

# 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43卷 第3期 (总第199期)

2023年6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: 国内公开发行

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。2023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

### 实验动物与比较药理

顺铂对小鼠下丘脑-垂体-肾上腺/性腺轴功能的损伤作用及

脱氢表雄酮的干预效应

潘志强, 农溜心, 谢海纳, 彭佩克 ..... 229

人参皂苷Rg1在小鼠创伤性脑损伤修复中的作用

郭文文, 赵 亚, 王颖花, 刘 可, 葛 煦, 张延英, 汪永锋,

师长宏 ..... 243

广藿香对贵州小型猪血清代谢组的影响及其机制探讨

陆涛峰, 张 慧, 周 洁, 李 倩, 吴曙光, 吴延军 ..... 253

奥氮平诱导体重增加小鼠的全脑转录组学分析

张 渊, 李 晗, 张成芳 ..... 262

### 模式动物与动物模型

h1l-1基因通过饮食限制通路调节秀丽隐杆线虫寿命

成 慧, 方 菲, 石嘉豪, 杨 桦, 张梦杰, 杨 平, 费 俭 ..... 271

Micall2a基因表达下调抑制斑马鱼血管发育

杨晋娴, 王淑娟, 翟金云, 朱顺星 ..... 282

神经母细胞瘤动物模型研究进展与应用

谭志刚, 刘锦信, 郑楚雅, 廖文峰, 冯露平, 彭红丽, 严 秀,

卓振建 ..... 288

### 动物实验技术与方法

一种显著提高实验用斑马鱼繁殖效率和使用寿命的优化养殖方案

金仕容, 华 叶, 訾化星, 杜旭飞, 卜纪雯 ..... 297

兔眼角膜着染对眼刺激性试验结果评价的影响

徐红花, 金 天, 王 海, 沈梦莹, 王 瑞, 周艺佳, 谭 莹 ..... 307

大鼠血清尿酸液相色谱-紫外检测新方法的建立及比较研究

夏子茵, 柴媛媛, 徐云霞, 俞沁玮, 黄 鑫, 张陆勇, 江振洲 ..... 314

# 比较医学研究与报告规范

《动物研究：体内实验报告》即 ARRIVE 2.0 指南的解释和阐述（二）

|                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------|-----|
| 陈国元，卢 晓，白 玉，于灵芝，乔 颖，王 剑，卢 今，刘晓宇，卢选成，高 静，李 垚，<br>庞万勇 ..... | 323 |
|-----------------------------------------------------------|-----|

# 实验动物与比较医学科创团队推介

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| 南方医科大学实验动物管理中心 .....                 | 332 |
| 复旦大学附属肿瘤医院实验动物中心 .....               | 334 |
| 上海市生物医药技术研究院药物与医疗器械研究所药理毒理学研究室 ..... | 336 |

# 读者-作者-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》有关实验动物福利伦理内容的说明 .....  | 252                        |
| 2023 年版 ICMJE 推荐规范的更新内容 .....     | 281                        |
| 《实验动物与比较医学》出版伦理声明 .....           | 306                        |
| 《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 ..... | 322                        |
| 《实验动物与比较医学》2023 年刊务理事会名单 .....    | 338                        |
| 严济慈同志题词 .....                     | 英文目次页后插页                   |
| 广告 .....                          | 封二, 前插 1~7, 后插 1~6, 封三, 封底 |

期刊基本参数: CN 31-1954/Q\*1981\*b\* 大 16\*110\*zh\*P\*¥ 30.00\*2000\*14\* 2023-06  
(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 | 陈民利     |     |     |     |     |     |     |     |
| 本期审稿专家 | 陈民利     | 代解杰 | 邸亚男 | 丁文华 | 丁玉强 | 富群华 | 高彩霞 | 高海军 |
|        | 黄 冰     | 李 华 | 李 垚 | 林金杏 | 刘恩岐 | 刘 静 | 庞晓斌 | 钱晓庆 |
|        | 沈如凌     | 宋宁宁 | 王 健 | 王朝霞 | 魏 盛 | 吴宝金 | 谢建芸 | 徐 平 |
|        | 姚 明     | 应华忠 | 张 博 | 张 泉 | 张 钰 | 张 周 | 朱彦兵 |     |
| 本期责任编辑 | 张俊彦 丁宇菁 |     |     |     |     |     |     |     |
| 本期责任排版 | 王伟民     |     |     |     |     |     |     |     |
| 本期特邀编校 | 富群华     | 陶启辰 | 刘晓宇 | 朱德才 | 孙 琛 |     |     |     |
| 本期实习编校 | 崔占鼎     | 郭家欣 | 姜怡欣 | 陆佳雯 | 苏 琪 | 王 艳 | 吴昊晟 | 赵宇朋 |
|        | 周 培     | 周 烁 | 周晓铎 |     |     |     |     |     |

# LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981

Volume 43, Issue 3

June 25, 2023

## 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© 2023 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, CHEN Minli

## CONTENTS IN BRIEF

### Experimental Animals and Comparative Pharmacology

- Injurious Effect of Cisplatin on the Function of Hypothalamus-pituitary-adrenal/  
gonadal Axis in Mice and the Intervention Effect of Dehydroepiandrosterone  
*PAN Zhiqiang, NONG Zixin, XIE Haina, PENG Peike* ..... 229
- Repairing Effects of Ginsenoside Rg1 on Traumatic Brain Injury in Mice  
*GUO Wenwen, ZHAO Ya, WANG Yinghua, LIU Ke, GE Xu, ZHANG Yanying,  
WANG Yongfeng, SHI Changhong*..... 243
- Effects of *Pogostemon cablin* on Serum Metabolomics of Guizhou Miniature Pigs  
and Its mechanism  
*LU Taofeng, ZHANG Hui, ZHOU Jie, LI Qian, WU Shuguang, WU Yanjun* ..... 253
- Whole-brain Transcriptomic Analysis of Weight Gain Mice induced by Olanzapine  
*ZHANG Yuan, LI Han, ZHANG Chengfang* ..... 262

### Model Animals and Animal Models

- H1 Linker Histone Gene Regulates Lifespan via Dietary Restriction Pathways  
in *Caenorhabditis elegans*  
*CHENG Hui, FANG Fei, SHI Jiahao, YANG Hua, ZHANG Mengjie, YANG Ping,  
FEI Jian* ..... 271
- Downregulation of *Micall2a* Gene Expression Inhibited Vascular Development  
in Zebrafish  
*YANG Jinxian, WANG Shujuan, ZHAI Jinyun, ZHU Shunxing* ..... 282
- Advances and Applications in Animal Models of Neuroblastoma  
*TAN Zhigang, LIU Jinxin, ZHENG Chuya, LIAO Wenfeng, FENG Luping,  
PENG Hongli, YAN Xiu, ZHUO Zhenjian*..... 288

### Animal Experimental Techniques and Methods

- An Optimized Experimental Zebrafish Breeding Scheme for Significantly Enhancing  
Reproductive Efficiency and Service Life  
*JIN Shirong, HUA Ye, ZI Huaxing, DU Xufei, BU Jiwen* ..... 297
- Influence of Corneal Staining in Rabbits on the Evaluation of Eye Irritation Test Results  
*XU Honghua, JIN Tian, WANG Hai, SHEN Mengying, WANG Rui, ZHOU Yijia,  
TAN Ying* ..... 307
- Quantification of Uric Acid of Rat Serum by Liquid Chromatography-ultraviolet  
Detection and Its Comparison Study  
*XIA Ziyin, CHAI Yuanyuan, XU Yunxia, YU Qinwei, HUANG Xin, ZHANG Luyong,  
JIANG Zhenzhou*..... 314

### Guidelines for Comparative Medical Research and Reporting

- Explanation and Elaboration of the ARRIVE Guidelines 2.0—Reporting Animal  
Research and *In Vivo* Experiments ( II )  
*CHEN Guoyuan, LU Xiao, BAI Yu, YU Lingzhi, QIAO Ying, WANG Jian, LU Jin,  
LIU Xiaoyu, LU Xuancheng, GAO Jing, LI Yao, PANG Wanyong* ..... 323

發展我國實驗動物科技事業，  
為社會主義現代化建設做貢獻！

題贈

實驗動物科技工作會議

嚴濟慈



一九八五年十月

（注：这是全国人大常委会原副委员长、中国科学院主席团原执行主席  
严济慈同志为第二次全国实验动物科技工作会议的题词，  
首次发表于本刊1986年第5期）





潘志强, 医学博士, 教授, 博士生导师, 上海中医药大学实验中医教研室主任, 第四批全国中医(临床、基础)优秀人才, 美国佐治亚医学院访问学者。先后当选为中华中医药学会中医基础理论分会第二届委员、第三届委员、第四届常务委员, 上海市中医药学会中医基础学分会副主任委员兼秘书。长期供职于上海中医药大学, 主要从事实验中医医学教学与科研, 以及中医内科杂病的诊疗工作。先后承担国家自然科学基金青年项目和面上项目、上海市科委实验动物专项、上海市卫健委三年行动计划以及上海市教委资助项目等研究。作为第一作者及通信作者在国内核心期刊发表学术论文90余篇; 协同导师方肇勤教授创建了“大鼠/小鼠辨证论治实验方法学”, 作为主要完成人的相关科研成果分别荣获国家科学技术奖、上海医学科技奖、中华中医药学会科技奖、中国实验动物学会科技奖等荣誉; 领衔的“实验中医医学教学团队”被评为2020年度上海中医药大学优秀教学团队; 参与国家发明专利2项, 参与编写中医药高等教育规划教材2部(副主编), 参编专著4部。培养研究生10名。

## 顺铂对小鼠下丘脑-垂体-肾上腺/性腺轴功能的损伤作用及脱氢表雄酮的干预效应

潘志强, 农淄心, 谢海纳, 彭佩克

(上海中医药大学中医学院, 上海 201203)



**[摘要]** **目的** 研究顺铂(又名顺式-二氯二氨合铂, cis-dichlorodiamineplatinum, DDP)抑制小鼠类固醇激素合成的作用途径, 并观察脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)的干预效应。**方法** 将60只成年ICR小鼠随机分为3组: 对照组、DDP建模组、DHEA治疗组, 每组10只雄性和10只雌性小鼠。DDP建模组小鼠按 $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量腹腔注射DDP溶液, 每3 d注射1次, 共7次; 建模同日, 对照组小鼠腹腔注射等量的生理盐水; 而DHEA治疗组小鼠在予以DDP处理的同时, 按 $8.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量给予DHEA灌胃, 连续给药21 d。通过旷场、抓力和转棒试验观察小鼠疲劳指标的变化, 采用常规组织切片的HE染色法观察肾上腺、睾丸与卵巢组织形态的变化, 运用高效液相色谱串联质谱方法检测小鼠血清类固醇激素的含量, 运用实时荧光定量PCR和蛋白质印记技术检测下丘脑、垂体、肾上腺、睾丸和卵巢组织中相关基因的mRNA和蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, DDP建模组雄性与雌性小鼠的体重以及旷场运动能力均显著下降( $P < 0.05$ ), 同时雌性小鼠的抓力和转棒时间也均显著下降( $P < 0.05$ ); 而DHEA治疗组小鼠的上述疲劳指标均显著改善( $P < 0.05$ )。DDP建模组雄性小鼠睾丸组织中各级生精细胞排列紊乱且睾丸间质水肿, 雌性小鼠卵巢组织中大量原始卵泡被激活, 闭锁卵泡增多, 卵泡颗粒细胞减少; 而DHEA治疗组小鼠睾丸和卵巢受损伤表型均得到显著改善。与对照组比较, DDP建模组雄性与雌性小鼠血清睾酮、二氢睾酮含量均显著降低( $P < 0.01$ ), 雄性小鼠血清孕烯醇酮含量下降而皮质酮含量显著升高( $P < 0.05$ ), 雌性小鼠血清皮质酮含量显著降低( $P < 0.05$ ); 与DDP建模组比较, DHEA治疗组雄性小鼠的孕烯醇酮含量和雌性小鼠的孕酮含量均显著增高( $P < 0.05$ ), 而雌性小鼠的孕烯醇酮含量和雄性小鼠的孕酮含量均显著降低( $P < 0.05$ )。与对照组比较, DDP建模组雄性与雌性小鼠的肾上腺Cyp21a1、Cyp11a1基因和下丘脑Gnrh基因表达均显著下调( $P < 0.05$ ); 雌性小鼠肾上腺Hsd3b2基因, 卵巢Star、Cyp11a1、Lhr基因, 下丘脑Crh、垂体Pomc和Lhb基因表达均显著下调( $P < 0.05$ ); 雄性小鼠睾丸Star基因及StAR蛋白以及垂体Fshb和Lhb基因表达均显著下调( $P < 0.05$ )。与DDP建模组比较, 补充DHEA后, 雄性小鼠肾上腺Cyp17a1基因和睾丸Cyp17a1、Lhr、Fshr基因表达均显著下调( $P < 0.05$ ); 雌性小鼠肾上腺Cyp11a1基因表达显著下调( $P < 0.05$ ), 而肾上腺Hsd3b2基因和卵巢Star、Cyp11a1、Hsd3b2、Lhr基因, 以及垂体Lhb基因表达均上调( $P < 0.05$ )。**结论** DDP间断给药可以抑制下丘脑-垂体-肾上腺皮质与性腺轴功能, 并且雌性受抑制更显著; 补充DHEA有助于调节体内类固醇激素水平的自身稳态。

**[关键词]** 顺铂; 脱氢表雄酮; 睾丸; 卵巢; 类固醇激素; 小鼠

**[基金项目]** 上海市科学技术委员会科研计划项目“糖皮质激素诱发药源性脾肾虚证小鼠模型的创建及其指标评价体系研究”(19140905000)

**[第一作者]** 潘志强(1977—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中医证候动物模型及其物质基础研究。E-mail: pzq527@163.com。ORCID: 0000-0003-4143-2312

[中图分类号] R-332; Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2023)03-0229-14

## Injurious Effect of Cisplatin on the Function of Hypothalamus-pituitary-adrenal/gonadal Axis in Mice and the Intervention Effect of Dehydroepiandrosterone

PAN Zhiqiang, NONG Zixin, XIE Haina, PENG Peike

(School of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Correspondence to: PAN Zhiqiang (ORCID: 0000-0003-4143-2312), E-mail: pzq527@163.com

**[ABSTRACT]** **Objective** To study the pathway of cis-dichlorodiamineplatinum (DDP) inhibiting the synthesis of steroid hormones in mice, and to observe the intervention effect of dehydroepiandrosterone (DHEA). **Methods** Sixty adult ICR mice were randomly divided into three groups: control group, DDP modeling group, and DHEA group, with 10 male and 10 female mice in each group. The DDP modeling group mice were intraperitoneally injected with DDP solution at a dose of  $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , once every 3 days, a total of 7 times. On the same day of modeling, the control group mice were injected with an equal amount of physiological saline intraperitoneally. The DHEA treatment group mice were treated with DDP and given a dose of  $8.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  of DHEA by gavage for 21 consecutive days. The changes of fatigue indexes of mice were observed by open field, grip and rod rotation tests. The morphology changes of adrenal gland, testicular and ovarian tissue were observed by pathological section and HE staining. The levels of serum steroid hormones were detected by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The mRNA and protein expression levels of the related genes of the hypothalamus, hypophysis, adrenal, testis and ovary were tested by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting. **Results** Compared with control group, both male and female mice in DDP modeling group were significantly losing weight ( $P < 0.05$ ), their abilities in horizontal movement and vertical movement decreased (all  $P < 0.05$ ), and the stay time and grip also significantly decreased (all  $P < 0.05$ ) in female mice. Indexes of fatigue were improved after DHEA supplement (all  $P < 0.05$ ). In the DDP modeling group, the arrangement of spermatogenic cells at all levels in the testicular tissue was disordered and the testicular interstitial edema was observed, and a large number of primordial follicles in the ovarian tissue were activated, the number of atresia follicles increased, and the number of granulosa cells in the follicles decreased; while in the DHEA group, the damaged phenotype of testicles and ovaries was significantly improved. Compared with control group, the levels of serum testosterone and dihydrotestosterone in both male and female DDP modeling mice significantly decreased ( $P < 0.01$ ), the pregnenolone was down-regulated but corticosterone was up-regulated significantly ( $P < 0.05$ ) in male mice, the corticosterone was down-regulated significantly ( $P < 0.05$ ) in female mice. Compared with the DDP group, after DHEA supplement, the pregnenolone in male mice and the progesterone in female mice increased significantly ( $P < 0.05$ ), but the pregnenolone in female mice and the progesterone in male mice decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the expression levels of *Cyp21a1* and *Cyp11a1* genes in the adrenal gland and *Gnrh* gene in the hypothalamus of male and female mice in the DDP modeling group significantly decreased (all  $P < 0.05$ ); the expression levels of *Hsd3b2* gene in the adrenal gland, *Star*, *Cyp11a1*, and *Lhr* genes in the ovaries, *Crh*, *Pomc*, and *Lhb* genes in the hypothalamus, pituitary, and pituitary of female mice significantly decreased (all  $P < 0.05$ ); the expression levels of *Star* gene and StAR protein in the testicles of male mice, as well as *Fshb* and *Lhb* genes in the pituitary gland, were significantly down-regulated (all  $P < 0.05$ ). After DHEA supplement, compared with the DDP modeling group, the mRNA expression levels of *Cyp17a1* in the adrenal gland of male mice and *Cyp17a1*, *Lhr* and *Fshr* genes in testis were down-regulated

significantly ( $P < 0.05$ ); the expression level of *Cyp11a1* gene in the adrenal gland of female mice was also decreased ( $P < 0.05$ ); while the expression levels of *Hsd3b2* gene in the adrenal gland, *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b2* and *Lhr* gene in the ovary, and *Lhb* gene in the pituitary gland were all up-regulated ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** The function of hypothalamus-pituitary-adrenal/gonadal axis was inhibited by DDP intermittent injection, especially in female. Supplementation of DHEA can help regulate the homeostasis of steroid hormone levels.

**[Key words]** Cisplatin; Dehydroepiandrosterone; Testis; Ovary; Steroid hormone; Mice

顺铂（又名顺式-二氯二氨合铂，cis-dichlorodiamineplatinum，DDP）是临床常用的抗肿瘤药物，尤其对卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肺癌、头颈部实体肿瘤的疗效确切。DDP属于阻断细胞周期的非特异性药物，对癌细胞和正常细胞均可造成损伤，化疗时易引起诸多不良反应，例如对肾脏、神经系统、胃肠道、骨髓造血的毒性较大<sup>[1]</sup>。此外，DDP也可诱发生殖系统损伤，基础研究人员常通过DDP给药制备卵巢早衰动物模型<sup>[2]</sup>。然而，目前人们对DDP诱发生殖系统损伤的作用途径尚不清楚。本课题组前期发现DDP会抑制小鼠肾上腺皮质轴与性腺轴功能，诱发小鼠药源性脾肾虚证<sup>[3-4]</sup>。中医学界认为虚证与神经内分泌免疫网络关系密切<sup>[5-6]</sup>。基于此，本研究拟探讨DDP对小鼠下丘脑-垂体-肾上腺/性腺轴功能的影响，比较雄性与雌性小鼠对DDP的敏感性，并观察补充性激素合成前体物质脱氢表雄酮（dehydroepiandrosterone，DHEA）对DDP所致生殖系统损伤的干预效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF级ICR小鼠60只，雌雄各半，4~5周龄，体重22~24 g，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK（沪）2017-0005]。动物饲养于上海中医药大学实验动物中心SPF级啮齿类屏障设施[SYXK（沪）2020-0009]中，室温22~25℃，相对湿度40%~70%，12 h明暗交替，常规饲养饮食。本实验方案已通过上海中医药大学实验动物伦理委员会审议批准（批号：PZSHUTCM200904017）。

### 1.2 药物、试剂和仪器

注射用DDP（冻干型）（齐鲁制药有限公司）；DHEA（国药集团化学试剂有限公司）；RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的山羊抗兔/小鼠

IgG（H+L）、封闭液、一抗稀释液（上海碧云天生物技术有限公司）；总RNA提取试剂RNAiso Plus、PrimeScript®反转录试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™（TliRNaseH Plus）II试剂盒[宝生物工程（大连）有限公司]；A5441-β-actin抗体（美国Sigma-Aldrich公司）；ab109497-TSPO抗体、ab96637-StAR抗体、ab175408-Cyp11A1抗体、ab232701-Cyp21A2抗体、ab2298821-Cyp11B1抗体（美国Abcam公司）。

CP225D型电子天平（德国Sartorius公司），7500 Fast型实时荧光定量PCR仪（美国ABI公司），Elx800型酶标仪（美国Biotek公司），Alpha化学发光型凝胶成像系统（美国Protein-Simple公司），YLS-4C型转棒式疲劳仪和YLS-13A小鼠抓力测试仪（山东省医学科学院设备站），UPLC-QQQ-MS型超高效液相色谱串联质谱联用仪（美国Waters公司）。

### 1.3 实验动物的给药处理和样本收集

小鼠适应性饲养1周后，随机分为3组：对照组、DDP建模组、DHEA治疗组，每组20只（雌雄各10只）。DDP建模组：将DDP用生理盐水（即0.9%NaCl溶液）稀释到0.3 mg/mL，按照每只小鼠2.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的剂量腹腔注射DDP，每3 d 1次，共7次。对照组：在DDP建模组小鼠腹腔注射DDP的同日，腹腔注射等量生理盐水。DHEA治疗组：在按DDP建模组相同方案进行DDP给药处理的同时，依据60 kg成人治疗剂量50 mg/d的10倍，换算成每只小鼠8.3 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的给药剂量，每天灌胃给药，连续给药21 d。给药处理结束后，采用摘眼球法收集小鼠外周血后，脱颈椎处死小鼠，收集下丘脑、垂体、肾上腺、睾丸和卵巢组织。

### 1.4 小鼠体重与疲乏指标检测

每日上午8:30记录各组小鼠体重，并在处死前1 d通过旷场试验、抓力测试和转棒疲劳试验，检测小鼠的疲乏指标。旷场试验：将小鼠分别置于铺设有4 cm×4 cm透明塑料板的旷场笼中，录像并统计小鼠1 min内水平和垂直运动的次数；其后肢移动的格子数

记为水平运动，前肢离地的次数记为垂直运动，以反映小鼠自主活动度。抓力测试：同一人使用小鼠抓力仪进行测试，每只小鼠记录3次，取平均值作为小鼠抓力的测定值。转棒疲劳试验：设定转速为30 r/min，每次实验前让每只小鼠在机器上进行3次适应训练；最大转棒时间设定为10 min，超过10 min也按10 min计，以分析小鼠疲劳度。

1.5 高效液相色谱串联质谱法检测小鼠血清中各种类固醇激素含量

委托深圳市绘云生物科技有限公司代谢组学研究团队，采用高效液相色谱串联质谱联用仪检测小鼠血清中皮质激素 [包括11-脱氧皮质酮 (11-deoxycorticosterone, DOC) 和皮质酮 (corticosterone, Cort)]、孕烯醇酮及其代谢产物 [包括孕酮 (progesterone, Prog)、17-羟孕烯醇酮 (17-OH Prog) 和17-羟孕酮 (17-OH Prog)]、雄激素 [包括雄烯二酮 (androstenedione, Andro)、睾酮 (testosterone, T) 和二氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT)] 等各种类固醇激素的含量。

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequences in real-time fluorescent quantitative PCR

| 基因名称<br>Gene name | 引物序列<br>Primer sequence                                       | 产物大小<br>Length/bp |
|-------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|
| <i>β-actin</i>    | F: 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'; R: 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3'   | 165               |
| <i>Star</i>       | F: 5'-TTGGGCATACTCAACAACCA-3'; R: 5'-GAAACACCTTGCCACATCT-3'   | 103               |
| <i>Cyp11a1</i>    | F: 5'-ACTTCCGGTACTTGGGCTTT-3'; R: 5'-GCTTGAGAGGCTGGAAGTTG-3'  | 201               |
| <i>Cyp11b1</i>    | F: 5'-GTATCGAGAGCTGGCAGAGG-3'; R: 5'-GGGTTGATGTCGTGTCAGTG-3'  | 140               |
| <i>Cyp21a1</i>    | F: 5'-CTCCGGCTATGACATCCCTA-3'; R: 5'-ACAGCCAAAGGATGGTGTTCT-3' | 151               |
| <i>Cyp17a1</i>    | F: 5'-TGGTCATATGCATGCCAACT-3'; R: 5'-CCCTTCTTCACGAGCACTTC-3'  | 132               |
| <i>Hsd3b2</i>     | F: 5'-TCCAGCTCAGTTGATGTTGC-3'; R: 5'-TGCCTTCTCAGCCATCTTTT-3'  | 129               |
| <i>Cyp19a1</i>    | F: 5'-CTTTCAGCCTTTTGGCTTTG-3'; R: 5'-ATTTCCACAAGGTGCCTGTC-3'  | 192               |
| <i>Hsd17b1</i>    | F: 5'-GTTATGAGCAAGCCCTGAGC-3'; R: 5'-AAGCGTTTCGTGGAGAAGTA-3'  | 112               |
| <i>Ar</i>         | F: 5'-AAGCAGGTAGCTCTGGGACA-3'; R: 5'-GAGCCAGCGGAAAGTTGTAG-3'  | 117               |
| <i>Fshr</i>       | F: 5'-ATCACACATGCCATGCAACT-3'; R: 5'-GTACGAGGAGGGCCATAACA-3'  | 199               |
| <i>Lhr</i>        | F: 5'-CAATGGGACGACGCTAATCT-3'; R: 5'-CTGGAGGGCAGAGTTTTTCAG-3' | 204               |
| <i>Esr1</i>       | F: 5'-TTACGAAGTGGGCATGATGA-3'; R: 5'-CCTGAAGCACCCATTTCATT-3'  | 117               |
| <i>Esr2</i>       | F: 5'-GAAGCTGGCTGACAAGGAAC-3'; R: 5'-AACGAGGTCTGGAGCAAAGA-3'  | 187               |
| <i>Gper1</i>      | F: 5'-GTCAACCTTGACGCTTCTC-3'; R: 5'-AGCACTGCTGAACCTGACCT-3'   | 198               |
| <i>Pomc</i>       | F: 5'-CATTAGGCTTGGAGCAGGTC-3'; R: 5'-CTTCTCGGAGGTCATGAAGC-3'  | 128               |
| <i>Fshb</i>       | F: 5'-TCAGCTTTCCCCAGAAGAGA-3'; R: 5'-CCGAGCTGGGTCCTTATACA-3'  | 249               |
| <i>Lhb</i>        | F: 5'-CTCAGCCAGTGTGCACCTAC-3'; R: 5'-GACCCCCACAGTCAGAGCTA-3'  | 150               |
| <i>GnRH</i>       | F: 5'-AGCACTGGTCCTATGGGTTG-3'; R: 5'-GGGCCAGTGCATCTACATCT-3'  | 221               |
| <i>Crh</i>        | F: 5'-TCTCACCTTCCACCTTCTGC-3'; R: 5'-AAGCGCAACATTTTCATTCC-3'  | 118               |

注：F为正向引物；R为反向引物。  
Note: F, Forward primer; R, Reverse primer.

1.6 小鼠肾上腺、睾丸与卵巢组织切片及HE染色

将摘取的小鼠肾上腺、睾丸与卵巢组织用10%甲醛溶液固定后，常规石蜡包埋与切片；将切片浸泡于苏木精溶液中染色，取出冲洗后，再放入伊红染液进行对比染色，再次冲洗；脱水、透明、封片和晾干后，置于光学显微镜下，观察各组织结构和细胞形态，并采集图像。

1.7 实时荧光定量PCR检测相关基因表达水平

将收集到的每只小鼠的肾上腺、睾丸、卵巢、下丘脑和垂体组织，加入RNAiso Plus试剂，抽提总RNA。采用Primer3 (v.0.4.0) 在线软件设计引物 (表1)，并委托美国Life Technologies公司合成。应用PrimeScript反转录试剂盒制备cDNA，反应体系为40 μL，反应条件为37 °C 15 min，85 °C 5 s，4 °C至终止。应用SYBR® Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒进行PCR扩增，PCR体系为20 μL，反应程序为95 °C变性3 min，95 °C退火30 s，60 °C延伸30 s，40个循环。每个待测样本设置3个复孔，采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算各目的基因的mRNA相对表达量。



## 1.8 蛋白质印迹法检测相关蛋白表达水平

将收集到的每只小鼠的部分肾上腺、睾丸、卵巢组织分别置于含有1 mL RIPA裂解液的EP管中,研磨后,4 °C 14 000 r/min离心15 min,取上清液。BCA法测定总蛋白浓度。各孔取20 μg蛋白上样,进行10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶80 V 30 min,分离胶120 V 90 min)。将分离后的蛋白电转移(恒流250 mA 150 min)至PVDF膜,加入封闭液封闭1.5 h。加入TBST溶液,置于摇床上振荡洗膜,清洗3次,每次10 min,分别加入一抗(β-actin抗体的体积稀释比例为1:50 000,其他抗体的体积稀释比例均为1:2 000),4 °C孵育过夜。次日洗膜(同上),加入HRP标记的山羊抗兔/小鼠IgG(体积稀释比例为1:2 000),室温孵育1.5 h。洗膜后依据说明书滴加显色剂进行显影,采用Image J图像分析管理系统对蛋白条带灰度值进行分析。

## 1.9 统计学方法

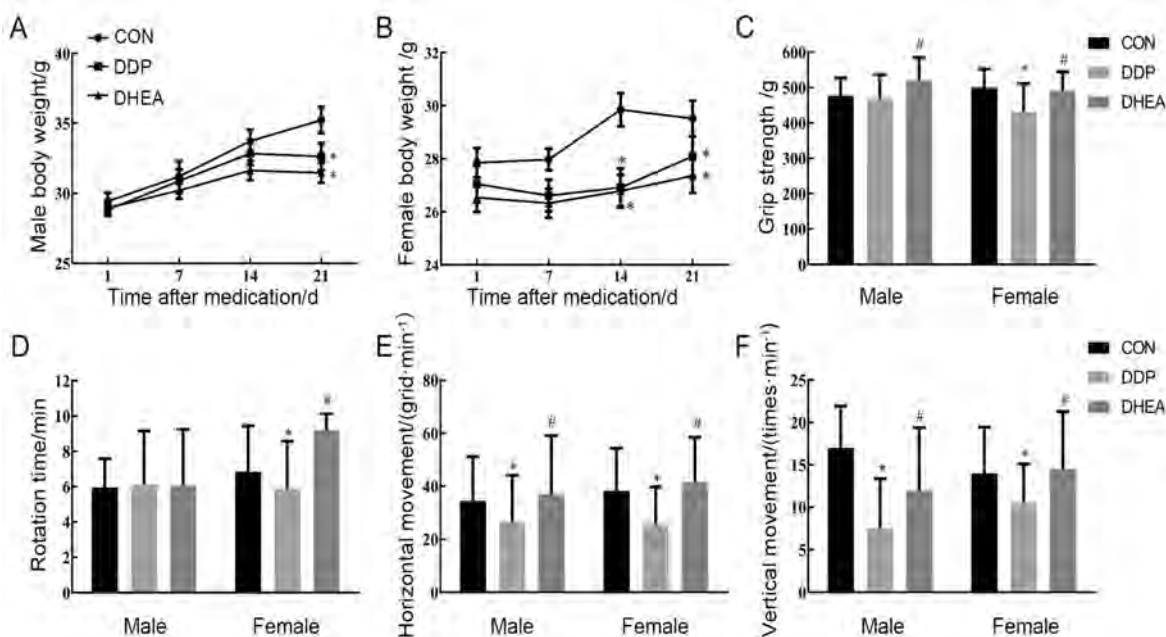
采用GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析和制图。符合正态分布的数据采用单因素方差分析、重复测量方差分析,组内两两比较采用Pillai's Trace检验;非参数检验采用Kruskal-Wallis检验分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DDP和DHEA处理对小鼠体重增长和小鼠疲劳指标的影响

造模后第21天,DDP建模组和DHEA治疗组雄性小鼠的体重增长均显著低于对照组( $P<0.05$ ,图1A);而造模后第14天,DDP建模组和DHEA治疗组雌性小鼠的体重增长就已显著低于对照组( $P<0.05$ ,图1B);造模后第21天,DDP建模组和DHEA治疗组之间雌雄小鼠的体重增长均无明显差异( $P>0.05$ )。结果提示,DDP能抑制小鼠体重增长,且其对雌性小鼠体重增长的影响更为明显,而DHEA则对小鼠体重增长没有明显影响。

与对照组比较,DDP建模组雌性小鼠的抓力和转棒时间均显著下降( $P<0.05$ ),而雄性与雌性小鼠的水平和垂直运动能力均显著下降( $P<0.05$ );与DDP建模组比较,DHEA治疗组雄性和雌性小鼠的抓力、水平运动和垂直运动能力都显著增强( $P<0.05$ ),且雌性小鼠的转棒时间也显著延长( $P<0.05$ ),但雄性小鼠的转棒时间没有明显变化( $P>0.05$ )(图1C~F)。结果提示,DDP处理可诱发小鼠疲劳,补充DHEA不但可以有效缓解由DDP所致的疲劳现象,而且对雌性小鼠疲劳现象的改善作用可能更强。



注: CON为对照组, DDP为DDP建模组, DHEA为脱氢表雄酮治疗组。与正常组比较, \* $P<0.05$ ; 与DDP建模组比较, # $P<0.05$ 。

Note: CON indicates control group, DDP indicates cis-dichlorodiamineplatinum (cisplatin) modeling group, DHEA indicates dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment after cisplatin modeling group. Compared with the control group, \* $P<0.05$ ; Compared with the cisplatin modeling group, # $P<0.05$ .

图1 DDP和DHEA处理后小鼠体重和疲劳指标的变化

Figure 1 Changes of body weight and fatigue indexes in mice after DDP and DHEA treatment

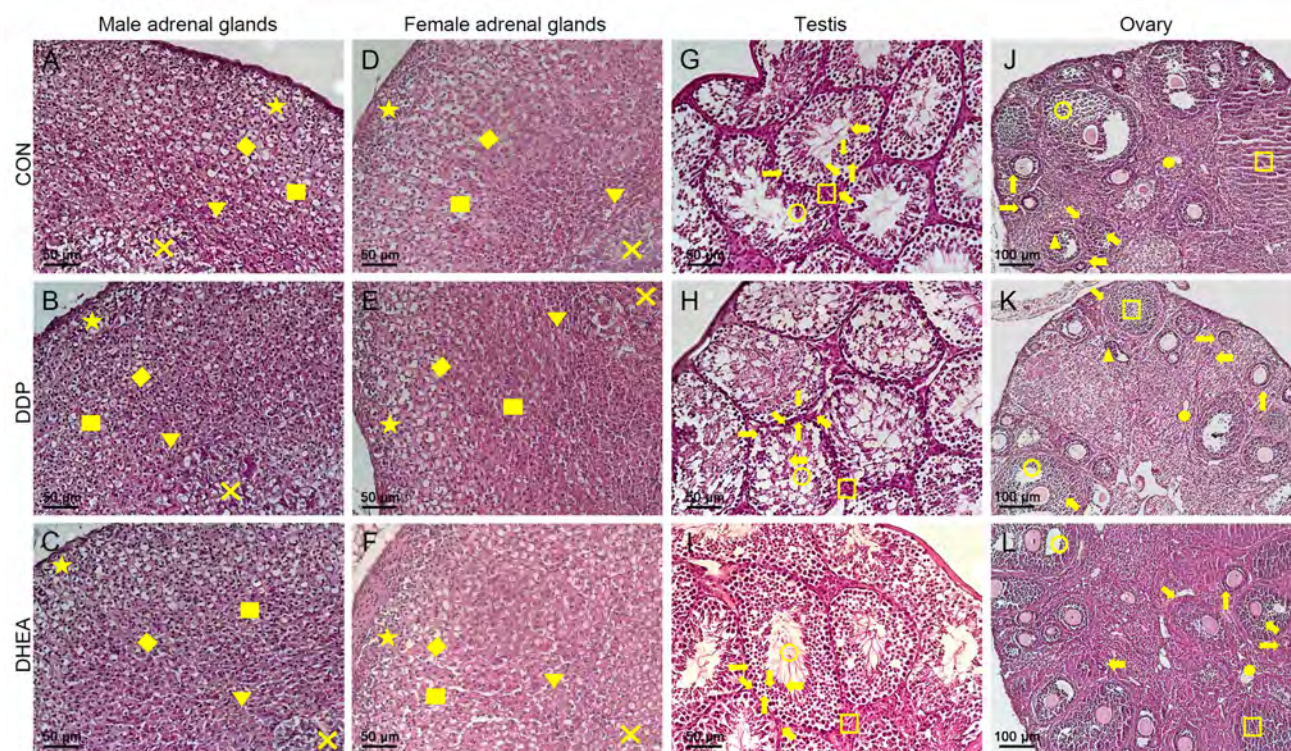
## 2.2 DDP和DHEA处理对小鼠肾上腺、睾丸和卵巢组织形态结构的影响

HE染色结果显示, 对照组小鼠肾上腺被膜清楚, 球状带细胞类圆形, 束状带细胞排列呈条索状, 网状带细胞清晰 (图2A和D); 与对照组比较, DDP建模组小鼠的肾上腺组织中束状带细胞条索状排列稍紊乱 (图2B和E); 而补充DHEA治疗后有所改善 (图2C和F)。结果提示DDP对肾上腺皮质形态结构的影响较小。

对照组小鼠睾丸形态结构清晰, 各级细胞排列有序, 睾丸间质紧密充盈 (图2G); DDP建模组小鼠睾丸曲细精管变形, 各级生精细胞紊乱, 管腔内生精细

胞层数缺乏, 支持细胞减少, 睾丸间质出现水肿 (图2H); 而补充DHEA有助于改善曲细精管及生精细胞, 并减轻睾丸间质水肿 (图2I)。结果提示DDP会损伤睾丸组织及其生精功能, 而DHEA有助于缓解DDP对睾丸的损伤作用。

与对照组相比, DDP建模组小鼠卵巢组织中原始卵泡减少, 闭锁卵泡与次级卵泡增多, 卵泡膜变薄, 卵泡颗粒细胞减少 (图2J和K); 而补充DHEA后出现较多初级和次级卵泡, 成熟卵泡与颗粒细胞有所增加 (图2L)。结果提示DDP会促进原始卵泡分化, 导致大量闭锁卵泡的产生, 以及正常成熟卵泡的减少, 而DHEA有助于改善DDP对卵巢的不良影响。



注: CON为对照组, DDP为DDP建模组, DHEA为脱氢表雄酮治疗组。肾上腺组织 (图A~F, 比例尺大小为50 μm) 中, ■表示肾上腺皮质; ×表示肾上腺髓质; ★表示球状带; ◆表示束状带; ▼表示网状带。睾丸组织 (图G~I, 比例尺大小为50 μm) 中, ○表示曲细精管; ←表示精子细胞; →表示精原细胞; ↑表示初级精母细胞; ↓表示次级精母细胞; \表示支持细胞; ↖表示睾丸间质细胞。卵巢组织 (图J~L, 比例尺大小为100 μm) 中, ○表示卵泡腔; □表示黄体; ▲表示闭锁卵泡; ●表示白体; ←表示原始卵泡; →表示初级卵泡; ↑表示次级卵泡; \表示卵泡膜层; ↖表示颗粒细胞。

Note: CON indicates control group, DDP indicates cisplatin modeling group, DHEA indicates dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment after cisplatin modeling group. In Fig. A-F (scale bar size is 50 μm), ■ indicates adrenal cortex, × indicates adrenal medulla, ★ indicates zona glomerulosa, ◆ indicates zona fasciculata, ▼ indicates zona reticularis. In Fig. G-I (scale bar size is 50 μm), ○ indicates seminiferous tubule, ← indicate spermatocyte, → indicates spermatogonia, ↑ indicates primary spermatocyte, ↓ indicates secondary spermatocyte, \ indicates sertoli cells, ↖ indicates leydig cells. In Fig. J-L (scale bar size is 100 μm), ○ indicates follicular cavity, □ indicates corpus luteum, ▲ indicates atresia follicles, ● indicates corpus albicans of ovary, ← indicates primordial follicle, → indicates primary follicle, ↑ indicates secondary follicle, \ indicates follicle, ↖ indicates granulosa cells.

图2 小鼠肾上腺(×200)、睾丸(×200)、卵巢(×100)组织病理形态学观察(HE染色)

Figure 2 Pathological morphology of adrenal gland (×200), testis (×200) and ovary (×100) in mice (HE staining)



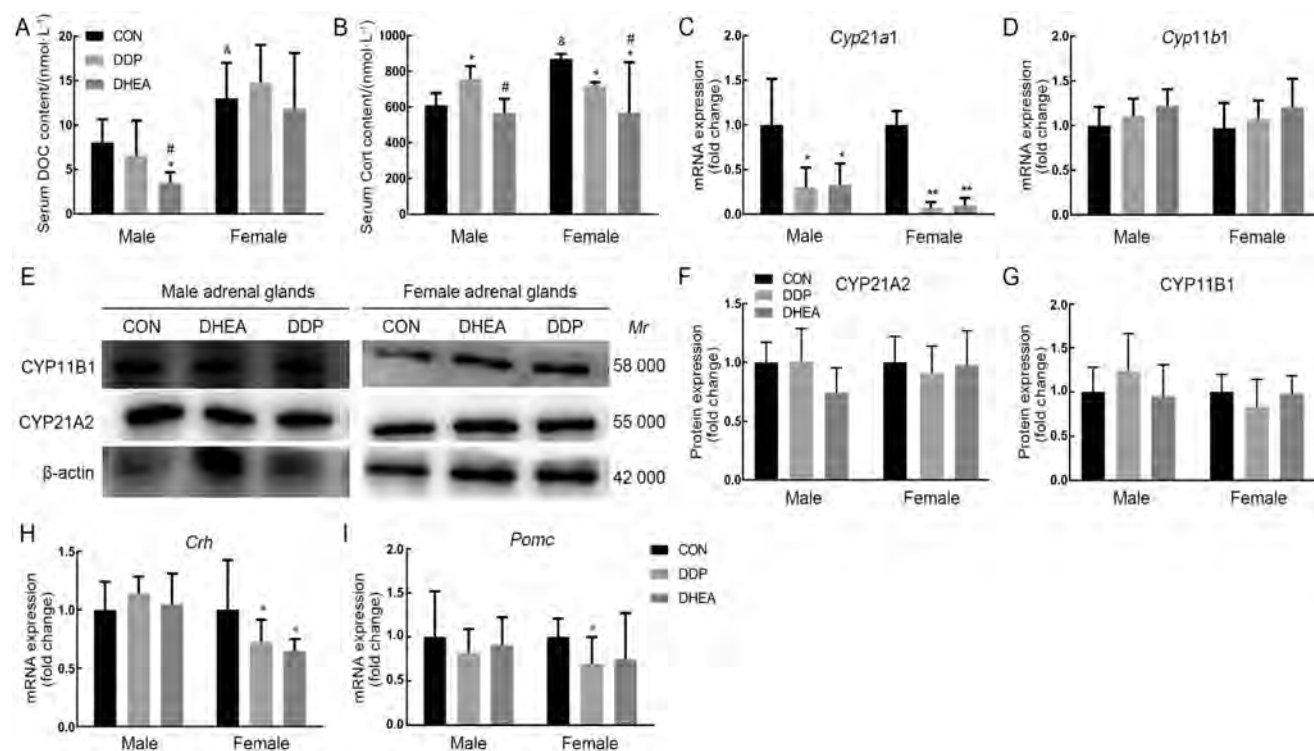
## 2.3 DDP和DHEA处理对小鼠类固醇激素合成与分泌的影响

### 2.3.1 血清皮质激素含量及皮质激素合成相关基因表达水平的变化

高效液相色谱串联质谱法检测显示, 对照组雌性小鼠的血清皮质激素DOC (图3A) 和Cort (图3B) 含量均显著高于雄性小鼠; 与对照组比较, DDP建模组雄性和雌性小鼠的血清DOC含量均无明显变化 ( $P > 0.05$ , 图3A), 而雄性小鼠血清Cort含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 但雌性小鼠血清Cort含量却显著降低 ( $P <$

0.05, 图3B); 补充DHEA后, 雄性小鼠血清DOC含量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而雌性小鼠血清DOC含量无明显变化 ( $P > 0.05$ , 图3A), 但雄性和雌性小鼠血清Cort含量都显著降低 ( $P < 0.05$ , 图3B)。结果提示, 雄性与雌性小鼠体内DOC与Cort的分泌水平存在差异性, 且DDP对Cort分泌的影响更明显, 补充DHEA有助于抑制亢奋的Cort分泌。

实时荧光定量PCR和蛋白质印迹结果显示, 与对照组比较, DDP建模组雄性与雌性小鼠的肾上腺组织中编码21-羟化酶的 *Cyp21a1* 基因表达水平显著下



注: A~B, 高效液相色谱串联质谱联用仪检测小鼠血清中11-脱氧皮质酮 (DOC) 和皮质酮 (Cort) 含量的结果; C~D, 实时荧光定量PCR检测小鼠肾上腺组织中 *Cyp21a1* 和 *Cyp11b1* mRNA水平; E~G, 蛋白质印迹法检测肾上腺组织中CYP11B1与CYP21A2蛋白表达及其相对表达量分析; H~I, 实时荧光定量PCR检测小鼠下丘脑组织中促肾上腺皮质激素释放激素 (*Crh*) 和垂体组织中促肾上腺皮质激素 (*Pomc*) mRNA水平。CON为对照组, DDP为DDP建模组, DHEA为脱氢表雄酮治疗组。与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与DDP建模组比较, # $P < 0.05$ ; 与同组雄性小鼠比较, & $P < 0.05$ 。

Note: A-B, The contents of 11-deoxycorticosterone (DOC) and corticosterone (Cort) in mouse serum were determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); C-D, The expression levels of *Cyp21a1* and *Cyp11b1* mRNA in adrenal tissue were determined by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR); E-G, The expression levels of CYP11B1 and CYP21A2 protein in adrenal tissue were determined by Western blotting; H-I, The expression levels of corticotropin releasing hormone (*Crh*) mRNA in hypothalamus and pro-opiomelanocortin-alpha (*Pomc*) mRNA in pituitary were determined by RT-qPCR. CON indicates control group, DDP indicates cisplatin modeling group, DHEA indicates dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment after cisplatin modeling group. Compared with control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; Compared with the DDP group, # $P < 0.05$ ; Compared with male mice in the same group, & $P < 0.05$ .

图3 小鼠血清皮质激素含量及肾上腺、下丘脑和垂体组织中皮质激素合成相关基因表达水平

Figure 3 The content of serum corticosteroid and the expression levels of corticosteroid synthesis-related genes in adrenal, hypothalamic, and pituitary tissues of mice

调 ( $P < 0.05$ ), 尤其以雌性小鼠更加显著 (图 3C), 然而 CYP21A2 蛋白表达在雌性与雄性小鼠的肾上腺组织中变化差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 3F); 而编码 11 $\beta$ -羟化酶的 *Cyp11b1* 基因及其蛋白的表达水平变化差异也无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 3D 和 G)。

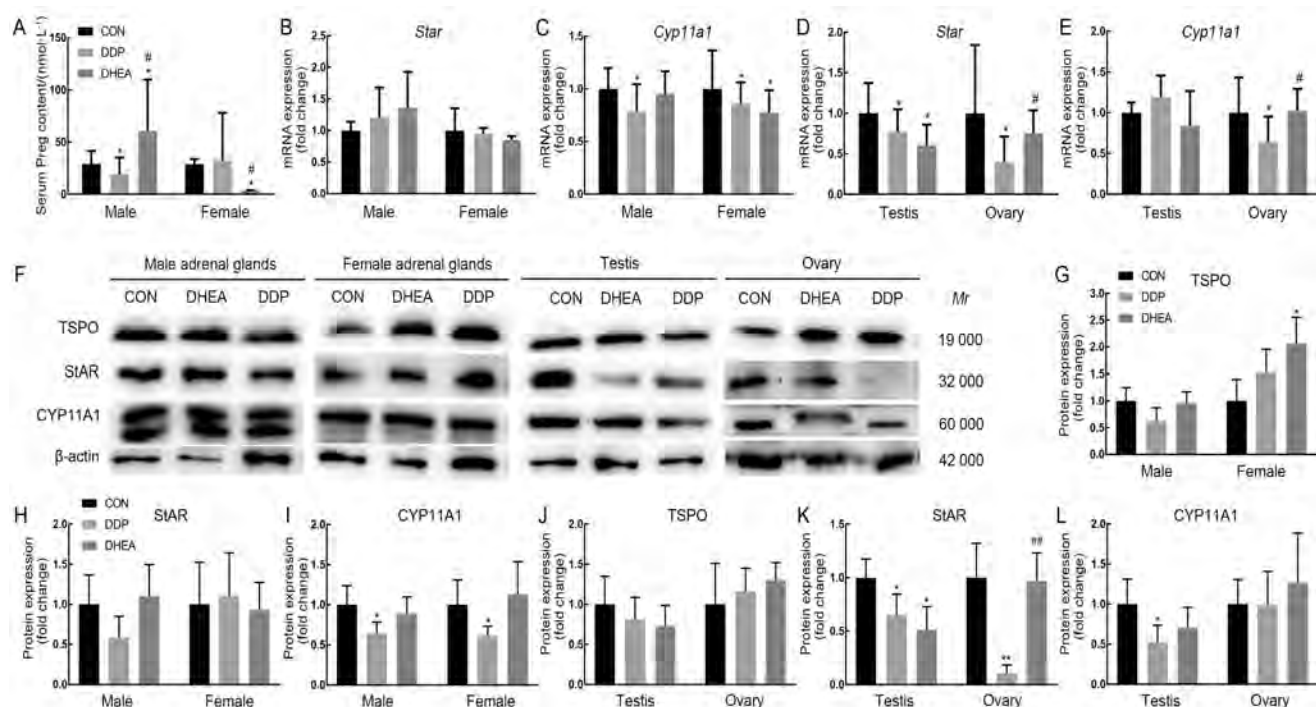
与对照组相比, DDP 建模组雌性小鼠下丘脑中促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotropin releasing hormone, *Crh*) 基因与垂体中促肾上腺皮质激素 (又称阿片黑素促皮质激素原, pro-opiomelanocortin- $\alpha$ , *Pomc*) 基因的表达水平均显著下调 ( $P < 0.05$ ), 而雄性小鼠无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 补充

DHEA 后 *Crh* 与 *Pomc* 基因的表达水平也无明显变化 ( $P > 0.05$ , 图 3H ~ I)。

### 2.3.2 血清孕烯醇酮含量及其合成相关基因表达水平的变化

高效液相色谱串联质谱法检测显示, 与对照组相比, DDP 建模组雄性小鼠的血清孕烯醇酮含量显著下降 ( $P < 0.05$ ); 补充 DHEA 后, 雄性小鼠血清孕烯醇酮含量显著增高 ( $P < 0.05$ ), 但雌性小鼠血清孕烯醇酮水平却显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 4A)。结果提示 DHEA 对小鼠体内孕烯醇酮合成分泌的调控作用具有明显的性别差异性。

实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹结果显示, 与对



注: A, 高效液相色谱串联质谱联用仪检测小鼠血清孕烯醇酮 (Preg) 含量的结果; B ~ C, 实时荧光定量 PCR 检测小鼠肾上腺组织中类固醇激素急性调节蛋白 (*Star*) 和 P450<sub>scc</sub> 裂解酶编码基因 *Cyp11a1* 的 mRNA 转录水平; D ~ E, 实时荧光定量 PCR 检测小鼠睾丸与卵巢组织中 *Star* 和 *Cyp11a1* mRNA 水平; F ~ L, 蛋白质印迹法检测小鼠肾上腺、睾丸与卵巢组织中 18ku 转位蛋白 (TSPO)、StAR 与 CYP11A1 蛋白及其相对表达量分析。CON 为对照组, DDP 为 DDP 建模组, DHEA 为脱氢表雄酮治疗组。与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 DDP 建模组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

Note: A, The contents of pregnenolone (Preg) in mouse serum was determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); B-C, The expression levels of steroidogenic acute regulatory protein (*Star*) and *Cyp11a1* mRNA in adrenal tissue were determined by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR); D-E, The expression levels of *Star* and *Cyp11a1* mRNA in testis and ovary were determined by RT-qPCR; F-L, The expression levels of translocator protein (TSPO), StAR and CYP11A1 proteins in adrenal, testis and ovary tissues were determined by Western blotting. CON indicates control group, DDP indicates cisplatin modeling group, DHEA indicates dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment after cisplatin modeling group. Compared with control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; Compared with the DDP group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

图 4 小鼠血清孕烯醇酮含量及肾上腺、睾丸与卵巢组织中孕烯醇酮合成相关基因表达水平

Figure 4 The content of serum pregnenolone and the expression levels of pregnenolone-synthesis-related genes in adrenal, testis and ovary tissues of mice



照组比较, DDP建模组雄性和雌性小鼠肾上腺组织中类固醇激素急性调节蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, *Star*) 基因 (图4B) 及 StAR 蛋白 (图4F、H) 表达水平均无明显变化 ( $P>0.05$ ), 而 P450<sub>scc</sub> 裂解酶编码基因 *Cyp11a1* (图4C) 及其蛋白 CYP11A1 (图4F、I) 表达水平均显著下降 ( $P<0.05$ ); 补充 DHEA 后, 雄性小鼠 *Cyp11a1* 基因表达水平与对照组已无显著差异 ( $P>0.05$ ), 但雌性小鼠 *Cyp11a1* 基因表达水平仍显著降低 ( $P<0.05$ , 图4C), 而雌性小鼠 18ku 转位蛋白 (translocator protein, TSPO) 表达显著增强 ( $P<0.05$ , 图4F、G)。

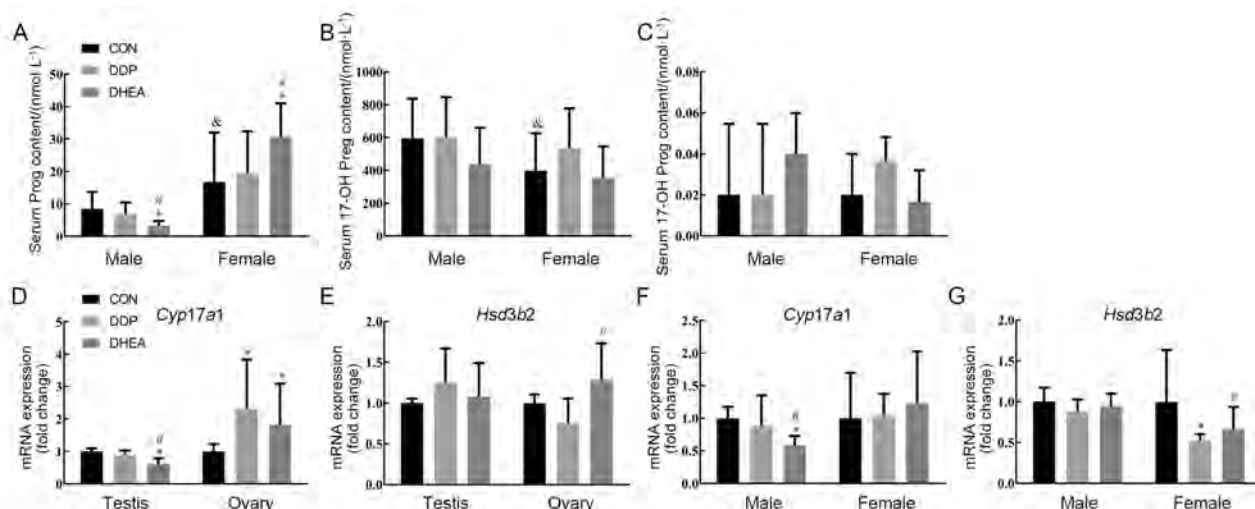
与对照组相比, DDP建模组雄性小鼠睾丸组织中 *Star* 基因 (图4D) 与 StAR 蛋白 (图4K) 以及 CYP11A1 蛋白 (图4L) 表达水平均显著下降 ( $P<0.05$ ); 而雌性小鼠卵巢组织中 *Star* 基因 (图4D)、*Cyp11a1* 基因 (图4E) 及 CYP11A1 蛋白 (图4L) 表达水平均显著下降 ( $P<0.05$ ), 补充 DHEA 后, 小鼠卵巢组织中 *Star* 基因 (图4D) 和 *Cyp11a1* 基因 (图4E) 表达以及 StAR 蛋白 (图

4K) 表达水平显著增高 ( $P<0.05$ )。

### 2.3.3 血清孕烯醇酮代谢产物水平及其合成相关基因表达水平的变化

高效液相色谱串联质谱法检测显示, 与雄性小鼠比较, 对照组雌性小鼠的血清孕烯醇酮代谢产物 Prog 水平显著增高 ( $P<0.05$ , 图5A), 而 17-OH Prog 水平显著降低 ( $P<0.05$ , 图5B), 但 17-OH Prog 水平无显著差异 ( $P>0.05$ , 图5C); 与对照组相比, DDP建模组雄性和雌性小鼠的血清 Prog、17-OH Prog 和 17-OH Prog 水平均无明显变化 ( $P>0.05$ , 图5A~C); 然而补充 DHEA 后, 雄性小鼠血清 Prog 水平显著降低 ( $P<0.05$ , 图5A), 而雌性小鼠血清 Prog 水平显著升高 ( $P<0.05$ , 图5A), 但 17-OH Prog 和 17-OH Prog 水平无明显变化 ( $P>0.05$ , 图5B~C)。结果提示补充 DHEA 能促进雌性小鼠体内 Prog 的合成与分泌。

实时荧光定量 PCR 结果显示, 与对照组比较, DDP建模组小鼠睾丸组织中 17 $\alpha$ -羟化酶编码基因 *Cyp17a1* 表达水平无明显变化 ( $P>0.05$ ), 而 DHEA 治



注: A~C, 高效液相色谱串联质谱联用仪检测小鼠血清孕酮 (Prog)、17-羟孕烯醇酮 (17-OH Preg) 和 17-羟孕酮 (17-OH Prog) 含量的结果; D~E, 实时荧光定量 PCR 检测小鼠睾丸和卵巢组织中 17 $\alpha$ -羟化酶编码基因 *Cyp17a1* 和 3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 2 (*Hsd3b2*) mRNA 水平; F~G, 实时荧光定量 PCR 检测小鼠肾上腺组织中 *Cyp17a1* 和 *Hsd3b2* mRNA 水平。CON 为对照组, DDP 为 DDP 建模组, DHEA 为脱氢表雄酮治疗组。与对照组比较, \* $P<0.05$ ; 与 DDP 建模组比较, # $P<0.05$ ; 与同组雄性小鼠比较, & $P<0.05$ 。

Note: A-C, The contents of progesterone (Prog), 17-hydroxypregnenolone (17-OH Preg) and 17-hydroxyprogesterone (17-OH Prog) in mouse serum were determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); D-E, The expression levels of *Cyp17a1* and 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (*Hsd3b2*) mRNA in testis and ovary were determined by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR); F-G, The expression levels of *Cyp17a1* and *Hsd3b2* mRNA in adrenal tissue were determined by RT-qPCR. CON indicates the control group, DDP indicates cisplatin modeling group, DHEA indicates dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment after cisplatin modeling group. Compared with the control group, \* $P<0.05$ ; Compared with the DDP group, # $P<0.05$ ; Compared with male mice in the same group, & $P<0.05$ .

图5 小鼠血清孕酮、17-羟孕烯醇酮和 17-羟孕酮含量以及肾上腺、睾丸与卵巢组织中合成相关基因表达

Figure 5 The content of serum progesterone, 17-hydroxypregnenolone and 17-hydroxyprogesterone as well as the expression levels of their synthesis-related genes in adrenal, testis and ovary tissues of mice

疗组小鼠睾丸组织中 *Cyp17a1* 基因表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); DDP 建模组和 DHEA 治疗组小鼠卵巢组织中 *Cyp17a1* 基因表达水平均显著增高 ( $P < 0.05$ , 图 5D)。与对照组比较, DDP 建模组小鼠睾丸组织中  $3\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 2 (3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, *Hsd3b2*) 表达水平无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 而 DHEA 治疗组小鼠卵巢组织中 *Hsd3b2* 基因表达水平显著上调 ( $P < 0.05$ , 图 5E)。

除了性腺外, 肾上腺皮质网状带细胞也合成性激素。与对照组和 DDP 建模组比较, DHEA 治疗组雄性小鼠的肾上腺组织中 *Cyp17a1* 基因表达显著下调 ( $P < 0.05$ ), 而雌性小鼠无明显变化 ( $P > 0.05$ , 图 5F)。与对照组相比, DDP 建模组雌性小鼠的肾上腺组织中 *Hsd3b2* 基因表达显著下调 ( $P < 0.05$ ), 而补充 DHEA 能显著促进 *Hsd3b2* 基因的表达 ( $P < 0.05$ , 图 5G)。

### 2.3.4 血清雄激素水平及下丘脑-垂体-性腺轴相关基因表达水平的变化

高效液相色谱串联质谱法检测显示, 对照组中雌性小鼠的血清 Andro、T 和 DHT 水平均显著低于同组雄性小鼠 ( $P < 0.01$ ); 与对照组相比, DDP 建模组雄性小鼠的血清 Andro、T 和 DHT 水平均显著下降 ( $P < 0.05$ ), 雌性小鼠血清 T 和 DHT 水平也显著下降 ( $P < 0.05$ ), 但 Andro 水平无明显变化 ( $P > 0.05$ ); 与 DDP 建模组比较, DHEA 治疗组雄性和雌性小鼠血清 Andro、T 和 DHT 水平没有显著差异 ( $P > 0.05$ , 图 6A~C)。

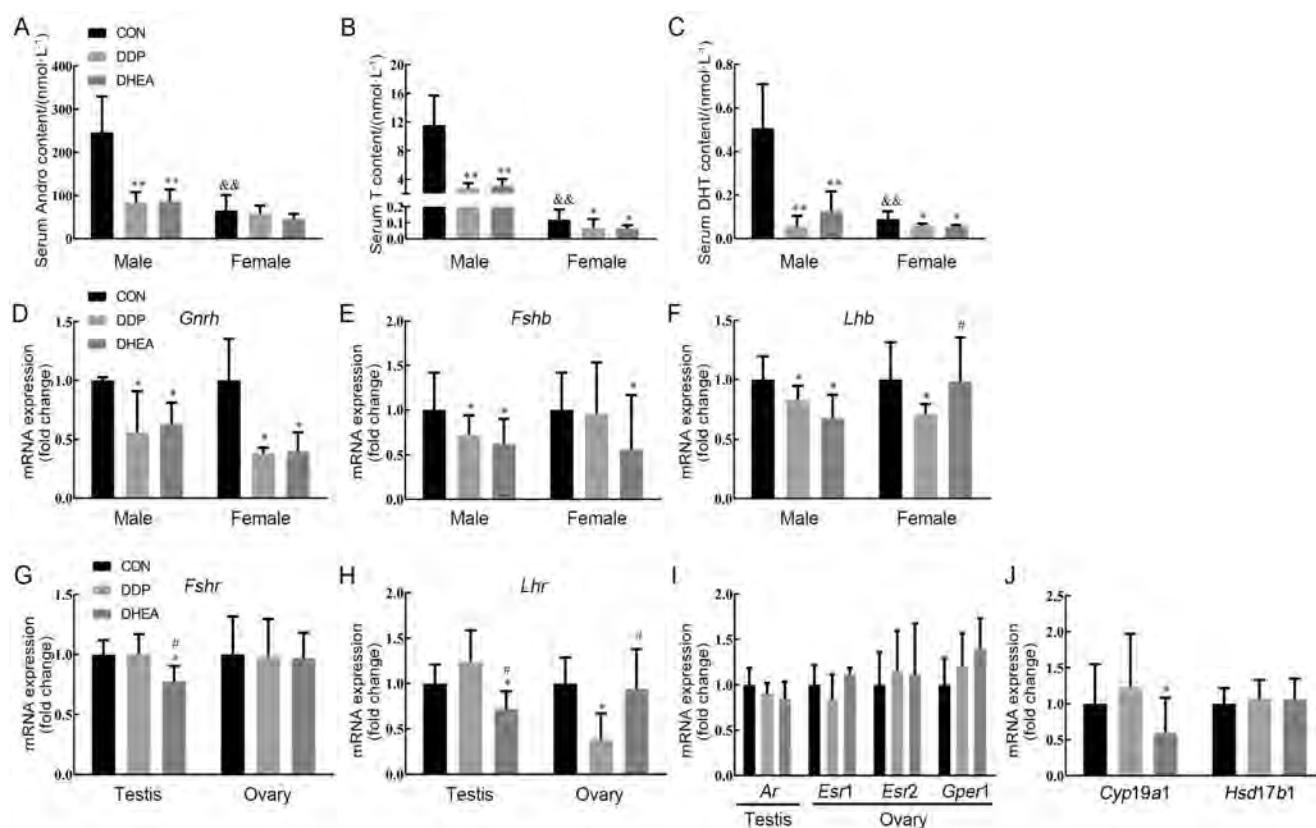
实时荧光定量 PCR 结果显示, 与对照组比较, DDP 建模组雄性与雌性小鼠下丘脑组织中促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, *Gnrh*) 基因表达水平均显著下降 ( $P < 0.05$ ), 补充 DHEA 后并不能上调 *Gnrh* 基因的表达水平; DDP 建模组雄性小鼠垂体组织中促卵泡刺激素  $\beta$  亚基 (follicular stimulating hormone beta subunit, *Fshb*) 和黄体生成素  $\beta$  亚基 (luteinizing hormone subunit beta, *Lhb*) 基因表达均显著被抑制 ( $P < 0.05$ ), 雌性小鼠垂体组织中 *Lhb* 基因的表达水平也显著下降 ( $P < 0.05$ ); 补充 DHEA 会进一步抑制雄性小鼠垂体中 *Fshb* 和 *Lhb* 基因的表达 ( $P < 0.05$ ), 但能显著促进雌性小鼠垂体中 *Lhb* 基因的表达 ( $P < 0.05$ , 图 6D~F)。结果提示 DDP 可能通过干扰下丘脑-垂体-性腺轴功能, 抑制 GnRH、FSH 和 LH 的合成与分泌, 而 DHEA 可能对 LH 的合成与分泌有一定的改善作用。

实时荧光定量 PCR 还发现, 与对照组比较, DDP

建模组小鼠睾丸组织中促卵泡刺激素受体 (follicular stimulating hormone receptor, *Fshr*)、黄体生成素受体 (luteinizing hormone receptor, *Lhr*) 基因表达水平以及卵巢 *Fshr* 基因表达水平均无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 但卵巢 *Lhr* 基因表达水平显著下降 ( $P < 0.05$ ), 而 DHEA 治疗组睾丸 *Fshr* 和 *Lhr* 基因表达水平显著下调 ( $P < 0.05$ ), 卵巢 *Lhr* 基因表达水平较 DDP 建模组显著增高 ( $P < 0.05$ ), 但卵巢 *Fshr* 基因表达水平无明显变化 ( $P > 0.05$ )。此外, 与对照组相比, DDP 建模组和 DHEA 治疗组小鼠雄激素受体 (androgen receptor, *Ar*)、雌激素受体 (estrogen receptor, *Esr*) 1、*Esr2* 和 G 蛋白偶联雌激素受体 1 (G-protein coupled estrogen receptor 1, *Gper1*) 基因表达水平均无明显变化 ( $P > 0.05$ ); DDP 建模组小鼠卵巢组织中芳香化酶编码基因 *Cyp19a1*、 $17\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 1 (17- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *Hsd17b1*) 以及 DHEA 治疗组小鼠卵巢组织中 *Hsd17b1* 基因表达水平也都没有明显变化 ( $P > 0.05$ ), 但 DHEA 治疗组 *Cyp19a1* 基因表达水平显著下调 ( $P < 0.05$ , 图 6G~J)。

## 3 讨论

DDP 作为经典的抗肿瘤化学药物, 单独或联合其他化疗药物均显示出良好的抗肿瘤疗效, 然而其毒性和不良反应限制了大剂量或长时间使用。以往有文献报告, DDP 可导致肾小管特别是远曲小管和集合管呈局部急性灶性坏死, 破坏耳蜗柯替器官的毛细胞和损伤前庭, 作用于呕吐中枢后诱发胃肠道反应, 可抑制骨髓所有细胞系, 也可导致潜在可逆性的精子缺乏症。值得注意的是, DDP 使用后年老者较年轻者更易发生耳毒性不良反应, 听力损害较重; 另外, DDP 对儿童的耳毒性也更加敏感。中医理论认为, 老年人存在生理性肾虚, 儿童肾气尚不足, 提示在肾气不足状态下 DDP 更容易诱发典型的药源性肾虚证。针对 DDP 的不良反应, 目前常采用大剂量水化以减小其毒性, 也可采用抗氧化剂诸如超氧化物歧化酶、维生素 C、维生素 E 等或使用硒类衍生物对抗 DDP 引起的肾毒性<sup>[7]</sup>, 或采用地塞米松减弱 DDP 导致的耳毒性损伤<sup>[8]</sup>。此外, 中药在增效减毒方面也呈现一定优势, 比如: 黄芪能改善 DDP 所致小鼠体重、尿量的减少以及血尿素氮、血肌酐、血清 N-乙酰- $\beta$ -氨基葡萄糖酶含量的增高<sup>[9]</sup>; 参芪水煎液通过改善血肌酐、尿蛋白、尿- $\beta$ 2 微球蛋白、尿视黄醇结合蛋白表达, 改善 DDP 所致肾



注: A~C, 高效液相色谱串联质谱联用仪检测小鼠血清雄烯二酮 (Andro)、睾酮 (T) 和二氢睾酮 (DHT) 含量的结果; D~F, 实时荧光定量 PCR 检测小鼠下丘脑组织中促性腺激素释放激素 (*GnRh*) 以及垂体组织中促卵泡刺激素β亚基 (*Fshb*)、黄体生成素β亚基 (*Lhb*) mRNA 表达水平; G~I, 实时荧光定量 PCR 检测小鼠睾丸和卵巢组织中促卵泡刺激素受体 (*Fshr*)、黄体生成素受体 (*Lhr*)、雄激素受体 (*Ar*)、雌激素受体 (*Esr1*、*Esr2*) 和 G 蛋白偶联雌激素受体 1 (*Gper1*) mRNA 表达水平; J, 实时荧光定量 PCR 检测小鼠卵巢组织中芳香化酶编码基因 *Cyp19a1* 和 17β-羟基类固醇脱氢酶 1 (*Hsd17b1*) mRNA 表达水平。CON 为对照组, DDP 为 DDP 建模组, DHEA 为脱氢表雄酮治疗组。与对照组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 与 DDP 建模组比较, # $P<0.05$ ; 与同组雄性小鼠比较, && $P<0.01$ 。

Note: A-C, The contents of androstenedione (Andro), testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT) in mouse serum were determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); D-F, The expression levels of gonadotropin-releasing hormone (*GnRh*) mRNA in hypothalamus tissue, follicular stimulating hormone beta subunit (*Fshb*) and luteinizing hormone subunit beta (*Lhb*) mRNA in pituitary were determined by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR); G-I, The expression levels of follicular stimulating hormone receptor (*Fshr*), luteinizing hormone receptor (*Lhr*), and androgen receptor (*Ar*), estrogen receptor (*Esr*) 1/2 and G-protein coupled estrogen receptor 1 (*Gper1*) mRNA in testis and ovary were determined by RT-qPCR; J, The expression levels of *Cyp19a1* and 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (*Hsd17b1*) mRNA in mouse ovarian tissue by RT-qPCR. CON indicates control group, DDP indicates cisplatin modeling group, DHEA indicates dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment after cisplatin modeling group. Compared with control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; Compared with the DDP group, # $P<0.05$ ; Compared with male mice in the same group, && $P<0.01$ .

图6 小鼠血清雄激素水平及下丘脑-垂体-性腺轴相关基因表达水平

Figure 6 The content of serum androgen and the expression levels of hypothalamus-pituitary-adrenal/gonadal axis-related genes in adrenal, testis and ovary tissues of mice

损伤<sup>[10]</sup>; 西洋参总皂苷联合 DDP 可克服 DDP 导致的脾脏萎缩、体重减少等不良反应<sup>[11]</sup>。因此, 在确保 DDP 疗效的同时如何减轻其毒性作用, 是学术界非常渴望解决的关键问题。基于此, 本研究着重从神经内分泌层面探索 DDP 对类固醇激素合成与分泌的影响, 以弥补该领域的空白, 有助于为中医药通过调控神经

内分泌功能减轻 DDP 毒性作用, 提供可借鉴的科学依据。

本研究按  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量腹腔注射 DDP 溶液 21 d (每 3 d 注射 1 次, 共 7 次), 发现可以抑制小鼠体重增长。廖英俊等<sup>[12]</sup>报道  $3 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  DDP 连续给药 5 d 可引起小鼠体重明显下降。这两个研究结果提



示, DDP短期连续或长期间断给药均可抑制体重增长。此外, DDP对多脏器组织形态均有影响。刘崇斌等<sup>[13]</sup>采用20 mg/kg DDP腹腔注射一次性给药可导致小鼠肾小管-间质急性损伤。舍雅莉等<sup>[14]</sup>采用2 mg/kg DDP治疗H22荷瘤小鼠14 d, 发现DDP治疗组小鼠的肝细胞体积增大, 染色变浅, 个别区域有点状坏死灶, 中央静脉扩张充血, 肝血窦狭窄闭塞, 并且胸腺皮髓质界限不清, 胸腺小体不易辨认, 髓质区淋巴细胞分布疏松且数量减少。另有研究者采用2.5 mg/kg DDP连续腹腔注射3 d, 发现大鼠睾丸生精上皮细胞排列紊乱、生精细胞减少、基底部出现空泡, 而且随着DDP剂量增大, 睾丸组织病理改变更加明显<sup>[15-16]</sup>。齐聪采用10~20 mg/kg DDP治疗雌性大鼠5~10 d, 发现卵泡数的减少与用药剂量、用药时间长短有关, 表现为越成熟的大卵泡越容易受到DDP的影响; 随着用药时间的延长, 本应发育成中卵泡的小卵泡停止发育, 大卵泡和中卵泡明显减少, 血液中促卵泡刺激素(follicular stimulating hormone, FSH)升高、雌二醇明显下降<sup>[17]</sup>。本研究主要采用HE染色检测了内分泌组织, 结果显示: DDP用药后睾丸曲细精管变形, 各级生精细胞紊乱, 管腔内生精细胞层数缺乏, 支持细胞减少, 睾丸间质出现水肿; DDP也可导致小鼠卵巢中大量原始卵泡被激活, 闭锁卵泡增多, 原始卵泡和成熟卵泡减少, 卵泡膜变薄, 卵泡颗粒细胞减少; 然而DDP对肾上腺皮质细胞的影响较小。肾上腺、卵巢、睾丸作为类固醇激素合成内分泌细胞, DDP对肾上腺皮质细胞影响小可能与肾上腺皮质细胞合成的糖皮质激素参与应激有关, 其代偿性反应有助于保护皮质细胞受损。此外, 廖英俊等<sup>[12]</sup>报道DDP连续给药5 d可引起小鼠全频率的听力阈值升高, 血清尿素含量和丙氨酸氨基转移酶活性等指标异常, 并呈剂量依赖关系, 并认为氧化损伤是DDP产生其毒性作用的可能机制。以上研究结果提示DDP不仅有损组织形态结构, 而且会引起相应组织的细胞生物学功能异常。

本研究中血液类固醇激素含量检测的结果表明, 小鼠体内类固醇激素以17-OH Prog和Cort含量最高, 达500 nmol/L以上水平, 其次是Andro达100 nmol/L以上水平, 孕烯醇酮含量也有20 nmol/L以上水平, 而Prog、DOC和T含量仅10 nmol/L上下, 17-OH Prog和DHT含量则不足1 nmol/L。值得注意的是, DHEA、可的松、皮质醇、21-脱氧皮质醇、11-脱氧皮质醇、雌酮、雌二醇、雌三醇等物质未能检出。有文献报告

C57BL/6小鼠中雌酮、雌二醇、雌三醇含量低<sup>[18]</sup>, 也有研究者专门比较了不同动物与人类血液中雄激素及其前体物质的含量, 发现小鼠与大鼠的DHEA含量非常低<sup>[19-20]</sup>。此外, 正常雄性小鼠血液中Andro、T和DHT水平显著高于雌性小鼠, 而Prog、Cort和DOC水平则低于雌性小鼠。以上研究结果提示, 血液类固醇激素含量在不同物种的动物之间存在较大差异。

本研究表明, DDP非常显著地抑制雄性与雌性小鼠体内Andro、T和DHT分泌, 也抑制雌性小鼠体内孕烯醇酮和Cort分泌; 然而DDP对类固醇激素合成中间物质, 诸如Prog、17-OH Prog、17-OH Preg和DOC的分泌无明显影响。结果提示DDP在临床治疗过程中会影响类固醇激素终产物皮质激素与雄激素的分泌, 从而进一步影响各激素下游的作用靶点。本研究进一步检测类固醇激素合成酶, 发现DDP显著抑制了雄性与雌性小鼠肾上腺皮质CYP11A1蛋白、*Cyp11a1*与*Cyp21a1*基因表达, 也抑制睾丸与卵巢组织中*Star*基因及*StAR*蛋白表达, 以及卵巢*Cyp11a1*、*Hsd3b2*基因表达。结果提示DDP是通过抑制类固醇激素合成部分关键酶的基因转录, 从而减少激素合成量。DDP还抑制雄性与雌性小鼠下丘脑*Gnrh*与垂体*Lhb*基因表达, 同时雌性小鼠下丘脑*Crh*与垂体*Pomc*基因表达以及雄性小鼠垂体*Fshb*基因表达均被抑制, 提示DDP抑制雄激素分泌与其全面影响下丘脑-垂体-性腺轴功能有关。

另外, 本研究还发现, 就血液中几种雄激素水平变化而言, DDP对雄激素的影响最显著。对于雄性小鼠, 血液雄激素95%来源于睾丸间质细胞, 少部分来自肾上腺皮质网状带细胞; 而雌性小鼠的雄激素则主要来自肾上腺皮质网状带细胞。结果提示DDP能显著抑制雄性小鼠睾丸间质细胞中T及其前体物质的合成, 同样也抑制肾上腺皮质网状带细胞雄激素的合成。因此, 临床运用DDP抗肿瘤过程中, 有必要关注机体雄激素水平的变化。此外, DDP对下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的功能与性别有关, 雌性小鼠表现出系统性的抑制效应, 结合雄性小鼠雄激素水平普遍下降, 推测DDP导致雄性小鼠性腺轴功能低下, 可能引起其肾上腺皮质轴代偿性反应。欧阳可育等<sup>[21]</sup>研究发现辛二酰苯胺异羟肟酸可增强DDP对肾上腺皮质癌的疗效, 但是没检测肾上腺皮质相关激素变化。王泽先等<sup>[22]</sup>给大鼠腹腔注射6 mg/kg DDP 5 d, 大鼠摄食量显著下降与其下丘脑和血浆中Ghrelin和Orexin表达下调有关。因此, DDP对肾上腺皮质相关激素的影响还有待更深

入的研究。

考虑到DDP对小鼠多脏器的确定性损害,本研究采用雄激素前体物质DHEA同步治疗DDP建模小鼠,结果发现:雄性小鼠的Cort、DOC、Prog分泌量降低,孕烯醇酮含量升高;相应地,雌性小鼠的孕烯醇酮含量降低,Prog水平升高。DHEA自身属于肾上腺皮质网状带细胞、睾丸间质细胞、卵巢卵泡膜细胞与颗粒细胞合成的重要雄激素前体物质,其与雄激素受体亲和力和力弱,表现出极弱的雄激素活性,且啮齿类动物体内DHEA含量极低,因此,补充外源性DHEA会影响体内各内分泌细胞类固醇激素合成相关环节的中间物质含量。

综上,本研究发现DDP间断给药会抑制下丘脑-垂体-性腺轴与肾上腺皮质轴功能,补充DHEA有助于调节体内类固醇激素水平的自身稳态。

#### [医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的动物实验均已通过上海中医药大学实验动物伦理委员会批准(批号为PZSHUTCM200904017)。实验各过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (IACUC No. PZSHUTCM200904017). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals.

#### [作者贡献 Author Contribution]

潘志强负责实验方案构思与设计、数据分析、论文撰写与投稿及修稿;

农淄心负责动物实验实施与相关指标检测;

谢海纳参与小鼠疲乏指标检测;

彭佩克负责论文中结果图的制作与修改。

#### [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] 邓成艳,黄荣丽,连利娟,等. 顺铂的毒副作用及其防治[J]. 中华妇产科杂志, 1995, 30(6): 376-379.  
DENG C Y, HUANG R L, LIAN L J, et al. Toxic and side effects of cisplatin and its prevention and treatment[J]. Chin J Obstet Gynecol, 1995, 30(6): 376-379.
- [2] 董若曦,朱小丹,樊伯珍,等. 不同剂量顺铂腹腔注射建立大鼠化疗损伤性卵巢早衰模型[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(2): 104-109. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.003.  
DONG R X, ZHU X D, FAN B Z, et al. Intraperitoneal injection in different dosages of cisplatin to establish a rat model of premature ovarian failure induced by chemotherapy[J]. Lab

Anim Comp Med, 2020, 40(2): 104-109. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.003.

- [3] 农淄心,邓琳,贺健祥,等. 顺铂短期给药诱发小鼠药源性虚证模型的评价研究[J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(4):35-44. DOI: 10.16306/j.1008-861x.2021.04.006.  
NONG Z X, DENG L, HE J X, et al. Evaluation on drug-induced deficiency syndrome model by short-term administration of cisplatin in mice[J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2021, 35(4):35-44. DOI: 10.16306/j.1008-861x.2021.04.006.
- [4] 潘志强. "药源性证候"的新生学术问题与思考[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(6):5-8. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2018.06.002.  
PAN Z Q. New academic problems and thinking of drug-induced syndromes[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2018, 52(6):5-8. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2018.06.002.
- [5] 陈晓. 神经内分泌免疫网络在虚证实验动物中的变化[J]. 上海中医药大学学报, 2002, 16(2): 61-65. DOI: 10.16306/j.1008-861x.2002.02.021.  
CHEN X. Change of neuroendocrine immune network in experimental animals with deficient syndrome[J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2002, 16(2):61-65. DOI: 10.16306/j.1008-861x.2002.02.021.
- [6] 沈自尹,黄建华,林伟,等. 从整体论到系统生物学进行肾虚和衰老的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(6):548-550. DOI: 10.3321/j.issn: 1003-5370.2005.03.017.  
SHEN Z Y, HUANG J H, LIN W, et al. Transition of studying on Shen deficiency syndrome and aging from holistic concept to systematic biologic viewpoint[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2009, 29(6):548-550. DOI: 10.3321/j.issn: 1003-5370.2005.03.017.
- [7] 韩咏梅,朱永廉. 减轻顺铂毒性的研究进展[J]. 国外医学(肿瘤学分册), 1999, 26(2): 86-89.  
HAN Y M, ZHU Y L. Research progress on reducing the toxicity of cisplatin[J]. Foreign Med Sci Cancer Sect, 1999, 26(2): 86-89.
- [8] 涂钰莹,易英,涂玉梅,等. 地塞米松对顺铂致斑马鱼毛细胞损伤的保护作用研究[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2022, 30(1): 64-68. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7299.2022.01.015.  
TU Y Y, YI Y, TU Y M, et al. Protective effects of dexamethasone on cisplatin-induced hair cell injury in zebrafish[J]. J Audiol Speech Pathol, 2022, 30(1): 64-68. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7299.2022.01.015.
- [9] 孔庆志,黄涛,费雁,等. 黄芪对大剂量顺铂所致肾毒性防护的实验研究[J]. 中国药理学杂志, 1999, 34(7): 447-450. DOI: 10.3321/j.issn: 1001-2494.1999.07.006.  
KONG Q Z, HUANG T, FEI Y, et al. Experimental study on protective effect of astragalus membranaceus on nephrotoxicity induced by high dose cisplatin[J]. Chin Pharm J, 1999, 34(7): 447-450. DOI: 10.3321/j.issn: 1001-2494.1999.07.006.
- [10] 孙美娟,费梅,祝皓. 参芪水煎液防治顺铂化疗所致肾损伤临床研究[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1):21-24. DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2021.0021.  
SUN M J, FEI M, ZHU H. Clinical study on the prevention and treatment of renal injury induced by cisplatin chemotherapy

- with Shenqi Decoction[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2021, 37(1):21-24. DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2021.0021.
- [11] 张慧琼, 李刚敏, 陈俊仁, 等. 西洋参总皂苷联合顺铂对 Luc-A549 肺癌小鼠瘤体生长的影响[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 50-55. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2021.03.010.
- ZHANG H Q, LI G M, CHEN J R, et al. Effect of total saponins in panacis quinquefolii Radix combined with cisplatin on tumor growth in mice bearing luc-A549 cells[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(3): 50-55. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2021.03.010.
- [12] 廖英俊, 汤浩, 金亚平. 抗癌药顺铂对小鼠的耳、肾和肝毒性及其机制的研究[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(1):82-85. DOI: 10.3321/j.issn: 1001-1978.2004.01.023.
- LIAO Y J, TANG H, JIN Y P. Study of toxic effects on hearing, kidney and liver of mice induced by anticancer agent of cisplatin and their mechanisms[J]. Chin Pharmacol Bull, 2004, 20(1):82-85. DOI: 10.3321/j.issn: 1001-1978.2004.01.023.
- [13] 刘崇斌, 黄柳维, 李彩珍, 等. 阻断 pannexin-1 可减轻肾脏组织炎症细胞浸润和缓解顺铂诱导的急性肾损伤[J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(5): 508-514. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2019.05.02.
- LIU C B, HUANG L W, LI C Z, et al. Blocking pannexin-1 alleviates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by reducing renal inflammatory cell infiltration[J]. J South Med Univ, 2019, 39(5): 508-514. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2019.05.02.
- [14] 舍雅莉, 闫德祺, 刘永琦, 等. 当归贝母苦参丸对顺铂化疗 H22 荷瘤小鼠肿瘤及肝脏、肾脏和胸腺组织病理形态的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(5): 56-60. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2014.05.018.
- SHE Y L, YAN D Q, LIU Y Q, et al. Effect of Danggui Beimu Kushen pill on pathological morphology of tumor, liver, kidney and Thymus of H22 tumor-bearing mice treated with cisplatin[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2014, 21(5): 56-60. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2014.05.018.
- [15] 孙铨钊, 关朕, 孙应彪, 等. 顺铂染毒大鼠睾丸定量组织学分析及睾丸酶活力的变化[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(3):172-176. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2015.03.003.
- SUN Y F, GUAN Z, SUN Y B, et al. Quantitative histological analysis of testes and effect on testicular enzymes induced by cisplatin in rats[J]. J Toxicol, 2015, 29(3):172-176. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2015.03.003.
- [16] ERFANI MAJD N, TABANDEH M R, HOSSEINIFAR S H, et al. Protective effect of Aloe vera gel against cisplatin-induced testicular damage, sperm alteration and oxidative stress in rats[J]. Int J Fertil Steril, 2021, 15(3): 210-218. DOI: 10.22074/IJFS.2020.134691.
- [17] 齐聪. 顺铂腹腔内给药对大鼠卵巢的毒性作用[J]. 上海医科大学学报, 2000, 27(4): 324-325. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8467.2000.04.031.
- QI C. Observation of ovarian toxicity following intraperitoneal administration of cisplatin in mice[J]. J Shanghai Med Univ, 2000, 27(4): 324-325. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8467.2000.04.031.
- [18] NILSSON M E, VANDENPUT L, TIVESTEN Å, et al. Measurement of a comprehensive sex steroid profile in rodent serum by high-sensitive gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Endocrinology, 2015, 156(7):2492-2502. DOI: 10.1210/en.2014-1890.
- [19] SCHIFFER L, BARNARD L, BARANOWSKI E S, et al. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: a comprehensive review[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2019, 194:105439. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105439.
- [20] CUTLER G B Jr, GLENN M, BUSH M, et al. Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and Primates[J]. Endocrinology, 1978, 103(6):2112-2118.
- [21] 欧阳可育, 胡卫列, 聂奇伟. 辛二酰苯胺异羟肟酸联合顺铂对裸鼠肾上腺皮质癌的实验研究[J]. 临床泌尿外科杂志, 2014, 29(4): 342-345. DOI: 10.13201/j.issn.1001-1420.2014.04.021.
- OUYANG K Y, HU W L, NIE Q W. Effects of SAHA combined with cisplatin on adrenocortical carcinoma in nude mice model[J]. J Clin Urol, 2014, 29(4):342-345. DOI: 10.13201/j.issn.1001-1420.2014.04.021.
- [22] 王泽先, 郭菲菲, 公衍玲, 等. 顺铂化疗对下丘脑、血浆 ghrelin 和 orexin 表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(31):6023-6027, 6041. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2016.31.006.
- WANG Z X, GUO F F, GONG Y L, et al. Effects of orexin on the cisplatin-induced Pica in rats[J]. Prog Mod Biomed, 2016, 16(31):6023-6027, 6041. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2016.31.006.
- (收稿日期: 2022-11-23 修回日期: 2023-02-14 )  
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 周烁)

#### [引用本文]

潘志强, 农淄心, 谢海纳, 等. 顺铂对小鼠下丘脑-垂体-肾上腺/性腺轴功能的损伤作用及脱氢表雄酮的干预效应[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 229-242. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.182.

PAN Z Q, NONG Z X, XIE H N, et al. Injurious effect of cisplatin on the function of hypothalamus-pituitary-adrenal/gonadal axis in mice and the intervention effect of dehydroepiandrosterone[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3): 229-242. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.182.





汪永锋, 教授, 硕士生导师, 主要研究中西医结合防治消化道疾病。目前任甘肃中医药大学党委常委、副校长, 比较医学学科带头人, 甘肃省实验动物产业技术创新战略联盟理事长, 甘肃省实验动物行业技术中心主任。先后主持国家自然科学基金、省部级课题10项。获甘肃省科技进步二等奖、三等奖4项, 甘肃省皇甫谧医学二等奖、三等奖5项。主编教材及学术著作7部, 参编19部。发表学术论文97篇, 其中SCI论文33篇。作为负责人主持设立甘肃省工信厅认定的“甘肃省实验动物行业技术中心”, 省科技厅批准的“甘肃实验动物产业技术创新战略联盟”。先后获得“全国优秀共青团干部”“全国社会实践先进个人”等荣誉称号。



师长宏, 医学博士, 教授, 博士生导师。目前任空军军医大学(原第四军医大学)实验动物中心主任, 陕西省实验动物质量监督检测中心主任。获全国优秀科技工作者、军队育才银奖和中国实验动物学会青年人才奖。兼任中国实验动物学会常务理事、全军实验动物专业委员会副主任委员、陕西省实验动物学会副理事长。主要从事人源化动物模型研究, 重点围绕肿瘤模型的制备、影像学评估和应用等开展研究工作。近5年, 作为第一作者或通信作者发表SCI论文10余篇, 刊于 *Cancer Cell*、*Biomaterials* 和 *Nano Research* 等期刊。先后承担国家“863”专项、军队和省重大科技项目10余项。获陕西省科技进步二等奖和陕西省教学成果一等奖各1项。

## 人参皂苷 Rg1 在小鼠创伤性脑损伤修复中的作用

郭文文<sup>1,2</sup>, 赵亚<sup>2</sup>, 王颖花<sup>2</sup>, 刘可<sup>2</sup>, 葛煦<sup>2</sup>, 张延英<sup>1,3</sup>, 汪永锋<sup>1</sup>, 师长宏<sup>2</sup>

(1. 甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730030; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 3. 甘肃省实验动物行业技术中心, 兰州 730030)

**[摘要]** **目的** 探讨人参皂苷 Rg1 在创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 小鼠模型血脑屏障、神经炎症、行为学功能等方面的作用。**方法** 实验分2部分。第一部分是27只SPF级雄性BALB/c小鼠随机分为空白组、假手术组、TBI模型组, 每组9只; TBI模型组开颅后采用受控皮质冲击 (controlled cortical impact, CCI) 方式造模, 假手术组只开颅不进行打击, 空白组不经任何处理; 手术后进行造模效果评价。第二部分是40只雄性BALB/c小鼠随机分为假手术组、3个剂量的人参皂苷 Rg1 治疗组和溶剂DMSO对照组, 每组8只小鼠。Rg1治疗组在TBI建模成功后6 h腹腔注射剂量分别为10、20、40 mg/kg的人参皂苷 Rg1, 而DMSO对照组给予等量的1% DMSO, 持续给药1周, 每天2次。于造模后1、3、7、14 d分别进行改良的神经损伤严重程度评分 (modified neurological severity scores, mNSS); 取造模后第3天的小鼠脑组织, 采用蛋白质印迹法检测血脑屏障渗漏情况; 第14、16天分别采用高架十字迷宫实验、水迷宫实验检测小鼠神经行为功能; 第28天麻醉、灌注后取脑, 免疫荧光染色观察小胶质细胞、星形胶质细胞活化等神经炎症。**结果** 人参皂苷 Rg1 治疗组的血脑屏障标志物MMP-9表达量减少 ( $P < 0.01$ ), 小胶质细胞 (Iba-1 阳性表达) 和星形胶质细胞 (GFAP 阳性表达) 数量均明显减少 ( $P < 0.05$ ), 提示神经炎症得到抑制, 且以20 mg/kg剂量效果最好 ( $P < 0.01$ )。人参皂苷 Rg1 治疗组小鼠的mNSS评分显著低于溶剂DMSO对照组 ( $P < 0.01$ ), 进入开放臂次数比例显著高于DMSO对照组 ( $P < 0.05$ ); 其在水迷宫实验平台所在象限的时间比及穿越平台的次数均显著多于DMSO对照组 ( $P < 0.05$ ), 且均以20 mg/kg剂量效果最佳。**结论** 成功构建TBI小鼠模型并用于人参皂苷 Rg1 的损伤修复研究。人参皂苷 Rg1 能够显著改善TBI模型小鼠血脑屏障, 减轻神经炎症, 发挥改善神经行为功能的作用, 且以20 mg/kg剂量作用效果最为显著。

**[基金项目]** 陕西省创新能力支撑计划-科技资源开放共享平台项目“基于诱导性多潜能干细胞的人神经元嵌合小鼠的制备与评价”(2021PT-037); 军队实验动物专项科研课题“人神经元嵌合小鼠的制备与评价”(SYDW[2018]01)

**[第一作者]** 郭文文(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经生物学。E-mail: 553743953@qq.com

**[通信作者]** 汪永锋(1968—), 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中西医防治消化系统疾病。E-mail: wyf@gszy.edu.cn。ORCID: 0000-0003-0560-333x;

师长宏(1973—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人源化动物模型的制备与评价。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn。ORCID: 0000-0001-7490-3593

[关键词] 创伤性脑损伤; 人参皂苷 Rg1; 小鼠; 神经炎症; 行为学

[中图分类号] R-332; Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2023)03-0243-10



## Repairing Effects of Ginsenoside Rg1 on Traumatic Brain Injury in Mice

GUO Wenwen<sup>1,2</sup>, ZHAO Ya<sup>2</sup>, WANG Yinghua<sup>2</sup>, LIU Ke<sup>2</sup>, GE Xu<sup>2</sup>, ZHANG Yanying<sup>1,3</sup>, WANG Yongfeng<sup>1</sup>, SHI Changhong<sup>2</sup>

(1. Basic Medical College, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China; 2. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Gansu Province Experimental Animal Industry Technology Center, Lanzhou 730030, China)

Correspondence to: WANG Yongfeng (ORCID: 0000-0003-0560-333x), E-mail: wyf@gszy.edu.cn;

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

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the effects of ginsenoside Rg1 on blood-brain barrier, neuroinflammation and behavioral function of traumatic brain injury (TBI) mouse model. **Methods** The experiment was divided into two parts. In the first part, 27 SPF male BALB/c mice were randomly divided into blank group, sham operation group and TBI model group, with 9 mice in each group. TBI model group was made by controlled cortical impact (CCI) after craniotomy, while sham operation group was only performed craniotomy without any treatment, and the blank group was not treated at all. The effect of modeling was evaluated after operation. In the second part, 50 male BALB/c mice were randomly divided into sham operation group, three different drug dosage groups and solvent (DMSO) control group, with 8 mice in each group. The drug treatment groups were injected with ginsenoside Rg1 at the doses of 10, 20 and 40 mg/kg respectively 6 hours after TBI model had been successfully established, while the DMSO control group was given the same amount of 1% DMSO for one week, twice a day. Modified neurological severity scores (mNSS) were performed on the 1st, 3rd, 7th and 14th day after modeling, and the blood-brain barrier leakage was detected by Western blotting on the 3rd day after modeling. On the 14th and 16th day, the elevated cross maze test and water maze test were used to detect the neurobehavioral function. On the 28th day after anesthesia and perfusion, the brains were taken out, and the neuroinflammation such as activation of microglia and astrocytes was observed by immunofluorescence staining. **Results** The expression level of MMP-9, a marker of blood-brain barrier, decreased in ginsenoside Rg1 treatment group ( $P < 0.01$ ). The number of microglia (Iba-1 positive) and astrocyte (GFAP positive) cells decreased significantly ( $P < 0.05$ ), which indicated that neuroinflammation was inhibited, and the best effect was achieved at the dosage of 20 mg/kg ( $P < 0.01$ ). The mNSS of mice in ginsenoside Rg1 treatment group were significantly lower than those in DMSO control group ( $P < 0.01$ ), and the proportion of times they entered the open arm was significantly higher than that in DMSO control group ( $P < 0.05$ ). The time ratio in the quadrant where the water maze experimental platform was located and the times of crossing the platform were significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ), and the dosage of 20 mg/kg had the best effect. **Conclusion** The TBI mouse model was successfully constructed and applied to the study of ginsenoside Rg1 repair of mouse traumatic brain injury. Ginsenoside Rg1 can significantly improve blood-brain barrier, alleviate neuroinflammation and improve neurobehavioral function in TBI model mice, and the effect is the most significant at the dose of 20 mg/kg.

**[Key words]** Traumatic brain injury; Ginsenoside Rg1; Mice; Nervoinflammation; Ethology

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 主要是由外部机械力引起的脑组织病理学改变或脑功能障碍<sup>[1]</sup>, 如果不及时治疗, 将导致长期的认知问题, 影

响患者进行日常活动和重返工作的能力<sup>[2]</sup>。目前, TBI 已成为重要的全球公共卫生问题, 每年至少有 1 000 万例住院或死亡的 TBI 患者<sup>[3]</sup>。

目前, 针对TBI的治疗方法及药物大多局限于康复性或姑息性, 尚无法有效恢复神经功能<sup>[4]</sup>。人参皂苷是人参的主要生物活性成分, 具有易提取、成本低等优点, 其显著的神经保护和神经营养作用受到普遍关注。研究发现, 人参皂苷能够发挥抑制神经兴奋性毒性、减轻氧化应激和神经炎症、维持神经递质平衡、促进神经干/祖细胞增殖、促进神经突起生长和神经网络形成等作用, 进而显著改善TBI后继发的神经功能损伤<sup>[5]</sup>。已有研究证实, 人参皂苷的主要成分之一Rg1 (分子式为C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub>, 相对分子量为801.01) 可以修复TBI后被破坏的血脑屏障, 促进体外神经干细胞的增殖、分化, 抑制神经细胞凋亡, 促进神经再生, 若用于颅脑损伤, 可能会减轻神经元的继发性损伤<sup>[6]</sup>。

人参皂苷Rg1能否促进TBI后的神经发生和神经元再生, 并有助于神经功能的恢复, 目前国内尚无相关文献报告。因此, 本研究从小鼠TBI建模后血脑屏障渗漏、神经炎症及神经行为功能等方面, 评估不同剂量人参皂苷Rg1的治疗效果, 以期进一步完善中西医结合治疗TBI的策略并探索人参皂苷Rg1的作用价值, 为临床治疗TBI提供新的理论基础和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF级雄性BALB/c小鼠67只, 6~8周龄, 体重25~30 g, 由空军军医大学实验动物中心[SCXK(陕)2019-001]提供, 均饲养于空军军医大学实验动物中心屏障环境[SYXK(陕)2019-001], 室温控制在24~26℃, 光线每12 h明暗交替, 自由进食, 每周更换2次垫料。相关动物实验方案通过空军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(审批号: IACUC-20220830)。

### 1.2 主要试剂与仪器

人参皂苷Rg1 (粉剂, 规格1 g, 纯度≥98%, 批号22427-39-0) 购自上海源叶生物科技有限公司; 先用二甲基亚砜(DMSO)溶液将人参皂苷Rg1配制成质量浓度为400 mg/mL的母液, 然后用生理盐水(即0.9% NaCl溶液)稀释为1、2、4 mg/mL, -20℃避光保存备用; 用药前根据动物体重和目标剂量10、20、40 mg/kg计算相应的给药体积。

抗基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)抗体(Ab283575)、抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(Ab68428)

和抗离子钙结合衔接分子1(ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba-1)抗体(Ab178846)均为英国Abcam公司产品; DyLight 594荧光标记二抗购自美国Genetex公司; Cy3荧光染料(EK012)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, 10 μg/mL)及BCA蛋白浓度测定试剂盒(PA115-02)购自北京雷根生物技术有限公司; 蛋白提取试剂盒(P0033)购自上海碧云天生物技术有限公司; SDS凝胶试剂盒(EC0004)为山东思科捷生物技术有限公司产品; 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(YA1701)为美国Millipore公司产品; 辣根过氧化物酶标记的二抗IgG(AT0001)为美国Engibody公司产品。

激光共聚焦显微镜(型号LSM800)为德国Carl Zeiss AG公司产品; 脑立体定位仪(型号51730)为美国Stoelting公司产品; 颅脑损伤打击器(型号68099 II)、高架十字迷宫(型号63010)和水迷宫(型号63003)等行为学设备, 以及冰冻切片机(型号FS800A/FS800)均为深圳市瑞沃德生命科技有限公司产品。

### 1.3 TBI动物模型建立及评价

27只小鼠经适应性饲养1周后, 随机分为空白组、假手术组、TBI模型组, 每组9只。术前所有动物禁食12 h, 但自由饮水。TBI模型组根据文献[7-8], 采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型: 经异氟烷麻醉后固定小鼠于脑立体定位仪上, 在两耳之间正中做一矢状切口, 暴露前正中线及前囟点, 在前囟后1 mm, 前正中线左侧2 mm, 做直径3 mm的颅骨切除手术, 暴露硬脑膜, 注意在开颅过程中保持硬脑膜完整性; 将颅脑损伤打击器的撞击头(直径2 mm)移至该坐标点, 调节并校正打击零界面, 设置打击参数为打击速度5.6 m/s, 深度1.5 mm, 直径2 mm, 打击停留时间1 s, 造成左脑初级视觉皮层损伤; 撞击后及时止血并缝合头皮。假手术组只进行开颅但不撞击。通过脑组织缺损观察和行为学测试评价TBI模型建立效果。

### 1.4 药物干预及评价

40只小鼠随机分为假手术组、人参皂苷Rg1治疗组(3个剂量)和溶剂DMSO对照组, 每组8只小鼠。假手术组只进行开颅但不撞击; Rg1治疗组小鼠在TBI手术后6 h, 腹腔注射剂量分别为10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg的人参皂苷Rg1; 溶剂对照组给予等量的1% DMSO。连续给药1周, 每天2次。观察各组小鼠的饮食情况、体重变化等特征, 记录其肢体运动、角膜反



射、耳廓反射等基本情况。然后通过蛋白质印迹、行为学测试、免疫荧光染色评价药物作用。

### 1.5 小鼠行为学观察

随机选用手术建模后的每组9只实验小鼠以及用药干预后的每组8只小鼠,进行以下行为学实验。

(1) 神经功能评分:在TBI建模后第1、3、7、14天进行改良的神经损伤严重程度评分(modified neurological severity scores, mNSS)。根据参考文献[9-11]的神经功能评分判定标准:每出现一个异常行为或缺乏测试条件反射,就得1分;评分范围0~18,分数越高,提示损伤越严重;总分为0分表示正常,1~6分表示轻度损伤,7~12分表示中度损伤,13~18分表示严重损伤。

(2) 高架十字迷宫实验:TBI后14 d将小鼠置于高架十字迷宫装置的中心(直径10 cm、臂长45 cm),由Smart 3.0行为学检测系统分别记录5 min内小鼠在开放臂及闭合臂的行动路程及探索时间,以评估焦虑及探索行为。

(3) 水迷宫实验:在神经功能评分及高架十字迷宫实验后,让动物休息2 d。然后,采用海马依赖性行为任务的水迷宫实验来研究小鼠的空间学习和记忆能力。正式实验前所有小鼠自由游泳120 s,用以排除与年龄相关的视觉缺陷和运动能力缺陷。然后进行为期4 d、每天4次、每次60 s的训练,根据随机数字表选择任一象限作为入水点,面向池壁将小鼠放入水中,小鼠在添加非过敏性黑色水粉颜料的圆柱形水池(直径120 cm,高度60 cm)中找到位于水面以下2 cm(24 °C)的水下平台(直径10 cm)。如果在60 s内未找到平台,则将动物引导至平台并停留15 s。使用视频跟踪系统记录小鼠寻找平台所需时间。在第5天进行一次60 s的探测试验:将平台从池中移出,将小鼠从平台所在象限对侧放入水池,记录小鼠在原平台所在象限的停留时间、穿越平台次数及运动路程,以评估各组小鼠的空间学习及运动能力。

### 1.6 脑损伤观察及脑组织取材

TBI手术后第28天,小鼠经麻醉后开胸,剪开右心耳,同时左心室插管,先灌注生理盐水(即0.9%NaCl溶液)100 mL,然后换用质量分数4%的多聚甲醛溶液灌注250 mL。断头后完整取脑,各组随机取2只小鼠脑组织用于观察组织缺损。

再随机选取各组3只小鼠脑组织,放置于4%多聚甲醛溶液中,4 °C温度下保存至少24 h。然后分别用梯度蔗糖溶液进行脱水,在FS800A/FS800冰冻切片机

上行冠状连续切片,用于免疫荧光染色。切片厚度为20 μm,置于-20 °C保存。

### 1.7 免疫荧光染色及激光共聚焦观察

将切片在PBS(pH 7.4)中洗涤5 min,用0.2% Triton 20通透10 min,然后进行免疫荧光标记处理。切片在2% BSA中孵育1 h后,加入一抗4 °C孵育过夜(GFAP和Iba-1抗体的工作液稀释比例分别为1:250、1:500)。第2天在PBS中洗涤3次,将切片与相应的二抗(Dylight 594和Cy3荧光标记的二抗工作液稀释比例均为1:500)在室温下避光孵育2 h。切片在PBS中洗涤3次,每次5 min,避光。细胞核用DAPI溶液(10 μg/mL)染色8 min,然后用甘油明胶进行封片。使用激光共聚焦显微镜拍摄照片,并使用Image J软件分析区域内阳性细胞数。

### 1.8 蛋白质印迹法检测相关蛋白表达

TBI手术后第3天,各组取3只小鼠损伤部位的新鲜脑组织,采用蛋白提取试剂盒提取蛋白质。提取的蛋白质于-70 °C保存备用。用BCA蛋白定量法检测样品蛋白质浓度,取50 μg蛋白质加入2×SDS凝胶加样缓冲液中,将样品经10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶60 V 30 min,分离胶120 V 1 h)分离。分离后的蛋白质在120 V恒压状态下2 h电转移至PVDF膜。PVDF膜在5%脱脂奶粉溶液中,37 °C封闭2 h。分别加入相应的抗MMP-9一抗(工作液稀释比例为1:2 000),与PVDF膜在4 °C培育过夜,与辣根过氧化物酶标记的二抗IgG(工作液稀释比例为1:4 000)于37 °C孵育2 h。采用化学发光底物进行化学发光,暗室曝光,显影定影后用Bio-RAD Quantity One图像分析软件进行扫描分析。

### 1.9 统计学处理

采用SPSS 22.0和GraphPad Prism 8.4.0软件进行数据统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较使用两因素方差分析,应用LSD-*t*检验进行组内两两比较,以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

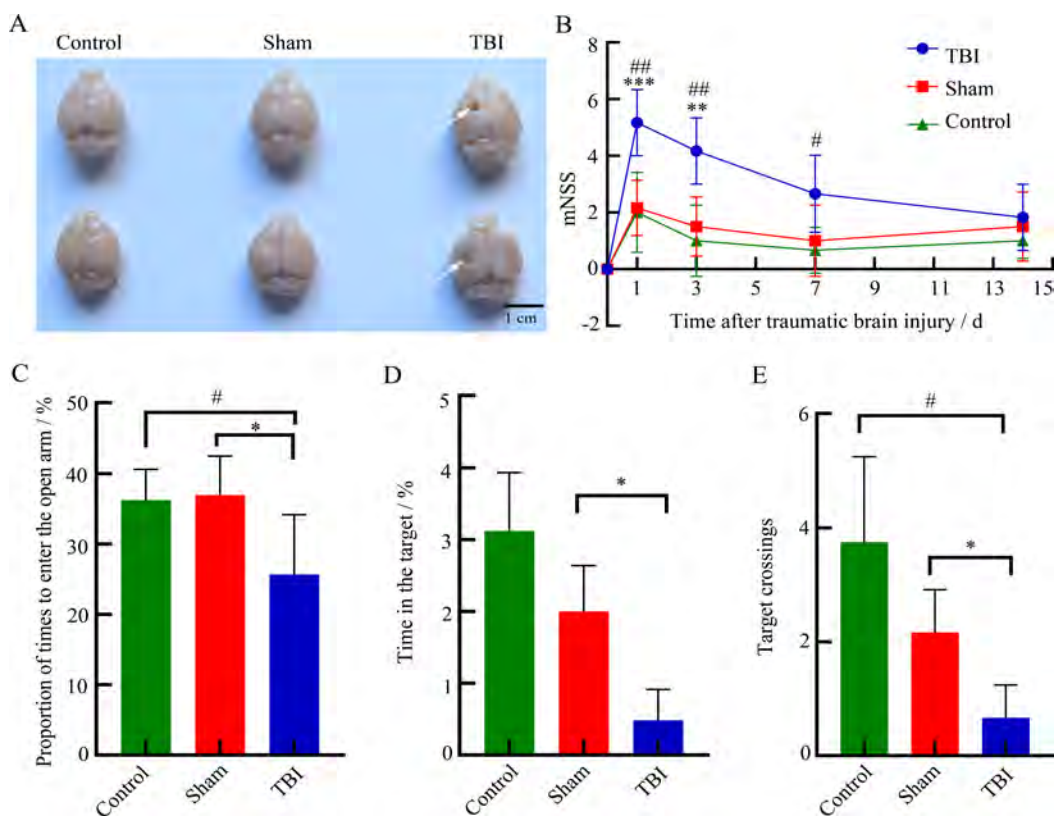
## 2 结果

### 2.1 成功建立TBI模型

本实验通过脑组织观察、神经功能评分及高架十字迷宫、水迷宫等行为学实验评价受控皮质冲击手术后小鼠的学习、认知及运动功能以确认TBI模型是否成功建立。脑损伤后灌注取脑观察,可见明显的脑挫伤部位(图1A);TBI模型组小鼠的神经功能评分显著

高于假手术组 ( $P < 0.01$ , 图1B), 进入开放臂次数比例显著低于假手术组 ( $P < 0.05$ , 图1C), 水迷宫实验中其在平台所在象限的时间比及穿越平台的次数均显

著少于假手术组 ( $P < 0.05$ , 图1D~E)。结果表明TBI后小鼠神经功能受损, 出现了学习、认知及运动功能障碍。



注: A, 脑组织损伤情况观察 (白色箭头所指为TBI后脑组织缺损); B, 神经功能评分 (mNSS即改良的神经损伤严重程度评分); C, 高架十字迷宫实验; D~E, 水迷宫实验。Control即不进行任何处理组; Sham即假手术组; TBI即采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型组, 每组9只小鼠。与Sham组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ; 与Control组相比,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。

Note: A, Observation of brain tissue injury (the white arrow refers to damaged brain region by TBI); B, Neurological function score (mNSS is the improved nerve injury severity score); C, Elevated cross maze experiment; D-E, Water maze experiment. Control is the blank group without any treatment; Sham is the sham operation group; TBI is TBI modeling group by controlled cortical impact method, with 9 mice in each group. Compared with the sham group,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ; Compared with control group,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .

图1 小鼠创伤性脑损伤模型的建立与评估

Figure 1 Establishment and evaluation of traumatic brain injury (TBI) model in mice

## 2.2 人参皂苷Rg1改善脑损伤后血脑屏障功能

蛋白质印迹法检测各组小鼠脑组织中血脑屏障功能指标MMP-9蛋白的表达情况, 结果显示, 与假手术组相比, TBI模型组MMP-9蛋白水平略升高, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图2); 而与溶剂DMSO对照组相比, 经过10~40 mg/kg的人参皂苷Rg1治疗后MMP-9蛋白表达量均明显下降 (均  $P < 0.01$ , 图2)。结果提示10~40 mg/kg人参皂苷Rg1能够明显改善脑损伤后的血脑屏障功能。

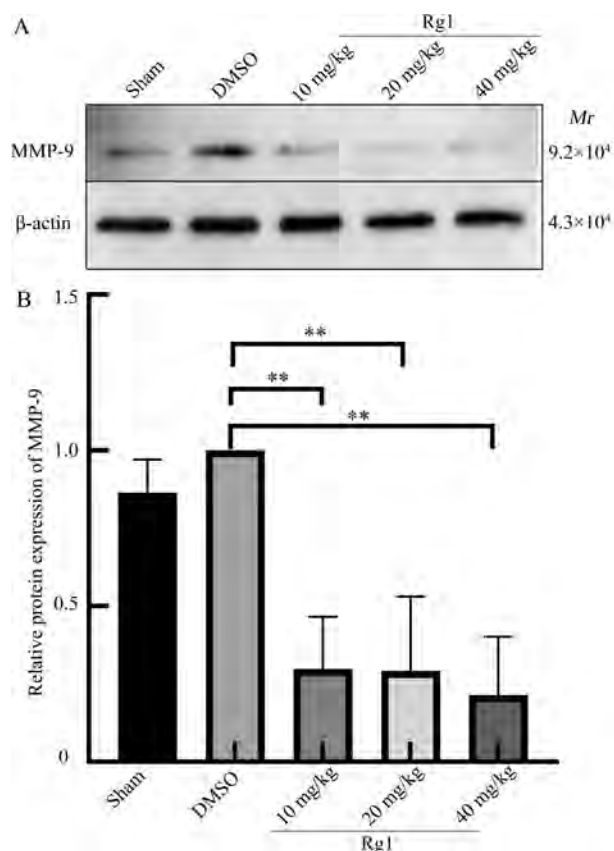
## 2.3 人参皂苷Rg1改善脑损伤后神经炎症

通过免疫荧光染色检测发现, TBI建模28 d的小鼠

脑组织中小胶质细胞 (Iba-1 阳性标记) 及星形胶质细胞 (GFAP 阳性标记) 在病变区域显著富集, 相应地在假手术组小鼠脑组织中未看到Iba-1和GFAP明显表达; 与溶剂DMSO对照组相比, 经过10~40 mg/kg的人参皂苷Rg1治疗后TBI小鼠脑组织中小胶质细胞及星形胶质细胞活化均显著减少 (均  $P < 0.05$ , 图3), 尤以20 mg/kg效果最显著 ( $P < 0.01$ )。

## 2.4 人参皂苷Rg1改善脑损伤后小鼠行为学功能

在TBI造模之前, 各组之间的神经功能评分没有差异 (图4A)。TBI造模后第1天、第3天溶剂DMSO对照组小鼠的神经功能评分显著高于假手术组 ( $P <$



注: MMP-9, 基质金属蛋白酶-9。Sham 即假手术组; DMSO 即采用受控皮质冲击方法建立小鼠 TBI 模型后的溶剂对照组; 10、20、40 mg/kg Rg1 即采用受控皮质冲击方法建立小鼠 TBI 模型后的 10、20、40 mg/kg 人参皂苷 Rg1 灌胃治疗组, 每组 8 只小鼠。与 DMSO 组相比,  $**P < 0.01$ 。

Note: MMP-9, matrix metalloproteinase-9. Sham is the sham operation group; DMSO is the solvent control group after TBI modeling by controlled cortical impact method; 10 mg/kg, 20 mg/kg, and 40 mg/kg Rg1 are 10, 20, 40 mg/kg of ginsenoside Rg1 treatment groups after TBI modeling by controlled cortical impact method, with 8 mice in each group. Compared with DMSO group,  $**P < 0.01$ .

**图2 人参皂苷 Rg1 对小鼠创伤性脑损伤后血脑屏障的影响**  
**Figure 2 Effect of ginsenoside Rg1 on blood-brain barrier after traumatic brain injury (TBI) in mice**

0.01), 表明 TBI 建模后小鼠神经损伤严重。而与溶剂对照组相比, 经过 10~40 mg/kg 的人参皂苷 Rg1 治疗后, 小鼠神经功能评分显著降低 ( $P < 0.05$ )。从第 7 天到第 14 天, 各剂量人参皂苷 Rg1 治疗组小鼠的神经功能评分与假手术组小鼠相比逐渐没有显著性差异, 表明经过较长时间的 Rg1 治疗 TBI 小鼠的神经功能逐渐恢复 (图 4A)。

高架十字迷宫实验显示, 与假手术组相比, TBI 建模后溶剂 DMSO 对照组小鼠进入开放臂次数比例显著降低 ( $P < 0.01$ ); 而 20~40 mg/kg 的人参皂苷 Rg1 治疗

后小鼠进入开放臂次数的比例显著高于溶剂对照组 ( $P < 0.05$ ), 其中 20 mg/kg 组与假手术组小鼠相比已无显著差异 ( $P > 0.05$ , 图 4B), 提示人参皂苷 Rg1 改善了 TBI 后小鼠的焦虑情绪。

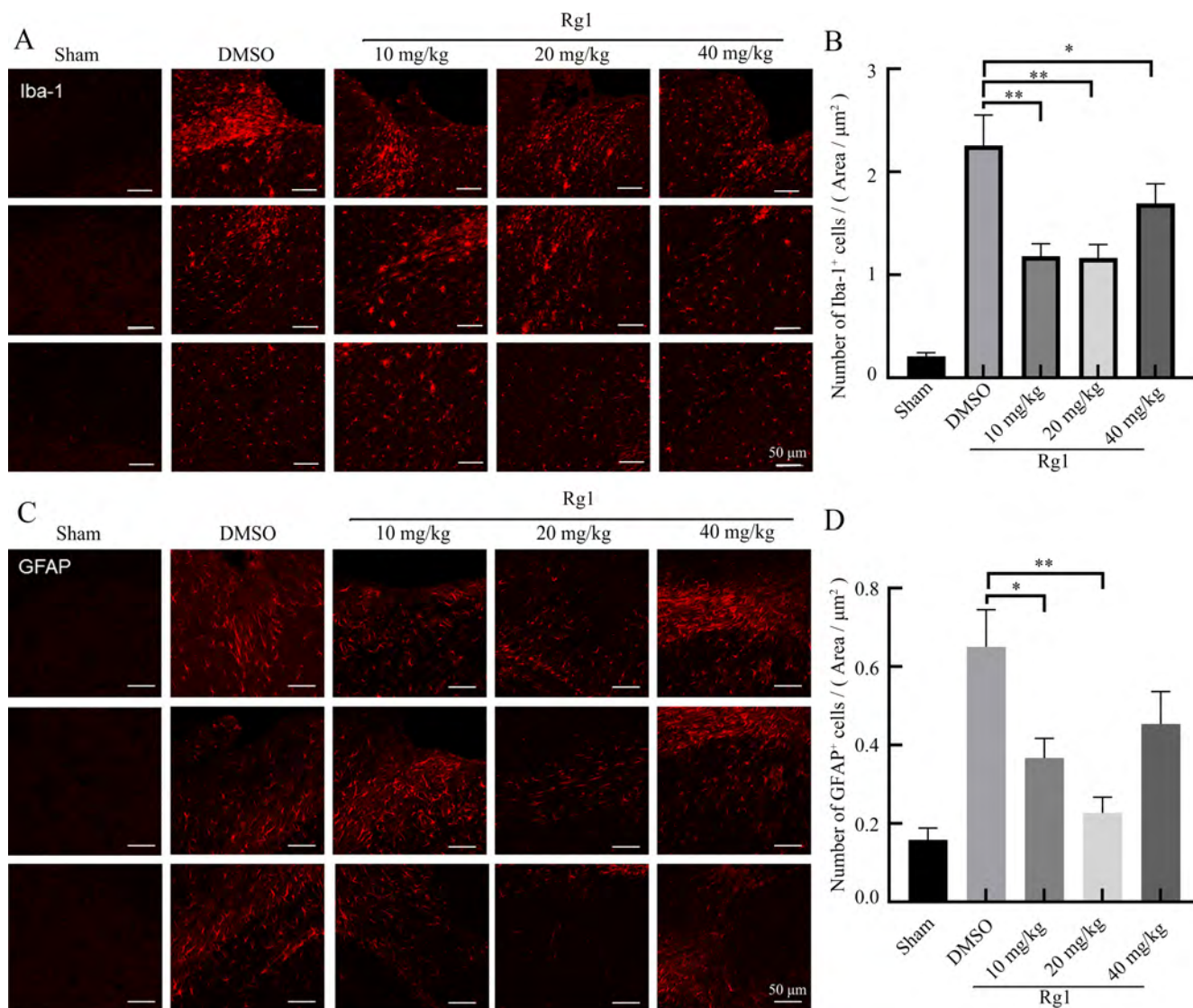
水迷宫实验显示, 在隐藏平台获取阶段, 几乎所有组小鼠都表现为潜伏期逐渐缩短, 表明受试小鼠可以了解平台的位置。但与溶剂 DMSO 对照组相比, 20 mg/kg 人参皂苷 Rg1 治疗组小鼠的逃逸潜伏期明显减少 ( $P < 0.05$ , 图 4C)。在第 5 天训练试验后 24 h 进行了无平台探测测试, 结果显示 20、40 mg/kg 人参皂苷 Rg1 治疗组小鼠的平台穿越次数显著高于溶剂 DMSO 对照组小鼠 ( $P < 0.05$ , 图 4D)。实验结果提示人参皂苷 Rg1 治疗显著改善了 TBI 小鼠的空间学习和记忆能力。

### 3 讨论

TBI 往往以各种形式出现, 继而引起中枢神经系统长期且严重损伤。根据损伤的严重程度不同, 针对 TBI 的治疗方法也大有不同, 同时治疗手段需要不断更新<sup>[12]</sup>。从日常认知疗法到根治性手术, 都需要根据具体情况来制定合适的治疗方案, 而中医药作为辅助治疗手段也能发挥明显功效。其中, 人参因其“补五脏、镇静身心”的功效被广泛用于治疗精神障碍<sup>[13]</sup>。作为人参主要活性成分之一的人参皂苷 Rg1 具有抗炎、抗氧化、神经保护等多种药理活性, 已被证明在几种神经疾病动物模型中可用作神经保护剂, 改善认知和记忆功能障碍<sup>[14]</sup>。在目前的相关研究中, 人参皂苷 Rg1 的应用剂量多为 5~60 mg/kg, 其中 20~40 mg/kg 剂量效果较为显著<sup>[15-18]</sup>。因此本实验采用文献[7-8]报告的受控皮质冲击方法制备精确模拟 TBI 的小鼠模型, 并通过脑组织缺损观察及相关行为学实验验证 TBI 模型建立成功与否, 然后在 TBI 模型构建成功 6 h 后进行 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg 人参皂苷 Rg1 干预, 并对人参皂苷 Rg1 的最佳药物作用剂量进行探索。

据报告, 血脑屏障破坏是由脑血管内皮细胞间的紧密连接与完整的血管系统相断开所导致<sup>[19]</sup>, 且这种破坏进一步引起了正常神经元生理学微环境的恶化。在大脑中, 基质金属蛋白酶对组织形成、神经元网络重塑和血脑屏障完整性至关重要, 目前研究得最明确的是 MMP-2 和 MMP-9<sup>[20]</sup>。虽然药代动力学研究表明人参皂苷 Rg1 不能被充分转运穿过血脑屏障<sup>[21]</sup>, 但在一些研究中仍然发现人参皂苷 Rg1





注：A ~ B为免疫荧光染色法检测各组小鼠脑组织中Iba-1蛋白表达（反映小胶质细胞活性），以及其阳性表达细胞数的统计图；C ~ D为免疫荧光染色法检测各组小鼠脑组织中GFAP蛋白表达（反映星形胶质细胞活性），以及其阳性表达细胞数的统计图。A和C图中，各组上中下3个照片分别表示3只小鼠脑组织中相似层面的3个切片。Sham即假手术组；DMSO即采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型后的溶剂对照组；10、20、40 mg/kg即采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型后的10、20、40 mg/kg人参皂苷Rg1灌胃治疗组，每组8只小鼠。与DMSO组相比，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

Note: A-B show ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) protein expression (reflecting microglia activity) and the number of Iba-1 positive cells in brain tissues of mice in each group detected by immunofluorescence staining. C-D show glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression (reflecting the activity of astrocytes) and the number of GFAP positive cells in the brain tissue of mice in each group detected by immunofluorescence staining. In Figures A and C, the top, middle, and bottom three photos in each group show three slices of similar layers in the brain tissue of three mice. Sham is the sham operation group; DMSO is the solvent control group after TBI modeling by controlled cortical impact method; 10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg Rg1 are 10, 20, 40 mg/kg of ginsenoside Rg1 treatment groups after TBI modeling by controlled cortical impact method, with 8 mice in each group. Compared with DMSO group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

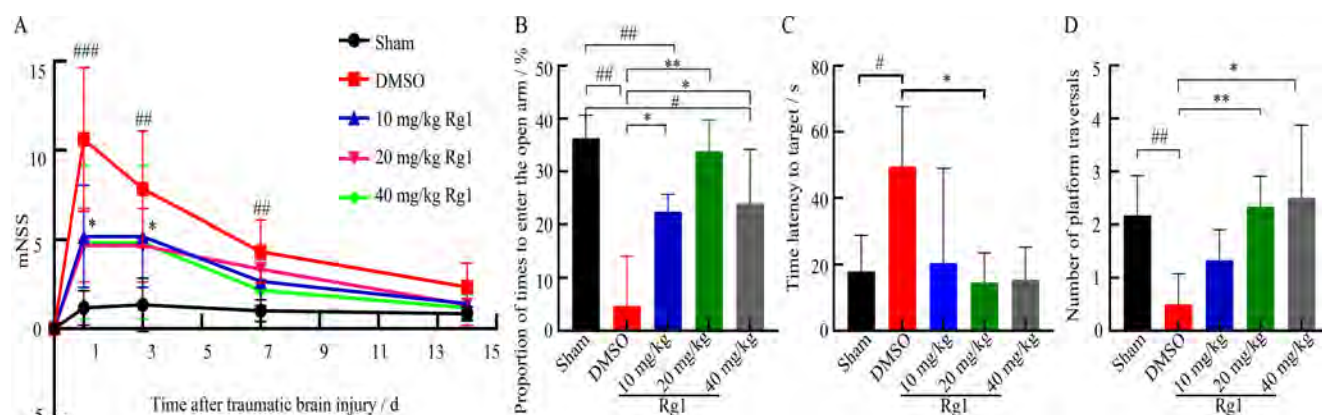
图3 人参皂苷Rg1对小鼠创伤性脑损伤28 d后小胶质细胞及星形胶质细胞的影响

Figure 3 Effect of ginsenoside Rg1 on microglia and astrocytes 28 d after traumatic brain injury (TBI) in mice

可以加速基质金属蛋白酶水解，进而发挥减轻脑血管内皮损伤的作用，保护血脑屏障的完整性，具有良好的治疗TBI的潜力<sup>[18]</sup>。本实验中选用MMP-9作为反映血脑屏障变化的标志物，结果显示TBI损伤

后MMP-9表达显著增加，而经过人参皂苷Rg1干预后MMP-9表达又明显减少，证实人参皂苷Rg1具有改善血脑屏障破坏的效能。

神经炎症是TBI后继发性反应的主要病理过程。



注：A，mNSS神经功能评分；B，高架十字迷宫实验；C~D，水迷宫实验。Sham即假手术组；DMSO即采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型后的溶剂对照组；10、20、40 mg/kg即采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型后的10、20、40 mg/kg人参皂苷Rg1灌胃治疗组，每组8只小鼠。与Sham组比较， $^*P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ ；与DMSO组比较， $^*P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ 。

Note: A, mNSS neurological function score; B, Elevated cross maze experiment; C-D, water maze experiment. Sham is the sham operation group; DMSO is the solvent control group after TBI modeling by controlled cortical impact method; 10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg Rg1 are 10, 20, 40 mg/kg of ginsenoside Rg1 treatment groups after TBI modeling by controlled cortical impact method, with 8 mice in each group. Compared with Sham group,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ; compared with DMSO group,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ .

图4 人参皂苷Rg1对创伤性脑损伤后小鼠行为学功能的影响

Figure 4 Effect of ginsenoside Rg1 on behavioral performance in mice after traumatic brain injury (TBI)

星形胶质细胞和小胶质细胞通常是在TBI之后最先出现的能够反映神经炎症的细胞类型，可分泌各种细胞因子、趋化因子和生长因子，并在中枢神经系统损伤后发生形态学变化，因此这两种细胞的激活都被认为是大脑损伤反应的生物标志<sup>[22-23]</sup>。小胶质细胞是中枢神经系统中的固有免疫细胞。在病理条件下，小胶质细胞是导致脑外伤后炎症反应的最重要的细胞类型之一。脑损伤后小胶质细胞被迅速激活并启动各种炎症级联反应以恢复组织稳态。星形胶质细胞对损伤反应的增加被称为星形胶质细胞增生<sup>[24]</sup>，这种反应包括形态学变化、中间丝蛋白、GFAP和波形蛋白的表达增加，且这种反应性胶质增生在损伤后可维持长达60 d<sup>[25]</sup>。本实验通过免疫荧光染色观察到，在TBI后28 d小鼠大脑损伤区域及附近有大量Iba-1标志的小胶质细胞及GFAP标志的星形胶质细胞富集，形成胶质瘢痕，影响神经纤维和神经元再生。经过人参皂苷Rg1治疗后Iba-1、GFAP阳性细胞数量减少，荧光强度下降，表明人参皂苷Rg1有助于改善TBI后的局部神经炎症。

学习和记忆障碍等认知缺陷是TBI后最重要的后遗症之一<sup>[26]</sup>。神经功能评分、高架十字迷宫、水迷宫实验是评估啮齿类动物神经功能最常用的方法，因此本实验采用这3种行为学实验分别从初步的神经功能、

焦虑情绪到深层的学习记忆等3个方面评估人参皂苷Rg1的作用。结果发现，在TBI后第1天和第3天即TBI急性期，溶剂DMSO对照组小鼠的神经功能评分显著高于假手术组，从第7天到第14天逐渐与假手术组无明显差异，表明在TBI急性期内神经功能严重缺损，而后有自限性恢复的趋势。但是经过人参皂苷Rg1治疗的TBI小鼠的神经功能评分在第1、3天即显著低于溶剂DMSO对照组小鼠，各剂量组无显著差异。高架十字迷宫实验结果显示溶剂DMSO对照组小鼠焦虑情绪严重、学习探索能力降低，具体表现为进入开放臂的次数比例显著降低，人参皂苷Rg1治疗后这种情况显著改善，且以20 mg/kg剂量组效果最为显著。水迷宫实验结果显示，各组小鼠在寻找平台的潜伏期均逐渐缩短，表明实验小鼠可以了解平台的位置；在训练期结束撤除平台后的探查实验中，与溶剂DMSO对照组小鼠相比，人参皂苷Rg1治疗组小鼠的逃逸潜伏期显著较短（各剂量组之间无显著差异），且人参皂苷Rg1治疗组小鼠的平台穿越次数显著多于溶剂DMSO对照组，表明人参皂苷Rg1治疗可改善TBI后小鼠的空间记忆能力，且以20 mg/kg剂量的作用效果最为显著。

综上所述，人参皂苷Rg1具有明显的神经保护作用，可显著改善TBI后的血脑屏障破坏、神经炎症等继发性损伤，可能起到修复神经功能的良好作用。

**[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空军军医大学科学伦理委员会的审核批准(批号 IACUC-20220830)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by the Scientific Ethics Committee of Air Force Medical University (Approval Letter No. IACUC-20220830). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017). *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018) and so on.

**[作者贡献 Author Contribution]**

郭文文负责方案策划、动物实验、数据处理、软件处理、初稿写作及修改;

赵亚、王颖花负责方法设计、提供资源和动物实验;

刘可负责文献支持;

葛煦、张延英负责提供资源和方法设计;

汪永锋、师长宏负责有效验证、项目管理、监督指导、提供资源,以及稿件核定。

**[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] LANGLOIS J A, RUTLAND-BROWN W, WALD M M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview[J]. *J Head Trauma Rehabil*, 2006, 21(5):375-378. DOI: 10.1097/00001199-200609000-00001.
- [2] KATZ D I, BERNICK C, DODICK D W, et al. National institute of neurological disorders and stroke consensus diagnostic criteria for traumatic encephalopathy syndrome[J]. *Neurology*, 2021, 96(18): 848-863. DOI: 10.1212/WNL.00000000000011850.
- [3] SILVERBERG N D, IACCARINO M A, PANENKA W J, et al. Management of concussion and mild traumatic brain injury: a synthesis of practice guidelines[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2020, 101(2):382-393. DOI: 10.1016/j.apmr.2019.10.179.
- [4] GALGANO M, TOSHEKI G, QIU X C, et al. Traumatic brain injury: current treatment strategies and future endeavors[J]. *Cell Transplant*, 2017, 26(7): 1118-1130. DOI: 10.1177/0963689717714102.
- [5] AHMED T, RAZA S H, MARYAM A, et al. Ginsenoside Rb1 as a neuroprotective agent: a review[J]. *Brain Res Bull*, 2016, 125: 30-43. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.04.002.
- [6] GAO J, BAI H J, LI Q, et al. In vitro investigation of the mechanism underlying the effect of ginsenoside on the proliferation and differentiation of neural stem cells subjected to oxygen-glucose deprivation/reperfusion[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(1):353-363. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3253.
- [7] WU Y X, WU H J, ZENG J X, et al. Mild traumatic brain injury induces microvascular injury and accelerates Alzheimer-like pathogenesis in mice[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2021, 9(1):74. DOI: 10.1186/s40478-021-01178-7.
- [8] CUI W X, WU X, FENG D Y, et al. Acrolein induces systemic coagulopathy via autophagy-dependent secretion of von willebrand factor in mice after traumatic brain injury[J]. *Neurosci Bull*, 2021, 37(8):1160-1175. DOI: 10.1007/s12264-021-00681-0.
- [9] CHEN Y F, LI J, MA B T, et al. MSC-derived exosomes promote recovery from traumatic brain injury via microglia/macrophages in rat[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(18):18274-18296. DOI: 10.18632/aging.103692.
- [10] LONG X B, YAO X L, JIANG Q, et al. Astrocyte-derived exosomes enriched with miR-873a-5p inhibit neuroinflammation via microglia phenotype modulation after traumatic brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):89. DOI: 10.1186/s12974-020-01761-0.
- [11] ZHANG Y L, ZHANG Y, CHOPP M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve functional recovery in rats after traumatic brain injury: a dose-response and therapeutic window study[J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2020, 34(7):616-626. DOI: 10.1177/1545968320926164.
- [12] ARAKI T, YOKOTA H, MORITA A. Pediatric traumatic brain injury: characteristic features, diagnosis, and management[J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2017, 57(2):82-93. DOI: 10.2176/nmc.ra.2016-0191.
- [13] 雷助明. 人参皂苷 Rg1 对新生鼠缺氧缺血性脑损伤海马神经元凋亡及学习记忆能力的影响[J]. *中国中西医结合儿科学*, 2018, 10(4): 277-279. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3865.2018.04.001. LEI X M. Effects of ginseng Rg1 on hippocampal neuronal apoptosis and learning ability of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Chin Pediatr Integr Tradit West Med*, 2018, 10(4): 277-279. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3865.2018.04.001.
- [14] SONG X Y, HU J F, CHU S F, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates okadaic acid induced spatial memory impairment by the GSK3 $\beta$ /tau signaling pathway and the A $\beta$  formation prevention in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 710(1-3): 29-38. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.03.051.
- [15] ZOU S F, CHEN W, DING H, et al. Involvement of autophagy in the protective effects of ginsenoside Rb1 in a rat model of traumatic brain injury[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2022, 47(6):869-877. DOI: 10.1007/s13318-022-00799-0.
- [16] ZHANG Z R, SONG Z J, SHEN F M, et al. Ginsenoside Rg1 prevents PTSD-like behaviors in mice through promoting synaptic proteins, reducing Kir4.1 and TNF- $\alpha$  in the Hippocampus[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(4): 1550-1563. DOI: 10.1007/s12035-020-02213-9.
- [17] HU B Y, LIU X J, QIANG R, et al. Treatment with ginseng total saponins improves the neurorestoration of rat after traumatic brain injury[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2):1243-1255. DOI: 10.1016/j.jep.2014.07.009.
- [18] ZHAI K F, DUAN H, WANG W, et al. Ginsenoside Rg1



- ameliorates blood-brain barrier disruption and traumatic brain injury via attenuating macrophages derived exosomes miR-21 release[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(11): 3493-3507. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.03.032.
- [19] DHANDA S, SANDHIR R. Blood-brain barrier permeability is exacerbated in experimental model of hepatic encephalopathy via MMP-9 activation and downregulation of tight junction proteins[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(5): 3642-3659. DOI: 10.1007/s12035-017-0521-7.
- [20] REMPE R G, HARTZ A M S, BAUER B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: versatile breakers and makers[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(9):1481-1507. DOI: 10.1177/0271678X16655551.
- [21] LI Y H, MENG Q, YANG M B, et al. Current trends in drug metabolism and pharmacokinetics[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(6):1113-1144. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.10.001.
- [22] XIONG Y, MAHMOOD A, CHOPP M. Animal models of traumatic brain injury[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(2): 128-142. DOI: 10.1038/nrn3407.
- [23] KARVE I P, TAYLOR J M, CRACK P J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4):692-702. DOI: 10.1111/bph.13125.
- [24] SOFRONIEW M V, VINTERS H V. Astrocytes: biology and pathology[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(1):7-35. DOI: 10.1007/s00401-009-0619-8.
- [25] VILLAPOL S, BYRNES K R, SYMES A J. Temporal dynamics of cerebral blood flow, cortical damage, apoptosis, astrocyte-vasculature interaction and astrogliosis in the pericontusional region after traumatic brain injury[J]. *Front Neurol*, 2014, 5:82. DOI: 10.3389/fneur.2014.00082.
- [26] KOLIATSOS V E, RAO V. The behavioral neuroscience of traumatic brain injury[J]. *Psychiatr Clin North Am*, 2020, 43(2): 305-330. DOI: 10.1016/j.psc.2020.02.009.
- (收稿日期:2022-12-06 修回日期:2023-04-13 )  
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,郭家欣)

### 引用本文

郭文文, 赵亚, 王颖花, 等. 人参皂苷 Rg1 在小鼠创伤性脑损伤修复中的作用[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 243-252. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.187.  
GUO W Q, ZHAO Y, WANG Y H, et al. Repairing effects of ginsenoside Rg1 on traumatic brain injury in mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(3): 243-252. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.187.

\*\*\*\*\*

## 《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, 请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



陆涛峰, 博士, 贵州中医药大学副教授, 中国畜牧兽医学会畜禽遗传标记学会理事。2014年博士毕业于中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。2014—2019年在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物与比较医学创新团队从事博士后研究工作。2019年6月起就职于贵州中医药大学实验动物研究所, 主要从事实验动物质量控制与实验动物新资源培育相关研究。参加工作以来, 主持国家自然科学基金青年科学基金项目1项, 国家重点研发计划子课题2项, 贵州省科技支撑计划项目1项, 贵州省教育厅自然科学研究项目1项; 以第一完成人身份获得国家发明专利3项; 获批2项地方标准和1项实验动物团体标准; 作为第一作者发表SCI论文10余篇。

## 广藿香对贵州小型猪血清代谢组的影响及其机制探讨

陆涛峰<sup>1</sup>, 张慧<sup>2</sup>, 周洁<sup>3</sup>, 李倩<sup>1</sup>, 吴曙光<sup>1</sup>, 吴延军<sup>1</sup>

(1. 贵州中医药大学实验动物研究所, 贵阳 550025; 2. 广州中医药大学东莞医院, 东莞 523000; 3. 上海懿尚生物科技有限公司, 上海 201319)

**[摘要]** 目的 基于液相色谱-串联质谱联用 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 技术研究广藿香对贵州小型猪血清代谢的影响, 探讨其药理学作用机制。方法 将9头贵州小型猪随机分为广藿香给药组 (5头) 和对照组 (4头)。广藿香给药组按  $0.5\text{ g}\cdot\text{头}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  剂量通过拌料经口饲喂广藿香中药配方颗粒, 连续给药8 d; 对照组正常饲喂, 不额外给药。用药结束后采集各组动物的血清样品, 采用LC-MS/MS技术分析各组样品的血清代谢物, 对代谢组数据进行注释并与KEGG、HMDB和Lipidmaps数据库比对, 通过偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)、组间聚类、差异代谢物分析和功能富集等生物信息学分析方法, 筛选差异代谢生物标志物及其可能的代谢通路。结果 在广藿香给药组和对照组的血清样本中共鉴定出443个血清代谢物, 筛选出44个差异显著 ( $P<0.05$ ) 的代谢物, 其中显著上调 ( $P<0.01$ ) 的代谢物为肉桂酰甘氨酸、N-苄基-N-异丙基-N'- (4-三氟甲基) 苯尿素、亚牛磺酸、D-葡萄糖-6-磷酸、顺-2-癸烯酸、二十碳二烯酸 (顺-11, 14)、前列腺素A2和10-羟基癸烯酸, 显著下调 ( $P<0.01$ ) 的代谢物为溶血磷脂酰胆碱22:5、溶血磷脂酸22:6和溶血磷脂酸22:5。差异代谢物主要富集在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路 (MapID: map00250), 以及牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路 (MapID: map00430)。结论 广藿香能显著影响贵州小型猪的溶血磷脂酸类物质的代谢, 可能通过影响天冬氨酸-谷氨酸代谢通路、牛磺酸-亚牛磺酸代谢通路, 起到缓解机体氨基酸代谢紊乱、调节炎症反应发生等功能。

**[关键词]** 代谢组学; 广藿香; 贵州小型猪; 中药药理; 作用机制

**[中图分类号]** R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0253-09



## Effects of *Pogostemon cablin* on Serum Metabolomics of Guizhou Miniature Pigs and Its mechanism

LU Taofeng<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>, ZHOU Jie<sup>3</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, WU Shuguang<sup>1</sup>, WU Yanjun<sup>1</sup>

(1. Institute for Laboratory Animal Research, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. Dongguan Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Dongguan 523000, China; 3. Shanghai Yishang Biotechnology Co., LTD., Shanghai 201319, China)

Correspondence to: WU Yanjun (ORCID: 0000-0002-4379-8230), E-mail: 601833449@qq.com

**[基金项目]** 贵州省科技计划项目“贵州香猪疫病监测体系建立及主要疫病防控技术研究”(黔科合支撑[2020]1Y035)

**[第一作者]** 陆涛峰(1982—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 实验动物学。E-mail: taofenglu@163.com。ORCID: 0000-0001-5881-905X;

张慧(1995—), 女, 硕士, 中医师, 研究方向: 中医学。E-mail: mofans318@163.com。ORCID: 0009-0001-9384-9163

**[通信作者]** 吴延军(1987—), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: 601833449@qq.com。ORCID: 0000-0002-4379-8230

**[ABSTRACT] Objective** Based on the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), to study the effects of *Pogostemon cablin* on serum metabolism of Guizhou miniature pigs, and to explore its pharmacological mechanism. **Methods** Nine healthy Guizhou miniature pigs were divided into two groups, namely *Pogostemon cablin* drug group ( $n=5$ ) and control group ( $n=4$ ). The pigs in *Pogostemon cablin* drug group were orally fed with traditional Chinese medicine formula granules, each 0.5 g per day, for consecutive 8 days, while those in control group were given normal feeding without additional treatment. After the feeding experiment, serum samples were collected and analyzed using the LC-MS/MS technology. The metabolomics data was annotated and compared with KEGG, HMDB and Lipidmaps databases. Bioinformatics analysis methods including partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), intergroup clustering, differential metabolite analysis and functional enrichment were used to screen differential metabolic biomarkers and their possible metabolic pathways. **Results** Forty-four differential metabolites ( $P<0.05$ ) were screened out from the 443 metabolites, eight differential metabolites were significantly up-regulated ( $P<0.01$ ), namely cinnamoylglycine, N-benzyl-N-isopropyl-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]urea, hypotaurine, D-glucose 6-phosphate, cis-2-decenoic acid, 11(Z), 14(Z)-eicosadienoic acid, prostaglandin A2 and 10-hydroxydecanoic acid, and three differential metabolites were significantly down-regulated ( $P<0.01$ ), namely lysophosphatidyl choline 22:5, lysophosphatidic acid 22:6 and lysophosphatidic acid 22:5. The differential metabolites were mainly enriched in the metabolic pathways of alanine, aspartate and glutamate metabolism (MapID: map00250) and taurine and hypotaurine metabolism (MapID: map00430). **Conclusion** *Pogostemon cablin* can significantly affect the metabolism of lysophosphatidic acids in porcine, and relieve the disorder of amino acids metabolism and regulate the occurrence of inflammation by affecting the metabolic pathways of alanine, aspartate and glutamate metabolism and taurine and hypotaurine metabolism.

**[Key words]** Serum metabolomics; *Pogostemon cablin*; Guizhou miniature pig; Pharmacology of traditional Chinese medicine; Action mechanism

芳香类中药多具有清热解毒、芳香化湿的功效，能够发挥抗病毒、抗菌、消炎解热及调节免疫功能等作用<sup>[1-2]</sup>，因此常被应用于防治瘟疫的方剂中<sup>[3]</sup>。广藿香 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] 味辛温，归脾、胃、肺经，具有健脾化湿、消食和胃、散邪除暑等功效<sup>[4-5]</sup>。药理学研究显示，广藿香也具有抗炎<sup>[6]</sup>、抗菌<sup>[7]</sup>、抗病毒<sup>[8]</sup>和保护胃肠道正常功能的作用。

在防治新型冠状病毒感染 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 的临床实践中，中医药发挥了积极作用<sup>[9]</sup>。《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第八版）》推荐的中医治疗方案中，藿香或广藿香被频繁使用用于治疗 COVID-19 多种证型（轻型、普通型、重型）的多种方剂（清肺排毒汤、寒湿疫方、宣肺败毒方和化湿败毒方）中<sup>[1,10-11]</sup>。因此，针对广藿香调节机体代谢和免疫，以及抗炎、抗病毒等方面的相关机制研究具有重要意义。

代谢组学分析是利用液相色谱-串联质谱联用 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 技术检测生物系统受到干预后体液中代谢产

物变化的一种简便、快捷的研究方法，例如通过分析在疾病或药物影响下代谢产物及代谢通路的变化，找出代谢产物与生理、病理变化之间的关系<sup>[12-13]</sup>。该方法具有无创性、动态性和接近生理条件的特点。利用代谢组学技术开展中药代谢及药效物质基础研究，能极大地提高中药研究的通量和效率，具有明显的科学意义<sup>[14]</sup>。

小型猪因其在生理学、解剖学、饮食结构和代谢机制等方面与人类极为相似，是构建人类疾病模型的理想实验动物<sup>[15-17]</sup>。因此，本研究通过基于 LC-MS/MS 技术的代谢组学方法，检测防治 COVID-19 的高频中药广藿香在贵州小型猪体内的代谢情况，通过分析广藿香的血清主要代谢产物和代谢通路，初步探讨广藿香发挥作用的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

随机挑选普通级成年贵州小型猪 9 头，1.5~2 岁，体重 (28±3) kg，由贵州中医药大学实验动物研究所 [SCXK (黔) 2021-0003] 提供。实验动物在贵州中医



药大学实验动物研究所普通级动物房 [SYXK (黔) 2021-0005] 单笼饲养, 自由饮水, 基础饲料由贵州台农青印迹饲料发展有限公司 [黔饲证 (2022) 01020] 提供。本研究涉及的所有动物实验方案均已通过贵州中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批号: 20210024)。

## 1.2 主要实验材料

广藿香中药配方颗粒 (批号 160317, 不含其他中药成分) 购自江阴天江药业有限公司, 规格为每袋 0.5 g, 相当于饮片 10 g。LC-MS 级甲醇 (货号 67-56-1)、LC-MS 级甲酸 (货号 64-18-6)、LC-MS 级醋酸铵 (货号 631-61-8) 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, LC-MS 级水 (货号 7732-18-5) 购自德国 Merck 公司。

## 1.3 主要仪器设备

Thermo QE 系列质谱仪 (Q Exactive™ HF-X), Thermo 色谱仪 (Vanquish UHPLC), Thermo 色谱柱 (Hypersil Gold column), Scilogex 低温离心机 (D3024R)。

## 1.4 动物实验及样品采集

将贵州小型猪随机分为 2 组: 广藿香给药组 5 头, 对照组 4 头。适应性饲养 1 周后, 广藿香给药组通过拌料经口饲喂广藿香中药配方颗粒  $0.5 \text{ g} \cdot \text{头}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (相当于每日每头 10 g 广藿香饮片), 每天上午给药 1 次并确定药品完全被口服, 连续给药 8 d; 对照组正常饲喂, 不额外给药。按照 2017 年版《兽药质量标准》推荐广藿香作用于猪的饲喂剂量标准  $5 \sim 10 \text{ g/d}$ , 且为更好地观察给药后差异, 本研究按最大剂量每日每头 10 g 给药。末次给药 24 h 后, 空腹采集每头实验猪的前腔静脉血约 10 mL,  $1\,500 \text{ r/min}$  室温离心 10 min 以分离血清。分别收集广藿香给药组和对照组每只动物的血清样品进行单独的血清代谢组学分析, 血清分析前所有样品暂时保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。

## 1.5 血清代谢组学检测与数据分析

### 1.5.1 样品处理

在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  环境中解冻血清样品后, 取  $100\text{ }\mu\text{L}$  置于 EP 管中, 加入  $400\text{ }\mu\text{L}$  80% 甲醇溶液; 涡旋振荡, 冰浴静置 5 min,  $15\,000 \text{ r/min}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  离心 20 min; 取  $200\text{ }\mu\text{L}$  上清液, 加 LC-MS 级水稀释至甲醇含量为 53%; 于  $15\,000 \text{ r/min}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  离心 20 min, 收集上清液, 上样并进行 LC-MS/MS 分析。

### 1.5.2 色谱条件

色谱柱为 Hyperil Gold column (C18); 柱温  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 流速  $0.2 \text{ mL/min}$ 。正模式流动相 A 为 0.1% 甲酸, 流动相 B 为甲醇; 负模式流动相 A 为  $5 \text{ mmol/L}$  醋酸铵

( $\text{pH } 9.0$ ), 流动相 B 为甲醇。

### 1.5.3 质谱条件

扫描范围选择质荷比 ( $m/z$ )  $70 \sim 1\,050$ 。电喷雾离子源 (electron spray ionization, ESI) 的设置: 电喷雾电压 (spray voltage)  $3.2 \text{ kV}$ ; 鞘气流速 (sheath gas flow rate)  $35 \text{ arb}$ ; 辅助气流速 (aux gasflow rate)  $10 \text{ arb}$ ; 毛细管温度 (capillary temp)  $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Polarity 阴性、阳性。MS/MS 二级扫描设置为数据依赖扫描 (data-dependent scans)。

### 1.5.4 代谢物的鉴定与分析

将 LC-MS/MS 分析获得的下机原始数据导入 Compound Discoverer 3.1 (Thermo Fisher) 软件中, 对保留时间、质荷比等参数进行筛选。然后针对不同样品, 根据保留时间偏差  $0.2 \text{ min}$  和质量数偏差  $5 \times 10^{-6}$  进行峰对齐。随后根据设置的质量偏差  $5 \times 10^{-6}$ 、信号强度偏差 30%、信噪比 3、最小信号强度  $1 \times 10^5$  等信息进行峰提取, 用 blank 样本去除背景离子, 然后将峰值强度归一化为总光谱强度。根据累积离子 (additive ions)、分子离子峰 (molecular ion peaks) 和碎片离子 (fragment ions), 使用归一化数据预测代谢物的分子式。然后将峰图与 mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>)、mzVault 和 Mass List 数据库进行比对, 获得鉴定的定量结果。相关数据分析使用 R 语言 (R version 3.4.3)、Python (Python version 2.7.6) 和 CentOS (CentOS release 6.6) 软件完成。

### 1.5.5 代谢组数据注释及差异代谢物分析

将得到的代谢物分析数据, 使用 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库 (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)、HMDB (Human Metabolome Database) 数据库 (<https://hmdb.ca/metabolites>) 和 LIPID Maps 数据库 (<http://www.lipidmaps.org/>) 进行注释。使用 metaX 软件进行偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)。使用单变量分析 ( $t$  检验) 来计算统计量的显著性 ( $P$  值)。

差异代谢物的筛选主要参考差异倍数 (fold change, FC)、变量对模型的重要性 (variable importance in the projection, VIP) 和  $P$  值这 3 个参数, 其中 VIP 值表示代谢物对分组的贡献度, 为 PLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度。差异代谢物的筛选标准要求  $|\log_2(\text{FC})| \geq 1$ 、 $\text{VIP} \geq 1$  且  $P < 0.05$ , 通过计算  $\log_2(\text{FC})$  和  $-\log_{10}(P\text{-value})$  生成火山图 (volcano plot), 利用火山图反映差异代谢物。使用不同代谢强度区域

的 $z$ 分数( $z$ -scores)对得到的代谢物数据进行归一化处理,使用R语言的热图(Heatmap)包进行聚类分析并绘制热图。差异代谢物之间的相关性、显著性分析及绘图均使用R语言软件完成。利用KEGG数据库分析这些代谢物的功能和代谢途径,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

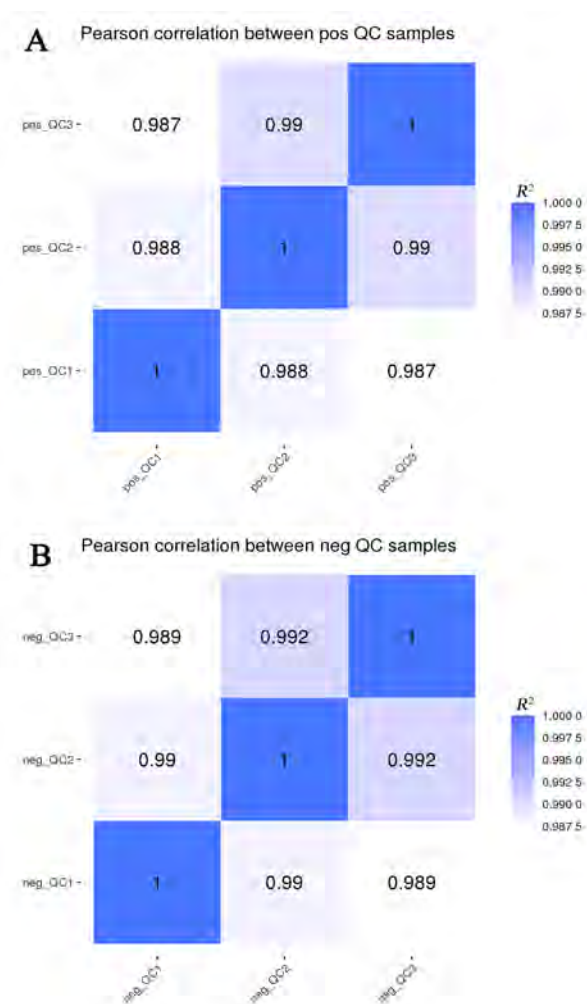
### 2.1 广藿香给药后实验猪血清经LC-MS/MS初步分析的代谢谱

广藿香给药组按照每日每头10 g广藿香饮片的剂量连续给药8 d,对照组正常饲喂,末次给药24 h后,分别收集广藿香给药组和对照组每头实验猪的血清样品,以进行单独的基于LC-MS/MS技术的血清代谢组学分析。为了提高非靶向代谢组数据的可靠性,本研究首先基于代谢物的相对定量值来计算质量控制(quality control, QC)样本之间的pearson相关系数 $R^2$ ,以检验整个检测过程的可靠性和稳定性。比较正负离子模式下QC样本的pearson相关系数 $R^2$ 发现,负离子模式下其 $R^2$ 值更接近于1(图1),且色谱峰的保存时间和相应强度稳定性更好。因此,后续结果分析时主要采用负离子模式的结果。

为了直观表现广藿香给药组和对照组血清代谢物的差异,随机挑选广藿香给药组和对照组血清样本经LC-MS/MS分析后的一个总离子流图进行展示,见图2A。从图中可以看出广藿香给药组和对照组血清代谢物在色谱峰的数量和高度上存在明显差异,且集中出现在14~15.5 s范围。基于广藿香给药组和对照组的代谢物种类和数量的数据,进行PLS-DA分析,结果显示组间和组内聚类情况良好,不同组样本点明显分离(图2B),表明广藿香对贵州小型猪的血清代谢组产生了明显影响。

### 2.2 广藿香给药后实验猪血清代谢物注释

基于负离子模式下广藿香给药组和对照组的代谢物数据,共鉴定出443种代谢产物,所有代谢物的名称、分子式、分子量、保留时间以及相对含量数据详见附表(在本刊官网显示本条文献的附件资料中)。将得到的所有血清样本的代谢物数据与HMDB数据库、KEGG数据库和LIPID Maps数据库进行比对和注释。其中,有156个代谢产物在HMDB数据库上成功比对(图3A),主要为脂类和类脂分子(lipids and lipid-like molecules)、有机酸及其衍生物(organic acids and



注: QC指质量控制样本; pos指阳离子模式; neg指阴离子模式。  
Note: QC, Quality control sample; pos, Positive ion mode; neg, Negative ion mode.

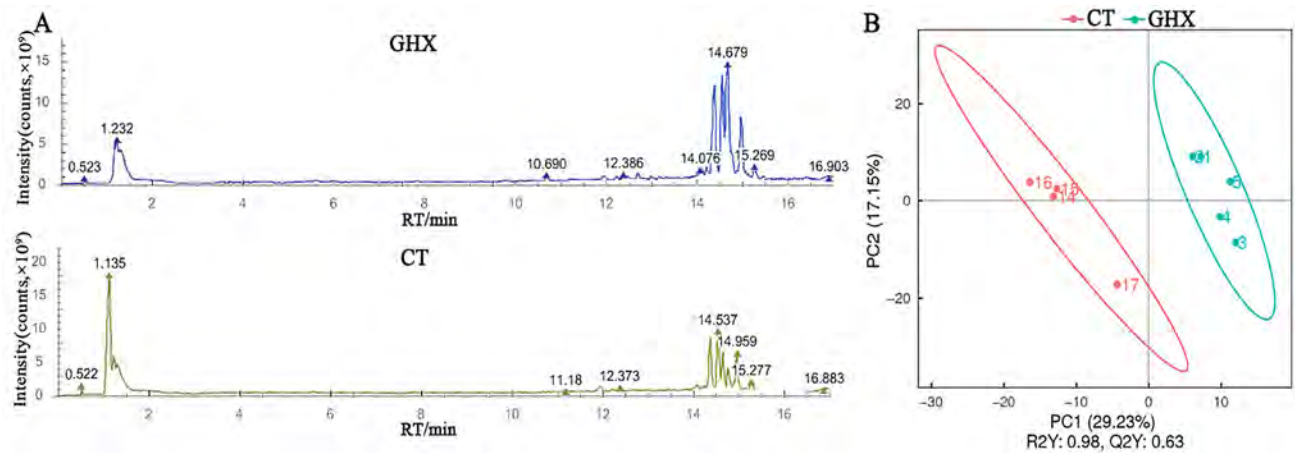
图1 正(A)负(B)离子模式下QC样本的两两相关性分析  
Figure 1 Pairings correlation of QC samples in positive (A) and negative (B) ion mode

derivatives)。有98个代谢产物在KEGG数据库上成功比对(图3B),主要为氨基酸代谢(amino acid metabolism)、脂质代谢(lipid metabolism)和消化系统(digestive system)有关的代谢产物。有128个代谢产物在LIPID Maps数据库上成功比对(图3C),主要为甘油磷酸胆碱(glycerophosphocholines[GP01])、脂肪酸和偶联物(fatty acids and conjugates[FA01])和甘油磷酸酯(glycerophosphates[GP10])。

### 2.3 广藿香给药后实验猪血清差异代谢物分析

#### 2.3.1 差异代谢物筛选

用火山图对广藿香给药组和对照组的差异代谢物进行展示(图4A)。根据上调代谢物的 $\log_2(FC) \geq 1$ 、下调代谢物的 $\log_2(FC) \leq -1$ 、VIP $\geq 1$ 且 $t$ 检验 $P<0.05$ 的标



注：A，负离子模式下的LC-MS/MS总离子流图；B，代谢物的偏最小二乘判别分析（PLS-DA）得分图。GHX为广藿香给药组，CT为不加药、正常饲喂的对照组；RT，治疗时间。

Note: A, LC-MS/MS negative mode scanning total ion flow diagram; B, Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) score map for metabolite data. GHX, *Pogostemon cablin* drug group given 0.5 g/head of traditional Chinese medicine formula granules per day by mixing materials through oral feeding for consecutive 8 days; CT, The control group given normal feeding without additional treatment; RT, Treatment time.

图2 广藿香给药后猪血清代谢物的LC-MS/MS总离子流图(A)及PLS-DA得分图(B)

Figure 2 The results of LC-MS/MS negative mode scanning total ion flow diagram (A) and PLS-DA score map (B) of serum metabolites of pigs after administration of *Pogostemon cablin*

准，筛选出差异显著的代谢物。结果显示，在443个代谢物中共筛选出44个显著差异代谢物（ $P<0.05$ ），其中30个为上调的代谢物，14个为下调的代谢物。这些差异代谢产物中，显著上调（ $P<0.01$ ）的代谢物有8个，分别为肉桂酰甘氨酸、N-苄基-N-异丙基-N'-(4-三氟甲基)苯尿素、亚牛磺酸、D-葡萄糖-6-磷酸、顺-2-癸烯酸、二十碳二烯酸（顺-11,14）、前列腺素A2和10-羟基癸烯酸；显著下调（ $P<0.01$ ）的代谢物有3个，分别为溶血磷脂酰胆碱 22:5

（lysophosphatidyl choline 22:5, LPC 22:5）、溶血磷脂酸 22:6（lysophosphatidic acid 22:6, LPA 22:6）和溶血磷脂酸 22:5（lysophosphatidic acid 22:5, LPA 22:5）。差异代谢物信息如表1所示。

2.3.2 组间聚类分析

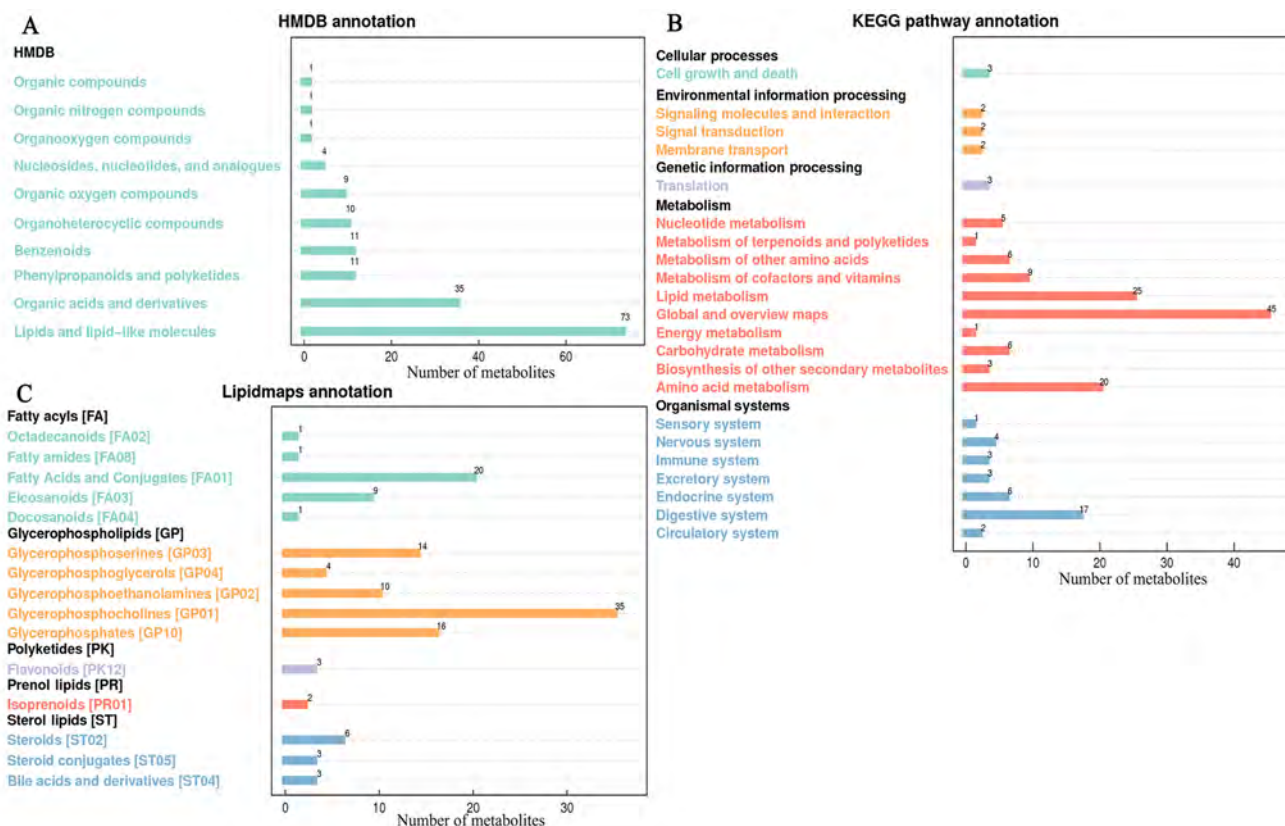
对从广藿香给药组和对照组实验猪血清样本中获得的差异代谢物进行聚类分析，比较两组间代谢物差异情况，结果显示广藿香给药可导致贵州小型猪的代谢水平发生改变（图4B）。与对照组相比，广藿香给

表1 广藿香给药后影响猪血清主要差异代谢物的基本信息

Table 1 The basic information of the main differential metabolites of pigs after administration of *Pogostemon cablin*

| 代谢物<br>Metabolites                                        | 代谢物中文名称<br>Metabolites in Chinese | 保留时间/min<br>Retention time/<br>min | $\log_2$<br>(FC) | P值<br>P value |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------|---------------|
| Cinnamoylglycine                                          | 肉桂酰甘氨酸                            | 8.378                              | 3.670            | 0.001         |
| N-benzyl-N-isopropyl-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl] urea | N-苄基-N-异丙基-N'-(4-三氟甲基)苯尿素         | 4.541                              | 2.217            | 0.005         |
| Hypotaaurine                                              | 亚牛磺酸                              | 14.485                             | 1.703            | 0.008         |
| D-Glucose 6-phosphate                                     | D-葡萄糖-6-磷酸                        | 1.158                              | 1.595            | 0.003         |
| cis-2-Decenoic acid                                       | 顺-2-癸烯酸                           | 12.057                             | 1.536            | 0.002         |
| 11(Z),14(Z)-Eicosadienoic acid                            | 二十碳二烯酸(顺-11,14)                   | 14.820                             | 1.349            | 0.007         |
| Prostaglandin A2                                          | 前列腺素A2                            | 12.727                             | 1.289            | 0.008         |
| 10-Hydroxydecanoic acid                                   | 10-羟基癸烯酸                          | 11.707                             | 1.261            | 0.004         |
| Lysophosphatidyl choline 22:5                             | 溶血磷脂酰胆碱 22:5                      | 14.673                             | -2.190           | 0.002         |
| Lysophosphatidyl acid 22:6                                | 溶血磷脂酸 22:6                        | 14.010                             | -2.201           | <0.001        |
| Lysophosphatidyl acid 22:5                                | 溶血磷脂酸 22:5                        | 14.139                             | -2.361           | 0.003         |





注：A～C分别为HMDB（Human Metabolome Database）数据库、KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）数据库和LIPID Maps数据库的对比注释结果。

Note: A to C are the comparative annotation results of HMDB (Human Metabolome Database) database, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database, and LIPID Maps database, respectively.

图3 广藿香给药后猪血清中差异代谢物的注释结果

Figure 3 Annotation results of serum metabolites of pigs after administration of *Pogostemon cablin*

药组中LPC 22:5、LPA 22:6和LPA 22:5等的含量明显下调，而肉桂酰甘氨酸、N-苄基-N-异丙基-N'-(4-三氟甲基)苯尿素、亚牛磺酸、D-葡萄糖-6-磷酸、顺-2-癸烯酸、二十碳二烯酸（顺-11,14）、前列腺素A2和10-羟基癸烯酸等含量明显上调。相关性分析结果显示，显著性下调的差异代谢产物（LPC 22:5、LPA 22:6、LPA 22:5）之间呈正相关，而与上述显著性上调的差异代谢产物呈负相关，同样显著性上调的差异代谢产物之间呈正相关（图4C）。

### 2.3.3 代谢通路富集分析

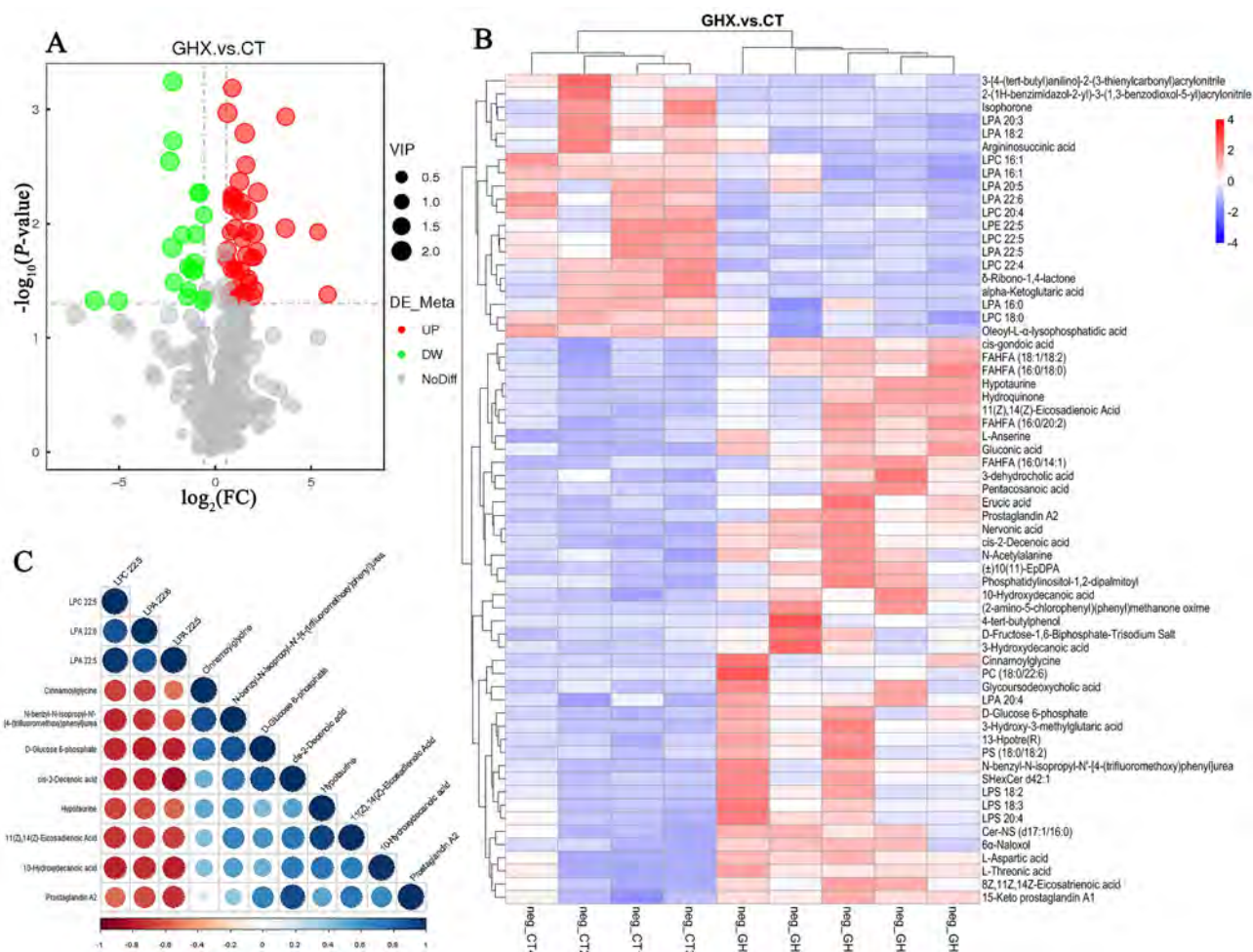
利用KEGG数据库将44个差异代谢物的相关数据进行注释、功能聚类 and 显著性分析，结果显示，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路（MapID: map00250,  $P=0.031$ ）、牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路（MapID: map00430,  $P=0.031$ ）是显著富集的代谢通路（ $P<0.05$ ），其中，L-天门冬氨酸和 $\alpha$ -酮戊二酸是map00250通路的主要差异代谢物， $\alpha$ -酮戊二酸和亚牛

磺酸是map00430通路的主要差异代谢物。

## 3 讨论

血清代谢组学分析技术是通过检测介入因素前后血清中代谢物的变化，分析介入因素影响代谢网络的变化，进而为疾病机制的阐释和新的生物标志物的发现提供依据。对于成分复杂的中医药物，采用单组分独立验证的方式探究其发挥作用的物质基础及机制比较繁琐、费时、费力<sup>[12]</sup>。血清代谢组学是从整体的血清生物化学表现型来把握生物的功能状态，这与中医学的“整体论”相一致，也适用于中医药发挥作用的物质基础及机制研究<sup>[18]</sup>。通过对中医药作用后血清代谢组分析，找到显著变化的代谢物，研究差异代谢物与生理学表型之间的关系，再有目的地验证中医药发挥作用的物质基础及机制，不失为一种有的放矢的思路<sup>[14]</sup>。

病毒作为外源生物因子，入侵机体后可以引起



注：GHX 为广藿香给药组，CT 为不加药、正常饲养的对照组；FC，差异倍数。

Note: GHX, *Pogostemon cablin* drug group given 0.5 g/head of traditional Chinese medicine formula granules per day by mixing materials through oral feeding for consecutive 8 days; CT, The control group given normal feeding without additional treatment; FC, Fold change.

图4 广藿香组(GHX)和对照组(CT)猪血清差异代谢物的火山图(A)、聚类热图(B)和相关性分析图(C)

Figure 4 Volcanic map (A), clustering heat map (B) and correlation analysis diagram (C) of differential serum metabolites of pigs after administration of *Pogostemon cablin*

宿主细胞的脂质代谢发生变化，这主要是由于宿主代谢资源被用于病毒感染的不同阶段<sup>[19]</sup>。不同病毒感染引起机体血浆或血清中脂类代谢产物的变化也有差异，例如在感染寨卡病毒的患者中，磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamines, PEs)类脂质代谢产物的水平明显上升<sup>[20]</sup>；感染 COVID-19 的患者体内会发生胞质磷脂酶 A2 $\alpha$  (cPLA2 $\alpha$ ) 活化，引发肺部炎症，血清中溶血磷脂酸类物质 (LPAs、LPCs 和 LPIs) 的含量显著增多，而磷脂酸类物质 (PAs、PCs 和 PIs) 含量显著减少<sup>[21]</sup>。溶血磷脂酸类物质是一类内源性的生物活性分子，参与调节多种生物学功能。本研究，广藿香给药的贵州小型猪血清中溶血磷脂酸类物质 (LPC 22:5、LPA 22:6 和 LPA 22:5) 表达显著下调

( $P < 0.001$ )，说明广藿香能影响溶血磷脂酸类物质代谢，这可能与之发挥药效作用有很大相关性。另外，鉴于广藿香具有显著调节溶血磷脂酸类物质代谢的功能，后续可能基于广藿香开发调节溶血磷脂酸类物质的专门药物。

氨基酸代谢是机体重要的代谢途径，该代谢紊乱会影响机体炎症反应和免疫功能的调节<sup>[22]</sup>。轻度和中度 COVID-19 患者中许多氨基酸（包括丝氨酸、色氨酸、缬氨酸、脯氨酸、甘氨酸和异亮氨酸）显著减少。重症 COVID-19 患者气道黏液的蛋白质组学分析结果显示，有 375 个 COVID-19 相关蛋白在氨基酸（包括  $\beta$ -丙氨酸、色氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸）代谢通路发生了显著富集，这表明 COVID-19 能引起机体的氨基



酸代谢功能紊乱<sup>[23]</sup>。另外,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路可以受到黄芪甲苷Ⅳ的影响,在减轻急性肾损伤和调节炎症反应及自身免疫功能中发挥作用<sup>[24]</sup>。亚牛磺酸是牛磺酸的前体,是半胱氨酸氧化为半胱亚磺酸后,在半胱亚磺酸脱羧酶作用下去羧基的产物<sup>[25]</sup>。牛磺酸和亚牛磺酸代谢途径通常与炎症反应和药物发挥抗炎作用相关<sup>[26]</sup>。本研究中,广藿香给药的贵州小型猪血清中差异代谢产物主要富集在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路(MapID: map00250)以及牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路(MapID: map00430),表明广藿香可能通过影响机体氨基酸代谢来起到缓解机体氨基酸代谢紊乱、调节炎症反应发生等功能。

综上所述,本研究发现广藿香能显著影响溶血脂酸类物质的代谢,可能通过调节天冬氨酸-谷氨酸代谢通路(MapID: map00250)和牛磺酸-亚牛磺酸代谢通路(MapID: map00430)起到逆转机体氨基酸代谢紊乱,调节炎症反应,进而缓解肺部炎症的作用。

#### [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贵州中医药大学实验动物伦理委员会批准(批号:20210024)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (IACUC No. 20210024). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

#### [作者贡献 Author Contribution]

陆涛峰负责方案设计、样品采集、数据分析和初稿撰写等;

张慧负责动物实验、样品采集和初稿撰写等;

周洁参与数据分析和数据可视化等;

李倩参与动物实验和修改稿修订等;

吴曙光负责提供资源和动物实验指导等;

吴廷军负责方案设计、样品采集、提供资助和监督指导等。

#### [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] 罗晶,殷宁,黄小英,等.芳香中药防治新型冠状病毒肺炎作用机制探究[J].江西中医药大学学报,2020,32(3):66-73.  
LUO J, YIN N, HUANG X Y, et al. Study on the mechanism of aromatic traditional Chinese medicine compound on

prevention and treatment of new coronavirus pneumonia[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 2020, 32(3): 66-73.

- [2] 梁嘉丽.环氧广藿香烯抗炎及抗胃溃疡的药效及机制研究[D].广州:广州中医药大学,2018.

LIANG J L. Evaluation of patchoulene epoxide on the activity of anti-inflammation and gastroprotection[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2018.

- [3] 陈春宇,董汉玉,纪瑞锋,等.基于中医药理论的芳香类中药防治新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用探讨[J].中草药,2020,51(11):3051-3061. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.025.

CHEN C Y, DONG H Y, JI R F, et al. Discussion on role of aromatic Chinese herbs in prevention and treatment of COVID-19 based on theory of traditional Chinese medicine[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(11): 3051-3061. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.025.

- [4] 徐雯,吴艳清,丁浩然,等.广藿香的药理作用及机制研究进展[J].上海中医药杂志,2017,51(10):103-106. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2017.10.028.

XU W, WU Y Q, DING H R, et al. Research progress on pharmacological effects and mechanism of Herba Pogostemonis[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2017, 51(10): 103-106. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2017.10.028.

- [5] 齐乐辉,王知斌,孟永海,等.中药广藿香有效成分及药理作用研究进展[J].化学工程师,2018,32(2):49-50,56. DOI: 10.16247/j.cnki.23-1171/tq.20180249.

QI L H, WANG Z B, MENG Y H, et al. Research progress of the active ingredient and pharmacological action of Chinese medicine patchouli[J]. Chem Eng, 2018, 32(2): 49-50, 56. DOI: 10.16247/j.cnki.23-1171/tq.20180249.

- [6] 黎玉翠.广藿香酮及广藿香醇的抗炎、抗真菌活性及药物代谢研究[D].广州:广州中医药大学,2013.

LI Y C. Metabolism, anti-inflammatory and anti-fungal activities of pogostone and patchouli alcohol[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2013.

- [7] 王磊,李跟旺.广藿香抗菌消炎调节免疫作用的最新研究[J].西部中医药,2018,31(2):138-140.

WANG L, LI G W. The latest research of antibacterial action, anti-inflammatory action and regulating immunity of patchouli[J]. West J Tradit Chin Med, 2018, 31(2): 138-140.

- [8] 魏晓露.广藿香油抗病毒的物质基础研究[D].成都:成都中医药大学,2013.

WEI X L. Research on material basis of antiviral of patchouli oil[D]. Chengdu: Chengdu University of Chinese Medicine, 2013.

- [9] 仝小林,李修洋,赵林华,等.从“寒湿疫”角度探讨新型冠状病毒肺炎的中医药防治策略[J].中医杂志,2020,61(6):465-470,553.

TONG X L, LI X Y, ZHAO L H, et al. Discussion on traditional Chinese medicine prevention and treatment strategies of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from the perspective of "cold-dampness pestilence"[J]. J Trad Chinese Med, 2020.61(6):465-470,553.

- [10] 邵仲柏,朱月霞,刘书豪,等.临床使用治疗新型冠状病毒肺炎中药复方中高频率中药抗病毒研究概述[J].中草药,2020,51(5):1153-1158. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.009.

SHAO Z B, ZHU Y X, LIU S H, et al. A review on clinical



- application of high frequency traditional Chinese medicine in treatment of coronavirus pneumonia 2019[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(5): 1153-1158. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.009.
- [11] 邓燕君, 刘博文, 贺桢翔, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索藿香正气口服液预防新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物研究[J]. 中草药, 2020, 51(5): 1113-1122. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.004.
- DENG Y J, LIU B W, HE Z X, et al. Study on active compounds from Huoxiang Zhengqi Oral Liquid for prevention of coronavirus disease 2019 (COVID-19) based on network pharmacology and molecular docking[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(5): 1113-1122. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.004.
- [12] 魏聪聪, 朱明丹, 冯利民, 等. 代谢组学技术在中医证候学和药效物质基础研究中的应用[J]. 江苏中医药, 2012, 44(1): 1-3. DOI: 10.3969/j.issn.1672-397X.2012.01.001.
- WEI C C, ZHU M D, FENG L M, et al. Application of metabonomics technology in the study of TCM syndromes and pharmacological material basis[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2012, 44(1): 1-3. DOI: 10.3969/j.issn.1672-397X.2012.01.001.
- [13] 马素娜, 关亚奇, 张森, 等. 代谢组学技术在中医证候学研究中的应用优势[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(7): 1714-1716.
- MA S N, GUAN Y Q, ZHANG M, et al. The advantage of metabolomics in the study of TCM syndrome[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(7): 1714-1716.
- [14] 杨艳, 韦炎龙, 方峰. 代谢组学阐明中医药治疗代谢性疾病的机制研究[J]. 中医药临床杂志, 2020, 32(9): 1601-1605. DOI: 10.16448/j.cjctcm.2020.0901.
- YANG Y, WEI Y L, FANG F. Research progress of mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of metabolic diseases from metabolomics[J]. Clin J Tradit Chin Med, 2020, 32(9): 1601-1605. DOI: 10.16448/j.cjctcm.2020.0901.
- [15] 李小海, 刘新峰, 伍瑶斌, 等. 多排螺旋CT重建技术测量贵州成年小型猪支气管[J]. 解剖学杂志, 2019, 42(1): 40-43. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1633.2019.01.010.
- LI X H, LIU X F, WU Y B, et al. Bronchial data of adult Guizhou miniature pig measured by multiple spiral computed tomography and its reconstruction technique in vivo[J]. Chin J Anat, 2019, 42(1): 40-43. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1633.2019.01.010.
- [16] 王郭琦, 吴曙光, 陈明飞, 等. 贵州小型猪肾虚动物模型的建立[J]. 贵州科学, 2019, 37(5): 48-51. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6563.2019.05.009.
- WANG G Q, WU S G, CHEN M F, et al. Construction of kidney Yang deficiency animal model with Guizhou miniature pigs[J]. Guizhou Sci, 2019, 37(5): 48-51. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6563.2019.05.009.
- [17] 张慧, 吴延军, 姚瑾, 等. 五苓散对高脂血症模型贵州小型猪的治疗作用[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(2): 138-142. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.188.
- ZHANG H, WU Y J, YAO J, et al. Therapeutic effect of Wuling Powder on Guizhou mini-pigs of hyperlipidemia model[J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(2): 138-142. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2020.188.
- [18] 于兰, 金鑫, 南红梅. 代谢组学技术在中医"整体观念、辨证论治"理论研究中的应用[J]. 中国继续医学教育, 2015, 7(20): 191-192. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9308.2015.20.140.
- YU L, JIN X, NAN H M. The application of the theory of the "holistic concept, the syndrome differentiation and treatment" of the traditional Chinese medicine[J]. China Continuing Med Educ, 2015, 7(20): 191-192. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9308.2015.20.140.
- [19] Xiaoyong C, Shuaiwei W, Peiling G, et al. Comprehensive analysis of lipid metabolism in influenza virus infection[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 175.
- [20] MARTÍN-ACEBES M A, VÁZQUEZ-CALVO Á, SAIZ J C. Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses[J]. Prog Lipid Res, 2016, 64: S0163-S7827(16)30015-7. DOI: 10.1016/j.plipres.2016.09.005.
- [21] SONG J W, LAM S M, FAN X, et al. Omics-driven systems interrogation of metabolic dysregulation in COVID-19 pathogenesis[J]. Cell Metab, 2020, 32(2): S1550-S4131(20) 30317-X. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.06.016.
- [22] HE S S, WANG Y L, XIE J H, et al. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic study of the effects of flavonoids on citrinin production by *Monascus*[J]. Food Res Int, 2020, 137: S0963-S9969(20)30557-3. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109532.
- [23] ZHANG Z L, WANG T, LIV F, et al. The proteomic characteristics of airway mucus from critical ill COVID-19 patients[J]. Life Sci, 2021, 269: 119046. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119046.
- [24] JIANG M, KUANG S F, LAI S S, et al. Na<sup>+</sup>-NQR confers aminoglycoside resistance via the regulation of l-alanine metabolism[J]. mBio, 2020, 11(6): e02086-e02020. DOI: 10.1128/mBio.02086-20.
- [25] 胡恺. 神经胶质细胞与胶质瘤细胞亚牛磺酸代谢特征的差异研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2018.
- HU K. Study on the difference of metabolic characteristics of glutamate in glial cells and glioma cells[D]. Dalian: Dalian Medical University, 2018.
- [26] ZHOU J, YAO N, WANG S X, et al. Fructus Gardeniae-induced gastrointestinal injury was associated with the inflammatory response mediated by the disturbance of vitamin B6, phenylalanine, arachidonic acid, taurine and hypotaurine metabolism[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 235: 47-55. DOI: 10.1016/j.jep.2019.01.041.

(收稿日期: 2022-12-05 修回日期: 2023-02-09)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 崔占鼎)

#### [引用本文]

- 陆涛峰, 张慧, 周洁, 等. 广藿香对贵州小型猪血清代谢组的影响及其机制探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 253-261. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.186.
- LU T F, ZHANG H, ZHOU J, et al. Effects of *Pogostemon cablin* on serum metabolomics of Guizhou miniature pigs and its mechanism[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3): 253-261. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.186.

# 奥氮平诱导体重增加小鼠的全脑转录组学分析

张 渊<sup>1</sup>, 李 晗<sup>2</sup>, 张成芳<sup>1</sup>

(1. 同济大学附属精神卫生中心(上海市浦东新区精神卫生中心), 同济大学精神疾病临床研究中心, 上海 200124;

2. 上海交通大学医学院附属精神卫生中心, 上海市重性精神病重点实验室, 上海 201108)

**[摘要]** **目的** 分析奥氮平给药组与对照组的小鼠脑组织的转录组测序结果, 筛选出差异表达基因, 探索非典型抗精神病药奥氮平导致体重增加的潜在作用靶点。**方法** 20只雌性C57BL/6小鼠被随机分为对照组和奥氮平给药组, 分别给予生理盐水和奥氮平溶液灌胃, 8周后留取全脑组织进行转录组测序(transcriptome sequencing, RNA-Seq)。通过对测序结果进行基因本体论(gene ontology, GO)功能注释分析和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)途径富集分析以及蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络分析等, 寻找奥氮平诱导体重增加的可能靶点, 并通过实时荧光定量PCR法进行验证。**结果** 对照组和奥氮平给药组的差异表达基因共591个, 其中上调基因251个, 下调基因340个。GO分析显示差异基因广泛参与转录过程, 其中消化系统的调节和冷诱导的产热相关基因表达属于显著富集项目。KEGG分析显示差异基因广泛参与神经活性物质与受体之间的相互作用, 差异基因显著富集在催产素信号、脂肪的消化吸收以及胆固醇代谢通路。实时荧光定量PCR结果表明, 富集在摄食调控、胃运动、产热、脂肪代谢等过程的基因(*Oxt*、*Trpv1*、*Adipoq*、*Phox2b*、*Abcg5*、*Mogat2*、*Dbh*、*Plac8*、*Neurog1*)以及PPI网络中的枢纽基因(*Fos*、*Dusp1*、*Egr2*)的表达改变与RNA-Seq趋势一致。**结论** 奥氮平给药导致小鼠中枢的摄食调控、胃肠运动、产热等生理过程发生改变, 这些改变可能参与了奥氮平诱导的体重增加。

**[关键词]** 奥氮平; 体重增加; 全脑; 转录组测序; 小鼠

**[中图分类号]** R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0262-09



## Whole-brain Transcriptomic Analysis of Weight Gain Mice induced by Olanzapine

ZHANG Yuan<sup>1</sup>, LI Han<sup>2</sup>, ZHANG Chengfang<sup>1</sup>

(1. Clinical Research Center for Mental Disorders, Shanghai Pudong New Area Mental Health Center, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200124, China; 2. Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiao Tong University of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Psychotic Disorders, Shanghai 201108, China)

Correspondence to: ZHANG Chengfang (ORCID: 0000-0002-5977-0312), E-mail: callup1987@126.com

**[ABSTRACT]** **Objective** The transcriptome sequencing results of brain tissues of olanzapine-treated mice were analyzed to screen out differentially-expressed genes and explore potential targets of atypical antipsychotics leading to body weight gain. **Methods** Twenty female C57BL/6 mice were randomly divided into control group (Ctrl) and Olanzapine administration group (Olz), which were given saline and Olanzapine solution by gavage, respectively. The whole brain tissues were collected 8 weeks later for Transcriptome sequencing (RNA-Seq). The possible targets of olanzapine-induced body weight gain were identified by the Gene Ontology (GO) functional annotation analysis, the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

**[基金项目]** 上海市浦东新区优秀青年医学人才培养计划“基于全脑转录组测序筛选奥氮平调控小鼠中枢摄食网络的关键基因”(PWRq2020-19);上海市浦东新区精神卫生中心院级科研面上项目“稳定期精神分裂症患者外周血氧化应激与认知功能相关性分析”(PDJWM-202002)

**[第一作者]** 张 渊(1988—),女,硕士,主治医师,研究方向:抗精神病药物相关动物模型。E-mail: 450718469@qq.com。ORCID: 0000-0001-6662-4738;

李 晗(1984—),男,硕士,助理研究员,研究方向:精神疾病模型。E-mail: erjunda140@126.com。ORCID: 0000-0003-3903-5254

**[通信作者]** 张成芳(1987—),女,博士,主治医师,研究方向:抗精神病药物代谢不良反应的机制和临床防治。E-mail: callup1987@126.com。ORCID: 0000-0002-5977-0312

pathway enrichment analysis, and protein-protein interaction (PPI) network analysis. Differential expression levels of mRNAs were further verified by real-time quantitative fluorescence PCR (RT-qPCR). **Results** Compared with Ctrl group, 591 differentially expressed genes were screened in Olz group, including 251 up-regulated genes and 340 down-regulated genes. GO analysis showed that differential genes were widely involved in transcriptional process, among which the expression of genes related to the regulation of digestive system and cold-induced thermogenesis were significantly enriched. KEGG analysis showed that differential genes were widely involved in the interaction between neuroactive ligands and receptors, and the differential genes were significantly enriched in oxytocin signaling, fat digestion and absorption, and cholesterol metabolism pathways. RT-qPCR were performed to verify the expression levels of genes enriched in feeding regulation, gastric kinesis, thermogenesis, fat metabolism and other processes (*Oxt*, *Trpv1*, *Adipoq*, *Phox2b*, *Abcg5*, *Mogat2*, *Dbh*, *Plac8* and *Neurog1*) as well as hub genes in PPI network (*Fos*, *Dusp1* and *Egr2*), and the results were consistent with the trend of RNA-Seq. **Conclusion** Olanzapine administration resulted in changes in central feeding regulation, gastrointestinal motility, thermogenesis and other physiological processes in mice, which might be involved in body weight gain induced by olanzapine.

**[Key words]** Olanzapine; Body weight gain; Whole brain; RNA-Seq; Mice

非典型抗精神病药 (atypical antipsychotics, APs) 是治疗精神分裂症等重性精神疾病的主流用药, 然而相当一部分患者困扰于这类药物带来的体重增加<sup>[1]</sup>。APs 导致体重增加的机制尚未阐明, 揭示其机制对于未来寻找更加安全有效的抗精神病药物治疗方案, 从而改善精神分裂症的不良预后有十分重要的价值。在所有 APs 中, 奥氮平导致的体重增加最为显著, 而摄食增加可能是奥氮平诱导体重增加的始动因素<sup>[2]</sup>。中枢神经系统存在复杂的食欲调节网络, 具有促食欲或抑食欲作用的因子在脑内形成复杂的食欲调节网络和相互投射的神经环路, 对食欲进行精确的调控。目前认为参与食欲调控的中枢结构主要是位于下丘脑弓状核、外侧下丘脑和脑桥臂旁核的部分神经元<sup>[3]</sup>。影像学研究显示, 食物奖赏加工脑区 (眶额叶皮质、外侧前额叶)、食物注意相关脑区 (枕叶、项下小叶) 等结构也参与摄食行为。有研究将功能磁共振与视觉处理食欲刺激的任务结合起来, 发现与健康志愿者相比, 接受奥氮平给药的患者岛叶皮质、杏仁核及小脑对食欲性刺激存在过度激活, 该变化与胃饥饿素 (ghrelin) 的外周水平以及食欲调节相关的认知改变相关<sup>[4]</sup>, 提示奥氮平治疗伴有食欲调节方面的认知变化。

鉴于奥氮平对摄食行为的影响所涉及的脑区可能是广泛的, 有必要关注奥氮平对全脑水平摄食网络的影响, 这对于系统把握 APs 诱导体重增加的病理机制, 从而寻找其导致体重增加的上游关键调控因素有指导意义。为此, 本研究利用转录组测序技术检测奥氮平诱导的体重增加小鼠模型与非给药对照组在全脑水平

的差异基因, 并对差异基因的信号通路进行分析比较, 以期后续 APs 诱导体重增加的相关分子机制研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠 20 只, 平均体重 20 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供 [SCXK (沪) 2017-0005], 在上海睿太莫斯生物科技有限公司的实验动物屏障设施 [SYXK (沪) 2018-0007] 内, 用独立通气笼盒 (individually ventilated cages, IVC) 饲养, 室温 (23±1) °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h 昼夜交替光照, 小鼠可自由摄食和饮水。小鼠饲料购自上海普路腾生物科技有限公司 (ISO 9001: 2015)。动物实验操作方案经上海睿太莫斯生物科技有限公司实验动物使用与管理委员会 (SHRTMOBIO-IACUC-PR01-20211115) 和上海市浦东新区精神卫生中心伦理委员会 (PDJWLL2020036) 审查批准。

### 1.2 实验试剂及仪器

奥氮平 (132539-06-1) 购自美国 Sigma 公司。TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司。Ribo-Zero 磁性试剂盒和 RNA 外切酶 (RNase R) 购自美国 Epicenter 公司。TruSeq™ RNA 文库制备试剂盒和 HiSeq 2500 测序平台为美国 Illumina 公司产品。Nanodrop2000 紫外分光光度计为美国 Thermo 产品。实时荧光定量 PCR 仪为美国 Thermo Fisher 公司产品, SYBR Premix Ex Taq 和 PCR 反应板为日本 TaKaRa 公司产品。



1.3 构建奥氮平诱导的体重增加小鼠模型及其样本收集

小鼠适应性喂养1周后，随机分为2组：奥氮平给药组每天给予6 mL/kg（体重）的奥氮平生理盐水溶液（质量浓度0.5 mg/mL）灌胃，对照组每天给予同等体积的生理盐水灌胃，每组10只。每周记录各组小鼠的体重和采食量，给药8周。实验结束后使用异氟烷吸入法麻醉小鼠，立即解剖取出全脑，置于液氮中速冻保存。

1.4 总RNA提取及cDNA文库构建

使用TRIzol法分别提取两组小鼠全脑组织中总RNA，利用琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性，用Nanodrop紫外分光光度计检测样品浓度和纯度。用Ribo-Zero磁性试剂盒和RNase R去除rRNA和线性RNA。纯化后的RNA使用TruSeq™ RNA文库制备试剂盒生成mRNA测序文库，将文库制备物在Illumina HiSeq 2500测序平台上进行转录组测序〔由晶能生物技术（上海）有限公司完成〕。

1.5 转录组学分析

1.5.1 数据质控及处理

使用Fastp软件对原始数据进行过滤去杂，主要包括测序接头序列、含N序列、低质量序列等，获得高质量序列。随后使用Hisat2软件将高质量序列数据与参考基因组比对，再将比对到的数据用StringTie软件进行转录本组装和新转录本预测，并利用featureCounts软件分析数据，获得mRNA的表达值。

1.5.2 差异基因表达分析

利用limma软件在不同样本组之间筛选差异表达的已知基因，以满足 $P \leq 0.05$ 和 $\geq 2$ 倍差异表达范围来筛选两组之间的差异基因。分析中采用BH（Benjamini & Hochberg）多重检验校正法，通过错误发现率（false discovery rate, FDR）法可以得到每个基因 $P$ 值校正后的 $q$ 值。

1.5.3 差异基因功能富集分析

针对目的基因集，采用TopGO软件进行GO功能分析和KEGG pathway功能分析。GO功能分析是针对每组比较的差异分析结果，将全部差异基因、上调差异基因、下调差异基因分别作为目的基因集，进行GO功能富集分析。详细的方法：将全部基因作为背景列表，目的基因列表作为从背景列表中筛选出来的候选列表，利用Fisher精确检验计算代表GO功能集在目的基因列

表中是否显著富集的 $P$ 值，再对 $P$ 值经BH多重检验校正后，得到FDR。KEGG pathway功能分析是针对这些基因进行KEGG数据库中Pathway的功能注释和归类，采用KOBAS软件进行富集分析。

1.5.4 蛋白质互作分析

为了更好地理解重要基因的相互作用，使用STRING数据库对差异基因编码蛋白进行相互作用（protein-protein interaction, PPI）分析。利用Cytoscape软件构建PPI网络。在PPI网络中，每个节点代表蛋白质，节点之间的连线代表生物分子之间的相互作用。

1.6 实时荧光定量PCR法进行验证

根据GO、KEEG和PPI分析结果，用合成的cDNA作为模板，对筛选到的体重增加相关基因进行实时荧光定量PCR验证。相关基因的引物序列见表1。

表1 差异基因的实时荧光定量PCR引物序列  
Table 1 Primer sequences of differential genes used in real-time quantitative fluorescence PCR

| 基因名称           | 引物序列(5'→3')                                                |
|----------------|------------------------------------------------------------|
| <i>β-Actin</i> | F: GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG<br>R: ATGCCACAGGATCCATACC       |
| <i>Oxt</i>     | F: TTGACCAGATGAACGGAGTG<br>R: AGCTACTCGGATACGGGAGA         |
| <i>Trpv1</i>   | F: GGGCGAGACTGTCAACAAGA<br>R: CGGCTCTATTGCTCCCTGAG         |
| <i>Adipoq</i>  | F: TGCCCTGTAACCTCTACCCCA<br>R: GGCAAGTGTCCTCAACTGTGTC      |
| <i>Phox2b</i>  | F: TACGCCGCGAGTTCCATACAAACTC<br>R: TCTTTGAGCTGCGCGCTTGTAAG |
| <i>Abcg5</i>   | F: GTTCCAAGACTGCTTCTC<br>R: ATGACTGCCTCTACCTTC             |
| <i>Mogat2</i>  | F: CCAGGTTGAGAACACCCCTG<br>R: CTCGATGGGCTTCCCCACTAT        |
| <i>Dbh</i>     | F: AATCTGCAGCCTTTGCCTAA<br>R: TTCAGCATCTGCCTCTGTTG         |
| <i>Plac8</i>   | F: TGGACTACAAAGACGATGACGA<br>R: ACAAAAGGTCCACAGAGGC        |
| <i>Neurog1</i> | F: CGATCCCCTTTTCTCCTTTC<br>R: TGCAGCAACCTAACAAGTGG         |
| <i>Fos</i>     | F: TTTCAACGCGGACTACGAGG<br>R: GCGCAAAAGTCCTGTGTGTT         |
| <i>Dusp1</i>   | F: TGTGAAGCAGAGGAGGAGC<br>R: ACGCACGGCATGTTGGTC            |
| <i>Egr2</i>    | F: TTGACCAGATGAACGGAGTG<br>R: AGCTACTCGGATACGGGAGA         |

注：β-Actin为PCR内参基因。F为正向引物；R为反向引物。  
Note: β-Actin is a reference gene in PCR. F is the forward primer; R is the reverse primer.

## 1.7 统计学处理

应用SPSS 23软件进行数据分析处理。不同时间点的组内比较采用两因素重复测量的方差分析, 不同时间点两两比较采用LSD-*t*检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 奥氮平诱导小鼠体重增加

经过8周的奥氮平灌胃, 两组小鼠不同时间点体重差异有统计学意义 ( $F_{\text{时间}}=24.04$ ,  $P < 0.05$ ), 两组小鼠间体重的总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{分组}}=8.01$ ,  $P < 0.05$ , 图1)。与对照组相比, 给药组的体重从第5周开始至第8周均明显增加 (第5周  $t=-2.265$ ,  $P=0.036$ ; 第6周  $t=-2.7$ ,  $P=0.015$ ; 第7周  $t=-2.41$ ,  $P=0.027$ ; 第8周  $t=-2.33$ ,  $P=0.032$ )。

两组小鼠不同时间点摄食量的差异有统计学意义 ( $F_{\text{时间}}=7.79$ ,  $P < 0.05$ ), 两组小鼠间摄食量的总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{分组}}=73.37$ ,  $P < 0.05$ , 图1)。与对照组相比, 给药组小鼠摄食量从第3周开始至第8周均明显增多 (第3周  $t=-2.32$ ,  $P=0.032$ ; 第4周  $t=-2.79$ ,  $P=0.012$ ; 第5周  $t=-2.64$ ,  $P=0.017$ ; 第6周  $t=-4.12$ ,  $P=0.001$ ; 第7周  $t=-2.82$ ,  $P=0.011$ ; 第8周  $t=-2.56$ ,  $P=0.02$ )。

### 2.2 奥氮平诱导引起的差异基因筛选

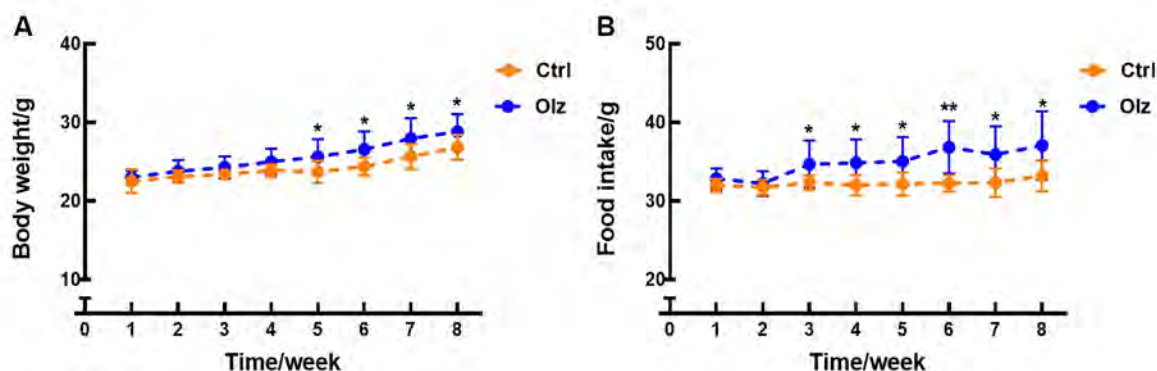
通过差异表达基因分析, 共筛选到591个差异基因, 其中上调基因为251个, 下调基因为340个。两组

之间差异基因的整体分布情况见火山图 (图2A), 其中上调的差异基因用橙色表示, 下调的差异基因用蓝色表示, 差异不明显的基因用灰色表示, 图中标注了  $P$  值排列在前10位的上调和下调基因。结果显示, 上调的基因与细胞因子介导的信号转导、转录调控、生殖细胞发育等过程有关, 下调基因与神经发育、内源性刺激反应、突触信号传递、受体结合、离子通道活性、转录调控等过程有关。

### 2.3 差异基因的功能富集分析

GO是描述基因功能的综合性数据库, 可分为分子功能 (molecular function, MF)、细胞组成 (cellular component, CC) 和生物过程 (biological process, BP) 3个大类, 各自描述了基因产物可能行使的分子功能、所处的细胞环境, 以及参与的生物学过程。分析结果显示, 富集的GO项目共有2 623项, 其中生物学过程2 159项, 细胞组成157项, 分子功能307项。从上述分析结果中, 选择以上3个大类中每个类别最显著的前30个项目。生物学过程中, 主要的生物学功能表现在神经发育、骨骼肌细胞增殖调节、消化系统调节、疼痛反应、冷诱导产热等方面; 细胞组成中, 主要表现在突触、核周内质网、转录调节复合物、外泌体等方面; 分子功能方面, 主要表现为DNA结合转录激活剂活性、RNA聚合酶II特异性、离子门控通道活性、阳离子转运体活性、细胞因子受体活性等方面。以上结果说明差异基因广泛参与转录过程 (图2B)。

由于差异基因在消化系统调节 (*Oxt*、*Trpv1*、

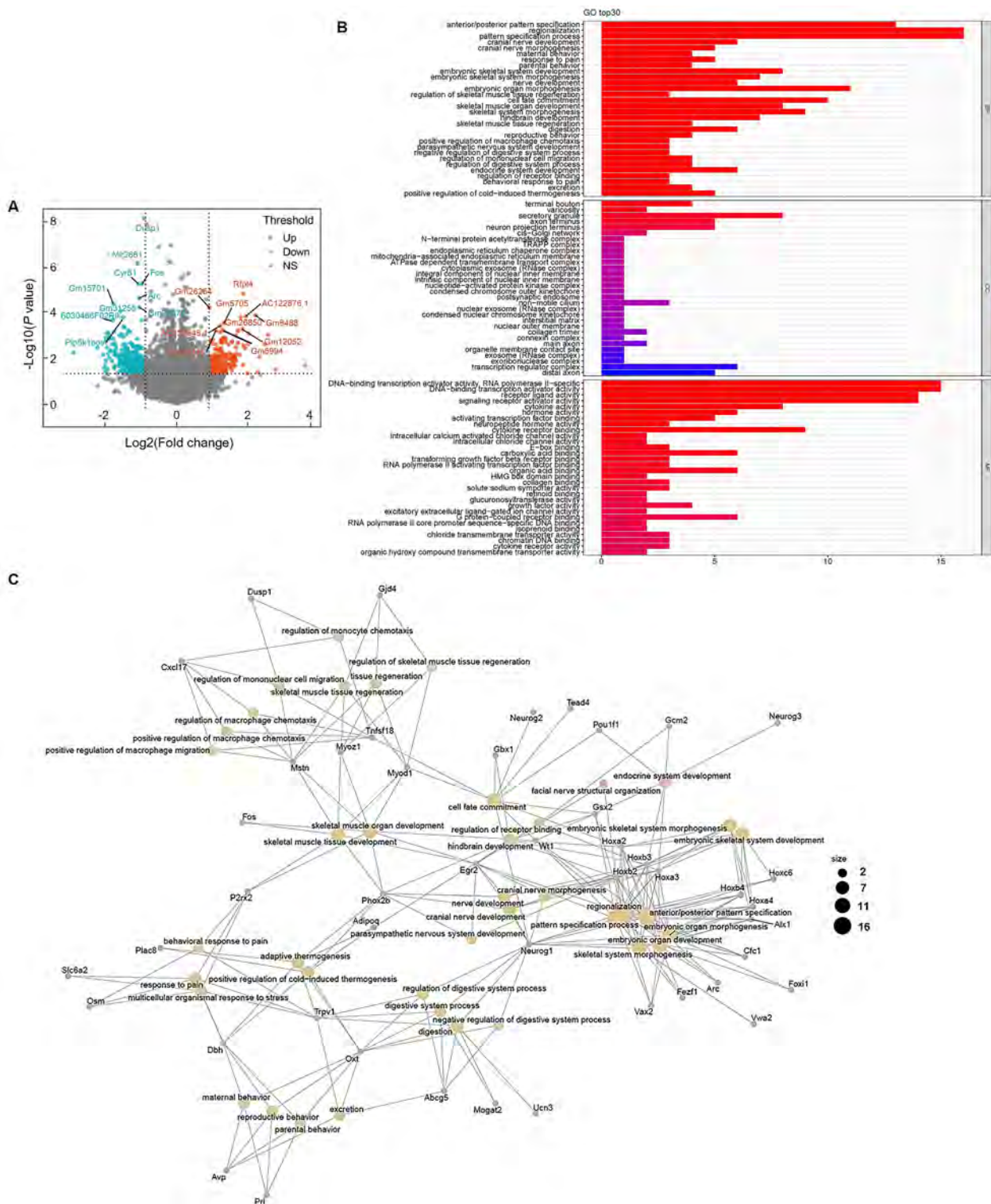


注: A, 奥氮平给药引起的小鼠体重变化; B, 奥氮平给药引起的小鼠摄食量变化。每组  $n=10$ 。Ctrl, 对照组 (生理盐水灌胃); Olz, 奥氮平组 (奥氮平灌胃)。与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

Note: A, Changes in body weight induced by olanzapine administration; B, Changes in food intake induced by olanzapine administration.  $n=10$  in each group. Ctrl, control group (intragastric injection with saline); Olz, olanzapine group (intragastric injection with olanzapine). Compared with control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图1 奥氮平给药引起的体重和摄食量变化趋势

Figure 1 Changes of body weight and food intake induced by olanzapine administration



注: A, 差异表达基因分布的火山图(X、Y坐标轴均取筛选条件值的对数形式。图中每个点代表1个差异表达基因, 橙色为上调基因, 蓝色为下调基因, 灰色为无明显变化的基因)。B, 差异表达基因的GO富集分析结果(差异表达基因产物可能行使的分子功能、所处的细胞环境以及参与的生物学过程)。C, 差异表达基因GO网络分析。

Note: A, Volcano map of differentially-expressed genes (logarithmic form of screening condition values were taken for the X and Y axes. Each point in the figure represents a differentially expressed gene. Orange, blue and gray indicate the up-regulated, down-regulated and unchanged genes, respectively). B, GO analysis of differentially expressed genes (differentially-expressed genes-involved molecular functions, cellular environments and biological processes). C, GO-net analysis of differentially expressed genes.

图2 奥氮平给药后差异表达基因的转录组学分析(火山图和GO分析)

Figure 2 Transcriptomic analysis of differentially expressed genes after olanzapine administration (Volcano map and GO analysis)



*Neurog1*), 冷诱导产热 (*Phox2b*、*Dbh*、*Plac8*), 脂类消化、吸收或代谢 (*Adipoq*、*Abcg5*、*Mogat2*) 等过程富集, 而这些过程与体重的改变相关, 因此通过构建 GO 项目的关系网络来进一步分析靶基因之间的相互作用和调控关系, 如图 2C 所示。

KEGG 是整合了基因组、化学和系统功能信息的数据库, 主要针对生物体中的代谢通路进行分析, 可以帮助研究者了解一个物种中的生物体系统。结果显示, 奥氮平诱导小鼠体重增加后, 差异基因富集到 143 条 KEGG 代谢通路中。在此, 列出了显著富集的通路, 并且依靠网络聚类图划分为 7 个不同的群组 (图 3A), 显示这些通路广泛参与神经活性物质与受体之间的相互作用。在 KEGG 分析中可以看到差异基因在催产素信号、脂肪的消化和吸收、胆固醇代谢通路显著富集, 提示这些通路可能参与奥氮平诱导的体重增加。

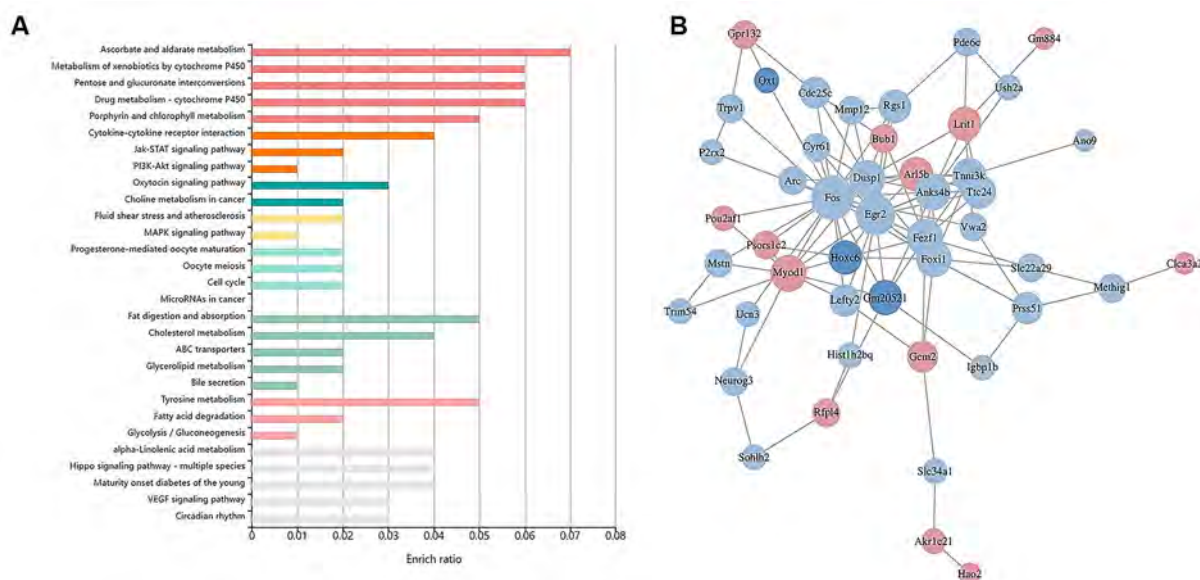
## 2.4 蛋白互作网络分析

在基因作用网络中检测到一组相互作用的基因簇, 共包含 45 个基因 (图 3B)。组成相互作用网络的这些基因主要参与神经受体-配体相互作用、信号转导、转录调控等过程, 它们可能在奥氮平诱导小鼠体重增加中发挥重要作用, 其中 *Fos*、*Dusp1*、*Egr2* 基因

链接点数最多, 占据了网络的枢纽位置。此外, 参与摄食调控和胃肠运动的 *Oxt*、*Trpv1* 基因也包含在网络当中。

## 2.5 差异基因的实时荧光定量 PCR 验证

鉴于 GO 和 KEGG 分析提示差异基因在消化系统调节、冷诱导产热、催产素信号、脂肪消化和吸收、胆固醇代谢通路上显著富集, 而这些通路体重增加相关, 因此对这些基因 (*Oxt*、*Trpv1*、*Adipoq*、*Phox2b*、*Abcg5*、*Mogat2*、*Dbh*、*Plac8*、*Neurog1*) 进行 PCR 验证。由于 PPI 网络提示 *Fos*、*Dusp1*、*Egr2* 处于网络枢纽位置, 也对其进行了 PCR 验证。结果表明, 各基因的定量结果与转录组测序结果的表达趋势一致 (图 4), 其中 *Oxt* ( $t=3.836$ ,  $P=0.001$ )、*Trpv1* ( $t=2.11$ ,  $P=0.049$ )、*Adipoq* ( $t=2.16$ ,  $P=0.045$ )、*Phox2b* ( $t=2.369$ ,  $P=0.029$ )、*Dbh* ( $t=2.606$ ,  $P=0.018$ ) 和 *Dusp1* ( $t=2.177$ ,  $P=0.043$ ) 均下调, 而 *Plac8* ( $t=-2.169$ ,  $P=0.044$ ) 上调, 且差异显著。另外, *Abcg5* ( $t=0.837$ ,  $P=0.414$ )、*Mogat2* ( $t=1.946$ ,  $P=0.067$ )、*Fos* ( $t=1.984$ ,  $P=0.063$ )、*Egr2* ( $t=1.745$ ,  $P=0.098$ ) 呈下调趋势, *Neurog1* ( $t=-1.502$ ,  $P=0.15$ ) 呈上调趋势, 与 RNA 测序结果的趋势一致, 但差异无统计学意义, 进一步证实了转录组测序结果的可靠性。

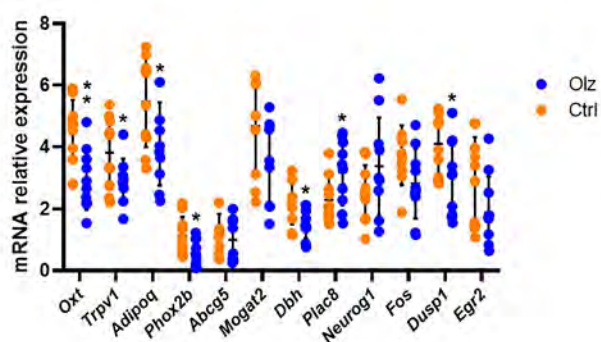


注: A, 差异表达基因 KEGG 富集分析 (不同的颜色代表了不同的通路群组或网络聚类)。B, 蛋白互作 (PPI) 网络分析 (各连接点标注为蛋白名称, 蓝色为下调基因, 红色为上调基因。圆点越大表示连接数越多, 黑线代表两者间存在调节作用)。

Note: A, KEGG analysis of differentially expressed genes (different colors represent different path groups or network clusters). B, protein-protein interaction (PPI) network analysis (each connection point is labeled with the name of the proteins. Blue indicates the down-regulated genes, and red shows the up-regulated gene. The larger the dot, the more connections there are. The black line represents the regulatory effect between the two genes).

图 3 奥氮平给药后差异表达基因的转录组学分析 (KEGG 分析和 PPI 网络分析)

Figure 3 Transcriptomic analysis of differentially expressed genes after olanzapine administration (KEGG analysis and PPI network analysis)



注: Ctrl, 对照组 (生理盐水灌胃); Olz, 奥氮平组 (奥氮平灌胃)。每组  $n=10$ , 与对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

Note: Ctrl, control group (intragastric injection with saline); Olz, olanzapine group (intragastric injection with olanzapine).  $n=10$  in each group. Compared with the control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

图4 奥氮平灌胃组与对照组小鼠全脑组织中差异基因的实时荧光定量PCR验证结果

Figure4 Real-time quantitative fluorescence RCR verification results of differentially expressed genes in the whole brain tissues of mice in the olanzapine infusion group and control group

### 3 讨论

催产素 (编码基因为 *Oxt*) 受体广泛分布于控制小鼠和大鼠能量平衡相关的区域<sup>[5]</sup>。催产素通过多种机制来终止进食行为, 这种作用源于催产素神经元在神经内分泌通路中的战略性定位, 这些通路介导肠-脑相互作用、激素变化和奖赏处理。关于享乐性进食的研究表明, 中枢催产素在降低对碳水化合物和非碳水化合物甜味剂的食欲方面效果显著。催产素被直接注射于大鼠的腹侧被盖区、伏隔核和基底外侧杏仁核, 减少了可口甜味剂的摄入量, 这种影响可以通过催产素受体拮抗剂进行预处理来逆转, 而催产素受体敲除小鼠会饮用过量的蔗糖和糖精溶液<sup>[6]</sup>。对健康男性鼻内给予催产素后, 检测非饥饿情况下奖励驱动的零食摄入量, 发现催产素显著减少了零食的摄入量, 尤其是巧克力饼干的摄入量减少了25%<sup>[10]</sup>。有趣的是, 服用奥氮平或喹硫平的双相障碍患者对甜食的渴求频率更高<sup>[7]</sup>。Mathews等<sup>[8]</sup>使用功能磁共振成像检测了给予奥氮平的健康个体的大脑活动, 发现在对食物奖励的反应中, 与预期和消费有关的大脑区域的激活明显增强, 但参与进食抑制的大脑区域对食物消费的反应下降, 而催产素是否参与了APs诱导的奖赏驱动的摄食改变尚无相关报告。

瞬时感受器电位香草酸受体1 (transient receptor

potential vanilloid type 1, TRPV1) 又称辣椒素受体1 (编码基因为 *Trpv1*) 在中枢的脑干、中脑、下丘脑和边缘系统中高度表达, 其参与了能量稳态, 控制食物摄入和能量消耗<sup>[9]</sup>。内源性大麻素也是TRPV1的内源性配体, 在啮齿类动物中, 内源性大麻素已被证明能够增强下丘脑、伏隔核水平的食物摄入动机<sup>[10]</sup>。有趣的是, 大麻素系统可能参与奥氮平诱导的食欲增加, 而且研究表明花生四烯乙醇胺作为主要的内源性大麻素, 可能是精神分裂症患者服用奥氮平后诱导杏仁核敏化对食物线索反应的外周生物标志物<sup>[11]</sup>。TRPV1还与食欲调节激素相互作用。据文献报告, TRPV1的激活降低了血浆中ghrelin水平, 增加了胃相关迷走神经背侧运动核的瘦素受体神经元中微型兴奋性突触电流的频率, 还可能在促进胰高血糖素样肽-1分泌中发挥作用<sup>[12]</sup>。有趣的是, 有大量研究显示APs可导致ghrelin增高、瘦素降低、胰高血糖素样肽-1降低, 尽管结果不完全一致<sup>[13]</sup>, 而且接受奥氮平治疗的精神分裂症患者往往胃排空加快, 并与体重增加相关<sup>[14]</sup>, 但TRPV1下调是不是APs对食欲调节激素产生影响的上游因素尚需进一步研究。

脂联素 (编码基因为 *Adipoq*) 主要是促进脂肪酸氧化分解, 降低脂肪及类脂合成, 从而调节动物脂代谢<sup>[15]</sup>。成对同源框2B (paired like homeobox 2B, PHOX2B) 在缺氧应激下的通气和体温调节反应中起作用, *Phox2b*<sup>+/-</sup>小鼠幼崽在寒冷环境中也表现出较低的耗氧量, 反映出产热减少和体温降低<sup>[16]</sup>。多巴胺-羟化酶 (编码基因为 *Dbh*) 基因的失活, 导致小鼠不能合成去甲肾上腺素或肾上腺素, 这些小鼠不耐冷, 无法通过解偶联蛋白诱导棕色脂肪组织产热, 导致突变体的食物摄入量增加, 但由于基础代谢率同时提高而导致并未发生肥胖<sup>[17]</sup>。胎盘特异性抗原8 (编码基因为 *Plac8*) 在白色和棕色脂肪组织中也都有表达, *Plac8*<sup>-/-</sup>小鼠会出现迟发性肥胖, 棕色脂肪分化异常, 产热能力降低。胎盘特异性抗原8在体内对于正常的脂肪细胞数量调节是必需的<sup>[18]</sup>。然而, 胎盘特异性抗原8在中枢的表达情况和功能尚不完全清楚。ATP结合盒式转运蛋白G5 (编码基因为 *Abcg5*) 属于参与分子运输的跨膜蛋白, 其G5与G8形成专性异二聚体, 负责甾醇特别是植物甾醇的跨膜转运; 在人类和小鼠体内 *Abcg5* 缺陷会导致植物固醇在循环和组织中积累, 从而增加动脉粥样硬化的发生风险<sup>[19]</sup>。单酰甘油酰基转移酶2 (编码基因为 *Mogat2*) 能够催化三酰甘油的合

成，这是肠道脂肪吸收所必需的。*Mogat2*<sup>-/-</sup>小鼠表现出能量消耗增加，以及对摄食过量引起肥胖的抵抗。诱导性*Mogat2*基因敲除小鼠也表现出脂肪吸收延迟，食物摄入量减少，并且倾向于使用脂肪酸作为燃料<sup>[20]</sup>。神经调节蛋白1（neuregulin 1，NRG-1）参与消化系统的调节，在外周神经系统中其甲基化与结肠癌有关，在中枢神经系统中主要与神经发育有关，尚无对代谢、摄食等过程作用的报告<sup>[21]</sup>。

在此，对上述基因改变可能产生的效应做一归纳（表2），可以发现，部分起到相反效应的基因同时有改变。例如：在产热方面，*Oxt*、*Trpv1*、*Phox2b*、*Dbh*表达下调导致产热减少，而*Plac8*表达上调导致产热增加；在脂类的代谢方面，*Adipoq*和*Abcg5*表达下调导致脂类吸收和合成增加，而*Mogat2*表达下调导致脂肪吸收延迟。结果提示，可能是差异基因改变的净效应造成了体重增加，又由于涉及上述过程的差异基因以下调为主，推测可能是奥氮平带来的广泛神经阻滞，导致调节消化系统活动、产热、脂类代谢以及奖赏系统的信号传递失衡。

表2 奥氮平引起差异基因改变及可能产生的代谢效应  
Table 2 Differential genes changes inced by olanzapine and possible metabolic effects

| 基因             | 奥氮平给药的影响 | 可能的效应                  |
|----------------|----------|------------------------|
| <i>Oxt</i>     | ↓        | 胃肠道厌食信号减少，享乐性进食增加，产热减少 |
| <i>Trpv1</i>   | ↓        | 胃肠道厌食信号减少，享乐性进食增加，产热减少 |
| <i>Adipoq</i>  | ↓        | 脂类合成增加、降解减少            |
| <i>Phox2b</i>  | ↓        | 产热减少                   |
| <i>Abcg5</i>   | ↓        | 脂类吸收增加                 |
| <i>Mogat2</i>  | ↓        | 脂肪吸收的延迟                |
| <i>Dbh</i>     | ↓        | 产热减少                   |
| <i>Plac8</i>   | ↑        | 产热增加                   |
| <i>Neurog1</i> | ↑        | 未知                     |

此外，*Fos*、*Dusp1*、*Egr2*的共同点是三者均属于即刻早期基因，这是细胞经外部刺激后短暂而迅速被激活的一组基因，是联系细胞生化改变与细胞最终对刺激发生特异性反应的中介物。其中，*c-Fos*是大脑中研究最多的即刻早期基因之一。多项研究表明，不同的刺激可以诱导*c-Fos*基因的表达<sup>[22]</sup>。抗精神病药物确实在某种程度上影响了即刻早期基因的表达，然而结果并不一致，而且它们是相关性研究，并没有涉及

这些蛋白的作用机制<sup>[23]</sup>。本研究发现包括上述在内的多个即刻早期基因在奥氮平给药后下调，提示这些基因的表达下调可能参与奥氮平诱导的体重增加，但其更可能是一种反映神经细胞功能状态的指标，这也与奥氮平作为多受体阻滞剂的药理学特征相符。

综上所述，本研究通过进行全脑水平的转录组测序，发现奥氮平给药造成摄食调控、胃肠运动、产热、脂类吸收和代谢等过程发生显著改变，相关的差异基因通过实时荧光定量PCR进行了验证。由于部分差异基因的改变带来的是相反的效应，提示可能是差异基因改变的净效应最终造成了体重增加，而*Oxt*和*Trpv1*在APs诱导的奖赏驱动的摄食增加中作用如何，值得进一步研究探讨。

[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上海睿太莫斯生物科技有限公司实验动物使用与管理委员会（批号SHRTMOBIO-IACUC-PR01-20211115）和上海市浦东新区精神卫生中心伦理委员会（批号PDJWLL2020036）审查批准。所有实验过程均遵照中国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 Animal Care and Use Committee in Shanghai Rat-Mouse Biotechnology Co.,LTD. (Approval Letter No. SHRTMOBIO-IACUC-PR01-20211115) and Ethics Committee of Shanghai Pudong New Area Mental Health Center (Approval Letter No. PDJWLL 2020036). All experiment procedures were performed in accordance with the requirements of Chinese laws and regulations related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

张渊和李晗贡献相当，分别负责动物饲养、组织留取、PCR实验，或数据整理和分析；张成芳负责实验设计、论文撰写和修改。

[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] CARLI M, KOLACHALAM S, LONGONI B, et al. Atypical antipsychotics and metabolic syndrome: from molecular mechanisms to clinical differences[J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(3):238. DOI: 10.3390/ph14030238.

[2] LORD C C, WYLER S C, WAN R, et al. The atypical antipsychotic olanzapine causes weight gain by targeting serotonin receptor 2C[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(9):3402-3406. DOI: 10.1172/JCI93362.



- [3] ANDERMANN M L, LOWELL B B. Toward a wiring diagram understanding of appetite control[J]. *Neuron*, 2017, 95(4):757-778. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.06.014.
- [4] STIP E, LUNGU O V, ANSELMO K, et al. Neural changes associated with appetite information processing in schizophrenic patients after 16 weeks of olanzapine treatment[J]. *Transl Psychiatry*, 2012, 2(6): e128. DOI: 10.1038/tp.2012.53.
- [5] KEREM L, LAWSON E A. The effects of oxytocin on appetite regulation, food intake and metabolism in humans[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14):7737. DOI: 10.3390/ijms22147737.
- [6] LAWSON E A, OLSZEWSKI P K, WELLER A, et al. The role of oxytocin in regulation of appetitive behaviour, body weight and glucose homeostasis[J]. *J Neuroendocrinol*, 2020, 32(4): e12805. DOI: 10.1111/jne.12805.
- [7] PLATZER M, FELLENDORF F T, BENGESESSER S A, et al. The relationship between food craving, appetite-related hormones and clinical parameters in bipolar disorder[J]. *Nutrients*, 2020, 13(1):76. DOI: 10.3390/nu13010076.
- [8] MATHEWS J, NEWCOMER J W, MATHEWS J R, et al. Neural correlates of weight gain with olanzapine[J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2012, 69(12):1226. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2012.934.
- [9] BENÍTEZ-ANGELES M, MORALES-LÁZARO S L, JUÁREZ-GONZÁLEZ E, et al. TRPV1: structure, endogenous agonists, and mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3421. DOI: 10.3390/ijms21103421.
- [10] KOMARNYTSKY S, RATHINASABAPATHY T, WAGNER C, et al. Endocannabinoid system and its regulation by polyunsaturated fatty acids and full spectrum hemp oils[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11):5479. DOI: 10.3390/ijms22115479.
- [11] POTVIN S, LUNGU O V, STIP E. Anandamide is involved in appetite-related amygdala hyperactivations in schizophrenia patients treated with olanzapine: a functional magnetic resonance imaging study[J]. *J Clin Psychopharmacol*, 2015, 35(1):82-83. DOI: 10.1097/JCP.0000000000000236.
- [12] DERBENEV A V, ZSOMBOK A. Potential therapeutic value of TRPV1 and TRPA1 in diabetes mellitus and obesity[J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(3):397-406. DOI: 10.1007/s00281-015-0529-x.
- [13] BENARROCH L, KOWALCHUK C, WILSON V, et al. Atypical antipsychotics and effects on feeding: from mice to men[J]. *Psychopharmacology*, 2016, 233(14):2629-2653. DOI: 10.1007/s00213-016-4324-8.
- [14] 刘玉芝, 徐乐平, 袁娇, 等. 奥氮平对精神分裂症患者胃动力学的影响[J]. *中国健康心理学杂志*, 2013, 21(8): 1149-1151. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2010.05.014.
- LIU Y Z, XU L P, YUAN J, et al. The influence of olanzapine in the treatment of schizophrenic patients on the gastric motility[J]. *China J Health Psychol*, 2013, 21(8): 1149-1151. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2010.05.014.
- [15] FANG H, JUDD R L. Adiponectin regulation and function[J]. *Compr Physiol*, 2018, 8(3): 1031-1063. DOI: 10.1002/cphy.c170046.
- [16] RAMANANTSOA N, MATROT B, VARDON G, et al. Impaired ventilatory and thermoregulatory responses to hypoxic stress in newborn phox2b heterozygous knock-out mice[J]. *Front Physiol*, 2011, 2:61. DOI: 10.3389/fphys.2011.00061.
- [17] THOMAS S A, PALMITER R D. Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline[J]. *Nature*, 1997, 387(6628): 94-97. DOI: 10.1038/387094a0.
- [18] JIMENEZ-PREITNER M, BERNEY X, THORENS B. Plac8 is required for white adipocyte differentiation in vitro and cell number control in vivo[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48767. DOI: 10.1371/journal.pone.0048767.
- [19] VANMIERLO T, RUTTEN K, VAN VARK- VAN DER ZEE L C, et al. Cerebral accumulation of dietary derivable plant sterols does not interfere with memory and anxiety related behavior in Abcg5<sup>-/-</sup> mice[J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2011, 66(2): 149-156. DOI: 10.1007/s11130-011-0219-3.
- [20] NELSON D W, GAO Y, YEN M I, et al. Intestine-specific deletion of acyl-CoA: monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) 2 protects mice from diet-induced obesity and glucose intolerance[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(25): 17338-17349. DOI: 10.1074/jbc.M114.555961.
- [21] ELLIOTT K L, PAVLÍNKOVÁ G, CHIZHIKOV V V, et al. Development in the mammalian auditory system depends on transcription factors[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4189. DOI: 10.3390/ijms22084189.
- [22] Aggleton JP, Brown MW, Albasser MM. Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: insights from immediate-early gene functional imaging [J]. *Neuropsychologia*, 2012;50(13):3141-3155. DOI: 10.1016/j.neuropsychologia.2012.05.018.
- [23] GALLO F T, KATCHE C, MORICI J F, et al. Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: focus on c-fos, Egr1 and arc[J]. *Front Behav Neurosci*, 2018, 12: 79. DOI: 10.3389/fnbeh.2018.00079.
- (收稿日期: 2023-02-01 修回日期: 2023-04-11)  
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 周培)

#### [引用本文]

张渊, 李哈, 张成芳. 奥氮平诱导体重增加小鼠的全脑转录组学分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(3): 262-270. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.006.

ZHANG Y, LI H, ZHANG C F. Whole-brain transcriptomic analysis of weight gain mice induced by olanzapine[J]. *Lab Anim Comp Med* 2023, 43(3): 262-270. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.006.



费 俭, 博士, 教授, 博士生导师。1988—1999 年就职于中国科学院上海细胞生物研究所; 2000—2007 年就职于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所; 2007 年起就职于同济大学生命科学与技术学院。2000 年作为主要参与者建立了国内首个基因工程小鼠研发和表型分析平台——上海南方模式生物科技发展有限公司(上海南方模式生物研究中心)。主要研究方向是建立各种基因剔除小鼠, 通过分析这些遗传修饰小鼠的表型变化, 获得相关突变基因的功能信息, 并将基因功能直接和疾病进行关联, 从而可以评估这些基因成为药物研发靶点的可能性, 为发现新的基因工程药物奠定基础。主持完成国家级及上海市科研项目 10 余项, 发表学术论文 200 余篇, 获得授权专利 10 余项。

## *hil-1* 基因通过饮食限制通路调节秀丽隐杆线虫寿命

成 慧<sup>1</sup>, 方 菲<sup>1</sup>, 石嘉豪<sup>1</sup>, 杨 桦<sup>1</sup>, 张梦杰<sup>1</sup>, 杨 平<sup>2</sup>, 费 俭<sup>1,2</sup>

(1. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200082; 2. 上海模式动物工程技术研究中心, 上海 201309)

**[摘要]** 目的 揭示 H1 连接子组蛋白基因 (H1 linker histone gene, *hil-1*) 的生理学功能, 以及其调控线虫寿命的分子机制。方法 以秀丽隐杆线虫为模式生物, 采用 RNA 干扰菌喂食、*hil-1(gk229)* 突变体回交纯化以及过表达质粒显微注射技术来敲降、敲除以及过表达 *hil-1* 基因, 然后观察线虫存活寿命及产卵情况, 通过热耐受实验、百草枯应激实验和重金属 Cr<sup>6+</sup> 应激实验评价 *hil-1(gk229)* 突变体的抗逆性, 利用实时荧光定量 PCR 实验以及构建双突变体线虫进一步确定 *hil-1* 调控寿命所关联的信号通路和作用靶点。结果 与野生型 N2 线虫相比, RNA 干扰后的线虫寿命以及 *hil-1(gk229)* 突变体线虫寿命明显缩短 ( $P < 0.001$ ), 而 *hil-1* 全身性过表达后线虫寿命延长 ( $P < 0.05$ )。与野生型 N2 线虫相比, *hil-1(gk229)* 突变体线虫对热压力和氧化压力的耐受性明显降低 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ), 而对重金属的耐受能力无差异 ( $P > 0.05$ )。并且, 相比于野生型 N2 线虫, *hil-1(gk229)* 突变体线虫的发育周期缩短 ( $P < 0.001$ ), 产卵提前 ( $P < 0.001$ ), 但产卵总量没有显著变化 ( $P > 0.05$ )。给 *eat-2(ad465)* 突变体线虫喂食 *hil-1* RNA 干扰菌后, *hil-1* 表达下调不影响 *eat-2(ad465)* 突变体线虫的寿命 ( $P > 0.05$ )。相较于野生型 N2 线虫, *hil-1(gk229)* 突变体线虫中 *daf-16* 表达水平明显下调 ( $P < 0.001$ ), 其下游基因 *mtl-1* 和 *ctl-1* 表达也下调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ )。与 *daf-2(e1370)* 突变体相比, *daf-2(e1370); hil-1(gk229)* 双突变体线虫的寿命无明显变化 ( $P > 0.05$ ); 而与 *daf-16(mu86)* 突变体相比, *daf-16(mu86); hil-1(gk229)* 双突变体线虫的寿命明显缩短 ( $P < 0.001$ )。与对照组相比, 在表皮和肠道中 RNA 干扰 *hil-1* 基因表达后线虫寿命明显缩短 ( $P < 0.001$ )。结论 *hil-1* 基因缺失明显缩短线虫寿命, 同时使线虫对热压力和氧化压力的耐受性降低。*hil-1* 基因可能通过饮食限制信号通路调控秀丽隐杆线虫的寿命, 且该作用主要在表皮和肠道。

**[关键词]** 秀丽隐杆线虫; H1 连接子组蛋白基因; 衰老; 寿命; 饮食限制通路

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0271-11



## H1 Linker Histone Gene Regulates Lifespan via Dietary Restriction Pathways in *Caenorhabditis elegans*

CHENG Hui<sup>1</sup>, FANG Fei<sup>1</sup>, SHI Jiahao<sup>1</sup>, YANG Hua<sup>1</sup>, ZHANG Mengjie<sup>1</sup>, YANG Ping<sup>2</sup>, FEI Jian<sup>1,2</sup>

(1. School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200082, China; 2. Shanghai Model Animal

**[基金项目]** 上海市科学技术委员会科研计划项目“上海模式动物工程技术研究中心”(19DZ2280500)、“上海市比较医学专业技术服务平台”(18DZ2293500)

**[第一作者]** 成 慧(1996—), 女, 硕士, 研究方向: 遗传与衰老。E-mail: 1931474@tongji.edu.cn

**[通信作者]** 费 俭(1965—), 男, 博士, 教授、博士生导师, 研究方向: 基因功能的模式生物研究。E-mail: jfei@tongji.edu.cn。ORCID: 0000-0001-7755-0818

Engineering Technology Research Center, Shanghai 201309, China)

Correspondence to: FEI Jian (ORCID: 0000-0001-7755-0818), E-mail: jfei@tongji.edu.cn

**[ABSTRACT] Objective** To reveal the physiological function of H1 linker histone gene (*hil-1*) and its molecular mechanism for regulating the lifespan in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). **Methods** *C. elegans* was used as a model organism and *hil-1* gene was knock-down, knock-out and over-expressed via RNA interference technology, *hil-1(gk229)* mutants backcross purification and microinjection technology. Then the survival and oviposition of *C. elegans* were observed. Physiological tests including heat shock test, paraquat stress test and heavy metal  $\text{Cr}^{6+}$  stress test were conducted to evaluate the stress resistance of *hil-1* mutants. After constructing a dual mutant nematode, real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to further identify the signaling pathways and target sites associated with *hil-1* gene regulatory lifespan. **Results** Compared with wild-type N2 worms, the lifespan of *C. elegans* of RNA interference and *hil-1(gk229)* mutants were significantly shortened ( $P < 0.001$ ), while overexpression of *hil-1* in the whole body increased lifespan ( $P < 0.05$ ). The tolerance of *hil-1(gk229)* mutants to heat stress and oxidative stress was significantly decreased ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ), but the tolerance to heavy metals was not different compared to wild-type N2 worms ( $P > 0.05$ ). In addition, the developmental cycle of *hil-1(gk229)* mutants was shortened and the time of oviposition was advanced ( $P < 0.001$ ), but there was no significant change in total number of oviposition ( $P > 0.05$ ). After feeding *hil-1* RNA interference bacteria to *eat-2(ad465)* mutants, the down-regulation of *hil-1* expression did not affect the lifespan of *eat-2(ad465)* mutants ( $P > 0.05$ ). Compared with wild-type N2 worms, the expression level of *daf-16* in *hil-1(gk229)* mutants was significantly down-regulated ( $P < 0.001$ ), and the expressions of downstream genes, *mtl-1* and *ctl-1*, were also down-regulated ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ). Compared with *daf-2(e1370)* mutants, the lifespan of *daf-2(e1370); hil-1(gk229)* mutants did not shortened ( $P > 0.05$ ). Compared with *daf-16(mu86)* mutants, the lifespan of *daf-16(mu86); hil-1(gk229)* mutants was significantly shortened ( $P < 0.001$ ). The knockdown of *hil-1* via RNA interference technology, specifically in epidermis and intestine, was sufficient for lifespan reduction ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The deletion of *hil-1* gene significantly shortened the lifespan of *C. elegans* and decreased the tolerance to heat and oxidative stress. The *hil-1* gene regulates the lifespan of *C. elegans* via dietary restriction pathway and acts mostly in epidermis and intestine.

**[Key words]** *Caenorhabditis elegans*; H1 linker histone gene (*hil-1*); Aging; Lifespan; Dietary restriction pathway

衰老是个体随着年龄增长出现的身体结构和生理功能的衰退,是人类癌症、糖尿病、心血管疾病和神经退行性疾病等的重要风险因素<sup>[1]</sup>。当今社会人口老龄化严重,与衰老相关的疾病发生率逐年上升,不仅影响自身健康,也日益加重医疗成本和社会负担。现有研究显示,通过合理干预,人们在一定程度上能够延缓衰老的进程。因此,探索衰老的本质,研究延缓衰老的机制,对于了解生命现象、健康老龄化均具有重要意义。

现有研究中,主要是通过各种模式生物如线虫、果蝇和小鼠等阐明衰老相关的信号通路和分子机制。其中,秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)是衰老研究中常用的一种模式生物,也是第一个完成基因组测序的多细胞生物,有60%~80%的基因与人

类基因同源<sup>[2]</sup>。成年线虫体长约1 mm,有雌雄同体和雄虫两种性别,在正常培养条件下主要以雌雄同体的形式存在,雄虫只占到约0.5%;其生活史简单,在20℃的实验条件下,从受精卵发育到成虫仅需3 d,生命周期为3~4周。一只雌雄同体的线虫一生可以产卵约300枚。1974年,科学家们以线虫为模式生物开始开展与衰老相关的研究工作,许多调控衰老和寿命的通路都是在线虫模型中首先被发现,包括胰岛素/胰岛素样生长因子1信号通路、雷帕霉素受体通路和饮食限制通路等<sup>[3-5]</sup>,并且这些信号通路在进化上高度保守<sup>[6-9]</sup>。

H1连接子组蛋白(H1 linker histone, H1)是一类参与形成超核小体染色质高阶结构的DNA结合蛋白<sup>[10-11]</sup>。已知哺乳动物有11种H1亚型<sup>[12]</sup>。人类



H1.0由194个氨基酸残基组成,其中无序的N端约占23个残基,无序的C端约占97个残基,中间球状结构域约占74个残基。球状结构域是H1中主要负责与核小体上的DNA结合的区域<sup>[13]</sup>。H1参与对基因表达的调控,有研究称H1.0和其他H1亚型相比,更广泛地参与了对基因表达的抑制<sup>[14]</sup>。研究发现不同物种间同种亚型的相似性高于同一物种中不同亚型间的相似性,相比于H1的其他亚型,H1.0在人类、黑猩猩、小鼠、猪等哺乳动物中是最保守的<sup>[15]</sup>。秀丽隐杆线虫中存在7种H1亚型,由*hil-1*~6和*his-24*基因编码。

前期本课题组为了研究衰老过程中相关基因的表达变化,选取成年线虫(10日龄)与老年线虫(22日龄)进行了基因表达芯片分析,发现随着线虫年龄增长,*hil-1*基因表达上调,推测其可能参与了线虫寿命的调控。由于目前尚未有对*hil-1*基因相关功能的文献报告,因此本研究首次利用RNA干扰技术、突变体线虫杂交以及显微注射过表达质粒技术,探讨了*hil-1*基因表达缺失或过量对线虫寿命的影响,并通过环境耐受实验对*hil-1(gk229)*突变体的抗逆性进行评价,以期了解*hil-1*基因的功能及与个体衰老的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 线虫品系、菌株及质粒

野生型秀丽隐杆线虫Bristol(N2),以及突变品系*hil-1(gk229)*、*daf-2(e1370)*、*daf-16(mu86)*、*eat-2(ad465)*和组织特异性品系NR350、TU3311、NR222和VP303均购自美国明尼苏达大学线虫遗传中心(Caenorhabditis Genetics Center, CGC)。在开展寿命实验之前,将*hil-1(gk229)*突变体与野生型N2线虫回交6次,最终获得纯合的*hil-1*基因突变品系。若无特殊说明,实验中线虫的食物为尿嘧啶渗漏缺陷型大肠埃希菌OP50(购自CGC)。HT115感受态菌株购自天根生化科技(北京)有限公司。质粒L4440、pPD95\_75和*Pmyo-3::mCherry::unc-54* 3'UTR均来源于Addgene共享数据库,购自北京中源合聚生物科技有限公司。

### 1.2 试剂与仪器

胰蛋白胨(tryptone,英国Oxoid公司,LP0042),琼脂粉(Agar Powder,美国Sangon Bitech公司,A505255),异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)(美国Sangon Bitech公司,A600168),5-氟去氧尿苷(5-fluoro-2'-deoxyuridine, FUDR)(美国Sangon Bitech公司,A600080),反转录试

剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(日本TaKaRa公司,RR047A),实时荧光定量PCR试剂盒TB Green® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)(日本Takara公司,RR820A),NaCl、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO等试剂(中国医药集团有限公司),反转录试剂TRIzol(天根生化科技(北京)有限公司),48孔培养板(美国Axygen公司)。生化培养箱(日本Sanyo公司,MIR254),体视显微镜(日本Olympus公司,SZ61),PCR仪(德国Eppendorf公司,Eppendorf Mastercycler pro)。

### 1.3 线虫处理实验方法

#### 1.3.1 线虫生长培养基(*C. elegans* growth medium, NGM)的配制

称取3 g NaCl、2.5 g胰蛋白胨、17 g琼脂粉,溶于970 mL ddH<sub>2</sub>O中,灭菌后冷却至60℃左右,依次加入1 mL 5 mg/mL胆固醇、1 mL 1 mol/L CaCl<sub>2</sub>、1 mL 1 mol/L MgSO<sub>4</sub>和25 mL 1 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,无菌状态铺板,室温保存。2 d后涂上适量过夜培养的大肠埃希菌OP50,室温放置2 d,即制成NGM培养基(固态,一般倒置使用,以防细菌污染),可用于线虫培养。

#### 1.3.2 线虫同步化及培养

挑取8~10条复苏后代2~3代并在20℃下正常饲养的产卵期成虫,转移至涂有新鲜OP50菌的60 mm NGM培养基中,放置1 h。收集到适当数量的虫卵后,将成虫移出该培养基,获得的卵孵化后即生长状态一致的同步化线虫。所有品系的线虫均在实验前进行同步化处理。

#### 1.3.3 线虫RNA干扰实验

选取*hil-1*基因的cDNA序列(*hil-1*正向引物为5'-GGACTAGTATGACCACTTCGCTCATC-3';反向引物序列为5'-GGGAAGCTTACAATAGCTCTTT-CTGGTT-3'),以L4440质粒为骨架构建靶标*hil-1*基因的RNA干扰质粒,转入HT115感受态菌株(这是一种RNase III缺陷型大肠埃希菌株,可以用IPTG诱导表达双链RNA,用于RNA干扰),经测序鉴定筛选出含有干扰质粒的克隆菌,将其加到含双抗(100 mg/mL Amp及12.5 mg/mL Tet)的LB液体培养基中,37℃摇床培养过夜。次日将*hil-1* RNA干扰菌株以1:100的体积比接种至LB液体培养基中,加入终质量浓度为50 mg/mL的Amp,37℃摇床培养数小时后用紫外分光光度计测定菌液浓度,待A<sub>600nm</sub>值为1左右时停止培养,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG。按一定比例将菌

液加至含有 1 mmol/L IPTG 的 NGM 培养基上, 用于线虫培养, 即通过给野生型 N2、*eat-2(ad465)* 突变体、组织特异性 RNA 干扰线虫 (NR350、TU3311、NR222 和 VP303) 喂食这种 RNA 干扰细菌, 获得可降低靶标基因 *hil-1* 表达的 RNA 干扰线虫。实验中以喂食 L4440 空质粒的线虫为对照组。

### 1.3.4 显微注射法构建过表达线虫

以 pPD95\_75 质粒为骨架, 构建 *Pdpy-30::GFP::T2A::hil-1* 过表达质粒 (其中 T2A 为共转录原件), 利用全身性表达的 *dpy-30* 基因的启动子驱动绿色荧光报告基因 GFP (删去终止密码子) 和目标基因 *hil-1* 共转录。将过表达质粒与 *Pmyo-3::mCherry::unc-54 3'UTR* 质粒 (其中 mCherry 为红色荧光标记, 可作为显微注射阳性的筛选标记) 混匀, 制备成终质量浓度分别为 100 ng/mL 和 50 ng/mL 的注射液。用显微注射法将混合质粒注射液注入刚成虫 (体内没有卵或有几个卵的) 的线虫生殖囊中。注射成功的线虫单独培养, 3 d 后在荧光显微镜下挑出既发红光又发绿光的子代线虫, 转移到 35 mm NGM 板上单独培养传代。若其后代发光率稳定在 50% 以上, 则视为过表达线虫建成功, 命名为 *hil-1* OE 线虫。

### 1.3.5 杂交法构建双突变体线虫

*hil-1(gk229)* 突变体线虫与野生型 N2 株系雄虫交配, 获得 *hil-1(gk229)* 的雄虫, 再与野生型 N2 的雌雄同体线虫进行 2 次回交, 通过单只线虫基因组 PCR 法鉴定出交配后背景纯化的 *hil-1(gk229)* 基因突变的雌雄同体线虫。使用 *daf-16(mu86)* 雌雄同体线虫和野生型 N2 雄虫进行交配, 得到 *daf-16(mu86)* 的雄虫, 然后再与 *hil-1(gk229)* 雌雄同体线虫交配, 通过单只线虫基因组 PCR 法鉴定出交配后的纯合体雌雄同体, 获得 *daf-16(mu86);hil-1(gk229)* 双突变株线虫。使用 *daf-2(e1370)* 雌雄同体线虫和野生型 N2 雄虫进行交配, 得到 *daf-2(e1370)* 的雄虫, 然后再与 *hil-1(gk229)* 雌雄同体线虫交配, 通过单只线虫基因组 PCR 法和测序法鉴定出交配后的纯合体雌雄同体, 获得 *daf-2(e1370);hil-1(gk229)* 双突变株线虫<sup>[16]</sup>。

## 1.4 观察及评价实验

### 1.4.1 线虫寿命观察

将 RNA 干扰线虫、过表达线虫、*hil-1(gk229)* 突变体线虫和野生型 N2 线虫在 20 °C 下正常饲养, 挑取产卵期成虫各 30 条。将它们转移至涂有新鲜 OP50 菌的 100 mm NGM 培养基中, 放置 2 h 收集到 200~300 个虫

卵后, 将成虫从培养基挑出。待虫卵发育至成虫后, 将线虫挑至涂有 OP50 菌且含有 12.5 mg/mL FUDR 的 60 mm NGM 培养基中, 每个培养基上放置 35 条线虫。培养过程中用挑针轻轻触碰线虫头部, 如果没有发生摆动反应, 则判断它已死亡, 并将其移出培养基。寿命分析实验设置 3 个重复, 以线虫挑进培养基为第一天 (Day1), 以最后一条线虫死亡为实验终点<sup>[17]</sup>, 每 2 d 记录线虫死亡情况和存活数量, 以此绘制线虫存活曲线。

### 1.4.2 热耐受实验

*hil-1(gk229)* 突变体线虫和野生型 N2 线虫在 20 °C 下正常饲养, 将成虫第一天的同步化线虫挑至涂有 OP50 菌的 60 mm NGM 培养基中, 每个培养基放置 30 条线虫, 每种线虫重复 3 个培养基。将各类线虫及培养基放入 35 °C 培养箱中培养, 每 3 h 记录线虫死亡情况和存活数量。线虫死亡的标准定义为震动、强光照射后身体不动<sup>[18]</sup>。

### 1.4.3 百草枯应激实验

*hil-1(gk229)* 突变体线虫和野生型 N2 线虫在 20 °C 下正常饲养, 将成虫第一天的同步化线虫挑入加了 90  $\mu$ L M9 缓冲液的 48 孔培养板孔中, 每孔 30 条线虫。每种线虫重复 3 个孔, 每孔加入 30  $\mu$ L 200 mmol/L 的百草枯溶液 (终浓度为 50 mmol/L), 对照组加入 30  $\mu$ L M9 缓冲液。各组线虫置于 20 °C 继续培养, 每 12 h 记录线虫死亡情况和存活数量。线虫死亡的标准为震动、强光照射后身体不动<sup>[18]</sup>。

### 1.4.4 重金属 Cr<sup>6+</sup> 应激实验

*hil-1(gk229)* 突变体线虫和野生型 N2 线虫在 20 °C 下正常饲养, 将成虫第一天的同步化线虫挑入加了 270  $\mu$ L M9 缓冲液的 48 孔培养板孔中, 每孔 30 条线虫。每种线虫重复 3 个孔, 每孔加入 30  $\mu$ L 100 mmol/L 的 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 溶液 (终浓度为 10 mmol/L), 对照组加入 30  $\mu$ L M9 缓冲液。各组线虫置于 20 °C 继续培养, 每 12 h 记录线虫死亡情况和存活数量。线虫死亡的标准为震动、强光照射后身体不动<sup>[18]</sup>。

### 1.4.5 线虫生长及产卵统计

*hil-1(gk229)* 突变体线虫和野生型 N2 线虫在 20 °C 下正常饲养, 记录线虫从卵发育阶段到产下第一颗卵的时间, 观察 L4 期的体型、生殖囊中有无成型卵, 测量其体长。将 L4 期同步化线虫挑至涂有 OP50 菌的 60 mm NGM 培养基中, 每个培养基放置 5 条, 每种线虫重复 3 个培养基并标记序号。每隔 24 h 将线虫挑至对

应序号的新涂有 OP50 菌的 60 mm NGM 培养基中，记录原来培养基中产卵的数量，直至线虫产卵结束。

1.4.6 实时荧光定量 PCR 检测寿命相关信号通路及靶点基因表达

使用 TRIzol 法从野生型 N2 线虫以及 *hil-1* (*gk229*) 突变体线虫中提取总 RNA，取 1  $\mu$ g 转录成 cDNA。应用实时荧光定量 PCR 检测 *hil-1* 以及胰岛素信号通路相关基因 *daf-16* 及其靶基因 *mtl-1* 和 *ctl-1* 的 mRNA 水平，以 *act-4* 作为内参。引物序列见表 1。PCR 反应体系包括 PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (2 $\times$ ) 10  $\mu$ L，正反向引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.8  $\mu$ L，ROX Reference Dye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ L，cDNA 反应液 2  $\mu$ L，ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。PCR 反应条件为 50  $^{\circ}$ C 2 min，95  $^{\circ}$ C 2 min；95  $^{\circ}$ C 15 s，60  $^{\circ}$ C 1 min，40 个循环。熔解曲线反应条件：95  $^{\circ}$ C 15 s，60  $^{\circ}$ C 1 min，95  $^{\circ}$ C 15 s。结果以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析目的基因的相对表达量。

表1 PCR引物序列  
Table 1 Prime sequences for PCR

| 基因            | 引物序列                                    |
|---------------|-----------------------------------------|
| Gene          | Sequences of primers                    |
| <i>hil-1</i>  | Forward: 5'-AATGGAACCGGAAGCAGCAA-3'     |
|               | Reverse: 5'-TCCGCGAGTCTGTTCATGT-3'      |
| <i>daf-16</i> | Forward: 5'-GCTCCCTTCACTCGACACTT-3'     |
|               | Reverse: 5'-TTCGATTGAGTTCGGGGACG-3'     |
| <i>mtl-1</i>  | Forward: 5'-GCTTGCAAGTGTGACTGCAA-3'     |
|               | Reverse: 5'-TTGATGGGTCTTGCTCTCCGC-3'    |
| <i>ctl-1</i>  | Forward: 5'-TACCGAGGAGGGTAAGTGGG-3'     |
|               | Reverse: 5'-AGTCTGTGGATTGCGCTTCA-3'     |
| <i>act-4</i>  | Forward: 5'-GCCACCGCTGCCTCCTCATC-3'     |
|               | Reverse: 5'-CCGGCAGACTCCATACCCAAGAAG-3' |

1.5 数据处理和统计学分析

每个实验至少重复 3 次，每次至少 3 个平行操作，实验数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示。使用 GraphPad Prism version 7.0 软件进行数据分析及统计作图。线虫寿命数据采用 log-rank (Mantel-Cox) 检验分析。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *hil-1* 基因参与调控线虫寿命

首先利用 RNA 干扰技术，给野生型 N2 线虫喂食 *hil-1* RNA 干扰菌株，结果显示线虫寿命明显缩短；统计分析显示，与空质粒 L4440 对照组相比，RNA 干扰

线虫的平均寿命缩短了 23.53% ( $P < 0.001$ ，图 1A)。

为进一步验证 *hil-1* 基因缺失对线虫寿命的影响，利用 *hil-1* (*gk229*) 突变体验证了 *hil-1* RNA 干扰的结果。结果显示 *hil-1* (*gk229*) 突变体线虫的平均寿命是 18 d，野生型 N2 线虫的平均寿命是 22 d，*hil-1* (*gk229*) 突变体的平均寿命相比于野生型 N2 线虫显著缩短 ( $P < 0.001$ ，图 1B)。

另外，利用显微注射过表达质粒的方法将 *hil-1* 全身性过表达后，*hil-1* OE 线虫的平均寿命相比于野生型 N2 线虫有所延长 ( $P < 0.05$ ，图 1C)。这些结果表明，*hil-1* 基因参与调控线虫寿命。线虫寿命实验的具体数据分析见表 2。

2.2 *hil-1* 缺失导致线虫对环境耐受能力降低

对 *hil-1* (*gk229*) 突变体线虫和野生型 N2 线虫分别进行了 35  $^{\circ}$ C 热耐受实验、百草枯应激实验和重金属 Cr<sup>6+</sup> 应激实验，以测试它们耐受热压力、氧化压力和重金属压力的能力差异。结果显示，在 35  $^{\circ}$ C 环境下，*hil-1* (*gk229*) 突变体相比于野生型 N2 线虫对热压力的耐受能力显著降低 ( $P < 0.001$ ，图 2A)。

在用 50 mmol/L 的百草枯处理 12 h 时，野生型 N2 线虫的存活率接近 70%，而 *hil-1* (*gk229*) 突变体线虫的存活率约为 45%，表明 *hil-1* (*gk229*) 突变体相比于野生型 N2 线虫对氧化压力的耐受降低 ( $P < 0.05$ ，图 2B)。但在 10 mmol/L K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 处理下，*hil-1* (*gk229*) 突变体相比于野生型 N2 线虫对重金属的耐受力并无显著差异 ( $P > 0.05$ ，图 2C)。

这些结果表明，*hil-1* 缺失导致线虫对热压力和氧化压力的耐受能力降低。

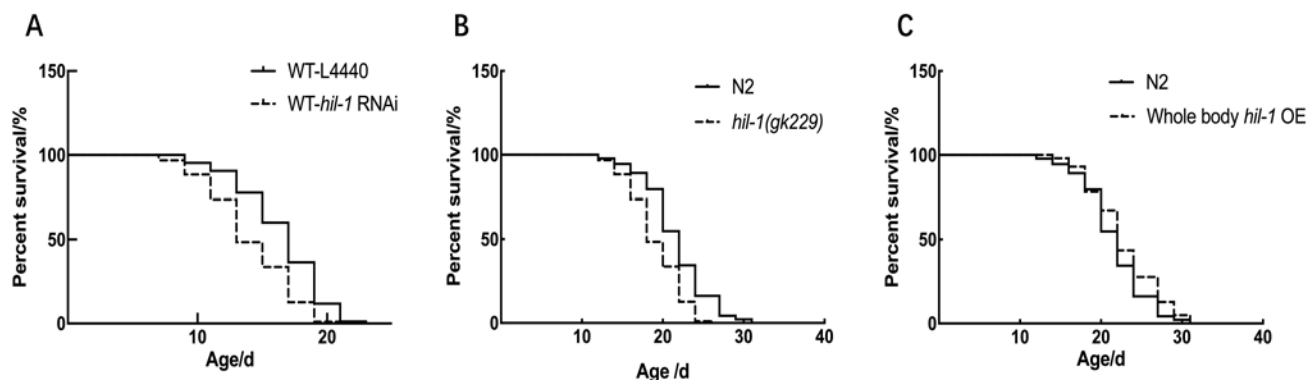
2.3 *hil-1* 缺失影响线虫的生长和生殖

实验过程中发现，*hil-1* (*gk229*) 突变体线虫在发育过程中，相比于野生型 N2 线虫发育成成虫的时间提前。L4 期时，*hil-1* (*gk229*) 突变体比野生型 N2 线虫的体长更长，且在生殖囊中观察到有卵成型，而野生型 N2 线虫的生殖囊中还未有成型的卵，但成虫后两者体型并无明显差异 (图 3A)。

统计了 *hil-1* (*gk229*) 突变体和野生型 N2 线虫从卵发育阶段到产下第一颗卵的时间，发现 *hil-1* (*gk229*) 突变体线虫的平均发育时间是 65 h，而野生型 N2 线虫的平均发育时间是 69 h (图 3B)，表明 *hil-1* 突变会导致线虫发育周期缩短 ( $P < 0.001$ )，但并不影响成虫的体长。

同时，从 L4 期开始，每隔 24 h 统计 *hil-1* (*gk229*)



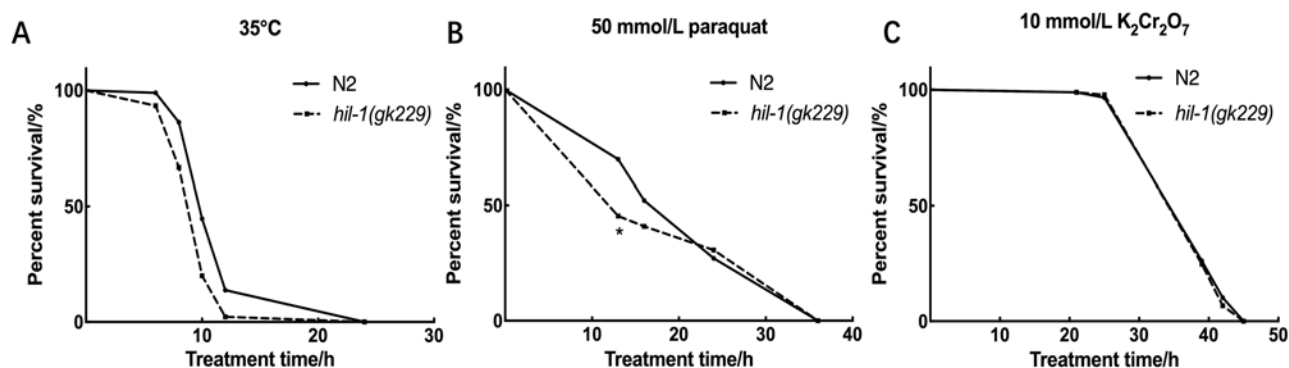


注：A，野生型 N2 线虫喂食 *hil-1* RNA 干扰 (RNAi) 菌的生存曲线 [与对照组 (喂食 L4440) 相比， $P < 0.001$ ]；B，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体线虫的生存曲线 (与 N2 线虫相比， $P < 0.001$ )；C，野生型 N2 线虫与 *hil-1* 全身性过表达线虫 (*hil-1* OE) 的生存曲线 (与 N2 线虫相比， $P < 0.05$ )。

Note: A, Survival curves of wild-type N2 worms fed *hil-1* RNA interference (RNAi) bacteria [compared with control group (fed L4440),  $P < 0.001$ ]; B, Survival curves of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutants (compared with N2,  $P < 0.001$ ); C, Survival curves between wild-type N2 nematode and *hil-1* systemic overexpression worms (compared with N2 nematode,  $P < 0.05$ ).

图1 *hil-1*参与线虫寿命的调控

Figure 1 *hil-1* is involved in regulation of the lifespan in *C. elegans*



注：A，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体线虫从 20 °C 转移至 35 °C 环境中的生存曲线， $P < 0.001$ ；B，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体在 50 mmol/L 百草枯环境中的生存曲线， $*P < 0.05$ ；C，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体在 10 mmol/L  $K_2Cr_2O_7$  环境中的生存曲线， $P > 0.05$ 。

Note: A, Survival curves of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms transferred from 20 °C to 35 °C,  $P < 0.001$ ; B, Survival curves of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms exposed to 50 mmol/L paraquat,  $*P < 0.05$ ; C, Survival curves of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms exposed to 10 mmol/L  $K_2Cr_2O_7$ ,  $P > 0.05$ .

图2 *hil-1*缺失降低了线虫对热压力和氧化压力的耐受性

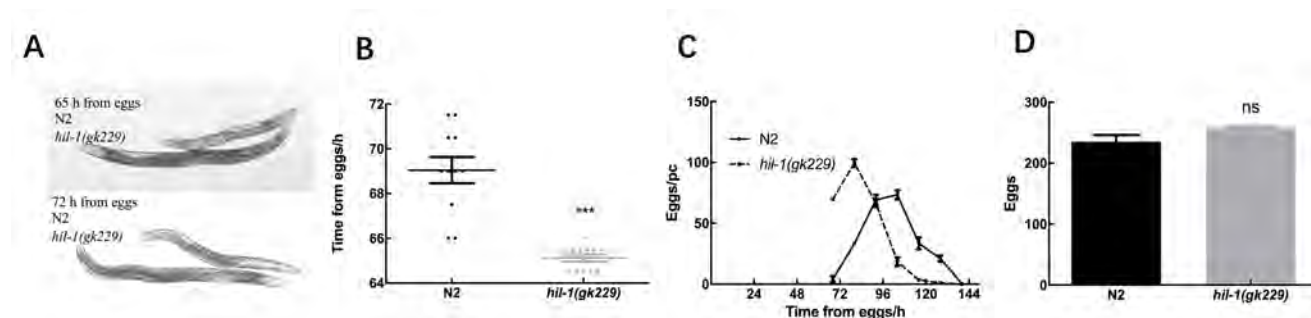
Figure 2 The deletion of *hil-1* reduces the tolerance to heat shock and oxidative stress of *C. elegans*

突变体和野生型 N2 线虫的产卵情况，结果表明 *hil-1(gk229)* 突变体线虫的产卵高峰期在卵孵化后 80 h，而野生型 N2 线虫的产卵高峰期在卵孵化后 116 h，提示产卵时间提前 ( $P < 0.001$ ，图 3C)，但在产卵总数方面 *hil-1(gk229)* 突变体与野生型 N2 之间没有显著差异 ( $P > 0.05$ ，图 3D)。

以上结果表明 *hil-1* 缺失会导致线虫发育周期缩短，产卵时间提前，但并不影响线虫产卵总数。

## 2.4 *hil-1* 依赖饮食限制信号通路调控寿命

以往研究发现成年线虫经过急性饥饿处理后，连接组蛋白 HIL-1 的表达水平上调<sup>[19]</sup>，而且 HIL-1 主要在线虫咽部的边缘细胞中表达<sup>[20]</sup>。*hil-1(gk229)* 是一种 *eat-2* 基因发生无义突变的突变体线虫，由于突变带入了终止密码子，造成了 EAT-2 蛋白翻译提前终止。*hil-1(gk229)* 突变体咽部抽吸能力低于正常线虫，通过减少摄食达到饮食限制的效果，达到饮食限制的目的，



注：A，分别在卵发育 65 h 和 72 h 时在显微镜下观察野生型 N2 线虫和 *hil-1(gk229)* 突变体线虫（放大倍数 100X）；B，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体线虫从卵发育到产下第一颗卵所用时间，每组各 10 条线虫，\*\*\* $P < 0.001$ ；C，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体从卵发育开始每 12 h 平均产卵量，每组均不少于 10 条线虫；D，野生型 N2 线虫与 *hil-1(gk229)* 突变体平均产卵总量，每组均不少于 10 条线虫， $P > 0.05$ 。

Note: A, Observing the morphology of eggs of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms at 65 h and 72 h of development under microscope, with magnification of 100X; B, The duration of wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms from egg to the laying of the first egg,  $n = 10$  in each group, \*\*\* $P < 0.001$ ; C, The average number of eggs production every 12 h from egg development in wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms,  $n > 10$  in each group; D, The total number of eggs in wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms.  $n > 10$  in each group, <sup>ns</sup> $P > 0.05$ .

图3 *hil-1* 缺失影响线虫发育

Figure 3 The deletion of *hil-1* affects the development of *C. elegans*

并延长线虫寿命<sup>[21]</sup>。为了探究 *hil-1* 是否通过饮食限制通路调节线虫寿命，本研究给 *hil-1(gk229)* 突变体线虫喂食 *hil-1* RNA 干扰菌，即在饮食限制的背景下，利用 RNAi 干扰技术降低 *hil-1* 的表达，通过探究 *hil-1* 降低表达后短寿效应是否消除，来明确 *hil-1* 与通路之间的关系。

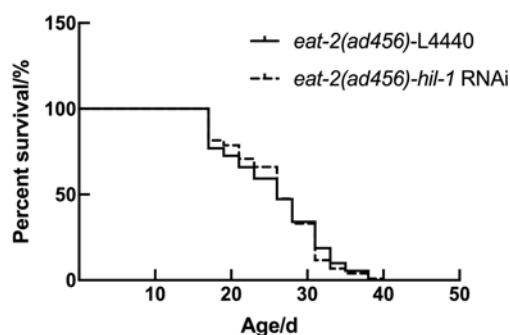
寿命观察结果发现，与喂食空质粒 L4440 的对照组相比，*hil-1* 表达下调并不影响 *eat-2(ad465)* 突变体

线虫的寿命 ( $P > 0.05$ ，图4)，这表明 *hil-1* 可能通过影响饮食限制通路来调节线虫寿命。线虫寿命实验的具体数据分析见表2。

## 2.5 *hil-1* 不完全依赖胰岛素信号通路调控寿命

在线虫中，*daf-2* 编码胰岛素信号通路受体，*daf-16* 是下游转录因子，当 *daf-2* 发生突变后，该信号通路下调，使得 DAF-16 去磷酸化，易位进入细胞核并调控系列基因的表达，从而引起线虫寿命的延长<sup>[22-23]</sup>。将 *hil-1(gk229)* 和 *daf-2(e1370)* 突变体线虫进行杂交，得到包含两种基因型的双突变体线虫 *daf-2(e1370); hil-1(gk229)*，进行寿命分析。结果显示，尽管 *hil-1* 的缺失在前期降低了 *daf-2(e1370)* 突变体线虫的生存率，但在整体水平上 *daf-2(e1370); hil-1(gk229)* 突变体与 *daf-2(e1370)* 突变体相比，两者寿命无明显差异 ( $P > 0.05$ ) (图5A)，这说明 *hil-1(gk229)* 突变缩短寿命的效应依赖于 *daf-2*。

为了进一步探究 *hil-1* 与 *daf-2* 下游基因 *daf-16* 之间的相关性，通过实时荧光定量 PCR 检测到相较于野生型 N2 线虫，*hil-1(gk229)* 突变体线虫中 *daf-16* 表达水平下调幅度近一倍以上 ( $P < 0.001$ ，图5B)，其下游基因 *mtl-1* 和 *ctl-1* 的表达也显著下调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ，图5C)，这提示 *hil-1* 可能通过 *daf-16* 影响线虫寿命。接下来，构建了 *daf-16* 和 *hil-1* 的双突变线虫 *daf-16(mu86); hil-1(gk229)*，观察发现在 *hil-1* 缺失后，*daf-16(mu86)* 突变体线虫的寿命进一步缩短 ( $P < 0.001$ ，图



注：*eat-2(ad465)* 突变体喂食 *hil-1* RNA 干扰 (RNAi) 菌的生存曲线。与对照组 (喂食 L4440) 相比， $P > 0.05$ 。

Note: Survival curves of *eat-2(ad465)* mutants fed *hil-1* RNA interference (RNAi) bacteria. Compared with control group (fed L4440),  $P > 0.05$ .

图4 *hil-1* 敲降不影响 *eat-2(ad465)* 突变体寿命

Figure 4 The knockdown of *hil-1* has no significant effect on the lifespan of *eat-2(ad465)*

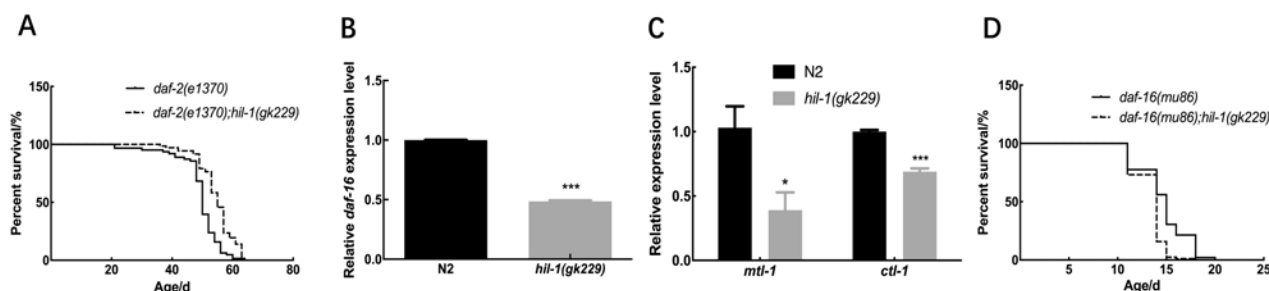
5D), 这表明 *hil-1* 突变导致的寿命缩短不完全依赖于 *daf-16*。线虫寿命实验的具体数据分析见表2。

## 2.6 *hil-1* 作用于表皮和肠道调控寿命

为了进一步确定 *hil-1* 调控线虫寿命的作用部位, 利用组织特异性 RNA 干扰线虫 (肌肉组织 NR350、神经元 TU3311、表皮组织 NR222、肠道组织 VP303), 给其喂食 *hil-1* RNA 干扰菌株, 进行寿命观察。结果表明, 与对照组相比, 在肌肉和神经元中 RNA 干扰 *hil-1* 基因表达后, 线虫寿命无显著变化 (图 6A ~ B,  $P>0.05$ ), 而在表皮和肠道中 RNA 干扰 *hil-1* 基因表达后, 线虫寿命明显缩短 (图 6C ~ D,  $P<0.001$ )。线虫寿命实验的具体数据分析见表2。这些结果表明 *hil-1* 调节寿命的作用部位主要在表皮和肠道组织。

## 3 讨论

秀丽隐杆线虫是最早使用且最常用的衰老研究模式生物之一<sup>[24]</sup>。本课题组前期实验结果表明, *hil-1* 在线虫衰老过程中表达水平显著上调。*hil-1* 与哺乳动物 H1.0 连接子组蛋白同源, H1.0 连接子组蛋白在维持高阶染色质结构和调节基因表达中起着重要作用<sup>[25]</sup>, 但尚不清楚是否对寿命有调控作用。本研究发现 *hil-1* 参与了线虫寿命的调控。有研究表明 H1.0 连接子组蛋白参与哺乳动物的发育过程和组织分化<sup>[26]</sup>。果蝇中的 H1 变体 dBigH1 是果蝇卵巢中生殖干细胞 (germ line stem cell, GSC) 调节所必需, 该变体缺失激活 GSC 分化因子 *bam*, 导致 GSC 过早分化, 产卵总量减少<sup>[27]</sup>。在线虫中, 本研究发现 *hil-1* 缺失并不会导致产卵总量

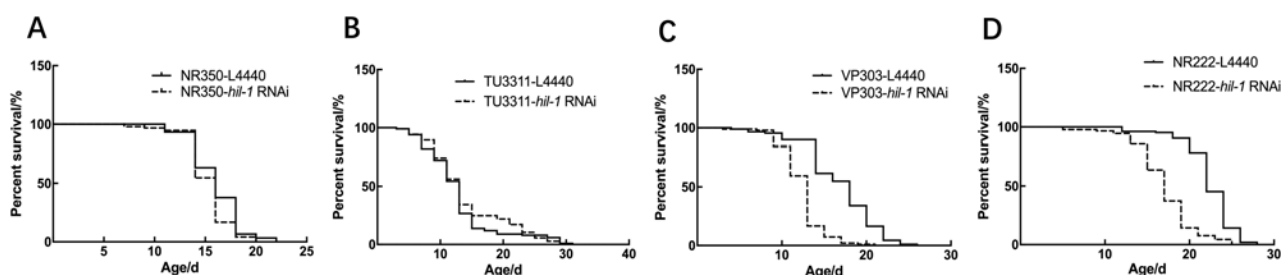


注: A, *daf-2(e1370)* 突变体和 *daf-2(e1370);hil-1(gk229)* 双突变体线虫的生存曲线,  $P>0.05$ ; B, 野生型 N2 线虫和 *hil-1(gk229)* 突变体线虫中 *daf-16* 的表达量 (与 N2 相比,  $***P<0.001$ ); C, 野生型 N2 线虫和 *hil-1(gk229)* 突变体线虫中 *daf-16* 下游靶基因 *mtl-1* 和 *ctl-1* 的表达 (与 N2 相比,  $*P<0.05$ ,  $***P<0.001$ ); D, *daf-16(mu86)* 突变体和 *daf-16(mu86);hil-1(gk229)* 双突变体线虫的生存曲线,  $P<0.001$ 。

Note: A, Survival curves of *daf-2(e1370)* mutant worms and *daf-2(e1370);hil-1(gk229)* mutant worms,  $P>0.05$ ; B, Analysis of the expression levels of *daf-16* gene in wild-type N2 worms and *hil-1(gk229)* mutant worms (Compared with wild-type N2 worms,  $***P<0.001$ ); C, Analysis of the expression levels of *daf-16* target genes *mtl-1* and *ctl-1* in wild-type N2 and *hil-1(gk229)* mutant worms (compared with wild-type N2 worms  $*P<0.05$ ,  $***P<0.001$ ); D, Survival curves of *daf-16(mu86)* mutant worms and *daf-16(mu86);hil-1(gk229)* mutant worms,  $P<0.001$ .

图5 *hil-1* 不完全依赖胰岛素信号通路调控线虫寿命

Figure 5 *hil-1* is not completely dependent on insulin signaling pathway to regulate lifespan of *C. elegans*



注: A ~ D 分别为肌肉 (A)、神经 (B)、表皮 (C) 和肠道 (D) 组织特异性 RNA 干扰 (RNAi) 线虫喂食 *hil-1* RNA 干扰菌株后的生存曲线。仅在表皮或者肠道组织降敲 *hil-1* 基因表达会显著缩短线虫寿命。

Note: A-D, Survival curves of worms with tissue-specific knockdown of *hil-1* in muscle (A), neuron (B), hypodermis (C) and intestine (D), respectively. Lifespan is shortened only in hypodermis-specific RNA interference (RNAi) or intestine-specific RNAi worms.

图6 *hil-1* 作用于表皮和肠道调控线虫寿命

Figure 6 *hil-1* acts in the hypodermis or intestine to regulate lifespan



表2 线虫寿命实验的数据分析

Table 2 Analysis of experimental data of lifespan in *C. elegans*

| 线虫种类<br><i>C. elegans</i> strains       | 线虫数量<br>Number | 平均寿命<br>Mean lifespan /d |
|-----------------------------------------|----------------|--------------------------|
| N2                                      | 94             | 22±0.23                  |
| <i>hil-1(gk229)</i>                     | 95             | 18±0.67***               |
| Whole body <i>hil-1</i> OE              | 101            | 22±0.22*                 |
| <i>daf-2(e1370)</i>                     | 101            | 47±0.46                  |
| <i>daf-2(e1370);hil-1(gk229)</i>        | 97             | 47±0.57                  |
| <i>daf-16(mu86)</i>                     | 98             | 15±0.24                  |
| <i>daf-16(mu86);hil-1(gk229)</i>        | 82             | 14±0.26▲▲▲               |
| N2-L4440                                | 85             | 17±0.23                  |
| N2- <i>hil-1</i> RNAi                   | 95             | 13±0.60△△△               |
| <i>eat-2(ad465)</i> -L4440              | 91             | 26±0.41                  |
| <i>eat-2(ad465)</i> - <i>hil-1</i> RNAi | 103            | 26±0.42                  |
| NR350-L4440                             | 90             | 16±0.56                  |
| NR350- <i>hil-1</i> RNAi                | 95             | 16±0.57                  |
| TU3311-L4440                            | 101            | 13±0.28                  |
| TU3311- <i>hil-1</i> RNAi               | 105            | 13±0.33                  |
| NR222-L4440                             | 105            | 22±0.27                  |
| NR222- <i>hil-1</i> RNAi                | 91             | 17±0.34 <sup>aaa</sup>   |
| VP303-L4440                             | 91             | 18±0.62                  |
| VP303- <i>hil-1</i> RNAi                | 96             | 13±0.44 <sup>bbb</sup>   |
| AMJ345-L4440                            | 99             | 15±0.21                  |
| AMJ345- <i>hil-1</i> RNAi               | 99             | 15±0.23 <sup>cc</sup>    |

注：与N2线虫相比，\**P*<0.05，\*\*\**P*<0.001；与*daf-16 (mu86)* 线虫相比，▲▲▲*P*<0.001；与N2-L4440 线虫相比，△△△*P*<0.001；与NR222-L4440 线虫相比，<sup>aaa</sup>*P*<0.001；与VP303-L4440 相比，<sup>bbb</sup>*P*<0.001；与AMJ345-L4440，<sup>cc</sup>*P*<0.01。

Note: Compared with wild-type N2 worms, \**P*<0.05, \*\*\**P*<0.001; Compared with *daf-16 (mu86)* mutant worms, ▲▲▲*P*<0.001; Compared with N2-L4440 worms, △△△*P*<0.001; Compared with NR222-L4440 worms, <sup>aaa</sup>*P*<0.001; Compared with VP303-L4440 worms, <sup>bbb</sup>*P*<0.001; Compared with AMJ345-L4440 worms, <sup>cc</sup>*P*<0.01.

减少，但是会导致产卵时间提前。

抗压性检测是研究衰老和健康跨度的重要手段<sup>[28]</sup>。本研究通过热耐受和百草枯、重金属Cr<sup>6+</sup>应激实验发现，*hil-1* 缺失会使线虫对热压力和氧化压力的耐受能力下降，但对重金属镉的耐受能力无影响。并且本研究发现，*hil-1* 的缺失降低了*mtl-1* 和*ctl-1* 基因mRNA水平的表达。以往研究显示，*mtl-1* 编码金属硫蛋白可以延长线虫寿命<sup>[29]</sup>；在热刺激下，*mtl-1* 在咽部细胞诱导表达<sup>[30]</sup>；*ctl-1* 编码过氧化氢酶，可以帮助线虫抵御氧化损伤<sup>[31]</sup>。这些文献报告与本研究中*hil-1(gk229)* 突变体对热压力和氧化压力的耐受能力降低的结果相一致。因此推测，*hil-1(gk229)* 突变体线虫寿命缩短可能是由于其对热压力和氧化压力的耐受能力降低所导致。

在不同物种中，饮食限制是延缓衰老、延长寿命最有效的手段之一。对线虫进行间歇性禁食，其寿命可以延长50%以上<sup>[3]</sup>。成年线虫经历急性饥饿处理后，*HIL-1* 的表达水平上调<sup>[19]</sup>。本研究发现，在饮食限制的条件下，通过RNA干扰下调*hil-1* 表达，对线虫寿命无显著性影响。已有研究表明，*H1.X* 在线虫咽部的边缘细胞中突出表达，*H1.X* 的RNA干扰导致咽部纵向扩大<sup>[20]</sup>。笔者推测*hil-1* 有可能通过影响咽部肌肉的发育改变线虫的抽吸速率，进而通过饮食限制信号通路调节线虫寿命。

另外，饮食限制会导致碳水化合物摄入减少，从而降低胰岛素信号的传导<sup>[32]</sup>。本研究发现*hil-1* 缺失线虫缩短寿命的效应依赖于*daf-2*，*hil-1* 缺失降低了*daf-16* 的表达。有文献报告*daf-16* 对线虫寿命的调控主要作用于肠道<sup>[33]</sup>，而本研究发现*hil-1* 对线虫寿命的影响也主要来自其对表皮和肠道的调控，因此提示*hil-1* 缺失线虫缩短寿命的效应可能有*daf-16* 的参与。但是本研究还发现，*daf-16(mu86);hil-1(gk229)* 双突变体线虫的寿命进一步缩短，说明*hil-1* 并不完全依赖胰岛素信号通路来调节线虫寿命。

此外，已有研究表明，饮食限制对个体的调节可以是广泛且多位点的。例如，饮食限制可以负调控雷帕霉素和S6激酶信号通路<sup>[34]</sup>，抑制这一过程可以阻断饮食限制介导的线虫寿命延长<sup>[35-36]</sup>；同时胰岛素/胰岛素样生长因子1信号通路下游最重要的调控寿命的转录因子*skn-1* 缺失也会抑制饮食限制引起的线虫寿命延长<sup>[37]</sup>。据此，笔者推测*hil-1* 对线虫寿命的调控可能涉及多条信号通路，需要进一步探究。

综上所述，本研究揭示了*hil-1* 的生理学功能，初步探究了*hil-1* 调控线虫寿命的分子机制，为研究衰老机制提供了实验基础和理论依据。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的动物实验均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals.

[作者贡献 Author Contribution]

成慧与方菲负责方法设计与实验操作、结果分析、论文构思及初稿撰写；  
石嘉豪负责项目管理、质粒构建；  
杨桦和张梦杰负责文稿校正；  
杨平负责线虫品系提供、方法设计；  
费俭负责方案策划、项目管理、获取资助、论文修改及定稿。

**[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] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, et al. The hallmarks of aging[J]. Cell, 2013, 153(6):1194-1217. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- [2] NIGON V M, FÉLIX M A. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms[J]. WormBook, 2017, 2017:1-84. DOI: 10.1895/wormbook.1.181.1.
- [3] HONJOH S, YAMAMOTO T, UNO M, et al. Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*[J]. Nature, 2009, 457(7230): 726-730. DOI: 10.1038/nature07583.
- [4] KENYON C, CHANG J, GENSCH E, et al. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type[J]. Nature, 1993, 366(6454):461-464. DOI: 10.1038/366461a0.
- [5] VELLAI T, TAKACS-VELLAI K, ZHANG Y, et al. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*[J]. Nature, 2003, 426(6967):620.
- [6] HARRISON D E, STRONG R, DAVE SHARP Z, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice[J]. Nature, 2009, 460(7253): 392-395. DOI: 10.1038/nature08221.
- [7] KAEBERLEIN M, POWERS R W 3rd, STEFFEN K K, et al. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients[J]. Science, 2005, 310(5751):1193-1196.
- [8] KENYON C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants[J]. Cell, 2005, 120(4):449-460.
- [9] KAPAH P, ZID B M, HARPER T, et al. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway[J]. Curr Biol, 2004, 14(10):885-890.
- [10] NOLL M, KOROBERG R D. Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1[J]. J Mol Biol, 1977, 109(3):393-404. DOI: 10.1016/S0022-2836(77)80019-3.
- [11] ALLAN J, HARTMAN P G, CRANE-ROBINSON C, et al. The structure of histone H1 and its location in chromatin[J]. Nature, 1980, 288(5792):675-679. DOI: 10.1038/288675a0.
- [12] HERGETH S P, SCHNEIDER R. The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle[J]. EMBO Rep, 2015, 16(11): 1439-1453. DOI: 10.15252/embr.201540749.
- [13] HAO F F, KALE S, DIMITROV S, et al. Unraveling linker histone interactions in nucleosomes[J]. Curr Opin Struct Biol, 2021, 71: S0959-S440X(21)00083-X. DOI: 10.1016/j.sbi.2021.06.001.
- [14] BHAN S, MAY W, WARREN S L, et al. Global gene expression analysis reveals specific and redundant roles for H1 variants, H1c and H1(0), in gene expression regulation[J]. Gene, 2008, 414(1-2):10-18. DOI: 10.1016/j.gene.2008.01.025.
- [15] DI LIEGRO C, SCHIERA G, DI LIEGRO I. H1.0 linker histone as an epigenetic regulator of cell proliferation and differentiation[J]. Genes, 2018, 9(6): 310. DOI: 10.3390/genes9060310.
- [16] 石锦平, 任长虹, 李媛, 等. 秀丽隐杆线虫双突变株系 hif-1(ia04); glb-13(tm2825)的制备与鉴定[J]. 军事医学, 2011, 35(4):253-257. DOI:10.3969/j.issn.1674-9960.2011.04.004.
- [17] SHI J P, REN C H, LI Y, et al. Construction and characterization of double mutant strain hif-1(ia04); glb-13(tm2825) in *C. elegans*[J]. Military Medical Sciences, 2011, 35(4):253-257. DOI:10.3969/j.issn.1674-9960.2011.04.004.
- [18] ZHAO Y, GILLIAT A F, ZIEHM M, et al. Two forms of death in ageing *Caenorhabditis elegans*[J]. Nat Commun, 2017, 8: 15458. DOI: 10.1038/ncomms15458.
- [19] YANG P, SUN R L, YAO M H, et al. A C-terminal truncated mutation of spr-3 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013, 45(7): 540-548. DOI: 10.1093/abbs/gmt048.
- [20] LARANCE M, POURKARIMI E, WANG B, et al. Global proteomics analysis of the response to starvation in *C. elegans*[J]. Mol Cell Proteomics, 2015, 14(7): 1989-2001. DOI: 10.1074/mcp.M114.044289.
- [21] JEDRUSIK M A, VOGT S, CLAUS P, et al. A novel linker histone-like protein is associated with cytoplasmic filaments in *Caenorhabditis elegans*[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 14):2881-2891.
- [22] HUANG C, XIONG C J, KORNFIELD K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(21):8084-8089.
- [23] LEE S S, KENNEDY S, TOLONEN A C, et al. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism[J]. Science, 2003, 300(5619): 644-7. DOI: 10.1126/science.1083614.
- [24] SUN X, CHEN W D, WANG Y D. DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 548. DOI: 10.3389/fphar.2017.00548.
- [25] 尹丹阳, 胡怡, 史仍飞. 动物衰老模型的研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 156-162. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.094.
- [26] YIN D Y, HU Y, SHI R F. Advances in animal aging models[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 156-162. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.094.
- [27] HARSHMAN S W, YOUNG N L, PARTHUN M R, et al. H1 histones: current perspectives and challenges[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(21):9593-9609. DOI: 10.1093/nar/gkt700.
- [28] PAN C Y, FAN Y H. Role of H1 linker histones in mammalian development and stem cell differentiation[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1859(3): S1874-S9399(15)00266-7. DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.12.002.
- [29] SUN J, WEI H M, XU J, et al. Histone H1-mediated epigenetic regulation controls germline stem cell self-renewal by modulating H4K16 acetylation[J]. Nat Commun, 2015, 6:8856. DOI: 10.1038/ncomms9856.
- [30] YANASE S, YASUDA K, ISHII N. Adaptive responses to oxidative damage in three mutants of *Caenorhabditis elegans* (age-1, mev-1 and daf-16) that affect life span[J]. Mech Ageing Dev, 2002, 123(12):1579-1587.
- [31] ANBALAGAN C, LAFAYETTE I, ANTONIOU-KOUROUNOTI M, et al. Transgenic nematodes as biosensors for metal stress in

- soil pore water samples[J]. *Ecotoxicology*, 2012, 21(2):439-455. DOI: 10.1007/s10646-011-0804-0.
- [30] MOILANEN L H, FUKUSHIGE T, FREEDMAN J H. Regulation of metallothionein gene transcription[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(42):29655-29665. DOI: 10.1074/jbc.274.42.29655.
- [31] LIN C X, ZHANG X Y, SU Z X, et al. Carnosol improved lifespan and healthspan by promoting antioxidant capacity in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5958043. DOI: 10.1155/2019/5958043.
- [32] GREEN C L, LAMMING D W, FONTANA L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(1): 56-73. DOI: 10.1038/s41580-021-00411-4.
- [33] ZHANG Y P, ZHANG W H, ZHANG P, et al. Intestine-specific removal of DAF-2 nearly doubles lifespan in *Caenorhabditis elegans* with little fitness cost[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6339. DOI: 10.1038/s41467-022-33850-4.
- [34] HAHM J H, JEONG C, NAM H G. Diet restriction-induced healthy aging is mediated through the immune signaling component ZIP-2 in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(5): e12982. DOI: 10.1111/ace1.12982.
- [35] WEIR H J, YAO P, HUYNH F K, et al. Dietary restriction and AMPK increase lifespan via mitochondrial network and peroxisome remodeling[J]. *Cell Metab*, 2017, 26(6): S1550-S1513(17)30612-5. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.09.024.
- [36] CAI H H, RASULOVA M, VANDEMEULEBROUCKE L, et al. Life-span extension by axenic dietary restriction is independent of the mitochondrial unfolded protein response and mitohormesis in *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2017, 72(10):1311-1318. DOI: 10.1093/gerona/glx013.
- [37] SMITH-VIKOS T, DE LENCASTRE A, INUKAI S, et al. MicroRNAs mediate dietary-restriction-induced longevity through PHA-4/FOXA and SKN-1/Nrf transcription factors[J]. *Curr Biol*, 2014, 24(19): S0960-S9822(14)00991-9. DOI: 10.1016/j.cub.2014.08.013.
- (收稿日期:2022-11-28 修回日期:2023-02-15 )  
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,苏琪)

### [引用本文]

成慧, 方菲, 石嘉豪, 等. *hil-1* 基因通过饮食限制通路调节秀丽隐杆线虫寿命[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 271-281. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.183.

CHENG H, FANG F, SHI J H, et al. H1 linker histone gene regulates lifespan via dietary restriction pathways in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(3): 271-281. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.183.

\*\*\*\*\*

## 2023年版 ICMJE 推荐规范的更新内容

2023年5月, 国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE)发布《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“2023年版 ICMJE 推荐规范”。现将主要的更新内容摘译如下。正式的英文版本见 [www.icmje.org](http://www.icmje.org)。若需引用, 请用英文官方版本。

II.A.4. 人工智能辅助技术: 在投稿时, 期刊应要求作者披露他们是否在撰稿过程中使用了人工智能(AI)辅助技术[如大型语言模型(LLMs)、聊天机器人或图像创建器]。使用这些技术的作者应该在投稿函和提交的稿件中描述他们是如何使用的。聊天机器人(如ChatGPT)不应被列为作者, 因为它们不能对作品的准确性、完整性和原创性负责, 而这些责任是作者必须承担的(请见II.A.1节)。因此, 人类应对任何提交的材料负责, 包括所使用的人工智能辅助技术。作者应该仔细审查和编辑结果, 因为人工智能可能会输出不正确、不完整或带有偏见的, 但貌似很权威的内容。作者不应将人工智能和人工智能辅助技术列为作者或共同作者, 也不应引用以人工智能为作者的内容。作者应该能够确认他们的论文中没有抄袭, 包括由人工智能生成的文本和图像。人类必须确保所有引用材料都有恰当的出处, 包括完整的引文。

II.C.3. 同行审稿人: 在审稿过程中, 审稿人若寻求实习生或同事的帮助, 应在提交给编辑的书面审稿意见中感谢他们的贡献。审稿人必须按上述规定对稿件内容保密, 不得将稿件上传到无法保证其保密性的软件或其他人工智能技术平台上。审稿人应该向期刊披露是否以及如何使用人工智能技术协助审稿。审稿人应该意识到, 人工智能会输出貌似很权威的内容, 而这些内容可能是不正确、不完整或有偏见的。

IV.A.3.g. 参考文献: 不能将人工智能生成的内容作为一手来源资料进行引用。

完整的中文译本请见 ICMJE 官网: <http://www.icmje.org/recommendations/translations/chinese2023.pdf>。

(张俊彦、于笑天、汪源, 摘译)



# Mical2a 基因表达下调抑制斑马鱼血管发育

杨晋娟<sup>1,2</sup>, 王淑娟<sup>1</sup>, 翟金云<sup>1</sup>, 朱顺星<sup>1,2</sup>

(1. 南通大学杏林学院, 南通 226001; 2. 南通大学实验动物中心, 南通 226001)

**[摘要]** **目的** 探究斑马鱼胚胎早期发育过程中 *Mical2a* 基因的表达模式, 以及该基因对斑马鱼血管发育的影响。**方法** 使用 *Tg (fli:GFP)* 转基因斑马鱼 (用绿色荧光蛋白标记血管) 和野生型斑马鱼 (AB), 采用全胚胎原位杂交技术检测其早期胚胎不同发育阶段的 *Mical2a* 基因表达水平。通过显微注射吗啉反义寡核苷酸下调 *Mical2a* 基因, 并采用实时荧光定量 PCR 技术检测该基因在斑马鱼胚胎不同发育阶段 mRNA 表达水平。采用激光共聚焦显微成像技术, 观察并分析 *Mical2a* 基因下调后斑马鱼的血管表型变化。**结果** 受精后 24 h (24 hours post-fertilization, 24 hpf)、36 hpf 和 48 hpf 的斑马鱼早期胚胎的脑、心脏、血管系统中均有 *Mical2a* 基因表达。显微注射吗啉反义寡核苷酸后 *Mical2a* 基因的 mRNA 水平增加, 抑制斑马鱼胚胎的血管发育, 导致斑马鱼节间血管发育缺陷。**结论** *Mical2a* 基因表达下调可以抑制斑马鱼血管的发育。

**[关键词]** *Mical2a* 基因; 原位杂交; 胚胎发育; 血管发育; 斑马鱼; 血管依赖性疾病

**[中图分类号]** R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0282-06



## Downregulation of *Mical2a* Gene Expression Inhibited Vascular Development in Zebrafish

YANG Jinxian<sup>1,2</sup>, WANG Shujuan<sup>1</sup>, ZHAI Jinyun<sup>1</sup>, ZHU Shunxing<sup>1,2</sup>

(1. Xinglin College of Nantong University, Nantong 226001, China; 2. Laboratory Animal Center of Nantong University, Nantong 226001, China)

Correspondence to: ZHU Shunxing (ORCID: 0000-0001-8011-4099), E-mail: zsx@ntu.edu.cn

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the expression pattern of *Mical2a* gene during the early development of zebrafish embryos and the effect of this gene on zebrafish vascular development. **Methods** Whole embryo *in situ* hybridization was used to detect *Mical2a* expression levels at different stages of early embryo development of *Tg (fli:GFP)* transgenic (labeled with green fluorescent protein) and wild type zebrafish (AB). *Mical2a* gene expression was downregulated by microinjection of a morpholine antisense oligonucleotide, and real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect mRNA expression of the gene at different developmental stages of zebrafish embryos. Laser confocal microscopy was used to observe and analyze vascular phenotypic changes in zebrafish after the downregulation of *Mical2a*. **Results** *Mical2a* was expressed in the brain, heart, and vascular system of zebrafish embryos at the 24th, 36th, and 48th hours post fertilization. The mRNA level of *Mical2a* increased after microinjection of morpholine antisense oligonucleotides, inhibiting vascular development in zebrafish embryos, resulting in internode angiogenesis defects in zebrafish. **Conclusion** Downregulation of *Mical2a* expression inhibits the development of blood vessels in zebrafish.

**[Key words]** *Mical2a* gene; *In situ* hybridization; Vascular development; Embryonic development; Zebrafish; Vascular dependent diseases

Mical (molecule interacting with CasL) 是一类细胞质内多结构域蛋白的保守家族, 与细胞的轴突引导和运动、细胞连接的形成、囊泡的转运, 以及癌细胞的

转移等有关<sup>[1-3]</sup>。迄今为止, 研究者已发现在斑马鱼 (*Danio rerio*) 体内表达的 8 个 *Mical* 家族同源基因, 并且大多数斑马鱼的 *Mical* 家族基因在神经系统和肌肉系

**[基金项目]** 江苏省高等学校自然科学研究面上项目“LncRNA SLC25A34-AS1 调控斑马鱼动静脉分化的机制研究”(20KJB310028); 南通市科技计划项目“利用斑马鱼模型研究 miR-22a 调控血管芽生导向的机制”(JC2020104); 南通大学杏林学院大学生创新创业训练计划项目“*Mical2a* 基因调控斑马鱼胚胎血管发育”(201813993021x1)

**[第一作者]** 杨晋娟 (1990—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 人类疾病与动物模型。E-mail: yjx0815@ntu.edu.cn

**[通信作者]** 朱顺星 (1968—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 人类疾病与动物模型。E-mail: zsx@ntu.edu.cn。ORCID: 0000-0001-8011-4099

统中表达<sup>[4]</sup>。*Micall2a*是在斑马鱼心脏中检测到的5个同源物之一<sup>[5-6]</sup>，但其在斑马鱼心血管发育过程中的作用尚未见详细报告。目前，Mical家族的功能研究主要集中在无脊椎动物胚胎、成体组织以及脊椎动物的体外培养细胞中，但是其对于脊椎动物发育的具体功能仍然不清楚<sup>[7]</sup>。

心血管是斑马鱼胚胎发育中最早形成并行使功能的组织器官之一。斑马鱼心脏发育大概分为以下几个阶段：(1)最早于受精后5 h (5 hours post-fertilization, 5 hpf)，中胚层前外侧板出现心脏的前体细胞；(2)15 hpf左右，心脏前体细胞向胚胎中线处融合成心锥，然后向前延伸形成线性的心管；(3)约22 hpf，心脏开始出现收缩；(4)28 hpf左右，心房和心室形成；(5)48 hpf左右，瓣膜形成，心房心室可清晰识别<sup>[8]</sup>。和高等脊椎动物一样，斑马鱼的血管原细胞也来源于中胚层，14~16 hpf迁移至躯干中线部位，并形成血管索；然后，血管原细胞分化形成血管细胞和造血细胞，血管细胞进一步分化形成轴向血管、背部主动脉和后主静脉，约24 hpf开始出现血液循环<sup>[9]</sup>。由于斑马鱼在血管发育研究方面具有优势，且*Tg (fli:GFP)*转基因斑马鱼的血管内皮细胞被绿色荧光蛋白标记，可以通过激光聚集焦观察到斑马鱼的血管发育情况，因此它是一种非常理想的动物模型<sup>[10]</sup>。

生理性的血管生成是正常组织发育的必要条件，而包括肿瘤在内的一系列血管生成依赖性疾病中，病理性的血管生成发挥关键作用。1970年代初Folkman提出肿瘤生长依赖于血管形成的概念<sup>[11]</sup>，此后大量研究证明肿瘤血管生成与肿瘤生长、侵袭和转移等特性密切相关，进而推动了肿瘤血管生成抑制疗法的产生。本实验利用转基因斑马鱼*Tg (fli:GFP)*和野生型斑马鱼(AB)为研究对象，采用全胚胎原位杂交技术，检测*Micall2a*基因在斑马鱼胚胎期不同发育阶段的表达情况，并通过显微注射吗啉反义寡核苷酸(morpholinoantisense oligos, Mo)法下调*Micall2a*基因表达，探究该基因在斑马鱼胚胎血管发育过程中的作用，为研究血管发育的调控机制提供实验依据，甚至为血管抑制相关的抗癌治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

本实验中使用的*Tg (fli:GFP)*转基因斑马鱼和野生型斑马鱼(AB)<sup>[12]</sup>均来自南通大学实验动物中心[SCXK(苏)2019-0001]，使用标准的斑马鱼养殖系

统(北京爱生科技有限公司产品)进行饲养，包括整套的斑马鱼饲养系统、自动换水系统和紫外杀菌过滤系统[SYXK(苏)2020-0029]。斑马鱼养殖水温严格控制28.5℃，且模拟光照/黑暗14 h(8:00—22:00)/10 h(22:00—08:00)，30日龄后斑马鱼饲喂孵化的丰年虫。喂养和杂交方案严格参照文献<sup>[12]</sup>进行，根据形态特征与产出时间区分发育阶段<sup>[13]</sup>。动物实验方案经南通大学实验动物伦理委员会审查批准(编号S20210911-1001)，所有实验操作按照南通大学实验动物中心标准操作规程进行。

### 1.2 实验试剂

焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)为生工生物工程(上海)股份有限公司产品(货号B501005)。地高辛标记的原位杂交探针(Anti-Dig-AP, 货号11093274910)和蛋白酶K为美国Roche公司产品。琼脂糖为北京百晶生物技术有限公司产品(货号162135)。氨苄西林(货号A9518)、柠檬酸(货号C2404)和酵母RNA(货号R362920)为美国Sigma公司产品。10×磷酸盐平衡生理盐水(10×PBS)为北京兰杰柯科技有限公司产品(货号21235297)。20×盐酸柠檬酸钠(saline sodium citrate, SSC)为美国Invitrogen公司产品(货号AM9770)。DNA Marker、超凝胶核酸染色剂(货号GR501-01)、PCR扩增高保真酶2×Phanta Flash Master Mix(货号P520-01)、高灵敏性染料法定量PCR检测试剂盒ChamQ SYBR qPCR Master Mix(货号Q341-02)和第三代实时荧光定量PCR预混液(HiScript III RT SuperMix for qPCR, 货号R323-01)为南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品。甲酰胺(货号R21111-500 mL)为上海源叶生物科技有限公司产品。肝素(货号542858)为北京百灵威科技有限公司产品。马来酸(货号M0375)为美国Sigma公司产品。SP6 RNA聚合酶(货号P1085)为普洛麦格(北京)生物技术有限公司产品。TRIzol试剂盒(货号10296010)为美国Invitrogen公司产品。Tween-20为北京索莱宝科技有限公司产品(货号822L0410)。BM-purple-AP(货号11442074001)为瑞士Roche公司产品。合成*Micall2a*基因反义RNA探针的PCR引物由南京金斯瑞生物科技股份有限公司合成，上下游引物序列为5'-GATTTGAAGAGACGCCGCAT-3'和5'-ACCAT-ATCCTCCGCATCCAG-3'。

### 1.3 溶液配制

50×E3培养液配制：称取NaCl 14.6 g、KCl 0.65 g、CaCl<sub>2</sub> 1.81 g、MgSO<sub>4</sub>晶体4.05 g，加入ddH<sub>2</sub>O充分溶解

后,定容至1 L,用0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。1×E3 培养液配制:量取20 mL的50×E3 培养液和10 mL亚甲基蓝,加到10 L超纯水中,充分混匀。0.003% 苯硫脲(phenylthiourea, PTU) 培养液配制:称取0.3 g PTU 粉末,用1×E3 培养液充分溶解,外加10 mL亚甲基蓝,加到10 L超纯水中。麻醉药MS-222 配制:称取2 g MS-222 粉末,用300 mL超纯水充分溶解,然后定容至500 mL,再用1 mol/L Tris-HCl 调节pH至7.0。1×PBST 溶液配制:将5 mL 10×PBS 加到45 mL DEPC 水中,再加50  $\mu\text{L}$  Tween-20。预杂交液配制:吸取25 mL 甲酰胺、12.5 mL 20×SSC、460  $\mu\text{L}$  柠檬酸(1 mol/L, pH 6.0) 和50  $\mu\text{L}$  Tween-20,加入DEPC 水补至50 mL。杂交液配制:吸取25 mL 甲酰胺、12.5 mL 20×SSC、460  $\mu\text{L}$  柠檬酸(1 mol/L, pH 6.0)、250  $\mu\text{L}$  酵母RNA (20 mg/mL)、50  $\mu\text{L}$  肝素钠(50 mg/mL) 和50  $\mu\text{L}$  Tween-20,加入DEPC 水补至50 mL。4%多聚甲醛固定液配制:称取4 g多聚甲醛粉末,用1×PBS 充分溶解后,定容至100 mL。

#### 1.4 斑马鱼繁育

受精卵收集前一晚,将野生型斑马鱼成鱼按雌雄比为1:2 饲养于杂交缸(中间用挡板隔开),次日早晨亮灯后拨去挡板,待交配后收集受精卵。将受精卵放入适量的胚胎培养液(1×E3) 中,置于28.5  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养孵化,24 hpf 开始使用0.003% PTU 溶液处理,以防止黑色素生成。分别在24 hpf、36 hpf 和48 hpf,各取20 条斑马鱼胚胎,先用4%多聚甲醛溶液于室温条件下固定2 h,然后用含Tween-20 的1×PBST 清洗,甲醇脱水,−20  $^{\circ}\text{C}$  储存。

#### 1.5 全胚胎原位杂交法检测 *Micall2a* 基因表达

取−20  $^{\circ}\text{C}$  储存的不同发育阶段(24、36 和48 hpf) 的野生型斑马鱼胚胎,各10 条,1×PBST 溶液清洗后用蛋白酶K 消化,室温下根据胚胎不同发育阶段调整蛋白酶K 的消化时间:24、36 和48 hpf 胚胎的消化时间分别为2、5 和10 min。加入预杂交液,于70  $^{\circ}\text{C}$  水浴中进行预杂交4 h 以上,然后加入 *Micall2a* 基因的反义RNA 探针(1 ng/ $\mu\text{L}$ ),70  $^{\circ}\text{C}$  水浴条件下杂交过夜。使用含Tween-20 的0.2×SSC 溶液洗涤后,加入 anti-Dig-AP 探针孵育4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,然后使用 PBST 溶液洗涤,加入 BM-Purple-AP 溶液37  $^{\circ}\text{C}$  避光显色,每隔1 h 于正置体式显微镜(Motic, SMZ168) 下观察显深紫色情况,当组织器官有明显颜色显现完全后,用 NTMT 清洗10 min/2 次终止反应,用 PBST 溶液洗脱,用70% 乙醇溶液脱水,加入甘油,使用体视显微镜观察,记录大脑、

心脏及血管显色情况并成像<sup>[14-15]</sup>。

#### 1.6 显微注射吗啉反义寡核苷酸下调 *Micall2a* 基因表达

通过 Genetools 公司合成能特异性抑制 *Micall2a* 基因翻译的吗啉(morpholino, Mo) 反义寡核苷酸<sup>[8]</sup>。*Micall2a*-Mo 反义核苷酸序列为5'-GCGCTTT-AATAGCCGCCATTCTCTC-3'。将3 ng *Micall2a*-Mo 显微注射至1 细胞时期的 *Tg(fli:GFP)* 转基因斑马鱼胚胎中,作为 *Micall2a* 敲降组;对照组显微注射同等体积的1×PBS。将各组胚胎置于28.5  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养至24 hpf 和48 hpf,然后每组各取45 个胚胎,采用实时荧光定量PCR 法检测 *Micall2a* 下调情况。同等条件下培养至24 hpf 和50 hpf,然后每组各取10 个胚胎,使用激光共聚焦显微成像技术观察血管发育情况。

#### 1.7 实时荧光定量PCR 检测 *Micall2a* 基因表达

收集24 hpf 和48 hpf 发育阶段的 *Micall2a* 敲降组和对照组斑马鱼胚胎各15 条,提取总RNA 并反转录成cDNA。针对内参基因 *YEF1a* 和 *Micall2a* 基因设计定量PCR 引物: *Micall2a* 基因的正向引物序列为5'-GTGCGCTCATCCACAAGTTC-3',反向引物序列为5'-GGAGCGGCCATGGAAGTAAT-3'; *YEF1a* 基因的正向引物序列为5'-TGATCTACAAATGCGGTGGA-3',反向引物序列为5'-CAATGGTGATACCACGCTCA-3'。PCR 反应体系包括:2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各0.4  $\mu\text{L}$ , cDNA 200 ng 混匀,最后加入 ddH<sub>2</sub>O 将体系补至20  $\mu\text{L}$ 。实时定量PCR 程序:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性15 s,59  $^{\circ}\text{C}$  退火/延伸1 min,2 个温度循环40 次。熔解曲线程序:95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  15 s,95  $^{\circ}\text{C}$  15 s。反应结束后确认荧光定量PCR 的扩增曲线和熔解曲线,进行PCR 定量时制作标准曲线,并分析 *Micall2a* 基因表达水平。

#### 1.8 激光共聚焦显微成像观察血管发育

将前期获得的 *Micall2a* 敲降组和对照组24 hpf 和50 hpf 斑马鱼胚胎各10 条,使用麻醉药MS-222 麻醉后,用0.7% 低熔点的琼脂糖固定<sup>[15]</sup> 在特制的玻璃皿上。用尼康Nikon A1R HD25 激光共聚焦显微镜观察斑马鱼胚胎中血管的发育情况:在蓝光激发下,可显绿色荧光蛋白;利用激光共聚焦显微20 倍镜头成像,并进行图像处理。

#### 1.9 统计分析

各实验均重复3 次,使用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析。两组间差异分析采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

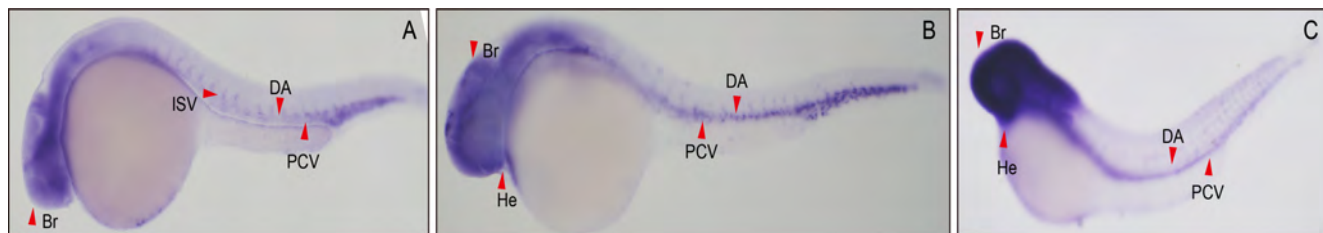


## 2 结果

### 2.1 *Micall2a*基因在斑马鱼胚胎中高表达

全胚胎原位杂交结果显示, 在24、36和48 hpf的斑马鱼胚胎的背主动脉、后主静脉以及节间血管

中, *Micall2a* 基因均有表达 (图1)。在36 hpf时的斑马鱼心脏和脑中同样能检测到深紫色杂交信号; 尤其当斑马鱼发育到48 hpf阶段后, *Micall2a* 基因在斑马鱼的心脏和脑部表达信号更为显著。



注: A~C分别为受精后24、36和48 h。ISV为节间血管, PCV为后主静脉, DA为背主动脉。Br为大脑, He为心脏 (红色箭头指示位置)。

Note: A-C, *Micall2a* expression levels at the 24th, 36th, and 48th hours post fertilization in the zebrafish. ISV, intersegmental vessel; DA, dorsal aorta; PCV, posterior cardinal vein; Br, brain; He, heart. Red arrow indicates the location.

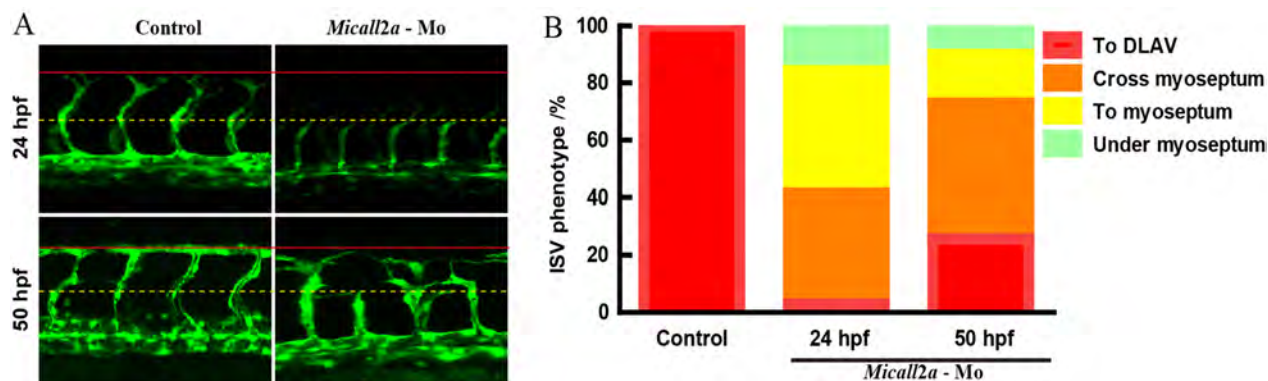
图1 *Micall2a*基因在斑马鱼胚胎血管系统中的表达

Figure 1 Expression of the *Micall2a* gene in the vascular system of zebrafish embryos

### 2.2 *Micall2a*基因表达下调导致斑马鱼胚胎血管发育缺陷

将 *Micall2a*-Mo 注射到1细胞时期的转基因斑马鱼 *Tg(fli:GFP)* 胚胎中, 分别培养至24 hpf和50 hpf, 用激光共聚焦显微成像技术观察并分析斑马鱼胚胎的节间血管形态。结果如图2所示, *Micall2a* 敲降组斑马鱼胚胎在24 hpf, 仅有约2.86%的节间血管

生长至背部纵向吻合血管, 其中84.29%能生长至横向肌隔; 在50 hpf (大约至48 hpf斑马鱼节间血管发育完全), 约25.71%的节间血管生长至背部纵向吻合血管。另外, 下调 *Micall2a* 基因表达后直至发育到50 hpf, *Micall2a* 敲降组斑马鱼胚胎的背主动脉管腔与对照组相比变细, 并且生长方向受到明显影响 (图2)。



注: A为显微注射吗啉反义寡核苷酸下调转基因斑马鱼 *Tg(fli:GFP)* *Micall2a* 基因 (*Micall2a*-Mo组) 和注射相同体积PBS转基因斑马鱼 (Control组), 并培养至受精后24 h (24 hpf) 和50 h (50 hpf), 斑马鱼胚胎内节间血管形态的激光共聚焦显微镜成像图片; 背侧纵向吻合口血管 (DLAV) 由红色实线表示, 水平肌间隔用黄色虚线表示。B为各组斑马鱼胚胎中节间血管 (ISV) 生长的表型占比 (红色为血管生长至背侧纵向吻合口血管, 橘色为穿过肌隔膜, 黄色为到达横向肌隔膜, 绿色为肌隔膜下)。每组10个胚胎, 每个胚胎统计7个ISV。

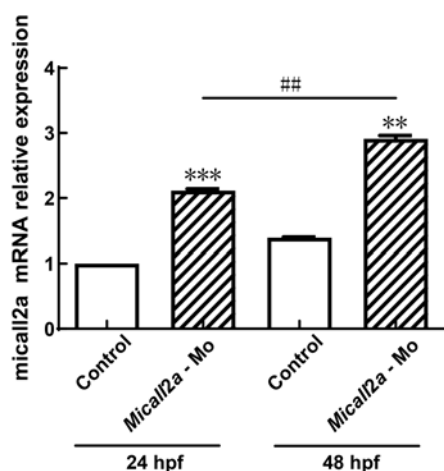
Note: (A) Laser confocal microscope image of internode vascular morphology in zebrafish embryos with microinjection of morpholine antisense oligonucleotide knockdown of the expression of *Micall2a* in *Tg(fli:GFP)* transgenic lines (*Micall2a*-Mo group) and injection of the same volume of PBS in transgenic zebrafish (control group) cultured to 24 and 50 hpf. The dorsal longitudinal anastomosis vessel (DLAV) is indicated by a solid red line and the horizontal septum by a yellow dashed line. (B) Phenotypic proportion of internodal vascular (ISV) growth in zebrafish embryos (red indicates blood vessel growth to the dorsal longitudinal anastomotic blood vessel, orange indicates growth through the myoseptum, yellow indicates growth to the transverse myodiam, and green indicates submyspheric growth). 10 embryos per group and 7 ISVs per embryo were counted.

图2 下调 *Micall2a* 基因表达后24和50 hpf斑马鱼胚胎中节间血管的发育情况

Figure 2 Morphology of zebrafish embryos larval internodal vascular after the knock-down of *Micall2a* gene at 24 and 50 hpf

### 2.3 *Micall2a* 基因下调后 mRNA 水平增加

为了探究 *Micall2a* 基因敲降效率, 采用实时荧光定量 PCR 的方法检测 *Micall2a* mRNA 转录水平, 结果表明: 在 24 hpf, *Micall2a*-Mo 注射后 *Micall2a* mRNA 水平显著高于对照组 ( $P=0.000\ 5$ ); 在 48 hpf, *Micall2a*-Mo 注射后 *Micall2a* mRNA 水平显著高于对照组 ( $P=0.001\ 7$ ) (图 3)。与 24 hpf 比较, 48 hpf 的 *Micall2a*-Mo 组 mRNA 水平显著高于 24 hpf 的 *Micall2a*-Mo 组 ( $P=0.001\ 3$ )。



注: *Micall2a*-Mo 组为显微注射吗啉反义寡核苷酸下调转基因斑马鱼 *Tg(fli: GFP)* 中 *Micall2a* 基因并培养至受精后 24 h (24 hpf) 和 50 hpf; 对照组为注射相同体积 PBS 的转基因斑马鱼。与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 24 hpf 相比, \*\*\* $P < 0.01$ 。每组 15 个胚胎, 实验重复 3 次。

Note: The *Micall2a*-Mo group was microinjected with morpholine antisense oligonucleotide and the expression of *Micall2a* in *Tg(fli: GFP)* transgenic lines and cultured to 24 and 50 hpf. The control group was injected with an equal volume of PBS. Compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with 24 hpf, \*\*\* $P < 0.01$ . The experiment was repeated three times for each group of 15 embryos.

图 3 实时荧光定量 PCR 分析注射 *Micall2a*-Mo 后斑马鱼胚胎体内 *Micall2a* 基因表达变化

Figure 3 Real-time PCR analysis of *Micall2a* gene expression changes in zebrafish embryos after injection of *Micall2a*-Mo

## 3 讨论

根据数据库分析及分子克隆结果, 目前发现斑马鱼中有 8 个 *Mical* 家族基因, 包括 *Mical2*、*Mical3* 和 *Micall2* 以及它们的两个旁系同源基因。据报告, 果蝇中 *Mical* 基因主要表达于神经系统和肌肉组织, 对轴突导向、肌丝组织和突触发生起作用<sup>[14-18]</sup>。对于哺乳动物的胚胎发生, 目前仅研究了啮齿类动物的 *Mical* 亚家

族基因, 并且它们表达于神经系统<sup>[13,17]</sup>。而在成年哺乳动物组织中, *Mical* 家族基因主要表达于脑、脊髓、肺、肝、肾、肌肉、心脏、胸腺、脾、睾丸以及造血细胞和某些癌细胞<sup>[19]</sup>。Xue 等<sup>[4]</sup> 研究结果显示, *Micall2a* 表达于斑马鱼血管。本研究中原位杂交结果同样也证实, *Micall2a* 基因表达于斑马鱼胚胎期的血管系统, 脑与心脏中也有表达, 并在不同胚胎期显现出不同的分布趋势。

遍布全身的血管是脊椎动物体内物质交换的基础。脊椎动物的血管发育可以分为两个阶段: 血管发生 (vasculogenesis) 和血管新生 (angiogenesis)<sup>[20-21]</sup>。人类肿瘤发生过程中, 肿瘤细胞通过分泌多种细胞因子诱导内皮细胞活化, 进而导致肿瘤血管生成。血管的新生是肿瘤发生、发展以及转移的重要条件。斑马鱼胚胎早期透明, 是进行活体成像和研究血管新生的良好模型。本研究利用血管内皮细胞被特异性荧光标记的转基因斑马鱼 *Tg(fli: GFP)*<sup>[12,22]</sup>, 探讨 *Micall2a* 基因在胚胎期血管发育中的功能。在抑制 *Micall2a* 基因表达后, 发现 24 hpf 的斑马鱼大部分节间血管不能生长至背部纵向吻合血管, 并且在发育后期 (50 hpf 后), 血管生长方向受到明显影响。同时本研究采用实时荧光定量 PCR 技术检测敲降 *Micall2a* 基因效率, 发现在注入 *Micall2a*-Mo 的斑马鱼胚胎中 *Micall2a* 基因表达高于对照组, 这可能是由于 *Micall2a*-Mo 导致该基因的翻译过程受到阻碍, 从而产生反馈效果, 诱导更多的 RNA 转录本产生, 本课题组后续将进一步深入探讨该机制。

综上所述, 在斑马鱼胚胎发育过程中 *Micall2a* 基因能够影响血管发育, 其中涉及的分子机制有待进一步研究。本研究结果为进一步探讨 *Micall2a* 基因抑制肿瘤血管的发生提供了重要依据。

### [医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验方案经南通大学实验动物伦理委员会审查批准 (批号 S20210911-1001), 所有实验操作均按照南通大学实验动物中心标准操作规程进行, 遵照中国实验动物相关法律法规条例要求。

All animal experiments involved in this study have been reviewed and approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Nantong University (Approval Letter No. S20210911-1001). All experimental operations are carried out in accordance with the standard operating procedures of the Laboratory Animal Center of Nantong University and in accordance with the relevant laws, regulations and regulations of Chinese laboratory animals.

**[作者贡献 Author Contribution]**

杨晋娟负责实验设计、实验操作、数据统计及论文撰写；  
王淑娟和翟金云负责文献阅读及筛选，参与前言撰写；  
朱顺星提供研究经费，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] HUNG R J, YAZDANI U, YOON J, et al. Mical links semaphorins to F-actin disassembly[J]. *Nature*, 2010, 463 (7282):823-827. DOI: 10.1038/nature08724.
- [2] BEUCHLE D, SCHWARZ H, LANGEGER M, et al. Drosophila MICAL regulates myofilament organization and synaptic structure[J]. *Mech Dev*, 2007, 124(5): 390-406. DOI: 10.1016/j.mod.2007.01.006.
- [3] WEIDE T, TEUBER J, BAYER M, et al. MICAL-1 isoforms, novel rab1 interacting proteins[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(1):79-86. DOI: 10.1016/s0006-291x(03)00918-5.
- [4] XUE Y L, KUOK C XIAO A, et al. Identification and expression analysis of mical family genes in zebrafish[J]. *J Genet Genom*, 2010, 37(10):685-693. DOI: 10.1016/S1673-8527(09)60086-2.
- [5] YANG Y X, YE F W, XIA T X, et al. High MICAL-L2 expression and its role in the prognosis of colon adenocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1):487. DOI: 10.1186/s12885-022-09614-0.
- [6] WU H, YESILYURT H G, YOON J, et al. The MICALs are a family of F-actin dismantling oxidoreductases conserved from drosophila to humans[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 937. DOI: 10.1038/s41598-017-17943-5.
- [7] WANG Y, DENG W, ZHANG Y, et al. MICAL2 promotes breast cancer cell migration by maintaining epidermal growth factor receptor (EGFR) stability and EGFR/P38 signalling activation [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2018, 222(2): 10.1111/apha.12920. DOI: 10.1111/apha.12920.
- [8] BAKKERS J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(2):279-288. DOI: 10.1093/cvr/cvr098.
- [9] HOGAN B M, SCHULTE-MERKER S. How to plumb a Pisces: understanding vascular development and disease using zebrafish embryos[J]. *Dev Cell*, 2017, 42(6): 567-583. DOI: 10.1016/j.devcel.2017.08.015.
- [10] 江霞, 钱豪杰, 魏迅, 等. 斑马鱼糖尿病模型的构建及应用进展 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(6):547-552. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.06.016.  
JIANG X, QIAN H J, WEI X, et al. Research progress in construction and application of diabetes model in zebrafish [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2020, 40(6):547-552. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2020.06.016.
- [11] Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(4): 273-286. DOI: 10.1038/nrd2115.
- [12] WANG J L, ZHANG X H, XU X Y, et al. Pro-angiogenic activity of Tongnao Decoction on HUVECs *in vitro* and zebrafish *in vivo*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 254: 112737. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112737.
- [13] CASEY M J, STEWART R A. Zebrafish as a model to study neuroblastoma development[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 372(2): 223-232. DOI: 10.1007/s00441-017-2702-0.
- [14] CHITRAMUTHU B P, BENNETT H P J. High resolution whole mount in situ hybridization within zebrafish embryos to study gene expression and function[J]. *J Vis Exp*, 2013(80): e50644. DOI: 10.3791/50644.
- [15] 张晶晶, 王新, 刘东. C型利钠肽基因调控斑马鱼胚胎血管发育 [J]. *生理学报*, 2017, 69(1): 11-16. DOI: 10.13294/j.aps.2016.0098.  
ZHANG J J, WANG X, LIU D. C-type natriuretic peptide gene regulates the vascular development of zebrafish embryos[J]. *Acta Physiol Sin*, 2017, 69(1): 11-16. DOI: 10.13294/j.aps.2016.0098.
- [16] SUMMERTON J E. Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity[J]. *Curr Top Med Chem*, 2007, 7(7):651-660. DOI: 10.2174/156802607780487740.
- [17] ZHOU Y P, GUNPUT R A F, ADOLFS Y, et al. MICALs in control of the cytoskeleton, exocytosis, and cell death[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(24):4033-4044. DOI: 10.1007/s00018-011-0787-2.
- [18] RAHAJENG J, GIRIDHARAN S S P, CAI B S, et al. Important relationships between Rab and MICAL proteins in endocytic trafficking[J]. *World J Biol Chem*, 2010, 1(8): 254-264. DOI: 10.4331/wjbc.v1.i8.254.
- [19] TERA T, NISHIMURA N, KANDA I, et al. JRAB/MICAL-L2 is a junctional Rab13-binding protein mediating the endocytic recycling of occludin[J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(5):2465-2475. DOI: 10.1091/mbc.e05-09-0826.
- [20] 杨晋娟, 王新, 刘东, 等. Clec14a 基因调控斑马鱼胚胎血管发育 [J]. *交通医学*, 2018, 32(6): 535-539. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.118.  
YANG J X, WANG X, LIU D, et al. Clec14a gene contributes to zebrafish angiogenesis[J]. *Med J Commun*, 2018, 32(6): 535-539. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.118.
- [21] DIOMEDE F, DILETTA MARCONI G, FONTICOLI L, et al. Functional relationship between osteogenesis and angiogenesis in tissue regeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (9):3242. DOI: 10.3390/ijms21093242.
- [22] 王晓航, 陈洋, 戚中田, 等. 血脑屏障动物模型的研究进展[J]. *海军军医大学学报*, 2022(3):314-319.  
WANG X H, CHEN Y, QI Z T, et al. Animal models of blood-brain barrier: research progress[J]. *Acad J Nav Med Univ*, 2022 (3):314-319.

(收稿日期: 2022-10-31 修回日期: 2023-04-17 )

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 周烁)

**[引用本文]**

杨晋娟, 王淑娟, 翟金云, 等. *Mical2a* 基因表达下调抑制斑马鱼血管发育[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(3): 282-287. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.166.  
YANG J X, WANG S J, ZHAI J Y, et al. Downregulation of *Mical2a* gene expression inhibited vascular development in zebrafish[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(3): 282-287. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.166.



# 神经母细胞瘤动物模型研究进展与应用

谭志刚<sup>1,2</sup>, 刘锦信<sup>1,2</sup>, 郑楚雅<sup>1,2</sup>, 廖文峰<sup>1,2</sup>, 冯露平<sup>1,2</sup>, 彭红丽<sup>1,2</sup>, 严 秀<sup>3</sup>, 卓振建<sup>1,2</sup>

(1. 北京大学深圳研究生院实验动物中心, 深圳 518055; 2. 省部共建肿瘤化学基因组学国家重点实验室, 深圳 518055; 3. 佛山科学技术学院, 佛山 528200)

**[摘要]** 神经母细胞瘤 (neuroblastoma, NB) 是儿童最常见的实体恶性肿瘤, 居我国儿童肿瘤发病率第四位, 占儿童肿瘤死亡人数的15%, 高危患者存活率低。目前对于NB的发病及药物治疗机制知之甚少。NB动物模型可以表征NB发展特征, 是研究预防和治疗NB的重要工具, 然而尚未有一种动物模型可以模拟人类NB的所有特征。本文介绍了当前研究较多的几种NB动物模型 (小鼠模型、鸡胚绒毛尿囊膜模型和斑马鱼模型), 并对每种NB动物模型的种类、构建方法、特征、优缺点及研究进展做了详细阐述, 同时对NB的应用方向及前景进行概括, 以期对NB动物模型构建和NB治疗等提供理论依据。

**[关键词]** 神经母细胞瘤; 动物模型; 小鼠; 鸡胚绒毛尿囊膜; 斑马鱼

**[中图分类号]** R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0288-09



## Advances and Applications in Animal Models of Neuroblastoma

TAN Zhigang<sup>1,2</sup>, LIU Jinxin<sup>1,2</sup>, ZHENG Chuya<sup>1,2</sup>, LIAO Wenfeng<sup>1,2</sup>, FENG Luping<sup>1,2</sup>, PENG Hongli<sup>1,2</sup>, YAN Xiu<sup>3</sup>, ZHUO Zhenjian<sup>1,2</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen 518055, China; 2. State Key Laboratory of Chemical Oncogenomics, Shenzhen 518055, China; 3. Foshan University, Foshan 528200, China)

Correspondence to: ZHUO Zhenjian (ORCID: 0000-0003-0142-4086), E-mail: zhenjianzhuo@163.com

**[ABSTRACT]** Neuroblastoma (NB) is one of the most common malignant solid tumors in children, ranks fourth in the incidence of pediatric tumors, and accounts for 15% of pediatric tumor deaths in children in China. Despite the development of new treatment options, the prognosis for high-risk patients is still poor. An animal model that can replicate the tumorigenesis of NB is an important tool for the prevention and treatment of NB. However, there are currently no animal models that can simulate all features of human NB. To provide a reference for the construction of animal models and treatment of NB, this article introduced several animal models of NB that have been extensively researched: the mouse, chick embryo chorioallantoic membrane, and zebrafish models. At the same time, it elaborated on the species, construction methods, characteristics, advantages and disadvantages, and research progress in NB.

**[Key words]** Neuroblastoma; Animal model; Mice; Chick embryo chorioallantoic-membrane; Zebrafish

神经母细胞瘤 (neuroblastoma, NB) 是一种儿童交感神经系统的肿瘤, 也是儿童最常见的实体瘤, 死亡率占有儿童肿瘤的15%, 常见于新生儿期, 主要症状包括疲乏、食欲减退、发热以及关节疼痛<sup>[1]</sup>。多数低、中危NB患者靠手术和化疗能够基本痊愈, 甚至

能自行消退; 而高危患者经放化疗、免疫治疗、干细胞移植、骨髓疗法等综合治疗后, 5年生存率仅提升到50%, 且易复发和转移<sup>[2]</sup>。近年, 随着免疫治疗的发展, 自体干细胞移植 (autologous stem cell transplant, ASCT) 联合抗GD2抗体治疗高危NB患者后, 生存率

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目“遗传变异调控 ALKBH5 基因表达影响神经母细胞瘤迁移侵袭的作用及机制研究”(82002636); 深圳市自然科学基金项目“N1-甲基腺苷修饰基因与神经母细胞瘤遗传易感的机制研究”(JCYJ20220531093213030)

**[第一作者]** 谭志刚(1989—), 男, 硕士, 兽医师, 主要从事实验动物设施管理、实验动物疾病研究等。E-mail: 18819267200@163.com

**[通信作者]** 卓振建(1990—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事肿瘤模型构建、实验动物管理、肿瘤机制研究。E-mail: zhenjianzhuo@163.com。ORCID: 0000-0003-0142-4086

可达70%<sup>[3]</sup>。然而，目前人们对NB的致病及其药物保护机制知之甚少，迫切需要进行深入研究，以解析高危NB的发生机制，为高效抗肿瘤药物的研发提供理论依据。

在研究NB致病机制过程中，动物模型的建立具有重要作用。由于实验动物、移植及移植方式均存在较大差异，故建立贴近于临床的NB动物模型对研究NB发病机制及保护性药物意义重大，有利于制定合理的诊疗方案以预防和及时治疗NB并发症。本文对已报告的NB动物模型研究进展、特征及优缺点进行综述，以期对NB的临床研究提供参考依据。

### 1 NB动物模型

NB动物模型是研究人类NB发病机制、发展、转移与复发等过程的替代品。迄今已报告的NB实验动物模型主要有小鼠模型、鸡胚绒毛尿囊膜模型和斑马鱼模型。

#### 1.1 小鼠模型

由于遗传背景清晰、操作简易、取材方便等特点，小鼠模型在NB研究中最常用，已广泛应用于NB的发病机制研究与新药开发，主要分为移植瘤模型和基因工程小鼠模型。

##### 1.1.1 小鼠移植瘤模型

小鼠移植瘤模型可模拟人肿瘤自然生长过程，是目前研究NB的重要手段，但需仔细考虑宿主、移植物和移植部位等因素，以保证其与人类发病特征的一致性。尽管皮下移植瘤模型制备相对简单，利于药物复合筛选，但是由于宿主、微环境和肿瘤之间的相互作

用等因素，原位瘤更接近人类表型，更有利于肿瘤学与病理学的研究。

1975年，Lawrence将人源NB细胞（SK-N-SH与SK-N-MC细胞）移植于裸小鼠皮下，首次成功建立NB皮下异位移植瘤模型<sup>[4]</sup>。此方法操作简易，成瘤率高，至今仍被广泛使用。1979年，Bogden等<sup>[5]</sup>首次建立了NB肾膜囊下原位移植瘤小鼠模型，该模型被美国国立癌症研究所（National Cancer Institute，NCI）列为研究抗癌新药物的重要方法之一。其后，Khanna等<sup>[6]</sup>研究发现，往肾上腺腹膜后脂肪注射两种NB细胞系（SK-N-AS和SMS-KCNR），可引起NB原位瘤的发生。肿瘤最初发生在肾上腺周围脂肪垫，随后侵入肾上腺皮质，然后延伸并包裹同侧肾脏。此方法已被学者广泛借鉴，但是由于小鼠肾上腺体积小，注射剂量难以控制。Rowe等<sup>[7]</sup>对该模型进行优化，提高了注射精准度，并降低了技术要求，注射体积可高达100 μL（1×10<sup>6</sup>个细胞），相比Flickinger等<sup>[8]</sup>与Khanna等<sup>[6]</sup>模型实验中的10 μL（5×10<sup>5</sup>个细胞）和50 μL（未提及细胞数）明显增多。结果证实，此模型能更好地保持人源性的肿瘤组织学特征，是一种稳定可靠的NB原位瘤模型<sup>[9]</sup>。刘波等<sup>[10]</sup>通过分别向SCID-Beige小鼠皮下和右侧肾上腺周围脂肪层注射50 μL SK-N-BE2（BE2）细胞，成功建立了皮下异位移植瘤模型与肾上腺原位瘤模型，结果显示肾上腺原位瘤的成瘤率更高，肿瘤生长速度更快，同时更符合临床NB生长位置。此外，也有来自不同NB细胞系的临床前实验模型被报告，详见表1。

有研究报告用不同的患者肿瘤组织建立高危NB人

表1 常见的NB细胞系来源的临床前实验小鼠模型  
Table 1 Frequently used preclinical laboratory mouse models derived from NB cell lines

| 细胞系<br>Cell line | 小鼠品系<br>Mouse strain                 | MYCN基因状态<br>MYCN status | ALK基因突变<br>ALK mutation | P53基因突变<br>P53 mutation | 参考文献<br>Reference |
|------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| KELLY            | BALB/c-nude 小鼠                       | 扩增                      | 野生型                     | 野生型                     | [11]              |
| CHP-212          | NSG 小鼠                               | 扩增                      | 野生型                     | 野生型                     | [12]              |
| SKNAS            | BALB/c-nude 小鼠                       | 非扩增                     | 野生型                     | H168R                   | [13]              |
| SH-SY-5Y         | Foxn1nu/Nju 小鼠、ICR 小鼠、BALB/c-nude 小鼠 | 非扩增                     | F1174L                  | 野生型                     | [14-16]           |
| IMR-32           | NSG 小鼠                               | 扩增                      | 野生型                     | 野生型                     | [17]              |
| IMR-05           | SHC 小鼠                               | 扩增                      | 野生型                     | 野生型                     | [18]              |
| LA-N-5           | BALB/c-nude 小鼠                       | 扩增                      | R1275Q                  | 野生型                     | [19]              |
| NB-1             | BALB/c-nude 小鼠                       | 扩增                      | 野生型扩增                   | 野生型                     | [20-21]           |
| SK-N-BE(2)       | SCID-Beige 小鼠                        | 扩增                      | 野生型                     | C135F                   | [10]              |
| SK-N-BE(2)-C     | BALB/c-nude 小鼠、Foxn1nu/Nju 小鼠        | 扩增                      | 野生型                     | C135F                   | [11, 22]          |
| CHP-134          | NOD-SCID 小鼠                          | 扩增                      | 野生型                     | 野生型                     | [23]              |
| SK-N-DZ          | BALB/c-nude 小鼠                       | 扩增                      | 野生型                     | R110L                   | [24]              |

源肿瘤异种移植 (patient derived tumor xenograft, PDX) 模型, 结果显示移植NB复发患者的肿瘤组织建立的PDX模型成功率最高, 而且原位移植比皮下或肌内移植更有效, 这表明高危PDX模型可用不同类型的样本稳定建立<sup>[25]</sup>。Byrne等<sup>[26]</sup>通过将荧光素酶标记的NB细胞注入小鼠肾上腺, 分析原位瘤模型中肿瘤的生长及转移情况; 该方法为探究NB的疾病发展、转移过程提供了重要手段。近期有文献<sup>[27]</sup>报告了一种新型的肾上腺外NB动物模型, 即胸腔NB模型, 通过向C57BL/6J小鼠胸膜下方注射 $2 \times 10^6$ 个小鼠NB细胞9464D, 成功建立了胸膈膜NB肿瘤模型。其中, 小鼠NB细胞9464D是转基因细胞系, 来源于C57BL/6背景的Th-MYCN转基因小鼠(酪氨酸羟化酶)模型, 可产生高表达MYCN的自发肿瘤, 含有人类MYCN转基因, 从酪氨酸羟化酶启动子表达外源性MYCN。该模型重现性高, 创口恢复快, 同时可在免疫功能正常动物体内建模, 可较高程度地模拟临床中机体发病情况, 为阐明肿瘤亚型之间的生物学和微环境差异提供了实践基础, 同时为高危患者开发针对性的治疗方案提供了新手段。

1.1.2 基因工程小鼠模型

1.1.2.1 MYCN扩增的基因工程小鼠模型

1997年, Weiss等<sup>[28]</sup>建立了针对NB的第一个基因工程小鼠模型, 即Th-MYCN小鼠模型, 这是NB研究中应用最广泛、最具特征的基因工程小鼠模型。纯合子的MYCN转基因小鼠可自发形成NB, 该模型发病率为临床NB的40倍以上<sup>[29]</sup>。在129X1/SvJ基因背景下, 纯合子Th-MYCN小鼠的肿瘤形成潜伏期很短, 为4~7周, 从肿瘤外显至死亡的平均时间仅为5d<sup>[30]</sup>。

在表达多巴胺-β-羟化酶(dopamine beta-hydroxylase, dβh)细胞中, 用Cre条件诱导可构建MYCN扩增的基因工程小鼠模型(LSL-MYCN; dβh-

iCre小鼠)<sup>[31]</sup>。该模型成瘤于交感神经节和肾上腺髓质, 成瘤时长较Th-MYCN小鼠模型浮动更大, 且时间更长(平均80d), 然而其成瘤率较高的特点使之成为优势配种品系。

1.1.2.2 ALK突变的基因工程小鼠模型

研究发现ALK是一种与家族性NB相关的受体酪氨酸激酶, 多数家族性NB病例中可以检测到ALK基因的激活突变, 是NB中最常见的突变基因<sup>[32]</sup>。ALK突变基因工程小鼠模型中含两种最常见的突变: ALK<sup>R1275</sup>(占43%)与ALK<sup>F1174</sup>(占30%)<sup>[33]</sup>。dβh-iCre; CAG-LSL-ALK<sup>F1174L</sup>小鼠和Th-IRES-Cre; CAG-LSL-ALK<sup>F1174L</sup>小鼠可分别在dβh与Th阳性神经嵴组织中表达ALK突变体, 产生低于50%外显率的NB, 肿瘤生长在脊椎旁神经节或肾上腺, 部分小鼠还可能出现肝转移<sup>[34]</sup>。当dβh-iCre; CAG-LSL-ALK<sup>F1174L</sup>小鼠与Th-MYCN小鼠杂交时, 子代小鼠的肿瘤发生率显著升高, 潜伏期显著缩短<sup>[35]</sup>。而另一种ALK<sup>F1174</sup>小鼠模型(即Th-ALK<sup>F1174L</sup>)不自发成瘤<sup>[33]</sup>, 当其与Th-MYCN小鼠杂交时, 所得后代与相同背景下的Th-MYCN小鼠相比, 肿瘤发生率大幅增加, 潜伏期更短<sup>[34]</sup>。同样, 在129×B6遗传背景下, ALK<sup>R1275Q</sup>基因敲入小鼠与Th-MYCN小鼠杂交, 子代小鼠的肿瘤完全外显, 而亲代在该背景上均未引起肿瘤发生<sup>[36]</sup>。

1.1.2.3 LIN28B转基因小鼠模型

RNA结合蛋白LIN28B是let-7 siRNA家族的负调控因子, 可通过负调控MYCN发挥抑制肿瘤生长的作用<sup>[12,37]</sup>。在大多数高危NB中可观察到LIN28B过表达, 而在少部分肿瘤中也出现LIN28B扩增<sup>[38]</sup>。条件性过表达LIN28B的转基因小鼠(dβh-iCre; CAG-LSL-LIN28B小鼠)有25%的概率自发成瘤。另外, 除以上主要基因工程小鼠外, 目前文献报告的还有其他一些相关模型, 具体见表2。

表2 常见的NB基因工程小鼠模型  
Table 2 The common genetically engineered mouse models

| 小鼠模型<br>Mouse model | 优势<br>Advantage          | 局限性<br>Limitation      | 参考文献<br>Reference |
|---------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|
| Th-MYCN             | 代表高危NB型, 成瘤率高            | 成瘤时间长, 转移少             | [39-40]           |
| LSL-MYCN; dβh-iCre  | 比Th-MYCN更明确的转基因插入, 发病率更高 | 转移率低                   | [31]              |
| Th-MYCN/CASP8(KO)   | 存在转移, 成瘤率高               | 引起原发肿瘤细胞外基质结构的改变       | [41]              |
| Th-MYCN/Trp53(KI)   | 诱导性P53丢失                 | P53突变多发于复发肿瘤中, 小鼠的存活率低 | [42]              |
| ALK(F1174)          | 符合NB表型                   | 临床常见率低                 | [33]              |
| Th-MYCN/ALK(F1174)  | 成瘤率高, 肿瘤生长快              | 相关性低                   | [35]              |
| SV40 Tag            | 与NB表型一致, 肿瘤发病率高, 存在转移    | 所有小鼠在28周龄前死亡           | [43]              |



## 1.2 鸡胚绒毛尿囊膜模型

鸡胚绒毛尿囊膜 (chick embryo chorioallantoic membrane) 模型是最早的异种移植瘤模型之一<sup>[44]</sup>。此时雏鸡的免疫系统未完全发育, 排斥反应尚未建立, 因此肿瘤生长具有良好条件。然而该模型在NB研究中鲜有报告, 可比性较低。1998年, Ribatti等<sup>[45]</sup>首次在鸡胚绒毛尿囊膜实验中证明了人源NB细胞系的细胞悬液可刺激机体血管生成。同时, 免疫组织化学结果显示, NB细胞呈簇状排列于血管周围及内部。Mangieri等<sup>[46]</sup>进一步研究发现, 在基质凝胶中培养数天后的NB细胞表现出多种与人类疾病类似的特征, 如血管生成活性与内皮生长因子-A、低氧诱导因子-2 $\alpha$ 的转录产物高表达等相关, 表明该实验模型可用于人类肿瘤进展研究及抗血管生成分子的筛选。

Herrmann等<sup>[47]</sup>证实NB细胞可在鸡胚绒毛尿囊膜上成功形成肿瘤。此外, 缺氧预处理可改变NB细胞表型, 促进肿瘤转移到其他器官, 该模型被证明适用于肿瘤治疗药物研究。Swadi等<sup>[48]</sup>进一步探究在鸡胚绒毛尿囊膜上形成的NB分化情况, 结果表明在成瘤的3 d中, 将反式维甲酸注射到尿囊内, 可以减少两种MYC扩增的NB细胞系增殖。

## 1.3 斑马鱼模型

近年来, 斑马鱼已成为科学家进行生物学及其他研究的热门工具。斑马鱼具有繁殖力强、饲养成本低、易于观察等特点, 是一种良好的脊椎动物模型<sup>[49]</sup>。1965年, Stanton<sup>[50]</sup>利用二乙基亚硝胺诱导斑马鱼肝脏发生瘤变, 这是斑马鱼首次在肿瘤学方面的应用研究。2003年, 有学者通过Rag2启动子调控过表达MYC致癌基因, 成功建立了第一个斑马鱼T细胞白血病基因模型<sup>[51]</sup>。近十年来, 该模型不断衍生出适用于不同研究领域的转基因和突变品系, 包括黑色素瘤、横纹肌肉瘤、肝癌等肿瘤类型<sup>[52-54]</sup>。

斑马鱼NB模型首次报告于2012年, 该研究通过使用斑马鱼将d $\beta$ h启动子驱动增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 融合到MYCN的氨基末端, 驱使致癌基因MYCN和激活突变的ALK (这是原发NB中最常见的突变基因与靶向治疗候选基因) 基因表达<sup>[32]</sup>。2017年, Tao等<sup>[55]</sup>对原始模型进行了改进, 采用共注射法构建了一种稳定的斑马鱼品系 (TgMYCN-TT), 该方法将肿瘤外显率提高到70%。接下来, 为了探究ALK在NB中的作用, Zhu等<sup>[56]</sup>将d $\beta$ h融合到野生型ALK或ALK (F1174L) 构

建了转基因斑马鱼, 结果显示活化的ALK在斑马鱼发育过程中减轻了MYCN诱导的交感神经肾上腺祖细胞凋亡反应, 但嗜铬细胞系的分化仍然受阻。2017年, Zhang等<sup>[57]</sup>利用MYCN过表达的斑马鱼NB模型, 探究了蛋白酪氨酸磷酸酶非受体型11 (protein tyrosine phosphatase nonreceptor 11, PTPN11) 突变基因在NB中的作用。结果表明, MYCN转基因斑马鱼中PTPN11的表达促进了NB的形成, 同时增加了肿瘤外显率, 这为PTPN11通过激活RAS-MAPK信号通路与MYCN协同促进NB形成提供了直接证据。图1概述了应用斑马鱼模型进行NB研究的基本流程。

斑马鱼PDX模型 (zebrafish Patient-derived tumor xenograft, zPDX) 可用于监测肿瘤发展, 筛选新的肿瘤治疗方法。Costa等<sup>[58]</sup>与Fior等<sup>[59]</sup>建立了结直肠癌zPDX模型, 为临床治疗方案的筛选提供了新途径。Almstedt等<sup>[60]</sup>通过高通量斑马鱼NB移植瘤模型, 探究大麻素受体2 (cannabinoid receptor 2, CNR2) 和丝裂原激活蛋白激酶8 (mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8) 的治疗效果。药物筛选发现, GW405833和AS601245是最有效和耐受性良好的CNR2和MAPK8靶向化合物, 可有效抑制斑马鱼异种移植瘤的生长。

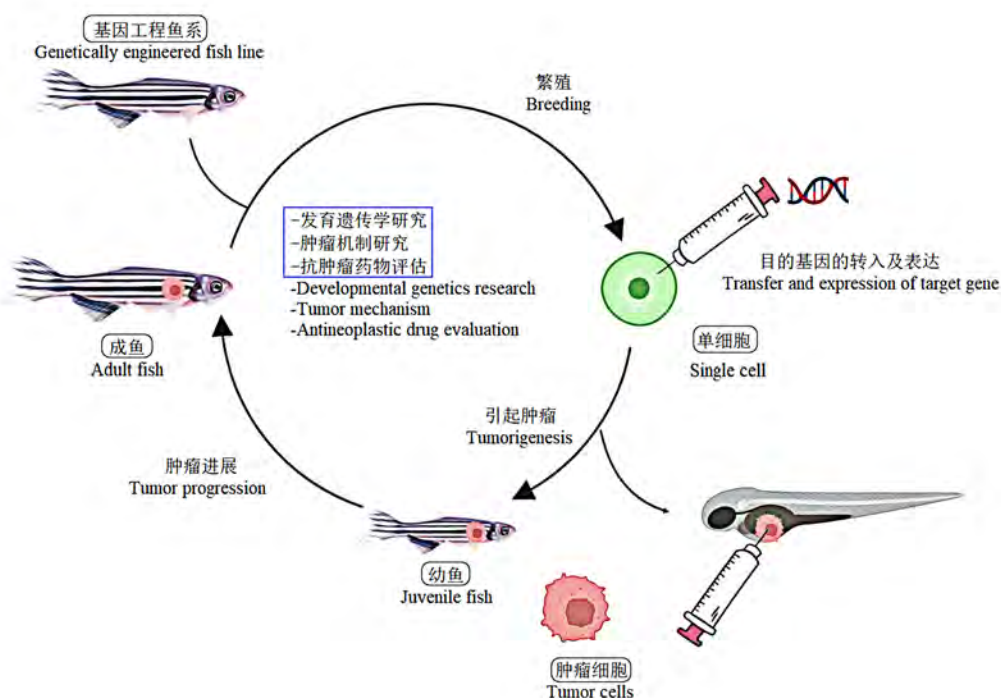
斑马鱼模型在研究NB发病机制及体内药物筛选中的作用日益显著, 研究者已成功将不同遗传背景的人源肿瘤细胞移植到胚胎期或成熟期斑马鱼体内<sup>[61]</sup>。其中已有不同注射部位的研究, 包括卵黄周间隙、心包间隙、卵黄和脑部等<sup>[58, 61-62]</sup>。近期还有研究者将NB细胞异种移植到斑马鱼胚胎迁移神经嵴干细胞中, 并结合共聚焦延时成像和细胞跟踪技术, 为研究肿瘤微环境和肿瘤细胞与宿主的相互作用提供了新手段<sup>[63]</sup>。

迄今为止, 现有的斑马鱼模型均是基于MYCN基因高表达。因此, 迫切需要发展非依赖MYCN的斑马鱼模型, 以用于非MYCN扩增患者的治疗。

## 2 NB动物模型的应用

### 2.1 肿瘤生物学特性及机制研究

肿瘤转移的过程、机制和预防是研究的重点, 而这都需要合适的动物模型来进行。Ibarra等<sup>[64]</sup>将NB细胞异种移植到斑马鱼胚胎建立斑马鱼模型, 通过共聚焦延时成像和细胞跟踪等手段监测人类NB细胞在胚胎微环境中的体内动向。Delloye-Bourgeois等<sup>[65]</sup>使用鸡胚绒毛尿囊膜模型证明了信号素3C (semaphorin 3C, SEMA3C) 在NB细胞凝聚中的作用, 表明SEMA3C水



注：斑马鱼肿瘤模型主要用于发育遗传学研究、肿瘤机制研究和抗肿瘤药物评估。

Note: Zebrafish tumor model can be mainly used for the developmental genetics research, studies on tumor mechanisms, and antineoplastic drug evaluation.

图1 斑马鱼模型进行NB研究的流程示意图

Figure 1 Process diagram of zebrafish model for NB research

平降低阻碍了细胞的集体迁移，导致细胞扩散和转移扩散的增加。在斑马鱼 NB 模型中，LIM 结构域的转录辅助因子 LMO1 被证明与 MYCN 有协同作用，可促进 NB 的发生、发展和广泛转移<sup>[66]</sup>。Dong 等<sup>[67]</sup> 利用斑马鱼和小鼠模型探究生长休止基因 GAS7 缺失对 MYCN 扩增的 NB 细胞扩散转移的影响，结果显示在斑马鱼模型中，GAS7 基因缺失对肿瘤的形成无显著影响，而 GAS7 缺失在哺乳动物模型中有抑制 NB 转移的作用。

在肿瘤机制研究方面，本课题组前期研究发现在小鼠 NB 异种移植瘤模型中，甲状腺转录因子 1 (thyroid transcription factor-1, TTF1) -TrkA-miR-204/TrkB 轴对 NB 生长及其神经源性分化发挥重要作用<sup>[68]</sup>。通过注射 SK-N-SH 细胞于小鼠肾上腺和尾静脉，成功建立 NB 原位瘤模型与转移模型，进一步研究发现脂肪酸结合蛋白 4 (fatty acid-binding protein 4, FABP4) 可能介导巨噬细胞通过泛素化 ATPB 使 NF- $\kappa$ B-IL1 $\alpha$  通路失活，从而促进 NB 细胞的增殖和迁移<sup>[69]</sup>。

## 2.2 肿瘤药物评估及耐药机制研究

皮下注射 NB 细胞 SK-N-BE2 于 NOD-SCID 小鼠的

腹部，建立皮下移植瘤模型后进行药物评估，可以探究三联疗法产生的协同作用，结果发现乙酰唑胺与苯地胺和顺铂联合使用可增加化疗药物的细胞毒性，增强治疗效果<sup>[70]</sup>。柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazine, SSZ) 是 FDA 批准适用于治疗类风湿关节炎及溃疡性结肠炎的药物，被证明对海蝶呤还原酶 (sepiapterin reductase, SPR) 有抑制作用<sup>[71]</sup>。而 SPR 是一种还原型辅酶 II (NADPH) 依赖酶，可产生 NB 增殖过程所需的代谢辅助因子<sup>[72]</sup>。Mooney 等<sup>[73]</sup> 建立小鼠异种移植瘤模型后研究 SSZ 对 NB 的抑制效果，结果显示 SSZ 单独或与羧甲基纤维素 (sodium carboxymethyl cellulose, CMC) 联合给药在体内可以显示抗肿瘤作用，可用于治疗 NB 等对其敏感的实体肿瘤疾病。

另有研究通过建立 NB 小鼠 PDX 模型，开发并使用一种类似 COJEC 的治疗方案 (顺铂、卡铂、环磷酰胺、依托泊苷和长春新碱 5 种化疗药物交替给药)，详细分析 NB 治疗期间和复发时转录组学和基因组学变化，以期揭示 NB 的耐药机制，结果显示原发性耐药与高遗传多样性和胚胎表型有关<sup>[74]</sup>。Zhang 等<sup>[75]</sup> 通过建立小

鼠皮下移植瘤模型, 探究生长激素受体 (growth hormone receptor, GHR) 对耐依托泊苷的NB细胞系与肿瘤形成之间的影响, 结果表明GHR下调可引起依托泊苷的抗肿瘤作用增强, 同时发现依托泊苷耐药是由MEK/ERK信号通路失活引起, 推测GHR表达上调可能是依托泊苷耐药机制之一。

### 2.3 寻找新的治疗靶点和治疗方法

研究发现, 核糖核苷酸还原酶亚基M2 (ribonucleotide reductase regulatory subunit M2, RRM2) 可能是影响NB发生发展的候选因子之一<sup>[76]</sup>。在MYCN驱动的斑马鱼NB模型中, RRM2过表达可加速NB形成, 增加肿瘤外显率, 激活共济失调毛细血管扩张Rad3相关蛋白 (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein, ATR) - 细胞周期检测点激酶 (checkpoint kinase 1, CHK1) 信号通路。同时, RRM2和CHK1的抑制剂在高危NB细胞系和患者来源的异种移植模型中均显示出良好的协同作用, 该发现对研发NB新药和指导联合用药具有重要意义。

最近有研究者采用Th-MYCN转基因小鼠肿瘤样本, 通过单细胞RNA测序、流式细胞技术和聚类分析等手段, 探究了NB微环境的免疫成分, 为未来的NB靶向治疗提供了新的方向<sup>[77]</sup>。此外Li等<sup>[78]</sup>在NSG小鼠皮下及原位接种荧光标记的NBEB (NBEB-Luc) 细胞建立移植瘤模型, 以评估心肌特异性肌钙蛋白T抗体3 (cardiac troponin T 3, CT3) 来源的嵌合抗原受体T细胞 (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) 的抗肿瘤活性, 结果显示所有接受CT3 CAR-T细胞治疗的个体中, 肿瘤可消退至极小, 甚至完全消退。这一结果表明CT3 CAR-T细胞治疗可诱导NB持续消退, 提示可利用RNA-SEQ数据来识别与肿瘤相关的基因外显子, 从而为靶向治疗实体肿瘤提供有效策略。Theruvath等<sup>[79]</sup>在MYCN扩增的NB异体移植小鼠模型中探索双唾液酸神经节苷脂 (disialoganglioside, GD2) 与整合素相关蛋白CD47抗体药的协同能力, 发现联用后可促进肿瘤消退, 提高小鼠生存率。最近有报告<sup>[80]</sup>利用鸡胚绒毛尿囊膜模型研究了CDK抑制剂对NB细胞分化、增殖等过程的影响, 结果表明CDK1抑制剂促使SK-N-AS和SK-N-BE2细胞增殖及缺氧预处理驱动的肿瘤迁移减少了60%, 即CDK1可用于NB的靶点治疗。

## 3 总结与展望

大多数关于胚胎发育的研究都基于以下假设: 在

动物模型中, 尤其是啮齿类动物中, 可重现人类恶性肿瘤疾病。小鼠模型上的大量研究提高了人们对NB生物学和遗传学特性的认知, 然而NB在小鼠身上无法自发形成, 这在一定程度上限制了NB发生机制的研究。动物模型在NB发生、发展、分子机制和治疗研究中起着至关重要的作用。不同动物模型有各自的特点, 可以模拟人类NB发展的不同特征。斑马鱼的基因组和疾病信号通路与人类具有高度同源性, 器官发生、疾病生理与人类相似度较高, 因此其成为了动物化学遗传学研究和药物发现的主要模式生物, 可用于研究胚胎和成年阶段的人类疾病和药物治疗方法。然而, 斑马鱼与哺乳类动物的免疫系统相比, 仍然存在一定差异。斑马鱼有哺乳动物免疫系统的重要部分, 如巨噬细胞、B淋巴细胞和T淋巴细胞等, 但是斑马鱼的先天免疫系统和适应性免疫系统高度保守, 而人类免疫系统更为复杂, 两者免疫反应也有所差异<sup>[81]</sup>。皮下移植的NB小鼠模型成瘤重复性好, 测量方便, 可用于评估肿瘤生长及药物疗效, 但极少发生肿瘤转移, 而且测试药物反应时与人源肿瘤部位可能不一致。原位移植的NB小鼠模型可反映NB原位发生及转移的特征, 尤其是类器官原位移植小鼠模型, 多用于评估抗肿瘤及转移药物。基因工程小鼠可用于探究NB相关基因在疾病发生发展中的机制作用, 用于研究新疗法 (如新型免疫疗法) 并评估预防癌症策略, 但靶向胚胎的NB基因激活或失活可以启动肿瘤的发生, 这与人类NB的发展仍有区别。鸡胚绒毛尿囊膜模型的独特优势在于血管网络丰富、成本低、免疫系统发育缓慢, 不引起免疫排斥反应, 便于异种组织 (如人类肿瘤) 的移植等, 但该模型无法模拟肿瘤与机体之间的免疫反应, 也无法评测肿瘤与免疫细胞之间的相互作用。

不同特征的动物模型可用于不同目的的实验研究, 选择合适的动物模型尤为重要。同时, 不同动物模型都具有其优势和不足。人源化小鼠模型的建立为疾病的病因学、发展过程和治疗研究提供了极大的帮助, 尤其是近年来分子生物学技术进步及在人源化小鼠模型中的应用, 为各种疾病相关基因研究奠定了基础, 为进一步研究疾病发生机制及靶向治疗提供了依据。随着免疫治疗的发展, 虽然目前尚未有一种能将人类NB与完整免疫系统结合起来的小鼠, 但可以确信未来在构建人源化免疫小鼠模型方面会有所突破。综上所述, NB动物模型为研究NB提供了一定的理论基础和科学依据。



**[作者贡献 Author Contribution]**

谭志刚提出文章思路, 撰写、修订文章;  
 刘锦信对文章思路有重要建议, 对文章框架及内容作批评性  
 审阅;  
 郑楚雅对文章的知识性内容作批评性审阅, 并给予指导性  
 支持;  
 廖文峰提供图文素材, 补充内容;  
 冯露平、彭红丽负责部分英文材料翻译;  
 严秀协助修改论文;  
 卓振建选题, 制定论文框架, 审阅及修订。

**[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] ZAFAR A, WANG W, LIU G, et al. Molecular targeting therapies for neuroblastoma: progress and challenges[J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(2):961-1021. DOI: 10.1002/med.21750.
- [2] CHUNG C, BOTERBERG T, LUCAS J, et al. Neuroblastoma[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2021, 68: e28473. DOI: 10.1002/pbc.28473.
- [3] SUN X F, ZHEN Z J, GUO Y, et al. Oral metronomic maintenance therapy can improve survival in high-risk neuroblastoma patients not treated with ASCT or anti-GD2 antibodies[J]. *Cancers*, 2021, 13(14): 3494. DOI: 10.3390/cancers13143494.
- [4] HELSON L, DAS S K, HAJDU S I. Human neuroblastoma in nude mice[J]. *Cancer Res*, 1975, 35(9): 2594-2599.
- [5] BOGDEN A E, COBB W R, LEPAGE D J, et al. Chemotherapy responsiveness of human tumors as first transplant generation xenografts in the normal mouse: six-day subrenal capsule assay[J]. *Cancer*, 1981, 48(1):10-20. DOI: 10.1002/1097-0142(19810701)48:1<10: AID-CNCR2820480105>3.0.CO;2-I.
- [6] KHANNA C, JABOIN J J, DRAKOS E, et al. Biologically relevant orthotopic neuroblastoma xenograft models: primary adrenal tumor growth and spontaneous distant metastasis[J]. *In Vivo*, 2002, 16(2):77-85.
- [7] ROWE D H, HUANG J Z, LI J, et al. Suppression of primary tumor growth in a mouse model of human neuroblastoma[J]. *J Pediatr Surg*, 2000, 35(6): 977-981. DOI: 10.1053/jpsu.2000.6946.
- [8] FLICKINGER K S, JUDWARE R, LECHNER R, et al. Integrin expression in human neuroblastoma cells with or without N-myc amplification and in ectopic/orthotopic nude mouse tumors[J]. *Exp Cell Res*, 1994, 213(1): 156-163. DOI: 10.1006/excr.1994.1185.
- [9] KANG J, ISHOLA T A, BAREGAMIAN N, et al. Bombesin induces angiogenesis and neuroblastoma growth[J]. *Cancer Lett*, 2007, 253(2):273-281. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.02.007.
- [10] 刘波, 苗佳宁, 张斯萌, 等. 神经母细胞瘤肾上腺原位移植瘤动物模型的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(12):1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.12.001.  
 LIU B, MIAO J N, ZHANG S M, et al. Establishment of an orthotopic xenografted animal model of neuroblastoma[J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(12):1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.12.001.
- [11] SENEVIRATNE J A, CARTER D R, MITTRA R, et al. Inhibition of mitochondrial translocase SLC25A5 and histone deacetylation is an effective combination therapy in neuroblastoma[J]. *Int J Cancer*, 2023, 152(7): 1399-1413. DOI: 10.1002/ijc.34349.
- [12] MISSIONS P, DA ROCHA E L, PEARSON D S, et al. LIN28B alters ribosomal dynamics to promote metastasis in MYCN-driven malignancy[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(22):e145142. DOI: 10.1172/JCI145142.
- [13] CANDIDO M F, MEDEIROS M, VERONEZ L C, et al. Drugging hijacked kinase pathways in pediatric oncology: opportunities and current scenario[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(2):664. DOI: 10.3390/pharmaceutics15020664.
- [14] GU Y Y, ZHONG K, PENG L Z, et al. TRAF4 silencing induces cell apoptosis and improves retinoic acid sensitivity in human neuroblastoma[J]. *Neurochem Res*, 2023, 48(7): 2116-2128. DOI: 10.1007/s11064-023-03882-3.
- [15] CONDURAT A L, AMINZADEH-GOHARI S, MALNAR M, et al. Verteporfin-induced proteotoxicity impairs cell homeostasis and survival in neuroblastoma subtypes independent of YAP/TAZ expression[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 3760. DOI: 10.1038/s41598-023-29796-2.
- [16] HE Y, LUO M H, LEI S, et al. Luteoloside induces G0/G1 phase arrest of neuroblastoma cells by targeting p38 MAPK[J]. *Molecules*, 2023, 28(4):1748. DOI: 10.3390/molecules28041748.
- [17] GAO Y, VOLEGOVA M, NASHOLM N, et al. Synergistic anti-tumor effect of combining selective CDK7 and BRD4 inhibition in neuroblastoma[J]. *Front Oncol*, 2022, 11: 773186. DOI: 10.3389/fonc.2021.773186.
- [18] MAKVANDI M, SAMANTA M, MARTORANO P, et al. Pre-clinical investigation of astatine-211-parthanatine for high-risk neuroblastoma[J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1): 1260. DOI: 10.1038/s42003-022-04209-8.
- [19] ZHU Q Q, FENG C, LIAO W W, et al. Target delivery of MYCN siRNA by folate-nanoliposomes delivery system in a metastatic neuroblastoma model[J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1):65. DOI: 10.1186/1475-2867-13-65.
- [20] RYU S, HAYASHI M, AIKAWA H, et al. Heterogeneous distribution of alectinib in neuroblastoma xenografts revealed by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging: a pilot study[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(1):29-37. DOI: 10.1111/bph.14067.
- [21] NOMURA M, SHIMBO T, MIYAMOTO Y, et al. 13-*Cis* retinoic acid can enhance the antitumor activity of non-replicating Sendai virus particle against neuroblastoma[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(2):238-244. DOI: 10.1111/cas.12063.
- [22] SEPPORTA M V, PRAZ V, BALMAS BOURLOUD K, et al. TWIST1 expression is associated with high-risk neuroblastoma and promotes primary and metastatic tumor growth[J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1):42. DOI: 10.1038/s42003-021-02958-6.
- [23] LAMPIS S, RAIELI S, MONTEMURRO L, et al. The MYCN inhibitor BGA002 restores the retinoic acid response leading to differentiation or apoptosis by the mTOR block in MYCN-amplified neuroblastoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 160. DOI: 10.1186/s13046-022-02367-5.
- [24] XIAO H L, LI Y H, ZHANG Y, et al. Long noncoding RNA LINC01296 regulates the cell proliferation, migration and invasion in neuroblastoma[J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(4): 1247-1258. DOI: 10.1007/s11011-022-00935-4.
- [25] KAMILI A, GIFFORD A J, LI N, et al. Accelerating development of high-risk neuroblastoma patient-derived xenograft models for preclinical testing and personalised

- therapy[J]. *Br J Cancer*, 2020, 122(5): 680-691. DOI: 10.1038/s41416-019-0682-4.
- [26] BYRNE F L, MCCARROLL J A, KAVALLARIS M. Analyses of tumor burden *in vivo* and metastasis *ex vivo* using luciferase-expressing cancer cells in an orthotopic mouse model of neuroblastoma[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1372: 61-77. DOI: 10.1007/978-1-4939-3148-4\_5.
- [27] GRANT C N, WILLS C A, LIU X M, et al. Thoracic neuroblastoma: a novel surgical model for the study of extra-adrenal neuroblastoma[J]. *In Vivo*, 2022, 36(1): 49-56. DOI: 10.21873/in vivo.12675.
- [28] WEISS W A, ALDAPE K, MOHAPATRA G, et al. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice[J]. *EMBO J*, 1997, 16(11): 2985-2995. DOI: 10.1093/emboj/16.11.2985.
- [29] MARSHALL G M, CARTER D R, CHEUNG B B, et al. The prenatal origins of cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(4): 277-289. DOI: 10.1038/nrc3679.
- [30] Rasmuson A, Segerström L, Nethander M, et al. Tumor development, growth characteristics and spectrum of genetic aberrations in the TH-MYCN mouse model of neuroblastoma[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51297.
- [31] ALTHOFF K, BECKERS A, BELL E, et al. A Cre-conditional MYCN-driven neuroblastoma mouse model as an improved tool for preclinical studies[J]. *Oncogene*, 2015, 34(26): 3357-3368. DOI: 10.1038/ncr.2014.269.
- [32] ROSSWOG C, FASSUNKE J, ERNST A, et al. Genomic ALK alterations in primary and relapsed neuroblastoma[J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(8): 1559-1571. DOI: 10.1038/s41416-023-02208-y.
- [33] BRESLER S C, WEISER D A, HUWE P J, et al. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 682-694. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.09.019.
- [34] HEUKAMP L C, THOR T, SCHRAMM A, et al. Targeted expression of mutated ALK induces neuroblastoma in transgenic mice[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(141): 141ra91. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003967.
- [35] BERRY T, LUTHER W, BHATNAGAR N, et al. The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(1): 117-130. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.06.001.
- [36] UEDA T, NAKATA Y, YAMASAKI N, et al. ALK(R1275Q) perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN[J]. *Oncogene*, 2016, 35(34): 4447-4458. DOI: 10.1038/ncr.2015.519.
- [37] LIN Z H, RADAIEVA M, CHERKASOV A, et al. Lin28 regulates cancer cell stemness for tumour progression[J]. *Cancers*, 2022, 14(19): 4640. DOI: 10.3390/cancers14194640.
- [38] MOLENAAR J J, DOMINGO-FERNÁNDEZ R, EBUS M E, et al. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(11): 1199-1206. DOI: 10.1038/ng.2436.
- [39] MASSUDI H, LUO J S, HOLIEN J K, et al. Inhibitors of the oncogenic PA2G4-MYCN protein-protein interface[J]. *Cancers*, 2023, 15(6): 1822. DOI: 10.3390/cancers15061822.
- [40] KAMBE K, IGUCHI M, HIGASHI M, et al. Development of minimally invasive cancer immunotherapy using anti-disialoganglioside GD2 antibody-producing mesenchymal stem cells for a neuroblastoma mouse model[J]. *Pediatr Surg Int*, 2022, 39(1): 43. DOI: 10.1007/s00383-022-05310-z.
- [41] TEITZ T, INOUE M, VALENTINE M B, et al. Th-MYCN mice with caspase-8 deficiency develop advanced neuroblastoma with bone marrow metastasis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(13): 4086-4097. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2681.
- [42] YOGEV O, BARKER K, SIKKA A, et al. p53 loss in MYC-driven neuroblastoma leads to metabolic adaptations supporting radioresistance[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(10): 3025-3035. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1939.
- [43] EIBL R H, SCHNEEMANN M. Medulloblastoma: from TP53 mutations to molecular classification and liquid biopsy[J]. *Biology*, 2023, 12(2): 267. DOI: 10.3390/biology12020267.
- [44] MITREVSKA K, MERLOS RODRIGO M A, CERNEI N, et al. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay for the evaluation of the antitumor and antimetastatic activity of platinum-based drugs in association with the impact on the amino acid metabolism[J]. *Mater Today Bio*, 2023, 19: 100570. DOI: 10.1016/j.mtbio.2023.100570.
- [45] RIBATTI D, ALESSANDRI G, VACCA A, et al. Human neuroblastoma cells produce extracellular matrix-degrading enzymes, induce endothelial cell proliferation and are angiogenic *in vivo*[J]. *Int J Cancer*, 1998, 77(3): 449-454. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19980727)77:3<449:aid-ijc22>3.0.co;2-1.
- [46] MANGIERI D, NICO B, COLUCCIA A M L, et al. An alternative *in vivo* system for testing angiogenic potential of human neuroblastoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2009, 277(2): 199-204. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.12.014.
- [47] HERRMANN A, RICE M, LÉVY R, et al. Cellular memory of hypoxia elicits neuroblastoma metastasis and enables invasion by non-aggressive neighbouring cells[J]. *Oncogenesis*, 2015, 4(2): e138. DOI: 10.1038/ncncs.2014.52.
- [48] SWADI R, MATHER G, PIZER B L, et al. Optimising the chick chorioallantoic membrane xenograft model of neuroblastoma for drug delivery[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 28. DOI: 10.1186/s12885-017-3978-x.
- [49] LI S, YEO K S, LEVEE T M, et al. Zebrafish as a neuroblastoma model: progress made, promise for the future[J]. *Cells*, 2021, 10(3): 580. DOI: 10.3390/cells10030580.
- [50] STANTON M F. Diethylnitrosamine-induced hepatic degeneration and neoplasia in the aquarium fish, brachydanio rerio[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1965, 34: 117-130. DOI: 10.1093/jnci/34.1.117.
- [51] LANGENAU D M, TRAVER D, FERRANDO A A, et al. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish[J]. *Science*, 2003, 299(5608): 887-890. DOI: 10.1126/science.1080280.
- [52] ETCHIN J, KANKI J P, LOOK A T. Zebrafish as a model for the study of human cancer[J]. *Methods Cell Biol*, 2011, 105: 309-337. DOI: 10.1016/B978-0-12-381320-6.00013-8.
- [53] FEITSMA H, CUPPEN E. Zebrafish as a cancer model[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(5): 685-694. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2167.
- [54] BENJAMIN D C, HYNES R O. Intravital imaging of metastasis in adult Zebrafish[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 660. DOI: 10.1186/s12885-017-3647-0.
- [55] TAO T, SONDALLE S B, SHI H, et al. The pre-rRNA processing factor DEF is rate limiting for the pathogenesis of MYCN-driven neuroblastoma[J]. *Oncogene*, 2017, 36(27): 3852-3867. DOI: 10.1038/ncr.2016.527.
- [56] ZHU S Z, LEE J S, GUO F, et al. Activated ALK collaborates

- with MYCN in neuroblastoma pathogenesis[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3):362-373. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.02.010.
- [57] ZHANG X L, DONG Z W, ZHANG C, et al. Critical role for GAB2 in neuroblastoma pathogenesis through the promotion of SHP<sub>2</sub>/MYCN cooperation[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(12):2932-2942. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.02.065.
- [58] COSTA B, ESTRADA M F, MENDES R V, et al. Zebrafish avatars towards personalized medicine-a comparative review between avatar models[J]. *Cells*, 2020, 9(2):293. DOI: 10.3390/cells9020293.
- [59] FIOR R, PÓVOA V, MENDES R V, et al. Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(39):E8234-E8243. DOI: 10.1073/pnas.1618389114.
- [60] ALMSTEDT E, ELGENDY R, HEKMATI N, et al. Integrative discovery of treatments for high-risk neuroblastoma[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):71. DOI: 10.1038/s41467-019-13817-8.
- [61] VEINOTTE C J, DELLAIRE G, BERMAN J N. Hooking the big one: the potential of zebrafish xenotransplantation to reform cancer drug screening in the genomic era[J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(7):745-754. DOI: 10.1242/dmm.015784.
- [62] HANEY M G, MOORE L H, BLACKBURN J S. Drug screening of primary patient derived tumor xenografts in zebrafish[J]. *J Vis Exp*, 2020(158):10.3791/60996. DOI: 10.3791/60996.
- [63] CABEZAS-SÁINZ P, PENSADO-LÓPEZ A, SÁINZ B Jr, et al. Modeling cancer using zebrafish xenografts: drawbacks for mimicking the human microenvironment[J]. *Cells*, 2020, 9(9):1978. DOI: 10.3390/cells9091978.
- [64] IBARRA B A, JIANG X H, TREFFY R W, et al. Injection of human neuroblastoma cells into neural crest streams in live zebrafish embryos[J]. *STAR Protoc*, 2022, 3(2):101380. DOI: 10.1016/j.xpro.2022.101380.
- [65] DELLOYE-BOURGEOIS C, BERTIN L, THOINET K, et al. Microenvironment-driven shift of cohesion/detachment balance within tumors induces a switch toward metastasis in neuroblastoma[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(4):427-443. e8. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.09.006.
- [66] ZHU S Z, ZHANG X L, WEICHERT-LEAHEY N, et al. LMO1 synergizes with MYCN to promote neuroblastoma initiation and metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(3):310-323. e5. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.08.002.
- [67] DONG Z W, YEO K S, LOPEZ G, et al. GAS7 deficiency promotes metastasis in MYCN-Driven neuroblastoma[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(11):2995-3007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-1890.
- [68] YANG T Y, LI J H, ZHUO Z J, et al. TTF<sub>1</sub> suppresses neuroblastoma growth and induces neuroblastoma differentiation by targeting TrkA and the miR-204/TrkB axis [J]. *iScience*, 2022, 25(7):104655. DOI: 10.1016/j.isci. 2022.104655.
- [69] MIAO L, ZHUO Z J, TANG J, et al. FABP4 deactivates NF- $\kappa$ B-IL1 $\alpha$  pathway by ubiquitinating ATPB in tumor-associated macrophages and promotes neuroblastoma progression[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(4):e395. DOI: 10.1002/ctm2.395.
- [70] GARBATI P, BARBIERI R, CALDERONI M, et al. Efficacy of a three drug-based therapy for neuroblastoma in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13):6753. DOI: 10.3390/ijms22136753.
- [71] HARUKI H, PEDERSEN M G, GORSKA K I, et al. Tetrahydrobiopterin biosynthesis as an off-target of sulfa drugs[J]. *Science*, 2013, 340(6135):987-991. DOI: 10.1126/science.1232972.
- [72] SHANG T S, KOTAMRAJU S, ZHAO H T, et al. Sepiapterin attenuates 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in neuroblastoma cells transfected with neuronal NOS: role of tetrahydrobiopterin, nitric oxide, and proteasome activation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39(8):1059-1074. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.022.
- [73] MOONEY M R, GEERTS D, KORT E J, et al. Anti-tumor effect of sulfasalazine in neuroblastoma[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 162:237-249. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.01.007.
- [74] MAÑAS A, AALTONEN K, ANDERSSON N, et al. Clinically relevant treatment of PDX models reveals patterns of neuroblastoma chemoresistance[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(43):eabq4617. DOI: 10.1126/sciadv.abq4617.
- [75] ZHANG H M, XIA H F, CHEN H, et al. The inhibition of GHR enhanced cytotoxic effects of etoposide on neuroblastoma [J]. *Cell Signal*, 2021, 86:110081. DOI: 10.1016/j.celsig. 2021.110081.
- [76] NUNES C, DEPESTEL L, MUS L, et al. RRM2 enhances MYCN-driven neuroblastoma formation and acts as a synergistic target with CHK<sub>1</sub> inhibition[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(28):eabn1382. DOI: 10.1126/sciadv.abn1382.
- [77] COSTA A, THIRANT C, KRAMDI A, et al. Single-cell transcriptomics reveals shared immunosuppressive landscapes of mouse and human neuroblastoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(8):e004807. DOI: 10.1136/jitc-2022-004807.
- [78] LI N, TORRES M B, SPETZ M R, et al. CAR T cells targeting tumor-associated exons of glypican 2 regress neuroblastoma in mice[J]. *Cell Rep Med*, 2021, 2(6):100297. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100297.
- [79] THERUVATH J, MENARD M, SMITH B A H, et al. Anti-GD2 synergizes with CD47 blockade to mediate tumor eradication [J]. *Nat Med*, 2022, 28(2):333-344. DOI: 10.1038/s41591-021-01625-x.
- [80] SWADI R R, SAMPAT K, HERRMANN A, et al. CDK inhibitors reduce cell proliferation and reverse hypoxia-induced metastasis of neuroblastoma tumours in a chick embryo model[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):9136. DOI: 10.1038/s41598-019-45571-8.
- [81] LEIBA J, ÖZBILGIÇ R, HERNÁNDEZ L, et al. Molecular actors of inflammation and their signaling pathways: mechanistic insights from zebrafish[J]. *Biology*, 2023, 12(2):153. DOI: 10.3390/biology12020153.
- (收稿日期:2022-12-29 修回日期:2023-04-11)  
(本文编辑:张俊彦,富群华,姜怡欣,丁宇菁)

## 引用本文

谭志刚, 刘锦信, 郑楚雅, 等. 神经母细胞瘤动物模型研究进展与应用 [J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 288-296. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.194.

TAN Z G, LIU J X, ZHENG C Y, et al. Advances and applications in animal models of neuroblastoma[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(3): 288-296. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.194.





卜纪雯, 西南大学分子发育生物学硕士。2008年进入中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所(现变更为中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心)工作, 2014年被评为高级实验师。2005年至今一直从事斑马鱼相关研究和管理工作。工作期间以第二作者在 *Circulation Research*、*Angewandte Chemie International Edition* 等杂志发表合作论文共8篇。主要擅长的技术有斑马鱼胚胎显微注射、转基因斑马鱼制备、CRISPER/Cas9 基因敲除/敲入技术、斑马鱼胚胎移植、斑马鱼胚胎原位杂交、活体斑马鱼长时程共聚焦成像等。在长期的斑马鱼管理工作中, 积累了丰富的管理经验, 主持开发了《斑马鱼房及品系自动化管理系统 V1.0》软件, 于2021年获得计算机软件著作权。

## 一种显著提高实验用斑马鱼繁殖效率和使用寿命的优化养殖方案

金仕容<sup>1</sup>, 华叶<sup>1</sup>, 訾化星<sup>2</sup>, 杜旭飞<sup>1</sup>, 卜纪雯<sup>2</sup>

[1. 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心(原中国科学院上海生命科学院神经科学研究所), 全脑介观神经联接图谱研究平台(斑马鱼), 上海 200031; 2. 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心(原中国科学院上海生命科学院神经科学研究所), 感觉整合与行为研究组, 上海 200031]

**[摘要]** 目的 解决实验用斑马鱼出现的生长发育滞后、产卵量不足等问题, 以提高实验用斑马鱼的繁殖效率和使用寿命。**方法** 取受精后2月龄的斑马鱼, 以投喂商品化的观赏鱼专用颗粒饲料或冰冻成体卤虫为实验组, 以投喂活的幼体卤虫为对照组。不同饵料投喂70 d内, 通过测量体长和体重评估斑马鱼生长性能, 通过统计产卵量和产卵率等评估斑马鱼繁殖性能。对甲状腺肿大病症明显的斑马鱼投喂颗粒饲料, 通过测量其甲状腺肿大病灶直径大小变化评估颗粒饲料对该病症的抑制效果。将3种饲料配合使用, 对饲养方案进行优化, 通过繁殖性能测试验证其用于斑马鱼饲养的实际效果。**结果** 从60 dpf开始投喂颗粒饲料直到111 dpf, 颗粒饲料组的体长、体重均日渐优于对照组 ( $P<0.0001$ )。从60 dpf开始投喂成体卤虫直到96 dpf, 成体卤虫组的体长增长趋势与对照组基本相同, 而75~82 dpf时成体卤虫组的雌鱼体重极明显高于对照组的雌鱼 ( $P<0.0001$ )。成体卤虫组斑马鱼相比于对照组, 雌雄间体色差异显著, 在75 dpf时, 已可以通过体色差异准确区分性别; 而且成体卤虫组斑马鱼3月龄时产卵率显著高于对照组 (94.44% vs 27.78%,  $P<0.05$ )。另外, 投喂颗粒饲料130 d后, 所有实验用斑马鱼的甲状腺肿大病灶均消失。根据以上结果, 将3种饲料组合, 优化大于2月龄的斑马鱼饲养方案为上午保持喂食幼体卤虫, 下午用颗粒饲料和成体卤虫交替投喂, 直至12月龄斑马鱼的产卵率可以保持70%, 产卵量达到  $(233.6\pm3.95)$  颗, 受精率和孵化率分别为97.47%和90.24%, 均显著高于原方案饲养组 ( $P<0.001$ 或 $P=0.01$ )。**结论** 相比幼体卤虫饵料, 商品化的颗粒饲料能显著提升斑马鱼的生长性能, 并对甲状腺肿大病症有治疗作用, 而成体卤虫饵料能显著提高斑马鱼的早期繁殖性能。优化后的饲养方案成功提高了斑马鱼的产卵效率, 并延长其繁殖使用寿命, 能更好地保障相关科学研究的开展。

**[关键词]** 斑马鱼; 饲养方案; 繁殖性能; 生长性能

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0297-10



## An Optimized Experimental Zebrafish Breeding Scheme for Significantly Enhancing Reproductive Efficiency and Service Life

JIN Shirong<sup>1</sup>, HUA Ye<sup>1</sup>, ZI Huaxing<sup>2</sup>, DU Xufei<sup>1</sup>, BU Jiwen<sup>2</sup>

[1. Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology (Institute of Neuroscience), Chinese

**[基金项目]** 国家重点研发计划“发育编程及其代谢调节”重点专项项目“斑马鱼发育与代谢突变体库的系统创制”(2018YFA0801000)

**[第一作者]** 金仕容(1994—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 水产养殖。E-mail: 18817772747@163.com;

华叶(1983—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 斑马鱼早胚发育与精子发生。E-mail: ye.hua@ion.ac.cn

**[通信作者]** 卜纪雯(1982—), 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 分子发育生物学。E-mail: jwbu@ion.ac.cn. ORCID: 0009-0006-0933-7314

Academy of Sciences, Research Platform of Whole Brain Mesoscopic Neural Junction Map (Zebrafish), Shanghai 200031, China; 2. Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology (Institute of Neuroscience), Chinese Academy of Sciences, Lab of Sensory Integration & Behavior, Shanghai 200031, China]

Correspondence to: BU Jiwen (ORCID: 0009-0006-0933-7314), E-mail: jwbu@ion.ac.cn

**[ABSTRACT] Objective** To solve the problems of delayed growth and development and insufficient spawning of experimental Zebrafish, so as to improve the reproductive efficiency and service life of experimental Zebrafish. **Methods** The zebrafish at the age of 2 months after fertilization were divided into two groups. The experimental group was fed with dry commercial diets specifically designed for ornamental fish or frozen adult brine shrimp, while control group was fed with live laval brine shrimp. Within a period of 70 days, the growth performance of the zebrafish was evaluated by measuring body length and weight, and the reproductive performance was assessed by measuring the fecundity and spawning rate. Zebrafish with apparent goiter disease were fed with dry commercial diets, and the inhibitory effect of the pellets on this disease was evaluated by measuring the diameter of the thyroid enlargement lesion. The three feeding methods were combined, and the feeding plan was optimized. The actual effects of the plan on zebrafish rearing were validated through reproductive performance tests. **Results** Starting from 60 days post-fertilization (dpf) until 111 dpf, the body length and weight of the dry commercial diets feed group gradually surpassed those of control group (all  $P < 0.0001$ ). From 60 dpf to 96 dpf, the growth trend in body length of the adult brine shrimp group was similar to that of control group, but the female fish in the adult brine shrimp group had significantly higher body weight than the female fish in control group at 75-82 dpf ( $P < 0.0001$ ). Compared to control group, there was a significant difference in body color between males and females in the adult brine shrimp group, and at 75 dpf, gender could be accurately distinguished by body color differences. Furthermore, the spawning rate of the zebrafish in the adult brine shrimp group at 3 months of age was significantly higher than that of control group (94.44% vs. 27.78%,  $P < 0.05$ ). Additionally, after feeding with the dry commercial diets for 130 days, all thyroid enlargement lesions in the experimental zebrafish disappeared. Based on the above results, the three feeding methods were combined and the feeding plan for zebrafish older than 2 months of age was optimized as follows: feed live brine shrimp in the morning, and alternate between dry commercial diets and adult brine shrimp in the afternoon. This feeding plan lasts until the age of 12 months. The spawning rate of Zebrafish can maintain 70%, and the spawning amount can reach  $(233.6 \pm 3.95)$  eggs. The fertilization rate and hatching rate were 97.47% and 90.24%, respectively, both significantly higher than those of control group ( $P < 0.001$ , or  $P = 0.01$ ). **Conclusion** Compared to live brine shrimp feed, the dry commercial diets feed significantly improves the growth performance of zebrafish and has a therapeutic effect on thyroid enlargement disease. On the other hand, adult brine shrimp feed significantly enhances the early reproductive performance of zebrafish. The optimized feeding plan successfully improves the spawning efficiency of laboratory zebrafish, prolonging their reproductive lifespan and better supporting relevant scientific research.

**[Key words] Zebrafish; Breeding scheme; Reproduction; Growth**

斑马鱼 (*Danio rerio*) 是生命科学研究中常用的模式脊椎动物, 它具有体型小、繁殖力强、可体外受精和体外发育、胚胎全身透明等众多优点。目前, 国内外以斑马鱼为主要研究对象的实验室日益增多<sup>[1]</sup>, 同时斑马鱼养殖标准化的问题也日益凸显。在2020年实施的GB/T 39649—2020《实验动物 实验鱼质量控制》中, 仅注明5~15 dpf (day post fertilization, 受精后日

龄) 斑马鱼适宜投喂草履虫, 未给出适宜投喂 $\geq 16$  dpf 斑马鱼的生物饵料方案<sup>[2]</sup>。业内交流中发现, 大部分斑马鱼实验室采用卤虫 (也称盐水丰年虾, brine shrimp) 休眠卵孵化的无节幼体卤虫作为单一食物来源, 和剑尾鱼、诸氏鲮虾虎鱼养殖方案一致, 其优点是养殖操作简便, 盐水孵化18~30 h便可获得<sup>[3]</sup>, 但也存在营养来源不足的缺陷。

适宜的饵料对鱼类的健康及繁殖能力至关重要<sup>[4-5]</sup>。自然条件下,斑马鱼食谱广泛,包括蠕虫、昆虫幼虫和各种底栖及浮游甲壳动物<sup>[6]</sup>。但是在实验室养殖过程中,由于食物来源单一,斑马鱼常出现个体消瘦、生长发育滞后、体色变浅、雌雄性征不明显、免疫力下降、繁殖力下降等一系列问题。除此之外,实验室养殖的斑马鱼还具有以下特点:(1)品系较多,包括各种特殊遗传学模型(如一些基因敲入、基因敲除、ENU诱变的模型等)或转基因动物;(2)繁殖频次高,为满足科研需求,往往雌鱼7 d一个交配周期,雄鱼则多为3 d一个交配周期;(3)为保障较高的遗传均一性,转基因品系和突变品系往往以近交方式进行繁殖<sup>[7]</sup>,进而导致不良突变的累积,容易造成发育缺陷。以上特点决定了实验室条件下斑马鱼对营养物质的需求更高。因此,在实验室条件下养殖斑马鱼,需要更加注重食物的选择和搭配,以弥补实验室养殖条件下的诸多不足。

对鱼类而言,天然饵料一般更有吸引力且更易于消化<sup>[8]</sup>,但可能存在营养物质不足的风险,例如卤虫常缺乏某些脂肪酸或维生素C<sup>[9]</sup>。为此,商品化的配合饲料应运而生,其按鱼体所需营养水平,将不同能量饲料、蛋白质饲料及矿物质、维生素、微量元素通过科学配比混合,采用相应的工艺配制而成<sup>[10]</sup>。目前,商品化的斑马鱼专用饲料研发进展缓慢<sup>[11]</sup>;而观赏鱼配合颗粒饲料的研究进展迅速,且商品化技术成熟<sup>[12-13]</sup>。已有的商品化的观赏鱼饲料是否可以满足斑马鱼的需求,尚且未知。本研究选取两类商品化饲料和冰冻成体卤虫对实验用斑马鱼进行投喂,比较不同饵料对斑马鱼生长和繁殖指标的影响,旨在对实验室条件下的斑马鱼饲养方案进行优化,以提高实验用斑马鱼的繁殖性能,并延长其使用寿命,从而保障科学研究的效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用动物

选择体长及体重适中、规格一致、亲本相同的2月龄(即60 dpf)斑马鱼 *mi/fa*<sup>w2/w2</sup> (AB),之前均采用传统投喂方式,饲料为幼体卤虫。本研究在中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心杜久林研究组斑马鱼房进行,该单位前身为国家斑马鱼中心,目前改迁至武汉斑马鱼中心,是国内最早一批以斑马鱼为模式生物的实验室,已经有十几年的养殖历史,一直稳定

养殖本实验中使用的野生型斑马鱼品系。本研究方案经中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心动物管理委员会动物福利伦理审核小组审批通过(伦理批号:NA-046-2019)。

### 1.2 实验材料

活幼体卤虫(0.4~0.5 mm)由休眠的皇冠西藏大红卵孵化(水温30℃,盐度10‰,孵化时间23 h)获得。两类商品化饵料为观赏鱼专用颗粒饲料——莫斯特主食M号(0.5~0.8 mm)和日清丸红B2号(0.36~0.62 mm),以及冰冻成体卤虫为神阳多维冰冻丰年虾(50~80 mm),由鲜活的卤虫成体经过营养富集后急速冰冻而成。

### 1.3 实验分组

实验分2组进行:实验组1投喂商品化的颗粒饲料,实验组2投喂成体卤虫(冻);2组的对照均投喂幼体卤虫(活)。每组设3个缸,每缸(3 L)饲养斑马鱼20尾。每天于9:00、15:00各投喂一次。投喂量以斑马鱼5~10 min 吃食完且胃部呈饱满状态为准,并根据斑马鱼的生长情况及时调整。

### 1.4 饵料营养成分检测

委托英格尔检测技术服务(上海)有限公司对颗粒饲料1(莫斯特牌)、颗粒饲料2(日清牌)、成体卤虫、幼体卤虫进行营养成分的检测,包括钙、磷、镁、铁、硒、锌、泛酸(维生素B3)、抗坏血酸(维生素C)和维生素B2。

### 1.5 生长性能指标测定

生长性能指标为体长(cm)、体重(g)。分别于60 dpf(初始时间)、75 dpf、82 dpf、89 dpf、96 dpf/111 dpf 采样测量斑马鱼的体长、体重,即每组随机捞取斑马鱼9尾(3尾/缸),禁食24 h后,MS-222(0.1 g/L, Sigma-Aldrich E10521)麻醉,厨房用纸吸干鱼体表面水分,用直尺测量体长,然后用电子秤(Mettler PL202-S,精度为0.01 g)测量体重。

### 1.6 繁殖性能指标测定

繁殖性能指标为体色、产卵率、产卵量、受精率和孵化率。90 dpf时,进行体色观察,并且每组随机抽取1条斑马鱼,用iphone 11相机直接近距离拍摄。

选取颗粒饲料组或成体卤虫组雌鱼与幼体卤虫对照组雄鱼,按照雌雄比例1:2进行配对繁殖实验。将雌雄配对的亲鱼放入专用交配缸中,用隔板隔开雌雄鱼过夜后,于次日早上取出隔板,让雌雄鱼相互追逐



并产卵繁殖。1 h后将雌雄亲鱼移出，收集鱼卵至培养皿中，用 Visual Counter 软件对鱼卵进行计数，并将培养皿置于培养箱中孵化 [上海一恒科学仪器有限公司光照培养箱 MGC-350BP-2, (28±0.5) °C, 明暗交替 14 h: 10 h]。后续及时吸出未受精卵，并计数受精卵数。将孵化出膜的仔鱼移入另一培养皿中，记录初孵仔鱼数。并按以下公式计算亲鱼繁殖性能指标：产卵率 (%) = 产卵缸数/配鱼缸数×100；产卵量 (颗) = 每缸实际产卵数量；受精率 (%) = 受精卵数/产卵量×100；孵化率 (%) = 初孵仔鱼数/受精卵数×100。

1.7 甲状腺肿大病症治疗效果测定

实验室斑马鱼在养殖过程中甲状腺肿大病症频发，肉眼可以很明显地观察到甲状腺肿大。而预实验发现，颗粒饲料对甲状腺肿大病症起到了显著的抑制作用。因此，本实验随机选取一批甲状腺肿大症状明显的病鱼作为实验对象 (n=15)，每天于 9:00、15:00 投喂颗粒饲料。实验开始第 0、30、130 d, MS-222 (0.1 g/L) 麻醉病鱼，厨房用纸吸干鱼体表面水分后，用直尺测量甲状腺肿大病灶直径 (cm)。

1.8 优化饲养方案后的斑马鱼生长及繁殖性能测定

结合实验结果，将 3 种饲料配合使用，对饲养方案进行优化后，通过 1.6 节繁殖性能测试验证其用于饲养斑马鱼的实际效果。以原饲养方案 [在仔鱼期 (12 dpf 前) 投喂海水轮虫，此后仅投喂幼体卤虫 (活) 作为唯一食物来源] 为对照。

1.9 统计

应用 SPSS 13.0 软件对各实验数据进行统计分析，图表中的数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间差异用两因素方差

分析，组内两两比较用 LSD-*t* 检验，并进行显著性检验，设显著性水平为 0.05，极显著水平为 0.01。

2 结果

2.1 不同饵料营养成分对比

由于目前有关斑马鱼对矿物质、维生素等营养需求的研究较少 [5]，因此表 1 中列举的部分指标是将鲤鱼的需求量作为斑马鱼 (同为鲤科) 需求量的参考。由表 1 可知，幼体卤虫所含营养成分最低，钙、铁、维生素 B3、维生素 B2 均未检测出，该食物仅满足斑马鱼对硒和锌的营养需求。颗粒饲料 2 (日清牌) 的营养成分最全面，除维生素 B3 未检测出以外，其余成分的含量均超出斑马鱼成长需求，且相较于颗粒饲料 1 (莫斯特牌) 而言，其营养价值更高。值得关注的是，在 4 种饵料中，仅成体卤虫含有丰富的维生素 B3，且满足斑马鱼生长需求。

因此，在后续实验中，以颗粒饲料 2 为实验对象，成体卤虫为天然饵料对象，开展斑马鱼生长及繁殖性能的测试。

2.2 不同饵料对斑马鱼生长性能的影响

2.2.1 颗粒饲料组

由图 2 可知，各实验组斑马鱼的初始体重一致，而整个实验期内，体长、体重均呈现增加趋势。实验期 1 ~ 22 d 内，颗粒饲料组 (日清牌) 斑马鱼的体长和体重增长量高于幼体卤虫组 (对照组)，但是差异没有统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 1A ~ B)。随后，颗粒饲料组斑马鱼的体长和体重持续快速增长，89 dpf 时其体长及体重均极显著高于幼体卤虫组 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ) (图 1A ~ B)。直至实验结束，颗粒饲料组斑马鱼在体长和体重指标上始终极显著高于

表 1 不同饵料营养成分表  
Table 1 Nutrition ingredients of different diets

| 营养成分<br>Nutrition ingredients            | 需求量<br>Requirement                 | 幼体卤虫(活)<br>Larva brine<br>shrimp (live) | 成体卤虫(冻)<br>Adult brme<br>shrimp (frozen) | 颗粒饲料 1<br>Dry commercial<br>diets-1 | 颗粒饲料 2<br>Dry commercial<br>diets-2 |
|------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 钙 Calcium/%                              | 0.9 ~ 1.6 (斑马鱼) <sup>[5]</sup>     | 未检出                                     | 未检出                                      | 2.31                                | 2.62                                |
| 磷 Phosphorus/%                           | 0.8 ~ 1.4 (斑马鱼) <sup>[5]</sup>     | 0.12                                    | 0.07                                     | 1.92                                | 2.22                                |
| 镁 Magnesium/(mg·kg <sup>-1</sup> )       | 600 mg/kg (鲤鱼) <sup>[14]</sup>     | 186                                     | 102                                      | 6 110                               | 5 360                               |
| 铁 Iron/(mg·kg <sup>-1</sup> )            | 150 mg/kg (鲤鱼) <sup>[15]</sup>     | 未检出                                     | 58.5                                     | 575                                 | 940                                 |
| 硒 Selenium/(mg·kg <sup>-1</sup> )        | 0.12 mg/kg (鲤鱼) <sup>[16]</sup>    | 0.15                                    | 0.27                                     | 3.22                                | 4.55                                |
| 锌 Zinc/(mg·kg <sup>-1</sup> )            | 15 ~ 30 mg/kg (鲤鱼) <sup>[15]</sup> | 20                                      | 5.3                                      | 160                                 | 300                                 |
| 维生素 B3 Vitamin B3/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 30 ~ 40 mg/kg (鲤鱼) <sup>[17]</sup> | 未检出                                     | 133                                      | 未检出                                 | 未检出                                 |
| 维生素 C Vitamin C/(mg·kg <sup>-1</sup> )   | 30 ~ 50 mg/kg (鲤鱼) <sup>[17]</sup> | 50.5                                    | 102                                      | 1 000                               | 3 960                               |
| 维生素 B2 Vitamin B2/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 7 ~ 10 mg/kg (鲤鱼) <sup>[17]</sup>  | 未检出                                     | 未检出                                      | 38                                  | 84.8                                |

幼体卤虫组 ( $P<0.0001$ , 图1A~B)。结果显示, 商品化的颗粒饲料显著提升了斑马鱼的生长性能。

## 2.2.2 成体卤虫组

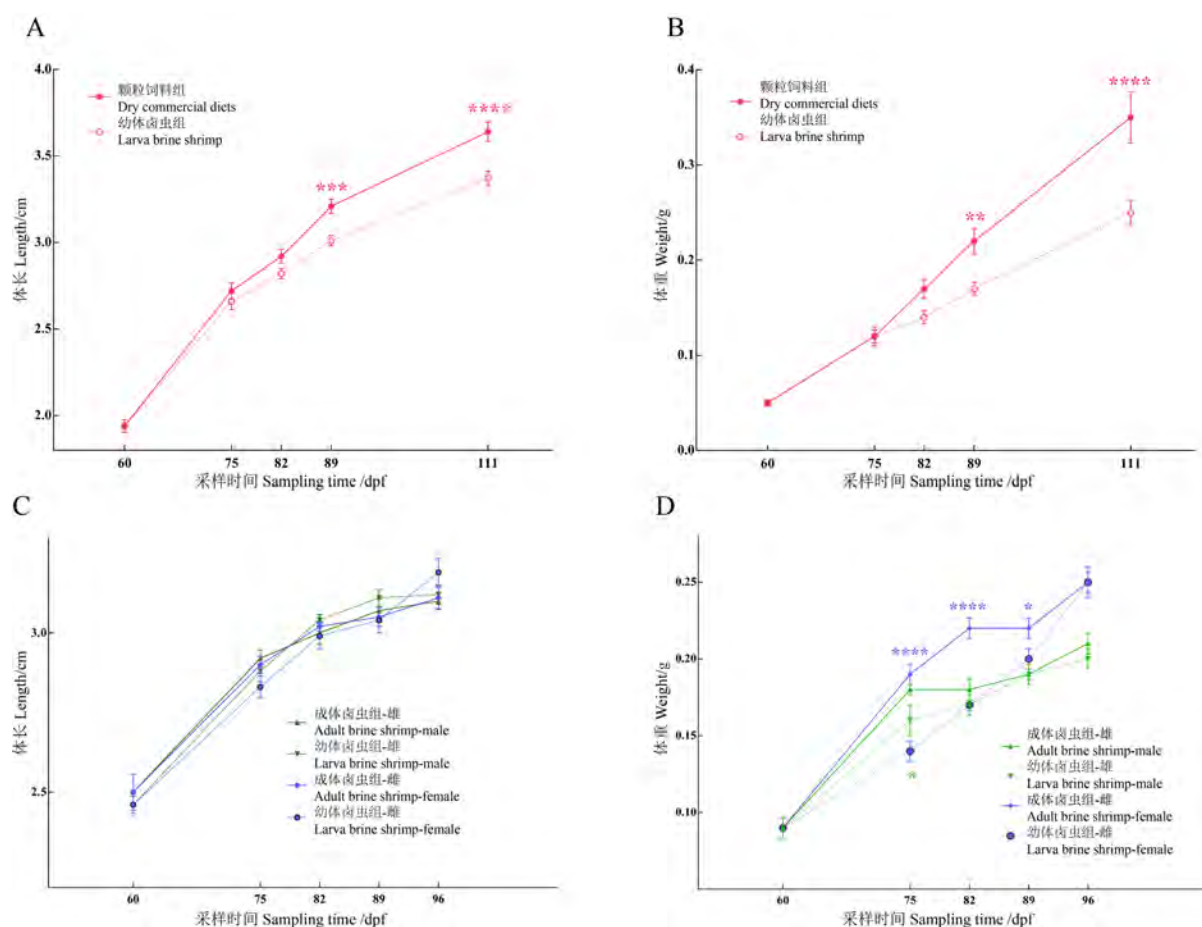
投喂至 75 dpf 时, 成体卤虫组可根据体色和体型明显区分出雌雄性别, 按照雌雄分组后分别进行体长及体重的测量。由图1C可知, 成体卤虫组斑马鱼的体长增长趋势和幼体卤虫组基本相同, 雌雄分别对比幼体卤虫组时均未见明显差异 ( $P>0.05$ )。而从增重效果来看, 幼体卤虫组雌鱼增重先慢后快, 而成体卤虫组先快后慢, 其中成体卤虫组体重在 72、82 dpf 极显著高于幼体卤虫组 ( $P<0.0001$ ), 随后雌性鱼体重增长放缓, 在 89 dpf 显著高于幼体卤虫组 ( $P<0.05$ ), 直

至 96 dpf, 幼体卤虫组雌鱼和成体卤虫组雌鱼的体重差异缩小 (图1D)。相较于雌鱼而言, 两个处理组间雄鱼体重增长趋势基本相同, 仅 75 dpf 时成体卤虫组雄鱼体重显著高于幼体卤虫组 ( $P<0.05$ , 图1D)。因此, 成体卤虫可显著提高斑马鱼雌鱼早期的体重生长性能。

## 2.3 不同饵料对斑马鱼繁殖性能的影响

### 2.3.1 雌雄体色差异

投喂成体卤虫组斑马鱼相较于幼体卤虫组, 体色鲜艳, 呈金黄色, 雌雄间体色差异显著; 在 75 dpf 时, 已可以通过体色差异, 准确区分性别 (图2A)。相较于幼体卤虫组, 颗粒饲料组的体色发白, 且雌雄个体



注: 每组9条斑马鱼, 数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示。A~B为颗粒饲料组和幼体卤虫组斑马鱼的体长(A)和体重(B)变化(与幼体卤虫组相比, \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$ )。C~D为成体卤虫组和幼体卤虫组雌雄斑马鱼的体长(C)和体重(D)变化(分别与幼体卤虫组雌雄斑马鱼相比, \*\*\*\* $P<0.0001$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$ )。dpf, 受精后日龄。

Note: Data are presented as means $\pm$ SEM ( $n=9$ ). A-B are the body length (A) and body weight (B) changes of zebrafish in dry commercial diets group and larva brine shrimp group (compared with larva brine shrimp group, \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$ ). C-D are the changes in body length (C) and body weight (D) of male and female zebrafish in adult brine shrimp group and larva brine shrimp group (compared with male and female zebrafish in larval brine shrimp group, \*\*\*\* $P<0.0001$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$ ). dpf, age after fertilization.

图1 颗粒饲料和成体卤虫对斑马鱼生长的影响

Figure 1 Effects of dry commercial diets and adult brine shrimp on growth of zebrafish

均较大；但是雌雄体色差别很不明显，至 89 dpf 仍难以通过体型、体色很好地区分不同性别（图 2A）。

### 2.3.2 繁殖力差异

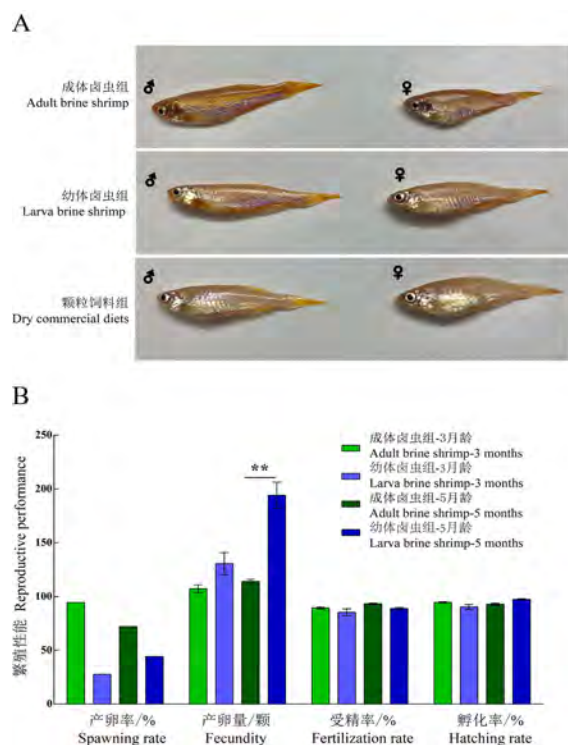
由于颗粒饲料组的斑马鱼雌雄性征不明显，大部分无法正确区分雌雄。为确保繁殖测试正常进行，尽量区分雌雄后，采取 2 雌：2 雄进行预实验，结果显示产卵率为 88%，但单缸产卵量从 10~400 颗不等，提示雌雄分组不准确，后续无法严格按照 1 雌：2 雄进行配对繁殖测试。因此，后续仅测量并记录成体卤虫组的繁殖性能指标。

图 2B 结果显示，成体卤虫组的产卵率明显高于幼体卤虫组，3 月龄成体卤虫组的产卵率是幼体卤虫组的

3.5 倍，到 5 月龄时仍存在约 1.6 倍的差异。与之相反，5 月龄时幼体卤虫组的产卵量显著高于成体卤虫组 ( $P<0.01$ )。而受精率和孵化率方面，2 个处理组之间差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。综上所述，饲喂成体卤虫显著提高了成年斑马鱼的早期繁殖力，但到 5 月龄时产卵率和产卵量均有所下降，可能提示成体卤虫难以满足实验室斑马鱼需长期保持高产卵率和产卵量的要求。

### 2.4 颗粒饲料对斑马鱼其他体征的影响

实验选取的甲状腺肿大病鱼初始（记为 0 d）病灶直径为 0.5~4 mm 不等。在投喂颗粒饲料 30 d 后，发现部分具有甲状腺肿大病症的斑马鱼其病灶出现消失或者缩小的趋势；在实验进行 130 d 后，所有实验用鱼的甲状腺肿大病灶均消失（图 3）。这提示颗粒饲料可能有治疗斑马鱼甲状腺肿大的作用。

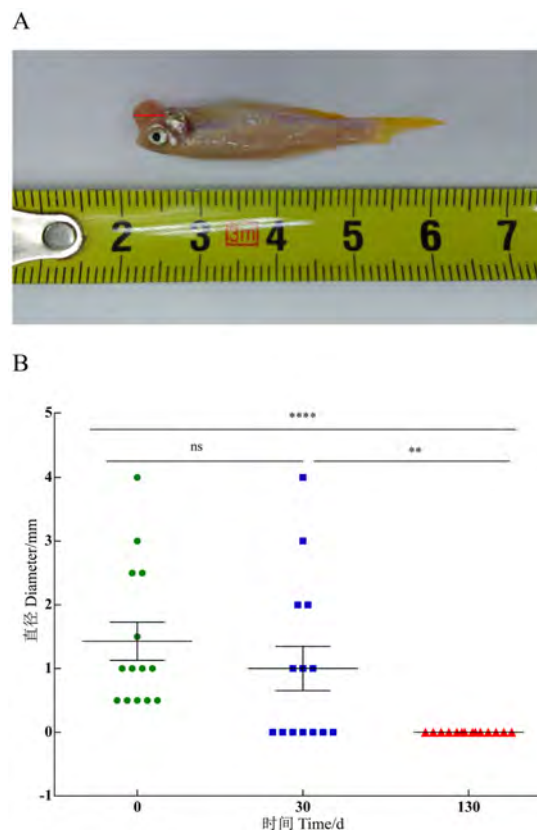


注：A，饲喂成体卤虫组、幼体卤虫组或颗粒饲料组斑马鱼的典型外观（♂雄，♀雌）。B，饲喂成体卤虫或幼体卤虫组的 3 月龄和 5 月龄斑马鱼产卵率、产卵量、受精率和孵化率比较（每组 9 条斑马鱼，产卵量、受精率和孵化率均以平均值±标准差表示，\*\* $P<0.01$ ）。

Note: A, the typical appearance of zebrafish (♂ male, ♀ female) in dry commercial diets group, adult brine shrimp group and larva brine shrimp group. B is the comparison of spawning rate, spawning amount, fertilization rate and hatching rate of 3-month-old and 5-month-old zebrafish between adult brine shrimp group and larva brine shrimp group (9 zebrafish in each group. Spawning amount, fertilization rate and hatching rate are presented as means±SEM, \*\* $P<0.01$ ).

图 2 不同饲料对斑马鱼繁殖性能的影响

Figure 2 Effects of different diets on reproductive characteristics of zebrafish



注：A，甲状腺肿大的斑马鱼外观；B，颗粒饲料喂养后的斑马鱼甲状腺直径变化[数据均以平均值±标准差表示 ( $n=15$ ), \*\* $P<0.01$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ , ns 表示没有统计学差异]。

Note: A, Appearance of Zebrafish with goiter; B, Changes in thyroid diameter of Zebrafish after dry commercial diets feeding [Data are presented as means±SEM ( $n=15$ ), \* $P<0.01$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ , ns indicated no statistical difference].

图 3 颗粒饲料对斑马鱼甲状腺肿大病症的影响

Figure 3 Effect of dry commercial diets on goiter disease of zebrafish



## 2.5 饲养方案优化后斑马鱼繁殖性能提高

综合以上结果, 将幼体卤虫、颗粒饲料和成体卤虫配合使用, 对饲养方案进一步优化。原饲养方案称为 Du-Lab Zeb's Recipe 1.0, 新饲养方案称为 Du-Lab Zeb's Recipe 2.0。如图4所示, 原饲养方案在仔鱼期(12 dpf 前)投喂海水轮虫, 此后仅投喂幼体卤虫(活)作为唯一食物来源。新饲养方案在仔鱼期(12 dpf 前)投喂海水轮虫, 幼鱼期(12 dpf~2月龄)投喂幼体卤虫, 2月龄后组合喂食, 即上午保持喂食幼

体卤虫, 下午用颗粒饲料和成体卤虫交替投喂。

测试结果显示, 直至12月龄, 新饲养方案组的产卵率为70%, 高于原饲养方案组的64%; 产卵量为 $(233.60 \pm 3.95)$ 颗, 极显著高于原饲养方案组的 $(139.40 \pm 9.41)$ 颗 ( $P < 0.001$ ); 受精率和孵化率分别为97.47%和90.24%, 显著高于原饲养方案组的94.92%和73.52% (均  $P = 0.01$ )。这表明, 新饲养方案可显著提升斑马鱼的产卵效率, 并延长其繁殖使用寿命。



图4 新饲养方案 Du-Lab Zeb's Recipe 2.0示意图

Figure 4 New breeding scheme Du-Lab Zeb's Recipe 2.0

## 3 讨论

杜久林研究组斑马鱼房(前身为国家斑马鱼中心, 目前改迁至武汉斑马鱼中心)作为国内最早一批以斑马鱼为模式生物的实验室, 始终关注实验鱼的质量控制。目前对于斑马鱼幼苗期(5~15 dpf)的养殖方案, 国家标准GB/T 39649—2020<sup>[2]</sup>以及国家斑马鱼资源中心均建议投喂草履虫, 并且已经建立了一套比较稳定的实验室养殖程序, 因此大部分国内斑马鱼养殖实验室均采用草履虫进行投喂。但是, 对斑马鱼而言, 轮虫相较于草履虫适口性好, 营养价值高, 稳定性高, 且海水轮虫对于淡水斑马鱼养殖引入外源微生物的风险更小。经过长期探索, 本实验室已成功解决实验室稳定养殖海水轮虫的技术难题, 建立了 Du-Lab Zeb's Recipe 1.0 饲养方案, 即在仔鱼期(12 dpf 前)将饵料由草履虫更换为海水轮虫, 此后仅投喂幼体卤虫(活)作为唯一食物来源。本研究旨在继续探索斑马鱼幼鱼期及成鱼期的饵料多样性, 以期建立更加科学合理的

斑马鱼饲养方案, 以保证实验用斑马鱼的科学健康养殖。

对于斑马鱼幼鱼期及成鱼期, 国家标准及国内外权威机构仅建议可喂食多种食物, 但是没有给出明确的饲养方案, 因此大部分斑马鱼实验室仅投喂幼体卤虫。本研究中营养成分分析结果表明, 单一食物幼体卤虫的营养缺陷明显, 仅投喂幼体卤虫不足以提供斑马鱼生长繁殖所需的营养物质。成体卤虫是由卤虫卵孵化出的无节幼体经过几次蜕皮变态发育而成<sup>[18]</sup>。成体卤虫多为孤雌生殖, 雌性卤虫的生殖系统能形成两种类型的卵: 冬卵和夏卵。条件差时产冬卵, 冬卵又称休眠卵、耐久卵, 这就是养殖中所使用的卤虫卵。成体卤虫富含蛋白质和脂肪以及碳水化合物等营养素, 是优质天然饵料<sup>[19]</sup>。

本研究参考价格、使用效果、口碑、销售量等因素, 选取了两类商品化的观赏鱼饵料以及成体卤虫(冷冻品)进行营养成分分析, 最终确定了颗粒饲料2及成体卤虫进行后续生长繁殖测试。测试结果显示,

颗粒饲料极显著地提高了斑马鱼的生长速率,但是斑马鱼雌雄体色差异和性征不明显,无法开展繁殖测试。此外,颗粒饲料饲养的斑马鱼会出现过度生长、肥胖等营养过剩表型<sup>[20]</sup>。据报告,营养过剩对鱼类繁殖性能也有负面影响,例如投喂高 n-3 高不饱和脂肪酸 (n-3 highly unsaturated fatty acids, n-3HUFA) 水平的饵料会降低海鲷的总产卵量<sup>[21]</sup>。因此,颗粒饲料可以显著提高斑马鱼的生长性能,但无益于甚至减弱生殖性能。

体色是动物的基本特征之一,在其生存和繁殖中发挥着重要作用<sup>[22]</sup>。类胡萝卜素水平是影响鱼类体色的主要因素之一<sup>[23]</sup>,但是鱼类不能从头合成类胡萝卜素,必须从食物中摄取<sup>[24]</sup>。本次实验结果显示,在 75 dpf 时,成体卤虫组的斑马鱼体色鲜艳,性征明显,但是颗粒饲料组和幼体卤虫组均体色暗淡,这可能与成体卤虫富含  $\beta$ -胡萝卜素有关<sup>[25]</sup>。

成体卤虫组在 60 dpf ~ 89 dpf 期间,雌鱼的体重显著增加,同时其繁殖力也得到了显著提升。之前的研究表明,当发育到 60 dpf 时,斑马鱼性腺分化结束,卵巢和精巢开始形成,在 90 dpf 时达到性成熟<sup>[26]</sup>。因此,60 dpf ~ 90 dpf 是斑马鱼性腺发育成熟的关键时期,在这一时期适当人工添加中链脂肪酸 (medium-chain fatty acid, MCFA) 和 n-3HUFA 可以促进斑马鱼雌鱼的繁殖性能和仔鱼成活率的提高<sup>[27]</sup>。本研究结果说明,成体卤虫可以满足斑马鱼性腺发育成熟所需的营养,同时提示原饲养方案中幼体卤虫的脂肪酸含量不足,仅投喂幼体卤虫容易导致斑马鱼性腺发育迟缓,性成熟滞后。但是,到繁殖中期 (5 月龄),成体卤虫组的产卵率下降,而繁殖力受到亲鱼饲料中营养缺乏的影响<sup>[21]</sup>,这提示长期单一投喂成体卤虫不能满足频繁交配的实验用斑马鱼的营养需求。

本研究中还意外地发现,颗粒饲料对于实验室养殖斑马鱼常见病症甲状腺肿大显著的治愈效果。有研究表明,甲状腺肿大与斑马鱼在摄食过程中碘离子摄取不足显著相关<sup>[28]</sup>,这说明传统食物幼体卤虫中碘离子缺乏,而颗粒饲料中碘离子含量丰富。

综合以上结果可以发现,颗粒饲料和成体卤虫单独饲养对于斑马鱼的生长和发育有利有弊。本研究明确了颗粒饲料可提高斑马鱼的生长性能,而成体卤虫可提高斑马鱼繁殖性能。同时考虑到幼体卤虫价格便宜,易于消化<sup>[10]</sup>,且活体食物可以刺激斑马鱼的自然进食<sup>[29]</sup>。因此,本平台将幼体卤虫、颗粒饲料和成体

卤虫三者配合使用,对原有的饲养方案进行优化,满足了提高斑马鱼繁殖能力,延长其使用寿命的科研需求。目前,新饲养方案已经在本实验室稳定投入使用超过 2 年,在此期间观察到斑马鱼体长、体重的增长明显优于原饲养方案,同时鱼体颜色鲜艳,雌雄体色差异明显,3 月龄均可明确区分雌雄,且再未发现甲状腺肿大病症的鱼体。

本研究遵循食物多样性的原则,结合实验结果,对实验室斑马鱼的原饲养方案进行了优化,配合使用多种饵料,成功提高了实验室斑马鱼的繁殖性能,并延长其使用寿命,进而更好地保障科学研究的开展,且实现了可操作性、可坚持性和可推广性的目标。对于特殊科研需求的斑马鱼养殖,笔者建议可以对多种食物进行组合实验,进一步优化饲养方案,更好地为科研工作服务。

#### [医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验已通过中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心动物管理委员会动物福利伦理审核小组审查批准 (NA-046-2019)。所有实验过程均遵照中国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 Institutional Animal Care and Use Committee of Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology (Institute of Neuroscience) (Approval Letter NA-046-2019). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China 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 so on.

#### [作者贡献 Author Contribution]

金仕容负责方案策划、动物实验及初稿写作;  
华叶负责实验设计和部分动物实验;  
訾化星参与文章思路讨论及部分文章内容的撰写和修改;  
杜旭飞参与文章的整体设计,研究内容的讨论;  
卜纪雯负责整体研究方案、经费管理和文章审核定稿。

#### [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] 李阔宇,潘鲁源,孙永华. 斑马鱼鱼房和养殖系统建设标准[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6):121-127. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.06.018.  
LI K Y, PAN L Y, SUN Y H. Standards for constructing zebrafish houses and breeding systems[J]. Chin J Comp Med,

- 2020, 30(6):121-127. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.06.018.
- [2] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 实验鱼质量控制: GB/T 39649—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- State Administration for Market Regulation, China National Standardization Commission. Laboratory animal-Quality control of laboratory fish: GB / T 39649—2020 [S]. Beijing: China Standards Press, 2020.
- [3] 欧阳娟, 薛松磊, 徐妍, 等. 环境因素对丰年虾孵化的影响及孵化条件优化[J]. 中国饲料, 2018(18): 83-86. DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20181817.
- OUYANG J, XUE S L, XU Y, et al. The effect of environmental factors on the hatching of *Artemia salina* and the optimization of hatching conditions[J]. China Feed, 2018(18): 83-86. DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20181817.
- [4] LAWRENCE C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review[J]. Aquaculture, 2007, 269(1-4): 1-20. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.077.
- [5] 祝梅香, 王天奇, 张长勇, 等. 实验用斑马鱼剑尾鱼营养需求及饲料现状分析[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(12): 61-65. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2009.12.012.
- ZHU M X, WANG T Q, ZHANG C Y, et al. Nutritional requirements and current status of diets of laboratory zebrafish and swordtails[J]. Chin J Comp Med, 2009, 19(12): 61-65. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2009.12.012.
- [6] SPENCE R, FATEMA M K, ELLIS S, et al. Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh[J]. J Fish Biol, 2007, 71(1):304-309. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x.
- [7] 何嘉玲, 刘静, 王天奇, 等. 斑马鱼的质量标准化[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 99-102. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.018.
- HE J L, LIU J, WANG T Q, et al. Research of zebrafish quality standardization[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2014, 22(6): 99-102. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.018.
- [8] CAHU C, INFANTE J Z. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae[J]. Aquaculture, 2001, 200(1-2):161-180. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00699-8.
- [9] Baert P, Bosteels T, Sorgeloos P. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture [J]. Fao Fisheries Technical Paper, 1996. DOI: <http://tailieu.vn/doc/manual-on-the-production-and-use-of-live-f>.
- [10] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- LI A J. Aquatic animal nutrition and Feed science [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996.
- [11] WATTS S A, POWELL M, D'ABRAMO L R. Fundamental approaches to the study of zebrafish nutrition[J]. Ilar J, 2012, 53(2):144-160. DOI: 10.1093/ilar.53.2.144.
- [12] 张蓉, 王晓雯, 朱华. 观赏鱼营养需要研究与饲料配制[J]. 中国饲料, 2017(17): 5-9, 17. DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20171701.
- ZHANG R, WANG X W, ZHU H. Study on nutritional needs of ornamental fish and feed preparation[J]. China Feed, 2017(17): 5-9, 17. DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20171701.
- [13] 王强. 浅谈观赏鱼的配合颗粒饲料[J]. 中国园林, 1992, 8(1):57.
- WANG Q. 浅谈观赏鱼的配合颗粒饲料[J]. J Chin Landsc Archit, 1992, 8(1):57.
- [14] 汪福保, 罗莉, 王朝明, 等. 鱼类镁营养研究进展[J]. 动物营养学报, 2011, 23(6): 930-936. DOI: 10.3969/j.issn.1006-267X.2011.06.007.
- WANG F B, LUO L, WANG C M, et al. Recent advances in magnesium nutrition of fish[J]. Acta Zoonutrimenta Sin, 2011, 23(6):930-936. DOI: 10.3969/j.issn.1006-267X.2011.06.007.
- [15] 梁德海. 鱼类对矿物质的营养需要及其缺乏症[J]. 饲料工业, 1998, 019(10):25-26. DOI: CNKI:SUN:FEED.0.1998-10-012.
- LIANG D H. Nutritional requirement of fish for minerals and its deficiency[J]. Feed Ind, 1998(10): 25-26. DOI: CNKI: SUN: FEED.0.1998-10-012.
- [16] 吴云发, 方春林, 王庆萍. 鱼类矿物质营养研究进展[J]. 江西水产科技, 2007(4): 19-22. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3188.2007.04.007.
- WU Y F, FANG C L, WANG Q P. Research progress of mineral nutrition in fish[J]. Jiangxi Fish Sci Technol, 2007(4): 19-22. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3188.2007.04.007.
- [17] 韩如政. 维生素对鱼类的营养作用及在饲料中的添加[J]. 饲料工业, 1989(9):34-36.
- HAN R. 维生素对鱼类的营养作用及在饲料中的添加[J]. Feed Ind, 1989(9):34-36.
- [18] 曹洪泽, 胡旭辉, 杨树娥. 卤虫的生活习性及其养殖技术[J]. 河北渔业, 2003(4): 45-46. DOI: 10.3969/j.issn.1004-6755.2003.04.027.
- CAO H Z, HU X H, YANG S E. Life habits and culture techniques of *Artemia*[J]. Hebei Fish, 2003(4): 45-46. DOI: 10.3969/j.issn.1004-6755.2003.04.027.
- [19] 张宏, 陈燕琴. 卤虫的饵料价值与选用[J]. 青海师范大学学报(自然科学版), 2009, 25(1): 67-71. DOI: 10.3969/j.issn.1001-7542.2009.01.019.
- ZHANG H, CHEN Y Q. Feed value and select application of *Artemia*[J]. J Qinghai Norm Univ Nat Sci Ed, 2009, 25(1):67-71. DOI: 10.3969/j.issn.1001-7542.2009.01.019.
- [20] 郑新春, 刘莉, 戴文聪, 等. 过度喂养建立斑马鱼幼鱼肥胖模型[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(1):20-25. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.01.04.
- ZHENG X C, LIU L, DAI W C, et al. Establishment of a diet-induced obesity model in zebrafish larvae[J]. J South Med Univ, 2016, 36(1): 20-25. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.01.04.
- [21] IZQUIERDO M S, FERNÁNDEZ-PALACIOS H, TACON A G J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish[M] // Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture. Amsterdam: Elsevier, 2001:25-42. DOI: 10.1016/b978-0-444-50913-0.50006-0.
- [22] 王梅, 张永勤, 黄靖, 等. 红斑马鱼体色观察及敲除 *mitfa* 基因对其体色发育的影响[J]. 激光生物学报, 2022, 31(1):19-26. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7146.2022.01.004.
- WANG M, ZHANG Y Q, HUANG J, et al. Observation of red zebrafish body color and the effects of knocking out *mitfa* gene on its body color development[J]. Acta Laser Biol Sin, 2022, 31(1):19-26. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7146.2022.01.004.
- [23] LECLERCQ E, TAYLOR J F, MIGAUD H. Morphological skin



- colour changes in teleosts[J]. Fish Fish, 2009, 11(2): 159-193. DOI: 10.1111/j.1467-2979.2009.00346.x.
- [24] GOODWIN T. The biochemistry of the carotenoids: volume II animals[M/OL]. 2nd ed. New York: Chapman and Hall, 1984. <https://link.springer.com/content/pdf/bfm:978-94-009-5542-4/1.pdf>. DOI: 10.1007/978-94-009-5560-9\_11.
- [25] 曹天义, 景晓娜. 人工投喂饵料提高卤虫养殖单产的探究[J]. 水产养殖, 2020, 41(12):40-41, 44. CAO T Y, JING X. 人工投喂饵料提高卤虫养殖单产的探究[J]. J Aquac, 2020, 41(12):40-41, 44.
- [26] 林小涵, 金超凡, 高晨, 等. MiR-430 对斑马鱼原始生殖细胞迁移和性腺发育影响的初步研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2022, 52(3):72-79. DOI: 10.16441/j.cnki.hdx.20210144. LIN X H, JIN C F, GAO C, et al. Preliminary functional analysis of miR-430 in regulating zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cell migration and gonad development[J]. Period Ocean Univ China, 2022, 52(3): 72-79. DOI: 10.16441/j. cnki. hdx. 20210144.
- [27] 郭盼, 周继术, 吉红, 等. 不同链长脂肪酸对斑马鱼的性腺脂肪酸组成、繁殖力与仔鱼成活率的影响[J]. 水生生物学报, 2017, 41(4):766-773. DOI: 10.7541/2017.95. GUO P, ZHOU J S, JI H, et al. Influence of fatty acids with different chain length on fatty acid composition of ovaries, fecundity and survival rate of larvae in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2017, 41(4): 766-773. DOI: 10.7541/2017.95.
- [28] MURRAY K N, WOLF J C, SPAGNOLI S T, et al. Reversibility of proliferative thyroid lesions induced by iodine deficiency in a laboratory zebrafish colony[J]. Zebrafish, 2018, 15(6):558-565. DOI: 10.1089/zeb.2018.1603.
- [29] D'ABRAMO L. Challenges in developing successful formulated feed for culture of larval fish and crustaceans[J]. Avances en Nutrición Acuicola VI, 2002, 143-151.
- (收稿日期: 2023-01-16 修回日期: 2023-04-18 )  
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 周晓铧)

### 【引用本文】

金仕容, 华叶, 訾化星, 等. 一种显著提高实验用斑马鱼繁殖效率和使用寿命的优化养殖方案[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 298-307. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.004.

JIN S R, HUA Y, ZI H X, et al. An optimized experimental zebrafish breeding scheme for significantly enhancing reproductive efficiency and service life[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3): 297-306. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.004.

\*\*\*\*\*

## 《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, 编辑部将第一时间处理。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

# 兔眼角膜着染对眼刺激性试验结果评价的影响

徐红花<sup>1,2</sup>, 金 天<sup>1,2</sup>, 王 海<sup>1,2</sup>, 沈梦莹<sup>1,2</sup>, 王 瑞<sup>1,2</sup>, 周艺佳<sup>1,2</sup>, 谭 莹<sup>1,2</sup>

(1. 云南省药物研究所, 昆明 650111; 2. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 昆明 650111)

**[摘要]** **目的** 观察正常实验兔眼经荧光素钠染色后的着染现象对眼刺激性试验结果评价的影响。**方法** 在进行针对氯化钠滴眼液、四味珍层冰硼滴眼液、玻璃酸钠滴眼液、色甘酸钠滴眼液和复方门冬维甘滴眼液的实验兔眼刺激性试验(每组4只, 雌雄各半)中, 将给予生理盐水的兔左眼(自身阴性对照)和给予药物制剂的右眼(给药实验)进行1%荧光素钠染色, 然后用裂隙灯显微镜连续31 d观察兔眼刺激反应并评分, 记录兔角膜上皮着染的形态变化并计算着染发生率。观察结束后对眼球及哈氏腺进行组织病理学检查, 并将左眼着染发生率检查结果与给予相应药物的右眼进行统计学对比分析。**结果** 给予生理盐水的左眼和给予药物制剂的右眼均无眼刺激反应, 评分均为0, 角膜着染总发生率分别为3%、1%, 左右眼每天和总着染发生率无明显差异( $P>0.05$ )。角膜上皮着染形态有单点状着染、散在点状着染、局限性着染和大片融合着染的无规律变化, 眼球及哈氏腺未见组织病理学改变, 结果评价为无刺激性。**结论** 实验兔眼无规律间断出现的角膜上皮着染对眼刺激性试验的结果评价无影响。

**[关键词]** 实验兔; 角膜; 着染; 眼刺激性试验; 结果评价

**[中图分类号]** R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0307-07



## Influence of Corneal Staining in Rabbits on the Evaluation of Eye Irritation Test Results

XU Honghua<sup>1,2</sup>, JIN Tian<sup>1,2</sup>, WANG Hai<sup>1,2</sup>, SHEN Mengying<sup>1,2</sup>, WANG Rui<sup>1,2</sup>, ZHOU Yijia<sup>1,2</sup>, TAN Ying<sup>1,2</sup>

(1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China; 2. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

Correspondence to: TAN Ying (ORCID: 0009-0007-3084-9020), E-mail: tanying@ynby.cn

**[ABSTRACT]** **Objective** To observe the influence of the staining phenomenon after fluorescein sodium staining on eye irritation in normal rabbits. **Methods** In the experimental rabbit eye irritation test conducted with sodium chloride eye drops, Siwei Zhenceng Bingpeng eye drops, sodium hyaluronate eye drops, sodium cromoglycate eye drops, and compound aspartate eye drops (4 in each group, half male and half female), the left eyes of rabbits were administered normal saline (self-negative control) and the right eyes were administered the experimental medicine; the eyes were stained with 1% sodium fluorescein, and eye irritation was observed and scored using slit lamp microscope for 31 days. Morphological changes of corneal epithelial staining were recorded and the incidence of staining was calculated. After the observation, the eyeballs and Hasselblad glands were examined histopathologically, and the staining rate of the left eye was compared with that of the right eye which was administered the corresponding medicine. **Results** Neither eye had any irritation symptoms; the scores were 0, and the total incidences of corneal staining were 3% (left) and 1% (right), respectively. There was no significant difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). Corneal epithelial staining showed single-spot staining, scattered dot, localized, or large areas of fusion staining. No histopathological changes were found in the eyeballs or Hasselblad glands, and the results were evaluated as non-irritative. **Conclusion** The irregularity of corneal epithelial staining in rabbits did not influence the results of the ocular irritation test.

**[Key words]** Rabbits; Cornea; Staining; Eye irritation test; Result evaluation

**[基金项目]** 云南省药物研究所第三方公共技术服务能力提升建设(202104AR040002)

**[第一作者]** 徐红花(1978—),女,本科,高级工程师,主要从事药物安全性评价研究。E-mail: 601139654@qq.com

**[通信作者]** 谭 莹(1979—),女,博士,高级工程师,研究方向:药物安全性评价研究。E-mail: tanying@ynby.cn。ORCID: 0009-0007-3084-9020

实验兔眼刺激性试验一直以来是评价眼刺激的常用方法,其主要用于评估药物制剂或化妆品等经眼给药或可能接触到眼后对眼局部产生的刺激性,该试验是临床前安全性评价的组成部分,结果可为药物制剂或化妆品的临床使用提供安全性依据<sup>[1-2]</sup>。由于实验动物“3R”原则的实施,以及在体眼刺激性试验数据具有主观性强、不易测量等缺点,体外替代方法逐渐成为眼刺激性评价研究的发展方向<sup>[3-4]</sup>。近年来通过体外试验方法研究发现,体外试验虽有优势,但也存在无法模拟神经调节、吸收、分布和代谢等复杂体内环境的缺陷。迄今为止,还没有一种体外方法能够完全替代体内眼刺激性试验<sup>[5]</sup>。因此,体内眼刺激性试验仍是经典的评价方法之一,但需要不断优化在体眼刺激性试验的方法,总结试验中影响结果评价的因素和经验,提高在体眼刺激性试验结果的准确性。本研究观察实验兔眼刺激性试验中角膜经荧光素钠染色后着染现象的发生发展过程,探讨其对体内眼刺激性试验结果评价的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

4~5月龄的普通级新西兰白兔20只,雌雄各半,体质量为2.8~3.5 kg,由青岛艾莱克生物科技有限公司提供[SCXK(鲁)2019 0006],质量合格证编号为NO.370839200100002171。动物饲养于云南省药物研究所药物安全性评价中心的普通级动物实验室[SYXK(滇)K2017-0004],环境温度为18~24℃,相对湿度为40%~70%,照明条件为12 h:12 h(08:30—20:30)明暗交替,实验动物可自由饮水,每日饲喂兔生长繁殖配合饲料(批号:22014111)2次,上午喂饲约50 g,下午喂饲约100 g。动物实验方案经云南省药物研究所实验动物管理与使用委员会(IACUC)审查通过[动(伦)IACUC-2022-0011-01]。

### 1.2 药品与试剂

氯化钠滴眼液(山东博士伦福瑞达制药有限公司,批号220302);四味珍层冰硼滴眼液(江西珍视明药业有限公司,批号220401);玻璃酸钠滴眼液(德国URSAPHARM Arzneimittel GmbH公司,批号302575);色甘酸钠滴眼液(武汉五景药业有限公司,批号22010403);复方门冬维甘滴眼液[曼秀雷敦(中国)药业有限公司,批号228111];生理盐水即0.9%氯化钠注射液(昆明南疆制药有限公司,批号A22012503

B);荧光素钠注射液(广州白云山明兴制药有限公司,批号1212101);舒泰50(法国VIRBAC公司,批号8EM1A);改良Davidson's液为实验室自配(10%中性缓冲福尔马林液、无水乙醇、乙酸、自来水按6:3:1:10比例混合);甲醛溶液、无水乙醇和乙酸均购于国药集团化学试剂有限公司;HE染色剂为实验室自配(苏木红1 g加10 mL无水乙醇溶解,硫酸铝钾20 g加纯水200 mL溶解,两液混合加热煮沸,加2 g氧化汞后冷却过滤,使用前每100 mL加入冰醋酸6 mL和甘油10 mL)。

### 1.3 主要仪器

裂隙灯显微镜(杭州爱视界医疗器械有限公司,型号ML-350S);组织切片机(型号RM2255)、包埋机(型号EG1160)、脱水机(型号ASP300 S)、染色机(型号ST5020)和光学显微镜(型号DM6000B、DM500)均为德国Leica公司产品;数字病理切片扫描仪(宁波江丰生物技术公司,型号KF-PRO-005)。

### 1.4 荧光素钠染色液的配制方法

用一次性注射器抽取规格3 mL:0.6 g(20%)的荧光素钠注射液0.1 mL于离心管中,再加入1.9 mL氯化钠注射液,混匀后即是1%荧光素钠染色液。每天在超净工作台现配,配制后常温下使用。

### 1.5 动物分组与给药

实验兔在给药第1天分组前用1%荧光素钠进行双眼染色,染色后10 min内用裂隙灯显微镜检查,排除有眼睛刺激症状、角膜缺陷、着染和结膜损伤的动物<sup>[6]</sup>。检查后20只动物均合格,随机将20只实验兔分为氯化钠滴眼液组、四味珍层冰硼滴眼液组、玻璃酸钠滴眼液组、色甘酸钠滴眼液组和复方门冬维甘滴眼液组,每组4只,雌雄各2只。分组后,采用自体自身对照法,动物左眼给予生理盐水(阴性对照),右眼给予上述对应的滴眼液药物制剂(实验给药)<sup>[7-8]</sup>,每眼每次滴入0.05 mL的相应药物或生理盐水,每天6次,每次间隔1 h。以后每天均按上述给药方法,连续给药28 d,停药恢复观察3 d。每天首次给药前和恢复期间,左右眼均进行1%荧光素钠染色并检查1次,给药期间检查完后即开始给药。

### 1.6 眼刺激反应的观察及评分

每天第1次给药前和恢复期间,将实验兔固定,拉开下眼睑,左右眼各滴入1滴(约0.02 mL)1%荧光素钠溶液染色,染色后10 min内用裂隙灯显微镜观察实验兔双眼角膜、虹膜、结膜的眼刺激反应并评分,



拍照。

眼刺激反应的评分标准见表1。将每一个观察时间、每一只实验兔的眼刺激反应分值相加，最大总积分为16分。各组实验兔每天积分相加得到总分值，再除以每组实验兔数量得到每组平均分。根据最后的平均分判断各组实验兔的左右眼刺激性：0~3分为无刺激性；4~8分为轻度刺激性；9~12分为中度刺激性；13~16分为重度刺激性。

表1 兔眼刺激反应分值标准

Table 1 The standard scores for eye ocular irritation in rabbits

| 刺激部位<br>Site of irritation         | 眼刺激反应<br>Reaction to eye irritation | 分值<br>Score |
|------------------------------------|-------------------------------------|-------------|
| 角膜 Cornea                          | 无混浊                                 | 0           |
|                                    | 散在或弥漫性混浊,虹膜清晰可见                     | 1           |
|                                    | 半透明区易分辨,虹膜模糊不清                      | 2           |
|                                    | 出现灰白色半透明区,虹膜细节不清,瞳孔大小勉强可见           | 3           |
|                                    | 角膜不透明,虹膜无法辨认                        | 4           |
| 虹膜 Iris                            | 正常                                  | 0           |
|                                    | 皱褶明显加深、充血、肿胀,角膜周围轻度充血,瞳孔对光仍有反应      | 1           |
|                                    | 出血,肉眼可见坏死,对光无反应(或其中一种)              | 2           |
| 结膜 Conjunctiva                     | 血管正常                                | 0           |
|                                    | 血管充血呈鲜红色                            | 1           |
|                                    | 血管充血呈深红色,血管不易分辨                     | 2           |
|                                    | 弥漫性充血呈紫红色                           | 3           |
|                                    | 无水肿                                 | 0           |
|                                    | 轻微水肿(含眼睑)                           | 1           |
|                                    | 明显水肿伴部分眼睑外翻                         | 2           |
|                                    | 水肿至眼睑近半闭合                           | 3           |
|                                    | 水肿至眼睑超过半闭合                          | 4           |
|                                    | 无分泌物                                | 0           |
|                                    | 少量分泌物                               | 1           |
|                                    | 分泌物使眼睑和睫毛潮湿或黏着                      | 2           |
|                                    | 分泌物使整个眼区潮湿或黏着                       | 3           |
| 最大总积分 Maximum total integral value |                                     | 16          |

1.7 眼角膜上皮着染情况检查

试验期间,实验兔眼角膜每次染色后,用裂隙灯显微镜的钴蓝光检查左右眼角膜上皮被着染为黄绿色<sup>[6]</sup>的动物数和着染形态,计算实验兔每天着染的发生率,以及观察期间出现着染动物的总发生率。

1.8 解剖肉眼观察及组织病理学检查

第31天染色检查后,用舒泰50按8 mg/kg的剂量经耳缘静脉注射麻醉实验兔。股动脉放血处死后,肉眼观察阴性对照动物眼的外观情况。摘取眼球和哈氏腺,用改良Davidson's液固定48 h,然后采用常规的HE染色法进行组织病理学检查。

1.9 统计分析方法

运用IBM SPSS Statistics 24软件进行统计分析。采用 $\chi^2$ 检验比较给予生理盐水的实验兔左眼和给予药物制剂的实验兔右眼的每天着染发生率和总着染发生率,

以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 眼刺激反应检查评分

各组实验兔经1%荧光素钠染色后的左右眼检查均未见异常,评分均为0,按眼刺激反应评价标准评为无刺激性。

2.2 眼角膜上皮着染发生率和着染形态的动态变化

给药期间,各组实验兔左右眼均可偶见着染情况发生,但每天发生率均较低,在0%~25%,观察期间各组左右眼着染的总发生率为0.8%~3.2%。全部实验兔左眼角膜上皮着染的总发生率为3%,每天的发生率为0%~20%;右眼的总发生率为1%,每天的发生率为0%~10%。同只动物的左眼或右眼角膜着染现象间

断出现，呈不规律变化；大部分动物仅偶发，着染的形态有单点状着染、散在点状着染、局限性着染和大片融合着染，个别时间左眼的着染面积更大，程度更重。结果见表2，图1。

表2 观察期间各组实验兔左右眼角膜上皮着染出现的时间和发生率  
Table 2 The time and incidence of corneal epithelial staining in the left and right eyes of the rabbits in each group during the observation period

| 组别<br>Test group                  | 观察部位<br>Observed position | 每天发生率/%<br>Daily incidence/% |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 总发生率/%<br>Total incidence/% |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------------------|
|                                   |                           | D1                           | D3 | D9 | D10 | D12 | D17 | D18 | D20 | D24 | D28 | D31 |                             |
| 氯化钠滴眼液组 (n=4)                     | 左眼                        | 0                            | 0  | 25 | 0   | 25  | 0   | 0   | 25  | 25  | 0   | 0   | 3.2                         |
| Sodium chloride eye drops         | 右眼                        | 0                            | 25 | 0  | 0   | 0   | 25  | 0   | 0   | 0   | 25  | 0   | 2.4                         |
| 四味珍层冰硼滴眼液组 (n=4)                  | 左眼                        | 0                            | 0  | 0  | 25  | 25  | 0   | 0   | 25  | 0   | 0   | 0   | 2.4                         |
| Siwei Zhenceng Bingpeng eye drops | 右眼                        | 0                            | 25 | 0  | 0   | 0   | 0   | 25  | 0   | 0   | 0   | 0   | 1.6                         |
| 玻璃酸钠滴眼液组 (n=4)                    | 左眼                        | 0                            | 0  | 25 | 0   | 25  | 0   | 0   | 25  | 0   | 0   | 0   | 2.4                         |
| Sodium hyaluronate eye drops      | 右眼                        | 0                            | 0  | 0  | 0   | 0   | 25  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0.8                         |
| 色甘酸钠滴眼液组 (n=4)                    | 左眼                        | 0                            | 0  | 0  | 0   | 25  | 0   | 0   | 0   | 25  | 0   | 25  | 2.4                         |
| Sodium cromoglycate eye drops     | 右眼                        | 0                            | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 25  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0.8                         |
| 复方门冬维甘滴眼液组 (n=4)                  | 左眼                        | 0                            | 0  | 0  | 25  | 0   | 0   | 0   | 25  | 0   | 0   | 25  | 2.4                         |
| Compound aspartate eye drops      | 右眼                        | 0                            | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 25  | 0   | 0.8                         |
| 全部实验兔 (n=20)                      | 左眼                        | 0                            | 0  | 10 | 10  | 20  | 0   | 0   | 20  | 10  | 0   | 10  | 3.0                         |
| All experimental rabbits          | 右眼                        | 0                            | 10 | 0  | 0   | 0   | 10  | 10  | 0   | 0   | 10  | 0   | 1.0                         |

注：采用自体自身对照法，每组动物左眼给予生理盐水（阴性对照），右眼给予滴眼液药物制剂（实验给药），每天首次给药前和恢复期间左右眼进行1%荧光素钠染色。D1~D31指染色第1~31天；每天发生率为每天出现的动物数/总动物数；总发生率为观察期出现着染的次数/总检查次数（各组4只×31 d=124次，全部20只×31 d=620次）；卡方检验显示左右眼每天和总着染发生率差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。  
Note: The same body self-contrast method was used. Normal saline was administered to the left eye and experimental medicine was administered to the right eye. All eyes were stained with 1% sodium fluorescein before daily administration. D1-D31 refer to the 1st to 31st days after staining, and the daily incidence is the number of animals per day/ total number of animals. The total incidence rate was calculated as the number of stainings/total examinations performed during the observation period (in each group,  $n=4\times31\text{ d}=124$ ; total  $n=20\times31\text{ d}=620$ ). The Chi-square test showed no significant difference in the incidence of daily or total staining between the left and right eyes ( $P>0.05$ ).

2.3 眼角膜解剖后肉眼观察及组织病理学检查情况

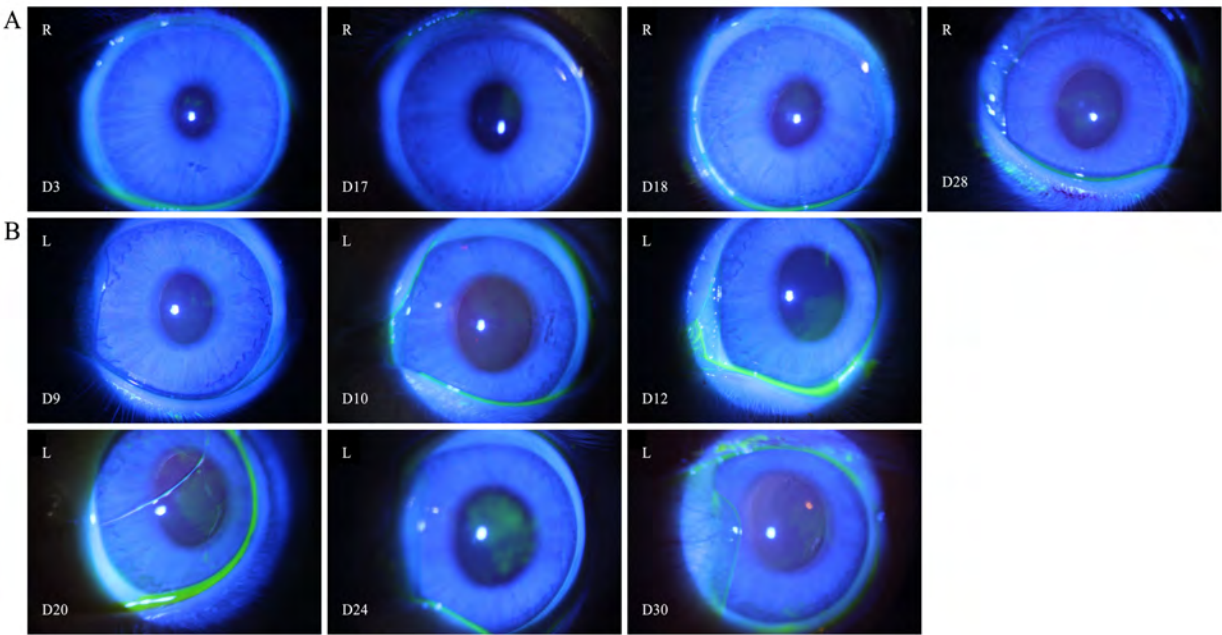
在第31天染色观察结束后解剖，肉眼观察20只试验兔的左右眼外观均未见异常。对摘取的眼球（含角膜和视网膜）及眼附属器哈氏腺进行组织病理学检查，结果发现左右眼的角膜、视网膜、哈氏腺等组织结构及其细胞形态均未见异常（图2）。

3 讨论

在体内眼刺激性试验中，着染是荧光素钠在不光滑的眼角膜上滞留，通过裂隙灯显微镜在钴蓝光下观察到的一种现象，也叫荧光素滞留或染色。临床上认为，角膜上皮着染是由泪膜不稳定导致角膜上皮损伤所致<sup>[9-11]</sup>，其中眼干燥症也是泪膜不稳定引起的症状之一<sup>[12]</sup>。在评价以眼角膜损伤为主的受试物时，往往将着染现象作为评价眼角膜损伤的指标之一<sup>[13]</sup>。然而

角膜作为最先与药物接触的组织更易受到损伤，非药物的其他原因也可能导致着染现象而影响实验结果的评价。因此，在体内眼刺激性试验中，观察着染的变化情况及影响因素，对客观评价受试物的眼刺激性显得非常重要。

本研究结果表明，实验兔入组前左右眼检查均无角膜上皮着染，但在观察期间，给予0.9%氯化钠注射液的左眼出现了着染，其发生率（3%）略高于给予药物制剂的右眼（1%），且左右眼出现的时间均呈间断无规律变化；另外，眼角膜组织病理学检查未见异常，结果评价为无刺激性。由此表明正常实验兔在非药物原因影响下也会出现无规律变化的角膜上皮着染现象，该现象对结果评价无影响。本实验结果提示，在实验兔眼刺激性试验中，当给药组动物的眼角膜上皮出现着染时，需根据发生率、持续时间、变化规律和着染程度等与阴性对照进行比较分析后再做客观评价。若

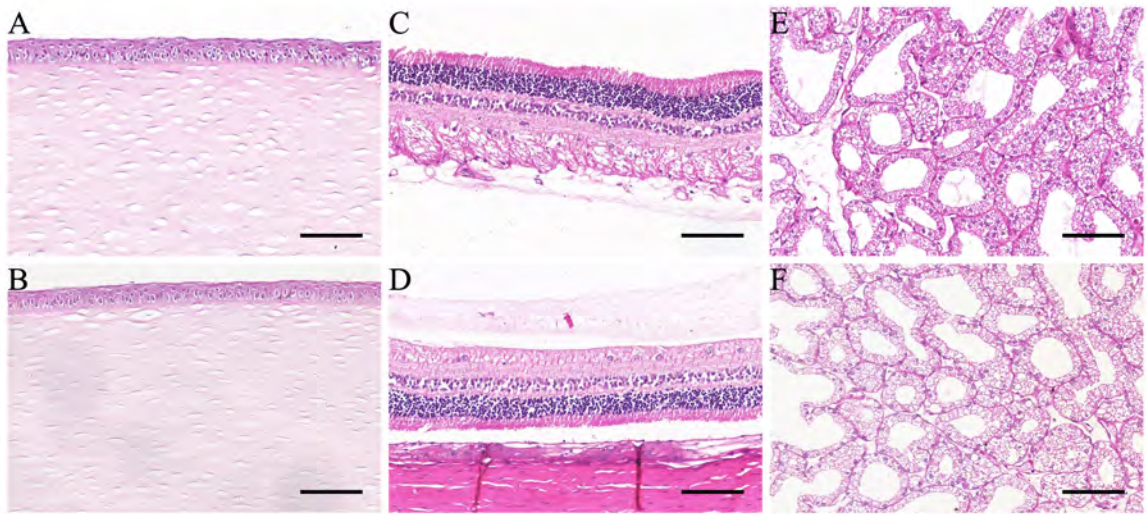


注：A，不同时间的右眼（给药）着染形态汇总：第3天（D3），散在点状着染；第17、18、28天（D17、D18、D28），局限性着染。B，不同时间的左眼（阴性对照）着染形态汇总：第9天（D9），单点状着染；第10、12、20、30天（D10、D12、D20、D30），局限性着染；第24天（D24），大片融合着染。

Note: (A) The morphology of staining in the right eye at different times after administration is summarized: D3, scattered dot; D17, D18, and D28, localized dot. (B) The morphology of staining in the left eye at different times after administration is summarized: D9, single dot; D10, D12, D20, and D30, localized dot; D24, large fusion.

图1 观察期间实验兔的左右眼角膜上皮着染出现的时间和形态汇总

Figure 1 Summary of the timing and morphology of corneal epithelial staining in the left and right eyes of rabbits during the observation period.



注：A，左眼角膜正常；B，右眼角膜正常；C，左眼视网膜正常；D，右眼视网膜正常；E，左眼哈氏腺正常；F，右眼哈氏腺正常。各图中比例尺大小为100 μm。左右眼每个组织标本本数各为20。

Note: (A) Normal cornea in the left eye; (B) Normal cornea in the right eye; (C) Normal retina in the left eye; (D) Normal retina in the right eye; (E) Normal Hasselblad gland in the left eye; (F) Normal Hasselblad gland in the right eye. The scale size of each figure is 100 μm. A total of 20 tissue samples were collected from each eye.

图2 实验兔染色检查31 d后眼球及哈氏腺组织病理学观察(HE染色, ×20)

Figure 2 The histopathology of the eyeballs and Harderian glands were observed after 30 days of staining ( HE staining , ×20 )



确实是药物产生刺激导致眼角膜损伤,那么在连续给药的情况下,着染出现的时间应有一定规律,即随给药时间的延长发生率升高,着染程度加重,且发生率和程度至少应高于阴性对照组。分析本研究中阴性对照组实验兔出现角膜上皮着染的原因,结合以往文献资料,推测角膜上皮着染是由泪膜不稳定导致,而破坏泪膜稳态的因素分为内源性和外源性:内源性因素包括眼表组织的破坏及机体内环境的异常;外源性因素则是外源的刺激和破坏,例如佩戴角膜接触镜等<sup>[14-15]</sup>。综上,考虑本研究的眼角膜着染现象主要为外源性的刺激引起,初步推测该刺激与实验者的操作有关。

为了避免人为操作对试验结果评价的影响,结合本试验结果,笔者建议采用以下措施优化试验方法和评分标准,从而提高试验结果的准确性。(1)减少检查频率,如28 d的长时间给药周期可减少到3~7 d检查1次,从而降低人为操作所致的着染发生率,该措施可通过泪膜破裂时间的测定进一步证实其科学性<sup>[16]</sup>。(2)建立实验室背景数据,增加着染项目的评分,并结合着染形态/程度和发生率制定评分标准,如本试验可将着染形态单点状着染、散在点状着染、局限性着染和大片融合着染分别评为1、2、3、4分,每天评分,最后计算总积分,当给药组的着染现象有规律变化且发生率高于阴性对照(3%)、总积分明显高于阴性对照组时,可初步判断为有刺激性。(3)结合组织病理学检查结果进行综合评价,当根据着染评分和发生率判断给药组有刺激性时,若组织病理学检查结果显示有刺激性,则最终判断有刺激性,否则需结合其他观察内容或增加其他观察指标来判断刺激性情况。

#### [医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物试验均已通过云南省药物研究所实验动物管理与使用委员会(IACUC)审查批准[审批号:动(伦)IACUC-2022-0011-01]。所有实验过程均遵照中国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 Yunnan Institute of Materia Medica (Approval Letter No. IACUC-2022-0011-01). All experimental procedures were performed following the requirements of China's laws and regulations related to experimental animals, such as *Animal Management Regulations* (01/03/2017).

#### [作者贡献 Author Contribution]

徐红花负责课题设计、过程管理、数据统计分析、论文写作、修改和定稿;

金天、王海、沈梦莹、王瑞、周艺佳参与试验操作、数据收集,稿件修改过程的审核;

谭莹负责试验人员、实验动物、仪器设备的统筹协调,以及论文审核。

#### [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] 石莹,阮鸿洁,张宏伟,等.化妆品及原料眼刺激性STE法评价[J]. 中国公共卫生, 2020, 36(5): 745-748. DOI: 10.11847/zgggws1123082.  
SHI Y, RUAN H J, ZHANG H W, et al. Assessment on eye irritation of cosmetics raw materials and products with short time exposure in vitro test[J]. Chin J Public Health, 2020, 36(5):745-748. DOI: 10.11847/zgggws1123082.
- [2] 王庆利,彭健. Draize 眼刺激性试验的评价[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(4):301-304. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2005.04.026.  
WANG Q L, PENG J. Evaluation of Draize eye irritation test[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2005, 16(4): 301-304. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2005.04.026.
- [3] 钱仪敏,王若男,李华,等.眼刺激性评价体外替代方法研究进展[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(6): 618-623. DOI:10.3969/j.issn.1003-3734.2020.06.005.  
QIAN Y M, WANG R N, LI H, et al. Research progress on in vitro alternative method of eye irritation evaluation[J]. Chin J New Drugs, 2020, 29(6): 618-623. DOI:10.3969/j.issn.1003-3734.2020.06.005.
- [4] 敖华英,程树军,潘芳,等.化妆品眼刺激试验替代方法标准化与展望[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(1):74-77. DOI:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.001.017.  
AO H Y, CHENG S J, PAN F, et al. Standardization and prospect of alternative methods to cosmetics eye irritation [J]. Chin J Comp Med, 2012, 22(1): 74-77. DOI:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.001.017.
- [5] 忻佳裕,纪宏宇,唐景玲,等.眼用制剂刺激性体内评价方法研究进展[J]. 中国药师, 2015, 18(4): 644-646. DOI:10.3969/j.issn.1008-049X.2015.04.042.  
XIN J Y, JI H Y, TANG J L, et al. Study progress in eye irritation test in vivo for ophthalmic preparations[J]. China Pharm, 2015, 18(4): 644-646. DOI: 10.3969/j.issn.1008-049X.2015.04.042.
- [6] 肖云峰,盛惟,刘剑. 0.01% 硫酸阿托品滴眼液对实验动物眼部的安全性评价研究[J]. 北方药学, 2020, 17(7):143-144, 196. DOI:10.3969/j.issn.1672-8351.2020.07.107.  
XIAO Y F, SHENG W, LIU J. Safety evaluation of 0.01% atropine sulfate eye drops on the eyes of experimental animals[J]. J North Pharm, 2020, 17(7): 143-144, 196. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8351.2020.07.107.

- [7] 国家药品监督管理局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[A/OL]. (2014-05-13)[2022-06-28]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypggtg/ypqgtg/20140513120001448.html>. National Medical Products Administration. The Technical guidelines for drug safety of irritability, allergy, and hemolysis research[A/OL]. (2014-05-13) [2022-06-28]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypggtg/ypqgtg/20140513120001448.html>.
- [8] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范[A/OL]. (2015-12-23)[2022-06-28]. <https://www.nmpa.gov.cn/hzhp/hzhpqgtg/hzhpqgtg/20151223120001986.html>. National Medical Products Administration. Technical Specification for cosmetic safety[A/OL]. (2015-12-23)[2022-06-28]. <https://www.nmpa.gov.cn/hzhp/hzhpqgtg/hzhpqgtg/20151223120001986.html>.
- [9] 边思予, 仁干格麦, 何元浩, 等. 短期夜戴角膜塑形镜对成年近视患者泪膜的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2020, 51(1): 102-106. DOI: 10.12182/20200160605. BIAN S Y, REN Q, HE Y H, et al. The influence of short-term orthokeratology on tear film in adult myope[J]. J Sichuan Univ Med Sci Ed, 2020, 51(1): 102-106. DOI: 10.12182/20200160605.
- [10] 王湘娟, 应文闯, 陈士成, 等. 小牛血去蛋白提取物滴眼液对佩戴角膜塑形镜青少年近视患者眼表情况的改善效果[J]. 眼科, 2022, 31(3): 231-234. DOI: 10.13281/j.cnki.issn.1004-4469.2022.03.012. WANG X J, YING W C, CHEN S C, et al. Effect of calf blood deproteinized extract eye drops on improvement of ocular surface in adolescents wearing orthokeratology lenses[J]. Ophthalmol China, 2022, 31(3): 231-234. DOI: 10.13281/j.cnki.issn.1004-4469.2022.03.012.
- [11] 王宏娜, 鲁元媛, 丁香英, 等. 配戴夜戴型角膜塑形镜对青少年近视患者泪膜稳定性的影响[J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(12): 1118-1121. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2019.12.013. WANG H N, LU Y Y, DING X Y, et al. The influence of overnight orthokeratology on tear film stability in adolescent Myopia patients[J]. J China Med Univ, 2019, 48(12): 1118-1121. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2019.12.013.
- [12] 邱敬华, 李金凤, 尹娟娟, 等. 普拉洛芬滴眼液联合小牛血去蛋白提取物滴眼液治疗中重度干眼[J]. 国际眼科杂志, 2018, 18(4): 702-705. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.4.27. QIU J H, LI J F, YIN J J, et al. Clinical effect observation of pranoprofen combined with deproteinized calf blood extract eye drops for moderate to severe dry eye[J]. Int Eye Sci, 2018, 18(4): 702-705. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.4.27.
- [13] 殷莉莉, 袁振丽, 郝冬海, 等. 拉坦前列素脂质体滴眼液的眼表毒性[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(8): 634-638. DOI: 10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2014.08.013. YIN L L, YUAN Z L, HAO D H, et al. Ocular surface toxicity of latanoprost liposome eye drops[J]. J Shenyang Pharm Univ, 2014, 31(8): 634-638. DOI: 10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2014.08.013.
- [14] 张洪波, 李树茂, 鲁向阳, 等. 框架眼镜联合角膜塑形镜矫正青少年高度近视的临床疗效及对角膜内皮细胞和泪膜的影响[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(4): 645-649. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.04.009. ZHANG H B, LI S M, LU X Y, et al. Clinical efficacy of frame glasses combined with orthokeratology lens in correction of high Myopia in adolescents and its influence on corneal endothelial cells and tear film[J]. Prog Mod Biomed, 2021, 21(4): 645-649. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.04.009.
- [15] 严丹, 严晨曦, 傅瑶. 泪膜稳态影响因素的研究进展[J]. 国际眼科纵览, 2019(5): 337-340. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-5803.2019.05.010. YAN D, YAN C X, FU Y. Research advances in factors affecting homeostasis of the tear film[J]. Int Rev Ophthalmol, 2019(5): 337-340. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-5803.2019.05.010.
- [16] 陈洪涛, 罗睿强. 两种基底结膜瓣小梁切除术对青光眼患者术后早期泪膜功能及远期动态泪膜稳定性的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(10): 86-88. DOI: 10.19347/j.cnki.2096-1413.202110026. CHEN H T, LUO R Q. Effects of two kinds of basal conjunctival flap trabeculectomy on postoperative early tear film function and long-term dynamic tear film stability in patients with glaucoma[J]. Clin Res Pract, 2021, 6(10): 86-88. DOI: 10.19347/j.cnki.2096-1413.202110026.

(收稿日期: 2022-11-02 修回日期: 2023-02-08)

(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 赵宇朋)

#### [引用本文]

徐红花, 金天, 王海, 等. 兔眼角膜着染对眼刺激性试验结果评价的影响[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 308-314. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.169.

XU H H, JIN T, WANG H, et al. Influence of corneal staining in rabbits on the evaluation of eye irritation test results[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3): 307-313. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.169.

# 大鼠血清尿酸液相色谱-紫外检测新方法的建立及比较研究

夏子茵<sup>1</sup>, 柴媛媛<sup>1</sup>, 徐云霞<sup>1</sup>, 俞沁玮<sup>1</sup>, 黄鑫<sup>1</sup>, 张陆勇<sup>1,2</sup>, 江振洲<sup>1</sup>

(1. 中国药科大学新药筛选中心, 江苏省药效研究与评价服务中心, 多靶标天然药物全国重点实验室, 南京 210009;  
2. 广东药科大学新药研发中心, 广州 510006)

**[摘要]** **目的** 建立更准确、灵敏的液相色谱紫外 (liquid chromatography-ultraviolet, LC-UV) 检测大鼠血清尿酸的方法, 并将该方法与市售试剂盒的检测结果进行比较, 为氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型中血清尿酸含量的准确测定提供新方法。**方法** 采用向 SPF 级雄性 SD 大鼠腹腔注射氧嗪酸钾 (300 mg/kg) 的方法建立高尿酸血症大鼠模型, 对照组给予等量的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。经眼眶后静脉丛采血, 离心获得大鼠血清样品, 经 0.1% 三氟乙酸-乙腈 (含内标 3, 4-二羟基苯胺氢溴酸盐) 沉淀后, 取上清液进样分析。采用 Waters XBridge HILIC 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 对尿酸进行分离, 使用乙腈 (含 0.5% 甲酸与 2 mmol/L 甲酸铵) 作为有机相, 甲醇溶液 (甲醇: 水=1:1, 含 0.5% 甲酸与 2 mmol/L 甲酸铵) 作为水相, 进行等度洗脱, 于 290 nm 波长处进行检测。使用活性炭处理的血清样品作为空白生物基质, 用于方法学验证。分别使用所建立的 LC-UV 方法与两种市售试剂盒 (尿酸酶法和磷钨酸法) 检测高尿酸血症模型大鼠的血清尿酸水平, 并对 3 种检测方法的准确度进行比较。**结果** 大鼠血清中的尿酸在 10~200 μg/mL 质量浓度内线性关系良好 ( $R>0.999$ ), 定量下限为 10 μg/mL, 准确度为 -2.17%~2.21%, 批内精密度的 0.52%~1.95%, 批间精密度的 3.04%~4.90%, 提取回收率为 83.12%~89.91%。在氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型中, 市售的磷钨酸法试剂盒测定结果显著高于 LC-UV 法测定结果, 市售的尿酸酶法试剂盒测定结果显著低于 LC-UV 法测定结果, 但 LC-UV 方法的加样回收率结果最佳 (95.90%~99.96%)。**结论** 所建立的 LC-UV 方法能够准确测定大鼠血清中尿酸含量, 与市售试剂盒相比具有更高的准确度, 推荐作为氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型中血清尿酸含量的检测方法。

**[关键词]** 尿酸; 液相色谱; 内标法; 高尿酸血症; 大鼠

**[中图分类号]** R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0314-09



## Quantification of Uric Acid of Rat Serum by Liquid Chromatography-ultraviolet Detection and Its Comparison Study

XIA Ziyin<sup>1</sup>, CHAI Yuanyuan<sup>1</sup>, XU Yunxia<sup>1</sup>, YU Qinwei<sup>1</sup>, HUANG Xin<sup>1</sup>, ZHANG Luyong<sup>1,2</sup>, JIANG Zhenzhou<sup>1</sup>

(1. New Drug Screening Center, Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Center for Drug Research and Development, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Correspondence to: ZHANG Luyong (ORCID: 0000-0003-1164-7371), E-mail: lyzhang@cpu.edu.cn;

JIANG Zhenzhou (ORCID: 0000-0002-0420-0822), E-mail: beaglejiang@cpu.edu.cn

**[ABSTRACT]** **Objective** To establish a more accurate and sensitive liquid chromatography-ultraviolet (LC-UV) method for the determination of uric acid in rat serum, and compare the results with those of commercial kits, providing a new method for the accurate determination of uric acid in the rat hyperuricemia model induced by potassium oxonate. **Methods** A hyperuricemia model was established by intraperitoneal injection of potassium oxonate (300 mg/kg) into SPF-grade male SD rats, and the control

**[第一作者]** 夏子茵 (1997—), 女, 硕士, 研究方向: 药代与靶向代谢组学。E-mail: xiaziyin0701@163.com。ORCID: 0000-0003-0660-5214

**[通信作者]** 张陆勇 (1962—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 新药筛选及早期成药性评价和分子毒理学。E-mail: lyzhang@cpu.edu.cn。ORCID: 0000-0003-1164-7371;

江振洲 (1976—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 药源性肝脏毒性及其分子机制、代谢动力学物质基础研究。E-mail: beaglejiang@cpu.edu.cn。ORCID: 0000-0002-0420-0822



group was administered an equal amount of 0.5% sodium carboxymethylcellulose solution. Blood samples were collected from the posterior orbital venous plexus and centrifuged to obtain serum samples. After precipitation with 0.1% trifluoroacetic acid-acetonitrile (containing the internal standard 3, 4-dihydroxybenzylamine hydrobromide), the supernatant was injected for analysis. Uric acid was separated on a Waters XBridge HILIC column (150 mm×4.6 mm, 3.5  $\mu$ m) using acetonitrile (containing 0.5% formic acid and 2 mmol/mL ammonium formate) as the organic phase and methanol solution (methanol: water=1: 1, containing 0.5% formic acid with 2 mmol/L ammonium formate) as the aqueous phase for isocratic elution and detection at 290 nm. Serum samples treated with activated carbon were used as substitute matrices for the methodological verification. Serum uric acid levels in rats with potassium oxonate-induced hyperuricemia were measured using the established LC-UV method and commercially available kits (uricase and phosphotungstic acid methods), and the accuracies of the three methods were compared.

**Results** Serum uric acid showed a good linear relationship ( $R>0.999$ ) at mass concentration of 10–200  $\mu$ g/mL in rats, the lower limit of quantification was 10  $\mu$ g/mL, the accuracy ranged from -2.17% to 2.21%, the intra-batch precision ranged from 0.52% to 1.95%, the inter-batch precision ranged from 3.04% to 4.90%, and the extraction recovery ranged from 83.12% to 89.91%. In the rat model, the results obtained using the commercially available phosphotungstic acid method kit were significantly higher than those of the LC-UV method, and those obtained using the commercially available uricase method kit were significantly lower than those of the LC-UV method, but the LC-UV method showed the best recovery of the spiked sample (95.90%–99.96%). **Conclusion** The LC-UV method developed in this study can determine the concentration of uric acid in rat serum with higher accuracy than commercially available kits and is recommended for the determination of serum uric acid in the rat model of hyperuricemia induced by potassium oxonate.

**[Key words]** Uric acid; Liquid chromatography; Internal standard method; Hyperuricemia; Rats

尿酸作为嘌呤代谢的终产物，是临床诊断痛风、肾结石的传统生化指标<sup>[1-2]</sup>。尿酸在人体功能中起着至关重要的作用，尿酸水平过高会引发一系列疾病。研究发现，高尿酸与非酒精性脂肪肝<sup>[3-4]</sup>、高血压<sup>[5]</sup>、动脉粥样硬化<sup>[6]</sup>、静脉血栓栓塞<sup>[7]</sup>、代谢综合征<sup>[8-9]</sup>等密切相关。高尿酸血症对身体多种脏器都可产生损害，如关节损伤、肾脏损伤、心血管损伤等<sup>[10]</sup>。高尿酸血症动物模型的建立是高尿酸血症临床前研究的关键工具，其中常用的就是氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型<sup>[11]</sup>，血清尿酸含量又是该模型的关键性指标。有效降低尿酸水平是降低痛风发生风险及预防并发病的关键。因此，准确测定血尿酸水平对监测高尿酸血症的发生、发展及临床前研究至关重要。

目前，尿酸的检测方法主要有试剂盒检测法与液相色谱法，其中试剂盒的检测原理主要分为尿酸酶法和磷钨酸法<sup>[12]</sup>，然而血清中许多内源性物质可能干扰尿酸酶法和磷钨酸法的测定，使测量结果出现偏差<sup>[13]</sup>。高效液相色谱法经过样品前处理，利用样品中各组分在色谱柱中固定相和流动相分配系数或吸附系数等差异，将各组分分离后进行定量分析，具有很好的专属性<sup>[14]</sup>。因此，本研究将建立液相色谱-紫外(liquid chromatograph-ultraviolet, LC-UV)检测方法，

并与市售的尿酸酶法、磷钨酸法试剂盒比较，用于测定高尿酸血症模型大鼠的血清尿酸含量，以期血清尿酸的准确检测提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

尿酸标准品(纯度 $\geq 99\%$ ，批号BCCC8658)和3, 4-二羟基苄胺氢溴酸盐(3, 4-dihydroxybenzylamine hydrobromide, DHBA)标准品(纯度98%，批号MKBS7646V)均购自德国Sigma Aldrich公司；氧嗪酸钾(批号YQ34L-LA)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司；羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na, 批号20170810)购自国药集团化学试剂有限公司；三氟乙酸(色谱纯)购自美国TEDIA公司；甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯，购自德国Merck公司；尿酸检测试剂盒(酶比色法，批号20210831)和尿酸检测试剂盒(磷钨酸比色法，批号202100807)均购自南京建成生物工程研究所有限公司。

### 1.2 仪器

LC-20AD 色谱泵、SIL-20AC 自动进样器、CBM-20A 连接器和 SPD-20A 紫外吸收检测器均为日本 Shimadzu 公司产品；色谱柱(货号186004441)购自沃

特世科技(上海)有限公司; HT-220A 柱温箱为中国天津市恒奥科技发展有限公司产品; Sartorius QUINTIX125D-1CN 天平(精度 0.01 mg)为德国 Sartorius 公司产品; Legend Micro 21R 低温离心机和 GenPure UV-TOC/UF xCAD plus 自动纯水机为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

### 1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只, 体质量 160~180 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [SCXK (沪) 2017-0005], 实验动物质量合格证编号为 20170005065698。动物饲养于中国药科大学药理学动物实验中心 [SYXK (苏) 2021-0011], 实验期间动物自由进食、饮水, 12 h/12 h 昼夜节律正常。动物实验方案经中国药科大学伦理委员会审核批准 (2021-09-025)。

### 1.4 高尿酸血症大鼠模型的建立

12 只 SPF 级雄性 SD 大鼠在实验前适应性饲养 1 周。将 SD 大鼠随机分为对照组和氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症组, 每组 6 只, 禁食 12 h。高尿酸血症组腹腔注射氧嗪酸钾 (300 mg/kg), 对照组给予等量的 0.5% CMC-Na 溶液。给药完毕后, 动物结束禁食。分别于氧嗪酸钾给药前及给药后 1 h, 经眼眶后静脉丛采血 500  $\mu$ L 于 1.5 mL 离心管中, 所得血样经 3 500 $\times g$  离心 10 min 得血清样品。

### 1.5 LC-UV 检测

#### 1.5.1 尿酸及 DHBA 标准品溶液的配制

尿酸标准品溶液的制备: 精密称定尿酸标准品, 用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并定容, 配制质量浓度为 1 mg/mL 的尿酸标准品溶液。

DHBA 标准品溶液的制备: 精密称定 DHBA 标准品, 用甲醇溶解并定容, 配制质量浓度为 1 mg/mL 的内标标准品溶液。

#### 1.5.2 尿酸标准曲线样品及质控样品工作溶液的配制

取尿酸 1 mg/mL 的标准品溶液, 用甲醇稀释制备质量浓度分别为 10、25、50、80、100、120、160、200  $\mu$ g/mL 的尿酸标准曲线样品工作溶液, 以及质量浓度分别为 25、100、160  $\mu$ g/mL 的质控样品工作溶液。

#### 1.5.3 空白生物基质的制备

取实验室前期收集的经眼眶后静脉丛采血所得空白雄性 SD 大鼠血清样品, 每 1 mL 血清加入 150 mg 活性炭, 涡旋振荡 30 min 后离心 (14 000 $\times g$ , 15 min), 取上清液。该过程重复两次后即可得到无尿酸的空白血清样品。

### 1.5.4 样品前处理

取 12 只雄性 SD 大鼠的血清 50  $\mu$ L, 加入 250  $\mu$ L 0.1% 三氟乙酸-乙腈 (含内标 DHBA 70  $\mu$ g/mL), 涡旋振荡后离心 (14 000 $\times g$ , 10 min); 取上清液 250  $\mu$ L, 加入 50  $\mu$ L 超纯水, 涡旋振荡后二次离心 (14 000 $\times g$ , 10 min); 取上清液 250  $\mu$ L, 进样分析。

### 1.5.5 色谱分析条件

色谱柱为 Waters XBridge HILIC (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.5  $\mu$ m)。流动相水相为甲醇溶液 (甲醇和水体积比为 1:1, 含 0.5% 甲酸和 2 mmol/mL 甲酸铵), 有机相为乙腈 (含 0.5% 甲酸和 2 mmol/mL 甲酸铵)。采用等度洗脱, 水相与有机相的体积比为 1:9, 流速为 0.5 mL/min, 进样体积为 10  $\mu$ L, 柱温为 40  $^{\circ}$ C, 自动进样器温度为 4  $^{\circ}$ C, 检测波长为 290 nm。

### 1.6 方法学验证

根据《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》(<https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfo?page?zdyzIdCODE=3e1a118fa1599529d3406fe6ee5821a5>), 该方法验证内容包括专属性、线性、准确度、精密度、定量下限、提取回收率及稳定性。

#### 1.6.1 专属性

分别取 SD 大鼠的空白生物基质、加入了尿酸的空白生物基质、正常大鼠血清, 按照“1.5.4”项下样品前处理方法, 考察方法的专属性, 以确认内源性物质在尿酸和 DHBA 的保留时间内有无干扰。

#### 1.6.2 标准曲线

按照“1.5.2”项下描述配制尿酸标准曲线样品工作溶液, 分别吸取 50  $\mu$ L 于 1.5 mL 离心管中, 氮吹仪挥干溶剂, 加入 50  $\mu$ L 空白生物基质, 混匀后按照“1.5.4”项下描述处理上述标准血清样本。以尿酸与内标 DHBA 的峰面积比为纵坐标, 以相应质量浓度为横坐标, 使用加权最小二乘法进行回归分析, 制作标准曲线。

#### 1.6.3 准确度和精密度

按照“1.5.2”项下描述配制尿酸质控样品工作溶液, 分别吸取 50  $\mu$ L 于 1.5 mL 离心管中, 氮吹仪挥干溶剂, 加入 50  $\mu$ L 空白生物基质, 混匀后按照“1.5.4”项下描述处理上述血清样本。为考察批内和批间差异, 3 个浓度均平行制备 5 份, 并连续测定 3 个分析批次。准确度用相对误差 (relative error, RE) 表示; 精密度用质控样品的批内和批间相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 表示。

### 1.6.4 定量下限

按照“1.5.2”项下描述配制质量浓度为10  $\mu\text{g/mL}$ 的尿酸工作液,吸取50  $\mu\text{L}$ 于1.5 mL离心管中,氮吹仪挥干溶剂,加入50  $\mu\text{L}$ 空白生物基质,混匀后按照“1.5.4”项下描述处理。平行制备5份,连续测定3个分析批次。

### 1.6.5 提取回收率

通过比较空白生物基质分别在提取前和提取后加入尿酸标准品的峰面积比,评价尿酸在3个质控浓度下的提取回收率,确定其结果的精密度和可重现性。

### 1.6.6 稳定性

按照“1.5.2”项下描述配制尿酸质控样品工作液,分别吸取50  $\mu\text{L}$ 于1.5 mL离心管中,氮吹仪挥干溶剂,加入50  $\mu\text{L}$ 空白生物基质,混匀。分别考察其在4  $^{\circ}\text{C}$ 自动进样器中放置25 h、-20  $^{\circ}\text{C}$ 条件冻融3次、室温放置4 h、-20  $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置1周、-80  $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置4周的稳定性,以确定生物样品的存放条件和时间。

## 1.7 试剂盒检测及3种方法比较

采用尿酸酶法和磷钨酸法两种市售试剂盒测定大鼠血清样本中尿酸含量,测定流程按照试剂盒说明书进行。尿酸酶法试剂盒检测出的尿酸浓度单位为 $\mu\text{mol/L}$ ,而磷钨酸法试剂盒与本研究建立的LC-UV方法测出的尿酸单位为 $\mu\text{g/mL}$ ,3种方法比较时将LC-UV方法与磷钨酸法所测的尿酸浓度单位统一换算为 $\mu\text{mol/L}$ 。

为验证LC-UV方法检测血清尿酸含量的准确性,比较了LC-UV检测方法和市售试剂盒(尿酸酶法和磷钨酸法)检测高尿酸血症组大鼠给药前与给药后1 h血清样品中的加样回收率。在已知浓度的大鼠血清中加入定量的对照品,按照LC-UV法、尿酸酶法与磷钨酸法的处理步骤分析,得到的结果与理论值的比值即为加样回收率。为避免超出两种试剂盒的检测限值,加样质量浓度分别设置为10  $\mu\text{g/mL}$ 和25  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 1.8 数据处理与统计方法

采用SPSS 23.0软件进行统计分析。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。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 方法学验证结果

#### 2.1.1 专属性

如图1A~B所示,尿酸和内标DHBA均具有良好

的峰形,并且分离效果好,其保留时间分别为6.45 min和13.45 min。空白生物基质在尿酸和DHBA的保留时间窗口中,内源性干扰低于定量下限响应的20%,不影响尿酸的测定(图1C~D)。对照组大鼠血清中尿酸保留时间与尿酸对照品溶液、空白生物基质中加入尿酸的保留时间相同,并且大鼠血清中无内源性物质干扰DHBA出峰(图1E~F)。

#### 2.1.2 标准曲线

以尿酸与内标DHBA的峰面积比为纵坐标,以相应质量浓度为横坐标,使用加权最小二乘法进行回归分析,权重系数为 $1/x^2$ 。所得线性方程为 $y=0.022x-0.021$ ,相关系数 $R>0.999$ 。标准曲线如图2所示。

#### 2.1.3 准确度、精密度和定量下限

如表1所示,尿酸在质控浓度的准确度(以RE表示)在-2.17%~2.21%,批内精密度(以RSD表示)在0.52%~1.95%,批间精密度(即RSD)在3.04%~4.90%。尿酸测定的定量下限质量浓度为10  $\mu\text{g/mL}$ 。尿酸在定量下限的准确度(以RE表示)为-1.99%,批内和批间的精密度(以RSD表示)分别为2.42%和5.07%。

#### 2.1.4 提取回收率和稳定性

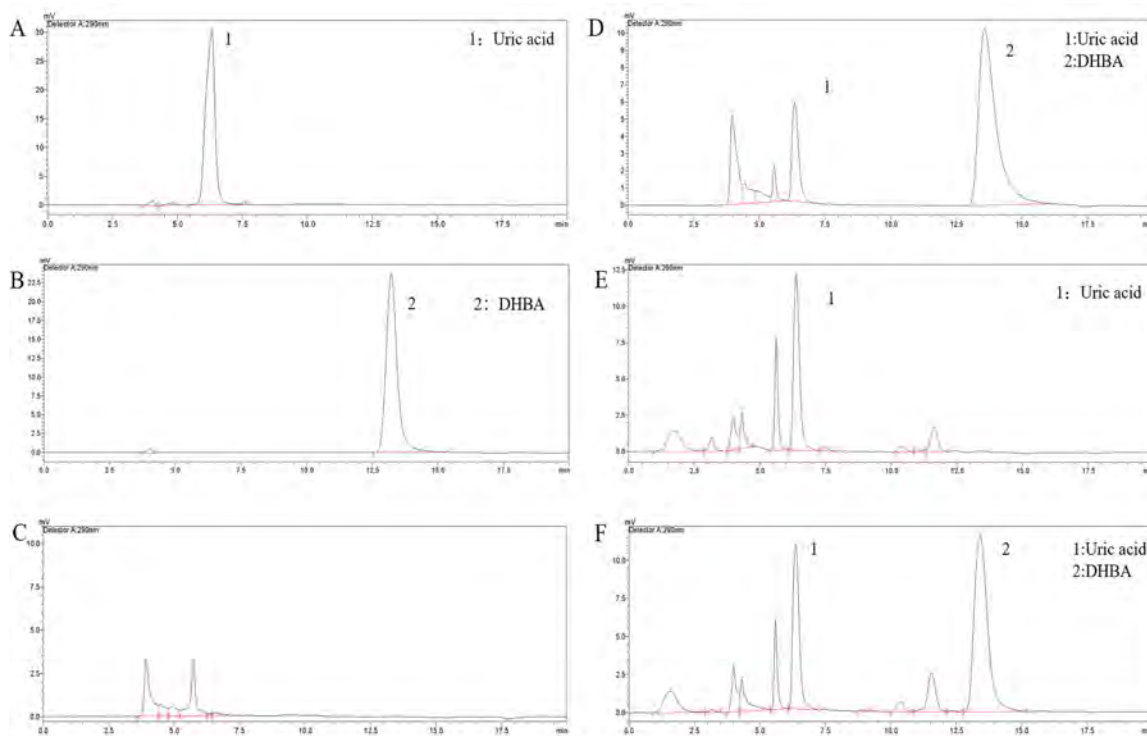
如表1所示,该方法在3个质控浓度的提取回收率在83.12%~89.91%,其精密度(以RSD表示)均小于15%。质控样品在稳定性验证所考察的各种条件下,RE均小于 $\pm 15\%$ 。

## 2.2 大鼠血清尿酸含量

如图3A所示,采用LC-UV法对比检测对照组和高尿酸血症组大鼠在给药前与给药后1 h的血清尿酸水平,可以看出给药前两组血清尿酸水平差异无统计学意义( $t=-1.314$ ,  $P=0.218$ ),但是给药1 h后高尿酸血症组血清尿酸水平显著高于对照组( $t=-5.514$ ,  $P<0.001$ ),同时也显著高于给药前( $t=-13.074$ ,  $P<0.001$ ),说明造模成功。

进一步比较高尿酸血症组大鼠在造模前和造模1 h后,不同检测方法测定血清尿酸含量的差异。如图3B所示,磷钨酸法试剂盒的检测值在0 h显著高于LC-UV法,差异具有统计学意义( $t=2.961$ ,  $P=0.010$ )。尿酸酶法试剂盒与LC-UV法的检测值在0 h差异无统计学意义( $t=-0.767$ ,  $P=0.455$ )。如图3C所示,造模1 h后,磷钨酸法试剂盒的检测值显著高于LC-UV法( $t=3.149$ ,  $P=0.007$ ),尿酸酶法试剂盒的检测值显著低于LC-UV法( $t=4.843$ ,  $P<0.001$ )。





注: A, 10  $\mu\text{g/mL}$  尿酸对照品溶液; B, 50  $\mu\text{g/mL}$  3, 4-二羟基苄胺氢溴酸盐 (DHBA) 对照品溶液; C, 空白生物基质; D, 定量下限样品; E, 对照组 (腹腔注射给予等量的 0.5% CMC-Na 溶液) 大鼠血清 (无内标); F, 对照组大鼠血清。

Note: A, 10  $\mu\text{g/mL}$  uric acid standard solution; B, 50  $\mu\text{g/mL}$  DHBA (3, 4-dihydroxybenzylamine hydrobromide) standard solution; C, Blank biomatrix; D, Lower limit of quantitation sample; E, Rat serum (without internal standard) in the control group (intraperitoneal injection of an equal amount of 0.5% CMC-Na solution); F, Rat serum in the control group.

图1 尿酸专属验证的色谱图

Figure 1 Chromatogram of uric acid specificity verification

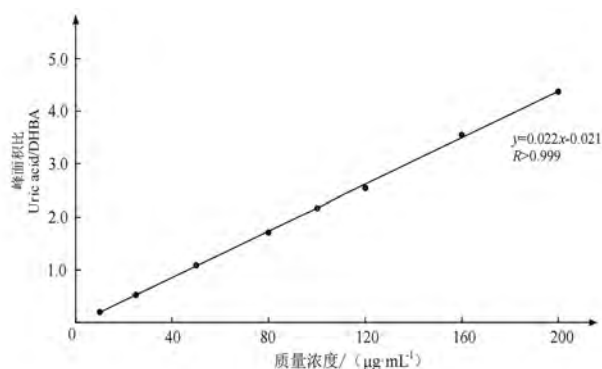


图2 尿酸的标准曲线图

Figure 2 Standard curve of uric acid

### 2.3 LC-UV 法与市售试剂盒检测的加样回收率比较

如表2所示, 磷钨酸法试剂盒的加样回收率在造模前后均偏高; 尿酸酶法试剂盒的加样回收率偏低, 并且在造模后加样质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  时加样回收率由 60.05% 降低至 27.37%, 加样质量浓度为 25  $\mu\text{g/mL}$

时加样回收率由 84.31% 降低至 43.55%。而 LC-UV 检测方法在造模前后的不同加样质量浓度组之间, 回收率均高于 95%, 说明 LC-UV 具有较好的测定准确度。

LC-UV 法、磷钨酸法、尿酸酶法这 3 种方法检测血清尿酸的原理、特点及局限性比较如表 3 所示。

## 3 讨论

目前, 尿酸的检测方法主要有试剂盒法与高效液相色谱法, 其中试剂盒的检测原理主要分为尿酸酶法和磷钨酸法。尿酸酶法的检测原理是尿酸在尿酸酶的作用下生成尿囊素、二氧化碳和过氧化氢, 过氧化氢进而与显色剂反应显色<sup>[15]</sup>。然而造模剂氧嗪酸钾是尿酸酶的抑制剂, 可能会抑制反应试剂中尿酸酶的活性, 导致检测结果偏低。磷钨酸法的检测原理是尿酸在碱性溶液中与磷钨酸反应生成尿囊素、二氧化碳以及钨蓝, 钨蓝的生成量与尿酸含量成正比, 可进行比色测定<sup>[16]</sup>。然而, 磷钨酸法特异性差, 易受其他还原性物

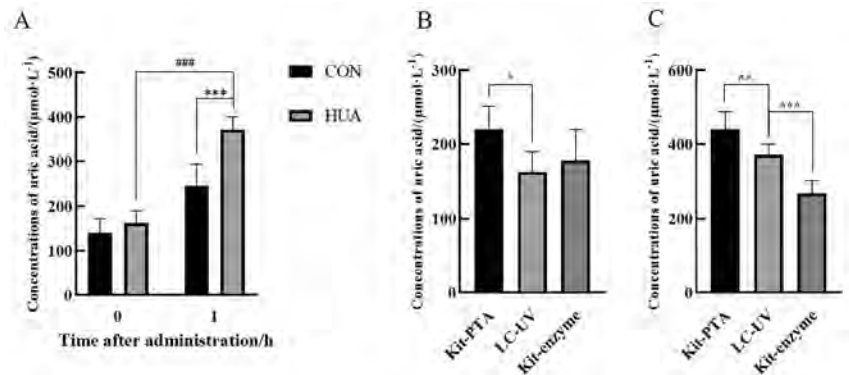
表1 尿酸检测的批内/批间准确度、精密度、提取回收率以及稳定性

Table 1 Intra- and inter-batch accuracy and precision, extraction recovery and stability test of uric acid determination

| 尿酸质量浓度<br>$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | 批内准确度和精密度                |      | 批间准确度和精密度                 |      | 提取回收率                              |      | 稳定性               |                  |                 |                     |                     |
|---------------------------------------------------|--------------------------|------|---------------------------|------|------------------------------------|------|-------------------|------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
|                                                   | Intra-A&P/%<br>( $n=5$ ) |      | Inter-A&P/%<br>( $n=15$ ) |      | Extraction recovery/%<br>( $n=5$ ) |      | Stability (RE)/%  |                  |                 |                     |                     |
|                                                   | RE                       | RSD  | RE                        | RSD  | $\bar{x} \pm s$                    | RSD  | 4 °C<br>( $n=5$ ) | FTC<br>( $n=5$ ) | RT<br>( $n=3$ ) | -20 °C<br>( $n=3$ ) | -80 °C<br>( $n=3$ ) |
| 10                                                | -1.99                    | 2.42 | -3.67                     | 5.07 |                                    |      |                   |                  |                 |                     |                     |
| 25                                                | -2.17                    | 1.95 | -3.68                     | 4.90 | 89.91±4.55                         | 5.06 | -3.12             | -2.19            | -11.47          | -1.09               | -9.51               |
| 100                                               | 0.74                     | 1.54 | 1.15                      | 3.04 | 84.42±1.61                         | 1.90 | -2.48             | -2.23            | -6.85           | -5.01               | -14.51              |
| 160                                               | 2.21                     | 0.52 | -0.56                     | 3.67 | 83.12±5.63                         | 6.77 | -5.46             | -4.57            | -8.41           | -6.74               | -12.76              |

注：A&P为准确度和精密度，用相对误差（RE）表示准确度，用质控样品的批内和批间相对标准偏差（RSD）表示精密度；FTC为冻融条件；RT为室温条件。

Note: A&P, accuracy and precision; RE, relative error; RSD, relative standard deviation; FTC, freeze-thaw cycles; RT, room temperature.



注：A，LC-UV法检测两组大鼠给药前和给药后1 h的血清尿酸浓度（CON，给予0.5%CMC-Na溶液的对照组；HUA，腹腔注射300 mg/kg氧嗪酸钾的高尿酸血症组。与CON组相比，\*\*\* $P<0.001$ ；与给药前相比，\*\*\* $P<0.001$ 。 $n=6$ ）。B～C，给药前和给药后1 h三种方法测定的血清尿酸浓度比较（LC-UV，液相色谱-紫外检测法；Kit-PTA，磷钨酸法试剂盒；Kit-enzyme，尿酸酶法试剂盒。与LC-UV法相比， $^{\wedge}P<0.05$ ， $^{\wedge\wedge}P<0.01$ ， $^{\wedge\wedge\wedge}P<0.001$ 。 $n=6$ ）。

Note: (A) LC-UV method was used to detect the serum uric acid concentration of rats in the two groups before and 1 h after administration (CON, control group administered 0.5% CMC-Na solution; HUA, hyperuricemia group administered 300 mg/kg potassium oxyzate). Compared with the CON group, \*\*\* $P<0.001$ ; Compared to before administration, \*\*\* $P<0.001$ .  $n=6$ ). (B-C) Serum uric acid concentration was measured using three methods before and 1 h after administration (LC-UV, liquid chromatography-ultraviolet; Kit-PTA, phosphotungstic acid method Kit; Kit-enzyme, uricase method Kit. Compared with LC-UV,  $^{\wedge}P<0.05$ ,  $^{\wedge\wedge}P<0.01$ ,  $^{\wedge\wedge\wedge}P<0.001$ .  $n=6$ ).

图3 给药前与给药后1 h大鼠血清尿酸含量

Figure 3 Determination of serum uric acid concentrations in rats before and 1 h after administration

表2 LC-UV法与市售试剂盒检测的加样回收率比较

Table 2 Comparison of the spiked recovery of LC-UV method and commercially available kits

| 取样时间/h<br>Time/h | 加样质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )<br>$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | 加样回收率/%<br>Recovery of spiked samples/% |                 |                    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------|--------------------|
|                  |                                                                                        |                                         |                 |                    |
|                  |                                                                                        | LC-UV                                   | 磷钨酸法<br>Kit-PTA | 尿酸酶法<br>Kit-enzyme |
| 0 <sup>a</sup>   | 10                                                                                     | 99.97±6.86                              | 118.83±21.22    | 60.05±11.2         |
|                  | 25                                                                                     | 95.90±4.54                              | 117.90±8.48     | 84.31±4.31         |
| 1 <sup>a</sup>   | 10                                                                                     | 98.18±3.23                              | 125.00±5.34     | 27.37±8.62         |
|                  | 25                                                                                     | 99.64±0.99                              | 112.96±3.85     | 43.55±5.38         |

注：LC-UV，液相色谱-紫外检测法；Kit-PTA，磷钨酸法试剂盒；Kit-enzyme，尿酸酶法试剂盒。a，LC-UV法测定HUA组给药前和给药后1 h血清尿酸质量浓度分别为21.21  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和50.71  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Note: LC-UV, liquid chromatography-ultraviolet detection; Kit-PTA, phosphotungstic acid method; Kit-enzyme, uricase method. a, The concentrations of uric acid in serum before and 1 h after administration were 21.21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 50.71  $\mu\text{g}/\text{mL}$  by LC-UV.

表3 LC-UV法与磷钨酸法、尿酸酶法检测血清尿酸含量的比较

Table 3 Comparison of liquid chromatography-ultraviolet (LC-UV) method with phosphotungstic acid method and uricase method for determining serum uric acid

| 检测方法<br>Method                      | 原理<br>Principle                             | 特点<br>Features           | 局限性<br>Limitations           |
|-------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| 磷钨酸法<br>Phosphotungstic acid method | 尿酸在碱性溶液中与磷钨酸反应,生成尿囊素、二氧化碳和钨蓝,钨蓝的生成量与尿酸含量成正比 | 操作简单,检测时间短,成本低,可用于自动化分析  | 特异性差,准确度低,检测结果易受血清中其他还原性物质影响 |
| 液相色谱-紫外检测法<br>LC-UV                 | 溶于流动相中的各组分经过固定相时,由于与固定相发生作用的大小不同,导致其保留时间不同  | 专属性强,准确度高,线性范围广,色谱柱可反复使用 | 成本较高、检测时间较长                  |
| 尿酸酶法<br>Uricase method              | 尿酸在尿酸酶的作用下生成尿囊素、二氧化碳和过氧化氢,过氧化氢与显色剂反应显色      | 操作简单,检测时间短,成本低,可用于自动化分析  | 尿酸酶的活性易被血清中氧嗪酸钾抑制,准确度低       |

质(如谷胱甘肽、抗坏血酸)的影响<sup>[12]</sup>。在反应过程中,还原物质会增加显色产物的含量,导致检测结果高于真实值。而在高效液相色谱法中,溶于流动相中的各组分经过固定相时,由于与固定相发生作用(吸附、分配、排阻、亲和)的大小、强弱不同,在固定相中滞留时间不同,从而能实现对待测组分的分离,因此,高效液相色谱具有专属性强、准确度高的特点。本研究中3种检测方法的加样回收率表明,在氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型中,尿酸酶法与磷钨酸法的准确度均低于LC-UV检测方法,因此在该模型中建议采用更准确、可靠的LC-UV分析方法来检测高尿酸血症大鼠模型的血清尿酸水平。

根据《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》中生物样品分析方法的基本要求,专属性考察结果表明LC-UV检测方法的专属性良好,标准曲线结果表明LC-UV检测方法所测尿酸在10~200 μg/mL范围内有良好的线性关系。上述指导原则中要求准确度的验收标准为RE在±15%内,精密度的验收标准为RSD小于

15%,定量下限的验收标准为RE在±20%内、RSD小于20%。本研究结果表明,LC-UV检测方法的质控浓度与定量下限准确度和精密度良好,符合样品分析要求;而且LC-UV检测方法的提取回收率稳定,质控样品在考察条件下稳定性良好,能够满足测定需求。因此,本研究建立的LC-UV法专属性、标准曲线、准确度、精密度、定量下限、提取回收率及稳定性的考察结果均符合方法学验证要求。

在已报告的尿酸LC-UV检测方法中,反相C18柱是最常用的色谱柱。由于尿酸极性大(尿酸结构式见图4A),使用常规的反相色谱柱保留时间短,为了延长尿酸保留时间需要使用高比例的水相,然而高比例水相会影响色谱柱的使用寿命。Zhao等<sup>[17]</sup>建立了一种LC-UV方法检测血浆与尿中的肌酐与尿酸,该方法使用了C18柱与高比例的水相作为流动相,尿酸的出峰时间仅在3 min左右,保留时间短,易被血清中的内源性物质干扰测定。Waters XBridge HILIC是未键合的亚乙基桥杂化颗粒色谱柱,HILIC是一种用来改善在反相色谱中保留较差的强极性物质保留行为的色谱技术,通过采用强极性固定相,并且结合高比例有机相/低比例水相组成的流动相来实现这一目的<sup>[18]</sup>。本研究采用HILIC柱与90%的有机相等度洗脱进行尿酸含量分析,对色谱柱的使用寿命没有损害,对尿酸有较好的保留。

在采用质谱为检测器的尿酸检测方法中,同位素内标是最常用也是最为理想的<sup>[19]</sup>,但由于分离能力有限,同位素内标并不适用于LC-UV检测。在部分已发表的文献中并未选用合适的内标用于尿酸含量的LC-UV测定<sup>[17,20]</sup>。本研究在方法摸索过程中筛选了尿酸

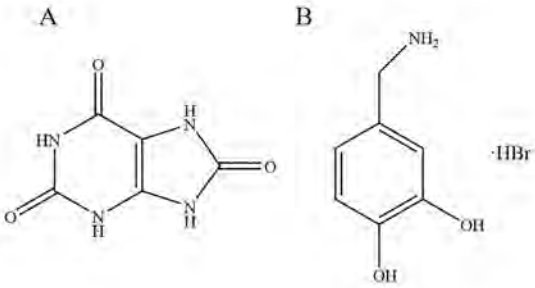


图4 尿酸(A)与DHBA(B)的结构式

Figure 4 Structures of uric acid (A) and 3,4-dihydroxybenzylamine hydrobromide (DHBA) (B)



的结构类似物5-氟尿嘧啶、DHBA等,其中DHBA与尿酸的结构存在部分相似(DHBA与尿酸的结构式见图4),均具有芳香环结构,能够与尿酸实现很好的分离,并且其出峰稳定,响应良好,无内源性物质干扰。因此,本研究选择DHBA作为血清尿酸含量测定的内标,为尿酸LC-UV检测方法的建立提供了参考。

另外,尿酸作为维持人体健康的内源性生物活性分子,在LC-UV测定中常缺乏真实的空白生物基质来制备标准曲线。Wen等<sup>[15]</sup>采用LC-UV法检测血清中尿酸含量,并与常规的尿酸检测方法(尿酸酶法和磷钨酸法)进行了对比,但该方法未使用空白生物基质,基质中存在的内源性干扰对测定的影响不明。本研究选择了活性炭处理过的血清作为空白基质,结果证实其在尿酸和内标的保留时间窗口中无明显内源性干扰,不影响尿酸的测定。

综上所述,本研究建立的LC-UV法与之前已报告的LC-UV法相比,主要有如下优势:(1)本方法选用了HILIC柱与高比例有机相洗脱进行尿酸含量分析,不仅对色谱柱的使用寿命没有损害,而且对尿酸有较好的保留;(2)本方法为尿酸的LC-UV检测选择了一个合适的内标,使用内标法定量更加准确;(3)本方法选择了活性炭处理过的血清作为尿酸含量测定的空白生物基质,检测结果更加准确。与此同时,本方法也存在一些不足:(1)HILIC色谱柱需要较长的平衡时间才能有稳定的基线和色谱峰保留<sup>[21]</sup>,导致每批分析时间较长,有待进一步优化;(2)本方法目前仅用于动物模型中尿酸的检测,是否适用于人类血尿酸含量的测定尚需进一步验证。

本研究表明,在氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型中,尿酸酶法与磷钨酸法的准确度均低于LC-UV法,本研究所建立的LC-UV法能够更加准确、可靠地测定氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症模型大鼠的血清尿酸含量。

#### [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中国药科大学伦理委员会批准(审批号:2021-09-025)。所有实验过程均遵照中国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 Ethics Committee of China Pharmaceutical University (Approval Letter No. 2021-09-025). All experimental protocols followed the guidelines of experimental animal-related laws and regulations.

#### [作者贡献 Author Contribution]

夏子茵参与课题设计、实验操作、数据收集整理、统计分析、文章撰写及修改;  
柴媛媛负责课题设计与论文修改;  
徐云霞、俞沁玮参与实验操作、数据收集;  
黄鑫进行实验指导;  
张陆勇、江振洲负责课题策划、实验指导,以及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] 孙琳,王桂侠,郭蔚莹.高尿酸血症研究进展[J].中国老年学杂志,2017,37(4):1034-1038. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.04.112.  
SUN L, WANG G X, GUO W Y. Research progress of hyperuricemia[J]. Chin J Gerontol, 2017, 37(4):1034-1038. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.04.112.
- [2] FATHALLAH-SHAYKH S A, CRAMER M T. Uric acid and the kidney[J]. Pediatr Nephrol, 2014, 29(6):999-1008. DOI: 10.1007/s00467-013-2549-x.
- [3] XU C F, YU C H, XU L, et al. High serum uric acid increases the risk for nonalcoholic fatty liver disease: a prospective observational study[J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11578. DOI: 10.1371/journal.pone.0011578.
- [4] LIU J, XU C F, YING L M, et al. Relationship of serum uric acid level with non-alcoholic fatty liver disease and its inflammation progression in non-obese adults[J]. Hepatol Res, 2017, 47(3): E104-E112. DOI: 10.1111/hepr.12734.
- [5] PERTICONE M, TRIPEPI G, MAIO R, et al. Risk reclassification ability of uric acid for cardiovascular outcomes in essential hypertension[J]. Int J Cardiol, 2017, 243:473-478. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.05.051.
- [6] PRASAD M, MATTESON E L, HERRMANN J, et al. Uric acid is associated with inflammation, coronary microvascular dysfunction, and adverse outcomes in postmenopausal women[J]. Hypertension, 2017, 69(2): 236-242. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08436.
- [7] KUBOTA Y, MCADAMS-DEMARCO M, FOLSOM A R. Serum uric acid, gout, and venous thromboembolism: the atherosclerosis risk in communities study[J]. Thromb Res, 2016, 144:144-148. DOI: 10.1016/j.thromres.2016.06.020.
- [8] KANBAY M, JENSEN T, SOLAK Y, et al. Uric acid in metabolic syndrome: from an innocent bystander to a central player[J]. Eur J Intern Med, 2016, 29:3-8. DOI: 10.1016/j.ejim.2015.11.026.
- [9] SHARAF EL DIN U A A, SALEM M M, ABDULAZIM D O. Uric acid in the pathogenesis of metabolic, renal, and cardiovascular diseases: a review[J]. J Adv Res, 2017, 8(5):537-548. DOI: 10.1016/j.jare.2016.11.004.
- [10] BORGHI C, AGABITI-ROSEI E, JOHNSON R J, et al. Hyperuricaemia and gout in cardiovascular, metabolic and kidney disease[J]. Eur J Intern Med, 2020, 80:1-11. DOI: 10.1016/j.ejim.2020.07.006.
- [11] 周子正,徐琳,高建东.高尿酸血症动物模型研究进展[J].医学综

- 述, 2020, 26(8): 1462-1466. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2020.08.002.
- ZHOU Z Z, XU L, GAO J D. Research progress of hyperuricemia animal model[J]. Med Recapitul, 2020, 26(8): 1462-1466. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2020.08.002.
- [12] 王璟. 检测血尿酸的方法比较及进展[J]. 糖尿病临床, 2014, 8(8): 362-363. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7851.2014.08.005.
- WANG J. Comparison and progress of methods for detecting serum uric acid[J]. Clin J Diabetes World, 2014, 8(8): 362-363. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7851.2014.08.005.
- [13] WANG Q W, WEN X, KONG J M. Recent progress on uric acid detection: a review[J]. Crit Rev Anal Chem, 2020, 50(4): 359-375. DOI: 10.1080/10408347.2019.1637711.
- [14] GUMUSTAS M, KURBANOGU S, USLU B, et al. UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters[J]. Chromatographia, 2013, 76(21): 1365-1427. DOI: 10.1007/s10337-013-2477-8.
- [15] WEN S S, ZHANG Z X, CHEN X P, et al. An improved UPLC method for determining uric acid in rat serum and comparison study with commercial colorimetric kits[J]. Acta Chromatogr, 2019, 31(3): 201-205. DOI: 10.1556/1326.2018.00449.
- [16] 江民川, 赵阳, 马芳芳, 等. 尿酸检测方法的研究进展[J]. 化工科技, 2021, 29(3): 75-79. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0511.2021.03.014
- JIANG M C, ZHAO Y, MA F F, et al. Research progress on uric acid detection methods[J]. Sci Technol Chem Ind, 2021, 29(3): 75-79. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0511.2021.03.014.
- [17] ZHAO J X. A simple, rapid and reliable high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of creatinine and uric acid in plasma and urine [J]. Anal Methods, 2013, 5(23): 6781-6787. DOI: 10.1039/C3AY41061G.
- [18] BUSZEWSKI B, NOGA S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) —a powerful separation technique [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402(1): 231-247. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5.
- [19] 张海晨, 李水军, 孙贺伟, 等. 液相色谱 - 串联质谱法测定尿酸及与常规检测方法的比较[J]. 检验医学, 2015, 30(5): 422-426. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2015.05.004.
- ZHANG H C, LI S J, SUN H W, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for uric acid and its comparison with clinical routine determination method[J]. Lab Med, 2015, 30(5): 422-426. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2015.05.004.
- [20] 刘旭圆, 商倩, 李川, 等. HPLC 法用于小鼠高尿酸模型中血尿酸测定及相关药物评价[J]. 药物评价研究, 2017, 40(3): 319-323. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.03.006.
- LIU X Y, SHANG Q, LI C, et al. HPLC method for determination of uric acid in plasma of hyperuricemia model mice[J]. Drug Eval Res, 2017, 40(3): 319-323. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.03.006.
- [21] MCCALLEY D V. Managing the column equilibration time in hydrophilic interaction chromatography[J]. J Chromatogr A, 2020, 1612: 460655. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460655.
- (收稿日期: 2022-12-14 修回日期: 2023-04-13 )  
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 崔占鼎)
- 【引用本文】**  
夏子茵, 柴媛媛, 徐云霞, 等. 大鼠血清尿酸液相色谱-紫外检测新方法的建立及比较研究[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 315-323. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.189.
- XIA Z Y, CHAI Y Y, XU Y X, et al. Quantification of uric acid of rat serum by liquid chromatography-ultraviolet detection and its comparison study[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3): 314-322. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.189.

\*\*\*\*\*

## 《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专业性学术期刊, 执行严格的同行评议和二审三校制度。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。从 2021 年 4 月起, 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、电话, 以及开放研究者与贡献者身份识别码 (open researcher and contributor ID, ORCID) 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, 并在文末列出本文涉及的医学伦理声明。

4. 填写作者贡献及利益冲突声明表, 并在文末列出所有署名作者的贡献情况及利益声明。

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, 并在首页注明基金名称、受资助项目名称及编号。

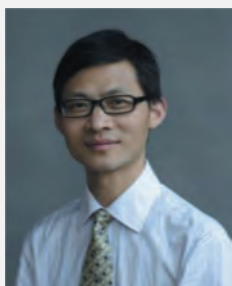
以上 2 ~ 5 材料均请打包后, 作为附件上传至本刊投稿系统。若材料或信息不齐、造假, 编辑部将直接退稿。

详情可见本刊官网首页的“期刊政策”-“投稿指南”和“投稿必看”-“稿件要求细则”。相关模板可至“投稿必看”-“附件模板下载”获取。

《实验动物与比较医学》编辑部



**庞万勇**, 兽医学博士, 中国实验动物学会认证的实验动物高级医师, 美国实验动物医学会认证的实验动物专科兽医师 (DACLAM), 以及中国兽医病理学家分会认证的兽医病理师。中国实验动物学会常务理事、实验动物医师工作委员会主任委员、实验动物福利伦理专业委员会秘书长, 中国合格评定国家认可委员会 (CNAS) 实验动物专业委员会委员, 中华医学会医师培训工程——中华医学人文培训工程专家委员会委员, 国际AAALAC认可委员会委员, 世界兽医协会 (WVA) 理事 (代表实验动物专科兽医师)。本科和硕士毕业于中国农业大学动物医学院, 博士毕业于爱尔兰国立都柏林大学兽医学院, 曾在丹麦哥本哈根大学从事实验动物医学博士后研究。现任赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台总监, 负责该公司在全球范围内动物实验外包和合作业务的动物福利合规事务, 并协调该公司在中国的临床申报项目中的临床前研究部分。发表文章36篇, 其中SCI文章20篇。



**陈国元**, 生物化学与分子生物学博士, 高级工程师, 硕士研究生导师。上海市实验动物学会常务理事兼副秘书长, 上海市实验动物学会教育培训与科普专委会副主任委员, 《实验动物与比较医学》杂志编委。本科毕业于浙江大学, 硕士、博士毕业于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 美国国立卫生研究院 (NIH) 心肺血研究所转基因中心访问学者, 入选中国科学院特聘研究骨干岗位。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副主任, 负责实验动物设施运行和实验动物模型研究。在 *Gastroenterology*、*BBRC*、*Clinical Cancer Research*、《实验动物与比较医学》、《实验动物科学》等杂志发表论文10多篇, 获得中国和欧美专利4项, 参编专著《实验动物医学管理》等。



**卢晓**, 兽医药理学博士, 农业农村部注册兽医师。上海市实验动物学会理事, 中国实验动物学会实验动物医师认证工作委员会委员, 中国毒理学会认证毒理学家, 美国实验动物学会注册实验动物医师 (R.LATG), 国际AAALAC认可委员会委员。目前就职于迪哲医药有限公司, 担任实验室运营总监, 负责公司实验室以及动物设施的日常管理、动物实验以及职业健康管理工作。

**白玉**, 兽医学博士, 农业农村部注册兽医师, 中国兽医病理学家分会认证兽医病理师。中国畜牧兽医学会兽医病理学分会理事, 北京实验动物行业协会理事, 北京实验动物学会理事, 中国实验动物学会实验病理学专业委员会委员, 国际AAALAC认可委员会委员, 中国合格评定国家认可委员会 (CNAS) 评审专家。本科、硕士、博士均毕业于中国农业大学动物医学院, 并作为联合培养博士生在美国马里兰大学动物医学院完成其博士阶段研究。现任诺和诺德中国研究发展中心运营及动物设施部总监, 负责研发中心实验室管理 [包括环境、健康和安全管理 (EHS)], 设施运行, 项目管理及欧盟标准动物设施的运营管理, 保证并维持诺和诺德中国研究发展中心平稳运行以及诺和诺德全球动物管理与福利标准。在 *PNAS*、*Nature Biotechnology*、《实验动物与比较医学》和《实验动物科学》等杂志上发表文章20余篇, 参与编译相关专业著作10余部。



## 《动物研究:体内实验报告》即ARRIVE 2.0指南的解释和阐述(二)

陈国元<sup>1</sup>, 卢晓<sup>2</sup>, 白玉<sup>3</sup>, 于灵芝<sup>4</sup>, 乔颖<sup>3</sup>, 王剑<sup>5</sup>, 卢今<sup>5</sup>, 刘晓宇<sup>6</sup>, 卢选成<sup>7</sup>, 高静<sup>8</sup>, 李焱<sup>5</sup>, 庞万勇<sup>9</sup>

(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. 迪哲医药股份有限公司, 上海 201203; 3. 北京诺和诺德医药科技有限公司, 北京 102206; 4. 上海实验动物研究中心, 上海 201203; 5. 上海交通大学

**[第一作者]** 陈国元(1977—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 实验动物模型。E-mail: chenguoy@sibcb.ac.cn

卢晓(1981—), 男, 博士, 研究方向: 实验动物医学。E-mail: Frank.Lu@dizalharma.com. ORCID: 0000-0003-2236-027X

白玉(1981—), 女, 博士, 研究方向: 实验动物医学。E-mail: caubaiyu@hotmail.com

\*对本文贡献相等。

**[通信作者]** 庞万勇(1974—), 男, 博士, 研究方向: 实验动物医学。E-mail: panglyong@outlook.com. ORCID: 0000-0002-0724-2016



医学院实验动物科学部, 上海 200025; 6. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050; 7. 中国疾病预防控制中心, 北京 102206; 8. 上海交通大学医学院临床研究中心, 上海 200025; 9. 赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台, 北京 100022)

**[摘要]** 提高生物医学研究结果的可重复性是一项重大挑战, 研究人员透明且准确地报告其研究过程有利于读者评估该研究结果的可靠性, 进而重复该实验或在该成果的基础上进一步探索。ARRIVE 2.0 指南是英国国家 3Rs 中心 (NC3Rs) 于 2019 年组织发布的一份适用于任何与活体动物研究报告相关的指导性清单, 用以提高动物体内实验设计、实验实施和实验报告的规范性, 以及动物实验结果的可靠性、可重复性和临床转化率。ARRIVE 2.0 指南的使用不仅可以丰富动物实验研究报告的细节, 确保动物实验结果信息被充分评估和利用, 还可以使读者准确且清晰地了解作者所表述的内容, 促进基础研究评审过程的透明化和完整性。目前, ARRIVE 2.0 指南已经被国际生物医学期刊广泛采纳。本文是在国际期刊遵循 ARRIVE 2.0 指南的最佳实践基础上, 对 2020 年发表于 *PLoS Biology* 期刊上的 ARRIVE 2.0 指南完整解读版 (原文请见 <https://arriveguidelines.org>) 进行中文编译 (第二部分包括“关键 10 条”里的第 4~7 条: “随机化”、“盲法”、“结果测量”和“统计方法”等部分), 以期促进国内研究人员充分理解并使用 ARRIVE 2.0 指南, 提高实验动物研究及报告的规范性, 助推我国实验动物科技与比较医学研究的高质量发展。

**[关键词]** 动物实验; ARRIVE 2.0 指南; ARRIVE 关键 10 条; 随机化; 盲法; 结果测量;

统计方法

**[中图分类号]** R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0323-09



## Explanation and Elaboration of the ARRIVE Guidelines 2.0—Reporting Animal Research and *In Vivo* Experiments ( II )

CHEN Guoyuan<sup>1\*</sup>, LU Xiao<sup>2\*</sup>, BAI Yu<sup>3\*</sup>, YU Lingzhi<sup>4</sup>, QIAO Ying<sup>3</sup>, WANG Jian<sup>5</sup>, LU Jin<sup>5</sup>, LIU Xiaoyu<sup>6</sup>, LU Xuancheng<sup>7</sup>, GAO Jing<sup>8</sup>, LI Yao<sup>5</sup>, PANG Wanyong<sup>9</sup>

(1. Animal Core Facility, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China; 2. Dizal Pharmaceuticals Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 3. Novo Nordisk Research Centre China, Beijing 102206, China; 4. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China; 5. Department of Laboratory Animal Science, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 6. National Institute for Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China; 7. Laboratory Animal Center, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 8. Clinical Research Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 9. Translational *In Vivo* Model Research Platform, Sanofi G&D, Beijing 100022, China)

Correspondence to: PANG Wanyong (ORCID: 0000-0002-0724-2016), E-mail: pang1yong@outlook.com

**[ABSTRACT]** Improving the reproducibility of biomedical research results remains a major challenge. Transparent and accurate reporting of progress can help readers evaluate the reliability of research results and further explore an experiment by repeating or building upon its findings. The ARRIVE 2.0 guidelines, released in 2019 by the UK National Centre for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research (NC3Rs), provide a checklist applicable to any *in vivo* animal research report. These guidelines aim to improve the standardization of experimental design, implementation, and reporting, as well as the reliability, repeatability, and clinical translatability of animal experimental results. The use of the ARRIVE 2.0 guidelines not only enriches the details of animal experimental research reports, ensuring that information on animal experimental results is fully evaluated and utilized, but also enables readers to understand the content expressed by the author accurately and clearly, promoting the transparency and integrity of the fundamental research review process. At present, the ARRIVE 2.0 guidelines have been widely adopted by international biomedical journals. This article is the second part of the Chinese translation of the complete interpretation of the ARRIVE 2.0 guidelines published in *PLoS Biology* in 2020 (original text can be found at <https://arriveguidelines.org>) and based on the best practices for following the ARRIVE 2.0 guidelines in international journals. This part includes Items 4-7 of "ARRIVE Essential 10" in the ARRIVE 2.0 guidelines:

"Randomization", "Blinding", "Outcome Measurement", and "Statistical Methods". Our Chinese translated version aims to promote the full understanding and use of the ARRIVE 2.0 guidelines by domestic researchers, enhancing the standardization of experimental animal research and reporting, and promoting the high-quality development of experimental animal technology and comparative medicine research in China.

**[Key words] Animal experiment; ARRIVE 2.0 guidelines; ARRIVE Essential 10; Randomization; Blinding; Outcome measurement; Statistical methods**

*PLoS Biology* 期刊于2020年发表了ARRIVE 2.0指南完整解读版(原文请见<https://arriveguidelines.org>)。该解读版是一份适用于任何与活体动物研究报告相关的,用以指导实验设计、实验实施、实验报告等整个动物实验研究过程规范性的内容清单和详解说明。《实验动物与比较医学》于2023年第43卷第2期发表了《〈动物研究:体内实验报告〉即ARRIVE 2.0指南的解释和阐述(一)》一文,基于国际期刊遵循ARRIVE 2.0指南的最佳实践,对该指南解读版原文前言和“关键10条”里的条目1~3进行了中文编译。本文将继续对“关键10条”里的条目4~7,包括“随机化”、“盲法”、“结果测量”和“统计方法”等部分进行相应编译介绍,以期促进国内研究人员充分理解并使用ARRIVE 2.0指南,提高动物实验研究及报告的规范性。

## 1.4 条目4: 随机化

1.4.1 子条目4a: 说明是否采取随机化方法将实验单元分配给对照组和实验组。如已随机化分配,需提供产生随机化序列的方法

**详解:** 在进行分组时,使用适当的随机化分配方法能够确保各实验单元接受到特定处理的机会相同,且使每组实验单元的数量均衡。仅仅从笼盒里“随机”(即随意或任意)选择一只动物,不是真正统计学意义上的随机,因为它涉及人为判断。这种做法会带来偏倚并影响实验结果,原因在于研究人员进行动物分组时可能会有意或无意地做出一些主观判断,也可能由于不同实验组间的实验条件或动物本身就存在一些未知和不可控的差异。所以,使用经过验证的随机化方法有助于将选择性偏倚最小化,并减少分配到各组的动物在特征上存在系统化差异<sup>[62-64]</sup>。由于非随机性分组得到的统计推断是无效的<sup>[65-66]</sup>,因此对于旨在检验假设的任何实验,随机化都是先决条件。适当的随机化方法有多种,包括可以使用在线随机数生成器(例

如<https://www.graphpad.com/quickcalcs/randomize1/>),或使用Excel、Google Sheets、LibreOffice等电子表格软件中诸如“Rand()”这样的函数。实验设计助手(Experimental Design Assistant, EDA)系统也具有随机化和分配隐藏的专用功能<sup>[19]</sup>。

已有系统综述表明,动物实验如没有报告随机化或其他可减少偏倚的措施(例如盲法),更有报告夸大效应的可能,且这些效应符合传统的统计学显著性<sup>[67-69]</sup>。在实验的全部或部分不能适用盲法的情况下,使用随机化就显得尤为重要。即使采用了随机化方法,研究人员的偏好也可能会扭曲分配情况,这种情况可使用分配隐藏来避免(见条目5:盲法)。在样本量较小的研究中,简单的随机化可能会导致组间不平衡;这时鼓励研究人员采用一些随机化的策略来进行平衡,如配对随机化<sup>[70-72]</sup>和区组化<sup>[17]</sup>。准确报告动物或实验单元分配至各组的方法,可使读者能够评估结果的可靠性,并识别潜在的局限性。

应报告使用的随机化类型(简单随机化、分层随机化、随机完全区组等),用于生成随机化序列的方法(例如计算机生成的随机化序列,以及所使用的算法或程序的详细信息),以及随机化的内容(例如对实验单元的处理,每只动物的处理顺序)。如果采用的随机化类型因实验而异,应报告每个实验的具体信息。如果将实验单元分配至各组时未采取随机化的方法,应明确说明并解释如何产生用来进行比较的各个实验组。

随机化策略的考量因素:(1)简单随机化。不考虑任何其他变量,将所有动物/样本同时随机分配到各实验组。这种策略很少使用,因为它不能确保其他可能影响实验结果的变量在比较组间是均衡的。(2)区组随机化。区组化法是一种控制实验单元之间自然变异的方法。该方法将一个实验分成更小的子实验(区组),并在每个区组内将实验处理随机分配给实验单元<sup>[17,66,73]</sup>。这样就考虑到了可能使结果产生偏倚的干扰变量(例如笼盒位置、操作日期或周数)。分层随机

化采用与区组随机化相同的原理,只是分层往往是基于可能与反应相关的动物特征(例如体重等级或肿瘤大小等级)。与区组随机化相比,分层随机化在实际应用时可能出现一些差异(例如,在每个体重等级中可能不具有相等数量的实验单元)。(3)其他随机化策略。最小化是一种将动物/样本分配给实验组的替代策略,用来平衡可能影响实验结果的变量。在最小化的情况下,分配给下一只动物/样本的实验操作取决于已经被分配的那些动物/样本的特征。其目的在于每次分配都应尽量减少多个因素之间的不平衡<sup>[74]</sup>。这种方法适用于连续性干扰变量,例如体重或起始肿瘤体积。

随机化策略中可考虑的干扰变量示例:(1)实验时间或日期;(2)窝、笼、鱼缸;(3)研究人员或手术人员(实施实验处理、进行手术或评估结果的人员,其经验和水平的不同会导致动物的应激水平或麻醉持续时间不同);(4)设备(例如PCR仪、分光光度计等,其校准可能会有所不同);(5)研究参数的测量(例如初始肿瘤体积);(6)动物特征(如性别、年龄范围、体重范围);(7)位置(在不同高度或不同笼架上的笼盒,其光照、通风和受到的干扰情况有所不同,这些可能会影响动物的重要生理过程)。

如果在随机化时使用了区组化因素,那么区组化因素也应该包括在分析中。干扰变量增加了样本的变异性,从而降低了统计效力。在分析中纳入一个干扰变量作为区组化因素,既可以解释这种变异性,也能增加统计的效力,从而可提高利用更少的实验单元检测真实效果的能力。但是,如果干扰变量对变异性没有实质性影响,区组化会耗损自由度,并因此降低效力。

**报告示例1:**“50只12周龄的SD大鼠,体重320~360 g,购自广东省医学实验动物中心(中国广州)。大鼠随机分为2组(25只/组):完整组和去势组。动物分组的随机数由微软Excel的Rand()函数生成”<sup>[75]</sup>。

**报告示例2:**“初始慢性缺血/再灌注损伤后存活的动物进行随机分组。分组采用基于计算机的随机数字生成器”<sup>[76]</sup>。

**报告示例3:**“在每个研究所,定期收集年龄匹配、具有相同遗传背景的野生型小鼠的两种性别的表型数据。每个管线、每种性别生成至少7只纯合子小鼠的队列……。小鼠随机分配到实验组(野生型与基因敲除型)是由孟德尔遗传法则驱动”<sup>[29]</sup>。

**1.4.2子条目4b:**描述用于将潜在混杂因素最小化的策略,如处理和测量的顺序,或者动物/笼具的位置等。如果没有控制混杂因素,则需明确声明

**详解:**确保不同组动物之间除了实验操作外没有系统性差异,这是整个实验过程的一个重要原则。在实验设计和分析中,识别干扰变量(可能对结果产生潜在偏倚的变异源或条件)并对其进行处理,可以提高实验的灵敏度。例如,笼架顶部笼盒里的啮齿类动物可能会暴露在更高的光照水平下,这会影响动物的应激反应<sup>[77]</sup>。

为了最大程度地减少实验过程中处理组之间出现的潜在差异,报告所实施的策略可以使他人能够评估实验的内部有效性。可报告的策略包括标准化(保持条件相同,例如由同一手术人员进行所有手术)、随机化(例如采样或测量顺序)、区组化或均衡化(例如动物笼或动物箱在架子上的位置)等,以确保各实验组受变异源的影响大致相同。在某些情况下,由于实际条件的限制,一些干扰变量的随机化受到阻碍,但它们仍然可以在分析中加以描述(见条目7:统计方法)。

在说明动物分组的方法时,应同时报告最小化混杂因素的方法。如果没有采取任何措施来最大限度地减少混杂因素(例如实验处理顺序、测量顺序、动物笼盒或动物箱在架子上的位置),请明确说明并解释原因。

**报告示例1:**“随机分组按照如下方法进行。从El-Nile公司抵达后,动物被指定组别并称其体重。一共有32只动物,分成4个不同体重组(每组8只动物)。各体重组别内的每一动物都被赋予一个临时随机数。根据笼盒在笼架上的位置,每个笼盒也被赋予一个数字编号。从每组所有的笼盒中随机选择一笼。从每个体重组中取2只动物,并在笼盒中给予它们永久的数字编号。然后,将笼盒随机分配至实验(暴露)组”<sup>[78]</sup>。

**报告示例2:**“……测试时间为每天上午8:30至中午12:30,每天测试顺序随机。每只动物在每个测试日的不同时间被测试”<sup>[79]</sup>。

**报告示例3:**“所有公牛按照体重分为4组,每组905只,每组内的公牛体重相似。按照完全随机区组设计,每组中的公牛被随机分配到4种实验处理中的一种,即每种实验处理905只公牛。动物被分配到20个围栏中(每个围栏181只,每种实验处理5个围栏)”<sup>[80]</sup>。



## 1.5 条目5: 盲法

### 1.5.1 描述谁会在实验的不同阶段（动物分配、实验实施、结果评估、数据分析）知晓分组情况

**详解:** 研究人员通常期望特定的实验结果, 这可能会导致在无意中影响实验, 或以这种方式来解释数据以支持自己的研究假设<sup>[81]</sup>。盲法就是一种用来尽量减少这些主观偏倚的策略。

尽管在直接比较盲法与非盲法评估结果的临床文献中, 有重要证据表明盲法的影响<sup>[82]</sup>, 但在动物研究中关于盲法影响的经验证据还比较有限<sup>[83-84]</sup>。不过有来自系统综述的令人信服的数据表明, 非盲法结果评估会导致处理效果被高估, 而且缺乏随机化和盲法等减少偏倚的措施会使得效应量被夸大 30%~45%<sup>[67-68, 85]</sup>。

理想情况下, 从实验开始到数据分析结束, 研究人员不应知晓动物已经或将要接受的处理。如果不能在实验的每个阶段都做到, 那么应该至少在其中某些阶段实施盲法。这对实验的组织会有一些影响, 可能需要额外人员的帮助, 例如手术人员的介入、技术员为动物用注射器进行编码、同事为实验组编码以进行分析等等。另外, 有在线资源可用于实施分配隐藏和盲法<sup>[19]</sup>。

实验不同阶段的盲法包括: (1) 分配时。分配隐藏是指在动物分组完成之前, 不告知实施分组的人员将要分配给每只动物的实验处理。结合随机化, 分配隐藏有助于最大程度地减少选择性偏倚, 因为这种偏倚可能会在实验组间引入系统性差异。(2) 实验实施过程中。如果可能, 动物护理人员和进行实验处理的人员应不知晓分组情况, 以确保所有动物以相同的方式被看护、监测和处理。依据动物所接受的实验处理的不同而区别对待, 可能会改变动物的行为和生理并产生混杂。出于福利或安全原因, 有时不宜对动物护理人员使用盲法, 但在大多数情况下, 盲法是可行的。例如, 如果使用了有害微生物, 对照组动物可被视为和受感染的动物一样危险。如果某一福利问题出现于接受处理的动物时可短期容忍, 但出现于对照动物时不可接受, 就需要进行利弊分析, 以决定是否应该使用盲法。(3) 结果评估时。收集实验测量结果或进行评估的人员不应知道样本/动物接受了哪些处理, 以及哪些样本/动物被分组在一起。在结果评估过程中, 盲法尤为重要, 特别是在有主观因素的情况下(例如, 在评估行为变化或组织学切片阅片时)<sup>[83]</sup>。随机化测

试顺序也可以减少偏倚。如果无法对结果评估人员隐藏分组情况(例如组间具有明显的表型或行为差异), 可将数据发送给第三方进行分析。第三方须对实验没有既得利益, 且不知道实验处理的预期是会改善还是恶化结果。通过以上这种方法可以减轻部分但不是全部的偏倚来源。(4) 数据分析时。数据分析人员应知晓哪些数据被分在一组, 以便进行分组比较, 但不应知晓每组接受了哪种特定的实验处理。这种盲法类型很重要, 但通常被忽视, 因为分析人员会做出许多半主观性决策, 例如将测量结果进行数据转换、选择处理缺失数据的方法以及处理异常值。如何做出这些决策也应该事前确定。

也可以在分析之前对数据进行编码处理, 从而在分析完成之前无法识别实验处理组。应具体说明实验过程的每个步骤或阶段是否使用了盲法, 并说明研究人员知晓或不知晓哪些特定实验处理或条件。如果在任何实验阶段中都没有使用盲法, 应明确说明这一点, 并给出不能或不考虑盲法的原因。

**报告示例1:** “对于每只动物, 有4名不同研究人员的参与, 情况如下: 第一名研究人员根据随机化表进行操作。该研究者是唯一知道实验处理组分配的人。第二名研究人员负责麻醉程序。第三名研究人员负责手术程序。最后, 由不知道分组和实验处理情况的前四名研究者来测量和评估实验结果”<sup>[46]</sup>。

**报告示例2:** “……由于给药后会出现明显的行为性癫痫活动, 无法对实验者隐藏动物被注射的是毛果芸香碱还是生理盐水”<sup>[86]</sup>。

**报告示例3:** “由于毛色的差异, 无法对研究人员隐藏小鼠品系。但是, 进行三室社交测试时, 使用头顶摄像机系统, 由ANY迷宫视频跟踪软件进行自动化的动物行为测试, 并进行无偏倚的数据分析。单室社交测试需要手动评分, 并由一位不了解实验目的的人员进行分析”<sup>[87]</sup>。

## 1.6 条目6: 结果测量(又称结局变量)

### 1.6.1 子条目6a: 清晰地定义所有评估的结果测量指标(如细胞死亡、分子标志物或行为变化)

**详解:** 结局变量(也称为因变量或响应变量)是研究期间记录的任何变量(例如受损组织的体积、死细胞的数量、特定分子标志), 以评估实验处理或实验干预的效果。结局变量对于表征样本(如基线数据)或描述复杂的反应(例如“血流动力学”结局变量, 包括心率、血压、中心静脉压和心输出量)可能很重

要。未能披露所有结局变量会导致在文献中引入偏倚，因为研究者往往更多地报告阳性结果（例如那些具有统计学意义的结果）<sup>[88-91]</sup>。

明确阐述所测量的指标至关重要，尤其是当该指标可以通过不同的方式进行测量时。例如，动物的活动情况可以记录为移动时间或移动距离。在可能的情况下，结局变量应无偏倚地记录（例如对每个实验组的处理分配使用盲法。参见条目5：盲法）。需详细说明评估的结局变量与研究目标的相关性。

**报告示例1：**“评估了以下参数：阈值压力（TP，排尿前瞬时膀胱内压力）；排尿后压力（PVP，排尿后瞬时膀胱内压力）；峰值压力（PP，排尿时的膀胱内最高压力）；容量（CP，诱导第一次排尿所需的生理盐水体积）；顺应性（CO，CP与TP之比）；排尿收缩频率（VC）和非排尿收缩频率（NVCs）”<sup>[92]</sup>。

**1.6.2 子条目6b：**对于检验假说的研究，明确主要的结果测量指标，即用于确定样本量的结果测量

**详解：**在假设验证实验中，主要结局变量用于回答主要的生物学问题。它是最重要的结果，在实验的计划阶段就需确定，并作为样本量计算的依据。而对于探索性研究，不必确定唯一的主要结局变量，通常会对多个实验结果进行评估（见条目13：研究目标）。

在一项旨在检测主要结局变量效应的假设检验研究中，次要结果的数据用于评估实验干预措施的其他效应，但次要结局变量的后续统计分析可能效力不足，这会使结果和解释变得不太可靠<sup>[88,93]</sup>。声称检验假设但没有预先定义主要结局变量的实验，或在收集数据后改变了主要结局变量的实验（也称为主要结果转换），倾向于选择性地只报告具有统计学意义的结果，有利于阳性结果的发现<sup>[94]</sup>。

提前注册实验方案可以保护研究人员免受选择性报告研究结果（也称为数据挖掘或P值操纵）的担忧，并为证明研究论文中报告的主要结果与研究计划的一致性<sup>[95]</sup>提供证据（见条目19：实验方案注册）。

在使用推论统计来检验假设的研究中（例如t检验、方差分析），如果评估了一个以上的结果，要明确主要的结局变量，说明其是否在数据收集之前已明确定义，以及是否用于样本量计算。如果没有主要结局变量，请明确说明。

**报告示例1：**“本研究的主要结果是通过阶梯测试评估的前肢功能。次要结果包括旋转杆测试表现、脑卒中体积（利用MR成像或脑切片进行定量）、弥散张

量成像（DTI）连接组图和组织学分析，以评估神经元和小胶质细胞密度以及吞噬细胞活性等。该研究设计具有80%的检验效力，以检测阶梯试验中“抓到糖果颗粒”这一表现的相对25%的差异”<sup>[96]</sup>。

**报告示例2：**“本研究的主要终点定义为随访结束时通过磁共振成像（MRI）评估的左心室射血分数（EF）。次要终点是通过MRI评估的左心室舒张末期容积（EDV）和左心室收缩末期容积（ESV），通过三苯基氯化四氮唑（TTC）共孵育后进行离体大体检查和延迟钆迟增强（LGE）MRI评估的梗死面积，通过压力容积（PV）-环和心脏超声检查连续评估的功能性参数，通过冠状动脉内压力和血流量评估的冠状动脉微血管功能，以及通过组织学评估的血管密度和纤维化”<sup>[76]</sup>。

## 1.7 条目7：统计方法

**1.7.1 子条目7a：**提供用于每次分析的统计方法的细节，包括使用的软件

**详解：**实验采用的统计分析方法会反映实验的目的和设计。在数据收集前就需要确定统计分析方法（详见条目19：实验方案注册）。探索性研究和假设检验研究都可能使用描述性统计来总结数据（例如平均值和标准差，或中位数和极差）。在没有检验特定假设的探索性研究中，报告描述性统计数据对于产生新的假设很重要，这些新假设可能在后续实验中进行验证，但它不允许得出超出数据范围之外的结论。除了描述性统计之外，假设检验研究还可以使用推论统计来检验特定的假设。

详细报告分析方法对于确保读者和同行审稿人能够评估所选方法的适当性并判断分析结果的有效性至关重要。统计分析方法的描述应提供足够的细节，以便其他研究人员可以使用相同的方法重新分析原始数据并获得相同的结果。应明确哪种方法用于哪个分析。使用不同的方法分析数据，并有选择地报告那些具有统计学显著性的数据，会构成P值操纵（P-hacking，指为满足特定统计学标准而操纵数据）并在文献中引入偏倚<sup>[90,94]</sup>。应完整地报告所有已执行的分析。描述统计方法的相关信息包括：（1）结局变量；（2）目标自变量；（3）在每项统计检验中所考虑的干扰变量（例如作为区组因素或协变量）；（4）所使用的统计分析和参考文献；（5）如何处理缺失值；（6）多重比较的调整；（7）所使用的软件和版本，如可能，应包括计算机代码<sup>[97]</sup>。



结局变量可能受到所测试的处理或干预措施的影响,同时也可能受到其他因素的影响,如生物样本的特征(性别、窝、年龄、体重等)和技术因素(笼具、一天中的时刻、批次、实验者等)。为了降低偏倚风险,在实验设计中可以考虑其中的一些因素,例如在随机化中使用区组因素(详见条目4:随机化)。影响结果测量变异性的因素也应在分析中加以处理,例如作为区组因素(如试剂的批次或实验者)或作为协变量(如在随机化时的起始肿瘤大小)。

此外,为了正确地分析实验结果,认识到实验中可能存在的层次结构非常重要。层次结构可以引起集群效应。例如,当来自同一笼/窝的动物或来自同一动物的细胞,其测量结果彼此更相似时,可能会出现笼、窝或动物效应。这种关系必须在统计分析中进行处理,方法是在模型中纳入笼/窝/动物效应,或将结局变量汇总到笼/窝/动物水平。因此,描述实验的真实情况和数据的层次结构,以及为此而在设计和分析中所采取的措施,对于评估所使用的统计方法是否合适至关重要。

对于定制分析,例如有许多项的回归分析,详细描述分析路径是必要的。这可能包括详细描述初始模型和任何的模型简化步骤。

在报告描述性统计量时,应明确指出报告的是哪一种集中趋势指标(如平均值或中位数)和离散趋势指标(如标准差、极差、四分位数或四分位数极差)。同时描述在分析前对原始数据所做的任何修改(例如,相对于管家基因的目的基因表达相对量化)。有关统计报告的进一步指南,请参阅《已发表文献中的统计分析和方法(SAMPL)指南》<sup>[98]</sup>。

**报告示例 1:**“使用 SAS (SAS Inst., Cary, NC) 的 GLM 程序进行方差分析。以猪圈作为实验单元,猪的生产性能参数记为猪圈平均值。该模型考虑了区组和饲料处置(5 种饲料)的影响。以初始体重为协变量对数据进行调整。用正交对比来检验 SDPP 处理(经紫外线处理 *vs* 未经紫外线处理)和饲料 SDPP 水平(3% *vs* 6%)的影响。结果以最小二乘均值表示。显著性水平设定为  $P < 0.05$ ”<sup>[99]</sup>。

**报告示例 2:**“在单一模型中对所有感兴趣的风险因素进行了研究。逻辑回归考虑了区组因素,可以在控制其他变量的基础上明确研究每个自变量的效应……因为我们对饲养和环境影响感兴趣,所以在分析中通过对重要的生物学变量(年龄、背景品系、近交、性别、繁殖状况)进行区组化来控制它们的影响——

这些生物学变量在理发行为中的作用在其他地方有所描述,特别是将“理发”作为人类拔毛癖的模型中……本研究还通过按房间进行区组化来控制与此设计变量相关的未知环境变量的影响。检测了以下饲养和环境风险因素的效应:同笼动物的关系(如兄弟姐妹、非兄弟姐妹或混合),笼盒类型(如塑料或钢制),笼盒距地面的高度,笼盒的水平位置(笼盒是在笼架的侧面还是中间),饲养密度,以及笼盒里成年动物的数量。研究了笼盒离地板的高度与笼盒材料之间的相互作用,以及笼盒水平位置与笼盒材料之间的相互作用,然后从模型中删除了这几项,因为它们不显著。 $N = 1\,959$  只小鼠被纳入该分析”<sup>[100]</sup>。

### 1.7.2 子条目 7b: 描述用于评估数据是否能满足统计假设的任何方法,以及当统计假设无法满足时所做的方法变更

**详解:**假设检验通常是基于与基础数据相关的一些前提(条件)。应描述如何评估这些前提条件,以及数据是否满足这些前提,使读者能够评估所使用的统计方法的适用性。如果前提不正确,结论就可能不成立。例如,使用参数检验(如  $t$  检验、 $z$  检验、方差分析等)的前提是数据是连续变量,分析的残差符合正态分布,各组响应相互独立,且各组总体方差齐。

有多种正态性检验的方法,例如 Shapiro-Wilk 检验和 Kolmogorov-Smirnov 检验。然而,这些检验必须谨慎使用。如果样本量较小,它们将难以检测到非正态性;如果样本量较大,将检测到不重要的偏离。另一种方法是用可视化图形来评估数据,例如正态概率图、箱型图、散点图。如果分析的残差不符合正态分布,则通过数据转换有可能满足前提条件,即将相同的数学函数(如  $\log_e$ 、 $\log_{10}$ 、平方根)应用于所有数据以产生符合正态分布数据。

其他类型的结局变量(二分类、多分类或等级变量)则需要不同的分析方法,每种方法都有不同的前提条件。例如,分类数据应按计数和百分比或比例进行汇总,并通过比例检验进行分析;这些分析方法的前提是,相关数据是二分类、等级或名义变量,并且是独立的<sup>[18]</sup>。

对于每一个统计检验(参数或非参数),需要报告结局变量的类型和用于检验统计学前提(是否得到满足)的方法。如果对数据进行了转换,应准确指出所使用的转换方法,以及应用于哪些结局变量。如果不满足前提条件,并且使用了替代方法(如使用了非参



数检验,它不需要有正态性),则需要报告分析中的任何改变。如果未检验数据是否满足前提条件,则应明确说明。

**报告示例 1:**“使用 Shapiro-Wilk 正态检验和 Levene's 方差齐性检验,并通过检查残差和拟合值图来检验模型假设(是否被满足)。一些响应变量必须采用自然对数或平方根或立方根进行转换,但为了显示显著效应而进行了反向转换”<sup>[101]</sup>。

**报告示例 2:**“采用固定效应两因素方差分析(fixed-effects 2-way ANOVA)评估饲养条件(实验处理)和安乐死对皮质醇水平的影响。初步的探索性分析表明,平均皮质醇水平较高的组在这一反应变量上也有较大的差异。为了使差异更加均匀,我们在分析中使用了每条鱼单位体重的皮质醇的对数变换作为因变量。这使得分析前提即正态性和方差齐性(标准差相等)得以满足”<sup>[102]</sup>。

(未完待续)

#### [作者贡献 Author Contribution]

陈国元负责 ARRIVE 2.0 指南完整版“关键 10 条”中第 4~5 条的编译初稿,以及本文内容的整合和修改;  
卢晓负责 ARRIVE 2.0 指南完整版“关键 10 条”中第 6 条的编译初稿,以及本文内容的修改;  
白玉负责 ARRIVE 2.0 指南完整版“关键 10 条”第 7 条的编译初稿,以及本文内容的修改;  
于灵芝和乔颖分别参与 ARRIVE 2.0 指南完整版“关键 10 条”第 6 和第 7 条的编译初稿写作;  
王剑、卢今、刘晓宇和卢选成负责对 ARRIVE 2.0 指南完整版“关键 10 条”中第 4~7 条的编译内容提出关键性修改建议;  
高静负责 ARRIVE 2.0 指南完整版中文编译内容中有关统计学概念及阐述的审定;  
李焱负责 ARRIVE 2.0 指南完整版中文编译工作的策划、组织,以及提出关键性修改建议;  
庞万勇负责 ARRIVE 2.0 指南完整版中文编译工作的指导,以及全部内容的审定。

#### [利益声明 Declaration of Interest]

本文所有作者均声明不存在利益冲突。

#### [参考文献 References]

- [62] SCHULZ K F, CHALMERS I, HAYES R J, et al. Empirical evidence of bias. Dimensions of methodological quality associated with estimates of treatment effects in controlled trials[J]. JAMA, 1995, 273(5): 408-412. DOI: 10.1001/jama.273.5.408.
- [63] SCHULZ K F, GRIMES D A. Allocation concealment in randomised trials: defending against deciphering[J]. Lancet, 2002, 359(9306):614-618. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)07750-4.
- [64] CHALMERS T C, CELANO P, SACKS H S, et al. Bias in treatment assignment in controlled clinical trials[J]. N Engl J Med, 1983, 309(22): 1358-1361. DOI: 10.1056/NEJM198312013092204.
- [65] GREENBERG B G. Why randomize?[J]. Biometrics, 1951, 7(4): 309. DOI: 10.2307/3001653.
- [66] ALTMAN D G, BLAND J M. Statistics notes. Treatment allocation in controlled trials: why randomise?[J]. BMJ, 1999, 318(7192):1209. DOI: 10.1136/bmj.318.7192.1209.
- [67] HIRST J A, HOWICK J, ARONSON J K, et al. The need for randomization in animal trials: an overview of systematic reviews[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98856. DOI: 10.1371/journal.pone.0098856.
- [68] VESTERINEN H M, SENA E S, FFRENCH-CONSTANT C, et al. Improving the translational hit of experimental treatments in multiple sclerosis[J]. Mult Scler, 2010, 16(9): 1044-1055. DOI: 10.1177/1352458510379612.
- [69] BEBARTA V, LUYTEN D, HEARD K. Emergency medicine animal research: does use of randomization and blinding affect the results?[J]. Acad Emerg Med, 2003, 10(6):684-687. DOI: 10.1111/j.1553-2712.2003.tb00056.x.
- [70] TAVES D R. Minimization: a new method of assigning patients to treatment and control groups[J]. Clin Pharmacol Ther, 1974, 15(5):443-453. DOI: 10.1002/cpt1974155443.
- [71] SAINT-MONT U. Randomization does not help much, comparability does[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132102. DOI: 10.1371/journal.pone.0132102.
- [72] LAAJALA T D, JUMPPANEN M, HUHTANIEMI R, et al. Optimized design and analysis of preclinical intervention studies *in vivo*[J]. Sci Rep, 2016, 6: 30723. DOI: 10.1038/srep30723.
- [73] KANG M, RAGAN B G, PARK J H. Issues in outcomes research: an overview of randomization techniques for clinical trials[J]. J Athl Train, 2008, 43(2):215-221. DOI: 10.4085/1062-6050-43.2.215.
- [74] ALTMAN D G, BLAND J M. Treatment allocation by minimisation[J]. BMJ, 2005, 330(7495): 843. DOI: 10.1136/bmj.330.7495.843.
- [75] ZHAO S K, KANG R, DENG T, et al. Comparison of two cannulation methods for assessment of intracavernosal pressure in a rat model[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0193543. DOI: 10.1371/journal.pone.0193543.
- [76] JANSEN OF LORKEERS S J, GHOSH J M I H, KOUDESTAAL S, et al. Xenotransplantation of human cardiomyocyte progenitor cells does not improve cardiac function in a *Porcine* model of chronic ischemic heart failure. results from a randomized, blinded, placebo controlled trial[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0143953. DOI: 10.1371/journal.pone.0143953.
- [77] ISHIDA A, MUTOH T, UEYAMA T, et al. Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release[J]. Cell Metab, 2005, 2(5): 297-307. DOI: 10.1016/j.cmet.2005.09.009.
- [78] EL-AGROUDY N N, EL-NAGA R N, EL-RAZEQ R A, et al. Forskolin, a hedgehog signalling inhibitor, attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats[J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(22):3248-3260. DOI: 10.1111/bph.13611.
- [79] CARRILLO M, MIGLIORATI F, BRULS R, et al. Repeated

- witnessing of conspecifics in pain: effects on emotional contagion[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0136979. DOI: 10.1371/journal.pone.0136979.
- [80] DEL BIANCO BENEDETI P, PAULINO P V R, MARCONDES M I, et al. Partial replacement of ground corn with glycerol in beef cattle diets: intake, digestibility, performance, and carcass characteristics[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0148224. DOI: 10.1371/journal.pone.0148224.
- [81] NUZZO R. How scientists fool themselves - and how they can stop[J]. Nature, 2015, 526(7572):182-185. DOI: 10.1038/526182a.
- [82] HRÓBJARTSSON A, THOMSEN A S S, EMANUELSSON F, et al. Observer bias in randomised clinical trials with binary outcomes: systematic review of trials with both blinded and non-blinded outcome assessors[J]. BMJ, 2012, 344: e1119. DOI: 10.1136/bmj.e1119.
- [83] ROSENTHAL R, FODE K L. The effect of experimenter bias on the performance of the albino rat[J]. Syst Res, 2007, 8(3):183-189. DOI: 10.1002/bs.3830080302.
- [84] ROSENTHAL R, LAWSON R. A longitudinal study of the effects of experimenter bias on the operant learning of laboratory rats[J]. J Psychiatr Res, 1964, 2(2): 61-72. DOI: 10.1016/0022-3956(64)90003-2.
- [85] MACLEOD M R, VAN DER WORP H B, SENA E S, et al. Evidence for the efficacy of NXY-059 in experimental focal cerebral ischaemia is confounded by study quality[J]. Stroke, 2008, 39(10):2824-2829. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.515957.
- [86] NEUMANN A M, ABELE J, KIRSCHSTEIN T, et al. Mycophenolate mofetil prevents the delayed T cell response after pilocarpine-induced status epilepticus in mice[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0187330. DOI: 10.1371/journal.pone.0187330.
- [87] HSIEH L S, WEN J H, MIYARES L, et al. Outbred CD1 mice are as suitable as inbred C57BL/6J mice in performing social tasks[J]. Neurosci Lett, 2017, 637: 142-147. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.11.035.
- [88] JOHN L K, LOEWENSTEIN G, PRELEC D. Measuring the prevalence of questionable research practices with incentives for truth telling[J]. Psychol Sci, 2012, 23(5):524-532. DOI: 10.1177/0956797611430953.
- [89] DWAN K, ALTMAN D G, ARNAIZ J A, et al. Systematic review of the empirical evidence of study publication bias and outcome reporting bias[J]. PLoS One, 2008, 3(8): e3081. DOI: 10.1371/journal.pone.0003081.
- [90] TSILIDIS K K, PANAGIOTOU O A, SENA E S, et al. Evaluation of excess significance bias in animal studies of neurological diseases[J]. PLoS Biol, 2013, 11(7): e1001609. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001609.
- [91] SENA E S, VAN DER WORP H B, BATH P M W, et al. Publication bias in reports of animal stroke studies leads to major overstatement of efficacy[J]. PLoS Biol, 2010, 8(3): e1000344. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000344.
- [92] CLAUDINO M A, LEIRIA L O S, DA SILVA F H, et al. Urinary bladder dysfunction in transgenic sickle cell disease mice[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0133996. DOI: 10.1371/journal.pone.0133996.
- [93] LANDIS S C, AMARA S G, ASADULLAH K, et al. A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research[J]. Nature, 2012, 490(7419):187-191. DOI: 10.1038/nature11556.
- [94] HEAD M L, HOLMAN L, LANFEAR R, et al. The extent and consequences of p-hacking in science[J]. PLoS Biol, 2015, 13(3): e1002106. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002106.
- [95] MUNAFÒ M R, NOSEK B A, BISHOP D V M, et al. A manifesto for reproducible science[J]. Nat Hum Behav, 2017, 1:0021. DOI: 10.1038/s41562-016-0021.
- [96] EMMRICH J V, NEHER J J, BOEHM-STURM P, et al. Stage 1 Registered Report: effect of deficient phagocytosis on neuronal survival and neurological outcome after temporary middle cerebral artery occlusion (tMCAo)[J]. F1000Research, 2017, 6:1827. DOI: 10.12688/f1000research.12537.3.
- [97] BRITISH ECOLOGICAL SOCIETY. A guide to reproducible code in ecology and evolution[S/OL]. 2017 [2020-06-16]. <https://www.britishecologicalsociety.org/wp-content/uploads/2017/12/guide-to-reproducible-code.pdf>.
- [98] LANG T A, ALTMAN D G. Basic statistical reporting for articles published in biomedical journals: the Statistical Analyses and Methods in the Published Literature or the SAMPL Guidelines[J]. Int J Nurs Stud, 2015, 52(1): 5-9. DOI: 10.1016/j.ijnurstu.2014.09.006.
- [99] POLO J, RODRÍGUEZ C, RÓDENAS J, et al. Ultraviolet light (UV) inactivation of *Porcine parvovirus* in liquid plasma and effect of UV irradiated spray dried *Porcine* plasma on performance of weaned pigs[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133008. DOI: 10.1371/journal.pone.0133008.
- [100] GARNER J P, DUFOUR B, GREGG L E, et al. Social and husbandry factors affecting the prevalence and severity of barbering ('whisker trimming') by laboratory mice[J]. Appl Anim Behav Sci, 2004, 89(3-4): 263-282. DOI: 10.1016/j.applanim.2004.07.004.
- [101] NEMETH M, MILLES E, WAGNER K H, et al. Sex-specific effects of diets high in unsaturated fatty acids on spatial learning and memory in Guinea pigs[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0140485. DOI: 10.1371/journal.pone.0140485.
- [102] KECK V A, EDGERTON D S, HAJIZADEH S, et al. Effects of habitat complexity on pair-housed zebrafish[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015, 54(4):378-383.

(收稿日期:2023-03-30 修回日期:2023-06-18)

(本文编辑:张俊彦,富群华)

## 引用本文

陈国元, 卢晓, 白玉, 等. 《动物研究: 体内实验报告》即 ARRIVE 2.0 指南的解释和阐述(二)[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 324-333. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.042.

CHEN G Y, LU X, BAI Y, et al. Explanation and elaboration of the ARRIVE guidelines 2.0—reporting animal research and *in vivo* experiments ( II ) [J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3): 323-331. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.042.

# 南方医科大学实验动物管理中心



## 1 中心简介

南方医科大学实验动物管理中心（以下简称“本中心”）的前身是第一军医大学实验动物中心，成立于1973年，2004年随学校整体移交地方并更名为“南方医科大学实验动物中心”，2019年1月再次更名为“南方医科大学实验动物管理中心”。

本中心是集学科建设、科研动物实验平台建设、实验动物生产供应和保障服务为一体的教学科研保障服务机构，拥有广东省实验动物

生产许可证和使用许可证资质，是中国实验动物学会实验小型猪专业委员会主任委员单位、广东省实验动物学会副理事长单位。本中心年均生产供应不同品种（系）和不同微生物等级的实验动物20多万只，数量和品种（系）都位居广东省各医科院校首位，用户覆盖广东、广西、海南、湖南、新疆、香港等十多个省份和地区，是广东省最早开展SPF级新西兰兔培育的单位，自主培育的FMMU白化豚鼠及西藏小型猪也已广泛应用于生物医学研究中。

## 2 科学研究

围绕“人类疾病动物模型与比较医学”研究方向，本中心承担了“封闭群FMMU白化豚鼠的培育”和“中医类风湿性关节炎病理模型制作”项目，均获得全军科技进步三等奖。此外，本中心开展的科学研究还包括：（1）已获得广东省科技厅核发的实验用西藏小型猪动物质量合格证（粤监证字2006A055），并入选国家自然资源实验动物E平台；（2）较为系统地掌握了西藏小型猪的生物学特征；（3）开展了链球菌感染、尿路结石、糖尿病、乙型肝炎病毒感染等常见多发病的大动物模型研制工作，建立了稳定的西藏小型猪慢性肺动脉高压模型、急性肺损伤模型和肝/肾移植模型；（4）通过转基因克隆方法，与广州健康研究院合作制备了红、黄、蓝、绿四色荧光蛋白转基因猪，获得了转基因抗黏液病毒克隆猪、具有明显临床症状的基因修饰亨廷顿舞蹈症克隆猪，以及白化西藏小型猪动物模型；（5）在西藏小型猪的研究方面，合作单位中国科学院广州生物医药与健康研究院基于西藏小型猪胚胎成纤维细胞（porcine embryonic fibroblasts, PEFs），应用逆转录病毒转导法已获得西藏小型猪诱导性多能干细胞（induced pluripotent stem cells, iPS）。

本中心和广东省医学实验动物中心作为广东省的两家豚鼠生产供应单位，为国家药检系统提供豚鼠以开展新冠疫苗批签发工作，至2021年9月份共完成新冠疫苗检定任务数亿剂次。本中心获批成为“广东省实验小型猪种质资源建设暨检定用小型猪培育工程技术研究中心”，初步建立了大型实验动物实验生物医学研究与应用平台（包括手术室、观察室、细胞室、生化室等硬件条件，并搭配合理的专业技术人才队伍），并已





开展了多项生物医学研究项目。同时,本中心拥有完善的分子生物学实验室、转基因实验室、病理组织学实验室、微生物学实验室、细胞培养室等相关功能实验室,是华南地区及国内有一定影响力的医学实验动物和比较医学研究机构,相关研究成果获广东省科技进步一等奖1项,广州市科技进步一等奖1项,西藏自治区科技奖二等奖1项,2018年荣获“广东省实验动物管理工作先进单位”奖励(右图)。历年来本中心发表SCI论文72篇;获得国家级课题8项,省部级课题20项。

### 3 教学工作

本中心除了每年承担学校其他专业本科生和硕士研究生的“医学实验动物学”课程教学任务之外,还承担本中心招收的硕士和博士研究生培养任务。中心于1995年获得实验动物学硕士授权点,2002年开始招收比较医学研究方向的博士研究生,2011年开始招收动物学博士;截至目前累计培养硕士研究生54名,博士研究生23名,博士后2名。中心主编出版教材及专著7部,副主编教材1部,参编教材及专著8部(右图),其中《比较医学》和《西藏小型猪组织胚胎学图谱》分别填补了国内相关领域的空白。



### 4 社会服务



本中心主要面向校内外提供全方位的服务,包括:(1)实验动物生产供应及保障服务;(2)科研动物实验保障服务;(3)实验动物质量及环境控制;(4)实验动物管理及法规宣贯;(5)本科生及研究生教学任务。中心现有实验动物生产设施面积2 667 m<sup>2</sup>,实验动物使用设施面积4 231 m<sup>2</sup>,笼位数为11 000笼(左图)。近五年来,中心承接校内外科研动物实验项目约890项,其中小动物实验约790项,大动物实验约100项。中心每年除了承担全校10 000多名本科生和3 000多名研究生教学科研用动物和动物实验的保障任务之外,还承担省内外医科院校、医药企业和法定检定机构的实验动物及动物实验保障任务。

### 5 未来展望

本中心将继续加强符合国家标准的实验动物饲养管理和实验设施的建设,重视生物安全防护。同时,继续加强管理体系的规范化、软件化、系统化建设,保证实验动物的使用和管理更便捷、更合理;继续加强人才队伍的培养和建设,保障实验动物使用与管理程序符合国家标准要求;全力推进本中心实验动物信息化智能管理系统正式上线运行并不断完善优化,实现网页端、手机客户端的双线运行,线上下单,线下服务,以提高各部门工作效率,提升用户使用体验,为实验动物生产及动物实验提供高效的保障服务。

文字:田雨光

图片:罗烘权

审核:袁进

# 复旦大学附属肿瘤医院实验动物中心

## 1 中心简介

复旦大学附属肿瘤医院实验动物中心，现隶属于复旦大学肿瘤研究所，主要从事肿瘤动物实验相关的动物饲养服务、技术服务、咨询服务，是集研发、应用、实验和检测为一体的技术服务平台。本实验动物中心的建设立足医院，服务上海，辐射华东地区乃至全国，服务对象范围涵盖医疗机构、生物医药企业、大专院校、科研院所，提供高水平、高品质、有创新、有特色的公共资源平台。

实验动物中心坚持“以人为本”，以实际需求为导向，将各项工作做到既有深度，又有广度，更有温度，为肿瘤医院提供动物实验全方位资源共享服务。



## 2 资源条件

实验动物中心拥有标准实验动物屏障设施，建筑面积1 730 m<sup>2</sup>，可提供约3 500个大鼠、小鼠笼位，配备了多种肿瘤动物实验相关的高端仪器设备，建立了肿瘤动物模型资源平台、小动物影像学平台、动物实验新技术研发平台、抗肿瘤药物筛选平台等多个动物实验相关研究平台。针对肿瘤研究特色，主要提供基因工程动物和移植性肿瘤模型动物的饲养服务，开展肿瘤异位移植、原位移植等肿瘤动物模型建立，以及人源肿瘤组织来源移植瘤（patient derived xenografts, PDX）、人源肿瘤细胞系异种移植瘤（cell line derived xenograft, CDX）模型等多系统、多器官新建肿瘤动物模型、免疫重建人源化小鼠模型、肿瘤转移动物模型及高转移动物模型筛选等技术服务。

实验动物中心现有工作人员7人，其中博士2人，本科2人，其他技术人员3人，是一支





专业而精悍的技术团队，主要由青年科研人员构成。在肿瘤动物实验、肿瘤分子生物学和细胞生物学等专业方面都拥有良好的科研背景、扎实的技术能力、丰富的研究经验，且具有极强的团队合作精神，人员队伍稳定，科研气氛浓厚。

### 3 研究方向

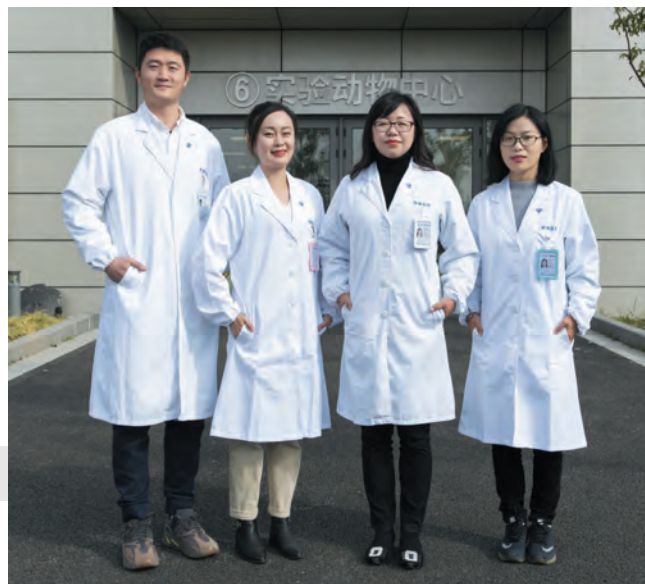
秉持管理和科研并进的观念，以管理带科研，以科研促管理。团队的研究方向主要聚焦于肿瘤转移的分子作用机制及抗转移治疗研究。近年来主要采用动物体内循环筛选、体内与体外联合筛选等方法建立了肺癌皮下移植高转移动物模型、肺癌细胞心内注射骨高转移动物模型。在此基础上，采用基因组学和蛋白组学方法，进行肺癌转移相关分子的筛选、鉴定及转移分子机制研究等工作。自成立5年以来，在实验动物中心主任闫明霞研究员的带领下，研究团队承担了国家自然科学基金4项、省部级科研项目4项，总科研经费达200余万元；在 *Theranostics*、*Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 等学术期刊上发表SCI论文10余篇，影响因子近50分。

### 4 工作成果

实验动物中心始终顺应实验动物学和肿瘤学行业发展趋势及技术发展方向，坚持自主创新，不断提高技术水平，构建高效科技研发体系。团队自主研发建立并筛选了肺癌、胃癌、结直肠癌、黑色素瘤等多种肿瘤高转移动物模型；根据肿瘤免疫学研究热点，自主研发建立了免疫重建人源化小鼠模型，为肿瘤学应用研究提供了可靠的体内研究工具。实验动物中心对医院重要科研成果的产出起到了有力的支撑作用。2022年，依托实验动物中心支持，医院在 *Cell Metabolism*、*Cell Research*、*Nature Metabolism*、*Advanced Science* 等高水平学术期刊上发表影响因子10分以上的SCI论文30余篇。同时，实验动物中心为医院的国家自然科学基金重大项目、重大研究计划、重点项目、联合基金重点支持项目、国家杰出青年科学基金、科技部国家重点研发计划、医院的大科学团队等诸多科研项目的顺利开展提供了有力支撑。

### 6 发展方向

实验动物中心的未来发展目标是将肿瘤基础研究与临床研究有机结合，整合资源，加强转化，将动物实验与实验动物技术服务做精、做强、做专，在肿瘤研究领域建设独具专业特色的实验动物科研团队；同时，通过国际及国内权威机构的认证，打造一个标准化、规范化的实验动物科技服务平台。总之，实验动物中心将不断发展和完善动物实验相关平台建设，研发肿瘤实验相关的新型动物模型和技术，从而更好地增强对肿瘤基础及应用研究的支撑能力，为科研工作的顺利开展提供有力保障。



图文：潘洪玉、柴文君

审核：闫明霞



# 上海市生物医药技术研究院

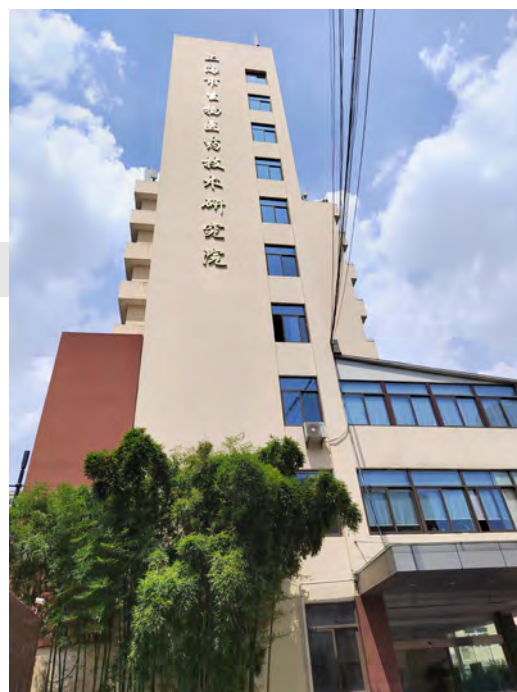
## 药物与医疗器械研究所药理毒理学研究室

上海市生物医药技术研究院（以下简称上海市生研院）药理毒理学研究室前身是1978年成立的上海市计划生育科学研究所（以下简称上海计生所）药理毒理学研究室。2021年3月，上海计生所更名重组为上海市生研院并设立5个研究所，其中，药理毒理学研究室隶属于药物与医疗器械研究所。

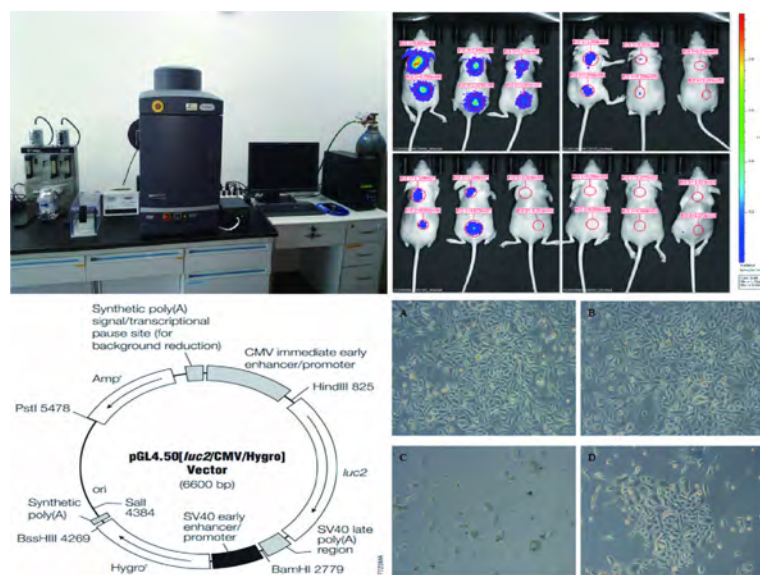
### 1 平台资源

药理毒理学研究室在以朱焰研究员、李卫华研究员和吴建辉研究员为核心的3个科研团队带领下，围绕生殖药理学、生殖毒理学和分子生殖毒理等专业领域开展研究。研究室目前共有研究人员18名，其中高级职称7名，中级职称7名，初级职称4名，现有博士生导师1名，硕士生导师3名，多人获得国家万人计划、全国巾帼建功标兵、上海市启明星计划、上海市浦江人才、上海市青年科技英才、上海市人才发展计划等荣誉称号。药理毒理学研究室是中国药理学学会生殖药理专业委员会、上海药理学学会生殖药理专业委员会的挂靠单位。

药理毒理学研究室依托上海市生研院，拥有附属医院、SPF级实验动物设施、普通级动物设施和相应的实验仪器设备，包括小动物活体成像系统（如左下图）、多功能流式细胞仪、万级细胞培养室、生物安全柜、荧光共聚焦显微镜、核磁共振仪、质谱仪、激光共聚焦显微镜、Real-Time PCR仪、核酸定量仪、DNA测序仪、基因分析仪、细胞培养超净台、高速冷冻离心机、超低温冰箱、全自动酶标仪及病理学分析平台等。



### 2 研究方向



药理毒理学研究室以新药研发和医疗器械开发为主导，利用动物模型开展生育调控药物以及妇科疾病、男科疾病、肾脏疾病和生殖系统肿瘤治疗药物的临床前药效学评价和药理学研究，同时建立多种生殖相关疾病的体内外模型以探讨疾病发生机制，并开展环境污染物的生殖发育毒性及其机制等研究。

主要研究方向包括：（1）生殖系统肿瘤药物药效学评价、药理研究和新药研发；（2）新型外用避孕药物和阴道杀微生物剂的研发；（3）避孕药物或器械新用途研发；（4）药物及环境化学物的生殖发育毒性及其机制的研究；（5）泌尿系统疾病动物模型建立及新药研发；

(6) 生殖系统疾病动物模型建立和新药研发；(7) 基于类器官等技术建立泌尿生殖系统疾病模型；(8) 细胞系来源移植瘤 (cell line derived xenografts, CDX) /人肿瘤组织来源移植瘤 (patient derived xenograft, PDX) 模型建立及应用；(9) 药物非临床药效学及药理学研究。

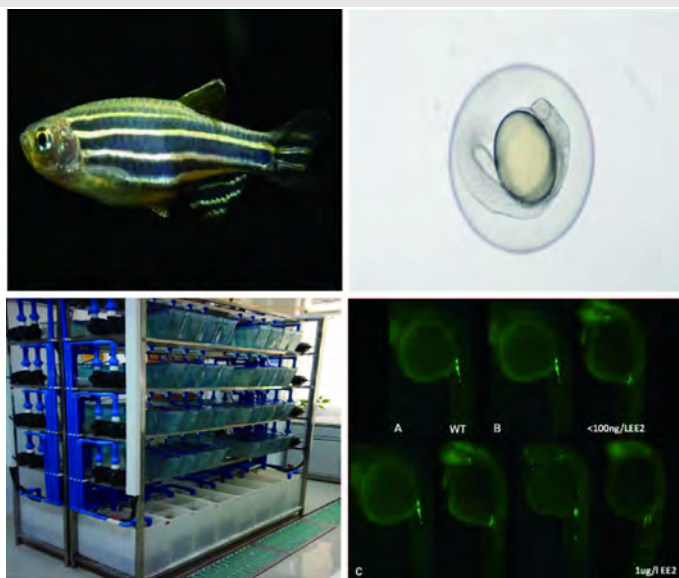
### 3 主要科研成果

药理毒理学研究室已建立独具特色的子宫内膜异位症、不完全流产、痛经、子宫内膜增生症/内膜癌、子宫肌瘤、卵巢早衰、多囊卵巢、睾丸癌、睾丸炎、附睾损伤、前列腺增生、前列腺炎、前列腺癌、弱精/少精症、阴茎勃起功能障碍、慢性肾炎、肾功能衰竭、膀胱炎、膀胱结石、膀胱癌等疾病的药物药理药效学评价模型，建有低剂量甾体激素类临床前药代动力学检测方法和斑马鱼生殖发育毒性评价平台（如右图），已对外开展相应评价服务，协助委托单位获得20余个新药临床试验批件。

药理毒理学研究室开发了一系列新型女性生殖道外用避孕药、预防人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 经性途径传播的杀微生物剂、阴道润滑剂等，在该领域的研究处于国内领先水平，并首次系统证实了内分泌干扰物双酚A与前列腺增生的关系。研究室成员参编了专著《药理研究方法学》《药理实验方法学》，负责撰写生殖系统疾病相关章节内容。

药理毒理学研究室与德国联邦风险评估研究所和德国 Charite 大学医学院合作，完善了实验动物胚胎发育畸形图像数据库的中英文版，WHO 国际化学品安全规划部门、美国环境保护署 (EPA)、英国中央毒理学实验室、日本京都大学等国际机构均参与了该项目合作。

药理毒理学研究室近年来已承担50余项国家级和省部级科研项目，包括“十一五”国家科技支撑计划项目“活性宫内节育器生物学评价规范及技术标准研究”“透皮避孕贴膜的研制”，“十二五”国家科技支撑计划项目“男用避孕方法的研究-抗生育中药研发与应用”“新型短效口服避孕药的研究-诺美孕酮创新工艺国产化前期研究”“外用避孕新剂型的研究-经皮给药避孕系统研究”，“十三五”国家科技支撑计划项目“避孕节育及兼有治疗作用的新药具研发-避孕兼顾治疗作用的阴道环新器具研发”，国家传染病重大专项“杀微生物剂的药物载体和剂型的研究”，以及国家自然科学基金项目、上海市科委重点项目、上海市自然科学基金项目、上海市浦江人才项目和上海市科技启明星计划项目等。研究室成员已发表150余篇论文，其中SCI论文60余篇；培养研究生40余名。研究室已获得20项国家发明专利和10余项实用新型专利授权。研究室参与研发的抗早孕药物RU486、长效避孕皮下埋植剂等10余个新药已成功上市，近年自主研发的新药甲磺酸酚妥拉明胶囊已获得新药证书，苯扎氯铵阴道避孕凝胶剂和乙酸避孕凝胶已获CFDA临床批文并进入临床试验。研究室曾获得国家科技进步二等奖和三等奖，上海市科技进步一等奖、二等奖、三等奖等奖项。



### 4 对外服务

药理毒理学研究室面对国内外制药企业、医院和科研院校，开展以下评价服务：(1) 生殖系统疾病药物药效学评价和药理学研究；(2) 泌尿系统疾病药物药效学评价和药理学研究；(3) 药物及环境化学物的生殖发育毒性评价；(4) 药物非临床安全性评价 (非GLP)；(5) 抗肿瘤药物的药效学评价。

图文：李卫华、朱 焰

审核：吴建辉

《实验动物与比较医学》创刊于1981年,是我国实验动物科学领域内第一本专业性学术刊物,主要报道实验动物与比较医学方面的最新研究成果、实验方法和技术。为加强产学研合作,以期刊为媒介凝聚行业力量,促进国内实验动物和比较医学领域有关科研单位及技术企业的横向交流和科技创新,自2006年起成立《实验动物与比较医学》刊务理事会。

2023年《实验动物与比较医学》刊务理事会理事长由《实验动物与比较医学》编辑部法人代表担任,秘书长由《实验动物与比较医学》编辑部负责人担任。秘书长在理事会领导下负责日常工作。秘书处设在《实验动物与比较医学》编辑部。本会以自愿参加为原则,随时接纳新的申请单位,欢迎全国各地企事业单位加盟,共谋实验动物与比较医学行业大发展。

## 《实验动物与比较医学》2023年刊务理事会名单

### 理 事 长

范 春 主任 上海实验动物研究中心

### 副理事长

赵 勇 副部长 上海实验动物研究中心科研管理部  
周正宇 主任 苏州大学实验动物中心  
夏长友 主任 哈尔滨兽医研究所  
王靖宇 主任 大连医科大学实验动物中心  
袁 进 副主任 南方医科大学实验动物管理中心  
丁玉强 主任 复旦大学实验动物科学部

### 理 事

李 焱 主任 上海交通大学医学院实验动物科学部  
王德军 主任 浙江中医药大学动物实验研究中心  
王 刚 主任 广东省医学实验动物中心  
李 娜 高级工程师 中国科学院上海药物研究所实验动物室  
刘恩岐 主任 西安交通大学医学院实验动物中心  
刘忠华 主任 华南农业大学实验动物中心  
应华忠 主任 浙江省实验动物中心  
顾美儿 副主任 杭州师范大学实验动物中心  
张 泉 主任 扬州大学比较医学中心  
王可洲 常务副主任 山东省实验动物中心  
施 恩 总经理 上海斯莱克实验动物有限责任公司  
汪亚兵 总经理 上海开纯洁净室技术工程有限公司  
吴 强 总经理 江苏苏净集团苏州苏净节能科技有限公司  
吴征宏 总经理 安维迪生命科学(浙江)有限公司  
魏 然 总经理 泰尼百斯实验室设备贸易(上海)有限公司  
崔锦鹏 总经理 上海开上生物医学科技有限公司  
刘建中 总经理 上海业腾机电工程有限公司  
张亚兵 总经理 上海天焕科技发展有限公司  
潘 慧 华东销售经理 厦门抱壹智能科技有限公司

### 秘 书 长

张俊彦 《实验动物与比较医学》编辑部