

实验动物与比较医学 (原《上海实验动物科学》)

Laboratory Animal and Comparative Medicine

第 40 卷第 5 期

2020 年 10 月

目 次

• 论 著 •

- 基于声辐射力脉冲弹性成像技术初步探索肝纤维化小鼠肝剪切波速 …陈高峰, 高志玲, 楼唯薇, 等(361)
- 不同低氧胁迫方式构建 SD 大鼠高原肺水肿模型的比较研究 ……林 雪, 雷有芳, 蒲小燕(367)
- 用高热量饲料建立大鼠肥胖模型的实验研究 ……吕晓君, 吴 森, 张 菊, 等(374)
- 香叶木素对胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤的作用及其机制探讨 ……郝莉霞, 卢 蓉, 马霞霞, 等(384)
- 川芎嗪对胶原诱导型关节炎大鼠细胞外调节蛋白激酶通路的影响 ……梁锦峰, 刘文华, 鄢 宏, 等(391)
- 眼缺血综合征大鼠视网膜形态及 RhoA 和 ROCK-2 表达的变化 ……安 鑫, 刘兰静, 步建平(397)
- 草氨酸钠对胆管癌细胞自噬与凋亡的影响 ……何大伟, 何教林, 周明慧, 等(403)
- 加味吴茱萸汤对高糖高脂及饮酒致大鼠高血压和血管内皮功能的影响 ……吴浩杰, 周瑞堂, 倪 宁(410)
- 裸鼯鼠心脏对 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射耐受的初步研究 ……李 煜, 刘尹航, 陈 超(415)
- 老年 SD 大鼠自发性肿瘤的病理学观察 ……周晓丽, 张 倩, 高 峥, 等(420)
- 基于冷冻肿瘤组织切片的磷酸化 HER2 免疫组织化学染色方法探讨 ……范姝琼, 郑 莉(426)

• 经验交流 •

- 医科院校实验动物学教学中践行“课程思政”的探讨 ……赵善民, 杨文静, 林丽芳, 等(432)
- 三维热管在实验动物设施除湿中的节能应用 ……吴 强, 尤 军, 吴 成, 等(437)

• 综 述 •

- 斑马鱼作为模式动物在人类眼睛疾病研究中的应用 ……邱亚男, 朱丽英, 钱 雯, 等(440)
- 肠道病毒 71 型致病机制及免疫反应研究进展 ……施梅言, 陆彩霞, 代解杰(449)

• 规范与指南 •

- 学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范(一) ……(456)

• 书 评 •

- 补片植入材料及腹股沟疝修补术后护理探讨——评《基于 ABUS 技术的
切口疝轻量型植入补片检测与评优研究》 ……刘小娟, 李世森, 王 珂(后插 1)

- 《实验动物与比较医学》第六届编辑委员会 ……(前插 10)
- 《实验动物与比较医学》创刊 40 周年专题征稿启事 ……(后插 2)
- 致谢本刊支持单位 ……(448)
- 广告 ……(封二, 前插 1~9, 封三, 封底)

Laboratory Animal and Comparative Medicine

Vol.40 No.5

Oct. 2020

Main Contents

- Experimental Study on Hepatic Shear Wave Velocity in Mice with Liver Fibrosis
Based on Acoustic Radiation Force Pulse Elastic ImagingCHEN Gaofeng, GAO Zhiling, LOU Weiwei, et al(361)
- Establishment of High Altitude Pulmonary Edema Model in SD Rats by
Different Hypoxia Stress MethodsLIN Xue, LEI Youfang, PU Xiaoyan(367)
- Experimental Study on Establishment of Obesity Model in Rats Induced by
High-Calorie Diet.....LV Xiaojun, WU Sen, ZHANG Ju, et al(374)
- Effect of Diosmetin on Acute Lung Injury Induced by Meconium and Its
Mechanism in Neonatal RatsHAO Lixia, LU Rong, MA Xiaxia, et al(384)
- Effect of Tetramethylpyrazine on Extracellular Regulated Protein Kinase
Pathway in Collagen-induced Arthritis RatsLIANG Jinfeng, LIU Wenhua, YAN Hong, et al(391)
- Changes of Retinal Morphology and Expressions of RhoA and ROCK-2
in Ocular Ischemic Syndrome RatsAN Xin, LIU Lanjing, BU Jianping(397)
- Effects of Sodium Oxalate on Autophagy and Apoptosis of
Cholangiocarcinoma Cells.....HE Dawei, HE Aolin, ZHOU Minghui, et al(403)
- Effects of Modified Wuzhuyu Decoction on Blood Pressure and Vascular Endothelial
Function in Rats with Hypertension Induced by High Sugar and Fat Diet and
Alcohol DrinkingWU Haojie, ZHOU Ruitang, NI Ning(410)
- Preliminary Study on Heart Tolerance to ⁶⁰Co γ -ray Radiation in Naked Mole RatsLI Yu, LIU Yinhang, CHEN Chao(415)
- Pathological Observation of Spontaneous Tumor in Aged SD Rats.....ZHOU Xiaoli, ZHANG Qian, GAO Zheng, et al(420)
- Exploration of Phospho-HER2 Immunohistochemistry Staining on Frozen Tumor TissuesFAN Shuqiong, ZHENG Li(426)
- Application of Zebrafish as A Model Animal in Research of Human Eye DiseasesDI Yanan, ZHU Liying, QIAN Wen, et al(440)
- Progress in Pathogenesis and Immune Response of Enterovirus 71.....SHI Meiyuan, LU Caixia, DAI Jiejie (449)

实验动物与比较医学

SHIYAN DONGWU YU BIJIAO YIXUE

1981年9月创刊, 双月刊

第40卷第5期 2020年10月25日

主管单位 上海科学院

主办单位 上海市实验动物学会 上海实验动物研究中心

主 编 高 诚

编辑出版 《实验动物与比较医学》编辑部

地址: 上海市金科路3577号, 邮编201203

电话: (021)50793648-81018, 50793657

E-mail: bjb50793657@163.com

网址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>

印 刷 上海新开宝商务印刷有限公司

发 行 上海市报刊发行局

2020年版权归《实验动物与比较医学》编辑部所有

(责任编辑: 富群华、张俊彦)

Laboratory Animal and Comparative Medicine

Established in September 1981, Bimonthly

Vol.40 No.5 Oct. 25, 2020

Supervised by Shanghai Academy of Science & Technology

Sponsored by

Shanghai Laboratory Animal Science Association

Shanghai Laboratory Animal Research Center

Editor-in-Chief GAO Cheng

Edited, Published and Distributed by

Editorial Department of *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, 3577 Jin Ke Road, Shanghai 201203, China

Tel: (0086-21)50793648-81018, 50793657

E-mail: bjb50793657@163.com

<http://www.slarc.org.cn/dwyx>

Printed by Shanghai Newcabo Business Printing Co., LTD

Copyright© 2020 by the Editorial Department of *Laboratory Animal and Comparative Medicine*

(Managing Editors: FU Qunhua, ZHANG Junyan)

ISSN 1674-5817

CN 31-1954/Q

公开发行

邮发代号: 4-789

每期定价: 10.00 元

基于声辐射力脉冲弹性成像技术初步探索肝纤维化小鼠肝剪切波速

陈高峰^{1*}, 高志玲^{2*}, 楼唯薇³, 黄凌鹰^{3#}, 金树根^{4#}

(上海中医药大学附属曙光医院 1. 肝病研究所,

2. 超声诊断科, 3. 肝病科, 4. 细胞免疫室, 上海 201203)

[摘要] 目的 应用声辐射力脉冲弹性成像 (acoustic radiation force impulse imaging, ARFI) 技术探索四氯化碳 (CCl₄) 诱导的肝纤维化模型小鼠肝内剪切波速变化特征与意义。方法 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠分为 3 组: 对照组采用食用油 (0.1 mL/20 g 体质量) 隔日一次灌胃, 共 8 周; 4 周组实验 1~4 周采用上述食用油隔日一次灌胃, 实验第 5 周开始灌胃 1% CCl₄ 食用油混合液 (250 μ L/kg) 染毒, 隔日一次共 4 周; 8 周组实验第 1 周开始灌胃 CCl₄ 食用油混合液 (250 μ L/kg) 染毒, 隔日一次共 8 周。实验 8 周后及停毒正常饲养 2 周后采用 ARFI 技术检测肝内剪切波速, 然后处死所有小鼠, 收集肝组织, 进行 HE 和天狼猩红胶原纤维染色, 观察肝组织病理学变化。结果 与对照组小鼠相比, 4 周组正常饲养 2 周后肝内剪切波速增加, 组织学观察见纤维化形成; 而 8 周组正常饲养 2 周后肝内剪切波速更高, 组织学观察见肝硬化形成。但 4 周组、8 周组染毒结束时肝内剪切波速相似, 均明显高于各自正常饲养 2 周后。结论 应用 ARFI 技术检测的肝剪切波速能反映小鼠肝纤维化变化, 但须排除肝内炎性损伤对肝内剪切波速的影响。

[关键词] 肝纤维化; 超声成像; 声辐射力脉冲弹性成像; 剪切波速; 小鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0361-06

弹性成像除超声和磁共振两大类外, 还有光和机械压力传感器等。在超声四大弹性成像技术即瞬时弹性成像 (transient elastography, TE)、

声辐射力脉冲弹性成像 (acoustic radiation force impulse imaging, ARFI)、实时组织弹性成像 (real-time tissue elastography, RTE) 和实时剪切波弹性成像 (real-time shear wave elastography, SWE) 中, 应用于肝纤维化检测的 Fibroscan 和 FibroTouch 是采用 TE 技术开发的, 其中 FibroTouch 是 TE 与二维超声影像技术结合。虽然 Fibroscan 和 FibroTouch 广泛应用于临床肝病患者的肝纤维化检测和疗效评价观察, 但临床实践发现炎性反应因素影响检测结果^[1]。迄今为止, Fibroscan 和 FibroTouch 仍不能在大鼠和小鼠的肝纤维化实验中应用。仅有一项研究采用 TE 技术研发出一种瞬间微弹性成像技术, 成功应用于检测小鼠四氯化碳 (CCl₄) 诱导的肝纤维化和淀粉样变性模型^[2]。与 Fibroscan 和 FibroTouch 仅限于检测肝纤维化不同, 理论上 ARFI 可检测其他组织器官弹性变

[收稿日期] 2020-01-08

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81603589)

[作者简介] 陈高峰(1974—), 男, 主治医师、主管技师, 主要从事肝病病理诊断与临床工作。

E-mail: gaofengchen06@126.com

高志玲(1983—), 女, 主管技师, 主要从事肝脏肿瘤、甲状腺肿瘤的超声诊断及介入性治疗工作。E-mail: 15800389546@139.com

* 共同第一作者

[通信作者] 黄凌鹰(1985—), 女, 主治医师, 主要从事肝病基础研究与临床工作。E-mail: hly320@126.com

金树根(1965—), 男, 主治医师, 主要从事肝病基础研究与临床工作。E-mail: jingsg@hotmail.com

共同通信作者

化。目前, ARFI 的声触诊组织量化已被应用于大鼠肠^[3]、肝^[4-5]、眼^[6]和脑^[7]组织炎性损伤、脂肪变性和纤维化检测的动物实验, 但未见应用于小鼠肝纤维化检测的报道。本研究采用 ARFI 技术检测 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化时肝内剪切波速变化, 评估其作为一种可替代肝活检的实时、非创伤性诊断肝纤维化方法的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只, 6 周龄, 体质量 (24 ± 2) g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK (沪) 2017-0005]。小鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心[SYXK (沪) 2014-0008], 饲养室温度 25~26 °C, 相对湿度 50%~60%, 光照周期明暗各 12 h, 自由饮食。适应性饲养一周后开始实验。

1.2 试剂

CCl₄ 购自国药集团化学试剂有限公司, 采用市售食用油 (福临门一级大豆油, 中粮集团生产) 配成质量分数为 1%; 异氟烷 (isoflurane) 购自河北一品制药股份有限公司。

1.3 主要仪器设备

呼吸麻醉机 (中国瑞沃德, R500)、彩超仪 (德国西门子, SC2000)、小动物光声成像系统 (加拿大 Fuji, LazrX)、脱水机 (德国莱卡, ASP 300S)、包埋机 (德国莱卡, EG1150H)、切片机 (德国莱卡, RM2235)、显微镜 (日本奥林巴斯, DP71) 及其图像处理分析系统 (MediaCybernetics, Image-Pro Plus)。

1.4 CCl₄ 染毒制备肝纤维化模型及分组

10 只雄性小鼠作为对照组, 自实验开始采用食用油 (0.1 mL/20 g 体质量) 隔日一次灌胃, 共 8 周。4 周组 (15 只) 在实验 1~4 周, 采用上述食用油隔日一次灌胃, 实验第 5 周开始灌胃 CCl₄ 食用油混合液 (250 μL/kg) 染毒, 隔日一次, 共 4 周。8 周组 (15 只) 在实验第 1 周开始灌胃 CCl₄ 食用油混合液 (250 μL/kg) 染毒, 隔

日一次, 共 8 周。实验 8 周后各组均正常饲养 2 周。实验结束, 处死小鼠并收集肝组织样本, 之前 12 h 禁食不禁水。

1.5 多模式小动物光声成像系统 B 超检测肝灰度

用 4% 的异氟烷诱导麻醉小鼠后, 用 1.5% 的异氟烷维持麻醉小鼠。采用多模式小动物光声成像系统, 高频线阵探头, 频率 40 MHz, 观察小鼠肝右叶同一区域, 读取肝灰度值。

1.6 ARFI 法检测肝内剪切波速

如前麻醉状态下, 采用西门子 Acuson S2000 彩色多普勒超声诊断仪, 9L4 高频线阵探头, 频率 9 MHz, 观察各小鼠肝右叶同一区域, 等待图像保持平稳后, 切换 UPDATE 按钮, 自动计算出结节内感光区域剪切波的速度。

1.7 肝组织 HE 与天狼猩红胶原染色

肝组织经中性甲醛缓冲液固定, 石蜡包埋。HE 染色: 石蜡切片, 切片厚度为 4 μm, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇溶液水化, 蒸馏水洗 3~5 min, Harris 苏木精染色 15 min, 自来水洗 3~5 min, 5% 盐酸乙醇溶液分化 10 s, 水洗蓝化 3~5 min, 镜检细胞核, 伊红复染 10 s, 梯度脱水, 二甲苯透明, 封固。天狼猩红胶原染色: 石蜡切片, 切片为 4 μm 厚度, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇溶液水化, 蒸馏水洗 3~5 min, 天狼猩红染色液滴染 15 min, 无水乙醇分化, 二甲苯透明, 封固。胶原染色阳性面积分析: 采用 Olympus DP71 显微数码 CCD 采集图片, 用 Image-Pro Plus 6.1 进行肝组织胶原面积 (反映纤维化) 半定量分析。

1.8 数据处理

所有数据均采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析, 组间差异比较采用方差分析法, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周时 B 超检测小鼠肝灰度和肝内剪切波速变化

正常小鼠的肝超声灰度为 0.6, 染毒 4 周、8 周时肝超声灰度均为 1.6 左右 (图 1); 正常小鼠肝内剪切波速为 0.6~0.8, 染毒 4 周、8 周时小鼠肝内剪切波速均在 2.6~2.8。

2.2 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时肝内剪切波速变化

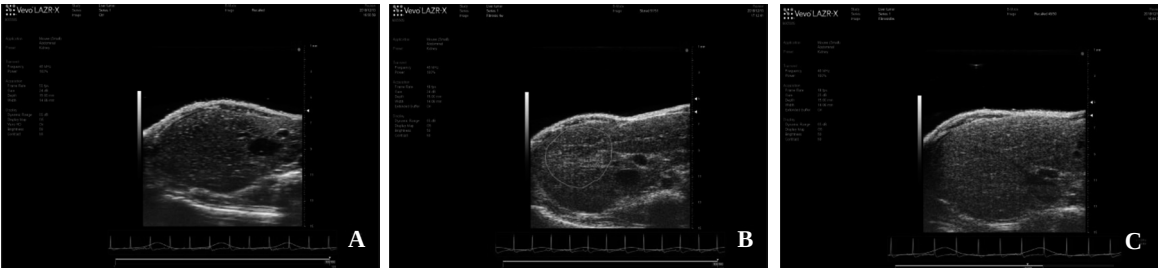
与对照组比, CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时肝内剪切波速依次增加 (均 $P < 0.05$), 各组肝内剪切波速变化见图 2 和表 1。

2.3 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时小鼠肝组织病理改变

CCl₄ 染毒 4 和 8 周后正常饲养 2 周时肝纤维化

半定量分析结果见表 2。

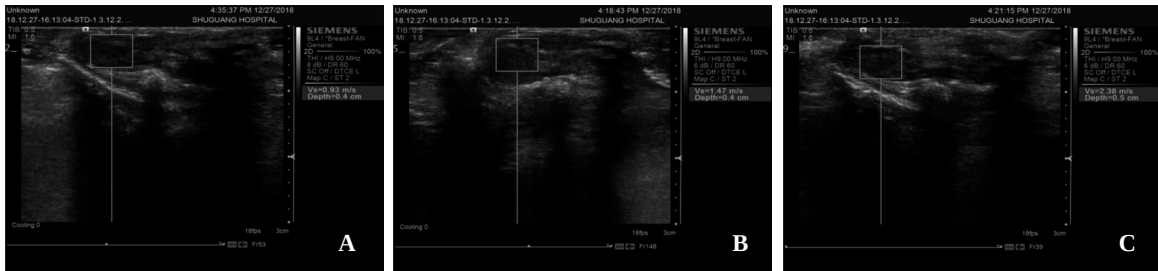
与正常组 (图 3 A、D) 比, 4 周组 (图 3 B、E) 肝细胞的细胞质疏松, 汇管区没有明显炎性细胞聚集, 汇管区胶原纤维变粗向肝实质伸入; 8 周组 (图 C、F) 肝细胞的细胞质疏松明显, 汇管区炎性细胞聚集, 胶原纤维变粗且向肝实质伸入, 形成典型的 P-P、P-C 纤维间隔 (假小叶形成)。



A 为对照组, B 为 4 周组, C 为 8 周组。

图 1 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周时小动物光声成像系统 LazrX 检测小鼠肝超声灰度值

Figure 1 The gray scale value of liver ultrasound in mice at 4 and 8 weeks after CCl₄ exposure was detected by photoacoustic imaging system LazrX



A 为正常组, B 为 CCl₄ 染毒 4 周后正常饲养 2 周, C 为 CCl₄ 染毒 8 周后正常饲养 2 周。

图 2 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周小鼠肝内剪切波速

Figure 2 The intrahepatic shear wave velocity at 2 weeks of normal feeding after CCl₄ exposure for 4 and 8 weeks

表 1 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时肝内剪切波速
Table 1 The intrahepatic shear wave velocity (SWV) at 2 weeks of normal feeding after CCl₄ exposure for 4 and 8 weeks

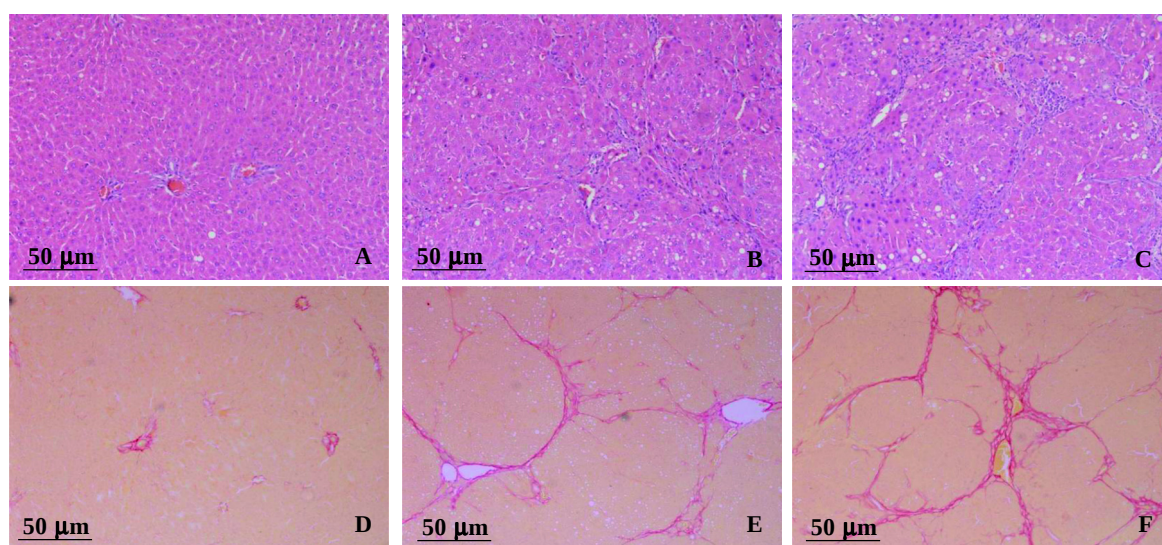
组别	n	SWV/(m · s ⁻¹)
对照组	10	0.89 ± 0.20
4 周组	12 [#]	1.52 ± 0.34 [*]
8 周组	10 [#]	2.47 ± 0.39 ^{*△}

注: [#] 在染色 4 周和 8 周期间小鼠死亡各 3 只和 5 只。与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 4 周组比较, [△] $P < 0.05$ 。

表 2 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时小鼠肝纤维化
Table 2 The liver fibrosis semi-quantitative analysis of mice at 2 weeks of normal feeding after CCl₄ exposure for 4 and 8 weeks

组别	n	纤维化半定量/%
对照组	10	0.35 ± 0.24
4 周组	12 [#]	1.72 ± 0.39 [*]
8 周组	10 [#]	4.57 ± 0.76 ^{*△}

注: [#] 在染色 4 周和 8 周期间小鼠死亡各 3 只和 5 只。与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 4 周组比较, [△] $P < 0.05$ 。



A~C 为 HE 染色, D~F 为天狼猩红染色。A 和 D 为正常组, B 和 E 为 CCl₄ 染毒 4 周后正常饲养 2 周, C 和 F 为 CCl₄ 染毒 8 周后正常饲养 2 周。

图 3 CCl₄ 染毒 4 周和 8 周后正常饲养 2 周时小鼠肝组织病理改变

Figure 3 The pathological change of mouse liver tissues at 2 weeks of normal feeding after CCl₄ exposure for 4 and 8 weeks

3 讨论

采用小动物光声成像系统 LazrX 对肝纤维化造模小鼠检测发现, CCl₄ 染毒 4 周、8 周肝纤维化模型小鼠肝实质灰度相近, 同时采用 ARFI 技术检测 CCl₄ 染毒所致的肝纤维化小鼠肝剪切波速, 发现结果与小动物光声成像系统 LazrX 肝内灰度检测结果完全一致。考虑低剂量 CCl₄ 染毒肝损伤多在 24 h 前后达最高峰, 肝内炎性坏死 2 周后消失, 几乎接近正常^[8]。在 CCl₄ 染毒 4 周、8 周后正常饲养 2 周再进行肝剪切波速检测, 发现肝内剪切波速在 CCl₄ 染毒 8 周后正常饲养 2 周组 > CCl₄ 染毒 4 周后正常饲养 2 周组 > 正常对照组, 与肝内纤维化改变相一致。上述结果与临床检测发现肝功能异常可致肝弹性检测硬度明显上调, 随肝功能恢复正常而肝弹性检测硬度下调^[9-12]完全一致。除了实时与非创伤性, 考虑 ARFI 还能检测肝以外其他器官组织^[3, 6-7]。因此, 只要排除炎性损伤改变, ARFI 可作为替代活检的诊断纤维化的有效方法。换言之, 因为急性炎性损伤也能导致超声成像的剪切波速改变^[13-16], 所以可利用此特点将 ARFI 技术应用于急性肝等组织器官损伤的临床诊治和抗肝等组织器官损伤的药物筛选中。目前, 已开展对

CCl₄ 中毒大鼠急性肝损伤进行 ARFI 法动态检测肝内剪切波速变化的研究, 旨在建立一个实时、非创伤性抗急性肝损伤的药物筛选平台。

另外, 考虑 SC2000 检测剪切波速时取框大而且固定不可调小, 因此实验动物应尽量选择体质量大一些的成年小鼠。本课题组同时对大鼠肝剪切波速检测发现, 3~4 周龄正常大鼠肝脏因体积小而受管道干扰, 其检测到的肝剪切波速竟高于 6 月龄大鼠。大龄大鼠因肝脏体积大, 如选择检测部位不同其所含管道密度也不同, 肝剪切波速相差很大, 这一现象也似表明: 与其说反映肝剪切波速增龄性变化不太明显, 不如说其含管道密度影响肝剪切波速检测结果 (将另文发表)。小动物 B 超如富士 VisualSonics 公司 VECO 系列 2100、3100, 特别是最新升级版的多模式光声成像系统 LazrX, 因其高分辨率 (30~40 MHz 甚至 70 MHz), 适合包括斑马鱼、小鼠在内的更小动物的急性肝炎和肝纤维化等慢性肝损伤的检测^[17]。事实上, 同时应用多模式光声成像系统 LazrX 的光声仪检测含氧与非含氧血红蛋白以分析肝内血氧饱和度时发现, 急性肝损伤时肝内灌注不足导致严重缺氧, 保肝有效药物可明显恢复肝内血氧供应, 而 CCl₄ 等肝损伤药物明显加重了肝内缺血

缺氧(结果待发表)。

综上所述,本研究结果表明,采用 ARFI 法进行肝剪切波速检测能反映小鼠肝纤维化变化,但炎性细胞浸润也导致肝剪切波速变化,因此须排除肝内炎性细胞浸润所致肝损伤对肝内剪切波速的影响。

参考文献:

- [1] 杨柯柯,廖锦堂. ARFI评价急性药物性肝损伤的临床研究[J]. 肝脏, 2016, 21(5):338-340,359.
- [2] Bastard C, Bosisio MR, Chabert M, et al. Transient micro-elastography: A novel non-invasive approach to measure liver stiffness in mice[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(8):968-975.
- [3] Dillman JR, Stidham RW, Higgins PD, et al. US elastography-derived shear wave velocity helps distinguish acutely inflamed from fibrotic bowel in a Crohn disease animal model[J]. Radiology, 2013, 267(3):757-766.
- [4] Hu Z, Luo J, Wei H, et al. Correlation of virtual touch tissue quantification and liver biopsy in a rat liver fibrosis model [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5):3694-3700
- [5] Guo Y, Dong C, Lin H, et al. *Ex vivo* study of acoustic radiation force impulse imaging elastography for evaluation of rat liver with steatosis [J]. Ultrasonics, 2017, 74:161-166.
- [6] Zha L, Chen KQ, Zheng XZ, et al. The safety and feasibility of diagnostic acoustic radiation force impulse elastography used for eyes. A preliminary *in vivo* study[J]. Med Ultrason, 2017, 19(2):185-189.
- [7] Zhu ZH, Peng KP, Liu MH, et al. Acoustic radiation force impulse imaging with virtual touch tissue quantification enables characterization of mild hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J]. J Ultrasound Med, 2019, 38(7): 1797-1805.
- [8] Bruckner JV, MacKenzie WF, Muralidhara S, et al. Oral toxicity of carbon tetrachloride: acute, subacute, and subchronic studies in rats[J]. Fundam Appl Toxicol, 1986, 6(1):16-34.
- [9] 宋望姝,王学梅,姜锐,等. 实时剪切波弹性成像检测急性肝炎肝脏弹性[J]. 中国医学影像技术, 2014, 30(11): 1687-1690.
- [10] 张志志,李淑英,王娟. 声辐射脉冲成像在评价急性药物性肝损伤中的应用价值[J]. 临床超声医学杂志, 2015, 17(5):320-322.
- [11] 卢超政. 实时剪切波弹性成像对急性肝炎的诊断价值 [J]. 河南医学研究, 2017, 26(3):467-468.
- [12] 杭敏,王兴田. 弹性成像技术在肝炎、肝硬化诊断中的应用进展[J]. 山东医药, 2017, 57(7):108-110.
- [13] Cao W, Zhou Y, Niu Y, et al. Quantitative analysis of hepatic toxicity in rats induced by inhalable silica nanoparticles using acoustic radiation force imaging[J]. J Ultrasound Med, 2017, 36(9):1829-1839.
- [14] 武荣,罗渝昆,吕发勤,等. 实时剪切波弹性成像诊断急性肝创伤的动物实验研究[J]. 中国医学影像学杂志, 2012, 20(4):294-297.
- [15] 刘涵生,饶浩高,徐清华,等. 显微外科技术建立稳定的大鼠梗阻性黄疸内引流模型[J]. 中国现代普通外科进展, 2017, 20(1):845-850.
- [16] 黄品同,王力,孔凡雷,等. 声辐射力脉冲成像技术对兔急性淤血肝的弹性评价[J]. 肝胆胰外科杂志, 2009, 21(3):184-186.
- [17] Naser MA, Sampaio DRT, Munoz NM, et al. Improved photoacoustic-based oxygen saturation estimation with SNR-regularized local fluence correction[J]. IEEE Trans Med Imaging, 2019, 38(2):561-571.

Experimental Study on Hepatic Shear Wave Velocity in Mice with Liver Fibrosis Based on Acoustic Radiation Force Impulse Imaging

CHEN Gaofeng^{1*}, GAO Zhiling^{2*}, LOU Weiwei³, HUANG Lingying^{3#}, JIN Shugen^{4#}

(1. Institute of Liver Diseases, 2. Department of Ultrasonography, 3. Department of Liver Diseases, 4. Cellular Immunology Lab, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

* These two authors contributed equally.

#Correspondence to: HUANG Lingying, hly320@126.com; JIN Shugen, jingsg@hotmail.com

[Abstract] Objective Acoustic radiation force impulse imaging (ARFI) was used to explore the characteristics and significance of intrahepatic shear wave velocity of mice with liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄). **Methods** Six weeks old male C57BL/6J mice were used. The control group mice were given edible oil (0.1 mL/20 g body weight) by gavage once every other day for 8 weeks. In the 4-weeks group, the above-mentioned edible oil was given by gavage once every other day for 4 weeks, then the mixture of 1% CCl₄ and edible oil (250 µL/kg) were given by gavage once every other day for 4 weeks. In the 8-weeks group, the mixture of 1% CCl₄ and edible oil (250 µL/kg) were given by gavage once every other day for 8 weeks. After 8 weeks of the experiment and another 2 weeks of normal feeding, ARFI was used to detect the intrahepatic shear wave velocity respectively. All the mice were sacrificed and the liver tissues were collected for HE and Sirius red collagen staining, and the pathological changes of liver tissues were observed. **Results** Compared with the control group, the intrahepatic shear wave velocity of the 4-week group was increased after 2 weeks of normal feeding, and the histological liver fibrosis was formed, while that of the 8-week group was higher than that of the control group after 2 weeks of normal feeding and the liver cirrhosis was formed. However, the intrahepatic shear wave velocity of 4-week group and 8-week group was similar, which was significantly higher than that of after 2 weeks of normal feeding respectively. **Conclusion** The intrahepatic shear wave velocity of ARFI can reflect the changes of liver fibrosis in mice, but the effect of intrahepatic inflammatory injury on intrahepatic shear wave velocity should be excluded.

[Key words] Liver fibrosis; Ultrasound elastography; Acoustic radiation force impulse imaging; Shear wave velocity; Mice

不同低氧胁迫方式构建 SD 大鼠高原肺水肿模型的比较研究

林 雪, 雷有芳, 蒲小燕

(青海大学医学院基础医学部, 西宁 810016)

[摘要] 目的 研究不同低氧胁迫方式构建高原肺水肿模型的效果。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为 3 组: 对照组 (海拔 400 m), 低压氧舱组 (模拟海拔 6 000 m 低氧胁迫 48 h), 实地低氧组 (海拔 4 200 m 低氧胁迫 28 d); 每组 20 只。通过检测实验大鼠肺组织的干湿比、形态学和病理生理学特征、关键基因水通道蛋白 1 (aquaporin-1, AQP-1) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达, 以及氧化应激水平, 比较不同低氧胁迫方式构建 SD 大鼠高原肺水肿模型的效果。结果 与对照组相比, 低压氧舱组和实地低氧组大鼠的肺动脉压和肺组织含水量均显著升高 (均 $P < 0.01$), 而氧分压及氧饱和度显著下降 (均 $P < 0.01$)。对照组肺组织形态在光镜和电镜下均显示结构正常; 低压氧舱组和实地低氧组肺组织在光镜下均可见肺泡壁且肺泡间隔明显增宽, 大量红细胞和炎性细胞溢出, 且在肺泡间隔出现明显水肿。两实验组大鼠肺组织中 AQP-1 mRNA 和蛋白水平均较对照组明显升高 (均 $P < 0.01$), VEGF mRNA 和蛋白水平均较对照组明显降低 (均 $P < 0.01$), 而且血清中谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 水平明显降低, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平明显升高。结论 低压氧舱模拟海拔 6 000 m 低氧胁迫 48 h, 以及海拔 4 200 m 实地低氧胁迫 28 d, 均可有效构建 SD 大鼠高原肺水肿模型; 其中, 应用低压氧舱构建 SD 大鼠高原肺水肿模型相对更占优势。

[关键词] 高原急性肺水肿; 低氧; 低压氧舱; 实地低氧; 动物模型; SD 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R33-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0367-07

高原肺水肿 (high altitude pulmonary edema, HAPE) 是指机体快速 (24~72 h 内) 暴露于高原低氧环境后, 急性缺氧导致肺毛细血管内

皮细胞和肺泡上皮细胞受损, 通透性增加, 进而产生以肺间质或肺泡水肿为基本病理特征的急性高原疾病, 临床表现为心慌、胸闷、咳嗽、呼吸困难、咳粉红色泡沫痰、肺部湿啰音和发绀等, 该病危害性大, 严重时危及生命^[1-2]。由于 HAPE 的发病机制复杂, 目前其发病原因仍不清楚^[3-4], 可能与海拔高度、环境温度、运动强度及机体的适应与重塑有关^[5-6], 但至今仍无一种制作 HAPE 模型的标准方法。因此, 本课题组通过不同的低氧胁迫方式构建重现性较高的 HAPE 大鼠模型, 为后期的疾病研究创造基础条件。

[收稿日期] 2020-02-26

[基金项目] 青海省科技计划项目(2019-ZJ-7047); 国家级大学生创新创业训练计划(201910743003); 青海大学医学院中青年科技项目(2019-kyy-5)

[作者简介] 林 雪(1999—), 女, 临床医学专业在读本科生, 主要研究低氧对机体的影响。

E-mail: 1810845344@qq.com

[通信作者] 蒲小燕(1975—), 女, 副教授, 博士在读, 主要从事低氧生理学研究。E-mail: 878794913@qq.com

1 材料与方法

1.1 实验分组及模型构建

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 200 ± 20 g, 购自西安交通大学医学部实验动物中心 [SCXK (陕) 2019-0001]。所有大鼠随机分为 3 组: (1) 对照组, 饲养于四川大学华西医院科技园区科研基地动物实验楼 (海拔 400 m) [SYXK (川) 2018-119]; (2) 低压氧舱组, 于青海大学医学院高原医学研究中心低压氧舱室, 先模拟海拔 6 000 m 低氧胁迫 48 h 后, 立即降至 3 500 m 进行动物实验; (3) 实地低氧组, 于青海省玛多县人民医院 (海拔 4 200 m) 低氧胁迫 28 d 后, 立即进行动物实验。每组 20 只。实验期间, 3 组动物的饲养环境均达到如下要求: SPF 环境饲养, 温度为 $20 \sim 26$ °C, 相对湿度为 40%~70%, 自由进食饮水 (饮水瓶的瓶口加钢珠)。所有大鼠用 45 mg/kg 戊巴比妥钠进行腹腔麻醉, 取仰卧位固定于实验台, 手术部位备皮消毒, 待大鼠无角膜反射及收缩反应后, 进行下述实验操作。实验中所涉及处理动物的操作均按照国家相关法规要求执行。

1.2 血气及血管组织病理检测

切开大鼠腹部皮肤及肌肉层, 暴露腹腔背侧面, 分离腹主动脉, 用 PresetBM 动脉采血器 (美国 BD 公司产品) 抽取全血 1 mL, 通过 Sysmex 全自动血气分析仪分析腹主动脉血氧分压及氧饱和度; 分离右颈外静脉, 结扎远心端, 用动脉夹夹住近心端, 挑起颈外静脉, 气管插管行机械通气后, 使用 PowerLab 生理记录仪观察压力波形的变化。将导管缓慢插入上腔静脉到右心房, 可见小的压力波形, 继续将导管插入右心室, 记录右心室压力曲线。再将导管在右心室血流的作用下送入肺动脉, 通过压力传感器采集肺动脉压力, 并记录数据。

1.3 肺组织含水量测定

以断颈法迅速处死大鼠后, 取左肺上叶, 用吸水纸吸去组织表面水分, 电子天平称湿重, 记为 W1; 恒温烘干箱 55 °C 烤 72 h 至恒重, 称干重, 记为 W2。根据 Elliot 公式计算肺组织含水量 = $(W1 - W2) / W1 \times 100\%$ 。

1.4 肺组织 HE 染色后显微结构检测

以断颈法处死大鼠后, 取右肺下叶组织, 大小 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$, 漂洗后用 4% 多聚甲醛溶液 (编号 BL539A, 日本 TaKaRa 公司产品) 固定。常规石蜡包埋, 制成 5 μm 厚的石蜡切片后, 用 HE 染色试剂盒染色 (编号 G1120, 日本 TaKaRa 公司产品), 光学显微镜 (型号 CX-21, 日本 Olympus 公司产品) 放大 400 倍后观察各组大鼠肺组织的形态结构变化。

1.5 肺组织超微结构检测

取右下肺尖处肺组织, 切成 1 mm³ 小块, 固定于 2.5% 戊二醛溶液即 Gluta 固定液 (编号 P1126, 日本 TaKaRa 公司产品) 中, 按常规制作电镜超薄切片, 用透射电镜 (型号 JEM-1400PLUS, 日本电子株式会社产品) 观察各组大鼠肺组织的超微结构改变。

1.6 肺组织氧化应激相关蛋白检测

取左肺下叶肺组织, 加入一定量的 PBS 手动匀浆, 取匀浆液于低温离心机中 3000 r/min 离心 20 min。取上清液, 严格按照 ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司产品) 操作说明, 检测谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量, 用酶标仪检测各孔吸光度, 最后计算出目的蛋白浓度。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测关键基因表达

使用 TRIzol (编号 N0.9769, 日本 TaKaRa 公司产品) 提取左肺下叶肺组织总 RNA, 反转录成 cDNA, 然后采用实时荧光定量 PCR 法检测组织中水通道蛋白 1 (aquaporin-1, AQP-1) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达情况。按照 Real-time Quality PCR 试剂盒说明书进行操作, 用实时荧光定量仪 (美国 ThermoFisher 公司产品) 对样品进行检测。引物序列见表 1, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。以 β -actin 作内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达值。各个基因的表达值测量均重复 3 次。

1.8 蛋白质印迹法检测关键蛋白表达

细胞总蛋白提取: 用冷的 PBS 洗肺组织 3

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequence

引物名称	正向引物序列	反向引物序列
AQP-1	5'-CTGGCCTTTGGTTTGAGCAT-3'	5'-CCACACACTGGGCGATGAT-3'
VEGF	5'-GGCCTCTGAAACCATGAACT-3'	5'-ATGCTGCAGGAAGCTCATCT-3'
β-Actin	5'-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3'	5'-GCGGGGCATCGGAACCGCTCA-3'

注：AQP-1 为水通道蛋白 1，VEGF 为血管内皮生长因子。

次，滤纸吸去水分，置于液氮中研磨至粉末状，加入 RIPA 裂解液，4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min，上清液即为细胞总蛋白。根据所测定蛋白质的质量浓度 (μg/μL)，计算所要上样的体积 (μL)，将样品加入等体积的 2 × SDS 上样缓冲液，100 ℃ 加热变性，上样后进行 SDS-PAGE (80 V 30 min，120 V 60 min)。电泳结束后，切下需要的凝胶条带，加入事先预冷的 2 × Transfer Buffer，冰盒内电转膜 (200 mA 90 min)。用含 5% BSA 的封闭液进行封闭，加入 1 : 500 稀释的兔抗人 VEGF 多克隆抗体 (编号 SP0810，广州深达生物有限公司产品) 和兔抗人 AQP-1 多克隆抗体 (编号 P4788Rb-h，上海万疆生物有限公司产品)，4 ℃ 孵育过夜；随后加入 1 : 10 000 稀释的荧光标记的羊抗兔 IgG (编号 BA1054，武汉博士德生物工程有限公司产品)，室温避光孵育 1 h，用 Licor Odyssey 红外成像系统扫描实验结果，最后运用 Quantity One 软件分析目的条带与 β-actin 蛋白条带的灰度值之比。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据处理。

数据的正态性和方差同质性采用 Kolmogoroe-Simirnov 和 Levene 检验，符合正态分布并具有同质性的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。3 组比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用 LSD-*t* 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺动脉压及血氧值分析

与对照组相比，低压氧舱组和实地低氧组大鼠的肺动脉压显著升高 (均 $P < 0.01$)，而氧分压及氧饱和度均显著下降 (均 $P < 0.01$)；此外，肺动脉压、氧分压及氧饱和度在低压氧舱组和实地低氧组之间比较，均显示无明显差异 ($P > 0.05$)，见图 1。

2.2 肺组织含水量分析

与对照组相比，低压氧舱组和实地低氧组大鼠的肺组织含水量均明显升高 (每组 6 只，肺组织含水量分别为 0.720 ± 0.007 、 0.799 ± 0.004 和 0.792 ± 0.009)，差异具有统计学意义 (均 $P < 0.01$)；此外，肺组织含水量在低压氧舱

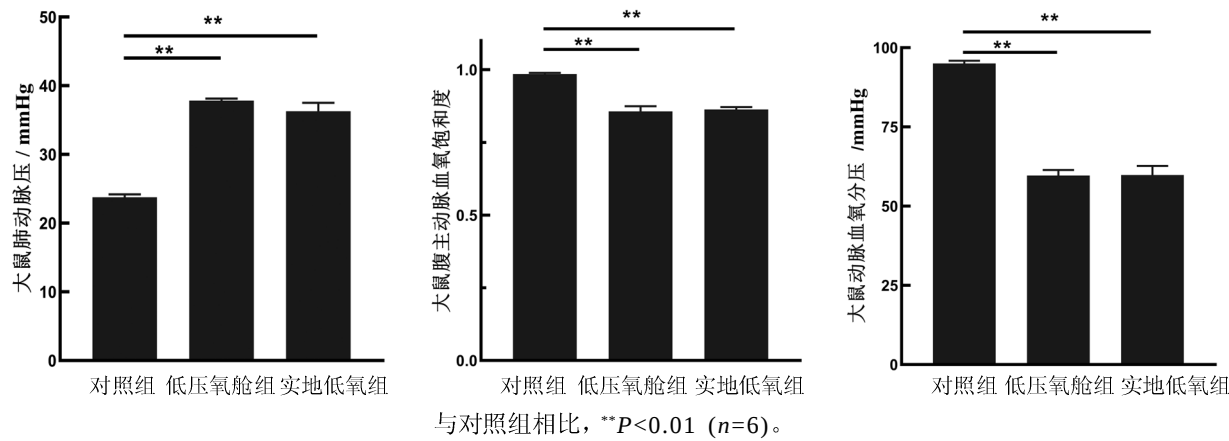


图 1 各组大鼠的肺动脉压、腹主动脉血氧饱和度及动脉血氧分压
Figure 1 Pulmonary arterial pressure, abdominal aortic oxygen saturation and arterial partial pressure of oxygen of rats in each group

组和实地低氧组之间比较, 均显示无明显差异 ($P > 0.05$)。

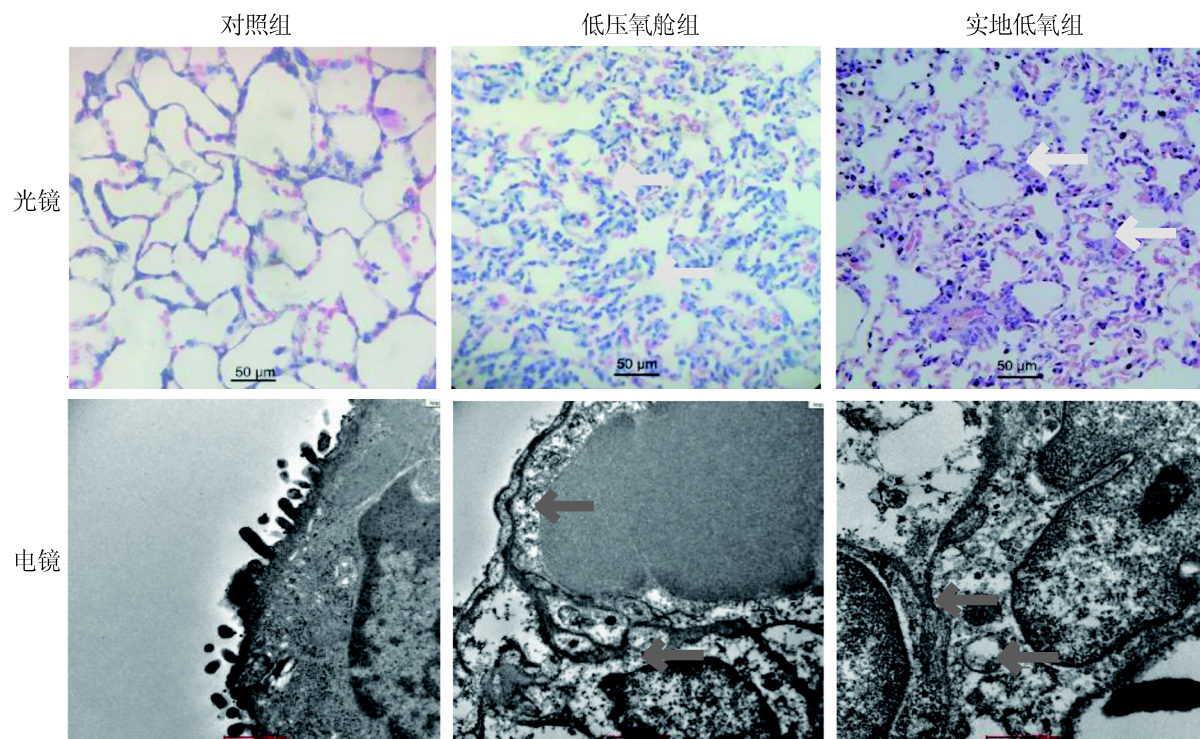
2.3 肺组织形态学变化

HE 染色后, 对照组大鼠的肺组织形态在光镜和电镜下均显示结构正常: 光镜下, 肺泡腔结构清晰, 肺泡间隔无大量红细胞, 并未出现水肿现象; 电镜下, 肺泡结构完整, 未出现间质水肿。低压氧舱组和实地低氧组大鼠的肺组织水肿十分严重: 光镜下, 两组肺组织均可见肺泡间隔明显增宽, 大量红细胞和炎性细胞溢

出; 电镜下, 两组大鼠均出现肺泡间隔明显水肿, 见图 2。

2.4 肺氧化应激水平分析

ELISA 检测结果显示, 与正常对照组相比, 低压氧舱组及实地低氧组大鼠肺组织中 SOD 活力和 GSH-Px 含量均明显降低, MDA 浓度明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。此外, SOD、MDA 和 GSH-Px 在低压氧舱组和实地低氧组之间比较, 均显示无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 2。



注: HE 染色后光镜下, 低压氧舱组和实地低氧组大鼠的肺泡腔出现大量渗出物, 肺泡壁毛细血管明显充血, 如黄色箭头所示; 电镜下, 低压氧舱组和实地低氧组大鼠肺泡腔明显扩大, II 型肺泡细胞结构不规整, 可见少量红细胞, 如红色箭头所示。图中比例尺大小为 50 μm 。

图 2 各组大鼠肺组织的光镜和电镜观察结果

Figure 2 Light and electron microscopic results of rat lung tissues in each group

表 2 各组大鼠肺组织氧化应激水平

Table 2 Oxidative stress levels in lung tissues of rats in each group

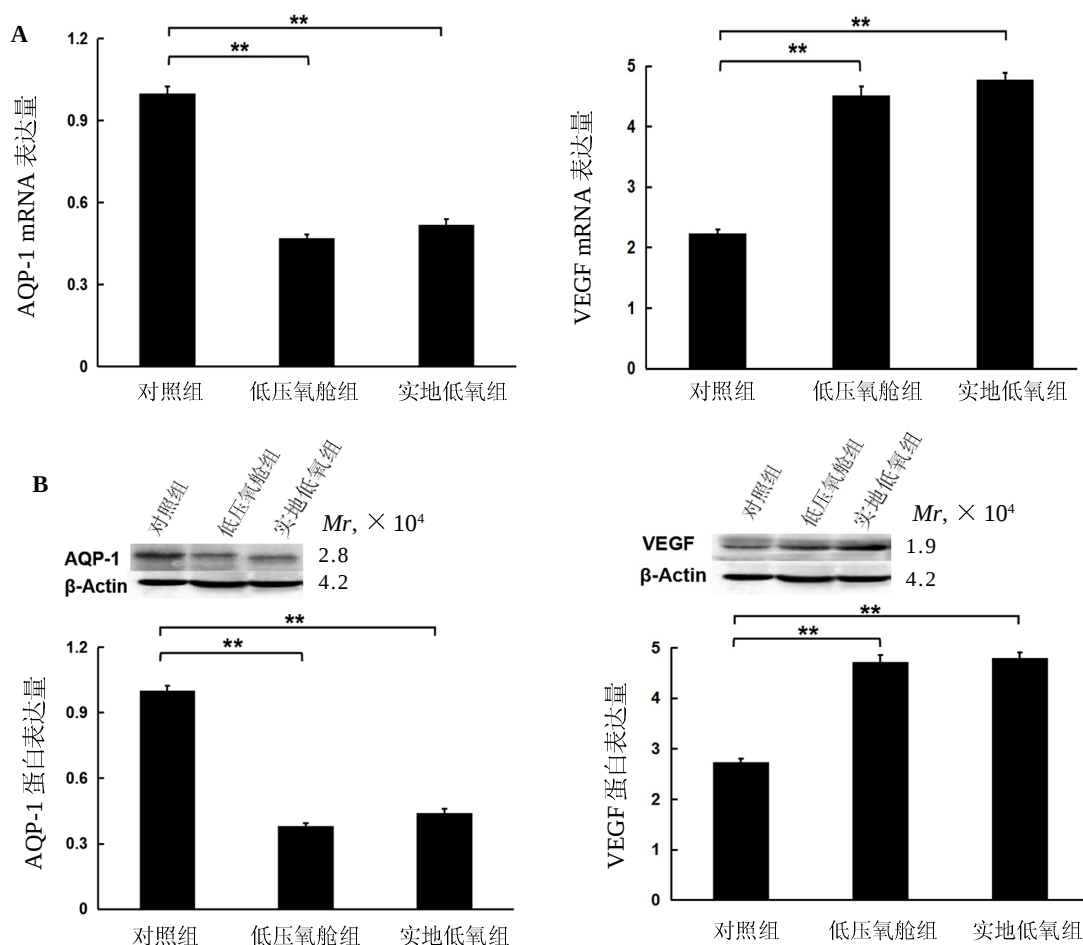
组 别	组数 n	SOD $z/(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$	GSH-Px $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	($\bar{x} \pm s$)
				MDA $c/(\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1})$
对照组	6	2.62 ± 0.11	4.29 ± 0.03	0.91 ± 0.02
低压氧舱组	6	$2.20 \pm 0.18^{**}$	$3.54 \pm 0.04^{**}$	$1.05 \pm 0.03^{**}$
实地低氧组	6	$2.25 \pm 0.33^{**}$	$3.47 \pm 0.03^{**}$	$1.00 \pm 0.01^{**}$

注: 与对照组相比, $^{**}P < 0.01$ 。

2.5 肺组织中 VEGF 及 AQP-1 表达

实时荧光定量 PCR (图 3A) 和蛋白质印迹法 (图 3B) 检测结果显示, 低压氧舱组和实地低氧组大鼠肺组织中 AQP-1 mRNA 和蛋白

表达水平均较对照组明显升高, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 而 VEGF mRNA 和蛋白表达水平均较对照组明显降低, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。



与对照组相比, ** $P < 0.01$ ($n=6$)。

图 3 各组大鼠肺组织中 VEGF 和 AQP-1 mRNA (A) 及蛋白 (B) 的表达量分析

Figure 3 The expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and aquaporin-1 (AQP-1) at the levels of mRNA (A) and protein (B)

3 讨论

HAPE 作为一种非心源性肺水肿, 是由于机体快速进入高海拔地区后对低压低氧环境不适应而产生的一种高原地区特发性疾病^[7]。国内外多采用模拟高原低氧环境复制 HAPE 大鼠模型, 通过观察大鼠行为活动、疾病的发生过程及相应病理变化, 以确定高原舱模拟的 HAPE 大鼠模型成功建立。由于高原舱模拟的 HAPE 大鼠模型的成功建立需要达到相应的评判标准, 并受到海拔高

度、减压速度及持续时间、舱内环境和机体情况等多种因素影响, 所以理想的动物模型建立除了能够复制疾病的发生、发展过程及相应病理变化外, 还应该满足操作简便、因地制宜、人力及物力消耗少等条件^[8]。本实验在既往 HAPE 动物模型复制 (低压氧舱环境模拟海拔 6 000 m) 的研究基础上, 还在实地低氧环境 (青海省玛多县海拔 4 200 m) 下构建了 HAPE 动物模型, 然后比较两组 HAPE 大鼠模型肺组织的干湿比、显微结构、超微结构、部分血氧值、肺动脉

压力、关键基因(AQP-1及VEGF)表达及氧化应激对应指标的差异,证明了两种造模方法均能成功构建HAPE模型。

本实验通过肺组织的HE染色发现,相较于正常对照组,低压氧舱组和实地低氧组大鼠均表现出严重的肺组织水肿现象,两组肺组织肺泡间隔明显增宽,大量红细胞和炎性细胞溢出,且出现肺泡间隔的明显水肿,这一结果说明在低氧刺激下,肺毛细血管通透性增加,大量液体通过靠近阻力血管的动脉壁漏出、转移并滞留,引起肺间质和肺泡水肿,推测两组SD大鼠HAPE模型构建成功。此外,在本实验中,低压氧舱组和实地低氧组均表现为显著的肺动脉高压,而腹主动脉搏血氧分压及氧饱和度均明显下降,这是由于大鼠进入急性低氧环境后,对环境的习服适应机制尚未建立,从而产生一系列应激反应,持续的应激反应使肺血管直接或间接收缩、阻力增大,导致肺动脉压力升高,从而引起血氧分压及氧饱和度下降^[9]。

国内外大量研究表明,肺脏干湿重比的测定是评估肺水肿动物模型效果的最佳方法^[10]。本实验采用该方法评价低氧胁迫方式构建的大鼠HAPE模型,结果显示,两组模型中(W1-W2)/W1比值升高,符合肺水肿后肺组织的病变特征。有研究表明,VEGF与其特异性受体结合后能够提高血管通透性,且AQP-1与水和蛋白的漏出密切相关^[11]。因此,本实验通过实时荧光定量PCR和蛋白质印迹法检测了肺组织中VEGF及AQP-1的表达,发现低压氧舱组和实地低氧组肺组织内VEGF表达水平均异常升高,超出机体的代偿能力,而两个模型组大鼠肺组织中AQP-1表达水平均显著下降。结合以往文献推测,VEGF使肺毛细血管通透性增加,导致大量血浆蛋白漏出血管外^[12];而AQP-1使肺泡主动转运液体功能及细胞膜水通透功能异常,出现了水抑制^[13],进而出现了肺水肿现象。现在的研究认为,SOD是机体内主要的抗氧化酶^[14];而MDA作为脂质过氧化反应的最终产物,是机体内反映氧化损伤程度最经典、最有效的指标之一^[15]。此外,GSH是一种能够直接清除ROS、保护细胞免受自由基损害的内源性抗氧化剂。本实验结果显示,低压氧

舱组和实地低氧组大鼠肺组织中SOD和GSH-Px含量均显著低于对照组,说明低氧胁迫后大鼠抗氧化能力下降,机体受到氧化应激损伤;此外这两组大鼠肺组织中MDA浓度明显高于对照组,说明HAPE启动了脂质过氧化反应,提高了脂质过氧化物含量,从而加重了肺损伤。

综上所述,本研究对比了两种造模方法,发现不同低氧胁迫方式均能构建SD大鼠HAPE模型,且可安全、便捷地观察其病理变化过程。另外,本实验初次在实地低氧环境中建立适合高海拔地区的、简单有效且可复制的大鼠HAPE实验模型,为在高原地区进一步研究HAPE发病机制并预防和诊治该疾病提供了动物实验基础,具有重要意义。

参考文献:

- [1] Basnyat B, Subedi D, Sleggs J, et al. Disoriented and ataxic pilgrims: An epidemiological study of acute mountain sickness and high-altitude cerebral edema at a sacred lake at 4 300 m in the Nepal Himalayas[J]. *Wild Environ Med*, 2000, 11(2):89-93.
- [2] 廉国锋,李钢,罗勇军.高原肺水肿和心源性肺水肿鉴别诊断及治疗研究进展[J]. *人民军医*, 2017, 60(10):1045-1048.
- [3] Paul S, Gangwar A, Arya A, et al. High altitude pulmonary edema: An update on omics data and redefining susceptibility[J]. *J Proteomics Bioinform*, 2015, 8(6):116-125.
- [4] Hackett PH, Roach RC. High-altitude illness[J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(2):107-114.
- [5] Basnyat B, Murdoch DR. High-altitude illness[J]. *Lancet*, 2003, 361(9373):1967-1974.
- [6] Maggiorini M. High altitude-induced pulmonary oedema[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(1):41-50.
- [7] Omura A, Roy R, Jennings T. Inhaled nitric oxide improves survival in the rat model of high-altitude pulmonary edema[J]. *Wilderness Environ Med*, 2000, 11(4):251-256.
- [8] 陶义存,是文辉,许永华,等.模拟高原环境下高原肺水肿大鼠模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(1):76-78.
- [9] Zhou QQ, Luo YJ, Li H, et al. Epidemiological study of mountain sickness complicated with multiple organ dysfunction syndrome on the Qinghai-Tibetan Plateau: Report of 103 cases[J]. *Sci Res Essays*, 2010, 5(17):2506-

- 2516.
- [10] Sciuto AM, Moran TS, Narula A, et al. Disruption of gas exchange in mice after exposure to the chemical threat agent phosgene[J]. *Mil Med*, 2001, 166(9):809-814.
- [11] 杜宁, 谢印芝. 血管内皮生长因子和水通道蛋白与高原肺水肿的关系[J]. *解放军预防医学杂志*, 2004, 22(6):474-477.
- [12] Ran YH, Zhang DX, Xiao ZH, et al. Changes of VEGF, TNF- α , IL-6 and NO in serum of patients with HAPE [J]. *Chinese J Physiol*, 2011, 27(2):201-203.
- [13] 王雪倩, 高芬. AQP-1 在高原低氧肺损伤大鼠肺组织中的表达变化[J]. *中国高原医学与生物学杂志*, 2013, 34(1):46-48.
- [14] Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(12):1600-1619.
- [15] 刘宁, 赵筱芳, 刘莉, 等. 脐血丙二醛含量与胎儿晚期缺氧的关系[J]. *新医学*, 2005, 36(7):397-398.

Establishment of High Altitude Pulmonary Edema Model in SD Rats by Different Hypoxia Stress Methods

LIN Xue, LEI Youfang, PU Xiaoyan

(Department of Basic Medicine, Medical College of Qinghai University, Xining 810016, China)

Correspondence to: PU Xiaoyan, 878794913@qq.com

[Abstract] **Objective** To study the effects of different hypoxia stress on the construction of high altitude pulmonary edema (HAPE) model. **Methods** Total of 60 SD rats were randomly divided into 3 groups: the control group (at an altitude of 400 m), the hypobaric oxygen chamber group (simulating altitude of 6 000 m, and hypoxia stress for 48 h), and the field hypoxia group (at an altitude of 4 200 m, 28 days of hypoxia stress), 20 animals in each group. By detecting lung tissue dry-wet ratio, morphological and pathophysiological characteristics, expressions of key genes including aquaporin-1 (AQP-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF), and oxidative stress level, the effect of different hypoxia stress on the establishment of HAPE model in SD rats was compared. **Results** Compared with the control group, the results of hypobaric oxygen chamber group and the field hypoxia group were as follows: the pulmonary artery pressure of the rats in the two groups increased significantly ($P<0.01$), while the oxygen partial pressure and oxygen saturation decreased significantly (both $P<0.01$); the lung tissue moisture content in both groups increased significantly ($P<0.01$). The lung tissue morphology of the control group was normal under a light microscope and an electron microscope, while the alveolar wall and alveolar septum of the two experimental groups were significantly widened under a light microscope, with a large number of red blood cells and inflammatory cells overflowing, and the obvious edema of alveolar septum was observed under a light microscope. The mRNA and protein levels of AQP-1 in the lung tissues of the two experimental groups were significantly higher than those of the control group, while the mRNA and protein levels of VEGF were significantly lower than those of the control group (all $P<0.01$). There were low GSH-Px and SOD levels and high MDA level in the serum of the two experimental groups. **Conclusion** Both the hypobaric oxygen chamber simulating the hypoxia stress at an altitude of 6 000 m for 48 h and the field hypoxia stress at an altitude of 4 200 m for 28 d effectively can construct the HAPE model of SD rats, and the hypobaric oxygen chamber for constructing the SD rat model of HAPE was more dominant.

[Key words] Acute pulmonary edema at high altitude; Hypoxia; Hypobaric oxygen chamber; Field hypoxia; Animal model; SD rats

用高热量饲料建立大鼠肥胖模型的实验研究

吕晓君^{1,2}, 吴森^{1,2}, 张菊^{1,2}, 徐小玲^{1,2}, 潘望平^{1,2}, 李厚钢^{1,2}, 王平慧^{1,2}, 何开勇^{1,2}

(1. 湖北省药品监督检验研究院, 武汉 430064;

2. 湖北省药品质量检测与控制工程技术研究中心, 武汉 430064)

[摘要] 目的 观察用高热量饲料建立大鼠肥胖模型的效果, 以及两个品种大鼠的建模差异, 并比较不同的肥胖评价方法和肥胖敏感动物筛选方法, 为研究减肥产品的功能时制备动物模型提供参考。方法 选用SD及Wistar雄性大鼠各120只, 分别按体质量随机分为2组(空白对照组和模型组), 每组60只。空白对照组给予维持饲料, 模型组给予改进配方的高热量饲料, 每周记录大鼠体质量和体长1次, 每周称饲料质量2次, 计算Lee's指数、摄食量及食物利用率, 共6周。喂养2周或6周后, 每组分别选取30只大鼠检测血生化指标, 解剖后取双侧肾周围脂肪和睾丸周围脂肪并称重, 计算脂/体比。分析大鼠体质量增加、Lee's指数与肥胖和肥胖敏感的相关性, 比较喂养2周时剔除体质量增加分别排在后1/3、10%、20%的大鼠后体质量增加与肥胖的相关性。结果 与空白对照组比较, 两种品系的模型组大鼠体质量、Lee's指数、体质量增加、食物利用率、体内脂肪质量及脂/体比均增加, 摄食量降低, 血清葡萄糖和三酰甘油水平升高, 高密度脂蛋白胆固醇水平降低(均 $P < 0.05$)。SD大鼠和Wistar大鼠比较, 模型组大鼠的各指标无明显差异($P > 0.05$), 空白对照组大鼠的体长、Lee's指数和食物利用率偶而有差异(均 $P < 0.05$), 空白对照组大鼠的血清高密度脂蛋白胆固醇水平在喂食2周和6周时有明显差异($P < 0.05$)。两种品种的大鼠体质量增加与肥胖及肥胖敏感的相关性均明显大于Lee's指数与肥胖及肥胖敏感的相关性(均 $P < 0.05$); 剔除体质量增加排在后10%和20%的大鼠时体质量增加与肥胖的相关性均明显好于剔除体质量增加排在后1/3的大鼠, 其中剔除10%的相关系数最高。结论 用改进的高热量饲料可成功建立SD和Wistar大鼠肥胖模型, 且两个品种间无明显差异; 体质量增加作为肥胖评价和肥胖敏感动物筛选的指标优于Lee's指数, 而且筛选肥胖敏感动物时可选用剔除体质量增加排在后10%的方法。

[关键词] 高热量饲料; 肥胖模型; SD大鼠; Wistar大鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0374-10

随着人们生活水平的日渐提高, 饮食结构和

生活方式在逐渐发生改变, 同时肥胖症的发病率日益增加, 现已成为世界范围内的一种流行病^[1-2]。高脂饮食诱导的食物性肥胖模型是以高热量饲料诱发遗传易感性动物形成肥胖模型, 这类模型与人类肥胖的自然过程相近, 已成为研究肥胖症的重要模型之一^[3-5]。高热量饲料诱导的肥胖大鼠是评价减肥功能性食品的传统模型, 这种营养性肥胖建模的成功率相对较高, 可有效完成肥胖动物模型的构建, 但不同的配方饲料在建模效果方面存在差异。另外, 目前国内使用的大鼠品种主要

[收稿日期] 2020-04-22

[基金项目] 国家食品药品监督管理总局保健食品功能目录研究专项(ZBW-2017-BJSP-05)

[作者简介] 吕晓君(1983—), 女, 副主任药师, 硕士, 主要研究方向: 保健食品功能与毒理学评价。

E-mail: lvxiaojunwhu@foxmail.com

[通信作者] 何开勇(1972—), 男, 主任药师, 硕士, 主要研究方向: 现代药理学。

E-mail: 13971376736@139.com

是 SD (Sprague-Dawley) 和 Wistar 大鼠, 选用哪种品种的大鼠更加适宜并不清楚。本研究参考文献[6-7]报道的制备大鼠肥胖模型的实验方法, 优化高热量模型饲料的配方, 并在原料选择和加工工艺方面作进一步改良, 观察其建立大鼠肥胖模型的效果, 以及两个品种大鼠的建模差异; 并比较不同的肥胖评价方法和肥胖敏感动物筛选方法, 为研究减肥产品功能时制备动物模型提供参考。

1 材料与方法

1.1 饲料

维持饲料和高热量饲料均由武汉市万千佳兴生物科技有限公司提供[SCXK (鄂) 2016-0011], 饲料配方、能量值及营养成分比例见表 1 和表 2。除粗脂肪外, 其他营养成分均达到国家标准。模型饲料的能量值增加, 主要是脂肪和碳水化合物的供能比增加。

1.2 实验动物及其饲养管理环境

SPF 级雄性 SD 及 Wistar 大鼠各 120 只, 购入时体质量为 130~140 g, 5 周龄, 由斯贝福(北京) 生物技术有限公司提供[SCXK (京) 2016-0009], 维持饲料适应性喂养 7 d。每笼 2 只大鼠, 饲养于屏障环境[SYXK (鄂) 2014-0009], 自

表 1 维持饲料和高热量饲料的原料配方及热量值
Table 1 Formula and energy of basic diet and high-calorie diet

成 分	高热量饲料		维持饲料	
	质量/g	热量/kcal	质量/g	热量/kcal
玉米	200.00	748.39	400.00	1 350.00
蔗糖	150.00	600.00	0.00	0.00
猪油	150.00	1 350.00	0.00	0.00
豆粕	100.00	346.27	200.00	620.00
酪蛋白	90.00	360.00	0.00	0.00
面粉	64.13	217.29	230.00	729.10
进口鱼粉	64.10	223.40	70.00	280.00
麦芽糊精淀粉	100.00	0.00	0.00	0.00
磷酸氢钙	29.88	0.00	22.00	0.00
酵母	19.55	27.96	35.00	50.05
钙粉	11.17	0.00	14.00	0.00
预粉料	10.00	21.18	10.00	20.00
油	8.38	75.42	15.00	135.00
食盐	2.79	0.00	4.00	0.00
总计	1 000.00	4 200.02	1 000.00	3 184.45

注: 1 kcal = 4.186 kJ。

表 2 维持饲料和高热量饲料营养成分比例及供能比
Table 2 Nutrient composition ratio and energy ratio of basic diet and high-calorie diet

营养成分	高热量饲料		维持饲料	
	比例	能量比	比例	能量比
蛋白质	21.0	19.70	20.7	27.03
碳水化合物	50.6	44.34	52.4	61.63
粗脂肪	17.0	35.96	4.15	11.34
粗纤维	1.50	0	2.31	0
钙	1.23	0	1.24	0
磷	0.82	0	0.83	0
钙 : 磷	1.51	—	1.49	—

由饮用净化水, 光照为 12 h 明暗交替, 温度为 20~26℃, 相对湿度为 40%~70%。

1.3 试剂和仪器

麻醉剂戊巴比妥钠购自广州化学试剂厂, 批号 850601; 异氟烷购自河北一品制药有限公司, 批号 C002150101; 血液生化试剂盒均为深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司生产, 包括葡萄糖 (glucose, GLU) (批号 141417010)、三酰甘油 (triglyceride, TG) (批号 141718004)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) (批号 141618006)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density liptein cholesterol, HDL-C) (批号 142118004)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density liptein cholesterol, LDL-C)。ML303 电子天平 and XS6001S 动物秤购自瑞士 Mettler-Toledo 公司; VP3 麻醉剂挥发罐为美国 DRE Veterinary 公司产品; AU400 全自动生化分析仪为日本 Olympus 公司产品。

1.4 实验分组及处理

实验前测量两品种雄性大鼠的体质量、体长, 分别按体质量随机分为 2 组 (空白对照组和模型组), 每组 60 只, 使组间体质量和体长均无明显差异。空白对照组给予维持饲料, 模型组给予高热量饲料, 共 6 周。喂养 2 周后, 每组选取 30 只大鼠, 禁食 16 h, 麻醉后采血并处死, 解剖取双侧肾周围脂肪、睾丸周围脂肪并称重, 检测血生化指标; 剩余 30 只大鼠继续喂养 4 周后, 同前处理。

1.5 观测指标

1.5.1 一般情况观察 每日观察并记录所有动物

的一般表现、行为、毛发、精神、活动、饮食、饮水和大小便等。

1.5.2 体质量和体长、Lee's 指数 每周称大鼠体质量 1 次, 测量体长 1 次。测量体长时先用异氟烷气体麻醉动物, 然后测量动物鼻尖至肛门的长度, 计算 Lee's 指数。Lee's 指数^[8] = 体质量 (g)^{1/3} × 10 / 体长 (cm)。

1.5.3 摄食量 每周加入饲料 2 次, 称剩余饲料质量和撒食量各 2 次, 计算周摄食量、周食物利用率、摄入总热量和总食物利用率。摄食量 = 饲料加入量 - 剩余量 - 撒食量, 摄入总热量 = 摄食量 × 每公斤饲料热量, 周食物利用率 (%) = 周体质量增加值 / 周饲料摄入量 × 100%, 总食物利用率 = 实验期间动物体质量总增加值 / 饲料总摄入量 × 100%。

1.5.4 体内脂肪质量及脂/体比 解剖后取双侧肾周围脂肪和睾丸周围脂肪, 并称质量, 然后计算脂肪与体质量之比。动物体质量为禁食后的体质量。脂/体比 (%) = (肾周围脂肪质量 + 睾丸周围脂肪质量) / 动物体质量 × 100%。

1.5.5 血生化指标 制备大鼠血清, 检测血糖和血脂水平, 包括 GLU、TG、TC、HDL-C 和 LDL-C。

1.6 结果分析及统计处理方法

对上述观测指标及检测项目进行综合分析, 评价肥胖模型是否成功。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行 *t* 检验, 比较空白对照组和模型组的差异、两品种大鼠之间的差异是否有统计学意义; 对体质量增加、Lee's 指数和肥胖及肥胖敏感性的相关性进行分析, 并比较喂养 2 周时剔除体质量增加分别排在后 1/3、10%、20% 的大鼠后体质量增加与肥胖的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空白对照组和模型组大鼠的一般状况良好, 精神、皮毛、饮水和运动等均未见异常; 模型组大鼠的食欲降低, 摄食量低于空白对照组; 模型组大鼠的粪便量少于空白对照组, 颜色稍浅, 质地较硬。SD 和 Wistar 大鼠之间无明显差异。

2.2 高热量饲料对大鼠体质量、体长和 Lee's 指数的影响

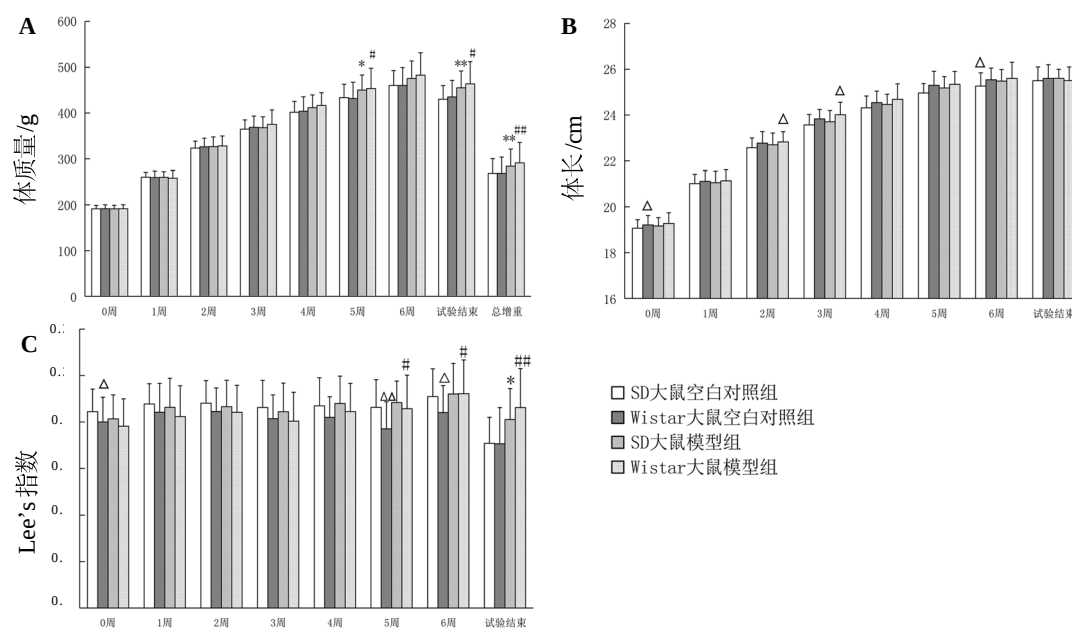
结果见图 1。实验期间, SD 大鼠和 Wistar 大鼠的体质量、体长均正常增长; 其中在第 5 周和实验结束时, 模型组大鼠的体质量比空白对照组明显增加, 体质量总增加值也明显大于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。SD 大鼠在实验结束时, Wistar 大鼠在第 5 周、第 6 周和实验结束时, 模型组大鼠的 Lee's 指数比空白对照组明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 说明肥胖模型建立成功。SD 大鼠和 Wistar 大鼠在其他时间的体质量、Lee's 指数和整个实验期间的体长, 以及空白对照组和模型组之间相比, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

实验期间, 空白对照组 Wistar 大鼠的体长在第 0、2、3、5 周时大于 SD 大鼠, Lee's 指数在第 0、5、6 周时小于 SD 大鼠, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 空白对照组 Wistar 大鼠的体质量、体质量总增加值与 SD 大鼠比较, 无明显差异 ($P > 0.05$)。在整个实验期间, 模型组 Wistar 大鼠的体质量、体质量总增加值、体长、Lee's 指数与 SD 大鼠比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 高热量饲料对大鼠摄食量、食物利用率的影响

结果见图 2。实验期间, SD 大鼠和 Wistar 大鼠的周摄食量逐渐增加, 食物利用率逐渐降低; 与空白对照组比较, 模型组大鼠的周摄食量和总摄食量减少, 周食物利用率和总食物利用率升高, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 但空白对照组和模型组大鼠的摄入总热量无明显差异 ($P > 0.05$)。结果说明高热量饲料影响动物摄食。

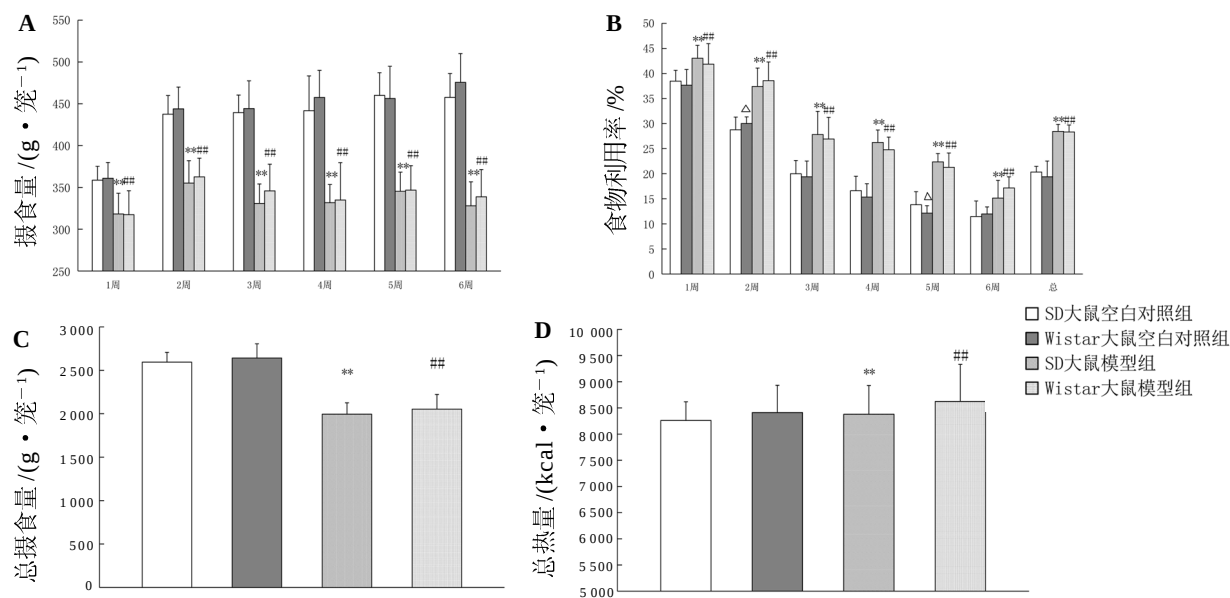
实验期间, 空白对照组 Wistar 大鼠的周食物利用率在第 2 周和第 5 周时小于 SD 大鼠, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 空白对照组 Wistar 大鼠的周摄食量、总摄食量、总食物利用率和摄入总能量与 SD 大鼠比较, 无明显差异 ($P > 0.05$)。模型组 Wistar 大鼠的周摄食量、周食物利用率、总摄食量、总食物利用率和摄入总能量在整个实验期间与 SD 大鼠比较, 均无明显差异 ($P > 0.05$)。



0~2周, $n=60$; 3周~实验结束, $n=30$ 。SD大鼠模型组(高热量饲料喂养)与空白对照组(维持饲料喂养)比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$; Wistar大鼠模型组与空白对照组比较, $#P<0.05$, $##P<0.01$; Wistar大鼠与SD大鼠比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图1 SD大鼠、Wistar大鼠的体重(A)、体长(B)及Lee's指数(C)

Figure 1 Body weight (A), body length (B) and Lee's index (C) in SD rats and Wistar rats



A~B: 0~2周, $n=30$; 3~6周, $n=15$ 。C~D: $n=15$ 。SD大鼠模型组(高热量饲料喂养)与空白对照组(维持饲料喂养)比较, $**P<0.01$; Wistar大鼠模型组与空白对照组比较, $##P<0.01$; Wistar大鼠与SD大鼠比较, $\Delta P<0.05$ 。

图2 SD大鼠、Wistar大鼠的周摄食量(A)、周食物利用率(B)、总摄食量(C)及摄入总热量(D)

Figure 2 Food intake (A) and food utilization (B) in every week as well as the total food intake (C) and total calorie intake (D) in SD rats and Wistar rats

2.4 高热量饲料对大鼠体内脂肪质量和脂/体比的影响

结果见图3。与空白对照组比较,SD大鼠和Wistar大鼠在喂养2周和喂养6周(实验结束)时模型组的体内脂肪质量(肾周脂肪、睾周脂肪)及脂/体比均明显升高,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),说明肥胖模型建立成功。

在喂食2周和喂养6周(实验结束)时,SD大鼠空白对照组及模型组的肾脏周围脂肪质量、睾丸周围脂肪质量、体内脂肪质量(肾周+睾周)、脂/体比与Wistar大鼠比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 高热量饲料对大鼠血糖和血脂水平的影响

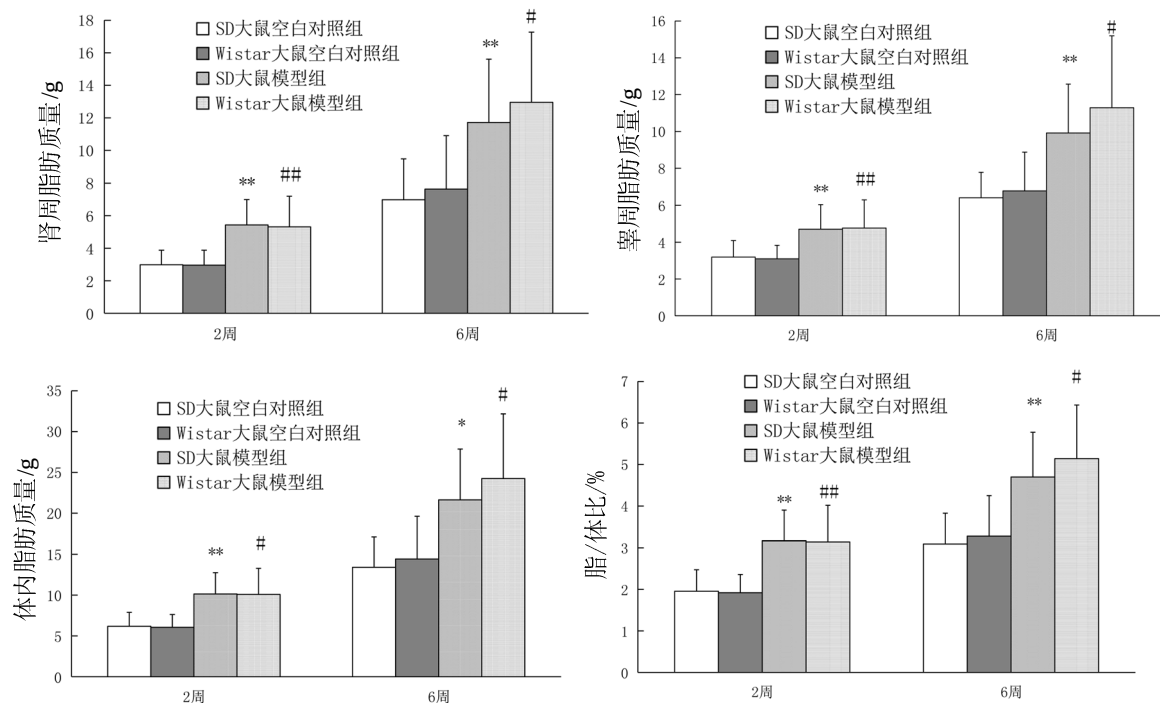
结果见图4。与空白对照组比较,SD大鼠模型组在喂养2周时GLU水平升高,喂养6周时GLU、TG和LDL-C水平升高,HDL-C水平降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);Wistar大鼠模型组在喂养2周时HDL-C水平降低,喂养6周时GLU和TG水平升高,而HDL-C水平降低,

差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。结果说明高热量饲料引起血糖和血脂水平升高,肥胖模型建立成功。

Wistar大鼠空白对照组在喂食2周和6周(实验结束)时的血清LDL-C水平与SD大鼠比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);Wistar大鼠空白对照组的GLU、TG、TC和HDL-C水平与SD大鼠比较,无明显差异($P > 0.05$)。Wistar大鼠模型组的各项生化指标在喂食2周和喂养6周时与SD大鼠比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 体质量增加、Lee's指数与体内脂肪质量的相关性

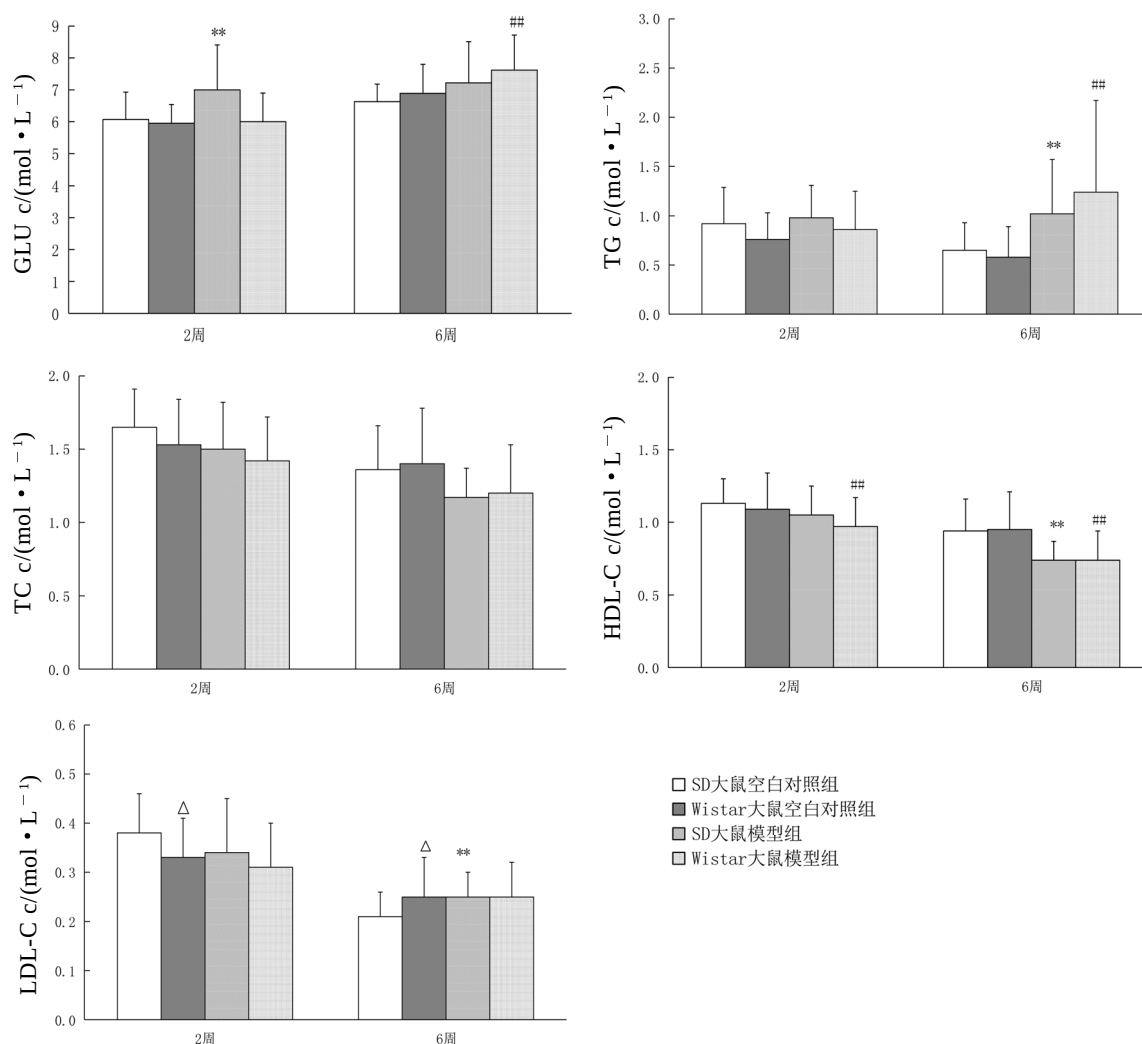
结果见表3。在喂食2周和喂食6周(实验结束)时,将大鼠的体内脂肪质量与体质量增加值进行相关性分析,发现无论是所有大鼠(对照组+模型组)还是仅模型组大鼠都呈明显相关性($P < 0.01$)。而将大鼠的体内脂肪质量与Lee's指数进行相关性分析,发现Wistar大鼠在喂食2



SD大鼠模型组(高热量饲料喂养)与空白对照组(维持饲料喂养)比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;Wistar大鼠模型组与空白对照组比较,## $P < 0.05$,### $P < 0.01$ 。 $n = 30$ 。

图3 SD大鼠、Wistar大鼠的脂肪质量及脂/体比

Figure 3 Body fat weight and fat/body weight ratio in SD rats and Wistar rats



GLU 即葡萄糖, TG 即三酰甘油, TC 即总胆固醇, HDL-C 即高密度脂蛋白胆固醇, LDL-C 即低密度脂蛋白胆固醇。SD 大鼠模型组(高热量饲料喂养)与空白对照组(维持饲料喂养)比较, ** $P < 0.01$; Wistar 大鼠模型组与空白对照组比较, ## $P < 0.01$; Wistar 大鼠与 SD 大鼠比较, $\Delta P < 0.05$ 。 $n=30$ 。

图4 SD大鼠、Wistar大鼠的血生化指标

Figure 4 The biochemical indicators in SD rats and Wistar rats

周和6周时呈明显相关, SD大鼠在喂食6周时呈明显相关, 而喂食2周时不相关, 且体内脂肪质量与体质量增加的相关系数均大于与Lee's指数的相关系数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.7 体质量增加、Lee's指数与肥胖敏感相关性

结果见表4。将喂食2周时大鼠的体质量增加与实验结束时大鼠的体内脂肪质量、体质量增加、体质量进行相关性分析, 结果发现无论是所有大鼠(对照组+模型组)还是仅模型组大鼠都呈明显相关性。而将喂食2周时大鼠的Lee's指数与实验结束时大鼠的体内脂肪质

量、体质量增加、体质量进行相关性分析, 发现SD大鼠和Wistar大鼠的Lee's指数与体质量、体质量增加呈明显相关, Wistar大鼠的Lee's指数与体内脂肪质量呈明显相关, SD大鼠的Lee's指数与体内脂肪质量不相关。而且, 除了Wistar大鼠的Lee's指数与脂肪质量的相关系数(0.738)大于与0~2周体质量增加的相关系数(0.693)外, 实验结束时体内脂肪质量、体质量增加、体质量与0~2周体质量增加的相关系数均大于与Lee's指数的相关系数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表3 大鼠体质量增加、Lee's 指数与肥胖的相关性分析

Table 3 Analysis of the correlation of weight gain, Lee's index with obesity in rats

品种	动物统计量	喂食 2 周时体内脂肪质量		实验结束时体内脂肪质量	
		与体质量增加 的相关系数	与 Lee's 指数 的相关系数	与体质量增加 的相关系数	与 Lee's 指数 的相关系数
SD	2 组全部(60 例)	0.572**	0.188	0.700**	0.483**
	模型组(30 例)	0.693**	0.283	0.802**	0.732**
Wistar	2 组全部(60 例)	0.532**	0.276*	0.753**	0.682**
	模型组(30 例)	0.630**	0.597**	0.813**	0.639**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表4 大鼠体质量增加、Lee's 指数与肥胖敏感的相关性分析

Table 4 Analysis of the correlation of weight gain, Lee's index with obesity sensitivity in rats

品种	动物统计量	2 周体质量增加			2 周 Lee's 指数		
		与实验结束时脂肪 质量(肾周 + 睾周) 的相关系数	与实验结束 时体质量的 相关系数	与实验结束时 体质量增加的 相关系数	与实验结束时脂肪 质量(肾周 + 睾周) 的相关系数	与实验结束 时体质量的 相关系数	与实验结束时 体质量增加的 相关系数
SD	2 组全部(60 例)	0.446**	0.743**	0.761**	0.157	0.286*	0.298*
	模型组(30 例)	0.606**	0.790**	0.756**	0.175	0.395*	0.371*
Wistar	2 组全部(60 例)	0.521**	0.764**	0.778**	0.491**	0.564**	0.589**
	模型组(30 例)	0.693**	0.829**	0.812**	0.738**	0.741**	0.750**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.8 不同的剔除范围大鼠体质量增加与肥胖的相关性

结果见表 5。将模型组大鼠喂食 2 周后的体质量增加值按大小顺序排列, 分别剔除排在后 1/3、10%、20% 的大鼠, 然后将剩余大鼠的 2 周时体质量增加值与肥胖指标(即实验结束时的体内脂肪质量、大鼠体质量、体质量增加值)进

行相关性分析, 结果显示不同剔除范围的 SD 大鼠和 Wistar 大鼠 2 周时体质量增加与肥胖的相关系数大小排序均为: 剔除 10% > 剔除 20% > 剔除 1/3, 即剔除 10% 或 20% 比剔除 1/3 的相关性更好, 其中剔除 10% 的相关系数最高, 说明筛选肥胖敏感动物时可选用喂食 2 周时剔除体质量增加排在后 10% 的大鼠的方法。

表5 不同剔除范围的大鼠体质量增加与肥胖相关性分析

Table 5 Analysis of the correlation between weight gain and obesity after eliminating different weight gain rats

品种	动物统计量	2 周体质量增加		
		与脂肪质量(肾周 + 睾周) 的相关系数	与实验结束时体 质量的相关系数	与实验结束时体 质量增加的相关系数
SD	模型组剔除 1/3(20 例)	0.425	0.791**	0.794**
	模型组剔除 10%(27 例)	0.646**	0.854**	0.846**
	模型组剔除 20%(24 例)	0.526**	0.818**	0.809**
Wistar	模型组剔除 1/3(20 例)	0.641**	0.720**	0.698**
	模型组剔除 10%(27 例)	0.706**	0.822**	0.801**
	模型组剔除 20%(24 例)	0.685**	0.807**	0.785**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4 讨论

高脂膳食诱导的肥胖大鼠模型在肥胖研究中

应用非常广泛^[9], 模型饲料的配方是影响致肥胖效果的重要因素。然而, 文献报道的构建大鼠肥胖模型所使用的饲料配方成分种类较多, 造模效

果良莠不齐^[10-12]。我国评价减肥功能性保健食品所采用的高热量模型饲料配方为“在维持饲料中添加 15.0% 蔗糖、15.0% 猪油，适量的酪蛋白、磷酸氢钙、石粉等。除了粗脂肪外，模型饲料的水分、粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分、钙、磷、钙：磷均要达到维持饲料的国家标准”；由于该配方中猪油含量很高，饲料质地柔软、难以成形，在实验过程中大鼠不易啃食，浪费严重，成模效果不佳。因此，本研究在传统配方中维持猪油和蔗糖的比例不变，添加酪蛋白以维持蛋白质的营养比例，增加麦芽糊精并调整饲料加工工艺，使模型饲料硬度适中、不易碎；用改良的模型饲料喂食大鼠，观察大鼠的进食情况和致肥胖效果。结果表明，SD 和 Wistar 两品种大鼠在喂食 6 周高热量模型饲料后，体质量增加，体质量增加值增加，体内脂肪质量及脂/体比增加，血糖血脂升高，说明肥胖模型制备成功。在实验过程中，动物出现摄食量比空白对照组减少，这可能是模型饲料的气味和口感偏油腻所致；但模型组的食物利用率明显升高，说明高热量饲料在体内转化为脂肪，致使体质量增加，形成肥胖。因此，可认为改良的模型饲料适合肥胖模型的建立。

在传统的肥胖动物模型中，一般采用同一品种的大鼠经高脂饲料直接诱导而成。然而，国内常用的 SD 和 Wistar 大鼠品种间是否存在差异，尚未见报道。本研究比较了两种大鼠在体质量、体长、Lee's 指数、摄食量、食物利用率、体内脂肪质量及脂/体比、血生化指标等的差异，结果发现两品种的模型组差异均无统计学意义，说明在建立肥胖模型的过程中，选择 SD 或 Wistar 大鼠均可。但是，两品种的空白对照组大鼠体长、Lee's 指数、食物利用率和 LDL-C 水平在某些时间点出现差异，可能与维持饲料饲养第 0 周（试验开始）时 SD 大鼠和 Wistar 大鼠的生理指标就存在差异有关，导致生长曲线和生化指标出现差异。

目前，国内外没有判定肥胖动物模型成功的统一标准，大多以超过空白对照组平均体质量百分比、体质量增加值、脂/体比和 Lee's 指数等指标来判定建模是否成功^[13-15]。动物体内脂肪质

量增加可直接说明动物肥胖，因此本研究比较了体质量增加、Lee's 指数与体内脂肪质量的相关性。结果发现，两品种的大鼠在喂食 2 周（肥胖敏感筛选期）和喂食 6 周（实验结束）时的体质量增加与体内脂肪质量的相关性高于 Lee's 指数与体内脂肪质量的相关性，因此用体质量增加评价肥胖比 Lee's 指数更优。

随着肥胖领域的研究不断进展，越来越多的研究倾向于在建立肥胖模型过程中将肥胖抵抗的大鼠从肥胖易感大鼠中剔除，从而使肥胖模型更具有代表性。Levin 等^[16]首次在诱导肥胖模型中将肥胖易感大鼠和肥胖抵抗大鼠进行了区分。本研究比较了在肥胖敏感筛选期（喂食 2 周）大鼠体质量增加、Lee's 指数分别与实验结束（喂食 6 周）时体质量、体质量增加和体内脂肪质量的相关性，结果发现两品种的大鼠在喂食 2 周时体质量增加明显高于 Lee's 指数的相关系数，因此用喂食 2 周时大鼠体质量增加作为筛选肥胖敏感大鼠的指标。另外，本研究还比较了剔除不同范围体质量增加的大鼠后体质量增加与实验结束（喂食 6 周）时大鼠体质量、体质量增加、脂肪质量的相关性，结果表明两品种的模型组大鼠在喂食 2 周时剔除 10% 或 20% 比剔除 1/3 的相关性更好，以剔除 10% 最优。因此，淘汰动物时数量可减少，以避免实验动物的浪费。

综上所述，两品种大鼠喂食改进的高热量饲料均可成功建立肥胖模型，且 SD 大鼠和 Wistar 大鼠在造模效果上无明显差异；选用体质量增加作为肥胖评价和肥胖敏感筛选的指标优于 Lee's 指数，且剔除体质量增加排在后 10% 的大鼠即可与成功建立肥胖模型有较好的相关性。

参考文献:

- [1] 王先科, 史莹华, 王成章, 等. 不同高脂饲料建立高脂血症大鼠模型的对比研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1): 182-184.
- [2] 田梦菲, 陈涤平, 李文林, 等. 肥胖与中医体质类型相关性的研究进展[J]. 广东医学, 2018, 39(1): 60-62.
- [3] 刘学哲. 肥胖的研究现状与展望[J]. 体育科技文献通报, 2009, 17(2): 113-114.
- [4] 于康, 刘燕平. 肥胖症的医学营养治疗[J]. 中国医学科学

- 院学报, 2011, 33(3):239-242.
- [5] 汤锦花, 严海东. 营养性肥胖大鼠模型的建立及评价[J]. 同济大学学报, 2010, 31(1):32-34.
- [6] 展佳悒, 宋祥福, 李金华. 单纯性肥胖大鼠动物模型的构建及血脂变化[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(4):657-658.
- [7] 张晓林, 刘明军. 基于现代文献探索大鼠肥胖模型建立的优选方案研究[J]. 长春中医药大学学报, 2019, 35(1):131-135.
- [8] Bermardis LL, Patterson DB. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions[J]. J Endocrinol, 1968, 40(4):527-528.
- [9] Cao ZH, Gu DH, Lin QY, et al. Effect of pu-erh tea on body fat and lipid profiles in rats with diet-induced obesity[J]. Phytother Res, 2011, 25(2):234-238.
- [10] 李鸿雁, 颜克松, 战大伟. 常规饲料添加蛋黄和花生米的方法建立大鼠肥胖模型[J]. 实验动物科学, 2015, 32(3):48-50.
- [11] 那立欣, 赵丹, 宁华. 减肥功能实验动物模型的改良[J]. 卫生研究, 2010, 39(2):162-164.
- [12] 朱磊, 路瑛丽, 冯连世, 等. 不同配方高脂饲料构建SD大鼠肥胖模型的实验研究[J]. 中国运动医学杂志, 2016, 35(7):642-647.
- [13] Miao YF, Kang HX, Li J, et al. Effect of Sheng-jiang powder on multiple-organ inflammatory injury in acute pancreatitis in rats fed a high-fat diet[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(6):683-695.
- [14] 葛可佑. 肥胖的研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004:913-921.
- [15] Wen JJ, Gao H, Hu JL, et al. Polysaccharides from fermented momordica charantia ameliorate obesity in high-fat induced obese rats[J]. Food Funct, 2019, 10(1):448-457.
- [16] Levin BE, Triscari J, Hogan S, et al. Resistance to diet-induced obesity: Food intake, pancreatic sympathetic tone, and insulin[J]. Am J Physiol, 1987, 252(3 Pt 2):R471-R478.

Experimental Study on Establishment of Obesity Model in Rats Induced by High-Calorie Diet

LV Xiaojun^{1,2}, WU Sen^{1,2}, ZHANG Ju^{1,2}, XU Xiaoling^{1,2},

PAN Wangping^{1,2}, LI Hougang^{1,2}, WANG Pinghui^{1,2}, HE Kaiyong^{1,2}

(1. Hubei Institute for Drug Control, Wuhan 430064, China;

2. Hubei Engineering Research Center for Drug Quality Control, Wuhan 430064, China)

Correspondence to: HE Kaiyong, 13971376736@139.com

[Abstract] **Objective** To observe the effect of high-calorie diet on the establishment of obesity model in rats, and the differences in modeling between two different stocks of rats, and to compare the differences of obesity evaluation methods and obesity-sensitive animals screening methods, providing a reference for the preparation of animal models to study the function of weight loss products. **Methods** Total of 120 SD (Sprague Dawley) and 120 Wistar male rats were randomly divided into 2 groups (blank control group and model group) by body weight, with 60 rats in each group. The rats in blank control group were given basic diet, and the rats in model group were given improved high-calorie diet. The body weight and body length of the rats were recorded once a week, and the feeds were weighed twice a week to calculate the Lee's index, food intake and food utilization for 6 weeks. After 2 weeks and 6 weeks of feeding, 30 rats in each group were respectively selected to measure the biochemical indicators, and the fat around the kidney and the testis was dissected and weighed to calculate the fat/body weight ratio. The correlations of weight gain and Lee's index with obesity and obesity sensitivity were analyzed. The correlation between obesity and weight gain after eliminating the last 1/3, 10%, and 20% rats with weight gain after 2 weeks of feeding were compared. **Results** Compared with blank control group, the body weight, Lee's index, weight gain, food utilization rate, body fat weight and fat/body weight ratio, as well as the serum levels of glucose and triglyceride in the two stocks of rats in model group were increased, while the food intake and the serum level of high density liprotein cholesterol (HDL-C) were decreased (all $P < 0.05$). There was no significant difference in each index of model group between SD rats and Wistar rats ($P > 0.05$), but the differences in body length, Lee's index and food utilization rate of the two stocks of rats in blank control group were occasionally appeared during the experiment (all $P < 0.05$). There was significant difference in serum level of HDL-C between SD rats and Wistar rats in the blank group at 2 and 6 weeks of feeding ($P < 0.05$). The correlations of body weight gain with obesity and obesity sensitivity of the two stocks of rats were greater than those of Lee's index with obesity and obesity sensitivity (both $P < 0.05$). When eliminating the last 10% or 20% rats with weight gain, the correlation between weight gain and obesity was better as compared with eliminating last 1/3 rats; the correlation coefficient was the highest when eliminating the last 10%. **Conclusions** The obesity model of rats induced by the improved high-calorie diet can be successfully established in SD rats and Wistar rats, and there is no significant difference between the two stocks. As an index of obesity evaluation and obesity sensitive rat selection, weight gain is better than Lee's index. Eliminating the last 10% rats with weight gain is useful for selecting the obesity sensitive animals.

[Key words] High-calorie diet; Obesity model; SD rats; Wistar rats

香叶木素对胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤的作用及其机制探讨

郝莉霞¹, 卢 蓉², 马霞霞¹, 樊书娟³

(1. 延安大学附属医院新生儿科, 延安 716000; 2. 延安大学附属医院儿科一病区, 延安 716000; 3. 西安交通大学第一附属医院新生儿科, 西安 710061)

[摘要] 目的 探讨香叶木素对胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤的作用及其分子机制。方法 48只1日龄SPF级雄性SD大鼠由气管插管注入胎粪1.5 mL/kg, 建立胎粪肺损伤模型。大鼠随机分为4组: 对照组、模型组、甲强龙组和香叶木素组。全自动血气分析仪检测各组大鼠的动脉氧合指数。HE染色检测大鼠肺组织病理损伤程度, 并进行肺损伤病理评分。肺损伤模型建立24 h后, 切除肺组织, 称取其质量; 酶联免疫吸附测定法检测炎症因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和IL-6水平; 蛋白质印迹法检测含pyrin结构域的NOD样受体蛋白3 (NOD-like receptor with pyrin domain 3, NLRP3)炎症小体、剪切型半胱天冬酶1 (cleaved caspase-1, c-caspase-1)和IL-1 β 蛋白水平。结果 与模型组相比, 甲强龙组与香叶木素组大鼠的平均动脉氧合指数明显降低 (均 $P < 0.05$), 病理损伤程度及肺损伤病理评分明显降低 (均 $P < 0.05$), 炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平明显降低 (均 $P < 0.01$), NLRP3、c-caspase-1和IL-1 β 蛋白表达明显下调 (均 $P < 0.01$)。结论 香叶木素通过降低动脉氧合指数及炎症因子表达水平, 并下调NLRP3、c-caspase-1和IL-1 β 蛋白表达水平, 对胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤具有一定的治疗作用。

[关键词] 香叶木素; 胎粪吸入性肺炎; 炎症因子; NOD样受体蛋白3; SD大鼠

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)05-0384-07

胎粪吸入性肺炎 (meconium aspiration pneumonia) 又称胎粪吸入综合征, 是引起新生儿呼吸窘迫综合征的原因之一, 尤其在足月或过期妊娠婴儿中发病率和死亡率极高^[1]。在分娩过程中, 胎粪沿着呼吸道进入肺泡引起机械性阻塞和化学炎症反应, 同时引起其他器官损伤^[2]。胎粪吸入性肺炎占有呼吸衰竭病例的10%左右, 在发展中国家的死亡率约为39%, 早期诊断和早期

治疗对改善患者预后很重要^[3]。目前尚无有效的药物干预措施用于降低胎粪吸入性肺炎死亡率, 因此迫切需要开发新的有效的预防和治疗方法。

香木叶素是一种从橄榄叶和豆科植物中分离出来的黄酮类化合物, 具有抗炎、抗雌激素、抗氧化剂、抗微生物和抗肿瘤等药理作用^[4]。已有研究报道, 香木叶素可通过激活核因子E2相关因子2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 通路和抑制含pyrin结构域的NOD样受体蛋白3 (NOD-like receptor with pyrin domain 3, NLRP3) 炎症小体, 减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤^[5], 说明香木叶素对肺损伤有治疗作用。然而目前尚未见有相关文献报道香叶木素对胎粪吸入性肺炎的作用机制。本研究用胎粪诱导建立

[收稿日期] 2019-12-27

[基金项目] 陕西省社会发展科技攻关项目(2015SF037)

[作者简介] 郝莉霞(1982—), 女, 副主任医师, 研究方向: 新生儿内科学。E-mail: xfjdf170g@sina.com

[通信作者] 卢 蓉(1983—), 女, 副主任医师, 研究方向: 儿科内科学。E-mail: 81727839@qq.com

大鼠急性肺损伤模型,探讨香叶木素对胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤的作用及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 药物和主要试剂

香叶木素(批号111788-200801)购自中国食品药品检定研究院,化学式为 $C_{16}H_{12}O_6$,相对分子质量为300.3,纯度 $\geq 95.7\%$;甲强龙(CAS号2375-03-3)购自美国TargetMol公司;HE染色试剂盒(货号C0105)购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(ab6671)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)(ab100704)、IL-6(ab100712)、NLRP3(ab214185)、剪切型半胱天冬酶1(cleaved caspase-1, c-caspase-1)(ab138483)和GAPDH单克隆抗体(ab9485)均购自英国Abcam公司。

1.2 动物模型的建立与分组

50只1日龄SPF级雄性SD大鼠购自空军军医大学(原第四军医大学)实验动物中心[SCXK(陕)2014-002],饲养于陕西省食品药品检验研究院[SYXK(陕)2018-002],室温23~25℃,光照/黑暗时间12h/12h,自由进食饲料和水。用氯胺酮(20 mg/kg)和甲苯噻嗪(5 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,行气管切开术。取48只大鼠随机分为4组,每组12只,按下述方法操作^[6]。手术对照组:将大鼠置于机械通气机上,气管中插入气管导管,呼吸机通气30 min,缓慢注入0.9%氯化钠溶液即生理盐水(1.5 mL/kg),呼吸机通气15 min,确保生理盐水均匀进入支气管及肺泡,缝合切口。模型组:将大鼠置于机械通气机上,气管中插入气管导管,呼吸机通气30 min,缓慢注入胎粪(1.5 mL/kg),呼吸机通气15 min,确保胎粪均匀进入支气管及肺泡,缝合切口。甲强龙组:操作同模型组,模型建立后尾静脉注射甲强龙(2 mg/kg),作为阳性对照。香叶木素组:操作同模型组,模型建立后腹腔注射香叶木素(20 mg/kg)。造模过程中,对照组大鼠死亡1只,模型组大鼠死亡4只,甲强龙组和香叶木

素组大鼠各死亡2只。模型组补充2只大鼠,以同样实验方法造模并成功,最终各组大鼠均取10只用于后续实验。

各组处理24 h后麻醉,开胸,心脏放血法处死大鼠。解剖后,取各组大鼠肺组织,称重,然后用体积分数为10%的甲醛溶液固定,行石蜡包埋切片。

1.3 动脉氧合指数

建模后24 h,处死前取各组大鼠动脉血,加入全自动血气分析仪,检测动脉血氧分压(arterial partial pressure of oxygen, PaO_2)和吸入氧分数(fraction of inspired oxygen, FiO_2),根据公式计算动脉氧合指数:氧合指数 = PaO_2 / FiO_2 。

1.4 HE染色

采用HE染色方法进行肺组织病理学检测。将石蜡切片脱蜡,蒸馏水润湿组织,苏木精染色细胞核5 min,水洗5 s,伊红染色细胞质30 s,水洗后,滤纸吸干,无水乙醇脱水2次后封固,在荧光显微镜下观测染色结果。参考Turhan等^[7]的方法,计算肺损伤病理评分。

1.5 酶联免疫吸附测定法检测IL-6、IL-1 β 和TNF- α 含量

模型建立24 h后,采用支气管肺泡灌洗术^[8]收集肺泡表面液体,在4℃下用50 mmol/L碳酸盐包被缓冲液溶解抗原后,以100 μ L/孔的量接种到96孔酶标板。按照试剂盒说明进行IL-6、IL-1 β 和TNF- α 含量检测,用酶标仪测定450 nm处吸光度,通过绘制标准曲线求出样品中IL-6、IL-1 β 和TNF- α 含量。

1.6 蛋白质印迹法检测NLRP3、IL-1 β 和c-caspase-1蛋白表达

将肺组织置于玻璃匀浆器内,在冰上溶解25 min。以12 000 r/min的速度离心10 min,加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行总蛋白提取,用BCA试剂盒测定蛋白质含量。取等量的蛋白质样品(20 mg),在100℃条件下变性5 min。然后采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白,电泳结束后将蛋白条带转移至聚偏二氟乙烯膜,在4℃条件下加入兔抗NLRP3、IL-1 β 和c-caspase-1单克隆抗体(工作液稀释比例均为

1:1 000), 并孵育过夜, 三羟甲基氨基甲烷缓冲液清洗, 然后在 4 °C 下加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (1:20 000) 并孵育 2 h, 最后加入电化学发光染色液, 曝光处理。应用 Image J 软件统计各条带灰度值, 以分析目的蛋白的相对表达水平。

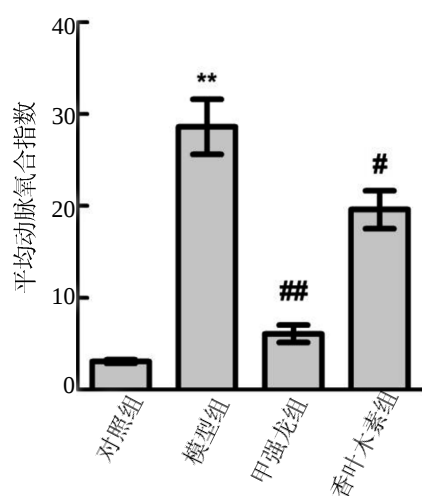
1.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件对各实验结果进行统计学分析。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用多因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 香叶木素降低动脉氧合指数

与对照组比较, 胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤模型组平均动脉氧合指数明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而与模型组相比, 甲强龙组 (即阳性药物对照) 的平均动脉氧合指数明显降低 ($P < 0.01$), 香叶木素组的平均动脉氧合指数也低于模型组 ($P < 0.05$), 但比甲强龙组有所回升 (6.10 ± 0.96 vs 19.60 ± 2.04) (图 1)。



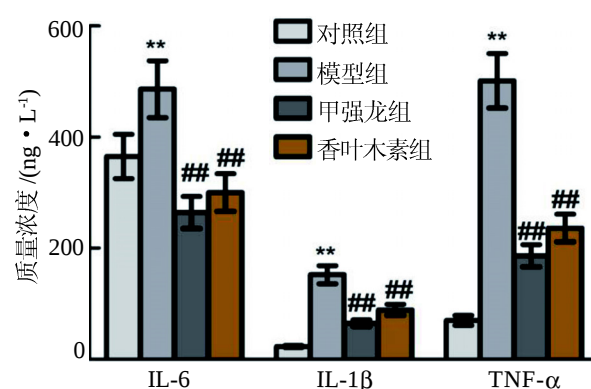
每组 10 只大鼠。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 1 香叶木素对胎粪诱导的急性肺损伤大鼠动脉氧合指数的影响

Figure 1 Effect of diosmetin on the arterial oxygenation index in rats with meconium-induced acute lung injury

2.2 香叶木素下调炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平

与对照组相比, 胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤模型组大鼠的 IL-6 水平明显升高 ($P < 0.01$), 而甲强龙组和香叶木素组的 IL-6 水平均明显低于模型组 (均 $P < 0.01$); 模型组的 IL-1 β 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而甲强龙组和香叶木素组的 IL-1 β 水平明显低于模型组 (均 $P < 0.01$); 与对照组相比, 模型组的 TNF- β 水平也明显升高 ($P < 0.01$), 而甲强龙组和香叶木素组的 TNF- α 水平也明显低于模型组 (均 $P < 0.01$) (图 2)。



每组 10 只大鼠。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 2 香叶木素对胎粪诱导急性肺损伤大鼠中炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平的影响

Figure 2 Effects of diosmetin on the levels of inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α in rats with meconium-induced acute lung injury

2.3 香叶木素减轻肺组织病理损伤程度

HE 染色检测各组大鼠肺组织病理损伤情况, 结果如图 3A 所示。对照组肺泡扩张良好, 支气管黏膜正常。与对照组相比, 胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤模型组表现出明显的病理损伤, 肺泡壁明显水肿, 肺实质明显实变, 管腔狭窄, 可见大量炎性细胞浸润, 肺损伤评分明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 甲强龙组的肺泡壁仍水肿、增厚, 但炎性细胞浸润减少, 肺组织评分明显降低 ($P < 0.05$)。香叶木素组较模型组的肺组织病理损伤程度明显降低, 肺泡壁轻微水肿, 中度出血及炎性细胞浸润, 肺组织评分明显降低 ($P < 0.05$, 图 3B)。

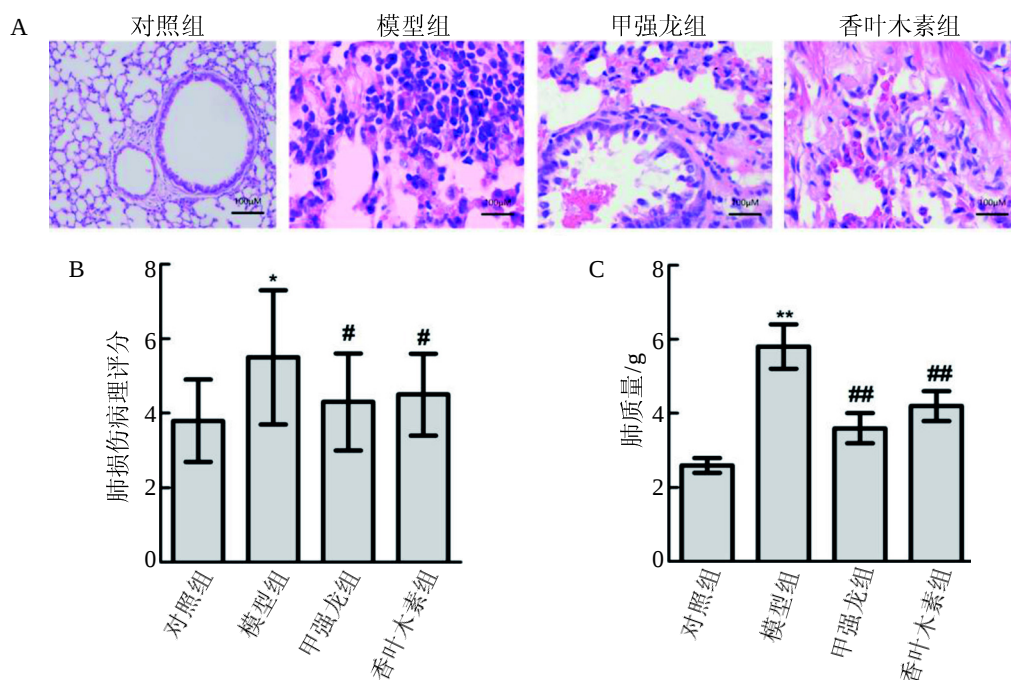
模型建立 12 h 后称肺组织质量, 结果如图

3C 所示: 模型组的肺质量明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而甲强龙组和香叶木素组的肺质量明显低于模型组 (均 $P < 0.01$)。

2.4 香叶木素下调 NLRP3、c-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达

蛋白质印迹法检测各组大鼠肺组织中 NLRP3、IL-1 β 和 c-caspase-1 蛋白水平, 结果如图 4 所示。与对照组相比, 胎粪诱导的新生大鼠

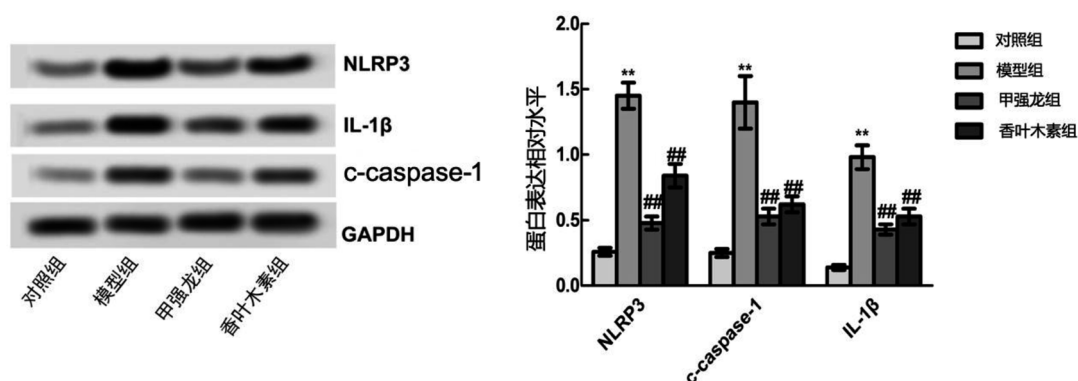
急性肺损伤模型组的 NLRP3 蛋白水平明显升高 ($P < 0.01$), 而甲强龙组和香叶木素组的 NLRP3 蛋白水平均明显低于模型组 (均 $P < 0.01$); 模型组的 c-caspase-1 蛋白水平也明显高于对照组, 甲强龙组和香叶木素组的 c-caspase-1 蛋白水平也明显低于模型组 (均 $P < 0.01$); 模型组的 IL-1 β 蛋白水平明显高于对照组、甲强龙组和香叶木素组 (均 $P < 0.01$)。



A 为肺组织病理学观察结构 (HE 染色, 比例尺大小为 100 μ m), B 为肺损伤病理学评分结果, C 为各组肺质量。每组 10 只大鼠; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 3 香叶木素对胎粪诱导急性肺损伤大鼠的肺组织病理损伤程度的影响

Figure 3 Effect of diosmetin on the pathological degree of lung tissues in rats with meconium-induced acute lung injury



每组 10 只大鼠。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 4 香叶木素对胎粪诱导急性肺损伤大鼠中 NLRP3、c-caspase-1 和 IL-1 β 蛋白水平的影响

Figure 4 Effects of diosmetin on NLRP3, c-caspase-1 and IL-1 β levels in rats with meconium-induced acute lung injury

3 讨论

胎粪吸入性肺炎是一种胎粪引起的新生儿呼吸功能障碍,能导致严重的肺功能衰竭。临床上,胎儿窘迫或子宫内抽吸导致胎粪吸入,从而发生炎症反应、气道阻塞、肺表面活性物质失活及细胞凋亡,从而破坏肺发育^[9-10]。目前,胎粪吸入性肺炎的确切机制在很大程度上仍不清楚,治疗仅局限于机械通气、表面活性剂治疗和气道清洁^[11]。因此,治疗胎粪吸入性肺炎想要取得良好的效果,需要探索新的有效药物。

香叶木素天然存在于豆科植物金合欢和橄榄叶的叶子中。已经证实香叶木素具有多种药性,包括抗菌、抗癌、抗炎和抗氧化活性^[12]。传统医学植物成分作为胎粪吸入性肺炎的预防和治疗药物正越来越受到人们的关注^[13]。组织病理学变化是胎粪吸入性肺炎的可视化反应,本实验通过HE染色观察发现香叶木素改善了胎粪诱导的肺组织病理学症状,如炎症细胞浸润和肺泡充血均减轻,肺损伤评分降低。此外,香叶木素明显减轻了胎粪诱导的新生大鼠肺组织质量。

胎粪吸入性肺炎患儿由于呼吸功能较差,肺部换气及通气功能受阻,导致机体氧供不足,引起血气指标发生相应的异常变化^[14]。血气分析能够反映组织氧供及耗氧状态。Chen等^[2]研究发现,高频振荡通气联合肺表面活性物质表达通过降低动脉氧合指数对胎粪吸入性肺炎具有显著疗效。本实验结果显示,香叶木素降低了新生大鼠胎粪吸入性肺炎的动脉氧合指数,表明香叶木素通过改善血气状态,对胎粪诱导新生大鼠的呼吸功能进行调节。

胎粪是水、上皮细胞、胆汁、黏液和羊水的复杂混合物,含有多种可能引起炎症反应的危险因子^[15]。炎症反应已被证明在胎粪诱导的肺损伤中发挥了关键作用^[16]。胎粪是中性粒细胞和肺泡巨噬细胞的有效激活剂。在胎粪吸入性肺炎的早期阶段,IL-1 β 是一种相当活跃的细胞因子,可引起促炎介质如IL-6和IL-8释放,从这些介质中获取支持,募集炎症细胞,过度炎症反应最终导致肺损伤^[17]。香叶木素可以改善促炎性细胞因子的产生,如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6^[18]。Thomas

等^[19]研究发现,C5和CD14联合抑制体内胎粪诱导的炎症因子IL-6和IL-1 β 表达,从而治疗胎粪吸入性肺炎。Zhang等^[20]研究发现,香叶木素显著降低了细菌性脑膜炎大鼠模型的海马组织中促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的表达水平。本实验结果与上述研究结果一致,香叶木素极显著地降低支气管肺泡中炎症因子IL-6、IL-1 β 和TNF- α 分泌水平,同时降低了肺组织中IL-1 β 蛋白表达水平,表明香叶木素通过调节炎症因子水平改善胎粪诱导的新生大鼠肺损伤。

NLRP3炎性小体作为固有免疫的重要组分,在机体免疫反应和疾病发生过程中具有重要作用。NLRP3炎性小体由NOD样受体蛋白家族成员凋亡相关斑点样蛋白和caspase-1组成,可以通过各种刺激激活细菌、病毒、真菌和垂死细胞的重要成分^[21]。蛋白酶caspase-1介导细胞因子IL-1 β 和IL-18,刺激促炎免疫应答,并保护生物体免于病原体诱导的死亡^[22]。已有研究表明,NLRP3炎性小体过度激活释放炎症介质,导致与肺部疾病相关的炎症反应^[23]。Liu等^[5]研究发现,香叶木素通过激活Nrf2通路,抑制NLRP3炎性小体,减轻脂多糖诱导的急性肺损伤。Zhang等^[24]研究发现,褪黑素通过抑制NLRP3和c-caspase-1蛋白表达治疗急性肺损伤。本实验结果与上述研究结果一致,香叶木素下调胎粪诱导的急性肺损伤中NLRP3、c-caspase-1和IL-1 β 蛋白水平,提示NLRP3炎症小体可能与胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤病情严重程度以及病程有关,可以作为评估其疾病进程的一个指标。

综上所述,香叶木素改善新生大鼠炎症反应、呼吸状况及病理损伤的效果较好,可将香叶木素用于治疗新生儿胎粪吸入性肺炎。本实验尚存在一定局限性,如纳入样本少,指标单一,还需配合机械通气治疗,因此香叶木素治疗胎粪吸入性肺炎的安全性和有效性仍需要进一步的临床试验加以探究和证实。

参考文献:

- [1] Liu J, Cao HY, Fu W. Lung ultrasonography to diagnose meconium aspiration syndrome of the newborn[J]. J Int Med Res, 2016, 44(6):1534-1542.

- [2] Chen DM, Wu LQ, Wang RQ. Efficiency of high-frequency oscillatory ventilation combined with pulmonary surfactant in the treatment of neonatal meconium aspiration syndrome[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8):14490-14496.
- [3] Swarnam K, Soraisham AS, Sivanandan S. Advances in the management of meconium aspiration syndrome[J]. *Int J Pediatr*, 2012, 2012:359571.
- [4] Jiang YS, Liu JG, Zhou ZM, et al. Diosmetin attenuates Akt signaling pathway by modulating nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)/inducible nitric oxide synthase (iNOS) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic nephropathy mice[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:7007-7014.
- [5] Liu QM, Ci XX, Wen ZM, et al. Diosmetin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through activating the Nrf2 pathway and inhibiting the NLRP3 inflammasome[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2018, 26(2):157-166.
- [6] Turhan AH, Atici A, Muslu N, et al. Erythropoietin may attenuate lung inflammation in a rat model of meconium aspiration syndrome[J]. *Exp Lung Res*, 2016, 42(4):199-204.
- [7] Turhan AH, Atici A, Muslu N, et al. The effects of pentoxifylline on lung inflammation in a rat model of meconium aspiration syndrome[J]. *Exp Lung Res*, 2012, 38(5):250-255.
- [8] Zhao H, Gu HY, Liu TM, et al. Analysis of curative effect of adjuvant therapy with bronchoalveolar lavage on COPD patients complicated with pneumonia[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(5):3799-3804.
- [9] Kääpä PO. Meconium aspiration syndrome (MAS)—Where do we go? Research perspectives[J]. *Early Hum Dev*, 2009, 85(10):627-629.
- [10] Zagariya A, Sierzputowska M, Navale S, et al. Role of meconium and hypoxia in meconium aspiration-induced lung injury in neonatal rabbits[J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010:204831.
- [11] Ota C, Gopallawa I, Ivanov V, et al. Protection of meconium-induced lung epithelial injury by protease inhibitors[J]. *J Lung Pulm Respir Res*, 2017, 4(5):145.
- [12] Liu J, Wen XJ, Liu B, et al. Diosmetin inhibits the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating the expression levels of MMP-2 and MMP-9[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3):2401-2408.
- [13] Chen XJ, Zhang B, Hou SJ, et al. Osthole improves acute lung injury in mice by up-regulating NRF-2/thioredoxin 1 [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2013, 188(2):214-222.
- [14] Dargaville PA. Inflammation in meconium aspiration syndrome—one of many heads of the hydra[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2016, 51(6):555-556.
- [15] de Beaufort AJ, Bakker AC, van Tol MJD, et al. Meconium is a source of pro-inflammatory substances and can induce cytokine production in cultured A549 epithelial cells[J]. *Pediatr Res*, 2003, 54(4):491-495.
- [16] Mokra D, Drgova A, Pullmann R Sr, et al. Selective phosphodiesterase 3 inhibitor olprinone attenuates meconium-induced oxidative lung injury[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2012, 25(3):216-222.
- [17] Cross LJ, Matthay MA. Biomarkers in acute lung injury: Insights into the pathogenesis of acute lung injury[J]. *Crit Care Clin*, 2011, 27(2):355-377.
- [18] Yu G, Rong W, Yin GJ, et al. Diosmetin ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis in mice by inhibiting the activation of the nuclear factor- κ B[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(5):2133-2142.
- [19] Thomas AM, Schjalm C, Nilsson PH, et al. Combined inhibition of C5 and CD14 attenuates systemic inflammation in a piglet model of meconium aspiration syndrome [J]. *Neonatology*, 2018, 113(4):322-330.
- [20] Zhang Y, Jiang YL, Lu DJ. Diosmetin suppresses neuronal apoptosis and inflammation by modulating the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway in a rat model of pneumococcal meningitis[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:2238-2245.
- [21] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, et al. Inflammasomes in health and disease[J]. *Nature*, 2012, 481(7381):278-286.
- [22] Kovarova M, Hesker PR, Jania L, et al. NLRP1-dependent pyroptosis leads to acute lung injury and morbidity in mice [J]. *J Immunol*, 2012, 189(4):2006-2016.
- [23] Kebaier C, Chamberland RR, Allen IC, et al. Staphylococcus aureus α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *J Infect Dis*, 2012, 205(5):807-817.
- [24] Zhang Y, Li XR, Grailer JJ, et al. Melatonin alleviates acute lung injury through inhibiting the NLRP3 inflammasome [J]. *J Pineal Res*, 2016, 60(4):405-414.

Effect of Diosmetin on Acute Lung Injury Induced by Meconium and Its Mechanism in Neonatal Rats

HAO Lixia¹, LU Rong², MA Xiaxia¹, FAN Shujuan³

(1. Department of Neonatology, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, China;

2. Department of Pediatrics 1 Ward, Affiliated Hospital of Yan'an University,

Yan'an 716000, China; 3. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Correspondence to: LU Rong, 81727839@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the therapeutic effect of diosmetin on fetal faecal-induced acute lung injury in neonatal rats. **Methods** Forty-eight neonatal male SD rats were enrolled. The rats were injected with 1.5 mL/kg fetal faecal by endotracheal intubation to replicate meconium lung injury model and randomly divided into 4 groups: control group, model group, methylprednil group and diosmetin group for subsequent experiments. Automatic blood gas analyzer was used to detect the arterial oxygenation index. Hematoxylin-eosin (HE) dye was used to detect the degree of lung tissue pathological injury and to evaluate the pathological score of lung injury. The lung tissue was removed and weighed 24 h after the establishment of lung injury model. The levels of inflammatory cytokines including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expressions of NOD-like receptor with pyrin domain 3 (NLRP3) inflammasome, cleaved caspase-1 (c-caspase-1) and IL-1 β proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the mean arterial oxygenation index of methylprednil group and diosmetin group decreased significantly (both $P < 0.05$), and the pathological damage degree and lung injury pathological score were significantly reduced (both $P < 0.05$), the levels of inflammatory factors TNF- α , IL-6 and IL-1 β as well as the expressions of NLRP3, c-caspase-1 and IL-1 β proteins were significantly lower (all $P < 0.01$). **Conclusion** Diosmetin can down-regulate the levels of NLRP3, c-caspase-1 and IL-1 β , as well as reduce the arterial oxygenation index and the levels of inflammatory cytokines, thereby can be used to treat neonatal rats with meconium-induced acute lung injury.

[Key words] Diosmetin; Meconium aspiration pneumonia; Inflammatory cytokines; NOD-like receptor protein 3; SD rats

川芎嗪对胶原诱导型关节炎大鼠细胞外调节蛋白激酶通路的影响

梁锦峰¹, 刘文华¹, 鄢宏², 邓少杰¹

(1. 深圳市宝安区人民医院骨科中心, 深圳 518100;

2. 深圳市第二人民医院骨关节外科, 深圳 518000)

[摘要] 目的 探讨川芎嗪对胶原诱导型关节炎大鼠细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)通路的影响。方法 30只SPF级雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组和川芎嗪组, 每组10只。对模型组和川芎嗪组大鼠进行胶原诱导型关节炎造模, 造模成功后川芎嗪组每日给予川芎嗪(0.1 g/kg), 连续灌胃给药28 d; 模型组、正常组给予相同体积生理盐水。每周测量3组大鼠的后足体积变化情况, 采用HE染色法观察各组大鼠炎性细胞浸润情况, 并采用实时荧光定量PCR和ELISA法检测大鼠滑膜组织及血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、血管生成素1(angiotensin 1, Ang-1)、白细胞介素1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平, 以及采用蛋白质印迹法检测大鼠滑膜组织中ERK通路相关蛋白的表达水平。结果 造模后第2周开始, 模型组大鼠后足体积显著大于对照组($P < 0.05$), 川芎嗪组大鼠后足体积与模型组同时间点比较显著降低($P < 0.05$); 同时模型组和川芎嗪组大鼠血清和滑膜组织中炎性因子TNF- α 、Ang-1、IL-1 β 及其mRNA表达水平均比对照组大鼠明显升高($P < 0.05$); 川芎嗪组大鼠滑膜组织中VEGF水平相比模型组降低($P < 0.05$); 模型组和川芎嗪组大鼠磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)蛋白表达水平均升高($P < 0.05$), 但川芎嗪组大鼠p-ERK1/2蛋白表达水平明显低于模型组($P < 0.05$)。结论 川芎嗪可能通过有效抑制ERK通路, 调节胶原诱导型关节炎大鼠血清和滑膜组织中TNF- α 、IL-1 β 水平, 缓解关节肿胀症状。

[关键词] 川芎嗪; 胶原诱导型关节炎; 细胞外信号调节激酶通路; 炎性因子; 大鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0391-06

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性骨关节炎, 主要病理改变为关节滑膜炎症性浸润以及患者运动功能受损, 临床症状表现为关节肿痛、关节畸形和行动不便。目前, 临床上治疗RA的主要方向是减轻患者关节炎症、改善患者骨侵蚀程度, 这需要通过抑制滑膜细胞增殖、血管翳形成而实现^[1]。RA发病机制尚未完全明确, 但已有研究^[2]证实一些炎性因

子如白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等在RA发病过程中发挥重要作用。细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)作为参与细胞信号转导的重要通路之一, 具有促进细胞增殖分化以及参与机体炎性反应功能。研究^[3]证实, ERK通路也参与了RA的发生和发展过程, RA的关节炎症性浸润病理改变与ERK通路存在紧密联系, 因此ERK通路在RA中的作用逐渐引起高度重视。川芎嗪(tetramethylpyrazine)是目前临床中医治疗RA的一种常用药物, 临床试验证实其具有抗炎、消肿和镇痛之功效, 可以有效缓解RA患者关节炎临

[收稿日期] 2020-01-02

[作者简介] 梁锦峰(1972—), 男, 副主任医师, 研究方向: 骨科关节、脊柱。E-mail: uzhuang26264@sina.com

床症状。同时川芎嗪还具有抑制血管内皮细胞增殖和新生血管生成的作用^[4],但川芎嗪治疗 RA 是否通过干预 ERK 通路起效仍需要进一步研究证实。本研究通过建立胶原诱导型关节炎大鼠模型,观察川芎嗪对关节炎模型大鼠病理学变化和体内炎性因子水平的影响,探讨和分析川芎嗪治疗 RA 的起效机制以及对 ERK 通路的影响。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂及仪器

30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, (10.23 ± 2.15) 周龄, 体质量 300~350 g, 购自深圳康泰生物制品股份有限公司[SCXK(粤)2018-0193]。动物饲养于康美华大基因技术有限公司[SYXK(粤)2019-0205], 动物实验伦理审批文号: 医科伦审-2018017。TNF- α 、血管生成素 1 (Ang-1)、IL-1 β 和血管内皮生长因子 (VEGF) 抗体试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司; 磷酸川芎嗪片购自广州康和药业有限公司 (规格 50 mg, 国药准字 H44024272); 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 反转录试剂盒和总 RNA 提取试剂盒购自美国赛默飞公司。

荧光定量 PCR 仪 (型号 ABI 7500, 美国赛默飞公司); 高速冷冻离心机 (型号 Mikro220R, 德国 Hettich 公司); 电泳仪和电泳槽 (型号分别为 DYCZ、DYCP, 中国北京六一仪器厂); 分光光度计 (型号 UV-2000, 美国安捷伦科技公司); 酶标仪 (型号 EL30, 美国 Bio-Tek 公司); ELISA 分析软件 (ReaderFit, 中国杭州艾米绿公司); 96 孔酶标板 (美国 Costar 公司)。

1.2 方法

将 30 只大鼠随机分为对照组、模型组和川芎嗪组, 每组各 10 只, 采用文献报道的胶原诱导型关节炎造模方法^[5-6]: 将 20 mg 鸡 II 型胶原充分溶解于 10 mL 浓度为 0.1 mol/L 的乙酸中, 得到质量浓度为 2 g/L 的鸡 II 型胶原, 然后将等体积弗氏完全佐剂与该溶液混合并乳化完全得到乳化剂。造模成功后, 川芎嗪组每日给予川芎嗪 (0.1 g/kg) (其中磷酸川芎嗪片使用适量生理

盐水溶解, 配制成灌胃混悬液), 连续灌胃给药 28 d; 模型组、正常组给予相同体积生理盐水。每周测量 3 组大鼠后足体积变化情况, 采取 HE 染色法观察各组大鼠炎性细胞浸润情况, 采用 ELISA 法测定各组大鼠滑膜组织及血清中 TNF- α 、Ang-1、IL-1 β 、VEGF 水平, 另外采用蛋白质印迹法检测各组大鼠 ERK1/2 蛋白及磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 蛋白的表达水平。

1.3 观察指标及评价标准

1.3.1 各组大鼠关节肿胀度测定及比较 造模成功后, 使用记号笔在大鼠足部踝骨关节突出位置作标记, 每周使用排水法^[7]测量并记录各组大鼠后足的体积大小, 每只大鼠每次测定 3 次, 取平均值。

1.3.2 各组大鼠组织病理学变化比较 于实验 28 d 脊椎脱臼法处死大鼠后, 使用体积分数 10% 的多聚甲醛溶液浸泡大鼠双后肢膝关节 1 d, 然后使用体积分数 5% 的硝酸溶液浸泡膝关节组织 2 周, 浸泡至组织脱钙完全且能够顺畅切断骨质后, 重新使用体积分数 10% 的多聚甲醛溶液浸泡, 然后进行石蜡包埋、切片以及 HE 染色。

1.3.3 各组大鼠滑膜组织及血清中炎性因子水平测定 于实验 28 d 脊椎脱臼法处死大鼠前采集大鼠动脉血 4 mL, 离心后分离得到上层血清。另外, 手术切取大鼠膝关节滑膜组织, 用 ELISA 试剂盒检测所有样本中 TNF- α 、IL-1 β 、Ang-1 以及 VEGF 水平。严格按试剂盒操作说明检测, 使用酶标仪进行样品检测。

1.3.4 滑膜组织各炎性因子 mRNA 表达测定 分别取各组大鼠关节滑膜组织, 用总 RNA 提取试剂盒提取组织中总 RNA, 使用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 样品吸光度比值 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$ 视为合格。采用反转录试剂盒将总 RNA 进行反转录, 分别得到模板单链 cDNA, 然后使用 PCR 试剂盒对 cDNA 进行 PCR。PCR 反应条件为 95 °C 30 s, 退火 60 °C 40 s, 延伸 72 °C 30 s; 连续循环 30 次。然后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算血清 mRNA 相对表达量^[8]。

1.3.5 蛋白质印迹法测定 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达水平 剪取各组小鼠滑膜组织并加入裂解缓冲液, 当组织得到充分匀浆后将其静置一段时

间,然后放入离心机以 12 000 r/min 离心 20 min,取出上清液后采用 BCA 法对 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白进行定量测定。使用 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳对蛋白样品进行分离后,将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,使用封闭液将样品于室温下封闭 2 h。将膜转入封闭液稀释的一抗,4℃过夜后使用 PBST 冲洗液进行洗涤,加二抗后继续于室温下孵育 1 h,洗涤后采用电化学发光法检测并进行印迹成像。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件分析不同组别各项指标间差异,多组间采用方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠关节肿胀度

从第 2 周开始,模型组大鼠后足开始发生明显肿胀,后足体积显著大于川芎嗪组和对照组($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 大鼠关节组织病理学观察

对照组大鼠关节结构完整且关节面光滑,关节间隙大小正常,未显示存在炎性浸润和滑膜组

织增生,关节两端未发生骨侵蚀(图 1A);模型组大鼠关节腔间隙比对照组显著变大,且间隙中填充有滑膜增生组织,存在炎性浸润和骨侵蚀现象,关节面和关节结构被破坏(图 1B)。川芎嗪组大鼠关节病理切片情况相比模型组有明显好转,关节面较清晰,关节间隙轻微增大,存在轻微炎性浸润情况,但未发生明显骨侵蚀,骨关节结构比较完整(图 1C)。

2.3 大鼠血清和滑膜组织中炎性因子水平

模型组和川芎嗪组大鼠血清和滑膜组织中炎性因子 TNF- α 、Ang-1、IL-1 β 表达水平比对照组大鼠均显著升高($P < 0.05$),同时川芎嗪组大鼠血清和滑膜组织中各炎性因子水平比模型组均降低($P < 0.05$)。各组大鼠血清中均未检测到 VEGF,但模型组和川芎嗪组大鼠滑膜组织中 VEGF 水平均升高($P < 0.05$),且川芎嗪组明显低于模型组($P < 0.05$) (表 2)。

2.4 大鼠滑膜组织各炎性因子 mRNA 表达

与对照组相比,模型组和川芎嗪组大鼠滑膜组织中各炎性因子 mRNA 表达水平均显著升高($P < 0.05$);川芎嗪组大鼠各炎性因子 mRNA 水平与模型组相比均显著降低($P < 0.05$) (表 3)。

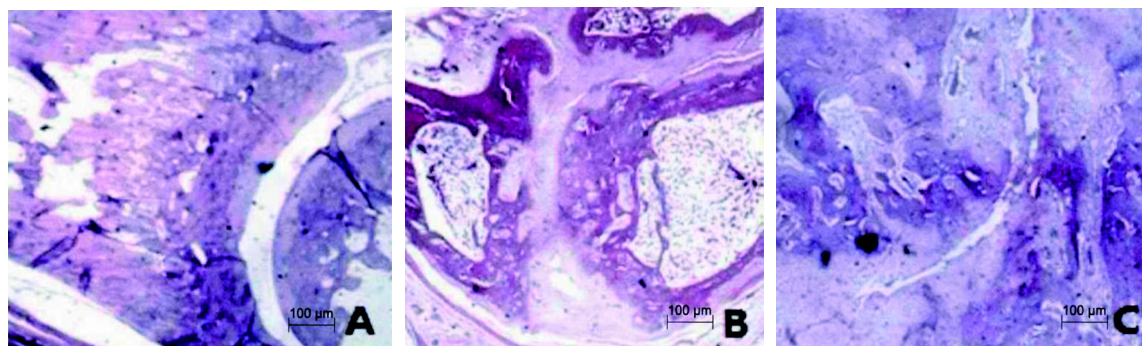
表 1 各组大鼠关节肿胀度测定

Table 1 Results of joints welling test in rats

($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	用药后时间			
		1 周	2 周	3 周	4 周
对照组	10	1.08 $\pm$ 0.24	1.06 $\pm$ 0.24	1.09 $\pm$ 0.31	1.11 $\pm$ 0.28
模型组	10	1.05 $\pm$ 0.19	1.62 $\pm$ 0.30*	1.97 $\pm$ 0.42*	2.05 $\pm$ 0.43*
川芎嗪组	10	1.10 $\pm$ 0.23	1.31 $\pm$ 0.27*#	1.59 $\pm$ 0.38*#	1.55 $\pm$ 0.46*#

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。



A 为对照组, B 为模型组, C 为川芎嗪组。

图 1 大鼠关节组织病理学观察 (HE 染色)

Figure 1 Pathological observation on joint tissues in rats (HE staining)

2.5 大鼠滑膜组织 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达
与对照组比较, 模型组和川芎嗪组大鼠滑膜组织 p-ERK1/2 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$),

但川芎嗪组表达水平低于模型组 ($P < 0.05$); 模型组和川芎嗪组大鼠 ERK1/2 蛋白表达水平与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 4)。

表 2 大鼠滑膜组织和血清中炎症因子水平

Table 2 The levels of inflammatory factor levels in synovial tissue and serum of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清			滑膜组织			
		TNF- α	Ang-1	IL-1 β	TNF- α	Ang-1	IL-1 β	VEGF
		$\rho/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$
对照组	10	8.85 $\pm$ 0.10	8.05 $\pm$ 1.15	45.71 $\pm$ 8.20	54.47 $\pm$ 5.69	8.68 $\pm$ 1.52	38.25 $\pm$ 7.41	75.62 $\pm$ 8.45
模型组	10	656.35 $\pm$ 12.74*	23.20 $\pm$ 2.01*	756.35 $\pm$ 20.41*	263.65 $\pm$ 15.25*	58.25 $\pm$ 6.87*	123.24 $\pm$ 12.36*	146.57 $\pm$ 10.14*
川芎嗪组	10	235.41 $\pm$ 10.32**	15.74 $\pm$ 2.06**	352.28 $\pm$ 15.26**	68.34 $\pm$ 6.85**	23.54 $\pm$ 5.14**	42.36 $\pm$ 8.55**	104.46 $\pm$ 8.56**

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ** $P < 0.05$ 。

表 3 大鼠滑膜组织各炎症因子 mRNA 表达

Table 3 The mRNA expressions of inflammatory factors in synovial tissues of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α	Ang-1	IL-1 β	VEGF
对照组	10	0.89 $\pm$ 0.11	0.88 $\pm$ 0.17	0.78 $\pm$ 0.12	1.20 $\pm$ 0.12
模型组	10	3.98 $\pm$ 0.69*	3.98 $\pm$ 0.41*	4.89 $\pm$ 0.54*	7.65 $\pm$ 0.46
川芎嗪组	10	2.12 $\pm$ 0.54**	1.56 $\pm$ 0.25**	1.56 $\pm$ 0.23**	2.31 $\pm$ 0.32**

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, 与模型组比较, ** $P < 0.05$ 。

表 4 大鼠滑膜组织 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达水平

Table 4 The expressions of ERK1/2 and p-ERK1/2 proteins in synovial tissues of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ERK1/2	p-ERK1/2
对照组	10	1 080.41 $\pm$ 100.25	720.84 $\pm$ 85.42
模型组	10	1 102.62 $\pm$ 125.69	1 052.98 $\pm$ 100.56*
川芎嗪组	10	1 185.17 $\pm$ 130.41	896.23 $\pm$ 60.82**

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, 与模型组比较, ** $P < 0.05$ 。

3 讨论

胶原诱导性关节炎大鼠模型是一种慢性免疫炎症性动物模型, 已被学术界认可作为研究 RA 发病机制的理想动物模型^[9]。ERK 作为与细胞信号转导和炎症反应密切相关的信号通路, 与 RA 的新生血管生成、细胞增殖分化、炎症浸润以及蛋白酶表达等过程密切相关, 在 RA 整个发生和发展过程中活跃度很高^[10]。TNF- α 、IL-1 β 是促炎性 Th1 细胞分泌的一些重要炎症因子, 其中 IL-1 β 属于炎症始动因子, 高 IL-1 β 水平会刺激软骨细胞过度合成胶原酶以及致炎致痛物质前列腺素 E2, 同时促进嗜中性粒细胞、巨噬细胞聚集于关节滑膜, 从而产生关节滑膜炎性反应, 导致软骨基质

发生降解^[11]。TNF- α 不仅可以诱导炎症反应, 还能促进成纤维细胞增生, 以及导致软骨受损^[12]。在 RA 患者体内 Th1 和 Th2 细胞处于失衡状态, 其中 Th1 细胞及其分泌的促炎细胞因子占据绝对优势。本研究发现 RA 模型大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 等 Th1 促炎因子相比正常组大鼠明显升高 ($P < 0.05$)。有研究表明, VEGF、基质金属蛋白酶等一些与血管新生相关的细胞因子在 RA 患者血清和关节滑膜组织中也呈现明显高表达, 且与患者 RA 疾病严重程度存在显著正相关性^[13]。以上研究结果说明上述细胞因子共同参与了 RA 疾病的进展, 促进新生血管生成、炎症浸润以及骨侵蚀过程。

川芎嗪是从中药材川芎中提取出来的一种活性成分, 其药理作用如抗新生血管生成、抑制细胞分化增殖和抑制炎症反应等均已得到充分证实, 且大量临床研究和基础研究证实川芎嗪可以缓解 RA 患者临床症状^[14]。本研究结果显示, 造模后第 2 周开始, 模型组大鼠后足体积以及炎症因子 TNF- α 、Ang-1、IL-1 β 水平显著大于或者高于对照组和川芎嗪组 ($P < 0.05$); 且病理观察显示, 模型组大鼠关节腔间隙存在炎症浸润、滑膜

增生组织和骨侵蚀现象, 关节面和关节结构被破坏, 而川芎嗪组大鼠关节间隙炎性损伤程度明显低于模型组大鼠, 未发生明显骨侵蚀, 骨关节结构相对较完整, 表明川芎嗪可降低炎性反应, 减轻后足炎性损伤。谢平金等^[15]研究发现, 使用川芎嗪对模型大鼠进行干预后, 大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 表达水平相对于模型组显著降低 ($P < 0.05$), 证实川芎嗪在治疗 RA 中发挥显著抗炎作用。另外, 本研究结果表明, 模型组和川芎嗪组大鼠 p-ERK1/2 蛋白表达水平相比对照组均显著升高 ($P < 0.05$), 但川芎嗪组相比模型组显著降低 ($P < 0.05$), 说明模型大鼠中 p-ERK1/2 蛋白存在过度表达, 而川芎嗪可以通过抑制 ERK 信号通路促进 ERK1/2 磷酸化即增加 p-ERK1/2 蛋白表达水平。李巍等^[16]研究表明, 川芎嗪可以通过抑制滑膜组织 ERK 通路活化, 有效降低胶原诱导型关节炎模型动物血清和滑膜组织中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-12 炎性因子表达水平 ($P < 0.05$), 与本研究结果一致。王春亮等^[17]研究发现, IL-1 和 TNF- α 可以快速激活成纤维样滑膜细胞中 ERK、c-JUN 氨基末端蛋白激酶和 P38 激酶活性, 激活后的 ERK 和 P38 又会进一步诱导 IL-1 和 TNF- α 等细胞因子表达, 进而导致 RA 的发生发展。白菁安等^[18]报道, 川芎嗪治疗 RA 的起效机制可能与抑制 ERK 通路活化过程存在密切联系。结合本次研究结果, 笔者认为川芎嗪治疗 RA 的起效机制可能是由于川芎嗪显著减少炎性因子分泌, 抑制机体淋巴细胞增殖, 从而抑制 ERK 通路, 降低 ERK 相关蛋白表达水平, 最终有效改善大鼠关节肿胀症状, 缓解关节组织的病理情况。

本研究采用的是经典 RA 大鼠造模方法, 已有大量文献报道验证, 故研究中仅对造模组血清和滑膜组织炎性反应进行评估, 就可以判断造模成功。同时考虑到本研究主要目的是观察川芎嗪对炎性因子和 ERK 通路相关蛋白表达的影响, 因此着重关注川芎嗪组与模型组和空白对照组的比较, 未设置阳性药对照组, 后续可进一步完善。

综上所述, 川芎嗪可能通过有效抑制 ERK 通路, 调节胶原诱导型关节炎大鼠血清和滑膜组织中 TNF- α 、IL-1 β 等炎性因子水平, 缓解关节肿胀症状。

参考文献:

- [1] Strangfeld A, Richter A, Siegmund B, et al. Risk for lower intestinal perforations in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab in comparison to treatment with other biologic or conventional synthetic DMARDs [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(3):504-510.
- [2] Javadi F, Ahmadzadeh A, Eghtesadi S, et al. The effect of Quercetin on inflammatory factors and clinical symptoms in women with rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized controlled trial[J]. *J Am Coll Nutr*, 2017, 36(1):9-15.
- [3] Borges G, Miguelez C, Neto F, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) in the locus coeruleus contributes to pain-related anxiety in arthritic male rats[J]. *Int J Neuropsychoph*, 2017, 20(6):463.
- [4] Usoltsev AN, Adonin SA, Abramov PA, et al. Tetra- and pentanuclear iodobismuthates with the cation based on 2, 3,5,6-tetramethylpyrazine: syntheses and crystal structures[J]. *Russ J Coord Chem*, 2018, 44(12):772-778.
- [5] 梁洁, 赵向聪, 牛红青, 等. ATP 结合盒转运蛋白在胶原诱导性关节炎模型鼠的差异表达及其与血清炎性细胞因子的相关性研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2019, 23(3): 153-159.
- [6] 周强, 吕厚山, 栗占国. 胶原诱导的关节炎动物模型研究现状及进展[J]. *中华风湿病学杂志*, 2003, 7(4):227-231.
- [7] 蔡国伟, 李柏村, 李佳, 等. 温针灸对骨关节炎大鼠软组织 Clock、Bmal1 蛋白的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(10):1225-1229.
- [8] Liu N, Feng X, Wang W, et al. Paenol protects against TNF- α -induced proliferation and cytokine release of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by upregulating FOXO3 through inhibition of miR-155 expression[J]. *Inflammation Res*, 2017, 66(7):1-8.
- [9] Serchov T, Heumann R, Van Calker D, et al. Signaling pathways regulating Homer1a expression[J]. *Biol Chem*, 2017, 397(3):207-214.
- [10] Yeh CC, Mann MJ, Fan Y, et al. Atrial ERK1/2 activation in the embryo leads to incomplete Septal closure: a novel mouse model of atrial Septal defect[J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1):89-94.
- [11] 樊莎莎, 宗明, 陆英, 等. 体外实验经典活化型巨噬细胞抑制类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖[J]. *中华风湿病学杂志*, 2015, 19(8):540-544.
- [12] Thanapati S, Ganu M, Giri P, et al. Impaired NK cell functionality and increased TNF- α production as biomarkers of chronic chikungunya arthritis and rheumatoid arthritis [J]. *Hum Immunol*, 2017, 78(4):370-374.

- [13] Äyräväinen L, Heikkinen A M, Kuuliala A, et al. Inflammatory biomarkers in saliva and serum of patients with rheumatoid arthritis with respect to periodontal status [J]. *Ann Med*, 2018, 50(4):1-38.
- [14] 朱海泉, 刘子敏, 孟祥圣, 等. 川芎嗪抑制 NF- κ B P65 磷酸化对 LPS 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡和炎症反应的调节作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(2):59-63.
- [15] 谢平金, 余翔, 柴生颢, 等. 川芎嗪干预早期膝骨关节炎大鼠软骨 II 型胶原纤维 α 1 基因与血管内皮生长因子 mRNA 及 miR20b 的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(12):1846-1851.
- [16] 李巍, 冼呈, 赵劲民, 等. 骨髓间充质干细胞移植联合川芎嗪膝关节腔注射治疗兔膝关节骨关节炎[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(5):18-22.
- [17] 王春亮, 王林, 潘继红. TNF- α 对类风湿性关节炎患者滑膜成纤维细胞 RUNX3 表达的影响及意义[J]. *山东医药*, 2018, 58(20):21-24.
- [18] 白菁安, 边艳琴, 牛旭艳, 等. 川芎嗪联合来氟米特对胶原诱导关节炎大鼠血小板活化和炎症反应的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017(7):953-956.

Effect of Tetramethylpyrazine on Extracellular Regulated Protein Kinase Pathway in Collagen-induced Arthritis Rats

LIANG Jinfeng¹, LIU Wenhua¹, YAN Hong², DENG Shaojie¹

(1. Department of Orthopedic, Shenzhen Baoan District People's Hospital, Shenzhen 518100, China)

2. Department of Bone and Joint Surgery, Shenzhen 518000, China)

Correspondence to: LIANG Jinfeng, uzhuang26264@sina.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of tetramethylpyrazine (TMP) on the extracellular regulated protein kinase (ERK) pathway in collagen-induced arthritis rats. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into control group, model group and TMP group, with 10 rats in each group. The rats in the model group and the TMP group were modeled with collagen-induced arthritis. After the successful modeling, the TMP group was treated daily with TMP (0.1 g/kg) by intragastric administration, for continuous 28 d. The model group and the normal group were given the same volume of physiological saline. The volume changes of the hind paws in the three groups were measured weekly, and the inflammatory cell infiltration of each group was observed by HE staining. The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), angiopoietin 1 (Ang-1), interleukin 1 β (IL-1 β) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in synovial tissue and serum of rats were detected by real-time PCR and ELISA, respectively. The expressions of ERK pathway-related proteins in synovial tissues were detected by Western blotting. **Results** From the second week after modeling, the hind paw volume in the model group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the one in the TMP group was lower than that in the model group ($P < 0.05$). The expression levels of inflammatory factors TNF- α , Ang-1 and IL-1 β in the model group and the TMP group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), but the ones in the TMP group were lower than those in the model group ($P < 0.05$). The level of VEGF in the synovial tissue of rats in the TMP group was lower than that of the model group ($P < 0.05$). The expression of p-ERK1/2 protein in the model group and the TMP group was increased ($P < 0.05$), and the expression level of p-ERK1/2 protein in the TMP group was lower than that of the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** TMP can effectively regulate the levels of TNF- α and IL-1 β in serum and synovial tissue of rats with collagen-induced arthritis and alleviate the symptoms of joint swelling by inhibiting the ERK pathway.

[Key words] Tetramethylpyrazine; Collagen-induced arthritis; Extracellular regulated protein kinase pathway; Inflammatory factor; Rats

眼缺血综合征大鼠视网膜形态及 RhoA 和 ROCK-2 表达的变化

安 鑫, 刘兰静, 步建平

(首都医科大学大兴教学医院眼科, 北京 102600)

[摘要] 目的 通过建立眼缺血综合征(OIS)大鼠模型, 观察缺血后视网膜形态及 RhoA、ROCK-2 在大鼠视网膜中表达的差异。方法 Brown Norway 大鼠 20 只随机均分为 OIS 模型组及假手术组。OIS 模型组大鼠采用双侧颈总动脉完全结扎法(BCCAO)造模; 假手术组大鼠仅对其游离而不结扎。行苏木精-伊红(HE)染色观察建模3个月后2组大鼠视网膜神经节细胞数量及视网膜各层厚度; 采用免疫组织化学法和蛋白质印迹法分析2组大鼠 RhoA 和 ROCK-2 在视网膜中的表达水平。结果 模型组中9只大鼠造模成功。与假手术组相比, 模型组大鼠视网膜神经节细胞数量显著下降 ($P < 0.01$); 视网膜总厚度和内丛状层、内核层及外丛状层厚度均显著降低 (均 $P < 0.05$); 外核层厚度相对变薄, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与假手术组相比, 模型组大鼠视网膜中 RhoA 蛋白和 ROCK-2 蛋白表达水平均显著升高 (前者 $P < 0.01$, 后者 $P < 0.05$)。结论 OIS 模型组中 RhoA、ROCK-2 表达显著升高, 或可为该病的防治研究提供新的思路。

[关键词] 眼缺血综合征; 大鼠模型; RhoA; ROCK-2

[中图分类号] R73-3; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0397-06

眼缺血综合征(ocular ischemic syndrome, OIS)是一类累及眼部及脑部等器官的多学科的疾病, 患者通常可伴有颈动脉不同程度的狭窄及阻塞^[1]。由于该病起病隐匿, 早期诊断困难, 后期严重损害患者视力, 甚至致盲, 所以对 OIS 发病机制的研究尤为重要。目前研究已证实, 利用双侧颈总动脉完全结扎(BCCAO)法不仅可以制作慢性脑缺血的动物模型; 同时因为 BCCAO 可导致视网膜慢性缺血而被尝试作为 OIS 建模方法^[2]。Rho (Ras-related monomer guanosine triphosphate kinase) / Rho 激酶信号通路与钠/钾/钙离子信号通路一样, 体内分布广泛, 通过介导

细胞凋亡、细胞增殖和细胞收缩等参与机体多种生理及病理过程。研究表明 Rho/Rho 激酶通路对于视网膜缺血再灌注、急性视网膜缺血等发挥重要作用^[3-4], 但是在视网膜慢性缺血如 OIS 中的作用鲜有报道。有学者在 BCCAO 导致慢性脑缺血的动物模型中发现, 脑缺血后脑皮质及海马 RhoA、ROCK-2 (Rho-associated coiled coil forming protein kinase-2) 表达增加^[5]; 由于视网膜组织及血管与脑部构造高度相似, 推测在眼部慢性缺血, 尤其是 OIS 中可能也存在同样的改变。本实验将初步探索 OIS 模型与 RhoA、ROCK-2 表达的关系, 从而为临床诊治 OIS 提供新的思路。

[收稿日期] 2020-03-17

[作者简介] 安 鑫(1987—), 女, 硕士, 医师, 主要从事眼底病研究。E-mail: 1766514920@qq.com

[通信作者] 步建平(1979—), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事眼底病研究。E-mail: bujianping-2004@sohu.com

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级近交系雄性 BN 大鼠 20 只, 2~3 月龄,

250~300 g, 购自北京维通利华公司[SCXK(京)2016-0006]。大鼠饲养于18~25℃室温环境, 相对湿度50%~70%[SYXK(京)2017-0019], 自由饮食。

1.2 动物模型的建立

20只大鼠采用抽签随机法分为2组, 每组10只。OIS模型组大鼠采用BCCAO法造模^[6]; 假手术组中只游离大鼠双侧颈总动脉, 其余处理同模型组。两组大鼠术后自由饮食, 常规消毒颈部伤口, 未使用镇痛药及抗生素。

1.3 组织学观察

术后3个月将大鼠脱颈椎处死, 取大鼠双侧眼球置于质量分数4%的多聚甲醛溶液中固定24 h, 依次经过梯度乙醇脱水、二甲苯透明和组织浸蜡, 将眼球包埋成石蜡包块。按照平行于视盘至角膜的矢状位平面纵向切片(厚度为7 μm), HE染色后在光学显微镜下观察并拍照。选择100倍视野下观察2组大鼠眼球视网膜神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)5个不同区域中神经节细胞数, 应用Image-Pro Plus 5.0软件观察距视盘边缘200 μm处的视网膜厚度, 分别测量视网膜总厚度(total retina thickness, TRT)以及外核层(outer nuclear layers, ONL)、外丛状层(outer plexiform layer, OPL)、内核层(inner nuclear layer, INL)和内丛状层(inner plexiform layer, IPL)厚度(μm), 每个样本测量5次, 取其平均值。

1.4 免疫组织化学法测定RhoA和ROCK-2蛋白在视网膜中的表达

石蜡切片脱蜡脱水。按照常规组织化学方法及试剂盒说明分别进行RhoA和ROCK-2免疫组织化学检测, 用PBS代替一抗作阴性对照, 显色剂显色, 自来水充分冲洗, 对比染核及封固。在高倍镜下随机选取5个视野观察阳性细胞, 即细胞质中有棕黄色颗粒者。采用Image-Pro Plus 5.0软件测量平均吸光度。

1.5 蛋白质印迹法检测RhoA和ROCK-2蛋白表达量

摘取麻醉大鼠双眼眼球并提取视网膜组织, 将其放入-80℃冰箱中保存。取视网膜组织加入裂解液, 离心并提取视网膜组织蛋白, 用Lowry

法测定蛋白浓度。取总蛋白20 μL, 经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 进行蛋白质转膜, 加入抗体显色, 采用UVP凝胶数字成像系统将β-actin表达量作为内参进行结果分析, 用Image-Pro Plus 5.0软件测定灰度值, 目的蛋白的表达水平按照目的蛋白条带和内参条带的比值计算。

1.6 统计学处理

统计学分析采用SPSS 18.0软件进行, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 采用两独立样本的 t 检验进行计量资料分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模术后情况

造模当日OIS模型组中1只大鼠死亡, 可能与手术中出血较多、代偿能力差有关。其余大鼠正常存活, 饮食、饮水及活动正常。

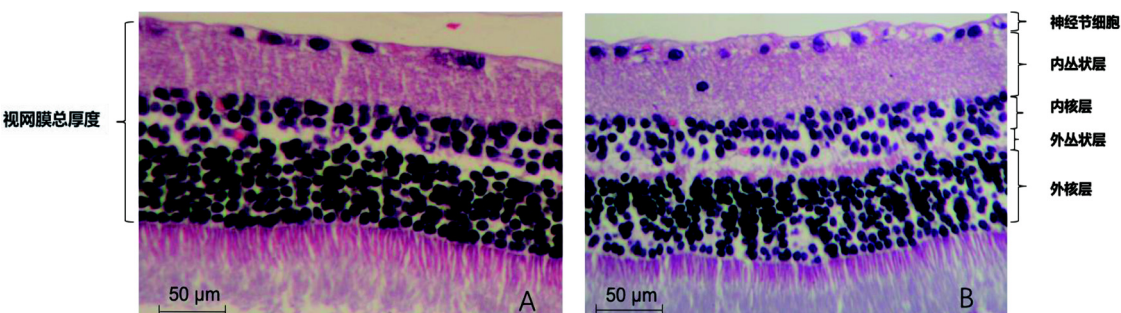
2.2 大鼠视网膜组织学观察

由视网膜HE染色切片观察, OIS模型组大鼠视网膜神经节细胞数量(图1A)较假手术组(图1B)明显减少; 分别计算两组神经节细胞单位面积密度, 结果与所观察一致, 与假手术组神经节细胞数量(819.9 ± 311.0)相比, OIS模型组(280.2 ± 78.0)显著降低($P < 0.01$)。两组大鼠视网膜厚度测量结果显示, 与假手术组相比, OIS模型组TRT明显减小($P < 0.05$), OIS模型组INL、IPL及OPL厚度与TRT变化一致, 均明显变薄(均 $P \leq 0.01$), ONL相对变薄, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

2.3 视网膜中RhoA和ROCK-2的分布及表达

免疫组织化学法检测发现, RhoA和ROCK-2蛋白主要集中表达在神经节细胞层胞质、IPL、INL和OPL中(图2); 假手术组大鼠视网膜可观察到少量RhoA和ROCK-2表达; 与假手术组相比, OIS模型组视网膜中RhoA蛋白表达水平升高($P < 0.05$), ROCK-2蛋白表达水平增高($P < 0.05$)(表2)。

蛋白质印迹法检测结果显示, 在2组大鼠视网膜组织蛋白样本量及内参照β-actin条带灰度基本相同的前提下, 与假手术组RhoA蛋白(1.27 ± 0.23)相比, OIS模型组RhoA蛋白表达水平

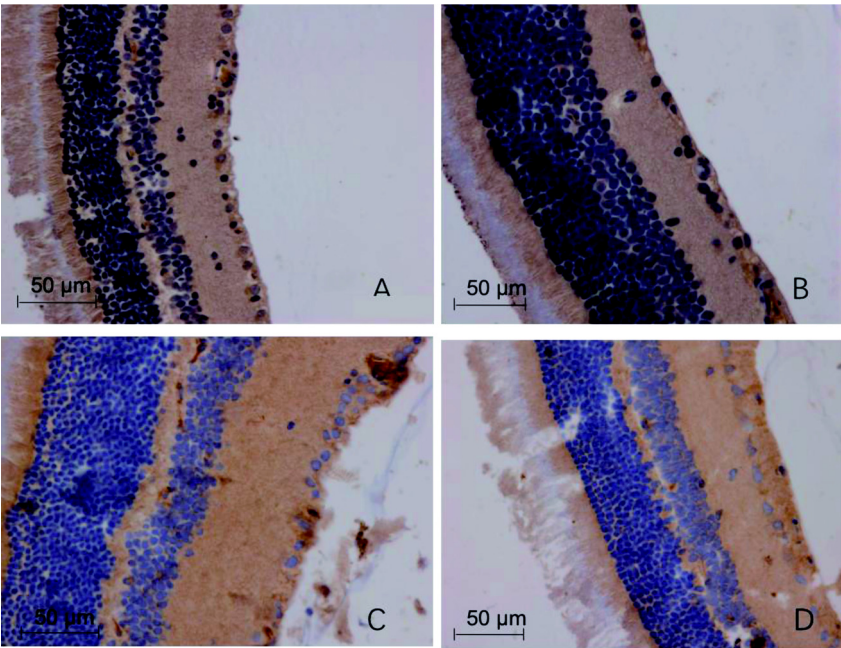


A 为 OIS 模型组，B 为假手术组。
图 1 各组大鼠视网膜组织学观察 (HE 染色)
Figure 1 Histological observation on retina of rats in OIS model group and the sham group (HE staining)

表 1 各组大鼠各层视网膜厚度比较
Table 1 Retinal thickness of rats in OIS model group and the sham group

		(厚度/μm, $\bar{x} \pm s$)				
组别	n	IPL	INL	OPL	ONL	TRT
OIS 模型组	9	24.76 ± 1.56	15.23 ± 3.12	6.88 ± 1.67	37.88 ± 9.72	96.28 ± 13.89
假手术组	9	41.05 ± 9.68	24.77 ± 5.78	10.66 ± 1.90	50.73 ± 10.59	139.43 ± 28.59
t 值		3.715	3.339	3.341	2.000	3.036
P 值		0.006	0.010	0.010	0.081	0.016

注：IPL，内丛状层；INL，内核层；OPL，外丛状层；ONL，外核层；TRT，视网膜总厚度。



A 示 OIS 模型组视网膜中 RhoA 的表达，B 示假手术组视网膜中 RhoA 的表达，C 示 OIS 模型组视网膜中 ROCK-2 的表达，D 示假手术组视网膜中的 ROCK-2 的表达。

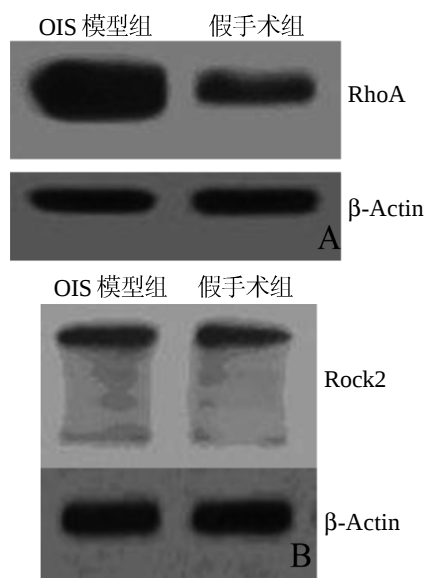
图 2 免疫组织化学法观察各组大鼠视网膜 RhoA、ROCK-2 的表达
Figure 2 Immunohistochemical assay of RhoA and ROCK-2 in retinal tissues of rats in the OIS model group and the sham group

(2.41 ± 0.38) 显著升高 ($P < 0.01$); 同时 OIS 模型组 ROCK-2 蛋白表达水平 (0.40 ± 0.08) 高于假手术组 (0.25 ± 0.05) ($P < 0.05$) (图 3)。

表 2 免疫组织化学法检测大鼠视网膜中 RhoA 和 ROCK2 蛋白表达

Table 2 Expressions of RhoA and ROCK-2 proteins in rat retina detected by immunohistochemical assay

组别	n	RhoA	ROCK2
OIS 模型组	9	0.26 ± 0.02	0.23 ± 0.02
假手术组	9	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.01
t 值		2.750	2.330
P 值		0.016	0.031



A 示 RhoA 蛋白在两组视网膜的表达, B 示 ROCK-2 蛋白在两组视网膜的表达。n=5。

图 3 蛋白质印迹法检测各组大鼠视网膜中 RhoA 和 ROCK-2 表达

Figure 3 Expressions of RhoA and ROCK-2 proteins in retina of rats detected by Western blotting

3 讨论

采用 BCCAO 法研究眼部缺血性病变, 尤其是 OIS, 已得到越来越多的认可^[7]。双侧颈总动脉被结扎后, 眼动脉进一步缺血, 但可以通过椎动脉等代偿性供血, 从而导致眼部局部缺血, 所以 BCCAO 法导致的眼部组织及功能损伤过程与 OIS 极为相似^[8]。颈总动脉结扎后, 眼球局部缺血加速神经节细胞及光感受器变性, 从而进一步

引起感觉传入神经阻滞和视神经束变性, 最终导致瞳孔反射消失^[6,9]。

本研究发现, BCCAO 术后神经节细胞明显减少, 同时内层视网膜即内丛状层厚度变薄显著。Yamamoto 等^[10]发现, 术后 1 周神经节细胞减少 40%~60%。眼部缺血后内层视网膜最为敏感, 其主要原因为 BCCAO 术后眼部血供减少, 为内层网膜供血的视网膜中央动脉进一步缺血缺氧, 加之其为终末动脉且无侧枝循环, 最终加速视网膜神经节细胞数量减少及各种其他细胞的凋亡, 视网膜萎缩变薄。本研究结果显示, BCCAO 术后 90 d 除 ONL 外各层网膜变薄。Yamamoto 等^[10]研究也发现 BCCAO 术后 2 周即可观察到 INL 退行性改变, 与本实验结果相符。但 Daniel 等^[8]在术后 1 个月只观察到 IPL 损伤, 其他层改变无统计学意义, 延迟损害的原因可能是由于大鼠血管的先天性异常及麻醉药物的不同。本实验中发现 ONL 相对变薄, 但差异无统计学意义, 可能原因为外层视网膜的血供主要来源于脉络膜, 脉络膜的血供主要来源于睫状后短动脉, 且侧枝循环丰富, 彼此交通, 故外层视网膜往往损伤较小。但是 Davidson 等^[11]和 Stevens 等^[12]研究结果与本研究结果相反, 大鼠 BCCAO 术后视网膜 ONL 厚度明显减少, 可能原因是术后脉络膜急性缺血, 从而导致外层视网膜急性缺血。

Rho/Rho 激酶信号通路包括 Rho、Rho 激酶 (ROCK) 和肌球蛋白磷酸酶 (myosin phosphatase, MP)。其中 RhoA 是目前研究最多的 Rho 蛋白^[13]。ROCK 分为 ROCK-1 和 ROCK-2, 是 Rho 的下游靶效应分子中最主要的效应分子; 前者主要分布于非神经组织中, 如骨骼肌等; 后者主要分布于心脏和中枢神经系统^[14]。被激活的 ROCK 作用于 MP, 使肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC) 增加或减少磷酸化水平, 从而诱导细胞的收缩和舒张, 产生相应的生物学行为^[15]。近年来研究发现, RhoA/ROCK 通路在心、脑、肺等多个器官的慢性缺血性疾病中发挥作用^[16-18]。本研究中 OIS 模型组 RhoA 和 ROCK-2 表达显著增高, 提示 BCCAO 导致的慢性视网膜缺血状态进一步激活了 Rho/ROCK 信号通路, 从而使 RhoA 及 ROCK-2 表达增加。Du 等^[19]研究发现, BCCAO

术后3个月视网膜中RhoA表达显著增高,与本研究结果一致。RhoA及ROCK-2表达增加可能是由于视网膜慢性缺血缺氧后,炎症因子释放以及血-视网膜屏障破坏,同时促进细胞凋亡,但是RhoA/ROCK-2信号通路导致OIS的具体机制仍需进一步研究。

综上所述,BCCAO术后可进一步激活视网膜中RhoA/ROCK-2通路,研究RhoA/ROCK-2通路在OIS中的作用及机制,将为OIS的防治提供新的思路。本实验组大鼠视网膜中RhoA及ROCK-2在不同时间点的表达及具体下游靶点仍待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王艳玲. 建立多学科综合诊疗模式, 提高眼缺血综合征诊治水平[J]. 中华眼底病杂志, 2013, 29(3):233-236.
- [2] Qin YL, Ji MQ, Deng TT, et al. Functional and morphologic study of retinal hypoperfusion injury induced by bilateral common carotid artery occlusion in rats[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):80.
- [3] 王晓玲, 陈长征. Ras同源蛋白/ras同源蛋白激酶通路及其抑制剂在视神经疾病中的作用研究现状[J]. 中华眼底病杂志, 2017, 33(5):548-550.
- [4] 王超. Rho激酶抑制剂对青光眼的神经保护作用及研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(4):381-384.
- [5] 王志. Rho/Rho激酶信号通路的激活与小鼠脑缺血损伤关系的研究[D]. 泰安: 泰山医学院, 2008.
- [6] 谢国立, 傅强, 赵露, 等. 大鼠眼缺血综合征动物模型的制备[J]. 临床和实验医学杂志, 2015(22):1841-1843.
- [7] 安鑫. 眼缺血综合征实验动物模型的制备[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(3):285-288.
- [8] Daniel L, Nice SA, Matilde A, et al. Chronic bilateral common carotid artery occlusion: a model for ocular ischemic syndrome in the rat[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2006, 244(2):199-204.
- [9] 王佳琳, 侯金彤, 李茜, 等. 眼缺血综合征大鼠视网膜Bcl-2和Bax的表达[J]. 中华眼科杂志, 2015, 51(12):912-917.
- [10] Yamamoto H, Schmidt-Kastner R, Hamasaki DI, et al. Complex neurodegeneration in retina following moderate ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion in Wistar rats[J]. Exp Eye Res, 2006, 82: 767-779.
- [11] Davidson CM, Pappas BA, Stevens WD, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: Loss of pupillary reflex, visual impairment and retinal neurodegeneration[J]. Brain Res, 2000, 859(1):96-103.
- [12] Stevens WD, Fortin T, Pappas BA. Retinal and optic nerve degeneration after chronic carotid ligation: Time course and role of light exposure[J]. Stroke, 2002, 33(4):1107-1112.
- [13] Tsai NP, Wei LN. RhoA/ROCK1 signaling regulates stress granule formation and apoptosis[J]. Cell Signal, 2010, 2(4): 668-675.
- [14] Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(6):446-456.
- [15] Hartmann S, Ridley AJ, Lutz S. The function of Rho-associated kinases ROCK1 and ROCK2 in the pathogenesis of cardiovascular disease[J]. Front Pharmacol, 2015, 6: 276.
- [16] 程载兴, 王明亮, 万黎, 等. Rho激酶抑制剂在大鼠肺缺血再灌注损伤中的保护作用的研究[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(3):447-450.
- [17] Lin YH, Fang LH, Du GH. Research advances on regulatory effect of RhoA on myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Chin Pharmacol Bull, 2015, 31(10):1336-1339.
- [18] Kuroda S, Tashiro H, Kimura Y, et al. Rho-kinase inhibitor targeting the liver prevents ischemia/reperfusion injury in the steatotic liver without major systemic adversity in rats [J]. Liver Transpl, 2015, 21(1):123-131.
- [19] Du R, Wang JL, Wang YL. Role of RhoA/MERK1/ERK1/2/iNOS signaling in ocular ischemic syndrome[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2016, 254(11):2217-2226.

Changes of Retinal Morphology and Expressions of RhoA and ROCK-2 in Ocular Ischemic Syndrome Rats

AN Xin, LIU Lanjing, BU Jianping

(Department of Ophthalmology, Daxing Teaching Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 102600, China)

Correspondence to: BU Jianping, bujianping-2004@sohu.com

[Abstract] Objective To set up an ideal rat model for ocular ischemic syndrome (OIS), and to investigate the differences in the retinal morphology and the expressions of Ras-related monomer guanosine triphosphate kinase A (RhoA) and Rho-associated coiled coil forming protein kinase-2 (ROCK-2) in rat retina. **Methods** Twenty BN rats were randomly divided into two groups: the sham group and OIS model group (by bilateral carotid artery occlusion, BCCAO). Overall retinal thickness and retinal cell density were evaluated by histological analysis three months after modeling, respectively. The protein expressions of RhoA and ROCK-2 were also examined by immunohistochemical staining and Western blotting. **Results** Compared with the sham group, the number of retinal ganglion cells (RGC) was diminished in the model group ($P < 0.01$). The significant decrease of thickness was found in the total retina, inner plexiform layer (IPL), inner nuclear layer (INL) and outer plexiform layer (OPL) ($P < 0.05$); however, no change was evident in the outer nuclear layers (ONL) ($P > 0.05$). The expressions of RhoA and ROCK-2 in the model group were significantly increased as compared with the sham group by immunohistochemical staining and Western blotting analysis (the former $P < 0.01$, the latter $P < 0.05$). **Conclusion** RhoA and ROCK-2 are significantly expressed in the OIS model group, which maybe provide new ideas for the treatment of this disease.

[Key words] Ocular ischemic syndrome; Rat models; RhoA; ROCK-2

草氨酸钠对胆管癌细胞自噬与凋亡的影响

何大伟¹, 何教林¹, 周明慧¹, 于亚平², 张明华²

(1. 昆山市第一人民医院临床实验研究中心, 昆山 215300;

2. 昆山市第一人民医院肝胆外科, 昆山 215300)

[摘要] 目的 观察乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 抑制剂草氨酸钠对人胆管癌细胞株 Hucct-1 自噬与凋亡的影响, 并初步探讨其相关机制。方法 用不同浓度的草氨酸钠处理 Hucct-1 细胞, 或将 LDHA 小干扰 RNA 转染 Hucct-1 细胞后, CCK8 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡, 划痕愈合实验检测细胞迁移, 实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法分别检测自噬相关 mRNA 和蛋白的表达水平, 乳酸检测试剂盒检测细胞内乳酸的含量。结果 草氨酸钠抑制 Hucct-1 细胞增殖 ($P < 0.01$), 并呈剂量依赖性, 其半数抑制浓度为 50 mmol/L。用 50 mmol/L 草氨酸钠干预 Hucct-1 细胞或 LDHA 小干扰 RNA 转染 Hucct-1 细胞后, LDHA mRNA 和蛋白表达水平均降低 (均 $P < 0.01$), 细胞内乳酸的含量减少 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$), 细胞迁移距离缩短 ($P < 0.01$), 细胞中自噬相关基因 7 (autophagy-related gene 7, ATG7)、Beclin-1 和微管相关蛋白 1 轻链 3 II (microtubule-associated protein 1 light chain 3 II, LC-3 II) 表达水平升高 (均 $P < 0.01$), P62 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)。结论 草氨酸钠通过抑制 Hucct-1 细胞中 LDHA 表达来促进细胞自噬, 诱导细胞凋亡。

[关键词] 草氨酸钠; 胆管癌; 乳酸脱氢酶 A; 细胞自噬; 细胞凋亡

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0403-07

胆管癌是一种预后极差的恶性肿瘤, 在肝胆系统恶性肿瘤中发病率居第 2 位, 且近年来有上升趋势。临床上绝大多数胆管癌是进展期胆管癌, 缺乏有效的治疗方法, 这是因为胆管癌对传统的抗肿瘤药物不敏感, 应答率 $< 30\%$, 患者中位生存时间 < 12 个月, 中位无进展生存期仅为 8 个月^[1-3]。近年来, 肿瘤细胞糖代谢的研究取得了重要进展, 发现肿瘤组织与正常组织细胞的能量代谢截然相反: 肿瘤在正常氧分压的条件下, 糖酵解活性显著增强, 氧化磷酸化供能受到抑制, 产

生大量乳酸。研究表明, 利用这种代谢差异, 扰乱能量代谢过程, 会对肿瘤细胞具有杀伤作用^[4-5]。乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 是糖酵解的关键酶之一。目前, LDHA 抑制剂草氨酸钠对胆管癌的作用效果鲜有报道。本研究用草氨酸钠体外干预人胆管癌细胞株 Hucct-1, 观察细胞自噬与凋亡的变化, 为进一步进行动物体内研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人胆管癌细胞株 Hucct-1 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, LDHA 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 购自广州锐博生物科技有限公司, 草氨酸钠购自美国 Sigma 公司, 兔抗人自噬相关基因 7 (autophagy-related

[收稿日期] 2019-12-06

[基金项目] 昆山市科技计划项目(KS1537)

[作者简介] 何大伟(1987—), 男, 助理研究员, 研究方向: 细胞自噬与肿瘤的发生发展。

E-mail: 824171022@qq.com

[通信作者] 张明华(1977—), 男, 副主任医师, 研究方向: 胆管癌的靶向治疗。E-mail: zhmh1977@163.com

gene 7, ATG7) 单克隆抗体、兔抗人 Beclin-1 单克隆抗体、兔抗人 P62 单克隆抗体、兔抗人微管相关蛋白 1 轻链 3 II (microtubule-associated protein 1 light chain 3 II, LC-3 II) 单克隆抗体、兔抗人 LDHA 单克隆抗体和兔抗人 β -actin 单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司, 反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1 : 2 000)、乳酸检测试剂盒、CCK8 检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒和 RIPA 裂解液均购自上海碧云天生物科技有限公司, TRIzol 试剂、LipofectAMINE 2000 购自美国 Thermo 公司、RPMI 1640 培养液、Opti-MEM 培养液、胰蛋白酶、胎牛血清和 PBS 均购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组与转染 人胆管癌细胞 Hucct-1 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的平衡湿度培养箱中培养。当细胞融合度为 70%~80% 时进行消化传代, 按所需密度接种于细胞培养板。

实验分为正常对照组、草氨酸钠组和 LDHA-siRNA 组。将处于对数生长期的细胞接种于 6 孔板 (5×10^4 个/孔, 每组 3 个复孔), 培养至细胞密度为 50%~60% 时, 进行 siRNA 转染。将 siRNA (每孔 100 pmol) 和 LipofectAMINE 2000 (每孔 4 μ L) 分别用 Opti-MEM 培养液稀释至 100 μ L, 将两种稀释液混合, 避光孵育 30 min 后, 将混合液加入到含 Hucct-1 细胞的 6 孔板中, 每孔 200 μ L; 每孔再加 1.8 mL Opti-MEM 培养液, 培养 6 h 后更换 RPMI 1640 培养液, 继续培养 48 h。草氨酸钠组应用 0、25、50、100 和 200 mmol/L 的草氨酸钠作用 48 h 后, 进行后续实验。正常对照组加正常培养液培养 48 h。

1.2.2 荧光定量 PCR 收集上述分组处理过的细胞, 按 TRIzol 试剂盒说明提取细胞总 RNA, 用酶标仪测定 RNA 的浓度和纯度后, 用 DEPC 水将 RNA 稀释至终质量浓度为 1 μ g/ μ L, 取 1 μ L 进行反转录合成 cDNA, 反应条件为 55 °C 15 min, 85 °C 5 s。然后取 2 μ L cDNA 进行实时荧光定量 PCR, 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 引物

序列如下: LDHA 基因上游引物序列为 5'-ATGAAGGA-CTTGGCAGAT-3', 下游引物序列为 5'-TGACA-GCTTAATGGGTGA-3'; 内参 β -actin 基因上游引物序列为 5'-ACCACCATGGAGAA-GGCTGG-3', 下游引物序列为 5'-CTCAGTG-TAGCCCAGG-ATGC-3'。以 GAPDH 为内参, 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 LDHA 的相对表达量。

1.2.3 蛋白质印迹法检测 LDHA 及细胞自噬相关蛋白表达 细胞接种于 6 孔板, 按上述分组处理结束后, PBS 洗涤, 用 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒检测各组蛋白浓度。取 20 g 蛋白以 80 V 15 min 后转 110 V 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 随后以 110 V、1.5 h 电转移至聚偏二氟乙烯膜, 10% 脱脂奶粉封闭 2 h。加入兔抗人 ATG7、Beclin-1、P62、LC3-II、LDHA 和 GAPDH 抗体 (工作液稀释比例均为 1 : 1 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。然后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1 : 2 000), 常温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。最后用化学发光法显色, 观察并分析目的蛋白条带与内参 β -actin 条带的灰度值之比。

1.2.4 CCK8 法检测细胞活力 细胞接种于 96 孔板, 按上述分组处理结束后, 设置空白对照孔和不同浓度 (0、25、50、100 和 200 mmol/L) 的草氨酸钠组, 每组 6 个重复孔。各组细胞作用结束前 2 h, 每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 孵育 1~3 h, 应用全波长酶标仪检测波长 450 nm 时的各组吸光度, 细胞活力以加药孔吸光度减去空白对照孔吸光度的差值来表示。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 Hucct-1 细胞干预结束后, 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 离心后重悬于 400 μ L 凋亡试剂盒缓冲液中。加入 5 μ L Annexin V - 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC), 室温避光孵育 5 min。然后加入 10 μ L 碘化丙啶 (propidium iodide, PI), 4 °C 避光孵育 30 min, 应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.6 细胞迁移实验 细胞接种于 6 孔板, 待细胞融合度为 80%~90% 时, 尽量垂直于培养板用无菌移液枪尖划出一道痕迹, PBS 洗涤细胞 2 次,

除去漂浮细胞。置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的恒温箱中培养,按 1.2.1 节分组处理细胞,48 h 后在光学显微镜下观察并拍照。通过测量划痕宽度的变化来分析各组细胞的迁移能力。

1.2.7 乳酸检测 细胞接种于 6 孔板,经上述分组处理结束后,收集细胞上清液,按乳酸检测试剂盒说明书依次加入上清液、酶工作液和显色剂,涡旋混匀,37 ℃ 孵育 10 min,加入终止液终止反应。设置空白孔和标准孔,波长 530 nm 时测量各孔吸光度,绘制标准曲线,计算各组细胞中的乳酸含量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。各实验均独立重复 3 次,结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用方差分析,组内两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 草氨酸钠抑制 Hucct-1 细胞增殖

Hucct-1 细胞中分别加入 0、25、50、100 和 200 mmol/L 草氨酸钠作用 48 h 后,检测各组细胞的活性。结果(图 1)显示,随着药物浓

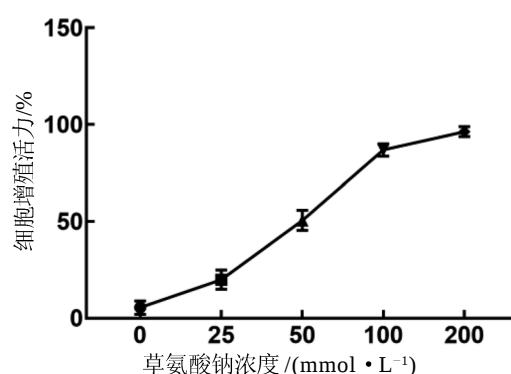


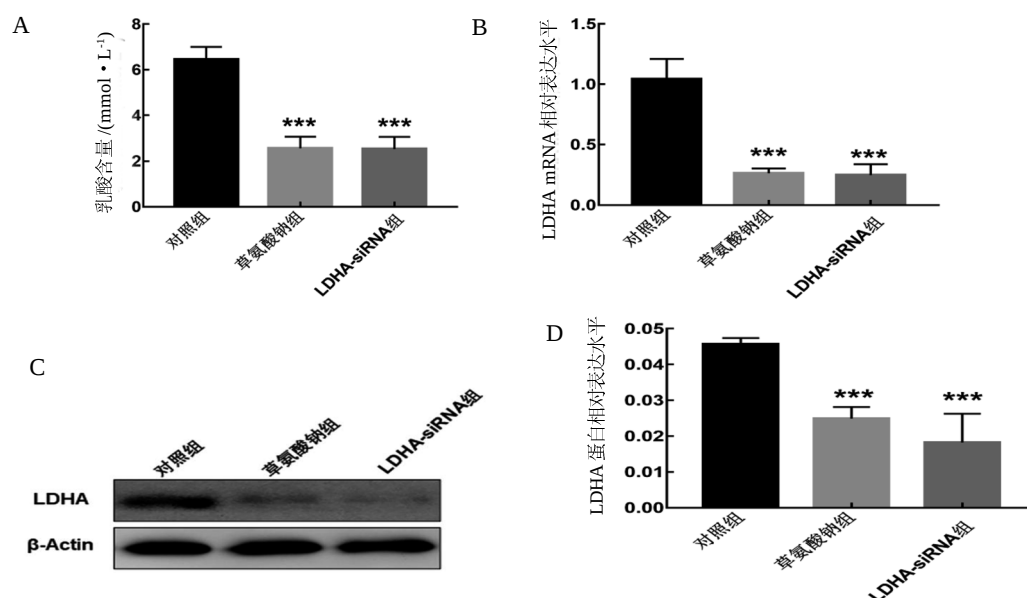
图 1 草氨酸钠对 Hucct-1 细胞活性影响

Figure 1 Effect of sodium oxalate on Hucct-1 cell activity

度的增加,细胞增殖活力显著降低($P < 0.001$),呈明显的剂量依赖性。计算得到草氨酸钠的半数抑制浓度为 50 mmol/L,后续实验中草氨酸钠组即用 50 mmol/L 的草氨酸钠干预细胞。

2.2 草氨酸钠抑制 Hucct-1 细胞中乳酸含量和 LDHA 表达

用 50 mmol/L 的草氨酸钠作用 Hucct-1 细胞 24 h 或转染 LDHA-siRNA 24 h 后,与不经任何处理的正常对照组比较,草氨酸钠组和 LDHA-siRNA 组乳酸含量均明显降低($P = 0.0009$, $P = 0.0008$)(图 2A),而 LDHA 的 mRNA



A 为乳酸含量检测; B 为实时荧光定量 PCR 法检测 LDHA mRNA 相对表达水平; C 和 D 分别为蛋白质印迹法检测 LDHA 蛋白表达及其条带灰度分析结果。与对照组比较,*** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 2 草氨酸钠和 LDHA-siRNA 对胆管癌 Hucct-1 细胞中乳酸含量和 LDHA 表达的影响

Figure 2 Effects of sodium oxalate and LDHA-siRNA on the lactate content and LDHA expression in Hucct-1 cells

($P = 0.0019$, $P = 0.0014$) 和蛋白 ($P = 0.0215$, $P = 0.0043$) 表达水平明显降低 (图 2B ~ D)。

2.3 草氨酸钠对 Hucct-1 细胞凋亡的影响

Annexin V /PI 双染法检测细胞凋亡结果显示, 草氨酸钠作用或 LDHA-siRNA 转染 24 h 后, 草氨酸钠组 ($P = 0.0002$) 和 LDHA-siRNA 组 ($P < 0.0001$) 细胞凋亡率明显高于正常对照组 (图 3), 说明通过抑制 LDHA 的表达可以诱导胆管癌细胞凋亡。

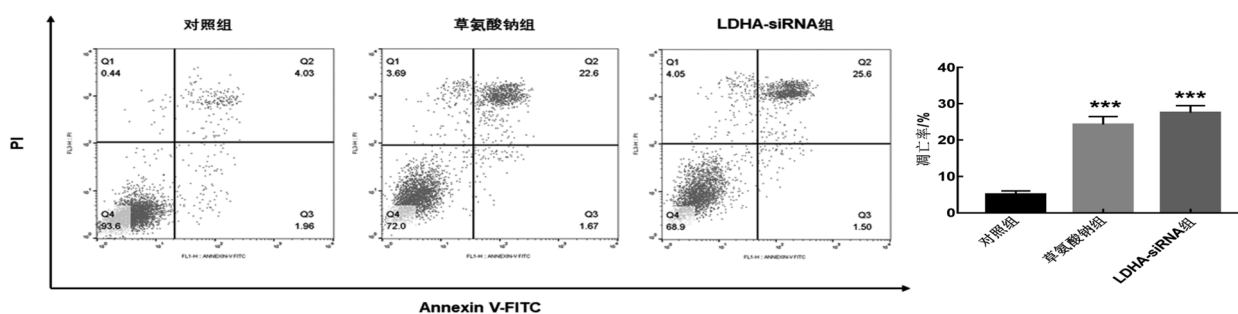
2.4 草氨酸钠对 Hucct-1 细胞迁移能力的影响

草氨酸钠作用或 LDHA-siRNA 转染 48 h 后, 与正常对照组比较, 草氨酸钠组 ($P = 0.0013$)、LDHA-siRNA 组 ($P = 0.0003$) 的 Hucct-1 细胞

迁移距离均显著缩短 (图 4), 表明草氨酸钠可以通过下调 LDHA 的表达抑制细胞迁移。

2.5 草氨酸钠对 Hucct-1 细胞自噬相关蛋白表达的影响

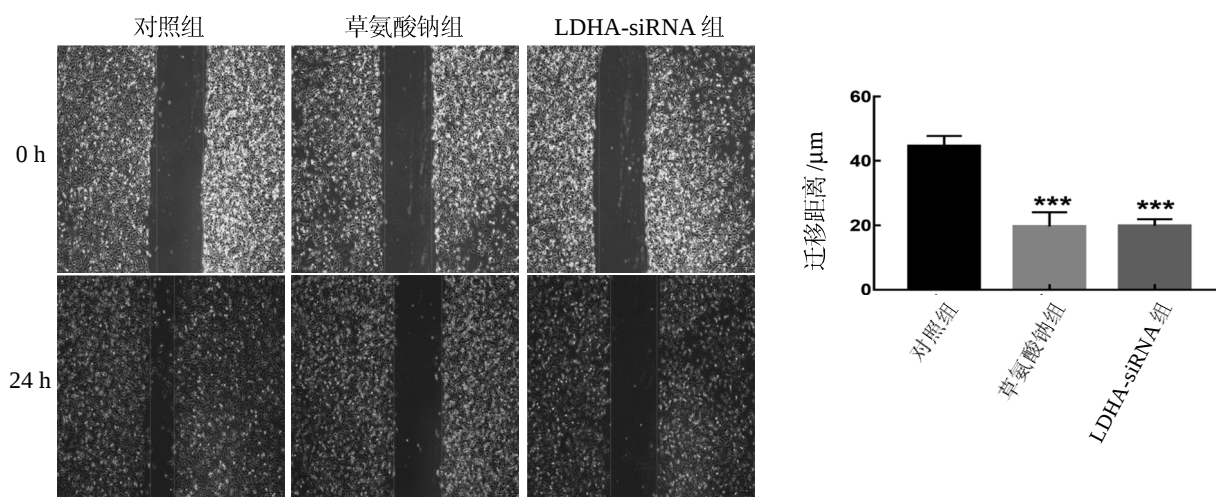
草氨酸钠干预或 LDHA-siRNA 转染 48 h 后, 提取 Hucct-1 细胞总蛋白, 蛋白质印迹法检测结果 (图 5A) 表明, 草氨酸钠组、LDHA-siRNA 组细胞自噬相关蛋白 ATG7 ($P = 0.0006$, $P = 0.0001$)、Beclin-1 ($P = 0.0004$, $P = 0.0033$) 和 LC3-II ($P = 0.0003$, $P = 0.0003$) 表达水平明显升高 (图 5B、C、D), 自噬底物蛋白 P62 ($P = 0.0009$, $P = 0.0008$) 的表达水平明显降低, 差异均有统计学意义 (图 5E)。



与对照组比较, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 3 流式细胞术检测草氨酸钠和 LDHA-siRNA 对胆管癌 Hucct-1 细胞凋亡的影响

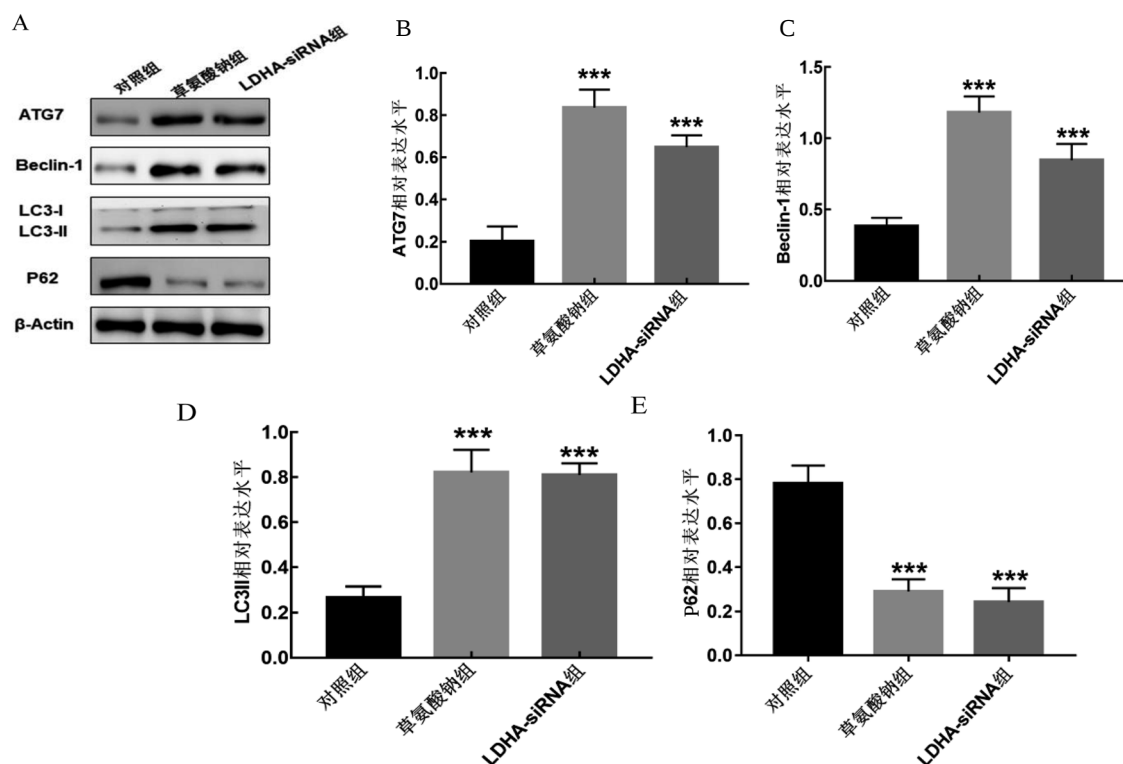
Figure 3 Effects of sodium oxalate and LDHA-siRNA on apoptosis of Hucct-1 cells were detected by flow cytometry



与对照组比较, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 4 划痕愈合实验检测草氨酸钠和 LDHA-siRNA 对胆管癌 Hucct-1 细胞迁移的影响

Figure 4 Effects of sodium oxalate and LDHA-siRNA on migration of Hucct-1 cells were detected by wound healing assay



ATG7 为自噬相关蛋白 7, LC3- I /II 为自噬相关蛋白轻链 3- I /II, P62 为功能蛋白 P62, Beclin-1 为一种自噬效应蛋白。与对照组比较, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 5 蛋白质印迹法检测草氨酸钠和 LDHA-siRNA 对 Hucct-1 细胞自噬相关蛋白表达的影响

Figure 5 Effects of sodium oxalate and LDHA-siRNA on Hucct-1 cell autophagy-related protein expressions were detected by Western blotting

3 讨论

细胞生长过程都是以能量代谢为基础。正常的组织细胞在缺氧环境下,可激活糖酵解代谢途径,LDHA 表达增高,应用糖酵解提供能量,产生大量的乳酸。在正常氧分压或缺氧条件下,肿瘤细胞过量摄取葡萄糖后,糖酵解途径激活,有氧供能受到抑制,产生大量乳酸,这种现象称为“Warburg 效应”^[6-7]。肿瘤的生长速度、恶性程度与能量代谢密切相关。研究表明,利用肿瘤细胞与正常细胞的代谢差异,扰乱其能量代谢过程,会对肿瘤细胞具有杀伤作用,而不会影响正常细胞的代谢^[8-9],这为肿瘤治疗提供了新的策略。LDHA 是能量代谢的关键酶之一。研究表明,LDHA 在胆管癌组织和胆管癌细胞中的表达水平升高^[10],说明 LDHA 与胆管癌的发生与发展相关。

胆管癌的发病机制复杂,与多种抑癌基因的失活、原癌基因的激活以及其他特殊的微环境相关,胆管癌组织中的 2- 氟 -2- 脱氧 -D- 葡萄糖显著增加,提示胆管癌细胞代谢具备 Warburg 效应^[11]。胆管癌的生长可能更加依赖肿瘤细胞的 Warburg 效应,因此可以推断,干扰胆管癌特有的能量代谢途径会抑制胆管癌的各种生物学行为,从而改善胆管癌患者的预后。LDHA 主要催化糖酵解途径的丙酮酸转化为乳酸,产生 ATP^[12];抑制 LDHA 必然会抑制胆管癌细胞的各种生物学行为;研究证实,阻断胰腺癌及乳腺癌等恶性肿瘤细胞的 LDHA 表达,可明显抑制这些肿瘤细胞的增殖,并诱导细胞凋亡的发生^[13]。本研究发现,LDHA 表达下调后,明显抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,由此推测,LDHA 有可能成为胆管癌治疗的新靶点。

草氨酸钠的化学成分为丙酮酸类似物,与丙

酮酸竞争性地结合 LDHA 而抑制其催化活性。作为一种新型的抗肿瘤药物,草氨酸钠具有广泛的应用前景。鉴于 LDHA 在肿瘤细胞 Warburg 效应中的关键作用,本研究发现草氨酸钠可通过阻断 LDHA 的酶活性,抑制胆管癌细胞增殖,促进其凋亡发生。细胞自噬在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要作用,自噬与凋亡是影响肿瘤的重要因素,调节自噬影响肿瘤细胞的生存与凋亡。目前,部分科学家认为,肿瘤细胞可以依赖细胞自噬维持细胞稳态,以抵抗放疗和化疗药物的压力,同时维持肿瘤细胞内蛋白质和细胞器的更新,防止 DNA 损伤^[14]。本研究在细胞水平证实,应用草氨酸钠干预胆管癌细胞后,细胞凋亡率升高,细胞自噬相关蛋白 ATG7、Beclin-1 和 LC3- II 表达水平明显升高,自噬底物蛋白 P62 表达水平下降。本研究发现草氨酸钠可以激活细胞自噬,促进细胞凋亡。草氨酸钠作为新型的抗肿瘤药物,其确切机制尚未明确。本研究组将继续通过动物体内实验探究草氨酸钠诱导胆管癌细胞凋亡的分子病理机制。

参考文献:

- [1] Sempoux C, Jibara G, Ward SC, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: new insights in pathology[J]. *Semin Liver Dis*, 2011, 31(1):49-60.
- [2] Wei CX, Wong H, Xu F, et al. IRF4-induced upregulation of lncRNA SOX2-OT promotes cell proliferation and metastasis in cholangiocarcinoma by regulating SOX2 and PI3K/AKT signaling[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(23):8169-8178.
- [3] Cadamuro M, Brivio S, Mertens J, et al. Platelet-derived growth factor-D enables liver myofibroblasts to promote tumor lymphangiogenesis in cholangiocarcinoma[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(4):700-709.
- [4] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5):325-337.
- [5] Garcia-Heredia JM, Carnero A. Decoding Warburg's hypothesis: tumor-related mutations in the mitochondrial respiratory chain[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39):41582-41599.
- [6] Li L, Liang Y, Kang L, et al. Transcriptional regulation of the Warburg effect in cancer by SIX1[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(3):368-385.
- [7] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms[J]. *Cell*, 2011, 147(2):275-292.
- [8] Zhu Y, Dean AE, Horikoshi N, et al. Emerging evidence for targeting mitochondrial metabolic dysfunction in cancer therapy[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(9):3682-3691.
- [9] Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(4):267-277.
- [10] 廖敏琪, 傅 赞, 于亚平, 等. 乳酸脱氢酶A在人胆管癌组织及胆管癌细胞中的表达及意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(5):682-685.
- [11] Thonsri U, Seubwai W, Waraasawapati S, et al. Overexpression of lactate dehydrogenase A in cholangiocarcinoma is correlated with poor prognosis[J]. *Histol Histopathol*, 2017, 32(5):503-510.
- [12] Tang D, Xu L, Zhang M, et al. Metformin facilitates BG45 induced apoptosis via an antiWarburg effect in cholangiocarcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(4):1957-1965.
- [13] Cui XG, Han ZT, He SH, et al. HIF1/2 α mediates hypoxia-induced LDHA expression in human pancreatic cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15):24840-24852.
- [14] 阚月一, 王娅杰, 李 琦, 等. 肿瘤发展过程中自噬与凋亡的相互作用[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(2):106-112.

Effects of Sodium Oxalate on Autophagy and Apoptosis of Cholangiocarcinoma Cells

HE Dawei¹, HE Aolin¹, ZHOU Minghui¹, YU Yaping², ZHANG Minghua²

(1. Clinical Experimental Research Center, 2. Department of Hepatobiliary surgery First People's Hospital of Kunshan, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China)

Correspondence to: ZHANG Minghua, zhmh1977@163.com

[Abstract] **Objective** To observe the effects of sodium oxalate, an inhibitor of lactate dehydrogenase A (LDHA), on autophagy and apoptosis of cholangiocarcinoma cell line Hucct-1, and to explore the related mechanisms. **Methods** Hucct-1 cells were treated with different concentrations of sodium oxalate. And LDHA siRNA was transfected into Hucct-1 cells by LipofectAMINE 2000 and Opti-MEM medium. Then the cell proliferation was detected by CCK8 assay, the apoptosis was detected by flow cytometry, and the cell migration was detected by scratch healing test. Meanwhile, the expressions of autophagy-related mRNAs and proteins were detected respectively by RT-PCR and Western blotting. And the lactic acid detection kit was used to detect lactate content in cells. **Results** Sodium oxalate inhibited the proliferation of Hucct-1 cells in a dose-dependent manner, its half-inhibitory concentration increased was 50 mmol/L. After Hucct-1 cells were treated with 50 mmol/L sodium oxalate or transfected with LDHA siRNA, the mRNA and protein expression levels of LDHA were decreased (both $P<0.01$), and the intracellular lactic acid content was decreased ($P<0.01$). In the meantime, the apoptosis rate was increased ($P<0.01$), and the cell migration distance was decreased ($P<0.01$). And the expression levels of autophagy-related gene 7 (ATG7), Beclin-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC-3 II) were increased (all $P<0.01$). In addition, the expression of P62 protein was significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Sodium oxalate can promote autophagy and induce apoptosis by inhibiting the expression of LDHA in Hucct-1 cells. **[Key words]** Sodium oxalate; Cholangiocarcinoma; Lactate dehydrogenase A; Autophagy; Apoptosis

加味吴茱萸汤对高糖高脂及饮酒致大鼠 高血压和血管内皮功能的影响

吴浩杰¹, 周瑞堂², 倪 宁³

(1. 西安市第一医院心内科, 西安 710002; 2. 西安市第一医院中医科, 西安 710002

3. 西安交通大学医院内科, 西安 710049)

[摘要] 目的 探讨加味吴茱萸汤对高糖高脂饲料加饮酒致高血压模型大鼠血压及血管内皮功能的影响。方法 选择 SPF 级雄性 SD 大鼠 100 只, 20 只为正常对照组, 80 只制备高糖高脂饲料及梯度饮酒高血压模型。将造模成功的 80 只大鼠随机分为 4 组, 高血压模型组、加味吴茱萸汤低剂量治疗组、中剂量治疗组和高剂量治疗组, 每组 20 只。治疗组每日用不同浓度加味吴茱萸汤灌胃, 正常对照组和高血压模型组大鼠均以蒸馏水灌胃。测定实验前、造模成功后(给药前)及治疗后的收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、平均动脉压(MBP)和心率(HR)。酶联免疫吸附试验测定治疗前后血清中细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、内皮缩血管肽-1(ET-1)、一氧化氮(NO)、内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)水平。结果 与正常对照组比较, 造模后(给药前)各治疗组大鼠 SBP、DBP 和 MBP 明显升高($P < 0.05$)。与高血压模型组比较, 中剂量与高剂量加味吴茱萸汤治疗后大鼠的 SBP、DBP 和 MBP 明显下降($P < 0.05$)。各组大鼠在治疗前后 HR 差异没有统计学意义($P > 0.05$)。与正常对照组比较, 各治疗组大鼠 ICAM-1 和 ET-1 水平明显升高, NO 和 eNOS 水平明显降低($P < 0.05$); 与高血压模型组比较, 加味吴茱萸汤中剂量与高剂量治疗组大鼠的 ICAM-1 和 ET-1 水平明显升高, 而 NO 和 eNOS 水平明显降低($P < 0.05$)。结论 中剂量与高剂量的加味吴茱萸汤对高糖高脂及饮酒致高血压大鼠具有明显的降压效果。

[关键词] 加味吴茱萸汤; 高糖高脂饲料; 饮酒; 高血压; 血管内皮功能; 大鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0410-05

高血压(hypertension)是临床上慢性疾病中较为常见的一种, 也是多种疾病的主要危险因素。根据《中国心血管病报告 2016》^[1]概要显示, 我国目前已发现高血压患者约 2.7 亿例。随着社会发展, 人们的生活习惯也随之发生改变, 高血压患者越来越多, 且发病人群越来越趋向年轻^[2]。除严重损害和威胁人们的身体健康外, 从中冠心

病的药物治疗。高血压还会引发各种严重的并发症, 例如脑卒中、冠心病、慢性肾脏疾病以及视网膜病变等等^[3]。高血压疾病的发生发展机制较为复杂, 其中血管内皮功能的紊乱与高血压发病密切相关^[4]。有研究证实, 加味吴茱萸(*Tetradium ruticarpum*)汤对自发性高血压大鼠的血压具有一定的调节作用^[5]。本研究初步探讨加味吴茱萸汤对高糖高脂饮酒致大鼠高血压及血管内皮功能的影响。

[收稿日期] 2019-12-31

[作者简介] 吴浩杰(1977—), 女, 硕士, 从事冠心病的药物研究。E-mail: wuzh88@yeah.net

[通信作者] 倪 宁(1963—), 男, 硕士, 从事心血管内科相关工作。E-mail: jxjai004@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 100 只, 8 周龄, 体质

量 140~160 g, 由长沙天勤有限责任公司[SCXK(湘)2019-0023]提供, 饲养于屏障设施[SYXK(湘)2019-0013]内。每笼 5 只, 正常饲料适应性喂养, 自由饮水, 实验前观察 1 周, 各大鼠活动、进食、粪便以及一般情况均无异常变化后进行实验。

1.2 主要药品、试剂和仪器

加味吴茱萸汤由西安市第一医院药剂科调配、煎制, 基本方组成: 吴茱萸 60 g, 石决明 60 g, 天麻 60 g, 黄芪 60 g, 夏枯草 60 g, 当归 60 g, 人参 60 g, 大枣 45 g, 丹参 50 g, 甘草 50 g。按此方比例称取药物, 加水煎煮 2 次, 每 1 次加 12 倍量蒸馏水。每次煎煮 1 h, 取滤液, 加工减压浓缩至相对密度 1.25~1.30(70 °C)备用(后面治疗组汤药每毫升相当于 0.5 g 原药)。红星二锅头酒(乙醇体积分数 52%, 北京红星股份有限公司)。细胞间黏附分子-1(ICAM-1)(CD54)免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德公司; ^{125}I 内皮缩血管肽-1(^{125}I -ET-1)放射免疫试剂盒购自北京北方生物技术研究所; 一氧化氮(NO)测试盒(一步法)购自南京赛维尔生物有限公司。内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)酶联免疫吸附试验试剂盒购自中国上海英展机电企业有限公司(EXCELL)。Medlab 大鼠无创血压测量系统购自中国南京卡尔文生物科技有限公司。高糖高脂饲料购自中国医学科学院实验动物研究所(基础饲料 68.8%, 蔗糖 10.0%, 蛋黄粉 10.0%, 猪油 10.0%, 胆固醇 1.0%, 胆盐 0.2%)。

1.3 模型建立及实验方法

100 只雄性 SD 大鼠适应性喂养后, 20 只大鼠作为正常对照组, 给予普通饲料, 自由饮水。其余 80 只大鼠给予高糖高脂饲料及梯度饮酒以制备高血压大鼠模型^[6]: 大鼠给予高糖高脂饲料, 同时给予勾兑成乙醇体积分数为 5% 的白酒, 连续 1 周后将酒的乙醇体积分数提升为 10%, 以后每隔 1 周将乙醇体积分数提升 2%, 直到 18%。然后每周将乙醇体积分数提升 1%, 直到 22%, 再连续喂养至 17 周完成造模。造模 17 周后, 通过无创血压测量系统连续 5 d 且同一时间点分别测量血压, 收缩压(SBP)持续高于 160 mmHg, 舒张压(DBP)持续高于 130 mmHg, 即认为高糖高脂饲料加饮酒诱导高血压模型成功。

将造模成功的大鼠随机分为 4 组, 每组 20 只, 分别为高血压模型组、低剂量治疗组[5 mL · kg⁻¹ · d⁻¹]、中剂量治疗组[10 mL · kg⁻¹ · d⁻¹]和高剂量治疗组[20 mL · kg⁻¹ · d⁻¹]。采用不同浓度的加味吴茱萸汤药液每日定时灌胃给药, 20 只正常对照组和高血压模型组大鼠以蒸馏水[10 mL · kg⁻¹ · d⁻¹]灌胃, 全部大鼠每日灌胃 1 次, 连续灌胃 6 周。

1.4 血压测定

实验前、造模后(给药前)及治疗完成后用动物无创血压测量系统连续 5 d 且同一时间点分别测量各组大鼠的 SBP、DBP、平均动脉压(MBP)和心率(HR), 并且记录数值。

1.5 血清 ICAM-1、ET-1、NO 及 eNOS 水平测定

末次给药后, 大鼠腹腔注射 8% 戊巴比妥钠(5 mL/kg)麻醉, 腹主动脉取血(过程中不注入抗凝剂)。5 mL 后室温下静置 20 min, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液用于 ICAM-1、ET-1、NO 及 eNOS 的检测, 测定方法按相应的试剂盒说明书。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理。呈正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组正态分布计量资料使用单因素方差分析进行多组样本均数的比较, 采用 SNK-*q* 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 SBP 和 DBP 比较

与正常对照组比较, 造模后(给药前)各组大鼠的 SBP 和 DBP 明显升高($P < 0.05$); 与高血压模型组比较, 在治疗后中剂量与高剂量治疗组的 SBP 和 DBP 明显下降($P < 0.05$)(表 1)。

2.2 各组大鼠 MBP 和 HR 比较

与正常对照组比较, 造模后(给药前)各组大鼠的 MBP 明显升高($P < 0.05$); 与高血压模型组比较, 在治疗完成后中剂量与高剂量治疗组的 MBP 明显下降($P < 0.05$)。各组大鼠在治疗前后 HR 的差异没有统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。

2.3 各组大鼠血清 ICAM-1、ET-1、NO 和 eNOS 水平

与正常对照组比较, 各治疗组大鼠的 ICAM-1

和 ET-1 水平明显升高, NO 和 eNOS 水平明显降低($P < 0.05$); 与高血压模型组比较, 中剂量与高剂量治疗组的 ICAM-1 和 ET-1 水平明显升高, 而 NO 和 eNOS 水平明显降低($P < 0.05$)(表 3)。

表 1 各组大鼠治疗前后的 SBP、DBP 水平比较

Table 1 The systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) in each group of rats before and after different treatments

组 别	n	SBP/ mmHg			DBP/ mmHg		
		实验前	造模后(给药前)	治疗后	实验前	造模后(给药前)	治疗后
正常对照	20	125.41 ± 12.11	124.90 ± 17.13	126.22 ± 11.33 ^b	104.30 ± 9.11	107.13 ± 9.21	105.61 ± 9.50 ^b
高血压模型	20	127.32 ± 11.71	169.13 ± 15.32 ^a	163.72 ± 12.13 ^a	103.43 ± 8.71	135.42 ± 18.10 ^a	137.42 ± 18.72 ^a
低剂量治疗	20	124.52 ± 13.53	166.72 ± 18.53 ^a	155.82 ± 11.71 ^{ab}	104.82 ± 9.52	134.92 ± 16.62 ^a	131.83 ± 16.12 ^a
中剂量治疗	20	126.13 ± 12.83	164.51 ± 16.40 ^a	146.42 ± 13.33 ^{ab}	106.32 ± 9.82	138.60 ± 17.52 ^a	125.33 ± 9.72 ^b
高剂量治疗	20	125.64 ± 12.32	167.23 ± 19.21 ^a	130.11 ± 12.60 ^b	105.71 ± 9.33	135.31 ± 15.31 ^a	110.21 ± 9.12 ^b

注: 与同时时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时时间点高血压模型组比较, ^b $P < 0.05$; SBP: 收缩压; DBP: 舒张压。

表 2 各组大鼠治疗前后的 MBP、HR 水平比较

Table 2 The mean arterial pressure (MBP) and heart rate (HR) in each group of rats before and after different treatments

组 别	n	MBP/mmHg			HR/(次 · min ⁻¹)		
		实验前	造模后(给药前)	治疗完成后	实验前	造模后(给药前)	治疗完成后
正常对照	20	111.61 ± 9.62	152.21 ± 9.13	114.71 ± 9.53	415.32 ± 14.82	416.52 ± 15.24	421.32 ± 13.73
高血压模型	20	112.23 ± 11.22	145.62 ± 11.53 ^a	144.72 ± 12.12 ^a	417.43 ± 11.23	412.61 ± 11.71	416.82 ± 13.72
低剂量治疗	20	114.34 ± 11.24	143.12 ± 12.13 ^a	135.31 ± 12.91 ^a	414.71 ± 15.10	416.52 ± 17.23	415.61 ± 12.65
中剂量治疗	20	113.51 ± 11.23	146.52 ± 11.90 ^a	127.72 ± 13.22 ^b	426.22 ± 18.41	421.32 ± 15.92	424.60 ± 11.71
高剂量治疗	20	112.72 ± 11.20	143.23 ± 10.84 ^a	119.23 ± 11.50 ^b	411.54 ± 16.14	421.40 ± 12.34	421.50 ± 16.12

注: 与同时时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时时间点高血压模型组比较, ^b $P < 0.05$; MBP: 平均动脉压; HR: 心率。

表 3 各组大鼠治疗后血清中 ICAM-1、ET-1、NO、eNOS 水平比较

Table 3 The serum contents of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), endothelin-1 (ET-1), nitric oxide (NO) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in each group of rats before and after different treatments

组 别	n	ICAM-1/(ng · L ⁻¹)		ET-1/(ng · L ⁻¹)		NO/(μmol · L ⁻¹)		eNOS/(U · mL ⁻¹)	
		实验前	造模后(给药前)	实验前	造模后(给药前)	实验前	造模后(给药前)	实验前	造模后(给药前)
正常对照组	20	252.42 ± 21.32	30.25 ± 8.26	39.11 ± 4.31	146.11 ± 11.20				
高血压模型组	20	323.17 ± 24.18 ^a	45.33 ± 7.91 ^a	7.37 ± 1.16 ^a	104.72 ± 12.53 ^a				
低剂量治疗组	20	311.51 ± 18.24 ^a	40.22 ± 6.88 ^a	15.73 ± 5.91 ^a	111.81 ± 11.72 ^a				
中剂量治疗组	20	291.29 ± 22.52 ^b	37.39 ± 7.58 ^b	23.58 ± 7.86 ^b	126.23 ± 9.91 ^b				
高剂量治疗组	20	267.21 ± 20.61 ^b	33.92 ± 7.86 ^b	35.77 ± 7.19 ^b	135.22 ± 12.71 ^b				

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与高血压模型组比较, ^b $P < 0.05$; ICAM-1: 细胞间黏附分子-1; ET-1: 内皮素-1; NO: 一氧化氮; eNOS: 内皮型一氧化氮合成酶。

3 讨论

目前, 全球高血压患者已超 10 亿人, 中国成人高血压患病率高达 33.5%, 患病人数近 3.3

亿^[7-8]。研究^[9-10]表明, 高血压患者具有明显的血管内皮损伤情况, 因此与血管内皮损伤相关的因子表现出异常的表达状态。在临床检测指标中与血管内皮功能相关的因子相对较多, 例如 ICAM-1、

ET-1、NO 和 eNOS 都是评估血管内皮功能的常用指标^[11-12]。其中 ICAM-1 在炎症反应介导过程中发挥重要作用,同样在白细胞与血管内皮之间的粘附过程中也发挥重要作用,另外,对病理状态下导致的血管内皮炎性损伤具有更重要的评估意义^[13-14]。eNOS 由血管内皮细胞生成,eNOS 过度表达后 eNOS 含量、NO 活性和 cGMP 水平均上调。血管中氧自由基产生过多,氧化应激反应损伤血管内皮功能,并促进血管平滑肌细胞增殖和肥大,导致血管重构,从而参与高血压病发生、发展和靶器官损害^[15-16]。

目前,药物治疗加上健康的生活方式管理是针对高血压最主要的治疗方法。中药在心血管病的治疗中有着独特优势。已有文献^[17-18]报道,加味吴茱萸汤用吴茱萸疏肝降气、温胃散寒,人参和大枣补气健脾,石决明和天麻平肝潜阳,黄芩和夏枯草清肝郁热,当归和丹参养血活血,甘草调和诸药,故能起到降肝气之上逆,健中气以运脾,补阴血以养肝肾的标本兼治作用,因而具有显著的降压效果。基于此理论,本实验采用加味吴茱萸汤治疗诱发的大鼠高血压,取得了较好的疗效。

本研究发现,中剂量与高剂量的加味吴茱萸汤对高糖高脂饲料及饮酒致高血压模型大鼠的 SBP 和 DBP 都具有一定的调节作用。与高血压模型组比较,在治疗完成后中剂量与高剂量治疗组大鼠的 SBP 和 DBP 呈现明显下降趋势。通过检测各组大鼠血液中 ICAM-1、ET-1、NO 和 eNOS 的水平,发现治疗完成后中剂量与高剂量治疗组大鼠的 ICAM-1 和 ET-1 水平明显低于高血压模型组,且趋近于正常组,而 NO 和 eNOS 水平明显高于高血压模型组。该结果为临床高血压患者的治疗用药提供了一定的参考。

参考文献:

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2016》概要[J].中国循环杂志,2017,32(6):521-530.
- [2] 李秀芹.糖尿病合并高血压患者发生视网膜病变的相关危险因素分析[J].中国保健营养(下旬刊),2014,24(7):3822.
- [3] 冯国明.高血压并发症及其预防和治疗研究[J].心血管病防治知识(学术版),2016(2):13-15.
- [4] Bleakley C, Hamilton PK, Pumb R, et al. Endothelial function in hypertension: victim or culprit?[J]. J Clin Hypertens, 2015, 17(8):651.
- [5] 汪晓芬,和渝斌,张源波,等.高血压发病机制及诊疗研究的新认识[J].中国循证心血管医学杂志,2015,7(2):281.
- [6] 浙江中医药大学.一种饮酒加高糖高脂饮食导致的生活性高血压动物模型:CN201210164078.8[P].2013-12-04.
- [7] 卢婉君,龚书豪,李娟,等.伴高血压的原发性膜性肾病临床病理特点及高血压发生的影响因素分析[J].华中科技大学学报(医学版),2019,48(6):655-660.
- [8] 杨红霞,景策,刘睿,等.高血压发病机制研究进展[J].医学综述,2019,25(22):4483-4487.
- [9] 李超民,罗薇,李慧,等.人参皂苷 Rg2 对 SHR 大鼠血压及肾脏 MMP2、MMP9 表达的影响[J].心脏杂志,2017,29(1):44-47.
- [10] 刘娟,罗云梅,潘承正,等.人参皂苷 Rg1 抗野百合碱诱导大鼠肺动脉高压的作用机制[J].中国新药与临床杂志,2014,33(8):578-582.
- [11] 雍苏南,房赤,龙远雄,等.高血压病中医病性证素分布与血管内皮相关性研究[J].中国中医药信息杂志,2019,26(12):21-25.
- [12] 陈勇,方汉云,潘建生,等.血管紧张素转化酶抑制剂对高血压患者氧化应激水平及血管内皮功能的影响[J].重庆医学,2019,48(23):4054-4056,4061.
- [13] 戴志强,张旋,冯阳,等.高盐诱导自发性高血压大鼠脑出血及脑微血管构筑改变[J].第三军医大学学报,2016,38(21):2291-2296.
- [14] 蔺晓源,刘丹,曾勇.复方七芎降压片保护自发性高血压大鼠血管内皮损伤的作用研究[J].中国中医急症,2016,25(12):2220-2222.
- [15] 崔晓云,谭弘,范文英,等.高血压与心脏舒张功能障碍的相关性研究[J].中华中医药杂志,2015,30(12):4414-4416.
- [16] 黄建跃,丁胜鸿.微创血肿清除术对高血压脑出血患者氧化应激指标及神经功能的影响[J].中国老年学杂志,2019,39(15):3628-3630.
- [17] 李明懋.加味吴茱萸汤治疗高血压病患者的达标率分析[J].成都中医药大学学报,2008,31(1):11-12.
- [18] 管建飞,和会静,王岩.吴茱萸汤治疗对老年高血压患者血压及并发症的影响[J].临床医药文献电子杂志,2019,6(19):145-146.

Effects of Modified Wuzhuyu Decoction on Blood Pressure and Vascular Endothelial Function in Rats with Hypertension Induced by High Sugar and Fat Diet and Alcohol Drinking

WU Haojie¹, ZHOU Ruitang², NI Ning³

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Xi'an No.1 Hospital, Xi'an 710002, China; 3. Internal Medicine Department, The Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Correspondence to: NI Ning, jxjai004@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of modified Wuzhuyu (*Tetradium ruticarpum*) decoction on blood pressure and vascular endothelial function in rats with hypertension induced by high sugar and fat diet and alcohol drinking. **Methods** One hundred SPF male SD rats were selected, 20 were used as control group, and 80 were used for establishing hypertension model induced by high sugar and fat diet and gradient alcohol drinking. The successfully induced model rats were randomly divided into 4 groups with 20 rats in each: hypertension model group, modified Wuzhuyu decoction low-dose treatment group, middle-dose treatment group, and high-dose treatment group. The rats of treatment group were oral gavaged daily with different concentrations of modified Wuzhuyu decoction, and the normal control group and hypertension model group were oral gavaged with distillation respectively. The systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), mean arterial pressure (MBP), and heart rate (HR) were detected before the experiment, after the successful modeling (before administration), and after treatment. The serum intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), endothelin-1 (ET-1), nitric oxide (NO), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, the SBP, DBP, and MBP in each experimental group were significantly increased after modeling (before administration) ($P<0.05$). Compared with the hypertension model group, the SBP, DBP, and MBP in the medium-dose and high-dose treatment groups decreased significantly after treatment ($P<0.05$). There was no significant difference in HR between the groups of rats before and after treatment ($P>0.05$). After treatment, compared with the control group, the levels of ICAM-1 and ET-1 in each experimental group increased significantly, and the levels of NO and eNOS decreased significantly ($P<0.05$). Compared with the hypertension model group, the levels of ICAM-1 and ET-1 in the medium-dose and high-dose treatment groups were significantly increased, while the levels of NO and eNOS were significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion** Medium-dose and high-dose modified Wuzhuyu decoction has obvious antihypertensive effect on hypertensive rats induced by high sugar and fat diet and alcohol drinking.

[Key words] Modified Wuzhuyu (*Tetradium ruticarpum*) decoction; High sugar and high fat diet; Alcohol drinking; Hypertension; Vascular endothelial function; Rats

裸鼯鼠心脏对 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射耐受的初步研究

李煜^{1*}, 刘尹航^{2*}, 陈超¹

(1. 海军军医大学基础医学院实验动物学教研室, 上海 200433;

2. 上海外国语大学附属中学, 上海 200083)

[摘要] 目的 观察和分析 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射后裸鼯鼠心脏形态结构及组织生化指标变化, 初步研究裸鼯鼠心脏在 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射耐受方面的特性。方法 裸鼯鼠经一次性10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身辐照, 分别于辐照后7 d和14 d采集裸鼯鼠心脏, 制作石蜡切片, 经HE染色后, 光学显微镜下观察其心脏显微结构; 采用动物组织生化检测试剂盒检测心脏组织丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)等指标。结果 镜检显示, 辐照后裸鼯鼠心脏组织并未出现明显的萎缩、水肿、坏死及纤维化等病变。生化检测显示, 辐照后心脏组织中的MDA含量显著上升($P < 0.01$), T-AOC、GSH和GSSG含量均呈现时间相关的递减趋势(均 $P < 0.05$)。结论 裸鼯鼠心脏对 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线具有一定程度的耐受能力, 但其具体耐受机制尚未明确。

[关键字] 裸鼯鼠; 心脏; $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线; 辐射耐受

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0415-05

癌症是威胁人类健康的重大疾病之一, 全球每年有数千万人死于癌症。目前, 放射治疗是治疗癌症的常用方法之一, 大约半数的癌症患者通过放疗手段进行治疗^[1-2]。但是, 在放疗过程中, 不可避免地癌症患者会出现相应的放疗后遗症, 放射性心脏病便是其中之一。放射性心脏病范围较广, 包括心包炎、心肌病、心肌纤维化、瓣膜病、冠状动脉疾病和传导异常等^[3-4]。放射性心脏病一旦发生, 便不可逆转, 从早期的急性心包炎向晚期动脉粥样硬化、心脏瓣膜损伤

以及心脏传导异常等转变^[5], 严重威胁人类健康。

电离辐射包括人工辐射和天然辐射。目前, 人工辐射已广泛应用于农业、工业、军事和医疗领域^[6]。天然辐射广泛地分布于人类赖以生存的自然环境, 其中, ^{60}Co 放射源产生的 γ 射线也是天然辐射的一种。因具有波长短、频率高、能量高等特点, ^{60}Co 暴露达到一定剂量就会对生物体造成DNA与RNA降解等影响, 从而使得蛋白质合成等功能丧失, 导致生物体的损伤^[7-9]。有研究报道^[10-12], 高剂量的辐射能够引起急性心包炎, 一段时间后还可能引起动脉粥样硬化加速、不良心肌重塑、传导异常和心脏瓣膜损伤等状况。目前, 虽然放射性心脏病的生物学机制日趋明确^[13], 但临床研究过程中最适实验动物的选择尚未有明确报道。

裸鼯鼠属于啮齿目, 分布于肯尼亚、埃塞俄比亚等非洲地区。1980年代后期发现, 裸鼯鼠应用于生物医学研究方面具有较多优越性^[14]。裸鼯鼠因具有对癌症的天然免疫等特性, 受到生物医学界的广泛关注。电离辐射作为诱发癌症的

[收稿日期] 2020-08-01

[基金项目] 上海市科“技术创新行动计划”实验动物研究领域项目(20140900100)

[作者简介] 李煜(1992—), 硕士, 助教, 主要从事实验动物学教学及研究工作。E-mail: 591332278@qq.com
刘尹航(2002—), 学生。

E-mail: liuyinhang_27@163.com

* 共同第一作者

[通信作者] 陈超(1987—), 本科, 讲师, 研究方向: 人类疾病动物模型研究。E-mail: chencao_8713@aliyun.com

因素之一,是致癌模型建立的常用方式。裸鼹鼠虽然对癌症天然免疫,但是否对电离辐射具有耐受目前尚未见报道。在前期的预实验中,本课题组对裸鼹鼠进行了不同剂量的 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线一次性全身照射,并对其存活率进行统计。结果显示,10 Gy 组裸鼹鼠 30 d 存活率为 50%。因此,本研究通过观察裸鼹鼠经 10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后的心脏组织结构及生化指标变化,初步探讨裸鼹鼠心脏的辐射耐受能力,为后续研究其耐受特性的分子机制提供依据,为临床治疗放射性心脏病提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

18 月龄健康雄性裸鼹鼠 21 只,由本教研室生产,饲养于屏障设施[SYXK(沪)2017-0004]。

1.2 实验动物分组与实验处理

21 只裸鼹鼠随机分为 2 组,分别为对照组 7 只和实验组 14 只。实验组裸鼹鼠给予一次性全身 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照,辐射剂量率为 1.163 Gy/min,辐照时间为 8.6 min,总辐射剂量为 10 Gy,由海军军医大学辐照中心完成。

1.3 主要仪器设备及试剂

自动组织脱水机、包埋机、转轮式切片机、染色机、封片机和倒置荧光显微镜等均购自徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;生化检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 心脏组织切片的制备与观察

分别取对照组、 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后 7 d 和 14 d 实验组各 3 只裸鼹鼠,通过腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠对动物进行麻醉,迅速打开胸腔,取其心脏,置于通用型中性组织固定液中固定 24 h。经脱水、透明、包埋、切片、染色、封固等步骤完成 HE 染色组织切片的制备,光学显微镜下观察。

1.4.2 心脏组织氧化应激水平检测 分别取对照组、辐照后 7 d 和 14 d 实验组各 4 只裸鼹鼠,通过腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠对动物进行麻醉,迅速打开胸腔,取其心脏,剪取 0.1 g 心脏组织,经 40 μm 孔径筛网研磨过滤后加入 1 mL 裂解液,12 000 $\times g$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,取上清液用于检测丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量,检测步骤参照试剂盒说明书。

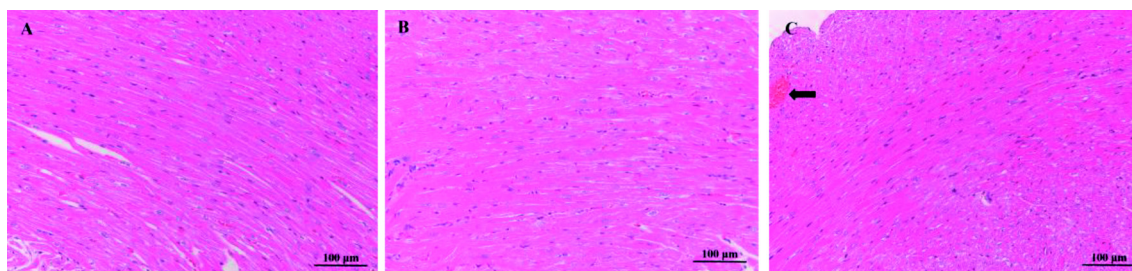
1.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 Graphpad Prism 5.0 软件对数据进行分析。多组计量数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察

光学显微镜下观察,对照组心肌细胞大小正常,呈短柱状,有分支和横纹,心肌细胞间结构正常,心肌纤维排列整齐致密(图 1A)。 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后 7 d 及 14 d,镜下可见心肌纤维排列紧密,心肌细胞大小正常,未出现明显的萎缩、水肿、坏死及纤维化等病变(图 1B、C),但偶见小灶心肌血管充血(图 1C)。



A 为对照组, B 为辐照后 7 d, C 为辐照后 14 d (箭头示血管充血), 均为 HE 染色结果。

图 1 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后不同时间裸鼹鼠心脏组织病理学观察

Figure 1 Histopathological observation on the heart tissues of naked mole rats at different time after $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray irradiation

2.2 心脏生化指标检测结果

如表 1 显示, 辐照后 7 d 心脏组织中 MDA 含量显著高于对照组 ($P < 0.01$), $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后 14 d 较辐照后 7 d 显著降低 ($P < 0.01$), 但仍显著高于对照组 ($P < 0.01$)。心脏组织 T-AOC 在

辐照后 7 d 未有显著降低, 但在辐照后 14 d 显著低于对照组 ($P < 0.05$) 和辐照后 7 d 组 ($P < 0.05$)。心脏组织 GSH 与 GSSG 含量均在辐照后 7 d 和辐照后 14 d 显著降低 ($P < 0.01$), 且辐照后 14 d 组含量显著低于辐照后 7 d 组 ($P < 0.01$)。

表 1 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照对裸鼹鼠心脏氧化应激水平的影响

Table 1 Effect of $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray radiation on oxidative stress in the heart of naked mole rats

指 标	对照组 (n=4)	辐照后 7 d (n=4)	辐照后 14 d (n=4)
MDA/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	5.261 $\pm$ 0.113	8.335 $\pm$ 0.156**	7.187 $\pm$ 0.114***
T-AOC/(mmol $\cdot$ g $^{-1}$)	0.435 $\pm$ 0.009	0.428 $\pm$ 0.008	0.413 $\pm$ 0.009**
GSH/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	12.494 $\pm$ 0.112	10.402 $\pm$ 0.017**	7.458 $\pm$ 0.061***
GSSG/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	6.247 $\pm$ 0.014	5.201 $\pm$ 0.011**	3.729 $\pm$ 0.065***

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与辐照后 7 d 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

电离辐射虽然对肿瘤具有一定程度的治疗作用, 但其引发的放射性并发症也一直严重威胁着人类的健康。心脏作为对电离辐射较为敏感的器官, 在经过电离辐射后, 通常情况下会出现与辐射剂量和辐射时间具有相关性和依赖性的病变。王升晔等^[15]报道小鼠心脏在经过电离辐射后呈现出心脏广泛纤维增厚、心脏微血管和内皮细胞减少等病变, 辐射能导致心肌纤维排列紊乱, 心肌细胞出现水样变性等。另有研究发现, 在局部心脏辐射几个月后, 可以观察到心肌血管周围间质胶原沉积增加, 并逐渐恶化^[16-18]。大鼠在经过全身高剂量辐射后, 心脏微血管密度显著降低^[19]。此外, 有报道显示, 经过辐射后, 不仅心脏微血管密度会改变, 其部分功能亦发生改变^[20]。本研究中, 经过一次性 10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照后, 裸鼹鼠心肌纤维排列紧密, 心肌细胞大小正常, 仅偶见小灶心肌血管充血, 未出现心肌纤维广泛增厚、排列严重紊乱、间质细胞炎性浸润和纤维化等病变, 表明裸鼹鼠心脏组织结构未受辐射的明显影响。

辐射对于细胞的损伤, 一方面是通过对其直接生化修饰进行影响, 另一方面则是通过分解细胞水分子产生活性氧簇和活性氮自由基, 促使机体产生氧化应激反应, 从而间接损伤组织结构^[14,21]。正常情况下, 对于体内存在的自由基,

机体具有一定的清除机制, 即机体抗氧化防御机制。该机制包括以 GSH、过氧化氢酶等为代表的低分子量抗氧化剂, 能够将氧化因子经过一系列反应最终转化为水和氧气^[22-23]。当机体受到电离辐射时, 自由基大量产生, 超出了机体清除机制的承受能力, 因此会引起机体的氧化损伤。而机体受到氧化损伤最直接的重要标志, 就是脂质过氧化的终产物 MDA 大量增加。研究发现, 将小鼠进行 6 Gy 剂量 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后, 其心脏组织中 MDA 显著增加^[24]。作为机体内重要的抗氧化和自由基清除剂, GSH 在机体中主要以两种形式存在, 分别为 GSSG 和还原型 GSH, 但机体正常情况下主要以还原型 GSH 形式存在^[25], 且自身会维持还原型 GSH 和 GSSG 的动态平衡, 以更好保证生物体内抗氧化和清除行为的进行; 而受到不同条件刺激时, 该动态平衡将进行自身调整以应对外部刺激。如左丽丽等^[24]研究发现, 小鼠在经过 6 Gy 剂量 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后, 其心脏组织中 GSH 含量显著降低。T-AOC 反映的是机体总体的抗氧化能力, 其数值的高低表明机体抗氧化能力的强弱^[26]。在本研究中, 经过一次性 10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后, 裸鼹鼠心脏组织中 MDA 含量显著增加, T-AOC、GSH 和 GSSG 含量均显著降低, 与文献报道结果相符, 表明裸鼹鼠心脏组织在辐射后发生明显的氧化应激, 且心肌过氧化损伤显著。

综上所述, 虽然裸鼹鼠心脏组织中的 MDA

含量呈现升高趋势, T-AOC、GSH 和 GSSG 含量均呈现时间相关的递减趋势, 但在组织学观察时并未发现相应病变。一方面表明了裸鼯鼠心脏组织确实具有一定程度的辐射耐受能力, 另一方面也说明裸鼯鼠心脏组织中还存在其他尚未明确的抗氧化修复机制或其他辐射耐受机制, 这为后续的裸鼯鼠辐射耐受机制的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Barton MB, Jacob S, Shafiq J, et al. Estimating the demand for radiation therapy from the evidence: A review of changes from 2003 to 2012[J]. *Radiat Ther Oncol*, 2014, 112:140-144.
- [2] Delaney G, Jacob S, Featherstone C, et al. The role of radiation therapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines[J]. *Cancer*, 2005, 104:1129-1137.
- [3] Boerma M, Hauer-Jensen M. Potential targets for intervention in radiation-induced heart disease[J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(11):1405-1412.
- [4] Andratschke N, Maurer J, Molls M, et al. Late radiation induced heart disease after radiotherapy. Clinical importance, radiobiological mechanisms and strategies of prevention[J]. *Radiother Oncol*, 2011, 100(2):160-166.
- [5] Taunk NK, Haffty BG, Kostis JB, et al. Radiation-induced heart disease: Pathologic abnormalities and putative mechanisms[J]. *Front Oncol*, 2015, 5:39.
- [6] 吕宗鑫. 对电离辐射与电磁辐射区别的探讨[J]. *低碳世界*, 2019, 9(1):22-23.
- [7] 陈超, 丛薇, 杨文静, 等. 裸鼯鼠与小鼠抗辐射能力比较研究[J]. *实验动物与比较医学*, 2019, 39(6):479-483.
- [8] Li M, Zhao DH, Wang JS. Research progress on antiradiation drugs[J]. *Pract Pharm Clin Remed*, 2017, 20(12):1435-1440.
- [9] 韦瑀龙, 蓝晓庆. 中药钴 60 辐照灭菌的应用研究进展[J]. *海峡药学*, 2019, 31(8):4-7.
- [10] Heidenreich PA, Kapoor JR. Radiation induced heart disease: Systemic disorders in heart disease[J]. *Heart*, 2009, 95(3):252-258.
- [11] Martinou M, Gaya A. Cardiac complications after radical radiotherapy[J]. *Semin Oncol*, 2013, 40(2):178-185.
- [12] Mill WB, Baglan RJ, Kurichety P, et al. Symptomatic radiation-induced pericarditis in Hodgkin's disease[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1984, 10(11):2061-2065.
- [13] 于兰, 万海涛, 王刚, 等. 放射性心脏病研究进展[J]. *中国放射医学与防护杂志*, 2016, 36(6):475-480.
- [14] 珠娜, 郝云涛, 张亭, 等. 核桃低聚肽对⁶⁰Co γ 射线照射小鼠氧化损伤保护作用的实验研究[J]. *中国预防医学杂志*, 2019, 20(3):212-216.
- [15] 王升晔, 封巍, 程国平, 等. 单次高剂量放疗对小鼠心脏的病理学改变及机制探讨[J]. *心电与循环*, 2019, 38(5):395-399.
- [16] Boerma M, Zurcher C, Esveldt I, et al. Histopathology of ventricles, coronary arteries and mast cell accumulation in transverse and longitudinal sections of the rat heart after irradiation[J]. *Oncol Rep*, 2004, 12(2):213-219.
- [17] Schultz-Hector S. Radiation-induced heart disease: Review of experimental data on dose response and pathogenesis[J]. *Int J Radiat Biol*, 1992, 61(2):149-160.
- [18] Sridharan V, Tripathi P, Sharma S, et al. Roles of sensory nerves in the regulation of radiation-induced structural and functional changes in the heart[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014, 88(1):167-174.
- [19] Baker JE, Fish BL, Su J, et al. 10 Gy total body irradiation increases risk of coronary sclerosis, degeneration of heart structure and function in a rat model[J]. *Int J Radiat Biol*, 2009, 85(12):1089-1100.
- [20] Boerma M, Kruse JJ, van Loenen M, et al. Increased deposition of von Willebrand factor in the rat heart after local ionizing irradiation[J]. *Strahlenther Onkol*, 2004, 180(2):109-116.
- [21] 冯艳群, 李路, 田树泰, 等. 玫瑰茄多糖对电离辐射小鼠抗氧化应激能力的影响[J]. *特产研究*, 2013, 35(3):51-53.
- [22] Desouky, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation[J]. *Rad Res App Sci*, 2015, 8(2):247-254.
- [23] Giardi MT, Touloupakis E, Bertolotto D, et al. Preventive or potential therapeutic value of nutraceuticals against ionizing radiation-induced oxidative stress in exposed subjects and frequent fliers [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(8):17168-17192.
- [24] 左丽丽, 富校轶, 高永欣, 等. 狗枣猕猴桃多酚对⁶⁰Co γ 射线辐射防护作用的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 22:344-353.
- [25] Forman HJ. Glutathione—From antioxidant to post-translational modifier[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 595:64-67.
- [26] 袁带秀, 袁志忠, 李中正, 等. 对 D- 半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用研究[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(12):2968-2970.

Preliminary Study on Heart Tolerance to $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray Radiation in Naked Mole Rats

LI Yu^{1*}, LIU Yinhang^{2*}, CHEN Chao¹

(1. Department of Laboratory Animal Science, School of Basic Medical Sciences, Naval Medical University, Shanghai 200433, China;
2. Shanghai Foreign Language School, Shanghai 200083, China)

* These two authors contributed equally.

Correspondence to: CHEN Chao, chenchao_8713@aliyun.com

[Abstract] **Objective** To observe and analyze the changes of cardiac morphology and biochemical indexes in naked mole rats after $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray radiation, and to preliminarily study the characteristics of $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray radiation tolerance in naked mole rats heart. **Methods** The naked mole rats were generally radiated by the single 10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray, and then their hearts were collected after 7 days and 14 days respectively. After paraffin section and hematoxylin eosin (HE) staining, the microstructure of naked mole rat heart was observed under an optical microscope, and the pathological analysis was carried out. The malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (T-AOC), glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) contents in heart tissues were detected by biochemical test kit. **Results** Microscopic examination showed that there was no obvious atrophy, edema, necrosis and fibrosis in the heart tissues of naked mole rats after irradiation. According to the biochemical test, the content of MDA in heart tissues increased significantly after irradiation ($P<0.01$), and the T-AOC, GSH and GSSG contents decreased significantly with time (all $P<0.05$). **Conclusion** The heart of naked mole rats can tolerate $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray to some extent, but the specific mechanism of tolerance is not clear.

[Key words] Naked mole rat; Heart; $^{60}\text{Co}\gamma$ -rays; Radiation tolerance

老年 SD 大鼠自发性肿瘤的病理学观察

周晓丽, 张 倩, 高 峰, 钱智勇

(天津市疾病预防控制中心毒理科, 天津 300011)

[摘要] 目的 观察 SD 大鼠自发性肿瘤发生情况, 为开展新药致癌试验提供背景数据。方法 某项致癌试验正常对照组中 4 周龄 SPF 级 SD 大鼠共 120 只, 雌雄各半, 实验前观察 1 周, 常规饲料饲养 104 周后实施安乐死。对实验期间死亡大鼠和处死大鼠进行解剖后称量心、肺、肝、脾、肾、肾上腺、胸腺、脑、睾丸和附睾(或子宫)等器官, 常规病理学取材制片后光学显微镜观察各脏器自发肿瘤的类型和发生率。结果 共观察了 113 只 SD 大鼠(试验过程中损失了 7 只), 患瘤大鼠占 66.4% (75/113), 其中良性肿瘤占 48.7% (55/113), 恶性肿瘤占 17.7% (20/113)。雄性大鼠发生肿瘤 49.1% (28/57), 其中良性肿瘤占 50.9% (26/57), 恶性肿瘤占 3.5% (2/57); 良性肿瘤主要是垂体腺瘤(36.8%)和肾上腺髓质腺瘤(7.0%), 恶性肿瘤主要是甲状腺腺癌(1.8%)和纤维肉瘤(1.8%)。雌性大鼠发生肿瘤 83.9% (47/56); 其中良性肿瘤占 51.8% (29/56), 恶性肿瘤占 32.1% (18/56); 良性肿瘤主要是垂体腺瘤(50.0%)、乳腺纤维腺瘤(12.5%)和乳腺腺癌(12.5%), 恶性肿瘤主要是乳腺腺癌(25.0%)和纤维肉瘤(3.6%)。结论 正常饲养的 2 岁多的 SD 大鼠自发肿瘤发生率较高, 且良性肿瘤发生率高于恶性肿瘤, 可能与衰老、肿瘤以及个体差异有关。

[关键词] 自发性肿瘤; 病理学观察; SD 大鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0420-06

新药致癌性研究是药物非临床安全性评价的重要内容, 通过考察药物在动物体内的潜在致癌作用, 评价和预测可能对人体造成的危害, 并以风险控制计划、说明书、临床监察、上市后监测等手段进行风险控制^[1]。由于致癌试验需要 6 个月以上甚至更长(国际上致癌试验一般周期为 24 个月)的动物给药时间, 对动物质量(高质量的动物可避免自发疾病对试验结果的影响)、动物房环境、动物福利以及操作人员的技术要求(比如避免连续 24 个月经口给药时发生操作失误)比较高。在致癌试验动物(尤其是大鼠的

品系)选择中, 针对不同药物可以更好更合理挑选动物品种、品系和性别(如果需要)。在组织病理分析和诊断中, 更准确判断肿瘤和药物的关系, 综合评价药物对动物的致癌影响^[2]。根据本实验室最近开展的一项 SD 大鼠致癌试验, 本文分析该试验中对照组 120 只 SD 大鼠喂饲 2 年后的各种肿瘤发生率, 并进行病理学观察。由于对照组未经染毒和任何人为干扰, 可以认为其发生的肿瘤病变及其发生率的高低在进行致癌试验结果评价时具有重要的参照价值。另外, 不同品系及不同批次大鼠的自发肿瘤及其发生率可存在一定的差异, 本文进一步丰富了现有 SD 大鼠自发肿瘤病变及其发生率的资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物和饲养环境

致癌试验中正常对照组 SPF 级 SD 大鼠 120

[收稿日期] 2019-11-05

[作者简介] 周晓丽(1987—), 女, 技师, 研究方向: 维生素对高脂血症的作用与机制。

E-mail: zxl88224@126.com

[通信作者] 钱智勇(1971—), 主任技师, 研究方向: 转基因食品的安全性评价。E-mail: qzyong@sohu.com

只,雌雄各半,体质量40~60 g,4周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001]。所有大鼠饲养于天津市疾病预防控制中心屏障设施内[SYXK(津)2014-0001],室温控制在20~25℃,相对湿度40%~70%,12 h照明,12 h黑暗。动物按不同性别分笼饲养,对照组食用常规动物饲料,自由饮水,每周更换1次鼠盒及垫料。所有动物检疫观察1周,即观察动物的活动、饮食等表现。动物在使用前,经兽医检查合格后进行致癌试验。

1.2 仪器与试剂

全自动 Thermo 染色机购自美国 Thermo Electron 公司,ASP3000 全自动封闭脱水机和 EG1150H 石蜡包埋机购自德国 Leica 公司,BX51 显微镜购自日本 Olympus 公司,CP323S 天平购自德国 Sartorius 公司,苏木精和伊红染色液购自哈尔滨格林标本技术开发有限公司。

1.3 大体病理学检查

致癌试验周期为104周,试验结束后用戊巴比妥钠(50 mg/kg,腹腔注射)麻醉动物,通过腹主动脉取血法将动物安乐死。常规检查动物体质、发育和营养状况,检查口、鼻、外耳、肛门和外生殖器有无异常。系统剖检包括脏器的位置、大小、色泽和质地是否正常,有无粘连、肿瘤等,胸腔、心包、腹腔及颅腔有无积液或出血。着重检查皮肤、皮下及各脏器有无包块,注意包块的色泽、硬度和大小等。试验期间每日进行临床观察,将自然死亡与濒死的动物及时进行剖检。

1.4 组织病理学检查

对致癌试验过程中死亡的动物、因濒死而被处死的动物、试验结束时所有存活动物处死后均进行全面的大体解剖,解剖时详细记录肿瘤的部位、形状、大小、质地、颜色和肿瘤个数等。将下列组织用质量分数4%的甲醛溶液固定,供进一步组织病理学观察:病变及肿瘤组织、脑(包括大脑、小脑、脑干)、脊髓、心、肺、气管、肝、脾、肾、胰、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、膀胱、肾上腺、垂体、甲状腺(包括甲状旁腺)、胸腺、附睾、睾丸、前列腺、卵巢、子宫、肌肉、

骨、淋巴结和眼球等脏器。取固定的组织和器官,经脱水后石蜡包埋,切片(厚度为3~5 μm),苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜检查。诊断术语参照美国毒性病理学会(Society of Toxicology Pathology)指导文件 *Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria*。天津市疾病预防控制中心毒理科负责进行组织病理学检查,并计算各种肿瘤病变的发生率。

1.5 数据处理和统计分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均值间比较采用独立样本 *t* 检验,率的比较用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

对120只SD大鼠在不同时间段的死亡率进行统计。由于试验过程中死亡7只,且发现时脏器已发生自溶,失去病理学观察意义,因此仅对113只大鼠进行了病理学检查,其中雌性大鼠56只,雄性大鼠57只。试验期间观察到这些大鼠的临床主要表现为体表肿块、脱毛、步态异常、活动减少、消瘦、腹泻、会阴污秽、眼有血性分泌物等,个别动物出现下肢瘫痪和血尿。

2.2 死亡率

雌性大鼠最早死亡时间为试验第49周,雄性大鼠最早死亡时间为第62周。死亡动物解剖时未发现异常,病理学观察无器质性病变。试验第27~52周时动物死亡率为1.7%(2/120),雌性大鼠死亡率略高于雄性大鼠;随着时间延长,死亡率呈现递增趋势,第53~78周死亡率为16.7%(20/120),雌雄大鼠死亡率相当;第79~104周死亡率为41.7%(50/120),雌性大鼠死亡率高于雄性(表1)。

表1 20只SD大鼠不同时间段死亡率

Table 1 Mortality of 120 SD rats in different time periods

死亡时间	动物数 (n=120)	[n(%)]		P 值
		雌性 (n=60)	雄性 (n=60)	
第27~52周	2(1.7)	2(3.3)	0(0)	0.081
第53~78周	20(16.7)	10(16.7)	10(16.7)	1.000
第79~104周	50(41.7)	28(46.7)	22(36.7)	0.152

2.3 肿瘤发生情况

总体肿瘤发生率为 66.4%，单发和多发性肿瘤比例相似，详见表 2。

表 2 113 只 SD 大鼠自发性肿瘤发生情况
Table 2 Spontaneous tumorigenesis in 113 SD rats
[n(%)]

肿瘤发生情况	动物数 (n=113)	雌性 (n=56)	雄性 (n=57)	P 值
所有肿瘤	75(66.4)	47(83.9)	28(49.1)	<0.001
良性肿瘤	55(48.7)	29(51.8)	26(50.9)	0.887
恶性肿瘤	20(17.7)	18(32.1)	2(3.5)	<0.001
单发肿瘤	40(35.4)	17(30.4)	23(40.4)	0.138
多发肿瘤	35(31.0)	30(53.6)	5(8.8)	<0.001

2.4 良性肿瘤病理类型

雄性大鼠以垂体腺瘤最多见 (36.5%)，其次是肾上腺髓质腺瘤 (7.0%)。垂体腺瘤在解

剖时可见垂体肿大，大小约 0.3 cm × 0.4 cm × 0.4 cm，可与周围组织完全剥离，有些可见局部出血；主要表现为嗜酸性腺瘤、嗜碱性腺瘤、嫌色细胞腺瘤和混合细胞腺瘤，其中嗜酸性细胞腺瘤多见，嫌色细胞腺瘤少见。其他的良性肿瘤有肾上腺皮质腺瘤、甲状腺瘤、皮肤纤维瘤和脂肪瘤等。

雌性大鼠以垂体腺瘤 (50.0%)、乳腺纤维腺瘤 (12.5%) 和乳腺腺瘤 (12.5%) 最多见。垂体腺瘤临床表现和大体解剖所见与前述的雄性大鼠基本相同。乳腺良性肿瘤大体解剖可见乳腺部位皮下单个或多个肿块，最大直径可达 11~16 cm，可与周围组织剥离，灰白色或伴有红色区域。雌性大鼠其他良性肿瘤病变有肾上腺髓质腺瘤、皮肤纤维瘤、甲状腺腺瘤、子宫内膜息肉和子宫平滑肌瘤等 (表 3)。

表 3 SD 大鼠良性肿瘤病变类型及发生率
Table 3 Histological types and incidences of benign neoplastic lesions in SD rats

发生部位或脏器	肿瘤类型	动物数(n=113)	雌性(n=56)	雄性(n=57)	P 值
垂体	腺瘤	49(43.4)	28(50.0)	21(36.8)	0.064
肝	血管瘤	1(0.9)	0(0)	1(1.8)	0.155
大脑	海绵状血管瘤	1(0.9)	1(1.8)	0(0)	0.155
肾上腺	皮质腺瘤	9(8.0)	5(8.9)	4(7.0)	0.602
胰腺	胰岛细胞瘤	1(0.9)	0(0)	1(1.8)	0.155
甲状腺	腺瘤	4(3.5)	2(3.6)	2(3.5)	0.989
乳腺	腺瘤	7(6.2)	7(12.5)	0(0)	—
	纤维腺瘤	7(6.2)	7(12.5)	0(0)	—
子宫	内膜息肉	1(0.9)	1(1.8)	0(0)	0.155
	平滑肌瘤	1(0.9)	1(1.8)	0(0)	0.155
皮肤	纤维瘤	7(6.2)	4(7.1)	3(5.3)	0.552
	脂肪瘤	1(0.9)	0(0)	1(1.8)	0.155

2.5 恶性肿瘤病理类型及其发生率

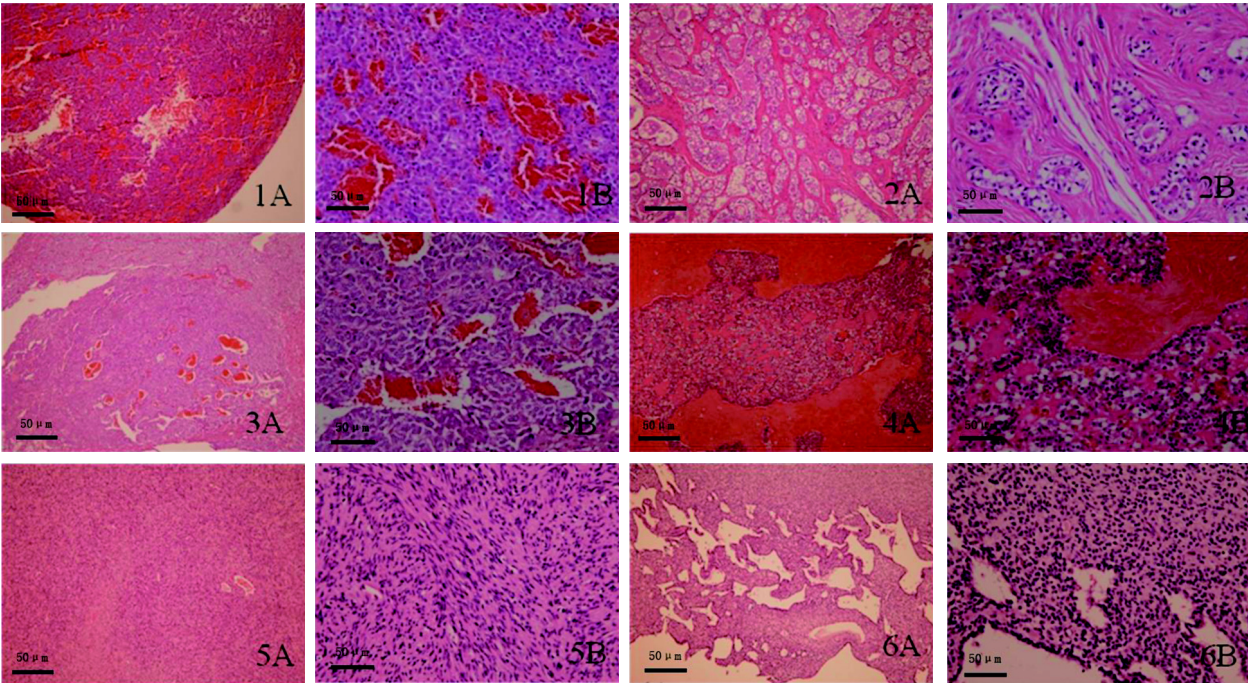
从表 4 可见，雄性大鼠恶性肿瘤主要有甲状腺癌 (1.8%) 和皮肤纤维肉瘤 (1.8%)，雌性大鼠恶性肿瘤主要有乳腺癌 (25.0%)、皮肤纤维肉瘤 (3.6%)、膀胱移行上皮细胞癌 (1.8%) 和肝癌 (1.8%) 等。有的动物腮部出现肿瘤，刚发现时多为直径约 1 cm 的轻微隆起，长到直径约 3~5 cm 时呈球形隆起，后期肿瘤表面溃破，内部坏死，肿瘤压迫一侧眼睛和耳朵，也影响口腔摄食，解剖时与周围组织界限不清，经

病理检查其为腺癌。发生于内脏器官的恶性肿瘤多数在动物死亡后才发现，可见恶性肿瘤病变已扩散到周围组织，与周围组织粘连在一起，或扩散至全身器官。此外，生长在皮下的球形恶性肿瘤病变与皮下良性细胞球形肿瘤的临床和大体解剖情况类似，但生长较快，瘤体较大，肿瘤中心部位可见坏死，病理类型为纤维肉瘤，一般并发脾脏肿大，光学显微镜下可见脾脏髓外造血增加。典型肿瘤组织经 HE 染色后病理学观察结果见图 1。

表 4 SD 大鼠恶性肿瘤病变类型及发生率

Table 4 Histological types of malignant neoplastic lesions in SD rats and their incidences

发生部位或脏器	肿瘤类型	动物数(n=113)	雌雄(n=56)	雄性(n=57)	[n(%)] P 值
肝	肝癌	1(0.9)	1(1.8)	0(0)	0.155
乳腺	腺癌	14(12.4)	14(25.0)	0(0)	< 0.001
膀胱	移行上皮细胞癌	1(0.9)	1(1.8)	0(0)	0.155
甲状腺	腺癌	1(0.9)	0(0)	1(1.8)	0.155
皮肤	纤维肉瘤	3(2.7)	2(3.6)	1(1.8)	0.407



1A 和 1B 示垂体嗜酸性腺瘤，瘤细胞体积较大，核圆形或染色浅，细胞质丰富嗜酸性，细胞排列成巢状；2A 和 2B 示乳腺纤维腺瘤，腺上皮和纤维细胞呈肿瘤性增生；3A 和 3B 示肾上腺髓质腺瘤，瘤细胞质丰富，排列成巢或团索状；4A 和 4B 示乳腺癌，癌细胞呈单层或多层乳头状增生；5A 和 5B 示皮肤纤维肉瘤，肉瘤细胞短梭形，大小不一，核染色深，可见核分裂象；6A 和 6B 示膀胱移行上皮细胞癌，移行上皮细胞可见细胞异型性和分裂象，向周围组织浸润。A 为 HE 低倍视野，B 为 HE 高倍视野。

图 1 大鼠自发性肿瘤病理组织学观察（HE 染色）

Figure 1 Pathological observation of spontaneous tumors in rats (HE staining)

3 讨论

自发肿瘤是大鼠生物学特征的重要表现形式之一。自 1979 年开始，有报道显示裸小鼠可自发肿瘤，随后国外陆续有 SPF 级大鼠自发肿瘤的报道^[3-4]。本文通过对新药致癌试验期为 104 周的正常对照组 113 只 SD 大鼠自发肿瘤的组织病理学检查结果进行详细分析，总结了雄性和雌性 SD

大鼠各种自发良性和恶性肿瘤病变及其发生率；结果显示，雄性大鼠以垂体腺瘤和肾上腺髓质腺瘤高发，雌性大鼠以垂体腺瘤、乳腺纤维腺瘤和乳腺腺瘤高发，这些高发的肿瘤均为良性肿瘤。肖成荣等^[5]对喂养 2 年的 Wistar 大鼠生存、体质量及进食量进行观察与分析，发现雄性大鼠死亡率、死亡动物平均活存时间具有高于雌性大鼠的趋势，雌性大鼠的自发性肿瘤发生率

较雄性大鼠略高,并且存在同一只大鼠多器官发生肿瘤的现象。

肿瘤的发生与性别相关。本研究结果显示,雌性大鼠恶性肿瘤发生率高于雄性大鼠。动物肿瘤生态学研究^[6]结果表明,在1 077例肿瘤中,雌性动物的肿瘤发生率高于雄性和去势动物,雌性占48.7%,雄性占40%,去势动物占11.3%。性别差异也因肿瘤良恶性不同有所区别。良性肿瘤中,雄性动物的检出例数多于雌性和去势动物;恶性肿瘤则相反,雌性动物的检出例数明显多于雄性和去势动物。雌性大鼠恶性肿瘤发生率远远高于雄性大鼠的原因可能是,检出率高的好发恶性肿瘤如乳腺癌等多发生于雌性大鼠。本文还详细介绍了与肿瘤病变相关的临床表现和大体解剖所见,可为相关技术人员特别是初次开展SD大鼠致癌试验的人员提供一些参考和借鉴。

根据肿瘤发生率进行评定时,主要通过统计学显著性检验来评价,如果染毒组的肿瘤发生率高于对照组且差异具有统计学意义(最好具有剂量-反应关系),则认为致癌试验结果为阳性^[7]。有研究^[8]表明,当对照组肿瘤自发率分别为1%、5%、10%、20%和30%,染毒组肿瘤发生率相应为20%、30%、40%、50%和60%时,才有90%的把握度获得阳性结果。动物数不变的情况下,如果对照组动物自发性肿瘤发生率很高,则可降低统计学显著性检验的效率,掩盖受试物所引起的肿瘤病变发生率的增高,干扰对研究结果的准确评价^[7]。

不同实验室、不同品系大鼠、不同批次大鼠以及不同时间开展的致癌试验中,动物自发性肿瘤类型及其发生率可存在一定的差异。对于同一种属、同一品系、同一实验室条件下饲养的大鼠,其自发肿瘤的发生率随着动物生命周期的延长而增加^[9],这与本实验结果一致。有文献报道^[10],176只SD大鼠中雄性大鼠良恶性肿瘤发生率分别为35.6%和16.1%,雌性大鼠良恶性肿瘤发生率分别为61.8%和15.7%;本研究中雄性大鼠良恶性肿瘤发生率分别为50.9%和3.5%,雌性大鼠良恶性肿瘤发生率分别为51.8%和32.1%。文献^[10]报道中雄性大鼠恶性肿瘤发生率高于本研究结果,这种现象可能与SD大鼠来源、样本数

量和饲养条件等因素有关。Son^[11]统计了1 284只雄性SD大鼠和1 264只雌性SD大鼠的自发肿瘤情况,结果发现SD大鼠最常发生的肿瘤为垂体腺瘤,其次为乳腺纤维腺瘤和乳腺癌;在50周致癌实验终点安乐死的动物中,垂体腺瘤的发生率分别为雄性37%和雌性79.5%。本研究中肿瘤发生率最高的类型分别是雄性大鼠的垂体腺瘤和肾上腺髓质腺瘤,雌性大鼠的垂体腺瘤、乳腺纤维腺瘤和乳腺腺瘤,其中垂体腺瘤的发生率分别为雄性36.8%和雌性50.0%,且雌性发生率高于雄性,这与Son的结果一致。

SD大鼠、F344大鼠和TR1及TR2系大鼠自发肿瘤发生率的资料表明,这些品系大鼠的自发肿瘤也以垂体腺瘤和乳腺癌最高发^[12-15]。这些品系大鼠中以SD大鼠的自发腺瘤发生率最高,可达70%;本研究中113只SD大鼠自发肿瘤总体发生率为66.4%,与该结论接近。本文报告的SD大鼠自发肿瘤及其发生率进一步丰富了现有SPF级SD大鼠自发性肿瘤的数据资料,可为我国毒性致癌试验的安全性评价提供一定的参考和借鉴。

参考文献:

- [1] ICH. S6(R1): Addendum to ICH S6: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals[EB/OL]. 2009-10-29. <http://www.ich.cog>.
- [2] 黄明珠, 富欣. 有关开展致癌试验的现状[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3):590.
- [3] Crabbs TA, Frame SR, Laast VA, et al. Occurrence of spontaneous amphophilic-vacuolar renal tubule tumors in Sprague-Dawley rats from subchronic toxicity studies[J]. Toxicol Pathol, 2013, 41(6):866-871.
- [4] Kuzutani K, Shibunishi T, Kangawa Y, et al. Spontaneous mammary adenocarcinoma in a twelve-week-old female Sprague-Dawley rat [J]. J Toxicol Pathol, 2012, 25(3):221-224.
- [5] 肖成荣, 谭洪玲, 马增春, 等. Wistar大鼠二年喂养对其生存、体质量、进食量及自发性肿瘤发生率的观察与分析[J]. 实验动物科学, 2014, 31(1):34-40.
- [6] 王雯慧, 陈怀涛. 动物肿瘤病的发生与动物性别的关系[J]. 甘肃畜牧兽医, 1996(1):9-10.
- [7] 吕秋军. 新药药理学研究方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007:414-415.
- [8] Son WC, Gopinath C. Early occurrence of spontaneous tumors in CD-1 mice and Sprague-Dawley rats[J]. Toxicol

- Pathol, 2004, 32(4):371-374.
- [9] Mann SW, Yuschak MM, Amyes SJ, et al. A combined chronic toxicity/carcinogenicity study of sucralose in Sprague-Dawley rats[J]. Food Chem Toxicol, 2000, 38 (Suppl 2):S71-89.
- [10] 何亚男, 张素才, 张惠铭. SD 和 Wistar 大鼠自发性肿瘤的病理学观察[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(4):249-254.
- [11] Son WC. Factors contributory to death of young Sprague-Dawley rats in carcinogenicity studies[J]. Toxicol Lett, 2004, 153(2):213-219.
- [12] 王捷, 乔良, 于峰, 等. 克草胺慢性毒性及致癌性联合实验研究[J]. 卫生毒理学杂志, 2001(1):40-41.
- [13] 马国云, 董竞武, 金耀球, 等. 三唑磷农药对大鼠的致癌性实验病理观察[J]. 环境与职业医学, 2007(6):592-595.
- [14] 尹纪业, 董延生, 袁本利, 等. F344大鼠自发性肿瘤的病理学观察[J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(3):188-192.
- [15] 林炳水, 窦桂荣, 王东茂, 等. TR1 和 TR2 系大鼠中自发性肿瘤观察[J]. 上海实验动物科学, 1987(3):131-132.

Pathological Observation of Spontaneous Tumor in Aged SD Rats

ZHOU Xiaoli, ZHANG Qian, GAO Zheng, QIAN Zhiyong
(Department of Toxicology, Tianjin Center for Disease Control
and Prevention, Tianjing 300011, China)

Correspondence to: QIAN Zhiyong, qzyong@sohu.com

[Abstract] Objective To observe the occurrence of spontaneous tumors in SD rats, and to provide the background data for carrying out new drug induction trials. **Methods** In a carcinogenicity test, 120 normal SD rats (SPF-grade) at 4 weeks of age were divided into male and female with the same number. All rats were observed for one week before the experiment. After 104 weeks of conventional feeding, the sedation was performed. The dead rats during the experiment and the sacrificed rats were dissected. The organs such as heart, lung, liver, spleen, kidney, adrenal gland, thymus, brain, testis and epididymis (or uterus) were weighed, and the types and incidence of spontaneous tumors in each organ were observed by an optical microscope after routine pathology. **Results** A total of 113 SD rats were observed (7 rats were lost during the test), the tumor-bearing rats accounted for 66.4% (75/113), of which the benign tumors accounted for 48.7% (55/113), and the malignant tumors accounted for 17.7% (20/113). Tumors occurred in 49.1% (28/57) of male rats, of which 50.9% (26/57) were benign tumors, and 3.5% (2/57) were malignant tumors; the benign tumors were mainly pituitary adenomas (36.8%) and adrenal medulla tumor (7.0%), the malignant tumors were mainly thyroid adenocarcinoma (1.8%) and fibrosarcoma (1.8%). Female rats had tumors of 83.9% (47/56), of which the benign tumors accounted for 51.8% (29/56), and the malignant tumors were 32.1% (18/56); the benign tumors were mainly pituitary adenomas (50.0%), breast fibrous glands tumors (12.5%) and breast adenomas (12.5%), the malignant tumors were mainly breast adenocarcinoma (25.0%) and fibrosarcoma (3.6%). **Conclusion** The incidence of spontaneous tumors was higher in more than 2 years old SD rats, and the incidence of benign tumors was higher than that of malignant tumors, which may be related to aging, tumors and individual differences.

[Key words] Spontaneous tumor; Pathological observation; SD rats

基于冷冻肿瘤组织切片的磷酸化 HER2 免疫组织化学染色方法探讨

范姝琼^{1,2}, 郑莉¹

[1. 迪哲(上海)医药有限公司, 上海 201203; 2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433]

[摘要] 目的 探索针对磷酸化人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 免疫组织化学染色实验中冷冻组织切片的最佳固定与保存条件。方法 在 BALB/c-nu/nu 小鼠中建立人源性乳腺癌细胞 BT474 的皮下移植瘤模型, 对比不同的抗原固定条件和存储时间下, 免疫组织化学染色观察肿瘤模型中磷酸化 HER2 的信号变化。结果 冰冻切片用体积分数为 10% 的甲醛溶液固定 5 min, 可以维持良好的细胞形态。在 -20℃ 的存储条件下, 肿瘤组织中磷酸化 HER2 蛋白在 12 周内表达稳定。结论 冰冻组织切片进行免疫组织化学染色用时短, 可以作为常规石蜡切片染色方法的补充或者替代。

[关键词] 冷冻切片; 人类表皮生长因子受体 2; 免疫组织化学; BALB/c-nu/nu 小鼠

[中图分类号] R737.9; Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)05-0426-06

原癌基因编码蛋白人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 作为表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 家族成员之一, 当基因扩增或过表达时会形成同源二聚体, 或与 EGFR 家族其他成员形成异源二聚体, 激活下游细胞通路, 影响细胞的生长与增殖等功能^[1-2]。肿瘤分子标志物存在于肿瘤组织中, 当机体发生癌变时, 与之相对应的癌因子会发生功能性的改变。因此, 通过对肿瘤分子标志物的检测可以及早发现肿瘤患者, 并监测其临床治疗效果以及评估预后。肿瘤分子标志物在细胞中的精准定位及表达水平与分子靶向药物的治疗效果密切相关^[3]。在早期药物研发阶段, 通过肿瘤分子标志物检测和判读, 可以直接验证靶向化合物的作用机制, 分析化合物在动物模型中达到的药效动力学, 帮助了解药效

动力学和药代动力学的相关性。磷酸化 HER2 (phospho-HER2, p-HER2) 作为 HER2 抑制剂的直接作用靶点, 是最直接最理想的药效验证靶向蛋白^[4]。从技术手段角度来说, 免疫组织化学方法方便、快捷、易于操作, 医院病理科以及中心实验室都具备比较成熟的免疫组织化学检测技术和实验条件, 易于推广。

在实际科研和病理诊断工作中, 冷冻切片在操作上相较于石蜡切片更快速, 常用于短时限内病理诊断与生物标志物的检测。但冷冻切片的组织形态与抗原稳定性容易受外部因素的影响, 例如切片温度、不同的组织固定液和切片存储条件等^[5-6]。相较于石蜡切片, 多次制片更容易对冷冻组织造成不可逆的损失和损伤。本文通过对比不同的固定条件和存储时间, 观察免疫组织化学染色过程中 p-HER2 的信号变化, 探讨针对 p-HER2 检测过程中冷冻组织切片的最佳固定与保存条件。

[收稿日期] 2019-09-12

[作者简介] 范姝琼(1988—), 女, 硕士研究生, 主要从事肿瘤分子病理研究。E-mail: shin0323@163.com

[通信作者] 郑莉(1972—), 女, 博士, 研究方向: 肿瘤分子病理。E-mail: Joan.fan@dizalparma.com

1 材料与方法

1.1 动物模型

6~8 周龄雌性 BALB/c-nu/nu 小鼠 10 只, 体

质量为20~25 g, 购自北京维通利华实验动物有限公司[SCXK(京)2016-0011], 饲养于迪哲(上海)医药有限公司动物实验室[SYXK(沪)2018-0015]。实验正式开始前, 需将动物在新环境中适应性饲养1周。选取p-HER2高表达的人源性乳腺癌细胞株BT474, 通过腹部皮下注射的方法建立小鼠皮下移植瘤模型, 建模成功率为60%(6/10)。本实验符合迪哲(上海)医药有限公司动物伦理委员会制定的伦理学标准(IACUC: 1804-ONM-02)。

1.2 试剂

抗p-HER2(6B12)抗体购自美国Cell Signaling Technology公司, 免疫组织化学检测试剂盒购自瑞士Ventana Roche公司, 冷冻包埋剂OCT购自美国Thermo公司, 苏木精购自美国Sigma公司, 甲醛、无水乙醇和乙酸均购自国药集团药业股份有限公司。乙醇-乙酸-甲醛(AAF)混合固定液的配制: 冰醋酸5 mL, 37%甲醛溶液10 mL, 无水乙醇85 mL。

1.3 仪器

冷冻切片Leica CM3050S Motorized Cryostat和病理切片病理数字扫描系统Aperio ScanScope均购自德国Leica公司, 全自动免疫组织化学染色仪Ventana Discovery XT购自瑞士Ventana Roche公司。

1.4 制片

接种后第5日起, 每隔3 d用游标卡尺测量移植瘤体的长径(L)、短径(W)1次, 取平均值, 按公式 $V = 1/2 (L \times W^2)$ 计算移植瘤平均体积。待裸小鼠BT474细胞皮下肿瘤生长至约300 mm³时处死小鼠, 剥离肿瘤组织, 用液氮速冻^[7], 连续冰冻切片(厚度为5 μm)。然后进行最佳固定与保存条件的探索。

1.5 切片固定

实验分3部分。(1)探索不同固定液对p-HER2免疫组织化学染色信号的影响: 制作2组冷冻组织切片, 分别用体积分数10%的中性甲醛固定液和AAF固定液处理5 min, 然后进行免疫组织化学染色。(2)探索冷冻切片后不同时间点进行甲醛溶液固定对p-HER2免疫组织化学染色信号的影响: 冷冻制片后1、5、20和30 min后, 用10%中性甲醛溶液固定5 min, 然后进行免疫组织化学染色。(3)探索冷冻切片固定后在超低温

保存条件下的抗原稳定性: 采用逆向计算实验时间的方法, 在不同时间制备冷冻组织切片; 未染色的切片经过固定后, 置于-20℃冰箱内存储; 切片分别经过1周、4周和12周后, 与新鲜制备的冷冻切片一同进行免疫组织化学染色, 并将所有切片的染色结果与新鲜切片染色结果进行对比。

1.6 免疫组织化学染色

用全自动免疫组织化学染色仪进行免疫组织化学检测。在制作好的切片上滴加质量浓度为3.4 μg/mL的兔抗人p-HER2(Tyr1221/1222)单克隆抗体, 孵育20 min后, 洗去一抗; 再滴加即用型Ultra Map过氧化物酶标记的羊抗兔二抗试剂, 孵育16 min, 再用ChromoMap DAB进行显色。显色完成的切片滴加苏木精染液, 再滴加蓝化试剂进行返蓝, 完成组织细胞核的对比染色程序。染色完成的切片在无水乙醇中清洗, 然后置于自动封片机上封固。

1.7 结果判读

免疫组织化学染色切片经Aperio成像系统扫描归档, 染色结果由病理医师进行观察、对比, 并截图拍照。

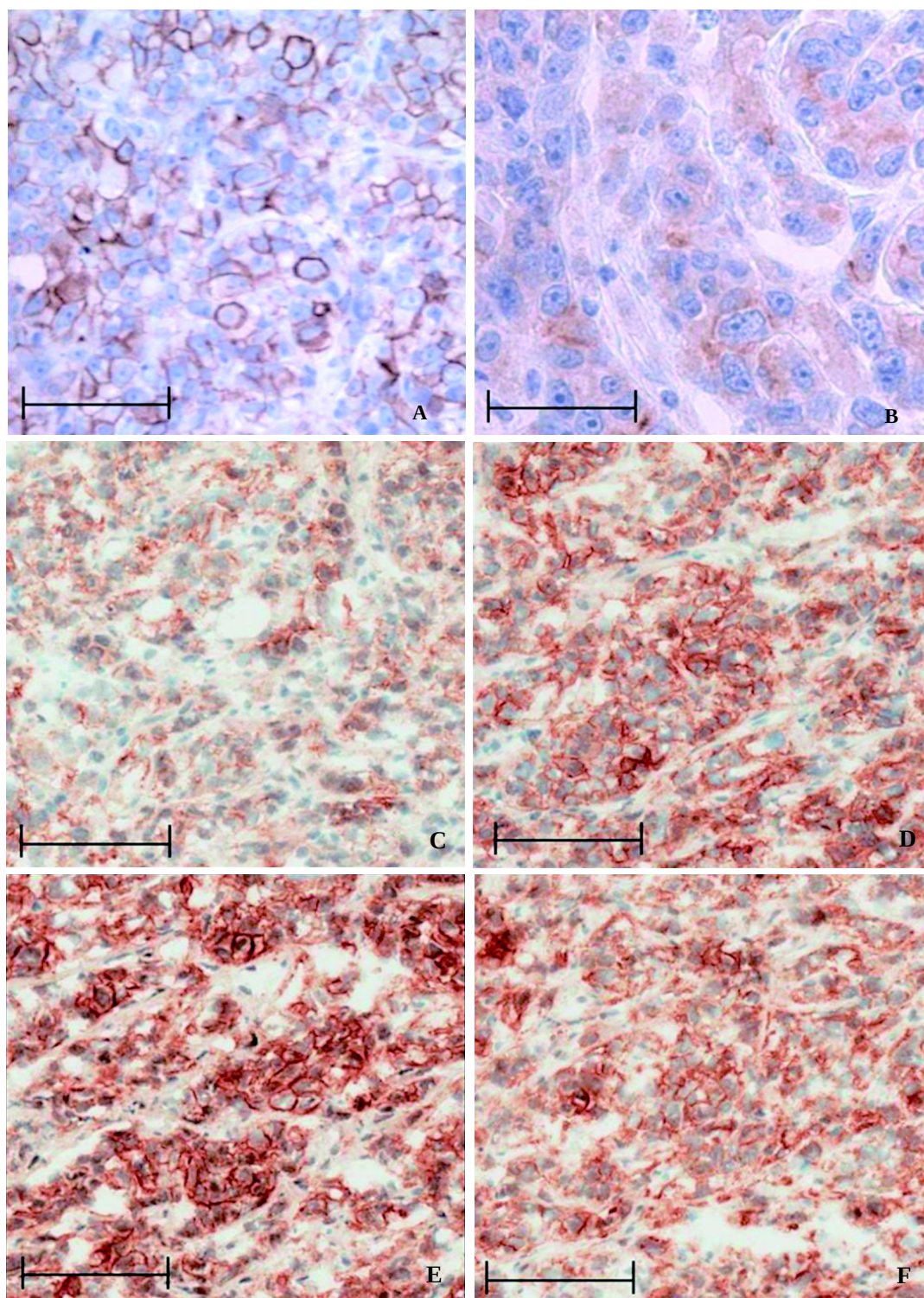
2 结果

2.1 不同固定液对p-HER2免疫组织化学染色结果的影响

用10%中性甲醛固定液处理后, 切片组织结构完整, 细胞形态和结构清晰, p-HER2的免疫组织化学染色信号清晰可判读(图1A)。用AAF固定液处理后, 虽然切片组织和细胞结构清晰, 但p-HER2的免疫组织化学染色信号强度相对较弱(图1B)。

2.2 BT474肿瘤组织固定前抗原的稳定性

BT474移植瘤组织在冷冻制片后5~20 min进行甲醛溶液固定, 组织黏附性好, 染色过程中不易掉片, 光学显微镜下显示组织结构与细胞形态清晰, p-HER2染色信号稳定无差异(图1C~E)。冷冻制片30 min后再行甲醛溶液固定的切片中, p-HER2染色信号开始下降。冷冻组织制片后立即进行甲醛溶液固定的切片在光学显微镜下显示组织黏附性较差, 在染色冲洗过程中容易掉片, 细胞结构不够清晰, p-HER2免疫组织化学信号弥散(图1F)。



A 和 B 为经过不同固定液固定后的冰冻组织切片[A: 10% 中性甲醛溶液固定; B: 乙醇 - 乙酸 - 甲醛(AAF)混合固定液。比例尺为 150 μm]。C~F 为冷冻组织切片后经过不同时间固定(C, 1 min; D, 5 min; E, 20 min; F, 30 min。比例尺为 100 μm)。

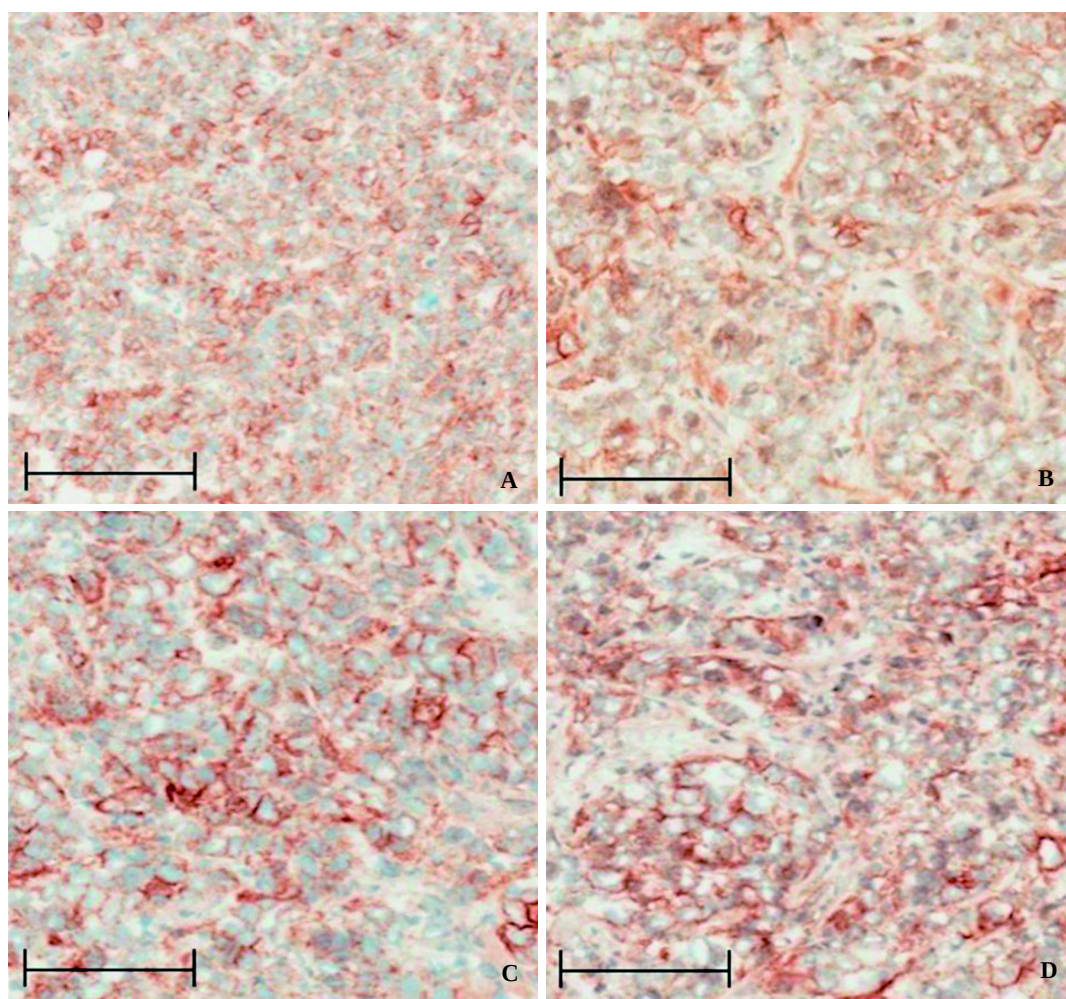
图 1 冷冻组织切片中 p-HER2 免疫组织化学染色结果(DAB 显色)

Figure 1 Immunohistochemistry staining result of phospho-human epidermal growth factor receptor 2 (p-HER2) in frozen sections (DAB coloring)

2.3 BT474 肿瘤组织固定后抗原的稳定性

利用全自动染色仪对新鲜及经过长时间保存的冷冻组织切片进行免疫组织化学染色。结果显示, 未经染色的冷冻组织切片经过 12 周的存储后, 组织黏附性好, 染色过程中没有发生

组织脱落的现象, 且组织与细胞形态完整清晰; p-HER2 免疫组织化学染色信号清晰, 其信号强度与固定完当日即行免疫组织化学染色的切片相比没有明显差异 (图 2)。



A, 0 d; B, 1 周; C, 4 周; D, 12 周。比例尺为 100 μm 。

图 2 未染色的冷冻组织切片经过不同时间保存后 p-HER2 免疫组织化学检测结果 (DAB 显色)

Figure 2 Immunohistochemistry staining result of phospho-human epidermal growth factor receptor 2 (p-HER2) in frozen sections stored for different time (A, 0 day; B, 1 week; C, 4 weeks; D, 12 weeks) (DAB coloring)

3 讨论

免疫组织化学染色作为生物标志物常用检测方法, 利用抗原抗体结合以及化学显色反应, 反映组织细胞中的蛋白含量及分布情况。由于其方

法相对简单, 因此普及率相当高, 在医院内常用于辅助患者明确病理诊断, 从而提供依据帮助选择合适的靶向治疗方案, 以及用于判断患者的预后情况。在新药研发的过程中, 免疫组织化学染色方法也常用于确定药物的作用机制, 并分析药

代动力学与药物效果的相关性。常规的免疫组织化学实验采用经甲醛溶液固定的石蜡组织切片,其优点是样品易于保存,而缺点是从样品采集、充分固定到石蜡切片制备完成所需要的时间较长,而且在实验过程中经过固定的抗原需要先进行抗原修复。而冷冻组织切片相较于石蜡组织切片而言,其制片非常快速,抗原保存完好,而且切片染色可以满足病理诊断的要求;冷冻组织切片由于当天即可完成免疫组织化学染色,可以帮助医生与科研人员在尽可能短的时间内得出结论,因此该方法在医院临床实践以及科研工作中都具有一定的优势。

本实验通过比较针对冷冻组织切片的不同固定条件与保存时长对免疫组织化学信号的影响,探索多组样本量情况下冷冻组织制片操作与存储中可灵活调整的时间段,优化针对同一样本多种生物标志物检测的制片规划,减少多次制片引起的反复冻融而导致冷冻样本遭受不可逆的形态损伤与抗原丢失问题。

醛类固定液会使蛋白质发生交联^[8],而乙醇通过沉淀蛋白发挥固定作用,同时兼有脱水作用^[9],因此10%中性甲醛溶液与AAF混合溶液均是医院与各科研院所广泛使用的针对冰冻细胞与组织切片的固定试剂。经过短时间的固定液处理,用10%中性甲醛溶液固定的冷冻切片中的细胞形态与免疫组织化学染色信号强度相比于用AAF混合溶液固定过的样品更为清晰,更有利于研究者在光学显微镜下进行判读打分。

冷冻组织切片中未经固定的磷酸化蛋白降解非常迅速。本实验对p-HER2抗原的稳定性进行了分析,发现在冷冻组织制片5~20 min采用10%中性甲醛溶液固定后,检测到的p-HER2免疫组织化学染色信号强度与新鲜切片没有明显差异;而在冷冻制片经过30 min后再进行固定的切片中,检测到的p-HER2免疫组织化学染色信号明显减弱。本研究发现p-HER2在20 min内拥有良好的抗原稳定性,这为日常工作中大批量冷冻样品制片提供了一定的灵活操作时间。

综上所述,利用冰冻组织切片进行免疫组织

化学染色的可操作性强,需要染色时间短,在提高工作效率的同时不影响染色结果的判读,可以考虑将其作为常规石蜡切片染色方法的补充或者替代。然而,冷冻组织切片未经固定即暴露于外界,不仅组织形态容易遭受损伤,组织抗原信号也会降解甚至消失。本研究发现,冷冻组织制片后5~20 min,经过10%中性甲醛溶液充分固定后的组织形态结构清晰,p-HER2蛋白稳定性较好,而且-20℃条件下保存3个月之内仍可以较好保存其抗原性,这一发现对实际检测工作具有一定的价值。

参考文献:

- [1] Nielsen DL, Kümler I, Palshof JAE. Efficacy of HER2-targeted therapy in metastatic breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors[J]. Breast, 2013, 22(1):1-12.
- [2] Artufel MV, Valero AC, Llado RR, et al. Molecular protocol for Her-2/neu analysis in breast carcinoma[J]. Clin Transl Oncol, 2005, 7(11):504-511.
- [3] Sirkisoon SR, Carpentier RL, Rimkus T. EGFR and HER2 signaling in breast cancer brain metastasis[J]. Front Biosci, 2016, 8:245-263.
- [4] Wang CX, Koay DC, Edwards A, et al. *In vitro* and *in vivo* effects of combination of trastuzumab (herceptin) and tamoxifen in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 92(3):251-263.
- [5] Stockl T, Kwan L, Bradford LS, et al. Accuracy of frozen section in the diagnosis of gynecological tumors: 5 years of experience from a tertiary center[J]. Gynecol Oncol, 2015, 139(3):598.
- [6] Selove W, Bradford LS, Liu Y. Assessing residents' frozen section skills for endometrial cancer[J]. Int J Gynecol Pathol, 2016, 35(5):402-409.
- [7] 王德田,董建强.实用现代病理学技术[M].北京:中国协和医科大学出版社,2012:83.
- [8] Moelans CB, Oostenrijk D, Moons MJ, et al. Formaldehyde substitute fixatives: effects on nucleic acid preservation[J]. J Clin Pathol, 2011, 64(11):960-967.
- [9] 吴平,张声.无醛固定液与甲醛固定液对组织形态学保存效果比较[J].临床与实验病理学杂志,2015,31(3):343-344.

Exploration of Phospho-HER2 Immunohistochemistry Staining on Frozen Tumor Tissues

FAN Shuqiong^{1,2}, ZHENG Li¹

[1. Dizal (Shanghai) Pharmaceutical Co.,Ltd, Shanghai 201203, China;

2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China]

Correspondence to: ZHENG Li, Joan.fan@dizalpharma.com

[Abstract] **Objective** To investigate the optimized fixation and storage conditions for the immunohistochemistry detection of phospho-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) on frozen sections. **Methods** Xenograft model was established by subcutaneously injecting human breast cancer cell BT474 into the abdomen of BALB/c-nu/nu mice. The mice were sacrificed when the tumor volume up to 300 mm³. The tumor samples were quickly frozen, sectioned, fixed in different reagents and stored for different time period. Phospho-HER2 immunohistochemistry was performed to evaluate the change of protein expression under these conditions. **Results** Good cell morphology was kept by the fixation of frozen section in 50% formalin for 5 minutes. The expression of phospho-HER2 protein was stable within 12 weeks after fixation when the tumor tissues were stored in -20 °C. **Conclusion** The immunohistochemistry staining on frozen tissues takes less time and can be a supplement or replacement of traditional staining on formalin-fixed and paraffin-embedded sections. **[Key words]** Frozen section; Human epidermal growth factor receptor 2; Immunohistochemistry; BALB/c-nu/nu mice

医科院校实验动物学教学中践行 “课程思政”的探讨

赵善民, 杨文静, 林丽芳, 陈超, 孙伟, 崔淑芳
(海军军医大学基础医学院实验动物学教研室, 上海 200433)

[摘要] 实验动物学是医科院校学生的重要基础课程之一, 其蕴含着一定的思想政治教育元素, 能够承担和发挥思想政治教育的作用。在当前全面深化“课程思政”的教育改革背景下, 深入挖掘实验动物学课程的思政元素与措施具有重要的实践意义。本文基于医科院校学生的专业特点, 探讨了实验动物学课程教学中的思政教学案例, 并提出了“课程思政”的举措, 以期为广大医科院校实验动物学“课程思政”教学改革提供参考。

[关键词] 医科院校; 实验动物学; 课程思政; 探讨

[中图分类号] Q95-33; G428 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0432-05

“课程思政”是当代高等教育发展背景下形成的一种创新教育理念, 其内涵是充分挖掘和运用高等院校教学中各专业课程(非思政课)所蕴含的思想政治教育资源, 培养社会主义事业的合格接班人^[1-4]。习总书记在全国高校思想政治工作会议上明确提出: 把思想政治工作贯穿教育教学全过程。在此背景下, 将思想政治教育融入专业课教学过程, 成为了广大教育和科技工作者面临的全新课题。

长久以来, 高校思想政治教育职能主要依赖于思想政治课程教学, 如何将专业课程中基础知识的传授、技能的培养与思想政治教育相结合, 充分发挥“课程思政”的育人作用, 是值得长期深入探讨的课题。作为医科院校应该紧跟时代发展, 把握自身特点, 充分挖掘各专业课程中的思想政治教育元素, 探索和构建各专业“课程思

政”育人机制, 达到立德树人的目标^[5-6]。

实验动物学作为一门综合性应用性科学, 其包含着丰富的思想政治教育资源, 在思想政治教育实践中具有独特优势。笔者就医科院校实验动物学“课程思政”进行深入思考, 总结了实验动物学“课程思政”元素, 提出在实验动物学教学中践行“课程思政”的一些具体措施, 以供同行参考。

1 实验动物学“课程思政”的优势

医科院校培养的学生将来要面对鲜活的生命, 不仅需要具备扎实的专业知识, 更要具有医者仁心, 尊重患者, 敬畏生命。因此, 在开展专业课程教学的同时, 还要不断强化学生的思想建设, 培养其高度的责任心、强烈的使命感及对生命的敬畏之情。

实验动物学作为高等医科院校本科学士及硕士研究生需要学习的基础课程之一, 具有培养学生科研思维和提高动物实验操作能力的目的, 其作为基础医学与临床医学的桥梁学科, 在整个医学教育中发挥着重要的纽带作用。而且对于医科院校学生来讲, 第一次解剖、第一次取材、第

[收稿日期] 2020-07-17

[基金项目] 国家自然科学基金(31402028); 上海市科学技术委员会科研计划项目(13140900800)

[作者简介] 赵善民(1986—), 男, 博士, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: zhaoshanmin2006@163.com

[通信作者] 崔淑芳(1968—), 女, 教授, 研究方向: 实验动物资源开发与应用。E-mail: youngstar_sf@163.com

一个手术、第一项研究等通常是起始于动物实验。因此,在实验动物学教学过程中践行“课程思政”教育,对医学生树立正确的职业观及价值观具有明显的先天优势。同时,实验动物学课程作为一门综合应用学科,蕴含着丰富的思政元素,在发挥思想政治教育功能上也具有显著的学科优势。

2 实验动物学“课程思政”元素的挖掘

2.1 展示我国实验动物行业发展历程及前沿进展,强化社会主义道路自信

我国实验动物和动物实验研究事业虽然起步较晚,但在党和政府的正确领导和大力支持下,实验动物行业取得了长足发展,在短短数十年的时间里建成了以小鼠、大鼠、鱼类、兔、犬、禽类和非人灵长类等国家实验动物种子中心和种质资源基地为主的实验动物资源保存、开发及共享体系,充分体现了我国社会主义道路的优越性。在教学过程中,应结合相关知识点,突出介绍我国实验动物学科发展中的先进事例和令人瞩目的前沿成果,激发学生对我国实验动物行业发展的自豪感,并融入我国社会主义制度优势,坚定学生走中国特色社会主义发展道路的自信心,激励学生为实现“中国梦”而努力奋斗。

例如,在讲解实验动物资源时,突出强调中国实验动物科技工作者经过几十年的不懈努力,极大提升了我国实验动物资源的丰富度。截至2019年底我国实验动物资源品种、品系已达到11 000余种(包括遗传修饰动物),自主研发了包括小型猪、树鼩、裸鼯鼠、东方田鼠、长爪沙鼠、田鼠、大仓鼠、灰仓鼠、虾虎鱼、红鲫、果蝇和雪貂等各种模式动物,以及家畜、家禽等多物种、多层次的实验动物新资源^[7-12]。

在讲解转基因实验动物时,介绍中国科学院神经科学研究所的研究人员攻坚克难,突破技术难题,最终采用体细胞核移植技术成功获得了世界首例体细胞核移植克隆猴。这项里程碑式的研究成果,迅速引起了中外媒体的广泛关注。此外,国内学者优化出一批具有自主知识产权的人

类疾病模型动物,培育了肌肉生长抑制素(myostatin)基因敲除犬、基因敲入食蟹猴和亨廷顿舞蹈症(Huntington's disease)基因敲入猪等^[13-15]。这些国际瞩目的科研成果产出,标志着我国实验动物资源研发能力已经达到了国际先进水平。

通过上述案例的介绍,可以提高学生的民族自豪感,增强中国特色社会主义道路自信。

2.2 对照科学家的真实事例,培养学生正确的社会价值观

价值观是一个人的精神支柱和行动向导,个人甚至民族的成长和进步很大程度上取决于价值观的引领。在教学过程中,用科学家的真实事例作对照,可以启发学生领悟和树立正确的价值观。因此,在实验动物学教学中,要充分借助科学家的先进典型事迹,培养学生正确的社会价值观。

例如,在讲解我国实验动物发展史时,重点介绍我国实验动物科学事业重要开拓者刘瑞三教授。刘老艰苦奋斗,开拓创新,为我国实验动物事业做出了重大贡献。新中国成立初期,刘老为推动我国实验动物事业发展,四处奔走调查,撰写长文,上书市长,多方呼吁,引起社会各界对实验动物事业的重视^[17]。二十世纪八十年代初,为学习发达国家实验动物管理经验,刘老受命远赴美国,积极为我国实验动物科学与比较医学发展先行探路。此外,刘老等发起创立了中国实验动物学会,主持翻译了《实验动物医学》,编著了《比较医学》等实验动物学专著。刘老在年逾八旬时,仍然身兼多个重要学术岗位的职务,亲自审阅文稿,编写专著,笔耕不辍^[17]。刘老勇于探索、不断进步的成长史有助于启发学生树立积极进取、奋发有为,将个人理想追求有机融入国家和民族事业中的社会价值观。

同时,在课堂之外,设置拓展问题,引导学生搜集纪实报道、视频、专著等丰富的先进人物事迹,增强典范教育的效果,培养学生树立正确的社会价值观。

2.3 列举我国实验动物学专家先进事迹,传承爱国主义情怀

在我国抗击非典和新型冠状病毒肺炎疫情斗争中,广大医务工作者秉承家国情怀,传承国家

和民族大义，迎难而上，身先士卒，成为抗疫狙击战线中的中坚力量。医科院校作为培养医务工作者的主阵地，必须将爱国主义教育贯彻始终，为国家培养出胸怀天下、赤诚报国的合格接班人。在我国实验动物学专家中，不乏力学笃行、无私奉献、报效祖国的优秀榜样。

例如，在讲解我国实验动物发展史时，着重介绍天津医学院李漪教授的先进事迹。李漪教授是原北平医学专科学校毕业的第一位女生，1941年被国民政府派遣到美国学习。新中国成立后，李漪教授毅然放弃国外优越条件，冲破重重阻力回到祖国，于1956年进入天津医学院。为推动我国肿瘤实验研究，李漪教授克服各种困难建立了新中国第一个实验肿瘤研究室，系统开展了近交系小鼠品种的培育及研究工作。她所培育的两个小鼠品系（津白1低癌系小鼠和津白2高癌系小鼠）得到了国际学者的广泛认可，被小鼠遗传命名标准化国际委员会（International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, CSNM）定为国际通用标准化小鼠，为我国学者赢得了极高的国际声望。李漪教授为了揭癌之谜，终身未嫁，毕生与实验小鼠为伍，被誉为“揭癌之谜的女强人”^[18]。

通过学习回顾以李漪教授为代表的老一辈实验动物学专家在艰难岁月中刻苦求学、奉献祖国的光辉历程，可以启发学生弘扬以爱国主义为核心的民族精神和以改革创新为核心的时代精神。利用鲜活的实验动物学专家事迹，能够起到培养学生爱国主义情怀和艰苦奋斗作风的思政教育目标。

2.4 以动物实验操作为契机，培养学生的团队协作精神

对医生而言，救治伤者时分工协助是提高诊疗效率的重要保障。因此，良好的团队协作精神也是医生应该具备的职业素养。医科院校在培养医务人才的过程中，必须重视团队协作精神的培养。实验动物学实验教学中，存在大量的团队配合操作内容，并且对协作水平要求较高，是培养学生团队协作精神的最佳途径。

例如，在实验教学中，改变过去强调个人操作的考核方式，更注重小组团体考核，即改为分组合作、集体考核的方式。根据实验教学内容，

让组内学生自行分工，并报教师督查指导。团队成员之间加强协作配合，如进行大鼠腹腔注射实验时，一人徒手固定动物，另外一人进行腹腔注射操作；在手术制备动物模型时，切口消毒、切开、结扎止血、缝合、取材等操作由多个学生配合完成。在进行操作考核时，重点考察团队整体完成实验的效率和质量，从而激发学生的合作热情，提高配合默契度，增强实验操作能力。因此，整体合作质量越高，配合越默契，实验操作成绩即越高。随后在书写实验报告时，还要求组员共同分析实验结果，并与其他各组的实验结果进行比较，最终形成实验结论，以此培养学生的团队交流、沟通与思辨能力，强化合作共赢意识。

2.5 贯彻动物福利伦理，把敬重生命理念植入人心

实验动物作为人类的“替身”被用于实验研究，为人类医学研究做出牺牲，替人类遭受着痛苦，这极易引发学生的伦理学思考。在实验动物学教学中，贯彻动物福利伦理，加强医学生“敬畏生命”的伦理教育是一项非常重要的教学内容^[7]。在教学过程中，通过保证动物福利思想（如“3R原则”）的传输，强化实验动物伦理理念，从思想上牢固树立遵守人类道德伦理标准和国际惯例的意识，切实将精神文明思想植入到学生心中。

另外，可借助实验动物发展现状、社会争议或热点问题等充分展开讨论，分析其引发的社会伦理学内涵，从而深入探讨医学研究中实验动物伦理学相关的问题。例如，2019年美国耶鲁大学的研究人员让死亡4h的实验猪短暂恢复了脑循环和部分脑细胞功能，该研究结果经*Nature*杂志发表后，立刻引发了伦理学讨论。针对这一事例，在课堂上可引导学生充分考虑实验动物福利，善待动物，尽量减少甚至避免动物的痛苦和损伤，尊重动物生命。通过该思政元素的融入，让学生切身体会实验动物伦理拷问，触发学生对生命的敬畏和感恩，使学生在今后的从医生涯中能懂得尊重和爱护患者。

2.6 强化实验动物管理法制意识，使法制精神融入职业发展

1988年经国务院批准发布《实验动物管理条例》（后经多次修订，现已实施2017年3月1日

修正版), 这标志着我国实验动物管理工作进入了法制化管理轨道^[19]。目前, 我国已经形成了国家法律、国家标准、行业标准、地方标准和团体标准等共同构成的多层次、多角度实验动物管理体系。在讲解实验动物质量控制时, 要着重强调相关法律或标准要求, 深度植入法制化观念, 倡导法制化精神。

例如, 我国《实验动物管理条例》明确规定: “应用不合格实验动物取得的检定或安全评价结果无效, 所生产的制品不得使用”。这就告诫广大学生在购买实验动物及开展动物实验时, 必须严格贯彻与执行上述法律和标准, 否则实验结果无法发表, 相关产品也将不被认可。因此, 在教学中通过宣讲实验动物相关管理法律、法规及国家标准, 使学生树立实验动物法制化意识, 强化其法治思维和责任担当。

3 提高实验动物学“课程思政”效果的探索与思考

3.1 提升教师素质, 树立思政导向

习总书记强调“办好思想政治理论课关键在教师”。提高教师思想政治理论素质是开展思政教学的首要任务。在实验动物学教学过程中, 难免存在部分教师对开展“课程思政”认识深度不够的问题。因此, 首先要从教师思想认识上, 明确思想政治教育与实验动物课程之间的关系。

例如, 教研室以学校开展办学思想大讨论为契机, 深入开展实验动物学“课程思政”教学讨论, 树立思政导向。加深教师对课程育人标准的理解, 明确课程对培养学生科学素养、人文精神及价值导向的重要作用, 使教师们认识到在实验动物学教学中“课程思政”与知识传授、技能培养形成的辩证统一关系。只有教师认清了“课程思政”在实验动物学教学中的重要性和可行性, 才能够积极主动释放内在潜力, 积极提升自己的思想政治素养和教育能力, 积极拓展知识, 精研教法, 提高实验动物学“课程思政”的教育水平。

同时, 在科室内部持续开展“两学一做”、“三讲三整顿”、“不忘初心, 牢记使命”、

“四史”学习、党章学习等一系列思想政治教育活动, 提高教师的思想政治素质。此外, 通过定期组织教学研讨、课前试讲、集体查课、教研室督导等多种形式的教学实践活动, 加强科室内教师之间的沟通交流, 提高教师的“课程思政”授课能力。

3.2 优化教学内容, 融合思政元素

在学校优化人才培养顶层设计、完善人才培养方案的形势下, 教研室积极开展教学内容优化, 重新修改课程标准, 编撰新版医学实验动物学教材, 并将临床八年制专业的实验动物学课程由 30 学时调整为 36 学时, 教学内容中丰富和拓展了大量思政元素。例如, 把教学内容与社会主义核心价值观有机结合, 在理论教学内容中, 以我国实验动物行业发展历程及前沿进展、实验动物科学家的真实事例、实验动物法制化管理体系等为载体, 强化学生的中国特色社会主义道路自信, 培养学生正确的社会价值观, 厚植爱国主义情怀和法制观念。在动物实验操作教学中, 通过分组合作、集体考核等举措培养学生的团队协作精神, 同时贯彻动物福利伦理, 把敬重生命理念植入人心。总之, 在实验动物学教学过程中, 充分发挥实验动物理论联系实践的教学特点, 将“课程思政”融入到整个教学过程, 实现思政教育从理论到实践的对接。

3.3 丰富教学手段, 提高教学效果

实验动物学教学中, 要实现专业知识传授和思政教育的自然融合, 就需要教师不断丰富各种教学方法和手段, 因势利导, 借题发挥, 把思政教育巧妙地融入课程教学中。例如, 在课堂上, 主要通过案例评析、互动讨论、多媒体课件、视频播放等形式, 融合思政元素, 使教学方式变得更加多样、灵活, 教学效果更加理想。课后, 借助网络资源, 如课程学习交流微信群和在线课程共享平台等, 围绕课程中涉及的知识要点、难点或者社会热点、焦点问题等进行专题探讨, 充分发挥教师的主观引领作用, 潜移默化地将思政元素融入互动交流。另外, 通过课程论文撰写, 充分调动学生的主观能动性, 使他们更深刻地体会和吸收实验动物学课程所蕴含的思政元素。

综上所述,全面推行“课程思政”是新时期高校教育发展的重要方向。目前,“课程思政”改革的实践已在部分省市深入展开,如2014年上海市10余所本科高校开展了“中国系列”试点课程,逐渐形成了高校“大思政”格局^[20]。当前,“课程思政”已经成为高等院校肩负的一项时代使命。医科院校主要为社会培养医学专业人才,而医学类人才不仅需要较高的专业技能,更需要高尚的价值观和道德观。因此,医科院校应努力构建“课程思政”的育人大格局,深入挖掘各类课程中所蕴含的思想政治教育资源,推动思想政治工作体系贯通人才培养体系。实验动物学作为医科院校的重要基础课程,在未来的教育改革中应该积极主动向思想政治培养靠拢,发挥自身学科优势,持续开展“课程思政”的探索与实践。

参考文献:

- [1] 矫利艳. 高校“课程思政”的核心要领与实践路径探索[J]. 产业与科技论坛, 2020, 19(7):167-168.
- [2] 郭丽, 周志强, 韩福芹, 等. 无机化学“课程思政”教学改革实践[J]. 教育进展, 2019, 9(5):602-607.
- [3] 刘丽君, 李薇, 柴长斌, 等. 医学微生物学课程思政的探索与实践[J]. 微生物学通报, 2020, 47(4):1178-1185.
- [4] 王昕晔. 医学高校课程思政建设与人文精神的培养研究[J]. 科技资讯, 2018, 16(32):178-179.
- [5] 陶然, 曲鹏, 郑敏, 等. 对医学专业课程实施课程思政的思考[J]. 教育教学论坛, 2020, 22:58-59.
- [6] 邓婵娟. 课程思政: 高校各类课程协同育人机制研究[J]. 黑龙江教育(理论与实践), 2020, 5:8-9.
- [7] 罗晓琼, 马喜桃, 王艳桥, 等. 实验动物福利的发展与伦理审查[J]. 中华医学科研管理杂志, 2019, 32(2):139-142.
- [8] 程苹, 王锡乐, 卢凡, 等. 关于我国实验动物资源建设与发展思考[J]. 中国科技资源导刊, 2018, 50(5):50-54.
- [9] 郭大伟, 朱冠, 金东庆. 我国实验动物产业化发展的困境和对策探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(2):145-148.
- [10] 李琳, 丁燕霞, 朱莉莉, 等. 高校实验动物中心创新发展模式初探[J]. 实验动物科学, 2017, 34(4):71-73.
- [11] 孔琪. 中国实验动物行业发展现状调查研究[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5):19-22.
- [12] 秦川. 中国实验动物学科发展的关键问题与对策的思考[J]. 科学通报, 2017, 62(30):3413-3419.
- [13] Yao X, Liu Z, Wang X, et al. Generation of knock-in cynomolgus monkey via CRISPR/Cas9 editing[J]. Cell Res, 2018, 28(3):379-382.
- [14] Cui Y, Niu Y, Zhou J, et al. Generation of a precise Oct4-hrGFP knockin cynomolgus monkey model via CRISPR/Cas9-assisted homologous recombination[J]. Cell Res, 2018, 28(3):383-386.
- [15] Yan S, Tu Z, Liu Z, et al. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease[J]. Cell, 2018, 173(4):989-1002.
- [16] Auchincloss H, Jr Winn HJ. Clarence Cook Little (1888-1971): the genetic basis of transplant immunology[J]. Am J Transplant, 2004, 4(2):155-159.
- [17] 尹松林. 德高望重无私奉献——深切缅怀刘瑞三教授[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(2):85-87.
- [18] 史文寿. 中国培育纯系动物的先驱——李漪[J]. 沧桑, 2002, 3:19-20.
- [19] 赵心刚, 卢凡, 程苹, 等. 我国实验动物资源建设的问题与展望[J]. 中国科学院院刊, 2019, 34(12):1371-1378.
- [20] 杨元宵, 姚乐, 郑鸣之, 等. 临床医学专业药理学“课程思政”的探索与实践[J]. 浙江医学教育, 2019, 18(4):4-6.

三维热管在实验动物设施除湿中的节能应用

吴强¹, 尤军¹, 吴成², 王志毅³

(1. 苏州苏净安发空调有限公司, 苏州 215122;

2. 南京工业大学, 南京 211816; 3. 浙江理工大学, 杭州 310018)

[摘要] 在实验动物设施以制冷方式除湿的过程中, 冷量和热量相互抵消, 造成了额外的能量损失。在空调机组(AHU)中, 安装除湿三维热管可以回收这些额外消耗能量, 即利用内部介质完成热交换, 提供免费预冷和再热, 明显节约能耗, 全年可节约能耗约20%。

[关键词] 实验动物设施; 热管; 除湿; 回收能量

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0437-03

GB 14925—2010《实验动物 环境及设施》对实验动物环境技术指标做了具体的规定, 实验动物设施的空调通风系统应按要求控制温度与湿度^[1-3]。在环境湿度高于指标要求时, 一般空调系统对新风进行降温除湿后, 再通过电加热的方式, 将送风温度提高以符合标准要求。由于该降温除湿方式存在冷量和热量相互抵消的问题, 导致系统能耗较高。作者采用无功耗的热管, 通过其“三维热管回路”的特殊设计^[4-8], 对冷热量进行自动分配, 一定程度上解决了冷热抵消问题, 从而有效降低设施的运行成本。

1 三维热管的工作原理

热管是一种由管壳、吸液芯和工作介质组成的导热组件, 采用相变传热的原理, 利用管内工作介质吸热汽化、遇冷液化的特性, 介质在蒸汽状态上升至热管的冷凝端, 液体状态时在重力作用下回流至蒸发端, 通过循环往复实现流经热管外壁的空气在两端的热量交换。热管具有造价适中、安装方便、维护费用低、不产生交叉污染的优点^[9]。

三维热管用于实验动物设施除湿节能时安装在空调箱中表冷器两侧, 其工作流程为: 新风进→初效过滤→三维热管预冷降温→表冷器降温除湿→三维热管再热升温→风机→中、高效过滤→送风。

如图1所示, 由于空调机组(air handle unit, AHU)工作时, 表冷器前后的气流存在一定的温差, 利用三维热管热超导的特性, 热量由三维热管的预冷段转移至三维热管的再热段。空气经过热管预冷段后, 起到初步的制冷降温效果, 再经过表冷器过冷除湿。过冷后的空气经过热管的再热段, 温度升高至相应的送风温度。除湿过程中, 三维热管利用内部介质蒸发吸热/冷凝散热原理, 完成表冷器两端的热交换, 降低再热成本。

三维热管的安装形式见图2。除湿节能的三维热管安装在空调箱中表冷器两侧, 三维热管维护保养方便简单, 只需定期清洗表面, 无需更换耗材, 维保费用低; 安装简单, 不需要改变箱体原本结构和增加功能段, 改造施工方便, 不影响正常的生产活动。

2 三维热管的节能应用

某屏障环境设施空调面积为2 009 m², 其中SPF屏障系统面积为1 000 m²。SPF屏障环境包括一次更衣室、二次更衣室、小鼠饲养室、大鼠饲养室、走廊、灭菌后储藏室和行为实验室, 洁

[收稿日期] 2020-05-08

[作者简介] 吴强(1972—), 高级工程师, 主要从事净化空调系统节能技术研究工作。

E-mail: wq@aimfar.com.cn

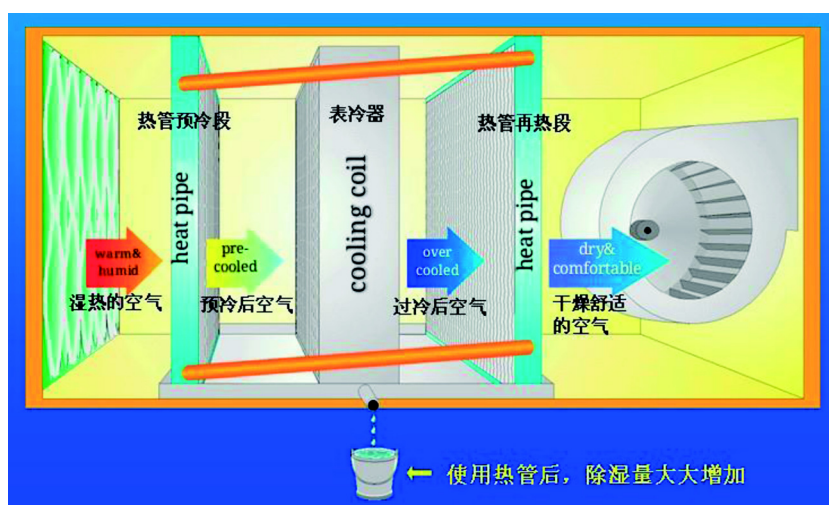


图 1 三维热管工作原理

Figure 1 Operating principle of three dimensional heat pipe

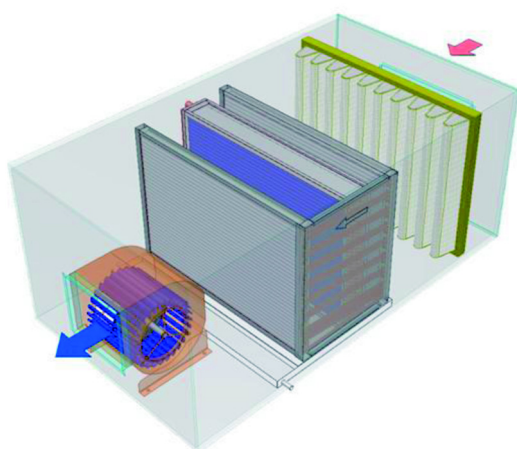


图 2 三维热管安装

Figure 2 Installation of three dimensional heat pipe

净等级为 ISO 7 级, 温度为 20~26 °C, 相对湿度为 40%~70%, 最大日温差不高于 4 °C, 最小换气次数不低于 20 次/h; 其中一次更衣室压力控制为 10 Pa, 二次更衣室压力控制为 20 Pa, 走廊压力控制为 30 Pa, 小鼠饲养室、大鼠饲养室、行为实验室和灭菌后储藏室压力控制为 40 Pa。

系统采用风量为 37 000 m³/h 的全新风净化组合 AHU 一台。根据实测, 原设施 2018 年空调系统耗电总费用 105 万元。2019 年节能改造采用除湿三维热管, 当年夏季使用, 总运行时间为 2 453 h。环境新风温度达 24 °C 开始制冷运

行, 不同环境新风温度的年运行时间见图 3。表冷器出风温度保持在 12 °C。新风温度 ≤ 31 °C, 热管再热后温度达不到要求时, 由机组电加热补充; 新风温度 ≥ 33 °C, 控制热管再热出风温度 ≤ 19 °C (图 4)。

风量为 37 000 m³/h 的全新风净化组合 AHU 按照设计工况: 表冷器处理空气至 12 °C 机器露点, 当夏季干湿球温度为 34.4 °C/28.3 °C 时, 安装除湿三维热管后, 可以免费提供 100.45 kW 的预冷量和 100.45 kW 的再热量 (图 5); 降低机组运行时的制冷和再热的能耗, 全年可节约制冷和加热的费用约 20 万元 (图 6), 节约电费比例可以达到 20%。

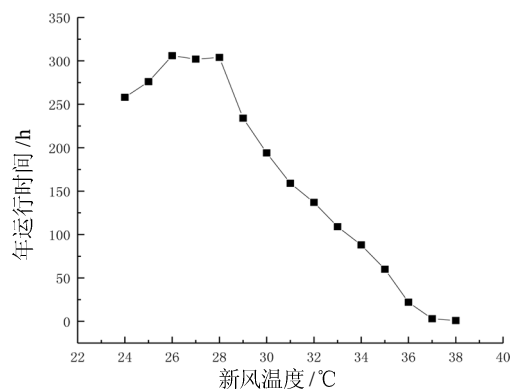


图 3 不同新风温度环境的年运行时间

Figure 3 Annual running time in different fresh air temperature environments

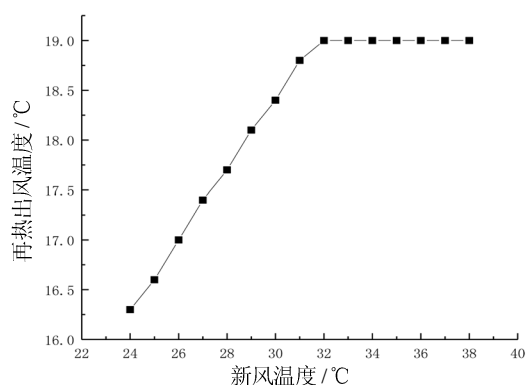


图4 不同新风温度环境的再热出风温度

Figure 4 Reheated air outlet in different fresh air temperature environment

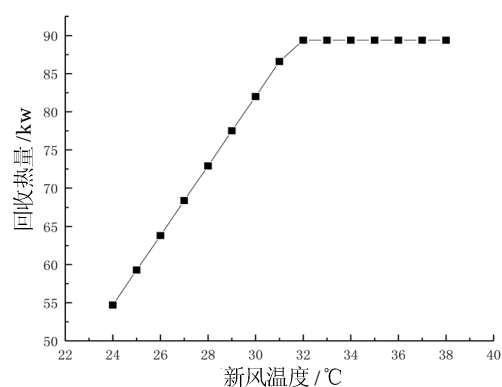


图5 不同新风温度环境的回收热量

Figure 5 Recovery of heat from different fresh air temperature environment

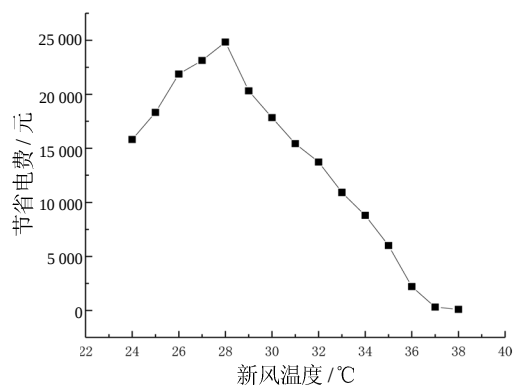


图6 不同环境新风温度的节省电费

Figure 6 Saving of electricity costs in different fresh air temperature environment

3 结论

由于实验动物的屏障设施需要长时间不间断运行, 同时需要对温度和湿度进行严格的控制, 因此能耗较高。以往的实践中, 也有采用热管技术在空调系统的新风和排风端进行热量回收, 取得了不错的节能效果。作者使用三维热管在实验动物屏障设施的降温 - 除湿 - 再热过程中成功地通过回收热量降低运行成本, 适合在湿度较高及持续期较长的地区推广应用。

参考文献:

- [1] Baize S, Pannetier D, Oestereich L, et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea[J]. N Engl J Med, 2014, 371 (15):1418-1425.
- [2] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. N Engl J Med, 2020, 382(8):727-733.
- [3] 李可欣, 张凤梅, 杨根岭, 等. 实验动物屏障设施系统自动化控制技术体系应用探索[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12):102-107.
- [4] 王贵平, 薛智谋, 周正宇, 等. 排气通风笼具微环境的动态检测[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(2):150-154.
- [5] 邵奇鸣, 竇木林. 实验动物设施的职业健康管理体系的建立与实施初探[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8):1-6.
- [6] GB 50447 — 2008. 实验动物设施建筑技术规范 [S]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2008.
- [7] 吕阳, 徐立大, 刘光栓, 等. 清洁级实验动物设施环境指标的跟踪监测与分析[J]. 中国实验动物学报, 2002, 10 (1): 27-29.
- [8] 钱晓栋, 李震, 李志信. 数据机房热管空调系统的实验研究[J]. 工程热物理学报, 2012, 33(7):1217-1220.
- [9] 张大维, 徐彩云, 李晓慧, 等. 热管式空气换热器在实验动物设施建设上的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1):109-112.

斑马鱼作为模式动物在人类 眼睛疾病研究中的应用

邸亚男¹, 朱丽英², 钱 雯², 潘 卫^{2,3,4}

(1. 北京大学第三医院北方院区检验科, 北京 100089;

2. 贵州医科大学医学检验学院, 贵阳 550025;

3. 贵州医科大学附属医院贵州省产前诊断中心, 贵阳 550025;

4. 贵州医科大学环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵阳 550025)

[摘要] 斑马鱼 (*Zebrafish*, *Danio rerio*) 作为一种优良的动物模型已经被广泛用于发育生物学、遗传学和毒理学等研究领域。由于斑马鱼在眼睛形态、解剖结构、基因表达及功能等方面与人类存在极大的相似性, 并且具有发育快、体外受精、胚胎透明、易于观察等优势, 目前已越来越多地用于眼睛发育及相关疾病如眼睛缺损、青光眼、白内障、视杆视锥细胞变性、糖尿病视网膜病变等的研究。本文综述了斑马鱼眼睛发育及结构, 以及作为研究眼睛疾病模型的优缺点, 从而探讨斑马鱼在人类眼睛疾病研究中的应用价值。

[关键词] 斑马鱼; 眼睛发育; 眼睛疾病; 模式动物

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0440-09

视力损害是危害人类健康的主要公共卫生问题之一。据统计, 至 2010 年全球范围内大约有 2.85 亿人伴有不同类型及程度的眼睛疾病, 其中约有 0.39 亿人失明^[1]。视力损害的主要病因有屈光不正、白内障、年龄相关性黄斑变性、糖尿病视网膜变性和青光眼^[2]。虽然眼睛疾病很少危及生命, 但对个人、家庭及社会造成了巨大影响。因此, 眼睛疾病的防治非常重要。然而, 目前许多眼睛疾病的发病机制不明确, 并且缺乏有效的治疗方法。因此, 能够有效复制人类眼睛疾病且用于快速高通量药物筛选的模式生物具有十分重要的应用价值。

作为一种新兴模式生物, 斑马鱼 (*Zebrafish*, *Danio rerio*) 已经被广泛用于人类血液系统疾病、肌肉系统疾病、中枢神经系统疾病、心脏疾病、肾脏疾病及眼睛疾病等的研究^[3]。目前, 斑马鱼信息网络 (*zebrafish information network*, ZFIN) 已经收录了大量斑马鱼突变品系及转基因品系的相关信息。由于斑马鱼在眼睛形态、解剖结构、基因表达及功能等方面与人类存在着极大的相似性, 并且具有发育快、体外受精、胚胎透明、易于观察等优势, 因此其在眼睛发育及疾病的研究中具有重要意义。

随着基因编辑技术、表型精细筛选技术、行为学观察技术和基因及其功能鉴定技术的发展, 斑马鱼作为模式动物在眼睛疾病中的应用越来越广泛, 已被用于眼睛缺损、青光眼、白内障、视杆视锥细胞变性和糖尿病视网膜病变等眼睛疾病的研究^[4]。除此之外, 斑马鱼模型能够实现高通量和高效率的药物筛选, 可为筛选治疗眼睛疾病的药物提供良好的平台^[5]。本文对斑马鱼的生

[收稿日期] 2020-04-20

[作者简介] 邸亚男(1984—), 女, 博士研究生, 副主任技师, 主要从事人类眼睛疾病遗传学研究。

E-mail: diyanan2003@163.com

[通信作者] 潘 卫(1966—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 糖尿病慢性并发症发病机制、疾病蛋白质组学。E-mail: 313831139@qq.com

物学及基因组学特性、眼睛发育及结构,以及作为研究眼睛疾病模型的优缺点等进行综述。

1 斑马鱼的生物学及基因组学特性

斑马鱼属鲤科热带淡水鱼,原产于印度恒河流域。野生型斑马鱼体梭形,体侧具有5~7条纵向暗蓝与银色相间条纹,为低温低氧鱼,耐寒性和耐热性都很强。斑马鱼为杂食动物,以浮游生物和昆虫为食,人工喂养以蛋黄和轮虫等为食,成鱼可喂丰年虾和红虫等。斑马鱼繁殖周期短,多为7 d左右,若温度适宜,一年四季均产卵。雌雄鱼交配行为受光照刺激,可通过调控光周期或控制雌雄鱼的接触,实现产卵时间控制。每尾雌鱼每次产卵可达200~300枚,为非黏性沉性卵,直径大约0.7 mm,因其密度比水大而沉于缸底。卵细胞体外受精,体外发育且速度快,胚体透明^[6]。鱼卵受精后24 h,其主要器官已经基本形成;3 d后幼鱼逐渐从卵壳孵出,并开始游动和觅食;大约3~4个月时,幼鱼达到性成熟,可以繁殖后代^[7]。斑马鱼生长发育非常快。成鱼体长约3~5 cm,寿命2~3年。

斑马鱼品系众多,常用的主要是野生型Tuebingen品系、AB品系、WILK品系及多个突变品系和转基因品系^[8]。目前主要的斑马鱼保存机构有国际斑马鱼资源中心(Zebrafish International Resource Center, ZIRC)、中国斑马鱼资源中心(China Zebrafish Resource Center, CZRC)、依托于北京大学和清华大学的国家斑马鱼模式动物北方中心,以及南方医科大学肿瘤研究所-香港科技大学人类疾病斑马鱼模型研究联合实验室等。

斑马鱼有25条染色体,多为中间着丝粒或端着丝粒。斑马鱼的全基因组约有 1.5×10^9 bp,碱基数量约为人类基因组的一半^[7]。在英国Sanger研究所主持下,2001年开始了斑马鱼基因组测序,现转由Genome Reference Consortium(GRC)主持。GRC在2014年9月发布了斑马鱼基因组最新版本Zv10(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002035.5/),且会不断更新。基因注释计划提示,斑马鱼约有26 000个蛋白编码基因^[9]。人类70%的蛋白编码基因在斑

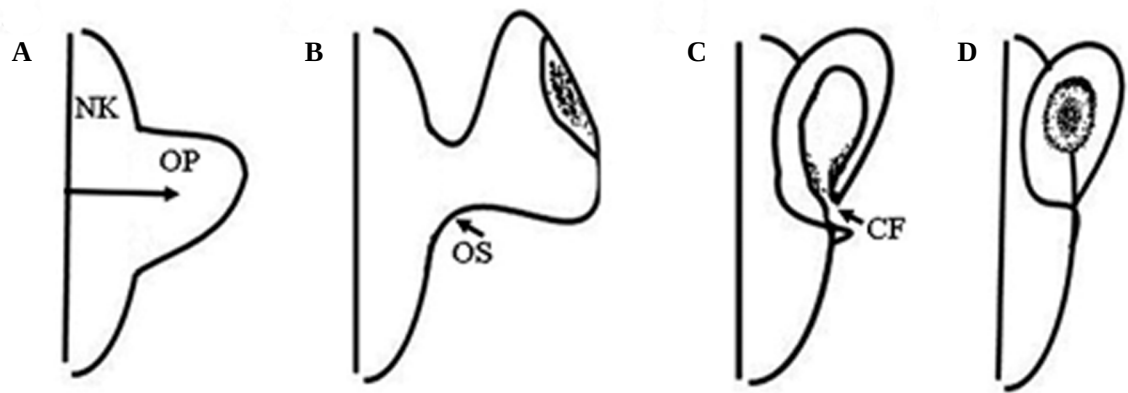
马鱼中有同源基因。但斑马鱼基因组也有一些与脊椎动物不同的特性,如假基因较少、重复序列较多等^[7]。由于在辐鳍鱼进化历程中发生了硬骨鱼类特异的全基因组复制事件(teleost-specific genome duplication, TSD),斑马鱼的蛋白编码基因与人类蛋白编码基因并不是一对一的关系,大多数人的基因在斑马基因组中有两个或多个拷贝^[10]。例如,在人类基因组中,SRY相关HMG盒转录因子11(SRY-related HMG-box transcription factor 11, SOX11)基因仅存在一个拷贝,而在斑马鱼基因组中则存在两个拷贝:SOX11a和SOX11b^[11]。因此,为了更好地利用斑马鱼这种模式生物,需要高质量的斑马鱼基因组学信息,并且将其与人类基因组进行差异分析。

2 斑马鱼的眼睛发育、结构及功能

斑马鱼的发育非常迅速。根据斑马鱼在受精后3 d内的发育形态学变化,可以将其发育过程分为8个大的时期,即受精卵期、分裂期、囊胚期、原肠胚期、体节期、咽裂期及孵化期和幼鱼阶段^[12]。脊椎动物的眼睛发育具有严格保守性。眼睛发育大致来源于3种胚胎组织。其中,视网膜、色素上皮、视柄及睫状缘来源于神经外胚层;晶状体和角膜来源于皮肤外胚层;巩膜和角膜的连接组织主要来源于神经嵴起源的头部间质^[13]。斑马鱼的眼睛发育顺序也类似于大多数脊椎动物。

斑马鱼眼睛发育的基本过程见图1。约在10 hpf(hours post fertilization,受精后小时数)左右,受精卵第一个体节形成,胚胎发育进入体节期。此时期的胚胎中,包括视原基在内的各个器官原基相继形成;该期持续到24 hpf,大部分器官基本成型,但尚未有功能^[12]。视原基起源于前脑的神经龙骨突,于神经龙骨前部延长形成“wing-like”结构,“wing-like”结构通过视柄与前脑相连。约15 hpf时,神经视网膜与色素上皮开始出现;约16 hpf时,晶状体基板开始形成;约24 hpf时,“wing-like”结构旋转并内陷形成视杯,玻璃体动脉通过成形的脉络膜裂进入视杯。在30 hpf时,角膜上皮形成于外胚

层表面，并覆盖晶体^[14]；36 hpf 时，视杯嵌入脑部，脉络膜裂开始闭合，基质细胞和韧带覆盖脉络膜；48 hpf 时，脉络膜裂完全闭合，视神经延伸至视顶盖；50 hpf 时，内核层的无长突细胞和水平细胞开始出现；55 hpf 时，外核层视杆和视锥细胞外节形成；60 hpf 时，双极细胞出



A：前脑神经龙骨突（NK）外翻形成视原基（OP）（约 12 hpf）；B：视原基延长形成“翼状”结构，通过视柄（OS）与前脑相连（约 16 hpf）；C：“翼状”结构旋转并内陷形成视杯，脉络膜裂（CF）成形，以便玻璃体动脉通过而进入视杯（约 24 hpf）；D：视杯嵌入脑部，脉络膜裂闭合，视神经延伸至视顶盖（约 48 hpf）。

图 1 斑马鱼眼睛发育过程示意图

Figure 1 Schematic diagram of eye development in zebrafish

现^[15]；约 72 hpf 时，斑马鱼幼鱼具有视觉功能，同时眼周围的肌肉发育成熟并具有功能，这是斑马鱼具有视动功能的先决条件^[16]。

与哺乳动物不同的是，在某种程度上可以说，斑马鱼的视网膜从不会停止发育，成熟斑马鱼的视网膜仍然在增殖。所有类型的视网膜细胞都不断地从睫状缘的周围生发中心产生。另外，视锥细胞也不断地由视锥祖细胞生成。位于内核层的 Müller 神经胶质细胞可以在视网膜受损伤时，修复产生所有类型的视网膜细胞^[17]。另外，啮齿类动物体内存在抑制性因子，而缺乏促生长因子，其视网膜神经节细胞轴突不可再生；与之不同的是，斑马鱼体内存在大量促生长因子，其神经节细胞轴突可再生，从而恢复视功能^[18]。

斑马鱼眼睛结构与人类有很大相似性，但也有一定区别（表 1，图 2），在应用斑马鱼复制人类眼睛疾病时应注意二者的差异。首先，人和斑马鱼的眼睛形状与位置不同。人眼睛为圆形，而斑马鱼眼睛为椭圆形，因而斑马鱼的玻璃体较少。人眼睛位于头面部前方，双眼视觉高度交叉；而斑马鱼眼睛位于头两侧，双眼视觉交叉甚小^[19]。其次，人和斑马鱼的视网膜各层厚度不一

表 1 人类眼睛和斑马鱼眼睛的差异

Table 1 Differences between human eyes and zebrafish eyes

结 构	人 类	斑 马 鱼
眼睛形状及位置	椭圆；位于头面部前侧且双眼视觉高度交叉	近圆形；位于头部两侧且双眼视觉交叉较少
视网膜厚度	约 289 μm	约 180 μm
视网膜中央凹	有	无
视觉(视锥细胞)	三色视觉(3 种视锥细胞，无 UV- 敏感视锥细胞)	四色视觉(4 种视锥细胞，有 UV- 敏感视锥细胞)
髓鞘包被	筛状板前段视神经纤维无髓鞘包被	整段视神经纤维均有髓鞘包被
视网膜 / 视神经再生情况	不可再生*	可再生
虹膜	具有收缩性	无收缩性

注：* 近年来研究显示，人类角膜缘细胞具有再生能力。

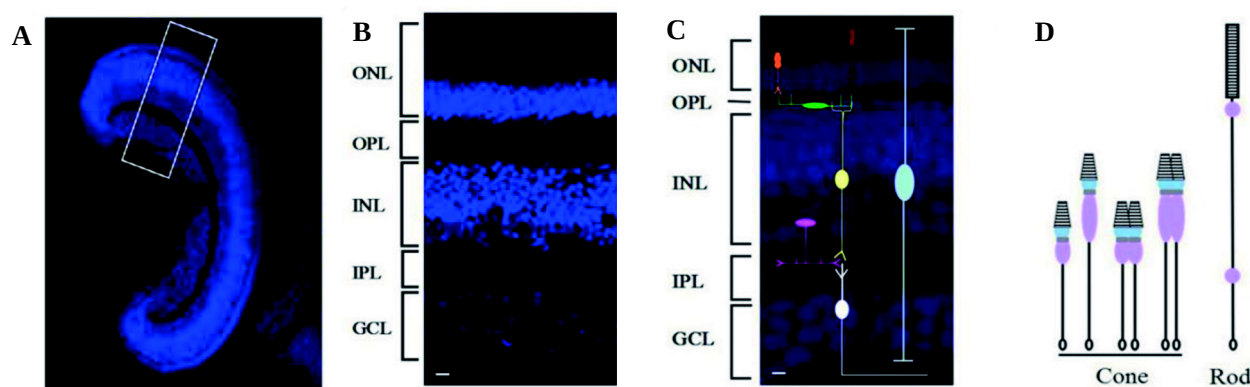
样。斑马鱼视网膜由 6 种神经元细胞和 Müller 神经胶质细胞组成。与人类视网膜相似，斑马鱼视网膜由内向外分为 5 层（图 2A 和 2B）：神经节细胞层、内丛状层（包含双极细胞、无长突细胞和神经节细胞的突触连接^[20]）、内核层（包含双极细胞、无长突神经细胞、水平细胞胞体和 Müller 神经胶质细胞胞质^[20]）、外丛状层（包含感光细胞与双极细胞、水平细胞的突触连接）和外核层（包含感光细胞：视锥和视杆细胞）^[14, 16, 20]。

另外，斑马鱼神经节细胞都是有髓鞘的，而人类神经节细胞视网膜部分的突触是脱髓鞘的，只有视神经部分有髓鞘。视网膜在视觉形成过程中发挥着重要作用。外界光线投射到眼球表面，经过屈光介质到达视网膜，并被视网膜上感光细胞捕获，将光信号转化为化学信号，再通过双极细胞传递至视网膜神经节细胞，最后经视神经通路投射到大脑皮层（感光细胞—双极细胞—神经节细胞）。除此之外，该转化后的化学信号还可以通过间接途径，由双极细胞传递给神经节细胞（感光细胞—水平细胞—双极细胞—无突触细胞—神经节细胞）（图 2C）^[21]。外核层外面有视网膜色素细胞上皮（retinal pigmented epithelium, RPE）层包裹。RPE 主要功能是为视网膜提供营养物质、氧化应激调控和维持感光细胞外节的代谢。在发育过程中，RPE 的缺陷可

导致眼缺损、小眼畸形及无眼等眼睛疾病^[13]。

斑马鱼的感光细胞即视锥细胞和视杆细胞的形态学特点与人类相似，由胞体和顶端域构成。顶端域由一个近端内节和一个远端外节构成。其中，外节由膜盘堆积而成，包含能捕获光量子的视蛋白。外节可脱落并更新，脱落的顶端被相邻的 RPE 吞噬^[13, 22]。斑马鱼和人类均是昼行性动物，其白天视力主要由视锥细胞控制。与夜行性啮齿类动物如小鼠和大鼠等不同，斑马鱼的视力几乎全部由视锥细胞控制^[23]。斑马鱼的视锥细胞分为 4 种，分别是短单（紫外线敏感）、长单（蓝光敏感）、长双（红光敏感）和短双（绿光敏感）（图 2D）^[20]。这 4 种视锥细胞以“马赛克（mosaic）”模式排列，即成排分布的双锥细胞和单锥细胞交替排列^[24]。由于斑马鱼具有 4 种视锥细胞，所以可产生四色视觉；而人类缺乏紫外线-敏感视锥细胞，只有三色视觉^[25-26]。斑马鱼的视杆细胞只有 1 种，并且以视紫红质为发色团。另外，需要说明的是，虽然斑马鱼的视网膜在 5 dpf 时形态学发育上已经完善，但至少要在 15 dpf 时才能发挥功能^[23]。

眼前段结构（角膜、晶体、虹膜、睫状体和角膜虹膜角）是光线进入眼睛到视网膜的途径，对调节眼内压有重要作用。斑马鱼的眼前段结构与高级脊椎动物相似，但亦存在差异。斑马



A: 正常斑马鱼视网膜冰冻切片（DAPI 染色）；B: 正常斑马鱼视网膜分层（ONL 是外核细胞层，OPL 是外网状层，INL 是内核细胞层，IPL 是外网状层，GCL 是视神经节细胞层，比例尺大小为 25 μm ）；C: 神经细胞种类示意图（橙色为视锥细胞，棕色为视杆细胞，浅蓝色为 Müller 细胞，绿色为水平细胞，浅黄色为双极细胞，紫色为无突触细胞，白色为视神经节细胞，比例尺大小为 50 μm ）；D: 视杆细胞（rod）和视锥细胞（cone）结构示意图。

图 2 斑马鱼视网膜结构示意图

Figure 2 Schematic diagram of retina structure in zebrafish

鱼的虹膜基质缺乏肌细胞,不具有收缩能力,无环状肌。与虹膜前部相连的部位被称为睫状区,而非睫状“体”。睫状上皮功能具有背腹差异,背侧睫状上皮主要是产生房水,而腹侧则是房水排出通路^[27]。斑马鱼的房水回流机制与人类亦存在差异。另外,斑马鱼的小梁网基质组成及超微结构也和人类有区别^[28]。因此,在利用斑马鱼研究人类眼睛疾病时应注意以上差异。

3 斑马鱼作为眼睛疾病模型的优势

3.1 斑马鱼作为模式生物的一般优势

自从遗传学家 George Streisinger 将斑马鱼用于人工雌核的发育研究^[3]后,斑马鱼作为模式生物逐渐引起了人们的极大关注。斑马鱼作为模式生物具有以下优点:(1) 体型小且价廉,适于大规模养殖;(2) 产卵量大,发育快,生长周期短,3~5 个月性成熟即进入繁殖期;(3) 胚胎透明,体外受精和发育,易于观察和操作;(4) 斑马鱼基因组与人类基因组相似度很高,且其基因表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)足够多,已有约 7 万个 ESTs 被鉴定(<http://danio.mgh.harvard.edu/chrMarkers/zfssr.html>);(5) 斑马鱼可用于大规模药物或化学分子的高通量筛选;(6) 品系资源丰富;(7) 精子可以冷冻保存^[29]。

3.2 斑马鱼作为眼睛疾病模型的独特优势

斑马鱼在眼睛疾病研究中具有独特的优势。例如,其体型相对较小,但眼睛比较大,易于观察和操作;眼睛发育快,72 hpf 已具有功能。斑马鱼作为模式生物越来越多地用于眼睛和视力相关疾病的遗传筛选和表型筛选。

传统的遗传筛选方法大致可分为正向遗传学和反向遗传学。正向遗传学一般是通过生物体的自发突变或人工诱变,寻找表型遗传的突变个体,从而找到对应的突变基因,并揭示其功能。通过该方法往往可以找到新基因。目前,利用该技术已经筛选并鉴定了影响眼睛和视力的相关疾病的大量基因^[30]。人工诱变的方法有放射线导致基因缺失或突变,以及各种化学诱变剂诱导基因发生点突变。常用的化学诱变剂有乙基亚硝基脲(ethylnitrosourea, ENU)。ENU 通过对 DNA 碱

基烷基化,诱导 DNA 复制时发生错配或碱基置换,产生单个核苷酸突变;其突变效率高,突变具有随机性,无倾向性^[31]。另外,用于正向遗传筛选的策略包括反转录病毒或基因诱捕技术介导的大规模插入突变,这种策略也被相继应用到斑马鱼的基因突变研究中。Goss 等^[32]利用反转录病毒介导的插入突变技术筛选到了 40 个与视觉系统发育和功能有关的基因,如 Cyclin A2、MCM2 和 NRR-1 等。

反向遗传学,即通过基因敲除或转基因技术改变某个特定基因的功能,寻找有关的表型变化。用于斑马鱼反向遗传学研究的有定向诱导基因组突变技术(targeting induced local lesions in genomes, TILLING)、RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术、反义寡核苷酸(morpholino, MO)、锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)技术、类转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇的规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白 9 (CRISPR-associated protein 9, Cas9) 技术^[30]。Lee 等^[33]利用 MO 技术敲低 *Bcl6a* 基因表达,引起斑马鱼眼睛缺损。CRISPR/Cas9 作为新兴的基因编辑技术,在反向遗传学及基因治疗方面也具有重大价值;目前该技术的应用已扩展到先天性白内障、先天性青光眼、视网膜色素变性等遗传性眼睛疾病的基因治疗^[34]。

事实上,目前有多个实验室和机构在开展斑马鱼模式生物相关的基因突变研究工作(表 2),如 Sanger 研究所资助的 ZMP 计划(Zebrafish Mutation Project)、欧盟资助的 ZF-HEALTH 计划(Zebrafish Regulomics for Human Health)、国际斑马鱼诱捕协会的多实验室通过插入诱变获得的突变库(即 zifishbook 插入突变数据库)等。另外,有一些网络在线免费工具可以用来搜寻和设计特定基因突变斑马鱼所需要的靶点,如 ZIFIT (Zinc Finger Targeter, <http://zifit.partners.org/ZiFiT/>)可以用来搜寻和设计 ZFN、TALEN 和 CRISPER 等基因编辑技术所需的靶点序列,Mojo Hand (<http://talendesign.com/mojohand.main.php>)

表 2 斑马鱼基因突变研究计划常用的突变技术和数据库及网站链接

Table 2 Mutation technologies, databases and website links of zebrafish gene mutation research programs		
计划/数据库	资助机构/实验室	网 址
ZMP 计划	Sanger研究所	http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/zmp/
ZF-HEALTH 计划	欧盟资助	http://www.zf-health.org/
Moens TILLING	NIH 资助	http://www.labs.fhcrc.org/moens/Tilling_Project.html
ZInC 计划	NIH 和 NSFC 资助	http://research.nhgri.nih.gov/zinc
人工核酸内切酶突变计划	美国 Joung 实验室	http://www.addgene.com/zfc/ or http://www.addgene.com/talengineering/
Zifishbook 插入突变数据库	国际斑马鱼诱捕协会	http://www.zfishbook.org/
zTRAP 数据库	日本 Kawakami 实验室	http://kawakami.lab.nig.ac.jp/ztrap/

可以用来搜寻和设计TALEN所需的靶点序列。

目前，斑马鱼的表型筛选主要是通过形态学、视觉行为学、成像系统及基因表达进行的。从形态学观察眼睛的大小、形状与位置以及色素表达等是比较简单和直接的方法。斑马鱼可以通过周围光线情况调节其色素表达，若其视觉有问题而不能感受光线变化，则其色素表达量比正常多，利用这种特点可以进行视觉损伤的筛选。另外，目前国际斑马鱼资源中心有大量标记斑马鱼眼睛组织的抗体（<http://zfin.org/action/antibody/search>），可以用免疫组织化学法来进行相应抗原的检测。斑马鱼行为学观察是筛查其视力损害的有效方法，包括观察视动和眼动行为学变化、惊恐反应、逃避反应、趋光反应和背光反应等^[35]。但需要注意的是，行为学观察法具有一定的局限性，例如肌肉损伤影响斑马鱼的运动功能时，可能会错误地认为是视觉损伤。因此，为了确保结果可靠性，可以应用另外的方法来确证，如可以应用视网膜电图进行视网膜功能的检测^[36]。

4 斑马鱼模型在眼睛疾病研究中的应用

目前，斑马鱼已经作为模式生物成功地应用于多种眼睛疾病的研究中。Neuhauss 等^[37]利用视动和眼动视觉行为观察了 450 尾基因突变斑马鱼，并从色素形成和组织形态等方面鉴定其眼睛损害，最后发现了多种引起视力损害的基因突变，包括晶体异常基因（SANDY）、轴突生长

异常基因（GRUMPY、SLEEPY、PINSCHER）和视网膜神经节细胞缺失基因（LAKRITZ）等。Gross 等^[32]对利用反转录病毒诱导插入突变的 250 尾斑马鱼进行了眼睛形态学及视觉行为学检测，最后发现了 40 个引起眼睛发育异常和 / 或视觉功能损害的突变位点，如与早期眼睛发育形态有关的 NDR2，与感光细胞损伤有关的 NRF1、IXL 和 PWI。另外，截至目前，已经利用基因突变成功建立了先天性白内障、青光眼、糖尿病视网膜病、老年黄斑变性及先天性眼球震颤等眼睛疾病的斑马鱼动物模型^[38]。例如，叉头转录因子 1 基因主要表达在眼前段及眼周间质细胞中，与眼前段的发育与形态维持有关，该基因的缺陷可以引起斑马鱼类似青光眼表型的病理改变，如虹膜、小梁网和角膜异常^[39]。低密度脂蛋白受体相关蛋白 2 基因突变可引起斑马鱼眼睛变大、眼压升高及视网膜神经节细胞数量逐渐减少等类似青光眼病变^[40]。与人眼睛疾病相关的斑马鱼模型及基因突变和诱导方式总结见表 3。

5 总结

视力损害是全球范围内广受关注的公共卫生问题之一，研究其病理机制及治疗方法十分重要。由于斑马鱼的眼睛发育及形态结构等与人类有相似性，并具有易于繁殖、生长发育较快、眼睛较大、易于观察等优势，斑马鱼成为了研究人类视力损伤的一种理想模式生物。同时也应该注意到其与人类眼睛的差异，比如斑

表 3 与常见眼睛疾病相关的斑马鱼模型
Table 3 Zebrafish models related to common eye diseases

斑马鱼疾病模型	突变基因 / 诱导方式	组织 / 病理表现
眼睛缺损	Adenomatous polyposis coli (<i>APC</i>)	眼睛缺损
	Transcription factor AP2 alpha (<i>TFAP2a</i>)	眼球缺损, 小眼球
	ATP-binding cassette, subfamily B6 (<i>ABCB6</i>)	眼球缺损, 小眼球
	Laminin beta 1 (<i>LAMB1</i>)	眼球缺损
白内障	Crystallin gamma C (<i>CRYGC</i>)	晶体去核不完全或空泡
	<i>UNC45b</i>	晶体内核累积
	Connexin 48.5	晶体内稳态异常
青光眼	Forkhead transcription factor 1 (<i>FOXC1</i>)	虹膜, 小梁网, 角膜异常
	Lipoprotein receptor-related protein 2 (<i>LRP2</i>)	眼内压增高, 近视
	<i>Six6a/b</i>	小眼, 视神经损伤
老年黄斑变性	低氧诱导	视网膜血管增生紊乱
糖尿病视网膜病变	高糖诱导	内核层和内网状层变薄; 感光细胞变性
其他	Mab-21-like 2 (<i>MAB21L2</i>)	玻璃体脉管系统减少
	Syndecan 2 (<i>SDC2</i>)	晶体无血管
	Choroideremia (<i>CHM</i>)	视网膜色素上皮缺陷, 视网膜变性, 无脉络膜症
	Protocadherin 15b	感光细胞损伤
	Phosphodiesterase 6 alpha	视锥细胞变性
	Fleer (<i>FLR</i>)	视杆细胞外节缺陷

注: 由于篇幅有限未列出所有相关基因。

马鱼是四色视觉, 而人类是三色视觉, 从而在利用斑马鱼模型进行人类眼睛疾病相关研究时设计实验更科学, 得出结论更严谨。

参考文献:

- [1] Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010[J]. Br J Ophthalmol, 2012, 96(5):614-618.
- [2] Guo C, Wang Z, He P, et al. Prevalence, causes and social factors of visual impairment among Chinese adults: Based on a national survey[J]. Int J Environ Res Public Health, 2017, 14(9):1034.
- [3] 向文碧, 何志旭, 舒莉萍. 斑马鱼白血病模型的研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(2):263-268.
- [4] Cogne B, Latypova X, Senaratne LDS, et al. Mutations in the kinesin-2 motor KIF3B cause an autosomal-dominant ciliopathy[J]. Am J Hum Genet, 2020, 106:1-12.
- [5] 王成, 龚莉虹, 郭朝成, 等. 模式生物斑马鱼在中药药效物质筛选中的应用进展[J]. 中草药, 2019, 50(24):6125-6134.
- [6] 刘可春, 高燕, 张云, 等. 模式生物斑马鱼在听觉领域的应用[J]. 山东科学, 2019, 32(5):46-53.
- [7] Glass AS, Dahm R. The zebrafish as a model organism for eye development[J]. Ophthalmic Res, 2004, 36(1):4-24.
- [8] 熊凤, 谢训卫, 潘鲁媛, 等. 国家斑马鱼资源中心的资源、技术和服务建设[J]. 遗传, 2018, 40(8):683-692.
- [9] Collins JE, White S, Searle SM, et al. Incorporating RNA-seq data into the zebrafish Ensembl genebuild[J]. Genome Res, 2012, 22(10):2067-2078.
- [10] Meyer A, Schartl M. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions[J]. Curr Opin Cell Biol, 1999, 11(6):699-704.
- [11] Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes[J]. Genome Res, 2000, 10(9):1351-1358.
- [12] Kimmel CB, Korf I, Kadavi C, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Dev Dyn, 1995, 203(3):253-310.
- [13] Miesfeld JB, Brown NL. Eye organogenesis: A hierarchical view of ocular development[J]. Curr Top Dev Biol, 2019, 132:351-393.
- [14] Chhetri J, Jacobson G, Gueven N. Zebrafish—on the move towards ophthalmological research[J]. Eye (Lond), 2014, 28(4):367-380.
- [15] Avanesov A, Malicki J. Analysis of the retina in the zebrafish model[J]. Methods Cell Biol, 2010, 100:153-

- 204.
- [16] Easter SS, Nicola GN. The development of eye movements in the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Dev Psychobiol, 1997, 31(4):267-276.
- [17] Ventura ALM, Dos Santos-Rodrigues A, Mitchell CH, et al. Purinergic signaling in the retina: From development to disease[J]. Brain Res Bull, 2019, 151:92-108.
- [18] Zambusi A, Ninkovic J. Regeneration of the central nervous system-principles from brain regeneration in adult zebrafish [J]. World J Stem Cells, 2020, 12(1):8-24.
- [19] Maurer CM, Huang YY, Neuhauss SC. Application of zebrafish oculomotor behavior to model human disorders [J]. Rev Neurosci, 2011, 22(1):5-16.
- [20] 张艳琼, 王跃祥, 蒋 璆, 等. 斑马鱼视网膜感光细胞的发育及视蛋白的表达[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2008, 8(2):84-86.
- [21] Lagnado L. Retinal processing: amacrine cells keep it short and sweet[J]. Curr Biol, 1998, 8(17):R598-600.
- [22] Brockerhoff SE. Genome editing to study Ca^{2+} homeostasis in zebrafish cone photoreceptors[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1016:91-100.
- [23] Bilotta J, Saszik S, Sutherland SE. Rod contributions to the electroretinogram of the dark-adapted developing zebrafish [J]. Dev Dyn, 2001, 222(4):564-570.
- [24] 于珊珊. CERKL 敲除导致斑马鱼感光细胞外节吞噬障碍, 引起视杆 - 视锥营养不良[D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- [25] Bollmann JH. The zebrafish visual system: From circuits to behavior[J]. Annu Rev Vis Sci, 2019, 5:269-293.
- [26] Fleisch VC, Neuhauss SC. Visual behavior in zebrafish[J]. Zebrafish, 2006, 3(2):191-201.
- [27] Soules KA, Link BA. Morphogenesis of the anterior segment in the zebrafish eye[J]. BMC Dev Biol, 2005, 5: 12.
- [28] Chen CC, Yeh LK, Liu CY, et al. Morphological differences between the trabecular meshworks of zebrafish and mammals[J]. Curr Eye Res, 2008, 33(1):59-72.
- [29] 黄月玥. 斑马鱼前肾突变体的遗传筛选及精子冻存[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [30] Niklaus S, Neuhauss SCF. Genetic approaches to retinal research in zebrafish[J]. J Neurogenet, 2017, 31(3):70-87.
- [31] 刘香梅, 李培宁, 刘冬虹, 等. 大鼠 Pig-a 基因突变试验中 N- 乙基 -N- 亚硝基脲和环磷酰胺量 - 效关系的优化[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2):69-73.
- [32] Gross JM, Perkins BD, Amsterdam A, et al. Identification of zebrafish insertional mutants with defects in visual system development and function[J]. Genetics, 2005, 170(1): 245-261.
- [33] Lee J, Lee BK, Gross JM. Bcl6a function is required during optic cup formation to prevent p53-dependent apoptosis and colobomata[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(17):3568-3582.
- [34] 吴世靖, 睢瑞芳. CRISPR/Cas9 技术在遗传性眼病基因治疗中的应用[J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36(11):892-896.
- [35] 邹苏琪, 殷 梧, 杨昱鹏, 等. 斑马鱼行为学实验在神经科学中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(1): 5-12.
- [36] Xie J, Jusuf PR, Goodbourn PT, et al. Electroretinogram recording in larval zebrafish using a novel cone-shaped sponge-tip electrode[J]. J Vis Exp, 2019, 145:e59487.
- [37] Neuhauss SC, Biehlmaier O, Seeliger MW, et al. Genetic disorders of vision revealed by a behavioral screen of 400 essential loci in zebrafish[J]. J Neurosci, 1999, 19(19): 8603-8615.
- [38] 高 蒙. 以斑马鱼为模式生物研究 HSF4 调控晶状体发育和白内障形成的机制[D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- [39] Tamimi Y, Skarie JM, Footz T, et al. FGF19 is a target for FOXC1 regulation in ciliary body-derived cells[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(21):3229-3240.
- [40] Coltery RF, Link BA. Precise short sequence insertion in zebrafish using a CRISPR/Cas9 approach to generate a constitutively soluble Lrp2 protein[J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7:167.

Application of Zebrafish as A Model Animal in Research of Human Eye Diseases

DI Yanan¹, ZHU Liying², QIAN Wen², PAN Wei^{2,3,4}

(1. Clinical Laboratory in Beifang Section of Peking University Third Hospital, Beijing 100089, China;

2. School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;

3. Guizhou Prenatal Diagnosis Center, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 4. Key Laboratory of Environmental Pollution and Disease Monitoring, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

Correspondence to: PAN Wei, 313831139@qq.com

[Abstract] As an excellent animal model, zebrafish (*Danio rerio*) has been widely used in the fields of developmental biology, genetics, toxicology and so on. Because it is great similar to human in aspect of eye morphology, anatomical structure, gene expression and function, and has advantages on rapid development, sperm reception way, embryo transparency and easy observation, zebrafish has been increasingly used in the study of eye development and related diseases such as eye defect, glaucoma, cataract, rod cone degeneration and diabetic retinopathy. This article will review the eye development and structure of zebrafish as well as the advantages and disadvantages of zebrafish as a model for the study of eye diseases, which will help to have a more comprehensive understanding of the application value of zebrafish in the research of human eye diseases.

[Key words] Zebrafish; Eye development; Eye diseases; Animal model

致谢本刊支持单位

广东省实验动物监测所

苏州大学动物实验中心

上海西普尔-必凯实验动物有限公司

上海交通大学医学院实验动物科学部

广东省医学实验动物中心

上海斯莱克实验动物有限责任公司

中国科学院上海药物研究所实验动物室

上海市实验动物质量监督检验站

南方医科大学实验动物中心

大连医科大学实验动物中心

新疆实验动物研究中心

扬州大学比较医学中心

浙江省实验动物中心

河南省实验动物中心

南通大学实验动物中心

复旦大学药学院

广州中医药大学实验动物中心

西安交通大学医学院实验动物中心

山东省实验动物中心

浙江中医药大学动物实验研究中心

海军军医大学实验动物中心

哈尔滨兽医研究所

杭州师范大学实验动物中心

(排名不分先后)

肠道病毒 71 型致病机制及免疫反应研究进展

施梅言, 陆彩霞, 代解杰

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118)

[摘要] 肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 主要经由胃肠道或呼吸道传染人类, 是引起手足口病的主要病原体之一, 还能导致神经系统性疾病, 如神经源性肺水肿, 甚至死亡, 严重威胁婴幼儿生命安全。虽然 EV71 的全病毒灭活疫苗已经上市, 但其感染导致的并发症的致病机制及免疫反应尚未完全明确。本文对 EV71 的致病机制、免疫应答及免疫原性方面的动物实验研究进展进行综述, 为深入研究 EV71 提供理论支持。

[关键词] 肠道病毒 71 型; 致病机制; 动物实验; 免疫反应

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0449-07

肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 是单股正链小 RNA 病毒, 无包膜, 属于肠道病毒科肠道病毒属, 是正二十面体颗粒。EV71 核酸长约 7.4 kb, 两端分别为 5'-UTR 和 3'-UTR, 中间是单一的开放阅读框, 可编码多聚蛋白; 而多聚蛋白可被宿主和病毒蛋白酶水解, 可产生 4 个病毒衣壳结构蛋白 VP1~VP4 和 7 个非结构蛋白 (2A~2C, 3A~3D), 其中 VP1、VP2、VP3 暴露于病毒衣壳的外侧, VP4 包埋于内侧, 抗原决定簇基本位于 VP1~VP3^[1]。EV71 是引起手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD) 的主要病原体之一。HFMD 主要发生在 5 岁以下儿童^[2], 可通过呼吸道、消化道和密切接触传播。EV71 感染引起的 HFMD, 除了手足口症状外, 还能导致神经系统疾病, 如神经源性肺水肿、脑干

脑炎、无菌性脑膜炎、急性弛缓性麻痹等, 严重威胁儿童的生命健康安全^[3]。我国自 1981 年在上海发现 HFMD 以后, 北京、河北等十几个省均有报道, 香港地区 1987 年发生过 EV71 流行; 1998 年我国台湾省发生 EV71 引起的感染疾病和疱疹性咽颊炎暴发流行, 在 6 月和 10 月两波流行中, 共监测到 129 106 例, 其中重症患者 405 例, 死亡 78 例, 死亡病例大多为 5 岁以下的儿童^[4]。自 2008 年开始 HFMD 发病率呈逐年上升趋势, 2013~2014 年增长速度最快, 达到 70.03/10 万^[5]。然而, 目前关于 EV71 如何入侵神经系统的致病机制尚不明确。本文就 EV71 的致病机制及免疫反应研究进展进行综述, 为今后 EV71 重症患者的救治和疫苗及药物的研发提供理论依据。

1 致病机制

EV71 入侵人体后, 若机体未产生足够抗体清除病毒, 病毒随血液循环导致第一次病毒血症。若机体免疫力差, EV71 入侵淋巴结、肝、脾、骨髓等靶器官, 经血液循环, 引发严重病变, 临床表现为脊髓灰质炎、脑炎、无菌性脑膜炎、神经源性肺水肿、急性弛缓性麻痹或心肌炎等^[6-7], 其中以脑组织病变最为严重, 提示 EV71 可能由血脑屏障进入神经系统, 或通过周

[收稿日期] 2020-03-23

[基金项目] 云南省科技人才和平台计划 (2017HC019, 2018HB071); 云南省高层次卫生健康技术人才培养项目 (D-2018026); 昆明市科技计划项目 (2019-1-R24483)

[作者简介] 施梅言 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 病原生物学。E-mail: 1758651731@qq.com

[通信作者] 代解杰 (1961—), 男, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型建立及相关研究。

E-mail: dj@imbcams.com.cn

围神经的轴突由逆向轴浆的方式进入。重症 HFMD 患者病情发展迅猛, 甚至导致死亡。有研究表明, 部分成人感染 EV71 后可通过接触传播将病毒传染给儿童使其致病^[8]。

1.1 EV71 感染对神经系统的致病机制

目前 HFMD 动物模型主要包括 BALB/c 小鼠模型、ICR 小鼠模型、免疫缺陷小鼠模型、中缅树鼩模型及猕猴模型等。Caine 等^[9]成功建立了免疫缺陷小鼠模型, 并通过腹腔注射途径感染时小鼠出现神经系统病变, 表现为肢体瘫痪和死亡, 在其肠道和中枢神经系统中均能检测到病毒蛋白。EV71 感染的重症患者中, 发现脑组织病变最为严重。李军等^[10]通过 EV71 感染小鼠模型发现, EV71 存在中枢神经系统的病变部位, 提示 EV71 可直接造成中枢神经系统 (CNS) 损伤。Lin 等^[11]通过对 EV71 感染死亡患儿的尸解发现, 脑膜表面有中性粒细胞浸润, 脑实质有大范围中性粒细胞, 神经元细胞坏死, 脑干和脊髓严重受累。郝博等^[12]通过尸检在感染者 CNS 中发现 EV71 及炎症存在。Khong 等^[13]通过口服途径感染小鼠时, 缺乏外源性抗体的 AG129 小鼠出现肢体瘫痪和死亡, 肠道感染和口腔感染的中枢神经系统均检测到病毒蛋白。Liou 等^[14]通过 EV71 感染杂交小鼠时出现了肢体瘫痪, 但在肌肉中没有检测到病毒 RNA 或蛋白质, 仅在中脑和脊髓等中枢神经系统中显示出高密度的病毒蛋白, 这表明瘫痪仅仅是由中枢神经系统损伤引起的, 而不是肌炎和肌肉破坏。有学者^[15-16]推测 EV71 侵入机体后可能通过逆向轴突运输途径累及 CNS, 这可能与 EV71 具有嗜神经性及病毒衣壳蛋白有关。Fu 等^[17]通过小鼠实验也证实, 神经通路的逆行轴突运输可能是 EV71 累及 CNS 的主要方式。病毒感染后激发机体免疫反应, 释放多种细胞因子, 形成“风暴”引起全身炎症反应, 导致多脏器功能衰竭。患者的 CD4、CD8、T 细胞和自然杀伤 (NK) 细胞耗竭。在脑干脑炎患儿中, 神经系统炎症反应伴有白细胞介素 10 (IL-10)、IL-13 和干扰素- γ (IFN- γ) 产生以及淋巴细胞损耗, 导致机体的免疫功能下降, 病情加重。因此, 对 EV71 致病机制的深入探索有利于重症患者的治疗。

1.2 EV71 感染对神经源性肺水肿的致病机制

Dong 等^[18]通过静脉、呼吸道途径感染 3~3.5 岁猕猴, 成功建立了 EV71 猕猴模型, 均能引起中枢神经、呼吸系统明显的病理改变, 表现为肺气肿、肺出血、神经元损伤和炎性细胞浸润等特点。神经源性肺水肿是 HFMD 患儿死亡的主要原因之一, 神经源性肺水肿的发生是一个复杂的病理生理过程, 主要与 CNS 损伤后神经因素、体液因素、生物活性因子等有关。动物实验和病理检查发现, EV71 感染的肺组织表现为肺部充血水肿并伴有局灶性出血, 并且从中未分离到 EV71 病原体, 另外心脏组织病理检查无明显炎症改变, 结合肺水肿发生过程中伴有神经性尿潴留、肠麻痹、多汗、失眠和心动过速等自主神经功能失调表现, 推测 EV71 感染后的肺水肿是神经源性^[19]。王文广等^[20]采用滴鼻、灌胃等途径感染中缅树鼩, 成功制备了 HFMD 模型并出现与人类相似的症状, 如心、肺、肠、脾和肾等部位出现组织变性坏死、水肿、炎性细胞浸润等病理改变。杨坤等^[21]研究认为, EV71 感染后所致神经源性肺水肿的发病机制可能是 EV71 入侵 CNS 后并发脑干脑炎, 造成视丘下部和延髓孤束核功能紊乱, 机体的应激反应导致交感神经兴奋, 血中儿茶酚胺 (肾上腺素、去甲肾上腺素等) 含量显著增高, 进而全身血管收缩, 血流动力学急剧变化, 动脉血压急剧增高, 体循环内大量血液进入肺循环; 一方面肺毛细血管床有效滤过压急剧增高, 大量体液滞留在肺组织间隙, 从而形成肺水肿; 另一方面血流冲击造成血管内皮细胞损伤, 同时体内血管活性物质 (如组织胺和缓激肽等) 大量释放, 使血管通透性增加, 大量血浆蛋白外渗, 导致急性肺水肿进一步加重。

Liao 等^[22]发现用 EV71 感染小鼠时, 会产生一些炎症因子, 如 IL-6、IL-10 和 IFN- γ 。Chen 等^[23]研究发现, EV71 重症患者中被感染的免疫细胞可使促炎因子大量释放, 而促炎因子也与肺水肿有关。人类树突状细胞会在病毒感染的条件下释放促炎因子 IL-6、IL-12 和肿瘤坏死因子 α (TNF α)^[24], 也可诱使人类 T 细胞、巨噬细胞和人类单核细胞产生促炎因子, 如 TNF α 和巨噬细胞迁移抑制因子^[25]。Jin 等^[26]建立了 EV71 感染的

小鼠模型,发现EV71感染后,小鼠的大脑、肺和骨骼肌中均可见肥大细胞的积累、激活和过敏性炎症,在小鼠的肺中IL-4、IL-5、IL-13和TNF α 水平升高。细胞因子“风暴”的发生对机体的免疫耐受产生严重的影响,也是引起EV71重症患者死亡的重要原因。EV71入侵机体后,首先破坏脑中中具有特定功能的调节结构,引发神经功能紊乱,最终导致神经源性肺水肿的发生。因此,对重症患者的细胞因子水平进行严密监测,有助于患者治疗,进一步降低EV71的致死率。

2 EV71 感染引起的固有免疫反应

固有免疫是机体抵御病毒入侵的第一道防线,病毒入侵后,会被模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRR)如Toll样受体(Toll-like receptors, TLR)、维甲酸诱导的基因I样受体[retinoid acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors, RLR]识别,激活固有免疫系统,使其产生促细胞因子和I型干扰素,对病毒进行抵御和清除。Lei等^[27]研究发现,当EV71重症感染时,I型干扰素缺失,而其他细胞因子水平异常增高,这表明固有免疫反应失衡。Khong等^[13]发现,免疫缺陷的AG129小鼠缺乏I型和II型干扰素受体时,可通过腹腔注射和口服途径感染非小鼠适应的EV71,受感染的小鼠在死亡前表现出肢体瘫痪。越来越多的病毒感染致病机制研究表明,机体的固有免疫应答具有抵抗病毒感染的能力,是通过活化PRR通路,产生干扰素,PRR(包括TLR和RIG-I)通过识别不同途径的病毒核酸,招募特异接头蛋白,激活一系列信号级联反应,引发I型干扰素和促炎因子的产生。研究表明,IFN- α 的表达能显著降低EV71的感染率。

固有免疫的调控需要免疫细胞的参与,包括吞噬细胞、NK细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和B1细胞等。在EV71重症患者的血清和脑脊液中能够检测到包括IL-6、IL-10、IL-13、TNF α 、IL-1 β 和IL-8等在内的大量炎症因子和趋化因子的异常增高^[28-32]。TLR和RLR通过对病原相关分子模式(pathogen-associated

molecular patterns, PAMP)的识别,触发下游固有免疫,激活相关信号通路,主要包括丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、核转录因子 κ B(NF- κ B)、TANK结合蛋白激酶1-干扰素调节因子3信号通路和激活蛋白1(activator protein 1, AP-1)信号通路^[33]。EV71感染时,在激酶活化下,TAK1结合蛋白1(TAK1-binding protein 1, TAB1)能够使I κ B激酶(I κ B kinase, IKK)复合物磷酸化,最后激活NF- κ B和AP-1,两者均可调控前炎症因子的基因转录过程^[34],同时产生IL-6、IL-8和IL-1 β 及相关炎症因子,抵御EV71感染。研究表明,当EV71入侵时,TLR3通过招募干扰素诱导型含TIR结构域的接头分子(TRIF),经泛素化激活下游信号转化生长因子活化激酶1(TAK1),继而使IKK α 、IKK β 磷酸化,最终活化NF- κ B,从而介导MyD88非依赖性信号通路^[35],诱导细胞因子及干扰素的表达,从而抑制EV71的复制。

Meng等^[36]研究发现,在EV71轻症、重症感染患者和健康对照人群的外周血单核细胞(PBMC)中,有8 541个长链非编码RNA(lncRNA)发生差异表达变化,其中大量lncRNA与固有免疫和炎症反应密切相关,提示lncRNA在EV71感染固有免疫调控过程中也可能扮演重要角色。研究EV71感染与其触发的固有免疫反应之间的相互作用机制,寻找EV71致病过程中关键的宿主分子或病毒蛋白等作为靶标,对疫苗和药物的研发有积极的推动作用。近年来研究取得了一定的进展,如Liao等^[37]采用小鼠适应EV71株(MP4)感染的7日龄ICR小鼠模型,探讨二甲胺四环素治疗EV71感染的抗炎抗病毒作用,发现二甲胺四环素降低了细胞病理效应(CPEs)、病毒蛋白表达、病毒滴度、IL-6和IL-8的水平,证明二甲胺四环素在感染和炎症神经系统疾病模型中具有抗炎和免疫调节特性;另有研究^[38]发现,以NF- κ B通路为作用靶点可以抑制EV71的复制。近年来,随着EV71感染固有免疫反应调控研究的不断深入,人们对免疫调控有了更深入的认识,为今后深入研究EV71感染引起的固有免疫反应提供了新思路。

3 EV71 感染引起的适应性免疫

病毒入侵机体后,可诱发机体产生适应性免疫,包括T细胞介导的细胞免疫与B细胞介导的体液免疫,主要依靠特异性T细胞活化发挥免疫效应,以及依靠B细胞产生特异性的抗体发挥免疫效应,达到清除病毒的目的。有研究发现,在感染前或感染后对小鼠注射一种EV71特异性中和抗体,可以在B细胞缺乏的C57BL/6来源小鼠中显著降低小鼠致死率和组织中的病毒载量^[11]。T细胞膜表面有100多种特异性抗原,两群辅助性T细胞(Th)克隆均能诱导抗原提呈细胞(APC)表达主要组织相容性复合体(MHC)II类抗原,Th1通过IFN- γ 诱导巨噬细胞(macrophages, M ϕ)表达Ia抗原,而Th2通过IL-4对M ϕ 和B细胞Ia抗原表达起正调节作用,对抗病毒免疫应答进行调节^[39]。细胞毒性T细胞表面表达CD8,这类细胞可以通过MHC I类抗原直接结合识别内源性抗原,对靶细胞产生直接杀伤作用,进行病毒清除。

刘莉等^[40]研究表明,感染EV71可通过凋亡引起NK细胞、CD3⁺T细胞等淋巴细胞减少,对机体免疫反应产生抑制作用。B细胞不仅表达MHC I类抗原,而且表达高密度的MHC II类抗原,B细胞表面的MHC II类抗原在B细胞与T细胞相互协作时起重要作用,此外,还参与B细胞作为辅佐细胞的抗原提呈作用。B细胞表面的CD40与T细胞表面的CD40L交联,能诱导B细胞免疫应答,促进细胞因子释放。Johnson等^[41]研究表明,缺乏IFN的AG129小鼠,也能产生有效的体液和细胞免疫。据报道,滤泡辅助性T细胞(一种新的CD4⁺T细胞亚群Tfh),在抗体产生过程中发挥着重要的作用,其主要功能是辅助B细胞增殖、分化,继而参与到抗体产生及体液免疫应答^[42]。有研究表明,Th1向Th2细胞转变,从而产生免疫抑制效果,同时也是促进HFMD发展的重要机制之一^[43]。Imura等^[44]发现,用甲醛溶液灭活的EV71皮下接种免疫成年转基因小鼠,该疫苗在免疫小鼠中诱导了足够水平的中和抗体,大多数免疫小鼠存活,无临床症状或组织病理学损伤,免疫小鼠的病毒复制明显

低于未免疫小鼠。总之,固有免疫和适应性免疫在EV71感染过程中被激活时,二者通过协同作用对病毒进行清除,两者密不可分,互相影响。

4 免疫原性

预防性疫苗的研发是控制EV71感染引起HFMD最有效的方法,目前中国医学科学院医学生物研究所(IMBCAMS)和北京科兴生物制品有限公司(Inovac)研发的EV71灭活疫苗已经实现量产。免疫原性研究疫苗的种类包括灭活疫苗、杆状病毒表达的病毒样颗粒(VLP)疫苗和大肠埃希菌表达的VP1亚单位疫苗,评价模型一般选择小鼠、猕猴等动物。

EV71灭活疫苗通常选择毒力较高的毒株作为疫苗候选株,具有良好的免疫原性及遗传稳定性,并在动物实验中具有交叉保护作用。EV71疫苗原液的免疫原性要显著低于铝佐剂疫苗^[45],目前进入临床的灭活疫苗均使用铝作为疫苗佐剂。Bek等^[46]对用C4a亚型毒株制备的2种灭活疫苗进行小鼠攻毒保护研究,结果显示,小鼠接种2种疫苗3~5周后均产生高滴度的IgG抗体以及针对C4和B3亚型毒株的中和抗体。此外,小鼠可抵御B3亚型EV71攻击病毒株(MP-26M)的攻击。但部分中和抗体滴度较低的母鼠产生的子代乳鼠也可在攻毒后得以存活,故认为除中和抗体外,体液免疫应答的调节功能在动物保护中也可能发挥了重要作用。Chou等^[47]用甲醛溶液灭活的EV71毒株免疫小鼠可引起高水平的病毒特异性抗体,具有交叉中和活性,并保护免疫的宿主对抗病毒EV71在小鼠模型中的致死性攻击。

EV71灭活疫苗在动物实验中具有良好的免疫原性,为临床试验阶段的研究提供了重要的依据。通过杆状病毒表达系统表达的VLP可诱导小鼠产生体液免疫和细胞免疫,对小鼠有一定的保护能力,但是还缺乏VLP交叉保护的研究^[48]。Foo等^[49]通过研究EV71的T细胞和B细胞表位,并成功从VP1中鉴定出3个表位,且实验结果证实这3个表位均可以促进CD4⁺T细胞的分化,产生大量的IL-2和IFN- γ 。Lin等^[50]应用制备的VLP疫苗免疫猕猴,结果显示,VLP疫苗和EV71灭活病毒均可诱生大量的抗EV71抗体,且均可诱

导 T 细胞和 B 细胞应答,但 VLP 疫苗诱导的中和抗体滴度低于 EV71 灭活病毒组,可能是 VLP 中 VP1 的构象与天然病毒有差异。虽然猕猴对 EV71 疫苗产生抗体反应,与在人类身上观察到的类似,但是它们不适合研究神经毒力和肺水肿并发症,并且它们的使用受到伦理和经济的限制^[51]。VP1 是中和表位的主要聚集区,具有作为抗病毒亚单位疫苗的潜力,动物实验结果表明此类重组 VP1 亚单位疫苗具有一定的免疫原性^[52-55],且大肠埃希菌中表达的 VP1 蛋白融合完全佐剂能在小鼠体内诱导中和和抗体效应,增强辅助 T 细胞增殖,诱导产生高水平的 IL-10 和 IFN- γ ,对小鼠有一定保护作用。Liu 等^[56]研究发现,用 EV71 截短肽生成的候选融合蛋白疫苗免疫可以保护小鼠免受致命性 EV71 的感染。以上研究为 HFMD 安全性疫苗的研发奠定了基础。

5 展望

近年来,关于 EV71 致病机制及免疫反应方面的研究已经取得了一定进展。这些研究从 EV71 逃逸干扰素反应、EV71 抑制 NF- κ B 信号通路、EV71 与天然免疫细胞相互作用等方面对 EV71 与宿主固有免疫系统之间的关系进行了深入剖析。同时, EV71 的免疫调控过程也受到宿主 RNA 表达谱的影响;部分研究还揭示了 EV71 致病过程中关键的宿主分子或病毒蛋白等靶标,这对疫苗和药物的研发有积极推动作用。

虽然目前对 EV71 的研究已经取得了很大进展,但 EV71 感染重症患者的免疫失衡机制以及致弛缓神经系统麻痹机制等问题未完全阐明。展望未来,今后关于 EV71 的研究热点和方向主要是 EV71 的致病机制及其与宿主细胞的免疫反应机制,对这些问题的阐释有助于为 EV71 重症患者有效药物的研发提供理论基础。

参考文献:

- [1] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26(1):91-107.
- [2] 白江涛,许少坚,任燕,等. 2015—2016 年深圳市龙华区手足口病流行病学和病原学特征[J]. *中华疾病控制杂志*, 2017, 21(7):732-736.
- [3] Huang CC, Liu CC, Chang YC, et al. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(13):936-942.
- [4] Liu CC, Tseng HW, Wang SM, et al. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998: Epidemiologic and clinical manifestations[J]. *J Clin Virol*, 2000, 17(1): 23-30.
- [5] 李鹏,葛淼,王聪霞,等. 2008—2014 年中国大陆手足口病的时空变化规律[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(3):380-385.
- [6] Sun L, Wen H, Wang Z. Research into the pathogenicity of enterovirus 71[J]. *Bing Du Xue Bao*, 2015, 31(2):192-196.
- [7] Ong KC, Wong KT. Understanding enterovirus 71 neuropathogenesis and its impact on other neurotropic enteroviruses[J]. *Brain Pathol*, 2015, 25(5):614-624.
- [8] Yang Q, Ding J, Cao J, et al. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Wuhan, China from 2012 to 2013: Outbreaks of coxsackieviruses A10[J]. *Med Virol*, 2015, 87(6):954-960.
- [9] Caine EA, Partidos CD, Santangelo JD, et al. Adaptation of enterovirus 71 to adult interferon deficient mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8:e59501.
- [10] 李军,姜琴,孟红,等. 肠道病毒 71 型感染后组织病理改变实验研究[J]. *中国实用儿科杂志*, 2013, 28(7):540-542.
- [11] Lin YW, Chang KC, Kao CM, et al. Lymphocyte and antibody responses reduce enterovirus EV71 lethality in mice by decreasing tissue viral loads[J]. *J Virol*, 2009, 83(13):6477-6183.
- [12] 郝博,高迪,汤大为,等. 肠道病毒 71 型在脑干脑炎婴幼儿脑干中的分布及感染机制[J]. *法医学杂志*, 2012, 28(2):85-88, 91.
- [13] Khong WX, Yan B, Yeo H, et al. A non-mouse-adapted enterovirus 71 (EV71) strain exhibits neurotropism, causing neurological manifestations in a novel mouse model of EV71 infection[J]. *J Virol*, 2012, 86(4):2121-2131.
- [14] Liou AT, Wu SY, Liao CC, et al. A new animal model containing human SCARB2 and lacking stat-1 is highly susceptible to EV71[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:31151.
- [15] Teng S, Wei Y, Zhao SY, et al. Intestinal detoxification time of hand-foot-and-mouth disease in children with EV71 infection and the related factors [J]. *World J Pediatr*, 2015, 11(4):380-385.
- [16] Wong KT, Munisamy B, Ong KC, et al. The distribution of inflammation and virus in human enterovirus 71 encephalomyelitis suggests possible viral spread by neural pathways [J]. *Neuropathol Exp Neurol*, 2008, 67(2):162-

- 169.
- [17] Fu YC, Chi CS, Lin NN, et al. Comparison of heart failure in children with enterovirus 71 rhombencephalitis and cats with norepi-nephine cardiotoxicity[J]. *Pediatr Cardiol*, 2006, 27(5):577-584.
- [18] Dong CH, Wang JJ, Liu LD, et al. Optimized development of a candidate strain of inactivated EV71 vaccine and analysis of its immunogenicity in rhesus monkeys[J]. *Hum Vaccin*, 2010, 6(12):1028-1037.
- [19] 何颜霞, 付丹. EV71 感染相关神经源性肺水肿和心肺衰竭[J]. *临床儿科杂志*, 2008, 26(12):1087-1090.
- [20] 王文广, 黄晓燕, 徐娟, 等. EV71 可感染幼龄中缅树鼩[J]. *动物学研究*, 2012, 33(1):7-13.
- [21] 杨坤, 赵东赤. EV71 感染致重症手足 E1 病的研究进展[J]. *国际儿科学杂志*, 2010, 37(2):199-202.
- [22] Liao CC, Liou AT, Chang YS, et al. Immunodeficient mouse models with different disease profiles by *in vivo* infection with the same clinical isolate of enterovirus 71[J]. *J Virol*, 2014, 88(21):12485-12499.
- [23] Chen CS, Yao YC, Lin SC, et al. Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice[J]. *J Virol*, 2007, 81(17):8996-9003.
- [24] Chen LC, Yeh TM. Enterovirus 71 infection of human immune cells induces the production of proinflammatory cytokines [J]. *J Biomed Lab Sci*, 2009, 21: 82-90.
- [25] Lin YW, Wang SW, Tung YY, et al. Enterovirus 71 infection of human dendritic cells[J]. *Exp Biol Med*, 2009, 234:1166-1173.
- [26] Jin Y, Zhang C, Wang H, et al. Mast cells contribute to Enterovirus 71 infection-induced pulmonary edema in neonatal mice[J]. *Lab Invest*, 2018, 98(8):1039-1051.
- [27] Lei X, Cui S, Zhao Z, et al. Etiology, pathogenesis, antivirals and vaccines of hand, foot, and mouth disease[J]. *Natl Sci Rev*, 2015, 2(3):268-284.
- [28] Wang SM, Lei HY, Yu CK, et al. Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71 associated brainstem encephalitis[J]. *J Infect Dis*, 2008, 198(7):1002-1006.
- [29] Zhang Y, Liu H, Wang L, et al. Comparative study of the cytokine/chemokine response in children with differing disease severity in enterovirus 71-induced hand, foot and mouth disease[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e67430.
- [30] Chen Z, Li R, Xie Z, et al. IL-6, IL-10 and IL-13 are associated with pathogenesis in children with Enterovirus 71 infection [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(9):2718-2723.
- [31] Han J, Wang Y, Gan X, et al. Serum cytokine profiles of children with human enterovirus 71 associated hand, foot and mouth disease[J]. *J Med Virol*, 2014, 86(8):1377-1385.
- [32] Lee JY, Son M, Kang JH, et al. Serum interleukin-6 levels as an indicator of aseptic meningitis among children with enterovirus 71 induced hand, foot and mouth disease[J]. *Postgrad Med*, 2018, 130(2):258-263.
- [33] Cao X. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(1):35-50.
- [34] 尹卫国, 肖建华. IRAK 家族在 TLR 介导的信号通路中的功能和意义[J]. *中南医学科学杂志*, 2012(2):109-115.
- [35] Choi YJ, Im E, Pothoulakis C, et al. TRIF modulates TLR5 dependent responses by inducing proteolytic degradation of TLR5 [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(28):21382-21390.
- [36] Meng J, Yao Z, He Y, et al. Long non-coding RNA expression profiles in different severity EV71-infected hand foot and mouth disease patients[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(4):1594-1600.
- [37] Liao YT, Wang SM, Chen SH. Anti-inflammatory and antiviral effects of minocycline in enterovirus 71 infections [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118:1-10.
- [38] Chen D, Tian X, Zou X, et al. Harmine, a small molecule derived from natural sources inhibits enterovirus 71 replication by targeting NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 60:111-120.
- [39] 饶翠琼. 水溶性维生素在利巴韦林治疗小儿手足口病中的疗效 [J]. *临床医学工程*, 2012, 19(11):1913-1914.
- [40] 刘莉, 李青, 冯淑琴, 等. 静注人免疫球蛋白治疗手足口病合并脑炎患儿的疗效观察[J]. *中国全科医学*, 2012, 15 (30):3516-3518.
- [41] Johnson AJ, Roehrig JT. New mouse model for dengue virus vaccine testing[J]. *J Virol*, 1999, 73(1):783-786.
- [42] Zhang X, Ing S, Fraser A, et al. Follicular helper T cells: New insights into mechanisms of autoimmune diseases[J]. *Ochsner J*, 2013, 13(1):131-139.
- [43] 刘威龙, 吴伟刚, 陈圆圆, 等. 基于枯草芽孢杆菌系统制备的 EV71 VP1 重组抗原诱导小鼠免疫应答的研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2013, 27(6):410-412.
- [44] Imura A, Sudaka Y, Takashino A, et al. Development of an enterovirus 71 vaccine efficacy test using human scavenger receptor B2 transgenic mice[J]. *Virology*, 2020, 94(6):1-14.
- [45] 王一平, 李政颖, 高帆, 等. 氢氧化铝佐剂对肠道病毒 71 型灭活疫苗诱导小鼠细胞免疫应答的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(8):939-942.
- [46] Bek EJ, Hussain KM, Phuektes P, et al. Formalin-inactivated vaccine provokes cross-protective immunity in a mouse model of human enterovirus 71 infection [J]. *Vaccine*, 2011, 29(29/30):4829-4838.
- [47] Chou AH, Liu CC, Chang JY, et al. Formalin-Inactivated

- EV71 vaccine candidate induced cross-neutralizing antibody against subgenotypes B1, B4, B5 and C4A in adult volunteers[J]. PLoS One, 2013, 8(11):e79783.
- [48] Chung YC, Ho MS, Wu JC, et al. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge[J]. Vaccine, 2008, 26(15):1855-1862.
- [49] Foo DG, Alinso S, Phoon MC, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of enterovirus 71 using synthetic peptides[J]. Virus Res, 2007, 125(1):61-68.
- [50] Lin YL, Yu CI, Hu YC, et al. Enterovirus type 71 neutralizing antibodies in the serum of macaque monkeys immunized with EV71 virus-like particles[J]. Vaccine, 2012, 30(7): 1305-1312.
- [51] Wang YF, Yu CK. Animal models of enterovirus 71 infection: applications and limitations[J]. J Biomed Sci, 2014, 21(1):31-41.
- [52] Chen HF, Chang MH, Chiang BL, et al. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71[J]. Vaccine, 2006, 24 (15):2944-2951.
- [53] Premanand B, Prabakaran M, Kiener TK, et al. Recombinant baculovirus associated with bilosomes as an oral vaccine candidate against EV71 infection in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(2):e55536.
- [54] Wang M, Jiang S, Wang Y. Recombinant VP1 protein expressed in *Pichia pastoris* induces protective immune responses against EV71 in mice[J]. Biophys Res Commun, 2013, 430(1):387-393.
- [55] Zhang J, Dong M, Jiang B. et al. Antigenic characteristics of the complete and truncated capsidproteins VP1 of enterovirus 71[J]. Virus Res, 2012, 167(2):337-342.
- [56] Liu J, Zhao B, Xue L, et al. Immunization with a fusion protein vaccine candidate generated from truncated peptides of human enterovirus 71 protects mice from lethal enterovirus 71 infections[J]. Virol J, 2020, 17(1):1-9.

Progress in Pathogenesis and Immune Response of Enterovirus 71

SHI Meiyang, LU Caixia, DAI Jiejie

(Tree Shrew Germplasm Resource Center, Institute of Medical Biology,
Chinese Academy of Medicine Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Correspondence to: DAI Jiejie, dj@imbcams.com.cn

[Abstract] Enterovirus 71 (EV71) mainly infects humans through the gastrointestinal or respiratory tracts, which is one of the main pathogens of hand, foot and mouth disease. It can also cause neurological diseases such as neurogenic pulmonary edema and even death, threatening the safety of infants and young children. Although the whole-virus inactivated vaccine of EV71 has been marketed, the pathogenesis and immune response of complications caused by its infection have not been fully clarified. This article reviews the pathogenesis, immune response and immunogenicity response of EV71, which will pave the way for further research on EV71.

[Key words] Enterovirus 71; Pathogenesis; Animal experiment; Immune response

学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范（一）

国际医学期刊编辑委员会
2019年12月更新

[译者按] 国际医学期刊编辑委员会（International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE）于1978年首次发表《生物医学期刊投稿的统一要求》（*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*），之后作过多次修订。2013年8月修订时更名为《学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》（*Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals*），简称“ICMJE推荐规范”。本文是“ICMJE推荐规范”2019年12月更新版的中文译本，由《实验动物与比较医学》编辑部张俊彦、《法医学杂志》编辑部于笑天、《环境与职业医学》编辑部汪源翻译。ICMJE定期更新“ICMJE推荐规范”，因而于2020年10月完成的此中文译本不一定准确反映ICMJE网站发布的最新版本的内容。此译本的内容未经ICMJE审核和认定。“ICMJE推荐规范”正式的英文版本见 www.icmje.org。使用者应引用此正式版本。

I. 关于“推荐规范”

I.A. “推荐规范”的目的

I.B. “推荐规范”的使用者

I.C. “推荐规范”的历史沿革

II. 作者、贡献者、审稿人、编辑、出版者以及期刊所有者的职能和责任

II.A. 定义作者和贡献者的职能

II.A.1. 为什么作者署名很重要

II.A.2. 谁是作者

II.A.3. 作者之外的贡献者

II.B. 财务和非财务关系与活动以及利益冲突的申报

II.B.1. 参与者

II.B.1.a. 作者

II.B.1.b. 同行审稿人

II.B.1.c. 编辑与期刊工作人员

II.B.2. 报告关系与活动

II.C. 投稿和同行评议过程中的责任

II.C.1. 作者

II.C.1.a. 掠夺性期刊或假期刊

II.C.2. 期刊

II.C.2.a. 保密性

II.C.2.b. 时效性

II.C.2.c. 同行评议

II.C.2.d. 公正性

II.C.2.e. 多元性和包容性

II.C.2.f. 期刊计量指标

II.C.3. 同行审稿人

II.D. 期刊所有者和编辑自由

II.D.1. 期刊所有者

II.D.2. 编辑自由

II.E. 受试者保护

III. 与医学期刊论文发表相关的出版和编辑问题

III.A. 更正、发表后撤稿、再发表和版本管理

III.B. 学术不端、关注通告和发表后撤稿

III.C. 版权

III.D. 重复内容的发表

III.D.1. 一稿多投

III.D.2. 重复发表和预先发表

III.D.3. 可接受的再次发表

III.D.4. 基于相同数据库的稿件

III.E. 通信

III.F. 费用

III.G. 增刊、专刊和特刊

III.H. 赞助与合作

III.I. 电子出版

III.J. 广告

III.K. 期刊与媒体

III.L. 临床试验

III.L.1. 注册

III.L.2. 数据共享

IV. 稿件准备和投稿

IV.A. 准备稿件以向医学期刊投稿

IV.A.1. 一般原则

IV.A.2. 报告指南

IV.A.3. 稿件各部分

IV.A.3.a. 文题页

IV.A.3.b. 摘要

IV.A.3.c. 引言

IV.A.3.d. 方法

IV.A.3.d.i. 受试者的选择与描述

IV.A.3.d.ii. 技术信息

IV.A.3.d.iii. 统计学

IV.A.3.e. 结果

IV.A.3.f. 讨论

IV.A.3.g. 参考文献

IV.A.3.g.i. 总则

IV.A.3.g.ii. 类型与格式

IV.A.3.h. 表格

IV.A.3.i. 图

IV.A.3.j. 计量单位

IV.A.3.k. 缩写和符号

IV.B. 向期刊投稿

I. 关于“推荐规范”

I.A. “推荐规范”的目的

国际医学期刊编辑委员会 (International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE) 制定这份“推荐规范”是用于检查发表于医学期刊的研究工作及其他资料在实施和报告过程中的最佳实践及伦理标准, 帮助作者、编辑以及同行评议和生物医学出版过程中的其他人员创作和传播准确、清晰、可重复、无偏倚的医学期刊论文。这份“推荐规范”还有助于大众媒体、患者及其家属、普通读者更好地了解医学编辑和出版过程。

I.B. “推荐规范”的使用者

这份“推荐规范”首先旨在供可能将研究提交给 ICMJE 成员期刊发表的作者使用。很多非 ICMJE 成员期刊 (见 www.icmje.org/journals-following-the-icmje-recommendations/) 自愿使用这些推荐规范。ICMJE 鼓励这种使用但没有职权监督或者强制执行。在任何情况下, 作者都应当将这些推荐规范与具体期刊的作者须知一同使用。作者还应该参考具体研究类型的指南 (例如, 报告随机对照临床试验的 CONSORT 指南), 见 www.equator-network.org。

ICMJE 鼓励遵守这些推荐规范的期刊将它们纳入其作者须知中, 并在其中明确表示遵守“ICMJE 推荐规范”。想要在 ICMJE 网站列出刊名以表示遵守这些推荐规范的期刊, 可以通过 www.icmje.org/journals-following-the-icmje-recommendations/journal-listing-request-form/ 来告知 ICMJE 秘书处。过去这样做但现在不再遵守“ICMJE 推荐规范”的期刊, 应该用同样的方法请求从该名单中移除。

ICMJE 鼓励广泛传播这些推荐规范, 以及为教育、非营利目的复制本文件全文, 不必考虑版权问题。但是使用这些推荐规范和本文件时, 应指示作者到 www.icmje.org 获取正式的最新版本, 因为当有新的问题出现时, ICMJE 会定期更新“推荐规范”。

I.C. “推荐规范”的历史沿革

ICMJE 制定过本文件的很多版本, 以前被称为“生物医学期刊投稿的统一要求” (*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*, 简称 URM)。URM 首次发表于 1978 年, 以规范不同期刊之间稿件的格式和准备工作。多年来, 稿件准备之外的出版问题不断涌现。于是, ICMJE 又制定了一些“附加声明”并对该文件进行了更新, 将其更名为“学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范” (*Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals*), 从而反映其

更广泛的涵盖内容。本文以前的版本可以在 www.icmje.org 的 Archives 栏内找到。

II. 作者、贡献者、审稿人、编辑、出版者以及期刊所有者的职能和责任

II.A. 定义作者和贡献者的职能

II.A.1. 为什么作者署名很重要

作者署名是对作者身份的认可, 有重要的学术、社会和经济意义。作者署名还意味着对已发表研究的义务与责任。以下建议旨在确保将作者身份给予对文章有实质性智力贡献的人, 并且确保因其贡献而被确认为作者的人知晓他们对已发表的研究承担义务和责任。

由于作者署名并不传达某人贡献多大才能具有作者资格, 现在有些期刊要求获取并公开投稿中提到的每位研究参与者的具体贡献信息, 至少要求原创性研究这样做。强烈建议编辑制定并实施贡献者署名政策。这样的政策能消除很多有关贡献问题的不明确之处, 然而还是无法解决何种贡献的质和量才能确定某人具备作者署名资格的问题。ICMJE 于是制定了作者署名的标准, 这些标准可用于所有期刊, 包括那些区分作者和其他贡献者的期刊。

II.A.2. 谁是作者

ICMJE 建议作者署名要同时符合以下 4 条标准:

(1) 对研究的思路或设计有重要贡献, 或者为研究获取、分析或解释数据;

(2) 起草研究论文或者在重要的知识性内容上对论文进行关键性修改;

(3) 对将要发表的版本进行最终定稿;

(4) 同意对研究工作的各个方面承担责任, 以确保与论文任何部分的准确性或诚信有关的质疑得到恰当的调查和解决。

除了对他或她自己完成的那部分工作负责外, 作者还需要知道哪个共同作者为研究工作的其他哪个具体部分负责。另外, 作者应该相信其共同作者为该研究所做工作的诚信。

所有被指定为作者的人都应该满足作者署名的 4 条标准, 而所有满足以上 4 条标准者也都应该被确定为作者。未满足全部 4 条标准者应该被致谢, 见下文 II.A.3 节。这些作者署名的标准旨在使那些应该得到认可且能够为研究工作承担责任的人被署名为作者, 而不是通过剥夺实现上述第 2 或第 3 条标准的机会, 取消本来满足作者署名标准的合作者的作者署名资格。因此, 所有符合第 1 条标准者都应该有机会参与稿件的审阅、起草以及最终定稿。

实施研究工作的人有责任确定谁符合上述作者署名标准。理想的情况是在制定研究计划的时候就应该

做到这一点,而后随着工作的进展进行相应调整。我们鼓励与研究所在单位的同事进行合作和共同署名论文。确定所有署名的作者都能满足上述4条标准是作者们的共同责任,而不是所投期刊的责任;决定谁不够资格被署名为作者或仲裁作者署名矛盾不是期刊编辑的工作。如果无法就谁符合作者署名资格达成一致,则应该要求研究工作实施单位而非期刊编辑进行调查。用于确定作者署名顺序的标准可能各有不同,须由作者共同决定,而非编辑。如果作者在投稿或稿件发表后要求删除或添加某个作者,期刊编辑应当要求作者给出解释,并得到所有署名作者以及将要被删除或添加的作者同意变动的签字声明。

通信作者是在投稿、同行评议及出版过程中主要负责与期刊联系的人。一般来说,通信作者负责确保所投稿件完全达到期刊的管理要求,诸如提供作者署名的详细信息、伦理委员会审批文件、临床试验注册相关文件以及关系和活动申报信息,虽然这些任务可以分配给其他一位或几位共同作者。通信作者在整个投稿和同行评议过程中应当能及时回答编辑的问题,在论文发表后应及时回复对研究工作的评论。文章发表后一旦受到质疑,期刊会要求提供原始资料或其他信息,通信作者要积极配合。虽然通信作者主要负责与期刊的联系,但ICMJE建议编辑将所有的通信发送给全部署名作者。

如果研究工作是由众多作者组成的大型团队实施,理想的情况是这个团队在研究开始前就决定谁将成为作者,并且在投稿给期刊发表前确定作者名单。所有署名为作者的团队成员都应当满足作者署名的全部4条标准,包括对稿件的最终定稿;他们应当能对研究工作承担公共责任,并且完全信任团队内其他作者所承担工作的准确性和诚信。他们还应各自填写关系和活动申报表。

一些多作者组成的大型团队仅将作者署名为团队名称,或署以团队名称加上各个作者的姓名。提交以团队为作者的稿件时,如果有团队名称,则通信作者应确定团队的具体名称,明确指定哪些团队成员能够获得作者身份认可并为研究工作承担责任。论文的署名行要能看出谁对稿件直接负责。MEDLINE将所有出现在署名行的姓名列作为作者。如果署名行包含团队名称,特别是如果署名行有注释明确说明团队各成员姓名见文章其他部分,且说明这些人是作者还是合作者,那么MEDLINE会列出每个团队成员的姓名,无论他们是作者还是合作者,有时这些合作者被称为作者之外的贡献者。

II.A.3. 作者之外的贡献者

有贡献但只满足部分而非全部上述4条作者署名

标准者,不应被列为作者,但他们应当被致谢。仅有以下贡献(无其他贡献)的贡献者不可获得作者署名资格:筹得研究资金;对研究团队进行普通监督或提供一般性的管理支持;协助写作,技术编辑,语言编辑及校样修改。可以对那些贡献不达作者署名资格者逐一致谢,或列在单个小标题(如“临床调查者”或“参与调查者”)下一起致谢,应具体说明他们的贡献(如“出任科学顾问”“审阅研究方案并提出意见”“收集资料”“为研究提供病例并照顾患者”“参与稿件的写作和技术编辑”)。

致谢可能意味着被致谢人认可研究的数据及结论,因此建议编辑要求通信作者取得所有被致谢人同意被致谢的书面许可。

II.B. 财务和非财务关系与活动以及利益冲突的申报

公众对科学研究过程的信任和已发表论文的可信度,部分取决于在科学研究工作的计划、实施、写作、同行评议、编辑和出版过程中,对直接或看似与研究工作相关的作者关系和活动的处理是否透明。

当对主要利益(如患者的福利或研究的可靠性)的专业判断可能被次要利益(如经济收益)影响时,就说明有潜在利益冲突或偏倚。觉察的利益冲突与实际的利益冲突同等重要。

对于作者的关系或活动是否代表利益冲突,每个人可能持不同意见。虽然某种关系或活动的存在并不一定表示其对论文内容的影响存在问题,但是与实际的利益冲突一样,觉察的利益冲突也可能削弱对科学研究的信任。归根结底,读者必须能够独立判断作者的关系和活动是否与论文内容有关。做出这些判断要求信息公开透明。作者的完全公开表示其恪守信息透明承诺,并有助于维护对科研过程的信任。

经济关系(如雇佣、顾问、股权或期权、酬金、专利以及有偿的专家证言)是最容易确认、最常见的利益冲突,也最有可能损害期刊、作者及科学本身的可信度。其他利益也可能代表或被认为是冲突,比如人际关系或对手间的竞争、学术竞争以及学术信仰等。

如果研究资助者会干扰作者获得全部研究数据,或者干扰他们独立地分析和阐释数据,撰写文稿,以及选择在何时何处发表论文,则作者应该避免与其签订协议,无论它们是营利还是非营利的机构。规定作者向何处发表研究成果的做法违背学术自由的原则。期刊可能会要求作者提供这类保密协议。

正如III.B节中所述,故意不报告期刊申报表中所述关系或活动是一种不端行为。

II.B.1. 参与者

所有同行评议和出版过程的参与者——不仅是作

者,还有期刊的同行审稿人、编辑和编委会成员——在审稿和论文发表的过程中履行其职责时必须考虑并公开其关系和活动。

II.B.1.a. 作者

作者投稿时,无论稿件类型或格式如何,他们均有责任公开所有可能或被认为使其研究工作产生偏倚的各种关系和活动。ICMJE 制定了一份《申报表》以方便和规范作者公开关系和活动。ICMJE 成员期刊要求作者使用这份表格,ICMJE 也鼓励其他期刊采用这份表格。

II.B.1.b. 同行审稿人

编辑在邀请审稿人审稿的时候应询问他们是否存在可能影响其审稿的关系和活动。审稿人必须向编辑公开任何可能使他们对稿件产生偏见的关系和活动,只要有产生偏见的可能,审稿人就应该主动回避,不审阅该稿件。审稿人不得在其所审阅的稿件发表前利用其中的知识为自己谋利。

II.B.1.c. 编辑与期刊工作人员

如果对稿件作终审决定的编辑与他们正在处理的论文之间存在引发潜在利益冲突的关系或活动,则编辑应主动回避,不参与编辑决定。编辑部的其他成员如果也参与编辑决定,必须向编辑提供关于其现有关系或活动的陈述(因为这可能与编辑决定有关),主动回避任何与他们有潜在冲突的决定。编辑人员不得利用处理稿件时获得的信息谋取私利。编辑和期刊工作人员应定期发布自己的关系与活动公开声明。特邀编辑同样应当遵循这些程序。

期刊应该采取额外的防范措施,并有一个明确的政策用于评估参与编辑决定者提交的稿件。更进一步的指南可以从出版伦理委员会(Committee on Publication Ethics, COPE; 网址: https://publicationethics.org/files/A_Short_Guide_to_Ethical_Editing.pdf)和世界医学编辑学会(World Association of Medical Editors, WAME; 网址: <http://wame.org/conflict-of-interest-in-peer-reviewed-medical-journals>)处获得。

II.B.2. 报告关系与活动

论文发表时应有声明或辅助文件(如 ICMJE 的申报表)说明如下全部内容:

(1) 作者的关系和活动。

(2) 研究工作的资助来源,包括资助者名称以及对资助者在以下方面所起作用的解释:研究的设计,数据的收集、分析和解释,报告的撰写,对投稿发表研究报告的限制;或者声明资助者没有参与这些工作或对文章发表施加限制。

(3) 作者是否获得了研究数据,并解释获取途径的性质和获取范围,以及是否可持续获取。如

果研究受到资助,且资助者拥有研究结果的所有权或者能从研究结果中获取经济利益,则为了支持前述声明,编辑可以要求该研究的作者签署一份声明,如“我得到了本研究的全部数据,我对数据的完整性和数据分析的准确性负全部责任。”

II.C. 投稿和同行评议过程中的责任

II.C.1. 作者

作者应遵守有关作者署名以及公开关系和活动的准则,详见本文件 II.A 及 II.B 节。

II.C.1.a. 掠夺性期刊或假期刊

越来越多的单位宣传自己是“医学学术期刊”,而实际上并没有医学学术期刊的功能。这些期刊(“掠夺性期刊”或“假期刊”)录用并发表几乎所有的投稿,并在发给作者录用通知后,才告知收取文章处理费(或发表费)。他们通常声称实行同行评议,实际上却并非如此。他们可能会故意给期刊取一个与公认的好期刊相似的刊名。他们可能会声明自己是 ICMJE 的成员,实际上却并不是(ICMJE 当前成员详见 www.icmje.org);他们也可能声明遵守 ICMJE、COPE 和 WAME 等组织制定的规范。研究人员必须意识到这些期刊的存在,避免向他们提交研究论文。作者有责任评估其投稿期刊的诚信、来历、做法和声誉。来自不同组织的指导有助于识别声誉良好的同行评议期刊的特征(详见 www.wame.org/identifying-predatory-or-pseudo-journals 和 www.wame.org/about/principles-of-transparency-and-best-practice),也可向科研导师、资深同事和有多年学术论文发表经验的其他人求助。

作者应避免引用掠夺性期刊或假期刊上的文章。

II.C.2. 期刊

II.C.2.a. 保密性

期刊的投稿是特许保密通信,是作者的私有保密财产,过早泄露稿件的任何或全部细节都可能损害作者的利益。

因此,除作者及审稿人外,编辑不得与任何人分享稿件的信息,包括稿件是否被接收和送审、稿件内容、审稿进程、审稿人的意见以及稿件的最终结局。编辑应礼貌地拒绝第三方因法律程序使用稿件和审稿意见的要求,即使收到法院传票,编辑也应尽力避免提供这样的保密资料。

编辑必须明确告知审稿人,他们应该对稿件、相关材料以及其中包含的信息严格保密。在稿件发表之前,审稿人和编辑人员不得公开讨论作者的研究工作,审稿人不得盗用作者的思想。审稿人不得保留稿件供其个人使用,在提交审稿意见之后,应

当销毁稿件纸质版并删除电子版。

如果稿件被拒,期刊最好在其编辑系统中将稿件副本彻底删除,除非当地有规定要求保留。保留被拒稿件的期刊应在其作者须知中公告这种做法。

如果稿件已发表,期刊应保留原始投稿、审稿意见、修改稿以及通信至少3年,如果可能的话应永久保存,这取决于当地的规定,将来一旦出现针对此研究的问题,则会有助于问题的解答。

编辑不能未经审稿人和作者允许发表或公开同行审稿人的意见。如果期刊的政策是不告知作者审稿人身份且审稿人不在审稿意见上签名,则未经审稿人书面许可,不得向作者或其他任何人透露审稿人的身份。

若断定有不诚实或欺诈行为,则可能不得不打破保密性原则。不过,一旦编辑打算这样做,就应该通知作者或审稿人,否则仍必须履行保密性原则。

II.C.2.b. 时效性

编辑应竭尽所能利用其现有资源确保稿件得到及时处理。如果编辑有意发表某篇稿件,则应尽力及时发表,如有计划延迟,则应与作者协商。如果期刊无意处理某篇稿件,编辑应尽快拒稿,以便作者改投他刊。

II.C.2.c. 同行评议

同行评议通常由编辑人员之外的专家对投给期刊的稿件进行批评性的评价。公平的、独立的、批评性的评价是包括科学研究在内的一切学术工作的一个内在的组成部分,因此,同行评议是科学研究过程的重要延伸。

尽管对同行评议的实际价值争论颇多,但同行评议过程使得稿件在科学界学者中得到公平审理。更为实际地说,它能帮助编辑决定哪些稿件适合他们的期刊发表。同行评议常能帮助作者和编辑改进报告的质量。

期刊有责任建立能确保挑选合适审稿人的系统。编辑有责任确保审稿人可以获取与稿件评审可能相关的所有材料,包括只供在线发表的补充材料,并确保在审稿人声明其关系和活动的情况下正确评估和解释其审稿意见。

同行评议期刊没有义务将投稿送审,也没有义务遵循审稿人的意见,无论审稿意见是正面的还是负面的。期刊编辑最终负责期刊全部内容的选择,而编辑所作决定的依据可以是与稿件质量无关的问题,如是否适合期刊发表等。编辑可在发表前的任何时间拒绝任何一篇论文,包括录用后因发现研究工作存在诚信问题而拒稿。

每种期刊送审稿件的数量和种类,为每一篇稿件选择审稿人的数量和类型,审稿过程是否为盲

审,以及审稿过程的其他方面都可能有所不同。基于此原因以及出于对作者的服务,期刊应公开说明其同行评议过程。

期刊应告知审稿人最终决定是接受还是拒稿,并应感谢同行审稿人对期刊所做的贡献。建议编辑告知审稿人其他审稿人对同一篇文章的意见,以便他们能在审稿过程中互相学习。

作为同行评议的一部分,建议编辑审查研究方案、没有包含在研究方案中的统计分析计划,或与具体研究项目相关的合同。在录用涉及这类情况的研究论文之前,编辑应鼓励作者在发表时或发表后公开此类文件。有些期刊可能把要求公开这些文件作为录用的条件。

在此次修订“推荐规范”期间,期刊对独立分析数据及公开数据的要求也在变化,反映出有关数据获取对出版前和出版后同行评议的重要性的观念在不断进步。当前有些期刊编辑要求在接爱论文发表之前有独立的生物统计学家对临床试验数据进行统计分析,有些则要求作者说明研究数据是否可供第三方查看、使用和再分析,还有一些则鼓励或要求作者与他人共享他们的数据用于回顾和再分析。每种期刊都应制定和公开其关于数据分析的具体要求,并在其潜在作者能轻易获取的地方发布。

有人认为文章发表的那天,真正科学的同行评议才刚刚开始。基于此种理念,医学期刊应建立让读者对已发表论文评论、质疑或批评的机制,作者有责任进行恰当的回复。文章发表后一旦受到质疑,期刊会要求作者提供数据或其他信息,作者要配合(见第III章)。

ICMJE认为研究人员有义务保存已发表的结果的原始数据和分析过程至少10年。ICMJE鼓励将这些资料保存在资料库中以保证它们长期可用。

II.C.2.d. 公正性

编辑的决定应建立在稿件与期刊的相关性以及稿件的原创性、质量及其对重要问题的贡献上。这些决定不应被商业利益、人际关系或个人目的、阴性结果或合理挑战既定认知的结果所影响。此外,对于结果没有统计学意义或没有确定结论的研究,作者也应该投稿发表或通过其他途径公开,而编辑亦不应该不考虑发表。这些研究提供的证据,结合通过meta分析得到的其他研究的证据,可能仍会有助于回答一些重要问题。记录并公开此类阴性结果或无明确结论的研究,可避免其他正在考虑相似研究的研究者进行徒劳的重复,对他们也是有价值的。

期刊应清楚地说明其申诉流程并具备回复申诉与投诉的系统。

II.C.2.e. 多元性和包容性

为提升学术文化,编辑应当多方谋求并广纳他人建言,诸如作者、审稿人、编辑人员、编委会成员、读者。

II.C.2.f. 期刊计量指标

期刊影响因子被广泛误用作研究和期刊质量的代名词。同时,期刊影响因子还被用于衡量特定研究项目的重要性或研究人员个人的学术水平,包括他们是否适合获得聘用、晋升、任期、奖金或研究经费。ICMJE 建议期刊不要将影响因子作为单一度量,而是应该为其读者和作者提供一系列文章和期刊计量指标。

II.C.3. 同行审稿人

期刊的投稿是特许保密通信,是作者的私有保密财产,过早泄露稿件的任何或全部细节都可能损害作者的利益。

因此,审稿人应该对稿件及其中包含的信息严格保密。在稿件发表之前,审稿人不得公开讨论作者的研究工作,不得盗用作者的思想。审稿人不得将稿件留作私用,在提交审稿意见之后,应当销毁稿件副本。

在审稿过程中,审稿人若寻求实习生或同事的帮助,应在提交给编辑的书面审稿意见中感谢他们的贡献。如上文所述,这些人也必须对稿件内容保密。

审稿人应及时回复审稿邀请,在规定时间内提交评审意见。审稿意见应有建设性、诚实、礼貌。

审稿人应公开可能影响其公正审稿的关系和活动,如果存在冲突,应该主动回避,不参与同行评议过程。

II.D. 期刊所有者和编辑自由

II.D.1. 期刊所有者

医学期刊所有者与编辑拥有共同目标,但职责有别,有时这些差别会导致冲突。

医学期刊所有者有权聘任和辞退编辑。期刊所有者在聘任编辑时要有合同,合同上应明确说明编辑的权利和职责、职权、聘任的一般条款,以及解决冲突的机制。评价编辑的工作表现可采用双方商定的办法,其内容包括但不限于读者群、投稿量和处理稿件的次数,以及各种期刊计量指标。

期刊所有者基于以下重要原因才能解雇编辑,例如学术不端行为、在期刊长远的编辑宗旨上存在分歧、商定的绩效指标考核不达标,或与其重要职位不匹配的不当行为。

编辑的聘用和解雇应基于独立专家小组的评估,而非由期刊所属机构的少数行政人员决定。这在解雇编辑时尤为必要,因为社会对科学界言论自由高

度重视,而且编辑的职责通常使其以可能与期刊所有者的利益产生冲突的方式挑战常规。

医学期刊应该清晰地说明其管理方式及其与期刊所有者(例如主办期刊的学会)的关系。

II.D.2. 编辑自由

ICMJE 采纳 WAME 关于编辑自由的定义(<http://wame.org/editorial-independence>)。该定义认为主编可以全权决定其期刊的全部编辑内容及其发表时间。期刊所有者不应干涉任何一篇论文的评价、选择、处理进度和编辑,不论是直接干涉还是通过制造某种环境来严重影响编辑的决定。编辑的决定应该以研究工作的有效性及其对期刊读者的重要性为基础,而不应基于期刊的商业利益。编辑应能自由且负责任地对医学各方面表达批评意见,而不用担心遭受报复,即使这些意见与出版者的商业目标相左。

主编还应当对期刊刊登或不刊登何种广告或者推广内容,包括是否出版增刊,拥有最终话语权,对期刊商标使用和期刊内容商业使用的总体方针拥有最终话语权。

建议期刊组建独立且多元的编辑顾问委员会来帮助编辑建立和维护编辑政策。为了支持编辑的决定和可能引起争议的观点的表达,期刊所有者应确保在出现针对编辑的法律诉讼时编辑能获得妥善的保障,并确保在需要的时候提供法律咨询。如果出现法律问题,编辑应尽快通知他们的法律顾问,以及期刊所有者和出版单位。按照 ICMJE 的规定(见 II.C.2.a 节),编辑应捍卫作者和同行审稿人的保密权(姓名及审稿人的意见)。编辑应采取一切合理措施核实期刊评论文章中的事实,包括新闻报道版面的内容以及在社会媒体中的报道,并确保所有为期刊工作的人员坚守最佳的新闻实践,包括现场记录以及在发表前尽可能谋求各方回复。此类维护事实和公众利益的实践对于防范诽谤的法律指控可能尤为必要。

为了在实际工作中保护编辑自由,编辑应该可以直接接触期刊所有方的最高层,而不是委派的经理或行政人员。

编辑和编辑组织有义务维护编辑自由的理念,并引导国际医学界、学术界和非专业社团关注严重违反编辑自由的事件。

II.E. 受试者保护

所有研究人员应当确保人体研究的实施计划和报告符合 2013 年修订的《赫尔辛基宣言》(www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/)的要求。所有作者都应当征求独立的

方、区域或国家审查机构（例如，伦理委员会、机构审查委员会）批准其实施研究。如果研究的实施是否符合《赫尔辛基宣言》的要求受到质疑，则作者必须解释采用其研究方法的理由，并证明地方、区域或国家审查机构已明确批准了受到质疑的那部分研究。审查机构的批准并不妨碍编辑对研究的实施是否恰当做出他们自己的判断。

患者有隐私权，不应在没有知情同意的情况下受到侵犯。可辨认身份的信息，包括姓名和其首字母缩写，或住院号，都不应在书面描述、照片或遗传谱系中公开，除非该信息对于科学研究必不可少，并且患者（或其父母或监护人）签署知情同意书，同意发表。出于此目的签署知情同意书时，要求将准备发表的稿件让身份可识别的患者过目。作者应该向这些患者公开，论文发表后是否还有其他可能识别身份的材料会出现在互联网上或印刷品中。患者的同意必须是书面的，并要依照当地的法律或规定，或由期刊存档，或由作者存档，或双方都存档。相关的法律各地不同，期刊应依法制定自己的规定。由于存档知情同意书的期刊将会知晓患者的身份，有些期刊认为知情同意书由作者存档会使患者的隐私

得到更好的保护，作者只需向期刊提供一份书面声明，证实他们收到并存档了患者的知情同意书。

应省略非必要的能识别患者身份的细节。只要对匿名性有任何疑问，就应该获得知情同意。例如，遮蔽患者照片中的眼部不足以保护患者不被认出。如果对身份识别特征作了“去识别”处理，则作者应该保证且编辑也应注明，这种更改不会歪曲科学意义。

期刊的作者须知中应该包括对知情同意的要求。如果已取得知情同意，应在发表的论文中说明。

报告动物实验时，作者应该说明是否遵循了单位和国家有关实验动物管理和使用的规定。动物研究伦理指南详见国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》(<http://www.veteditors.org/consensus-author-guidelines-on-animal-ethics-and-welfare-for-editors>)。

（待续）

（张俊彦、于笑天、汪源译。本文的翻译符合 ICMJE 的规定。感谢 *Journal of Integrative Medicine* 执行主编周庆辉教授为此提供的帮助）

Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals

International Committee of Medical Journal Editors

Updated in December 2019

[Translators' Commentary]

The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) first published its formal document of “*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*” (URM) in 1978, and has since made several revisions. The URM was renamed “*Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals*” (ICMJE Recommendations) in August 2013. This text is a Chinese language translation of the ICMJE Recommendations updated December 2019. Junyan Zhang from the Editorial Office of the *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, Xiaotian Yu from the Editorial Office of the *Journal of Forensic Medicine*, and Yuan Wang from the Editorial Office of the *Journal of Environmental and Occupational Medicine* prepared this translation. The ICMJE periodically updates the ICMJE Recommendations, so this translation prepared in October 2020 may not accurately represent the current official version at www.icmje.org. The ICMJE has not endorsed nor approved the contents of this reprint/translation. The official version of ICMJE Recommendations is located at www.icmje.org. Users should cite this official version when citing the document.