

联体共生动物模型对医学的贡献

冯楠, 罗建民

(河北医科大学第二医院血液科, 河北 050000)

【摘要】 联体共生(parabiosis)是医学实验中的一种造模方法,此动物模型可很好的体现两只动物经联体手术后形成血液、体液交互,达到共生目的,观察联体动物之间从血液到免疫等各个层面对机体的影响。近几年联体实验在联体共生的基础上,多采用异时共生(Heterochronic parabiosis)模型,为肿瘤、内分泌、移植、神经病学、口腔科等领域的研究提供实验基础。

【关键词】 联体共生;异时共生;血液交互

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 04-0074-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.004.015

Contribution of parabiosis animal models In medicine

FENG Nan, LUO Jian-min

(Department of Hematology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

【Abstract】 Parabiosis is an experimental animal model in medical studies. This kind of animal models can realize the exchange of blood and body fluid between the two united animals very well, and makes it possible to observe all influences of these exchange in different aspects, ranging from blood to immunity. Over the past few years, based on parabiosis studies, heterochronic parabiosis animals are preferred to be used as conjoint models and to provide experimental basis for researches in cancer, endocrine, transplantation, neurology and stomatology and so on.

【Key words】 Parabiosis; Heterochronic parabiosis; Blood exchange

联体共生(parabiosis)一词起源于希腊语,‘para’指旁边,紧挨着。‘bios’指生命,中文翻译为联体共生或异种共生。是指以实验手段将两只动物连接在一起,使它们共用一套血液循环系统,形成体液、血液交互,类似于人类的联体婴儿^[1]。联体共生动物常以小鼠作为模型动物,在医学实验研究中应用超过了150年,其中以美国、英国、瑞士及日本应用联体共生动物模型的研究较多,我国对这一实验方法应用较少。2013年,Francesco等^[2]应用联体共生小鼠模型在cell杂志上发表了一篇循环因子GDF11逆转年龄相关性心肌肥厚的文章,引起轰动,随后Science杂志在2014年相继发表两篇文

章佐证这一观点,证实GDF11有改善衰老小鼠的大脑和骨骼肌的功能^[3,4],使这一实验造模方法再次引发关注。目前,小鼠联体共生动物模型在肿瘤、内分泌、移植、神经病学、口腔科均展开应用,现将世界范围内的小鼠联体共生动物模型的发展史综述如下。

1 概述

小鼠联体共生模型最早应用于医学实验是在1860年,法国的生理学家Paul Bert利用白鼠做成联体共生动物模型,以期了解日后器官移植的可行性^[5]。在其后的100多年的医学研究中,联体共生

[作者简介] 冯楠(1981-),住院医师,博士研究生,主要研究方向:恶性血液病的诊断与治疗,E-mail: fengnan630@126.com。

[通讯作者] 罗建民(1960-),主任医师,主要研究方向:恶性血液病诊断与治疗,E-mail: Luoym315@163.com。

动物模型的造模方法基本均沿用了 Paul Bert 的手术方法,将两只小鼠的侧边皮肤纵向切开,切口对位缝合,形成联体。术后可检测到两只小鼠毛细血管已经连通,有血液循环交互。基于他的开创性工作,Paul Bert 在 1866 年获得了法国科学院实验生理学奖。1908 年,德国医生 Sauerbruch 和 Heyde 成功的重复了这一动物模型^[6]。2013 年 Conboy 对 Bert 联体共生动物模型手术方法进行改良,将两只小鼠的紧挨的前腿和后腿对应进行缝合,以增加其稳定性^[1]。

早期的联体共生模型均选取同一性别、年龄、种属且最好是同窝出生的小鼠。这是因为早期实验多为生理学、病理生理学实验,关注的焦点是在联体之后小鼠的死亡率、生存状态、体液、免疫因子等变化情况。这些实验证实联体共生模型小鼠的死亡率与一般外科手术的死亡率相似,存活率在 70%~80%,Molpurgo^[7]报道联体共生模型小鼠可共生超过 3 个月。张富祥等^[8]报道术后联体小鼠出现兴奋、焦虑等特征性运动失常,随后数周小鼠活动逐渐适应联体状态;术后 3 d 出现体重下降,但术后 1 个月体重又恢复至正常;术后粪便中皮质酮代谢物水平快速升高,至第 75 天降至正常;检测术后其中 3 对联体小鼠之间的血液交换率,结果基本正常,第 12 周血液完全交换率分别为 63、46 和 107 min;其联体共生模型 120 d 内无一对死亡。

从 20 世纪 70 年代开始,研究人员不再局限于选取同一种属、性别、年龄的联体共生模型进行研究,而是将年长的小鼠与年轻的小鼠制造成联体共生模型,也称异时共生(Heterochronic parabiosis)模型。1972 年,Ludwig^[9]应用小鼠联体共生动物模型探讨老化的生命体暴露在年轻的生存环境中后的机体变化情况,以寻找机体细胞重新恢复活力的办法,实验证实异时共生模型的年长小鼠生存状态优于同时共生模型。近些年,利用联体共生模型研究的焦点由观察共生小鼠生理学、病理生理学变化,转移到如何利用联体共生模型为与机体细胞老化有关的人类慢性病如心脑血管疾病、糖尿病、阿尔茨海默病、慢性肿瘤等寻找治愈的办法。

2 联体共生模型在肿瘤学中的应用

Rous^[10]应用 Sauerbruch 和 Heyde 的手术方法,缝合 4 对小鼠,联体共生模型中的 1 只为荷腺瘤小鼠,另 1 只为反复荷瘤均不成功的肿瘤耐受小鼠,每只小鼠缝合前都腹腔注射硫酸吗啡麻醉。成对小

鼠胸腹部侧边缝合,术后 10 d 给其中 1 只小鼠皮下注射亚甲蓝,在两只小鼠尿液中均检出亚甲蓝,证明两只小鼠建立了微循环。Rous 的实验中联体共生小鼠最长生存 34 d,1 对中的 1 只死亡后,另 1 只也迅速死亡。Rous 观察到荷瘤小鼠肿瘤体积有所缩小,但是他指出希冀联体共生模型彻底消灭肿瘤不太可能实现。以此实验为基础,后期 Rous 发现了诱导肿瘤病毒,命名为罗氏病毒(Rous's sarcoma virus, RSV),并因此获得 1966 年的诺贝尔医学奖。

3 联体共生模型应用于内分泌研究

Coleman^[11]将缺失 *db* 基因 II 型糖尿病模型小鼠与非肥胖小鼠组成联体共生模型,观察到 II 型糖尿病模型小鼠体重仍上长,未受到正常小鼠的体液影响。由此推断,某些生物因素在 II 型糖尿病模型小鼠身上未起作用,如饱腹感。30 年后 Friedman 在此实验的基础上,发现了确定饱腹感出现的关键因素——瘦素。瘦素作用于下丘脑的代谢调节中枢,发挥抑制食欲,减少能量摄取,增加能量消耗,抑制脂肪的合成。缺失 *db* 基因的大鼠,食欲旺盛,体重增加,导致病态肥胖。目前瘦素已应用于临床治疗病态肥胖的病人。

4 联体共生模型应用于心血管系统的研究

Dahl^[12]的团队建立了具有潜在高血压风险的野生型小鼠联体共生模型,给予高钠饮食,发现两只联体小鼠发生肾功能不全性高血压的机率均等,考虑某些体液因素与高血压的发生有关。将其中 1 只具有潜在高血压风险的小鼠去除肾脏后,与之联体共生的另 1 只小鼠未出现高血压。1993, Lewanczuk^[13]依据这一理论,最终发现了循环高血压因子-甲状旁腺高血压因子(Parathyroid hypertensive factor, PHF),并指出低肾素型高血压动物模型中 PHF 较高。

2013 年 Francesco 选取 6 对 C57 小鼠,每对含年长小鼠 C57 1 只(23 月龄),年轻 C57 小鼠 1 只(2 月龄),缝合成异种共生的小鼠实验模型,观察循环因子对异种共生小鼠的影响,试图阐明心脏肥大老化的机制。Francesco 在小鼠联体 4 周时观察发现联体共生小鼠中年老的老鼠肥大的心肌细胞体积明显缩小,细胞功能也明显恢复。其利用蛋白质组学实验,发现并确认 GDF-11 蛋白属于调节细胞生长和分化的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 家族中的一员,可逆转心肌细胞老

年性肥大,指出未来医学有治愈心脏衰老的可能^[2]。2014 年 Wagers 提出 GDF-11 在年轻小鼠体内的自然浓度较高,通过提高老年小鼠体内 GDF-11 的浓度水平有可能改善其器官系统的功能^[3,4]。GDF11 或许是舒张性心力衰竭——一种不可逆的老年致命疾病的可行性治疗方法。

5 联体共生模型应用于移植科学的研究

1996 年,Starzl^[14]提出成年鼠联体共生可作为研究嵌合体与移植耐受之间关系的一个理想模型。2000 年,史其新等^[15]选取 DA、LEW 大鼠各 28 只,10~12 周龄,将异基因成年大鼠联体共生以诱导相互特异的移植耐受,探讨嵌合体与耐受的关系。实验组联体前后均给予低剂量环磷酰胺(CP, 100 mg/kg)腹腔注射,以减轻主要组织相容性抗原复合物(major histocompatibility complex, MHC)的产生,避免因移植后的免疫排斥反应导致联体失败。因为 MHC 不仅控制着同种移植排斥反应,也与机体免疫应答、免疫调控等关系密切。因为联体共生模型的存活时间直接代表了移植耐受的程 度,史其新等研究人员在异基因成年大鼠联体后第 5、15、45 天时将联体大鼠分开,并相互植皮,观察其皮肤存活时间及免疫耐受等情况。DA、LEW 大鼠于联体 15 d 可诱导较稳定的皮肤移植耐受,并通过流式细胞仪检测联体后再分开的大鼠的脾脏、胸腺供体细胞嵌合程度发现,在联体 5~15 d 内,耐受的诱导与嵌合状态有明显相关性。

吕艳等^[16]利用联体共生模型讨论移植后免疫耐受情况,将 BALB/c 小鼠及 C57BL/6 (B6) 小鼠的脾细胞分别经尾静脉注射给对方,再腹腔注射环磷酰胺(CP, 150 mg/kg),为了降低移植后的免疫排斥反应对实验的影响。手术联体后 1 周分开,并进行相互间的植皮。发现 BALB/c 小鼠对 B6 小鼠的皮肤耐受期明显延长,但是 B6 小鼠对 BALB/c 小鼠的皮肤耐受期无明显延长。在联体小鼠分开后的第 1 天及第 30 天应用流式分析仪进行胸腺及脾脏嵌合程度的检查,发现皮肤耐受时限与嵌合程度不呈正相关。对联体后耐受的 BALB/c 小鼠进行体内和体外细胞转移实验,均未发现耐受小鼠的脾细胞中存在抑制细胞活性。在耐受 BALB/c→B6 小鼠的单向混合淋巴细胞反应(MLR)体系中加入外源 IL-2 可以部分反转耐受 BALB/c 小鼠脾细胞的增殖反应,表明本实验诱导耐受的机制可能与克隆不应答有关。

6 联体共生模型应用于神经病学研究

Morpurgo^[7]早在 1923 年就利用联体共生模型希望寻找到神经细胞再生的可行性。直到 2011 年 Villeda^[17]利用联体共生模型发表在 NATURE 上一篇老化系统环境负性调节神经和认知功能文章,引起广泛关注。Villeda 将一个年轻的老鼠与年长老鼠联体,年轻的老鼠会从年老的老鼠的血浆或者交互的血液环境中获得负性调节因子,实验观察到年轻老鼠的脑神经细胞突触的变形可塑性明显下降,皮层认知功能和空间学习记忆功能亦受到损害。研究证实其负性调节因子为嗜酸粒细胞趋化蛋白 CCL11,增加年轻小鼠体内 CCL11 趋化因子浓度水平可导致其脑内神经细胞数量减少,学习和记忆功能下降^[18]。Villeda 指出在中枢神经系统中,机体功能老化是导致成人神经干/祖细胞和神经细胞数量较少及认知功能障碍的重要原因,使用异种共生动物模型研究血源性因素的变化进一步证实了这一观点。

另外,Wagers 及 Rubin 从联体共生小鼠模型的心血管系统研究中获得灵感,将 GDF11 应用于神经系统研究,通过实验证实了 GDF11 具有促进老年小鼠的神经干细胞增生及大脑中血管发育的作用,可帮助老年小鼠从肌肉损伤中恢复,从而提高它们的跑动速度和抓握力量。小鼠 3D 大脑重建和磁共振成像(MRI)结果表明,老年小鼠的新生血管数量和血流量较前明显增多。基于 GDF11 对于大脑还有更广泛的影响,有可能逆转衰老损伤^[3,4],研究人员可考虑将来 GDF11 会在治疗阿尔茨海默病中凸显价值。

7 小鼠联体共生模型在口腔科学中的研究

Frozoni^[19]应用联体共生小鼠模型分析非始祖细胞和造血细胞在牙质修复中的作用,他选取的是 12~16 周龄的野生型 C57BL/6 小鼠及转基因 C57BL/6 自带荧光小鼠,共 6 对,平均体重 20 g。联体共生小鼠模型中 1 只自带 GFP 荧光,即 GFP+,另 1 只 GFP-,暴露上颌骨第一磨牙牙髓,并从臀部至下颌角做皮肤切口,切口对齐缝合,术后给予盐酸丁丙诺啡(0.2~0.5)mg/kg 注射。分别在联体后 4 周和 8 周用免疫荧光显微镜观察 GFP-小鼠牙髓,均发现 GFP+ 细胞通过根尖孔扩散至其牙髓。实验进一步指出,牙本质样细胞高表达 3.6-GFP,其参与牙本质发育及修复过程。

8 联体共生模型抗衰老的研究

现代医学对于由衰老所引起的疾病,往往没有治愈的办法,如随着年龄增长导致的心肌、骨骼等细胞的衰老、肥大^[20]。1972 研究人员发现年老的老鼠与年轻的老鼠联体后,其生存时间比两只年老的老鼠联体的生存时间延长^[1]。2000 年, Wagers 等^[21]利用小鼠联体共生模型展开研究,她观察到年轻小鼠的血液在老年小鼠体内循环,对老年小鼠损伤后的肌肉修复可产生再生效应。

9 联体共生模型的前景

联体共生模型目前仍存在一些问题,如伦理学家认为联体会增加实验动物的痛苦。但 Alexander Eggela 指出联体共生的造模手术仅有 1% 的死亡率,而且联体共生模型能在手术后存活 2 年之久,与未联体小鼠相比,联体共生对实验动物的寿命影响微乎其微^[22]。该实验模型的耐受性好,可在医学研究的多个试验领域应用。并且,联体共生小鼠模型从体液免疫、分子生物、血液交互、移植耐受等各个方面的影响,为今后治疗甚至治愈慢性病奠定了良好实验基础^[23-25]。在研究人类的慢性疾病等方面,联体共生动物模型具有其独特的应用价值。

参考文献:

[1] Conboy MJ, Conboy IM, Rando TA et al. Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity [J]. Aging Cell, 2013, 12(3): 525 - 530.

[2] Loffredo FS, Steinhauser ML, Steven M, et al. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy [J]. Cell, 2013, 153(4): 828 - 839.

[3] Katsimpardi L, Litterman NK, Pamela A, et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors [J]. Science, 2014, 344(6184): 630 - 634.

[4] Sinha M, Jang YC, Oh J, et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle [J]. Science, 2014, 344(6184): 649 - 652.

[5] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. Nature, 1994, 372(6505): 425 - 432.

[6] Deacon RM. Assessing nest building in mice [J]. Nature protocols, 2006, 1(3): 1117 - 1119.

[7] Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour [J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13(10): 701 - 712.

[8] 张富祥, 杨亦彬, 柯贵宝, 等. 联体小鼠在联体状态下的生理变化 [J]. 动物学研究, 2012, 33(5): 493 - 497.

[9] Ludwig FC, Elashoff RM. Mortality in syngeneic rat parabionts of different chronological age [J]. Trans N Y Acad Sci, 1972, 34(7): 582 - 587.

[10] Rous P. Parabiosis as a test for circulating anti-bodies in cancer: first paper [J]. J Exp Med, 1909, 11(6): 810 - 814.

[11] Coleman DL. A historical perspective on leptin [J]. Nat Med, 2010, 16(10): 1097 - 1099.

[12] Knudsen KD, Iwai J, Heine M, et al. Genetic influence on the development of renal hypertension in parabiotic rats: evidence for a humoral factor [J]. J Exp Med, 1969, 130(6): 1353 - 65.

[13] Lewanczuk RZ, Pang PK. The occurrence of parathyroid hypertensive factor (PHF) in Dahl rats [J]. Am J Hypertens, 1993, 6(9): 758 - 762.

[14] Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, et al. The lost chord: microchimerism and allograft survival [J]. Immunol Today, 1996, 17: 577 - 584.

[15] 史其新, 谢蜀生, 俞莉章, 等. 成年大鼠联体诱导的移植耐受与嵌合状态相关性的研究 [J]. 中华医学杂志, 2000, 80(8): 602 - 605.

[16] 吕艳, 谢蜀生, 张庆殷, 等. 供体脾细胞输注诱导小鼠移植耐受及其机理的研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(2): 146 - 150.

[17] Villeda SA, Luo J, Mosher KI, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function [J]. Nature, 2011, 477(7362): 90 - 94.

[18] Ruckh JM, Zhao JW, Shadrach JL, et al. Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system [J]. Stem Cell, 2012, 10(1): 96 - 103.

[19] Frozoni M, Zaia AA, Line SR, et al. Analysis of the contribution of nonresident progenitor cells and hematopoietic cells to reparative dentinogenesis using parabiosis model in mice [J]. J Endod, 2012, 38(9): 1214 - 1219.

[20] 王喆, 李瑞生. 衰老动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2013(3): 67 - 70.

[21] Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells [J]. Science, 2002, 297(5590): 2256 - 2259.

[22] Eggela A, Wyss-Coray T. A revival of parabiosis in biomedical research [J]. Swiss Med Wkly, 2014, 4(144): 13914.

[23] Salpeter SJ, Khalailah A, Weinberg-Corem N, et al. Systemic regulation of the age-related decline of pancreatic β -cell replication [J]. Diabetes, 2013, 62(8): 2843 - 2848.

[24] Czirr E, Wyss-Coray T. The immunology of neurodegeneration [J]. J Clin Invest, 2012, 122(4): 1156 - 1163.

[25] Demy DL, Ranta Z, Giorgi J-M, et al. Generating parabiotic zebrafish embryos for cell migration and homing studies [J]. Nat Meth, 2013, 10(3): 256 - 258.

[修回日期] 2015-01-16