

中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

月刊 1993 年 6 月创刊

第 30 卷 第 5 期 2022 年 9 月 30 日出版

目次

研究报告

- H1N1 病毒感染树鼯模型的血清代谢组学研究
..... 吴芳芳,李太平,方衡,罕园园,谭梳恩,张孟丽,林浩,何艳梅,欧敏,金亮子,代解杰,王喜军(597)
- 探讨不同浓度 Matrigel 对小鼠 Lewis 肺癌异位皮下移植瘤的影响.....
..... 邢淑雁,晋一帆,王含雪,孙竹筠,孙启慧,刘孝云,叶冬雪,宫宁远,李正昊,杨勇,容蓉(606)
- 四神丸对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 TLR4、NOD2 表达的影响 何兰娟,邓渊,王燕,朱向东(613)
- 基于转录组测序研究 *CatSper1* 在版纳微型猪近交系睾丸组织中的转录调控特征
..... 张霞,王配,刘志朋,霍海龙,代红梅,赵筱,霍金龙(619)
- 骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达对小鼠运动能力和糖耐量的影响..... 严露,张纓(629)
- 和厚朴酚对心肌梗小鼠的心肌保护作用研究 江丽青,张溧昀,师恒,杨家昌,刘金成,段维勋(639)
- 白藜芦醇改善 α -突触核蛋白 A53T 转基因小鼠运动功能障碍和调节外周免疫的作用研究
..... 冯胜蓝,孙晓东,谢丽霞,叶俊杰,覃冰清,许倩倩,杜凯丽,王敏,桑明(646)
- 布鲁氏菌外膜蛋白 OMP25 诱导 BALB/c 小鼠免疫反应的分析 王书利,李志强,魏淑娟,司丽芳(655)
- 蛭螬肽提取物对铅致小鼠肾中毒的解毒保护作用机制研究
..... 李子莹,吴琮,张华,温海京,张鑫玉,张永红,沈红,崔德凤(662)
- 芍药苷通过激活 LKB1/AMPK 信号通路对急性脑梗死大鼠神经损伤的保护作用
..... 赵霞,薛娣,师少军(671)
- SMA 模型小鼠骨髓间充质干细胞体外培养体系的建立 陈志衡,吴刘成,景谨,朱顺星(679)

研究进展

- 啮齿类实验动物行为学视觉测量方法 程天,姚泰康,索玲格,张顿,张纯(686)
- 慢性阻塞性肺疾病啮齿类动物模型与评估方法的研究进展
..... 李静,张利英,雍文兴,张苡铭,李洋洋,周谷城,牛帆,李高勤(692)
- 大小鼠焦虑行为实验方法概述 姜宁,姚彩虹,叶帆,孙秀萍,刘新民(698)

模式生物斑马鱼在植物多糖生物活性评价中的应用进展 尹娜,陈秋燕,王瑞芳,齐景伟,王国(705)

胰腺癌小鼠模型研究进展 苗晋鑫,张钟允,王峥,宋韶鹤(713)

基于免疫检查点抑制剂靶向胰腺癌微环境的联合免疫治疗策略 雷静玉,罗宝花,赵菊梅,师长宏(720)

超声微泡技术在动物实验的应用 王佩瑶,王灿,孙瑶琪,秦杨阳,黄猛(727)

广告 (封二、封底、内插)

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

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Monthly, Established in June 1993

Volume 30, Number 5, September, 2022

CONTENTS

- Serum metabolomics study of a tree shrew model of H1N1 influenza virus infection
..... WU Fangfang, LI Taiping, FANG Heng, HAN Yuanyuan,
TAN Zhien, ZHANG Mengli, LIN Hao, HE Yanmei, OU Min, JIN Liangzi, DAI Jiejie, WANG Xijun (597)
- To investigate the effect of different concentrations of Matrigel on ectopic subcutaneous transplanted tumor of Lewis
lung cancer in mice XING Shuyan, JIN Yifan, WANG Hanxue, SUN Zhuyun,
SUN Qihui, LIU Xiaoyun, YE Dongxue, GONG Ningyuan, LI Zhenghao, YANG Yong, RONG Rong (606)
- Effect of Sishen pills on the expression of TLR4 and NOD2 in a rat colon with ulcerative colitis
..... HE Lanjuan, DENG Yuan, WANG Yan, ZHU Xiangdong (613)
- Transcriptional regulation characteristics of *CatSper1* in testis of Banna mini-pig inbred line based on transcriptome
sequencing
ZHANG Xia, WANG Pei, LIU Zhipeng, HUO Hailong, DAI Hongmei, ZHAO Xiao, HUO Jinlong (619)
- Effect of overexpression of the skeletal muscle-specific *Chrono* gene on exercise capacity and glucose tolerance in
mice YAN Lu, ZHANG Ying (629)
- Study on myocardial protective effect of honokiol in mice after acute myocardial infarction
..... JIANG Liqing, ZHANG Liyun, SHI Heng, YANG Jiachang, LIU Jincheng, DUAN Weixun (639)
- Effect of resveratrol on motor dysfunction and peripheral immunity in α -synuclein A53T mice
..... FENG Shenglan,
SUN Xiaodong, XIE Lixia, YE Junjie, QIN Bingqing, XU Qianqian, DU Kaili, WANG Min, SANG Ming (646)
- Immune responses of BALB/c induced by *Brucella melitensis* outer membrane protein OMP25
..... WANG Shuli, LI Zhiqiang, WEI Shujuan, SI Lifang (655)
- Detoxification and protection mechanism of grub peptide extract on lead-induced nephrotoxicity in mice
..... LI Zixuan,
WU Qiong, ZHANG Hua, WEN Haijing, ZHANG Xinyu, ZHANG Yonghong, SHEN Hong, CUI Defeng (662)
- Protective effect of paeoniflorin on nerve injury in rats with acute cerebral infarction by activating the LKB1/AMPK

signaling pathway	ZHAO Xia, XUE Di, SHI Shaojun(671)
An <i>in vitro</i> culture system for bone marrow mesenchymal stem cells in a mouse SMA model	CHEN Zhiheng, WU Liucheng, JING Jin, ZHU Shunxing(679)
Behavioral measurements of visualization in rodent laboratory animals	CHENG Tian, YAO Taikang, SUO Lingge, ZHANG Di, ZHANG Chun(686)
Progress in the evaluation for chronic obstructive pulmonary disease using a rodent model	LI Jing, ZHANG Liying, YONG Wenxing, ZHANG Yiming, LI Yangyang, ZHOU Gucheng, NIU Fan, LI Gaoqin(692)
Overview of animal behavioral tests of anxiety	JIANG Ning, YAO Caihong, YE Fan, SUN Xiuping, LIU Xinmin(698)
Progress in the application of model organism zebrafish in the evaluation of plant polysaccharide bioactivity	YIN Na, CHEN Qiuyan, WANG Ruifang, QI Jingwei, WANG Yuan(705)
Advances in mouse models of pancreatic cancer	MIAO Jinxin, ZHANG Zhongyun, WANG Zheng, SONG Shaohe(713)
Combined immunotherapy using immune checkpoint inhibitors targeting the microenvironment of pancreatic cancer	LEI Jingyu, LUO Baohua, ZHAO Jumei, SHI Changhong(720)
Application of ultrasound-stimulated microbubbles in zoopery	WANG Peiyao, WANG Can, SUN Yaoqi, QIN Yangyang, HUANG Meng(727)

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

Institute of Laboratory Animal Sciences,

Chinese Academy of Medical Sciences

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Managing Editor

DONG Lingying(董令赢)

Editing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Publishing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Distributor

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021

Tel: 010-67779337

Fax: 010-67770690

E-mail: bjb@cnilas.org

<http://zgswdw.cnjournals.com/sydwbybjyx/ch/index.aspx>

CSSN

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

Copyright 2022 by the Chinese Association for Laboratory
Animal Sciences

吴芳芳,李太平,方衡,等. H1N1 病毒感染树鼩模型的血清代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 597-605.
Wu FF, Li TP, Fang H, et al. Serum metabolomics study of a tree shrew model of H1N1 influenza virus infection [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 597-605.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.001

H1N1 病毒感染树鼩模型的血清代谢组学研究

吴芳芳^{1#}, 李太平^{1,2#}, 方衡², 罕园园³, 谭梈恩¹, 张孟丽¹, 林浩², 何艳梅^{1,2}, 欧敏¹,
金亮子³, 代解杰^{3*}, 王喜军^{1,2*}

(1. 广西壮族自治区药用植物园, 西南濒危药材资源开发国家工程实验室, 南宁 530023; 2. 黑龙江中医药大学, 中医方证代谢组学研究中心, 哈尔滨 150040; 3. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

【摘要】 目的 基于 UPLC-Q/TOF-MS 研究 H1N1 病毒感染树鼩动物模型的血清代谢特征。**方法** H1N1 病毒滴鼻法制备感染树鼩动物模型, 测量病毒载量和抗体血抑制滴度, 进行肺组织的病理学检查, 采集树鼩血清样本并进行非靶向代谢组学研究。**结果** 模型制备第 3 ~ 7 天, 体温和病毒载量逐渐达峰, 多变量统计分析发现 H1N1 病毒感染树鼩血清中 24 个差异离子, 它们导致磷脂酰胆碱代谢、鞘脂代谢、花生四烯酸代谢等代谢紊乱。**结论** 本研究首次发现 H1N1 病毒感染树鼩模型的代谢特征, H1N1 病毒感染树鼩模型紊乱的代谢与炎症反应有关。

【关键词】 流感; 树鼩; 代谢组学; 炎症反应; 机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0597-09

Serum metabolomics study of a tree shrew model of H1N1 influenza virus infection

WU Fangfang^{1#}, LI Taiping^{1,2#}, FANG Heng², HAN Yuanyuan³, TAN Zhien¹, ZHANG Mengli¹, LIN Hao², HE Yanmei^{1,2},
OU Min¹, JIN Liangzi³, DAI Jiejie^{3*}, WANG Xijun^{1,2*}

(1. National Engineering Laboratory for the Development of Southwestern Endangered Medicinal Materials, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China. 2. National Chinmedomics Research Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040. 3. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118)

Corresponding author: DAI Jiejie. E-mail: dj@imbcams.com.cn; WANG Xijun. E-mail: xijunw@sina.com

【Abstract】 Objective The serum metabolic characteristics of a tree shrew model of H1N1 influenza virus infection were studied by UPLC-Q/TOF-MS. **Methods** The H1N1 virus nasal drip method was used to prepare the tree shrew model. Then, the viral load and antibody hemostatic titer were measured. Pathological examination of the lung tissue was performed, and tree shrew serum samples were collected for untargeted metabolomics research. **Results** From day 3 to 7 of model preparation, the body temperature and viral load in the infected tree shrews peaked. Multivariate statistical analysis

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (82003932), 广西科技计划项目 (2018JJB140057, AD18126013), 中央引导地方科技创新基地建设类项目 (桂科 ZY21195044), 广西八桂学者项目, 广西药用植物园创新团队项目 (桂药创 2019001)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82003932), Guangxi Science and Technology Plan Project (2018JJB140057, AD18126013), the Central Government Guides Local Science and Technology Development Fund Projects (ZY21195044), the "Ba Gui Scholars" Program of Guangxi, Innovation Team Project of Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants (2019001)。

【作者简介】 吴芳芳 (1982—), 女, 博士, 研究方向: 中药药效物质基础研究。Email: wfftn@163.com;

李太平 (1995—), 男, 博士, 研究方向: 中药质量标记物研究。Email: 1319797933@qq.com。

#共同第一作者

【通信作者】 代解杰 (1961—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型建立与应用研究。Email: dj@imbcams.com.cn;

王喜军 (1961—), 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究。Email: xijunw@sina.com。

* 共同通信作者

found 24 differential ions in the serum of tree shrews infected with the H1N1 virus, which led to metabolic disorders such as phosphatidylcholine metabolism, sphingolipid metabolism, and arachidonic acid metabolism. **Conclusions** This study defined for the first time the metabolic characteristics of H1N1 virus-infected tree shrews, and provided evidence that the disordered metabolism in this animal model was related to inflammation.

【Keywords】 influenza; tree shrew; metabolomics; inflammatory response; mechanisms

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

流感是一种流感病毒引起的丙类传染性疾病,主要以打喷嚏和咳嗽为传染途径的春夏秋冬季节多发性疾病,疾病表现为发热、乏力、肌肉酸痛、头痛、咳嗽及轻微的呼吸系统症状,流感病毒具有较强的传播和感染能力,危险人群为免疫低下的儿童和老年,严重者导致病毒性肺炎和呼吸衰竭,流感病毒可感染呼吸道的所有各类细胞,并能在其内复制,其致病的主要机制是病毒复制引起的细胞损伤及死亡^[1-4]。

树鼩是一种形似松鼠、吻部较长的小型哺乳动物,是树鼩科树鼩属动物,主要分布于南亚、东南亚及我国南部等地区,由于树鼩全基因组有超过 90% 与灵长类动物相似,并且近似于人类的组织解剖结构、生理生化 and 免疫学等生物特征,因此在病毒、肿瘤、神经、代谢等疾病研究具有强大的应用潜力和应用价值^[5-6]。

代谢组学是系统生物学的重要组成部分,凭借高通量和高灵敏的分析仪器洞悉生物体的代谢变化,目前,代谢组学技术被广泛用于医药作用评价,食品安全和环境污染监测^[7-9]。基于此,本研究应用代谢组学方法分析 H1N1 病毒感染树鼩模型的代谢变化,阐述病毒研究的理想动物—树鼩的代谢网络,发现其生物标记物,为 H1N1 流感病毒早期诊治及药物筛查提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只 2 ~ 3 周岁普通级 *Tupaia Belangeri Chiensis* 雄性树鼩,体重 120 ~ 140 g,来自中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心【SCXK(滇)K2018-0002】,实验在中国医学科学院医学生物学研究所进行【SYXK(滇)K2018-0002】,饲养条件:饲养室为普通环境动物隔离室;设定温度 20 ~ 25℃;设定相对湿度 40% ~ 70%;照明时间:12 h/12 h(8:00 开灯,20:00 关灯,采用动物照明控制系统);换气次数每小时>15 次;工作照度:>

200 LX;动物照度:15 ~ 20 LX。所有操作均符合实验动物伦理学要求,本研究方案实施前已经中国医学科学院医学生物学研究所伦理审查委员会审查批准(DWSP201902013)。

1.1.2 主要试剂与仪器

A/Michigan/45/2015(H1N1)pdm09 疫苗株(中国医学科学院医学生物学研究所);色谱级甲醇(ThermoFisher,美国,批号:193130);乙腈(ThermoFisher,美国,批号:191778);亮氨酸脑啡肽(Sigma,美国,批号:W19091942);甲酸(ThermoFisher,美国,批号:193497);纯水(广州屈臣氏食品饮料有限公司,生产日期:20201224);戊巴比妥钠(天津市大茂化学试剂厂,批号:20180716);生理盐水(广西裕源药业,批号:H19082808)。

Waters ACQUITY™ UPLC 超高效液相色谱仪(Waters,美国),Waters G₂ Si Q/TOF 质谱仪(Waters,美国),BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm id,1.8 μm,Waters,美国);定量梯度 PCR 仪-(Bio-Rad,美国);Masslynx V4.2 数据采集工作站(Waters,美国);Progenesis QI 2.0 代谢组学数据处理平台(Waters,美国);EZ info 3.0 软件(Waters,美国);低温超高速离心机(ThermoFisher,美国);New Classic MF 型电子天平(METTLER TOLED,德国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及树鼩流感模型建立

树鼩分 2 组,模型组 6 只(记为 1#,2#,3#,4#,5#,6#),对照组 4 只。模型组树鼩麻醉后,经鼻滴入 H1N1 流感病毒液 100 μL,模型组树鼩中每只动物鼻内给药 10^{6.8} TCID₅₀;对照组树鼩鼻内滴入无病毒等体积的未感染尿囊液,置于树鼩专用隔离器中进行饲养。

1.2.2 生物样本采集及流感树鼩模型评价

实验期间记录树鼩体温、生存率,观察并记录有无咳嗽、流涕、呕吐、食欲缺乏等表现,称量攻毒前后树鼩体重。此外,制备鼻洗液样品作为标本,并从每只安乐死或处死的动物中收集肺和气管的

代表性切片,样品在液氮中速冻并储存在 -80°C 以备检测病毒载量。7 d 后,测量咽拭子,血清和肺组织的病毒载量,检测血清抗体及组织病变。所有血液样品静置 30 min 后离心(4°C , 3000 r/min, 15 min),取 100 μL 血清加 400 μL 甲醇,涡旋 30 s,静置 30 min,离心(4°C , 3000 r/min, 20 min)取上清液 400 μL , 40°C 真空吹干,残渣用 100 μL 甲醇复溶后离心(4°C , 3000 r/min, 20 min),取 100 μL 上清液,供 UPLC-MS 分析。

1.2.3 代谢组学分析条件

应用 UPLC-Q/TOF-MS 分析树鼩的血清样品。优化后的分析条件如下:

色谱条件:色谱柱:BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm ID, 1.8 μm);流动相 A:0.1% 甲酸乙腈溶液,流动相 B:0.1% 甲酸水溶液;柱温: 40°C ;流速:0.4 mL/min;进样量:4 μL 。梯度洗脱方法见表 1。

表 1 树鼩血清代谢组学分析色谱梯度洗脱条件

Table 1 Chromatographic gradient elution conditions of tree shrew serum metabolomics analysis

时间(min)	流速(mL/min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
Time(min)	Rate(mL/min)	Mobile phase A(%)	Mobile phase B(%)
0	0.4	95	5
5	0.4	65	35
8	0.4	45	55
10	0.4	10	90
12	0.4	0	100

质谱条件:电喷雾离子源(ESI);正离子模式毛细管电压 2.4 kV;负离子模式毛细管电压 2.3 kV;样品锥孔电压 30 V;脱溶剂气温度 350°C ;脱溶剂气流量 800 L/h;锥孔反吹气流量:50 L/h;离子源温度: 110°C 。锁定质量溶液:采用 Lockspray 校正系统进行在线质量校正,亮氨酸-脑啡肽($[\text{M}+\text{H}]^{+}=556.2771$, $[\text{M}-\text{H}]^{-}=554.2615$),溶液浓度为 1 ng/ μL ,流速为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$;质量扫描范围: m/z 50 ~ 1200 Da,扫描时间 0.2 s;MassLynx V4.2 工作站以 continuum 模式采集数据。

1.3 统计学分析

所有数据使用 Excel 分析并用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较使用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

代谢组学数据应用 Progenesis Q1 软件进行降噪、峰提取、峰匹配和归一化,识别离子信息,以备多变量统计分析,非监督主成分分析(principal

component analysis, PCA) 判别模型和空白组间差异,正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 预测模型可靠性和稳定性,计算投影值的可变重要性(variable importance in projection value, VIP),同时计算组间离子的归一化丰度, t 检验筛选 $P < 0.05$ 的差异离子,结合 MS/MS 信息和人类代谢组数据库(HMDB),脂质代谢组学数据库(Lipid maps)及京都基因和基因组百科全书数据库(KEGG)确定潜在生物标记物,对确定的生物标记物进行代谢通路富集分析,阐述其与急性肺炎疾病的生物关系。

2 结果

2.1 H1N1 感染树鼩的一般行为学评价

模型制备期间未出现动物死亡现象,但是模型制备前后所有树鼩出现饮食减少,体重下降现象(图 1),模型制备第 3 天,模型组树鼩开始出现咳嗽,流涕等流感症状,造模前后模型组和对照组的体温升高了近 2°C (图 2),但是统计分析结果显示两组无显著性差异。

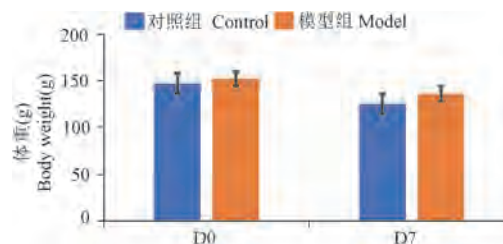


图 1 造模前后空白组和模型组的体重统计分析

Figure 1 Statistical analysis of body weight of control group and model group before and after modeling

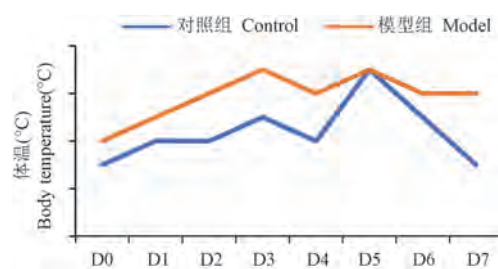


图 2 造模前后空白组和模型组的体温统计分析

Figure 2 Statistical analysis of body temperature of control group and model group before and after modeling

2.2 H1N1 感染树鼩的组织病理学观察

所有动物于攻毒后第 7 天用戊巴比妥钠麻醉后处死,进行大体解剖,观察肺组织病变程度,其中 4 只攻毒树鼩肺出现病变,在镜下观测到树鼩



图3 树鼩攻毒肺病变图

Figure 3 General observation of lung tissue in the tree shrew

肺组织肺间隔增宽,散在炎性细胞浸润,局部可见异物结晶体及异物巨细胞,考虑为异物肉芽肿,另有支气管固有层淋巴细胞浸润,详见图3和图4,可能由于感染大量病毒后引发的炎症损伤的病理改变。

2.3 H1N1 感染树鼩的病毒载量和血清检测

进行咽拭子,血清及肺组织的病毒载量测定,

判断病毒感染情况。结果显示,从攻毒后第1天开始,6只攻毒动物咽拭子都能检测到低病毒载量状态,第2、3天仍可以检测到咽拭子的病毒载量(图5A),第5、6天逐渐降低,到第7天不可检出。攻毒后第1天直到第7天安乐死,6只攻毒动物血清均出现低拷贝载量(图5B),此外安乐死后肺部组织检查发现了3只攻毒动物的低拷贝载量病毒(图5C)。血清抗体检测发现攻毒后第1天,动物血清开始出现抗体,第3天升高明显,并在第7天持续升高(图5D)。

2.4 H1N1 感染树鼩的血清代谢组学分析

采用优化后的分析条件,在正负离子模式下采集树鼩的血清代谢轮廓(图6),获取的全部代谢组数据代入 Progenesis Q1 软件进行预处理,利用 SIMCA-P 软件对模型组不同时间点的数据进行 PCA。结果发现实验第7天树鼩血液代谢轮廓与空白组分离明显,说明染毒第7天树鼩体内代谢网络

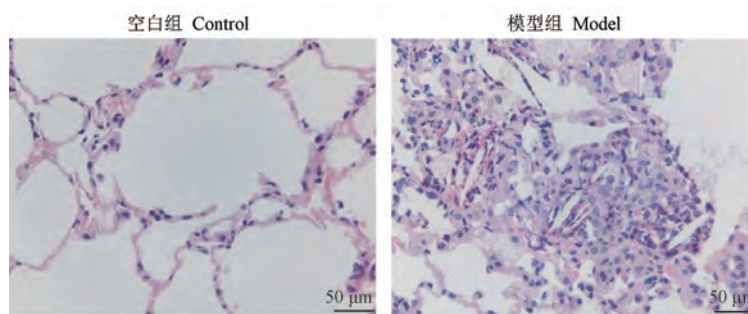
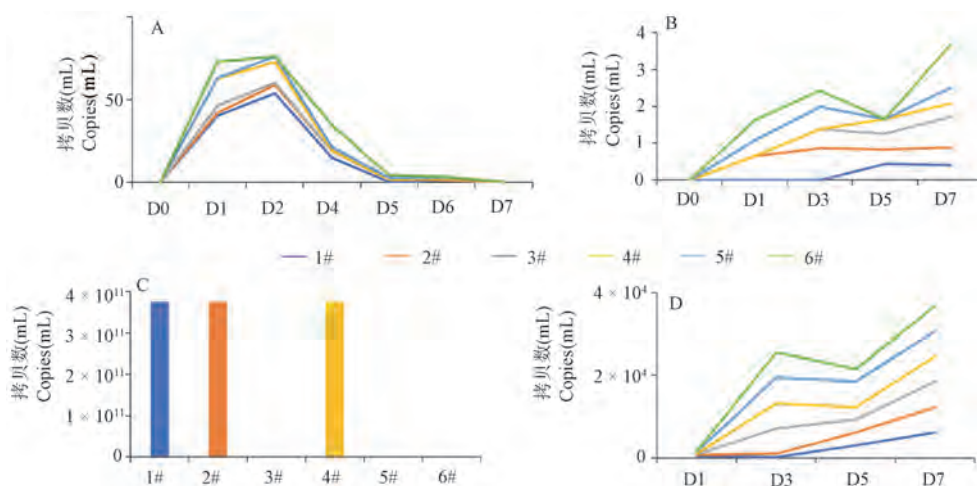


图4 树鼩肺组织病理图

Figure 4 Lung histopathological observation of the tree shrew



注:A:咽拭子病毒载量测定;B:血清病毒载量测定;C:肺组织病毒载量测定;D:抗体血抑滴度测定。

图5 病毒载量和血清抗体检测

Note. A. Determination of viral load in throat swabs. B. Determination of serum viral load. C. Determination of viral load in lung tissue. D. Determination of antibody serum inhibitory titer.

Figure 5 Viral load and serum antibody detection

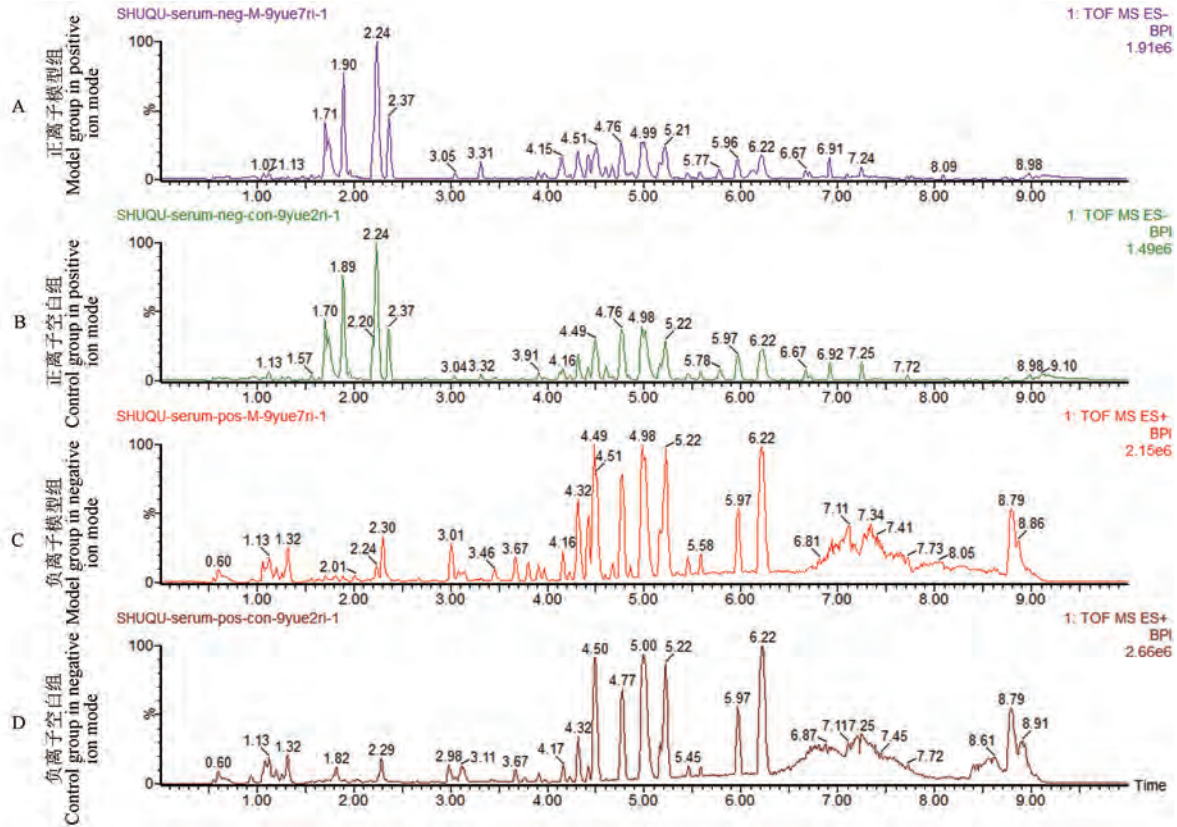
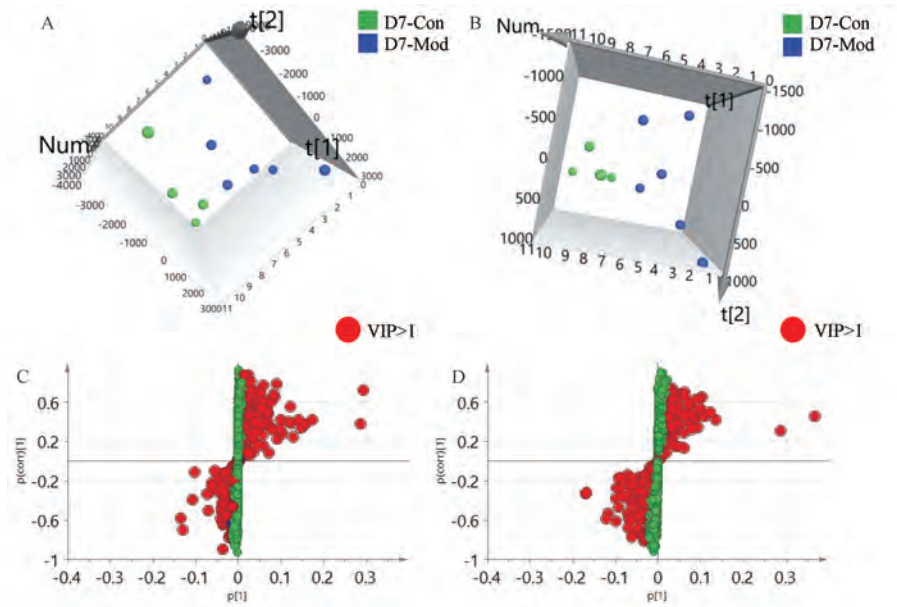


图 6 树鼩流感模型血清代谢指纹图

Figure 6 Tree shrew influenza model serum metabolism fingerprint



注: A: PCA 正离子模式 3D 图; B: PCA 负离子模式 3D 图; C: 正离子模式 S-plot; D: 负离子模式 S-plot。

图 7 空白组、模型组树鼩血清第 7 天多变量统计分析

Note. A. PCA 3D plot in positive ion mode. B. PCA 3D plot in negative ion mode. C. S-plot in positive ion mode. D. S-plot in negative ion mode.

Figure 7 Multivariate statistical analysis of tree shrew serum in the blank group and model group on day 7

已经发生明显变化,最终导致代谢轨迹的偏移(图 7)。

进一步筛选对第 7 天的空白组与模型组间差异生物标记物,采用 OPLS-DA 寻找内源性物质的差异,计算正离子模式的 $R^2X(CUM) = 0.981$, $Q^2(CUM) = 0.863$,负离子模式的 $R^2X(CUM) = 0.972$, $Q^2(CUM) = 0.554$,表明该统计模型具有一定的稳定性和可预测性。通过计算,获得反应离子贡献度的 VIP 值,选择 VIP 值大于 1 的数据,进一步计算组件差异离子的归一化丰度,同时匹配 MS/

MS、HMDB、Lipid map 等内源性代谢物数据库,结果共鉴定树鼩流感模型血清生物标记物 24 个,其中正离子模式 16 个、负离子模式 8 个(表 2)。鉴定结果通过 MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>)进行通路富集分析。

将 24 个血清生物标记物进行代谢通路富集分析,异常的 24 个代谢物干扰了 7 个代谢通路(图 8),包括甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、嘌呤代谢等,其中甘油磷脂代谢和鞘脂代谢最为显著。

表 2 树鼩流感病毒模型血清生物标记物鉴定结果

Table 2 Identification results of serum biomarkers in tree shrew influenza virus model

序号 NO.	质荷比 m/z	保留时间 (min) Rt(min)	名称 Name	加合物 Adducts	分子式 Formula	通路 Pathway	趋势 Trend
1	417.14	5.43	油苷二甲酯 Oleoside dimethyl ester	M-H, M + FA-H	$C_{18}H_{26}O_{11}$	-	↑
2	202.11	1.58	L-乙酰肉碱 L-Acetylcarnitine	M-H, M + FA-H	$C_9H_{17}NO_4$	胰岛素抵抗 Insulin resistance	↑
3	187.10	1.75	2-戊基丁二酸 2-Pentyl succinic acid	M-H, M + FA-H	$C_9H_{16}O_4$	-	↑
4	297.11	1.75	7-甲基鸟苷 7-Methylguanosine	M + FA-H	$C_{11}H_{16}N_5O_5+$	-	↑
5	473.01	8.83	2'-脱氧腺嘌呤 2'-Deoxyinosine-5'- diphosphate	M + FA-H	$C_{10}H_{14}N_4O_{11}P_2$	嘌呤代谢 Purine metabolism	↑
6	302.30	4.59	鞘氨醇 Sphinganine	M + H	$C_{18}H_{39}NO_2$	鞘脂代谢,鞘脂类信号通路 Sphingolipid metabolism, sphingolipid signaling pathway	↓
7	284.29	4.59	十八酰胺 Octadecanamide	M + H	$C_{18}H_{37}NO$	-	↓
8	808.49	7.68	磷脂酰乙醇胺(18:3(6Z,9Z, 12Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z, 16Z,19Z)) PE(18:3(6Z,9Z,12Z)/22:6 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	M + Na	$C_{45}H_{72}NO_8P$	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	↑
9	766.46	8.69	磷脂酰丝氨酸(15:0/18:3(6Z, 9Z,12Z)) PS(15:0/18:3(6Z,9Z,12Z))	M + Na	$C_{39}H_{70}NO_{10}P$	磷脂酰胆碱生物合成 Phosphatidylcholine biosynthesis	↑
10	854.57	6.71	磷脂酰胆碱(20:4(5Z,8Z,11Z, 14Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z, 16Z,19Z)) PC(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/22:6 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	M + H	$C_{50}H_{80}NO_8P$	甘油磷脂代谢,花生四烯酸代谢, 亚油酸代谢 Glycerol phospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism	↓
11	804.56	6.71	磷脂酰胆碱(14:0/22:4(7Z, 10Z,13Z,16Z)) PC(14:0/22:4(7Z, 10Z,13Z,16Z))	M + Na	$C_{44}H_{80}NO_8P$	甘油磷脂代谢,花生四烯酸代谢, 亚油酸代谢 Glycerol phospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism	↓
12	328.14	1.26	精氨酸-甲硫氨酸 Arginyl-methionine	M + Na	$C_{11}H_{23}N_5O_3S$	-	↓

续表2

序号 NO.	质荷比 m/z	保留时间 (min) Rt(min)	名称 Name	加合物 Adducts	分子式 Formula	通路 Pathway	趋势 Trend
13	242.07	1.19	天冬酰胺 Serylaspargine	M + Na	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₅	-	↓
14	830.56	2.51	磷脂酰胆碱(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/20:3(5Z,8Z,11Z)) PC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/20:3(5Z,8Z,11Z))	M + H, M + Na	C ₄₈ H ₈₀ NO ₈ P	甘油磷脂代谢,花生四烯酸代谢, 亚油酸代谢 Glycerol phospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism	↑
15	808.59	6.92	磷脂酰胆碱(16:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)) PC(16:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))	M + H, M + Na	C ₄₆ H ₈₂ NO ₈ P	甘油磷脂代谢,花生四烯酸代谢, 亚油酸代谢 Glycerol phospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism	↓
16	786.60	8.95	磷脂酰胆碱 (18:1(9Z)/18:1(9Z)) PC(18:1(9Z)/18:1(9Z))	M + H	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	磷脂酰胆碱生物合成 Phosphatidylcholine biosynthesis	↑
17	782.57	6.92	磷脂酰乙醇胺 (22:1(13Z)/15:0) PE(22:1(13Z)/15:0)	M + Na	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	甘油磷脂代谢 Glycerol phospholipid metabolism	↓
18	818.60	6.71	磷脂酰胆碱 (20:2(11Z,14Z)/P-18:1(11Z)) PC(20:2(11Z,14Z)/P-18:1(11Z))	M + Na	C ₄₆ H ₈₆ NO ₇ P	甘油磷脂代谢,花生四烯酸代谢, 亚油酸代谢 Glycerol phospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism	↓
19	736.48	3.21	磷脂酰乙醇胺 (14:0/20:3(5Z,8Z,11Z)) PE(14:0/20:3(5Z,8Z,11Z))	M + Na	C ₃₉ H ₇₂ NO ₈ P	甘油磷脂代谢 Glycerol phospholipid metabolism	↓
20	696.46	3.01	磷脂酰胆碱 (14:1(9Z)/14:1(9Z)) PC(14:1(9Z)/14:1(9Z))	M + Na	C ₃₆ H ₆₈ NO ₈ P	甘油磷脂代谢,花生四烯酸代谢, 亚油酸代谢 Glycerol phospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism	↓
21	707.46	3.01	鞘脂醇 (15:0/20:3(5Z,8Z,11Z)) PA(15:0/20:3(5Z,8Z,11Z))	M + Na	C ₃₈ H ₆₉ O ₈ P	三酰甘油生物合成 Triacylglycerol biosynthesis	↓
22	800.55	2.91	磷脂酰乙醇胺 (22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/P-18:1(9Z)) PE(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/P-18:1(9Z))	M + Na	C ₄₅ H ₈₀ NO ₇ P	甘油磷脂代谢 Glycerol phospholipid metabolism	↓
23	778.54	2.94	磷脂酰胆碱 (14:0/20:3(5Z,8Z,11Z)) PC(14:0/20:3(5Z,8Z,11Z))	M + Na	C ₄₂ H ₇₈ NO ₈ P	甘油磷脂代谢,花生四烯酸代谢, 亚油酸代谢 Glycerol phospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism	↓
24	679.44	2.62	磷脂醇 (18:3(9Z,12Z,15Z)/15:0) PA(18:3(9Z,12Z,15Z)/15:0)	M + Na	C ₃₆ H ₆₅ O ₈ P	三酰甘油生物合成 Triacylglycerol biosynthesis	↓

注: ↓: 与空白组比较模型组归一化丰度下调; ↑: 与空白组比较模型组归一化丰度上调。
Note. ↓: Compared with the control group, the normalized abundance of the model group was down-regulated. ↑: Compared with the stomach-good group, the normalized abundance of the model group was up-regulated.

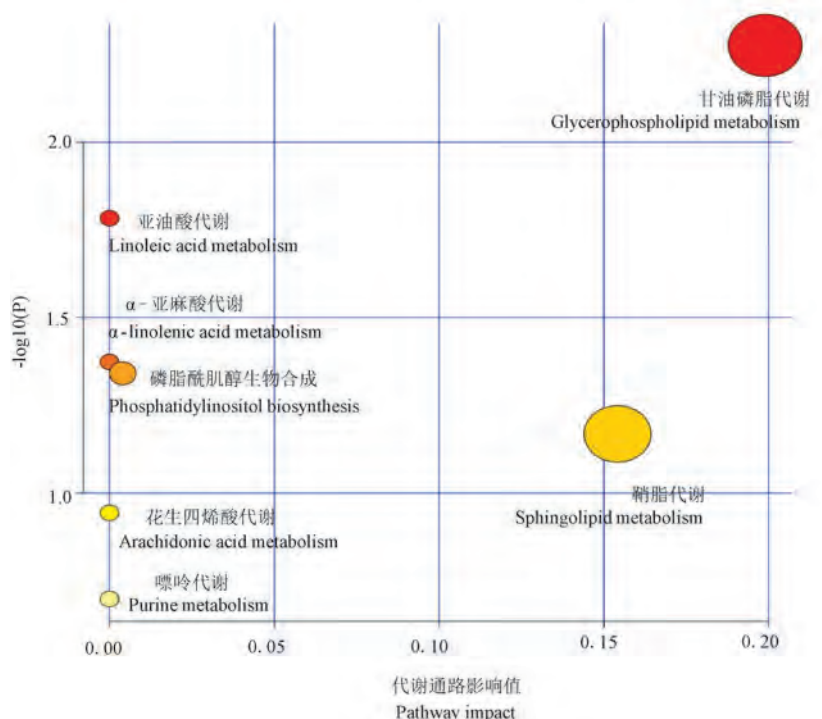


图8 树鼩流感模型血清潜在生物标记物的代谢通路分析

Figure 8 Metabolism pathway analysis of potential biomarkers in serum of tree shrew influenza model

3 讨论

本次实验研究发现 H1N1 流感株能够渐进式引起树鼩出现流感症状,首先滴鼻后在咽部出现病毒载量,之后成功进入肺部,并在血清内一直呈现低拷贝载量状态存在,病理结果表明与感染相关,该病毒株可感染树鼩。树鼩感染病毒后,体温出现显著性升高,约 2℃。同时发现,感染树鼩血清第 1 天开始产生抗体,其中,4 只树鼩的抗体第 3 天到达峰值,2 只树鼩的抗体第 7 天到达峰值,抵抗病毒感染,抗体呈现阶梯式上升。

经血清代谢组学分析,发现了 24 个差异离子介导了 7 条代谢通路,H1N1 感染树鼩模型发生了系列的代谢紊乱,这些差异离子和紊乱的代谢通路可能促进了炎症反应,造成树鼩流感样症状。流感会引起系列的呼吸道症状,并且会引起脂类代谢、氨基酸代谢及糖代谢的异常^[10-11]。通过代谢通路富集分析,发现甘油磷脂代谢和鞘脂代谢发生强烈的扰动,它们属于脂质中重要的一类物质。作为生物体重要的组成部分,脂质具有重要的生物功能和地位,脂质类化合物可以传递细胞间的信号,并介导物质进入和流出细胞,维持细胞正常的生存和凋亡。同样,流感病毒在宿主细胞生存和复制依赖于

脂质,因为流感病毒在发芽过程中获得宿主衍生的脂质包膜,流感病毒可定制过氧化物酶体,以便进行有效复制^[12-13]。本研究结果显示,许多涉及脂质代谢的磷脂酰胆碱等化合物水平在 H1N1 感染树鼩的血清中相对丰度低于对照组树鼩,说明病毒的复制和生存与脂质代谢密切相关。

病毒-宿主相互作用是病毒复制和免疫反应的重要决定因素,研究表明,人支气管上皮细胞在感染 H1N1 病毒后会发生近百种蛋白的上调,并且它们集中于嘌呤的生物合成代谢,糖代谢和蛋白质修饰^[14]。此外,作为公共卫生安全的主要威胁性传染病,流感病毒感染和登革热病毒感染也会引发嘌呤代谢的异常^[15],此外,这些病毒性感染还会引起花生四烯酸代谢和脂肪酸生物合成等代谢紊乱。我们在 H1N1 感染后的树鼩血清中发现了参与嘌呤代谢的二磷酸脱氧腺苷,经多变量统计分析发现它显著高于对照组血清中的归一化丰度,是感染 H1N1 病毒树鼩和正常树鼩代谢轮廓差异的背景之一,代谢差异形成的原因可能与嘌呤代谢生成的尿酸致炎性相关^[11]。花生四烯酸代谢和亚油酸代谢是感染 H1N1 树鼩发生的代谢异常之一。花生四烯酸在许多疾病的发生发展中起到促进作用,花生四烯酸可由不饱和脂肪酸前体化合物转化而来,此

外,经环氧化和脂氧化途径,花生四烯酸可以进一步生成促炎性化合物,例如前列腺素和血栓素^[16]。

综上所述,本研究成功建立 H1N1 感染树鼯流感模型,应用代谢组学技术发现了树鼯发生流感样病理改变的代谢机制,H1N1 病毒感染树鼯主要发生了甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢及嘌呤代谢异常。

参 考 文 献(References)

- [1] 蔡祺,陈骊婷,郭平,等. 外周血白细胞形态学参数在甲型、乙型流行性感胃诊断中的应用 [J]. 检验医学, 2021, 36(6): 586-589.
Cai Q, Chen LT, Guo P, et al. Application of leukocyte morphological parameters in the diagnosis of influenza a and b [J]. Lab Med, 2021, 36(6): 586-589.
- [2] 李雨鹏,宓丹,潘冲,等. 基于“截断”理论的柴芩石膏汤对流行性感胃临床研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 24(2): 103-107.
Li YP, Mi D, Pan C, et al. Effect of chai qin gypsum decoction on viral cold based on “truncation” theory [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2021, 24(2): 103-107.
- [3] 钟雪锋,李毅,方保民,等. 老年流行性感胃患者临床特点及并发脓毒症的影响因素 [J]. 临床药物治疗杂志, 2021, 19(6): 57-63.
Zhong XF, Li Y, Fang BM, et al. The clinical characteristics of elderly patients with influenza and the influencing factors accompanied with sepsis [J]. Clin Med J, 2021, 19(6): 57-63.
- [4] 郑贵锋,温顺航,陈小芳,等. 重症和危重症流行性感胃患儿的临床特点及其影响因素分析 [J]. 中华传染病杂志, 2021, 39(5): 285-288.
Zheng GF, Wen SH, Chen XF, et al. Clinical characteristics and risk factors of severe and critical influenza in children [J]. Chin J Infect, 2021, 39(5): 285-288.
- [5] 贾杰,代解杰. 树鼯在生物医学研究中的优势与挑战 [J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(1): 3-8.
Jia J, Dai JJ. Advantages and challenges of tree shrews in biomedical research [J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(1): 3-8.
- [6] Chen M, Ou C, Yang C, et al. A novel animal model of induced breast precancerous lesion in tree shrew [J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(4): 580-585.
- [7] 张帆,王静,颜朦朦,等. 阵列式薄膜固相微萃取结合高效液相色谱-串联质谱法测定农产品中 13 种农药残留 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(16): 5401-5409.
Zhang F, Wang J, Yan MM, et al. Determination of 13 kinds of pesticide residues in agricultural products by array-thin film micro-extraction coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Safe Qual Detec Technol, 2022, 13(16): 5401-5409.
- [8] 许腾,张玥,张海丽,等. 代谢组学技术在营养学研究中的应用 [J]. 中国食物与营养, 2017, 23(11): 11-16.
Xu T, Zhang Y, Zhang HL, et al. Application of metabolomics in nutrition [J]. Food Nutr Chin, 2017, 23(11): 11-16.
- [9] 闫广利,孙晖,张爱华,等. 基于中医方证代谢组学的中药质量标志物发现研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3729-3734.
Yan GL, Sun H, Zhang AH, et al. Discovery of quality markers of chinese materia medica based on chinmedomics [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2018, 49(16): 3729-3734.
- [10] 李俊,王军,万艳,等. 基于 GC/TOF-MS 技术对流感感染小鼠粪便代谢组学的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(4): 115-120.
Li J, Wang J, Wan Y, et al. Metabolomics of feces in a murine model of influenza infection based on the GC/TOF-MS technique [J]. Anim Husbandry Veter Med, 2019, 51(4): 115-120.
- [11] 钱文娟,杨瑞,谢彤,等. 蒲地蓝消炎口服液治疗甲型 H1N1 流感病毒性肺炎的 GC-MS 代谢组学研究 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2258-2264.
Qian WJ, Yang R, Xie T, et al. Metabolomics on pudilan xiaoyan oral liquid in treatment of influenza A/H1N1-induced pneumonia based on GC-MS [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2018, 49(10): 2258-2264.
- [12] Tanner LB, Chng C, Guan XL, et al. Lipidomics identifies a requirement for peroxisomal function during influenza virus replication [J]. J Lipid Res, 2014, 55(7): 1357-1365.
- [13] Morita M, Kuba K, Ichikawa A, et al. The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza [J]. Cell, 2013, 153(1): 112-125.
- [14] Kroeker AL, Ezzati P, Coombs KM, et al. Influenza A infection of primary human airway epithelial cells up-regulates proteins related to purine metabolism and ubiquitin-related signaling [J]. J Proteome Res, 2013, 12(7): 3139-3151.
- [15] Cui L, Fang J, Ooi EE, et al. Serial metabolome changes in a prospective cohort of subjects with influenza viral infection and comparison with dengue fever [J]. J Proteome Res, 2017, 16(7): 2614-2622.
- [16] 孙启慧,张静,李壮壮,等. 基于代谢组学的麻黄细辛附子汤治疗流感小鼠的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 763-771.
Sun QH, Zhang J, Li ZZ, et al. Action mechanism of mahuang xixin fuzi decoction for mice with influenza based on metabolomics information [J]. Chin J Chin Mater Med, 2017, 42(4): 763-771.

[收稿日期] 2021-11-15

邢淑雁, 晋一帆, 王含雪, 等. 探讨不同浓度 Matrigel 对小鼠 Lewis 肺癌异位皮下移植瘤的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 606-612.

Xing SY, Jin YF, Wang HX, et al. To investigate the effect of different concentrations of Matrigel on ectopic subcutaneous transplanted tumor of Lewis lung cancer in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 606-612.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.002

探讨不同浓度 Matrigel 对小鼠 Lewis 肺癌异位皮下移植瘤的影响

邢淑雁¹, 晋一帆¹, 王含雪¹, 孙竹筠¹, 孙启慧¹, 刘孝云^{2,3,4}, 叶冬雪^{2,3,4}, 官宁远¹,
李正昊¹, 杨勇^{2,3,4*}, 容蓉^{1,3*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学实验中心, 济南 250355; 3. 山东省高校中医药抗病毒协同创新中心, 济南 250355; 4. 山东省中医药抗病毒工程研究中心, 济南 250355)

【摘要】 目的 探讨不同浓度 Matrigel 对小鼠 Lewis 肺癌异位皮下移植瘤的影响。方法 将 24 只 C57BL/6J Nifdc 小鼠随机分为肺癌组、50% 基质胶组、75% 基质胶组、100% 基质胶组, 每组各 6 只。将 Lewis 肺癌细胞 (LL/2) 分别与 0%、50%、75%、100% Matrigel 按照体积 1:1 混合, 于小鼠右侧前肢腋下进行皮下注射, 每日测量各组小鼠体重、进食量及饮水量; 观察比较各组成瘤时间、成瘤率和肿瘤大小, 于肿瘤形成后每天测量肿瘤的长径、短径, 计算肿瘤体积变化; 于肿瘤接种第 15 天处死动物, 完整剥离肿瘤组织并称重, HE 染色检测肿瘤组织病变情况。结果 与肺癌组相比, 75% 基质胶组小鼠自造模第 2 天起体重显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 100% 基质胶组小鼠自造模第 10 天起, 体重明显上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组小鼠平均进食量于造模 8 d 后有所降低, 饮水量总体呈现上升趋势。各组小鼠成瘤率均为 100%, 添加基质胶组的小鼠相比肺癌组小鼠成瘤时间早, 肿瘤生长速度快, 且肿瘤较大。其中, 75% 基质胶组肿瘤体积增长最快, 肿瘤重量最大, 为 (1358.88 ± 388.14) mg, 与肺癌组相比, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); 100% 基质胶组肿瘤体积增长次之, 肿瘤重量为 (1142.37 ± 423.08) mg, 与肺癌组相比, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); 50% 基质胶组肿瘤体积增长最慢, 肿瘤重量最小, 为 (808.83 ± 393.41) mg。HE 染色结果显示, 相比于肺癌组, 添加基质胶组的肿瘤细胞生长旺盛, 轮廓清晰, 细胞核体积较大, 肿瘤组织间质中血管成分明显增多。结论 基质胶能稳定成瘤率, 加快肿瘤生长, 增大成瘤体积, 且 75% 基质胶浓度条件下肿瘤增长最快, 肿瘤体积最大, 肿瘤的均一性较好。

【关键词】 Lewis 肺癌; 肿瘤; 基质胶浓度; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0606-07

To investigate the effect of different concentrations of Matrigel on ectopic subcutaneous transplanted tumor of Lewis lung cancer in mice

XING Shuyan¹, JIN Yifan¹, WANG Hanxue¹, SUN Zhuyun¹, SUN Qihui¹, LIU Xiaoyun^{2,3,4}, YE Dongxue^{2,3,4}, GONG Ningyuan¹,
LI Zhenghao¹, YANG Yong^{2,3,4*}, RONG Rong^{1,3*}

【基金项目】 国家自然科学基金 (81873220, 81774167), 山东省重点研发计划 (重大科技创新工程) (2020CXGC010505), 山东中医药大学 2021 年大学生创新训练计划 (SRT) 项目 (2021057)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81873220, 81774167), Shandong Provincial Key Research and Development Plan (Major Scientific and Technological Innovation Projects) (2020CXGC010505), 2021 College Student Innovation Training Program (SRT) Project of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (2021057)。

【作者简介】 邢淑雁 (1996—), 女, 硕士, 研究方向: 中药及复方活性成分与质量控制。Email: xsy407861520@163.com

【通信作者】 杨勇 (1972—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药抗病毒的药效和机制。Email: yy7204@163.com;

容蓉 (1970—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药及复方活性成分与质量控制。Email: rosierong@163.com。

* 共同通信作者

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China. 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine Experimental Center, Jinan 250355. 3. Shandong Provincial Collaborative Innovation Center for Antiviral Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355. 4. Shandong Provincial Engineering Research Center for Antiviral Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355)

Corresponding author: YANG Yong. E-mail: yy7204@163.com; RONG Rong. E-mail: rosierong@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of different concentrations of Matrigel on ectopic subcutaneous transplanted tumor of Lewis lung cancer in mice. **Methods** Twenty-four C57BL/6J Nifdc mice were randomly divided into a Lung cancer group, 50% Matrigel group, 75% Matrigel group, and 100% Matrigel group, with six mice in each group. Lewis lung cancer cells (LL/2) were mixed with 0%, 50%, 75% and 100% Matrigel at a volume ratio of 1 : 1. The mice were injected subcutaneously under the armpit of the right forelimb. The weight, diet and volume of drinking water of mice in each group were measured every day. The tumor formation time, tumor formation rate and tumor size were observed. The long diameter and short diameter of the tumor were measured every day after the formation of the tumor, and the change in tumor volume was calculated. The animals were terminated on 15 days after tumor inoculation, the tumor tissue was removed and weighed, and the pathological changes of the tumor tissue were detected by HE staining. **Results** Compared with the Lung cancer group, the weight of the 75% Matrigel group increased significantly from the second day of modeling ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The weight of mice in the 100% Matrigel group increased significantly from the 10th day of modeling ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The average diet of mice in each group decreased eight days after modeling, and the volume of drinking water showed an upward trend. The tumor formation rate in each group was 100%. Mice with Matrigel had earlier tumor formation time, faster tumor growth rate, and a larger tumor than those without. Among them, the 75% Matrigel group had the fastest tumor volume growth and the greatest tumor weight, (1358.88 ± 388.14) mg, compared with the Lung cancer group ($P < 0.05$). The tumor volume growth and tumor weight in the 100% Matrigel group were the second greatest, and the tumor weight was (1142.37 ± 423.08) mg, which was significantly different from that in the Lung cancer group ($P < 0.05$). The tumor volume growth and tumor weight in the 50% Matrigel group were the smallest, (808.83 ± 393.41) mg. The result of HE staining show that, compared with the Lung cancer group, the tumor cells with Matrigel group had vigorous growth, a clear outline, large nuclear volume, and significantly more vascular components in the stroma of the tumor tissue. **Conclusions** Matrigel can stabilize the tumor formation rate, accelerate tumor growth, and increase the tumor formation volume. Under the condition with 75% Matrigel, the tumor growth was the fastest, the tumor volume was the largest, and the tumor was uniform.

【Keywords】 Lewis lung cancer; tumor; concentration of Matrigel; mice

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

目前,肺癌动物模型的构建方法有异位移植法、原位移植法、化学诱导法等^[1-4]。其中,异位皮下移植是将体外培养的肿瘤细胞移植到动物身上与肿瘤原发部位不相关的部位。由于其操作简单方便、实验周期短、可复制性强以及易于观察等特点,故成为肺癌实验研究中动物造模最常用的方法^[5]。但由于肿瘤细胞脱离了体外培养条件而进入体内,生长环境发生改变,加之实验人员操作误差、动物个体差异等因素,易导致成瘤率、肿瘤大小均不稳定,使该造模方法的应用受到局限。因此,找到一种优化并稳定该造模方法的解决方案意义重大。研究发现,近年来基质胶越来越多的应用于构建小鼠异位皮下移植瘤模型。Matrigel 基质胶来源于 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 小鼠肉瘤的基底

膜基质,其主要成分有层粘连蛋白、Ⅳ型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白,还包含基质金属蛋白酶和各种细胞因子^[6-7]。这是一种 4℃ 时呈液体状态,22 ~ 35℃ 时迅速凝胶,以固态形式存在形成交联网络,从而使细胞分散均匀,聚合形成具有生物学活性的三维基质^[8]。基质胶作为一种辅助物质,可为肿瘤细胞的侵袭、迁移、管腔结构的形成及细胞的生化功能等提供有利的生存条件,更好的模拟了肿瘤细胞的体内生长环境,从而提高了肿瘤细胞在体内成瘤的比例和速度^[9-10]。

尽管基质胶在稳定成瘤率及提高肿瘤生长速度方面优势明显,但其应用的适宜浓度尚未明确,因此,本研究旨在探讨 Matrigel 浓度对小鼠 Lewis 肺癌异位皮下移植瘤成瘤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J N 雄性小鼠 24 只, 4 周龄, 体重 17 ~ 19 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】; 饲养于山东省高校中医药抗病毒协同创新中心【SYXK(鲁)2017-0022】。经适应性喂养 3 d 后, 按体重随机分为 4 组, 分别为肺癌组、50% 基质胶组、75% 基质胶组、100% 基质胶组, 每组各 6 只。饲养期间小鼠自由饮食和饮水, 灯光 12 h 循环, 室温维持在 22 ~ 25℃, 湿度 40% ~ 60%。本实验所有操作已通过山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会的批准(SDUTCM20211123001)。

1.1.2 细胞

LLC 小鼠肺癌细胞 (CL-0140), 购于武汉普诺赛生命科技有限公司, 培养于山东省高校中医药抗病毒协同创新中心二级生物安全实验室, 将细胞置于含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 完全培养基中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 1 d 更换培养液 1 次, 每 2 d 用 0.25% 胰酶消化传代 1 次。

1.1.3 主要试剂与仪器

胎牛血清 (BI 公司, 以色列, 批号: 2022057); 高糖 DMEM 培养基 (Gibco 公司, 美国, 批号 8121488); 青霉素-链霉素溶液 (Gibco 公司, 美国, 批号: 2321127); 0.25% 胰蛋白酶 (Gibco 公司, 美国, 批号: 2186956); 1 × PBS 缓冲液 (biosharp 公司, 美国, 批号: 71012000); Matrigel 高浓度基质胶 (BD 公司, 美国, 货号: 354248); 氯化钠注射液 (青州尧王制药有限公司, 批号: 2220030305); 异氟烷 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 批号: 21082101); 75% 乙醇消毒液 (山东利尔康医疗科技股份有限公司, 批号: 210407)。

HF safe 1200LC 生物安全柜、HF-90 CO₂ 培养箱 (上海力申科学仪器有限公司); CKX41 倒置相差显微镜 (日本奥林巴斯株式会社); TC20 细胞计数器 (美国 Bio-Rad 公司); TDZ5-WS 医用离心机 (湖南平凡科技有限公司); MP10001 型电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); TC25H6 型独立通气笼 IVC (苏州市苏杭科技器械有限公司); R550IE 小动物麻醉机 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 250 μL 微量进样器 (上海高鸽工贸有限公司); 宠物局部剃毛器 (宁波锐雷森电器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Matrigel 基质胶的分装及处理

-20℃ 保存的基质胶冰浴条件下置于 4℃ 冰箱过夜, 待完全融化后将其置于超净台内, 使用经无菌并提前预冷的 1.5 mL EP 管、1 mL 枪头进行分装, 每个 EP 管装有基质胶体积为 1 mL, 分装后将其置于 -20℃ 冰箱保存。每次实验前, 将分装冻存的 Matrigel 基质胶从 -20℃ 冰箱取出, 冰浴条件下置于 4℃ 冰箱解冻。待完全融化后, 进行后续实验。

1.2.2 构建 Lewis 肺癌模型

待细胞汇合率达 90% 以上, 吸弃旧细胞培养基, 用 PBS 缓冲液洗 1 遍, 加 1 mL 0.25% 胰酶消化 1 min 左右, 吹打, 制成单细胞悬液。1095 r/min 离心 4 min 后, 弃上清, 加入生理盐水重悬细胞沉淀, 使细胞充分悬浮于生理盐水中, 并进行细胞计数, 参照文献^[11]方法并进行调整, 配制浓度为 4×10^7 cells/mL 的细胞悬液, 备用。用 pH=7.4 的 PBS 稀释已完全解冻的基质胶, 分别配制浓度为 50%、75% 和 100% 的基质胶溶液, 将上述 4×10^7 cells/mL 密度的细胞悬液, 与 Matrigel 基质胶溶液按体积 1:1 混匀, 各制备 1 mL 的混悬液, 于 SPF 级实验室备用, 所有操作均在冰浴中进行。对小鼠进行呼吸麻醉, 将异氟烷麻醉剂量调为 4、氧气流速调为 3, 小鼠麻醉后, 对其右侧前肢腋下脱毛, 并用 75% 乙醇消毒, 用 250 μL 无菌微量进样器吸取上述混悬液, 按照每只 100 μL, 即每只小鼠注射约 2×10^6 个活细胞, 于右侧前肢腋下处斜行入针, 刺入皮下, 形成圆形小皮丘, 注射完按压入针点, 缓慢出针。

1.2.3 动物一般情况观察

每天测量小鼠体重、饮食、饮水量, 记录一般体征, 包括自主活动、对外界刺激的反应、皮毛光泽情况和精神状态等。

1.2.4 肿瘤体积的测量

观察肿瘤形成情况, 实体瘤形成后, 每天用游标卡尺读取小鼠皮下肿瘤最大长径 a (mm) 和短径 b (mm), 根据瘤体体积计算公式: $V(\text{mm}^3) = 1/2 ab^2$, 计算各组小鼠肿瘤体积变化。

1.2.5 肿瘤重量的记录

造模 14 d 结束后, 完整剥取瘤体, 拍照并称重, 比较各组小鼠实体瘤的重量。

1.2.6 HE 染色检测肿瘤组织病变情况

完整剥离肿瘤组织, 立即切取大约 5 mm 厚度的瘤块, 放入 4% 多聚甲醛溶液中固定, 常规制备石

蜡包埋块,切片 5 μm ,常规 HE 染色,封口片后,于光学显微镜下观察肿瘤组织形态。

1.3 统计学分析

运用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,各组数据在分析前进行正态性检验和方差分析,正态分布数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组数据间的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤细胞生长情况

Lewis 肺癌细胞放于倒置显微镜下观察,细胞形态正常,呈上皮细胞样,贴壁生长,多数呈圆形,少数呈梭形,外形完整,大小不一,排列不规则,生长状态良好。

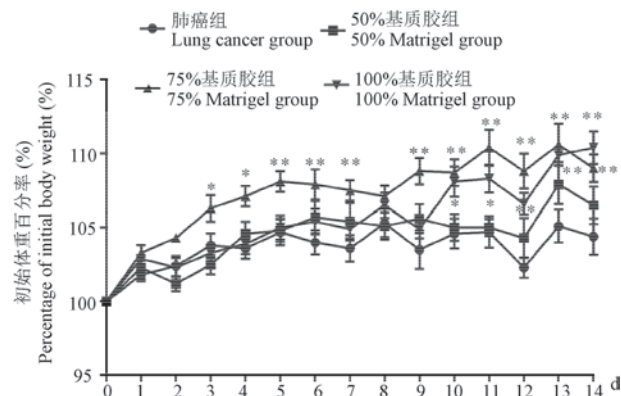
2.2 一般情况检测结果

2.2.1 一般体征

造模前 7 d,小鼠活泼好动,皮毛光亮顺滑,反应灵敏,精神状态良好。造模 8 d 后,随着肿瘤增长,部分小鼠出现行动迟缓,精神倦怠,皮毛失去光泽,形体消瘦,75% 基质胶组和 100% 基质胶组小鼠因肿瘤体积较大,出现行动不便、疲乏无力等现象。

2.2.2 体重

肺癌组小鼠体重总体呈现缓慢上升趋势。与肺癌组相比,自造模第 2 天起,75% 基质胶组小鼠体重显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);自造模第 10 天起,100% 基质胶组小鼠体重明显上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);50% 基质胶组小鼠体重没有明显差异 ($P > 0.05$)。各组小鼠的体重变化趋势见图 1。



注:与肺癌组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 1 各组小鼠的体重变化趋势 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with lung cancer group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

(The same in the following figures and tables)

Figure 1 Weight change trend of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.2.3 平均日饮食量

造模前 7 d,小鼠平均日饮食量维持在 3 g 左右,造模第 8 天后,小鼠平均日饮食量较前 7 d 有所降低,与肺癌组相比,各基质胶组小鼠平均日饮食量没有明显变化。小鼠平均日饮食量变化见图 2。

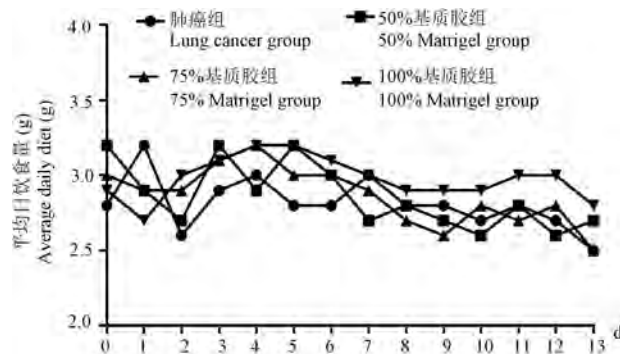


图 2 各组小鼠的平均日饮食量变化趋势

Figure 2 Change trend of average daily diet of mice in each group

2.2.4 平均日饮水量

各组小鼠平均日饮水量总体呈现上升趋势,与肺癌组相比,各基质胶组小鼠平均日饮水量无明显差异。各组小鼠的平均日饮水量变化见图 3。

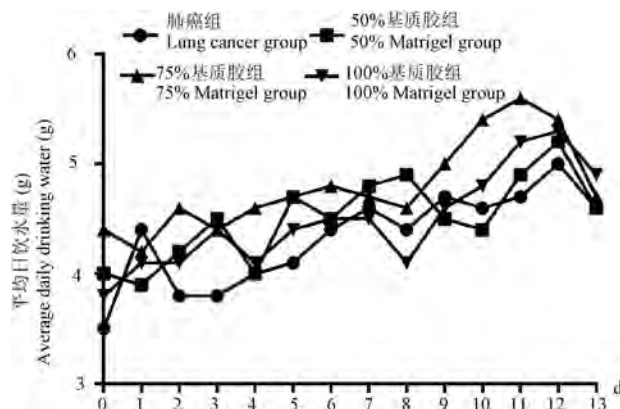


图 3 各组小鼠的平均日饮水量变化趋势

Figure 3 Change trend of average daily water consumption of mice in each group

2.3 肿瘤评价结果

2.3.1 成瘤率及肿瘤形态

与肺癌组相比,添加基质胶组的小鼠成瘤较早。各基质胶组小鼠于接种肿瘤细胞第 6 天、肺癌组小鼠于接种肿瘤细胞第 7 天,在接种部位触及到质地较软的突起,随着时间的延长,肿块逐渐增大,成瘤率为 100%。与肺癌组相比,75% 基质胶组和 100% 基质胶组的肿瘤形状较规则,大小较均匀。各组小鼠肿瘤情况见图 4。

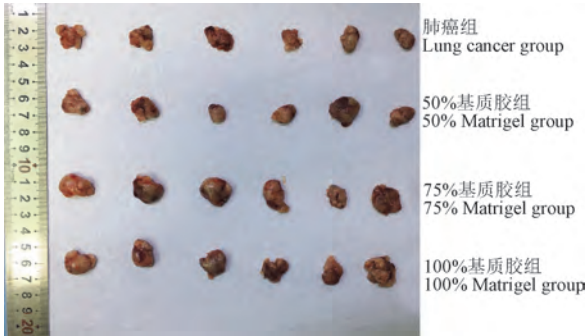


图 4 各组小鼠的成瘤情况
Figure 4 Tumor formation of mice in each group

2.3.2 肿瘤体积

与肺癌组相比,添加基质胶组的小鼠肿瘤增长速度较快。接种肿瘤细胞第 6 天,50%基质胶组、75%基质胶组、100%基质胶组于接种部位可见小突起,第 7 天肺癌组小鼠于右侧前肢腋下可触及较软突起,自接种肿瘤细胞第 8 天起,与肺癌组相比,75%基质胶组和 100%基质胶组肿瘤增长迅速,体积显著增大($P < 0.05, P < 0.01$);自接种肿瘤细胞第 10 ~ 13 天,与肺癌组相比,50%基质胶组肿瘤体积明显增大($P < 0.05, P < 0.01$)。各组小鼠肿瘤体积增长结果见图 5。

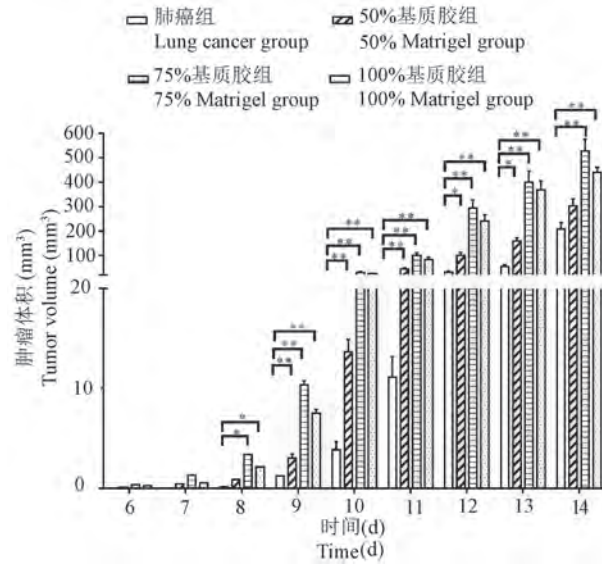


图 5 各组小鼠的肿瘤体积比较
Figure 5 Comparison of tumor volume of mice in each group

2.3.3 肿瘤重量

与肺癌组相比,添加基质胶组的小鼠肿瘤重量均有所增大,其中,75%基质胶组肿瘤重量最大,100%基质胶组次之,50%基质胶组最小;与肺癌组

相比,75%基质胶组和 100%基质胶组肿瘤重量增大具有显著性差异($P < 0.05$)。75%基质胶组小鼠的肿瘤变异系数最小,低于肺癌组,说明此基质胶浓度下的成瘤均一性最好。各组小鼠肿瘤重量结果见表 1。

表 1 各组小鼠的肿瘤重量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Tumor weight measurement results of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)		
组别 Groups	肿瘤重量 (mg) Tumor weight (mg)	离散系数 (CV = $\bar{s} \pm s$) Discrete coefficient (CV = $\bar{s} \pm s$)
肺癌组 Lung cancer group	621.82 ± 181.19	0.29
50%基质胶组 50% Matrigel group	808.83 ± 393.41	0.48
75%基质胶组 75% Matrigel group	1358.88 ± 388.14 *	0.28
100%基质胶组 100% Matrigel group	1142.37 ± 423.08 *	0.37

2.4 肿瘤组织病理学检查结果

肿瘤组织切片 HE 染色观察,肺癌组的肿瘤细胞形状不规则,多呈圆形或椭圆形,细胞核大小不一,深染,异形性明显;50%基质胶组、75%基质胶组、100%基质胶组的肿瘤细胞轮廓清晰、核体积较大,分布密集,多呈现片状分布,细胞生长旺盛,随着基质胶浓度的增大,肿瘤组织间质中血管成分明显增多,细胞间有结缔组织浸润。各组小鼠肿瘤组织病理切片结果见图 6。

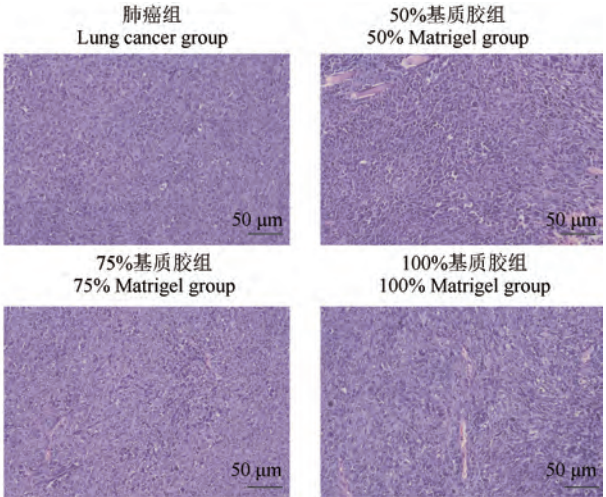


图 6 各组小鼠的肿瘤组织病理切片图(HE 染色)
Figure 6 Tumor histopathological sections of mice in each group(HE staining)

3 讨论

肺癌动物模型是人类研究肺癌的重要手段,建

立合适的动物模型对肺癌的发生机制、诊断及药物筛选具有十分重要的意义。按照肿瘤细胞来源不同,小鼠肺癌模型主要分为自发性、诱发性、移植性和基因修饰等^[12]。其中,移植性肿瘤模型是目前应用最多的肿瘤模型。移植性动物模型又可分为原位移植和异位移植。异位皮下移植因其操作简单且易于观察成瘤情况,此建模方法已被广泛采用。但也存在一定的局限性,异位皮下移植脱离了其起源组织器官的肿瘤微环境,需要克服肿瘤细胞由体外培养条件转入小鼠体内环境的不适应性而导致的成瘤率及肿瘤大小不稳定等问题。因此,如何实现肿瘤细胞从体外培养到体内生长的过渡、稳定成瘤率及肿瘤生长的均一性,是肺癌动物模型研究亟待解决的问题。

近年来,Matrigel 已广泛应用于构建小鼠体内肿瘤模型。研究发现,Matrigel 可以促进细胞分化,提高肿瘤细胞接种后的成瘤性^[13]。Matrigel 是从小鼠肿瘤中提取出的基底膜基质,包含多种蛋白和生长因子,有利于肿瘤细胞在动物体内的快速增殖,同时 Matrigel 在生理体温下会迅速凝结固化,有助于肿瘤细胞锚定在皮下某一固定位置,促进实体瘤的形成^[14],具有促进细胞增殖分化、血管生成、组织成形等作用,对提高成瘤率、缩短成瘤时间及促进肿瘤生长具有重要作用^[15-16]。本文研究发现,添加基质胶对小鼠一般体征、饮食量及饮水量影响不大,对体重的影响可能是由于肿瘤本身重量增长引起,而且基质胶的成分多来源于小鼠,相对安全可靠。

尽管 Matrigel 应用广泛,但其应用的适宜浓度尚未明确。Matrigel 常用的种类有标准浓度 Matrigel (蛋白浓度范围:8 ~ 12 mg/mL) 和高浓度 Matrigel (蛋白浓度范围:18 ~ 22 mg/mL) 两种,标准型 Matrigel 融化后为澄清液体,蛋白浓度越高,融化后的液体越粘稠。对于小鼠体内的成瘤实验,应选用高浓度 Matrigel,高蛋白浓度不仅增加肿瘤的生长,还能保证注射后的细胞的定位及肿瘤的完整性^[17]。但高浓度的 Matrigel 在使用时也存在一定的问题,不仅液体流动性差,且较易凝固成胶,给注射操作带来一定的困难。对于 Matrigel 基质胶的应用浓度,文献方法多以基质胶原始浓度与细胞悬液按照等体积 1:1 稀释^[18-19]。是否蛋白浓度越高越有利于肿瘤的生长,尚待进一步研究。

找到 Matrigel 应用的最佳浓度以进一步突出该建模方法的优势,对后续实验的理论及实践基础的

建立具有重要意义。本研究在已有研究的基础上,用 pH=7.4 的 PBS 配置了 50%、75%、100% 3 种浓度的基质胶,再将不同浓度的基质胶与细胞悬液按照等体积 1:1 稀释,按照每只 100 μ L 给小鼠注射。探讨不同浓度的 Matrigel 对小鼠 Lewis 肺癌异位皮下移植瘤成瘤的影响。结果显示,75%浓度的基质胶组小鼠肿瘤体积增长最快,肿瘤最大,且形状规则、大小均匀;100%浓度的基质胶组肿瘤体积增长和肿瘤重量次之;50%浓度的基质胶组肿瘤体积增长最慢,肿瘤最小。表明 75%浓度的基质胶是小鼠皮下肿瘤生长的适宜浓度条件,可为后期基质胶应用于小鼠皮下移植瘤模型的建立提供理论参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] 侯伟. 肺癌 I 号方对 Lewis 肺癌小鼠癌细胞凋亡相关蛋白表达的实验研究 [D]. 昆明: 云南中医药大学; 2019.
Hou W. The experimental research of lung cancer I prescription affect apoptosis-related proteins of lewis lung cancer mice [D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine; 2019.
- [2] 陈正庭. PTTG1 通过 TGF- β 1/SMAD3 通路调控放射后肺腺癌侵袭转移能力和免疫功能改变的研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学; 2020.
Chen ZT. PTTG1 via TGF- β 1/SMAD3 pathway regulates the invasion, metastasis and immune function of lung adenocarcinoma after radiation [D]. Kunming: Kunming Medical University; 2020.
- [3] 陈婷, 王双, 张恋, 等. 多次注射乌拉坦诱导的 BALB/C 及 C57BL/6J 小鼠肺癌模型的比较 [J]. 四川动物, 2014, 33 (2): 275-278.
Chen T, Wang S, Zhang L, et al. Comparative study of lung cancer models on BALB/C and C57BL/6J mice induced by multiple urethane injections [J]. Sichuan J Zool, 2014, 33 (2): 275-278.
- [4] 韩靓, 刘殿峰, 祁明辉, 等. TETs 蛋白在乌拉坦诱导小鼠肺癌模型中的表达模式 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (1): 1-6.
Han L, Liu DF, Qi MH, et al. Analysis of the expression pattern of TET proteins in lung cancer mouse model induced by urethane [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30 (1): 1-6.
- [5] 胥孜杭, 刘菲, 邹纯朴, 等. 小鼠肺癌原位模型的建立 [J]. 中国医药导报, 2015, 12 (1): 15-18, 169.
Xu ZH, Liu F, Zou CP, et al. Establishment of orthotopic lung cancer model in mice [J]. Chin Med Her, 2015, 12 (1): 15-18, 169.
- [6] 李杰, 缪维芳, 吴秀兰. Matrigel 在肿瘤体内外研究模型中的应用 [J]. 海峡药学, 2014, 26 (8): 74-76.
Li J, Miao WF, Wu XL. Application of matrigel in tumor research model *in vivo* and *in vitro* [J]. Strait Pharm J, 2014, 26 (8): 74-76.

- [7] Kastana P, Zahra FT, Ntenekou D, et al. Matrigel plug assay for *in vivo* evaluation of angiogenesis [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1952: 219–232.
- [8] 张斌斌, 高全文, 李冰, 等. 骨髓间充质干细胞在 Matrigel 凝胶支架上的生长与变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(13): 1993–1998.
- Zhang BB, Gao QW, Li B, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells on matrigel: growing and changing [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22(13): 1993–1998.
- [9] Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 287–309.
- [10] Flidner FP, Hansen AE, Jørgensen JT, et al. The use of matrigel has no influence on tumor development or pet imaging in fadu human head and neck cancer xenografts [J]. *BMC Med Imaging*, 2016, 16: 5.
- [11] 李杨, 杨玲玲, 白彦丽, 等. 黄芪多糖对气阴两虚 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长、转移及细胞周期的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2018, 45(3): 131–137.
- Li Y, Yang LL, Bai YL, et al. Effects of astragalus polysaccharides on the growth, metastasis and cell cycle of lewis lung cancer in tumor-bearing mice with qi and yin deficiency [J]. *Cancer Res Prev Treat*, 2018, 45(3): 131–137.
- [12] 张娜, 田燕歌, 刘学芳, 等. 小鼠移植性肺癌转移模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(4): 557–562.
- Zhang N, Tian YG, Liu XF, et al. Research progress in the metastatic model of transplanted lung cancer in mouse [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(4): 557–562.
- [13] 李宁, 张晓晔, 蒋中秀, 等. 小鼠 Lewis 肺癌原位模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(5): 79–83.
- Li N, Zhang XY, Jiang ZX, et al. Establishment of a mouse model of orthotopic Lewis lung cancer [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2014, 22(5): 79–83.
- [14] 袁志强. RGD 介导的环境敏感型胶束在治疗非小细胞肺癌中的应用 [D]. 苏州: 苏州大学; 2017.
- Yuan ZQ. Application of RGD mediated environment sensitive micelles in the treatment of non-small cell lung cancer [D]. Suzhou: Suzhou University; 2017.
- [15] 张胜行, 张诗兰, 兰小鹏. 人结肠癌 SW480 细胞裸鼠皮下移植瘤模型的建立 [J]. *东南国防医药*, 2012, 14(2): 108–110.
- Zhang SX, Zhang SL, Lan XP. The establishment of subcutaneous transplantation model of human colon cancer SW480 cells in nude mice [J]. *Mil Med J Southeast Chin*, 2012, 14(2): 108–110.
- [16] 雷霞, 伍津津. 基质胶的生物学活性研究进展 [J]. *口腔医学*, 2011, 31(6): 368–371.
- Lei X, Wu JJ. Research progress on biological activity of matrigel [J]. *Stomatol*, 2011, 31(6): 368–371.
- [17] Hadley MA, Byers SW, Suárez-Quian CA, et al. Extracellular matrix regulates sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development *in vitro* [J]. *J Cell Biol*, 1985, 101(4): 1511–1522.
- [18] 张龙, 孙晓娟, 陈成龙, 等. Matrigel 对人骨肉瘤动物模型移植瘤形成的影响 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2017, 29(11): 721–725.
- Zhang L, Sun XJ, Chen CL, et al. Effect of Matrigel on the formation of transplanted tumor in human osteosarcoma animal model [J]. *Cancer Res Clin*, 2017, 29(11): 721–725.
- [19] 郭建勋, 王任先, 刘巍峰, 等. 人骨肉瘤 OS-732、Saos-2 和 U2OS 裸鼠成瘤模型的建立和比较 [J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(7): 1103–1107.
- Guo JX, Wang RX, Liu WF, et al. Establishment and comparison of tumor forming models of human osteosarcoma OS-732, Saos-2 and U2OS in nude mice [J]. *J Mod Oncol*, 2021, 29(7): 1103–1107.

[收稿日期] 2021–11–24

何兰娟,邓渊,王燕,等. 四神丸对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 TLR4、NOD2 表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 613-618.

He LJ, Deng Y, Wang Y, et al. Effect of Sishen pills on the expression of TLR4 and NOD2 in a rat colon with ulcerative colitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 613-618.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.003

四神丸对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 TLR4、NOD2 表达的影响

何兰娟¹, 邓渊², 王燕^{1,3}, 朱向东^{1,3*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730101; 2. 甘肃省人民医院, 兰州 730000; 3. 宁夏医科大学, 银川 750004)

【摘要】 目的 通过对比大鼠结肠组织中的 Toll 样受体 4 (TLR4) 和核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2 (NOD2) 治疗前后水平的变化,从修复肠粘膜屏障的角度探讨四神丸治疗溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的作用机制。**方法** UC 大鼠模型制备采用三硝基苯磺酸/乙醇溶液灌肠法。将 40 只大鼠随机分为空白组、模型组、柳氮磺吡啶组 (0.36 g/(kg·d)) 和中药组 (5 g/(kg·d)), 通过采用 HE 染色法、RT-qPCR 法、SP 法和 Western Blot 法观察结肠组织中 TLR4、NOD2 的基因和蛋白表达。**结果** 与空白组相比较,模型组大鼠结肠损伤严重,损伤评分显著增高 ($P < 0.01$), TLR4、NOD2 mRNA 和蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与模型组相比较,各治疗组大鼠结肠损伤有一定程度的恢复,损伤评分显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), TLR4、NOD2 mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 四神丸可以通过提高大鼠的免疫功能,抑制肠道炎症反应,达到治疗 UC 的目的。

【关键词】 四神丸; 溃疡性结肠炎; Toll 样受体 4; 核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0613-06

Effect of Sishen pills on the expression of TLR4 and NOD2 in a rat colon with ulcerative colitis

HE Lanjuan¹, DENG Yuan², WANG Yan^{1,3}, ZHU Xiangdong^{1,3*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730101, China. 2. Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000. 3. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

Corresponding author: ZHU Xiangdong. E-mail: zhuxiangdong33@163.com

【Abstract】 Objective To observe the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nucleotide binding oligomerization domain protein 2 (NOD2) in the colon of a ulcerative colitis (UC) rat model, and to explore the therapeutic mechanism of Sishen pills in the treatment of UC from the perspective of repairing the intestinal mucosal barrier. **Methods** A UC rat model was prepared by administration of a trinitrobenzenesulfonic acid/ethanol solution enema. Forty rats were randomly divided into four groups, a blank group, model group, salazopyrimidine group (0.36 g/(kg·d)), and Sishen pills group (5 g/(kg·d)). The mRNA and protein expressions of TLR4 and NOD2 in colon tissue were detected by

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81360541、81760833、81960826), 兰州市科技发展指导性计划项目 (2020-ZD-61), 甘肃省中医药研究中心 2020 年专项开放课题 (zyzx-2020-13)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81360541, 81760833, 81960826), Science and Technology Development Guiding Plan Project of Lanzhou (2020-ZD-61), Special Open Project of Gansu Research Center of Traditional Chinese Medicine in 2020 (zyzx-2020-13).

【作者简介】 何兰娟 (1989—), 女, 住院医师, 研究方向: 中医治则治法。Email: 1032497493@qq.com

【通信作者】 朱向东 (1973—), 男, 教授, 研究方向: 中医治则治法。Email: zhuxiangdong33@163.com

HE staining, RT-qPCR, SP immunohistochemistry and Western Blot. **Results** Compared with the blank group, the colonic mucosal injury score of the model group was significantly greater ($P < 0.01$), and the expressions of TLR4, NOD2 mRNA and protein were significantly greater ($P < 0.01$, $P < 0.05$); Compared with the model group, the scores of colonic mucosal injury in each treatment group were significantly less ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the expressions of TLR4, NOD2 mRNA and protein were significantly less ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusions** Sishen pills can improve the immune function of rats and inhibit intestinal inflammatory reactions for UC treatment.

【Keywords】 Sishen pills; ulcerative colitis; Toll-like receptor 4; nucleotide-binding oligomerization domain protein 2

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

溃疡性结肠炎是一种病因尚不明确的慢性非特异性炎症性肠病,且发病率逐年增长。目前 UC 的发病机制多认为与免疫因素相关^[1]。固有免疫作为人体第一道机体防御感染性防线,它的启动和实施主要依靠模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别病原体相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP)。而哺乳动物中的最典型的两类 PRRs 为 TOLL 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 和核苷酸结合寡聚化结构域受体 (nucleotide-binding domain leucine-rich repeats, NLRs)^[2]。

目前临床多采用糖皮质激素、免疫抑制剂等免疫疗法,但是疗效不稳定,所以急需寻找一种新的特异性疗法^[3-4]。近年来,中医药在治疗 UC 和缓解 UC 症状等方面优势明显^[5]。四神丸之名首载于《陈氏小儿痘疹方论》,临床研究发现其对 UC 具有良好的治疗作用,本课题通过对比四神丸治疗 UC 大鼠后结肠组织中的 TLR4、NOD2 的表达变化,进一步明确其治疗 UC 的机制,为进一步开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 8 月龄体重为 (180 ± 20) g 的 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只 (雌雄各 20 只),饲养于温度 $21 \sim 25^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $50\% \sim 60\%$,光照昼夜交替各 12 h 的环境中,饮水自由,普通饲料喂养。实验用鼠购买和喂养均在甘肃中医药大学实验动物中心进行【SCXK (甘) 2020-0001】【SYXK (甘) 2020-0009】。本实验符合甘肃中医药大学实验动物伦理会审查要求 (2018-081)。

1.1.2 主要试剂与仪器

四神丸 (补骨脂、肉豆蔻、五味子、吴茱萸)、柳氮磺胺嘧啶肠溶片均购自于兰州惠仁堂大药房,生

产批号分别为 20140502、1412001、20140812、20140822、09140703。四神丸制备浓缩为 1 g/mL 的药液;柳氮磺胺嘧啶肠溶片研磨后制成浓度为 0.025 g/mL 的药液。所有药品均于 4°C 保存。

2,4,6-三硝基苯磺酸/TNBS (美国 Sigma 公司,批号 2508-19-2);PCR 试剂盒 (Promega Corporation 公司);PCR 引物 (生工生物工程股份有限公司);Anti-TLR4 antibody、Anti-NOD2 antibody (abcam 公司,批号 ab13556、ab124348);BCA 蛋白定量试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司,批号:1431401);DAB 显色试剂盒、SP 检测试剂盒 (中杉金桥生物技术有限公司,批号 K156921A、15155A06) 等。

iMark 酶标仪、S1000™ 型 PCR 仪、凝胶成像仪、电泳仪电源、电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司);7500 实时定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司);XS-212-202 双目显微镜 (日本奥林巴斯公司);冷冻离心机 (中国上海天美生化仪器设备有限公司) 等。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组

将 40 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、西药组、四神丸组,每组 10 只。将大鼠喂养 1 周后,除空白组外,用三硝基苯磺酸 (TNBS)/乙醇溶液灌肠 (100 mg/kg) 缓慢注入结肠部位制备 UC 大鼠模型^[6]。

1.2.2 给药与取材

给药剂量按照人与大鼠体表系数折算法计算^[7],空白组和模型组以等体积生理盐水灌胃,柳氮磺胺嘧啶组用 SASP 溶液 $0.36 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃治疗,中药组用四神丸 $5 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃治疗。共计干预 21 d。治疗结束后,取动脉血及结肠组织备用。

1.2.3 肉眼观察大鼠结肠粘膜损伤及进行损伤评分

将大鼠处死后取结肠病变部分,洗净后观察大鼠结肠粘膜损伤情况,并参考 Wallace & Keenan 标准^[8]进行评分 (见表 1)。

表 1 结肠粘膜损伤评分表

Table 1 Colonic mucosal injury score

损伤情况	分数
Damage condition	Score
无损伤	0 分
No damage	Score 0
局部充血无溃疡	1 分
Local congestion without ulcer	Score 1
1 处溃疡不伴充血或肠壁增厚	2 分
1 ulcer without hyperemia or intestinal wall thickening	Score 2
1 处溃疡伴炎症	3 分
1 ulcer with inflammation	Score 3
> 2 处溃疡伴炎症	4 分
> 2 ulcers with inflammation	Score 4
> 2 处溃疡和/或炎症 > 1 cm	5 分
> 2 ulcers and/or inflammation > 1 cm	Score 5

1.2.4 HE 染色法观察大鼠结肠病理组织变化

采用苏木素-伊红染色法染色,将结肠组织玻片放置在显微镜下观察大鼠结肠病理学改变,并拍照分析。

1.2.5 RT-qPCR 法检测大鼠结肠组织中 TLR4、NOD2 mRNA 的表达

采用 TRIzol 法提取 RNA 后,按照 Go Taq 2-Step RT-qPCR System 试剂盒说明书进行操作,逆转录为 cDNA。运用 PCR 仪进行扩增,具体配置比例按照 Reverse Transcription System 试剂盒说明进行。采用 ΔCt 法计算基因的相对表达量,TLR4、NOD2 引物信息见表 2。

表 2 引物信息

Table 2 Information of primers

引物	序列(5'→3')	长度(bp)
Primers	Sequences(5'→3')	Size(bp)
内参	F:GGACCTGACTGACTACTACTGAA	41
β -actin	R:CTTAATGTCACGCACGATTTC	
Toll 样受体 4	F:TGGCATCATCT TCATTGTCC	94
Toll4	R:CAGAGCATTGCTCTCCCACT	
核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2	F:GTTCTGATGGGGTTCAGTGG	58
NOD2	R:GACGCCCTAGAGGTAAGC	

1.2.6 SP 免疫组化法检测大鼠结肠组织中 TLR4、NOD2 蛋白的表达

将切片放入二甲苯及乙醇溶液中脱蜡水化,灭活内源性过氧化物酶后进行抗原修复,滴加封闭用正常山羊血清工作液阻断非特异性反应,加入一抗 TLR4(1:200),NOD2(1:400),再滴加生物素标记山羊抗兔/小鼠 IgE 及滴加辣根酶标记链霉卵白

素工作液,最后 DAB 显色、复染、脱水透明封片分析其平均光密度值。

1.2.7 Western Blot 检测 TLR4、NOD2 蛋白的表达

蛋白提取后,电泳跑胶转膜封闭后,加入一抗 TLR4(1:500),NOD2(1:2000), β -actin(1:1000),37℃ 孵育 30 min,4℃ 过夜;加入二抗(1:5000)。曝光后进行分析。

1.3 统计学分析

结果采用 SPSS 19.0 软件处理,数据均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表达,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示组间比较具有显著性差异。

2 结果

2.1 大鼠结肠粘膜损伤情况

空白组大鼠结肠粘膜光滑,未见充血、溃疡等情况;模型组大鼠结肠可见不同程度粘膜充血,部分可见水肿糜烂溃疡,肠壁增厚;柳氮磺胺嘧啶组和中药组大鼠结肠可有不同程度恢复,轻度充血水肿,基本无糜烂及溃疡面。模型组结肠组织损伤评分较空白组明显升高($P < 0.01$),柳氮磺胺嘧啶组和四神丸组结肠组织损伤评分较模型组明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)(见表 3)。

表 3 各组症状积分及结肠肉眼评分表($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Symptom score and macroscopic colon score of each

group($\bar{x} \pm s, n = 10$)		
组别	剂量(g/kg)	结肠粘膜损伤评分
Groups	Dose(g/kg)	Colonic mucosal injury score
空白组	0.00	0.30 $\pm$ 0.48
Blank group		
模型组	0.00	2.50 $\pm$ 1.08 $^{\Delta}$
Model group		
柳氮磺胺嘧啶组	0.36	1.50 $\pm$ 0.85 $^{\Delta}$
SASP group		
四神丸组	5.00	1.30 $\pm$ 0.95 *
Sishen pills group		

注:与空白组相比, $^{\Delta}P < 0.01$;与模型组相比, $^*P < 0.01$,与柳氮磺胺嘧啶组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。(下表同)

Note. Compared with the blank group, $^{\Delta}P < 0.01$. Compared with the model group, $^*P < 0.01$. Compared with the SASP group, $^{\Delta}P < 0.05$. (The same in the following tables)

2.2 大鼠结肠病理形态学观察

空白组大鼠结肠黏膜结构清晰无异常;模型组结肠组织结构被破坏,可见大量炎性细胞浸润并伴有溃疡;柳氮磺胺嘧啶组和四神丸组结肠粘膜逐步恢复正常结构,炎性细胞浸润情况较模型组减轻,可见肠壁增厚及肉芽组织增生(见图 1)。

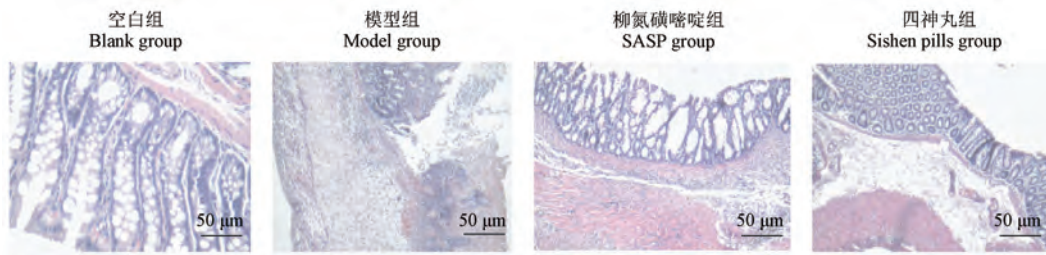


图 1 各组大鼠结肠病理形态学变化

Figure 1 Pathological changes of colon in each group

2.3 对大鼠结肠组织 TLR4、NOD2 mRNA 的影响

模型组大鼠结肠组织中 TLR4、NOD2 mRNA 表达水平较空白组明显上升 ($P < 0.01$); 柳氮磺胺吡啶组和四神丸组结肠组织中 TLR4、NOD2 mRNA 表达水平较模型组明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$) (见表 4)。

2.4 对大鼠结肠组织 TLR4、NOD2 蛋白定位的影响

TLR4 和 NOD2 在空白组中基本不表达, 在模型组中的黏膜上层和固有层中表达明显增多, 经治疗后, 表达明显降低。模型组结肠组织中 TLR4、NOD2

蛋白表达水平较空白组明显升高 ($P < 0.05$); 氮磺胺吡啶组和四神丸组结肠组织中 TLR4、NOD2 蛋白表达水平较模型组明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$) (见图 2, 表 5)。

2.5 对 UC 大鼠结肠组织 TLR4 与 NOD2 蛋白表达的影响

与空白组比较, 模型组大鼠结肠组织中 TLR4、NOD2 蛋白表达水平明显上升 ($P < 0.01$); 氮磺胺吡啶组和四神丸组大鼠结肠组织中 TLR4、NOD2 蛋白表达水平较模型组明显下降 ($P < 0.01$) (见图 3, 表 6)。

表 4 各组大鼠结肠组织中 TLR4、NOD2 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Expression of TLR4 and NOD2 mRNA in colon tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	Toll 样受体 4	核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2
Groups	Dose (g/kg)	TLR4	NOD2
空白组 Blank group	0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组 Model group	0.00	1.69 ± 0.13 [△]	1.55 ± 0.21 [△]
柳氮磺胺吡啶组 SASP group	0.36	1.24 ± 0.99 [▲]	1.37 ± 0.80 [▲]
四神丸组 Sishen pills group	5.00	1.33 ± 0.28 [*]	1.21 ± 0.62 [*]

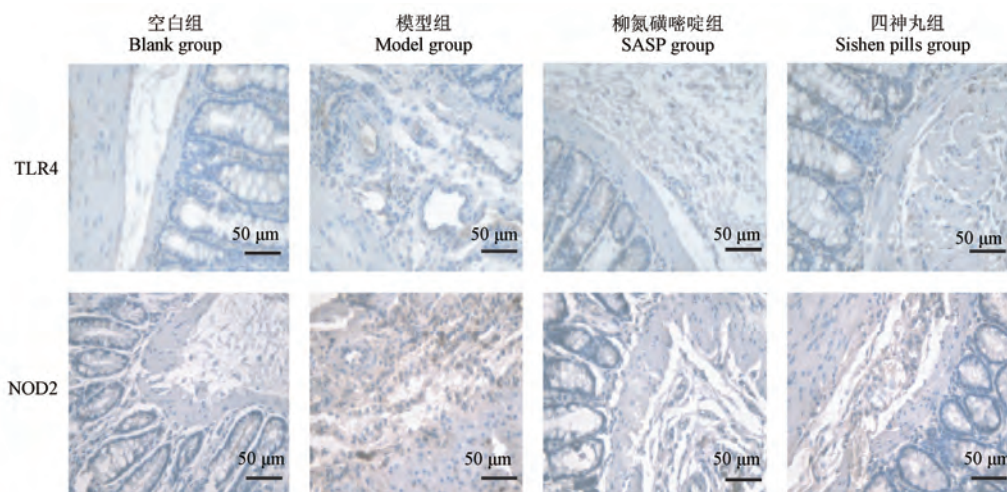


图 2 各组大鼠结肠组织中 TLR4、NOD2 蛋白的表达

Figure 2 Expression of TLR4 and NOD2 protein in colon tissue of rats in each group

表 5 各组大鼠结肠组织中 TLR4、NOD2 蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Expression of TLR4 and NOD2 protein in colon tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose (g/kg)	Toll 样受体 4 TLR4	核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2 NOD2
空白组 Blank group	0.00	0.315 ± 0.039	0.291 ± 0.006
模型组 Model group	0.00	0.344 ± 0.010 [△]	0.411 ± 0.005 [△]
柳氮黄嘧啶组 SASP group	0.36	0.324 ± 0.030 [▲]	0.311 ± 0.003 [▲]
四神丸组 Sishen pills group	5.00	0.310 ± 0.006 [*]	0.370 ± 0.010 [*]

表 6 各组大鼠结肠组织中 TLR4、NOD2 蛋白的相对表达量($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 6 Relative expression of TLR4 and NOD2 proteins in colon of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose(g/kg)	Toll 样受体 4 TLR4	核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2 NOD2
空白组 Blank group	0.00	0.459 ± 0.079	0.643 ± 0.237
模型组 Model group	0.00	0.920 ± 0.032 [△]	1.045 ± 0.186 [△]
柳氮黄嘧啶组 SASP group	0.36	0.808 ± 0.077 [▲]	0.859 ± 0.107 [▲]
四神丸组 Sishen pills group	5.00	0.751 ± 0.049 [*]	0.825 ± 0.029 [*]

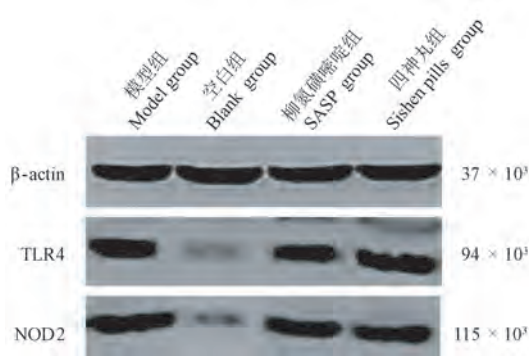


图 3 大鼠结肠组织中 TLR4、NOD2 蛋白表达电泳

Figure 3 Electrophoresis of TLR4、NOD2 protein expression in rat colon

3 讨论

UC 属于中医学中“泄泻”的范畴,若先天禀赋不足,则会导致肾阴阳之亏虚,继而导致脾失濡养,脾肾亏虚最终运化无能导致泄泻,所以 UC 的发病多与脾肾密切相关,而脾肾阳虚又进一步助长了湿气的产生,因此“阳虚湿盛”为 UC 发生的重要病机。四神丸由肉豆蔻、五味子、补骨脂、吴茱萸、生姜、大枣组成,适用于由脾肾虚寒所致的肠失固摄之证。诸药相配,则脾肾温则运化复,大肠固而泄可止。

TLR4 作为人类首个发现的 TLR 相关蛋白,广泛存在于人体的各类细胞中,是参与免疫炎症反应的重要因子^[9],TLR 与内源性配体结合后触发炎症,产生免疫应答。NF-κB 是位于 TLR4 的下游信号通路,大量的研究显示 TLR4/NF-κB 信号通路与抗炎免疫机制密切相关,在炎症发生发展过程中发挥着重要作用^[10]。近年来,相关研究在肠粘膜上皮

细胞中也发现 TLR4 的存在,并证明其在减轻肠道损伤方面具有重要意义^[11]。

NOD2 作为一种细胞内模式识别受体,通过与其配体 MDP 相结合,主要存在于单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等^[12]。正常情况下,NOD2 通过 NF-κB 信号通路激活其下游的各种炎症介质,从而介导机体的炎症反应^[13]。有研究显示 NOD2 在识别和杀灭细菌功能方面有密切的联系,提示 NOD2 可能还有直接杀菌的作用^[14]。另外,有研究显示,NOD2 基因突变可以导致肠道屏障受损,使得肠道杀菌能力降低,引起致病菌侵入并导致相关炎症反应^[15-16]。

因此,Toll 样受体和 NOD 样受体作为启动固有免疫,激活免疫应答的重要因子,在免疫反应中有着至关重要的作用。本研究结果显示,模型组中 TLR4 和 NOD2 含量明显增高,经四神丸治疗后,TLR4 和 NOD2 含量明显降低,提示四神丸可以提高大鼠的免疫功能,抑制炎症反应,修复大鼠肠道屏障,达到治疗 UC 的目的。

参 考 文 献 (References)

- [1] Liu ZJ, Yadav PK, Su JL, et al. Potential role of TH17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(46): 5784-5788.
- [2] 饶振华, 谢小梅. NODs 蛋白及其与 TLRs 相互调控在机体抗病原真菌感染中的作用 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(3): 281-285.
Rao ZH, Xie XM. The role of NODs proteins and their interaction with TLRs in the body's resistance to fungal infection [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2012, 32(3): 281-285.
- [3] 冉志华, 童锦禄. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见 (2018 年, 北京) 克罗恩病部分解读 [J]. 中华消化杂志, 2018, 38

- (5): 315-317.
- Ran ZH, Tong JL. Interpretation of the consensus on diagnosis and management of inflammatory bowel disease (Beijing, 2018) from the perspective of diagnosis of Crohn's disease [J]. Chin J Dig, 2018, 38(5): 315-317.
- [4] Guo BJ, Bian ZX, Qiu HC, et al. Biological and clinical implications of herbal medicine and natural products for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. Ann N Y Acad Sci, 2017, 1401(1): 37-48.
- [5] 顾思臻, 薛艳, 张玉丽, 等. 口服中药复方治疗溃疡性结肠炎临床疗效 Meta 分析 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(12): 981-986.
- Gu SZ, Xue Y, Zhang YL, et al. Meta-analysis of the efficacy of oral traditional chinese medicine in the treatment of ulcerative colitis [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2018, 26(12): 981-986.
- [6] 梁勇, 颜丽萍, 苏林, 等. 枯草杆菌二联活菌对溃疡性结肠炎大鼠的作用及机制 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(1): 27-29.
- Liang Y, Yan LP, Su L, et al. Effect and mechanism of *Bacillus subtilis* on rats with ulcerative colitis [J]. Chin J Gerontol, 2017, 37(1): 27-29.
- [7] 赖慧敏, 黄敏聪, 楼招欢, 等. 天台乌药对 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎模型大鼠的抗炎作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(2): 37-44.
- Lai HM, Huang MC, Lou ZH, et al. The effect of Tiantai Radix Linderae on a rat model of ulcerative colitis induced by TNBS [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(2): 37-44.
- [8] Wallace JL, Keenan CM. An orally active inhibitor of leukotriene synthesis accelerates healing in a rat model of colitis [J]. Am J Physiol, 1990, 258(4): G527-G534.
- [9] 郭晓强. Toll 受体的发现及其意义 [J]. 生物学教学, 2012, 37(3): 59-60.
- Guo XQ. Discovery of toll like receptor and its significance [J]. Biol Teach, 2012, 37(3): 59-60.
- [10] 王娜, 张雪梅, 陈立杰. TLR4 信号通路炎症相关性疾病 [J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(5): 857-860.
- Wang N, Zhang XM, Chen LJ. TLR4 signaling pathway and inflammation related diseases [J]. Chin J Lab Diagn, 2015, 19(5): 857-860.
- [11] 于志坚. 溃疡性结肠炎菌群变化对肠上皮细胞 TLRs 表达影响 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学; 2016.
- Yu ZJ. Effect of bacterial flora of ulcerative colitis on the expression of TLRs in intestinal epithelial cells [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University; 2016.
- [12] 高其宏, 芮景. 细胞内模式识别受体 NOD2 蛋白的研究进展 [J]. 放射免疫学杂志, 2008, 21(5): 432-434.
- Gao QH, Rui J. Research progress of intracellular pattern recognition receptor NOD2 protein [J]. J Radioimmunol, 2008, 21(5): 432-434.
- [13] Inohara N, Ogura Y, Chen FF, et al. Human nod1 confers responsiveness to bacterial lipopoly-saccharides [J]. Biol Chem, 2001, 276(4): 2551-2554.
- [14] Hismatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, et al. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells [J]. Gastroenterology, 2003, 124(4): 993-1000.
- [15] Kim YG, Shaw MH, Warner N, et al. Cutting edge: Crohn's disease-associated Nod2 mutation limits production of proinflammatory cytokines to protect the host from *Enterococcus faecalis*-induced lethality [J]. J Immunol, 2011, 187(6): 2849-2852.
- [16] Ferreira CM, Vieira AT, Vinolo MAR, et al. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases [J]. J Immunol Res, 2014, 2014: 1-12.

[收稿日期] 2021-11-29

张霞,王配,刘志朋,等. 基于转录组测序研究 *CatSper1* 在版纳微型猪近交系睾丸组织中的转录调控特征 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 619-628.

Zhang X, Wang P, Liu ZP, et al. Transcriptional regulation characteristics of *CatSper1* in testis of Banna mini-pig inbred line based on transcriptome sequencing [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 619-628.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.004

基于转录组测序研究 *CatSper1* 在版纳微型猪近交系 睾丸组织中的转录调控特征

张霞^{1,2#}, 王配^{2#}, 刘志朋², 霍海龙³, 代红梅², 赵筱³, 霍金龙^{2*}

(1. 吕梁学院 生命科学系, 山西 吕梁 033001; 2. 云南农业大学 动物科学技术学院, 昆明 650201;
3. 云南农业职业技术学院, 昆明 650212)

【摘要】 目的 *CatSper1* 是精子特定的电压门控 Ca^{2+} 通道蛋白, 在精子生成和受精过程中具有重要作用。本研究旨在分析 *CatSper1* 基因在版纳微型猪近交系(BMI)的表达调控模式、序列特征与潜在的生物学功能。**方法** 取成年 BMI 公猪睾丸进行转录组测序; 采用 RT-PCR 技术克隆 *CatSper1* 的完整编码序列; 分析 *CatSper1* 的序列、结构特征及相互作用蛋白; 利用转录组测序数据构建 *CatSper1* 的 lncRNA 和 miRNA 调控网络, 并进行 GO 功能注释。**结果** RNA-seq 获得 *CatSper1* 基因的平均表达量和平均 TPM 值分别为 2817.5 和 33.6。*CatSper1* CDS 区全长为 2166 bp (GenBank 登录号: OK042306), 编码 721 个氨基酸, 含有 233 个氨基酸残基组成的 Ion_trans 保守结构域以及与精子生成相关的保守跨膜螺旋结构。*CatSper1* 蛋白与 10 个雄性育性相关蛋白质存在相互作用, 尤其与该基因家族成员 *CatSper2-4* 蛋白互作最为紧密。*CatSper1* 基因受 10 个 miRNAs 靶向调控, 分别有 16 个和 14 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-1343 和 ssc-miR-744。GO 注释发现 *CatSper1* 基因在分子功能(MF)、生物学过程(BP)、细胞成分(CC)等方面均具有重要功能。**结论** 本研究报道了 *CatSper1* 在 BMI 睾丸中的表达, 基因的分子结构特征和表达调控网络, 为深入研究 *CatSper1* 基因在 BMI 精子发生、精子获能和顶体反应等重要生物学过程中的功能奠定了基础。

【关键词】 版纳微型猪近交系; 阳离子通道精子相关蛋白 1; 转录组测序; 精子生成; 转录调控

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0619-10

Transcriptional regulation characteristics of *CatSper1* in testis of Banna mini-pig inbred line based on transcriptome sequencing

ZHANG Xia^{1,2#}, WANG Pei^{2#}, LIU Zhipeng², HUO Hailong³, DAI Hongmei², ZHAO Xiao³, HUO Jinlong^{2*}

(1. Department of Life Science, Lyuliang University, Lvliang 033001, China. 2. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201. 3. Yunnan Vocational and Technical College of Agriculture, Kunming 650212)

Corresponding author: HUO Jinlong. E-mail: jinlonghuo973@163.com

【Abstract】 Objective *CatSper1* is a sperm-specific voltage-gated Ca^{2+} channel protein that plays an essential role in spermatogenesis and fertilization. We analyzed the expression regulation pattern, sequence characteristics, and potential biological function of *CatSper1* gene of Banna mini-pig inbred (BMI) line. **Methods** The testes of adult BMI boars were

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (32060733, 31460580, 31660637, 31660650), 吕梁学院博士科研启动基金项目。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32060733, 31460580, 31660637, 31660650), Doctoral Research Foundation of Lyuliang University.

【作者简介】 张霞 (1990—), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 猪分子生物学研究。Email: xiazhang1425@163.com;

王配 (1987—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 猪分子遗传学研究。Email: peipei99999@126.com。

#共同第一作者

【通信作者】 霍金龙 (1975—), 男, 副教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 猪分子遗传育种和生殖生理研究。Email: jinlonghuo973@163.com

used for RNA sequencing (RNA-seq), and the complete coding sequence of *CatSper1* was cloned using reverse-transcription polymerase chain reaction. The sequence, structural characteristics, and interacting proteins of *CatSper1* were analyzed. The lncRNA and miRNA regulatory network of *CatSper1* was constructed, and gene ontology function annotations were carried out using RNA-seq data. **Results** The average expression level and transcripts per million of *CatSper1* obtained by RNA-seq was 2817.5 and 33.6, respectively. The full-length coding sequence of *CatSper1* was 2166 bp (GenBank accession number: OK042306), encoding 721 amino acids. *CatSper1* protein contained an Ion_trans conserved domain of 233 amino acid residues and a conserved transmembrane helix structure related to spermatogenesis. *CatSper1* protein interacted with 10 proteins related to male reproduction, especially *CatSper2-4* of the *CatSper* family. Ten miRNAs regulated *CatSper1* gene by a targeted mode, and 16 and 14 lncRNAs completed with *CatSper1* for binding to ssc-miR-1343 and ssc-miR-744, respectively. The gene ontology annotation result indicated that the *CatSper1* gene plays important roles in molecular functions, biological processes, and cellular components. **Conclusions** This study reported the expression *CatSper1* in BMI testis, the molecular structure characteristics and expression regulatory network. The fundings will lay groundwork for further research of *CatSper1* function in important biological processes such as spermatogenesis, sperm capacitation and acrosome reaction in BMI line.

【Keywords】 Banna mini-pig inbred line (BMI); cation channel sperm-associated protein 1 (*CatSper1*); RNA-seq; spermatogenesis; transcriptional regulation

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

在哺乳动物的许多生物学过程中,离子通道具有重要的功能,其不仅能传导电信号,还具有传送 Ca^{2+} 化学信号、跨上皮转运、调节细胞质或囊泡离子浓度和 pH 值以及调节细胞体积等功能^[1]。精子细胞内的 pH 和 Ca^{2+} 浓度可调节精子活力、趋化性、获能和顶体反应,并对精子到达卵子以及受精成败至关重要^[2]。*CatSper* 家族是精子特定的电压门控 Ca^{2+} 通道,对酸碱度较为敏感^[3]。该通道蛋白主要存在于成熟精子尾部鞭毛细胞的质膜中^[4],它允许 Ca^{2+} 流入精子,并参与其生理过程,最后启动酪氨酸磷酸化级联放大反应来控制精子的活力^[5]。有研究发现,若小鼠 *CatSper* 通道功能被抑制,则卵子受精能力将严重下降^[6]。*CatSper* 家族包含 4 个成员 (*CatSper1-4*) 和 6 个辅助亚基 (*CatSperβ*、*γ*、*δ*、*ε*、*ζ* 和 *EFCAB9*)^[7],*CatSper* 家族成员的序列同一性在整个离子通道结构域中介于 22% ~ 27% 之间^[8]。在小鼠中,*CatSper1*、2、3 或 4 的缺失会导致精子活力异常甚至雄性不育^[9]。在人类中,该家族能够介导类固醇性激素黄体酮诱导的 Ca^{2+} 流入,进而影响精子的活力、过度活化、获能和顶体反应,最终影响雄性的生育能力^[10]。另外,辅助亚基 *CatSperβ*、*γ*、*δ*、*ε* 均包含 1 个跨膜片段和 1 个大的细胞外结构域,可与 *CatSper1-4* 相互作用形成稳定复合体,在精子生成过程和受精过程的活化阶段发挥重要作用。

CatSper1 (Cation channel sperm-associated protein 1) 是男性不育的重要标志物之一,其表达水平在精

子活力不足的低生育力患者中显著降低^[11]。敲除 *CatSper1* 基因的小鼠,其精子的鞭毛弯曲程度和游动振幅会受到严重影响,精子运动能力明显减弱,最终无法使卵子受精^[4]。而且敲除该基因后,精子质膜上无法检测到 *CatSperβ*、*CatSperγ*、*CatSperδ*、*CatSper2*、*CatSper3* 和 *CatSper4*,这表明所有 *CatSper* 亚基都需要正确的通道组装,单个亚基的缺失可能导致剩余的 *CatSper* 蛋白降解^[6]。在大鼠中,敲低 *CatSper1* 会诱发特发性弱精子症^[12]。综上所述,*CatSper1* 基因在雄性育性方面至关重要,本研究采用 RNA-Seq 二代测序研究检测版纳微型猪近交系睾丸组织中 *CatSper1* 基因的表达^[13],获得与之相互作用的 lncRNA 和 miRNA,并利用睾丸 RNA 克隆 *CatSper1* 基因,对其序列特征和功能进行分析,最终通过大数据联合分析获得 *CatSper1* 和 lncRNA、miRNA 的调控网络,以期解析 *CatSper1* 调控版纳微型猪近交系精子生成及受精过程的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

版纳微型猪近交系是利用云南特有地方猪种资源,采用连续高度近交加严格选择的科学方法,经过 40 多年的连续高度近交,培育成功的基因高度纯合、遗传背景清楚的大型哺乳类实验动物近交

系。本研究选用普通级版纳微型猪近交系 12 月龄成年公猪 4 头,来自昆明原种猪场【SCXK(滇)2021-0008】,饲养于云南农业大学【SYXK(滇)2021-0019】,体重 35 ~ 40 kg,光照昼夜交替各 12 h,猪舍内温度 16 ~ 25℃,湿度 60% ~ 70%。去势取睾丸组织样品。本研究相关的动物护理和实验程序均严格执行中华人民共和国科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》(【2006】398 号),并经云南农业大学动物保护委员会批准(2021-JJX-001)。

1.1.2 主要试剂与仪器

RNAiso Plus(9108)、反转录试剂盒(6110A)、Premix Taq™ version 2.0(R004Q)均购自大连 TaKaRa。高通量测序仪为 Illumina 公司的 Hiseq2000 平台;PCR 仪为 Eppendorf 公司的 Mastercycler proS。

1.2 方法

1.2.1 RNA-seq 测序及数据质控

提取睾丸组织 RNA,反转录为 cDNA,采用 RNA-seq Illumina Hiseq 2000 平台进行转录组测序,利用 Fastp 软件^[14]对原始数据进行质控并过滤,分别去除含接头的序列、含 N 比例大于 10% 的序列、全部是 A 碱基的序列和低质量序列。

1.2.2 序列比对

使用 bowtie2-2.1.0 比对工具^[15]将过滤好的数据与猪核糖体数据库进行比对,去除比对到核糖体的序列(不允许错配),并保留剩下的数据用于后续比对分析。

1.2.3 基因扩增及序列测定

根据 Ensembl 猪 *CatSper1* 201 转录本(ENSSSCT00000014164.3)设计 *CatSper1* 基因引物 F₁R₁、F₂R₂(表 1),以睾丸 cDNA 为模板通过 PCR 扩增、测序、拼接来获得全长编码序列。反应体系 25 μL;Premix Taq™ version 2.0 12.5 μL, 10 μmol/L *CatSper1*-1/2 上、下游引物各 1 μL,25 ng/μL cDNA

1 μL, H₂O 9.5 μL;PCR 程序:95℃ 5 min;95℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 80 s,35 个循环;72℃ 5 min。

1.2.4 CatSper1 功能分析

利用 Lasergene 7.1 校对测序的 *Catsper1* 序列;分别用 ProtParam 程序、SOPMA、ProtScale 和 Prosite 对 *CatSper1* 蛋白质序列的结构进行预测分析;用 String 进行蛋白互作网络分析。

1.2.5 CatSper1 的 GO 功能注释和 miRNA、lncRNA 调控网络构建

利用 Uniprot 进行 GO(Gene Ontology)注释;利用已获得的猪 RNA-seq 数据进行 miRNA 和 lncRNA 表达分析;利用 miRanda 3.3 和 RNAhybrid 2.1.2 软件对潜在的调控 *Catsper1* 的 miRNA 和 lncRNA 进行分析;用 Cytoscape 3.8.2 进行网络图绘制。

1.3 统计学分析

从 Ensembl 网站下载猪参考基因组(*Sus scrofa* 11.1)和注释文件(gtf 11.1),用 STAR-2.5.2a^[16]软件建立参考基因组 index,并将已去除核糖体序列的数据与猪参考基因组比对。用 featureCounts-2.0.1 软件^[17]和 salmon-1.5.1 软件^[18]分别计算每个样本中所有基因原始表达量和 TPM 值校正表达量。

2 结果

2.1 CatSper1 基因的转录组表达结果

RNA-seq 获得 *CatSper1* 基因的平均表达量为 2817.5,其转录本 ENSSSCT00000014164.3 在 4 个样本中的平均 TPM 值为 33.6。

2.2 CatSper1 基因及氨基酸结构信息

利用 F₁/R₁、F₂/R₂ 引物分两段扩增 *CatSper1* 基因,分别获得 1313 bp 和 1324 bp 长的产物(图 1A),通过核对测序峰图并拼接,获得 *CatSper1* 基因全长 CDS 序列 2166 bp,已获得 Genbank 认证(Accession No. OK042306),编码 721 个氨基酸(图 1B)。其中,384 ~ 617 AA 处含有 Ion_trans 保守结构域(图 1B,图 1C)。

2.3 CatSper1 基因组结构信息

CatSper1 基因定位于猪(*Sscrofa*11.1)2 号染色体 6312906 ~ 6321690 bp 位置,有 12 个外显子和 11 个内含子(图 2),剪接位点符合 GT-AG 法则。

2.4 CatSper1 蛋白质序列及结构分析

猪 *CatSper1* 蛋白质分子量 41.19×10^3 ,分子式 C₁₈₂₆H₂₇₇₅N₅₀₇O₅₄₅S₂₀,等电点 6.89,正电荷残基和负

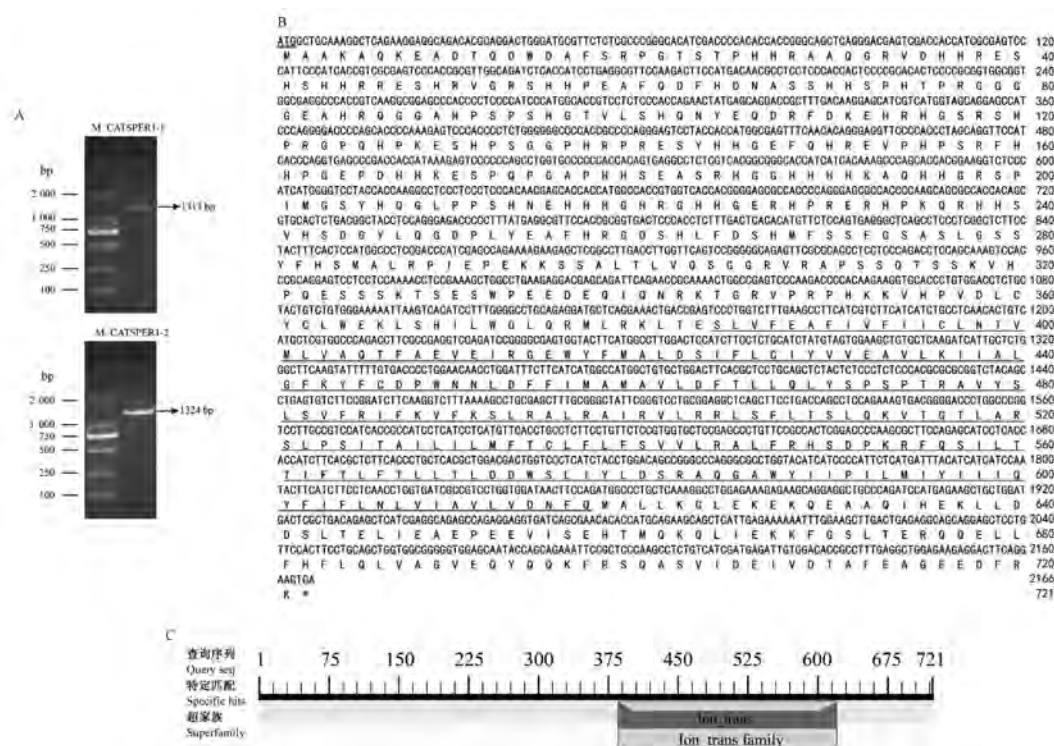
表 1 *CatSper1* 基因引物信息

Table 1 Primer information of *Catsper1* gene

名称 Name	引物(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物(bp) Product (bp)
<i>CatSper1</i> -1	F ₁ :GTCTTTTGGGCCCGTCTT	1313
	R ₁ :TCGCCCCGATCTCGACCT	
<i>CatSper1</i> -2	F ₂ :CCCAGACCTCCAGCAAAGTCCA	1324
	R ₂ :TGCAGGCCCAACGATCTTTCC	

电荷残基均为 26。二级结构元件中无规则卷曲、 α 螺旋、延伸链分别包含 293、54 和 29 个氨基酸;在

393 和 234 氨基酸处分别具有最大疏水值 3.489 和最小疏水值-3.600, N 端和 C 端均亲水。



注:A: *CatSper1* 基因 RT-PCR 产物;M:DL2000 DNA 分子量标准; *CatSper1-1*: F_1/R_1 的 PCR 产物; *CatSper1-2*: F_2/R_2 的 PCR 产物;B: *CatSper1* 基因编码序列及氨基酸序列;双下划线:起始密码子;单下划线:保守结构域 Ion_trans (384-617 位氨基酸);“*”:终止密码子;上一行和相应的下一行字母:核酸和氨基酸序列;C: *CatSper1* 蛋白质保守结构域。

图 1 *CatSper1* 基因结构

Note. A. RT-PCR product of *CatSper1*. M. DL2000 DNA Marker. *CatSper1-1*, PCR product of F_1/R_1 . *CatSper1-2*, PCR product of F_2/R_2 . B. Coding sequence and corresponding amino acid sequence of *CatSper1* gene. Double underline, start codon. Single underline, conserved domain Ion_trans (384-617AA). Asterisk, stop codon; Letters in upper line and lower line are nucleotides and amino acids, respectively. C. Conserved domain of *CatSper1*.

Figure 1 Gene structure of *CatSper1*

2.5 *CatSper1* 蛋白互作网络

PPI 蛋白互作网络分析表明, BMI *CatSper1* 蛋白与其他 10 个蛋白有相互作用关系, 包括 *CatSper2*、*CatSperB*、*CatSperG*、*CatSper4*、HSP70.2、CKAP2、*CatSperD*、KCNU1、HSPA2 和 CATSPER3, 其中与 *CatSper2*、*CatSper3* 和 *CatSper4* 蛋白相互作用最为紧密(图 3)。

2.6 跨膜螺旋结构

BMI *CatSper1* 具有 6 个跨膜螺旋结构, 分别位于 386 ~ 408 AA、418 ~ 440 AA、452 ~ 471 AA、521 ~ 543 AA、555 ~ 577 AA 和 587 ~ 609 AA 位置。通过 BLAST 获得人和小鼠的 *CatSper1* 基因的氨基酸序列, 比对结果发现该基因在人类中具有

782 个氨基酸, 有 5 个跨膜螺旋结构, 分别位于 443 ~ 465 AA、486 ~ 508 AA、583 ~ 605 AA、612 ~ 629 AA、644 ~ 666 AA 位置。在小鼠中具有 686 个氨基酸, 有 7 个跨膜螺旋结构, 分别位于 347 ~ 369 AA、390 ~ 412 AA、422 ~ 444 AA、465 ~ 484 AA、489 ~ 511 AA、518 ~ 535 AA、550 ~ 572 AA(图 4A)。BMI、人和小鼠跨膜螺旋结构长度分别为 224 AA、224 AA 和 226 AA, 序列长度较为保守, 且序列碱基也很保守, 100% 同源的氨基酸占比较大(图 4B)。

2.7 BMI *CatSper1* 的 GO 注释和潜在的 miRNA 和 lncRNA 调控网络

网络图分析发现, 版纳微型猪近交系 *CatSper1*

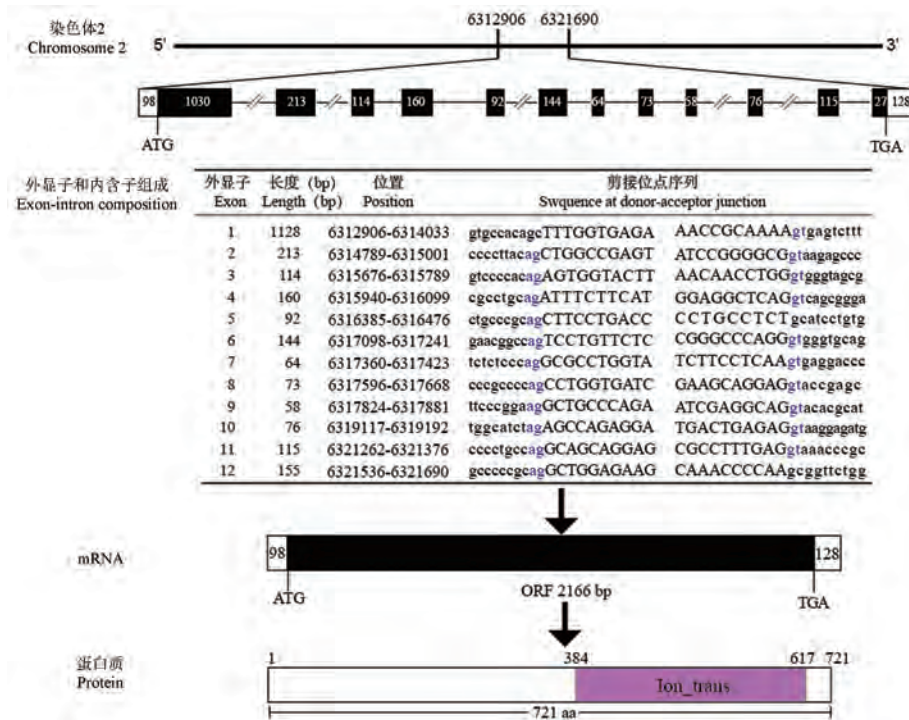
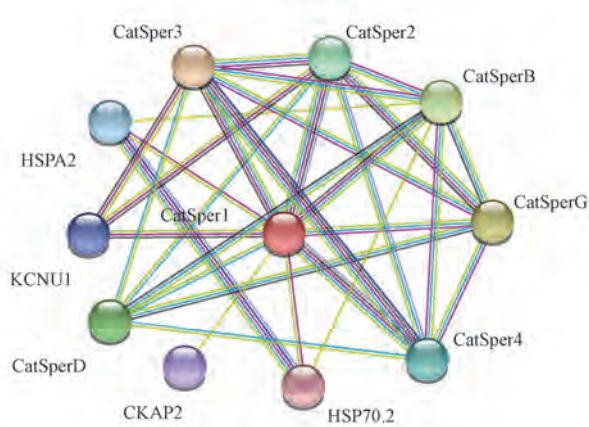


图2 *CatSper1* 基因染色体定位、mRNA 序列和蛋白质保守结构域

Figure 2 Chromosome location, mRNA sequence of *CatSper1* and its conserved protein domain



注:线:蛋白质之间作用的置信度,线越多置信度越高。

图3 猪 *CatSper1* 蛋白互作网络

Note. Line. The confidence of interactions among proteins, and more lines indicates higher confidence.

Figure 3 Interacting network of pig *CatSper1* protein

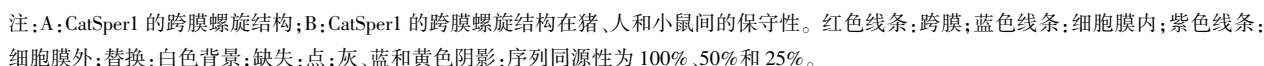
受到 10 个潜在的 miRNAs (ssc-miR-24-1-5p、ssc-miR-24-3p、ssc-miR-378、ssc-miR-423-3p、ssc-miR-24-2-5p、ssc-miR-193a-5p、ssc-miR-331-5p、ssc-miR-1343、ssc-miR-744 和 ssc-miR-378b-3p) 靶向调控。有 16 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-1343,有 14 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-744,有 3 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合

ssc-miR-24-3p,有 2 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-423-3p,有 1 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-378b-3p,有 1 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-193a-5p,有 1 个 lncRNAs 与 *CatSper1* 竞争性结合 ssc-miR-378。

通过对 *CatSper1* 的功能注释结果发现其参与 15 个 GO: 在分子功能 (molecular function, MF) 方面,主要涉及电压门控 Ca^{2+} 通道活性和钙激活阳离子通道活性等 3 个 GO; 在生物学过程 (biological process, BP), 主要涉及鞭毛精子活力、精子发生、钙离子转运、参与纤毛运动的纤毛搏动频率的调节、 Ca^{2+} 跨膜转运等 9 个 GO; 在细胞成分 (cellular components, CC), 主要涉及 G Ca^{2+} Sper 复合体、质膜、膜的组成等 3 个 GO (图 5)。

3 讨论

本研究通过版纳微型猪近交系睾丸转录组测序,获得了 *CatSper1* 基因在睾丸中的表达量,并通过 RT-PCR 克隆了该基因,拼接后获得 2 166 bp 全长 CDS 序列,编码 721 个 AA。将获得的 CDS 序列与猪基因组 (Sscrofa11.1) 比对,发现 *CatSper1* 基因位于 2 号染色体 6 312 906 ~ 6 321 690 bp 之间,共包含 12 个外显子和 11 个内含子。有研究通过对啮齿类动物 9 个亚科的物种进行研究,发现 *CatSper1* 基



Note. A. Transmembrane helix structure of CatSper1. B. Conservation of transmembrane helix structure of CatSper1 in BMI, human and mouse. Red line, transmembrane. Blue line, Inside of the cell membrane. Purple line, Outside of the cell membrane. Substitutions, White background. Deletions, Dots, Gray. Yellow and blue background, Homologies of 100%, 50% and 25%, respectively.

Figure 4 Transmembrane helix structure of CatSper1 and its conservation in BMI, human and mouse

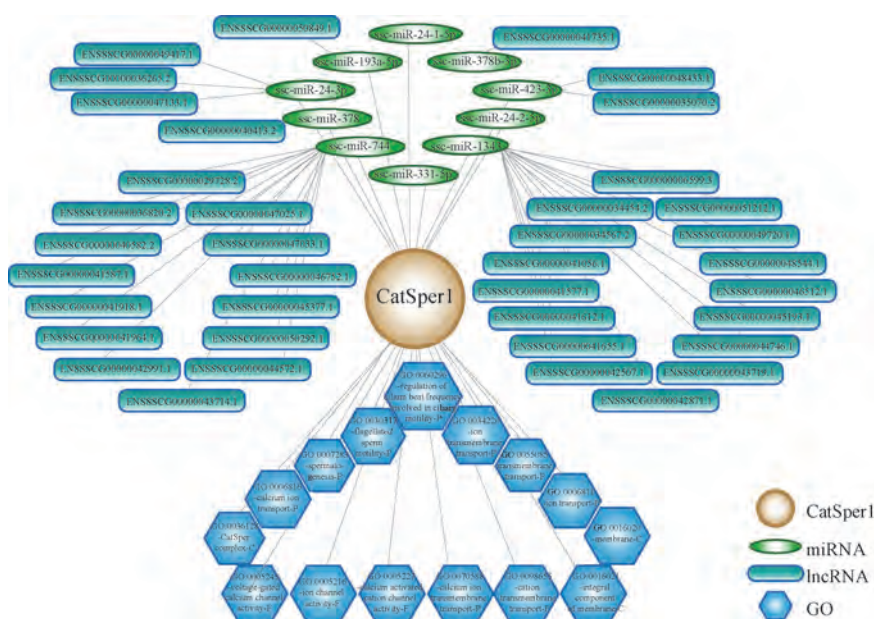


Figure 5 GO annotation of BMI *CatSper1* and potential miRNA and lncRNA regulatory network

上游 126 bp 处的 G2241A;位于外显子 7 下游 43 bp 处的 C4675T,以及位于外显子 9 下游 206 bp 处的 G5270A^[21]。单核苷酸多态性和插入缺失 (INDELs)是目前研究基因组变异的重要方法,目前已证明 *CatSper1* 基因的 c. 539-540insT 和 c. 948-949insATGGC 会导致移码突变和终止密码子提前,

并与人类男性不育相关^[22]。另外, *CatSper1* 基因的 rs1893316 多态性与男性特发性弱精子症显著相关^[23]。另外, 对于 *CatSper1* 基因其他家族成员的核酸序列变异已经有所研究和发现。

有研究表明 *CatSper1* 的 N 端区长度可作为精子游动速度的标志之一^[24], 本研究发现 *CatSper1* 的 N 端氨基酸为亲水性氨基酸, 可与其他残基或水分子形成氢键或盐桥, 从而稳定 *CatSper1* 蛋白质的构象并协助形成蛋白质表面的水合层, 表明 *CatSper1* N 端侧链氨基酸的特征与精子运动有关, 且在第 393 AA 有最大疏水值 3.489, 第 234 AA 处有最小疏水值 -3.600。跨膜螺旋结构是 *CatSper1* 家族的重要特征, *CatSper1* 在 BMI、人和小鼠均具有跨膜螺旋结构, 分别位于 223 AA (386 ~ 609 AA)、223 AA (443 ~ 666 AA) 和 225 AA (347 ~ 572 AA) 位置, 从跨膜区域长度和氨基酸同源性来说, 该基因的跨膜螺旋结构域高度保守, 能在精子运动过程中发挥重要作用。有研究发现 *CatSper1* 基因的启动子序列中含有性别决定基因 *SRY* 的 4 个特异性结合位点, 说明该基因的转录水平受 *SRY* 调控^[25]。*CatSper1* 在减数分裂的生精细胞中表达^[26], 其表达水平在男性精子活力不足的低生育力患者中显著降低^[11]。*CatSper1* 基因的表达会受到外界因素影响, 如醋酸铅或氯化汞会导致小鼠生精小管的退行性损伤和精子质量下降, 且由于结构的相似性, 这些金属可能会替代 Ca^{2+} 的作用, 对钙通道产生影响, 导致 *CatSper1* 基因表达量降低, 从而影响雄性育性^[27]。 γ 辐射不仅会改变睾丸组织学和精子参数, 还会降低雌性小鼠中 *CatSper1* 基因的表达^[28]。镉和镍均会导致精子参数降低以及生发上皮厚度减少, 镉会导致 *CatSper1* 基因表达下调^[29]。硒可上调该基因在的表达, 提高精子活力、改善精子形态以及存活率^[30]。苦参碱能通过 *CatSper* 通道抑制小鼠精子的总运动力、进行性运动、线速度、获能和孕酮诱导的顶体反应, 在苦参碱暴露小鼠的睾丸中, *CatSper1* 基因表达量降低^[31]。人参可使小鼠睾丸中 *CatSper1* 的 mRNA 水平和蛋白水平显著增加, 从而改善精子的过度活化^[32]。过量的氟化物会对小鼠精子的趋化性产生不利影响^[33], 如氟化钠会使小鼠体内 Ca^{2+} 浓度降低, 从而导致 *CatSper1* 的 mRNA 水平降低^[34]。Vitamin E 和左旋肉碱可提高成年小鼠中 *CatSper1* 蛋白的表达量^[35]。同样该基因的表达水平也会受到自身疾病的影响, 甲状腺激素是睾丸功

能的重要调节剂, 精子的受精能力与精子的正常形态、染色质质量和运动能力之间关系密切。甲状腺功能减退使 *CatSper1* 基因的表达下调, 从而影响了小鼠的精子形态、精子染色质凝聚和 *CatSper1* 基因的表达^[36]。精索静脉曲张对大鼠的精子参数、睾丸结构以及 *CatSper1* 基因的表达均具有不利影响^[37]。

CatSper1-4 是 *CatSper* 家族的 4 个成员, 在雄性育性方面均发挥着重要作用。由图 4 可以看出, 该家族的 4 个成员彼此之间的相互作用较为紧密, 且主要形成四聚复合体发挥作用。*CatSperG* 是 *CatSper* 家族的相关蛋白, 具有一个跨膜螺旋结构域, 该蛋白仅在睾丸中表达并且位于精子的主要部分。若 *CatSper1* 缺失, *CatSperG* 蛋白也会相应失去功能, 但 K^{+} 通道亚家族 U1 (potassium channel subfamily u1, KCNU1) 蛋白依然可以正常发挥其功能^[38]。有研究表明, *CatSperG* 和 *CatSperB* (*CatSper β*) 能否发挥正常的生理功能, 主要取决于 *CatSper1* 蛋白。在不同发育阶段的成年小鼠组织中, *CatSperB* 只在睾丸中表达, 且在生精小管中的特异性染色效果较显著, 在精母细胞和精子细胞中表达, 这与 *CatSper1-4* 是一致的^[39]。KCNU1 位于精子的鞭毛部位, 是负责获能诱导超极化的主要 K^{+} 通道, 能影响精子形态、运动性能和顶体反应, 进而影响雄性育性^[40]。KCNU1 (SLO3) 突变后, 精子细胞在过度活化终止后可能会发生顶体反应, 但不能实现透明带穿透, 渗透环境是精子流向卵母细胞的重要问题之一, K^{+} 和 KCNU1 通道在这种渗透环境调节中发挥着重要作用。如果渗透量失调, 会导致精子细胞膨胀并发生形态变化, 这些变化可能会阻止精子细胞粘附在卵母细胞上, 最终导致不育^[40]。由图 4 可以看出, KCNU1 确实与 *CatSper1/2/3* 相互作用紧密, 说明在雄性育性方面发挥着重要作用。*CatSperD* 编码一种非成孔跨膜亚基 *CatSper δ* , 该亚基是 *CatSper* 家族辅助成员之一, 如果雄性小鼠的 *CatSperD* 缺失, 会导致精子特定的电压门控 Ca^{2+} 通道无法正常进行生理活动, 进而导致不育^[41], 造成这种原因可能是 *CatSper δ* 的缺失以及 *CatSperD* 在精子细胞中跨膜蛋白的缺失。*CatSper* 家族的非成孔辅助亚基具有较大的胞外域, 可能是结合该家族 Ca^{2+} 通道的重要因子^[42]。这也说明 *CatSper δ* 对 *CatSper* 家族正常功能的发挥起着至关重要的作用。HSP70-2 是哺乳动物的生殖细胞和体细胞组织中常见的 5 种 70×10^3 热休克蛋白 (HSP70) 外的一种重

要热休克蛋白,该蛋白在减数分裂过程中参与联会复合体的形成,并且与抑制细胞凋亡有关^[43]。图 3 显示,CatSperB、CatSperD 和 CatSperG 彼此之间均有相互作用,且这三个亚基均与 CatSper 家族的 4 个主要成员有紧密的相互作用,也进一步说明,该家族成员之间存在着依附关系,且主要通过形成复合体发挥功能。HSP70.2 是 HSP70 家族在精子发生过程中表达的成员之一,主要在小鼠精母细胞粗线期中表达量较高^[44]。HSPA2(热休克蛋白 A2)是 HSP70 家族在精子发生过程中表达的另一成员,该蛋白与精子成熟度、精子功能和生育力相关,在精子获能和精卵识别过程中发挥重要作用^[45]。HSPA2 的表达与精子浓度和形态显著相关,且在可育个体中的表达显著高于不育个体^[46]。HSPA2 蛋白与精子细胞 DNA 包装蛋白、过渡蛋白 1 和 2 紧密相关,所以 HSPA2 也被确定为第一个过渡蛋白伴侣^[47]。从图 3 中也可以看出 HSPA2 和 HSP70.2 蛋白的相互作用较为紧密,说明二者在精子发生过程中可能会有协同作用。在有丝分裂期间,CKAP2(细胞骨架相关蛋白 2)与纺锤体和纺锤体微管相关,从前期到后期,并在胞质分裂期间从微管中消失,该蛋白的调节对于正常有丝分裂进程至关重要^[48]。当复制的中心体分离后,CKAP2 在细胞的整个细胞周期均有波动现象,与 G2 晚期的中心体微管相关。

本研究发现 *CatSper1* 受到 10 个潜在的 miRNA 靶向调控。*ssc-miR-1343* 和 *ssc-miR-744* 目前已被广泛研究,使用 *ssc-miR-1343* 和 *ssc-miR-744* 的模拟物,介导猪的颗粒细胞,发现 *ssc-miR-1343* 可以靶向调控 *Pak4* 基因,*ssc-miR-744* 可靶向调控 *Elk1* 转录因子^[49]。另外有报道认为 *miR-744* 可以参与调节细胞增殖和细胞周期^[50]。*p21* 活化蛋白激酶(PAK)丝氨酸/苏氨酸激酶主要参与细胞形态、细胞运动以及细胞转化等生物学过程,是 Rho 家族 GTP 酶的主要效应物之一。*Pak4* 是 PAK 激酶的成员,被认为是 *Cdc42* 的效应蛋白^[51]。真核转录因子的众多家族中,通常含有相似度较高的 DNA 结合序列,*Elk1* 转录因子具有独特的结合方式,并证明该转录因子在控制细胞迁移过程中起重要作用^[52]。对患有乳腺炎的中国荷斯坦奶牛 NF- κ B 通路中 miRNA 的研究发现,相比健康的牛 *ssc-miR-24-1-5p* 表达有所下调^[53]。*miR-24-2-5p* 可以通过介导的 *EZH2*(*zeste* 同源物 2 的组蛋白增强子)调节,进而

影响 *PCSEAT* 基因促进前列腺癌细胞的增殖^[54]。*miRNA* 可在转录水平调节病原体 and 宿主的相互作用,研究表明 *miR-24-3p* 可调节血红素加氧酶-1(HO-1)的表达,过表达 *miR-24-3p* 可降低 HO-1 的 mRNA 和蛋白质的表达,并能致使猪繁殖与呼吸综合征(PRRSV)病毒快速复制^[55]。为了研究猪不同月龄阶段的肌肉发育情况,通过 miRNA 检测和鉴定发现,*ssc-miR-378* 在骨骼肌中有较高表达,且骨骼肌的表达谱表明 *ssc-miR-378* 是用于肌生成的新候选 miRNA,并参与猪的骨骼肌发育。*miR-378* 可能通过调节骨形态发生蛋白 2(BMP2)和丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)来调节肌肉生成,并参与细胞增殖和分化^[56]。综上,miRNA 不仅在精子生成过程中至关重要,而且在免疫调节、细胞增殖、细胞凋亡、乳腺癌以及前列腺癌等方面也发挥着重要作用。*lncRNA* 在表观遗传、细胞分裂和凋亡等多种生命活动中不可或缺,是研究分子机制的热点方向。大部分 *lncRNA* 需与一种或多种 RNA 结合蛋白(RBP)相互作用来发挥其生理功能;同样,RBP 也能够结合大量不同的 RNA^[57]。本研究发现 16 个 *lncRNAs* 与 *CatSper1* 竞争性结合 *ssc-miR-1343*,14 个 *lncRNAs* 与 *CatSper1* 竞争性结合 *ssc-miR-744*,*lncRNA* 数量最多,这也说明 *lncRNA* 的重要性。从 GO 分析来看,不管是分子功能、生物学过程或者细胞成分,主要富集的条目都与精子生成过程相关,且与 *CatSper1* 基因的结构功能紧密相关,如精子活力,精子发生、钙离子转运以及电压门控 Ca^{2+} 通道活性等,说明 *CatSper1* 基因在 BMI 精子发生和受精过程中发挥重要作用。

综上所述,本研究使用 RNA-seq 二代测序技术获得了版纳微型猪近交系睾丸组织 *CatSper1* 基因的表达量,获得了 *CatSper1* 基因的全长 CDS;分析了该基因的结构、氨基酸序列特征;构建了蛋白质互作 PPI 网络;注释了该基因并构建了基因与 miRNA 和 *lncRNA* 调控网络。结果可为深入研究 *CatSper1* 基因在 BMI 精子发生过程的功能提供数据资料,也可挖掘与其他哺乳动物精子发生相关基因的研究提供借鉴。

参 考 文 献(References)

- [1] Hübner CA, Jentsch TJ. Ion channel diseases [J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(20): 2435-2445.
- [2] Lishko PV, Kirichok Y. The role of *hvl* and *CatSper* channels in sperm activation [J]. J Physiol, 2010, 588(23): 4667-4672.
- [3] Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp

- measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel [J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 737–740.
- [4] Marquez B, Ignatz G, Suarez SS. Contributions of extracellular and intracellular Ca^{2+} to regulation of sperm motility: release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm [J]. *Dev Biol*, 2007, 303(1): 214–221.
- [5] Chung JJ, Shim SH, Everley RA, et al. Structurally distinct Ca^{2+} signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility [J]. *Cell*, 2014, 157(4): 808–822.
- [6] Nazari M, Mirshahi M, Mowla SJ, et al. Investigation *in vitro* expression of CatSper sub fragment followed by production of polyclonal antibody: potential candidate for the next generation of non hormonal contraceptive [J]. *Cell J*, 2012, 14(3): 215–224.
- [7] Wang H, Liu J, Cho KH, et al. A novel, single, transmembrane protein CatSperg is associated with CatSper1 channel protein [J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(3): 539–544.
- [8] Lobley A, Pierron V, Reynolds L, et al. Identification of human and mouse *CatSper3* and *CatSper4* genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1: 53.
- [9] Qi H, Moran MM, Navarro B, et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(4): 1219–1223.
- [10] Strinker T, Goodwin N, Brenker C, et al. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm [J]. *Nature*, 2011, 471(7338): 382–386.
- [11] Nikpoor P, Mowla SJ, Movahedin M, et al. CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(1): 124–128.
- [12] Jin ZR, Fang D, Liu BH, et al. Roles of CatSper channels in the pathogenesis of asthenozoospermia and the therapeutic effects of acupuncture-like treatment on asthenozoospermia [J]. *Theranostics*, 2021, 11(6): 2822–2844.
- [13] Huo JL, Zhang LQ, Zhang X, et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism array and whole-genome sequencing reveal the inbreeding progression of Banna minipig inbred line [J]. *Anim Genet*, 2022, 53(1): 146–151.
- [14] Chen S, Zhou Y, Chen Y, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one Fastq preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884–i890.
- [15] Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with bowtie 2 [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(4): 357–359.
- [16] Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(1): 15–21.
- [17] Liao Y, Smyth GK, Shi W. feature Counts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(7): 923–930.
- [18] Patro R, Duggal G, Love MI, et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(4): 417–419.
- [19] Podlaha O, Webb DM, Tucker PK, et al. Positive selection for indel substitutions in the rodent sperm protein CatSper1 [J]. *Mol Biol Evol*, 2005, 22(9): 1845–1852.
- [20] Geetha T, Subodh K, Dubey PP, et al. Sequence variability in catsper1 gene in vrindavani crossbred cattle [J]. *Indian J Anim Sci*, 2011, 81(9): 981–983.
- [21] Smith RM, Kotzé A, Grobler JP, et al. Identifying sequence variation in cation channel sperm associated genes in cape mountain zebra (*Equus zebra*) [J]. *S Afr J Anim Sci*, 2020, 50(6): 807–813.
- [22] Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, et al. Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein [J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 84(4): 505–510.
- [23] Shu F, Zhou X, Li F, et al. Analysis of the correlation of CATSPER single nucleotide polymorphisms (SNPs) with idiopathic asthenospermia [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32(11): 1643–1649.
- [24] Vicens A, Tourmente M, Roldan ER. Structural evolution of CatSper1 in rodents is influenced by sperm competition, with effects on sperm swimming velocity [J]. *BMC Evol Biol*, 2014, 14: 106.
- [25] Olivares A, Hernández-Reyes A, Felix R, et al. Regulation of CATSPER1 expression by the testis-determining gene SRY [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205744.
- [26] Yu Q, Mei XQ, Ding XF, et al. Construction of a *CatSper1* DNA vaccine and its antifertility effect on male mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127508.
- [27] Mohammadi S, Gholamin M, Mohammadi M, et al. Down-regulation of CatSper 1 and CatSper 2 genes by lead and mercury [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 59: 82–86.
- [28] Mohammadi S, Kianmehr M, Mohammadi M, et al. Correlation between expression of CatSper1,2 and sperm parameters in the gamma irradiated adult mouse testis [J]. *Int J Radiat Biol*, 2019, 95(6): 691–696.
- [29] Mohammadi S, Gholamin M, Mansouri A, et al. Effect of cadmium and nickel on expression of CatSper 1 and 2 genes in mice [J]. *Toxin Rev*, 2018, 37(3): 216–222.
- [30] Mohammadi S, Movahedin M, Mowla SJ. Up-regulation of CatSper genes family by selenium [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 7: 126.
- [31] Luo T, Zou QX, He YQ, et al. Matrine compromises mouse sperm functions by a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -related mechanism [J]. *Reprod Toxicol*, 2016, 60: 69–75.
- [32] Park EH, Kim DR, Kim HY, et al. Panax ginseng induces the expression of CatSper genes and sperm hyperactivation [J]. *Asian J Androl*, 2014, 16(6): 845–851.
- [33] Lu Z, Wang S, Sun Z, et al. *In vivo* influence of sodium fluoride on sperm chemotaxis in male mice [J]. *Arch Toxicol*, 2014, 88(2): 533–539.

- [34] Sun Z, Niu R, Su K, et al. Effects of sodium fluoride on hyperactivation and Ca^{2+} signaling pathway in sperm from mice; an *in vivo* study [J]. Arch Toxicol, 2010, 84(5): 353–361.
- [35] Mohammadi S, Jalali M, Nikraves MR, et al. Effects of l-carnitine treatment on expression of catsper proteins in the aging mouse model [J]. Eur J Exp Biol, 2013, 3(3): 731–735.
- [36] Alipour F, Jalali M, Nikraves MR, et al. Assessment of sperm morphology, chromatin integrity, and *catSper* genes expression in hypothyroid mice [J]. Acta Biol Hung, 2018, 69(3): 244–258.
- [37] Soleimani MZ, Jalali Mashayekhi F, Mousavi Hasanzade M, et al. Alteration in *CatSper1* and 2 genes expression, sperm parameters and testis histology in varicoceles rats [J]. Int J Reprod Biomed, 2018, 16(3): 183–190.
- [38] Navarro B, Kirichok Y, Clapham DE. KSper, a pH-sensitive K^{+} current that controls sperm membrane potential [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(18): 7688–7692.
- [39] Liu J, Xia J, Cho KH, et al. CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex [J]. J Biol Chem, 2007, 282(26): 18945–18952.
- [40] Santi CM, Martínez-López P, de la Vega-Beltrán JL, et al. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility [J]. FEBS Lett, 2010, 584(5): 1041–1046.
- [41] Chung JJ, Navarro B, Krapivinsky G, et al. A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa [J]. Nat Commun, 2011, 2: 153.
- [42] Chung JJ, Miki K, Kim D, et al. CatSper ζ regulates the structural continuity of sperm Ca^{2+} signaling domains and is required for normal fertility [J]. Elife, 2017, 6: e23082.
- [43] Dix DJ, Allen JW, Collins BW, et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(8): 3264–3268.
- [44] Allen RL, O'Brien DA, Eddy EM. A novel hsp70-like protein (P70) is present in mouse spermatogenic cells [J]. Mol Cell Biol, 1988, 8(2): 828–832.
- [45] Redgrove KA, Nixon B, Baker MA, et al. The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50851.
- [46] Jenkins TG, Aston KI, Meyer TD, et al. Decreased fecundity and sperm DNA methylation patterns [J]. Fertil Steril, 2016, 105(1): 51–57.
- [47] Govin J, Caron C, Escoffier E, et al. Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis [J]. J Biol Chem, 2006, 281(49): 37888–37892.
- [48] Seki A, Fang G. CKAP2 is a spindle-associated protein degraded by APC/C-cdh1 during mitotic exit [J]. J Biol Chem, 2007, 282(20): 15103–15113.
- [49] Tian Y, Zhang MY, Li N, et al. Zearalenone exposure triggered porcine granulosa cells apoptosis via microRNAs-mediated focal adhesion pathway [J]. Toxicol Lett, 2020, 330: 80–89.
- [50] Lin F, Ding R, Zheng S, et al. Decrease expression of microRNA-744 promotes cell proliferation by targeting c-Myc in human hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell Int, 2014, 14: 58.
- [51] Liu Y, Xiao H, Tian Y, et al. The PAK4 protein kinase plays a key role in cell survival and tumorigenesis in athymic mice [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(7): 1215–1224.
- [52] Odrowaz Z, Sharrocks AD. ELK1 uses different DNA binding modes to regulate functionally distinct classes of target genes [J]. PLoS Genet, 2012, 8(5): e1002694.
- [53] Chen L, Liu X, Li Z, et al. Expression differences of miRNAs and genes on NF- κ B pathway between the healthy and the mastitis Chinese Holstein cows [J]. Gene, 2014, 545(1): 117–125.
- [54] Yang X, Wang L, Li R, et al. The long non-coding RNA PCSEAT exhibits an oncogenic property in prostate cancer and functions as a competing endogenous RNA that associates with EZH2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 502(2): 262–268.
- [55] Xiao S, Wang X, Ni H, et al. MicroRNA miR-24-3p promotes Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication through suppression of heme oxygenase-1 expression [J]. J Virol, 2015, 89(8): 4494–4503.
- [56] Hou X, Tang Z, Liu H, et al. Discovery of microRNAs associated with myogenesis by deep sequencing of serial developmental skeletal muscles in pigs [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52123.
- [57] Ferrè F, Colantoni A, Helmer-Citterich M. Revealing protein-lncRNA interaction [J]. Brief Bioinform, 2016, 17(1): 106–116.

[收稿日期] 2022-01-28

严露,张纓. 骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达对小鼠运动能力和糖耐量的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 629-638.
Yan L, Zhang Y. Effect of overexpression of the skeletal muscle-specific *Chrono* gene on exercise capacity and glucose tolerance in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 629-638.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.005

骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达对小鼠运动能力和糖耐量的影响

严露^{1,2}, 张纓^{2*}

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

【摘要】 目的 骨骼肌糖代谢水平是影响有氧运动能力的重要因素, 骨骼肌糖代谢水平又受到生物钟的调控。*Chrono* 是近年新发现的生物钟基因, 它可反馈性抑制核心生物钟转录因子 BMAL1 对其下游生物钟靶基因的转录, 被认为是 BMAL1 的转录抑制因子。研究表明 BMAL1 参与骨骼肌糖代谢的调控, 而 *CHRONO* 作为 BMAL1 的转录抑制因子, *CHRONO*-BMAL1 通路对运动能力和糖耐量的影响目前尚未可知。因此, 本研究拟通过骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达小鼠和野生型小鼠, 探讨 *CHRONO*-BMAL1 通路对糖耐量和运动能力的影响, 为阐明调节糖耐量与影响骨骼肌健康的新机制提供理论依据。**方法** 健康 8 周龄 C57BL/6N 野生鼠 (WT) 和骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达鼠 (TG) 各 20 只, 雌雄各半。记录小鼠体重和摄食量, 进行体成分测试, 对小鼠进行自主活动性测试、递增负荷运动能力测试、葡萄糖耐量测试和抓力测试, 取小鼠骨骼肌称重, 进行实时荧光定量 PCR 检测 *Chrono*、*MyhcI*、*MyhcIIa*、*MyhcIIb*、*MyhcIIx*、*Pdha1* 的 mRNA 表达, 试剂盒检测肌糖原含量。**结果** (1) 与 WT 鼠相比, TG 鼠的自主活动性和递增负荷运动能力均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); (2) 与 WT 鼠相比, TG 鼠腓肠肌、股四头肌、比目鱼肌、趾长伸肌和胫骨前肌重量均明显增加 ($P < 0.01$), TG 雌鼠腓肠肌和股四头肌重量则明显低于 TG 雄鼠 ($P < 0.01$); (3) 与 WT 鼠相比, TG 雄鼠前肢抓力显著下降 ($P < 0.05$), 骨骼肌 *MyhcII* 型 mRNA 表达也明显下降或呈现下降趋势, TG 雌鼠的抓力和 II 型肌纤维 mRNA 的表达则均显著高于 TG 雄鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); (4) 与 WT 鼠相比, TG 鼠糖耐量测试时各点血糖值和曲线下面积均显著升高 ($P < 0.01$), TG 雌鼠则显著低于 TG 雄鼠 ($P < 0.01$); (5) 与 WT 鼠相比, TG 鼠肌糖原含量明显增多 ($P < 0.05$), *Pdha1* mRNA 表达明显减少或呈减少趋势, 而 TG 雌鼠肌糖原含量和 *Pdha1* mRNA 的表达均显著高于 TG 雄鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 骨骼肌 *Chrono* 过表达可降低小鼠自主活动性, 导致糖耐量降低, 并影响有氧运动能力。

【关键词】 *Chrono*; 骨骼肌; 运动能力; 糖耐量

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0629-10

Effect of overexpression of the skeletal muscle-specific *Chrono* gene on exercise capacity and glucose tolerance in mice

YAN Lu^{1,2}, ZHANG Ying^{2*}

(1. Key Laboratory of Sports and Physical Health, Ministry of Education, Beijing 100084, China. 2. College of Human Sport Science, Beijing Sport University, Beijing 100084)
Corresponding author: ZHANG Ying. E-mail: zhyi9256@126.com

【Abstract】 Objective The level of skeletal muscle glucose metabolism is an important factor affecting aerobic exercise capacity, and is regulated by the biological clock. *Chrono* is a newly discovered circadian clock gene. It is involved in the feedback inhibition of transcription of the core circadian clock transcription factor BMAL1 to its downstream circadian clock target genes, and is considered a transcription repressor of BMAL1. Studies have shown that BMAL1 is involved in

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (32071168), 运动与体质健康教育部重点实验室资助项目。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32071168), Key Laboratory of Sports and Physical Health from Ministry of Education.

[作者简介] 严露 (1994—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 运动与骨骼肌代谢适应。Email: lulusd061@163.com

[通信作者] 张纓 (1961—), 女, 教授, 博士, 博士研究生导师, 研究方向: 运动与骨骼肌代谢适应。Email: zhyi9256@126.com

the regulation of skeletal muscle glucose metabolism. However, CHRONO is a transcription inhibitor of BMAL1, and the effect of the CHRONO-BMAL1 pathway on exercise capacity and glucose tolerance is currently unknown. Therefore, this study employed skeletal muscle-specific *Chrono* overexpression mice and wild-type mice to explore the effect of the CHRONO-BMAL1 pathway on glucose tolerance and exercise capacity. Our findings provide a theoretical basis for elucidating new mechanisms affecting skeletal muscle health. **Methods** In total, 20 healthy 8-week-old C57BL/6N wild-type (WT) mice and 20 skeletal muscle-specific *Chrono* overexpression (*Chrono*-TG) mice (50:50, male; female) were used in this study. Body weight and food intake were recorded. The body composition test, autonomous activity test, incremental load exercise ability test, glucose tolerance test, and grip test were performed. Skeletal muscle was weighed and the mRNA expression levels of the *Chrono*, *Myhcl*, *MyhclIa*, *MyhclIb*, *MyhclIx*, and *Pdha1* genes were detected by Real-time PCR. The content of muscle glycogen was detected using an appropriate kit. **Results** (1) Compared with WT mice, the autonomous mobility and exercise ability of *Chrono*-TG mice were obviously reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); (2) Compared with WT mice, the weights of the gastrocnemius, quadriceps, soleus, extensor digitorum longus, and tibial anterior muscles of TG mice were significantly increased ($P < 0.01$), while the weights of the gastrocnemius and quadriceps femoris of female TG mice were lower than for male TG mice ($P < 0.01$); (3) Compared with WT mice, the strength of the front paw of male TG mice was significantly reduced ($P < 0.05$), and *MyhclIs* mRNA expression in skeletal muscle was also decreased or showed a downward trend. The forepaw grip and *MyhclIs* mRNA expression in female TG mice were clearly higher than in male TG mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); (4) Compared with WT mice, the blood glucose value and the area under the curve at each point in the glucose tolerance test of the TG mice were increased ($P < 0.01$), while female TG mice showed lower levels than male TG mice ($P < 0.01$); (5) Compared with WT mice, the content of muscle glycogen in TG mice was increased ($P < 0.05$), and the expression of *Pdha1* mRNA was decreased or showed a decreasing trend, while the muscle glycogen content and *Pdha1* mRNA expression in female TG mice were significantly higher than in male TG mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** Overexpression of the *Chrono* gene in skeletal muscle can reduce autonomic mobility, impair glucose tolerance, and affect the aerobic exercise capacity of mice.

【Keywords】 *Chrono*; skeletal muscle; exercise capacity; glucose tolerance

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

骨骼肌占人体体重约 40%^[1], 是重要的代谢调节组织, 可将大部分餐后血糖吸收摄取并储存, 对于维持血糖水平的稳定至关重要^[2-4]。骨骼肌糖代谢水平则是影响有氧运动能力的重要因素^[5], 而骨骼肌糖代谢水平会受到生物钟的调控^[6]。BMAL1 (brain and muscle ARNT-like protein 1) 是核心生物钟分子, 可与 CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) 形成 BMAL1-CLOCK 异二聚体, 它们作为转录因子可调控生物钟靶基因的转录^[7-8]。*Chrono* (computationally highlighted repressor of network oscillator, 也称 *Gm129*、*Ciart*、*C1orf51* 等) 是近年新发现的生物钟基因^[9], 其编码的 CHRONO 蛋白可直接与转录因子 BMAL1 相结合, 并反馈性抑制 BMAL1-CLOCK 的转录活性^[10-11], CHRONO-BMAL1 被认为是调控生物节律的重要通路。另外, 研究发现, 骨骼肌生物钟核心分子 BMAL1 参与调节骨骼肌胰岛素敏感性^[12], 调控骨骼肌中糖代谢相关基因表达的节律性变化, 以维持血糖水平稳定^[13], 骨骼肌 BMAL1 缺失则会显著降低骨骼肌葡萄糖摄取^[6,14-15]和糖耐量水平^[16]。因此, BMAL1 不

仅参与骨骼肌生物钟调节, 可能也是调节骨骼肌糖代谢的重要分子。然而, CHRONO 作为 BMAL1 的转录抑制因子, CHRONO-BMAL1 通路是否会对糖耐量产生影响? 进而影响运动能力呢? 这些问题目前未见相关文献报道。

因此, 本研究拟通过骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达和野生型小鼠, 探讨 CHRONO-BMAL1 通路对糖耐量和运动能力的影响, 为阐明调节糖耐量与影响骨骼肌健康的新机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6N 野生鼠 (Wild Type, WT), 其中雄性 10 只, 体重 (22.65 ± 0.21) g, 雌性 10 只, 体重 (18.41 ± 0.13) g。20 只 8 周龄 SPF 级骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达鼠 (*Chrono*-TG), 其中雄性 10 只, 体重 (23.16 ± 0.37) g, 雌性 10 只, 体重 (18.69 ± 0.29) g。WT 鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK (京) 2016-

0006】，Chrono-TG 鼠其背景为 C57BL/6N 鼠，由赛业生物科技有限公司制作，中国医学科学院医学实验动物研究所负责繁育【SCXK(京)2019-0011】。

所有小鼠饲养及测试工作均在北京体育大学动物房【SYXK(京)2021-0053】完成。动物房室内温度维持在 25℃ 左右，相对湿度 60% ~ 70%，12 h 光照~12 h 黑暗周期(7:00 开, 19:00 关)。饲养采用国家啮齿类动物标准饲料，整个饲养过程动物可以自由饮水、进食。本研究经北京体育大学运动科学实验伦理委员会批准(批准号:2021042A)。

1.1.2 主要试剂与仪器

血浆胰岛素试剂盒(GEL2579-B, 金恩来, 中国北京), 糖原含量检测试剂盒(BC0345, 索莱宝, 中国北京), RNAiso Plus(9109, TaKaRa, 日本), 逆转录试剂盒(FSQ101, Toyobo, 日本), SYBR Green Realtime PCR Master Mix(QPK-201, Toyobo, 日本), 18S 引物(QT02448075, QIAGEN, 德国)、Chrono 引物(QT01533749, QIAGEN, 德国)。

小动物成分分析仪(Echo-MRI, 美国), 小鼠自主活动转轮笼系统(武汉一鸿科技, 中国), 动物跑台(Columbus Instruments, 美国), 小鼠抓力测试仪(北京众实迪创科技, 中国), 血糖仪及血糖试纸(三诺 GA-6, 中国), 组织研磨仪(Next Advance, 美国), 低温离心机(Eppendorf, 德国), 微量分光光度计(NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, 美国), PCR 扩增仪(A300, LongGene, 中国杭州), 荧光定量 PCR 仪(ABI7500, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 体重、摄食量记录及体成分测试

定时记录各组小鼠每周体重及摄食量。采用小动物脂成分分析仪对各组小鼠的脂肪含量和瘦体重含量进行分析测定。

1.2.2 自主活动性测试

采用小鼠自主活动转轮笼系统连续记录采集黑暗下 72 h 小鼠自主活动情况。

1.2.3 递增负荷运动能力测试

递增负荷运动能力测试参照 Burch 等^[17]的研究并进行了改良。具体如图 1: 跑台+5°坡度, 以 10 m/min 速度跑 5 min, 6 min 跑速增为 13 m/min, 之后每 3 min 增加跑速 3 m/min, 让小鼠运动至力竭。力竭的判断标准是: 小鼠不能维持现有跑速继续运动, 机械刺激和电刺激小鼠 10 s 以上仍不能继续运动即判断为力竭。

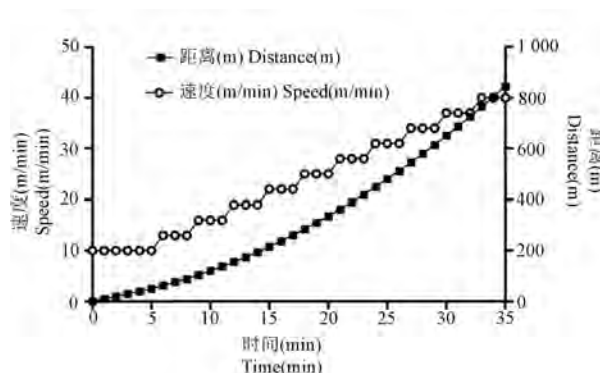


图 1 运动能力测试方案

Figure 1 Exercise capacity test program

1.2.4 抓力测试

先进行 3 d 的抓力测试适应, 正式测试时让小鼠两只前爪握住抓力杆, 测试者抓住小鼠尾巴让小鼠身体与抓力仪保持平行, 并保证小鼠两前爪能持续稳定的发力, 记录下持续发力阶段的握力最大值和平均值。

1.2.5 血糖及葡萄糖耐量测试

采集小鼠尾静脉血, 测试小鼠在非禁食状态下的血糖值。

葡萄糖耐量试验(glucose tolerance test, GTT): 小鼠禁食 8 h 后, 根据体重通过腹腔注射 1 g/kg 体重的葡萄糖溶液(100 mg/mL)。检测小鼠尾静脉末梢血糖水平, 记录下注射前(0 min)及注射后 15、30、45、60、90 和 120 min 7 个时间点的血糖值。

计算血糖曲线下面积(area under the curve, AUC)=(0 min 血糖值+15 min 血糖值)×15/2+(15 min 血糖值+30 min 血糖值)×15/2+(30 min 血糖值+45 min 血糖值)×15/2+(45 min 血糖值+60 min 血糖值)×15/2+(60 min 血糖值+90 min 血糖值)×30/2+(90 min 血糖值+120 min 血糖值)×30/2。

1.2.6 动物取材及骨骼肌称重

收集小鼠眼眶后静脉血并制备血浆, 随后脱颈处死, 取心脏、肝和肾, 并迅速分离腿部骨骼肌, 对各块骨骼肌进行称重记录, 随后用锡纸包好编号, 投入液氮并转入-80℃保存。

1.2.7 血浆胰岛素测定

按照试剂盒说明书测定小鼠血浆中胰岛素含量。

1.2.8 骨骼肌糖原含量检测

取 50 mg 腓肠肌, 按照试剂盒说明书进行糖原提取与测定。

1.2.9 实时荧光定量 PCR

提取腓肠肌总 RNA, 检测目的基因 *Chrono*、肌球蛋白重链 I 型 (*MyhcI*)、肌球蛋白重链 IIa 型 (*MyhcIIa*)、肌球蛋白重链 IIb 型 (*MyhcIIb*)、肌球蛋白重链 IIx 型 (*MyhcIIx*)、丙酮酸脱氢酶 E1 α 亚单位 (*Pdha1*) 的相对表达。除内参 18S 和 *Chrono* 外, 其余引物序列由 Primerbank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>) 网站查询获得, 见表 1, 由 Thermo Fisher Scientific 合成。取 50 mg 腓肠肌组织, 加入 800 μ L 预冷的 RNAiso Plus 进行组织研磨, 4 $^{\circ}$ C, 11 304 r/min 离心 10 min 后取上清, 氯仿分相, 取上层无色水相用异丙醇分离 RNA, 4 $^{\circ}$ C, 11 304 r/min 离心 20 min 后用 75% 乙醇洗涤 RNA, 然后进行干燥, 再悬浮, 得到总 RNA 提取液。测定所提 RNA 浓度及纯度, 之后进行逆转录, 反应条件为 65 $^{\circ}$ C, 5 min; 37 $^{\circ}$ C, 15 min; 98 $^{\circ}$ C, 5 min。加入反应体系和相应的引物进行实时荧光定量 PCR 检测。通过仪器自带软件读取实时荧光量 CT 值, 用比较 CT 法对目的基因的表达进行相对定量, 公式如下: 目的基因 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers

引物 Primers	序列 (5'→3') Sequences (5'→3')	长度 (bp) Size (bp)
<i>MyhcI</i>	F: ACTGTCAACACTAAGAGGGTCA	114
	R: TTGGATGATTTGATCTTCCAGGG	
<i>MyhcIIa</i>	F: AAGTGACTGTGAAAACAGAAGCA	222
	R: GCAGCCATTTGTAAGGGTTGAC	
<i>MyhcIIb</i>	F: TTGAAAAGACGAAGCAGCGAC	190
	R: AGAGAGCGGGACTCCTTCTG	
<i>MyhcIIx</i>	F: GCCAATCGAGGCTCAGAACAA	138
	R: GTAGTTCCGCCCTTCGGTCTTG	
<i>Pdha1</i>	F: GAAATGTGACCTTCATCGGCT	123
	R: TGATCCGCCCTTTAGCTCCATC	

1.3 统计学分析

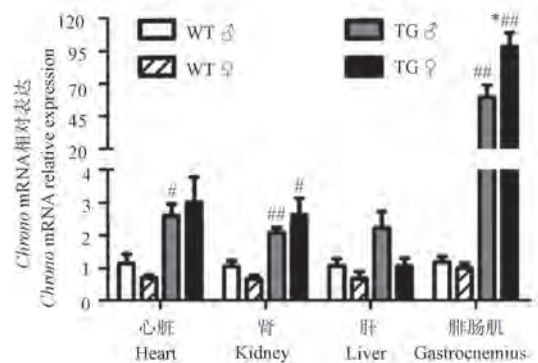
用 SPSS 软件进行数据的统计处理, 结果用平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示。采用独立样本 *t* 检验对数据进行分析, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别代表具有显著性和非常显著性差异。

2 结果

2.1 各组小鼠不同组织 *Chrono* mRNA 表达

在 TG 鼠中, 雌鼠骨骼肌 *Chrono* mRNA 表达显著高出雄鼠 65.36%; 与 WT 鼠比, 其雄、雌鼠的心脏和肾中 *Chrono* mRNA 的表达略高, *Chrono*-TG 雄鼠

心脏和肾中 *Chrono* mRNA 表达分别为 WT 雄鼠的 2.6 倍和 2.07 倍, TG 雌鼠肾中 *Chrono* mRNA 表达为 WT 雌鼠的 3.98 倍, 而 TG 鼠腓肠肌 (gastrocnemius) 的 *Chrono* mRNA 表达则非常显著地高于 WT 鼠, 雄鼠高 49.88 倍, 雌鼠高 99.45 倍 (图 2)。



注: 与各相应雄鼠比, * $P < 0.05$; 与 WT 鼠相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 不同组织 *Chrono* mRNA 表达

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

Figure 2 *Chrono* mRNA expression in different tissues

2.2 各组小鼠体重、摄食量及体成分变化

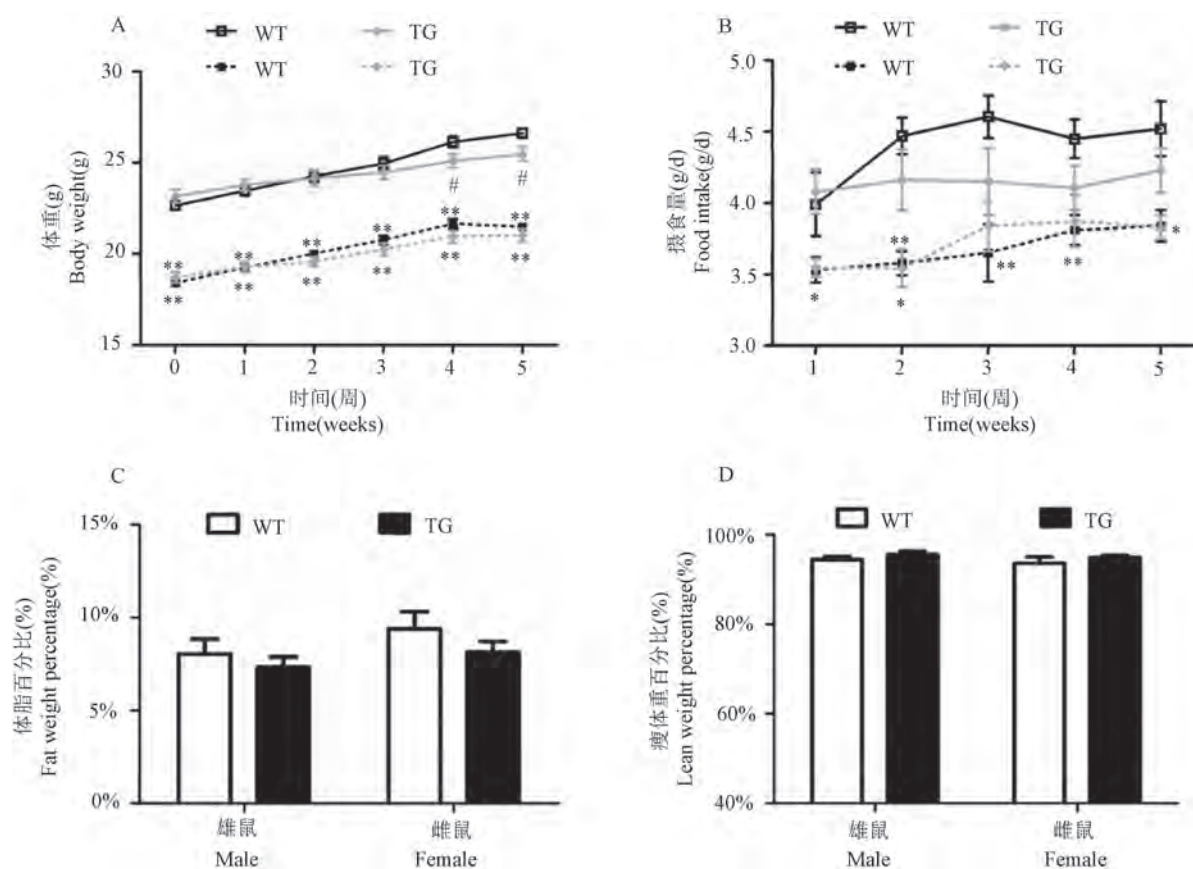
在 *Chrono*-TG 鼠中, 雌鼠体重从 (18.69 $\pm$ 0.29) g 增长至 (21.00 $\pm$ 0.35) g, 雄鼠体重从 (23.16 $\pm$ 0.37) g 增长至 (25.46 $\pm$ 0.39) g, 整个饲养周期中雌鼠体重始终显著低于雄鼠 ($P < 0.01$), TG 雌鼠在第 1、2 周摄食量明显低于雄鼠 ($P < 0.05$), 体脂百分比和瘦体重百分比则无明显变化; 在 WT 鼠中, 雌鼠体重从 (18.41 $\pm$ 0.13) g 增长至 (21.49 $\pm$ 0.21) g, 雄鼠则从 (22.65 $\pm$ 0.21) g 增长至 (26.62 $\pm$ 0.25) g, 雌鼠体重始终显著低于雄鼠 ($P < 0.01$), 且雌鼠在第 2、3、4、5 周的摄食量均显著低于雄鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 *Chrono*-TG 雄鼠体重在第 4、5 周分别为 (25.09 $\pm$ 0.36) g 和 (25.46 $\pm$ 0.39) g, WT 雄鼠体重在第 4、5 周则为 (26.13 $\pm$ 0.30) g 和 (26.62 $\pm$ 0.25) g, 在这两周 TG 雄鼠体重明显低于 WT 雄鼠 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.3 各组小鼠自主活动变化

图 4A 可以看出, TG 鼠中雄鼠自主转轮活动总量为 (20 628.91 $\pm$ 2 108.31) m, 雌鼠自主转轮活动总量为 (25 323.53 $\pm$ 2 772.84) m, 雌雄并无明显差异, WT 鼠中雄鼠自主转轮活动总量为 (30017.26 $\pm$ 1913.43) m, 雌鼠为 (35920.16 $\pm$ 1131.04) m, 雌性

活动总量显著高于雄性($P < 0.05$);TG 鼠与 WT 鼠相比,雌、雄鼠的自主转轮活动总量均显著降低($P < 0.01$)。图 4B 显示,在 TG 鼠中,其雄鼠和雌鼠在全天 24 h 内的转轮活动量无显著变化,在 WT 鼠

中,雌鼠在夜晚(19:00 ~ 7:00)明显高于雄鼠($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TG 鼠与 WT 鼠相比,雌、雄鼠在夜晚的转轮活动量均明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

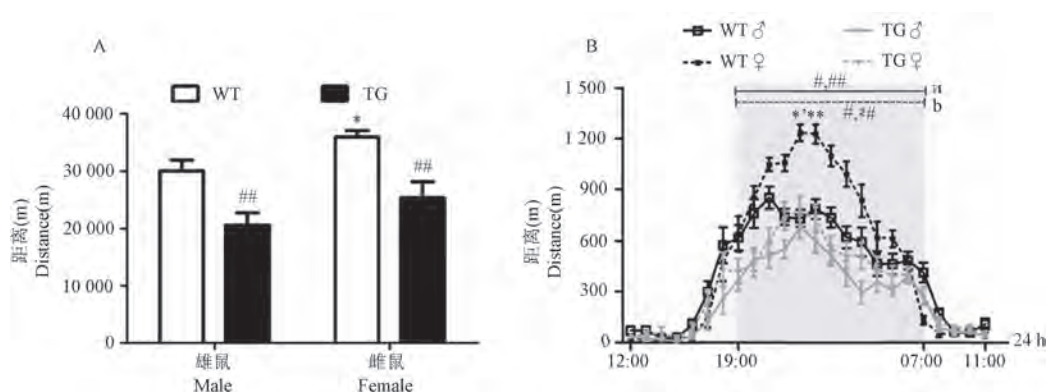


注:与各相应雄鼠相比, ** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 3 体重、摄食量及体成分变化

Note. Compared with the corresponding male mice, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 3 Changes of body weight, food intake and body composition



注:A:小鼠自主转轮总活动量;B:每小时平均转轮活动量,a: TG 雄鼠与 WT 雄鼠相比,b: WT 雌鼠与 WT 雄鼠、TG 雌鼠与 WT 雌鼠相比。

图 4 自主活动变化

Note. A. Total amount of autonomous activity. B. Average amount of voluntary activity per hour. a. Represents the comparison between TG male mice and WT male mice. b. Represents the comparison between WT female mice and WT male mice, and TG female mice and WT female mice.

Figure 4 Change of autonomous activity

2.4 各组小鼠跑台运动能力变化

从图 5 知,在 TG 鼠中,雄鼠进行递增负荷至力竭的运动时间为 (43.76 ± 1.57) min,运动距离为 (1218.81 ± 77.53) m,雌鼠运动时间为 (44.17 ± 1.14) min,运动距离为 (1233.35 ± 57.90) m,雌雄

之间无明显变化;WT 雄鼠运动时间为 (51.34 ± 1.35) min,距离为 (1608.34 ± 75.22) m,WT 雌鼠运动时间为 (48.78 ± 1.81) min,距离为 (1480.42 ± 96.47) m,与 WT 鼠比,TG 鼠其雌、雄鼠运动时间和距离均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

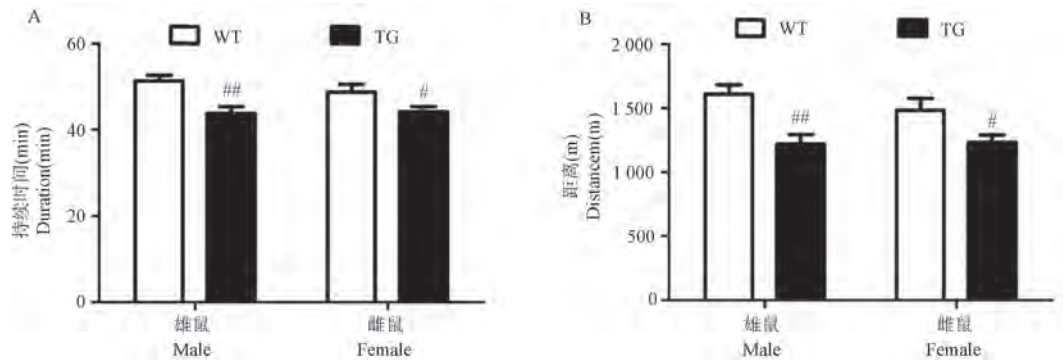


图 5 递增负荷至力竭的运动时间和运动距离变化

Figure 5 Changes of time and distance of incremental load to exhaustion

2.5 各组小鼠葡萄糖耐量、非禁食血糖和胰岛素浓度变化

如图 6A 所示,在 TG 鼠中,雌鼠在第 30、45、60、90、120 min 的血糖值显著低于雄鼠($P < 0.01$),WT 鼠中,雌鼠在第 0、30、45、60、90、120 min 的血糖值明显低于雄鼠($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TG 鼠与 WT 鼠相比,其雌、雄鼠在第 15、30、45、60、90、120 min 这 6 个时间点的血糖值都显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。图 6B 显示,TG 雄鼠 GTT 曲线下面积(AUC)为 (1161.82 ± 25.56) ,TG 雌鼠 AUC 为 (1028.58 ± 18.30) ,WT 雄鼠 AUC 为 (1004.68 ± 20.25) ,WT 雌鼠 AUC 为 (897.64 ± 22.34) 。在 TG 鼠和 WT 鼠中,雌鼠 AUC 均显著低于雄鼠($P < 0.01$),TG 鼠与 WT 鼠相比,其雌、雄鼠 AUC 均显著升高($P < 0.01$)。图 6C 和 6D 可以看出,TG 鼠中雌鼠非禁食血糖为 (6.58 ± 0.25) mmol/L,血浆胰岛素浓度为 (9.79 ± 0.17) mIU/L,雄鼠非禁食血糖为 (6.91 ± 0.12) mmol/L,胰岛素为 (9.69 ± 0.18) mIU/L,雌雄之间无明显差异,WT 鼠中雌鼠非禁食血糖为 (6.22 ± 0.13) mmol/L,显著低于雄鼠的 (6.93 ± 0.24) mmol/L($P < 0.05$)。

2.6 各组小鼠抓力、骨骼肌重量及肌纤维类型 mRNA 表达变化

图 7A 表明,在 TG 鼠中,雌鼠抓力相对最大值 (2.40 ± 0.11) ,相对平均值 (2.09 ± 0.07) ,明显高于雄鼠最大值 (2.04 ± 0.08) 和平均值 $(1.75 \pm$

$0.06)$ ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 WT 雄鼠抓力最大值 (2.35 ± 0.10) ,平均值 (2.04 ± 0.08) 相比,TG 雄鼠抓力最大值和平均值显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。图 7B 中显示,TG 雌鼠腓肠肌和股四头肌相对重量为 (5.93 ± 0.08) 和 (7.93 ± 0.11) ,显著低于 TG 雄鼠的 (6.44 ± 0.08) 和 (8.41 ± 0.10) ($P < 0.01$),WT 鼠中雌鼠的腓肠肌和股四头肌相对重量为 (5.40 ± 0.08) 和 (7.38 ± 0.10) ,显著低于 WT 雄鼠的 (5.72 ± 0.06) 和 (7.76 ± 0.09) ($P < 0.01$);TG 鼠与 WT 鼠比,其雌、雄鼠腓肠肌、比目鱼肌、趾长伸肌、胫骨前肌和股四头肌的相对重量都明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。图 7C 和 7D 显示,TG 鼠中,雌鼠和雄鼠骨骼肌 *MyhcI* 的 mRNA 表达无明显变化,雌鼠 *MyhcIIa*、*MyhcIIb* 和 *MyhcIIx* 的 mRNA 表达则明显多于雄鼠($P < 0.05$),分别高 0.54、0.38 和 0.33 倍,WT 鼠中雌鼠 *MyhcIIa* 的 mRNA 表达显著高于雄鼠 0.41 倍($P < 0.01$);TG 鼠与 WT 鼠比,其雄鼠 *MyhcIIa* 和 *MyhcIIb* 的 mRNA 表达显著降低 32.35% 和 29.41% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),雌鼠 *MyhcIIa* mRNA 表达明显减少 26.39% ($P < 0.05$)。

2.7 各组小鼠肌糖原含量和骨骼肌丙酮酸脱氢酶(*Pdha1*) mRNA 表达变化

由图 8A 可看出,TG 雌鼠肌糖原含量为 (0.0120 ± 0.0009) mg, TG 雄鼠为 (0.0092 ± 0.0002) mg, WT 雌鼠肌糖原含量为 $(0.0099 \pm$

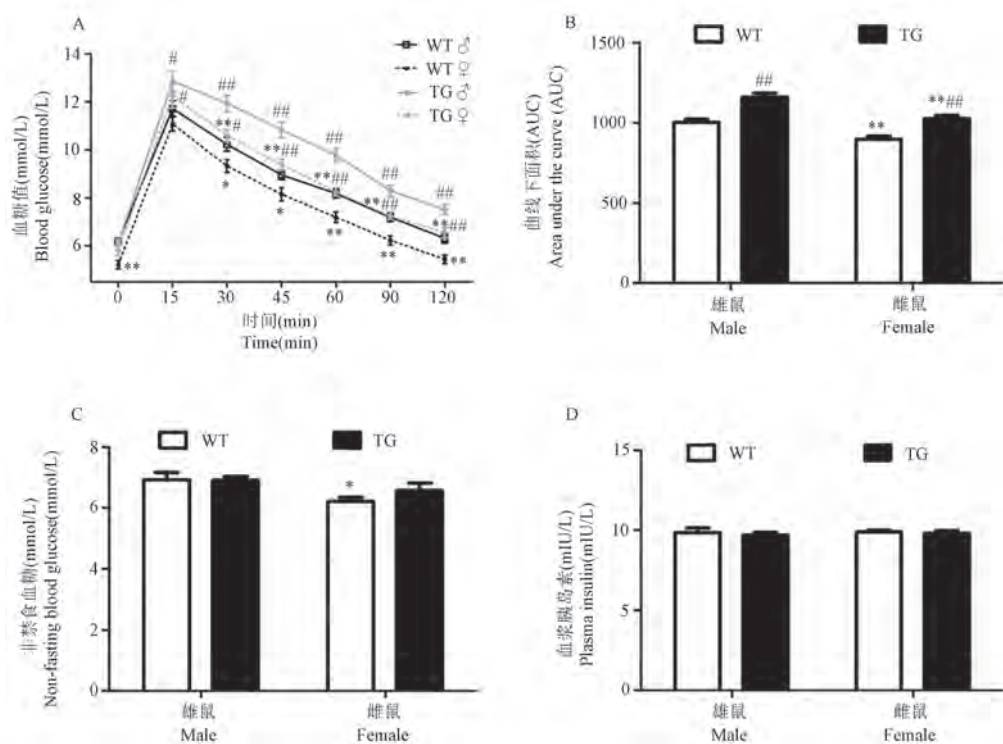
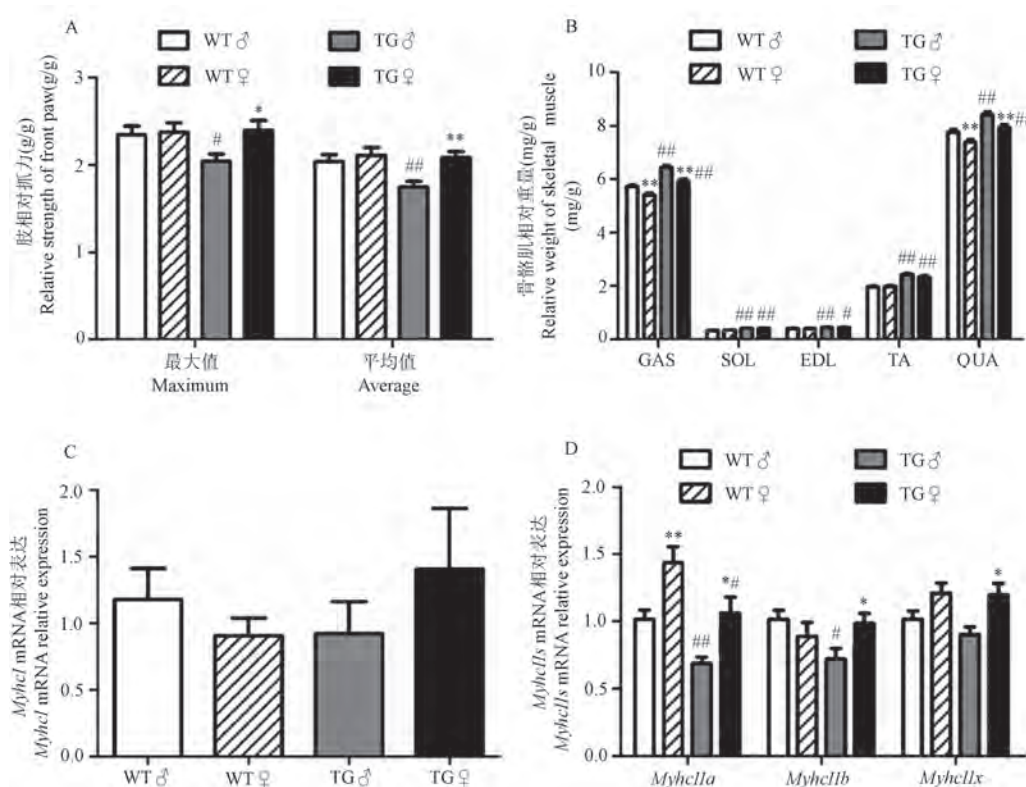


图 6 葡萄糖耐量、非禁食血糖和胰岛素浓度变化

Figure 6 Changes of glucose tolerance, non-fasting blood glucose and plasma insulin concentration



注: GAS: 腓肠肌; SOL: 比目鱼肌; EDL: 趾长伸肌; TA: 胫骨前肌; QUA: 股四头肌。

图 7 抓力、骨骼肌重量及肌纤维类型 mRNA 表达变化

Note. GAS. Gastrocnemius. SOL. Soleus. EDL. Extensor digitorum longus. TA. Tibialis anterior. QUA. Quadriceps.

Figure 7 Changes of strength of front paw, muscle weight and muscle fiber type mRNA expression

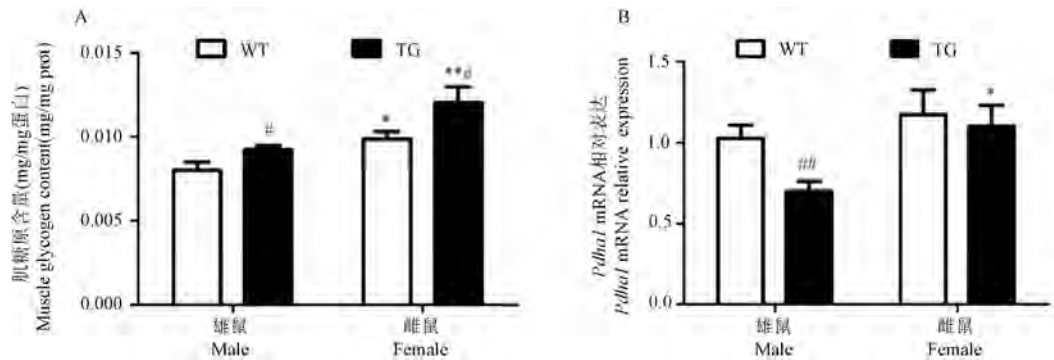


图8 肌糖原含量和骨骼肌丙酮酸脱氢酶 mRNA 表达的变化

Figure 8 Changes of muscle glycogen content and skeletal muscle pyruvate dehydrogenase mRNA expression

0.0005) mg, WT 雄鼠则为 (0.0080 ± 0.0005) mg。在 TG 鼠和 WT 鼠中,雌鼠肌糖原含量均明显高于雄鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TG 鼠与 WT 鼠相比,其雌、雄鼠肌糖原含量均显著增多 ($P < 0.05$)。图 8B 显示,TG 鼠中雌鼠骨骼肌 *Pdha1* mRNA 表达显著多于雄鼠 0.57 倍 ($P < 0.05$);TG 鼠与 WT 鼠相比,雄鼠骨骼肌中 *Pdha1* mRNA 表达显著降低 32.04% ($P < 0.01$)。

3 讨论

Chrono 是近年来在哺乳动物中新发现的生物钟基因^[18-19]。*Chrono* 可影响小鼠昼夜节律周期^[9]。研究表明,*Chrono* 是 BMAL1 的靶基因,*Chrono* 编码的 CHRONO 蛋白可以和内源性 BMAL1 相结合,并能抑制 BMAL1-CLOCK 对其生物钟靶基因的转录活性^[10-11]。因此,CHRONO 蛋白被认为是 BMAL1 的转录抑制因子,CHRONO-BMAL1 通路也是调控生物节律的重要通路^[20]。

3.1 骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠自主活动节律性的影响

本研究对该鼠不同组织器官进行 *Chrono* mRNA 表达的检测,发现在心脏、肾和肝中 *Chrono* mRNA 的表达与 WT 鼠相比虽有所提高但倍数较小,而腓肠肌中 *Chrono* mRNA 的表达高于 WT 鼠约 50 ~ 100 倍,并表现出了较大的性别差异。表明该鼠确实是骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达鼠。

该研究对骨骼肌特异性 *Chrono*-TG 鼠进行自主活动节律性测试,利用自主转轮笼系统连续记录小鼠的运动情况,发现在 3 d 全黑时间里,TG 鼠总活动量显著低于 WT 鼠,而在 24 h 的昼夜周期中,7:00 ~ 19:00 为休息期,活动量较少,在 19:00 ~ 7:00 为活跃期,TG 鼠活动量明显低于 WT 鼠,TG

鼠其雌、雄鼠总活动量和活跃期活动量并无明显差异。表明骨骼肌 *Chrono* 过表达可显著降低小鼠的自主活动性,而这种影响并无性别差异。

3.2 骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠体重、摄食及体成分的影响

本研究观察了骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠体重、摄食量和体成分的影响,发现在摄食量和体成分上,TG 鼠和 WT 鼠无显著差异,而体重在饲养第 4、5 周出现 TG 雄鼠明显低于 WT 雄鼠的现象,这可能与 TG 雄鼠摄食量始终偏低有关,导致其体重增长速度低于 WT 雄鼠,从而在饲养后期出现体重差异增加。此外,两种鼠在 5 周饲养期内体重和摄食量均出现明显的性别差异,即雌鼠体重明显低于雄鼠,摄食量总体上低于雄鼠,而体脂百分比和瘦体重百分比无性别差异。以上表明,骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠体重、摄食量和体成分影响不大。

3.3 骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠运动能力、抓力和肌纤维类型的影响

研究发现,核心生物钟基因 *Bmal1* 的表达可影响机体的运动能力。*Bmal1* 基因敲除鼠与同窝对照鼠相比,白天进行耐力运动的时间明显增加,晚上则无变化^[21]。骨骼肌特异性 *Bmal1* 基因敲除鼠与同窝对照鼠相比,跑台测试中的运动距离和运动时间都显著升高^[22]。然而也有研究表明,*Bmal1* 基因与运动能力关系不大。骨骼肌特异性 *Bmal1* 基因过表达小鼠在进行递增负荷运动能力测试时的运动表现及最大摄氧量与野生鼠并无差异^[23]。

CHRONO 作为 BMAL1 的转录抑制因子,其对运动能力的影响目前尚不明确,因此,本研究采用骨骼肌特异性 *Chrono* 过表达鼠和 WT 鼠,进行跑台递增负荷至力竭的运动能力测试,TG 鼠运动至力竭的时间和距离均明显低于 WT 鼠,TG 鼠递增负荷运

动至力竭的运动能力无性别差异。表明骨骼肌 *Chrono* 过表达可显著降低小鼠有氧运动能力。

生物钟基因 *Bmal1* 还可影响骨骼肌重量及肌纤维类型。*Bmal1* 敲除会使小鼠肌肉力量下降,粗肌丝的超微结构出现损坏,甚至出现严重的肌肉萎缩等^[24-26]。非诱导型和可诱导型骨骼肌特异性 *Bmal1* 敲除小鼠,均表现出正常的骨骼肌形态及超微结构,同时肌肉重量略有增加,肌纤维横截面积也更大,但肌肉力量有所下降,快肌纤维比例减少^[14,27]。

而 *Chrono* 基因是否也会对骨骼肌产生影响呢?目前尚不清楚。因而本研究对小鼠骨骼肌相关指标进行检测,发现 TG 鼠其雌、雄鼠的腓肠肌、比目鱼肌、趾长伸肌、胫骨前肌和股四头肌的相对重量都明显高于 WT 鼠,骨骼肌相对重量也表现出性别差异,WT 雌鼠和 TG 雌鼠的腓肠肌与股四头肌相对重量均显著低于各自雄鼠。此外,对小鼠前肢的抓力测试显示,TG 雄鼠的抓力显著低于 WT 雄鼠,两种雌鼠间无明显差异,而雌性 TG 鼠抓力则显著大于雄性 TG 鼠。TG 雄鼠的骨骼肌相对重量较大,但其抓力却较小,其原因可能与骨骼肌纤维类型的改变有关,而持续较短时间的前肢抓力则更多与快肌纤维相关^[28]。本研究对小鼠腓肠肌纤维类型进行 mRNA 表达检测发现,慢肌纤维即 *MyhcI* 型在 TG 鼠和 WT 鼠中并无较大变化,但快肌纤维即 *MyhcII* 型的差异却比较明显,TG 雄鼠的 *MyhcIIa* 和 *MyhcIIb* 型肌纤维表达显著低于 WT 雄鼠,TG 雌鼠 3 种 II 型肌纤维的表达均高于 TG 雄鼠,这可能是造成 TG 雄鼠抓力比 WT 雄鼠和 TG 雌鼠均较差的原因。

3.4 骨骼肌 *Chrono* 过表达对小鼠糖耐量、肌糖原和骨骼肌丙酮酸脱氢酶 (*Pdha1*) mRNA 表达的影响

核心生物钟基因 *Bmal1* 被证实可显著影响骨骼肌糖代谢功能。细胞实验表明,沉默 *Bmal1* 基因会减弱 C2C12 细胞的胰岛素信号通路作用,产生明显的胰岛素抵抗^[12]。动物实验表明,骨骼肌 *Bmal1* 特异性敲除可显著下调糖代谢相关基因 mRNA 表达,使骨骼肌糖酵解作用减弱,葡萄糖吸收利用减少和糖耐量水平下降^[13-14,16]。而骨骼肌 *Bmal1* 过表达会降低急性睡眠剥夺后小鼠骨骼肌的胰岛素敏感性^[29]。

本研究发现,CHRONO 作为 BMAL1 的转录抑制因子,与 BMAL1 相同也会小鼠糖耐量水平产

生显著影响。TG 鼠糖耐量血糖值及曲线下面积都明显高于 WT 鼠,并且在 WT 鼠和 TG 鼠中都呈现出非常明显的性别差异,即雌鼠的糖耐量血糖值和曲线下面积显著低于雄鼠,而在血浆胰岛素和非禁食血糖方面,TG 鼠与 WT 鼠相比并无异常。同时 TG 雌、雄鼠肌糖原含量均明显高于 WT 鼠,出现肌糖原大量积累的情况,而 TG 雄鼠丙酮酸脱氢酶 *Pdha1* mRNA 的表达显著低于 WT 雄鼠,丙酮酸脱氢酶是糖酵解进入三羧酸循环的关键^[30],其表达减少提示糖有氧氧化过程受到抑制。另外,两种雌鼠的肌糖原均明显高于各自相应雄鼠,*Pdha1* mRNA 的表达也高于雄鼠或有升高的趋势,这可能是造成小鼠糖耐量出现性别差异的原因之一。以上结果表明,骨骼肌 *Chrono* 过表达可导致小鼠肌糖原堆积,骨骼肌 *Pdha1* mRNA 表达减少,糖耐量异常。

骨骼肌 *Chrono* 过表达可降低小鼠自主活动性,导致糖耐量降低,并影响有氧运动能力。

参 考 文 献 (References)

- [1] Kim KM, Jang HC, Lim S. Differences among skeletal muscle mass indices derived from height-, weight-, and body mass index-adjusted models in assessing sarcopenia [J]. Korean J Intern Med, 2016, 31(4): 643-650.
- [2] DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2009, 32(2): 157-163.
- [3] Ferrannini E, Simonson DC, Katz LD, et al. The disposal of an oral glucose load in patients with non-insulin-dependent diabetes [J]. Metabolism, 1988, 37(1): 79-85.
- [4] Thiebaud D, Jacot E, DeFronzo RA, et al. The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man [J]. Diabetes, 1982, 31(11): 957-963.
- [5] Hearris MA, Hammond KM, Fell JM, et al. Regulation of muscle glycogen metabolism during exercise; implications for endurance performance and training adaptations [J]. Nutrients, 2018, 10(3): 298.
- [6] Yin H, Li W, Chatterjee S, et al. Metabolic-sensing of the skeletal muscle clock coordinates fuel oxidation [J]. FASEB J, 2020, 34(5): 6613-6627.
- [7] O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, et al. Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote [J]. Nature, 2011, 469(7331): 554-558.
- [8] 肖邦, 崔淑芳. 体外培养细胞生物节律研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(11): 61-66.
Xiao B, Cui SF. Research progress of biological rhythm of cell cultured *in vitro* [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(11): 61-66.
- [9] Anafi RC, Lee Y, Sato TK, et al. Machine learning helps

- identify CHRONO as a circadian clock component [J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(4): e1001840.
- [10] Goriki A, Hatanaka F, Myung J, et al. A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the mammalian circadian clock [J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(4): e1001839.
- [11] Annayev Y, Adar S, Chiou YY, et al. Gene model 129 (Gm129) encodes a novel transcriptional repressor that modulates circadian gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(8): 5013–5024.
- [12] Liu J, Zhou B, Yan M, et al. CLOCK and BMAL1 regulate muscle insulin sensitivity via SIRT1 in male mice [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(6): 2259–2269.
- [13] Hodge BA, Wen Y, Riley LA, et al. The endogenous molecular clock orchestrates the temporal separation of substrate metabolism in skeletal muscle [J]. *Skelet Muscle*, 2015, 5(1): 17.
- [14] Dyar KA, Ciciliot S, Wright LE, et al. Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock [J]. *Mol Metab*, 2014, 3(1): 29–41.
- [15] Schiaffino S, Blaauw B, Dyar KA, et al. The functional significance of the skeletal muscle clock: lessons from *Bmal1* knockout models [J]. *Skelet Muscle*, 2016, 6(1): 33.
- [16] Harfmann BD, Schroder EA, Kachman MT, et al. Muscle-specific loss of *bmal1* leads to disrupted tissue glucose metabolism and systemic glucose homeostasis [J]. *Skelet Muscle*, 2016, 6: 12.
- [17] Burch N, Arnold AS, Item F, et al. Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle [J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e10970.
- [18] Hatanaka F, Matsubara C, Myung J, et al. Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(24): 5636–5648.
- [19] Rey G, Cesbron F, Rougemont J, et al. Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver [J]. *PLoS Biol*, 2011, 9(2): e1000595.
- [20] Robinson R. Chronos: stress makes the clock tick [J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(4): e1001838.
- [21] Adamovich Y, Dandavate V, Ezagouri S, et al. Clock proteins and training modify exercise capacity in a daytime-dependent manner [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(35): e2101115118.
- [22] Wada T, Ichihashi Y, Suzuki E, et al. Deletion of *Bmal1* prevents diet-induced ectopic fat accumulation by controlling oxidative capacity in the skeletal muscle [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2813.
- [23] Brager AJ, Heemstra L, Bhambra R, et al. Homeostatic effects of exercise and sleep on metabolic processes in mice with an overexpressed skeletal muscle clock [J]. *Biochimie*, 2017, 132: 161–165.
- [24] Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, et al. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(14): 1868–1873.
- [25] Musiek ES, Lim MM, Yang G, et al. Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(12): 5389–5400.
- [26] Khapre RV, Kondratova AA, Susova O, et al. Circadian clock protein BMAL1 regulates cellular senescence *in vivo* [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(23): 4162–4169.
- [27] Schroder EA, Harfmann BD, Zhang X, et al. Intrinsic muscle clock is necessary for musculoskeletal health [J]. *J Physiol*, 2015, 593(24): 5387–5404.
- [28] 王瑞元, 苏全生. 运动生理学 [M]. 北京: 人民体育出版社; 2011.
- Wang RY, Su QS. *Sports Physiology* [M]. Beijing: People's Sports Publishing House; 2011.
- [29] Ezagouri S, Zwigah Z, Sobel J, et al. Physiological and molecular dissection of daily variance in exercise capacity [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(1): 78–91.
- [30] 郑集, 陈钧辉. 普通生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社; 2007.
- Zheng J, Chen JH. *General Biochemistry* [M]. Beijing: Higher Education Press; 2007.

[收稿日期] 2021-12-10

江丽青,张溧昀,师恒,等. 和厚朴酚对心梗小鼠的心肌保护作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 639-645.

Jiang LQ, Zhang LY, Shi H, et al. Study on myocardial protective effect of honokiol in mice after acute myocardial infarction [J].

Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 639-645.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.006

和厚朴酚对心梗小鼠的心肌保护作用研究

江丽青,张溧昀,师恒,杨家昌,刘金成,段维勋*

(空军军医大学西京医院心血管外科,西安 710032)

【摘要】 目的 探讨和厚朴酚(Honokiol, HKL)对急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)小鼠的心肌保护作用及其可能的调控机制。**方法** 80只雄性C57BL/6J小鼠随机分为四组,每组20只:假手术(Sham)组、心梗模型+空白溶剂(Vehicle)(MI+V)组、心梗模型+和厚朴酚治疗(MI+HKL)组、心梗模型+和厚朴酚+沉默调节蛋白1(Sirtuin-1, SIRT1)抑制剂(selisistat, EX527)处理(MI+HKL+EX)组。造模后记录28d内小鼠的死亡情况;术后第28天检测小鼠超声心动图后,处死动物留取血清标本,酶联免疫吸附剂(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测血清炎症指标。留取心脏组织标本,活性氧荧光探针-二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)法检测心肌组织氧化应激水平;末端DNA转移酶dUTP缺口末端标记(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)法检测心肌细胞凋亡率,蛋白质印迹法(Western Blot)检测目标蛋白的表达水平。**结果** 与模型组比较, HKL口服治疗4周后可显著改善心梗小鼠的心功能,降低血清炎症因子水平和心肌细胞凋亡率,减轻心肌氧化应激水平,上调SIRT1表达并下调Ac-Foxo1表达。而使用SIRT1抑制剂EX527阻断SIRT1信号后, HKL的上述保护作用明显减弱($P < 0.05$)。**结论** 口服HKL可以抵抗心梗引发的心肌损伤,并显著改善心梗小鼠心功能,其作用机制可能是SIRT1/Ac-Foxo1信号参与调节。

【关键词】 心肌梗死;和厚朴酚;心肌凋亡;沉默信息调节蛋白1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0639-07

Study on myocardial protective effect of honokiol in mice after acute myocardial infarction

JIANG Liqing, ZHANG Liyun, SHI Heng, YANG Jiachang, LIU Jincheng, DUAN Weixun*

(Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Corresponding author: DUAN Weixun. E-mail: duanweixun@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the myocardial protective effect and possible regulatory mechanism of Honokiol (HKL) on Acute Myocardial Infarction (AMI) *in vivo*. **Methods** Eighty male C57BL/6J mice were randomly divided into the following groups: Sham (Sham) group, Myocardial Infarction model and Vehicle (MI + V) group, Myocardial Infarction model and HKL treatment (MI + HKL) group, Myocardial Infarction model, HKL treatment and Sirtuin-1 (SIRT1) inhibitor (selisistat, EX527) (MI + HKL + EX) group, with twenty mice in each group. The mortality of the mice during modeling stage was recorded after the operation. The echocardiogram and serum samples of the mice

【基金项目】 国家自然科学基金项目资助(82070503, 81970213), 陕西省创新人才推进计划项目资助(2017KJXX-05), 陕西省自然科学基金研究计划项目(S2022-JC-QN-1264)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82070503, 81970213), Innovative Talent Promotion Plan Project of Shaanxi Province (2017KJXX-05), Natural Science Basic Research Project of Shaanxi Province (S2022-JC-QN-1264).

【作者简介】 江丽青(1985—), 女, 硕士研究生, 研究实习员, 研究方向: 心肌保护的基础研究。Email: jliqing_0202@126.com

【通信作者】 段维勋(1977—), 男, 博士生导师, 副教授, 研究方向: 心血管疾病的临床和基础研究。Email: duanweixun@126.com

were gathered on the 28th day after the operation. The inflammatory indexes in the serum were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Besides, dihydroethidium staining (DHE) was utilized to display the intensity of reactive oxygen species in myocardial tissue. Apoptosis ratio was evaluated by detection of terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) and the expression of other target molecules was detected by Western Blot. **Results** Compared with the model group, the heart function of MI mice treated with oral HKL was significantly improved, the levels of inflammatory factors in serum were decreased. Additionally, cardiomyocyte apoptosis rate and reactive oxygen species in myocardial tissue were reduced. Simultaneously, the expression of SIRT1 was significantly up-regulated while the expression of Ac-Foxo1 protein was down-regulated, which were reversed by SIRT1 inhibitor (EX527) ($P < 0.05$).

Conclusions Oral HKL attenuate myocardial damage induced by myocardial infarction and significantly improve myocardial function, which may be regulated by the SIRT1/Ac-Foxo1 signal.

【Keywords】 myocardial infarction; honokiol; myocardial apoptosis; silencing information regulatory protein 1

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

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是心力衰竭最重要的病因之一, 在全球范围内发病率和死亡率都很高, 严重危害人类生命健康。但随着早期再灌注策略的实施以及治疗方法的改进, 急性心梗 30 d 内死亡率显著降低, 其预后效果也获得了很大改善^[1-3]。但生存率的提高伴随的是心梗后慢性心衰病人明显增多, 这与心梗后一系列病理性心肌重构密切相关^[4-5]。目前, 临床上缺乏针对心梗后病理性心肌重构的有效防治药物, 随着中医药研究的发展, 中药在心梗预防和治疗方面起到的作用日益显著。

和厚朴酚 (honokiol, HKL) 是一种从木兰科植物中提取的多酚类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤以及神经保护等多种药理作用, 已被广泛用于中药制剂研究^[6-10]。近年来, HKL 在心血管疾病方面的作用也备受关注, 如 Tsai 等^[11] 发现, 给大鼠静脉注射 HKL, 可显著降低心肌缺血后左室心律失常的发生率并缩短持续时间。Pillai 等^[12] 亦证实 HKL 不仅可以通过改善线粒体功能减轻多柔比星引起的心脏毒性, 也可以阻断甚至逆转心肌肥厚反应的发生。虽然 Wang 等^[13]、Zhang 等^[14] 已经发现 HKL 能明显减轻大鼠的心肌缺血/再灌注损伤, 然而, 其在小鼠急性心梗后近远期治疗效果及其具体分子机制还尚待研究。本研究将探讨 HKL 对急性心梗小鼠心肌损伤的影响及其可能的调控机制, 为 HKL 新的临床药用价值提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 80 只, 体重 20 ~ 25 g, 购自空军军医大学动物实验中心【SCXK

(陕)2019-001】, 小鼠由空军军医大学实验动物中心饲养【SYXK(陕)2019-001】。饲养期间所有小鼠自由饮食, 12 h 循环光照, 温度 24 ~ 26℃, 湿度 50% ~ 60%。所有操作均符合空军军医大学实验动物中心实验伦理学要求 (IACUC-20190115)。

1.1.2 主要试剂与仪器

和厚朴酚 (美国 Sigma-Aldrich 公司, 化学合成物, 纯度 $\geq 98\%$, 批号: H4914); 戊巴比妥钠 (北京索来宝有限公司, 中国, 批号: 57-33-0); SIRT1 抑制剂 EX527 (美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: E7034); SIRT1 (GR3392540-1)、Bcl-2 (GR3390921-1) 一抗 (美国 Abcam 公司); Bax (美国 CST 公司, 批号: 12)、GAPDH (美国 Proteintech 公司, 批号: 00081503)、Ac-Foxo1 (美国 Santa Cruz 公司, 批号: F1714)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (中杉金桥, 中国, 批号: 200830803); BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司, 批号: VK314219); TUNEL 试剂盒 (德国 Roche 公司, 批号: 49330900); DAPI 染液 (美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: D9542); IL- β 、IL-6、TNF- α 检测试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司, 批号分别为: 5EEUZ9PLRK、KZ9XUYNEYN、3B164BNQLX); Vevo3100 小动物超声仪 (Visual-Sonics 公司, 加拿大); FV10-ASW 激光共聚焦显微镜 (Olympus 公司, 日本); Western 发光照相系统 (Bio-Rad 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立

小鼠心肌梗死模型是聘请美国 Thomas Jefferson 大学的 Gao Erhe 教授构建, 具体方法参照文献^[15], 结扎冠脉左前降支, 结扎线下方心肌缺血变白且心电图显示 ST 波倒置, 代表造模成功, 模型成功率达 98% 以上。

1.2.2 实验分组及给药方式

将 80 只小鼠随机分成 4 组, 每组 20 只, 即 Sham 组、MI + V 组、MI + HKL 组、MI + HKL + EX 组。治疗组在行心梗手术前 1 周开始口服 HKL (5 mg/(kg · d), 溶于 < 1% DMSO 的纯净水中), 抑制剂组除按前面剂量口服 HKL 外, 腹腔注射 Ex527 抑制剂, 每 5 d 1 次 (5 mg/(kg · d), 溶于 < 1% DMSO 的无菌生理盐水中), 注射 6 次, HKL 给药剂量参照文献^[14]。

1.2.3 心脏功能检测

各组小鼠在心梗术后第 28 天, 剔除小鼠胸前毛, 每组随机取 5 只用异氟烷麻醉小鼠并将其固定于恒温检测台上, 用小动物超声仪采集二维超声心动图像, 并用软件计算出相应的左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 与左室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS) 等心功能指标。

1.2.4 血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的检测

超声检测小鼠心功能后, 使用异氟烷麻醉小鼠并固定于小动物操作台上, 颈部消毒, 眼科剪沿颈前正中线剪开并剥离出颈动脉, 剪断后收集血液, 静置 30 min 后离心收集上层血清, 参照 ELISA 检测试剂盒说明书要求, 检测各组血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量。

1.2.5 心肌组织活性氧簇生成量检测

小鼠 MI 术后第 28 天, 采集完血液后取下小鼠心脏, 取 5 个用预冷的 PBS 洗涤后, 在液氮中快速冷冻, 用冰冻切片包埋剂处理后并切成 5 μ m 厚度组织切片。然后, 用 DHE 和 DAPI 染料对组织切片进行染色, 光镜下扫描并拍照, 使用 Image-Pro Plus 软件测定每组中的乙锭荧光。

1.2.6 心肌组织 TUNEL 检测

小鼠 MI 术后第 28 天, 采集完血液后取下小鼠心脏, 取 5 个浸泡在 4% 多聚甲醛, 石蜡包埋后切片备用, 按 TUNEL 常规染色步骤染色, 光镜下扫描并拍照, 然后统计每组心肌细胞凋亡率, 以绿色凋亡小体个数/蓝色核个数表示细胞凋亡率。

1.2.7 心肌组织 SIRT1、Ac-Foxo1、Bax、Bcl-2 蛋白表达检测

小鼠 MI 术后第 28 天, 采集血液后取下小鼠心脏, 取左室部分组织称重, 在预冷 PBS 中剪碎, 离心 5 min, 去除上清, 加入相应体积的裂解液并进行组

织匀浆。然后在 4℃ 条件下充分裂解 20 min, 再以 12 000 r/min 转速离心 20 min。采用 BCA 法检测上清液中蛋白浓度, 其余上清液以 1 : 4 的比例与蛋白上样缓冲液 (5 $\times$) 混合后煮沸使蛋白变性, -80℃ 冰箱保存, 待用。经蛋白凝胶电泳分离后, 用湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭后, 切膜, 于 4℃ 条件下孵育一抗, 稀释比例为: SIRT1、Ac-Foxo1、Bax、Bcl-2 均为 1 : 1000, GAPDH 为 1 : 5000, 孵育过夜, TBST 洗脱 3 次, 每次 10 min, 分别加 1 : 5000 HRP 标记的二抗 (山羊抗鼠及山羊抗兔), 室温孵育 2 h, TBST 洗脱 3 次, 每次 10 min, 使用 ECL 化学发光液进行曝光显影, 采用 Bio-Rad 照相系统进行拍照和并用 Image Lab 软件分析蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

实验数据用 GraphPad Prism 8.0 统计学软件进行分析, 符合正态分布的计量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 多组之间的比较通过 One-ANOVA 分析方法进行统计。P < 0.05 表示具有显著性差异。

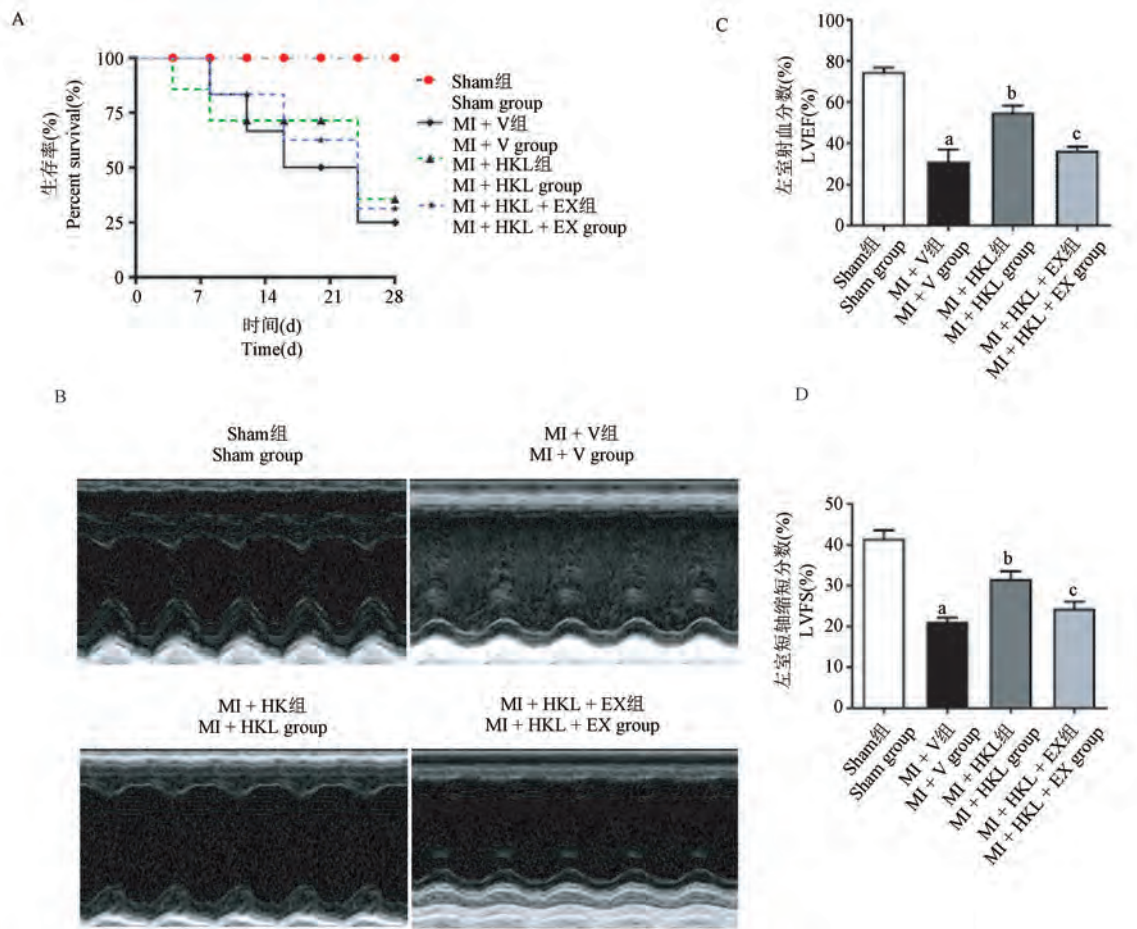
2 结果

2.1 小鼠 MI 后 28 d 生存率及 HKL 对 MI 小鼠心功能的影响

小鼠行 MI 手术后, 观察 28 d 生存情况, Sham 组无死亡小鼠, MI + V 组、MI + HKL 组、MI + HKL + EX 组均有死亡, 3 组之间无显著性差异, 但较 Sham 组生存率明显下降 (P < 0.01), 如图 1A。小鼠 MI 后第 28 天超声心动图统计结果显示, 与 Sham 组相比较, MI + V 组小鼠心功能损伤显著加重 (P < 0.01); 与 MI + V 组比较, 口服 HKL 治疗后心功能明显得到改善 (P < 0.01), 而加 SIRT1 抑制剂 EX527 后显著抑制了 HKL 的心功能改善作用 (P < 0.05) (见图 1B, 图 1C, 图 1D)。

2.2 口服 HKL 治疗降低 MI 小鼠血清炎症因子水平

小鼠血清检测结果显示, MI 术后小鼠血清中炎症相关因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量较 Sham 组显著升高 (P < 0.01), 与 MI + V 组比较, 口服 HKL 治疗后血清中炎症相关因子含量又显著下降 (P < 0.01), 而加 SIRT1 抑制剂 EX527 后, 炎症水平又明显加重 (P < 0.05) (见表 1)。



注:A:各组小鼠 MI 后 28 d 内生存曲线, $n = 20$; B:各组小鼠超声心动图; C:左室射血分数(LVEF)统计图, $n = 5$; D:左室缩短分数(LVFS)统计图, $n = 5$ 。与 Sham 组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与 MI + V 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 MI + HKL 组比较, ^c $P < 0.05$ 。(下图/表同)

图 1 各组小鼠生存率及心功能比较

Note. A. Survival curve of mice in each group within 28 days after MI, $n = 20$. B. Representative images of Echocardiogram of each group of mice. C. Statistics chart of left ventricular ejection fraction, $n = 5$. D. Statistics chart of left ventricular shortening fraction. Compared with the Sham group, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$. Compared with the MI + V group, ^b $P < 0.01$. Compared with the MI + HKL group, ^c $P < 0.05$, $n = 5$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Comparison of the survival and cardiac function of mice among different groups

表 1 和厚朴酚对心梗小鼠小鼠血清炎症因子的影响 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

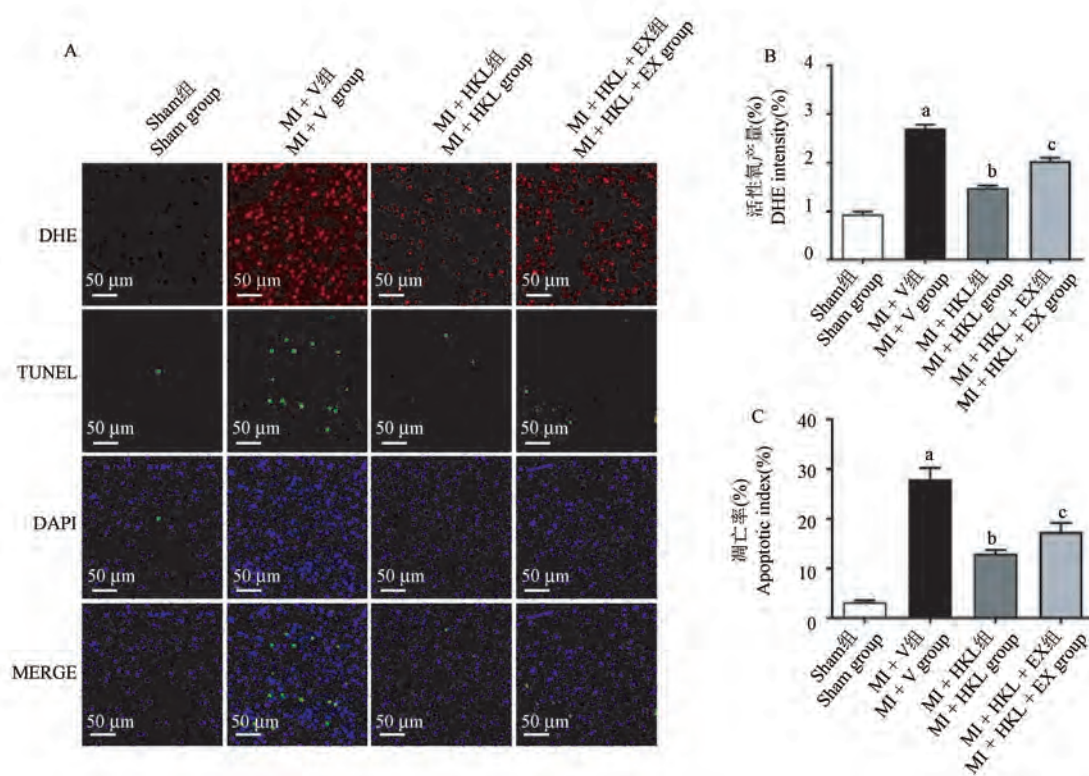
Table 1 Effect of honokiol on serum inflammatory factors in mice with myocardial infarction (pg/mL, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别 Groups	白细胞介素-1 β IL-1 β	白细胞介素-6 IL-6	肿瘤坏死因子- α TNF- α
Sham 组 Sham group	1.69 $\pm$ 0.08	1.82 $\pm$ 0.74	16.20 $\pm$ 5.42
MI + V 组 MI + V group	9.66 $\pm$ 1.47 ^a	8.95 $\pm$ 1.64 ^a	109.80 $\pm$ 17.27 ^a
MI + HKL 组 MI + HKL group	3.35 $\pm$ 0.63 ^b	4.24 $\pm$ 1.61 ^b	33.86 $\pm$ 11.30 ^b
MI + HKL + EX 组 MI + HKL + EX group	5.40 $\pm$ 1.06 ^c	6.62 $\pm$ 2.80 ^c	46.28 $\pm$ 14.34 ^c

2.3 口服 HKL 治疗对 MI 小鼠心肌组织氧化应激和心肌细胞凋亡水平的影响

心肌组织 DHE 和 TUNEL 染色结果显示,与 Sham 组比较,MI + V 组氧化应激和凋亡水平明显

加重($P < 0.01$),与 MI+V 组比较,口服 HKL 治疗后显著改善了 MI 小鼠心肌组织氧化应激和凋亡水平($P < 0.01$),而加 SIRT1 抑制剂 EX527 后,这种改善作用又明显减弱($P < 0.05$)(见图 2)。



注:A:各组小鼠心肌组织 DHE 和 TUNEL 染色结果;B:各组小鼠心肌组织氧化应激水平统计图;C:各组小鼠心肌凋亡水平统计图。

图 2 各组小鼠心肌氧化应激和凋亡水平的比较

Note. A. Representative images of apoptotic cardiomyocytes and ROS levels. B. DHE intensity. C. Cell apoptosis presented as the apoptotic index.

Figure 2 Comparison of myocardial oxidative stress and apoptosis indexes among different groups

2.4 口服 HKL 治疗对 MI 小鼠心肌组织凋亡相关蛋白及 SIRT1/Ac-Foxo1 信号通路的影响

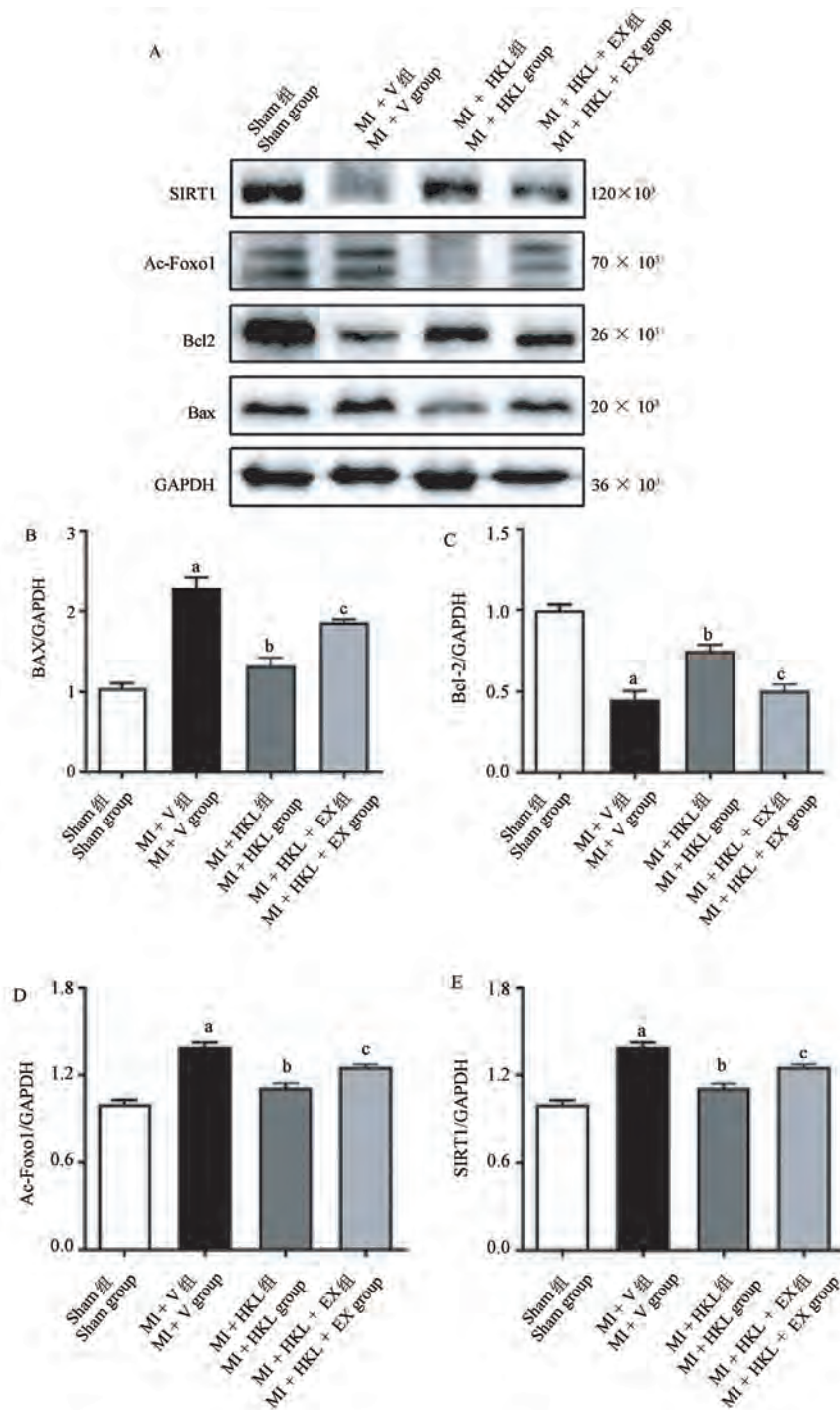
与 Sham 组相比较,MI + V 组凋亡相关蛋白 Bax 和 SIRT1 信号通路下游蛋白 Ac-Foxo1 的表达显著增加($P < 0.01$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 SIRT1 信号的表达水平显著降低($P < 0.01$);而口服 HKL 治疗后可显著缓解 MI 后心肌损伤,Bax 和 Ac-Foxo1 的表达较 MI + V 组明显降低($P < 0.01$),Bcl-2 和 SIRT1 的表达水平又明显升高($P < 0.01$);加入 SIRT1 抑制剂 EX527 后,这种改善作用又明显减弱($P < 0.05$)(见图 3)。

3 讨论

本研究通过对急性心梗小鼠模型的实验研究发现,较假手术组,心肌梗死后小鼠 28 d 内生存率明显下降,心功能明显变差;口服和厚朴酚治疗可以显著改善心梗小鼠的心功能,并显著降低小鼠血清中炎症因子水平,生存率略有改善但无明显差异。和厚朴酚作为一种中药材中天然、安全的“靶向”药物,在心血管领域能够发挥多重积极的作用,

如降血压、抑制动脉血栓形成、逆转心肌肥厚反应以及保护线粒体等^[12,16-17]。此外,和厚朴酚已被广泛用于减轻多个脏器缺血再灌注损伤的研究中。重要的是,Zhang 等^[14]研究发现,和厚朴酚可以显著改善糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤后的心脏功能障碍,但其在急性心梗后如何发挥保护效应还鲜有研究报道。因此,和厚朴酚对近远期缺血性心脏病的防治效果研究显得尤为迫切。

据报道,心梗后一系列病理变化包括心肌组织氧化应激增加、炎症细胞广泛浸润、心肌细胞死亡、心脏收缩功能变差等,这些导致心脏病理性架构变化,并最终导致心衰^[5,18-19]。张超等^[20]研究发现,和厚朴酚可以通过减轻炎症因子水平和抗凋亡作用对 D-半乳糖致腰椎间盘突出有明显治疗作用。本研究通过给予心梗小鼠口服和厚朴酚发现,治疗组可以明显降低小鼠心肌组织氧化应激水平,减少心肌细胞凋亡,同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量显著增加,凋亡蛋白 Bax 表达水平显著降低,表明和厚朴酚可通过降低小鼠血清炎症因子水平和心肌细胞凋亡率改善心梗后小鼠心功能。



注:A:各心肌组织中相关蛋白的表达;B,C,D,E:分别是 SIRT1、Ac-Foxo1、Bax、Bcl-2 蛋白的表达变化统计图。

图 3 各组小鼠心肌组织中凋亡相关蛋白表达及 SIRT1/Ac-Foxo1 信号通路蛋白的表达变化

Note. A. Representative protein images by Western Blot from different groups. B, C, D, E. Expression of SIRT1, Ac-Foxo1, Bax, Bcl-2.

Figure 3 Comparison of apoptosis and SIRT1/Ac-Foxo1 signal pathway-related proteins level in myocardial tissues among different groups

SIRT1 是一种主要分布于细胞核中的去乙酰化酶,通过对一些组蛋白和非组蛋白的去乙酰化作用,参与调控多种组织细胞的生存、凋亡、生长、衰老以及物质代谢^[21]。此外,文献报道表明 SIRT1 可

通过抑制细胞凋亡、降低氧化应激与内质网应激水平、调控细胞自噬等途径来减轻心肌缺血再灌注损伤^[22],那么,心肌梗死后和厚朴酚是否能通过激活 SIRT1 信号发挥保护作用尚需证实。本研究通过给

心梗模型小鼠腹腔注射 SIRT1 抑制剂 EX527,同时给予和厚朴酚口服给药,发现加入抑制剂后,较单纯给药组,心肌组织氧化应激和心肌细胞凋亡水平明显增加,血清炎症因子也显著增加,同时和厚朴酚的心功能明显变差,SIRT1 下游分子 Ac-Foxo1 表达显著增加。因此,该研究表明和厚朴酚对心梗小鼠心功能的保护作用部分是通过 SIRT1/Ac-Foxo1 信号的抗凋亡作用实现的。

综上所述,该研究表明和厚朴酚可减轻心梗后小鼠心肌损伤,其潜在的作用机制可能是通过激活 SIRT1/Ac-Foxo1 信号通路抑制心肌细胞凋亡,但其具体的下游机制仍需进一步研究。因此,本研究将为和厚朴酚在临床上治疗心肌梗死提供可能的理论依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Bhatt AS, Ambrosy AP, Velazquez EJ. Adverse remodeling and reverse remodeling after myocardial infarction [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2017, 19(8): 71-79.
- [2] Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(2): 119-177.
- [3] Tamis-Holland JE, Jneid H, Reynolds HR, et al. Contemporary diagnosis and management of patients with myocardial infarction in the absence of obstructive coronary artery disease: a scientific statement from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2019, 139(18): 891-908.
- [4] Lewis EF, Moye LA, Rouleau JL, et al. Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the Care study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42(8): 1446-1453.
- [5] Oliveira JB, Soares AASM, Sposito AC. Inflammatory response during myocardial infarction [J]. *Adv Clin Chem*, 2018, 84: 39-79.
- [6] Ye JS, Chen L, Lu YY, et al. SIRT3 activator honokiol ameliorates surgery/anesthesia-induced cognitive decline in mice through anti-oxidative stress and anti-inflammatory in hippocampus [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(3): 355-366.
- [7] Wijesuriya YK, Lappas M. Potent anti-inflammatory effects of honokiol in human fetal membranes and myometrium [J]. *Phytomedicine*, 2018, 49: 11-22.
- [8] Lee JS, Sul JY, Park JB, et al. Honokiol induces apoptosis and suppresses migration and invasion of ovarian carcinoma cells via AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(5): 1969-1978.
- [9] Woodbury A, Yu SP, Chen D, et al. Honokiol for the treatment of neonatal pain and prevention of consequent neurobehavioral disorders [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(11): 2531-2536.
- [10] Rauf A, Olatunde A, Imran M, et al. Honokiol: a review of its pharmacological potential and therapeutic insights [J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: 153647.
- [11] Tsai SK, Huang CH, Huang SS, et al. Antiarrhythmic effect of magnolol and honokiol during acute phase of coronary occlusion in anesthetized rats: influence of L-NAME and aspirin [J]. *Pharmacology*, 1999, 59(5): 227-233.
- [12] Pillai VB, Samant S, Sundaresan NR, et al. Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6656.
- [13] Wang Y, Zhang ZZ, Wu Y, et al. Honokiol protects rat hearts against myocardial ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress and inflammation [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(1): 315-319.
- [14] Zhang B, Zhai M, Li B, et al. Honokiol ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by reducing oxidative stress and apoptosis through activating the SIRT1-Nrf2 signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 3159801.
- [15] Gao E, Lei YH, Shang X, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse [J]. *Circ Res*, 2010, 107(12): 1445-1453.
- [16] Zhang GS, Wang RJ, Zhang HN, et al. Effects of chronic treatment with honokiol in spontaneously hypertensive rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(3): 427-431.
- [17] Pillai VB, Kanwal A, Fang YH, et al. Honokiol, an activator of Sirtuin-3 (SIRT3) preserves mitochondria and protects the heart from doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(21): 34082-34098.
- [18] Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis [J]. *Circ Res*, 2016, 119(1): 91-112.
- [19] Teringova E, Tousek P. Apoptosis in ischemic heart disease [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 87.
- [20] 张超, 吴俊学, 王治, 等. 和厚朴酚对 D-半乳糖致腰椎间盘突出大鼠血清炎症因子及细胞线粒体凋亡通路的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(11): 62-68, 75.
- Zhang C, Wu JX, Wang Z, et al. Effect of honokiol on serum inflammatory factors and mitochondrial apoptosis pathway in rats with D-galactose-induced lumbar intervertebral disc degeneration [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(11): 62-68, 75.
- [21] Ma L, Li Y. SIRT1: role in cardiovascular biology [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 440: 8-15.
- [22] Hsu CP, Zhai P, Yamamoto T, et al. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion [J]. *Circulation*, 2010, 122(21): 2170-2182.

冯胜蓝,孙晓东,谢丽霞,等. 白藜芦醇改善 α -突触核蛋白 A53T 转基因小鼠运动功能障碍和调节外周免疫的作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 646-654.

Feng SL, Sun XD, Xie LX, et al. Effect of resveratrol on motor dysfunction and peripheral immunity in α -synuclein A53T mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 646-654.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.007

白藜芦醇改善 α -突触核蛋白 A53T 转基因小鼠运动功能障碍和调节外周免疫的作用研究

冯胜蓝^{1,2,3}, 孙晓东^{1,2,3}, 谢丽霞^{1,2,3}, 叶俊杰^{1,2,3}, 覃冰清^{1,2,3}, 许倩倩^{1,2,3},
杜凯丽^{1,2}, 王敏^{1,2}, 桑明^{1,2,3*}

(1. 湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院转化医学中心, 湖北 襄阳 441000; 2. 湖北省帕金森病临床医学研究中心, 湖北 襄阳 441000; 3. 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000)

【摘要】 目的 研究白藜芦醇(resveratrol, RES)对 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn) A53T 转基因小鼠运动功能障碍及外周免疫的影响。**方法** 选取8月龄的A53T转基因小鼠,随机分成4组:对照组(WT)、对照治疗组(WT + RES)、模型组(PD)、模型治疗组(PD + RES)。治疗组每3 d灌胃RES,用药3个月;对照组和模型组给予等量生理盐水。通过爬杆实验、转棒实验、前脚抓力实验、四肢抱紧实验检测各组小鼠运动水平。流式细胞仪检测小鼠T淋巴细胞亚群,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠血清中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-18(IL-18)以及转化生长因子- β (TGF- β)的水平。**结果** 与对照组相比,模型组运动功能评分均较低;与模型组相比,模型治疗组运动功能评价显著改善。流式结果显示,与对照组比,模型组小鼠外周T细胞占比、CD4⁺T细胞占比、CD4⁺/CD8⁺比值均降低,CD8⁺T细胞占比无统计学意义。与模型组相比,模型治疗组T淋巴细胞占比和CD4⁺T细胞占比均显著升高,有统计学意义,CD4⁺/CD8⁺比值也升高,但差异无统计学意义。外周血血清ELISA结果显示,与对照组相比,模型组小鼠IL-6、IL-18均升高,TGF- β 降低,TNF- α 浓度无统计学差异。与模型组相比,模型治疗组IL-6、IL-18浓度显著下降,TGF- β 有所上升,结果无统计学意义。**结论** RES通过调节小鼠外周免疫,减少神经炎症反应,从而显著改善A53T转基因小鼠的运动功能障碍。

【关键词】 白藜芦醇; α -突触核蛋白 A53T 转基因小鼠;帕金森病;运动功能障碍;外周T淋巴细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)05-0646-09

Effect of resveratrol on motor dysfunction and peripheral immunity in α -synuclein A53T mice

FENG Shenglan^{1,2,3}, SUN Xiaodong^{1,2,3}, XIE Lixia^{1,2,3}, YE Junjie^{1,2,3}, QIN Bingqing^{1,2,3}, XU Qianqian^{1,2,3}, DU Kaili^{1,2},
WANG Min^{1,2}, SANG Ming^{1,2,3*}

(1. Center for Translational Medicine at Xiangyang No. 1 People's Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang 441000, China. 2. Hubei Clinical Research Center of Parkinson's Disease, Xiangyang 441000, 3. Hubei Key laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Shiyan 442000)

Corresponding author: SANG Ming. E-mail: smxd2000@126.com

【基金项目】 湖北省实验动物资源开发及利用项目(2020DFE025), 湖北医药学院药护学院团队项目(2017YHKT02), 襄阳市第一人民医院科技创新项目(XYY2021M07), 湖北医药学院研究生科技创新项目(YC2022008, YC2022003)。

Funded by the Experimental Animal Resources Development and Utilization Project of Hubei Province of China (2020DFE025), the Innovative Team Project (2017YHKT02) from the Institute of Medicine and Nursing at Hubei University of Medicine, Innovative Research Program of Xiangyang No. 1 People's Hospital(XYY2021M07), Innovative Research Program for Graduates of Hubei University of Medicine(YC2022008, YC2022003).

【作者简介】 冯胜蓝(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:神经免疫。Email:1784485381@qq.com

【通信作者】 桑明(1978—),男,硕士研究生导师,博士,研究方向:神经免疫,病原微生物。Email:smxd2000@126.com

【Abstract】 Objective To illustrates the effect of resveratrol on motor dysfunction and peripheral immunity in α -synuclein A53T mice. **Methods** Eight-month-old A53T α -syn transgenic mice were randomly divided into four groups: model group (PD), model treatment group (PD + RES), control group (WT) and control treatment group (WT + RES). The treatment groups were given Resveratrol (RES) by gavage every 3 days for 11 months, while the control and model groups were given an equal volume of normal saline. The motoric function of the animals was analyzed with a forelimb grip strength test, Rotarod test, and Pole climbing test. The proportion of T lymphocyte subsets in different groups of mice was detected by flow cytometry. IL-6, TNF- α , IL-18 and TGF- β in each group were detected by an ELISA kit. **Results** the motor function scores in the PD group were worse than those in the WT group. Compared with the PD group, the motor function score of the PD + RES group was significantly improved. The flow cytometry result showed that compared with the WT group, the T lymphocyte ratio, CD4⁺T cell ratio, and CD4⁺/CD8⁺ ratio were less in the PD group, while the CD8⁺T cell ratio was not significantly different. After RES treatment, T lymphocytes, CD4⁺ cells, and the CD4⁺/CD8⁺ ratio were significantly greater in the PD + RES group than the PD group. The ELISA result showed that compared with the WT group, the IL-6 and IL-18 levels in the PD group were greater, the TGF- β level were less, and the TNF- α level showed no significant statistical difference. After RES treatment, compared with the PD group, the IL-6 and IL-18 levels in the PD + RES group were significantly less, while the TGF- β level was greater; however, the result showed no statistical difference. **Conclusions** Resveratrol can reduce motor disorders, regulate peripheral immune function, and effectively reduce neuroinflammation.

【Keywords】 resveratrol; α -synuclein (α -Syn) A53T transgenic mice; Parkinson's disease; motor dysfunction; peripheral T lymphocytes

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

帕金森病(Parkinson's disease, PD)也称为震颤麻痹(paralysis agitans),在中老年人群中多发,随着人口老龄化的不断加剧,PD的发病率不断升高^[1]。PD的主要病理特征为中脑黑质和纹状体处多巴胺(dopamine, DA)能神经元进行性丢失以及 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn)的积累,临床上伴随典型运动迟缓、静止性震颤等运动功能障碍^[2]。有研究发现,PD患者的血清及脑脊液中促炎因子IL-6(interleukin-6)、IL-1 β 升高,抗炎因子IL-10降低,说明PD患者存在神经炎症反应^[3]。PD患者的外周血中CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞占比减少,说明PD患者存在免疫调节异常的现象^[4]。目前,PD的具体发病原因及机制尚不明确,缺乏有效的治疗方法^[5]。白藜芦醇(resveratrol, RES)是一种药食同源的天然多酚类化合物,具有抗炎、抗凋亡、抗氧化及神经保护等作用^[6]。同时,RES是沉默信息调节器1(silence information regulator 1, SIRT1)的变构激活剂,具有调控自噬作用^[7]。在PD患者中,SIRT1的酶活性降低,减弱了其抵抗神经毒素的能力,导致神经炎症发生^[8]。研究表明,RES在帕金森动物模型中具有神经保护作用^[9-11]。Pmp-SNCA-A53T转基因小鼠是过表达包含A53T突变的人源SNCA基因的PD模型小鼠,后代纯合子小鼠从8月龄开始

出现进行性运动障碍^[12-13]。该模型很好的模拟帕金森症发病情况,是研究PD发病机制较理想的小鼠模型。研究发现RES对该模型小鼠运动、认知功能和神经病理具有积极改善作用^[14-16]。RES的上述作用机制尚不明确,因此,本实验以RES灌胃治疗A53T转基因小鼠3个月,研究RES对该模型小鼠运动功能、T淋巴细胞亚群和外周炎症因子影响,为应用RES治疗PD提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

12只SPF级8月龄A53T转基因阳性小鼠及12只同窝转基因阴性小鼠,雄性,体重20~30g,本研究所用A53T转基因小鼠是武汉大学张振涛教授实验室【SCXK(鄂)2019-0004】赠予,在襄阳市第一人民医院转化医学中心动物实验室【SYXK(鄂)2022-0093】扩繁和饲养。昼夜各半循环照明,环境相对湿度40%~60%,温度控制范围20~24℃之内,日温差 $\leq 1^\circ\text{C}$,食物供给充足,按照实验动物使用原则(3R原则)给予人道主义关怀。本项目动物实验均通过襄阳市第一人民医院动物伦理委员会审批(2021DW008)。

1.1.2 主要试剂与仪器

白藜芦醇 (1602105-100MG, Sigma-Aldrich, 美国); IL-6 (MM-1011M2)、IL-18 (MM-0169M1)、TNF- α (MM-0132M2) 及 TGF- β (MM-45041M2) ELISA 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司), 单抗试剂: APC-Cy7 anti-mouse, Percpcy 5.5 anti-mouse CD3e, FITC anti-mouse CD4, PE anti-mouse CD8a (BD, 美国), SYBR Green PCR Mix (Promega, 美国), 实验所用引物由湖北省武汉市金开瑞生物工程有限公司合成 (武汉), Phospho-alpha-Synuclein (S129) Antibody (PPS091, R&D SYSTEMS, 美国)。SpectraMax i3x 酶标仪 (Molecular Devices, 美国); ABI 7500 PCR 仪 (Life technology, 美国); BD FACS AriaII 流式细胞分析仪 (BD, 美国); XR501 型大小鼠抓力测定仪 (上海欣软信息科技有限公司); XR-6C 型小鼠转棒疲劳仪 (上海欣软信息科技有限公司); 自备一根直径 1 cm、长度 50 cm 的表面粗糙的木杆。

1.2 方法

1.2.1 实验设计

8 月龄 SPF 级 A53T 转基因阳性小鼠 12 只, 随机分成两组, 模型组 (PD), 模型治疗组 (PD + RES); 选取同窝转基因阴性小鼠 12 只, 随机分成两组, 对照组 (WT), 对照治疗组 (WT + RES), 给药组每 3 d 灌胃 1 次 RES (30 mg/kg), 至 11 月龄; 对照组和模型组每 3 d 灌胃等容积生理盐水。在治疗 4 个时间点 (0、1、2、3 月) 进行运动行为学测试, 治疗终点取小鼠外周血进行 T 淋巴细胞亚群和血清炎症因子检测。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测 SNCA 基因表达

剪小鼠尾尖组织, 提取小鼠组织 DNA。按 SYBR Green 试剂盒说明进行扩增, PCR 体系为 20 μ L, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。每个样品设 3 个复孔, 引物序列见表 1。转基因阳

性小鼠的基因型是通过使用适当的内源参照基因片段, 将每个未知样本的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值与已知的纯合子和杂合子对照进行比较确定的。计算方法如下, 将样本差异以内参基因均一化, $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}$; 然后, 将待测样本与对照样本比较得出 $\Delta\Delta Ct$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{处理样本} - \Delta Ct_{对照样本}$; 利用公式计算获得待测样本的 RQ 值 (倍数变化) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.2.3 免疫组化检测 P- α -Syn (S129) 蛋白在小鼠中脑组织中的表达

取小鼠中脑组织, 4% 的多聚甲醛固定、石蜡包埋, 5 μ m 连续切片。采用免疫组织化学方法检测中脑组织中 P- α -Syn 蛋白的表达。阳性染色为棕黄色。首先选择在低倍镜观察整个组织切片, 圈定 4 个细胞染色清晰、组织结构良好的区域视野, 最后选择高倍镜观察。

1.2.4 小鼠行为学测试

(1) 爬杆实验: 记录小鼠从爬杆顶部爬至杆底的时长, 每只小鼠重复 3 次, 取平均值。(2) 转棒实验: 将小鼠置于恒定转速 (30 r/min, 以正常小鼠 3 min 内掉下为标准) 的转棒仪上, 记录小鼠掉落时所转的总路程, 每只小鼠重复 3 次, 取平均值。(3) 抓力实验: 依次将小鼠放于抓力测试仪上, 抓住鼠尾, 当小鼠前爪在仪器抓杆上抓牢后, 以匀速匀力向后拉, 待小鼠松爪, 记录小鼠前爪最大拉力, 每只小鼠重复 3 次, 取平均值。(4) 下肢抱紧实验: 尾根部悬吊小鼠并坚持 15 s 后, 根据后肢抱紧的严重程度进行评分, 进行评分从 0 到 3 计算: 0 = 后肢远离腹部, 向外张开; 1 = 观察期间一侧下肢部分向腹部内缩回至少 50%; 2 = 在观察期双下肢部分向腹部内缩回至少 50%; 3 = 观察期间两后肢完全向腹部内缩少于 50%。评分为 0.5 分属正常数值, 在连续 3 d 的 3 个独立实验后, 取平均值。

1.2.5 外周血 T 淋巴细胞及其亚群检测

采用多色抗小鼠单克隆抗体 (mAbs) 联合试剂 APC-Cy7 anti-mouse CD45, Percpcy 5.5 anti-mouse CD3, FITC anti-mouse CD4, PE anti-mouse CD8 和匹配的同型对照, 在灌胃 RES 治疗 3 个月后, 取血至 EDTA 抗凝小管中, 进行抗体染色, PBS 清洗两次后, 进行流式细胞术检测, 计数 1×10^5 个细胞。所有样本均采用 BD FACS Aria II 流式细胞仪进行检测, 应用 Flow J 软件对检测结果进行分析。

1.2.6 外周血血清炎症因子检测

取外周血后, 分离血清, -20 $^{\circ}$ C 保存, 测定前复

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

基因名称 Gene name	引物类型 Primer type	序列 (5' $\rightarrow$ 3') Sequence (5' $\rightarrow$ 3')
内参基因 Internal positive control	上游 Forward	CACGTGGGCTCCAGCATT
	下游 Reverse	TCACCAGTCATTTCTGCCITTTG
突触核蛋白基因 SNCA	上游 Forward	TGACGGGTGTGACAGCAGTAG
	下游 Reverse	CAGTGGCTGCTGCAATG

融,混匀,2000 r/min 转速离心 20 min,取上清后按 ELISA 试剂盒说明书进行操作。检测 IL-6、IL-18、TNF- α 及 TGF- β 表达。

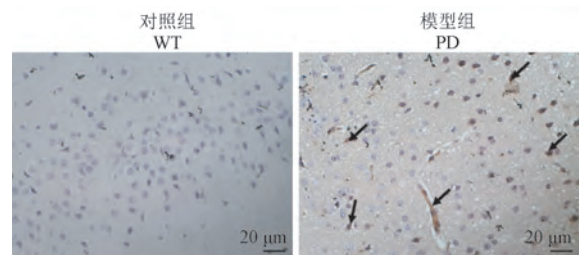
1.3 统计学分析

应用 SPSS 24.0 统计学软件对数据进行统计学分析并整理,连续变量用均值表示,计量资料采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 帕金森病 A53T 转基因小鼠鉴定

荧光定量 PCR 检测 A53T 转基因阳性小鼠的 SNCA 基因鉴定结果如表 2 所示;免疫组化检测小鼠中脑中 P- α -Syn(S129)蛋白的表达,结果与对照组相比,A53T 小鼠的 P- α -Syn 蛋白表达显著增多(图 1),表明本实验所用小鼠基因型正确符合要求。



注:免疫组化法检测 P- α -Syn 蛋白在中脑组织中的表达。

图 1 A53T 转基因小鼠鉴定

Note. The protein levels of P- α -Syn in midbrain tissue was detected using immunohistochemical.

Figure 1 Identification of α -synuclein A53T mice

2.2 RES 对 A53T 转基因小鼠运动功能障碍的影响

RES 治疗 3 个月后,与模型组相比,模型治疗组小鼠爬杆总时长显著缩短($P < 0.01$)(图 2A)。与对照组相比,模型组小鼠前脚抓力显著较小($P < 0.05$),RES 治疗后,与模型组相比,模型治疗组小鼠前脚抓力显著增加($P < 0.05$)(图 2B)。同时,与对照组相比,模型组小鼠转棒总路程显著缩短($P < 0.05$),RES 治疗后,与模型组相比,模型治疗组小鼠转棒总路程显著延长($P < 0.05$)(图 2C)。与对照组相比,对照治疗组爬杆时长,抓力大小以及转棒总路程均不具有统计学意义(图 2)。

同时,对小鼠体重进行测量,发现 RES 对小鼠体重无显著差异(图 3A);与对照组相比,模型组小鼠在尾部悬吊之后表现出下肢抱紧行为,这是神经退行性疾病小鼠模型常见的运动障碍特征;RES 治疗后,与模型组相比,模型治疗组小鼠抱紧行为改善(图 3B)。与对照组相比,模型组小鼠四肢抱紧运动功能评分升高($P < 0.005$);RES 治疗后,与模型组相比,模型治疗组小鼠四肢抱紧运动功能评分显著降低($P < 0.01$)。与对照组相比,对照治疗组四肢抱紧运动功能评分无显著性差异(图 3C)。

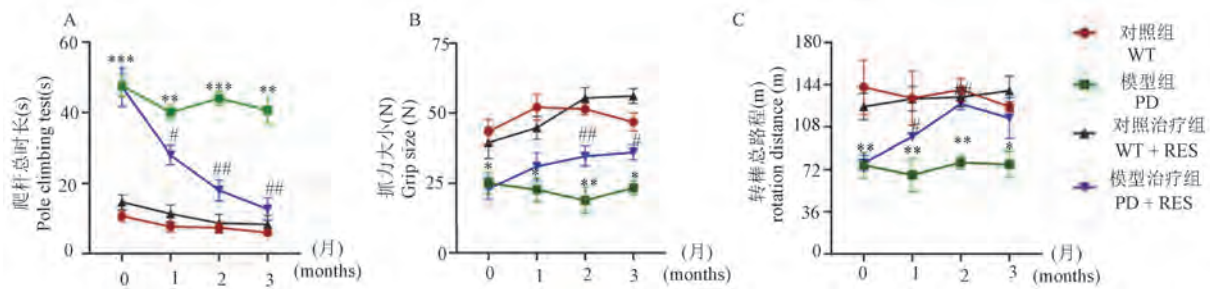
2.3 RES 对 A53T 转基因小鼠外周 T 淋巴细胞及其亚群影响

流式圈门策略及典型示例见图 4 所示。流式检测结果显示:与对照组相比,模型组 T 淋巴细胞占比显著降低,差异具有显著性($P < 0.001$);经 3 个月 RES 灌胃治疗后,与模型组相比,模型治疗组 T 淋巴细胞占比增加,差异具有统计学意义($P <$

表 2 A53T 转基因小鼠 SNCA 基因鉴定

Table 2 SNCA gene identification in α -Synuclein A53T mice

内参校准值 Internal reference calibration value	检测 RQ 值 Detection of RQ values	检测的动物 Animals tested	基因型 Genotype
1.02	0.00	野生对照 Wild contrast	野生型 WT
0.97	1.00	杂合对照 Hybrid control	杂合子 Mut/WT
1.01	1.63	鼠 1 Mouse 1	纯合子 Mut/Mut
1.02	1.48	鼠 2 Mouse 2	纯合子 Mut/Mut
0.98	1.88	鼠 3 Mouse 3	纯合子 Mut/Mut
0.99	1.57	鼠 4 Mouse 4	纯合子 Mut/Mut
1.02	1.61	鼠 5 Mouse 5	纯合子 Mut/Mut
1.04	1.83	鼠 6 Mouse 6	纯合子 Mut/Mut
0.98	1.44	鼠 7 Mouse 7	纯合子 Mut/Mut
1.00	1.72	鼠 8 Mouse 8	纯合子 Mut/Mut
0.99	1.83	鼠 9 Mouse 9	纯合子 Mut/Mut
0.96	1.96	鼠 10 Mouse 10	纯合子 Mut/Mut
1.01	1.74	鼠 11 Mouse 11	纯合子 Mut/Mut
0.99	1.85	鼠 12 Mouse 12	纯合子 Mut/Mut

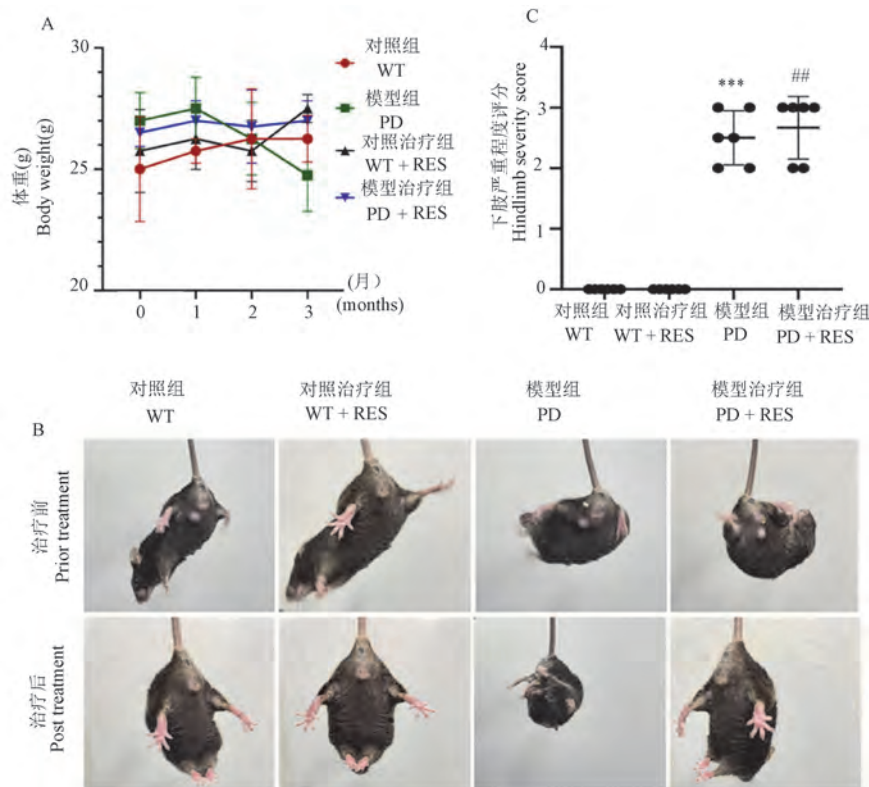


注:A:爬杆实验;B:抓力实验;C:转棒实验。与对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$;与模型组比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下图同)

图2 RES 治疗后小鼠行为学检测结果

Note. A. Pole climbing test. B. Forelimb grip strength test. C. Rotarod test. Compared with WT group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$. Compared with PD group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Motoric function results of mice after RES treatment



注:A:RES 对小鼠体重的影响;B:下肢抱紧评分根据严重程度从 0 ~ 3;C:小鼠的代表性图像。

图3 RES 治疗后小鼠体重、运动功能评分

Note. A. Effect of RES on body weight of mice. B. The hindlimb clasp score was rated from 0 ~ 3 based on severity. Representative images of mouse littermates treated with RES or vehicle. C. Representative images of mouse littermates treated with RES or vehicle.

Figure 3 Body weight and motor function scores of mice after RES treatment

0.001)(图 5A)。与对照组相比,模型组 Th 细胞 ($CD3^+CD4^+$) 占比显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$);与模型组相比,模型治疗组 Th 细胞 ($CD3^+CD4^+$) 占比增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.005$)(图 5C)。与对照组相比,模型组 Tc 细胞 ($CD3^+CD8^+$) 占比差异不具有统计学意义;与模型

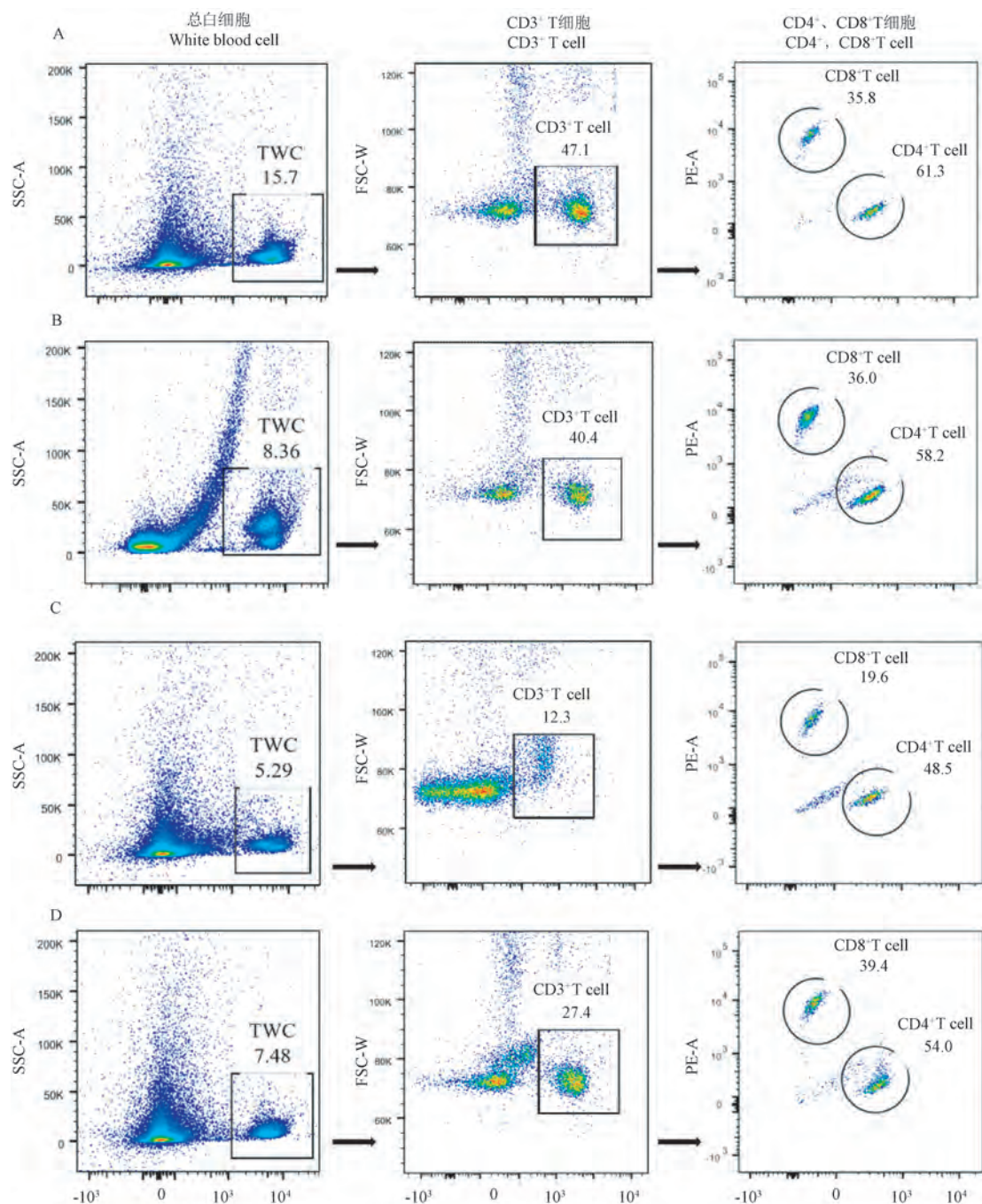
组相比,模型治疗组 Tc 细胞 ($CD3^+CD8^+$) 占比不具有统计学意义(图 5B)。与对照组相比,模型组 $CD4^+/CD8^+$ 比值降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组相比,模型治疗组 $CD4^+/CD8^+$ 比值增加,差异不具有统计学意义(图 5D)。与对照组相比,对照治疗组 T 淋巴细胞占比、 $CD4^+$ T 淋巴细

胞占比、CD8⁺T 淋巴细胞占比及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均不具有统计学意义(图 5)。

2.4 RES 对 A53T 转基因小鼠外周血血清炎症因子的影响

与对照组相比,模型组小鼠血清中 IL-6、IL-18 含量显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.005$,

$P < 0.01$);经 3 个月 RES 灌胃治疗后,与模型组相比,模型治疗组小鼠血清中 IL-6、IL-18 含量显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.001$, $P < 0.05$)(图 6A,6B)。在各组间血清 TNF- α 含量差异不具有显著性(图 6C)。与对照组相比,模型组小鼠血清 TGF- β 含量显著减少,差异具有统计学意

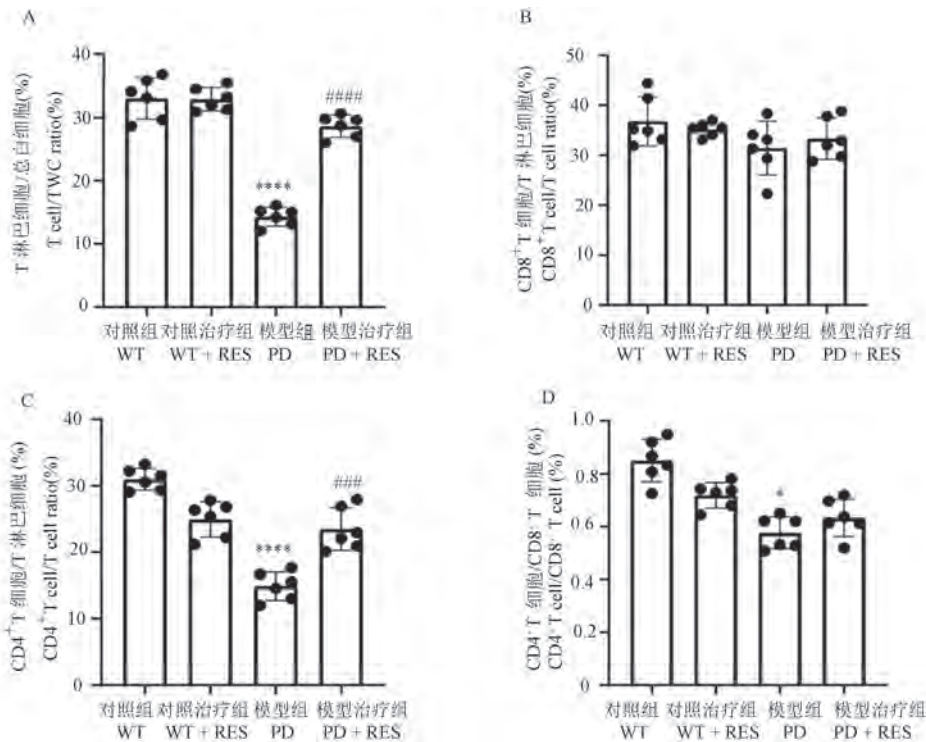


注:A:对照组;B:对照治疗组;C:模型组;D:模型治疗组。

图 4 A53T 转基因小鼠外周血 T 淋巴细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞流式散点图

Note. A. WT. B. WT + RES. C. PD. D. PD + RES.

Figure 4 Flow cytometry results of T lymphocyte, CD4⁺T cell and CD8⁺T cell



注:与对照组比,**** $P < 0.001$;与模型组相比,### $P < 0.005$,##### $P < 0.001$ 。

图 5 A53T 转基因小鼠外周血流式细胞仪检测结果

Note. Compared with WT group, **** $P < 0.001$. Compared with PD group, ### $P < 0.005$, ##### $P < 0.001$.

Figure 5 Flow cytometry results of peripheral blood of α -synuclein A53T mice

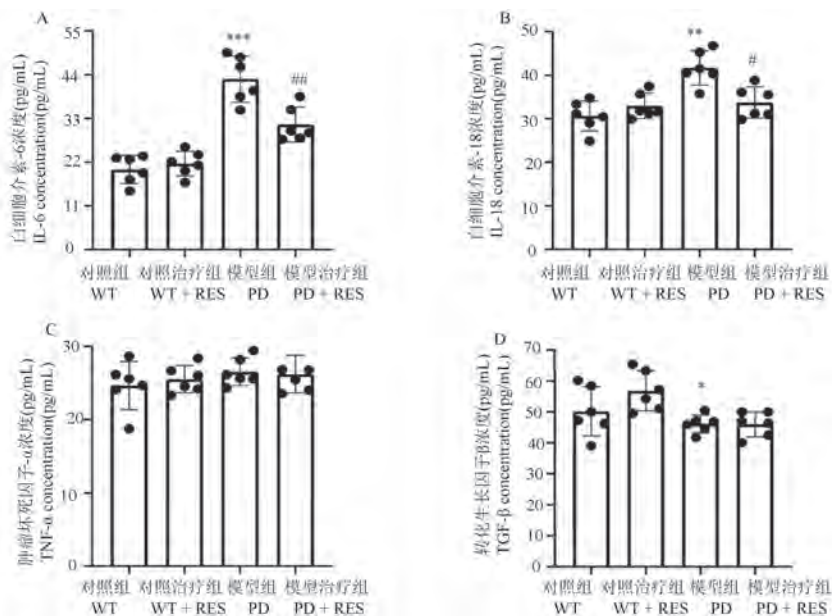


图 6 A53T 转基因小鼠血清炎症因子检测结果

Figure 6 Results of serum inflammatory factors in α -synuclein A53T mice

义($P < 0.05$);与模型组相比,模型治疗组小鼠血清中 TGF- β 含量回升,差异不具有统计学意义(图 6D)。与对照组相比,对照治疗组 IL-6、IL-18、TNF- α 及 TGF- β 含量均不具有统计学意义(图 6)。

3 讨论

近年来大量研究证实 RES 可以减少神经元细胞的凋亡,从而减少神经炎症发生^[17]。RES 作为

SIRT1 基因的激活剂,可激活线粒体自噬,减轻 DA 能神经元中 α -Syn 低聚物的形成,保护神经元,从而改善 PD 模型大鼠运动障碍^[8,18]。本研究显示,RES 缩短 A53T 转基因小鼠爬杆时长,降低小鼠四肢抱紧运动功能评分,增加 A53T 转基因小鼠转棒路程及前脚抓力,说明应用 RES 治疗 PD 有较大潜力,这与已有报道一致。

PD 患者普遍存在免疫功能异常,T 淋巴细胞介导的细胞免疫功能减退^[19]。正常情况下,在中枢神经系统中激活的 T 淋巴细胞较少出现,当中枢神经系统发生炎症反应时,神经元释放促炎因子(IL-1 β 、TNF- α 等),改变血脑屏障通透性,从而在中枢神经系统中产生激活的 T 淋巴细胞,被激活的 T 淋巴细胞会进一步迁移至神经元损伤部位,加速神经炎症的发展^[20]。研究发现,激活的小胶质细胞以及星形胶质细胞会释放 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 等细胞因子,诱导神经炎症的发生,导致 DA 能神经元的损伤以及神经元数量减少^[21-22]。以上研究提示,免疫功能的紊乱及神经炎症的发生是 PD 病理进展的重要方面。研究指出,PD 患者外周血中 CD3⁺T 淋巴细胞占比、CD4⁺T 细胞占比及 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值与健康对照人群相比显著降低^[23],IL-6 作为主要的炎症因子参与炎症反应,是组织损伤程度与炎症反应的重要标志物之一,与健康对照相比,在 PD 患者血浆中 IL-6 的表达增高^[24-25]。IL-18 作为白细胞介素的重要成员,通过参与 CD4⁺T 细胞的增值与分化过程、增加促炎因子 TNF- γ 的产生发挥免疫应答作用^[26],最近的研究发现 IL-18 可以与小胶质细胞受体结合,加快小胶质细胞的激活,激活的小胶质细胞进一步释放炎性因子,恶性循环的过程导致神经炎症的发生,加速 PD 的进展^[27]。同时,研究指出另一种参与免疫调节的重要成员 TGF- β ,其是具有免疫抑制功能的细胞因子,可以通过对黏附分子的下调作用,参与机体免疫耐受过程。TGF- β 可刺激 T 细胞分化成 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)细胞,分泌 IL-10 等抑制性细胞因子维持机体免疫系统的平衡,这也是 Treg 细胞发挥免疫抑制功能的重要途径之一^[28]。因此,T 淋巴细胞的免疫调节作用和炎症因子异常释放参与 PD 发病进展。

本研究发现 A53T 转基因小鼠与野生型小鼠相比,T 淋巴细胞占比、CD4⁺T 细胞占比、CD4⁺/CD8⁺比值均显著降低,说明 A53T 转基因小鼠存在免疫功能减退和免疫系统失调。有研究证实,淋巴细胞

占比下降和 CD4⁺T 细胞百分比减少有关^[29],这说明 A53T 转基因小鼠 CD4⁺T 细胞介导的免疫过程存在异常。CD4⁺/CD8⁺比值可以间接反应机体免疫状态,A53T 转基因小鼠与野生型小鼠相比 CD4⁺/CD8⁺比值下降,说明 A53T 转基因小鼠存在免疫调节异常。同时,A53T 转基因小鼠与野生型小鼠相比,IL-6、IL-18 表达显著增高,TGF- β 表达降低,一方面说明,A53T 转基因小鼠存在机体内的神经炎症反应;另一方面说明,抗原提呈细胞抗原提呈的过程受到影响,抑制了 T 淋巴细胞及 CD4⁺T 细胞增殖与分化,免疫系统的平衡存在紊乱。RES 治疗后显著增加 T 淋巴细胞占比、CD4⁺T 细胞占比以及 CD4⁺/CD8⁺比值;显著降低了 IL-6、IL-18 炎症因子的表达,说明 RES 可改善 A53T 转基因小鼠的免疫功能异常。

综上所述,Prnp-SNCA-A53T 转基因小鼠可模拟帕金森病的部分外周免疫异常状态,本研究结果证实 RES 可显著改善该模型小鼠的运动功能障碍,通过调节小鼠外周 T 淋巴细胞数量和炎症因子水平,使小鼠免疫状态恢复正常。本研究为 RES 在 PD 的临床应用提供了实验依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Jankovic J, Tan EK. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2020, 91(8): 795-808.
- [2] 霍孝成,张瑜,王普清,等. 帕金森病伴纹状体畸形的研究进展 [J]. 湖北医药学院学报, 2021, 40(4): 437-440.
Huo XC, Zhang Y, Wang PQ, et al. Progress in the study of Parkinson's disease with striatal malformation [J]. J Hubei Univ Med, 2021, 40(4): 437-440.
- [3] Zhang H, Wu J, Shen FF, et al. Activated Schwann cells and increased inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α in patients' sural nerve are lack of tight relationship with specific sensory disturbances in Parkinson's disease [J]. CNS Neurosci Ther, 2020, 26(5): 518-526.
- [4] Hirsch EC, Standaert DG. Ten unsolved questions about neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. Mov Disord, 2021, 36(1): 16-24.
- [5] Rahman MH, Akter R, Bhattacharya T, et al. Resveratrol and neuroprotection: impact and its therapeutic potential in Alzheimer's disease [J]. Front Pharmacol, 2020, 11(3): 619024.
- [6] Stacchiotti A, Corsetti G. Natural compounds and autophagy: allies against neurodegeneration [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8(4): 55409.
- [7] Zhang X, Wan F, You W, et al. Comparison of apoptosis between bovine subcutaneous and intramuscular adipocytes by

- resveratrol via SIRT1 [J]. *Animal Biotechnol*, 2020, 31(6): 538–546.
- [8] Li X, Feng Y, Wang XX, et al. The critical role of SIRT1 in Parkinson's disease: mechanism and therapeutic considerations [J]. *Aging Dis*, 2020, 11(6): 1608–1622.
- [9] Khan MM, Ahmad A, Ishrat T, et al. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease [J]. *Brain Res*, 2010, 13(8): 139–151.
- [10] Wang Y, Xu H, Fu Q, et al. Protective effect of resveratrol derived from *Polygonum cuspidatum* and its liposomal form on nigral cells in parkinsonian rats [J]. *J Neurol Sci*, 2011, 304(1–2): 29–34.
- [11] Su CF, Jiang L, Zhang XW, et al. Resveratrol in rodent models of Parkinson's disease: a systematic review of experimental studies [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12(7): 644219.
- [12] Zhang Z, Kang SS, Liu X, et al. Asparagine endopeptidase cleaves α -synuclein and mediates pathologic activities in Parkinson's disease [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(8): 632–642.
- [13] 张旭, 张如意, 陈晨, 等. 二苯乙烯苷对 A53T α -突触核蛋白转基因小鼠运动功能和黑质多巴胺能神经元的影响 [J]. *神经疾病与精神卫生*, 2017, 17(3): 163–166.
- Zhang X, Zhang RY, Chen C, et al. Effects of tetrahydroxystilbene glucoside on motor function and dopaminergic neurons in substantia nigra of A53T α -synuclein transgenic mice [J]. *J Neurosci Ment Health*, 2017, 17(3): 163–166.
- [14] Zhang LF, Yu XL, Ji M, et al. Resveratrol alleviates motor and cognitive deficits and neuropathology in the A53T α -synuclein mouse model of Parkinson's disease [J]. *Food Funct*, 2018, 9(12): 6414–6426.
- [15] 王嫚诗, 张玲, 秦川, 等. α -突触核蛋白 A53T 突变损伤小鼠认知功能 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(5): 7–13.
- Wang MS, Zhang L, Qin C, et al. α -synuclein A53T mutation impairs cognitive function in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(5): 7–13.
- [16] Malpartida AB, Williamson M, Narendra DP, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's disease: from mechanism to therapy [J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46(4): 329–343.
- [17] Ma S, Fan L, Li J, et al. Resveratrol promoted the M2 polarization of microglia and reduced neuroinflammation after cerebral ischemia by inhibiting miR-155 [J]. *Int J Neurosci*, 2020, 130(8): 817–825.
- [18] Wu Y, Li X, Zhu JX, et al. Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease [J]. *Neurosignals*, 2011, 19(3): 163–174.
- [19] Schwab AD, Thurston MJ, Machhi J, et al. Immunotherapy for Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 137: 104760.
- [20] Levite M. Dopamine and T cells; dopamine receptors and potent effects on T cells, dopamine production in T cells, and abnormalities in the dopaminergic system in T cells in autoimmune, neurological and psychiatric diseases [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2016, 216(1): 42–89.
- [21] Haque A, Samantaray S, Knaryan VH, et al. Calpain mediated expansion of CD4⁺ cytotoxic T cells in rodent models of Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 2020, 8(3): 113–315.
- [22] Yang X, Ren H, Wood K, et al. Depletion of microglia augments the dopaminergic neurotoxicity of MPTP [J]. *Faseb J*, 2018, 32(6): 3336–3345.
- [23] Bartels T, De Schepper S, Hong S. Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. *Science*, 2020, 370(6512): 66–69.
- [24] Li N, Wang JX, Huo TT, et al. Associations of IL-1 β and IL-6 gene polymorphisms with Parkinson's disease [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(2): 890–897.
- [25] Green HF, Khosousi S, Svenningsson P. Plasma IL-6 and IL-17A correlate with severity of motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease [J]. *J Parkinsons Dis*, 2019, 9(4): 705–709.
- [26] Fahmy E, Rabah A, Sharaf S, et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms and idiopathic Parkinson disease: an Egyptian study [J]. *Acta Neurol Belg*, 2019, 119(2): 219–224.
- [27] Zhang X, Zhang Y, Li R, et al. Salidroside ameliorates Parkinson's disease by inhibiting NLRP3-dependent pyroptosis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10): 9405–9426.
- [28] Tesseur I, Nguyen A, Chang B, et al. Deficiency in neuronal TGF- β signaling leads to nigrostriatal degeneration and activation of TGF- β signaling protects against MPTP neurotoxicity in mice [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(17): 4584–4592.
- [29] Jiang S, Gao H, Luo Q, et al. The correlation of lymphocyte subsets, natural killer cell, and Parkinson's disease: a meta-analysis [J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(8): 1373–1380.

[收稿日期] 2021-11-05

王书利,李志强,魏淑娟,等. 布鲁氏菌外膜蛋白 OMP25 诱导 BALB/c 小鼠免疫反应的分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 655-661.

Wang SL, Li ZQ, Wei SJ, et al. Immune responses of BALB/c induced by *Brucella melitensis* outer membrane protein OMP25 [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 655-661.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.008

布鲁氏菌外膜蛋白 OMP25 诱导 BALB/c 小鼠免疫反应的分析

王书利^{1,2}, 李志强², 魏淑娟², 司丽芳^{1*}

(1. 河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2. 商丘师范学院生物与食品学院, 河南 商丘 476000)

【摘要】 目的 本研究旨在分析布鲁氏菌外膜蛋白 OMP25 诱导机体产生的免疫反应。方法 采用 PCR 方法扩增羊种布鲁氏菌 16M 的 *omp25* 基因, 克隆至 pET-32a 质粒。重组质粒 pET32a-OMP25 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 并诱导表达。利用 Ni²⁺ 柱纯化试剂盒进行蛋白纯化。用纯化的重组蛋白 (rOMP25) 和 Rev. 1 疫苗株免疫小鼠, 检测小鼠脾细胞中 IFN- γ 和 IL-2 的水平, 以及小鼠血清中 IgG 抗体和抗炎因子 IL-10 水平, 并用 Western Blot 检测反应原性。结果 (1) *omp25* 基因大小为 642 bp, 编码 214 个氨基酸, rOMP25 大约在 40.8×10^3 处出现蛋白条带, 纯化后为单一条带。(2) 用 *t* 检验方法统计显示, rOMP25 免疫小鼠后, 诱导脾细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 的水平, 小鼠血清中 IgG 和 IL-10 的水平与 Rev. 1 组相似, 显著高于对照组 ($P < 0.01$)。(3) Western Blot 检测结果显示, rOMP25 具有较好的反应原性。结论 rOMP25 具有较好的免疫原性和反应原性, 为进一步研究 OMP25 蛋白的功能, 以及研制相关疫苗提供了生物材料。

【关键词】 布鲁氏菌; OMP25; 免疫

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0655-07

Immune responses of BALB/c induced by *Brucella melitensis* outer membrane protein OMP25

WANG Shuli^{1,2}, LI Zhiqiang², WEI Shujuan², SI Lifang^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China.

2. College of Biology and Food, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000)

Corresponding author: SI Lifang. E-mail: 511488470@qq.com

【Abstract】 **Objective** The purpose of this study was to analyze the immune responses induced by *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) outer membrane protein OMP25. **Methods** The *omp25* gene from *B. melitensis* 16M was amplified by PCR. The fragment was cloned into pET-32a vector plasmid. The constructed recombinant plasmid pET32a-OMP25 was transformed to *E. coli* BL21 (DE3) and was induced to express the fusion protein. Then the protein was purified using a Ni²⁺ column purification kit. Mice were immunized with rOMP25 and current vaccine Rev. 1, and IFN- γ , IL-2 in splenocytes and IgG antibody and anti-inflammatory factor IL-10 levels in the serum were detected by ELISA. The reactionogenicity was detected by Western Blot. **Results** (1) The full length of the *omp25* gene was 642 bp, encoding 214 amino acids. rOMP25 was approximately 40.8×10^3 as measured by SDS-PAGE. There was a single band after

【基金项目】 河南省高等学校重点科研项目 (21A230015), 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) 项目 (212102310746)。

Funded by the Key Scientific Research Project of Colleges and Universities in Henan Province (21A230015), Foundation of the Technology Department of Henan Province (212102310746).

【作者简介】 王书利 (1988—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物传染病致病机理及免疫防治。Email: 453144249@qq.com

【通信作者】 司丽芳 (1976—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 微生物与分子生物学。Email: 511488470@qq.com

purification. (2) The *t*-test method showed that mice were immunized with rOMP25 and Rev. 1, the levels of IFN- γ and IL-2 in splenocytes, IgG antibody and IL-10 levels in serum in the rOMP25 group were similar to those in the Rev. 1 group, and significantly greater than those in the control ($P < 0.01$). (3) rOMP25 had good reactivity as observed in the Western Blot. These result confirmed that rOMP25 could induce the body to produce high levels of cellular and humoral immunity, with good reactivity. **Conclusions** This study provides technical support for further study of the function of OMP25 protein for *B. melitensis* related vaccine development.

【Keywords】 *Brucella melitensis*; OMP25; immunity

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

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌引起的细菌性人畜共患病,给许多发展中国家造成了巨大的公共卫生负担^[1]。人类通过接触受感染的动物或其产品而感染布鲁氏菌病^[2]。动物发病后主要表现为流产,而人类发病后会导致反复发热、脊柱炎、关节炎和骨髓炎等^[3]。Rev. 1 是通过世界卫生组织和世界动物卫生组织认证的用于羊的疫苗株^[4]。Rev. 1 为光滑型菌株,具有链霉素抗性^[5]。Rev. 1 可诱导机体较强的免疫应答,保护羊免受布鲁氏菌的感染^[6]。但这些疫苗也有一些缺点,如妊娠动物流产、干扰血清学诊断、通过气溶胶传播,及引起局部超敏反应等^[7]。因此,需要研制一种安全有效的疫苗。

重组亚单位疫苗是当前布鲁氏菌疫苗研发热点,该疫苗不存在毒性,不会引起感染。外膜蛋白是布鲁氏菌保护性抗原。OMP25 是布鲁氏菌的一种外膜蛋白,在多种布鲁氏菌属和菌株中具有高度保守性,与布鲁氏菌的肽聚糖层结合^[8]。OMP25 是布鲁氏菌毒力因子之一,可抑制 TNF- α 产生,是布鲁氏菌潜在抗原^[9-10]。基于 OMP25 在布鲁氏菌毒力中的意义,我们研究了羊种布鲁氏菌 OMP25 作为布鲁氏菌病亚单位疫苗候选株的可行性。由于重组蛋白亚单位疫苗的组成是已知的,且不能在宿主体内复制,免疫动物后不会致病,因此,亚单位疫苗被认为是新一代疫苗更好、更安全的选择。

本研究为了筛选布鲁氏菌亚单位疫苗株的候选抗原,对外膜蛋白 OMP25 进行原核表达,并对其诱导机体产生的免疫反应进行检测,为亚单位疫苗候选抗原的筛选提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

15 只 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,6 周龄,体重约为 25 ~ 30 g,购于河南省实验动物中心【SCXK(豫)2017-0001】,饲养于商丘美兰生物工程有限公司动

物实验室【SYXK(豫)2017-0006】。饲养期间各组小鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由河南省实验动物中心【SCXK(豫)2017-0001】提供。饲养环境:温度控制在 22 ~ 25℃,湿度 50% ~ 60%,自动光控(昼夜各半循环照明)。所有操作均符合商丘师范学院实验动物伦理学要求(2021-5)。

1.1.2 主要试剂与仪器

T-Vector pMD 19 (Simple) 载体 (TaKaRa, 日本);限制性内切酶 *Bam*H I (TaKaRa, 日本);限制性内切酶 *Sal* I (TaKaRa, 日本);DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (TaKaRa, 日本);DNA Marker (TaKaRa, 日本);pET-32a 载体 (Promega, 美国);蛋白 Marker (博士德, 中国);2 × Taq PCR Mastermix (天根生化科技(北京)有限公司, 中国);琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (中科瑞泰(北京)生物科技有限公司, 中国);高纯度质粒小提试剂盒 (天根生化科技(北京)有限公司, 中国);大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 和 BL21 (DE3)感受态细胞 (北京全式金生物技术有限公司, 中国);IPTG 诱导剂 (西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, 中国);蛋白纯化试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司, 中国);氨苄霉素 (西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, 中国);刀豆蛋白 (ConA, 上海源叶生物有限公司);NC 膜 (北京索莱宝科技有限公司, 中国);辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG (EarthOx, 美国);布鲁氏菌(外膜蛋白 OMP25)特异性 IgG ELISA 检测试剂盒 (RD, 美国);细胞因子 ELISA 检测试剂盒 (RD, 美国);RPMI 1640 细胞培养液 (Gibco 生命科技公司, 美国);胎牛血清 (Gibco 生命科技公司, 美国);一次性细胞培养板 (Gibco 生命科技公司, 美国)。

微量移液枪 (Eppendorf, 德国);PCR 仪 (nexus GSX1, Eppendorf, 德国);凝胶成像系统 (Gel Doc XR+, Bio-Rad, 美国);高速离心机 (MiniSpin, Eppendorf, 德国);冷冻离心机 (Centrifuge 5810R, Eppendorf, 德国);电子分析天平 (FA2204, 上海舍岩

仪器有限公司,中国);电热恒温培养箱(DNP-9052,上海舍岩仪器有限公司,中国);恒温摇床(OLB-200B,欧莱博,中国);电泳仪、电泳槽和半干式转膜系统(北京六一生物科技发展有限公司,中国);分子杂交箱(Big SHOT III,Boekel Scientific,美国);生物安全柜(BIO II A,Telstar,西班牙)。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建与鉴定

利用 Primer5.0 软件,根据 GenBank 登录的布鲁氏菌 16M 的 *omp25* 基因序列(BMEI1249)设计引物(表 1)。以布鲁氏菌 16M 基因组为模板,PCR 扩增 *omp25* 基因。利用琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测,将扩增产物进行回收纯化后,克隆至 pMD 19-T simple 载体,获得重组质粒。采用限制性内切酶 *Bam*H I/*Sal* I 对质粒进行酶切后与 pET-32a 载体相连,获得 pET OMP25-32a 质粒。质粒经 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切鉴定后,由公司测序鉴定。转化鉴定正确的质粒至 *E. coli* BL21 感受态细胞,获得克隆菌。

表 1 *omp25* 基因的引物序列

Table 1 Primers for the *omp25*

引物名称 Primer names	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
OMP25-N	GGATCCATGCGCACTCTTAAGTCTCTC(<i>Bam</i> H I)
OMP25-C	GTCTGACTTAGAAGCTTGTAGCCGATGCC(<i>Sal</i> I)

1.2.2 重组蛋白的表达与纯化

将克隆菌培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4 h,取 2 mL 菌液后,在剩余菌液中加入终浓度 1 mol/L 的 IPTG 进行诱导,诱导 2、4 和 6 h 时各取 2 mL 菌液,通过 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测 OMP25 表达情况。蛋白通过蛋白纯化试剂盒进行纯化后,利用 SDS-PAGE 电泳对纯化效果检测。

1.2.3 免疫小鼠

参照相关文献^[11]对 BALB/c 小鼠进行免疫。将 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组,每组 5 只。第 1 组皮下注射弗氏佐剂乳化 rOMP25(含 50 μg 的 rOMP25),免疫 3 次,每次间隔 2 周。第 2 组第只腹腔注射 1 × 10⁶ CFU 的 Rev. 1,第 3 组腹腔注射 200 μL 的 PBS。

1.2.4 rOMP25 蛋白免疫小鼠后诱导细胞因子水平分析

三免后第 6 周处死小鼠,参照相关文献^[12]无菌分离脾细胞,测定细胞因子的水平。用 rOMP25、

ConA(阳性对照)或 RPMI 1640 细胞培养液(阴性对照)刺激小鼠脾细胞,检测细胞因子 IFN-γ 和 IL-2 的水平。

1.2.5 血清学分析

小鼠免疫后,采用鼠尾采血法于第 2、4、6、8 周采集小鼠外周血,分离血清^[13]。参照相关文献^[14],利用小鼠血清 IgG 和 IL-10 ELISA 检测试剂盒测定小鼠血清中 IgG 和 IL-10 水平。

1.2.6 Western Blot 分析

参考相关文献^[15],取 1 μg 纯化的 rOMP25 蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,将目的凝胶块切下,200 mA 电流转膜 1 h,用 5 mL 5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,以 rOMP25、Rev. 1 和 PBS 免疫小鼠的血清(1:300)为一抗,以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:2000)为二抗,经 Western Blot 检测 rOMP25 的反应原性。

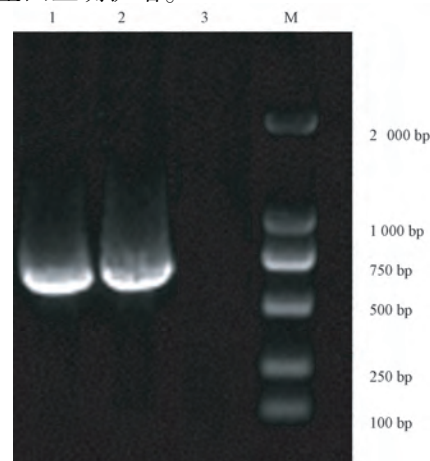
1.3 统计学分析

细胞因子用平均细胞因子浓度平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。抗体用平均 OD₄₅₀ ± s 表示。用 *t* 检验方法统计显著性(*P* 值)。用 SPSS 21.0 软件对各组间的差异进行方差分析。*P* < 0.05 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 重组质粒(pET OMP25-32a)的构建与鉴定

利用 PCR 扩增 *omp25* 基因后,获得 642 bp 的基因片段,与预期大小(642 bp)相符(图 1),表明 *omp25* 基因正确扩增。



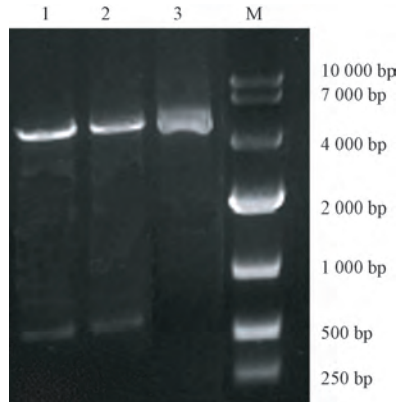
注:Lanes 1~2:*omp25* 的 PCR 产物;Lane 3:阴性对照;Lane M:DL2 000 DNA Marker。

图 1 *omp25* 基因的 PCR 扩增

Note. Lanes 1~2. PCR products of *omp25*. Lane 3. Negative control. Lane M. DL2 000 DNA Marker.

Figure 1 PCR amplification of *omp25* gene

将构建的重组质粒 pET OMP25-32a 进行 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切后,发现两条条带,5900 bp 的条带系 pET-32a,642 bp 的条带系 *omp25* (图 2),与载体片段及目的片段的预期大小(642 bp)一致,且公司测序结果与 GenBank 中布鲁氏菌 16M 菌株的 *omp25* 基因序列同源性达 100%,未发生碱基错配,表明重组质粒 pET OMP25-32a 构建正确。



注: Lanes 1~2: pET OMP25-32a 酶切结果; Lane 3: pET OMP25-32a 质粒; Lane M: DL10000 DNA Marker。

图 2 重组质粒 pET OMP25-32a 的鉴定

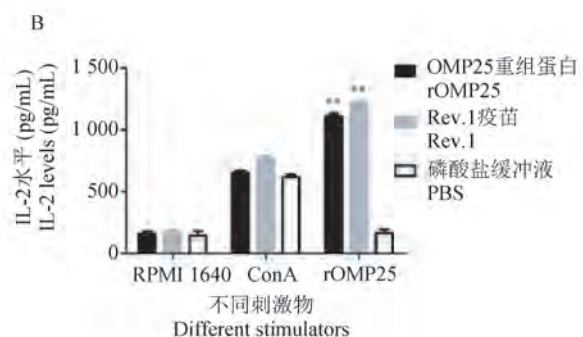
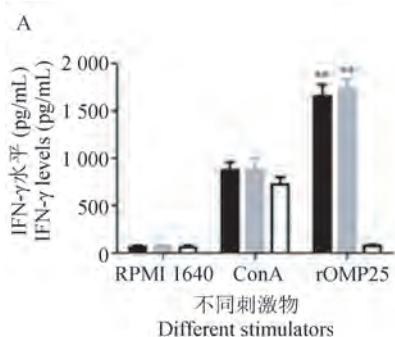
Note. Lanes 1~2. pET OMP25-32a digestion. Lane 3. pET OMP25-32a plasmid. Lane M. DL10000 DNA Marker

Figure 2 Identification of pET OMP25-32a recombinant plasmid

2.2 rOMP25 的表达与纯化

将重组质粒 pET OMP25-32a 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行表达,在菌液中加入 IPTG 后进行 SDS-PAGE 检测,rOMP25 在 (40.8×10^3) 处出现与预期蛋白分子质量 (40.8×10^3) 大小一致的蛋白条带(图 3A),表明 rOMP25 表达正确,且在 IPTG 诱导 6 h 时表达量最高。

菌体超声破碎后,经蛋白纯化试剂盒纯化后,

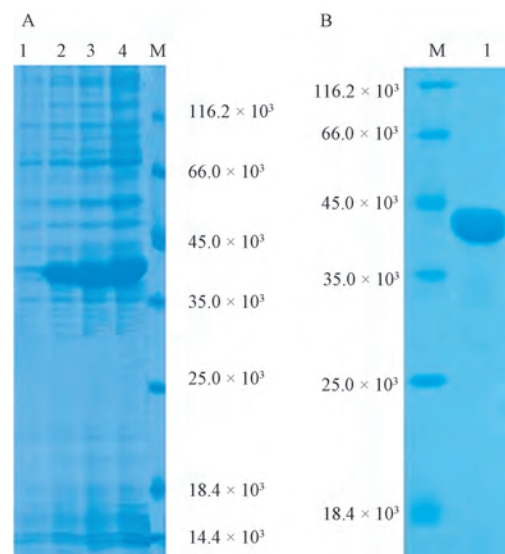


注: A: IFN- γ 的水平; B: IL-2 的水平; 与 PBS 组相比, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 4 rOMP25 和 Rev. 1 免疫小鼠后小鼠脾细胞中 IFN- γ 和 IL-2 的水平检测

Note. A. IFN- γ levels. B. IL-2 levels. Compared with PBS group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 4 Detection of IFN- γ and IL-2 levels in splenocytes of the immunized mice by rOMP25 and Rev. 1



注: A: rOMP25 的表达分析; Lane 1: 未诱导的 rOMP25 蛋白样品; Lanes 2~4: 诱导 2、4、6 h 的 rOMP25 蛋白样品; Lane M: 蛋白 Marker。B: rOMP25 的纯化分析; Lane M: 蛋白 Marker; Lane 1: rOMP25 的纯化样品。

图 3 rOMP25 的表达纯化分析

Note. A. Expression analysis of rOMP25. Lane 1. Sample of rOMP25 without induction. Lanes 2~4. Samples of rOMP25 induced after 2, 4, 6 h. Lane M. Protein Marker. B. Purification analysis of rOMP25. Lane M. Protein Marker. Lane 1. Samples of rOMP25 purification

Figure 3 Expression and purification analysis of rOMP25

SDS-PAGE 检测结果显示,在 40.8×10^3 处出现单一蛋白条带(图 3B)。

2.3 rOMP25 可诱导细胞免疫反应

为了检测 rOMP25 诱导的细胞免疫反应, rOMP25、Rev. 1 和 PBS 免疫小鼠 6 周后,处死小鼠,无菌摘除脾,分离脾细胞,检测脾细胞中 IFN- γ 和 IL-2 水平。免疫小鼠的脾细胞用 rOMP25、ConA 或

RPMI 1640 进行刺激。当用 ConA 刺激时,免疫 rOMP25 小鼠脾细胞 IFN- γ 表达量为 873.68 pg/mL, IL-2 的表达量为 655.21 pg/mL, 表达水平与免疫 PBS 小鼠脾细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 的水平相似 ($P > 0.05$), 免疫 rOMP25 小鼠较免疫 PBS 小鼠无显著性差异 (图 4)。免疫 Rev. 1 小鼠脾细胞 IFN- γ 的表达量为 879.98 pg/mL, IL-2 的表达量为 761.16 pg/mL, 表达水平与免疫 PBS 小鼠脾细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 的水平相似 ($P > 0.05$), 免疫 Rev. 1 小鼠较免疫 PBS 小鼠无显著性差异 (图 4)。当用 RPMI 1640 刺激脾细胞时, 各组产生的细胞因子较少 (图 4)。当用 rOMP25 刺激时, 免疫 rOMP25 小鼠脾细胞 IFN- γ 的表达量为 1655.98 pg/mL, IL-2 的表达量为 1108.79 pg/mL, 表达水平显著高于免疫 PBS 小鼠脾细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 的水平 ($P < 0.01$) (图 4)。免疫 Rev. 1 小鼠脾细胞 IFN- γ 的表达量为 1732.23 pg/mL, IL-2 的表达量为 1215.15 pg/mL, 表达水平显著高于免疫 PBS 小鼠脾细胞产生 IFN- γ 和 IL-2 的水平 ($P < 0.01$) (图 4)。表明小鼠免疫 rOMP25 后, 可诱导细胞免疫反应。

2.4 rOMP25 可诱导体液免疫反应

采集 rOMP25、Rev. 1 和 PBS 免疫小鼠后的血清, 检测血清中 IgG 水平。发现 rOMP25 和 Rev. 1 免疫组产生 IgG 的水平较高, 两组无显著性差异 ($P > 0.05$), IgG 的水平在免疫后第 6 周到达高峰 (图 5)。但是注射 PBS 的小鼠产生的 IgG 较低 (图 5)。表明 rOMP25 可诱导体液免疫反应。

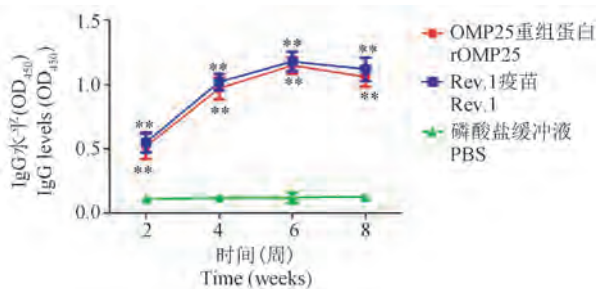


图 5 rOMP25 和 Rev. 1 免疫小鼠后小鼠血清中 IgG 抗体的水平检测

Figure 5 Detection of IgG antibody levels in serum of immunized mice by rOMP25 and Rev. 1

2.5 rOMP25 可抑制炎症反应

采集 rOMP25、Rev. 1 和 PBS 免疫小鼠后不同时间点的血清, 检测血清中抗炎因子 IL-10 的水平。发现 rOMP25 和 Rev. 1 免疫组产生 IL-10 的水平较高, 免疫 rOMP25 小鼠较免疫 Rev. 1 小鼠无显著性

差异 ($P > 0.05$) (图 6)。但是注射 PBS 的小鼠产生的 IL-10 较低 (图 6)。表明 rOMP25 后可抑制机体的炎症反应。

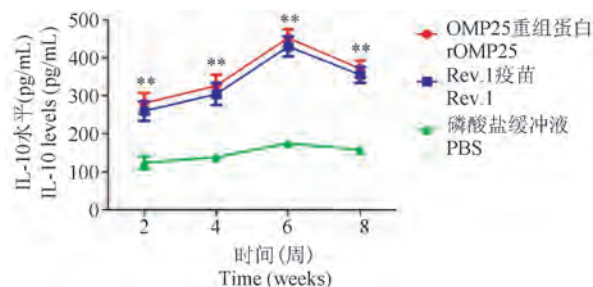
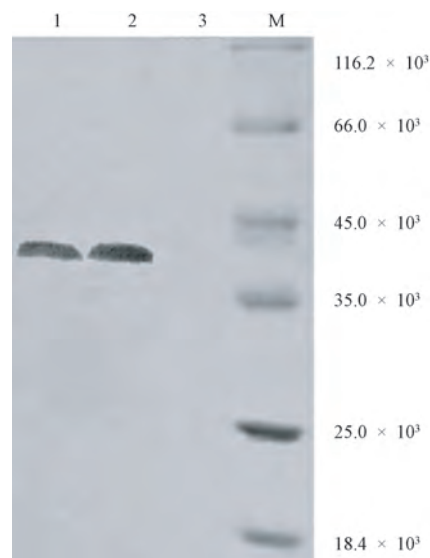


图 6 rOMP25 和 Rev. 1 免疫小鼠后小鼠血清中抗炎因子 IL-10 的水平检测

Figure 6 Detection of anti-inflammatory factor IL-10 levels in serum of immunized mice by rOMP25 and Rev. 1

2.6 rOMP25 的反应原性分析

为了检测 rOMP25 蛋白的反应原性, 以 rOMP25、Rev. 1 和 PBS 免疫小鼠的血清作为一抗, 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 进行 Western Blot 分析。结果显示, rOMP25 和 Rev. 1 免疫的小鼠出现血清反应, 但 PBS 免疫的小鼠血清无反应 (图 7), 表明 rOMP25 具有良好的反应原性。



注: Lane 1: 用于 rOMP25 免疫小鼠血清的 Western Blot 结果; Lane 2: 用于 Rev. 1 免疫小鼠血清的 Western Blot 结果; Lane 3: 用于 PBS 免疫小鼠血清的 Western Blot 结果; Lane M: 蛋白 Marker。

图 7 Western Blot 检测 rOMP25 的反应原性

Note. Lane 1. Western Blot using serum from rOMP25 immunized mice. Lane 2. Western Blot using serum from Rev. 1 immunized mice. Lane 3. Western Blot using serum from PBS immunized mice. Lane M. Protein Marker.

Figure 7 The immunoreactivity of rOMP25 was detected by Western Blot

3 讨论

近年来,越来越多的研究者致力于布鲁氏菌亚单位疫苗的研发,外膜蛋白的疫苗潜力已受到人们的重视。布鲁氏菌的外膜蛋白按其分子量可分为 3 组,其中第 3 组($25 \times 10^3 \sim 31 \times 10^3$)具有高度同源性,参与布鲁氏菌的毒力^[16]。OMP25 是布鲁氏菌的主要外膜蛋白之一,研究发现,OMP25 与毒力有关,牛种布鲁氏菌 omp25 突变株在机体内是减毒的^[17-19]。用抗 OMP25 的抗体对动物进行被动免疫,可提供较强的免疫保护力,进一步证实了 OMP25 在布鲁氏菌毒力中的作用,以及 OMP25 作为疫苗候选抗原的重要性^[20]。已有研究报道,将 OMP25 DNA 疫苗免疫 BALB/c 小鼠后,可保护小鼠免受羊种布鲁氏菌的侵袭^[21]。也有研究表明,牛种布鲁氏菌的重组 OMP25 蛋白也可为 BALB/c 小鼠提供保护力,抵抗牛种布鲁氏菌的感染^[22]。因此,OMP25 为较好的亚单位疫苗候选抗原。

由于布鲁氏菌为兼性胞内寄生菌,因此,细胞免疫是清除布鲁氏菌的关键^[23]。早期研究也证明,能够诱导较强的细胞免疫反应的疫苗株可有效地预防布鲁氏菌病^[24]。IFN- γ 是一种重要的效应细胞因子,它能刺激巨噬细胞有效地杀死和清除细胞内的布鲁氏菌^[25]。IL-2 为 T 细胞生长因子,可促进 Th1 型和 Th2 型细胞分化,并激发 B 细胞生长及抗体产生^[26]。在本研究中,我们探讨了 rOMP25 免疫小鼠后,诱导机体产生的免疫应答情况。从免疫 rOMP25 小鼠中无菌分离脾细胞,并在体外用 rOMP25 刺激,可产生较高水平的 IFN- γ 和 IL-2,表明 rOMP25 可诱导机体产生强烈的细胞免疫应答。此外,在布鲁氏菌感染期间,体液免疫反应发挥重要作用^[27]。本研究发现,小鼠免疫 rOMP25 后,产生了较高水平的 IgG,且在三免后第 6 周达到高峰,表明 rOMP25 可诱导机体产生体液免疫反应。IL-10 是一种介导免疫抑制的细胞因子,可促进 B 细胞增殖分化及抗体产生。本研究发现,小鼠免疫 rOMP25 后,可产生较高水平的 IL-10,表明 rOMP25 可抑制机体的炎症反应。

目前,布鲁氏菌的许多外膜蛋白已被用于开发亚单位疫苗,如 OMP10^[28-29]、OMP19^[28-29]、OMP28^[29]、OMP25c^[30] 以及 OMP31^[31] 等。这些亚单位除了产生免疫反应外,还具有一定的保护力。本研究发现 rOMP25 可作为亚单位疫苗候选抗原,

但还需进一步评价其产生的保护能力。

本研究成功表达并纯化了布鲁氏菌外膜蛋白 OMP25,小鼠 rOMP25 免疫后产生的免疫水平较高,且 rOMP25 可抑制炎症反应。此外,rOMP25 具有良好的反应原性。因此,在布鲁氏菌亚单位疫苗抗原筛选中 OMP25 是其理想的候选抗原。然而,还需进一步检测 rOMP25 的保护效果。

参 考 文 献 (References)

- [1] Singh D, Goel D, Bhatnagar R. Recombinant L7/L12 protein entrapping plga (poly lactide-co-glycolide) micro particles protect BALB/c mice against the virulent b. abortus 544 infection [J]. Vaccine, 2015, 33(24): 2786-2792.
- [2] Babaoglu UT, Ogutucu H, Demir G, et al. Prevalence of *Brucella* in raw milk: an example from turkey [J]. Niger J Clin Pract, 2018, 21(7): 907-911.
- [3] Glynn MK, Lynn TV. Brucellosis [J]. J Am Vet Med Assoc, 2008, 233(6): 900-908.
- [4] Muñoz PM, De Miguel MJ, Grilló MJ, et al. Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams [J]. Vaccine, 2008, 26(21): 2562-2569.
- [5] Elberg SS, Faunce K Jr. Immunization against *Brucella* infection. VI. immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis* [J]. J Bacteriol, 1957, 73(2): 211-217.
- [6] Ebrahimi M, Nejad RB, Alamian S, et al. Safety and efficacy of reduced doses of *Brucella melitensis* strain Rev. 1 vaccine in pregnant iranian fat-tailed ewes [J]. Vet Ital, 2012, 48(4): 405-412.
- [7] Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future [J]. Vet Microbiol, 2002, 90(1-4): 479-496.
- [8] Cloeckert A, Kerkhofs P, Limet JN. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(12): 3168-3174.
- [9] 乔凤. 外膜蛋白 Omp25 在布鲁氏菌毒力及免疫保护中的作用研究 [D]. 长春: 吉林大学; 2009.
Qiao F. Investigation on the role of outer membrane protein Omp25 in the virulence and immunological protection of *B. melitensis* [D]. Changchun: Jilin University; 2009.
- [10] 吕亚辉. 布鲁氏菌 Omp25 蛋白抑制巨噬细胞分泌 TNF- α 的分子机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学; 2013.
Lv YH. Study on the molecular mechanism of inhibitory effects of brucella Omp25 protein on TNF- α secretion in macrophage [D]. Yangling: Northwest A&F University; 2013.
- [11] Li Z, Zhang H, Zhang J, et al. *Brucella abortus* phosphoglyceromutase and dihydrodipicolinate reductase induce Th1 and Th2-related immune responses [J]. World J Microbiol

- Biotechnol, 2018, 34(2): 22.
- [12] Li Z, Wang S, Zhang H, et al. Immunization with recombinant GntR plasmid confers protection against *Brucella* challenge in BALB/c mice [J]. Microb Pathog, 2017, 111: 357–361.
- [13] 杨健莉, 刘佳, 郑志红. 常用实验大小鼠采血方法及其对实验动物福利的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 90–94.
- Yang JL, Liu J, Zheng ZH. Comparison and analysis of blood sampling methods from rats and mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 90–94.
- [14] Li Z, Wang S, Zhang H, et al. Development and evaluation of in murine model, of an improved live-vaccine candidate against brucellosis from to *Brucella melitensis* vjbR deletion mutant [J]. Microb Pathog, 2018, 124: 250–257.
- [15] Li Z, Wang S, Zhang J, et al. brucella abortus 2308ΔNodVΔNodW double-mutant is highly attenuated and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice [J]. Microb Pathog, 2017, 106: 30–39.
- [16] Salhi I, Boigegrain RA, Machold J, et al. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp [J]. Infect Immun, 2003, 71(8): 4326–4332.
- [17] Edmonds MD, Cloeckaert A, Booth NJ, et al. Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25×10^3 outer membrane protein in cattle [J]. Am J Vet Res, 2001, 62(9): 1461–1466.
- [18] Edmonds MD, Cloeckaert A, Hagius SD, et al. Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* deltaomp25 deletion mutant [J]. Res Vet Sci, 2002, 72(3): 235–239.
- [19] Edmonds MD, Cloeckaert A, Elzer PH. Brucella species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against brucella melitensis and *Brucella ovis* [J]. Vet Microbiol, 2002, 88(3): 205–221.
- [20] Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, et al. Outer-membrane protein- and rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis* [J]. J Med Microbiol, 1995, 43(5): 344–347.
- [21] Commander NJ, Spencer SA, Wren BW, et al. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes [J]. Vaccine, 2007, 25(1): 43–54.
- [22] Goel D, Bhatnagar R. Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects BALB/c mice from virulent B. abortus 544 [J]. Mol Immunol, 2012, 51(2): 159–168.
- [23] Baldwin CL, Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*; does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? [J]. Crit Rev Immunol, 2006, 26(5): 407–442.
- [24] Yang X, Skyberg JA, Cao L, et al. Progress in *Brucella* vaccine development [J]. Front Biol, 2013, 8(1): 60–77.
- [25] Murphy EA, Sathiyaseelan J, Parent MA, et al. Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice [J]. Immunology, 2001, 103(4): 511–518.
- [26] Spolski R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(10): 648–659.
- [27] Castaño-Zubieta MR, Rossetti CA, García-González DG, et al. Evaluation of the safety profile of the vaccine candidate *Brucella melitensis* 16MDelta vjbR strain in goats [J]. Vaccine, 2021, 39(3): 617–625.
- [28] Shim S, Soh SH, Im YB, et al. Elicitation of Th1/Th2 related responses in mice by chitosan nanoparticles loaded with *Brucella abortus* malate dehydrogenase, outer membrane proteins 10 and 19 [J]. Int J Med Microbiol, 2020, 310(1): 151362.
- [29] Im YB, Park WB, Jung M, et al. Comparative analysis of immune responses to outer membrane antigens OMP10, OMP19, and OMP28 of brucella abortus [J]. Jpn J Infect Dis, 2018, 71(3): 197–204.
- [30] Paul S, Peddayelachagiri BV, Nagaraj S, et al. Recombinant outer membrane protein 25c from *Brucella abortus* induces Th1 and Th2 mediated protection against *Brucella abortus* infection in mouse model [J]. Mol Immunol, 2018, 99: 9–18.
- [31] Shojaei M, Tahmoorespur M, Soltani M, et al. Immunogenicity evaluation of plasmids encoding *Brucella melitensis* Omp25 and Omp31 antigens in BALB/c mice [J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(9): 957–964.

[收稿日期] 2021-10-21

李子萱,吴琼,张华,等. 蛭螬肽提取物对铅致小鼠肾中毒的解毒保护作用机制研究[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 662-670.

Li ZX, Wu Q, Zhang H, et al. Detoxification and protection mechanism of grub peptide extract on lead-induced nephrotoxicity in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 662-670.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.009

蛭螬肽提取物对铅致小鼠肾中毒的解毒保护作用 机制研究

李子萱,吴琼,张华,温海京,张鑫玉,张永红,沈红*,崔德凤*

(北京农学院动物科学技术学院,兽医学(中医药)北京市重点实验室,北京 102206)

【摘要】 目的 本实验通过构建醋酸铅致小鼠肾中毒模型,探讨蛭螬肽提取物对小鼠的解毒保护作用机制,为机体铅性肾病的防治提供试验依据。**方法** 随机取小鼠分为对照组、模型组、阳性药组以及不同剂量蛭螬肽组(80、160、320 mg/kg),除对照组外所有组小鼠隔天腹腔注射醋酸铅 20 mg/kg,连续 15 d。此时对照组和模型组小鼠同时灌服生理盐水而阳性药组小鼠灌服二巯基丁二酸(DMSA 70 mg/kg)混悬液,蛭螬肽组小鼠灌服不同剂量蛭螬肽提取物,每天 1 次连续 15 d,采用 HE 染色显微镜观察肾组织状态;检测肾功能指标(BUN、Cr)和肾组织中抗氧化酶水平(SOD、GSH-Px)及过氧化物(MDA)含量;RT-PCR、Western Blot 技术检测分析Ⅱ相解毒酶(NQO1)、抗氧化酶(HO-1)和信号分子(Nrf2)基因和蛋白表达水平。**结果** 蛭螬肽组与模型组小鼠相比,体重增加但低于对照组,肾组织形态显著改善,血清中 BUN、Cr 水平显著降低($P < 0.05$),肾组织中抗氧化酶(SOD、GSH-Px)水平显著提高($P < 0.05$),MDA 含量显著减少,Ⅱ相解毒酶基因(NQO1)、抗氧化酶(HO-1)及信号分子(Nrf2)mRNA 及蛋白表达水平均显著上调($P < 0.01$)。**结论** 蛭螬肽提取物激活 Nrf2-ARE 信号通路,增强铅中毒小鼠的抗氧化功能和提高解毒酶基因表达而发挥其解毒保护作用。

【关键词】 蛭螬肽;醋酸铅;小鼠;肾中毒;解毒保护作用

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)05-0662-09

Detoxification and protection mechanism of grub peptide extract on lead-induced nephrotoxicity in mice

LI Zixuan, WU Qiong, ZHANG Hua, WEN Haijing, ZHANG Xinyu, ZHANG Yonghong, SHEN Hong*, CUI Defeng*

(College of Animal Science and Technology, Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Corresponding author: SHEN Hong. E-mail: shenhong912@sina.com; CUI Defeng. E-mail: cdfiff@163.com

【基金项目】 2020 年度北京高等学校高水平人才交叉培养“实培计划”项目(PXM2021_014207_000009),北京农学院学位与研究生教育改革与发展项目(2021YJS001),北京市生猪产业创新团队项目(BAIC02),2018 年度新型生产经营主体科技能力提升项目(1083252001)。

Funded by the 2020 “Practical Training Program” for the Cross-training of High-level Talents in Beijing Colleges and Universities (PXM2021_014207_000009), Beijing Agricultural College Degree and Postgraduate Education Reform and Development Project (2021YJS001), Beijing Pig Industry Innovation Team Project (BAIC02), 2018 Annual New Production and Operation Subject Technology Capacity Improvement Project (1083252001).

【作者简介】 李子萱(1997—),女,硕士研究生,研究方向:中药与动物疫病防控。Email:296253608@qq.com

【通信作者】 沈红,女,教授,研究方向:中药药物作用机制研究。Email:shenhong912@sina.com;

崔德凤,高级实验师,研究方向:中药作用机制与动物疫病综合防控。Email:cdfiff@163.com。

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective In this experiment, a mouse model of nephropathy induced by lead acetate was created to study the mechanism of detoxification and protection of grub peptide extract on mice, which provided experimental evidence for the prevention and treatment of lead-induced nephropathy. **Methods** Mice were randomly divided into a Control group, Model group, Positive drug group, and Grub peptide groups. The Grub peptide groups were given different doses (80, 160, 320 mg/kg) of grub peptide. All mice, except the Control group, were injected intraperitoneally with 20 mg/kg lead acetate every other day, for 15 consecutive days. The mice in the Control group and Model group were then fed normal saline, while the mice in the Positive drug group were fed a dimercaptosuccinic acid (DMSA 70 mg/kg) suspension. The mice in the Grub peptide groups were fed different doses of grub peptide extract. The state of the kidney tissue was observed by HE staining once a day for 15 days. The renal function indexes (BUN, Cr), antioxidant enzyme levels (SOD, GSH-Px), and peroxide (MDA) content in renal tissue were detected. RT-PCR and Western Blot techniques were used to detect and analyze the gene and protein expression levels of phase II detoxification enzyme (NQO1), an antioxidant enzyme (HO-1), and a signaling molecule (Nrf2). **Results** The weight of mice in the Grub peptide groups was greater than those in the Model group; however, they were less than those in the Control group, and the morphology of the kidney tissue was significantly better. Compared with the control group, the morphology of the kidney tissue of mice in the Grub peptide groups was significantly improved, the level of BUN and Cr in the serum was significantly less ($P < 0.05$), the level of antioxidant enzymes (SOD, GSH-Px) in renal tissue was significantly less ($P < 0.05$), and the content of MDA was significantly less. The phase II detoxification enzyme gene (NQO1), antioxidant enzyme (HO-1), and signal molecule (Nrf2) mRNA, and protein expression levels were significantly up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusions** Grub peptides can activate Nrf2-ARE signaling pathway to enhance antioxidant function and increase the gene expression of detoxification enzymes in lead-poisoned mice. The protective detoxification effect can then be extracted.

【Keywords】 grub peptide; lead acetate; mice; nephrotoxicity; detoxification protection

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

铅元素是环境中广泛分布的一种有毒性重金属,各行业中都有所应用,在当今世界中铅已经成为了不可或缺的金属,但铅金属所导致的环境污染,使铅中毒患者数量增多^[1]。铅能在机体体内长期累积致全身多系统损害,研究显示,儿童比成人对铅元素的吸收要高,滞留在体内的铅元素对儿童的生长发育造成一定影响^[2]。目前,常用的驱铅药物为依地酸钙钠,其排铅效果虽好,但会引起机体出现多种副作用,如头晕、恶心、畏寒、发热、食欲不振等症状^[3]。因此,开发低毒天然药物成为生物医学研究热点。研究发现,治疗儿童高铅血症时服用杞枣口服液、黄芪健脾汤、丹参注射液等^[4-5]多种中药对铅中毒进行治疗后,能减轻铅中毒所产生的情绪不稳定、腹痛、食欲差等不良反应且降铅疗效果好^[6]。在中医学记载中,蛭蟥是金龟子等近缘昆虫的幼体,其具有破血、散瘀、明目、通乳的作用^[7],可治疗痈疽、痔漏、丹毒、跌打损伤等症^[8]。《神农本草经》中有记载“目中淫肤、青翳白膜”为蛭蟥主治功能之一,现代医学已证实以蛭蟥为主成分的滴眼液对白内障具有良好的治疗效果^[9]。近年研究表明,蛭蟥肽提取物呈现多种药理作用,如抗氧化、抗肿瘤、抗菌、解毒

保肝等作用^[10]。Oh 等^[11]发现蛭蟥可使脂肪肝小鼠血浆中丙氨酸转氨酶和 ALP 的活性降低,HE 染色切片观察到肝细胞病变有明显的改善,结果减轻了小鼠肝损伤。当机体受到不良刺激时,核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)与核内抗氧化反应元件(ARE)结合激活 Nrf2-ARE 信号通路,使下游 II 相解毒酶、抗氧化酶基因表达增加^[12],如醌氧化还原酶 1(NQO1)、血红素加氧酶-1(HO-1)、超氧化物歧化酶(SOD)等,促进了细胞内的氧化还原反应、维持细胞内平衡,并且共同参与机体应激的抗氧化和解毒保护作用^[13-14]。经研究发现,由于肾功能下降,肾小管损伤标志物的表达量增加,氧化应激等因素的影响,与正常组小鼠相比,Nrf2 缺陷型小鼠的急性肾损伤更加严重,提示 Nrf2 对肾损伤有一定保护作用^[15]。地鳖肽与蛭蟥肽提取物联合应用时能清除自由基,抑制脂质过氧化反应^[16]。但蛭蟥肽提取物能否通过 Nrf2-ARE 信号通路表现解毒保护作用仍未知。因此,本研究拟通过建立醋酸铅致小鼠肾中毒模型,探讨蛭蟥肽提取物对肾中毒小鼠的解毒保护作用及其机制,为未来研发蛭蟥肽提取物作为高效解毒保护剂,及其在养殖业中应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

72 只 8 周龄清洁级雄性 KM 小鼠, 体重 21 ~ 26 g, 购于中国军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军)2019-0002】, 饲养于北京农学院实验动物房【SYXK(京)2021-0001】, 温度 22 ~ 24℃, 湿度恒定, 昼夜光照各半, 实验期间小鼠自由采食、饮水。本实验所有操作均符合北京农学院兽医药理学实验室伦理要求(BUA2021042)。

1.1.2 主要试剂与仪器

谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、肌酐 (creatinine, Cr)、和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒均购自南京建成生物有限公司 (货号分别为: A005-1-2、C013-1-1、A001-3-2、C011-2-1、A003-1-2); 全蛋白提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司 (货号: BC3710); BCA 蛋白检测试剂盒、ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术公司 (货号分别为: P0012、P0018S); 兔源 NQO1、HO-1、Nrf2、GAPDH 抗体和 HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司 (货号分别为: bs-2184R、bs-273397R、bs-1074R、bs-0755R、bs-40295G-HRP); HiFi-MMLV cDNA Kit 购自康为试剂生物科技有限公司 (货号: CW0744M); 醋酸铅 (Pb)、二巯基丁二酸 (DMSA) 购自北京爱普锐晟科技有限公司 (货号分别为: 316512-25G、R050651-25g); 蛭螬多肽 (grub polypeptide) 提取物由北京农学院兽医药理学实验室【SYXK(京)2021-0001】制备; 所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

UV-3 紫外可见分光光度 (上海美普达有限公司); 低温高速离心机 (Eppendorf 公司); 超低温冰箱 (SANYOO, 日本); S1000 Thermal Cycler 梯度 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国); CFX Connect 荧光定量 PCR 检测系统 (Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 分组与小鼠肾中毒模型建立

72 只 8 周龄清洁级雄性 KM 小鼠, 随机分为对照组、模型组、阳性药组、不同剂量蛭螬多肽组 (80、160、320 mg/kg)。每组 12 只小鼠, 实验期间自由采食、饮水。为构建铅中毒小鼠模型, 正常组小鼠腹

腔注射 20 mg/kg 生理盐水, 其余各组小鼠均隔天腹腔注射 20 mg/kg 醋酸铅 1 次, 连续 15 d, 此后正常组、模型组小鼠灌服生理盐水, 阳性药组小鼠灌服 70 mg/kg DMSA 混悬液, 蛭螬多肽组灌服不同剂量蛭螬多肽提取物 (80、160、320 mg/kg), 每天 1 次连续 15 d。

1.2.2 血清学指标检测

实验期间小鼠每周称重, 小鼠末次给药 24 h 后, 用 4% 异氟烷麻醉小鼠后眼眶采血, 制备血清采用试剂盒检测血尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙二醇 (MDA); 小鼠颈椎脱臼处死后, 取出肾进行肉眼观察并称重。取 1 g 肾组织与 9 mL 生理盐水于研磨瓶中, 研磨制备 10% 肾组织匀浆液, 部分肾组织低温冻存储备用; 处理数据并计算肾重量指数 = (肾重量/小鼠体重) × 100%。

1.2.3 肾组织病理观察

取小鼠部分肾置于 4% 多聚甲醛溶液中浸泡固定, 制作肾组织切片, HE 染色后光学显微镜下观察组织结构并拍照。

1.2.4 RT-PCR 检测小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子基因表达水平

采用 TRIzol 提取肾组织中 RNA, 测浓度后反转录成 cDNA, 以 GAPDH 为内参用 RT-PCR 仪扩增, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primers	序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')
GADPH-F	AGTCGGACTCAACGGATTT
GADPH-R	CGCTCCTGGAAGATACTGAT
Nrf2-F	ATAGAGCAAGTTTGGGAAGA
Nrf2-R	TTCAGGGCTCGTGATGTT
HO-1-F	GAATGAATGCCCTTGAGAT
HO-1-R	GCATCCTGATTGCTCTCT
NQO1-F	CCCAGTGCCTTTGCTACGA
NQO1-R	GTCAGCCGCTTCAATCTTCT

1.2.5 Western Blot 检测小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子蛋白表达水平

取肾组织匀浆, 加入蛋白裂解液并离心 (-4℃, 12000 r/min, 30 min)。BCA 法测蛋白浓度, 制备 10% 下层胶, 进行 SDS-PAGE 使蛋白分离, 转膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。用 TBST 缓冲液清洗后加入 NQO1、HO-1、Nrf2 及 GADPH (1 : 1000) 抗体, 4℃ 冰箱过夜孵育后用 TBST 缓冲液清洗, 加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG (1 : 1000) 孵育 2 h。TBST 缓冲液清洗后加入 ECL 显色液, 用 Bio-Rad 系统显影并分析。

1.3 统计学分析

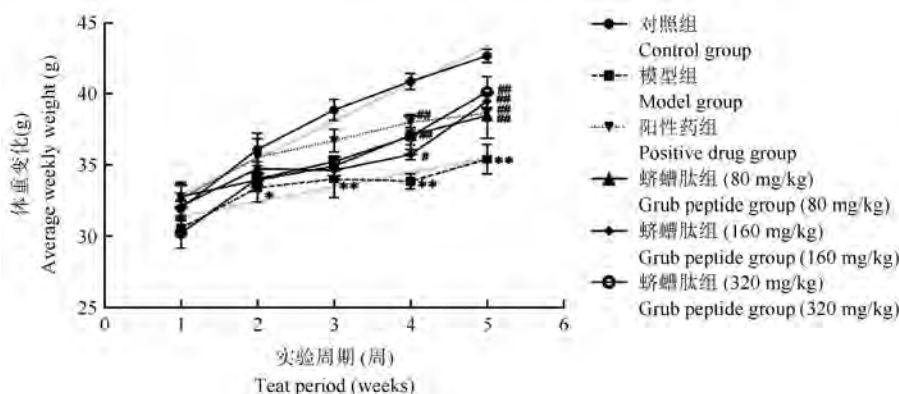
所有数据经 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 9 软件统计分析,结果用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较运用 t 检验方法, $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异极具显著性。

2 结果

2.1 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠精神状态和体重的影响

经肉眼观察,实验期间对照组小鼠精神状态

良好,食欲正常;模型组小鼠表现为烦躁不安、被毛粗乱,而后表现为精神萎靡、嗜睡、采食量下降;阳性药组和蛭螬肽组小鼠表现较为安静、嗜睡、未见明显异常。第 1 周时各组体重无明显差异;第 2 周开始模型组小鼠体重显著低于对照组 ($P < 0.05$),阳性药组和蛭螬肽组小鼠体重较对照组无显著性差异;第 3、4、5 周时模型组小鼠体重极显著低于对照组 ($P < 0.01$),阳性药组、蛭螬肽组与模型组相比小鼠体重呈现极显著性增长 ($P < 0.01$,图 1)。



注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 蛭螬肽提取物对小鼠体重的影响

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

Figure 1 Effect of grub peptide extract on the body weight of the mice

2.2 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠肾指数的影响

模型组小鼠肾指数极显著高于对照组 ($P < 0.01$);阳性药组小鼠肾指数较对照组无显著性差异;经蛭螬肽提取物给药后,低剂量蛭螬肽组小鼠肾指数显著低于模型组 ($P < 0.05$);中、高剂量组小鼠肾指数极显著低于模型组 ($P < 0.01$,图 2)。

2.3 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠肾组织结构的影响

肉眼观察小鼠肾形态,对照组小鼠肾颜色呈淡红色且有光泽,形态正常,无肉眼可见病理变化;模型组左肾出现白色斑点,右肾出现坏死点并与其他周围组织严重粘连(图 3);阳性药组和不同剂量蛭螬肽组肾颜色及形态有显著改善。肾组织切片 HE 染色后显微镜下观察,对照组小鼠肾小球形态、大小正常,边界清晰,无明显结构损伤;模型组小鼠肾小球萎缩,近端小管轮廓模糊、形态不规则,肾小管

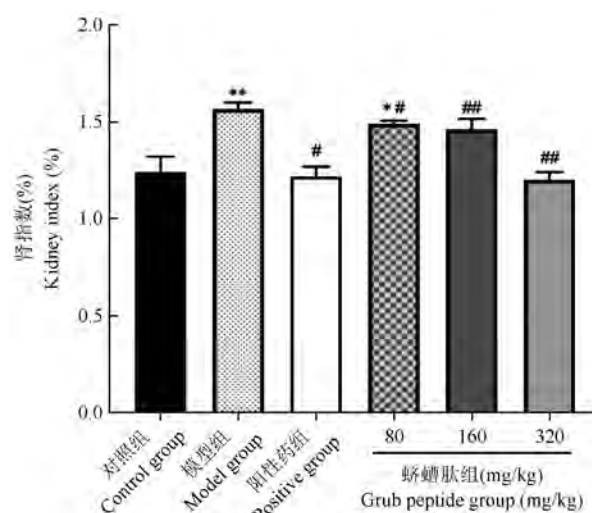


图 2 蛭螬肽提取物对小鼠肾指数的影响

Figure 2 Effect of grub peptide extract on mouse kidney index

内有渗出物;阳性药组和蛭螬肽组小鼠肾小球萎缩程度、官腔形态有所改善(图 4)。

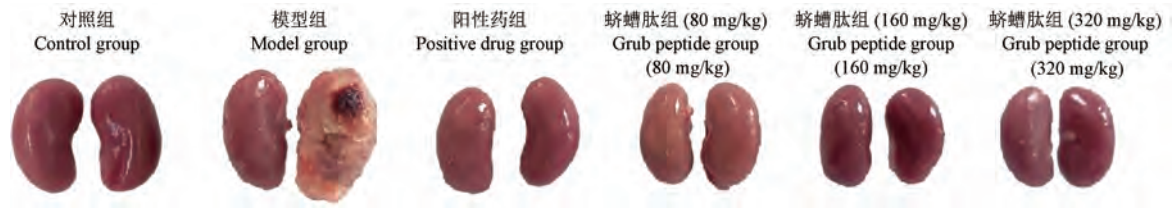


图 3 肉眼观察小鼠肾组织形态变化

Figure 3 Morphological changes of the mice kidney tissue by the visual observation

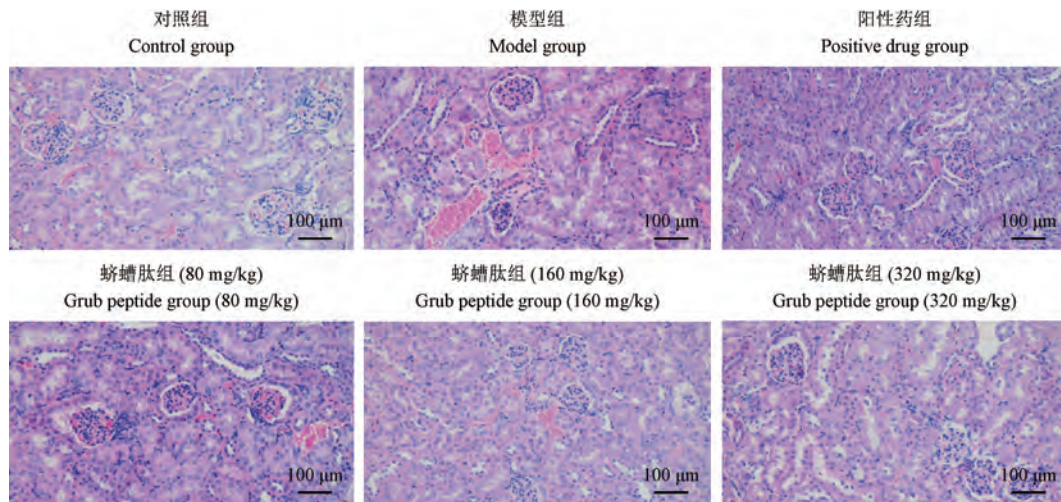


图 4 蛭螬肽提取物对小鼠肾组织结构的影响

Figure 4 The effect of grub peptide extract on the structure of mouse kidney tissue

2.4 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠肾功能的影响

为进一步了解小鼠肾功能,采用试剂盒检测肾血尿素氮(BUN)和血肌酐(Cr)指标变化。与对照组相比,模型组小鼠肾BUN和Cr水平极显著升高($P < 0.01$);阳性药组无显著性差异。与模型

组相比,阳性药组小鼠肾BUN和Cr水平极显著下降($P < 0.01$);低剂量组与模型组无显著性差异;中剂量组小鼠肾BUN与模型组无显著性差异,中剂量组小鼠肾Cr较模型组显著降低($P < 0.05$);高剂量组小鼠肾BUN、Cr水平极显著下降($P < 0.01$,图5)。

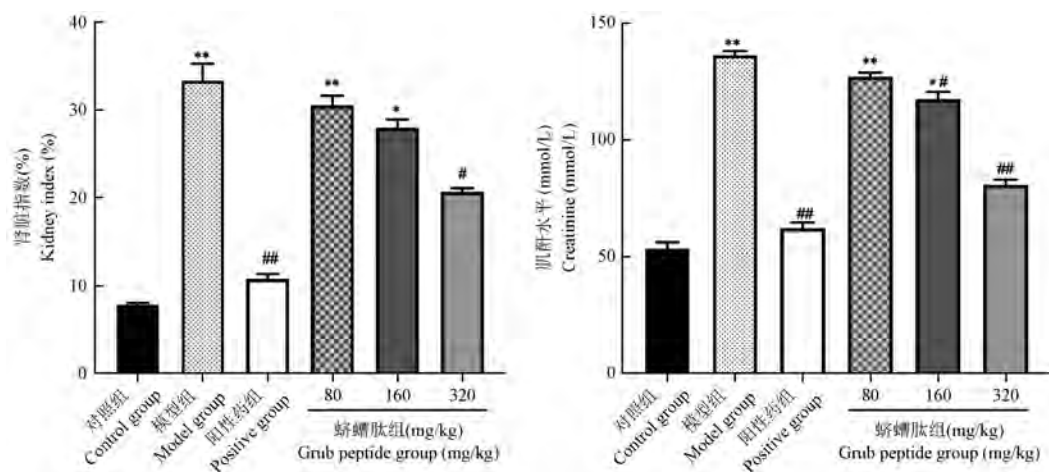


图 5 蛭螬肽提取物对小鼠肾功能影响

Figure 5 Effects of grub peptide extract on renal function of the mice

2.5 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠肾组织中抗氧化酶及过氧化反应的影响

小鼠肾组织中抗氧化酶水平及过氧化物含量经试剂盒检测后,与对照组相比,模型组 GSH-Px、SOD 水平极显著低于对照组 ($P < 0.01$);阳性药组和蛭螬肽组中 GSH-Px、SOD 水平均呈现上升趋势,随着蛭螬肽提取物剂量的增加,肾组织中的 GSH-Px、SOD 水平逐渐升高,其中高剂量组肾组织中的 GSH-Px、SOD 水平增加最显著 ($P < 0.05$)。模型组小鼠肾组织中丙二醛 (MDA) 含量与对照组相比极显著增加 ($P < 0.01$);阳性药组较对照组无显著性差异;蛭螬肽组 MDA 含量均有不同程度的降低,并随着蛭螬肽提取物剂量的增加,小鼠肾组织中 MDA 含量逐渐降低,其中高剂量组与模型组相

比极显著下降 ($P < 0.01$),与对照组相比无显著性差异 (图 6)。

2.6 蛭螬肽提取物对小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子基因表达的影响

通过 RT-PCR 技术分析 Nrf2-ARE 信号通路相关基因和关键分子基因表达水平,与对照组相比,模型组小鼠肾组织中 NQO1 和 HO-1 的 mRNA 表达量极显著降低 ($P < 0.01$);阳性药组显著高于模型组 ($P < 0.05$);而蛭螬肽组随着蛭螬肽剂量增加其 mRNA 表达量增加。与对照组相比,模型组小鼠肾组织中 Nrf2 分子 mRNA 表达量极显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比,经蛭螬肽提取物处理后低、中剂量组 Nrf2 的 mRNA 表达量无显著性差异,而高剂量组 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05$,图 7)。

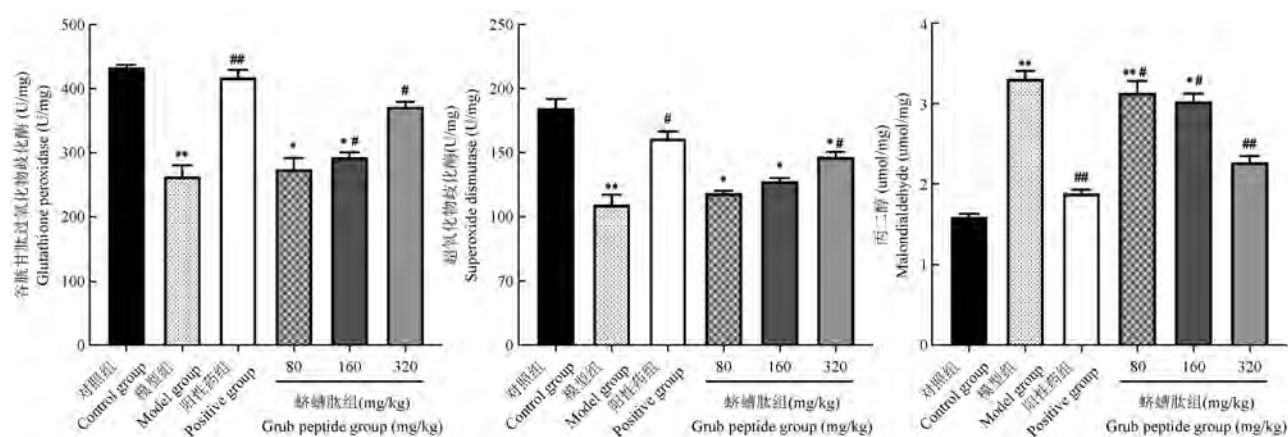


图 6 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠肾组织中抗氧化酶 (GSH-Px、SOD) 及过氧化反应 (MDA) 的影响

Figure 6 Effect of grub peptide extract on the antioxidant enzymes (GSH-Px, SOD) and peroxidation (MDA) in the kidney tissue of mice with lead-induced nephrotoxicity

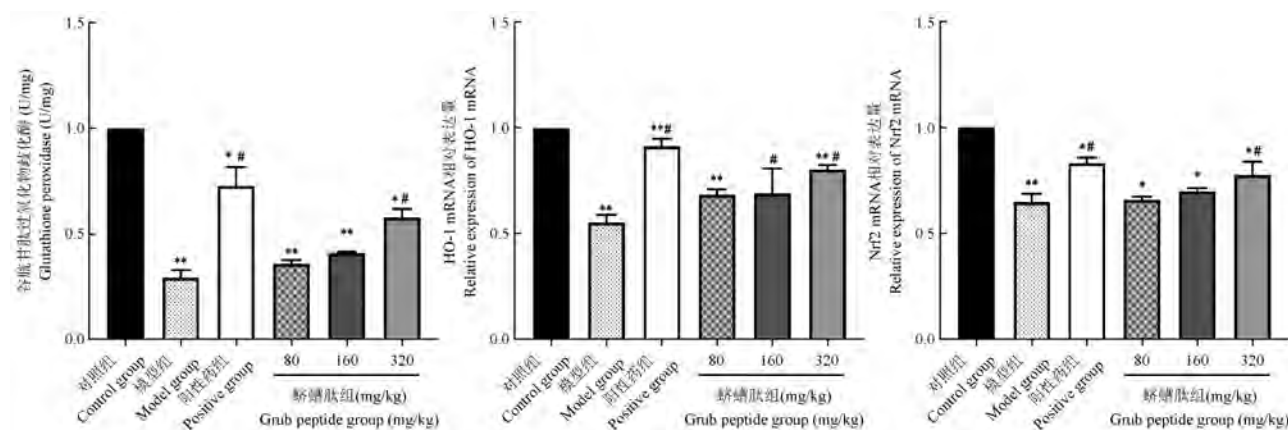


图 7 蛭螬肽提取物对小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子基因表达的影响

Figure 7 Effect of grub peptide extract on the expression of phase II detoxification enzymes, antioxidant enzymes and key molecular genes in mouse kidney tissues

2.7 蛭螬肽提取物对小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子蛋白表达的影响

经 Western Blot 法检测 NQO1、HO-1 和 Nrf2 蛋白表达量,与对照组相比,模型组 NQO1、HO-1 蛋白表达极显著降低($P < 0.01$),Nrf2 蛋白表达显著降低($P < 0.05$);阳性药组无显著性差异。经蛭螬肽提取物给药后,低、中、高剂量的蛭螬肽组与模型组

相比,NQO1、HO-1 和 Nrf2 蛋白表达均有不同程度的上调。其中,低、中剂量组 NQO1 蛋白表达较模型组显著增加($P < 0.05$);高剂量组则呈极显著增加($P < 0.01$)。低、中剂量组 HO-1 蛋白表达较模型组无显著性差异;高剂量组呈极显著增加($P < 0.01$)。低、中剂量组 Nrf2 蛋白表达较模型组无显著性差异;高剂量组呈显著增加($P < 0.05$,图 8)。

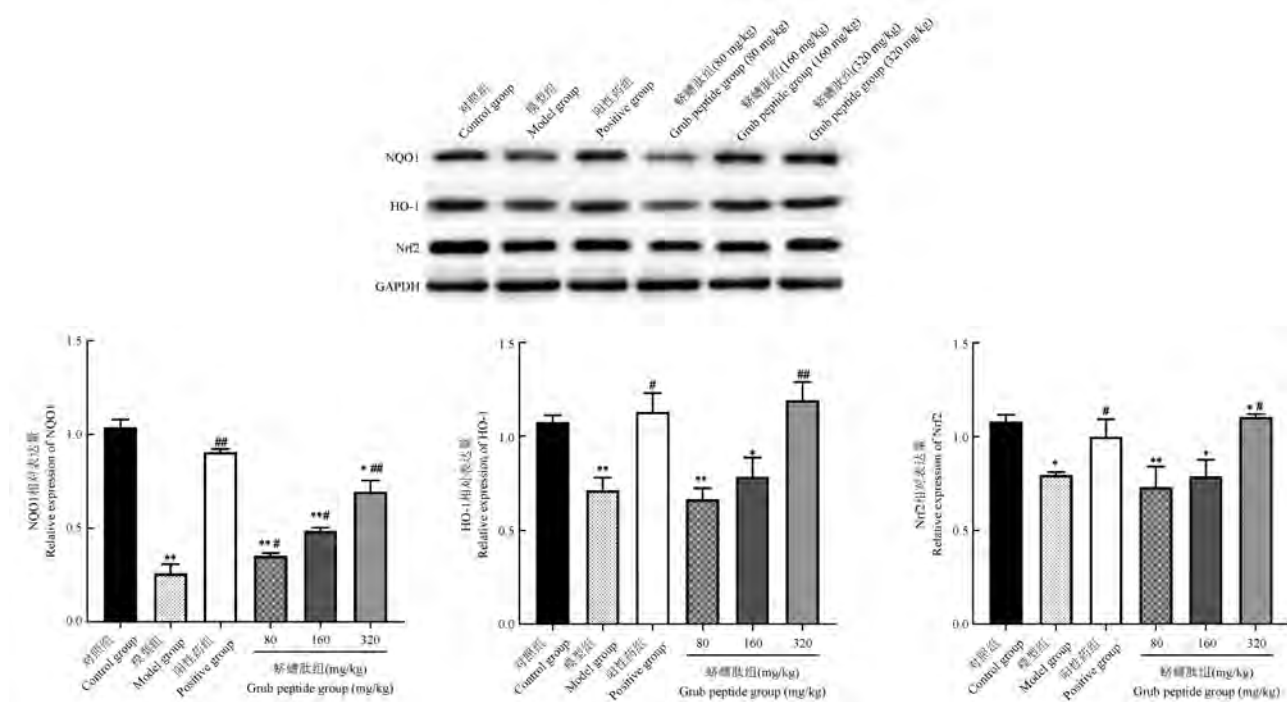


图 8 蛭螬肽提取物对小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子蛋白表达的影响

Figure 8 Effect of grub peptide extract on the expression of phase II detoxification enzymes, antioxidant enzymes and key molecular proteins in mouse kidney tissues

3 讨论

当含铅物质进入机体后对各个组织器官均可产生一定影响,其中肾对含铅物质极为敏感。肾中的铅不断积累后会导致肾的形态和功能出现变化^[17]。肾形态出现肾小球上皮细胞萎缩,肾小管形态不规则,毛细血管扩张充血;肾功能下降,肾小球滤过功能降低,肾小管损伤等。以上原因会导致 BUN 和 Cr 不能随尿液排出而增高,并在体内蓄积使肾受到损伤^[18]。临床上以 BUN、Cr 作为肾检测指标,二者水平变化可反应肾功能的变化。本实验研究发现,铅中毒小鼠体重降低,肾颜色及形态发生改变,肾组织中 BUN 和 Cr 水平升高。可提示醋酸铅对小鼠肾造成了损伤,小鼠肾中毒模型建立成功。而经不同剂量蛭螬肽处理的小鼠体重、肾形态有所改善,BUN、Cr 的水平降低,由此可提示蛭螬肽

提取物可缓解铅中毒所致的小鼠肾损伤。

经研究显示,机体内的氧化系统和抗氧化两系统在正常情况下处于平衡状态,但当机体受到某些因素产生的氧化刺激时,会产生对机体造成损害的自由基^[19],体内 GSH-Px 是抗氧化系统中重要的酶类,可保护机体免受自由基的伤害^[20]。SOD 是抗氧化系统中首要参与反应的物质^[21],可与超氧阴离子相作用从而清除自由基^[22]。MDA 是机体受到氧化刺激后所产生的过氧化产物,其含量可体现出体内自由基水平及受损情况^[23]。本研究结果中模型组肾抗氧化酶活性降低且过氧化物水平高,而阳性药组和蛭螬肽组小鼠肾组织中 GSH-Px 和 SOD 水平显著升高,MDA 水平降低,结果表明蛭螬肽提取物可增强抗氧化酶防御系统,从而去除活性氧自由基,降低脂质过氧化反应,并缓解铅中毒引起的肾组织损伤,提示蛭螬肽提取物对肾损伤有保护作用。

Nrf2-ARE 信号通路与机体内源性抗氧化应激系统和解毒调节传导系统有关,在氧化应激反应应答中起关键作用^[24]。HO-1 为抗氧化酶对细胞有一定保护作用,当机体受到损伤时可清除自由基并对机体产生抗氧化效应^[25]。NQO1 可与部分有毒物质产生反应并将其清除,抑制脂质过氧化反应从而稳定细胞^[26]。Nrf2 是机体中重要的物质分子,广泛存在于各细胞中,若机体细胞 Nrf2 缺失可能导致肺炎、肝病、肾病、神经性病变等^[27]。研究显示,小鼠在白茶提取物的作用下,使 NQO1、HO-1 和 Nrf2 表达量增加,通过激活 Nrf2-ARE 信号通路从而保护了肾免受阿霉素引起的蛋白质和脂质氧化损伤^[28]。姜黄素和百里香酚联合应用时,可缓解大鼠肾组织损伤,增强肾功能,上调 BUN、Cr 水平及 Nrf2、HO-1 蛋白表达量,从而减轻顺铂对肾产生的毒副作用^[29]。木犀草素可激活 Nrf2-ARE 信号通路,抑制氧化应激,缓解了醋酸铅致大鼠肾毒性^[30]。本研究结果显示,与模型组相比,经蛭螭肽提取物处理后,小鼠肾组织中 NQO1、HO-1、Nrf2 的 mRNA 和蛋白水平显著增加。该结果表明,蛭螭肽提取对肾中毒小鼠的解毒保护作用,可能通过激活 Nrf2-ARE 信号通路,减少铅中毒对机体的损伤。

综上所述,醋酸铅致肾中毒小鼠,在蛭螭肽提取物的作用下,可增强小鼠肾组织中抗氧化酶活力,降低过氧化反应,上调 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子 Nrf2 基因和蛋白的表达,达到改善肾组织结构和提高肾功能等解毒保护作用,其机制可能与激活机体内源性 Nrf2-ARE 信号通路有关。

参 考 文 献 (References)

- [1] 何剪太,朱轩仪,巫放明,等. 铅中毒和驱铅药物的研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(14): 53-57.
He JT, Zhu XY, Wu FM, et al. Research progress on lead poisoning and development of deleading reagents [J]. Chin J Mod Med, 2017, 27(14): 53-57.
- [2] Duan Y, Shi H, Jiang Y. The blood lead levels of children and the loss of Ca^{2+} from neurons owing to lead [J]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 18(22): 12051.
- [3] 乔增运,李昌泽,周正,等. 铅毒性危害及其治疗药物应用的研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2020, 34(5): 416-420.
Qiao ZY, Li CZ, Zhou Z, et al. Research progress on lead toxicity and its therapeutic drug application [J]. J Toxicol, 2020, 34(5): 416-420.
- [4] 姚开娟. 生活性铅中毒 8 例临床分析 [J]. 中国现代医药杂志, 2021, 23(7): 73-75.
Yao KJ. Clinical analysis of 8 cases of life-related lead poisoning [J]. Mod Med J Chin, 2021, 23(7): 73-75.
- [5] 黄援,谭美珍,何艳玲,等. 中药治疗儿童早期铅中毒 200 例 [J]. 中医杂志, 2003, 44(10): 766-767.
Huang Y, Tan MZ, He YL, et al. Treatment of 200 cases of early childhood lead poisoning with traditional Chinese medicine [J]. J Tradit Chin Med, 2003(10): 766-767.
- [6] 耿乃志,崔燕. 中药治疗儿童铅中毒的研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(10): 54-55.
Geng NZ, Cui Y. Research progress of traditional Chinese medicine in the treatment of lead poisoning in children [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2009, 11(10): 54-55.
- [7] 陈智,郑学燕,朱荣刚,等. 蛭螭化学成分及药理作用研究进展 [J]. 食品与药品, 2014, 16(1): 62-64.
Chen Z, Zheng XY, Zhu RG, et al. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effects of grubs [J]. Food Drug, 2014, 16(1): 62-64.
- [8] 王静. 虫类中药蛭螭的化学成分研究 [D]. 成都: 西南交通大学; 2011.
Wang J. Study on the chemical constituents of grubs, a traditional chinese medicine of insects [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University; 2011.
- [9] 吴大力,蒋鹏飞,彭俊,等. 蛭螭提取物对兔光损伤视网膜变性视网膜厚度的影响 [J]. 江西中医药, 2020, 51(8): 61-62.
Wu DL, Jiang PF, Peng J, et al. The effect of grub extract on retinal thickness in rabbits with light-damaged retinal degeneration [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2020, 51(8): 61-62.
- [10] 董庆峰,张崇禧,张书锋,等. 蛭螭的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2008, 26(1): 14-16, 19.
Dong QF, Zhang CX, Zhang SF, et al. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effects of grubs [J]. J Pharm Pract, 2008, 26(1): 14-16, 19.
- [11] Oh WY, Pyo S, Lee KR, et al. Effect of holotrichia diomphalia larvae on liver fibrosis and hepatotoxicity in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2003, 87(2-3): 175-180.
- [12] Thiruvengadam M, Venkidasamy B, Subramanian U, et al. Bioactive compounds in oxidative stress-mediated diseases: targeting the NRF2/ARE signaling pathway and epigenetic regulation [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(12): 1859.
- [13] Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, et al. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update [J]. Med Res Rev, 2016, 36(5): 924-963.
- [14] 姚娟,吴平安,李芸,等. Keap1-Nrf2-ARE 信号通路及其激活剂的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(10): 1342-1346.
Yao J, Wu PA, Li Y, et al. Research progress of Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway and its activators [J]. Chin Pharm Bull, 2019, 35(10): 1342-1346.
- [15] Rubio-Navarro A, Vázquez-Carballo C, Guerrero-Hue M, et al. Nrf2 plays a protective role against intravascular hemolysis-mediated acute kidney injury. [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 740.

- [16] 刘丹, 曹硕, 刘超, 等. 多肽提取物的体外抗氧化作用的研究 [A]. 中国畜牧兽医学学会兽医药理毒理学分会、中国畜牧兽医学学会兽医药理毒理学分会第十五次学术讨论会论文集 [C]; 2019.
- Liu D, Cao S, Liu C, et al. Study on the *in vitro* antioxidant effect of polypeptide extracts [A]. Chinese society of animal husbandry and veterinary medicine. branch of veterinary pharmacology and toxicology of chinese society of animal husbandry and veterinary medicine. Proceedings of the fifteenth academic symposium [C]; 2019.
- [17] 孟金萍, 孙淑华, 王艳蓉, 等. 铅的生物学毒性效应 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(1): 58-61, 54.
- Meng JP, Sun SH, Wang YR, et al. Biototoxicity of lead [J]. Chin J Comp Med, 2007, 17(1): 58-61, 54.
- [18] 周东月, 王春璐, 任艳平, 等. 黄连多糖通过抑制氧化应激和炎症反应减轻糖尿病大鼠肾损伤的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 37-42.
- Zhou DY, Wang CL, Ren YP, et al. Coptis chinensis polysaccharide protects against renal injury in diabetic rats by suppressing oxidative stress and inflammatory reaction [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 37-42.
- [19] Zhang J, Gu HD, Zhang L, et al. Protective effects of apricot kernel oil on myocardium against ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(12): 3136-3141.
- [20] 莫颂铁, 张丽凤, 黄彦峰, 等. 慢性铝中毒小鼠学习记忆与大脑皮层 ACh、 β -EP、SOD 及 MDA 关系的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 63-67.
- Mo SY, Zhang LF, Huang YF, et al. Study on the relationship between learning and memory and cerebral cortex ACh, β -EP, SOD and MDA in mice with chronic aluminum poisoning [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(7): 63-67.
- [21] 张秋月, 黎谢飞, 曾小群, 等. 产超氧化物歧化酶乳酸菌的筛选及发酵条件优化 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 143-150.
- Zhang QY, Li XF, Zeng XQ, et al. Screening of superoxide dismutase-producing lactic acid bacteria and optimization of fermentation conditions [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2021, 21(10): 143-150.
- [22] Sharpe PC, Liu WH, Yue KK, et al. Glucose-induced oxidative stress in vascular contractile cells: comparison of aortic smooth muscle cells and retinal pericytes [J]. Diabetes, 1998, 47(5): 801-809.
- [23] 仪丽荣. 丙二醇对小鼠造血系统辐射损伤的防护作用及其机制研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心; 2019.
- Yi LR. Study on the protective effect and mechanism of propylene glycol on radiation damage to the hematopoietic system in mice [D]. Beijing: Chinese Center for Disease control and Prevention; 2019.
- [24] 李前辉, 张宜林, 谢小娟, 等. 黄芩苷介导 Nrf2/HO-1 通路的激活增强丙泊酚对肾缺血再灌注损伤大鼠的保护作用 [J]. 中医学报, 2021, 36(8): 1704-1710.
- Li QH, Zhang YL, Xie XJ, et al. Baicalin-mediated activation of Nrf2/HO-1 pathway enhances the protective effect of propofol on renal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Acta Chin Med, 2021, 36(8): 1704-1710.
- [25] 乔丽杰, 王延让, 张明. Nrf2/HO-1 通路在氧化损伤保护机制中研究进展 [J]. 中国职业医学, 2013, 40(1): 82-84.
- Qiao LJ, Wang YR, Zhang M. Research progress of Nrf2/HO-1 pathway in the protective mechanism of oxidative damage [J]. Chin Occup Med, 2013, 40(1): 82-84.
- [26] 谷崇高, 张永红, 白若雨, 等. 地鳖多肽提取物的抗氧化衰老机制 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 66-74, 14.
- Gu CG, Zhang YH, Bai RY, et al. Antioxidative aging mechanism of polypeptide extracts from turtle turtle [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(6): 66-74, 14.
- [27] Zhu Q, Zeng J, Li J, et al. Effects of compound centella on oxidative stress and Keap1-Nrf2-ARE pathway expression in diabetic kidney disease rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 9817932.
- [28] Espinosa C, López-Jiménez JA, Pérez-Llamas F, et al. Long-term intake of white tea prevents oxidative damage caused by adriamycin in kidney of rats [J]. J Sci Food Agric, 2016, 96(9): 3079-3087.
- [29] Al Fayi M, Otifi H, Alshyarba M, et al. T Thymoquinone and curcumin combination protects cisplatin-induced kidney injury, nephrotoxicity by attenuating NF κ B, KIM-1 and ameliorating Nrf2/HO-1 signalling [J]. J Drug Target, 2020, 28(9): 913-922.
- [30] Albarakati AJA, Baty RS, Aljoudi AM, et al. Luteolin protects against lead acetate-induced nephrotoxicity through antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(4): 2591-2603.

[收稿日期] 2021-11-10

赵霞,薛娣,师少军. 芍药苷通过激活 LKB1/AMPK 信号通路对急性脑梗死大鼠神经损伤的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 671-678.

Zhao X, Xue D, Shi SJ. Protective effect of paeoniflorin on nerve injury in rats with acute cerebral infarction by activating the LKB1/AMPK signaling pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 671-678.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.010

芍药苷通过激活 LKB1/AMPK 信号通路对急性脑梗死大鼠神经损伤的保护作用

赵霞^{1*}, 薛娣¹, 师少军²

(1. 南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 473000; 2. 河南省安阳市中医院神经外科, 河南 安阳 455000)

【摘要】 目的 探讨芍药苷通过激活肝激酶 B1(LKB1)/5'-磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)信号通路对急性脑梗死大鼠神经损伤的保护作用。**方法** 通过线栓闭塞大鼠大脑中动脉建立急性脑梗死模型,随机分为模型组、芍药苷(10 mg/kg)组、AMPK 抑制剂 CC(0.2 mg/kg)组、芍药苷(10 mg/kg)+CC(0.2 mg/kg)组,每组 12 只,另取 12 只大鼠仅分离出颈总动脉与颈外动脉,不插线栓,设为假手术组,分组给药处理后,采用 Morris 水迷宫实验评测大鼠认知功能;采用三苯基氯化四氮唑(TTC)染色检测各组大鼠脑梗死情况;采用 TUNEL 染色测定各组大鼠海马神经元凋亡率;采用试剂盒测量各组大鼠血清炎症因子诱导型一氧化氮合酶(iNOS)与白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平、脑组织过氧化氢酶(CAT)、活性氧(ROS)与丙二醛(MDA)含量;采用蛋白免疫印迹法检测各组大鼠脑组织凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、BCL2 相关 X 蛋白(Bax)与 LKB1/AMPK 通路相关蛋白(p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK)表达状况。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间、脑组织 CAT 含量、p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著降低($P < 0.05$),脑梗死面积、海马神经元凋亡率、血清 iNOS 与 IL-1 β 水平、脑组织 ROS 与 MDA 含量、Bax 表达水平显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比,芍药苷组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间、脑组织 CAT 含量、p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著升高($P < 0.05$),脑梗死面积、海马神经元凋亡率、血清 iNOS 与 IL-1 β 水平、脑组织 ROS 与 MDA 含量、Bax 表达水平显著降低($P < 0.05$)。CC 可减轻芍药苷对大鼠脑梗死的保护作用。**结论** 芍药苷可能通过激活 LKB1/AMPK 信号通路,而阻止炎症发生发展,降低氧化应激水平,减轻大鼠脑组织梗死及海马神经元凋亡,改善其认知功能,起到保护神经的作用。CC 可减轻芍药苷对大鼠脑梗死的保护作用。

【关键词】 芍药苷;肝激酶 B1/5'-磷酸腺苷激活的蛋白激酶;急性脑梗死;神经损伤;保护作用

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0671-08

Protective effect of paeoniflorin on nerve injury in rats with acute cerebral infarction by activating the LKB1/AMPK signaling pathway

ZHAO Xia^{1*}, XUE Di¹, SHI Shaojun²

(1. Nanyang Medical College, Nanyang 473000, China. 2. Department of Neurosurgery, Henan Anyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Anyang 455000)

Corresponding author: ZHAO Xia. E-mail: nyzx010608@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of paeoniflorin on nerve injury in rats with acute cerebral infarction by activating the liver kinase B1 (LKB1)/5'-amp activated protein kinase (AMPK) signaling pathway. **Methods** An acute cerebral infarction model was established by occlusion of the middle cerebral artery in rats using sutures,

[基金项目] 南阳市 2020 年市级科技计划项目(KJGG132)。

Funded by Nanyang 2020 Municipal Science and Technology Plan Project (KJGG132)。

[作者简介] 赵霞(1977—),女,副教授,研究方向:基础医学研究。Email:nyzx010608@163.com

and the rats were randomly divided into a Model group, Paeoniflorin (10 mg/kg) group, AMPK inhibitor Compound C (CC) (0.2 mg/kg) group, and Paeoniflorin (10 mg/kg) + CC (0.2 mg/kg) group, with 12 animals per group. In addition, 12 rats were separated from the common carotid artery and external carotid artery without the suture plug and used as the Sham group. After group administration, a Morris water maze test was used to evaluate the cognitive function of the rats. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used to detect the cerebral infarction of rats in each group. TUNEL staining was used to determine the hippocampal neuron apoptosis rate of rats in each group. Kits were used to measure the levels of serum inflammatory factor inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1 β (IL-1 β) levels, brain catalase (CAT), reactive oxygen species (ROS), and malondialdehyde (MDA) in the brain tissues of the rats. Western blotting was used to detect the expression of apoptosis-related proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), BCL2-associated X protein (Bax), and LKB1/AMPK pathway related proteins (p-LKB1/LKB1, p-LKB1/LKB1, p-AMPK/AMPK) in the brain tissues. **Results** Compared with the Sham operation group, the number of times crossing the original platform, residence time in the original platform quadrant, brain tissue CAT content, p-LKB1/LKB1, p-AMPK/AMPK, and Bcl-2 expression levels in the Model group were significantly less ($P < 0.05$), and the cerebral infarction area, hippocampal neuron apoptosis rate, serum iNOS and IL-1 β levels, brain tissue ROS and MDA content, and Bax expression level were significantly greater ($P < 0.05$). Compared with the Model group, the number of times crossing the original platform, residence time in the original platform quadrant, brain tissue CAT content, p-LKB1/LKB1, p-AMPK/AMPK, and Bcl-2 expression levels in the Paeoniflorin group were significantly greater ($P < 0.05$), the cerebral infarction area, hippocampal neuron apoptosis rate, serum iNOS and IL-1 β levels, brain tissue ROS and MDA contents, and Bax expression level were significantly less ($P < 0.05$). CC can reverse the protective effect of paeoniflorin in a rat cerebral infarction. **Conclusions** Paeoniflorin may activate the LKB1/AMPK signal to prevent the occurrence and development of inflammation, reduce the oxidative stress level, reduce brain tissue infarction and hippocampal neuronal apoptosis in rats, improve cognitive function, and play a role in protecting nerves. CC can reduce the protective effect of paeoniflorin in a rat cerebral infarction.

[Keywords] paeoniflorin; liver kinase B1/5'-amp activated protein kinase; acute cerebral infarction; nerve injury; protective effect

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

急性脑梗死 (acute cerebral infarction, ACI) 是一种常发生于中老年人群的脑血管疾病, 发病率高, 病情进展快, 治愈困难, 可导致偏瘫、认知功能障碍等后遗症, 是我国主要的致死、致残疾病之一^[1-2]。ACI 发病机制复杂, 抗炎因子和致炎因子表达失衡引发的炎症在其中发挥着重要作用, 研究显示, 抑制炎症, 降低氧化应激水平, 可减轻缺血再灌注脑组织损伤, 改善 ACI 引发的神经功能障碍^[3-4]。

芍药苷是从芍药中提取的活性成分, 具有抗炎、抗过敏、抗氧化及改善认知等多种生物学效应, 可通过抑制 NLRP3 炎症小体信号激活而减轻脑缺血再灌注损伤^[5], 还可激活 SIRT1/NF- κ B 信号通路, 改善缺氧缺血性脑损伤新生大鼠认知功能^[6], 是治疗 ACI 的一种重要药物, 但其治疗 ACI 的机制还未有具体定论。肝激酶 B1 (liver kinase B1, LKB1)/5'-磷酸腺苷激活的蛋白激酶 (5'-amp activated protein kinase, AMPK) 是调控脂质代谢、氧化应激和炎症的重要通路。上调 SIRT1 表达, 可激活 LKB1/AMPK 信号通路, 显著减轻氧化应激损伤,

抑制脂质合成^[7-8], 还可通过减轻炎症、氧化应激和神经细胞凋亡来改善 ACI 引发的脑损伤^[9]。因而推测激活 LKB1/AMPK 信号通路可能是芍药苷治疗 ACI 的药理机制。本文以线栓闭塞大鼠大脑中动脉的方法建立 ACI 模型, 探讨芍药苷通过激活 LKB1/AMPK 信号通路对其神经损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

60 只 SPF 级健康成年 SD 大鼠, 雌雄各半, 8 周龄, 体重 290 ~ 310 g, 购自北京华阜生物科技股份有限公司【SCXK (京) 2019-0008】, 分笼饲养在河南中医药大学动物房中【SYXK (豫) 2020-0004】, 室内温度、相对湿度分别设为 (24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、55% $\pm$ 5%, 12 h/12 h 明暗交替照明, 大鼠自由饮水采食, 饲喂普通维持饲料购于江苏省协同医药生物工程有限公司。大鼠适应性饲养 1 周后进行研究。本研究符合本校动物实验与伦理审查 (2021-0003)。

1.1.2 主要试剂与仪器

芍药苷(纯度 $\geq 98\%$, 货号 VTY31585), 购于北京德航五洲科技有限公司; AMPK 的抑制剂 Compound C (CC) (货号 HY-13418A), 购于美国 MedChemExpress 公司; 三苯基氯化四氮唑 (Triphenyltetrazolium chloride, TTC) (货号 T8170)、高效 RIPA 裂解液(货号 R0010)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(货号 T2190), 购于北京索莱宝科技有限公司; 大鼠诱导型一氧化氮合酶 (Inducible nitric oxide synthase, iNOS) 酶联免疫吸附测定 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒(货号 SBJ-R00), 购于上海木来科技有限公司; 白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 试剂盒(货号 H002)、活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 测定试剂盒(货号 E004-1-1), 购于南京建成生物工程研究所有限公司; 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒(货号 ab238537)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活性测定试剂盒(货号 ab83464)、BCA 蛋白检测试剂盒(货号 ab102536)、兔源 Anti-B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 一抗(货号 ab194583)、兔源 Anti- β -actin 一抗(货号 ab8227)、羊抗兔二抗(货号 ab150077)、兔源 Anti-BCL2 相关 X 蛋白 (BCL2-associated X protein, Bax) 一抗(货号 ab32503), 购于美国 Abcam 公司; 兔源 Anti-LKB1 一抗(货号 AF7389)、兔源 Anti-p-AMPK 一抗(货号 AF5908)、兔源 Anti-AMPK 一抗(货号 AF6195), 购于上海碧云天生物技术有限公司; 兔源 Anti-p-LKB1 一抗(货号 sc-271924) 购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司等。

MG-3Y 迷宫刺激器, 成都泰盟科技有限公司产品; Morris 水迷宫, 购自安徽正华生物仪器设备有限公司; 自动酶标仪购于美国伯腾公司, 型号 2010ELX-808; 包埋机、倒置光学显微镜、切片机购于德国 Leica 公司, 型号 EG1160、DMI3000B、CM3050S; 高通量垂直电泳仪、转印电泳仪购于北京六一生物科技有限公司, 型号 DYCZ-20H、DYCZ-40K; 蛋白凝胶成像仪购于美国 Bio-Rad 公司, 型号 170-8200 等。

1.2 方法

1.2.1 ACI 大鼠模型制备及分组给药

参照文献制备 ACI 大鼠模型^[10]; 大鼠禁食不禁水 12 h, 腹腔注射 45 mg/kg 戊巴比妥钠, 待大鼠进入深度麻醉状态后仰卧固定, 颈部备皮消毒后切开

皮肤、肌肉组织, 找到颈总动脉、颈外动脉与颈内动脉, 将其游离, 永久结扎颈外动脉远心端, 暂时夹闭颈总动脉近心端和颈内动脉远心端, 于距离分叉处 2 mm 的颈外动脉处作切口, 插入圆头线栓, 沿颈内动脉前进至圆头端距离分叉处约 16 mm 为止, 2 h 后取出线栓, 恢复供血, 即完成造模, 将其随机分为模型组、芍药苷组、CC 组、芍药苷 + CC 组, 每组 12 只, 另取 12 只大鼠仅分离出颈总动脉、颈外动脉与颈内动脉, 不插线栓, 作为假手术组。

将芍药苷与 CC 分别溶于 0.9% 氯化钠溶液, 获得 1 mg/mL 的芍药苷药液^[10], 0.02 mg/mL 的 CC 药液^[11], 芍药苷 + CC 组大鼠以 10 mL/kg 剂量的芍药苷药液每天灌胃干预 1 次, 同时以 10 mL/kg 剂量的 CC 药液每天尾静脉注射干预 1 次; 芍药苷组大鼠以 10 mL/kg 剂量的芍药苷药液每天灌胃干预 1 次, 同时以 10 mL/kg 剂量的 0.9% 氯化钠溶液每天尾静脉注射干预 1 次; CC 组大鼠以 10 mL/kg 剂量的 0.9% 氯化钠溶液每天灌胃干预 1 次, 同时以 10 mL/kg 剂量的 CC 药液每天尾静脉注射干预 1 次, 共给药 14 d。假手术组与模型组在相应位置注射等量 0.9% 氯化钠溶液。

1.2.2 检测大鼠认知功能

药物干预结束后 24 h, 通过 Morris 水迷宫实验检测大鼠认知功能: 将大鼠面朝水池 (水深 22 cm, 有 4 个等大的象限) 壁放入水中, 训练其寻找平台 (位于象限正中, 高 20 cm), 5 d 后撤去平台, 将大鼠自每个象限面朝水池壁依次放入水中, 记录其 60 s 内运动轨迹, 分析得到各组大鼠跨越原平台次数及原平台象限内停留时间^[12]。

1.2.3 检测大鼠脑梗死情况及标本收集

Morris 水迷宫实验结束后, 以 1.2.1 中的方法麻醉大鼠, 自颈总动脉抽血, 静置离心, 取出上清, 放置于干净 EP 管中分组标记, 在 -80°C 保存。各组大鼠中任意选出 6 只, 断头后分离出大脑, 切片得到厚度大致相同的冠状切片, 将其浸入 TTC 溶液中染色, 然后固定、拍照, 使用 Image pro 软件进行图像分析, 计算出脑梗死面积 (%) = 全脑梗死面积 / 全脑片面积 $\times 100\%$ 。将各组剩余的 6 只大鼠断头分离出大脑后, 剪下 1.2 g 脑组织, 剪成小碎块后加入适量高效 RIPA 裂解液, 匀浆离心, 以 BCA 试剂盒测量上清中蛋白总浓度后, 将其分组标记, 在 -80°C 保存; 剩余脑组织漂洗、固定、脱水后, 以仪器进行包埋、切片备用。

1.2.4 检测大鼠海马神经元凋亡情况

选出 1.2.3 中含有完整海马结构的脑组织切片,进行脱蜡、水化、TUNEL 染色、脱水、透明、封片,镜下观察着色情况,以 Image pro 软件分析图像,计算出凋亡率(%)= 凋亡细胞数/总细胞数 $\times$ 100%,具体操作参照试剂盒说明书指导进行。

1.2.5 检测大鼠血清 iNOS 与 IL-1 β 水平、脑组织 CAT、ROS 与 MDA 含量

取出 1.2.3 中血清与脑组织蛋白样品液,以冰水浴缓慢解冻,各取出 0.15 mL,测定血清 iNOS 与 IL-1 β 水平、脑组织 CAT、ROS 与 MDA 含量,具体操作参照试剂盒说明书指导进行。

1.2.6 检测大鼠脑组织凋亡蛋白与 LKB1/AMPK 通路相关蛋白表达

取出 1.2.5 中剩余的脑组织蛋白样品液,根据蛋白浓度测定结果将其调至各组相等,然后加入适量上样缓冲液,变性蛋白(煮沸,5 min),取 20 μ L 样品液,依次通过电泳、湿转实验,将总蛋白分离后转至 PVDF 膜上,以 3% 牛血清白蛋白溶液封闭蛋白非特异位点,分别以兔源 Bcl-2、Bax、p-LKB1、LKB1、p-AMPK、AMPK、 β -actin 一抗孵育、TBST 洗膜、二抗孵育、TBST 洗膜、化学发光法显影、拍照,使用 Image pro 软件分析蛋白条带图像灰度值,计算出各组蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析

实验数据为计量资料,均采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 24.0 软件统计分析,多组间比较行单因素方差,组间两两进一步比较采用 SNK- q 检验分析, $P < 0.05$,表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠认知功能检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间显著降低($P < 0.05$)。与模型组、芍药苷 + CC 组分别相比,芍药苷组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间均显著升高($P < 0.05$),CC 组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间均显著降低($P < 0.05$)(见表 1)。

2.2 各组大鼠脑梗死情况检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠脑梗死面积显著升高($P < 0.05$)。与模型组、芍药苷 + CC 组分别相比,芍药苷组大鼠脑梗死面积均显著降低($P < 0.05$);CC 组大鼠脑梗死面积均显著升高($P < 0.05$)(见图 1、表 2)。

表 1 各组大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Comparison of times of crossing the original platform and residence time in the original platform quadrant of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Groups	跨越原平台次数(n) Times of crossing the original platform(n)	原平台象限内停留时间(s) Dwell time in quadrant of original platform(s)
假手术组 Sham operation group	13.01 $\pm$ 3.12	34.76 $\pm$ 4.07
模型组 Model group	6.28 $\pm$ 0.54 ^a	21.93 $\pm$ 2.02 ^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	8.26 $\pm$ 1.22 ^{bc}	26.54 $\pm$ 2.75 ^{bc}
CC 组 CC group	1.02 $\pm$ 0.11 ^{bc}	7.01 $\pm$ 1.63 ^{bc}
芍药苷 + CC 组 Paeoniflorin + CC group	6.79 $\pm$ 0.68	23.04 $\pm$ 2.28

注:与假手术组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与芍药苷 + CC 组相比,^c $P < 0.05$ 。(下表同)

Note. Compared with sham operation group, ^a $P < 0.05$. Compared with model group, ^b $P < 0.05$. Compared with paeoniflorin + CC group, ^c $P < 0.05$. (The same in the following tables)

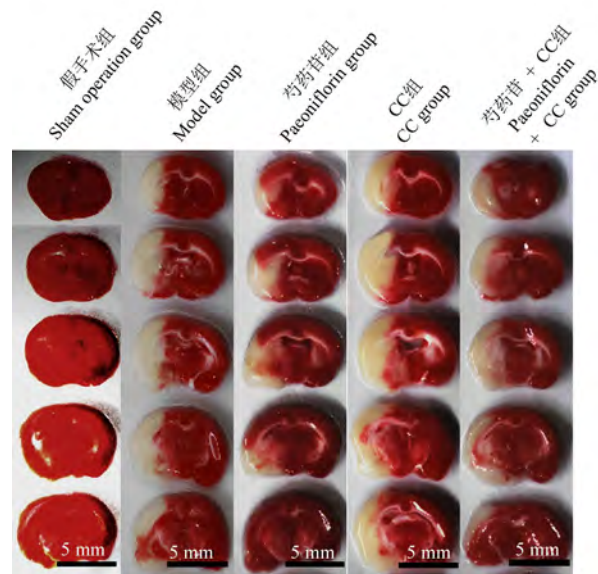


图 1 TTC 染色检测各组大鼠脑梗死情况

Figure 1 TTC staining was used to detect the cerebral infarction of rats in each group

2.3 各组大鼠海马神经元凋亡情况检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠海马神经元凋亡率显著升高($P < 0.05$)。与模型组、芍药苷 + CC 组分别相比,芍药苷组大鼠海马神经元凋亡率均显著降低($P < 0.05$);CC 组大鼠海马神经元凋亡率均显著升高($P < 0.05$)(见图 2、表 3)。

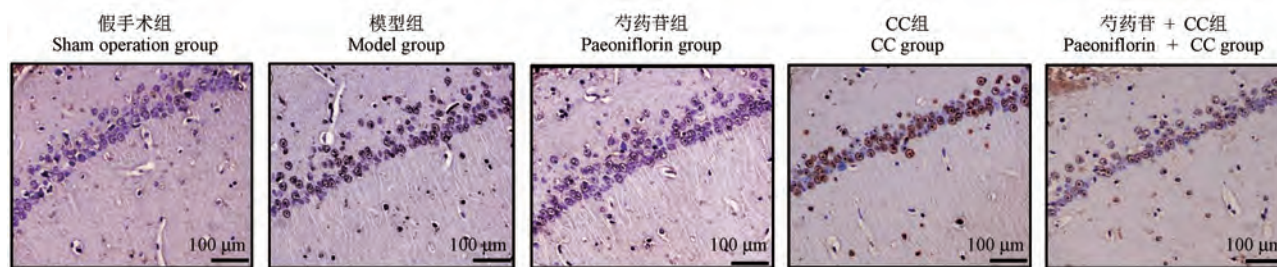


图 2 TUNEL 染色检测各组大鼠海马神经元凋亡情况

Figure 2 TUNEL staining was used to detect the apoptosis of hippocampal neurons in each group

表 2 各组大鼠脑梗死面积比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Comparison of cerebral infarction area of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	脑梗死面积(%) Cerebral infarction area(%)
假手术组 Sham operation group	0.00 ± 0.00
模型组 Model group	26.10 ± 1.36 ^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	9.25 ± 0.92 ^{bc}
CC 组 CC group	45.32 ± 4.01 ^{bc}
芍药苷 + CC 组 Paeoniflorin + CC group	24.86 ± 1.75

表 3 各组大鼠海马神经元凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 3 Comparison of apoptosis rate of hippocampal neurons in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	凋亡率(%) Apoptosis rate(%)
假手术组 Sham operation group	1.20 ± 0.36
模型组 Model group	26.07 ± 1.25 ^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	5.13 ± 0.86 ^{bc}
CC 组 CC group	59.34 ± 5.25 ^{bc}
芍药苷 + CC 组 Paeoniflorin + CC group	25.78 ± 1.62

2.4 各组大鼠血清炎症因子 iNOS 与 IL-1 β 水平检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠血清炎症因子 iNOS 与 IL-1 β 水平显著升高($P < 0.05$)。与模型组、芍药苷 + CC 组分别相比,芍药苷组大鼠血清炎症因子 iNOS 与 IL-1 β 水平均显著降低($P < 0.05$); CC 组大鼠血清炎症因子 iNOS 与 IL-1 β 水平均显著升高($P < 0.05$)(见表 4)。

表 4 各组大鼠血清炎症因子 iNOS 与 IL-1 β 水平比较结果($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 4 Serum inflammatory factors iNOS and IL-1 of rats in each group β Horizontal comparison results($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Groups	iNOS (U/mL)	IL-1 β (pg/mL)
假手术组 Sham operation group	15.16 ± 3.25	62.43 ± 5.89
模型组 Model group	67.43 ± 8.09 ^a	117.39 ± 10.54 ^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	17.08 ± 3.56 ^{bc}	64.28 ± 7.21 ^{bc}
CC 组 CC group	108.02 ± 10.15 ^{bc}	168.46 ± 12.96 ^{bc}
芍药苷 + CC 组 Paeoniflorin + CC group	65.37 ± 8.61	115.25 ± 9.12

2.5 各组大鼠脑组织氧化应激水平检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 CAT 含量显著降低($P < 0.05$),ROS、MDA 含量显著升高($P < 0.05$)。与模型组、芍药苷 + CC 组分别相比,芍药苷组大鼠脑组织 CAT 含量均显著升高($P < 0.05$),ROS、MDA 含量均显著降低($P < 0.05$); CC 组大鼠脑组织 CAT 含量均显著降低($P < 0.05$),ROS、MDA 含量均显著升高($P < 0.05$)(见表 5)。

表 5 各组大鼠脑组织 CAT、ROS 与 MDA 含量比较结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 5 Comparison results of cat, ROS and MDA contents in brain tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	CAT (U/mg prot)	ROS (U/kg prot)	MDA (nmol/mg prot)
假手术组 Sham operation group	6.59 ± 0.71	0.92 ± 0.21	1.12 ± 0.13
模型组 Model group	2.65 ± 0.18	6.84 ± 0.67 ^a	3.90 ± 0.35 ^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	6.17 ± 0.83 ^{bc}	1.14 ± 0.32 ^{bc}	1.20 ± 0.29 ^{bc}
CC 组 CC group	0.68 ± 0.15 ^{bc}	12.38 ± 2.26 ^{bc}	6.04 ± 0.41 ^{bc}
芍药苷 + CC 组 Paeoniflorin + CC group	2.92 ± 0.39	6.57 ± 0.84	3.71 ± 0.39

2.6 各组大鼠脑组织凋亡相关蛋白 (Bcl-2、Bax) 与 LKB1/AMPK 通路相关蛋白 (p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK) 表达检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Bax 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,芍药苷组大鼠脑组织 p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Bax 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); CC 组大鼠脑组

织 p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Bax 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), p-LKB1/LKB1 水平无显著性差异 ($P > 0.05$)。与芍药苷 + CC 组相比,芍药苷组大鼠脑组织 p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Bax 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), p-LKB1/LKB1 水平无显著性差异 ($P > 0.05$); CC 组大鼠脑组织 p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK、Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Bax 表达水平显著升高 ($P < 0.05$) (见图 3, 表 6)。

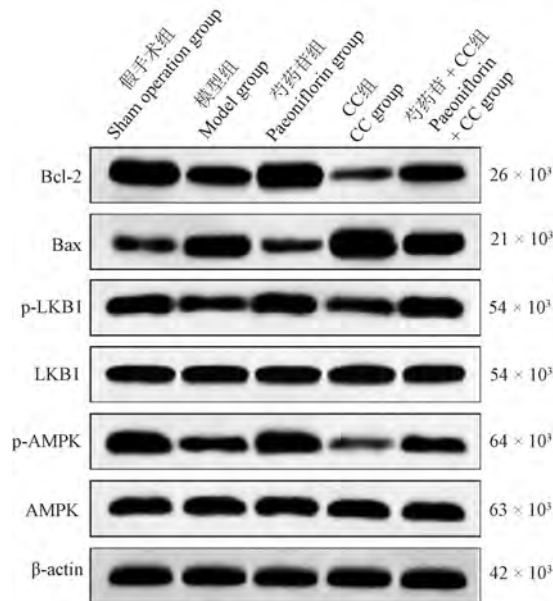


图 3 免疫印迹检测各组大鼠脑组织凋亡相关蛋白与 LKB1/AMPK 通路相关蛋白表达水平

Figure 3 Expression levels of apoptosis related proteins and LKB1/AMPK pathway related proteins in rat brain were detected by Western Blot

表 6 各组大鼠凋亡相关蛋白与 LKB1/AMPK 通路相关蛋白相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Comparison of relative expression levels of apoptosis related proteins and LKB1/AMPK pathway related proteins in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	p-LKB1/LKB1	p-AMPK/AMPK
假手术组 Sham operation group	1.84 ± 0.37	0.22 ± 0.07	1.31 ± 0.28	1.68 ± 0.33
模型组 Model group	0.71 ± 0.14^a	1.48 ± 0.23^a	0.47 ± 0.09^a	0.72 ± 0.12^a
芍药苷组 Paeoniflorin group	1.79 ± 0.42^{bc}	0.25 ± 0.08^{bc}	1.26 ± 0.25^b	1.64 ± 0.41^{bc}
CC 组 CC group	0.12 ± 0.03^{bc}	2.13 ± 0.31^{bc}	0.45 ± 0.08^c	0.18 ± 0.05^{bc}
芍药苷+CC 组 Paeoniflorin + CC group	0.74 ± 0.13	1.45 ± 0.29	1.23 ± 0.30	0.76 ± 0.14

3 讨论

ACI 具有高发病率、高病死率、高致残率等特点,我国每年因此而致死致残的人数众多,所花费

的金钱、精力、时间给患者家庭带来了沉重的负担,极大降低了患者及其家庭的生活质量,是目前神经临床医学亟需解决的热点和难点问题^[13]。线栓法构建的大脑中动脉栓塞模型是常用的模拟动物脑

缺血损伤的模型之一,被广泛应用于脑部缺血疾病的研究,可较好类比人脑缺血损伤的病理机制。因此本文以线栓闭塞大鼠大脑中动脉的方法建立急性脑梗死模型,结果显示,造模大鼠脑梗死面积、血清 iNOS 与 IL-1 β 水平、脑组织 ROS 与 MDA 含量、Bax 表达水平显著升高,导致强烈的炎症及氧化应激,造成大鼠海马神经元凋亡,跨越原平台次数、原平台象限内停留时间降低,学习认知能力受损,提示模型构建成功。

芍药苷作为具有很强抗炎、抗氧化作用的天然活性物质,可抑制 NLRP3 炎症小体信号,进而延缓视网膜缺血性损伤^[14],还可减少氯化钴诱导的神经细胞 PC12 内 ROS 水平,降低氧化应激水平,抑制细胞凋亡,并对脑缺血再灌注损伤大鼠起到明显的神经保护作用^[5,15],半暗带损伤是脑梗死不良预后的主要原因,其具有可逆性,及时采取药物恢复血流可恢复半暗带损伤。氧自由基增多可能会促进半暗带细胞的凋亡,因此抑制氧自由基的释放,恢复半暗带区域的神经元活力是治疗脑缺血损伤的方法之一。本研究芍药苷处理的 ACI 大鼠脑组织脑梗死面积明显减少,ROS 与 MDA 含量、海马神经凋亡比例降低,CAT 含量升高,脑梗死面积减少的可能原因是芍药苷清除氧自由基,促进了缺血半暗带的转换,脑梗死面积减少。同时芍药苷处理大鼠跨越原平台次数、原平台象限内停留时间升高,大鼠认知功能提升,证实了芍药苷对 ACI 大鼠的疗效。此外芍药苷处理大鼠血清 iNOS 与 IL-1 β 水平降低,表明芍药苷可抑制致炎因子表达,阻碍炎症发生与进展。

脑组织缺血再灌注引发的严重炎症反应和高水平的氧化应激造成神经元细胞变性凋亡,是 ACI 的主要致病基础,抑制炎症及脂质过氧化是减轻 ACI 所致神经损伤的有效手段^[16-17]。LKB1/AMPK 作为机体调控炎症与氧化应激反应的重要通路,在脑损伤、阿尔茨海默病、帕金森病等神经系统疾病的发病及病情进展过程中发挥着关键作用,促进 LKB1、AMPK 的磷酸化激活,可通过促进自噬抑制氧-葡萄糖剥夺/复氧诱导的神经细胞 PC12 凋亡^[18],还可减轻神经炎症,缓解脑缺血再灌注引发的氧化应激损伤,起到神经保护作用^[9,19-20]。由此可知,LKB1/AMPK 信号是 ACI 的一个重要治疗靶点。本文结果显示,芍药苷干预可阻止 ACI 大鼠脑组织 p-LKB1/LKB1、p-AMPK/AMPK 水平的降低,

以 AMPK 抑制剂 CC 处理 ACI 大鼠,可加重神经炎症及氧化应激反应,增强脑梗死及海马神经元凋亡,导致大鼠认知功能进一步受损,并可减弱芍药苷改善 ACI 大鼠脑损伤的作用,逆转其对大鼠的神经保护功能,表明芍药苷可通过激活 LKB1/AMPK 信号通路,阻碍氧化应激与炎症反应发生发展,减轻脑梗死及海马神经元凋亡,增强 ACI 大鼠认知能力,改善其神经功能。

综上所述,芍药苷可增强 LKB1、AMPK 的磷酸化,清除氧自由基,减少炎性细胞因子表达,减轻神经炎症,减弱氧化应激,抑制脑梗死与海马神经元凋亡,修复 ACI 大鼠认知功能,起到神经保护作用,促进 LKB1/AMPK 信号传导是其药理机制之一。

参 考 文 献 (References)

- [1] 阮中繁, 谢明, 李艳, 等. 参麦对急性脑梗死小鼠脑组织的保护作用及相关机制的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 23-27.
Ruang ZF, Xie M, Li Y, et al. Exploration of the protective effect of shenmai injection on brain tissue and its related mechanisms in a mouse model of cerebral infarction [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 23-27.
- [2] Liu L, Zhang L. Posterior reversible encephalopathy syndrome coexists with acute cerebral infarction: challenges of blood pressure management [J]. Quant Imaging Med Surg, 2020, 10(12): 2356-2365.
- [3] 何明月, 陆菁菁. 炎症与急性缺血性脑卒中出血转化研究进展 [J]. 中华神经科杂志, 2020, 53(9): 732-735.
He MY, Lu JJ. Research progress of update on inflammation and hemorrhagic transformation [J]. Chin J Neurol, 2020, 53(9): 732-735.
- [4] 王志成, 吕晓红. 缺血性脑卒中的氧化应激相关因子研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2013, 30(1): 87-89.
Wang ZC, Lv XH. Research progress of oxidative stress related factors in ischemic stroke [J]. J Apoplexy and Nervous Diseases, 2013, 30(1): 87-89.
- [5] 刘湘, 乔丽菲, 刘垚君, 等. 芍药苷对脑缺血再灌注损伤大鼠 NLRP3 炎症体信号通路相关因子表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(10): 40-44.
Liu X, Qiao LF, Liu YJ, et al. Effect of paeoniflorin on the expression of NLRP3 inflammatory signal pathway related factors in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Inform Tradit Chin Med, 2019, 26(10): 40-44.
- [6] 刘延霞, 涂丰霞, 林则彬. 芍药苷对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠认知功能的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(24): 3992-3994.
Liu YX, Tu FX, Lin ZB. Effect of paeoniflorin on cognitive function in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain injury [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(24): 3992-3994.
- [7] Sharma A, Anand SK, Singh N, et al. Berbamine induced

- activation of the SIRT1/LKB1/AMPK signaling axis attenuates the development of hepatic steatosis in high-fat diet-induced NAFLD rats [J]. *Food Funct*, 2021, 12(2): 892-909.
- [8] Li X, Liu J, Hu H, et al. Dichloroacetate ameliorates cardiac dysfunction caused by ischemic insults through AMPK signal pathway-not only shifts metabolism [J]. *Toxicol Sci*, 2019, 167(2): 604-617.
- [9] Cai Z, Wang C, Chen Y, et al. An antioxidant role by minocycline via enhancing the activation of LKB1/AMPK signaling in the process of cerebral ischemia injury [J]. *Curr Mol Med*, 2018, 18(3): 142-151.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84.
- [11] 马蒂达, 吴洋, 王显, 等. 桃叶珊瑚苷通过 AMPK/NLRP3 通路对心肌梗死大鼠心功能的影响及机制 [J]. *贵州医科大学学报*, 2021, 46(7): 773-780.
- Ma DD, Wu Y, Wang X, et al. Effect and mechanism of aucubin on cardiac function in rats with myocardial infarction through AMPK/NLRP3 pathway [J]. *J Guizhou Med Univ*, 2021, 46(7): 773-780.
- [12] 何磊, 陈军, 陈丽莉, 等. 应用 Morris 水迷宫实验评估银屑病对小鼠模型认知功能的影响 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2019, 52(11): 836-839.
- He L, Chen J, Chen LL, et al. Evaluation of the effect of psoriasis on cognitive function of mouse model by Morris water maze test [J]. *Chin J Dermatol*, 2019, 52(11): 836-839.
- [13] Song XD, Li SX, Zhu M. Plasma miR-409-3p promotes acute cerebral infarction via suppressing CTRP3 [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(4): 324-333.
- [14] 杨佩瑶, 赵军, 张娟美, 等. 芍药苷通过调控 NLRP3 炎症小体保护视网膜缺血性损伤 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2019, 36(12): 920-924.
- Yang PY, Zhao J, Zhang JM, et al. Paeoniflorin protects retinal ischemic injury by regulating NLRP3 inflammatory bodies [J]. *Chin J Expophthalmol*, 2019, 36(12): 920-924.
- [15] 雷昌, 黄丹, 向韵, 等. 芍药苷对氯化钴诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. *中成药*, 2020, 42(10): 2605-2610.
- Lei C, Huang D, Xiang Y, et al. Protective effect of paeoniflorin on oxidative stress injury of PC12 cells induced by cobalt chloride [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2020, 42(10): 2605-2610.
- [16] Yan W, Sun W, Fan J, et al. Sirt1-ROS-TRAF6 signaling-induced pyroptosis contributes to early injury in ischemic mice [J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36(8): 845-859.
- [17] Feng W, Liu G, Qin J. Ginkgo biloba damo injection combined with troxerutin regulates the TLR4/NF- κ B pathway and promotes the recovery of patients with acute cerebral infarction [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(4): 3344-3350.
- [18] Zhao DY, Yu DD, Ren L, et al. Ligustilide protects PC12 cells from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis via the LKB1-AMPK-mTOR signaling pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(3): 473-481.
- [19] Qiao P, Ma J, Wang Y, et al. Curcumin prevents neuroinflammation by inducing microglia to transform into the M2-phenotype via CaMKK β -dependent activation of the AMP-activated protein kinase signal pathway [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2020, 17(8): 735-752.
- [20] Cai ZY, Wang CL, Lu TT, et al. Berberine alleviates amyloid-beta pathogenesis via activating LKB1/AMPK signaling in the brain of APP/PS1 transgenic mice [J]. *Curr Mol Med*, 2019, 19(5): 342-348.

[收稿日期] 2021-11-09

陈志衡, 吴刘成, 景谨, 等. SMA模型小鼠骨髓间充质干细胞体外培养体系的建立[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 679-685.

Chen ZH, Wu LC, Jing J, et al. An *in vitro* culture system for bone marrow mesenchymal stem cells in a mouse SMA model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 679-685.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.011

SMA模型小鼠骨髓间充质干细胞体外培养体系的建立

陈志衡^{1,2}, 吴刘成¹, 景谨¹, 朱顺星^{1*}

(1. 南通大学实验动物中心, 江苏 南通 226001; 2. 南通大学江苏省教育部神经再生重点实验室, 江苏 南通 226001)

【摘要】 目的 建立脊髓型肌萎缩症(SMA)小鼠骨髓间充质干细胞(BMMSC)体外培养体系, 研究反义寡核苷酸(ASO)对其生物学特性的影响, 为深入研究 SMA 发病机制及药物筛选提供可靠的体内模拟工具细胞。**方法** 选取刚出生 4 d 的 SMA 小鼠, CO₂ 窒息法处死后, 于 75%乙醇中浸泡, 分离、纯化骨髓细胞。细胞荧光检测细胞表面标志物; RT-PCR 及 Western Blot 研究 ASO 对运动神经元存活基因 2(SMN2)外显子(exon7)列入水平以及运动神经元存活(SMN)蛋白表达量; EDU 法和 TUNEL 法检测细胞增殖和凋亡能力。**结果** 体外分离培养的 SMA 模型小鼠 BMMSC 具有贴壁生长、可以传代等特点; 对 P3 代 BMMSC 进行细胞免疫荧光鉴定结果显示: CD44、CD29 高表达, CD34、CD45 低表达; 转染 ASO 后细胞 SMN2 exon7 列入率显著上升以及 SMN 蛋白表达量显著上调, 并显著促进细胞增殖能力, 同时核内 Gemini bodies(gems)数量也有所增多。**结论** 成功建立 SMA 小鼠 BMMSC 体外培养体系, 通过阳性药物 ASO 验证可促进 BMMSC SMN2 exon7 列入及 SMN 蛋白表达, 为 SMN2 相关调控机制及药物筛选提供一种新的工具细胞。

【关键词】 SMA 小鼠; 骨髓间充质干细胞; ASO; 运动神经元存活 2 基因; 细胞增殖

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0679-07

An *in vitro* culture system for bone marrow mesenchymal stem cells in a mouse SMA model

CHEN Zhiheng^{1,2}, WU Liucheng¹, JING Jin¹, ZHU Shunxing^{1*}

(1. Laboratory Animal Center of Nantong University, Nantong 226001, China. 2. Key Laboratory of Neuroregeneration of Jiangsu and Ministry of Education of Nantong University, Nantong 226001)

Corresponding author: ZHU Shunxing. E-mail: ZSX@ntu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a culture system of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) *in vitro* in a mouse spinal muscular atrophy (SMA) model, study the antisense oligonucleotide (ASO) influence of its biological characteristics, and establish a reliable simulation tool with the SMA model for the in depth study of the pathogenesis of SMA and drug screening. **Methods** The marrow of the femur and humeral bones of four-day-old SMA mice were harvested. The surface markers of BMMSCs were identified by immunofluorescence. The survival motor neuron gene 2 (SMN2) exon7 inclusion level and survival motor neuron (SMN) protein expression were detected by RT-PCR and Western Blot. The cell proliferation and apoptosis were detected by an EDU kit and TUNEL kit. **Results** The BMMSCs isolated and cultured *in vitro* from SMA mice showed adherent growth and the ability to passage. P3 generation BMMSCs were identified by cellular immunofluorescence, in which the positive markers of CD44 and CD29 were highly expressed, and the negative markers of CD34 and CD45 expression were low. SMN2 exon7 inclusion and SMN protein expression increased significantly after ASO transfected the cells, and the proliferation was significantly promoted, while the number of

[作者简介] 陈志衡(1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 神经退行性疾病。Email: 1634917858@qq.com

[通信作者] 朱顺星(1968—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 疾病动物模型。Email: ZSX@ntu.edu.cn

gemi bodies within the nucleus also increased. **Conclusions** A BMMSC *in vitro* culture system for SMA mice was successfully established to promote the inclusion of BMMSC *SMN2* exon7 and the expression of SMN protein via ASO verification as a new tool cell for the study of *SMN2*-related regulatory mechanisms and drug screening.

【Keywords】 SMA mice; BMMSC; ASO; *SMN2*; cell proliferation

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

脊髓性肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA), 一种罕见的由于脊髓前角发生退行性病变, 导致运动神经元功能退化、肌肉萎缩的常染色体隐性的神经退行性遗传病^[1-2], 是婴儿致死率最常见的遗传性神经疾病之一, 在新生儿中患病率达 1/6000^[2]。目前通过修正 *SMN2* (survival of motor neuron 2) 基因^[3]; 或增加 *SMN2* exon7 的列入^[4]; 或对患者的 *SMN1* 基因进行替代进而达到挽救 SMA 患者的效果^[5]。或将 SMA 患者皮肤成纤维细胞或尿液分离的肾小管上皮细胞诱导成 iPSC (induced pluripotent stem cells, 诱导多能干细胞), 进一步将 iPSC 诱导分化成运动神经元细胞, 进而对患者进行治疗^[6-7], 但是诱导产生 iPSC 的过程繁琐复杂、周期长。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC) 具有贴壁生长、增殖能力强、分化程度低等优点^[8-9], 目前已用于人、大鼠、小鼠等相关疾病模型的研究^[10], 但有关 SMA 模型小鼠骨髓间充质干细胞的研究暂无报道。本研究探索分离培养 SMA 模型小鼠的骨髓间充质干细胞, 并将其作为 SMA 相关药物研发及筛选的工具细胞, 为治疗 SMA 疾病相关药物的研发及筛选提供一种工具细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

所使用 SMA 模型鼠来源于 Jackson laboratory, 在南通大学实验动物中心保种扩繁【SCXK (苏) 2019-0001】。实验用 SPF 级 FVB. Cg-Smn1^{tm1Hung} Tg (*SMN2*) 2Hung/J 雄鼠 (*smn*^{-/-} *SMN2*^{2tg/2tg}) 4 只, 8 ~ 10 周龄, 体重在 28 ~ 30 g; 雌鼠 (*smn*^{-/-} *SMN2*^{2tg/2tg}) 8 只, 8 ~ 10 周龄, 体重在 22 ~ 25 g, 饲养于南通大学实验动物中心 SPF 级屏障【SYXK (苏) 2017-0045】。饲养环境: 温度 (21 ± 1) °C、相对湿度 (55 ± 5) %, 12 h/12 h 光/暗循环。将 1 雄和 2 雌进行配种繁殖, 自由采食、饮水, 定期更换笼具、垫料, 每日观察老鼠状态, 孕鼠及时分笼, 记录生产时间, 选取

刚出生 4 d 的小鼠 (基因型: *smn*^{-/-} *SMN2*^{2tg/2tg}) 8 只, 雌雄不拘, 体重在 2 ~ 4 g。实验过程中对小鼠的操作经南通大学动物伦理委员会伦理学审批 (S20201203-301)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DME/F12 (Hyclone, SH20023.01), FBS (Gibco, A3160802), 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, 2185855), Anti-SMN/Gemin 1 (Abcam, ab108531), Anti-integrin beta-1/CD29 (Proteintech, 12594-1-AP), Anti-CD44 (Proteintech 15675-1-AP), Anti-CD34 (Proteintech, 14486-1-AP), Anti-CD45 (Proteintech, 20103-1-AP), Anti-β-Actin (Santa Cruz, sc-47778), Anti-α-Tubulin (Cell Signaling Technology, #3873), LipofectamineTM 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific, L3000001), 抗荧光淬灭液 (含 DAPI) (Beyotime, P0131), EDU 检测试剂盒 (Beyotime, C0071S), TUNEL 检测试剂盒 (Vazyme, A112-01)。

NanoDropTM 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, OD-1000, 美国), 荧光显微镜 (OLYMPUS, BX51, 日本) 和倒置光学显微镜 (OLYMPUS, CKX31SF, 日本), MuLi 显影仪 (Tanon, Tanon-5200, 中国), 电泳仪及湿转膜系统 (BIO-Rad, PowerPac Basic, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 SMA BMMSC 原代培养

取出生 4 d 的 SMA 小鼠尾尖, 进行快速基因型鉴定, 选取基因型为 *smn*^{-/-} *SMN2*^{2tg/2tg} 的小鼠进行 BMMSC 提取分离实验: 将小鼠置于可封闭的安乐死装置中, 释放 CO₂ 使其窒息而亡, 于 75% 乙醇中浸泡, 取其四肢, 剥离肌肉, 取股骨以及肱骨骨髓, 用含 10% FBS 的 DME/F12 完全培养基培养, 次日进行换液^[11]。倒置显微镜观察细胞形态, 待其长满 (70% ~ 80%) 后记为 P0, 用 0.25% 胰酶消化, 进行传代培养。P3 代细胞用于后续实验。

1.2.2 SMA BMMSC 细胞鉴定

以每毫升 1 × 10⁶ 个将 P3 代细胞接种于含有小圆玻片的六孔板中, 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱内

过夜培养。次日,将小圆玻片固定,封闭后孵育一抗^[12-13],4℃过夜;第3天,洗去未结合的一抗,室温避光孵育荧光二抗2h,洗去未结合的二抗,加入抗荧光淬灭液(含 DAPI),封片,拍照。

1.2.3 SMA BMMSC 细胞转染

以每毫升 1×10^6 个将 P3 代细胞接种于六孔板中,待其长至 70% ~ 80% 进行细胞转染实验。设置空白对照组与实验组:实验组中加入 ASO10-29 (以下简称 ASO,一种反义寡核苷酸)^[14],37℃,5% CO₂ 培养箱培养 48 h。

1.2.4 RT-PCR 及 SMN2 FL 表达分析

利用 TRIzol 法收集 Total RNA,用 NanoDrop™1000 Spectrophotometer 检测细胞 Total RNA 浓度。取 1 μg Total RNA 进行逆转录反应,按 Reverse Transcriptase 试剂盒说明进行 RT-PCR 反应。以此 RT 产物为模板进行 PCR 反应(反应条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min 循环 35 次;72℃,7 min)。SMN 基因引物序列(5'-3') : Forward: ATAATCCCCCACCACCTCCC; Reverse: TTGCCACATACGCCTCACATAC。

取少量 PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳,120 V,30 min,核酸成像系统显影拍照。将剩下的 PCR 产物中加入 DdeI 限制性内切酶,37℃ 水浴,酶切过夜。次日,将酶切过夜的产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,110 V,60 min。核酸成像系统显影拍照,计算 SMN2 exon7 列入比率^[4]。

1.2.5 Western Blot

收集蛋白,使用 NanoDrop™1000 Spectrophotometer 检测蛋白浓度,调整上样量为 30 μg。用 10% PAGE 凝胶进行蛋白电泳,转 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,4℃ 孵育过夜,洗去未结合的一抗,室温孵育二抗 2 h,洗去未结合的二抗。用 MuLi 显影仪显影,Image J 软件对结果进行定量分析。

1.2.6 细胞免疫荧光检测 SMN 蛋白表达情况

将 P3 代细胞接种于含有小圆玻片的 12 孔板内,转染 48 h 后进行细胞免疫荧光实验。将小圆玻片固定、通透、封闭后,4℃ 孵育一抗过夜。第 2 天,洗去未结合的一抗,室温避光孵育二抗 2 h,加入抗荧光淬灭液(含 DAPI),封片,使用荧光显微镜拍照。

1.2.7 EDU 法检测 SMA BMMSC 细胞增殖

按照 EDU 检测试剂盒说明对转染 48 h 后的 P3 代细胞进行细胞增殖实验。每孔加入 500 μL 10 mol/L EDU 溶液,37℃ 孵育 2 h,洗去未反应的 EDU 溶液,4% 多聚甲醛固定,0.5% TritonX-100 进行通透,洗去通透液,每孔加入 500 μL Click 反应液,室温避光孵育 30 min,洗去未反应的 Click,加入抗荧光淬灭封片液(含 DAPI),封片,拍照。

1.2.8 TUNEL 法检测 SMA BMMSC 细胞凋亡

按照 TUNEL 检测试剂盒说明对转染 48 h 后的 P3 代细胞进行细胞凋亡实验。用 4% 多聚甲醛固定,洗去多聚甲醛溶液,加入 0.5% TritonX-100 进行通透,加入 $1 \times$ Equilibration Buffer 室温平衡 30 min,避光加入 50 μL TdT 缓冲液,37℃ 孵育 1 h,洗去未反应的 TdT,滴加抗荧光淬灭液(含 DAPI),封片,使用荧光显微镜拍照。

1.3 统计学分析

每组实验重复 3 次,使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行画图分析和 Image J 软件进行灰度分析。分组之间数据分析使用 *t* 检验, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

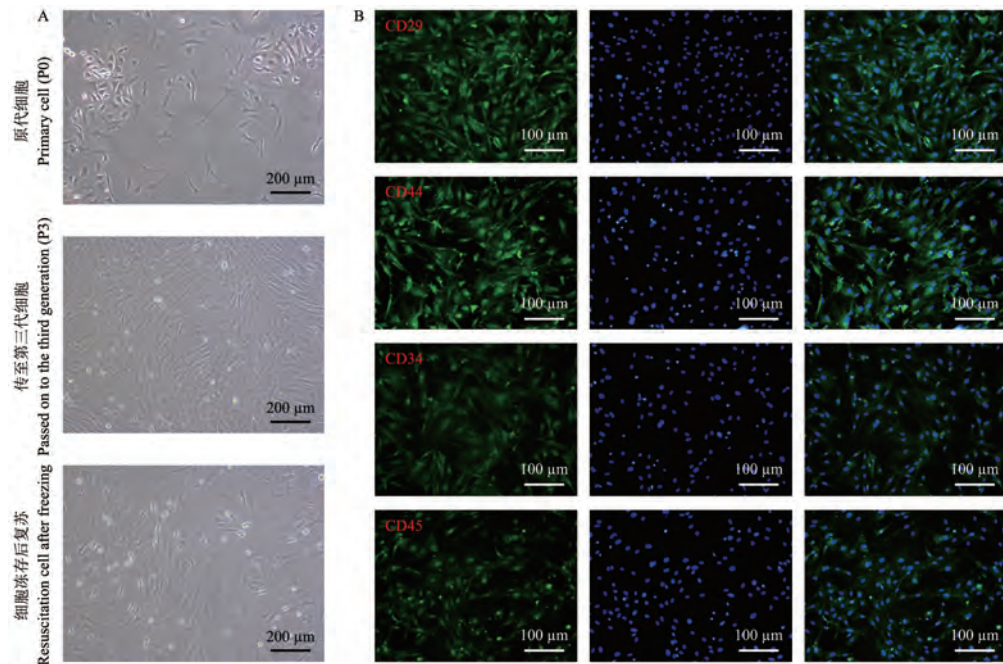
2 结果

2.1 SMA 小鼠 BMMSC 培养体系的建立

所提取分离、纯化的 SMA BMMSC 具有贴壁生长、可进行传代及可冻存等特点,细胞形态呈梭形或扁平型,传至 P3 代后细胞形态稳定(见图 1A)。对 P3 代 BMMSC 进行细胞免疫荧光鉴定实验,发现 BMMSC 表面标志物 CD29、CD44 分子均高表达,造血细胞表面标志物 CD34、CD45 分子不表达或低表达(见图 1B)。因此,所提取分离得到的 SMA 模型小鼠 BMMSC 具有骨髓间充质干细胞的特征。

2.2 ASO 显著促进 SMN2 exon7 列入水平及 SMN 蛋白表达

通过 PCR 及酶切反应结果表明:实验组与对照组相比 SMN2 exon7 的列入水平显著上升,SMN2 有功能的全长基因显著增多,SMN2 exon7 列入比率由原来的 46% 上升至 88% ($n = 3, P < 0.05$) (见图 2A,图 2B)。通过 Western Blot 实验结果表明:实验组与对照组相比 SMN 蛋白表达量显著上调,SMN/β-Actin 比值由原来的 1 上升至 2.2 ($n = 3, P < 0.05$) (见图 2C,图 2D)。

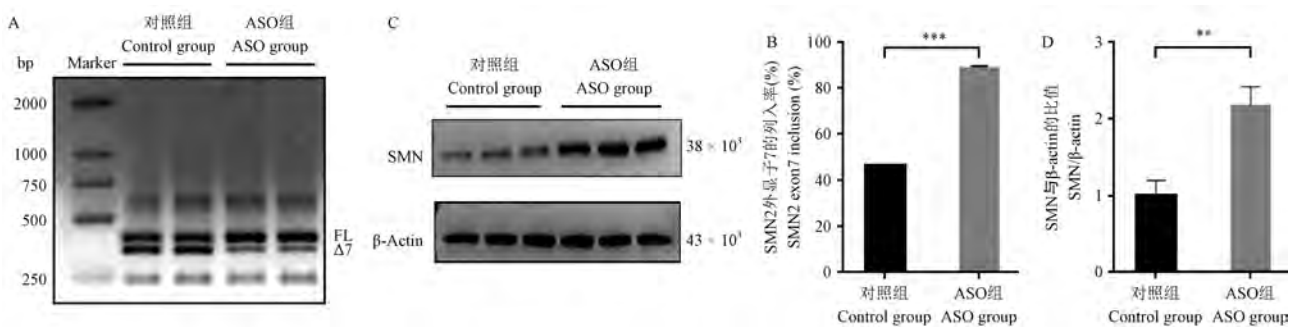


注:A:原代细胞(P0)、第三代细胞(P3)以及冻存后细胞复苏形态;B:免疫荧光鉴定 BMMSC 表面特征分子。

图 1 SMA BMMSC 原代培养及形态鉴定

Note. A. Morphology of primary cells (P0) and third-generation cells (P3) and resuscitation cell after freezing. B. Identification of characteristic molecules on the surface of BMMSC by immunofluorescence.

Figure 1 Primary culture and morphological identification of SMA BMMSC



注:A:PCR 及酶切后电泳结果;FL:Full-length;Δ7:exon 7-skipped;B:A 的定量分析;C:蛋白印迹结果;D:C 的定量分析;与 NC 组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。(下同)

图 2 转染 ASO 后 SMN2 exon7 列入水平及 SMN 蛋白表达情况

Note. A. Electrophoresis results after PCR and restriction digestion. FL. Full-length. Δ7. exon 7-skipped. B. Quantitative analysis of A. C. Western Blot results. D. Quantitative analysis of C. Compared with the NC group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

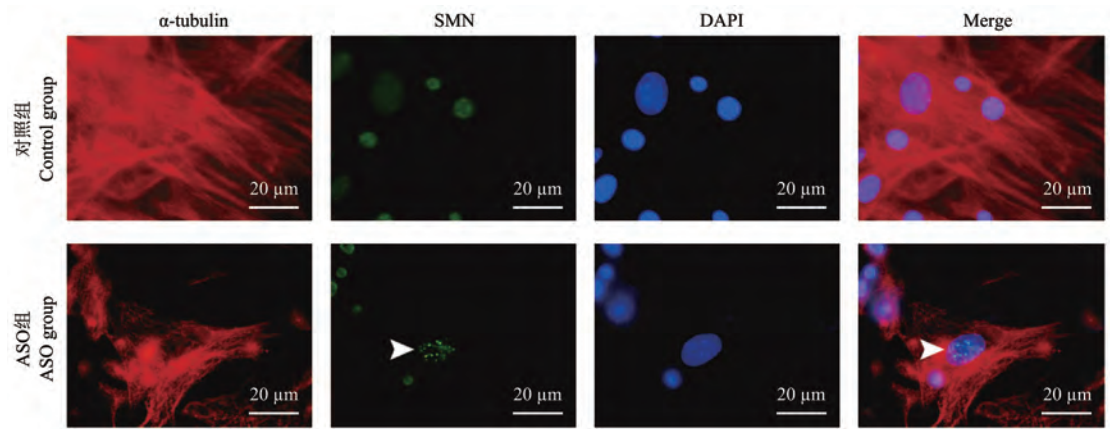
Figure 2 SMN2 exon7 inclusion level and SMN protein expression after ASO transfection

2.3 ASO 促进细胞核内 Gemini bodies (gems) 数量明显增多

通过细胞免疫荧光实验,以 Anti-SMN/Gemin1 标记绿色荧光,DAPI 标记蓝色荧光,α-Tubulin 标记红色荧光。实验组与对照组相比细胞核内 Gemini bodies 数量显著增多($P < 0.05$) (见图 3)。

2.4 ASO 显著促进 SMA BMMSC 细胞增殖能力而不影响其凋亡

免疫荧光实验结果表明:实验组与对照组相比 EDU 标记的细胞核数量显著增加($n = 5, P < 0.05$) (见图 4A,图 4B),表明 ASO 促进 SMA 模型小鼠 BMMSC 细胞增殖。实验组与对照组 TUNEL 标记的细胞核数量没有差异,不具有统计学意义($n = 5, P > 0.05$) (见图 4C,图 4D),表明 ASO 不影响 SMA 模型小鼠 BMMSC 细胞凋亡。

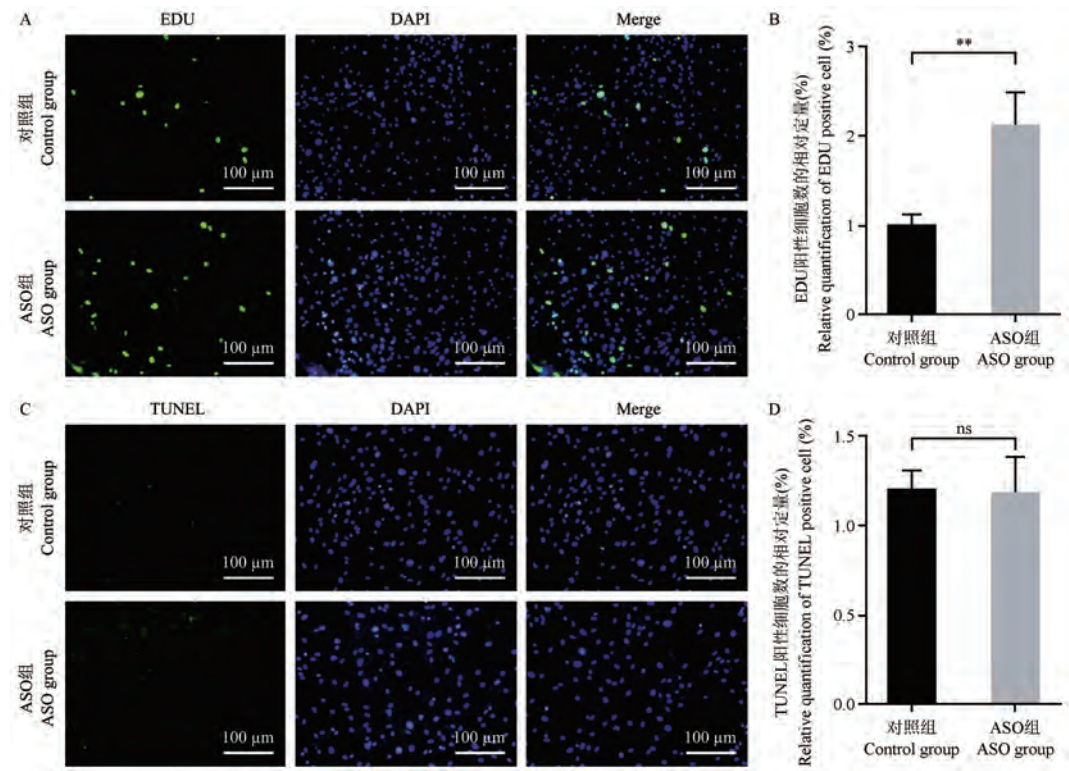


注:细胞免疫荧光检测对照组与实验组细胞核内 Gemini 小体数量,α-tubulin 标记细胞骨架,箭头所指示即为 Gemini 小体。

图 3 转染 ASO 后细胞免疫荧光观察核内 SMN 蛋白表达情况($n=5$)

Note. Cellular immunofluorescence was used to detect the number of Gemini bodies in the nucleus of the control group and the experimental group, and α-tubulin labeled the cytoskeleton. The arrow indicates the Gemini body.

Figure 3 Observation of SMN protein expression in the nucleus by immunofluorescence after ASO transfection($n=5$)



注:A:EDU 细胞增殖实验;B:A 的相对定量分析;C:TUNEL 细胞凋亡实验;D:C 的相对定量分析。EDU 和 TUNEL 绿色荧光标记。

图 4 转染 ASO 后 EDU 法和 TUNEL 法检测 SMA BMMSC 增殖和凋亡情况

Note. A. EDU cell proliferation experiment. B. Relative quantitative analysis of A. C. TUNEL cell proliferation experiment. D. Relative quantitative analysis of C. EDU and TUNEL were labeled with green fluorescence.

Figure 4 Detection of proliferation and apoptosis of SMA BMMSC by EDU and TUNEL after ASO transfection

3 讨论

SMA 患者的致病基因是位于 5 号染色体上的运动神经元存活 1 基因 (survival motor neuron 1, *SMN1*), 它发生病变导致 SMA 疾病的发生^[15]。*SMN2* 作为 *SMN1* 的同源基因, 其外显子 7 的第六位碱基发生突变, 使得外显子 7 不能正常列入, 导致编码产生的仅大约 10% 为有功能的 SMN 全长蛋白, 用来维持 SMA 患者的生存^[16]。目前新生儿中该疾病缺陷基因携带者占 1/40 ~ 60^[17], 占比较多的一类 SMA 患者, 存活不超过 2 周岁^[18]。

研发 SMA 疾病相关药物对于治疗 SMA 疾病至关重要, 目前主要将 SMA 疾病模型小鼠作为体内药物研发的载体, 直接在 SMA 疾病模型小鼠体内进行试验^[4,19], 成本高, 工作繁琐。但是构建的 SMA 转基因小鼠, 由于本身 SMN 基因缺失, 仅有 2 个拷贝的 *SMN2*, 产生的 SMN 蛋白极少^[14], 神经系统及外周神经系统功能发生异常, 小鼠出生后状态逐渐变差, 10 d 左右死亡^[20], 因此用于发病机制研究和药物筛选比较困难。

那么, 探索一种疾病动物细胞模型用于研发 SMA 疾病相关药物至关重要。本研究前期曾尝试 SMA 小鼠其他组织细胞进行体外培养, 但由于不能传代、冻存等原因而放弃。骨髓间充质干细胞具有贴壁生长、增殖能力强、分化程度低等优点, 目前已广泛用于各种疾病的研究, 特别是在一些神经退行性疾病例如帕金森^[21]、阿尔兹海默症^[22]等已有相关报道。同时, 骨髓间充质干细胞在大鼠^[10]、小鼠^[23]、猪^[24]等动物以及人^[25]已有相关报道。本研究通过构建 SMA 模型小鼠 BMMSC 培养体系, 在体外实验上对药物进行初步筛选、验证。骨髓间充质干细胞来源于骨髓, 具有间充质干细胞的特性, 不属于造血干细胞^[8]。通过细胞免疫荧光实验检测其细胞表面标志物表达情况。结果发现 BMMSC 高表达骨髓间充质干细胞表面标志物 CD44、CD29, 并不表达或低表达造血细胞的表面标志物 CD45、CD34。本研究表明: 所提取、分离、纯化的 SMA 模型小鼠 BMMSC 具有贴壁生长、可以传代等特点, 同时具有骨髓间充质干细胞的特性。同时所提取的 BMMSC 来源于 SMA 模型小鼠, 这是体外最真实的模。其本身具有 SMA 疾病的特征: *SMN2* exon7 列入水平以及 SMN 蛋白表达均较低。因此, 可初步将其作为体外研究 SMA 疾病的载体细胞。

目前已合成了一些药物如 Spinrazas^[26]、Zolgensma^[27]、Evrysdi^[28]、Apitegromab^[29]等已用于治疗 SMA 疾病。其中 Spinrazas 是第一款被用于 SMA 疾病治疗的药物, 该药是一种反义寡核苷酸, 通过侧脑室注射给药方式进行治疗^[30]。它通过与 *SMN2* 内含子 7 上的 ISS (intron splicing silencer, 内含子剪接沉默子) 序列结合, 进而使剪接沉默子不能与 ISS 序列结合, 使内含子 7 发生正常剪接过程, 从而使 *SMN2* exon7 正常的列入, 增加有功能性 SMN 全长蛋白的数量^[4]。ASO10-29 是一种反义寡核苷酸^[14], 与 Spinrazas 相似, 可作为治疗 SMA 相关模型的阳性对照药物。本研究发现经 ASO10-29 治疗后 *SMN2* exon7 列入显著上升以及 SMN 蛋白表达显著上调。同时, 通过凋亡和增殖实验发现: ASO10-29 不影响 SMA 模型小鼠 BMMSC 凋亡, 却促进 SMA 模型小鼠 BMMSC 细胞增殖。表明本研究建立的 SMA BMMSC 是一种体外研究 *SMN2* 基因功能或药物筛选的最佳工具细胞。

本研究从 SMA 小鼠自体所提取、分离培养并鉴定的 BMMSC, 具有贴壁生长、获得简便以及可传代的优点, 且 ASO 能够通过上调 BMMSC 细胞 *SMN2* FL 基因和 SMN 蛋白, 促进其增殖。因此, 该 BMMSC 可用于研究 *SMN2* 基因相关分子机制, 以及药物前期大量初筛, 具有广泛的临床前期应用价值。

参 考 文 献 (References)

- [1] Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy [J]. Neurol Clin, 2015, 33(4): 831-846.
- [2] Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of > 72,400 specimens [J]. Eur J Hum Genet, 2012, 20(1): 27-32.
- [3] Hua Y, Sahashi K, Hung G, et al. Antisense correction of *SMN2* splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model [J]. Genes Dev, 2010, 24(15): 1634-1644.
- [4] Hua Y, Sahashi K, Rigo F, et al. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model [J]. Nature, 2011, 478(7367): 123-126.
- [5] Zhou M, Hu Z, Qiu L, et al. Seamless genetic conversion of *SMN2* to *SMN1* via CRISPR/Cpf1 and single-stranded oligodeoxynucleotides in spinal muscular atrophy patient-specific induced pluripotent stem cells [J]. Hum Gene Ther, 2018, 29(11): 1252-1263.
- [6] Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient [J]. Nature, 2009, 457(7227): 277-280.
- [7] Ovechkina VS, Maretina MA, Egorova AA, et al. Generation of a spinal muscular atrophy type III patient-specific induced

- pluripotent stem cell line ICGi003-A [J]. Stem Cell Res, 2020, 48: 101938.
- [8] 李建国, 颠孙永勋, 冉丕鑫, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养及鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(12): 28-31.
- Li JG, Zhuan SYX, Ran PX, et al. Isolation, culture and identification of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow [J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(12): 28-31.
- [9] Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, et al. Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells [J]. Ann N Y Acad Sci, 2016, 1370(1): 109-118.
- [10] 赵宣洪, 张钰, 秦川, 等. 神经营养因子-3 基因修饰的骨髓间充质干细胞和水凝胶联合应用对脊髓损伤模型大鼠的治疗作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(7): 1-12.
- Zhao XQ, Zhang Y, Qin C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells modified with the neurotrophic factor-3 gene combined with hydrogels for the treatment of spinal cord injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(12): 28-31.
- [11] Abou Nader Z, Espéli M, Balabanian K, et al. Culture, expansion and differentiation of mouse bone-derived mesenchymal stromal cells [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2308: 35-46.
- [12] Oostendorp RA, Spitzer E, Reisbach G, et al. Antibodies to the beta 1-integrin chain, CD44, or ICAM-3 stimulate adhesion of blast colony-forming cells and may inhibit their growth [J]. Exp Hematol, 1997, 25(4): 345-349.
- [13] Guo W, Spiller KV, Tang J, et al. Hypoxia depletes contaminating CD45⁺ hematopoietic cells from murine bone marrow stromal cell (BMSC) cultures; methods for BMSC culture purification [J]. Stem Cell Res, 2021, 53: 102317.
- [14] Sheng L, Wan B, Feng P, et al. Downregulation of survivin contributes to cell-cycle arrest during postnatal cardiac development in a severe spinal muscular atrophy mouse model [J]. Hum Mol Genet, 2018, 27(3): 486-498.
- [15] Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3 [J]. Nature, 1990, 344(6266): 540-541.
- [16] Cobben JM, van der Steege G, Grootsholten P, et al. Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy [J]. Am J Hum Genet, 1995, 57(4): 805-808.
- [17] Prior TW. Professional practice and guidelines committee. carrier screening for spinal muscular atrophy [J]. Genet Med, 2008, 10(11): 840-842.
- [18] Farrar MA, Vucic S, Johnston HM, et al. Pathophysiological insights derived by natural history and motor function of spinal muscular atrophy [J]. J Pediatr, 2013, 162(1): 155-159.
- [19] Bebee TW, Dominguez CE, Chandler DS. Mouse models of SMA; tools for disease characterization and therapeutic development [J]. Hum Genet, 2012, 131(8): 1277-1293.
- [20] Wan B, Feng P, Guan Z, et al. A severe mouse model of spinal muscular atrophy develops early systemic inflammation [J]. Hum Mol Genet, 2018, 27(23): 4061-4076.
- [21] 路亚岚, 石桂英, 王克维, 等. 骨髓间充质干细胞治疗阿尔兹海默病模型小鼠研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 122-127.
- Lu YL, Shi GY, Wang KW, et al. Progress in research using mouse models of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 122-127.
- [22] Ramezani M, Komaki A, Hashemi-Firouzi N, et al. Therapeutic effects of melatonin-treated bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) in a rat model of Alzheimer's disease [J]. J Chem Neuroanat, 2020, 108: 101804.
- [23] Jin J, Ou Q, Wang Z, et al. BMSC-derived extracellular vesicles intervened the pathogenic changes of scleroderma in mice through miRNAs [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 327.
- [24] Shi D, Zhang J, Zhou Q, et al. Quantitative evaluation of human bone mesenchymal stem cells rescuing fulminant hepatic failure in pigs [J]. Gut, 2017, 66(5): 955-964.
- [25] Li S, Stöckl S, Lukas C, et al. Curcumin-primed human BMSC-derived extracellular vesicles reverse IL-1 β -induced catabolic responses of OA chondrocytes by upregulating miR-126-3p [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 252.
- [26] Bennett CF, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense oligonucleotide therapies for neurodegenerative diseases [J]. Annu Rev Neurosci, 2019, 42: 385-406.
- [27] Menduti G, Rasà DM, Stanga S, et al. Drug screening and drug repositioning as promising therapeutic approaches for spinal muscular atrophy treatment [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 592234.
- [28] Singh RN, Ottesen EW, Singh NN. The first orally deliverable small molecule for the treatment of spinal muscular atrophy [J]. Neurosci Insights, 2020, 15: 2633.
- [29] Barrett D, Bilic S, Chyung Y, et al. A randomized phase 1 safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the novel myostatin inhibitor apitegromab (SRK-015): a potential treatment for spinal muscular atrophy [J]. Adv Ther, 2021, 38(6): 3203-3222.
- [30] Neil EE, Bisaccia EK. Nusinersen: a novel antisense oligonucleotide for the treatment of spinal muscular atrophy [J]. J Pediatr Pharmacol Ther, 2019, 24(3): 194-203.

[收稿日期] 2021-11-06

程天,姚泰康,索玲格,等. 啮齿类实验动物行为学视觉测量方法 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 686-691.

Cheng T, Yao TK, Suo LG, et al. Behavioral measurements of visualization in rodent laboratory animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 686-691.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.012

啮齿类实验动物行为学视觉测量方法

程天¹,姚泰康¹,索玲格²,张颀²,张纯^{2*}

(1. 北京大学基础医学院,北京 100191;2. 北京大学第三医院眼科,北京 100191)

【摘要】 啮齿类动物广泛运用于视觉疾病的造模;为了合理评估动物模型的视觉疾病损害程度和治疗手段干预效果,需要掌握合适的啮齿类实验动物视觉检测手段。视觉行为学检测具有简明、直观、非侵入、可重复的优良特性,能够弥补其他视觉测量手段的缺陷。从定性以及定量两个角度对常用的啮齿类实验动物行为学视觉测量方法进行综述,有助于实验者选择适当的检测方法,提升动物视觉检测效率。

【关键词】 啮齿类动物;视觉测量;行为学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0686-06

Behavioral measurements of visualization in rodent laboratory animals

CHENG Tian¹, YAO Taikang¹, SUO Lingge², ZHANG Di², ZHANG Chun^{2*}

(1. School of Basic Medicine Sciences, Peking University, Beijing 100191, China. 2. Department of Ophthalmology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191)

Corresponding author: ZHANG Chun. E-mail: zhangc1@yahoo.com

【Abstract】 Rodents, as important experimental animals, are exceptionally well-suited for studies of peripheral visual field diseases because of their visual structure, and are therefore key to the development of drugs related to peripheral visual field diseases. Behavioral visual measurements, including qualitative as well as quantitative measures, have the positive characteristics of being concise, intuitive, non-invasive, reproducible and can compensate for the shortcomings of other visual measures. Qualitative measures for judging vision in rodents are simple and easy to perform, including the visual placing test, the visual cliff test, and looming visual stimuli. By contrast, quantitative measures such as a water maze and the visual water task can accurately measure the visual acuity of rodents. This review provides a reference for researchers using rodents as experimental animals for visual studies. In addition, it provides valuable information to select appropriate modeling method and behavioral tests according to the purpose of the study, which will help experimenters to improve the efficiency of animal vision detection by selecting appropriate tests.

【Keywords】 rodents; visual testing; behavioral measurement

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

啮齿类动物与人类同属哺乳动物纲,在自然界分布广泛,其中小鼠、大鼠、沙鼠、豚鼠等是重要的实验动物。与人的视觉系统不同,啮齿类动物的视网膜缺乏黄斑及中央凹结构,整体视网膜感光细胞分布比例更接近于人类视网膜的外周区域。如小

鼠即使在视网膜中心视锥细胞密度峰值处,仍然是主暗视的视杆细胞占比更多^[1]。此种视网膜结构决定了啮齿类动物的视觉在明亮环境中细节辨认上不具优势,但对黑暗环境下的轮廓辨认与运动识别十分擅长^[2]。

【基金项目】 国家自然科学基金(81970798),首都医学发展科研基金(CFH2020-2-40911)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81970798), Capital's Funds for Health Improvement and Research (CFH2020-2-40911).

【作者简介】 程天(2001—),男,研究方向:视功能与视觉疾病。Email: iamchengtian@pku.edu.cn

【通信作者】 张纯,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:青光眼、干细胞及视网膜神经保护。Email: zhangc1@yahoo.com

啮齿类动物的视觉系统结构使其格外适合从事外周视野的研究,基因编辑等技术在小鼠上积累的经验优势也使得其在遗传性视觉疾病的造模中得到普遍运用^[3]。通过选择与人类疾病病因学相似的啮齿动物模型,我们能够以更低的成本和更多的数据获得关于疾病机制和治疗策略的有价值信息。寻找简明的啮齿类动物视觉测量手段,有助于合理评估视觉疾病损害程度和治疗手段干预效果。常用的电生理学视觉检测手段准确快速,但也存在无法直观反映视觉能力、采用侵入性操作等缺陷。

行为学视觉检测是客观评估视功能的重要方法,具有独到的实验优势^[3];相较于影响视觉细胞状态的电生理学方法以及需要处死实验动物的组织学方法,行为学视觉检测技术简明、直观、非侵入、可重复,在连续测量实验动物的视觉能力上有着直观的效果。更重要的是,此类测量结果能够直接的与视觉疾病的识别和治疗联系起来,这为新药物或临床新治疗方案提供了简洁而直观的检测工具。本文将从定性以及定量两个角度探讨实验动物行为学视觉测量方法,并结合不同种类啮齿类实验动物特点对常用行为学视觉测量方法进行综述。

1 视觉感知的定性检测

在测量实验动物的视觉之前,首先应当判断实验动物是否具有视觉。某些白化^[3-4]、基因突变^[5-6]、经过基因编辑或基因敲除的小鼠可能出现视网膜退化性变或是视感细胞和视锥细胞的丢失^[7-8],这些都可能会导致其感光能力的下降和视觉能力的受损。疾病也会损伤视觉,当实验动物作为疾病模型使用时,需要有便捷的手段来评估和监测其视觉感知。

1.1 眨眼反射实验

测试动物是否具有视觉最简单的方法之一是用物体接近动物的眼睛:若动物看到有物体逼近眼球,它将反射性眨眼以保护自身^[9]。眨眼反射属于机体应对威胁的防御性反射。作为物种进化的产物,眨眼反射具有普遍性的特点,无论是动物还是人类都可以采用这种方式进行视觉感知的检测^[10]。

与眨眼反射实验类似的一个测试是 Irwin^[11] (1968) 提出的视觉置位实验 (visual placing test, VPT)。将实验动物眼睛朝下悬吊着迅速下落,出于视觉置位反射,动物会将前爪伸出作为缓冲。一个简单的评分是根据动物伸出前爪之前鼻子离底座

的距离来评估动物的视觉水平,但由于主观性太大,VPT 很少作为定量实验使用。

1.2 昼夜节律

视觉的重要作用之一在于感知外界光照刺激以校准生物节律:光提供了使昼夜节律与外部环境同步的主要时间线索^[12]。Jud 等^[13]报道小鼠的生物钟为 23.5 h,因此在持续黑暗的环境中,缺乏光线校正的小鼠活动每天都会提前开始。作为昼伏夜出的生物,小鼠在黑暗时活动增加,而光照时减少。Buhr 等^[14]利用跑轮研究过小鼠在光暗节律中的行为,结果显示视觉正常小鼠在跑轮上活动的频率表现出明显的昼伏夜出节律,而视杆细胞、视锥细胞和黑视蛋白三重敲除的小鼠则体现为不分昼夜的“随机奔跑”。

1.3 视觉悬崖实验

视觉悬崖实验 (visual cliff test, VCT) 是 Gibson 等^[15]用来研究婴儿和不同动物深度知觉的简单实验。VCT 将受试的 6 月龄婴儿放置在贴有具有强烈对比效果棋盘图案的连续玻璃板上,图案看上去好似有一个“悬崖”将玻璃板从中间分开。当母亲站在“悬崖”一边招呼他们时,绝大多数婴儿会拒绝爬过看起来具有悬崖特点的连续玻璃板。无独有偶,在对猫、山羊、小鼠的实验中,这些动物也无一例外的表现出了对“悬崖”的排斥。Fox^[16]证实这种测试可以用于区分小鼠品系差异。

1.4 突现的视觉刺激

突现的视觉刺激 (looming visual stimuli, LVS) 是 Koehler 等^[17]提出的一种较新颖的小鼠视觉评估方式,其原理是小鼠的先天避光反射。LVS 实验在避光空间内进行,先将小鼠置于空间内适应 10 min,然后施放 10 次 LVS。小鼠会通过停止运动或逃到藏身之处对刺激做出反应。利用监督机器学习方法分析发现,正常小鼠的移动速度在 LVS 后发生了显著变化,而在盲小鼠中未观察到类似反应^[18]。

本节提及的视觉测量方法均已多次得到良好应用,具有充分的可靠性。然而,虽然测试本身快速且易进行,但它们的共性问题限于检测动物是否具有视觉,而对动物看到什么知之甚少,对于一些需要监测视力变化的疾病模型来说并不适用^[3]。同时,上述实验部分反射涉及的神经通路十分复杂,还需要更多研究来进一步证实其神经机制^[19]。

2 视觉精度的定量检测

尽管定性测量简单有用,但实际视觉研究中更

关注的是对于视觉的定量测量;精确的动物视觉测量数据有助于在人类临床试验之前评估干预的成效,促进新型有效疗法的开发。实验动物视觉行为学测量方法包括选择性任务和视觉反射任务^[20]。整合多种视觉功能的测定结果以系统评估整体视觉功能,是视觉研究的一项重要工作。

啮齿类动物行为情绪敏感多变,易受外界影响,因此定量检测实验前应先让实验动物熟悉环境,对实验动物轻拿轻放,并在安静环境下进行测量。如非实验特别要求,应控制检测外周环境光线不宜过强,以免动物产生应激反应。

2.1 基于任务选择的测量

量化视觉行为功能最常见的方法是任务选择。为训练实验动物识别光栅,通常会使用奖励或其他强化物,如食物、水、逃生等作为塑造期望行为的手段,从而实现测量实验动物光栅分辨力的目的。

2.1.1 跳台实验

Lashley^[21]提出的跳台实验是首个使用选择性任务测量啮齿动物视觉的可行方法。该实验将大鼠置于一个具有两扇门的跳台上,其中一扇门贴有条栅作为阳性刺激。训练大鼠跳向贴有条栅的门。若正确选择,大鼠会得到奖赏;如果大鼠跳过的是未贴条栅的门,大鼠将从平台上跌落作为惩罚。

尽管 Lashley 的跳台实验是测量大鼠视觉精度的一种古老而实用的方法,但它存在许多缺陷:让动物学会跳台需要耗费大量时间,实验动物复杂的学习任务也限制了该方法的应用。据 Prusky 等^[22]报道,跳台实验从未成功的适用于小鼠。Baker 等^[23]将改进的跳台实验运用于沙鼠,成功测定了沙鼠的视锐度。

2.1.2 Morris 水迷宫

Morris 水迷宫最初是 Morris^[24]为研究空间记忆以及非空间辨别学习而开发的,后被修改用以测量小鼠的视觉。Morris 在一个环形水箱内安放了一个位置不固定的隐匿平台,小鼠需要通过训练,利用远处的视觉信号作为线索来找到这一潜在平台的位置,从而游到平台上^[25]。水箱上方的摄像机和数据采集程序可以监控小鼠的游泳轨迹^[26]。由于实验在水中进行,该实验很好的避免了在嗅觉和触觉信息上的干扰;但 Morris 水迷宫的设计很难控制小鼠与远处视觉信号之间的观察距离,这给控制变量带来了不便。

2.1.3 视觉梯形水迷宫

Morris 的实验设计启发人们认识到以水为环境的逃避任务可以使实验动物得到更有效的训练和视觉测试,这促使 Entlerova 等^[26]发明了视觉梯形水迷宫实验(visual water task, VWT)。

VWT 在一个 Y 形水箱中进行^[27]。Y 形水箱的一端有逃生平台,放置有水平或垂直的正弦波光栅,具有可调整的空间频率和对比度;没有逃生平台的另一侧则显示统一的灰色图案。预实验需要训练小鼠利用视觉刺激游到有逃生平台的一侧;若小鼠游到了没有逃生平台的一侧,小鼠将会坠落到水箱下方的铜网内。正式实验中,小鼠须利用 Y 形水箱两端提供的视觉线索判断淹没在水中的逃生平台位于哪一侧。

与 Morris 水迷宫一样,在水中进行的 VWT 可以抑制多种感官输入,有助于小鼠集中注意力在显示器上。而且在进入目标臂前,小鼠似乎具有自发比较两臂屏幕差异的天性,这大大降低了训练小鼠的困难^[3]。然而,虽然实验动物不需要被明确的强化,但对于非常大规模的研究来说,VWT 仍然显得过于操作繁琐^[28]。这促使视觉研究者不断的追寻更加先进和简便的视觉测量方式。

2.1.4 强迫选择辨别任务

Jacobs 等^[29]在研究小鼠的色觉时设计了强迫选择辨别任务:将测试灯随机照射到 3 个测试面板上,训练小鼠通过触摸选择被照亮的面板,通过改变测试灯的色差可以测量出小鼠的辨色力。值得注意的是,此实验训练小鼠需要实验者付出巨大的努力:单只小鼠需要进行 6 000 到 10 000 次训练实验才能学会如何选择面板。

张秀艳等^[30]将 Jacobs 强迫选择辨别实验中的测试灯更换成光栅图案并用于豚鼠,提出了豚鼠的高级视皮层行为学视锐度检测方法。

2.2 基于视觉反射的检测

基于视觉反射的检测依赖于啮齿动物头部和颈部在视觉刺激方向上的反射性转动。这种反射由来自方向选择性 RGCs 的神经元输入驱动,对于保持图像在视网膜上稳定至关重要。在存在可重复和确定的刺激的情况下,这种反射非常适合于分析视网膜神经元的电路和性能的微妙变化。增加每度这些交替光栅的周期,或者逐渐降低视觉刺激的对对比度,可以确定动物不再跟踪刺激的阈值水

平,从而可以非侵入性的确定动物的视觉功能。

2.2.1 机械视运动反应测试

视运动反应测试(optomotor response, OMR)基于啮齿动物的前庭眼球反射(vestibulo-ocular reflex, VOR)提出^[31]:当光栅刺激物在动物的视野中移动时,由于前庭输入与视觉输入不匹配,动物的头部会因 VOR 反射性地产生跟踪旋转的代偿性运动以补偿感觉的分离^[32]。因此,OMR 可用于测试实验动物的视敏度和对比度阈值^[33]。

Cowey 等^[34]最先使用了一种内壁带有黑白条纹刺激的圆柱形机械鼓作为光栅刺激物。将实验动物大鼠置于鼓中央的固定圆形高台,覆盖一个有机玻璃烧杯。机械鼓围绕大鼠旋转,用覆盖在平台上的摄像机监测大鼠跟随条纹移动头部的次数。通过缝上大鼠的一只眼睛,Cowey 等^[34]还测量了大鼠的单眼视力。Abdeljalil 等^[35]将该方法成功应用于小鼠,用于筛查小鼠暗位和光位条件下的视觉异常。

OMR 可以用光动眼试验(optokinetic response, OKR)来补充。与 OMR 不同,OKR 需要在颅骨和眼眶周围植入固定器和探测器,评估的是光动眼运动而不是头部的运动。OKR 已在神经元回路的研究中得到了普及^[36]。

目前,机械 OMR 已被广泛用于测量啮齿动物视网膜变性和功能障碍模型的视觉恢复情况。然而,尽管机械 OMR 应用广泛,但是光栅空间频率难以调节和动物相对位置难以固定这两项缺陷限制了该装置的实用性。上述问题已经被 Prusky 等^[37]开发的虚拟视动系统(virtual optokinetic system, VOS)解决。

2.2.2 虚拟视动系统

Prusky 等^[38]在机械 OMR 的基础上将传统的机械光栅改良为电子屏幕显示的光栅图像,提出了 VOS。VOS 利用计算机改变显示器上光栅图像的参数,如空间频率、对比度和旋转速度,这为精确测量实验动物的视觉分辨能力带来了极大便利。实验者可以通过增加光栅的空间频率确定实验动物的视锐度值,还可以在空间频率一定的条件下逐渐改变光栅条纹的对比度以测量动物能感知的最小对比度值^[39]。这是机械 OMR 难以完成的。此外,VOS 还减少了动物在测试前所需接受的训练。这大大缩短了测试时间,并使得展开更大规模的研究成为可能。

Thomas 等^[40]改进了 VOS 装置,使之可以在不缝合或者遮盖动物眼睛的情况下单独测量每只眼睛的反应。这项评估技术对诸如视网膜变性评估这样的单眼疾病特别适用,并且在评估各种单眼治疗干预方面具有价值。

Benkner 等^[41]进一步开发了自动检测和量化 VOS 中小鼠头部运动的技术,程序对头部运动的自动分析减少了实验者主观评估的偏差,提高了结果的可重复性。Shi 等^[42]则提出将小鼠的头部暂停行为作为 VOS 负向监测指标。VOS 已在小鼠的视觉研究中获得了广泛普及。

基于任务选择的视觉测量可以评估动物区分与逃离水相关的光栅图案的能力,研究人员使用这种技术成功分析了不同环境对视觉表现的影响。选择测试的缺点包括费时费力的动物训练和多次重复实验;长时间的训练或测试会导致动物疲劳继而影响结果,也意味着对于需要在药物干预后即刻检测视锐度值的情形,选择性任务显得力不从心。同时,选择性任务通常应用于较年轻的实验动物,因为它们能够更快完成任务的学习^[37],这也导致选择性任务在研究与年龄相关的疾病时明显不利。

视觉反射任务能很好地弥补选择任务的缺陷:迅速发生的反射能够灵敏地反映视锐度值在短时间内的变化,这使得它成为视觉表现的更快速、更可靠的测试^[20]。由于多数任务均基于先天反射,实验动物几乎不需要进行专门的训练^[43]。这也解决了选择性任务中潜在的年龄偏倚问题。特别的,由于 OMR 测试高度依赖于功能性 RGC 的反应,因此格外适合评估青光眼视神经病变对视觉表现的影响。当然,反射实验也有其缺点,譬如手术干预升高了 OKR 的动物损失风险,同时对操作者技术能力提出了较高的要求。

3 总结

行为学测量方法具有简明、直观的特点,是重要的视觉检测手段。然而,在实际操作中,必须把行为学方法同电生理、组织学等多种方法结合起来,才能有效地检测动物模型的视觉状态,评估治疗手段的干预效果,破译视觉疾病“从分子到细胞到行为”的问题。

在定量检测中,选择行为学还是电生理学方法需要依照多方面的考量。OMR 测试可能是测试实验室啮齿动物图案视觉的最快方法,但该测试并不

借助于视觉皮层的功能,因此对关注高级视觉中枢的测量不适用。VWT 对初级视觉通路的功能障碍十分敏感,但训练动物可能需要花费较多的时间人力资源。对于要求多次、重复、连续定量测量啮齿类动物的视觉,或者实现对视功能进行长期动态监测的,采用电生理检测则是最佳选择。

不同的视觉检测手段均有其优势和缺点,简单的定性实验往往只能提供“是否存在视觉”的信息,能够精确测量视锐度的实验往往又操作复杂。一种最优化的啮齿类动物视觉测量策略是,先利用简单的测试评估动物的视觉状况,再采取有效的定量评估手段评估动物的视觉。在定量检测中,实验者可以优先采用无需事先训练实验动物的手段测量一些指标,如若没有发现显著差异,再进行更为复杂耗时的测试。在较大规模的实验中,此策略能快速筛选出视觉异常的动物,提升检测效率。

参 考 文 献(References)

- [1] Verra DM, Sajdak BS, Merriman DK, et al. Diurnal rodents as pertinent animal models of human retinal physiology and pathology [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2020, 74: 100776.
- [2] Peirson SN, Brown LA, Potheary CA, et al. Light and the laboratory mouse [J]. *J Neurosci Methods*, 2018, 300: 26–36.
- [3] Leinonen H, Tanila H. Vision in laboratory rodents-tools to measure it and implications for behavioral research [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 352: 172–182.
- [4] Braha M, Porciatti V, Chou TH. Retinal and cortical visual acuity in a common inbred albino mouse [J]. *PLoS One*, 2021, 16(5): e0242394.
- [5] Colozo AT, Vasudevan S, Park PS. Retinal degeneration in mice expressing the constitutively active G90D rhodopsin mutant [J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(6): 881–891.
- [6] Zaninello M, Palikaras K, Naon D, et al. Inhibition of autophagy curtails visual loss in a model of autosomal dominant optic atrophy [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4029.
- [7] Patrizi C, Llado M, Benati D, et al. Allele-specific editing ameliorates dominant retinitis pigmentosa in a transgenic mouse model [J]. *Am J Hum Genet*, 2021, 108(2): 295–308.
- [8] Kostic C, Arsenijevic Y. Animal modelling for inherited central vision loss [J]. *J Pathol*, 2016, 238(2): 300–310.
- [9] Sambo CF, Liang M, Cruccu G, et al. Defensive peripersonal space: the blink reflex evoked by hand stimulation is increased when the hand is near the face [J]. *J Neurophysiol*, 2012, 107(3): 880–889.
- [10] Versace V, Campostrini S, Sebastianelli L, et al. Prepulse inhibition vs cognitive modulation of the hand-blink reflex [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 4618.
- [11] Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse [J]. *Psychopharmacologia*, 1968, 13(3): 222–257.
- [12] Lee R, Tapia A, Kaladchibachi S, et al. Meta-analysis of light and circadian timekeeping in rodents [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, 123: 215–229.
- [13] Jud C, Schmutz I, Hampf G, et al. A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions [J]. *Biol Proced Online*, 2005, 7: 101–116.
- [14] Buhr ED, Van Gelder RN. Local photic entrainment of the retinal circadian oscillator in the absence of rods, cones, and melanopsin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(23): 8625–8630.
- [15] Gibson EJ, Walk RD. The “visual cliff” [J]. *Sci Am*, 1960, 202: 64–71.
- [16] Fox MW. The visual cliff test for the study of visual depth perception in the mouse [J]. *Anim Behav*, 1965, 13(2): 232–233.
- [17] Koehler CC, Hall LM, Hellmer CB, et al. Using looming visual stimuli to evaluate mouse vision [J]. *J Vis Exp*, 2019, (148): 10.
- [18] Amorim FE, Moulin TC, Amaral OB. A freely available, self-calibrating software for automatic measurement of freezing behavior [J]. *Front Behav Neurosci*, 2019, 13: 205.
- [19] Baker M. Neuroscience: Through the eyes of a mouse [J]. *Nature*, 2013, 502(7470): 156–158.
- [20] Douglas RM, McGill TJ, Prusky GT. Visual behavior [A]. *Animal models for retinal diseases* [C]. Totowa, NJ: Humana press, 2010; 13–24.
- [21] Lashley KS. The mechanism of vision: I. A method for rapid analysis of pattern-vision in the rat [J]. *Pedagogical Seminary J Genet Psychology*, 1930, 37(4): 453–460.
- [22] Prusky GT, Alam NM. Behavioral measurement of mouse visual function [A]. *Behavioral Genetics of the Mouse* [C]. Cambridge England: Cambridge Univ Press; 2014.
- [23] Baker AG, Emerson VF. Grating acuity of the Mongolian gerbil (*Mmeriones unguiculatus*) [J]. *Behav Brain Res*, 1983, 8(2): 195–209.
- [24] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat [J]. *J Neurosci Methods*, 1984, 11(1): 47–60.
- [25] Ihalaenen J, Savolainen K, Tanila H, et al. Comparison of phencyclidine-induced spatial learning and memory deficits and reversal by sertindole and risperidone between Lister Hooded and Wistar rats [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 305: 140–147.
- [26] Entlerova M, Lobellova V, Hatalova H, et al. Comparison of long-evans and wistar rats in sensitivity to central cholinergic blockade with scopolamine in two spatial tasks: an active place avoidance and the morris water maze [J]. *Physiol Behav*, 2013, 120: 11–18.
- [27] Gudapati K, Singh A, Clarkson-Townsend D, et al. Behavioral assessment of visual function via optomotor response and cognitive

- function via y-maze in diabetic rats [J]. J Vis Exp, 2020, (164): 10.
- [28] Chalupa LM, Williams RW. Eye, retina, and visual system of the mouse [M]. Cambridge: Mit Press; 2008.
- [29] Jacobs GH, Williams GA, Fenwick JA. Influence of cone pigment coexpression on spectral sensitivity and color vision in the mouse [J]. Vision Res, 2004, 44(14): 1615–1622.
- [30] 张秀艳, 毕爱玲, 战梅霞, 等. 啮齿类动物的行为学视力测试方法 [J]. 国际眼科杂志, 2018, 18(4): 645–648.
- Zhang XY, Bi AL, Zhan MX, et al. A review of behavioral visual acuity tests for rodents [J]. Int Eye Sci, 2018, 18(4): 645–648.
- [31] Walsh EM, Bojrab DI. The vestibulo-ocular reflex and head impulse testing [A]. Diagnosis and treatment of vestibular disorders [C]. Cham Switzerland: Springer; 2019.
- [32] Kretschmer F, Sajgo S, Kretschmer V, et al. A system to measure the Optokinetic and Optomotor response in mice [J]. J Neurosci Methods, 2015, 256: 91–105.
- [33] Schmucker C, Seeliger M, Humphries P, et al. Grating acuity at different luminances in wild-type mice and in mice lacking rod or cone function [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(1): 398–407.
- [34] Cowey A, Franzini C. The retinal origin of uncrossed optic nerve fibres in rats and their role in visual discrimination [J]. Exp Brain Res, 1979, 35(3): 443–455.
- [35] Abdeljalil J, Hamid M, Abdel-Mouttalib O, et al. The optomotor response: a robust first-line visual screening method for mice [J]. Vision Res, 2005, 45(11): 1439–1446.
- [36] Stahl JS. Using eye movements to assess brain function in mice [J]. Vision Res, 2004, 44(28): 3401–3410.
- [37] Prusky GT, Alam NM, Beekman S, et al. Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(12): 4611–4616.
- [38] Prusky GT, Douglas RM. Developmental plasticity of mouse visual acuity [J]. Eur J Neurosci, 2003, 17(1): 167–173.
- [39] Marcelli F, Escher P, Schorderet DF. Exploration of the visual system: Part 2: *in vivo* analysis methods: virtual-reality optomotor system, fundus examination, and fluorescent angiography [J]. Curr Protoc Mouse Biol, 2012, 2(3): 207–218.
- [40] Thomas BB, Seiler MJ, Sadda SR, et al. Optokinetic test to evaluate visual acuity of each eye independently [J]. J Neurosci Methods, 2004, 138(1–2): 7–13.
- [41] Benkner B, Mutter M, Ecke G, et al. Characterizing visual performance in mice; an objective and automated system based on the optokinetic reflex [J]. Behav Neurosci, 2013, 127(5): 788–796.
- [42] Shi C, Yuan X, Chang K, et al. Optimization of optomotor response-based visual function assessment in mice [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 9708.
- [43] Kang JI, Groleau M, Dotigny F, et al. Visual training paired with electrical stimulation of the basal forebrain improves orientation-selective visual acuity in the rat [J]. Brain Struct Funct, 2014, 219(4): 1493–1507.

[收稿日期] 2022-02-28

李静,张利英,雍文兴,等. 慢性阻塞性肺疾病啮齿类动物模型与评估方法的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 692-697

Li J, Zhang LY, Yong WX, et al. Progress in the evaluation for chronic obstructive pulmonary disease using a rodent model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 692-697.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.013

慢性阻塞性肺疾病啮齿类动物模型与评估方法的研究进展

李静¹, 张利英^{1*}, 雍文兴^{2*}, 张苡铭¹, 李洋洋¹, 周谷城¹, 牛帆¹, 李高勤²

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学附属医院, 兰州 730000)

【摘要】 慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是以持续性气流受限为特征的常见呼吸系统疾病,其较高的发病率和死亡率给患者和社会带来了沉重负担。为了复制人类 COPD 的病理,深入探讨 COPD 的发病机制、药物开发等,近年来动物模型的研究得到越来越多的重视。本文详细综述了近年来常用复合方法造模的优缺点以及评价模型的方法,为 COPD 的研究奠定基础。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;动物模型;评估方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0692-06

Progress in the evaluation for chronic obstructive pulmonary disease using a rodent model

LI Jing¹, ZHANG Liying^{1*}, YONG Wenxing^{2*}, ZHANG Yiming¹, LI Yangyang¹, ZHOU Gucheng¹, NIU Fan¹, LI Gaoqin²

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

Corresponding author: ZHANG Liying, E-mail: zhangliying201212@163.com; YONG Wenxing. E-mail: 1473124396@qq.com

【Abstract】 Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a common respiratory disease characterized by persistent airflow restriction resulting in high morbidity and mortality that burdens patients and society. To replicate the pathology of human COPD and explore drug developments for treatment, attention has been directed to animal model research in recent years. In this paper, the advantages and disadvantages of common composite modeling method and evaluation method are reviewed to establish a foundation for the study of COPD.

【Keywords】 chronic obstructive pulmonary disease; animal model; appraisal procedure

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

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)作为慢性疾病的发病率及死亡率的主要原因之一,预测到2030年将成为全球

第三大死亡原因^[1]。COPD具有患病率高、死亡率高、致残率高、经济负担重等特点^[2],已经给人类健康带来了巨大挑战。因此,通过建立成功的COPD

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82160868),兰州市卫生健康重点科技发展项目(2021006)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82160868), Lanzhou Key Health Science and Technology Development Project (2021006).

【作者简介】 李静(1996—),女,硕士,研究方向:中西医结合急危重症。Email:2257518207@qq.com

【通信作者】 张利英,女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:中西医结合防治肿瘤。Email:zhangliying201212@163.com;

雍文兴,男,硕士,主任医师,硕士生导师,研究方向:中西医结合急危重症。Email:1473124396@qq.com。

* 共同通信作者

动物模型对研究其发病机制、治疗具有重要的意义。

目前, COPD 啮齿类动物模型应用较多, 因为其具有繁殖成本低、繁殖周期短、基因组与人类相似等优点, 其建模的方法主要分为单一因素造模和复合因素模型。单一因素诱导主要有烟草暴露, 空气污染物暴露, 气道内滴注酶类、细菌等造成 COPD 模型, 此类模型耗时长, 且无法符合气道重塑、血管重塑、持续气流受限等复杂的 COPD 病理特点。因此, 为了构建有效的动物模型, 复合因素造模越来越得到更多关注, 其不仅缩短了模型时间, 而且多因素可造成多种病理结果的 COPD 模型, 应用更加广泛。本文综述了复合因素造模常用几种方法的特点, 为研究 COPD 各种机制提供依据。

1 烟草烟雾联合造模方法

吸烟是 COPD 的重要诱因, 研究显示烟草烟雾 (cigarette smoke, CS) 中含有尼古丁、焦油、一氧化碳等 4000 多种有害物质, 已知可能有 60 多种参与 COPD 的发生^[3], 因此常用 CS 暴露构建 COPD 模型。该方法已运用于各类动物 COPD 的模型中, 如小鼠、大鼠、豚鼠、犬类等, 一般至少需要暴露 2 个月才会出现气道炎症反应等早期 COPD 的病理表现, 6 个月则出现稳定期 COPD 模型^[4]。虽然单一 CS 暴露是目前较为理想的 COPD 模型制备方法, 且较为简便, 但由于短时间内很难引起明显的肺泡腔扩大、小气道重塑及肺功能下降等明显 COPD 的特征^[5], 以及不同实验中烟雾浓度、烟熏时间不同, 暂缺乏统一标准 CS 暴露方案^[6]。因此目前更多是利用 CS 联合其他因素造模, 其造成的病理特征更加符合临床 COPD 的复杂性, 在所有复合模型中应用最为广泛。

1.1 CS 联合脂多糖

CS 是氧化剂自由基和不同化合物的混合物, 会导致肺部氧化应激, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌的内毒素, 可引起肺损伤^[7]。CS 联合 LPS 诱导模拟了 COPD 的病因, 不仅可形成典型特征的 COPD 模型, 而且有效缩短了造模时间, 更加符合 COPD 病理生理特点, 因此国内外广泛用于 COPD 的模型制备。选择的鼠型主要以雄性 C57BL/6J 小鼠及 SPF 级 Wistar 大鼠为主, 目前最多的造模方案为第 1 天、第 15 天气道滴注 LPS 0.2 mL (1 mL/mg), 滴注日不吸烟, 2 ~ 14 d、16 ~ 28 d 将大鼠置于烟熏箱内被动吸烟, 每次持续 30 min、每

天 2 次, 共计 28 d^[8-9]。观察到肺组织及支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中出现明显的炎症反应, 其中中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞数量明显增加, 炎性细胞显著募集^[10], 氧化应激反应明显增强, 如诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 等显著增高, 以及各种炎症因子如 IL-6、IL-8、TNF- α 、TGF- β 等明显升高^[11]。相较其他模型来看, CS 联合 LPS 模型炎性反应明显增强, 小气道狭窄、肺泡壁增厚较单纯 CS 模型更加严重, 因此 CS 联合 LPS 更加适合炎性机制及气道重塑的研究^[12]。

1.2 CS 联合大气细颗粒物 (PM_{2.5})

长期暴露于空气污染也是 COPD 的一个重要危险因素, 最近有研究表明, PM_{2.5} 暴露的动物模型中可引发免疫紊乱, 促进肺部炎症, 加剧气道重塑^[13]。目前, 予以吸入含有 PM_{2.5} 颗粒的气体或气管内滴注 PM_{2.5} 混悬液两种方法构建 COPD 大鼠模型, 因其制备工艺繁杂, 故通过此类方法建立模型的研究较少^[14]。Wang 等^[15]将雄性 C57BL/6 小鼠同时暴露于超声雾化器释放的 PM_{2.5} (110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) 及被动吸烟装置中, 每次 10 支, 每天 2 次, 每周 5 d, 连续 10 月, 观察结果显示, CS + PM_{2.5} 较 CS 组、PM_{2.5} 组的炎症细胞数量明显增加、气管上皮细胞显著增生以及 IL-6、IL-8 炎症因子均增高。Chu 等^[16]首先将小鼠全部暴露于烟雾装置中, 每次 45 min, 每天 4 次, 持续 90 d, 结束后将小鼠转移到 PM_{2.5} (770 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) 的容器中, 每次 30 min, 每天 4 次, 持续 90 d, 造模完后显示 CS + PM_{2.5} 组的肺功能包括吸气峰流量 (PIF)、呼气峰流量 (PEF) 以及巨噬细胞、IL-6、IL-8、TNF- α 均较 CS 组明显增加。此类实验模型造模时间均在 6 个月以上, 建模时间较长, 但可形成持续的慢性炎症反应, 在证明 COPD 的小鼠更容易受到空气污染同时, 对 COPD 稳定期研究、小气道重塑也具有重要意义。

1.3 CS 联合细菌

感染是 COPD 急性加重常见原因, 主要以细菌感染为主, 常见的细菌有铜绿假单胞菌、流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、肺炎克雷伯杆菌等^[17]。细菌感染易致动物死亡, 故对鼠的选择要求较高, 通常选用 SD 大鼠为模型动物^[18], 选择的方法是细菌混悬液经气管滴注或鼻腔滴注, 且需要反复染菌才可造成 COPD 模型。细菌感染很少单独构建 COPD 模

型,通常都是联合 CS 或另一种细菌造成复合模型。陈庆芸等^[19]采用 CS 联合肺炎链球菌造模方法,分别在 1、14、28 d 经鼻滴注肺炎链球菌混悬液后观察大鼠的血氧显著降低,同时 CO₂ 含量升高,气道阻力增加,联合模型较单纯的 CS 模型程度更重,其表现也临床患者相似。Herr 等^[20]利用 CS 联合不同浓度的流感嗜血杆菌 (*nontypeable haemophilus influenzae*, NTHi) 在不同时间内造成 COPD 模型的比较中发现,CS 组 2 周、3 个月、6 个月的炎症细胞数量并未出现太大变化,NTHi 组在 2 周和 3 个月时 BALF 中出现大量巨噬细胞和中心粒细胞,而这种现象在联合组中更为明显;更有趣的是,CS 暴露 6 个月后反而抑制了 IL-17A 的表达,但联合组出现了明显的升高,因此认为细菌刺激 IL-17A 是必要的,而 IL-17A 可导致气道产生大量黏液,其他研究表明 CS 联合细菌使巨噬细胞、杯状细胞化生,黏液分泌明显增多,近年来研究证实黏液分泌增多是 COPD 的一个重要发病机制^[21]。CS 和细菌成分的共同应用导致了 COPD 的发展特征,包括可引起气道炎症,但很少造成肺气肿及气道重塑^[22]。有研究数据表明,微生物暴露的程度可能决定了 COPD 模型的炎症表型^[23],并且 COPD 发生机制与细菌及其产物有密切相关,因此 CS 联合细菌更适用于 COPD 的细菌炎症机制及黏液分泌失衡的研究。

2 LPS 联合造模方法

LPS 是革兰阴性杆菌的细胞壁成分,可存在于空气污染和有机粉尘中^[24]。有研究表明,单独气管内滴注 LPS 可诱导肺部炎症^[25],然而,LPS 不是慢阻肺的主要病因,反复滴注模拟反复感染导致炎症爆发,只能观察到 COPD 部分病理改变^[26]。为了复制人类 COPD 的病理生理,利用 LPS 复合因素构建模型的研究也越来越多,主要是联合烟熏法或弹性蛋白酶。弹性蛋白酶是一种可溶性蛋白水解酶,由肺中活化的中性粒细胞释放,通过募集炎症因子、降解肺组织弹性蛋白及纤维蛋白、促进气道粘液分泌等参与了大多数肺部疾病的发生^[27]。弹性蛋白酶主要造成以蛋白酶-抗蛋白酶失衡的特征模型,此模型可产生严重的肺气肿^[28],但弹性蛋白酶在 COPD 肺气肿中的作用依赖于多种病理生理机制,这为 COPD 的机制研究带来了干扰。Ishii 等^[29]第 1 天经鼻滴注 0.5 U 猪胰弹性蛋白酶 (*porcine pancreatic elastase*, PPE),随后在第 7、10、14 天分别

经鼻给予 25 mg LPS,观察到在 PPE 基础上联合 LPS 可加剧肺气肿,肺组织中中性粒细胞、巨噬细胞及相关炎症介质明显增加,造成一个肺气肿急性加重模型。De Oliveira 等^[30]通过每周 4 次气管内滴注 PPE,每次 0.2 U,连续滴注 4 周,第 5 周向气管内滴注 LPS 0.2 mg,与 PPE、LPS 组相比,PPE + LPS 组表现出更严重的肺泡壁破坏、肺泡过度膨胀、内皮细胞损伤及间质水肿,中性粒细胞及巨噬细胞浸润,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 VEGF 水平升高等,此研究还检测相关肺外指标,联合组射血分数更低、膈肌功能显著降低、横膈膜结构紊乱、心室壁增厚等,成功建立肺气肿恶化模型。研究表明多次使用 PPE 滴注可形成与人类肺气肿相识的肺外效应^[31],而 LPS 联合 PPE 使肺部炎症两次激活,炎症因子释放造成严重的肺气肿急性加重模型,虽然此模型与人类 COPD 发病机制不同,但对于肺气肿相关机制研究依然具有重要意义。

3 其他因素复合造模方法

除上述应用较多的复合模型外,利用机动车尾气 (*motor vehicle exhaust*, MVE) 联合 LPS 建立 COPD 模型^[32],CS 联合接种 H3N1 病毒成功建立 AECOPD 模型^[33],张甜甜等^[34]运用铜绿假单胞菌及肺炎链球菌建立放大炎症的 AECOPD 模型,除此之外还有氯化钙 + 山梨豆类制、烟熏 + 间歇低氧等方法来构建 COPD 模型。总之,复合因素多构成急性加重期特征为主的 COPD 模型,但不同的因素又有不同的模型特点,所以需要我们根据实验目的选择更加贴近的模型。

4 COPD 模型评估

4.1 一般情况

COPD 是一种全身性疾病,在造模过程中可以观察鼠的皮毛光泽度、精神状态、活动情况、饮食水量、体质量,以及呼吸状况有无咳嗽、喷嚏、呼吸急促、呼吸道有物分泌物从口鼻流出、有无气道痰鸣音等。一般情况作为初步的评价指标,也可为后续是否继续造模提供依据。

4.2 肺功能及血气分析测定

肺功能的测定在 COPD 中具有重要意义,FEV1/FVC (1 秒率) 更是临床诊断 COPD 的金标准。COPD 模型中肺总量、残气量增大,肺活量 (FVC) 及最大呼气量 (PEF) 均有所降低^[35]。吸气

峰流量(PIF)、呼气峰流量(PEF)测定表示气道阻塞程度,除此之外动态肺弹性在肺气肿中明显增加,其表示肺泡最大程度的过度膨胀和纤维化程度^[31],静态顺应性测定等也在评估 COPD 中广泛应用。Sun 等^[36]通过测量 FEV25/FVC、FEV50/FVC、FEV75/FVC 等气流速率参数,提示气流受限情况。血气相关指标如动脉氧分压(PaO_2)、血氧饱和度(SaO_2)、动脉二氧化碳分压(PaCO_2)的水平提示缺氧程度。肺功能测定对有无持续气流受限有重要意义,且操作方便,可重复性良好。

4.3 病理改变

从整体观察 COPD 肺体积增大、肿胀、颜色变浅和弹性下降等^[37]。镜下观察稳定期肺组织弹性减退,肺泡持续扩大,肺泡数量显著减少,小血管管壁增厚,也可见炎性细胞浸润和气道上皮细胞增生。在急性加重期可观察到肺上皮细胞出现变形、坏死,细胞间质有淋巴细胞、中性粒细胞为主的炎性浸润,支气管黏膜上皮脱落,黏液腺增生、肥大,管腔可见大量黏液,气管上皮柱状细胞增生,肺泡管、肺泡囊明显扩大,有时可见肺泡壁变薄破裂形成肺大泡^[38]。病理检查可直观观察到气管和肺组织的病理特征,评估疾病的严重程度,是评价模型是否成功的最直接有力的证据。

4.4 炎症指标

炎症反应作为 COPD 发生的重要机制,在评价模型中具有重要地位。通常在血清、肺泡灌洗液、肺组织中检测炎性细胞及炎症因子水平,炎性细胞常见有白细胞总数、淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、TH17 细胞数量等,炎症介质有 IL-6、IL-8、IL-10、IL-17、TNF- α 、TGF- β 等,其测定为 COPD 炎性浸润和严重程度提供依据。

4.5 影像学改变

目前对于临床诊断 COPD 来讲,除了肺功能测定,影像学资料可直接观察 COPD 的肺部病变进程。X 光片检查、电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)、核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)作为常用检查手段,在 COPD 模型中可观察到支气管管壁增厚、肺纹理增粗、肺气肿、肺纤维化等,严重模型可观察到肺大泡等影像学改变^[39],通过胸部微计算机断层扫描(Micro-CT)可观察肺的形态学变化,判断肺气肿的定量改变。除此之外,近年来小动物正电子发射计算机断层显像(positron emission tomography, PET)-计算机断层扫

描(computed tomography, CT)技术的发展,同样为实验动物的活体观察创造了条件^[40]。影像学检查具有操作简单、结果直观、无创性等优点,目前在动物实验模型评价中应用广泛。

4.6 其他指标

除上述评估方法之外,免疫组织化学法作为病理诊断的重要手段,通过化学反应使标记抗体的显色剂显色,以确定肺组织细胞内的抗原,并对其进行定位、定性及半定量的研究^[41],其相较 HE 染色更为优化、精确,同时可评估中心粒细胞、巨噬细胞、T 细胞等细胞水平,对 COPD 的病理机制研究至关重要。蛋白免疫印迹(Western Blot)通过检测 COPD 肺组织及肺泡灌洗液中相关机制蛋白,来确认模型是否成功。此外小动物活体体内光学成像(optical *in vivo* imaging, OI)技术采用生物发光和荧光两种方式,可以直接在动物体内检测炎症发生、特定基因表达等多种细胞基因行为,期待在未来 COPD 研究广泛应用。除此之外,肺力学测量、形态计量指标、肺的血流动力学变化等都是评估 COPD 及全身疾病的指标。

5 结语

COPD 是严重危害人类健康的慢性疾病,其病因、发病机制、病理变化复杂多样,且其病情进展缓慢呈进行性,因此目前尚未有根治 COPD 的方法。缺少完全符合人类 COPD 特征动物模型便是一个限制因素,单一因素造模方法目前研究较多,但由于其耗时长,病理特征不明显,很难符合临床 COPD 的特征。目前多采用复合因素造模,不同因素造成其病理特征的侧重点不同,对深入机制的研究有重要作用。动物与人类的生理病理尚有差异,想要建立接近人类 COPD 特点的模型,评估方法必不可少,在评估模型时,需注意结合功能学、病理学、影像学及炎症细胞等多种方法,以保证模型成功的准确性。尽管复合模型已经从多方面靠近 COPD 病理特点,但 COPD 包括多种的病理变化,如肺气肿、小气道重塑、血管重塑、支气管炎等,要想完全再现 COPD 的功能变化仍然是个未解的问题。尽管复合因素模型应用广泛,模型良好,但其研究的模型动物、耗时长短、药物剂量、诱导方式等依然没有统一标准。期待未来有更多实验着重于慢阻肺动物模型的研究,为解决 COPD 的发病机制、寻找有效靶点药物等作出贡献。

参 考 文 献(References)

- [1] Ko FW, Chan KP, Hui DS, et al. Acute exacerbation of COPD [J]. *Respirology*, 2016, 21(7): 1152-1165.
- [2] Gu YH, Yamasita T, Kang KM. Subchronic oral dose toxicity study of *Enterococcus faecalis* 2001 (EF 2001) in mice [J]. *Toxicol Res*, 2018, 34(1): 55-63.
- [3] Sun X, Feng X, Zheng D, et al. Ergosterol attenuates cigarette smoke extract-induced COPD by modulating inflammation, oxidative stress and apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(13): 1523-1536.
- [4] Ito JT, Cervilha DAB, Lourenço JD, et al. Th17/Treg imbalance in COPD progression: a temporal analysis using a cs-induced model [J]. *PLoS One*. 2019, 14(1): 1-19.
- [5] He S, Li L, Sun S, et al. A novel murine chronic obstructive pulmonary disease model and the pathogenic role of microRNA-21 [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 503-515.
- [6] 姜友军, 张培蓓, 叶贤伟. 慢性阻塞性肺疾病鼠类动物模型研究进展 [J]. *医学综述*, 2021, 27(7): 1350-1357.
Jiang YJ, Zhang PB, Ye XW. Research progress in rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Med Rec*, 2021, 27(7): 1350-1357.
- [7] Wang XL, Li T, Li JH, et al. The effects of resveratrol on inflammation and oxidative stress in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Molecules*, 2017, 22(9): 1529-1542.
- [8] 王智超, 吴雨潇, 王振兴, 等. LPS 联合烟熏致 COPD 大鼠模型的证候判定 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(6): 2035-2041.
Wang ZC, Wu YX, Wang ZX, et al. Syndrome judgment of COPD rat model induced by LPS combined with smoking [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2020, 22(6): 2035-2041.
- [9] 熊英, 张金娟, 李玲, 等. 香烟烟雾对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺功能及血清细胞因子水平影响 [J]. *实验动物与比较医学*, 2017, 37(4): 315-319.
Xiong Y, Zhang JJ, Li L, et al. Effects of cigarette smoke on lung function and serum cytokine levels in chronic obstructive pulmonary disease rat [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2017, 37(4): 315-319.
- [10] Rho J, Seo CS, Hong EJ, et al. Yijin-tang attenuates cigarette smoke and lipopolysaccharide-induced chronic obstructive pulmonary disease in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 1-12.
- [11] Shin NR, Kim SH, Ko JW, et al. Hemohim, a herbal preparation, alleviates airway inflammation caused by cigarette smoke and lipopolysaccharide [J]. *Lab Anim Res*, 2017, 33(1): 40-47.
- [12] Yang Y, Di T, Zhang Z, et al. Dynamic evolution of emphysema and airway remodeling in two mouse models of COPD [J]. *BMC Pulm Med*, 2021, 21(1): 134-144.
- [13] Gu XY, Chu X, Zeng XL, et al. Effects of PM2.5 exposure on the Notch signaling pathway and immune imbalance in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Environ Pollut*, 2017, 226: 163-173.
- [14] Chen L, Yuan X, Zou L, et al. Effects of 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 on the prevention of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in rats exposed to air pollutant particles less than 2.5 micrometers in diameter (PM2.5) [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 356-362.
- [15] Wang Z, Zhao J, Wang T, et al. Fine-particulate matter aggravates cigarette smoke extract-induced airway inflammation via Wnt5a-ERK pathway in COPD [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2019, 14: 979-994.
- [16] Chu X, Liu XJ, Qiu JM, et al. Effects of Astragalus and *Codonopsis pilosula* polysaccharides on alveolar macrophage phagocytosis and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease mice exposed to PM2.5 [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 48: 76-84.
- [17] 陈美凤, 加慧, 夏书月. 不同 COPD 动物模型特点及应用的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(4): 563-569.
Chen MF, Jia H, Xia SY. Research progress on the characteristics of animal models of chronic obstructive pulmonary disease and relate clinical applications [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(4): 563-569.
- [18] 梅晓峰, 吴婉柳, 肖振亚, 等. 补肺益肾方对 COPD 大鼠气道黏液高分泌及肺组织 Notch3, HES1 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(3): 68-75.
Mei XF, Wu WL, Xiao ZY, et al. Effect of bufei yishen prescription on airway mucus hypersecretion and notch3 and HES1 expression in lung tissues of rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(3): 68-75.
- [19] 陈庆芸, 刘美花, 韦超超, 等. 吸入烟雾联合经鼻滴入肺炎链球菌建立大鼠慢性阻塞性肺疾病模型 [J]. *基础医学与临床*, 2020, 40(10): 1407-1408.
Chen QY, Liu MH, Wei CC, et al. Inhaled smoke combined with nasal drip of *Streptococcus pneumoniae* to build a COPD rat model [J]. *Basic Clin Med*, 2020, 40(10): 1407-1408.
- [20] Herr C, Han G, Li D, et al. Combined exposure to bacteria and cigarette smoke resembles characteristic phenotypes of human COPD in a murine disease model [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2015, 67(3): 261-269.
- [21] Guan X, Lu Y, Wang G, et al. The role of regulatory t cell in nontypeable haemophilus influenzae-induced acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 24: 356-362.
- [22] Shu J, Li D, Ouyang H, et al. Comparison and evaluation of two different methods to establish the cigarette smoke exposure mouse model of COPD [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15454.
- [23] Leung JM, Tiew PY, Mac Aogáin M, et al. The role of acute and chronic respiratory colonization and infections in the pathogenesis of COPD [J]. *Respirology*, 2017, 22(4): 634-650.

- [24] Cui H, Liu X, Zhang J, et al. Attenuates cigarette smoke and lipopolysaccharide-induced COPD in rats via inflammation inhibition and antioxidant and antifibrosis pathways [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6103158.
- [25] Hou J, Wang J, Meng J, et al. *Zanthoxylum bungeanum* seed oil attenuates LPS-Induced BEAS-2B cell activation and inflammation by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 2073296.
- [26] Ghorani V, Boskabady MH, Khazdair MR, et al. Experimental animal models for COPD: a methodological review [J]. Tob Induc Dis, 2017, 15: 25–37.
- [27] 焦丽君, 章菁仪, 王欣燕. 中性粒细胞弹性蛋白酶对支气管扩张症作用机制的研究进展 [J]. 现代医学, 2021, 49(6): 710–713.
- Jiao LJ, Zhang JY, Wang XY. Research progress on the mechanism of neutrophil elastase on bronchiectasis [J]. Mod Med J, 2021, 49(6): 710–713.
- [28] Melo AC, Cattani-Cavaliere I, Barroso MV, et al. Atorvastatin dose-dependently promotes mouse lung repair after emphysema induced by elastase [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 160–168.
- [29] Ishii T, Hosoki K, Nikura Y, et al. FN regulatory factor 3 potentiates emphysematous aggravation by lipopolysaccharide [J]. J Immunol, 2017, 198(9): 3637–3649.
- [30] De Oliveira MV, Rocha NN, Santos RS, et al. Endotoxin-induced emphysema exacerbation: a novel model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations causing cardiopulmonary impairment and diaphragm dysfunction [J]. Front Physiol, 2019, 10: 664–680.
- [31] Rocha NN, de Oliveira MV, Braga CL, et al. Ghrelin therapy improves lung and cardiovascular function in experimental emphysema [J]. Respir Res, 2017, 18(1): 185–197.
- [32] Shu J, Lu W, Yang K, et al. Establishment and evaluation of chronic obstructive pulmonary disease model by chronic exposure to motor vehicle exhaust combined with lipopolysaccharide instillation [J]. Exp Physiol, 2018, 103(11): 1532–1542.
- [33] Oostwoud LC, Gunasinghe P, Seow HJ, et al. Apocynin and ebselen reduce influenza A virus-induced lung inflammation in cigarette smoke-exposed mice [J]. Sci Rep, 2016, 6: 20983.
- [34] 张甜甜, 王惠琴, 薛佩妮, 等. 铜绿假单胞菌及肺炎链球菌诱发 AECOPD 大鼠血清 PCT 和 IL-6 水平的变化及意义 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(11): 1198–1206.
- Zhang TT, Wang HQ, Xue PN, et al. Levels and significance of serum PCT and IL-6 in AECOPD rats induced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pneumoniae* [J]. J Patho Bio, 2018, 13(11): 1198–1206.
- [35] 包海蓝, 特日格乐, 其木格. 红花黄色素对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺功能的改善作用 [J]. 中国药房, 2021, 32(13): 1578–1582.
- Bao HL, Te RGL, Qi MG. Improvement effects of safflower yellow on lung function of chronic obstructive pulmonary disease model rats [J]. Chin Pharm, 2021, 32(13): 1578–1582.
- [36] Sun Z, Li F, Zhou X, et al. Generation of a chronic obstructive pulmonary disease model in mice by repeated ozone exposure [J]. J Vis Exp, 2017, 126: 56095.
- [37] 林敏聪, 张胜军. 慢性阻塞性肺疾病动物模型及评价方法研究进展 [J]. 海南医学, 2020, 31(15): 2006–2010.
- Lin MC, Zhang SJ. Advances in animal models and evaluation methods of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Hainan Med J, 2020, 31(15): 2006–2010.
- [38] Xiao C, Cheng S, Li R, et al. Isoforskolin alleviates AECOPD by Improving pulmonary function and attenuating inflammation which involves downregulation of Th17/IL-17A and NF- κ B/NLRP3 [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 721273.
- [39] Thiboutot J, Yuan W, Park HC, et al. Current advances in COPD imaging [J]. Acad Radiol, 2019, 26(3): 335–343.
- [40] 黄明, 张应洵, 陆丰荣, 等. PET-CT 观察矽肺动物模型可行性研究 [J]. 中国职业医学, 2017, 44(3): 245–252.
- Huang M, Zhang YX, Lu FR, et al. Observation and measurement of silicosis animal model by PET-CT [J]. Chin Occup Med, 2017, 44(3): 245–252.
- [41] 吉佳乐, 林爽, 曾晖, 等. 不同染色条件对 COVID-19 Nucleocapsid 抗体免疫组化染色的比较 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2021, 37(11): 1277–1280.
- Ji JL, Lin S, Zeng H, et al. Comparison of different staining conditions for immunohistochemical staining of COVID-19 nucleocapsid antibody [J]. J Clin Exp Pathol, 2021, 37(11): 1277–1280.

[收稿日期] 2021-12-12

姜宁,姚彩虹,叶帆,等. 大小鼠焦虑行为实验方法概述 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 698-704.

Jiang N, Yao CH, Ye F, et al. Overview of animal behavioral tests of anxiety [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 698-704.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.014

大小鼠焦虑行为实验方法概述

姜宁¹,姚彩虹¹,叶帆¹,孙秀萍²,刘新民^{1*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193;2. 北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021)

【摘要】 焦虑行为学实验是研究焦虑症等神经精神疾病发生机制及开发防护措施的必要手段。焦虑行为实验方法主要是基于啮齿类动物的探索本性与外界环境的矛盾“冲突”而引起焦虑情绪或动物面临不可避免或即将发生的厌恶性刺激时做出的情绪适应性反应建立的。常用的大小鼠焦虑行为实验方法可分为两大类,非条件反射和条件反射性。非条件反射包括探究行为、社会行为和防御行为,经典的实验方法包括旷场、高架十字迷宫、明暗箱、孔板、新奇环境摄食抑制实验等。条件反射包括饮水冲突、Geller-Seifter 冲突等。本文首次对常用的大鼠和小鼠焦虑行为实验的实验原理、操作步骤和评价指标进行系统的概述,旨在为研究者们在进行焦虑行为学实验时选择合适的行为学方法提供参考。

【关键词】 焦虑;行为实验方法;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0698-07

Overview of animal behavioral tests of anxiety

JIANG Ning¹, YAO Caihong¹, YE Fan¹, SUN Xiuping², LIU Xinmin^{1*}

(1. the Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100193, China. 2. Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Chinese Academy of Medical Sciences, Institute of Laboratory Animals Science, Beijing 100021)

Corresponding author: LIU Xinmin. E-mail: liuxinmin@hotmail.com

【Abstract】 Behavioral tests of anxiety are necessary to study the mechanisms of neuropsychiatric disorders, especially anxiety disorder, and to develop preventive measures. These tests are mainly based on the contradiction between the exploring nature of rodents and their fear of the external environment, or the emotional adaptive response when faced with an inevitable or imminent aversive stimulus. The commonly used behavioral tests for anxiety in rats and mice are divided into two main categories including the unconditioned reflex type and conditioned reflex type. Unconditioned reflex tests include exploratory, social, and defensive behaviors. Classical experimental method include the open field test, elevated plus-maze test, light-dark box test, orifice plate test, and novelty suppressed feeding test. Conditioned reflex tests include the vogel conflict test and Geller-Seifter conflict test. The experimental principles, operating steps, and evaluation indexes of these tests are systematically summarized in this article to provide a reference for researchers to choose appropriate behavioral method in anxiety behavior experiments.

【Keywords】 anxiety; behavioral test; animal model

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

【基金项目】 国家重大研发计划(2018YFC1602105),中国医学科学院创新工程(2021-I2M-1-034)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1602105), CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) grant (2021-I2M-1-034).

【作者简介】 姜宁(1989—),女,博士,助理研究员,研究方向:动物行为学和神经精神药理研究。Email:jiangning0603@163.com

【通信作者】 刘新民(1962—),男,博士,教授,研究员,博士生导师,研究方向:动物行为学和神经精神药理研究。

Email:liuxinmin@hotmail.com

焦虑症是一种常见精神疾病,以急性焦虑反复发作作为特征,主要表现为发作性或持续性的恐惧、担心和焦虑、紧张等情绪反应,并伴有自主神经功能失调、肌肉紧张与运动不安等症状^[1]。临床上焦虑症主要分为广泛性焦虑障碍、惊恐障碍、社交焦虑障碍、强迫障碍、特异性恐惧症等类型。在精神障碍中,焦虑症的终身患病率最高,影响到 30% 的人口^[2-3],严重影响人们的生活质量和水平^[4]。焦虑症的诱发因素与心理、社会、生理等多种因素有关,其发病机制复杂,目前尚未阐明,研究表明可能涉及到神经生化、神经免疫、神经内分泌等方面。近年来,对焦虑症发病机制的研究和防治药物的研发已成为国内外的研究热点。基于动物整体生理和心理状态综合反应的动物行为学实验可以反映复杂神经系统对外界刺激后经过一系列的生理、生化加工过程后产生的综合性整体效应,已成为研究焦虑症等神经精神类疾病发病机制和药物研发的基本实验手段^[5]。

焦虑行为的实验方法主要是基于啮齿类动物的探索本性与外界环境的矛盾“冲突”从而引起的焦虑情绪或动物在面临不可避免或即将发生的厌恶性刺激时做出的情绪适应性反应,包括抑制性回避、警觉性增高、神经内分泌改变等建立的。常用的大小鼠焦虑行为实验方法可以分为两大类,非条件反射和条件反射。非条件反射包括探究行为、社会行为和防御行为,经典的实验方法包括旷场实验、高架十字迷宫实验、明暗箱实验、孔板实验、新奇环境摄食抑制实验和新奇物体探索实验等。条件反射包括饮水冲突、Geller-Seifter 冲突等。本文以 PubMed 和 CNKI 等中英文文献库为重点进行查阅,分析整理相关文献,对常用的大鼠和小鼠焦虑行为实验技术和方法进行概述,为基于动物行为学的焦虑行为科学研究提供参考。

1 非条件反射实验方法

1.1 高架十字迷宫实验

Pellow 等^[6]将 1955 年建立的高架十字迷宫实验(elevated plus-maze)发展并应用于评价大鼠焦虑状态,证明了高架十字迷宫实验可以有效的评价大鼠焦虑样行为。1987 年,Lister^[7]在此基础上对装置进行了改进,用于评价小鼠焦虑样行为。高架十字迷宫实验是利用啮齿类动物对新异环境的探究

特性和对高悬敞开臂的恐惧形成的矛盾冲突状态设计的^[8]。当动物在中央区时,同时面对开臂(开臂和外界相通)和闭臂(封闭的通道),由于对新奇环境的先天的好奇,动物会更多的去探究开臂的环境。但是悬敞的高悬开臂又具有一定的威胁性,从而诱发矛盾冲突,产生焦虑行为,在实验中,焦虑水平高的动物会在闭臂(“无新奇、安全”)中的停留时间更长。抗焦虑药物则能使动物克服恐惧所导致的探究抑制,表现为在开臂停留更多的时间,对开臂的探究次数也增多。高架十字迷宫具有简便快速、敏感性高、重复性好等优点,是最经典的评价啮齿类动物焦虑状态的实验方法。此外,高架十字迷宫实验也是国际上公认的状态性焦虑模型,广泛用于抗焦虑药物的筛选,且对安定类抗焦虑剂尤其敏感。

1.1.1 实验方法

将大(小)鼠置于高架十字迷宫中央,动物头朝(面向)开臂,立即开始实验,没有适应期,为了减少干扰,观察者应距离迷宫中心至少 1 m。实验时间应为 5 min。为了提高大小鼠入臂总次数,避免大小鼠总是躲在闭臂中,通常在测试前先将大小鼠放在开阔场地中适应 5 min 后再放入迷宫中进行实验。研究发现低强度光线可以明显增加实验动物进入开臂的时间和次数且不影响其自发活动^[9],建议在低强度光线下进行此实验。

1.1.2 评价指标

目前在高架十字迷宫实验中最常使用的评价指标为动物进入开臂次数比例以及开臂时间比例,其他参考指标包括动物进入开臂时间和次数,进入闭臂的时间和次数等,也作为焦虑行为评价的参考指标。以动物四肢全部入开(闭)臂作为进出开(闭)臂的标准,具体指标包括^[10-11]:

(1)开臂次数:实验时间内进入开臂的总次数。如果一个药物增加动物进入开臂的次数和,而不改变入臂总次数,则认为该药有抗焦虑作用。正常组动物开臂次数大于 10 次。

(2)开臂次数百分比:实验时间内动物进入开臂的次数/进入开臂和闭臂总次数之和 $\times 100\%$ 。与焦虑程度成反比。正常组动物开臂次数百分比范围为 10% ~ 45%。

(3)开臂时间百分比:实验时间内,动物进入开臂的时间/进入开臂和闭臂的总时间之和 $\times 100\%$ 。

正常组动物开臂时间百分比范围为 10% ~ 40%。

(4)总次数:实验时间内进入开臂和闭臂的总次数之和。

(5)闭臂次数:实验时间内进入闭臂的总次数。总次数不变时,动物进入闭臂的次数越多,表明动物焦虑程度越重。

(6)闭臂次数百分比:进入闭臂的总次数/开臂和闭臂总次数之和。

1.2 明暗箱实验

明暗箱实验(light/dark box test)是由 Crawley 等^[12]于 1980 年所建立。其原理是利用啮齿类的嗜暗习性设计的,动物对新奇环境更有兴趣、更好奇,会去探究,但又对明室中的亮光先天的厌恶,由此形成矛盾冲突状态表现出焦虑行为,实验中体现为动物的穿箱次数的减少。抗焦虑药物可显著增加鼠的穿箱次数以及在明室时间。明暗箱实验操作简单快速且不需要事先训练动物,广泛应用于啮齿类动物焦虑行为的评价和抗焦虑药物研发。此外,明暗箱实验也是公认的状态性焦虑模型可以用来筛选潜在的抗焦虑药物。但由于明暗箱实验是基于动物的一般性探索行为,需要对其运动功能进行评价以排除由于自发活动影响实验的准确性。

1.2.1 实验方法

实验开始时从明室或暗室放入动物,无适应期,观察动物进出明暗室的行为。测试时间有 5 ~ 30 min,一般为 10 min^[13]。

1.2.2 评价指标

避暗实验中明室穿箱次数以及明室滞时间是评价焦虑的经典指标,其他指标如明室和暗室内指标均包括潜伏期、次数、路程、速度以及运动总时间和运动总路程等指标,可作为焦虑行为评价的参考指标^[14-15]。

(1)(暗室)时间:动物在明室(暗室)停留的时间;动物在暗室中停留时间应大于总时间的 60%,5 min 不进入暗室的动物可剔除。

(2)穿箱次数:动物进入暗室次数与进入明室次数之和。检测时间 5 min,正常组动物穿箱次数多大于 5 次。次数越少,表示焦虑程度越轻。

(3)潜伏期:动物第一次从明室(暗室)完全进入暗室(明室)的时间。

(4)其余可作为焦虑行为评价的参考指标:如明室(暗室)运动时间,明室(暗室)路程等。

1.3 新奇环境摄食抑制实验

新奇环境抑制摄食实验(novelty-suppressed feeding test)是由 Britton 等^[16]于 1981 年建立,最早用于抗焦虑药物的评价,其原理是禁食后的动物在处于一个新奇的环境中会产生摄食欲望和对环境恐惧的矛盾冲突,给予抗焦虑药物可使动物的这种矛盾冲突反应降低,表现为首次摄食潜伏期缩短^[17]。1988 年, Bodnoff 等^[18]首次证实该实验可用于检测抗抑郁药物是否具有抗焦虑作用。由于焦虑是抑郁症患者常见的症状,因此新奇抑制摄食实验常用于评价抑郁动物模型出现的焦虑样行为。

1.3.1 实验方法

实验总共需要 2 ~ 3 d:实验动物禁食(不禁水)24 ~ 48 h 后进入检测期。检测开始前在测试箱中央提前放入事先准备好的大小相同的食丸(小鼠:1 ~ 2 粒,大鼠 5 ~ 8 粒),然后将所有动物面朝箱壁放入测试箱的一角,开始检测,计算大鼠开始摄食的潜伏期。检测时间:小鼠一般为 5 ~ 10 min,大鼠为 10 ~ 15 min^[19-22]。

1.3.2 评价指标

摄食潜伏期:动物自放入测试箱到首次摄取食物的时间(摄食的判定标准是动物开始咀嚼食物,而不是仅仅嗅闻或摆弄食物摄食潜伏期)。如在检测期内动物仍未摄食,则摄食潜伏期记为检测总时长。检测时间为 5 min,多数正常组小鼠的摄食潜伏期小于 4 min。检测时间为 15 min,多数正常组大鼠的摄食潜伏期小于 13 min。摄食潜伏期越长,表示焦虑程度越重。摄食潜伏期在统计学上有显著性差异($P < 0.05$),则视为新奇环境摄食抑制实验评价焦虑行为有改变。

1.4 旷场实验

旷场实验(open field test)是评价啮齿类实验动物状态焦虑行为的经典方法,当动物被放入陌生的开放场(陌生环境)后,由于对陌生环境的恐惧会主要在周边区域活动,但对陌生环境的新奇感又会促使其对中央区域进行探究,从而产生冲突“矛盾”^[23]。旷场实验最早由 Hall^[24]于 1934 年提出,早期是通过记录动物在箱子里的排泄物数来反映动物的焦虑情绪,现如今主要通过记录动物的运动情况来评价动物焦虑行为。旷场实验设备简单,操作简便,被广泛用于神经精神药理学的基础研究,是一种测试经典苯二氮卓类和 5-HT_{1A} 激动剂类抗

焦虑药的行为效应的模型和检测方式,而对三唑仑、苯二氮磷类及选择性五羟色胺重吸收抑制剂无效^[25]。

1.4.1 实验方法

实验开始前,调整旷场实验环境灯光,一般在空场上方照明,或在透明地板下方照明,有时使用红外灯。有文献选用中央区的灯光强度为 100 ~ 150 LX,也有照明区域灯光强度为 8 ~ 13 LX。实验开始时,将小鼠放入旷场测试箱的中央区即开始检测。检测无适应期,实验检测时间为 5 ~ 10 min,也有文献报道 15 ~ 30 min^[26]。

1.4.2 评价指标

(1)运动总时间:动物在实验记录时间内的运动状态的时间累积。

(2)总路程:在检测时间内动物的运动总路程。

(3)中央区/周边区时间比值:动物在中央区/周边区停留总时间的比值。为焦虑行为评价的主要指标。中央区宜划分测试箱总面积的 30% ~ 50%。

(4)中央区/周边区运动路程比值:动物在中央区/周边区运动的路程。

与空白组相比,不改变总的运动状态的情况下,中央区时间显著减少,表明动物的焦虑状态。其它指标如粪便颗粒数、理毛次数可作为焦虑行为评价的参考指标。

1.5 孔板实验

1962 年, Boissier 等^[27]建立了孔板实验(holeboard test),用于评价动物对不熟悉环境的反应,广泛用于评估动物情绪、焦虑和压力和药效研究^[28]。孔板实验是利用动物在孔板箱中产生新奇和恐惧的矛盾冲突,诱导焦虑反应,探头次数和时间减少。动物反复探头反应其对新环境的新奇感和逃避的渴望,抗焦虑药物可增加动物的探头次数和时间。

1.5.1 实验方法

检测时,将小鼠背对实验者置于孔板中央,孔板实验检测时间多为 5 min^[29]。

1.5.2 评价指标

(1)探头次数:动物在检测时间内动物探头的总次数(动物两眼消失在洞中为 1 次探头)。

(2)探头时间:动物在检测时间内动物探头的

总时间。不改变动物自主活动状态的情况下,探头次数和时间减少,表明动物的焦虑状态。其它指标如探头潜伏期和自主活动数可作为焦虑行为评价的参考指标。

2 条件反射实验方法

2.1 饮水冲突实验

饮水冲突实验(water-drinking conflict test/Vogel test)是根据禁水大鼠饮水动机与电击惩罚形成矛盾冲突状态的经典的焦虑行为评价实验,可用于动物焦虑状态的评价和抗焦虑药物的研发。该方法由 Vogel 等^[30]首先建立,由 Lippa 等^[31]进行了改进。同时,饮水冲突实验可作为基于饮水—电击冲突的焦虑症动物模型,研究发现苯二氮卓类、戊巴比妥类可以增加大鼠的点击次数,而吗啡、美匹莫林、氢溴酸东莨菪碱则无此效应^[32]。

2.1.1 实验方法

实验前将动物禁食 48 h、禁水 24 h。分两阶段进行^[33-34]:

(1)非惩罚饮水训练:动物禁水 24 h 后,应单只放入测试箱内,让其充分探究,直到发现瓶嘴并开始舔水,测试时间应为 3 min,淘汰舔水少于 300 次的大鼠。

(2)惩罚实验:将动物禁水 24 h 后置于测试箱开始实验。自动物第一次找到瓶嘴并开始舔水后自动开始计数和计时,动物舔水次数到 20 次时立即给予 1 次电击,如此重复循环。测试时间应为 3 min。

2.1.2 评价指标

舔水次数:惩罚期内大鼠舔吸水管的次数。焦虑模型动物的舔水次数明显减少,抗焦虑药则可增多动物的舔水次数。检测期内,正常动物惩罚期舔水次数为 200 ~ 400 次左右。

2.2 Geller-Seifter 冲突实验

1960 年, Geller 等^[35]根据 Estes 在 40 年代有关惩罚的研究工作,设计了基于对动物对奖赏物质渴望和惩罚刺激的害怕而产生的矛盾冲突的焦虑行为评价方法(Geller-Seifter conflict test),实验中,通过在给予饥饿大鼠(提前禁食)食物奖赏的同时给予一定的电击惩罚,抑制这种奖赏的获得,从而使大鼠产生矛盾冲突状态,给与抗焦虑药物可相应改变这种矛盾冲突状态。后期不少学者纷纷对

Geller-Seifter 程序进行改进后,形成了 Geller-Seifter 冲突实验,用于条件反射焦虑行为检测,同时也作为基于饮食-点击冲突的焦虑症动物模型用于抗焦虑工具药物的研究^[36]。由于 Geller-Seifter 冲突实验操作复杂,周期长,且对动物造成一定的伤害,目前已较少使用。

2.2.1 实验方法

经典 Geller-Seifter 程序由变动间期 (variable interval, VI) 和固定比率 (fixed ratio, FR) 两部分组成^[37-38]。

(1)训练期:FR1:大鼠禁食 24 h 后进行压杆训练,训练期为 3 d,以食丸(45 mg)作为奖赏(强化)训练其学会压杆操作,每次压杆都有一次强化(FR1),每天训练 30 min,连续 3 d。检测期间限制饮食饮水,使之维持在正常饲养体重的 80%,通过限制饮食饮水使动物产生饥渴感,以保持对奖赏物质的驱动力,整个奖赏操作阶段要维持饮食饮水限制。VI-2 min:平均每 2 min 的间隔给予大鼠一次奖励物质,每天训练 5 个周期,每次 15 min,每天训练总时间为 75 min。

(2)检测期:非惩罚(VI)期:压杆率较稳定后,则在间期内的每个 15 min 的周期内加入声刺激(3 min)。在声刺激期间,食物强化由 VI-2 min 变为 FR1。惩罚(FR)期:约 7 个训练期后,在声刺激间期中加入电击刺激(0.6 ~ 0.85 mA),声音信号期间:压杆,获得食物同时给予电击。

2.2.2 评价指标

压杆率:动物在规定时间内压杆的比率。主要的评价指标是非惩罚期和惩罚期的压杆率,前者用来检测药物非特异性效应,如镇静或兴奋效应,后者反映动物焦虑情绪的变化。抗焦虑剂选择性增加惩罚期反应,呈阳性结果,而非抗焦虑剂如抗精神病药、兴奋剂等均呈阴性反应。

3 总结与展望

大小鼠焦虑行为实验方法主要是基于啮齿类动物的探索本性与外界环境的矛盾“冲突”从而引起焦虑情绪或动物面临不可避免或即将发生的厌恶性刺激时做出的情绪适应性反应建立的。对于研究焦虑的发生发展机制、抗焦虑药物研发具有广泛的应用价值,在寻找有效的防护措施方面有着重大意义,如极地、高原、深海和太空等不同于地球生

活的极限环境,导致的焦虑症状,重大新发突发传染性疾病、地震和战争等诱导的创伤后应激综合症,焦虑是其主要的表现。由于动物的焦虑样行为并不是单一的情绪表现,而是一种复合的情绪,建议研究者在研究中至少采取上述实验方法中的 2 ~ 3 种去评价动物的焦虑行为。目前,在焦虑的科学研究中,最为常用的行为学实验方法为高架十字迷宫实验、旷场实验、明暗箱实验、新奇环境摄食抑制实验等非条件反射实验方法,非条件反射实验方法操作简单,无训练期,无适应期或熟悉期,不用施加惩罚或奖赏刺激,几乎对动物不产生正向或者反向应激,但值得注意的是,该类方法的准确性与动物运动机能状态密切相关,凡能影响动物运动机能的药物和动物本身状态均可能影响该实验的正常结果。此外,焦虑行为学实验受检测装置(尺寸、形状、颜色等)和环境(灯光与位置,声音与气味,观察者等)不同因素的影响,进行实验时,应尽量保证安静、稳定的实验环境,减少干扰因素。条件反射实验方法如饮水冲突、Geller-Seifter 冲突等焦虑行为学实验方法往往结合惩罚性刺激(电击)的策略,动物在饮水或者获得奖赏和避免电击之间的矛盾心理冲突引起焦虑,此类方法对动物会造成伤害性刺激,目前已较少使用。目前焦虑行为学实验的主要评价指标大多数是评价动物水平运动情况,例如在某个水平区域的活动的路程、时间和速度等或进入某个水平区域的次数,然而对于垂直运动的相关参数和情绪性维度的指标像理毛次数,排便次数提取较少,且这些指标的提取主要依靠人工观察计数。随着云计算、大数据、人工智能、数字分析引擎等各种新技术向动物行为实验领域的交叉渗透融合,给提取动物的三维运动情况,情绪性指标提供了技术基础,为多维度精细活动信息全方位采集提供了可能。可以预测将各种的技术融合于动物行为实验研究中,提取更精细敏感的行为学指标,构建更系统的行为学评价方法,是动物行为实验方法的发展方向。

参 考 文 献(References)

- [1] Rouillon F. Anxiety with depression: a treatment need [J]. Eur Neuropsychopharm, 1999, 9(3): S87-S92.
- [2] Demyttenaere K, Bruffaerts R, Posada-Villa J, et al. Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the world health organization world mental health

- surveys [J]. JAMA, 2004, 291(21): 2581-2590.
- [3] Kessler RC, Berglund P, Demler O, et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of dsm-iv disorders in the national comorbidity survey replication. [J]. Arch Gen Psychiatry, 2005, 62(6): 593-602.
- [4] 刘洁. 基于 HPA 轴及 BDNF-ERK-ECS 信号通路探讨酸枣仁—五味子药对的抗焦虑作用及其机制 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2018.
- Liu J. Based on HPA axis and BDNF-ERK-ECS signaling pathway to investigate the anti-anxiety effect and mechanism of suanzaoren-schisandra herbal pair [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2018.
- [5] 姜宁, 张亦文, 姚彩虹, 等. 大小鼠抑郁行为实验方法概述 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 830-838.
- Jiang N, Zhang YW, Yao CH, et al. Overview of animal behavioral tests of depression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 830-838.
- [6] Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze; a novel test of anxiety in the rat [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1986, 24(3): 525-529.
- [7] Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse [J]. Psychopharmacology (Berl), 1987, 92(2): 180-185.
- [8] Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1997, 21(6): 801-810.
- [9] Garcia AM, Cardenas FP, Morato S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze [J]. Physiol Behav, 2005, 85(3): 265-270.
- [10] Yao JQ, Liu C, Jin ZL, et al. Serotonergic transmission is required for the anxiolytic-like behavioral effects of YL-IPA08, a selective ligand targeting TSPO [J]. Neuropharmacology, 2020, 178(5): 108230.
- [11] Gomes KS, Nunes-De-Souza RL. Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5HT_{1A}) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2009, 33(7): 1261-1269.
- [12] Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1980, 13(2): 167-170.
- [13] Hascoët M, Bourin M. A new approach to the light/dark test procedure in mice [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1998, 60(3): 645-653.
- [14] 张宏霞, 吕静薇, 张北月, 等. 一种大小鼠明暗箱图像分析处理系统的研制 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(4): 43-49, 72.
- Zhang HX, LV JW, Zhang BY, et al. Development of a computer-aided-controlling and image analysis system for light/dark box test in mice and rats [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(4): 43-49, 72.
- [15] Cheng CH, Costall B, Kelly ME, et al. Actions of 5-hydroxytryptophan to inhibit and disinhibit mouse behaviour in the light/dark test [J]. Eur J Pharmacol, 1994, 255(1-3): 39-49.
- [16] Britton DR, Britton KT. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1981, 15(4): 577-582.
- [17] 张晶. 幼年注射氟西汀诱导的小鼠成年抑郁模型的研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院; 2009.
- Zhang J. Study on adult mouse depression model induced by childhood injection of fluoxetine [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences; 2009.
- [18] Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Aitken DH, et al. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety [J]. Psychopharmacology (Berl), 1988, 95(3): 298-302.
- [19] Gregorio DD, McLaughlin RJ, Posa L, et al. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain [J]. Pain, 2019, 160(1): 136-150.
- [20] Abela AR, Browne CJ, Sargin D, et al. Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus [J]. Neuropharmacology, 2020, 168(18): 107985.
- [21] Steimer T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues [J]. Dialogues Clin Neurosci, 2011, 13(4): 495-506.
- [22] 兰嘉琦, 赵春阳, 吴镭, 等. 抗焦虑障碍药物非临床药效学评价体系探索 [J]. 药学报, 2021, 56(4): 949-965.
- Lan JQ, Zhao CY, Wu L, et al. Exploration on non-clinical anxiety disorder models [J]. Acta Pharma Sin, 2021, 56(4): 949-965.
- [23] Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice [J]. J Vis Exp, 2015, 6(96): e52434.
- [24] Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. defecation and urination as measures of individual differences in emotionality [J]. J comp physiol, 1934, 18(3): 385-403.
- [25] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 463(1-3): 3-33.
- [26] Hale MW, Hay-Schmidt A, Mikkelsen JD, et al. Exposure to an open-field arena increases c-fos expression in a distributed anxiety-related system projecting to the basolateral amygdaloid complex [J]. Neuroscience, 2008, 155(3): 659-672.
- [27] Boissier JR, Simon P. The exploration reaction in the mouse. Preliminary note [J]. Therapie, 1962, 17: 1225-1232.
- [28] Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice [J]. Eur J Pharmacol, 1998, 350(1): 43-49, 72.

- 21-29.
- [29] Wang X, Li G, Li P, et al. Anxiolytic effects of orcinol glucoside and orcinol monohydrate in mice [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(6): 876-881.
- [30] Vogel JR, Beer B, Clody DE. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents [J]. *Psychopharmacologia*, 1971, 21(1): 1-7.
- [31] Lippa A, Czobor P, Stark J, et al. Selective anxiolysis produced by ocinaplon, a GABA(A) receptor modulator [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(20): 7380-7385.
- [32] Millan MJ, Brocco M. The vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463(1-3): 67-96.
- [33] Kennett GA, Trail B, Bright F. Anxiolytic-like actions of bw 723c86 in the rat vogel conflict test are 5-HT_{2b} receptor mediated [J]. *Neuropharmacology*, 1998, 37(12): 1603-1610.
- [34] Stachowicz K, Golembiowska K, Sowa M, et al. Anxiolytic-like action of mtep expressed in the conflict drinking vogel test in rats is serotonin dependent [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 53(6): 741-748.
- [35] Geller I, Seifter J. The effects of meprobamate, barbiturates, D-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat [J]. *Psychopharmacology*, 1960, 1(6): 482-492.
- [36] Pollard GT, Howard JL. The geller-seifter conflict paradigm with incremental shock [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1979, 62(2): 117-121.
- [37] Babbini M, Gaiardi M, Bartoletti M. Benzodiazepine effects upon geller-seifter conflict test in rats; analysis of individual variability [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1982, 17(1): 43-48.
- [38] Kennett GA, Bright F, Trail B, et al. Anxiolytic-like actions of the selective 5-HT₄ receptor antagonists sb 204070a and sb 207266a in rats [J]. *Neuropharmacology*, 1997, 36(4-5): 707-712.
- [收稿日期] 2022-01-29

《中国实验动物学报》稿约

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

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!

尹娜,陈秋燕,王瑞芳,等. 模式生物斑马鱼在植物多糖生物活性评价中的应用进展[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 705-712.

Yin N, Chen QY, Wang RF, et al. Progress in the application of model organism zebrafish in the evaluation of plant polysaccharide bioactivity [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 705-712.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.015

模式生物斑马鱼在植物多糖生物活性评价中的应用进展

尹娜, 陈秋燕, 王瑞芳, 齐景伟, 王园*

(1. 内蒙古农业大学动物科学学院, 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古自治区草食家畜饲料工程技术研究中心, 呼和浩特 010018)

【摘要】 斑马鱼作为一种新型的模式动物, 因其个体小、发育周期短和透明易观察等优点, 已在发育生物学、遗传学、基础医学、药理学、毒理学、药物研发以及生态环境评价等诸多领域得到了广泛应用, 并且随着功能性食品、营养品和天然化妆产品的需求不断增加。斑马鱼已经是一种实用工具, 可有效鉴别天然产品中的有效物质。近年来, 作为国际公认的新型脊椎类模型动物, 斑马鱼已用于多种植物多糖及产品的抗氧化、免疫调节及心脏保护等生物活性评价。本文将介绍近年来斑马鱼作为模式动物在多糖, 特别是植物多糖生物活性研究的进展。

【关键词】 斑马鱼; 植物多糖; 生物活性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0705-08

Progress in the application of model organism zebrafish in the evaluation of plant polysaccharide bioactivity

YIN Na, CHEN Qiuyan, WANG Ruifang, QI Jingwei, WANG Yuan*

(1. College of Animal Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China. 2. Inner Mongolia Herbivorous Livestock Feed Engineering Technology Research Center, Hohhot 010018)

Corresponding author: WANG Yuan. E-mail: wangyuan.926@163.com

【Abstract】 Being a new model animal, zebrafish has been widely used in many fields such as developmental biology, genetics, basic medicine, pharmacology and toxicology, drug development, and ecological environment evaluation because of its small size, short developmental cycle and transparency for easy observation. And with the increasing demand for functional foods, nutritional products, and natural cosmetic products, zebrafish has been a practical tool to effectively identify the active substances in natural products. In recent years, as a new internationally recognized vertebrate model animal, zebrafish have been used for the evaluation of biological activities such as antioxidant, immunomodulation, and cardioprotection of various plant polysaccharides and products. In this paper, we will introduce the progress of zebrafish as a model animal in the study of polysaccharides, especially plant polysaccharide bioactivity in recent years.

【Keywords】 zebrafish; plant polysaccharides; bioactivity

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

【基金项目】 内蒙古自然科学基金项目(2020MS03041), 内蒙古自治区关键技术攻关计划项目(2020GG0030), 内蒙古农业大学科技成果转化专项资金(YZGC2017025), 内蒙古自治区科技重大专项(2020ZD0004)。

Founded by Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2020MS03041), Key Technology Project of Inner Mongolia Autonomous Region Funded by (2020GG0030), Scientific and Technological Achievements Transformation Project of IMAU (YZGC2017025), the Major Science and Technology Program of Inner Mongolia Autonomous Region (2020ZD0004).

【作者简介】 尹娜(1997—), 女, 博士, 研究方向: 生物饲料的研发与应用。Email: yinna0420@163.com

【通信作者】 王园(1986—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物饲料的研发与应用。Email: wangyuan.926@163.com

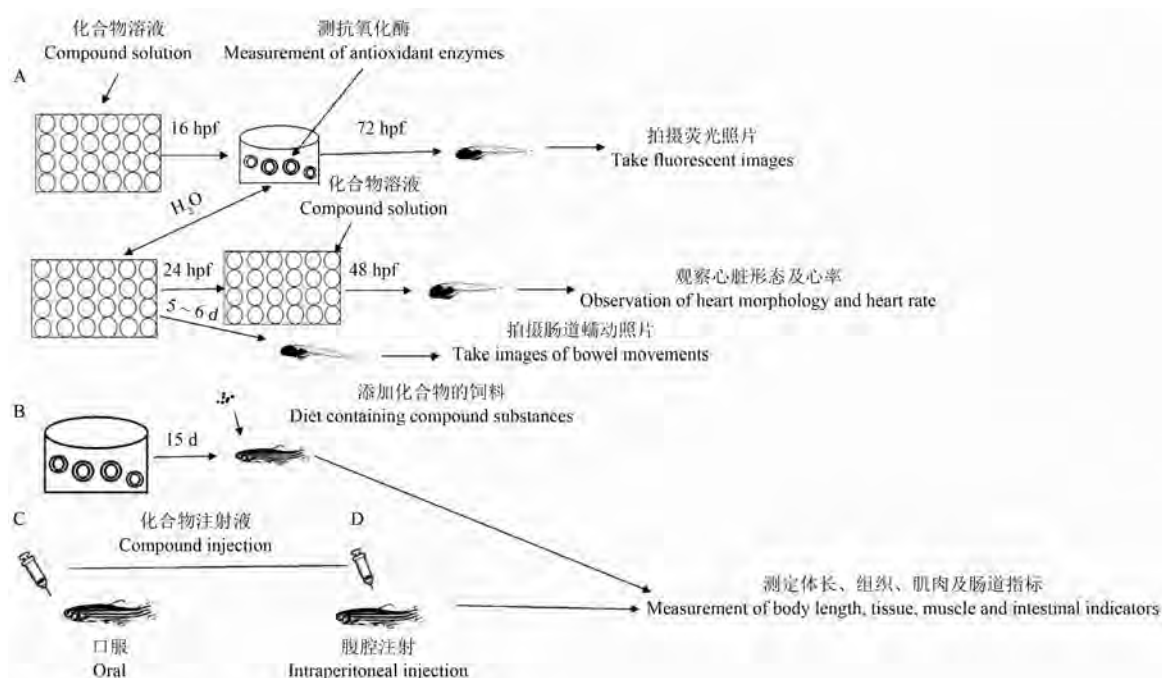
植物多糖 (plant polysaccharides, PP) 是由相同或者不同的单糖通过 α -或者 β -糖苷键组成的聚合度 10 以上的化合物^[1]。随着分子生物学的发展, 科学界逐渐认识到, 多糖与蛋白质、核酸并列为 3 大生物大分子, 在植物体的生长发育过程中发挥着重要作用^[2]。同时, 因其具有抗氧化、免疫调节、降血脂、降血糖、抗肿瘤等生物功能^[3-6], 被广泛应用于医药、食品、饲料、保健品和化妆品行业。我国中草药资源丰富, 越来越多来源于中草药的植物多糖被应用于食品行业, 但仍存在如何快捷有效鉴别其生物活性并评价安全性的问题。

国际上公认的植物多糖生物活性评价方法有体内、外两种。体外试验可以更经济且更快的得到结论, 但在不能确定植物多糖体内吸收、分布、代谢和排泄的规律时, 进行以模式动物开展的体内试验是非常有必要。斑马鱼具有遗传同源性高、繁殖力强、发育快及透明易观察等特点, 继大鼠和小鼠之后, 被美国国家卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 列为第三大模式动物, 已在药物研发、药理毒理学领域得到了广泛应用。近年来, 植物多糖的研发和应用已成为食品领域研究的重点和热点, 模式生物斑马鱼在植物多糖生物活性评价方面得到了一定程度的应用。因此, 本文综述了

斑马鱼模型在植物多糖生物活性评价中的应用进展。

1 斑马鱼在植物多糖生物活性评价中的优势

斑马鱼作为一种脊椎动物模型, 已经被广泛应用于发育生物学、药物开发、安全药理学、毒理学及人类疾病模型的构建等研究领域^[7]。与其他哺乳类模式动物相比, 斑马鱼具有以下独特的生物学特性: 在实验室条件下斑马鱼可以实现全年产卵, 雌性斑马鱼每周可产数百枚卵, 具有很强的繁殖能力; 斑马鱼胚胎发育极快, 在受精后 13 hpf (hours post fertilization, hpf) 头部形成, 24 hpf 尾部形成, 在 36 hpf 时出现所有器官的前体, 并且 3 个月后成鱼就可以达到生殖成熟期^[8]; 斑马鱼与人类的遗传同源性高达 87%^[9], 并且具有遗传可操作与再生能力^[10], 这使得斑马鱼成为近年来研究脊椎动物胚胎发育及造血分化的动物模型^[11]; 斑马鱼胚胎及幼鱼透明便于观察; 给药方式多样, 最常见的方法是将化合物直接添加到培养斑马鱼胚胎、幼虫或成鱼的培养基或水中^[12]; 此外, 还可以将不溶性物质纳入饲料中, 以制备直径为 5 mm 的颗粒饲喂斑马鱼^[13]; 口服灌胃和注射可用于输送精确剂量的溶液 (图 1)^[14-15]。



注: A: 浸没在溶解了化合物的水中; B: 用添加化合物的饲料喂养; C: 麻醉后口服化合物溶液; D: 麻醉后腹腔注射化合物溶液。

图 1 斑马鱼给药方式及可测定指标

Note. A. Submerged in water with dissolved compounds. B. Feed with compound-added feed. C. Oral compound solution after anesthesia. D. Injection of compound solution after anesthesia.

Figure 1 Zebrafish administration method and measurable indicators

2 斑马鱼及其胚胎在植物多糖功能测定中的应用

在过去的 20 年里,斑马鱼因其生物学优势,逐渐成为生物和生物医学研究的最佳模式动物之一。虽然斑马鱼最初是作为发育遗传学的模型而被开发,但是它的用途已迅速扩展到植物多糖的多种生物活性研究中。

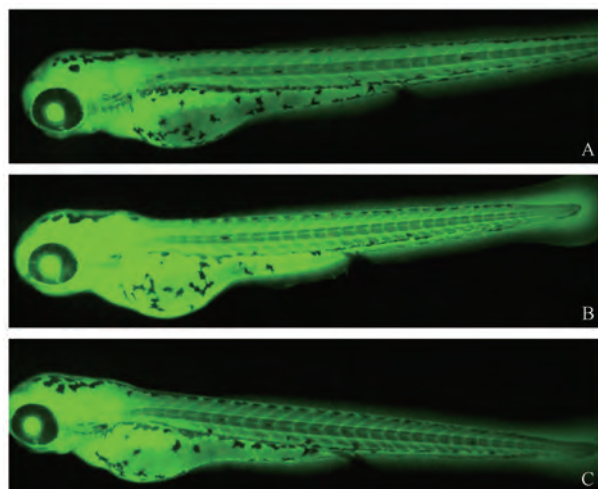
2.1 抗氧化活性

斑马鱼作为被广泛应用的抗氧化模型,通常采用偶氮二异丁脒盐酸盐(2, 2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride, AAPH)、 H_2O_2 、百草枯、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等处理诱导产生氧化应激,并产生包括活性氧(reactive oxygen species, ROS)和 NO^- 在内的自由基。ROS 是斑马鱼体内代谢的产物,可以被特异性的染料检测,加上斑马鱼胚胎透明的特点使得检测结果更加明显,用斑马鱼体内 ROS 检测模型检测 ROS 水平具有可靠、快速、高效、经济和高通量等优点^[16]。植物多糖作为天然存在的有效成分,常被用作食品添加剂。多糖分子上存在的还原性半醛羟基,可以与超氧阴离子自由基发生氧化还原反应,去除脂质过氧化反应产生的多余 ROS。如图 2 所示,用 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸(2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)预处理斑马鱼幼鱼在荧光显微镜下为绿色,荧光强度弱说明斑马鱼体内 ROS 产生少。Wang 等^[17]利用柑橘果渣制备其水提物,并研究了其体内抗氧化活性,结果发现,柑橘果渣水提物可显著提高 AAPH 诱导的斑马鱼胚胎存活率并缓解心率,降低斑马鱼胚胎的 ROS 和细胞死亡水平。同样, Kang 等^[18]研究发现,与 AAPH 诱导的氧化应激模型组相比,芦荟多糖的预暴露可显著降低斑马鱼胚胎的 ROS 水平和细胞死亡率,且呈剂量依赖性。Jayawardena 等^[19]利用分离纯化后的岩藻多糖(F10)对 LPS 处理的斑马鱼模型进行研究,结果表明 F10 有效降低了 LPS 诱导产生的斑马鱼胚胎中的 NO^- 、ROS 和细胞死亡水平且呈现剂量依赖性,同时斑马鱼胚胎中的炎性介质一氧化氮合酶、诱生型环氧化酶均被下调。对于高离子辐射引起的斑马鱼氧化应激而言,植物多糖同样具有缓解作用。Lee 等^[20]研究发现铁钉菜多糖对 γ 射线诱导斑马鱼产生氧化应激的影响,研究显示铁钉菜多糖可以增加斑马鱼存活率,减少卵黄囊水肿

及尾巴弯曲等畸形,同时也减少了斑马鱼细胞死亡率、ROS 和 NO^- 产生率。

2.2 免疫调节活性

研究发现,斑马鱼尽管没有淋巴结但是却有丰富的淋巴和发达的胸导管,并且斑马鱼与哺乳动物的免疫系统有着极大的相似性^[21],同样具有天然免疫系统和获得性免疫系统。在出生后 2 周内建立和发育完全透明的斑马鱼胚胎,以及可用免疫细胞荧光标记的转基因斑马鱼系的发展,使得跟踪斑马鱼胚胎这一完整生物体的免疫反应成为可能^[22]。据报道,肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是免疫系统中的一个重要媒介,通过激活巨噬细胞,刺激细胞因子的分泌来诱导先天免疫反应^[23]。先前研究发现,大多数来自植物、动物和真菌的多糖可与巨噬细胞表面受体结合,刺激 TNF- α 的分泌^[24-26]。Zhang 等^[27]利用斑马鱼证实了从芒果中分离出的 GMP90-1 按 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 给药 24 h 后发现 TNF- α 的水平以剂量依赖的方式明显增加,分别比对照组高出 5.6%、41.7% 和 200.1%,其他关于免疫功能基因白介素-6 和白介素-1 β 的水平也成剂量依赖性增加。Udayangani 等^[28]将从燕麦中提取的纳米级 β -葡聚糖可以上调斑马鱼幼鱼的 TNF- α 、白介素-1、 β -防御素、溶菌酶、白介素-10 及白介素-12 等,发现其可能具有触



注:A:未经诱导的斑马鱼幼鱼;B:诱导后的斑马鱼幼鱼;C:添加植物多糖预保护的斑马鱼幼鱼。

图2 斑马鱼 ROS 产生率变化

Note. A. Uninduced zebrafish larvae. B. Zebrafish larvae after induction. C. Zebrafish larvae pre-protected with added plant polysaccharides.

Figure 2 Changes in ROS production rate in zebrafish

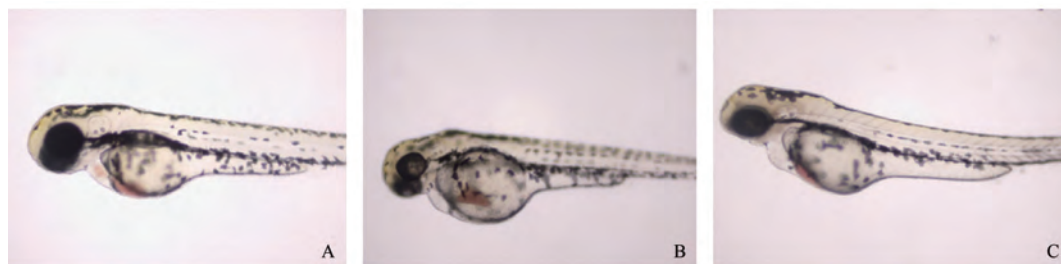
发先天性免疫的能力。同时还有其他研究证实从大冬青叶^[29]、金银花和山竹中分离出来的多糖同样也具有提高免疫调节的能力^[30-31]。

总之,斑马鱼在为评价植物多糖的免疫能力和免疫活性物质的相关应用中提供了理想的模型,不仅可以确定植物多糖的适宜浓度,还可以确定添加的形式,因此斑马鱼在验证植物多糖免疫方面具有很广阔的开发前景。

2.3 心脏保护

斑马鱼的心脏是两腔的,但与人类有共通的基本特性,其心率、收缩力学与动作电位等与人类在

生理方面表现出相同的特征^[32-34]。斑马鱼的心脏由心房、心室、动脉球及静脉窦组成,位于鱼体头段与胸腹段交界处最后一对鳃丝的后下方。在 5 hpf 时,心脏祖细胞出现,于 16 ~ 22 hpf 分化为心室和心房的心肌细胞^[35];24 hpf 跳动的线性心脏血管发育形成;48 hpf 心肌细胞重新排列,心脏的发育基本完成,心脏通过舒张期实现泵血功能^[36]。同时斑马鱼在早期的发育阶段并不依赖心脏循环生存。因此,心脏的发育紊乱不会立即造成胚胎死亡。再加上斑马鱼全身透明的特点可以看到心脏,使得斑马鱼成为一个具有吸引力的心脏模型(图 3)。



注:A:正常斑马鱼心脏形态;B:特非那定处理后斑马鱼心脏形态;C:添加植物多糖预保护后斑马鱼心脏形态。

图 3 斑马鱼心脏形态变化

Note. A. Heart morphology of normal zebrafish. B. Heart morphology of zebrafish after terfenadine treatment. C. Heart morphology of zebrafish after pre-protection with plant polysaccharides.

Figure 3 Morphological changes in zebrafish heart

特非那定,是一种从抗精神病药物的筛选中发现用于治疗过敏性疾病,和可选择性阻断 H1 受体而产生抗组胺作用的药物,常被用来诱导斑马鱼的心脏损伤^[37]。研究发现许多植物提取物均可以缓解由特非那定所引起的斑马鱼心脏损伤。斑马鱼的心率是评价心功能的指标之一,记录每分钟的心跳次数可用来评价植物多糖对心脏毒性的影响。例如段文娟等^[38]研究了不同相对分子质量的瓜蒌多糖使特非那定诱导的斑马鱼心率上升、缓解了斑马鱼的心率异常活性,其中 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 总样、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石油醚萃取物和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石油醚萃取物具有显著的保护作用,乙酸乙酯萃取物和水层样品在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下表现出一定的改善心脏毒性作用。郑秀花等^[39]则探究了瓜蒌不同部位的多糖对于特非那定引起的血流的节间血管数量和心率下降具有缓解作用,且结果表明 60%醇沉的瓜蒌多糖对心脏的保护作用最好。何俊霖等^[40]利用斑马鱼模型研究发现中低剂量异甘草素具有良好的抗血管生成和减慢心率的作用,高剂量则会随着作用时间的延长起到抑制发育的作用。静脉窦(SV)是血液进入心房的部位,动脉球(BA)是血液流出心室的

部位。斑马鱼 SV-BA 的距离可反应心脏环化程度,心房和心室的位置发生改变,SV-BA 距离相应变化。通过在显微镜下测量 SV-BA 间距可判断植物多糖对斑马鱼心脏的影响^[41]。陈秋燕等^[42]研究证明添加不同浓度提纯后的麸皮多糖能够使受损伤后的斑马鱼心脏 SV-BA 间距缩小,同时在最优浓度时斑马鱼的心脏损伤修复率可达 82.19% (斑马鱼心脏损伤修复率:心脏损伤修复率(%) = (给药治疗组斑马鱼心脏 SV-BA 间距 - 特非那定组斑马鱼心脏 SV-BA 间距) / (正常对照组斑马鱼 SV-BA 间距 - 模型组斑马鱼 SV-BA 间距) $\times$ 100%)。此外原花青素和西洋参等的多糖提取物同样具有心脏保护作用^[43-44]。可见,以斑马鱼为模型探讨植物多糖对心脏的保护是切实可行的,同时也为各类植物中药的研发带来了新思路。

2.4 脂质代谢

斑马鱼的脂质分布及代谢与人类的非常相似,并且斑马鱼体内主要的载脂蛋白人类的载脂蛋白具有很高的同源性。迄今为止,关于高脂血症模型的大多数研究都集中在哺乳动物上,包括高脂饮食诱导的高脂血症的小鼠、大鼠、兔和仓鼠模型。但

是,这些模型通常耗时且昂贵^[45-46]。用细胞模型进行药物筛选也是可行的,但是由于细胞模型缺乏器官结构,难以分析各组织器官中的脂质代谢情况。对比而言斑马鱼可以全程观察并研究其发育状况,方便分析饮食中的脂类分子在体内代谢的情况,为在斑马鱼幼虫中大规模筛选影响脂类代谢的小分子化合物提供了基础。例如,Wei 等^[47]利用固态发酵杏鲍菇产生的多糖(PESF)能够显著减少斑马鱼幼体高脂血症模型中的脂滴数量。在浓度为 200、400 和 600 $\mu\text{g/mL}$ 时,PESF 将脂质含量分别降低到 $(62\% \pm 20\%)$ 、 $(33\% \pm 9\%)$ 和 $(67\% \pm 15\%)$,结果表明,PESF 在斑马鱼幼体高脂血症模型中具有抑制脂质积累的生物活性。同时还有研究发现从菊苣中提取的多糖可以通过降低总胆固醇和甘油三酸酯的含量减少肝脂肪的变性,进而对高胆固醇诱导的斑马鱼幼鱼起到降脂作用,还可以减少脂质合成相关基因脂肪酸合成酶基因和固醇调节元件结合转录因子重组蛋白 1,并增加脂质氧化相关基因的表达^[48]。

除此之外,高胆固醇斑马鱼模型已运用于抗动脉粥样硬化植物化学物质的筛选和机理研究中。例如,姜黄和月桂树的水提取物已显示出可以减轻体重,并能够降低以高脂肪日粮(HCD)喂养的斑马鱼的总胆固醇和甘油三酯水平^[49]。该小组随后使用相同的 HCD 斑马鱼模型研究出 1,8-桉树脑(姜黄和月桂叶粉的亲水提取物的主要成分)可以通过提高抗氧化活性和增强的胆固醇逆向转运发挥抗炎和降脂作用^[50]。此外,使用高胆固醇斑马鱼模型还揭示了肉桂和丁香的水提取物以及葡萄皮^[51],枇杷叶和巴西莓的水提取物的抗动脉粥样硬化活性^[52]。

2.5 肠道蠕动

斑马鱼没有典型结构的胃,但消化管胃段在功能上与人类的胃高度同源。在细胞学和解剖学角度,斑马鱼的肠道结构与人类的相似,均由上皮细胞、结缔组织、环状肌及外纵肌组成^[53],并且在功能上也与人类高度同源。在 72 hpf 时斑马鱼胚胎发育成幼鱼,在摄食的情况下,首次出现不稳定的肠道自发性收缩。当斑马鱼幼鱼发育至 120 ~ 144 hpf 时,其肠道出现自发性的蠕动,这时便可以通过观察植物多糖对斑马鱼肠道蠕动次数的影响来评价植物多糖对斑马鱼肠道功能的作用。

尼罗红(9-二乙氨基-5 H-苯并[α]吩恶嗪-5-酮)是一种无毒,可用于标记活体细胞培养中的

巨噬细胞、平滑肌细胞中脂滴的荧光染料^[54]。当用尼罗红溶液处理斑马鱼卵时,可与含有丰富脂肪的卵黄囊结合。当斑马鱼成长到 5 ~ 6 d 时,大部分的卵黄囊被吸收,斑马鱼开始依靠自发的肠蠕动进食,在荧光显微镜下可以清晰的观察到斑马鱼肠道中尼罗红分布,同时尼罗红不会被其他组织所吸收^[55](图 4)。当斑马鱼肠道的荧光强度减弱时,说明给予的食品或药物有助于肠蠕动。研究发现,添加浓度为 125、250、500、1000 和 2000 $\mu\text{g/mL}$ 益身清(多种植物提取物的产物)时斑马鱼肠道内容物的荧光强度显著低于对照组,且促进肠蠕动的作用也从 0% 随着浓度的增加分别上升到 25%、45%、49%、62%、66%^[56]。杨胜杰等^[57]认为管花肉苁蓉提取物可以明显促进斑马鱼肠道蠕动,且呈剂量依赖性,并且在浓度 2000 $\mu\text{g/mL}$,促进率可达 23.26%,达到润肠通便的能力。低聚果糖是一类重要的功能性低聚糖,广泛存在于菊苣、菊芋、大蒜、洋葱及小麦等植物中^[58]。侯海荣等^[59]在研究过程中得出了随着低聚果糖溶液浓度在 125 ~ 500 mg/mL 浓度范围内增加时,斑马鱼的肠道蠕动次数也逐渐增加,并且在 500 mg/mL 的低聚果糖溶液处理 24 h 后,斑马鱼的肠道收缩强度与蠕动也更加明显。由上可知斑马鱼的肠道蠕动模型可以为之后植物多糖提取物在药品中的添加提供实验依据。



图 4 斑马鱼肠道内容物荧光染色图(尼罗红)

Figure 4 Fluorescent staining of zebrafish intestinal contents (Nile red)

3 结语

当前,关于植物多糖的生物活性研究主要集中于体外试验,缺乏体内试验研究。因此本文着重介绍了植物多糖评价中的斑马鱼模型,总结和讨论将斑马鱼作为一种工具,为快速、经济的筛选和评估对人类健康有潜在益处的植物多糖提供了一种可靠且易用的策略。同时为了使斑马鱼对人类健康更具指导意义,应进一步进行特定的基因敲除、过

度表达或引入目标基因来探索斑马鱼与人类之间的机制关系,以及了解植物多糖对斑马鱼的调节机制,使植物多糖在未来的开发中发挥出精准作用。此外应多关注植物多糖在斑马鱼的添加形式及时间,研究植物多糖在斑马鱼中的生物利用度和生物可及性。总的来说,斑马鱼模型是评价植物多糖的有效工具,可以在功能食品、营养品和化妆品的开发中发挥重要作用。

参 考 文 献(References)

- [1] Delattre C, Fenoradosa TA, Michaud P. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides [J]. *Braz Arch Biol Technol*, 2011, 54(6): 1075–1092.
- [2] Cosgrove DJ. Growth of the plant cell wall [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(11): 850–861.
- [3] Jin M, Huang Q, Zhao K, et al. Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 54: 16–23.
- [4] Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(3): 258–274.
- [5] Xie JH, Liu X, Shen MY, et al. Purification, physicochemical characterisation and anticancer activity of a polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* leaves [J]. *Food Chem*, 2013, 136(3–4): 1453–1460.
- [6] Xie JH, Wang ZJ, Shen MY, et al. Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from cyclocaryapaliurus [J]. *Food Hydrocolloid*, 2016, 53: 7–15.
- [7] Love DR, Pichler FB, Dodd A, et al. Technology for high-throughput screens; the present and future using zebrafish [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15(6): 564–571.
- [8] McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13(9–10): 394–401.
- [9] Woo K, Shih J, Fraser SE. Fate maps of the zebrafish embryo [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1995, 5(4): 439–443.
- [10] Brönnimann D, Annese T, Gorr TA, et al. Splitting of circulating red blood cells as an *in vivo* mechanism of erythrocyte maturation in developing zebrafish, chick and mouse embryos [J]. *J Exp Biol*, 2018, 221(15): jeb184564.
- [11] de Jong JL, Zon LI. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis [J]. *Annu Rev Genet*, 2005, 39: 481–501.
- [12] Caro M, Iturria I, Martinez-Santos M, et al. Zebrafish dives into food research: effectiveness assessment of bioactive compounds [J]. *Food Funct*, 2016, 7(6): 2615–23.
- [13] Dos Santos MM, de Macedo GT, Prestes AS, et al. Modulation of redox and insulin signaling underlie the anti-hyperglycemic and antioxidant effects of diphenyl diselenide in zebrafish [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 158: 20–31.
- [14] Collymore C, Rasmussen S, Tolwani RJ. Gavaging adult zebrafish [J]. *J Vis Exp*, 2013, 11(78): 50691.
- [15] Yan C, Do D, Yang Q, et al. Single-cell imaging of human cancer xenografts using adult immunodeficient zebrafish [J]. *Nat Protoc*, 2020, 15(9): 3105–3128.
- [16] Casares L, García V, Garrido-Rodríguez M, et al. Cannabidiol induces antioxidant pathways in keratinocytes by targeting BACH1 [J]. *Redox Biol*, 2020, 28(10): 13–21.
- [17] Wang L, Lee WW, Yang HW, et al. Protective effect of water extract of citrus pomace against aaph-induced oxidative stress *in vitro* in vero cells and *in vivo* in zebrafish [J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2018, 23(4): 301–308.
- [18] Kang MC, Kim SY, Kim YT, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of polysaccharide purified from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) gel [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 99: 365–371.
- [19] Jayawardena TU, Fernando IPS, Lee WW, et al. Isolation and purification of fucoidan fraction in turbinaria ornata from the maldives; inflammation inhibitory potential under LPS stimulated conditions in *in vitro* and *in vivo* models [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 131: 614–623.
- [20] Lee WW, Kang N, Kim AE, et al. Radioprotective effects of a polysaccharide purified from lactobacillus plantarum-fermented ishigeokamuriae against oxidative stress caused by gamma ray-irradiation in zebrafish *in vivo* model [J]. *J Funct Foods*, 2017, 28: 83–89.
- [21] Pressley ME, Phelan PE 3rd, Witten PE, et al. Pathogenesis and inflammatory response to edwardsiella tarda infection in the zebrafish [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29(6): 501–513.
- [22] Zapata A, Diez B, Cejalvo T, et al. Ontogeny of the immune system of fish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20(2): 126–136.
- [23] Tang S, Jiang M, Huang C, et al. Characterization of arabinogalactans from larix principis-rupprechtii and their effects on no production by macrophages [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 200: 408–415.
- [24] Lee SY, Zaske AM, Novellino T, et al. Probing the mechanical properties of TNF- α stimulated endothelial cell with atomic force microscopy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 179–195.
- [25] Feng J, Chang X, Zhang Y, et al. Characterization of a polysaccharide HP-02 from honeysuckle flowers and its immunoregulatory and anti-aeromonas hydrophila effects in *Cyprinus carpio* L [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 140: 477–483.
- [26] Wen Y, Peng D, Li C, et al. A new polysaccharide isolated from morchella importuna fruiting bodies and its immunoregulatory mechanism [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 137: 8–19.
- [27] Zhang S, Li Z, Wang X, et al. Isolation, structural elucidation, and immunoregulation properties of an arabinofuranan from the rinds of garcinia mangostana [J]. *Carbohydr Polym*. 2020, 246: 116567.

- [28] Udayangani RMC, Dananjaya SHS, Fronte B, et al. Feeding of nano scale oats β -glucan enhances the host resistance against *edwardsiella tarda* and protective immune modulation in zebrafish larvae [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 60: 72–77.
- [29] Prata MNL, Charlie-Silva I, Gomes JMM, et al. Anti-inflammatory and immune properties of the peltatoside, isolated from the leaves of *annona crassiflora* mart., in a new experimental model zebrafish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 101: 234–243.
- [30] Zhang S, An L, Li Z, et al. An active heteropolysaccharide from the rinds of *garcinia mangostana* linn.: structural characterization and immunomodulation activity evaluation [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 235: 115929.
- [31] Poss KD. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(10): 710–722.
- [32] Arnaout R, Ferrer T, Huiskens J, et al. Zebrafish model for human long QT syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(27): 11316–11321.
- [33] Leong IU, Skinner JR, Shelling AN, et al. Zebrafish as a model for long QT syndrome: the evidence and the means of manipulating zebrafish gene expression [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2010, 199(3): 257–276.
- [34] Yu F, Zhao Y, Gu J, et al. Flexible microelectrode arrays to interface epicardial electrical signals with intracardiac calcium transients in zebrafish hearts [J]. *Biomed Microdevices*, 2012, 14(2): 357–366.
- [35] Tu S, Chi NC. Zebrafish models in cardiac development and congenital heart birth defects [J]. *Differentiation*, 2012, 84(1): 4–16.
- [36] Zakaria ZZ, Benslimane FM, Nasrallah GK, et al. Using zebrafish for investigating the molecular mechanisms of drug-induced cardiotoxicity [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 1642684.
- [37] Vornanen M, Hassinen M. Zebrafish heart as a model for human cardiac electrophysiology [J]. *Channels (Austin)*, 2016, 10(2): 101–110.
- [38] 段文娟, 赵伟, 李月, 等. 瓜蒌不同部位对斑马鱼促血管生成及心脏保护作用 [J]. *中成药*, 2017, 39(6): 1261–1264. Duan WJ, Zhao W, Li Y et al. Angiogenic and cardioprotective effects of different parts of *trichosanthes kirilowii* on zebrafish [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2017, 39(6): 1261–1264.
- [39] 郑秀花, 郝翠, 王晓, 等. 瓜蒌多糖抗氧化及心脏保护活性研究 [J]. *食品科技*, 2017, 42(11): 222–226. Zheng XH, Hao C, Wang X, et al. Antioxidant and heart protection activities of polysaccharides from *trichosanthes kirilowii* maxim [J]. *Food Sci Technol*, 2017, 42(11): 222–226.
- [40] 何俊霖, 于思, 曹治兴, 等. 异甘草素对斑马鱼胚胎发育、血管生成和心脏的影响 [J]. *四川动物*, 2018, 37(6): 672–677. He JL, Yu S, Cao ZX, et al. Effects of Isoliquiritigenin on embryonic development, angiogenesis and heart in zebrafish embryos [J]. *SiChuan J Zool*, 2018, 37(6): 672–677.
- [41] 张利军. 斑马鱼心脏毒性评价模型的建立及美托洛尔心脏毒性作用机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院; 2012. Zhang LJ. Cardiotoxicity evaluation model of zebrafish and mechanism of metoprolol cardiotoxicity [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences of the Liberation Army; 2012.
- [42] 陈秋燕, 王园, 尹娜, 等. 发酵麦麸阿魏酰低聚糖的纯化工艺及其心脏保护作用研究 [J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(11): 21–28, 56. Chen QY, Wang Y, Yin N, et al. Study on purification technique of feruloylated oligosaccharides from fermented wheat bran and its heart protection activities [J]. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 2021, 36(11): 21–28, 56.
- [43] 李智平, 韩利文, 何秋霞, 等. 原花青素对特非那定诱导的斑马鱼心脏损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(3): 54–57. Li ZP, Han LW, He QX, et al. Protective effect of procyanidins to terfenadine-induced cardiac injury on zebrafish embryos [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2017, 33(3): 54–57.
- [44] 吕婧, 李晨, 杨龙飞, 等. 基于斑马鱼模型的西洋参提取物心脏保护作用研究 [J]. *中国药房*, 2020, 31(3): 308–313. Lv J, Li C, Yang LF, et al. Study on the heart protective effect of panax quinquefolium extract based on zebra fish model [J]. *Chin Pharm*, 2020, 31(3): 308–313.
- [45] Chen L, Liu L, Li C, et al. A mix of apple pomace polysaccharide improves mitochondrial function and reduces oxidative stress in the liver of high-fat diet-induced obese mice [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(3): 1–12.
- [46] Li J, Sapper TN, Mah E, et al. Green tea extract provides extensive Nrf2-independent protection against lipid accumulation and NF κ B pro-inflammatory responses during nonalcoholic steatohepatitis in mice fed a high-fat diet [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(4): 858–870.
- [47] Wei H, Yue S, Zhang S, et al. Lipid-lowering effect of the pleurotus eryngii (king oyster mushroom) polysaccharide from solid-state fermentation on both macrophage-derived foam cells and zebrafish models [J]. *Polymers (Basel)*, 2018, 10(5): 492.
- [48] Li M, Ma J, Ahmad O, et al. Lipid-modulate activity of cichorium glandulosum boiss. et huet polysaccharide in nonalcoholic fatty liver disease larval zebrafish model [J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 138(4): 257–262.
- [49] Jin S, Hong JH, Jung SH, et al. Turmeric and laurel aqueous extracts exhibit *in vitro* anti-atherosclerotic activity and *in vivo* hypolipidemic effects in a zebrafish model [J]. *J Med Food*, 2011, 14(3): 247–256.
- [50] Cho KH. 1, 8-cineole protected human lipoproteins from modification by oxidation and glycation and exhibited serum lipid-lowering and anti-inflammatory activity in zebrafish [J]. *BMB Rep*, 2012, 45(10): 565–570.
- [51] Kim JY, Hong JH, Jung HK, et al. Grape skin and loquat leaf

- extracts and acai puree have potent anti-atherosclerotic and anti-diabetic activity *in vitro* and *in vivo* in hypercholesterolemic zebrafish [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(3): 606-614.
- [52] Rich A. A new high-content model system for studies of gastrointestinal transit: the zebrafish [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2009, 21(3): 225-228.
- [53] Flores E, Thompson L, Sirisaengtaksin N, et al. Using the protozoan *paramecium caudatum* as a vehicle for food-borne infections in zebrafish larvae [J]. *J Vis Exp*, 2019, 143: 10.
- [54] 石玉新, 穆迪, 武洪庆, 等. 微藻油脂含量的几种快速测定方法 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(21): 11067-11069.
- Shi YX, Mu Di, Wu HQ, et al. Several methods for rapid determination of lipid from algal culture [J]. *Anhui Agric Sci*, 2012, 40(21): 11067-11069.
- [55] 周娟, 郭胜亚, 李春启. 建立斑马鱼肠蠕动模型及筛选促胃肠动力药物的方法: CN103301480A [P]. 2019-11-08.
- Zhou J, Guo SY, Li CQ. Establishment of a zebrafish intestinal motility model and screening of pro-gastrointestinal motility drugs: CN103301480A [P]. 2019-11-08.
- [56] 钱星文, 谭转换, 朱晨, 等. 益身清对斑马鱼的肠道蠕动促进作用研究 [J]. *中医药导报*, 2020, 26(15): 22-24.
- Qian XW, Tan ZH, Zhu C et al. Study on the promoting effect of yishenqing on intestinal peristalsis of zebrafish [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 26(15): 22-24.
- [57] 杨胜杰, 刘明川, 杨进平, 等. 管花肉苁蓉提取物通便作用的实验研究 [J]. *北方药学*, 2019, 16(8): 128-130.
- Yang SJ, Liu MC, Yang JP, et al. The effect of *cistanche tubulosa* extract on intestinal peristalsis of zebrafish [J]. *J North Pharm*, 2019, 16(8): 128-130.
- [58] 丁晓雯, 周才琼. 保健食品原理 [M]. 重庆: 西南师范大学出版社; 2008.
- Din XW, Zhou CQ. Principles of health food [M]. Chongqing: Southwest Chin Normal Univer Press; 2008.
- [59] 侯海荣, 张姗姗, 孙晨, 等. 低聚果糖和低聚异麦芽糖促进斑马鱼肠道蠕动作用的研究 [J]. *山东科学*, 2016, 29(6): 56-61.
- Hou HR, Zhang SS, Sun C, et al. The effect of fructo oligosaccharides and isomalto-oligosaccharide on the intestinal peristalsis of zebrafish [J]. *Shandong Sci*, 2016, 29(6): 56-61.

[收稿日期] 2021-10-18

《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R 国际刊号 ISSN 1671-7856 邮局代号 82-917

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊)。征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。栏目设置包括研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等栏目。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、被《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、中国生物医学期刊数据库等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章正文字数在 5000 字左右。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/zgbjyxzz/ch/index.aspx>

期待您的来稿!

苗晋鑫,张钟允,王峥,等. 胰腺癌小鼠模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 713-719.

Miao JX, Zhang ZY, Wang Z, et al. Advances in mouse models of pancreatic cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 713-719.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.016

胰腺癌小鼠模型研究进展

苗晋鑫^{1*}, 张钟允¹, 王峥¹, 宋韶鹤²

(1. 河南中医药大学 中医药科学院, 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第一附属医院 药学部, 郑州 450000)

【摘要】 胰腺癌是一种恶性程度高、预后极差的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率不断上升。胰腺癌小鼠模型可以表征胰腺肿瘤特征,是研究癌症预防和治疗的工具。胰腺癌小鼠模型分为诱导性模型、移植性模型和基因工程模型。然而,与人类胰腺癌相比,没有简单动物模型可以模拟人类胰腺癌的所有特征。已有胰腺癌小鼠模型各自用途不一,本文对不同胰腺癌小鼠模型的造模方法、特征及优缺点的研究进展做一综述,为胰腺癌疾病的研究提供理论依据。

【关键词】 胰腺癌;小鼠模型;移植性模型;基因工程

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0713-07

Advances in mouse models of pancreatic cancer

MIAO Jinxin^{1*}, ZHANG Zhongyun¹, WANG Zheng¹, SONG Shaohe²

(1. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China. 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

Corresponding author: MIAO Jinxin. E-mail: miaojinxin2022@163.com

【Abstract】 Malignant pancreatic cancers show a high degree of malignancy, a poor prognosis, and high rates of morbidity and mortality. Mouse models of pancreatic cancer demonstrate certain characteristics of human pancreatic tumors and are useful for studying cancer prevention and treatment. Mouse models are divided into induced, transplanted, and genetically engineered models, each of which shows specific characteristics of human pancreatic cancer. Various mouse models are reviewed in the present report.

【Keywords】 pancreatic cancer; mouse model; transplantation model; genetic engineering

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

胰腺癌是最致命的人类恶性肿瘤之一,发病率在全球范围内各不相同,但总体却逐年上升。胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 占有胰腺恶性肿瘤的85%以上,预计到2030年成为癌症相关死亡的第二大原因^[1]。尽管手术技术

和辅助治疗取得了进步,但是胰腺癌5年生存率仍约为9%^[2]。需要开发早期检测方法和有效治疗方法来改善胰腺癌患者预后。研究胰腺癌发病机制、转移及药物评价对改善胰腺癌患者预后至关重要。胰腺癌小鼠模型是研究人类胰腺癌发生发展、转

【基金项目】 中国博士后科学基金特别资助(2021T140184),河南省博士后科研项目(202001043),河南省自然科学基金青年项目(202300410259)。

Funded by Special Program of the Postdoctoral Science Foundation of China (2021T140184), Postdoctoral Research Startup Project in Henan Province (202001043), Natural Science Foundation of Henan Province (202300410259).

【作者简介】 苗晋鑫(1986—),男,博士,助理研究员,硕士生导师,研究方向:转基因动物及肿瘤防治研究。

Email: miaojinxin2022@163.com

移、药物开发和治疗方式的常用体内模型。胰腺癌小鼠模型主要分为诱导模型、移植瘤模型、基因工程模型。我们在《中国比较医学杂志》和《中国实验动物学报》发表结直肠癌、黑色素瘤、食管癌一系列肿瘤小鼠模型的分类^[3-5]。这些类型的肿瘤小鼠模型是研究人员经常选择的动物模型,但是没有一种模型能概况胰腺癌发生发展及评价药物与治疗方法,需要根据特定研究目的选择适宜的胰腺癌小鼠模型。本文旨在介绍常用胰腺癌小鼠模型方法、特征及用途等方面,比较优缺点,为胰腺癌研究提供理论依据。

1 诱导性胰腺癌模型

诱导性胰腺癌小鼠模型多为致癌因素对小鼠的胰腺直接或间接接触,使胰腺发生癌变形成胰腺癌小鼠模型。化学药物诱导小鼠模型是通过化学致癌物使小鼠胰腺细胞发生恶变引起胰腺癌。亚硝胺类致癌物是胰腺癌诱发致癌物,我们在食管癌文章中已经说明亚硝胺类化学物不在用于动物实验。因此,N-亚硝基-2-氧基丙胺不再阐述,本文介绍二甲基苯并蒽(dimethyl benz anthracene,DMBA)、重氮乙酰丝氨酸(*o*-diazoacetyl-L-serine, AZA)在小鼠中的应用。

Osvoldt 等^[6]将 1 mg 的 DMBA 注射到雄性 CF-1 小鼠的近端胰腺,建立原位胰腺癌小鼠模型。该模型组织病理显示,17%的小鼠具有反应性增生和腺癌,67%具有胰腺腺管内上皮瘤(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN)病变。另外研究人员利用 AZA 每天 1 次的灌胃或腹腔注射 C57BL/6 小鼠 3 周建立 PanIN 小鼠模型用于研究高脂肪饮食改变了肠道微生物群的组成,并参与 AZA 致癌物诱导的胰腺癌进展^[7]。研究发现 DMBA 或 AZA 诱导的胰腺癌小鼠模型可产生 PanIN 病变和导管腺癌,其组织学与人类胰腺癌相似^[6-7]。但是,诱导的周期长、死亡率高、不能全部成瘤,并可引起其他部位肿瘤且诱导时间长短与病灶发展关系不明确,限制了该模型的应用。

2 移植性胰腺癌模型

移植性胰腺癌模型是用胰腺癌细胞系或胰腺癌组织(人或动物)移植到小鼠体内形成的移植性胰腺癌模型。根据移植位置,可分为异位移植和原位移植;根据移植供体与受体间的关系,可分为

同种移植和异位移植。我们根据移植位置和移植物来源进行动物模型总结分析。

2.1 胰腺癌的异位移植模型

异位移植模型是将体外培养的胰腺癌细胞或胰腺癌组织接种到同原发部位不相关的动物皮下^[8]。异位(皮下瘤)模型操作简单、接种成活率高,监测肿瘤方便且模型重复性好,是临床前常用的动物实验模型^[9]。然而,皮下瘤在形态、血管密度、免疫细胞浸润和肿瘤微环境与内脏肿瘤不同,同时皮下瘤极少发生转移,与人类肿瘤生物学特性有差异^[10]。

2.1.1 同种移植皮下模型

将小鼠胰腺癌细胞植入相同品系小鼠皮下制备同种移植皮下模型。同种移植肿瘤细胞,肿瘤具有较短潜伏期和可靠的生长动力学,同时该模型具有免疫系统的完整性,是研究免疫治疗和靶点治疗的很好模型。研究人员将 1×10^6 cells/100 μ L Panc02 小鼠胰腺癌细胞注射 C57BL/6 小鼠皮下,成功建立有完全免疫能力的胰腺癌小鼠模型,评估 PD-1 抗体和 OX40 抗体联合 PancVAX 疫苗可有效抗胰腺癌^[11]。Hy15549 和 Han4.13 小鼠胰腺癌细胞系来自 *Ptf1-Cre; LSL-KRAS-G12D; p53 Lox/+* 小鼠原发性胰腺肿瘤,分别与 C57BL/6 和 FVB 小鼠品系同源。Erstad 等^[12]将 1×10^4 cells/100 μ L Hy15549 和 Han4.13 小鼠胰腺癌细胞分别注射 C57BL/6 小鼠和 FVB 小鼠腹侧皮下和胰腺原位。同种原位比皮下肿瘤生长得更快、更大,同时利用两种小鼠模型评估 FOLFIRINOX 治疗效果。MPC-83 小鼠胰腺癌细胞是我国建立的第一株小鼠可移植性胰腺腺泡细胞癌株,其瘤源来自昆明种小鼠^[13]。研究者通过 MPC-83 建立皮下移植瘤发现白细胞介素-6 明显促进胰腺肿瘤细胞的增殖生长作用^[14]。

2.1.2 异种移植皮下模型

将人胰腺癌细胞或组织植入免疫缺陷小鼠皮下制备异种移植皮下模型。此类模型常选用免疫缺陷小鼠如裸鼠、NOD-SCID 和 NSG 小鼠。人源细胞异种移植(cell line derived xenograft, CDX)模型和患者肿瘤组织异种移植(patient derived xenograft, PDX)模型在肿瘤模型研究中广泛应用。Conti 等^[15]将 4×10^6 cells/100 μ L PaCa44 人胰腺癌细胞皮下注射 CD1 裸鼠腹部右侧,成功构建胰腺癌 CDX 模型,用于评估 HFl-MP-PASE-MIT 纳米制剂的疗效和副作用。将患者来源的原代胰腺癌细胞注射或胰腺癌组织块植入到免疫低下的小鼠体内,建立胰

腺癌异种移植模型。研究者将患者胰腺癌组织块皮下植入 6 周的 NOD-SCID 小鼠,成功建立胰腺癌 PDX 小鼠模型^[16]。使用这种肿瘤块植入的方法能更多的保留人类肿瘤基质成分(10 代以内),而原代细胞移植则没有此特征。基于此胰腺癌 PDX 模型开发了核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)

显微镜跟踪放射性标记的丙酮酸在体内转化为乳酸盐的过程的生物标志物,以确定可用于临床的胰腺肿瘤侵袭性。商品化和患者原代胰腺癌细胞系生成的 CDX 模型缺乏原发性胰腺肿瘤的肿瘤细胞和基质细胞异质性, PDX 模型解决了 CDX 模型的局限性,且应用于临床前药物评价(表 1)。

表 1 PDX 模型评估 PDAC 药物疗效的临床前研究

Table 1 Preclinical study of PDX model to evaluate the efficacy of PDAC drugs

年 Year	研究类型 Research type	肿瘤位置 Tumor location	PDX(例数) PDX (NO.)	靶点 Targets	药物 Drugs	文献 References
2010	疗效 Therapy	皮下 Subcutaneous	3	PLK1	Rigosertib, gemcitabine	[17]
2012	疗效 Therapy	皮下 Subcutaneous	2	CHK1	AZD7762	[18]
2015	精准医疗 Precision medicine	皮下 Subcutaneous	≥5	-	Encorafenib, binimetnib, BKM120, LEE011	[19]
2016	疗效 Therapy	皮下 Subcutaneous	5	BET protein	JQ1	[20]
2017	疗效 Therapy	原位 Orthotopic	6	PLK4	CFI-400945	[21]
2019	疗效 Therapy	皮下 Subcutaneous	2	BET protein, PARP	JQ1, olaparib	[22]

类器官作为一种新型体外研究系统,可高度模拟体内组织、器官生物学特性,可用于不同组织和器官生理、病理及药物作用的过程研究^[23]。常用方法是首先将获得患者胰腺癌组织切碎,然后利用消化液将胰腺细胞消化分散,并与含有生长因子和调节剂的培养基一起置于基质(胶原蛋白或基质胶)中培养,细胞在 2 d 内形成器官样结构^[24]。Seino 等^[25]利用 CRISPR/Cas9 系统对导管类器官进行了 PDAC 驱动基因(*Kras*、*Cdkn2a*、*Smad4* 和 *Tp53*)编辑,编辑后的导管类器官种移植于 BALB/c 裸鼠皮下,建立同人类基因的 PDAC 小鼠模型。结果发现,编辑后 4 个基因类器官形成的肿瘤细示核异型性和肿瘤出芽,这与 PDAC 组织学相似。

2.2 胰腺癌的原位植入模型

原位胰腺癌模型是通过胰腺原位注射细胞悬液或胰腺肿瘤细胞植入建立的动物模型。其优势包括可利用相关位点进行肿瘤-宿主相互作用,肿瘤转移的发展,治疗的部位特异性和依赖性,基因的器官特异性表达等研究以及可复制临床情况。但此建模方法技术难度大,价格昂贵,实验周期较长^[26]。

2.2.1 同种原位移植模型

Adjuto-Saccone 等^[27]采用 5×10^5 cells/100 μ L PK4A 小鼠胰腺肿瘤细胞原位注射 *Ink4a*/*Arf*^{fl/fl};

LSL-Kras^{G12D} 转基因小鼠胰腺,证明 TNF- α 诱导小鼠胰腺肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)增加,揭示了胰腺癌发展的内皮-间质转化机制。另一项研究,将 1×10^6 cells/100 μ L DT6606 小鼠胰腺癌原位注射 C57BL/6 小鼠胰腺尾,建立全免疫能力的胰腺癌小鼠模型评估 VVL-21 痘苗溶瘤病毒协同 PD-1 抗体增强抗肿瘤作用^[28]。同时该研究还利用胰腺皮下小鼠模型和胰腺原位叙利亚仓鼠模型评价 VVL-21 的抗肿瘤作用^[28]。Hwang 等^[29]将 PAN02 小鼠胰腺癌细胞皮下注射到裸鼠侧腹制备肿瘤块,该肿瘤块原位植入 C57BL/6 的胰尾并切除脾,建立脾切除原位同源小鼠胰腺癌模型。结果发现,脾切除后增强原位同源小鼠胰腺癌小鼠模型中肿瘤生长和腹膜播散。为提高异种移植成功率提供一种手术方法。

2.2.2 异种原位移植模型

由于胰腺是内脏组织,将胰腺癌细胞系携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)、红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)荧光基因或是荧光素酶等,对于原位监测非常方便。Moreno 等^[30]将 50 μ L 的 3×10^6 /mL PANC-1-GFP 细胞悬液原位注射 BALB/c 裸鼠胰腺,成功建立异种原位胰腺癌小鼠模型。荧光活体成像结果显示,肿瘤体积随着时间增加显著增大,且出现脾、肝和胃肠道

多组织转移。2020 年,冷泉港实验室的研究人员分别将 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 的人患者来源的类器官单细胞悬液注射小鼠胰腺导管内和 5×10^5 的人患者来源的类器官单细胞悬液注射小鼠胰腺尾内,成功建立胰腺导管内移植类器官(intraductal transplantation of organoids, IGO)胰腺癌小鼠模型和胰腺尾内移植类器官胰腺癌小鼠模型^[31]。IGO 模型是将类器官单细胞悬液注射到免疫缺陷小鼠主胰腺导管中,该模型更好概括从导管系统内侵袭前细胞到组织侵袭性导管外肿瘤伴周围发育不全的进展。上述胰腺癌原位类器官移植小鼠模型模拟人类胰腺癌更相似。

3 基因工程小鼠胰腺癌模型

人类胰腺癌中已经发现多种遗传基因、表观遗传基因异常。抑癌基因和致癌基因的异常突变导致肿瘤的发生和发展^[32]。通过引入特定的致癌基因突变、灭活抑癌基因对小鼠进行基因修饰建立胰腺癌基因工程小鼠模型。基因工程小鼠对胰腺癌基因组分析确定分子亚型评估对胰腺癌的生物学和病理学影响。此外,基因工程小鼠模型为临床前靶向治疗和新型免疫疗法提供可靠的评价工具。多种此类基因工程小鼠模型用于研究胰腺上皮内皮瘤变和胰腺癌^[33]。由于 Kras 突变不足以诱导进展到胰腺腺癌的侵袭期,因此多基因的转基因小鼠 PDAC 和转移性疾病的组合模型开发并用于临床前研究。常见基因工程小鼠模型基于 Kras 突变和其他基因缺失或突变修饰,本文主要介绍目前常用的几种小鼠模型。

3.1 PDX-1-Cre, LSL-Kras^{G12D}, LSL-Trp53^{R172H/-}转基因小鼠

Hingorani 等^[34]建立靶向 PDX-1-Cre 小鼠胰腺同时表达 Kras^{G12D} 和 Trp53^{R172H} 的转基因小鼠。8 ~ 10 周龄 PDX-1-Cre、LSL-Kras^{G12D}、LSL-Trp53^{R172H/-} (KPC)小鼠呈现早期 PanIN 病变,10 周龄以后小鼠发生胰腺癌,同时显示出与人类疾病相似的临床特征(恶病质、肠和胆道阻塞、出血性腹水),且在 12 个月前死亡。组织病理学显示与人类相似,免疫组化表达 CK19,肝和肺的转移与胰腺原发灶相似。研究人员利用 KPC 小鼠研究 PDAC 的发展进程和评价免疫治疗药物^[35]。KPC 模型是研究 PDAC 最多的基因工程小鼠模型之一。

3.2 PDX1-Cre, KrasG12D, Ink4a/Arf^{fllox/lox} 转基因小鼠

患者胰腺肿瘤经常 INK4A 缺失,但是 Ink4a/Arf (Cdkn2a) 基因座的两个或任何一个组成部分缺失的小鼠不会自发性胰腺癌^[36]。Aguirre 等^[37]首先使用 Cre 介导的突变 Kras (Kras^{G12D}) 激活和条件性 Ink4/Arf 肿瘤抑制等位基因缺失建立 3 基因的转基因小鼠。结果发现小鼠在 7 ~ 11 周龄时出现体重减轻、腹水、黄疸、腹部出现肿块以及垂死等症状。组织病理结果显示,初期可检测到 PanIN-1 病变,12 周则出现导管病变,肿瘤小鼠腺体形态与人胰腺导管腺癌相似。此模型概括了多种恶性肿瘤及胰腺癌经典特征,可用于开发抑制肿瘤恶性生长的分子靶向治疗。

3.3 其他

胰腺癌有超过 30 种不同的转基因小鼠模型且具有不同的表型^[38]。基于 Kras 突变的转基因小鼠已通过 p53、Mist、Smad4、TGFB β 基因的缺失或突变进行修饰获得胰腺癌转基因小鼠模型^[39-41]。另外一些遗传性胰腺癌综合征小鼠模型是一个或多个基因突变,如 Brca2 突变小鼠在胰腺癌转基因的背景下表型差异很大^[42]。

4 胰腺癌小鼠模型的优缺点

胰腺癌小鼠模型在胰腺癌发生、发展、分子机制和治疗研究中起着至关重要的作用。3 种不同类型胰腺癌小鼠模型有各自模拟人类胰腺癌特征(表 2)。诱导性小鼠模型常用于研究 PanIN 病变过程和导管腺癌。皮下移植的胰腺癌小鼠模型成瘤重复性好和测量方便,用于评估瘤生长及药物疗效,但极少发生转移,且测试药物反应时与人原肿瘤部位可能不一致。原位植入的胰腺癌小鼠模型概括了胰腺癌原位发生及转移特征,尤其是类器官原位移植小鼠模型,多用于评估抗肿瘤及转移药物。同种移植胰腺癌小鼠模型由于有全免疫,多用于免疫治疗。基因工程小鼠可用于探究胰腺癌相关基因在疾病中的机制作用及用于研究新疗法(新型免疫疗法)并评估预防癌症策略,但靶向胚胎的胰腺基因激活或失活以启动肿瘤发生,这与人类胰腺肿瘤的发展仍有区别。不同胰腺癌小鼠模型的特征可用于不同实验研究,选择合适的小鼠模型很重要。由于小鼠代谢与人类相差较大,提示我们可构建人源化小鼠用于胰腺癌的研究。总之,胰腺癌小鼠模型为胰腺癌的研究提供理论基础和科学依据。

表 2 胰腺癌小鼠模型的优缺点

Table 2 Advantages and disadvantages of pancreatic cancer mouse models

模型类型 Model type	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
诱导性小鼠模型 Induce mouse model	成本低;易操作;可发生 Low cost, easy operation, occur	死亡率高且不能全部成瘤;诱导时间长短与病灶发展关系不明确 High mortality, not all tumor formation, the relationship between the length of induction and the development of lesions is not clear
CDX	皮下;易操作;易重复 原位;转移 Subcutaneous. easy operation, easy repeat Orthotopic. metastasis	需要免疫缺陷小鼠(小鼠肿瘤细胞系模型除外);无肿瘤异质性;细胞系缺乏生物稳定性 Need immunodeficiency mice (except in mouse cell tumor cell line models), no tumor heterogeneity, cell lines lack biological stability
PDX	最接近患者的突变谱,包括异质性; 允许评估靶向治疗和确定患者特异性治疗的方法;PDX 皮下传代可以连续通过小鼠并保持肿瘤大多数特征;原位 PDX 发生转移 Most closely resemble mutational spectrum of a patient including heterogeneity, allow assessment of targeted therapeutics and a means to identify patient-specific treatment, can be serially passaged through multiple mice and maintain most features, orthotopic PDX metastases	免疫系统必须被抑制;成本高;仅限于活检样本或可切除的肿瘤 Immune system has to be suppressed, costly, limited to biopsy samples or resectable tumors
异种类器官原位小鼠模型 <i>In vivo</i> orthotopic organoid mouse models	人源类器官可无限期培养和冷冻保存;原位移植导致 PanIN 和侵袭性胰腺癌;允许评估导管细胞的恶性进展及新的干预措施 Organoids can be cultured indefinitely and cryopreserved, orthotopic transplantation leads to PanIN and invasive Pancretic cancer, allow assessment of malignant processes of ductal cells and novel interventions	成本高;肿瘤坏死影响人类类器官的制备;需要免疫缺陷小鼠 Costly, high levels of necrosis in tumor samples prevents organoid generation, human organoids require immunodeficient mice
基因工程小鼠模型 Genetically engineered mouse models	为特定基因突变参与提供信息;完全免疫系统;胰腺发生肿瘤,转移;PanIN;允许评估新免疫疗法 Informative for involvement of particular genetic mutations, Competent immune system, tumor arise in pancreas, metastasis; PanIN, allow assessment of novel immunotherapy	成本高、耗时;基因修饰从出生就存在所有细胞;所有肿瘤细胞突变相同 Costly and time consume, genetic modification present from birth and in all cells, all tumor cell have same mutations

参 考 文 献(References)

[1] Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic cancer: a review [J]. JAMA, 2021, 326(9): 851-862.

[2] Alhobayb T, Peravali R, Ashkar M. The relationship between acute and chronic pancreatitis with pancreatic adenocarcinoma: review [J]. Diseases, 2021, 9(4):93.

[3] 宋韶鹤, 苗晋鑫, 王峥, 等. 食管癌小鼠模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 140-146.

[4] 王峥, 苗晋鑫. 黑色素瘤小鼠模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(2): 120-127.

[5] 苗晋鑫, 宋韶鹤, 李秀敏. 结直肠癌小鼠模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 267-272.

[6] Osvaldt AB, Wendt LR, Bersch VP, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by dmba in mice [J]. Surgery, 2006, 140(5): 803-809.

Song SH, Miao JX, Wang Z, et al. Advances in mouse of esophageal cancer [J]. Clin J Comp Med, 2021, 31(7): 140-146.

Wang Z, Miao JX. [J]. The current state of mouse modeling in melanoma research [J]. Clin J Comp Med, 2021, 31(2): 120-127.

Miao JX, Song SH, Li XM. Advances in mouse models of colorectal cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 267-272.

- [7] Liu B, Wang F, Chen L, et al. Effects of high-fat diet on carcinogen-induced pancreatic cancer and intestinal microbiota in C57BL/6 wild-type mice [J]. *Pancreas*, 2021, 50(4): 564–570.
- [8] Garcia PL, Miller AL, Yoon KJ. Patient-derived xenograft models of pancreatic cancer: overview and comparison with other types of models [J]. *Cancers(Basel)*, 2020, 12(5): 1327.
- [9] Kong K, Guo M, Liu Y, et al. Progress in animal models of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *J Cancer*, 2020, 11(6): 1555–1567.
- [10] Bisht S, Feldmann G. Animal models for modeling pancreatic cancer and novel drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2019, 14(2): 127–142.
- [11] Kinkead HL, Hopkins A, Lutz E, et al. Combining sting-based neoantigen-targeted vaccine with checkpoint modulators enhances antitumor immunity in murine pancreatic cancer [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(20): e122857.
- [12] Erstad DJ, Sojoodi M, Taylor MS, et al. Orthotopic and heterotopic murine models of pancreatic cancer and their different responses to folfinorix chemotherapy [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(7): dmm034793.
- [13] 胡美英, 梁明达, 贾伟, 等. 小鼠可移植性胰腺腺泡细胞癌株(MPC-83)的建立及其特性研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1986, 8(1): 1–3.
Hu MY, Liang MD, Jia W, et al. Establishment and characteristics of a mouse transplantable pancreatic acinar cell carcinoma line (MPC-83) [J]. *Chin J Oncol*, 1986, 8(1): 1–3.
- [14] 马永超, 杜晓鹏, 李海龙, 等. 白细胞介素-6 对胰腺癌荷瘤小鼠移植瘤生长及 Caspase-3/Bax/Bcl-2 信号通路的影响 [J]. *解剖学报*, 2020, 51(2): 216–219.
Ma YC, Du XJ, Li HL, et al. Tumorigenic effect of interleukin-6 on mice with pancreatic carcinoma via regulating the Caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathway [J]. *Acta Anat Sin*, 2020, 51(2): 216–219.
- [15] Conti G, Pitea M, Ossanna R, et al. Mitoxantrone-loaded nanoferritin slows tumor growth and improves the overall survival rate in a subcutaneous pancreatic cancer mouse model [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(11): 1622.
- [16] Dutta P, Perez MR, Lee J, et al. Combining hyperpolarized real-time metabolic imaging and nmr spectroscopy to identify metabolic biomarkers in pancreatic cancer [J]. *J Proteome Res*, 2019, 18(7): 2826–2834.
- [17] Jimeno A, Rubio-Viqueira B, Rajeshkumar NV, et al. A fine-needle aspirate-based vulnerability assay identifies polo-like kinase 1 as a mediator of gemcitabine resistance in pancreatic cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(2): 311–318.
- [18] Venkatesha VA, Parsels LA, Parsels JD, et al. Sensitization of pancreatic cancer stem cells to gemcitabine by CHK1 inhibition [J]. *Neoplasia*, 2012, 14(6): 519–525.
- [19] Gao H, Korn JM, Ferretti S, et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11): 1318–1325.
- [20] Garcia PL, Miller AL, Kreitzburg KM, et al. The BET bromodomain inhibitor jq1 suppresses growth of pancreatic ductal adenocarcinoma in patient-derived xenograft models [J]. *Oncogene*, 2016, 35(7): 833–845.
- [21] Lohse I, Mason J, Cao PM, et al. Activity of the novel polo-like kinase 4 inhibitor CFI-400945 in pancreatic cancer patient-derived xenografts [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(2): 3064–3071.
- [22] Miller AL, Fehling SC, Garcia PL, et al. The bet inhibitor jq1 attenuates double-strand break repair and sensitizes models of pancreatic ductal adenocarcinoma to parp inhibitors [J]. *EBioMedicine*, 2019, 44: 419–430.
- [23] Fujii M, Clevers H, Sato T. Modeling human digestive diseases with CRISPR-CAS9-modified organoids [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(3): 562–576.
- [24] Tiriac H, Bucobo JC, Tzimas D, et al. Successful creation of pancreatic cancer organoids by means of eus-guided fine-needle biopsy sampling for personalized cancer treatment [J]. *Gastrointest Endosc*, 2018, 87(6): 1474–1480.
- [25] Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, et al. Human pancreatic tumor organoids reveal loss of stem cell niche factor dependence during disease progression [J]. *Cell stem cell*, 2018, 22(3): 454–467.
- [26] Boj SF, Hwang CI, Baker LA, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer [J]. *Cell*, 2015, 160(1–2): 324–338.
- [27] Adjuto-Saccone M, Soubeyran P, Garcia J, et al. TNF- α induces endothelial-mesenchymal transition promoting stromal development of pancreatic adenocarcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 649.
- [28] Marelli G, Chard Dunmall LS, Yuan M, et al. A systemically deliverable vaccinia virus with increased capacity for intertumoral and intratumoral spread effectively treats pancreatic cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(1): e001624.
- [29] Hwang HK, Murakami T, Kiyuna T, et al. Splenectomy is associated with an aggressive tumor growth pattern and altered host immunity in an orthotopic syngeneic murine pancreatic cancer model [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(51): 88827–88834.
- [30] Moreno JA, Sanchez A, Hoffman RM, et al. Fluorescent orthotopic mouse model of pancreatic cancer [J]. *J Vis Exp*, 2016, 9(115): 54337.
- [31] Miyabayashi K, Baker LA, Deschênes A, et al. Intraductal transplantation models of human pancreatic ductal adenocarcinoma reveal progressive transition of molecular subtypes [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(10): 1566–1589.
- [32] Orth M, Metzger P, Gerum S, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches [J]. *Radiat Oncol*, 2019, 14(1): 141.
- [33] Herreros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, et al. Mouse models of pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(12): 1286–1294.

- [34] Hingorani SR, Wang L, Multani AS, et al. Trp53r172h and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice [J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(5): 469–483.
- [35] Principe DR, Narbutis M, Kumar S, et al. Long-term gemcitabine treatment reshapes the pancreatic tumor microenvironment and sensitizes murine carcinoma to combination immunotherapy [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(15): 3101–3115.
- [36] Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, et al. Loss of p16InK4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis [J]. *Nature*, 2001, 413(6851): 86–91.
- [37] Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, et al. Activated kras and InK4A/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(24): 3112–3126.
- [38] Weidenhofer J, Colvin EK, Bond DR, et al. Animal models of pancreatic cancer and their application in clinical research [J]. *Gastro Cancer Tar Ther*, 2016, 6: 31–39.
- [39] Tuveson DA, Zhu L, Gopinathan A, et al. Mist1-KrasG12D knock-in mice develop mixed differentiation metastatic exocrine pancreatic carcinoma and hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 242–247.
- [40] Kojima K, Vickers SM, Adsay NV, et al. Inactivation of Smad4 accelerates Kras (G12D)-mediated pancreatic neoplasia [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17): 8121–8130.
- [41] Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, et al. Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor- β signaling in cooperation with active Kras expression [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(22): 3147–3160.
- [42] Cassidy LD, Liao SS, Venkitaraman AR. Chromosome instability and carcinogenesis: insights from murine models of human pancreatic cancer associated with BRCA2 inactivation [J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(2): 161–168.

[收稿日期] 2022-01-18

综述:肠道微生物与肠病关系的研究进展

肠道微生态是指多达 $10^{13} \sim 10^{14}$ 种微生物聚集在营养丰富的肠道中,共同构成了具有复杂且相对平衡的富有多样化特征的微生物群。肠道微生物参与物质代谢和宿主生理活动,抑制病原微生物的生长。肠上皮细胞和黏液层与共生微生物共同构成肠上皮黏膜屏障维持肠道微生态稳态。肠道微生态失衡对多种系统疾病有重要影响,尤其是炎症肠道疾病。根据世界卫生组织分类,炎症肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。来自中国中央民族大学的研究者们总结归纳了目前肠道微生物在肠上皮黏膜屏障中的变化以及不同治疗方法干预后肠道微生物的变化。

文中提到,肠黏液层分为内外黏液层,外黏液层直接与微生物群接触且作为共生菌能量来源,其中阿克曼菌和脆弱拟杆菌释放黏蛋白水解酶溶解黏液层为定植提供能量。在炎症肠病模型中,存在大量具有促炎作用的微生物群,且 UC 模型中拟杆菌门、厚壁菌门、变形杆菌的丰度更高;在 CD 模型中厚壁菌门显著低于健康组,尤其是健康组动态变化的微生物群与 CD 缺少的微生物群高度重叠。

本文也介绍了不同治疗方法对炎症肠病模型肠道微生物的影响,包括益生菌、益生元、粪便微生物移植、饮食疗法、中草药干预,这些方式均在不同程度上调节肠道微生物并改善肠病模型症状。

综上所述,本文全面概括了目前肠道微生态与肠上皮黏膜屏障的关系以及不同肠道模型中肠道菌群的变化,指出了研究者通过选择合适的动物模型来研究不同的菌群功能,有利于进一步探索肠道微生态的功能机制以及开展相应的临床研究。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 8(4):297–310; <https://doi.org/10.1002/ame2.12262>)。

雷静玉,罗宝花,赵菊梅,等. 基于免疫检查点抑制剂靶向胰腺癌微环境的联合免疫治疗策略[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 720-726.

Lei JY, Luo BH, Zhao JM, et al. Combined immunotherapy using immune checkpoint inhibitors targeting the microenvironment of pancreatic cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 720-726.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.017

基于免疫检查点抑制剂靶向胰腺癌微环境的联合免疫治疗策略

雷静玉^{1,2}, 罗宝花³, 赵菊梅^{1*}, 师长宏^{2*}

(1. 延安大学医学院, 陕西 延安 716000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 3. 广州中医药大学科技创新中心, 广州 510405)

【摘要】 胰腺癌是一种较为难治且恶性程度极高的肿瘤,其发病隐匿,进展迅速。传统的治疗方法对胰腺癌患者效果不佳,以免疫检查点抑制剂为代表的免疫治疗在非小细胞肺癌和黑色素瘤等多种恶性肿瘤中显示出良好的效果,但对胰腺癌患者治疗效果有限,这可能与胰腺癌独特的肿瘤微环境有关。针对胰腺癌微环境中的特定位点进行靶向调节,促使肿瘤微环境由免疫抑制状态向免疫激活状态转变,可能是增强免疫检查点抑制剂治疗效果的有效策略,因此,联合免疫检查点抑制剂与靶向治疗可能在胰腺癌治疗中具有良好的应用前景。本文将对靶向胰腺癌肿瘤微环境的药物作用机制及其与免疫检查点抑制剂联合应用的策略进行综述,以期对胰腺癌的联合免疫治疗提供有效参考。

【关键词】 胰腺癌;免疫检查点抑制剂;肿瘤微环境;肿瘤免疫治疗;靶向治疗;联合治疗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0720-07

Combined immunotherapy using immune checkpoint inhibitors targeting the microenvironment of pancreatic cancer

LEI Jingyu^{1,2}, LUO Baohua³, ZHAO Jumei^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Medical College of Yan'an University, Yanan 716000, China. 2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032. 3. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn; ZHAO Jumei. E-mail: jmz2003.stu@163.com

【Abstract】 Pancreatic cancer is a highly malignant tumor characterized by insidious onset and rapid progression. Patients with pancreatic cancer do not respond well to traditional treatments. Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have therapeutic efficacy in non-small cell lung cancer, melanoma, and other malignant tumors. However, ICIs have limited effect on patients with pancreatic cancer, which may be related to the unique tumor microenvironment. Targeting specific sites in the microenvironment of pancreatic cancer to promote the transformation of the tumor microenvironment from an immunosuppressive state to an immune activation state may be an effective strategy to enhance the therapeutic effect of ICIs. Thus, combining ICIs with targeted therapy may be a promising strategy for pancreatic cancer treatment. In this paper, we

【基金项目】 陕西省创新能力支撑计划(2020PT-005, 2021PT-037)。

Funded by the Shaanxi Innovation Capability Support Plan (2020PT-005, 2021PT-037).

【作者简介】 雷静玉(1997—),女,硕士,研究方向:肿瘤免疫治疗。Email:1072871602@qq.com

【通信作者】 师长宏,男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病的动物模型。Email:changhong@fmmu.edu.cn

赵菊梅,女,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。Email:jmz2003.stu@163.com

* 共同通信作者

summarize the relative mechanisms of drugs targeting the microenvironment of pancreatic cancer and strategies combined with ICI. The aim was to provide an effective reference for combined immunotherapy to treat pancreatic cancer.

【Keywords】 pancreatic cancer; immune checkpoint inhibitor; tumor microenvironment; tumor immunotherapy; targeted therapy; combination therapy

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

胰腺癌(Pancreatic cancer, PC)是一种较为难治且恶性程度极高的肿瘤,其发病隐匿,进展迅速^[1-4]。手术切除是目前治疗胰腺癌的主要手段,然而,即使是接受手术治疗的患者其术后 5 年生存率不超过 20% ~ 25%^[5-6],因此,迫切需要寻找新的治疗方式来提高胰腺癌的治疗效果。免疫治疗是继手术、放疗、化疗后的一种新的抗肿瘤治疗方式,其中以免疫检查点抑制剂的疗效最为突出,其在非小细胞肺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、肾细胞癌等恶性肿瘤中已显示出良好的治疗效果^[7-11]。但临床数据显示,单一的免疫检查点抑制剂对治疗胰腺癌患者并没有起到良好的抗肿瘤作用,这可能与独特的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)有关^[12]。胰腺癌微环境中存在致密的基质成分并有广泛的免疫抑制细胞浸润,被认为是一种免疫学上的“冷”肿瘤^[13-15]。应用联合疗法,促使低免疫反应的“冷”肿瘤转变成对免疫治疗敏感的“热”肿瘤将是肿瘤免疫治疗的下一步发展方向^[16]。针对胰腺癌微环境的特定位点进行靶向调节,从而改善胰腺癌肿瘤微环境的状态,促使肿瘤微环境由免疫抑制状态向免疫激活状态转变,激活大量免疫效应细胞并浸润到肿瘤微环境中,可能能够增强免疫检查点抑制剂的抗肿瘤效果。因此,联合免疫检查点抑制剂和靶向治疗可能是延长胰腺癌患者生存期的有效策略。

1 免疫检查点抑制剂

目前常用的免疫检查点主要有细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4)、程序性死亡受体-1(programmed death-1, PD-1)及其配体(programmed death ligand-1, PD-L1)等^[17]。应用免疫检查点抑制剂能够增强效应 T 细胞的活性,进而增强抗肿瘤效应^[18]。临床数据表明,免疫检查点抑制剂对于部分肿瘤具有显著的抑瘤作用,然而在胰腺癌的治疗中,治疗效果并不明显^[19-20]。在一项 II 期临床试验中,27 名胰腺癌患者接受抗 CTLA-4 单抗 Ipilimumab 的治疗后患者情况未见缓解^[21],在另一项抗 PD-L1 单抗治疗

的 I 期临床试验中,14 名胰腺癌患者在接受单药治疗后的效果同样令人失望^[22],这些研究结果表明胰腺癌患者对单一免疫检查点抑制剂治疗的获益甚微。单一的免疫检查点抑制剂对胰腺癌的疗效不佳,这很可能与胰腺癌独特的肿瘤微环境有关。

2 胰腺癌的肿瘤微环境

胰腺癌的肿瘤微环境是一个相对复杂且有利于肿瘤细胞生长的内环境,其微环境的一个显著特点就是存在大量致密的基质成分,包括成纤维细胞、血管、胰腺星状细胞(pancreatic stellate cell, PSC)等物质,这些致密的基质成分为胰腺癌细胞的生长提供了有利条件^[23]。此外,胰腺癌的肿瘤微环境中还存在着多种具有不同功能的免疫细胞^[24],如具有抗肿瘤效应的 CD4⁺/CD8⁺效应 T 细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK cell)以及树突状细胞(dendritic cell, DC)等,这些免疫细胞在肿瘤微环境中含量较少;而具有免疫抑制功能的调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)、髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)以及肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAMs)在肿瘤微环境中大量存在,它们的功能十分活跃,能够分泌大量 IL-10、IL-23、TGF- β 、IDO 等免疫抑制因子,形成胰腺癌免疫抑制型肿瘤微环境,抑制免疫应答,造成免疫逃逸,从而影响胰腺癌的免疫治疗效果^[25]。胰腺癌独特的肿瘤微环境很可能是导致胰腺癌单一免疫检查点抑制剂治疗效果不佳的重要因素。有研究表明,使用联合治疗策略能够逆转胰腺癌微环境的免疫抑制状态,使其对免疫检查点抑制剂产生应答^[26]。因此,基于免疫检查点抑制剂联合靶向胰腺癌肿瘤微环境的药物,很可能会是一种提高胰腺癌免疫治疗效果的有效策略。

3 基于免疫检查点抑制剂的靶向联合治疗策略

胰腺癌在免疫学上被认为是一种“冷”肿瘤,使用联合治疗可逆转其处于抑制的微环境状态,使其变成“热”肿瘤,对免疫治疗产生反应。大量

临床前动物模型和临床试验显示,免疫检查点抑制剂与放化疗联合应用仅略微的提高了患者的生存率,但却产生了显著的毒副作用^[27-28]。靶向治疗是一种在细胞分子水平进行的治疗方式,针对某些特定的致癌物质或者信号通路设计相对应的治疗药物,药物进入体内后会与相对应的位点发生特异性的结合,造成肿瘤细胞特异性的死亡而不会对周围正常细胞造成损伤^[29],与传统放化疗相比,其特异性与安全性更高。胰腺癌的肿瘤微环境主要由肿瘤细胞、免疫细胞及其周围的基质成分组成,研究证实,靶向 TME 中的成分可诱导有效的免疫反应,改善胰腺癌的免疫治疗效果^[30],因此,在使用免疫检查点抑制剂的基础上,可以靶向肿瘤细胞,也可以靶向胰腺癌肿瘤微环境中的相关免疫细胞和基质成分,从而达到增强免疫治疗疗效的目的(见表 1)。

3.1 靶向肿瘤细胞

在胰腺癌的肿瘤微环境中存在大量处于增殖状态的肿瘤细胞,对肿瘤细胞增殖相关的多种途径进行抑制能够减少肿瘤细胞的生成。

3.1.1 致癌信号通路

KRAS 突变在胰腺癌的进展中发挥着重要作用,突变的 KRAS 会造成 ARF6 和 MYC 过表达,促进癌细胞的增殖,因此,通过靶向相应的信号通路,控制致癌信号的传导,可减慢胰腺癌进展。Hashimoto 等^[31]在胰腺癌 KPC 小鼠模型中发现,应用 eIF4A 抑制剂靶向突变的 KRAS 能够抑制 ARF6 和 MYC 的过表达,提高抗 PD-1 相关免疫检查点抑制剂的疗效。2019 年 Pu 等^[32]发现细胞内源性 PD-1 可通过 Hippo 通路调节 CYR61/CTGF 信号,从而促进胰腺癌的进展,对 BXPC3 细胞系给予 Hippo 抑制剂与抗 PD-1 抗体干预后,肿瘤细胞的生长受到了明显的抑制。既往研究发现,NSG3 在胰腺癌患者中表达较低,过表达 NSG3 能够抑制胰腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移。2021 年 Xia 等^[33]发现过表达 NSG3 能够阻止 Erk1/2 磷酸化,抑制 PD-L1 的表达,从而增强胰腺癌免疫反应,作者构建了一个稳定过表达 NSG3 的小鼠胰腺癌细胞系 PANC02 后皮下移植到 C57BL/6 小鼠后用抗 PD-1 抗体治疗,小鼠肿瘤生长速度明显减慢。这些研究结果表明靶

表 1 靶向胰腺癌肿瘤微环境的免疫治疗策略

Table 1 Immunotherapy strategies for targeting tumor microenvironment in pancreatic cancer

肿瘤微环境 Tumor microenvironment	靶向位置 Target location	免疫检查点抑制剂 Immune checkpoint inhibitor	治疗策略 Treatment strategy	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
肿瘤细胞 Tumor cell	致癌信号通路 Oncogenic signaling pathway		eIF4 ANXA2 靶向 疫苗 ANXA2 Targeted vaccine	抑制肿瘤细胞增殖 Inhibit tumor cell proliferation	含量少 Low content
	KRAS	抗 PD-1 Anti-PD-1			
	肿瘤相关抗原 (膜联蛋白 A2) Tumor associated antigen (Annexin A2)				
免疫细胞 Immune cell	免疫效应细胞 Immune effector cell	抗 PD-1 Anti-PD-1	CD40 agonist IFN- γ	增加免疫效应细胞数 量,提高抗肿瘤作用 Increase the number of immune effector cells and improve the anti-tumor effect	抗肿瘤免疫细胞 浸润含量少 Less anti-tumor immune cell infiltration
	免疫抑制细胞 Immunosuppressive cells	抗 PD-1 Anti-PD-1	GB1275	解除免疫抑制的肿瘤 微环境状态 Relieve Tumor microenvironment status of immunosuppression	促进肿瘤细胞 增殖 Promote tumor cell proliferation
	MDSC				
肿瘤基质 Tumor stroma	FAP	抗 PD-L1 Anti-PD-L1	FAP inhibitor VS-4718	存在大量靶点 There are plenty of targets	大量间质成分使药物 难以渗透至肿瘤内部 A large number of interstitial components make it difficult for drugs to penetrate into the tumor
	FAK	抗 PD-1 Anti-PD-1			

向致癌信号通路具有增强免疫检查点抑制剂抗肿瘤疗效的潜力。

3.1.2 肿瘤相关抗原

胰腺导管癌是一种免疫原性和肿瘤突变负荷 (tumor mutational burden, TMD) 相对较低的肿瘤, 由于低 TMD 会阻碍新抗原的释放和呈现, 从而导致较少的淋巴细胞浸润和较低的免疫检查点抑制剂敏感性。已证实膜联蛋白 A2 (annexin A2, ANXA2) 是 PDAC 相关肿瘤抗原, 在一项临床前实验中, Kim 等^[34]用一种以 ANXA2 为靶向的疫苗进行治疗后, 不仅延长了 PDAC 小鼠模型的生存期, 而且更重要的是, 当其与抗 PD-1 抗体联合治疗后发现 ANXA2 特异性 T 细胞的 IFN- γ 的表达显著增高, 增强对免疫检查点抑制剂的敏感性。

3.1.3 细胞周期

细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin dependent kinase, CDK) 调控细胞周期, 在癌细胞中 CDK 常被过度激活, 因此, 抑制细胞周期相关蛋白可有效的抑制癌细胞的增殖。胰腺癌细胞对 CDK4/6 抑制剂非常敏感, 2021 年 Knudsen 等^[35]发现, 在 PDX 小鼠胰腺癌模型中, 将 MEK 抑制剂与 CDK4/6 抑制剂联合使用后调节了 PDAC 的微环境, 增加了对免疫检查点抑制剂的敏感性, CDK4/6 和 MEK 抑制剂与抗 PD-L1 联合使用可使小鼠的 CD8⁺T 细胞明显增加, 抑制肿瘤生长。

3.1.4 凋亡与自噬

声动力学疗法 (sonodynamic therapy, SDT) 作为一种新型的靶向抗癌方法, 其利用超声激活致敏剂后与分子氧或者生物底物相互作用, 产生活性氧 (ROS), 通过诱导细胞凋亡引起肿瘤细胞的死亡。2021 年 Nesbitt 等^[36]在小鼠胰腺癌肿瘤模型中发现 SDT 联合抗 PD-L1 治疗后, 与未治疗组进行对比, 联合治疗组肿瘤体积明显减少, 肿瘤内浸润的 CD8⁺T 和 CD4⁺T 细胞数量明显增加。

3.2 靶向免疫细胞

胰腺癌的肿瘤微环境中存在着大量的免疫细胞, 其中包括免疫效应细胞和免疫抑制细胞。通过促进效应 T 细胞及树突状细胞的激活和呈递, 抑制免疫抑制细胞的活性, 可增强免疫检查点抑制剂的抗肿瘤效果。

3.2.1 激活免疫效应细胞

胰腺癌的肿瘤微环境中具有抗肿瘤效应的 CD4⁺/CD8⁺效应 T 细胞、NK 细胞以及 DCs 细胞含

量较少, 且功能受到抑制, 因此, 通过各种途径增加细胞毒性免疫细胞的浸润及活化, 可增强胰腺癌抗肿瘤免疫反应。CD40 在多种免疫细胞上表达, 包括 DCs、B 细胞以及 NK 细胞等, 激活后可增强免疫细胞的抗肿瘤的作用, Ma 等^[37]在转移性胰腺癌小鼠模型中使用 T 细胞诱导疫苗联合 CD40 激动剂和抗 PD-1 单抗进行三联治疗后发现 TME 中的细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 浸润增加, IFN- γ 、颗粒酶 B (granzyme B, GZMB) 数量增加, MDSCs 数量明显减少, 肿瘤生长受到明显抑制。ATM 在电离辐射后的 DNA 双链断裂中起着关键作用, 当 ATM 损伤后可引起 STING/TBK1 的激活, 从而激活先天性免疫系统。2019 年 Zhang 等^[38]在小鼠皮下胰腺癌肿瘤模型中发现, ATM 抑制剂能够增强免疫检查点抑制剂的敏感性, 当其与抗 PD-L1 抗体联合使用后, CD8⁺T 细胞数量明显增加, 肿瘤生长受到明显抑制。IFN- γ 是先天性和适应性免疫中的关键细胞因子, IFN- γ 通过激活细胞因子来诱导杀伤细胞。2019 年 Ding 等^[39]通过皮下注射 BXPC3 细胞到裸鼠体内建立皮下 PDAC 小鼠模型后, 给予 IFN- γ 和纳武利尤单抗联合治疗能够增强抗肿瘤疗效。

新抗原靶向疫苗已被证明可以在具有免疫原性的肿瘤中诱导 T 细胞的反应, 单用免疫检查点抑制剂对胰腺癌的治疗甚微, 但可以通过接种疫苗使肿瘤微环境变得“热”起来, 从而产生免疫应答。Kinkead 等^[40]设计了一种新抗原靶向疫苗 PancVAX, 在 PDAC 皮下肿瘤模型中, 将其与抗 PD-1 抗体以及 OX40 激动剂进行三联用药后发现, 与对照组和单药治疗组相比, 三联用药后通过诱导疫苗特异性肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL) 从而产生显著的抗肿瘤效应, 小鼠的生存率提高了 30%。另外在 2019 年 Bassani-Sternberg 等^[41]开展的一项 I b 期临床试验中, 在对三例胰腺癌患者接种疫苗后给予纳武利尤单抗治疗, 发现能够诱导和激活疫苗特异性 TIL 的产生。

3.2.2 减少免疫抑制细胞浸润

在胰腺癌微环境中存在着广泛的免疫抑制细胞浸润, 包括 Tregs、MDSCs、TAMs 等, 这些细胞能够分泌免疫抑制因子 TGF- β 、IL-10 等, 抑制 CD8⁺T 细胞的增殖和 IFN- γ 的产生, 从而形成免疫抑制的肿瘤微环境。靶向这些免疫抑制细胞, 使其在 TME 中的活性受到抑制, 能够解除免疫抑制的肿瘤微环境状态。

在胰腺癌 TME 中, MDSCs 向 TME 的迁移和招募的过程是由 CD11b/CD18 整合素异源二聚体介导的, GB1275 是一种 CD11b 的调节剂, 有研究发现, 在胰腺癌模型中使用 GB1275 治疗后, 在减少 MDSCs 数量的同时能够增加活化的 CD103⁺ DCs 和 CD8⁺ T 细胞的数量, 在胰腺癌模型联合使用抗 PD-1 抗体和 GB1275 治疗后, 与对照组相比, 联合治疗组小鼠的生存期显著延长^[42]。

在胰腺癌 TME 中, 肿瘤相关中性粒细胞 (tumor-associated neutrophil, TAN) 分为抗肿瘤型的 N1 型肿瘤相关中性粒细胞和促肿瘤型的 N2 型肿瘤相关中性粒细胞, Nielsen 等^[43]在 PDAC 小鼠模型中发现非受体酪氨酸激酶洛拉替尼能够抑制 TME 中 N2 型肿瘤相关中性粒细胞的浸润, 从而抑制胰腺癌的生长。此外, 作者应用原位胰腺癌 KPC 小鼠模型发现洛拉替尼与抗 PD-1 抗体联合治疗后小鼠肿瘤内中性粒细胞的数量减少, 且显著增加了 CD8⁺ T 细胞的浸润, 肿瘤生长速度显著减慢, 表明洛拉替尼能够改善 PDAC 对免疫治疗的反应。

肿瘤相关巨噬细胞 (tumor associated macrophages, TAMs) 包括抑制肿瘤生长的 M1 型和促进肿瘤侵袭的 M2 型两种类型, 在胰腺癌微环境中常表现为 M2 型 TAMs, 形成 PDAC 免疫抑制的微环境。2020 年 Lu 等^[44]发现 IL-20 高表达胰腺癌患者预后较差, 应用 KPC 和原位 PDAC 两种胰腺癌模型进行研究, 发现靶向 IL-20 后能够减少原位 PDAC 模型中 M2 型 TAMs 的浸润, 将 IL-20 的拮抗剂 7E 与抗 PD-1 抗体联合治疗后在减少 M2 浸润的同时还增加了 CD8⁺ T 细胞的浸润, 削弱了肿瘤微环境免疫抑制, 抑制了肿瘤生长, 显著延长了小鼠生存期。

3.3 靶向肿瘤基质

大量致密的基质成分是胰腺癌微环境的显著特点, 约占 TME 的 80%, 从而形成了一个物理屏障, 呈现出免疫抑制肿瘤微环境, 有利于胰腺肿瘤的进展, 是导致耐药性和免疫治疗效果较差的主要原因。在胰腺癌间质中, 有大量肿瘤相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblasts, CAFs) 被激活, CAFs 产生的细胞外基质可引起纤维化, 抑制肿瘤免疫细胞浸润。靶向破坏胰腺癌基质成分, 使癌细胞暴露出来, 有利于免疫效应物质进入杀伤癌细胞。细胞外基质主要由胶原蛋白、纤维连接蛋白、糖胺聚糖、透明质酸和蛋白酶组成^[45], 因此, 免疫治疗联合针对 TME 中的肿瘤间质可能会对胰腺的治疗产生效果。

成纤维活化蛋白 (fibroblast activation protein, FAP) 是一种 CAFs 细胞的活化标志物, 在胰腺肿瘤

TME 中过表达, 与患者的不良预后有关。在胰腺癌模型中发现, FAP 抑制剂和抗 PD-L1 抗体联合使用能减少抑制因子 CXCL12 的产生, 从而减缓 PDAC 的进展, 能延长荷瘤小鼠的生存期^[46]。

局部粘着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 是一种非受体酪氨酸蛋白激酶, 是细胞与其外基质之间的接触点, 在胰腺癌等多种恶性肿瘤中过表达。有研究发现 FAK 在调节肿瘤间质纤维化和胰腺癌免疫抑制微环境中发挥重要作用, 并且与效应 T 细胞的低浸润有关。Symeonides 等^[47]在 PDAC 小鼠模型中发现, 抑制 FAK 能够有效的减少胶原蛋白和其他细胞外基质成分, 这些变化能够改善胰腺癌 TME 的状态, 有利于发挥抗肿瘤效应。进一步将 FAK 抑制剂、吉西他滨与抗 PD-1 抗体联合使用后显示出了强大的抗肿瘤效应, 小鼠的生存期明显延长。类似的研究也被 Jiang 等^[48]所报道, 他们在 KPC 小鼠模型中将 FAK 抑制剂 VS-4718、吉西他滨与抗 PD-1 抗体进行三联联合, 实验发现 FAK 抑制剂作用后能够抑制胰腺间质的纤维化, 促进胰腺癌对免疫治疗的反应, 显著抑制肿瘤的生长, 延长荷瘤小鼠的生存期。

IL-6 主要来源于胰腺星状细胞, 并且通过 STAT 信号通路在 TME 中排泄乳酸, 对 PDAC 的进展具有重要作用。2020 年 Kesh 等^[49]发现, 在皮下小鼠胰腺癌模型中使用 IL-6 抑制剂能够有效抑制微环境中乳酸排泄, 减少肿瘤内 CD133⁺ 的数量, 增强胰腺肿瘤对抗 PD-1 的敏感性。Mace 等^[50]报道了相似的研究, 他们发现在自发胰腺癌小鼠模型 KPC-Brca2 中使用 IL-6 抑制剂和抗 PD-L1 抗体后能够对胰腺肿瘤的生长产生明显的抑制作用, 并且肿瘤内效应 T 细胞的数量明显增加。

4 展望

总之, 单一免疫检查点抑制剂治疗对胰腺癌患者的治疗效果非常有限, 通过联合治疗促使肿瘤微环境由免疫抑制状态向免疫激活状态转变, 促进免疫效应细胞的浸润, 可有效提高免疫治疗效果。除此之外, 胰腺癌肿瘤微环境潜在的治疗靶点还有很多, 比如在肿瘤基质中大量存在的透明质酸、VEGF、血管等这类物质, 设计对其进行靶向治疗的药物, 并与免疫检查点抑制剂联合起来也可能是治疗胰腺癌的潜在策略。此外, 随着对免疫治疗深入研究, 人们发现肠道微生物群与肿瘤免疫反应密切相关, 在已确诊的胰腺癌患者中, 相比短期生存者, 那些具有丰富的肿瘤微生物多样性的患者生存率明

显更长一些,而且通过调节肠道微生物群能够影响到胰腺癌肿瘤微环境中免疫细胞的浸润,因此,肠道微生物群也可能作为一种提高抗肿瘤疗效的潜在靶点,其与免疫检查点抑制联合应用也具有巨大的发展潜力^[51-52]。未来针对胰腺癌患者的治疗方式将会是多样化和个性化的,应根据每个患者自身特点,有针对性的选择合适的治疗方案才能达到更好的治疗效果,实现有效延长患者生存期的目的^[53]。

参 考 文 献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] Masiak-Segit W, Rawicz-Pruszyński K, Skórzewska M, et al. Surgical treatment of pancreatic cancer [J]. Pol Przegl Chir, 2018, 90(2): 45-53.
- [3] Goto Y, Nakamura A, Ashida R, et al. Clinical evaluation of intensity-modulated radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer [J]. Radiat Oncol, 2018, 13(1): 118.
- [4] Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 379(25): 2395-2406.
- [5] Vincent A, Herman J, Schulick R, et al. Pancreatic cancer [J]. Lancet, 2011, 378(9791): 607-620.
- [6] Ibrahim AM, Wang YH. Viro-immune therapy: a new strategy for treatment of pancreatic cancer [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(2): 748-763.
- [7] Suresh K, Naidoo J, Lin CT, et al. Immune checkpoint immunotherapy for non-small cell lung cancer: benefits and pulmonary toxicities [J]. Chest, 2018, 154(6): 1416-1423.
- [8] Willmore ZN, Coumbe BGT, Crescioli S, et al. Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: treatment of melanoma and immune mechanisms of action [J]. Eur J Immunol, 2021, 51(3): 544-556.
- [9] Kuzume A, Chi S, Yamauchi N, et al. Immune-checkpoint blockade therapy in lymphoma [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5456.
- [10] Gul A, Stewart TF, Mantia CM, et al. Salvage ipilimumab and nivolumab in patients with metastatic renal cell carcinoma after prior immune checkpoint inhibitors [J]. J Clin Oncol, 2020, 38(27): 3088-3094.
- [11] Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade [J]. Sci, 2018, 359(6382): 1350-1355.
- [12] Balachandran VP, Łuksza M, Zhao JN, et al. Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer [J]. Nature, 2017, 551(7681): 512-516.
- [13] Skelton RA, Javed A, Zheng L, et al. Overcoming the resistance of pancreatic cancer to immune checkpoint inhibitors [J]. J Surg Oncol, 2017, 116(1): 55-62.
- [14] Amedei A, Niccolai E, Prisco D. Pancreatic cancer: role of the immune system in cancer progression and vaccine-based immunotherapy [J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(11): 3354-3368.
- [15] Steele CW, Karim SA, Leach JDG, et al. CXCR2 Inhibition profoundly suppresses metastases and augments immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Cancer Cell, 2016, 29(6): 832-845.
- [16] Principe DR, Narbutis M, Kumar S, et al. Long-term gemcitabine treatment reshapes the pancreatic tumor microenvironment and sensitizes murine carcinoma to combination immunotherapy [J]. Cancer Res, 2020, 80(15): 3101-3115.
- [17] Disis ML. Mechanism of action of immunotherapy [J]. Semin Oncol, 2014, 41(5): S3-S13.
- [18] Garris CS, Arlauckas SP, Kohler RH, et al. Successful anti-pd-1 cancer immunotherapy requires T cell-dendritic cell crosstalk involving the cytokines IFN- γ and IL-12 [J]. Immunity, 2018, 49(6): 1148-1161.
- [19] Henriksen A, Dyhl-Polk A, Chen I, et al. Checkpoint inhibitors in pancreatic cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2019, 78: 17-30.
- [20] Ott PA, Bang YJ, Piha-Paul SA, et al. T-cell-inflamed gene-expression profile, programmed death ligand 1 expression, and tumor mutational burden predict efficacy in patients treated with pembrolizumab across 20 cancers: keynote-028 [J]. J Clin Oncol, 2019, 37(4): 318-327.
- [21] Hingorani SR, Zheng L, Bullock AJ, et al. Halo 202: randomized phase ii study of pegph20 plus nab-paclitaxel/gemcitabine versus nab-paclitaxel/gemcitabine in patients with untreated, metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. J Clin Oncol, 2018, 36(4): 359-366.
- [22] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer [J]. N Engl J Med, 2012, 366(26): 2455-2465.
- [23] Fan JQ, Wang MF, Chen HL, et al. Current advances and outlooks in immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 32.
- [24] Balachandran VP, Beatty GL, Dougan SK. Broadening the impact of immunotherapy to pancreatic cancer: challenges and opportunities [J]. Gastroenterology, 2019, 156(7): 2056-2072.
- [25] Ren B, Cui M, Yang G, et al. Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 108.
- [26] Kabacaoglu D, Ciecieski KJ, Ruess DA, et al. Immune checkpoint inhibition for pancreatic ductal adenocarcinoma: current limitations and future options [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1878.
- [27] Kang J, Hwang I, Yoo C, et al. Nab-paclitaxel plus gemcitabine versus FOLFIRINOX as the first-line chemotherapy for patients with metastatic pancreatic cancer: retrospective analysis [J]. Invest New Drugs, 2018, 36(4): 732-741.
- [28] McBride A, Bonafede M, Cai Q, et al. Comparison of treatment patterns and economic outcomes among metastatic pancreatic cancer patients initiated on nab-paclitaxel plus gemcitabine versus FOLFIRINOX [J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2017, 10(10): 1153-1160.

- [29] Panchal K, Sahoo RK, Gupta U, et al. Role of targeted immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) treatment: an overview [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107508.
- [30] Faurobert E, Bouin AP, Albiges-Rizo C. Microenvironment, tumor cell plasticity, and cancer [J]. *Curr Opin Oncol*, 2015, 27(1): 64–70.
- [31] Hashimoto A, Handa H, Hata S, et al. Inhibition of mutant KRAS-driven overexpression of ARF6 and MYC by an eIF4A inhibitor drug improves the effects of anti-PD-1 immunotherapy for pancreatic cancer [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 54.
- [32] Pu N, Gao S, Yin H, et al. Cell-intrinsic PD-1 promotes proliferation in pancreatic cancer by targeting CYR61/CTGF via the hippo pathway [J]. *Cancer Lett*, 2019, 460: 42–53.
- [33] Xia X, Li R, Zhou P, et al. Decreased NSG3 enhances PD-L1 expression by Erk1/2 pathway to promote pancreatic cancer progress [J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(3): 916–929.
- [34] Kim VM, Blair AB, Lauer P, et al. Anti-pancreatic tumor efficacy of a listeria-based, annexin A2-targeting immunotherapy in combination with anti-PD-1 antibodies [J]. *J Immunother Cancer*. 2019, 7(1): 132.
- [35] Knudsen ES, Kumarasamy V, Chung S, et al. Targeting dual signalling pathways in concert with immune checkpoints for the treatment of pancreatic cancer [J]. *Gut*, 2021, 70(1): 127–138.
- [36] Nesbitt H, Logan K, Thomas K, et al. Sonodynamic therapy complements PD-L1 immune checkpoint inhibition in a murine model of pancreatic cancer [J]. *Cancer Lett*, 2021, 517: 88–95.
- [37] Ma HS, Poudel B, Torres ER, et al. A CD40 Agonist and PD-1 antagonist antibody reprogram the microenvironment of nonimmunogenic tumors to allow T-cell-mediated anticancer activity [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(3): 428–442.
- [38] Zhang Q, Green MD, Lang X, et al. Inhibition of ATM increases interferon signaling and sensitizes pancreatic cancer to immune checkpoint blockade therapy [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(15): 3940–3951.
- [39] Ding G, Shen T, Yan C, et al. IFN- γ down-regulates the PD-1 expression and assist nivolumab in PD-1-blockade effect on CD8⁺ T-lymphocytes in pancreatic cancer [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 1053.
- [40] Kinkead HL, Hopkins A, Lutz E, et al. Combining STING-based neoantigen-targeted vaccine with checkpoint modulators enhances antitumor immunity in murine pancreatic cancer [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(20): e122857.
- [41] Bassani-Sternberg M, Digkila A, Huber F, et al. A Phase Ib study of the combination of personalized autologous dendritic cell vaccine, aspirin, and standard of care adjuvant chemotherapy followed by nivolumab for resected pancreatic adenocarcinoma—a proof of antigen discovery feasibility in three patients [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1832.
- [42] DeNardo DG, Galkin A, Dupont J, et al. GB1275, a first-in-class CD11b modulator: rationale for immunotherapeutic combinations in solid tumors [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(8): e003005.
- [43] Nielsen SR, Strøbech JE, Horton ER, et al. Suppression of tumor-associated neutrophils by lorlatinib attenuates pancreatic cancer growth and improves treatment with immune checkpoint blockade [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3414.
- [44] Lu SW, Pan HC, Hsu YH, et al. IL-20 antagonist suppresses PD-L1 expression and prolongs survival in pancreatic cancer models [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4611.
- [45] Edwards P, Kang BW, Chau I. Targeting the stroma in the management of pancreatic cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 691185.
- [46] Feig C, Jones JO, Kraman M, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(50): 20212–20217.
- [47] Symeonides SN, Anderton SM, Serrels A. FAK-inhibition opens the door to checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5: 17.
- [48] Jiang H, Hegde S, Knolhoff BL, et al. Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy [J]. *Nat Med*, 2016, 22(8): 851–860.
- [49] Kesh K, Garrido VT, Dosch A, et al. Stroma secreted IL6 selects for “stem-like” population and alters pancreatic tumor microenvironment by reprogramming metabolic pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 967.
- [50] Mace TA, Shakya R, Pitarresi JR, et al. IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer [J]. *Gut*, 2018, 67(2): 320–332.
- [51] Griffin ME, Espinosa J, Becker JL, et al. *Enterococcus* peptidoglycan remodeling promotes checkpoint inhibitor cancer immunotherapy [J]. *Science*, 2021, 373(6558): 1040–1046.
- [52] Luo B, Zhang Y, Zhang C, et al. Intestinal microbiota: A potential target for enhancing the antitumor efficacy and reducing the toxicity of immune checkpoint inhibitors [J]. *Cancer Lett*, 2021, 509: 53–62.
- [53] Zhang J, Wolfgang CL, Zheng L. Precision immuno-oncology: prospects of individualized immunotherapy for pancreatic cancer [J]. *Cancers(Basel)*, 2018, 10(2): 39.

[收稿日期] 2021-10-20

王佩瑶,王灿,孙瑶琪,等. 超声微泡技术在动物实验的应用[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 727-732.
Wang PY, Wang C, Sun YQ, et al. Application of ultrasound-stimulated microbubbles in zoopery [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 727-732.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.018

超声微泡技术在动物实验的应用

王佩瑶¹,王灿¹,孙瑶琪²,秦杨阳¹,黄猛^{1,3*}

(1. 安徽医科大学第一附属医院,合肥 230022;2. 安徽医科大学附属巢湖医院,安徽 巢湖 238000;3. 安徽医科大学第一附属医院东城院区/肥东县人民医院,合肥 231600)

【摘要】 低频超声激发微泡技术在临床中的应用越来越常见,主要包括靶向输送药物、增强免疫治疗、介导基因转染、开放血脑屏障、损伤肿瘤血管、辅助血栓消融。本文总结了超声微泡的制备、超声微泡技术在动物实验的应用,旨在为临床超声微泡技术的实际应用提供理论参考。

【关键词】 低频超声;微泡;制备;动物实验

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 05-0727-06

Application of ultrasound-stimulated microbubbles in zoopery

WANG Peiyao¹, WANG Can¹, SUN Yaoqi², QIN Yangyang¹, HUANG Meng^{1,3*}

(1. the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China. 2. Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Chaohu 238000. 3. East District of First Affiliated Hospital of Anhui Medical University/Feidong People's Hospital, Hefei 231600)

Corresponding author: HUANG Meng. E-mail: 353867450@qq.com

【Abstract】 Ultrasound-stimulated microbubble technology is becoming increasingly more common in the clinical setting. Its uses mainly include targeted drug delivery, enhanced immunotherapy, gene transfection, opening of the blood-brain barrier, damaging tumor blood vessels, and assisting in thrombus ablation. In this paper, the preparation of ultrasonic microbubbles and the application of ultrasonic microbubbles in zoopery are summarized with the aim of providing a theoretical reference for the practical application of ultrasonic microbubbles in clinical practice.

【Keywords】 low-intensity ultrasound; microbubbles; preparation; zoopery

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

近年来,随着超声新技术的发展、造影剂的完善,低频超声联合微泡的应用研究在临床治疗中引起了广泛关注。超声微泡技术可为疾病提供一种无创、靶向、可逆的治疗新方案:(1)可以使细胞膜产生瞬时孔,让外来物质通过孔进入细胞^[1],却没有在病理上造成靶器官的损伤,具有无创性;(2)不仅可以提高人体免疫反应强度,而且可以提高免疫

治疗药物传递的效率^[2],实现局部区域的治疗,具有靶向性;(3)可用于短暂和可逆的血脑屏障破坏,显著促进脑内给药^[3],短暂开放组织屏障后依然能重新恢复,具有可逆性。基于这些优于传统治疗方法的独特优势,研究学者们将其应用在动物模型上,进行了一系列的探索。现对其应用进展综述如下。

【基金项目】 安徽医科大学第一附属医院东城院区/肥东县人民医院内科科研项目(Ky2022019)。

Funded by Research Project of East District of First Affiliated Hospital of Anhui Medical University/Feidong People's Hospital (Ky2022019).

【作者简介】 王佩瑶(1996—),女,硕士研究生,研究方向:超声医学。Email:wpay_ay@163.com

【通信作者】 黄猛(1976—),男,硕士生导师,研究方向:超声影像诊断及治疗。Email:353867450@qq.com

1 超声微泡的制备

1.1 超声仪器和使用试剂

超声微泡 (low-intensity ultrasound with microbubbles, USMB) 是一种非侵入性、靶向性的治疗方法^[4], 通过在低频超声 (low-intensity ultrasound, US) 作用下让通过外周循环静脉注射的微泡 (microbubbles, MB) 发生一系列生物物理效应。

US 是频率低、功率小的超声波, 具有穿透力强、探测深度深、探测范围广的特点^[5]。MB 是由蛋白质、脂质或聚合物外壳及稳定的气体核心组成一种微米大小的球体^[6]。由于造影时间、稳定性、安全性的需要, 外壳主要应用脂质、聚合物^[7]。气体核心多采用高分子量、低血液溶解度、低弥散度的氟化气体^[8]。

1.2 制备超声微泡的技术参数设定

微泡、超声实验参数的不同可能会导致不一样的实验结果。直径约 1 μm 的 MB 与全氟碳芯和较长链的脂质壳在 4 MHz 的超谐波成像中表现最好^[9]。低机械指数 (< 0.2)、低声压 ($< 0.15 \text{ MPa}$) 超声下微泡以稳态空化为主, 随着机械指数、声压增高, 微泡以稳态空化和瞬态空化两种方式并存, 当达到一定机械指数 (> 0.3)、声压 ($> 0.2 \text{ MPa}$) 时, 微泡以瞬态空化为主^[10]。开放组织屏障的机械指数最低为 0.3, 而高达 0.7 可以不引起明显的出血或组织损伤^[11]。

由于各项参数之间相互影响, 以及不同实验条件下存在不同的最佳参数, 所以仍需对微泡和超声的参数以及安全性、可行性进行进一步探索。

1.3 超声微泡的制备

薄膜水化法和冷冻干燥法为国内外制备 MB 的常用方法, 用超声处理和机械振荡作为形成气泡所需的能量输入方式, 使含有壳膜材料的液体与气体相混合^[12]。具体制备方法如下。

1.3.1 薄膜水化法-声振法

称取一定比例的壳膜材料、靶向修饰物溶解于氯仿 (1 mL), 得到的溶液蒸发形成薄膜, 用水合液 (1 mL) 水合, 真空干燥 12 h, 在 55℃ 的培养箱中保持 60 min 来得到脂质体。然后, 将脂质体转移到 EP 管 (1.5 mL), 加入氟化气体。最后, 在 95 W 超声下振 8 s, 获得脂质纳米级气泡, 通过低速离心分离形成薄层。在 4℃ 下用 PBS 处理脂质纳米级气泡 30 min, 即获得靶向纳米级微泡超声造影剂^[13]。

1.3.2 冷冻干燥-机械振荡法

称取一定比例的壳膜材料、靶向修饰物、D-葡萄糖 (低温保护剂) 混合在西林瓶 (3 mL) 中形成混悬液, 冷冻干燥后加入溶媒液 (由甘油、丙二醇及去离子水按一定的比例混合制备), 加入氟化气体。密闭后在机械振荡仪上按设定的功率及时间进行充分混悬, 即制备得到脂质微泡超声造影剂初品, 将初品高速离心后, 弃上清, 取乳白色液体层, 移于新的西林瓶中, 钴 60 辐照灭菌^[14]。

冷冻干燥-机械振荡法制备的 MB 粒径分布较均一、浓度高、用时短, 薄膜水化-声振法制备的 MB 更易负载脂溶性药物、荧光染料^[15]。此外, 机械振荡法相较于声振法在制备携带质粒 DNA 分子的 MB 时, 可以避免对 DNA 的损伤^[16]。这两种方法各有其优点和弊端, 因此, 在制备 MB 时要根据具体要求再做选择。

2 USMB 技术在动物实验的应用

USMB 在动物实验中的应用主要有以下几个方面。

2.1 靶向输送药物

晚期癌症一般手术效果不佳, 只能通过药物治疗。若是采用化疗往往因缺乏靶向性而导致药物分布于全身, 一方面会因药物蓄积不足而治疗效果不佳, 另一方面会导致全身毒副作用。而低频超声可通过空化效应让细胞膜产生一过性空隙, 通透性增加, 使药物进入细胞^[17]。

USMB 可以产生一种高效的药物传递系统^[18]。MB 可在超声的辐射引导下, 将药物选择性的释放在靶器官部位, 加强细胞对药物的吸收, 从而在不减弱疗效的同时, 减少用药剂量、降低副作用^[19]。Li 等^[20]建立裸鼠肝细胞癌模型, 将其随机分为 A 组 (NS)、B 组 (5-FU 纳米气泡)、C 组 (非低频超声纳米气泡)、D 组 (5-FU 低频超声纳米气泡), 通过超声观察治疗前后裸鼠的肿瘤大小、绘制生存曲线、定量分析细胞凋亡指数、计算肿瘤微血管密度, 结果发现 D 组肿瘤生长速度最慢、肿瘤抑制率和凋亡指数最高、肿瘤微血管密度降低, 表明 USMB 负载 5-FU 可以进一步提高药物的靶向性, 进而抑制移植瘤的生长。

因此, USMB 治疗可以介导药物高效、靶向运输至病灶区域, 增加特定区域的药物浓度。

2.2 增强免疫治疗

肿瘤细胞在生长过程中,常通过抑制免疫系统介导肿瘤免疫逃逸。对于常规的手术、放化疗,肿瘤容易复发、产生耐药性和不良反应。而超声微泡的空化效应可以改变肿瘤微环境,增强免疫激活,抑制肿瘤生长^[21]。

USMB 可以输送免疫刺激物质,实现了抗肿瘤免疫反应^[22]。张蔚等^[23]将小鼠脱颈椎处死、骨髓腔冲洗和尼龙毛柱法得到其骨髓源性树突状细胞(DCs)、脾源性 T 淋巴细胞,来与小鼠前列腺癌 RM-1 细胞进行体外培养,一方面实验分组为对照组(DCs + T)、共同培养组(DCs + T + RM-1)、超声微泡组(DCs + T + 实验前 24 h 采用 USMB 辐照后的 RM-1),实验前后用流式细胞仪检测表型对比发现共同培养组 DCs 的分化受抑制、超声微泡组 T 淋巴细胞比例增加,说明体外小鼠前列腺癌微环境中 DCs 和 T 细胞的分化受抑制,而 USMB 可以促进免疫细胞(DCs 和 T 细胞)的分化;另一方面实验分组为对照组(RM-1)、超声微泡组(实验前 24 h 采用 USMB 辐照后的 RM-1)、免疫组(DCs + T + RM-1)、超声微泡联合免疫组(DCs + T + 实验前 24 h 采用 USMB 辐照后的 RM-1),24 h 后运用划痕试验、CCK-8 试验、Transwell 试验分别检测得出各组迁移、增殖、侵袭能力,发现对照组能力最强、超声微泡联合免疫组能力最弱,表明 USMB 可以协同抗肿瘤免疫反应。

因此,USMB 治疗可以通过激活免疫系统、递送免疫调节物质,活化免疫系统,抑制肿瘤的发生发展。

2.3 介导基因转染

基因治疗具有高序列特异性、高选择性等特点,是生物研究的热点。若是采用放、化疗,不仅毒副作用大,且疗效也不明显。而超声的惯性空化作用可使细胞膜形成暂时性小孔,促进细胞对物质的摄取,来提高基因转染效率^[24]。

US 介导的基因传递可以在不引起机体免疫反应和病毒载体突变的情况下,安全高效的进行基因转染。它是通过将外源性 DNA 或 RNA 结合到 MB 外壳或包裹在内,再经 US 破坏,将其释放到靶器官区域^[25]。程祖胜等^[26]将实验大鼠随机分为 7 组,正常组正常饲养,其余各组给予肝纤维化诱导,对照组(NS)、CTGF-siRNA 质粒组(NS + 质粒)、超声联合微泡组(USMB)、超声联合微泡介导基因组(不

同浓度梯度的低、中、高剂量质粒 + USMB),运用超声及病理切片 HE 染色评价肝纤维化程度、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肝组织中 CT-GF、I 型和 III 型胶原的 mRNA 表达、Masson 染色观察胶原纤维含量,显示含质粒的分组超声及病理切片纤维化程度降低、超声联合微泡介导基因组 CT-GF、I 型、III 型胶原的 mRNA 表达以及胶原纤维含量明显降低且随着质粒剂量增大而减少,因此,在 USMB 作用下 CTGF-siRNA 基因能特异地作用于靶位点进行转染,有效抑制肝纤维化进程。

因此,USMB 治疗可以有效提高非病毒性载体转染率,通过载体将基因安全高效地传递到靶器官。

2.4 开放血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)

中枢神经系统中 BBB 使大部分治疗性药物难以进入颅内病灶部位,严重影响了临床治疗效果。若是采用药物或外科手术只能部分缓解脑部疾病症状,且运动和神经功能也会受损。而超声微泡可以产生空化效应,打开内皮细胞间的紧密连接,随着血脑屏障的开放,载药微泡可靶向输送至颅内特定部位^[27]。

USMB 可无创、局部、可逆地打开 BBB,为治疗中枢神经系统和颅内疾病提供了新策略^[28]。Wang 等^[29]建立大鼠阿尔茨海默病模型、制备载脑源性神经生长因子(brain-derived nerve growth factor, BDNF)逆转录病毒(pLXSN)的微泡(MpLXSN-BDNF)及载增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的微泡(MpLXSN-EGFP),随机分为对照组(NS)、MpLXSN-EGFP + US 组(经尾静脉注射 MpLXSN-EGFP, US 辐照脑区)、MpLXSN-BDNF + US 组(经尾静脉注射 MpLXSN-BDNF, US 辐照脑区)、MB + pLXSN-BDNF + US 组(经尾静脉注射 MB 和 pLXSN-BDNF, US 辐照脑区),并在 MRI 引导下用 US 照射大鼠海马,采用免疫组化和高效液相色谱分别测定脑组织中乙酰胆碱酯酶阳性细胞的数量和乙酰胆碱的含量、突触棘 IF 染色和 Western Blot 检测突触密度恢复,结果在 MRI 图像上可以观察到 BBB 破坏部位的信号强度增强、治疗组脑内乙酰胆碱酯酶阳性细胞和乙酰胆碱含量明显减少、MpLXSN-BDNF + US 组较其他治疗组突触损失恢复地更好,表明 USMB 技术可以辐照开放大鼠海马区。

因此,USMB 治疗可以安全、高效地开放 BBB,使药物能在颅内局部达到有效浓度。

2.5 损伤肿瘤血管

与正常细胞相比,肿瘤细胞需要血管提供充足的营养物质、氧气,而通过抑制新生血管可减少肿瘤细胞的增殖。若是用化学方法去攻击肿瘤血管的特异性靶点,副作用大,疗效也不理想。而肿瘤组织新生血管的管壁薄弱,对微泡介导的超声空化效应尤为敏感^[30]。

USMB 可诱导明显的微血管损伤,导致细胞坏死或凋亡^[31]。Shen 等^[32]构建裸鼠皮下前列腺肿瘤模型,随机分组为对照组(假治疗)、US 组(US)、USMB 组(USMB),采用彩色多普勒血流成像、HE 染色、免疫印迹和透射电镜,发现 USMB 组肿瘤坏死(肿瘤体积明显减小、细胞核消失、胞浆空泡化增加、核周池扩张)、血管管腔闭塞、血流信号消失、COX-2 和血管内皮生长因子的强度明显降低,而在对照组和 US 组肿瘤有完整的血管内皮和血管腔,因此,得出 USMB 可能导致裸鼠皮下肿瘤的血管闭塞和生长抑制作用。

因此,USMB 治疗可以导致广泛的内皮细胞死亡,从而导致肿瘤血管系统的机械性破坏。

2.6 辅助血栓消融

血栓脱落可能会导致急性脑梗死,最应采取的措施是使阻塞的血管早期再通、及时恢复供血。若是采用药物只能治疗超早期脑梗死,而且具有出血危险性高及治疗时间窗短等因素限制的影响。而超声波可以利用其机械效应,帮助溶栓药物扩散到血凝块中,并机械地分解血凝块,提高超声溶栓的效果^[33]。

USMB 不仅可以达到对靶向血管内血栓的完全溶解,同时也能达到预防微循环的再栓塞作用^[34]。王蕊等^[35]制备大鼠下肢微动脉血栓栓塞模型,随机分为对照组(持续泵入 MB)、治疗组 1(1000 周期低频长脉冲治疗超声+持续泵入 MB)、治疗组 2(5000 周期低频长脉冲治疗超声+持续泵入 MB),并同时连续成像超声观察、重复再灌注微血栓悬液,留取栓塞前、栓塞后、治疗 1 min、治疗 10 min 下肢再灌注成像图像,描绘视频强度-时间曲线,对比栓塞前后下肢微血管血流容积,结果发现治疗组的溶栓效果显著高于对照组,得出低频长脉冲治疗超声联合 MB 对大鼠下肢微动脉血栓栓塞有良好的治疗效果。

因此,USMB 治疗可以通过超声聚焦于血栓部位,加用溶栓剂辅助血栓消融实现超声溶栓。

3 问题与展望

众多的研究均表明,利用 USMB 治疗能无创、靶向、可逆地靶向输送药物、增强免疫治疗、介导基因转染、开放血脑屏障、损伤肿瘤血管、辅助血栓消融,为疾病的治疗提供新途径、新思路。虽然目前在动物实验方面已有不少研究表明 USMB 技术的应用广泛,但是实际应用于临床却仍需完善诸多问题:(1)明确不同生物物理效应相对应的具体作用原理,提高临床治疗效率;(2)恰当利用超声的热效应,减少不必要损伤;(3)提升微泡制备技术,兼顾考虑载体半衰期和穿透效率;(4)加强微泡稳定性,延长在靶器官区域停留时间;(5)探究不同疾病的最佳超声参数,做到有针对性地治疗。

针对 USMB 技术的应用研究,无论是动物实验方面,还是实际临床方面,超声新技术的发展、造影剂的完善都面临着诸多挑战。这不仅需要临床供给指引,还需要多学科合作。尽管存在许多问题,但已取得的研究成果充分显示了 USMB 技术潜在优势,随着对其在动物实验方面应用的深入研究,USMB 将广泛应用于临床,对临床治疗作出巨大贡献。

参 考 文 献(References)

- [1] Meng L, Liu X, Wang Y, et al. Sonoporation of cells by a parallel stable cavitation microbubble array [J]. Adv Sci (Weinh), 2019, 6(17): 1900557.
- [2] Shi G, Zhong M, Ye F, et al. Low-frequency hifu induced cancer immunotherapy: tempting challenges and potential opportunities [J]. Cancer Biol Med, 2019, 16(4): 714-728.
- [3] Wang F, Dong L, Wei X, et al. Effect of gambogic acid-loaded porous-lipid/plga microbubbles in combination with ultrasound-triggered microbubble destruction on human glioma [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 711787.
- [4] 林晨, 陈叶梓, 刘朝奇, 等. 超声微泡介导的载药系统在肿瘤靶向治疗的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(17): 1368-1371.
Lin C, Chen YZ, Liu CQ, et al. Recent advances of ultrasound microbubble-mediated drug delivery system in tumor targeted therapy [J]. Chin Pharm J, 2021, 56(17): 1368-1371.
- [5] 姚志伟, 黄桂芬, 陈锦婷. 高频、低频彩色多普勒超声检查与血浆 PCT 对阑尾炎的诊断价值 [J]. 海南医学, 2022, 33(6): 769-772.
Yao ZW, Huang GF, Chen PT. Diagnostic value of high-frequency and low-frequency color Doppler ultrasound combined with plasma procalcitonin in appendicitis [J]. Hainan Med J, 2022, 33(6): 769-772.
- [6] Sharma D, Giles A, Hashim A, et al. Ultrasound microbubble

- potentiated enhancement of hyperthermia-effect in tumours [J]. PLoS One, 2019, 14(12): e226475.
- [7] 鲁众阳, 周亚婷. 超声造影剂专利分析 [J]. 中国科技信息, 2020, 16: 17-18.
- Lu ZY, Zhou YT. Patent analysis of ultrasound contrast agent [J]. Chin Sci Tech Inform, 2020, 16: 17-18.
- [8] Nanda NC, Wistran DC, Karlsberg RP, et al. Multicenter evaluation of sonovue for improved endocardial border delineation [J]. Echocardiography, 2002, 19(1): 27-36.
- [9] Newsome IG, Kierski TM, Dayton PA. Assessment of the superharmonic response of microbubble contrast agents for acoustic angiography as a function of microbubble parameters [J]. Ultrasound Med Biol, 2019, 45(9): 2515-2524.
- [10] 位红芹, 马穗红, 柳建华. 诊断超声及低声压治疗超声对微泡的作用效果研究 [J]. 广州医药, 2021, 52(2): 33-36.
- Wei HQ, Ma SH, Liu JH. Study of diagnostic ultrasound and low acoustic pressure therapy on microbubbles [J]. Guangzhou Med, 2021, 52(2): 33-36.
- [11] Cammalleri A, Croce P, Lee W, et al. Therapeutic potentials of localized blood-brain barrier disruption by noninvasive transcranial focused ultrasound: a technical review [J]. J Clin Neurophysiol, 2020, 37(2): 104-117.
- [12] Unga J, Kageyama S, Suzuki R, et al. Scale-up production, characterization and toxicity of a freeze-dried lipid-stabilized microbubble formulation for ultrasound imaging and therapy [J]. J Liposome Res, 2020, 30(3): 297-304.
- [13] Fu YR, Chen F, Luo Y, et al. Nanoscale bubble ultrasound contrast agents-mediated suicide gene therapy system, nanoscale bubble-LV5-YCD-TK/GCV/5-FC, effectively inhibits bladder cancer cell growth [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(1): 75-86.
- [14] 张萍, 高云华, 刘平, 等. 冷冻干燥法制备载紫杉醇脂质微泡的实验研究 [J]. 中国超声医学杂志, 2008, 24(4): 290-292.
- Zhang P, Gao YH, Liu P, et al. Preparation of paclitaxel-loaded liposome microbubbles using lyophilization: an experimental study [J]. Chin J Ultrasound Med, 2008, 24(4): 290-292.
- [15] 郑剑, 王平, 尹庭辉, 等. 机械振荡法与声振法制备纳米级微泡超声造影剂效能比较 [J]. 中华超声影像学杂志, 2012, 21(12): 1078-1081.
- Zheng J, Wang P, Yin TH, et al. Comparison of preparation efficiency of nanometer microbubble ultrasound contrast agent by mechanical vibration method and acoustic vibration method [J]. Chin J Ultrasonogr, 2012, 21(12): 1078-1081.
- [16] 江琼超, 智慧. 脂质微泡造影剂的制备方法及其应用的研究进展 [J]. 中国介入影像与治疗学, 2010, 7(5): 576-578.
- Jiang QC, Zhi H. Methods of preparation for lipid microbubble contrast media and advances in the application [J]. Chin J Interv Imaging Ther, 2010, 7(5): 576-578.
- [17] Zhang L, Yin T, Li B, et al. Size-modulable nanoprobe for high-performance ultrasound imaging and drug delivery against cancer [J]. ACS Nano, 2018, 12(4): 3449-3460.
- [18] Lee S, Jeon H, Shim S, et al. Preclinical study to improve microbubble-mediated drug delivery in cancer using an ultrasonic probe with an interchangeable acoustic lens [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 12654.
- [19] 杜宇翎, 陈思瑶, 周野, 等. 基于微流控技术制备微泡的研究进展 [J]. 科技创新与应用, 2021, 11(30): 121-124.
- Du YL, Chen SY, Zhou Y, et al. Research progress in preparation of microbubbles based on microfluidic technology [J]. Technol Innovation Appl, 2021, 11(30): 121-124.
- [20] Li Q, Li H, He C, et al. The use of 5-fluorouracil-loaded nanobubbles combined with low-frequency ultrasound to treat hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. Eur J Med Res, 2017, 22(1): 48.
- [21] Ho YJ, Li JP, Fan CH, et al. Ultrasound in tumor immunotherapy: current status and future developments [J]. J Control Release, 2020, 323: 12-23.
- [22] 谢茜, 刘小慧, 刘朝奇, 等. 超声微泡介导肿瘤免疫治疗的机制及其应用 [J]. 实用医学杂志, 2020, 36(13): 1849-1853.
- Xie Q, Liu XH, Liu ZQ, et al. The mechanism and application of ultrasound microbubble mediated tumor immunotherapy [J]. J Practical Med, 2020, 36(13): 1849-1853.
- [23] 张蔚, 白文坤, 孟哲颖, 等. 低频超声联合微泡提高小鼠前列腺癌微环境中抗肿瘤免疫的体外实验研究 [A]. 中国超声医学工程学会第五届全国介入超声医学学术交流大会 [C]; 2019.
- Zhang W, Bai WK, Meng ZY, et al. *In vitro* experimental study of low frequency ultrasound combined with microbubbles to improve anti-tumor immunity in mouse prostate cancer microenvironment [A]. The 5th national academic exchange conference of interventional ultrasound medicine of chinese society of ultrasonic medical engineering [C]; 2019.
- [24] 黄叶, 陈巍, 田海. 超声波靶向微泡击碎技术在心脏病基因治疗中的现状与前景 [J]. 疑难病杂志, 2021, 20(9): 948-952.
- Huang Y, Chen W, Tian H. Current status and prospect of ultrasonic-targeted microbubble destruction in gene therapy of cardiac disease [J]. Chin J Difficult Cas Complicated Cases, 2021, 20(9): 948-952.
- [25] Qian L, Thapa B, Hong J, et al. The present and future role of ultrasound targeted microbubble destruction in preclinical studies of cardiac gene therapy [J]. J Thorac Dis, 2018, 10(2): 1099-1111.
- [26] 程祖胜, 夏国园, 钱彩艳, 等. 超声作用下 CTGF-siRNA 对大鼠肝纤维化基因治疗的实验研究 [J]. 中国超声医学杂志, 2021, 37(1): 93-96.
- Cheng ZS, Xia GY, Qian CY, et al. The experimental study of CTGF-siRNA gene therapy for liver fibrosis in rats under ultrasound [J]. Chin J Ultrasound Med, 2021, 37(1): 93-96.
- [27] 钟林宏, 祝兴宇, 张渝, 等. 超声联合微泡开放血脑屏障的研究进展 [J]. 临床超声医学杂志, 2021, 23(12): 934-937.

- Zhong LH, Zhu XY, Zhang Y, et al. Research progress of ultrasound combined with microbubbles to open the blood-brain barrier [J]. J Clin Ultrasound Med, 2021, 23(12): 934-937.
- [28] Sierra C, Acosta C, Chen C, et al. Lipid microbubbles as a vehicle for targeted drug delivery using focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(4): 1236-1250.
- [29] Wang F, Wei XX, Chang LS, et al. Ultrasound combined with microbubbles loading bdnf retrovirus to open bloodbrain barrier for treatment of Alzheimer's disease [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 615104.
- [30] 韩璐, 郭凯, 郑瑜, 等. 微泡介导超声空化联合自然杀伤细胞对兔肝 VX2 肿瘤热消融的增效作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 16-21.
- Han L, Guo K, Zheng Y, et al. Microbubble-enhanced ultrasound cavitation combined with natural killer cells augmented microwave ablation of rabbit liver VX2 tumors [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 16-21.
- [31] Hou R, Xu Y, Lu Q, et al. Effect of low-frequency low-intensity ultrasound with microbubbles on prostate cancer hypoxia [J]. Tumour Biol, 2017, 39(10): 1-9.
- [32] Shen ZY, Shen E, Diao XH, et al. Inhibitory effects of subcutaneous tumors in nude mice mediated by low-frequency ultrasound and microbubbles [J]. Oncol Lett, 2014, 7(5): 1385-1390.
- [33] Goel L, Jiang X. Advances in sonothrombolysis techniques using piezoelectric transducers [J]. Sensors (Basel), 2020, 20(5): 1288.
- [34] 阿丽米娜·阿文, 穆玉明. 靶向微泡携带药物联合低频超声溶栓的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(30): 34-37.
- Alimina AW, Mu YM. Reseach progress of targeted microbubble with low-frequency ultrasound in thrombolysis [J]. Chin Med Herald, 2015, 12(30): 34-37.
- [35] 王蕊, 杨莉, 陈向辉, 等. 长脉冲超声联合声学微泡治疗大鼠下肢微动脉血栓栓塞的实验研究 [J]. 中国超声医学杂志, 2017, 33(12): 1127-1130.
- Wang R, Yang L, Chen XH, et al. Long-pulsed ultrasound mediated microbubbles effects for the treatment of hind limb micro-artery thromboembolism in a rat model [J]. Chin J Ultrasound Med, 2017, 33(12): 1127-1130.

[收稿日期] 2022-04-28

《中国实验动物学报》刊期变更通知

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

欢迎读者积极订阅! 欢迎各位学者踊跃投稿!