魏杰, 王洪, 刘甦苏, 等. hACE2-KI/NIFDC 小鼠主要生物学特性指标测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 39-42.
Wei J, Wang H, Liu SS, et al. Determination of the main biological characteristic values in hACE2-KI/NIFDC mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 39-42.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 006

hACE2-KI/NIFDC 小鼠主要生物学特性指标测定

魏杰[#], 王洪[#], 刘甦苏, 光姣娜, 周佳琪, 冯育芳, 秦骁, 王莎莎,
范昌发, 付瑞, 岳秉飞^{*}

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

【摘要】 目的 测定自培育 hACE2-KI/NIFDC 转基因小鼠的生物学特性指标。方法 分别测定 4 周龄和 8 周龄各 10 只雌性 hACE2-KI/NIFDC 小鼠的 11 项脏器系数、22 项血液生理指标和 13 项血液生化指标, 利用统计学方法分析组间差异。结果 4 周龄组的 5 项脏器系数(脾、肺、胸腺、左肾、右肾, $P < 0.01$) 和 3 项血液生理指标(MCV、MCH、EOS, $P < 0.05$) 高于 8 周龄组, 5 项指标(MON%、ALP, $P < 0.05$; 心脏脏器系数、AST、P, $P < 0.01$) 低于 8 周龄组。结论 hACE2-KI/NIFDC 小鼠生物学特性指标的测定为其应用研究提供了基础数据。

【关键词】 血管紧张素转化酶 2; 转基因小鼠; 脏器系数; 血液生理; 生化指标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0039-04

Determination of the main biological characteristic values in hACE2-KI/NIFDC mice

WEI Jie[#], WANG Hong[#], LIU Susu, GUANG Jiaona, ZHOU Jiaqi, FENG Yufang, QIN Xiao,
WANG Shasha, FAN Changfa, FU Rui, YUE Bingfei^{*}
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 Objective To study the biological characteristic values of human angiotensin-converting enzyme II (hACE2)-KI/NIFDC mice. **Methods** Ten hACE2-KI/NIFDC female mice at 4 and 8 weeks of age were tested for 11 organ coefficients, 22 physiological values and 13 biochemical values. Statistical method were used for data analysis. **Results** The 4-week-old mice had higher values than the 8-week-old mice in five organ coefficients (spleen, lung, thymus, left kidney, right kidney, $P < 0.01$) and three physiological values (mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, eosinophil granulocyte, $P < 0.05$). However, in the 4-week-old mice, the other five values were below those of the 8-week-old mice (percentage of monocyte, alkaline phosphatase, $P < 0.05$; heart organ coefficients, aspartate transaminase, phosphorus, $P < 0.01$). **Conclusions** These findings may provide support for the application of hACE2-KI/NIFDC mice.

【Keywords】 ACE2; transgenic mice; organ coefficient; blood physiological values; biochemical values

[基金项目] 国家科技重大专项(2017ZX10304402)。

[作者简介] 魏杰(1982—), 女, 副研究员, 硕士。研究方向: 动物遗传学。E-mail: jane3040320@163.com

王洪(1977—), 女, 研究员, 硕士。研究方向: 动物遗传学。E-mail: littstar@163.com

[#]共同第一作者

[通信作者] 岳秉飞(1960—), 男, 研究员, 博士。研究方向: 动物遗传学。E-mail: y6784@126.com

血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 是一种在体内有广泛分布的锌离子依赖蛋白酶。通过负性调节肾素-血管紧张素-醛固酮系统,在体内广泛参与心脑血管、呼吸系统、泌尿系统、消化系统及肿瘤等生理和病理进程^[1-7]。

2018 年本单位以 C57BL/6 为背景鼠,通过将人源化的 ACE2 基因插入小鼠 ACE2 基因中构建了 hACE2 敲入小鼠,命名为 hACE2-KI/NIFDC。该小鼠能适用于 ACE2 相关病理生理研究,并在 2019-nCoV 疾病研究、疫苗研发中发挥了重要作用^[8-10]。

目前,尚没有关于该小鼠主要生物学特性指标的报道。本研究首次通过对不同周龄 hACE2-KI/NIFDC 小鼠的脏器系数、生理生化的生物学指标的测定,为该模式小鼠提供更广泛的应用基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4 周龄和 8 周龄雌性 hACE2-KI/NIFDC 小鼠各 10 只,SPF 级,体重分别为 13.5~16.9 g 以及 18.9~21.9 g,来自本单位模式动物室[SCXK(京)2017-0005],饲养于 IVC 屏障环境[SYXK(京)2017-0013],福利伦理审查由中国食品药品检定研究院福利伦理审查委员会审批(中检动(福)第(B)021 号),实验遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

Sartorius CPA 423 电子天平(德国);光电 Mek7222 血细胞分析仪(日本);日立 7080 全自动生化分析仪(日本)。

生理检测试剂(稀释液 DH640,分析清洗液 DH520、DH620,溶血剂 DH910、DH680)购自上海光电医用电子仪器有限公司;生化检测试剂购自中生北控生物科技股份有限公司,包含丙氨酸氨基转移酶试剂盒(底物法)、天冬氨酸氨基转移酶试剂盒(底物法)、总蛋白试剂盒(双缩脲法)、白蛋白试剂盒(溴甲酚绿法)、碱性磷酸酶试剂盒(NPP 底物-AMP 缓冲液法)、尿素氮试剂盒(尿素酶-谷氨酸脱氢酶法)、肌酐试剂盒(氧化酶法)、葡萄糖试剂盒(己糖激酶法)、钙(邻甲酚酞络合酮法)、无机磷试剂盒(磷钼酸盐法)、总胆固醇试剂盒(CHOD-PAP 法)、总胆红素试剂盒(钒酸盐氧化法)和甘油三酯试剂盒(GPO-PAP 法)。

1.3 实验方法

小鼠禁食 12 h,先编号称体重,后眼静脉采血术

取 20 μ L 抗凝血和 0.5 mL 全血并分离血清,分别用于生理生化指标测定。小鼠处死后解剖脏器称重,通过电子天平对各编号小鼠的心、肝、脾、肺、左右肾、左右肾上腺、左右卵巢进行称重,并计算对应的脏器系数。22 项血液生理指标和 13 项血液生化指标分别通过血细胞分析仪和生化分析仪测定。生理指标包括:白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血小板计数(PLT)、血红蛋白浓度(HGB)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞分布宽度(RDW)、白细胞五分类计数、平均血小板体积(MPV)、血小板压积(PCT)和血小板分布宽度(PDW)。生化指标包括:丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素(BUN)、肌酐(CREA)、葡萄糖(GLU)、钙(CA)、磷(P)、总胆固醇(CHO)、总胆红素(Tbili)和甘油三酯(TG)。

1.4 统计学方法

按照周龄和测定项目分类整理数据,结果以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并用 SPSS 软件作独立样本 *t* 检验统计分析组间差异。

2 结果

2.1 脏器系数测定结果

11 项脏器系数指标中,8 周龄组的脾、肺、胸腺、左肾、右肾占体重百分比均低于 4 周龄组($P < 0.01$)、心脏占体重百分比高于 4 周龄组($P < 0.01$)。肝、左肾上腺、右肾上腺、左卵巢、右卵巢占体重百分比两组间无显著性差异(表 1)。

表 1 4 周龄和 8 周龄 hACE2-KI/NIFDC 的脏器系数比较
Table 1 Organ coefficient comparison of 4-week-old and 8-week old hACE2-KI/NIFDC mice

项目 Items	4 周龄($n=10$) 4-week-old	8 周龄($n=10$) 8-week-old
心脏 Heart	0.0052 $\pm$ 0.0005 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.0064 $\pm$ 0.0006
肝 Liver	0.0046 $\pm$ 0.0006	0.0045 $\pm$ 0.0006
脾 Spleen	0.0040 $\pm$ 0.0005 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.0030 $\pm$ 0.0004
肺 Lung	0.0084 $\pm$ 0.0011 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.0063 $\pm$ 0.0009
胸腺 Thymus	0.0053 $\pm$ 0.0013 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.0035 $\pm$ 0.0009
左肾 Left kidney	0.0070 $\pm$ 0.0005 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.0061 $\pm$ 0.0005
右肾 Right kidney	0.0067 $\pm$ 0.0007 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.0064 $\pm$ 0.0012
左肾上腺 Left adrenal	0.0002 $\pm$ 0.0001	0.0002 $\pm$ 0.0001
右肾上腺 Right adrenal	0.0002 $\pm$ 0.0001	0.0002 $\pm$ 0.0001
左卵巢 Left ovary	0.0001 $\pm$ 0.0001	0.0002 $\pm$ 0.0001
右卵巢 Right ovary	0.0001 $\pm$ 0.0001	0.0002 $\pm$ 0.0001

注:与 8 周龄组相比, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

Note. Compared to 8-week-old group, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$.

2.2 生理指标测定结果

4 周龄在 MCV、MCH、EOS 指标上高于与 8 周龄组 ($P < 0.05$), 在 MON% 指标上低于 8 周龄组。其余 18 项生理指标无显著性差异(表 2)。

表 2 4 周龄和 8 周龄 hACE2-KI/NIFDC 血液生理指标的比较

Table 2 Blood physiological values comparison of 4-week old and 8-week-old hACE2-KI/NIFDC mice

项目 Item	4 周龄 4-week-old	8 周龄 8-week-old
白细胞计数($10^9/L$) WBC	5.39±1.36	3.78±0.87
红细胞计数($10^{12}/L$) RBC	10.26±0.52	10.55±0.41
血红蛋白(g/L) HGB	159.80±8.08	159.60±7.63
红细胞压积(%) HCT	48.69±2.64	48.97±2.48
平均红细胞体积(fL) MCV	47.37±1.05 [▲]	46.42±0.66
平均红细胞血红蛋白(pg) MCH	15.57±0.50 [▲]	15.14±0.24
平均血红蛋白浓度(g/L) MCHC	328.40±9.41	325.90±6.12
红细胞分布宽度(%) RDW	14.52±0.99	14.09±0.80
血小板计数($10^9/L$) PLT	681.40±89.32	746.30±67.13
血小板压积(%) PCT	0.17±0.02	0.19±0.04
平均血小板体积(fL) MPV	2.41±0.19	2.49±0.36
血小板分布宽度(%) PDW	16.62±0.78	16.02±0.61
淋巴细胞计数($10^9/L$) LYM	5.03±1.25	3.52±0.89
单核细胞计数($10^9/L$) MON	0.00±0.00	0.00±0.00
中性粒细胞计数($10^9/L$) NEUT	0.35±0.15	0.26±0.15
嗜酸性粒细胞计数($10^9/L$) EOS	0.01±0.03 [▲]	0.00±0.00
嗜碱性粒细胞计数($10^9/L$) BAS	0.00±0.00	0.00±0.00
淋巴细胞百分比(%) LYM%	93.05±1.90	92.45±4.03
单核细胞百分比(%) MON%	0.20±0.17 [▲]	0.35±0.46
中性粒细胞百分比(%) NEUT%	6.35±1.95	7.03±3.99
嗜酸性粒细胞百分比(%) EOS%	0.37±0.65	0.07±0.06
嗜碱性粒细胞百分比(%) BAS%	0.03±0.07	0.03±0.05

注:与 8 周龄组相比, [▲] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with 8-week-old mice group, [▲] $P < 0.05$.

2.3 生化指标测定结果

4 周龄在 AST、P 两项指标上显著低于 8 周龄组 ($P < 0.01$), 在 ALP 指标上也低于 8 周龄组 ($P < 0.05$)。其余 10 项生化指标无显著性差异(表 3)。

3 讨论

依据《实验动物生物学数据采集技术规范》要求,测定小鼠的主要生物学特性通常选择 4 周和 8 周龄小鼠,4 周龄小鼠是免疫等常见应用初始周龄,8 周龄则代表了成年小鼠的普遍水平。这一规范同样适用于基因工程小鼠。

hACE2-KI/NIFDC 小鼠是学界公认的新型冠状病毒肺炎疾病机理、药物、疫苗的模式动物之一^[11-14]。在研究评价中,通常需要测定实验动物的脏器重量、生理生化指标来评价疾病健康状态以及药物疫苗的毒副作用。因此,测定不同周龄小鼠的生物学特性指标能够为其应用建立基础数据。但由于在新冠肺炎疾病研究中,该模型鼠供应紧张,本次生物学数据仅测定了 4 周龄和 8 周龄雌性。

表 3 4 周龄和 8 周龄 hACE2-KI/NIFDC 血液生化指标的比较

Table 3 Serum biochemical values comparison of 4-week-old and 8-week-old hACE2-KI/NIFDC mice

项目 Item	hACE2-KI/NIFDC 4-week-old	hACE2-KI/NIFDC 8-week-old
丙氨酸氨基转移酶(U/L) ALT	22.66±3.77	3.77±1.19
天冬氨酸氨基转移酶(U/L) AST	106.09±27.83 ^{▲▲}	154.09±25.35
总蛋白(g/L) TP	55.7±2.96	58.03±4.39
白蛋白(g/L) ALB	26.53±1.29	27.8±1.60
碱性磷酸酶(U/L) ALP	150.95±12.26 [▲]	225.14±80.15
尿素氮(mmol/L) BUN	10.61±1.49	10.16±6.05
肌酐($\mu\text{mol/L}$) CREA	21.88±16.7	39.92±24.01
葡萄糖(mmol/L) GLU	7.69±1.17	7.26±2.16
钙(mmol/L) CA	2.12±0.16	1.93±0.93
磷(mmol/L) P	2.62±0.25 ^{▲▲}	4.14±0.61
总胆固醇(mmol/L) CHO	2.2±0.25	1.97±0.28
甘油三酯(mmol/L) TG	1.37±0.23	1.25±0.23
总胆红素($\mu\text{mol/L}$) T.Bili	4.95±2.96	6.87±14.36

注:与 8 周龄组相比, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$ 。

Note. Compared with 8-week-old mice group, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$.

脏器系数是反映动物内脏器官状态的生物学指标,在毒性试验和安全评价中经常通过脏器系数的变化来评价相关指标影响因素^[15-17]。本研究中,8 周龄组的脾、肺、胸腺、左肾、右肾占体重百分比均低于 4 周龄组($P < 0.01$)、心脏占体重百分比高于 4 周龄组($P < 0.01$)。随着周龄增加,脾、肺、胸腺、左肾、右肾并未出现与体重一致的正相关增长,反映出了不同年龄器官功能的分化成熟状态;只有心脏的脏器系数 8 周龄组高于 4 周龄组,反映出随着周龄增长 hACE2-KI/NIFDC 小鼠的心脏供血能力增强。

血液生理生化指标是反映机体是否正常的两类基础指标。本研究测定的 22 项血生理指标和 13 项血生化指标中,仅 MCV、MCH、EOS、MON% 四项生理指标和 AST、ALP、P 三项生化指标在 4 周龄和 8 周龄雌性组间存在差异,反映了离乳后和性状表达期两个阶段在造血、免疫和肝肾功能的差异 MCV、MCH 是反映红细胞体积和血红蛋白浓度指标,均存在 4 周龄高于 8 周龄的情况,这一结果也符合鼠成年后红细胞体积减小以及血红蛋白运氧功能成熟的情况。EOS 是过敏反应指标,4 周龄高于 8 周龄;MON% 是细胞免疫指标,8 周龄高于 4 周龄,这两个指标的变化反映出随着周龄增长,细胞免疫不断成熟的状态。其中 3 项生化指标均存在 8 周龄组高于 4 周龄组的情况。AST、ALP 是评价肝功能的两项指标,P 是评价肾功能的指标。在应用该小鼠进行肝肾功能评价时,需要排除性别和周龄差异带来的影响。较之常规品系,本研究中转基因小鼠不同周龄差异化生理生化指标相对较少,这可能也与基因敲入有关^[18]。在疫苗研发的动物实验中,经常选用 4~5 周的小鼠进行免疫并定期观察。对于雌性的该模型鼠,4 周龄和 8 周龄组 18 项指标和 10 项生化指标均没有统计学差异。但对于药物评价通常使用某体重组的小鼠研究来说,没有周龄界定,在评价生物学指标时也需要关注周龄变化可能带来的影响。

参考文献:

- [1] 王红,张帅,侯晓彤. 血管紧张素转化酶 2 在新型冠状病毒感染及心脏损伤中的作用 [J]. 心肺血管病杂志, 2020, 39(5): 492-495.
- [2] 宋丽妮,曹曦,刘薇,等. 血管紧张素转化酶 2 对肝细胞凋亡的影响 [J]. 首都医科大学学报, 2018, 39(2): 223-229.
- [3] 齐明华,刘吉奎,叶静,等. 原发性肝癌患者血管紧张素转化酶与血管紧张素转化酶 2 基因转录水平变化趋势 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2014, 24(4): 227-229.
- [4] 隋超,陈亚镇,赖贻旺. 血管紧张素转化酶抑制剂联合 SGLT-2 抑制剂治疗糖尿病肾病效果研究 [J]. 临床军医杂志, 2018, 46(12): 1437-1438.
- [5] 戴海龙,杨强凤,光雪峰,等. 先天性心脏病肺动脉高压介入封堵前后血清血管紧张素转化酶 2 水平研究 [J]. 中国心血管病研究, 2020, 18(2): 97-99.
- [6] 于诗然,杨旻,曹新冉,等. 关注 ACE2 的心血管保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(5): 433-437.
- [7] 王树越,吴娟,贾一扬,等. ACE 和 ACE2 基因多态性与冠心病的相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(16): 3963-3965.
- [8] 白亮,刘宝宁,赵四海,等. 新型冠状病毒来源、传播途径及易感动物模型研究进展 [J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5(S1): 1-2, 11.
- [9] 熊芮,吕建军,聂建辉,等. 冠状病毒动物模型研究进展及 2019-nCoV 可能的易感小动物模型 [J]. 传染病信息, 2020, 33(1): 61-64.
- [10] Sun SH, Chen Q, Gu HJ, et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis [J]. Cell Host Microbe, 2020, 28(1): 124-133.
- [11] Pujhari S, Rasgon JL. Mice with humanized-lungs and immune system-an idealized model for COVID-19 and other respiratory illness [J]. Virulence, 2020, 11(1): 486-488.
- [12] Yinda CK, Port JR, Bushmaker T, et al. K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19 [J]. PLoS Pathog, 2021, 17(1): e1009195.
- [13] Lutz C, Maher L, Lee C, et al. COVID-19 preclinical models: human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice [J]. Hum Genomics, 2020, 14(1): 20.
- [14] Zheng J, Wong LR, Li K, et al. COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice [J]. Nature, 2021, 589(7843): 603-607.
- [15] 李志春,陈赶林,郑凤锦,等. 甘蔗醋对高脂喂养小鼠体重、脏器系数和血清生化指标的影响 [J]. 中国酿造, 2020, 39(1): 50-54.
- [16] 王华民,马珍珍,郝少君,等. 骨刺散对大鼠佐剂关节炎模型继发性病变的影响 [J]. 西部中医药, 2020, 33(4): 45-48.
- [17] 蒋春飞,刘东文,郑芳昊. 伤科黄水经口给药的长期毒性研究 [J]. 陕西中医, 2020, 41(1): 16-19, 23.
- [18] 黎桂玲,刘科,黎雄才,等. 不同生理阶段及性别 SPF 级 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠血液生理生化指标测定与比较 [J]. 广东农业科学, 2019, 46(12): 102-109.

[收稿日期] 2020-09-15