

实验动物与比较医学



期刊网站

Shiyan Dongwu Yu Bijiao Yixue

双月刊 1981年9月创刊

第42卷 第4期 (总第194期)

2022年8月25日出版

主 管

上海科学院

主 办

上海市实验动物学会

上海实验动物研究中心

编 辑

《实验动物与比较医学》编辑委员会

主 编

王 健

执行主编

吴宝金

出 版

《实验动物与比较医学》编辑部

地址: 上海市金科路3577号

邮编: 201203

电话: 021-50793657

E-mail: bjb50793657@163.com

网址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>

编辑部负责人

张俊彦

印 刷

上海新开宝商务印刷有限公司

发 行

上海市报刊发行局

范围: 国内公开发售

邮发代号: 4-789

零 售

《实验动物与比较医学》编辑部

201203, 上海市金科路3577号

电话: 021-50793657

联系人: 王伟民

定 价

每期30.00元, 全年180.00元

中国标准连续出版物号

ISSN 1674-5817

CN 31-1954/Q

版 权 声 明

本刊为开放获取期刊, 遵从CC BY-NC-ND 4.0协议。2022年版权归《实验动物与比较医学》编辑部所有。

作者向本刊投稿, 即视为愿意将著作权(包括但不限于信息网络传播权等)授予本刊。不同意者请在投稿时声明。

除非特别说明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会及主办单位的观点。

目 次

动物实验技术与方法专题

大鼠肠系膜淋巴液持续引流新方法的初步建立

张笑瑞, 曹 静, 吴倩倩, 康 康, 陈国元, 吴宝金 267

不同剂型普罗布考对大鼠肠系膜淋巴转运及药代动力学的影响

张笑瑞, 曹 静, 吴倩倩, 刘季俊, 陈国元, 吴宝金 275

三硝基苯磺酸诱导急性肠纤维化大鼠模型的改良方法

王怡如, 蒋笑影, 董若曦, 潘一滨, 韩向晖, 曹永清 284

利用CRISPR/Cas9技术构建脂多糖结合蛋白基因敲除小鼠

李思迪, 付 彬, 郭中坤, 林颖杰, 张振宇, 米传靓, 王可洲 294

放置时间对大鼠血清样本中电解质含量及pH值的影响

冯丁山, 黄业宇, 张晓昕, 吴爱琴, 王 湛, 苏林梁 301

浅谈微量采血法在药物非临床研究中的应用及3R原则的贯彻

陈佳琦, 吕龙宝, 张飞燕, 李 瑞, 李乙江, 李丽红, 张晓迪 306

皮肤致敏性替代试验方法的研究进展

黄静怡, 李培宁, 刘香梅, 刘忠华, 黄宇锋 313

人类疾病动物模型

抑制磷脂酶D1活性可促进缺血性脑卒中模型小鼠神经功能恢复

朱彦兵, 白 帆, 陶少鑫, 潘雨花蕾, 王 欢, 赵羽商, 王 崧, 于 艳 322

大鼠急性牙髓炎痛敏模型的疼痛效应评价

赵斯佳, 何新宇, 景 泉, 马 林, 郭春岚, 万 阔 333

阿尔茨海默病动物模型的研究进展

盛哲津, 李利妹 342

动物模型在Eph家族蛋白功能研究中的应用

胡耀华, 赵菊梅, 师长宏 351

实验动物质量控制

实验动物质量控制中泰泽病原体的研究进展

陶俊豪, 鄢慧琼, 谢 琿, 应华忠, 戴方伟 358

实验动物设施及管理

高校 ABSL-2 实验室流程管理的实践探讨:以厦门大学为例

郑秀青, 邵志强, 宋 婧, 张越华, 苏金华 364

实验动物与比较医学科创团队推介

中国生育调节药物毒理检测中心实验动物研发平台 371

复旦大学丁玉强实验室及实验动物科学部 373

树鼩种质资源中心/代解杰实验室 375

作者-读者-编者

《实验动物与比较医学》第七届编辑委员会名单 前插 8

《实验动物与比较医学》“前沿文献述评”——青年编委专栏邀请函 283

《实验动物与比较医学》2022 年征订启事 293

《实验动物与比较医学》出版伦理声明 305

《实验动物与比较医学》被美国乌利希国际期刊指南(Ulrichsweb)收录 312

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明 332

2022 年版 ICMJE 推荐规范的更新内容 341

《实验动物与比较医学》有关作者投稿必备信息和材料的说明 350

《实验动物与比较医学》常用英文缩略词表 370

《实验动物与比较医学》2022 年刊务理事会名单 后插 1

广告 封二, 前插 1~7, 后插 2~6, 封三, 封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q*1981*b* 大 16*110*zh*P*¥30.00*2000*16*2022-08

(经方正字库授权,本刊使用字体包括方正雅宋系列、方正兰亭黑 pro global 系列、方正金陵系列、方正 Capitolium 系列)

本期责任编辑 谢建芸

本期审稿专家 白 玉 陈 丽 陈民利 程树军 丁玉强 高 诚 黄 缨 赖国旗
黎 明 李 华 李 静 李 焱 刘 静 刘月环 庞晓斌 施爱民
史利军 孙德明 田嘉军 王朝霞 王红平 王 健 王 荣 王 宇
吴宝金 谢建芸 邢 敏 徐 平 徐汪节 闫明霞 姚 明 张 钰
张 周 周光兴 周晓辉 (排名不分先后)

本期责任编辑 张俊彦

本期责任编辑 王伟民

本期中英文校对 富群华 丁宇菁 陶启辰 刘晓宇 朱德才 孙 琛

本期实习编辑 崔占鼎 郭嘉欣 洪 怡 姜怡欣 任益凡 余儒洋 赵宇朋 周 烁 周 培

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981 Volume 42, Issue 4

August 25, 2022

Directed by

Shanghai Academy of Science and
Technology

Sponsored by

Shanghai Laboratory Animal Science
Association
Shanghai Laboratory Animal Research
Center

Edited by

Editorial Board of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine*

Editor-in-Chief

WANG Jian

Executive Editor-in-Chief

WU Baojin

Published by

Editorial Office of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine*
3577 Jinke Road, Pudong District,
Shanghai 201203, China
Tel: 0086-21-50793657
E-mail: bjb50793657@163.com
<http://www.slarc.org.cn/dwyx>

Managing Editor

ZHANG Junyan

Printed by

Shanghai Newcabo Business Printing
Co., Ltd.

Distributed by

Shanghai Postal Bureau of Press Issuing
Postal code: 4-789

Price

RMB 30.00 per issue

CSSN

ISSN 1674-5817
CN 31-1954/Q

Copyright© 2022 by the Editorial

Office of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine*.

This is an open access journal under CC BY-NC-ND 4.0 license.

All articles published represent the opinions of
the authors, and do not reflect the official
policy of the Editorial Board of *Laboratory
Animal and Comparative Medicine*, unless
this is clearly specified.

Executive Editors for This Issue

ZHANG Junyan, XIE Jianyun

CONTENTS IN BRIEF

Animal Experimental Techniques and Methods

A Preliminary Method for Continuous Drainage of Mesenteric Lymph Fluid in Rats
ZHANG Xiaorui, CAO Jing, WU Qianqian, KANG Kang, CHEN Guoyuan,
WU Baojin 267

Effects of Probutol Formulations on Mesenteric Lymphatic Transport Efficiency and
Pharmacokinetics in Rats
ZHANG Xiaorui, CAO Jing, WU Qianqian, LIU Jijun, CHEN Guoyuan,
WU Baojin 275

Modified method for inducing acute intestinal fibrosis in rats using 2,4,6-trinitrobenzene
sulfonic acid
WANG Yiru, JIANG Xiaoying, DONG Ruoxi, PAN Yibin, HAN Xianghui,
CAO Yongqing 284

Construction of Lipopolysaccharide Binding Protein Knockout Mice Using
CRISPR/Cas9 Technology
LI Sidi, FU Bin, GUO Zhongkun, LIN Yingjie, ZHANG Zhenyu, MI Chuanliang,
WANG Kezhou 294

Effects of Storage Time on Electrolyte Content and pH Value in Rat Serum Samples
FENG Dingshan, HUANG Yeyu, ZHANG Xiaoxin, WU Aiqin, WANG Zhan,
SU Linliang 301

Application of Blood Microsampling and Its Implementation of the 3Rs in Non-clinical
Studies of Drugs
CHEN Jiaqi, LÜ Longbao, ZHANG Feiyan, LI Rui, LI Yijiang, LI Lihong,
ZHANG Xiaodi 306

Research Progress on Alternative Methods of Skin Sensitization Test
HUANG Jingyi, LI Peining, LIU Xiangmei, LIU Zhonghua, HUANG Yufeng 313

Animal Models of Human Diseases

Inhibition of Phospholipase D1 Activity Improves the Recovery of Neurological
Function in Mice with Ischemic Stroke
ZHU Yanbing, BAI Fan, TAO Shaoxin, PAN Yuhualei, WANG Huan,
ZHAO Yushang, WANG Song, YU Yan 323

Evaluation of Pain in Acute Pulpitis Hyperalgesia Model Rats
ZHAO Sijia, HE Xinyu, JING Quan, MA Lin, GUO Chunlan, WAN Kuo 333

Research Progress in Animal Model of Alzheimer's Disease
SHENG Zhejin, LI Limei 342

Application of Animal Models in the Functional Studies of Eph Family Proteins
HU Yaohua, ZHAO Jumei, SHI Changhong 351

Quality Control of Laboratory Animals

Research Progress of Tyzzer's Organism in Quality Control of Laboratory Animals
TAO Junhao, YAN Huiqiong, XIE Hui, YING Huazhong, DAI Fangwei 358

Facilities and Management for Laboratory Animals

Practice of ABSL-2 Laboratory Process Management in Universities: Xiamen University
as An Example
ZHENG Xiuqing, SHAO Zhiqiang, SONG Jing, ZHANG Yuehua, SU Jinhua 364

为适应之化需要
发展我国实验动物
科学技术事业作出
贡献！

谈家桢 一九八五年九月

(注：这是我国现代遗传学奠基人谈家桢院士为1985年第二次全国实验动物科技工作会议的题词，原刊登于本刊1986年第5期。另外，谈家桢院士在1988—2008年担任本刊名誉主编。)



张笑瑞, 工程师, 现任中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台主管, 曾就职于上海睿智化学研究有限公司, 任生物部体内药理药效研究员。主要从事显微外科手术、人类疾病动物模型构建与实验动物饲养管理方面的研究。

吴宝金, 博士, 研究员, 硕士研究生导师。现任中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台主任, 兼任上海市实验动物学会副理事长及秘书长, 中国实验动物学会标准化委员会委员, 中国科学院实验动物工作委员会委员, 《实验动物与比较医学》执行主编。研究方向为人类疾病动物模型、分子遗传学、实验动物屏障设施管理。主持完成国家自然科学基金3项, 教育部留学回国人员基金和杭州市重点实验室建设等课题10余项, 参加国家“十五”重点攻关计划“国家遗传工程小鼠资源库的建立”; 发表学术论文40余篇, 其中SCI论文11篇; 参编多部专业书籍, 包括副主编《中国大百科全书》兽医卷实验动物分册(2021)、《实验动物解剖学》(2020)等。



大鼠肠系膜淋巴液持续引流新方法的初步建立

张笑瑞¹, 曹 静², 吴倩倩¹, 康 康¹, 陈国元¹, 吴宝金¹

(1. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台, 上海 200031; 2. 上海中医药大学科技实验中心实验动物中心, 上海 200031)

[摘要] **目的** 通过建立大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流方法, 实现肠系膜淋巴液的持续引流。**方法** 将16只雄性SD大鼠随机均分为2组。对照组大鼠进行十二指肠和肠系膜淋巴管双插管手术, 术后收集肠系膜淋巴液。实验组大鼠进行颈静脉和肠系膜淋巴管双插管手术, 建立肠系膜淋巴管-颈静脉循环模型。术后第7天利用清醒活动装置收集肠系膜淋巴液, 记录各组大鼠的肠系膜淋巴液流量, 检测其细胞成分及部分生化指标。**结果** 成功建立了大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流方法, 模型维持时间达7 d以上。实验组大鼠的肠系膜淋巴液流量多于对照组流量 [(2.01±0.12) mL/h vs (0.92±0.09) mL/h, $P < 0.01$]。实验组淋巴液中淋巴细胞数和淋巴细胞百分率高于对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而中性粒细胞比例和单核细胞比例均低于对照组 ($P < 0.01$)。实验组淋巴液中 K^+ 、 Na^+ 、 CO_2 和尿素水平均高于对照组 ($P < 0.01$), 而三酰甘油和 P^{3+} 水平均低于对照组 ($P < 0.01$)。**结论** 肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流技术能够实现大鼠在清醒、不限制饮食和正常活动状态下, 实时并长期收集淋巴液, 避免了手术应激、全身麻醉或动物受限对实验结果的影响。

[关键词] 肠系膜淋巴液; 插管; 辅助回流; SD大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0267-08

A Preliminary Method for Continuous Drainage of Mesenteric Lymph Fluid in Rats

ZHANG Xiaorui¹, CAO Jing², WU Qianqian¹, KANG Kang¹, CHEN Guoyuan¹, WU Baojin¹

(1. Animal Core Facility, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences; University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2. Experiment Animal Center, Experiment Center for Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200031, China)

Correspondence to: WU Baojin (ORCID: 0000-0002-9768-8862), E-mail: baojin.wu@sibcb.ac.cn

[基金项目] 中国科学院战略生物资源计划实验动物平台项目-2022年度实验动物模型研发子课题(KFJ-BRP-005)

[第一作者] 张笑瑞(1987—), 男, 工程师, 研究方向: 人类疾病动物模型与新药临床前评价。E-mail: xiaorui.zhang@sibcb.ac.cn

[通信作者] 吴宝金(1969—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 小鼠遗传学和人类疾病动物模型。E-mail: baojin.wu@sibcb.ac.cn。ORCID: 0000-0002-9768-8862

[ABSTRACT] Objective To establish a novel sustained collection method for mesenteric lymph fluid by means of assisted reflux from the mesenteric-jugular lymphatic duct in rats. **Methods** Sixteen male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into two groups. The control group underwent duodenal and intestinal lymphatic duct cannulation, after which intestinal lymph fluid was collected. The experimental group underwent jugular vein and intestinal lymphatic duct cannulation to establish intestinal-jugular lymphatic duct assisted reflux. The intestinal lymph fluid was collected on the 7th day after the operation using an awake mobility device. The flow rate of intestinal lymph fluid was recorded, and its cellular components and some biochemical indicators were detected. **Results** Mesenteric-jugular lymphatic duct vein cannulation assisted reflux was successfully established in rats, and the rat models could be maintained for more than seven days. The intestinal lymph flow rate was (2.01 ± 0.12) mL/h in the experimental group, which was higher than that of the control group $[(0.92 \pm 0.09)$ mL/h, $P < 0.01$]. The number of lymphocytes (LYM#) and percentage of lymphocytes (LYM/%) in the experimental group were higher than those in the control group ($P < 0.01$). The percentage of neutrophils (NEUT/%) and percentage of monocytes (MONO/%) were lower than those in the control group ($P < 0.01$, $P < 0.05$, respectively). The concentrations of K^+ , Na^+ , CO_2 , and urea in the lymph fluid of the experimental group were higher than those of the control group ($P < 0.01$). However, the concentrations of triacylglycerol (TG) and P^{3+} were lower than those of the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** This novel method can achieve real-time and long-term collection of mesenteric lymph fluid in rats under the condition of being awake, unrestricted in diet and in normal state, avoiding the influence of surgical stress, general anesthesia or animal restraint on the experimental results.

[Key words] Mesenteric lymph fluid; Cannulation; Assisted reflux; Sprague-Dawley rats

肠淋巴系统参与机体免疫细胞运输^[1]、体液平衡^[2]、内环境稳态^[3]、肠道饱腹感信号的传递^[4]和膳食脂质的运输^[5]。在病理状态下,淋巴液中会出现肿瘤细胞和病毒等特异性生物标志物^[6-7],其含量显著高于外周血^[8-9],通过分析淋巴液有助于了解病理机制并进行早期诊断。自1948年Bollman等^[10]首次建立了大鼠肠系膜淋巴液引流技术以来,越来越多的研究者利用该技术开展各种研究。但在引流肠系膜淋巴液时,动物长时间处于麻醉或被限制的状态^[11-13],导致动物肠系膜淋巴液流速和淋巴转运能力下降^[14],部分实验中动物还需接受胃或十二指肠插管手术以补充营养物质,对动物产生额外的损伤,这些因素均会影响肠系膜淋巴系统的研究和该方法的应用。

近年来,有研究者采用一种大鼠胆汁辅助回流装置,实现了胆汁的实时连续收集,被广泛应用于消化系统疾病方面的研究^[15]。本文采用这种胆汁辅助回流装置,建立大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流技术,以实现大鼠在清醒自由状态下实时、长期收集淋巴液,且能避免手术应激、全身麻醉或动物受限对肠系膜淋巴液形成和组成的影响,从而为肠系膜淋巴系统功能的深入研究提供一种创新的肠系膜淋巴液采集的技术手段。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠16只,8周龄,体质量 (250 ± 9) g,购自上海杰思捷实验动物有限公司[SCXK(沪)2018-0004、SCXK(沪)2019-0001],质量合格证号为20180004058749、20211221Aazz061900169。所有大鼠均饲养于中国科学院分子细胞科学卓越创新中心实验动物屏障设施[SYXK(沪)2018-0007],自由饮食,温度 $20 \sim 25$ ℃,相对湿度40%~70%,噪声 ≤ 60 dB,生活照明20 lx(12/12 h明暗循环);全部大鼠每笼不超过3只,适应性饲养7 d后开始实验。本研究所有实验程序经中国科学院分子细胞科学卓越创新中心实验动物使用与管理委员会审查批准(IACUC No. SIBCB-S118340-2112-045),手术操作均按照《实验动物护理和使用指南》在超净工作台中完成。

1.2 仪器与试剂

体视显微镜(SZX16)为日本Olympus公司产品;微量注射泵(XFP01-BD)为苏州讯飞科学仪器有限公司产品;全自动血液分析仪XN-1000为日本SYSMEX(希森美康)公司产品;大鼠2通道VAB系绳

(VABR2T/25)、大鼠2通道血管通路按钮 (VABR2B/25R22)、大鼠2通道VAB回路连接器 (VABR2L)、PinPort进样器 (PNP3M)、2通道转子 (375/D/25LT)、多轴平衡臂 (MCLA/MED)、大鼠采样笼器具 (MTANK/WF) 和聚氨酯 (polyurethane, PU) 导管 (BTPU-027、BTPU-040) 均购自美国Instech公司, 硅胶导管 (3 Fr、5 Fr) 购自美国SAI公司。舒泰50 (Zoletil 50) 购自法国Virbac公司; 医用组织胶水 (1469SB) 购自美国3M公司; 全血稀释液CELLPACK DCL, 溶血剂Lysercell WNR和LysercellTM WDF, 血细胞分析用染色液Fluorocell WNR、Fluorocell WDF和Fluorocell PLT, 清洗液和校准品 (XN CAL/XN CAL PF) 均购自日本SYSMEX (希森美康) 公司; 体外诊断试剂干片购自美国Ortho公司。

1.3 实验分组与模型制备

将16只雄性SD大鼠随机分为2组 (8只/组): 实验组和对照组。麻醉状态下, 实验组行肠淋巴管及颈静脉双插管手术, 建立大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流技术模型; 对照组行肠系膜淋巴管及十二指肠双插管手术, 建立传统引流模型。图1示大鼠肠系膜淋巴液收集装置, 图2示大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流模型建立过程图。

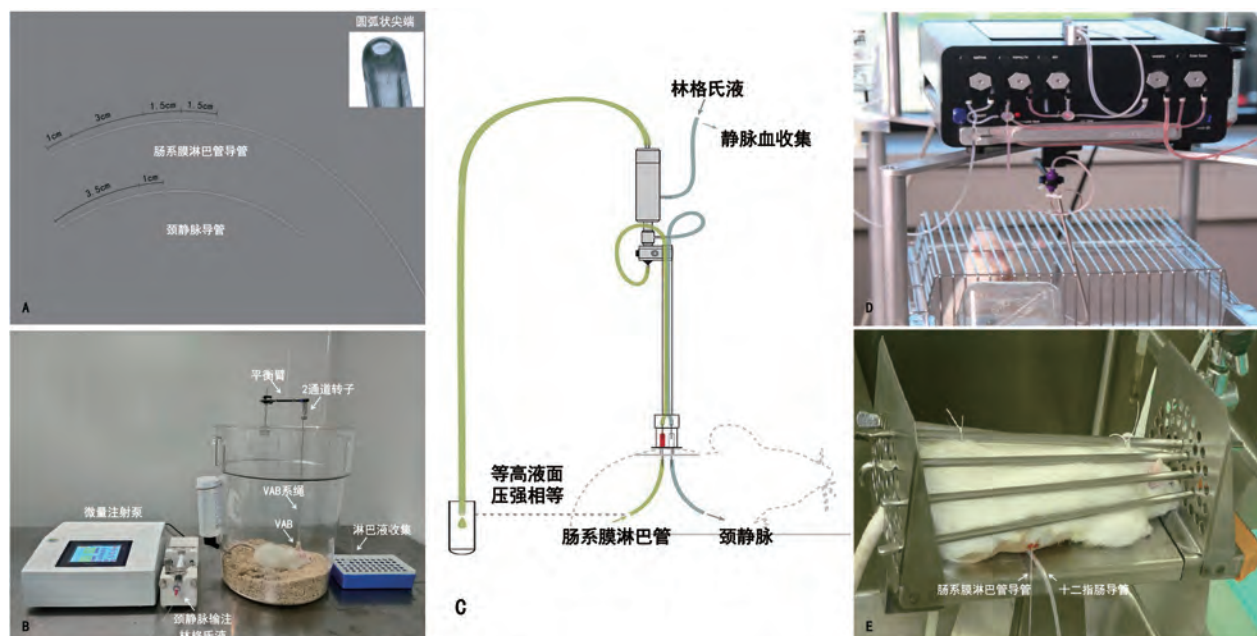
1.3.1 术前准备

(1) 动物术前准备: 大鼠术前0.5 h口服灌胃玉米油 (5 mL/kg), 随着小肠脂质的吸收产生乳白色的乳糜微粒, 定位肠系膜淋巴管^[16]。

(2) 制备大鼠颈静脉套管: 将5 Fr硅胶管套至PU管 (BTPU-027) 形成固定扣。制备大鼠肠系膜淋巴管套管: 将3 Fr硅胶导管套至PU管 (BTPU-040)。用酒精灯加热PU管尖端, 使其成圆弧状 (图1A)。

1.3.2 实验组模型制备

(1) 肠系膜淋巴管插管: 在腹中线上腹部2/3处做3~4 cm的正中切口, 打开腹膜腔。用无菌纱布将胃肠脏器推至左腹侧腹膜下固定, 暴露出左肾静脉和下腔静脉区域, 此时可观察到与肠系膜动脉 (鲜红色、有波动感) 并行的乳白色肠系膜淋巴管 (图2A)。在体视显微镜下分离肠系膜淋巴管 (直径0.5~1 cm), 并用动脉夹和结扎线临时阻断通路。在淋巴管上方45°角做切口, 插入淋巴导管并下行1 cm, 此时可见导管中的淋巴液流动, 分别固定1 cm固定扣和淋巴管肠端。取出纱布, 将导管呈C型紧贴于腹壁内侧, 并将导管4 cm、5.5 cm和7 cm处的固定扣固定于腹壁内肌肉 (图2B), 脏器位置还原至原始状态。将导管另一端引导并接入颈部VAB的淋巴管端口。



注: A为自制导管, B为实验组收集系统, C为实验组系统结构, D为自动采血系统, E为对照组收集系统。

Note: (A) The self-made catheter; (B) The experimental group collection system; (C) The structure of the experimental group system; (D) The automatic blood collection system; (E) The control group collection system.

图1 大鼠肠系膜淋巴液收集

Figure 1 Collection of rat intestinal lymphatic fluid

(2) 颈静脉插管：在颈腹部左侧锁骨区域的皮肤上做0.5 cm的切口，暴露颈外静脉，并用动脉夹和结扎线临时阻断通路（图2C）。在血管上方45°角做切口，根据大鼠颈部血管走势，插入静脉导管并下行3.5 cm到达左锁骨下静脉处，分别固定导管3.5 cm处固定扣和颈浅静脉近心端（图2D）。将导管另一端引导并接入VAB的颈静脉端口。完成插管后，将VAB和VAB回路连接器相连（图2E，图2F），缝合创口。

(3) 清醒活动装置连接：将VAB、2通道VAB系绳、转子、多轴平衡臂、采样笼盒连接，将收集导管放置在淋巴插管的高度（图1B，图1C）。

1.3.3 对照组模型制备

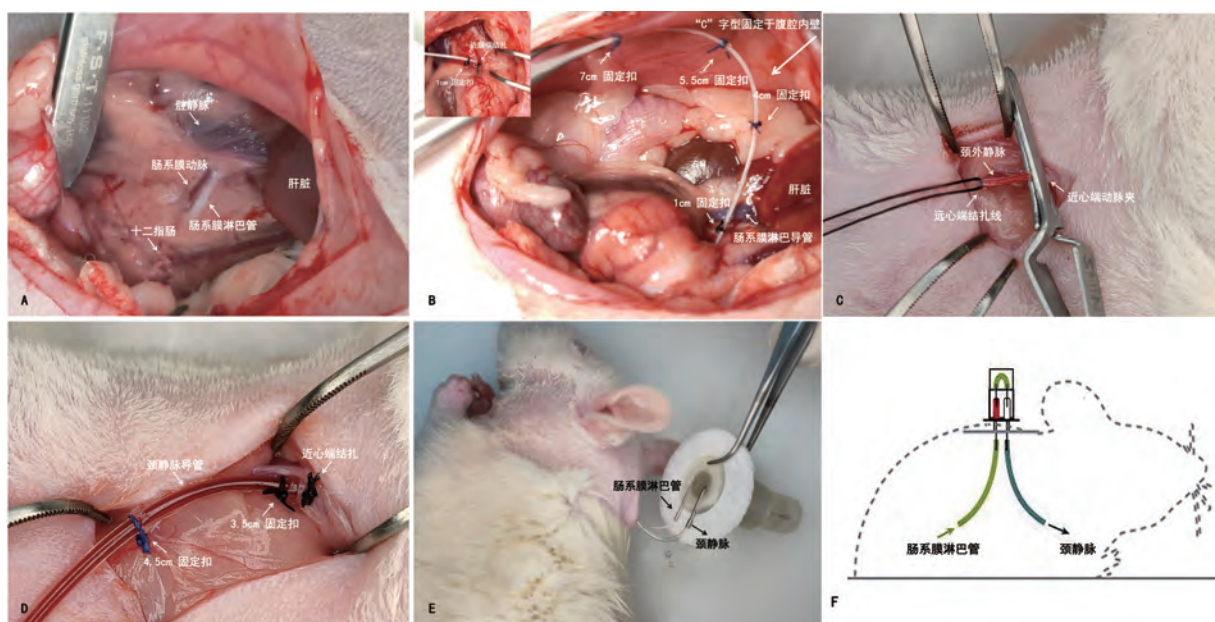
(1) 肠系膜淋巴管插管：手术位置同实验组，在

肠系膜淋巴管上穿刺并插入导管，组织胶水固定。插管成功后将导管的另一端穿出体外，以收集淋巴液。

(2) 十二指肠插管：在幽门下方约2 cm的十二指肠上穿刺并插入导管，组织胶水固定后，将导管另一端传出体外连接至微量注射泵，将大鼠放置固定器内（图1E）。

1.4 淋巴液流量测定

对照组大鼠在术后连续1 h收集肠系膜淋巴液，实验组大鼠术后恢复7 d后连续1 h收集肠系膜淋巴液。收集过程中以3 mL/h的速度将林格液分别注入十二指肠和颈静脉管中，对大鼠进行补液^[17]。测量单位小时内收集的淋巴液体积，计算肠系膜淋巴液流量。



注：A显示肠淋巴管位置，B显示腹腔内导管固定，C显示颈静脉位置，D显示颈静脉导管固定，E显示导管接入VAB，F显示淋巴管-颈静脉辅助回流结构。

Note: (A) Location of the mesenteric lymphatic duct; (B) Fixed catheter in the abdominal cavity; (C) Location of jugular veins; (D) Fixed jugular vein catheters; (E) Catheter access to VAB; (F) Intestinal lymphatic duct-jugular vein auxiliary reflux structure.

图2 大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流模型建立过程图

Figure 2 Establishment of auxiliary reflux model of mesenteric lymph

1.5 淋巴液细胞成分测定

定量提取20 μ L淋巴液与120 μ L CELLPACK DCL稀释液，混匀。使用全自动血液分析仪XN-1000检测白细胞总数（total number of white blood cells, WBC）、中性粒细胞数（number of neutrophil, NEUT#）、淋巴细胞数（number of lymphocyte, LYM#）、单核细胞数（number of monocyte, MONO#）、嗜酸性粒细胞数（number of eosinophilia, EOS#）、嗜碱性粒细胞数

（number of basophil, BASO#）、中性粒细胞比例（percentage of neutrophil, NEUT/%）、淋巴细胞百分率（percentage of lymphocyte, LYM/%）、单核细胞比例（percentage of monocyte, MONO/%）、嗜酸性粒细胞百分比（percentage of eosinophilia, EOS/%）和嗜碱性粒细胞百分比（percentage of basophil, BASO/%）。

1.6 淋巴液生化成分测定

收集的淋巴液静置30 min后离心（5 min, 3 000 r/

min), 取得上清液, 检测电解质指标 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 P^{3+} , 物质代谢指标尿素 (urea, UREA)、肌酐 (creatinine, CRE)、尿酸 (uric acid, URIC)、葡萄糖 (glucose, GLU)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, CHO)、高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL), 蛋白水平指标总蛋白 (total protein, TP) 和白蛋白 (albumin, Alb), 以及酸碱指标二氧化碳 (CO_2)。

1.7 麻醉方法

使用舒泰 50 以 50 mg/kg 的剂量肌肉注射给 SD 大鼠, 观察大鼠呼吸频率降低、肌肉舒张和无疼痛反射后, 将其仰卧位置于手术台上, 四肢用胶带固定。

1.8 数据统计方法

数据分析和绘图使用 GraphPad Prism 8.0 软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。淋巴液流量测定数据比较采用配对 t 检验, 其余数据比较采用多个样本 t 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流技术模型的效果

行肠淋巴管及颈静脉双插管手术建立的大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流模型与清醒活动装置组成了一个大鼠肠系膜淋巴液引流系统, 该系统在术后第 7 天仍可以实时收集肠系膜淋巴液。并且, 在此期间动物无异常。

2.2 淋巴液流速测定

经测定, 实验组动物肠系膜淋巴液流量为 (2.01 ± 0.12) mL/h, 对照组流量为 (0.92 ± 0.09) mL/h。与对照组相比, 实验组动物肠系膜淋巴液流量显著升高 ($P < 0.01$)。

2.3 淋巴液细胞成分

与对照组相比, 实验组大鼠淋巴液中 LYM# 和 LYM/% 显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), NEUT/% 和 MONO/% 显著降低 (均 $P < 0.01$), 其他指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

2.4 淋巴上清液生化指标

与对照组相比, 实验组大鼠淋巴液中 K^+ 、 Na^+ 、 CO_2 、UREA 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), TG 和 P^{3+} 显著降低 (均 $P < 0.01$), 其他指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

表1 对照组与实验组大鼠淋巴液细胞成分

Table 1 Lymphocyte composition of rats in the control and experimental group

	($\bar{x} \pm s$)	
血细胞分类	对照组	实验组
Blood cell classification	Control group	Experimental group
	($n=8$)	($n=8$)
WBC/($10^9 \cdot L^{-1}$)	7.48 $\pm$ 3.45	14.01 $\pm$ 9.93
NEUT#/($10^9 \cdot L^{-1}$)	0.79 $\pm$ 0.42	0.45 $\pm$ 0.20
LYM#/($10^9 \cdot L^{-1}$)	2.14 $\pm$ 1.03	7.34 $\pm$ 4.89*
MONO#/($10^9 \cdot L^{-1}$)	4.54 $\pm$ 2.36	6.21 $\pm$ 5.09
EOS#/($10^9 \cdot L^{-1}$)	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01
BASO#/($10^9 \cdot L^{-1}$)	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00
NEUT/%	11.20 $\pm$ 4.51	4.35 $\pm$ 2.16**
LYM/%	28.23 $\pm$ 6.78	51.99 $\pm$ 7.40**
MONO/%	60.36 $\pm$ 9.81	43.44 $\pm$ 6.61**
EOS/%	0.15 $\pm$ 0.12	0.14 $\pm$ 0.15
BASO/%	0.06 $\pm$ 0.07	0.09 $\pm$ 0.14

注: WBC 为白细胞总数, NEUT# 为中性粒细胞数, LYM# 为淋巴细胞数, MONO# 为单核细胞数, EOS# 为嗜酸性粒细胞, BASO# 为嗜碱性粒细胞, NEUT/% 为中性粒细胞比例, LYM/% 为淋巴细胞百分比, MONO/% 为单核细胞比例, EOS/% 为嗜酸性粒细胞百分比, BASO/% 为嗜碱性粒细胞百分比。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note: WBC, total number of white blood cells; NEUT#, number of neutrophils; LYM#, number of lymphocytes; MONO#, number of monocytes; EOS#, number of eosinophilia; BASO#, number of baso-philis; NEUT/%, percentage of neutrophils; LYM/%, percentage of lymphocytes; MONO/%, percentage of monocytes; EOS/%, percentage of eosinophilia; BASO/%, percentage of basophils. Compared to the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

3.1 新方法的优势

文献^[14]报告, 国内外学者多选择在动物术后并处于麻醉或束缚的状态下收集淋巴液, 这虽然缩短了实验时间, 且保证了样本收集的成功率, 但会带来一些问题: (1) 动物在麻醉状态下会出现胃排空减少、小肠毛细血管通透性改变、淋巴转运能力下降, 本研究中对照组和实验组的淋巴液流速也证实了这一点; (2) 只能间断地收集淋巴液, 不能准确计算出经淋巴转运药物的总量, 使模型应用受到了限制; (3) 为了方便给药, 有学者还要对大鼠进行十二指肠插管, 通过导管持续输注脂质与药物来评价其经淋巴转移的能力, 然而胃内分泌物以及神经传导在整个消化过程中发挥关键作用, 因此在这种病理生理状态下获取的数据可能存在偏差; (4) 动物饮食受到限制, 需要通过

表2 对照组与实验组大鼠淋巴液生化指标

Table 2 Comparison of biochemistry indexes of rats in the control and experimental group

生化指标 Biochemical indicators	对照组 Control group (n=8)	实验组 Experimental group (n=8)
	($\bar{x} \pm s$)	
Cl ⁻ c/(mmol·L ⁻¹)	99.75±1.85	100.75±1.71
K ⁺ c/(mmol·L ⁻¹)	4.75±0.74	5.74±0.21**
Na ⁺ c/(mmol·L ⁻¹)	136.75±1.48	139.63±1.58**
P ³⁺ c/(mmol·L ⁻¹)	3.79±0.18	3.49±0.11**
Ca ²⁺ c/(mmol·L ⁻¹)	2.65±0.11	2.66±0.05
Mg ²⁺ c/(mmol·L ⁻¹)	0.90±0.13	0.93±0.07
UREA c/(mmol·L ⁻¹)	5.13±0.33	5.75±0.66*
CRE c/(μmol·L ⁻¹)	23.56±8.91	24.61±3.50
URIC c/(mmol·L ⁻¹)	37.81±21.46	51.19±8.85
GLU c/(mmol·L ⁻¹)	12.83±3.01	14.66±1.55
TG c/(mmol·L ⁻¹)	3.63±1.02	1.57±0.47**
CHO c/(mmol·L ⁻¹)	1.69±0.16	1.62±0.20
HDL c/(mmol·L ⁻¹)	1.16±0.13	1.15±0.15
TP ρ/(g·L ⁻¹)	47.05±2.35	45.31±1.19
ALB ρ/(g·L ⁻¹)	24.81±1.91	23.51±0.66
CO ₂ c/(mmol·L ⁻¹)	22.50±2.45	27.25±1.09**

注：UREA 为尿素，CRE 为肌酐，URIC 为尿酸，GLU 为葡萄糖，TG 为三酰甘油，CHO 为总胆固醇，HDL 为高密度脂蛋白，TP 为总蛋白，ALB 为白蛋白。与对照组相比，**P*<0.05，***P*<0.01。

Note: UREA, urea; CRE, creatinine; URIC, uric acid; GLU, glucose; TG, triglyceride; CHO, total cholesterol; HDL, high-density lipoprotein; TP, total protein; ALB, albumin. Compared to the control group, **P*<0.05, ***P*<0.01.

皮下注射或胃肠插管输注营养液来维持动物体液平衡和体能。

本研究中使用的淋巴液收集系统能够实现大鼠在完全清醒、自由活动、不限制饮食的状态下，实时并长期收集淋巴液、血液或给药，避免了手术应激、全身麻醉或动物受限对肠系膜淋巴液形成和组成的影响。该模型具有十分显著的优势（表3）：（1）在插管完成后，利用 VAB 回路连接器建立一条新的淋巴循环通路，动物可以在愈后健康状态下开展实验，避免麻醉、创伤、感染等因素对实验造成干扰，实现对药物经淋巴转运更精确和长期的测量；（2）通过建立淋巴液-血液循环通路，可以根据实验需求随时阻断肠系膜淋巴液，同时结合全自动采血给药仪，还可以实现完全自动化的淋巴液和血液采集或静脉给药；（3）由于淋巴引流的管路呈 U 型结构且两端口的液面一致，根据等高液面压强相等的原理，此时导管内淋巴液流量等同

于肠系膜淋巴管内实际流量，并且在淋巴引流过程中，可以根据淋巴流速和血液损耗量精准补充等渗离子溶液，维持机体体液平衡和内环境稳态。

3.2 淋巴液流速及成分的比较分析

与对照组相比，实验组动物淋巴液流速显著升高，这可能与受试动物的体质量、脂质摄入、麻醉或约束束以及感染等生理状况有关^[14, 18]。在细胞成分检测中，实验组动物的LYMPH#和LYMPH/%显著升高，推测与动物在麻醉状态下，胸腺、脾脏和其他中枢淋巴器官的淋巴细胞转运能力下降有关^[14]；并且NEUT/%和MONO/%显著降低，这可能与对照组动物在术后立即提取淋巴液，机体存在疼痛应激及炎症反应有关^[19]。在生化成分检测中，实验组动物的电解质指标K⁺和Na⁺显著升高，而P³⁺显著降低，这可能与两组动物对林格液的吸收方式有关；实验组动物的物质代谢指标UREA显著升高，这主要与对照组动物禁食导致蛋白质摄入不足有关；实验组动物TG显著降低，这是因为对照组动物在术前口服大量玉米油，经消化分解为TG再转运至肠系膜淋巴系统；实验组动物的酸碱指标CO₂显著升高，这可能与麻醉状态下组织细胞的代谢有关，另一个侧面也提示淋巴液呈碱性环境，淋巴液的碱性物质可对抗休克所导致的酸中毒，这可能是淋巴液抗休克的作用机制之一^[20]。经验证，实验组模型的细胞成分与生化指标均符合大鼠正常生理水平^[21]，具有可靠性和可重复性，可以成功取代之前的模型。

3.3 模型制备的注意事项

在肠淋巴插管的位置选择上，国内外学者的描述较为模糊。很多学者选择在右肾动脉并行的淋巴管处插管，但该处是肠系膜淋巴管和辅助淋巴管的汇集处，因此收集的淋巴液无法准确评估脂质类药物经肠道淋巴转运的真实情况。也有学者选择切断这一辅助淋巴管的通路，这增加了手术的难度和风险^[17]。本研究中选择与肠系膜动脉并行的淋巴管，手术难度较低且可以精准收集全部肠系膜淋巴液。同时由于淋巴液和淋巴管呈无色透明状，通过在术前让大鼠口服玉米油使其生成乳白色的乳糜微粒^[16]，可准确定位肠系膜淋巴管，这主要是因为脂质降解形成的长链脂肪酸（14 C ~ 24 C）可与其他脂类产物生成乳白色牛奶状的乳糜微粒^[1,20,22]。对于腹腔内导管的处理方式在不同的研究中也存在差异。很多人选择预留部分导管在腹腔内，以防止导管拉扯而脱离淋巴管，但这容易引发肠道蠕动

表3 大鼠肠系膜淋巴液引流新旧技术对比

Table 3 Comparison of novel and traditional techniques for intestinal lymphatic drainage in rats

指标	传统技术	新技术
Indicator	Traditional technology	Novel technology
动物状态	麻醉或束缚状态	清醒、自由活动
State of the animal		
淋巴液收集频率	仅术后单次收集	实时、连续多次收集
Frequency of lymph collection		
给药方式	受限制,部分给药需通过手术,	不限制,结合自动化仪器,可实现自动化给药和体
Route of administration	如胃插管	液采集
动物饮食	禁食	自由饮食
Animal feeding state		
原肠淋巴管循环通路	阻断	建立新的肠系膜淋巴管-左颈浅静脉管循环通路
Circulation pathway of mesenteric lymphatic duct		
淋巴液流速	不稳定,不能反映真实淋巴液	稳定,真实反映淋巴液流速
Flow rate of lymph fluid	流速	
补液方式	通过十二指肠插管以恒定速率	通过颈静脉插管补充,并根据淋巴液流速实时调
Rehydration method	补充	整,维持机体体液平衡
肠系膜淋巴液收集	部分	全部
Collection of intestinal lymphatic fluid		
造模成功率	较低	高
Modeling success rate		

时与导管发生缠绕,导致大鼠死亡。本研究中将导管呈C型走位贴于腹腔内壁,结果提示这是维持动物高存活率的又一保障。

肠系膜淋巴管壁非常脆弱,且在分离淋巴管时极易破坏周边淋巴组织,从而导致淋巴液回流到乳糜池受阻。因此,该方法对于术者的显微外科技能要求较高。此外,应选择一套适合的显微手术器械和自制导管。显微器械可精准分离出血管和淋巴管,减少其周围组织受损。有学者将导管的头端斜切形成尖锐的角度,虽便于插管,但极易划伤或刺破管壁,且在抽取体液时,由于导管尖端产生负压,极易贴合血管或淋巴管内壁,导致导管不通^[17]。本研究中自制的导管头端圆滑,且材质选用医用级材料,不易出现组织排斥。另外在导管固定方面,有学者使用医用胶水固定插入导管^[17],一方面导管牢固度不明,另一方面胶水会破坏周边结缔组织,甚至会影响局部微循环^[16]。在进行腹腔手术时,复原腹腔脏器的位置往往容易被忽略,脏器异位可致动物死亡^[16]。由于肠系膜淋巴结分布密集,淋巴液内成分在经过这些多级淋巴结后会如何变化,还有待进一步研究。且肠系膜与小肠是一个有机整体,而小肠的不同部位其消化吸收功能有一定差异,因此,针对不同肠段及淋巴结精准提取其淋巴液的技术尚待进一步优化。

综上所述,该技术方法可以在大鼠清醒、正常活动状况下反复、实时收集肠系膜淋巴液,用于脂质、蛋白质、外泌体、电解质及免疫细胞等的定性和定量分析,有助于我们更好地认知肠道毛细淋巴管吸收能力及功能状态。因此,本研究为肠系膜淋巴液的采集提供了新的技术方法,在涉及肠道淋巴的生理功能、脂溶性药物吸收、肠道疾病诊断及其机制研究中有很好的应用价值。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验通过中国科学院分子细胞科学卓越创新中心实验动物使用与管理委员会的审核批准(IACUC No. SIBCB-S118340-2112-045)。所有实验操作均遵照中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台发布的《动物实验技术平台标准操作规程》的条例进行。

All animal experiments involved in this study have been reviewed and approved by the Laboratory Animal Use and Management Committee of the Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences (IACUC No. SIBCB-S118340-2112-045). All experimental procedures were carried out in accordance with the regulations of *Standard Operating Procedures for Animal Experiment Technology Platforms* established by Animal Core Facility, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences.

[作者贡献 Author Contribution]

张笑瑞、曹静和吴倩倩负责收集资料、实验设计、实验操作、数据及论文撰写；陈国元和康康负责淋巴液的细胞学及生化指标分析，并参与论文撰写；吴宝金提供研究经费，负责研究方案与论文的审核及修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] ALEXANDER J S, GANTA V C, JORDAN P A, et al. Gastrointestinal lymphatics in health and disease[J]. *Pathophysiology*, 2010, 17(4):315-335. DOI:10.1016/j.pathophys. 2009. 09.003.
- [2] WANG Y H, GHOSH S, WARD M, et al. Chylomicrons promote intestinal absorption and systemic dissemination of dietary antigen (ovalbumin) in mice[J]. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8442. DOI:10.1371/journal.pone.0008442.
- [3] JI Y, SAKATA Y, YANG Q, et al. Activation of rat intestinal mucosal mast cells by fat absorption[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(11): G1292-G1300. DOI: 10.1152/ajpgi.00011.2012.
- [4] KOHAN A, YODER S, TSO P. Lymphatics in intestinal transport of nutrients and gastrointestinal hormones[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1207(Suppl 1): E44-E51. DOI:10.1111/j.1749-6632.2010.05753.x.
- [5] KRAFT J C, FREELING J P, WANG Z Y, et al. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems[J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(1):29-52. DOI:10.1002/jps.23773.
- [6] SCHÖNFELD P, WOJTCZAK L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective[J]. *J Lipid Res*, 2016, 57(6):943-954. DOI:10.1194/jlr.R067629.
- [7] KARAMAN S, DETMAR M. Mechanisms of lymphatic metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(3):922-928. DOI:10.1172/jci71606.
- [8] MOSSEL E C, RAMIG R F. A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse[J]. *J Virol*, 2003, 77(22): 12352-12356. DOI: 10.1128/jvi. 77.22.12352-12356.2003.
- [9] ZAWIEJA D C, THANGASWAMY S, WANG W, et al. Lymphatic cannulation for lymph sampling and molecular delivery[J]. *J Immunol*, 2019, 203(8): 2339-2350. DOI: 10.4049/jimmunol. 1900375.
- [10] BOLLMAN J L, CAIN J C, GRINDLAY J H. Techniques for the collection of lymph from the liver, small intestine, or thoracic duct of the rat[J]. *J Lab Clin Med*, 1948, 33(10):1349-1352.
- [11] KRAFT J C, FREELING J P, WANG Z Y, et al. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems[J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(1):29-52. DOI:10.1002/jps.23773.
- [12] SAKAMOTO W, MASUNO T, YOKOTA H, et al. Expression profiles and circulation dynamics of rat mesenteric lymph microRNAs[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 1989-1996. DOI: 10.3892/mmr.2017.6259.
- [13] LIU Y J, CHEN C X, SUN Q, et al. Mesenteric lymph duct drainage attenuates lung inflammatory injury and inhibits endothelial cell apoptosis in septic rats[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:3049302. DOI:10.1155/2020/3049302.
- [14] ZHANG Y M, ZHANG S K, CUI N Q. Intravenous infusion of mesenteric lymph from severe intraperitoneal infection rats causes lung injury in healthy rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(16):4771-4777. DOI:10.3748/wjg.v20.i16.4771.
- [15] UYEDA C, PHAM R, FIDE S, et al. Application of automated dried blood spot sampling and LC-MS/MS for pharmacokinetic studies of AMG 517 in rats[J]. *Bioanalysis*, 2011, 3(20):2349-2356. DOI:10.4155/bio.11.227.
- [16] DAHAN A, MENDELMAN A, AMSILI S, et al. The effect of general anesthesia on the intestinal lymphatic transport of lipophilic drugs: comparison between anesthetized and freely moving conscious rat models[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 32(4-5):367-374. DOI:10.1016/j.ejps.2007.09.005.
- [17] KOSTIK V, MEMETI S, BAUER B. Fatty acid composition of edible oils and fats[J]. *J Hyg Eng Des*, 2013, 4: 112-116.
- [18] TREVASKIS N L, LEE G, ESCOTT A, et al. Intestinal lymph flow, and lipid and drug transport scale allometrically from pre-clinical species to humans[J]. *Front Physiol*, 2020, 11:458. DOI: 10.3389/fphys.2020.00458.
- [19] 邓雯, 陈莉莉, 刘晶, 等. SPF级SD大鼠血液学及血清生化指标正常值探讨[J]. *毒理学杂志*, 2010, 24(2):174-175. DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2010.02.004.
- [20] DENG W, CHEN L L, LIU J, et al. Discussion on the normal values of hematology and serum biochemical indexes in SPF SD rats[J]. *J Toxicol*, 2010, 24(2):174-175. DOI:10.16421/j.cnki. 1002-3127.2010.02.004.
- [21] ZHANG L M, JIANG L J, ZHAO Z G, et al. Mesenteric lymph duct ligation after hemorrhagic shock enhances the ATP level and ATPase activity in rat kidneys[J]. *Ren Fail*, 2014, 36 (4):593-597. DOI:10.3109/0886022X.2014.882183.
- [22] 赵自刚, 牛春雨, 侯亚利, 等. 正常淋巴液与血液的流变性及成分比较[J]. *中国应用生理学杂志*, 2009, 25(4):482-484. DOI:10. 13459/j.cnki.cjap.2009.04.013.
- [23] ZHAO Z G, NIU C Y, HOU Y L, et al. Comparison of rheology and ingredient between normal lymph and blood[J]. *Chin J Appl Physiol*, 2009, 25(4): 482-484. DOI: 10.13459/j.cnki. cjap. 2009.04.013.
- [24] BROCKS D R, DAVIES N M. Lymphatic drug absorption via the enterocytes: pharmacokinetic simulation, modeling, and considerations for optimal drug development[J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2018, 21(1s):254s-270s. DOI:10.18433/jpps30217.

(收稿日期:2022-03-04 修回日期:2022-05-17)

(本文编辑:张俊彦,富群华,崔占鼎)

不同剂型普罗布考对大鼠肠系膜淋巴转运及药代动力学的影响

张笑瑞¹, 曹 静², 吴倩倩¹, 刘季俊¹, 陈国元¹, 吴宝金¹

(1. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台, 上海 200031; 2. 上海中医药大学实验动物中心, 上海 200031)

[摘要] **目的** 通过一种新型的肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流模型, 比较普罗布考橄榄油制剂与普罗布考混悬液制剂对大鼠肠系膜淋巴转运及药代动力学的影响。**方法** 12只SD大鼠随机分为4组, 即混悬液制剂-颈静脉单插管组(H-JD组)、混悬液制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组(H-JCS组)、橄榄油制剂-颈静脉单插管组(G-JD组)、橄榄油制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组(G-JCS组)。用液相色谱和串联质谱联用(LC-MS/MS)法测定各组大鼠在不同时间全血和淋巴液中普罗布考的浓度, 绘制药-时曲线, 计算药代动力学参数、相对生物利用度(F_{rel})和淋巴液剂量百分比。**结果** 各组的药-时曲线符合非房室模型。前述各组到达峰值时间(T_{max})分别为(11±12)h、(5±2)h、(13±9)h和(19±9)h; 到达峰值浓度(C_{max})分别为(148±60)ng/mL、(207±137)ng/mL、(453±204)ng/mL和(309±177)ng/mL; 药-时曲线下面积(AUC_{last})分别为(3 210±885)h·ng·mL⁻¹、(3 677±2 014)h·ng·mL⁻¹、(12 360±6 629)h·ng·mL⁻¹和(8 080±3 064)h·ng·mL⁻¹。H-JCS组和G-JCS组的淋巴液剂量百分比分别为(1.29±0.50)%和(2.59±0.43)%。与H-JD组相比, G-JD组中普罗布考的 F_{rel} 为(409±269)%; 与H-JCS组相比, G-JCS组中普罗布考的 F_{rel} 为(309±256)%。与H-JD组和H-JCS组相比, G-JD组和G-JCS组大鼠全血的 C_{max} 、 T_{max} 、 AUC_{last} 和淋巴液剂量百分比显著升高($P<0.05$); 其中G-JD组全血的 AUC_{last} 显著高于G-JCS组($P<0.05$), 而H-JD组和H-JCS组差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 使用橄榄油制剂可以提高普罗布考通过肠系膜淋巴液的转运吸收率和生物利用度。

[关键词] 普罗布考; 肠系膜淋巴液; 药代动力学; 转运; SD大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0275-09

Effects of Probucol Formulations on Mesenteric Lymphatic Transport Efficiency and Pharmacokinetics in Rats

ZHANG Xiaorui¹, CAO Jing², WU Qianqian¹, LIU Jijun¹, CHEN Guoyuan¹, WU Baojin¹

(1. Animal Core Facility, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences; University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

2. Experiment Animal Center, Experiment Center for Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200031, China)

Correspondence to: WU Baojin (ORCID: 0000-0002-9768-8862), E-mail: baojin.wu@sibcb.ac.cn

[ABSTRACT] **Objective** To compare the effects of probucol olive oil and suspension formulations on the pharmacokinetics and mesenteric lymphatic transport in rats using an innovative mesenteric-jugular lymphatic duct assisted reflux model. **Methods** Twelve Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: suspension preparation-jugular vein single cannulation group (H-JD group), suspension preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group (H-JCS group), olive oil preparation-jugular vein single cannulation group (G-JD group), olive oil preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group (G-JCS group). The concentrations of probucol in whole

[基金项目] 中国科学院战略生物资源计划实验动物平台项目-2022年度实验动物模型研发子课题(KFJ-BRP-005)

[第一作者] 张笑瑞(1987—), 男, 工程师, 研究方向: 人类疾病动物模型与新药临床前评价。E-mail: xiaorui.zhang@sibcb.ac.cn

[通信作者] 吴宝金(1969—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 小鼠遗传学和人类疾病动物模型。E-mail: baojin.wu@sibcb.ac.cn。ORCID: 0000-0002-9768-8862

blood and lymph fluid of rats at different times were determined by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and drug-time curves were drawn. The pharmacokinetic parameters, relative bioavailability (F_{rel}) and percentage dose in lymph fluid were calculated. **Results** The drug-time curve of each group conformed to the non-compartmental model. The peak times (T_{max}) of the H-JD group, H-JCS group, G-JD group, and G-JCS group were (11±12), (5±2), (13±9), and (19±9) h, respectively; the peak concentrations (C_{max}) were (148±60), (207±137), (453±204), and (309±177) ng/mL, respectively; the areas under the curve (AUC_{last}) were (3 210±885), (3 677±2 014), (12 360±6 629), and (8 080±3 064) h·ng·mL⁻¹, respectively. The percentages of lymphatic fluid dose in the H-JCS and G-JCS groups were (1.29±0.50)% and (2.59±0.43)%. Compared with the H-JD group, the F_{rel} of probucol in the G-JD group was (409±269)%; compared with the H-JCS group, the F_{rel} of probucol in the G-JCS group was (309±256)%. Compared with the H-JD and H-JCS groups, the whole blood values of C_{max} , T_{max} , AUC_{last} and percentage of lymphatic fluid probucol concentrations of the G-JD and the G-JCS groups were significantly increased ($P < 0.05$). The AUC_{last} of whole blood in the G-JD group was significantly higher than that in the G-JCS group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the H-JD and H-JCS groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Olive oil formulation can improve the ratio of probucol transport through mesenteric lymph as well as its bioavailability.

[Key words] Probucol; Mesenteric lymph fluid; Pharmacokinetics; Transport; Sprague-Dawley rats

普罗布考是一种人工合成的脂溶性抗氧化剂^[1], 具有降血脂^[2]、抗动脉粥样硬化^[3]、治疗糖尿病^[4]等广阔的临床应用前景^[5]。脂溶性药物因水溶性较差^[6], 不利于在胃肠道扩散吸收, 导致它们的生物利用度降低^[7], 因此这类药物的口服吸收问题一直是制剂研发领域需要解决的难点。近年来, 经肠系膜淋巴转运介导的口服吸收途径得到广泛关注^[8-9]。研究发现, 脂溶性药物能否特异性地被吸收到肠淋巴液中与乳糜微粒有关, 药物在乳糜微粒中的含量越大, 药物经肠系膜淋巴吸收的比例就越高, 两者呈明显的线性相关^[8-10]。体外实验表明, 普罗布考在乳糜微粒中的含量最高可达38%^[11-12]。因此, 改变普罗布考的剂型在理论上会影响其经肠系膜淋巴系统转运吸收的比例, 进而影响该药的药代动力学参数, 但目前尚未检索到相关的研究报告。

大鼠肠系膜淋巴管插管是开展药物经肠系膜淋巴系统转运研究广泛使用的动物模型。然而制备该模型的手术难度高、成功率低, 且动物处于麻醉或受限制的状态, 无法模拟动物正常生理状态下的淋巴转运效果^[9]。本实验室建立了一种新型大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流模型, 避免了手术应激、全身麻醉或动物受限对肠系膜淋巴吸收的影响, 实现大鼠在清醒、自由饮食状态下, 实时并长期收集生理状态下肠系膜淋巴液的功能^[13]。本研究即采用自主创建的大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流模型, 研究普罗布考在橄榄

油制剂及混悬液制剂状态下经肠淋巴吸收的比例, 以及其药代动力学差异, 以期对脂溶性药物的相关工作提供科学的研究模式和可靠的数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠12只, 9周龄, 体质量为(280±9) g, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-0001], 质量合格证为20211221Aazz0619000169。大鼠饲养于中国科学院分子细胞科学卓越创新中心实验动物屏障设施[SYXK(沪)2018-0007], 自由饮水和饮食, 温度20~25℃, 相对湿度40%~70%, 噪声≤60 dB, 生活照明20 lx(12/12 h明暗循环)。所有大鼠3只/笼饲养, 适应性饲养7 d后开始实验。本研究中动物实验方案经中国科学院分子细胞科学卓越创新中心实验动物使用与管理委员会审核批准(IACUC No. SIBCB-S118340-2112-045)。

1.2 药品试剂与主要仪器

普罗布考($C_{31}H_{48}O_2S_2$)原粉和柳胺酚($C_{13}H_{11}NO_3$)由凯惠药业(上海)有限公司提供, 批号为051M14375V和23288-49-5; 普罗布考片剂由齐鲁制药(山东)集团有限公司提供, 批号为H10980054; 色谱级乙腈(CH_3CN)为美国Sigma-Aldrich公司生产, 批号为S93271; 醋酸铵(NH_4OAc)为美国TEDIA公司生产的色谱纯试剂, 批号为601058; 橄榄油

(A0285378) 为美国 Acros 公司产品; 舒泰 50 (Zoletil 50) 为法国 Virbac 公司产品; 水为超纯水; 其他化学试剂均为分析纯。液相色谱质谱联用仪 (API-4000) 为美国 Sciex 公司产品; 电子天平 (Mettler-Toledo XP26) 为瑞士 Mettler Toledo 公司产品; 高速大容量低温离心机 (5810R) 为德国 Eppendorf 公司产品; 小型摇床 (Vibrax VXR) 和振荡器 (Vortex 3) 为德国 Ika 公司产品; 超声波清洗器 (KQ5200DA) 为昆山市舒美超声仪器有限公司; 大鼠 2 通道 VAB 系绳 (VABR2T/25)、大鼠 2 通道血管通路按钮 (VABR2B/25R22)、大鼠 2 通道 VAB 回路连接器 (VABR2L)、PinPort 进样器 (PNP3M)、2 通道转子 (375/D/25LT)、多轴平衡臂 (MCLA/MED)、大鼠采样笼器具 (MTANK/WF) 和聚氨酯 (polyurethane, PU) 导管 (BTPU-027、BTPU-040) 均购自美国 Instech 公司。

1.3 制剂配制

普罗布考橄榄油制剂: 精密称取 42.48 mg 普罗布考原粉, 缓慢加入橄榄油定容至 21.24 mL, 涡旋 1~2 min, 超声 10~15 min 直至化合物完全溶解, 得到质量浓度为 2 mg/mL 的黄色澄清溶液。4 °C 低温保存备用, 有效期为 1 周, 使用前放至室温。

普罗布考混悬液制剂: 精密称取 93.89 mg 普罗布考片剂粉末 (纯度为 62.55%), 缓慢加入 10 mmol/L 磷酸盐生理盐水缓冲液 (pH 7.4) 定容至 29.36 mL, 涡旋 2~3 min, 超声 30~40 min, 得到质量浓度为 2 mg/mL 的白色混悬液。4 °C 低温保存备用, 有效期为 1 周, 使用前放至室温。

1.4 动物模型构建

动物麻醉: 使用舒泰 50 以 50 mg/kg 的剂量对大鼠进行肌内注射, 待观察到呼吸频率降低、肌肉舒张和无疼痛反射后, 将大鼠固定于手术台上进行手术。

肠系膜淋巴管插管: 术前对大鼠腹部剃除毛发并用 75% 乙醇溶液消毒, 沿腹中线上腹部 2/3 处做正中切口, 打开腹膜腔并暴露出左肾静脉和下腔静脉区域, 此时可观察到与肠系膜动脉并行的肠系膜淋巴管。在体视显微镜下分离肠系膜淋巴管, 在淋巴管上方 45° 角做切口, 插入淋巴导管并深入 1 cm, 分别固定导管和淋巴管肠端。将导管另一端引导并接入颈部 VAB 的淋巴管端口。

颈静脉插管: 在颈腹部左侧锁骨区域做切口, 暴露颈外静脉, 在血管上方 45° 角做切口, 插入静脉导管并深入 3.5 cm 到达左锁骨下静脉处, 分别固定导管和颈静脉近心端。将导管另一端引导并接入 VAB 的颈静

脉端口。完成插管后, 将 VAB 和 VAB 回路连接器相连, 缝合创口。

清醒活动装置连接: 将 VAB、2 通道 VAB 系绳、转子、多轴平衡臂、采样笼盒连接, 将收集导管放置在淋巴插管的高度^[13]。

1.5 动物分组与用药实验

将 12 只大鼠随机分为 4 组: 混悬液制剂-颈静脉单插管组 (H-JD 组), 混悬液制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组 (H-JCS 组), 橄榄油制剂-颈静脉单插管组 (G-JD 组), 橄榄油制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组 (G-JCS 组)。H-JD 组和 G-JD 组大鼠行颈静脉单插管手术, 建立颈静脉插管模型。H-JCS 组和 G-JCS 组大鼠行颈静脉插管和肠系膜淋巴管双插管手术, 建立肠淋巴管-颈静脉辅助回流模型, 并结合清醒活动装置组成肠系膜淋巴液收集系统。

各组大鼠行插管手术后恢复 7 d, H-JD 组与 H-JCS 组大鼠口服灌胃普罗布考混悬液制剂 20 mg/kg, G-JD 组与 G-JCS 组大鼠口服灌胃普罗布考橄榄油制剂 20 mg/kg。各组大鼠在清醒状态下, 分别于给药后 0、0.25、0.5、1、2、4、8、24、48、72 h 通过颈静脉插管采集血液 50 μ L, 其中 H-JCS 组和 G-JCS 组大鼠分别于给药后 0~4、4~8 和 8~24 h 时间段内连续采集淋巴液。

1.6 液相色谱和串联质谱联用 (LC-MS/MS) 法测定

测定条件: 采用 API-4000 型液相色谱质谱联用仪进行测定。色谱柱为 Ultimate XB-C₈ (2.1 μ m $\times$ 50 μ m, 5 μ m, LD), 流动相中乙腈和醋酸铵的比例为 3:17, 流速为 0.45 mL/min, 进样量为 5 μ L, 色谱柱温度为 40 °C。质谱检测方式为多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式进行二级质谱分析, 负离子模式下扫描, 电喷雾离子源。普罗布考与内标柳胺酚的检测离子对分别为 m/z 515.3/277.2 和 m/z 444.3/319.2, 雾化气 50 Psi, 辅助雾化气 50 Psi, 离子去簇电压 -45 V, 碰撞活化电压 -34 V, 加热温度 500 °C。

样品处理: 收集的全血样品用去离子水按 1:3 比例稀释, 淋巴液样品用肝素抗凝处理。在 30 μ L 全血和淋巴液样品中各加入 150 μ L 乙腈 (含有 100 ng/mL 的内标柳胺酚), 涡旋 5 min, 离心 5 min (14 000 r/min), 取上清液进行 LC-MS/MS 分析。

标准曲线制备: 用空白全血和淋巴液分别配成不同浓度的普罗布考标准品系列, 使其药物质量浓度分别为 3 000、1 000、300、100、30、10、3 和 1 ng/mL,

按全血和淋巴液处理方法处理后, 进行 LC-MS/MS 分析。以普罗布考与内标柳胺酚的峰面积比 (A) 为纵坐标, 普罗布考浓度 (C) 为横坐标, 绘制标准曲线, 并建立回归方程, 求出其相关系数 (R^2)。

1.7 数据分析及统计

根据药物平均浓度-时间数据, 采用 WinNonlin 6.2 软件按非房室模型计算普罗布考的药代动力学参数, 包括到达峰值浓度 ($C_{\max}$)、到达峰值时间 ($T_{\max}$)、消除半衰期 ($T_{1/2}$)、药-时曲线下面积 (AUC)、药物经肠系膜淋巴转运比例、相对生物利用度 (F_{rel}) 和淋巴液剂量百分比。低于 80% 定量下限的数据不参与药代动力学参数的计算。数据分析使用 GraphPad Prism 8.0 软件, 多组之间比较采用方差分析, 组内两两比较采用 LSD- t 检验, 以评价两种制剂的生物等效性。

2 结果

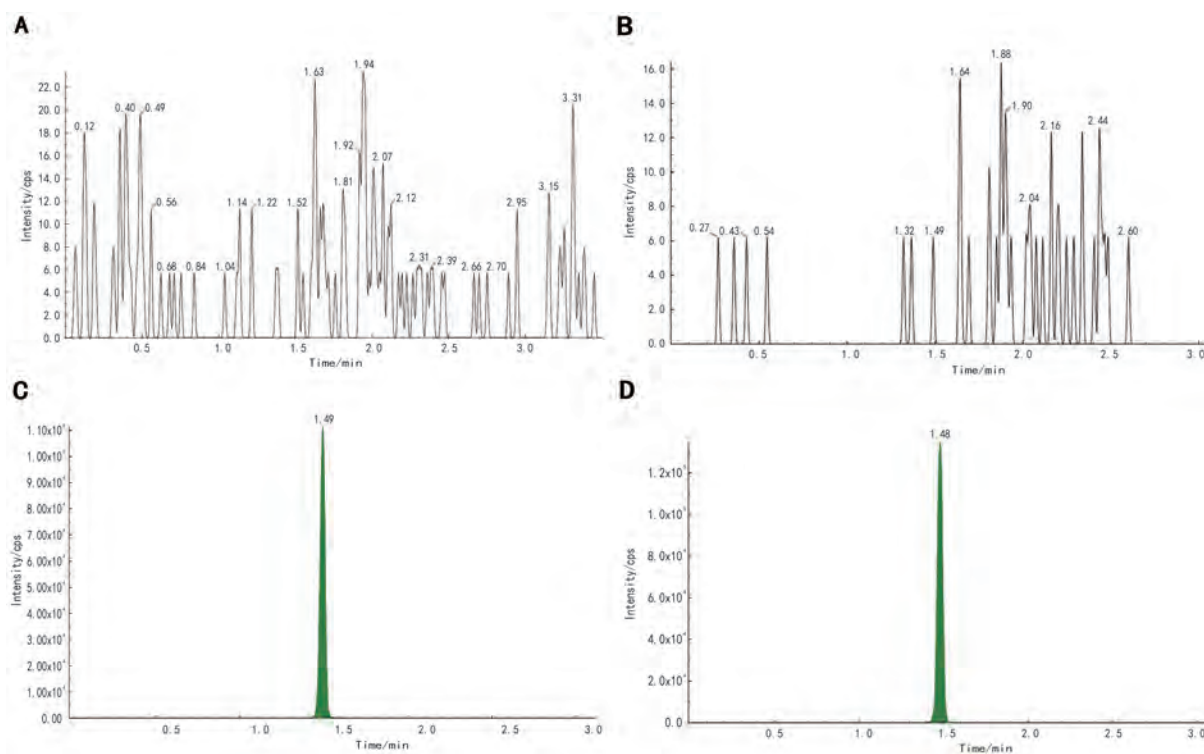
2.1 普罗布考在全血和淋巴液中的标准曲线

普罗布考的色谱峰峰形尖锐且对称, 样品与杂质分离良好, 无明显干扰峰 (图 1)。全血中普罗布考的

线性回归方程为 $y=517.3x+9\ 654$ ($R^2=0.999\ 2$), 表明全血普罗布考在 $1\sim 3\ 000\ \text{ng/mL}$ 质量浓度范围内线性关系良好, 标准曲线见图 2A。淋巴液中普罗布考的线性回归方程为 $y=230.62x+10\ 425$ ($R^2=0.999\ 2$), 表明淋巴液普罗布考在 $1\sim 10\ 000\ \text{ng/mL}$ 质量浓度范围内线性关系良好, 标准曲线见图 2B。以上方程式中, x 代表药物浓度, y 代表对应的峰面积。

2.2 全血药代动力学参数

各组大鼠口服普罗布考橄榄油制剂和普罗布考混悬液制剂后的血药浓度-时间数据见表 1, 药-时曲线如图 3A。药-时数据经药代动力学程序软件 WinNonlin 6.2 处理, 药代动力学参数见表 2。普罗布考在大鼠体内的药代动力学过程呈非房室模型。H-JD、H-JCS、G-JD 和 G-JCS 各组大鼠体内普罗布考的半衰期 ($T_{1/2}$) 分别为 $(12\pm 1)\ \text{h}$ 、 $(17\pm 3)\ \text{h}$ 、 $(13\pm 3)\ \text{h}$ 和 $(19\pm 11)\ \text{h}$, 说明普罗布考在大鼠体内消除较慢。经统计学分析, 与 H-JD 组和 H-JCS 组相比, G-JD 组和 G-JCS 组大鼠全血的 $C_{\max}$ 、 $T_{\max}$ 、 AUC_{last} 、 F_{rel} 和淋巴液的剂量百分比均显著升高

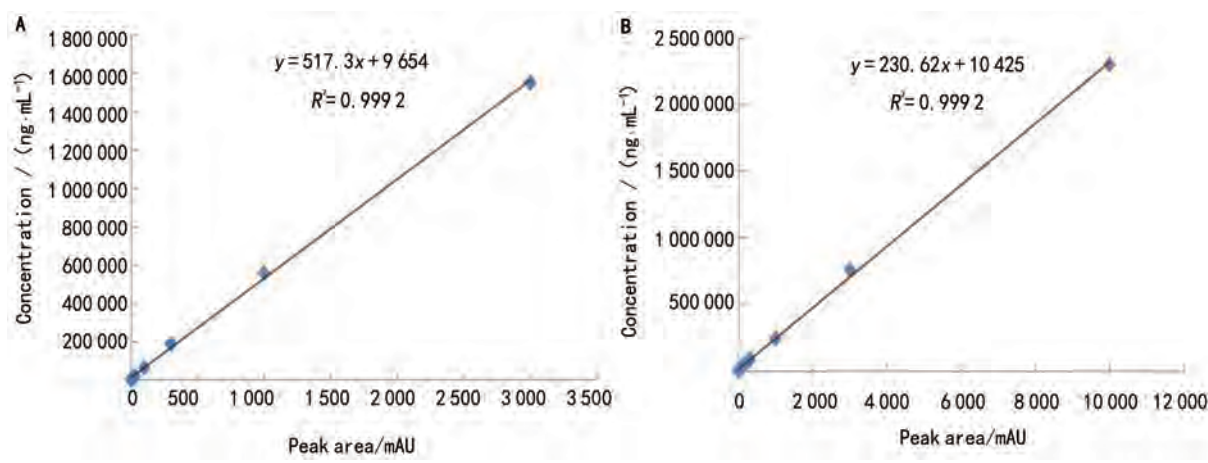


注: A 示空白全血的色谱图, B 示空白淋巴液的色谱图, C 示全血中添加普罗布考 ($1\ \text{ng/mL}$) 的色谱图, D 示淋巴液中添加普罗布考 ($1\ \text{ng/mL}$) 的色谱图。

Note: (A) Blank whole blood; (B) Blank lymph fluid; (C) Probucol ($1\ \text{ng/mL}$) added to whole blood; (D) Probucol ($1\ \text{ng/mL}$) added to lymph fluid.

图 1 普罗布考色谱图

Figure 1 Chromatogram of blood and lymph with and without probucol



注：A 示普罗布考在全血中的标准曲线图，B 示普罗布考在淋巴液中的标准曲线图。
Note: (A) Probucol in whole blood; (B) Probucol in lymph fluid.

图2 普罗布考的标准曲线图
Figure 2 Standard curves of probucol in blood and lymph

($P < 0.05$)；其中 G-JD 组全血的 AUC_{last} 显著高于 G-JCS 组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，其平均 AUC_{last} 之差为 $4\,280\text{ h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，而 H-JD 组和 H-JCS 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。通过计算得出普罗布考橄榄油制剂经肠系膜淋巴转运比例高于普罗布考混悬液制剂 (35% vs 0%)。

2.3 相对生物利用度

通过橄榄油制剂（实验制剂）的 AUC 与混悬液制

剂（对照制剂）的 AUC 相比，计算出 F_{rel} ，结果见表 3。以 H-JD 组为参比，G-JD 组中普罗布考的 F_{rel} 为 $(409\pm 269)\%$ 。以 H-JCS 组为参比，G-JCS 组中普罗布考的 F_{rel} 为 $(309\pm 256)\%$ 。结果提示，与 H-JD 组和 H-JCS 组相比，G-JD 组和 G-JCS 组的生物利用度明显提高。

2.4 肠淋巴液药动学参数

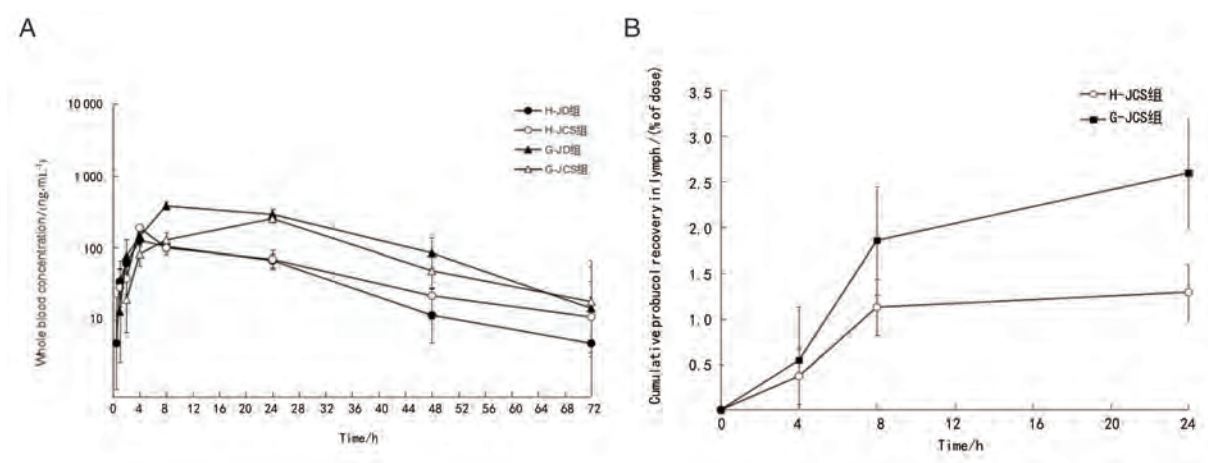
肠淋巴管-颈静脉辅助回流模型大鼠口服普罗布考橄榄油制剂和普罗布考混悬液制剂后的淋巴液剂量百

表1 各组大鼠的血药浓度
Table 1 Drug concentrations in the blood of rats in each group

($\bar{x} \pm s, n=3$)

采血时间 Blood collection time/h	普罗布考 Probucol ρ /(ng·mL ⁻¹)			
	H-JD 组	H-JCS 组	G-JD 组	G-JCS 组
	H-JD group	H-JCS group	G-JD group	G-JCS group
0	-	-	-	-
0.25	-	-	-	-
0.5	5	-	-	-
1	34±7	28±32	13±5	-
2	62±48	38±32	76±30	19±23
4	126±91	188±167	143±26	82±119
8	104±87	100±36	379±138	128±184
24	67±30	69±49	289±296	252±189
48	12±5	22±15	85±23	48±13
72	5±1	11±10	15±5	18±1

注：H-JD 组指混悬液制剂-颈静脉单插管组；H-JCS 组指混悬液制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组；G-JD 组指橄榄油制剂-颈静脉单插管组；G-JCS 组指橄榄油制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组。
Note: H-JD, suspension preparation-jugular vein single cannulation group; H-JCS, suspension preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group; G-JD, olive oil preparation-jugular vein single cannulation group; G-JCS, olive oil preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group.



注：H-JD 组指混悬液制剂-颈静脉单插管组；H-JCS 组指混悬液制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组；G-JD 组指橄榄油制剂-颈静脉单插管组；G-JCS 组指橄榄油制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组。
Note: H-JD, suspension preparation-jugular vein single cannulation group; H-JCS, suspension preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group; G-JD, olive oil preparation-jugular vein single cannulation group; G-JCS, olive oil preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group.

图3 各组大鼠的药物浓度-时间曲线(A)和淋巴液剂量百分比曲线(B)

Figure 3 Drug concentration-time curve (A) and dose percentage curve of lymphatic fluid (B) in all groups of rats

表2 各组大鼠的全血药动学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters of the whole blood of rats in each group

参数	H-JD 组	H-JCS 组	G-JD 组	G-JCS 组
Parameters	H-JD group	H-JCS group	G-JD group	G-JCS group
峰值时间 T_{max}/h	11±12	5±2	13±9	19±9
峰值浓度 $C_{max}/(ng·mL^{-1})$	148±60	207±137	453±204	309±177
半衰期 $T_{1/2}/h$	12±1	17±3	13±3	19±11
药-时曲线下面积 $AUC_{last}/(h·ng·mL^{-1})$	3 210±885	3 677±2 014	12 360±6 629	8 080±3 064
药-时曲线下面积 $AUC_{INF}/(h·ng·mL^{-1})$	3 293±899	3 970±2 295	12 623±6 650	8 947±2 218

注：H-JD 组指混悬液制剂-颈静脉单插管组；H-JCS 组指混悬液制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组；G-JD 组指橄榄油制剂-颈静脉单插管组；G-JCS 组指橄榄油制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组。 AUC_{last} 指从给药时间开始到最后一个点这段时间的曲线下面积， AUC_{INF} 指从给药开始到理论外推无穷远这段时间的曲线下面积。

Note: H-JD, suspension preparation-jugular vein single cannulation group; H-JCS, suspension preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group; G-JD, olive oil preparation-jugular vein single cannulation group; G-JCS, olive oil preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group. AUC_{last} , the area under the curve from time zero to time of last measurable concentration; AUC_{INF} , the area under the curve from time zero to infinity.

分比参数见表4，剂量百分比曲线如图3B。经统计学分析，与H-JCS组相比，G-JCS组大鼠淋巴液的剂量百分比显著升高 ($P<0.05$)。

3 讨论

与传统门静脉系统吸收途径相比，脂溶性药物经肠系膜淋巴转运具有明显的优势，不仅吸收比例高，还可以避开肝脏的首过消除效应^[7, 14]。某些脂类大分子物质因溶解度和溶出速率低，只能依赖肠系膜淋巴

管的转运吸收^[15-16]。大鼠肠系膜淋巴管插管模型是研究药物经淋巴系统转运最广泛的技术手段，但传统的肠系膜淋巴液直接引流的方式存在明显的缺陷：在淋巴液采集过程中，动物长时间处于禁食禁水、麻醉或被限制的状态，这些因素会导致其肠淋巴液流速和淋巴转运能力下降，不能模拟生理状态下的淋巴转运过程^[17]。本研究利用一种新型的大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流模型，结合清醒活动装置，实现了大鼠在清醒自由、正常采食饮水的状态下实时收集淋巴液

表3 各组大鼠的相对生物利用度(F_{rel})
Table 3 Relative bioavailability (F_{rel}) of rats in each group

动物 Rat	药-时曲线下面积 $AUC_{last}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$		$F_{rel}/\%$	药-时曲线下面积 $AUC_{last}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$		$F_{rel}/\%$
	H-JD 组	G-JD 组		H-JCS 组	G-JCS 组	
	H-JD group	G-JD group		H-JCS group	G-JCS group	
第1只 No.1	2 750	19 800	720	3 360	8 680	258
第2只 No.2	4 230	10 200	241	1 840	10 800	587
第3只 No.3	2 650	7 080	267	5 830	4 760	82
平均数 $\bar{x} \pm s$	3 210 $\pm$ 885	12 360 $\pm$ 6 629	409 $\pm$ 269	3 677 $\pm$ 2 014	8 080 $\pm$ 3 064	309 $\pm$ 256

注: H-JD 组指混悬液制剂-颈静脉单插管组; H-JCS 组指混悬液制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组; G-JD 组指橄榄油制剂-颈静脉单插管组; G-JCS 组指橄榄油制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组。

Note: H-JD, suspension preparation-jugular vein single cannulation group; H-JCS, suspension preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group; G-JD, olive oil preparation-jugular vein single cannulation group; G-JCS, olive oil preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group.

表4 各组大鼠的淋巴液剂量百分比参数
Table 4 Dose percentage parameters of lymphatic fluid of rats in each group

参数 Parameters	采液时间/h Liquid collection time/h	$(\bar{x} \pm s, n=3)$	
		H-JCS 组 H-JCS group	G-JCS 组 G-JCS group
质量浓度 $\rho/(ng \cdot mL^{-1})$	0~4	2 880 $\pm$ 2 120	2 862 $\pm$ 968
	4~8	5 682 $\pm$ 4 935	4 019 $\pm$ 4 019
	8~24	417 $\pm$ 189	1 345 $\pm$ 1 695
体积 V/mL	0~4	6.8 $\pm$ 0.5	11.0 $\pm$ 2.0
	4~8	7.2 $\pm$ 0.6	19.2 $\pm$ 1.4
	8~24	20.8 $\pm$ 2.4	30.4 $\pm$ 3.0
剂量百分比 Dose percentage/%	0~4	0.37 $\pm$ 0.26	0.60 $\pm$ 0.25
	0~8	1.13 $\pm$ 0.87	1.85 $\pm$ 0.88
	0~24	1.29 $\pm$ 0.50	2.59 $\pm$ 0.43

注: H-JCS 组指混悬液制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组; G-JCS 组指橄榄油制剂-颈静脉和肠淋巴管双插管组。

Note: H-JCS, suspension preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group; G-JCS, olive oil preparation-jugular vein and intestinal lymphatic double cannulation group.

并用于分析,实验数据真实地反映了普罗布考经大鼠肠系膜淋巴系统转运的药代动力学特征。

普罗布考作为脂溶性药物,在胃肠道中难溶且吸收不规则,导致其口服生物利用度较低($<10\%$)^[18],限制了该药的药效发挥和临床应用。因此,对该药进行剂型改造、吸收模式及药代动力学的深入研究受到了研究者的普遍关注。近年来,自微乳、微囊、聚合物胶束和纳米粒等新型制剂技术的应用可以改善普罗布考在体内的组织分布和生物利用度^[19],并提高其在体内的持效时间^[20]。然而这类制剂往往成本高昂,部分因含有大量的表面活性剂,不能长期给药,限制了相关技术的应用^[19]。Schönfeld等^[21]研究发现,脂质制剂可以提高脂溶性药物经肠系膜淋巴系统的转运能力。被脂质包装后的药物在口服后,一部分药物经传

统肝门静脉途径进入全身血液循环,另一部分药物经小肠黏膜上皮细胞吸收后,与不饱和脂肪酸、三酰甘油等共同组装成为乳糜微粒,并经小肠毛细淋巴管-肠淋巴管-胸导管途径入血^[22]。橄榄油中富含大量的长链脂肪酸和单不饱和脂肪酸^[23],理论上可以促进普罗布考溶解并进入小肠黏膜上皮细胞与乳糜微粒结合^[11],进而提高其口服吸收水平。本研究工作证实了上述过程,同时也发现橄榄油对普罗布考的药代动力学参数有较大的影响。

本研究表明,各组普罗布考的药-时曲线均符合非房室模型,其在大鼠体内分布较快,消除较为缓慢,且消除半衰期大于分布半衰期,说明普罗布考在体内的药代动力学过程为慢消除过程。与普罗布考混悬液制剂组相比,普罗布考橄榄油制剂组全血的 C_{max} 、

$T_{\max}$ 、 AUC_{last} 、生物利用度和淋巴液剂量百分比显著升高 ($P<0.05$), 表明普罗布考的混悬液制剂和橄榄油制剂不具有生物等效性, 经橄榄油溶解的普罗布考在大鼠体内的生物利用度和肠淋巴系统代谢能力得到提升, 体内持效时间进一步增加。在橄榄油制剂状态下, 颈静脉单插管大鼠全血的 AUC_{last} 显著高于颈静脉-肠淋巴管双插管大鼠 ($P<0.05$), 而混悬液制剂组间无显著差异 ($P>0.05$), 这可能是由于大鼠的肠系膜淋巴液被收集后, 经肠淋巴系统途径运输的部分药物未进入体内血液循环, 这说明普罗布考溶于橄榄油制剂后被特异性地吸收到肠淋巴液中。总之, 普罗布考橄榄油制剂在大鼠体内的肠淋巴转运比例及生物利用度都得到显著提升。

综上所述, 本研究采用新型的大鼠肠系膜淋巴管-颈静脉辅助回流模型开展了普罗布考的药代动力学研究, 发现橄榄油制剂可以显著促进普罗布考经肠系膜淋巴系统的转运吸收, 提高了普罗布考在大鼠体内的生物利用度。本研究为脂溶性药物的肠淋巴转运研究、普罗布考的剂型改造及其药代药效研究提供了新的技术手段及可靠数据。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验通过中国科学院分子细胞科学卓越创新中心实验动物使用与管理委员会的审核批准 (IACUC No. SIBCB-S118340-2112-045)。所有实验操作均遵照中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台发布的《动物实验技术平台标准操作规程》的条例进行。

All animal experiments involved in this study have been reviewed and approved by the Laboratory Animal Use and Management Committee of the Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences (IACUC No. SIBCB-S118340-2112-045). All experimental procedures were carried out in accordance with the regulations of *Standard Operating Procedures for Animal Experiment Technology Platforms* established by the Animal Core Facility, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences.

[作者贡献 Author Contribution]

张笑瑞、曹静和吴倩倩负责收集资料、实验设计、实验操作、数据及论文撰写; 刘季俊和陈国元负责开展普罗布考药物分析并参与论文撰写; 吴宝金提供研究经费, 负责研究方案与论文的审核及修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] HIRATA K I. New evidence of probucol on cardiovascular events[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2021, 28(2): 97-99. DOI: 10.5551/jat.ED155.
- [2] YAMASHITA S, MASUDA D, OHAMA T, et al. Rationale and design of the PROSPECTIVE trial: probucol trial for secondary prevention of atherosclerotic events in patients with prior coronary heart disease[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(6): 746-756. DOI:10.5551/jat.32813.
- [3] LIU J C, LI M H, LU H, et al. Effects of probucol on restenosis after percutaneous coronary intervention: a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124021. DOI:10.1371/journal.pone.0124021.
- [4] HIGASHI K, MORI A, SAKAMOTO K, et al. Probucol slows the progression of cataracts in streptozotocin-induced hyperglycemic rats[J]. *Pharmacology*, 2019, 103(3-4): 212-219. DOI:10.1159/000496055.
- [5] JUNG Y S, PARK J H, KIM H, et al. Probucol inhibits LPS-induced microglia activation and ameliorates brain ischemic injury in normal and hyperlipidemic mice[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(8):1031-1044. DOI:10.1038/aps.2016.51.
- [6] HAN L M, YANG Q S, SHEN T, et al. Lymphatic transport of orally administered probucol-loaded mPEG-DSPE micelles[J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(6): 1955-1961. DOI: 10.3109/10717544.2015.1028600.
- [7] QIAN Y W, CHEN G G, WANG J, et al. Preparation and evaluation of probucol-phospholipid complex with enhanced bioavailability and No food effect[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, 19(8):3599-3608. DOI:10.1208/s12249-018-1157-2.
- [8] GERSHKOVICH P, HOFFMAN A. Uptake of lipophilic drugs by plasma derived isolated chylomicrons: linear correlation with intestinal lymphatic bioavailability[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 26(5):394-404. DOI:10.1016/j.ejps.2005.07.011.
- [9] YÁÑEZ J A, WANG S W J, KNEMEYER I W, et al. Intestinal lymphatic transport for drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(10-11):923-942. DOI:10.1016/j.addr.2011.05.019.
- [10] BEG S, ALAM M N, AHMAD F J, et al. Chylomicron mimicking nanocolloidal carriers of rosuvastatin calcium for lymphatic drug targeting and management of hyperlipidemia[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 177:541-549. DOI:10.1016/j.colsurfb.2019.02.039.
- [11] HOKKANEN K, TIRRONEN A, YLÄ-HERTTUALA S. Intestinal lymphatic vessels and their role in chylomicron absorption and lipid homeostasis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2019, 30(5): 370-376. DOI:10.1097/MOL.0000000000000626.
- [12] KIM H, SEONG I, RO J, et al. Enhanced association of probucol with chylomicron by pharmaceutical excipients: an in vitro study[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41(7): 1073-1079. DOI:10.3109/03639045.2014.927479.
- [13] 张笑瑞, 曹静, 吴倩倩, 等. 大鼠肠系膜淋巴液持续引流新方法的初步建立[J]. *实验动物与比较医学*, 2022, 42(4):267-274. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.024.
ZHANG X R, CAO J, WU Q Q, et al. A preliminary method for

- continuous drainage of mesenteric lymph fluid in rat[J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2022, 42(4): 267-274. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.024.
- [14] ALEXANDER J S, GANTA V C, JORDAN P A, et al. Gastrointestinal lymphatics in health and disease[J]. Pathophysiology, 2010, 17(4):315-335. DOI:10.1016/j.pathophys.2009.09.003.
- [15] HYEONGMIN K, YEONGSEOK K, JAEHWI L E. Liposomal formulations for enhanced lymphatic drug delivery[J]. Asian J Pharm Sci, 2013(2):96-103.
- [16] MARWAHA R K, DABAS A. Bioavailability of nanoemulsion formulations vs conventional fat soluble preparations of cholecalciferol (D3) - An overview[J]. J Clin Orthop Trauma, 2019, 10(6):1094-1096. DOI:10.1016/j.jcot.2019.07.014.
- [17] ZHANG Y M, ZHANG S K, CUI N Q. Intravenous infusion of mesenteric lymph from severe intraperitoneal infection rats causes lung injury in healthy rats[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(16):4771-4777. DOI:10.3748/wjg.v20.i16.4771.
- [18] CHAMPAGNE D, PEARSON D, DEA D, et al. The cholesterol-lowering drug Probucol increases apolipoprotein E production in the hippocampus of aged rats: implications for Alzheimer's disease[J]. Neuroscience, 2003, 121(1):99-110. DOI: 10.1016/S0306-4522(03)00361-0.
- [19] BROCKS D R, DAVIES N M. Lymphatic drug absorption via the enterocytes: pharmacokinetic simulation, modeling, and considerations for optimal drug development[J]. J Pharm Pharm Sci, 2018, 21(1s):254s-270s. DOI:10.18433/jpps30217.
- [20] LI J, YANG Y, ZHAO M H, et al. Improved oral bioavailability of probucol by dry media-milling[J]. Mater Sci Eng C, 2017, 78: 780-786. DOI:10.1016/j.msec.2017.04.141.
- [21] SCHÖNFELD P, WOJTCZAK L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective[J]. J Lipid Res, 2016, 57(6):943-954. DOI:10.1194/jlr.R067629.
- [22] TANOUS D, BRÄSEN J H, CHOY K, et al. Probucol inhibits intimal thrombosis and neointimal hyperplasia by promoting re-endothelialization[J]. Atherosclerosis, 2006, 189(2): 342-349. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2006.01.025.
- [23] KOSTIK V, MEMETI S, BAUER B. Fatty acid composition of edible oils and fats[J]. J Hyg Eng Des, 2013, 4: 112-116.
- (收稿日期:2022-03-04 修回日期:2022-07-19)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁)

《实验动物与比较医学》“前沿文献述评” ——青年编委专栏邀请函

2022年1月,《实验动物与比较医学》在第七届编委会改选之际新成立了青年编委会。本刊青年编委会由46位年龄在45周岁以下、职称在副高以上(或博士学位以上)的青年专家组成,任期2年。为鼓励青年编委在自身能力提升的基础上,增强参与国内外学术交流及期刊建设的积极性和使命感,本刊特开辟针对实验动物与比较医学研究前沿的文献述评专栏。

本专栏来稿的第一作者一般是本刊青年编委。文章要求针对某一重点、热点或新兴研究领域的突破性进展,以国内外最新(3个月内)发表的1~3篇优秀文献为基础,进行方法学介绍、结果点评或类比研究展望。文章内容必须是作者感兴趣的或与所在团队的研究相关,鼓励作者结合本团队的相关研究提出自己的观点和思考,鼓励采用方法学流程图或简略醒目的图片展示结果及作者观点,以便读者学习,字数一般控制在5 000字以内。

本专栏的宗旨是普及与提高,并助力青年科研团队建设。因此,也欢迎本刊资深编委专家或国内外高水平研究学者(具有高级职称)积极参与本专栏的撰写工作,也可提供热点资讯或推荐优质青年作者,为我国实验动物与比较医学的科技发展、人才培养及学术交流平台建设做出积极贡献。

本专栏来稿一律走绿色通道,快审、快编校、快数字出版。发表周期一般控制在2个月。

投稿要求同常规论文,咨询电话:021-50793657。

联系邮箱:bjb50793657@163.com。

投稿地址:http://www.slarc.org.cn/dwyx。

《实验动物与比较医学》编辑部



曹永清，中共党员，主任医师、博士研究生导师，中医外科学教授，上海市名中医。长期从事肛肠疾病的研究，对盆底疾病的生理病理、解剖、诊断有较高的造诣，擅长采用中医中药治疗各种疑难肛肠疾病。现任世界中医药学会联合会肛肠病专业委员会会长、上海市中西医结合学会大肠肛门病专业委员会主任委员、上海市中医专业质控组（中医肛肠）组长等职。主持并完成国家科技部“十一五”科技支撑计划、国家中医药管理局等国家及省部级科研项目9项，并担任国家科技部“十一五”科技支撑计划“中医治疗外科常见病研究”项目组组长。发表论文65篇，主编（主审）专著4部，副主编教材与专著3部。获得国家发明专利授权2项，实用新型专利授权14项。培养硕博硕士研究生46名。先后获得2019年上海中医药学会科技进步一等奖（第1完成人）、2020年上海市科学技术奖二等奖（第1完成人）等科技奖励10项。

三硝基苯磺酸诱导急性肠纤维化大鼠模型的改良方法

王怡如¹，蒋笑影¹，董若曦¹，潘一滨¹，韩向晖²，曹永清¹

(1. 上海中医药大学附属龙华医院肛肠科，上海 200032； 2. 上海中医药大学附属龙华医院中医外科研究所，上海 200032)

[摘要] 目的 探索2,4,6-三硝基苯磺酸（2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS）诱导急性肠纤维化大鼠模型的方法及不同药物配比的效果。**方法** 30只雌性SD大鼠随机分为5组，每组各6只。A~D组为模型组，模型组大鼠采用不同配比的药物溶液通过改良保留灌肠法一次性造模：A组，5%TNBS+50%乙醇（体积比1:1）；B组，5%TNBS+75%乙醇（体积比1:1）；C组，5%TNBS+100%乙醇（体积比1:1）；D组，5%TNBS+50%乙醇（体积比2:1）；对照组用生理盐水（0.9%氯化钠溶液）灌肠；观察造模后1周内动物的症状、体征和体质量变化，并进行疾病活动指数（disease activity index, DAI）评分。分别于造模后7 d和14 d，随机选择每组内一半大鼠进行取材，观察结肠组织大体损伤程度并以结肠炎损伤指数（colon macroscopic damage index, CMDI）评分；结肠组织病理切片以HE染色观察肠炎严重程度，Masson染色观察胶原纤维沉积情况。**结果** 各模型组大鼠均出现轻重不等的肠炎及肠纤维化病变，其中以体积比为1:1的5%TNBS+75%乙醇溶液造模观察期内未导致大鼠死亡，造模后24 h大鼠体质量明显下降、出现稀便及血便症状，结肠壁纤维化病变明显，体质量下降、DAI评分与CMDI评分升高，与对照组相比差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；光学显微镜下炎症程度较重，呈透壁性；Masson染色显示造模部位的肠壁增厚明显，黏膜下层、肌层及浆膜层均出现弥漫性胶原纤维沉积。**结论** 改良的TNBS保留灌肠法能有效构建肠纤维化大鼠模型，体积比为1:1的5%TNBS+75%乙醇溶液所建模型可模拟克罗恩病纤维化两大特征，即透壁性炎症和肠壁纤维化。该造模方法简便、高效，动物死亡率低。

[关键词] 炎症性肠病；克罗恩病；肠道纤维化；2,4,6-三硝基苯磺酸；SD大鼠

[中图分类号] R-332；Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0284-10

Modified Method for Inducing Acute Intestinal Fibrosis in Rats Using 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid

WANG Yiru¹, JIANG Xiaoying¹, DONG Ruoxi¹, PAN Yibin¹, HAN Xianghui², CAO Yongqing¹

(1. Department of Anal-rectal Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81874469)“红萸饮下调chr10:115386962-115390436+/miR-6914-5p/Atg7通路治疗IBD的机制研究”

[第一作者] 王怡如(1991—)，女，博士研究生，研究方向：中医外科学及中医药治疗炎症性肠病。E-mail: wangyiru1707@163.com。ORCID: 0000-0003-1622-9793

[通信作者] 曹永清(1961—)，男，主任医师，教授，博士生导师，主要从事中医外科学及中医药治疗大肠肛门疾病的研究。E-mail: cyq88tcm@163.com。ORCID: 0000-0001-8482-2359

Shanghai 200032, China; 2. Department of Institute of Chinese Traditional Surgery, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: CAO Yongqing (ORCID: 0000-0001-8482-2359), E-mail: cyq88tcm@163.com

[ABSTRACT] Objective To explore 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced acute intestinal fibrosis in rats and the effect of different drug ratios. **Methods** Thirty female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups with six rats in each group. Groups A to D were the model groups, in which the rats were induced by modified retention enemas using solutions with different drug ratios: group A, 5% TNBS + 50% ethanol (1:1 v/v); group B, 5% TNBS + 75% ethanol (1:1 v/v); group C, 5% TNBS + 100% ethanol (1:1 v/v); group D, 5% TNBS + 50% ethanol (2:1 v/v); and the control group was induced by normal saline (0.9% sodium chloride solution) enema. The symptoms, signs, and body mass changes of the animals were observed within one week after modeling, and scored using the disease activity index (DAI). At 7th d and 14th d after model establishment, half of the rats in each group were randomly selected for sampling to observe the degree of gross damage to the colon tissue and scored using the colon macroscopic damage index (CMDI). Pathological sections of colon tissue were stained with hematoxylin-eosin (HE) to observe the severity of enteritis, and Masson staining was used to observe collagen fiber deposition. **Results** The rats in each model group showed enteritis and intestinal fibrosis lesions of different severities, of which 5% TNBS + 75% ethanol solution (1:1 v/v) did not lead to death during the observation period. At 24 h after model establishment, the rats had significantly decreased body weight, loose stool, and bloody stool, significant colonic wall fibrosis lesions, and increased DAI and CMDI scores compared with the control group ($P < 0.05$). The degree of inflammation was transmural and more severe, as seen under the light microscope, and Masson staining showed that the intestinal wall at the model site was significantly thickened, and diffuse collagen fiber deposition occurred in the submucosa, muscular layer, and serosal layer. **Conclusion** The modified TNBS retention enema method can effectively construct a rat model of intestinal fibrosis, and the model established using 5% TNBS + 75% ethanol solution (1:1 v/v) can simulate the two major characteristics of Crohn's disease fibrosis, namely transmural inflammation and intestinal wall fibrosis. This method is simple and efficient, and the mortality rate of animals is low.

[Key words] Inflammatory bowel disease; Crohn's disease; Intestinal fibrosis; 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; Sprague-Dawley rats

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 包括克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎, 其特征是在遗传易感个体的消化道中存在长期持续的炎症。肠纤维化是 CD 病程中的常见并发症, 表现为肠腔狭窄和肠壁增厚, 在上下消化道均可发生, 以回肠末端、回盲瓣、肛直肠段多见; 半数 CD 患者存在发生肠腔狭窄的终身风险, 纤维化使器官失去正常结构及功能, 严重的狭窄是导致手术和肠切除的主要原因之一^[1-2]。既往认为, CD 患者的肠纤维化是一个相对缓慢的过程, 故肠纤维化动物模型多以周期性反复引发炎症建立的慢性纤维化为主。但近期研究显示, 纤维化病变在部分 CD 患者中迅速发展, 形成狭窄的速度可能比以往认为的早得多^[3]。因此, 对 CD 患者急性肠纤维化的研究已成为该领域的重点之一, 建立符合 CD 患者肠纤维化疾病特征的动物模型是研究该疾病发生机制和治疗方法的主要

途径和重要需求。

半抗原化剂 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS) 灌肠诱导的结肠炎模型是研究 CD 最常用和最具特征性的模型之一^[4], 但其诱导的急性肠纤维化模型目前国内未见探讨。基于这一广泛验证的模型基础, 本课题探索了一次性保留灌肠建立急性肠纤维化大鼠模型的改良方法, 同时设立多组不同药物剂量和乙醇溶液浓度的配比以观察诱导的大鼠结肠炎症和纤维化效果差异。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 30 只, 体质量为 200~220 g, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (浙) 2019-0001], 质量合格证为 20210107Aazz061900

882。大鼠饲养于上海中医药大学动物实验中心[SYXK(沪)2020-0009], 饲养环境温度 $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为40%~60%, 光/暗每12 h交替, 灭菌全价营养饲料喂养, 自由进食饮水。本研究方案经上海中医药大学动物实验伦理委员会批准(PZSHUTCM201225008), 实验过程符合3R原则。

1.2 主要试剂与仪器

TNBS(批号SLCG2384)和戊巴比妥钠(批号57-33-0)均购自美国Sigma公司; 无水乙醇(批号20191017)、苯胺蓝(批号20190604)、磷钼酸(批号20190626)和正丁醇(批号20190802)均购自国药集团化学试剂有限公司(沪试); 双蒸水和生理盐水(即0.9%氯化钠溶液)(批号S2005066)购自上海百特医疗用品有限公司; 多聚甲醛(批号202201)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 伊红(批号C201103)、苏木精(批号C201204)和BASO粪便隐血双联法试剂组(批号BA-2020E)购自珠海贝索生物技术有限公司; Weigert铁苏木素(批号20200407)购自北京索莱宝科技有限公司; 二甲苯(批号2021033102)购自上海盛稀化工有限公司。

手术器械购自上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂(金钟手术器械); 一次性无菌注射器购自威海洁瑞医用制品有限公司; L80型一次性直肠给药管购自任丘市洪达气体有限公司(绿林); 组织包埋机和石蜡切片机为德国Leica公司产品; 光学显微镜为日本Olympus公司产品。

1.3 药品配制及动物分组

将无水乙醇与双蒸水按相应体积比配制成体积分数为50%和75%的乙醇溶液。5%TNBS分别与不同体积分数的乙醇混合配制成体积比为1:1的5%TNBS+50%乙醇溶液(A组)、体积比为1:1的5%TNBS+

75%乙醇溶液(B组)、体积比为1:1的5%TNBS+无水乙醇溶液(C组), 以及体积比为2:1的5%TNBS+50%乙醇溶液(D组)。4个不同配比的TNBS/乙醇溶液配制后, 在4℃冷藏避光保存, 使用前再次混匀。

30只雌性SD大鼠随机分为5组, 每组6只。对照组予生理盐水0.6 mL灌肠, 模型组分为A、B、C、D组, 用上述对应配比的溶液各0.6 mL灌肠。

1.4 一次性保留灌肠法建立炎性肠纤维化大鼠模型

各组大鼠适应性饲养1周, 第7天起禁食不禁水24 h, 第8天造模前称重。造模麻醉前再次促进大鼠排便。造模时, 先用2%戊巴比妥钠溶液按每只大鼠0.3~0.4 mL的用量进行腹腔注射麻醉。麻醉生效后参考Morris法^[5]进行一次性灌肠操作, 改良方法: 用1 mL注射器连接圆头灌肠软管(长8 cm, 内径2 mm)制作灌肠器; 麻醉后的大鼠以俯卧位提起大鼠尾部, 暴露肛门, 灌肠管蘸取少许造模药液润滑管壁, 插入肛门约8 cm处, 缓慢匀速推注药液0.6 mL; 退出灌肠管后立即用木夹子夹闭大鼠肛门, 并将大鼠呈头低位尾部固定于笼网; 保持肛门夹闭状态, 计时30 min后取下夹子将大鼠放回笼中, 待其自然苏醒(图1)。

1.5 造模后动物一般情况观察

记录造模后7 d内大鼠每日精神及活动状态、体质量变化、粪便性状及便血、死亡情况, 并参照Murano等^[6]方法进行大鼠疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分。(1)体质量下降: 无, 记0分; 1%~5%, 记1分; 6%~10%, 记2分; 11%~15%, 记3分; >15%, 记4分。(2)粪便性状: 正常, 记0分; 松散, 记2分; 稀便, 记4分。(3)便血: 隐血(-), 记0分; 隐血(+), 记2分; 肉眼血便, 记4分。 $\text{DAI} = (\text{体质量下降分数} + \text{粪便性状分数} + \text{便血分数}) / 3$,



图1 大鼠保留灌肠示意图

Figure 1 Schematic diagram of retention enema

以造模当日体质量作为初始体质量,与造模后第1天起每日体质量作对比。

1.6 造模后实验动物取材与样本保存

造模后第7天、第14天,用2%戊巴比妥钠溶液按每只大鼠0.7~0.8 mL的用量腹腔注射麻醉每组一半大鼠。麻醉前不禁食不禁水。麻醉起效后,沿腹中线剖开腹腔并观察腹腔内情况;经腹主动脉采血后,以脱颈椎法安乐死大鼠;然后取下肛门至盲肠全段,于造模给药处(距肛门6~10 cm范围)剪断肠管;沿肠管纵轴剖开,必要时用生理盐水冲洗肠腔残留粪便,观察肠道炎症最明显处;测量后截取该部位结肠组织,固定于多聚甲醛溶液中,留做病理切片。若全结肠未见明显肉眼大体形态改变,则截取距肛门1 cm、3 cm、6 cm、9 cm范围内的结肠肠段0.3 cm作为样本。

1.7 结肠组织大体形态学观察

取材时记录腹腔积液、病变肠管与周围组织关系等,无张力拉直肠管后测量从肛门到结肠盲肠交界处的全结直肠长度。然后观察肠管外壁有无穿孔、狭窄、膨大、粘连等改变,沿纵轴剖开肠管后观察肠腔面。综合以上信息,参考Butzner等^[7]方法进行大鼠结肠炎大体损伤指数(colon macroscopic damage index, CMDI)评分。(1)结肠损伤:正常外观,记0分;局灶充血但黏膜无糜烂或溃疡,记1分;溃疡不伴充血或肠壁增厚,记2分;一处溃疡伴炎症,记3分;两处及以上的局灶溃疡或炎症,记4分;主要炎症损伤处沿肠管纵向延伸范围>1 cm,记5分;损伤范围>2 cm,每增加1 cm再多记1分,即记6~10分。(2)结肠与周围组织关系:与周围组织无粘连,记0分;轻度粘连(与周围组织易于分离),记1分;重度粘连(与周围组织不易分离),记2分。评分由两位研究者分别独立进行,再对结果进行比较分析。

1.8 HE染色和Masson染色

各组炎症结肠组织以多聚甲醛溶液固定后,经常规石蜡包埋、切片、脱水等步骤制作病理切片,同一块结肠组织分别切片进行HE染色和Masson染色,光学显微镜下取肠壁全层视野,观察黏膜损伤程度、肠壁增厚、炎细胞浸润深度、纤维化部位等情况,并比较对照组与模型组的胶原蛋白沉积部位和范围。

1.9 统计学方法

应用SPSS 23.0软件进行统计学分析,并用Graphpad Prism 8.0软件作图。计数资料以率描述,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述。资料服从正态分布时,两组间比

较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,并以LSD- t 检验进行两两比较。若资料不服从正态分布,则多组间比较采用Kruskal-Wallis非参数检验,以Dunn法作进一步比较。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后大鼠一般情况

造模后,模型组大鼠出现不同程度的精神萎靡,表现为反应慢、挣扎减弱、喜聚集、蜷缩、鼠毛暗淡,且肛周有稀便污染;持续1~3 d后,整体情况随体质量升高逐渐好转。适应期及造模当日,各组大鼠体质量比较差异无统计学意义($P > 0.05$);造模前禁食24 h后,大鼠体质量较前平均下降(18.3 ± 8.7) g。造模完成后,对照组在进食后体质量迅速回升,模型组体质量持续下降1~2 d后才开始缓慢回升。与对照组相比,模型组造模后第1、2天的体质量明显偏低,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图2A)。

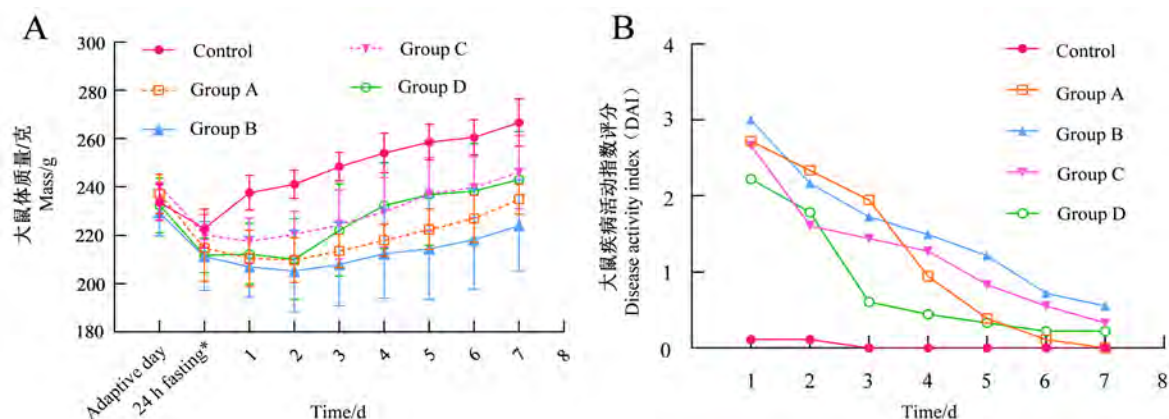
造模24 h后,模型组均可见粪便性状改变,便质稀或呈糊状,伴黏液及血迹。肉眼见血便多数持续2~3 d;隐血阳性在肉眼血便消失后仍存在1~3 d;稀便持续时间每组不等, A组3~6 d, B组3~7 d, C组4~7 d, D组模型不稳定,持续1~14 d。造模后24 h各模型组的DAI评分均较对照组明显升高,其中B组与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$,图2B);造模后24 h各模型组的DAI评分均逐渐下降,但各模型组之间DAI评分比较的差异无统计学意义($P > 0.05$,图2B)。

2.2 模型动物死亡率

A组与B组观察期内大鼠无死亡。C组造模后第2天和第6天各有1只大鼠死亡, D组造模后第3天有2只大鼠死亡, C组与D组死亡率均为33.3%。

2.3 结肠大体外观

对照组结肠正常,肠管外壁与周围组织易于分离。模型组各组大鼠可见不同程度的结肠炎改变,造模给药处可见局部肠管膨隆,肠段增厚明显,肠管质韧,肠管外壁均未见穿孔,造模部位肠管外壁与周围器官组织炎性粘连,严重病变肠管外出现脂肪组织蓄积、包裹,不易分离。模型组之间对比, A组的结肠外观变化总体较轻; B、C组节段性增厚较明显,可伴上段肠管扩张,出现不完全性肠梗阻; D组内模型差异较大,部分出现明显的炎性狭窄性病变,部分未见明显异常(图3)。

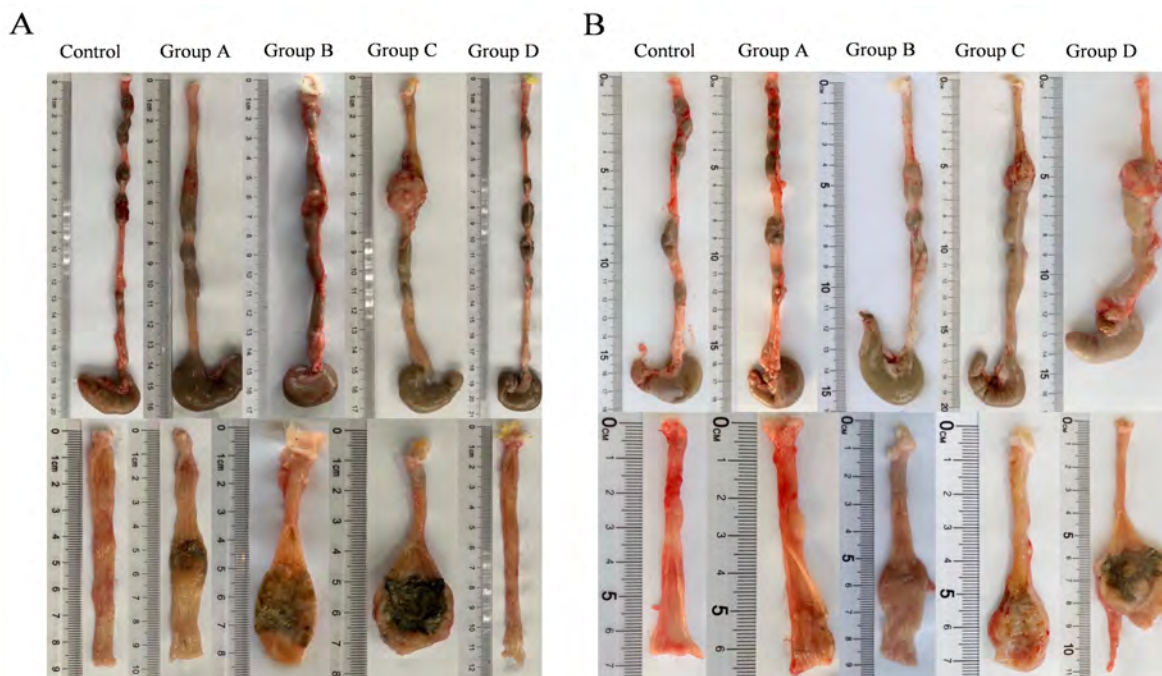


注: *表示造模当日。对照组用生理盐水灌肠; A~D组为模型组, 分别用5%TNBS+50%乙醇溶液(体积比1:1)、5%TNBS+75%乙醇溶液(体积比1:1)、5%TNBS+无水乙醇(体积比1:1)、5%TNBS+50%乙醇溶液(体积比2:1)灌肠。每组6只大鼠, C组造模后第2天和第6天各有1只大鼠死亡, D组造模后第3天有2只大鼠死亡。

Note: *shows the modeling day. The control group was induced by normal saline enema; Groups A to D were model groups: group A was induced by 5% TNBS + 50% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group B was induced by 5% TNBS+75% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group C was induced by 5% TNBS+100% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group D was induced by 5%TNBS+50% ethanol solution (2:1 v/v) enema. There're 6 rats contained in each group, but one of which died on days 2 and 6 in group C and two of which died on day 3 in group D after modeling.

图2 造模后大鼠体质量变化趋势(A)和疾病活动指数评分(B)

Figure 2 Changes in rat body mass (A) and disease activity index (B) after model establishment



注: A图为造模后第7天, B图为造模后第14天, 上图为全结肠整体外观, 下图为结肠造模部位纵剖面。对照组用生理盐水灌肠; A~D组为模型组, 分别用5%TNBS+50%乙醇溶液(体积比1:1)、5%TNBS+75%乙醇溶液(体积比1:1)、5%TNBS+无水乙醇(体积比1:1)、5%TNBS+50%乙醇溶液(体积比2:1)灌肠。

Note: (A) Seven days after model establishment. (B) Fourteen days after model establishment. The upper panel shows the overall appearance of the whole colon and the lower panel shows the longitudinal section of the colon model site. The control group was induced by normal saline enema; Groups A to D were model groups: group A was induced by 5% TNBS + 50% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group B was induced by 5% TNBS+75% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group C was induced by 5% TNBS+100% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group D was induced by 5%TNBS+50% ethanol solution (2:1 v/v) enema.

图3 模型建立后的大鼠结肠组织

Figure 3 Colonic tissue of rats after model establishment

2.4 结肠长度及形态学改变

对各组大鼠结肠长度进行测量, 结果见图4A。对照组大鼠结肠长度为16~18 cm, 各模型组结肠长度总体均较对照组缩短, 其中A、B、C三组与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), D组结肠长度变化与对照组相比无明显差异, A、B、C三组间对比的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

纵向剖开肠管观察肠管内壁, 第7天时模型组见造模部位肠壁出现严重炎症损伤, 坏死组织色黑, 附着于肠腔内表面, 与周围组织分界明显; 第14天时局部肠段仍有增厚, 坏死组织较前部分脱落, 黏膜见一处或多处纵深溃疡, 结肠皱襞紊乱或消失, 非药物作用部位的黏膜肉眼观大致正常。模型组之间比较, 第7天时, B组和C组造模效果相近, 肠壁损伤及肠壁增厚明显, 病变范围大; A组炎症范围及程度较轻; D组大鼠结肠肉眼未见明显损伤。第14天时, B组和C组造模部位肠壁增厚仍较明显; A组也可见肠壁裂隙样溃疡, 肠壁增厚程度较前两组轻; D组肠壁见较大范围凹陷的溃疡面, 但肠壁增厚程度轻于B组和C组。

对各组结肠炎大体损伤程度进行评分, 结果见图4B。模型组CMDI评分均较对照组升高, 其中A组炎症范围、肠壁增厚程度总体较轻, D组内大鼠病变程度

差异较大, A、D两组与对照组相比的CMDI评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$); B组、C组造模处组织损伤及纤维化明显, 与对照组的CMDI评分差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

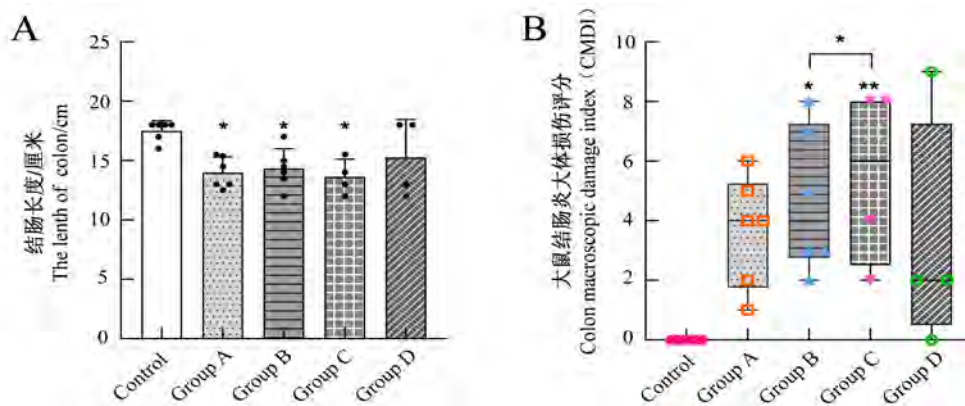
2.5 结肠组织病理学改变

2.5.1 HE 染色

光学显微镜下表现为造模部位黏膜裂隙样溃疡、缺损、坏死或脱落, 隐窝表现为异常缩小、扩大或分支; 炎细胞浸润达肠壁深层, 黏膜下层和浆膜层亦可见炎细胞浸润。与正常对照组相比, 模型组肠壁有不同程度增厚, 以黏膜下层增厚明显, 黏膜肌层和固有肌层也可见增厚, 部分切片可见管壁组织变性的血管。总体而言, A组炎症程度较轻, B组和C组较重, D组炎症程度轻重不一 (图5A)。

2.5.2 Masson 染色

Masson 染色使胶原纤维及黏液蓝染, 细胞质和肌纤维红染, 细胞核呈棕黑色。对照组与模型组对比明显。对照组蓝染区域主要集中在黏膜下层, 黏膜下层为疏松结缔组织, 生理状态下胶原纤维含量丰富, 肌层及浆膜层组织内无明显蓝染。模型组以黏膜下层、肌层弥漫性蓝染和厚度增加最为明显, 部分样本浆膜层亦出现类似表现。炎细胞浸润和胶原沉积呈透壁性, 深达肠壁各层。第7天时, A组、B组和C组黏膜下层、



注: 对照组用生理盐水灌肠; A~D组为模型组, 分别用5%TNBS+50%乙醇溶液 (体积比1:1)、5%TNBS+75%乙醇溶液 (体积比1:1)、5%TNBS+无水乙醇 (体积比1:1)、5%TNBS+50%乙醇溶液 (体积比2:1) 灌肠。每组6只大鼠, C组造模后第2天和第6天各有1只大鼠死亡, D组造模后第3天有2只大鼠死亡。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

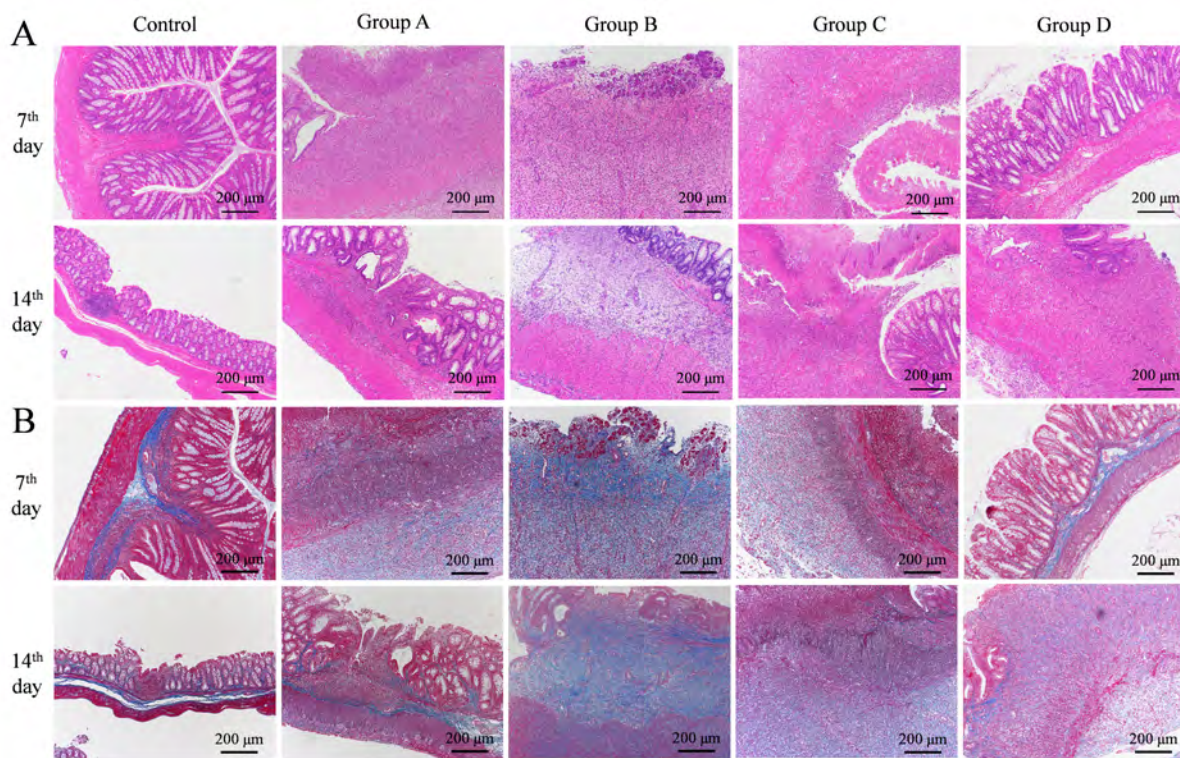
Note: The control group was induced by normal saline enema; Groups A to D were model groups: group A was induced by 5% TNBS + 50% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group B was induced by 5% TNBS+75% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group C was induced by 5% TNBS+100% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group D was induced by 5%TNBS+50% ethanol solution (2:1 v/v) enema. There're 6 rats contained in each group, but one of which died on days 2 and 6 in group C and two of which died on day 3 in group D after modeling. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图4 造模后大鼠结肠长度(A)和结肠炎大体损伤评分(B)

Figure 4 The length of rat colon after model establishment (A) and colon macroscopic damage index (B) in rats after model establishment

肌层及浆膜层增厚, 组织内均出现弥漫性蓝染的胶原沉积, 其中A、B两组黏膜下纤维化最为明显; C组浆膜层也出现明显增厚及胶原沉积; D组与对照组无明显差异。第14天时, A组标本造模部位的黏膜下层和

肌层均出现胶原弥漫性沉积增多; B组和C组病变分别与其第7天样本相似; D组肠壁增厚, 浆膜层胶原弥漫性沉积增多, 肌层纤维化严重, 组织间分界模糊(图5B)。



注: 对照组用生理盐水灌肠; A~D组为模型组, 分别用5%TNBS+50%乙醇溶液(体积比1:1)、5%TNBS+75%乙醇溶液(体积比1:1)、5%TNBS+无水乙醇(体积比1:1)、5%TNBS+50%乙醇溶液(体积比2:1)灌肠。

Note: The control group was induced by normal saline enema; Groups A to D were model groups: group A was induced by 5% TNBS + 50% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group B was induced by 5% TNBS+75% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group C was induced by 5% TNBS+100% ethanol solution (1:1 v/v) enema, group D was induced by 5% TNBS+50% ethanol solution (2:1 v/v) enema.

图5 造模后大鼠结肠HE(A)和Masson(B)染色结果(×100)

Figure 5 HE staining (A) and Masson staining (B) of rats' colons after model establishment (×100)

3 讨论

由于肠纤维化在CD发展过程中难以预测, 仅靠临床人体研究进展困难或滞后, 动物模型可以极大地补充和扩展肠纤维化在CD中的研究, 具有无可替代的重要作用。肠纤维化模型有限, 现已开发出化学诱导型、微生物型、免疫介导型、基因靶向型、自发型、辐射诱导型和手术干预型等七大类^[8-9]。不同类型的疾病模型没有绝对的优劣和固定标准, 它们具有不同的关键特征、潜在机制和优缺点, 允许人们从多个侧面增进对疾病机制的认识并加以互补, 研究人员可根据模型特点, 按照病因学、免疫学、发病机制、药物筛选

等不同研究方向和用途选用恰当的模型^[10-11]。

CD的炎症及纤维化均涉及先天和后天性免疫机制^[2]。尽管目前CD的炎症治疗已取得显著进展, 但抗感染治疗不能减少纤维化, 也尚无抗纤维化药物可用^[8, 12]。在应用广泛的化学诱导型模型中, TNBS因其诱导的结肠炎症与CD疾病特征和免疫机制具有相似性, 故在CD的免疫研究和药物筛选上占据重要地位^[13]。TNBS是一种接触性致敏的化学性半抗原物质, 与乙醇配制成溶液后使用, 由乙醇破坏肠黏膜屏障完整性, 继而使TNBS得以渗入肠壁, 与组织蛋白结合形成抗原后诱发免疫反应, 引起结肠炎症^[13]。

以往认为, CD的肠纤维化是在相对缓慢的慢性炎

症过程中产生^[3,12]。鉴于此, TNBS 诱导的肠纤维化模型多为慢性模型, 通过周期性重复给药方案来建立, 需在 6~8 周甚至更长的周期内定期反复给药^[8,14], 故成模周期长、效率低、鼠龄老化严重、动物死亡或产生耐受等不足限制了其应用。同时, 近期研究显示, CD 的肠纤维化进程既不完全依赖于炎症, 也不一定是一个缓慢的过程^[3], CD 肠纤维化和狭窄可以在短期内发生, 所以急性形成的肠纤维化动物模型对病程研究 also 具有重要意义。本研究证实 TNBS 一次性造模即可导致急性肠纤维化发生, 打破了 TNBS 难以在短期内诱导肠纤维化的以往观点^[9]。

以往文献中有关 TNBS 诱导造模的操作方法通常是向大鼠或小鼠结肠内滴注一定配比的 TNBS 溶液并采用倒置体位保持 1~3 min。但在实践中这种方法失误可能性较大。本课题组反复摸索实验条件, 认为成模的关键在于 TNBS 溶液与肠壁有效接触且作用时间充足, 才能在特定的药物配比下产生预期的效果。故本研究中采用了改良的一次性保留灌肠法, 通过延长药物的有效作用时间, 不仅成功建立了纤维化明显、成模率稳定的急性纤维化模型, 还提高了造模效率。

本研究还通过设立不同药物配比的分组来观察模型效果的差异。尝试不同 TNBS 溶液配比的必要性在于, TNBS 的有效剂量接近动物的致死量, 需要给予亚致死量的 TNBS 来使结肠炎症最大化^[10,15]。造模条件不足, 则出现成模率低、炎症轻、自愈快、同一造模条件下组内模型间异质性大等问题; 造模条件过度, 则导致动物极度虚弱或死亡率升高。本实验中 4 个模型组给药体积相同, A、B、C 组按照 TNBS/乙醇为 1:1 的比例使用了相同剂量的 TNBS 和 50%、75% 和 100% 的乙醇溶液来配制; 结果显示 A、B 两组无动物死亡, A 组总体纤维化评价较 B 组轻, B、C 两组均产生了中重度的肠纤维化, 但 C 组有 33.3% 的死亡率。D 组按照 TNBS/乙醇为 2:1 的比例, 使用了 2 倍剂量的 TNBS 和 50% 的乙醇溶液; 结果显示组内成模效果差异较大, 且同样有 33.3% 的死亡率。以上结果说明高剂量的 TNBS 和高浓度的乙醇均具有较强的致死性, 而乙醇浓度过低会使破坏黏膜屏障的效果降低, 导致模型不稳定, 而 A、B 两组的配比在保留灌肠中使用相对安全有效。对于实际使用而言, 虽然 A、B 两组纤维化程度有轻重差异, 但均具有应用价值: A 组造模条件适用于针对 CD 疾病早期、纤维化总体较轻的研究, B 组适合于 CD 纤维化明显的疾病中晚期研究。

纤维化的特征是富含胶原的细胞外基质, 在通常

含有较少结缔组织的组织中过度蓄积^[3]。富含胶原的细胞外基质及间质样细胞在正常肠组织中主要存在于黏膜下层, 二者在病变局部增生不仅导致黏膜下层过度纤维化, 还导致黏膜肌层及固有肌层增厚, 这被认为是 CD 肠纤维化的组织学特征^[16]。在本组模型中, 造模部位出现肉眼可见的病变, 肠段的肠壁增厚; HE 染色显示炎细胞呈弥漫性浸润于肠壁的各层结构中; Masson 染色显示, TNBS/乙醇诱导的肠纤维化模型的纤维化和增厚主要发生在黏膜下层和肌层, 浆膜层亦可有明显的胶原纤维弥漫性增多。Zidar 等^[17]在人类 CD 样本上观察到的结果与上述结果一致; 该学者认为, CD 的纤维化发病机制可能与其他器官的纤维化相当, 可能是肠壁对其深层结构中存在的炎症产生(过度)反应的结果, 纤维化的部位即是间充质细胞聚集的部位。本模型模拟了 CD“透壁性”炎症和深层组织纤维化的表征, 在组织病理学水平上具有应用于 CD 纤维化研究的参考价值。

使用 TNBS 也存在一定不足, 这是由于 TNBS 诱导模型受多方面因素的影响。(1) 动物对药物反应的异质性: TNBS 能否诱发结肠炎首先与动物有关。TNBS 可用于大鼠、小鼠和兔, 不同种属和品种品系的动物具有不同的易感性和耐药性, 病程进展和持续时间也有差异, 选择对 TNBS 敏感的品种品系能增加模型的成功率。常见的 IBD 模型动物有 SD、Wistar 大鼠和 BALB/c、SJL/J、WT、C57BL/6J 小鼠^[18]。需要注意的是, 某些动物(如 C57BL/6 小鼠)对肠道瘢痕形成抵抗力较强, 可诱发炎症但不一定能引起实质性纤维化^[4,7]。(2) 微生物背景: 微生物在肠道炎症模型建立和最终发生纤维化中发挥关键作用^[3,19], 诱导和维持肠道炎症依赖肠道菌群的存在, “无菌无结肠炎”的观点现已被广泛接受^[11]。动物携带的微生物不同, 可能使同样的浓度方案出现不同轻重的炎症。预实验有益于个体化调整浓度和剂量方案。以上为动物实验中不可避免的差异。(3) 鼠龄: 鼠龄小对 TNBS 敏感性较高, 但由于鼠龄与体质量正相关, 体质量过轻的动物对药物耐受性较差, 容易死亡。禁食 24 h 的大鼠体质量在 200 g 以上时造模后存活率更高。(4) 性别: 动物模型会因性别不同出现差异^[20], 故在同一实验中, 应使用同性别的动物。综上, 相同品种品系、来源、批次、周龄及相同的饲养环境能较好地控制模型条件的均质性, 但即使严格控制了以上所有条件, 仍存在出现造模失败或动物死亡的可能性, 所以适量计划额外数量的动物是有必要的。

另外, TNBS 灌肠的操作技术也可能引起造模失误, 故总结下述细节以供参考。(1) 麻醉前充分促排便。粪便会吸附药液, 影响药物与肠壁接触。禁食 24 h 不能使粪便排空, 而延长禁食时间会使大鼠体质量和耐受性进一步下降, 使死亡率升高。除用棉签刺激肛门外, 也可手指沿腹中线在大鼠下腹部向肛门方向轻轻推压助排。进管时若遇阻涩感说明肠腔仍有粪便存留。(2) 充分的麻醉是顺利完成保留灌肠的保障。(3) 使用圆头侧开口灌肠管可避免锐器导致肠穿孔的风险。(4) 避免用石蜡油润滑灌肠管, 以减少石蜡油黏附于肠壁。蘸取少量灌肠药液即可润滑。(5) 长时间保留灌肠时, 大鼠倒置悬挂不能完全避免药液溢出。灌肠管的插入、药液的刺激性、药液体积、给药速度等因素均可引起大鼠肠道反射使药液被排出, 且溢药量难以估计。退出灌肠管后立即夹闭肛门并保持头低位可有效避免。有研究者尝试在小鼠灌肠后使用肛塞^[21], 但经尝试不适用于大鼠。本实验中使用木夹, 夹闭力度适中, 持续夹闭 30 min 后未观察到对大鼠肛门造成明显损伤。(6) 药物质量是关键。同批次的新鲜 TNBS 和无水乙醇可保证模型效果, 实验中造模时间较长时需避免乙醇挥发的影响。

造模后大鼠体质量减轻、腹泻、肉眼血便及隐血便等与肠炎程度有良好的相关性, 体外观测相关症状即能体现模型的严重程度和进展。造模后 24 h 通过观察体征变化判断造模效果, 再进行随机分组, 可减少模型异质性对研究结果的影响。

综上所述, 本研究建立了一种运用改良一次性保留灌肠技术建立急性肠纤维化模型的方法, 该方法简便、周期短、造模效果稳定、肠壁纤维化表现明显, 动物死亡率低。而且这一方法建立的大鼠模型中肠纤维化的组织学特点与临床上 CD 肠纤维化具有相似性, 因此本研究中的操作方法及药物配比可推广应用于该领域的相关实验研究, 具有良好的参考价值。同时, 模型大鼠急性肠纤维化的分子学机制值得进一步研究探讨。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验均已通过上海中医药大学实验动物伦理委员会审查批准 (PZSHUTCM201225008)。所有实验过程均遵照实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been reviewed and approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Shanghai University of Traditional Chinese

Medicine (Approval Letter No. PZSHUTCM201225008). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations related to experimental animals, including the guidelines such as *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892—2018) and ARRIVE 2.0.

[作者贡献 Author Contribution]

王怡如参与课题设计、实验操作、数据收集整理、统计分析、可视化处理和论文写作与修改; 蒋笑影和董若曦参与实验操作、数据收集; 潘一滨进行实验指导、统计指导、论文理论部分的关键性修改指导; 韩向晖进行实验操作指导、论文实验部分的关键性修改指导; 曹永清负责课题策划、论文修改指导及定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] RIEDER F, BETTENWORTH D, MA C, et al. An expert consensus to standardise definitions, diagnosis and treatment targets for anti-fibrotic stricture therapies in Crohn's disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 48(3):347-357. DOI:10.1111/apt.14853.
- [2] SCHMOYER C J, SAIDMAN J, BOHL J L, et al. The pathogenesis and clinical management of stricturing crohn disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2021, 27(11): 1839-1852. DOI: 10.1093/ibd/izab038.
- [3] ROGLER G, HAUSMANN M. Factors promoting development of fibrosis in Crohn's disease[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2017, 4:96. DOI:10.3389/fmed.2017.00096.
- [4] KUEMMERLE J F. Murine trinitrobenzoic acid-induced colitis as a model of Crohn's disease[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422:243-252. DOI:10.1007/978-1-4939-3603-8_22.
- [5] MORRIS G P, BECK P L, HERRIDGE M S, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(2): 795-803. DOI: 10.1016/S0016-5085(89)80079-4.
- [6] MURANO M, MAEMURA K, HIRATA I, et al. Therapeutic effect of intracolonic administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1):51-58. DOI:10.1046/j.1365-2249.2000.01183.x.
- [7] BUTZNER J D, PARMAR R, BELL C J, et al. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat[J]. *Gut*, 1996, 38(4):568-573. DOI:10.1136/gut.38.4.568.
- [8] RIEDER F, KESSLER S, SANS M, et al. Animal models of intestinal fibrosis: new tools for the understanding of pathogenesis and therapy of human disease[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(7): G786-G801. DOI: 10.1152/ajpgi.00059.2012.
- [9] DE SALVO C, RAY S, PIZARRO T T. Mechanisms and models

- for intestinal fibrosis in IBD[J]. Dig Dis, 2014, 32(Suppl 1):26-34. DOI:10.1159/000367822.
- [10] ELSON C O, SARTOR R B, TENNYSON G S, et al. Experimental models of inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterology, 1995, 109(4):1344-1367. DOI:10.1016/0016-5085(95)90599-5.
- [11] 甘华田. 正确选择炎症性肠病实验研究的动物模型[J]. 胃肠病学, 2007, 12(3):132-134.
GAN H T. Select the correct animal model for experimental study of inflammatory bowel disease[J]. Chin J Gastroenterol, 2007, 12(3):132-134.
- [12] ALFREDSSON J, WICK M J. Mechanism of fibrosis and stricture formation in Crohn's disease[J]. Scand J Immunol, 2020, 92(6): e12990. DOI:10.1111/sji.12990.
- [13] 刘登瑞, 哈小琴, 高明太. 炎症性肠病动物模型的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(1): 77-80. DOI:10.3969/j.issn.1008-7125.2009.09.012.
LIU D R, HA X Q, GAO M T. Progress on animal model of inflammatory bowel disease[J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(1): 77-80. DOI:10.3969/j.issn.1008-7125.2009.09.012.
- [14] LI C, FLYNN R S, GRIDER J R, et al. Increased activation of latent TGF- β 1 by α V β 3 in human Crohn's disease and fibrosis in TNBS colitis can be prevented by cilengitide[J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(13):2829-2839. DOI:10.1097/MIB.0b013e3182a8452e.
- [15] LAWRENCE I C, WU F, LEITE A Z A, et al. A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF- κ B[J]. Gastroenterology, 2003, 125(6):1750-1761. DOI:10.1053/j.gastro.2003.08.027.
- [16] D'ALESSIO S, UNGARO F, NOVELLO D, et al. Revisiting fibrosis in inflammatory bowel disease: the gut thickens[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(3): 169-184. DOI: 10.1038/s41575-021-00543-0.
- [17] ZIDAR N, LANGNER C, JERALA M, et al. Pathology of fibrosis in Crohn's disease-contribution to understanding its pathogenesis[J]. Front Med (Lausanne), 2020, 7: 167. DOI: 10.3389/fmed.2020.00167.
- [18] 方磊, 乔立超, 顾一帆, 等. 克罗恩病小鼠动物模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5):688-694.
FANG L, QIAO L C, GU Y F, et al. Progress on animal model of Crohn's disease in rats and mice[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2020, 28(5):688-694.[知网]
- [19] SARTOR R B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases[J]. Gastroenterology, 2008, 134(2): 577-594. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.059.
- [20] SCHEIFFELE F, FUSS I J. Induction of TNBS colitis in mice[J]. Curr Protoc Immunol, 2002, Chapter 15: Unit 15.19. DOI: 10.1002/0471142735.im1519s49.
- [21] 李球, 丁健. 小鼠灌肠方法的总结与优化[J]. 实验动物科学, 2020, 37(2):70-72. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2020.02.012.
LI Q, DING J. The summary and improvement of mice's Enema method[J]. Lab Animal Sci, 2020, 37(2): 70-72. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2020.02.012.
- (收稿日期:2021-09-02 修回日期:2022-03-20)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁)

《实验动物与比较医学》2022年征订启事

《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817)由上海科学院主管,上海市实验动物学会和上海实验动物研究中心联合主办,是我国实验动物科学及比较医学领域创刊最早的一本专业学术期刊。本刊目前是中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊),并被美国“Chemical Abstracts”、美国“Ulrichsweb”、中国核心期刊数据库、中国科技期刊数据库、中国生物医学文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网和万方医学网等收录,2020年入选中国医师协会发布的中国医药卫生“核心期刊”目录。

本刊兼顾理论与实践、普及与提高,刊登实验动物科学和比较医学领域的研究及应用新成果、新进展、新信息。期刊内容主要涉及人类疾病动物模型、实验动物资源开发与利用、实验动物管理、实验动物福利与伦理、动物实验技术与方法、实验动物医学、比较医学方法研究,以及以实验动物为基础的生物医药各领域基础与应用研究。设置栏目包括专家论坛、研究论著、综述、经验交流、实践与探索、技术与平台、政策与法规、标准与指南、人物、简报、动态与书讯等。读者对象为生物学、医学、药学、动物学和农学等各领域从事实验动物生产、繁育、检测和管理,以及应用实验动物进行比较医学研究的广大科技工作者、教育工作者和医学工作者。欢迎订阅!

本刊为双月刊,大16开,铜版纸,彩色印刷;全年出版6期,每期定价30元/本,全年定价180元/套。读者可在各地邮局订阅,邮发代号为4-789;也可以联系本刊编辑部购买,联系电话:021-50793657。E-mail:bjb50793657@163.com。编辑部地址:上海市浦东新区金科路3577号(邮编201203)。期刊官网地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

《实验动物与比较医学》编辑部



王可洲, 基础兽医学专业博士, 研究员。现任山东第一医科大学 (山东省医学科学院) 实验动物学院 (省实验动物中心) 常务副院长 (常务副主任)、药理学专业硕士研究生指导教师, 主要从事消化道黏膜免疫及分子病理学研究, 以及全省实验动物管理、检测、病理及毒理等方面的研究管理工作。同时兼任中国实验动物学会理事, 中国实验动物学会标准化委员会副主任委员、实验动物与毒理学专业委员会常务委员、实验病理学专业委员会委员、环境控制与节能专业委员会委员, 山东省实验动物学会副理事长兼秘书长, 山东药理学学会药物毒理专业委员会副主任委员, 山东药理学学会中药药理专业委员会副主任委员, 山东省毒理学学会副秘书长, 山东免疫学会兽医免疫学专业委员会副主任委员。主持完成国家自然科学基金项目1项, 山东省自主创新成果转化重大专项2项, 省博士基金1项, 山东省科技攻关计划项目2项, 国家重点研发计划子课题1项, 现主持山东省重点研发计划项目1项。在国内外期刊发表论文40余篇, 主译著作2部, 副主编著作1部, 参编著作4部。

利用 CRISPR/Cas9 技术构建脂多糖结合蛋白基因敲除小鼠

李思迪¹, 付彬¹, 郭中坤¹, 林颖杰^{1,2}, 张振宇¹, 米传靓¹, 王可洲¹

(1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)实验动物学院(省实验动物中心), 济南 250002; 2. 山东第一医科大学附属皮肤病医院(山东省皮肤病医院), 山东省皮肤病性病防治研究所, 济南 250022)

[摘要] **目的** 利用成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) /CRISPR相关蛋白核酸酶9 (CRISPR-associated nuclease 9, Cas9) 基因编辑技术构建稳定遗传的脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide binding protein, *Lbp*) 基因敲除小鼠。**方法** 根据 C57BL/6J 小鼠的 *Lbp* 基因序列特征, 设计 sgRNA 靶点, 删除 *Lbp* 基因 5'-端蛋白编码保守序列并引入移码突变, 使编码 LBP 失活。提取 F0、F1、F2、F3 代小鼠基因组, PCR 鉴定并测序验证 *Lbp* 基因敲除效果, RT-PCR 测序验证 *Lbp* 基因转录水平, 蛋白质印迹法验证 F2 代 LBP 蛋白表达水平。**结果** F0 代获得 5 只杂合子敲除小鼠 (*Lbp*^{+/-})、F1 代获得 3 只 *Lbp*^{+/-} 小鼠, F2 代获得 4 只 *Lbp* 纯合子敲除小鼠 (*Lbp*^{-/-}), F3 代获得 30 只 *Lbp*^{-/-} 小鼠。RT-PCR 测序表明, *Lbp*^{-/-} 小鼠 mRNA 缺失 244 bp 且发生移码突变, 导致翻译提前终止。蛋白质印迹证明 *Lbp*^{-/-} 小鼠肝脏组织中无 LBP 蛋白表达。**结论** 通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建可以稳定遗传的 *Lbp* 基因敲除小鼠, 为后续进一步研究 LBP 的免疫及其生理作用提供基础。

[关键词] 脂多糖结合蛋白; CRISPR/Cas9 技术; 稳定遗传; 基因敲除小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0294-07

Construction of Lipopolysaccharide Binding Protein Knockout Mice Using CRISPR/Cas9 Technology

LI Sidi¹, FU Bin¹, GUO Zhongkun¹, LIN Yingjie^{1,2}, ZHANG Zhenyu¹, MI Chuanliang¹, WANG Kezhou¹

(1. School of Laboratory Animal & Shandong Laboratory Animal Center, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250002, China; 2. Shandong Provincial Hospital for Skin Diseases & Shandong Provincial Institute of Dermatology and Venereology, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250022, China)

Correspondence to: WANG Kezhou (ORCID: 0000-0003-1919-272X), E-mail: wangkezhou_cn@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To construct a stable hereditary lipopolysaccharide binding protein (*Lbp*) gene

[第一作者] 李思迪 (1996—), 女, 硕士研究生, 药理学专业。E-mail: 1322701578@qq.com

[通信作者] 王可洲 (1974—), 男, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事药理毒理学研究。E-mail: wangkezhou_cn@163.com。ORCID: 0000-0003-1919-272X

knockout mice by using clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated nuclease 9 (Cas9) gene editing technology. **Methods** According to the sequence characteristics of *Lbp* gene in C57BL/6J mice, the target of sgRNA was designed, the 5'-end protein coding conserved sequence of *Lbp* gene was deleted and the shift mutation was introduced to inactivate LBP. The genome of F0, F1, F2, F3 generation mice was extracted; PCR was used to identify and sequence *Lbp* knockout; RT-PCR was used to verify *Lbp* gene transcription, and Western blotting was used to verify LBP protein expression in F2 generation. **Results** Five *Lbp*^{-/-} mice from F0 generation, three *Lbp*^{-/-} mice from F1 generation, four *Lbp*^{-/-} mice from F2 generation and thirty *Lbp*^{-/-} mice from F3 generation were obtained. RT-PCR showed that *Lbp*^{-/-} mice mRNA was 244 bp and the translation was stopped early by code-shifting mutation. Western blotting showed that LBP protein was not expressed in the liver of *Lbp*^{-/-} mice. **Conclusion** The *Lbp* gene knockout mice were successfully constructed by CRISPR/Cas9 technique, which will provide a basis for further study of the immune and physiological effects of LBP.

[Key words] Lipopolysaccharide binding protein; CRISPR / cas9 technology; Stable inheritance; Gene knockout mice

脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide binding protein, LBP) 作为一种糖蛋白, 是LBP家族成员之一^[1]。LBP的相对分子质量为60 000, 其蛋白质部分是相对分子质量为50 000的单链多肽^[2-3]。LBP分布广泛, 在啮齿类动物的心、肝、肺等多个器官中均有表达, 其中在肝脏中的表达水平较高。人和动物血清中的LBP主要与脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 结合发挥作用^[4]。LPS又被称为内毒素, 是革兰阴性菌外膜上的主要成分之一, 可以促进炎症发生, 引起机体各种疾病, 严重时甚至会导致机体死亡^[5]。研究表明, LBP与多种疾病的发生发展相关。如Heizhati等^[6]在研究LBP对睡眠结构影响的实验中发现, 血清LBP高浓度与中年男性高血压患者睡眠第一阶段时间延长相关; Pal等^[7]在研究与帕金森病有关的胃肠道炎症性标志物时, 发现LBP是一种与LPS神经毒性相关的胃肠道生物标志物。He等^[8]在研究LPS诱导下LBP编码基因缺失 (*Lbp*^{-/-}) SD大鼠的转录水平及其在脓毒症期间对肝脏的影响时发现, 当核因子κB (nuclear factor kappa-B, NF-κB) 的活性受到抑制时, *Lbp*基因缺失会影响过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators activated receptor, PPAR) 信号通路, 从而影响细菌清除。Li等^[9]研究了牛野生型LBP和突变型LBP (67Ala变Thr) 对LPS诱导牛乳腺上皮细胞 (bovine mammary epithelial cells, BMEC) 炎症反应的影响, 发现5 μg/mL突变型LBP处理BMEC导致的细胞凋亡率高于野生型LBP, 且没有细胞毒性。这些相关研究揭示了LBP与LPS结合可导致炎症反应的发生, 但对其具体作用机制的研究还不够深入。为探索LPS在*Lbp*基因敲除小鼠体内如何诱导炎症反应发生、发展, 本文将外显子2

的全部序列与外显子3的部分序列特异剪切, 建立*Lbp*基因敲除小鼠模型, 为进一步研究LBP蛋白在免疫方面的作用机制和生理作用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级C57BL/6J小鼠和ICR小鼠均购自北京唯尚立德生物科技有限公司 [SCXK (京) 2016-0009], 饲养于山东省实验动物中心 [SYXK (鲁) 2019-0007], 饲料购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 并经⁶⁰Co灭菌。实验动物使用遵循3R原则, 且获得山东省实验动物中心伦理委员会批准 (20181224-01)。

1.2 主要试剂与仪器

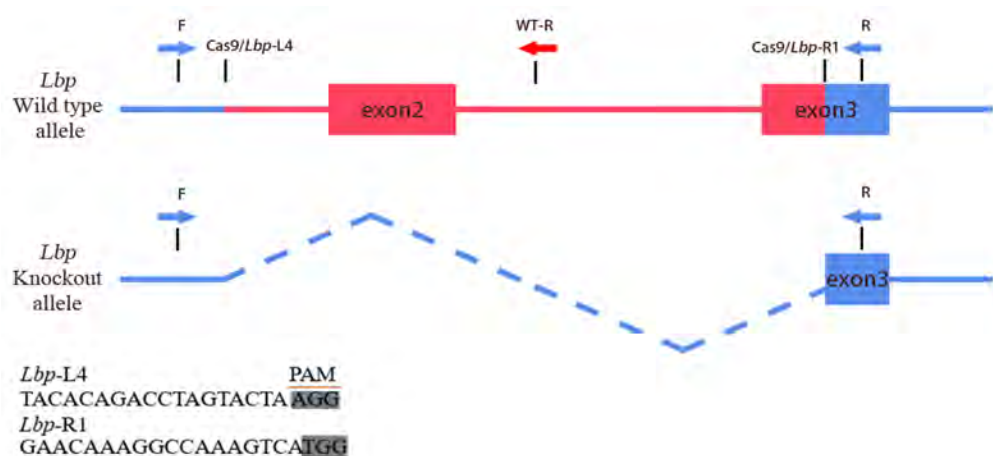
实验所用试剂: Cas9 mRNA、Cas9/gRNA靶点效率检测试剂盒 (VK007) 购自北京唯尚立德生物科技有限公司; Hi Scribe T7 ARCA mRNA试剂盒 (E2065S) 购自美国New England Biolabs公司; 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) (181223)、血促性素 (pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG) (1905152) 购自宁波第二激素厂; pClone007 Blunt Simple VECTOR Kit (OCE20601)、金牌 mix (TSE101)、动物组织/细胞基因组DNA提取试剂盒 (0180331AX) 均购自北京擎科生物科技有限公司; Total RNA Kit II (R6934-02) 购自美国Omega公司; 通用抗体稀释液 (U3635) 购自美国Sigma公司; 高效抗体稀释液 (WA-002) 购自美国Invent Biotechnologies公司; 高效RIPA组织/细胞快速裂解液 (R0010) 购自北京索莱宝科技有限公司; 一抗β-actin (4970S)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase,

HRP) 标记的抗兔 IgG 二抗 (7074S) 均购自 Cell Signaling Technology 公司; 一抗 LBP (PA5-79586) 购自美国 Invitrogen 公司。

实验所用仪器: 拉针仪 (PN-31) 购自日本 Narishige 公司; 高速冷冻离心机 (5424R) 购自德国 Eppendorf 公司; 凝胶成像仪 (Universal Hood II) 购自美国 Bio-Rad 公司; 体视显微镜 (SMZ745T) 购自日本 Nikon 公司; PCR 仪 (Mastercycler X50s) 购自德国 Eppendorf 公司; 显微注射用显微镜 (IX73P1F) 购自日本 Olympus 公司; 电泳仪 (PowerPac™ Basic) 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 *Lbp* 基因 sgRNA 靶点设计及制备

根据数据 NCBI-Gene ID: 16803 及 Ensembl-Gene: *Lbp* ENSMUSG00000016024 可得 *Lbp* 基因的序列结构、保守区域及转录产物等信息, 依据这些信息设计小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 的靶点。对 *Lbp* 基因的序列进行分析后, 本实验选择剪切 2 号外显子全部序列及 3 号外显子部分序列, 图 1 为靶点剪切示意图。靶点设计完成后进行体外转录, 并检测转录产物活性, 筛选出酶切活性较高的 sgRNA 靶点备用。同时参照 Hi Scribe T7 ARCA mRNA 试剂盒说明书制备 Cas9 mRNA。



注: *Lbp* 指脂多糖结合蛋白基因。下方为靶点 *Lbp*-L4 和 *Lbp*-R1 的序列, 序列标灰为原间隔序列临近基序 (PAM)

Note: *Lbp*, lipopolysaccharide binding protein gene. Below is the sequences of *Lbp*-L4 and *Lbp*-R1, and the sequence gray is protospacer adjacent motif (PAM).

图1 *Lbp* 基因敲除示意图

Figure 1 *Lbp* gene knockout diagram

1.4 胚胎移植及其前期准备

准备 4 周龄 C57BL/6J 雌鼠和 8~12 周龄 C57BL/6J 雄鼠。雌鼠腹腔注射 PMSG 0.1 mL (5 U) /只, 48 h 后腹腔注射 hCG 0.1 mL (5U) /只, 18 h 后取卵子备用。取雄鼠附睾, 再从附睾中取出精子。

取出的精子在获能液中获能后, 选取活力较好的精子滴加到经过短暂培养的卵细胞中, 经 3~4 h 体外受精获得受精卵。用 RNA-free 水配制 sgRNA&Cas9 mRNA 混合物 (sgRNA 25 ng/μL, Cas9 mRNA 50 ng/μL), 借助显微注射系统将其注射到受精卵内。将注射 sgRNA&Cas9 mRNA 混合物的受精卵移植到经 12.5 mg/mL 三溴乙醇腹腔注射麻醉后的假孕 ICR 雌鼠输卵管中, 将代孕 ICR 雌鼠置于独立通气笼盒 (individual

ventilated cages, IVC) 中饲养, 待小鼠出生后鉴定基因型。

1.5 *Lbp* 基因敲除小鼠的获得及鉴定

将代孕 ICR 雌鼠生产的仔鼠作为 Founder 并命名为 F0 代, F0 代出生 2 周后, 剪小鼠的脚趾进行编号, 使用基因组提取试剂盒提取小鼠基因组。使用正向引物 (F: CATTTGTTTGGAACCCC) 和反向引物 (R: AAGGGCTGGAATGCTAATG) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: TSE101 mix 15 μL、上游引物 0.6 μL、下游引物 0.6 μL、DNA 1.2 μL、ddH₂O 2.6 μL。反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 98 °C 变性 20 s, 59 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 55 s, 共 35 个循环; 68 °C 延伸 10 min; 10 °C 保持。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 目的条带切胶

回收进行平末端克隆、转化、涂板,并挑单克隆测序验证。结合基因组鉴定和测序结果:只出现770 bp左右的目的条带,且测序显示单链缺失1 457 bp的判断为 $Lbp^{-/-}$;只出现2 153 bp左右的野生型(wild type, WT)条带,且测序显示与WT一致的判断为 $Lbp^{+/+}$;出现770 bp左右的目的条带及2 153 bp左右的WT条带,且770 bp左右目的条带测序显示单链缺失1 457 bp的判断为 $Lbp^{+/-}$ 。F0代后新增引物WT-R(TGCCTGACCCAAGAGTTT),对引物F/R基因鉴定结果进一步验证:F/WT-R出现810 bp左右的WT条带的为 $Lbp^{+/+}$ 或 $Lbp^{+/-}$,未出现任何条带的为 $Lbp^{-/-}$ 。F0代小鼠进行基因组鉴定测序后,选出 $Lbp^{+/-}$ 小鼠与WT小鼠交配,生产的后代为F1代;F1代小鼠基因组鉴定测序后,选出 $Lbp^{+/-}$ 小鼠自交,生产的后代为F2代;F2代小鼠基因组鉴定及测序后,选出 $Lbp^{+/-}$ 小鼠自交,生产的后代为F3代;F3代小鼠继续进行基因组鉴定及测序。

1.6 RT-PCR 测序鉴定 Lbp 基因敲除小鼠的 mRNA 转录

使用Total RNA Kit II试剂盒提取组织总RNA,将总RNA反转录为cDNA,使用正向引物(F: TGCTCTCTACATTGCTGGGG)和反向引物(R: GGAGGTCCACTGAAATGGTG)进行PCR扩增。PCR反应体系:TSE101 mix 10 μ L、上游引物0.4 μ L、下游引物0.4 μ L、cDNA 1 μ L、ddH₂O 3.2 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性3 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,52 $^{\circ}$ C退火50 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5 min;10 $^{\circ}$ C保持。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,目的条带切胶回收后进行平末端克隆、转化、涂板、挑单克隆测序验证。结合PCR结果和测序结果:只出现121 bp左右目的条带,且测序显示单链缺失244 bp的判断为 $Lbp^{-/-}$;只出现365 bp左右WT条带,且测序显示与WT一致的判断为 $Lbp^{+/+}$;出现121 bp左右目的条带及365 bp左右WT条带,且121 bp左右目的条带测序显示单链缺失244 bp的判断为 $Lbp^{+/-}$ 。

1.7 蛋白质印迹法检测 Lbp 基因敲除小鼠的 LBP 蛋白表达

因NCBI及MGI数据提示LBP在肝脏中表达量较高,故本实验选取肝脏组织蛋白进行蛋白质印迹实验。取WT小鼠、 Lbp 敲除杂合子鼠($Lbp^{+/-}$)及 Lbp 敲除纯合子鼠($Lbp^{-/-}$)的肝脏组织,加入预冷的蛋白裂解液与蛋白酶抑制剂,组织破碎后冰上反应30 min,4 $^{\circ}$ C

14 000 $\times g$ 离心5 min,取上清液并用改良型Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。然后加5 $\times$ 蛋白Loading于100 $^{\circ}$ C煮沸10 min,用5%的浓缩胶与8%的分离胶分离蛋白,0.2 A、1.5 V转膜50 min,5%的脱脂奶粉37 $^{\circ}$ C封闭2 h,用预冷的TBST洗3次(每次10 min),加入一抗(β -actin及兔抗小鼠LBP抗体均1:1 000稀释)且4 $^{\circ}$ C孵育过夜,第二天用预冷的TBST洗3次(每次10 min),加入二抗(HRP标记的抗兔 β -actin IgG以1:2 000稀释,HRP标记的抗兔LBP IgG以1:10 000稀释)且37 $^{\circ}$ C孵育2 h,用预冷的TBST洗3次(每次10 min),Immobilon Western化学发光HRP底物(ECL发光试剂)显色后凝胶成像仪成像。

2 结果

2.1 根据 Lbp 基因组结构设计 CRISPR/gRNA 靶点

通过NCBI及Ensembl网站查询可知, Lbp 基因有5个转录产物,其中3个可翻译为蛋白质。对该基因蛋白功能保守区域及基因序列相关信息分析发现,2、3号两个公共外显子位于功能保守区BPI/LBP/CETP N端区,剪切位点位于42~123 aa处,其蛋白编码区的碱基数为244,非3的倍数,剪切后造成移码突变,从而导致蛋白失活。最终我们选择 Lbp -201作为敲除转录模板。在2号外显子一端与3号外显子中间部位设计靶点,靶点序列信息如表1所示。针对上述设计的多个sgRNA靶点,使用sgRNA体外酶切活性检测试剂盒检测其体外酶切活性,根据靶点活性检测结果,本实验选择 Lbp -L4和 Lbp -R1作为首选靶点。

2.2 Lbp 基因敲除鼠的鉴定

显微注射后,共获得65枚生长活性较好的受精卵,将这些受精卵移植到2只假孕的ICR雌鼠中,分娩后共获得17只F0代小鼠,基因组鉴定及测序显示脚趾编号为3、8、10、12、15的小鼠为阳性杂合子鼠(图2A、B),阳性率为22.73%。因F0代3号小鼠770 bp左右目的条带较为清晰,测序显示单链缺失1 457 bp,故将F0代3号小鼠与WT的C57BL/6小鼠交配,共获得6只F1代,基因组鉴定及测序表明3只小鼠为 $Lbp^{+/-}$ 。

F1代 $Lbp^{+/-}$ 鼠间自交共获得12只F2代鼠,基因组鉴定及测序表明4只小鼠为 $Lbp^{-/-}$,5只为 $Lbp^{+/-}$,3只为WT。F3代共获得122只小鼠,其中 $Lbp^{-/-}$ 30只(14 ♀ +16 ♂)、 $Lbp^{+/-}$ 61只(32 ♀ +29 ♂)、WT 31只(14 ♀ +17 ♂),分别占F3代总数的24.59%、50.00%和25.41%,

表1 针对 *Lbp* 基因的 sgRNA 靶点名称及序列

Table 1 Names and sequences of lipopolysaccharide binding protein (*Lbp*) gene-small guide RNA (gRNA) target

靶点名称	靶点序列 (5'→3')
Target name	Target sequence (5'→3')
<i>Lbp</i> -L1	AGTTGCTCCCATCATCCCTGG
<i>Lbp</i> -L2	AGCCTGTGCTGTGACTGCCGG
<i>Lbp</i> -L3	ACCCCTGACAACCCTGCAGG
<i>Lbp</i> -L4	TACACAGACCTAGTACTAAGG
<i>Lbp</i> -L5	TGGTTAGAAAAGTCCACAGG
<i>Lbp</i> -R1	GAACAAAGGCCAAAGTCATGG
<i>Lbp</i> -R2	GCCTTTGTTCTTCTTCCTGG
<i>Lbp</i> -R3	GACAGACAGGTGTAACCCAGG
<i>Lbp</i> -R4	TGTAACCCAGGCCCCAGTGGG
<i>Lbp</i> -R5	AGAAAGAACTCGGGACTCGG

注：在靶点序列中后三位为原间隔临近基序（PAM）序列。

Note: The last three bits in target sequence are protospacer adjacent motif (PAM) sequence.

约为 1 : 2 : 1，符合孟德尔遗传定律且性别比例约为 1 : 1。

2.3 F2代 *Lbp* 基因敲除鼠的 mRNA 和蛋白鉴定

由 *Lbp*^{-/-} 小鼠肝脏组织中 mRNA 的 RT-PCR 测序结果可知，*Lbp*^{-/-} mRNA 缺失 244 bp，符合设计目的（图 3A、B）。序列剪切后 mRNA 发生移码突变，拼接成新的 mRNA，新序列在剪切位点后第 29 位（图 4B 划框

位置）对应 LBP 的第 71 位氨基酸处引入翻译终止信号，导致翻译提前终止，从而无法进行正常翻译。

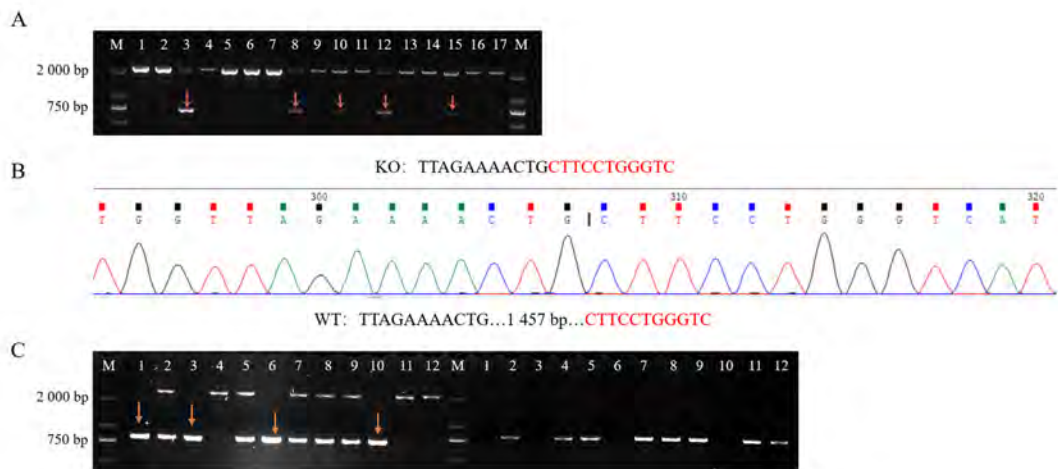
蛋白质印迹实验结果如图 3C 所示，提示 *Lbp*^{-/-} 小鼠肝脏不表达 LBP。

2.4 *Lbp* 基因敲除鼠的表型分析

观察 F0、F1、F2、F3 代 *Lbp*^{-/-}、*Lbp*^{+/-} 小鼠的表型发现，与 WT 相比，其体重、毛色、窝产仔鼠数量、对外界刺激的反应大小、自发活动等均无明显差异。后续腹腔注射不同剂量（10、20、50、100、150 μL）、质量浓度为 1 mg/mL 的 LPS，观察不同时间段 *Lbp*^{-/-}、*Lbp*^{+/-} 及 WT 小鼠的表型，发现 WT 小鼠随注射剂量的增加，冷颤、发抖、腹泻、眼分泌黏液、行动迟缓等症状加重，甚至出现死亡的现象（150 μL 剂量 84 h 死亡）；相同条件下 *Lbp*^{-/-} 小鼠的症状明显轻于 WT 和 *Lbp*^{+/-} 小鼠，且没有出现死亡现象。

3 讨论

LPS 作为一种促炎因子及免疫分子，可以刺激机体发生相应的免疫反应，在天然免疫反应中发挥着重要的作用。但过高的 LPS 会对机体产生不同程度的伤害，导致机体炎性因子过度释放，严重时可引起多器官功能衰竭、败血症休克等，危及生命 [10-11]。LBP 的作用主要与炎性反应有关，其在发挥作用时对炎性反



注：A 为 F0 代鼠基因型鉴定结果（引物为 F/R，M 即 DL2000 Marker，图中箭头所指条带即为突变条带）；B 为 F0 代 3 号雌鼠测序峰图（碱基缺失 1457 bp）；C 为 F2 代鼠基因型鉴定结果（左部分引物为 F/R，右部分引物为 F/WT-R，M 即 DL2000 Marker，图中箭头所指条带即为纯合子小鼠的突变条带）。KO 为敲除，WT 为野生型。

Note: A, the results of genotype identification of F0 generation mice (using F and R primers, M is DL2000 marker, the arrow in the figure points to the mutation strip); B, the sequencing peak map of F0 offspring No.3 female mice (base deletion 1457 bp); C, F2 mice genotype identification results (using F and R primers in left, using F and WT-R primers in right, M is DL2000 marker, the arrow in the figure points to the mutant band of homozygous mice). KO: knockout; WT: wild type.

图2 F0代及F2代 *Lbp* 基因敲除小鼠的基因型鉴定结果

Figure 2 Genotyping results of F0 and F2 lipopolysaccharide binding protein (*Lbp*) gene knockout mice



注: A为 *Lbp* 基因敲除鼠 mRNA 测序峰图; B为 *Lbp* 敲除鼠的 mRNA 序列与 WT 鼠 mRNA 序列对比图 (最右边数字为每行最后一个碱基在整个 *Lbp* mRNA 序列对应的碱基数, 第二行划框位置为 *Lbp*^{-/-} 翻译终止位置); C为蛋白质印迹鉴定 F2 代小鼠肝脏组织中 LBP 表达结果。KO 为敲除, WT 为野生型。HE 为杂合子, HO 为纯合子。

Note: A, mRNA sequencing peak mapping in *Lbp* knockout mice; B, the mRNA sequence of the *Lbp* gene knockout mice was aligned against the WT mice (the rightmost number is the base number corresponding to the last base in each line of *Lbp* mRNA sequence, and the second line is *Lbp*^{-/-} termination); C, western blotting of LBP expression in the liver of F2 generation mice. KO, knockout; WT, wild type. HE, heterozygote; HO, homozygote.

图3 RT-PCR 测序和蛋白质印迹法分别检测 *Lbp* 基因敲除鼠的 mRNA 转录及蛋白表达情况

Figure 3 The expression of mRNA and protein in liver tissues of *Lbp* gene knockout mice detected by RT-PCR sequencing and Western blotting

应有两方面的影响^[12-13]: 一是当 LPS 与 LBP 的炎性位点结合时, 引起相关转录因子及炎性介质产生, 从而起到促炎作用; 二是当 LPS 结合 LBP 的抗炎部位时, 它向靶细胞传递信号, 中和或消除 LPS, 阻止 LPS 发挥作用, 从而起到抗炎作用^[14]。*Lbp*^{-/-} 小鼠在多种实验研究中均有重要作用, 如: Won 等^[15] 以 BALB/c *Lbp*^{-/-} 小鼠为背景, 讨论了低炎性反应下与骨关节炎相关的致病介质; Molinaro 等^[16] 以 MyD88 敲除小鼠为背景, 探讨了 LBP 的表达对小鼠葡萄糖稳态的影响; 宋子晨^[17] 将 SD 大鼠的 *Lbp* 基因敲除, 研究了 LPS 对肝脏线粒体的损害及作用机制。然而, 在 LBP 这些相关研究中, 以 C57BL/6J *Lbp*^{-/-} 小鼠为背景的相关报告较少。LBP 与 LPS 结合的具体作用机制虽有研究, 但造成炎性反应的因素较为复杂, LBP 在抗菌、抗炎等方面的作用机制需要进一步揭示^[18-20]。

Lbp 基因有 5 个转录产物, 其中 *Lbp*-201、*Lbp*-202、*Lbp*-203 可翻译为蛋白质, *Lbp*-202 的序列为 1 ~ 123 aa, *Lbp*-203 的序列起始位点为 194 aa。本次实验在设计靶点时考虑到这 3 个序列的差异, 因此选择对 *Lbp*-201 的序列进行剪切, 剪切位点位于功能保守区的 N 端 (42 ~ 123 aa), 剪切后导致 *Lbp*-201、*Lbp*-202、

Lbp-203 均无法正常翻译, 从而达到 LBP 失活的目的。本次实验利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Lbp* 敲除小鼠, 通过 PCR 鉴定及测序验证, F0 代共获得 5 只 *Lbp*^{+/+} 小鼠, F1 代 3 只 *Lbp*^{+/+}, F2 代 4 只 *Lbp*^{-/-}、5 只 *Lbp*^{+/-}, F3 代 30 只 *Lbp*^{-/-}、61 只 *Lbp*^{+/-}。F2 代 *Lbp*^{-/-} DNA 测序结果显示, 1 457 bp 缺失符合预期, 其 RNA 测序结果显示 244 bp 缺失符合预期。

蛋白质印迹实验结果表明, *Lbp*^{-/-} 小鼠肝脏中 LBP 不表达, F3 代各小鼠基因型和性别数值显示, 本次构建获得的 *Lbp* 敲除小鼠能够稳定遗传, 且符合孟德尔遗传规律。杂合子小鼠继续繁育, 即可获得大量可用于后续实验的纯合子敲除鼠。正常情况下 *Lbp*^{-/-} 的表型与 WT 没有显著差异, 但注射 LPS 后 WT 小鼠的炎性反应显著大于 *Lbp*^{-/-}, 由此推测 *Lbp*^{-/-} 虽无法正常表达 LBP, 但仍会将 LPS 信号传递给靶细胞, 引起机体出现冷颤、发抖等炎性反应, 但是此传递过程缓慢, 引起的炎性反应程度轻。

综上, 本实验利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了以 C57BL/6J 为背景的 *Lbp*^{-/-} 小鼠, 为进一步探索 LBP 对 C57BL/6J 小鼠肠道菌群的影响, 研究 LBP 缺失前后 LPS 对肝、肾等组织免疫调节的影响提供了基础。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究中动物实验遵循3R原则, 已获得山东省实验动物中心伦理批准(20181224-01)。所有实验过程均遵照实验动物相关法律法规条例要求进行。

The animal experiments involved in this study were carried out in accordance with the principle of 3Rs, and had obtained the ethical approval of Shandong Laboratory Animal Center (No. 20181224-01). All experiment protocols were carried out following the relevant laws and regulations on Laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

李思迪负责论文撰写及实验实施; 付彬、郭中坤负责论文撰写及实验实施指导; 林颖杰负责论文实验操作指导; 张振宇、米传靓负责论文相关实验操作; 王可洲负责实验实施指导、论文撰写及修改指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

本文所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] QIAO J, DONG C, WANG X P, et al. One-step production of bioactive human lipopolysaccharide binding protein from LPS-eliminated *E. coli* [J]. Protein Expr Purif, 2019, 157:17-20. DOI:10.1016/j.pep.2019.01.008.
- [2] TSUKAMOTO H, TAKEUCHI S, KUBOTA K, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKKε-IRF3 axis activation[J]. J Biol Chem, 2018, 293(26):10186-10201. DOI:10.1074/jbc.M117.796631.
- [3] ALDAG J, PERSSON T, HARTMANN R K. 2'-fluoro-pyrimidine-modified RNA aptamers specific for lipopolysaccharide binding protein (LBP)[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12):3883. DOI: 10.3390/ijms19123883.
- [4] YU Y, SONG G H. Lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein in lipid metabolism and cardiovascular diseases[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1276:27-35. DOI:10.1007/978-981-15-6082-8_3.
- [5] STASI A, INTINI A, DIVELLA C, et al. Emerging role of lipopolysaccharide binding protein in *Sepsis*-induced acute kidney injury[J]. Nephrol Dial Transplant, 2017, 32(1): 24-31. DOI:10.1093/ndt/gfw250.
- [6] HEIZHATI M, LI N F, SHAO L, et al. Elevated serum concentrations of lipopolysaccharide binding protein might prolong sleep stage one in middle-aged hypertensive males [J]. Sleep Breath, 2017, 21(2):327-332. DOI:10.1007/s11325-016-1415-z.
- [7] PAL G D, SHAIKH M, FORSYTH C B, et al. Abnormal lipopolysaccharide binding protein as marker of gastrointestinal inflammation in Parkinson disease[J]. Front Neurosci, 2015, 9:306. DOI:10.3389/fnins.2015.00306.
- [8] HE Z X, SONG Z C, MENG L L, et al. Lipopolysaccharide-induced transcriptional changes in LBP-deficient rat and its possible implications for liver dysregulation during *Sepsis*[J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 8356645. DOI: 10.1155/2021/8356645.
- [9] LI X J, LI L, SUN Y, et al. Comparison of the effect of recombinant bovine wild and mutant lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-challenged bovine mammary epithelial cells[J]. Cell Stress Chaperones, 2016, 21(3):439-452. DOI:10.1007/s12192-016-0671-y.
- [10] KOPP F, KUPSCH S, SCHROMM A B. Lipopolysaccharide-binding protein is bound and internalized by host cells and colocalizes with LPS in the cytoplasm: implications for a role of LBP in intracellular LPS-signaling[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(4):660-672. DOI:10.1016/j.bbamcr.2016.01.015.
- [11] SEETHALER B, BASRAI M, NEYRINCK A M, et al. Biomarkers for assessment of intestinal permeability in clinical practice [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2021, 321(1): G11-G17. DOI:10.1152/ajpgi.00113.2021.
- [12] LAUGERETTE F, VORS C, ALLIGIER M, et al. Postprandial endotoxin transporters LBP and sCD14 differ in obese vs. overweight and normal weight men during fat-rich meal digestion[J]. Nutrients, 2020, 12(6): 1820. DOI: 10.3390/nu12061820.
- [13] CHALUBINSKA-FENDLER J, FENDLER W, SPYCH M, et al. Lipopolysaccharide-binding protein is efficient in biodosimetry during radiotherapy of lung cancer[J]. Biomed Rep, 2016, 5(4):450-454. DOI:10.3892/br.2016.739.
- [14] CIREGIA F, BAIWIR D, COBRAVILLE G, et al. Glycosylation deficiency of lipopolysaccharide-binding protein and corticosteroid-binding globulin associated with activity and response to treatment for rheumatoid arthritis[J]. J Transl Med, 2020, 18(1):8. DOI:10.1186/s12967-019-02188-9.
- [15] WON Y, YANG J I, PARK S, et al. Lipopolysaccharide binding protein and CD14, cofactors of toll-like receptors, are essential for low-grade inflammation-induced exacerbation of cartilage damage in mouse models of posttraumatic osteoarthritis[J]. Arthritis Rheumatol, 2021, 73(8): 1451-1460. DOI:10.1002/art.41679.
- [16] MOLINARO A, KOH A, WU H, et al. Hepatic expression of lipopolysaccharide-binding protein (Lbp) is induced by the gut microbiota through Myd88 and impairs glucose tolerance in mice independent of obesity[J]. Mol Metab, 2020, 37:100997. DOI:10.1016/j.molmet.2020.100997.
- [17] 宋子晨. LBP通过mTOR信号通路抑制脓毒症大鼠肝细胞线粒体损伤[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2020.
SONG Z C. LBP protected hepatic mitochondria from sepsis-induced damage via mTOR signaling pathway in rat sepsis model[D]. Hefei: Anhu University of Chinese Medicine, 2020.
- [18] WANG M, MA L J, YANG Y, et al. N-3 Polyunsaturated fatty acids for the management of alcoholic liver disease: a critical review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019, 59(sup1): S116-S129. DOI:10.1080/10408398.2018.1544542.
- [19] PERVIN M, KARIM M R, KURAMOCHI M, et al. Macrophage populations and expression of regulatory inflammatory factors in hepatic macrophage-depleted rat livers under lipopolysaccharide (LPS) treatment[J]. Toxicol Pathol, 2018, 46(5):540-552. DOI:10.1177/0192623318776898.
- [20] MOTIANI K K, COLLADO M C, ESKELINEN J J, et al. Exercise training modulates gut microbiota profile and improves endotoxemia[J]. Med Sci Sports Exerc, 2020, 52(1):94-104. DOI: 10.1249/MSS.0000000000002112.

(收稿日期: 2022-01-10 修回日期: 2022-04-27)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 赵宇朋)

放置时间对大鼠血清样本中电解质含量及pH值的影响

冯丁山, 黄业宇, 张晓昕, 吴爱琴, 王 湛, 苏林梁

(海南省疾病预防控制中心, 海口 570203)

[摘要] **目的** 观察SD大鼠血清样本放置时间对血清中 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 含量和pH值检测结果的影响。**方法** 取雌雄SD大鼠各20只, 腹腔静脉采血后分离血清, 样本加盖存放于 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 在0 h、2 h、4 h、6 h、24 h、48 h和120 h共7个时间点分别测定 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 含量和pH值。**结果** K^+ 、 Na^+ 含量各时间点比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与0 h检测结果比较, 放置48 h和120 h的 Cl^- 含量明显升高 ($P<0.05$), 放置48 h和120 h的 Ca^{2+} 含量明显降低 ($P<0.05$), 放置24 h、48 h、120 h的pH值明显升高 ($P<0.05$); 而在6 h内这3个指标均无明显差异 ($P>0.05$)。**结论** SD大鼠血清样本放置时间对血清中 Ca^{2+} 、 Cl^- 、pH检测结果有明显影响, 样本应加盖贮存于 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 并在6 h内完成检测。

[关键词] 血清; 放置时间; K^+ ; Na^+ ; Ca^{2+} ; pH值; SD大鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0301-05

Effects of Storage Time on Electrolyte Content and pH Value in Rat Serum Samples

FENG Dingshan, HUANG Yeyu, ZHANG Xiaoxin, WU Aiqin, WANG Zhan, SU Linliang

(Hainan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Haikou 570203, China)

Correspondence to: FENG Dingshan (ORCID: 0000-0003-0488-7684), E-mail: fds1369@163.com

[ABSTRACT] **Objective** To observe the effects of serum sample placement time on the detection results of K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- and pH in sera of SD rats. **Methods** The sera of 20 male and 20 female SD rats were separated after blood collection from abdominal vein. The samples were covered and stored in a refrigerator at $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$. The electrolyte indexes including K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- and pH in serum were measured at 7 time points of 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h and 120 h after storage. **Results** There were no significant differences in the detection results of K^+ and Na^+ at each time point ($P>0.05$). Compared with the test results at 0 h, the content of Cl^- increased significantly at 48 h and 120 h ($P<0.05$); the content of Ca^{2+} decreased significantly at 48 h and 120 hours, and the pH increased significantly at 24 h, 48 h and 120 h ($P<0.05$). There was no significant difference in these three indexes within 6 h ($P>0.05$). **Conclusion** The storage time of serum samples of SD rats has a significant impact on the detection results of Ca^{2+} , Cl^- and pH in serum. The samples should be covered and stored in a refrigerator at $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ and completed within 6 h after sample preparation.

[Key words] Serum; Placement time; K^+ ; Na^+ ; Ca^{2+} ; pH; Sprague-Dawley rats

电解质是反映实验动物健康状况的重要而敏感的指标, 也是食品安全风险评估中毒理实验的重要评价指标。水和电解质广泛分布在细胞内外, 参与体内许多重要的功能和代谢活动, 对维持正常生命活动起着

非常重要的作用^[1-2]。电解质检测中许多指标是离子浓度, 对外界影响因素比较敏感。现阶段对电解质检测结果影响因素的研究主要还是集中在人体样本方面, 对实验动物样本电解质检测结果影响因素的研究还很

[基金项目] 海南省卫生健康行业科研项目(20A200123)“食品安全评价中大鼠电解质指标检测系统的建立”

[第一作者] 冯丁山(1975—), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 食品毒理、实验动物管理。E-mail: fds1369@163.com。ORCID: 0000-0003-0488-7684

少, 而且也不全面^[3-4]。在动物标本的采集与检测过程中, 经常会把不同时间收到的标本集中检测。有文献显示在人的血清电解质指标检测过程中, 储存时间对其检测结果有明显的影响^[5]。本研究采用广泛应用于药理、毒理、肿瘤等生物科学各个领域的常用实验动物SD大鼠, 通过标准操作规程锁定选用的麻醉剂、采血管、样本的种类和类型, 采集血清样本后进行测定观察, 比较实验动物血清样本不同放置时间对电解质指标检测结果的影响, 从而建立数据库, 为实验动物SD大鼠的电解质指标检测结果判定提供依据。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养条件

SPF级SD大鼠40只, 1月龄, 体质量为60~70 g, 雌雄各半, 由长沙市天勤生物技术有限公司提供[SCXK(湘)2019-0014], 质量合格证号为430726211100268255。检疫观察5 d后适应性饲养。饲料由长沙市天勤生物技术有限公司提供[SCXK(湘)2019-0013], 质量合格证号为4307372100001621。实验动物饲养于海南省疾病预防控制中心[SYXK(琼)2020-0021]。动物实验室环境温度为20~26℃, 12 h昼夜交替光照, 相对湿度为40%~70%。动物实验方案经海南省疾病预防控制中心动物管理委员会审查批准(编号: HICDC/CX18-02)。

1.2 实验仪器

梅州康立K-Lite8G电极式电解质分析仪(包含自动校正)购自梅州康立高科技有限公司, 仪器参加省级临检中心室间比对, 测定前按要求对仪器进行保养和校正。电子计重秤购自常熟市双杰测试仪器厂, 电子天平购自赛多利斯科学仪器(北京)有限公司, 离心机为德国Eppendorf公司。

1.3 试剂

电解质分析仪原配套试剂为梅州康立高科技有限公司产品; 戊巴比妥钠购自北京索莱宝科技有限公司。

1.4 方法

适应性饲养至大鼠体质量约90 g后, 单笼正常喂养28 d, 分别编号称重后采血^[6]。采血前动物禁食16 h, 自由饮水。根据操作规程, 选择含2%戊巴比妥钠的生理盐水(即0.9%氯化钠)溶液进行动物麻醉, 注射剂量为50 mg/kg(麻醉药质量/动物体质量)。选用带分离

胶的5 mL采血管通过腹腔静脉采血, 采血量最少3.5 mL。采血后放置30 min, 以3 000 r/min离心10 min, 尽快分离血清备用。采血环境为空调控温, 温度26℃。血清样本加盖后存放于2~8℃冰箱中, 分别于采样离心后0 h、2 h、4 h、6 h、24 h、48 h和120 h这7个时间点测定K⁺、Na⁺、Ca²⁺和Cl⁻含量共4项电解质指标以及pH值。

1.5 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 h、4 h、6 h、24 h、48 h、120 h分别与0 h比较时采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物生长情况

实验期间, 动物被毛光滑, 活动正常, 摄食、饮水正常, 生长良好。表1显示雌雄大鼠均体质量增长正常, 不同性别之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 提示大鼠生长状况良好, 可用于电解质指标检测。

表1 实验期间大鼠的体质量

Table 1 Weight of rats during the test

实验时间 Test time	(m/g, $\bar{x} \pm s$)	
	大鼠性别 Rat sex	
	雄性 Male (n = 20)	雌性 Female (n = 20)
起始 Initial	95.7±3.5	92.0±4.0
第1周 1 st week	169.0±6.9	152.0±7.1
第2周 2 nd week	246.5±7.4	197.7±13.8
第3周 3 rd week	313.8±12.6	228.1±16.4
第4周 4 th week	350.5±15.0	244.1±18.5

2.2 电解质和pH值测定结果

用Grubbs法剔除了检测数据中1只雌鼠的异常值(即根据Grubbs算法检测的离群值)后, 将不同时间点的检测结果分别与“0 h”时检测结果比较, 雌雄鼠分别统计。表2结果提示雌、雄大鼠电解质指标检测结果经分析随时间变化的趋势一致: 放置48 h后Cl⁻含量随时间推移逐渐升高(除雄鼠120 h略有波动), 放置24 h后Ca²⁺含量随时间推移逐渐降低(雄鼠24 h除

外), 放置 2 h 后 pH 值随时间推移逐渐升高。统计分析结果显示, 与 0 h 检测结果比较, 放置 48 h 和 120 h 的 Cl^- 含量明显升高 ($P < 0.05$), 放置 48 h 和 120 h 的 Ca^{2+} 含量明显降低 ($P < 0.05$), 放置 24、48、120 h 的 pH 明显升高 ($P < 0.05$); 而各时间点之间 K^+ 和 Na^+ 的检测结果差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 并且 6 h 内 Cl^- 和 Ca^{2+} 含量以及 pH 值的检测结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 大鼠血清样本放置不同时间的电解质指标检测结果
Table 2 Results of electrolyte indexes of rat serum samples placed for different storage times

($\bar{x} \pm s$)						
性别	放置时间/h	K^+	Na^+	Cl^-	Ca^{2+}	pH
Rat sex	Placement time /h	$c/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$c/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$c/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	$c/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	
雄性 Male ($n = 20$)	0	5.27±1.97	142.96±1.09	99.21±1.14	2.24±0.13	7.53±0.11
	2	5.33±2.22	143.43±1.35	99.81±1.06	2.28±0.07	7.44±0.07
	4	5.31±2.25	142.93±1.08	99.33±1.37	2.31±0.08	7.49±0.10
	6	5.35±2.25	142.59±1.22	99.75±1.07	2.32±0.08	7.54±0.08
	24	5.37±2.23	143.43±1.39	99.42±1.34	2.23±0.16	7.65±0.07*
	48	5.35±2.21	142.57±0.94	100.30±1.47*	2.02±0.20*	7.68±0.08*
	120	5.34±2.16	142.62±1.23	100.19±1.57*	1.87±0.16*	7.72±0.07*
雌性 Female ($n = 19$)	0	5.26±1.36	143.34±0.92	99.66±1.59	2.10±0.18	7.61±0.08
	2	5.23±1.47	144.29±1.26	99.50±1.58	2.29±0.06	7.26±0.10
	4	5.38±1.43	143.24±1.09	100.12±1.61	2.34±0.07	7.44±0.09
	6	5.19±1.41	142.98±1.14	100.19±2.04	2.32±0.08	7.50±0.09
	24	5.29±1.38	143.88±1.01	99.37±1.84	2.03±0.20	7.66±0.08*
	48	5.33±1.43	142.95±0.92	101.00±1.89*	1.86±0.15*	7.69±0.08*
	120	5.28±1.39	143.62±1.55	102.23±2.23*	1.71±0.09*	7.76±0.08*

注: 与“0 h”时检测结果比较, * $P < 0.05$ 。
Note: Compared with 0 h, * $P < 0.05$.

3 讨论

电解质是人的重要物质, 对维持体液渗透压、体液平衡和酸碱平衡、神经和肌肉的应激性, 以及细胞正常的物质代谢都起到重要的作用, 是保证机体正常代谢和各器官功能正常运行的基本条件^[7]。电解质主要包括 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 和 HCO_3^- 。实验动物血液中的电解质也是评价动物营养和生理健康状况的重要指标。电解质指标检测是一个系统工程, 影响因素很多, 样本质量的好坏直接影响检验结果的准确性^[8], 其中存储温度和放置时间是影响样本存储的两个重要因素。存储温度对电解质指标的影响较小, 且可通过冰箱保存降低其影响效果; 放置时间就成为检测过程中比较容易忽略且容易造成电解质指标检测结果误差的重要因素^[5, 9-10]。本研究根据电解质指标的检测原理和检测过程中比较容易出现的时间段以及观察放置时间对检测结果影响程度的需要, 选择 0 h、2 h、4 h、6 h、24 h、48 h 和 120 h 这 7 个时间点进行研究。

本次研究结果显示大鼠血清与人血清样本放置时间对电解质指标检测结果的影响趋势相似, 但也存在一些差异。实验动物 SD 大鼠的 5 个电解质指标 (K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、pH) 在放置 6 h 内检测结果与“0 h”的结果之间没有明显差异 ($P > 0.05$); 超过 6 h 后 K^+ 、 Na^+ 检测结果与“0 h”比较无明显差异 ($P > 0.05$), 而 Ca^{2+} 、 Cl^- 和 pH 的检测结果与“0 h”比较有明显差异 ($P < 0.05$)。根据以上检测数据的分析结果来看, 大鼠 5 个电解质指标的检测样本应尽早检测, 如不能立即检测, 应加盖贮存于 2~8 °C, 采血后 6 h 内检测结果比较准确。

综上, 人体电解质指标在临床上应用已久, 对其原理及干扰因素也有了较多的研究, 但动物与人的样本存在着很大的差异, 不能简单地把人体样本方面的研究成果直接应用到动物样本的检测中^[11-12]。本课题选择受影响因素较少且动物实验过程利于采集的大鼠血清样本进行电解质检测研究, 通过标化麻醉剂、采血管、样本的种类等各种影响因素^[13-16], 选择容易出

现误差的放置时间进行研究, 主要比较实验动物的血清样本不同放置时间对电解质指标检测结果的影响, 为提高动物实验电解质指标检测结果的准确性提供了参考依据。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过海南省疾病预防控制中心实验动物管理委员会审查批准(编号: HICDC/CX18-02)。所有实验操作均在海南省疾病预防控制中心进行, 符合实验动物相关法律法规条例要求。

All of the animal experiments involved in this study have been reviewed and approved by the Experimental Animal Management Committee of Hainan Provincial Center for Disease Control and Prevention (Approval Letter No. HICDC/CX18-02). All operations were performed in the Hainan Provincial Center for Disease Control and Prevention, following the guidelines such as *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), ARRIVE 2.0, IGP 2012 and IAVE 2010.

[作者贡献 Author Contribution]

冯丁山为课题的申请人, 负责动物实验设计、质量控制、实验动物观察、电解质指标检测、统计等, 为主要贡献者; 黄业宇、张晓昕、吴爱琴、王湛和苏林梁根据课题负责人的安排进行实验动物称重、采血等操作。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 樊林花, 李丹, 刘茂林, 等. 清洁级SD大鼠血液生理及生化指标正常参考值的观察[J]. 中国医疗前沿, 2011, 6(19):33-34, 63. FAN L H, LI D, LIU M L, et al. Investigation on normal reference range and values of blood physiological and biochemical indexes in clean SD rat[J]. Natl Med Front China, 2011, 6(19):33-34, 63.
- [2] 嘉莉莎. 高血脂对间接离子选择电极法检测电解质的影响[J]. 中国当代医药, 2018, 25(3):148-150. DOI:10.3969/j.issn.1674-4721.2018.03.048. JIA L S. Influence of hyperlipidemia on the detection of electrolyte by indirect ion selective electrode[J]. China Mod Med, 2018, 25(3): 148-150. DOI: 10.3969/j. issn. 1674-4721.2018. 03.048.
- [3] 房玉珠, 姚冬明, 顾红兵, 等. 三种检测系统测定血清电解质的方法学对比与评估[J]. 江苏大学学报(医学版), 2008, 18(1):73-76. DOI:10.13312/j.issn.1671-7783.2008.01.010. FANG Y Z, YAO D M, GU H B, et al. Comparative evaluation of the serum electrolyte determination with three different detection systems[J]. J Jiangsu Univ Med Ed, 2008, 18(1): 73-76. DOI:10.13312/j.issn.1671-7783.2008.01.010.
- [4] 吴芳兰, 应燕萍, 吴卓媚. 中心静脉血与动脉血血浆电解质检测比较的临床研究[J]. 护士进修杂志, 2007, 22(6):494-495. DOI:10.16821/j.cnki.hsjx.2007.06.008. WU F L, YING Y P, WU Z M. Clinical observation on comparing results of plasma electrolyte between blood from central vein and artery[J]. J Nurses Train, 2007, 22(6):494-495. DOI:10.16821/j.cnki.hsjx.2007.06.008.
- [5] 董树芬. 血样本放置时间和方式对血清电解质测定的影响[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(8):1007-1008. DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.08.051. DONG S F. Effect of blood sample placement time and method on serum electrolyte determination[J]. Lab Med Clin, 2013, 10(8): 1007-1008. DOI: 10.3969/j. issn. 1672-9455.2013. 08.051.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 28天经口毒性试验: GB 15193.22—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard, 28 day oral toxicity test: GB 15193.22—2014 [S]. Beijing: China Standards Press, 2015.
- [7] 陈坚, 黄嘉骅, 黄仲义. 血样处理方法对体内电解质钾、钠、氯测定结果评价的影响研究[J]. 中国药房, 2012, 23(46):4401-4403. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2012.46.31. CHEN J, HUANG J H, HUANG Z Y. Effect of treatment methods of blood sample on determined results evaluation of K⁺, Na⁺ and Cl⁻ in vivo[J]. China Pharm, 2012, 23(46): 4401-4403. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2012.46.31.
- [8] 王晓刚, 农乐关, 刘旭, 等. 不同类型外周血标本电解质检测结果比较[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(10):1356-1357. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.015. WANG X G, NONG L G, LIU X, et al. Comparison of electrolyte levels between different peripheral blood samples[J]. Int J Lab Med, 2015, 36(10):1356-1357. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.015.
- [9] 李情操, 穆银玉, 卢雯君, 等. 不同真空采血管和标本放置时间对电解质检测结果的影响[J]. 上海预防医学, 2014, 26(3):149-151. DOI:10.19428/j.cnki.sjpm.2014.03.016. LI Q C, MU Y Y, LU W J, et al. Effect of different placed time for vacutainer and specimen on electrolyte test results[J]. Shanghai J Prev Med, 2014, 26(3):149-151. DOI:10.19428/j.cnki.sjpm.2014.03.016.
- [10] 吴琰. 不同存储条件对血样电解质及凝血功能指标检测结果的影响[J]. 医疗装备, 2021, 34(9):57-59. DOI:10.3969/j.issn.1002-2376.2021.09.026. WU Y. Influences of different storage conditions on the detection results of blood electrolyte and coagulation function[J]. Med Equip, 2021, 34(9):57-59. DOI:10.3969/j.issn.1002-2376.2021.09.026.
- [11] 杨利红, 彭小燕, 刘鹏. 样品再定位对电解质分析仪检测结果的影响[J]. 中国城乡企业卫生, 2015, 30(2):115-116. DOI:10.16286/j.1003-5052.2015.02.050. YANG L H, PENG X Y, LIU P. Influence of sample repositioning on the detection results of electrolyte analyzer [J]. Chin J Urban Rural Enterp Hyg, 2015, 30(2):115-116. DOI:10.

- 16286/j.1003-5052.2015.02.050.
- [12] 钟昆华. 血清电解质钾、钠、氯检测方法比较[J]. 四川解剖学杂志, 2014, 22(4):12-14. DOI:10.3969/j.issn.1005-1457.2014.070. ZHONG K H. Comparison on methods analysis of serum electrolyte of K, Na and Cl[J]. Sichuan J Anat, 2014, 22(4):12-14. DOI:10.3969/j.issn.1005-1457.2014.070.
- [13] 张耀东. 血清K⁺、Na⁺、Cl⁻、HCO₃⁻检测结果与放置时间相关性的研究[J]. 中外医疗, 2011, 30(3):38, 40. DOI:10.16662/j.cnki.1674-0742.2011.03.050. ZHANG Y D. Study on the correlation between the detection results of serum K⁺, Na⁺, Cl⁻ and HCO₃⁻ and storage time[J]. China Foreign Med Treat, 2011, 30(3):38, 40. DOI:10.16662/j.cnki.1674-0742.2011.03.050.
- [14] 晏文强, 邓涛, 刘杨, 等. 血液标本不同保存时间及条件对生化检测结果的影响[J]. 湖北医药学院学报, 2017, 36(4):334-337. DOI:10.13819/j.issn.1006-9674.2017.04.011. YAN W Q, DENG T, LIU Y, et al. The effect of preservation time and condition of blood samples on biochemical tests[J]. J Hubei Univ Med, 2017, 36(4):334-337. DOI:10.13819/j.issn.1006-9674.2017.04.011.
- [15] 杨惠元. 3种真空采血管不同时间检测电解质的结果比较[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(19):2893-2894. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.053. YANG H Y. Comparison of electrolyte detection results of three kinds of vacuum blood collection tubes at different time[J]. Int J Lab Med, 2015, 36(19):2893-2894. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.053.
- [16] 李红, 敬海明, 林长缨, 等. 大鼠血清葡萄糖测定分析的影响因素[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5):466-468. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2020.097. LI H, JING H M, LIN C Y, et al. Influence factors of serum glucose measurement and analysis in rats[J]. Lab Animal Comp Med, 2021, 41(5):466-468. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2020.097.
- (收稿日期:2022-03-03 修回日期:2022-05-25)
(本文编辑:张俊彦, 富群华, 周培)

《实验动物与比较医学》出版伦理声明

为加强科研诚信与学术道德建设, 树立良好学风和期刊形象, 建立和维护公平、公正的学术交流生态环境, 《实验动物与比较医学》承诺严格遵守并执行国家有关科研诚信和学术道德的政策与法规。同时, 为促进我国实验动物科学与比较医学科研成果的国际交流与认可, 本刊参照并遵循国际出版伦理委员会(Committee on Publication Ethics, COPE)和国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE)等国际通行的出版伦理规范。因此, 本刊根据目前实际情况, 特做以下声明, 借此规范作者、同行评议专家、期刊编辑等在投稿、审稿、编辑出版全流程中的行为, 并接受学术界和全社会的监督。

1. 所有来稿必须是作者的原创作品, 如文中使用先前发表的资料(如图、表格), 需要提供相关的版权及许可证明。
2. 本刊坚决抵制第三方代写或代投、抄袭(即剽窃)、造假(包括伪造及篡改)等学术不端行为。一经发现, 编辑部立即撤稿, 该文所有作者均会被列入黑名单。
3. 本刊不接受重复发表文章(包括不同语种), 也不允许作者一稿多投(包括同时或错时)。稿件一旦受理, 编辑部将即时处理。若作者有加急需求, 可第一时间联系编辑部寻求帮助。
4. 作者投稿前须确认署名及顺序, 所有作者均须对该文的科研诚信负责。投稿时应登记所有署名作者的基本信息, 并在文末附作者贡献说明及利益冲突声明。
5. 若来稿有过投稿他刊的经历, 本刊鼓励作者第一时间如实说明, 并提供以往的审稿意见及修改情况(包括补充论据或解释说明)。这样的诚信行为有利于该稿在本刊的审稿速度和录用概率。
6. 本刊实行严格的三审制度, 所有来稿均需通过编辑部初审、同行评议专家外审和主编定稿会终审共3个审稿环节, 才决定录用与否。
7. 本刊审稿专家和编辑均需公正、尽责对待所有来稿, 对学术不端行为不姑息、不偏袒, 努力维护期刊学术声誉, 并在文章未发表前不随意公开研究内容, 以保障作者的首发权。
8. 所有来稿中若涉及学术不端行为(《CY/T 174—2019: 学术出版规范 期刊学术不端行为界定》), 均须由作者本人负责。本刊对已发现的学术不端作者, 保留通报其所在单位及同领域期刊社的权利。

《实验动物与比较医学》编辑部



吕龙宝, 正高级工程师, 中国科学院昆明动物研究所实验动物中心主任, 国家非人灵长类实验动物资源库常务副主任。兼任中国实验动物学会第七届理事会常务理事、中国合格评定国家认可委员会实验动物机构认可评审员、中国实验灵长类养殖开发学会副会长、中国实验动物学会福利伦理专业委员会委员、中国科学院实验动物工作委员会委员、中国实验动物学会实验动物标准委员会副主任委员、云南省实验动物学会秘书长、昆明市实验动物行业协会副理事长等。长期从事非人灵长类、树鼩、大鼠、小鼠等实验动物的基础生物学、神经生物学、疾病动物模型、动物实验关键技术、资源保存与利用、树鼩实验动物化研究等工作, 树鼩近交品系成功培育至7代。目前主持国家项目1项、省部级项目4项; 已获授权专利15项, 主持和参与编制国家标准2项、地方标准9项、行业标准5项、团体标4项; 发表中英文论文70余篇; 主持和参与编写《脑外伤比较图谱》、《中国大百科全书》、《中华医学百科全书·实验动物学》、《树鼩基础生物学与疾病模型》等著作12部。曾获中国科学院关键技术人才、云南省技术创新人才。

浅谈微量采血法在药物非临床研究中的应用及3R原则的贯彻

陈佳琦, 吕龙宝, 张飞燕, 李 瑞, 李乙江, 李丽红, 张晓迪

(中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

[摘要] 药物开发中的实验动物福利伦理备受关注, 如何善待动物已成为一个重要课题。微量采血法(blood microsampling)克服了常规大容量采血方法操作复杂、对动物的伤害大、对啮齿类动物的数量要求高等诸多缺点, 在动物福利、科学性和成本方面均有极大优势, 其应用被认为是落实3R原则的重要实践。本文介绍微量采血法的最新研究进展以及在非临床研究中应用的优势和挑战, 以期推动这项新技术在药物开发领域内更广泛应用。

[关键词] 微量采血法; 药物; 非临床; 3R原则

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0306-07

Application of Blood Microsampling and Its Implementation of the 3Rs in Non-clinical Studies of Drugs

CHEN Jiaqi, LÜ Longbao, ZHANG Feiyan, LI Rui, LI Yijiang, LI Lihong, ZHANG Xiaodi

(Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Correspondence to: LÜ Longbao (ORCID:0000-0002-8437-6333), E-mail: lvlongbao@mail.kiz.ac.cn

[ABSTRACT] The welfare and ethics of laboratory animals in drug development has attracted increasing attention, and how to treat animals well has become an important topic. Blood microsampling overcomes several disadvantages of conventional large-volume blood sampling methods, such as complex operation, great harm to animals and high requirement on rodent quantity, and has great advantages in animal welfare, scientificity and cost. Therefore, its application is regarded as an important practice to implement the 3Rs. This article reviewed the latest research progress of blood microsampling, and its advantages and challenges in non-clinical studies in order to promote the wider application of this new technique in this field.

[Key words] Blood microsampling; Drug; Nonclinical; 3Rs principle

[第一作者] 陈佳琦(1987—), 女, 工程师, 硕士, 研究方向: 实验动物的福利伦理。E-mail: chenjiaqi@mail.kiz.ac.cn

[通信作者] 吕龙宝(1974—), 男, 正高级工程师, 硕士, 研究方向为实验动物的标准化与基础生物学。E-mail: lvlongbao@mail.kiz.ac.cn。

ORCID: 0000-0002-8437-6333

药物临床前的评价研究离不开实验动物的条件技术支持。为探究药物的有效性和安全性，为人类临床试验提供参考，需要开展各种体内外实验，包括药效学(pharmacodynamics)、药代动力学(pharmacokinetics)和毒代动力学(toxicokinetic)等评价研究。作为动物离体器官、组织、细胞的“捐献者”，以身试病、以身试药、以身试毒的“受难者”，实验动物为人类及动物的健康作出了巨大贡献和牺牲。随着科学技术的发展与社会文明的进步，如何处理动物实验引发的伦理学问题，已成为药物研发中的一个重要课题。

以替代(replacement)、优化(refinement)和减少(reduction)为核心的3R原则为缓和与化解实验动物伦理矛盾提供了一种可行的解决理论。3R原则是现代科学研究中使用动物的基本原则^[1]。世界范围内，已有上百个国家制定了实验动物福利相关的法律法规及标准，这些法律及标准的核心均是3R原则。欧盟2010年颁布的《保护实验动物2010/63/EU号指令》也明确了3R原则的指导性地位^[2]。我国修订中的《实验动物管理条例》《关于善待实验动物的指导性意见》《实验动物福利伦理审查指南》等法规及标准中也明确了3R原

则。因此，3R原则是实验动物福利伦理的核心体现。

生物分析技术的进步，开启了微量血样分析的时代，也带动了微量采血法的发展。微量采血法是指血液样本不超过50 μL^[3]的采集程序。该技术最大的特征是样品体积的微小化，例如利用Gyrolab免疫实验平台，血液样本的体积可缩小至4 μL^[4]。在药物非临床研究中应用微量采血法，被认为是贯彻3R原则的重要实践，得到了国际人用药品注册技术协调会(International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)的认可^[5]。因此，本文聚焦于药物非临床研究领域，介绍了微量采血法的最新研究进展以及应用的优势和挑战，以期推动该技术更广泛的应用，促进药物研发与动物福利伦理的协调发展。

1 不同微量采血法的最新进展

非临床研究中，有几种常用的微量采血法。实际应用过程中，方法的选择应考虑到每种方法的适用条件和特点(表1)。

表1 非临床研究中几种常见的微量采血法

Table 1 Common approaches for blood microsampling in non-clinical studies

微量采血法 Blood micro-sampling method	基质类型 Matrix type	基质形式 Matrix form	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
DBS	全血	干燥	无需离心, 储存和运输方面要求低	全血数据与血浆数据转化复杂, HCT效应, 需要特殊的提取技术
DPS	血浆	干燥	储存和运输方面要求低	需要特殊的提取技术, 可能需要离心
VAMS	全血、血浆、血清	干燥	储存和运输方面要求低, 样品体积准确	全血数据与血浆数据转化复杂, 血浆、血清制备程序复杂
CMS	全血、血浆、血清	液体	样品体积准确	储存和运输要求高(-20℃), 血浆、血清制备操作不便

注: DBS为干血斑, DPS为干血浆斑, VAMS为固定体积采血, CMS为毛细管微量采血, HCT为血细胞比容。
Note: DBS, dried blood spot; DPS, dried plasma spot; VAMS, volumetric absorptive microsampling; CMS, capillary microsampling; HCT, hematocrit.

1.1 干血斑(dried blood spot, DBS)

DBS, 即将约15 μL的全血样品直接滴到卡纸上, 样品在常温干燥后, 通过使用打孔器获得相同尺寸的滤纸片, 用于样品的提取和分析。DBS因具有微创、简单、易于存储和运输等优点, 五十多年来一直是临床上新生儿遗传代谢性疾病筛查的常用采血方法。

2004年, Beaudette和Bateman^[6]将DBS引入到非临床研究中, 并证明了其在药物发现阶段的潜力后, DBS技术迅速推广。Clark等^[7]开发了一套高灵敏度的通用性分析方法, 可使90%测试化合物的定量下限为1 ng/mL, 并将其应用于小鼠药代动力学研究, 得到了更高质量的药代动力学特征。Barfield等^[8]将DBS首

次用于非临床安全性评价研究,观察到从犬血DBS样品中获得的乙酰氨基酚毒代动力学特征与液态基质血样的相当。

近来,研究人员对DBS的研究热情因其在临床应用中暴露出来的生物分析问题而有所降低。DBS的生物分析问题均与基质为全血有关。具体来说,血细胞比容(hematocrit, HCT)会影响斑点的大小^[9]和目标分析物的提取,进而在定量生物分析中引入系统误差^[10]。这对于遗传均一性良好的实验动物来说,可能并不是太大的问题,但在开发红细胞增多症、贫血、癌症等疾病的药物时,应特别关注。业界在过去几年内也提出了几种解决方案:一是通过基于钾离子浓度或血红蛋白浓度^[11]来估计和校准DBS样品中的HCT;二是改变滤纸材料,如采用疏水纸,减少血纸互动^[12];三是通过滤纸片预打孔^[13]或滤纸片周围增设滤纸环^[14],配备“计量芯片”^[15]等技术收集和存储准确体积的血液。这些技术的改进,大大促进了DBS的应用和发展。

1.2 干血浆斑(dried plasma spot, DPS)

DPS与DBS相似,唯一不同的是滴在卡纸上的是血浆样品。DPS保留了DBS的许多优点(稳定性好,保存和运输方便),同时解决了DBS最大的问题(HCT效应)。缺点是血液需要离心处理,且所需血量要加倍。在一项以犬为模型的研究中, Li等^[16]分析了不同方法(通过移液器或SAFE-TEC)制备的DPS样品中利托那韦的浓度,结果显示与液态血浆中的药物浓度一致,试验样品再分析(incurred sample reanalysis)的结果也表明DPS技术可稳定检测。之后, Li等^[17]的对比研究显示从大鼠尾静脉连续采血制备DPS样品或液态血浆中多乙酰氨基酚及其代谢产物对乙酰氨基酚葡萄糖苷酸(APAP-gluc)和对乙酰氨基酚硫酸结合物(APAP-sulf)的浓度,与从舌下静脉采集的血浆中浓度不相上下,且连续收集毒代动力学样品并未增加动物的应激水平,从而证明了DPS在大鼠毒代动力学研究中的实用性。

相较于其他微量采血技术, DPS在非临床研究中的应用很少,可能与干燥基质的验证负担以及复杂的操作程序有关。该技术最新的改进主要是提高了操作和分析的自动化水平,包括在DBS的基础上增加红细胞过滤膜^[18-20]以简化采样程序,引入微流体过滤和自动计量技术^[21]以快速获得准确体积的血浆,以及开发与现有DBS机器人技术兼容的DPS卡^[19-20]。

1.3 固定体积采血法(volumetric absorptive microsampling, VAMS)

VAMS是采样设备的吸头不完全浸入全血、血浆或血清中,通过毛细作用准确收集特定体积血样的方法。干燥后,血样被运送到生物分析实验室进行处理。VAMS也是DBS的一个改进版,几乎拥有DBS的全部优点,且不用考虑HCT的影响^[22-23],操作更方便,更适合自动化处理。经多项方法验证,已有文献报告证明了VAMS应用于非临床研究的可行性^[24-26]。VAMS的首次实际应用是Denniff等^[27]对乙酰氨基酚的大鼠毒代动力学研究。这项研究中,VAMS样品和液态稀释血样表征的药-时曲线下面积很接近,但药峰浓度之间出现了40%的差异,差异的原因可能与样本量小有关,而与采血方法无关。Thiry等^[28]通过优化生物分析方法,将VAMS成功应用于4种伊曲康唑制剂的生物利用率的评估实验中。

值得一提的是,虽然VAMS在基质选择上比DBS更为灵活,但选择全血为基质时同样面临需要关联全血浓度和血浆浓度的问题,选择其他基质类型,需要利用其他设备来制备血浆或血清,操作较为复杂。

1.4 毛细管微量采血法(capillary microsampling, CMS)

CMS是指用毛细管准确收集固定体积全血、血浆或血清的方法。典型的过程是将毛细管的一端浸入血液中,通过毛细作用准确收集全血,完成后可直接进行低温保存,也可进行稀释、分离血浆或血清等预处理。CMS被视为最有潜力的微量采血法,因为它除了样品量的减少外,与常规采样并没有本质区别^[29-31]。基质的形式未发生改变,避免了进行“干基”和“湿基”之间的桥连研究,且CMS多用于制备应用最广泛的血浆样品,不需要全血和血浆数据之间建立联系的复杂过程。与普通DBS相比,CMS所采样品体积更准确^[30],与基质的生理特性(如HCT)无关。受DBS的启发,人们很快将CMS应用到非临床研究中,评估了小鼠、大鼠和犬等物种的药代动力学、毒代动力学参数,结果证明该技术给出的结果与常规方法有高度可比性^[31-36]。

CMS的缺点是操作复杂,分离血浆或血清时需要切割毛细管,存在扎伤风险。不过有研究者提出了一种带触变性凝胶(离心时在血细胞和血浆间形成物理屏障)的毛细管^[37],这种改良的毛细管省去了切割步骤,提高了操作的便利性和安全性。

2 微量采血法的应用优势

2.1 动物福利方面

微量采血法有助于3R原则中“优化”的实现。由于所需血量很少,根据实验性质可选择动物的疼痛、组织损伤及压力最小且操作更简单的采血部位和程序。常用的采血部位通常是大鼠、小鼠的侧尾静脉、隐静脉,兔的耳缘静脉,犬、猴的头静脉。对于啮齿类动物和兔来说,可大幅缩短采血前通过加热或施加化学刺激物等措施促进血管扩张的时间^[38]。对于所有动物而言,采血过程中不需要或仅需要很小程度的身体限制,保证了人员安全,避免了动物应激。在Powles-Glover等^[38]的研究中,高达62%的大鼠在未进行任何身体限制的情况下被成功实施了微量采血法。常用的采血针规格为23 G,故对动物身体的损伤极小^[39]。另外,由于操作简单方便,采样程序可直接在动物设施中进行。

除了“优化”,微量采血法也有利于“减少”的实现。非临床研究中,对动物数量影响最大的是药代动力学和毒代动力学研究。常规啮齿类动物的药代动力学研究设计,一般在24 h内设6~12个采血时间点,每个时间点每个组至少3只动物,以充分解析药物的动力学性质。由于血容量和采样部位等^[40]的限制,每个组需要24~36只小鼠或者6~9只大鼠^[41-42]。毒代动力学与药代动力学类似,但是给药剂量更高。常规啮齿类动物的安全性评价中,为避免干扰毒理学终点,毒代动力学样本是由主要研究动物之外的卫星动物提供的,这使得动物用量更大。微量采血法结合灵敏的生物分析技术,使血样体积微小化,允许在特定时间内对同一动物同一位点进行多次采样,因此可以大幅减少动物的用量。据报告,与传统采样相比,微量采血法可减少66%~95%^[28, 43-50]的动物用量,当然具体减少幅度取决于研究类型、物种、采血方案等因素。

2.2 科学方面

微量采血法允许重新设计非临床研究方案,以更少的动物获得足够多的优质数据,提高了研究的转化价值。“多”体现在检测指标、药-时曲线数量的增加^[48],以及可获得常规方法难以采集的信息,实现信息的最大化。“优质”来源于两个方面:一是不易造成动物过度的应激反应,对药代动力学或毒代动力学参数的干扰较小,这在肝提取率较高的药物研发中尤为

重要;二是对于啮齿类动物,同一个体的药理学或毒理学效应可直接与药物暴露关联,而且每只啮齿类动物都可能拥有完整的药代动力学/毒代动力学特征,个体间的变异系数降低了。Joyce等^[47]研究了微量采血法所得药代动力学参数的个体间变异系数,结果显示传统采血的高达150%,而微量采血法的不超过30%。

2.3 成本方面

微量采血法可有效节约成本。随着动物用量减少,药物、动物、实验用品和实验人员等直接成本大幅下降,尤其在药物量十分有限的发现阶段和利用昂贵的转基因小鼠^[34, 47]开展的研究中。另一方面,以较低的成本获得充足的优质数据,意味着可以用少量的资源开展实验,从而快速做出决策,这对药物发现项目都相当有利。例如,在药物发现阶段早期,筛选具有合适的生物利用率的化合物,可采用连续微量采血法将6种化合物的药代动力学研究同时进行,这样的动物用量可减少80%,药物材料可减少75%,研究时间减少40%^[47]。当然,成本的节约程度取决于具体的研究类型、物种、采血方案等^[51]。

3 微量采血法的应用挑战

目前,微量采血法的发展面临着两个挑战。一是提升检测微小体积样本中目标分析物的能力。样品体积的减少,制备和运输方式等的改变,可能会给检测的准确度和灵敏度造成不利影响。绝大多数目标分析物与高灵敏度的分析方法(液相色谱-质谱联用法LC-MS/MS和Cyrolab免疫实验平台)兼容,可使用10 μ L或更少的样品就达到足够的灵敏度,而对于药物为肽类和核酸类等具有特殊分子结构和性质的物质,可能还需要开发灵敏度更高的生物分析方法。二是毒理学解释的能力。啮齿类动物的非临床安全性评价中,收集毒代动力学血样可能会对主要研究动物的器官功能和临床病理参数产生影响。有研究人员对此进行了调查,结果表明:在正常及某些特殊生理状态(如妊娠)的啮齿类动物上实施微量采血法,对毒理学评价终点的影响是微乎其微的^[32, 37, 43-45, 52-53]。当然,为支持微量采血法的更广泛应用,还需要继续开展相关的配套研究,如针对具有特殊分子结构和性质的物质,开发灵敏度更高的生物分析方法,进一步探索各种毒性研究中对主要研究动物实施微量采血法收集毒代动力学样本的影响等。

4 小结

在药物非临床研究中,微量采血法能提高动物福利,减少动物的用量,获得足够、优质数据,降低研发成本,是值得推广的一项新技术。但是,未来还需要继续开展该方法及其相关的配套研究,以促进其更广泛的应用,实现科学进步与动物福利伦理进步并行。

[作者贡献 Author Contribution]

陈佳琦负责文献查阅和整理,以及文章撰写与修改;吕龙宝负责文献查阅和整理,并对文章撰写提供指导,以及对全文进行修改;张飞燕参与文章思路及整体内容的讨论和全文修改;李瑞负责临床前研究和生物分析相关知识的讨论和梳理;李乙江、李丽红:提供文章整体内容的修改建议;张晓迪参与文章思路及整体内容的讨论。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] MACARTHUR CLARK J. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement[J]. *Br J Nutr*, 2018, 120(s1): S1-S7. DOI:10.1017/S0007114517002227.
- [2] 莫菲. 比较法视野中的实验动物伦理与安全法治模式: 兼谈实验动物法与中国特色动物保护法体系建设的关系[J]. *法学评论*, 2021, 39(6):148-158. DOI:10.13415/j.cnki.fxpl.2021.06.013.
MO F. Rule of law model of experimental animal ethics and safety in perspective of comparative law[J]. *Law Rev*, 2021, 39(6):148-158. DOI:10.13415/j.cnki.fxpl.2021.06.013.
- [3] CHAPMAN K, CHIVERS S, GLIDDON D, et al. Overcoming the barriers to the uptake of nonclinical microsampling in regulatory safety studies[J]. *Drug Discov Today*, 2014, 19(5): 528-532. DOI:10.1016/j.drudis.2014.01.002.
- [4] JONSSON O, STEFFEN A C, SUNDQUIST V S, et al. Capillary microsampling and analysis of 4- μ l blood, plasma and serum samples to determine human α -synuclein elimination rate in mice[J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(4):449-462. DOI:10.4155/bio.12.337.
- [5] ICH. Questions and answers to ICH s3a: note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies focus on microsampling [EB/OL]. (2017-11-16). https://database.ich.org/sites/default/files/S3A_Q%26As_Q%26As.pdf.
- [6] BEAUDETTE P, BATEMAN K P. Discovery stage pharmacokinetics using dried blood spots[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 809(1):153-158. DOI:10.1016/j.jchromb.2004.06.018.
- [7] CLARK G T, HAYNES J J, BAYLISS M A J, et al. Utilization of DBS within drug discovery: development of a serial microsampling pharmacokinetic study in mice[J]. *Bioanalysis*, 2010, 2(8):1477-1488. DOI:10.4155/bio.10.91.
- [8] BARFIELD M, SPOONER N, LAD R, et al. Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 870(1): 32-37. DOI:10.1016/j.jchromb.2008.05.025.
- [9] COBB Z, DE VRIES R, SPOONER N, et al. In-depth study of homogeneity in DBS using two different techniques: results from the EBF DBS-microsampling consortium[J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(17):2161-2169. DOI:10.4155/bio.13.171.
- [10] FREY B S, DAMON D E, BADU-TAWIAH A K. Emerging trends in paper spray mass spectrometry: Microsampling, storage, direct analysis, and applications[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2020, 39(4):336-370. DOI:10.1002/mas.21601.
- [11] CAPIAU S, WILK L S, AALDERS M C G, et al. A novel, nondestructive, dried blood spot-based hematocrit prediction method using noncontact diffuse reflectance spectroscopy[J]. *Anal Chem*, 2016, 88(12): 6538-6546. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b01321.
- [12] DAMON D E, YIN M Z, ALLEN D M, et al. Dried blood spheroids for dry-state room temperature stabilization of microliter blood samples[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(15): 9353-9358. DOI:10.1021/acs.analchem.8b01962.
- [13] YOUHNOVSKI N, BERGERON A, FURTADO M, et al. Pre-cut dried blood spot (PCDBS): an alternative to dried blood spot (DBS) technique to overcome hematocrit impact[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(19):2951-2958. DOI:10.1002/rcm.5182.
- [14] NAKAHARA T, OTANI N, UENO T, et al. Development of a hematocrit-insensitive device to collect accurate volumes of dried blood spots without specialized skills for measuring clozapine and its metabolites as model analytes[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1087-1088:70-79. DOI:10.1016/j.jchromb.2018.04.019.
- [15] LENK G, SANDKVIST S, POHANKA A, et al. A disposable sampling device to collect volume-measured DBS directly from a fingerprick onto DBS paper[J]. *Bioanalysis*, 2015, 7(16): 2085-2094. DOI:10.4155/bio.15.134.
- [16] LI W K, DOHERTY J, FAVARA S, et al. Evaluation of plasma microsampling for dried plasma spots (DPS) in quantitative LC-MS/MS bioanalysis using ritonavir as a model compound [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 991: 46-52. DOI:10.1016/j.jchromb.2015.03.026.
- [17] LI W K, DUGYALA R, DEVINE P J, et al. Application of tail vein serial microsampling for plasma or dried plasma spots in toxicokinetic assessment in rats using acetaminophen as the model compound[J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34(10): e4917. DOI:10.1002/bmc.4917.
- [18] LI Y Y, HENION J, ABBOTT R, et al. The use of a membrane filtration device to form dried plasma spots for the quantitative determination of guanfacine in whole blood[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012, 26(10):1208-1212. DOI: 10.1002/rcm.6212.
- [19] STURM R, HENION J, ABBOTT R, et al. Novel membrane devices and their potential utility in blood sample collection prior to analysis of dried plasma spots[J]. *Bioanalysis*, 2015, 7(16):1987-2002. DOI:10.4155/bio.15.98.

- [20] RYONA I, HENION J. A book-type dried plasma spot card for automated flow-through elution coupled with online SPE-LC-MS/MS bioanalysis of opioids and stimulants in blood[J]. *Anal Chem*, 2016, 88(22):11229-11237. DOI:10.1021/acs.analchem.6b03691.
- [21] HAUSER J, LENK G, ULLAH S, et al. An autonomous microfluidic device for generating volume-defined dried plasma spots[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(11): 7125-7130. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b00204.
- [22] DENNIFF P, SPOONER N. Volumetric absorptive micro-sampling: a dried sample collection technique for quantitative bioanalysis[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(16):8489-8495. DOI: 10.1021/ac5022562.
- [23] SPOONER N, DENNIFF P, MICHIELSEN L, et al. A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: overcoming the issues associated blood hematocrit[J]. *Bioanalysis*, 2015, 7(6):653-659. DOI:10.4155/bio.14.310.
- [24] THIRY J, EVRARD B, NYS G, et al. Sampling only ten microliters of whole blood for the quantification of poorly soluble drugs: Itraconazole as case study[J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1479:161-168. DOI:10.1016/j.chroma.2016.12.009.
- [25] NYS G, GALLEZ A, KOK M G M, et al. Whole blood microsampling for the quantitation of estetrol without derivatization by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 140: 258-265. DOI:10.1016/j.jpba.2017.02.060.
- [26] KITA K, NORITAKE K, MANO Y. Application of a volumetric absorptive microsampling device to a pharmacokinetic study of tacrolimus in rats: comparison with wet blood and plasma [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2019, 44(1):91-102. DOI: 10.1007/s13318-018-0493-7.
- [27] DENNIFF P, PARRY S, DOPSON W, et al. Quantitative bioanalysis of paracetamol in rats using volumetric absorptive microsampling (VAMS)[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 108:61-69. DOI:10.1016/j.jpba.2015.01.052.
- [28] THIRY J, KOK M G M, COLLARD L, et al. Bioavailability enhancement of itraconazole-based solid dispersions produced by hot melt extrusion in the framework of the Three Rs rule[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 99:1-8. DOI:10.1016/j.ejps.2016.12.001.
- [29] SPREADBOROUGH M J, DAY J, JACKSON-ADDIE K, et al. Bioanalytical implementation of plasma capillary micro-sampling: small hurdles, large gains[J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(12): 1485-1489. DOI:10.4155/bio.13.120.
- [30] VERHAEGHE T, DILLEN L, STIELTJES H, et al. The application of capillary microsampling in GLP toxicology studies[J]. *Bioanalysis*, 2017, 9(7):531-540. DOI:10.4155/bio-2016-0297.
- [31] VERHAEGHE T, DILLEN L, STIELTJES H, et al. Comparison of toxicokinetic parameters of a drug and two metabolites following traditional and capillary microsampling in rat[J]. *Bioanalysis*, 2019, 11(13):1233-1242. DOI:10.4155/bio-2019-0085.
- [32] JONSSON O, PALMA VILLAR R, NILSSON L B, et al. Capillary microsampling of 25 μ l blood for the determination of toxicokinetic parameters in regulatory studies in animals[J]. *Bioanalysis*, 2012, 4(6):661-674. DOI:10.4155/bio.12.25.
- [33] DILLEN L, LOOMANS T, VAN DE PERRE G, et al. Blood microsampling using capillaries for drug-exposure determination in early preclinical studies: a beneficial strategy to reduce blood sample volumes[J]. *Bioanalysis*, 2014, 6(3):293-306. DOI:10.4155/bio.13.286.
- [34] WANG B, WANG L N, BATOG A, et al. Investigation on the effect of capillary microsampling on hematologic and toxicokinetic evaluation in regulatory safety studies in mice [J]. *AAPS J*, 2020, 22(2):55. DOI:10.1208/s12248-020-00438-z.
- [35] RAJE A A, MAHAJAN V, PATHADE V V, et al. Capillary microsampling in mice: effective way to move from sparse sampling to serial sampling in pharmacokinetics profiling[J]. *Xenobiotica*, 2020, 50(6): 663-669. DOI: 10.1080/00498254.2019.1683259.
- [36] ZHU L, WANG Y, JOYCE A, et al. Fit-for-purpose validation of a ligand binding assay for toxicokinetic study using mouse serial sampling[J]. *Pharm Res*, 2019, 36(12):169. DOI:10.1007/s11095-019-2699-z.
- [37] BOWEN C L, LICEA-PEREZ H, KARLINSEY M Z, et al. A novel approach to capillary plasma microsampling for quantitative bioanalysis[J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(9): 1131-1135. DOI: 10.4155/bio.13.58.
- [38] POWLES-GLOVER N, KIRK S, WILKINSON C, et al. Assessment of toxicological effects of blood microsampling in the vehicle dosed adult rat[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2014, 68(3):325-331. DOI:10.1016/j.yrtph.2014.01.001.
- [39] BURNETT J E. Dried blood spot sampling: practical considerations and recommendation for use with preclinical studies [J]. *Bioanalysis*, 2011, 3(10):1099-1107. DOI:10.4155/bio.11.68.
- [40] DIEHL K H, HULL R, MORTON D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes[J]. *J Appl Toxicol*, 2001, 21(1):15-23. DOI:10.1002/jat.727.
- [41] SPARROW S S, ROBINSON S, BOLAM S, et al. Opportunities to minimise animal use in pharmaceutical regulatory general toxicology: a cross-company review[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2011, 61(2):222-229. DOI:10.1016/j.yrtph.2011.08.001.
- [42] HOPPER L D. Automated microsampling technologies and enhancements in the 3Rs[J]. *ILAR J*, 2016, 57(2):166-177. DOI: 10.1093/ilar/ilw020.
- [43] POWLES-GLOVER N, KIRK S, JARDINE L, et al. Assessment of haematological and clinical pathology effects of blood microsampling in suckling and weaned juvenile rats[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2014, 69(3): 425-433. DOI: 10.1016/j.yrtph.2014.05.006.
- [44] NIU X Y, BEEKHUIJZEN M, SCHOONEN W, et al. Effects of capillary microsampling on toxicological endpoints in juvenile rats[J]. *Toxicol Sci*, 2016, 154(1): 69-77. DOI: 10.1093/toxsci/kfw146.
- [45] MITCHARD T, KIRK S, GRANT C, et al. Investigation into the effect of microsampling on mouse fetuses and pregnant mice in the embryofetal development study design[J]. *Reprod Toxicol*, 2017, 67:140-145. DOI:10.1016/j.reprotox.2016.12.006.

- [46] PENG S X, ROCKAFELLOW B A, SKEDZIELEWSKI T M, et al. Improved pharmacokinetic and bioavailability support of drug discovery using serial blood sampling in mice[J]. J Pharm Sci, 2009, 98(5):1877-1884. DOI:10.1002/jps.21533.
- [47] JOYCE A P, WANG M M, LAWRENCE-HENDERSON R, et al. One mouse, one pharmacokinetic profile: quantitative whole blood serial sampling for biotherapeutics[J]. Pharm Res, 2014, 31(7):1823-1833. DOI:10.1007/s11095-013-1286-y.
- [48] KORFMACHER W, FITZGERALD M, LUO Y Y, et al. Capillary microsampling of whole blood for mouse PK studies: an easy route to serial blood sampling[J]. Bioanalysis, 2015, 7(4):449-461. DOI:10.4155/bio.14.275.
- [49] PATEL N J, WICKREMSINHE E, HUI Y H, et al. Evaluation and optimization of blood micro-sampling methods: serial sampling in a cross-over design from an individual mouse[J]. J Pharm Pharm Sci, 2016, 19(4):496-510. DOI:10.18433/J3NK60.
- [50] WAN K X, REIMER M T, METCHKAROVA M P, et al. Toxicokinetic evaluation of atrasentan in mice utilizing serial microsampling: validation and sample analysis in GLP study [J]. Bioanalysis, 2012, 4(11):1351-1361. DOI:10.4155/bio.12.91.
- [51] SPOONER N, ANDERSON K D, SIPLE J, et al. Microsampling: considerations for its use in pharmaceutical drug discovery and development[J]. Bioanalysis, 2019, 11(10):1015-1038. DOI: 10.4155/bio-2019-0041.
- [52] CARON A, LELONG C, BARTELS T, et al. Clinical and anatomic pathology effects of serial blood sampling in rat toxicology studies, using conventional or microsampling methods[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2015, 72(3): 429-439. DOI:10.1016/j.yrtph.2015.05.022.
- [53] HATTORI N, TAKUMI A, SAITO K, et al. Effects of serial cervical or tail blood sampling on toxicity and toxicokinetic evaluation in rats[J]. J Toxicol Sci, 2020, 45(10):599-609. DOI: 10.2131/jts.45.599.
- (收稿日期:2021-10-25 修回日期:2021-11-25)
(本文编辑:张俊彦,富群华,任益凡)

《实验动物与比较医学》被美国乌利希国际期刊指南 (Ulrichsweb) 收录

2022年8月,《实验动物与比较医学》(*Laboratory Animal and Comparative Medicine*) (ISSN 1671-5817, CN 31-1954/Q) 被美国乌利希国际期刊指南 (Ulrichsweb Global Serials Directory) 收录,标志着本刊在学术论文水平和期刊标准化、规范化方面得到了国际认可,对今后进一步提升期刊学术水平、扩大国际显示度及影响力具有积极的作用。

乌利希国际期刊指南是国际权威期刊书目数据库,由美国著名的书目文献出版公司 R. R. Bowker 于 1932 年创办,原称为“期刊指南”(Periodicals Directory),1943 年以纽约公共图书馆期刊部门负责人卡罗琳·乌尔里希 (Carolyn Ulrich) 的名字命名,现隶属于国际著名信息服务商 ProQuest 公司。它是一部可反映世界各国期刊和报纸出版信息的综合性指南,目前已收录 200 多个国家的 30 多万种期刊,涉及学科 950 余个,是目前世界上规模最大、搜罗最全的国际期刊检索工具之一。乌利希数据库的官方网址为 <http://ulrichsweb.serialssolutions.com/>。

《实验动物与比较医学》创刊于 1981 年,是国内实验动物科技领域的第一本专业性学术期刊,刊登国内外实验动物和比较医学领域科技研究及应用的新成果、新进展和新信息,内容主要涉及人类疾病动物模型、动物实验技术与方法、实验动物资源开发与管理、动物生物学、实验动物医学、人类与动物比较医学等。衷心感谢广大作者、读者、审者及编者对本刊的热情关注和大力支持,诚挚欢迎国内外实验动物与比较医学专家、学者、科研人员、硕博硕士研究生等继续向本刊投递高质量稿件,为《实验动物与比较医学》向更高水平、更高质量发展共同努力!

《实验动物与比较医学》编辑部

皮肤致敏性替代试验方法的研究进展

黄静怡^{1,2}, 李培宁², 刘香梅², 刘忠华¹, 黄宇锋²

(1. 华南农业大学兽医学院, 广州 510630; 2. 广州质量监督检测研究院, 广州 511447)

[摘要] 过敏性接触性皮炎是皮肤反复接触某种物质后所引起的Ⅳ型超敏反应, 也是常见的公共健康问题。传统皮肤致敏性测试以豚鼠最大值试验、封闭斑贴等动物实验为主。近年来, 随着动物伦理不断被人们重视以及科学技术的发展, 皮肤致敏性替代方法相继出现。根据原理不同, 这些替代方法分为体内替代法、几类基于有害结局通路的体外替代法、基因组过敏原快速检测法等。本文将对这些皮肤致敏性替代方法的研究进展以及几类基于有害结局通路的整合测试与评估方法进行综述。

[关键词] 皮肤致敏性试验; 过敏性接触性皮炎; 替代方法

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0313-09

Research Progress on Alternative Methods of Skin Sensitization Test

HUANG Jingyi^{1,2}, LI Peining², LIU Xiangmei², LIU Zhonghua¹, HUANG Yufeng²

(1. College of Veterinary Medicine of South China Agricultural University, Guangzhou 510630, China;

2. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China)

Correspondence to: HUANG Yufeng (ORCID: 0000-0002-0987-2636), E-mail: 78649403@qq.com

[ABSTRACT] Allergic contact dermatitis is a type IV hypersensitivity reaction caused by repeated skin exposure to a substance and is a common public health problem. Traditional skin sensitization tests are based on animal experiments such as guinea pig maximum test and closed patch. In recent years, with the increasing attention of animal ethics and the development of science and technology, alternative methods of skin sensitization test have emerged. According to different principles, these alternative methods are divided into *in vivo* alternative methods, several *in vitro* alternative methods based on harmful outcome pathways, and genomic allergen rapid test, etc. In this paper, we reviewed the progress of these alternative methods of skin sensitization test, and several integrated testing and evaluation methods based on adverse outcome pathways.

[Key words] Skin sensitization experiment; Allergic contact dermatitis; Alternative method

过敏性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 是由低分子量化合物 (low molecular weight, LMW) 与存在于皮肤中的内源蛋白结合形成的Ⅳ型超敏反应。ACD的临床症状通常表现为皮肤瘙痒、红斑及丘疹等。LMW普遍存在于化学品、药品以及个人护理用品中, LMW与皮肤的频繁接触会导致ACD发病率增加。研究表明, 在欧洲特定人群中, ACD的患病率高达18.6%, 占西方世界工作人口中所有职业性皮肤病的85%~90%^[1]。因此, ACD已经成为一种职业性皮肤病, 在一定程度上影响了人类的正常生活和工作。

传统的皮肤致敏性测试通常采用的是动物实验, 譬如豚鼠最大值试验 (guinea pig maximization test, GPMT)、Buehler封闭斑贴试验 (Buehler test, BT) 等。然而, 随着近年来毒理检测技术的进步、研究方法的更新、动物伦理被越来越多的国家重视和关注, 皮肤致敏性测试替代方法的开发就显得尤为重要。因此, 本文结合国内外研究进展, 就体内替代致敏方法、基于有害结局通路 (adverse outcome pathway, AOP) 机制的体外替代方法以及基因组过敏原快速检测法 (genomic allergen rapid detection, GARD) 等目前几类

[第一作者] 黄静怡(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 毒理安全性评价。E-mail: 844353890@qq.com

[通信作者] 黄宇锋(1979—), 男, 高级工程师, 研究方向: 化妆品及食品安全性评价。E-mail: 78649403@qq.com。ORCID: 0000-0002-0987-2636

皮肤致敏性测试替代方法进行综述。

1 体内替代方法

皮肤致敏体内替代方法是指使用小鼠替代豚鼠作为实验动物主体,建立小鼠局部淋巴结测试法(local lymph node assay, LLNA)。根据LLNA法的优点和局限性,研究人员开发了基于LLNA法的改良方法,即5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)-酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)-LLNA法和LLNA-内源性三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)检测法。

1.1 基础的LLNA法

LLNA是鉴别化学物质是否具有致敏潜力的替代测试方法之一,已被欧盟67/548/EEC指令认可。LLNA是以致敏物能诱导皮肤接触部位引流淋巴结中的T细胞活化增殖为基础,将被放射性物质标记的核酸(如 ^3H -甲基胸腺嘧啶脱氧核苷、 ^{125}I -碘脱氧尿嘧啶核苷等)由尾静脉注入小鼠体内^[2],5 h后取诱导部位淋巴结制备单细胞悬液,测定T细胞增殖情况。

该方法的检测指标有两个。一是刺激指数(stimulation index, SI),即受试组与对照组增殖T细胞的比值,该指标用于判断受试物是否为致敏剂。当 $\text{SI} \geq 3$ 时,受试物被判定为致敏剂^[3]。另一个检测指标是 $\text{SI}=3$ 时的有效化学品浓度(effective chemical 3, EC3),该值可以通过剂量-反应数据的线性差值得出^[4],用于受试物的致敏能力分级。根据欧洲化学品生态毒理学和毒理学中心公布的数据,当 $\text{EC3} < 0.1\%$ 时,受试物判定为极强致敏剂;当 EC3 在 $0.1\% \sim 1\%$ 时,受试物为强致敏剂; EC3 在 $1\% \sim 10\%$ 时,受试物为中度致敏剂; $\text{EC3} \geq 10\%$,则为弱致敏剂^[5]。

LLNA法具有周期短、实验动物使用量少、判定方法更为客观准确等优点,同时不需使用弗氏佐剂来刺激受试动物,符合3R(reduction、replacement、refinement)原则。LLNA法已于2010年被世界经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)纳入皮肤致敏检测方法指南^[6]。值得一提的是,LLNA法易被受试物的溶解性所限制。因水溶性大分子物质很难在小鼠的皮肤上涂抹均匀并被吸收^[7],因此该方法只适用于脂溶性的小分子物质。

1.2 已通过验证的LLNA改良法

1.2.1 BrdU-ELISA-LLNA法

2003年,Takeyoshi等^[8]利用示踪剂代替放射性

标志物建立了LLNA的改良方法,即BrdU-ELISA-LLNA(又称LLNA:BrdU-ELISA)。其在原理和检测指标方面,与LLNA法基本一致,但在核酸标志物方面改用与胸腺嘧啶结构相似的BrdU。即在末次染毒24 h后腹腔注射BrdU,处死小鼠取淋巴结,称重后制备细胞悬液,然后采用ELISA法检测增殖细胞中BrdU的标记数。

该方法综合了LLNA试验周期短、动物用量少、判定方法客观的优点,还解决了LLNA法使用放射性标记物的安全性问题。在OECD指南中,该方法推荐使用CBA小鼠,但这种品系的小鼠在我国供应数量较少,且价格偏贵。因此,有学者通过对比分析BALB/c和CBA两种品系小鼠用该方法试验的结果,证实可以使用BALB/c小鼠替代CBA小鼠进行LLNA:BrdU-ELISA法检测^[9]。除此之外,该法腹腔注射BrdU时会使小鼠痛苦,不符合动物福利。基于此,有研究团队改进了LLNA:BrdU-ELISA法,先给小鼠耳部染毒后处死,取耳后引流淋巴结,在含有BrdU的培养基中体外培养淋巴细胞24 h后,再对淋巴细胞中的BrdU含量进行测定^[10]。

1.2.2 LLNA-ATP检测法

LLNA-ATP检测法(又称LLNA:DA)是基于ATP水平与活细胞数呈正相关,并且可与荧光素-荧光素酶复合物作用产生可测定光这一原理,因此可以通过生物荧光法检测细胞中ATP的含量来确定受试物的致敏性^[11]。该法选用的测试指标包括ATP发光值、淋巴结质量、增殖的淋巴细胞数,以及SI和EC值^[12]。

该方法具有LLNA:BrdU-ELISA法的全部优点,但因将ATP数量作为测试指标,有着明显的局限性。(1)时间限制:动物死后体内ATP数量会逐渐下降,若长时间不进行测定,测试结果会出现偏差。因此,OECD指南明确规定待测样本从取材到检测的时间应在20 min以内^[13]。(2)假阳性:为解决这个问题,有研究人员提出,可以同时开展耳重、耳厚差等活组织检测以及红斑评级,以排除受试物的刺激性对结果的影响^[14]。(3)该法不适用于影响ATP生成和稳定性的受试物,例如ATP抑制剂等^[14]。

2 基于AOP的体外替代方法

2007年,由美国国家科学研究委员会首次提出AOP,用以描述皮肤敏化从分子起始事件到系统敏化效应产生过程中的一系列反应事件。2012年,OECD

提出将皮肤变态反应的体外研究方法整合, 建立基于AOP原理的皮肤致敏预测方法^[15-16], 包括直接反应肽试验 (direct peptide reactivity assay, DPRA)、氨基酸衍生物反应性测定 (amino acid derivative reactivity assay, ADRA)、KeratinoSensTM/LuSens 试验和人细胞系活化试验 (human cell line activation test, h-CLAT)。

皮肤致敏 AOP 机制由 4 个要素组成: (1) 起始事件 (molecular initiating event, MIE) 是抗原和皮肤蛋白结合形成免疫复合物半抗原; (2) 角质细胞反应是半抗原被角质细胞摄取, 发生炎症反应, 产生的炎症因子激活树突状细胞 (dendritic cells, DCs); (3) DCs 反应是 DCs 被激活后摄取呈递抗原, 表面特异性标志物表达上升, 释放的细胞因子激活 T 细胞; (4) 组织/器官层次事件是 DCs 提呈相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 后迁移至淋巴结, T 细胞识别 MHC 形成特异性 T 细胞, 当机体再次接触同种抗原时发生 ACD。与毒性反应不同, AOP 最关键的特征是以可检测到的 4 种分子事件的定向关系为研究要点^[17]。

2.1 DPRA 化学法

Gerberick 团队于 2004 年开发了 DPRA 法, 该方法模拟致敏物质与皮肤蛋白共价结合形成半抗原 (即 AOP 通路中起始事件) 的过程。采用化学方法将致敏原与谷胱甘肽以及半胱氨酸和赖氨酸多肽的肽模板反应结合, 再使用高效液相色谱-紫外线检测 (high performance liquid chromatography-ultraviolet, HPLC-UV) 测定两种结合抗原的消耗情况, 以此来判定受试物致敏能力^[18]。其检测结果与 LLNA 法的一致性可达到 89%。该方法已于 2015 年被 OECD 收录至 TG 442C 指南^[19]。

目前该法主要用于单一化学品或化妆品原料的致敏测定, 未能应用到化妆品成品检测。2009 年, Gerberick 等^[20]对 DPRA 法进行了改良, 在反应体系中加入辣根过氧化物酶-过氧化氢, 使该方法拥有检测抗原前体物的能力, 扩大了检测范围, 为拓展 DPRA 法的应用范围打下了强有力的基础。

为了提高检测通量、灵敏度及准确性, Wei 等^[21]开发了一种基于 384 孔板的快速固相萃取 (solid phase extraction, SPE)-串联质谱 (tandem mass spectrometry, MS)-DPRA 自动化快速检测法。与 HPLC-UV 法相比, SPE-MS 通量从每份样品的 16 min 缩短到 10 s, 底物使用量也从 100 mmol/L 减少到 5 μ mol/L, 大大提高了检测效率。

2.2 ADRA 法

化学方法代替动物实验进行皮肤致敏测试的局限性在于, HPLC-UV 分析中待测化学品与亲核试剂的共同洗脱, 导致无法准确量化未反应的亲核试剂以及预测待测物的致敏能力^[22]。为解决这个问题, Fujita 等^[23]开发并验证了一种新型的皮肤致敏替代方法, 即 ADRA 法。

该方法的原理与 DPRA 法类似, 同样模拟 AOP 通路中的起始事件, 只是在使用 HPLC-UV 定量时改为 281 nm 进行, 提高了基线稳定性。该方法中使用的亲核试剂是由 Fujita 团队制定合成的两种氨基酸衍生物乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC) 和乙酰赖氨酸 (N- α -acetyl-L-lysine, NAL)^[24]。ADRA 法测试终点为 NAC/NAL 的反应性, 即根据待测物中未反应的 NAC/NAL 浓度相对于对照组平均浓度下降值而计算出的消耗百分比。

2019 年, Fujita 团队通过改用荧光检测开发了新的 ADRA-荧光检测法 (ADRA-fluorescence detection, ADRA-FL)^[25]。相对于传统 ADRA 法使用 HPLC-UV 和高效液相色谱-荧光法 (high performance liquid chromatography-fluorescence, HPLC-FL), ADRA-FL 测量 NAC 和 NAL 时拥有更高的灵敏度和信噪比 (指电子设备或者电子系统中信号与噪声的比例)。研究人员对化妆品常用植物提取物溶液 (芦荟、甘草、绿茶) 分析的结果显示, 该方法存在预测多成分物质致敏风险的可能性, 但因受试物中含有免疫抑制剂, 故无法评估免疫抑制效应。

2.3 KeratinoSensTM/LuSens 试验

半抗原由抗原和皮肤蛋白结合生成, 当其接触表皮角质形成细胞后, 可引起氧化应激反应 (即关键事件 2)。在机体发生氧化应激时, 抗氧化应激感受器的主要调控因子 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 与核转录因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2) 相互作用, 对改善氧化应激至关重要^[26]。

基于上述原理, 研究人员开发了两种来源于角质细胞水平的测试方法 KeratinoSensTM和 LuSens 试验。这两种检测方法的区别在于抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 不同: KeratinoSensTM 试验的 ARE 来源于人的 AKR1C2 (Aldo-keto reductase family 1 member C2) 基因, 而后者来自大鼠的 NQO1 (NAD (P)H quinone dehydrogenase 1) 基因^[27]。两种基因均

含荧光素酶, 因此都以荧光素酶的诱导倍数 (fold of induction, FI) 作为评价指标^[27], 当 FI > 1.5 时可判断受试物为致敏物。

有研究表明, 与人类皮肤致敏数据以及 LLNA 测试结果相比, KeratinoSens™ 试验的准确率分别为 94% 和 93%, 而 LuSens 试验稍低, 分别为 83% 和 74%^[28]。目前, KeratinoSens™ 试验已被纳入 OECD 指南 442D 中^[28], 而 LuSens 试验还处于验证阶段。

2.4 h-CLAT 法

h-CLAT 法的开发基于 AOP 通路的关键事件 3 和 4 (即 DCs 事件和组织/器官层次事件)。将急性单核细胞白血病 THP-1 细胞暴露于无细胞毒性的受试物中 24 h, 终止暴露后收集细胞, 利用流式细胞仪测定细胞表面表达物 CD86 和 CD54 的相对荧光强度变化^[29], 以此为依据判定待测物是否具有致敏性。

该测试方法需要重复 3 次试验, 且保证 2 次试验结果均为有效, 才能进行下一步判定。将结果与阴性对照组进行比对, 如 CD86 > 150% 且 CD54 > 200%, 则表明 THP-1 细胞被活化, 判定受试物为致敏剂。研究表明, h-CLAT 法与 LLNA 法的试验结果一致性为 84%^[30]。2018 年, 该方法被 OECD 纳入毒理学测试指南^[31]。

袁园等^[32]通过对 h-CLAT 法验证的 10 种物质分别采用 CCK-8 细胞增殖/毒性检测法和流式细胞仪法进行检测, 结果显示两种方法的组内相关系数为 0.993, 一致性很高。此外, 研究人员还发现将 IL-8 与 CD86 结合作为检测终点也能够对致敏物进行判定^[33]。同时, 该方法也可以用于筛选致敏生物标志物。Karkhanis 团队于 2021 年利用强致敏剂 1-氯-2,4-二硝基苯 (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, DNCB)、中等强度致敏剂二氯化镍 (NiCl₂) 以及阴性对照二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 处理 THP-1 细胞, 通过 RNA 测序确定了 5 种新型的 h-CLAT 标志物: CD109、CD181、CD183、CLEC5A 和 CD354^[34]。

3 基于基因组学的过敏原快速检测法

随着基因组学技术的发展以及对皮肤变态反应发生机制的研究不断深入, 研究人员将目光投向了基因组学方面。2011 年, Johansson 等^[35]发现了一种细胞系——人类急性髓细胞白血病细胞系 MUTZ-3, 其在转录和诱导特异性 T 细胞产生应答等方面与 DCs 相似。

MUTZ-3 分化后其免疫相关表型类似于未成熟的 DCs, 表达 CD1d、MHC I 和 MHC II 呈递抗原, 并诱导特异性 T 细胞增殖。

变态反应产生的生物标志物能够对致敏物和非致敏物进行识别, 并出现不同转录结果。因此, 这些不同致敏剂的有效预测指标统称为 GARD 预测信号 (GARD predictive signals, GPS)。GPS 包括与先天免疫反应信号、DCs 成熟、应激反应和外来物质识别相关的基因, 有着完整的能够识别和监测皮肤致敏中各种关键事件的能力。基于这一原理, 研究人员建立了一种基于 MUTZ-3 细胞的 GARD 法。该方法的判断终点是根据 GPS 的转录水平, 使用支持向量机 (support vector machine, SVM) 赋予待测样本一个决定值 (decision value, DC)。DC > 0, 为致敏剂; DC ≤ 0, 则为非致敏剂^[36]。

GARD 是一种基于基因组读数、新型且灵活的体外致敏评估法, 该方法可测试 200 个与致敏相关的基因转录组的变化。这些基因的生物标志物特征包括参与氧化应激、DCs 成熟以及细胞因子反应的转录本^[37]。体内完整基因组所带来的巨大的多功能性, 为进一步发展和拓宽皮肤致敏分析方法提供了条件, 也为进一步了解体内致敏的过程提供了参考。其次, 整体基因组读数提供的大量信息, 还可用于特定信号或代谢途径机制的研究^[38]。此外, GARD 法还可用于判定呼吸致敏剂, 如 Masinja 等^[39]发现了一种能够区分呼吸致敏剂和非致敏剂的生物标志物, 并整理在尚未公开的数据库中。

4 皮肤致敏替代方法的比较分析

随着毒理学技术不断发展以及人类对动物实验越来越重视, 研究人员逐步将目光投向皮肤致敏试验替代方法的开发验证。因而, 越来越多的替代方法如 LLNA、LLNA; BrdU-ELISA、DPRA、GARD 等相继出现, 并通过验证。

如表 1 所示, 各种替代方法均有不同的优缺点。这些方法的优势大多集中于实验动物的使用量减少, 甚至是使用细胞替代了实验动物, 灵敏度和准确度较高, 以及测试时间缩短等方面。但各个方法的局限性也很突出, 尤其是结果假阳性以及对待测物的性质和溶解度要求较高等问题。皮肤致敏 AOP 是一个完整的生物过程, 而现有的替代方法无法完全覆盖整个通路, 因此有必要通过组合方法来改善。

表1 皮肤致敏替代方法的比较

Table 1 Comparison of alternative methods of skin sensitization

方法 Method	适用范围 Application scope	优点 Advantages	局限性 Limitation	检测终点 Detection endpoint	准确度 Accuracy
LLNA	化学品 (包括化妆品、农药等)、脂溶性小分子物质	减少实验时间和成本,动物用量少,体积小,灵敏度高	非致敏的皮肤刺激性化学物质 ^[40] ; 溶剂假阳性结果 ^[41] ; 对受试物溶解性要求高; 需要使用实验动物、放射性物质	强致敏剂: SI≥3, EC3<0.1%	72% ^[42]
LLNA: BrdU-ELISA	化学品 (包括化妆品、农药等)	综合了 LLNA 的优点, 且未使用放射性物质	未能解决 LLNA 法中出现的假阳性问题 ^[43]	ELISA 检测增殖淋巴细胞中 BrdU 的标记数	86% ^[44]
LLNA: DA	化学品 (包括化妆品、农药等)	具有 LLNA: BrdU-ELISA 的全部优点	时间限制; 假阳性; 不适用于影响 ATP 产生的化合物	ATP 数量、淋巴结重量、增殖的淋巴细胞数, 以及 SI 和 EC 值	87% ^[45]
DPRA	可溶性的单一化学物质以及化妆品原料	不使用实验动物, 灵敏度和准确性高	缺乏代谢体系 ^[46] ; 溶解性、透皮性差的待测物会影响结果 ^[47] ; 待测物与亲核试剂共同洗脱导致准确性下降	液相色谱法测定被测化合物消耗半胱氨酸和赖氨酸多肽的情况	80%
ADRA	可溶性的单一化学物质以及化妆品原料	不使用实验动物, 灵敏度和准确性高, 对待测物浓度要求低	对待测物溶解性要求较高; 评估多成分物质时无法避免待测物的免疫抑制	NAC/NAL 的反应性	86.9% ^[48]
KeratinoSens™/LuSens	可溶并能形成稳定体系的待测物	灵敏度高, 准确度高, 不使用实验动物	选择性与赖氨酸残基反应的待测物会出现假阳性 ^[49] ; 如待测物需要酶的激活可能出现假阳性 ^[50]	荧光诱导倍数 FI>1.5 可判断受试物为致敏物	94%/83%
h-CLAT	可溶性化合物	不使用实验动物, 细胞株易于获得且稳定, 灵敏度高, 特异性高	对待测物的溶解度要求较高; 荧光干扰以及待测物细胞毒性引起的假阳性 ^[51] ; 弱致敏物质易产生假阴性结果 ^[52]	当 CD86>150% 且 CD54>200% 时, 可判定为致敏物	84%
GARD	可溶性固/液化合物	准确度高, 不使用实验动物, 稳定、高重复性, 可检测呼吸道致敏物	成本高; 不能涵盖完整的路径	DC>0, 为致敏剂; DC≤0 为非致敏剂	84% ^[53]

注: LLNA 即小鼠局部淋巴结测试法; LLNA: BrdU-ELISA 即 5-溴脱氧尿嘧啶核苷-酶联免疫吸附测定-LLNA 法; LLNA: DA 即 LLNA-ATP 检测法; DPRA 即直接反应肽试验; ADRA 即氨基酸衍生物反应性测定; h-CATL 即人细胞系活化试验; GARD 即基因组过敏原快速检测法。

Note: LLNA is local lymph node assay; LLNA: BrdU-ELISA is LLNA-5-bromo-2-deoxyuridine-enzyme linked immunosorbent assay; LLNA: DA is LLNA: Daicel; DPRA is direct peptide reactivity assay; ADRA is amino acid derivative reactivity assay; h-CALT is human cell line activation test; GARD is genomic allergen rapid detection.

5 整合策略与评估方法

皮肤变态反应是一个极为复杂的过程, 凭借单独的体外测试方法无法完整获取皮肤致敏信息, 若对皮肤致敏反应进行更进一步的探索, 则需结合各种替代方法的灵敏度、优缺点等方面建立方法组合策略。因此, OECD 于 2016 年发布了整合策略与评估方法来评价未知化合物的致敏性及其致敏效力。整合策略与评估方法是一种基于科学、实用的化学危害特征描述方法, 即依据现有的化学结构特征信息、毒理学信息、计算机模型、体外实验结果进行的综合分析及整合测试策略, 以评价受试物的致敏性和风险类别^[54]。

目前, 我国食品药品检定研究院已经完成对 DPRA 法、LLNA: DA 和 LLNA: BrdU-ELISA 等替代方法的研究验证, 并已将它们纳入《化妆品安全技术规范》(2015 年版)^[55]。但对于替代试验的整合策略方面还处于前期探索阶段, 研究报告较少。如 Cao 等^[56]通过构建 THP-1 细胞和角质细胞的共培养系统以实现受试物的致敏性检测, 结果表明共培养细胞系统比单一使用 THP-1 细胞时更灵敏; 柯逸晖等^[57]通过将 DPRA 法和 h-CLAT 法简单组合, 实现了对单一化合物的致敏性评价。

定量构效关系 (quantitative structure activity relationship, QSAR) 是通过分析现有的某一系列具有

相同生物活性且结构相似的化合物, 以其理化或结构参数为自变量, 生物活性为因变量, 利用数理统计方法, 建立化合物结构与其生物活性之间的定量关系^[58]。QSAR系统能够对多个毒理学终点进行预测。近年来, 研究人员尝试将其应用到化妆品皮肤致敏性评价中, 开发了类似的皮肤渗透性QSAR模型, 并阐明了化合物的皮肤渗透性与致敏性之间的关系^[59]。同时, 采用计算机模拟QSAR软件进行化妆品毒理学评价, 也得到了越来越多的重视, 例如化合物毒性预测工具树 (toxic hazard estimation, Toxtree)、OECD开发的QSAR工具箱 (OECD QSAR Toolbox)、组织新陈代谢模拟器 (tissue metabolism simulator, TIMES-SS) 等^[60]。但这类软件是作为单一致敏评估方法来开发和验证的, 因此一些国外大型日化企业将基于AOP通路的皮肤致敏替代方法与这些QSAR软件结合后自主开发出皮肤致敏测试整合策略。

目前, OECD在整合策略与评估方法指导文件中纳入的整合策略大都由国外大型日化企业开发, 例如德国巴斯夫 (BASF) 公司开发的“3选2”原则 (BASF ‘2 out of 3’)、美国宝洁 (P&G) 公司开发的贝叶斯网络整合测试策略 (Bayesian network integrated testing strategy)、法国欧莱雅 (L’ORÉAL) 公司开发的堆叠元模型 (Stacking Meta-mode), 以及日本资生堂 (Shiseido) 公司开发的人工神经网络分析法 (artificial neural network) 等^[61]。

5.1 “3选2”原则

该方法由德国巴斯夫公司开发, 综合了DPRA、KeratinSensTM/LuSens和h-CLAT这3种单一替代试验方法^[62], 该方法覆盖了AOP中至少两个关键事件。其判定方式为: 若3种试验中有2种结果呈阳性, 则判定受试物为致敏剂, 反之则为非致敏剂。与单一试验相比, 该整合策略预测结果的准确率为81%~88%。

5.2 贝叶斯网络整合测试策略

该方法由美国宝洁公司开发, 在涵盖了DPRA、KeratinSensTM和h-CLAT这3种单一替代方法的基础上, 增加了TIMES-SS基于受试物结构的预测以及生物利用度等数据信息^[63-64]。该方法主要应用于致敏性及致敏效力的判断。与LLNA结果相比, 致敏性判定的准确率为100%, 致敏效力分级的准确率为89%。

5.3 堆叠元模型

该方法由法国欧莱雅公司开发, 在结合了覆盖AOP的3个关键事件的DPRA法、KeratinSensTM法和骨髓

髓U937细胞皮肤致敏试验 (bone marrow U937 cell skin sensitization test, U-SENSTM) 这3种单一替代方法的基础上, 又增加了两种分析工具TIME-SS、Toxtree以及受试物的理化性质, 进而结合5种不同的统计方法组合而成^[65]。该模型的判定方式为: 对5种不同统计方法给出的数据进行分析后, 根据定义阈值判定受试物是否具有致敏性^[66]。与单一试验方法相比, 该方法的准确性为93%。

5.4 人工神经网络分析法

该方法由日本资生堂公司开发, 覆盖了AOP关键事件1~3, 同时综合了受试物的理化性质和计算机模拟参数, 构成一个非线性统计模型^[67]。该方法将DPRA法、KeratinSensTM法、ARE、h-CLAT法和硫醇基蛋白反应性测试作为单一元素, 利用模型对单一元素的不同组合进行回归分析, 判定受试物的致敏性及致敏效力^[68]。与LLNA法相比, 该模型的准确性为91%。

6 小结

随着对皮肤致敏机制的深入研究, 从LLNA法到基于AOP通路建立的替代试验, 以及基于体内皮肤致敏过程所建立的整合策略已经逐步建立, 但目前我们所掌握的AOP通路还只是很小的一部分, 任何体内外替代方法都无法完整模拟致敏后体内的真实反应。因此, 建立皮肤致敏替代试验仍然面临着巨大的挑战, 寻找能够模拟出皮肤变态反应整个过程或是关键步骤的替代方法将会是未来皮肤致敏替代方法研究的发展趋势。另一方面, 伴随着基因组学皮肤致敏测试方法的开发, 相信不久的将来, 皮肤致敏测试方法必将陆续迭代, 检测结果会更加灵敏、准确和快速。

【作者贡献 Author Contribution】

黄静怡参与讨论并确定主体框架, 查找及筛选相关文献, 撰写初稿并修改; 李培宁参与讨论并确定主体框架, 查找及筛选相关文献, 参与文稿的修订; 刘香梅共同讨论并确定文章主体框架, 参与文稿修订; 刘忠华共同讨论并确定文章主体框架, 并对整体框架给予修改意见; 黄宇锋共同讨论并确定文章主体框架, 审核初稿并给予修改意见。

【利益声明 Declaration of Interest】

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

【参考文献 References】

[1] MORTZ C G, BINDSLEV-JENSEN C, ANDERSEN K E. Hand

- eczema in The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis (TOACS): prevalence, incidence and risk factors from adolescence to adulthood[J]. *Br J Dermatol*, 2014, 171(2):313-323. DOI:10.1111/bjd.12963.
- [2] GERBERICK G F, RYAN C A, KERN P S, et al. Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods[J]. *Dermatitis*, 2005, 16(4): 157-202.
 - [3] OECD. Test No. 429: Skin sensitisation: Local lymph node assay[M]. Paris: OECD, 2010. DOI:10.1787/9789264071100-en.
 - [4] BASKETTER D A, LEA L J, COOPER K, et al. Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation[J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37(12):1167-1174. DOI:10.1016/S0278-6915(99)00112-X.
 - [5] VOCANSON M, HENNINO A, ROZIÈRES A, et al. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis[J]. *Allergy*, 2009, 64(12): 1699-1714. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2009.02082.x.
 - [6] BALL N, CAGEN S, CARRILLO J C, et al. Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, Guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2011, 60(3): 389-400. DOI: 10.1016/j.yrtph.2011.05.007.
 - [7] KREILING R, HOLLNAGEL H M, HARENG L, et al. Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the Guinea pig maximization test (GPMT)[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(6):1896-1904. DOI:10.1016/j.fct.2008.01.019.
 - [8] TAKEYOSHI M, SAWAKI M, YAMASAKI K, et al. Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with α -hexylcinnamic aldehyde as an example[J]. *Toxicology*, 2003, 191(2-3): 259-263. DOI: 10.1016/S0300-483X(03)00255-5.
 - [9] 胡培丽, 张露勇, 李波, 等. 两品系小鼠局部淋巴结试验结果比较[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(5):54-57. DOI:10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.013.
HU P L, ZHANG L Y, LI B, et al. The comparative study of two strains on results of Local lymph node assays[J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 25(5): 54-57. DOI: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.013.
 - [10] 秦珩, 程洁, 靳苏香, 等. 小鼠局部淋巴结试验(BrdU-ELISA)改良法在 2, 4-二硝基氯代苯皮肤致敏性检测中的应用[J]. *毒理学杂志*, 2020, 34(2): 138-142. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2020.02.010.
QIN H, CHENG J, JIN S X, et al. Application of modified local lymph node assay (BrdU-ELISA) in the detection of DNCB skin sensitization in mice[J]. *J Toxicol*, 2020, 34(2): 138-142. DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2020.02.010.
 - [11] 阳晓燕, 赵康峰, 刘辉, 等. LLNA: BrdU-ELISA 法与 LLNA: DA 法检测 15 种染发剂致敏性的对比研究[J]. *环境与健康杂志*, 2018, 35(9):791-794. DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2018.09.010.
YANG X Y, ZHAO K F, LIU H, et al. LLNA: BrdU-ELISA and LLNA: DA used in assessment of skin sensitization of fifteen hair dyes: a comparative study[J]. *J Environ Health*, 2018, 35(9):791-794. DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2018.09.010.
 - [12] ZHANG H, SHI Y, WANG C, et al. An improvement of LLNA: DA to assess the skin sensitization potential of chemicals[J]. *J Toxicol Sci*, 2017, 42(2):129-136. DOI:10.2131/jts.42.129.
 - [13] OECD. Test No. 442A: Skin sensitization: Local lymph node assay: DA[M]. Paris: OECD, 2010. DOI:10.1787/9789264090972-en.
 - [14] STEWART I, SEAWRIGHT A A, SCHLUTER P J, et al. Primary irritant and delayed-contact hypersensitivity reactions to the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and its associated toxin cylindrospermopsin[J]. *BMC Dermatol*, 2006, 6:5. DOI:10.1186/1471-5945-6-5.
 - [15] 瞿小婷, 程树军, 秦瑶, 等. 有害结局通路指南及毒性测试应用分析[J]. *日用化学工业*, 2016, 46(8):473-478. DOI:10.13218/j.cnki.csdc.2016.08.010.
QU X T, CHENG S J, QIN Y, et al. Adverse outcome pathways guide and toxicity test applications[J]. *China Surfactant Deterg & Cosmet*, 2016, 46(8): 473-478. DOI: 10.13218/j.cnki.csdc.2016.08.010.
 - [16] OECD. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins[M]. Paris: OECD, 2012.
 - [17] GERBERICK G F, VASSALLO J D, FOERTSCH L M, et al. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach[J]. *Toxicol Sci*, 2007, 97(2):417-427. DOI:10.1093/toxsci/kfm064.
 - [18] 杨婷婷, 易路遥, 王绎, 等. 采用 DPRA 替代方法评价 3 种香料的皮肤致敏性[J]. *日用化学工业*, 2021, 51(5):438-442.
YANG T T, YI L Y, WANG Y, et al. Evaluation of skin sensitization of three perfumes by using DPRA alternative method[J]. *China Surfactant Deterg & Cosmet*, 2021, 51(5): 438-442.
 - [19] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals. *In chemico* skin sensitisation: Direct peptide reactivity assay (DPRA)[M]. Paris: OECD, 2015.
 - [20] GERBERICK G F, TROUTMAN J A, FOERTSCH L M, et al. Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system[J]. *Toxicol Sci*, 2009, 112(1):164-174. DOI:10.1093/toxsci/kfp192.
 - [21] WEI Z X, FANG Y H, GOSZTYLA M L, et al. A direct peptide reactivity assay using a high-throughput mass spectrometry screening platform for detection of skin sensitizers[J]. *Toxicol Lett*, 2021, 338:67-77. DOI:10.1016/j.toxlet.2020.12.002.
 - [22] WANIBUCHI S, YAMAMOTO Y, SATO A, et al. The amino acid derivative reactivity assay with fluorescence detection and its application to multi-constituent substances[J]. *J Toxicol Sci*, 2019, 44(12):821-832. DOI:10.2131/jts.44.821.
 - [23] FUJITA M, YAMAMOTO Y, TAHARA H, et al. Development of a prediction method for skin sensitization using novel cysteine and lysine derivatives[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2014, 70(1):94-105. DOI:10.1016/j.vascn.2014.06.001.
 - [24] FUJITA M, YAMAMOTO Y, WATANABE S, et al. Cause of and countermeasures for oxidation of the cysteine-derived reagent used in the amino acid derivative reactivity assay[J]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(2):191-208. DOI:10.1002/jat.3707.

- [25] FUJITA M, YAMAMOTO Y, WANIBUCHI S, et al. A newly developed means of HPLC-fluorescence analysis for predicting the skin sensitization potential of multi-constituent substances using ADRA[J]. *Toxicol Vitro*, 2019, 59: 161-178. DOI:10.1016/j.tiv.2019.04.014.
- [26] 熊款款, 谭磊, 王爱兵, 等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路抗氧化机制及抗氧化剂的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(4):89-94. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2021.04.018.
- XIONG K K, TAN L, WANG A B, et al. Progress on anti-oxidation mechanisms and antioxidants of the Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway[J]. *Prog Vet Med*, 2021, 42(4): 89-94. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2021.04.018.
- [27] RAMIREZ T, MEHLING A, KOLLE S N, et al. LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification[J]. *Toxicol Vitro*, 2014, 28(8): 1482-1497. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.08.002.
- [28] OECD. Test No. 442D: In vitro skin sensitisation: ARE-Nrf2 luciferase test method[M]. Paris: OECD, 2022. DOI: 10.1787/9789264229822-en.
- [29] SAKAGUCHI H, ASHIKAGA T, MIYAZAWA M, et al. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an *in vitro* skin sensitization test - human cell line activation test (h-CLAT)[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2009, 25(2):109-126. DOI:10.1007/s10565-008-9059-9.
- [30] MIYAZAWA M, ITO Y, YOSHIDA Y, et al. Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens[J]. *Toxicol Vitro*, 2007, 21(3): 428-437. DOI:10.1016/j.tiv.2006.10.005.
- [31] OECD. Test No. 442E: In vitro skin sensitisation[M]. Paris: OECD, 2018. DOI:10.1787/9789264264359-en
- [32] 袁园, 阳晓燕, 石莹, 等. 人细胞系活化试验用于皮肤致敏性测试的实验验证[J]. *环境卫生学杂志*, 2019, 9(1):56-64. DOI:10.13421/j.cnki.hjwsxzz.2019.01.011.
- YUAN Y, YANG X Y, SHI Y, et al. Experimental verification of human cell line activation test for skin allergenicity detection [J]. *J Environ Hyg*, 2019, 9(1):56-64. DOI:10.13421/j.cnki.hjwsxzz.2019.01.011.
- [33] ASHIKAGA T, SAKAGUCHI H, SONO S, et al. A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA)[J]. *Altern Lab Anim*, 2010, 38(4): 275-284. DOI: 10.1177/026119291003800403.
- [34] KARKHANIS A V, CHAN E C Y, REN E C. Preliminary discovery of novel markers for human cell line activation test (h-CLAT) [J]. *Toxicol Vitro*, 2021, 74:105154. DOI:10.1016/j.tiv.2021.105154.
- [35] JOHANSSON H, LINDSTEDT M, ALBREKT A S, et al. A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based *in vitro* alternative to animal tests[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12:399. DOI:10.1186/1471-2164-12-399.
- [36] STEVENSON M, CZEKALA L, SIMMS L, et al. The use of Genomic Allergen Rapid Detection (GARD) assays to predict the respiratory and skin sensitising potential of e-liquids[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2019, 103: 158-165. DOI: 10.1016/j.yrtph.2019.01.001.
- [37] JOHANSSON H, ALBREKT A S, BORREBAECK C A K, et al. The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers [J]. *Toxicol Vitro*, 2013, 27(3): 1163-1169. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.05.019.
- [38] JOHANSSON H, RYDNERT F, KÜHNEL J, et al. Genomic allergen rapid detection In-house validation—a proof of concept[J]. *Toxicol Sci*, 2014, 139(2): 362-370. DOI: 10.1093/toxsci/kfu046.
- [39] MASINJA W, ELLIOTT C, MODI S, et al. Comparison of the predictive nature of the Genomic Allergen Rapid Detection (GARD) assay with mammalian assays in determining the skin sensitisation potential of agrochemical active ingredients[J]. *Toxicol Vitro*, 2021, 70: 105017. DOI: 10.1016/j.tiv.2020.105017.
- [40] LOVELESS S E, LADIES G S, GERBERICK G F, et al. Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial[J]. *Toxicology*, 1996, 108(1-2):141-152. DOI:10.1016/0300-483X(95)03279-O.
- [41] MONTELIUS J, BOMAN A, WAHLKVIST H, et al. The murine local lymph node assay: search for an alternative, more adequate, vehicle than acetone/olive oil (4: 1) [J]. *Contact Dermatitis*, 1996, 34(6):428-430. DOI:10.1111/j.1600-0536.1996.tb02249.x.
- [42] ANDERSON S E, SIEGEL P D, MEADE B J. The LLNA: a brief review of recent advances and limitations[J]. *J Allergy (Cairo)*, 2011, 2011:424203. DOI:10.1155/2011/424203.
- [43] HAYASHI D, NOZAKI Y, TAKAGI H, et al. Sensitivity comparison of 3 CBA mouse strains under the LLNA: BrdU-ELISA test method[J]. *Altern Animal Test Exp*, 2012, 17(2): 63-68.
- [44] 陈宁, 黄泽愉, 孙晓, 等. 局部淋巴结试验(LLNA:BrdU-ELISA)对 14 种化学物质刺激和致敏性的评价[J]. *毒理学杂志*, 2022, 36(2) : 157-162. DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2022.02.018.
- CHEN N, HUANG Z Y, SUN X, et al. Local lymph node assay(LLNA: BrdU-ELISA) for evaluating the irritation and sensitization of 14 chemicals[J]. *J Toxcol*. 2022, 36(2) :157-162. DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2022.02.018.
- [45] 洗静雯, 郭煜堂, 陈宁, 等. BALB/c 小鼠 LLNA: DA 改良法在 15 种化学物皮肤致敏性评价中的应用[J]. *环境与健康杂志*, 2017, 34(5):441-443. DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2017.05.018.
- XIAN J W, GUO Y T, CHEN N, et al. Performance of the LLNA: DA using BALB/c mice for 15 substances in skin-sensitivity evaluation[J]. *J Environ Health*, 2017, 34(5): 441-443. DOI: 10.16241/j.cnki.1001-5914.2017.05.018.
- [46] 丁诗璇, 李小林, 曲栗, 等. 直接多肽反应试验在化妆品检测中的应用[J]. *日用化学品科学*, 2018, 41(11):19-24. DOI:10.13222/j.cnki.dc.2018.11.004.
- DING S X, LI X L, QU L, et al. Application of direct peptide reactivity assay on cosmetics[J]. *Deterg & Cosmet*, 2018, 41(11):19-24. DOI:10.13222/j.cnki.dc.2018.11.004.
- [47] 梅承翰, 庄慧敏, 刘师卜, 等. 直接肽反应试验及其研究进展[J]. *中国医药生物技术*, 2018, 13(6):556-559. DOI:10.3969/j.issn.1673-713X.2018.06.014.
- MEI C H, ZHUANG H M, LIU S B, et al. Direct peptide reactivity assay and its research progress[J]. *Chin Med*

- Biotechnol, 2018, 13(6):556-559. DOI:10.3969/j.issn.1673-713X.2018.06.014.
- [48] FUJITA M, YAMAMOTO Y, WATANABE S, et al. The within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of the *in chemico* amino acid derivative reactivity assay: results of validation study implemented in four participating laboratories[J]. J Appl Toxicol, 2019, 39(11):1492-1505. DOI:10.1002/jat.3834.
- [49] 陈虹, 黄元礼, 王涵, 等. KeratinoSens 试验在医疗器械致敏性检测中的应用研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2021, 33(6):455-460. DOI:10.3969/j.issn.1004-616x.2021.06.010.
- CHEN H, HUANG Y L, WANG H, et al. Research on KeratinoSens assay applied to medical devices[J]. Carcinog Teratog Mutagen, 2021, 33(6): 455-460. DOI: 10.3969/j. issn. 1004-616x.2021.06.010.
- [50] BAUCH C, KOLLE S N, RAMIREZ T, et al. Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2012, 63(3): 489-504. DOI:10.1016/j.yrtph.2012.05.013.
- [51] 李晨, 沙毅杰, 霍倩, 等. 人源 THP-1 细胞系活化试验在化妆品皮肤致敏性评价中的应用研究[J]. 现代预防医学, 2022, 49(2):349-353, 379.
- LI C, SHA Y J, HUO Q, et al. Application of THP-1 human cell line activation test in skin sensitization evaluation of cosmetics[J]. Mod Prev Med, 2022, 49(2):349-353, 379.
- [52] 所雅琼, 罗飞亚, 张凤兰, 等. 皮肤致敏替代方法和整合策略研究进展及思考[J]. 香料香精化妆品, 2021(5):96-102.
- SUO Y Q, LUO F Y, ZHANG F L, et al. Research progress and analysis of alternative methods and integration strategies for skin sensitization[J]. Flavour Fragr Cosmet, 2021(5):96-102.
- [53] FORRERYD A, JOHANSSON H, ALBREKT A S, et al. Prediction of chemical respiratory sensitizers using GARD, a novel *in vitro* assay based on a genomic biomarker signature[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0118808. DOI:10.1371/journal.pone.0118808.
- [54] OECD. Guidance document on the reporting of defined approaches to be used within integrated approaches to testing and assessment[M]. Paris: OECD, 2017. DOI:10.1787/9789264274822-en.
- [55] 罗飞亚, 苏哲. 中国化妆品安全评估中替代方法的现状[J]. 口腔护理用品工业, 2020, 30(5):62-64.
- LUO F Y, SU Z. Present situation of alternative methods in cosmetic safety assessment in China[J]. Oral Care Ind, 2020, 30(5):62-64.
- [56] CAO Y P, MA P C, LIU W D, et al. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals in THP-1/keratinocyte co-cultures[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2012, 34(2): 196-204. DOI:10.3109/08923973.2011.591800.
- [57] 柯逸晖, 陈彧, 程树军, 等. 直接多肽结合试验组合人细胞系活化试验预测皮肤致敏物的探讨[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(6): 611-617. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.011.
- KE Y H, CHEN Y, CHENG S J, et al. Preliminary study for integrating DPRA with h-CLAT to predict skin sensitizers[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2016, 24(6):611-617. DOI:10.3969/j. issn.1005-4847.2016.06.011.
- [58] 安丽英, 相玉红, 张卓勇, 等. 定量构效关系研究进展及其应用[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2006, 27(3):52-57. DOI:10.19789/j.1004-9398.2006.03.014.
- AN L Y, XIANG Y H, ZHANG Z Y, et al. The new advance and applications of quantitative structure-activity relationship[J]. J Cap Norm Univ Nat Sci Ed, 2006, 27(3):52-57. DOI:10.19789/j. 1004-9398.2006.03.014.
- [59] ALVES V M, MURATOV E, FOURCHES D, et al. Predicting chemically-induced skin reactions. Part II: QSAR models of skin permeability and the relationships between skin permeability and skin sensitization[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 284(2): 273-280. DOI: 10.1016/j. taap.2014.12.013.
- [60] 汤欣, 赵文静, 于清. 医疗器械毒理学风险评估中 QSAR 的应用[J]. 中国医疗器械杂志, 2022, 46(2):200-205.
- TANG X, ZHAO W J, YU Q. Applications of QSAR in toxicological risk assessment of medical devices[J]. Chin J Med Instrum, 2022, 46(2):200-205.
- [61] 王雪梅, 罗飞亚, 邢书霞, 等. 皮肤致敏整合测试与评估策略研究进展及思考[J]. 香料香精化妆品, 2020(5):79-85.
- WANG X M, LUO F Y, XING S X, et al. Research progress and analysis on integrated strategies for alternative tests of skin sensitization[J]. Flavour Fragr Cosmet, 2020(5):79-85.
- [62] URBISCH D, MEHLING A, GUTH K, et al. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2015, 71(2):337-351. DOI: 10.1016/j.yrtph.2014.12.008.
- [63] JAWORSKA J, DANCİK Y, KERN P, et al. Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice[J]. J Appl Toxicol, 2013, 33(11): 1353-1364. DOI:10.1002/jat.2869.
- [64] JAWORSKA J S, NATSCH A, RYAN C, et al. Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy [J]. Arch Toxicol, 2015, 89(12):2355-2383. DOI:10.1007/s00204-015-1634-2.
- [65] DEL BUFALO A, PAULOIN T, ALEPÉE N, et al. Alternative integrated testing for skin sensitization: assuring consumer safety[J]. Appl Vitro Toxicol, 2018, 4(1): 30-43. DOI: 10.1089/aivt.2017.0023.
- [66] TOURNEIX F, ALÉPÉE N, DETROYER A, et al. Skin sensitisation testing in practice: applying a stacking meta model to cosmetic ingredients[J]. Toxicol Vitro, 2020, 66: 104831. DOI:10.1016/j.tiv.2020.104831.
- [67] HIROTA M, FUKUI S, OKAMOTO K, et al. Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization[J]. J Appl Toxicol, 2015, 35(11): 1333-1347. DOI: 10.1002/jat.3105.
- [68] 孙方卉, 宋肖洁, 霍刚. 皮肤致敏测试整合策略的现状与展望[J]. 日用化学工业, 2021, 51(8):782-788.
- SUN F H, SONG X J, HUO G. Current situation and prospect of integrated strategies for skin sensitization testing[J]. China Surfactant Deterg & Cosmet, 2021, 51(8):782-788.

(收稿日期:2021-11-27 修回日期:2022-05-31)

(本文编辑:张俊彦,富群华,赵宇朋)



于 艳, 神经生物学博士, 现任中国康复科学所康复医学研究所所长。主要研究方向为中枢神经系统损伤修复及康复治疗技术, 围绕脑损伤康复及脑可塑性、脊髓损伤的再生及免疫细胞治疗、神经损伤并发症的治疗, 结合电化学、基因组学、代谢组学和生物信息学等手段, 解决康复医学基础研究中的重大问题。参与组建中国康复医学研究所神经科学研究与发现中心、北京脑重大疾病研究院神经损伤与修复研究所和神经损伤与康复北京市重点实验室等康复基础及临床研究基地。以第一作者或通信作者在 *Microbiome*、*Oxidative Medicine and Cellular* 等期刊发表科研论文十余篇, 获得发明专利及实用新型专利合计7项, 获得北京医学会科技进步奖和中国康复医学会科技进步奖各1项。

朱彦兵, 神经生物学博士, 副研究员, 副教授, 首都医科大学附属北京友谊医院神经病学系硕士生导师。兼任中国神经科学学会会员、中国生理学会会员。主要研究方向包括: (1) 缺血性脑卒中及卒中后认知障碍的神经免疫学机制和细胞治疗; (2) 生物信息学结合单细胞测序技术以及空间转录组测序技术在神经系统疾病和功能性胃肠病中的应用。近年来以第一作者和通信作者在 *Journal of Neuroscience*、*Frontiers in Cellular Neuroscience* 和 *Nature Communication* 等期刊发表SCI文章20多篇; 主持国家自然科学基金青年和面上项目各1项, 参与国家自然科学基金项目9项。



抑制磷脂酶D1 活性可促进缺血性脑卒中模型小鼠神经功能恢复

朱彦兵^{1,2}, 白 帆^{3,4}, 陶少鑫^{1,2}, 潘雨花蕾^{1,2}, 王 欢¹, 赵羽商¹, 王 崧¹, 于 艳^{3,4}

(1. 北京市临床医学研究所, 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050; 2. 首都医科大学附属北京友谊医院神经内科, 北京 100050; 3. 中国康复研究中心中国康复科学所, 北京 100068; 4. 神经损伤与康复北京市重点实验室, 北京 100068)

[摘要] **目的** 探讨小鼠缺血性脑卒中发生后不同时期病灶脑组织自噬的动态变化, 以及抑制磷脂酶D (phospholipase D, PLD) 1活性与自噬及神经功能的关系。**方法** 先用21只8周龄成年雄性C57BL/6小鼠构建缺血性脑卒中模型, 随机分为假手术组和缺血性脑卒中后4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、72 h组, 每组各3只, 采用蛋白质印迹法和免疫荧光染色法检测小鼠病灶脑组织中自噬相关蛋白LC3的表达及分布情况。另将36只8周龄成年雄性C57BL/6小鼠随机分为假手术组、缺血性脑卒中后腹腔注射PBS组和4个浓度(0.3、0.9、1.8和3.6 mg/kg)的PLD活性抑制剂FIPI组, 每组各6只; 缺血性脑卒中发生后的第1、第3和第7天, 分别通过贴纸去除实验、触须诱发前肢放置实验和TTC染色法评估抑制剂最佳浓度及其对神经功能和脑梗死面积的影响。再将9只8周龄成年雄性C57BL/6小鼠随机分为假手术组、缺血性脑卒中后立即腹腔注射PBS和0.9 mg/kg FIPI组, 每组3只, 通过蛋白质印迹法检测FIPI对自噬相关蛋白表达的影响。最后将36只8周龄成年雄性C57BL/6小鼠随机分为假手术组、缺血性脑卒中后立即腹腔注射PBS组以及不同时间窗(术后立即和术后4 h、8 h、12 h)腹腔注射0.9 mg/kg FIPI组, 每组各6只, 通过行为学实验和TTC染色法评估缺血性脑卒中小鼠的神经功能和脑梗死面积。**结果** 小鼠缺血性脑卒中发生后, 病灶组织中LC3-II相对表达水平开始升高, 24 h达到峰值 ($P < 0.05$), 然后逐渐下降。与PBS组相比, 给予0.9 mg/kg的PLD1活性抑制剂FIPI组能明显抑制小鼠缺血性脑卒中后病灶组织中LC3-II相对表达水平 ($P < 0.05$), 缩小梗死面积 ($P < 0.05$), 促进损伤后神经功能的恢复 ($P < 0.05$)。与PBS组相比, 除了缺血性脑卒中后立即给予FIPI组外, 缺血性脑卒中后4 h、8 h和12 h腹腔给予FIPI也都可以明显缩小梗死面积 ($P < 0.05$), 使小鼠神经功能得到明显恢复 ($P < 0.05$)。**结论** 缺血性脑卒中发生后24 h病灶组织自噬最为明显, 降低PLD1活性可以明显抑制自噬, 从而促进缺血性脑卒中后神经功能的恢复。同时, 除了缺血性脑卒中后立即给予FIPI外, 延迟4~

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81771235)“磷脂酶D在脑卒中后反应性星形胶质细胞增殖和分泌中的作用及其机制研究”; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2019CZ-14)“磷脂酶D在脑卒中后神经元过度自噬中的作用以及机制研究”

[第一作者] 朱彦兵(1980—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为神经生物学。E-mail: zhuyanbing@ccmu.edu.cn

[通信作者] 于 艳(1981—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为神经生物学。E-mail: yuyancrc@163.com。ORCID: 0000-0001-5377-8631

12 h 给予 FIPI 也可以缩小梗死面积, 促进神经功能的恢复, 这拓宽了缺血性脑卒中的治疗窗口期, 可能为临床治疗脑卒中提供新的策略。

[关键词] 缺血性脑卒中; 自噬; 磷脂酶 D1; 神经功能; C57BL/6 小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0322-11

Inhibition of Phospholipase D1 Activity Improves the Recovery of Neurological Function in Mice with Ischemic Stroke

ZHU Yanbing^{1,2}, BAI Fan^{3,4}, TAO Shaoxin^{1,2}, PAN Yuhualei^{1,2}, WANG Huan¹, ZHAO Yushang¹, WANG Song¹, YU Yan^{3,4}

(1. Beijing Clinical Research Institute, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Department of Neurology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 3. China Rehabilitation Science Institute, China Rehabilitation Research Center, Beijing 100068, China; 4. Beijing Key Laboratory of Neural Injury and Neural Rehabilitation, Beijing 100068, China)

Correspondence to: YU Yan (ORCID: 0000-0001-5377-8631), E-mail: yuyancrc@163.com

[ABSTRACT] Objective To investigate the dynamic changes of autophagy in infarcted cortex at different stages after ischemic stroke, and the relationship between phospholipase D1 (PLD1) activity, autophagy, and the neurological function in mice. **Methods** Firstly, twenty-one male C57BL/6 mice at age of 8 weeks were used to establish ischemic stroke models, and they were randomly divided into sham surgery and ischemic stroke groups. The groups were furtherly divided into 4-, 6-, 8-, 12-, 24-, and 72-hour groups according to the onset of ischemic stroke with three mice in each group. Dynamic expression and change of autophagy-related protein LC3 in the infarcted cortex were observed using Western blotting method and immunofluorescence staining. Secondly, thirty-six male C57BL/6 mice at age of 8 weeks were randomly divided into the sham surgery group, the PBS treatment group, and different concentrations of phospholipase D activity inhibitor 5-fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI) treatment groups containing 0.3, 0.9, 1.8, and 3.6 mg/kg, respectively. Each group comprised six mice. The optimal FIPI concentration and its effects on neurological function and infarcted volume were assessed by adhesive removal and whisker tests and TTC staining. Furthermore, nine male C57BL/6 mice at age of 8 weeks were divided into sham surgery group, intraperitoneal administration of PBS group, and 0.9 mg/kg FIPI group. Each group comprised three mice. The effects of FIPI on changes in autophagy-related protein LC3 were examined by Western blotting. Finally, thirty-six adult male C57BL/6 mice at age of 8 weeks were divided into sham surgery group, intraperitoneal administration of PBS group, and 0.9 mg/kg FIPI treatment groups at four time points (0, 4, 8, and 12 hours) after ischemic stroke. Furthermore, the neurological functions and infarcted volume were assessed by the adhesive removal and whisker tests as well as TTC staining with six mice in each group. **Results** The ratio of LC3- II / β -actin in the infarcted cortex increased, peaked at 24 hours ($P < 0.05$), and then gradually declined after ischemic stroke. Compared with the PBS group, the administration of 0.9 mg/kg FIPI significantly decreased the ratio of LC3- II / β -actin ($P < 0.05$), reduced the infarcted area ($P < 0.05$), and ameliorated neurological functions ($P < 0.05$) more than those observed in the other concentration groups. Compared with the PBS group, in addition to 0.9 mg/kg FIPI without delay, the administration of 0.9 mg/kg FIPI at 4-, 8-, and 12-hour after ischemic stroke could also decrease the infarcted volume ($P < 0.05$) and improve the neurological function ($P < 0.05$). **Conclusion** The change of autophagy was the most obvious at 24-hour after ischemic stroke and inhibition of PLD1 could improve the recovery of neurological function after ischemic stroke. Meanwhile, in addition to administration of 0.9 mg/kg FIPI without delay, 4-, 8-, and 12-hour after ischemic stroke could also shrink the infarcted volume and improve the neurological function. The inhibition of the PLD1 could extend the therapeutic window and provide a novel therapeutic strategy for the clinical treatment of cerebral stroke.

[Key words] Ischemic stroke; Autophagy; Phospholipase D1; Neurological function; C57BL/6 mice

缺血性脑卒中是威胁人类健康的最主要疾病之一^[1],在我国已成为致死和致残的首要病因。如何降低神经损伤并且改善卒中预后是脑血管病领域亟待解决的一个问题。目前针对缺血性脑卒中,主要的治疗方式有静脉溶栓、机械取栓以及使用神经保护药物。静脉溶栓和机械取栓都有非常严格的窗口期,而神经保护药物的治疗作用还需要进一步评估。

越来越多的证据^[2]表明,缺血性脑卒中发生后,在缺血低氧等因素的刺激下,自噬相关基因迅速激活,并且随着脑缺血症状的加重,自噬程度会进一步加大,同时促进病灶部位神经元和胶质细胞的不可逆死亡。所以,减轻或者阻断由急性缺血低氧引发的自噬是实施神经保护的主要手段^[3]。这就需要针对缺血性脑卒中后自噬发生、发展的规律以及机制进行深入研究,从而为神经保护提供潜在靶点。

自噬的过程从自噬体形成到自噬体与溶酶体融合均与脂类代谢有密切的联系,因此调控脂类代谢的蛋白可能参与自噬过程的调控^[4-5]。据文献报告,磷脂酶D(phospholipase D, PLD)1作为调控脂类代谢的关键分子之一,参与调控感应细胞内氨基酸浓度的自噬关键蛋白即哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的活性,并且在自噬体形成以及自噬体和溶酶体融合过程中发挥关键作用^[6-8]。而PLD家族的另一主要成员PLD2似乎并不参与自噬的调控^[7-8]。本课题组前期研究证实,神经发育过程中PLD1在神经元和星形胶质细胞内都有表达,并且在树突和树突棘的发育中发挥关键的调节作用^[9-10];进一步研究证实,敲除神经元内PLD1基因抑制其表达可以改善缺血性脑卒中的预后^[11]。另有研究发现,PLD1在神经元和星形胶质细胞中均有表达,在血管内皮细胞和小胶质细胞中也有表达^[12]。所以,有必要从整体角度观察抑制PLD1表达对缺血性脑卒中后神经功能的影响,而系统给予PLD1抑制剂是较为便捷和有效的实验手段。本研究即通过腹腔施予PLD1抑制剂的方式,观察缺血性脑卒中发生后病灶组织中自噬指标动态改变和神经功能恢复情况,以期为临床缺血性脑卒中的治疗提供线索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

PLD活性抑制剂FIPI(5-fluoro-2-indolyl deschlorohalopemide)(Cat#: 528245)和2,3,5-氯化三苯基四氮

唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)(Cat#: T8877)购自美国Sigma-Aldrich公司;微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated-protein light-chain-3, LC3)抗体(Cat#: L7543)和 β -actin抗体(Cat#: A5441)购自美国Sigma-Aldrich公司;PVDF膜(Cat#: IPFL00010)购自美国Merck公司。ChemiDOC-TM XRS+化学发光凝胶成像系统和iMark-TM吸收光酶标仪为美国Bio-Rad公司产品,激光共聚焦显微镜FV1000(即IX81倒置荧光显微镜)及成像分析系统为日本Olympus公司产品,冷冻切片机为美国Leica Biosystems公司产品。

1.2 动物来源及模型构建

成年雄性C57BL/6小鼠,8周龄,共112只,购自北京华阜康实验动物有限公司[SCXK(京)2021-0006],实验动物质量合格证编号为110011211100540968。动物饲养于首都医科大学附属北京友谊医院屏障设施[SYXK(京)2017-0019],饲养环境温度保持在23℃。动物实验方案经首都医科大学附属北京友谊医院实验动物福利与管理委员会批准(编号:21-2005),并严格遵循首都医科大学实验动物管理和使用的相关规章制度。

缺血性脑卒中模型构建步骤参照文献[11],即腹腔注射戊巴比妥钠(150 mg/kg)麻醉小鼠后,通过永久性结扎大脑中动脉远端,并短暂性地阻断两侧颈总动脉5 min,造成小鼠大脑皮质局部缺血,且有神经功能缺损症状出现,判断为缺血性脑卒中模型构建成功;假手术组小鼠除不进行大脑中动脉远端的结扎外,其他操作步骤与缺血性脑卒中模型组相同。

1.3 动物实验分组

为了解缺血性脑卒中后小鼠病灶组织中自噬相关蛋白LC3-II的表达变化,将21只8周龄成年雄性C57BL/6小鼠随机分为7组:假手术组,缺血性脑卒中后4 h组、6 h组、8 h组、12 h组、24 h组和72 h组。每组3只。

为评估最佳的PLD抑制剂浓度及其对小鼠神经功能的影响,将36只8周龄成年雄性C57BL/6小鼠随机分为6组:假手术组,缺血性脑卒中后腹腔给予PBS组,缺血性脑卒中后通过腹腔给药的方式给予不同浓度(0.3、0.9、1.8和3.6 mg/kg^[13-14])的FIPI组;给药途径为每天腹腔注射一次,连续7 d。

为观察FIPI抑制PLD1活性对小鼠病灶组织中自噬相关蛋白LC3-II表达及梗死面积的影响,将9只8周

龄成年雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组：假手术组，缺血性脑卒中后立即腹腔给予 PBS 组，缺血性脑卒中后立即腹腔给予 0.9 mg/kg FIPI 组；给药途径为每天腹腔注射一次，连续 3 d。

为观察不同时间窗使用 FIPI 抑制 PLD1 活性对缺血性脑卒中小鼠神经功能和梗死面积的影响，将 36 只 8 周龄成年雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组：假手术组，缺血性脑卒中后立即腹腔给予 PBS 组，缺血性脑卒中后不同时间（术后立即、术后 4 h、术后 8 h 和术后 12 h^[15]）腹腔给予 0.9 mg/kg FIPI 组；给药途径为每天腹腔注射一次，连续 7 d。

1.4 小鼠行为学实验检测神经功能变化

小鼠行为学实验包括贴纸去除实验（Adhesives-removal test）和触须诱发前肢放置实验（Whisker test）两种。前者是通过检测小鼠感知贴于脚掌上贴纸的时间以及去除贴纸的时间，进行行为学分析和评定，判断小鼠的感觉和运动功能；后者是由于正常动物在触须后能迅速将对侧前肢放置到桌角上，而发生脑缺血后根据损伤的程度不同，损伤侧触须诱导的对侧前肢放置功能会有不同程度的受损，因此通过触须诱发前肢放置实验可以评估缺血性脑卒中后神经功能变化情况。

所有小鼠在做行为学检测前都至少在检测环境内适应 0.5 h 以上，防止部分小鼠出现受惊等应激反应，以保证行为学检测的一致性。在小鼠缺血性脑卒中模型建立前 3 d 进行行为学训练，在建立模型后第 1、3 和 7 天进行行为学测试，以验证模型建立成功。并在动物模型用药后，以建模第 1、3 和 7 天为时间点进行行为学测试，探讨 FIPI 抑制 PLD1 活性对小鼠神经功能的影响。

1.5 蛋白质印迹法检测自噬相关蛋白表达

在小鼠缺血性脑卒中模型建立后的不同时间点（4、6、8、12、24 和 72 h）以及给予 PLD1 活性抑制剂 FIPI 24 h 后，腹腔注射戊巴比妥钠（150 mg/kg）麻醉小鼠，并进行安死术，取脑缺血病灶组织置于 EP 管中。提取组织总蛋白质，用 BCA 法定量；取 40 μ g 总蛋白上样于 10%SDS-PAGE 凝胶上，电压为 150 V，时间为 90 min，电泳至目的蛋白分离，再将蛋白条带转移到 PVDF 膜上，然后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h；分别加入兔多克隆 LC3 抗体和小鼠单克隆 β -actin 抗体且 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，次日洗膜后分别加入对应的山羊抗小鼠和山羊抗兔的二抗孵育 1 h，ECL 光化学法曝光显影，最后凝胶成像系统拍照统计。以目的蛋白 LC3-II 与内

参 β -actin 的条带灰度值之比表示自噬相关蛋白 LC3-II 的相对表达水平。

1.6 免疫荧光染色法观察自噬相关蛋白分布

在小鼠缺血性脑卒中模型建立 24 h 后，腹腔注射戊巴比妥钠（150 mg/kg）麻醉小鼠并施行安死术，立即取病灶脑组织并置于干冰上。常规包埋、冷冻切片后，行 PBS 水化，0.3% Triton X-100/PBS 打孔，PBS 洗片，然后用 10% 驴血清室温封闭 1 h。加入兔多克隆 LC3 抗体（稀释比例为 1 : 500），4 $^{\circ}$ C 反应过夜；PBS 洗片后，加入 546 荧光探针标记的山羊抗兔二抗（稀释比例为 1 : 1 000），室温避光反应 1 h；再 PBS 洗片后，用 DAPI 封固。用共聚焦显微镜观察自噬相关蛋白 LC3-I 和 LC3-II 的分布情况（反映自噬体的形成过程），即细胞质从弥散状 LC3-I 分布向聚集状 LC3-II 改变则判断为自噬发生。

1.7 TTC 染色法检测脑梗死面积

根据 TTC 染色出现的颜色变化可以区分缺血灶区域（白色）和正常组织区域（红色）。在小鼠缺血性脑卒中模型建立 3 d 后，腹腔注射戊巴比妥钠（150 mg/kg）麻醉小鼠并施行安死术，立即取病灶脑组织；然后行冷冻切片，每片厚度约 1 mm；将切好的脑片置于已预热的盛有 2%TTC 的溶液中，放于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中 5 min；染色完成后，倒掉 TTC 溶液，加入质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定 24 h；常规扫描仪扫描后用 Image J 软件分析统计各组小鼠脑皮质梗死情况，即用 Image J 软件圈出不同切片中的梗死范围，经软件自动计算出圈出的梗死面积。假手术组由于没有病灶，所以不做 TTC 染色。

1.8 统计方法

应用 GraphPad Prism 7 软件对各实验结果数据进行统计学分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验；多组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

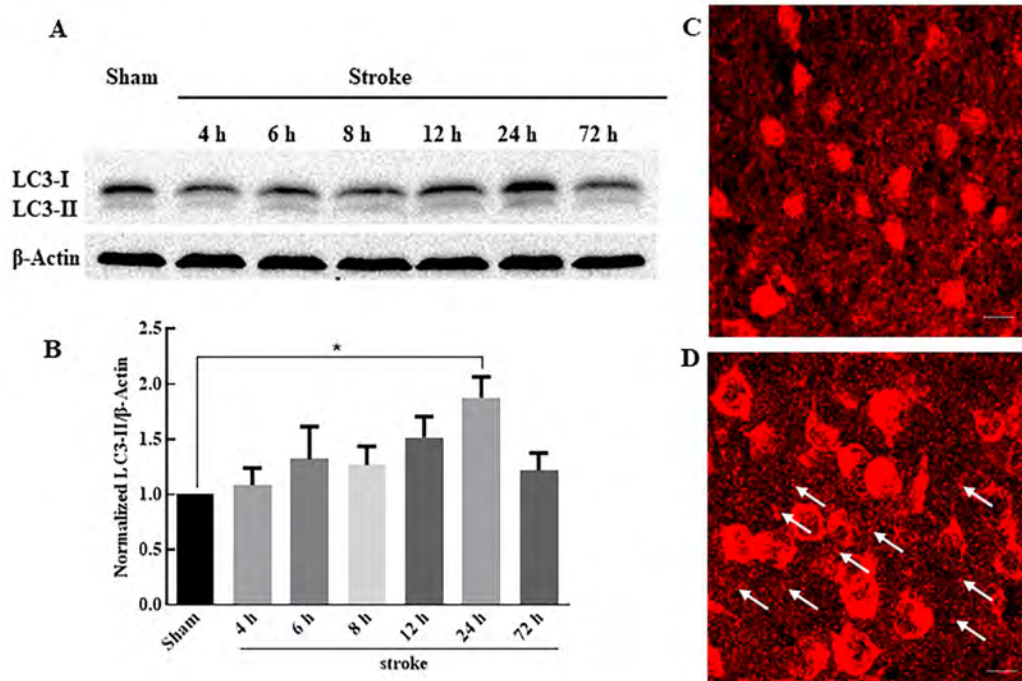
2.1 缺血性脑卒中后自噬发生特征

蛋白质印迹法检测缺血性脑卒中发生后小鼠脑缺血病灶组织内自噬相关蛋白 LC3 的相对表达水平，结果如图 1A~B 所示。缺血性脑卒中发生后，LC3-II/ β -actin 的比值缓慢升高，在缺血性脑卒中发生后 24 h 达到峰值，在缺血性脑卒中发生后 72 h 下降到假手术

组水平。统计学分析结果显示,假手术组与缺血性脑卒中发生后24 h组之间LC3- II/ β -actin 比值差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

通过免疫荧光染色观察小鼠脑缺血病灶组织内自

噬相关蛋白LC3的分布情况(反映自噬体形成),结果如图1C~D所示。缺血性脑卒中发生后24 h病灶组织内弥散型LC3- I明显转变为聚集状膜型LC3- II,提示自噬发生。



注: A为缺血性脑卒中发生后不同时间点(4~72 h)自噬相关蛋白LC3的表达情况; B为LC3- II/ β -actin 比值随缺血性脑卒中发生后不同时间的变化(每个时间点均3只小鼠, $^*P < 0.05$)。C和D分别为共聚焦显微镜下观察假手术组和缺血性脑卒中发生后24 h组的LC3- II分布情况(箭头所指为聚集状膜型LC3- II, 标尺为10 μ m)。

Note: A is the level of autophagy-related protein LC3 at different time points (4-72 h). B is the statistical analysis of the ratio of LC3- II/ β -actin at different time points ($n=3$ at each time point, $^*P < 0.05$). C is the morphology of LC3 in the sham group. D is the morphology of LC3 in 24-hour group after ischemic stroke (the arrow points for LC3- II, and the scale bar is 10 μ m).

图1 蛋白质印迹法(A~B)和免疫荧光染色法(C~D)检测缺血性脑卒中小鼠病灶组织中自噬相关蛋白LC3的表达情况

Figure 1 Expression of autophagy-related LC3 in the infarcted cortex after ischemic stroke detected by Western blotting (A and B) and immunofluorescent staining (C and D)

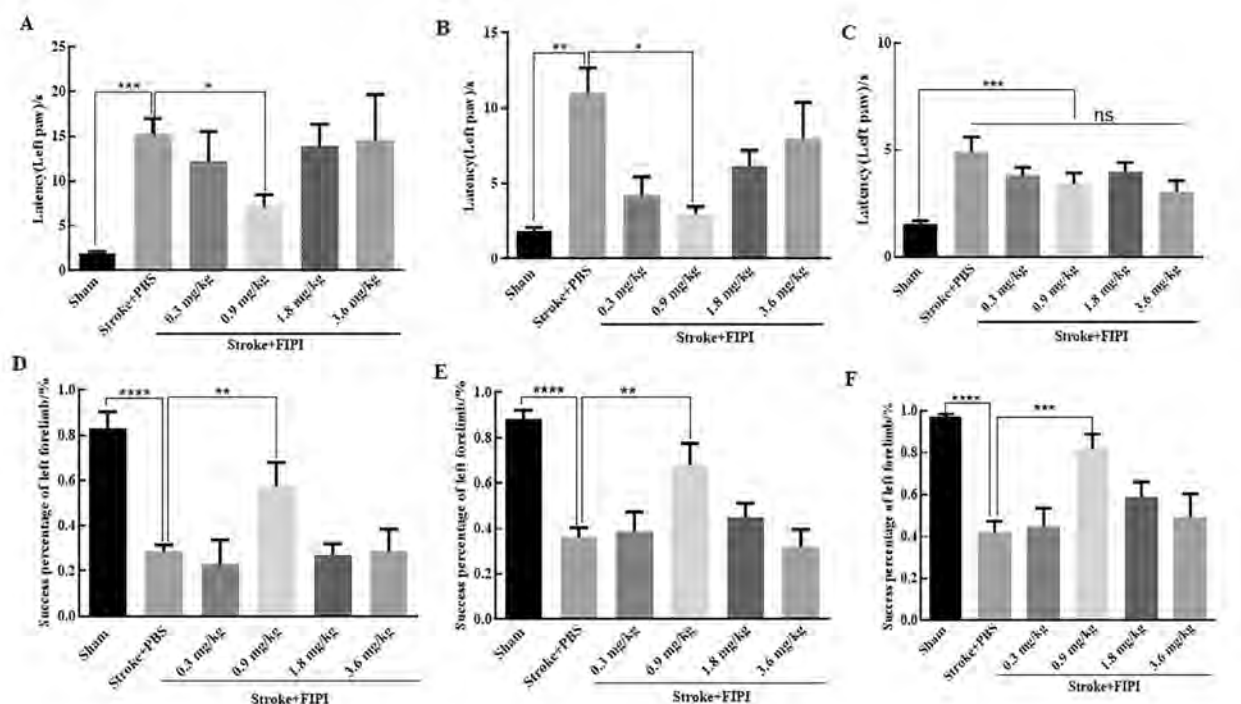
2.2 抑制PLD1可明显促进神经功能的恢复

缺血性脑卒中小鼠建模后用不同浓度的PLD抑制剂FIPI腹腔给药,通过贴纸去除实验和触须诱发前肢放置实验观察小鼠行为学变化,以此反映小鼠神经功能的恢复情况,结果如图2所示。统计学分析结果显示,与假手术组相比,缺血性脑卒中小鼠给予PBS组的贴纸持续时间明显延长,前肢触发成功率明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),提示缺血性脑卒中模型构建成功,小鼠神经功能明显被抑制。而与PBS组相比,缺血性脑卒中小鼠给予0.9 mg/kg FIPI后贴纸持续时间明显缩短,前肢触发成功率明显提高,差异

均有统计学意义 ($P < 0.05$),提示0.9 mg/kg FIPI腹腔给药能明显促进缺血性脑卒中小鼠的神经功能恢复。因此,后续实验中使用质量浓度为0.9 mg/kg的FIPI抑制PLD活性。

2.3 抑制PLD1可明显抑制缺血性脑卒中发生后病灶组织的自噬

通过蛋白质印迹法检测缺血性脑卒中发生后抑制PLD1活性对自噬相关蛋白LC3- II表达的影响,结果如图3A~B所示。统计学分析结果显示,缺血性脑卒中发生后,与PBS组相比,给予0.9 mg/kg FIPI抑制PLD活性可以明显下调小鼠病灶脑组织中自噬相关



注：A～C图为贴纸去除实验，以左脚掌上的贴纸持续时间反映小鼠神经功能；D～F组为触须诱发前肢放置实验，以左前肢触发成功率反映小鼠神经功能。A和D为小鼠缺血性脑卒中发生第1天的行为学实验结果；B和E为小鼠缺血性脑卒中发生第3天的行为学实验结果；C和F为小鼠缺血性脑卒中发生第7天的行为学实验结果。每组6只小鼠；* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ ，表示组间有明显差异；ns表示没有组间差异无统计学意义。FIPI为磷脂酶D活性抑制剂。

Note: A, B, and C denote adhesive removal tests (detecting latency time of left paw); D, E, and F are whisker tests (detecting success percentage of left forelimb). A and D show the behavior tests on the 1st day; B and E show the behavior tests on the 3rd day; C and F show the behavior tests on the 7th day. $n=6$ in each group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$; ns, not significant. FIPI, 5-fluoro-2-indolyl deschlorohalopemide, is a phospholipase D inhibitor.

图2 行为学实验显示缺血性脑卒中后给予0.9 mg/kg抑制剂FIPI后可以明显促进小鼠神经功能的恢复

Figure 2 Behavior tests reveal administration of 0.9 mg/kg FIPI after ischemic stroke obviously improves neurological function of mice

蛋白LC3-II的相对表达水平，差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 抑制PLD1可明显缩小缺血性脑卒中小鼠的梗死面积

通过TTC染色评估即刻给予0.9 mg/kg FIPI抑制PLD1活性对缺血性脑卒中小鼠梗死病灶的影响，结果如图3C～D所示。构建缺血性脑卒中小鼠模型后，与PBS组相比，FIPI组小鼠的梗死病灶面积明显缩小，差异具有统计学意义($P<0.05$)，提示造模后即刻给予FIPI具有减弱缺血导致脑梗的作用。

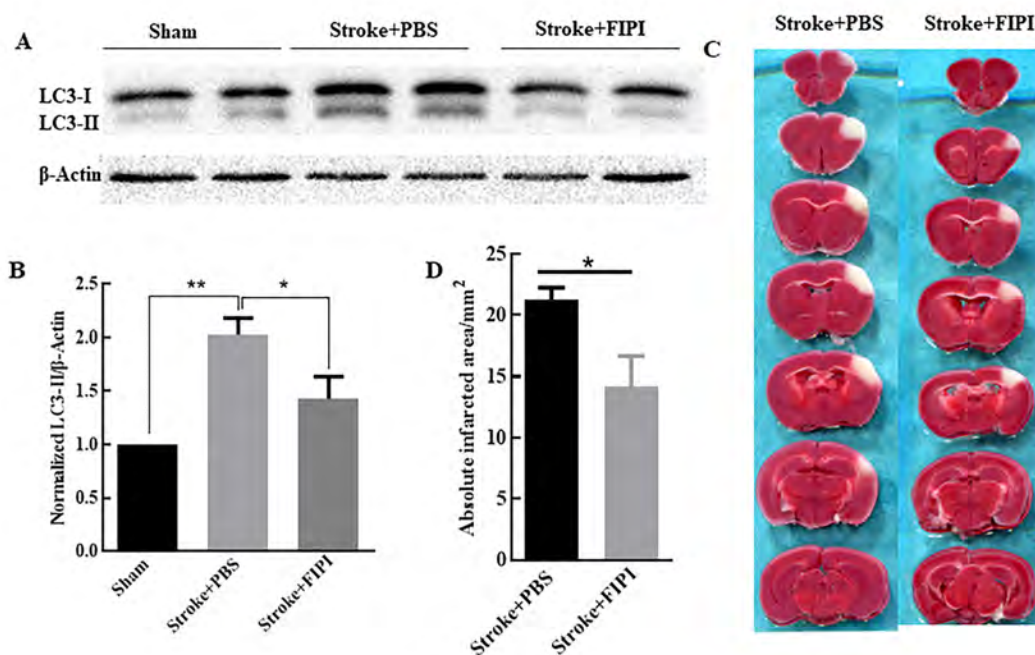
2.5 延迟抑制PLD1也可以明显改善小鼠的神经功能

在缺血性脑卒中发生后的不同时间窗即0 h、4 h、8 h和12 h，腹腔给予0.9 mg/kg FIPI抑制PLD1活性后通过贴纸去除实验和触须诱发前肢放置实验检测小鼠

神经功能恢复情况，结果如图4所示。除缺血性脑卒中发生后第7天的贴纸去除实验结果没有明显差异外(图4C)，与缺血性脑卒中发生后给予PBS组相比，缺血性脑卒中发生后0 h、4 h、8 h和12 h给予FIPI用药后的小鼠贴纸持续时间均明显缩短，前肢触发成功率明显提高，差异均具有统计学意义($P<0.05$)，提示0～12 h时间窗的FIPI用药均可明显促进小鼠神经功能恢复。

2.6 延迟给FIPI亦明显减少缺血性脑卒中小鼠的梗死面积

通过TTC染色评估缺血性脑卒中发生后4 h、8 h和12 h给予0.9 mg/kg FIPI抑制PLD1活性对缺血性脑卒中小鼠梗死病灶的影响，结果如图5所示。建立缺血性脑卒中小鼠模型后，与PBS组相比，不同时间窗给予FIPI治疗后第3天的小鼠梗



注: A为自噬相关蛋白LC3的蛋白质印迹结果; B为LC3- II/β-actin比值变化的统计分析结果(每组3只小鼠, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。C为缺血性脑卒中后小鼠脑组织的TTC染色结果, 白色为梗死病灶组织, 红色为正常脑组织; D为梗死面积的统计分析结果(每组6只小鼠, * $P < 0.05$)。FIPI为磷脂酶D活性抑制剂。

Note: A is the level of autophagy-related protein LC3 at different time points; B is the statistical analysis of the ratio of LC3- II/β-actin ($n=3$ in each group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). C is the TTC staining of the infarcted cortex in two groups; white color indicates the infarcted cortex and red color indicates the normal cortex; D is the statistical analysis of the infarcted cortex area ($n=6$ in each group, * $P < 0.05$). FIPI, 5-fluoro-2-indolyl deschlorohalopemide, is a phospholipase D inhibitor.

图3 蛋白质印迹法(A ~ B)和TTC染色法(C ~ D)分别检测抑制剂FIPI给药对缺血性脑卒中小鼠病灶组织中自噬相关蛋白LC3表达及梗死面积的影响

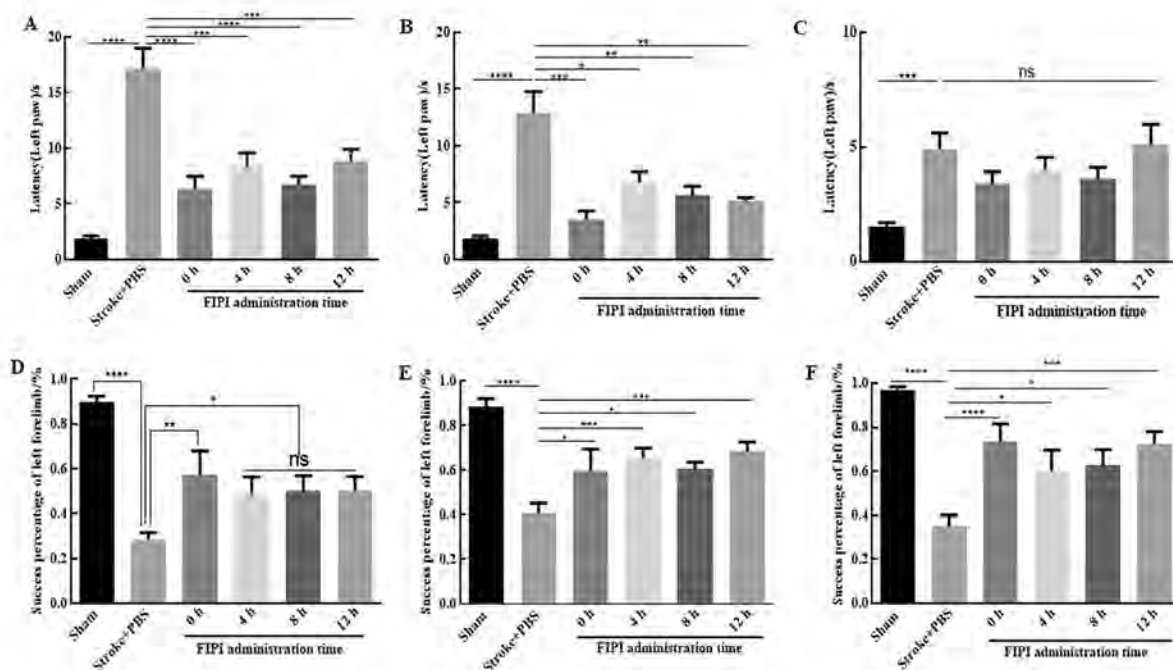
Figure 3 Expression of autophagy-related LC3 and the change in the infarcted cortex volume after FIPI inhibitor treatment are detected by Western blotting (A and B) and TTC staining (C and D)

死病灶面积均明显缩小, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

细胞自噬是一种由溶酶体介导的高度保守的降解过程, 在营养缺乏、细胞器老化和活性氧堆积等条件下, 细胞通过形成双层膜结构的自噬小体, 包裹一部分胞内物质并将其运送到溶酶体进行降解或者重新利用^[16]。在正常生理情况下, 自噬可以降解老化的细胞器以维持细胞内稳态。在病理条件下, 通过自噬降解部分细胞器可以保证主要细胞器功能的维持。细胞接受内外自噬信号后, 形成自噬体, 之后可与实现细胞内吞作用的吞噬泡、吞饮泡和内体融合, 继而与溶酶体融合形成自噬泡, 自噬体内容物被溶酶体内的水解酶降解。但是在疾病、外界压力、饥饿、低氧和内质

网应激等特殊情况下, 各种刺激信号引发的自噬就不再是细胞自保的手段, 而是会促进细胞的不可逆死亡, 所以预防自噬也是治疗相关疾病的主要手段之一^[17]。另外, LC3是自噬相关标志性蛋白, 其有两种表达形态: LC3-I和LC3-II。正常条件下, 细胞中LC3-I为主, 为弥散状分布; 发生自噬时, LC3-II为主, 为聚集状分布。自噬体的形成过程也是细胞质内弥散型LC3-I转变为聚集状膜型LC3-II的过程, 所以观察LC3不同形态的转变是检测自噬是否发生的金标准。研究者往往可以通过电子显微镜观察LC3的分布形态, 或者采用蛋白质印迹法检测LC3-II和LC3-I或内参的比值变化来分析自噬的发生情况^[18]。本研究中, 主要通过蛋白质印迹法观察病灶组织中自噬相关蛋白LC3-II与内参β-actin的比值变化来分析PLD1对缺血性脑卒中发生后病灶组织自噬的影响。



注：A～C图为贴纸去除实验，以左脚掌上的贴纸持续时间反映小鼠神经功能；D～F图为触须诱发前肢放置实验，以左前肢触发成功率反映小鼠神经功能。A和D为小鼠缺血性脑卒中中发生第1天的行为学实验结果；B和E为小鼠缺血性脑卒中中发生第3天的行为学实验结果；C和F为小鼠缺血性脑卒中中发生第7天的行为学实验结果。每组6只小鼠；组间差异，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ 。FIPI为磷脂酶D活性抑制剂。

Note: A, B, and C denote adhesive removal tests (detecting latency time of left paw); D, E, and F are whisker tests (detecting success percentage of left forelimb). A and D show the behavior tests on the 1st day; B and E show the behavior tests on the 3rd day; C and F show the behavior tests on the 7th day. $n=6$ in each group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$; ns, not significant. FIPI, 5-fluoro-2-indolyl deschlorohalopemide, is a phospholipase D inhibitor.

图4 行为学实验显示缺血性脑卒中后不同时间点给予0.9 mg/kg抑制剂FIPI均可以明显促进神经功能的恢复

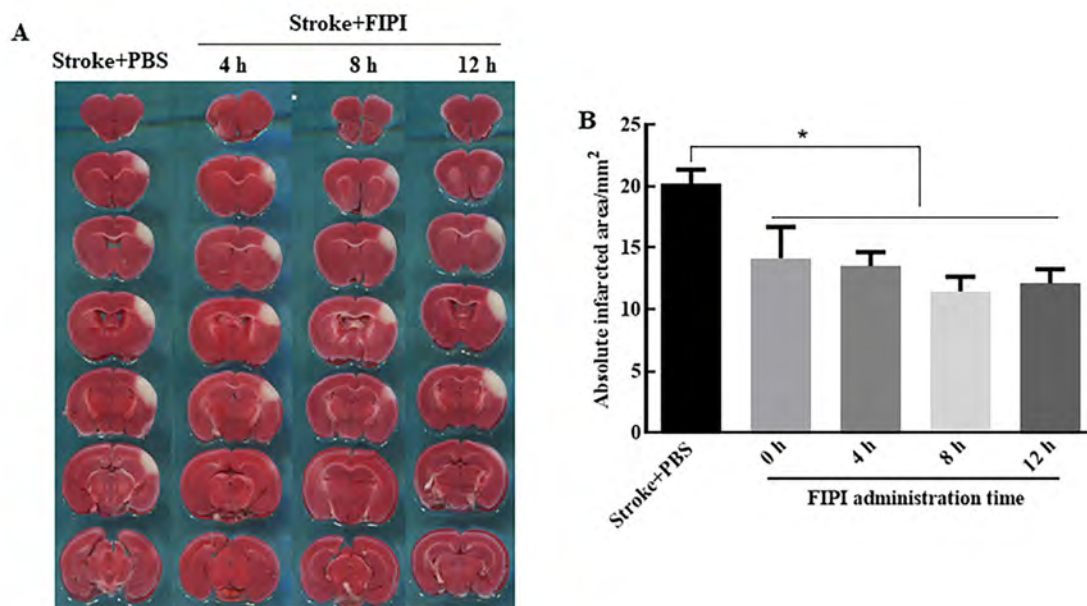
Figure 4 Behavior tests reveal the administration of 0.9 mg/kg FIPI at different time points after ischemic stroke can improve the neurological function of mice

有研究运用在体成像技术观察GFP-LC3转基因小鼠脑缺血后LC3的表达特征，发现随着脑缺血症状的加重，LC3荧光表达量逐渐增强，脑缺血后1 d病灶部位的LC3荧光强度达到峰值^[18]；本研究结果与该文献报告相符。此外，本研究中蛋白质印迹法检测证实缺血性脑卒中发生后24 h病灶组织中自噬相关蛋白LC3-II的相对表达水平最大，提示缺血性脑卒中后24 h是自噬发生的高峰。同时免疫荧光染色证实，缺血性脑卒中发生后24 h病灶组织细胞内弥散型LC3-I明显转变为聚集状膜型LC3-II。

本课题组前期研究证实，通过构建条件性敲除小鼠，特异性地敲除神经元内PLD1的表达可以缓解缺血性脑卒中后神经功能的损伤^[11]。但也有研究证实，缺血性脑卒中发生后，病灶部位的星形胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞和血管内皮细胞等也会发生明显的自噬，但不同类型的细胞发生自噬的时期和作用

还需要进一步研究观察^[2, 19]。本课题组前期研究发现，生理情况下，PLD1在神经元和星形胶质细胞中都有表达^[9-10]。鉴于此，从整体角度阐明缺血性脑卒中后病灶组织自噬的规律非常重要。本研究主要观察缺血性脑卒中发生后病灶组织的自噬规律，并且通过腹腔给予抑制剂FIPI抑制PLD1的活性，观察发现这有利于促进缺血性脑卒中后神经功能的恢复。需要说明，本研究并没有观察缺血性脑卒中后不同时期具体哪种细胞类型发生自噬以及自噬的特点，在后续实验中需要先观察缺血性脑卒中发生后早期、中期和晚期自噬细胞的类型以及自噬规律，然后在构建不同细胞类型的条件性敲除小鼠时，敲除包括PLD1在内的自噬相关蛋白将会进一步阐明不同类型细胞自噬在缺血性脑卒中发生发展中的作用。

PLD1在自噬体形成过程中发挥重要作用。例如在帕金森病的发生发展中，PLD1具有调控自噬流和清除



注：A为缺血性脑卒中后不同组小鼠脑组织的TTC染色结果，白色为梗死病灶组织，红色为正常脑组织。B为梗死面积的统计分析结果（每组6只小鼠， $^*P<0.05$ ）。FIPI为磷脂酶D活性抑制剂。

Note: A is the TTC staining of the infarcted cortex in different groups; white color indicates the infarcted cortex and red color indicates the normal cortex; B is the statistical analysis of the infarcted cortex volume ($n=6$ in each group, $^*P<0.05$). FIPI, 5-fluoro-2-indolyl deschlorohalopemide, is a phospholipase D inhibitor.

图5 TTC染色观察缺血性脑卒中发生后不同时间点给予0.9 mg/kg抑制剂FIPI缩小小鼠脑梗死面积

Figure 5 TTC staining reveals the administration of 0.9 mg/kg FIPI at different time points after ischemic stroke can reduce the volume of infarcted cortex of mice

突触核蛋白 (α -synuclein) 聚集的作用；同时还证实，抑制 PLD1 后 α -synuclein 聚合物会大量聚集在人类成神经细胞瘤 SH-SY5Y 分化细胞中，最终导致细胞死亡 [4, 20–22]。本研究证实 PLD1 和自噬的关系非常密切。而同样作为磷脂酶 D 家族重要成员之一的 PLD2 却鲜有和自噬相关的报告，主要原因可能在于 PLD1 和自噬相关蛋白 LC3 共定位，在细胞质内弥散型 LC3- I 转变为聚集状膜型 LC3- II 的过程中发挥关键作用，而 PLD2 并不和 LC3 共定位。因此大多数情况下，通过广谱抑制剂 FIPI 干预 PLD 活性可达到调控自噬的目的。另有研究显示，抑制 PLD2 可以缓解阿尔茨海默病发生过程中 β 样淀粉蛋白对神经元的损伤 [23]，但其具体机制还需要进一步探讨 [24]。本课题组前期进行的缺血性脑卒中后不同时间点组织测序结果也证实，缺血性脑卒中后病灶组织中 PLD1 表达明显上调，但 PLD2 表达基本没有变化，提示 PLD1 比 PLD2 在缺血性脑卒中后自噬过程中发挥更重要的功能。但与上述研究报告中 PLD1 对帕金森病发生的作用不同，本研究证实缺血性脑卒中发生过程中抑制 PLD1 可促进神经功能恢复，提示

在不同疾病中自噬发挥不同功能。

此外，本研究通过贴纸去除实验和触须诱发前肢放置实验来评估缺血性脑卒中后神经功能的恢复情况，结果显示两种行为学表现有差异，这可能和本研究所用的模型有关。本研究使用的是大脑中动脉远端结扎模型 [11, 25]，此模型利用了啮齿类动物桶状皮层特征，触须神经冲动的传入通过“触须-丘脑-桶状皮质 (Barrel Cortex)”途径的脑区，该模型能够模拟较为精确的点对点方式联系的损伤，所以触须诱发前肢放置实验结果可能比贴纸去除实验结果更为准确。另外，还有可能与实验的样本只数有关系，在后续实验中将通过增加样本量以更加准确地评估动物行为学的变化。

目前针对缺血性脑卒中的治疗主要是采取早期组织多肽抗原 (tissue polypeptide antigen, TPA) 静脉溶栓和介入取栓，这两种治疗方式的疗效都受限于非常狭窄的窗口期，因此延长缺血性脑卒中的治疗窗口期对于其治疗至关重要。本研究发现，在缺血性脑卒中后的 4 h、8 h 和 12 h 抑制 PLD1 活性均可以缩小缺血梗死面积，并促进神经功能恢复。FIPI 作为 FDA 批准的

抗肿瘤药物, 主要是通过抑制 PLD 促进肿瘤细胞转移的功能发挥作用, 因此推测运用 FIPI 可通过抑制 PLD 活性达到治疗缺血性脑卒中的目的。本研究证实, FIPI 抑制 PLD 活性可以缓解缺血性脑卒中小鼠的神经损伤, 并且能明显拓宽治疗的窗口期, 这为 FIPI “老药新用” 提供了一定的理论依据。

综上所述, 本研究通过动物行为学、蛋白质印迹和 TTC 染色证实, 自噬是导致缺血性脑卒中发生后神经损伤的重要原因之一, 通过抑制小鼠缺血性脑卒中后神经元内的 PLD1 活性可以有效减少神经元自噬, 缩小梗死面积, 改善神经功能。但是缺血性脑卒中后 PLD1 诱导的自噬以及不同时期自噬的细胞类型及具体机制还需进一步探索。总之, 本研究为临床治疗缺血性脑卒中提供了新的实验依据和治疗思路。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过首都医科大学附属北京友谊医院实验动物福利与管理委员会批准 (项目批准号: 21-2005)。所有实验过程均遵照实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments in this study were approved by the Experimental Animal Welfare and Ethics Committee of Beijing Friendship Hospital of Capital Medical University (Approval Letter No. 21-2005). All experimental protocols followed the guidelines of experimental animal-related laws and regulations.

[作者贡献 Author Contribution]

朱彦兵负责课题设计、蛋白质印迹实验、文章撰写及修改; 白帆负责蛋白质印迹实验和文章撰写; 陶少鑫和潘雨花蕾负责缺血性脑卒中小鼠模型构建; 王欢、赵羽商和王崧负责行为学实验和数据收集; 于艳参与课题设计和论文把关。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] CAMPBELL B C V, DE SILVA D A, MACLEOD M R, et al. Ischaemic stroke[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 70. DOI: 10.1038/s41572-019-0118-8.
- [2] WANG P, SHAO B Z, DENG Z Q, et al. Autophagy in ischemic stroke[J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 163-164: 98-117. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2018.01.001.
- [3] HWANG J Y, GERTNER M, PONTARELLI F, et al. Global ischemia induces lysosomal-mediated degradation of mTOR and activation of autophagy in hippocampal neurons destined to die[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(2): 317-329. DOI: 10.1038/cdd.2016.140.
- [4] DALL'ARMI C, DEVEREAUX K A, DI PAOLO G. The role of lipids in the control of autophagy[J]. *Curr Biol*, 2013, 23(1): R33-R45. DOI: 10.1016/j.cub.2012.10.041.
- [5] PURI C, RENNA M, BENTO C F, et al. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes[J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1285-1299. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.044.
- [6] HUR J H, PARK S Y, DALL'ARMI C, et al. Phospholipase D1 deficiency in mice causes nonalcoholic fatty liver disease via an autophagy defect[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39170. DOI: 10.1038/srep39170.
- [7] DALL'ARMI C, HURTADO-LORENZO A, TIAN H, et al. The phospholipase D1 pathway modulates macroautophagy[J]. *Nat Commun*, 2010, 1: 142. DOI: 10.1038/ncomms1144.
- [8] YOON M S. Vps34 and PLD1 take center stage in nutrient signaling: their dual roles in regulating autophagy[J]. *Cell Commun Signal*, 2015, 13: 44. DOI: 10.1186/s12964-015-0122-x.
- [9] ZHU Y B, KANG K, ZHANG Y, et al. PLD1 negatively regulates dendritic branching[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(23): 7960-7969. DOI: 10.1523/jneurosci.5378-11.2012.
- [10] ZHU Y B, GAO W, ZHANG Y, et al. Astrocyte-derived phosphatidic acid promotes dendritic branching[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21096. DOI: 10.1038/srep21096.
- [11] 陶少鑫, 朱彦兵, 于山平, 等. 小鼠缺血性脑卒中后磷脂酶 D1 在自噬和神经损伤中的作用[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(8): 790-794. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2019.08.002.
- [12] TAO S X, ZHU Y B, YU S P, et al. Role of phospholipase D1 in autophagy and neuronal damage after focal ischemic stroke in mice[J]. *J Clin Exp Med*, 2019, 18(8): 790-794. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2019.08.002.
- [13] KLIER M, GOWERT N S, JÄCKEL S, et al. Phospholipase D1 is a regulator of platelet-mediated inflammation[J]. *Cell Signal*, 2017, 38: 171-181. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.07.007.
- [14] SU W, YEKU O, OLEPU S, et al. 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI), a phospholipase D pharmacological inhibitor that alters cell spreading and inhibits chemotaxis[J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(3): 437-446. DOI: 10.1124/mol.108.053298.
- [15] HENKELS K M, MUPPANI N R, GOMEZ-CAMBRONERO J. PLD-specific small-molecule inhibitors decrease tumor-associated macrophages and neutrophils infiltration in breast tumors and lung and liver metastases[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166553. DOI: 10.1371/journal.pone.0166553.
- [16] MAO L L, LI P Y, ZHU W, et al. Regulatory T cells ameliorate tissue plasminogen activator-induced brain haemorrhage after stroke[J]. *Brain*, 2017, 140(7): 1914-1931. DOI: 10.1093/brain/awx111.
- [17] ANDREJEVA G, GOWAN S, LIN G, et al. De novo phosphatidylcholine synthesis is required for autophagosome membrane formation and maintenance during autophagy[J]. *Autophagy*, 2020, 16(6): 1044-1060. DOI: 10.1080/15548627.2019.1659608.
- [18] CAI M, HE J, XIONG J, et al. Phospholipase D1-regulated autophagy supplies free fatty acids to counter nutrient stress in cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(11): e2448. DOI: 10.1038/cddis.2016.355.

- [18] TIAN F, DEGUCHI K, YAMASHITA T, et al. *In vivo* imaging of autophagy in a mouse stroke model[J]. *Autophagy*, 2010, 6(8): 1107-1114. DOI:10.4161/auto.6.8.13427.
- [19] MARCHESAN D, RUTBERG M, ANDERSSON L, et al. A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29):27293-27300. DOI:10.1074/jbc.m301430200.
- [20] NGUYEN T B, OLZMANN J A. Lipid droplets and lipotoxicity during autophagy[J]. *Autophagy*, 2017, 13(11):2002-2003. DOI: 10.1080/15548627.2017.1359451.
- [21] MCDERMOTT M I, WANG Y, WAKELAM M J O, et al. Mammalian phospholipase D: function, and therapeutics[J]. *Prog Lipid Res*, 2020, 78: 101018. DOI: 10.1016/j. plipres. 2019.101018.
- [22] BAE E J, LEE H J, JANG Y H, et al. Phospholipase D1 regulates autophagic flux and clearance of α -synuclein aggregates[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(7): 1132-1141. DOI: 10.1038/cdd. 2014.30.
- [23] OLIVEIRA T G, CHAN R B, TIAN H, et al. Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(49): 16419-16428. DOI:10.1523/jneurosci.3317-10.2010.
- [24] KIM S H, PARK M Y, YUN N J, et al. Targeting PLD2 in adipocytes augments adaptive thermogenesis by improving mitochondrial quality and quantity in mice[J]. *J Exp Med*, 2022, 219(2): e20211523. DOI:10.1084/jem.20211523.
- [25] YUZHU W, DAN T, CHANGWEI W, et al. Propofol attenuates α -synuclein aggregation and neuronal damage in a mouse model of ischemic stroke [J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36(3):289-298. DOI:10.1007/s12264-019-00426-0
- (收稿日期:2022-03-29 修回日期:2022-05-19)
(本文编辑:张俊彦,富群华,郭嘉欣)

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明

本刊是我国实验动物科学与比较医学领域的一本专业学术期刊,严格遵守国家实验动物相关法律、法规和标准,包括但不限于《实验动物管理条例》(2017年3月1日修订版)和《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)等,同时参考借鉴国际生物医学期刊关于动物实验研究报告的相关指南共识(如ARRIVE 2.0、IGP 2012、IAVE Guidelines 2010等)。因此,本刊对所有涉及动物实验的来稿均需审查实验动物福利与伦理相关内容。现将一些具体要求说明如下:

1. 涉及动物实验的来稿,需提供实验动物生产许可证和质量合格证,以及动物实验场所的实验动物使用许可证。以上证明须与使用动物种类及动物实验单位名称相匹配,并在正文中列出其对应的许可证编号。

2. 涉及动物实验的来稿,需在考虑3R(替代、减少和优化)原则的基础上设计动物实验,并提供作者单位实验动物福利伦理委员会(或相关机构)出具的实验动物福利伦理审查批件。批件中所列内容须与投稿文章相吻合,并在正文中列出对应的批准编号。

3. 实验动物的用药,尤其是麻醉镇痛用药必须优先使用药用级麻醉剂,特别是当涉及存活手术的动物实验时。鉴于无法确定非药用级麻醉剂(如三溴乙醇、水合氯醛等)的相关性状及对实验动物的影响,从而不能保障实验动物福利及研究结果的可靠性,而且目前已有更优的市售麻醉药剂可供选择,因此本刊不建议使用上述试剂。如确需使用,需提供充足理由说明及相应的批准文件。

4. 涉及肿瘤动物模型的研究,本刊参考国内及国际通用准则,建议单个肿瘤体直径不超过20 mm(小鼠)或40 mm(大鼠)且不出现明显的肿瘤溃疡。如投稿文章有超出上述标准的研究内容,需提交作者单位相关肿瘤动物模型研究的指导原则文件,以及从科学角度判断肿瘤体积合理性的依据材料。

《实验动物与比较医学》编辑部



万 阔, 教授, 硕士生导师, 主任医师。现任北京协和医院无痛牙科治疗中心主任, 兼任中华口腔医学会镇静镇痛专业委员会主任委员、中国妇幼保健协会口腔保健专业委员会顾问委员、中国医药教育协会妇儿口腔保健分会主任委员、中华口腔医学会口腔医学标准工作专家委员会委员、《中国口腔医学继续教育杂志》编委、中央保健委员会中央保健会会诊专家、北京口腔医学会镇静镇痛专业委员会主任委员。长期从事无痛牙科治疗及孕妇口腔诊疗的临床、教学、研究工作, 研究方向包括口腔无痛牙科治疗技术及牙科镇静技术研究。主持完成美国中华医学基金 (China Medical Board, CMB) 项目1项, 参与教材《牙及牙槽外科学》和《罕见病学》的编写, 连续多年举办口腔无痛治疗国家级培训班。发表相关领域学术论文40余篇, 获得相关领域各类专利9项。

大鼠急性牙髓炎痛敏模型的疼痛效应评价

赵斯佳, 何新宇, 景 泉, 马 林, 郭春岚, 万 阔

(中国医学科学院北京协和医院口腔科, 北京 100730)

[摘要] **目的** 采用大鼠上颌磨牙开髓暂封脂多糖处理的方法诱导急性牙髓炎模型, 并对造模后大鼠出现的急性疼痛和牙髓炎状态进行分析和评价, 探究急性牙髓炎模型大鼠的痛阈改变。**方法** 将45只成年雄性SD大鼠分为脂多糖 (LPS) 组、生理盐水 (NS) 组和空白对照 (SHAM) 组, 每组15只。LPS组大鼠右上第一磨牙开髓后暂封LPS, 制备大鼠急性牙髓炎模型; NS组开髓暂封生理盐水; SHAM组仅进行诱导麻醉。在造模前及造模后的2 h、24 h、48 h和72 h, 分别检测3组大鼠的疼痛行为学指标, 包括自发性疼痛行为评分、足机械刺激后的50%缩足反射阈值 (paw withdrawal threshold, PWT)、舌机械刺激后的头部退缩反射阈值 (head withdrawal threshold, HWT)、冷刺激后的缩足反射潜伏期 (paw withdrawal latency, PWL) 以及牙齿冷刺激后的头部退缩反射潜伏期 (head withdrawal latency, HWL); 麻醉处死大鼠后, HE染色观察牙髓组织病理学变化, ELISA法测定大鼠血清中白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平。**结果** 在自发性疼痛行为方面, 造模后LPS组大鼠面部梳理时间明显多于NS组 ($P < 0.05$), 且随造模后时间延长而不断增加, 而大鼠活动时间未见明显差异。在机械痛敏方面, 造模后2 h、24 h及48 h的LPS组HWT明显低于NS组 ($P < 0.05$); LPS组和NS组大鼠的50% PWT分别较SHAM组明显降低 ($P < 0.05$), 但LPS组与NS组间未见明显差异。在冷刺激痛敏方面, LPS组较NS组大鼠的HWL在造模后2 h和48 h明显降低 ($P < 0.05$); 造模后72 h, LPS组的PWL较NS组明显降低 ($P < 0.05$)。LPS及NS组大鼠血清中IL-1 β 和TNF- α 水平在造模后2 h开始升高, 并于48 h达到峰值, 组间差异明显 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。病理学结果显示, 自造模后24 h至72 h, LPS组中性粒细胞浸润区逐渐由穿髓点依次扩大至冠髓及上段根髓, NS组较LPS组的炎症表现程度较轻。**结论** 基于大鼠行为学观察、牙髓病理学特征改变及血清炎症因子检测, LPS诱导急性牙髓炎模型可导致大鼠出现病理性疼痛和痛阈改变。

[关键词] 急性牙髓炎; 痛觉过敏; 脂多糖; 疼痛行为学; SD大鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0333-09

Evaluation of Pain in Acute Pulpitis Hyperalgesia Model Rats

ZHAO Sijia, HE Xinyu, JING Quan, MA Lin, GUO Chunlan, WAN Kuo

(Department of Stomatology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China)

Correspondence to: WAN Kuo (0000-0002-7092-1126), E-mail: wankuo@126.com

[第一作者] 赵斯佳(1989—), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事口腔镇静镇痛研究。E-mail: zhaosijia89@163.com

何新宇(1991—), 男, 博士, 住院医师, 主要从事牙体牙髓病学研究。E-mail: hexinyupumch@126.com

[通信作者] 万 阔(1970—), 男, 硕士, 主任医师, 从事口腔镇静镇痛研究。E-mail: wankuo@126.com。ORCID: 0000-0002-7092-1126

[ABSTRACT] Objective To establish a rat hyperalgesia model of acute pulpitis induced by lipopolysaccharide (LPS) administration to the maxillary molars. In addition, to analyze and evaluate the acute pain and LPS-induced pulpitis, and to investigate the change of pain threshold in rats with acute pulpitis. **Methods** Forty-five adult male Sprague-Dawley (SD) rats were equally divided into LPS group, normal saline (NS) group, and blank control (SHAM) group, with 15 rats in each group. Under isoflurane anesthesia, the rats in the LPS group had their right upper molar teeth drilled and LPS was sealed temporarily with Cavition, while those in the NS group had their right upper molar teeth drilled and normal saline was sealed temporarily with Cavition. Rats in the SHAM group, serving as blank control group, were only anesthetized with isoflurane. Pain behavioral indexes, including spontaneous pain behavior scores, 50% paw withdrawal threshold (PWT), head withdrawal thresholds (HWT), paw withdrawal latency (PWL), and head withdrawal latency (HWL) were measured before and 2 h, 24 h, 48 h, and 72 h after surgery. After rats were anesthetized and sacrificed, the pathological status of pulp tissues was confirmed with hematoxylin-eosin staining and pathological examination and serum IL-1 β and TNF- α were determined by ELISA. **Results** Concerning spontaneous pain behavior, the facial grooming time in the LPS group was significantly higher than that in the NS group postoperatively ($P < 0.05$), and increased gradually with time, although there was no significant difference in activity time. The HWT in the LPS group was significantly lower than that in the NS group at 2 h, 24 h, and 48 h postoperatively ($P < 0.05$). Additionally, 50% PWT in the LPS and NS groups were significantly lower than those in the SHAM group ($P < 0.05$). The LPS group had a significantly lower HWL than the NA group at 2 h and 48 h postoperatively ($P < 0.05$). Likewise, the PWL was significantly lower in the LPS group than the NS group ($P < 0.05$) at 72 h postoperatively. The IL-1 β and TNF- α levels in the rats' serum were significantly higher in the LPS group than in the NS group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Moreover, the IL-1 β and TNF- α levels in all groups began increasing 2 h after the model establishment, reaching a peak at 48 h. The pathological results of the LPS group showed a gradual expansion in the neutrophil infiltration area from the point of perforation to the crown pulp and upper root pulp, in 24-72 h after modeling. The rats in the NS group exhibited milder degree of inflammation than those in the LPS group. **Conclusion** Based on the observations regarding rat behavior, pathological changes of dental pulp, and detection of inflammatory factors in serum, the LPS induced acute pulpitis model causes pathological pain and pain threshold alterations in rats.

[Key words] Acute pulpitis; Hyperalgesia; Lipopolysaccharide; Pain behavior; Sprague-Dawley rats

急性牙髓炎 (acute pulpitis) 是指牙髓组织在病原刺激下发生牙髓炎性病变, 其特征是起病急、自发痛、放射痛以及冷刺激可诱发持续剧烈牙痛^[1], 且口服止痛药的治疗效果不佳。急性牙髓炎的发病率约占急性牙痛患者的 45%, 是口腔急症就诊的首位疾病^[2]。急性牙髓炎的疼痛反应虽然给患者带来巨大痛苦, 但其也可以给牙髓炎症状态的诊断提供依据, 例如牙齿冷刺激一过性或持续性疼痛, 常作为判断牙髓炎症严重程度的标准^[1]。目前针对急性牙髓炎疼痛的研究主要集中于对牙髓炎患者进行多种痛觉过敏指标的测量, 以及对牙髓炎大鼠进行炎症及疼痛分子指标的检测, 而对急性牙髓炎大鼠疼痛症状的效应评价鲜有报告。

建立恰当的急性牙髓炎疼痛效应模型, 是推动

牙髓炎疼痛机制研究和开发新治疗方式过程中必不可少的重要环节。曾有研究者采用烧器械接触牙髓炎患牙诱导大鼠嘶叫^[3], 或对大鼠牙髓炎患牙周围面部皮肤或舌体进行触碰引发头部退缩反射^[4]等方法进行疼痛模型的评估, 然而以上研究均未系统、完整地对大鼠牙髓炎模型进行疼痛效应评价。本研究参考牙髓炎动物的经典造模方法, 使用髓腔内置入脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 及亲水暂封材 Cavition 暂封造模^[5], 通过对大鼠牙髓炎症以及若干疼痛行为学指标进行观察, 分别从疼痛行为、牙髓组织形态学变化、血清炎症因子表达这 3 个方面, 验证大鼠急性牙髓炎痛敏模型的有效性, 以期后续牙髓炎疼痛的传导机制及有效镇痛药物的筛选研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

45只8周龄SPF级雄性SD大鼠,体质量为(220±20)g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0011],质量合格证号为110011211108238156。大鼠饲养于北京协和医院动物实验中心[SYXK(京)2020-0026]。饲养环境:室温(23±2)℃,12h循环灯光,自由饮食。本实验方案通过北京协和医院实验动物福利伦理委员会审核批准(伦理审批号:XHDW-2019-019),所有操作均遵循中华人民共和国《实验动物管理条例》及相关要求。

1.2 主要仪器与试剂

异氟烷购自上海恒丰强动物药业有限公司(批号20200303);LPS购自美国Sigma公司(批号20201210);Cavition购自日本而至陶齿工业株式会社(批号2012091);4%多聚甲醛组织固定液(批号20200904)、EDTA脱钙液(批号20200618)和HE染色试剂盒(批号20201207)均购自北京索莱宝科技有限公司;大鼠白细胞介素1β(interleukin-1β, IL-1β)和肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)检测用ELISA试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司(批号分别为A301B10755、A38210815)。动物麻醉机为天津森迪恒生科技公司产品(型号SD-MIII);大鼠口腔手术用鼻罩为本实验室自制(专利号:ZL2020 2 2238865.5);冷热板测痛仪为北京众实迪创科技公司产品(型号1056316);Von Frey Hairs Test触觉纤维丝为美国Stoelting公司产品(型号Von-Frey);牙齿冷测试仪为南京卡尔文生物科技有限公司产品(型号KW-YL),动物行为视频跟踪分析系统为深圳市腾安科技有限公司产品(型号TSAFE-JK6985)。

1.3 分组与造模

将大鼠适应性喂养1周后,采用随机数字表法进行分组:45只雄性SD大鼠分为空白对照组(SHAM组)、脂多糖组(LPS组)、生理盐水组(NS组),每组15只。LPS组造模方法:2%异氟烷吸入麻醉下将大鼠的右侧上磨牙开髓,表面放置浸满5g/L LPS溶液的棉球,待棉球作用30min后,Cavition暂封;NS组以同样方式封入生理盐水(即0.9%氯化钠溶液);SHAM组仅进行异氟烷麻醉。实验前将每组15只大鼠随机放入5个笼子中,每笼3只,分别于造模前(记为0h)及造模后2h、24h、48h和72h,随机选取3只大鼠,依次

进行自发性疼痛行为学评分、疼痛指标测定及处死取材。

1.4 自发性疼痛行为学评分

分别于造模前及造模后2h、24h、48h和72h将大鼠逐一置于70cm×70cm×30cm(长×宽×高)的有机玻璃透明观察箱中。待大鼠预适应30min后,使用架空于实验场上方2m的视频跟踪系统记录动物在观察箱内30min的行为,记录参数包括活动时间(测试过程中的动作秒数)、面部梳理时间和直立时间。时间记录采用秒表测量后人工计算。

1.5 机械痛阈检测

1.5.1 足机械刺激反射

分别于造模前及造模后2h、24h、48h和72h,采用Chaplan等^[6]创建的Up-Down方法对3组大鼠进行机械痛阈的检测。测量前将大鼠置于特定的铁丝网上,并盖上透明的有机玻璃罩(20cm×20cm×15cm),使大鼠适应环境30min。待大鼠安静(停止梳理毛发和探索活动)后,选用不同的Von Frey刺激丝(力量分别为0.4g、0.6g、1.0g、2.0g、4.0g、6.0g、8.0g、15.0g、26.0g),以4.0g开始将Von-Frey丝垂直刺向大鼠后足的足底中央(避开足垫),垂直用力使其轻微弯曲;每次的刺激时间≤5s,间隔时间>2min。当大鼠出现缩足或舔足行为即为阳性反应,记为“X”,下一次更换低一级力度进行刺激;反之,若出现阴性反应(大鼠无缩足或舔足行为),记为“O”,下一次换高一级力度进行刺激。由此可得到一串以“O”或“X”组合的序列。以第一次出现“X”的前一次“O”作为起点,选择包括该起点的连续6次的检测结果作为推算50%缩足反射阈值(paw withdrawal threshold, PWT)的关键序列。计算公式为 $50\% \text{ PWT (g)} = 10^{(x_f + k\delta)} / 10\,000$,式中 x_f 为序列中最末次检测Von Frey纤维丝的对数值, k 为根据检测所得“X”“O”序列查表所得, δ 为0.231。

1.5.2 舌机械刺激反射

分别于造模前及造模后2h、24h、48h和72h,在2%异氟烷轻度麻醉下,对大鼠造模牙齿侧舌缘(舌尖后方3mm)部位进行机械刺激,将双极搪瓷涂层不锈钢丝电极放置在头夹肌中记录反射响应肌电图(电极间距离5~6mm),测定头部退缩反射阈值(head withdrawal threshold, HWT)^[7]。具体是用塑料绳轻轻牵动大鼠下颌,拉开大鼠口腔,使用尖端扁平的钳子将0~130g的机械刺激作用于造模牙同侧的舌外侧边

缘进行机械刺激测试;刺激速度由人工控制,连续从0 g到阈值,速度约为10 g/s,诱发头部肌电活动改变的机械刺激阈值强度被定义为舌机械刺激HWT。

1.6 冷痛敏检测

1.6.1 足趾冷刺激反射

分别于造模前及造模后2 h、24 h、48 h和72 h,采用足底冷板测试仪检测两组大鼠患侧缩足反射潜伏期(paw withdrawal latency, PWL)。测量时将大鼠置于透明冷板测痛仪上,室温保持在(25±2)℃。大鼠安静(停止梳理毛发和探索性活动)后,从开始足底冷刺激至大鼠出现抬腿回避时的时间作为大鼠的冷刺激PWL。每只脚测试3次,每次间隔5~6 min,取3次结果的平均值^[8]。

1.6.2 牙齿冷刺激反射

分别于造模前及造模后2 h、24 h、48 h和72 h,在2%异氟烷轻度麻醉下,使用牙冷测试仪对大鼠造模牙齿表面施加逐渐降温至零度的冷刺激,将双极搪瓷涂层不锈钢丝电极放置在头夹肌中记录反射响应肌电图(电极间距离5~6 mm),测定牙齿冷痛敏潜伏期。具体是用塑料绳轻轻牵动大鼠下颌,拉开大鼠口腔,将测试仪探头置于造模牙齿表面;开启仪器,探头从室温降至0℃大约需要180 s,降温过程中冷刺激牙齿诱发肌电活动的接触秒数定义为牙齿冷刺激诱发头部退缩反射潜伏期(head withdrawal latency, HWL);采用冷刺激3次,每次间隔5~6 min,取3次结果的平均值。

1.7 外周血炎症指标检测

分别于造模前及造模后的2 h、24 h、48 h和72 h,痛阈指标检测完成后,将异氟烷剂量迅速调大至5%;待大鼠失去意识后,采集各组大鼠心脏血液;血液经离心(2 000 r/min)后,留取血清,采用ELISA法测定各组大鼠血清中IL-1β和TNF-α水平。

1.8 牙髓组织病理学观察

3组大鼠分别于造模前及造模后的2 h、24 h、48 h和72 h,5%异氟烷麻醉取血后断颈处死,然后将右侧造模患牙及周围牙槽骨完整取出,用质量分数为4%的多聚甲醛溶液固定,用EDTA溶液浸泡脱钙8周,脱水包埋切片后进行苏木精-伊红染色。光学显微镜下观察组织病理学改变。

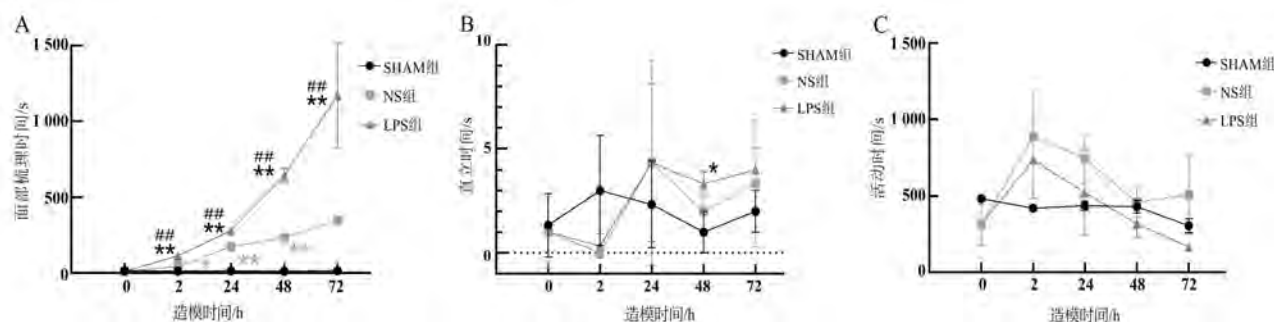
1.9 统计学分析

应用SPSS 23.0软件进行实验数据分析。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用重复测量方差分析法进行分析,组间比较采用Tukey检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的自发疼痛行为学差异

造模前,3组大鼠的自发性疼痛行为学评分均无明显差异。造模后2 h、24 h、48 h和72 h,NS组大鼠面部梳理时间显著多于SHAM组,同时LPS组大鼠面部梳理时间明显多于SHAM组和NS组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),提示造模后大鼠面部呈现渐进性疼痛(图1A)。



注: A为面部梳理时间; B为直立时间; C为活动时间。SHAM组指仅进行异氟烷麻醉的空白对照组, LPS组指异氟烷麻醉下大鼠右上磨牙开髓并暂封脂多糖组, NS组指异氟烷麻醉下大鼠右上磨牙开髓并暂封生理盐水组; 造模前每组15只大鼠, 造模后各时间点每组3只大鼠。与SHAM组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与NS组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: A, Facial grooming time; B, Upright time; C, Activity time. The rats in the SHAM group, a blank control group, only anesthetized with isoflurane; Under isoflurane anesthesia, the rats in the LPS group had their right upper molar teeth drilled and lipopolysaccharide was sealed temporarily with Cavition, while those in the NS group had their right upper molar teeth drilled and normal saline was sealed temporarily with Cavition. There were 15 rats in each group before modeling and 3 rats in each group at different time points after successful modeling. Compared with the SHAM group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with the NS group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

图1 急性牙髓炎模型大鼠自发性疼痛行为学评价

Figure 1 Evaluation of spontaneous pain in acute pulpitis model rats

造模后48 h, LPS组大鼠的直立时间较SHAM组明显升高 ($P < 0.05$), 其余组间未见明显差异 ($P > 0.05$, 图1B)。造模后各组大鼠的活动时间差异均没有统计学意义 ($P > 0.05$, 图1C)。

2.2 各组大鼠的机械痛觉过敏行为学差异

造模前, 3组大鼠的50% PWT均无明显差异 ($P > 0.05$); 造模后, LPS组和NS组之间大鼠50% PWT差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。造模后2 h、24 h、48 h和72 h, NS组大鼠的50% HWT明显低于SHAM组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 造模后2 h、48 h和72 h, LPS组大鼠的50% HWT明显低于SHAM组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 提示大鼠发生机械痛觉过敏现象 (图2A)。

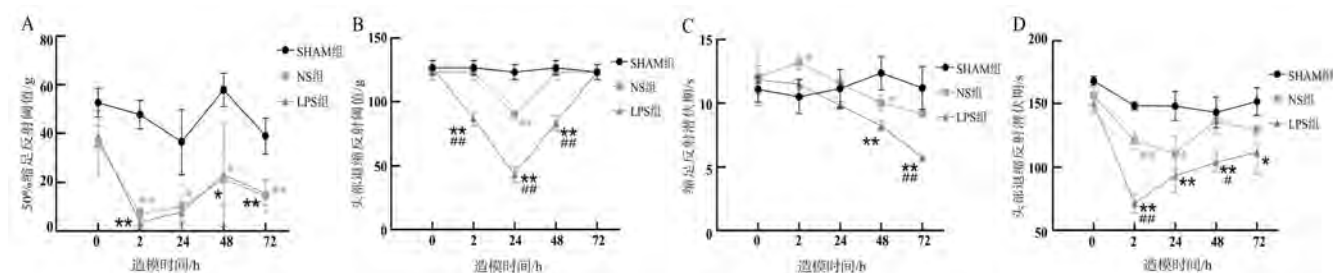
造模前, 3组大鼠HWT未见明显差异 ($P > 0.05$); 造模后72 h, 3组间HWT也未见明显差异 ($P > 0.05$)。造模后24 h, NS组大鼠的HWT明显低于SHAM组 ($P < 0.01$); 造模后2 h、24 h及48 h, LPS组大鼠的HWT明显低于SHAM组及NS组 ($P < 0.01$), 提示大鼠

出现面部机械痛觉过敏 (图2B)。

2.3 各组大鼠的冷刺激痛觉过敏差异

造模前, 3组大鼠PWL均无明显差异 ($P > 0.05$)。造模后2 h, NS组大鼠PWL较SHAM组明显升高 ($P < 0.05$); 造模后48 h, NS组大鼠PWL较SHAM组明显降低 ($P < 0.05$); 造模后48 h和72 h, LPS组PWL较SHAM组明显降低 ($P < 0.01$); 造模后72 h, LPS组PWL较SHAM组及NS组明显减低 ($P < 0.01$) (图2C)。

造模前, 3组大鼠HWL均无明显差异 ($P > 0.05$)。造模后2 h和24 h, NS组大鼠较SHAM组大鼠的HWL明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 造模后2 h、24 h、48 h和72 h, LPS组较SHAM组大鼠的HWL明显降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 造模后的2 h和48 h, LPS组较NS组大鼠的HWL明显降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 提示大鼠出现牙齿冷刺激痛觉过敏 (图2D)。



注: A为足机械刺激后的50%缩足反射阈值; B为舌机械刺激后的头部退缩反射阈值; C为足趾冷刺激后的缩足反射潜伏期; D为牙齿冷刺激后的头部退缩反射潜伏期。SHAM组指仅进行异氟烷麻醉的空白对照组, LPS组指异氟烷麻醉下大鼠右上磨牙开髓并暂封脂多糖组; NS组指异氟烷麻醉下大鼠右上磨牙开髓并暂封生理盐水组, 造模前每组15只大鼠, 造模后各时间点每组3只大鼠。与SHAM组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与NS组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

Note: A, 50% Paw withdrawal threshold (50% PWT); B, Head withdrawal threshold (HWT); C, Paw withdrawal latency (PWL); D, Head withdrawal latency (HWL). The rats in the SHAM group, a blank control group, only anesthetized with isoflurane; Under isoflurane anesthesia, the rats in the LPS group had their right upper molar teeth drilled and lipopolysaccharide was sealed temporarily with Caviton, while those in the NS group had their right upper molar teeth drilled and normal saline was sealed temporarily with Caviton. There were 15 rats in each group before modeling and 3 rats in each group at different time points after successful modeling. Compared with the SHAM group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with the NS group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

图2 急性牙髓炎模型大鼠机械刺激及冷刺激下的痛阈变化

Figure 2 Mechanical and cold pain threshold of acute pulpitis model rats

2.4 各组大鼠的患牙组织病理学变化

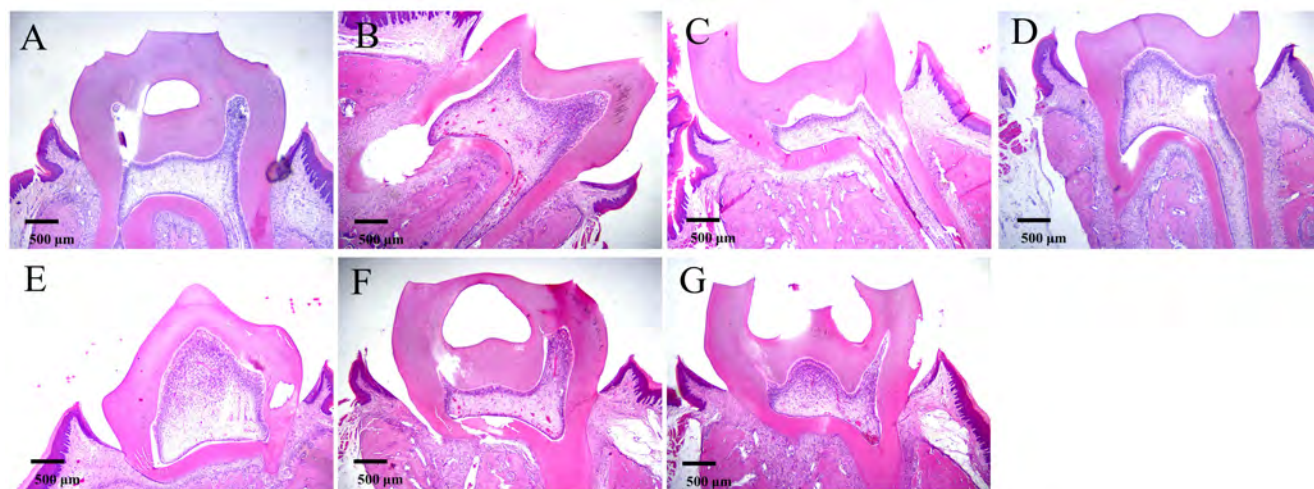
HE染色结果提示, 造模后24 h, LPS组可见穿髓点下方呈现以中性粒细胞浸润为主的急性浆液性炎症, 局部充血; 成牙本质细胞层排列稍紊乱; 部分牙髓变性坏死, 根髓基本正常 (图3A)。NS组与LPS组情况基本相同 (图3E)。SHAM组成牙本质细胞排列规则, 未见明显的炎症细胞浸润及血管扩张 (图3D)。

造模后48 h, LPS组穿髓点周围呈现部分灶性坏死, 中性粒细胞浸润较前更为明显; 成牙本质细胞层排列稍紊乱; 根髓充血 (图3B)。NS组与LPS组情况基本相同 (图3F)。

造模后72 h, LPS组冠髓区范围扩大, 累及上段根髓, 周围有大量粒细胞和部分单核-巨噬细胞浸润, 偶见淋巴细胞; 炎细胞浸润区周围可见少量纤维组织包

绕,成纤维细胞增生,部分细胞呈环状排列;根髓小血管明显扩张,根髓成牙本质细胞排列紊乱、变性,

无炎细胞浸润(图3C)。与LPS组相比,NS组炎症表现程度较轻(图3G)。



注: A~C分别为LPS组造模后24 h、48 h和72 h; D为正常对照(SHAM组); E~G分别为NS组造模后24 h、48 h和72 h。SHAM组指仅进行异氟烷麻醉的空白对照组, LPS组指异氟烷麻醉下大鼠右上磨牙开髓并暂封脂多糖组; NS组指异氟烷麻醉下大鼠右上磨牙开髓并暂封生理盐水组, 造模前每组15只大鼠, 造模后各时间点每组3只大鼠。

Note: A-C, LPS groups at 24, 48, and 72 h after modeling, respectively; D, Normal control; E-G, NS groups at 24, 48, and 72 h after modeling, respectively. The rats in the SHAM group, a blank control group, only anesthetized with isoflurane; Under isoflurane anesthesia, the rats in the LPS group had their right upper molar teeth drilled and lipopolysaccharide was sealed temporarily with Caviton, while those in the NS group had their right upper molar teeth drilled and normal saline was sealed temporarily with Caviton. There were 15 rats in each group before modeling and 3 rats in each group at different time points after successful modeling.

图3 LPS和NS诱导大鼠急性牙髓炎的组织病理变化(HE, 40倍)

Figure 3 Histopathological changes of LPS and NS induced acute pulpitis in rats (HE, ×40)

2.5 各组大鼠的血清IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达水平

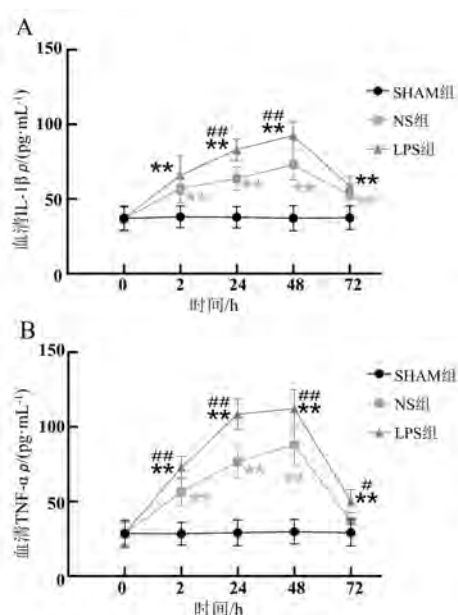
造模后, LPS组和NS组大鼠血清中IL-1 β 和TNF- α 蛋白表达水平显著高于SHAM组($P < 0.01$), 并均在造模后48 h达到最高值; 造模后24 h和48 h, LPS组IL-1 β 蛋白表达水平显著高于NS组($P < 0.01$); 造模后2 h、24 h、48 h和72 h, LPS组TNF- α 蛋白表达水平明显高于NS组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(图4)。

3 讨论

急性牙髓炎痛敏评价模型的建立是研究牙痛传导机制的基础。通过在动物模型上模拟临床急性牙髓炎的发生发展过程, 研究者可以重现急性牙髓炎的症状体征以及病理改变, 并进一步探究牙髓炎的发病机制及开发牙痛治疗新方法。目前, 国内外有多种成熟的牙髓炎造模方法, 然而对牙髓炎动物模型的痛敏评价较为简单粗糙, 缺乏一个完善的系统。

由于疼痛效应测量体系的影响因素复杂多样, 因此选择稳定的急性牙髓炎造模方法, 稳定可控地完成疾病模型的建立十分重要。牙髓炎的病理改变可分为

三种类型: I型为牙髓轻度损伤无坏死; II型为中度牙髓损伤, 牙髓部分坏死; III型为不可逆性牙髓炎, 牙髓逐步坏死并出现全身炎症反应^[9]。本研究选取稳定的III型牙髓病理结果作为造模标准, 并进行痛敏评价。目前, 不可逆性牙髓炎的造模方法主要包括LPS诱导法、弗氏佐剂诱导法、软龋置入法、牙髓暴露法等^[10]。由于弗氏佐剂诱导大鼠牙髓炎的病程较长, 软龋置入法具有较大的操作误差, 牙髓暴露法将牙髓直接暴露于口腔环境, 因此均不利于建立稳定的急性牙髓炎模型。LPS是革兰阴性菌细胞壁的组成部分, 广泛存在于组织炎症反应中^[11]。本研究采取LPS诱导法进行大鼠急性牙髓炎的造模。病理结果显示, 造模后24~72 h, LPS模型组冠髓区域出现充血至灶性坏死表现, 炎症范围逐渐扩散至根髓区域。顾斌等^[12]采用将LPS纸尖封入窝洞后暂封的方法, 由于纸尖吸纳的LPS剂量大, 病程进展较快, 造模后48 h可见冠髓区脓肿明显, 根髓散在大量中性粒细胞, 部分动物出现牙槽骨脓肿。牙髓暴露法建立牙髓炎模型的相对病程较长, 造模后7~14 d患牙的冠髓及根髓相继坏死^[10, 13-14]。



注：A为血清IL-1 β ；B为血清TNF- α 。SHAM组指仅进行异氟烷麻醉的空白对照组，LPS组指异氟烷麻醉下大鼠右上磨牙开髓并暂封脂多糖组；NS组指异氟烷麻醉下大鼠右上磨牙开髓并暂封生理盐水组，造模前每组15只大鼠，造模后各时间点每组3只大鼠。与SHAM组比较，* P <0.05，** P <0.01；与NS组比较，# P <0.05，## P <0.01。

Note: A, IL-1 β levels in serum; B, TNF- α levels in serum. The rats in the SHAM group, a blank control group, only anesthetized with isoflurane; Under isoflurane anesthesia, the rats in the LPS group had their right upper molar teeth were drilled and lipopolysaccharide was sealed temporarily with Caviton, while those in the NS group had their right upper molar teeth were drilled and normal saline was sealed temporarily with Caviton. There were 15 rats in each group before modeling and 3 rats in each group at different time points after successful modeling. Compared with the SHAM group, * P <0.05, ** P <0.01; Compared with the NS group, # P <0.05, ## P <0.01.

图4 急性牙髓炎模型大鼠血清炎症因子水平变化

Figure 4 Changes in serum inflammatory factors in acute pulpitis model rats

急性牙髓炎的疼痛表现多样，包括自发牙痛、临近组织放射痛和冷刺激诱发神经痛^[15]。目前，牙髓炎疼痛的传导机制尚不明确。有学者提出，牙髓炎机械刺激及冷刺激疼痛可能是外周感受器和中枢神经系统敏化^[16]共同导致的痛觉超敏现象^[17]。曾有多位学者建立大鼠牙髓炎模型并进行疼痛评价，但检测部位多为牙齿旁边组织如面部皮肤、舌体组织，检测类型多为机械痛阈的测定^[4, 7-19]。虽然面部皮肤、舌体、牙髓均为三叉神经分支的分布区域，但牙齿与软组织在解剖结构上存在明显差异。目前的研究存在缺少对牙齿痛阈的检测、痛阈类型测量不够全面、外周与中

枢敏化检测尚未得到有效区分等问题。因此，需要新的痛敏评价体系对大鼠疼痛状态进行包括患牙在内多部位、多方法的系统性评价。

本研究结果显示，在自发痛行为评价中，LPS组与NS组的大鼠面部梳理时间均随牙髓炎的炎症程度加重而显著增加，与Lin等^[4]研究一致。LPS组与NS组存在显著差异，可见面部梳理时间可较为准确地反映大鼠牙髓炎自发痛的程度。活动时间和直立时间分别反映了大鼠自发行为和探索行为^[18]。本研究并未直接评估颌面部大鼠行为，对口腔颌面部疼痛评估的特异性欠佳。本实验发现，造模后大鼠足爪50% PWT和HWT明显降低，提示外周及中枢机械痛觉过敏的发生，与Ohara等^[7]和Watase等^[19]学者的研究结果一致。本实验中，对造模后不同时间的血清炎症因子IL-1 β 和TNF- α 进行检测，结果显示，IL-1 β 和TNF- α 在造模后升高，并在术后48 h达到峰值。Lin等^[4]研究表明，急性牙髓炎模型大鼠血清炎症因子IL-1 β 和TNF- α 水平在术后1 d时显著升高。IL-1 β 和TNF- α 可增加神经元的兴奋性和敏感性，从而导致温度及机械痛觉过敏。此外，Worsley等^[20]也证实，大鼠牙髓炎症可导致长期中枢致敏改变。

此前尚无大鼠急性牙髓炎的冷刺激痛觉过敏研究。本实验结果发现，LPS组与NS组大鼠牙齿冷刺激痛觉过敏阈值降低，且两组间存在显著差异；而足爪冷刺激阈值差异不明显，与临床研究结果存在一致性。临床研究显示，不可逆性牙髓炎患者的口内机械痛觉过敏及冷痛觉过敏反应的发生率明显高于健康人群^[21]，牙本质过敏^[22]和不典型牙痛患者^[23]的牙齿冷刺激敏感程度均有升高，而全身冷刺激阈值无明显改变。因此，牙齿冷刺激痛觉过敏可能仅与牙齿内部神经元改变有关。最近一项研究通过体外制备小鼠下颌神经超活体模型发现，成牙本质细胞是牙齿冷传导的起始部位^[24]。

综上所述，本实验成功建立了大鼠急性牙髓炎痛敏评价模型，该模型可有效引发大鼠的局部牙髓炎症状，疼痛效应评价符合牙髓炎患者的临床测试结果。由于实验研究对象是大鼠的主观感受，在模型动物以及实验者主观感觉判断上均存在一定程度的不稳定性，因此导致本实验中部分痛阈指标存在标准误差较大的情况；但是血清学检测结果相对稳定，证实了本研究造模的可信性。此外，本实验还存在着疼痛评价较为复杂、疼痛机制研究不够深入等问题，仍需要继续探索。

总之,急性牙髓炎痛敏模型对牙髓炎疼痛传导、外周及中枢致敏机制以及牙痛治疗方法研究具有重要的应用价值,值得进一步推广。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过北京协和医院实验动物管理与伦理委员会审查批准(伦理审批号:XHDW-2019-019)。所有实验过程均遵照实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of Peking Union Medical College Hospital (Approval Letter No. XHDW-2019-019), and all experimental protocols were carried out following the guidelines such as *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892—2018) and ARRIVE 2.0.

[作者贡献 Author Contribution]

赵斯佳负责实验设计、采集分析数据和文章撰写;何新宇负责实验内容补充整理和文章修改指导;景泉负责实验相关英文材料的翻译和整理;马林和郭春岚负责实验指导和技术支持;万阔负责实验指导和经费支持。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- JESPERSEN J J, HELLSTEIN J, WILLIAMSON A, et al. Evaluation of dental pulp sensibility tests in a clinical setting [J]. *J Endod*, 2014, 40(3):351-354. DOI:10.1016/j.joen.2013.11.009.
- BAI J, XU T, JI A P, et al. Impact of COVID-19 on oral emergency services[J]. *Int Dent J*, 2021, 71(1): 27-31. DOI: 10.1111/idj.12603.
- 林正梅,凌均启,凌征宇,等. 实验性牙髓炎疼痛动物模型的建立[J]. *广东牙病防治*, 1999, 7(4):249-251.
LIN Z M, LIN J Q, LING Z Y, et al. Establishment of Animal Model about Dental Pain Caused by Experimental Pulpitis [J]. *Journal of dental prevention and treatment*, 1999, 7(4): 249-251.
- LIN J J, DU Y, CAI W K, et al. Toll-like receptor 4 signaling in neurons of trigeminal ganglion contributes to nociception induced by acute pulpitis in rats[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12549. DOI:10.1038/srep12549
- LI M, TIAN J, XU Z, et al. Histology-based profile of inflammatory mediators in experimentally induced pulpitis in a rat model: screening for possible biomarkers[J]. *Int Endod J*, 2021, 54(8):1328-1341. DOI:10.1111/iej.13514.
- CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1):55-63. DOI:10.1016/0165-0270(94)90144-9.
- OHARA K, SHIMIZU K, MATSUURA S, et al. Toll-like receptor 4 signaling in trigeminal ganglion neurons contributes tongue-referred pain associated with tooth pulp inflammation[J]. *J Neuroinflammation*, 2013, 10: 139. DOI: 10.1186/1742-2094-10-139.
- HARA K, HARANISHI Y, KATAOKA K, et al. Chlorogenic acid administered intrathecally alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 723: 459-464. DOI: 10.1016/j.ejphar. 2013. 10.046.
- BYERS M R, NÄRHI M V. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1999, 10(1):4-39. DOI:10.1177/10454411990100010101.
- 高磊,栗红师,闫磊,等. 大鼠实验性牙髓炎痛敏模型的建立及检验[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2015, 25(5):299-303, 328. DOI:10.15956/j.cnki.chin.j.conserv.dent.2015.05.008.
GAO L, LI H S, YAN L, et al. Establishment and verification of rat experimental hyperalgesic pulpitis[J]. *Chin J Conserv Dent*, 2015, 25(5): 299-303, 328. DOI: 10.15956/j. cnki. chin. j. conserv.dent.2015.05.008.
- NING T, SHAO J, ZHANG X, et al. Ageing affects the proliferation and mineralization of rat dental pulp stem cells under inflammatory conditions[J]. *Int Endod J*, 2020, 53(1):72-83. DOI:10.1111/iej.13205.
- 顾斌,刘洪臣,郭宏,等. 大鼠急性牙髓炎动物模型的建立[J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2009, 7(5):304-307. DOI:10.3969/j.issn. 1672-2973.2009.05.019.
GU B, LIU H C, GUO H, et al. Establishment of central hyperalgesia animal model induced by acute pulpitis[J]. *Chin J Geriatr Dent*, 2009, 7(5): 304-307. DOI:10.3969/j. issn. 1672-2973.2009.05.019.
- FAN W G, HUANG F, ZHU X, et al. Involvement of microglial activation in the brainstem in experimental dental injury and inflammation[J]. *Arch Oral Biol*, 2010, 55(9): 706-711. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2010.06.007.
- NAKAMURA K, YAMASAKI M, NISHIGAKI N, et al. Effect of methotrexate-induced neutropenia on pulpal inflammation in rats[J]. *J Endod*, 2002, 28(4):287-290. DOI:10.1097/00004770-200204000-00007.
- ALGHAITHY R A, QUALTROUGH A J E. Pulp sensibility and vitality tests for diagnosing pulpal health in permanent teeth: a critical review[J]. *Int Endod J*, 2017, 50(2):135-142. DOI:10.1111/iej.12611.
- VIANA F. Nociceptors: thermal allodynia and thermal pain[J]. *Handb Clin Neurol*, 2018, 156:103-119. DOI:10.1016/B978-0-444-63912-7.00006-0.
- LE FUR-BONNABESSE A, BODÉRE C, HÉLOU C, et al. Dental pain induced by an ambient thermal differential: pathophysiological hypothesis[J]. *J Pain Res*, 2017, 10: 2845-2851. DOI:10.2147/JPR.S142539.
- 张换鸽,党延红,胡柏平. 不同运动方式干预对攻击行为大鼠情绪行为的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(2):97-102. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2020.02.015.

- ZHANG H G, DANG Y H, HU B P. Effects of different types of exercise on emotion and behavior in aggressive rats[J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2):97-102. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2020.02.015.
- [19] WATASE T, SHIMIZU K, KOMIYA H, et al. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 channel expression in orofacial cutaneous hypersensitivity following tooth pulp inflammation[J]. J Oral Sci, 2018, 60(1): 8-13. DOI: 10.2334/josnusd.16-0854.
- [20] WORSLEY M A, ALLEN C E, BILLINTON A, et al. Chronic tooth pulp inflammation induces persistent expression of phosphorylated ERK (pERK) and phosphorylated p38 (pp38) in trigeminal subnucleus caudalis[J]. Neuroscience, 2014, 269: 318-330. DOI:10.1016/j.neuroscience.2014.03.056.
- [21] COSTA Y M, DE SOUZA P R J, MARQUES V A S, et al. Intraoral somatosensory alterations impact pulp sensibility testing in patients with symptomatic irreversible pulpitis[J]. J Endod, 2020, 46(6):786-793. DOI:10.1016/j.joen.2020.03.012.
- [22] RAHAL V, GALLINARI M O, BARBOSA J S, et al. Influence of skin cold sensation threshold in the occurrence of dental sensitivity during dental bleaching: a placebo controlled clinical trial[J]. J Appl Oral Sci, 2018, 26: e20170043. DOI: 10.1590/1678-7757-2017-0043.
- [23] BAAD-HANSEN L, PIGG M, IVANOVIC S E, et al. Intraoral somatosensory abnormalities in patients with atypical odontalgia: a controlled multicenter quantitative sensory testing study[J]. Pain, 2013, 154(8): 1287-1294. DOI: 10.1016/j.pain.2013.04.005.
- [24] BERNAL L, SOTELO-HITSCHFELD P, KÖNIG C, et al. Odontoblast TRPC5 channels signal cold pain in teeth[J]. Sci Adv, 2021, 7(13): eabf5567. DOI:10.1126/sciadv.abf5567.
- (收稿日期:2021-11-17 修回日期:2022-03-29)
(本文编辑:张俊彦,富群华,周烁)

2022年版ICMJE推荐规范的更新内容

2022年5月,国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE)发布了《学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》(*Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals*) 更新版,简称“2022年版ICMJE推荐规范”。现将主要的更新内容摘译如下,其中下划线处为新增内容。正式的英文版本见www.icmje.org。若需引用,请用英文官方版本。

III.D.2. 重复发表和预先发表

本推荐规范并不阻止期刊考虑发表之前已发布初步报告(如致编辑的信、预印本、科学会议摘要或壁报)后的完整报告。ICMJE 不认为卫生技术评估机构、医疗监管机构、医疗器械监管机构或其他监管机构发布的评估报告中包含的结果或数据再发表于期刊是重复发布。本规范也不阻止期刊考虑发表一篇已经在科学会议上展示过但尚未全文发表的论文,或拟在会议论文集以类似形式发表的论文。对会期已定的科学会议的新闻报道通常不视为违反这项规定,但如果额外的图表数据扩充了这些报道的话,就另当别论。作者还应该认识到,在科学会议上以学术报告之外的方式传播他们的研究成果,可能会使期刊编辑降低他们论文发表的优先级。

IV.A.3.d.i. 受试者的选择与描述

应清晰地描述观察或试验对象(健康人或患者,包括对照)的选择,包括纳入和排除标准以及对源人群的说明。由于在研究设计时不一定知道年龄、性别或种族等变量与研究的相关性,研究者应尽量在各种类型的研究中纳入代表性人群,至少提供这些变量及其他相关人口学变量的描述性数据资料。评论研究样本在更大范围研究人群中的代表性。

确保正确使用表示“性别”的两个词:生物性别 sex(报告生物因素时使用)和社会性别 gender(报告身份、社会心理或文化因素时使用)。正常情况下,应当报告受试者的性别[sex和(或)gender],以及动物或细胞的性别(sex),并描述用于确定性别的方法。如果研究仅涉及某一专门人群,例如仅在一种性别的人中实施,则作者应解释原因,除非是很显然的情况(如前列腺癌)。作者应说明,他们是如何确定种族或民族的,以及如何确定其与研究的相关性。如果没有收集种族或民族信息,则要解释为什么没有收集。种族和民族是社会学而非生物学概念,作者应该从这个角度来解释与种族和民族相关的试验结果。作者应该使用中立、精确和礼貌的语言来描述受试者,避免使用可能具有侮辱性的用词。

(张俊彦、于笑天、汪源,摘译)

阿尔茨海默病动物模型的研究进展

盛哲津¹, 李利妹²

(1. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; 2. 同济大学附属东方医院医学转化平台, 上海 200120)

[摘要] 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的老年性神经退行性疾病之一, 严重威胁着老年人的健康。目前被批准用于治疗AD的药物只能缓解AD的症状, 不能治愈AD或阻止其恶化。近40年来, 虽然AD的治疗方法层出不穷, 包括阻止脑淀粉样蛋白沉积或清除已有淀粉样蛋白斑块的化合物, 但是它们的临床疗效并不显著。因此, 需要更多的基础和临床研究来深入探讨AD疾病生物学机制。实验动物模型不仅对AD发病机制的研究, 还对AD药物的开发都非常重要。本综述从AD病理组织学特征和遗传因素出发, 论述已有的AD动物模型以及其评价方法。

[关键词] 阿尔茨海默病; 动物模型; 病理组织学特征; 淀粉样蛋白; 评价

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0342-09

Research Progress in Animal Model of Alzheimer's Disease

SHENG Zhejin¹, LI Limei²

(1. School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Research Center for Translational Medicine, Shanghai East Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200120, China)

Correspondence to: LI Limei (ORCID: 0000-0001-7027-4216), E-mail: 13601868653@163.com

[ABSTRACT] Alzheimer's disease (AD) is one of the most common neurodegenerative diseases, which seriously affects the health of the elderly people. The drugs currently approved for the treatment of AD can only reduce the symptoms severity of AD, but can't cure AD or prevent the deterioration of AD. Over the past 40 years, there have been numerous treatments for AD, including compounds that prevent amyloid deposition in the brain or remove existing amyloid plaques, but their clinical curative effects are not significant. Therefore, more basic and clinical studies are needed to improve our understanding of the biological mechanism of AD. Experimental animal models are very important not only for the study of the pathogenesis of AD, but also for the development of AD drugs. This paper reviewed the main histopathological characteristics, genetic factors, the current animal models and model evaluation of AD.

[Key words] Alzheimer's disease; Animal models; Histopathological characteristics; Amyloid; Evaluation

随着社会不断进步、生活水平大幅提高, 全球老龄化日益严重, 随之与年龄有关的疾病正威胁着全世界老年人的健康。阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最重要、最常见的年龄相关神经退行性疾病之一, 也是痴呆症最常见的病因^[1]。AD患者占年龄相关痴呆诊断病例的60%~80%^[1-2]。根据发病年龄的不同, AD可分为65岁以前发病的早发性痴呆和65岁以后发病的老年性痴呆^[2]。1906年, 阿洛伊斯·阿尔茨海默检查了一位失忆了3年后死亡妇女的大脑, 发现

了一些不寻常的团块 (称淀粉样斑块) 和纤维缠结 (称神经原纤维, 或Tau缠结)^[3]。如今, 大脑中的这些斑块和缠结被认为是AD的主要病理性特征^[2,4]。此外, AD的诊断至少还需要两种临床症状, 包括记忆丧失, 语言、注意力、判断和解决问题等能力受损^[5]。根据AD疾病的主要特征, 目前已开发了几种治疗AD的方法。譬如, 乙酰胆碱酯酶抑制剂和N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体拮抗剂, 尝试通过恢复大脑中神经递质水平治疗AD, 但临

[第一作者] 盛哲津 (1982—), 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 实验室管理与模式生物技术。E-mail: zhejinsheng@tongji.edu.cn

[通信作者] 李利妹 (1980—), 女, 博士, 助理研究员, 专业方向为小鼠模型及表皮干细胞的功能研究。E-mail: 13601868653@163.com。ORCID: 0000-0001-7027-4216

床结果显示只能缓解AD患者的症状,并不能真正治愈AD^[6-7]。理论上真正有效治愈AD的策略应该是阻止引起神经退行性病变的发病进程,但目前的治疗都只是降低症状发生率。因此,需要进一步探究AD致病机制及新的更有效的治疗策略。

AD是一种由多病因引起且病理学极其复杂的疾病^[8]。实验动物模型不管是对AD发病机制的研究还是对药物的开发都非常重要。为了帮助阐明AD的致病机制,目前已建立了多种动物模型,包括转基因小鼠、果蝇、鱼和蠕虫等^[9]。利用上述动物模型模拟人类AD组织病理学的各个方面特征,譬如 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)异常沉积的斑块和Tau蛋白异常聚集形成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs),这些模型大大加深了人们对AD发病机制的理解^[10-11]。另外,合适的动物模型也是候选药物进入临床前研究时一个非常重要的工具或条件。本文就AD的主要病理组织学特征、遗传因素、有关动物模型以及其评价指标进行综述。

1 AD的主要病理组织学特征

AD的临床表现以记忆缺陷为主,随后其他认知功能如判断、语言流利性或方向性逐渐减退。尽管上述AD临床症状出现的次序可能会有所不同,但记忆损伤通常是第一个也是最主要的特征^[12]。大量研究发现AD患者的海马结构、大脑皮层联合区和皮质下结构等区域发生了一些神经病理学改变。

1.1 A β 斑块

A β 斑块是AD的组织病理学特征之一^[4]。淀粉样蛋白是一类含有 β -折叠的异质性蛋白质聚集体,对刚果红染料具有很强的亲和力。AD患者体内A β 沉积在脑膜、脑血管周围和灰质,是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经 β -分泌酶和 γ -分泌酶的蛋白水解作用产生,其主要的蛋白质成分是40~42个氨基酸组成的多肽^[13]。A β 40是最常见的亚型;A β 42较不常见,但更容易聚集,且神经毒性更强^[13]。根据“淀粉样蛋白假说”,大脑中A β 的产生引发一系列病理变化,从而导致相应的AD临床症状^[14]。在能够引发A β 产生的转基因小鼠中,记忆障碍的严重程度与A β 斑块数量呈正相关^[15]。主动或被动进行A β 特异免疫可去除A β 斑块,恢复记忆功能^[16]。这些现象表明AD的产生与A β 斑块密切相关。

1.2 Tau蛋白的异常磷酸化与NFTs

AD的第二个病理组织学特征是神经原纤维退行性病变,称为NFTs,主要分布在神经元的胞体和顶端树突中^[4]。NFTs数量与痴呆严重程度之间存在正相关性^[17]。细胞内NFTs的核心蛋白为Tau蛋白,它们异常聚集形成不溶性的斑块。Tau是一种微管相关蛋白,在稳定微管方面起主要作用,还参与信号转导、肌动蛋白细胞骨架形成、细胞内囊泡转运以及磷酸酶和激酶的锚定^[18]。在AD等病理情况下,Tau蛋白被异常过度磷酸化,导致其正常生物功能丧失;而且过度磷酸化的Tau蛋白易于与微管分离,增加了Tau蛋白的可溶性,这可能是Tau长丝组装的第一步^[18]。在AD患者的大脑中,Tau还发生构象改变,可溶性Tau以一种自然未折叠的构象存在^[18]。此外,有研究还发现NFTs大量存在于其他神经退行性疾病中,如进行性核上性麻痹(progressive supranuclear palsy)、皮质基底节变性(corticobasal degeneration)、嗜银颗粒病(argyrophilic grain disease)等^[19]。虽然NFTs并不是AD特有的,但是它们与神经退行性疾病密切相关。

此外,A β 斑块和NFTs之间有协同作用。A β 斑块和NFTs经常一起存在于异常的神经突中^[20]。因此,共同表达突变APP和Tau的双转基因动物模型,对研究两种病变的相互作用非常有价值。

1.3 神经炎症

越来越多的研究发现神经炎症反应会造成神经元损伤,加重AD症状,于是人们推测炎症是AD的一个可能致病因素,但直到近年来才将其作为治疗靶点而得到重视^[21-22]。错误折叠/聚集的蛋白质与小胶质细胞或星形胶质细胞上的模式识别受体结合,激活以炎性介质为特征的先天性免疫反应,促进AD疾病的发展。有证据表明,胶质细胞的激活可能通过释放白细胞介素-1和肿瘤坏死因子等细胞因子来驱动AD的慢性炎症^[21]。另外,全身性炎症和肥胖可能会干扰大脑的免疫过程,从而进一步加剧AD疾病的进展^[21]。一些研究表明,常年使用抗炎药治疗类风湿关节炎的患者对痴呆症的发生似乎有抵抗力^[22]。

1.4 与代谢异常的关系

有研究认为AD可以称为“3型糖尿病”,因为某些形式的AD与胰岛素抵抗有关,而胰岛素抵抗是2型糖尿病的主要原因^[23]。2型糖尿病患者患老年痴呆症或血管性痴呆症的风险似乎也更大。上述发现促使研究人员开始寻找血糖紊乱与神经退行性病变的潜在关

系, 而且尝试将控制血糖的药物用于AD的防治中^[24]。

2 AD的遗传因素

在AD的复杂病因中, 除了环境因素外, 遗传因素起主要作用。根据遗传因素, 将AD分为两种类型: 家族性AD (familial AD, FAD) 和散发型AD (sporadic AD, SAD)^[25]。

2.1 FAD

FAD一般在65岁之前发病, 比较罕见, 占有AD病例的1%。该类型的AD通常由3个基因的一个显性突变导致。这3个基因分别为*APP*、早老素1 (presenilin-1, *PSEN1*) 和早老素2 (presenilin-2, *PSEN2*)^[26]。

*APP*基因突变约占FAD的5%。1991年, 在英国一个FAD家族中发现*APP*基因的第一个错义突变, 即171位的缬氨酸被异亮氨酸取代 (V717I), 后被称为“伦敦突变”^[27]。随后, 研究人员发现了更多的等位基因变异, 目前共鉴定出20多种*APP*基因的致病性突变。另外在瑞典的2个FAD家族中发现670位和671位密码子发生双碱基对替换, 导致赖氨酸和蛋氨酸被天冬氨酸和亮氨酸取代 (K670D/M671L), 被称为“瑞典突变”, 简称APP^{sw}^[28]。

1992年, 通过对14号染色体的连锁分析发现了第2个FAD基因座, 通过定位克隆鉴定发现*PSEN1*基因^[29]。进一步通过与*PSEN1*的同源性鉴定, 又找到了位于1号染色体的*PSEN2*^[29]。大多数FAD病例是由*PSEN1*和*PSEN2*基因突变引起。迄今为止, 已经发现了120多个*PSEN1*基因突变, 而*PSEN2*基因突变只有8个。

在FAD中没有发现*Tau*基因突变。但是1998年在17号染色体连锁伴帕金森病的额颞痴呆 (chromosome 17 in families with frontotemporal degeneration and parkinsonism, FTDP-17) 中发现了*Tau*基因突变^[30]。FTDP-17是一种与AD相关的家族性痴呆症。这些发现表明*Tau*的功能异常可导致神经退行性病变, 进而引起痴呆。除了额颞痴呆外, *Tau*突变还可引起多种疾病, 如进行性皮质下胶质增生、皮质基底节变性和苍白球脑桥黑质变性^[31]。

2.2 SAD

SAD大多在65岁以后发病, 称为迟发性AD, 在老年人中较常见, 但无明显家族遗传。FAD与SAD的组织病理学特征难以区分。流行病学研究表明, 大约

30%的SAD患者中至少有一个一级亲属患病的家族病史, 其中10%有明显的常染色体显性遗传^[25]。一些基因位点的多态性可能是导致SAD的危险因素, 但在已经确定的20多个基因中, 确认是SAD风险基因的只有载脂蛋白E (apolipoprotein E, *APOE*) 基因^[32]。

3 AD动物模型

动物模型的建立和研究有助于AD生物学机制的认识, 还可以帮助评估新药物与AD疾病相关表型之间的因果关系^[33]。因此, 动物模型是开发各种治疗药物的必要工具。值得注意的是, 尽管部分动物和人类有着高度相似的生理特性, 但仍然存在物种差异。因此, 验证动物模型是否适用于研究目的是必需的。

啮齿动物 (包括大鼠、小鼠等) 和各种非人灵长类动物是用于研发AD等药物的典型动物。对啮齿动物的行为研究有悠久历史, 已有很多丰富的研究数据库便于参考, 而且成本低。其他物种包括线虫、果蝇、鸡、青蛙、斑马鱼、犬、猫、山羊、狼獾、狐猴、兔、豚鼠、叙利亚仓鼠、绵羊、黑猩猩、北极地松鼠和黑熊也被认为是人类AD/痴呆症的实验模型。但是上述动物或多或少存在一些问题, 譬如有些动物不表现与人类AD疾病相似的行为, 有些动物存在成本、伦理或专利问题, 应用有限。

动物模型必须具有稳定性且可重复。用于研究AD的动物模型可分为自然模型 (natural models)、遗传修饰模型 (genetically modified models) 和诱导模型 (induced models) 三类。这三类模型各有优缺点 (表1)。

3.1 自然模型

失忆是衰老最初的普遍现象。因此, 老年动物可能被用作痴呆和记忆丧失障碍的自然模型。不同的动物 (包括犬、猫、北极熊、绵羊、山羊和一些非人灵长类动物) 可以自发地表现出与AD相关的神经病理特性^[34]。其中, 一些物种 (譬如犬和非人灵长类) 的老年表现与人类的AD特性更为相似。由于自然模型不需要任何人工操作, 是模拟AD自然病理生理学过程的宝贵工具^[34]。

老年啮齿动物 (包括大鼠和小鼠等) 通常不会自发地表现出AD样病理学特征, 但是一些动物可作为人类痴呆的替代模型, 用于评估认知功能障碍。譬如, 快速衰老的SAMP8品系小鼠是研究AD的理想模型^[35]。该品系小鼠不但表现出年龄相关的学习记忆障碍, 而且表现出AD发病机制的大部分特征, 包括抗衰

表1 三类阿尔茨海默病动物模型的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of three types of Alzheimer's disease (AD) animal models

模型类型	举例	优点	缺点
Model type	Example	Advantages	Disadvantages
自然模型	老年猕猴	与人类的发育相似,自发地表现出明显的AD相关神经病变	造模时间长,且某些个体生殖能力低
Natural models			
遗传修饰模型	Tg2576	有 β -淀粉样蛋白斑块、突触丧失及认知功能障碍	每个遗传模型不能显示所有AD相关基因的作用
Genetically modified models			
诱导模型	脑室内 β -淀粉样蛋白灌注	表现出部分AD特征,如胆碱能功能丧失	不能显示AD的所有典型特征
Induced models			

老因子、氧化应激、炎症因子异常表达、 $A\beta$ 沉积、Tau 过度磷酸化、内质网应激、自噬活性异常和肠道菌群破坏等^[35]。快速老化痴呆模型小鼠 SAMP8 是快速老化小鼠 (senescence accelerate mouse, SAM) 的一个亚系。SAM 小鼠是日本京都大学培育的一种近交系衰老模型鼠,已广泛用于衰老相关性疾病的研究^[35]。

3.2 遗传修饰模型

AD 遗传修饰模型是根据与 FAD 或 SAD 相关的易感基因设计而成,主要集中在 APP、PSEN1、微管相关蛋白 Tau (microtubule-associated protein Tau, MAPT)、髓样细胞表达触发受体-2 (triggering receptor-2 expressed on myeloid cells, TREM2) 和 APOE^[36-38]。迄今为止,已开发出近 170 个 AD 转基因/敲入/敲除模型 (具体可以参见 ALZForum 数据库: <https://www.alzforum.org/research-models>)。除 TREM2、APOE 外,这些模型几乎完全集中在淀粉样蛋白上, Tau 相关转基因较少。表2列出了 15 种常用的小鼠遗传修饰 AD 模型。

如何从 170 种左右的 AD 动物模式中选出最合适的模型,将是一个比较大的挑战,需要综合考虑。其中必须注意以下几点: (1) 没有一种动物模型能够完全再现人类 AD 发病机制中观察到的所有认知缺陷; (2) 每种小鼠模型都能模拟 AD 相关的某些方面; (3) 不同的小鼠模型之间,其认知缺陷发生的时间和严重程度各不相同; (4) 大多数模型的空间工作记忆的缺陷早于其他认知领域的缺陷; (5) 大多数使用 AD 小鼠模型的研究都集中利用行为学研究与 AD 相关的认知缺陷。然而,考虑到 AD 是一种复杂的疾病,各种非认知症状也会对不同的 AD 小鼠模型产生或多或少的影响,因此在评估行为表型时,各种非认知症状应与疾病的认知缺陷一起考虑。

3.3 诱导模型

根据颅内注射化学物质是否直接引起特定脑区诱

发病变的差异,AD 诱导模型可以分为化学诱导模型和损伤诱导模型^[39]。可以经脑部注入特定的物质影响神经递质途径,阻滞神经元,导致动物痴呆,从而建立化学诱导模型,例如 $A\beta$ 或东莨菪碱诱导的遗忘模型。通过外科手术在侧脑室或脑实质内注射微量神经毒物质 (如 NMDA、鹅膏蕈氨酸和胆碱毒素 AF64) 引起脑部病变,可建立损伤诱导模型,该模型有助于了解胆碱能神经支配在认知功能障碍中的作用机制^[38]。表3列出了 AD 诱导模型使用各种兴奋性毒素对胆碱能途径的化学损伤,或者是基于缺氧和 (或) 中风诱导的模型。

4 AD 动物模型的评价指标

AD 动物模型主要从以下几个方面进行评价: (1) 分子病理学或组织病理学特征测试,用于证实 $A\beta$ 斑块、Tau 蛋白的细胞内聚集体、氧化损伤以及大脑皮层和某些大脑皮层下区域的突触和神经元损失; (2) 行为测试,用于评价动物认知缺陷状况。一般利用常规的分子指标分析就可以实现分子病理学或组织病理学测试,如蛋白质印迹、免疫组织化学染色和实时定量 PCR。以下重点介绍动物行为评价和无创检测手段。

4.1 动物行为评价

在评估某种化合物是否具有改善认知功能作用时,行为测试结果通常是衡量指标,因为这些指标的变化与 AD 相关的认知功能障碍直接相关。如何在动物 (如啮齿动物和非人灵长类动物) 中有效地测量 AD 引起的认知障碍,对 AD 发病机制及药物发现都非常重要^[40-41]。表4列举了 5 种对 AD 动物模型进行行为测试的实验方法,主要测试动物的空间记忆行为 (Morris 水迷宫、放射臂迷宫和巴恩斯迷宫)、联想学习 (场景恐惧实验)、新物体再记忆 (新物体识别实验)。

但需要注意的是,与 AD 表型相关的生化指标变化相比,行为测试的结果一致性较差,需要更加严格的

表2 15种常用的小鼠阿尔茨海默病遗传修饰模型

Table 2 15 common genetically modified mouse models of Alzheimer's disease (AD)

模型名称	基因/小鼠类型	神经病理学特征	行为/认知障碍
Name of model	Type of gene/mouse	Characteristics of neuropathology	Behavioral / cognitive disorder
PDAPP	APP [*]	海马、大脑皮层胶质增生(3~4月龄),营养不良性神经突,海马的突触和树突减少	物体识别,空间记忆受损(3月龄),暗示条件恐惧反射受损(11月龄)
APP V717I	APP [*]	A β 斑块(10月龄),脑血管内淀粉样蛋白沉积(15月龄),淀粉样蛋白相关炎症,营养不良性神经突,过度磷酸化的Tau蛋白,无NFTs	空间和非空间定向及记忆障碍(6月龄),焦虑/不安情绪加重(2月龄),多动症和攻击性
G2576	APP [*]	A β 斑块(6~9月龄),氧化脂质损伤、星形胶质细胞增生和小胶质细胞增生(11~13月龄)	空间学习、工作记忆和条件化情景恐惧受损(6月龄),认知功能进行性损伤(12月龄)
APP23	APP [*]	A β 斑块(6月龄),过度磷酸化Tau,无NFTs,营养不良性神经突,海马CA1区神经元丢失,CAA	空间记忆缺陷(3月龄),被动回避的记忆缺陷(25月龄)
J20 (PDGF-APP ^{Sw} , Ind)	APP [*]	A β 斑块,营养不良性神经突,无NFTs,细胞减少丢失,突触的标志物减少,补体免疫反应增加	学习和记忆障碍(4月龄),多动,记忆缺陷(6月龄)
5 $\times$ FAD	APP [*] , PSEN1 [*]	A β 斑块(2月龄),胶质增生和突触变性,大脑皮层V区神经元丢失	记忆和暗示与关联条件恐惧受损(6月龄)
APP (V717I) $\times$ PS1 (A246E)	APP [*] , PSEN1 [*]	可溶性A β 寡聚物(2月龄),A β 斑块(6~9月龄),淀粉样蛋白相关炎症,CAA(8月龄),异常磷酸化Tau蛋白,营养不良性神经突,但无NFTs	空间和非空间定向及记忆障碍(5月龄),联想学习障碍、多动症、焦虑和攻击性
APP ^{Sw} /PSEN1dE9 (line 85)	APP [*] , PSEN1 [*]	A β 斑块(6月龄),神经元中度丢失(8~10月龄),无NFTs,突触标志物减少和补体免疫反应性增加	认知和情境记忆障碍(6月龄),空间学习障碍(12月龄),筑巢、挖洞等自发行行为改变
Tg2576/Tau(P301L) (APP ^{Sw} -Tau)	APP [*] , MAPT [*]	A β 斑块整个皮质、海马体和杏仁核(9月龄),星形细胞和小胶质细胞增多,CAA和NFTs(9~11月龄)	运动障碍(4~6月龄)
PLB1-triple (hAPP/hTau/hPS1)	APP [*] , MAPT [*] , PSEN1 [*]	A β 寡聚体,海马和皮质过度磷酸化Tau蛋白(6月龄),无明显NFTs,脑皮层代谢低下,基底前脑和腹中脑代谢活性增加	认知记忆和空间学习缺陷(5月龄),海马的结构可塑性受损
3 $\times$ Tg	APP [*] , PSEN1 [*] , MAPT [*]	A β 斑块(6月龄),NFTs(12月龄),突触功能障碍,突触可塑性缺陷	记忆缺陷,暗示与关联条件恐惧受损(4~5月龄)
hTau	mMAPT [#] , hMAPT [*]	NFTs(6月龄),NFTs和神经元丢失(15月龄)	工作记忆和空间记忆的缺陷(12月龄)
rTg (TauP301L) 4510	MAPT [*]	无NFTs和神经元丢失(4~6月龄)	空间记忆减退和新物体识别障碍(1.5~4月龄),暗示与关联条件恐惧受损
APOE4 Knock-In [§]	APOE [§]	大脑及血清中APOE水平显著高;禁食6h后,血清胆固醇和三酰甘油升高	无数据
PS1 [£]	PSEN1 [*]	无严重的神经病理学异常(24月龄)	记忆未受影响(24月龄)

注: *转基因; [£]多拷贝转基因; [#]敲除; [§]敲入; [§]表2中除了APOE2 Knock-In模型为家族性AD模型,其他全是散发型AD模型; [£]为该小鼠已用于产生APP (V717I) $\times$ PS1 (A246E)在内的多个双基因小鼠品系。APP为淀粉样前体蛋白; PSEN1/2为早老素1/2; A β 为 β -淀粉样蛋白, NFTs为神经原纤维缠结; CAA为脑淀粉样血管病; MAPT为微管相关蛋白Tau; mMAPT为小鼠MAPT基因; hMAPT为人MAPT基因; APOE为载脂蛋白E。

Note: *Transgenes; [£]Multi-copy transgenes; [#]Knockout; [§]Knock-in; [§]APOE2 Knock-In model is a familial AD model, all the other models are sporadic AD models in Table 2; [£]This mouse has been used to generate several digenic mouse models including APP (V717I) $\times$ PS1 (A246E). APP is amyloid precursor protein; PSEN1/2 is presenilin-1/2; A β is β -amyloid; NFTs is neurofibrillary tangles; CAA is cerebral amyloid angiopathy; MAPT is microtubule-associated protein Tau; mMAPT is mouse microtubule-associated protein Tau gene; hMAPT is human microtubule-associated protein Tau gene; APOE is apolipoprotein E.

实验要求,包括小鼠品系、性别、年龄、是否是同一窝出生的小鼠、实验环境等。即使行为评价模型是标准化的,各种模型之间的行为数据也可能难以比较。

4.2 成像系统

神经成像技术提供了一种非常好的无创性检测方法,在临床前和临床研究中发挥着重要作用^[42-43]。最

表3 常用的阿尔茨海默病诱导模型

Table 3 Common intervention models of Alzheimer's disease (AD)

造模方式 Modeling method	表型 Phenotype
脑室内注射β-淀粉样蛋白	急性或慢性脑室内注射或海马内注射Aβ40、β42或FAB(亚铁淀粉样丁硫氨酸)引起学习和认知障碍
雌性大鼠去卵巢后海马区注射β-淀粉样蛋白片段25-35	短记忆和空间记忆功能恶化,皮质醇水平升高,并伴有葡萄糖、脂质和骨代谢异常,空腹胰岛素抵抗
脑室内注射链脲佐菌素	与AD相似的进行性记忆丧失
脑室内注射软海绵酸	脑室内注射软海绵酸14 d导致p-Tau和Aβ的增加,造成认知障碍
脑室内注射AF64A	胆碱毒素选择性地降低乙酰胆碱、乙酰胆碱酯酶、胆碱乙酰转移酶、乙酰胆碱酯酶、钾离子水平,并可减少哇巴因刺激的乙酰胆碱酯酶释放水平
侧脑室注射192-IgG-saporin	免疫毒素造成持续性损伤,造成胆碱能通路受损,出现认知障碍
鹅膏蕈氨酸和其他兴奋性毒素(NMDA、喹啉酸、红藻氨酸和奎司喹酸)	单独使用兴奋性毒素或与Aβ联用可引起海马胆碱能神经元丢失,出现认知功能障碍
腹腔注射东莨菪碱	学习障碍
缺氧/中风	记忆障碍,血管性痴呆

注: STZ为链脲佐菌素; AF64A为1-乙基-1-(2-羟乙基)-氯化氮丙啶; NMDA为N-甲基-D-天冬氨酸。
Note: STZ is streptozotocin; AF64A is 1-(ethyl)-1-(2-hydroxyethyl) aziridinium chloride; NMDA is N-methyl-D-aspartic acid.

表4 阿尔茨海默病动物模型的行为测试实验

Table 4 Behavioral validation tests for animal models of Alzheimer's disease (AD)

行为测试实验 Behavioral validation test	测试的认知能力 Cognitive domains	注释 Description
Morris水迷宫 Morris water maze	空间参考记忆和工作记忆	根据在水箱外部学习到的视觉线索,测定大鼠或小鼠在装有不透明液体的圆形水箱中找到稳定平台的能力。找到这些平台所需的时间是衡量认知功能的主要指标。该模型是检测海马空间记忆缺陷最常见的行为测试方法之一
放射臂迷宫 Radial arm maze	空间参考记忆和工作记忆	有6~8条手臂从中心空间放射出来的迷宫。其中一只手臂含有动物找到后可以得到的奖励食物
巴恩斯迷宫实验 Barnes maze	空间参考记忆和工作记忆	圆形桌子边缘最多有20个圆孔,每个圆孔都有视觉提示,其中一个下方有一个“逃生箱”,啮齿动物可以通过桌面上相应的孔进入。由于啮齿动物对开放空间厌恶,此模型可以促使动物寻找逃生箱
场景恐惧实验 Cued and contextual fear conditioning	空间参考记忆和背景记忆	将一个特定的无倾向性的条件刺激与一个厌恶的无条件刺激联系起来,让动物表现出条件反应。具体操作如下:啮齿动物被放置在一个调节室中,给予条件刺激(听觉线索)和厌恶的非条件刺激(电击);休息一段时间后,动物暴露在同一个调节室和一个不同形状的环境空间中,出现听觉线索,观察动物出现冻结行为的情况。冻结行为是一种常见的对恐惧情境的反应,可以作为恐惧记忆的衡量指标
新物体识别实验 Novel object recognition	识别记忆	利用啮齿动物自发倾向于探索新物体的本能而建立模型。啮齿动物放置在测试空间探索并适应24 h后,在空间内等距放置两个相同的物体。第2天,这些动物被放在开阔的场地里,面对熟悉的物体和新奇的物体(高度和体积一致,但形状和外观不同),测试它们的长期识别记忆能力

常见的脑成像方法是磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)和正电子发射断层成像(positron emission tomography, PET)。MRI利用磁场和无线电波(不使用放射性示踪剂)能够提供良好的对比度图像。结构磁共振成像(structural MRI, sMRI)可以检测到AD脑组织的大小变化^[44];功能磁共振成像(functional MRI, fMRI)可识别与神经活动相关的血流动力学反应,表征神经系统疾病^[45]。MRI不能直接识

别AD的分子病理学或组织病理学特征,但是PET可以直接检测AD的分子病理学特征^[46-47]。因此,与MRI相比,PET具有更大的优势。PET是一种无创成像技术,可与放射性标记物相结合,评估Aβ在脑部沉积量的情况、代谢负荷以及葡萄糖下降率等。尽管神经影像学方法有许多优点,但也存在局限性^[47],例如PET检测手段成本高、存在放射性污染和对放射性过敏的风险。

5 展望

AD严重影响全世界老年人的健康,是一种多病因、病理学极其复杂的疾病。目前还没有找到AD的真正致病原因,因此也没有能够真正有效治疗的药物。根据AD最主要的神经病理学特征即在大脑部位形成A β 斑块,研究人员提出了淀粉样蛋白假说,已构建了170多种“A β 斑块”动物模型,并利用这些模型测试了许多阻止脑淀粉样蛋白沉积或清除已有淀粉样蛋白斑块的化合物,但是这些化合物一旦进入临床试验阶段均因无临床疗效而不得不放弃^[48]。因此,在大脑中过度表达各种形式的人类淀粉样蛋白的大多数转基因动物更像是一种导致AD的病理学模型。

值得一提的是,最近《科学》杂志发表了一篇详尽的调查报告,称2006年Sylvain Lesné等发表在《自然》杂志上的一篇文章涉嫌造假^[49]。该论文主要证明相对分子质量为56 000的可溶性A β 寡聚物形式(命名为A β *56)在老年AD模型小鼠Tg2576脑部沉积是该小鼠发生记忆缺陷的原因。上述工作是第一次在动物体内纯化获得一种特定的A β 寡聚物形式,并证明了其对神经的毒性,因此,该工作造假会对淀粉样蛋白假说形成一定“冲击”,让一些研究者更加严谨、客观地看待A β 斑块在AD发生中的作用。但A β *56只是A β 寡聚物的一种,并非AD患者脑部表达最多的A β 。目前,AD研究领域公认的是A β 40和A β 42,也是研究最多的两种A β 寡聚形式。因此,上述造假事件可能并不会影响淀粉样蛋白假说,或许针对A β 开发药物的不断失败才真正让人们开始怀疑它的正确性。

有研究表明,在非人灵长类动物AD模型中去除大脑的A β 斑块并没有改善灵长类动物的认知状态^[50]。因此,建议在临床试验前,先在非人灵长类动物模型中测试相关的AD候选药物,以避免临床试验失败带来的巨额成本。但需要注意,目前对非人灵长类动物AD病理特征的研究不多,有些国家存在动物伦理的争议,而且非人灵长类动物成本昂贵,上述因素均需要研究者在采用这类模型时综合考虑。此外,通过行为测试评价认知障碍的结果可能不够精准,需要进一步改善,一般至少需要两个行为测试来评估某化合物是否具有改善行为认知的能力。

总之,虽然目前已经有多达200多种的AD动物模型,但基于淀粉样蛋白假说开发的药物在临床试验中证明失败,提示研究者们需要开发出更多非“A β 斑块”动物模型,譬如更接近人类发病机制的自然模型。

希望这些新开发的模型能帮助人们更好地理解AD疾病的复杂致病机制,并帮助找到真正有效的治疗AD的药物。另外,还需要开发出更多的模型或实验方法来评估行为认知,如嗅觉障碍模型^[51],因为嗅觉障碍是AD的一个关键特征,它可能比Morris水迷宫、放射臂迷宫和巴恩斯迷宫更能反映AD动物的认知情况。

[作者贡献 Author Contribution]

盛哲津检索文献,并制作所有表格;李利妹撰写和修改文稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 张淇,贾杰.阿尔茨海默病功能障碍康复现状[J].中国医刊,2021,56(1):16-18. DOI:10.3969/j.issn.1008-1070.2021.01.005.
ZHANG Q, JIA J. Status of rehabilitation of dysfunction in Alzheimer's disease[J]. Chin J Med, 2021, 56(1):16-18. DOI:10.3969/j.issn.1008-1070.2021.01.005.
- [2] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590. DOI:10.1016/S0140-6736(20)32205-4.
- [3] MÖLLER H J, GRAEBER M B. The case described by Alois Alzheimer in 1911[J]. European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences, 1998, 248: 111-122. DOI: 10.1007/s004060050027.
- [4] 肖义军,陈莉莉.阿尔茨海默症及其预防措施概述[J].生物学教学,2020,45(10):2-4. DOI:10.3969/j.issn.1004-7549.2020.10.001.
XIAO Y J, CHEN L L. Overview of Alzheimer's disease and its preventive measures[J]. Biol Teach, 2020, 45(10):2-4. DOI:10.3969/j.issn.1004-7549.2020.10.001.
- [5] 刘畅,封海霞,沈萍,等.阿尔茨海默病的症状、诊断及其护理[J].基因组学与应用生物学,2021,40(3):1435-1440. DOI:10.13417/j.gab.040.001435.
LIU C, FENG H X, SHEN P, et al. Symptoms, diagnosis and nursing of Alzheimer's disease[J]. Genom Appl Biol, 2021, 40(3):1435-1440. DOI:10.13417/j.gab.040.001435.
- [6] KIM L D, FACTORA R M. Alzheimer dementia: starting, stopping drug therapy[J]. Cleve Clin J Med, 2018, 85(3):209-214. DOI:10.3949/ccjm.85a.16080.
- [7] ZANNI R, GARCIA-DOMENECH R, GALVEZ-LLOMPART M, et al. Alzheimer: a decade of drug design. why molecular topology can be an extra edge? [J]. Curr Neuropharmacol, 2018, 16(6):849-864. DOI:10.2174/1570159X15666171129102042.
- [8] 唐丽娜,许小明,李艳红.阿尔茨海默病发病机制研究进展[J].中国老年学杂志,2016,36(10):2545-2548. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2016.10.111.
TANG L N, XU X M, LI Y H. Research progress on pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Chin J Gerontol, 2016, 36(10): 2545-2548. DOI: 10.3969/j. issn. 1005-9202.2016. 10.111.
- [9] GÖTZ J, ITTNER L M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia[J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(7):

- 532-544. DOI:10.1038/nrn2420.
- [10] GALLARDO G, HOLTZMAN D M. Amyloid- β and tau at the crossroads of Alzheimer's disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1184:187-203. DOI:10.1007/978-981-32-9358-8_16.
- [11] 马登磊, 张兰. P301S突变tau转基因动物模型及其应用[J]. *实验动物与比较医学*, 2017, 37(6):491-496. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2017.06.015.
- MA D L, ZHANG L. P301S mutant tau transgenic mouse and their applications[J]. *Lab Animal Comp Med*, 2017, 37(6):491-496. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2017.06.015.
- [12] BASTIN C, DELHAYE E, MOULIN C, et al. Novelty processing and memory impairment in Alzheimer's disease: a review[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 100: 237-249. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2019.02.021.
- [13] 王金秀, 高凡, 孙慧珍, 等. A β 对阿尔茨海默病影响机制的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2021, 25(1):53-57, 79. DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.05.0185.
- WANG J X, GAO F, SUN H Z, et al. Research progress on mechanisms of A β effects on Alzheimer's disease[J]. *Life Sci Res*, 2021, 25(1):53-57, 79. DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.05.0185.
- [14] SELKOE D J, HARDY J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(6): 595-608. DOI:10.15252/emmm.201606210.
- [15] VASCONCELOS-FILHO F S L, DA ROCHA OLIVEIRA L C, DE FREITAS T B C, et al. Neuroprotective mechanisms of chronic physical exercise via reduction of β -amyloid protein in experimental models of Alzheimer's disease: a systematic review[J]. *Life Sci*, 2021, 275: 119372. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119372.
- [16] TOLAR M, ABUSHAKRA S, SABBAGH M. The path forward in Alzheimer's disease therapeutics: Reevaluating the amyloid cascade hypothesis[J]. *Alzheimer's Dement*, 2019 DOI:10.1016/j.jalz.2019.09.075.
- [17] 李瑞力, 杨明飞. P-tau蛋白在颅脑损伤及相关神经退行性疾病中的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(8):889-892. DOI:10.16571/j.cnki.1008-8199.2017.08.022.
- LI R L, YANG M F. The latest progress of p-tau conformations in traumatic brain injury and relevant neurodegeneration[J]. *J Med Postgrad*, 2017, 30(8):889-892. DOI:10.16571/j.cnki.1008-8199.2017.08.022.
- [18] CANEPA E, FOSSATI S. Impact of tau on neurovascular pathology in Alzheimer's disease[J]. *Front Neurol*, 2021, 11: 573324. DOI:10.3389/fneur.2020.573324.
- [19] GOEDERT M. Tau filaments in neurodegenerative diseases[J]. *FEBS Lett*, 2018, 592(14): 2383-2391. DOI: 10.1002/1873-3468.13108.
- [20] FAN D Y, SUN H L, SUN P Y, et al. The correlations between plasma fibrinogen with amyloid-beta and tau levels in patients with Alzheimer's disease[J]. *Front Neurosci*, 2021, 14: 625844. DOI:10.3389/fnins.2020.625844.
- [21] 张薇, 刘会, 张亚岚, 等. 炎症在阿尔茨海默病中作用机制的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2021, 25(2):144-150. DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.09.0248.
- ZHANG W, LIU H, ZHANG Y L, et al. Research progresses on mechanisms of inflammation in Alzheimer's disease[J]. *Life Sci Res*, 2021, 25(2): 144-150. DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.09.0248.
- [22] DEARDORFF W J, GROSSBERG G T. Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease: evidence for NSAIDs and novel therapeutics[J]. *Expert Rev Neurother*, 2017, 17(1):17-32. DOI:10.1080/14737175.2016.1200972.
- [23] DE LA MONTE S M, WANDS J R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed[J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2008, 2(6):1101-1113. DOI:10.1177/193229680800200619.
- [24] RORBACH-DOLATA A, PIWOWAR A. Neurometabolic evidence supporting the hypothesis of increased incidence of type 3 diabetes mellitus in the 21st century[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019:1435276. DOI:10.1155/2019/1435276.
- [25] DORSZEWSKA J, PRENDECKI M, OCZKOWSKA A, et al. Molecular basis of familial and sporadic Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2016, 13(9): 952-963. DOI: 10.2174/1567205013666160314150501.
- [26] SHASTRY B S. Molecular genetics of familial alzheimer disease[J]. *Am J Med Sci*, 1998, 315(4):266-272. DOI:10.1016/S0002-9629(15)40324-6.
- [27] GOATE A, CHARTIER-HARLIN M C, MULLAN M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 1991, 349(6311):704-706. DOI:10.1038/349704a0.
- [28] MULLAN M, CRAWFORD F, AXELMAN K, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid[J]. *Nat Genet*, 1992, 1(5):345-347. DOI:10.1038/ng0892-345.
- [29] CAMPION D, DUMANCHIN C, HANNEQUIN D, et al. Early-onset autosomal dominant alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum[J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 65(3):664-670. DOI:10.1086/302553.
- [30] HUTTON M, LENDON C L, RIZZU P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17[J]. *Nature*, 1998, 393(6686): 702-705. DOI:10.1038/31508.
- [31] GUO T, NOBLE W, HANGER D P. Roles of tau protein in health and disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(5):665-704. DOI:10.1007/s00401-017-1707-9.
- [32] SERRANO-POZO A, DAS S, HYMAN B T. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches[J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(1):68-80. DOI:10.1016/S1474-4422(20)30412-9.
- [33] 冯荣芳, 冯亚青, 吕佩源. 阿尔茨海默病动物模型研究进展[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2008, 16(6):724-726. DOI:10.3969/j.issn.1006-351X.2008.06.025.
- FENG R F, FENG Y Q, LÜ P Y. Research progress of animal models of Alzheimer's disease[J]. *J Brain Nerv Dis*, 2008, 16(6): 724-726. DOI:10.3969/j.issn.1006-351X.2008.06.025.
- [34] SALAZAR C, VALDIVIA G, ARDILES Á O, et al. Genetic variants associated with neurodegenerative Alzheimer disease in natural models[J]. *Biol Res*, 2016, 49(1): 1-9. DOI: 10.1186/s40659-016-0072-9.
- [35] LIU B, LIU J, SHI J S. SAMP8 mice as a model of age-related

- cognition decline with underlying mechanisms in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 75(2):385-395. DOI:10.3233/JAD-200063.
- [36] BILKEI-GORZO A. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(2):244-257. DOI:10.1016/j.pharmthera.2013.12.009.
- [37] GÖTZ J, SCHILD A, HOERNDLI F, et al. Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2004, 22(7): 453-465. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2004.07.013.
- [38] AUDRAIN M, HAURE-MIRANDE J V, MLECZKO J, et al. Reactive or transgenic increase in microglial TYROBP reveals a TREM2-independent TYROBP-APOE link in wild-type and Alzheimer's-related mice[J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(2): 149-163. DOI:10.1002/alz.12256.
- [39] GOODARZI P, PAYAB M, ALAVI-MOGHADAM S, et al. Development and validation of Alzheimer's disease animal model for the purpose of regenerative medicine[J]. *Cell Tissue Bank*, 2019, 20(2): 141-151. DOI: 10.1007/s10561-019-09773-8.
- [40] DAVIS S, LAROCHE S. What can rodent models tell us about cognitive decline in Alzheimer's disease? [J]. *Mol Neurobiol*, 2003, 27(3):249-276. DOI:10.1385/MN: 27:3: 249.
- [41] MASUDA A, KOBAYASHI Y, ITOHARA S. Automated, long-term behavioral assay for cognitive functions in multiple genetic models of Alzheimer's disease, using IntelliCage[J]. *J Vis Exp*, 2018(138):58009. DOI:10.37971/58009.
- [42] SCARFE L, BRILLANT N, KUMAR J D, et al. Preclinical imaging methods for assessing the safety and efficacy of regenerative medicine therapies[J]. *Npj Regen Med*, 2017, 2: 28. DOI:10.1038/s41536-017-0029-9.
- [43] SALMON E, BERNARD IR C, HUSTINX R. Pitfalls and limitations of PET/CT in brain imaging[J]. *Semin Nucl Med*, 2015, 45(6):541-551. DOI:10.1053/j.semnucmed.2015.03.008.
- [44] FRISONI G B, FOX N C, JACK C R, et al. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(2):67-77. DOI:10.1038/nrneurol.2009.215.
- [45] AGOSTA F, CANU E, FILIPPI M. Virtual reality and real-time neurofeedback functional MRI: a breakthrough in foreseeing Alzheimer's disease? [J]. *Brain*, 2020, 143(3): 722-726. DOI: 10.1093/brain/awaa038.
- [46] MARCUS C, MENA E, SUBRAMANIAM R M. Brain PET in the diagnosis of Alzheimer's disease[J]. *Clin Nucl Med*, 2014, 39(10): e413-e422; quiz e423-6. DOI: 10.1097/RLU.0000000000000547.
- [47] REIMAN E M, JAGUST W J. Brain imaging in the study of Alzheimer's disease[J]. *NeuroImage*, 2012, 61(2):505-516. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2011.11.075.
- [48] KARRAN E, DE STROOPER B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? [J]. *J Neurochem*, 2016, 139(Suppl 2):237-252. DOI:10.1111/jnc.13632.
- [49] LESNE S, KOH M T, KOTILINEK L, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory[J]. *Nature*, 2006, 440(7082):352-357. DOI:10.1038/nature04533.
- [50] RICCIARELLI R, FEDELE E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: it's time to change our mind[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2017, 15(6): 926-935. DOI: 10.2174/1570159X15666170116143743.
- [51] ROBERTS R O, CHRISTIANSON T J H, KREMERS W K, et al. Association between olfactory dysfunction and amnesic mild cognitive impairment and alzheimer disease dementia [J]. *JAMA Neurol*, 2016, 73(1):93-101. DOI:10.1001/jamaneurol.2015.2952.
- (收稿日期:2021-07-19 修回日期:2021-11-17)
(本文编辑:富群华,张俊彦,余儒洋)

《实验动物与比较医学》有关作者投稿必备信息和材料的说明

《实验动物与比较医学》是我国实验动物科学与比较医学领域创刊最早的一本专业性学术期刊, 执行严格的同行评议和三审三校制度。为提高稿件审理效率, 以及规范作者投稿行为, 本刊加大初审力度。作者从本刊官网 (<http://www.slarc.org.cn/dwyx>) 投稿时, 除提交 Word 格式的完整论文外, 还需提供以下必备信息和材料:

1. 所有署名作者的信息, 包括最高学历、职称、研究方向、E-mail 和电话等。
2. 第一作者单位盖章的论文审查表或介绍信扫描件, 需承诺本文符合科研诚信要求。
3. 涉及动物实验的研究性文章还需提供实验动物的生产许可证和质量合格证、实验场所的实验动物使用许可证、该研究的实验动物福利伦理审查表的扫描件。文中注明以上三证一表的准确编号。
4. 填写作者贡献及利益冲突声明表, 并在文末说明。
5. 研究如有基金资助, 请提供与本文内容相符的基金立项证明。

以上 2~5 材料均请打包后, 作为附件上传本刊投审稿系统。若材料不齐 (特殊情况须备注说明) 或信息造假, 编辑部将直接退稿。详情可见本刊官网首页的“政策指南” - “投稿指南”和“政策细则” - “稿件要求细则”。相关模板可至“政策细则” - “附件模板下载”获取。

《实验动物与比较医学》编辑部

动物模型在Eph家族蛋白功能研究中的应用

胡耀华^{1,2}, 赵菊梅¹, 师长宏²

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

[摘要] 促红细胞生成素产生肝细胞激酶 (erythropoietin-producing hepatocyte kinase, Eph) 作为家族成员最多的受体酪氨酸激酶, 与恶性肿瘤的发生、发展密切相关, 具有广泛的临床应用价值。动物模型在探索Eph家族分子的生物学功能、分子机制以及筛选治疗靶点等方面发挥了重要作用。本文总结归纳了异种移植瘤模型、肿瘤免疫治疗模型以及基因修饰模型在Eph家族功能研究中的应用及最新研究进展, 总结了各类模型的优缺点, 以期研究者开展Eph相关研究时选择合适的动物模型提供参考。

[关键词] 促红细胞生成素产生肝细胞激酶; 动物模型; 应用; 优缺点

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0351-07

Application of Animal Models in the Functional Studies of Eph Family Proteins

HU Yaohua^{1,2}, ZHAO Jumei¹, SHI Changhong²

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

Correspondence to: SHI Changhong (ORCID: 0000-0001-7490-3593), E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

ZHAO Jumei (ORCID: 0000-0002-7813-8224), E-mail: jmz2003.stu@163.com

[ABSTRACT] As a receptor tyrosine kinase with the most family members, erythropoietin-producing hepatocyte kinase (Eph) is closely related to the occurrence and development of malignant tumors and displays a wide range of clinical application value. Animal models have played an important role in exploring the biological functions, molecular mechanisms and screening therapeutic targets of Eph family molecules. In this paper, we reviewed the application and latest research progress of xenotransplantation model, immune-related model, and gene modification model in the study of Eph family's functional research, and summarized the advantages and disadvantages of various models, in order to provide a reference for researchers to select appropriate animal models for Eph related research.

[Key words] Erythropoietin-producing hepatocyte kinase; Animal models; Application; Advantages and disadvantages

受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 参与细胞生长发育的各个阶段, 并与恶性肿瘤的发生、发展密切相关。多种酪氨酸激酶靶点在开展癌症治疗、预测评估耐药机制等领域发挥重要作用。促红细胞生成素诱导肝细胞激酶 (erythropoietin-producing

hepatocyte kinase, Eph) 作为家族成员最多的RTK, 同样具有广泛的临床应用价值^[1]。该家族与传统RTK的不同之处在于其同源配体也是一种膜定位分子。因此, Eph受体和配体通常介导相同或不同类型细胞间的接触依赖性转导信号, 以调控细胞的形态、粘附、增殖、

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31772546)“基于临床肿瘤标本的胃癌个体化转移模型的建立及评估”

[第一作者] 胡耀华(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤分子病理与药物研究。E-mail: 457495004@qq.com

[通信作者] 师长宏(1973—), 男, 博士研究生导师, 教授, 研究方向: 肿瘤模型的制备与评价。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn。ORCID: 0000-0001-7490-3593

赵菊梅(1970—), 女, 硕士研究生导师, 教授, 研究方向: 肿瘤分子病理与药物。E-mail: jmz2003.stu@163.com。ORCID: 0000-0002-7813-8224

血管生成、分化等细胞生物学行为,在肿瘤的进展中发挥重要作用^[2]。目前,细胞模型和各类动物模型的应用极大促进了Eph家族相关基础研究。在具体研究过程中,研究者根据实验目的正确选择实验模型对探讨Eph家族相关分子的功能及靶向药物的研发至关重要。据此,本文针对在Eph家族分子功能研究中,如何选择合适的动物模型以及不同模型的优缺点进行归纳总结,以期为Eph家族的基础研究提供参考。

1 Eph家族的结构特点及功能

Eph家族包括Eph受体和Ephrin配体,是已知的家族成员最多的RTK。该家族参与调节细胞迁移、聚集、靶向等多种生理效应,在神经轴突导向、血管生成及肿瘤形成等方面发挥重要作用^[1]。根据Eph家族成员同源性、表达、分布和结构等的不同可细分为受体EphA、EphB及配体EphrinA、EphrinB两个亚类^[2]。Eph受体亚家族共有16个成员,包括EphA(1~10)以及EphB(1~6),其胞外区由一个N端球状结构域、一个富含半胱氨酸的结构域和两个纤连蛋白Ⅲ组成。胞内包含具有酪氨酸激酶活性的结构域、不育 α 基序(stereile alpha motif, SAM)结构域和C端的突触后致密蛋白结合区域(post-synaptic density protein, discs large, zona occludens, PDZ)结构域^[2]。Ephrin配体的结构则有明显的不同,包含通过糖脂磷脂酰肌醇连接方式结合到细胞膜上的EphrinA1~5以及含有跨膜区和胞质区的EphrinB1~3^[2]。Eph受体及Ephrin配体最主要的3个基本特征是:(1)两者都是膜定位分子;(2)虽有证据表明两者存在可溶性形式,但其相互作用依赖细胞之间的直接接触^[3];(3)两者都能传导信号到宿主细胞,产生双向信号,这种双向信号包括Eph受体产生的正向信号以及Ephrin配体产生的反向信号。同时,受体、配体的定义不是一成不变的,因为受体能充当配体,反之亦然。介于Eph家族复杂的表达模式,随着研究的不断深入和发展,针对不同的Eph功能研究相关的动物模型层出不穷。目前广泛使用的模型包括异种移植瘤模型、肿瘤免疫治疗模型、基因修饰小鼠模型等,不同模型在肿瘤侵袭、迁移、血管生成、耐药等多种恶性生物学行为的研究中发挥重要作用。

2 异体移植瘤模型在Eph研究中的应用

人源肿瘤细胞系异种移植(cell line derived

xenograft, CDX)模型、原代肿瘤细胞模型(patient-derived cell models, PDC)模型和人源肿瘤组织来源移植瘤(patient-derived xenograft, PDX)模型均属于异种移植瘤模型。它们均以免疫缺陷鼠为受体。CDX模型是将体外培养的肿瘤细胞通过皮下注射、腹腔注射、尾静脉注射的方式移植到免疫缺陷小鼠体内构建的肿瘤动物模型;其特点是易于形成肿瘤,构建周期短;大多数基因功能的体内验证、分子机制的探究都以该模型为基础,但该类模型缺乏原肿瘤的分子特征及异质性^[4-5]。将来源于患者的细胞或临床新鲜的手术标本移植到小鼠体内建立的PDC、PDX模型,含有源自患者的基质细胞和免疫细胞^[6],保留了原发肿瘤组织的病理学特征,可代替患者用于药物的筛选、新疗法的研发,但其移植成功率低,构建周期长。研究者利用上述模型重点探索了Eph家族分子在肿瘤转移、血管生成和耐药形成中的作用。

2.1 基于异种移植瘤模型研究Eph在肿瘤转移中的作用

大量体内外实验证明,Eph的异常表达与肿瘤的转移相关。为了阐明EFNA4(即EphrinA4)在肝癌发生中的生物学功能及相关分子机制,Lin等^[7]将过表达EFNA4的肝癌细胞注射到裸鼠的肝脏,构建CDX模型。结果表明,EFNA4过表达促进了肝癌细胞的上皮间质转化和肿瘤转移。同样在结直肠癌中,Dopeso等^[8]敲低CDX模型中的EphB4后,结直肠肿瘤增殖、侵袭、转移能力增加。上述Eph的研究通常是在单个受体或配体上进行,主要用于证实受体或配体单独表达对肿瘤转移的作用。值得注意的是,有证据表明,在前列腺癌中,EphA2与配体相互作用能够介导运动接触抑制,进而抑制肿瘤的侵袭、迁移^[9]。然而,当EphA2独立存在时,它可以转化为促癌蛋白,通过Akt磷酸化促进肿瘤细胞迁移和侵袭^[10]。据此,Astin等^[9]归因于Eph家族复杂的信号传导系统,Eph受体、配体以依赖或非依赖形式介导双重作用。然而仍存在一个关键问题,这种模式在体内是否依然存在,为此需构建动物模型,探讨Eph-Ephrin系统对肿瘤功能的影响。

Qazi等^[11]用从脑肿瘤患者收集的细胞建立了PDC模型,证实EphA2和EphA3受体共同驱动脑肿瘤复发和转移,提高肿瘤细胞的克隆形成和增殖能力。王洁等^[12]通过皮下移植建立14例胃癌PDX模型,进一步原位移植成功建立3例胃癌PDX模型,最后通过PCR-

Array 筛选出 3 个与胃癌转移显著相关的基因, 其中就包括了 EphB2。

2.2 基于异种移植瘤模型研究 Eph 在血管生成中的作用

血管生成是一个高度复杂的协调过程, 在正常发育和多种疾病进展的病理生理学过程中起着关键作用。Eph 家族分子同样在肿瘤血管生成中扮演重要角色, 目前研究其功能的动物模型大多聚焦在 CDX 模型。例如, 在结直肠癌中, Lv 等^[13] 通过稳定敲低和过表达 EphB4 建立 CDX 模型, 并使用对照细胞系研究了 EphB4 在结直肠癌中的作用, 结果表明结直肠癌异种移植肿瘤中的微血管密度与 EphB4 显著相关, EphB4 作为与增殖和血管生成相关的肿瘤启动子, 可能是潜在的结直肠癌治疗靶点。Sato 等^[14] 为了确定头颈部鳞状细胞癌中 EphB2 表达是否调节血管生成, 将敲低或过表达 EphB2 的 OSC19 细胞注射到裸鼠的舌头中, 与对照组和 EphB2-KD 组肿瘤相比, EphB2-OE OSC19 肿瘤中的血管密度显著增加, 提示高表达的 EphB2 促进肿瘤血管生成。在前列腺癌中, Li 等^[15] 敲低 EphA6 的表达建立 CDX 模型, 体内血管生成实验结果表明, 低表达的 EphA6 抑制血管生成。Neuber 等^[16] 给裸鼠皮下注射过表达 EphB4 的 A-375 细胞, 构建人黑色素瘤的 CDX 模型, 体内和离体荧光成像结果表明, Eph 抑制肿瘤血管生成。Festuccia 等^[17] 基于 Eph-Ephrin 系统的开发寻找新的抗肿瘤策略, 引入一种靶向 Eph/Ephrin 相互作用的小分子 UniPR1331, 其在脑胶质瘤的裸鼠异种移植和原位癌模型中均抑制血管生成, 具有显著的抗肿瘤活性。

2.3 基于异种移植瘤模型研究 Eph 在耐药中的作用

原发及继发耐药是肿瘤治疗过程中亟待解决的关键问题, 而研究耐药相关机制就必须对关键分子进行探索。越来越多的化疗药物通过肿瘤细胞实验、CDX 模型、PDX 模型来进行验证, 结果发现部分 Eph 家族分子可作为有前景的药物靶点, 且在不同类型的恶性肿瘤中发挥重要作用。Miao 等^[18] 通过生物信息学分析、细胞实验和 CDX 模型证实, EPHA2 抑制剂 ALW-II-41-27 和 HG-6-64-1 可有效抑制耐威罗非尼 (vemurafenib tablet, VEM) 的黑色素瘤细胞增殖; 同样, 作者构建了人黑色素瘤细胞 A-375 的裸鼠 CDX 模型并连续 40 周使用顺铂治疗, 发现 EphB4 过表达与肿瘤细胞对顺铂产生耐药性有关。此外, 顺铂与 EphB4

选择性抑制剂的组合可以削弱这种获得性耐药机制^[19]。为真实模拟临床, Leung 等^[20] 将临床新鲜的肝癌手术标本移植到 BALB/c 裸鼠皮下建立肝癌 PDX 模型, 通过持续对裸鼠使用索拉非尼灌胃, 构建耐索拉非尼的 PDX 模型, 利用该模型进行 RNA 测序分析, 确定 EphB2 是上调最显著的激酶; 在此基础上进一步确定 EphB2/ β -catenin/TCF1 的正反馈通路增强了肝癌的肿瘤细胞干性和索拉非尼耐药性, 揭示其可能是抗肝癌耐药的有效治疗策略。而 Toosi 等^[21] 分别采用相应的乳腺癌 CDX 和 PDX 模型对体外细胞学实验进行体内验证, 结果表明沉默 EphB6 促进了肿瘤的生长, 增加了乳腺癌对多柔比星的耐药性。

随着药物联合治疗方案的优化及给药系统的完善, pH 敏感性脂质复合物、线粒体靶向偶联物等新型给药途径在提高药物疗效、降低药物毒性以及特异靶向肿瘤部位等多方面发挥重要作用。Zhang 等^[22] 设计了一种兼具 pH 敏感性和主动靶向性的多功能给药系统, 成功获得具有良好理化性质的 EphA 抗体偶联多柔比星的脂质复合物。为了验证其效能, 该研究建立了人乳腺癌细胞 MCF-7 的 CDX 模型, 分组注射不同剂型的脂质复合物, 结果表明脂质复合体对 MCF-7 细胞具有良好的细胞毒性作用, 并克服了多药耐药效应。同样在人乳腺癌细胞 MCF-7 的 CDX 模型中, Zhang 等^[23] 进一步评估了不同制剂的抗肿瘤活性, 证实一种新型的线粒体靶向偶联物三苯基膦-多西他赛融合脂质体 (EPSLP/TD) 的制剂能够有效地将抗肿瘤药物递送到肿瘤细胞的线粒体, 并诱导线粒体介导的细胞凋亡。这些结果提示, 应用动物模型评估新型给药方式对逆转化疗药物耐药、提高晚期患者的存活率具有重大意义。

总之, Eph-Ephrin 系统在癌症转化和进展的每个阶段都发挥作用, 它可以成为筛查、预后评估和治疗的有效工具, 但由于其复杂的表达模式、双向信号系统的传导及其他系统的串扰, Eph 的研究错综复杂, 仍有待进一步深入探讨。异种移植模型的建立和应用为探究 Eph 家族分子创造了良好的条件。

3 肿瘤免疫治疗模型在 Eph 研究中的应用

肿瘤免疫治疗模型的应用推进了肿瘤相关免疫、干细胞等方面的研究。不同种类的肿瘤免疫治疗模型可移植不同的肿瘤或细胞, 特别是重度联合免疫缺陷的 NSG 小鼠能够植入正常或癌变的人类细胞或组织,

为人源化研究提供良好的实验工具。例如,移植人类免疫细胞,包括人外周血单核细胞^[24]或造血干细胞^[25],使小鼠拥有部分人类免疫功能,兼具评价免疫治疗效果、免疫调节剂的作用,在肿瘤免疫创新药物研发中有着广泛的应用前景。此外,有研究人员将PDX肿瘤与患者来源的免疫细胞相结合^[26],实现了精准的个体化免疫治疗研究。

以免疫检查点(immun checkpoint)抑制剂和嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)治疗为代表的新型免疫疗法开启了肿瘤免疫治疗的新方向。大量研究表明,Eph家族分子在单核细胞、巨噬细胞、T细胞、B细胞等多种免疫细胞中异常表达^[27-29],且在细胞发育、分化、激活和增殖中发挥关键作用。因此,NOD-SCID、NCG/NSG/NOD等免疫功能缺陷相关小鼠模型在Eph研究中具有独特的用途。NOD-SCID小鼠具有T细胞、B细胞缺陷,先天免疫水平低,模型构建周期短,重复性好,适用于多种肿瘤细胞移植,但不适于长期实验^[30]。NCG/NSG/NOD小鼠在NOD-SCID基础上敲除IL-2R β 基因,在缺失T细胞、B细胞的同时缺少NK细胞,免疫缺陷程度更高;此类小鼠建模成功率高,稳定性好,经过传代后仍能保持原代肿瘤的异质性,可用于长期实验^[31]。第一个被鉴定为肿瘤相关抗原的Eph分子是EphA2^[32],它在包括黑素瘤在内的多种恶性肿瘤中过度表达。随后证实EphA2受体在人CD4⁺T或CD8⁺T细胞中有多个识别位点^[33-34],是Eph家族中研究最广泛的肿瘤相关抗原。

3.1 基于肿瘤免疫治疗模型研究Eph在疫苗制剂中的作用

肿瘤相关抗原-树突细胞(dendritic cells, DCs)因其可诱导肿瘤抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T cell, CTL)和辅助T细胞而成为强有力的抗癌工具^[35]。Yamaguchi等^[36]以C57BL/6小鼠为研究对象,腹腔注射抗CD4抗体、抗CD8抗体、自然杀伤(natural killer, NK)细胞抑制剂抗asialo GM1抗体,构建T细胞和NK细胞双缺乏的结直肠癌免疫相关小鼠模型,用于评估接种EphA2衍生肽(Eph-DCs)疫苗的抗肿瘤免疫治疗情况;结果显示,EphA2阳性小鼠的免疫治疗效果更好,抑瘤作用更强,提示Eph-DCs疫苗对EphA2阳性的肿瘤具有特异的杀伤力。此外该团队进一步证明Eph-DCs疫苗对肝肿瘤细胞的再次攻击具有长期的免疫效果^[37]。上述证据表明,基于肿瘤

免疫治疗模型获得的肿瘤相关抗原-DCs疫苗的新策略有望提高晚期癌症患者的临床疗效。

3.2 基于肿瘤免疫治疗模型研究Eph在CAR-T细胞治疗中的作用

CAR-T细胞疗法的基本原理是利用患者自身的免疫细胞来清除癌细胞^[38]。许多肿瘤相关抗原的CAR-T细胞已在动物模型上验证并用于临床治疗。动物模型在CAR-T细胞的有效性和安全性等研究中具有重大意义。

Chow等^[39]开发了EphA2特异的嵌合抗原受体,T细胞能够在体外识别和杀伤EphA2阳性的成神经胶质细胞瘤,并在成神经细胞瘤原位异种移植的SCID小鼠模型中诱导肿瘤消亡。此外,在非小细胞肺癌中,EphA2特异的嵌合抗原受体能识别杀死EphA2阳性的肺癌细胞^[40],同时在SCID小鼠肺癌模型中,同样证明EphA2-CAR-T疗法有明显的抗肿瘤作用。在食管鳞状细胞癌中,研究者构建了EphA2-CAR-T细胞,发现该CAR-T细胞具有剂量依赖性的细胞杀伤作用^[41]。尽管CAR-T细胞疗法在临床疗效上取得了重大突破,但是CAR-T细胞的处理方式、靶抗原亲和力、T细胞的数量和质量等均影响CAR-T细胞的抗肿瘤效率,且目前尚缺乏评估CAR-T抗肿瘤效率的标准^[42]。针对此现象,An等^[43]选择NOD-SCID小鼠构建脑胶质瘤异种移植模型,探讨影响EphA2-CAR-T细胞抗肿瘤效率的相关因素,发现较高水平的 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和趋化因子受体1/2(chemokine receptor 1/2, CXCR1/2)与较差的抗肿瘤活性相关,提示IFN- γ 和CXCR1/2组合是评估CAR-T细胞抗肿瘤效率的关键因素。EphA2-CAR-T细胞的发现与构建为肿瘤免疫治疗开辟了新的途径。随着科研成果的积累,相信更多的Eph相关的CAR-T疗法将应用于临床治疗。

3.3 基于肿瘤免疫治疗模型研究Eph在免疫联合治疗中的作用

针对程序性死亡受体1(programmed death 1, PD-1)/程序性死亡配体1(programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)设计的免疫检查点抑制剂成为近年来肿瘤治疗领域的重大突破。最近Eph靶向化学药物联合免疫治疗取得了显著的临床疗效。Kamoun等^[44]选用BALB/c、A/J、C57BL/6小鼠腹腔注射抗CD8抗体,构建CD8⁺T缺陷的乳腺癌小鼠模型,发现靶向纳米脂质体紫杉烷制剂(EphA2-ILs-DTXp)与免疫检查点抑制剂协同,增加了CD8⁺T细胞活性,从而抑制肿瘤生长。

为进一步了解PD-L1的调控机制, Yang等^[45]选用T、B、NK细胞缺乏的NOD-SCID小鼠建立乳腺癌模型, 证实EphA10阻断剂不仅可以通过阻断PD-L1/PD-1信号转导来增强CTL活性, 而且可以增强CTL向肿瘤组织的浸润, 揭示EphA10作为免疫治疗新靶点具有极大的潜力。上述内容以鼠源的免疫系统为研究基础, 不能模拟人的实际情况。而人源化小鼠模型解决了这一问题, 可用于人类生物学研究和临床治疗方案的开发, 同时能更好地探讨Eph相关免疫制剂的研发。Eph家族分子是极具希望的免疫治疗的靶点, 尽管会面临一些问题, 诸如在不同的环境下, Eph信号转导具有双重作用, 受体配体产生的正向、反向信号在同一功能的研究中可能产生相同或完全相反的作用, 且Eph家族成员众多, 同一受体可与多种配体结合, 其表达模式复杂, 研究冗杂, 但该家族高度保守的进化序列为以Eph为基础的免疫疗法的开发和动物模型验证创造了机会。

4 基因修饰小鼠模型在Eph研究中的应用

基因修饰小鼠 (genetically modified mice) 同样为Eph关键分子的功能研究提供了良好工具。基因修饰小鼠是通过基因敲除、基因突变等手段对小鼠基因进行改造而建立的肿瘤模型, 该模型为潜在癌基因、药物靶点的验证、肿瘤免疫治疗、目的基因在体研究开创了新策略。但该类小鼠模型构建周期长、工作量大、成本高。Fawal等^[46]构建了人脑类器官 (patient-derived organoids), 寻找抑制脑肿瘤起始细胞自我更新、分化等的可能途径, 结果发现用重组配体EphrinB1-FC激活EphB受体会降低二氢叶酸还原酶的表达, 影响脑肿瘤起始细胞的自我更新及分化能力。Mateo-Lozano等^[47]通过一系列的体外实验发现, EphB6并不调节结直肠癌细胞粘附、迁移, 但EphB6缺失可以调节肿瘤发生、发展; 构建EphB6敲除小鼠模型后证明, EphB6缺失确实能促进结直肠癌的转移与扩散。在髓母细胞瘤中, 先前的研究表明EphA4、EphA7受体以及EFNA5配体介导肿瘤细胞的迁移。在此基础上构建EphA4、EphA7双基因敲除小鼠模型, 探讨EphA4和EphA7缺失对髓母细胞瘤的影响及其与p-Akt水平的相关性, 结果发现单独敲除EphA4、EphA7或联合敲除并不影响髓母细胞瘤的生长, 但与Akt磷酸化水平密切相关^[48]。Jackson实验室研发了一种C57BL/6J-Epha4rb-2J/GrsrJ小鼠突变体, 通过限

制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 技术获得该小鼠突变体中基因缺陷的详细信息, 为拓展EphB4的功能研究奠定了基础^[49]。如上所述, 基因敲除是使动物体内某种正常的基因失活, 观察该基因不表达会对个体产生哪些影响。而基因突变是确定某一未知基因与疾病的关系。两种基因编辑动物模型均可以推动特异性Eph所致疾病的研究, 直观反映其在体内的功能。

5 总结与展望

综上所述, 利用异种移植模型、肿瘤免疫治疗模型和基因修饰小鼠模型, 研究者不仅揭示了单个Eph受体或Ephrin配体调控肿瘤的相关分子机制, 而且以上述三种模型为基础可以探讨多个受体或多个配体相互协调的复杂信号通路, 验证多个Eph共同靶向的生物学功能及靶向治疗。但仍存在一些关键问题, 包括如何提高移植成功率、如何加快建模进程、如何优化保存条件、减少微生物感染等。总之, 选择合适的动物模型, 或将多种模型联合应用, 以及类器官等其他模型的佐证, 可能会更加准确地阐明Eph复杂的信号转导通路, 揭示疾病发生发展的相关机制。

[作者贡献 Author Contribution]

胡耀华采集整理文献, 设计文章框架, 并进行文章撰写; 赵菊梅和师长宏修改文章关键性问题并审核定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] RUDNO-RUDZIŃSKA J, KIELAN W, FREJLICH E, et al. A review on Eph/ephrin, angiogenesis and lymphangiogenesis in gastric, colorectal and pancreatic cancers[J]. Chin J Cancer Res, 2017, 29(4): 303-312. DOI: 10.21147/j. issn. 1000-9604.2017.04.03.
- [2] O'LEARY D D, WILKINSON D G. Eph receptors and ephrins in neural development[J]. Curr Opin Neurobiol, 1999, 9(1): 65-73. DOI: 10.1016/S0959-4388(99)80008-7.
- [3] ORICCHIO E, NANJANGUD G, WOLFE A L, et al. The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma[J]. Cell, 2011, 147(3): 554-564. DOI: 10.1016/j. cell.2011.09.035.
- [4] KUNG A L. Practices and pitfalls of mouse cancer models in drug discovery[J]. Adv Cancer Res, 2006, 96: 191-212. DOI: 10.1016/S0065-230X(06)96007-2.
- [5] STERNER R M, SAKEMURA R, COX M J, et al. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in

- xenografts[J]. *Blood*, 2019, 133(7):697-709. DOI:10.1182/blood-2018-10-881722.
- [6] KOPETZ S, LEMOS R, POWIS G. The promise of patient-derived xenografts: the best laid plans of mice and men[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(19): 5160-5162. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2408.
- [7] LIN J H, ZENG C T, ZHANG J K, et al. EFNA4 promotes cell proliferation and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma through a PIK3R2/GSK3 β / β -catenin positive feedback loop[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 25: 328-341. DOI:10.1016/j.omtn.2021.06.002.
- [8] DOPESO H, MATEO-LOZANO S, MAZZOLINI R, et al. The receptor tyrosine kinase EPHB₄ has tumor suppressor activities in intestinal tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(18):7430-7438. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-0706.
- [9] ASTIN J W, BATSON J, KADIR S, et al. Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(12):1194-1204. DOI:10.1038/ncb2122.
- [10] MIAO H, LI D Q, MUKHERJEE A, et al. EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt[J]. *Cancer Cell*, 2009, 16(1): 9-20. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.04.009.
- [11] QAZI M A, VORA P, VENUGOPAL C, et al. Cotargeting ephrin receptor tyrosine kinases A2 and A3 in cancer stem cells reduces growth of recurrent glioblastoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(17):5023-5037. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-18-0267.
- [12] 王洁. 基于肿瘤标本异种移植模型的胃癌转移相关基因研究[D]. 延安: 延安大学, 2020. DOI:10.27438/d.cnki.gyadu.2020.000548.
- WANG J. Research of metastasis-related genes derived from gastric cancer patient-derived xenograft models[D]. Yan'an : Yan'an University, 2020. DOI: 10.27438/d.cnki.gyadu.2020.000548.
- [13] LV J H, XIA Q Y, WANG J J, et al. EphB4 promotes the proliferation, invasion, and angiogenesis of human colorectal cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 100(3):402-408. DOI: 10.1016/j.yexmp.2016.03.011.
- [14] SATO S, VASAIKAR S, ESKAROS A, et al. EPHB₂ carried on small extracellular vesicles induces tumor angiogenesis via activation of ephrin reverse signaling[J]. *JCI Insight*, 2019, 4(23): e132447. DOI:10.1172/jci.insight.132447.
- [15] LI S, MA Y, XIE C, et al. EphA6 promotes angiogenesis and prostate cancer metastasis and is associated with human prostate cancer progression[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26): 22587-97. DOI:10.18632/oncotarget.4088.
- [16] NEUBER C, BELTER B, MEISTER S, et al. Overexpression of receptor tyrosine kinase EphB4 triggers tumor growth and hypoxia in A375 melanoma xenografts: Insights from multitracers small animal imaging experiments[J]. *Molecules*, 2018, 23(2). DOI:10.3390/molecules23020444.
- [17] FESTUCCIA C, GRAVINA G L, GIORGIO C, et al. UniPR1331, a small molecule targeting Eph/ephrin interaction, prolongs survival in glioblastoma and potentiates the effect of antiangiogenic therapy in mice[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(36): 24347-24363. DOI:10.18632/oncotarget.25272.
- [18] MIAO B C, JI Z Y, TAN L, et al. EPHA2 is a mediator of vemurafenib resistance and a novel therapeutic target in melanoma[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(3):274-287. DOI:10.1158/2159-8290.CD-14-0295.
- [19] YANG X K, YANG Y D, TANG S Q, et al. EphB4 inhibitor overcome the acquired resistance to cisplatin in melanomas xenograft model[J]. *J Pharmacol Sci*, 2015, 129(1): 65-71. DOI: 10.1016/j.jphs.2015.08.009.
- [20] LEUNG H W, LEUNG C O N, LAU E Y, et al. EPHB₂ activates β -catenin to enhance cancer stem cell properties and drive sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(12): 3229-3240. DOI: 10.1158/0008-5472.can-21-0184.
- [21] TOOSI B M, EL ZAWILY A, TRUITT L, et al. EPHB₆ augments both development and drug sensitivity of triple-negative breast cancer tumours[J]. *Oncogene*, 2018, 37(30):4073-4093. DOI:10.1038/s41388-018-0228-x.
- [22] ZHANG J L, DU Z Q, PAN S, et al. Overcoming multidrug resistance by codelivery of MDR1-targeting siRNA and doxorubicin using EphA10-mediated pH-sensitive lipoplexes: *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(25):21590-21600. DOI:10.1021/acsami.8b01806.
- [23] ZHANG J L, YANG C R, PAN S, et al. Eph A10-modified pH-sensitive liposomes loaded with novel triphenylphosphine-docetaxel conjugate possess hierarchical targetability and sufficient antitumor effect both *in vitro* and *in vivo*[J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1):723-737. DOI:10.1080/10717544.2018.1446475.
- [24] MORILLON Y M 2nd, SABZEVARI A, SCHLOM J, et al. The development of next-generation PBMC humanized mice for preclinical investigation of cancer immunotherapeutic agents[J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(10): 5329-5341. DOI: 10.21873/anticancer.14540.
- [25] ZUMWALDE N A, GUMPERZ J E. Modeling human antitumor responses *in vivo* using umbilical cord blood-engrafted mice [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:54. DOI:10.3389/fimmu.2018.00054.
- [26] SANMAMED M F, RODRIGUEZ I, SCHALPER K A, et al. Nivolumab and urelumab enhance antitumor activity of human T lymphocytes engrafted in Rag2-/-IL2R γ null immunodeficient mice[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(17):3466-3478. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-14-3510.
- [27] PREVOST N, WOULFE D, TANAKA T, et al. Interactions between Eph kinases and ephrins provide a mechanism to support platelet aggregation once cell-to-cell contact has occurred[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(14):9219-9224. DOI:10.1073/pnas.142053899.
- [28] BERROU E, SOUKASEUM C, FAVIER R, et al. A mutation of the human *EPHB2* gene leads to a major platelet functional defect[J]. *Blood*, 2018, 132(19): 2067-2077. DOI: 10.1182/blood-2018-04-845644.

- [29] BRAUN J, HOFFMANN S C, FELDNER A, et al. Endothelial cell ephrinB2-dependent activation of monocytes in arteriosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(2): 297-305. DOI:10.1161/ATVBAHA.110.217646.
- [30] ZHOU Q, FACCIPONTE J, JIN M, et al. Humanized NOD-SCID IL2rg^{-/-} mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies[J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(1): 13-19. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.10.015.
- [31] ZHANG L, MEISSNER E, CHEN J, et al. Current humanized mouse models for studying human immunology and HIV-1 immuno-pathogenesis[J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(2): 195-203.
- [32] CHIARI R, HAMES G, STROOBANT V, et al. Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17):4855-4863.
- [33] TATSUMI T, HERREM C J, OLSON W C, et al. Disease stage variation in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell reactivity to the receptor tyrosine kinase EphA2 in patients with renal cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15):4481-4489.
- [34] ALVES P M S, FAURE O, GRAFF-DUBOIS S, et al. EphA2 as target of anticancer immunotherapy: identification of HLA-A* 0201-restricted epitopes[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23): 8476-8480.
- [35] HART D N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response[J]. *Blood*, 1997, 90(9):3245-3287.
- [36] YAMAGUCHI S, TATSUMI T, TAKEHARA T, et al. Immunotherapy of murine colon cancer using receptor tyrosine kinase EphA2-derived peptide-pulsed dendritic cell vaccines[J]. *Cancer*, 2007, 110(7): 1469-1477. DOI: 10.1002/cncr.22958.
- [37] YAMAGUCHI S, TATSUMI T, TAKEHARA T, et al. Dendritic cell-based vaccines suppress metastatic liver tumor via activation of local innate and acquired immunity[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(12): 1861-1869. DOI: 10.1007/s00262-008-0514-5.
- [38] DOTI G, GOTTSCHALK S, SAVOLDO B, et al. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells[J]. *Immunol Rev*, 2014, 257(1):107-126. DOI: 10.1111/imir.12131.
- [39] CHOW K K H, NAIK S, KAKARLA S, et al. T cells redirected to EphA2 for the immunotherapy of glioblastoma[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(3):629-637. DOI:10.1038/mt.2012.210.
- [40] LI N, LIU S H, SUN M J, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells redirected to EphA2 for the immunotherapy of non-small cell lung cancer[J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(1):11-17. DOI:10.1016/j.tranon.2017.10.009.
- [41] SHI H, YU F, MAO Y T, et al. EphA2 chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(5): 2779-2788. DOI:10.21037/jtd.2018.04.91.
- [42] WANG E N, CESANO A, BUTTERFIELD L H, et al. Improving the therapeutic index in adoptive cell therapy: key factors that impact efficacy[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e001619. DOI:10.1136/jitc-2020-001619.
- [43] AN Z J, HU Y, BAI Y, et al. Antitumor activity of the third generation EphA2 CAR-T cells against glioblastoma is associated with interferon gamma induced PD-L1[J]. *Oncoimmunology*, 2021, 10(1):1960728. DOI:10.1080/2162402X.2021.1960728.
- [44] KAMOUN W S, DUGAST A S, SUCHY J J, et al. Synergy between EphA2-ILs-DTXp, a novel EphA2-targeted nanoliposomal taxane, and PD-1 inhibitors in preclinical tumor models[J]. *Mol Cancer Ther*, 2020, 19(1): 270-281. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0414.
- [45] YANG W H, CHA J H, XIA W Y, et al. Juxtacrine signaling inhibits antitumor immunity by upregulating PD-L1 expression[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(14):3761-3768. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-18-0040.
- [46] FAWAL M A, JUNGAS T, DAVY A. Inhibition of DHFR targets the self-renewing potential of brain tumor initiating cells[J]. *Cancer Lett*, 2021, 503: 129-137. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.01.026.
- [47] MATEO-LOZANO S, BAZZOCCO S, RODRIGUES P, et al. Loss of the EPH receptor B6 contributes to colorectal cancer metastasis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:43702. DOI:10.1038/srep43702.
- [48] BHATIA S, HIRSCH K, BAIG N A, et al. Effects of altered ephrin-A5 and EphA4/EphA7 expression on tumor growth in a medulloblastoma mouse model[J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 105. DOI:10.1186/s13045-015-0202-9.
- [49] MOHD-ZIN S W, ABDULLAH N L, ABDULLAH A, et al. Identification of the genomic mutation in EphA4(rb-2J/rb-2J) mice[J]. *Genome*, 2016, 59(7): 439-448. DOI: 10.1139/gen-2015-0142.

(收稿日期:2022-01-25 修回日期:2022-04-01)

(本文编辑:张俊彦,富群华,郭嘉欣)

实验动物质量控制中泰泽病原体的研究进展

陶俊豪, 鄢慧琼, 谢 珩, 应华忠, 戴方伟

(杭州医学院实验动物中心, 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 杭州 310013)

[摘要] 泰泽病原体 (Tyzzer's organism) 是一种能引起实验动物肝肠坏死和腹泻的毛发状芽孢杆菌 (*Clostridium piliforme*, 旧称 *Bacillus piliformis*)。该病原体引起的泰泽病是一种急性疾病, 其发病迅速、致死率高、临床症状不明显, 往往难以进行早期诊断和治疗, 一旦爆发, 将会造成严重的经济损失和实验室安全问题。本文从泰泽病原体的生物学特性、流行病学与疾病特征、检测方法、研究进展及防治多个方面进行综述。

[关键词] 泰泽病原体; 泰泽氏病; 研究进展; 防治

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0358-06

Research Progress of Tyzzer's Organism in Quality Control of Laboratory Animals

TAO Junhao, YAN Huiqiong, XIE Hui, YING Huazhong, DAI Fangwei

(Zhejiang Provincial Laboratory of Experimental Animal and Safety Evaluation Research, Laboratory Animal Center, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China)

Correspondence to: DAI Fangwei (ORCID: 0000-0001-6941-9860), E-mail: fangweidai@163.com

[ABSTRACT] Tyzzer's organism is a kind of *Clostridium piliforme*, formerly *Bacillus piliformis*, which can cause hepatointestinal necrosis and diarrhea in animals. Tyzzer's disease caused by this pathogen is an acute disease with rapid onset, high mortality and no obvious clinical symptoms, so it is difficult to make early diagnosis and treatment. Once the outbreak, it will cause irreparable economic losses and laboratory safety problems. This article reviewed the biological characteristics, epidemiological and disease characteristics, detection methods, research progress of Tyzzer's organism, as well as the prevention and treatment of Tyzzer's organism.

[Key words] Tyzzer organism; Tyzzer disease; Research progress; Prevention and treatment

泰泽病原体 (Tyzzer's organism) 是 Ernest Tyzzer^[1] 于 1917 年发现的一种毛发状芽孢杆菌 (*Clostridium piliforme*, 旧称 *Bacillus piliformis*), 能够感染多种动物, 引起肝肠坏死、腹泻及死亡 (称为泰泽病)。目前在小鼠、大鼠、豚鼠、沙鼠、仓鼠、麝鼠、兔、犬、猫和马等体内均发现过泰泽病原体, 此外有关鸟类感染泰泽病原体的案例报告有 4 篇^[2-5]。Smith 等^[6] 发现一例感染泰泽病原体的人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染患者, 其体内微生物序列与已知的泰泽病原体 16 S rRNA 序列只有一个碱基对不同, 这是迄今人类临床上报告的唯一病

例。国内姚菊芳等^[7] 对与实验动物有密切接触的饲养人员、相关人员和无关人员进行血清学调查, 发现密切接触人员的泰泽病原体抗体阳性率 (85.7%) 高于相关人员 (40.5%) 和无关人员 (22.0%)。泰泽病原体主要呈隐性或者亚临床感染, 对实验动物和相关工作人员均存在威胁, 国家标准《实验动物 泰泽病原体检测方法》(GB/T 14926.10—2001) 规定泰泽病原体是清洁级以上动物必须排除的病原体之一。

泰泽病原体是一种严格的细胞内寄生菌, 无法在无细胞培养基上培养, 只能用鸡胚和选定的细胞系进行体外培养^[8]。这极大地限制了对泰泽病原体的研

[基金项目] 浙江省医药卫生科技计划项目 (2020KY530) “基于 LAMP 与 dipstick 集成的实验动物泰泽病原体快速诊断新技术研究”

[第一作者] 陶俊豪 (1997—), 男, 硕士, 研究方向: 实验动物病原检测新技术研究。E-mail: 1062024353@qq.com

[通信作者] 戴方伟 (1978—), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物病原监测研究。E-mail: fangweidai@163.com。ORCID: 0000-0001-6941-9860

究。目前通常使用已经受感染的实验动物进行泰泽病原体研究。鉴于此, 本文从泰泽病原体的生物学特性、流行病学与疾病特征、检测方法与进展以及防治四个方面进行综述, 为以实验动物质量控制和生物安全管理为目标的泰泽病原体研究提供参考。

1 泰泽病原体的生物学特性

泰泽病原体是一种厌氧的专性细胞内寄生毛发状芽孢杆菌, 有繁殖体和芽孢两种形态^[9]。繁殖体呈丝状或粗短杆状。丝状结构的细菌边缘由细胞质膜、中间层和厚度为 25~30 nm 的特征性细胞壁组成, 富含鞭毛; 粗短杆状的细菌内含有许多较小的空泡, 细菌外壁边缘可见一层额外的疏松层, 厚度约为 3.5 nm, 完全包围菌体, 并与胞质和内质网直接接触, 寄主细胞的核糖体与其外围相连^[10]。繁殖体在体外易失活, 一般以芽孢的形式传播, 可通过鞭毛感染另一个宿主细胞。

泰泽病原体最常见的传播方式为粪-口传播, 动物一般从受粪便污染的环境中摄入芽孢。垂直传播也是泰泽病原体感染动物的途径之一。泰泽病原体通过细菌导向的宿主微丝依赖机制入侵肠上皮细胞, 然后迅速逃脱吞噬小体, 以与志贺菌和立克次体相似的方式在细胞质内复制。与其他胞内病原体的区别在于, 泰泽病原体富有的周生鞭毛使其能够在细胞内快速运动, 并可能侵入细胞核^[11]。

泰泽病原体的繁殖体在 45 °C 加热 15 min 即可被杀灭; 芽孢能够在 56 °C 下存活, 在 60 °C 加热 30 min 灭活, 在 80 °C 加热 15 min 灭活。泰泽病原体在 -80 °C 能保存数年, 其感染力与菌株种类、芽孢数量有关, 一般至少需要 50~100 个芽孢才能达到半数感染量。甲醛、过氧乙酸、次氯酸钠、碘酚、苯酚可灭活芽孢。

泰泽病原体有多种菌株, 不同宿主的菌株具有不同的抗原表位, 同一宿主的不同分离株在蛋白质和抗原表型上存在差异, 单个鞭毛抗原不能用于感染所有分离株的动物的血清学测试。但各分离株之间均有共同表位, 这可能是泰泽病原体为了适应不同宿主所出现的遗传进化^[12-13]。

2 泰泽病的流行病学与疾病特征

实验动物兔、小鼠、大鼠、沙鼠等对泰泽病原体均易感。有研究表明, 从小鼠体内分离的 M 株、大鼠

体内分离的 R 株以及兔体内分离的 K 株对小鼠致病性是相同的^[14]。泰泽病原体接种小鼠后, 小鼠体内白细胞介素-12 表达上升, 自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞和 Th1 反应在感染和介导免疫应答过程中发挥了重要作用^[15-16]。而且无胸腺的小鼠比有胸腺的小鼠更容易感染泰泽病原体^[17], 这可能是由于无胸腺的小鼠免疫力更低。泰泽病原体毒力因子的成分为蛋白质, 不同的分离株能引起不同程度的细胞毒性, 表明不同的泰泽病原体菌株可以诱导不同的临床表现^[18]。

泰泽病的症状一般在动物死亡前不久才出现, 而且通常是非特异性的, 在个体之间存在差异, 但都会出现肝脏和肠道病变。鼠类感染泰泽病原体后, 通常会出现肝肠病变, 偶尔出现心脏病变及脑炎^[3, 19]。小鼠对泰泽病原体的易感性随宿主年龄、免疫状态和感染菌株的不同而出现差异。仓鼠和沙鼠在死亡前很少有或无迹象, 有一些病例会出现腹泻、肛周粪便污染、抑郁、脱水、毛发粗糙等症状, 并且幼年动物无法成长^[20]。实验幼兔对泰泽病原体非常易感, 临床表现为不同程度的胃肠道症状, 体征包括食欲不振、嗜睡、腹胀、盲肠嵌塞、腹泻、脱水等^[21]。自发性脑炎是一种罕见的泰泽病表现, 在沙鼠和雀形目动物中有报告^[2-3, 22]。研究还发现, 泰泽病原体感染后的沙鼠^[22]和普通狢猴^[23]的中枢神经系统会发生病变。

对感染泰泽病原体的鼠类进行尸检, 发现盲肠和回肠肌层均有多灶性坏死, 有多形核细胞浸润, 黏膜溃疡旁的上皮细胞和黏膜肌层的平滑肌细胞内可见丛生的细长杆菌, 肠系膜内有淋巴细胞浸润; 肝脏中可观察到直径达 1 mm 的白褐色病灶, 门脉周围有凝固性肝细胞坏死的多灶性病变, 坏死灶含有细胞碎片, 轻度多形核细胞浸润, 偶见红细胞^[19]。在感染最严重时期的大鼠肌间神经丛内通常出现空泡化或缺失, 而在病情较轻的动物器官中仅发现肝门管区周围有轻微的淋巴细胞浸润^[24]。胃肠道、肝脏和心脏的坏死性和炎性病变是哺乳动物泰泽病的典型病理表现。病变区域和健康区域之间的过渡区很小, 由 1 层或 2 层部分变性的细胞组成, 对碱性和酸性染料的亲和力增强^[25]。

泰泽病的发病机制包括摄入泰泽病原体芽孢或繁殖体。动物感染该菌后, 首先在回肠-盲肠结肠区域复制, 进一步可能到达肝脏, 再感染体内其他组织或器官, 偶尔也通过体循环到达心脏^[26]。肝损伤可导致肝脏氨基酸清除率降低, 这可能是代谢性酸中毒的重要因素^[27]。肠黏膜上皮损伤与肝脏损伤都可能引起低

血糖。

泰泽病一般由多种因素引起,其发病率低,但致死率高。幼年动物特别是当免疫功能受损时最易感。在小型哺乳动物体内,潜伏期一般为2~10 d。Fries^[28]通过对小鼠、大鼠和兔体液抗体应答的长期观察发现,该病原体可能以持续或潜伏感染的形式存在于动物体内,并持续刺激免疫系统,动物对感染的抵抗力与抗体效价有关。泰泽病原体的感染力和致病力与宿主的种属、健康状况、周龄、性别、饮食和机体免疫,以及宿主所处的周边环境均有密切关系。过度拥挤、卫生条件差和皮质类固醇治疗等因素可诱发泰泽病。

Ganoe等^[29]认为,泰泽病可能是在过去50年里导致北美麝鼠数量显著下降的原因之一。研究还发现泰泽病原体在啮齿类实验动物体内具有较高的检出率。冯丽萍等^[30]、潘金春等^[31]和魏杰等^[32]分别对2010—2013年上海市、2013—2015年广东省和2009—2013年北京市实验大鼠、小鼠的病原体感染情况进行检测,结果显示,各年度均能检出泰泽病原体。戴方伟等^[33]对普通环境饲养的长爪沙鼠病原感染情况进行初步调查,泰泽病原体检出率为6.7%。北京市及浙江省的地方标准已经将泰泽病原体列入清洁级长爪沙鼠必检项目之一。

3 泰泽病原体的检测技术及其进展

泰泽病原体的检测方法有很多,如组织病理学诊断、可的松激发试验、悬液芯片技术、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫荧光法(immunofluorescence assay, IFA)、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)等,但都存在一定的缺陷^[34]。例如,2001年发布的国家标准(GB 14926.10—2001)将可的松激发试验作为参考方法,此法以发病动物特有的病理改变及镜下检出泰泽病原体为依据,结果准确可靠,但操作繁琐;组织病理学诊断也存在相似的缺点。

何静云等^[35]于2006年证明,免疫磁珠分离技术可有效地分离和纯化泰泽病原体,为特异性ELISA诊断抗原的制备奠定了基础。2008年国家标准(GB 14926.10—2008)将可的松激发试验删除,IFA和ELISA两种方法被用来进行泰泽病原体诊断。ELISA具有简单、可靠、准确性高的优点,但对窗口期或隐性感染动物易漏检;IFA方法虽简单易行,但由于梭菌

与泰泽菌有交叉反应,可能存在非特异性结合导致的假阳性。ELISA和IFA都存在检测灵敏度低、检测方法成本高等问题。由于泰泽病原体的分离培养较为困难,ELISA等方法的假阳性率较高,因此一般采用对患病动物的器官组织切片后通过银染或May-Giemsa染色来确认该菌。

Niepceron等^[36]在2010年建立了一种特异性强的巢式PCR检测法。该方法适用于临床标本,包括盲肠内容物和肝脏,也可应用于设备简单的实验室进行泰泽病的常规诊断。丁聪等^[37]采取ELISA和IFA并结合巢式PCR法对实验大鼠中泰泽病原体的携带情况进行调查,发现ELISA和IFA敏感性要高于PCR,提出采用IFA与ELISA相结合的方法可提高检测结果的敏感性及其可靠性。冯洁等^[38]对已建立的泰泽病原体巢式PCR检测方法进行优化,并将优化后的巢式NPCR与IFA相比,发现优化后的方法具有较高的特异性和灵敏度。PCR或反转录PCR等分子检测方法可以克服其他检测方法的局限性^[39],具有高特异性,能区分密切相关的非致病株和致病株的感染性病原体,但新菌株的引物位点的微小变化可能会导致假阴性,并且PCR的高敏感性可能会产生假阳性。

赵婷婷等^[40]根据泰泽病原体16S rDNA保守基因组序列设计引物和特异性探针,建立反向斑点杂交方法。张超超等^[41]采用悬液芯片技术进行实验兔中包括泰泽病原体在内的常见病原体检测,该方法具有快速、微量、特异、敏感性高等优点。Tosa等^[42]建立了泰泽病原体、鼠肝炎病毒和仙台病毒(又称日本血凝病毒)的多重免疫层析检测法,此方法快速简便,能够同时且特异地检测多种抗原的抗体,但试纸的制备费时费力,许多实验室可能缺乏必要的试剂和技术。

另外,由于泰泽病在早期很少出现症状,出现症状后动物很快就会死亡,因此开发一种早期诊断技术对泰泽病的防治至关重要。有研究者采用实时荧光PCR法分析废气粉尘样本的方法检测小鼠嗜肺巴斯德杆菌^[43]和诺如病毒(MNV)^[44],结果显示该方法优于传统的污秽垫料哨兵监测法^[45],这为泰泽病原体检测提供了新的思路。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)具有灵敏性高、特异性强等优点,将其与胶体金技术结合对泰泽病原体的早期诊断可起到重要作用。生物传感器技术、重组酶聚合酶扩增技术和生物成像发光技术等的高速发展,也为泰泽病原体检测带来广阔的前景。

4 泰泽病的防治

泰泽病原体的感染是由多种因素导致,目前还没有针对泰泽病原体的疫苗,对泰泽氏病的治疗尚不完善。由于该病发病迅速,在发现时动物往往很快就死亡,因此难以进行早期的诊断治疗。目前,仅有两例报告^[27,46]通过静脉注射葡萄糖、广谱抗生素、抗菌和抗炎药物成功治疗泰泽病原体感染的马;但大多数情况下通过静脉注射药物的方法使患有疾病的幼马短暂性好转后,还会很快恶化,最终死亡^[46]。一般认为,四环素对泰泽病有部分疗效,而氯霉素治疗需要大剂量^[47]。有研究者认为,针对泰泽病原体这类细胞内寄生型病原体的治疗药物研发,可参考同样作为胞内寄生菌的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和布鲁杆菌(*Brucella*)^[48]。例如,结核分枝杆菌的治疗药物贝达喹啉是针对ATP合成酶^[49];Q203则属于咪唑并吡啶类化合物,可作用细胞色素bc₁复合物,抑制ATP合成,影响结核分枝杆菌的能量代谢^[50]。上述两种药物均可作为泰泽病的治疗提供参考。

监测潜在的带菌动物,如沙鼠和仓鼠等啮齿动物,是一项预防泰泽病的重要措施。一旦发现动物被感染,芽孢很可能在个体之间快速转移,因此对小鼠和大鼠的感染群体应及时进行生物净化或淘汰处理。在实验动物的日常饲养工作中,预防泰泽病的具体措施包括:使用含氯、含碘消毒剂进行消毒,制定严格的洗手规章制度,增加更换防护用品的频率,改变动物的喂食顺序和清洗顺序,对进出饲养地的人员进行严格限制和培训管理^[51]。

5 展望

近年来,针对泰泽病原体的工作主要集中于检测技术开发、临床症状、病理特征研究和疾病治疗方面,而基础性研究并不多见。例如,关于泰泽病原体基因组方面的研究尚未见报告。另外,泰泽病原体难以进行人工培养和分离纯化,致使其深入研究相对困难。而且,由于无法体外获得大量纯化的抗原,使得国内泰泽病原体检测试剂盒的生产面临困境,进口试剂盒供应虽能暂时缓解国内检测材料供不应求的现状,但在新冠病毒肺炎全球大流行的环境下,进口试剂采购

的不便性势必会对检测工作产生不利影响。因此,泰泽病原体基因组序列的确定是研究泰泽病原体生物学特性的理论基础,人工培养泰泽病原体的体系优化也是必须要解决的难题之一,在此基础上才能为其生物学特性研究及疫苗研制等工作奠定基础,从而减少泰泽病原体感染,避免不必要的经济损失,保证我国实验动物科技事业稳步健康发展。

【作者贡献 Author Contribution】

陶俊豪和鄢慧琼检索和整理文献,撰写文章;谢琨对文章框架及内容进行修改,并提供重要意见;应华忠提供资金,对文章内容进行检查并提出意见;戴方伟修改文稿,提供资金。

【利益声明 Declaration of Interest】

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

【参考文献 References】

- [1] TYZZER E E. A fatal disease of the Japanese waltzing mouse caused by a spore-bearing *Bacillus* (*Bacillus piliformis*, N. SP.) [J]. J Med Res, 1917, 37(2):307-338.5.
- [2] METE A, EIGENHEER A, GOODNIGHT A, et al. *Clostridium piliforme* encephalitis in a weaver bird (*Ploceus castaneiceps*) [J]. J Vet Diagn Invest, 2011, 23(6): 1240-1242. DOI: 10.1177/1040638711425594.
- [3] METE A, ROGERS K H, WOODS L. Tyzzer's disease in free-ranging passerine birds in California, USA[J]. J Wildl Dis, 2017, 53(4):938-941. DOI:10.7589/2017-02-041.
- [4] RAYMOND J T, TOPHAM K, SHIROTA K, et al. Tyzzer's disease in a neonatal rainbow lorikeet (*Trichoglossus haematodus*) [J]. Vet Pathol, 2001, 38(3):326-327. DOI:10.1354/vp.38-3-326.
- [5] SAUNDERS G K, SPONENBERG D P, MARX K L. Tyzzer's disease in a neonatal cockatiel [J]. Avian Dis, 1993, 37(3): 891-894.
- [6] SMITH K J, SKELTON H G, HILYARD E J, et al. *Bacillus piliformis* infection (Tyzzer's disease) in a patient infected with HIV-1: confirmation with 16S ribosomal RNA sequence analysis [J]. J Am Acad Dermatol, 1996, 34(2): 343-348. DOI: 10.1016/S0190-9622(07)80005-3.
- [7] 姚菊芳, 汤家铭. 人群中泰泽氏菌感染的血清学调查 [J]. 上海实验动物科学, 1998, 18(S1):210.
YAO J F, TANG J M. Serological investigation on the infection of *Thalassella* in the population [J]. Shanghai Lab Animal Sci, 1998, 18(S1):210.
- [8] NAVARRO M A, UZAL F A. Pathobiology and diagnosis of clostridial hepatitis in animals [J]. J Vet Diagn Invest, 2020, 32(2):192-202. DOI:10.1177/1040638719886567.
- [9] FURUKAWA T, FURUMOTO K, FUJIEDA M, et al. Detection by PCR of the Tyzzer's disease organism (*Clostridium piliforme*) in feces [J]. Exp Anim, 2002, 51(5): 513-516. DOI: 10.1538/expanim.51.513.

- [10] GRUND S, THUNERT A. Electron microscopic studies of three forms of *Bacillus piliformis*[J]. Zentralbl Veterinarmed B, 1983, 30(2):117-130. DOI:10.1111/j.1439-0450.1983.tb01820.x.
- [11] FRANKLIN C L, KINDEN D A, STOGSDILL P L, et al. *In vitro* model of adhesion and invasion by *Bacillus piliformis*[J]. Infect Immun, 1993, 61(3): 876-883. DOI: 10.1128/iai.61.3.876-883.1993.
- [12] MOTZEL S L, RILEY L K. *Bacillus piliformis* flagellar antigens for serodiagnosis of tyzzer's disease[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(11):2566-2570. DOI:10.1128/jcm.29.11.2566-2570.1991.
- [13] RILEY L K, BESCH-WILLIFORD C, WAGGIE K S. Protein and antigenic heterogeneity among isolates of *Bacillus piliformis* [J]. Infect Immun, 1990, 58(4): 1010-1016. DOI: 10.1128/iai.58.4.1010-1016.1990.
- [14] FRIES A S. Studies on Tyzzer's disease: comparison between *Bacillus piliformis* strains from mouse, rat and rabbit[J]. Lab Anim, 1980, 14(1):61-63. DOI:10.1258/002367780780943079.
- [15] LIVINGSTON R S, FRANKLIN C L, BESCH-WILLIFORD C L, et al. A novel presentation of *Clostridium piliforme* infection (Tyzzer's disease) in nude mice[J]. Lab Anim Sci, 1996, 46(1): 21-25.
- [16] VAN ANDEL R A, HOOK R R Jr, FRANKLIN C L, et al. Effects of neutrophil, natural killer cell, and macrophage depletion on murine *Clostridium piliforme* infection[J]. Infect Immun, 1997, 65(7):2725-2731. DOI:10.1128/iai.65.7.2725-2731.1997.
- [17] SIMPSON V R, HARGREAVES J, BIRTLES R J, et al. Tyzzer's disease in a Eurasian otter (*Lutra lutra*) in Scotland[J]. Vet Rec, 2008, 163(18):539-543. DOI:10.1136/vr.163.18.539.
- [18] RILEY L K, CAFFREY C J, MUSILLE V S, et al. Cytotoxicity of *Bacillus piliformis*[J]. J Med Microbiol, 1992, 37(1):77-80. DOI: 10.1099/00222615-37-1-77.
- [19] WAGGIE K S, THORNBURG L P, GROVE K J, et al. Lesions of experimentally induced Tyzzer's disease in Syrian hamsters, guinea pigs, mice and rats[J]. Lab Anim, 1987, 21(2): 155-160. DOI:10.1177/002367728702100213.
- [20] MOTZEL S L, GIBSON S V. Tyzzer disease in hamsters and gerbils from a pet store supplier[J]. J Am Vet Med Assoc, 1990, 197(9):1176-1178.
- [21] RODRÍGUEZ-DE LARA R, CEDILLO-PELÁEZ C, CONSTANTINO-CASAS F, et al. Studies on the evolution, pathology, and immunity of commercial fattening rabbits affected with epizootic outbreaks of diarrhoeas in Mexico: a case report[J]. Res Vet Sci, 2008, 84(2):257-268. DOI:10.1016/j.rvsc.2007.04.018.
- [22] VEAZEY R S 2nd, PAULSEN D B, SCHAEFFER D O. Encephalitis in gerbils due to naturally occurring infection with *Bacillus piliformis* (Tyzzer's disease) [J]. Lab Anim Sci, 1992, 42(5):516-518.
- [23] YOSHIDA K, NIBE K, NAKAMURA T, et al. Spontaneous Tyzzer's disease with the central nerve involvement in a newborn common marmoset[J]. J Vet Med Sci, 2013, 75(8): 1119-1121. DOI:10.1292/jvms.13-0121.
- [24] FRIES A S, SVENDSEN O. Studies on Tyzzer's disease in rats [J]. Lab Anim, 1978, 12(1): 1-4. DOI: 10.1258/002367778780953297.
- [25] ALLEN A M, GANAWAY J R, MOORE T D, et al. Tyzzer's disease syndrome in laboratory rabbits[J]. Am J Pathol, 1965, 46(5):859-882.
- [26] NETO R T, UZAL F A, HODZIC E, et al. Coinfection with *Clostridium piliforme* and felid herpesvirus 1 in a kitten[J]. J Vet Diagn Invest, 2015, 27(4): 547-551. DOI: 10.1177/1040638715593600.
- [27] BORCHERS A, MAGDESIAN K G, HALLAND S, et al. Successful treatment and polymerase chain reaction (PCR) confirmation of Tyzzer's disease in a foal and clinical and pathologic characteristics of 6 additional foals (1986-2005)[J]. J Vet Intern Med, 2006, 20(5):1212-1218. DOI:10.1892/0891-6640(2006)20[1212:stapcr]2.0.co;2.
- [28] FRIES A S. Studies on Tyzzer's disease: a long-term study of the humoral antibody response in mice, rats and rabbits[J]. Lab Anim, 1979, 13(1):37-41. DOI:10.1258/002367779781071267.
- [29] GANOE L S, BROWN J D, YABSLEY M J, et al. A review of pathogens, diseases, and contaminants of muskrats (*Ondatra zibethicus*) in north America[J]. Front Vet Sci, 2020, 7:233. DOI:10.3389/fvets.2020.00233.
- [30] 冯丽萍, 陶凌云, 冯洁, 等. 2010—2013年上海地区实验大鼠小鼠病原体感染情况分析[J]. 实验动物与比较医学, 2015(5):398-402. FENG L P, TAO L Y, FENG J, et al. Analysis on pathogen infection of mice and rats in Shanghai from 2010 to 2013[J]. Lab Animal Comp Med, 2015(5):398-402.
- [31] 潘金春, 赵维波, 陈梅玲, 等. 2013年~2015年广东地区实验小鼠和大鼠微生物学及寄生虫学调查[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(2):64-69, 85. PAN J C, ZHAO W B, CHEN M L, et al. Microbiological and parasitological investigation in laboratory mice and rats in Guangdong Province from 2013 to 2015[J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(2):64-69, 85.
- [32] 魏杰, 黄健, 刘文菊, 等. 2017—2019年北京地区实验动物质量抽检结果分析[J]. 实验动物科学, 2021, 38(5):19-27, 58. WEI J, HUANG J, LIU W J, et al. Analysis of random testing results of laboratory animals in Beijing area from 2017 to 2019 [J]. Lab Animal Sci, 2021, 38(5):19-27, 58.
- [33] 戴方伟, 杜江涛, 周莎桑, 等. 普通环境长爪沙鼠种群中病原体携带情况普查[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11):15-18, 31. DAI F W, DU J T, ZHOU S S, et al. Investigation of pathogen infections in Mongolian gerbils raised in a conventional facility[J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(11):15-18, 31.
- [34] 祝岩波, 王俊霞. 实验动物泰泽氏菌、肺支原体、兔出血症病毒检测方法的评价[J]. 实验动物科学, 2017, 34(2):71-74. ZHU Y B, WANG J X. Evaluation of testing methods in laboratory animal *Clostridium piliforme*, *Mycoplasma pulmonis* and rabbit hemorrhagic disease virus[J]. Lab Animal Sci, 2017, 34(2):71-74.
- [35] 何静云, 刘星, 张丽芳, 等. 免疫磁珠分离技术纯化和检测泰泽氏病原体的研究[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(2):126-131. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2006.02.013. HE J Y, LIU X, ZHANG L F, et al. Isolation and detection of *Clostridium piliformis* by immunomagnetic bead assays[J].

- Acta Lab Animalis Sci Sin, 2006, 14(2):126-131. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2006.02.013.
- [36] NIEPCERON A, LICOIS D. Development of a high-sensitivity nested PCR assay for the detection of *Clostridium piliforme* in clinical samples[J]. Vet J, 2010, 185(2):222-224. DOI:10.1016/j.tvjl.2009.05.002.
- [37] 丁聪, 冯洁, 谢建云, 等. 实验大鼠泰泽病原体三种检测方法的比较[J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(6):415-419. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2010.06.005.
- DING C, FENG J, XIE J Y, et al. Comparison of three detection methods of clostridium piliforme infections in laboratory rats [J]. Lab Animal Comp Med, 2010, 30(6):415-419. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2010.06.005.
- [38] 冯洁, 谢建云, 胡建华, 等. 泰泽病原体 nested-PCR 检测方法的优化及应用研究[J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(3):183-187. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2010.03.007.
- FENG J, XIE J Y, HU J H, et al. Optimization for nested-PCR method for *Bacillus piliformis* detection and its application[J]. Lab Animal Comp Med, 2010, 30(3):183-187. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2010.03.007.
- [39] COMPTON S R. PCR and RT-PCR in the diagnosis of laboratory animal infections and in health monitoring[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2020, 59(5):458-468. DOI:10.30802/AALAS-JAALAS-20-000008.
- [40] 赵婷婷, 严磊, 魏立雯, 等. 反向斑点杂交检测泰泽病原体[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3):72-77. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.015.
- ZHAO T T, YAN L, WEI L W, et al. Application of reverse dot blotting for detection of Tyzzer's organism[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2014, 22(3):72-77. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.015.
- [41] 张超超, 黄小燕, 樊海艇, 等. 悬液芯片技术在实验兔病原体检测中的应用[J]. 实验动物与比较医学, 2016(4):307-309.
- ZHANG C C, HUANG X Y, FAN H T, et al. Application of suspension chip technology in pathogen detection of experimental rabbits[J]. Lab Animal Comp Med, 2016(4):307-309.
- [42] TOSA N, ISHIDA T, YOSHIMATSU K, et al. Multiplex immunochromatographic assay for serologic diagnosis of major infectious diseases in laboratory mice[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2019, 58(6):790-795. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-19-000008.
- [43] MILLER M, RITTER B, ZORN J, et al. Exhaust air dust monitoring is superior to soiled bedding sentinels for the detection of *Pasteurella pneumotropica* in individually ventilated cage systems[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(6):775-781.
- [44] ZORN J, RITTER B, MILLER M, et al. Murine norovirus detection in the exhaust air of IVCs is more sensitive than serological analysis of soiled bedding sentinels[J]. Lab Anim, 2017, 51(3):301-310. DOI:10.1177/0023677216661586.
- [45] MILLER M, BRIELMEIER M. Environmental samples make soiled bedding sentinels dispensable for hygienic monitoring of IVC-reared mouse colonies[J]. Lab Anim, 2018, 52(3):233-239. DOI:10.1177/0023677217739329.
- [46] PEEK S F, BYARS T D, RUEVE E. Neonatal hepatic failure in a Thoroughbred foal: successful treatment of a case of presumptive Tyzzer's disease[J]. Equine Vet Educ, 1994, 6(6):307-309. DOI:10.1111/j.2042-3292.1994.tb01160.x.
- [47] 于丽娟. 泰泽氏病流行病学特点和诊治方法[J]. 中国畜禽种业, 2020, 16(8):74.
- YU L J. Epidemiological characteristics and diagnosis and treatment of Thayer's disease[J]. Chin Livest Poult Breed, 2020, 16(8):74.
- [48] 吴移谋, 王建业. 胞内寄生菌与宿主细胞凋亡的相互作用分子机制研究[J]. 中南医学科学杂志, 2021, 49(3):249-252. DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2021.03.001.
- WU Y M, WANG J Y. Advances in molecular mechanisms of the interaction between intracellular pathogens and host cell apoptosis[J]. Med Sci J Central South China, 2021, 49(3):249-252. DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2021.03.001.
- [49] TIBERI S, DU PLESSIS N, WALZL G, et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(7):e183-e198. DOI:10.1016/S1473-3099(18)30110-5.
- [50] 许桂爱. 治疗结核病药物现状及进展[J]. 继续医学教育, 2021, 35(9):162-164.
- XU G A. Current situation and progress of drugs for tuberculosis[J]. Continuing Med Educ, 2021, 35(9):162-164.
- [51] STANNARD H J, TULK M L, OLD J M. Dead mouse hopping: Tyzzer's disease in spinifex hopping-mice (*Notomys alexis*)[J]. Vet Microbiol, 2017, 201:201-207. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.01.018.
- (收稿日期:2021-10-27 修回日期:2022-05-12)
(本文编辑:张俊彦,富群华,姜怡欣)

高校 ABSL-2 实验室流程管理的实践探讨:以厦门大学为例

郑秀青, 邵志强, 宋 婧, 张越华, 苏金华

(厦门大学实验动物中心, 厦门 361102)

[摘要] 建立标准化、科学化、规范化的动物生物安全二级 (animal biosafety level-2, ABSL-2) 实验室是支持高校涉及病原微生物教学和科研工作顺利开展的重要保证。本文以厦门大学实验动物中心 ABSL-2 实验室为例, 分别从资质备案, 生物安全管理体系文件, 日常工作管理, 压力梯度控制, 人员、动物及物品的管理, 生物安全监督检查, 以及废弃物处理等方面, 详细阐述了 ABSL-2 实验室的运行及管理模式, 并针对管理过程中遇到的问题提出应对措施。

[关键词] 实验动物; 动物生物安全二级实验室; 流程管理; 探讨

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)04-0364-07

Practice of ABSL-2 Laboratory Process Management in Universities: Xiamen University as An Example

ZHENG Xiuqing, SHAO Zhiqiang, SONG Jing, ZHANG Yuehua, SU Jinhua

(Laboratory Animal Center, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Correspondence to: SU Jinhua (ORCID: 0000-0002-8431-4909), E-mail: sujh@xmu.edu.cn

[ABSTRACT] The establishment of standardized, scientific and normalized animal biosafety level-2 (ABSL-2) laboratory is an important supporting of teaching and research in universities. Taking the ABSL-2 laboratory of Xiamen University laboratory animal center as an example, this paper elaborated the operation and management mode of the ABSL-2 laboratory from the aspects of the qualification for the record, biosafety management system documents, daily work management, pressure gradient control, the management of people, animals and materials, biological safety supervision and inspection, and waste disposal, and proposed countermeasures for the problems encountered in the management process.

[Key words] Laboratory animals; ABSL-2 laboratory; Process management; Discussion

生物安全实验室 (biosafety laboratory) 是通过防护屏障和管理措施以避免或控制生物因子危害, 达到生物安全要求的生物实验室和动物实验室, 是研究病原微生物的科学、安全平台。它既能保护研究人员不受实验生物因子的伤害, 也能保证实验生物因子不受外界因子的污染^[1-2]。《中华人民共和国生物安全法》第四十五条规定: 从事病原微生物实验活动应当在相应等级的实验室进行。按照规定, 对于《人间传染的病原微生物名

录》^[3] (2006 版) 中危害程度第三类和第四类的病原微生物及《动物病原微生物分类名录》^[4] (2020 版) 中的三类动物病原微生物, 进行动物体内实验须在动物生物安全二级 (animal biosafety level-2, ABSL-2) 实验室中操作。因而, 为适应高校日益增加的涉及病原微生物的教学和科研工作亟需建立符合规范的生物安全实验室。本文以厦门大学实验动物中心 ABSL-2 实验室为例, 分别从 ABSL-2 实验室设施基本情况、运行及管理模

[第一作者] 郑秀青 (1979—), 女, 实验师, 主要从事实验动物质量和 ABSL-2 实验室管理工作。E-mail: zhengxq@xmu.edu.cn

邵志强 (1989—), 男, 助理实验师, 主要从事实验动物质量检测与实验室管理工作。E-mail: szq201724@xmu.edu.cn

[通信作者] 苏金华 (1965—), 男, 高级实验师, 研究方向: 实验动物环境设施与动物实验安全管理。E-mail: sujh@xmu.edu.cn。ORCID: 0000-0002-8431-4909

门同意；与人体健康有关的高致病性病原微生物科研项目，实验室应当将立项结果告知省级以上人民政府卫生主管部门^[8]。目前，本实验室微生物科研活动主要与人体健康有关，涉及一级和二级人间传播病原微生物，根据《病原微生物实验室生物安全通用准则》应当向当地政府设立的卫生健康管理部门备案^[9]；若科研活动涉及动物本身的一级和二级病原微生物时，应向当地农业农村局申请备案。ABSL-2实验室在启用前，应委托第三方对设施环境指标进行检测，经确认后到当地政府卫生健康管理部门进行病原微生物种类备案。厦门大学备案凭证见图2。福建省科学技术厅每年需要对屏障环境设施指标抽检，ABSL-2实验室备案证号有效期五年，备案证号有效期期间的研究需要增加微生物种类时应重新申请备案，增补新的病原微生物名称。

厦门大学对BSL-2实验项目均实行“课题组长负责制”和“校生物研究工作安全指导委员会审核备案”管理。若BSL-2实验项目获得审批并需在ABSL-2实验室完成时，要求实验人员填写《ABSL-2生物安全动物实验申请表》，并提交给ABSL-2实验室负责人审核。所有ABSL-2实验项目需同时获得动物实验伦理审查号，在审核材料全部通过后开展实验。

2.2 ABSL-2实验室生物安全管理体系文件

厦门大学在ABSL-2实验室建设管理中认真贯彻国家标准和有关法规，从实验室自身实际出发，建立健全规章制度，确保实验室的规范管理，做到责任明确；同时完善操作规程，确保实验人员规范化、程序化、标准化操作，避免因操作不当引起实验室安全事故。

福建省病原微生物实验室备案凭证					
实验室设立机构名称		厦门大学		机构法定代表人	张荣
设立机构地址		厦门市思明南路 422 号		邮编	361005
机构联系人		苏金华		联系电话及手机	1895923898
有效期五年		2019 年 12 月 27 日至 2024 年 12 月 26 日			
实验室名称		实验室备案编号	实验室联系人及电话	是否定向气流	涉及主要病原微生物及实验活动*
厦门大学实验动物中心 E 区		20192079012	苏金华 1895923898	是	淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、单纯疱疹病毒、致病性大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌等免疫系统研究和建立模型试验。
备案意见	同意				
厦门市卫生健康委员会公章 2019 年 12 月 27 日					

图2 福建省厦门市颁发给厦门大学的病原微生物实验室备案凭证

Figure 2 Record certificate of pathogenic microorganism laboratory issue by Xiamen city, Fujian province for Xiamen University

当生物安全的法律法规发生修订更新时，本实验室会及时完善内部规章制度。图3为本实验室生物安全管理体系文件。

2.3 ABSL-2实验室日常工作管理

为严格落实日常管理，做到台账清楚，实验室制定了《ABSL-2实验室人员进出记录表》《ABSL-2实验

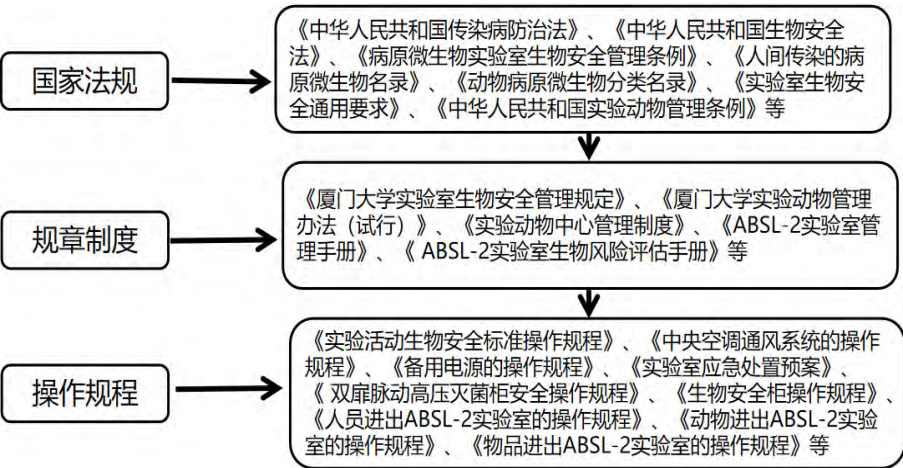


图3 厦门大学ABSL-2实验室生物安全管理体系文件

Figure 3 Documents of ABSL-2 laboratory biosafety management system in Laboratory Animal Center of Xiamen University

室实验动物进入记录表》《ABSL-2实验室动物尸体暂存记录表》《ABSL-2实验室废弃物暂存记录表》《ABSL-2实验室废弃物高压消毒灭菌记录表》《ABSL-2实验室病原微生物进饲养间记录表》《脉动真空高压灭菌柜使用记录表》《脉动真空高压灭菌柜物品灭菌结束领取记录表》《待灭菌物品记录表》《ABSL-2实验室卫生清洁消毒检查记录表》《IVC工作记录表》《臭氧发生器消毒使用记录表》《复合式紧急冲淋装置日常检查表》等表格,并将这些材料整理归档,集中保存。

2.4 ABSL-2实验室压力梯度控制

ABSL-2实验室采用全新风系统,压差调节与风量调节相结合。严格的压力梯度控制可确保气流定向流动,防止交叉感染。动物检疫室配有负压IVC、生物安全柜等;每间ABSL-2实验室配有负压IVC、生物安全柜、冰箱和物流推车等,实验操作在本实验室的生物安全柜内进行;操作室配有生物安全柜、冰箱、物流推车等,供实验结束时取材使用。

ABSL-2实验室压差气流流向:洁物走廊(-20 Pa)→动物检疫室或ABSL-2实验室(-30 Pa)←污物走廊(-20 Pa)→操作室(-30 Pa)/待无害化消毒物品间(-30 Pa)←污物走廊(-20 Pa)←出口缓冲间(-10 Pa)←更鞋区(+5 Pa),满足负压要求。

2.5 ABSL-2实验室人员管理

加强实验室生物安全管理,把工作落到实处,离不开一支训练有素、监管到位的专业管理人员^[10-11]。本实验室人员主要包括管理人员、兽医师、检疫人员、维修人员、实验人员。各课题组负责人应提交由实验动物中心制定的《实验室使用须知》及《课题组委托协议书》,并做好签字和学院盖章。课题组负责人应先向实验动物中心申请,审核通过后课题组成员方可向课题组负责人申请开展实验。课题组负责人审核通过后,所有参与人员必须接受实验室相关的生物安全知识培训,如省级实验动物学会举办的实验动物从业人员岗位培训、市级卫生健康委员会组织的生物安全实验室管理知识培训等,并通过考核持证上岗。此外,实验人员还需参加实验动物中心定期举办的实验室安全运行知识与管理的理论培训与笔试、现场培训与考核。理论培训主要包括实验动物与设施的分类、生物安全动物实验室管理、动物实验室安全管理注意事项、动物实验室违规处罚办法、实验动物转移(运)等流程。现场培训主要包括个人防护服穿着、实验室人员物品流向、仪器设备使用、消防演练、生物安全应急

演练等实地学习。实验人员经考核合格后,方可获得相应饲养间或操作间的门禁授权。

2.6 实验动物及物品进入管理

实验动物管理:实验动物须来源于本校实验动物中心繁殖或国内具有资质且质量合格的生产单位^[12]。本校实验动物中心繁殖的动物转运时应将动物放在已灭菌无破损的塑料运输笼中,用透明胶布将塑料运输盒外沿密封,并将运输笼用已灭菌的布袋密封包装,然后才能转移到ABSL-2实验区。外购动物运输到达本校实验动物中心后,应检查包装的完整性和安全性,若发现包装盒破损等情况时,拒绝其进入实验室。

病原微生物管理:病原微生物转运时需符合《人间传染的病原微生物名录》^[3](2006版)运输包装分类要求,应标明实验人员、课题组、病原微生物名称等基本信息,并用生物危害标识包装转移。单次使用剩余的病原微生物应进行无害化销毁,并详细记录使用情况。

特殊药品管理:特殊药品包括麻醉药品、精神药品、易制毒试剂、易挥发试剂、危险化学品等。因为本ABSL-2实验室属于校内公共平台,所以采用单次登记使用、剩余带回各课题组实验室保管的原则。

实验动物传递的消毒流程:登记备案,拆除最外层包装后进入消毒前室,经过消毒后从消毒后室、洁物走廊进入到动物检疫室或ABSL-2实验室。

物品传递的消毒流程:登记备案,根据物品性质和材质选择适宜的消毒方法。垫料、饲料、饮用水、水瓶、手术器械、抹布等耐高温高压物品必须经双扉脉动真空高压灭菌柜消毒灭菌。仪器设备、拖鞋、实验药品试剂、细胞、病原微生物等不耐高温高压的物品选择浸泡、紫外线、喷雾、臭氧发生器、过氧化氢消毒器等方式或仪器消毒灭菌。

2.7 实验室废弃物处置措施

ABSL-2实验室必须对所有废弃物进行严格高温高压消毒灭活,按分类包装贴上标签,并做好登记;不能高温高压的物品(例如仪器)按其他可靠安全的消毒方法操作。所有物品经过消毒灭菌预处理后,方能运出ABSL-2实验室^[13-14]。

2.7.1 尖锐器具处置措施

注射器、皮下注射针头等尖锐器具用过后不应重复使用,包括不能从注射器上取下、回套针头护套等,而应将其完整地置于盛放锐器的利器盒中。利器盒必须由不易刺破的材料构成,且盒内需添加不超过其容

量四分之三的消毒液。最后将利器盒包扎后进行高温消毒灭菌,以待统一处理。

2.7.2 废弃物处置措施

应对实验动物使用过的垫料、饮水瓶和实验操作用过的EP管、纸张、IVC等物品表面进行化学喷雾消毒,之后放入耐高压的医疗废物专用袋内,封口。对医疗专用袋的表面进行喷雾消毒,放至待无害化消毒物品间进行集中高温消毒灭菌。使用过的一次性个体防护装备需经集中高温消毒灭菌后,按感染性医疗废物处理。可重复使用的水瓶、IVC等物品必需经高温高压消毒灭菌,清洗烘干,再重新高温消毒灭菌后使用。高温消毒灭菌处理后的废弃物应分类装袋,由学校管理部门委托的专业环保机构进行集中无害化处理。

2.7.3 动物尸体处置措施

实验动物尸体及取材后剩余组织,需放入医疗专用袋,扎紧袋口,再对医疗专用袋的外表面周围喷雾消毒,经高温高压灭菌后二次打包存放在ABSL-2实验室外的专用冰柜暂存,集中一定数量后再交给由学校管理部门委托的专业机构进行无害化处理。全部过程的每个环节做好详细记录。

3 生物安全监督检查

3.1 ABSL-2实验室日常检查

饲养员每日检查饲养室仪器设备、照明系统、环境指标、环境卫生、饲养密度、饲料、饮用水、消毒试剂和各类记录表格标签等项目,并做好记录,若发现问题及时添加或上报实验室管理员。实验室管理员负责监管日常工作的生物安全情况、生物安全管理制度执行情况、生物安全设施环境指标运行情况、生物安全设备维护消毒情况、个人防护要求执行情况等问题,重点检查消毒液配制浓度是否符合要求、各类记录表填写是否如实全面、实验室人员的生物安全操作是否规范,项目审核制度是否严格执行等内容。同时每年还要对生物安全柜、高压灭菌柜、紫外灯等仪器设备进行年检、校正和维护。

3.2 学校生物研究工作安全指导委员会巡查

学校生物研究工作安全指导委员会成员在不定期巡查过程中检查ABSL-2实验室管理体系运行情况、生物安全管理制度完善情况、生物安全实验室的消毒和灭菌情况、感染性废弃物的处理情况、实验项目落实情况、生物安全设施设备的运行维护情况、消防安全情况、警报系统安全情况等。若检查中发现问题,责

成中心管理员及时纠正,监督实施整改并跟踪验证,必要时实施处罚措施。

3.3 市卫生健康管理部门督查

福建省厦门市卫生健康委员会不定期组织专家检查ABSL-2实验室的管理机构与管理体系文件,实验室活动管理情况,设施设备(含消防)管理情况,危化品管理情况,菌(毒)种及感染性材料的使用、保藏、处置、运输等管理情况,废弃物处置情况,安全保障情况,人员培训与健康情况等,若发现问题责令整改。

4 设施运行存在的问题与应对措施

4.1 设施运行存在问题

本校ABSL-2实验室在负压屏障环境的动物实验室基础上改建而成,功能上存在一定缺陷,运行近8年来发现以下主要问题:(1)操作室偏少,课题组使用时需等待较长时间;(2)课题组实验人员对生物安全认识不足,对实验动物福利认识不够深入,不能严格执行实验室管理规定及实验动物标准操作规程要求;(3)新老学生交替变更造成实验人员流动性大、实验时间不确定等,这些不可控因素增加了管理难度,降低了实验空间的有效利用率;(4)微生物种类多,实验室空间有限,仪器配置不足。

4.2 应对措施

针对以上问题,学校相关部门采取积极有效的应对措施。首先,加强学校层面的日常监管,定期举办ABSL-2实验室的安全运行管理、实验动物正确使用、实验动物福利和伦理知识,以及生物安全废弃物处置等业务培训,同时开展《实验动物学》和《模式动物学》教学课程,提升实验人员的基础知识和操作技能。其次,ABSL-2实验室实行预约制度,每个实验室均建立微信群预约,要求提前24 h预约成功后方可进入实验室,同一课题组的实验人员在同一时间段最多3人进入实验室,杜绝无关人员进入实验室。再次,加强实验室的监督管理,如规范穿戴个人防护用具,保证实验人员的安全操作,监督实验废弃物及时高温高压消毒处理,查看饲养密度是否超过规定等,保障ABSL-2生物安全实验室的正常运行;一旦发现违规人员,将根据情节轻重按《违反实验动物中心屏障环境安全运行处罚办法(试行)》进行处罚,严重时取消使用权限。最后,优化完善合理的符合人性化、标准化、规范化的ABSL-2实验室操作流程,确保实验人员能够共同遵守;做好定期设备维护、报废、更新和购置计划,满足实验人员需求。

5 结束语

动物生物安全实验室具有特殊性,对动物饲养环境和从业人员要求更高,风险意识要求更强,需要进一步强调生物安全风险评估,并完善生物安全管理体系^[15]。只有建立健全、严格的规章制度,强化实验室流程管理,提升实验人员生物安全意识,把实验室的生物安全风险降到最低,才能确保 ABSL-2 实验室规范、安全、有效运行。本校 ABSL-2 实验室在功能配置和运行流程上存在一定的不足,使用空间不能完全满足教学科研需要,未来学校将通过加大实验室设施设备投入,加强实验室人员安全知识培训,严格遵守国家法律法规和当地管理部门的要求,进一步提高 ABSL-2 实验室安全管理水平。

[作者贡献 Author Contribution]

郑秀青为初稿写作人;邵志强为初稿写作和整理者;宋婧和张越华为论文修改者;苏金华负责论文审核定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 汤文庭,李赫,唐奇.高校传染病实验室生物安全管理现状与对策研究[J].中国动物传染病学报,2022,30(2):233-236. DOI:10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.2022.02.005.
TANG W T, LI H, TANG Q. Current situations and countermeasures of biosafety management of infectious disease laboratories at Chinese universities[J]. Chin J Animal Infect Dis, 2022, 30(2):233-236. DOI:10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.2022.02.005.
- [2] 李晓燕,卢选成.生物安全二级动物实验设施(ABSL-2)运行管理要点分析[J].中国比较医学杂志,2019,29(7):80-85. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2019.07.013.
LI X Y, LU X C. Analysis on the key points of operation management in animal biosafety level-2 (ABSL-2) facilities[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(7):80-85. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2019.07.013.
- [3] 卫生部关于印发《人间传染的病原微生物名录》的通知[J].中华人民共和国卫生部公报,2006(2):32-52.
Notice of the ministry of health on printing and distributing the list of pathogenic microorganisms of human infection[J]. Gazette Minist Health People's Repub China, 2006(2):32-52.
- [4] 郭志儒.中华人民共和国农业部第53号令公布动物病原微生物分类名录[J].中国兽医学报,2005,25(5):473. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2005.05.009.
GUO Z R. Decree No.53 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China announced the classification list of animal pathogenic microorganisms[J]. Chin J Vet, 2005, 25(5):473. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2005.05.009.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.实验动物 环境及设施:GB 14925—2010[S].北京:中国标准出版社,2011.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, China National Standardization Administration. Laboratory animal environment and facilities: GB 14925—2010[S]. Beijing: China Standards Publishing House, 2011.
- [6] 中华人民共和国住房和城乡建设部.生物安全实验室建筑技术规范:GB 50346—2011[S].北京:中国建筑工业出版社,2012.
Ministry of Housing and Urban Rural Development of the People's Republic of China. Technical code for building of biosafety laboratory: GB 50346—2011[S]. Beijing: China Construction Industry Press, 2012.
- [7] 国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.实验室 生物安全通用要求:GB 19489—2008[S].北京:中国标准出版社,2009.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, China National Standardization Administration. General requirements for laboratory biosafety: GB 19489—2008[S]. Beijing: China Standards Press, 2009.
- [8] 中华人民共和国国务院.病原微生物实验室生物安全管理条例[A].2004-11-12.
State Council of the people's Republic of China. Regulations on biosafety management of pathogenic microorganism laboratories [A]. 2004-11-12.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.病原微生物实验室生物安全通用准则:WS 233—2017[S].北京:中国标准出版社,2018.
State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. General guidelines for biosafety of pathogenic microorganism laboratory: WS 233—2017[S]. Beijing: China Standards Press, 2018.
- [10] 秦锋,黄强,袁久洪.浅析高校实验室生物安全事件的原因与管理对策[J].实验室研究与探索,2017,36(8):302-306. DOI:10.3969/j.issn.1006-7167.2017.08.074.
QIN F, HUANG Q, YUAN J H. Cause analysis and management strategies of the biosafety in university laboratories[J]. Res Explor Lab, 2017, 36(8):302-306. DOI:10.3969/j.issn.1006-7167.2017.08.074.
- [11] 李冰洋,黄开胜,艾德生.世界一流大学实验室安全管理理念及清华大学实践[J].实验室研究与探索,2022,41(1):299-305. DOI:10.19927/j.cnki.syyt.2022.01.061.
LI B Y, HUANG K S, AI D S. The concept of laboratory safety management in world-class universities and its practice in tsinghua university[J]. Res Explor Lab, 2022, 41(1):299-305. DOI:10.19927/j.cnki.syyt.2022.01.061.
- [12] 王朝霞,蒋兴浩.高校实验动物的传染源防控措施研究与实践[J].实验技术与管理,2020,37(3):9-12. DOI:10.16791/j.cnki.sjg.2020.03.002.
WANG Z X, JIANG X H. Research and practice on prevention and control measures of infectious sources of university laboratory animals[J]. Exp Technol Manag, 2020, 37(3):9-12.

DOI:10.16791/j.cnki.sjg.2020.03.002.

[13] 谢忠忱, 江轶, 黄开胜, 等. 高校实验动物生物安全管理模式研究[J]. 实验技术与管理, 2020, 37(2):1-5. DOI:10.16791/j.cnki.sjg.2020.02.001.

XIE Z C, JIANG Y, HUANG K S, et al. Research on laboratory animal biosafety management model in colleges and universities[J]. Exp Technol Manag, 2020, 37(2): 1-5. DOI: 10.16791/j.cnki.sjg.2020.02.001.

[14] 魏强. 动物生物安全实验室管理和技术要点[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3):94-97. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2020.03.016.

WEI Q. Issues of animal experiments in biosafety laboratories [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 94-97. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2020.03.016.

[15] 杨华, 赵勇, 宋志刚, 等. 浅谈 ABSL-2 实验室运行管理要点[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(2): 149-153. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.011.

YANG H, ZHAO Y, SONG Z G, et al. A brief introduction about key points of management in ABSL-2 laboratory[J]. Lab Animal Comp Med, 2020, 40(2): 149-153. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.011.

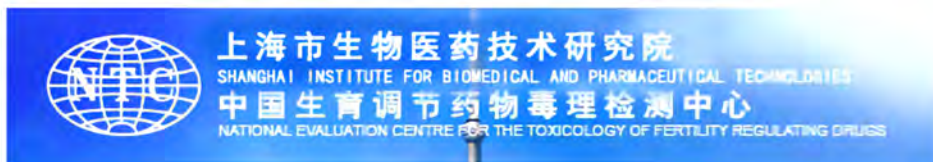
(收稿日期: 2021-10-19 修回日期: 2022-06-10)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 洪怡)

《实验动物与比较医学》常用英文缩略词表

英文缩略词	英文全称	中文全称(备注)
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
FDA	Food and Drug Administration	食品药品监督管理局(美国)
SPF	specific pathogen-free	无特定病原体
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
CT	computerized tomography	计算机体层摄影
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
CCK-8	cell counting kit-8	细胞计数试剂盒-8
MTT	thiazolyl blue	噻唑蓝(细胞增殖活性检测试剂)
BCA	bicinchoninic acid	二辛可宁酸(蛋白浓度测定试剂)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
SP	streptavidin-peroxidase	链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶
HE	hematoxylin and eosin	苏木精-伊红
DAB	3,3'-diaminobenzidine	二氨基联苯胺
ddH ₂ O	distillation-distillation H ₂ O	双蒸水
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	杜氏磷酸盐缓冲液
PBST	phosphate-buffered saline with Tween-20	含 Tween-20 的磷酸盐缓冲液
TBST	Tris-buffered saline with Tween-20	含 Tween-20 的 Tris 盐酸缓冲液
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
PE	phycoerythrin	藻红蛋白
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
RIPA	radio immunoprecipitation assay	放射免疫沉淀法
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
PI	propidium iodide	碘化丙啶
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B 淋巴细胞瘤-2 基因
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(内参)
Ras	rat sarcoma gene	大鼠肉瘤基因
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
cDNA	complementary DNA	互补(反向转录)DNA
siRNA	small interfering RNA	小干扰 RNA
miRNA	microRNA	微 RNA

《实验动物与比较医学》编辑部

中国生育调节药物毒理检测中心实验动物研发平台



1 中心简介

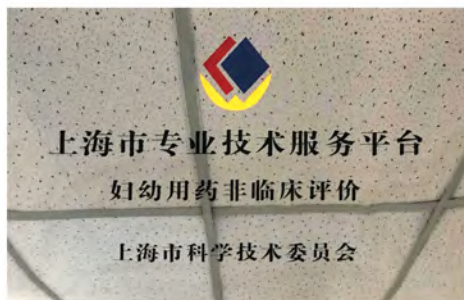
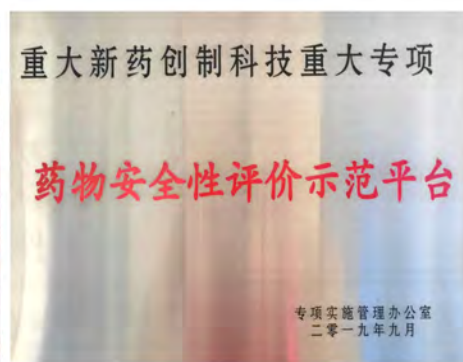
中国生育调节药物毒理检测中心（简称“毒理中心”）是一家从事新药临床前有效性和安全性评价的专业服务机构，其依托单位是上海市生物医药技术研究院。后者于2021年3月，由原上海市计划生育科学研究所更名重组，上海人类基因组研究中心（国家人类基因组南方研究中心）和上海生物信息技术研究中心整体并入，组建而成的公益一类科研事业单位，主要从事人口健康与生物医药领域关键共性技术、颠覆性技术和重大产品的研发、应用转化和服务。

为了满足我国生育调节药物新产品研发的需要，在世界卫生组织（WHO）、原国家计划生育委员会和国家卫生部的支持和指导下，毒理中心于1988年正式挂牌成立。毒理中心以生殖健康药物的药理毒理学研究为主导，以检测各类新药生殖毒性和遗传毒性为特色，对各类药物进行药理学研究和安全性评价，现为中国毒理学会生殖毒理专业委员会的依托机构。

2 设施设备

毒理中心拥有一支经验丰富的动物实验操作专业人员队伍，拥有一套符合《中华人民共和国药品管理法》和《中华人民共和国药品管理法实施条例》规定的实验动物设施（即具有小动物屏障系统及普通级大动物饲养设施）和设备仪器，2008年通过了国家食品药品监督管理总局的有关新药临床前安全性评价GLP认证，并获得GLP认证批件，2014年通过国际AAALAC认证。近3年来，毒理中心在原有的动物设施和实验设施基础上，扩建至总面积近5 000 m²，包括生殖药理学实验室、生殖毒理实验室、病理诊断室、毒代实验室、啮齿类动物解剖室和临床检验室在内的多功能实验室。

毒理中心现有约120台总价值2 000余万元的各类专用仪器设备，包括美国Hamilton Thorne TOX IVOS精子分析仪、安捷伦高效液相



色谱仪、美国 AB 公司的 API 5500 LC-MS-MS、Instem 公司的 Provantis 数据采集系统、EMKA 遥测系统及植入子、美国 ABI 荧光定量 PCR 仪、日立 7020 生化分析仪、Sysmex XT2000i 血球计数仪、美国贝克曼 FC500 流式细胞仪、ZENyTh200ST 酶联免疫仪、Leica ASP300 脱水机、ST5010 Leica 全自动染色机、EG1160 包埋机、RM2126 切片机、AUTOSTAINER XL 自动染色机、CN400 玻片扫描和数字化系统、IEC 低温高速离心机、超低温冰箱、贝克曼离心机、美国欧视博 VET2 眼底成像系统和日本 Sysmex CA500 血液凝固测定仪等。

3 近年成果

毒理中心目前拥有一支 40 余人的专业技术服务团队，其中博士/硕士超过 40%，拥有 3 名 CFDA 新药审评专家，核心骨干成员均具有良好的学术背景和专业经历，形成了高效率的科研团队。近年来，毒理中心孙祖越、吴建辉和郭隽科研团队主持了 20 余项国家级和省部级科研项目，承担了 267 项与医药企业合作或企业委托的项目，实施完成了 925 项试验，包括 139 项理论和应用基础类试验、114 项药理学试验，以及 672 项毒理学试验，总经费逾亿元。完成的药物相关非临床研究项目共 210 项，涉及 9 个新药产品的非临床安全性评价项目，包括啮齿类和非啮齿类单次给药毒性试验、啮齿类和非啮齿类重复给药毒性试验、生殖毒性 I / II / III 段试验、遗传试验、免疫和局部刺激等试验，建立了大鼠、小鼠、新西兰白兔、Beagle 犬和食蟹猴等多种实验动物模型。发表国内外论文共 437 篇，申请专利 36 项，授权专利共 23 项。主编学术专著 7 部，参编学术专著 5 部。



毒理中心在 20 余年的工作基础上，将 GLP 管理体系的理念成功运用到非临床评价体系和机制研究中，获得国家“十二五”科技重大专项计划“符合国际新药研究规范的临床前安全评价技术平台”，国家“十三五”科技重大专项重大新药创制“药物安全性评价示范平台”、“上海市男性生殖与泌尿疾病药物非临床评价专业技术服务平台”、“上海市妇幼用药非临床评价专业技术服务平台”、“上海市抗前列腺疾病药物临床前评价专业技术服务平台”等国家级、省部级称号和资质。先后荣获上海市科学进步二等奖和三等奖、中国实验动物学会科学技术二等奖、中国药学会科学技术三等奖、中国医疗保健国际促进会华夏医学科技二等奖等多项荣誉。

未来，毒理中心将在依托单位上海市生物医药技术研究院的支持下，抓住机遇、团结奋进、迎接挑战，不断加强实验动物研发平台的建设，加快实验动物资源和技术的创新发展，力争成为国际领先、国内一流的实验动物和药理毒理学评价领军者。

撰文：郭隽，谢淑武

供图：潘琦，徐斯翀

审核：王健

复旦大学丁玉强实验室及实验动物科学部

丁玉强教授是复旦大学实验动物科学部主任、博士生导师、国家杰出青年科学基金获得者，获教育部全国百篇优秀博士论文，入选国家新世纪“百千万人才工程”和上海市科技“领军人物”称号，担任中国神经科学学会神经毒素分会主任委员，上海市实验动物学会副理事长。近年来，主持国家自然科学基金重点项目、重大专项，科技部新药创制“重大科技专项”、干细胞专项、国家重点基础研究发展计划（973）、国家科技创新2030重大项目“脑计划”等多项课题。



丁玉强实验室 (<https://dinglab.fudan.edu.cn/>) 主要利用小鼠模型研究神经系统发育的细胞分子机制，以及神经精神疾病（如抑郁和精神分裂症）的致病机制。该团队现有科研人员4人，研究生7人（博士5人，硕士2人）。近5年来，在 *Mol Psychiatry*、*Cell Death Differ*、*Schizophr Bull*、*Cell Rep*、*Cell Death Dis*、*Development*、*Cereb Cortex*、*Transl Psychiatry* 等学术期刊发表论文32篇，丁玉强教授入选2014—2020年爱思维尔出版集团发布的中国神经科学高引用学者榜单。

丁玉强实验室依托于复旦大学实验动物科学部 (<http://labanimal.fudan.edu.cn/>)。复旦大学实验动物科学部的前身是1953年成立的上海第一医学院动物供应室，复旦大学和上海医科大学两校合并后，改名为实验动物科学部，为学校直属二级单位。实验动物科学部是集实验动物学教学科研、实验动物饲养和动物实验技术服务三位一体的综合性公共服务单位。下设教学科研、实验动物饲养、动物实验技术服务平台、用户服务等部门。现有教职



工22人，各部门聘用职工近40人。实验动物科学部现有正高级职称2人、副高级职称4人，有博士研究生指导教师5人，在读硕士研究生16人。

实验动物科学部拥有符合国家标准的实验动物设施，开展SPF级实验动物饲养及技术服务。2018年完成在美国NIH的注册更新，有利于学校进行国际合作研究。学校自2018年起对枫林校区实验动物设施进行现代化改造，规划饲养容量可达到3.5万笼位。

同期还配套建设有高水平的动物实验服务平台,包括动物净化保种、实验动物质量控制、生化血液检测、基因操作、小动物行为检测和小动物影像平台。

——动物净化保种平台:进行大鼠和小鼠的生物净化工作以及小鼠品系资源的保存工作,包括胚胎冷冻/复苏以及精子冷冻/复苏。

——实验动物质量控制平台:对预入驻及已饲养于屏障设施内实验动物的微生物学质量,予以严格监测和定期确认,保障屏障设施中的实验动物微生物控制符合国家标准。在满足实验动物相关法规要求的同时,确保实验动物从业人员及相关人员的健康得到生物安全保护。

——生化血液检测平台:包括全自动生化分析仪和全自动血液分析仪,可根据用户提供的血清或血液样本,检测26项生化指标或26项血液分析指标。

——基因操作平台:设于SPF级实验动物屏障设施内,接收研究人员提供的转基因质粒DNA或RNA等外源物质,通过操作小鼠胚胎,包括卵子、受精卵或囊胚等阶段,利用经典原核显微注射或囊胚显微注射技术,帮助研究人员建立基因修饰小鼠模型,以协助研究人员更好地进行疾病发生机制、确定治疗方案等多方位的动物在体科学研究。



(基因操作平台工作)

——小动物行为检测平台:包括全自动强迫游泳系统、跑步机、小动物行为跟踪系统、全自动旷场系统、全自动立体定位微注射系统、激光散斑血流成像系统、位置偏爱系统、恐惧记忆系统、震惊反射系统、Sable八通道代谢笼、小动物超声发放检测、全自动T迷宫、小鼠转棒式疲劳仪、听觉生理工作站、电子触觉测量仪、冷热板仪等先进行为学测试仪器设备,可全方位检测小动物的行为学表型。

——小动物影像平台:该平台是活体动物水平的新型研究平台,是开展转化医学研究的重要基础。包含三维光学小动物成像系统、Micro-CT、小动物超声、辐照仪等设备。

近年来,复旦大学实验动物科学部不断拓展动物实验服务的种类,提升服务能力。上述平台由具有博士学位的技术专家负责运行,为教学和科研提供重要的服务支撑。在满足校内需要的同时,也提供对外服务。

图文:宋宁宁,黄纓,潘华
审核:丁玉强

树鼩种质资源中心/代解杰实验室

树鼩种质资源中心隶属于中国医学科学院医学生物学研究所，建有全国先进的标准化和规模化树鼩种群基地，拥有代解杰实验室树鼩研究专业团队，是实验树鼩标准化研究和人类重大疾病动物模型创建与应用的重要示范基地。

1 中心简介

树鼩种质资源中心成立于2013年1月，拥有包括树鼩中心大楼、综合实验楼在内的完善的生产、科研和办公条件体系。目前存栏树鼩1500多只，每年繁育新生树鼩500余只，历年来陆续对外供应树鼩6000余只。其中树鼩中心大楼拥有普通级动物房2400 m²，屏障环境1600 m²，树鼩专用饲养笼架300多套，共有笼位3600多个，IVC独立送风隔离笼具30多套，普通级容量8000只，屏障级容量1600只。综合实验楼办公区域150 m²，实验区域300余平方米，包括二级生物安全实验室2间。中心建有完善的动物实验、分子生物学实验和细胞生物学实验等专业平台，拥有全自动动物血液分析仪、自动微生物鉴定及药敏系统、实时荧光定量PCR仪、流式细胞仪、超速冷冻离心机、荧光倒置显微镜、细胞培养实时拍照系统等专业设备百余台。

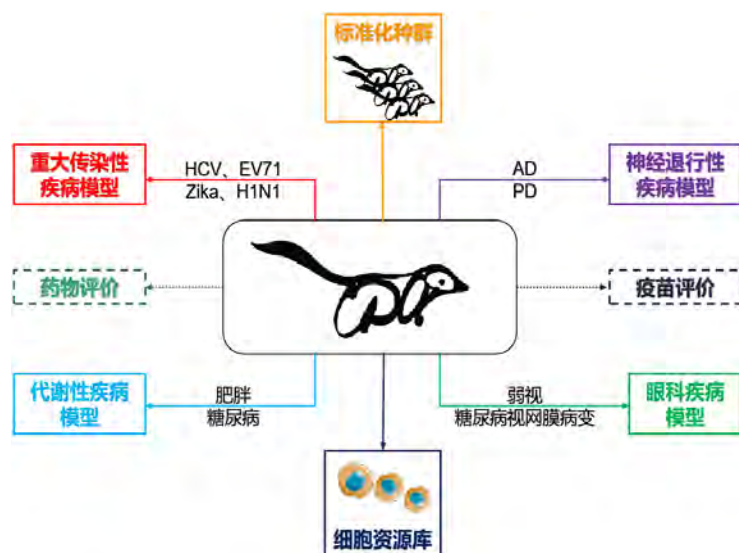


团队负责人为代解杰研究员，系博士生导师、全国优秀科技工作者、云南省中青年学术技术带头人、云南省有突出贡献的优秀专业技术人员、中国实验动物学会常务理事、中国实验动物学会标准化专业委员会常务委员、云南省委联系专家、云南省实验动物产业技术创新战略联盟常务副理事长，以及《实验动物与比较医学》《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》副主编，是国内实验动物学研究领域的知名专家。

团队其他成员13人，其中主任技师1名，副主任技师4名，助理研究员2名，专职饲养人员6名。现有病原学博士生导师1名，动物学和病原学硕士生导师3名，在读硕士、博士研究生7名。

2 主要研究方向和技术领域

树鼩研究专业团队目前主要研究工作：(1) 实验树鼩的标准化和细胞资源开发；(2) 病毒感染性树鼩模型创制与机制研究，如丙型肝炎病毒(HCV)、EV71、Zika、H1N1等；(3) 眼科疾病树鼩模型创制与机制研究，如弱视、糖尿病视网膜病变等；(4) 神经退行性疾病树鼩模型创制与机制研究，如阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)等；(5) 代谢性疾病树鼩模型创制与机制研究，如肥胖、糖尿病等；(6) 药物、疫苗评价等应用研究。



3 主要科研成果

近10年来, 树鼯研究专业团队在以下几方面取得了众多成果: (1) 建成实验树鼯标准化研究和人类重大疾病动物模型创建与应用示范基地, 建立树鼯主要细胞资源库, 创建10多种重大疾病树鼯模型, 研发8种树鼯特异性诊断试剂盒, 制定实验树鼯质量控制和模型创建技术规范40余项; (2) 承担国家科技支撑计划、国家自然科学基金、国家重点研发计划以及省市级科研项目20多项, 获得科研经费资助4 000多万元; (3) 发表研究论文150多篇, 其中SCI论文40余篇; (4) 制订实验树鼯云南省地方标准5项、中国实验动物学会团体标准6项; (5) 申请国家发

明专利18项, 取得发明专利授权14项, 取得软件著作权1项, 编写著作7部; (6) 获得云南省科技进步一等奖1项、云南省科学技术进步奖二等奖3项、中国实验动物学会科学技术奖一等奖3项。

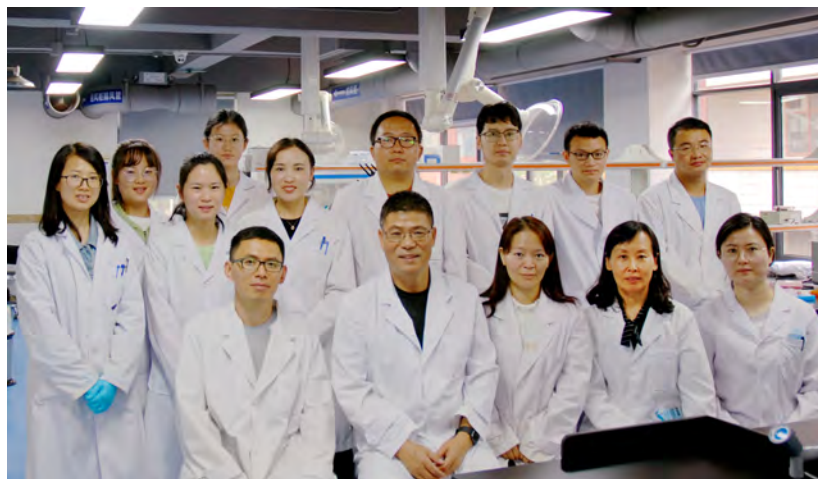
4 团队建设情况

先后入选云南省“中国医学科学院医学生物学研究所实验树鼯标准化与应用研究省创新团队”和昆明市“树鼯细胞资源库建立及病毒性疾病动物模型研究创新团队”; 参与“云南省眼科疾病防治研究重点实验室”、“云南省重大传染病重点实验室”建设; 获评“全国优秀科技工作者”1人, 入选云南省省委联系专家1人, 入选云南省中青年学术技术带头人2人、云南省技术创新人才1名, 入选云南省高层次卫生计生技术人才1名, 入选昆明市中青年学术技术带头人后备1人; 培养博士生和硕士生40余人。

5 对外服务与合作情况

树鼯种质资源中心长期提供优质的树鼯及其细胞资源、规范的树鼯饲养和实验场地、专业的动物实验操作技术服务, 先后为所内外各单位提供实验树鼯6 000余只, 累计提供技术服务万余次, 大力支持基础研究和疫苗研发, 成为云南特色动物资源开发与应用的典型示范。

其中为所内相关科室提供树鼯2 000余只, 支持了新冠肺炎、登革热、HCV等相关疾病模型的创建和疫苗评价研究; 对外支持了北京大学、北京生命科学研究院、湖南中医药大学、重庆医科大学、中国食品药品检定研究院等多家单位的科研工作; 为国家科技支撑计划项目、863课题、973课题和省级重大科研项目的实施提供了有力的科技支撑; 与中国人民解放军军事科学院军事医学研究院、云南省第二人民医院、昆明医科大学等多家科研院校联合申请多项课题; 同时利用现有树鼯技术平台, 接受了四川科伦博泰有限公司、台湾生控基因、广西中医药大学等多家单位的技术服务委托项目, 在国内外同行中产生了广泛的影响, 取得了显著的社会效益和经济效益。



(李娜、王文广撰文; 陆彩霞供图; 罕园园校对; 代解杰审核)