [#]	297.25 ± 11.96 [#]
宣肺解毒方中剂量组 XFJDF-medium dose group	276.37 ± 6.96	270.37 ± 14.40	279.12 ± 17.12 [#]	296.75 ± 26.88	300.00 ± 25.09 [#]
宣肺解毒方高剂量组 XFJDF-high dose group	266.12 ± 9.31	260.62 ± 12.90	280.87 ± 6.99 [#]	294.50 ± 7.87 [#]	302.50 ± 6.84 [#]

注:与空白组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$ 。(下同)

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

显著升高,提示肺水肿的发生;各干预治疗组均可抑制 MDR-PA 感染引起肺 W/D 增加($P < 0.01$),以宣肺解毒方高剂量组以及亚胺培南西司他丁组最为显著。见图 1。

形成等。与模型组相比,各干预治疗组均可不同程度改善肺泡壁的断裂,减少炎性细胞浸润,其中以宣肺解毒方高剂量组以及亚胺培南西司他丁组尤为明显。见图 2。



注:与亚胺培南西司他丁组相比,^{ΔΔ} $P < 0.01$;与宣肺解毒方低剂量组相比,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 肺组织湿干重比($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. Compared with IPM group, ^{ΔΔ} $P < 0.01$. Compared with XFJDF-low dose group, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Lung tissue wet-dry weight ratio($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.3 肺组织病理变化

光镜下空白组大鼠肺泡结构完整,无肺泡破裂融合,气道周围无炎性细胞浸润,黏膜上皮细胞整齐。模型组大鼠肺泡腔以及肺支气管周围存有大量炎性细胞浸润,部分肺泡壁出现断裂融合形成气腔并伴有炎性渗出,肺间质增厚,局部可见肺纤维

2.4 血清炎症因子水平

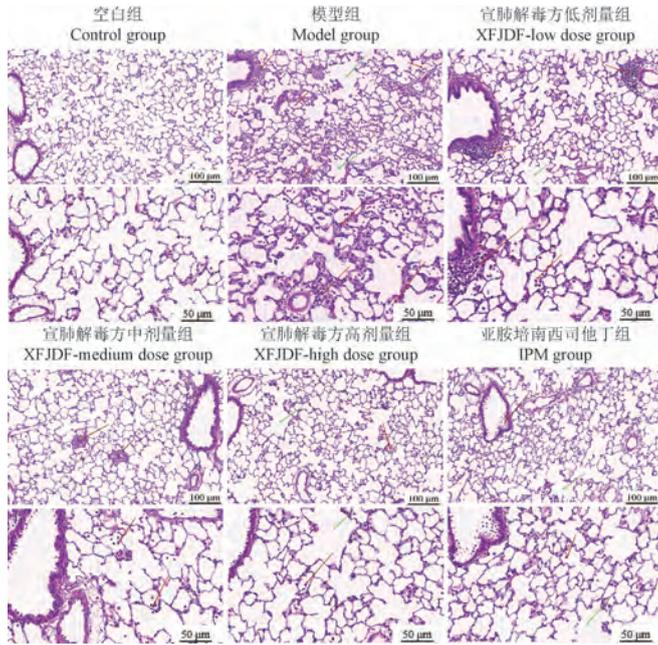
与空白组相比,模型组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 、IL-6 明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,各干预治疗组均可明显降低大鼠血清中 TNF- α 、TGF- β 、IL-6 水平($P < 0.01$);除宣肺解毒方低剂量组外,各干预治疗组大鼠血清中 IL-1 β 水平明显降低($P < 0.01$)。见图 3。

2.5 血清氧化应激水平

与空白组相比,模型组大鼠血清中 MDA 水平升高、MPO 活性增强、GSH 水平与 T-AOC 能力降低($P < 0.01$);与模型组相比,各干预治疗组均可不同程度降低大鼠血清中 MDA 水平与 MPO 活性,升高 GSH 水平、增强 T-AOC 能力($P < 0.05, P < 0.01$),其中以宣肺解毒方高剂量组与亚胺培南西司他丁组较为显著。见图 4。

2.6 肺组织中 TLR4、Myd88、NF- κ Bp65 的变化

根据 Image J 1.5 系统测量的平均光密度值(IOD),与空白组相比,模型组肺组织 TLR4、Myd88、NF- κ Bp65 表达量显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,各干预治疗组肺组织 TLR4、Myd88、NF- κ Bp65 表达量均呈不同程度的降低($P < 0.01$),其中 TLR4、Myd88 在宣肺解毒方高剂量组与亚胺培南西司他丁组中降低较为显著($P < 0.01$),NF- κ Bp65 在宣肺解毒方高剂量组降低最为显著($P < 0.01$)。见图 5,图 6,图 7。

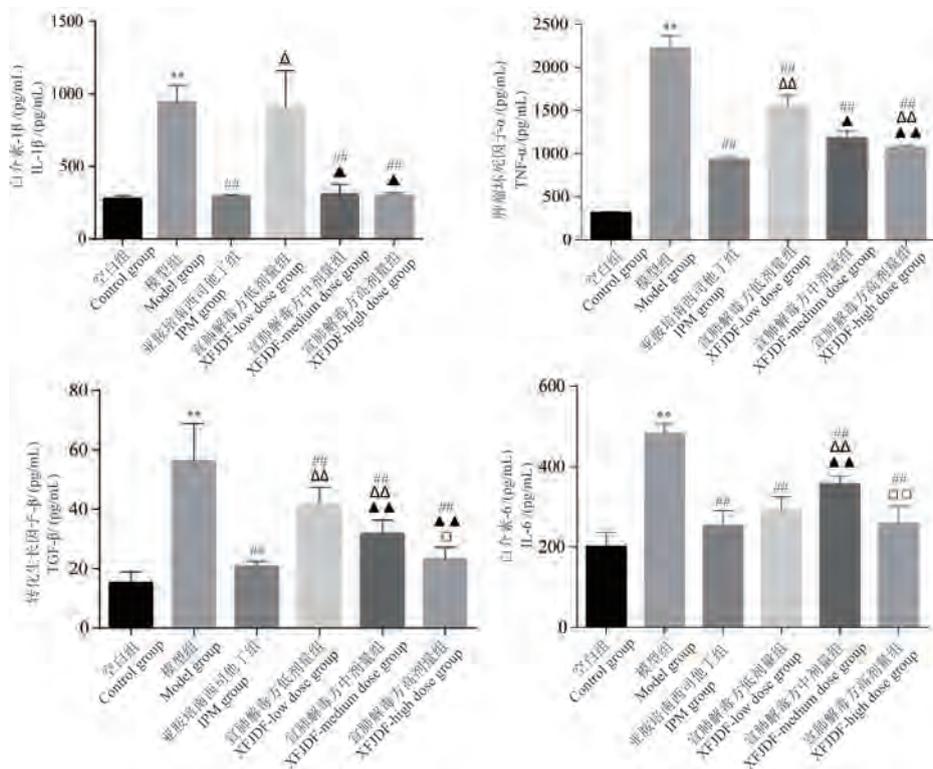


注:红色箭头:炎症细胞;绿色箭头:肺泡断裂融合成气腔。

图 2 肺组织病理(HE 染色)

Note. Red arrow. Inflammatory cells. Green arrow. Alveolar rupture melting syngas cavity.

Figure 2 Lung pathology(HE staining)



注:与亚胺培南西司他丁组相比,^Δ $P < 0.05$;与宣肺解毒方中剂量组相比,[□] $P < 0.05$,^{□□} $P < 0.01$ 。(下同)

图 3 血清中 IL-1β、TNF-α、TGF-β、IL-6 水平变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with IPM group, ^Δ $P < 0.05$. Compared with XFJDF-medium dose group, [□] $P < 0.05$, ^{□□} $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 3 Changes of serum IL-1β、TNF-α、TGF-β、IL-6 of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

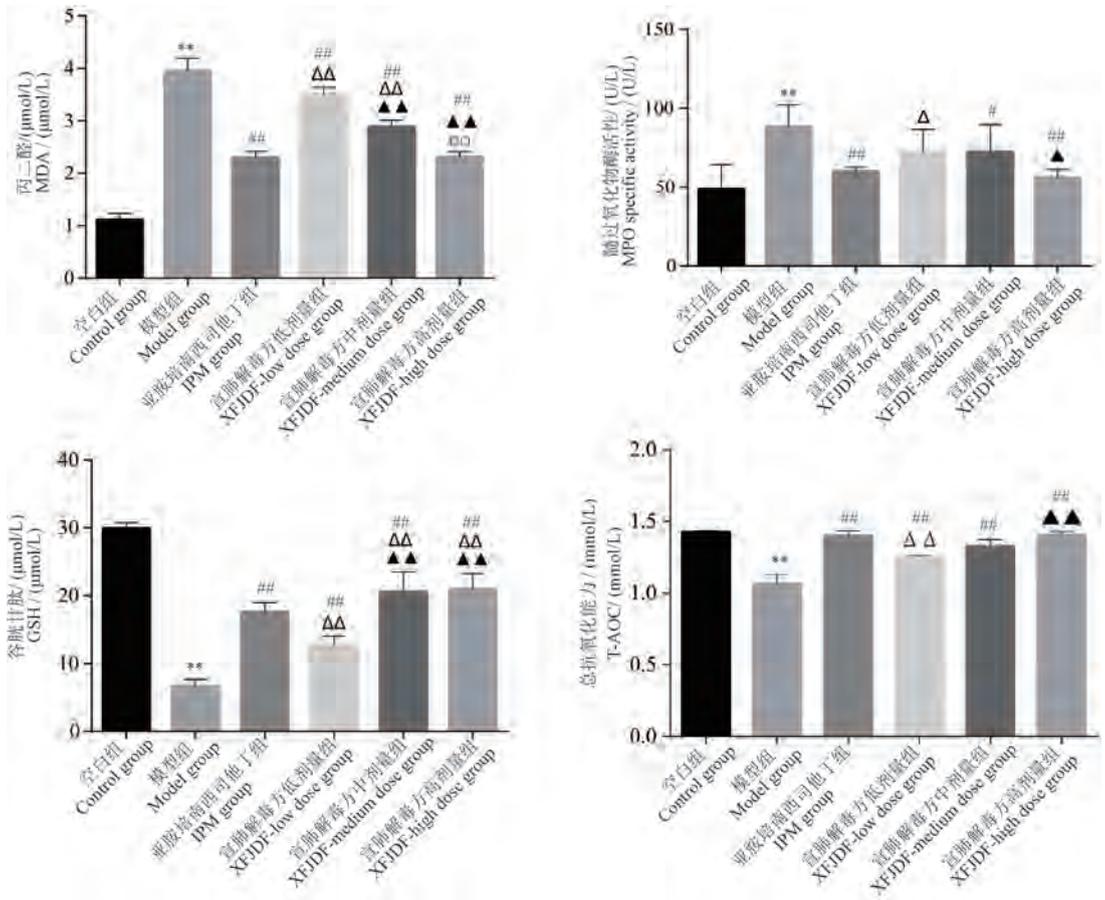


图 4 血清中 MDA、MPO、GSH、T-AOC 水平变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Figure 4 Changes of serum MDA, MPO, GSH, T-AOC of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

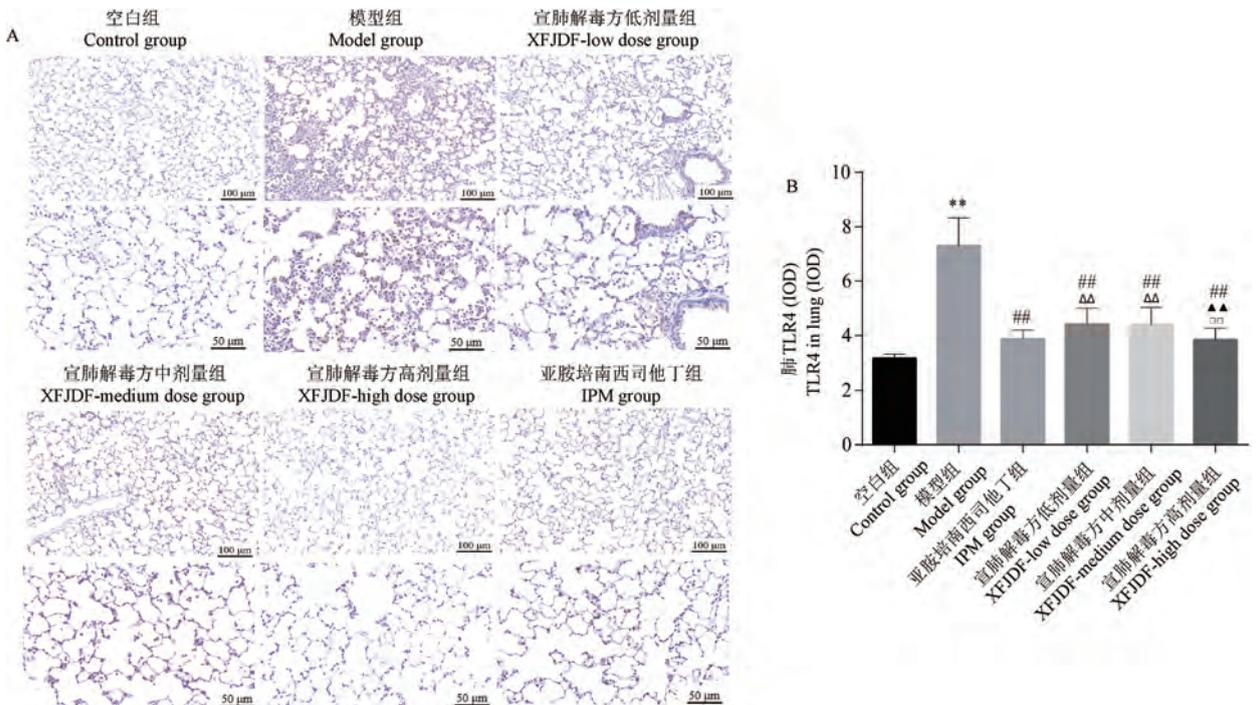


图 5 肺组织 TLR4 的表达变化

Figure 5 Changes of TLR4 expression in lung

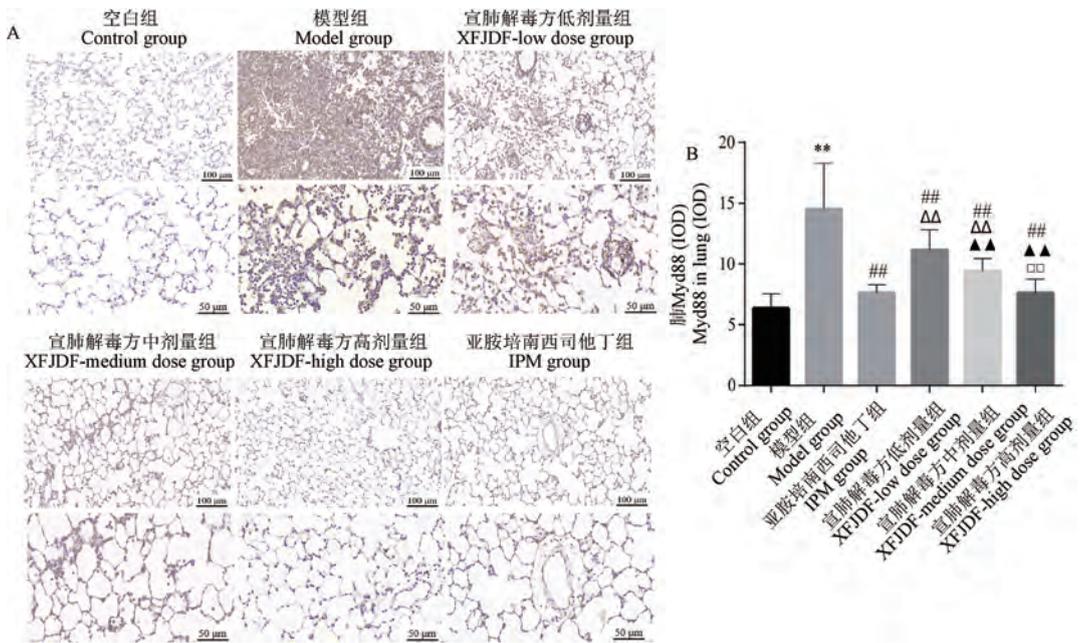


图 6 肺组织 Myd88 的表达变化

Figure 6 Changes of Myd88 expression in lung

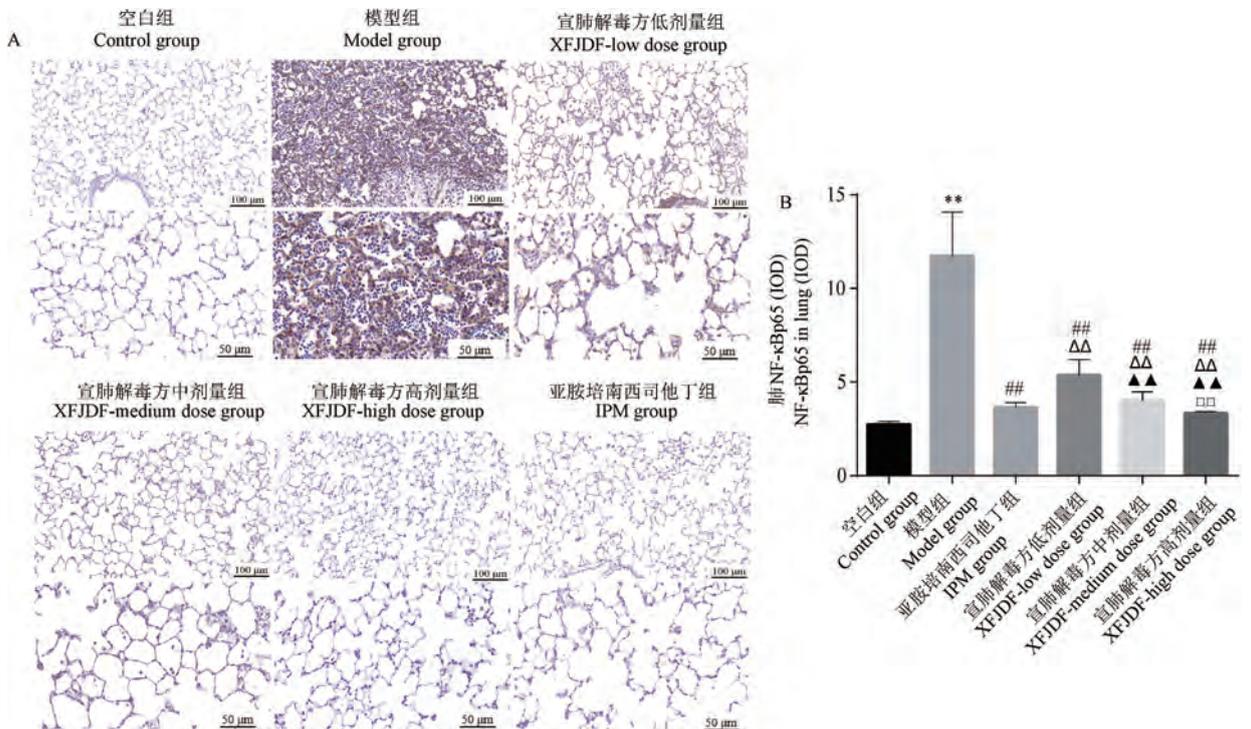


图 7 肺组织 NF-κBp65 的表达变化

Figure 7 Changes of NF-κBp65 expression in lung

2.7 qPCR 检测肺组织 TLR4、Myd88、NF-κBp65 的 mRNA 水平

与空白组相比,模型组肺组织 TLR4、Myd88、NF-κBp65 mRNA 表达量显著升高($P < 0.01$);与模

型组相比,各干预治疗组肺组织 TLR4、Myd88、NF-κBp65 mRNA 表达量均显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),以宣肺解毒方高剂量组与亚胺培南西司他丁组下降较为显著($P < 0.01$)。见图 8。

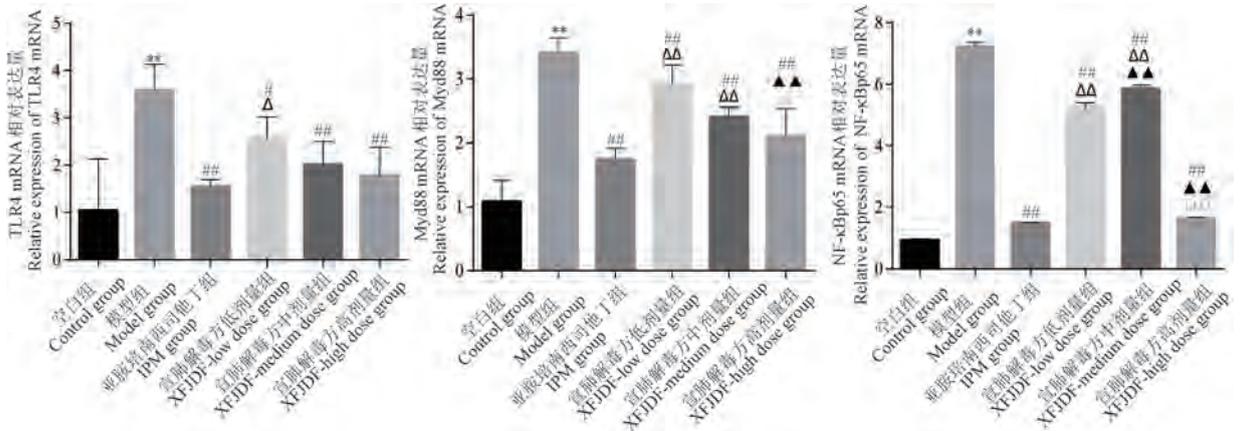


图 8 大鼠肺组织 TLR4、Myd88、NF-κBp65 mRNA 的表达变化($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 8 Changes of mRNA expression of TLR4, Myd88, NF-κBp65 in the lung tissues of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.8 Western Blot 检测肺组织 TLR4、Myd88、NF-κBp65 蛋白水平

与空白组相比,模型组肺组织 TLR4、Myd88、NF-κBp65 表达量显著升高($P < 0.01$);与模型组相

比,各干预治疗组肺组织 TLR4、Myd88、NF-κBp65 表达量均显著下降($P < 0.05$),以宣肺解毒方高剂量组与亚胺培南西司他丁组下降较为显著($P < 0.01$)。见图 9。

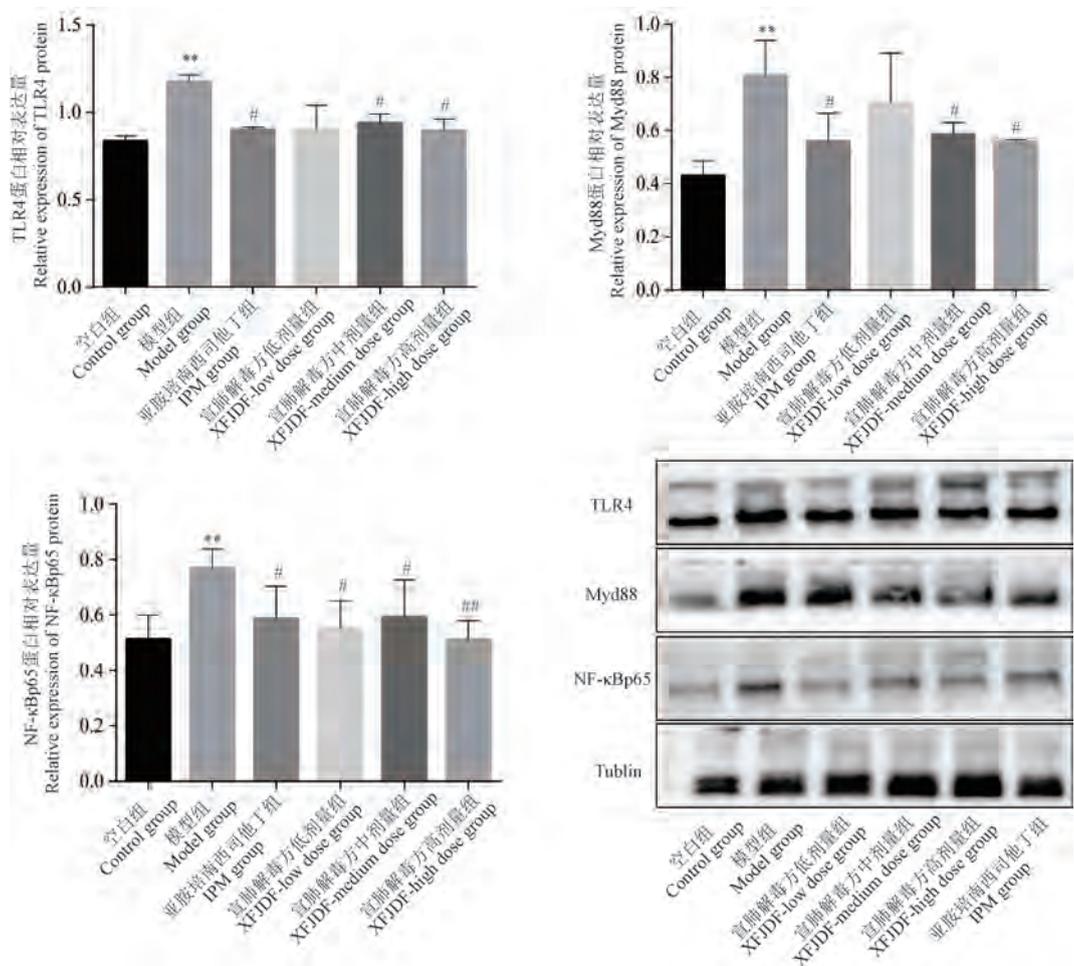


图 9 宣肺解毒方对大鼠肺组织 TLR4、Myd88 和 NF-κBp65 蛋白相对表达量的影响

Figure 9 Effect of XFJDF on the relative expression of TLR4, Myd88 and NF-κBp65 protein in lung tissues of rats

3 讨论

中国耐药性监测系统监测报告显示, PA 几乎对所有抗生素的敏感性都有所下降, 对常用抗菌药物的耐药率仍处于较高水平, 这使得 PA 感染的临床治疗面临严峻挑战^[16-17]。

中医药在治疗传染病方面具有独特的优势。以中医理论为指导的辨证论治作用机制涉及广泛, 不仅能直接抑杀耐药菌, 改善细菌耐药性以间接抑菌杀菌, 还能整体调节以提高机体抗病能力, 通过多靶点、多种途径发挥祛邪扶正作用, 在 PA 等耐药菌感染的治疗中发挥了重要作用^[18-19]。

多重耐药菌肺炎在中医古典文献中没有明确相对应的疾病, 大多学者将其归属于外感疾病范畴, 如外感六淫、外感疫毒、伏气温病等。临床上多重耐药菌致病菌易于侵犯的主要人类群体多合并基础疾病多、机体免疫能力低下、住院或患病时间长等危急重症或(和)老年体弱者, 其都兼具有正气亏虚之象。多重耐药菌肺炎最常见的 5 个中医证候为痰热蕴肺、气阴亏虚、邪在肺卫、热陷心包、肺胃热炽者为主, 其病机为虚实夹杂, 在治疗上应同时兼顾祛邪扶正, 其演变规律为痰热壅肺证逐渐演变为气阴亏虚证^[20]。

李素云教授归纳总结该病的症候特点, 提出“痰热互结, 壅闭于肺”为多重耐药菌肺炎的基本病机, “清热解毒、宣肺化痰, 兼顾祛邪扶正”是其主要治则, 故拟定宣肺解毒方。方中蜜麻黄、浙贝母, 清热宣肺、化痰平喘; 金银花、败酱草、野菊花、皂角刺等, 清热解毒; 黄芪、太子参、陈皮等, 益气健脾。前期临床应用表明, 宣肺解毒方能够明显改善感染后机体炎症反应、提高机体免疫能力、降低患者的死亡率, 但相关机制尚不明确。

本研究结果显示, 宣肺解毒方能够显著改善 MDR-PA 感染大鼠的一般状态, 抑制其体重减轻。肺 W/D 是反映肺含水量和肺水肿严重程度的最常见指标之一, 其升高代表肺毛细血管通透性增强, 肺水肿程度^[21]加重, 不同剂量的宣肺解毒方均可显著降低感染大鼠肺组织 W/D 比值, 以宣肺解毒方高剂量组与亚胺培南西司他丁组减轻肺水肿效果最优。

病理 HE 染色结果显示, 与模型组相比, 不同剂量的宣肺解毒方与亚胺培南西司他丁干预均能明显减轻 MDR-PA 感染大鼠肺间质水肿和炎性渗出,

增强肺泡结构的完整性, 减少炎性细胞浸润, 其中以宣肺解毒方高剂量组的改善最为显著。

炎症因子在机体免疫调节网络中至关重要, 起着介导炎症、调节免疫、参与组织修复的作用^[22-23]。本研究结果显示, MDR-PA 感染后大鼠血清中促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 、IL-6 水平显著升高, 不同剂量的宣肺解毒方干预可减少这 3 种促炎因子的释放, 控制炎症反应, 避免级联瀑布效应。

研究表明, 炎症因子的分泌会加重炎症过程并导致氧化应激^[13]。本研究结果显示, MDR-PA 感染后大鼠血清中 MDA 形成增加、MPO 的活性增强, 同时 GSH 的产生减少、T-AOC 能力降低; 各干预组治疗后均明显降低大鼠血清中 MDA 水平和 MPO 的活性, 同时增加了 GSH 的生成与 T-AOC 能力, 以宣肺解毒方高剂量组和亚胺培南西司他丁组效果较为显著。提示宣肺解毒方能够降低 MDR-PA 感染后机体的氧化应激反应。

TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路可调控多种炎症细胞因子的表达, 参与炎症细胞趋化、细胞粘附^[24]等病理过程, 与多种疾病的炎症免疫反应密切相关^[25-27]。本研究结果显示, MDR-PA 感染可激活大鼠这一信号通路, 并显著上调 TLR4、MyD88、NF- κ Bp65 mRNA 表达; 宣肺解毒方干预治疗后可显著降低 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路关键基因与蛋白的表达, 其中以宣肺解毒方高剂量组与亚胺培南西司他丁组疗效较为显著。

综上所述, 本研究基于 MDR-PA 感染大鼠肺炎模型, 发现宣肺解毒方能够明显改善 MDR-PA 感染大鼠一般状态和肺组织病理损伤, 降低炎症反应与氧化应激水平, 其作用机制可能与抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路活化有关, 为宣肺解毒方临床应用于 MDR-PA 感染提供了科学依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] ALBASANZ-PUIG A, GUDIOL C, PARODY R, et al. Impact of antibiotic resistance on outcomes of neutropenic cancer patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia (IRONIC study): study protocol of a retrospective multicentre international study [J]. BMJ Open, 2019, 9(5): e025744.
- [2] ROSSI E, ROSA R L, BARTELL J A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(5): 331-342.
- [3] SINHA M, GHOSH N, WIJESINGHE D S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* theft biofilm require host lipids of cutaneous wound [J]. Ann Surg, 2023, 277(3): e634-e647.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance

- threats in the United States [EB/OL]. [2019]. https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532/cdc_82532_DS1.pdf.
- [5] 全国细菌耐药监测网. 2014-2019 年支气管肺泡灌洗液细菌耐药监测报告 [J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(1): 61-69.
- China Antimicrobial Resistance Surveillance System. Bacterial drug resistance monitoring report of bronchoalveolar lavage fluid from 2014 to 2019 [J]. Chin J Infect Contr, 2021, 20(1): 61-69.
- [6] 吴振安, 张亮. 铜绿假单胞菌的临床分布及耐药性分析 [J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(1): 55-57.
- WU Z A, ZHANG L. Clinical distribution and drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chin Clin Dr, 2021, 49(1): 55-57.
- [7] 周俊立, 张文萃, 王莹莹, 等. 肺部感染患者多重耐药铜绿假单胞菌的耐药谱与特征 [J]. 中华疾病控制杂志, 2020, 24(9): 1046-1050, 1062.
- ZHOU J L, ZHANG W C, WANG Y Y, et al. Drug resistance spectrum and characteristics of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pulmonary infection [J]. Chin J Dis Contr Prev, 2020, 24(9): 1046-1050, 1062.
- [8] PIAZZA O, PULCRANO G, FIORI P L, et al. Toll-like receptor kinetics in septic shock patients: a preliminary study [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2012, 25(2): 425-433.
- [9] CHEN G, ZHANG W, KONG L, et al. Qiguiyin decoction improves multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in rats by regulating inflammatory cytokines and the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 5066434.
- [10] UTO T, FUKAYA T, TAKAGI H, et al. Clec4A4 is a regulatory receptor for dendritic cells that impairs inflammation and T-cell immunity [J]. Nat Commun, 2016, 7: 11273.
- [11] CHEN F, ZHU X, SUN Z, et al. Astilbin inhibits high glucose-induced inflammation and extracellular matrix accumulation by suppressing the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in rat glomerular mesangial cells [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1187.
- [12] SU Q, LV X, SUN Y, et al. Role of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in coronary microembolization-induced myocardial injury prevented and treated with nicorandil [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 776-784.
- [13] 丁甜. 血必净联合亚胺培南西司他丁钠对重症肺炎并发呼吸衰竭患者肺功能指标、炎症因子及氧化应激指标的影响 [J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(27): 54-56.
- DING T. Effects of Xuebijing combined with imipenem and cilastatin sodium on pulmonary function indexes, inflammatory factors and oxidative stress indexes in patients with severe pneumonia complicated with respiratory failure [J]. Clin Res Pract, 2022, 7(27): 54-56.
- [14] 王国玉, 王森, 李彤, 等. 慢性心力衰竭合并社区获得性肺炎患者血清 TLR4 表达及与 PCT、NT-proBNP、氧化应激指标的相关性分析 [J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(7): 60-65.
- WANG G Y, WANG M, LI T, et al. Serum TLR4 expression and its correlation with PCT, NT proBNP and oxidative stress in patients with chronic heart failure with community acquired pneumonia [J]. China J Mod Med, 2023, 33(7): 60-65.
- [15] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2011.
- CHEN Q. Research methodology of TCM pharmacology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2011.
- [16] SENDLER M, VAN DEN BRANDT C, GLAUBITZ J, et al. NLRP3 inflammasome regulates development of systemic inflammatory response and compensatory anti-inflammatory response syndromes in mice with acute pancreatitis [J]. Gastroenterology, 2020, 158(1): 253-269.
- [17] HORCAJADA J P, MONTERO M, OLIVER A, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(4): e00031-e00019.
- [18] 杨吉荣. 中药联合抗生素治疗急性重症肺炎 66 例临床观察 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(6): 970.
- YANG J R. Clinical observation on 66 cases of acute severe pneumonia treated by traditional Chinese medicine combined with antibiotics [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2012, 21(6): 970.
- [19] 杨明玮. 中药辅助替加环素 + 头孢哌酮舒巴坦联合方案治疗 ICU 重症肺炎合并 G⁻菌感染的临床观察 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(10): 2504-2506.
- YANG M W. TCM assisted tigecycline combined with cefoperazone sulbactam in treatment of severe pneumonia with G⁻ bacteria infection in ICU [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2016, 34(10): 2504-2506.
- [20] 刘剑兰, 胡琳娜, 黄炜萍, 等. 耐药菌肺炎中医证候分布及演变规律文献研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(10): 53-55.
- LIU J L, HU L N, HUANG W P, et al. Literature study on distribution and evolution of traditional Chinese medicine syndromes of drug-resistant pneumonia [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2021, 35(10): 53-55.
- [21] STAUB N C, HYDE R W, CRANDALL E. NHLBI workshop summary. Workshop on techniques to evaluate lung alveolar-microvascular injury [J]. Am Rev Respir Dis, 1990, 141(4): 1071-1077.
- [22] KARVE I P, TAYLOR J M, CRACK P J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury [J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(4): 692-702.
- [23] ZHOU X, ZHANG L, LIE L, et al. MxA suppresses TAK1-IKK α / β -NF- κ B mediated inflammatory cytokine production to facilitate *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. J Infect, 2020, 81(2): 231-241.
- [24] 朱海滨, 方静, 唐木兰, 等. 双氢杨梅树皮素对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤及 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 湖北农业科学, 2023, 62(5): 118-123.
- ZHU H B, FANG J, TANG M L, et al. The effects of ampelopsin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice

and the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Hubei Agric Sci, 2023, 62(5): 118-123.

[25] SOUZA A C, TSUJI T, BARANOVA I N, et al. TLR4 mutant mice are protected from renal fibrosis and chronic kidney disease progression [J]. Physiol Rep, 2015, 3(9): e12558.

[26] ZHU S, TANG S, SU F. Dioscin inhibits ischemic stroke-induced inflammation through inhibition of the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in a rat model [J]. Mol Med Rep,

2018, 17(1): 660-666.

[27] 孙振玉, 陈学军. TLR4、MyD88 和 NF- κ B 在大肠癌中的表达及意义 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(3): 548-551.

SUN Z Y, CHEN X J. Expressions of TLR4, MyD88 and NF- κ B in colorectal cancer and its clinical significance [J]. Chin J Gerontol, 2019, 39(3): 548-551.

[收稿日期] 2023-11-20

《动物模型与实验医学(英文)》(*Animal Models and Experimental Medicine, AMEM*) 审稿人招募

《动物模型与实验医学(英文)》(*Animal Models and Experimental Medicine, AMEM*)是国际化的,开放获取的英文期刊,致力于为实验动物物种资源、实验动物模型、实验动物技术、实验动物福利及实验医学、比较医学和转化医学等科学研究搭建国际交流平台,发挥学科引领和学术创新导向作用。自创刊以来,相继被 CSCD(核心)、DOAJ、PubMed、WJCI、MEDLINE、ESCI、Scopus 等国内外数据库收录,连续 3 年入选“中国国际影响力优秀学术期刊”。影响因子 3.8,且 CiteScore 值从 2022 年初的 5.5 上升到 6.3,期刊影响力得到国际认可,成为实验动物科学领域国际同行创新性研究成果的重要展示平台,更是实验动物科研工作者国际学术交流的重要渠道。AMEM 与国际著名出版集团 Wiley 合作出版,稳步推进期刊的国际化,并重视编委、作者、审稿人队伍的国际化。为提供更广阔的学术交流平台 and 成长空间,同时增强 AMEM 在实验动物科学领域的学科引领作用,AMEM 诚挚邀请海内外对动物模型研究和实验医学方面有浓厚兴趣、有高度热忱、有专业素养、有独到洞察的专家学者成为审稿人。

招募条件:

博士学位,研究背景为实验动物科学;近 3 年以通讯作者或第一作者发表至少 IF > 3 的论文;能以客观公正的态度审稿,并能严格按期完成任务;具有英文期刊审稿经验者优先。

权益:

颁发《*Animal Models and Experimental Medicine*》审稿人证书;每期出刊后可免费获赠本刊电子刊或纸刊一本;个人及团队投稿享受优先审稿绿色通道;可优先申请成为本刊编委;可以申请进行专栏组稿,扩大您及您团队的影响力;可推荐研究热点,编辑部帮助联系相关专家合作;有助于及时获取个人研究领域的新进展;有助于获得审稿和编辑经验。

需要承担的工作:

负责期刊审稿,每月需要完成高质量审稿 1 篇及以上。

请将申请表和学术简历(含个人基本信息、教育、访学和工作经历、主要研究领域、主持科研项目、代表性论文列表等),发送至 amem@cnilas.org

官网网址: <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/25762095>

Animal Models and Experimental Medicine 编辑部

扫码跳转至官网通知,在通知结尾点击“申请表”,下载填报后与个人学术简历一并发送至邮箱。



李新雨,李海凤,王煜,等. 两种呼吸道感染途径建立豚鼠结核模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 733-742.
LI X Y, LI H F, WANG Y, et al. Comparison of guinea pig models of tuberculosis established by two respiratory infection routes [J].
Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 733-742.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.006

两种呼吸道感染途径建立豚鼠结核模型的比较

李新雨^{1,2}, 李海凤^{1,2,3}, 王煜^{1,2,3}, 屈沛杰^{1,2,3}, 王俊飞^{1,2}, 占玲俊^{1,2,3*}

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021; 2. 北京协和医学院比较医学
研究中心,北京 100021; 3. 国家动物模型技术创新中心,北京 100021)

【摘要】 目的 建立不同剂量的滴鼻和气管内定量气溶胶感染途径的豚鼠结核模型,并进行对比分析,为标准化豚鼠呼吸道感染结核模型建立提供基础。方法 雌性哈氏豚鼠 24 只,随机分为 6 组,每组 4 只,气管内定量气溶胶和滴鼻途径感染豚鼠均用两个剂量,均分为 3 个组(A、B、C 组,D、E、F 组)。气溶胶感染途径分为 3 组:A 组(气溶胶对照组,未感染对照)、B 组(气溶胶低剂量感染组, 5×10^2 CFU)和 C 组(气溶胶高剂量感染组, 5×10^3 CFU);滴鼻感染途径也分为 3 组:D 组(滴鼻对照组,未感染对照)、E 组(滴鼻低剂量感染组, 1×10^4 CFU)和 F 组(滴鼻高剂量感染组, 5×10^4 CFU)。结核菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)感染豚鼠后观察其一般表现,第 14 天解剖,取肺、脾、肝组织,记录大体病变,用苏木素-伊红(HE)染色分析组织中结核肉芽肿病变,采用抗酸染色分析原位菌的分布和数量,菌分离培养分析脏器荷菌量。结果 4 个感染组(B、C、E、F 组)豚鼠的肺、脾、肝均有肉眼可见的结核病灶及 HE 染色后可见结核肉芽肿病变。抗酸染色和荷菌量提示,B、C 组的菌主要分布在肺组织,少数分布在脾和肝,荷菌量为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL;E、F 组的菌在肺、脾、肝均有分布,荷菌量为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL。B、C、E、F 组的病变和荷菌量,组间均无显著性差异,但 B、C、F 组内病理学及病原学指标的标准差较小。结论 两个剂量的气溶胶和滴鼻途径均能制备豚鼠急性结核模型,病理学检查和病原学分析表明,气溶胶 5×10^2 CFU Mtb 即可成功制备该模型,且模型均一性较好;滴鼻途径 5×10^4 CFU Mtb 也可制备更均一的豚鼠急性结核模型,然而气溶胶 5×10^2 CFU 比滴鼻途径 5×10^4 CFU 发展为更严重的急性结核模型。

【关键词】 结核分枝杆菌;豚鼠模型;气溶胶;滴鼻

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 06-0733-10

Comparison of guinea pig models of tuberculosis established by two respiratory infection routes

LI Xinyu^{1,2}, LI Haifeng^{1,2,3}, WANG Yu^{1,2,3}, QU Peijie^{1,2,3}, WANG Junfei^{1,2}, ZHAN Lingjun^{1,2,3*}

(1. Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;
2. Center of Comparative Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China;
3. National Center of Technology Innovation for Animal Model, Beijing 100021, China)

Corresponding author; ZHAN Lingjun. E-mail: zhanlj@cnilas.org

【Abstract】 Objective This study was performed to establish and compare guinea pig models of tuberculosis using intranasal and aerosol infection routes at different doses. The overall goal was to provide a foundation for establishing a standardized guinea pig model of tuberculosis for the study of respiratory tract infection. **Methods** Twenty-four female guinea pigs were randomly divided into six groups of four guinea pigs each. They were then infected with two doses of *Mycobacterium tuberculosis* through either the aerosol route (groups A, B, and C) or intranasal route (groups D, E, and F). Aerosol infection groups consist of 3 groups: group A (Aerosol control group, uninfected control group), group B

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-037)。

Funded by the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (2021-I2M-1-037)。

【作者简介】 李新雨,女,在读硕士研究生,研究方向:结核病动物模型。Email: 17865196153@163.com

【通信作者】 占玲俊,女,博士,研究员,研究方向:结核病的比较医学研究。Email: zhanlj@cnilas.org

(Aerosol low-dose group, 5×10^2 CFU), and group C (Aerosol high-dose group, 5×10^3 CFU) Intranasal infection groups also consist of 3 groups: group D (Intranasal control group, uninfected control group), group E (Intranasal low-dose group, 1×10^4 CFU), and group F (Intranasal high-dose group, 5×10^4 CFU). The clinical manifestations of the guinea pigs were observed after infection. All guinea pigs were euthanized on day 14. Lung, spleen, and liver tissues were obtained for gross examination and histopathological analysis using hematoxylin-eosin staining to identify characteristic lesions associated with tuberculosis. Acid-fast staining was performed on *in situ* tissues and organs followed by bacterial culture to analyze the bacterial load. **Results** The guinea pigs in four infection groups (B, C, E, and F) exhibited macroscopic tuberculosis lesions in the lung, spleen, and liver. Histopathological examination revealed the presence of tuberculous granuloma lesions. Acid-fast staining and bacterial load analysis demonstrated that the bacteria were primarily localized in the lung tissue of aerosol-infected groups B and C, with a few also present in the spleen and liver, and the bacterial load was $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL. In intranasal infection groups E and F, bacteria were found in the lung, spleen, and liver with a similar bacterial load of $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL. There was no significant difference in lesion severity or bacterial load among groups B, C, E, and F; however, groups B, C, and F showed low standard deviations for both pathology and etiology. **Conclusions** A guinea pig model of acute tuberculosis was successfully established using two doses administered through distinct routes of infection. Pathological examination and pathogenic analysis demonstrated that an aerosol dose of 5×10^2 CFU of Mtb effectively established a homogeneous model of acute tuberculosis with good consistency among the animals. Additionally, intranasal infection with 5×10^4 CFU of Mtb produced a relatively uniform model of tuberculosis. Notably, however, aerosol infection at 5×10^2 CFU progressed to an acute tuberculosis model more rapidly than intranasal infection at 5×10^4 CFU.

[Keywords] *Mycobacterium tuberculosis*; guinea pig model; aerosol infection; intranasal infection

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

结核病 (tuberculosis, TB) 是全球传染病死亡的第一大原因, 根据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 《2023 年全球结核病报告》, 每年约有 1000 万人罹患结核病, 2022 年, TB 是世界第二大单一病原体导致死亡的疾病^[1], 结核病的防治研究依然是当下迫切的需求。然而, 结核病是一种可预防且通常可治愈的疾病。结核动物模型是结核病防治研究的重要工具。利用结核动物模型可以阐明发病机制, 进而为结核的新药、疫苗效果评价及诊断试剂等提供可靠的临床前数据。

结核是呼吸道感染疾病, 理想的结核动物模型的感染途径、临床表现、疾病过程、病理病变特征、体内结核菌的分布和复制曲线等特征应与人类疾病相似, 由于物种的差异, 动物模型很难在各方面都类似。目前已经针对不同的研究目的制备了不同物种不同病程的结核动物模型, 包括小鼠、豚鼠、兔、斑马鱼、牛、猴及其他灵长类动物等。

豚鼠对结核菌更为敏感^[2], 是疫苗效果评价的首选模型, 豚鼠感染后的疾病进展、免疫病理方面与人类有较多相似之处^[3-4], 其肺部能够形成典型的肉芽肿炎性结构, 并可发展为干酪样坏死, 能较好地模拟人类结核病疾病进程, 可用于病理病变及疾病过程的研究, 也可用于结核治疗方案的制定研

究。豚鼠动物模型应用相对小鼠较少^[5], 主要原因有: (1) 用于科研的豚鼠近交系较少, 常用的豚鼠如哈氏豚鼠为封闭群, 个体差异较近交系大; (2) SPF 级豚鼠繁育饲养能力及专业知识不如小鼠成熟; (3) 目前缺乏豚鼠特异性免疫试剂。因此, 尽管豚鼠模型应用上很有吸引力, 但基于豚鼠的动物模型尚有很多待完善之处。

已经报道豚鼠感染模型的感染途径有静脉注射, 经前肢、腹股沟或大腿内侧皮下注射、腹腔注射^[6]、滴鼻感染^[7]、气溶胶感染^[8]等。随着科研的发展, 气溶胶感染结核模型是结核病基础和应用研究的方向, 滴鼻感染为呼吸道感染的次选途径。目前受生物安全实验室设施设备限制及基于生物安全管理考虑, 全自动气溶胶发生器的安全使用仍然在逐步探索, 气溶胶感染的结核动物模型在国内的应用尚处于起步阶段, 仍需完善和普及。气管内定量气溶胶感染操作简易且感染更均一、更有生物安全性, 不失为一种理想的结核动物模型感染方式。

本研究采用结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 标准株 Erdman, 选择滴鼻感染和气管内定量气溶胶感染两种方式, 探索建立 Mtb 急性感染豚鼠模型的制备方法, 以期为 TB 新型疫苗和药物的研究提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 SPF 级雌性哈氏豚鼠, 8 ~ 10 周龄, 体重 250 ~ 300 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0011】。饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所 ABSL3 实验室【SYXK(京)2021-0058】, 饲养条件为昼夜各半循环照明, 相对湿度 40% ~ 70%, 温度控制在 18 ~ 22 °C, 自由进食饮水。实验动物处置严格遵循动物福利原则, 研究方案经中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物管理和使用委员会批准(ZLJ23005)。

1.1.2 菌株

结核菌标准株 Erdman 为本实验室保存(菌株号: ATCC-35801)。

1.1.3 主要试剂与仪器

异氟烷(2023101601, 山东安特牧业科技有限公司); 舒泰(BN968AA, 法国维克); 7H10 培养基(2046511, 美国 BD 公司); OADC 增菌液(212351, 美国 BD 公司); 抗酸染色试剂盒(BH0027, 博尔夫生物)。美天妮匀浆机(GentleMACS, 德国美天旎公司); 肺部液体定量雾化器(YAN30012, 上海玉研科学仪器有限公司); 小动物呼吸麻醉机(R5001E, 瑞沃德)。

1.2 方法

1.2.1 通过气管内定量气溶胶感染建立豚鼠结核模型

将 12 只豚鼠随机分为 A 组(气溶胶对照组, 组内动物编号 A1 ~ A4)、B 组(气溶胶低剂量感染组, 5×10^2 CFU, 组内动物编号 B1 ~ B4)和 C 组(气溶胶高剂量感染组, 5×10^3 CFU, 组内动物编号 C1 ~ C4)共 3 组, 每组 4 只。使用舒泰经肌内注射麻醉豚鼠, 麻醉剂量按照 50 ~ 75 mg/kg 给药。其中, A 组经气管雾化注射 100 μ L 无菌生理盐水, B 组经气管雾化注射对数生长期 Erdman 株单细胞悬液 100 μ L (5×10^3 CFU/mL), C 组经气管雾化注射对数生长期 Erdman 株单细胞悬液 100 μ L (5×10^4 CFU/mL)。于 ABSL-3 实验室正常饲喂, 观察并记录豚鼠临床表现, 感染 2 周后解剖豚鼠。

1.2.2 滴鼻感染建立豚鼠结核模型

将 12 只豚鼠随机分为 D 组(滴鼻对照组, 组内动物编号 D1 ~ D4)、E 组(滴鼻低剂量感染组, $1 \times$

10^4 CFU, 组内动物编号 E1 ~ E4)和 F 组(滴鼻高剂量感染组, 5×10^4 CFU, 组内动物编号 F1 ~ F4)共 3 组, 每组 4 只。使用小动物麻醉机麻醉豚鼠, 在 2% ~ 5% 异氟烷与氧气混合气中进行, 通常在 5 ~ 10 min 内产生麻醉, 豚鼠麻醉后立即进行滴鼻感染实验。其中, D 组滴鼻 100 μ L 无菌生理盐水, E 组滴鼻对数生长期 Erdman 株单细胞悬液 100 μ L (1×10^5 CFU/mL), F 组经滴鼻对数生长期 Erdman 株单细胞悬液 100 μ L (5×10^5 CFU/mL)。于 ABSL-3 实验室正常饲喂, 观察并记录豚鼠临床表现, 感染 2 周后解剖豚鼠。

1.2.3 豚鼠组织荷菌量测定

于 ABSL-3 实验室负压解剖台中解剖感染豚鼠, 取肺、脾和肝组织; 拍照记录肺、脾和肝等器官的大体病变情况, 取左下和右下肺叶各半, 脾头部及肝大叶、小叶各半, 称重, 依次经 2% 稀硫酸溶液、生理盐水分别漂洗 30 s, 分别装入 gentleMACS M 管中, 加入 5 mL 生理盐水, 充分研磨后取组织匀浆液进行 10 倍倍比梯度稀释, 分别取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释液 50 μ L 均匀涂布于 7H10 固体二分平板培养基上, 于 37 °C 恒温培养箱中培养 4 周, 计算相应的组织器官荷菌量。

1.2.4 组织切片的苏木素-伊红(HE)染色及抗酸染色

各组织器官用 10% 中性福尔马林溶液固定 48 h, 制成 5 μ m 厚度石蜡切片, HE 染色后扫描并保存为 NanoZoomer 数字病理图像, 不同视野下拍照并进行组织病理学分析。抗酸染色组织切片脱蜡至水, 使用抗酸染色试剂盒进行抗酸染色。染色结束后使用中性树脂封片并扫描玻片后保存为 NanoZoomer 数字病理图像, 统计分析结核分枝杆菌阳性结果。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2 统计分析绘图软件, 结果以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

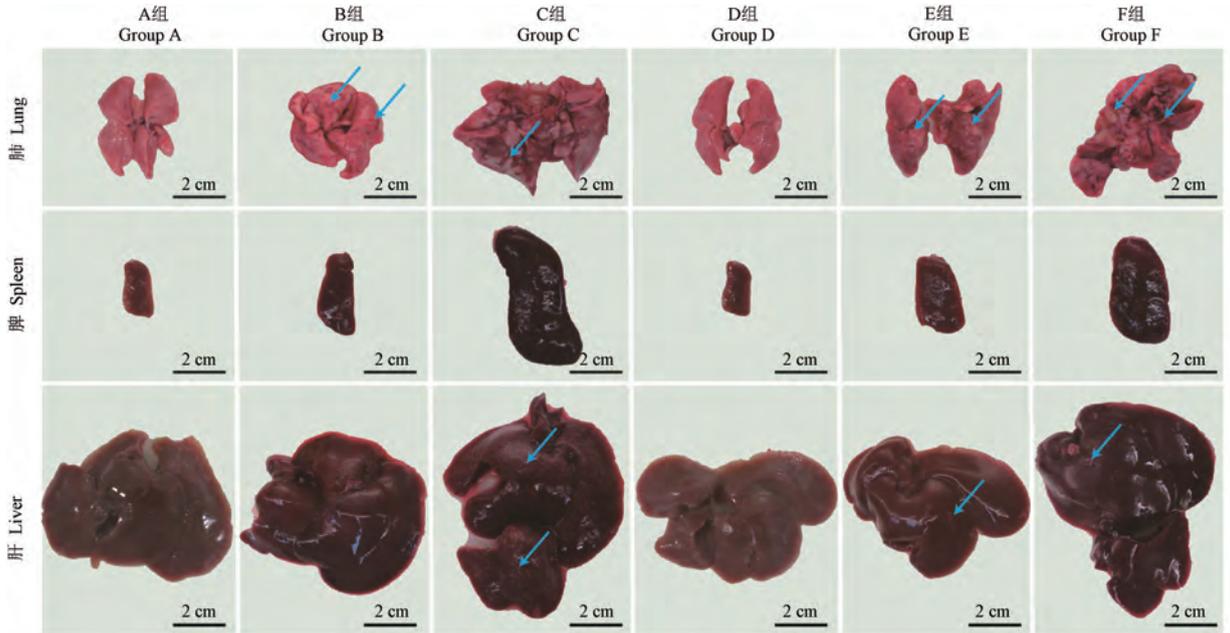
2 结果

2.1 豚鼠一般临床表现及大体病理

B、C、E 和 F 组与 A、D 组的豚鼠一般临床学表现无显著性差异, 其自主活动正常、精神状态良好, C 组和 F 组个别感染严重的豚鼠被毛凌乱不规则。

A 组和 D 组豚鼠解剖后肉眼可见各脏器组织表面光滑、无充血、水肿。B、C、E 和 F 组解剖后, 肉眼可见胸腔和腹腔脏器心脏、肾、肠道等无明显病变, 腹股沟淋巴结和腋下淋巴结触摸有肿大, 无肉眼病变。肺、脾和肝有大体病变, B、C、E 和 F 组均出现大体病变严重的豚鼠, 肉眼可见病变灶, 肺和

脾均有不同程度的肉眼观病理变化。具体表现为肺组织有粟粒样病变, 为白色透亮的结节样结核病灶, C 组和 F 组出现个别豚鼠肺部纤维化, 全肺视野组织均可见肉眼发白的结核样病变。B、C、E 和 F 组豚鼠脾和肝有不同程度的肿大, 组织出现肉眼可见的粟米大到黄豆大的白色病变(图 1)。



注: 箭头指示结核菌感染病变处。(下同)

图 1 不同组别豚鼠肺、脾、肝大体病变

Note. Arrows show the lesions of *Mtb* infection. (The same in the following figures)

Figure 1 Gross lesions of lung, spleen and liver in different groups of guinea pigs

2.2 豚鼠脏器的组织病理病变

A、D 组 HE 染色表现正常, B、C、E、F 组豚鼠肺、脾、肝组织 HE 染色均可见典型结核性病变。

2.2.1 脾和肝组织病变

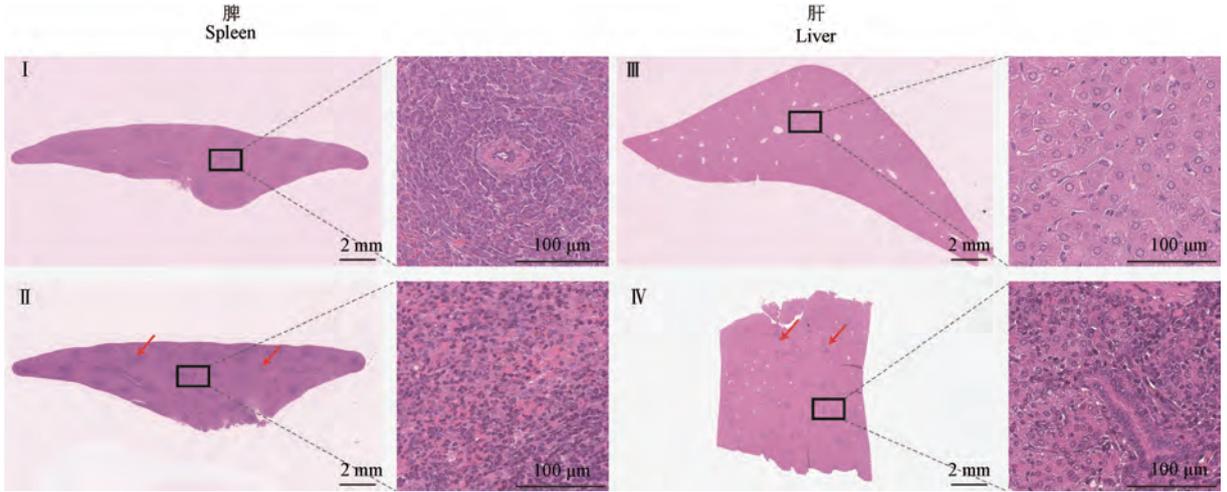
A 组和 D 组健康豚鼠脾可见完整的生发中心, 红髓与白髓边界清晰(图 2 I), B、C、E 和 F 组豚鼠脾白髓呈结核感染的病变生发中心被破坏, 可见炎症细胞浸润聚集, 组织中红细胞提示有充血、出血等病理变化, 且白髓病变与脾小体与红髓区界限不清(图 2 II); A 组和 D 组豚鼠肝无肉芽肿病灶(图 2 III), B、C、E 和 F 组豚鼠肝中出现多个散在的、大小不等的小肉芽肿和坏死灶(图 2 IV)。

2.2.2 肺组织病理病变

将豚鼠肺部病变发展分为 IV 个阶段(图 3): 第 I 阶段, 广泛性炎性细胞浸润。病变随机分布于肺泡区内、气管或支气管旁和血管周围组织中, 主要由巨噬细胞和散在的淋巴细胞组成, 偶可见嗜中性

粒细胞和嗜酸性粒细胞, 细胞浸润导致肺泡壁增厚(图 3 I); 第 II 阶段, 肺组织出现实变。出现界限分明、边界明确的小面积实变, 实变形态不规则, 开始形成结构不典型的结核肉芽肿。主要由分散的嗜中性细胞和巨噬细胞组成, 其中巨噬细胞呈上皮细胞样形态(图 3 II); 第 III 阶段, 形成典型结核肉芽肿并伴有较大面积实变。其特征是大量变性嗜酸性粒细胞伴核固缩和核分裂。早期干酪样坏死也出现, 主要由同质的嗜酸性物质组成。坏死的核心区被炎症细胞包围, 各病灶附近炎症细胞中有数量不等的嗜酸性白细胞, 并被上皮样巨噬细胞和不同数量的多核巨细胞(multinucleated giant cells, MNGCs)包围(图 3 III); 第 IV 阶段, 全肺大面积实变(实变面积大于 80%)。肉芽肿表现为广泛的、中心的干酪样坏死, 并伴有营养不良的钙化, 周围组织主要由上皮样巨噬细胞和部分淋巴细胞组成(图 3 IV)。

所有 B、C、E 和 F 组豚鼠肺部组织病理都出现



注:图 I 和 III 展示 A 组和 D 组未感染豚鼠脾和肝健康病理对照(以豚鼠 A1 为例);图 II 和 IV 展示 B、C、D 和 F 组豚鼠脾和肝典型结核感染病变(以豚鼠 C1 为例);箭头指示结核感染典型病灶。

图 2 结核菌感染豚鼠脾、肝组织病理变化

Note. I and III show healthy pathological controls of spleen and liver of uninfected guinea pigs in groups A and D (guinea pig A1 as an example). II and IV show typical Mtb infection lesions in spleen and liver of guinea pigs in groups B, C, D and F (guinea pig C1 as an example). Arrows indicate typical Mtb infection lesions.

Figure 2 Pathological changes of spleen and liver in all infected guinea pigs with Mtb infection

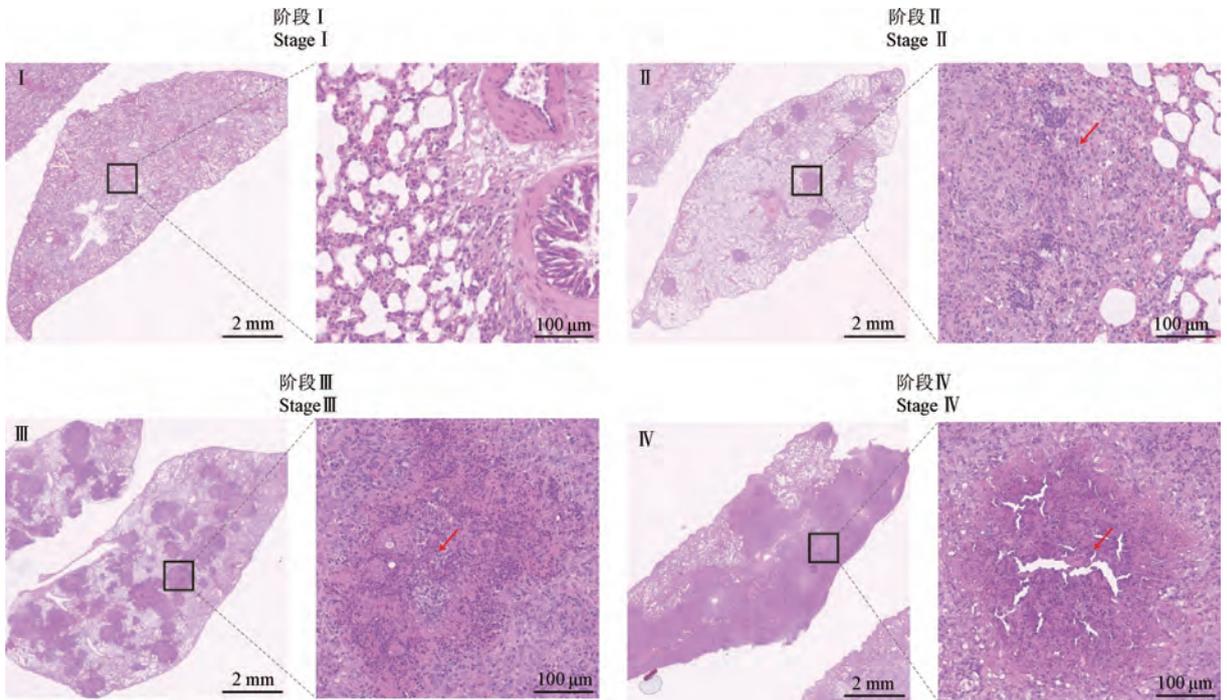


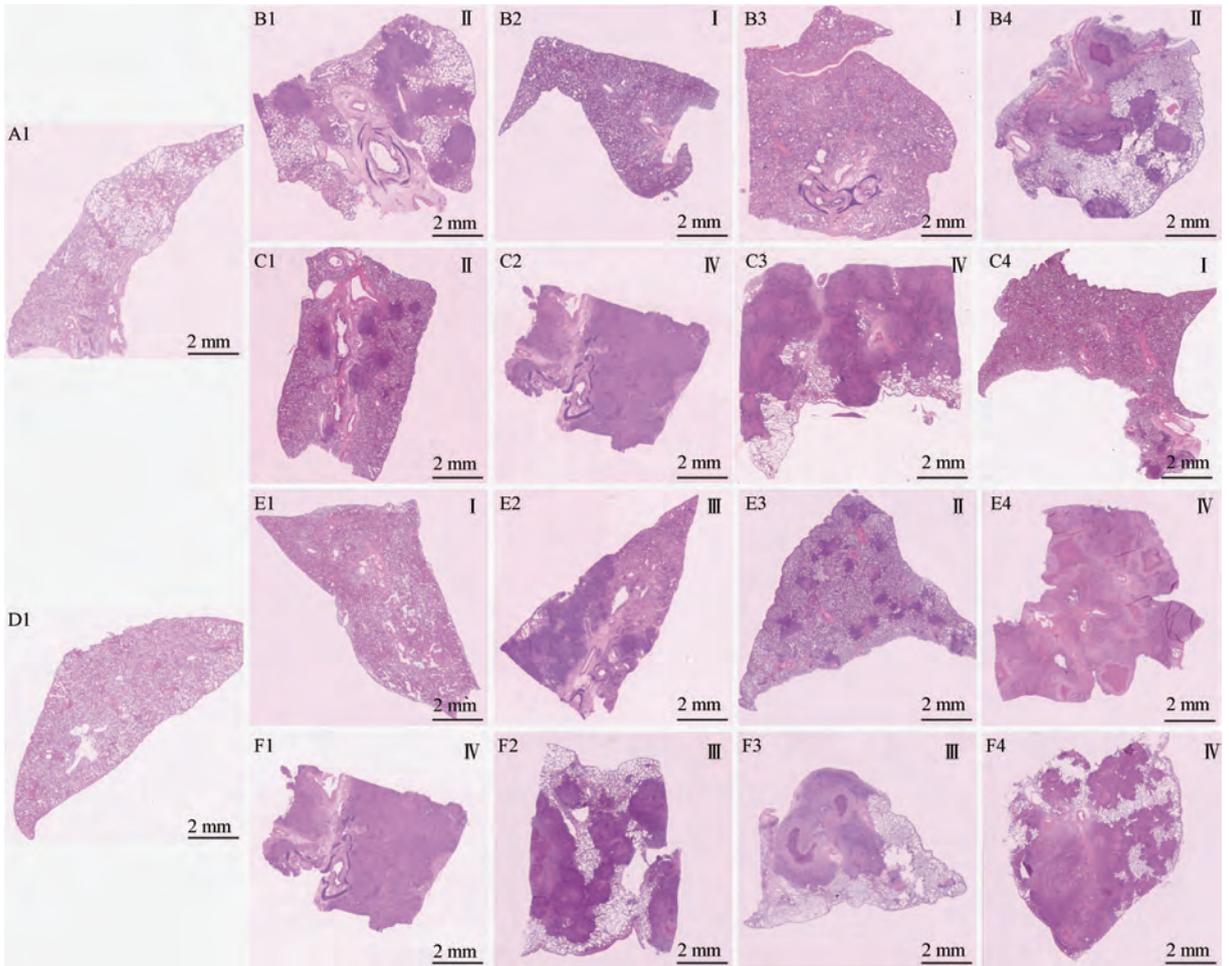
图 3 结核菌感染豚鼠肺部病变发展进程

Figure 3 Development of pulmonary lesions in guinea pigs infected with Mtb

典型性结核病变,表现为肺部支气管和血管旁及其管腔内均有炎性细胞浸润,有嗜酸性粒细胞及淋巴细胞渗出,并可见肺泡不均匀扩张,肺泡间隔断裂等;肺泡壁增厚,肺泡腔被淋巴细胞等炎症细胞填充。感染严重的豚鼠(B、C、E 和 F 组中均有)肺部

有肉芽肿样病变,肉芽肿由坏死样病灶和周围的上皮样细胞构成,并出现朗格汉斯细胞(图 4,图 5)。

B、C、E、F 组豚鼠肺部组织均出现 I ~ IV 阶段的结核肉芽肿病变(图 4),病变程度在组内存在个体差异。值得注意的是,滴鼻和气溶胶途径感染的



注: A ~ F 为组别编号, 1 ~ 4 表示组内动物编号; A、D 为未感染对照组, 每组取 1 只动物的肺组织病理图为代表; 罗马数字示病变阶段。

图 4 结核菌感染的豚鼠肺组织病理变化

Note. A ~ F represents the group number, and 1 ~ 4 represents the animal number within the group. A and D are uninfected control groups, thus only one typical animal is shown. I-IV represent the stage of the lesion.

Figure 4 Pathological changes of lung in all infected guinea pigs with Mtb infection

豚鼠在组织病理类型和严重程度并无显著性差异, 相同感染途径的高剂量组和低剂量组之间也无显著性差异, 这提示 5×10^2 CFU 气溶胶或 1×10^4 CFU 的滴鼻即可成功制备豚鼠结核模型。

2.3 肺组织抗酸染色结果

通过肺组织切片原位抗酸染色, 在 B、C、E、F 组豚鼠的肺部组织中均能检出结核分枝杆菌。在肺部仅形成广泛性炎症 (即肺部病变 I 阶段) 的组织切片中未检出结核菌, 肺部病变 II 阶段的小块实变中可检出极少量结核菌 (图 5: C4, E3)。在肺部病变形成大块实变的肉芽肿的区域 (III ~ IV 阶段) 可检出大量结核分枝杆菌, 尤其是肉芽肿的核心区域 (图 5: B4, F4)。这提示结核杆菌的分布与肺部病变程度相关, 结核菌分布于病灶内部, 集中分布于典型肉芽肿的核心区域的干酪样坏死区或实变区

的巨噬细胞内。

2.4 结核菌在各组织脏器中的分布和复制增殖

感染 2 周时, B、C、E、F 组豚鼠的肺组织中均能分离到结核菌, 荷菌量可达 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL, 两种感染途径的豚鼠肺组织的荷菌量无显著性差异, 同时滴鼻的两个感染剂量之间、气溶胶的两个感染剂量之间的豚鼠肺组的荷菌量均无显著性差异。相比较而言, F 组的组内差异最小, 均一性最好; B 组和 C 组组内差异明显小于 E 组, 提示低剂量的气溶胶感染已经可以达到较好的均一性 (表 1)。另外, 滴鼻和气溶胶感染的结核菌分布和数量级稍有差异。滴鼻途径感染的 E 组和 F 组豚鼠可在大部分脾和肝中分离到少量结核菌, 气溶胶途径感染的 B、C 两组豚鼠, 可在脾中分离到少量结核菌, 仅能在一只豚鼠 (C3) 肝中分离出结核菌 (表 2)。

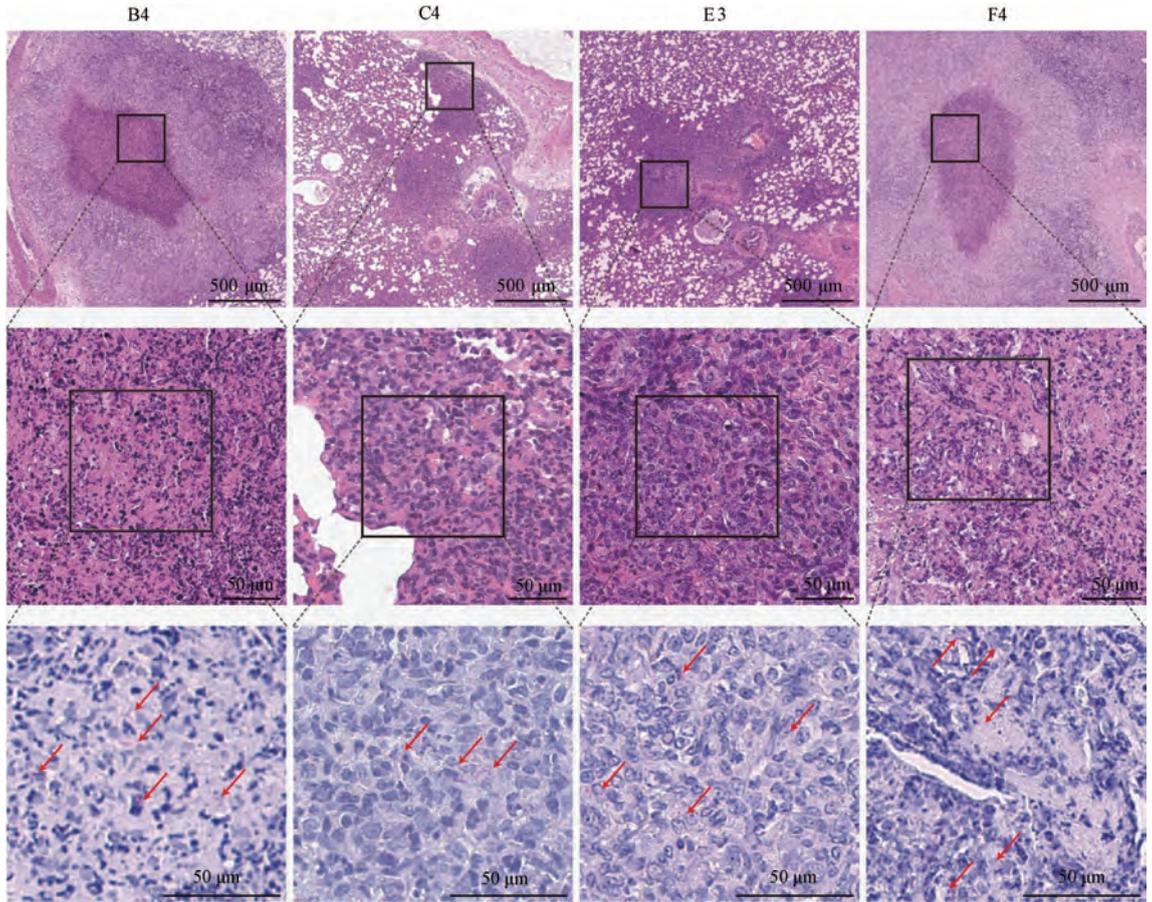


图 5 结核菌感染豚鼠肺部典型病变及抗酸染色

Figure 5 Typical lesions and acid-fast staining in the lungs of guinea pigs infected with Mtb

表 1 感染组豚鼠肺荷菌量 ($\bar{x} \pm s$, LgCFU/mL)

Table 1 Bacterial load in lung of guinea pigs with tuberculosis infection ($\bar{x} \pm s$, LgCFU/mL)

组别 Groups	荷菌量 Bacterial load
A 组 Group A	0
B 组 Group B	5.4045 ± 0.4440
C 组 Group C	5.8380 ± 0.4313
D 组 Group D	0
E 组 Group E	5.5086 ± 0.7677
F 组 Group F	5.1428 ± 0.2914

表 2 感染组豚鼠脾和肝荷菌量 ($\bar{x} \pm s$, LgCFU/mL)

Table 2 Bacterial load in spleen and liver of guinea pigs with tuberculosis infection ($\bar{x} \pm s$, LgCFU/mL)

组别 Groups	结核菌阳性动物数 Tuberculosis positive		荷菌量 Bacterial load	
	脾 Spleen	肝 Liver	脾 Spleen	肝 Liver
A 组 Group A	0/4	0/4	0	0
B 组 Group B	2/4	0/4	5.0344 ± 0.4051	0
C 组 Group C	2/4	1/4	5.2915 ± 0.6023	4.5396 ± 0.3374
D 组 Group D	0/4	0/4	0	0
E 组 Group E	3/4	2/4	5.1683 ± 0.3596	4.6703 ± 0.2952
F 组 Group F	4/4	3/4	4.7977 ± 0.4668	4.9014 ± 0.2558

3 讨论

豚鼠对 Mtb 高度敏感,迟发性免疫反应感染后会造肺组织损伤,形成干酪样坏死,产生空洞或发生钙化,与人的肺结核病理极为相似,较好地模拟了结核患者的病变过程,因此,豚鼠模型是国际

公认的最好的结核病动物模型之一^[6]。

结核动物模型制备涉及多方面因素,如动物品种、感染菌毒力、感染剂量、感染途径、感染周期以及操作者的技术经验,判定动物模型制备成功的主

要指标是组织脏器有持续复制的目标菌和特征性病理改变^[9-10],根据感染后两周豚鼠组织大体和组织病变、菌分布和荷菌量及原位抗酸染色的结果,可以证实两种途径不同剂量的 4 组(B、C、E、F 组),虽然感染所使用的菌量有 5 倍或 10 倍的差异,但感染豚鼠均成功建立急性结核模型。其中,无论是滴鼻还是气溶胶途径,高剂量组和低剂量组均能形成典型结核病变,菌复制可达 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL,且低剂量组和高剂量组组间荷菌量无显著性差异($P > 0.05$)。

然而,组内个体间存在差异,E 组肺组织荷菌量个体差异较大($s_E = 0.7677$),其余 3 组(B、C、F 组)肺组织荷菌量个体差异相对较小($s_B = 0.444$, $s_C = 0.4313$; $s_F = 0.2914$)。提示本实验设计的滴鼻高剂量组 5×10^4 CFU 是更合适的感染剂量,能够让豚鼠更为均一、稳定地感染结核;而气溶胶低剂量感染组 5×10^2 CFU 可以成功建立均一性较好的豚鼠急性结核模型。此外,两种途径的组织细菌分布不同。B、C、D、F 组豚鼠感染 2 周肺组织中均能分离出 Mtb,但脾、肝组织的菌分布不同。气溶胶途径感染的 B、C 组在脾(4/8)尤其是肝中(1/8)几乎未分离出结核菌,而滴鼻途径感染的 E、F 组在脾(7/8)和肝中(5/8)尚能分离出结核菌,这表明两种感染途径的细菌传播动力学具有异质性,与先前的报道^[11]相符。分析其原因可能是:不同感染途径,结核菌先后达到的组织脏器不同,经过的屏障(如粘膜屏障)不同,导致相同时间点菌分布和复制的数量级不同。此外,豚鼠是远交系,个体差异导致组内有不可避免的病原学,甚至病理学差异^[12]。

另外,同是呼吸道感染,豚鼠模型与结核患者的菌分布及病变靶器官稍有不同。可能原因:(1)本实验采用的是气溶胶/滴鼻感染途径,细菌首先在肺部定植,继而经血行传播可播散至其他组织和器官。本研究的模型感染周期为 2 周,处于结核病的早期,部分脾和肝已有结核菌分布及初现结核性病变。临床结核患者就诊时一般病程经过长期的发展且病变较重,以肺结核为主,少数出现肺外结核,如骨关节结核、结核性脑膜炎、肾结核、肠结核等。少见肝、脾结核性病变。因而豚鼠结核模型与临床患者靶器官稍有差异。(2)物种差异会导致结核菌的分布靶器官与患者有差异。结核患者以肺结核为主,少见累及肝、脾。气溶胶/滴鼻的感染制备的豚鼠急性感染模型,肺结核随病程进展,结核

菌可播散至其他组织脏器。推测结核患者与豚鼠模型中结核菌的播散途径有差异,除了淋巴引流,豚鼠相比结核患者可能更容易形成血行播散,肝、脾中能分离到结核菌。

根据结果,气溶胶途径相较于滴鼻途径有以下 3 个方面优势:第一,气溶胶途径能够更好地模拟自然感染^[13-14]。结核杆菌有多种传播途径,以气溶胶途径为主,基本原理为健康人群吸入 TB 患者排出的带有结核菌的气溶胶液滴^[15]。早在 1948 年, WELLS 等^[16]就通过兔的气溶胶感染实验发现 Mtb 气溶胶感染的最佳条件是直径为 $1 \sim 5 \mu\text{m}$ 、由 $1 \sim 3$ 个杆菌^[17]组成的小液滴,更多细菌更大液滴可能无法到达终末肺泡。滴鼻感染的液滴较大,因而无法保证所有细菌都能进入终末肺泡,并且较难穿过血管和肺泡间的屏障。而气管内定量雾化针制备直径小于 $5 \mu\text{m}$ 的小液滴核,所以更好地模拟自然感染的气溶胶传播途径。第二,本研究中的气溶胶感染能够精确定量,且 Mtb 用量更少,每只 500 CFU 即可均一、稳定地感染豚鼠,生物安全风险小。早先的研究表明,健康人群对含有 Mtb 的气溶胶微滴核的能力具有个体差异^[18-19]。滴鼻感染进入肺部的细菌损耗大且不能精确定量。而肺部雾化针直接插入豚鼠气管,深入肺部支气管,进入肺部的 Mtb 可以定量且用量大大减少,对操作者和环境而言生物风险更小。第三,气溶胶途径能够更好地模拟自然感染的天然免疫和特异免疫过程。气溶胶液滴直接进入肺支气管和细支气管,经过黏膜免疫屏障和血管屏障,并进入到肺泡中,启动结核菌感染的天然免疫和特异性免疫。

相较于全自动气溶胶发生器,气管内气溶胶感染具有独有的优势:第一,气管内气溶胶操作生物安全风险小,全自动气溶胶发生器在舱内形成气溶胶,放置/取出动物时易导致气溶胶暴露至环境中,且动物毛发上易沾染结核菌,动物可能会舔舐毛发,实验人员也会接触动物毛发,生物安全隐患较大。气管内气溶胶直接使用雾化针插入气管内喷雾,对环境和人员生物安全风险小。第二,定量气管内气溶胶,精准定量感染的剂量,全自动气溶胶发生器口鼻暴露感染的剂量范围受豚鼠呼吸频次深浅影响, LARENAS-MUÑOZ 等^[20]报道的气溶胶豚鼠模型,通过激发浓度为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/mL 的悬浮液,豚鼠暴露时间为 5 min,最终输送到每只动物的肺部吸入、保留剂量为 $10 \sim 50$ CFU; SAINI

等^[21]报道的气溶胶小鼠模型,使用 1.03 CFU/mL 的气溶胶浓度,小鼠在流速为 12.5 Lpm 时暴露 20 min,最终感染剂量为 400 CFU。4 周后小鼠肺部细菌量数量级为 $10^4 \sim 10^5$ CFU。而本研究采用的气管内气溶胶不受动物自主呼吸影响,更精确更均一,相对有优势。第三,气管内气溶胶仪器简单价格便宜、易于推广。全自动气溶胶发生器价格昂贵且安装复杂,需要与三级生物安全柜相连,保证生物安全,而气管内气溶胶感染途径仅需一支肺部定量雾化针,工具安全简单。其唯一受限的因素是对操作者技术熟练程度要求高,必须加强训练才能掌握。

总结,本研究成功建立了滴鼻感染豚鼠急性结核动物模型,以及气溶胶感染豚鼠急性结核模型,两种感染途径的病原学传播曲线稍有不同。下一步本团队将继续摸索气溶胶和滴鼻感染的豚鼠模型的菌复制和病变动态变化,以及区分急性结核和潜伏感染的最低感染剂量、致死剂量以及均一模型的最小感染剂量等。另外由于目前缺乏豚鼠相关的免疫学试剂,因而本模型的免疫学指标尚未深入探索,后续将关注相关免疫学试剂的研发,进一步深入结核相关的关键细胞亚型和细胞因子研究,发掘该模型的应用价值,为研究 TB 发病机制、新型疫苗和药物的筛选评价提供研究工具。

参 考 文 献(References)

- [1] BAGCCHI S. WHO's Global Tuberculosis Report 2022 [J]. Lancet Microbe, 2023, 4(1): e20.
- [2] CLARK S, HALL Y, WILLIAMS A. Animal models of tuberculosis: guinea pigs [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 5(5): a018572.
- [3] WHITE A D, SIBLEY L, SARFAS C, et al. MTBVAC vaccination protects rhesus macaques against aerosol challenge with *M. tuberculosis* and induces immune signatures analogous to those observed in clinical studies [J]. NPJ Vaccines, 2021, 6(1): 4.
- [4] WHITE A D, SIBLEY L, GULLICK J, et al. TB and SIV coinfection; a model for evaluating vaccine strategies against TB reactivation in Asian origin *Cynomolgus* macaques: a pilot study using BCG vaccination [J]. Vaccines, 2021, 9(9): 945.
- [5] ORME I M, BASARABA R J. The formation of the granuloma in tuberculosis infection [J]. Semin Immunol, 2014, 26(6): 601-609.
- [6] 张昊凌, 张志勇. 结核分枝杆菌感染动物模型的研究进展 [J]. 微生物与感染, 2012, 7(3): 184-189.
ZHANG H L, ZHANG Z Y. Advances in research on animal models of *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. J Microbes Infect, 2012, 7(3): 184-189.
- [7] 康健, 许承明, 张薇, 等. 结核分枝杆菌 H37Rv 株急性感染豚鼠模型的研究 [J]. 中国医药导报, 2020, 17(30): 20-23.
KANG J, XU C M, ZHANG W, et al. Study on guinea pig model of acute infection with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain [J]. Chin Med Her, 2020, 17(30): 20-23.
- [8] RUHL C R, PASKO B L, KHAN H S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* sulfolipid-1 activates nociceptive neurons and induces cough [J]. Cell, 2020, 181(2): 293-305. e11.
- [9] 王应辉, 王洪海, 曹健, 等. 潜伏性结核分枝杆菌感染动物模型 [J]. 中国感染控制杂志, 2011, 10(4): 312-315.
WANG Y H, WANG H H, CAO J, et al. Animal models of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Chin J Infect Contr, 2011, 10(4): 312-315.
- [10] 王豫萍, 王和. 结核分枝杆菌稳定 L 型致病性的研究 [J]. 上海医学检验杂志, 2001, 16(1): 14-16.
WANG Y P, WANG H. Study on pathogenicity of stable L-form of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Lab Med, 2001, 16(1): 14-16.
- [11] PLUMLEE C R, DUFFY F J, GERN B H, et al. Ultra-low dose aerosol infection of mice with *Mycobacterium tuberculosis* more closely models human tuberculosis [J]. Cell Host Microbe, 2021, 29(1): 68-82.
- [12] ZHANG Y, YEW W W, BARER M R. Targeting persisters for tuberculosis control [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(5): 2223-2230.
- [13] 黎友伦, 陈保文, 徐苗, 等. 结核分枝杆菌潜伏感染豚鼠模型的建立 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(9): 684-687.
LI Y L, CHEN B W, XU M, et al. A guinea pig model of latent *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv infection [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2010, 33(9): 684-687.
- [14] 卢锦标, 杨蕾, 苏城, 等. 重组 AEC/BC02 疫苗联合化疗在豚鼠模型中的抗结核效果 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2018, 38(6): 414-419.
LU J B, YANG L, SU C, et al. Therapeutic evaluation of antibiotics combined with recombinant tuberculosis vaccine AEC/BC02 in a guinea pig model of *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2018, 38(6): 414-419.
- [15] MARTINEZ L, VERMA R, CRODA J, et al. Detection, survival and infectious potential of *Mycobacterium tuberculosis* in the environment; a review of the evidence and epidemiological implications [J]. Eur Respir J, 2019, 53(6): 1802302.
- [16] WELLS W F, RATCLIFFE H L, GRUMB C. On the mechanics of droplet nuclei infection; quantitative experimental air-borne tuberculosis in rabbits [J]. Am J Hyg, 1948, 47(1): 11-28.
- [17] DONALD P R, DIACON A H, LANGE C, et al. Droplets, dust and guinea pigs: an historical review of tuberculosis transmission research, 1878-1940 [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2018, 22(9): 972-982.
- [18] ACUÑA-VILLAORDUÑA C, SCHMIDT-CASTELLANI L G,

- MARQUES-RODRIGUES P, et al. Cough-aerosol cultures of *Mycobacterium tuberculosis* in the prediction of outcomes after exposure. A household contact study in Brazil [J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0206384.
- [19] NARDELL E A. Catching droplet nuclei: toward a better understanding of tuberculosis transmission [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 169(5): 553-554.
- [20] LARENAS-MUÑOZ F, RUEDAS-TORRES I, HUNTER L, et al. Characterisation and development of histopathological lesions in a guinea pig model of *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Front Vet Sci, 2023, 10: 1264200.
- [21] SAINI D, HOPKINS G W, SEAY S A, et al. Ultra-low dose of *Mycobacterium tuberculosis* aerosol creates partial infection in mice [J]. Tuberculosis, 2012, 92(2): 160-165.
- [收稿日期] 2023-03-05

《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://zgsydw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!

孙竟然,卢秉久,郑佳连,等. 四氯化碳诱导 C57BL/6J 小鼠肝纤维化模型建立方法及优化 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 743-752.

SUN J R, LU B J, ZHENG J L, et al. Establishment and optimization of C57BL/6J mouse liver fibrosis model induced by carbon tetrachloride [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 743-752.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.007

四氯化碳诱导 C57BL/6J 小鼠肝纤维化模型 建立方法及优化

孙竟然^{1,2}, 卢秉久^{1,2*}, 郑佳连^{1,2}, 孙晓宁³, 徐俊超⁴

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院肝病科, 沈阳 110000;
3. 中国中医科学院广安门医院心内科, 北京 100032; 4. 中国人民武装警察部队
海警总队医院感染科, 浙江 嘉兴 314000)

【摘要】 目的 通过不同给药方式不同剂量四氯化碳诱导的 C57BL/6J 小鼠肝纤维化模型, 通过影像学、分子生物学及组织病理学等方法进行比较, 以此优化四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型。方法 36 只健康 C57BL/6J 雄性小鼠, 适应性饲养 1 周后, 随机分为空白组、2 周组、3 周组、4 周组、6 周组及 8 周组共 6 组 ($n = 6$), 除空白组外均作为阳性对照组。空白组以橄榄油 0.2 mL 腹腔注射, 每周 3 次, 各阳性对照组以 20% CCl_4 -橄榄油溶液腹腔注射, 剂量为 2 mL/kg, 每周 3 次。记录各组小鼠体重变化情况。分别于第 15、22、29、43 及 57 天测量小鼠肝弹性值后取血, 分别测量小鼠谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、层黏蛋白 (laminin, LN)、前 III 型前胶原 (pro-type III collagen, PC-III) 及 IV 型胶原 (type IV collagen, IV-C) 含量, 对肝组织进行苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE)、Masson 及天狼星红染色, Metavir 评分系统评估肝纤维化程度。结果 与空白组相比, 各阳性对照组小鼠精神萎靡、扎堆喜卧。在小鼠体重方面, 4 周组、6 周组、8 周组与空白组相比均明显下降, 而 2 周组与空白组相比体重明显升高。肝弹性超声显示, 随着给药时间增加, 弹性值呈进行性升高。生化结果显示, 与空白组相比, 各阳性对照组 ALT、AST 水平均显著升高, 随着给药时间增加, 各阳性对照组 HA、LN、PC-III 及 IV-C 水平呈升高趋势。病理结果显示: 随着给药时间增加, 小鼠肝纤维化程度呈进行性加重, 4 周时符合肝纤维化病理诊断, 6 周时有假小叶形成趋势, 而 8 周时已形成假小叶, 提示早期肝硬化。结论 20% CCl_4 -橄榄油溶液以每周 3 次、连续 4 周腹腔注射的方法能成功建立 C57BL/6J 小鼠肝纤维化模型, 稳定性好, 成模较快, 可以作为肝纤维化模型制造的优化方案。

【关键词】 肝纤维化; 肝纤维化模型; 四氯化碳; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 06-0743-10

Establishment and optimization of C57BL/6J mouse liver fibrosis model induced by carbon tetrachloride

SUN Jingran^{1,2}, LU Bingjiu^{1,2*}, ZHENG Jialian^{1,2}, SUN Xiaoning³, XU Junchao⁴

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 2. Department of Hepatology, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110000, China; 3. Department of Cardiology, Guang'anmen Hospital of Chinese Medical Science, Beijing 100032, China; 4. Department of Infectious Disease, China Coast Guard Hospital of the People's Armed Police Force, Jiaxing 314000, China)

Corresponding author: LU Bingjiu. E-mail: lubingjiu@163.com

【基金项目】 沈阳市科技局公共卫生研发专项(21-173-9-37)。

Funded by Public Health Research and Development Project of Shenyang Science and Technology Bureau(21-173-9-37)。

【作者简介】 孙竟然, 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 中西医结合肝病。Email: jingransun2022@163.com

【通信作者】 卢秉久, 男, 主任医师, 硕士, 研究方向: 中西医结合肝病。Email: lubingjiu@163.com

[Abstract] Objective To optimize a C57BL/6J mouse liver fibrosis model induced by different doses of carbon tetrachloride through imaging, molecular biology, and pathology method. **Methods** Thirty-six healthy C57BL/6J male mice were randomly divided into a control group, 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks, 6 weeks, and 8 weeks groups ($n = 6$) after adaptive feeding for 1 week. The control group was intraperitoneally injected with 0.2 mL olive oil three times a week, and the positive-control groups were intraperitoneally injected with 0.2 mL 20% CCl_4 -olive oil solution three times a week. Changes in the body weights of mice in each group were recorded. Liver stiffness was measured on days 15, 22, 29, 43 and 57, and blood samples were collected, and cereal third alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), hyaluronic acid (HA), laminin (LN), pro-type III collagen (PC-III), and type IV collagen (IV-C) content was measured. The liver tissues were stained with hematoxylin and eosin (HE), Masson, and Sirius red. The Metavir scoring system was used to evaluate the degree of liver fibrosis. **Results** Compared with the control group, mice in the positive-control groups were listless and tended to huddle together. In terms of body weight, the 4 weeks, 6 weeks, and 8 weeks groups were significantly lighter than the control group, while the 2 weeks group mice were significantly heavier than the control group mice. Liver elastography showed a progressive increase in stiffness with increased administration time. The biochemical tests showed that, compared with the control group, the other groups' ALT and AST levels were significantly higher. With an increase in drug delivery time, the positive-control group's HA, LN, PC-III and IV-C levels showed increasing trends. Pathological examination revealed that liver fibrosis was progressively aggravated with an increase in administration time. At 4 weeks, the pathological diagnosis was consistent with that of liver fibrosis, and there were signs of pseudolobule formation at 6 weeks. Pseudolobules were formed at 8 weeks, suggesting early cirrhosis. **Conclusions** A liver fibrosis model can be successfully established in C57BL/6J mice by intraperitoneal injection of 20% CCl_4 -olive oil solution three times a week for 4 consecutive weeks. The model has good stability, and the modeling method is rapid and can be used as an optimized scheme for the establishment of liver fibrosis models.

[Keywords] liver fibrosis; liver fibrosis model; carbon tetrachloride; animal models

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

肝纤维化(liver fibrosis, LF)是由于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过量沉积所形成的疾病,是慢性肝病共有的病理过程,也是肝硬化的必经过程。由于早期 LF 临床症状不明显,因此组织病理学是其诊断的金标准^[1]。肝硬化是慢性肝病的终末阶段,以肝小叶结构破坏、假小叶生成等病理表现为特征,是不可逆的病变过程^[2]。肝纤维化的纤维沉积具有可逆的特点,因此是预防肝硬化的最后一道防线。然而,由于肝活检为有创性检查,患者接受度差,因此往往错失诊治的最佳时机。

目前建立肝纤维化模型方法多样,根据诱发 LF 的不同病因,以乙醇^[3]、四氯化碳(CCl_4)^[4]、二甲基亚硝胺^[5]、蛋氨酸胆碱缺乏饮食^[6]、高脂饮食^[7]及高位胆管结扎^[8]等作为诱发因素。目前, CCl_4 诱导的肝纤维化模型应用十分广泛,而相关研究也证实了 CCl_4 诱导的小鼠肝纤维化与人肝纤维化的病理表现最为接近^[9]。在给药途径方面,灌胃、皮下注射与腹腔注射的选择尚存争议。研究人员在前期实验过程中发现灌胃法受人为操作影响较大,且高浓度 CCl_4 -橄榄油溶液灌胃的小鼠常因肠出血而死亡。腹腔注射经腹膜直接吸收,造模效率高却存在

着周期过短、死亡率高的不足,与其相反,皮下注射存在着吸收缓慢、造模周期过长的缺陷^[10]。在药物浓度选择上,一般配制 20% ~ 60% CCl_4 -橄榄油溶液作为造模药物的浓度,然而浓度过高时不仅溶液粘稠、操作难度大,而且加大了动物死亡的风险。因此,明确一种高效、安全、可行性高的肝纤维化规范造模方法非常必要。

本研究拟采取腹腔注射 20% CCl_4 -橄榄油溶液诱导肝纤维化 C57BL/6J 小鼠模型建立,基于腹腔注射 CCl_4 时间不同,借助分子生物学、组织病理学及影像学证据对 CCl_4 建立 LF 小鼠模型进行鉴定,明确合理造模周期,同时与 20% CCl_4 -橄榄油溶液灌胃 8 周诱导肝纤维化模型建立方法对比,明确该模型建立方法的独特优势,验证其可行性^[11]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 36 只,4 ~ 5 周龄,体重 20 ± 1 g,由辽宁长生生物有限公司提供【SCXK(辽)2020-0001】,动物饲养于辽宁中医药大学动物房【SYXK(辽)2019-0004】。饲养环境:环境

温度 20 ~ 25 ℃,相对湿度(55 ± 5)%,常规饲料饲养,自由饮食,12 h 昼夜交替。本动物实验经过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审批(21000042023078)。

1.1.2 主要试剂与仪器

小鼠谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)测定试剂盒(上海优科唯生物科技有限公司, YKW-20124);天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)测定试剂盒(上海优科唯生物科技有限公司, YKW-20133);透明质酸(hyaluronic acid, HA)测定试剂盒(深圳群安生物工程有限公司, C4001);层黏蛋白(laminin, LN)测定试剂盒(深圳群安生物工程有限公司, C4002);前Ⅲ型胶原(pro-type Ⅲ collagen, PC-Ⅲ)测定试剂盒(深圳群安生物工程有限公司, C4003);Ⅳ型胶原(type Ⅳ collagen, IV-C)检测试剂盒(深圳群安生物工程有限公司, C4004);苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司, G1076-500ML);马松(Masson)染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司, G1006-100ML);天狼星红染色试剂盒(abcam, ab150681);四氯化碳(Sigma, C805332)。

小动物超声仪(Vevo 2100, 日本);全自动酶标仪(Anthos Labtec Instruments, 奥地利);自动组织脱水处理机(TP1020, 德国);石蜡包埋机(EG1150, 德国);冰冻切片机(CM1850-1-1, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 分组与动物模型建立

将 36 只 C57BL/6J 小鼠随机分为空白组、2 周组、3 周组、4 周组、6 周组、8 周组共 6 个组($n = 6$),所有小鼠均以普通维持饲料喂养,自由进食进水。空白组(Control group)为阴性对照组,以橄榄油 0.2 mL 腹腔注射,每周 3 次。2 周组(2 weeks group)、3 周组(3 weeks group)、4 周组(4 weeks group)、6 周组(6 weeks group)及 8 周组(8 weeks group)均为阳性对照组,以 20% CCl₄-橄榄油溶液腹腔注射,剂量为 2 mL/kg,每周 3 次。

1.2.2 肝超声检查

以给药后第 2 天为基准,以首次给药后第 15、22、29、43 天为检测节点,分别检测 2 周组、3 周组、4 周组、6 周组小鼠肝弹性值,第 57 天检测空白组及 8 周组的小鼠肝弹性值。检测前以 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,麻醉后,使用小动物超声仪检

测肝弹性值,每鼠检测 3 次,记录测量值。

1.2.3 标本采集

超声检测后测量小鼠体重,取血 0.8 ~ 1.0 mL,冰盒中静置 30 min,随后放置于 4 ℃离心机中 3000 r/min 离心 15 min,离心半径 4 cm,留取上层血清置于-80 ℃冰箱中保存。取血后处死小鼠。打开小鼠腹腔,剪下小鼠肝,定性滤纸吸干多余水分后测量湿重、拍照,剪取部分肝组织置于液氮中速冻,其余置于 4%多聚甲醛固定,备用。

1.2.4 苏木精-伊红(HE)染色、Masson 染色及天狼星红染色

各组小鼠肝组织固定 48 h 后进行脱水、石蜡包埋,制作切片、脱蜡后分别按照 HE 染色试剂盒、Masson 染色试剂盒及天狼星红染色试剂盒说明书操作,染色后封片。用显微镜观察肝组织形态,借助 Image J 8.0 软件分析天狼星红染色下胶原纤维面积。

1.2.5 Metavir 评分评估小鼠肝纤维化程度

光镜下观察 Masson 染色肝组织汇管区及小叶内纤维组织沉积情况,应用 Metavir 评分系统对各组小鼠肝纤维化程度进行评分,评分细则如下。0 分:无纤维化;1 分:汇管区星芒状扩大,无纤维间隔形成;2 分:汇管区扩大,稀少的纤维间隔形成;3 分:很多纤维间隔形成;4 分:假小叶形成,肝硬化。

1.2.6 小鼠血清 ALT、AST、HA、LN、PC-Ⅲ及 IV-C 的 ELISA 检测

取各组小鼠血清进行检测。按照试剂盒说明书介绍的方法上机进行 ALT、AST、HA、LN、PC-Ⅲ及 IV-C 指标检测。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行图表绘制;所有计量数值均采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;两组间比较使用 *t* 检验,多组间比较使用单因素方差分析(One-way ANOVA),使用 SPSS 22.0 进行统计学计算, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 C57BL/6J 小鼠生存情况

2.1.1 小鼠一般状态

空白组小鼠状态良好,毛发茂密、有光泽、行动迅速、精神良好。阳性对照组首次给药后均出现精神萎靡、行动缓慢、饮食减少。第 3 周开始,阳性对照组小鼠出现相互攻击行为、毛发疏松、喜扎堆蜷

卧。第 6 周开始,阳性对照组小鼠出现背部脱毛的情况,精神极度萎靡、对外界刺激反应极差、饮食饮水减少、乏力懒动。

2.1.2 小鼠死亡情况

如图 1,造模期间共 3 只小鼠死亡,死亡率为 8.33%。6 周组死亡 1 只,8 周组死亡 2 只。其中 6 周组死亡小鼠膀胱破裂,考虑因注射操作不当所致;8 周组死亡的 2 只小鼠均出现弥漫性的腹腔出血,其中一只肝呈出血坏死样改变,考虑造模剂量过大所致。

2.2 小鼠体重及肝指数

在小鼠体重方面,4 周组、6 周组、8 周组与空白组相比均明显下降,而 2 周组与空白组相比,体重明显升高,差异具有显著性($P < 0.05$);在小鼠肝重方面,2 周组与空白组相比明显增高,4 周组、6 周组、8 周组与空白组小鼠相比明显降低,差异具有显著性



图 1 死亡小鼠尸体检

Figure 1 View of dead mice cadaver

($P < 0.05$);在小鼠肝指数方面,各阳性对照组与空白组相比明显升高,差异具有显著性($P < 0.05$)(见表 1)。

表 1 各组小鼠体重、肝重及肝指数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of body weight, liver weight, liver index level of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	<i>n</i>	体重/g Body weight/g	肝重/g Liver weight/g	肝指数/% Liver index/%
空白组 Control group	6	26.58 ± 0.74	1.04 ± 0.08	3.90 ± 0.22
2 周组 2 weeks group	6	27.58 ± 0.45*	1.24 ± 0.06*	4.49 ± 0.23*
3 周组 3 weeks group	5	26.32 ± 0.53 [△]	1.07 ± 0.08 [△]	4.08 ± 0.33* [△]
4 周组 4 weeks group	6	22.22 ± 0.58* ^{△#}	0.95 ± 0.06* ^{△#}	4.29 ± 0.19* ^{△#}
6 周组 6 weeks group	5	23.58 ± 0.86* ^{△#▲}	0.94 ± 0.05* ^{△#}	4.54 ± 0.35* ^{△#▲}
8 周组 8 weeks group	4	18.70 ± 0.74* ^{△#▲★}	0.93 ± 0.05* ^{△#}	4.98 ± 0.32* ^{△#▲★}

注:与空白组相比,* $P < 0.05$;与 2 周组相比,[△] $P < 0.05$;与 3 周组相比,[#] $P < 0.05$;与 4 周组相比,[▲] $P < 0.05$;与 6 周组相比,[★] $P < 0.05$ 。(下图/表同)

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with 2 weeks group, [△] $P < 0.05$. Compared with 3 weeks group, [#] $P < 0.05$. Compared with 4 weeks group, [▲] $P < 0.05$. Compared with 6 weeks group, [★] $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

2.3 小鼠肝组织形态观察

空白组肝颜色正常、表面光滑、肝缘锐利;随着造膜时间的进展,各阳性对照组肝组织颜色加深、晦暗无光,表面逐渐出现结节样改变,肝缘变钝。其中 6 周组和 8 周组肝缩小、肝叶比例失调、颜色深红暗淡、表面凹凸不平、有明显结节样改变(见图 2)。

2.4 HE 染色

如图 3 所示,空白组肝小叶结构规整,未见肝细胞炎症、水肿,汇管区结构正常;2 周组肝小叶结构尚规整,部分肝细胞水肿,少量炎细胞聚集于小叶内及汇管区;3 周组肝小叶结构欠规整,肝细胞水肿

较常见,部分细胞内可见 Mallory 小体(提示肝细胞损伤);4 周组肝小叶结构不整,肝窦迂曲,中央静脉及汇管区周围形成坏死带并伸入小叶内,小叶内可见较多片状坏死及炎症细胞聚集;6 周组部分肝小叶肝板塌陷、肝窦迂曲、汇管区体积增大,可见明显的纤维结缔组织包绕;8 周组肝组织内可见中央静脉-汇管区、中央静脉-中央静脉及汇管区-汇管区间桥接纤维化,纤维间隔分割肝实质,分割后小叶内无完整结构,假小叶形成。

2.5 Masson 染色

如图 4 所示,空白组小鼠肝小叶内无纤维沉积,



图 2 各组小鼠肝组织宏观病理改变($n = 3$)

Figure 2 Macroscopic pathological changes of liver tissue of mice in each group($n = 3$)

仅管腔结构着色;2 周组中央静脉及汇管区周围纤维间质增多并有伸入小叶内的趋势;3 周组肝内可见窦周纤维化形成,中央静脉及汇管区纤维间质向小叶内延伸;4 周组广泛窦周纤维化形成,中央静脉、汇管区周围纤维沉积增多并向小叶内延伸,可见广泛桥接纤维化;6 周组肝板塌陷,桥接纤维化呈现分割肝小叶趋势,可见散在纤维间隔;8 周组可见广泛纤维间隔分割肝实质,假小叶形成。

2.6 天狼星红染色

如图 5 所示,空白组小鼠小叶内无胶原纤维沉

积;2 周组肝窦内散在胶原纤维沉积;3 周组胶原纤维呈条带状沉积,由中央静脉、汇管区向小叶内延伸;4 周组可见桥接样胶原纤维沉积;6 周组可见胶原纤维沉积,部分间隔分割肝实质,其内无血供结构;8 周组肝窦内可见大量胶原纤维沉积,间隔分割肝实质,假小叶形成。

2.7 Metavir 评分与胶原纤维面积

应用 Metavir 评分系统评估肝组织纤维化程度。使用 Image J 8.0 软件对小鼠肝组织胶原纤维面积进行计算,具体结果见表 2。

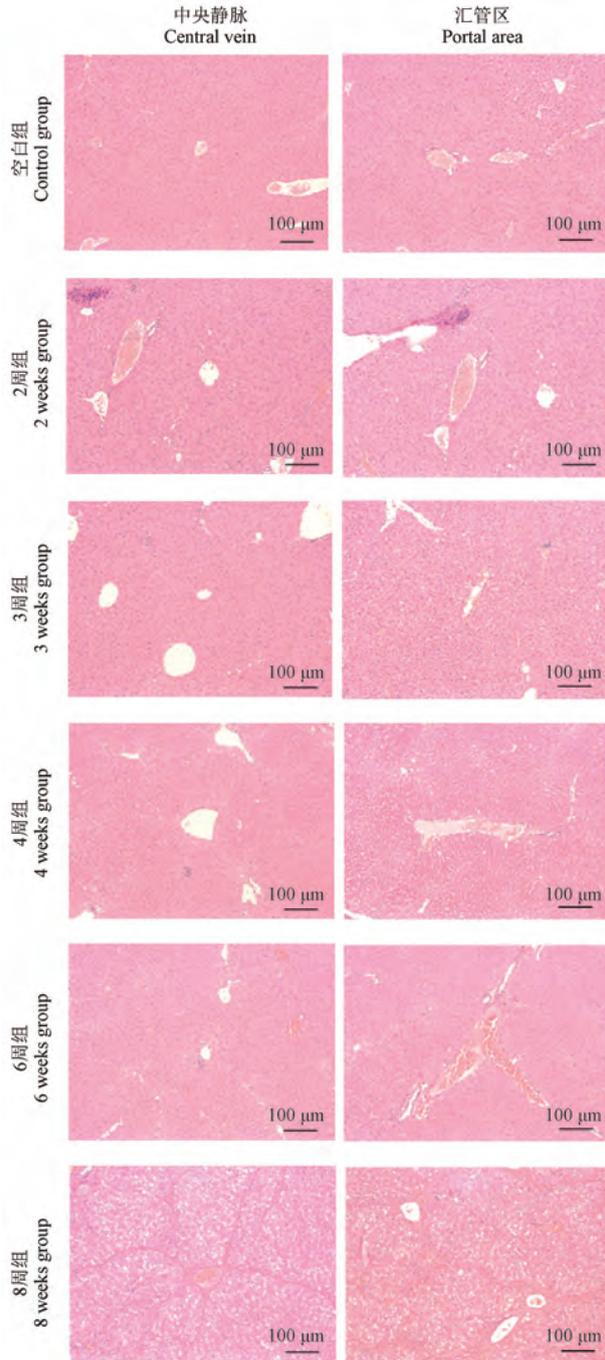


图3 各组小鼠肝组织 HE 染色

Figure 3 HE staining of liver tissue of mice in each group

2.8 肝弹性超声

如图 6 所示,空白组小鼠肝回声均匀,边缘光滑;各阳性对照组均出现不同程度肝回声粗糙不均,边缘欠光滑。如表 3 所示,与空白组相比,各阳性对照组肝弹性值均升高,差异具有显著性($P < 0.05$);随给药时间延长,弹性值呈进行性升高,差异具有显著性($P < 0.05$)。

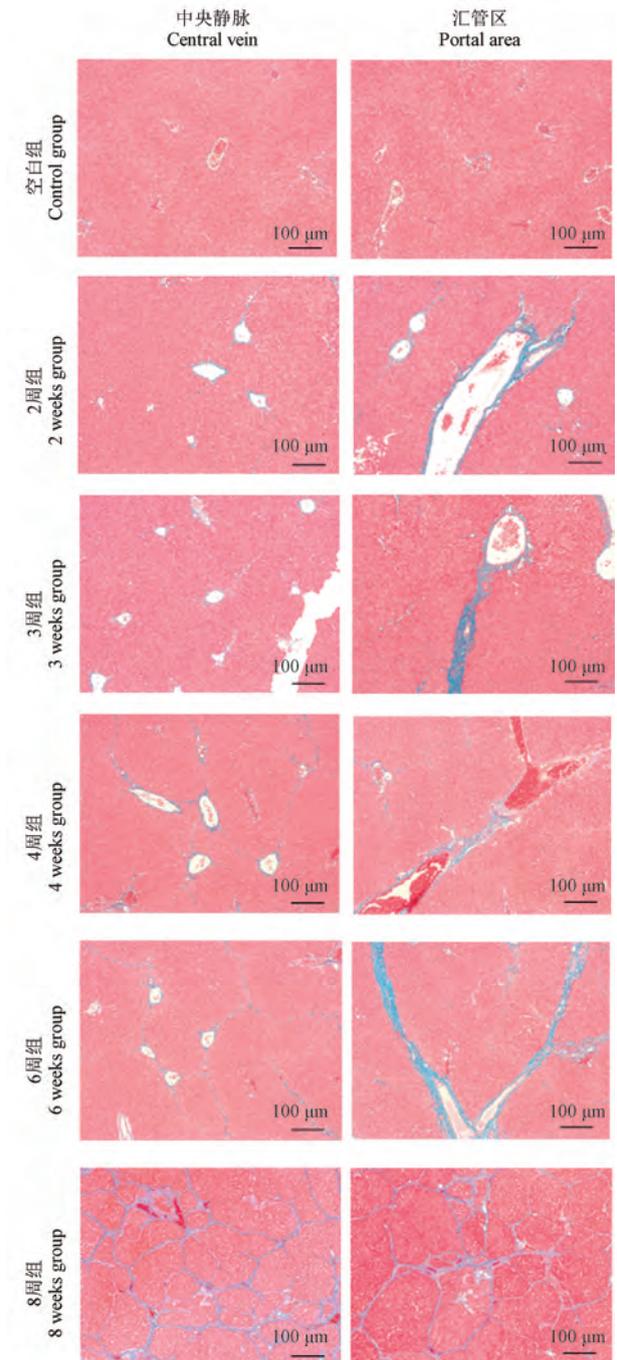


图4 各组小鼠肝组织 Masson 染色

Figure 4 Masson staining of liver tissue of mice in each group

2.9 血清 ALT、AST、HA、LN、PC-III 及 IV-C 水平

如图 7 所示,在转氨酶方面,与空白组相比,各阳性对照组 ALT、AST 水平均显著升高($P < 0.01$);6 周组与 8 周组 ALT 水平相近,无统计学意义($P > 0.05$)。如图 7 所示,与空白组相比,随造模周期延长,各阳性对照组 HA、LN、PC-III 及 IV-C 水平呈升高趋势,差异具有显著性($P < 0.01$);6 周组与 8 周

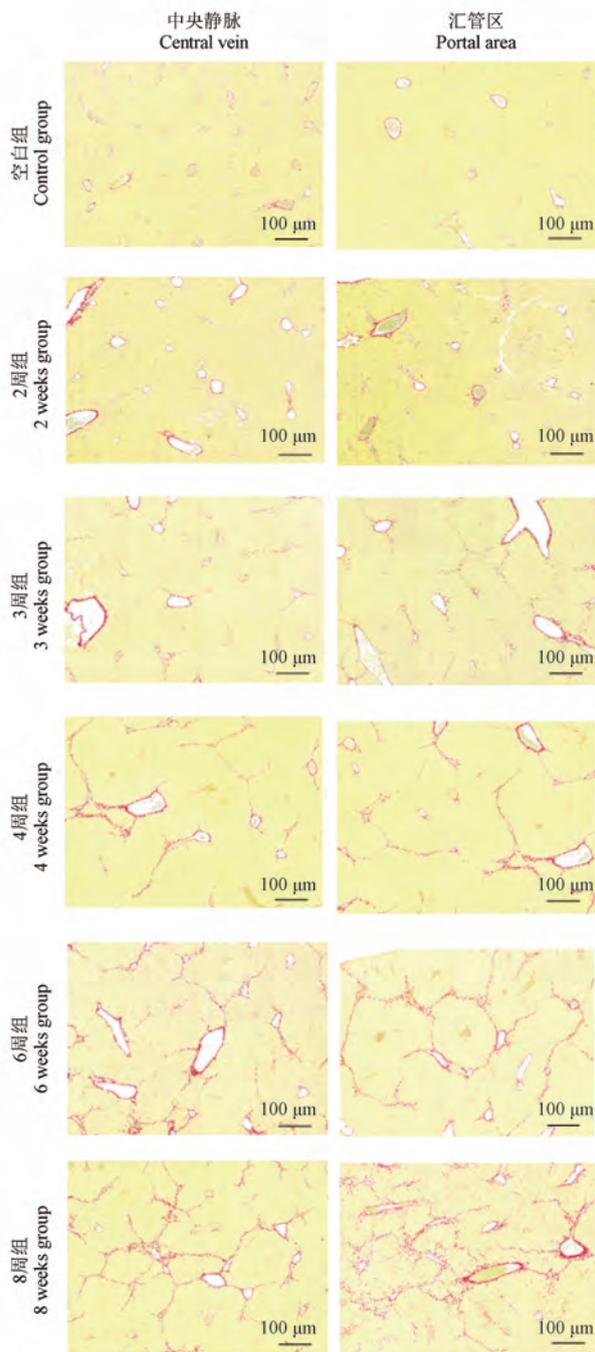


图 5 各组小鼠肝组织天狼星红染色

Figure 5 Sirius Red staining of liver tissue of mice in each group

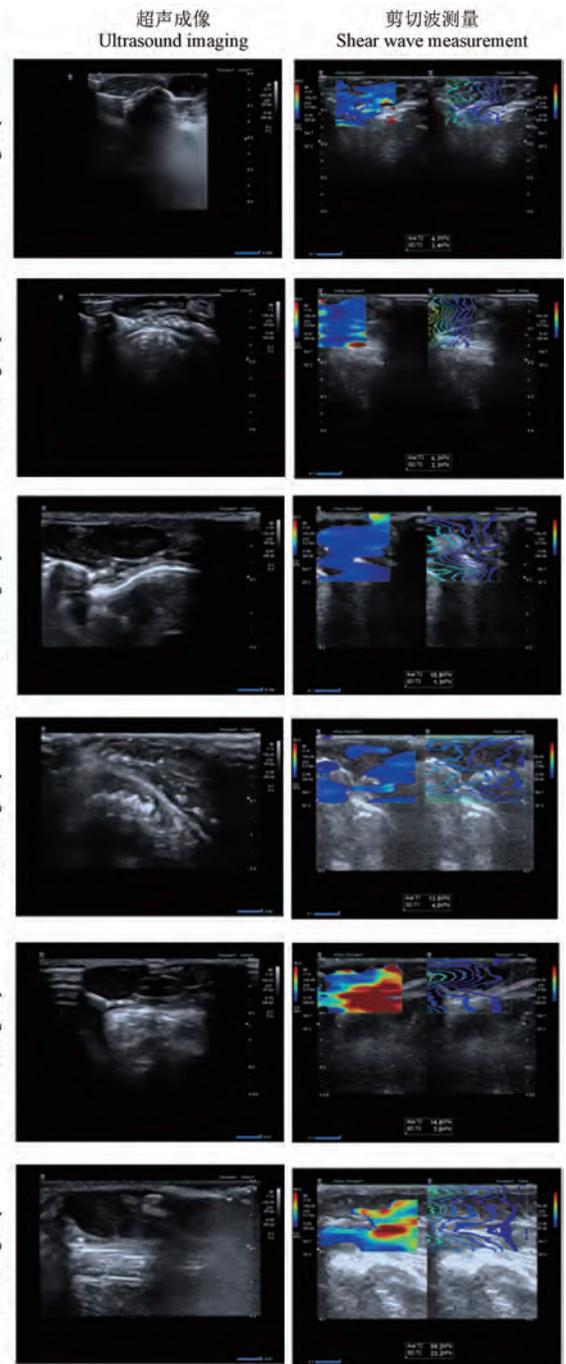


图 6 各组小鼠肝超声影像及瞬时弹性超声

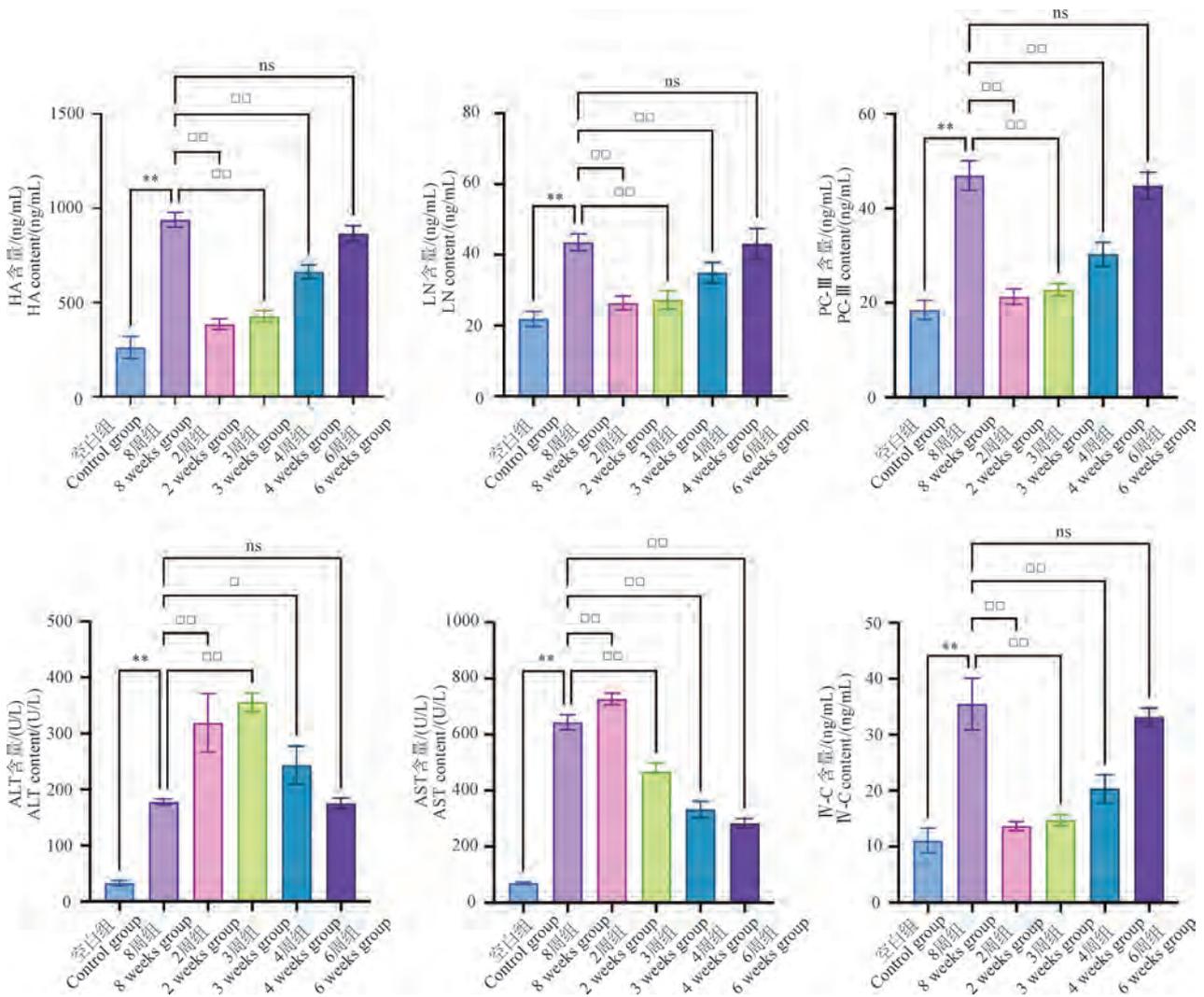
Figure 6 Liver ultrasound images and transient elastography of mice in each group

组相比, HA、LN、PC-Ⅲ及Ⅳ-C 水平相近, 无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

肝纤维化作为肝内炎症后纤维间质沉积的量变过程, 而肝硬化则是肝纤维化基础上的质变过程, 二者在病理学上存在密切联系。CCl₄ 通过激活

CYP450 氧化酶诱导肝纤维化, 是最广泛、最经典的 LF 造模药物, 其经济性好、安全性较高^[12]。在动物选择方面, 大鼠因无胆囊的特殊生理结构, 并不能完全排除胆囊对肝纤维化的影响, 而家兔等体型稍大的动物在操作难易度等方面略有不足。因此, 选取小鼠作为肝纤维化模型动物具备严谨度高、经济性好、操作便捷等优势。C57BL/6J 小鼠具备品系纯



注:与空白组相比, ** $P < 0.01$; 与 8 周组相比, $\square P < 0.05$, $\square\square P < 0.01$ 。

图 7 各组小鼠 ALT、AST、IV-C、HA、LN 和 PC-III 表达情况比较 ($n = 4$)

Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$. Compared with 8 weeks group, $\square P < 0.05$, $\square\square P < 0.01$.

Figure 7 Comparison of ALT, AST, IV-C, HA, LN and PC-III value of mice in each group ($n = 4$)

和度高、免疫应答活跃的优点,能明显提升动物实验的可重复性。因此,以 CCl_4 诱导 C57BL/6J 小鼠建立肝纤维化模型具备理论可行性,然而其造模周期、剂量等因素无法统一,严重影响模型建立的标准性和一致性。有研究通过对肝纤维化造模方法的数据挖掘,证实 8 周(每周 2 次)为 C57BL/6J 小鼠肝纤维化造模最常见的周期^[13]。因此,本研究将 8 周设置为造模终点并将给药频率增至每周 3 次,通过对造模期间各时间点小鼠肝组织纤维沉积情况进行观察,实时监测肝弹性值、肝功能、肝纤维化四项等指标并加以病理学验证,系统观察肝纤维化进展,明确成模最快、效果最好的造模周期。

本研究中,设置了空白组、2 周组、3 周组、4 周

组、6 周组及 8 周组,各组均采用维持饲料喂养,食水自由供应,仅造模周期不同。在实验过程中,出现 4 只小鼠死亡的情况,通过解剖发现 8 周组小鼠可能因药物剂量过大造成肝坏死及腹腔出血而死亡,其余小鼠均未出现上述情况,证实小鼠能够耐受每周 3 次的腹腔注射。通过对肝的肉眼观察,2 周组肝重及肝指数升高显著,而肝重或体积增高常见于急性肝炎水肿期。同时,2 周组、3 周组小鼠 ALT、AST 水平明显高于其他阳性对照组,证实了该阶段急性肝炎的存在。在肝纤维化进展方面,肝弹性值与肝纤维化四项水平随时间推移呈进行性升高,这表明肝纤维沉积与急性肝炎的出现无明显相关性,这种表现与人体肝炎肝纤维化的病理特征

表 2 各组小鼠 Metavir 评分、胶原面积百分比比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of Metavir score and percentage of collagen fiber area of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	n	Metavir 评分 Metavir score	胶原纤维面积 百分比/% Percentage of collagen fiber area/%
空白组 Control group	6	0	1.53 ± 0.30
2 周组 2 weeks group	6	1.2 ± 0.4*	3.06 ± 0.63*
3 周组 3 weeks group	5	1.6 ± 0.5 [△]	4.83 ± 0.45* [△]
4 周组 4 weeks group	6	2.3 ± 0.5* ^{△#}	7.85 ± 0.78* ^{△#}
6 周组 6 weeks group	5	3.2 ± 0.4* ^{△##▲}	9.67 ± 0.73* ^{△##▲}
8 周组 8 weeks group	4	3.6 ± 0.4* ^{△##▲★}	16.06 ± 2.15* ^{△##▲★}

表 3 各组小鼠肝弹性值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of liver SWE value of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	n	检测次数 Testing times	肝弹性值/Kpa Liver SWE value/Kpa
空白组 Control group	6	3	4.28 ± 0.45
2 周组 2 weeks group	6	3	6.26 ± 0.85*
3 周组 3 weeks group	5	3	9.93 ± 1.05* [△]
4 周组 4 weeks group	6	3	12.82 ± 1.34* ^{△#}
6 周组 6 weeks group	5	3	15.42 ± 1.21* ^{△##▲}
8 周组 8 weeks group	4	3	27.62 ± 2.83* ^{△##▲★}

相似^[14]。

组织病理学是诊断肝纤维化及肝硬化的金标准,是证实肝纤维化进展的最直观证据。HE 染色下可见 2 周组小鼠肝细胞广泛气球样变,3 周组炎症减轻而出现肝板塌陷及小叶结构不整的改变;Masson 染色更加直观地证实了随着给药时间的增加,中央静脉周围、汇管区周围纤维组织包绕增加,3 周组出现广泛窦周纤维化但桥接纤维化程度较轻,此时相当于 S1-S2 级纤维化;4 周组小叶中央静脉、汇管区纤维组织向肝内延伸,可见较多桥接纤维化,此时相当于 S2-S3 级纤维化;6 周组出现纤维组织包绕部分肝小叶形成的假小叶,而假小叶为肝硬化诊断的金标准,此时提示肝硬化形成,其纤维

化程度为 S4 级;8 周组数个假小叶分隔肝组织,此时为肝硬化^[2]。天狼星红染色进一步证实 Masson 染色的镜下表现,4 周组胶原纤维沉积及桥接纤维化情况最接近肝纤维化 S2-S3 的表现, Metavir 评分也证实这一结论。

综合上述结果,第 2 周肝体积增大、ALT 与 AST 升高、广泛肝细胞气球样变等改变提示此时处于急性炎症状态,而纤维间质及胶原沉积通常发生于炎症之后,故在该阶段以炎症为主。第 3 周肝炎转为慢性而形成汇管区纤维化及少量纤维间隔,而这种病理改变并不足以诊断肝纤维化。第 4 周肝组织内较多的桥接纤维化及纤维间隔,虽未破坏肝实质,但已具备了肝纤维化的典型特征,而此时肝炎转为慢性,与人体慢性肝炎肝纤维化的病理本质相符合。第 6 周肝组织内纤维化程度已达 S4 级,假小叶形成提示早期肝硬化的发生,而第 8 周肝组织已被大量纤维间隔分割,肝血运结构彻底被改变,此时已是典型的肝硬化表现,处于无法逆转的状态。由此可见,造模剂量或时间控制不当可导致模型建立的失败,而肝纤维化与肝硬化在造模上仅一步之遥。

综上所述,本研究所采取的 20% CCl₄-橄榄油溶液腹腔注射是模拟肝损伤因素造成的肝炎肝纤维化过程,在每周 3 次、连续 4 周腹腔注射 20% CCl₄-橄榄油溶液诱导时, C57BL/6J 小鼠从生存率、血清生化指标、肝弹性值及组织病理学等方面均较好地复制了疾病特征且具备操作简单、稳定性好、成模较快和毒性较小的优势,可以作为肝纤维化模型制造的优化方案。

参 考 文 献 (References)

[1] 徐列明, 刘平, 沈锡中, 等. 肝纤维化中西医结合诊疗指南 (2019 年版) [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(11): 1286-1295.
XU L M, LIU P, SHEN X Z, et al. Diagnosis and treatment guidelines of integrated Chinese and western medicine for treating hepatic fibrosis (2019 Ed) [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2019, 39(11): 1286-1295.

[2] 彭向欣, 王泰龄. 肝脏疾病临床病理学 [M]. 北京: 化学工业出版社; 2010.
PENG X X, WANG T L. Clinical pathology of liver diseases [M]. Beijing: Chemical Industry Press; 2010.

[3] BEIER J I, MCCLAIN C J. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease [J]. Biol Chem, 2010, 391(11): 1249-1264.

[4] BASU S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients

- [J]. *Toxicology*, 2003, 189(1/2): 113–127.
- [5] APARICIO-BAUTISTA D I, PÉREZ-CARREÓN J I, GUTIÉRREZ-NÁJERA N, et al. Comparative proteomic analysis of thiol proteins in the liver after oxidative stress induced by diethylnitrosamine [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1834(12): 2528–2538.
- [6] TOSELLO-TRAMPONT A C, LANDES S G, NGUYEN V, et al. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- α production [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(48): 40161–40172.
- [7] ITO M, SUZUKI J, TSUJIOKA S, et al. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet [J]. *Hepato Res*, 2007, 37(1): 50–57.
- [8] GEORGIEV P, JOCHUM W, HEINRICH S, et al. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation [J]. *Br J Surg*, 2008, 95(5): 646–656.
- [9] YANGUAS S C, COGLIATI B, WILLEBRORDS J, et al. Experimental models of liver fibrosis [J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(5): 1025–1048.
- [10] 叶霖财, 肖智勇, 周文霞, 等. 四氯化碳致肝纤维化动物模型实验条件的优化 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2010, 34(4): 340–344.
- YE L C, XIAO Z Y, ZHOU W X, et al. Optimization of an experimental model of hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride [J]. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2010, 34(4): 340–344.
- [11] 刘甦苏, 霍桂桃, 王辰飞, 等. 四氯化碳诱导近交系 C57BL/6 小鼠建立肝纤维化模型 [J]. *实验动物科学*, 2019, 36(4): 28–30, 34.
- LIU S S, HUO G T, WANG C F, et al. Establishment of hepatic fibrosis model induced by CCl_4 in inbred C57BL/6 mice [J]. *Lab Anim Sci*, 2019, 36(4): 28–30, 34.
- [12] 王丽春, 赵连三. 肝纤维化的实验动物模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12(4): 246–250.
- WANG L C, ZHAO L S. Researches in animal model of hepatic fibrosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2004, 12(4): 246–250.
- [13] 留甜甜, 宋亚刚, 苗明三. 基于数据挖掘的肝纤维化动物模型应用分析 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(4): 220–224.
- LIU T T, SONG Y G, MIAO M S. Application analysis of animal model of liver fibrosis based on data mining [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2021, 37(4): 220–224.
- [14] WU H, CHEN G, WANG J, et al. TIM-4 interference in Kupffer cells against CCl_4 -induced liver fibrosis by mediating Akt1/Mitophagy signalling pathway [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(1): e12731.

[收稿日期] 2023-12-05

贾雨欣,邓晓红,孙磊峰,等. 基于非稳态负荷评估雄性SD大鼠衰老进展及左归丸的干预作用[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 753-761.

JIA Y X, DENG X H, SUN L F, et al. Using allostatic load as a tool for evaluating aging of male SD rats and the intervention effects of Zuogui Pill [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 753-761.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.008

基于非稳态负荷评估雄性SD大鼠衰老进展 及左归丸的干预作用

贾雨欣¹, 邓晓红¹, 孙磊峰¹, 陈丹丹¹, 孙贤俊¹, 段晓红¹, 严诗楷^{2*}, 黄建华^{1*}

(1. 复旦大学附属华山医院中西医结合研究所, 上海 200040; 2. 上海交通大学药学院, 上海 200240)

【摘要】 **目的** 采用非稳态负荷(allostatic load, AL)的理论与方法评估衰老以及左归丸对自然衰老雄性SD大鼠模型的影响。**方法** 自然衰老雄性SD大鼠,分别在2、5、8、14、18、21月龄剪尾取血,其中18月龄时随机分为老年对照组、左归丸低剂量组和左归丸高剂量组。左归丸干预3个月后,取用血样以及肌肉、肝等组织样本。血样用流式细胞术检测T淋巴细胞数量和凋亡率,并检测血清生化指标,包括低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-c)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-c)、甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)、25羟维生素D(25 hydroxyvitamin D, 25-OH-D)、皮质酮(corticosterone, CORT)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)。将LDL-c、TC、HDL-c、FFA、TG、CORT、IL-6、CRP、25-OH-D、CD3⁺T淋巴细胞计数、CD3⁺T淋巴细胞凋亡率共11项指标用于AL评分。**结果** 大鼠血清LDL-c、TG、TC、25-OH-D、CRP、IL-6随增龄发生显著改变,但变化模式有所不同。CD3⁺T淋巴细胞计数随增龄显著降低($P < 0.01$),CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞凋亡率随增龄显著升高($P < 0.01$)。左归丸干预后,老年大鼠血清CORT水平显著提高($P < 0.01$)、CD8⁺T淋巴细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$)。AL评分自5月龄开始升高,至18月龄到达峰值。**结论** 与单一指标比较,AL能更好地表征衰老过程。左归丸可以提高衰老大鼠的应激反应能力,延缓其免疫衰老。

【关键词】 非稳态负荷;衰老;左归丸;免疫衰老

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)06-0753-09

Using allostatic load as a tool for evaluating aging of male SD rats and the intervention effects of Zuogui Pill

JIA Yuxin¹, DENG Xiaohong¹, SUN Leifeng¹, CHEN Dandan¹, SUN Xianjun¹,
DUAN Xiaohong¹, YAN Shikai^{2*}, HUANG Jianhua^{1*}

(1. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China; 2. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Corresponding author: YAN Shikai. E-mail: shkyan@sjtu.edu.cn; HUANG Jianhua. E-mail: hjhzyj@aliyun.com

【Abstract】 **Objective** Using the concept of allostatic load (AL) to evaluate aging of male SD rats and the effectiveness of Zuogui Pill in naturally aging rats. **Methods** Naturally aging male SD rats were tested at the ages of 2, 5, 8, 14, 18, and 21 months. They were divided into an elderly control group, low-dose Zuogui Pill group, and high-dose

【基金项目】 上海市扬帆计划(21YF1404000)。

Funded by Shanghai Sailing Program(21YF1404000)。

【作者简介】 贾雨欣,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合临床。Email:22211220074@m.fudan.edu.cn

【通信作者】 严诗楷,男,副教授,博士,研究方向:天然药物化学。Email:shkyan@sjtu.edu.cn;

黄建华,男,副研究员,博士,研究方向:中医证候基础研究。Email:hjhzyj@aliyun.com。

* 共同通信作者

Zuogui Pill group. Intervention with Zuogui Pill was trialed for 3 months. Blood samples were taken from the tails of rats each month, and the number of T lymphocytes and rate of apoptosis were measured by flow cytometry. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), free fatty acids (FFA), 25 hydroxyvitamin D (25-OH-D), corticosterone (CORT), C-reactive protein (CRP), and interleukin-6 (IL-6) were detected in rat sera. By identifying the collinearity between indicators and professional considerations, LDL-c, TC, HDL-c, FFA, TG, CORT, IL-6, CRP, 25-OH-D, CD3⁺ T cell count, and CD3⁺ T cell apoptosis rate were included in the AL scoring. The threshold for each indicator was established with data from 5-month-old rats, and the score was 1 point below or/and above the threshold. **Results** The serum levels of LDL-c, TG, TC, 25-OH-D, CRP, and IL-6 of rats showed significant changes with age, although the patterns of change differed. The CD3⁺ T lymphocyte count significantly decreased with age ($P < 0.01$), while the apoptosis rates of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocytes significantly increased with age ($P < 0.01$). Zuogui Pill significantly increased serum CORT levels in elderly rats ($P < 0.01$) and reduced the apoptosis rate of CD8⁺ T lymphocytes ($P < 0.05$). The AL score began to increase in rats at 5 months of age and reached its peak in those of 18 months of age. **Conclusions** AL can better characterize the aging process compared to a single indicator. Zuogui Pill can improve the stress response ability of aging rats and alleviate immunosenescence.

[Keywords] allostatic load; aging; Zuogui Pill; immunosenescence

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

衰老已被证明是人类大多数慢性疾病,如心血管疾病、癌症和神经变性等疾病的重要危险因素^[1]。迄今,已经提出了多种学说用于解释衰老的形成机制,如干细胞衰老、端粒缩短、炎症衰老、自由基损伤、免疫衰老等^[2-3]。但衰老的确切机制仍未明确,并且针对衰老尚无特异性的生物学表征,缺乏统一的评价标准和方法。

非稳态负荷(allostatic load, AL)是近年提出的用于解释某些健康问题的新理论架构。内外环境变化会触发机体启动多系统调节活动,传统生理学自稳态(homeostasis)概念强调内环境的动态平衡,暗含这些调节活动有一个确定的能够返回的(“home”)设定点和平衡点,维持稳态即目的,而非稳态理论认为机体的生理调节是为了应对变化,增加存活的机会,但反复以及不能有效地及时开启或关闭调节,会给机体带来多系统的、累积性的损伤,这些损伤是机体适应性调节过程中所付出的“成本”^[4]。非稳态理论目前已经发展了一种称为非稳态负荷评分的方法以定量描述该类损伤^[5]。20世纪90年代启动的一项临床研究首次使用了AL评分来评估健康老年人的死亡风险^[6-7],选用9种涵盖各系统的指标,这些指标均处于正常范围,依据是否位于该指标分布的上或下25%分位,给予“0”或“1”的评分,最后形成一个综合评分,结果发现具有高AL评分的老人,7年后全因死亡风险升高。2014年一项研究显示,AL评分每上升一个百分点,10年后全因死亡率升高20%,并且评分升高越快,

死亡率越高,进一步确认了如此构建的复合指数即AL评分是衰老相关死亡风险的重要预测因子^[8]。迄今,AL评分作为重要的健康评估工具,在衰老、精神分裂症、心血管疾病、焦虑、抑郁、痴呆、癌症等领域引起了广泛关注^[9]。

中医学理论认为,衰老与精气盛衰关系紧密。《素问·上古天真论》中提及,出生后男子、女子的精气逐渐充实,到男子四八、女子四七的年龄时,精气最为旺盛,之后逐渐衰减。左归丸是明代著名医家张景岳创制的补肾填精、滋养真阴经典方剂,以大补精血为特长。现代研究已表明,左归丸可以提高自然衰老大鼠的学习记忆能力^[10],在临床应用中还能延缓卵巢功能的衰退^[11]等。衰老和AL具有显著的相似性,均涉及多系统损伤、均在时间中逐渐积累,但尚未见到增龄和AL关系的相关研究报告^[12]。因此,本文拟采用大鼠年龄序列(2、5、8、14、18、21月龄),研究增龄和AL评分的关系;对老年大鼠采用左归丸干预,并基于AL评价左归丸是否具有延缓衰老作用,从整体出发,寻找左归丸延缓衰老的客观证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40只2月龄SPF级SD雄性大鼠,体重 200 ± 20 g,购于浙江维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(浙)2019-0001】。环境温度 $22 \sim 24$ ℃,湿

度 $55\% \pm 10\%$, 12 h 昼夜节律, 自由饮水和摄食(标准饲料), 适应性喂养 15 d 后进行实验, 饲养于复旦大学附属浦东医院实验动物中心【SYXK(沪)2020-0005】。本实验通过复旦大学实验动物科学部实验伦理审核(202310020Z)。

1.1.2 主要试剂与仪器

大鼠皮质酮(corticosterone, CORT) ELISA 试剂盒(LDN), 总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-c)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-c)、游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)测定试剂(南京建成生物工程研究所), 大鼠 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP) ELISA 试剂盒(联科生物), 25-羟维生素 D(25-hydroxyvitamin D, 25-OH-D)试剂盒(IDS), Rat CD3 APC 1F4, Rat CD4 BB700 OX-35R, Rat CD8A Horizon V450 OX-8, Apop Dtec Kit 1 (BD), 羧甲基纤维素钠(1000 ~ 1400 mpa, Aladdin), 左归丸(上海雷允上封浜制药有限公司)。

冷冻离心机(Eppendorf, 德国), 酶标仪(Eppendorf, 德国), 流式细胞仪(赛默飞, 美国), 洁净工作台(上海博讯实业医疗设备厂, 中国), 超低温冰箱(Heto Ultra Freeze, 丹麦)。

1.2 方法

1.2.1 分组与干预

自然衰老 SD 雄性大鼠, 分别在 2、5、8、14、18、21 月龄剪尾取血, 剪尾前将鼠尾置于 40 °C 水中 2 ~ 3 min 使血管扩张, 将鼠尾末端剪断 1 ~ 2 mm, 取血时使鼠尾处于最低位, 尽量避免挤压按摩以防发生溶血, 取血结束后在切口处涂抹 6% 火棉胶涂敷止血^[13]。肝素钠抗凝管取 300 μ L 全血用于流式细胞术检测 T 淋巴细胞数量、分类及凋亡, 另取全血 1 mL, 分离血清, 储存于 -80 °C 备用。大鼠于 18 月龄时随机分为老年对照组、左归丸低剂量组、左归丸高剂量组。给药剂量根据标准成人体重(70 kg)与大鼠表面积折算等效比率(0.018)换算, 大鼠左归丸干预低剂量为 2.43 g/kg, 高剂量为低剂量的 3 倍, 即 7.29 g/kg。左归丸干预组每天灌胃含药 0.5% 去甲基纤维素钠溶液 2 mL, 老年对照组给予 0.5% 去甲基纤维素钠溶液 2 mL, 持续给药 3 个月。

1.2.2 T 淋巴细胞数量及凋亡检测

取大鼠全血样本 100 μ L 至肝素钠抗凝管中, 加入鼠 CD3、CD4、CD8 抗体 2.5 μ L, 室温下避光 15

min 加入红细胞裂解液, 室温下避光 15 min。将管中液体转移至相应的 2 mL Ep 管中, 1477 r/min \times 5 min 离心, 弃去上清, 每管加入 PBS 1 ~ 2 mL, 移液枪轻轻吹打后转移至新的 2 mL Ep 管中, 1809 r/min \times 5 min 离心, 弃去上清。每管加入 100 μ L Binding buffer 重悬细胞, 再加入 Annexin V 5 μ L, PI 5 μ L, 室温下避光 15 min。将所有 Ep 管置于冰上避光保存, 立即用流式细胞仪检测。用 FlowJo v10.8.1 软件处理相关数据。

1.2.3 血清生化指标检测

血清 TC、TG、LDL-c、HDL-c、FFA、25-OH-D、CORT、CRP、IL-6 水平检测按说明书操作, 使用酶标仪在相应波长进行检测。

1.2.4 AL 相关指标选择及评分规则

本研究共检测 15 个生化指标用于评估衰老, 通过计算各指标的方差膨胀因子(VIF)识别指标间共线性问题, 纳入 VIF < 10 的指标进行 AL 评分, 包括: LDL-c、TC、HDL-c、FFA、TG、CORT、IL-6、CRP、25-OH-D、CD3⁺ T 淋巴细胞计数、CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率。以 5 月龄大鼠数据分布为基线建立各项指标界值, LDL-c、TC、FFA、TG、IL-6 水平高于该指标分布 90% 分位数, 记 1 分; HDL-c、25-OH-D 水平低于该指标分布 10% 分位数, 记 1 分; CORT 水平高于该指标分布 90% 分位数, 或低于该指标分布 10% 分位数, 均记 1 分; CD3⁺ T 淋巴细胞计数低于 30%, CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率高于 30%, 记 1 分。

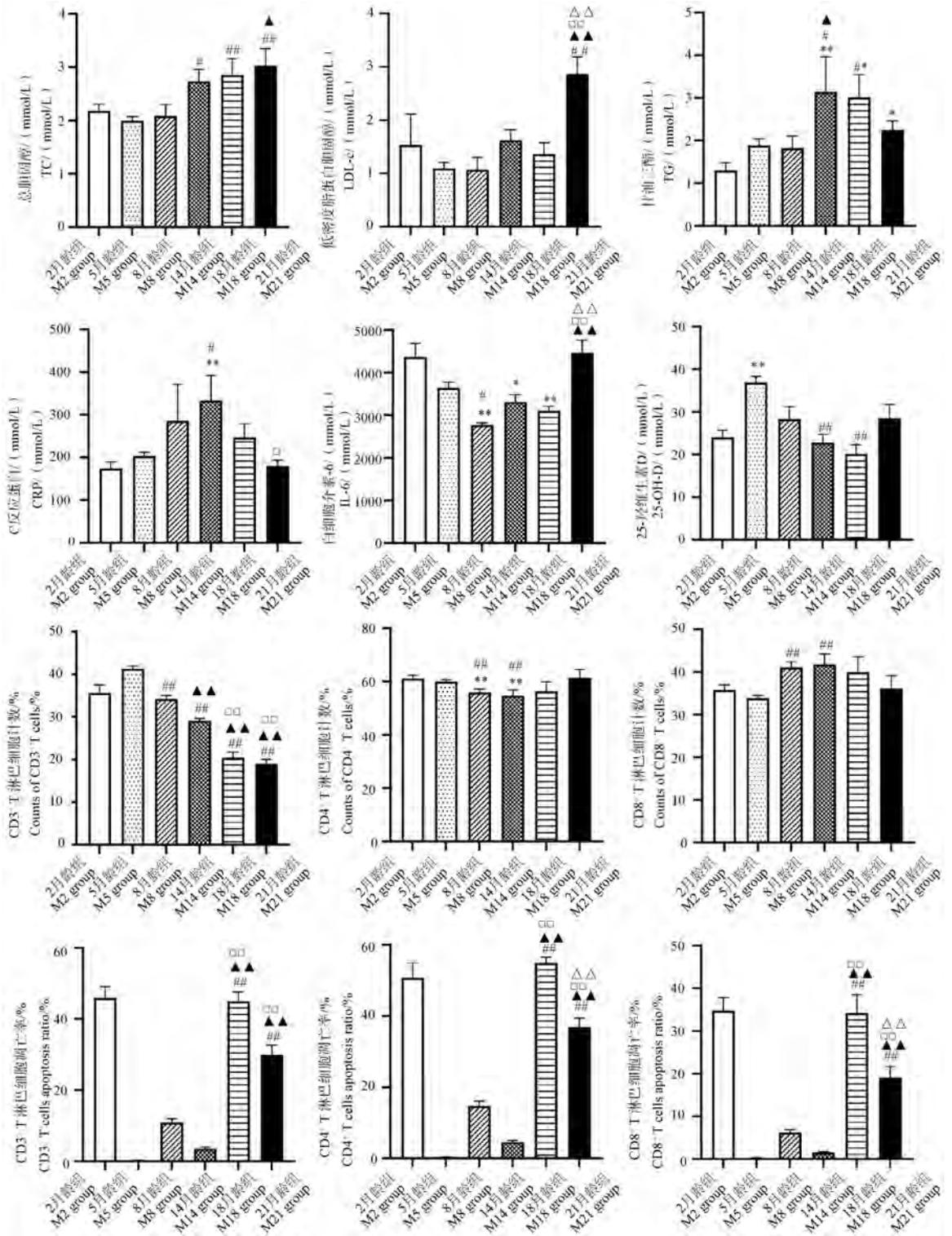
1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.4.1 进行数据处理和图像绘制, 数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析; 两两组间比较, 正态分布数据采用独立样本 *t* 检验, 非正态分布数据采用 *F* 检验。 *P* < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 衰老过程中各生化指标呈现不同的变化趋势

如图 1 所示, 15 个检测指标中, 脂代谢指标(血清 LDL-c、TG、TC、25-OH-D)、炎症指标(血清 CRP、IL-6)、免疫指标(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量及凋亡率)共 12 项有统计学意义。与 5 月龄组相比, 14、18、21 月龄组大鼠血清 TC 水平显著升高(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 其中 21 月龄组又显著高于 8 月龄组(*P* < 0.05); 与 5、8、14、18 月龄组相比, 21 月龄组大鼠血清 LDL-c 水平显著升高(*P* < 0.01);



注:与 2 月龄组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 5 月龄组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 8 月龄组相比, ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$; 与 14 月龄组相比, □ $P < 0.05$, □□ $P < 0.01$; 与 18 月龄组相比, △ $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 各月龄大鼠衰老相关生化指标比较

Note. Compared with the M2 group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the M5 group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with the M8 group, ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$. Compared with the M14 group, □ $P < 0.05$, □□ $P < 0.01$. Compared with the M18 group, △ $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Changes of biomarkers with increasing age in rats

与 2、5、8 月龄组相比, 14、18、21 月龄组大鼠血清 TG 水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 2、5 月龄组相比, 14 月龄组大鼠血清 CRP 水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 与 14 月龄组相比, 21 月龄组大鼠血清 CRP 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 2、21 月龄组相比, 8、14、18 月龄组大鼠血清 IL-6 水平显著降低, 其中 8 月龄组又显著低于 5 月龄组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 2 月龄组相比, 6 月龄组大鼠血清 25-OH-D 水平显著升高, 与 5 月龄组相比, 14、18 月龄组大鼠血清 25-OH-D 水平显著降低 ($P < 0.01$); 各组大鼠 CD3⁺ T 淋巴细胞计数水平随月龄增加显著降低 ($P < 0.01$); 与 2、5 月龄组相比, 8、14 月龄组大鼠 CD4⁺ T 淋巴细胞计数水平显著降低; 与 5 月龄组相比, 8、14 月龄组大鼠 CD8⁺ T 淋巴细胞计数水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 5、8、14 月龄组相比, 18、21 月龄组大鼠 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡水平均显著升高, 其中 21 月龄组大鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡水平显著低于 18 月龄组 ($P < 0.01$)。

为了更清晰地显示各指标和年龄的关系, 将 6 个月龄分组进行整合, 2、5 月龄为青年组, 8、14 月龄为中年组, 18、21 月龄为老年组, 其中 T 淋巴细胞凋亡相关的 3 个指标以 5 月龄单独为青年组。如图 2 所示, 大鼠血清 TC、LDL-c、TG 水平及 T 淋巴细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 血清 25-OH-D 水平、CD3⁺ T 淋巴细胞数量显著降低 ($P < 0.01$)。与青年组相比, 中年组 CD4⁺ T 淋巴细胞数量显著降低 ($P < 0.01$), 而 CD8⁺ T 淋巴细胞数量显著升高 ($P < 0.01$)。血清 CRP 水平随月龄呈现先升高再下降的趋势 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而血清 IL-6 水平呈现先下降再升高趋势 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2.2 免疫、代谢与衰老过程显著相关

将原有 15 个指标中 VIF < 10 的指标作为自变量, 月龄为应变量, 拟合多元回归方程, 包括 LDL-c、HDL-c、TC、TG、FFA、25-OH-D、CORT、IL-6、CRP、CD3⁺ T 淋巴细胞计数、CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率, 见表 1。多元回归分析结果显示 LDL-c、CD3⁺ T 淋巴细胞计数、CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率的回归系数分别为 $P < 0.1$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.05$ 。回归方程能解释 83.84% 的年龄变异。多元逐步回归分析显示仅纳入 LDL-c、CD3⁺ T 淋巴细胞计数、CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率即可解释 85.65% 的年龄变异。以上结果均显示免疫和代谢在衰老过程中变化明显。

表 1 各指标多元回归分析结果

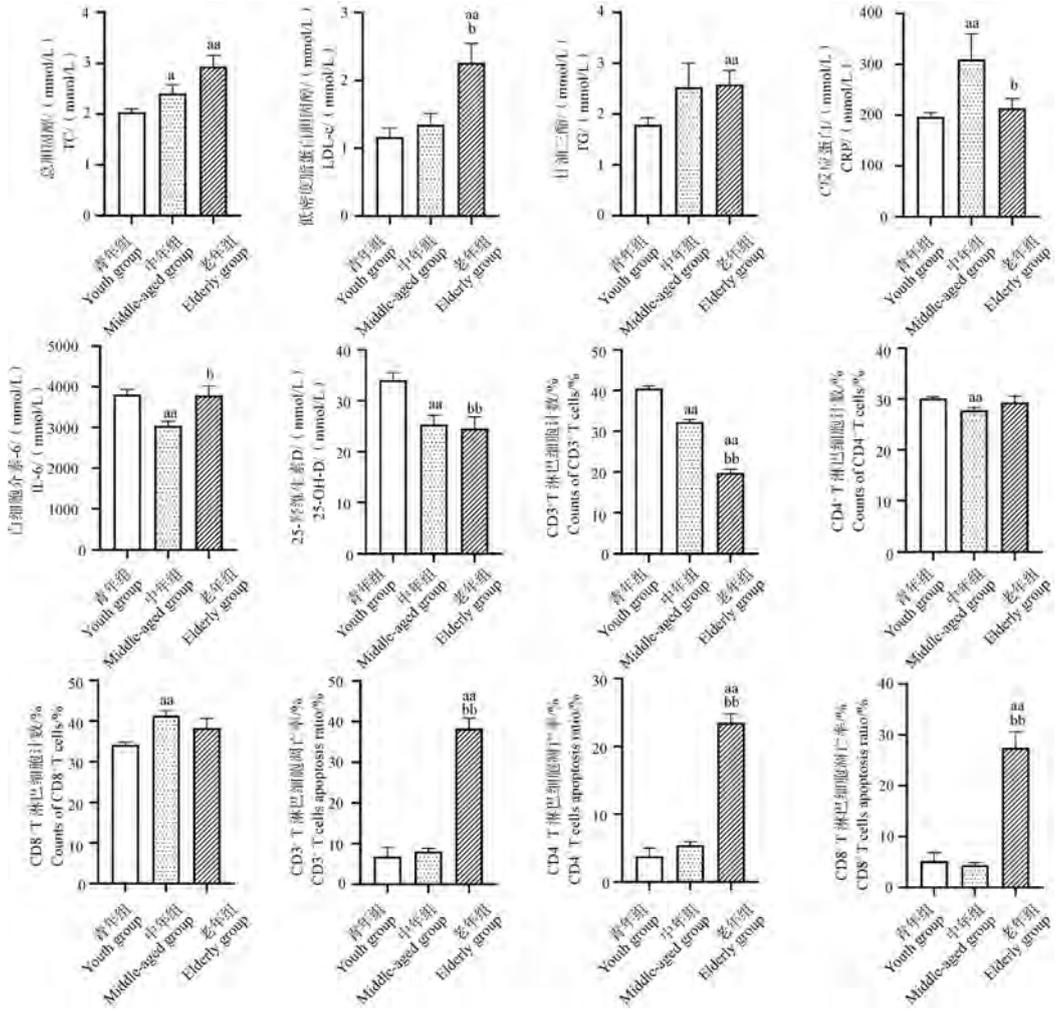
指标 Index	回归系数 Regression coefficient	P	方差膨胀 因子 VIF
截距 Intercept	38.811 136	1.59e-06	-
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-c	1.080 786	0.099 58	1.904 128
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-c	-0.933 752	0.328 03	2.800 977
总胆固醇 TC	0.726 710	0.546 87	4.109 963
甘油三酯 TG	-0.537 296	0.256 28	2.118 260
游离脂肪酸 FFA	2.684 240	0.302 88	1.495 319
25-羟维生素 D 25-OH-D	-0.054 647	0.496 74	2.123 081
皮质醇 CORT	0.002 662	0.946 90	1.502 549
白细胞介素-6 IL-6	-0.000 917	0.249 59	1.685 866
C 反应蛋白 CRP	0.001 407	0.779 89	1.278 384
CD3 ⁺ T 淋巴细胞计数 CD3 ⁺ T cells count	-0.711 768	1.03e-09	2.986 600
CD3 ⁺ T 淋巴细胞凋亡率 CD3 ⁺ T cells apoptosis ratio	-0.099 552	0.004 93	2.302 482

2.3 左归丸可提高大鼠血清 CORT 水平, 降低 CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡率

与 21 月龄组相比, 高剂量组大鼠血清 CORT 水平显著升高 ($P < 0.01$)。将 2 月龄组、5 月龄组合并为青年组, 将 8 月龄组、14 月龄组合并为中年组, 将 18 月龄组、21 月龄组合并为老年组, 同时将高、低剂量组合并为左归丸组。与老年组相比, 左归丸组大鼠血清 CORT 水平显著提高 ($P < 0.01$)、CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$), 具体见图 3。

2.4 AL 评分可有效评估衰老过程

5 月龄大鼠纳入 AL 评分各指标界值见表 2, 考虑到 T 淋巴细胞计数和凋亡数据方差较大, 指定 CD3⁺ T 淋巴细胞计数低于 30%, CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率高于 30%, 记 1 分。如图 4 所示, 与 5 月龄组、8 月龄组、14 月龄组相比, 18 月龄组、21 月龄组大鼠 AL 评分均显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 整合后, 与青年、中年组相比, 老年组大鼠 AL 评分也显著升高 ($P < 0.01$)。左归丸干预后, 与 21 月龄组比较, 低剂量组大鼠 AL 评分降低, 高剂量组大鼠 AL 评分升高, 但均没有统计学意义。对不同月龄组

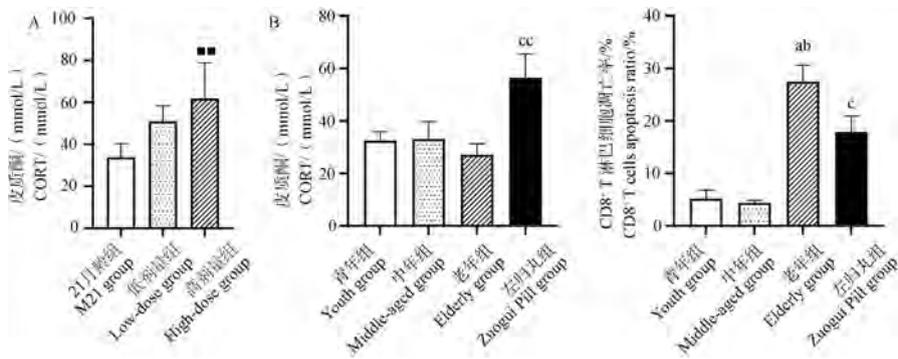


注:与青年组相比, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$;与中年组相比, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ 。(下图同)

图 2 青、中、老年大鼠各生化指标的变化

Note. Compared with youth group, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$. Compared with middle-aged group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes of biomarkers in young, middle-aged, and elderly rats



注:A:不同剂量左归丸干预对相关指标的影响;B:整合后左归丸干预对相关指标的影响;与老年组相比, ^c $P < 0.05$, ^{cc} $P < 0.01$ 。(下图同)

图 3 左归丸干预对相关指标的影响

Note. A. Influence of different doses of Zuogui Pills on related indexes. B. Effects of Zuogui Pill intervention in integrated group on related indexes. Compared with elderly group, ^c $P < 0.05$, ^{cc} $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 3 Effects of Zuogui Pill intervention on related indexes

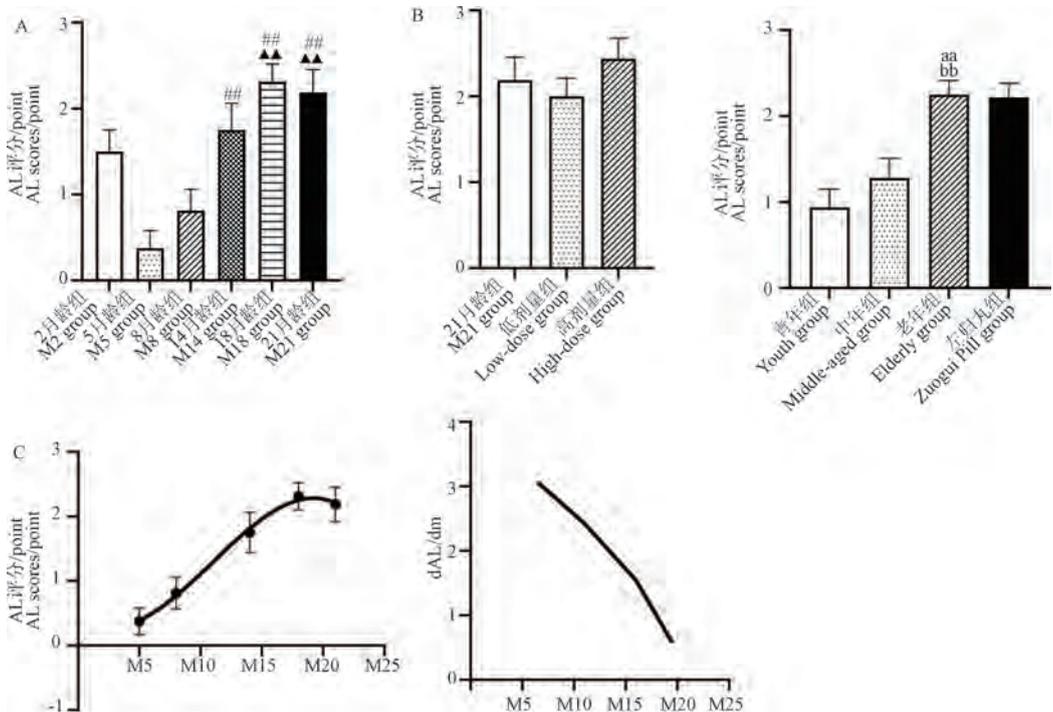
AL 评分、月龄进行函数拟合,发现可用 3 次多项式拟合两者之间的关系,对 AL 评分/月龄求导,发现

自 5 月龄后导数均下降,提示 AL 评分在 5 月龄升高得最快,该结果提示大鼠衰老可能在青中年时期

表 2 5 月龄大鼠各指标 AL 评分界值

Table 2 Cut point for AL scores of various indicators in 5-month-old rats

指标 Index	最小值 Minimum value	最大值 Maximum value	中位数 Median	第 10 分位数 10th percentiles	第 90 分位数 90th percentiles
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-c	0.44	3.89	1.41	0.62	1.63
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-c	1.34	4.52	2.92	1.85	3.60
总胆固醇 TC	1.25	4.15	2.34	1.48	2.44
甘油三酯 TG	0.80	7.91	1.94	1.02	2.79
游离脂肪酸 FFA	0.33	1.32	0.62	0.42	1.02
25-羟维生素 D 25-OH-D	12.71	45.02	27.50	27.36	45.20
皮质醇 CORT	3.51	123.55	25.56	7.93	59.13
白细胞介素-6 IL-6	2601.33	6469.67	3366.33	3028.67	4231.67
C-反应蛋白 CRP	104.10	623.10	206.60	153.59	248.31
CD3 ⁺ T 淋巴细胞计数 CD3 ⁺ T cells count	9.68	47.60	30.10	35.03	46.52
CD3 ⁺ T 淋巴细胞凋亡率 CD3 ⁺ T cells apoptosis ratio	0.09	57.50	12.65	0.06	12.65



注: A: 各组 AL 评分比较; B: 左归丸干预对 AL 评分的影响; C: 大鼠 AL 评分与月龄函数拟合结果。

Figure 4 Comparison of AL score and analysis of AL score change in each group

Note. A. Comparison of AL scores in each group. B. Effect of Zuogui Pill intervention on AL score. C. Function fitting results of AL scores.

Figure 4 Comparison of AL score and analysis of AL score change in each group

即开始,提前药物干预,延缓衰老效果可能更佳。本研究中,左归丸作用后,低剂量组 AL 评分有降低趋势,但与 21 月龄组或老年组比较,均无统计学意义,结合上述发现,左归丸在 5 ~ 8 月龄干预,可能延缓衰老作用更佳。

3 讨论

研究表明脂代谢在衰老过程中有显著改变^[14-15]。雌性和雄性衰老大鼠血清 TG 水平均显著升高, TG 清除率显著降低^[16]。本研究中大鼠血清 TG、LDL-c、TC、25-OH-D 水平随增龄均发生显著变化。血清 FFA 水平未见到显著增龄性改变,但左归丸干预后,低剂量组大鼠血清 FFA 水平显著降低。

在健康衰老人群和衰老大鼠的研究发现,血清 CRP 水平平均年龄依赖性增长^[17-18]。本研究大鼠血清 CRP 水平在中年达到高峰,之后下降。大鼠血清 IL-6 水平在青年时期较高,中年降低,而老年升高,其原因需进一步研究。左归丸干预对炎症因子没有显著影响。

糖皮质激素是 AL 的主要介导体之一^[4]。研究报告,老年人傍晚和晨间皮质醇浓度升高,晨间皮质醇浓度峰值提前、日内皮质醇振幅降低、皮质醇分泌模式不规则^[19-20]。与年轻小鼠相比,中年小鼠皮质酮水平升高,老年则不明显^[21]。本研究未发现大鼠血清皮质酮水平的增龄性变化。但左归丸干预后,与老年组比较皮质酮水平显著升高,与沈自尹等^[22]的报道相一致。但本研究通过剪尾取血,皮质酮水平的升高可能由于取血过程导致大鼠产生应激反应,该结果提示,左归丸能提高衰老大鼠面对损伤的应激反应能力。

免疫衰老是目前衰老机制的研究热点,免疫功能受损与衰老可能相互促进。胸腺退化是免疫衰老的特征之一,研究发现,衰老时先天免疫细胞处于持续激活状态^[23]。衰老适应性免疫系统的主要变化发生在 T 细胞亚群,随着胸腺逐渐退化,幼稚 T 细胞减少,导致 T 细胞多样性受损,此外衰老人群的记忆 T 细胞免疫应答能力严重下调,不能产生和维持保护性免疫应答反应^[24]。衰老人群的研究发现,CD3⁺ T 淋巴细胞数量随着年龄的增长而减少^[25],与本研究相一致。本研究还观察了 T 淋巴细胞凋亡,老年大鼠(18、21 月龄)CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡比例均显著高于青年(5 月龄)与中年(8、14 月龄)大鼠。多元回归分析显示,免疫指标与

衰老之间关系密切。郑振等^[26]就在临床中发现补肾中药能显著地降低老年人 T 淋巴细胞凋亡的升高,本研究也发现左归丸对老年大鼠过度的 CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡有降低作用。免疫衰老可能是中药干预衰老及老年相关疾病的重要切入点。

关于 AL 损伤机体的具体机制,McEwen 提出了“三阶段、四类型”和“能量模型”的学说,即神经内分泌和自主神经系统失调,分泌的物质为“primary mediators”。这些中介物会引起靶组织细胞的生化变化,产生“primary effects”。多种原初中介物和原初效应的综合作用,产生“secondary outcomes”,常见的胆固醇、低密度脂蛋白、血压、纤维蛋白原升高等都属于该范围。进一步发展,则到达第三阶段,产生具体疾病或者严重的功能失调,被称为“tertiary outcomes”。从发生机制上,将 AL 分为重复应激导致的、缺乏适应导致的、应激反应不消退和应激反应不充分^[4]4 种类型。AL 长期积累,最终还将导致能量失调^[27]。AL 评分作为一个综合的累积性损伤的评价工具,在评价衰老及药物干预衰老的效果方面似乎有独特的价值。本研究发现,自 5 月龄起,AL 评分随月龄的增长逐渐升高,到 18 月龄以后达到高峰,并且在青、中年时期大鼠 AL 评分升高最快,提示衰老过程可能在青中年时期启动,因而在青、中年时期就开始衰老干预是否有更好的效果,是值得进一步研究的问题。此外,本研究中 2 月龄大鼠 AL 评分,与 5 月龄相比,异常升高,主要是该月龄组大鼠 T 淋巴细胞凋亡比例显著高于 5 月龄大鼠,2 月龄大鼠 T 淋巴细胞过度凋亡的原因亦需进一步研究。

中医证候描述的领域与 AL 描述的领域大致相当,中医证候描述了 AL 的类型,现代医学对 AL 进行评分,但仅是评价 AL 量的变化,没有意识到 AL 分类、分型的问题^[28-30]。在中医学中,自然衰老常被认为是肾虚模型,本研究结果显示 AL 评分和增龄相关,提示 AL 在肾虚证程度及补肾药物效果的评估中可能具有一定的价值。AL 和其他中医证候及药物疗效评估的关系也值得深入研究。

参 考 文 献(References)

- [1] LARSEN P D. Geroscience: the intersection of basic aging biology, chronic disease, and health [J]. Rehabil Nurs, 2019, 44(4): 187-188.
- [2] FRANCESCHI C, SALVIOLI S, GARAGNANI P, et al. Immunobiography and the heterogeneity of immune responses in the elderly: a focus on inflammaging and trained immunity [J]. Front Immunol, 2017, 8: 982.

- [3] FERRUCCI L, FABBRIO E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(9): 505-522.
- [4] MCEWEN B S. Protective and damaging effects of stress mediators [J]. *N Engl J Med*, 1998, 338(3): 171-179.
- [5] GALLO L C, FORTMANN A L, MATTEI J. Allostatic load and the assessment of cumulative biological risk in biobehavioral medicine: challenges and opportunities [J]. *Psychosom Med*, 2014, 76(7): 478-480.
- [6] SEEMAN T E, SINGER B H, ROWE J W, et al. Price of adaptation-allostatic load and its health consequences. *MacArthur studies of successful aging* [J]. *Arch Intern Med*, 1997, 157(19): 2259-2268.
- [7] SEEMAN T E, MCEWEN B S, ROWE J W, et al. Allostatic load as a marker of cumulative biological risk; *MacArthur studies of successful aging* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(8): 4770-4775.
- [8] HWANG A C, PENG L N, WEN Y W, et al. Predicting all-cause and cause-specific mortality by static and dynamic measurements of allostatic load; a 10-year population-based cohort study in Taiwan [J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2014, 15(7): 490-496.
- [9] PARKER H W, ABREU A M, SULLIVAN M C, et al. Allostatic load and mortality: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Prev Med*, 2022, 63(1): 131-140.
- [10] 赵新永, 李晓婷, 周飞. 左归丸改善自然衰老大鼠学习能力的中枢神经线粒体机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(15): 3722-3725.
- ZHAO X Y, LI X T, ZHOU F. Zuoguiwan improves the learning ability of aging rats by neuron's mitochondria pathway [J]. *Chin J Gerontol*, 2019, 39(15): 3722-3725.
- [11] 高志莹. 左归丸治疗排卵障碍性不孕阴虚证的随机对照研究 [J]. *中国处方药*, 2022, 20(4): 116-117.
- GAO Z Y. A randomized controlled study on Zuogui pill in the treatment of anovulatory infertility with Yin deficiency syndrome [J]. *J Chin Prescr Drug*, 2022, 20(4): 116-117.
- [12] SEELEY K E, PROUDFOOT K L, EDES A N. The application of allostasis and allostatic load in animal species: a scoping review [J]. *PLoS One*, 2022, 17(8): e0273838.
- [13] 田顺亮, 钱学华. 大鼠断尾取血固定装置的设计及取血的方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(7): 419-421.
- TIAN S L, QIAN X H. Devices and skills used in blood collection by cutting rats' tails [J]. *Chin J Comp Med*, 2006, 16(7): 419-421.
- [14] JOHNSON A A, STOLZING A. The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(6): e13048.
- [15] MUTLU A S, DUFFY J, WANG M C. Lipid metabolism and lipid signals in aging and longevity [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(10): 1394-1407.
- [16] SPITLER K M, DAVIES B S J. Aging and plasma triglyceride metabolism [J]. *J Lipid Res*, 2020, 61(8): 1161-1167.
- [17] GORDON C J, ROWSEY P J, BISHOP B L, et al. Serum biomarkers of aging in the Brown Norway rat [J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(11): 953-957.
- [18] SKOBLOW H F, PROULX C M. C-reactive protein, subjective aging, and incident cardiovascular disease: a mediation model [J]. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, 2022, 77(9): 1654-1658.
- [19] VAN DEN BELD A W, KAUFMAN J M, ZILLIKENS M C, et al. The physiology of endocrine systems with ageing [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018, 6(8): 647-658.
- [20] GUPTA D, MORLEY J E. Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging [J]. *Compr Physiol*, 2014, 4(4): 1495-1510.
- [21] DALM S, ENTHOVEN L, MEIJER O C, et al. Age-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male C57BL/6J mice [J]. *Neuroendocrinology*, 2005, 81(6): 372-380.
- [22] 沈自尹, 王文健, 王惠, 等. 补肾药改善老年肾上腺皮质功能的临床与实验研究 [J]. *中西医结合杂志*, 1989, 9(9): 518-521, 514.
- SHEN Z Y, WANG W J, WANG H, et al. Therapeutic research of the kidney-tonifying herbs on the aged adrenocortical function [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 1989, 9(9): 518-521, 514.
- [23] KLEINNIJENHUIS J, QUINTIN J, PREIJERS F, et al. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(43): 17537-17542.
- [24] TU W, RAO S. Mechanisms underlying T cell immunosenescence: aging and cytomegalovirus infection [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 2111.
- [25] QIN L, JING X, QIU Z, et al. Aging of immune system: Immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults [J]. *Aging*, 2016, 8(5): 848-859.
- [26] 郑振, 沈自尹, 黄辉. 补肾与活血复方调节老年鼠 T 细胞凋亡的对比研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1999, 19(10): 610-612.
- ZHENG Z, SHEN Z Y, HUANG H. Comparative study of the regulation of kidney tonic and promoting blood circulation recipe on apoptosis in T cells of old rats [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 1999, 19(10): 610-612.
- [27] MCEWEN B S, WINGFIELD J C. The concept of allostasis in biology and biomedicine [J]. *Horm Behav*, 2003, 43(1): 2-15.
- [28] 黄建华. 中医“证”描述了非稳态负荷的类型——兼论病证关系(上) [J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(2): 11-16.
- HUANG J H. Syndrome of traditional Chinese medicine describes the pattern of allostatic load [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2017, 51(2): 11-16.
- [29] 黄建华. 中医“证”描述了非稳态负荷的类型——兼论病证关系(中) [J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(3): 13-17, 25.
- HUANG J H. Syndrome of traditional Chinese medicine describes the pattern of allostatic load [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2017, 51(3): 13-17, 25.
- [30] 黄建华. 中医“证”描述了非稳态负荷的类型——兼论病证关系(下) [J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(4): 16-22.
- HUANG J H. Syndrome of traditional Chinese medicine describes the pattern of allostatic load [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2017, 51(4): 16-22.

贾建, 谭睿陟, 钟霞, 等. 异鼠李素通过抑制 LncRNA-gm33782 减轻 AKI 肾小管炎性细胞凋亡 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 762-771.

JIA J, TAN R Z, ZHONG X, et al. Isorhamnetin alleviates acute kidney injury renal tubular inflammatory cell apoptosis by inhibiting LncRNA-gm33782 [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 762-771.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.009

异鼠李素通过抑制 LncRNA-gm33782 减轻 AKI 肾小管炎性细胞凋亡

贾建¹, 谭睿陟¹, 钟霞¹, 粟宏伟², 王丽^{1*}

(1. 西南医科大学附属中医医院中西医结合研究中心, 四川 泸州 646000;

2. 西南医科大学附属中医医院泌尿外科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA-gm33782 (LncRNA-gm33782) 在急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 肾小管损伤中的功能以及异鼠李素改善肾小管炎性细胞凋亡的作用机制。方法 将 48 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、治疗组 (AKI 模型构建后灌胃给予 30 mg/kg 异鼠李素)、空载质粒电转染组、LncRNA-gm33782 敲低组、LncRNA-gm33782 过表达组、LncRNA-gm33782 敲低组 + 模型组、LncRNA-gm33782 过表达 + 治疗组 8 组, 通过腹腔一次性注射 20 mg/kg 顺铂诱导小鼠 AKI, 原位电转染技术用于介导肾 LncRNA-gm33782 的敲低和过表达。采用 Chirp 实验捕获 AKI 肾 LncRNA-gm33782 结合蛋白进行质谱分析, 挖掘 LncRNA-gm33782 直接作用靶蛋白; 通过观察电转染敲低 LncRNA-gm33782 和异鼠李素 (isorhamnetin, ISO) 治疗干预后小鼠肾功能、病理结构改变、肾炎性因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) 表达, 评价 LncRNA-gm33782 在 AKI 中的作用; NF- κ B 被作为介导炎症的关键信号通路, Bax、Bcl-2 蛋白表达量以及流式凋亡检测结果被用于评价异鼠李素对 AKI 肾小管炎性细胞凋亡的治疗作用。结果 AKI 小鼠肾表现出严重的肾小管损伤以及巨噬细胞浸润和炎症, 异鼠李素的治疗干预和 LncRNA-gm33782 电转染敲低均能够减轻 AKI 肾损伤。LncRNA-gm33782 主要表达于 AKI 损伤的肾小管细胞, 质谱检测发现补体因子-H (complement factor-H, CFH) 与其有直接结合关系。体外过表达 LncRNA-gm33782 后, CFH 表达量随即升高, 而异鼠李素对 AKI 细胞炎性凋亡的治疗作用受到抑制。结论 异鼠李素是通过抑制 LncRNA-gm33782 对 CFH 的调控作用减轻 AKI 肾小管细胞炎性凋亡。

【关键词】 急性肾损伤; LncRNA-gm33782; 肾原位电转染; 异鼠李素; 炎性凋亡

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 06-0762-10

Isorhamnetin alleviates acute kidney injury renal tubular inflammatory cell apoptosis by inhibiting LncRNA-gm33782

JIA Jian¹, TAN Ruizhi¹, ZHONG Xia¹, SU Hongwei², WANG Li^{1*}

(1. Research Center for Integrative Medicine, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest

Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Department of Urology, Affiliated Traditional Chinese

Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Corresponding author: WANG Li. E-mail: Wangli120@swmu.edu.cn

【基金项目】 西南医科大学应用基础项目 (2021ZKQN120), 西南医科大学 (2023ZYQ08), 泸州市科技局创新苗子项目 (2021-RCM-118), 四川省科技厅项目 (2022YFS0621)。

Funded by Application Foundation Project of Southwest Medical University (2021ZKQN120), Southwest Medical University (2023ZYQ08), Luzhou Science and Technology Bureau Innovative Seedling Project (2021-RCM-118), Project of Science and Technology Department of Sichuan Province (2022YFS0621).

【作者简介】 贾建, 男, 实验师, 研究方向: 肾纤维化。Email: jiaj5681@163.com

【通信作者】 王丽, 女, 教授, 研究方向: 慢性肾病防治。Email: Wangli120@swmu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the role of LncRNA-gm33782 in tubular injury in acute kidney injury (AKI) and the mechanism by which isorhamnetin ameliorates inflammatory cell apoptosis of tubular cells in AKI. **Methods** Forty-eight male C57BL/6J mice were randomly assigned to four groups: control group, AKI model group, electroporation + AKI group, and treatment group (oral administration of 30 mg/kg isorhamnetin). AKI was induced by a one-time intraperitoneal injection of 20 mg/kg cisplatin. Chromatin isolation by RNA purification was used to capture the LncRNA-gm33782 binding protein in AKI-affected kidneys for mass spectrometry, revealing the direct target protein of LncRNA-gm33782. The role of LncRNA-gm33782 in AKI was evaluated by observing the renal function, pathological structure, and expression of renal inflammatory factors (interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α) in mice after electrotransfection and isorhamnetin treatment. Nuclear factor- κ B was detected as a critical mediator of inflammation. The expression levels of Bax and Bcl-2 protein were detected and flow cytometry was performed to evaluate the therapeutic effect of isorhamnetin on tubular cell apoptosis in AKI. **Results** Kidneys with cisplatin-induced AKI showed severe renal tubule injury, macrophage infiltration, and inflammation. Isorhamnetin treatment and LncRNA-gm33782 electrotransfection knockdown alleviated these signs of AKI. LncRNA-gm33782 was mainly expressed in renal tubular cells with AKI. LncRNA-gm33782 binding protein was detected by mass spectrometry, and complement factor H was found to have a direct binding relationship with LncRNA-gm33782. After LncRNA-gm33782 was overexpressed *in vitro*, the expression of complement factor-H immediately increased, and the therapeutic effect of isorhamnetin on apoptosis of AKI-affected inflammatory cells was inhibited. **Conclusions** Isorhamnetin alleviates apoptosis of tubular inflammatory cells in AKI by inhibiting the regulatory effect of LncRNA-gm33782 on complement factor H.

[Keywords] acute kidney injury; LncRNA-gm33782; renal *in situ* electroporation; isorhamnetin; inflammatory cell apoptosis

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

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是一种临床常见危重病,30% ~ 70%的 AKI 发展为慢性肾病(chronic kidney disease, CKD),约 17%的 AKI 患者 1 年内发展至终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)^[1],其中反复发生的微炎性反应是 AKI 进展至 CKD 的临床高危因素^[2]。全球每年约有 200 万人死于 AKI^[3],严重威胁着人类的生命健康安全。肾小管上皮细胞是 AKI 主要的受损细胞,在缺血、毒素等损伤作用下,肾小管上皮细胞发生凋亡、坏死等情况^[4],损伤的肾小管上皮释放肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein, MCP-1)、白细胞介素 6(interleukin, IL-6)、白细胞介素 1 β (interleukin, IL-1 β)等,炎症和趋化因子参与炎性细胞的趋化与活化过程,进一步导致炎症反应和肾小管细胞凋亡加重^[5-6],这种由炎症反应导致细胞凋亡的方式被称为炎性细胞凋亡。

长链非编码 RNAs(long non-coding RNAs, LncRNAs)是一类转录本长度超过 200 nt 的 RNA 分子^[7],在人类众多基因组上,仅有 1% ~ 2%的区域能够被编码翻译成蛋白,而高达 70%以上的区域被转录成为 RNA,这些 RNA 大部分为非编码 RNAs(non-coding RNAs, ncRNAs),起初被认为是基因组

转录的副产物,不具有生物学功能,然而高通量技术的发展提高了基因组测序的深度,使研究者对人类基因组有了全新的理解和认识,近年来 LncRNAs 被发现参与染色体沉默、基因组印记、染色质修饰、转录激活、转录干扰、核内运输等多种重要的调控过程^[8-9]。关于 LncRNAs 在 AKI 中作用的研究报道较多,包括小鼠 LncRNA a33 可通过激活 Axin2/ β -catenin 促进 AKI 进程^[10],人源性 LncRNA TUG1 可以通过抑制肾小管上皮细胞铁死亡减轻急性肾损伤^[11]。本研究发现 LncRNA-gm33782 在 AKI 肾表达显著升高,并且 LncRNA-gm33782 与补体因子-H(complement factor-H, CFH)具有直接结合关系。CFH 是补体替代途径中的主要负调控因子,有研究表明抗 CFH 的自身抗体能够有效减轻狼疮性肾炎^[12],而 CFH 是否作为 LncRNA-gm33782 影响 AKI 的直接作用靶点是本研究所关注的重点之一。

异鼠李素(isorhamnetin, ISO)是一种黄酮类化合物,在多种炎症性疾病模型中表现出抗炎作用,包括在炎症性肠道疾病、风湿关节炎等模型中,ISO 可有效减轻 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的释放,从而降低炎症反应^[13-14],然而其在 AKI 中的作用机制尚不清楚。本文旨在研究 ISO 对 AKI 肾炎症介导的肾小管细胞凋亡的改善作用,并探讨其作用机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

48 只 8 ~ 10 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 体重 20 ~ 22 g, 购买于成都集萃药康生物科技有限公司【SCXK(川)2020-034】。饲养期间严格控制温度(22 ± 2)℃、湿度(50% ~ 60%), 12 h 循环照明, 并保障小鼠自由摄食和饮水, 饲养于西南医科大学动物实验中心 SPF 级动物房【SYXK(川)2023-0065】。本研究所有动物实验操作获得西南医科大学伦理委员会的批准(20211122-075)。

1.1.2 细胞

小鼠肾小管上皮细胞株(transformed C3H mouse kidney-1, TCMK1, 购于上海雅吉生物科技有限公司), 培养条件为添加 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 温度 37 °C, CO₂ 含量 5%, 湿度 100%。

1.1.3 主要试剂与仪器

LncRNA-gm33782 质粒(pcDNA3.1-gm33782, 擎科生物), 异鼠李素(Medbio, 80003), HE 染色试剂盒(Beyotime, C0107), PAS 染色试剂盒(Medbio, C0142S), 免疫组化试剂盒(中杉金桥, PV-9005), FISH 染色试剂盒(Genepharma, F04401), DMEM 培养基(Gibco, 美国), 胎牛血清(Gibco, 美国), Lipofectamine 3000(Thermo, 美国), 总 RNA 提取试剂盒(Medbio, C0142S), 美国 CST 一抗: Anti-GAPDH、Anti-Tim1、Anti-Akt、Anti-P-Akt; 中国 Santa 一抗: Anti-TNF-α、Anti-IL-1β、Anti-IL-6、Anti-Bcl2、Anti-Bax、Anti-F4/80, HRP 标记的小鼠抗兔二抗(生工, D110065), HRP 标记的羊抗小鼠二抗(生工, D110103)。显微镜(Leica, 德国), 细胞培养箱(Thermo, 美国), 酶标仪(奥盛, 中国), 蛋白电泳及转印系统(Bio-Rad, 美国), 实时荧光定量 PCR 系统(ABI, 美国), EVOS 图像采集系统(Life Technologies, 美国), 凝胶成像系统(勤翔, 中国), 石蜡切片机(Leica, 德国), 电转仪(Pulse Generator, 德国), 流式细胞分析仪(BD, 美国), CHIRP 试剂盒(赛诚生物, KT105-01)。

1.2 方法

1.2.1 AKI 模型构建及给药

将 48 只小鼠随机分为 8 组, 每组 6 只, 分别为对照组、模型组、治疗组(AKI 模型构建后灌胃给予

30 mg/kg 的异鼠李素)、空载质粒电转染组、LncRNA-gm33782 敲低组、LncRNA-gm33782 过表达组、模型 + LncRNA-gm33782 敲低组、LncRNA-gm33782 过表达 + 治疗组。AKI 模型用腹腔注射顺铂的方式进行诱导, 在空腹状态下, 按照 20 mg/kg 剂量进行一次性腹腔注射, 注射后 1 h 对给药组小鼠进行给药干预, 第 3 天处死小鼠, 收集血液及肾组织。

1.2.2 病理染色

制备 4 μm 石蜡切片进行苏木素-伊红(HE)染色观察。糖原(PAS)染色参照染色试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 免疫组化染色

石蜡切片处理之后用含 5% 的牛血清蛋白的 PBS 溶液分别稀释 F4/80、TNF-α、IL-1β 抗体并滴于组织上, 在 4 °C 条件下进行孵育过夜。孵育完成后, 用 PBS 洗掉非特异性结合的抗体, 滴加兔鼠通用型免疫组化二抗于 37 °C 孵育 30 min 后即可进行显色。

1.2.4 肾功检测

小鼠麻醉后, 通过心脏穿刺法采集小鼠血液, 3500 r/min 离心 15 min 收集血清, 操作步骤参照试剂盒说明书, 肌酐检测结果单位为 μmol/L, 尿素氮单位为 mmol/L。

1.2.5 Western Blot

使用 RIPA 裂解液提取肾总蛋白, 通过考马斯亮蓝蛋白浓度测定法配平各组蛋白后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。采用湿法电转的方式将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶常温封闭非特异性抗原后加入稀释好的一抗于 4 °C 孵育过夜。最后用 TBST 洗掉未特异性结合的一抗后, 加入一抗对应种属的二抗于常温孵育 1 h 即可在凝胶成像仪中进行化学发光显色。使用 Image J 1.8.0 版本进行灰度值量化, GAPDH 作为内参用于各组蛋白量校正。

1.2.6 细胞造模及转染

为了模拟体内肾小管炎症反应, 在培养基中加入 500 ng/mL 的顺铂进行诱导。转染则通过 Lipofectamine 3000(操作步骤参照使用说明书)介导 pcDNA3.1-gm33782 进入细胞。

1.2.7 实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)

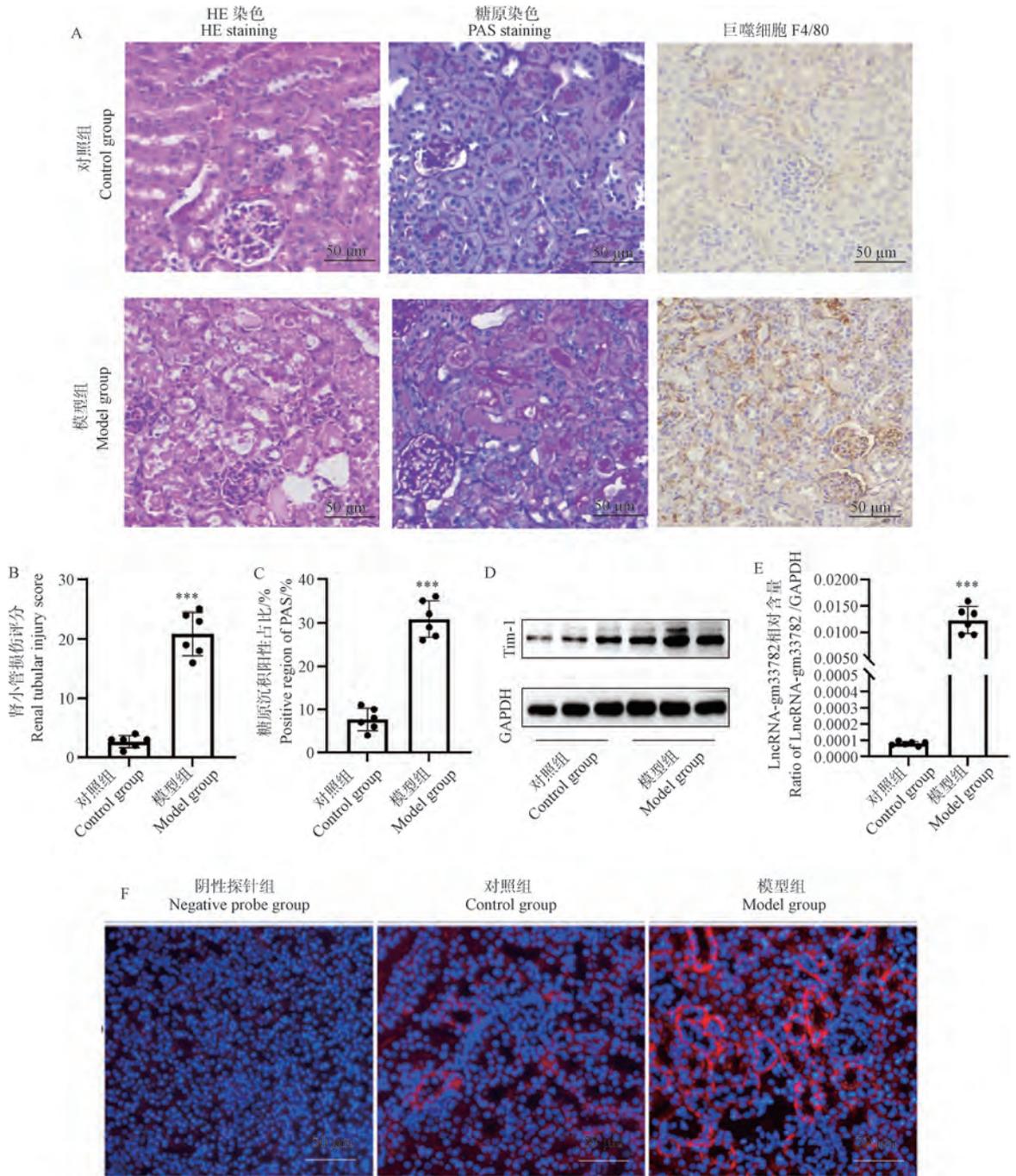
提取肾总 RNA, 每个样本的 1 μg 总 RNA 经由

HiScript® III RTs SuperMix 试剂盒 (R323-01, Vazyme) 逆转录为 cDNA。根据 hamQ Universal SYBR qPCR 试剂盒 (Q711-00, Vazyme) 说明书进行实时荧光定量 PCR, 所用引物序列见表 1。

1.2.8 肾原位电转染

按 50 mg/kg 腹腔注射戊巴比妥将小鼠麻醉后,

从背开口部暴露小鼠肾。血管钳夹闭肾动静脉后, 用带 36 G 针头注射器经静脉向肾注射 100 μL 质粒, 等待 3 min 让质粒在肾扩散。通过测试电阻 < 500 Ω 即可开始电转染。仪器设置参数: 电压 50 V, 电流 300 mA, 瞬时换电持续时间 50.0 ms, 瞬时换电静止时间 1000 ms, 总换电次数 4 次。



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 1 AKI 小鼠肾小管损伤及 LncRNA-gm33782 的表达

Note. Compared with control group, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 Expression of LncRNA-gm33782 and renal tubular injury in AKI mice

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
<i>LncRNA-gm33782</i>	F: TCCCTCTCTGTTTGCCGTGT R: CTCTCACACCAGGACAGTGG
<i>IL-1β</i>	F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG R: AAGTCCACGGGAAAGACAC
<i>IL-6</i>	F: AAAGAGTTGTGCAATGGCAATTCT R: AAGTGCATCATCGTTGTCATACA
<i>TNF-α</i>	F: CATCTTCTCAAAAATTCGAGTGACAA R: TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>GAPDH</i>	F: GGTGAAGGTCGGAGTCAACG R: CAAAGTTCATGGATGHACC

1.2.9 CHIRP 捕获 *LncRNA-gm33782* 靶蛋白

参照试剂盒说明书分别使用 2 条与 *LncRNA-gm33782* 结合位点不同的探针针对 *LncRNA-gm33782* 及与之有直接结合的蛋白进行捕获,同时设置阴性探针作为对照。将捕获到的蛋白送质谱测序分析,通过对比阴性探针捕获蛋白排除假阳性结果后,对 2 条探针所捕获的结合蛋白取交集后分析潜在结合靶蛋白。

1.3 统计学分析

实验数据通过 Prism 9.0 软件进行统计学分析,检测结果用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用非配对 *t* 检验法进行差异分析,多组间用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验, $P <$

0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 AKI 小鼠肾小管严重损伤

相较于对照组,模型组肾病变明显,包括肾小管上皮细胞脱落、细胞核固缩、巨噬细胞浸润以及明显的糖原沉积(见图 1A);肾小管损伤评分和糖原染色阳性区域统计结果显示,模型组相较于对照组,差异具有显著性($P < 0.001$)(见图 1B, 1C);Western Blot 检测结果显示模型组肾小管细胞损伤标志物 Tim-1 相较于正常小鼠明显升高(见图 1D)。RT-qPCR 检测结果显示模型组肾 *LncRNA-gm33782* 相较对照组显著升高($P < 0.001$)(见图 1E)。为明确 *LncRNA-gm33782* 在小鼠肾中的表达位置,原位杂交技术发现 *LncRNA-gm33782* 主要表达于肾小管细胞上,与对照组相比,模型组肾 *LncRNA-gm33782* 表达明显增加(见图 1F),主要表达于损伤的肾小管。

2.2 肾原位电转

空载质粒电转染组 HE 染色结果显示无明显病理改变,表明电转染本身未对肾造成明显损伤(见图 2A),电转染 *LncRNA-gm33782* 敲低质粒后,相比于对照组小鼠肾 *LncRNA-gm33782* 表达量显著降低($P < 0.001$)(见图 2B)。

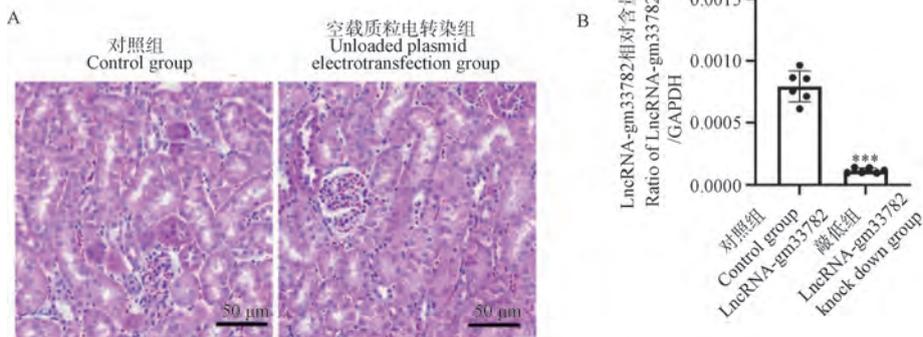


图 2 肾原位电转染流程及效果

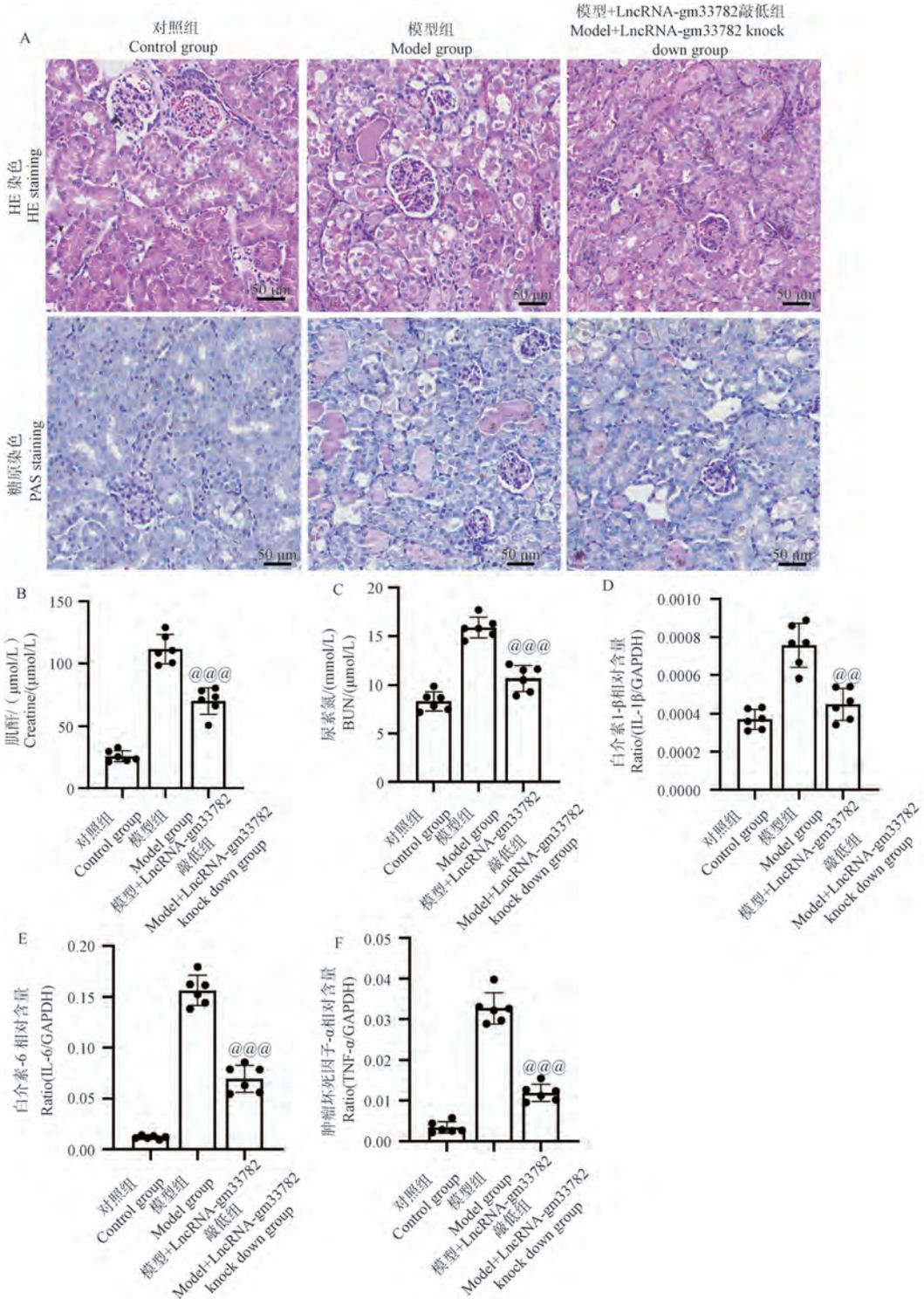
Figure 2 Procedure and effect of renal *in situ* electrotransfection

2.3 抑制 *LncRNA-gm33782* 明显改善 AKI 肾损伤

肾原位电转染敲低 *LncRNA-gm33782* 后明显减轻了 AKI 小鼠肾病理损伤(见图 3A),并且恢复肾功($P < 0.001$)(见图 3B, 3C),敲低 *LncRNA-gm33782* 降低了肾炎症因子 IL- β ($P < 0.01$)、IL-6 和 TNF- α ($P < 0.001$)的 mRNA 表达水平(见图 3D, 3E, 3F)。

2.4 *LncRNA-gm33782* 结合靶蛋白捕获

LncRNA-gm33782 结合靶蛋白捕获流程示意图(图 4A)。质谱分析检测结果显示 *LncRNA-gm33782* 探针 1 和探针 2 相较对照探针所捕获的潜在靶蛋白分别为 120 个和 62 个,2 条探针同时捕获的潜在靶蛋白有 15 个(图 4B)。其中与 AKI 肾炎症相关的基因 CFH 在 *LncRNA-gm33782* 过表达后显著升高(图 4C)。



注:与模型组相比, $^{@@} P < 0.01$, $^{@@@} P < 0.001$ 。(下图同)

图 3 电转染敲低 LncRNA-gm33782 后改善 AKI 肾小管损伤及肾炎症

Note. Compared with model group, $^{@@} P < 0.01$, $^{@@@} P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 3 Electric transfection on low after the LncRNA-gm33782 improve AKI renal tubular damage and kidney inflammation

2.5 异鼠李素减轻 AKI 肾炎症性凋亡

ISO 治疗干预后明显改善 AKI 小鼠肌酐、尿素氮异常 ($P < 0.001, P < 0.01$) (图 5A, 5B), 免疫组

化染色发现, ISO 明显抑制了 AKI 小鼠肾炎症性因子 IL-1 β 和 TNF- α 的表达 (图 5C); 此外 Western Blot 检测结果显示 ISO 治疗干预后, 炎症因子 TNF- α 、IL-

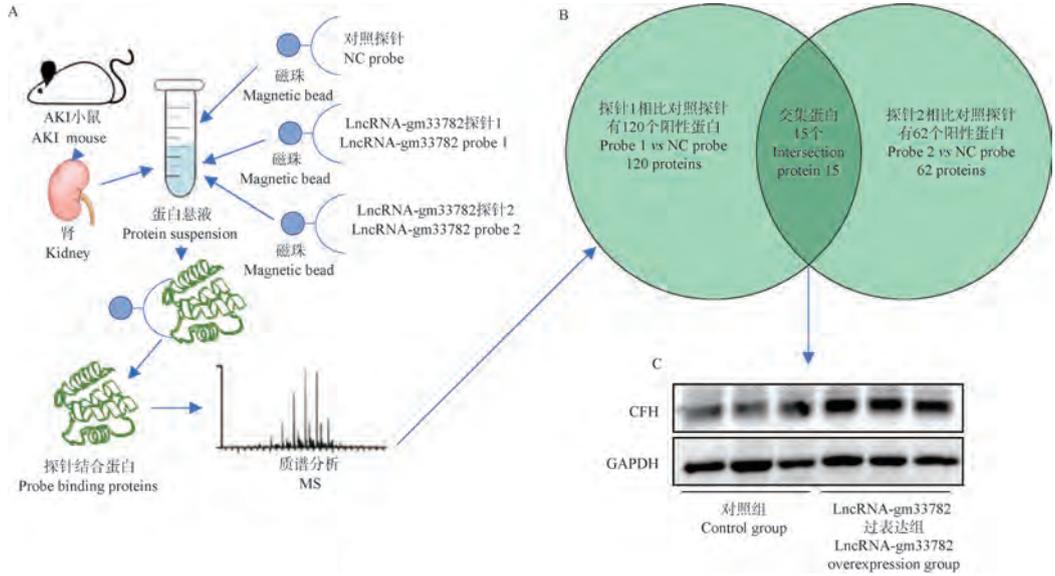


图 4 LncRNA-gm33782 靶蛋白捕获方法及验证

Figure 4 LncRNA-gm33782 target protein capture method and verification

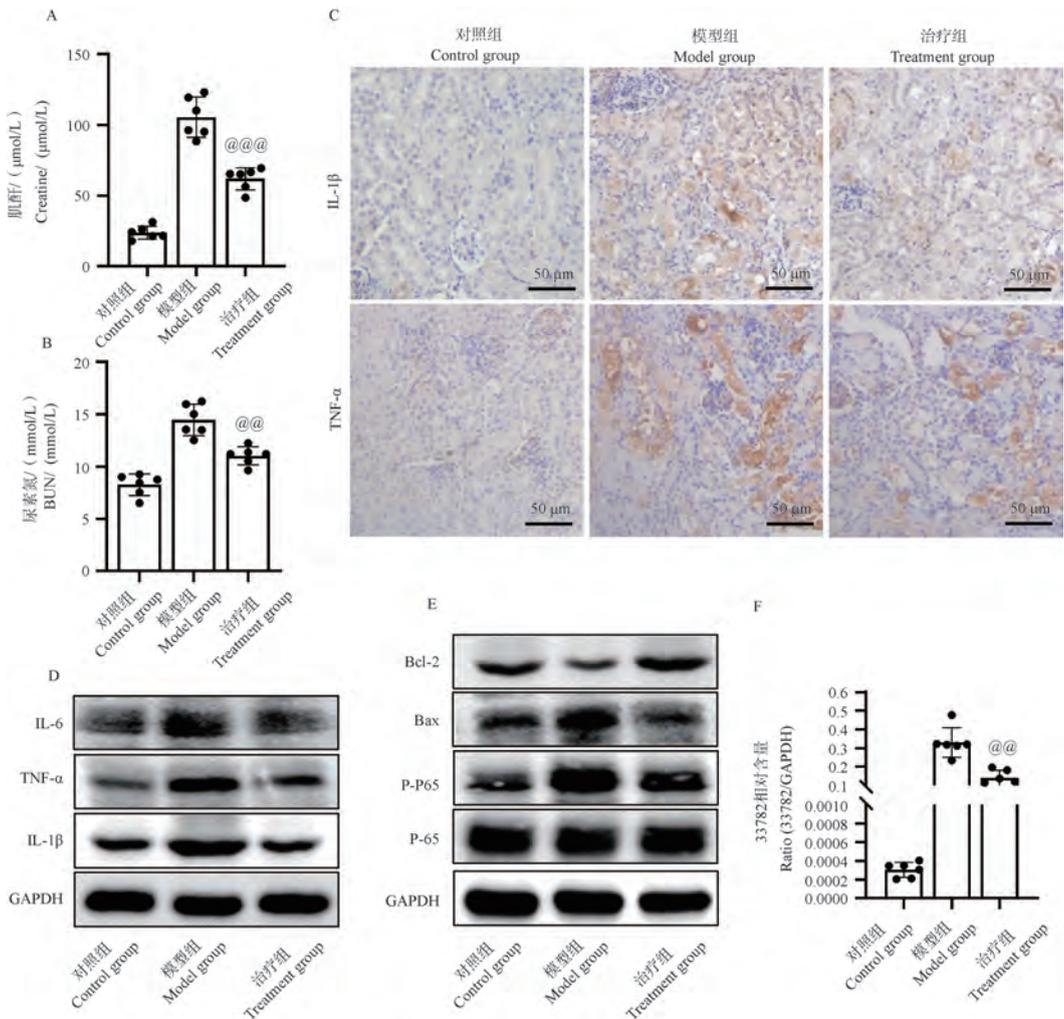


图 5 ISO 改善 AKI 肾炎症及肾小管细胞凋亡

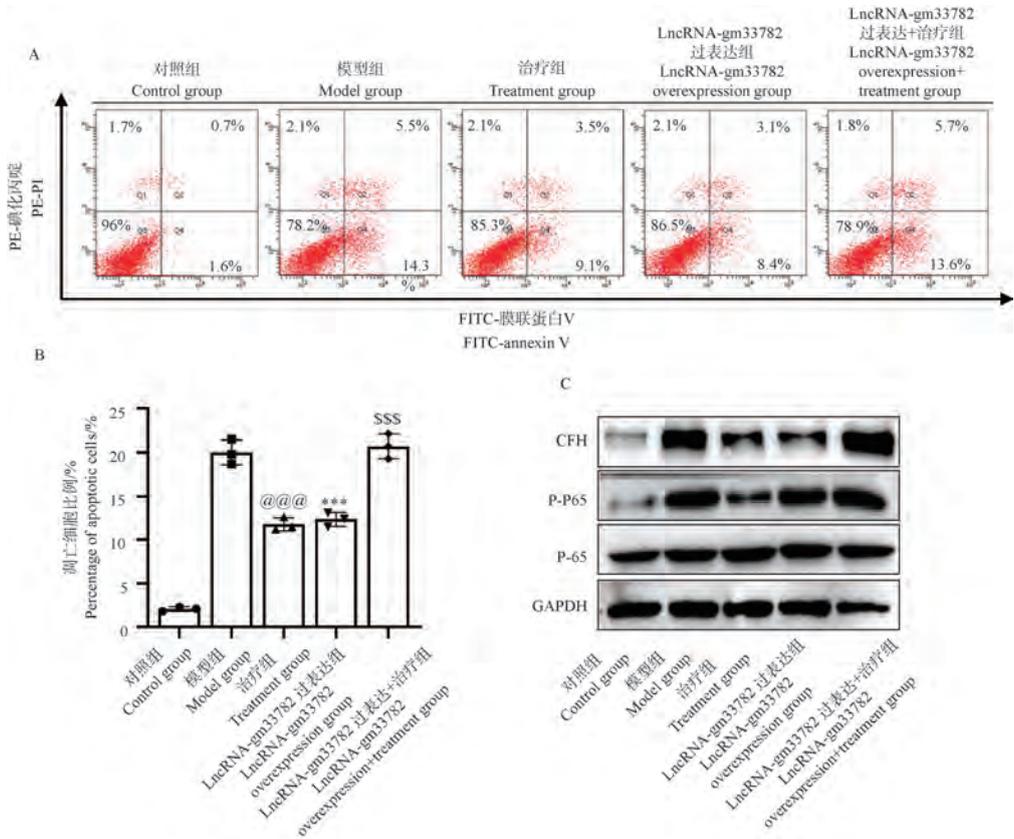
Figure 5 ISO improved renal inflammation and tubular cell apoptosis in AKI

IL-1 β 、IL-6 蛋白表达量明显下降, ISO 通过抑制 NF- κ B 信号通路,减轻了 BAX/Bcl-2 介导的细胞凋亡(图 5D,5E),并显著降低了 AKI 肾中 LncRNA-gm33782 及其靶蛋白 CFH 的表达($P < 0.01$)(图 5F)。

2.6 异鼠李素通过抑制 LncRNA-gm33782 减轻肾小管细胞凋亡

流式细胞分析检测结果显示,顺铂刺激后,肾小管细胞凋亡细胞比例明显升高,经 ISO 治疗干预

后,细胞凋亡情况有所改善($P < 0.001$); LncRNA-gm33782 过表达导致细胞出现明显凋亡情况($P < 0.001$),并且在过表达 LncRNA-gm33782 后的肾小管细胞中,ISO 对顺铂诱导的细胞凋亡治疗作用相对 ISO 治疗组被明显削弱($P < 0.001$)(图 6A, 6B)。Western Blot 检测结果显示,LncRNA-gm33782 过表达明显促进了 CFH 的表达和 NF- κ B 信号通路的激活,同时也减弱了 ISO 的抑制作用(图 6C)。



注:与治疗组相比, $^{SSS} P < 0.001$ 。

图 6 异鼠李素治疗机制探讨

Note. Compared with the treatment group, $^{SSS} P < 0.001$.

Figure 6 Study on the therapeutic mechanism of isorhamnetin

3 讨论

AKI 可由多种原因引起,如严重感染、药物中毒、创伤、心血管手术后并发症或其他致命疾病。AKI 的发生常伴随着炎症细胞的浸润和炎症因子的释放,炎症细胞如单核细胞、淋巴细胞等在肾组织中的聚集会导致炎症因子(如 TNF- α 、IL-1 β 等)的过度释放,炎症反应可以通过多种方式影响肾小管细胞的生存状态^[15-16],如诱导氧化应激反应^[17]、激活炎症信号通路^[18-19]、导致细胞凋亡相关的蛋白激

酶的激活等^[20]。本研究发现,由顺铂毒性诱导的 AKI 小鼠血清肌酐和尿素氮含量相对正常小鼠有明显上调,肾小管细胞出现了明显损伤和脱落,同时肾小管细胞间质巨噬细胞浸润量明显增加,与前期报道相符合。

LncRNAs 是一种不编码蛋白质的 RNA 分子,能够通过多种方式调控基因表达和细胞功能,包括转录后调控、染色质重塑、转录调节、miRNA 海绵(miRNA sponge)等机制^[21]。与 DNA、mRNA 和蛋白质等相互作用,参与细胞周期调控、细胞分化和

细胞凋亡等生物学过程^[22]。LncRNA-gm33782 是本研究中发现在 AKI 肾中显著升高的一个基因,目前尚未有关于 LncRNA-gm33782 在疾病中的作用报道。通过原位杂交技术发现 LncRNA-gm33782 主要表达于损伤后的肾小管细胞,提示其在 AKI 中扮演着重要角色。

原位电转染技术是一种用于向体内组织递送外源性 DNA、RNA 或蛋白质的技术,该技术使用电穿孔原理,利用电场的作用使细胞膜暂时性地产生微小的孔隙,从而促进外源性基因或药物等穿透并进入细胞内^[23]。为进一步明确 LncRNA-gm33782 在 AKI 中的功能,采用了肾原位电转染 LncRNA-gm33782 敲低质粒的方式以达到短时间内让小鼠肾 LncRNA-gm33782 沉默的目的^[10,24]。结果显示体内敲低 LncRNA-gm33782 后对顺铂诱导的 AKI 肾小管损伤具有明显抑制作用,同时肾炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达水平也明显降低,表明靶向抑制 LncRNA-gm33782 可以减轻 AKI 肾炎症反应进而改善肾小管细胞损伤。为进一步明确 LncRNA-gm33782 促进 AKI 的直接作用靶蛋白,通过 Chirp 实验技术捕获了 AKI 肾 LncRNA-gm33782 结合蛋白进行质谱检测,结果显示 LncRNA-gm33782 与 CFH 有直接作用关系,并且 LncRNA-gm33782 对其具有调控作用。

ISO 是一种植物类黄酮化合物,其广泛存在于多种食物中,如洋葱、菠菜、茶叶、草莓、苹果、葡萄等^[25]。研究表明,ISO 具有良好的抗炎效果,能够通过调节多种炎症相关信号通路,如 NF- κ B、MAPK 和 PI3K/AKT 等途径,抑制炎症因子的释放和炎症反应的发生^[26-27],但其在 AKI 中的作用尚未被报道。本研究最后观察了 ISO 对 AKI 的治疗作用,并重点关注了其对 NF- κ B 信号通路以及 Bax/Bcl-2 这一凋亡相关蛋白家族的影响。NF- κ B 是一种重要的转录因子,在调节炎症反应、细胞存活和免疫应答等过程中发挥关键作用,该通路的激活可以导致炎症因子的产生和炎症反应的加剧和促进细胞凋亡^[28-29]。Bax 和 Bcl-2 是与细胞凋亡密切相关的蛋白家族,Bax 是促进细胞凋亡的蛋白,其通过促进线粒体膜通透性转化而释放线粒体内的细胞凋亡因子,而 Bcl-2 则是抗凋亡蛋白,主要作用是抑制 Bax 的活性,维持线粒体膜的稳定性,从而阻止细胞凋亡的发生^[30-31]。结果显示 ISO 能够改善 AKI 小鼠肾功能,减少 AKI 肾炎症因子表达。此外,ISO 同样

能够抑制 AKI 肾 LncRNA-gm33782 及其靶蛋白 CFH 的表达,提示 ISO 可能通过抑制 LncRNA-gm33782 减轻了 AKI 肾小管细胞凋亡。为进一步验证这一机制,最后在体外进行了 LncRNA-gm33782 过表达恢复实验,结果显示过表达 LncRNA-gm33782 促进 NF- κ B 信号通路激活以及靶蛋白 CFH 的表达,而 ISO 对肾小管细胞炎性凋亡的治疗作用受到明显削弱,表明 ISO 对 AKI 治疗作用是依赖于抑制 LncRNA-gm33782 表达实现的。

综上所述,LncRNA-gm33782 通过促进靶蛋白 CFH 表达加剧 AKI 肾炎症性肾小管细胞炎性凋亡,ISO 能够通过抑制 LncRNA-gm33782,缓解炎症反应,减轻 AKI 肾小管细胞凋亡。

参 考 文 献(References)

- [1] SATO Y, TAKAHASHI M, YANAGITA M. Pathophysiology of AKI to CKD progression [J]. *Semin Nephrol*, 2020, 40(2): 206-215.
- [2] WANG Z, ZHANG C. From AKI to CKD: maladaptive repair and the underlying mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10880.
- [3] ORTIZ-SORIANO V, ALCORN J L 3rd, LI X, et al. A survey study of self-rated patients' knowledge about AKI in a post-discharge AKI clinic [J]. *Can J Kidney Health Dis*, 2019, 6: 2054358119830700.
- [4] 程洁, 周毕华, 黄雅倩, 等. 急性肾损伤的分子机制及中药的干预作用 [J]. *光明中医*, 2022, 37(12): 2142-2145.
CHENG J, ZHOU Y H, HUANG Y Q, et al. The molecular mechanism of acute kidney injury and the intervention effect of Chinese medicine [J]. *Guangming J Chin Med*, 2022, 37(12): 2142-2145.
- [5] AMROUCHE L, DESBUISSONS G, RABANT M, et al. MicroRNA-146a in human and experimental ischemic AKI: CXCL8-dependent mechanism of action [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(2): 479-493.
- [6] MARX D, METZGER J, PEJCHINOVSKI M, et al. Proteomics and metabolomics for AKI diagnosis [J]. *Semin Nephrol*, 2018, 38(1): 63-87.
- [7] MATTICK J S, AMARAL P P, CARNINCI P, et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(6): 430-447.
- [8] LI O, LI Z, TANG Q, et al. Long stress induced non-coding transcripts 5 (LSINCT5) promotes hepatocellular carcinoma progression through interaction with high-mobility group AT-hook 2 and miR-4516 [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 8510-8523.
- [9] FERRÈ F, COLANTONI A, HELMER-CITTERICH M. Revealing protein-lncRNA interaction [J]. *Brief Bioinform*, 2016, 17(1): 106-116.
- [10] XIE K H, LIU X H, JIA J, et al. Hederagenin ameliorates

- cisplatin-induced acute kidney injury via inhibiting long non-coding RNA A330074k22Rik/Axin2/ β -catenin signalling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 112: 109247.
- [11] CHANG X, ZHANG P, XU X X, et al. Total glucosides of paeony inhibited autophagy and improved acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion via the lncRNA TUG1/miR-29a/PTEN axis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 2229–2242.
- [12] LI L L, LUAN Z Q, TAN Y, et al. Anti-complement factor H (CFH) autoantibodies could delay pristane-induced lupus nephritis [J]. *Immunol Res*, 2023, 71(6): 849–859.
- [13] ALQUDAH A, QNAIS E Y, WEDYAN M A, et al. Isorhamnetin reduces glucose level, inflammation, and oxidative stress in high-fat diet/streptozotocin diabetic mice model [J]. *Molecules*, 2023, 28(2): 502.
- [14] ZHOU F, MEI J, YUAN K, et al. Isorhamnetin attenuates osteoarthritis by inhibiting osteoclastogenesis and protecting chondrocytes through modulating reactive oxygen species homeostasis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 4395–4407.
- [15] SHELKE V, DAGAR N, GAIKWAD A B. Phloretin as an add-on therapy to losartan attenuates diabetes-induced AKI in rats: a potential therapeutic approach targeting TLR4-induced inflammation [J]. *Life Sci*, 2023, 332: 122095.
- [16] TANG Y, WANG C, WANG Y, et al. Isoliquiritigenin attenuates LPS-induced AKI by suppression of inflammation involving NF- κ B pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(12): 4141–4151.
- [17] OLIVEIRA B M, DE ALMEIDA L F, DELUQUE A L, et al. Calcitriol reduces the inflammation, endothelial damage and oxidative stress in AKI caused by cisplatin [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15877.
- [18] HU X, ZHOU W, WU S, et al. Tacrolimus alleviates LPS-induced AKI by inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B signalling in mice [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(2): 507–514.
- [19] 文丹, 廖媛, 李健春, 等. 异甘草素通过 Smad3/Arid2-IR/NF- κ B 轴改善顺铂诱导的急性肾损伤小鼠炎症反应 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 25–30, 46.
- WEN D, LIAO Y, LI J C, et al. Effect of isoliquiritigenin on cisplatin-induced acute kidney injury in mice with inflammation through the Smad3/Arid2-IR/NF- κ B axis [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(6): 25–30, 46.
- [20] MATSUSHITA K, MORI K, SARITAS T, et al. Cilastatin ameliorates rhabdomyolysis-induced AKI in mice [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2021, 32(10): 2579–2594.
- [21] WU Q, HUANG F. lncRNA H19: a novel player in the regulation of diabetic kidney disease [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1238981.
- [22] SIMION V, ZHOU H, HAEMMIG S, et al. A macrophage-specific lncRNA regulates apoptosis and atherosclerosis by tethering HuR in the nucleus [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6135.
- [23] 李彤. 应用 CRISPR/Cas9 技术建立肿瘤基因点突变体外功能评估体系的研究 [D]. 西安: 西北大学; 2022.
- LI T. Application of CRISPR/Cas9 technology to establish in vitro functional evaluation system of tumor gene point mutation [D]. Xi'an: Northwestern University; 2022.
- [24] JIA J, XU L H, DENG C, et al. Hederagenin ameliorates renal fibrosis in chronic kidney disease through blocking ISG15 regulated JAK/STAT signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 118: 110122.
- [25] GONG G, GUAN Y Y, ZHANG Z L, et al. Isorhamnetin: a review of pharmacological effects [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110301.
- [26] REN X, HAN L, LI Y, et al. Isorhamnetin attenuates TNF- α -induced inflammation, proliferation, and migration in human bronchial epithelial cells via MAPK and NF- κ B pathways [J]. *Anat Rec*, 2021, 304(4): 901–913.
- [27] 钟旭, 唐国强, 刘迁, 等. 异鼠李素通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路对高氧诱导大鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(9): 1797–1802.
- ZHONG X, TANG G Q, LIU Q, et al. Protective effect of isorhamnetin on hyperoxia-induced acute lung injury in rats by regulating TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Chin J Immunol*, 2023, 39(9): 1797–1802.
- [28] BARNABEL L, LAPLANTINE E, MBONGO W, et al. NF- κ B: At the borders of autoimmunity and inflammation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 716469.
- [29] MING S, TIAN J, MA K, et al. Oxalate-induced apoptosis through ERS-ROS-NF- κ B signalling pathway in renal tubular epithelial cell [J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 88.
- [30] HUANG G, BAO J, SHAO X, et al. Inhibiting pannexin-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury via decreasing NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis [J]. *Life Sci*, 2020, 254: 117791.
- [31] LI J, SUN X A, YANG N, et al. Phosphoglycerate mutase 5 initiates inflammation in acute kidney injury by triggering mitochondrial DNA release by dephosphorylating the pro-apoptotic protein Bax [J]. *Kidney Int*, 2023, 103(1): 115–133.

李勇进,章晓云,曾浩. 骨质疏松症病证结合动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 772-785.

LI Y J, ZHANG X Y, ZENG H. Progress in the establishment and evaluation of osteoporosis disease and syndrome combination animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 772-785.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.010

骨质疏松症病证结合动物模型的研究进展

李勇进¹, 章晓云^{2*}, 曾浩¹

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

【摘要】 随着老龄化的加剧, 骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 的发病率逐年升高, 已成为全球公共卫生问题之一。其主要特征为骨量降低及骨微结构破坏, 临床上常表现为疼痛、驼背、身高降低, 甚至出现骨折。积极进行与 OP 相关的科学研究显得尤为重要, 动物模型的构建已经成为参与医药研究的关键手段之一, 尤其是在探索新的治疗方法和药物开发过程。其中, 融合了中医药特色的“病证结合”动物模型在我国中医药现代化研究中占据着不可替代的地位。本文从目前病证结合 OP 动物模型的现状出发, 总结模型构建及评价方法, 以期病证结合 OP 动物模型的研究提供一定的思路及参考。

【关键词】 骨质疏松症; 病证结合; 动物模型; 研究进展

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 06-0772-14

Progress in the establishment and evaluation of osteoporosis disease and syndrome combination animal models

LI Yongjin¹, ZHANG Xiaoyun^{2*}, ZENG Hao¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

Corresponding author: ZHANG Xiaoyun. E-mail: zhangxiaoyun520@126.com

【Abstract】 With increased population aging, the incidence of osteoporosis (OP) increases year by year, and has become a key global public health problem. Its main characteristics are reduced bone mass and damage to bone microstructure, often clinically manifesting as pain, hunched-back posture, height reduction, and even bone fractures. Therefore, it is particularly important to actively carry out scientific research related to OP, and the construction of animal models has become one of the key drivers of medical research, especially for exploring new treatments and in drug development. Animal models that are a “combination of disease and syndrome”, integrating the characteristics of Chinese medicine, occupy an irreplaceable position in research aiming to modernize traditional Chinese medicines. On the basis of

【基金项目】 国家自然科学基金 (82360937), 广西自然科学基金面上项目 (2023GXNSFAA026075), 广西中医药适宜技术开发与推广项目 (GZSY22-36), 广西中医药多学科交叉创新资助课题 (GZKJ2304), 广西高校壮医毒病研究重点实验室 (桂教科研 [2022] 10 号), 黄有荣桂派中医大师培养项目 (桂中医药科教发 [2022] 6 号), 广西中医药大学青年创新研究团队项目 (2021TD001)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82360937), Guangxi Natural Science Foundation Project (2023GXNSFAA026075), Guangxi Traditional Chinese Medicine Appropriate Technology Development and Promotion Project (GZSY22-36), Guangxi Traditional Chinese Medicine Multidisciplinary Interdisciplinary Innovation Funding Project (GZKJ2304), Key Laboratory of Zhuang Medicine Poison Research in Guangxi Universities (Gui Jiao Research [2022] No. 10), Huang Yourong Gui School TCM Master Training Project (Gui TCM Science and Education Fa [2022] No. 6), Youth Innovation Research Team Project of Guangxi University of Chinese Medicine (2021TD001).

【作者简介】 李勇进, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 脊柱、骨关节创伤性疾病的中医防治。Email: liyongjin3969@163.com

【通信作者】 章晓云, 男, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 骨伤科疾病的中医药临床与基础研究。

Email: zhangxiaoyun520@126.com

the current research status of disease-syndrome combination OP animal models, this paper summarizes model construction and evaluation method to provide certain ideas and references for research using these specialized OP animal models.

【Keywords】 osteoporosis; combination of disease and syndrome; animal models; research progress

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

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种全身性代谢性骨骼疾病,其主要病理特征在于骨质丢失造成的低骨量及骨微结构的恶化^[1]。OP 在临床上无明显症状^[2],但患者全身骨脆性增加,容易发生骨折,给患者个人及社会带来沉重的经济负担。随着我国老龄化加剧,OP 发病率逐年上升,已成为我国主要的公共健康问题之一,被称为“二十一世纪的无声流行病”^[3]。流行病学调查结果显示,50 岁以上人群 OP 患病率为 19.2%,其中女性为 32.1%、男性为 6.9%,而 65 岁以上人群 OP 患病率为 32.0%,其中女性为 51.6%、男性为 10.7%^[4]。OP 长期发展及其带来的并发症如骨骼畸形、骨折等,对人们的正常生活产生了严重影响。

目前,西医对 OP 的研究多偏向于病理方面,临床多以地舒单抗、降钙素、雌激素等药物进行对症治疗,但存在诸多禁忌症和毒副作用。中医药在治疗 OP 过程中具有价廉、易获得、毒副作用小等优势。西医对 OP 所采用的研究方法相对单一,多是从病理或临床单方面进行,而中医药研究更倾向于将 OP 的西医病理机制与中医证候辨证相结合,即病证结合,已成为医学科学发展的重要手段。通过构建 OP 病证结合动物模型,形成客观、科学的模型评价体系,对中医药防治 OP 及中医药现代化进程

的研究具有重大意义。本文通过中西医临床两个角度对疾病的认识进行总结,归纳出 OP 病证结合动物模型的构建方法和存在的问题,总结提炼不同证候的量化指标,为如何构建符合临床发病机理的病证结合动物模型及评价体系提供科学客观的依据。

1 OP 的发病机制

1.1 OP 西医发病的病因病理

虽然 OP 发病机制尚未明确,但破骨细胞活性提高,成骨细胞凋亡,进而影响人体骨代谢异常是目前学者们公认的主流发病机制之一^[5]。正常成年人中,骨骼自身存在代谢周期,被称为骨代谢^[6]。骨代谢的平衡是指破骨细胞对骨吸收速度与成骨细胞对骨形成速度大致相同,但当机体因衰老、激素水平、疾病、各种机械损伤及药物等影响时,出现成骨转化能力减弱或骨吸收能力增强的情况,则会伴随出现骨量丢失的现象,最终引发 OP。如氧化应激条件下大量活性氧堆积,从而引发成骨细胞脂质过氧化损伤而凋亡;再如贯穿机体骨发育过程中的铁离子出现代谢失衡,最终出现铁过载,导致成骨细胞铁死亡发生,而破骨细胞活性增强,也已成为 OP 的重要发病机制之一^[7](见图 1)。

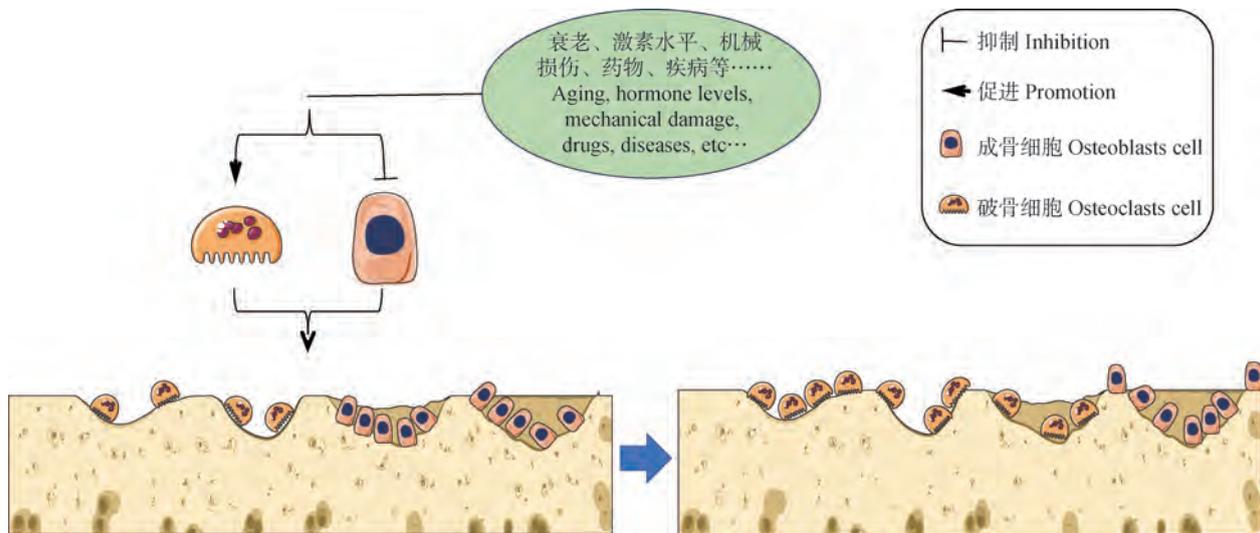


图 1 骨质疏松发生机制

Figure 1 Pathogenesis of osteoporosis

1.2 OP 中医发病的病因病机

中医并无 OP 病名,但按其症状及发病机理,可将其归属于“骨痹”“骨痿”“骨枯”等范畴。《素问·痿论篇》曰“肾主身之骨髓……肾气热,则腰脊不举,骨枯而髓减,发为骨痿”,认为肾主骨、生髓,肾精亏虚是 OP 发病的主要诱因。《黄帝内经》认为肾禀赋于先天之精,主骨并且依赖于后天之精的充养。脾为后天之本,气血生化之源,若后天水谷精微补充不足,或恣食肥甘厚味、嗜酒、偏食等伤及脾胃,则骨无以滋养发生骨痿^[8]。林崱镌等^[9]研究表明脾肾虚弱使肌肉充养不利,骨髓失养导致肌少症,从而诱发 OP,其认为脾、肾与 OP 病因病机之间存在紧密联系。刘金勇等^[10]研究表明龟鹿补骨方可通过滋补肝肾之阴从而有效治疗绝经后骨质疏松症,证实肝肾阴虚,精血化源不足,则骨枯而痿的病因病机。

2 OP 的诊断标准

2.1 西医诊断标准

参照《原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)》^[4]及国内外相关研究^[11-17],临床症状、影像学检查、实验室检查、骨密度检测是诊断 OP 的 4 个主要关键点,其中骨密度检测作为临床诊断最重要的手段之一,是诊断 OP 的“金标准”,应将其列为核心指标,

影像学及实验室检查可作为相对客观的评价手段,将其列为主要指标,临床症状缺乏特异性,将其列为次要指标,详见表 1。

2.2 中医诊断标准

参考《绝经后骨质疏松症(骨痿)中医药诊疗指南(2019 年版)》及相关研究^[18-21]发现,目前临床上最主要的证型为肾虚证型。不同证型各自所特有的临床表现应将其列为核心指标,而彼此之间存在的相似临床表现作为诊断 OP 的次要指标,见表 2。

3 动物模型的研究现状

目前,OP 基础实验中所需动物模型主要采用病理造模、病因造模以及病证结合造模 3 种方式,造模动物多为单一哺乳动物,如大鼠^[22]、小鼠^[23]、犬^[24]等。由于 OP 的临床症状、体征并无明显的特异性,因此大部分学者多以病因造模为主。动物模型成功与否也多采用是否符合 OP 临床症状或病理机制的单一因素进行评价,如绝经后骨质疏松症的动物模型,其评价方式只是通过检测骨密度及雌二醇水平。即便造模后动物的外在表现符合 OP 的临床症状或病理机制,但是生理生化指标与人体差异性很大,无法判断模型是否对应 OP 中医证候类型。

由于无法采用中医评价体系判断单一因素的

表 1 OP 的西医诊断标准

Table 1 Western medical diagnostic criteria for osteoporosis

诊断要素 Elements of diagnosis	诊断方法 Methods of diagnosis	指标性 Indexability
骨密度测试 ^[11-13] BMD testing ^[11-13]	①DXA/DEXA:T 评分等于或小于-2.5;②QCT:绝对 BMD 值小于 80 mg/cm ³ ;③TBS:TBS 值小于或等于 1.200。 ①DXA/DEXA. T score equal to or less than -2.5. ②QCT. Absolute BMD value less than 80 mg/cm ³ . ③TBS. TBS is less than or equal to 1.200.	核心指标 Core indicators
影像学 ^[14-16] Imaging ^[14-16]	①X 线检查:椎体内结构呈纵行条纹,周围骨皮质变薄,椎体变扁,上下缘内凹,椎间隙增宽;②CT:椎体中央或整个区域骨松质密度减低,CT 值有时低达-90 HU,有时椎体松质骨小梁呈粗点状、蜂窝状改变、骨皮质可见普遍变薄以及椎体周边骨质增生;③MRI:椎间盘变薄、呈低信号其内可见不规则斑点状高信号区,椎间隙距离增加。 ①X-ray examination. Longitudinal stripes in the internal structure of the vertebra, thinning of the peripheral bone cortex, flattening of the vertebral body, concave of the upper and lower edges, and widening of the intervertebral space. ②CT. Density of cancellous bone in the center or the entire area of the vertebral body is reduced, the CT value is sometimes as low as -90 HU, sometimes the trabecular bone of the vertebral cancellous bone is coarsely punctate, honeycomb changes, the bone cortex can be seen as general thinning, and the bone hyperplasia around the vertebral body. ③MRI. Intervertebral disc is thinned and low-signal, with irregular spot-like hyper-signal areas visible and intervertebral space distances increased.	主要指标 Main indicators
实验室检查 ^[17] Laboratory examination ^[17]	①血钙浓度降低;②骨钙素降低;③血清碱性磷酸酶降低;④血清抗酒石酸酸性磷酸酶升高等。 ①Blood calcium concentration decreased. ②Decreased osteocalcin. ③Serum alkaline phosphatase decreased. ④Serum anti-tartrate acid phosphatase increased, etc.	
临床症状 ^[4] Clinical signs ^[4]	①腰背部疼痛或全身性骨痛;②脊柱出现畸形形变;③身高降低或体态出现驼背畸形;④髋部或椎体发生脆性骨折。 ①Low back pain or generalized bone pain. ②Deformity of the spine occurred. ③Decreased height or humpback deformity. ④Fragility fractures of the hip or vertebral body.	次要指标 Secondary indicators

表 2 OP 主要证型的中医诊断标准

Table 2 Main diagnostic criteria of osteoporosis in traditional Chinese medicine

证型 Syndrome type	特有表现(核心指标) Characteristic presentation(Core indicators)	相似表现(次要指标) Similar presentation(Secondary indicators)
肾阳虚证 ^[18] Kidney-Yang deficiency ^[18]	①小便频数;②舌淡苔白、脉沉细弦 ①Frequency of urine. ②Pale tongue with whitish coat, deep pulse and thin string	①腰背冷痛;②酸软乏力;③驼背弯腰 ①Cold pain in the back and waist. ②Acidity, weakness, and fatigue. ③Hunchback
肝肾阴虚证 ^[19] Liver-kidney Yin deficiency syndrome ^[19]	①眩晕耳鸣;②五心烦热;③舌红少津、少苔、脉沉细数 ①Vertigo and tinnitus. ②Dysphoria in chestpalms-soles. ③Dry redness of tongue, lacking tongue coating, pulse sinking, fine and fast	①腰膝酸软无力,抽筋;②驼背弯腰;③形体消瘦 ①Lumbar and knee soreness and weakness, cramps. ②Hunchback. ③Physical emaciation
脾肾阳虚证 ^[19] Spleen and kidney Yang deficiency ^[19]	①小便不利或频多;②大便久泄不止或五更泄泻;③舌淡胖,苔白滑,脉沉细弱或沉弦迟 ①Poor or frequent urination. ②chronic diarrhea or Wugeng diarrhea. ③Pale and plump tongue, white and smooth tongue coating, dim and weak pulse or deep and taut pulse	①酸软乏力,甚则驼背弯腰;②活动受限 ①Acidity, weakness, and even stooping. ②Activity limitations
肾虚血瘀证 ^[20] Kidney deficiency and blood stasis ^[20]	①步履艰难;②舌质淡紫,脉细涩 ①Trudge. ②Tongue light purple, fine and astringent pulse	①腰脊刺痛;②腰膝酸软;③下肢萎弱 ①Lumbar spine tingling pain. ②Lumbar debility. ③Lower limb weakness
脾胃虚弱证 ^[21] Spleen and stomach deficiency ^[21]	①面色萎黄或浮肿或消瘦;②纳少脘胀、便溏;③舌淡苔白,脉细弱无力 ①Yellowish or swollen or emaciated complexion. ②Lack of appetite, bloating, diarrhea. ③Pale tongue with whitish coating, thin and delicate pulse	①腰背酸软、疼痛;②肌肉萎缩;③筋骨羸弱 ①Low back soreness and pain. ②Muscle atrophy. ③Weakness of muscles and bones
血瘀气滞证 ^[19] Syndrome of blood stasis and Qi stagnation ^[19]	①痛有定处,拒按;②筋肉挛缩;③舌质紫暗,有瘀点或瘀斑,脉涩或弦 ①Pain has a fixed point, refuse to press. ②Muscle contracture. ③Tongue purple dark, petechiae or ecchymosis, pulse astringency or stringency	①腰背及周身疼痛;②驼背弯腰 ①Pain in the back and body. ②Hunchback

OP 模型是否与中医证型对应,因此,OP 造模方式需要采取相较于单因素造模更合理的造模方式。将“外在”的证候和“内在”的病理指标结合进行多因素造模,才能构建同时符合西医病理机制与中医证型的动物模型,即 OP 病证结合造模。评价 OP 病证结合模型是否建立成功,不能简单地将造模动物的临床表现与 OP 西医临床症状或病理机制相对应,应当加入 OP 中医临床证候的评价要素,观察造模动物的症状表现与 OP 西医临床症状的符合程度(见表 3)。

4 OP 病证结合动物模型评价体系的探讨

评价病证结合动物模型应当以 OP 病理模型为基础,同时观察动物证候表现,如体重、毛发、爪甲、体态及二便等情况,当病理与证候表现二者完全符合或基本符合 OP 的临床诊断标准及不同证型的证候表现时,则造模成功。评价体系的关键是如何将不同证型模型的证候表现进行标准化。评价指标的收集与归纳也是不可或缺的一环,特别是中医证候的收集,由于中医临床所依赖的四诊合参在动物

模型上并不能及时有效地收集到合理且客观的 OP 证候表现,因此需要借助现代技术的帮助,如体温计测量动物模型肛温以收集体温改变^[35]、心电图测量心跳以收集动物模型脉搏^[36]、通过舌象仪采集动物模型舌象^[37]等。不同证型 OP 的证候特征彼此之间有共用性与特异性,在收集归纳特异性证候表现中,需要选择能与西医病理机制相互联系的证候表现。

4.1 OP 不同证型模型共用量化指标

无论何种证型的 OP 均可通过西医理论中 OP 的发病机制及病理表现一一对应阐释,而中医学认为病理表现与“证候表现”的关系密切,西医的病理生化指标相较于临床表现,拥有更高的敏感度,能及时捕捉到不同证型造模的细微变化。因此将西医病理生化指标作为造模评价体系的基础,并与中医证候相交叉,找到不同证型 OP 的共有病理生化指标,对造模评价体系标准的建立具有非常重要的意义(见表 4)。研究表明,骨代谢异常是导致 OP 发生的主要机制,骨保护素^[38]、碱性磷酸酶^[39]、骨钙素^[40]等含量会因骨形成异常而发生病理性减少;当骨吸收发生异常时,核因子- κ B 受体活化因子和核因子- κ B 受体活化因子配体^[41]、抗酒石酸酸性磷

表 3 不同 OP 动物模型造模的特点

Table 3 Characteristics of different OP animal models

造模类型 Modeling type	造模方法 Modeling method	动物 Animal	特点 Aharacteristic	符合症状 Conforming to symptoms	
				西医 Western medicine	中医 Traditional Chinese medical
病理造模 Pathological modeling	坐骨神经切 断法 ^[25] Sciaticnerve amputation method ^[25]	Wistar/SD 大鼠、C57BL/6 小鼠、新西兰长耳白 兔等 Wistar/SD rats, C57BL/6 mice, New Zealand long eared white rabbits, etc	均采用了手术方式进行造模。简便、 高效、造模所需时间短, 但会增加术 后感染及死亡的风险。 All models were made using surgical methods. It is simple, efficient, and requires a short time for modeling, but it increases the risk of postoperative infection and death.		
	卵巢切除术 势法 ^[26] Ovariectomy and castration method ^[26]	SD 大鼠、Wistar 大鼠、 C57BL/6 小鼠等 SD rats, Wistar rats, C57BL/6 mice, etc			
	糖皮质激素法 ^[27] Glucocorticoid method ^[27]	SD 大鼠、C57BL/6 小 鼠、新西兰大白兔、斑马 鱼 (AB/TU 品系) 等 SD rats, C57BL/6 mice, New Zealand white rabbits, zebrafish (AB/ TU strain), etc	不会对造模动物造成机械性损伤, 同 时更符合人体激素分泌水平。但是 所需要时间长, 药物本身存在干扰。 It will not cause mechanical damage to model animals and is more in line with human hormone secretion levels. But it takes a long time and the drug itself interferes.		
	维甲酸灌胃法 ^[28] Retinoic acid gavage method ^[28]	SD 大鼠 SD rats	操作简单、建模时间短、骨质疏松症 状典型, 但停用维甲酸后骨质疏松状 态逐渐恢复。 Operation is simple, the modeling time is short, and the symptoms of osteoporosis are typical. However, after discontinuing retinoic acid, the osteoporosis status gradually recovers.	血钙浓度降低、骨钙 素降低、骨小梁稀 疏、变细。 Blood calcium concentration decreases, osteocalcin decreases, and bone trabeculae become sparse and thinner.	体重下降、反 应迟钝、动作 迟缓。 Weight loss, slow reaction, and delayed movement.
病理造模 Pathological modeling	乙醇法 ^[29] Ethanol method ^[29]	SD 大鼠、 Wistar 大鼠 SD rats, Wistar rats	建模材料简单、方法简便易行, 是探 讨乙醇对骨代谢影响的重要模型, 应 用较多。但由于乙醇用量无法具体 控制, 因此无法准确断定造模成功所 需要的具体时间。 Modeling materials are simple, and the methods are simple and feasible. It is an important model for exploring the impact of ethanol on bone metabolism and has many applications. Since the amount of ethanol used cannot be controlled, it is not possible to determine exactly how long it will take for the mold to be successful.		
	链脉佐菌素法 ^[30] Streptozotocin method ^[30]	SD 大鼠 SD rats	建模方法成熟, 建模周期较长, 但模 型的发病过程及临床表现与人类糖 尿病相类似, 多用于研究糖尿病 性 OP。 Modeling method is mature and the modeling period is long, but the pathogenesis and clinical manifestations of the model are similar to those of human diabetes, and it is mostly used to study OP in diabetes.		

续表 3

造模类型 Modeling type	造模方法 Modeling method	动物 Animal	特点 Aharacteristic	符合症状 Conforming to symptoms	
				西医 Western medicine	中医 Traditional Chinese medical
病因造模 Pathogenic modeling	注射 RANKL(核因子- κ B 受体活化因子配体) ^[31] Injection of RANKL (nuclear factor κ B receptor activator ligand) ^[31]	SD 大鼠 SD rats	可模拟高周转率骨病模型,并用于表征 RANKL/RANK/OPG 通路在多种骨病中的潜在作用。 It can simulate a high turnover bone disease model and be used to characterize the potential role of the RANKL/RANK/OPG pathway in various bone diseases.	血钙浓度降低、骨钙素降低、骨小梁稀疏、变细。部分模型出现血清抗酒石酸酸性磷酸酶升高、脆性骨折。 Blood calcium concentration decreases, osteocalcin decreases, and bone trabeculae become sparse and thinner. Some models exhibit elevated serum tartrate resistant acid phosphatase and fragile fractures.	动作迟缓、肛温升高、小便黄赤、大便干结、毛发干枯。 Slow movement, elevated rectal temperature, yellow urine, dry stools, and dry hair.
	皮下注射注射链脉佐菌素 ^[32] Subcutaneous injection of streptozotocin ^[32]	SD 大鼠 SD rats	造模方法成熟,造模周期较长,但模型的发病过程及临床表现与人类发病相类似即在造模动物体内选择性破坏胰岛 β 细胞,使其诱发血糖升高,增加骨质流失,符合 OP 病因。 Modeling methods are mature and the modeling cycle is long, but the pathogenesis and clinical manifestations of the model are similar to those of humans, that is, selective destruction of pancreatic islets in modeling animals β cells can induce elevated blood sugar and increase bone loss, which is consistent with the etiology of OP.		
	维甲酸灌胃 + 氢化可的松臀部肌注 ^[33] Intragastric administration of retinoic acid + intramuscular injection of hydrocortisone into the buttocks ^[33]	SD 大鼠 SD rats	取材简便,同时减少了机械损伤对于造模因素的干扰,有效模拟了 OP 的肾阳虚型。 Easy to obtain materials while reducing the interference of mechanical damage on modeling factors. Effectively simulated the kidney Yang deficiency type of OP.		
病证结合造模 Combination of disease and syndrome modeling	肌注地塞米松注射液 ^[27] Intramuscular dexamethasone injection ^[27]	SD 大鼠 SD rats	造模方式简单、高效,药物取材方便且对造模因素外的干扰很小,有效模拟了 OP 的肾阴虚型。 Modeling method is simple and efficient, with convenient drug extraction and minimal interference from modeling factors. Effectively simulated the kidney Yin deficiency type of OP.	骨小梁稀疏变细、骨钙素降低、血清抗酒石酸酸性磷酸酶升高、发生脆性骨折等。 Sparse and thinning of bone trabeculae, decreased osteocalcin, increased serum tartaric acid phosphatase, and occurrence of brittle fractures.	共同症状:体重下降、反应迟钝、毛色不光。① 肾阳虚:精神萎靡、拱背蜷曲;② 肾阴虚:大便干结、小便黄赤;③ 脾肾阳虚:大便稀溏,甚者如水状。 Common symptoms: weight loss, slow reaction, and uneven hair color. ① Kidney Yang deficiency: mental exhaustion, arched back curling. ② Kidney Yin Deficiency: Dry and dry stools, yellow urine. ③ Spleen and Kidney Yang Deficiency: Loose and loose stools, sometimes resembling water.
	注射氢化可的松 + 番泻叶灌胃 ^[34] Injecting hydrocortisone + senna leaves by gavage ^[34]	SD 大鼠 SD rats	造模药物便宜易获得、造模简单易操作、干扰因素小,有效模拟了 OP 的脾肾阳虚型。 Modeling drugs are cheap and easy to obtain, and modeling is simple and easy to operate. Interference factor is small. Effectively simulated the spleen and kidney Yang deficiency type of OP.		

酸酶^[42]含量会显著上升。因此,上述与骨代谢相关指标水平改变可作为 OP 动物模型的共用量化评价指标。另外,血钙^[43]、血磷^[44]及肾功中肌酐^[45]、血清胱抑素 C 水平以及尿素氮^[46]等也会因为骨代谢异常而发生改变,这些指标也可作为不同证型 OP 动物模型的共用量化评价指标。PDGF-BB^[47]蛋白在临床研究中较为不常见,但可以通过调控骨骼中微血管形状(尤其是 H 形血管)影响骨骼的生长发育、修复、重塑和代谢等过程。因此,微血管形状及其数量也可作为共用量化指标之一。

中医理论认为“肝肾同源,精血同源”,肝肾两脏之间的关系密切^[48]。若肝血不足,一方面使肾精亏虚,则髓枯骨空;另一方面血虚肢体筋骨失养、肢体活动不利等,因肝血虚所引起的骨痿是目前临床 OP 发病的主要病机之一^[49]。《素问·阴阳应象大论篇》云“肾生骨髓,髓生肝”,即肝血不断濡养肾精使肾精化生有源,肾精使肝血充沛,两者之间是精血互化的关系^[50]。因此,OP 的 6 种证型都会在不同时期出现肝肾亏虚的表现,而肝肾亏虚的临床表现则可作为 OP 中医不同证型模型的共用量化指标。目前肝肾亏虚型 OP 的临床表现主要有骨节或腰脊酸痛软弱、头晕、耳鸣、步履艰难、持重困难等^[51]。

表 4 OP 不同证型模型的共用/特异性量化指标

Table 4 Quantitative indicators of OP specificity for different syndrome types

证型 Syndrome type	共用量化指标 Shared quantitative indicators	特异性量化指标 Specificity quantification
肾阳虚 Kidney-Yang deficiency		总三碘甲状腺原氨酸 ^[52] 下降、总甲状腺素 ^[52] 下降、体温 ^[53] 下降 Total-triiodothyronine ^[52] decreases, Total-thyroxine ^[52] decreases, Body temperature ^[53] decreases
肝肾阴虚 Liver-kidney Yin deficiency syndrome	骨保护素 ^[38] 、碱性磷酸酶 ^[39] 、骨钙素 ^[40] 、核因子-κB 受体活化因子和核因子-κB 受体活化因子配体 ^[41] 、抗酒石酸酸性磷酸酶 ^[42] 、血钙 ^[43] 、血磷 ^[44] 、肌酐 ^[45] 、血清胱抑素 C 和尿素氮 ^[46] 、微血管形状及其数量 ^[47]	C-反应蛋白 ^[54] 升高、平均动脉压 ^[54] 升高、水通道蛋白 1 ^[55] 升高、水通道蛋白 3 ^[55] 升高 C-reactive protein ^[54] rises, Mean arterial pressure ^[54] rises, Aquaporin 1 ^[55] rises, Aquaporin 3 ^[55] rises
脾肾阳虚 Spleen and kidney Yang deficiency		尿 D-木糖代谢率 ^[56] 下降 Decreased urine D-xylose metabolic rate ^[56]
肾虚血瘀 Kidney deficiency and blood stasis		内皮素 ^[57] 升高、血小板聚集率 ^[58] 升高、血浆粘稠度 ^[58] 升高 Elevated endothelin ^[57] , Elevated platelet aggregation rate ^[58] , Increased plasma viscosity ^[58]
脾胃虚弱 Spleen and stomach deficiency		胃泌素 ^[59] 降低、胃动素 ^[59] 降低 Gastrin ^[59] decreases, Motilin ^[59] decreases
血瘀气滞 Syndrome of blood stasis and Qi stagnation		痛阈值 ^[60] 改变、血清纤维蛋白原 ^[61] 升高、造模动物骨关节前后照片 ^[60] 改变 Pain threshold ^[60] changes, Serum fibrinogen ^[61] rises, Pre- and Post-joint photographs of modeled animals ^[60] changes

因此在建立 OP 模型时,若 OP 动物模型在满足西医共用量化指标的同时,也满足以上中医共用量化指标表现在动物身上的体征,如毛发干枯、饮水增多、易怒、四肢萎软等,则可认为成功构建 OP 病证结合动物模型。

4.2 OP 不同证型模型特异性量化指标

OP 的 6 种证型虽然都存在肝肾亏虚表现,但是每个证型也都存在各自特有的临床表现。因此,有必要收集不同证型所特有且与西医病理机制相互联系的表现,作为该证型的特异性量化指标(见表 4)。

4.2.1 肾阳虚

肾阳虚是指肾阳气亏虚,脏腑温煦功能下降。临床表现可见腰膝酸软、畏寒肢冷、精神不振、舌淡胖苔白、脉弱无力^[62]等。动物肾阳虚的造模方式普遍选择水应激、劳倦过度等外部环境因素干预构建体重下降、反应迟钝、毛色不光、精神萎靡、拱背蜷曲等相应表现^[63]。但这种方式不仅造模过程冗杂,同时也无法提供特异性量化指标以及评价造模是否成功^[64]。肾阳虚模型可以将肾阳虚所特有的表现,如畏寒肢冷、精神倦怠、反应迟钝等表现与甲状腺功能减退所诱发的体温降低、血压下降、精神倦

怠、反应迟钝^[65]等表现相联系,通过摘除甲状腺的方式进行造模,可能体现该模型的特异性量化指标,即总三碘甲状腺原氨酸(tatol-triiodothyronine, TT3)和总甲状腺素(total-thyroxine, TT4)^[52]、体温^[53]。由于 TT3、TT4 的血清含量会在甲状腺功能减退时发生明显下降^[66];同时,发生甲状腺功能减退时,体温也会相应下降^[67]。

4.2.2 肝肾阴虚

肝肾阴虚既是 OP 最常见的证型之一,也是 OP 主要病机^[68]。有许多中医临床特异性较强的表现,如手足心热、大便干结、舌红少苔、脉细数等^[69],与交感神经兴奋以及体液分泌减少诱发的心跳加快^[54]、大便干结^[70]等表现十分相似。因此,在建造肝肾阴虚模型时,需要找到与交感神经及体液分泌有关的特异性量化指标。以及当交感神经兴奋时,C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)与平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)显著升高。与体液分泌有关的特异性指标有水通道蛋白 1(Aquaporin 1, AQP1)、水通道蛋白 3(Aquaporin 3, AQP3)在血清中含量增加时,会减少肠道黏液的分泌^[55]。因此,可以采用电刺激/牵拉交感神经、灌注左甲状腺素钠等方式构建 OP 肝肾阴虚模型,在构建过程中定期测量造模动物 CRP、MAP 和血清中 AQP1 及 AQP3 的含量作为肝肾阴虚模型的特异性量化指标。

4.2.3 脾肾阳虚

脾肾阳虚是脾阳虚与肾阳虚的结合,以脾阳虚为主,损及肾阳引起^[71]。完谷不化是特异性最强的临床表现,与西医病理机制中的脾功能关系密切,脾功能中最具代表性的量化指标尿 D-木糖代谢率与脾功能呈正相关^[56]。因此在构建脾肾阳虚模型时可以先将造模动物通过番泻叶或大黄制剂灌胃,以抑制造模动物脾功能,造模前中后三期分别监测造模动物的尿 D-木糖代谢率。若尿 D-木糖代谢率相较于造模前期及中期出现下降趋势,则 OP 脾肾阳虚模型建立成功。

4.2.4 肾虚血瘀

该证型在 OP 各证型中最为少见,造模方式也少有人提及。多数 OP 肾虚血瘀模型的构建都是通过先构建肾虚证型再叠加血瘀证型。舌色淡紫与脉细涩是肾虚血瘀各类表现中特异性最强的表现。舌色淡紫与脉细涩在西医可以解释为血管收缩过度,血液循环受阻。因此,建立肾虚血瘀模型时,可

以通过结扎左冠状动脉前降支以及配合惊吓的方式建立肾虚血瘀模型。左冠状动脉前降支血流减缓后,内皮素(endothelin, ET)升高^[57]、血小板聚集率和血浆粘稠度^[58]升高。若 ET 含量升高、血浆粘稠度和血小板聚集率升高,则 OP 肾虚血瘀模型造模成功。

4.2.5 脾胃虚弱

脾胃虚弱模型的构建与西医糖尿病性 OP 模型构建方式相同,即使用糖皮质激素诱导动物发生 OP^[72]。该证型与脾肾阳虚证型有诸多相似之处,二者都是以脾虚为主要证型,但脾胃虚弱证相较于脾肾阳虚证更加偏向于统摄失权、运化无力等脾气虚弱的临床表现,与西医病理机制中消化不良所诱发的四肢乏力、腹部胀痛、厌食等症状相似^[73]。胃泌素(gastrin, GAS)、胃动素(motilin, MTL)水平会因为消化不良的影响而显著降低^[59],可作为脾胃虚弱证型的特异性量化指标。因此,通过饮食不节以及抑制有关 GAS、MTL 分泌的蛋白表达率来构造模型,若在造模后 MTL、GAS 水平发生显著下降,则证明脾胃虚弱模型构建成功。

4.2.6 血瘀气滞

《医林改错》中:“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀。”瘀血是 OP 最常见的病理因素,主要由于肝失条达导致气机阻滞、血行不畅,气血津液不能正常输布而导致筋骨失养,气血阻滞于脉络之间。最特异性的临床表现与瘀血有关,如关节刺痛、痛有定处、关节肿胀变形等^[60]。这一系列特异性表现可通过痛阈值改变^[61]、血清纤维蛋白原(fipinogen, FIB)含量改变^[61]以及拍摄造模动物骨关节前后照片对比而反映。由于关节的肿胀变形及疼痛,造模动物痛阈值会降低^[60];同时,瘀血的产生会使造模动物 FIB 明显升高^[74]。因此,在建立 OP 血瘀气滞模型时,可以对造模动物采用机械损伤增加粘连的方式构建血瘀气滞模型。若造模后痛阈值降低、FIB 显著升高及对比其造模前后关节发生肿胀变形,则表明血瘀气滞模型构建成功。

5 病证结合动物模型的具体场景和意义

动物模型的核心作用便是通过动物模型的构建提供研究者可施加干预的平台,其意义是通过特殊干预手段模拟人体病理改变,以获得客观的数据资料。6 种不同的 OP 证型的具体场景(见表 5)。

表 5 OP 不同证型模型的具体场景与建模方式

Table 5 Specific scenarios and modeling methods of different syndrome models of OP

证型 Syndrome type	具体场景 Specific scene	构建方式 Construction mode
肾阳虚 ^[75] Kidney-Yang deficiency ^[75]	研究老年性 OP 时可使用此类模型 This model can be used to study senile OP	通过灌胃药物 ^[76] 等方法抑制甲状腺功能造成甲状腺激素水平降低 Thyroid function was inhibited by intragastric drugs ^[76] and the level of thyroid hormone was reduced
肝肾阴虚 ^[77] Liver-kidney Yin deficiency syndrome ^[77]	研究糖尿病性 OP、PMOP 时可使用此类模型 This model can be used in the study of diabetic OP and PMOP	通过机械刺激交感神经并结合减少饮水 ^[78] By mechanical stimulation of the sympathetic nerve combined with reduced water intake ^[78]
脾肾阳虚 ^[79] Spleen and kidney Yang deficiency ^[79]	研究老年性 OP、肌少性 OP 时可使用此类模型 This model can be used in the study of senile OP and sarcopenia OP	通过大黄或番泻叶制剂进行多次低剂量灌胃,以大便不成形为标准 ^[80] Multiple low-dose intragastric administration was performed with rhubarb or senna preparations, with fecal information as the standard ^[80]
肾虚血瘀 ^[81] Kidney deficiency and blood stasis ^[81]	研究老年性 OP、PMOP 中后期时可使用此类模型 This model can be used to study the middle and late stages of senile OP and PMOP	通过结扎左冠状动脉减缓血流速度并结合恐吓 ^[82] Ligation of the left coronary artery slows down the flow rate and is combined with intimidation ^[82]
脾胃虚弱 ^[83] Spleen and stomach deficiency ^[83]	研究糖尿病性 OP、肌少性 OP 可使用此类模型 This model can be used to study diabetic OP and sarcopenia OP	通过禁止动物进食或不规律喂食的方式 ^[84] By prohibiting animals from eating or feeding them irregularly ^[84]
血瘀气滞 ^[85] Syndrome of blood stasis and Qi stagnation ^[85]	研究各类 OP 中后期时及其出现骨折并发症时可使用此类模型 This model can be used in the study of various OP in the middle and late stages and in the occurrence of fracture complications	通过束缚等方式增加动物机械损伤并结合药物诱发二次炎症形成粘连 ^[86] Mechanical damage of animals was increased by means of restraint and combined with drugs to induce secondary inflammation to form adhesion ^[86]

6 总结和展望

目前对于 OP 动物实验的开展,主要是以大鼠、小鼠、兔、狗等动物为主,针对不同实验需求,基本都采用单一因素造模方法。开展病证结合研究可以遵循中医辨证论治的实质,也体现了西医对 OP 的发病机制和病理表现。严格控制动物模型不同证候之间的关键量化因素,可以有效模拟人体 OP 症状,采用西医病理学检查手段,可以有效研究出 OP 发病机制中的特异性指标为中西医结合及其中医药的现代化提供了一种新的路径。过去评价造模成功的方式往往单纯采用西方医学的评价体系再叠加中医“证候”的评价体系,缺乏规范性和标准性,建立合理的模型评价体系于 OP 病证结合动物模型而言是目前急需解决的问题。

本研究通过总结能联系中医的“证”与西医的“病”的特异性量化指标,以期建立客观合理评价 OP 病证结合动物模型的体系。在此基础上,发展 OP 病证结合动物模型的应用,为构建 OP 病证结合动物模型提供新的评价思路及构建方式。

参 考 文 献(References)

- [1] ACOG Committee on Clinical Practice Guidelines-Gynecology. Management of postmenopausal osteoporosis; ACOG clinical practice guideline No. 2 [J]. *Obstet Gynecol*, 2022, 139(4): 698-717.
- [2] LETAROUILLY J G, BROUX O, CLABAUT A. New insights into the epigenetics of osteoporosis [J]. *Genomics*, 2019, 111(4): 793-798.
- [3] AIBAR-ALMAZÁN A, VOLTES-MARTÍNEZ A, CASTELLOTE-CABALLERO Y, et al. Current status of the diagnosis and management of osteoporosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 9465.
- [4] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会, 章振林. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2022) [J]. *中国全科医学*, 2023, 26(14): 1671-1691.
Chinese Society of Osteoporosis and Bone Mineral Research, ZHANG Z L. Guidelines for the diagnosis and treatment of primary osteoporosis (2022) [J]. *Chin Gen Pract*, 2023, 26(14): 1671-1691.
- [5] FISCHER V, HAFFNER-LUNTZER M. Interaction between bone and immune cells: implications for postmenopausal osteoporosis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 123: 14-21.
- [6] HART N H, NEWTON R U, TAN J, et al. Biological basis of

- bone strength: anatomy, physiology and measurement [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2020, 20(3): 347-371.
- [7] LEBOFF M S, GREENSPAN S L, INOIGNA K L, et al. The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Osteoporos Int*, 2022, 33(10): 2049-2102.
- [8] 曹盼举, 张晓刚, 王志鹏, 等. 中医古籍对骨质疏松症病因病机及治则的认识探析 [J]. *中医药信息*, 2018, 35(5): 31-34.
- CAO P J, ZHANG X G, WANG Z P, et al. Analysis on etiology, pathogenesis, and therapeutic principles of osteoporosis in TCM ancient books [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2018, 35(5): 31-34.
- [9] 林蔚鏖, 葛继荣. 从肝脾肾探讨原发性骨质疏松症与老年衰弱综合征 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(5): 671-675.
- LIN Y J, GE J R. Discussion on primary osteoporosis and senile frailty from the liver, spleen, and kidney [J]. *Chin J Osteoporos*, 2023, 29(5): 671-675.
- [10] 刘金勇, 王和鸣, 林坚, 等. 龟鹿补肾方辨治绝经后骨质疏松症患者 Th17/Treg 细胞因子的调节作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(24): 116-121.
- LIU J Y, WANG H M, LIN J, et al. Regulatory effect of Guilu bugu prescription in treating Th17/Treg cell factors of patients with postmenopausal osteoporosis based on syndrome differentiation [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2020, 26(24): 116-121.
- [11] SHEVROJA E, CAFARELLI F P, GUGLIELMI G, et al. DXA parameters, Trabecular Bone Score (TBS) and Bone Mineral Density (BMD), in fracture risk prediction in endocrine-mediated secondary osteoporosis [J]. *Endocrine*, 2021, 74(1): 20-28.
- [12] LIU Z J, ZHANG C, MA C, et al. Automatic phantom-less QCT system with high precision of BMD measurement for osteoporosis screening: Technique optimisation and clinical validation [J]. *J Orthop Translat*, 2022, 33: 24-30.
- [13] SILVA B C, LESLIE W D. Trabecular bone score: a new DXA-derived measurement for fracture risk assessment [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2017, 46(1): 153-180.
- [14] 刘婷, 何炜, 刘倩, 等. MRS 与 ^{18}F -FDG PET/CT 显像对骨质疏松与转移性椎体压缩性骨折的鉴别诊断 [J]. *医学影像学杂志*, 2020, 30(5): 834-838.
- LIU T, HE W, LIU Q, et al. The value of MRS and ^{18}F -FDG PET/CT in the differential diagnosis of osteoporosis and metastatic vertebral compression fractures [J]. *J Med Imag*, 2020, 30(5): 834-838.
- [15] ZHAO J, LIU Z, REN Q, et al. Measurement of Hounsfield units on proximal femur computed tomography for predicting regional osteoporosis [J]. *Radiologie*, 2023, 63(2): 90-97.
- [16] YIN H, LIN W, XIE F, et al. MRI-based vertebral bone quality score for osteoporosis screening based on different osteoporotic diagnostic criteria using DXA and QCT [J]. *Calcif Tissue Int*, 2023, 113(4): 383-392.
- [17] IMAMUDEEN N, BASHEER A, IQBAL A M, et al. Management of osteoporosis and spinal fractures: contemporary guidelines and evolving paradigms [J]. *Clin Med Res*, 2022, 20(2): 95-106.
- [18] 汪青, 黄昊强, 陈勇, 等. 二仙汤在绝经后骨质疏松症肾阳虚证治疗中的应用价值及作用机制研究 [J]. *中医正骨*, 2022, 34(3): 8-14.
- WANG Q, HUANG H Q, CHEN Y, et al. Applied values and mechanism of action of oral application of Erxian Tang in treatment of postmenopausal osteoporosis with syndrome of kidney-Yang deficiency: a clinical study [J]. *J Tradit Chin Orthop Traumatol*, 2022, 34(3): 8-14.
- [19] 中华中医药学会. 绝经后骨质疏松症(骨痿)中医药诊疗指南(2019年版) [J]. *中医正骨*, 2020, 32(2): 1-13.
- China Association of Chinese Medicine. Guidelines for TCM diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis (2019 edition) [J]. *J Tradit Chin Orthop Traumatol*, 2020, 32(2): 1-13.
- [20] 何才剑, 万全增, 陈天鹏, 等. 益气温经方在绝经后骨质疏松症肾虚血瘀证治疗中的应用 [J]. *中医正骨*, 2021, 33(8): 7-11, 15.
- HE C J, WAN Q Z, CHEN T P, et al. Application of Yiqi Wenjing Fang in treatment of kidney-deficiency-blood-stasis-type postmenopausal osteoporosis: a clinical study [J]. *J Tradit Chin Orthop Traumatol*, 2021, 33(8): 7-11, 15.
- [21] 张亚军, 张鹏, 刘忠厚. 骨质疏松症证候诊断 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2011, 17(4): 352-354, 343.
- ZHANG Y J, ZHANG P, LIU Z H. Syndrome diagnosis of osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporos*, 2011, 17(4): 352-354, 343.
- [22] 孙凯, 魏戌, 朱立国, 等. 病证结合模式下骨质疏松症实验动物模型的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(9): 1340-1344.
- SUN K, WEI X, ZHU L G, et al. Research progress in experimental osteoporosis animal model under the combination of disease and syndrome [J]. *Chin J Osteoporos*, 2019, 25(9): 1340-1344.
- [23] 王强, 吴德升. 小鼠骨质疏松模型建立方法的研究进展 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2021, 31(6): 572-576.
- WANG Q, WU D S. Research progress in the establishment of mouse osteoporosis model [J]. *Chin J Spine Spinal Cord*, 2021, 31(6): 572-576.
- [24] SHAUL J L, HILL R S, BOUXSEIN M L, et al. AGN1 implant material to treat bone loss: Resorbable implant forms normal bone with and without alendronate in a canine critical size humeral defect model [J]. *Bone*, 2022, 154: 116246.
- [25] 赵阳, 杨勇, 孟志成, 等. 骨质疏松症动物模型构建方法的研究进展 [J]. *山东医药*, 2023, 63(4): 95-99.
- ZHAO Y, YANG Y, MENG Z C, et al. Research progress on the construction method of animal model of osteoporosis [J]. *Shandong Med J*, 2023, 63(4): 95-99.
- [26] 武瑞骥, 章晓云, 杨启培, 等. 补肾脂活性成分治疗骨质疏松症的相关信号通路的研究进展 [J]. *解放军医学杂志*,

- 2024, 49(5): 587-585.
- WU R Q, ZHANG X Y, YANG Q P, et al. Advances in signal pathways related to psoralen active components in osteoporosis [J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2024, 49(5): 587-585.
- [27] 赵建栋, 郭成龙, 柴威涛, 等. 骨质疏松症动物模型造模方法的研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2023, 12(3): 76-80.
- ZHAO J D, GUO C L, CHAI W T, et al. Research progress in animal modeling of osteoporosis [J]. Rheum Arthritis, 2023, 12(3): 76-80.
- [28] 程余婷, 伍超, 黄晓林, 等. 低剂量唑来膦酸对去势拔牙大鼠破骨及成骨细胞的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(17): 2686-2693.
- CHENG Y T, WU C, HUANG X L, et al. Low-dose zoledronic acid regulates osteoclasts and osteoblasts in the extraction socket of ovariectomized rats [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2020, 24(17): 2686-2693.
- [29] 申意伟, 李雪, 张晓峰, 等. 酒精摄入对酒精性骨重构大鼠骨形态、生物力学及骨髓稳态的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(4): 515-521.
- SHEN Y W, LI X, ZHANG X F, et al. Effects of alcohol intake on bone morphology, bone biomechanics and bone marrow homeostasis in the rat model of alcoholic bone remodeling [J]. Chin J Osteoporos, 2022, 28(4): 515-521.
- [30] 唐辉, 姚志浩, 罗道文, 等. 高脂高糖饮食结合链脉佐菌素建立 2 型糖尿病性骨质疏松症大鼠模型 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(8): 1207-1211.
- TANG H, YAO Z H, LUO D W, et al. High fat and high sugar diet combined with streptozotocin to establish a rat model of type 2 diabetic osteoporosis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2021, 25(8): 1207-1211.
- [31] MATSUMOTO T, ENDO I. RANKL as a target for the treatment of osteoporosis [J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(1): 91-105.
- [32] 王泽凤, 高强, 朱煜, 等. 红景天苷调控 FoxO1/ β -catenin 通路对 2 型糖尿病骨质疏松大鼠的保护作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 55-60.
- WANG Z F, GAO Q, ZHU Y, et al. Protective effect of salidroside on type 2 diabetic osteoporosis rats by regulating the FoxO1/ β -catenin pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 55-60.
- [33] 曹端广, 夏汉庭, 杨文龙, 等. 加味阳和汤对肾虚型骨质疏松模型大鼠骨密度及血清微量元素的影响 [J]. 安徽中医药大学学报, 2019, 38(3): 76-79.
- CAO D G, XIA H T, YANG W L, et al. Effect of Jiawei Yanghe Decoction on bone mineral density and serum trace elements in osteoporosis rats with kidney Yang deficiency [J]. J Anhui Univ Chin Med, 2019, 38(3): 76-79.
- [34] 邓强, 王雨榕, 李中锋, 等. 温肾强骨丸对脾肾阳虚型骨质疏松症大鼠骨转化指标的影响 [J]. 西部中医药, 2021, 34(7): 34-37.
- DENG Q, WANG Y R, LI Z F, et al. Influence of Kidney-warming Bone-strengthening pills on bone transformation index of rats with osteoporosis of spleen and kidney Yang deficiency pattern [J]. West J Tradit Chin Med, 2021, 34(7): 34-37.
- [35] 夏炳江, 童培建, 孙燕, 等. 骨质疏松肾虚虚型小鼠病证结合模型建立的实验研究 [J]. 中国中医急症, 2013, 22(7): 1083-1086.
- XIA B J, TONG P J, SUN Y, et al. Research on osteoporosis mice model with type of deficiency of kidney-Yin [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2013, 22(7): 1083-1086.
- [36] 宋亚刚, 李艳, 崔琳琳, 等. 中医药病证结合动物模型的现代应用研究及思考 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3971-3978.
- SONG Y G, LI Y, CUI L L, et al. Modern application and thinking of traditional Chinese medicine disease and syndrome combined with animal model [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(16): 3971-3978.
- [37] 王玲, 林依凡, 李璐. 智能诊疗在舌象研究中的应用进展 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(1): 342-346.
- WANG L, LIN Y F, LI L. Application progress of intelligent diagnosis and treatment in tongue manifestation research [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(1): 342-346.
- [38] 余子维, 陈剑峰, 邓乔松, 等. 骨质疏松症中 lncRNA 可调控的骨代谢相关因子 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(9): 1362-1366, 1398.
- YU Z W, CHEN J F, DENG Q S, et al. Bone metabolism-related factors regulated by lncRNA in osteoporosis [J]. Chin J Osteoporos, 2023, 29(9): 1362-1366, 1398.
- [39] 何莉君, 漆小娟. 脂肪间充质干细胞过表达骨形态发生蛋白 2 促进骨质疏松大鼠牙槽骨缺损修复 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(1): 32-37.
- HE L J, QI X J. Adipose-derived mesenchymal stem cells overexpressing bone morphogenetic protein 2 promote alveolar bone defect repair in osteoporosis rats [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(1): 32-37.
- [40] 朴海旺, 金宝城, 赵胜军. 五味子甲素对去卵巢骨质疏松大鼠 SDF-1/CXCR4 信号通路的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(9): 1292-1297.
- PIAO H W, JIN B C, ZHAO S J. The effects of *Schisandra chinensis* A on SDF-1/CXCR4 signaling pathway in ovariectomized osteoporosis rats [J]. Chin J Osteoporos, 2023, 29(9): 1292-1297.
- [41] 智信, 陈晓, 苏佳灿. 绝经后骨质疏松症发病机制研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(11): 1510-1513, 1534.
- ZHI X, CHEN X, SU J C. Advances in research on the mechanism of postmenopausal osteoporosis [J]. Chin J Osteoporos, 2018, 24(11): 1510-1513, 1534.
- [42] 杨铠宁, 杨芳, 邸贵鑫, 等. 中医不同治法对绝经后骨质疏松症大鼠骨髓、骨骼肌 SDF-1 含量影响的比较研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(3): 337-340, 358.
- YANG K N, YANG F, DI G X, et al. Comparative study on the effect of different TCM treatment on SDF-1 levels of the bone and skeletal muscle in postmenopausal osteoporotic mice [J]. Chin J

- Osteoporos, 2021, 27(3): 337-340, 358.
- [43] PAN K, TU R, YAO X, et al. Associations between serum calcium, 25(OH)D level and bone mineral density in adolescents [J]. *Adv Rheumatol*, 2021, 61(1): 16.
- [44] 孔令岩, 郝帅, 柴仪, 等. 强骨健脾汤对老年性骨质疏松症大鼠骨密度、骨微结构的影响及其机制 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(21): 2951-2955, 2962.
- KONG L Y, HAO S, CHAI Y, et al. Effect of Qianggu Jianpi Decoction on bone density and bone microstructure of senile osteoporosis rats and its mechanism [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2022, 31(21): 2951-2955, 2962.
- [45] LADANG A, BEAUDART C, REGINSTER J Y, et al. Biochemical markers of musculoskeletal health and aging to be assessed in clinical trials of drugs aiming at the treatment of sarcopenia: consensus paper from an expert group meeting organized by the European society for clinical and economic aspects of osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (esceo) and the centre Académique de recherche et d'Expérimentation en santé (cares SPRL), under the auspices of the World Health Organization collaborating center for the epidemiology of musculoskeletal conditions and aging [J]. *Calcif Tissue Int*, 2023, 112(2): 197-217.
- [46] 吴善栋, 俞武良, 朱一飞, 等. 高血压合并骨质疏松症患者胱抑素 C 和血管内皮功能与骨密度的相关性 [J]. *中华高血压杂志*, 2022, 30(2): 183-188.
- WU S D, YU W L, ZHU Y F, et al. Correlation between cystatin C, vascular endothelial function and bone mineral density in patients with hypertension complicated with osteoporosis [J]. *Chin J Hypertens*, 2022, 30(2): 183-188.
- [47] 唐生平, 廖世杰, 刘建宏, 等. 非编码 RNA 在骨 H 型血管生成中的调控作用 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2023, 37(8): 1042-1048.
- TANG S P, LIAO S J, LIU J H, et al. Regulation of non-coding RNA in type H vessels angiogenesis of bone [J]. *Chin J Reparative Reconstr Surg*, 2023, 37(8): 1042-1048.
- [48] 王想福, 陈伟国, 叶丙霖, 等. 从“肝肾同源”理论论治绝经后妇女骨质疏松症的研究进展 [J]. *西部中医药*, 2019, 32(6): 155-158.
- WANG X F, CHEN W G, YE B L, et al. Research progress of treatment for osteoporosis of postmenopausal women based on the theory of “same source of liver and kidney” [J]. *West J Tradit Chin Med*, 2019, 32(6): 155-158.
- [49] 田涛, 范家玮, 许世航, 等. 基于肝肾同源探讨骨质疏松症与骨性关节炎的相关性与治疗 [J]. *中医临床研究*, 2023, 15(19): 22-26.
- TIAN T, FAN J W, XU S H, et al. A discussion on the correlation and treatment of osteoporosis and osteoarthritis based on the theory of liver and kidney homologous [J]. *Clin J Chin Med*, 2023, 15(19): 22-26.
- [50] 程园园, 黄传兵, 朱雅文, 等. 黄传兵从肝肾同源辨治骨关节炎探析 [J]. *中医药临床杂志*, 2023, 35(7): 1320-1324.
- CHENG Y Y, HUANG C B, ZHU Y W, et al. HUANG chuanbing's analysis of treating osteoarthritis from the same source of liver and kidney [J]. *Clin J Tradit Chin Med*, 2023, 35(7): 1320-1324.
- [51] 张风帅, 王广亮, 符朝程, 等. 张氏杜仲补骨汤治疗肝肾亏虚型原发性骨质疏松症临床观察 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(11): 37-40.
- ZHANG F S, WANG G L, FU C C, et al. Clinical observation of Zhang's Duzhong Bugu Decoction in treating primary osteoporosis with deficiency of liver and kidney [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2023, 25(11): 37-40.
- [52] 兰浩淼, 张立, 毛雨, 等. 小鼠甲状腺功能减退模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(1): 40-47.
- LAN H M, ZHANG L, MAO Y, et al. Establishment of hypothyroidism model in mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(1): 40-47.
- [53] WEINER J, ROTH L, KRANZ M, et al. Leptin counteracts hypothermia in hypothyroidism through its pyrexia effects and by stabilizing serum thyroid hormone levels [J]. *Mol Metab*, 2021, 54: 101348.
- [54] 万亚会, 吕梦頔, 李征, 等. 慢性失眠合并阻塞性睡眠呼吸暂停患者睡眠结构和自主神经功能特征及其与神经心理特征相关分析 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2023, 23(8): 693-708.
- WAN Y H, LÜ M D, LI Z, et al. Sleep structure and autonomic nervous function in patients with chronic insomnia combined with obstructive sleep apnea and their correlation with neuropsychological characteristics [J]. *Chin J Contemp Neurol Neurosurg*, 2023, 23(8): 693-708.
- [55] HE J, YANG B. Aquaporins in renal diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 366.
- [56] 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 Z F, WANG Y R, DENG Q, et al. Methods and evaluation of animal model of osteoporosis with spleen-kidney Yang deficiency [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2021, 23(12): 4476-4482.
- [57] 荆晓翔, 欧颖, 汪顺伟, 等. 病证结合冠心病动物模型研究进展 [J]. *中国中医急症*, 2023, 32(2): 356-360.
- JING X S, OU Y, WANG S W, et al. Research progress of animal model of coronary heart disease combined with disease and syndrome [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2023, 32(2): 356-360.
- [58] 王辞晓, 方娜. 通络宁血汤联合激素治疗 IgA 肾病(肾虚血瘀型)临床疗效分析 [J]. *四川中医*, 2023, 41(7): 112-114.
- WANG C X, FANG N. Clinical analysis of Tongluo Ningxue Decoction combined with hormone in the treatment of IgA nephropathy (kidney deficiency and blood stasis type) [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2023, 41(7): 112-114.
- [59] 卢小芳, 张声生. 中医药治疗功能性消化不良研究进展 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2023, 31(6): 405-410.

- LU X F, ZHANG S S. Research progress in the treatment of functional dyspepsia with traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Dig*, 2023, 31(6): 405-410.
- [60] 王广伟, 黄宏兴, 霍力为, 等. 绝经后骨质疏松症患者肌力与骨密度的相关性研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(10): 1155-1160.
- WANG G W, HUANG H X, HUO L W, et al. The study of the correlation between muscle strength and bone mineral density in postmenopausal osteoporotic patients [J]. *Chin J Osteoporos*, 2015, 21(10): 1155-1160.
- [61] 陈文佳, 李涛, 胥明珠, 等. 基于症状映射的类风湿关节炎瘀血阻络证生物内涵研究及其病证结合动物模型建立和评价 [J]. *药学报*, 2023, 58(8): 2434-2441.
- CHEN W J, LI T, XU M Z, et al. Exploring biological connotation of blood stasis syndrome of rheumatoid arthritis and establishment of improved animal models based on syndrome-symptom mapping [J]. *Acta Pharm Sin*, 2023, 58(8): 2434-2441.
- [62] 陈剑磨, 张胜军, 夏炳江. 骨质疏松肾阳虚病证结合模型构建的实验研究 [A]. 2018 年浙江省骨科学术年会论文集汇编 [C]; 2018.
- CHEN J M, ZHANG S J, XIA B J. Study on osteoporosis mice model syndrome of deficiency of kidney-yang [A]. 2018 Zhejiang Orthopedic Annual Conference [C]; 2018.
- [63] 张佳伟, 翟文生, 李冰, 等. “探微索隐”脾胃阳虚证及其动物模型研究述评 [J]. *中药药理与临床*, 2023, 1-15.
- ZHANG J W, ZHAI W S, LI B, et al. Exploring syndromes based on microscopic indicators for pishenyangxu syndrome and animal models; a review [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2023, 1-15.
- [64] 吉琳, 申琪, 郭向东. 阳虚动物模型及检测指标的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(1): 138-145.
- JI L, SHEN Q, GUO X D. Research progress in developing an animal model and detection index for Yang deficiency [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(1): 138-145.
- [65] BIONDI B, COOPER D S. Thyroid hormone therapy for hypothyroidism [J]. *Endocrine*, 2019, 66(1): 18-26.
- [66] SUN Q, OLTRA E, JANNEKE DIJCK-BROUWER D A J, et al. Autoantibodies to selenoprotein P in chronic fatigue syndrome suggest selenium transport impairment and acquired resistance to thyroid hormone [J]. *Redox Biol*, 2023, 65: 102796.
- [67] YAU W W, YEN P M. Thermogenesis in adipose tissue activated by thyroid hormone [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 3020.
- [68] 王小钢, 贺丰, 李日达, 等. 乌鸡白凤丸治疗绝经后骨质疏松症经验 [J]. *长春中医药大学学报*, 2023, 39(4): 384-388.
- WANG X G, HE F, LI R D, et al. Experience in treating postmenopausal osteoporosis with Wuji Baifeng Pills [J]. *J Changchun Univ Chin Med*, 2023, 39(4): 384-388.
- [69] 曾文泓, 王丽华, 梅鸥. 二至丸治疗绝经后肝肾阴虚型骨质疏松症的临床效果及对骨生化标志物的影响 [J]. *中国医学创新*, 2020, 17(11): 78-82.
- ZENG W H, WANG L H, MEI O. Efficacy of erzhi pills on liver and kidney Yin deficiency type of postmenopausal osteoporosis and the influence in bone biochemical markers [J]. *Med Innov Chin*, 2020, 17(11): 78-82.
- [70] BOILESEN S N, TAHAN S, DIAS F C, et al. Water and fluid intake in the prevention and treatment of functional constipation in children and adolescents; is there evidence? [J]. *J Pediatr*, 2017, 93(4): 320-327.
- [71] 葛继荣, 王和鸣, 郑洪新, 等. 中医药防治原发性骨质疏松症专家共识 (2020) [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(12): 1717-1725.
- GE J R, WANG H M, ZHENG H X, et al. Traditional Chinese medicine expert consensus on the prevention and treatment of primary osteoporosis (2020) [J]. *Chin J Osteoporos*, 2020, 26(12): 1717-1725.
- [72] 张悦, 李运峰. 骨质疏松症动物模型研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(1): 152-156.
- ZHANG Y, LI Y F. The research process in osteoporosis animal modeling [J]. *Chin J Osteoporos*, 2020, 26(1): 152-156.
- [73] 张声生, 钦丹萍, 周强, 等. 消化系统常见病功能性消化不良中医诊疗指南 (基层医生版) [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8): 3619-3625.
- ZHANG S S, QIN D P, ZHOU Q, et al. Guide to diagnosis and treatment of functional dyspepsia, a common disease in digestive system (basic doctors edition) [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 34(8): 3619-3625.
- [74] 孙盼, 朱征, 卿慧玲, 等. 不同中医证型非瓣膜性房颤患者抗凝出血、卒中危险度及心脏结构重构、电重构特点分析 [J]. *四川中医*, 2023, 41(2): 67-71.
- SUN P, ZHU Z, QING H L, et al. Analysis on characteristics of anticoagulation bleeding, stroke risk, cardiac structural remodeling and electrical remodeling for patients with non-valvular atrial fibrillation of different traditional chinese medicine syndromes [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2023, 41(2): 67-71.
- [75] 李中锋, 马鹏龙, 邓强, 等. 从“命门火衰, 督脉阳虚”探讨老年性骨质疏松症 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(4): 562-566, 579.
- LI Z F, MA P L, DENG Q, et al. Discussion on senile osteoporosis from fire decay of lifegate and Yang deficiency of Du meridian [J]. *Chin J Osteoporos*, 2022, 28(4): 562-566, 579.
- [76] 何兴鹏, 郑利钦, 李鹏飞, 等. 两种肾虚证型去势模型大鼠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 X P, ZHENG L Q, LI P F, 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.
- [77] 廖翼涛, 张贤, 邱峰, 等. FRAX® 探讨绝经后骨质疏松症中医证型与骨折风险的相关性研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(9): 1315-1319.

- LIAO Y T, ZHANG X, QIU F, et al. Study of the relationship between the syndrome types of postmenopausal osteoporosis in traditional Chinese medicine and fracture risk based on FRAX® [J]. *Chin J Osteoporos*, 2023, 29(9): 1315-1319.
- [78] 都梦岩, 吴威, 李威莹, 等. 高血压动物模型的造模方法与评价 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2023, 25(10): 3254-3263.
- DU M Y, WU W, LI W Y, et al. Modeling method and evaluation of animal models of hypertensive [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2023, 25(10): 3254-3263.
- [79] 吴海龙, 常天瀛, 卢焱, 等. 原发性骨质疏松症中医证候分布频率的 Meta 分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(5): 111-117.
- WU H L, CHANG T Y, LU Y, et al. Meta-analysis of distribution frequency of traditional Chinese medicine syndrome in primary osteoporosis [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2024, 30(5): 111-117.
- [80] 刘雅清, 刘海帆, 刘滨, 等. 四神丸合痛泻要方治疗脾肾虚兼肝郁型溃疡性结肠炎的药效及作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(7): 40-48.
- LIU Y Q, LIU H F, LIU B, et al. Sishenwan combined with Tongxie Yaofang treats ulcerative colitis with spleen-kidney Yang deficiency and liver depression [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2024, 30(7): 40-48.
- [81] 林贤灿, 陈桐莹, 林燕平, 等. 原发性骨质疏松症的中医认识与探索 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(6): 870-874, 885.
- LIN X C, CHEN T Y, LIN Y P, et al. TCM cognition and exploration of primary osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporos*, 2023, 29(6): 870-874, 885.
- [82] 梁国庆, 夏冉, 王银燕, 等. 基于 NLRP3/Caspase-1 信号通路探讨参芪健心方对慢性心力衰竭模型大鼠心肌细胞焦亡的影响 [J]. *中医杂志*, 2024, 65(1): 94-102.
- LIANG G Q, XIA R, WANG Y Y, et al. The effect of Shenqi Jianxin formula on cardiomyocyte pyroptosis in chronic heart failure model rats based on the NLRP3/Caspase-1 signaling pathway [J]. *J Tradit Chin Med*, 2024, 65(1): 94-102.
- [83] 李健阳, 葛继荣, 陈娟, 等. 2389 例绝经后妇女骨量丢失不同阶段的中医证候特征研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(1): 389-393.
- LI J Y, GE J R, CHEN J, et al. Study on TCM syndrome characteristics of 2389 postmenopausal women at different stages of bone loss [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(1): 389-393.
- [84] 赵琳娜, 白敏, 李润法, 等. 香砂六君子对脾胃虚弱型功能性消化不良大鼠十二指肠低度炎症的作用研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(15): 2198-2202.
- ZHAO L N, BAI M, LI R F, et al. Study of Xiangsha Liujunzi on low-grade duodenal inflammation in rats with functional dyspepsia of spleen stomach weakness [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2023, 39(15): 2198-2202.
- [85] 李娜, 杜丽坤, 王冰梅. 原发性骨质疏松症的中医证素辨证法 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(7): 1010-1014.
- LI N, DU L K, WANG B M. The syndrome-element differentiation of TCM for primary osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporos*, 2019, 25(7): 1010-1014.
- [86] 张帅, 李娜, 沈江立, 等. 优化溃疡结对溃疡性结肠炎气滞血瘀模型大鼠的影响及其作用机制研究 [J]. *中国全科医学*, 2024, 27(11): 1356-1362.
- ZHANG S, LI N, SHEN J L, et al. Effect and mechanism of optimized Kuijie Decoction in ulcerative colitis rats with TCM syndrome differentiation of qi stagnation and blood stasis [J]. *Chin Gen Pract*, 2024, 27(11): 1356-1362.

[收稿日期] 2023-10-08

翟文骥, 吴杰, 郑体花, 等. 听源性癫痫动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 786-792.

ZHAI W J, WU J, ZHENG T H, et al. Research progress in animal models of audiogenic seizures [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 786-792.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.011

听源性癫痫动物模型研究进展

翟文骥, 吴杰, 郑体花, 郑庆印*

(滨州医学院特殊教育与康复学院, 山东 烟台 264003)

【摘要】 听源性癫痫 (audiogenic seizures, AGS) 是由于强声刺激引起的癫痫, 发作时伴全身性肌肉痉挛, 其动物模型在研究癫痫发生机制、寻找致病基因及调控通道、筛选新的抗癫痫药物 (antiepileptic drugs, AEDs) 等方面具有重要意义。本文从发病特点、发病机制及致病基因等方面总结了目前常见 AGS 动物模型研究进展, 以为 AEDs 研发提供新的研究方向和靶点。

【关键词】 听源性癫痫; 动物模型; 抗癫痫药物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 06-0786-07

Research progress in animal models of audiogenic seizures

ZHAI Wenji, WU Jie, ZHENG Tihua, ZHENG Qingyin*

(School of Special Education and Rehabilitation, Binzhou Medical College, Yantai 264003, China)

Corresponding author: ZHENG Qingyin. E-mail: 2363616842@qq.com

【Abstract】 Audiogenic seizures (AGS) are the result of an epilepsy caused by strong acoustic stimulation and are characterized by generalized muscle spasms. AGS models are vital for studies of epileptogenesis, the search for causative genes and regulatory channels, and the screening of new antiepileptic drugs (AEDs). This paper summarizes the current progress of research on common animal models of AGS in terms of their pathogenetic features, possible pathogenesis, and causative genes to provide new research directions and targets for the development of AEDs.

【Keywords】 audiogenic seizures; animal model; antiepileptic drugs

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

癫痫是最常见的神经系统疾病之一, 目前, 我国约有 1000 万癫痫患者, 癫痫给个人、家庭、社区和国家带来巨大的身心伤害和经济负担^[1]。为探寻癫痫发病机制, 寻找新型低副作用抗癫痫药物 (antiepileptic drugs, AEDs), 科研人员建立了各种癫痫动物模型。当前, 常见的癫痫动物建模方法包括化学点燃、物理刺激和遗传模型等^[2-3], 其中, 遗传因素在癫痫发病机制中具有公认的主导作用, 已知超过 1000 个基因突变与癫痫发生有关^[4]。听源性癫痫 (audiogenic seizures, AGS) 是一种由强声 (通常

大于 100 dB) 刺激引发的癫痫, 其动物模型具有易于诱发、无化学或物理处理造成的损伤、发作后恢复快以及不留后遗症损伤等优点, 尤其重要的是, 绝大部分 AGS 动物模型的癫痫发作都受到遗传因素的调控。因此, AGS 动物模型在研究癫痫发病机制和新型 AEDs 研发方面具有巨大潜力^[5-6]。本文分别从多基因和单基因角度对当前常用的 AGS 动物模型的发病特点、发病机制及致病基因等方面进行综述, 以为 AEDs 的研发提供新的研究方向和靶点。

【基金项目】 国家自然科学基金 (81530030)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81530030).

【作者简介】 翟文骥, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 听力损失动物模型。Email: 1035382098@qq.com

【通信作者】 郑庆印, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 听力损失发生机制及干预。Email: 2363616842@qq.com

1 多基因或假定多基因的 AGS 动物模型

目前常见的寻找 AGS 致病基因的方法有数量性状基因座连锁分析与 DNA 微阵列等。在动物模型中,经过上述方法确定的 AGS 受多基因调控,称为多基因 AGS 动物模型(见表 1)。以下部分将概述多基因 AGS 动物模型的发病特征、致病基因及潜在发病机制。

1.1 DBA/2J 小鼠

1947 年, HALL [7] 首次发现 DBA/2J (D2) 小鼠和 C57BL/6J (B6) 小鼠暴露于相同声音条件时表现

情况具有很大差异。D2 小鼠暴露于响亮的混合频率声音(12 ~ 16 kHz, 90 ~ 120 dB), 几乎全部小鼠都会经历一系列癫痫过程。癫痫发作首先表现为狂野奔跑, 接着是阵挛性抽搐和全身肌肉强直性痉挛, 最终是呼吸停止。呼吸停止后小鼠通常会出现死亡或完全恢复两种情况, 而受同种条件声音刺激的 B6 小鼠无异常表现, 研究人员将这种由声音刺激引发的癫痫命名为 AGS。后续研究发现 D2 小鼠的 AGS 发作受年龄影响, 其发病率通常在 3 周龄左右最高, 但随着年龄增长逐渐降低, 这种在相同刺激下癫痫发作的容易程度称为易感性。在 D2 小鼠中, 推测这种癫痫易感性与其听力水平有关系, 因为 D2 小鼠除了作为癫痫动物模型外, 也是研究早

表 1 多基因 AGS 动物模型相关致病基因及其表达蛋白

Table 1 Pathogenic genes and their expressed proteins associated with polygenic AGS animal models

品系 Strain	基因 Gene	表达蛋白 Expressed protein	参考文献 References
DBA/2J 小鼠 DBA/2J mice	Kenj10	Kir4.1 钾离子通道 Kir4.1 potassium channel	[7-27]
Black Swiss 小鼠 Black Swiss mice	Jams1 Gipc3	电压门控离子通道亚基 HCN2 Voltage-gated ion channel subunit HCN2 Gipc3 蛋白 Gipc3 protein	[28-31]
遗传性癫痫易感大鼠 Genetically epilepsy-prone rat	-	-	[32-35]
Krushinsky-Molodkina 大鼠 Krushinsky-Molodkina rat	Ttr	转甲状腺素蛋白, 转运蛋白 Transthyretin, transport protein	[36-38]
	Msh3	DNA 错配修复 DNA mismatch repair	
	Vlgr1	超大 G 蛋白偶联受体 1 Very large G-protein coupled receptor 1	
	Chrna4	烟碱乙酰胆碱受体 Nicotinic acetylcholine receptor	
Wistar Audiogenic 大鼠 Wistar Audiogenic rat	Grin2a	谷氨酸受体亚基 Glutamate receptor subunit	[39-42]
	Grin2b	谷氨酸受体亚基 Glutamate receptor subunit	
	Kcnq3	电压门控钾离子通道 Voltage-gated potassium channel	
	Egr3	早期生长反应蛋白, 转录因子 Early growth response protein, transcription factor	
	Ttr	转甲状腺素蛋白, 转运蛋白 Transthyretin, transport protein	
萨拉曼卡遗传性听源性癫痫仓鼠 Genetic Audiogenic Seizure Hamster from Salamanca	Asb14	锚蛋白重复序列和抑制细胞因子信号盒 14 Ankyrin repeat and SOCS box containing 14	[43-45]
	Msh3	DNA 错配修复 DNA mismatch repair	
	Arhgef38	Rho 鸟嘌呤核苷酸交换因子 38 Rho guanine nucleotide exchange factor 38	
	Egr1	早期生长反应蛋白 1 Early growth response protein, transcription factor 1	
	Egr2	早期生长反应蛋白 2 Early growth response protein, transcription factor 2	
	Egr3	早期生长反应蛋白 3 Early growth response protein, transcription factor 3	
		早期生长反应蛋白, 转录因子 3 Early growth response protein, transcription factor 3	

期听力减退的模型。本实验室数据表明,在 3 周龄时便出现听力下降,在 3 月龄之前听力完全丧失^[8],与癫痫易感性吻合。

目前研究表明 D2 小鼠癫痫发病机制可能与甲状腺激素、能量代谢、神经递质、腺苷和遗传有关系。甲状腺激素在哺乳动物中枢神经系统髓鞘形成过程中具有显著的促进作用^[9]。相较于 3 周龄的 B6 小鼠,同龄 D2 小鼠的血清甲状腺激素水平达到峰值的时间更早,且其水平更高。同时,D2 小鼠的脑苷脂和 GM1 神经节苷脂含量也相对更高,这两种神经节苷脂均富含髓鞘组成成分之一的髓磷脂。髓磷脂水平的升高可通过降低电导率阈值来增加中枢神经系统的兴奋性,这可能是 D2 小鼠在相应年龄癫痫易感性较高的原因之一^[10-12]。进一步研究发现,在采用抑制甲状腺激素药物或切除甲状腺的方法处理后,D2 小鼠的癫痫易感性显著降低;而 B6 小鼠在服用甲状腺激素后,癫痫易感性则有所增强^[13]。

酮体是幼鼠脑代谢的主要能量来源,随年龄增长,幼鼠大脑的主要能量来源从酮体有序转变成碳水化合物^[14],D2 小鼠在这一转变过程中可能会出现一个由遗传因素决定的异常,导致大脑能量储备减少,当幼鼠短时间内有大量能量消耗时,其大脑可能会因能量储备不足发生短暂的紊乱,神经元群突然间歇性过度放电,导致癫痫发作^[15]。

兴奋性和抑制性神经递质系统异常也是 D2 小鼠 AGS 的一个发病机制^[16]。研究发现通过腹腔或脑室注射阻断 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)引起兴奋的拮抗剂可以预防 AGS 的发生^[17],脑室内给予 NMDA 受体反义探针,可以完全抑制 AGS 的发作^[18];脑室内注射代谢性谷氨酸受体拮抗剂具有抗惊厥作用^[19-20],上述研究表明 D2 小鼠异常的兴奋性神经递质系统是癫痫发作的原因之一。在抑制性神经递质系统中, γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的作用效果减弱会导致癫痫的发作^[21],在 30 d 的 D2 小鼠大脑切片中,GABA 释放数量和 GABA 受体结合位点的数量明显少于同龄 B6 小鼠,提示 D2 小鼠的抑制性神经递质系统也参与了癫痫发作^[22]。

D2 小鼠也是癫痫猝死(sudden unexpected death in epilepsy, SUDEP)模型,SUDEP 是指小鼠全身性肌肉痉挛强直发作之后因呼吸功能障碍而发生的猝死模型。已有研究表明阻断腺苷分解可以提高

D2 小鼠癫痫猝死率,这可能与癫痫发作后,脑部会释放大量的腺苷,而腺苷会通过抑制脑干进而抑制呼吸有关^[23]。

D2 小鼠癫痫发作受多个基因调控,目前研究人员发现分别位于 4、7、12 号染色体上的 Asp2、Asp3、Asp1 位点与其癫痫易感性有关^[24],主要是位于 4 号和 12 号染色体上的位点,因为它们与钙泵的酶活性调节有关^[25]。此外,位于 1 号染色体上的 KCNJ10 基因编码序列的变化导致 D2 小鼠 Kir4.1 钾离子通道的氨基酸发生替换^[26],从而导致 D2 小鼠星形胶质细胞中的 Kir4.1 钾离子通道活性降低,谷氨酸再摄取受损^[27],因此 KCNJ10 基因被认为是 D2 小鼠癫痫发作的一个致病基因。

1.2 Black Swiss 小鼠

Black Swiss 小鼠 AGS 发病率在 2 ~ 3 周龄时最高,随年龄增长而逐渐下降,6 周龄之后不再发病。目前研究表明 Black Swiss 小鼠 10 号染色体上的 Jams1 基因片段可能调控 AGS,此片段的关键区域与人类染色体 19p13.3 上的一个区域一致,该基因片段已被证实在人群中与家族性青少年高热惊厥有关^[28]。Jams1 基因片段包含 128 个基因,其中的 Hcn2 基因编码电压门控离子通道亚基 Hcn2,有研究表明 Hcn 离子通道异常与癫痫发作有关,因此 Hcn2 基因很可能调控 AGS 发作,但需要进一步研究证实^[29]。除此之外,在 Black Swiss 小鼠中还发现突变的 Gipc3 (GIPC PDZ domain containing family member 3 Gene, 含 GIPC PDZ 域的家庭成员 3) 基因,其编码的 Gipc3 蛋白在听觉毛细胞囊泡运输中起关键作用^[30],此基因突变导致 2 ~ 3 周龄的 Black Swiss 小鼠对于声音变得特别敏感,进而导致 AGS 的易感性增高,但具体机制尚不清楚^[31]。

1.3 遗传性癫痫易感大鼠

遗传性癫痫易感大鼠(genetically epilepsy-prone rat, GEPRs)主要由 GEPR-3 和 GEPR-9 两个亚系组成,它们最容易在 100 dB、10 kHz 纯音的声音刺激下癫痫发作^[32]。GEPRs 的主要特征是神经递质能系统的改变,包括去甲肾上腺素(noradrenaline, NA)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、GABA 等。研究发现缺乏 NA 会导致癫痫易感性增强^[33],而 GEPRs 大脑各区域的 NA 浓度低于正常大鼠^[34],这可能是其癫痫发病原因之一。下丘脑(inferior colliculus, IC)是 GRPRs AGS 发作的关键部位,研究发现当切断 GEPRs 双侧 IC 时可以阻止 AGS 的发

生,这可能与 GEPRs IC 中 GABA 的抑制作用减弱,导致其处于异常兴奋状态,而在切断 IC 后会阻止异常兴奋进一步上行传导有关^[35]。目前还未发现明确的基因位点调控 AGS 发作。

1.4 Krushinsky-Molodkina 大鼠

Krushinsky-Molodkina (KM) 大鼠自 1 月龄开始出现 AGS,3 月龄之后,AGS 发作变得稳定。研究发现,KM 大鼠在 1 月龄时,细胞外调节蛋白激酶表达过量,导致谷氨酸能神经递质释放增加。这种神经递质系统的异常可能会改变神经元回路的发育,成为导致 KM 大鼠 AGS 发作的原因之一^[36]。此外,研究发现 KM 大鼠的海马发育迟缓,也可能是导致 AGS 发作的原因之一^[37]。在遗传方面,调控 KM 大鼠 AGS 可能的基因包括参与转甲状腺素蛋白表达调控的 Ttr 基因,以及编码 DNA 修复系统一个组成部分的 Msh3 基因。然而,这些发现仍需进一步证实^[38]。

1.5 Wistar 听源性大鼠

Wistar 听源性大鼠 (Wistar audiogenic rat, WAR) 是从 Wistar 大鼠选择衍生得来^[39]。目前,研究发现在 WAR 海马中 GABA 的抑制作用降低,这可能是导致 WAR 的 AGS 发作原因之一^[40]。还有研究发现在注射同水平的促肾上腺素皮质激素后,WAR 体内皮质酮水平上升幅度高于对照组,因此建议将 WAR 作为应激-癫痫动物模型^[41]。尽管目前尚未明确指出调控癫痫发作的基因,但基因芯片发现了一些可能的基因,包括 Vlg1、Chrna4、Grin2a、Grin2b、Kcnq3、Egr3 以及 Ttr 基因,这些基因大多与离子通道及转运蛋白相关^[42]。

1.6 萨拉曼卡遗传性听源性癫痫仓鼠

萨拉曼卡遗传性听源性癫痫仓鼠 (Genetic Audiogenic Seizure Hamster from Salamanca, GASH-

Sal) 最初被视为阵发性肌张力障碍动物模型,如今则更多地被应用于 AGS 动物模型。研究发现,GASH-Sal 的 GABA 能系统受损,且反复发作的癫痫会加剧这种功能障碍。此外,GASH-Sal 大脑多个区域的 KCC2 蛋白表达水平较低,KCC2 蛋白分泌减少导致细胞内 Cl⁻ 浓度升高,使细胞处于超极化状态,兴奋性增加,从而诱发 AGS^[43]。在遗传方面,LÓPEZ-LÓPEZ 等^[44]发现 GASH-Sal 中的 Egr1、Egr2 和 Egr3 基因与 AGS 密切相关,此外,还鉴定出 3 个与癫痫发作相关的基因,分别为 Asb14、Msh3 和 Arhgef38。这些基因具体调控癫痫发作的机制尚不明,亟待进一步探索^[45]。

2 单基因 AGS 癫痫动物模型

除了已经明确的调控 AGS 的基因,找到潜在致病基因后,通过基因敲除策略进行验证,即建立相应的单基因 AGS 动物模型(见表 2)。以下部分梳理了单基因 AGS 癫痫动物模型发病特点、致病基因、可能的发病机制。

2.1 Frings 小鼠

Frings 小鼠最初是通过选择性育种从瑞士白化小鼠中获得^[46]。在 Frings 小鼠中,位于 13 号染色体上的基因 MASS1 发生了自发性突变,MASS1 又称为超大型 G 蛋白偶联受体 1 (very large G protein-coupled receptor 1, Vlg1),其编码的蛋白属于 G 蛋白偶联受体家族中的一员,在胚胎中枢神经系统中高度表达^[47-49]。据推测,VLGR1 蛋白功能障碍导致癫痫发作与轴突髓鞘形成受损有关^[49]。在 Vlg1 基因敲除小鼠中发现除了具有 AGS,还具有听力损失的情况,通过对比 AGS 易感性与听力阈值,研究者认为 AGS 易感性降低与听力阈值升高有密切联系^[50]。

表 2 单基因 AGS 动物模型相关致病基因及其表达蛋白

Table 2 Pathogenic genes and their expressed proteins associated with single-gene AGS animal models.

品系 Strain	基因 Gene	表达蛋白 Expressed protein	参考文献 References
Frings 小鼠 Frings mice	Vlg1	超大 G 蛋白偶联受体 1 Very large G-protein coupled receptor 1	[46-50]
Lgi1 基因敲除小鼠 Lgi1 gene knockout mice	Lgi1	富亮氨酸胶质瘤失活蛋白 1 Leucine rich glioma inactivated 1	[51-54]
Fmr1 基因敲除小鼠 Fmr1 gene knockout mice	Fmr1	脆性 X 智力低下蛋白 Fragile X mental retardation protein	[55-58]
致命性侏儒症伴癫痫大鼠 Lethal dwarfism with epilepsy rat	Wwox	肿瘤抑制蛋白 Domain-containing oxidoreductase	[59-60]
Gabrb2 基因敲除小鼠 Gabrb2 gene knockout mice	Gabrb2	γ-氨基丁酸受体 β2 亚基受体 β2-subunit of the γ-aminobutyric acid receptor	[61]

2.2 Lgi1 基因敲除小鼠

富亮氨酸胶质瘤失活蛋白 1 (leucine-rich glioma-inactivated protein 1, Lgi1) 是一种分泌蛋白, 是去整合素金属蛋白酶 22、23 (ADAM22、ADAM23) 的配体。Lgi1 与突触后膜 ADAM22 和突触前膜 ADAM23 结合, 介导 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑受体 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor, AMPAR) 和钾离子通道活性, 参与突触活性的调控^[51]。前期研究发现, 在 Lgi1 基因突变大鼠中, 由于 Lgi1 蛋白分泌受损, 进而导致癫痫发生^[52-53]。为进一步验证 Lgi1 基因对 AGS 的影响, 研究人员建立了 Lgi1 基因敲除小鼠, 发现杂合子小鼠 (Lgi1^{+/-}) 也会呈现较高的 AGS 易感性, 而纯合子 (Lgi1^{-/-}) 小鼠除此之外还具有自发性癫痫的情况^[54]。

2.3 Fmr1 基因敲除小鼠

Fmr1 基因编码脆性 X 智力低下蛋白 (fragile X mental retardation protein, FMRP), 作为 RNA 结合蛋白, Fmr1 可以通过结合靶基因的 mRNA 形成核糖核蛋白复合物颗粒, 控制包括早期胚胎发育在内的一系列重要生命过程。缺乏这种蛋白会导致谷氨酸受体的过度表达和突触可塑性受损, 进而导致智力残疾、自闭症以及 AGS 等病症^[55]。在 Fmr1 基因敲除的雌性小鼠中, AGS 发病具有年龄相关性, 其高峰出现在 22 日龄, 随后发病率随年龄增长而下降^[56]。Fmr1 基因敲除的雄性小鼠到 10 ~ 12 周龄时, 表现出 AGS, 基因治疗后, AGS 发病率下降^[57]。有研究表明, Fmr1 基因敲除小鼠癫痫发作是由于兴奋性代谢性谷氨酸受体和抑制性 GABA_B 受体信号失衡的结果^[58]。

2.4 致死性侏儒症伴癫痫大鼠

致死性侏儒症伴癫痫大鼠 (lethal dwarfism with epilepsy rat, LDE) 具有侏儒症、产后死亡、雄性性腺功能减退以及 AGS 等病症。SUZUKI 等^[59] 通过回交和连锁分析的方法将其致病基因定位在 19 号染色体上的一个区域, 该区域含有含 WW 域的氧化还原酶 (WW domain-containing oxidoreductase, Wwox) 基因, 在神经系统中广泛表达, Wwox 蛋白是一种肿瘤抑制蛋白, 具有抑制肿瘤生长的作用, 后续有研究人员建立 Wwox 基因突变小鼠模型, 发现具有 AGS 表型, 但其发病机制尚不清楚^[60]。

2.5 Gabrb2 基因敲除小鼠

γ -氨基丁酸 A 型受体 β 2 亚基 (GABA_A receptor

β 2 subunit gene, Gabrb2) 基因敲除小鼠模型会出现前脉冲抑制、多动、刻板印象、社交障碍、空间记忆缺陷和 AGS 等病症, 此基因突变会导致 GABA 抑制性作用减弱, 进而导致癫痫发作^[61]。

3 结论与展望

本文从多基因和单基因视角, 对当前广泛应用的 AGS 动物模型的发病特点、发病机制及致病基因等方面进行了全面梳理。在 AGS 动物模型中, 癫痫的发生涉及激素、神经递质和离子通道等多个系统, 尽管其发生机制存在一定的差异, 但其本质在于各个系统的异常导致中枢神经系统神经元细胞膜功能紊乱, 进而引发异常放电。据此推测, 保持癫痫患者中枢神经元细胞膜的稳定性或许是治疗的关键所在。

某些 AGS 动物模型的癫痫发病机制具有共性, 例如 DBA/2J 小鼠和遗传性癫痫易感大鼠等都存在神经递质 GABA 的抑制作用减弱等现象。选择这些共性的动物模型验证同一癫痫发病机制可能更有说服力。此外, 大部分 AGS 动物模型为遗传性癫痫模型, 这为筛选调控 AGS 的突变基因提供了便利, 同时也为研究人类癫痫的突变基因提供了参考。然而, 由于部分 AGS 动物模型伴有与年龄相关的听力损失, 其 AGS 易感性会随着听力损失的发生而降低。目前尚无单一 AGS 动物模型能够反映出所有可能的癫痫发病机制, 因此具有一定的局限性。

癫痫动物模型另外一个重要意义在于筛选 AEDs。当前 AEDs 存在副作用多和并非适用于所有癫痫患者的问题, 因此, 研发新型 AEDs 至关重要。尽管 AGS 动物模型存在年龄相关易感性、实验周期长和成本较高等问题, 但与化学点燃和物理刺激所建立的动物癫痫模型相比, 其优势显著, 如易于诱发、操作简便、适用范围广泛和可重复性强等。此外, 动物模型中基因调节的多样性为测试潜在靶向 AEDs 提供了广阔平台。

参 考 文 献 (References)

- [1] DING D, ZHOU D, SANDER J W, et al. Epilepsy in China: major progress in the past two decades [J]. Lancet Neurol, 2021, 20(4): 316-326.
- [2] 董博思, 邱湘苗, 赖婉琳, 等. 癫痫动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 128-138.
DONG B S, QIU X M, LAI W L, et al. Animal models of seizures and epilepsies [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 128-138.
- [3] 高青, 曾贵荣, 欧阳冬生. 6 Hz 角膜点燃癫痫动物模型的研究

- 究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(3): 393-398.
- GAO Q, ZENG G R, OUYANG D S. Research progress of the 6 Hz corneal kindling seizure animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(3): 393-398.
- [4] GARBUS D G, DAVLETSHIN A A, LITVINOVA S A, et al. Rodent models of audiogenic epilepsy: genetic aspects, advantages, current problems and perspectives [J]. Biomedicines, 2022, 10(11): 2934.
- [5] KUPFERBERG H. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs [J]. Epilepsia, 2001, 42(4): 7-12.
- [6] LÖSCHER W. The search for new screening models of pharmacoresistant epilepsy: is induction of acute seizures in epileptic rodents a suitable approach? [J]. Neurochem Res, 2017, 42(7): 1926-1938.
- [7] HALL C S. Genetic differences in fatal audiogenic seizures between two inbred strains of house mice [J]. J Hered, 1947, 38(1): 2-6.
- [8] ZHENG Q Y, KUI L, XU F, et al. An age-related hearing protection locus on chromosome 16 of BXD strain mice [J]. Neural Plast, 2020, 2020: 8889264.
- [9] ROWLAND M E, JIANG Y, SHAFIQ S, et al. Systemic and intrinsic functions of ATRX in glial cell fate and CNS myelination in male mice [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 7090.
- [10] PAGNIN M, KONDOS-DEVICIC D, CHINCARINI G, et al. Role of thyroid hormones in normal and abnormal central nervous system myelination in humans and rodents [J]. Front Neuroendocrinol, 2021, 61: 100901.
- [11] KOIBUCHI N. The role of thyroid hormone on functional organization in the cerebellum [J]. Cerebellum, 2013, 12(3): 304-306.
- [12] STRENG M L, KROOK-MAGNUSON E. The cerebellum and epilepsy [J]. Epilepsy Behav, 2021, 121: 106909.
- [13] SEYFRIED T N, GLASER G H, YU R K. Thyroid hormone influence on the susceptibility of mice to audiogenic seizures [J]. Science, 1979, 205(4406): 598-600.
- [14] DÜKING T, SPIETH L, BERGHOF S A, et al. Ketogenic diet uncovers differential metabolic plasticity of brain cells [J]. Sci Adv, 2022, 8(37): eabo7639.
- [15] SCHREIBER R A. Developmental changes in brain glucose, glycogen, phosphocreatine, and ATP levels in DBA/2J and C57BL/6J mice, and audiogenic seizures [J]. J Neurochem, 1981, 37(3): 655-661.
- [16] AKYUZ E, POLAT A K, EROGLU E, et al. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: an updated review [J]. Life Sci, 2021, 265: 118826.
- [17] CROUCHER M J, COLLINS J F, MELDRUM B S. Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists [J]. Science, 1982, 216(4548): 899-901.
- [18] CHAPMAN A G, WOODBURN V L, WOODRUFF G N, et al. Anticonvulsant effect of reduced NMDA receptor expression in audiogenic DBA/2 mice [J]. Epilepsy Res, 1996, 26(1): 25-35.
- [19] SARRO G D, CHIMIRRI A, MELDRUM B S. Group III mGlu receptor agonists potentiate the anticonvulsant effect of AMPA and NMDA receptor block [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 451(1): 55-61.
- [20] MOLDRICH R X, CHAPMAN A G, SARRO G D, et al. Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 476(1/2): 3-16.
- [21] GATTA E, CUPELLO A, BRACCIO M D, et al. Anticonvulsive activity in audiogenic DBA/2 mice of 1,4-benzodiazepines and 1,5-benzodiazepines with different activities at cerebellar granule cell GABA_A receptors [J]. J Mol Neurosci, 2016, 60(4): 539-547.
- [22] HORTON R W, PRESTWICH S A, MELDRUM B S. Gamma-Aminobutyric acid and benzodiazepine binding sites in audiogenic seizure-susceptible mice [J]. J Neurochem, 1982, 39(3): 864-870.
- [23] FAINGOLD C L, RANDALL M, KOMMAJOSYULA S P. Susceptibility to seizure-induced sudden death in DBA/2 mice is altered by adenosine [J]. Epilepsy Res, 2016, 124: 49-54.
- [24] BANKO M L, ALLEN K M, DOLINA S, et al. Genomic imprinting and audiogenic seizures in mice [J]. Behav Genet, 1997, 27(5): 465-475.
- [25] NEUMANN P E, SEYFRIED T N. Mapping of two genes that influence susceptibility to audiogenic seizures in crosses of C57BL/6J and DBA/2J mice [J]. Behav Genet, 1990, 20(2): 307-323.
- [26] FERRARO T N, GOLDEN G T, SMITH G G, et al. Fine mapping of a seizure susceptibility locus on mouse Chromosome 1: nomination of Kcnj10 as a causative gene [J]. Mamm Genome, 2004, 15(4): 239-251.
- [27] INYUSHIN M, KUCHERYAVYKH L Y, KUCHERYAVYKH Y V, et al. Potassium channel activity and glutamate uptake are impaired in astrocytes of seizure-susceptible DBA/2 mice [J]. Epilepsia, 2010, 51(9): 1707-1713.
- [28] MISAWA H, SHERR E H, LEE D J, et al. Identification of a monogenic locus (jams1) causing juvenile audiogenic seizures in mice [J]. J Neurosci, 2002, 22(23): 10088-10093.
- [29] SHIN M, SIMKIN D, SUYEOKA G M, et al. Evaluation of HCN2 abnormalities as a cause of juvenile audiogenic seizures in Black Swiss mice [J]. Brain Res, 2006, 1083(1): 14-20.
- [30] KANNAN-SUNDHARI A, YAN D, SAEIDI K, et al. Screening consanguineous families for hearing loss using the MiamiOtoGenes panel [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2020, 24(10): 674-680.
- [31] CHARIZOPOULOU N, LELLI A, SCHRADERS M, et al. Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human [J]. Nat Commun, 2011, 2: 201.
- [32] FAINGOLD C L, TRAVIS M A, GEHLBACH G, et al. Neuronal response abnormalities in the inferior colliculus of the genetically epilepsy-prone rat [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1986, 63(3): 296-305.
- [33] SZOT P, WEINSHENKER D, WHITE S S, et al. Norepinephrine-deficient mice have increased susceptibility to seizure-inducing stimuli [J]. J Neurosci, 1999, 19(24): 10985-10992.
- [34] SEO D O, SHIN C Y, RYU J R, et al. Effect of norepinephrine release on adrenoceptors in severe seizure genetically epilepsy-

- prone rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 396(2/3): 53–58.
- [35] RIBAK C E. An abnormal GABAergic system in the inferior colliculus provides a basis for audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats [J]. *Epilepsy Behav*, 2017, 71: 160–164.
- [36] CHERNIGOVSKAYA E V, KOROTKOV A A, DOROFEEVA N A, et al. Delayed audiogenic seizure development in a genetic rat model is associated with overactivation of ERK1/2 and disturbances in glutamatergic signaling [J]. *Epilepsy Behav*, 2019, 99: 106494.
- [37] KULIKOV A A, DOROFEEVA N A, NAUMOVA A A, et al. Impaired postnatal development of the hippocampus of Krushinsky-Molodkina rats genetically prone to audiogenic seizures [J]. *Epilepsy Behav*, 2020, 113: 107526.
- [38] CHUVAKOVA L N, FUNIKOV S Y, REZVYKH A P, et al. Transcriptome of the krushinsky-molodkina audiogenic rat strain and identification of possible audiogenic epilepsy-associated genes [J]. *Front Mol Neurosci*, 2021, 14: 738930.
- [39] DECHANDT C R P, FERRARI G D, DOS SANTOS J R, et al. Energy metabolism and redox state in brains of wistar audiogenic rats, a genetic model of epilepsy [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 1007.
- [40] DRUMOND L E, KUSHMERICK C, GUIDINE P A, et al. Reduced hippocampal GABAergic function in Wistar audiogenic rats [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2011, 44(10): 1054–1059.
- [41] VALENTIM-LIMA E, DE OLIVEIRA J A C, ANTUNES-RODRIGUES J, et al. Neuroendocrine changes in the hypothalamic-neurohypophysial system in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain submitted to audiogenic kindling [J]. *J Neuroendocrinol*, 2021, 33(7): e12975.
- [42] DAMASCENO S, FONSECA P A S, ROSSE I C, et al. Putative causal variant on *Vlgr1* for the epileptic phenotype in the model wistar audiogenic rat [J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 647859.
- [43] PRIETO-MARTÍN A I, AROCA-AGUILAR J D, SÁNCHEZ-SÁNCHEZ F, et al. Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains: The GASH; Sal model [J]. *Epilepsy Behav*, 2017, 71: 218–225.
- [44] LÓPEZ-LÓPEZ D, GÓMEZ-NIETO R, HERRERO-TURRIÓN M J, et al. Overexpression of the immediate-early genes *Egr1*, *Egr2*, and *Egr3* in two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures [J]. *Epilepsy Behav*, 2017, 71: 226–237.
- [45] DÍAZ-CASADO E, GÓMEZ-NIETO R, DE PEREDA J M, et al. Analysis of gene variants in the GASH/Sal model of epilepsy [J]. *PLoS One*, 2020, 15(3): e0229953.
- [46] FRINGS H, FRINGS M. Development of strains of albino mice with predictable susceptibilities to audiogenic seizures [J]. *Science*, 1953, 117(3037): 283–284.
- [47] SKRADSKI S L, CLARK A M, JIANG H, et al. A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy [J]. *Neuron*, 2001, 31(4): 537–544.
- [48] MCMILLAN D R, KAYES-WANDOVER K M, RICHARDSON J A, et al. Very large G protein-coupled receptor-1, the largest known cell surface protein, is highly expressed in the developing central nervous system [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(1): 785–792.
- [49] KRZYSKO J, MACIAG F, MERTENS A, et al. The adhesion GPCR VLGR1/ADGRV1 regulates the Ca²⁺ homeostasis at mitochondria-associated ER membranes [J]. *Cells*, 2022, 11(18): 2790.
- [50] YAGI H, NOGUCHI Y, KITAMURA K, et al. Deficiency of *Vlgr1* resulted in deafness and susceptibility to audiogenic seizures while the degree of hearing impairment was not correlated with seizure severity in C57BL/6- and 129-backcrossed lines of *Vlgr1* knockout mice [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 461(2): 190–195.
- [51] COWELL J K. LGI1: from zebrafish to human epilepsy [J]. *Prog Brain Res*, 2014, 213: 159–179.
- [52] KINBOSHI M, SHIMIZU S, MASHIMO T, et al. Down-regulation of astrocytic Kir4.1 channels during the audiogenic epileptogenesis in *Leucine-rich glioma-inactivated 1 (Lgi1)* mutant rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1013.
- [53] SENECHAL K R, THALLER C, NOEBELS J L. ADPEAF mutations reduce levels of secreted LGI1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy [J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(12): 1613–1620.
- [54] CHABROL E, NAVARRO V, PROVENZANO G, et al. Electroclinical characterization of epileptic seizures in leucine-rich, glioma-inactivated 1-deficient mice [J]. *Brain*, 2010, 133(9): 2749–2762.
- [55] BERRY-KRAVIS E, FILIPINK R A, FRYE R E, et al. Seizures in fragile X syndrome; associations and longitudinal analysis of a large clinic-based cohort [J]. *Front Pediatr*, 2021, 9: 736255.
- [56] CHEN L, TOTH M. Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli [J]. *Neuroscience*, 2001, 103(4): 1043–1050.
- [57] MUSUMECI S A, CALABRESE G, BONACCORSO C M, et al. Audiogenic seizure susceptibility is reduced in fragile X knockout mice after introduction of FMR1 transgenes [J]. *Exp Neurol*, 2007, 203(1): 233–240.
- [58] PACEY L K, THARMALINGAM S, HAMPSON D R. Subchronic administration and combination metabotropic glutamate and GABAB receptor drug therapy in fragile X syndrome [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 338(3): 897–905.
- [59] SUZUKI H, KATAYAMA K, TAKENAKA M, et al. A spontaneous mutation of the *Wwox* gene and audiogenic seizures in rats with lethal dwarfism and epilepsy [J]. *Genes Brain Behav*, 2009, 8(7): 650–660.
- [60] MALLARET M, SYNOFZIK M, LEE J, et al. The tumour suppressor gene *WWOX* is mutated in autosomal recessive cerebellar ataxia with epilepsy and mental retardation [J]. *Brain*, 2014, 137(2): 411–419.
- [61] YEUNG R K, XIANG Z H, TSANG S Y, et al. *Gabrb2*-knockout mice displayed schizophrenia-like and comorbid phenotypes with interneuron-astrocyte-microglia dysregulation [J]. *Transl Psychiatry*, 2018, 8(1): 128.

高天,董健健,喻绪恩. DMD模型鼠mdx小鼠线粒体损伤的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 793-798.
GAO T, DONG J J, YU X E. Progress of research into mitochondrial injury in mdx mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 793-798.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.012

DMD模型鼠mdx小鼠线粒体损伤的研究进展

高天^{1,2},董健健^{1,2},喻绪恩^{1,2*}

(1. 安徽中医药大学神经病学研究所,合肥 230038;2. 安徽中医药大学神经病学研究所附属医院,合肥 230061)

【摘要】 Duchenne 肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种由编码抗肌萎缩蛋白的 *Dystrophin* 基因突变导致的致死性、进行性、X 连锁隐性遗传肌肉疾病。目前, DMD 尚无治愈手段, 临床研究进展缓慢, 动物模型的建立对 DMD 的实验研究作用越来越重要。结合研究发现, mdx 小鼠具有 DMD 患者相同的发病机制, 广泛应用于 DMD 病理机制和新药开发的研究中。线粒体损伤是 DMD 重要的病理机制之一, 对线粒体的保护是 DMD 的潜在治疗靶点, 因此探讨 mdx 小鼠与线粒体损伤的关系具有重要意义。本文就近年来 DMD 模型鼠 mdx 小鼠线粒体损伤的研究进展进行综述, 为相关实验提供参考。

【关键词】 Duchenne 肌营养不良; 线粒体损伤; 动物模型; mdx 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 06-0793-06

Progress of research into mitochondrial injury in mdx mice

GAO Tian^{1,2}, DONG Jianjian^{1,2}, YU Xuen^{1,2*}

(1. Institute of Neurology, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 2. Affiliated Hospital of the Neurology Institute, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China)

Corresponding author: YU Xuen. E-mail: 1573872895@qq.com

【Abstract】 Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a lethal, progressive, X-linked recessive hereditary muscle disease caused by a mutation in the gene encoding dystrophin. Currently, no cure for DMD is available, and clinical research is progressing slowly. The establishment of animal models is becoming increasingly important for experimental research on DMD. Following the research findings that mdx mice have the same pathogenesis as DMD patients, this model is widely used in the study of DMD pathogenesis and drug development. Mitochondrial injury is one of the most important pathological mechanisms of DMD, and mitochondrial protection is a potential therapeutic strategy for DMD, and thus it is significant to study mitochondrial injury in mdx mice. This article reviews the progress of research into mitochondrial injury in DMD model mdx mice in recent years to provide a reference for related experiments.

【Keywords】 Duchenne muscular dystrophy; mitochondrial injury; animal model; mdx mice

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

Duchenne 肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种由编码抗肌萎缩蛋白的 *Dystrophin* 基因突变导致的严重的进行性、遗传性神经肌肉萎缩疾病^[1], 患儿初期以肌肉无力、萎缩、强

直等表现为主, 全球男性婴儿患病率约为 1/5000^[2]。目前, DMD 尚无有效的治疗手段, 仅依靠糖皮质激素延缓病程的发展^[3]。中西医结合治疗可能是 DMD 有效治疗方法的优化选择^[4], 其他各

【基金项目】 安徽省高校自然科学研究重点项目 (KJ2021A0550), 安徽中医药大学临床科研自然重大项目 (2021sfylc02)。

Funded by the Key Project of Natural Science Research Project of Universities in Anhui Province (KJ2021A0550), Anhui University of Chinese Medicine Clinical Research Natural Major Project (2021sfylc02).

【作者简介】 高天, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 神经肌肉病。Email: 2796410153@qq.com

【通信作者】 喻绪恩, 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 神经肌肉病。Email: 1573872895@qq.com

种治疗手段大多处于实验阶段,因此相关动物模型的替代研究成为时下研究的热点。已经建立的 DMD 动物模型包括小鼠、犬、猫、斑马鱼及秀丽隐杆线虫等,mdx 小鼠因具有与 DMD 患者相同的遗传基础,且临床表现相似,被广泛应用于探究 DMD 的发病机制、病理改变、实验治疗等领域。在细胞水平上,抗肌萎缩蛋白结构的缺陷损害了细胞膜的稳定性,诱导氧化应激和肌酸激酶流出,致使肌肉收缩和储存能量损失,同时 Ca^{2+} 异常流入激活蛋白酶并导致线粒体 Ca^{2+} 超载和功能障碍^[5]。线粒体损伤影响 DMD 病程的发展,在疾病的进展中发挥了重要作用,迄今国内外对于线粒体损伤与 mdx 鼠之间的关系仍未有系统性、一致性的研究报道,所以本文聚焦于 mdx 小鼠线粒体损伤的研究进展进行综述。

1 mdx 小鼠

mdx 小鼠是 DMD 研究使用最广泛的动物模型^[6]。在 20 世纪 80 年代初,C57BL/10ScSn 小鼠种群中发现具有高水平酶学和肌肉组织学病变的 mdx 小鼠^[7]。该品系小鼠在 *Dmd* 基因的第 23 号外显子发生无义突变(C 转变成 T),从而中止全长抗肌萎缩蛋白的表达^[8]。尽管 mdx 小鼠缺乏抗肌萎缩蛋白但临床症状轻微,没有表现出 DMD 的致病进程,寿命也没有显著缩短,肌肉萎缩、脊柱侧弯和心力衰竭等严重的肌营养不良表型直到小鼠 15 个月或以上才会发生。相比之下,DMD 患者的寿命往往活不过 30 岁^[9]。*Utrn* 基因的表达增加是 mdx 小鼠症状轻微的原因之一,该基因由于具有 *Dmd* 基因的同源性,可编码部分替代抗肌萎缩蛋白的 UTROPHIN 蛋白,在 DMD 患者的身上也是如此。此后设计了敲除 *Dmd* 基因和 *Utro* 基因的双基因敲除(double-knockout,DKO)小鼠^[10],具有更严重的表型,在 20 周龄左右因呼吸衰竭而死亡^[11]。研究显示,mdx 小鼠骨骼肌经历了不同的阶段:出生后的 2 周生长发育正常,3~6 周出现惊人的坏死^[12]。随后,由于肌细胞强大的再生能力,大部分骨骼肌进入了相对稳定的阶段,MASSOPUST 等^[13]报道证实了这一结论。此外,在 mdx 小鼠的骨骼肌中,膈肌的恶化最严重^[14],膈肌和肋间肌退行性变化引起的呼吸衰竭是导致 DMD 患者死亡的主要原因^[15]。

mdx 小鼠作为临床前研究,主要集中在治疗方法的开发上^[16],几十年来,丰富了对抗肌萎缩蛋白

生物学功能和 DMD 病理学的认识。当下,DMD 的致病基因已经明确,但其发病机制还不明了^[17],许多继发性病理生理过程加剧 DMD 的肌肉病理学,如免疫和炎症过程^[18]、钙稳态改变、氧化应激、细胞凋亡和自噬缺陷等,而对于线粒体损伤的研究成为时下热点,线粒体损伤与 DMD 早期阶段的肌肉损伤之间的潜在联系可能应用于指导临床前线粒体靶向治疗。

2 mdx 小鼠的线粒体损伤病理机制

关于 DMD 的线粒体损伤研究最早追溯到 1967 年,HUDGSON 等^[19]在电子显微镜下发现 DMD 患者肌肉中线粒体结构上发生了体积增大和卷曲。在此基础上,展开了对线粒体结构和功能的深入研究,以期了解线粒体损伤在 mdx 小鼠中的作用,阐明 DMD 的发病机制。

2.1 线粒体结构损伤

线粒体结构完整性对于维持肌肉健康至关重要^[20],8 周龄 mdx 小鼠骨骼肌组织电镜下可见线粒体形态和数量发生变化,严重者可出现空泡样改变^[21],表明 mdx 小鼠肌细胞线粒体结构损伤严重。DUBININ 等^[22]观察 mdx 小鼠心肌线粒体超微结构的变化,发现线粒体有明显肿胀,而且一些肿胀的线粒体显示嵴破坏。MOORE 等^[23]研究发现,在肌纤维损伤之前,来自雄性 mdx 和雌性 mdx 携带者小鼠的骨骼肌除了线粒体功能降低之外,还呈现异常的线粒体结构、嵴数目减少和线粒体内大空隙。WATKINS 等^[24]研究发现,DMD 患者股外侧肌再生肌纤维中存在结构损伤的线粒体。为此,线粒体结构损伤的修复也可能成为 DMD 的治疗途径。

2.2 线粒体功能障碍

线粒体功能障碍被认为既是许多神经系统疾病的促进因素之一^[25],也是导致 DMD 骨骼肌萎缩的重要原因之一,研究发现 mdx 小鼠肌肉组织中线粒体能量代谢异常、 Ca^{2+} 超载、氧化应激、自噬异常等都参与 DMD 的病理进程。

2.2.1 线粒体能量代谢异常

线粒体是真核生物细胞进行生物氧化和能量转换的场所,其为细胞的生命活动提供大部分能量,因此又叫作细胞的“动力工厂”。线粒体在 ATP 的合成中发挥着至关重要的作用,通过氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)释放氧气合成 ATP,骨骼肌呈现两种空间和功能上不同的线粒体

群体:肌原纤维间线粒体(intermmyofibrillar mitochondria, IFM)和肌膜下线粒体(subsarcolemmal mitochondria, SSM), IFM 位于靠近 I 带的肌原纤维间隙,提供细胞收缩所需的大部分 ATP,涵盖了大部分的线粒体,SSM 位于肌膜下方,占骨骼肌总线粒体的 10% ~ 15%^[26]。PERCIVAL 等^[27]研究发现 mdx 小鼠肌肉中 SSM 密度降低了 39%,还发现由于抗肌萎缩蛋白的缺乏导致 mdx 小鼠中骨骼肌线粒体的 ATP 合成能力降低。线粒体的氧化磷酸化系统由 4 种呼吸链酶复合物(复合物 I-IV)和 ATP 合酶复合物(复合物 V)组成,能够协调电子转移和建立 ATP 产生所必需的质子梯度。GAGLIANONE 等^[28]通过研究 12 周龄的 mdx 小鼠肌肉细胞中钙转运 ATP 酶的表达,发现趾长伸肌(extensor digitorum longus, EDL)中线粒体能量代谢减弱。KUZNETSOV 等^[29]研究发现 mdx 小鼠股四头肌所有呼吸链连接的线粒体酶的活性降低了约 50%。同时,参与有关线粒体能量代谢的基因表达下调,如 CHEN 等^[30]研究报道 DMD 患者骨骼肌线粒体功能和能量代谢的降低主要是由于核编码的线粒体基因的转录减少。肌肉的收缩依赖 ATP 的氧化磷酸化提供能量,可见线粒体能量代谢异常很大程度影响肌肉的收缩,提示 DMD 患者和 mdx 小鼠身上的肌肉萎缩、无力与线粒体能量代谢异常显著相关。

2.2.2 线粒体 Ca²⁺超载

肌内质网(sarco endoplasmic reticulum, SR/ER)负责蛋白质的折叠,提供肌纤维的连接,并与线粒体和 Ca²⁺稳态密切相关^[31]。骨骼肌的正常功能和存活离不开 Ca²⁺稳定的信号系统和 SR/ER 在肌纤维内构成广泛网络。有研究认为, Ca²⁺过量是有毒性的,且可致使肌细胞被破坏,这种现象也被称为 Ca²⁺超载,目前已被大多数人认可为线粒体损伤的诱因^[32]。在 DMD 中, Ca²⁺超载引起线粒体损伤和线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放显著^[33],同时肌细胞的细胞膜不稳定而引起细胞骨架的解体,也将导致胞质中游离的 Ca²⁺浓度增加。抗肌萎缩蛋白的缺乏与内质网应激通过改变 SR/ER 线粒体相互作用和肌肉运动过程中 Ca²⁺流动密切相关。BERTORINI 等^[34]研究发现,在 DMD 风险胎儿和后来发展为典型 DMD 早产儿的肌细胞中 Ca²⁺含量是正常胎儿的 36 倍。HUGHES 等^[35]研究发现,在 mdx 小鼠股四头肌肌肉中, Caspase 9 活性升高,诱导 mPTP 开放

的阈值降低,表明 Ca²⁺滞留能力降低,与该肌肉中线粒体诱导的细胞凋亡有关。KUZNETSOV 等^[29]研究认为骨骼肌中抗肌萎缩蛋白的缺乏最有可能是由于肌纤维 Ca²⁺超载造成。对 mdx 小鼠的研究表明, NO₂ 的拉伸激活会迅速产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),触发 Ca²⁺通过拉伸激活通道进入,导致线粒体 Ca²⁺增加和 ROS 的产生共同导致肌肉损伤。在 DMD 患者的萎缩肌肉中发现 Park14 基因编码的 PLA2G6 蛋白高表达,进一步研究发现, PLA2G6 蛋白通过活化钙池操纵 Ca²⁺通道(store-operated calcium channels, SOC),促进 Ca²⁺内流,肌细胞内 Ca²⁺异常积累进一步导致 DMD 的发生,抑制 Park14 基因表达能够抑制 mdx 小鼠肌细胞 Ca²⁺过度内流,可能是治疗 DMD 的药物靶点^[36-37]。

2.2.3 线粒体氧化应激

在细胞反应中,如果内源性抗氧化剂无法清除过量产生的 ROS,将导致 ROS 的上升超过正常或生理的阈值水平,这一过程称为氧化应激反应。通俗地讲,就是体内细胞或细胞器中氧化产物水平和类型显著超过了正常稳态水平的一种状态^[38]。有证据表明,短暂的 mPTP 开口在这一过程发挥重要的生理作用,维持健康的线粒体稳态。对氧化应激的适应性还涉及线粒体内膜阴离子通道(inner membrane anion channel, IMAC),可见线粒体在调节 ROS 产生发挥了很重要的作用。Ca²⁺超载可能会增加线粒体 ROS 的生成率,同时不平衡的 ROS 也将导致一种转录因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)的过度活化, NF- κ B 在营养不良肌纤维中普遍存在,负责触发以及增强炎症途径^[39]。以上表明 Ca²⁺失调、氧化应激和炎症反应之间存在复杂的相互作用,共同介导 DMD 的病理进程。慢性炎症状态下,氧化应激可导致肌肉无力,涉及许多肌肉疾病诸如肌营养不良症的病理学^[40]。DISATNIK 等^[41]研究发现,在坏死前的 mdx 小鼠肌肉中,存在编码抗氧化酶基因的表达异常,提示存在氧化应激反应。GROUNDS 等^[42]通过检测 DMD 患者和 mdx 小鼠肌肉病理中相关生物标志物,发现 DMD 存在强烈的氧化应激,并且与肌坏死和炎症显著相关。

2.2.4 线粒体自噬异常

线粒体自噬由 LEMASTERS^[43]在 2005 年首次提出,主要指在氧化应激、营养缺乏和细胞衰老等刺激下,细胞内的线粒体发生去极化损伤,损伤的线粒体被特异性包裹进自噬体中,并与溶酶体融

合,从而完成损伤线粒体的降解,维持细胞内环境稳态。线粒体损伤会导致细胞死亡,在健康骨骼肌中,受损和去极化的线粒体可通过线粒体自噬途径选择性去除。在肌肉萎缩、衰老、各种肌病以及在 DMD 患者和 mdx 小鼠的肌肉组织中发现了线粒体自噬^[44],线粒体自噬受损是 mdx 小鼠的重要特征,在 DMD 的早期阶段,mdx 小鼠线粒体自噬下降,这表明在严重的临床表现出现之前,线粒体自噬推动了 DMD 的病程发展。2012 年,PAULY 等^[45]研究提出促进损伤线粒体的自噬清除可能是 DMD 患者的治疗策略。VALLADARES 等^[46]研究发现,自噬标志物如微管相关蛋白 1 轻链 3 II (microtubule-associated protein 1 light chain 3 II, LC3 II) 和核孔蛋白 p62 在 mdx 小鼠中水平增加。KANG 等^[47]实验研究发现 1 岁或更大的 mdx 小鼠心脏中线粒体自噬强于野生型小鼠,推测骨骼肌或心肌对线粒体自噬功能有着很强的依赖性。最近研究结果显示,mdx 小鼠骨骼肌肌纤维坏死前就表现出线粒体结构异常和线粒体自噬,TRIM72 通过促进线粒体自噬缓解 mdx 小鼠的肌肉炎症^[48],尿石素 A 作为一种天然化合物,激活 mdx 小鼠的线粒体自噬,从而达到恢复肌肉功能和增加存活率的目的^[49]。激活线粒体自噬对于 DMD 具有潜在治疗价值。

3 结语

目前,广泛公认的线粒体损伤是抗肌萎缩蛋白缺乏的后果之一,但线粒体损伤可能参与促进 DMD 病理进程。综上所述,不仅线粒体结构损伤会影响 mdx 小鼠肌肉功能,而且线粒体功能障碍(能量代谢、Ca²⁺ 稳态、氧化应激、线粒体自噬)也会影响 DMD 相关基因和蛋白的表达。因此,线粒体可能是治疗 DMD 的重要靶点,未来也需要更多的研究去探索线粒体损伤与 DMD 发病机制之间的联系。

参 考 文 献(References)

[1] DUAN D, GOEMANS N, TAKEDA S, et al. Duchenne muscular dystrophy [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7 (1): 13.

[2] SHAH M N A, YOKOTA T. Cardiac therapies for Duchenne muscular dystrophy [J]. Ther Adv Neurol Disord, 2023, 16: 17562864231182934.

[3] BROOMFIELD J, HILL M, GUGLIERI M, et al. Life expectancy in Duchenne muscular dystrophy: reproduced individual patient data meta-analysis [J]. Neurology, 2021, 97 (23): e2304-e2314.

[4] 喻绪恩,余亚运,汪昌,等. 龟鹿二仙胶加味方联合泼尼松

片治疗 Duchenne 型肌营养不良的疗效观察 [J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41(3): 19-23.

YU X E, YU Y Y, WANG C, et al. Clinical effect of Jiawei Guilu Erxian glue combined with prednisone in treatment of Duchenne muscular dystrophy [J]. J Anhui Univ Chin Med, 2022, 41(3): 19-23.

- [5] MCGREEVY J W, HAKIM C H, MCINTOSH M A, et al. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy [J]. Dis Model Mech, 2015, 8 (3): 195-213.
- [6] ZAYNITDINOVA M I, LAVROV A V, SMIRNIKHINA S A. Animal models for researching approaches to therapy of Duchenne muscular dystrophy [J]. Transgenic Res, 2021, 30(6): 709-725.
- [7] BULFIELD G, SILLER W G, WIGHT P A, et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984, 81(4): 1189-1192.
- [8] SICINSKI P, GENG Y, RYDER-COOK A S, et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse; a point mutation [J]. Science, 1989, 244(4912): 1578-1580.
- [9] WAHLGREN L, KROKSMARK A K, TULINIUS M, et al. One in five patients with Duchenne muscular dystrophy dies from other causes than cardiac or respiratory failure [J]. Eur J Epidemiol, 2022, 37(2): 147-156.
- [10] 庞荣清,李自安,阮光萍,等. Duchenne 型肌营养不良小鼠模型鉴定及干细胞移植后 dystrophin 的变化 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 81-84, 11.
- PANG R Q, LI Z A, RUAN G P, et al. Identification of the method of establishment of a DKO mouse model of Duchenne muscular dystrophy and regeneration of dystrophin expression *in vivo* after stem cell transplantation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(6): 81-84, 11.
- [11] YUCEL N, CHANG A C, DAY J W, et al. Humanizing the mdx mouse model of DMD: the long and the short of it [J]. NPJ Regen Med, 2018, 3: 4.
- [12] CARNWATH J W, SHOTTON D M. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles [J]. J Neurol Sci, 1987, 80(1): 39-54.
- [13] MASSOPUST R T, LEE Y I, PRITCHARD A L, et al. Lifetime analysis of mdx skeletal muscle reveals a progressive pathology that leads to myofiber loss [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 17248.
- [14] PERCIVAL J M, WHITEHEAD N P, ADAMS M E, et al. Sildenafil reduces respiratory muscle weakness and fibrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy [J]. J Pathol, 2012, 228(1): 77-87.
- [15] LEE J, MYRIE N O, JEONG G J, et al. *In vivo* shear wave elasticity imaging for assessment of diaphragm function in muscular dystrophy [J]. Acta Biomater, 2023, 168: 277-285.
- [16] SHIRAKAWA T, IKUSHIMA A, MARUYAMA N, et al. A sandwich ELISA kit reveals marked elevation of titin N-terminal fragment levels in the urine of mdx mice [J]. Anim Model Exp Med, 2022, 5(1): 48-55.

- [17] 曾纛, 张成, 李才明, 等. 成肌调节因子 MyoD 和 myogenin 在不同月龄 DMD 模型鼠 mdx 小鼠的表达 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(3): 183-185, 153.
ZENG Y, ZHANG C, LI C M, et al. Expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in DMD mouse model mdx mice at different age [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2006, 14(3): 183-185, 153.
- [18] ROSENBERG A S, PUIG M, NAGARAJU K, et al. Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy [J]. Sci Transl Med, 2015, 7(299): 299rv4.
- [19] HUDGSON P, PEARCE G W, WALTON J N. Pre-clinical muscular dystrophy: histopathological changes observed on muscle biopsy [J]. Brain, 1967, 90(3): 565-576.
- [20] LEDUC-GAUDET J P, HUSSAIN S N A, BARREIRO E, et al. Mitochondrial dynamics and mitophagy in skeletal muscle health and aging [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8179.
- [21] 卜一, 张慧卿, 韩敬哲, 等. mTOR 调控自噬在 Duchenne 肌营养不良症肌纤维损害中的研究 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2023, 31(4): 240-244.
BU Y, ZHANG H Q, HAN J Z, et al. mTOR regulates autophagy in muscle fiber damage in Duchenne muscular dystrophy [J]. J Brain Nerv Dis, 2023, 31(4): 240-244.
- [22] DUBININ M V, TALANOV E Y, TENKOV K S, et al. Transport of Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent permeability transition in heart mitochondria in the early stages of Duchenne muscular dystrophy [J]. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2020, 1861(10): 148250.
- [23] MOORE T M, LIN A J, STRUMWASSER A R, et al. Mitochondrial dysfunction is an early consequence of partial or complete dystrophin loss in *mdx* mice [J]. Front Physiol, 2020, 11: 690.
- [24] WATKINS S C, CULLEN M J. A qualitative and quantitative study of the ultrastructure of regenerating muscle fibres in Duchenne muscular dystrophy and polymyositis [J]. J Neurol Sci, 1987, 82(1/2/3): 181-192.
- [25] JIA X, WANG Q, JI J, et al. Mitochondrial transplantation ameliorates hippocampal damage following status epilepticus [J]. Anim Model Exp Med, 2023, 6(1): 41-50.
- [26] HOPPELER H, FLUCK M. Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function [J]. Med Sci Sports Exerc, 2003, 35(1): 95-104.
- [27] PERCIVAL J M, SIEGEL M P, KNOWELS G, et al. Defects in mitochondrial localization and ATP synthesis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy are not alleviated by PDE5 inhibition [J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(1): 153-167.
- [28] GAGLIANONE R B, SANTOS A T, BLOISE F F, et al. Reduced mitochondrial respiration and increased calcium deposits in the EDL muscle, but not in soleus, from 12-week-old dystrophic mdx mice [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1986.
- [29] KUZNETSOV A V, WINKLER K, WIEDEMANN F R, et al. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse [J]. Mol Cell Biochem, 1998, 183(1/2): 87-96.
- [30] CHEN Y W, ZHAO P, BORUP R, et al. Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology [J]. J Cell Biol, 2000, 151(6): 1321-1336.
- [31] PAULY M, ANGEBAULT-PROUTEAU C, DRIDI H, et al. ER stress disturbs SR/ER-mitochondria Ca^{2+} transfer: Implications in Duchenne muscular dystrophy [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(9): 2229-2239.
- [32] KRIEGER C, DUCHEN M R. Mitochondria, Ca^{2+} and neurodegenerative disease [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 447(2/3): 177-188.
- [33] 赵治鹏, 李善刚. DMD 的肌膜损伤机制及其修复治疗的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 93-99.
ZHAO Z P, LI S G. Research progress on the mechanism of sarcolemma damage and repair treatment of Duchenne muscular dystrophy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 93-99.
- [34] BERTORINI T E, CORNELIO F, BHATTACHARYA S K, et al. Calcium and magnesium content in fetuses at risk and pre-necrotic Duchenne muscular dystrophy [J]. Neurology, 1984, 34(11): 1436-1440.
- [35] HUGHES M C, RAMOS S V, TURNBULL P C, et al. Early myopathy in Duchenne muscular dystrophy is associated with elevated mitochondrial H_2O_2 emission during impaired oxidative phosphorylation [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2019, 10(3): 643-661.
- [36] BOITIN F X, PETERMANN O, HIRN C, et al. Ca^{2+} -independent phospholipase A2 enhances store-operated Ca^{2+} entry in dystrophic skeletal muscle fibers [J]. J Cell Sci, 2006, 119(18): 3733-3742.
- [37] ISMAIL H M, DORCHIES O M, PEROZZO R, et al. Inhibition of iPLA2 β and of stretch-activated channels by doxorubicin alters dystrophic muscle function [J]. Br J Pharmacol, 2013, 169(7): 1537-1550.
- [38] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLOTT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. Physiol Rev, 2014, 94(3): 909-950.
- [39] CAPOGROSSO R F, COZZOLI A, MANTUANO P, et al. Assessment of resveratrol, apocynin and taurine on mechanical-metabolic uncoupling and oxidative stress in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy: a comparison with the gold standard, α -methyl prednisolone [J]. Pharmacol Res, 2016, 106: 101-113.
- [40] TERRILL J R, RADLEY-CRABB H G, IWASAKI T, et al. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies [J]. FEBS J, 2013, 280(17): 4149-4164.
- [41] DISATNIK M H, DHAWAN J, YU Y, et al. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state [J]. J Neurol Sci, 1998, 161(1): 77-84.
- [42] GROUNDS M D, TERRILL J R, AL-MSHHANI B A, et al.

- Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress [J]. *Dis Model Mech*, 2020, 13(2): dmm043638.
- [43] LEMASTERS J J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. *Rejuvenation Res*, 2005, 8(1): 3-5.
- [44] FIACCO E, CASTAGNETTI F, BIANCONI V, et al. Autophagy regulates satellite cell ability to regenerate normal and dystrophic muscles [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(11): 1839-1849.
- [45] PAULY M, DAUSSIN F, BURELLE Y, et al. AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(2): 583-592.
- [46] VALLADARES D, UTRERAS-MENDOZA Y, CAMPOS C, et al. IP₃ receptor blockade restores autophagy and mitochondrial function in skeletal muscle fibers of dystrophic mice [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(11): 3685-3695.
- [47] KANG C, BADR M A, KYRYCHENKO V, et al. Deficit in PINK1/PARKIN-mediated mitochondrial autophagy at late stages of dystrophic cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(1): 90-102.
- [48] WU M, LI H, HE J, et al. TRIM72 alleviates muscle inflammation in mdx mice via promoting mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023: 8408574.
- [49] LUAN P, D'AMICO D, ANDREUX P A, et al. Urolithin A improves muscle function by inducing mitophagy in muscular dystrophy [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(588): eabb0319.

[收稿日期] 2023-12-08

《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://zgdydw.cnjournals.com/zgbjyxzz/ch/index.aspx>

期待您的来稿!

刘学武,唐梓宁,彭冬冬,等. 雪貂在抗感染药物非临床研究中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 799-818.
LIU X W, TANG Z N, PENG D D, et al. Use of ferrets in nonclinical studies of anti-infective drugs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 799-818.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.013

雪貂在抗感染药物非临床研究中的应用

刘学武^{1,2}, 唐梓宁², 彭冬冬², 杜艳华^{1*}, 姜德建^{2*}

(1. 中山大学中山医学院药理教研室, 广州 510080; 2. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司 & 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 长沙 410329)

【摘要】 雪貂应用于抗感染药物评价的优势在于病原微生物(尤其是病毒株)能不经宿主适应直接进行感染和传播,且动物感染后的临床症状与人极为相似。虽然雪貂在抗病毒药物的研发中起到了极为重要的作用,但其应用范围仍有一定的局限性,可能与雪貂缺少相应的实验动物饲养和应用的国家级标准,缺乏特异性的诊断和检测试剂等因素有关。本文对雪貂作为感染疾病模型的特点进行总结,并汇总分析了雪貂在抗感染药物研究中的应用方向,旨在促进雪貂作为实验动物的标准化应用。

【关键词】 雪貂; 抗感染药物; 标准; 实验动物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 06-0799-20

Use of ferrets in nonclinical studies of anti-infective drugs

LIU Xuewu^{1,2}, TANG Zining², PENG Dongdong², DU Yanhua^{1*}, JIANG Dejian^{2*}

(1. Department of Pharmacology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Hunan Prima Drug Research Center Co., Ltd. & Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410329, China)

Corresponding author: JIANG Dejian. E-mail: jiangdejian@hnse.org; DU Yanhua. E-mail: duyanhua@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 Ferrets offer an advantage in nonclinical studies of anti-infective drugs because of their ability to be infected with and spread pathogenic microorganisms, especially viral strains, without the need for host adaptation. Additionally, the clinical symptoms exhibited by infected ferrets are very similar to those of humans. Although ferrets play a very important role in the research and development of antiviral drugs, the scope of their application remains limited. This may be related to the lack of corresponding national standards for laboratory animal feeding and application of ferrets as well as the lack of specific diagnostic and detection reagents. This paper summarizes the characteristics of ferrets as infectious disease models with a summary and analysis of the application direction of ferrets in anti-infective drug research. Our aim is to promote further standardization of the use of ferrets.

【Keywords】 ferret; anti-infective drugs; standards; laboratory animal

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

【基金项目】 湖南省药物非临床研究科技创新创业团队(2021), 湖南省重点研发计划(2023DK2006), “小荷”青年人才创新项目((2022)056)。

Funded by Scientific and Technological Innovation and Entrepreneurship Team of Pharmaceutical Non-Clinical Research in Hunan Province (2021), Hunan Province Key Research and Development Project (2020DK2003), “Xiao He” Youth Talent Innovation Project ((2022)056).

【作者简介】 刘学武,男,在读博士研究生,助理研究员,研究方向:新药药效与安全性评价。Email: liuxuewu@hnse.org

【通信作者】 姜德建,男,博士,研究员,研究方向:新药药效与安全性评价。Email: jiangdejian@hnse.org;

杜艳华,女,博士,教授,研究方向:药理与病理生理学。Email: duyanhua@mail.sysu.edu.cn。

* 共同通信作者

雪貂因其解剖结构的特殊性、对病原微生物(尤其是病毒株)易感性以及感染后临床症状与人类的相似性,使其用于感染药物的评价具有天然的种属优势。大量针对病原微生物的生物学特性研究和对应的抗感染药物的评价均依靠雪貂作为模式动物,这其中以流感病毒、新型冠状病毒等抗病毒药物尤为显著。与此同时,针对雪貂的特异性试剂的开发和实验动物化进展却与雪貂的应用需求极不相符,本文对雪貂的特性和在抗感染药物中的应用进行总结,以期对雪貂的推广应用提供资料参考。

1 雪貂的生物学特性

1.1 雪貂的生理特性

雪貂是食肉目鼬科貂属的夜食性哺乳动物,天生喜静,对外界环境的刺激具有高度警惕性。因其天生缺乏汗腺^[1],不适宜生存于高温环境。雪貂属于季节性发情动物,繁殖期为 5 ~ 6 年,每个季节可获得两胎幼仔。寿命 7 ~ 10 年,平均体重 0.3 ~ 2.5 kg,雌雄体重差异较大。

1.2 解剖学特性

雪貂天生缺乏汗腺和盲肠,且雄貂缺乏前列腺^[1]。雪貂的气管较长,上下呼吸道分腔明显,上、下呼吸道的解剖比例、支气管壁粘膜下腺的密度和终末细支气管的代数都与人类呼吸道的情况相似^[2-3],有利于研究外源性物质(如病毒、药物,尤其是吸入制剂)对呼吸道不同区域的效应/毒性差异。雪貂的食管形态学结构和分子表达与人较为相似,其中雪貂的食管粘膜下腺体与人类相似,而小鼠、大鼠或兔等均无粘膜下腺体^[4-6],且雪貂食管的分子表达(如 CK1-CK20、Mucin、LEF1 等)与人较为相近,可作为人食管疾病的模型动物之一^[7]。雪貂具有恶心、干呕、呕吐等呕吐反射特征,与其缺乏食道括约肌有关^[1,7],较适合用于观察胃肠型病原微生物感染后的相应临床症状。

2 雪貂感染病原微生物后的组织分布情况

考察病原微生物在动物模型中的组织分布对了解病原微生物的生物学特性(包括组织嗜性、宿主危害性等)、解释宿主的反应性、提示临床重点关注部位等均具有重要意义。BELSER 等^[8]在雪貂用于流感病毒感染模型的使用指南中提出,感染性标

本的收集顺序应从预期病毒载量最低的组织到最高病毒载量的组织,其中呼吸道(鼻甲、气管和肺、肺泡灌洗液)、眼部(眼睛和结膜)、胃肠道、脑(重点是嗅球)的病原微生物高分布,应靠后收集。此外,在每个样本采集中间,应用 70%乙醇对解剖器械进行净化,最大限度地减少交叉污染的可能性。但需了解到的是,除病原微生物本身的组织嗜性外,其他因素(如感染途径、基因突变、免疫状态等)对其组织分布均有重要的影响,因此在设置组织采集种类和顺序时,应同时兼顾感染途径、基因突变情况和免疫状态等因素。

2.1 感染途径影响病原微生物的组织分布

经鼻或经气管滴注是研究较多的感染途径,但随着对传播途径的认识加深,研究者逐渐意识到经气溶胶传播感染和经眼部接种感染也是接近人的重要感染方式。经呼吸道途径构建雪貂感染模型后,上呼吸道是病毒或细菌高分布的部位之一,通常检测鼻冲洗液或鼻甲组织中的病毒载量来反应感染情况。KWON 等^[9]的研究显示,经鼻内感染和经气管滴注感染甲型流感病毒株后,病毒在雪貂呼吸道的分布有显著性差异。其中鼻内感染途径下,流感病毒(A/broiler duck/Korea/Buan2/2014; A/breeder duck/Korea/Gochang1/2014)主要分布于鼻甲,且病毒不会向下呼吸道迁移。但采用气管滴注感染后,病毒主要分布于气管和肺,且随着感染后时间推移,病毒会进展性地分布于鼻甲。KIM 等^[10]比较了乙型流感病毒在雪貂的 3 种感染途径(滴鼻感染、直接接触感染和气溶胶传播感染)。结果显示,直接滴鼻感染主要在感染早期(1 ~ 5 d)在鼻甲内有较高的病毒分布,直接接触途径则在感染后 4 ~ 7 d 内显示出鼻甲部位的病毒高分布。RIJSBERGEN 等^[11]比较了 2 种感染途径下(滴鼻感染和气管滴注感染),3 型副流感病毒(human parainfluenza virus type-3, HPIV-3)在雪貂喉部的分布差异,结果显示,2 种感染途径下病毒均在喉部有较高的病毒分布,但分布时相有显著性差异。其中鼻内感染途径下,感染早期(1 ~ 7 d)在喉部有高病毒分布;气管滴注感染途径下,感染中期(3 ~ 10 d)在喉部有高病毒分布,提示感染途径影响病毒在气道内的感染性迁移。GUPTA 等^[12]比较了雪貂经气管注射感染、气溶胶传播感染、接触感染(同笼饲养)3 种途径下的结核感染分布情况,结果显示,气管注射感染和气溶胶传播感染途径下,结核杆菌在

气管和肺、纵隔淋巴结、脾、肝内均有检出,且持续时间至少为 10 周以上。接触感染途径下,仅 3/6 只雪貂在鼻甲冲洗液中检出结核杆菌,1/6 只雪貂在气管中检出结核杆菌,且 2 个部位均未表现出明显的结核杆菌定植特性(即未见持续检出)。SCHIFFMAN 等^[13]比较了 2 种感染途径(经鼻滴注、肌肉注射)下,线状病毒(包括埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV))在雪貂体内的组织分布差异。结果显示,在所有感染途径下均发现了全身性病毒传播,且无论感染途径如何,在终末时间点均在肝、脾、肾和肺部发现了高病毒滴度。此外,在脑和心脏检测 EBOV、本地布焦病毒(Bundibugyo virus, BDBV)和苏丹病毒(Sudan virus, SUDV),且在所有动物中均观察到病毒从口腔、鼻腔和直肠粘膜脱落。

2.2 基因变异影响病原微生物的组织分布

病原微生物感染雪貂后,在宿主体内的分布与其变异情况有关,PULIT-PENALOZA 等^[14]研究发现,雪貂感染以 1×10^6 PFU 经鼻接种严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)不同亚型毒株(WA1、Alpha、Beta、Delta)后,病毒在血液和各大脏器(眼睛、结膜、软腭、鼻甲、肾、脾、肝、心脏、肠(十二指肠、空肠回肠祥和降结肠)、嗅球、脑、肺和气管)均有广泛分布,且其中以呼吸道(鼻甲(含组织和冲洗液)、软腭、支气管、肺)分布最多,此外雪貂感染不同变异株后的分布也存在明显差异,其中以 Alpha 和 Delta 病毒株的分布最为广泛。HUANG 等^[15]的研究显示,雪貂经鼻感染 4 株不同来源的乙型流感病毒株(B/Brisbane/60/2008、B/Bolivia/1526/2010、两种 B/Yamagata 谱系(B/Florida/04/2006 和 B/Wisconsin/01/2010)),呼吸道组织中的病毒分布和病毒载量均有显著性差异,其中 4 株乙型流感病毒均在鼻腔中有大量复制,但其中仅 B/Brisbane/60/2008 能在下呼吸道(气管和肺)进行复制,且病毒载量也明显高于其余 3 株变异株。KIM 等^[10]则通过比较乙型流感病毒野生株(B/Florida/04/06)和鼠肺适应株(经 17 代适应)经鼻滴入感染后,病毒在气道的分布情况,结果显示,经鼠肺适应后,病毒发生了显著的变异突变,表现为核苷酸和氨基酸序列的显著突变,且病毒在感染后 1 ~ 7 d 内均在鼻甲中有更高的分布,感染后 1 ~ 3 d 则在气管和肺中显示出更高的分布,提示变异能显著影响病毒的分布。

2.3 组织嗜性影响病原微生物的组织分布

组织嗜性是病原微生物(尤其是病毒)对宿主特定组织具有选择性的亲和力和致病作用的特性,是影响病毒分布的一个重要原因。病毒的组织嗜性与病毒的抗原蛋白以及宿主组织的相应结合受体的分布有关。例如与甲型流感病毒相关的是 α -2,6-唾液酸糖蛋白受体,能被甲型流感病毒的血凝素(hemagglutinin, HA)特异性识别^[16],进而进行宿主细胞的感染和致病。人和雪貂的下呼吸道(肺门的粘膜下腺体)均主要表达 α -2,6-唾液酸糖蛋白受体,因此雪貂感染后的病毒组织分布和感染症状与人极为相似。此外,雪貂上呼吸道和下呼吸道(肺门区)几乎没有 α -2,3-唾液酸受体的表达,这与人类气管组织中的相应受体表达相似。此外,占玲俊等^[17]的研究发现,雪貂的支气管、肺、肾、回肠和盲肠均有唾液酸受体的典型分布,但各种亚型流感病毒株对不同组织的嗜性不完全与其受体分布一致,提示唾液酸受体并非所有流感病毒在雪貂组织中分布的决定性因子,可能还有其他因素(如其他受体或共受体等)影响到了组织病毒的组织分布。

SARS-CoV-2 主要通过靶向人血管紧张素转换酶 2(angiotensin converting enzyme II, ACE2)受体进入宿主细胞,且 SARS-CoV-2 的 S 蛋白对 ACE2 的亲合力是 SARS-CoV 的 10 ~ 20 倍,这可能是其高传染性的原因^[18]。单细胞 RNA 测序显示^[19-20],ACE2 主要表达于 II 型肺泡上皮细胞(alveolar type II cell, AT2)中,肺组织中表达 ACE2 的细胞约 83% 为 AT2 细胞,提示 SARS-CoV-2 主要感染下呼吸道。然而,除了呼吸上皮细胞外,ACE2 也在心肌细胞、肾近曲小管上皮细胞、膀胱上皮细胞以及食管、回肠和间质细胞中高表达,使得这些组织和器官允许 SARS-CoV-2 感染。在系统发育上,雪貂的 ACE2 基因与人类相同,ACE2 蛋白与 SARS-CoV-2 的 S 蛋白形成 6 个氢键,产生强大的结合力,可以有效感染雪貂的上呼吸道长达 8 d,而不会引起严重疾病或死亡,所有雪貂都产生 SARS-CoV-2 特异性抗体,且雪貂受 SARS-CoV-2 感染后,主要表现出体温升高和急性细支气管炎,感染后 8 d 在鼻、唾液、尿液和粪便样本中均可检测到病毒脱落^[21]。此外,CHEN 等^[22]的研究显示,肌球蛋白重链 9(myosin heavy chain 9, MYH9)过表达不增强 ACE2 敲除 A549 细胞中的 SARS-CoV-2 假病毒感染,仅增加了野生型 A549 细胞中的病毒感染。但敲除 MYH9 分子显著

降低了 ACE2-A549 细胞中 SARS-CoV-2 假病毒及真病毒感染。提示 MYH9 可能是 SARS-CoV-2 对组织细胞感染的共受体,与 ACE2 共同影响了病毒在组织中的分布情况。

2.4 免疫能力影响病原微生物的分布

宿主的免疫情况对病原微生物的持续时间有直接影响,尤其是在免疫低下或免疫豁免部位,病原微生物通常能持续滞留。WATSON 等^[23]的研究显示,EBOV 在肺、肝、脾、肾、睾丸、眼睛中均有大量分布,且在免疫豁免部位(眼睛、睾丸)的分布能持续更长时间,且未见明显的组织损伤,同时还存在最大程度的核酸序列突变,提示病毒在免疫豁免部位的持续残留与病毒的变异突变和宿主的免疫豁免有关。

3 雪貂感染病原微生物后的反应性

3.1 雪貂感染病原微生物的敏感性优势

多数病原微生物可不经宿主适应而直接感染雪貂,尤其是种属特异性较强的病毒(见表 1),其野生型病毒株可不经宿主适应而直接感染雪貂,并导致与人相似的临床症状,包括发热、流涕、喷嚏、咳嗽、活动减少、厌食和体重降低、感染部位的急性或慢性炎症和损伤等。啮齿类动物(如小鼠、大鼠等)通常仅存在感染后的部分症状,如小鼠感染流感病毒^[24],仅存在体重降低、肺病变,无咳嗽、喷嚏、流涕、发热等症状。如帕拉米韦、玛巴洛沙韦等^[25-26]神经氨酸酶抑制剂在进行抗流感病毒药效研究时,分别选用了 BALB/c 小鼠、雪貂进行不同亚型的流感病毒株(A/PR/8/34(H1N1)、A/Kumamoto/Y5/67(H2N2)、A/Victoria/3/75(H3N2)、B/Maryland/1/59 or B/Lee/40 等)感染模型的构建,其中在 BALB/c 小鼠模型上进行了肺部病毒滴度、肺部病变和死亡率的考察,但在雪貂感染模型上则分别观察到了受试物对临床症状(体重、体温、喷嚏、口式呼吸、鼻部炎症反应、死亡等)的改善和鼻部病毒滴度(鼻拭子和鼻冲洗液)、肺病毒滴度的抑制作用。新冠病毒药物 regkirona 在有效性研究过程中选用了 hACE2 小鼠、仓鼠、雪貂、恒河猴进行药效研究,结果显示,regkirona 能显著降低小鼠肺病毒滴度,显著改善雪貂感染模型的临床症状(咳嗽、鼻涕、活动减少等),显著降低恒河猴鼻部和肺部病毒滴度^[27]。通过比较不同种属感染模型的检测指标类型可知,小鼠主要用于观察病原学指标的变化(如病毒滴

度、病毒载量),且感染部位主要集中于下呼吸道(肺部),雪貂感染模型则可同时考察病原学指标和感染后的临床症状,且感染部位可同时包括上呼吸道(鼻甲、咽喉等)和下呼吸道(肺部)。雪貂从感染部位、感染后的反应性方面均更接近于人的临床表现,因此在评价抗病毒药物相关药效时,具有明显的种属优势。

3.2 雪貂感染病原微生物的年龄相关性

有研究显示,部分病毒对雪貂的感染具有年龄特异性,例如 KIM 等^[28]的研究表明,所有年龄段的雪貂均可感染 SARS-Cov-2,但老年雪貂(>3 岁)表现出更高的病毒载量,鼻腔病毒脱落时间更长,以及更严重的肺炎症、渗出以及临床症状(与 <6 个月的幼年雪貂和 1~2 岁的青年雪貂相比)。PRINCE 等^[29]、TAYLOR 等^[30]和 SUFFIN 等^[31]的研究显示,呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)在所有年龄段的雪貂鼻腔组织中均有高滴度的病毒复制,但在肺中的病毒复制仅局限于幼龄雪貂,提示 RSV 对雪貂的感染特性与人类具有相似的年龄相关性。PARK 等^[32]发现,发热伴血小板减少综合征静脉病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome phlebovirus, SFTSV)对雪貂的感染具有明显年龄依赖性,年轻成年雪貂(2 岁)没有表现出任何临床症状和死亡率,且表现出强烈的干扰素介导的抗病毒反应,而感染 SFTSV 的老年雪貂(24 岁)感染后具有更高的病毒载量,且存在持续上调的炎症免疫反应,并表现出严重的血小板减少、白细胞计数减少和高热,死亡率为 93%。多项研究显示^[33-34],年龄对雪貂感染流感病毒后的反应性影响巨大,感染后的严重程度依次为老年雪貂 > 成年雪貂 > 断奶雪貂,且上述反应性差异可能与不同年龄段雪貂的气道中唾液酸糖蛋白受体的表达量具有明显的年龄差异有关,其中新断奶和老年雪貂的 α -2,6-唾液受体水平更高,以及发挥病毒清除和进展的 α -2,3-唾液酸受体则呈年龄依赖性损失^[35]。雪貂作为实验动物时,虽然其使用年龄多在 6 月龄以上,但因其对多种病毒株感染的年龄依赖性特点,因此在进行抗病毒药物的研发时,应根据药物的适用人群(婴幼儿、成年人或老年人)选择合适年龄段的动物来进行研究。

3.3 雪貂感染病原微生物后的传播特点

细菌对宿主的选择性通常较弱,能感染雪貂的细菌通常也能在如大鼠、小鼠、猴等体内形成定植

和感染,但雪貂较为特有的种群传播能力(尤其是呼吸道感染后)则成为雪貂种属优势的主要原因之一^[36-37],且这种感染后的传播能力可能与雪貂在感染后特有的咳嗽、喷嚏等临床症状产生了大量携带病原微生物的气溶胶有关,并最终导致气溶胶或飞沫传播^[12,38]。GUPTA 等^[12]的研究显示,气管内高剂量($> 5 \times 10^3$ CFU)结核杆菌感染雪貂,7 周内出

现与大型动物如牛、猴、人等相似的急性感染期临床症状和病理特征,感染非常高剂量($> 5 \times 10^4$ CFU)的雪貂在 2 ~ 4 周内出现严重症状,体重降低高达 30%。急性感染时,传播更有效,会出现与封闭环境中接触活动性结核病患者类似的各种疾病症状。雪貂感染病原微生物后的反应性特点的比较见表 1。

表 1 雪貂感染病原微生物后的反应性比较

Table 1 Comparison of the reactivity of ferrets infected with pathogenic microorganisms

病原微生物 Pathogenic microorganism	感染途径 Route of infection	感染后的症状及与人的相似性 Symptoms after infection and their similarity to humans	其他动物种属模型的研究情况 Research on other animal species models	参考文献 References
甲型流感病毒/乙型 流感病毒/禽流感 病毒 Influenza A virus/ influenza B viruses/ avian influenza viruses	滴鼻/ 气管滴注/ 灌胃/ 直接接触/ 气溶胶接触 Intranasal/ intratracheal instillation/ intra gastric/ direct contact/ aerosol contact	感染后的临床症与人相似,包括发热、体重降低、活动减少、鼻涕、咳嗽、死亡,病毒在呼吸道有明显复制,且存在种群间的传播感染,是流感病毒感染的首选动物种属 Clinical symptoms after infection are similar to those of humans, including fever, weight loss, decreased activity, nasal discharge, cough, and death. Virus has obvious replication in the respiratory tract, and there is interpopulation transmission of infection, which is the preferred animal species for influenza virus infection	BALB/c 小鼠、仓鼠、豚鼠、鸡、犬、猪、猴。小鼠(可见体重减低,肺炎,鼠肺适应株可引起死亡)、仓鼠、豚鼠几乎无临床症状,不适合进行传播研究;鸡对人类病毒不敏感;犬不是流感病毒的天然宿主,无传播能力;猪和猴较为合适,但成本高 BALB/c mice, hamsters, guinea pigs, chickens, dogs, pigs, monkeys. Mice (body weight loss, pneumonia and murine lung adapted strains can cause death), hamsters, guinea pigs have almost no clinical symptoms and are not suitable for transmission studies. Chickens are not sensitive to human viruses. Dogs are not the natural host of influenza virus and have no ability to transmit. Pigs and monkeys are more suitable, but the cost is high	[36-45]
呼吸道合胞病毒 Respiratory syncytial virus	滴鼻/ 气管滴注 Intranasal/ intratracheal instillation	无明显临床症状(或仅见轻度体温升高),但存在血清细胞因子(IL-1 α 、IL-1 β 、INF- α 、INF- β)的变化,存在种群间传播。在鼻腔中的病毒复制与年龄无关,但在肺部的病毒复制情况与年龄呈负相关(唯一的与人相似的动物种属) There were no obvious clinical symptoms (or only mild temperature increase), but there were changes in serum cytokines (IL-1 α , IL-1 β , INF- α , INF- β), and there was interpopulation transmission. Viral replication in the nasal cavity is independent of age, but in the lungs is inversely associated with age (the only animal species similar to humans)	BALB/c 小鼠、大鼠、黑猩猩、棉鼠、牛、豚鼠、仓鼠、猴 BALB/c mice, rats, chimpanzees, cotton mice, cattle, guinea pigs, hamsters, monkeys	[29-31,46-48]
SARS (SARS-Cov/ SARS-Cov-2)	滴鼻/ 气管滴注/ 灌胃/ 直接接触/ 气溶胶接触 Intranasal/ intratracheal instillation/ intra gastric/ direct contact/ aerosol contact	感染后存在发热、急性支气管炎,且存在种群间的传播感染。临床症状(发热、呼吸道炎症)、传播感染均与人相似,是合适的动物种属 After infection, there were fever, acute bronchitis, and inter-population transmissible infection. Clinical symptoms (fever, respiratory inflammation), transmissible infection were similar to humans, so it was a suitable animal species	hACE2 转基因小鼠、非转基因小鼠(腺相关病毒转染 hACE2)、仓鼠、猴 hACE2 transgenic mice, non-transgenic mice (adeno-associated virus transfected with hACE2), hamsters, monkeys	[18-20,49-51]

续表 1

病原微生物 Pathogenic microorganism	感染途径 Route of infection	感染后的症状及与人的相似性 Symptoms after infection and their similarity to humans	其他动物种属模型的研究情况 Research on other animal species models	参考文献 References
偏肺病毒 Human metapneumovirus	滴鼻 Intranasal	感染后无临床症状,但存在病毒复制和中和抗体的产生 There are no clinical symptoms after infection, but viral replication and neutralizing antibody production are present	BALB/c 小鼠、棉鼠、豚鼠、仓鼠、非洲绿猴 BALB/c mice, cotton mice, guinea pigs, hamsters, African green monkeys	[52-54]
麻疹病毒/犬瘟热病毒(替代病毒) Measles virus/ canine distemper virus (alternative virus)	滴鼻/ 气管滴注/ 颅内注射 Intranasal/ intratracheal instillation/ intracranial	麻疹病毒(MV):常规途径不易感,ICV 途径可见神经毒性(脑膜炎); 犬瘟热病毒(CDV):易感,感染后可见发热、咳嗽、皮疹、肺炎、神经毒性等,且感染后的临床症状与人相似,但病变更严重,疾病进展更快,不是最佳的动物种属 Measles virus (MV) : Conventional route is not susceptible, ICV route can show neurotoxicity (meningitis); Canine distemper virus (CDV) : susceptible, fever, cough, rash, pneumonia, neurotoxicity can be seen after infection, clinical symptoms after infection are similar to humans, but the lesions are more serious and the disease progresses faster, not the best animal species	转基因小鼠、猴(新大陆猴、松鼠猴、猕猴、食蟹猴),其中猕猴和恒河猴是所有动物(包括雪貂)中最接近人的 Transgenic mice, monkeys (New World monkeys, squirrel monkeys, macaques, crab-eating monkeys), of which macaques and rhesus monkeys are the closest to humans of all animals (including ferrets)	[55-59]
风疹病毒 Rubella virus	经胎盘/ 颅内注射/ 滴鼻/ 皮下注射/ 腹腔注射 Transplacental/ intracranial instillation/ intranasal/ subcutaneous/ intra-peritoneal	感染后症状包括脑血管内皮细胞肿胀和壁变性,血管腔内积聚颗粒状嗜酸性粒细胞碎片,与风疹感染的人类胚胎相似的血管异常 Post-infection symptoms include swelling and wall degeneration of cerebral vascular endothelial cells, accumulation of granular eosinophile fragments in the vascular lumen, and vascular abnormalities similar to those seen in rubella infected human embryos	小鼠,多采用蛋白衣壳或抗原复合物进行免疫原性和候选疫苗的评价 In mice, protein capsid or antigen complex were used to evaluate immunogenicity and candidate vaccines	[21, 60-63]
丝状病毒(埃博拉病毒、马尔堡病毒、苏丹病毒、本地布焦病毒、雷斯顿病毒) Filovirus (Ebola virus, Marburg virus, Sudan virus, Bundibugyo virus, Reston virus)	滴鼻/ 气管滴注/ 肌内注射 Intranasal/ intratracheal instillation/ intramuscular	无需进行宿主适应,病毒存在全身性复制,且感染后症状与人非常相似,包括体重降低、发热、皮疹、出血、凝血障碍、淋巴细胞减少、中性粒细胞增多、血小板减少、炎症反应、多器官衰竭,死亡(感染后的死亡率高于人),是非常合适的动物种属(尤其针对无宿主适应性的特征) No host adaptation is required, the virus replicates throughout the body, and the symptoms after infection are very similar to those of humans, including weight loss, fever, rash, bleeding, clotting disorders, lymphocytopenia, neutrophilia, thrombocytopenia, inflammation, multiple organ failure, and death (mortality after infection is higher than in humans). It is a very suitable animal species (especially for the characteristics of no host adaptation)	BALB/c 小鼠、C57BL/6 小鼠、ICR 小鼠、金黄地鼠、豚鼠、猴,除猴以外,其余均需进行宿主适应 BALB/c mice, C57BL/6 mice, ICR mice, golden hamsters, guinea pigs, monkeys, except monkeys, all require host adaptation	[64-68]
尼帕病毒 Nipah virus	滴鼻/ 直接接触/ 气溶胶接触 Intranasal/ direct contact/ aerosol contact	感染后具有与人相似的临床症状,包括体重降低、发热、脑炎、肺、脾和肝损伤、出血(眼眶、面部和颈部等的皮下、脑、肺、脾)、死亡、神经系统损伤(后遗症:震颤、癫痫、脑瘫等),首选的动物种属 Clinical symptoms similar to humans after infection, including weight loss, fever, encephalitis, lung, spleen, and liver damage, bleeding (subcutaneous of orbital, face, and neck, brain, lung, spleen, etc.), death, neurological damage (sequelae: tremor, epilepsy, cerebral palsy, etc.), preferred animal species	小鼠、仓鼠、猪、非洲绿猴、狨猴,小鼠神经系统无法感染病毒,基于经济、临床一致性考察,仓鼠、雪貂是理想的动物模型 Mice, hamsters, pigs, African green monkeys, marmosets, mice nervous system can not be infected with the virus, based on economic and clinical consistency, hamsters and ferrets are ideal animal models	[69-75]

续表 1

病原微生物 Pathogenic microorganism	感染途径 Route of infection	感染后的症状及与人的相似性 Symptoms after infection and their similarity to humans	其他动物种属模型的研究情况 Research on other animal species models	参考文献 References
流行性腮腺炎病毒 Mumps virus	滴鼻/ 气管滴注/ Intranasal/ intratracheal instillation	感染后仅见轻微临床症状,可包括体温升高(不超过 40 ℃),未见其他临床症状,病毒复制具有自限性,鼻洗液检出少量或未检出病毒(与不同亚型的临床分离株有关),口腔拭子、尿液、粪便或组织匀浆中未检测到活病毒或病毒 RNA。可产生特异性血清抗体,并产生了与感染一致的细胞因子(INF- γ 、IL-2、IL-6、IL-10),不是合适动物种属 Only mild clinical symptoms are seen after infection, which may include an increase in body temperature (not exceeding 40 ℃), no other clinical symptoms, self-limited viral replication, little or no detectable virus in nasal wash (associated with clinical isolates of different subtypes), and no live virus or viral RNA detected in oral swabs, urine, feces, or tissue homogenates. It produces specific serum antibodies and produces infection-consistent cytokines (INF- γ , IL-2, IL-6, IL-10), which are not suitable animal species	BALB/c 小鼠、豚鼠、恒河猴。最佳动物模型为恒河猴,感染后 2 ~ 4 周出现典型的腮腺炎临床症状。但无发烧或神经系统症状。 BALB/c mice, guinea pigs, rhesus monkeys. Best animal model is the rhesus monkey, which presents with typical clinical symptoms of mumps 2 ~ 4 weeks after infection. But no fever or neurological symptoms.	[76-78]
副流感病毒 Parainfluenza virus	滴鼻/ 气管滴注/ 直接接触/ Intranasal/ intratracheal instillation / direct contact	成年雪貂:未见发热、体重降低等临床症状;有中和抗体产生,上、下呼吸道均存在病毒复制 幼年雪貂:可在感染后 24 ~ 72 h 内引起动物死亡,是较合适的动物种属 Adult ferret: No fever, weight loss and other clinical symptoms; Neutralizing antibodies were produced, and virus replication existed in both upper and lower respiratory tract Juvenile ferret: can cause death within 24 ~ 72 h after infection, is a more suitable animal species	小鼠,非洲绿猴和幼龄雪貂存在感染后的临床症状,是较合适的模型 Mice, African green monkeys and young ferrets present clinical symptoms after infection, are suitable models	[79-84]
裂谷热病毒 Rift Valley fever virus	滴鼻/皮下注射 Intranasal/ subcutaneous	存在与人感染相似的临床症状,皮内或鼻内感染后,病毒能广泛分布在各大脏器,其中脾和脑中病毒载量最高。雪貂感染后出现高热、体重减轻、淋巴细胞减少和低白蛋白血、中枢神经系统疾病,表现为癫痫发作、共济失调和/或后肢无力。有短暂的病毒性 RNA 血症,脑内高病毒 RNA 载量和脑炎的组织病理学证据。是合适的模型动物之一 There are clinical symptoms similar to human infection. After intradermal or intranasal infection, the virus can be widely distributed in all major organs, with the highest viral load in the spleen and brain. Ferrets with infection develop high fever, weight loss, lymphocytopenia and low albumin blood, central nervous system disease, manifested by seizures, ataxia, and/or hind leg weakness. Histopathological evidence of transient viral RNA emia, high viral RNA load in the brain, and encephalitis. Is one of the suitable model animals	BALB/c 小鼠,大鼠,猴,叙利亚仓鼠。大鼠的发病与感染途径相关,小鼠感染后的致死性更强,仓鼠容易诱发肝炎 BALB/c mice, rats, monkeys, Syrian hamsters. Pathogenesis of rats is related to the route of infection, the lethality of mice after infection is stronger, and the hamster is easy to induce hepatitis	[85-88]
戊型肝炎病毒 Hepatitis E virus	直接接触 Direct contact	与人具有相似的病毒复制、免疫反应和临床症状,是最合适的动物种属。感染后临床症状包括转氨酶(ALT、AST)升高,急性肝损伤,血液和粪便里均可检测到病毒 With similar viral replication, immune response and clinical symptoms to humans, it is the most suitable animal species. Post-infection clinical symptoms include elevated aminotransferase (ALT, AST), acute liver injury, and virus detection in blood and stool	免疫缺陷小鼠(嵌合了人肝细胞)、猴子和普通小鼠对 HEV 均不敏感,不合适 Immunodeficient mice (chimeric human hepatocytes), monkeys, and ordinary mice were insensitive to HEV and unsuitable	[89-92]

续表 1

病原微生物 Pathogenic microorganism	感染途径 Route of infection	感染后的症状及与人的相似性 Symptoms after infection and their similarity to humans	其他动物种属模型的研究情况 Research on other animal species models	参考文献 References
结核杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	滴鼻/ 直接接触/ 气溶胶接触 Intranasal/ direct contact/ aerosol contact	与人相似的感染症状、免疫反应和传播风险, 感染后的临床症状包括体温升高、体重降低、接种部位的肉芽肿, 肺部感染, 并向各大脏器进行分布感染, 体液免疫。优势在于能建立潜伏感染模型, 能进行种群间的传播感染研究, 是非常合适的动物种属 Symptoms of infection, immune response and transmission risk are similar to those of humans. Clinical symptoms after infection include elevated body temperature, weight loss, granuloma at the vaccination site, lung infection, and distribution of infection to major organs, and humoral immunity. Advantage is that it can establish the model of latent infection and carry out the study of transmissible infection between populations, so it is a very suitable animal species	小鼠和大鼠(不形成干酪样坏死, 且无潜伏期)、豚鼠、兔(特定的高毒力致病株)、猴(容易形成大暴发, 优势在于能通过免疫抑制诱导复发)、牛 Mice and rats (no caseous necrosis and no latency), guinea pigs, rabbits (specific highly virulent strains), monkeys (prone to large outbreaks, with the advantage of inducing relapse through immunosuppression), cattle	[93-102]
螺旋杆菌 <i>Helicobacter pylori</i>	灌胃 Intragastric	雪貂是雪貂螺旋杆菌的天然宿主, 主要定植于十二指肠近端和胃窦, 能诱导慢性炎症和溃疡。感染雪貂螺旋杆菌后, 能形成类似人类感染幽门螺旋杆菌的症状, 但组织病理改变缺乏多核细胞浸润 Ferrets are the natural host of ferret <i>Helicobacter pylori</i> (HP), which mainly colonizes the proximal duodenum and gastric antrum, and can induce chronic inflammation and ulcers. After infection with <i>Helicobacter ferret</i> , symptoms similar to human infection with HP can be formed, but the histopathological changes lack multinucleate cell infiltration	小鼠(不同品系之间有差异, C57BL/6 最佳)、大鼠(提前损伤胃黏膜增加定植)、豚鼠、蒙古沙鼠、猪、猫, 其中蒙古沙鼠最佳 Mice (there were differences among different strains, C57BL/6 was the best), rats (early damage of gastric mucosa to increase colonization), guinea pigs, Mongolian gerbils, pigs, cats, among which Mongolian gerbils were the best	[103-110]
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	滴鼻 Intranasal	形成细菌-病毒共感染, 细菌能增加病毒在粘膜定植, 感染后能在种群间进行传播, 呼吸道病毒感染能增加肺炎链球菌感染和传播, 与人临床表现一致, 是研究共感染和传播的合适动物种属之一 Formation of bacteria-virus co-infection, bacteria can increase the colonization of the virus in the mucosa, after infection can be transmitted between the population, respiratory virus infection can increase the infection and transmission of <i>Streptococcus pneumoniae</i> , consistent with human clinical manifestations, is one of the appropriate animal species to study co-infection and transmission	小鼠, 但仅能研究细菌-病毒共感染对个体致病性, 无法研究病原微生物的传播性 Mice, however, only the individual pathogenicity of bacteria-virus co-infection could be studied, and the transmissibility of pathogenic microorganisms could not be studied	[24, 111-114]
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	滴鼻 Intranasal	感染后可见体温升高, 活动减少, 肺泡实质性肺炎, 死亡, 组织器官菌负荷量, 且与人相似具有更相似的免疫反应, 但反应更剧烈, 死亡率更高, 是合适的动物种属之一 After infection, increased body temperature, decreased activity, alveolar parenchymatous pneumonia, death, tissue and organ bacterial load, and similar to humans with a more similar immune response, but more intense response, higher mortality, is one of the suitable animal species	小鼠、大鼠、兔等, 几乎所有实验动物均可进行感染 Mice, rats, rabbits, etc., almost all experimental animals can be infected	[36, 115-121]
大肠杆菌 O157:H7 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	直接接触/灌胃 Direct contact/ intragastric	肠道感染性结肠炎、腹泻、溶血性尿毒症, 血尿, 继发性肾小球损伤, 部分动物伴有, 血小板减少。溶血性尿毒症综合征和继发的肾损伤与人相似 Enteric infectious colitis, diarrhea, hemolytic uremia, hematuria, secondary glomerular injury, accompanied in some animals, thrombocytopenia. Hus syndrome and secondary renal injury are similar to those in humans	小鼠、大鼠、猴等, 不同的血清型菌株影响感染情况 Mice, rats, monkeys, etc. different serotypes of bacteria affected the infection	[122-126]

4 雪貂在抗感染药物评价中的应用

在 20 世纪 30 年代偶然发现雪貂对人类流感病毒的天然易感性之后,继而被发现能模拟多种人类呼吸道病毒感染的疾病进程,包括呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)、副流感病毒(PIV)和严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒等。到目前为止,雪貂已被用于人类/动物源病原微生物感染的多种方向研究^[36],包括病原微生物的致病性和发病机理、病原微生物的传播、免疫反应、抗病毒药物研发、疫苗免疫策略等^[42]。此外,在《流感疫苗指南-非临床和临床模块》(European Medicines Agency, EMA)^[127]等多个法规性文件中,雪貂被推荐为流感疫苗保护力评价实验的首选实验动物。采用雪貂进行非临床评价并上市的抗感染药物包括化学药物、生物制品和预防用疫苗,其中化学药物以抗流感病毒药物和抗冠状病毒为主,包括 M2 离子通道阻滞剂^[128]、神经氨酸酶抑制剂^[25,129-131]、血凝素抑制剂^[132]、RNA 聚合酶抑制剂^[26,133-139]、3CL 蛋白酶抑制剂^[135,140]、白介素-1 受体拮抗剂^[141]等,此外尚有多个其他候选化学药物处于临床前或临床研究阶段^[142-147]。生物制品^[148-160]有瑞达韦单抗(IgG 抗体),疫苗主要以流感疫苗(包括甲型流感、乙型流感和禽流感)为主,包括 arepanrix、fluenz、H5N1-medimmune、focetria、pandemrix、prepandrix、pumarix,此外还有新冠病毒疫苗 vaxzevria 等。此外,在多个丙肝病毒药物^[161-162]研发过程中,基于具有与人相似的呕吐反应,雪貂还作为安全药理学实验中的试验对象,进行胃肠道系统副作用的评价^[1,8,163](见表 2)。

5 雪貂的免疫学机制研究进展

雪貂在感染性疾病(尤其是呼吸系统感染性疾病)中的应用主要集中于病原体感染后的发病机制和传播研究以及疫苗的临床前评价,但针对病原体感染后的免疫学机制研究仍进展缓慢,可能主要与以下原因有关。

5.1 雪貂的应用范围仍较局限

不同于大、小鼠等啮齿类动物,雪貂目前主要应用于感染疾病模型和呕吐模型的构建,过窄的应用范围导致对特殊试剂(如单克隆抗体、分子探针等)的需求压力较小,无法加速免疫学基础研究的进步。但需注意到的是,雪貂在其他疾病领域(包

括消化系统和中枢神经系统等)的种属优势正在逐步被发掘,例如有研究发现,雪貂是幽门螺旋杆菌的天然宿主^[109],且只有雪貂和人的幽门和十二指肠的布鲁纳氏腺不含有酸性黏膜物质^[1],因此雪貂在消化系统疾病领域的优势还有较大的开发空间。此外,雪貂很容易被诱导高血氨,也能承受高血氨,是理想的氨代谢动物模型^[164]。同时雪貂的脑回结构和人非常相似,是研究脑部发育的理想动物种属之一^[165]。通过扩大雪貂的应用范围能加快特异性试剂的开发,促进雪貂免疫学机制研究的进展。

5.2 对雪貂的遗传信息了解较少

关于雪貂的遗传信息解密仍停留于基因组测序草图^[166],用于表征免疫反应的基因组序列信息极度缺乏,这其中就包括编码 B 细胞或 T 细胞受体的免疫特征性基因尚未得到充分的表征^[167],导致免疫细胞亚群标记物和细胞因子单克隆抗体的制备和生产受限,这些均限制了采用雪貂在免疫机制研究方面的进展。2018 年已有研究者完成雪貂的组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)测序^[39-41],2021 年 JIANG 等^[168]则通过多重 PCR 法对雪貂 B 细胞受体进行测序,完成了雪貂重组单克隆抗体的制备,2018 年 LIU 等^[169]则通过单细胞 PCR 法开发了小鼠抗雪貂 CXCR5 和 PD-1 单克隆抗体。这些研究成果在促进雪貂抗体试剂的开发和雪貂在免疫机制研究方面的应用作用巨大。

5.3 对雪貂的免疫系统功能了解较少

迄今为止,对雪貂的免疫系统的功能了解甚少,例如研究者已鉴定出犬和水貂等多种肉食动物的 4 种不同亚型的免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG),在猫的体内也鉴定出了 3 种亚型 IgG,这提示雪貂体内可能也存在多种亚型 IgG,但到目前为止,研究者仅在雪貂体内鉴定出 1 种 IgG 亚型,且对 Fc 受体的多样性和功能研究甚少^[41],这对研究雪貂 IgG 和 Fc 受体亚型介导的抗体效应功能(如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC))具有限制作用。此外,目前仍无法从雪貂 B 细胞中分离出单克隆抗体,进一步限制了雪貂对流感病毒等病原体抗原蛋白识别的相关研究^[169]。此外,雪貂缺乏大量的物种特异性试剂^[39-41],免疫机制研究过程中所需的免疫细胞标记物和细胞因子单克隆抗体的鉴定主要依赖于筛选与雪貂对应物发生交叉反应的其他物种的抗体^[40-41,57],这种低效的抗体筛选方

表 2 基于雪貂研究的上市抗感染药物或候选药物汇总

Table 2 Summary of marketed anti-infective drugs or candidates based on ferret studies

药物名称/ 受试物名称 Drug name/ name of the subject	作用机制 和特点 Mechanism and characteristics of action	适应症 Indication	给药途径 Route of administration	研究阶段 Research phase	雪貂的应用方向 Application direction of ferret	参考文献 References
金刚烷 Amantadine hydrochloride	M2 离子通道 阻滞剂 M2 ion channel blocker	抗甲型流感病毒感染 Anti-influenza A virus infection	口服 Oral	上市 On the market	有效性/药代动力学 Main pharmacodynamics/ pharmacokinetics	-
金刚乙胺 Rimantadine hydrochloride	M2 离子通道 阻滞剂 M2 ion channel blocker	抗甲型流感病毒感染 Anti-influenza A virus infection	口服 Oral	上市 On the market	有效性/药代动力学 Main pharmacodynamics/ pharmacokinetics	[129]
磷酸奥司 他韦 Oseltamivir phosphate	神经氨酸酶 抑制剂 Neuraminidase inhibitor	抗甲型流感病毒感染 Anti-influenza A virus infection	口服 Oral	上市 On the market	有效性/药代动力学 Main pharmacodynamics/ pharmacokinetics	[130]
帕拉米韦 Peramivir	神经氨酸酶 抑制剂 Neuraminidase inhibitor	抗甲型流感病毒感染 Anti-influenza A virus infection	静脉 Intravenous	上市 On the market	有效性/药代动力学 Main pharmacodynamics/ pharmacokinetics	[25]
扎那米韦 Zanamivir	神经氨酸酶 抑制剂 Neuraminidase inhibitor	抗甲型流感病毒感染 Anti-influenza A virus infection	吸入 Inhalation	上市 On the market	有效性/药代动力学 Main pharmacodynamics/ pharmacokinetics	[131]
拉尼娜米韦 Laninamivir	神经氨酸酶 抑制剂 Neuraminidase inhibitor	抗甲型流感病毒感染 Anti-influenza A virus infection	吸入 Inhalation	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[131]
阿比朵尔 Arbidol	血凝素 抑制剂 Hemagglutinin inhibitors	甲型和乙型流感及其他急性呼吸道病 毒感染;复发性疱疹感染的联合治疗 Influenza A and B and other acute respiratory viral infections; Combination therapy for recurrent herpes infection	口服 Oral	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[132]
法匹拉韦 Favipiravir	RNA 聚合酶 抑制剂 RNA polymerase inhibitors	抗甲型流感病毒感染 Anti-influenza A virus infection	口服 Oral	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[134]
玛巴洛沙韦 Baloxavir Marboxil	RNA 聚合酶 抑制剂 RNA polymerase inhibitors	抗甲型流感病毒感染 Anti-influenza A virus infection	口服 Oral	上市 On the market	有效性/药代动力学 Main pharmacodynamics/ pharmacokinetics	[26]
莫诺拉韦 Molnupiravir	RNA 聚合酶 抑制剂 RNA polymerase inhibitors	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	上市 On the market	有效性/药代动力学 Main pharmacodynamics/ pharmacokinetics	[135]
氢溴酸氩 瑞米德韦 Deuremidivir Hydrobromide	RNA 聚合酶 抑制剂 RNA polymerase inhibitors	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[136]
瑞德西韦 Remdesivir	RNA 聚合酶 抑制剂 RNA polymerase inhibitors	抗埃博拉病毒/新型冠状病毒感染 Anti-ebola virus/SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[136]
ZSP1273	RNA 聚合酶 抑制剂 RNA polymerase inhibitors	抗甲型流感和禽流感病毒感染 Anti-influenza A and avian influenza virus infection	口服 Oral	临床 III 期 Clinical phase III	有效性 Main pharmacodynamics	[137]

续表 2

药物名称/ 受试物名称 Drug name/ name of the subject	作用机制 和特点 Mechanism and characteristics of action	适应症 Indication	给药途径 Route of administration	研究阶段 Research phase	雪貂的应用方向 Application direction of ferret	参考文献 References
4'-氟尿苷 4'-Fluorouridine	RNA 聚合酶 抑制剂 RNA polymerase inhibitors	抗流感病毒/新型冠状病毒感染 Anti-influenza virus/ SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	临床前 Preclinical	有效性 Main pharmacodynamics	[138]
恩曲他滨 替诺福韦 Emtricitabine Tenofovir	RNA 聚合酶 抑制剂 RNA polymerase inhibitors	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	临床前 Preclinical	有效性 Main pharmacodynamics	[139]
GS-621763	RNA 聚合酶 抑制剂 RNA polymerase inhibitors	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	临床前 Preclinical	有效性 Main pharmacodynamics	[136]
帕克洛维 Paxlovid	3CL 蛋白酶 抑制剂 3C-like protease inhibitor	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[135]
GC376	3CL 蛋白酶抑 制剂 3C-like protease inhibitor	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	临床前 Preclinical	有效性 Main pharmacodynamics	[140]
阿那白滞素 Anakinra	白细胞介素-1 受体拮抗剂, 改善感染后的 临床症状 Interleukin-1 receptor antagonist to improve clinical symptoms after infection	抗新型冠状病毒感染, 抑制肺部炎症 Anti-SARS-Cov-2 infection, inhibit lung inflammation	皮下 Subcutaneous	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[141]
硫酸羟氯喹 Hydroxychloroquine sulfate	自噬抑制剂 Autophagy inhibitor	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	临床前 Preclinical	有效性 Main pharmacodynamics	[142]
硫唑嘌呤 Azathioprine	免疫抑制剂 Immunity inhibitor	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	临床前 Preclinical	有效性 Main pharmacodynamics	[142]
塞利尼索 Selinexor	XPO1 抑制剂 XPO1 inhibitor	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	临床前 Preclinical	有效性 Main pharmacodynamics	[143]
OL-1 and OL-2	免疫调节剂 Immunomodulator	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	口服 Oral	临床前 Preclinical	有效性 Main pharmacodynamics	[144]
DAS181	唾液酸酶 (融合蛋白) Neuraminidase (fusion protein)	抗流感病毒感染 Anti-influenza virus infection	口服 Oral	临床 II 期 Clinical phase II	有效性 Main pharmacodynamics	[145]
硝唑尼特 Nitazoxanide	HA 蛋白转运 抑制剂 HA protein transport inhibitors	抗流感病毒感染 Anti-influenza virus infection	口服 Oral	临床 III 期 Clinical phase III	有效性 Main pharmacodynamics	[146-147]
达沙韦钠 Exviera	RNA 聚合酶 抑制剂 RNA polymerase inhibitors	抗丙肝病毒感染 Anti-hepatitis C virus infection	口服 Oral	上市 On the market	安全性(安全药理) Safety (safety pharmacology)	[161]

续表 2

药物名称/ 受试物名称 Drug name/ name of the subject	作用机制 和特点 Mechanism and characteristics of action	适应症 Indication	给药途径 Route of administration	研究阶段 Research phase	雪貂的应用方向 Application direction of ferret	参考文献 References
利托那韦 Viekirax	NS3/4A 蛋白酶的抑制剂 NS3/4A protease inhibitors	抗丙肝病毒感染 Anti-hepatitis C virus infection	口服 Oral	上市 On the market	安全性(安全药理) Safety (safety pharmacology)	[162]
Arepanrix	H1N1 的单价灭活疫苗 Monovalent inactivated vaccine for H1N1	抗流感病毒感染 Anti-influenza virus infection	肌内注射 Intramuscular	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[148]
Fluenz	三价重组蛋白疫苗 Trivalent recombinant protein vaccine	抗流感病毒感染 Anti-influenza virus infection	鼻内 Intranasal	上市 On the market	有效性/安全性(安全药理, 重复给药毒性) Main pharmacodynamics/safety (safety pharmacology, repeated dose toxicity)	[149]
Fluenz tetra	四价重组蛋白疫苗 Quadrivalent recombinant protein vaccine	抗流感病毒感染 Anti-influenza virus infection	鼻内 Intranasal	上市 On the market	有效性/安全性(安全药理, 重复给药毒性) Main pharmacodynamics/safety (safety pharmacology, repeated dose toxicity)	[150]
Pandemic influenza vaccine H5N1 Medimmune	H5N1 的单价减毒疫苗 Monovalent live attenuated vaccine of H5N1	抗流感病毒感染 Anti-influenza virus infection	鼻内 Intranasal	上市 On the market	有效性/安全性(安全药理, 重复给药毒性) Main pharmacodynamics/safety (safety pharmacology, repeated dose toxicity)	[151]
Focetria	HA 和 NA 的三价裂解疫苗 HA and NA trivalent split vaccine	抗流感病毒感染 Anti-influenza virus infection	肌内注射 Intramuscular	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[152]
H1N1 疫苗 Pandemrix	H1N1 的单价灭活疫苗 Monovalent inactivated vaccine for H1N1	抗流感病毒感染 Anti-influenza virus infection	肌内注射 Intramuscular	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[153]
Pumarix	H5N1 的单价灭活疫苗 Monovalent inactivated vaccine for H5N1	抗流感病毒感染 Anti-influenza virus infection	肌内注射 Intramuscular	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[154]
Prepandrix	H5N1 的单价灭活疫苗 Monovalent inactivated vaccine for H5N1	抗禽流感病毒感染 Anti-avian influenza virus infection	肌内注射 Intramuscular	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[155]
Vaxzevria	刺突蛋白单价重组蛋白疫苗 Monovalent recombinant protein vaccine of spike protein	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	肌内注射 Intramuscular	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[156]

续表 2

药物名称/ 受试物名称 Drug name/ name of the subject	作用机制 和特点 Mechanism and characteristics of action	适应症 Indication	给药途径 Route of administration	研究阶段 Research phase	雪貂的应用方向 Application direction of ferret	参考文献 References
瑞丹维单抗 Regdanvimab	单克隆抗体(刺突蛋白的受体结合域) Monoclonal antibody (receptor binding domain of spike protein)	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	静脉注射 Intravenous	上市 On the market	有效性 Main pharmacodynamics	[157,27]
MEDI8852	单克隆抗体(血凝素蛋白) Monoclonal antibody hemagglutinin)	抗流感病毒感染, oral administration	静脉注射 Intravenous	临床 II 期 Clinical phase II	有效性 Main pharmacodynamics	[158-159]
莱乃康 (胎盘素) Laennec (placenta)	增强免疫 Immuno-enhancement	抗新型冠状病毒感染 Anti-SARS-Cov-2 infection	静脉注射 Intravenous	临床前 Preclinical	有效性 Main pharmacodynamics	[160]

法导致大量的抗体无法被满足,研究者仅能通过间接测量免疫基因表达(如 RT-PCR、转录组分析或寡核苷酸微阵列)来考察雪貂对病原体的免疫反应机制。

6 总结与展望

自 20 世纪初以来,雪貂一直被用作抗流感病毒研究的动物模型,随着它们对人类病毒,尤其是野生型的呼吸道病毒^[170]的易感性优势日益明显,更多的病原体(如细菌、真菌等)陆续被尝试,虽然雪貂对细菌和真菌感染的种属特异性弱于病毒,但因其感染后的临床症状与人类相似^[171-172],且能在个体之间进行感染性传播^[13],因此雪貂作为细菌类病原微生物感染的研究仍具有一定种属优势。此外,雪貂感染性模型在表征机会性感染和不同接种途径、气溶胶传播动力学以及免疫抑制或共病背景下感染的潜力仍处于初期探索阶段^[57],作为感染性疾病和感染性药物研究的工具仍具有进一步开发和应用的巨大空间。因特异性试剂(如单克隆抗体、引物等)的缺乏^[40-41],雪貂在感染性疾病中的应用方向主要集中于致病机制、传播研究和抗病毒疫苗的临床前评价,较少涉及病原体感染后的免疫学机制研究。遗憾的是,雪貂在我国仍属于非标准实验动物,尚无相关的国家标准,其进一步扩大应用受限于其特异性试剂的开发和实验动物标准化。

6.1 雪貂的实验动物化进展

雪貂并非我国的本土动物,在我国的应用历史较短,21 世纪初引入我国后,其配套饲养设施、遗传

质量、微生物和寄生虫学等相关的规范以及进一步的动物实验操作规范和相应的背景数据仍较为缺乏。目前仅有江苏和湖南两个省份颁布了相关的地方标准^[173-176]。江苏省颁布的 DB32/T 2731—2015《实验用雪貂》包括 3 部分,环境及设施(第 1 部分)、配合饲料(第 2 部分)和遗传、微生物和寄生虫控制(第 3 部分),湖南省颁布了 DB43/T 2288—2022《实验用雪貂的饲养环境及设施规范》,可供雪貂在动物生产质量控制和实验应用方面参考,但地方标准更多的是反映实验用动物的地方特色和局部地区应用情况^[177],标准中的部分内容不具有普适性,仍需通过更大范围的应用实践和验证性实验,才能提升标准中各条款内容的科学性、可靠性和权威性^[177-178]。关于雪貂的国家标准,需要考虑以下 5 个方面:(1)雪貂的微生物检测项目中,必检项目过少,包括流感病毒、犬瘟热病毒均属于非必检项目,但往往这些病毒属于雪貂感染模型中研究较多的病原体,因此建议进一步优化微生物检测项目内容,以满足基本的科研需求;(2)雪貂的繁殖仅限于封闭群,虽能保持种群的基因多态性,但同样会导致动物生物学反应个体差异大的缺点,鉴于雪貂的生命周期和性成熟周期短、多胎生的生理特点,未来可考虑进一步培育具有不同生物学特性的近交系动物,以满足相应科学研究的需求;(3)已颁布的标准仅适用于普通级雪貂,不适用于 SPF 级雪貂,鉴于雪貂对多种病原微生物的易感性,建议进一步开发 SPF 级雪貂,以减少自发病对实验结果的

影响^[1]; (4) 标准中缺乏雪貂的实验动物管理和福利伦理相关条款, 建议在逐步扩大雪貂应用范围的同时, 建立符合雪貂基本伦理福利需求的审查体系^[179]; (5) 此外, 实验操作相关的规范和标准需进一步建立, 例如生物学特性数据测定、实验基本操作技术、常用感染模型的制备等^[177]。

6.2 雪貂的应用前景展望

雪貂在研究多种人类感染性疾病的发病机制和传播以及疫苗的临床前评价方面具有巨大的应用价值, 通过进一步的实验动物标准化和特异性试剂的开发能完善雪貂在感染性疾病领域的应用, 尤其是针对新发现病原体的研究可能较其他动物种属具有更大的应用价值^[22, 180]。

参 考 文 献 (References)

- [1] QUESENBERRY K E, CARPENTER J W. Ferrets, rabbits, and rodents; clinical medicine and surgery [J]. *Can Vet J*, 2014, 55(4): 365.
- [2] JOHNSON-DELANEY C A, OROSZ S E. Ferret respiratory system; clinical anatomy, physiology, and disease [J]. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 2011, 14(2): 357-367.
- [3] 栗世婷, 何琳. 复制人类疾病动物模型时应注意的问题 [J]. *疾病监测与控制*, 2015, 9(9): 637-638.
LI S T, HE L. Issues to be noted when replicating human disease animal model [J]. *J Dis Monit Contr*, 2015, 9(9): 637-638.
- [4] 黄红坤, 唐小江, 严家荣, 等. 人类疾病动物模型资源数据库的构建 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31(4): 36-40.
HUANG H K, TANG X J, YAN J R, et al. Construction of resource database for animal models of human disease [J]. *Lab Anim Sci*, 2014, 31(4): 36-40.
- [5] 李会萍, 张文娟. 基于数据挖掘的人类疾病动物模型资源共享平台的设计与思考 [J]. *科技管理研究*, 2022, 42(18): 144-149.
LI H P, ZHANG W J. Design and thinking on resource sharing platform of animal models of human diseases based on data mining [J]. *Sci Technol Manag Res*, 2022, 42(18): 144-149.
- [6] 李博, 王磊, 赵伟, 等. 雪貂食管的形态学及其分子标记物的表达谱 [J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(3): 428-435.
LI B, WANG L, ZHAO W, et al. Morphology of the esophagus of ferrets and expression profile of molecular markers [J]. *J South Med Univ*, 2023, 43(3): 428-435.
- [7] 马丽娜, 李健, 叶祖光. 常用呕吐动物模型研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(13): 206-213.
MA L N, LI J, YE Z G. Commonly used vomiting animal models [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2019, 25(13): 206-213.
- [8] BELSER J A, ECKERT A M, HUYNH T, et al. A guide for the use of the ferret model for influenza virus infection [J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(1): 11-24.
- [9] KWON H I, KIM E H, KIM Y I, et al. Comparison of the pathogenic potential of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N6, and H5N8 viruses isolated in South Korea during the 2016-2017 winter season [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 29.
- [10] KIM E H, PARK S J, KWON H I, et al. Mouse adaptation of influenza B virus increases replication in the upper respiratory tract and results in droplet transmissibility in ferrets [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15940.
- [11] RIJSBERGEN L C, SCHMITZ K S, BEGEMAN L, et al. Modeling infection and tropism of human parainfluenza virus type 3 in ferrets [J]. *mBio*, 2021, 13(1): e0383121.
- [12] GUPTA T, SOMANNA N, ROWE T, et al. Ferrets as a model for tuberculosis transmission [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 873416.
- [13] SCHIFFMAN Z, LIU G, CAO W, et al. The ferret as a model for filovirus pathogenesis and countermeasure evaluation [J]. *ILAR J*, 2022, 61(1): 62-71.
- [14] PULIT-PENALOZA J A, BELSER J A, SUN X, et al. Comparative assessment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 variants in the ferret model [J]. *mBio*, 2022, 13(5): e0242122.
- [15] HUANG S S H, BANNER D, PAQUETTE S G, et al. Pathogenic influenza B virus in the ferret model establishes lower respiratory tract infection [J]. *J Gen Virol*, 2014, 95: 2127-2139.
- [16] JAYARAMAN A, CHANDRASEKARAN A, VISWANATHAN K, et al. Decoding the distribution of glycan receptors for human-adapted influenza A viruses in ferret respiratory tract [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e27517.
- [17] 占玲俊, 邓巍, 鲍琳琳, 等. 唾液酸受体并非流感病毒各亚型在雪貂组织中播散分布的决定因子 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(4): 23-26, 88-90.
ZHAN L J, DENG W, BAO L L, et al. Sialic acid receptors are not determinant factors for the organ distribution of different subtype influenza viruses in ferret [J]. *Chin J Comp Med*, 2012, 22(4): 23-26, 88-90.
- [18] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [19] HAMMING I, TIMENS W, BULTHUIS M L C, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis [J]. *J Pathol*, 2004, 203(2): 631-637.
- [20] HE Q, MOK T N, YUN L, et al. Single-cell RNA sequencing analysis of human kidney reveals the presence of ACE2 receptor: a potential pathway of COVID-19 infection [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(10): e1442.
- [21] ZHAO Y, WANG C L, GAO Z Y, et al. Ferrets: a powerful model of SARS-CoV-2 [J]. *Zool Res*, 2023, 44(2): 323-330.
- [22] CHEN J, FAN J, CHEN Z, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA facilitates SARS-CoV-2 infection in human pulmonary cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118

- (50): e2111011118.
- [23] WATSON R J, TREE J, FOTHERINGHAM S A, et al. Dose-dependent response to infection with Ebola virus in the ferret model and evidence of viral evolution in the eye [J]. *J Virol*, 2021, 95(24): e0083321.
- [24] ROWE H M, LIVINGSTON B, MARGOLIS E, et al. Respiratory bacteria stabilize and promote airborne transmission of influenza A virus [J]. *mSystems*, 2020, 5(5): e00762-e00720.
- [25] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Summary of zanamivir application information [EB/OL]. [1999-12-27]. https://www.pmda.go.jp/drugs/1999/g991201/81ctdp_1-278.pdf.
- [26] Food and Drug Administration. Antimicrobial drugs advisory committee meeting briefing document: molnupiravir-oral treatment of COVID-19 [EB/OL]. [2021-11-30]. <https://www.fda.gov/media/154421/download>.
- [27] European Medicines Agency. Public-assessment-report (regkirona) [EB/OL]. [2021-11-11]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/regkirona-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [28] KIM Y I, YU K M, KOH J Y, et al. Age-dependent pathogenic characteristics of SARS-CoV-2 infection in ferrets [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 21.
- [29] PRINCE G A, PORTER D D. The pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in infant ferrets [J]. *Am J Pathol*, 1976, 82(2): 339-352.
- [30] TAYLOR G. Animal models of respiratory syncytial virus infection [J]. *Vaccine*, 2017, 35(3): 469-480.
- [31] SUFFIN S C, PRINCE G A, MUCK K B, et al. Immunoprophylaxis of respiratory syncytial virus infection in the infant ferret [J]. *J Immunol*, 1979, 123(1): 10-14.
- [32] PARK S J, KIM Y I, PARK A, et al. Ferret animal model of severe fever with thrombocytopenia syndrome phlebovirus for human lethal infection and pathogenesis [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(3): 438-446.
- [33] BISSEL S J, CARTER C E, WANG G, et al. Age-related pathology associated with H1N1 A/california/07/2009 influenza virus infection [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(12): 2389-2399.
- [34] RIOUX M, FRANCIS M E, SWAN C L, et al. The intersection of age and influenza severity: utility of ferrets for dissecting the age-dependent immune responses and relevance to age-specific vaccine development [J]. *Viruses*, 2021, 13(4): 678.
- [35] CHEN S, KASPER B, ZHANG B, et al. Age-dependent glycomic response to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus and its association with disease severity [J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(11): 4486-4495.
- [36] DIEP B A, HILLIARD J J, LE V T, et al. Targeting alpha toxin to mitigate its lethal toxicity in ferret and rabbit models of *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(4): e02456-e02416.
- [37] ROWE H M, KARLSSON E, ECHLIN H, et al. Bacterial factors required for transmission of *Streptococcus pneumoniae* in mammalian hosts [J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(6): 884-891.
- [38] NGUYEN T Q, ROLLON R, CHOI Y K. Animal models for influenza research: strengths and weaknesses [J]. *Viruses*, 2021, 13(6): 1011.
- [39] ALBRECHT R A, LIU W C, SANT A J, et al. Moving forward: recent developments for the ferret biomedical research model [J]. *mBio*, 2018, 9(4): e01113-e01118.
- [40] WONG J, LAYTON D, WHEATLEY A K, et al. Improving immunological insights into the ferret model of human viral infectious disease [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2019, 13(6): 535-546.
- [41] REKSTIN A, SPARROW E G, TORELLI G, et al. Cross-Protective efficacy of monovalent live influenza B vaccines against genetically different lineages of B/Victoria and B/Yamagata in ferrets [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 9695628.
- [42] JONES J C, PASCUA P N Q, FABRIZIO T P, et al. Influenza A and B viruses with reduced baloxavir susceptibility display attenuated *in vitro* fitness but retain ferret transmissibility [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(15): 8593-8601.
- [43] HILL-BATORSKI L, HATTA Y, MOSER M J, et al. Quadrivalent formulation of intranasal influenza vaccine M2SR (M2-deficient single replication) protects against drifted influenza A and B virus challenge [J]. *Vaccines*, 2023, 11(4): 798.
- [44] PARK J, FONG LEGASPI S L, SCHWARTZMAN L M, et al. An inactivated multivalent influenza A virus vaccine is broadly protective in mice and ferrets [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(653): eabo2167.
- [45] BELSER J A, PULIT-PENALOZA J A, MAINES T R. Ferreting out influenza virus pathogenicity and transmissibility: past and future risk assessments in the ferret model [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10(7): a038323.
- [46] CHAN K F, CAROLAN L A, DRUCE J, et al. Pathogenesis, humoral immune responses, and transmission between cohoused animals in a ferret model of human respiratory syncytial virus infection [J]. *J Virol*, 2018, 92(4): e01322-e01317.
- [47] MOORE M L, PEEBLES R S Jr. Respiratory syncytial virus disease mechanisms implicated by human, animal model, and *in vitro* data facilitate vaccine strategies and new therapeutics [J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 112(2): 405-424.
- [48] HEYLEN E, NEYTS J, JOCHMANS D. Drug candidates and model systems in respiratory syncytial virus antiviral drug discovery [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 127: 1-12.
- [49] SHI J, WEN Z, ZHONG G, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2 [J]. *Science*, 2020, 368(6494): 1016-1020.
- [50] PANDEY K, ACHARYA A, MOHAN M, et al. Animal models for SARS-CoV-2 research: a comprehensive literature review [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68(4): 1868-1885.

- [51] WEISS S R, NAVAS-MARTIN S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69(4): 635–664.
- [52] ZHANG Y, NIEWIESK S, LI J. Small animal models for human metapneumovirus: cotton rat is more permissive than *Hamster* and mouse [J]. *Pathogens*, 2014, 3(3): 633–655.
- [53] SCHILDGEN O, SIMON A, WILLIAMS J. Animal models for human metapneumovirus (HMPV) infections [J]. *Vet Res*, 2007, 38(1): 117–126.
- [54] MACPHAIL M, SCHICKLI J H, TANG R S, et al. Identification of small-animal and primate models for evaluation of vaccine candidates for human metapneumovirus (hMPV) and implications for hMPV vaccine design [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(6): 1655–1663.
- [55] COX R M, SOURIMANT J, GOVINDARAJAN M, et al. Therapeutic targeting of measles virus polymerase with ERDRP-0519 suppresses all RNA synthesis activity [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(2): e1009371.
- [56] ENKIRCH T, VON MESSLING V. Ferret models of viral pathogenesis [J]. *Virology*, 2015, 479/480: 259–270.
- [57] LAKSONO B M, DE VRIES R D, DUPREX W P, et al. Measles pathogenesis, immune suppression and animal models [J]. *Curr Opin Virol*, 2020, 41: 31–37.
- [58] SIERING O, SAWATSKY B, PFALLER C K. C protein is essential for canine distemper virus virulence and pathogenicity in ferrets [J]. *J Virol*, 2021, 95(4): e01840-e01820.
- [59] BENNETT A J, PASKEY A C, EBINGER A, et al. Relatives of rubella virus in diverse mammals [J]. *Nature*, 2020, 586(7829): 424–428.
- [60] RORKE L B, FABIYI A, ELIZAN T S, et al. Experimental cerebrovascular lesions in congenital and neonatal rubella-virus infections of ferrets [J]. *Lancet*, 1968, 2(7560): 153–154.
- [61] THORMAR H, MEHTA P D, BROWN H R. Comparison of wild-type and subacute sclerosing panencephalitis strains of measles virus. Neurovirulence in ferrets and biological properties in cell cultures [J]. *J Exp Med*, 1978, 148(3): 674–691.
- [62] TRIFONOVA E A, ZENIN V A, NIKITIN N A, et al. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus [J]. *Antiviral Res*, 2017, 144: 27–33.
- [63] FABIYI A, GITNICK G L, SEVER J L. Chronic rubella virus infection in the ferret (*Mustela putorius fero*) puppy [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1967, 125(3): 766–771.
- [64] CROSS R W, FENTON K A, GEISBERT T W. Small animal models of filovirus disease; recent advances and future directions [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2018, 13(11): 1027–1040.
- [65] BANADYGA L, WONG G, QIU X. Small animal models for evaluating filovirus countermeasures [J]. *ACS Infect Dis*, 2018, 4(5): 673–685.
- [66] KOZAK R, HE S, KROEKER A, et al. Ferrets infected with bundibugyo virus or ebola virus recapitulate important aspects of human filovirus disease [J]. *J Virol*, 2016, 90(20): 9209–9223.
- [67] BANADYGA L, SCHIFFMAN Z, HE S, et al. Virus inoculation and treatment regimens for evaluating anti-filovirus monoclonal antibody efficacy *in vivo* [J]. *Biosaf Health*, 2019, 1(1): 6–13.
- [68] YAN F, HE S, BANADYGA L, et al. Characterization of reston virus infection in ferrets [J]. *Antiviral Res*, 2019, 165: 1–10.
- [69] SATTERFIELD B A, CROSS R W, FENTON K A, et al. Nipah virus C and W proteins contribute to respiratory disease in ferrets [J]. *J Virol*, 2016, 90(14): 6326–6343.
- [70] CLAYTON B A, MIDDLETON D, ARKINSTALL R, et al. The nature of exposure drives transmission of Nipah viruses from Malaysia and Bangladesh in ferrets [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(6): e0004775.
- [71] THAKUR N, BAILEY D. Advances in diagnostics, vaccines and therapeutics for Nipah virus [J]. *Microbes Infect*, 2019, 21(7): 278–286.
- [72] STEVENS C S, LOWRY J, JUELICH T, et al. Nipah virus Bangladesh infection elicits organ-specific innate and inflammatory responses in the marmoset model [J]. *J Infect Dis*, 2023, 228(5): 604–614.
- [73] WELCH S R, SCHOLTE F E M, HARMON J R, et al. *In situ* imaging of fluorescent Nipah virus respiratory and neurological tissue tropism in the Syrian *Hamster* model [J]. *J Infect Dis*, 2020, 221(4): S448-S453.
- [74] EDWARDS S J, ROWE B, REID T, et al. Henipavirus-induced neuropathogenesis in mice [J]. *Virology*, 2023, 587: 109856.
- [75] GEISBERT J B, BORISEVICH V, PRASAD A N, et al. An intranasal exposure model of lethal Nipah virus infection in African green monkeys [J]. *J Infect Dis*, 2020, 221(4): S414-S418.
- [76] XU P, HUANG Z, GAO X, et al. Infection of mice, ferrets, and rhesus macaques with a clinical mumps virus isolate [J]. *J Virol*, 2013, 87(14): 8158–8168.
- [77] PARKER L, GILLILAND S M, MINOR P, et al. Assessment of the ferret as an *in vivo* model for mumps virus infection [J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(6): 1200–1205.
- [78] LANG BALIJA M, ŠTIMAC A, KOŠUČIĆ GULIJA T, et al. Evaluation of the interactions between mumps virus and guinea pig [J]. *J Virol*, 2023, 97(4): e0035923.
- [79] DURBIN A P, ELKINS W R, MURPHY B R. African green monkeys provide a useful nonhuman primate model for the study of human parainfluenza virus types-1, -2, and-3 infection [J]. *Vaccine*, 2000, 18(22): 2462–2469.
- [80] HENRICKSON K J. Parainfluenza viruses [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16(2): 242–264.
- [81] DONG X M, ZHU Y M, CAI H, et al. Studies on the pathogenesis of a Chinese strain of bovine parainfluenza virus type 3 infection in BALB/c mice [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 158(1/2): 199–204.
- [82] DRAKE M G, BIVINS-SMITH E R, PROSKOCIL B J, et al. Human and mouse eosinophils have antiviral activity against

- parainfluenza virus [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(3): 387–394.
- [83] BURKE C W, BRIDGES O, BROWN S, et al. Mode of parainfluenza virus transmission determines the dynamics of primary infection and protection from reinfection [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(11): e1003786.
- [84] HAO F, WANG Z, MAO L, et al. The novel caprine parainfluenza virus type 3 showed pathogenicity in guinea pigs [J]. *Microb Pathog*, 2019, 134: 103569.
- [85] GANAIE S S, SCHWARZ M M, MCMILLEN C M, et al. Lrp1 is a host entry factor for Rift Valley fever virus [J]. *Cell*, 2021, 184(20): 5163–5178.
- [86] DOYLE J D, BARBEAU D J, CARTWRIGHT H N, et al. Immune correlates of protection following Rift Valley fever virus vaccination [J]. *NPJ Vaccines*, 2022, 7(1): 129.
- [87] SCHWARZ M M, CONNORS K A, DAVOLI K A, et al. Rift valley fever virus infects the posterior segment of the eye and induces inflammation in a rat model of ocular disease [J]. *J Virol*, 2022, 96(20): e0111222.
- [88] ROSS T M, BHARDWAJ N, BISSEL S J, et al. Animal models of Rift Valley fever virus infection [J]. *Virus Res*, 2012, 163(2): 417–423.
- [89] LI T C, YANG T, AMI Y, et al. Complete genome of hepatitis E virus from laboratory ferrets [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(4): 709–712.
- [90] YANG T, KATAOKA M, AMI Y, et al. Characterization of self-assembled virus-like particles of ferret hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses [J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(12): 2647–2656.
- [91] LI T C, YANG T, YOSHIKAWA S, et al. Ferret hepatitis E virus infection induces acute hepatitis and persistent infection in ferrets [J]. *Vet Microbiol*, 2016, 183: 30–36.
- [92] LEAN F Z X, LEBLOND A L, BYRNE A M P, et al. Subclinical hepatitis E virus infection in laboratory ferrets in the UK [J]. *J Gen Virol*, 2022, 103(11): 1–10.
- [93] BYROM AE, CALEY P, PATERSON BM, et al. Feral ferrets (*Mustela furo*) as hosts and sentinels of tuberculosis in New Zealand [J]. *N Z Vet J*, 2015, 63(1): 42–53.
- [94] BASARABA R J, HUNTER R L. Pathology of tuberculosis: how the pathology of human tuberculosis informs and directs animal models [J]. *Microbiol Spectr*, 2017, 5(3): 1–10.
- [95] SINGH A K, GUPTA U D. Animal models of tuberculosis: Lesson learnt [J]. *Indian J Med Res*, 2018, 147(5): 456–463.
- [96] DOMASZEWSKA T, SCHEUERMANN L, HAHNKE K, et al. Concordant and discordant gene expression patterns in mouse strains identify best-fit animal model for human tuberculosis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12094.
- [97] SÁNCHEZ-GARIBAY C, HERNÁNDEZ-CAMPOS M E, TENASUCK M L, et al. Experimental animal models of central nervous system tuberculosis: a historical review [J]. *Tuberculosis*, 2018, 110: 1–6.
- [98] RAGG J R, WALDRUP K A, MOLLER H. The distribution of gross lesions of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in feral ferrets (*Mustela furo*) from Otago, New Zealand [J]. *N Z Vet J*, 1995, 43(7): 338–341.
- [99] WAGH S, RATHI C, LUKKA P B, et al. Model-based exposure-response assessment for spectinomide 1810 in a mouse model of tuberculosis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021, 65(11): e0174420.
- [100] SCHLUGER N W. Of mice and men, women, and children: using animal models to inform tuberculosis clinical trials of novel agents [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(5): 493–494.
- [101] BUGSAN A N, MEHRA S, KHADER S A, et al. The current state of animal models and genomic approaches towards identifying and validating molecular determinants of *Mycobacterium tuberculosis* infection and tuberculosis disease [J]. *Pathog Dis*, 2019, 77(4): ftz037.
- [102] KURTZ S L, ROSSI A P, BEAMER G L, et al. The diversity outbred mouse population is an improved animal model of vaccination against tuberculosis that reflects heterogeneity of protection [J]. *mSphere*, 2020, 5(2): e00097-e00020.
- [103] NOTO J M, ROMERO-GALLO J, PIAZUELO M B, et al. The mongolian gerbil: a robust model of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422: 263–280.
- [104] JEFFRIES L, BUCKLEY D E, BLOWER P R, et al. Comparative sensitivities to antimicrobial agents of *Campylobacter pylori* and the gastric *Campylobacter* like organism from the ferret [J]. *J Clin Pathol*, 1987, 40(10): 1265–1267.
- [105] AMIEVA M, PEEK R M Jr. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(1): 64–78.
- [106] WERAWATGANON D. Simple animal model of *Helicobacter pylori* infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(21): 6420–6424.
- [107] LIN A S, MCCLAIN M S, BECKETT A C, et al. Temporal control of the *Helicobacter pylori* cag type iv secretion system in a mongolian gerbil model of gastric carcinogenesis [J]. *mBio*, 2020, 11(3): e01296-e01320.
- [108] ANSARI S, YAMAOKA Y. Animal models and *Helicobacter pylori* infection [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(11): 3141.
- [109] FOX J G, CORREA P, TAYLOR N S, et al. *Helicobacter mustelae*-associated gastritis in ferrets. An animal model of *Helicobacter pylori* gastritis in humans [J]. *Gastroenterology*, 1990, 99(2): 352–361.
- [110] BITZAN M M, GOLD B D, PHILPOTT D J, et al. Inhibition of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* binding to lipid receptors by bovine colostrum [J]. *J Infect Dis*, 1998, 177(4): 955–961.
- [111] ZANGARI T, WANG Y, WEISER J N. *Streptococcus pneumoniae* transmission is blocked by type-specific immunity in an infant mouse model [J]. *mBio*, 2017, 8(2):

- e00188-e00117.
- [112] GANGULY T, PETERSON A M, KAJFASZ J K, et al. Zinc import mediated by AdcABC is critical for colonization of the dental biofilm by *Streptococcus mutans* in an animal model [J]. Mol Oral Microbiol, 2021, 36(3): 214–224.
- [113] ORTIGOZA M B, BLASER S B, ZAFAR M A, et al. An infant mouse model of influenza virus transmission demonstrates the role of virus-specific shedding, humoral immunity, and sialidase expression by colonizing *Streptococcus pneumoniae* [J]. mBio, 2018, 9(6): e02359-e02318.
- [114] FRENCH A J, ROCKEY N C, LE SAGE V, et al. Detection of influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* in air sampled from co-infected ferrets and analysis of their influence on pathogen stability [J]. mSphere, 2023, 8(4): e0003923.
- [115] LARCOMBE S, JIANG J H, HUTTON M L, et al. A mouse model of *Staphylococcus aureus* small intestinal infection [J]. J Med Microbiol, 2020, 69(2): 290–297.
- [116] PLUMET L, AHMAD-MANSOUR N, DUNYACH-REMY C, et al. Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* infections; a review of animal models, treatments, and clinical trials [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 907314.
- [117] KAHL B C. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract coinfection-what can we learn from animal models? [J]. J Infect Dis, 2018, 217(6): 854–856.
- [118] MARTÍNEZ-SEIJAS C, MASCARÓS P, LIZANA V, et al. Genomic characterization of *Staphylococcus aureus* in wildlife [J]. Animals (Basel), 2023, 13(6): 1064.
- [119] WRIGHT A, ANDREWS P L, TITBALL R W. Induction of emetic, pyrexia, and behavioral effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in the ferret [J]. Infect Immun, 2000, 68(4): 2386–2389.
- [120] SANFORD B A, RAMSAY M A. *In vivo* localization of *Staphylococcus aureus* in nasal tissues of healthy and influenza A virus-infected ferrets [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1989, 191(2): 163–169.
- [121] SIEMENS N, OEHMCKE-HECHT S, METTENLEITER T C, et al. Port d'Entrée for respiratory infections-does the influenza A virus pave the way for bacteria? [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2602.
- [122] WOODS J B, SCHMITT C K, DARNELL S C, et al. Ferrets as a model system for renal disease secondary to intestinal infection with *Escherichia coli* O157: H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* [J]. J Infect Dis, 2002, 185(4): 550–554.
- [123] PHILIPSON C W, BASSAGANYA-RIERA J, HONTECILLAS R. Animal models of enteroaggregative *Escherichia coli* infection [J]. Gut Microbes, 2013, 4(4): 281–291.
- [124] DALGAKIRAN F, WITCOMB L A, MCCARTHY A J, et al. Non-invasive model of neuropathogenic *Escherichia coli* infection in the neonatal rat [J]. J Vis Exp, 2014, 92: e52018.
- [125] SELBY C M, GRAHAM B D, GRAHAM L E, et al. Research Note; Application of an *Escherichia coli* spray challenge model for neonatal broiler chickens [J]. Poult Sci, 2021, 100(4): 100988.
- [126] RITCHIE J M. Animal models of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection [J]. Microbiol Spectr, 2014, 2(4): EHEC-0022–2013.
- [127] European Medicines Agency. Guideline on influenza vaccines, non-clinical and clinical module. [EB/OL]. [2016–07–21]. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/influenza-vaccines-non-clinical-clinical-module_en.pdf.
- [128] SWEET C, HAYDEN F G, JAKEMAN K J, et al. Virulence of rimantadine-resistant human influenza A (H3N2) viruses in ferrets [J]. J Infect Dis, 1991, 164(5): 969–972.
- [129] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Summary of Oseltamivir application information [EB/OL]. [2000–12–12]. https://www.pmda.go.jp/drugs/2000/g001202/70ctdp_249-414.pdf.
- [130] Food and Drug Administration. Pharmacology Review [EB/OL]. [2013–12–23]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/206426Orig1s000PharmR.pdf.
- [131] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Summary of Laninamivir application information [EB/OL]. [2010–09–10]. https://www.pmda.go.jp/drugs/2010/P201000050/430574000_22200AMX00925_H100_1.pdf.
- [132] WANG Y, DING Y, YANG C, et al. Inhibition of the infectivity and inflammatory response of influenza virus by Arbidol hydrochloride *in vitro* and *in vivo* (mice and ferret) [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 91: 393–401.
- [133] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Summary of Favipiravir application information [EB/OL]. [2014–03–24]. https://www.pmda.go.jp/drugs/2014/P201400047/480297000_22600AMX00533_H100_1.pdf.
- [134] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Summary of Baloxavir marboxil application information [EB/OL]. [2018–02–23]. https://www.pmda.go.jp/drugs/2018/P20180312001/340018000_23000AMX00434_H100_1.pdf.
- [135] COX R M, LIEBER C M, WOLF J D, et al. Comparing molnupiravir and nirmatrelvir/ritonavir efficacy and the effects on SARS-CoV-2 transmission in animal models [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 4731.
- [136] COX R M, WOLF J D, LIEBER C M, et al. Oral prodrug of remdesivir parent GS-441524 is efficacious against SARS-CoV-2 in ferrets [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 6415.
- [137] CHEN X, MA Q, ZHAO M, et al. Preclinical study of ZSP1273, a potent antiviral inhibitor of cap binding to the PB2 subunit of influenza A polymerase [J]. Pharmaceuticals, 2023, 16(3): 365.
- [138] SOURIMANT J, LIEBER C M, AGGARWAL M, et al. 4'-Fluorouridine is an oral antiviral that blocks respiratory syncytial virus and SARS-CoV-2 replication [J]. Science, 2022, 375(6577): 161–167.
- [139] ZAPATA-CARDONA M I, FLOREZ-ALVAREZ L, GUERRA-SANDOVAL A L, et al. *In vitro* and *in silico* evaluation of antiretrovirals against SARS-CoV-2: a drug repurposing approach

- [J]. AIMS Microbiol, 2023, 9(1): 20–40.
- [140] SHARUN K, TIWARI R, DHAMA K. Protease inhibitor GC376 for COVID-19; Lessons learned from feline infectious peritonitis [J]. Ann Med Surg, 2021, 61: 122–125.
- [141] WU Z X, BARKER J S, BATCHELOR T P, et al. Interleukin (IL)-1 regulates ozone-enhanced tracheal smooth muscle responsiveness by increasing substance P (SP) production in intrinsic airway neurons of ferret [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2008, 164(3): 300–311.
- [142] PARK S J, YU K M, KIM Y I, et al. Antiviral efficacies of FDA-approved drugs against SARS-CoV-2 infection in ferrets [J]. mBio, 2020, 11(3): e01114–e01120.
- [143] KASHYAP T, MURRAY J, WALKER C J, et al. Selinexor, a novel selective inhibitor of nuclear export, reduces SARS-CoV-2 infection and protects the respiratory system *in vivo* [J]. Antiviral Res, 2021, 192: 105115.
- [144] LEHTINEN M J, KUMAR R, ZABEL B, et al. The effect of the probiotic consortia on SARS-CoV-2 infection in ferrets and on human immune cell response *in vitro* [J]. iScience, 2022, 25(6): 104445.
- [145] CHAN R W, CHAN M C, WONG A C, et al. DAS181 inhibits H5N1 influenza virus infection of human lung tissues [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(9): 3935–3941.
- [146] MIFSUD E J, TILMANIS D, OH D Y, et al. Prophylaxis of ferrets with nitazoxanide and oseltamivir combinations is more effective at reducing the impact of influenza a virus infection compared to oseltamivir monotherapy [J]. Antiviral Res, 2020, 176: 104751.
- [147] TILMANIS D, KOSZALKA P, BARR I G, et al. Host-targeted nitazoxanide has a high barrier to resistance but does not reduce the emergence or proliferation of oseltamivir-resistant influenza viruses *in vitro* or *in vivo* when used in combination with oseltamivir [J]. Antiviral Res, 2020, 180: 104851.
- [148] European Medicines Agency. Public-assessment-report (arepanrix) [EB/OL]. [2010–04–26]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/arepanrix-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [149] European Medicines Agency. Public-assessment-report (fluenz) [EB/OL]. [2014–12–03]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/fluenz-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [150] European Medicines Agency. Public-assessment-report (fluenz-tetra) [EB/OL]. [2013–12–17]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/fluenz-tetra-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [151] European Medicines Agency. Public-assessment-report (pandemic-influenza-vaccine-h5n1-medimmune) [EB/OL]. [2016–06–02]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/pandemic-influenza-vaccine-h5n1-medimmune-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [152] European Medicines Agency. Public-assessment-report (focetria) [EB/OL]. [2009–10–01]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/focetria-epar-assessment-report_en.pdf.
- [153] European Medicines Agency. Public-assessment-report (pandemrix) [EB/OL]. [2008–06–03]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/pandemrix-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [154] European Medicines Agency. Public-assessment-report (pumarix) [EB/OL]. [2011–04–05]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/pumarix-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [155] European Medicines Agency (EMA). Public-assessment-report (prepandrix) [EB/OL]. [2008–06–03]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/prepandrix-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [156] European Medicines Agency (EMA). Public-assessment-report (vaxzevria) [EB/OL]. [2021–02–18]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [157] RYU D K, SONG R, KIM M, et al. Therapeutic effect of CT-P59 against SARS-CoV-2 South African variant [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 566: 135–140.
- [158] KALLEWAARD N L, CORTI D, COLLINS P J, et al. Structure and function analysis of an antibody recognizing all influenza A subtypes [J]. Cell, 2016, 166(3): 596–608.
- [159] PAULES C I, LAKDAWALA S, MCAULIFFE J M, et al. The hemagglutinin A stem antibody MEDI8852 prevents and controls disease and limits transmission of pandemic influenza viruses [J]. J Infect Dis, 2017, 216(3): 356–365.
- [160] KIM E H, KIM Y I, JANG S G, et al. Antiviral effects of human placenta hydrolysate (Laennec®) against SARS-CoV-2 *in vitro* and in the ferret model [J]. J Microbiol, 2021, 59(11): 1056–1062.
- [161] European Medicines Agency. Public-assessment-report (exviera) [EB/OL]. [2015–02–12]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/exviera-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [162] European Medicines Agency. Public-assessment-report (viekirax) [EB/OL]. [2015–09–03]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/viekirax-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [163] VIDAL-TORRES A, FERNÁNDEZ-PASTOR B, GARCÍA M, et al. Bispecific sigma-1 receptor antagonism and mu-opioid receptor partial agonism: WLB-73502, an analgesic with improved efficacy and safety profile compared to strong opioids [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(1): 82–99.
- [164] MUKHOPADHYAY A, SARNAIK A P, DESHMUKH D R. Interactions of ibuprofen with influenza infection and hyperammonemia in an animal model of Reye’s syndrome [J]. Pediatr Res, 1992, 31(3): 258–260.
- [165] TOWN S M, POOLE K C, WOOD K C, et al. Reversible inactivation of ferret auditory cortex impairs spatial and nonspatial

- hearing [J]. *J Neurosci*, 2023, 43(5): 749–763.
- [166] PENG X, ALFÖLDI J, GORI K, et al. The draft genome sequence of the ferret (*Mustela putorius furo*) facilitates study of human respiratory disease [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(12): 1250–1255.
- [167] WONG J, TAI C M, HURT A C, et al. Sequencing B cell receptors from ferrets (*Mustela putorius furo*) [J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0233794.
- [168] JIANG W, WONG J, TAN H X, et al. Screening and development of monoclonal antibodies for identification of ferret T follicular helper cells [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 1864.
- [169] LIU S T H, BEHZADI M A, SUN W, et al. Antigenic sites in influenza H1 hemagglutinin display species-specific immunodominance [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(11): 4992–4996.
- [170] LAKSONO B M, ROELOFS D, COMVALIUS A D, et al. Infection of ferrets with wild type-based recombinant canine distemper virus overwhelms the immune system and causes fatal systemic disease [J]. *mSphere*, 2023, 8(4): e0008223.
- [171] BELSER J A, ECKERT A M, TUMPEY T M, et al. Complexities in ferret influenza virus pathogenesis and transmission models [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3): 733–744.
- [172] BELSER JA, LAU EHY, BARCLAY W, et al. Working group on the standardization of the ferret model for influenza risk assessment, robustness of the ferret model for influenza risk assessment studies: a cross-laboratory exercise [J]. *mBio*, 2022, 13(4): e0117422.
- [173] 湖南省市场监督管理局. 实验用雪貂的饲养环境及设施规范. DB43/T 2288–2022 [S]. 2022.
Market Supervision and Administration of Hunan Province. Code for breeding environment and facilities of experimental ferrets. DB43/T 2288–2022 [S]. 2022.
- [174] 江苏省质量技术监督局. 实验用雪貂 第 1 部分: 环境及设施; DB32/T 2731.1–2015 [S]. 2015.
Jiangsu Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision. Ferrets for laboratory use Part 1: Environment and facilities. DB32/T 2731.1 [S]. 2015.
- [175] 江苏省质量技术监督局. 实验用雪貂 第 2 部分: 配合饲料; DB32/T 2731.2–2015 [S]. 2015.
Jiangsu Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision. Ferrets for experimental use Part 2: Compound feed; DB32/T 2731.2–2015 [S]. 2015.
- [176] 江苏省质量技术监督局. 实验用雪貂 第 3 部分: 遗传、微生物和寄生虫控制; DB32/T 2731.3–2015 [S]. 2015.
Jiangsu Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision. Ferrets for laboratory use Part 3: Genetic, microbiological and Parasite control; DB32/T 2731.3–2015 [S]. 2015.
- [177] 贺争鸣, 李根平, 赵德明, 等. 把握改革机遇, 建立严谨的实验动物技术标准体系 [J]. *实验动物与比较医学*, 2016, 36(1): 57–60, 65.
HE Z M, LI G P, ZHAO D M, et al. Seize the opportunity of reform and establish a rigorous technical standard system for experimental animals [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2016, 36(1): 57–60, 65.
- [178] 沈培清, 郑红, 刘汝文, 等. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望 [J]. *动物学研究*, 2011, 32(1): 109–114.
SHEN P Q, ZHENG H, LIU R W, et al. Progress and prospect in research on laboratory tree shrew in China [J]. *Zool Res*, 2011, 32(1): 109–114.
- [179] 黄先蓉, 陈文锦. 加强出版伦理建设 提升出版伦理治理能力——基于《关于加强科技伦理治理的意见》的思考 [J]. *科技与出版*, 2022(5): 40–46.
HUANG X R, CHEN W J. Strengthening the construction of publishing ethics and improving the ability of publishing ethics governance—based on the opinions on strengthening the ethical governance of science and technology [J]. *Sci Technol Publish*, 2022(5): 40–46.
- [180] VAN DEN BRAND J M, HAAGMANS B L, VAN RIEL D, et al. The pathology and pathogenesis of experimental severe acute respiratory syndrome and influenza in animal models [J]. *J Comp Pathol*, 2014, 151(1): 83–112.

[收稿日期] 2023–09–20