

耿子涵, 包蕾, 郭姗姗, 等. 人冠状病毒 229E 寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠模型的建立及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 3-12, 67.

Geng ZH, Bao L, Guo SS, et al. Establishment and evaluation on a mouse model combing disease with syndrome of hCoV-229E pneumonia with “Hanshi Yidu Xifei” syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 3-12, 67.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 01. 001

人冠状病毒 229E 寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠模型的建立及评价

耿子涵, 包蕾, 郭姗姗, 时宇静, 鲍岩岩, 赵荣华, 孙静, 高英杰, 崔晓兰*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的 建立人冠状病毒 229E (hCoV-229E) 寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠模型, 观察其中医证候、疾病表现与病毒性肺炎典型临床表现的一致性, 验证该模型在药效评价中的可靠性。**方法** 将 BALB/c 幼龄小鼠置于具有寒湿环境的人工气候箱中, 并叠加 hCoV-229E 滴鼻感染的方法建立小鼠模型, 以仅进行感染、仅置于寒湿环境、正常饲养的小鼠分别作为对照。评价模型小鼠的中医证候相关外观行为表征, 以及肺指数、肺组织中的病毒载量及活病毒存在情况、肺部组织病理学及影像学改变、血清胃肠激素水平、淋巴细胞的百分比和肺组织中的炎性细胞因子水平变化, 并使用能够治疗寒湿疫毒袭肺证的复方中药“寒湿疫方”, 评价该模型在药效评价中的可靠性。**结果** 与正常小鼠相比, 模型小鼠表现出与寒湿证以及与病毒性肺炎疾病相一致的外观和行为, 包括摄食和饮水量减少、活跃程度下降、便溏、毛发油腻 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 以及肺部病毒核酸性、肺指数增加 ($P < 0.01$)、肺及支气管组织病理学评分显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、胃动素水平上升 ($P < 0.01$)、胃泌素水平降低 ($P < 0.01$)、外周血淋巴细胞百分比降低 ($P < 0.01$)、炎性细胞因子水平升高 ($P < 0.01$)。给予复方中药后, 各指标有不同程度的缓解 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 本研究建立的 hCoV-229E 寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠模型与临床疾病表现具有一致性, 为治疗该证候肺炎的药物筛选提供了一种潜在的方法。

【关键词】 人冠状病毒 229E; 病毒性肺炎; 中医药; 病证结合模型; 寒湿疫毒袭肺证

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0003-10

Establishment and evaluation on a mouse model combing disease with syndrome of hCoV-229E pneumonia with “Hanshi Yidu Xifei” syndrome

GENG Zihan, BAO Lei, GUO Shanshan, SHI Yujing, BAO Yanyan, ZHAO Ronghua,
SUN Jing, GAO Yingjie, CUI Xiaolan*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

【Abstract】 Objective To establish a disease-syndrome combination model of human coronavirus 229E (hCoV-229E) pneumonia and “Hanshi Yidu Xifei” syndrome, observe the consistency of traditional Chinese medicine syndrome and the disease of the model with typical clinical manifestations of viral pneumonia, and verify the reliability of the model for pharmacodynamic evaluation. **Methods** Young BALB/c mice were placed in a cold damp environment and infected

【基金项目】 国家重点研发计划中国-奥地利中医药防治重大感染性疾病“一带一路”联合实验室建设与联合研究 (2020YFE0205100)。

【作者简介】 耿子涵 (1992—), 女, 副研究员, 研究方向: 免疫学。E-mail: zhgeng@icmm.ac.cn

【通信作者】 崔晓兰 (1961—), 女, 研究员, 研究方向: 中药药理。E-mail: cuixiaolan2812@126.com

with hCoV-229E to establish the mouse model. The appearance and behavior of model mice, serum gastrointestinal hormone levels, lung index, viral load in lung tissue, changes in the presence of live virus, lung histopathology and imaging, inflammatory cytokines, and lymphocytes in peripheral blood were analyzed. A Chinese herbal compound prescription for “Hanshi Yidu Xifei” syndrome was used to assess the reliability of the model for drug evaluation. **Results** Compared with normal mice, model mice showed the appearance and behaviors of cold-dampness syndrome, such as reduced food and water intake, loose stool and greasy hair ($P<0.05$ or $P<0.01$). An increased motilin level ($P<0.01$) and decreased gastrin level ($P<0.01$) were also found in model mice. Viral nucleic acids in lungs, an increased lung index ($P<0.01$), increased lung and bronchial histopathology scores ($P<0.05$ or $P<0.01$), reduced frequency of T and B lymphocytes ($P<0.01$), and increased levels of inflammatory cytokines ($P<0.01$) were also observed, which were similar to the clinical features of coronavirus pneumonia. The prescription was effective to reverse the changes in these indicators ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusions** The disease-syndrome combination model of hCoV-229E pneumonia and “Hanshi Yidu Xifei” syndrome was established successfully and consistent with clinical manifestations. It provides a potential tool for drug screening to treat pneumonia presenting with this traditional Chinese medicine syndrome.

【Keywords】 human coronavirus 229E; viral pneumonia; traditional Chinese medicine; disease-syndrome combination model; “Hanshi Yidu Xifei” syndrome

病毒性肺炎是由病毒引起的单侧或双侧肺部炎性病变。基于上千年的经验和积累,中医药在历次病毒性肺炎疫情的防治中发挥了重要的作用,在缓解临床症状、缩短疗程、促进治愈等方面取得了良好的效果。不论是缓解急性重症呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)的急性早期症状^[1],在甲型 H1N1 流感的辨证治疗^[2],还是在新型冠状病毒性肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)疫情中^[3-7],复方中药或中成药均在临床应急治疗中发挥了积极作用。

与此同时,提供实验数据与临床相互验证,也显得尤为重要,这对有效药物的筛选、寻找其作用靶点、进一步推动中医药在临床应用具有现实意义。考虑到中医药治疗的特点是并不针对某一特定病毒,而是基于对其病因病机的认识进行辨证论治,主要注重机体整体状态、特别是对机体免疫状态的调节^[8],建立符合中医药特点的病毒感染动物模型十分必要。中药药效评价的模型着重于中医证候、疾病表现与临床症状的一致性,而不局限于特定的病毒感染。由寒、湿之邪导致的“寒湿疫毒袭肺证”是一种可见于病毒性肺炎早期的中医证候^[9-11],在本研究中,我们以寒湿疫毒袭肺证以及病毒性肺炎疾病的典型临床表现作为参照,使用人冠状病毒 229E(hCoV-229E)叠加寒湿刺激的方法,建立 hCoV-229E 寒湿疫毒袭肺证病证结合模型,对病毒的感染条件和模型小鼠的表现进行摸索和评价,为治疗以该证候为表现的肺炎的有效药物筛选和临床应用提供源自动物实验的科学数据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

72 只 21~28 日龄 BALB/c 小鼠,SPF 级,雌雄各半,体重(14 ± 1)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006]。小鼠饲养于中国中医科学院中药研究所 ABSL-2 实验室[SYXK(京)2019-0003]。所有动物实验均遵循美国国立卫生研究院(NIH)及北京市实验动物伦理委员会的规定,经过中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会批准(2020D007),实验遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

人肺癌细胞系 A549(BNCC337696)、人胚肺成纤维细胞系 MRC-5(BNCC338054),均购自北京北纳创联生物技术研究院。

1.1.3 病毒株

hCoV-229E 毒株由中国医学科学院医药生物技术研究所提供,由中药研究所 BSL-2、ABSL-2 实验室保存及传代。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),批号 35081003, Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) 培养基,批号 33218004,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS),批号 18919010,均购自美国康宁公司;青霉素链霉素双抗(Penicillin Streptomycin, PS),批号 1796440,胰蛋白酶,批号 2048080,均购自美国 Gibco 公司;甲醛溶液,批号 F20180825,二甲苯,批号 20170705,购自国药集团化学试剂有限公

司; QIAamp 病毒 RNA 纯化试剂盒, 批号 163052733, 购自凯杰企业管理上海有限公司; TRIzol Reagent, 批号 257403, 购自美国 Life 公司; Human Coronavirus (hCoV-229E) Real time RT-PCR kit, 批号 P20191201, 购自上海之江生物科技股份有限公司; Mouse Gas ELISA Kit, 批号 02/2020, Mouse MTL ELISA Kit, 批号 02/2020, 均购自上海酶联生物技术有限公司; Mouse IL6 Valukine™ ELISA Kit, 批号 951928, Mouse IL10 Valukine™ ELISA Kit, 批号 185314, Mouse TNF- α ELISA Kit, 批号 266117, Mouse INF- γ ELISA Kit, 批号 352764, 均购自美国 bio-technique 公司; 无水乙醇, 批号 20180208, 伊红, 批号 20150915, 购自北京化工厂; 4% 细胞组织固定液, 批号 DE0094, 购自北京拜尔迪生物技术有限公司; 苏木素染色液, 批号 DH0001/0405A17, 购自北京博瑞捷科技有限公司; PerCP-Cyanine5.5 标记抗小鼠 CD4(RM4-5), 批号 65-0042, APC 标记抗小鼠 CD8a (53-6.7), 批号 20-0081, PE 标记抗小鼠 CD19 (1D3), 批号 50-0193, 红细胞裂解液, 批号 B4300083019TN, 均购自美国 TONBO biosciences 公司。

验证用药使用《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版)》中的寒湿疫方^[12-13], 组成为: 生麻黄 6 g、生石膏 15 g、杏仁 9 g、羌活 15 g、葶苈子 15 g、贯众 9 g、地龙 15 g、徐长卿 15 g、藿香 15 g、佩兰 9 g、苍术 15 g、云苓 45 g、生白术 30 g、焦三仙 9 g、厚朴 15 g、焦槟榔 9 g、煨草果 9 g、生姜 15 g, 由中国中医科学院中药研究所中药药理研究中心制备, 批次 20200318。给药量根据 Meeh-Rubner 公式, 以人体给药剂量推算小鼠的等效剂量, 生药量 105.6 g/(kg·d) 为临床 2 倍剂量, 52.8 g/(kg·d) 为临床等效剂量。

A2 型生物安全柜, 型号 MCS-Advantage 1.8, 购自美国 Thermo 公司; 智能人工气候箱, 型号 RXZ-380B, 购自宁波江南仪器厂; 电子分析天平, 型号 AR1140 MAX110 g, 购自美国 Ohaus 公司; 电子天平, 型号 AL204 MAX210 g, 购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; IVC 小鼠饲养笼, 型号 ZJ-4, 购自苏州市冯氏实验室动物设备有限公司; Buxco 小鼠雾化吸入系统, 购自美国 DSI; 离心机, 型号 Centrifuge 5430, 购自德国 Eppendorf 公司; 石蜡包埋机, 型号 EG 1140 H, 自动染色机, 型号 XL 5010, 购自德国 Leica 公司; 全自动轮转式切片机, 型号 HM

355 S, 购自德国 Microm 公司; 全景组织定量分析系统, 型号 Tissue FAXS Plus, 购自奥地利 TissueGnostics 公司; 小动物 Micro-CT, 型号 Inveon MM, 购自德国 Siemens 公司。Real-time PCR 仪, 型号 QuantStudio 5, 购自美国 Applied biosystems 公司; 八连排管迷你离心机, 型号 LX-300, 迷你涡旋振荡器, 型号 OL-901, 均购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 多功能酶标仪, 型号 Enspire, 购自德国 PerkinElmer 公司; 流式细胞仪, 型号 Accuri C6 Plus, 购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 病毒株传代与感染

病毒液接种在 A549 细胞中, 在细胞维持培养基(含 2% FBS 的培养基)中培养 72~96 h 并观察细胞病变, 并将细胞及培养液于 -80℃ 下冻融后取上清, 采用 Reed-Muench 法梯度稀释病毒, 测定半数组织培养感染剂量(median tissue culture infective dose, TCID₅₀)^[14], 分装保存于 -80℃。在验证小鼠肺组织中是否存在活病毒的实验中, 取各组小鼠的全肺组织与 PBS 进行匀浆, 取匀浆上清接种于 MRC-5 细胞, 镜下观察细胞病变情况。所有病毒相关实验均在生物安全柜中操作。

1.3.2 hCoV-229E 寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠模型的建立

将模型组小鼠置于人工气候箱中, (4±2)℃, 相对湿度(90±3)%, 每天放置 4 h 至实验结束, 首次放置为第 1 天。于第 5、6 天轻度麻醉小鼠, 取生理盐水稀释的病毒悬液, 以 100 倍 TCID₅₀、体积为 50 μ L 的病毒稀释液滴鼻感染 BALB/c 小鼠。相应的 50 μ L 正常细胞培养上清用于正常组小鼠滴鼻。以仅放置于人工气候箱中的小鼠作为寒湿对照, 以正常环境下饲养的感染小鼠作为感染对照, 以正常环境下饲养且未进行病毒感染的小鼠作为正常对照。在造模期间对各组小鼠寒湿疫毒袭肺证相关的行为表征进行评价, 并于第 8 天进行肺指数、肺组织病毒载量、肺部 CT、肺组织中的炎性细胞因子、外周血淋巴细胞百分比等的检测。

1.3.3 寒湿疫毒袭肺证相关行为表征的评价

造模后, 分别于第 2、4、6、8 天进行行为表征观察和评分, 包括行为状态(扎堆不动=1, 少动=2, 适度活动=3, 活跃=4, 兴奋多动=5), 精神状态(迟滞=1, 倦怠=2, 适度=3, 易激惹=4, 躁怒=5), 皮肤毛发状态(枯乱=1, 不泽=2, 顺泽=3, 潮湿=4, 油腻=

5), 粪便状态(便硬结=1, 干燥=2, 适宜=3, 粘腻=4, 便溏=5), 并于第 7~8 天测定平均食物和水摄入量(计算方法为摄食或饮水总量/该组小鼠数量)。

1.3.4 小鼠肺组织病理分析

将在细胞组织固定液中固定后的小鼠肺组织用乙醇和二甲苯进行脱水, 并进行石蜡包埋。将蜡块切为 4~6 μm 的切片, 置于载玻片, 烤片烘干。石蜡切片经苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色后, 于光学显微镜下观察肺组织病理变化并拍照。根据组织病理学改变, 对各组小鼠肺组织进行评分, 其中, 无炎性渗出、水肿、明显出血红染=0, 肺间质有轻度炎性渗出, 肺细支气管及周围无明显炎症=1, 肺间质轻度渗出炎症, 有少量出血红染, 肺细支气管周围轻度炎性渗出=2, 肺间质出血红染, 伴肺泡塌陷、组织水肿、炎性渗出=3。

1.3.5 hCoV-229E 核酸提取与扩增

取小鼠左肺组织, 使用 TRIzol Reagent 提取肺组织 RNA。使用 hCoV-229E Real time RT-PCR Kit, 按说明书操作进行 HCoV-229E 核酸的扩增, 采用 QuantStudio 5 Real-time PCR 仪进行荧光信号检测。其中 FAM 通道 Ct 值小于等于 38 h 为病毒 RNA 阳性, 并根据试剂盒中阳性对照品的标准曲线计算病毒载量。

1.3.6 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

取小鼠血清, 按 ELISA 试剂盒操作说明检测小鼠血清中的胃动素、胃泌素水平。取小鼠右肺肺组织 50 mg 置于 2 mL PBS 中进行超声匀浆, 取匀浆上清, 按 ELISA 试剂盒操作说明检测肺组织中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ) 水平。使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值, 并根据标准曲线及样品稀释倍数计算上述各指标的浓度。

1.3.7 流式细胞术

取抗凝小鼠全血 150 μL , 按流式抗体及红细胞裂解液说明书, 分别加入抗小鼠 CD4、抗小鼠 CD8a 以及抗小鼠 CD19, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后, 加入 2 mL 1 \times 裂解液重悬细胞, 室温孵育 5~10 min 直至溶液由红色浑浊变为红色澄清, 立即加入 10 mL PBS 终止裂解, 1600 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 弃去上清, 用含 2% FBS 的 PBS 将 4% 细胞组织固定液稀释为 2%, 重悬细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存并尽快使用 Accuri C6

plus 流式细胞仪收集细胞, 使用 FlowJo 软件进行分析。

1.3.8 验证用药的给药方法

在造模的第 5~7 天, 每天进行 1 次灌胃给药, 高剂量组 105.6 g/(kg·d), 低剂量组 52.8 g/(kg·d), 体积 20 mL/(kg·d)。

1.4 统计学方法

所有数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的方式表示, 并采用 SPSS 或 GraphPad Prism 7 比较各组之间的差异。其中服从正态分布且方差齐性的两组数据采用 t 检验, 多组之间采用 One-way analysis of variance (ANOVA) 进行统计学分析, 方差不齐则采用 Dunnett T3 检验比较各组间差异。若样本不服从正态分布, 则采用 Kruskal-Wallis 独立样本非参数检验。当 $P < 0.05$ 时表示差异具有统计学意义。小鼠肺指数计算方法为: 肺湿重 $\times 100$ /体重。

2 结果

2.1 动物模型的建立

选择体重(14 \pm 1)g, 约为 3~4 周龄的 BALB/c 幼鼠, 构建 hCoV-229E 寒湿疫毒袭肺证病证结合模型。采用参考文献^[15]模拟寒湿环境刺激, 并使用 100 TCID₅₀ 的 hCoV-229E 进行滴鼻, 诱导小鼠肺部炎症。其分组与步骤如图 1 所示, 以模型小鼠开始放置于人工气候箱为造模第 1 天, 其中正常组小鼠饲养于正常环境且不进行感染; 感染组小鼠饲养于正常环境, 在第 5 天和第 6 天用病毒各滴鼻感染 1 次; 寒湿组小鼠从第 1 天起每天置于人工气候箱中 4 h, 但不进行感染; 模型组小鼠从第 1 天起每天置于人工气候箱 4 h, 并在第 5 天和第 6 天进行 2 次滴鼻感染。

2.2 动物模型的鉴定和评价-中医寒湿证表现

为了明确模型小鼠是否具有中医寒湿证相关的行为表征, 于造模第 2 天开始对小鼠的行为状态、精神状态、皮肤毛发状态以及大便状态进行评分。结果发现, 造模第 2 天, 寒湿组小鼠开始出现皮肤毛发潮湿, 相应评分增加, 其他行为表征均未出现异常; 造模第 4 天, 与正常小鼠相比, 寒湿组小鼠行为状态评分较低, 精神、皮肤毛发状态评分增高, 大便状态评分也较高; 造模第 6 天, 与正常小鼠相比, 寒湿组小鼠的行为状态评分较低, 皮肤毛发状态、大便状态评分均升高; 感染组小鼠的行为评分变化趋

势与寒湿组相似,但毛发和粪便更为干燥;模型组与寒湿组小鼠各项行为表征均较为一致,其中行为和精神状态的变化更为明显。对比造模第 8 天各组每只小鼠的评分,发现暴露于寒湿环境中的寒湿组和模型组小鼠的行为和精神状态评分低于正常,且毛发油腻、便溏,皮肤毛发和大便状态评分高于正常,与寒湿证相关文献报道一致^[16];而感染组的行为和精神状态评分明显下降,皮肤毛发则表现为干枯,大便硬结(图 2A)。

观察各组的平均摄食量、摄水量(摄食或饮水总量/该组小鼠数量),发现与正常组相比,模型组的摄入量较低;感染组和寒湿组与正常组相比摄食、摄水量减少,但高于模型组(图 2B)。以上结果表明模型小鼠能够表现出与中医寒湿证相吻合的外观和行为特征。

2.3 动物模型的鉴定和评价-基于现代医学的评价指标

为了明确该病毒是否会引起小鼠肺炎,对各组小鼠肺组织进行 hCoV-229E 核酸扩增,并观察肺部的组织病理学和影像学变化。结果显示,感染组以及模型组小鼠肺组织病毒 RNA 均呈阳性,其中模型组小鼠肺病毒载量显著高于感染组,提示寒湿环境可进一步促进病毒进入肺组织(图 3A)。肺指数计

算结果显示,在各组小鼠体重无显著性差异的前提下,与正常组相比,感染组及模型组小鼠肺指数显著升高(图 3B、3C)。随后,将各组小鼠肺组织匀浆上清接种至 MRC-5 细胞中,发现与正常培养的细胞相比,正常小鼠的肺组织匀浆上清使细胞形态略有改变,而感染组和模型组上清接种后造成了明显的细胞病变(图 3D),其 TCID₅₀ 分别为 10^{-5.23} 和 10^{-6.15},提示感染组和模型组小鼠肺组织中均存在活病毒。

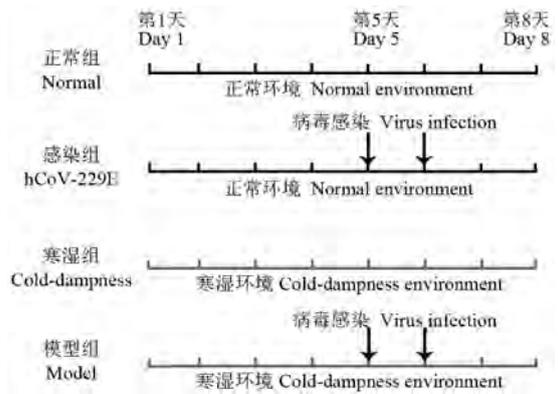
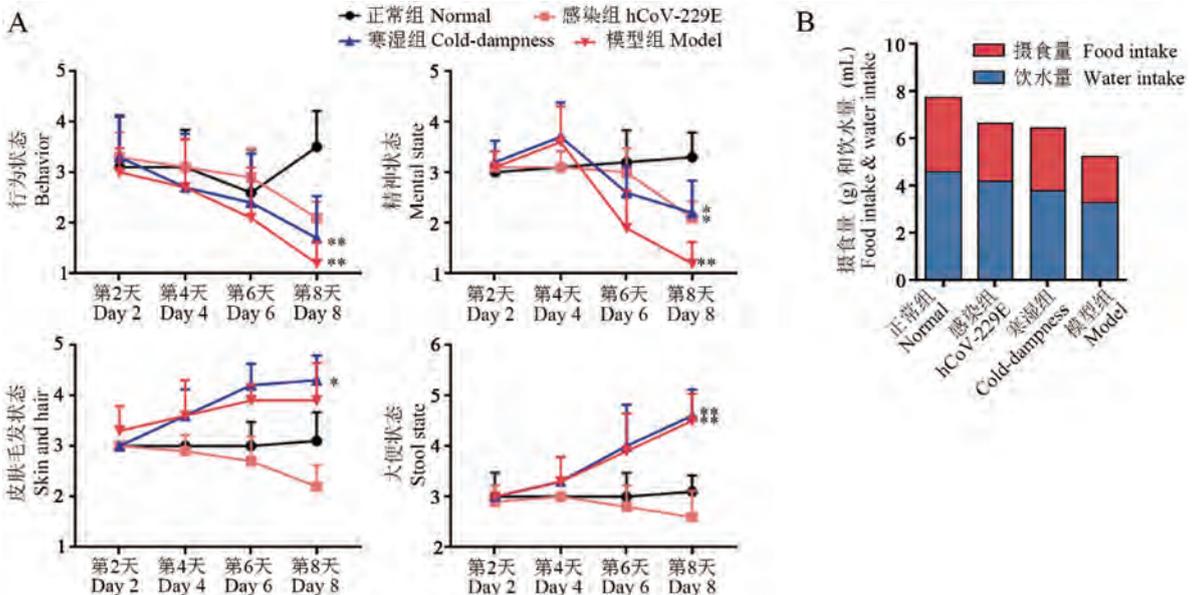


图 1 病证结合模型小鼠的构建方法

Figure 1 Methods to establish the disease-syndrome combination mouse model

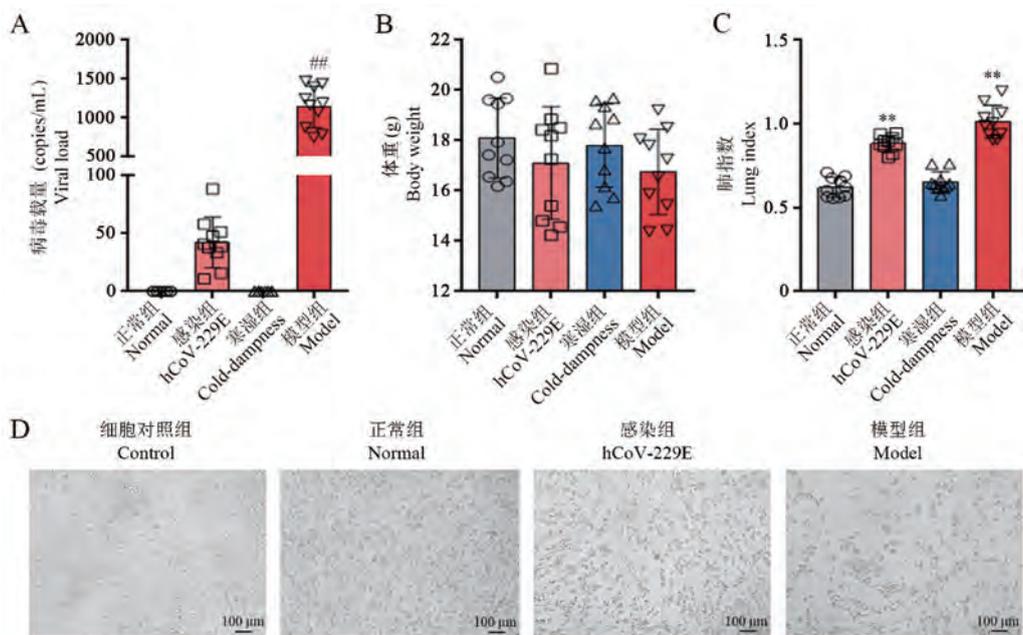


注:A:各组小鼠第 2、4、6、8 天的行为表征评分;B:造模第 7~8 天各组的平均摄食量和平均摄水量。第 8 天,与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 2 病证结合模型小鼠的建立及行为表征评价($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. A, Evaluation of behavior scores at the 2nd, 4th, 6th and 8th day. B, Average food intake and average water intake of each group (total food or water intake of each group) measured for 24 h from the 7th to 8th day. On the 8th day, compared with normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Establishment of the disease-syndrome combination model mice and evaluation of its appearance and behavior



注:A:小鼠肺组织的 hCoV-229E 病毒载量;B:第 8 天各组小鼠的体重;C:各组小鼠肺指数;D:各组 MRC-5 细胞形态。与正常组相比, ** $P < 0.01$;与感染组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 3 各组小鼠的肺指数及病毒活性检测($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Note. A, Real time RT-PCR amplification of hCoV-229E nucleic acid extracted from mice lung tissues. B, Body weight of mice measured at the 8th day. C, Lung index of mice. D, Microscopic cell morphology of MRC-5 cells of each group. Compared with normal group, ** $P < 0.01$. Compared with hCoV-229E group, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Detection of lung index and virus activity of each group

HE 染色结果显示,正常组的肺组织结构正常,肺组织未见明显肿胀,肺间质未见明显瘀血或炎性渗出;寒湿组观察到轻度出血、肺组织细胞增生和炎症浸润;感染组和模型组小鼠肺组织均出现大面积出血红染、肺泡支架塌陷,伴有肺泡上皮增生和炎性细胞浸润(图 4A)。与正常组相比,模型组支气管的组织病理学评分显著升高,感染组及模型组的肺病理学评分明显升高(图 4B、4C)。Micro-CT 结果显示,感染组和模型组小鼠肺静脉明显增粗,可观察到斑点状阴影(图 4D)。以上结果表明,模型小鼠除表现出中医寒湿证相关的行为表征外,肺部也表现出与病毒性肺炎相似的炎性改变。

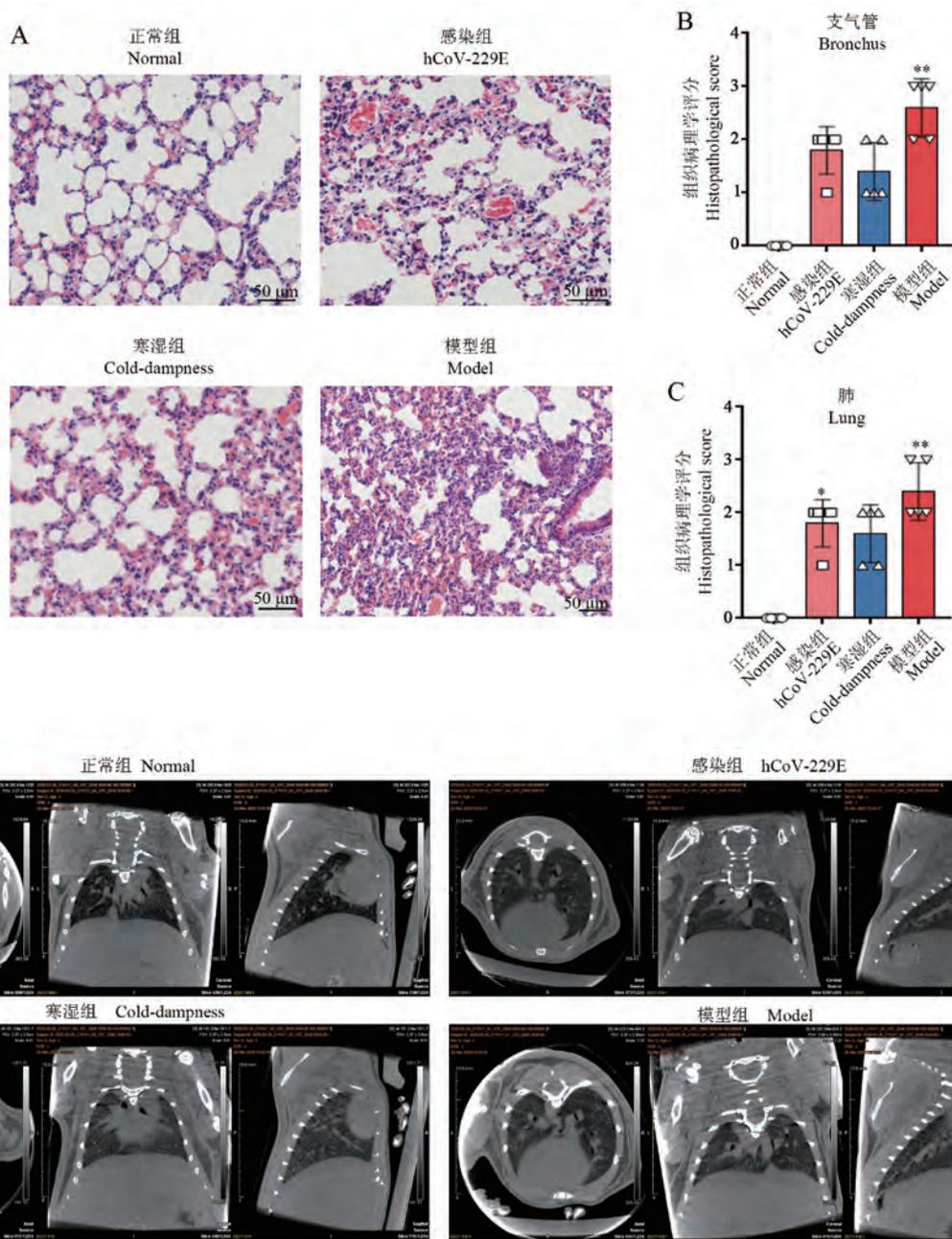
在外周血生理生化指标方面,对本模型小鼠外周血中的 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞以及 B 细胞的百分比进行检测,结果发现与正常组相比,模型组小鼠 T 和 B 细胞的百分比均显著降低(图 5A)。寒湿组的淋巴细胞也呈减少趋势,提示病毒和寒湿的刺激均可造成细胞免疫功能受损。对各组小鼠血清中的胃动素和胃泌素水平进行检测,发现与正常组相比,寒湿组和模型组胃泌素水平显著降低,而其它 3

组的胃动素水平显著升高,其中模型组小鼠胃动素水平最高(图 5B),提示寒湿组以及模型组小鼠胃肠功能受损。

对各组小鼠肺组织匀浆中细胞因子的水平变化情况进行检测,结果显示,与正常组相比,寒湿组的 4 种细胞因子无明显差异,感染组和模型组的 IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平显著升高(图 6A~6C);各组 IFN- γ 水平无统计学差异(图 6D)。以上结果显示,模型小鼠外周血淋巴细胞比例降低,肺组织中的炎性细胞因子水平升高,与人冠状病毒肺炎的临床表型类似。

2.4 动物模型的鉴定和评价-中药复方验证

为了对该小鼠模型在药效评价中的可靠性进行明确,使用能够治疗寒湿疫毒袭肺证的复方中药“寒湿疫方”^[13],以临床 2 倍剂量(高剂量)和等倍剂量(低剂量),从第 5 天开始每天进行给药。结果发现,在中医证候方面,与模型组相比,给药治疗能够恢复小鼠的平均摄食、饮水量(图 7A),能够缓解小鼠寒湿证行为表征(图 7B)。在小鼠肺炎疾病方面,与模型组相比,给药后小鼠肺指数显著降低(图 7C);小鼠肺病毒载



注:A:各组肺 HE 染色;B:细气管的组织病理学评分;C:肺组织病理学评分;D:各组小鼠肺 Micro-CT。与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 4 各组小鼠的肺部病理学和影像学改变($\bar{x} \pm s, n = 5$)

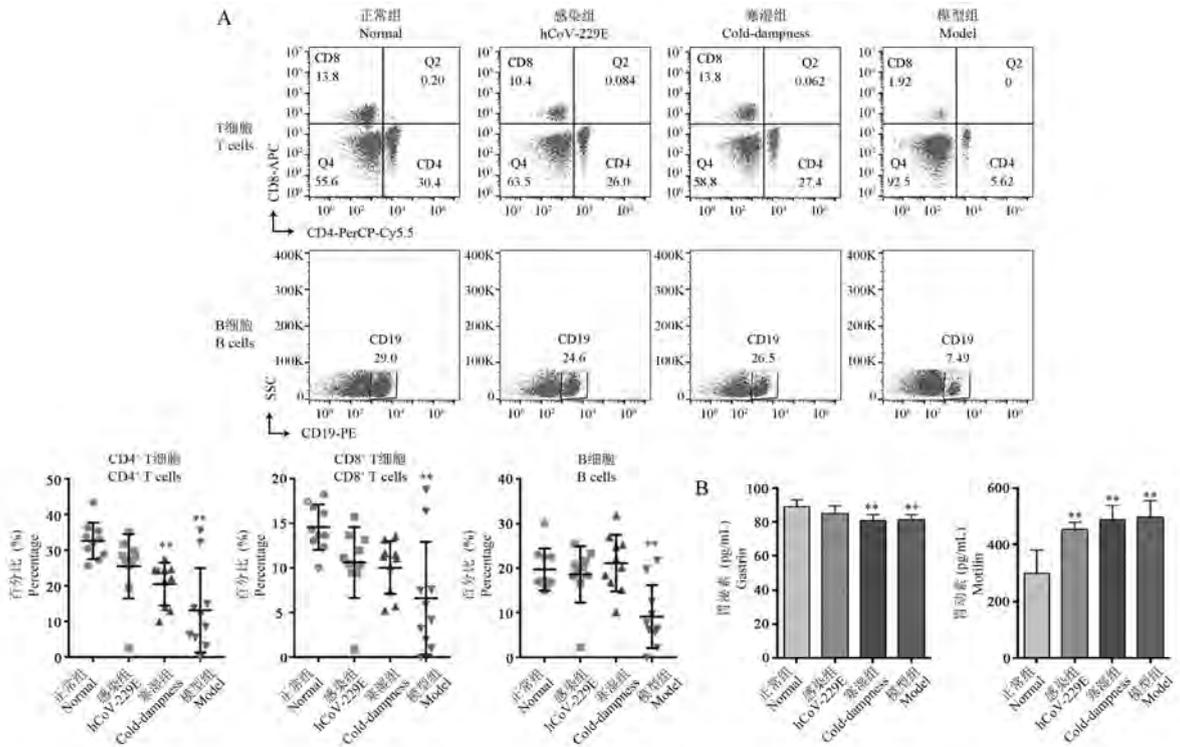
Note. A, HE staining of lungs. B, Histopathological scores of bronchioles. C, Histopathological scores of lungs. D, Micro-CT of mice lung in each group. Compared with normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Pathological and imaging changes of mice lung in each group

量、胃动素水平、外周血淋巴细胞百分比、细胞因子水平得到明显恢复(图 7D~7G)。以上结果表明治疗寒湿疫的复方中药对模型小鼠的各指标有不同程度的缓解作用,该模型对于评估药物是否可以缓解 hCoV-229E 寒湿疫毒袭肺证具有一定可靠性。

3 讨论

中医药在病毒性肺炎的治疗中有着丰富经验和积极的疗效,然而,大多数药物缺乏动物实验数据支持。其中的主要原因是缺乏相应的动物模型,因此,构建符合中医证候、适用于中医药药效评价

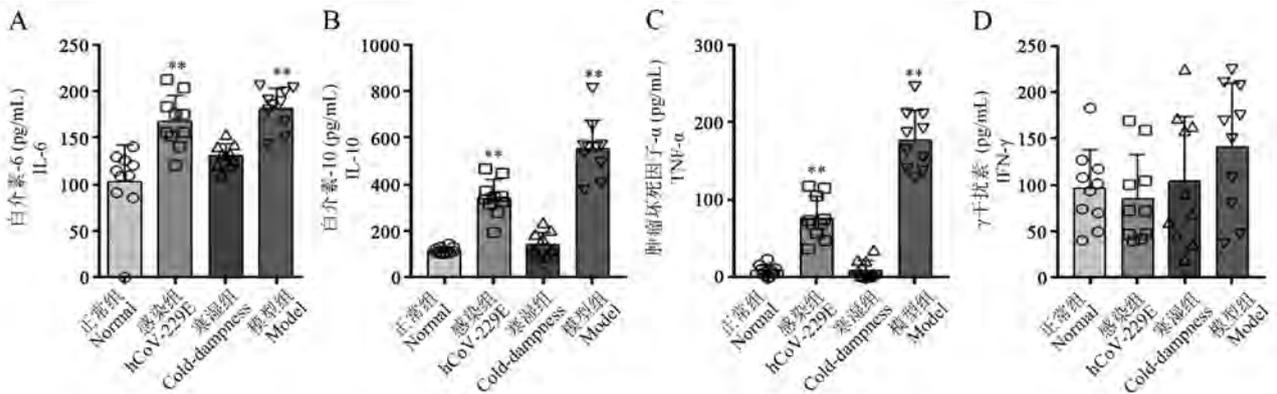


注:A:各组小鼠外周血淋巴细胞百分比;B:血清中胃泌素和胃动素的水平。与正常组相比, ** $P < 0.01$ 。

图5 各组小鼠外周血生理生化指标变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. A, Frequency of T and B lymphocytes in peripheral blood. B, Level of serum gastrin and motilin. Compared with normal group, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Physiological and biochemical changes in peripheral blood of mice

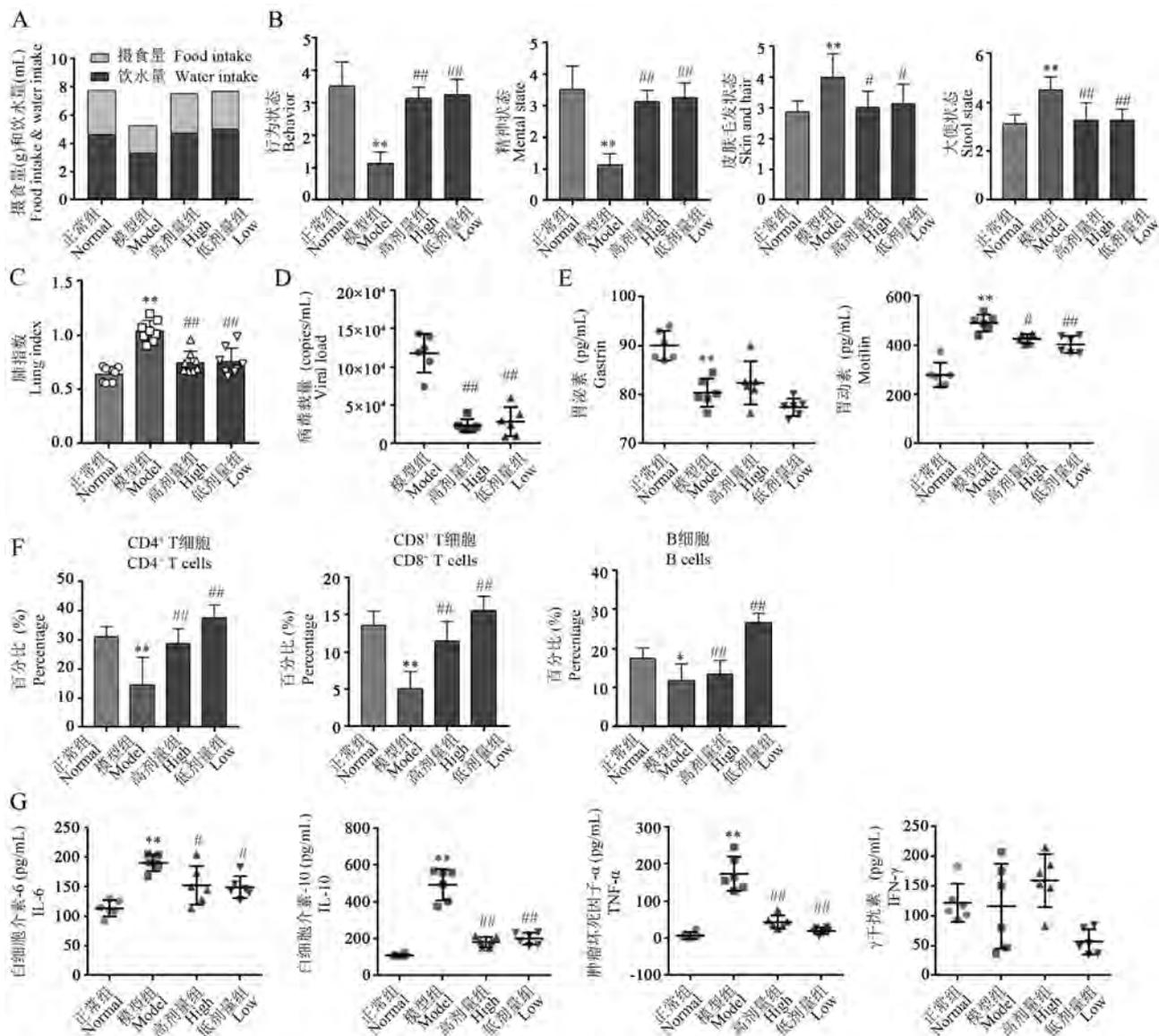


注:A:各组肺匀浆中IL-6的水平;B:各组肺匀浆中IL-10的水平;C:各组肺匀浆中TNF- α 水平;D:各组肺匀浆中IFN- γ 的水平。与正常组相比, ** $P < 0.01$ 。

图6 小鼠肺组织匀浆中的细胞因子水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. A, Level of IL-6 in lung homogenates of each group. B, Level of IL-10 in lung homogenates of each group. C, Level of TNF- α in lung homogenates of each group. D, Level of IFN- γ in lung homogenates of each group. Compared with normal group, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Cytokines level in lung homogenates of mice



注:A:第7天~第8天各组的平均摄食、饮水量;B:造模第8天各组小鼠的行为表征评分($n=8$);C:各组小鼠肺指数($n=8$);D:各组小鼠肺组织中的病毒载量($n=6$);E:各组小鼠血清中胃泌素和胃动素水平($n=8$);F:各组小鼠外周血T、B淋巴细胞的百分比($n=8$);G:各组小鼠肺组织匀浆中炎性细胞因子的水平($n=6$)。与正常组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与模型组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{###}P<0.01$ 。

图7 两剂量的复方中药对病证结合小鼠各评价指标的影响($\bar{x}\pm s$)

Note. A, Average food and water intake of each group from the 7th to 8th day. B, Appearance and behavior scores determined at the 8th day ($n=8$). C, Lung index of each group ($n=8$). D, RT-PCR of hCoV-229E in lung tissue ($n=6$). E, Level of gastrin and motilin in mice serum ($n=8$). F, Percentage of T and B lymphocytes in peripheral blood ($n=8$). G, Level of inflammatory cytokines in lung tissue homogenate ($n=6$), high and low represent clinical double and equal dose, respectively. Compared with normal group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with model group, $^{\#}P<0.05$, $^{###}P<0.01$.

Figure 7 Effect of compound TCM on the disease-syndrome combination model

的动物模型迫在眉睫。

在病毒性肺炎的治疗中,西药研发主要针对病毒本身,主要通过抑制病毒的糖基化修饰以及病毒核酸,从病毒增殖周期中的吸附、穿入、复制等环节发挥抗病毒作用^[17-18]。中医药治疗病毒性肺炎并不针对病毒本身,而是强调根据疾病证候特点辨证论治,更多关注机体整体状态的调节,其突出特点

是非特异性抗病毒、调节机体免疫功能、减轻炎性病理损伤的作用^[19-20]。因此,用动物模型从中医证型外观行为、一般状态,以及药理学、病理学、生理生化指标、免疫细胞比例等多方面对病毒性肺炎的临床表现进行模拟,更有利于中药抗病毒性肺炎的药效评价。本研究中,我们建立了 hCoV-229E 寒湿疫毒袭肺证病证结合模型,发现模型小鼠在中医寒

湿证以及肺炎疾病方面与临床表现具有一致性。

病毒感染呼吸道后,在气候和环境的作用下,可出现以寒、湿为主的证候特征^[9-10,13]。在中医寒湿证表现方面,模型小鼠在造模第 4 天出现毛发油腻、大便粘稠等,为寒湿的早期证候;从造模第 6 天开始,小鼠出现扎堆不动、摄食和饮水量减少,模型小鼠血清胃动素升高、胃泌素降低,这些表型均符合文献报道中寒湿证动物模型的特征^[15,21]。在临床上,寒湿疫毒袭肺证表现为乏力、恶寒、纳呆、恶心、大便粘腻,本模型的中医证候表现与临床疾病一致^[13]。

在肺炎疾病表现以及现代医学检测指标方面,模型小鼠出现肺组织水肿、肺泡结构破坏、炎性细胞浸润等组织病理学改变,以及肺部阴影等影像学改变,与临床中的肺炎的病理学和影像学表现一致。小鼠肺组织中的病毒核酸阳性,将模型小鼠肺组织匀浆上清接种至 MRC-5 细胞可造成细胞病变,说明模型小鼠肺组织中存在活病毒,符合病毒性肺炎的病原学表现。模型小鼠 IL-6、IL-10、TNF- α 显著升高,IFN- γ 有升高趋势,与冠状病毒感染的肺炎表现一致^[22-23]。模型小鼠外周血淋巴细胞百分比减少可能与淋巴细胞被招募至感染部位并发生活化后凋亡有关^[24-25],与临床上病毒性肺炎造成外周血淋巴细胞降低的现象一致^[26-27]。

此外,与正常组相比,寒湿组小鼠也出现了一定程度的肺指数升高、肺组织炎性细胞浸润、淋巴细胞百分比降低、IL-6 水平升高趋势,提示单纯的寒湿刺激也可引起肺部炎症以及免疫功能减弱。

寒湿疫方包括麻黄、石膏、苦杏仁、羌活、葶苈子、贯众、地龙、徐长卿、藿香、佩兰、苍术、茯苓、白术、焦三仙、厚朴、焦槟榔、煨草果、生姜,能够发挥散寒、胜湿、化湿、燥湿、利湿、宣肺解表的作用,从而治疗呼吸道相关症状,调节脾胃相关证候^[13,28],与寒湿疫毒袭肺证相适应。用该复方对模型小鼠进行验证性给药治疗后,不仅中医证候相关的行为表征评分以及摄食饮水量得到明显改善,肺指数、病毒载量、血清胃肠激素及淋巴细胞比例、肺组织炎性因子水平也得到了明显恢复,说明该模型在寒湿疫毒袭肺证药效评价中具有一定的可靠性,并体现了中医药整体调节的作用特点。

综上,本研究显示,模型小鼠能够模拟寒湿疫毒袭肺证的临床变化,包括外观和行为表征、摄食和饮水量、肺部影像学 and 病理学变化、肺部炎性细

胞因子水平和外周血淋巴细胞百分比等,在药效评价中具有可靠性,为治疗具有该证候的病毒性肺炎药物的应急筛选或日常研究,提供了一种可能的评价模型。

参考文献:

- [1] 张允岭, 张晓梅, 金耀文, 等. 中西医结合治疗 65 例非典型肺炎(SARS)的临床研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(6): 60-64.
- [2] 周红, 黄宏强, 张忠德, 等. 中医辨证治疗甲型 H1N1 流行性感冒 2015 例临床观察 [J]. 新中医, 2011, 43(1): 24-26.
- [3] 王薇, 王玉伟, 马爽, 等. 23 个省(市、自治区)中医治疗新型冠状病毒肺炎策略、参与率和治愈效果分析 [J]. 世界中医药, 2020, 15(6): 813-818.
- [4] 夏文广, 安长青, 郑娟娟, 等. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎 34 例临床研究 [J]. 中医杂志, 2020, 61(5): 375-382.
- [5] 田朝晖, 吴波, 向建军, 等. 中西医结合辨治新型冠状病毒肺炎理论分析与临床实践 [J]. 世界中医药, 2020, 15(4): 519-523.
- [6] 刘清泉, 夏文广, 安长青, 等. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎作用的思考 [J]. 中医杂志, 2020, 61(6): 463-464.
- [7] 雍文兴, 冯彩琴, 张利英, 等. 中西医结合治疗甘肃地区新型冠状病毒肺炎验案 4 则 [J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(3): 21-24.
- [8] Ma HD, Deng YR, Tian Z, et al. Traditional Chinese medicine and immune regulation [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2013, 44(3): 229-241.
- [9] 郭亚丽, 王玉光. 南北方 2009 年新型甲型 H1N1 流感中医证素分布特征分析 [J]. 环球中医药, 2015, 8(6): 706-708.
- [10] 翟志光, 侯石. 甲型 H1N1 流感的中医病因与发病研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(9): 945-947.
- [11] 赵荣华, 孙静, 时宇静, 等. 宣肺化痰法对冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺小鼠病证结合模型的干预作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(11): 21-27.
- [12] 国家卫生健康委, 国家中医药管理局. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版) [EB/OL]. (2020-8-18) [2020-8-19]. <http://www.nhc.gov.cn/cms-search/downloadFiles/a449a3e2e2c94d9a856d5faea2ff0f94.pdf>.
- [13] 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.
- [14] Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza virus [J]. Virology, 2001, 287(2): 243-250.
- [15] 章敏, 陈刚, 张六通, 等. 六淫湿邪动物模型研究 [J]. 湖北中医杂志, 2007, 29(9): 5-7.
- [16] 周游, 张杰. 内湿证动物模型研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(10): 141-144.
- [17] Kabinger F, Stiller C, Schmitzova J, et al. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis [J]. Nat Struct Mol Biol, 2021, 28(9): 740-746.

杨紫玉, 巩仔鹏, 王娅杰, 等. 戊己丸单次与多次给药对肠易激综合征大鼠体内药代动力学行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 13-23.

Yang ZY, Gong ZP, Wang YJ, et al. Comparison of pharmacokinetics after single and multiple oral administrations of Wuji Wan in irritable bowel syndrome rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 13-23.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.002

戊己丸单次与多次给药对肠易激综合征大鼠体内药代动力学行为的影响

杨紫玉¹, 巩仔鹏², 王娅杰¹, 董宇³, 董李晋川¹, 陈颖^{1*}, 杨庆¹, 蔡维艳¹,
李琦¹, 翁小刚¹, 郭雨轩¹, 朱晓新^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心 药学院, 贵阳 550004; 3. 中国中医科学院 广安门医院, 北京 100053)

【摘要】 目的 测定戊己丸中 10 个活性成分单次给药和多次口服给药后不同时间点的血药浓度, 比较其在正常大鼠和慢性内脏高敏感肠易激综合征 (CVH-IBS) 大鼠体内药代动力学特征的差异。方法 采用乳鼠结肠球囊刺激法制备 CVH-IBS 大鼠模型, 并对其进行内脏敏感性评价。单次或多次灌胃给予戊己丸提取物后于不同时间点从颈静脉采血, 采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 同时检测血浆中 10 个戊己丸活性成分的血药浓度, 比较其药代动力学参数的差异。结果 CVH-IBS 大鼠内脏敏感性增强。与单次给药相比, 多次给药正常与模型大鼠达峰时间 (t_{max}) 均提前。单次给药后模型与正常大鼠的差异可正向验证前期实验结果。多次给药后与正常大鼠相比, 模型大鼠体内戊己丸活性成分血药浓度峰值 (C_{max})、曲线下面积 (AUC_{0-t})、总清除率 (Cl) 发生显著改变。盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、表小檗碱 C_{max} 显著升高, 盐酸巴马汀、盐酸药根碱、二氢小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸内酯 C_{max} 显著下降; 盐酸黄连碱、表小檗碱 AUC_{0-t} 显著升高, 盐酸巴马汀、二氢小檗碱、盐酸药根碱、吴茱萸碱、吴茱萸内酯 AUC_{0-t} 显著下降; 盐酸黄连碱、吴茱萸内酯 Cl 明显升高, 表小檗碱 Cl 显著降低。盐酸巴马汀、芍药内酯苷 $t_{1/2}$ 明显降低; 盐酸药根碱 V_d 显著升高。模型大鼠多次给药和单次给药相比较, 黄连活性成分盐酸小檗碱、盐酸药根碱、表小檗碱、二氢小檗碱 C_{max} 明显降低; 盐酸药根碱 Cl 明显降低。芍药活性成分芍药苷 $t_{1/2}$ 明显下降, Cl 明显上升。结论 戊己丸中活性成分在正常大鼠、CVH-IBS 大鼠、戊己丸治疗后期的 CVH-IBS 大鼠体内的药代动力学行为存在明显差异, 这可能与 IBS 治疗早期肠道屏障被破坏和治疗后期肠道屏障修复、药物肝肠循环蓄积作用以及肝酶的活性等代谢功能改变相关。

【关键词】 戊己丸; 肠易激综合征 (IBS); 乳鼠结肠球囊刺激法; 药代动力学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0013-11

Comparison of pharmacokinetics after single and multiple oral administrations of Wuji Wan in irritable bowel syndrome rats

YANG Ziyu¹, GONG Zipeng², WANG Yajie¹, DONG Yu³, DONG Lijinchuan¹, CHEN Ying^{1*}, YANG Qing¹, CAI Weiyan¹,
LI Qi¹, WENG Xiaogang¹, GUO Yuxuan¹, ZHU Xiaoxin^{1*}

【基金项目】 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04905); 国家自然科学基金项目 (82074103); 国家“载人航天工程航天医学实验领域项目” (HYZHXM05003)。

【作者简介】 杨紫玉 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理。E-mail: yangziyu0991@163.com

【通信作者】 陈颖 (1979—), 女, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 中药药理学和药代动力学研究。E-mail: ychen@icmm.ac.cn

朱晓新 (1959—), 男, 研究员, 研究方向: 中药药理学。E-mail: Zhuxx@icmm.ac.cn

* 共同通信作者

- (1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China.
2. Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004. 3. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053)

【Abstract】 Objective The plasma concentrations of 10 active components in Wuji Wan were measured at various time points after single and multiple oral administrations to compare its pharmacokinetic characteristics in normal rats and rats with chronic visceral hypersensitivity irritable bowel syndrome (CVH-IBS) in different courses. **Methods** The CVH-IBS rat model was established by the neonatal rat colon balloon stimulation method and visceral sensitivity was evaluated. After single or multiple intragastric administrations of Wuji Wan, blood was collected from the jugular vein at various time points. Ultra-performance liquid chromatography-MS/MS was used to simultaneously measure the plasma concentrations of 10 active components of Wuji Wan in plasma and compare differences in pharmacokinetic parameters. **Results** Visceral sensitivity was enhanced in CVH-IBS rats. Compared with a single dose, the peak time (t_{max}) of multiple doses in normal and model rats was earlier. The difference between model and normal rats after a single dose verified the previous experimental results. Compared with normal rats, the active component C_{max} , AUC_{0-t} and Cl of Wuji Wan in model rats were changed significantly after multiple administrations. The C_{max} of berberine hydrochloride, coptisine hydrochloride and epiberberine was increased significantly, while that of palmatine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride, dihydroberberine, evodiamine and evodia lactone was decreased significantly. Epiberberine C_{max} was decreased significantly. Coptisine hydrochloride and epiberberine AUC_{0-t} was increased significantly. Palmatine hydrochloride, dihydroberberine, jatrorrhizine hydrochloride, evodiamine and evodia lactone AUC_{0-t} was decreased significantly. Coptisine hydrochloride and evodia lactone Cl was increased significantly. Epiberberine Cl was reduced significantly. Palmatine hydrochloride and albiflorin $t_{1/2}$ was reduced significantly. Jatrorrhizine hydrochloride V_d was increased significantly. By comparing multiple and single administrations in model rats, the C_{max} of active components coptidis berberine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride, epiberberine and dihydroberberine was decreased significantly and the C_{max} of jatrorrhizine hydrochloride was decreased significantly. The $t_{1/2}$ and Cl of paeoniflorin, the active component of *Radix Paeoniae Alba*, were significantly decreased and increased, respectively. **Conclusions** There are significant differences in the pharmacokinetic behaviors of the active components in Wuji Wan in normal, CVH-IBS and CVH-IBS rats at the late stage of treatment with Wuji Wan. This may be related to the disruption of the intestinal barrier in the early stage of IBS treatment, repair of the intestinal barrier in the late stage of treatment, accumulation of drugs in hepatic and enteric circulation, the activity of liver enzymes, and other metabolic changes.

【Keywords】 Wuji Wan; irritable bowel syndrome (IBS); neonatal rat colon balloon stimulation method; pharmacokinetics

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种机制复杂的慢性功能性肠病^[1],主要表现为不同程度的反复腹痛,排便习惯改变,同时有腹胀、腹泻等症状^[2-3]。然而临床上并未观察到明显的器质性改变^[4],病情反复,难以完全治愈,严重影响患者生活质量^[5]。

肠道是机体进行物质交换的重要场所,也是药物口服吸收的主要部位。肠道屏障能阻止外部物质进入机体,由以肠黏膜上皮细胞、粘液层、肠道紧密连接共同构成的机械屏障、以肠道菌为代表的生物屏障、以肠道黏膜驻留免疫细胞为代表的免疫屏障和肠神经系统共同组成^[6-7],并通过多种细胞因子、免疫因子等相互调节,维持着消化系统“首道屏

障”的相对稳定。IBS等慢性功能性肠病的发生、发展和转归都与肠道屏障的状态有着密不可分的关系^[8]。疾病早期 IBS 患者即发现肠黏膜通透性增加,随着病原菌、内毒素等入侵引起腹泻、排便紊乱等症状。随着肠道黏膜屏障的损伤和消化系统的长期异常状态,其病程渐进、迁延难愈。同时中枢神经系统通过“脑-肠轴”调控肠神经系统导致肠动力和内脏感知异常;而肠道屏障的进一步破坏、肠道渗透性改变又可诱导神经炎症^[6,9]。但是,对于 IBS 不同病程的肠道屏障状态,以及与药物的吸收代谢的关系尚无系统性研究。

IBS 属于中医“腹痛、泄泻”等范畴。中医学认为脾胃虚弱是其发病的主要病理基础;其病机主要在于

肝脾气机不畅、运化失常,大肠传导失司,日久及肾,导致肝、脾、肾、肠胃诸脏功能失调^[10]。戊己丸最早出自《太平惠民和剂局方》^[11],因“戊己”对应五行属于胃土、脾土而得名^[12]。本方剂由吴茱萸、黄连、白芍 3 味药组成,有疏肝理脾、和胃缓急之效,主治脾湿泻痢胃痛吞酸等肝脾不和之证^[11,13]。《幼幼新书》中其组方配比为黄连、吴茱萸、白芍各 5 两;《医方考》中黄连用量增加,配比为 5 : 1 : 1,实验表明黄连占比增加后戊己丸镇痛作用更显著^[14]。韦宇等^[15]认为腹泻型 IBS 主要病机为肝脾不调,或肝郁克脾,或土壅木郁,采用不同配伍剂量的戊己丸可疏肝理脾调肠道,缓痛止泻。本课题组前期大量实验证明戊己丸通过调节脑肠肽^[16]、5-HT 含量、改善肥大细胞的异常状态^[17],从而改善 IBS 大鼠“脑-肠轴”功能紊乱。我们前期基于神经-内分泌-免疫网络调节,优化得到一个降低内脏高敏感性、提高痛阈作用最为显著的戊己丸配伍方(黄连:吴茱萸:白芍配比为 12 : 1 : 12)^[18]。本配伍方通过 1 周的给药,可以基本缓解慢性内脏高敏感肠易激综合征(CVH-IBS)大鼠的腹痛、肠道运动功能紊乱等症状,但是其是否可以显著改善肠道屏障功能尚不清楚。

因此,为进一步研究戊己丸中活性成分的体内暴露水平与药效的相关性,为阐明戊己丸治疗 IBS 的物质基础及其作用机制提供依据,本研究利用前期建立的 LC-MS/MS 法^[19]同时检测戊己丸单次或多次给药后血浆中 10 种活性成分的药物浓度,比较在正常和 CVH-IBS 模型大鼠的疾病不同阶段戊己丸活性成分的体内暴露水平;拟通过其药代动力学变化规律的研究,为戊己丸临床的合理利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雌性乳鼠 20 只,5 日龄,体重约 10 g 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0011],中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会批准(2021B152)。动物饲养于中国中医科学院中药研究所[SYXK(京)2020-0042]。每 10 只乳鼠与母鼠一起饲养,至 25 日龄脱离母乳后 5 只每笼饲养,自由饮食饮水。实验遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

动脉成形术(PTCA)球囊,CorDis,球囊规格(3.0 mm×20 mm);导尿管,北京万东库利艾特医用制品有限公司;压力表,上海医疗设备厂;TB-215D 电子天平,丹佛仪器(北京)有限公司;大鼠固定器,

北京华美有机玻璃厂定做。VX-III 型多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司);NA-5 L 型氮气/空气一体机(北京中兴汇利科技发展有限公司);Centrifuge 5424R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Xevo TQ 型超高效液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司)。盐酸小檗碱(批号 10006-200807,纯度 99.90%)、盐酸巴马汀(批号 110713-201212,纯度 86.70%)、芍药苷(批号 110732-201108,纯度 86.70%)、吴茱萸碱(批号 110736-201136,纯度 96.50%)和盐酸苯海拉明(内标)对照品(批号 110802-200606,纯度 99.90%)均购自中国食品药品检定研究院;盐酸药根碱(批号 MUST-14022411,纯度 99.50%)、盐酸黄连碱(批号 MUST-13032301,纯度 99.50%)、二氢小檗碱(批号 MUST-13070212,纯度 99.50%)、表小檗碱(批号 MUST-13092410,纯度 99.50%)、吴茱萸内酯(批号 MUST-13092412,纯度 99.50%)、芍药内酯苷对照品(批号 MUST-13112803,纯度 91.37%)购自成都曼思特生物科技有限公司;乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯。

黄连、制吴茱萸、炒白芍饮片均购自北京卫仁中药饮片厂,经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定,均符合 2020 年版《中国药典》的相关要求。3 种药材在中日友好医院药剂室分别使用 10 倍量溶剂回流提取后真空干燥制备得到固体粉末,得率分别为 19.3%、17.7%、9.37%。按黄连-制吴茱萸-炒白芍(12 : 1 : 12)生药量比例称取提取物,加水配制成戊己丸混悬液。

1.3 方法

1.3.1 检测条件

ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),以乙腈(A)-0.2%甲酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~2 min,98%~60%B;2~2.5 min,60%~20%B;2.5~3 min,20%~10%B;3~3.5 min,10%~20%B;3.5~4 min,20%~60%B;4~4.1 min,60%~98%B;4.1~5 min,98%B),流速 0.4 mL/min,柱温 35℃,进样室温度 4℃,进样量 5 μL。采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式检测,选择多反应监测(MRM)模式进行二级质谱分析,离子对信息参考前期已发表文章^[19]。毛细管电压 1.0 kV,离子源温度 150℃,脱溶剂温度 500℃,脱溶剂气体流速 800 L/h,锥孔气体流速 50 L/h。

1.3.2 CVH-IBS 大鼠模型建立及评价

腹痛是 IBS 的主要临床表现之一;在 IBS 动物模型中则表现为对胃肠道机械扩张刺激可承受的

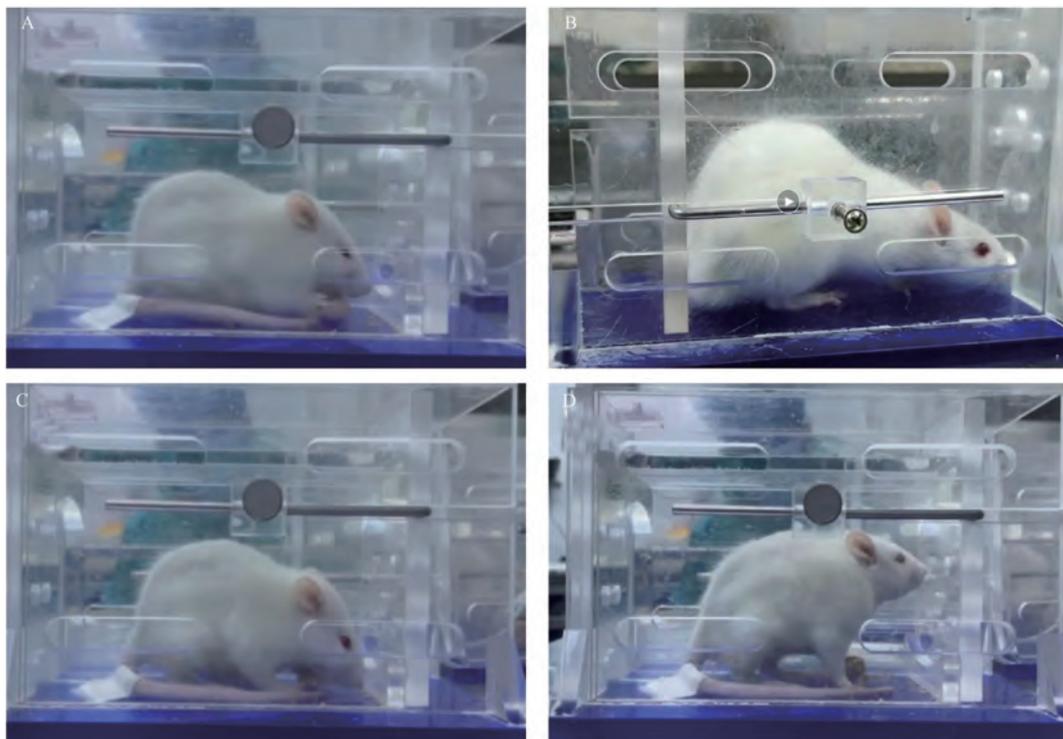
阈值降低、反应性增强,即内脏高敏感性。腹壁撤退反射(AWR)实验是最为经典的评价动物内脏敏感性的方法,观察动物肠道扩张后对疼痛做出的反映进行评分,标准评分标准如图 1 所示,分数越高则内脏敏感性越高^[20-21]。取 8 日龄雌性乳鼠,用 37℃ 生理盐水清洗肛周后将涂有液体石蜡的 PTCA 球囊插入乳鼠肛门内 2 cm 深,球囊位于结肠处,将球囊与压力表及注射器连接,注入空气至压力为 60 mmHg。每天如上刺激乳鼠 2 次,每次 1 min,两次间隔 30 min。正常组乳鼠每天抓起后,抚摸会阴部 1 min。结肠 PTCA 球囊刺激共持续 2 周。第 6 周进行 AWR 测试评价大鼠内脏敏感性。使用 6F 导尿管从大鼠肛门边缘约 4 cm 处插入。大鼠适应 3~5 min,待大鼠基本不动后注射生理盐水 0.6~1.2 mL 至球囊中,每 0.2 mL 进行 AWR 评分,每只大鼠重复 3 次,每次间隔 20 min。AWR 评分取 3 次平均值。每周记录 1 次大鼠体重。

1.3.3 药代动力学研究

IBS 模型建立后,将正常或模型大鼠随机分为单次给药组及多次给药组。单次给药组大鼠在颈静脉插管手术 12 h 后灌胃给药,给药量为戊己丸(10 mL/

kg,相当于盐酸小檗碱 44 mg/kg、盐酸巴马汀 10.6 mg/kg、盐酸黄连碱 11 mg/kg、盐酸药根碱 2.54 mg/kg、表小檗碱 2.57 mg/kg、二氢小檗碱 3 mg/kg、吴茱萸碱 0.055 mg/kg、吴茱萸内酯 0.2 mg/kg 和芍药苷 12.53 mg/kg、芍药苷内酯苷 2.48 mg/kg)。多次给药组大鼠以同等剂量连续给药 6 d,每天 1 次,第 6 天给药 12 h 后进行颈静脉插管手术,并在手术后 12 h 再次以同等剂量灌胃给药。大鼠于给药前和给药后 5 min、15 min、30 min、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h 从颈静脉插管处取血 200 μ L 放进肝素化 EP 管,再补充 200 μ L 肝素生理盐水溶液(50 IU/mL)注入大鼠体内。取血液离心(3500 r/min, 15 min)后取上层血浆 100 μ L,保存于-80℃待分析。

取血浆 100 μ L,加入 5 mg/L 苯海拉明内标溶液 20 μ L,涡旋 1 min,然后加入乙腈 360 μ L 涡旋混匀 5 min,然后离心(转速 13000 r/min, 15 min,下同),取上清液 350 μ L 到离心管,在氮吹仪上吹干,残渣用 50%乙腈 200 μ L 复溶,涡旋混匀 5 min,4℃ 离心,取上清 5 μ L 注入 LC-MS 仪进行分析。根据前期建立的 UPLC-MS/MS 检测条件^[19],对盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、表小



注:A:1分,身体不动和头部运动减少;B:2分,腹肌收缩,但未抬起;C:3分,抬起腹部;D:4分,身体呈弓形,会阴抬起。

图 1 大鼠 AWR 评分标准

Note. A, 1 point, immobility and reduced head movement. B, 2 points, abdominal muscle contraction, but not lifted. C, 3 points, lifting the abdomen. D, 4 points, the body is arched and the perineum is lifted.

Figure 1 AWR scoring criteria for rats

槲碱、二氢小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸内酯、芍药苷、芍药内酯苷的血药浓度进行检测。

1.4 统计学方法

采用 DAS 2.0 对实验数据进行拟合分析, 计算药代动力学参数, 记录达峰时间 (t_{max}), 药峰浓度 (C_{max}), 消除半衰期 ($t_{1/2}$), 药-时曲线下面积 (AUC_{0-t}), 表观分布容积 (V_d) 和清除率 (Cl) 相关数据。所有数据用平均数 \pm 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行 t 检验, 比较单次给药正常组和模型组、多次给药正常组和模型组、单次给药模型组和多次给药模型组的组间差异, $P < 0.05$ 即表示差异具有显著性, 测定各时间点血样中待测物的浓度, 绘制药-时曲线。

2 结果

2.1 CVH-IBS 大鼠模型建立及评价

如图 2A 所示, 各组间大鼠体重无明显差异, CVH-IBS 模型大鼠体重不受造模影响。如图 2B 所示, 大鼠第 6 周进行 AWR 评价, 注入球囊中生理盐水量为 0.6、0.8 mL 时模型大鼠与正常大鼠相比 AWR 评分显著增高, 说明疾病造模后大鼠内脏敏感性增高, 表示成功建立了 CVH-IBS 模型大鼠。

2.2 戊己丸给药后活性成分的体内药代动力学研究

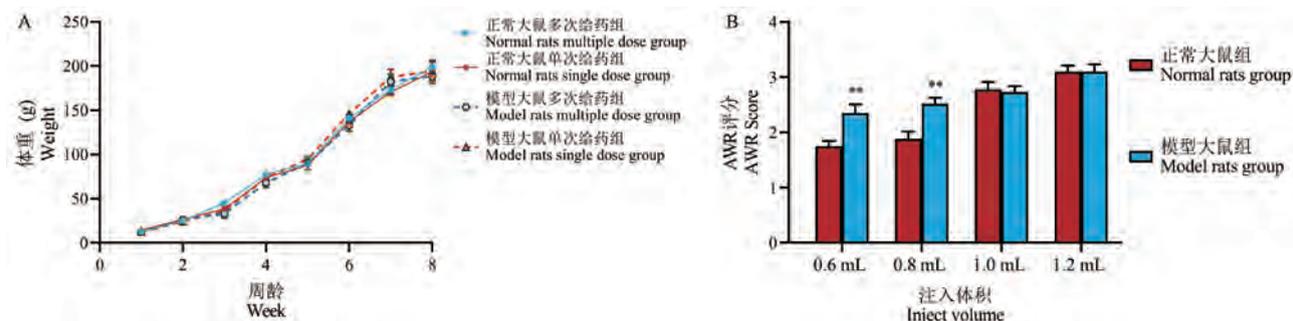
戊己丸单次或多次给药后, 戊己丸中 10 个活性成分在大鼠体内的药-时曲线如图 3 所示。结果可见, 单次灌胃给予戊己丸后, 正常大鼠中 10 个活性成分的各时间点血药浓度大多低于模型组大鼠; 在正常和模型大鼠体内, 活性成分盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、表小檗碱、二氢小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸内酯的药-时曲线均为单峰; 芍药苷呈现双峰; 而芍药内酯苷仅在模型大鼠体内呈现双峰。

连续灌胃给予戊己丸 7 d 后, 最后 1 次给药后的药-时曲线显示: 正常组大鼠体内来自黄连和吴茱萸的 8 个活性成分血药浓度大多高于模型组大鼠; 而且均表现为双峰或多峰。芍药苷在正常大鼠体内消除较慢。与单次给药相比, 多次给药后正常大鼠与模型大鼠的各活性成分的 t_{max} 均提前。

单次和多次灌胃给予戊己丸后, 10 个活性成分在正常和 IBS 大鼠体内的药代动力学参数结果见表 1。

单次灌胃给予戊己丸后, IBS 模型大鼠与正常组相比结果显示: 黄连活性成分盐酸小檗碱 C_{max} ($P < 0.05$)、 AUC_{0-t} ($P < 0.01$)、 $t_{1/2}$ ($P < 0.001$) 显著升高, Cl ($P < 0.05$) 显著降低; 盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、盐酸药根碱 AUC_{0-t} ($P < 0.05$) 显著升高, 盐酸巴马汀 Cl ($P < 0.01$) 显著下降, 盐酸黄连碱 Cl ($P < 0.05$) 显著下降; 表小檗碱 AUC_{0-t} ($P < 0.05$) 显著升高, Cl ($P < 0.01$) 显著降低; 二氢小檗碱 C_{max} ($P < 0.01$)、 AUC_{0-t} ($P < 0.001$)、 $t_{1/2}$ ($P < 0.05$) 及 Cl ($P < 0.01$) 显著降低; 吴茱萸成分吴茱萸内酯 AUC_{0-t} ($P < 0.01$) 显著升高, Cl ($P < 0.05$) 显著下降; 芍药有效成分芍药苷与芍药内酯苷有不同程度改变, 但未表现出显著性。

多次灌胃给予戊己丸后, IBS 模型大鼠与正常组相比, 盐酸小檗碱 C_{max} ($P < 0.01$) 显著升高; 盐酸巴马汀 C_{max} ($P < 0.01$)、 AUC_{0-t} ($P < 0.05$)、 $t_{1/2}$ ($P < 0.01$) 显著下降; 盐酸黄连碱 C_{max} ($P < 0.01$)、 AUC_{0-t} ($P < 0.05$) 及 Cl ($P < 0.05$) 显著升高; 盐酸药根碱 C_{max} ($P < 0.01$)、 AUC_{0-t} ($P < 0.01$) 显著降低, V_d ($P < 0.01$) 显著升高; 表小檗碱 C_{max} ($P < 0.05$)、 AUC_{0-t} ($P < 0.05$) 显著升高, Cl ($P < 0.01$) 显著降低; 二氢小檗碱 C_{max} ($P < 0.01$)、 AUC_{0-t} ($P < 0.05$) 显著下降; 吴茱萸碱 C_{max} ($P < 0.001$)、 AUC_{0-t} ($P < 0.01$) 显著下降; 吴茱萸内酯 C_{max} ($P < 0.01$)、 AUC_{0-t} ($P < 0.01$) 显著降低, Cl ($P < 0.01$) 显著上升; 芍药内酯苷 $t_{1/2}$ ($P < 0.05$) 显著降低。



注: A: 各组别大鼠 1~8 周体重 ($n=5$); B: 正常大鼠与 CVH-IBS 大鼠 AWR 评分 ($n=10$)。与正常大鼠组相比, $**P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠体重和 AWR 评分结果 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. A, Weight of rats in each group at 1~8 weeks ($n=5$). B, Normal rats and CVH-IBS rats AWR score ($n=10$). Compared with the normal rat group, $**P < 0.01$.

Figure 2 Body weight and AWR score of rats in each group

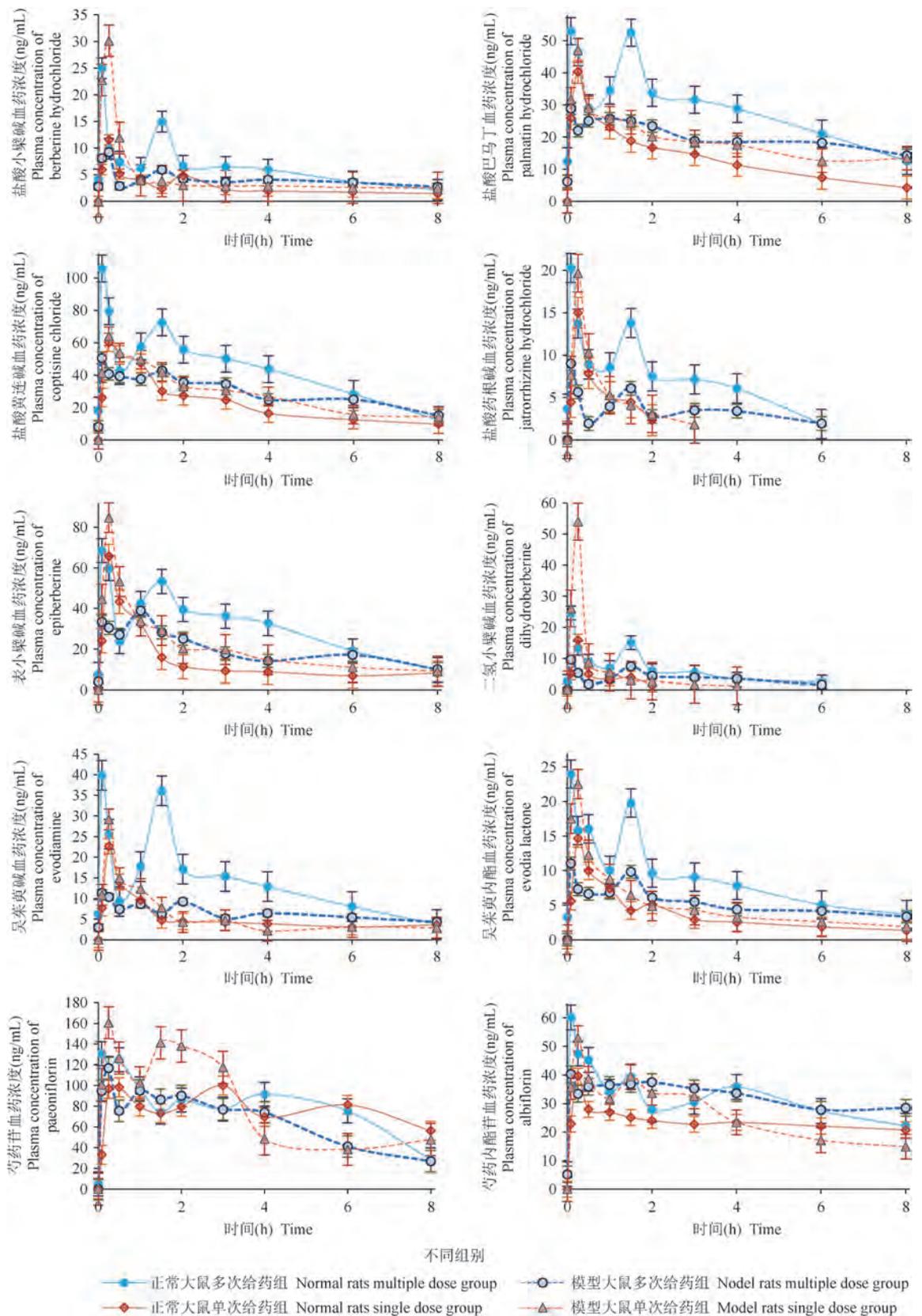


图 3 戊己丸给药后 10 个活性成分在不同组别大鼠体内的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Figure 3 Plasma concentration-time curve of 10 active ingredients in different groups of rats after administratlton of Wuji Wan

表 1 不同组别大鼠戊己丸给药后 10 个活性成分的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 5$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of 10 active ingredients in different groups of rats after administration of Wuji Wan

成分 Ingredients	组别 Groups	t_{max} (min)	C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	AUC_{0-4} ($\text{min} \cdot \mu\text{g/L}$)	$t_{1/2}$ (min)	V_d (L/kg)	Cl (L/(h · kg))
盐酸小檗碱 Berberine hydrochloride	正常大鼠单次给药 Normal rats single dose group	16.00±4.00	12.68±2.50	1583.87±105.60	212.96±12.81	1526.81±8317.06	1430.96±195.34
	模型大鼠单次给药 Model rats single dose group	11.00±2.45	31.49±6.56 ¹⁾	2564.89±260.15 ²⁾	341.11±17.77 ³⁾	7527.07±1148.01	781.07±79.23 ¹⁾
	正常大鼠多次给药 Normal rats multiple dose group	22.00±17.00	25.15±7.33	3593.56±73.49	358.66±54.43	4047.95±478.34	536.06±45.05
	模型大鼠多次给药 Model rats multiple dose group	26.00±16.16	10.80±1.13 ²⁾ *	2474.06±252.74	422.02±154.16	6809.27±1589.13	738.15±77.51
盐酸巴马汀 Palmatine hydrochloride	正常大鼠单次给药 Normal rats single dose group	15.00±0.00	40.36±3.88	7054.40±983.93	156.55±17.20	351.06±78.02	90.66±11.38
	模型大鼠单次给药 Model rats single dose group	39.00±15.44	130.65±18.72	34606.34±1650.69 ¹⁾	117.04±11.01	65.99±10.10	21.24±0.97 ²⁾
	正常大鼠多次给药 Normal rats multiple dose group	45.00±24.94	72.36±5.14	16282.47±1000.46	488.50±72.94	304.97±62.83	28.93±2.59
	模型大鼠多次给药 Model rats multiple dose group	47.00±24.22	40.11±5.05 ²⁾	12049.14±1232.93 ¹⁾	185.23±52.49 ²⁾	278.50±105.18	43.16±6.38
盐酸黄连碱 Coptisine chloride	正常大鼠单次给药 Normal rats single dose group	60.00±31.10	66.03±5.49	12471.69±963.27	206.78±42.18	254.35±48.26	48.00±4.54
	模型大鼠单次给药 Model rats single dose group	27.00±8.75	69.66±4.95	16202.40±938.40 ¹⁾	246.24±29.56	219.97±31.78	33.25±0.95 ¹⁾
	正常大鼠多次给药 Normal rats multiple dose group	30.00±22.58	122.63±7.74	23914.94±1520.59	308.55±73.87	151.01±33.69	23.18±2.32
	模型大鼠多次给药 Model rats multiple dose group	310.00±23.91	356.06±12.26 ²⁾	85657.94±1684.67 ¹⁾	1166.93±39.93	1004.64±35.94	172.30±3.11 ¹⁾
盐酸药根碱 Jatrorrhizine hydrochloride	正常大鼠单次给药 Normal rats single dose group	18.00±3.00	15.25±3.80	717.77±97.11	94.38±43.22	230.23±49.95	188.10±52.34
	模型大鼠单次给药 Model rats single dose group	15.00±0.00	19.67±2.57	1008.89±69.17 ¹⁾	90.68±25.33	241.13±55.53	124.89±10.53
	正常大鼠多次给药 Normal rats multiple dose group	10.00±5.00	22.06±2.32	2619.72±382.51	103.20±9.06	134.96±26.06	56.77±7.73
	模型大鼠多次给药 Model rats multiple dose group	39.00±20.82	10.81±1.70 ²⁾ *	1238.90±95.93 ²⁾	204.71±61.82	386.03±67.04 ²⁾	84.69±11.78 *
表小檗碱 Epiberberine	正常大鼠单次给药 Normal rats single dose group	18.00±3.00	65.86±9.50	7583.44±620.98	162.78±11.43	74.87±11.78	19.67±1.59
	模型大鼠单次给药 Model rats single dose group	15.00±0.00	84.76±9.46	11151.51±734.31 ²⁾	156.28±17.01	69.62±21.35	11.78±1.30 ²⁾
	正常大鼠多次给药 Normal rats multiple dose group	32.00±22.11	86.33±10.88	16637.64±1715.11	295.83±38.13	49.22±7.32	7.64±0.94
	模型大鼠多次给药 Model rats multiple dose group	35.00±17.10	58.02±5.00 ¹⁾ *	11234.91±1069.54 ¹⁾	206.33±42.50	61.16±13.86	12.96±1.21 ²⁾

续表 1

成分 Ingredients	组别 Groups	t_{\max} (min)	C_{\max} ($\mu\text{g/L}$)	AUC_{0-t} ($\text{min} \cdot \mu\text{g/L}$)	$t_{1/2}$ (min)	V_d (L/kg)	Cl (L/(h · kg))
二氢小檗碱 Dihydroberberine	正常大鼠单次给药 Normal rats single dose group	75.00±0.00	79.39±1.82	2941.98±68.77	263.67±9.18	1522.87±41.56	1388.68±38.99
	模型大鼠单次给药 Model rats single dose group	15.00±0.00	53.99±9.99 ²⁾	1592.26±170.74 ³⁾	113.57±15.94 ¹⁾	266.97±43.75	105.21±12.62 ²⁾
	正常大鼠多次给药 Normal rats multiple dose group	5.00±0.00	24.66±2.17	2266.24±235.67	149.89±48.40	206.61±21.14	70.64±14.71
	模型大鼠多次给药 Model rats multiple dose group	22.00±17.00	11.71±1.47 ^{2)***}	1350.49±200.74 ¹⁾	158.87±41.55	445.63±103.08	100.61±12.13
吴茱萸碱 Evodiamine	正常大鼠单次给药 Normal rats single dose group	15.00±0.00	22.67±2.68	3178.99±308.26	547.08±267.49	5.97±0.93	0.82±0.18
	模型大鼠单次给药 Model rats single dose group	15.00±0.00	29.15±6.73	3258.08±251.95	252.95±30.54	4.98±0.60	0.80±0.04
	正常大鼠多次给药 Normal rats multiple dose group	47.00±24.22	48.49±4.62	7622.24±765.47	214.72±16.63	2.17±0.28	0.36±0.04
	模型大鼠多次给药 Model rats multiple dose group	64.00±24.67	17.85±2.30 ³⁾	3800.27±401.26 ²⁾	280.84±58.91	4.43±0.84	0.71±0.09
吴茱萸内酯 Evodia lactone	正常大鼠单次给药 Normal rats single dose group	51.00±32.38	15.11±2.45	1733.69±97.40	226.76±43.57	27.02±5.30	5.68±0.46
	模型大鼠单次给药 Model rats single dose group	11.00±2.45	24.51±3.93	2532.42±185.47 ²⁾	202.65±26.94	23.91±5.23	4.05±0.23 ¹⁾
	正常大鼠多次给药 Normal rats multiple dose group	12.00±4.90	29.95±3.52	4941.06±265.05	240.62±22.12	12.91±1.73	2.00±0.12
	模型大鼠多次给药 Model rats multiple dose group	39.00±20.82	15.07±1.45 ²⁾	2832.56±385.80 ²⁾	226.15±46.44	18.61±3.33	3.65±0.40 ²⁾
芍药苷 Paeoniflorin	正常大鼠单次给药 Normal rats single dose group	234.00±80.55	141.52±26.34	47735.36±6616.66	242.20±40.03	77.46±19.55	14.50±2.79
	模型大鼠单次给药 Model rats single dose group	78.00±30.52	195.15±25.54	46335.61±6455.73	200.71±33.53	67.01±20.81	12.86±2.34
	正常大鼠多次给药 Normal rats multiple dose group	68.00±44.18	162.87±11.47	41826.79±5093.07	221.08±94.14	76.63±31.40	18.34±2.72
	模型大鼠多次给药 Model rats multiple dose group	39.00±15.44	130.65±18.72	34606.34±1650.69	117.04±11.01*	65.99±10.10	21.24±0.97*
芍药内酯苷 Albiflorin	正常大鼠单次给药 Normal rats single dose group	139.00±115.64	12.31±44.28	15924.69±1181.25	553.37±185.58	63.73±10.14	5.86±1.15
	模型大鼠单次给药 Model rats single dose group	345.00±30.59	312.08±13.63	79451.56±1836.06	2653.43±170.16	286.44±7.20	28.11±1.14
	正常大鼠多次给药 Normal rats multiple dose group	52.00±47.00	70.24±9.59	20633.96±2736.92	1047.66±245.52	56.94±7.67	4.68±1.70
	模型大鼠多次给药 Model rats multiple dose group	40.00±15.57	49.1747±5.06	21470.95±3245.36	422.86±44.03 ¹⁾	45.06±6.15	5.36±0.83

注:正常大鼠单次给药与模型大鼠单次给药、正常大鼠多次给药与模型大鼠多次给药相比,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$,³⁾ $P<0.001$;正常大鼠单次给药与模型大鼠单次给药的相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

Note. Compared with single dose in normal rats and single dose in model rats, multiple dose in normal rats and multiple dose in model rats,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$,³⁾ $P<0.001$. Compared with a single dose of normal rats and a single dose of model rats,* $P<0.05$,** $P<0.01$.

比较模型大鼠多次给药和单次给药的结果发现:盐酸小檗碱、盐酸药根碱、表小檗碱的 C_{max} ($P < 0.05$) 显著降低;二氢小檗碱 C_{max} ($P < 0.01$) 显著降低;盐酸药根碱 Cl ($P < 0.05$) 显著降低;白芍活性成分芍药苷 $t_{1/2}$ ($P < 0.05$) 显著下降, Cl ($P < 0.05$) 显著上升。

单次或多次给予戊己丸后,通过比较正常或模型大鼠体内各活性成分 AUC 的变化(见图 4),我们可以发现:戊己丸单次给药后,除二氢小檗碱和芍药苷外的其他活性成分在 IBS 大鼠体内暴露比正常大鼠体内暴露增加;但是在多次给药后,仅有盐酸黄连碱在 CVH-IBS 大鼠体内的暴露比在正常大鼠中增加。正常大鼠多次给药后,活性成分大多有一定蓄积,导致 AUC 增加;但是 CVH-IBS 大鼠多次给药后,除了黄连碱外,其余活性成分的 AUC 并未表现出增加。

3 讨论

单次灌胃给药戊己丸后, CVH-IBS 模型大鼠与正常大鼠的药-时曲线显示, CVH-IBS 大鼠对 10 个活性成分的吸收均高于正常组,这与本课题组前期实验结果一致。肠道屏障是人体内外环境相交互

用面积最大的屏障^[22],可能由于 CVH-IBS 大鼠肠道屏障破坏,对黄连生物碱等小分子化合物的通透性增加。LPS 预处理在肠外翻模型中能通过增加吸收、减少外排,显著提高小肠对黄连生物碱的通透性^[23]。

连续 7 d 灌胃给药戊己丸,最后 1 次给药后, CVH-IBS 模型大鼠与正常大鼠的药-时曲线显示, 10 个活性成分中黄连生物碱、吴茱萸碱、吴茱萸内酯在多次给予戊己丸的 CVH-IBS 大鼠体内特征趋势具有相似性。多次给予戊己丸的 CVH-IBS 大鼠和正常大鼠的药-时曲线基本为双峰,正常组双峰峰形及双峰分离更加明显,模型组峰形相对平缓。而单次给予戊己丸的 CVH-IBS 模型大鼠与正常大鼠体内芍药苷药-时曲线均为双峰,多次给药 CVH-IBS 大鼠与正常大鼠有多峰趋势。

戊己丸单次给药正常大鼠的芍药内酯苷的药-时曲线为单峰,迅速降低且达到稳态血药浓度速率快,可能与芍药内酯苷的水溶性、极性,且会被肠道菌群转化生成苯甲酸有关^[24];单次给药 CVH-IBS 模型大鼠与单次给药正常大鼠相比,有多峰趋势且代谢较慢,可能与 IBS 导致肠道菌群失调有关。戊己丸多次给药模型大鼠的芍药内酯苷的药-时曲线

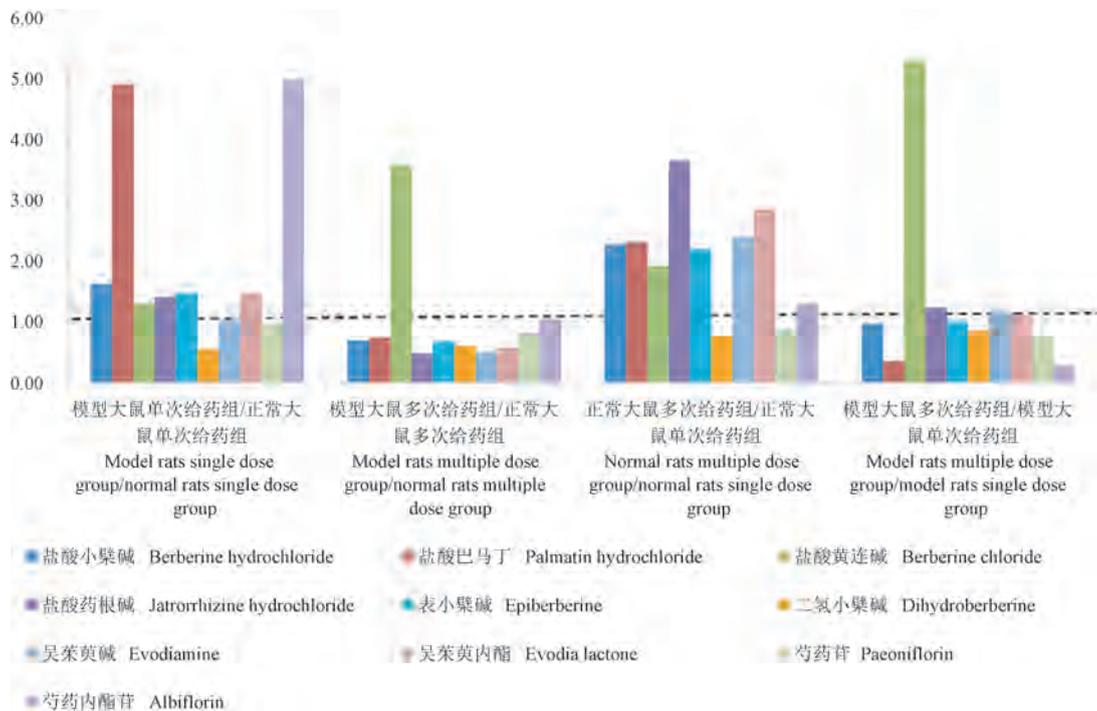


图 4 戊己丸给药后 10 种活性成分在不同组别的体内暴露水平(AUC)比值

Figure 4 Ratio of the *in vivo* exposure levels (AUC) of the 10 active ingredients in different groups after the administration of Wuji Wan

基本为单峰,可能是肠道屏障恢复所致;多次给药正常大鼠与多次给药 CVH-IBS 大鼠相比有多峰趋势,可能为多次给药的体内蓄积。

多次给予戊己丸后正常大鼠体内 10 个活性成分血药浓度基本高于 CVH-IBS 模型大鼠,证明了治疗后期 CVH-IBS 大鼠的肠道屏障逐步恢复,病程后期口服药物的吸收减少。多次灌胃戊己丸 CVH-IBS 模型大鼠与单次灌胃戊己丸 CVH-IBS 模型大鼠相比,多次给予戊己丸正常大鼠和单次给予戊己丸正常大鼠相比, t_{max} 出现均提前,侧面说明多次给药后活性成分在 CVH-IBS 大鼠和正常大鼠的体内均发生蓄积并持续发挥药效。

药代动力学参数计算结果显示,单次灌胃戊己丸的 CVH-IBS 模型大鼠与正常组大鼠相比,黄连活性成分盐酸小檗碱最大血药浓度显著升高,药物清除时间增加。盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、表小檗碱吸收总量不同程度地显著增高,与本课题前期实验结果一致。盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、表小檗碱清除率显著下降;二氢小檗碱最大血药浓度显著下降,吸收总量显著下降,清除时间缩短,清除率显著下降。吴茱萸成分吴茱萸内酯吸收总量显著升高,清除率明显下降。吴茱萸碱与白芍有效成分芍药苷与芍药内酯苷有不同程度改变,但未有显著性。

多次给予戊己丸的 CVH-IBS 模型大鼠与正常大鼠相比,盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、表小檗碱最大血药浓度显著升高;盐酸黄连碱、表小檗碱吸收总量显著增加,证明多次给药后模型组大鼠对黄连生物碱的吸收增多,也可能是肝肠循环使药物持续发挥作用^[25]。生物碱成分的 V_d 普遍较高,证明生物碱小分子与肠组织有特异性结合。盐酸巴马汀、盐酸药根碱、二氢小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸内酯的最大血药浓度、吸收总量明显下降。推测长期消化系统功能性疾病导致机体对药物的消化吸收能力下降。吴茱萸内酯清除率显著上升。盐酸巴马汀、芍药内酯苷清除时间显著缩短。

多次给予戊己丸的 CVH-IBS 模型大鼠与单次给予戊己丸的 CVH-IBS 模型大鼠相比,盐酸小檗碱、盐酸药根碱、表小檗碱最大血药浓度明显降低,再次显示出多次给药治疗后 CVH-IBS 大鼠的肠道屏障有所恢复。二氢小檗碱最大血药浓度显著降低;盐酸药根碱清除率明显降低,提示多次用药与肝肠循环发生协同作用。白芍活性成分芍药苷清

除时间明显下降,清除率明显上升,推测是治疗后期大鼠代谢功能有所恢复。

单次或多次给予戊己丸后,正常或 CVH-IBS 模型大鼠体内各活性成分 AUC 发生变化。戊己丸单次给药后,除二氢小檗碱和芍药苷外的其他活性成分在 IBS 大鼠体内暴露比正常大鼠体内暴露增加;但是在多次给药后,仅有盐酸黄连碱在 CVH-IBS 大鼠体内的暴露比在正常大鼠中增加。正常大鼠多次给药后,活性成分大多有一定蓄积,导致 AUC 增加;但是 CVH-IBS 大鼠多次给药后,除了盐酸黄连碱外,其余活性成分的 AUC 并未表现出增加。推测可能由于盐酸黄连碱分子量小,与肠道菌群相互作用,在肠道屏障恢复后依然保持着极易吸收入血的特性^[26],并且盐酸黄连碱主要代谢部位为肝^[27],多次给药后蓄积明显。

综上所述,CVH-IBS 模型大鼠的病理状态、不同病程和给药次数对戊己丸中活性成分药代动力学特征产生了显著影响,提示 IBS 病程前期和治疗后期肠道屏障通透性有所改变,大鼠代谢能力改善,多次给药与肝肠循环协同作用持续发挥药效,有助于改善 IBS。针对 IBS 大鼠肠道屏障、代谢功能的具体改善情况和戊己丸对肠道屏障发挥药效作用的机制值得下一步深入研究,以助于更为全面地了解复方中活性成分的体内过程及其对疾病的影响,为中药复方的临床应用提供实验依据。

参考文献:

- [1] 李军祥,陈詒,唐旭东,等. 肠易激综合征中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(3): 227-232.
- [2] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 肠易激综合征中西医结合诊疗共识意见[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(5): 587-590.
- [3] 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组,中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 2020年中国肠易激综合征专家共识意见[J]. 中华消化杂志, 2020, 40(12): 803-818.
- [4] 黄芬,苏斌,罗宜. 中医护理干预用于肝郁脾虚型肠易激综合征患者中的价值分析[J]. 基层医学论坛, 2021, 25(9): 1277-1278.
- [5] Schönrich S, Brockow T, Franke T, et al. Analyzing the content of outcome measures in clinical trials on irritable bowel syndrome using the international classification of functioning, disability and health as a reference [J]. Rehabilitation (Stuttg), 2006, 45(3): 172-180.
- [6] Julio-Pieper M, Bravo JA. Intestinal barrier and behavior [J]. Int Rev Neurobiol, 2016, 131: 127-141.
- [7] Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, et al. The digestive

- neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(2): 90-100.
- [8] Camilleri M, Madsen K, Spiller R, et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(6): 503-512.
- [9] César Machado MC, da Silva FP. Intestinal barrier dysfunction in human pathology and aging [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(30): 4645-4650.
- [10] 王豪. 肠易激综合征的中医辨证论治 [J]. *家庭医学*, 2020, 9: 52-53.
- [11] 刘文, 司娜, 陈龙富, 等. 戊己丸研究进展 [J]. *贵阳中医学院学报*, 2011, 33(3): 86-88.
- [12] 尤如喜. 中成药药名小考 [J]. *中国航天医药杂志*, 2003, 5(6): 76-77.
- [13] 杜贵森. 戊己丸临床运用举隅 [J]. *黑龙江中医药*, 1985, 4: 48-49.
- [14] 宫海明, 王兆淦, 段文卓. 戊己丸镇痛、抗炎作用的实验研究 [J]. *中国中医药科技*, 1998, 5(3): 148.
- [15] 韦宇, 张莉莉, 顾成娟. 黄连、吴茱萸、白芍治疗腹泻型肠易激综合征经验——全小林三味小方撷萃 [J]. *吉林中医药*, 2020, 40(10): 1270-1272.
- [16] 黄鹤飞, 强伟杰, 杨庆, 等. 戊己丸对炎症后肠易激综合征大鼠脑肠肽的调控作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3): 265-271.
- [17] 王迎寒, 周淑媛, 王娅杰, 等. 戊己丸不同配伍方对炎症后肠易激综合征模型大鼠结肠运动及 5-羟色胺含量的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(13): 1226-1233.
- [18] 王娅杰, 崔羲和, 陈颖, 等. 戊己丸不同配伍方治疗肠易激综合征的比较 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(13): 1-9.
- [19] 张红, 陈颖, 巩仔鹏, 等. 戊己丸中活性成分在正常大鼠和肠易激综合征大鼠体内药代动力学行为的差异性分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(17): 124-131.
- [20] 陈颖, 赵妍, 罗丹妮, 等. 腹壁撤退反射实验测量方法概述 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(8): 89-93.
- [21] Li YJ, Li J, Dai C. The role of intestinal microbiota and mast cell in a rat model of visceral hypersensitivity [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2020, 26(4): 529-538.
- [22] Barrett KE. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function [J]. *Adv Physiol Educ*, 2008, 32(1): 25-34.
- [23] Ma BL, Yao MK, Zhong J, et al. Increased systemic exposure to rhizoma coptidis alkaloids in lipopolysaccharide-pretreated rats attributable to enhanced intestinal absorption [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40(2): 381-388.
- [24] 赵朕雄, 冯茹, 符洁, 等. 基于肠道菌的芍药内酯苷抗抑郁 PK/PD 及分子机制研究 [A]. 中国药理学会药物代谢专业委员会. 第三届全国药物代谢动力学青年科学家论坛暨刘昌孝人才奖颁奖大会会议资料集 [C]; 2017.
- [25] Yuan J, Wang Y, An R, et al. Simultaneous determination of six alkaloids and one monoterpene in rats plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and pharmacokinetic study after oral administration of a Chinese medicine Wuji Pill [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 895-896: 154-161.
- [26] 王鑫喆, 沈梦婷, 闫鹏举, 等. 黄连生物碱类活性成分与肠道菌群相互作用的研究进展 [J]. *中国药房*, 2021, 32(1): 109-115.
- [27] 陈红影, 黄运芳, 刘起华, 等. HPLC-MS/MS 分析黄连碱在大鼠体内外的代谢产物 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(9): 113-119.

[收稿日期] 2021-11-10

裴海月, 姜宁, 王孟迪, 等. 槟榔对小鼠的抗抑郁作用影响及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 24-32.
Pei HY, Jiang N, Wang MD, et al. Antidepressant effect of *Areca catechu* L. on mice and its mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 24-32.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.003

槟榔对小鼠的抗抑郁作用影响及机制研究

裴海月^{1,2,3}, 姜宁⁴, 王孟迪², 王凤忠¹, 敖冬梅³, 王琼^{1,2*}

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193; 2. 西南医科大学附属中医医院中葡中医药国际合作中心/中西医结合学院, 四川 泸州 646000; 3. 北京城市学院, 北京 100094; 4. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所药理毒理研究中心, 北京 100193)

【摘要】 目的 研究槟榔对小鼠抑郁样行为的影响及其作用机制。方法 分别建立行为绝望模型和利血平拮抗模型, 雄性 ICR 小鼠分为槟榔低、中、高剂量组 (160、320、640 mg/kg) 和阳性药组 (氟西汀, 20 mg/kg), 连续灌胃给药 14 d。采用行为学检测小鼠旷场实验 (OFT)、悬尾实验 (TST) 及小鼠强迫游泳实验 (FST) 评价槟榔的抗抑郁活性; 采用利血平拮抗实验评价槟榔的抗抑郁作用和槟榔对单胺能神经系统功能的影响以及其氧化应激水平的改变。采用本课题组建立的 LC-MS/MS 分析方法测定小鼠神经递质含量; 通过超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性和丙二醛 (MDA) 含量反映槟榔抗氧化应激水平。结果 各组间体重均无显著性差异。旷场实验结果显示, 槟榔对小鼠的自发活动情况无影响。槟榔中、高剂量组可显著降低悬尾不动时间 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 低、高剂量组可明显减少小鼠在强迫游泳实验中的不动时间 ($P < 0.05$)。在利血平拮抗实验中与模型组相比, 槟榔低、高剂量组可拮抗利血平导致的小鼠体温降低 ($P < 0.01$), 且 3 个剂量组均可显著拮抗利血平引起的小鼠眼睑下垂 ($P < 0.05$)。与利血平拮抗模型组相比, 槟榔高剂量组小鼠脑组织中 5-HT 含量 ($P < 0.01$), 槟榔低、高剂量组 DA 含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 槟榔低、中剂量组 GABA 水平 ($P < 0.05$) 均有显著性升高; 槟榔中、高剂量组 5-HIAA 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。槟榔 3 个剂量组 SOD 和 CAT 活性均显著增强 ($P < 0.01$, $P < 0.01$); 槟榔中、高剂量组 MDA 含量显著下降 ($P < 0.01$)。结论 槟榔在应激类绝望模型和利血平拮抗药物模型中均表现出较好的抗抑郁疗效且未影响运动活性及体重。其抗抑郁的作用机制可能与增强脑内单胺神经能系统水平及抗氧化应激水平相关。

【关键词】 槟榔; 抑郁; 利血平; 悬尾; 强迫游泳; 神经递质; 氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0024-09

Antidepressant effect of *Areca catechu* L. on mice and its mechanism

PEI Haiyue^{1,2,3}, JIANG Ning⁴, WANG Mengdi², WANG Fengzhong¹, AO Dongmei³, WANG Qiong^{1,2*}

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China.

2. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000. 3. Beijing City College, Beijing 100094. 4. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193)

【Abstract】 Objective To study the effect of *Areca catechu* L. on depression-like behavior in mice and its mechanism. **Methods** Behavioral despair and reserpine antagonism models were established. Male ICR mice were divided

【基金项目】 中国农业科学院农产品加工研究所创新工程院所重点任务 (CAAS-ASTIP-2020-IFST); 泸州市高端人才引进项目 (刘新民团队); 国家重点研发计划 (2016YFE0131800)。

【作者简介】 裴海月 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药神经药理与航天医学。E-mail: 1538969289@qq.com

【通信作者】 王琼 (1975—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 食药资源神经精神调节作用研究。E-mail: luyiwangqiong@163.com

into *Areca catechu* L. low, medium and high dose groups (160, 320 and 640 mg/kg) and a positive control group (fluoxetine, 20 mg/kg). Administration was performed by continuous gavage for 14 days. The antidepressant activity of *Areca catechu* L. was evaluated by the behavioral test of open field test, tail suspension test and forced swimming test. The antidepressant effect of *Areca catechu* L. was also evaluated by the reserpine antagonism test to evaluate the effect of *Areca catechu* L. on monoaminergic nervous system functions and the change of oxidative stress level. The content of neurotransmitters in mice was determined by LC-MS/MS analysis. The anti-oxidative stress effect of *Areca catechu* L. was assessed by measuring superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT). **Results** There were no significant differences in body weight between the groups. The open field text showed that *Areca catechu* L. had no effect on the locomotor activity of mice. The medium and high dose groups of *Areca catechu* L. had significantly reduced time in the tail suspension test ($P < 0.05$), and the low and high dose groups of *Areca catechu* L. had significantly reduced immobility time of mice in the forced swimming test ($P < 0.05$). In the reserpine antagonism test, compared with the model group, the low and high dose groups of *Areca catechu* L. had antagonized eyelid ptosis induced by reserpine ($P < 0.05$), and the three doses significantly antagonized the decrease of body temperature induced by reserpine ($P < 0.01$). Compared with reserpine antagonism model group, the 5-HT content in the brain tissue of mice in the *Areca catechu* L. high dose group ($P < 0.01$), DA content in *Areca catechu* L. low and high dose groups ($P < 0.01$), and the GABA level in the *Areca catechu* L. low- and medium-dose groups ($P < 0.05$) were significantly increased and the 5-HIAA level in *Areca catechu* L. medium and high dose groups was decreased significantly ($P < 0.01$). SOD and CAT levels were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.01$) in the three dose groups of *Areca catechu* L.. MDA content was significantly decreased ($P < 0.01$) in the medium and high dose groups of *Areca catechu* L.. **Conclusions** *Areca catechu* L. has good anti-depressant efficacy in stress despair and reserpine antagonistic drug models without affecting motor activity or body weight. Its anti-depressant mechanism of action may be related to enhancement of monoamine neurogenic system levels and anti-oxidative stress effects.

【Keywords】 *Areca catechu* L.; depression; reserpine; suspended tail test; forced swimming test; neurotransmitter; oxidative stress

抑郁障碍(depressive disorder)是以显著而持久的心境低落为主要特征,表现出持续的情绪低落,兴趣减退或乐趣丧失等症状的精神疾病。现代社会节奏快、压力大,使人们身心健康受到严重威胁,易出现抑郁症。WHO对抑郁症患者的统计显示,全球约3.5亿人被此症折磨,平均发病率在4.4%左右^[1],终生患病率为5.2%~16.2%^[2]。黄悦勤教授团队发表“中国抑郁障碍患病率及卫生服务利用的流行病学现况研究”最新数据显示,我国成人抑郁障碍终生患病率达6.8%,其中抑郁症患病率为3.4%^[3]。据“全球疾病负担研究”报告显示,在精神障碍类疾病中,抑郁障碍所致的疾病负担在中国乃至全球均居首位^[4]。在全球所有疾病的疾病负担中抑郁障碍排名第13位,中国处于第11位之高,可见此症给社会、家庭和个人都造成了严重心理及经济负担。

目前的抗抑郁药物疗效有限,与其出现的副作用有关^[5-6]。临床上治疗抑郁症主要以化学合成药物为主,具有治疗效果但常伴随不良反应的发生,存在抗抑郁谱窄、复发率高等缺点^[7-8],使其安全性存在隐患,临床应用具有局限性。故开发高效、低毒、机制明确的抗抑郁中药产品成为治疗抑郁症的

一大思路与方向,也将在未来成为神经精神疾病的研究热点。

四大南药之首的槟榔(*Areca catechu* L.,以下简称:ACL)作为一大常用中药,具有“杀虫消积,降气,行水,截疟”之功效^[9],在古方及现代医学中均得到广泛应用^[10]。研究显示,槟榔的提取物对抑郁症可能有治疗作用^[11],但目前尚无文献报道对槟榔抗抑郁作用开展系统研究。因此,本研究利用经典的抗抑郁药物模型及筛选方法(悬尾、强迫游泳实验、利血平拮抗实验),评价槟榔的抗抑郁作用疗效,并采用利血平拮抗模型对其作用机制(神经递质含量变化和氧化应激水平)进行初步探索,以挖掘槟榔抗抑郁作用的潜能及在神经精神领域可提供的有利价值,为开发抗抑郁新药提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级雄性ICR小鼠120只,体重18~22g(3周龄),购于北京维通利华实验动物公司[SCXK(京)2016-0011]。实验期间动物均饲养于标准环境下(室温22℃~25℃,湿度55%±5%,12h照明/12h黑暗,照明时间为:8:00 am~20:00 pm),动物

房持续保持安静无杂音。自由进食 SPF 级动物饲料及动物饮用水。实验于中国医学科学院药用植物研究所进行[SYXK(京)2017-0020],经实验动物管理与动物福利委员会审查批准(SLXD-2021052117),实验过程严格遵守 3R 原则。

小鼠根据体重进行随机分配,以确保各组间体重基线相似。每组 12 只,小鼠给药体积:20 mL/kg。适应性饲养 4 d 后开始实验,每 3 d 进行 1 次体重监测。

1.2 主要试剂与仪器

槟榔(全果超微粉,湖南口味王集团);氟西汀(盐酸氟西汀胶囊,fluoxetine hydrochloride,法国礼来公司);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司);利血平注射液(reserpine,天津金耀药业有限公司)。超氧化物歧化酶(SOD)(批号:20210811);过氧化氢酶(CAT)(批号:20210901);丙二醛(MDA)(批号:20210810),以上试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。乙腈、甲醇色谱纯(美国 Merck 公司);甲酸铵分析纯(北京化工厂);5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT,货号:H7752);5-羟吲哚乙酸(5-hydroxy indoleacetic,5-HIAA,货号:H8876);多巴胺(Dopamine,DA,货号:H8502); γ -氨基丁酸(γ amino acid butyric acid,GABA);3,4-二羟基苯胺(DHBA,货号:A7000),以上标准品均购自美国 Sigma 公司。

小鼠自主活动测定仪(KSME01)及小鼠自主活动实时检测分析系统,小鼠恒温游泳仪(KSQT6),小鼠悬尾仪(KSXS01)及小鼠悬尾实时检测分析系统,以上均由中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员科研训练中心和北京康森益友科技有限公司联合研制开发;Q-Trap5500 型质谱分析仪(美国应用技术公司);电子直肠式体温计(OMRON MC-347);AL104 电子天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司);Vibra-Cell 型超声波破碎仪(美国 Sonics 公司)。

1.3 方法

ICR 小鼠 60 只,实验共设置 5 组,每组 12 只,共 60 只。分别为空白对照组(0.5% CMC-Na)、阳性药组(氟西汀:20 mg/kg)、槟榔低、中、高 3 个剂量组(低剂量:160 mg/kg;中剂量:320 mg/kg;高剂量:640 mg/kg)。按上述方法连续给药 14 d 后进行以下 3 项行为学检测,行为学检测前 1 h 灌胃给药。具体实验流程如图 1 所示。

1.3.1 小鼠旷场实验(open field test, OFT)

利用小鼠旷场实时检测分析处理系统进行自主活动实验检测。自主活动测试箱由 4 个开放的方形测试桶组成(30 cm × 28 cm × 35 cm),利用摄像头系统对测试动物实时检测,通过软件分析处理动物运动信息。实验分为适应期和测试期。将小鼠沿壁放入测试箱适应 2 min 后,检测动物 5 min 内运动情况,评价指标包括:运动总路程、运动总时间、平均速度。

1.3.2 悬尾实验(tail suspension experiment, TST)

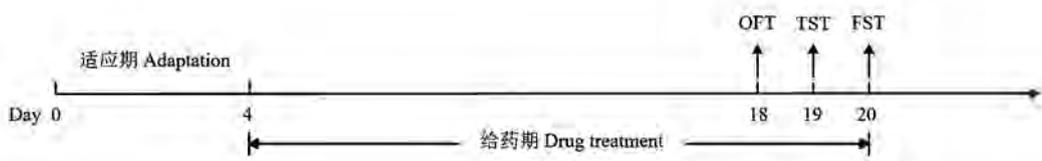
将小鼠距离尾尖部约 1 cm 处缠上胶布(约宽 6 mm,长 6~8 cm),同时挂在小鼠悬尾仪测试箱中的“S”型小铁钩上倒悬体位,其头部距箱底约 5~10 cm,测试共 6 min,前 2 min 为适应期,传感器连接系统自动统计小鼠后 4 min 内的累积不动时间。

1.3.3 小鼠强迫游泳实验(forced swimming test, FST)

将小鼠分别放入水深 15 cm 的小鼠恒温游泳仪(高 20 cm,直径 14 cm)中,水温维持在(24±1)℃。测试共 6 min,前 2 min 为适应期,系统自动记录小鼠后 4 min 内游泳累积不动时间。

1.3.4 小鼠利血平拮抗实验

ICR 小鼠 60 只,实验设置共 5 组,每组 12 只,分别为模型组(reserpine + control)、阳性对照组(reserpine+fluoxetine(20 mg/kg))、槟榔低(reserpine + ACL(160 mg/kg))、中(reserpine + ACL(320 mg/kg))、高(reserpine+ACL(640 mg/kg))3 个剂量组。



注:OFT:旷场实验;TST:悬尾实验;FST:强迫游泳实验。

图 1 实验流程和行为测试示意图

Note. OFT, Open field test. TST, Tail suspension experiment. FST, Forced swimming test.

Figure 1 Schematic representation of the experimental procedure and behavioral tests

按上述方法连续给药 14 d, 于末次给药 1 h 后, 各组腹腔注射 2 mg/kg 利血平 (reserpine, 1 mg/mL) 进行造模。评价指标: 注射利血平 1 h 后, 眼睑闭合度观测; 注射利血平 4 h 后, 体温观测。体温观测使用电子体温计 (插入肛门约 1 cm) 测量小鼠肛温。眼睑闭合度观测判断标准: 全部睁开记为 4 分, 眼闭 1/4 记为 3 分, 2/4 记为 2 分, 3/4 记为 1 分, 全闭记为 0 分^[12]。具体实验流程如图 2 所示。

1.3.5 生化指标测定

利血平拮抗实验观测指标检测后进行取材, 小鼠取血, 血浆于 4℃ 静置, 隔日离心 (3500 r/min, 10 min, 4℃), 吸取血清, 于 -80℃ 冰箱贮藏。采血后, 将小鼠处死, 在冰上迅速剥离出全脑组织, 去除小脑组织后, 按序分装于 0.5 mL 离心管放入液氮中暂存, 取材结束统一贮藏于 -80℃ 冰箱。

(1) 单胺类神经递质测定

检测前分装称重脑组织 (重量约 20~30 mg), 每个样本中加入 100 μL 超纯水, 冰浴中超声匀浆。精密吸取 50 μL 组织匀浆液置于离心管中, 加入 100 μL 乙腈溶液 (含内标 DHBA 5 μg/mL, 4℃), 涡旋混匀, 4℃ 低温离心 30 min (20000 r/min)。离心后, 小心吸取上清液依次转入样品瓶中进行 HPLC-MS 分析。制作标准曲线, 并依次计算各样本神经递质含量。

含量测定采用 TSK Gel amide 80 (2.0 mm × 150 mm, 3 μm) 色谱柱 (柱温 35℃), 流动相乙腈-15 mmol/L 甲酸铵水溶液 (pH = 5.5) (40 : 60), 流速 0.4 mL/min。质谱检测器 (Q-Trap 5500 型质谱分析仪) 以电喷雾电离方式进行离子化, 以多反应检测 (MRM) 模式进行扫描。离子源及其他相关参数优化为: TEM: 500℃; CAD: Medium; Gas1: 50 psi; Gas2: 70 psi; CUR: 20 psi。扫描方式为离子监测 (MRM) 模式, 参数: 喷雾电压 5500 V; EP: 10; CXP: 10。用于定量分析的离子为 m/z 177.0 → 160.0 (5-HT); m/z 154.2 → 136.6 (DA)^[13]。

(2) 氧化应激水平测定

取小鼠全脑组织称重后置于 1.5 mL EP 管中, 加入生理盐水 (重量 (g) : 生理盐水 (mL) = 1 : 9) 制成 10% 的组织匀浆。离心 (4℃, 3000 r/min, 10 min) 取组织上清液。按照各试剂盒说明书对小鼠脑组织进行 SOD、MDA 和 CAT 含量的测定。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 使用最小显著差数法 (LSD) 多重比较方法或非参数两独立样本检验 (曼-惠特尼检验) 进行显著性分析, 数据以平均数 ± 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槟榔对小鼠体重的影响

如图 3 所示各组的体重均有稳步上升。与空白对照组相比, 槟榔给药组整体增长趋势较缓, 但各组间无显著性差异 ($P > 0.05$), 表明槟榔给药后未出现对动物的体重有统计学意义的影响。实验中观察到高剂量组小鼠排便增多, 饮食饮水量未见减少的现象, 考虑槟榔具有“消积行气”之功效, 对胃肠道消化具有促进作用。且结合参考文献报道^[14], 槟榔中的槟榔碱对远端结肠平滑肌具有收缩作用, 其促收缩作用会随槟榔碱剂量增加而增强, 从而增加胃肠蠕动和排便次数, 故此可能是造成其体重与空白组相比较呈下降趋势的原因。

2.2 槟榔对小鼠旷场实验 (OFT) 中自发活动的影响

由表 1 可知, 与空白对照组相比, 槟榔各剂量组在 OFT 的运动路程、运动时间、平均速度, 各组间均无显著性差异 ($P > 0.05$), 各组间自主活动的运动路程、运动时间、运动速度相当。表明槟榔对小鼠的自发活动无明显影响。

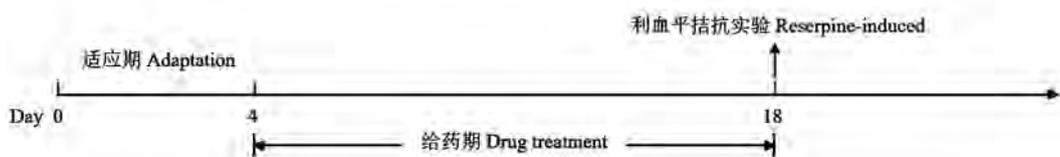


图 2 实验流程和行为测试示意图

Figure 2 Schematic representation of the experimental procedure and behavioral tests

2.3 槟榔对悬尾实验 (TST) 的影响

如图 4 所示,与空白对照组相比,槟榔 320 mg/kg 剂量组 TST 不动时间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),槟榔 640 mg/kg 剂量组不动时间显著降低 ($P < 0.01$)。另阳性药氟西汀组及槟榔 160 mg/kg 剂量组不动时间降低趋势明显,但差异无统计学意义 ($P = 0.07, P = 0.1$)。

2.4 槟榔对小鼠强迫游泳 (FST) 实验的影响

如图 5 所示,与空白组相比,槟榔 160、640 mg/kg 剂量组 FST 不动时间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。槟榔 320 mg/kg 剂量组具有降低不动时间的趋势,差异无统计学意义。

2.5 槟榔对利血平拮抗实验的影响

与模型组相比 (图 6A),阳性药氟西汀组、槟榔 160、640 mg/kg 剂量组可显著逆转利血平引起的肛温降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比 (图 6B),槟榔 160、320、640 mg/kg 3 个剂量组均可逆转利血平引起的眼睑下垂 ($P < 0.05$),其中槟榔 160、640 mg/kg 剂量组逆转作用显著 ($P < 0.01$)。

2.6 槟榔对利血平拮抗小鼠神经递质的影响

与利血平拮抗模型相比,槟榔 640 mg/kg 剂量组和阳性药氟西汀组可显著增加小鼠脑组织中 5-HT 含量 ($P < 0.01$) (图 7A);槟榔 160、640 mg/kg 剂量组可以显著增加小鼠脑组织中 DA 含量 ($P < 0.01$),槟榔 320 mg/kg 剂量组、阳性药氟西汀组可增加小鼠脑组织中 DA 含量的趋势,但结果无统计学意义 (图 7C);槟榔 160、320 mg/kg 剂量组和阳性药氟西汀组可以显著增加小鼠脑组织中 GABA 水平 ($P < 0.05$),槟榔 640 mg/kg 剂量组具有增加小鼠脑组织中 GABA 含量的趋势,但结果无统计学意义 (图 7D)。如图 7B 所示,与利血平拮抗模型比较,槟榔 320、640 mg/kg 剂量组可以显著降低小鼠脑组织中 5-HIAA 含量 ($P < 0.01$)。

2.7 槟榔对利血平拮抗小鼠氧化应激水平的影响

如图 8 所示,与模型组相比,槟榔 160、320、640 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 SOD 活性 ($P < 0.01$),CAT 活性均显著升高 ($P < 0.01$),槟榔 320、640 mg/kg 剂量组 MDA 含量显著减少 ($P < 0.01$)。

表 1 槟榔对小鼠自发活动的影响 (旷场法) ($n = 12, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Table 1 Effects of *Areca catechu* L. on spontaneous activity in mice (open field test)

	空白对照组 Control	氟西汀组 Fluoxetine	槟榔 (160 mg/kg) ACL (160 mg/kg)	槟榔 (320 mg/kg) ACL (320 mg/kg)	槟榔 (640 mg/kg) ACL (640 mg/kg)
总路程 (cm) Total distance	1662.14 ± 154.95	1552.99 ± 149.05	1445.52 ± 88.72	1379.52 ± 220.81	1393.05 ± 127.43
运动总时间 (s) Time of movement	123.83 ± 8.12	118.38 ± 7.95	111.99 ± 5.76	101.75 ± 14.14	106.35 ± 8.07
平均速度 (cm/s) Average velocity	7.36 ± 0.46	7.05 ± 0.45	6.68 ± 0.29	6.59 ± 0.29	7.64 ± 0.44

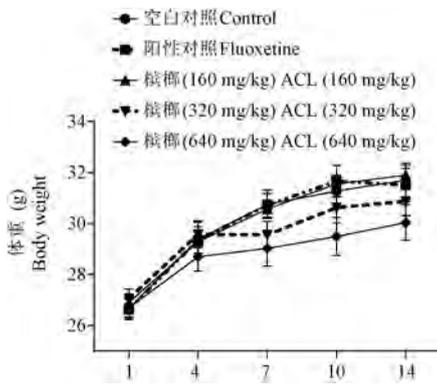
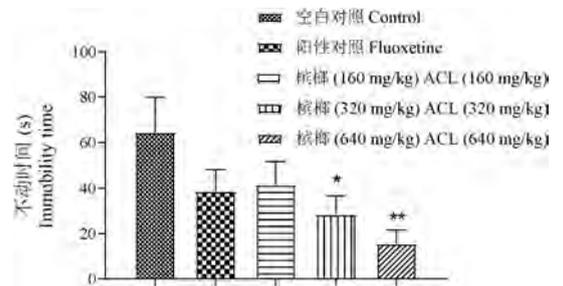


图 3 槟榔对小鼠体重的影响 ($n = 12, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Figure 3 Effects of *Areca catechu* L. on body weight of mice

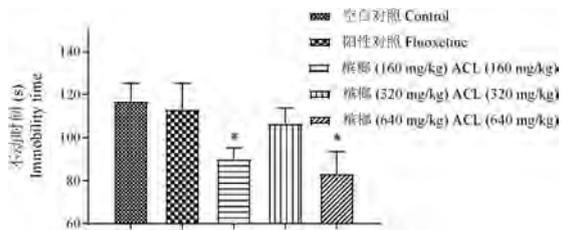


注:与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 槟榔连续给药 14 d 对小鼠悬尾实验不动时间的影响 ($n = 11 \sim 12, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Effects of *Areca catechu* L. on immobility time of mice in TST after 14 d continuous administration



注:与空白组相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 槟榔连续给药 14 d 对小鼠强

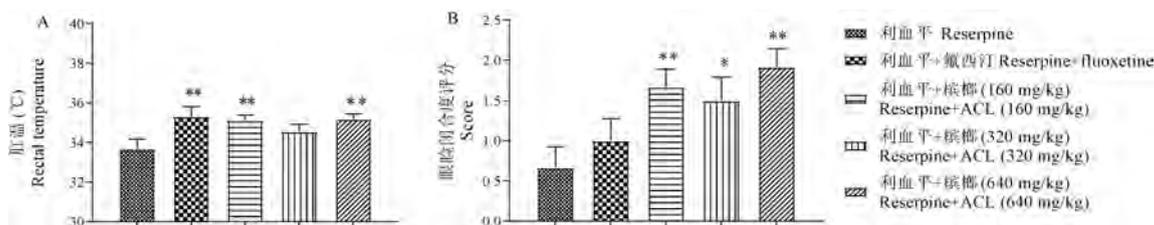
迫游泳实验不动时间的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 5 Effects of *Areca catechu* L. on immobility time of mice in FST after 14 d continuous administration

3 讨论

在中医学中抑郁症属“郁证”,其是由情绪不适、气滞、气血不畅引起的综合征,与多脏器损伤、功能紊乱相关^[15]。目前已有众多中药及中药复方均显示出一定抗抑郁活性,并具良好安全性,无明显副作用,由此为中药抗抑郁的疗效及发展建立了良好基础。依据文献报道,中药槟榔具有抗抑郁的潜能^[16],复方蒙药槟榔十三味丸用于治疗“赫依”^[17],并结合本研究中针对抑郁情绪的动物行为学实验结果,均显示出了槟榔初步抗抑郁药效。因此挖掘和验证槟榔在防治抑郁症的潜能是本研究

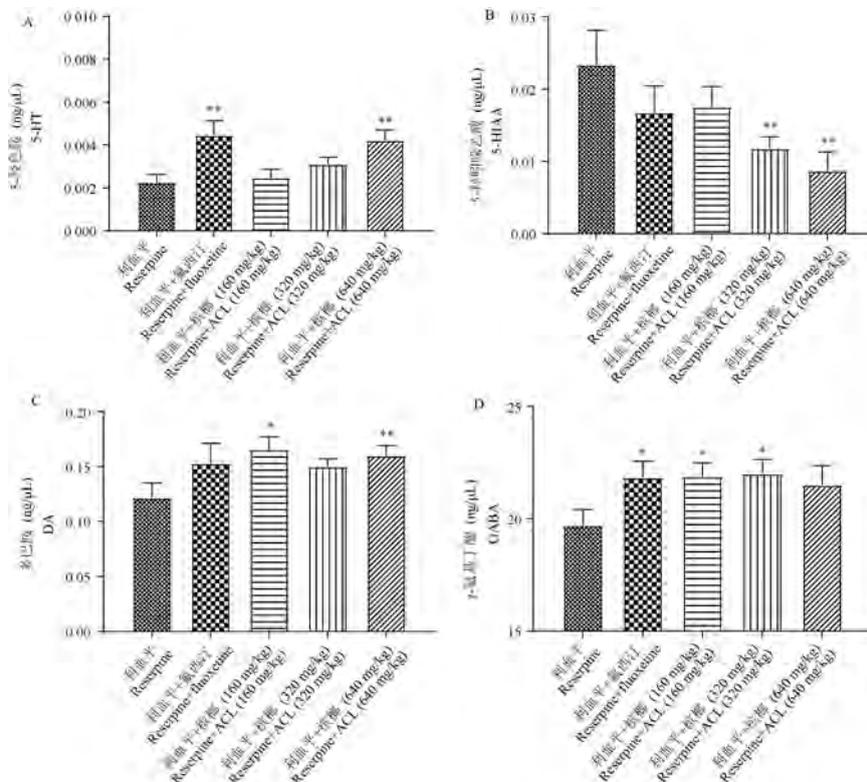


注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 6 槟榔对利血平拮抗所致眼睑下垂、体温降低的影响 ($n = 12, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Effects of *Areca catechu* L. on the reserpine-induced eye ptosis and hypothermia

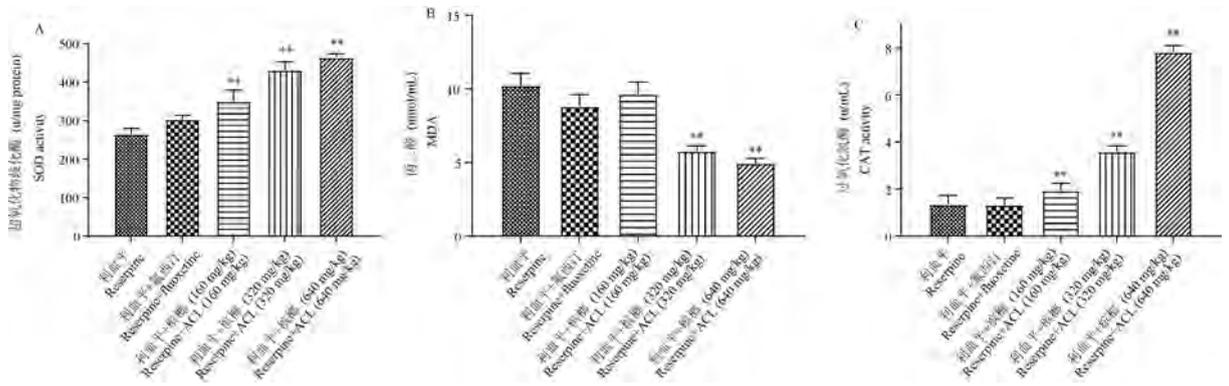


注:与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 7 槟榔对利血平拮抗小鼠脑组织中 5-HT、5-HIAA、DA、GABA 水平的影响 ($n = 8 \sim 12, \bar{x} \pm s\bar{x}$)。

Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 7 Effects of *Areca catechu* L. on 5-HT, 5-HIAA, DA, GABA levels in brain tissue of reserpine-induced mice



注:与模型组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 8 槟榔对利血平拮抗小鼠脑组织氧化应激水平的影响 ($n = 8, \bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. Compared with the model group, ** $P < 0.01$.

Figure 8 Effects of *Areca catechu* L. on the reserpine-induced oxidative stress in brain tissue of mice

的一大重要意义,继而探究其发病机制,为社会减轻疾病负担提供有力支持,为开发抗抑郁药物提供价值参考。

旷场实验(OFT)常贯穿应用于动物行为学研究中,检测与评价实验动物的自发活动行为(locomotor activity)和探索行为(exploratory behavior)。在神经学与精神药理学领域研究中可用于检测药物是否存在副作用(如对行动的影响等)。中枢兴奋药物可增加自发活动,减少探究行为,一定剂量下神经精神药物可减少探究行为,对自发活动无影响。本实验通过OFT对小鼠的自发活动进行检测,证明槟榔未对小鼠的运动活性产生影响,在各剂量下均未见中枢神经的过度兴奋或抑制,进一步得到槟榔可能不是中枢神经系统兴奋剂^[18]。伴随给药可见槟榔给药组的小鼠体重整体增长趋势相对较缓,且随剂量增加趋势愈加明显,但未达统计学意义。实验中观察可见高剂量组小鼠排便增多,饮食饮水量未见减少,考虑槟榔具有“杀虫消积,降气,行水,截疟”之功效^[9],其消积行气作用可能增强了其胃肠运动,对胃肠道消化具有促进作用。结合文献报道^[14],槟榔中的槟榔碱对远端结肠平滑肌具有收缩作用,且其促收缩作用会随槟榔碱剂量增加而增强,从而增加胃肠蠕动和排便次数,可能是造成其体重与空白组相比较呈下降趋势的原因。

两大绝望模型悬尾实验和强迫游泳实验作为经典的应激模型,均具有简便快捷的特点^[19-20]。强迫游泳实验(FST),也称Porsolt实验^[21],是研究啮齿类动物抑郁样行为最常用的方法之一^[22-23]。之

后悬尾实验以“绝望行为”启发并根据“搜寻-等待策略(searching-waiting strategy)”而建立,后也作为研究抑郁的常用分析方法^[24-25],这两种方法是利用小鼠企图但又无法逃脱,从而放弃挣扎,进入特有的抑郁不动状态的原理,对其不动时间进行统计分析及评价。多用于抗抑郁药物的初步筛选,快速评价其药效,并为起效的剂量范围提供参考。Dar等^[26]报道发现槟榔在小鼠悬尾和强迫游泳实验中表现出显著抗抑郁活性。本研究中,槟榔给药后对行为绝望模型小鼠具有良好的抗抑郁作用,在TST中槟榔中、高剂量组和FST中槟榔的低、高剂量组均可明显减少不动时间,抗抑郁效果显著。

利血平拮抗模型为传统的药物诱导抑郁模型^[27],不仅在抑郁症发病机理和抗抑郁药物研究中广泛使用^[28-29]。利血平为囊泡再摄取抑制剂,其通过耗竭脑组织中单胺类神经递质(如5-HT、DA等),抑制中枢神经系统,导致实验动物产生体温降低,眼睑下垂、心率减慢等抑郁样症状。根据抑郁症的“单胺假说”理论,其认为抑郁症与脑内胺类神经递质(5-HT、DA、NE)、氨基酸类(γ 氨基丁酸)神经递质的及其受体水平异常有关^[30-31]。而抗抑郁药通过增加脑内NA和5-HT水平产生抗抑郁作用,尤其以单胺氧化酶抑制剂为例,其可不同程度拮抗利血平引起的这些行为。槟榔表现出抗抑郁活性,可能是通过大脑中5-羟色胺和去甲肾上腺素的升高所介导的^[32]。本实验中槟榔从观测指标(肛温、眼睑闭合度)和神经递质浓度水平的结果中均表现出明显的抗抑郁作用,证实了既往文献中对槟榔具

抗抑郁作用的猜测。并有研究报道,槟榔发挥抗抑郁作用的机制可能与 A 型单胺氧化酶(MAO)抑制剂吗氯贝胺(moclobemide)相似^[33],通过抑制单胺氧化酶同工酶 A(MAO-A)的活性^[34],提高神经系统内单胺含量,发挥抗抑郁作用。

氧化应激(oxidative stress, OS)已被明确证实参与抑郁症的发病机制及病理过程^[35]。抑郁症发作与体内氧化应激水平增加及内源性抗氧化物质的浓度降低有关^[36]。抑郁症患者会出现内源性抗氧化物质水平下降,伴随包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等的活性降低。SOD 活性降低会引起自由基及活性氧(ROS)在体内蓄积,当抗氧化与氧化能力间的动态平衡被破坏,机体内活性氧自由基异常活跃,产生大量自由基而过度氧化,会导致脑组织脂质过氧化损伤,从而引起脂质过氧化产物堆积,如丙二醛(MDA)含量的增加。本研究中连续给予 14 d 槟榔的小鼠可明显升高 SOD、CAT 活性及下调 MDA 表达量,表明了槟榔在利血平致抑郁模型下具有良好的抗氧化应激的作用。

对于行为学实验结果显示,槟榔均有一定的抗抑郁疗效,其中槟榔中、高剂量对 TST,低、高剂量对 FST 和利血平拮抗实验中肛温均表现出显著的抗抑郁作用,低、中、高 3 个剂量对利血平拮抗实验的体温变化均有调节作用。其抗抑郁作用及机制指标结果虽不是每个指标均出现剂量效应递增或递减关系,但总体结果趋势有效,后期可以通过扩大动物样本量进行进一步证实。

综上所述,本实验通过采用两种经典可靠的应激类模型和一种药物诱导致抑郁模型,通过行为学指标分析其抗抑郁活性,后利用利血平拮抗实验对其脑组织中的神经递质和氧化应激的变化进行一系列的行为学验证和机制探索,并基于已有文献报道,证明了槟榔具有抗抑郁的活性及疗效,其抗抑郁的作用机制可能与增强脑内单胺神经能系统水平相关,并对氧化应激水平具有调控作用,具有可逆氧化,校正脑内自由基系统失衡的能力。

参考文献:

[1] Malhi GS, Mann JJ. Depression [J]. Lancet, 2018, 392(10161): 2299-2312.
[2] Bland RC. Epidemiology of affective disorder: a review [J]. Can

J Psychiat, 2019, 42: 367-377.
[3] Lu J, Xu X, Huang Y, et al. Prevalence of depressive disorders and treatment in China: a cross-sectional epidemiological study [J]. Lancet Psychiat, 2021, 8(11): 981-990.
[4] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. Lancet, 2020, 396(10258): 1204-1222.
[5] Lam RW, Kennedy SH. Evidence-based strategies for achieving and sustaining full remission in depression: focus on metaanalyses [J]. Can J Psychiat, 2004, 49(3 Suppl 1): 17-26.
[6] Dording CM, Mischoulon D, Petersen TJ, et al. The pharmacologic management of SSRI-induced side effects: a survey of psychiatrists [J]. Ann Clin Psychiat, 2002, 14(3): 143-147.
[7] Du Y, Li W, Li Y, et al. Repeated arctigenin treatment produces antidepressant-and anxiolytic-like effects in mice [J]. Brain Res Bull, 2019, 146: 79-86.
[8] Jiang N, Lv JW, Wang HX, et al. Dammarane sapogenins alleviates depression-like behaviours induced by chronic social defeat stress in mice through the promotion of the BDNF signalling pathway and neurogenesis in the hippocampus [J]. Brain Res Bull, 2019, 153: 239-249.
[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
[10] Peng W, Liu YJ, Wu N, et al. *Areca catechu* L. (Areaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 164: 340-356.
[11] Chu NS. Effects of Betel chewing on the central and autonomic nervous systems [J]. J Biomed Sci, 2001, 8(3): 229-236.
[12] Bourin M, Poncelet M, Chermat R, et al. The value of the reserpine test in psychopharmacology [J]. Arzneimittelforschung, 1983, 33(8): 1173-1176.
[13] Wang LS, Zhang MD, Tao X, et al. LC-MS/MS-based quantification of tryptophan metabolites and neurotransmitters in the serum and brain of mice [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1112: 24-32.
[14] Li CB, Yang X, Tang WB, et al. Arecoline excites the contraction of distal colonic smooth muscle strips in rats via the M3 receptor-extracellular Ca²⁺ influx-Ca²⁺ store release pathway [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(4): 439-447.
[15] 姜晓梅, 金永新, 向蓉, 等. 抑郁症的中医药治疗研究现状 [J]. 甘肃医药, 2017, 36(9): 728-730.
[16] 栾剑, 陶晓月. 关于传统中药槟榔生物活性的研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2018, 24(13): 8-12.
[17] 李杰. 蒙药槟榔十三味丸抗抑郁作用和改善抑郁综合症状的物质作用基础及机理 [J]. 中国民族医药杂志, 2016, 22(2): 47-52.
[18] Bende MM, Dudhgaonkar S, Jagdhani RS, et al. The

- antidepressant like action of ethanolic extract of *Areca catechu* on behavioral models of depression in rats [J]. Int J Basic Clin Pharmacol, 2016, 5(5): 2098-2102.
- [19] 薛涛, 邬丽莎, 刘新民, 等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3): 321-326.
- [20] 姜宁, 张亦文, 刘新民, 等. 大小鼠抑郁行为实验方法概述 [EB/OL]. (2021-12-1) [2022-01-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2986.Q.20211130.1227.012.html>.
- [21] Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments [J]. Nature, 1977, 266(5604): 730-732.
- [22] Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants [J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977, 229(2): 327-336.
- [23] Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, et al. The forced swim test as a model of depressive-like behavior [J]. J Vis Exp, 2015, 97: 52587.
- [24] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice [J]. Psychopharmacology, 1985, 85: 367-370.
- [25] Steru L, Thierry B, Chermat R, et al. Animal modeling of depression: an ethological approach and its relevance to psychopharmacology [A]. Presented at the 13th CINP Congress [C]. Jerusalem: CINP Congress; 1982.
- [26] Dar A, Khatoon S, Rahamn G, et al. Antidepressant activities of *Areca catechu* fruit extracts [J]. Phytomedicine, 1997, 4(1): 41.
- [27] 宗阳, 朱立静, 孙冰婷, 等. 利血平诱导的抑郁模型的研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(19): 2697-2699.
- [28] Askew BM. A simple screening procedure for imipramine-like antidepressant agents [J]. Life Sci, 1963, 2(10): 725-730.
- [29] Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder [J]. New Engl J Med, 2008, 358(1): 55-68.
- [30] Hirschfeld RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression [J]. J Clin Psychiatry, 2000, 61(Suppl 6): 4-6.
- [31] López-Muñoz F, Alamo C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(14): 1563-1586.
- [32] Abbas G, Naqvi S, Erum S, et al. Potential antidepressant activity of *Areca catechu* nut via elevation of serotonin and noradrenaline in the hippocampus of rats [J]. Phytother Res, 2013, 27(1): 39-45.
- [33] Dar A, Khatoon S. Behavioral and biochemical studies of dichloromethane fraction from the *Areca catechu* nut [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2000, 65(1): 1-6.
- [34] 何嘉泳, 陈杰桃, 辛志添, 等. 槟榔壳总酚类提取物抗抑郁作用研究 [J]. 中国药师, 2012, 15(8): 1076-1078.
- [35] Shvetank B, Anantha NN, Chandragouda RP. Role of oxidative stress in depression Author links open overlay panel [J]. Drug Discov Today, 2020, 25(7): 1270-1276.
- [36] 赵约翰. 银杏叶提取物 EGb761 改善脂多糖诱导的小鼠抑郁样行为及其机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2015.

[收稿日期]2021-11-25

郝志, 胡明会, 邢影, 等. 白香丹胶囊对大鼠卵巢摘除所致的经前期焦虑症的改善作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 33-40.

Hao Z, Hu MH, Xing Y, et al. Effect of Baixiangdan capsule on premenstrual anxiety caused by ovariectomy in rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 33-40.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 01. 004

白香丹胶囊对大鼠卵巢摘除所致的经前期焦虑症的改善作用

郝志¹, 胡明会², 邢影¹, 刘坤¹, 张浩², 杨焕新³, 李自发²,
耿希文^{2*}, 魏盛^{2*}

(1. 山东中医药大学中医学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学实验中心, 济南 250355;
3. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物工程学院, 济南 250355)

【摘要】 目的 通过系列行为学测试, 比较中药白香丹胶囊(BXD)、5-羟色胺3受体(5-HT₃R)特异性激动剂及其拮抗剂、大麻素受体1(CB₁R)特异性激动剂及其拮抗剂对经前期烦躁障碍(PMDD)焦虑症大鼠的干预效应。方法 大鼠经卵巢摘除、激素诱导动情周期和居住入侵3种复合因子构建PMDD焦虑症动物模型。后续实验分两批进行: 第1批大鼠分为对照组、模型组、5-HT₃R激动剂(1-phenylbiguanide, PBG)组、CB₁R激动剂(WIN55212-2, WIN)组、PBG+WIN组、BXD组; 第2批大鼠分为对照组、模型组、5-HT₃R拮抗剂(Granisetron, GRA)组、CB₁R拮抗剂(Rimonabant, RIM)组、GRA+RIM组、BXD组。药物干预结束后, 利用旷场行为测试(OFT)和高架十字迷宫行为测试(EPM)评价各组大鼠焦虑样行为。**结果** 相较于对照组, 模型组大鼠的居住入侵(RIT)混合攻击行为得分显著升高($P<0.01$)、OFT中央区进入次数及停留时间显著降低($P<0.05$)、EPM开放臂进入次数及停留时间百分比显著降低($P<0.05$); 相较于模型组, PBG组、RIM组、BXD组的RIT混合攻击行为得分显著降低($P<0.01$)、OFT中央区进入次数及停留时间显著升高($P<0.05$)、EPM开放臂进入次数及停留时间百分比显著升高($P<0.05$)。**结论** 中药BXD、5-HT₃R特异性激动剂1-phenylbiguanide、CB₁R特异性拮抗剂Rimonabant可有效纠正PMDD焦虑症模型大鼠的焦虑样行为。

【关键词】 经前烦躁障碍; 经前期焦虑症; 动物模型; 中药白香丹胶囊; 5-羟色胺3受体; 大麻素受体1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0033-08

Effect of Baixiangdan capsule on premenstrual anxiety caused by ovariectomy in rats

HAO Zhi¹, HU Minghui², XING Ying¹, LIU Kun¹, ZHANG Hao², YANG Huanxin³, LI Zifa²,
GENG Xiwen^{2*}, WEI Sheng^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China.
2. Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355. 3. College of Bioengineering,
Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250355)

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目(81703941, 81974553, 82004078); 山东省自然科学基金(ZR2019MH053, ZR2020ZD17); 山东省高等学校“青创科技计划”立项支持团队(2019KJK002); 山东省社会科学规划研究项目(20CJYJ14); 山东省教育科学规划项目(ZZ2019016)。

【作者简介】 郝志(1968—), 男, 教授, 硕士, 研究方向: 中医心理学。E-mail: haozhizy@163.com

【通信作者】 魏盛(1980—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 中医情志病证的脑环路基础和中药干预机制研究。E-mail: waysaint@163.com
耿希文(1990—), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 情志病证神经环路及中药干预机制。E-mail: xwgen@sdutem.edu.cn

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To compare the intervention effects of the Baixiangdan capsule (BXD), the 5-hydroxytryptamine 3 receptor (5-HT_{3R})-specific agonist and its antagonist, and the cannabinoid receptor 1 (CB1R)-specific agonist and its antagonist on premenstrual dysphoric disorder (PMDD) rats. **Methods** An animal model of PMDD anxiety was established using three compound factors; ovariectomy, hormone-induced estrous cycle and residential invasion. Follow-up experiments were carried out in two batches. The first batch of rats was divided into a blank group, a model group, a 5-HT_{3R} agonist (1-phenylbiguanide, PBG) group, a CB1R agonist (WIN55212-2, WIN) group, a PBG+WIN group and a BXD group. The second batch of rats was divided into a blank group, a model group, a 5-HT_{3R} antagonist (Granisetron, GRA) group, a CB1R antagonist (Rimonabant, RIM) group, a GRA+RIM group and a BXD group. After drug intervention, the anxiety-like behavior of rats in each group was evaluated using the open-field test (OFT) and elevated plus maze (EPM). **Results** Compared with the control group, the mixed aggressive behavior score of resident-intruder test (RIT) in the model group was significantly higher ($P < 0.01$), and the number of entries into the central area of the OFT and the percentage of staying in the EPM open arms were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the model group, the RIT mixed aggression scores of the PBG, RIM and BXD groups were significantly lower ($P < 0.01$), the number of entries and residence time in the central area of the OFT were significantly higher ($P < 0.05$), and the number of entries and residence time percentage of the EPM open arm were significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusions** BXD, 5-HT_{3R} agonist PBG and CB1R antagonist RIM can effectively correct the anxiety-like behavior of PMDD model rats.

[Keywords] PMDD; premenstrual anxiety; animal model; Baixiangdan capsule; 5-HT_{3R}; CB1R

经前烦躁障碍 (premenstrual dysphoric disorder, PMDD) 是经前期综合征的一种以情绪症状为主的严重亚型^[1]。患者在月经来潮的前 1 周出现情绪不稳定、易怒、抑郁情绪、焦虑、兴趣缺失等症状,并在不久后症状自行改善。PMDD 已被美国《精神障碍诊断和统计手册》(DSM-V) 归为一个新型诊断类别^[2]。值得注意的是,PMDD 与抑郁症和焦虑症的终生共病率很高,超过 50% 的 PMDD 患者被诊断为终生重度抑郁症^[3],因此有关 PMDD 的诊断与治疗逐渐吸引了社会各界的关注。目前 PMDD 发病的潜在机制仍未明确。

在传统中医学中,PMDD 被冠以月经前后诸症,属于典型情志病证。现代医家基于肝主疏泄理论,将 PMDD 认定为肝气逆证、肝气郁证两种亚型^[4]。20 世纪 90 年代山东地区女性流行病学调查发现,该病证候呈规律性分布,肝气逆证占患者总数的 58.9%^[5],急躁易怒为其最主要的临床表现^[6]。现代研究表明,PMDD 的发病机制可能与黄体期 5-羟色胺系统、 γ -氨基丁酸 A 型受体 (GABA_A) 对神经递体四氢孕酮的敏感性变化和涉及情绪功能的脑回路改变有关^[7],而 5-HT_{3R} 和 CB1R 共表达于可调控情绪的额叶皮层、海马、杏仁核等脑区 GABA 能神经元的突触前膜^[8]。同时,5-HT 与 5-HT_{3R} 结合可促进 GABA 的释放,CB1R 信号途径可通过逆向传递抑制 GABA 的释放。由前期工作我们发现中药白香丹胶囊 (BXD) 可能是通过调节血清及大脑皮层中 GABA 含量发挥疗效^[9],其是否可作用于情

绪调节脑区的 5-HT_{3R} 和 CB1R 受体进而发挥效应,仍有待进一步探查。因此,本研究通过观察 BXD、5-HT_{3R} 与 CB1R 的特异性激动拮抗剂对 PMDD 焦虑症大鼠焦虑样行为的影响,评价比较其干预效应,并对 BXD 的干预作用与 5-HT_{3R}、CB1R 的相关性进行探索。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雌性大鼠, Wistar 大鼠 150 只, 6~8 周龄, 体重 (140±20) g; SD 雌性大鼠 50 只, 4~6 周龄, 体重 (100±20) g。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [SCXK (京) 2021-0006]。动物饲养于山东中医药大学实验动物中心 [SYXK (鲁) 2017-0022], 实验操作均在暗淡红灯 (<25 lux) 下进行, 均遵守美国 NIH 颁布的《实验动物护理和使用指南》^[10] 要求。本研究获山东中医药大学实验动物伦理委员会批准 (DWSY201703013), 符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

白香丹胶囊 (由山东中医药大学药剂实验室提供); 戊巴比妥钠 (SigmaAldrich (上海) 贸易有限公司, 批号 20160414); 苯甲酸雌二醇 (Macklin 有限公司, 批号 10042617); 孕酮 (SigmaAldrich (上海) 贸易有限公司, 批号 101327062); 雌二醇 (Macklin 有限公司, 批号 10006920); 羧甲基纤维素钠 (上海国药集团, 批号 20170110); 1-phenylbiguanide (PBG, TCI (上海) 化成工业发展有限公司, 批号 FIA01-SOS);

WIN55212-2(WIN, MCE 中国(上海皓元生物医药科技有限公司), 批号 18285); Granisetron (MCE 中国(上海皓元生物医药科技有限公司), 批号 HY-B0071); Rimonabant(MCE 中国(上海皓元生物医药科技有限公司), 批号 HY-14136)。SuperMaze 动物行为分析系统(上海欣软信息科技有限公司, 型号 XR-Xmaze); 旷场实验系统(上海欣软信息科技有限公司, 型号 XR-XG201); 高架十字迷宫实验系统(上海欣软信息科技有限公司, 型号 XR-XG201)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验设计流程

实验设计流程见图 1。

1.3.2 构建 PMDD 动物模型的复合因子

通过大鼠卵巢摘除、激素诱导和居住入侵 3 种复合因子, 构建 PMDD 焦虑症动物模型。

1.3.3 卵巢摘除手术

手术器械用 75%乙醇溶液浸泡并高温消毒, 大鼠术前禁食。于大鼠腹腔注射 2%戊巴比妥钠进行麻醉(剂量 60 mg/kg), 在其后肢髂前上脊上部切口, 沿脂肪找到子宫结扎摘除, 滴入青霉素钾进行消毒。术后大鼠单笼饲养, 每天腹腔注射青霉素 2 万单位/只进行消炎, 持续 3 d。

1.3.4 外源性激素诱导正常动情周期

卵巢摘除术后 2 周进行外源激素诱导正常动情周期。第 1 天 11:30 每只大鼠皮下注射 0.5 μg/0.1 mL 苯甲酸雌二醇, 第 2 天 19:30 注射 0.5 μg/0.1 mL 雌二醇, 第 3 天 7:30 注射 0.5 mg/0.1 mL 孕酮, 持续 5 个周期。

1.3.5 居住入侵(resident-intruder test, RIT) 构建 PMDD 焦虑症大鼠模型

居住入侵实验评估动物由焦虑情绪产生的攻

击行为。实验于 12:30~15:30 在暗淡光线(<2 lux)下进行, 摄像记录 10 min 内大鼠的攻击行为^[11]。混和攻击行为得分的计算公式为: 复合攻击行为得分=攻击次数+0.2×攻击时间(s)+撕咬次数+0.2×攀爬时间(s)。

1.3.6 旷场行为测试(open-field test, OFT)

旷场实验检测动物在新异环境中的自主运动行为和焦虑程度^[12]。记录 6 min 内大鼠的运动总路程(total distance)、中央区停留时间(time in center area)和中央区进入次数(number of central district entry)。

1.3.7 高架十字迷宫行为测试(elevated plus maze, EPM)

高架十字迷宫评估动物焦虑样行为^[13]。记录 5 min 内大鼠进入开放臂次数(open arm entry, OE)、进入开放臂时间(time in open arm, OT)、进入闭合臂次数(close arm entry, CE)、进入闭合臂时间(time in close arm, CT)。公式: OE%=OE/(OE+CE)×100%, OT%=OT/(OT+CT)×100%。

1.3.8 分组、给药

实验 1: 统计术后第 1 个 R 期(receptive phases period)、NR 期(non-receptive phases period)居住鼠 RIT 的攻击得分差值, 由低到高排序, 将差值前 30% 的大鼠分为对照组, 后 30% 为应激组并将其随机均分为模型组、PBG 组、WIN 组、PBG+WIN 组、BXD 组^[14]。灌胃给药 12 d, 每天 8:30 给药, 每只大鼠给药量为 1 mL/100 g^[15]。实验所需药物均使用 0.5% CMC-Na 助溶, 给予空白及模型组等体积的 CMC-Na 溶液。

实验 2: 大鼠分组包括对照组、模型组、GRA 组、RIM 组、GRA+RIM 组、BXD 组。其余方法同实验 1。

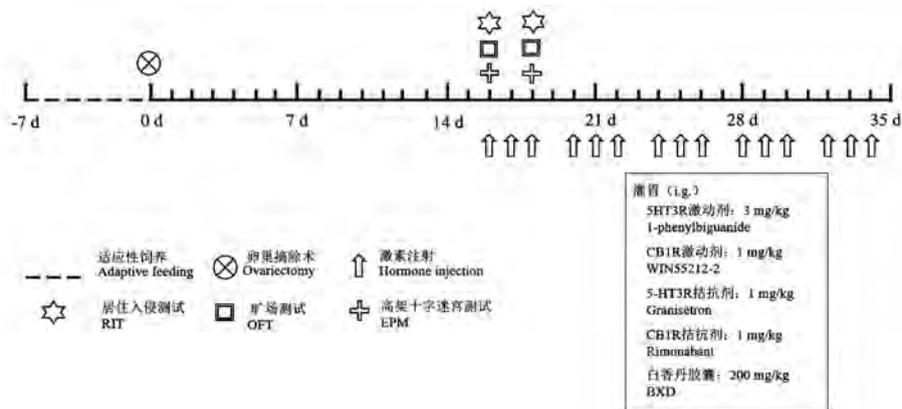


图 1 特异性激动/拮抗剂和 BXD 对 PMDD 焦虑症大鼠模型干预效应流程图

Figure 1 Flow chart of intervention effects of specific agonists/antagonists and BXD on PMDD anxiety rat model

1.4 统计学方法

采用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行统计分析,以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。给药前后组间比较用重复测量的双因素方差分析,超过两组间比较用单因素方差分析,两组间比较用 t 检验,显著性水平设定为 $P<0.05$ 。

2 结果

白香丹胶囊改善经前期焦虑症的作用机制,结果如下。

2.1 特异性激动/拮抗剂和 BXD 对 PMDD 焦虑症大鼠模型攻击行为的影响

如图 2A、2C 所示,实验 1、2 基线期应激组的攻击行为得分相较于对照组具有显著差异($P<0.0001$);如图 2B、2D 所示,给药前各应激组的攻击行为得分无显著差异,给药后 PBG 组、RIM 组、BXD 组的攻击行为得分相较于模型组显著降低($P<0.001, P<0.0001$)。

2.2 特异性激动剂和 BXD 对 PMDD 焦虑症大鼠模型旷场测试的影响

2.2.1 给药前后 NR 期 OFT 结果

如图 3A、3B、3C 所示,实验 1 给药前各组的

OFT 总路程无显著差异,各应激组的中央区进入次数及停留时间相较于对照组显著降低($P<0.05$);如图 3D、3E、3F 所示,给药后各组的 OFT 总路程无显著差异,模型组的中央区进入次数及停留时间相较于对照组显著降低($P<0.05$),PBG、BXD 组相较于模型组显著升高($P<0.05, P<0.001$)。

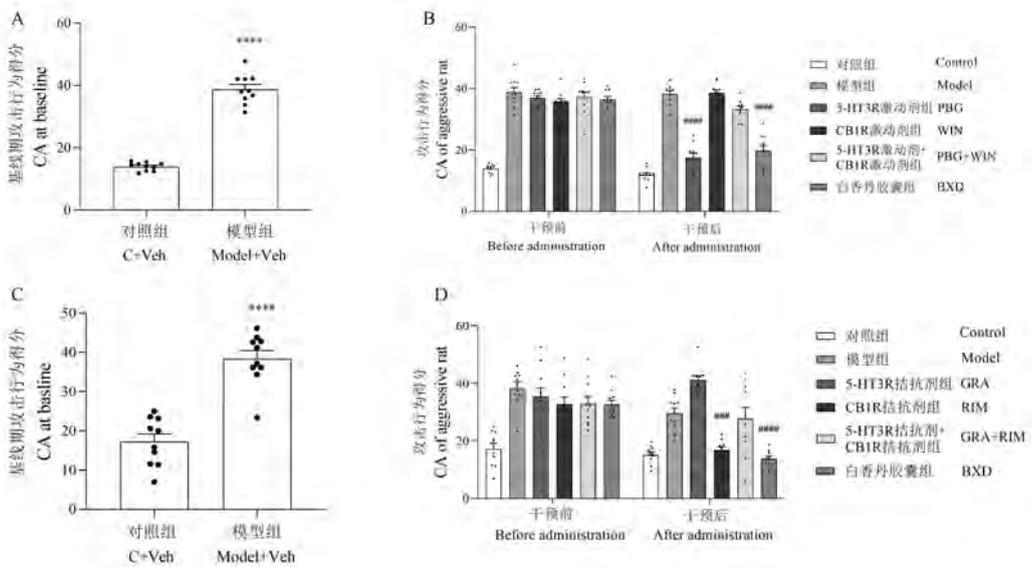
2.2.2 给药前后 NR 期 EPM 结果

如图 4A、4B 所示,实验 1 给药前各应激组的 EPM 开放臂进入次数及时间百分比相较于对照组显著降低($P<0.05$);如图 4C、4D 所示,给药后模型组的 EPM 开放臂进入次数及时间百分比相较于对照组显著降低($P<0.05$);PBG、BXD 组相较于模型组显著升高($P<0.05, P<0.01$)。

2.3 特异性拮抗剂和 BXD 对 PMDD 焦虑症大鼠模型旷场测试的影响

2.3.1 给药前后 NR 期 OFT 结果

如图 5A、5B、5C 所示,实验 2 给药前各组的 OFT 总路程无显著差异,各应激组的中央区进入次数及停留时间相较于对照组显著降低($P<0.05$);如图 5D、5E、5F 所示,给药后各组的 OFT 总路程无显著差异,模型组的中央区进入次数及停留时间相较于对照组显著降低($P<0.01, P<0.05$),RIM 组、

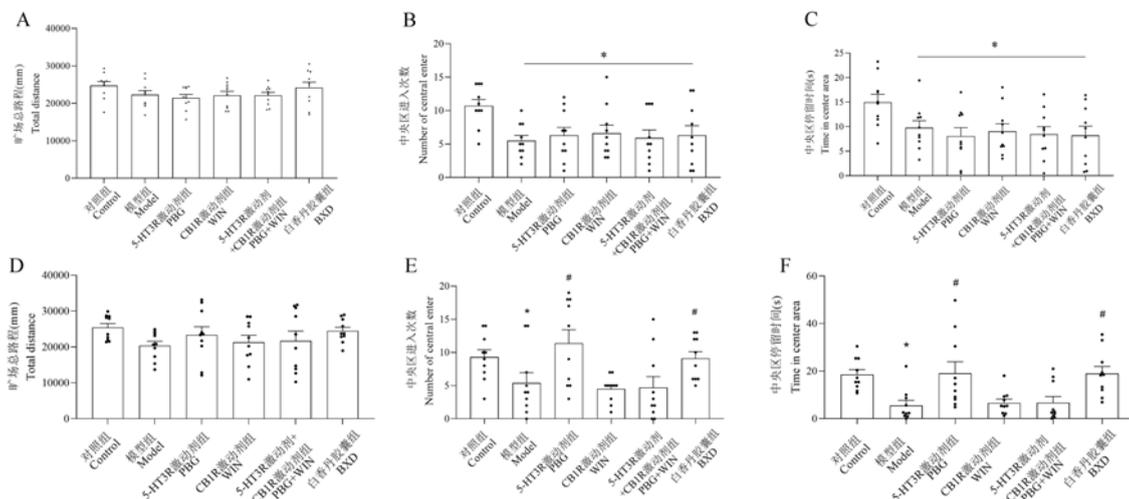


注:A:实验 1 基线期对照组与模型组攻击行为得分;B:实验 1 给药前后各组攻击行为得分;C:实验 2 基线期对照组与模型组攻击行为得分;D:实验 2 给药前后各组攻击行为得分。与对照组相比,**** $P<0.0001$;与模型组相比,### $P<0.001$,##### $P<0.0001$ 。

图 2 特异性激动/拮抗剂、BXD 影响大鼠的攻击行为得分($n=9$)

Note. A, Scores of aggressive behavior in the control group and the model group in the baseline period of experiment 1. B, Score of aggressive behavior in each group before and after administration in experiment 1. C, In experiment 2, the scores of aggressive behavior in the control group and the model group at baseline. D, Aggressive behavior scores of each group before and after administration in Experiment 2. Compared with the control group, **** $P<0.0001$. Compared with the model group, ### $P<0.001$, ##### $P<0.0001$.

Figure 2 Aggressive behavior scores of rats affected by specific agonists/antagonists and BXD

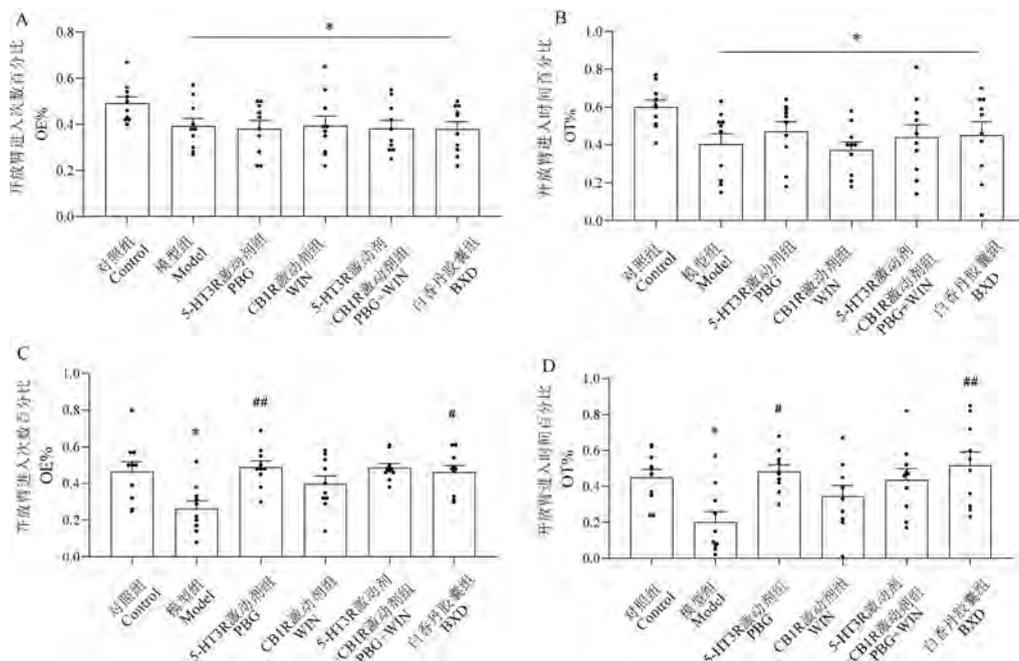


注:A:给药前 OFT 总路程;B:给药前中央区进入次数;C:给药前中央区停留时间;D:给药后 OFT 总路程;E:给药后中央区进入次数;F:给药后中央区停留时间。与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 实验 1 给药前后 PMDD 焦虑症大鼠模型 NR 期 OFT 测试结果 ($n = 9$)

Note. A, Total distance of OFT before administration. B, Number of central area entry before administration. C, Time in center area before administration. D, Total distance of OFT after administration. E, Number of central area entry after administration. F, Time in center area after administration. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Test results of OFT in NR phase of PMDD anxiety rat model before and after administration of Experiment 1



注:A:给药前 EPM 开放臂进入次数百分比;B:给药前 EPM 开放臂进入时间百分比;C:给药后 EPM 开放臂进入次数百分比;D:给药后 EPM 开放臂进入时间百分比。与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 4 实验 1 给药前后 PMDD 焦虑症大鼠模型 NR 期 EPM 测试结果 ($n = 9$)

Note. A, Percentage of EPM open arm entry times before administration. B, Percentage of EPM open arm entry time before administration. C, Percentage of EPM open arm entry times after administration. D, Percentage of EPM open arm entry time after administration. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 4 EPM test results in NR phase of PMDD anxiety rat model before and after administration of Experiment 1

BXD 组相较于模型组显著升高 ($P < 0.05$), GRA 组的中央区进入次数显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3.2 给药后 NR 期 EPM 结果

如图 6A、6B 所示,实验 2 给药前各应激组的 EPM 开放臂进入次数及时间百分比相较于对照组显著降低 ($P < 0.05$);如图 6C、6D 所示,给药后模型组的 EPM 开放臂进入次数及时间百分比相较于对照组显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), RIM 组、BXD 组相较于模型组显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), GRA 组的开放臂进入次数相较于模型组显著降低 ($P < 0.05$)。

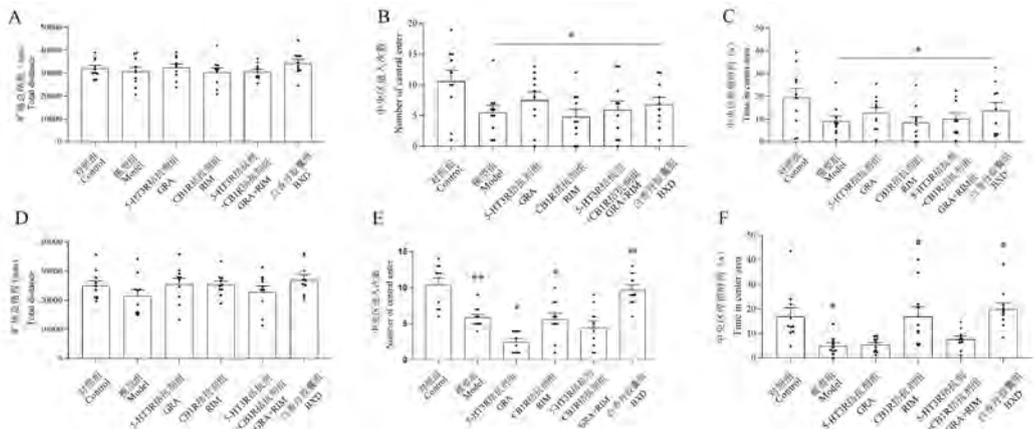
3 讨论

本研究利用居住入侵构建 PMDD 焦虑症大鼠模型,通过 OFT 和 EPM 行为学测评,比较了中药白香丹胶囊对比 5-HT₃R 和 CB₁R 的拮抗剂和激动剂在改善该模型大鼠动情周期非接受期焦虑样情绪的作用效果。结果表明:中药白香丹胶囊、5-HT₃R 激动剂 1-phenylbiguanide 和 CB₁R 特异性拮抗剂 Rimonabant 可有效纠正 PMDD 焦虑症模型大鼠的焦虑样行为。提示白香丹胶囊可能通过作用于 5-HT₃R 和 CB₁R 来发挥抗 PMDD 焦虑样情绪作用。

白香丹胶囊是根据我国第 1 个针对 PMS 肝气逆证的中药复方经前平颗粒化裁而来,由白芍、香附、丹皮的主要药效组分芍药苷、香附挥发油(以香附酮为主要成分)和丹皮酚等配伍组成,具有平肝

理气、抗焦虑、缓解愤怒情绪的作用^[16]。然而“肝气逆证模型”的病因、症候表现在动物体内很难模拟,本文通过大鼠卵巢摘除、激素诱导动情周期和居住入侵 3 种复合因子制备 PMDD 焦虑症动物模型,且白香丹胶囊对其有显著改善作用,故该模型可模拟 PMDD 肝气逆证。本研究结果与尹征^[17]、王帅等^[18]有关白香丹药效的研究结果一致,即白香丹胶囊可有效改善 PMDD 焦虑症动物模型大鼠的焦虑样行为。然而,由于白香丹胶囊成分的多样性,在该药物作用于 PMDD 焦虑症的微观机制方面尚未得到明确。

通过系列行为学测评,我们发现,白香丹胶囊与 5-HT₃R 激动剂 1-phenylbiguanide 和 CB₁R 特异性拮抗剂 Rimonabant 发挥了类似的抗焦虑效果。有研究表明,5-羟色胺(5-HT)受体参与调控多种情绪、应激反应^[19],其异常信号转导可引起神经内分泌紊乱,是 PMDD 发病的原因之一^[20-21]。5-HT₃R 属于配体门控离子通道,5-HT 与 5-HT₃R 结合可促进 GABA 的释放,调节郁怒情绪的表达,其异常表达可影响多种神经递质的代谢,进而影响人体的精神健康水平^[22-23]。而 GABA 是广泛存在于哺乳动物神经系统中的抑制性神经递质,对于调控神经元的兴奋程度具有重要影响。GABA 及其受体水平调节紊乱与多种情志病发病机制密切相关^[24-25]。同时,黄体期 5-HT 系统异常活动及类固醇孕酮代谢物四氢孕酮引起脑内 GABA_A 受体的改变,影响

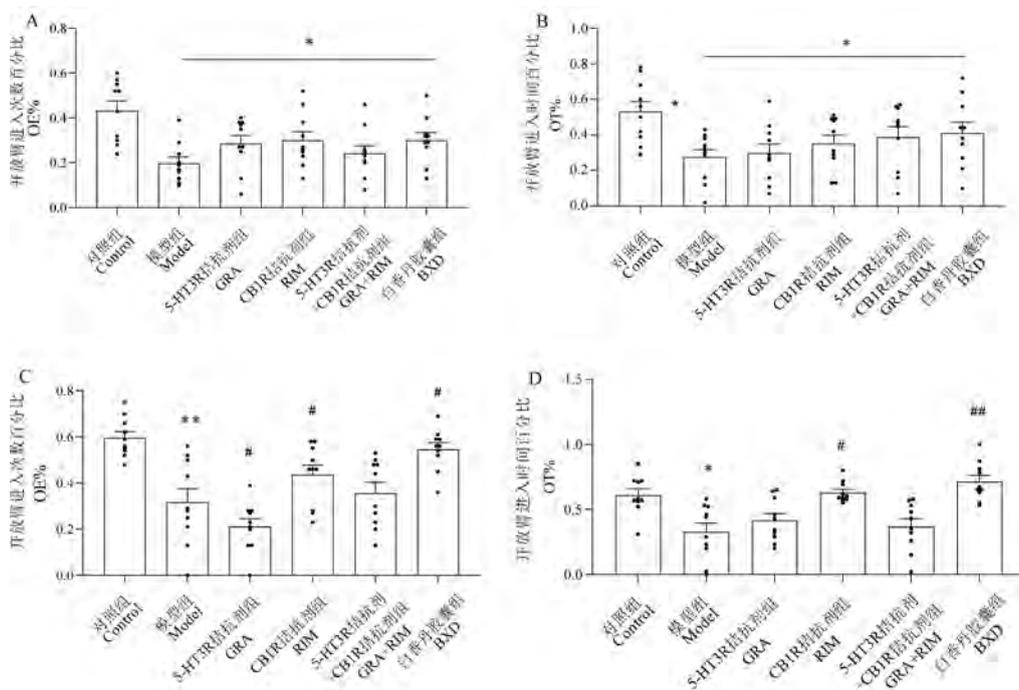


注:A:给药前 OFT 总路程;B:给药前中央区进入次数;C:给药前中央区停留时间;D:给药后 OFT 总路程;E:给药后中央区进入次数;F:给药后中央区停留时间。与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图 5 实验 2 给药前后 PMDD 焦虑症大鼠模型 NR 期 OFT 测试结果 ($n = 9$)

Note. A, Total distance of oft before administration. B, Number of central area entry before administration. C, Time in center area before administration. D, Total distance of OFT after administration. E, Number of central area entry after administration. F, Time in center area after administration. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Test results of OFT in NR phase of PMDD anxiety rat model before and after administration of Experiment 2



注:A:给药前 EPM 开放臂进入次数百分比;B:给药前 EPM 开放臂进入时间百分比;C:给药后 EPM 开放臂进入次数百分比;D:给药后 EPM 开放臂进入时间百分比。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 6 实验 2 给药后 PMDD 焦虑症大鼠模型 NR 期 EPM 测试结果 ($n = 9$)

Note. A, Percentage of EPM open arm entry times before administration. B, Percentage of EPM open arm entry time before administration. C, Percentage of EPM open arm entry times after administration. D, Percentage of EPM open arm entry time after administration. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 6 EPM test results in NR phase of PMDD anxiety rat model after administration in Experiment 2

GABA 释放进而导致 PMDD 的发生^[26]。

CB1R 是大麻素受体的主要亚型之一,以神经元的形式广泛分布于前脑、基底核、小脑、海马和大脑皮层等脑区,与情绪反应、应激反应及稳定内环境等方面密切相关^[27-28]。CB1R 可调节突触传递和神经元的兴奋性,突触后神经元可释放内源性大麻素物质与 CB1R 结合,抑制 GABA 释放^[29-30]。内源性大麻素和 5-HT 可协同作用调节中枢神经系统,具有调节疼痛、成瘾性、抑郁、焦虑情绪等功能^[31]。目前研究已经发现 5-HT3R 与 CB1R 介导情绪调控脑区 GABA 释放参与 PMDD 焦虑症发病,5-HT3R 和 CB1R 共表达于额叶皮层、海马、杏仁核等情绪相关脑区 GABA 能神经元的突触前膜,两者协同调控上述脑区 GABA 释放。课题组前期研究结果亦表明,白香丹胶囊可以通过调节血清及大脑皮层中 GABA 含量来发挥疗效。由此,我们有理由推测,白香丹胶囊可能通过作用于 5-HT3R 与 CB1R,促进相关脑区 GABA 的释放,发挥抗 PMDD 焦虑症的大鼠焦虑样行为。然而,本研究仅进行了行为药效表型观察和比较,并未从细胞、分子等微观层面对 PMDD

的发病及治疗进行深入机理探讨。今后的工作中我们将选取与这一机制密切相关的信号转导通路深入探查 PMDD 发病及中药干预的可能分子机制。

参考文献:

[1] Zhang H, Geng X, Li Z, et al. Paeonol at certain doses alleviates aggressive and anxiety-like behaviours in two premenstrual dysphoric disorder rat models [J]. Front Psychiatry, 2020, 11: 295.
 [2] Beddig T, Reinhard I, Kuehner C. Stress, mood, and cortisol during daily life in women with Premenstrual Dysphoric Disorder (PMDD) [J]. Psychoneuroendocrino, 2019, 109: 104372.
 [3] Cohen LS, Soares CN, Otto MW, et al. Prevalence and predictors of premenstrual dysphoric disorder (PMDD) in older premenopausal women; The Harvard Study of Moods and Cycles [J]. J Affect Disorders, 2002, 70(2): 125-132.
 [4] 牟翔宇. 肝疏泄不及病理与疏肝药理-PMDD 肝气郁证大鼠主要病理变化与柴芍皂苷主要药效机理研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
 [5] 乔明琦, 张珍玉, 徐旭杰, 等. 经前期综合征证候分布规律的流行病学调查研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1997, 3 (3): 31-33.

- [6] 高明周, 孙慧, 张长龙, 等. 中医典型情志病证之 PMS/PMDD 病证结合动物模型研究现状 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(12): 5804-5808.
- [7] Lanza di Scalea T, Pearlstein T. Premenstrual dysphoric disorder. [J]. Med Clin North Am, 2019, 103(4): 613-628.
- [8] Mikics E, Vas J, Aliczki M, et al. Interactions between the anxiogenic effects of CB1 gene disruption and 5-HT3 neurotransmission [J]. Behav Pharmacol, 2009, 20(3): 265-272.
- [9] 张浩. 肝疏泄失常深层机制—居住入侵应激诱导 PMDD 肝气逆证大鼠模型的鉴定及激素调控相关机制探查 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- [10] Ho HP, Olsson M, Pharm M, et al. The serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sex steroid-related aggression in female rats: an animal model of premenstrual irritability [J]. Neuropsychopharmacol, 2001, 24(5): 502-510.
- [11] Chung KK, Martinez M, Herbert J. Central serotonin depletion modulates the behavioural, endocrine and physiological responses to repeated social stress and subsequent *c-fos* expression in the brains of male rats [J]. Neuroscience, 1999, 92(2): 613-625.
- [12] 张鹏横, 阮璐薇, 卓泽伟, 等. 情绪异常大鼠模型的旷场行为实验在中医药领域的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 100-103.
- [13] 孙秀萍, 张楠, 高杰, 等. 慢性束缚应激模型致焦虑和抑郁共病的行为学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(6): 18-22.
- [14] Schneider T, Popik P. Increased depressive-like traits in an animal model of premenstrual irritability [J]. Horm Behav, 2007, 51(1): 142-148.
- [15] 孙丽. 经前期综合征肝气逆证大鼠模型血清及不同脑区孕酮及氨基酸检测分析 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2008.
- [16] 张海红, 张惠云. 白香丹胶囊治疗 PMS 肝气逆证作用机制研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2013, 42(9): 21-23.
- [17] 尹征. 白香丹胶囊对焦虑模型大鼠的抗焦虑作用及机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.
- [18] 王帅, 郜彦鑫, 张洪, 等. 白香丹胶囊对 PMDD 肝气逆证模型大鼠血清抗焦虑样作用机制研究 [J]. 医学研究杂志, 2019, 48(9): 66-70.
- [19] 高鹏, 张惠云. 调肝方药对愤怒、郁怒模型大鼠下丘脑 5-HT_{2C} 基因表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 120-124.
- [20] Parry BL. The role of central serotonergic dysfunction in the aetiology of premenstrual dysphoric disorder [J]. CNS drugs, 2001, 15(4): 277-285.
- [21] Bixo M, Allard P, Bäckström T, et al. Binding of [³H] paroxetine to serotonin uptake sites and of [³H] lysergic acid diethylamide to 5-HT_{2A} receptors in platelets from women with premenstrual dysphoric disorder during gonadotropin releasing hormone treatment [J]. Psychoneuroendocrino, 2001, 26(6): 551-564.
- [22] Turner TJ, Mokler DJ, Luebke JL. Calcium influx through presynaptic 5-HT₃ receptors facilitates GABA release in the hippocampus: *in vitro* slice and synaptosome studies [J]. Neuroscience, 2004, 129(3): 703-718.
- [23] Krzywkowski K, Davies PA, Feinberg-Zadek PL, et al. High-frequency *HTR3B* variant associated with major depression dramatically augments the signaling of the human 5-HT_{3AB} receptor [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(2): 722-727.
- [24] 崔维刚, 薛玲. 愤怒情绪模型大鼠不同脑区 γ 氨基丁酸 B₂ 受体表达的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(3): 22-26.
- [25] Wong CG, Bottiglieri T, Snead OC. GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease [J]. Ann Neurol, 2003, 54(S6): S3-S12.
- [26] Rapkin AJ, Korotkaya Y, Taylor KC. Contraception counseling for women with premenstrual dysphoric disorder (PMDD): current perspectives [J]. Open Access J Contracept, 2019, 10: 27-39.
- [27] 吴永涛. 大麻素 CB1、CB2 受体在脑组织中分布及其表达特性的研究 [D]. 北京: 第三军医大学, 2009.
- [28] Mouslech Z, Valla V. Endocannabinoid system: an overview of its potential in current medical practice [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2009, 30(2): 153-179.
- [29] Zhu PJ, Lovinger DM. Developmental alteration of endocannabinoid retrograde signaling in the hippocampus [J]. J Neurophysiol, 2010, 103(2): 1123-1129.
- [30] 孟宪栋. 颞叶癫痫海马区星形胶质细胞大麻素 I 型受体的表达及功能研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2014.
- [31] Radley JJ, Jacobs BL. Pilocarpine-induced status epilepticus increases cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats via a 5-HT_{1A} receptor-dependent mechanism [J]. Brain Res, 2003, 966(1): 1-12.

[收稿日期] 2021-09-11

张青, 李梦婷, 李梅, 等. 杜仲提取物多次给药后在正常大鼠和 SHR 模型体内的药动学比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 41-47.

Zhang Q, Li MT, Li M, et al. Pharmacokinetic comparison of active components in an *Eucommia ulmoides* extract by multiple administrations between normal and spontaneously hypertensive rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 41-47.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.005

杜仲提取物多次给药后在正常大鼠和 SHR 模型体内的药动学比较研究

张青¹, 李梦婷¹, 李梅¹, 鲍红松¹, 黄勇¹, 郑林¹, 李月婷¹, 陈颖², 巩仔鹏^{1*}

(1. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心 药学院, 贵阳 550004;
2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的 研究杜仲提取物多次给药后松脂醇二葡萄糖苷((+)-pinoresinol di-O-β-D-glucopyranoside, PDG)、京尼平苷酸(genipinic acid, GA)、绿原酸(chlorogenic acid, CA)、原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)、新绿原酸(neochlorogenic acid, NCA)、隐绿原酸(cryptochlorogenic acid, CCA)和松脂醇单葡萄糖苷((+)-pinoresinol 4'-O-β-D-glucopyranoside, PG) 7个活性成分在正常大鼠和自发性高血压大鼠机体内的药代动力学差异。方法 采用正常大鼠和自发性高血压大鼠为实验对象,以5.4 g/kg的给药剂量灌胃杜仲提取物,每天1次,连续7 d,比较杜仲提取物中的7个活性成分在正常大鼠与SHR模型体内的药代动力学和组织蓄积情况差异。结果 药代动力学的研究发现,CCA和NCA在SHR模型体内的药动学参数与正常组比较无明显差异。在SHR模型组体内PDG的 $T_{1/2}$ 为正常组的0.26倍;GA的 $T_{1/2}$ 、 T_{max} 、 AUC_{0-t} 在SHR模型组中分别为正常组的2.20、0.04、0.50倍;PG在SHR模型组体内的 $T_{1/2}$ 为正常组的0.55倍;PCA在SHR模型组内的 $T_{1/2}$ 为正常组的2.04倍;CA的 $T_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 分别为正常组的1.93、0.64倍。蓄积实验结果发现,GA等7种活性成分主要分布在胃、小肠、心、肝和肺中。除CCA外,CA、NCA、PCA、GA、PDG和PG在SHR模型体内与正常组相比,含量存在显著差异的组织器官数量分别为2~7个不等。结论 自发性高血压病理状态下的机体能够显著改变杜仲降压活性成分在血浆中药动学行为以及组织中的蓄积情况,而对于需要长期服药的高血压患者而言,药物在体内的药动学行为尤为重要,本研究可为杜仲在临床上的长期使用剂量调整提供一定的参考。

【关键词】 自发性高血压大鼠;杜仲提取物;药代动力学;松脂醇二葡萄糖苷

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0041-07

Pharmacokinetic comparison of active components in an *Eucommia ulmoides* extract by multiple administrations between normal and spontaneously hypertensive rats

ZHANG Qing¹, LI Mengting¹, LI Mei¹, BAO Hongsong¹, HUANG Yong¹, ZHENG Lin¹, LI Yueting¹,
CHEN Ying², GONG Zipeng^{1*}

(1. Guizhou Medical University Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Provincial Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, School of Pharmacy, Guiyang 550004, China.

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81703661, 81560683, 82160789); 国家大学生创新创业计划项目(202010660023)。

【作者简介】 张青(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药代动力学研究。E-mail: 3034997930@qq.com

【通信作者】 巩仔鹏(1985—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药药代动力学及其PK-PD结合模型研究。

E-mail: gzp4012607@126.com

【Abstract】 Objective To investigate differences in pharmacokinetics and accumulation of seven bioactive constituents, namely (+)-pinorensin di-O- β -D-glucopyranoside (PDG), genipinic acid (GA), chlorogenic acid (CA), protocatechuic acid (PCA), neochlorogenic acid (NCA), cryptochlorogenic acid (CCA) and (+)-pinorensin 4'-O- β -D-glucopyranoside (PG) in *Eucommia ulmoides* after multiple intragastric administrations between normal rats and spontaneously hypertensive rats (SHRs). **Methods** Normal rats and SHRs received intragastric *Eucommia ulmoides* extract at a dose of 5.4 g/(kg·d) for 7 consecutive days. Then, the pharmacokinetic parameters and tissue distribution were compared between normal rats and SHRs. **Results** Pharmacokinetic tests showed no obvious differences in all pharmacokinetic parameters of NCA and CCA between normal and model groups. The $T_{1/2}$ value of PDG in SHRs was 0.26 times that of normal rats. In model group, the $T_{1/2}$, T_{max} and AUC_{0-t} of GA were 2.20, 0.04 and 0.50 times those of normal group, respectively. For model group, the $T_{1/2}$ value of PG was 0.55 times that of normal group. Compared with normal rats, the $T_{1/2}$ of PCA in SHRs was increased by 2.04 times. The $T_{1/2}$ and AUC_{0-t} of CA in SHRs were 1.93 and 0.64 times of normal rats, respectively. Accumulation analysis showed that all representative active components were mainly distributed in the stomach, intestines, heart, liver and lungs. Except for CCA, the contents of the others in SHRs presented notable differences in tissues of two to seven compared with normal group. **Conclusions** The pharmacokinetics and accumulation of active anti-hypertensive components in *Eucommia ulmoides* extract after multiple administrations in rats were influenced remarkably by the pathological state of spontaneous hypertension. Moreover, it is important to learn about the pharmacokinetic characteristics of drugs for those who suffer from hypertension and need to take medicine persistently. This study provides a reference for clinical dosage adjustment of *Eucommia ulmoides* when used long-term.

【Keywords】 spontaneously hypertensive rats; *Eucommia ulmoides*; pharmacokinetics; (+)-pinorensin di-O- β -D-glucopyranoside

杜仲为被子门杜仲科 (*Eucommiaceae*) 杜仲属 (*Eucommia*) 植物杜仲 (*Eucommia ulmoides* Olive.) 的干燥树皮, 其在我国已拥有悠久的用药历史。据报道, 杜仲的主要活性成分包括木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类和黄酮类, 并且木脂素类中的松脂醇二葡萄糖苷, 环烯醚萜类中的京尼平苷酸、京尼平苷和桃叶珊瑚苷, 苯丙素类中的绿原酸等成分都具有较好的血管舒张作用^[1-2]。各成分降压机制主要与维持 NO 系统的平衡, 进而保护内皮细胞功能、拮抗 Ca^{2+} 通道、抑制肾素-血管紧张素-醛固酮以及作用血管平滑肌等有关^[3]。目前关于杜仲活性成分的药代动力学研究依然很欠缺, 本研究基于其降压活性成分经多次给药后在正常和自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHRs) 模型体内的蓄积情况进行考察, 以期对杜仲药材的临床长期合理安全使用提供一定的参考依据。

药物的组织分布常用于评价药物的靶向性和判断药物在体内蓄积的有无以及程度, 其主要受到药物性质和机体状况两个因素的影响^[4], 这些因素将导致药物的组织分布差异, 最终影响到药物疗效。对于需多次长期用药的慢性疾病, 药物的蓄积和毒副作用等安全性问题不容小觑, 因此药物蓄积的研究显得至关重要。

课题组前期通过调研发现杜仲潜在的降压活

性成分主要包括松脂醇二葡萄糖苷 (PDG)、松脂醇单葡萄糖苷 (PG)、京尼平苷酸 (GA)、原儿茶酸 (PCA)、绿原酸 (CA)、新绿原酸 (NCA)、隐绿原酸 (CCA) 等。因此本实验选用 Wistar 大鼠与 SHR 模型, 通过多次灌胃给予杜仲提取物后研究上述 7 种降压活性成分在生理和自发性高血压病理状态下大鼠体内的药动学行为, 通过比较京尼平苷酸等 7 个代表成分在正常大鼠和 SHR 模型体内的药动学和蓄积差异, 初步探究自发性高血压对杜仲提取物药动学和蓄积情况的影响, 以期为指导杜仲在临床上对于治疗原发性高血压长期合理安全用药的方案设计提供一定的参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级健康 Wistar 大鼠与 SHR 模型各 6 只, 雄性, 周龄 7~9 周, 体重 (275±25) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [SCXK (京) 2016-0006], 饲养于贵州医科大学实验动物中心 [SYXK (黔) 2018-001]。实验经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准 (1702077), 遵循 3R 原则。

饲养条件: 购入的大鼠进入动物房后, 按每笼 6 只分装饲养管理, 以标准饲料喂养并每天更换新鲜纯净水。动物房光照充足, 通风良好, 室温 18℃ ~

25℃,相对湿度 50%~70%,动物饲养室按常规要求定期消毒。

1.2 主要试剂与仪器

杜仲药材购于贵阳市药材公司,由贵州医科大学药学院药用植物与生药学教研室刘春花副教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮。松脂醇二葡萄糖苷(PDG)、京尼平苷酸(GA)、绿原酸(CA)、原儿茶酸(PCA)、葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111537-201204、111828-201403、110753-201415、110809-201205、110752-201514,纯度分别 $\geq 90.9\%$ 、 $\geq 94.6\%$ 、 $\geq 96.2\%$ 、 $\geq 99.9\%$ 、 $\geq 95.5\%$);新绿原酸(NCA)、隐绿原酸(CCA)对照品(四川维克奇生物科技有限公司,批号分别为 160318、160304,纯度均 $\geq 98\%$);松脂醇单葡萄糖苷(PG)对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 P09J7F8760,纯度 $\geq 98\%$);甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司,色谱纯);乙腈(德国 Merck 公司,色谱纯);甲酸(北京迪科马科技有限公司,批号为 6040672);实验用水为屈臣氏纯净水。

UPLC Xevo TQ-S 型超高效液相三重四级杆质谱联用仪(ACQUITY UPLC I-Class 系统,MassLynx 质谱工作站,美国沃特世公司);低温高速离心机(Allegra X-30 R,美国贝克曼公司);大鼠无创血压计(美国);超声波清洗器(KQ-300DE,昆山市超声仪器有限公司);氮气吹干仪装置(MTN-2800D,天津奥特塞恩斯仪器有限公司);多管涡旋振荡器(VX-III,北京踏锦科技有限公司);万分之一电子天平(EL204,上海 METTLER TOLEDO 公司),玻璃匀浆器(上海垒固仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 大鼠血压的测定

实验前对所购买的 SHR 模型进行血压测定,选取合格的大鼠进行本部分的实验(大鼠的 3 次收缩压值的平均值 ≥ 150 mmHg 为合格标准)。测压方法:测压前将随机选取的 SHR 模型置于 37℃ 预热箱中 10 min,之后用 MRBP 无创血压计测定大鼠尾动脉收缩压(SBP),记录大鼠安静状态下较稳定的 3 次结果,取其平均值,即得。

1.3.2 多次给药的药代动力学和蓄积实验研究

健康 Wistar 大鼠和合格 SHR 模型各 6 只,每天灌胃给予杜仲提取物溶液 1 次,给药剂量为 5.4 g/kg,连续灌胃 7 d,第 6 天晚上分别进行颈静脉插管

手术,待大鼠恢复 12 h 以上后,对其灌胃给予最后 1 次杜仲提取物溶液,给药剂量为 5.4 g/kg,于给药前和给药后 5 min、15 min、30 min、45 min、1 h、1.5 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、和 24 h 从颈静脉插管处采血约 250 μ L 放入肝素化的 EP 管中,同时补充 250 μ L 肝素溶液(1 mg/mL)。将获得的全血离心(4500 r/min,5 min),取血浆 100 μ L 于 -80℃ 冰箱中保存以备分析。于末次采血后迅速取出心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、小肠、肌肉及睾丸组织,置于冰生理盐水中清洗干净,并用滤纸将其沾干。对各组织进行称重、装袋后置于冰箱(-80℃)保存备用。采用 UPLC-MS/MS 方法测定 7 个代表成分在大鼠主要脏器中的含量以及在血浆中的药动学参数,并就此分析模型组和正常组之间的差异。组织和血浆的前处理以及测定方法详见课题组前期发表论文^[5-6]。

1.4 统计学方法

采用 WinNonLin 6.4(Phoenix,美国 Pharsight 公司)数据处理软件中的非房室模型(NCA)分析方法拟合各药动学参数,AUC、MRT 等参数选用统计矩方法进行计算。采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,实验结果用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用独立样本 *t* 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多次给药的药代动力学实验结果

正常大鼠和 SHR 模型多次灌胃给予杜仲提取物后各时间点血药浓度,平均血药浓度-时间曲线见图 1。采用 WinNonLin 6.4 软件计算药动学参数,并对药物在大鼠体内的动力学过程进行非房室模型拟合,相关药动学参数见表 1~表 4。对杜仲提取物中 GA 等 7 种成分在 SHR 模型和正常大鼠血浆中的药动学参数包括生物半衰期($T_{1/2}$)、血药浓度达峰时间(T_{max})、达峰浓度(C_{max})、药时曲线下面积(AUC)、表观分布容积(V_d/F)、清除率(CL/F)以及平均滞留时间(MRT)进行考察。结果表明,GA 在 SHR 模型组中的 $T_{1/2}$ 、 V_d/F 、 CL/F 、 $MRT_{0-\infty}$ 明显高于正常组,而 T_{max} 、 AUC_{0-t} 以及 $AUC_{0-\infty}$ 显著低于正常组;PCA 在 SHR 模型组中的 $T_{1/2}$ 和 V_d/F 相较于正常组显著增高;与正常组相比,CA 的 $T_{1/2}$ 、 V_d/F 和 $MRT_{0-\infty}$ 在 SHR 模型组中表现更高,而 AUC_{0-t} 则明显降低;在 SHR 模型组中,

PDG 的 $T_{1/2}$ 、 V_d/F 和 $MRT_{0-\infty}$ 显著低于正常组; PG 在 SHR 模型组中的 $T_{1/2}$ 明显低于正常组; CCA 和 NCA 在两组中的各药动学参数无明显差异。在 0~24 h 内, 自发性高血压病理状态降低了 GA 的血浓度, 其余 6 种成分中 CA、PCA、PDG、PG 在 SHR 模型中的 C-t 曲线变化趋势与正常组相比基本一致, 而 NCA 和 CCA 在两组之间的 C-t 曲线则有所差异。GA 在 SHR 组内整体的药动学参数与正常组相比差异最为明显。

2.2 杜仲提取物多次给药后其 7 个活性成分在正常大鼠和 SHR 模型体内的蓄积实验结果

大鼠灌胃给予杜仲提取物溶液 24 h 后, GA 等 7 种被测成分在正常大鼠和 SHR 体内各组织中的含量见表 5~表 7。

7 种活性成分在正常大鼠体内各组织器官中的含量排列顺序为 (1) PCA: 肠>胃>肾>肺>肝>心>脾>睾丸>脑>肌肉。(2) GA: 肠>肾>胃>肺>心>肝>脾>肌肉>睾丸>脑。(3) PG: 胃>肠>肺>肌肉>心>辜

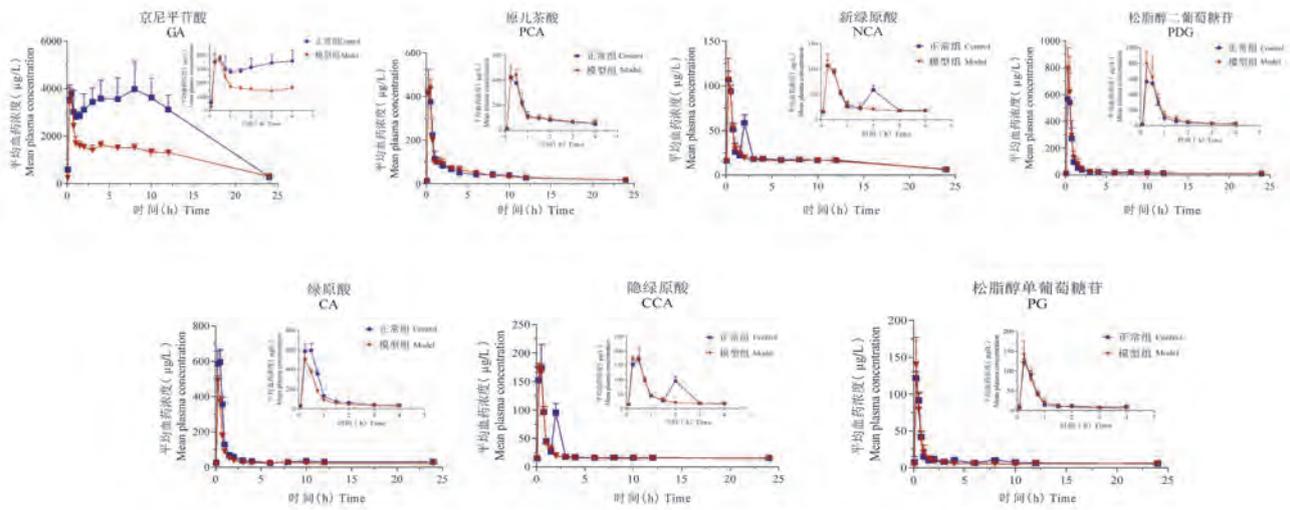


图 1 大鼠多次灌胃给予杜仲提取物后 GA、PG、CA、PCA、PDG、NCA、CCA 的 C-t 药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 1 Concentration-time profiles of GA, PG, CA, PCA, PDG, NCA, CCA in normal and SHR model after multiple intragastrically administered *Eucommia ulmoides* extract

表 1 多次灌胃给药后 PDG 和 GA 在正常及模型大鼠体内的 PK 参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of PDG and GA in normal and SHR model after multiple intragastrically administered *Eucommia ulmoides* extract

药动参数 Pharmacokinetic parameters	松脂醇二葡萄糖苷 PDG		京尼平苷酸 GA	
	正常组 Control	模型组 Model	正常组 Control	模型组 Model
$T_{1/2}$ (h)	37.15±15.33	9.65±3.49*	7.41±0.98	16.27±7.45*
T_{max} (h)	0.15±0.09	0.12±0.07	5.65±3.48	0.21±0.09***
C_{max} (μg/L)	666.07±185.26	862.02±183.39	4852±1343.82	4703.71±1282.64
AUC_{0-t} ((h·μg)/L)	735.15±216.65	800.46±230.71	66450.43±12635.04	33284.00±16490.31**
$AUC_{0-\infty}$ ((h·μg)/L)	1346.46±386.24	970.15±174.63	77155.00±14796.21	37851.00±12383.17**
V_d/F (L/kg)	1243.20±356.00	490.41±130.56***	9.12±2.05	37.78±13.84*
CL/F (L/(h·kg))	28.36±13.24	34.51±6.13	0.85±0.15	1.67±0.17***
MRT_{0-t} (h)	6.42±2.20	5.48±1.09	9.37±0.65	9.72±1.65
$MRT_{0-\infty}$ (h)	41.52±15.78	12.13±7.03**	12.89±1.65	25.43±5.17*

注:与正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

表 2 多次灌胃给药后 PG 和 PCA 在正常及模型大鼠体内的 PK 参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of PG and PCA in normal and SHR model after multiple intragastrically administered *Eucommia ulmoides* extract

药动参数 Pharmacokinetic parameters	松脂醇单葡萄糖苷 PG		原儿茶酸 PCA	
	正常组 Control	模型组 Model	正常组 Control	模型组 Model
$T_{1/2}$ (h)	30.53±10.96	16.64±5.55*	12.09±2.33	24.62±11.70*
T_{max} (h)	0.12±0.07	0.12±0.07	0.15±0.09	0.15±0.09
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	134.44±76.79	150.99±37.12	508.75±330.99	543.04±389.56
AUC_{0-1} ($(\text{h} \cdot \mu\text{g})/\text{L}$)	226.86±73.12	202.58±29.15	1066.52±431.19	1096.68±422.56
$AUC_{0-\infty}$ ($(\text{h} \cdot \mu\text{g})/\text{L}$)	494.62±148.33	347.68±27.21	1381.12±303.59	1690.24±740.91
Vd/F (L/kg)	2209.39±877.16	1903.07±552.52	56.86±12.96	79.65±17.88*
CL/F ($\text{L}/(\text{h} \cdot \text{kg})$)	67.47±28.36	80.20±6.36	3.18±0.72	2.88±1.15
MRT_{0-1} (h)	8.88±1.82	8.93±0.87	7.61±1.60	7.38±1.89
$MRT_{0-\infty}$ (h)	24.50±7.58	25.58±5.97	17.32±5.75	27.93±10.44

注:与正常组相比, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

表 3 多次灌胃给药后 CA 和 CCA 在正常及模型大鼠体内的 PK 参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Pharmacokinetic parameters of CA and CCA in normal and SHR model after multiple intragastrically administered *Eucommia ulmoides* extract

药动参数 Pharmacokinetic parameters	绿原酸 CA		隐绿原酸 CCA	
	正常组 Control	模型组 Model	正常组 Control	模型组 Model
$T_{1/2}$ (h)	12.33±3.23	23.80±16.42*	55.78±18.71	36.42±15.18
T_{max} (h)	0.17±0.09	0.12±0.08	0.17±0.09	0.12±0.07
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	850.88±291.03	638.01±125.39	239.05±104.91	244.82±96.69
AUC_{0-1} ($(\text{h} \cdot \mu\text{g})/\text{L}$)	1206.93±381.46	772.37±90.93*	512.45±118.75	480.14±98.37
$AUC_{0-\infty}$ ($(\text{h} \cdot \mu\text{g})/\text{L}$)	1742.18±373.00	1634.97±464.82	1694.51±515.95	1295.87±375.05
Vd/F (L/kg)	62.54±23.61	112.84±24.57*	201.81±84.95	157.50±80.29
CL/F ($\text{L}/(\text{h} \cdot \text{kg})$)	3.42±0.51	3.81±1.03	3.04±1.32	4.40±1.93
MRT_{0-1} (h)	7.84±2.05	7.64±0.34	9.28±1.36	9.73±1.76
$MRT_{0-\infty}$ (h)	18.82±7.25	34.15±10.53*	78.29±21.39	54.35±15.03

注:与正常组相比, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

表 4 多次灌胃给药后 NCA 在正常及模型大鼠体内的 PK 参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of NCA in normal and SHR model after multiple intragastrically administered *Eucommia ulmoides* extract

药动参数 Pharmacokinetic parameters	新绿原酸 NCA	
	正常组 Control	模型组 Model
$T_{1/2}$ (h)	50.47±18.16	38.40±10.96
T_{max} (h)	0.12±0.08	0.12±0.07
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	155.71±40.10	119.52±54.30
AUC_{0-1} ($(\text{h} \cdot \mu\text{g})/\text{L}$)	483.00±31.38	448.82±42.28
$AUC_{0-\infty}$ ($(\text{h} \cdot \mu\text{g})/\text{L}$)	1645.22±377.43	1377.90±622.31
Vd/F (L/kg)	99.13±16.07	86.01±20.80
CL/F ($\text{L}/(\text{h} \cdot \text{kg})$)	1.47±0.43	1.89±0.66
MRT_{0-1} (h)	10.12±0.85	10.68±0.96
$MRT_{0-\infty}$ (h)	71.78±24.35	57.74±15.65

丸>脾>肾。(4)PDG:肠>胃>肝>心>肺>脾>肌肉>脑>睾丸。(5)CA:心>肝>胃>肠>肺>脑>脾>肾>肌肉>睾丸。(6)NCA:胃>心>肺>肝>肠>脾>肾>肌肉>睾丸>脑。(7)CCA:肝>心>肠>胃>肺>脾>脑>肾>睾丸>肌肉。

7 种活性成分在 SHR 模型体内各组织器官中的含量排列顺序为(1)PCA:胃>肠>肺>肝>肾>脑>心>脾>睾丸>肌肉。(2)GA:胃>肠>肺>心>肝>肾>脾>睾丸>肌肉>脑。(3)PG:胃>肠>肺>心>肌肉>脾>睾丸>肾。(4)PDG:胃>肠>心>肝>肺>脾>脑>肌肉>睾丸。(5)CA:肠>胃>心>肝>肺>肾>脾>睾丸>肌肉>脑。(6)NCA:胃>肠>肺>心>肝>脾>肌肉>睾丸>肾>脑。(7)CCA:心>肝>肠>胃>肺>肾>脑>脾>睾丸>肌肉。

表 5 多次给予杜仲提取物后 CA、NCA、CCA 在正常大鼠和 SHR 模型体内各组织的含量($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 5 Content of CA, NCA, CCA in rat different tissues homogenate of normal and SHR model at 24 h after multiple intragastrically administered *Eucommia ulmoides* extract

组织 Tissue	绿原酸 CA		新绿原酸 NCA		隐绿原酸 CCA	
	正常 Control	SHR 模型 Model	正常 Control	SHR 模型 Model	正常 Control	SHR 模型 Model
心 Heart	10.24±2.20	8.94±2.10	4.20±1.85	3.78±0.57	39.90±10.88	43.43±12.23
肝 Liver	8.29±2.48	7.87±1.98	3.28±0.64	3.38±0.90	42.56±13.54	29.41±1.92
脾 Spleen	2.07±0.46	1.83±0.42	1.51±0.17	1.48±0.10	1.96±0.52	1.29±0.39
肺 Lung	2.76±0.88	3.47±0.94	3.65±0.19	4.08±0.75	4.79±0.27	4.90±0.40
肾 Kidney	1.86±0.47	2.81±0.43*	1.18±0.36	0.79±0.10*	1.71±0.54	1.82±0.41
胃 Stomach	8.04±1.67	9.52±2.52	12.78±0.83	12.98±1.43	5.12±1.16	5.05±0.28
脑 Brain	2.18±0.66	0.92±0.20*	0.93±0.27	0.63±0.20	1.35±0.27	1.55±0.34
肠 Intestine	5.74±0.96	10.14±3.30	3.04±0.88	5.83±1.07**	8.57±2.73	7.67±0.99
肌肉 Muscle	1.49±0.44	1.13±0.23	1.04±0.13	0.97±0.08	0.83±0.10	1.00±0.12
睾丸 Testis	1.44±0.30	1.30±0.20	1.03±0.07	0.91±0.06*	0.92±0.14	1.09±0.24

注:与正常组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。Note. Compared with the control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$.表 6 多次给予杜仲提取物后 PCA、GA 在正常大鼠和 SHR 模型体内各组织中的含量($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 6 Content of PCA, GA in rat different tissues homogenate of normal and SHR model at 24 h after multiple intragastrically administered *Eucommia ulmoides* extract

组织 Tissue	原儿茶酸 PCA		京尼平苷酸 GA	
	正常 Control	SHR 模型 Model	正常 Control	SHR 模型 Model
心 Heart	2.51±0.73	2.41±0.75	166.27±17.36	151.78±46.22
肝 Liver	4.49±1.75	7.69±1.13*	165.60±19.16	147.45±15.58
脾 Spleen	1.90±0.72	2.34±0.37	14.70±1.28	14.53±2.17
肺 Lung	5.47±1.19	10.29±2.75*	183.99±33.66	206.83±58.15
肾 Kidney	9.62±3.13	6.52±2.03	440.89±70.64	118.70±27.50***
胃 Stomach	146.22±20.12	646.99±124.07***	211.08±71.41	1160.87±132.01***
脑 Brain	1.46±0.22	2.88±0.37**	2.93±0.87	2.19±0.38
肠 Intestine	161.81±29.59	172.60±42.62	1514.85±548.69	1157.89±41.46
肌肉 Muscle	1.41±0.33	1.20±0.16	14.42±2.80	3.36±0.95**
睾丸 Testis	1.50±0.47	2.34±0.47*	11.75±2.58	7.07±1.49**

注:与正常组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。Note. Compared with the control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$.表 7 多次给予杜仲提取物后 PG、PDG 在正常大鼠和 SHR 模型体内各组织中的含量($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 7 Content of PG, PDG in rat different tissues homogenate of normal and SHR model at 24 h after multiple intragastrically administered *Eucommia ulmoides* extract

组织 Tissue	松脂醇单葡萄糖苷 PG		松脂醇二葡萄糖苷 PDG	
	正常 Control	SHR 模型 Model	正常 Control	SHR 模型 Model
心 Heart	2.39±0.61	5.46±1.65**	104.92±10.54	114.57±31.93
肝 Liver	ND	ND	116.46±7.39	111.61±4.23
脾 Spleen	1.42±0.33	2.86±0.74**	6.06±2.48	9.81±2.97
肺 Lung	13.32±3.13	38.17±8.83*	90.60±7.85	98.05±14.39
肾 Kidney	0.16±0.02	0.17±0.04	ND	ND
胃 Stomach	228.00±72.67	1459.74±218.79***	238.37±70.94	3023.48±702.49**
脑 Brain	ND	ND	3.16±0.97	3.83±0.66
肠 Intestine	103.15±23.23	51.37±3.90**	1430.19±499.56	138.50±17.19**
肌肉 Muscle	2.41±0.45	4.31±0.59**	4.79±0.76	3.11±0.95
睾丸 Testis	1.82±0.57	1.04±0.24*	1.58±0.41	1.91±0.38

注:ND:未检测到。与正常组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。Note. ND, Not detected. Compared with the control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$.

3 讨论

药物一般作用于疾病患者,而机体的疾病状态对药物的药代动力学有着不同程度的影响,这对于临床用药是否安全有效而言至关重要^[7]。对于口服给药,药物首先从给药部位吸收进入血液循环,随血流分布到全身各个组织器官、体液和细胞,这种药物在血液和组织之间的转运现象称为分布^[8]。了解药物的体内分布特征对于保证安全用药和新药开发意义重大。而通过研究病理生理状态下不同成分在不同组织器官之间的蓄积差异情况可以作为合理安全用药的参考。

在药动力学实验研究中,杜仲提取物中的 NCA 和 CCA 两种成分的药动力学参数未见明显的组间差异。PDG 在 SHR 模型组中的 $T_{1/2}$ 、 $MRT_{0-\infty}$ 、 V_d/F 分别较正常组显著降低;除了 C_{max} 、 MRT_{0-t} 外,GA 在 SHR 模型组中的 $T_{1/2}$ 、 V_d/F 、 CL/F 、 $MRT_{0-\infty}$ 与正常组相比明显上升,而其 T_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 则表现相反;PG 在 SHR 模型组中 $T_{1/2}$ 与正常组相比下降显著;相比正常组,PCA 在 SHR 模型组中的 $T_{1/2}$ 和 V_d/F 增加明显;与 AUC_{0-t} 相反,CA 的 $T_{1/2}$ 、 V_d/F 、 $MRT_{0-\infty}$ 在 SHR 模型组中相比正常组显著升高(均 $P < 0.05$)。以上结果提示病理状态下的机体会影响杜仲中 PDG、GA、PG、PCA 和 CA 在体内消除的快慢以及吸收的速度和程度。

在组织蓄积实验中,结果显示,杜仲提取物中的 7 种活性成分主要分布在胃、肠、心、肝、肺。相较于其它 4 种成分,CA、NCA、CCA 在各个器官中的含量整体很低,推测 3 种成分消除较快,无累积现象。CCA 的组织含量在 SHR 模型组中与正常组相比无明显差异。PCA 在 SHR 体内肝、肺、胃、脑、睾丸中的含量均高于正常组,提示自发性高血压病理状态会增加其体内蓄积;GA 在 SHR 模型体内肾、肌肉、睾丸中的含量均小于正常组,而在胃中的含量显著高于正常组,同时其在正常组中 24 h 肾中的含量仍然很高,推测 GA 在肾中可能发生累积,而 SHR 并无此特征;PG 在 SHR 模型体内的心、脾、肺、胃和肌

肉中含量均大于正常组,而在肠和睾丸内含量小于正常组;与肠内含量相反,PDG 在 SHR 模型体内胃中含量明显大于正常组;在两个组的肾和脑组织中,CA 的含量存在差异;NCA 在 SHR 模型体内肾、肠、睾丸含量与正常组相比存在差异。PCA、GA、PG、PDG 在 SHR 模型体内胃中的含量明显大于正常组,说明疾病状态对这几种成分在胃中的分布有影响。本实验的研究结果表明杜仲提取物中的原儿茶酸、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、新绿原酸和绿原酸 5 种降压活性成分在大鼠体内的药动力学和蓄积情况会受到自发性高血压病理状态的影响,这将为指导杜仲临床长期合理用药提供一定的参考依据。

参考文献:

- [1] 吴林霖,李梅,巩仔鹏,等.基于大鼠离体外翻肠囊模型考察杜仲提取物在正常和自发性高血压状态下的肠吸收特性差异[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(9):15-21.
- [2] 高宏伟,李玉萍,李守超.杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J].中医药信息,2021,38(6):73-81.
- [3] 梅蛟,杨帆.杜仲治疗高血压研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(81):35-36.
- [4] Celestin MN, Musteata FM. Impact of changes in free concentrations and drug-protein binding on drug dosing regimens in special populations and disease states [J]. Pharm Sci, 2021, 110(10): 3331-3344.
- [5] Li M, Hu HJ, Wu LL, et al. A comparative pharmacokinetic study of seven active components after oral administration of an *Eucommia ulmoides* barks extract in normal rats and SHR s [J]. Lat Am J Pharm, 2020, 39(1): 63-72.
- [6] Hu HJ, Xiao HQ, Bao HS, et al. Tissue distribution comparison of six active ingredients from an eucommiae cortex extract between normal and spontaneously hypertensive rats [J]. Evid-based Compl Alt, 2020, 2020: 2049059.
- [7] 王韵,柴逸峰,朱臻宇.基于疾病动物模型的中药药动力学研究进展[J].药学实践杂志,2017,35(2):108-111,140.
- [8] 刘晨希.齐墩果酸衍生物 HA-19 在大鼠体内药代动力学及其组织分布研究[D].南京:南京大学,2018.

[收稿日期]2021-10-28

王孟迪, 魏山山, 姜宁, 等. 金钗石斛对 MPTP 诱导 PD 小鼠的神经保护作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 48-56.

Wang MD, Wei SS, Jiang N, et al. Neuroprotective effects of *Dendrobium nobile* Lindl on MPTP-induced PD mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 48-56.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 01. 006

金钗石斛对 MPTP 诱导 PD 小鼠的神经保护作用及机制研究

王孟迪^{1,2}, 魏山山¹, 姜宁³, Alberto Carlos Pires Dias^{1,4}, 刘新民^{1,3*}, 王琼^{1,2*}

(1.西南医科大学附属中医医院中葡中医药国际合作中心 药学院, 四川 泸州 646000; 2.中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193; 3.中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所药理毒理研究中心, 北京 100193; 4.葡萄牙米尼奥大学分子和环境生物学中心生物系中葡食药资源研究中心, 葡萄牙 布拉加, 4710-057)

【摘要】 目的 探究金钗石斛提取物 (*Dendrobium nobile* Lindl, DNL) 在 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP) 诱导的小鼠帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 模型中的神经保护作用。**方法** 将小鼠随机分为对照组、模型组、美多芭组 (阳性药组)、DNL (100、200、300 mg/kg) 组, 通过腹腔注射 (i.p) MPTP (30 mg/(kg·d), 7 d) 建立亚急性小鼠 PD 模型, 进行步态分析实验、爬杆实验、悬挂实验等评估 DNL 对 PD 小鼠运动异常的影响; 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测各组小鼠纹状体区和皮层区肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 表达的变化; 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测各组小鼠纹状体 caspase-3 和 caspase-9 的表达情况。**结果** 模型组与对照组相比, 推进指数、支撑时相的步态指标有显著变化 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 美多芭组、DNL (100、200、300 mg/kg) 组在左后、右前、右后推进指数, 左后、右前、右后支撑时相均有明显改善 ($P < 0.05$); 与对照组相比, 模型组在爬杆上半段和总时间增加 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$), 调头时间和下半段时间无明显变化 ($P > 0.05$); 与模型组相比, DNL (300 mg/kg) 组可以改善上半段时间 ($P < 0.05$), 美多芭和 DNL (100、200 mg/kg) 组无明显改善 ($P > 0.05$); 与对照组相比, 模型组的悬挂评分降低 ($P < 0.05$), 与模型组相比, DNL (300 mg/kg) 可以增加悬挂评分 ($P < 0.05$), 美多芭和 DNL (100、200 mg/kg) 无明显改善 ($P > 0.05$); 与对照组相比, 模型组小鼠纹状体中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量增加 ($P < 0.05$), caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平显著增高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 美多芭、DNL (300 mg/kg) 组炎症因子指标均降低 ($P < 0.05$), 皮层中各组含量无差异 ($P > 0.05$); caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$)。**结论** DNL 能够改善 MPTP 诱导的 PD 小鼠行为变化, 减轻脑组织中的炎症反应, 抑制神经细胞凋亡, 在治疗 PD 药物及功能食品研发方面具有较好的潜力。

【关键词】 金钗石斛; 帕金森病; 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶; 美多芭; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0048-09

Neuroprotective effects of *Dendrobium nobile* Lindl on MPTP-induced PD mice

WANG Mengdi^{1,2}, WEI Shanshan¹, JIANG Ning³, Alberto Carlos Pires Dias^{1,4}, LIU Xinmin^{1,3*}, WANG Qiong^{1,2*}

(1. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, School of

【基金项目】 (泸州-医科大) 应用基础研究项目 (2018LZXNYD-ZK32); 中国农业科学院农产品加工研究所创新工程院所重点任务 (CAAS-ASTIP-2020-IFST); 泸州市高端人才引进项目 (刘新民团队); 国家重点研发计划 (2016YFE0131800)。

【作者简介】 王孟迪 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药神经药理与航天医学。E-mail: 18383067491@163.com

【通信作者】 王琼 (1975—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药神经药理与航天医学。E-mail: luyiwangqiong@163.com

刘新民 (1962—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药神经精神药理及实验方法学。E-mail: liuxinmin@hotmail.com

* 共同通信作者

Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. 2. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193. 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193. 4. Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), Department of Biology, SINO-PT Research Center For Food and Medicinal Plant Resources, University of Minho, Braga 4710-057, Portugal)

[Abstract] Objective To investigate the neuroprotective effect of *Dendrobium nobile* Lindl (DNL) in mice with 1-methyl-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease (PD). **Methods** After establishment of the MPTP-induced subacute PD mouse model (30 mg MPTP/(kg·day) i.p., 7 d), the effects of DNL on the motor dysfunction in PD mice were evaluated by gait analysis, the pole test, suspension test and open field test. The effects of DNL on the expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) in PD mice were determined by ELISA. The effects of DNL on the expression levels of caspase-3 and caspase-9 in PD mice were assessed by Western blot. **Results** Compared with the control group, gait indexes, such as the propulsion index and duty cycle, were significantly changed in the model group ($P < 0.05$) compared with model group, whereas Madopar and DNL (100, 200 and 300 mg/kg) groups showed significant improvements ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$). In the pole test, compared with the control group, climbing in the top half of the pole time and total time of the model group were significantly increased ($P < 0.01$ and $P < 0.001$), but the time of turn around and the time of the lower half of the pole were not changed significantly ($P > 0.05$). Compared with model group, the DNL (300 mg/kg) group showed improvement in the top half of the pole time ($P < 0.05$), but Madopar and DNL (100 and 200 mg/kg) groups had no significant improvement ($P > 0.05$). In the suspension test, compared with the control group, the suspension score of the model group was significantly decreased ($P < 0.05$) compared with that of the model group and the suspension score of the DNL (300 mg/kg) group was increased ($P < 0.05$), but there was no significant improvement in Madopar and DNL (100 and 200 mg/kg) groups ($P > 0.05$). Compared with the control group, the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, caspase-3 and caspase-9 were increased in the striatum of mice in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.001$) compared with model group and those in the DNL (300 mg/kg) group were significantly lower ($P < 0.05$), but there were no significant differences in the content of cortex among the groups ($P > 0.05$). **Conclusions** DNL significantly improved MPTP-induced behavioral changes in PD mice, reduced the inflammatory response and neuronal apoptosis in brain tissue, and has a good potential for the development of PD drugs and functional food.

[Keywords] *Dendrobium nobile* Lindl; Parkinson's disease; 1-methyl-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; Madopar; mice

帕金森病 (Parkinson's diseases, PD), 又称震颤麻痹 (paralysis agitans), 是一种常见的神经退行性疾病, 其典型的临床表现包括静止性震颤、运动迟缓、姿势失衡和步态障碍等^[1]。黑质多巴胺能神经元的变性坏死以及 α -突触核蛋白 (α -Synuclein, α -Syn) 为主要成分的路易小体 (Lewy's body, LB) 的形成是 PD 的特征性病理表现^[2]。目前关于 PD 发病的具体分子机制尚不清楚, 已有的研究认为 PD 与氧化应激、炎症反应以及细胞凋亡密切相关^[3-5]。至今, PD 的临床治疗仍然以药物为主, 主要包括左旋多巴、单胺氧化酶 B (monoamine oxidase-B, MAO-B) 抑制剂、NMDA 受体阻滞剂和抗胆碱能药物等^[6]。这类药物可有效缓解 PD 症状, 但长期治疗仍会引起诸多副作用, 如姿势不稳、自主神经功能紊乱等, 严重危害身体健康^[7]。因此迫切需要研发

安全、有效、副作用小的防治 PD 药物。

中医药在防治 PD 方面有着丰富的临床经验^[8], 且中药具有多环节、多靶点的药理特点, 可为 PD 治疗提供新思路。PD 在中医学理论中, 症见头摇、手足动摇为主者可属“颤证”范畴^[9]。金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl, DNL) 又名金钗石、扁金钗、扁黄草等, 味甘、微咸、无毒, 主要以新鲜或干燥茎入药, 主产于贵州、云南等地^[10]。2010 年版《中国药典》中已明确将金钗石斛作为药用石斛的首要来源^[11]。现代药理研究分析, 金钗石斛的主要化学成分为生物碱、多糖、氨基酸、酚类、挥发油等, 尤其是生物碱和多糖在抗肿瘤、降血糖以及对神经系统疾病等方面都具有显著的改善作用^[12]。金钗石斛提取物能有效改善小鼠抑郁模型的行为学表现, 显著提高小鼠脑内的 DA 和 5-HT^[13], 金钗石斛生物总

碱可以改善脂多糖诱导大鼠海马 tau 蛋白的高度磷酸化和炎症反应,减轻海马周围神经细胞的凋亡^[14];此外,段灿灿等^[15]通网络药理分析途径,筛选到金钗石斛活性成分 47 个,作用靶点 88 个,富集帕金森、阿尔茨海默症及精神、记忆障碍等神经系统疾病,从系统层面揭示了金钗石斛治疗神经系统疾病的药效物质基础及分子机制。因此,金钗石斛在防治帕金森病中具有很大的潜力。

在本研究中,我们采用 1-甲基-4 苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)制备经典的亚急性 PD 小鼠模型,探究金钗石斛提取物对 PD 小鼠的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

66 只 8~10 周龄,体重 18~20 g,SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006]。实验期间喂养于中国医学科学院药用植物研究所 SPF 级实验动物房[SYXK(京)2017-0020],自由供给标准饲料和纯净水,保持 12 h 光照(9:00~21:00)和 12 h 黑暗(21:00~次日 9:00)交替循环,室温 20℃~23℃,湿度(55±10)%。动物适应环境 5 d 后开始实验。实验过程严格遵守 3R 原则,并遵循本所实验动物伦理委员会相关规定(SLXD-2021052119)。

1.2 主要试剂与仪器

金钗石斛生药购自四川泸州合江凤鸣,由中国医学科学院药用植物研究所张本刚研究员鉴定为金钗石斛。

MPTP 购自美国 Sigma 公司(规格:100 mg);美多芭购自上海罗氏制药有限公司(规格:0.25 g,产品批号:SH5146);小鼠肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6 和 IL-1 β 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒均购自上海酶联生物公司;caspase-3、caspase-9 和 β -Actin 抗体均购自 CST 公司(caspase-3 产品编号:9664, caspase-9 产品编号:

9509, β -Actin 产品编号:4967);HRP 羊抗兔 IgG、HRP 羊抗鼠 IgG 等二抗购自 Jackson 公司。

步态计算机图像实时检测分析处理系统(中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员科研训练中心、北京鑫海仪技术公司联合研制);小鼠自主活动实时检测分析系统(中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员中心、北京康森益友科技有限公司共同研制);AL104 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);高速匀浆机(上海净信);台式高速冷冻离心机(湘立离心机);全自动酶标仪(美国,BIOTEK 有限公司);自制小鼠爬杆等。

1.3 方法

1.3.1 金钗石斛提取物的制备

称取金钗石斛茎干粉与 80% 酸性乙醇按 1:10 的料液比混合浸泡 1 夜,85℃ 条件下回流提取 3 次后合并提取液,浓缩得到浸膏,干燥、粉碎后的褐色粉末即为金钗石斛提取物。

1.3.2 帕金森小鼠模型的建立及分组

适应期结束后,将小鼠随机分为 6 组:对照组、模型组、美多芭组(112.5 mg/kg)、DNL 低剂量(100 mg/kg)组、DNL 中剂量(200 mg/kg)组和 DNL 高剂量(300 mg/kg)组,各组小鼠分笼群养,每笼 4 只,每组 10~12 只。除对照组以外,各组小鼠每天在固定时间进行腹腔注射(i.p)MPTP 30 mg/kg,每天 1 次,连续 7 d,建立亚急性 PD 模型。对照组小鼠 i.p 给予相同体积生理盐水。美多芭组与 DNL(100、200、300 mg/kg)组造模前 14 d 进行灌胃(i.g)预给药,造模期间持续每天灌胃给药直到取材结束,对照组和模型组灌胃予以相同体积纯水。造模完成后次日进行行为学检测,实验流程见图 1。

1.3.3 步态分析实验(gait analysis,GA)

步态分析实验主要用于动物运动能力及运动协调性的评价^[16]。开始实验前 5 d,每天对小鼠进行不少于 3 次训练,以确保动物可从检测通道的一端不间断地跑到另一端。正式检测前调试软件参数,保证小鼠足印在采集图像窗口中清晰可见。检

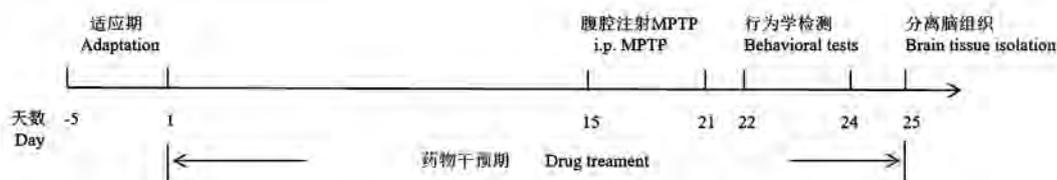


图 1 实验流程

Figure 1 Experimental procedure

测时,将小鼠的足部沾水,使小鼠连续通过跑台,此时高频摄像机记录下步态录像。录制完成的视频通过计算机分析软件进行分析,并统计步态指标。每只小鼠重复测量 3 次,取平均值进行分析。

1.3.4 爬杆实验

爬杆实验主要用于模型动物运动能力评价^[17]。自制一根长 69 cm,直径为 1 cm 的铁杆作为小鼠实验爬杆,将直径 25 cm 的软木质小球固定在爬杆顶部,爬杆上缠上医用胶带以防打滑。检测时,将每只小鼠头朝上放置在球顶使其自动爬下,以小鼠双前肢接触爬杆底部平台为爬完全长,记录以下时间:小鼠头向上至头向下的时间(调头时间),小鼠爬完杆子上半部分所需时间,小鼠爬完杆子下半部分所需时间,爬完全杆所需的总时间。每只小鼠重复测量 3 次,取平均值进行分析。

1.3.5 悬挂实验

悬挂实验参照 Kuribara 等^[18]的操作方法,准备一根离地面约 36 cm 的电线,将小鼠前肢悬挂于水平电线上,评分方法如下:小鼠四爪抓住电线则记 3 分,用一后爪抓住电线记 2 分,如果小鼠两后爪均抓不住电线则记 1 分,无法抓住而掉落记 0 分。

1.3.6 空场实验(the open-field test, OFT)

空场实验用于检测小鼠的自主活动情况^[19]。先将小鼠背对测试箱壁轻轻放入测试箱(30 cm×30 cm×35 cm),适应 3 min 后开始检测,计算机自动监测记录小鼠 10 min 内在测试箱中的自发活动情况,如总路程、运动时间、运动速度等指标。

1.3.7 小鼠脑组织分离

末次行为学实验结束后,小鼠处死后迅速断头,于冰上取脑,分离纹状体、皮层脑组织,-80℃条件下保存。

1.3.8 ELISA 法检测纹状体、皮层部位炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的含量

将脑组织进行冰上匀浆裂解,12000 r/min 离心 30 min,收集上清。ELISA 操作按试剂盒说明书进行。

1.3.9 Western blot 法检测纹状体中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白的表达

将各组脑组织加入蛋白裂解液匀浆,4℃条件下 12000 r/min 离心 15 min 后,取上清液,按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,分装,-80℃冻存待用。按每孔 30 μ g 蛋白上样量配制样品,加入 SDS-PAGE 上样缓冲液配置最终样品。凝胶蛋白电泳条

件:浓缩胶恒压 90 V,约 20 min;分离胶恒压 120 V。转膜条件:300 mA 恒流;0.45 μ m 孔径 PVDF 膜,转膜时间 60 min。室温封闭 1 h 后用抗体稀释液稀释 caspase-3 和 caspase-9 一抗(1:1000),4℃水平摇床孵育过夜。用抗体稀释液稀释山羊抗兔 IgG(H+L)HRP(1:0:10),室温孵育 1 h。用 ECL 化学发光液进行检测观察,使用 IPP 6.0 图像分析软件进行分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 对实验数据进行统计分析,数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,图形以 GraphPad Prism 6.02 软件制作。组间差异的显著性采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 金钗石斛对 PD 小鼠步态功能的影响

结果如表 1 所示,在步宽指标中,各组之间的前肢步宽和后肢步宽没有显著性差异($P > 0.05$)。在推进指数和支撑时相指标中,模型组与对照组相比,左后推进指数、右前推进指数、右后推进指数、左后支撑时相、右前支撑时相、右后支撑时相等步态指标均有显著差异($P < 0.01$, $P < 0.001$),而左前推进指数和左前支撑时相均没有显著性差异($P > 0.05$)。与模型组比较,美多芭组、DNL(100、200、300 mg/kg)剂量组在左后推进指数均有明显恢复($P < 0.001$),DNL(100、200、300 mg/kg)剂量组在右前推进指数($P < 0.05$, $P < 0.01$)和右后推进指数均有明显恢复($P < 0.01$)。与模型组相比,美多芭组、DNL(200、300 mg/kg)剂量组在左后支撑时相和右前支撑时相中有明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比,美多芭组在右后支撑时相中有明显改善($P < 0.05$, $P < 0.01$),DNL(100、200、300 mg/kg)剂量组与模型组相比有一定程度的改善趋势但无显著性差异($P > 0.05$)。

在平均步行周期指标中,模型组与对照组相比有上升趋势,各给药组与模型组相比有下降趋势,但无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 金钗石斛对 PD 小鼠爬杆时间和悬挂评分的影响

如表 2 所示,在爬杆实验中,与对照组比较,模型组的上半段时间、总时间均增加($P < 0.01$, $P < 0.001$),掉头时间和下半段时间无明显变化($P >$

0.05)。与模型组相比,DNL(300 mg/kg)组的爬杆上半段时间指标下降($P<0.01$),下半段时间、掉头时间和总时间无显著性差异($P>0.05$)。在悬挂评分实验中,模型组与对照组比较,悬挂评分明显下降($P<0.05$)。与模型组相比,DNL(300 mg/kg)组的评分增加具有显著性差异($P<0.05$),美多芭组、DNL(100、200 mg/kg)组评分有一定的增加趋势但

无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 金钗石斛对 PD 小鼠空场实验的影响

在空场实验中,如表 3 所示,与对照组相比,模型组在运动总路程、运动时间、平均速度、僵滞时间比率上均有显著性差异($P<0.05$)。与模型组相比,美多芭组,DNL(100、200、300 mg/mL)组各项指标均无显著性差异($P>0.05$)。

表 1 DNL 对 PD 小鼠步态功能的影响($\bar{x}\pm s, n=10\sim 11$)

Table 1 Effect of DNL on gait function in PD mice

步态指标 Gait indicators	对照组 Control	模型组 Model	美多芭组 Madopar	金钗石斛组 DNL		
				100 mg/kg	200 mg/kg	300 mg/kg
前肢步宽 (cm) Forepaw track width	1.36±0.38	1.39±0.59	1.10±0.26	1.17±0.41	1.24±0.43	1.21±0.43
后肢步宽 (cm) Hindpaw track width	1.65±0.68	2.47±0.66	1.50±0.42	1.76±0.31	1.92±0.52	1.62±0.45
左前推进指数 Lf propulsion index	0.39±0.12	0.62±0.18	0.48±0.08	0.47±0.05	0.46±0.07	0.46±0.08
左后推进指数 Lh propulsion index	0.50±0.06	0.73±0.06 ^{***}	0.55±0.03 ^{###}	0.51±0.01 ^{###}	0.53±0.01 ^{###}	0.54±0.04 ^{###}
右前推进指数 Rf propulsion index	0.46±0.05	0.65±0.13 ^{**}	0.50±0.04	0.46±0.04 ^{##}	0.47±0.06 [#]	0.46±0.05 [#]
右后推进指数 Rh propulsion index	0.47±0.12	0.66±0.04 ^{***}	0.56±0.03	0.52±0.07 ^{##}	0.53±0.04 ^{##}	0.57±0.07 ^{##}
左前支撑时相 Lf duty cycle	0.39±0.15	0.53±0.08	0.47±0.15	0.44±0.10	0.44±0.09	0.40±0.08
左后支撑时相 Lh duty cycle	0.45±0.08	0.55±0.05 [*]	0.44±0.03 ^{##}	0.49±0.07	0.43±0.04 ^{##}	0.45±0.06 ^{##}
右前支撑时相 Rf duty cycle	0.45±0.16	0.63±0.16 ^{**}	0.45±0.04 ^{##}	0.46±0.07	0.40±0.07 ^{##}	0.39±0.09 ^{##}
右后支撑时相 Rh duty cycle	0.49±0.13	0.66±0.13 ^{**}	0.45±0.04 ^{##}	0.51±0.05	0.54±0.08	0.55±0.09
平均步行周期 (s) Average step cycle	0.24±0.08	0.30±0.07	0.23±0.06	0.26±0.08	0.25±0.05	0.23±0.05

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

表 2 金钗石斛对 PD 小鼠爬杆时间和悬挂评分的影响($\bar{x}\pm s, n=10\sim 11$)

Table 2 Effects of DNL on climbing time and the score of the suspension test of PD mice

组别 Groups	调头时间 (s) Turn round time	上半段时间 (s) First half of time	下半段时间 (s) Second half of time	总时间 (s) Total time	悬挂评分 Score	
						对照组 Control
模型组 Model	0.98±0.03	6.13±0.99 ^{***}	6.73±0.91	12.86±1.16 ^{**}	1.70±0.48 [*]	
美多芭组 Madopar	0.98±0.02	5.74±0.79	6.66±1.07	12.40±1.18	2.11±0.78	
金钗石斛组 DNL	100 mg/kg	0.96±0.04	5.39±1.24	6.12±1.68	11.51±2.66	2.45±0.68
	200 mg/kg	0.98±0.03	5.15±0.88	5.66±1.17	10.81±1.66	2.55±0.52
	300 mg/kg	0.99±0.01	5.02±1.00 [#]	6.63±0.70	11.66±1.42	2.63±0.67 ^{##}

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

2.4 金钗石斛对 PD 小鼠脑组织炎症因子水平的影响

通过前期的行为学实验,我们认为 DNL 各剂量中 300 mg/kg 剂量效果最佳,因此仅选择 DNL (300 mg/kg) 进行后续的研究。ELISA 检测结果如图 2 所示,与对照组相比,模型组小鼠纹状体区炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平升高 ($P<0.001$)。与模型组相比,美多芭、DNL (300 mg/kg) 各指标显著下降 ($P<0.05, P<0.01$)。在皮层区,各组间炎症因子水平的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 金钗石斛对小鼠纹状体中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白的表达的影响

免疫印迹结果如图 3 所示,对照组中 caspase-3

和 caspase-9 蛋白的表达量较少,与对照组相比,模型组中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白的表达量明显增多 ($P<0.001$);与模型组相比,美多芭组和 DNL (300 mg/kg) 组中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白的表达均有显著下降 ($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。

3 讨论

帕金森病是一种由多种环境因素、生物因素介导的慢性神经退行性疾病,在 60 岁以上人群中患病率达 1%^[20]。为了深入研究 PD 的病因及治疗方法,研究者们根据疾病的病理特点制作了不同的动物模型,其中 MPTP 模型是目前最常用的神经毒素模型之一,具有较长的研究历史。MPTP 能够引起

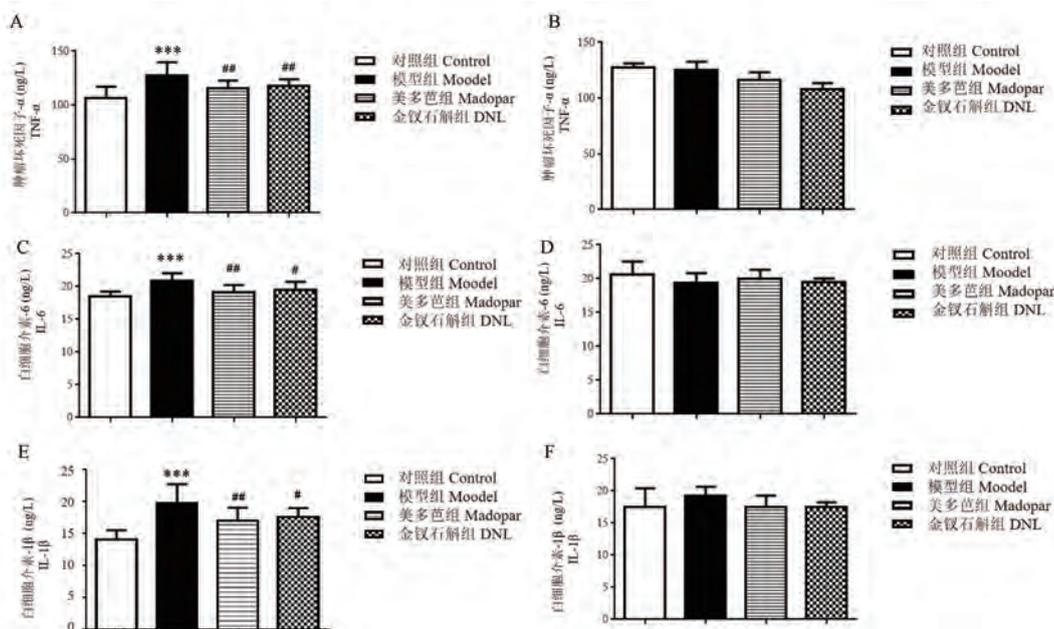
表 3 金钗石斛对 PD 小鼠空场实验的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10\sim 11$)

Table 3 Effects of DNL on the open-field test of PD mice

组别 Groups	总路程(cm) Total distance	运动时间(s) Time of movement	平均速度(cm/s) Speed of movement	僵滞时间比率(%) Ratio of stagnation time
对照组 Control	3750.05 \pm 490.98	192.66 \pm 38.09	6.25 \pm 0.81	67.90 \pm 6.35
模型组 Model	3188.43 \pm 647.56*	154.05 \pm 45.85*	5.31 \pm 1.08*	74.33 \pm 7.64*
美多芭组 Madopar	3342.14 \pm 479.48	158.42 \pm 34.41	5.57 \pm 0.80	73.61 \pm 5.73
金钗石斛组				
100 mg/kg	3172.60 \pm 494.68	150.43 \pm 37.41	5.29 \pm 0.82	74.94 \pm 6.24
200 mg/kg	3126.48 \pm 356.65	141.40 \pm 25.64	5.21 \pm 0.60	76.45 \pm 4.27
300 mg/kg	3215.28 \pm 699.36	151.42 \pm 59.79	5.36 \pm 1.17	74.78 \pm 9.97

注:与对照组相比, * $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, * $P<0.05$.

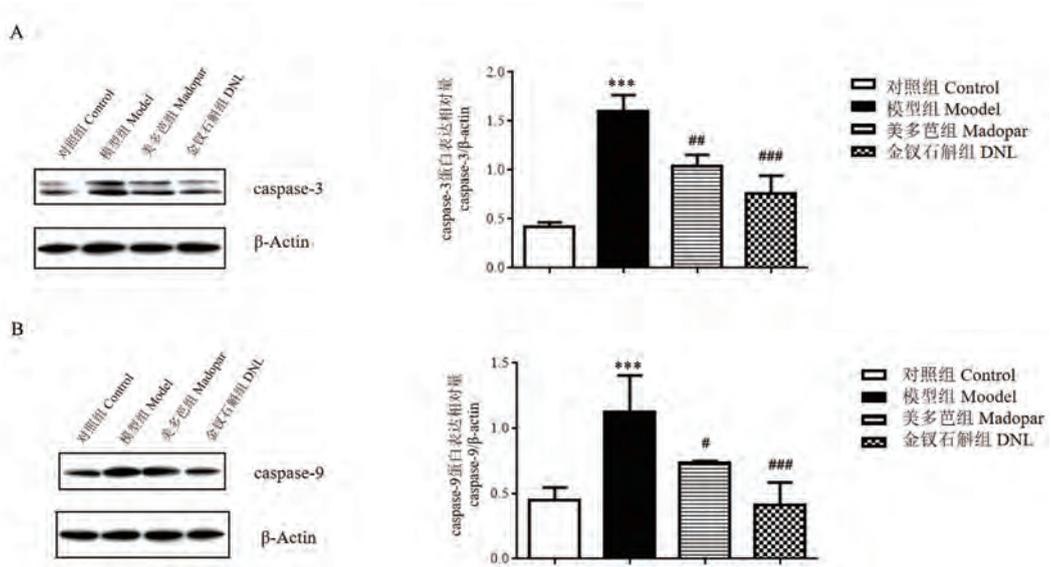


注:A:纹状体区 TNF- α 水平;B:皮层区 TNF- α 水平;C:纹状体区 IL-6 水平;D:皮层区 IL-6 水平;E:纹状体区 IL- β 水平;F:皮层区 IL- β 水平。与对照组相比, *** $P<0.001$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 2 金钗石斛对 PD 小鼠脑组织 TNF- α 、IL-6、IL- β 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=7$)

Note. A, TNF- α levels in striatum. B, TNF- α levels in cortex. C, IL-6 levels in striatum. D, IL-6 levels in cortex. E, IL- β levels in striatum. F, IL- β levels in cortex. Compared with control group, *** $P<0.001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 2 Effects of DNL on TNF- α , IL-6, IL- β levels in PD mice brain



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图3 金钗石斛对PD小鼠纹状体中caspase-3和caspase-9蛋白的表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note. Compared with control group, *** $P < 0.001$. Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 3 Effects of DNL on the expression of caspase-3 and caspase-9 proteins in the striatum of PD mice

黑质致密部多巴胺能神经元的变性,氧化应激反应和线粒体功能障碍,能够较好地模拟PD的临床表现和病理学特征^[21]。因此,在本研究我们采用腹腔注射给与MPTP 30 mg/kg连续7 d诱导的小鼠亚急性PD模型来评价DNL的药效。造模小鼠均在腹腔注射给予MPTP后5~30 min出现静止性震颤、立毛、弓背、行动减缓、聚集成团等现象,与参考文献^[22]报道一致,提示腹腔注射给与MPTP可成功建构PD模型。

现代药理学研究表明,金钗石斛生物碱具有显著的神经保护作用,Li等^[23]发现金钗石斛生物碱可以显著改善6-OHDA诱导的PD大鼠中脑黑质DA神经元丢失以及降低6-OHDA诱导的原代大鼠中脑神经元-胶质细胞中促炎因子的释放。石斛碱是金钗石斛中含量最高的倍半萜类生物碱,具有显著的生物活性^[24],可显著改善PD症状保护DA能神经元。此外,研究表明金钗石斛中的有效活性成分槲皮素可保护机体免受神经毒性化学物质的侵害,并可防止神经元损伤和神经变性的进化和发展^[25]。Singh等^[26]发现给予槲皮素可减轻链脲佐菌素(STZ)诱导的动物认知障碍。槲皮素还可以通过激活PINK1-Parkin线粒体吞噬通路改善6-OHDA诱导的PD模型的线粒体质量控制并保护DA神经元,改善6-OHDA处理下PC12细胞线粒体功能障碍,降低氧化应激水平^[27]。结合种种研究证据,我们认

为金钗石斛在防治PD药物研发方面具有较大的潜力,因此选择金钗石斛醇提物作为干预药物,探究其神经保护作用。

本研究选择爬杆实验、悬挂实验、步态分析实验和空场实验来评价动物的行为学指标。爬杆实验和悬挂实验是PD动物模型公认、经典、常用的行为学检测方法,对动物的协调性具有较好的检测效果^[18,28]。在爬杆实验中,小鼠在爬杆顶部调头至爬杆上半段时,需要调整姿势和方向,该动作能反映肢体的抓握调遣和协调能力,总时间可评估动物总体的运动速度和四肢协调性,因此常用于评价PD小鼠的运动功能。本实验中发现,MPTP模型组小鼠在爬杆上半段时间、总时间与对照组相比均有显著延长,表明腹腔注射给与MPTP使小鼠肢体运动协调能力受到一定程度的损害,而300 mg/kg的DNL对这种损伤起到了一定的恢复作用。同样,模型组悬挂评分显著降低,提示小鼠肢体运动协调能力受损,DNL(300 mg/kg)同样可以显著恢复这种受损现象。

步态分析实验是一种评价神经系统运动行为高度敏感的检测方法^[16],本研究采用自主研发的大小鼠步态分析系统,已在前期的课题中得到验证^[29],目前国内已有文献报道将该系统应用于小鼠帕金森步态行为的研究^[30]。推进指数是指推进时长/支撑时长,用来描述动物肢体离地,在行走过程

中足迹面积逐渐变小的过程。该指标在一定程度上能反映动物行走时肢体肌力的情况。在本实验中,模型组的推进指数出现异常,提示模型动物的肢体推动能力下降,需要靠更大的肌力代偿。步行周期分为支撑相和摆动相,支撑时相指一个步行周期里,动物肢体支撑时长与步行周期的比例,步行周期的异常提示动物行走整体功能出现障碍,导致步行时间减少,肢体与地面接触时间增加。在本实验中,与对照组相比,虽然模型组的步行周期没有显著性差异,但有增高趋势,提示该模型已经出现步行异常,步行速度下降从而使动物各肢体支撑时长上升,美多芭和 DNL(300 mg/kg)均可不同程度地改善 PD 小鼠步态指标的异常。

近年来研究表明,炎症反应参与了 PD 的发生发展^[31]。MPTP 腹腔注射可使小鼠纹状体内 TNF- α ^[32]、IL-6^[33]、IL-1 β ^[34]等促炎因子表达量增加,并伴有胶质细胞的增生^[35]。反应性小胶质细胞增生是 PD 炎症假说中的关键环节,有研究发现 PD 模型小鼠黑质致密部小胶质细胞出现明显增生,并产生了大量 TNF- α 和 IL-1 β , 后者加速了 DA 神经元的变性和死亡,继而引起了神经递质 DA 的生成的减少^[36-37],因此,恢复因过度炎症反应引起的 DA 神经元损伤是改善 PD 的一个重要途径。本研究结果显示,在 MPTP 模型组纹状体中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平及表达与对照组相比组显著升高, DNL(300 mg/kg) 给药组小鼠纹状体中的炎症因子指标相对于模型组均有所下降,说明 DNL 对 MPTP 引起的纹状体神经炎症同样发挥抑制作用。而在皮层区却并未观察到这一现象,这提示不同脑区对 MPTP 可能存在不同的免疫反应。

PD 的发生发展还与神经细胞凋亡密切相关,过度的细胞凋亡会严重影响神经功能。caspase 家族基因是控制凋亡的重要原件之一,当细胞凋亡途径激活,caspase-3 蛋白磷酸化,细胞凋亡进入不可逆阶段^[38]。在本实验中,与对照相比,模型组小鼠 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达量增高,表明 MPTP 使小鼠脑组织的神经细胞发生凋亡;相比模型组,美多芭、DNL(300 mg/kg) 给药组小鼠 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平均显著降低,提示 DNL 可能是通过降低 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平的途径来抑制细胞凋亡对 PD 动物模型的影响,更具体的作用机理有待我们下一步的研究。

综上所述,金钗石斛提取物对 MPTP 诱导的 PD

模型小鼠具有一定的神经保护作用,可缓解运动障碍,降低 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平,其作用机制可能是通过抑制炎症反应,减少神经细胞凋亡的途径来实现的。

参考文献:

- [1] Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2015, 386(9996): 896-912.
- [2] Burch D, Sheerin F. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2005, 365(9459): 622-627.
- [3] Mashima K, Takahashi S, Minami K, et al. Neuroprotective role of Astroglia in Parkinson disease by reducing oxidative stress through dopamine-induced activation of pentose-phosphate pathway [J]. *ASN Neuro*, 2018, 10: 166335284.
- [4] Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? [J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(4): 382-397.
- [5] Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, et al. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Clin Neurosci Res*, 2006, 6(5): 261-281.
- [6] Goetz CG, Pal G. Initial management of Parkinson's disease [J]. *BMJ*, 2014, 349: 6258.
- [7] 陈彪. 左旋多巴在帕金森病治疗中的地位及进展 [J]. *中国临床神经科学*, 2017, 5: 546-550.
- [8] 刘振国, 李文涛. 帕金森病运动并发症中西医结合诊治专家共识(2020) [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2020, 27(4): 247-252.
- [9] 吴勉华, 王新月. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
- [10] 施宝盛, 陶永生, 黎唯. 金钗石斛化学成分和药理作用研究进展 [J]. *昆明医科大学学报*, 2017, 38(10): 124-129.
- [11] 周威, 夏杰, 孙文博, 等. 金钗石斛的化学成分和药理作用研究现状 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(22): 2693-2700.
- [12] 李志平, 郑若男, 柯伙钊, 等. 金钗石斛生物碱的研究现状 [J]. *科技经济导刊*, 2019, 27(28): 96-98.
- [13] 姜宁, 范琳犀, 杨玉洁, 等. 金钗石斛提取物对慢性不可预见应激模型小鼠的抗抑郁作用 [J]. *生理学报*, 2017, 69(2): 159-166.
- [14] 石京山, 王茜, 李利生, 等. 金钗石斛生物碱抗老年痴呆基础研究 [J]. *神经药理学报*, 2017, 7(2): 6.
- [15] 段灿灿, 王清纯, 赵泽粉, 等. 基于网络药理学分析金钗石斛治疗神经系统疾病的药效物质基础及作用机制 [J]. *食品工业科技*, 2021, 42(13): 1-10.
- [16] Li SD, Shi Z, Zhang H, et al. Assessing gait impairment after permanent middle cerebral artery occlusion in rats using an automated computer-aided control system [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 250: 174-191.
- [17] Ogawa N, Hirose Y, Ohara S, et al. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice [J]. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1985, 50(3): 435-441.
- [18] Kuribara H, Higuchi Y, Tadokoro S. Effects of central

- depressants on rota-rod and traction performances in mice [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1977, 27(1): 117-126.
- [19] 杨久山, 张楠, 宋铭晶, 等. 柴胡总皂苷对小鼠抑郁样行为及学习记忆障碍的改善作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(24): 134-139.
- [20] Jankovic J, Stacy M. Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease [J]. *CNS Drugs*, 2007, 21(8): 677-692.
- [21] 许冰, 卢昌均. MPTP 诱导影响亚急性与慢性帕金森病模型小鼠黑质多巴胺能神经元 [J]. *华夏医学*, 2015, 28(1): 24-27.
- [22] 陈世坚, 李舸, 张钰. MPTP 诱导帕金森病小鼠亚急性与慢性模型比较及评价 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(8): 1303-1308.
- [23] Li DD, Wang GQ, Wu Q, et al. *Dendrobium nobile* lindl alkaloid attenuates 6-OHDA-induced dopamine neurotoxicity [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2020, 68(6): 1501-1507.
- [24] 王晓雅, 蒙春旺, 周勤梅. 金钗石斛倍半萜类成分研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(10): 1837-1845.
- [25] Islam MS, Quispe C, Hossain R, et al. Neuropharmacological effects of Quercetin: A literature-based review [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 665031.
- [26] Singh NK, Garabadu D. Quercetin exhibits α 7nAChR/Nrf2/HO-1-mediated neuroprotection against STZ-induced mitochondrial toxicity and cognitive impairments in experimental rodents [J]. *Neurotox Res*, 2021, 39(6): 1859-1879.
- [27] Wang WW, Han RY, He HJ, et al. Administration of quercetin improves mitochondria quality control and protects the neurons in 6-OHDA-lesioned Parkinson's disease models [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13: 11738-11751.
- [28] Luchtman DW, Shao D, Song C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *Physiol Behav*, 2009, 98(1-2): 130-138.
- [29] 李思迪, 金剑, 张恒, 等. 开心散对局灶性脑缺血模型大鼠认知和步行功能障碍的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(3): 425-426.
- [30] 李中正, 盛益华, 李思迪, 等. 电针对 MPTP 亚急性帕金森病模型小鼠步态运动行为的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(7): 874-878.
- [31] Wang Q, Liu Y, Zhou J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target [J]. *Transl Neurodegener*, 2015, 4(1): 19.
- [32] 朱蔚文, 刘焯霖, 徐浩文, 等. MPTP 所致帕金森病模型黑质区 TNF- α 、IL-1 β 的表达及灵芝孢子油的调控作用 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2007, 34(3): 201-204.
- [33] Lu YL, Su Y, Shen YQ, et al. The Levels of plasma IL-1 β , IL-6 of C57BL/6J mice treated with MPTP and brain lateralization [J]. *Cell Mol Immunol*, 2004, 1(3): 219-223.
- [34] Mogi M, Togari A, Ogawa M, et al. Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1 β and nerve growth factor in the striatum [J]. *Neurosci Lett*, 1998, 250(1): 25-28.
- [35] Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, et al. Association of circulating TNF- α and IL-6 with ageing and parkinsonism [J]. *Acta Neurol Scand*, 1999, 100(1): 34-41.
- [36] 王蓉, 欧阳敏, 张萍, 等. 帕金森病小鼠黑质纹状体小胶质细胞活化表达的炎性因子与多巴胺含量的关系 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(10): 2768-2770.
- [37] Block ML, Zecca LG, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8: 57-69.
- [38] 张晓愉, 张昆鹏, 王建民, 等. 圣草次苷调控 MPTP 诱导的慢性小鼠帕金森疾病和机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(3): 369-374.

[收稿日期] 2021-12-11

王雅欣, 郭姗姗, 高英杰, 等. 参味宁郁片对三种药物诱发动物模型的抗抑郁作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 57-61.

Wang YX, Guo SS, Gao YJ, et al. Antidepressant effect of Shenwei Ningyu tablets on animal models induced by three drugs [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 57-61.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.007

参味宁郁片对三种药物诱发动物模型的抗抑郁作用研究

王雅欣¹, 郭姗姗¹, 高英杰¹, 图 娅², 崔晓兰^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京 100029)

【摘要】 **目的** 探索参味宁郁片对三种药物诱发动物模型的抗抑郁机制。**方法** 建立了三种药物诱发的动物模型, 均在给药1周后进行造模, 在加强单胺作用试验中, 各组动物进行腹腔注射盐酸帕吉林 (pargyline hydrochloride), 再尾静脉注射5-羟色胺酸 (5-hydroxytryptophan, 5-HTP), 观察25 min内的甩头次数。在抑制去甲肾上腺素 (noradrenaline, NE) 重吸收实验中, 各给药组皮下注射NE后统计死亡率。在单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 抑制实验中, 各给药组尾静脉注射盐酸色胺并逐只观察大鼠“蹬踩”运动。**结果** 加强单胺作用实验: 各给药组的甩头次数较模型组明显增多, 并具有显著性差异。抑制NE重吸收实验: 与模型组比较, 各给药组小鼠的死亡率均明显增加, 其中低剂量组与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。MAO抑制实验: 模型组可出现明显的“蹬踩”运动, 各给药组动物造模后的“蹬踩”运动次数较模型组虽有明显增多, 但无显著性差异。**结论** 参味宁郁片的抗抑郁作用可能与增强NE神经功能及五羟色胺 (5-HT) 两个方面有关。

【关键词】 抑郁症; 参味宁郁片; 加强单胺作用; 抑制去甲肾上腺素重吸收; 单胺氧化酶抑制作用

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0057-05

Antidepressant effect of Shenwei Ningyu tablets on animal models induced by three drugs

WANG Yaxin¹, GUO Shanshan¹, GAO Yingjie¹, TU Ya², CUI Xiaolan^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China.

2. School of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

【Abstract】 **Objective** To explore the antidepressant mechanism of Shenwei Ningyu tablets on animal models induced by three drugs. **Methods** Three drug-induced animal models were established, following 1 week of drug administration. For the experiment aimed at strengthening the effect of monoamine, the animals in each group were injected with pargyline hydrochloride by intraperitoneal injection, followed by a tail vein injection of 5-hydroxytryptamine acid. The frequency of head-shaking within 25 min was observed. For the inhibition of norepinephrine (NE) reabsorption test, mortality was counted in each group following subcutaneous injection of NE. In the monoamine oxidase (MAO) inhibition test, tryptamine hydrochloride was injected into the tail vein of the animals in each administration group, and the “pedal”

【基金项目】 国家科技重大专项课题 (重大新药创制) (2019ZX09301-005)。

【作者简介】 王雅欣 (1995—), 女, 硕士, 研究方向: 中药抗病毒研究。E-mail: wyx_18434376603@163.com

【通信作者】 崔晓兰 (1961—), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 中药抗病毒研究。E-mail: cuixiaolan2812@126.com

movement of each rat was observed. **Results** For the enhanced monoamine action test, the frequency of head-shaking in mice in each administration group was significantly higher than that in the model group. For the inhibition of NE reabsorption assay, compared with the model group, the mortality of mice in each administration group was significantly higher, and there was a significant difference between the low-dose and model groups ($P < 0.05$). For the MAO inhibition test, obvious “pedaling” movements were observed in the model group, and the number of “pedaling” movements after animal modeling in each administration group was significantly higher than that in the model group; however, the difference was not significant. **Conclusions** The antidepressant effect of Shenwei Ningyu tablets may be related to its efficacy in enhancing NE nerve function and 5-hydroxytryptamine(5-HT).

[Keywords] depression; Shenwei Ningyu tablets; strengthening monoamine action; inhibition of norepinephrine reabsorption; monoamine oxidase inhibition

抑郁症已经成为近年来严重危害人类健康的常见精神类疾病之一,约有 3.5 亿人正受抑郁症的困扰^[1],重度抑郁症在全球范围内患病率逐年升高,给公共卫生系统带来极大的负担^[2],然而因其致病因素复杂、临床表现多样^[3]、发病年龄跨度较大,且常作为其他疾病的并发症,这些因素都极大阻碍了抑郁症的治疗及相关药物的研发工作,且常用的抗抑郁药物通常具有副作用大且病情易复发等缺点^[4],所以近年来的天然抗抑郁药物逐渐受到广泛关注^[5]。

抗抑郁新药-参味宁郁片是由郁金、酸枣仁、西洋参、五味子 4 味中药材组成,其中郁金的重量份为 600~1200、酸枣仁为 600~1200、西洋参为 100~600、五味子为 400~1000。该药在 2005 年获得 CFDA 临床研究批件(批件号:2005L02629),并于 2007 年 2 月获国家发明专利(专利号:ZL031531040),它作为国内首个批准进入临床试验的治疗抑郁症的纯中药小复方制剂(6.1 类)能够调节慢性束缚模型大鼠的免疫炎症反应,临床试验证实该药对于治疗气阴两虚型抑郁症有显著疗效^[6]。

目前关于抑郁症发病机制的研究主要有单胺类神经递质假说、受体假说、下丘脑-垂体-肾上腺轴假说等^[7]。本次研究主要以单胺类神经递质假说为依据展开,因使用单一抑郁症模型易产生假阳性或受到主观偏好的影响,而使用多种抑郁模型进行试验能更准确判断药物的抗抑郁效果^[8]。故本实验中使用 3 种药物诱发的不同动物模型来探索参味宁郁片的抗抑郁作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验纳入 6 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只,体重 160~180 g;KM 小鼠雄性 120 只,体重 13~15

g。实验动物均由北京维通利华公司实验动物中心提供[SCXK(京)2016-0011]。动物饲养于中国中医科学院中药研究所屏障动物实验设施[SYXK(京)2016-0013],并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。本实验中所有操作均遵循国家卫生研究院(national institutes of health, NIH)及北京市实验动物伦理委员会的规定。

1.2 主要试剂与仪器

受试药物:参味宁郁片(实验采用压片前的药粉),由郁金、酸枣仁、西洋参、五味子 4 味中药材组成,经中国中医科学院中药研究所剂型室提供,批号:030802。性状:浅棕色粉末。阳性对照:百忧解,英国礼来公司产品,批号(98)卫药准字 J-23 号。临床适应症:抑郁症。剂型:胶囊。用法用量:20~40 mg/d,口服给药。实验试剂:重酒石酸去甲肾上腺素(上海禾丰制药有限公司产品,批号:沪卫药准字(1995)第 010044 号);5-羟色胺酸(Sigma 公司产品,批号:035G4672);盐酸帕吉林(Sigmag 公司产品,批号:053K3675);盐酸色胺(中国医药公司北京采购供应站提供,批号 850906)。实验仪器:小鼠自主活动记录仪(DPOT-VARIMEX.3 型,美国产品);小鼠悬尾平衡支架(自制)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组

将实验动物进行适应性喂养后采用随机数字表(随机数字由 SPSS 25.0 统计学软件产生)将大鼠及小鼠分为正常组、模型组、百忧解组、参味宁郁片高剂量、中剂量组和低剂量组共 6 组,每组 10 只。

1.3.2 给药方法

剂量设计:参味宁郁片:人临床用量为 34 g/60 (kg·d),即 0.57 g/(kg·d),换算成小鼠用量即为 3.6、12 g/(kg·d),大鼠用量即为 1.5、3.6 g/(kg·d),均分别相当于人临床用量的 1/2 倍、等倍和 2

倍。百忧解:临床人用量为 40 mg/60(kg·d),实验时小鼠用量为 5.2 mg/(kg·d);大鼠用量为 2.6 g/(kg·d);均为临床等效用量。

给药方式:小鼠按 0.2 mL/10 g 灌胃给药,大鼠按 1 mL/100 g 灌胃给药。

1.3.3 实验方法

加强单胺作用实验-5-HTP 诱发小鼠甩头模型^[9-10]:各给药组灌胃给药,正常、模型组给予等量的生理盐水,每天 1 次,连续 6 d,第 7 天除正常对照组外,其余各组动物腹腔注射盐酸帕吉林 100 mg/kg,浓度为 6 mg/mL。1 h 后给药 1 次,再过 30 min,尾静脉注射 10 mg/kg 的 5-HTP,浓度为 0.8 mg/mL,正常对照组给予生理盐水。之后立即放入 24 cm×15 cm×15 cm 的小鼠箱内,观察小鼠每 5 min 内的甩头次数,共测定 25 min。5-HTP 诱发小鼠甩头模型是预先给予 5-HTP 药物后使外源性 5-HT 水平上升进而出现甩头行为^[11]。

抑制 NE 重吸收实验-增强 NE 对小鼠的毒性实验^[12]:各给药组灌胃给药,正常、模型组给予等量的生理盐水,每天 1 次,给药量为 0.2 mL/10 g,连续给药 1 周。除正常对照组外,其余各组于第 7 天灌胃 1 h 后,皮下注射 NE(12 mg/kg),药物浓度为 1.2 mg/mL 然后将小鼠置于塑料笼中,自由饮水、进食。观察各组小鼠的死亡数,48 h 后统计死亡率,死亡率=(死亡数/动物总数)×100%。能够抑制 NE 重摄取的抗抑郁药可以显著提高 NE 的浓度,也能增强外源性给予 NE 的毒性,此模型主要适用于 NE 重摄取抑制剂^[13]。

MAO 抑制实验-对增强色胺引起大鼠惊厥模型的影响:各给药组灌胃给药,正常、模型组给予等量的生理盐水,每天 1 次,连续 7 d。第 7 天给药后除正常组外各组于给药后 1 h 尾静脉注射新鲜配制的盐酸色胺溶液(6 组大鼠交叉进行注射)10 mg/kg,浓度为 2 mg/mL。然后逐只观察前肢特有的阳性反应-阵挛性“蹬踩”运动。色胺作为单胺氧化酶的底物在大鼠注射后可出现阵挛性惊厥反应,具有单胺氧化酶抑制作用的抗抑郁药物可增强色胺引起的惊厥作用^[14]。

1.4 统计学方法

待实验结束后,各组数据采用 SPSS 25.0 进行统计,实验结果均以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义;死亡率统计用 χ^2 检验,为降低 I 型错误

的概率, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 加强单胺作用实验——5-HTP 诱发小鼠甩头模型

表 1 中结果显示:正常组不出现甩头现象,与正常组相比,模型组出现明显的甩头现象,与模型组相比,各给药组的甩头次数明显增多,其中低剂量组稍高于高、中剂量组,各给药组与模型组比较均具有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 抑制 NE 重吸收实验——增强 NE 对小鼠的毒性实验

表 2 结果显示:与正常组相比,皮下注射 NE(12 mg/kg)后模型组小鼠的死亡率为 10%,与模型组相比,参味宁郁片各给药组小鼠的死亡率均明显增加,其中低剂量组为 60%,与模型组比较有显著性差异($P<0.05$)。

2.3 MAO 抑制实验——对增强色胺引起大鼠惊厥模型的影响

表 3 结果显示:正常组动物不出现“蹬踩”运动,与正常组相比,模型组的动物可出现明显的“蹬踩”运动。与模型组相比,各给药组动物造模后的“蹬踩”运动次数较模型组虽有明显增多,但并无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

抑郁症是一种病因复杂的精神类疾病,目前关于其发病机制的研究主要集中在中枢单胺类神经递质如 5-HT、NE 和多巴胺(DA)等方面^[15],大多数抗抑郁药可通过抑制单胺类递质重吸收、抑制 MAO 活性等方式体现药效^[16]。5-HT 作为一种常见的单胺类神经递质,在神经元中常参与包括情绪、睡眠及认知功能等方面的调控^[17],早在 19 世纪 50 年代就有临床实验发现与正常人相比抑郁症患者脑内缺乏 5-HT^[18],因此如何抑制 5-HT 在患者脑内的代谢过程成为治疗抑郁症的关键环节。

鉴于参味宁郁片抗抑郁的具体机制尚不明确,本研究通过建立 3 种不同的动物模型对参味宁郁片的抗抑郁作用进行初步探索。在 5-HT 诱发小鼠甩头模型中,与模型组相比,参味宁郁片 3 个剂量组的甩头次数均有所增多,其中小剂量组甩头次数最多,其次,在增强 NE 对小鼠的毒性实验中,与模型组比较各给药组小鼠的死亡率均明显增加,其中低剂量组具有显著性差异,此外,在增强色胺引大鼠

表 1 参味宁郁片对 5-HTP 诱发小鼠甩头次数的影响 ($n=10$)**Table 1** Effect of Shenwei Ningyu tablets on 5-HTP-induced head-shaking in mice

分组 Groups	给药剂量(g/kg) Dose administered	甩头次数 Head flick times
正常组 Normal group	-	0
模型组 Model group	-	68.3±24.6
百优解组 Fluoxetine hydrochloride group	0.0052	89.8±41.7*
高剂量组 High dose of group	12	97.9±39.8*
中剂量组 Medium dose group	6	83.0±36.3*
低剂量组 Low dose group	3	98.7±41.7*

注:与模型组相比,* $P<0.05$ 。Note. Compared with model group, * $P<0.05$.**表 2** 参味宁郁片增强 NE 对小鼠的毒性实验 ($n=10$)**Table 2** Effect of Shenwei Ningyu tablets on enhancing the toxicity of NE in mice

组别 Groups	给药剂量(g/kg) Dose administered	死亡数(只) Deaths number	死亡率(%) Mortality
正常组 Normal group	-	0	0
模型组 Model group	-	1	10%
百优解组 Fluoxetine hydrochloride group	0.0052	4	40%
高剂量组 High dose of group	12	3	30%
中剂量组 Medium dose group	6	4	40%
低剂量组 Low dose group	3	6	60%*

注:与模型组相比,* $P<0.05$ 。Note. Compared with model group, * $P<0.05$.**表 3** 参味宁郁片对增强色胺引大鼠惊厥试验的影响 ($n=10$)**Table 3** Effects of Shenwei Ningyu tablets on enhancing tryptamine-induced convulsion test in rats

组别 Groups	给药剂量 (g/kg) Dose administered	“蹬踩”运动 持续时间(s) “Pedal” movement duration
正常组 Normal group	-	0
模型组 Model group	-	59.8±9.9
百优解组 Fluoxetine hydrochloride group	0.0026	61.1±14.5
高剂量组 High dose of group	6	69.2±14.8
中剂量组 Medium dose group	3	69.4±13.8
低剂量组 Low dose group	1.5	68.4±10.0

惊厥模型的实验中,各给药组动物造模后的“蹬踩”运动次数较模型组均有一定程度的增加,但与模型组比较并无显著性差异。

在小鼠甩头模型及小鼠毒性实验的研究中发现参味宁郁片低剂量组具有更明显的抗抑郁作用,这可能由以下两方面原因导致,其一是有些中药材随着用量的加大会影响甚至改变其临床疗效^[19],因此可能是导致本实验中量效关系不明显的因素之一。其次是高浓度的药液可能会影响机体对药物有效成分的吸收从而影响药效,与高剂量组相比,如果低剂量组在确保疗效的基础上更容易增加机体对其有效成分的利用度,那么低剂量组可能具有更显著的疗效。

以上实验结果显示参味宁郁片可能是通过作用于 NE 能系统、阻断中枢 5-HT 等单胺类递质的重摄取使 5-HT 增多等两个方面发挥抗抑郁作用,对于该药是否具有 MAO 抑制作用的抗抑郁药效还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Solem S, Hagen R, Wang CE, et al. Metacognitions and mindful attention awareness in depression: a comparison of currently depressed, previously depressed and never depressed individuals [J]. Clin Psychol Psychother, 2017, 24(1): 94-102.
- [2] Kessler RC, Berglund P, Demler O, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R) [J]. JAMA, 2003, 289(23): 3095-3105.
- [3] 杨钦焱,周敏,罗春琼,等. 抑郁症的诊断研究进展 [J]. 国际精神病学杂志, 2014, 41(2): 100-102.
- [4] 马丽娜,李耘. 抗抑郁药物研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(24): 3777-3779.
- [5] 李慧婷,李远辉,任桂林,等. 中药挥发油防治情志疾病的研究现状及前景展望 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4031-4040.
- [6] 图娅,崔晓兰,曾美桦. 一种用于治疗抑郁症的中药组合物在调节免疫炎症反应中的应用: CN109602884A [P]. 2019-04-12.
- [7] 马宗国,江南,余梦瑶,等. 抑郁症发病机制及中药治疗研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(6): 548-553.
- [8] Hao YZ, Ge HX, Sun MY, et al. Selecting an appropriate animal model of depression [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4827.
- [9] Come SJ, Pickering RW, Warner BT. A method for assessing the effects of drugs on the central actions of 5-hydroxytryptamine [J]. Br J Pharmacol Chemother, 1963, 20(1): 106-120.
- [10] 王萍萍. 和厚朴酚抗抑郁作用及机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [11] Thomas SJ, Shin M, McInnis MG, et al. Combination therapy

- with monoamine oxidase inhibitors and other antidepressants or stimulants; strategies for the management of treatment-resistant depression [J]. *Pharmacotherapy*, 2015, 35(4): 433-449.
- [12] 陈文星, 刘乐平, 李璘, 等. 姜黄素抗抑郁作用及其机理研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2006, 17(5): 317-320.
- [13] 高杉, 李蓐. 抑郁症动物模型及其评价标准研究进展 [J]. *天津中医药大学学报*, 2012, 31(1): 57-60.
- [14] 江南, 许晓燕, 余梦瑶, 等. 当药黄素抗抑郁作用研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(1): 129-134, 162.
- [15] 王海岭, 师天元. 葛根异黄酮抗抑郁作用的实验研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(21): 268-271.
- [16] 高霄飞, 王雪琦, 何成, 等. 抑郁症单胺类递质受体研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2002, 33(1): 17.
- [17] Young SN. How to increase serotonin in the human brain without drugs [J]. *J Psychiatr Neurosci*, 2007, 32(6): 394-399.
- [18] López-Muñoz F, Alamo C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(14): 1563-1586.
- [19] 李邦明, 李勇. 15 种中药剂量与疗效关系简述 [J]. *时珍国医国药*, 2000, 11(1): 87-88.

[收稿日期] 2021-10-08

叶酸诱导的肾疾病动物模型

肾损伤临床上通常可分为急性肾损伤(AKI)和慢性肾疾病(CKD)的影响,两者紧密相关,由多种危险因素引起,如缺血、败血症、药物毒性和药物过量、暴露于重金属和糖尿病等。尽管我们对 AKI 和 CKD 的发病机制以及 AKI 向 CKD 的进展过程有了一定的研究成果,但目前仍然没有有效对抗肾疾病的治疗方法,因此,进一步研究 AKI、CKD 以及 AKI 如何进展为 CKD 的病理机制尤为重要。肾疾病的动物模型对于病理机制的研究是不可或缺的,本文对一种应用广泛的、叶酸诱导的肾疾病动物模型进行综述。

北德克萨斯大学健康科学中心药学院的晏良军教授通过本综述,对不同方法诱导的肾疾病动物模型进行了比较,并详细介绍了叶酸诱导的肾疾病动物模型的制作过程及发病特点,回顾了叶酸诱导肾损伤的主要机制。本文的最后,讨论了叶酸诱导的肾疾病动物模型在评价多种治疗方法中的应用。

文中指出,低剂量的叶酸对肾是具有营养作用的,但高剂量的叶酸对肾毒性很大。叶酸(维生素 B9)参与单碳代谢,可被肾小球自由过滤,重吸收率接近 100%,因此在正常叶酸浓度叶酸的肾排泄量很少。由于肾中叶酸受体含量高,所以叶酸在肾中比其他组织中积累更多。低剂量的叶酸(小于 10 mg/d)是有益的,可对抗氧化应激;而高剂量的叶酸具有高毒性,广泛用于诱导动物肾疾病,如大鼠、小鼠肾疾病模型的建立。

同时,文章总结了叶酸损伤肾的主要机制,包括氧化应激、铁死亡、线粒体功能障碍、成纤维细胞生长因子 23(FGF23)水平升高,并列举出通过叶酸诱导下的肾损伤模型对不同药物进行药物评价。

综上,叶酸诱导的肾疾病动物模型易于构建和重复,因此应用广泛,在肾疾病研究领域发挥了重要作用。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2021, 4(4): 329-342; <https://doi.org/10.1002/ame2.12194>)。

梁志健, 严家荣, 陈桂煌, 等. 蒺藜淫羊藿复合物对大鼠性功能及精子活力的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 62-67.

Liang ZJ, Yan JR, Chen GH, et al. Effect of *Tribulus terrestris* and the Epimedium complex on sexual function and sperm viability in male rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 62-67.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.008

蒺藜淫羊藿复合物对大鼠性功能及精子活力的影响

梁志健^{1,2}, 严家荣^{1,2}, 陈桂煌^{1,2}, 张建军^{1,2}, 陈润红^{1,2}, 邝少松^{1,2*}

(1.广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248; 2.广东省人民医院 广东省医学科学院, 广州 510080)

【摘要】 目的 研究蒺藜淫羊藿复合物对大鼠性功能及精子活力的影响。方法 50只雄性SD大鼠随机分为5组,除正常对照组外,其余大鼠摘除右侧睾丸,各组分别灌胃给予受试物或纯净水,连续40d。灌胃第30天,与发情处理的雌鼠进行交配实验。灌胃第35天,进行阴茎勃起潜伏期检测。灌胃第40天,动物安乐死后取称重睾丸、包皮腺、精囊腺和前列腺并计算脏器系数,检测血清中睾酮含量,计数精子数量、精子活动率,并观察精子活力。结果 低剂量和高剂量的蒺藜淫羊藿复合物能升高半去势雄性大鼠交配过程的捕捉率、射精率和射精次数($P < 0.05$)。与半去势的模型对照组比较,蒺藜淫羊藿复合物低剂量组动物血清的睾酮含量升高($P < 0.05$)、精囊腺和前列腺系数增加($P < 0.05$);高剂量组动物的精子活动率升高($P < 0.01$),呈快速直线向前运动的精子增多($P < 0.05$),死精子数量减少($P < 0.01$)。结论 蒺藜淫羊藿复合物可促进睾酮分泌、具有一定的雄激素样作用,可改善睾酮分泌减少所致的性功能障碍,增加精子活率及活力。

【关键词】 蒺藜;淫羊藿;半去势大鼠;性功能;精子活力

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0062-06

Effect of *Tribulus terrestris* and the Epimedium complex on sexual function and sperm viability in male rats

LIANG Zhijian^{1,2}, YAN Jiarong^{1,2}, CHEN Guihuang^{1,2}, ZHANG Jianjun^{1,2}, CHEN Runhong^{1,2}, KUANG Shaosong^{1,2*}

(1. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China. 2. Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080)

【Abstract】 Objective To study the effect of *Tribulus terrestris* and the Epimedium complex on sexual function and sperm viability. **Methods** 50 male rats were randomly divided into five groups. The right testis of all rats except for the normal control group were removed, and a test substance or water was administered intragastrically for 40 d. On the 30th day, the mating test was performed. On the 35th day, the erectile time of the male rats was measured. On the 40th day, the male rats were sacrificed, the testicles, preputial glands, seminal vesicles and prostate glands were weighed, serum testosterone level was measured, sperm count, motility rate and viability were evaluated. **Results** Low and high doses of *Tribulus terrestris* and the Epimedium complex improved the capture rate ejaculation rate and ejaculation counts of hemicastrated male rats ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the low dose group had significantly higher serum testosterone level and seminal vesicle and prostate gland coefficients ($P < 0.05$), and the high dose group had a higher sperm motility rate and forward motile sperm count ($P < 0.05$) and lower dead sperm count ($P < 0.01$). **Conclusions**

【基金项目】 广东省中医药局科研项目(20211057,202111058)。

【作者简介】 梁志健(1989—),男,主管中药师,硕士,研究方向:药理与毒理学。E-mail:kenjiliang@foxmail.com

【通信作者】 邝少松(1973—),女,高级兽医师,博士,研究方向:药效评价。E-mail:kuangss@126.com

Tribulus terrestris and the Epimedium complex promote the secretion of testosterone and improve the sexual function of rats.

【Keywords】 *Tribulus terrestris*; Epimedium; hemi-castrated rat; sexual function; sperm viability

据统计 40~70 岁男性中有约 52% 患有不同程度的性功能障碍,主要表现为性欲减退、阴茎勃起障碍、射精障碍及精子活力下降等^[1-2]。其原因可能与雄激素水平降低、机体疲劳、处于亚健康、疾病等有关。寻找能改善性功能障碍的安全有效的药物及保健食品具有深远的意义。中医认为“肾藏精、主生殖”,“肾者作强之官,伎巧出焉”,因此,中医补肾法是治疗性功能障碍和精子异常的基本治法^[3-5]。蒺藜淫羊藿复合物便是根据这一治法,由淫羊藿、蒺藜、西洋参提取物组方而成。本课题在半去势雄性大鼠模型基础上,通过观察蒺藜淫羊藿复合物对模型大鼠的交配行为、睾酮含量、精子活力等指标的影响,综合评价其是否具有增强性功能,改善性功能障碍的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,100 只,雌雄各半,8 周龄,271~298 g;购自广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2018-0002],合格证号为:44007200039469、44007200039470。实验于广东省医学实验动物中心进行[SYXK(粤)2018-0002],实验证明号为:00169157、00169158。饲养条件:5 只/笼,自由进食饮水,采用 12 h:12 h 昼夜间断照明,饲养室条件始终保持稳定。本研究经广东省医学实验动物中心实验动物伦理委员会审核(B201704-8),符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

十一酸睾酮软胶囊(药品级,浙江医药股份有限公司新昌制药厂);戊巴比妥钠(分析纯,德国默克公司);苯甲酸雌二醇注射液(药品级,宁波第二激素厂);黄体酮注射液(药品级,赤峰博恩药业有限公司);睾酮检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

BL-420 S 型生物机能仪(成都泰盟软件有限公司);CX21 型生物显微镜(日本奥林巴斯)。

1.3 实验方法

1.3.1 剂量设计与样品配制

蒺藜淫羊藿复合物由汤臣倍健股份有限公司提供,由蒺藜、淫羊藿、西洋参和辅料组成,其中每 100 g 含总皂苷不低于 2.0 g、淫羊藿苷不低于 0.5

g。根据《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版),蒺藜淫羊藿复合物以成人推荐用量的 10 倍、30 倍设为大鼠的低、高剂量,即分别为 0.51、1.52 g/kg。配制方法:称取 8.36 g 蒺藜淫羊藿复合物粉末,用纯净水溶解至 55 mL,得质量浓度 0.152 g/mL 的蒺藜淫羊藿复合物高剂量溶液。取 14 mL 的高剂量溶液,用纯净水稀释至 42 mL,得 0.051 g/mL 的低剂量溶液。

阳性对照品选用十一酸睾酮,以成人推荐用量的 10 倍设为大鼠的剂量,即 0.02 g/kg。

1.3.2 动物分组及处理

雄鼠的处理:50 只大鼠随机分为正常对照组 10 只和造模组 40 只。造模组动物按 45 mg/kg 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,摘除右侧睾丸、左侧不做处理。正常对照组大鼠做假手术处理。术后各组动物肌肉注射青霉素钠,每只 80000 U,每天 1 次,连续 3 d。术后 3 d,造模组动物按体重随机分为模型对照组、阳性对照组、蒺藜淫羊藿复合物低、高剂量组,每组 10 只。阳性对照组动物灌胃给予十一酸睾酮,蒺藜淫羊藿复合物低、高剂量组灌胃给予相应浓度的蒺藜淫羊藿复合物溶液,其余组别给予纯净水,灌胃体积均为 10 mL/kg,1 次 1 d,共 40 d。

雌鼠的处理:50 只大鼠按 45 mg/kg 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,摘除双侧卵巢。术后按上述方法肌注青霉素钠进行抗感染处理。

1.3.3 交配实验

为使去势的雌鼠同时发情,进行交配实验前 2 d,皮下注射给予苯甲酸雌二醇,剂量为 0.2 mg/kg;交配实验前 4 h,皮下注射给予黄体酮,剂量为 2 mg/kg。雄鼠在灌胃第 30 天晚上按 1 只/笼放入饲养笼中,适应环境 5 min 后,然后每笼投入 1 只发情雌鼠。记录投入雌鼠起 40 min 内,雄鼠首次捕捉雌鼠的时间、首次射精的时间、捕捉及射精的次数,并计算每组雄鼠的捕捉率和射精率^[6]。

1.3.4 阴茎勃起实验

雄鼠在结束第 35 天灌胃的 1 h 后,检测动物的阴茎勃起潜伏期。将生物机能仪的电极固定于阴茎根部,以 35 V、35 Hz 的电流进行刺激,记录刺激开始到阴茎充血勃起的时间,记为阴茎勃起潜伏期^[6]。

1.3.5 睾酮、脏器系数检测

雄性大鼠第 40 天末次灌胃 1 h 后,动物腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉采血,离心,取上清,根据试剂盒说明书检测其中睾酮的含量。大鼠采血、安乐死后,取睾丸、包皮腺、提肛肌、肾上腺、精囊腺+前列腺,称重后按公式计算脏器系数。

$$\text{脏器系数}(\text{mg/g}) = \frac{\text{脏器重}(\text{mg})}{\text{体重}(\text{g})}$$

1.3.6 精子数量、活动率与活力检测

取左侧附睾,用剪刀中间剪开,放入 1 mL 生理盐水中,振摇并放置 10 min,使精子充分溢出,取 1 滴该液体置于血细胞计数板中,在显微镜下计数,得到每毫升稀释液中含有的精子数量。再取 1 滴该液体置于血细胞计数板中,显微镜下观察 200 个精子,记录活动精子数目,按下列公式计算精子活动率^[7]。

$$\text{精子活动率} = \frac{\text{活动精子数}}{\text{活动精子数} + \text{不活动精子数}} \times 100\%$$

在观察活动率的同时,观察精子活力,精子活动分为 a、b、c、d 四个级别,a 级:精子呈快速直线前向运动;b 级:慢速或呆滞的前向运动;c 级:非前向运动;d 级:死精子。

1.4 统计学方法

实验所得数据均以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 21.0 软件作统计分析处理。数据满足正态和方差齐则采用方差分析,组间比较采用 LSD 法。若数据方差不齐或非正态,则非参数检验进行分析,组间比较采用 Kruskal-Wallis 法。

检验水平 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 蒺藜淫羊藿复合物对半去势大鼠交配实验的影响

如表 1 所示,模型对照组雄性大鼠的捕捉率较正常对照组降低($P < 0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组捕捉率升高($P < 0.01$),精力能低、高剂量组的捕捉率、射精率和射精次数升高,具有显著差异($P < 0.05$)。

2.2 蒺藜淫羊藿复合物对去势雄性大鼠性功能、激素及生殖系统的影响

如表 2 及表 3 所示,蒺藜淫羊藿复合物低剂量组能显著提高去势雄性大鼠血清中睾酮的含量($P < 0.05$),同时显著增加精囊腺和前列腺系数($P < 0.05$)。而高剂量组可见缩短阴茎勃起潜伏期的趋势,但无显著性($P > 0.05$)。

2.3 蒺藜淫羊藿复合物对去势雄性大鼠精子数量、精子活动率及精子活力的影响

如表 4 所示,与正常对照组比较,模型对照组的精子数量减少($P < 0.01$)、精子活动率降低($P < 0.01$)、呈快速直线前向运动的精子减少($P < 0.01$)、非前向运动的精子和死精子增多($P < 0.01$)。与模型对照组比较,蒺藜淫羊藿复合物高剂量组的精子活动率升高($P < 0.01$),呈快速直线前向运动的精子增多($P < 0.05$),死精子数量减少($P < 0.01$)。

表 1 蒺藜淫羊藿复合物对半去势大鼠交配实验的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of *Tribulus terrestris* and *Epimedium* complex on mating test of hemi-castrated rats

组别 Groups	捕捉率(%) Capture rate	射精率(%) Ejaculation rate	捕捉次数(次) Capture times	射精次数(次) Ejaculation times
正常对照组 Normal control group	80	60	9.2±6.3	11.3±10.0
模型对照组 Model control group	60**	50	11.8±14.1	10.2±5.4
阳性对照组 Positive control group	100##	60	21.3±13.1	25.0±11.5#
蒺藜淫羊藿复合物低剂量组 Low dose group	100##	80##	30.4±19.9	26.8±15.8#
蒺藜淫羊藿复合物高剂量组 High dose group	100##	70##	30.9±26.4	28.0±18.8#

注:与正常对照组相比,** $P < 0.01$;与模型对照组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal control group,** $P < 0.01$. Compared with the model control group,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$.

表 2 蒺藜淫羊藿复合物对去势大鼠勃起潜伏期、血清睾酮的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 2 Effects of *Tribulus terrestris* and Epimedium complex on erectile times and serum-testosterone level of hemi-castrated rats

组别 Groups	勃起潜伏期(s) Erectile times	睾酮(nmol/L) Testosterone
正常对照组 Normal control group	5.01±4.01	24.1±3.7
模型对照组 Model control group	9.27±3.01	17.6±3.8**
阳性对照组 Positive control group	8.72±3.65	24.6±5.0##
蒺藜淫羊藿复合物低剂量组 Low dose group	9.48±4.48	21.2±3.3#
蒺藜淫羊藿复合物高剂量组 High dose group	7.05±3.09	20.7±3.3

注:与正常对照组相比,** $P<0.01$;与模型对照组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal control group, ** $P<0.01$. Compared with the model control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

表 3 蒺藜淫羊藿复合物对去势大鼠性器官脏器系数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 3 Effects of *Tribulus terrestris* and Epimedium complex on genital organs coefficient of hemi-castrated rats

组别 Groups	脏器系数(mg/g) Organ coefficient		
	睾丸 Testicles	包皮腺 Preputial glands	精囊腺和前列腺 Seminal vesicles and prostate glands
正常对照组 Normal control group	3.68±0.16	0.33±0.10	5.97±0.45
模型对照组 Model control group	3.59±0.30	0.31±0.08	5.29±0.74*
阳性对照组 Positive control group	3.76±0.64	0.32±0.11	5.98±0.89#
蒺藜淫羊藿复合物低剂量组 Low dose group	3.86±0.19	0.35±0.12	6.03±0.64#
蒺藜淫羊藿复合物高剂量组 High dose group	3.69±0.57	0.35±0.13	5.84±0.85

注:与正常对照组相比,* $P<0.05$;与模型对照组相比,# $P<0.05$ 。

Note. Compared with the normal control group, * $P<0.05$. Compared with the model control group, # $P<0.05$.

表 4 蒺藜淫羊藿复合物对去势大鼠精子数量、精子活动率和活力的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 4 Effects of *Tribulus terrestris* and Epimedium complex on sperm counts, activity ratio and vitality on hemi-castrated rats

组别 Groups	精子数量($\times 10^8$ /mL) Sperm count	精子活动率(%) Motility rate	精子活动强度(%) Motility rate			
			a 级 Level a	b 级 Level b	c 级 Level c	d 级 Level d
			正常对照组 Normal control group	1.05±0.04	73.5±2.4	125±10
模型对照组 Model control group	0.78±0.12**	66.4±3.0**	105±7**	15±4	13±3**	67±6**
阳性对照组 Positive control group	0.94±0.05#	70.9±3.6	116±8	13±2	13±3	58±7
蒺藜淫羊藿复合物低剂量组 Low dose group	0.92±0.02	68.7±2.7	114±5	11±1	13±2	63±5
蒺藜淫羊藿复合物高剂量组 High dose group	0.91±0.02	70.1±2.1##	116±5#	12±3	12±2	60±4##

注:与正常对照组相比,** $P<0.01$;与模型对照组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal control group, ** $P<0.01$. Compared with the model control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

3 讨论

随着环境的污染、饮食习惯的改变及生活压力的增加,男性的生殖功能障碍呈明显的上升趋势,主要表现性欲低下、勃起功能障碍、射精障碍、精子数量及活力降低等^[8-10]。其中多见于中老年人群,这可能与该类人群受到各种压力的影响,机体处于疲劳的状态有关。此外,睾酮作为雄激素的主要成份,与男性性功能、生育功能有着密切关系,可促进性器官的发育、第二性征的维持、精子发生及成熟,而伴随着年龄增长的睾酮分泌水平下降。机体的疲劳状态和睾酮分泌减少,共同影响着中老年男性的性功能健康。

中医作为我国传统文化的瑰宝,具有十分重大的研究意义,根据中医理论指导开发方药及保健食品一直是研究热点,本课题便是从传统中医理论出发,寻找可以改善上述人群性功能的保健食品。中医认为肾藏精,主生殖,为先天之本。肾精不足,命门火衰则会出现性欲减退、阴茎勃起困难等表现,这与男性长期受到各种压力而导致的疲劳状态和伴随年龄增长的雄激素分泌减少所导致的性功能障碍极为相似,所以补肾益精及补气类中药常用于开发为改善性功能障碍的产品^[11-13]。

淫羊藿是小檗科淫羊藿属多年生草本植物,有坚筋骨、益精气、补腰膝、强心力等作用。现代药理研究表明,淫羊藿的主要成分是黄酮类和多糖,淫羊藿总黄酮及其标志成分淫羊藿苷可减缓睾丸组织的退化性变化,具有雄激素样作用,对下丘脑-垂体-性腺轴系统起正向调节作用,促进睾酮分泌^[14-15];此外,淫羊藿可以减轻大鼠受高强度运动量的影响,维持在正常生理水平,同时促进蛋白质合成,抑制氨基酸和蛋白质分解,提高运动训练大鼠血红蛋白含量和糖原的储备,从而增强大鼠抗疲劳能力^[16-17]。西洋参具有补气益血、清肺肾、凉心脾、清虚火、生津止渴、补阴退热、调补五脏、安神除烦、固精等功效。现代研究证明,西洋参主要有效成分为人参皂苷类成分,西洋参在抗疲劳、增强免疫力等方面均有良好的功效^[18-19]。蒺藜为蒺藜科植物蒺藜的果实,具有平肝解郁、活血祛风、明目止痒的功效。蒺藜主要含有皂苷类、黄酮类、生物碱类、多糖类等化合物,其中的蒺藜总皂甙能促进精液产生,增加性欲,促进雌性大鼠发情,提高生殖能力;临床研究发现可增加男人的精子数及活力,治

疗男性性功能低下,其作用可能与其提高体内性激素的含量有关^[20-23]。这一功效可能与其中的原薯蓣皂甙在体内通过代谢转化成脱氢表雄酮有关。同时蒺藜可以促进蛋白质合成,抑制氨基酸和蛋白质分解,提高血红蛋白含量和糖原的储备,增强抗疲劳能力。蒺藜淫羊藿复合物便是由淫羊藿提取物、西洋参提取物和蒺藜提取物组方而成,在增强机体抗疲劳能力的基础上加以补肾益精的作用。

选择合适的指标和合适的动物模型,是客观评价样品功效的关键。大鼠交配过程中的捕捉次数、射精次数、捕捉率和射精率可直接反映其性功能的强弱,作为评价性功能常用的指标。而附性器官,如包皮腺、精囊腺和前列腺等,在受到雄激素的影响时,会被促进发育而重量增加,所以附性器官的重量变化可反应样品的雄激素样作用。单侧去势雄鼠能模拟人体睾酮分泌减少的状态,雄性大鼠经单侧去势后,交配过程中捕捉率降低,阴茎勃起潜伏期延长,精囊腺和前列腺系数降低,精子数量、精子活动率降低,死精子增加。故本课题采用了这一动物模型对蒺藜淫羊藿复合物的改善性功能功效进行评价。

本课题研究发现,由淫羊藿、西洋参和蒺藜提取物组方而成的蒺藜淫羊藿复合物可提高半去势雄性大鼠交配过程中的捕捉率、射精率和射精次数,促进精囊腺和前列腺的生长发育,同时改善睾酮缺乏所致的精子数量减少、精子活力低下,这些功能可能与蒺藜淫羊藿复合物增加睾酮分泌和雄激素样作用有关。因此,蒺藜淫羊藿复合物可适用于体力疲劳和年龄增长所致的雄激素分泌低下的人群,改善其性功能表现。

参考文献:

- [1] 符庭波,田官强,程量,等.浅析与男性功能障碍相关的疾病及诊疗[J].保健医学研究与实践,2018,15(3):93-96.
- [2] 戴继灿.重视男性性欲低下相关问题的研究[J].中国男科学杂志,2021,35(1):4.
- [3] 黄震.补肾壮阳方对中老年男性功能障碍及血清性激素的调节[J].中药药理与临床,2016,32(1):206-208.
- [4] 杨荣松,高树冉.温肾活血方加减辅助辨治男性功能障碍的临床研究[J].中医临床研究,2019,11(12):95-96.
- [5] 郑敏华,谢福贤,高宇琳.补肾活血方对少弱畸精症患者精子DNA完整性及体外受精效果的影响[J].中国医药科学,2021,11(5):223-225.
- [6] 袁小茜,黄远英,杨明喆,等.牡蛎提取物对雄性大鼠性功能的影响[J].食品安全质量检测学报,2021,12(19):7798

- 7803.
- [7] 刘浩, 崔美芝, 董娟. 富硒蒜对 Wistar 雄性大鼠精子的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(12): 731-733.
- [8] 杨冬泉, 孙文学, 马然. 北京市城区与郊区中老年男性性功能的现状调查 [J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(4): 328-331.
- [9] 宋健, 邵强, 孙少鹏, 等. 北京地区多中心老年男性性功能障碍危险因素分析 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2012, 33(4): 300-304.
- [10] 蒋庆峰. 男性性功能障碍危险因素分析 [J]. 临床医药文献杂志, 2016, 3(56): 11111.
- [11] 苗明三, 闫欣. 补肾胶囊对去势大鼠模型的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(7): 918-920.
- [12] 何明大, 刘运林. 补肾壮阳方对中老年男性功能障碍及血清性激素的调节作用 [J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(5): 43-45.
- [13] 张秉汉, 汪祖光. 补肾壮阳汤治疗男性功能障碍的临床观察 [J]. 湖北中医杂志, 2003, 25(4): 28-29.
- [14] 高学勇, 林珊, 韩咪莎. 淫羊藿苷对环磷酸腺苷诱导生精障碍大鼠下丘脑-垂体-睾丸轴的影响 [J]. 解剖学杂志, 2018, 41(2): 147-151.
- [15] 尤旭, 赵海霞, 杨思琪, 等. 淫羊藿苷激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤研究 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2915-2921.
- [16] 李艳娥, 杨跃军, 张浩然, 等. 淫羊藿不同溶剂提取物的高效液相色谱分析及抗疲劳功效影响的研究 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 829-832.
- [17] 梁志健, 陈桂煌, 龙淑娴, 等. 马鹿茸组合物缓解大小鼠体力疲劳的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 39-43.
- [18] 王鹤, 刘磊, 任立焕, 等. 西洋参淫羊藿片缓解体力疲劳作用研究 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(6): 29-32.
- [19] 席晓志, 郭弘, 郭莎莎, 等. 洋参蒺藜多糖片的制备及其抗疲劳功能研究 [J]. 中国食品添加剂, 2018, 67(2): 67-72.
- [20] Ariyan F, Farshad A, Rostamzadeh J. Protective effects of *Tribulus terrestris* and *Cinnamomum zeylanicum* extracts and trehalose added to diluents on goat epididymal sperm freezability [J]. *Cryobiology*, 2021, 98: 172-180.
- [21] Goudarzi F, Vatanchi AM, Najmabadi KM. Impact of *Tribulus terrestris* on male fertility: Systematic review and meta-analysis [J]. *J Psychosom Obstet Gynaecol*, 2019, 22(3): 76-86.
- [22] Mostafa AS, Ashraf AH. Assessment of protective and antioxidant properties of *Tribulus terrestris* fruits against testicular toxicity in rats [J]. *J Intercult Ethnopharmacol*, 2014, 3(3): 113-118.
- [23] 朱辛为, 田洪艳, 李质馨, 等. 蒺藜皂苷对衰老小鼠睾丸生精功能影响 [J]. 中国公共卫生, 2012, 28(5): 636-637.

[收稿日期] 2021-11-18

(上接第 12 页)

- [18] Devaux CA, Rolain JM, Colson P, et al. New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19? [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 55(5): 105938.
- [19] 宋成, 李金昱, 孙明宇, 等. 从免疫调节探析“扶正祛邪”对新型冠状病毒肺炎的防治 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(8): 90-93.
- [20] 王雅欣, 崔晓兰, 郭姗姗. 中药防治呼吸道病毒感染性疾病的研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2021, 18(6): 592-596.
- [21] 李俊莲, 李艳彦, 高鹏, 等. 人工模拟寒湿环境对上呼吸道感染小鼠一般情况的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(8): 2404-2407.
- [22] Totura AL, Baric RS. SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon [J]. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(3): 264-275.
- [23] Han H, Ma Q, Li C, et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 1123-1130.
- [24] Li G, Fan Y, Lai Y, et al. Coronavirus infections and immune responses [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(4): 424-432.
- [25] Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection [J]. *Immunity*, 1998, 8(2): 177-187.
- [26] Cui W, Fan Y, Wu W, et al. Expression of lymphocytes and lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome [J]. *Clin Infect Dis*, 2003, 37(6): 857-859.
- [27] Xu YH, Dong JH, An WM, et al. Clinical and computed tomographic imaging features of novel coronavirus pneumonia caused by SARS-CoV-2 [J]. *J Infect*, 2020, 80(4): 394-400.
- [28] 杨映映, 李青伟, 鲍婷婷, 等. 全小林院士辨治新型冠状病毒肺炎——“寒湿疫”辨治体系的形成、创新与发展 [EB/OL]. (2021-11-20) [2021-12-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5529.R.20211118.2303.027.html>.

[收稿日期] 2021-11-13

杨志强, 陈路, 张雅茜, 等. 紫草素通过调节 PI3K/AKT 途径抑制骨肉瘤生长和作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 68-74, 96.

Yang ZQ, Chen L, Zhang YX, et al. Study on the mechanism of shikonin inhibiting osteosarcoma growth by regulating PI3K/AKT pathway [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 68-74, 96.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.009

紫草素通过调节 PI3K/AKT 途径抑制骨肉瘤生长 和作用机制研究

杨志强, 陈路, 张雅茜, 夏先学*

(川北医学院附属医院骨科, 四川南充 637000)

【摘要】 目的 研究紫草素(shikonin, SK)的抗骨肉瘤作用及其机制。方法 不同浓度的 SK 处理人骨肉瘤 U2OS 和 MG63 细胞及人成骨细胞 HFOB1.19 24 h 或用 SK 1 $\mu\text{mol/L}$ 分别处理 24、48 和 72 h 后, CCK-8 检测细胞活性; SK 0、0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 处理 U2OS 细胞, 克隆形成实验检测细胞增殖; 流式检测细胞凋亡, Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达; U2OS 细胞分为对照组, SK1 $\mu\text{mol/L}$ 组, PI3K 激活剂胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 组和 SK1 $\mu\text{mol/L}$ + IGF-1 组, Western blot 检测磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 和蛋白激酶 B (AKT) 磷酸化、胱天蛋白酶 (caspase-3, cas3)、cleaved cas3、Ki67 及干细胞标记物 SOX-2、OCT-4 和 Nanog 的表达; 细胞成球实验检测细胞成球能力。右侧腹皮下注射 U2OS 细胞构建移植瘤裸鼠模型并进行体内验证。结果 不同浓度的 SK 对 HFOB1.19 细胞无明显毒性作用, 而对 U2OS 和 MG63 细胞有显著毒性作用 ($P < 0.05$), 且具有浓度和时间依赖性。紫草素 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 可显著抑制 U2OS 细胞增殖和干细胞样特征, 诱导细胞凋亡 ($P < 0.05$), 并抑制 PI3K 和 AKT 蛋白的磷酸化 ($P < 0.05$)。IGF-1 明显逆转紫草素对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用, 以及对 U2OS 细胞增殖、凋亡, 干细胞样特征的影响 ($P < 0.05$)。体内实验表明, 紫草素能显著抑制肿瘤的生长 ($P < 0.05$), 并下调瘤组织中 p-AKT 的表达 ($P < 0.05$)。结论 紫草素对骨肉瘤 U2OS 细胞生长和干细胞样特征的抑制作用可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活有关。

【关键词】 骨肉瘤; 紫草素; 增殖; 细胞凋亡; 干细胞样特征; 磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0068-07

Study on the mechanism of shikonin inhibiting osteosarcoma growth by regulating PI3K/AKT pathway

YANG Zhiqiang, CHEN Lu, ZHANG Yaxi, XIA Xianxue*

(Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the anti-osteosarcoma effect and mechanism of shikonin (SK). **Methods** After various concentrations of SK were applied to human U2OS and MG63 osteosarcoma cells and human osteoblastic cell line HFOB1.19 for 24 h or SK 1 $\mu\text{mol/L}$ for 24, 48 and 72 h, CCK-8 was used to assay cell viability. U2OS cells were treated with SK at 0, 0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ and then colony formation assays were employed to assess cell proliferation. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Western blot was performed to determine the expression of apoptosis-related

【基金项目】 南充市科技局(19SXHZ0120)。

【作者简介】 杨志强(1985—), 男, 研究方向: 创伤骨科。E-mail: lydz2006@163.com

【通信作者】 夏先学(1980—), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 创伤骨科。E-mail: xiaxianxuexxx@163.com

proteins. U2OS cells were divided into control, SK1 $\mu\text{mol/L}$, PI3K activator insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and SK1 $\mu\text{mol/L}$ +IGF-1 groups. Western blot was used to detect phosphorylation levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT), and expression of caspase-3 (cas3), cleaved cas3, Ki67 and stem cell markers SOX-2, OCT-4 and Nanog. Cell spheroid assay was used to detect the ability of cells to form spheres. U2OS cells were injected subcutaneously into the right abdomen to establish a nude mouse model of tumors and verified *in vivo*. **Results** The various concentrations of SK had no obvious toxic effects on HFOB1.19 cells, but had significant toxic effects on U2OS and MG63 cells ($P<0.05$) in concentration- and time-dependent manners. SK at 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ significantly inhibited U2OS cell proliferation and stem cell-like characteristics, induced apoptosis ($P<0.05$), and inhibited phosphorylation of PI3K and AKT proteins ($P<0.05$). IGF-1 obviously reversed the inhibitory effect of SK on the PI3K/AKT signaling pathway and its effect on U2OS cell proliferation, apoptosis, and stem cell-like characteristics ($P<0.05$). *In vivo* experiments showed that SK significantly inhibited tumor growth ($P<0.05$) and downregulated expression of p-AKT in tumor tissues ($P<0.05$). **Conclusions** The inhibitory effect of SK on the growth and stem cell-like characteristics of U2OS osteosarcoma cells may be related to inhibition of PI3K/AKT signaling pathway activation.

【Keywords】 osteosarcoma; shikonin; proliferation; apoptosis; stem cell-like characteristics; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT)

骨肉瘤主要发生在儿童和青少年中,是最常见的原发性骨恶性肿瘤类型^[1]。目前,骨肉瘤的治疗方法包括新辅助化疗、外科手术切除、介入疗法以及冷热消融。但是,由于肺转移和对化疗的耐药性,骨肉瘤的 5 年生存率很难达到 80%^[2]。此外,目前批准的药物表现出严重的副作用。因此,需要在 OS 治疗中开发具有更高效率和降低毒性的新型药物。紫草素 (shikonin, SK) 是从中草药紫草中提纯的天然萘醌成分(化学结构式如图 1 所示),具有广泛的生物学活性,包括抗炎、增强机体免疫力等。研究表明,紫草素对口腔癌、肝细胞癌等均具有抑癌作用^[3-5]。缪明星等^[6]发现 SK 通过内质网应激蛋白抑制人骨肉瘤 U2OS 细胞的增殖。Yang 等^[7]研究发现 SK 通过上调骨肉瘤中的 caspase-3 和 caspase-8 来促进阿霉素诱导的凋亡,Deng 等^[8]研究发现 SK 通过抑制 MMP13 抑制骨肉瘤的浸润。上述研究表明 SK 在骨肉瘤中主要是通过抗增殖、侵袭及促凋亡发挥抗癌作用,但 SK 对骨肉瘤干细胞样特征未曾报道。本研究不仅发现 SK 对骨肉瘤生长、侵袭的抑制作用,而且发现 SK 抑制骨肉瘤的干细胞样特征,并进一步证实 SK 通过抑制 PI3K/AKT 途径发挥抗骨肉瘤的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人骨肉瘤细胞株 MG-63、U2OS 和人成骨细胞 HFOB1.19 购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。所有细胞在含有 10% FBS, 100 U/mL 的青霉素和

100 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素的 DMEM 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的潮湿培养箱中培养。

1.1.2 实验动物

14 只 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠(4~5 周龄,15~18 g)由川北医学院提供[SCXK(川)2018-18]。将裸鼠饲养于川北医学院 SPF 动物房中并在该处完成动物实验[SYXK(川)2018-076],房间温度控制在 23 $^{\circ}\text{C}$ ~27 $^{\circ}\text{C}$,湿度维持在 50%~60%,光照时间 12 h,并喂以水和标准实验室食物。在实验之前,所有小鼠适应环境 1 周。实验经北川动物伦理委员会审核批准(IACUC-20200316-03),所有实验操作遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

紫草素(>97%, shikonin, SK)(货号:E-0403)购自上海同田生物技术有限公司;胎牛血清(FBS)、链霉素和青霉素购自美国 Gibco 公司;B27 购自美国 Invitrogen;人表皮生长因子(EGF)人成纤维生长因子(bFGF)购自美国 Pepro Tech 公司;CCK-8 试剂盒、RIPA 裂解液、ECL 发光液和 BCA 试剂盒购自上海碧云天公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;兔抗 B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)(ab182858)、B 细胞淋巴

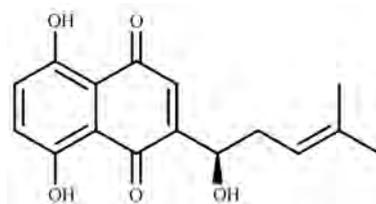


图 1 紫草素结构式

Figure 1 Structure formula of shikonin

瘤 2 相关的 X 蛋白(Bax) (ab32503)、兔抗磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (p-phosphoinositide 3-kinase, p-PI3K) (ab278545)、兔抗 SOX-2 抗体(ab92494)、兔抗 OCT-4 抗体(ab200834)、兔抗 Nanog 抗体(ab109250)、Ki67(ab92742)和 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG 抗体(ab6721)购自英国 Abcam 公司;兔抗 β -肌动蛋白(β -actin) (#4970);兔抗胱天蛋白酶-3(caspase-3, cas3) (#9662)、兔抗活化胱天蛋白酶-3(cleaved cas3) (#9664)、兔抗蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) (#9272)、兔抗 p-AKT (#4060) 和 PI3K (#4255);胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) (bs-4588P) 购自北京博奥森生物技术有限公司。iMark 酶标仪及蛋白电泳设备(美国 Bio-Rad);Accuri C6 流式细胞仪(美国 BD Biosciences);BX43 荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);TanoN5200 凝胶成像仪(上海天能公司)。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8 试验检测细胞活力

将人成骨细胞 HFOB1.19 及人骨肉瘤 U2OS 和 MG63 细胞接种到含有 100 μ L 完全培养基的 96 孔板(每孔 5×10^3 细胞)中,培养 24 h。然后,用 100 μ L 含有不同浓度 SK 的新鲜培养基处理 24 h 或用含有 SK 1 μ mol/L 的培养基分别处理 24、48 和 72 h 后,向每个孔中加入 10 μ L CCK-8,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

1.3.2 克隆形成实验检测细胞增殖

将骨肉瘤 U2OS 细胞(每孔 500 个细胞)接种到 6 孔板中,培养过夜。分别用 SK 0、0.01、0.1 和 1 μ mol/L 处理 48 h,再常规培养 6 d。用 4%多聚甲醛固定细胞集落,然后用 0.1%结晶紫染色,显微镜下观察。

1.3.3 流式细胞检测细胞凋亡

收集紫草素 SK 0、0.01、0.1 和 1 μ mol/L 处理 24 h 后的 U2OS 细胞,并用冷 PBS 洗涤 3 次,然后在暗室中孵育 Annexin V-FITC (5 μ L) 和 PI (5 μ L) 15 min。随后,使用流式细胞仪分析细胞。

1.3.4 Western blot 检测蛋白表达

使用冷 RIPA 缓冲液裂解细胞,并在 4 $^{\circ}$ C 离心,收集上清液。BCA 蛋白质测定试剂盒检测蛋白质浓度。通过 SDS-PAGE 分离等量(40 μ g)的总蛋白质,并转移到 PVDF 膜上,封闭膜并与相应的一抗(β -actin 1 : 1000、Bcl-2 1 : 2000、Bax 1 : 1000、cleaved caspase-3 1 : 1000、Ki67 1 : 1000、p-AKT 1 :

2000、AKT 1 : 1000、p-PI3K 1 : 1000、PI3K 1 : 1000、SOX-2 1 : 1000、OCT-4 1 : 10000 和 Nanog 1 : 1000)在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,然后与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG (1 : 2000)在室温下孵育 2 h,通过 ECL 发光液显影,使用 Image J 软件进行条带灰度值分析。

1.3.5 细胞成球实验

将 U2OS 细胞以 2000 细胞/孔的密度接种到 6 孔超低附着板中,在含有 1% B27 补充剂,10 ng/mL 人 EGF 和 10 ng/mL 人 bFGF 的无血清 DMEM 培养基中培养。1 周后,观察球体并通过显微镜拍摄照片。

1.3.6 验证 SK 对 U2OS 细胞的作用机制

将 U2OS 细胞分为对照组,SK 1 μ mol/L 组,IGF-1 组和 SK 1 μ mol/L+IGF-1 组,用 PI3K 途径特异性激活剂 IGF-1 (10 nmol/mL) 将 IGF-1 和 SK 1 μ mol/L+IGF-1 组中的细胞预处理 12 h。然后进行上述实验。

1.3.7 移植瘤实验

将约 3×10^6 U2OS 细胞悬浮在 100 μ L PBS 中,皮下接种到裸鼠的右侧腹中。注射后 3 d,将小鼠随机分为对照组,SK 2 mg/kg 组^[9],每组 7 只,SK 2 mg/kg 组每隔 1 d 腹腔内注射 100 μ L SK (2 mg/kg),对照组注射等量的生理盐水。每 3 d 测量 1 次肿瘤的长度和宽度,通过公式 $V = 1/2 \times (\text{宽度}^2 \times \text{长度})$ 计算肿瘤体积。实验结束时,切除肿瘤并称量。固定肿瘤并包埋在石蜡中,切成薄片。

1.3.8 免疫组化染色检测 p-AKT 和 Ki67 的表达

将组织切片在二甲苯中脱蜡,使用梯度乙醇水化,然后用 3% H_2O_2 处理 15 min。使用沸腾的柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)提取抗原,10 min 后将组织切片与 10%山羊血清孵育 15 min,并与 p-AKT(1 : 100)和 Ki67(1 : 500)的一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。将载玻片用 PBS 洗涤 3 次,使用二抗(1 : 500)在 37 $^{\circ}$ C 下孵育切片 30 min,并用苏木素复染细胞核。

1.3.9 TUNEL 染色检测肿瘤组织细胞凋亡

将肿瘤组织切片脱蜡和水合后,用 PBS 冲洗 2 次,然后在 37 $^{\circ}$ C 下与 20 μ g/mL 蛋白酶 K 一起孵育 25 min,PBS 洗涤 3 次。按照制造商的说明,将所有切片与 TUNEL 混合物一起孵育,显微镜下观察组织切片。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 5 进行数据统计分析。所

有数据均显示为至少 3 次独立实验的平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$),使用 Student's *t* 检验进行两组之间的比较。 $P<0.05$ 被认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 SK 抑制骨肉瘤细胞增殖

如图 2A、2B 所示,SK 对人成骨细胞 HFOB1.19 无明显细胞毒性,对骨肉瘤细胞 MG63 和 U2OS 均具有明显的细胞毒性作用($P<0.05$),且随着 SK 浓度和处理时间的增加而增强。选择对 SK 更为敏感的 U2OS 细胞系,SK 浓度为 0、0.01、0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 继续研究。与 SK 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,SK 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 明显抑制 U2OS 细胞的克隆形成(图 2C)。

2.2 SK 促进骨肉瘤细胞凋亡

如图 3 所示,与 SK 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,SK 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 U2OS 细胞凋亡明显增加($P<0.05$),Bax/Bcl-2 和 cleaved cas3/cas3 比值均显著上调($P<0.05$)。SK 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 组无显著性差异。

2.3 SK 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路抑制骨肉瘤细胞生长

如图 4 所示,与对照组比较,SK 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 U2OS 细胞中 PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化水平及 Ki67 表达水平显著降低($P<0.05$),cleaved cas3/cas3 比值显著上调($P<0.05$),IGF-1 组 PI3K 和 AKT 蛋白

磷酸化水平及 Ki67 和 cleaved cas3/cas3 比值无显著差异;与 SK 1 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,SK 1 $\mu\text{mol/L}$ +IGF-1 组 p-AKT、p-PI3K 和 Ki67 蛋白表达明显上调($P<0.05$),cleaved cas3/cas3 比值显著下调($P<0.05$)。

2.4 SK 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路抑制骨肉瘤细胞的干细胞样特征

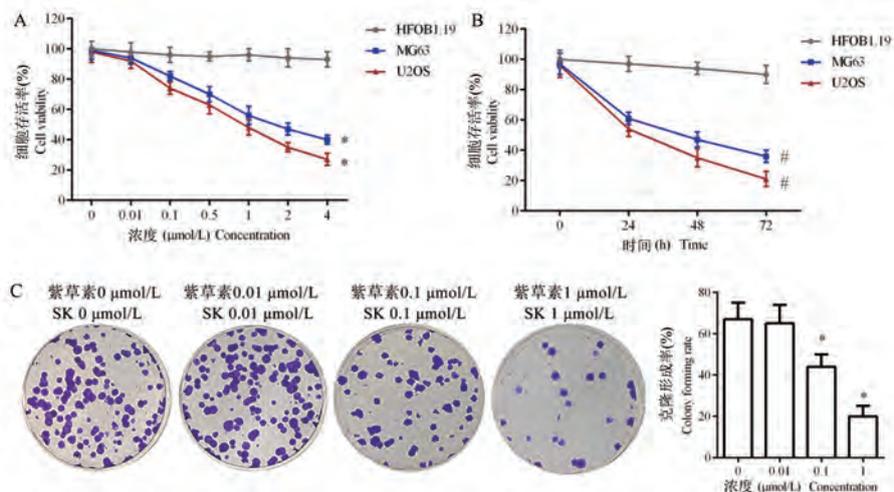
如图 5 所示,与对照组比较,SK 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 U2OS 细胞成球数量减少,成球直径减小($P<0.05$),SOX-2、OCT-4 和 Nanog 蛋白表达显著下调($P<0.05$);与 SK 1 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,SK 1 $\mu\text{mol/L}$ +IGF-1 组 U2OS 细胞成球数量增多,成球直径增大($P<0.05$),SOX-2、OCT-4 和 Nanog 蛋白表达显著上调($P<0.05$)。

2.5 SK 在体内抑制骨肉瘤肿瘤的生长

如图 6 所示,与对照组比较,SK 2 mg/kg 组肿瘤质量和体积明显减小($P<0.05$),瘤组织中 p-AKT 和 Ki67 的表达显著降低($P<0.05$),凋亡细胞显著增加($P<0.05$)。

3 讨论

辅助疗法的出现和外科技术的进步,已使骨肉瘤患者的总生存率达到 60%~75%^[2]。由于副作用和耐药性的发展,目前的化学药物受到限制。因此,鉴定副作用较小的有效药物对于骨肉瘤的治疗

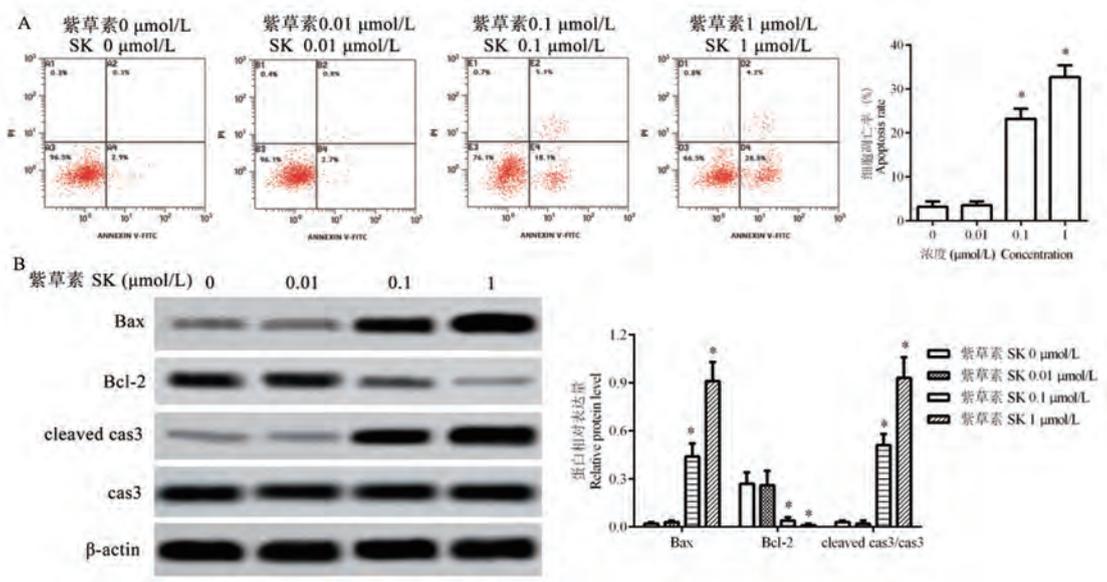


注:A:不同浓度SK对人成骨细胞和骨肉瘤细胞活性的影响;B:不同时间SK对人成骨细胞和骨肉瘤细胞活性的影响;C:各组U2OS细胞克隆形成率。与SK 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,* $P<0.05$;与0 h组相比,# $P<0.05$ 。

图2 SK对骨肉瘤细胞增殖的影响

Note. A, Effect of different concentrations of SK on the viability of human osteoblasts and osteosarcoma cells. B, Effect of SK on the viability of human osteoblasts and osteosarcoma cells at different times. C, Colony forming rate of U2OS cells in each group. Compared with SK 0 $\mu\text{mol/L}$ group, * $P<0.05$. Compared with 0 h group, # $P<0.05$.

Figure 2 Effect of SK on the proliferation of osteosarcoma cells

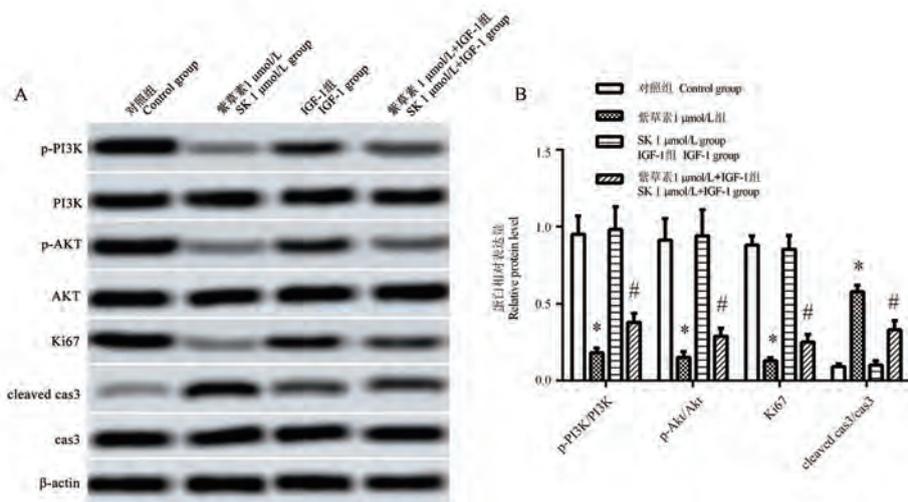


注:A:流式细胞检测各组细胞凋亡率;B:Western blot 检测各组凋亡蛋白的表达。与 SK 0 μmol/L 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 SK 对骨肉瘤细胞凋亡的影响

Note. A, Flow cytometry was commended to detect the apoptosis rate of each group. B, Western blot was used to test the expression of apoptosis protein in each group. Compared with SK 0 μmol/L group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Effect of SK on apoptosis of osteosarcoma cells



注:A:Western blot 检测各组蛋白表达;B:蛋白相对表达量。与对照组相比, * $P < 0.05$;与 SK 1 μmol/L 组相比, # $P < 0.05$ 。

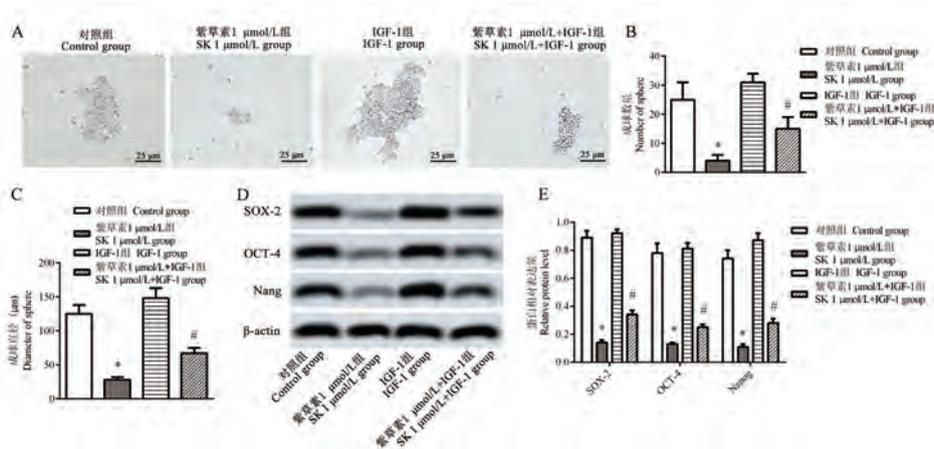
图 4 SK 通过调控 PI3K/AKT 信号通路对骨肉瘤细胞生长的影响

Note. A, Western blot was performed to assay the protein expression in each group. B, Relative protein expression. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the SK 1 μmol/L group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Effect of SK on the growth of osteosarcoma cells by regulating the PI3K/AKT signaling pathway

至关重要。SK 是中药的主要活性成分之一,研究表明紫草素已被用作化疗增敏剂,以增强传统肝癌化疗药物的抗癌作用,如三氧化二砷、多柔比星和顺铂^[10-11]。已有研究报道 SK 通过抑制骨肉瘤细胞的侵袭和诱导凋亡在骨肉瘤中发挥着抑癌作

用^[7-8]。本研究表明,SK 对人成骨细胞 HFOB1.19 为表现出明显的细胞毒性,对骨肉瘤 U2OS 和 MG63 细胞均表现出显著的细胞毒性,且具有时间和浓度依赖性。本研究结果表明 SK 抑制 U2OS 细胞增殖和骨肉瘤癌症干细胞样特征,诱导细胞凋亡,并进

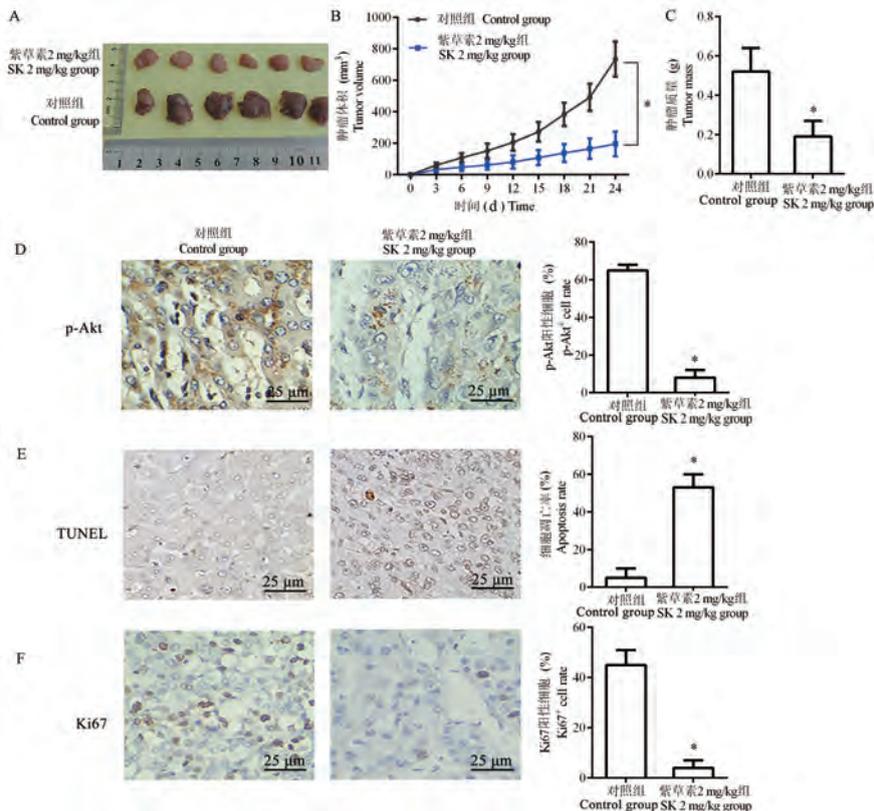


注:A:细胞成球;B:各组成球数量;C:各组成球直径;D:Western blot 检测各组 SOX-2、OCT-4 和 Nanog 蛋白的表达;E:蛋白相对表达量。与对照组相比, * $P < 0.05$;与紫草素 1 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 5 SK 通过调控 PI3K/AKT 信号通路对骨肉瘤细胞干细胞样特征的影响

Note. A, Cell spheroidization. B, Number of spheres of each group. C, Diameter of spheres of each group. D, Western blot was used to detect the expression of SOX-2, OCT-4 and Nanog protein in each group. E, Relative protein expression. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the SK 1 $\mu\text{mol/L}$ group, # $P < 0.05$.

Figure 5 Effect of SK on the stem cell-like characteristics of osteosarcoma cells by regulating the PI3K/AKT signaling pathway



注:A:裸鼠移植瘤;B:肿瘤体积;C:肿瘤质量;D:p-AKT 免疫组化染色;E:TUNEL 染色检测瘤组织细胞凋亡;F:Ki67 免疫组化染色。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 6 SK 在体内对骨肉瘤肿瘤生长的影响

Note. A, Nude mouse transplanted tumor. B, Tumor volume. C, Tumor mass. D, p-AKT immunohistochemical staining. E, TUNEL staining was employed to measure tumor tissue cell apoptosis. F, Ki67 immunohistochemical staining. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 6 Effect of SK on the growth of osteosarcoma tumor *in vivo*

一步探究了 SK 作用的相关分子机制。

Bax 是 Bcl-2 家族的促凋亡成员,它形成的离子通道直接导致线粒体释放细胞色素 c,然后激活 caspase-9 和 caspase-3,从而在末端诱导凋亡^[12]。PI3K/AKT 途径的激活可以促进各种人类癌症的发展,例如卵巢癌、肺癌、黑色素瘤和淋巴瘤^[13-14]。PI3K/AKT 途径通过调节许多下游转录因子在癌症的多个过程中(例如凋亡、增殖和转移)起着至关重要的作用^[15]。我们发现 SK 处理可诱导骨肉瘤 U2OS 细胞明显凋亡,并显著上调 cleaved cas3/cas3 和 Bax/Bcl-2 比值。此外,SK 明显抑制 PI3K/Ak 通路激活及 Ki67 的表达,促进 cleaved cas3 表达,而 PI3K 激活剂 IGF-1 可显著逆转 SK 对 PI3K/AKT 通路及 Ki67 表达的抑制以及 SK 对 cleaved cas3 的上调作用。我们的体内实验结果表明 SK 可明显抑制体内肿瘤的生长,降低瘤组织中 p-AKT 和 Ki67 的表达,诱导细胞凋亡。因此,SK 可能是通过抑制 PI3K/AKT 途径抑制 U2OS 细胞的生长,与之前的研究一致^[16]。

越来越多的证据表明,骨肉瘤具有癌症干细胞(CSC),这些亚群被认为与化学耐药性,肿瘤转移和复发有关,这应该是开发新药的有希望的目标^[17-18]。有证据表明 PI3K/AKT 信号传导途径可调节干细胞标志物的表达以维持 CSC 特性^[19]。多能干细胞因子,包括 SOX-2、OCT-4 和 Nanog,被确定为诱导多能干细胞形成的核心因子,并在维持正常和癌症干细胞的干性中起关键作用^[20]。这些多能干细胞因子在癌细胞中的过表达被证明参与了肿瘤的发生,转移和癌症复发^[21]。我们的结果表明,SK 明显抑制骨肉瘤干细胞样性状,细胞成球大小和直径显著减小,干细胞标记物 SOX-2、OCT-4 和 Nanog 的表达显著下调,IGF-1 明显逆转 SK 对干细胞样特征的抑制作用。因此,SK 可能是通过抑制 PI3K/AKT 途径抑制骨肉瘤干细胞样特征。

基于体内和体外实验,该研究证明了 SK 在骨肉瘤 U2OS 细胞中发挥着抗癌作用,其潜在机制可能是通过抑制 PI3K/AKT 途径抑制 U2OS 细胞的生长和干细胞样特征并诱导细胞凋亡,提示 SK 可能是抗人骨肉瘤的有前途的药物。

参考文献:

[1] Lei T, Qian H, Lei P, et al. Ferroptosis-related gene signature associates with immunity and predicts prognosis accurately in patients with osteosarcoma [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(11):

4785-4798.

- [2] Yao Z, Tan Z, Yang J, et al. Prognostic nomogram for predicting 5-year overall survival in Chinese patients with high-grade osteosarcoma [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):17728.
- [3] Guo N, Miao R, Gao X, et al. Shikonin inhibits proliferation and induces apoptosis in glioma cells via downregulation of CD147 [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5): 4335-4343.
- [4] 朱丹,汪立刚,徐蕾.紫草素对缺血性脑损伤大鼠脑组织保护作用的研究 [J]. *解放军医药杂志*, 2019, 31(7): 1-4.
- [5] Liu Y, Kang X, Niu G, et al. Shikonin induces apoptosis and prosurvival autophagy in human melanoma A375 cells via ROS-mediated ER stress and p38 pathways [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 626-635.
- [6] 缪明星,黄莉莉,王欣.紫草素通过内质网应激蛋白抑制人骨肉瘤 U-2 OS 细胞增殖的研究 [J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(10): 2899-2904.
- [7] Yang Q, Li S, Fu Z, et al. Shikonin promotes adriamycin-induced apoptosis by upregulating caspase-3 and caspase-8 in osteosarcoma [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1347-1352.
- [8] Deng B, Qiu B. Shikonin inhibits invasiveness of osteosarcoma through MMP13 suppression [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(12): 9311-9317.
- [9] Kim HJ, Hwang KE, Park DS, et al. Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 123.
- [10] Sha L, Lv Z, Liu Y, et al. Shikonin inhibits the Warburg effect, cell proliferation, invasion and migration by downregulating PFKFB2 expression in lung cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(2): 560.
- [11] Martin SP, Fako V, Dang H, et al. PKM2 inhibition may reverse therapeutic resistance to transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 99.
- [12] 陈炜,陈志刚,彭君臣,等.异鼠李素调控卵巢癌细胞生长、凋亡和氧化应激反应的机制 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2020, 17(5): 353-358.
- [13] 路晓琳. FSH-PI3K/AKT/NF- κ B 蛋白在上皮性卵巢癌组织中的表达及作用机制 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(9): 1477-1481.
- [14] 谢圆媛,胡海峰,赵莉,等.丙泊酚调控 PI3K/AKT 信号通路对肺癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响 [J]. *临床误诊误治*, 2021, 34(6): 107-112.
- [15] 赵存玲,郭风龙,谈燕燕,等.克唑替尼通过 PI3K/AKT/mTOR 途径抑制肺癌 HCC78 细胞系迁移的研究 [J]. *解放军医药杂志*, 2019, 31(10): 17-22.
- [16] Wu X, Yu H, Zhou H, et al. Proanthocyanidin B2 inhibits proliferation and induces apoptosis of osteosarcoma cells by suppressing the PI3K/AKT pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(20): 11960-11971.

曾信豪, 谢东可, 郑皓, 等. 苦杏仁苷对新生大鼠坏死性小肠结肠炎的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 75-81.
Zeng XH, Xie DK, Zheng H, et al. Protective effect of amygdalin against necrotizing enterocolitis in neonatal rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 75-81.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.010

苦杏仁苷对新生大鼠坏死性小肠结肠炎的保护作用

曾信豪^{1,2*}, 谢东可^{1,2}, 郑皓^{1,2}, 徐沛^{1,2}, 王小勇^{1,2}

(1.西南医科大学附属医院儿外科, 四川 泸州 646000; 2.四川省出生缺陷临床医学研究中心, 四川 泸州 646000)

【摘要】目的 分析苦杏仁苷对新生大鼠坏死性小肠结肠炎(NEC)的保护作用。**方法** 将60只出生7 d的健康新生SD大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、苦杏仁苷低剂量组、苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组和柳氮磺嘧啶组, 每组10只。除对照组外, 其他各组大鼠均采用缺氧冷应激联合配方奶侵袭性喂养法建立NEC模型。同时低、中、高剂量组分别给予20、40、80 mg/kg苦杏仁苷, 柳氮磺嘧啶组给予300 mg/kg柳氮磺嘧啶, 连续给药5 d。末次干预12 h后, 记录大鼠体重变化, 取小肠回盲部组织进行HE染色, 并进行回盲部肠组织损伤评分; 通过TUNEL染色检测细胞凋亡率; 通过酶联免疫法检测血清炎症因子: 肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。通过Western blot检测NOD样受体蛋白3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase-1)蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠体重显著下降, 肠组织损伤评分、肠组织细胞凋亡率、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、SOD、MDA、GSH-Px水平以及NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$); 与模型组相比, 苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组大鼠体重显著上升, 肠组织损伤评分、肠组织细胞凋亡率显著下降, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、SOD、MDA、GSH-Px水平、NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平显著下降($P < 0.05$)。**结论** 苦杏仁苷对新生大鼠坏死性小肠结肠炎有一定保护作用, 可以有效减少肠组织损伤、降低机体炎症反应、氧化应激反应, 减少肠组织细胞凋亡率, 但具体的反应机制尚不够明确, 有待临床进一步探究。

【关键词】 苦杏仁苷; 小肠结肠炎; 大鼠; 氧化应激水平

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0075-07

Protective effect of amygdalin against necrotizing enterocolitis in neonatal rats

ZENG Xinhao^{1,2*}, XIE Dongke^{1,2}, ZHENG Hao^{1,2}, XU Pei^{1,2}, WANG Xiaoyong^{1,2}

(1. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.

2. Sichuan Clinical Research Center for Birth Defects, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To analyze the protective effect of amygdalin against necrotizing enterocolitis (NEC) in neonatal rats. **Methods** 60 healthy 7-day old SD rats were divided into control, model and low-dose, middle-dose and high-dose amygdalin groups, and salazosulfadimidine group by a random number table with 10 rats in each group. Except for the control group, hypoxic cold stress combined with formula milk for invasive feeding was applied to establish NEC models in the other groups. The low-dose, middle-dose and high-dose amygdalin groups were administered with 20, 40 and 80 mg/kg amygdalin, respectively, whereas the salazosulfadimidine group was administered with 300 mg/kg

[基金项目] 四川省科技厅项目(2020YFSY0033)。

[作者简介] 曾信豪(1990—), 男, 硕士, 医师, 研究方向: 新生儿儿外科。E-mail: zengxinhao1990@163.com

salazosulfadimidine for 5 days. At 12 h after the last treatment, changes in weight were recorded. HE staining of ileocecal tissues was conducted. Ileocecal tissue damage was scored by intestinal damage criteria. The apoptosis rate was determined by TUNEL staining. The serum levels of inflammatory factors (tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured by enzyme-linked immunosorbent assays. The expression levels of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and cysteine aspartase (Caspase-1) were measured by Western blot. **Results** Compared with the control group, the weight of rats was significantly decreased in the model group, while the intestinal damage score, apoptosis rate of intestinal tissues, TNF- α , IL-6, IL-1 β , SOD, MDA and GSH-Px levels, and expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 were increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the weight of rats was significantly increased in middle-dose and high-dose amygdalin groups, and the salazosulfadimidine group, while the intestinal damage score, apoptosis rate of intestinal tissues, TNF- α , IL-6, IL-1 β , SOD, MDA and GSH-Px levels, and expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** Amygdalin has a protective effect against NEC in neonatal rats, which effectively reduces intestinal tissue damage, relieves the inflammatory response and oxidative stress, and reduces the apoptosis rate in intestinal tissues. However, the specific mechanism is unclear, which requires further clinical exploration.

[Keywords] amygdalin; enterocolitis; rat; oxidative stress level

坏死性小肠结肠炎 (necrotizing enterocolitis, NEC) 是一种肠道炎症性疾病, 在新生儿群体中发病率、病死率均较高^[1]。NEC 极易引发新生儿肠穿孔、多器官衰竭、败血症等, 甚至导致患儿死亡^[2]。目前, 临床可以采取外科手术的方式治疗 NEC, 但由于创伤大, 术后并发症多, 术后死亡率仍较高, 且较高的手术费会增加患者经济压力。如何利用其他方式避免 NEC 病情进展是新生儿外科医生和内科医生所需要共同面对的难题。抗炎药物、控制肠道菌群等药物进行保守治疗^[3-4], 可以规避临床手术风险, 但此类药物耐药性较强, 不良反应多, 且部分患者疗效不佳。苦杏仁苷 (amygdalin) 是苦杏仁的有效成分之一, 又称维生素 B17, 临床上常用于治疗祛痰止咳以及抗肿瘤的辅助治疗, 可有效改善咳喘、肺纤维化、抗高氧诱导肺损伤等呼吸疾病^[5]。相关研究表明, 苦杏仁苷可用于治疗缓解胃肠道疾病, 提高机体免疫功能、抑制肠道炎症、缓解肠组织损伤等^[6]。因此, 本研究探讨了苦杏仁苷对新生大鼠 NEC 的保护作用, 以期为临床提供更多治疗 NEC 的方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择 7 日龄的健康 SD 大鼠共 60 只, SPF 级, 雌雄不限, 体重约 15 g, 购自西南医科大学 [SCXK (川) 2018-17], 饲养于西南医科大学 [SYXK (川) 2018-065]。经本院西南医科大学附属医院伦理委员会批准 (IACUC20201207); 实验研究过程中符合

3R 原则。饲养条件: 采用清洁层流架小环境控制饲养。每 3 d 换 1 次垫料, 每天 09:00 和 20:00 各饲喂 1 次, 自由饮水。温度控制在 18℃ ~ 22℃, 湿度 50% ~ 60%。

1.2 主要试剂与仪器

强化配方乳、组织及细胞裂解液 (北京伊塔生物科技有限公司, 批号: 20200608、20200512、20200416); 苦杏仁苷 (上海韵泰信息科技有限公司, 批号: 20200226); PMSF 蛋白酶抑制剂混合物 (伊塔生物有限公司, 批号: 20200614); 细胞凋亡试剂盒 (武汉益普生物科技有限公司, 批号: 20200816)。肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20201012、20200924、20200916); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 检测试剂盒 (天津本生健康科技有限公司, 批号: 20200706、20200815、20200724); 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体 (北京百奥莱博, 批号: BL0899); β -actin 鼠单克隆抗体 (北京百奥莱博, 批号: WK347-XHA)。

Bio-Rad 多功能酶标检测仪 (型号 iMark680); OLYMPUS 光学显微镜 (型号 BX60); Bio-Rad SDS-PAGE 电泳仪和转膜仪 (型号 Mini Protean 3 Cell)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型建立和分组

将 60 只出生 7 d 的健康新生 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、苦杏仁苷低剂量组、苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组和柳氮磺嘧啶组,每组 10 只。利用配制代乳品(脂肪 120 g/L、蛋白质 75 g/L、乳糖 28 g/L、热量 5.9 mJ/L)喂养,每 5 h 喂养 1 次。除对照组外,将其他组大鼠放入缺氧箱内,向箱内注入浓度 100% 的氮气,当测氧仪每 min 测得箱内氧气浓度降为 0 时开始计时,1 min 后关闭阀门,取出大鼠;5 min 后立即将其置于 4℃ 冰箱中 10 min 进行冷刺激,每天 3 次;脂多糖 10 mg/kg 灌胃,每天 1 次,连续 3 d 重复上述操作。末次干预后第 2 天,低、中、高剂量组分别给予 20、40、80 mg/kg 苦杏仁苷,阳性对照组给予 300 mg/kg 柳氮磺嘧啶,连续给药 5 d;模型组给予等体积的氯化钠注射液;对照组则不予任何处理。若造模后大鼠出现吐奶、腹胀、腹泻、血便等症状,且 HE 染色显示肠组织病理损伤评分 ≥ 2 分为 NEC 建模成功。

1.3.2 评估回盲部肠组织病理组织损伤及大鼠体重变化

末次人工喂养 12 h 后,处死大鼠,记录体重。取各组回盲部肠组织,利用 4% 的多聚甲醛固定,进行石蜡包埋切片处理,并将回盲部肠组织进行苏木精-伊红染色,观察其病理学变化,根据参考文献^[7]对各组大鼠进行回盲部肠组织损伤评分:回盲部肠组织结构正常、绒毛及上皮均完整为 0 分,回盲部肠组织黏膜固有层有轻微肿胀或分离为 1 分;回盲部肠组织黏膜固有层中度肿胀分离为 2 分;回盲部肠组织黏膜固有层重度肿胀分离,且黏膜下肌层水肿并伴局部绒毛脱落为 3 分;肠坏死且回盲部肠组织绒毛消失为 4 分。

1.3.3 TUNEL 法检测肠组织细胞凋亡情况

将肠组织细胞处理为 5 μm 切片,烤片 30 min 后,进行脱蜡水化处理,利用苏木素染色 1 min 后,蒸馏水冲洗,再用盐酸乙醇分化 10 s,冲洗,氨水返蓝 30 s 后,冲洗,伊红染色 20 s,乙醇脱水,利用二甲苯透明,最后封片。用显微镜下观察细胞染色情况。

将各组大鼠回盲部肠组织进行石蜡包埋切片处理,脱蜡至水,利用原位末端标记(TUNEL)法检测大鼠肠组织细胞的凋亡情况,严格按照细胞凋亡试剂盒说明书步骤操作,最后用抗荧光淬灭剂封片液封片并镜检。

1.3.4 酶联免疫法检测炎症因子

取回盲部肠组织,按照 20 mg 加入 100 μL 组织裂解液的比例加入组织裂解液和蛋白酶抑制剂(苯甲基磺酰氟),在 4℃ 下,14000 r/min 离心 10 min,取上层清液,采用酶联免疫吸附试验测定 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.5 酶联免疫法检测氧化应激水平

采用玻璃匀浆器,将各组回盲部肠组织制成组织匀浆液,利用酶联免疫吸附法检测匀浆液中的 GSH-Px、SOD、MDA 含量,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.6 Western blot 检测 NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路

利用 Western blot 检测 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase-1, ASC) 蛋白表达水平。采用细胞裂解液裂解,组织匀浆,4℃ 下 14000 r/min 离心 5 min,取上清提取各组回盲部肠组织总蛋白,严格按照操作说明进行。采用 BCA 法进行蛋白定量,取 20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电转至 PVDF 膜上,采用洗膜缓冲液洗膜并加一抗(NLRP3、ASC、cleaved cas1/cas1),4℃,孵育过夜,洗膜加羊抗兔 IgG 二抗(1:3000),摇床震荡,于室温下孵育 2 h。电化学发光显影,用 β -actin 作为内参,用凝胶图象处理系统分析对比条带强弱。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,满足正态性的计量资料均以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析比较组间差异,SNK- q 比较多组两两组间差异,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苦杏仁苷剂量依赖性减轻肠组织病理组织损伤、增加大鼠体重

与对照组相比,模型组大鼠体重显著下降,肠组织损伤评分显著增加($P<0.05$);与模型组相比,苦杏仁苷中、高剂量组、柳氮磺嘧啶组大鼠体重显著上升,肠组织损伤评分显著下降($P<0.05$),提示苦杏仁苷有抑制组织损伤的作用,并且剂量越高这种抑制作用越显著。见表 1。

2.2 苦杏仁苷剂量依赖性抗细胞凋亡

HE 染色显示肠组织细胞被染成紫红色,肠组织

细胞核被染成紫蓝色。对照组大鼠肠组织细胞横纹清晰、结构完整、大小正常、排列整齐、灰白质分界清晰且核仁清晰可见;空白对照组和阴性对照组大鼠肠组织细胞显著增大、组织内存在较多空腔、排列紊乱,间质增多,灰白质分界不清晰,有明显成纤维细胞增生;阳性对照组大鼠肠组织细胞排列紊乱,间质稍增多,有少量成纤维细胞增生,见图 1。

TUNEL 法检测大鼠肠组织细胞显示,与对照组(2.02%)相比,模型组的细胞凋亡率(45.45%)显著升高($P<0.05$),与模型组相比,苦杏仁苷中剂量组(20.20%)、苦杏仁苷高剂量组(10.39%)、柳氮磺吡啶组(7.58%)细胞凋亡率显著下降($P<0.05$),见图 2、表 2。

2.3 苦杏仁苷剂量依赖性降低炎症因子水平

与对照组相比,模型组的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著升高($P<0.05$),与模型组相比,苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺吡啶组 TNF- α 、

IL-6、IL-1 β 显著下降($P<0.05$),提示苦杏仁苷有抑制炎症的作用,并呈现剂量依赖性。见表 3。

2.4 苦杏仁苷剂量依赖性降低氧化应激水平

与对照组相比,模型组的 SOD、MDA、GSH-Px 水平显著升高($P<0.05$),与模型组相比,苦杏仁苷中、高剂量组和柳氮磺吡啶组 SOD、MDA、GSH-Px 水平显著下降($P<0.05$),提示苦杏仁苷有减缓氧化应激水平的作用,随着剂量增加,减轻氧化应激水平的效果越显著。见表 4。

2.5 苦杏仁苷剂量依赖性降低 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达

与对照组比,模型组的 NLRP3、ASC、Caspase-1 表达水平显著升高($P<0.05$),与模型组相比,苦杏仁苷中、高剂量组和柳氮磺吡啶组 NLRP3、ASC、Caspase-1 水平显著下降($P<0.05$),说明苦杏仁苷可以通过调控 NLRP3、ASC、Caspase-1 等蛋白表达水平保护大鼠肠组织。见图 3、表 5。

表 1 苦杏仁苷剂量依赖性减轻肠组织病理组织损伤、增加大鼠体重($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Amygdalin dose-dependently reduces pathological tissue damage and increased body weight in rats

分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	体重变化 (g) Weight change	肠组织损伤评分 (分) Intestinal tissue injury score
对照组 Control group	-	2.16 \pm 1.47	0.17 \pm 0.07
模型组 Model group	-	-14.99 \pm 6.66*	3.32 \pm 0.55*
苦杏仁苷低剂量组 Amygdalin low-dose group	20	-14.80 \pm 6.86	3.22 \pm 0.70
苦杏仁苷中剂量组 Amygdalin middle-dose group	40	-4.55 \pm 4.21 [#]	2.41 \pm 0.57 [#]
苦杏仁苷高剂量组 Amygdalin high-dose group	80	-1.59 \pm 1.25 [#]	1.24 \pm 0.36 [#]
柳氮磺吡啶组 Sulfasalazine group	300	0.59 \pm 1.37 [#]	0.92 \pm 0.31 [#]

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group,* $P<0.05$. Compared with model group,[#] $P<0.05$.

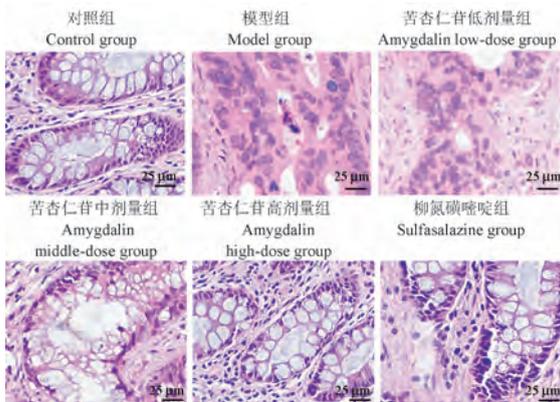


图 1 肠组织 HE 染色情况比较

Figure 1 Comparison of HE staining of intestinal tissue

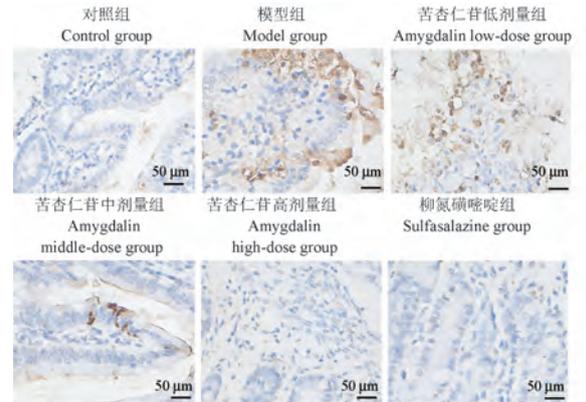


图 2 肠组织细胞凋亡情况比较

Figure 2 Comparison of cell apoptosis in intestinal tissue

3 讨论

NEC 是新生儿期常见的严重消化道疾病, 极低出生体重儿的 NEC 发病率为 7%, 病死率可达 30%^[8]。新生儿缺氧缺血、异常细菌定植、胎龄不足、配方奶喂养等被认为是 NEC 发生的主要影响因素^[9]。苦杏仁苷取自于杏仁, 在蔷薇科植物的成熟干燥种子广泛存在。有研究显示, 苦杏仁苷有抗肿瘤、抑制炎症、抑制组织损伤的作用^[10-11]。本研究结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠体重显著下降, 肠组织损伤评分显著增加; 与模型组相比, 苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组大鼠体重显著上升, 肠组织损伤评分显著下降, 与上述研究结论相符, 说明苦杏仁苷与柳氮磺嘧啶作用相近, 可以抑制肠组织损伤恢复大鼠体重, 且与苦杏仁苷浓度呈正相关。

苦杏仁苷在机体内通过白糖苷酶作用分解, 从而释放出氰化物, 氰化物本身具有很强的细胞毒性, 可抑制线粒体的功能, 拮抗炎症因子延缓细胞凋亡^[10]。有研究显示, 苦杏仁苷可以通过 JAK2-STAT3 通路促进 T 淋巴细胞增殖, 进而缩短细胞分裂周期, 增强细胞干扰和杀伤性细胞因子的分泌。苦杏仁苷经抗 CEA-单抗-葡萄糖苷酶偶联物特异激活后, 可以促进癌细胞凋亡, 对癌细胞具有靶向细胞毒作用^[12]。TUNEL 法检测结果显示, 与对照组相比, 模型组的细胞凋亡率显著升高, 与模型组相比, 苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组细胞凋亡率显著下降。本研究说明苦杏仁苷可以改善细胞凋亡, 且与苦杏仁苷浓度呈正相关。

本研究结果显示, 与对照组相比, 模型组的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 显著升高; 与模型组相比, 苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 显著下降。TNF- α 、IL-6、IL-1 β 常被作为临床炎症反应指标, 对炎症的发展有预示作用^[13]。既往研究显示, 脑组织损伤严重的大鼠伴随血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子水平升高, 提示组织损伤可能与血清炎症水平较高有关, 当炎症水平降低后, 组织病理损伤和细胞凋亡发生好转^[14]。有研究显示, 苦杏仁苷可以拮抗炎症因子诱导、促进细胞的凋亡, 苦杏仁苷对多种炎症性疾病有缓解作用, 可明显降低炎症因子^[15]。结合本研究说明苦杏仁苷降低了肠组织细胞中的炎

症反应, 促进肠道细胞恢复。

本研究结果显示, 与对照组相比, 模型组的 SOD、MDA、GSH-Px 水平显著升高; 与模型组相比, 苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组 SOD、MDA、GSH-Px 水平显著下降。既往研究显示, 苦杏仁苷可以通过抑制氧化应激及炎症反应减轻肝纤维化^[16]、抑制肿瘤的作用。SOD、GSH-Px 作为自由基解毒酶可以清除机体氧自由基, 自由基清除与产生之间的平衡对机体正常运转、抗衰老、抗病理变化起到重要作用, 测定氧化应激反应的代谢产物 MDA 可以进一步了解机体过氧化损伤的情况^[17]。本研究中 SOD、MDA、GSH-Px 水平显著下降提示了, 苦杏仁苷中可能通过抑制组织细胞的氧化应激反应缓解炎症反应, 保护肠组织。

表 2 苦杏仁苷剂量依赖性抗细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Amygdalin dose-dependently anti-apoptosis

分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	细胞凋亡率 (%) Apoptosis rate
对照组 Control group	-	2.02 \pm 0.02
模型组 Model group	-	45.45 \pm 7.07*
苦杏仁苷低剂量组 Amygdalin low-dose group	20	42.42 \pm 7.58
苦杏仁苷中剂量组 Amygdalin middle-dose group	40	20.20 \pm 8.08 [#]
苦杏仁苷高剂量组 Amygdalin high-dose group	80	10.39 \pm 5.53 [#]
柳氮磺嘧啶组 Sulfasalazine group	300	7.58 \pm 4.55 [#]

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, [#] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, [#] $P < 0.05$.

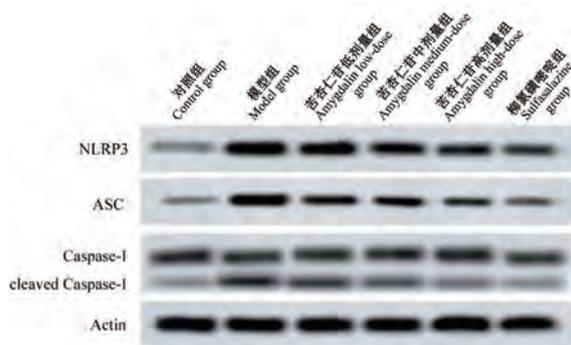


图 3 肠组织细胞 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达图谱
Figure 3 Intestinal tissue cell NLRP3, ASC, Caspase-1 protein expression profile

表 3 苦杏仁苷剂量依赖性降低炎症因子水平($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Amygdalin dose-dependently reduces the level of inflammatory factors

分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	TNF- α (ng/mL)	IL-6 (ng/mL)	IL-1 β (ng/mL)
对照组 Control group	-	79.87 \pm 14.70	138.05 \pm 12.51	96.64 \pm 13.37
模型组 Model group	-	439.53 \pm 37.24 [*]	579.07 \pm 58.39 [*]	625.58 \pm 61.35 [*]
苦杏仁苷低剂量组 Amygdalin low-dose group	20	394.45 \pm 31.85	425.29 \pm 34.72	563.80 \pm 53.36
苦杏仁苷中剂量组 Amygdalin middle-dose group	40	270.45 \pm 26.46 [#]	371.73 \pm 32.25 [#]	396.32 \pm 32.18 [#]
苦杏仁苷高剂量组 Amygdalin high-dose group	80	137.69 \pm 18.62 [#]	309.74 \pm 23.38 [#]	220.84 \pm 25.44 [#]
柳氮磺吡啶组 Sulfasalazine group	300	98.49 \pm 17.64 [#]	300.25 \pm 19.82 [#]	169.79 \pm 12.32 [#]

注:与对照组相比, * P <0.05;与模型组相比, # P <0.05。Note. Compared with control group, * P <0.05. Compared with model group, # P <0.05.表 4 苦杏仁苷剂量依赖性降低氧化应激水平($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Amygdalin dose-dependently reduces oxidative stress levels

分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	SOD (U/mg)	MDA (U/mg)	GSH-Px (U/mg)
对照组 Control group	-	239.69 \pm 29.39	2.04 \pm 0.49	152.48 \pm 13.87
模型组 Model group	-	86.62 \pm 10.19 [*]	17.56 \pm 2.33 [*]	54.90 \pm 2.57 [*]
苦杏仁苷低剂量组 Amygdalin low-dose group	20	160.63 \pm 23.77	15.81 \pm 2.72	71.59 \pm 8.93
苦杏仁苷中剂量组 Amygdalin middle-dose group	40	188.08 \pm 15.91 [#]	12.42 \pm 0.97 [#]	96.22 \pm 6.96 [#]
苦杏仁苷高剂量组 Amygdalin high-dose group	80	223.59 \pm 25.51 [#]	14.74 \pm 1.84 [#]	109.03 \pm 11.67 [#]
柳氮磺吡啶组 Sulfasalazine group	300	222.81 \pm 16.20 [#]	8.54 \pm 1.36 [#]	126.10 \pm 12.82 [#]

注:与对照组相比, * P <0.05;与模型组相比, # P <0.05。Note. Compared with control group, * P <0.05. Compared with model group, # P <0.05.表 5 苦杏仁苷剂量依赖性降低 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Amygdalin dose-dependently decreased NLRP3, ASC and Caspase-1 protein expression

分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	NLRP3	ASC	Caspase-1
对照组 Control group	-	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01
模型组 Model group	-	0.28 \pm 0.04 [*]	0.26 \pm 0.06 [*]	0.37 \pm 0.04 [*]
苦杏仁苷低剂量组 Amygdalin low-dose group	20	0.25 \pm 0.04	0.25 \pm 0.05	0.33 \pm 0.05
苦杏仁苷中剂量组 Amygdalin middle-dose group	40	0.07 \pm 0.03 [#]	0.11 \pm 0.04 [#]	0.07 \pm 0.03 [#]
苦杏仁苷高剂量组 Amygdalin high-dose group	80	0.03 \pm 0.01 [#]	0.04 \pm 0.02 [#]	0.03 \pm 0.02 [#]
柳氮磺吡啶组 Sulfasalazine group	300	0.02 \pm 0.01 [#]	0.02 \pm 0.01 [#]	0.02 \pm 0.02 [#]

注:与对照组相比, * P <0.05;与模型组相比, # P <0.05。Note. Compared with control group, * P <0.05. Compared with model group, # P <0.05.

本研究结果显示,与对照组相比,模型组的 NLRP3、ASC、Caspase-1 表达水平显著升高;与模型组相比,苦杏仁苷中剂量组、苦杏仁苷高剂量组、柳氮磺嘧啶组 NLRP3、ASC、Caspase-1 水平显著下降。有研究显示,ASC、Caspase-1 可导致 NLRP3 的激活,参与组织损伤的发生、发展。受体蛋白 NLRP3、凋亡相关点样蛋白 ASC、Caspase-1 均是 NLRP3 炎性小体的组成部分,收到外来刺激时,ASC 使 pro-Caspase-1 转化为有活性的 Caspase-1,进而促进 pro-IL-1 和 pro-IL-18 向白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 18(IL-18)转化,增加了 IL-1、IL-18 含量,介导炎症反应的发生^[18-19]。结合本研究结果说明苦杏仁苷可以通过调控 NLRP3、ASC、Caspase-1 来缓解炎症反应,改善肠组织损伤。

综上所述,苦杏仁苷对新生大鼠坏死性小肠结肠炎有一定保护作用,可以有效减少肠组织损伤、降低机体炎症反应、氧化应激反应,减少肠组织细胞凋亡率,但具体的反应机制尚不够明确,有待临床进一步探究。

参考文献:

- [1] 熊迪,贺巍,李颖,等. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜基因表达谱生物信息学分析 [J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(11): 50-55.
- [2] 邓国清,鲁利群,黄莉,等. 维生素 D 辅助治疗小儿轮状病毒性肠炎的效果及对免疫功能,胃肠激素的影响 [J]. 临床误诊误治, 2020, 3(8): 22-26.
- [3] 吴美玉,黄永德,陈建兴,等. 康复新液,地衣芽孢杆菌及美沙拉嗪联合对活动期溃疡性结肠炎疗效及对 IL-23、IL-17、氧自由基、肠道菌群的改善作用 [J]. 解放军医药杂志, 2020, 236(2): 85-89.
- [4] 程琳,徐发林,牛铭,等. 早产儿败血症的病原体及其临床特征 [J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21(9): 42-46.
- [5] Elsaed WM. Amygdalin (Vitamin B17) pretreatment attenuates experimentally induced acute autoimmune hepatitis through reduction of CD4⁺ cell infiltration [J]. Ann Anat, 2019, 22(4): 124-132.
- [6] Badr El-Kholy W, Abdel-Rahman SA, Abd El-Hady El-Safti FE, et al. Effect of vitamin B17 on experimentally induced colon cancer in adult male albino rat [J]. Folia Morphol (Warsz), 2021, 80(1): 158-169.
- [7] Afrazi A, Sodhi CP, Good M, et al. Intracellular heat shock

protein-70 negatively regulates TLR4 signaling in the newborn intestinal epithelium [J]. J Immunol, 2012, 188(9): 4543-4557.

- [8] 赵梅,张志宏,郭忠燕,等. 直肠癌患者外周血中 Galectin-3 mRNA、MUC1 mRNA 的表达及临床意义 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(4): 68-72.
- [9] 杜越,钟琴,冯慧,等. 影响新生儿坏死性小肠结肠炎严重程度的危险因素 [J]. 儿科药学杂志, 2019, 25(2): 22-25.
- [10] 史佳民,范理宏. 苦杏仁苷抗肿瘤机制的研究进展 [J]. 生命的化学, 2019, 39(1): 147-152.
- [11] 张莉野,田成旺,刘素香,等. 桂枝茯苓方的化学成分、药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 6-13.
- [12] Yang Y, Zhao J, Song X, et al. Amygdalin reduces lipopolysaccharide-induced chronic liver injury in rats by down-regulating PI3K/AKT, JAK2/STAT3 and NF- κ B signalling pathways [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 2688-2697.
- [13] El-Masry T, Al-Shaalan N, Tousson E, et al. Potential therapy of vitamin B17 against Ehrlich solid tumor induced changes in Interferon gamma, Nuclear factor kappa B, DNA fragmentation, p53, Bcl2, survivin, VEGF and TNF- α Expressions in mice [J]. Pak J Pharm Sci, 2020, 33(1): 393-401.
- [14] 岳凌峰,马敬,王宁. 松果菊苷对大鼠抑郁模型线粒体损伤的修复作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 63-69.
- [15] Wang R, Zhang D, Sun K, et al. Amygdalin promotes the activity of T cells to suppress the progression of HBV-related hepatocellular carcinoma via the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 56.
- [16] 王诗洋,王泉,徐祖清,等. 苦杏仁苷通过抑制氧化应激及炎症反应减轻四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化作用 [J]. 现代免疫学, 2020, 40(6): 33-37, 43.
- [17] Abboud MM, Awaida W, Alkhateeb HH, et al. Antitumor action of amygdalin on human breast cancer cells by selective sensitization to oxidative stress [J]. Nutr Cancer, 2019, 71(3): 483-490.
- [18] 谢玥,张绍衡,熊瑶,等. PBMC 中 CARD9、MDC、IL32 在溃疡性结肠炎诊断和病情评估中价值 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(8): 1329-1332.
- [19] 吴可,苏鹏飞,佟延新. 美沙拉秦联合双歧杆菌嗜酸乳杆菌肠球菌三联活菌治疗溃疡性结肠炎效果及对患者血清 sRAGE、Vaspin、炎症因子等影响 [J]. 临床误诊误治, 2020, 33(2): 37-42.

[收稿日期]2021-09-10

宗永辉, 李欣欣, 张宁, 等. 通心络对小鼠钙化性主动脉瓣膜病早期病变的影响研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 82-88, 140.

Zong YH, Li XX, Zhang N, et al. Effect of Tongxinluo on early lesions of calcified aortic valve disease in mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 82-88, 140.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.011

通心络对小鼠钙化性主动脉瓣膜病早期病变的影响研究

宗永辉^{1,2}, 李欣欣², 张宁², 陈云³, 刘新灿^{3*}

(1.濮阳市油田总医院, 河南 濮阳 457000; 2.河南中医药大学, 郑州 450000;
3.河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

【摘要】 目的 观察在钙化性主动脉瓣膜病早期进行通心络干预能否延缓其进展。方法 小鼠造模1周后通过随机区组法分成5组, 分别为: 假手术组、模型组、通心络大剂量组、通心络中剂量组、通心络小剂量组, 通心络干预6周后行多普勒超声检测主动脉瓣峰值流速变化; 检测血清髓过氧化物酶(MPO)活力和总胆固醇(TC)的浓度; 病理学观察主动脉瓣膜组织病理变化和钙盐沉积情况; 免疫组化染色检测瓣膜小叶内巨噬细胞浸润, 瓣膜间质细胞分化为肌成纤维细胞和成骨细胞的情况。**结果** 通心络干预6周后, 与模型组相比能够显著降低主动脉瓣膜的峰值流速($P<0.05$), 并且能够显著降低血清总胆固醇水平和血清MPO活力($P<0.01$); 与通心络干预各组相比, 模型组主动脉瓣小叶厚度明显增加($P<0.05$)并表现出钙盐沉积; 免疫组化结果显示: 与模型组比, 通心络干预各组巨噬细胞募集减少, α -SMA和OPN阳性细胞表达降低。**结论** 在钙化性主动脉瓣膜病早期通心络能够通过降低血清TC浓度, 抑制炎性巨噬细胞的浸润和降低MPO活性减少病变内氧化应激, 进而影响瓣膜间质细胞向肌成纤维细胞和成骨细胞分化, 延缓瓣膜钙化的进展。

【关键词】 钙化性主动脉瓣膜病; 炎症; 通心络; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0082-07

Effect of Tongxinluo on early lesions of calcified aortic valve disease in mice

ZONG Yonghui^{1,2}, LI Xinxin², ZHANG Ning², CHEN Yun³, LIU Xincan^{3*}

(1. Puyang Oilfield General Hospital, Puyang 457000, China. 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000. 3. the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 **Objective** To observe whether Tongxinluo treatment delays progression of calcified aortic valve disease in the early stage. **Methods** One week after modeling, the mice were randomly divided into five groups; sham operation, model, Tongxinluo high-dose, Tongxinluo medium-dose and Tongxinluo low-dose groups. Changes in aortic valve peak velocity were assessed by Doppler ultrasound after Tongxinluo treatment for 6 weeks. The activity of serum myeloperoxidase (MPO) and the concentration of total cholesterol (TC) were measured. Pathological changes and calcium

【基金项目】 河南省中医药科学研究重点专项(2017ZY1013); 河南省中医管理局国家中医临床研究基地科研重点专项(2018JDZX008)。

【作者简介】 宗永辉(1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 心血管疾病防治及介入医学研究。E-mail: zongyonghui101@163.com

【通信作者】 刘新灿(1965—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 心血管疾病防治及介入医学研究。

E-mail: liuxincan103@163.com

deposition were observed in the aortic valve. Infiltration of macrophages and differentiation of valve stromal cells into myofibroblasts and osteoblasts were examined by immunohistochemical staining. **Results** After 6 weeks of treatment, compared with the model group, Tongxinluo significantly reduced the peak flow velocity of the aortic valve ($P<0.05$), the serum level of total cholesterol, and the activity of serum MPO ($P<0.01$). Compared with the Tongxinluo intervention group, the leaflet thickness of the aortic valve was significantly increased in the model group ($P<0.05$) and showed calcium salt deposition. Immunohistochemistry showed that, compared with the model group, macrophage recruitment was decreased, expression of α -SMA and OPN-positive cells were decreased in the Tongxinluo intervention group. **Conclusions** In the early stage of calcified aortic valve disease, Tongxinluo reduces oxidative stress by reducing the concentrations of serum TC, inhibiting infiltration of inflammatory macrophages, reducing MPO activity, and then affects the differentiation of valve stromal cells into myofibroblasts and osteoblasts to delay the progression of valvular calcification.

【Keywords】 calcified aortic valve disease; inflammation; Tongxinluo; mice

钙化性主动脉瓣膜病 (calcified aortic valve disease, CAVD) 又称为“退行性”主动脉瓣膜病,是目前引起主动脉狭窄的最常见原因。由于 CAVD 的发生呈现出时间依赖性和被动性的钙沉积,以往很长一段时间被认为是一种退行性病变。随着对瓣膜组织病理学和流行病学研究的深入,发现其是一种类似于动脉粥样硬化的主动进展性疾病。首先越来越多的证据显示 CAVD 具有与动脉粥样硬化相同的病理特点:脂质在内皮下的大量堆积,炎症细胞的浸润,内皮功能障碍以及钙化等;其次是在流行病学发现二者之间具有多种危险因素的重叠,包括:年龄、吸烟、高血压、糖尿病、高脂血症和肾功能不全等^[1-2]。这些观察结果表明,CAVD 发病机制可能与动脉粥样硬化的早期机制相似,同样也有被防治的可能。通心络具有多效性作用,是动脉粥样硬化疾病治疗中常用的中成药。研究表明通心络通过剂量依赖型作用在降血脂,抗氧化和抗炎以及调节内皮功能障碍等方面与他汀类药物药理作用相当^[3-4]。基于 CAVD 早期发病机制与动脉粥样硬化相似,本研究拟通过导丝损伤瓣膜内皮机制建立 CAVD 动物模型^[5-7],在早期阶段进行中药通心络超微粉干预,尝试探讨通心络对 CAVD 早期阶段脂质、炎症、氧化应激等方面的影响,观察是否能够延缓 CAVD 的进展。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 50 只 10 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 25~28 g,购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场[SCXK(豫)2019-0002]。小鼠饲养于河南中医药大学一附院动物实验研究中心动物房[SYXK(豫)2017-0001],室内环境清洁,室温恒定

(22±2)℃,12 h 为明/暗周期,并随意接受食物和饮用水。动物实验研究方案已经过河南中医药大学第一附属医院动物实验中心伦理委员会的审查和批准(YFYDW2019039),实验研究过程中对实验鼠严格遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

总胆固醇(TC)含量检测液(BC1980, Elabscience);苏木素伊红(HE)染色液(G1120, Solarbio);髓过氧化物酶检测液(SEKM-0118, Elabscience);钙盐染色液(改良茜素红 S 法,G3280, Solarbio);anti-CD68 单克隆抗体(K200071 M, Solarbio);anti-ACTA2 单克隆抗体(K200017 M, Solarbio);anti-OPN 单克隆抗体(ABclonal);anti-NOS3 多克隆抗体(K009697P, Solarbio)。通心络超微粉剂,主要成分:人参、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、檀香、降香、乳香(制)、酸枣仁(炒)、冰片,均购自以岭药业。

1.3 方法

1.3.1 模型建立

10~12 周龄雄性 C57BL/6J(野生型)小鼠,体重 25~28 g,抽取适量 1.25%阿佛丁以 0.2 mL/10 g 剂量麻醉;待小鼠充分麻醉后,用脱毛膏清除颈部及胸前区(主要为左侧心前区)毛发,然后固定于鼠板上;持手术剪纵向剪开颈前皮肤,然后持无齿镊子和止血钳钝性分离出右颈动脉,并使其充分暴露;预留 2~3 根结扎线,结扎远端颈动脉;右手持穿刺针先 45°进针后平行血管向前推进一段距离,固定穿刺针外鞘后拔出针芯;将雅培直导丝(HI-TORQUE 0.014'')沿穿刺鞘管在超声引导下缓慢送入主动脉瓣膜处,前后移动 50 次后再以每秒 2 次的速度旋转 100 次。结束后退出导丝立即对主动脉瓣处行多普勒超声检测,确定是否反流。然后进行

近段结扎,在伤口处滴洒 2 滴抗生素预防感染。假手术组模型的建立,同样是钝性分离右颈动脉,送入导丝但不进入主动脉瓣膜处,其余操作方法相同。

1.3.2 实验分组和给药

建立模型 1 周后将所有动物行彩超多普勒检测主动脉流速检测,除假手术组(8 只)外把主动脉流速相对增加值(上下差值 $<10\%$)相近的组成一组,再在进行随机分配成 4 组分别为:模型组(12 只)、通心络大剂量组(10 只)、通心络中剂量组(10 只)、通心络小剂量组(10 只)。根据 973 项目关于通心络药物药效试验的配置和剂量规定:依据动物数量将通心络超微粉溶于纯水中配制成大中小剂量(中剂量为临床等效剂量)分别为 1.5、0.75、0.38 g/kg,每天灌胃 1 次。

1.3.3 多普勒超声心动图检测

M 型超声心动图和彩色多普勒超声分别检测左室心功能和主动脉瓣狭窄情况。M 模式下在胸骨旁长轴切面测量左室射血分数。壁厚测量采用胸骨旁长轴 M 型和短轴 M 型。彩色多普勒模式在胸骨旁长轴和胸骨上切面对主动脉瓣峰值流速及反流进行成像,超声探头角度校正范围为 $40^{\circ}\sim 50^{\circ}$ 。峰值流速较基线增加 $15\%\sim 50\%$ 定义为轻度狭窄, $50\%\sim 75\%$ 定义为中度狭窄, $>75\%$ 定义为重度主动脉瓣狭窄。整个操作过程有 1 人独自完成,减少个体间差异性;所有操作方法和检测结果都在超声科老师指导下完成。

1.3.4 血清指标检测

取材后采用腹主动脉采血法收集血液,将采集血样室温静置 2 h,然后放入离心机以 3500 r/min 离心 10 min 后分离血清备用,采用比色法检测血清髓过氧化物酶(MPO)活力和总胆固醇(TC)的浓度。

1.3.5 主动脉瓣瓣叶厚度和钙盐沉积情况检测

取新鲜主动脉瓣组织,10%中性福尔马林固定,乙醇梯度脱水,石蜡包埋。用组织切片机切 3 和 5 μm 超薄石蜡切片,分别进行 HE 染色和茜素红钙盐

染色观察主动脉瓣形态变化和钙盐沉积情况。

1.3.6 免疫组化检测分析

取脱水包埋后主动脉瓣组织,切 3 μm 超薄石蜡切片,免疫组化 SP 法检测各组标本中巨噬细胞, α -SMA 和 OPN 阳性细胞表达情况。采用 Image J 图像软件分析切片的阳性染色面积(平均光密度值表示)。

1.4 统计学方法

实验结果采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,计量资料采用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$),若数据方差齐且符合正态分布,采用单因素方差分析,当数据不是正态分布或方差不相等时,采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多普勒超声心动图检测结果

通心络灌胃 6 周后对各组主动脉峰值流速进行多普勒超声检测。与假手术组比较,其它各组主动脉瓣峰值流速明显增加,其中模型组增加最为显著;与模型组相比,经通心络干预后主动脉瓣峰值流速明显降低,而通心络 1.5 g/kg 组降低最多,如表 1 所示。

2.2 血清指标检测

通心络超微粉灌胃 6 周后,检测各实验组血清中总胆固醇和髓过氧化物酶的水平,结果显示:通心络各组血清总胆固醇含量较假手术组、模型组明显降低($P<0.05$),表明通心络在降低胆固醇方面效果显著;髓过氧化物酶作为氧化应激的来源,以此检测实验各组氧化应激水平。与假手术相比,其它实验组 MPO 活力明显升高($P<0.05$),但通心络干预各组较模型组 MPO 活力显著下降($P<0.05$),如表 2 所示。

2.3 各组主动脉瓣 HE 和茜素红钙盐染色

通过 HE 和茜素红钙盐染色分别观察主动脉瓣小叶的形态变化和钙盐沉积情况,如图 1、表 3 所示。HE 染色结果显示,与假手术组相比,其它实验各组主动脉瓣小叶海绵层内部结构紊乱,有不同程

表 1 通心络干预 6 周后主动脉流速检测值($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Aortic flow velocity after 6 weeks of Tongxinluo intervention

组别 Groups	假手术组 Sham group	模型组 Model group	通心络 1.5 g/kg Tongxinluo 1.5 g/kg	通心络 0.75 g/kg Tongxinluo 0.75 g/kg	通心络 0.38 g/kg Tongxinluo 0.38 g/kg
主动脉流速(m/s) AV Peak velocity	589.77 \pm 25.90	1024.98 \pm 81.67*	788.36 \pm 48.05**	848.68 \pm 54.20**	949.73 \pm 32.61** Δ

注:与假手术组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$;与通心络 1.5 g/kg 相比, $\Delta P<0.05$ 。

Note. Compared with sham operation group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with Tongxinluo 1.5 g/kg, $\Delta P<0.05$.

表 2 血清胆固醇和髓过氧化物酶的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Changes of serum cholesterol and myeloperoxidase

组别 Groups	假手术组 Sham group	模型组 Model group	通心络 1.5 g/kg Tongxinluo 1.5 g/kg	通心络 0.75 g/kg Tongxinluo 0.75 g/kg	通心络 0.38 g/kg Tongxinluo 0.38 g/kg
总胆固醇 (mmol/L) TC	2.43 ± 0.34	2.24 ± 0.26	1.61 ± 0.11 ^{*#}	1.65 ± 0.21 ^{*#}	1.86 ± 0.18 ^{*#}
髓过氧化物酶 (U/L) MPO	47.44 ± 14.50	453.40 ± 63.83 [*]	116.30 ± 28.74 ^{*#}	166.22 ± 29.81 ^{*#}	208.46 ± 35.21 ^{*#Δ}

注:与假手术组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$;与通心络 1.5 g/kg 相比, Δ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. Compared with Tongxinluo 1.5 g/kg, Δ $P < 0.05$.

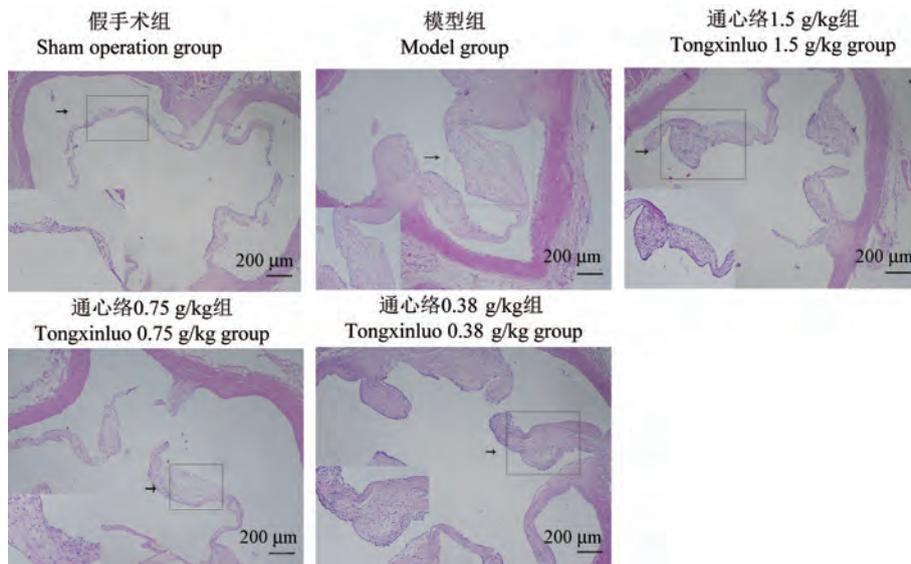


图 1 各组主动脉瓣小叶 HE 染色

Figure 1 HE staining of aortic valve leaflets in each group

表 3 主动脉瓣小叶厚度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 3 Comparison of aortic leaflet thickness

组别 Groups	假手术组 Sham group	模型组 Model group	通心络 1.5 g/kg Tongxinluo 1.5 g/kg	通心络 0.75 g/kg Tongxinluo 0.75 g/kg	通心络 0.38 g/kg Tongxinluo 0.38 g/kg
主动脉瓣叶厚度 (μm) Aortic leaflet thickness	23.55 ± 2.11	58.24 ± 2.40 [*]	37.72 ± 1.67 ^{*#}	40.87 ± 1.58 ^{*#}	42.04 ± 1.45 ^{*#}

注:与假手术组相比, * $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.01$ 。

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.01$. Compared with model group, # $P < 0.01$.

度的胶原纤维增 ($P < 0.05$), 其中模型组增厚较为明显, 通心络干预各组随着剂量的增加, 主动脉瓣增厚和分化程度逐渐减少。

茜素红钙盐染色结果显示, 如图 2 所示, 模型组出现少量钙盐沉积, 通心络干预各组均未出现。

2.4 免疫组化检测分析

CD68 抗体主要用于检测瓣膜病变部位炎性巨噬细胞浸润情况; 如图 3 所示, 巨噬细胞主要分布在主动脉瓣根部和病变部位瓣膜内皮细胞下; 与假手术组比, 各实验组巨噬细胞阳性率均增加, 模型组最为显著; 与模型组相比, 通心络干预各组其阳性细胞占比均明显减少; 通心络干预各组随着剂量增加, 瓣膜

内巨噬细胞阳性率逐渐减少, 但差异不显著。

ACTA2 单克隆抗体标记的平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 主要检测瓣膜肌成纤维的分布; 如图 4 所示, 假手术组中几乎未表达 α -SMA, 模型组中阳性细胞分布向内皮下层延伸, 并且阳性细胞分布面积均高于其他各组; 通心络干预各组阳性细胞分布面积较模型组减少但高于假手术组。

骨桥蛋白 (OPN) 抗体染色阳性细胞主要分布在瓣膜病变部位, 在所有各组中模型组阳性率最高, 通心络干预各组有少量阳性细胞, 但明显少于模型组, 假手术组仅有极少量阳性细胞, 如图 5 所示。

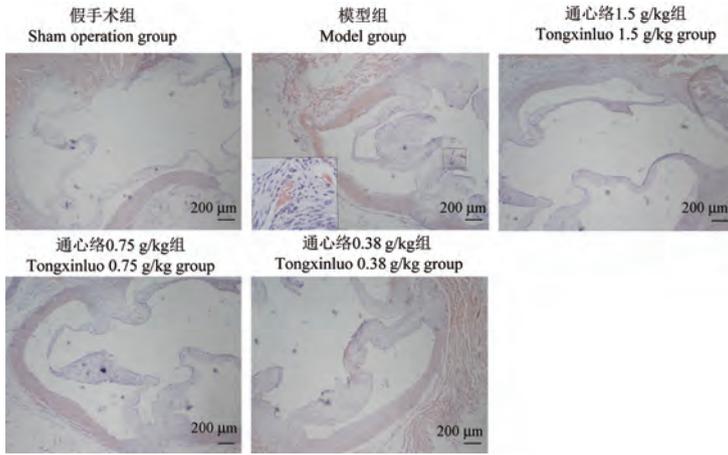
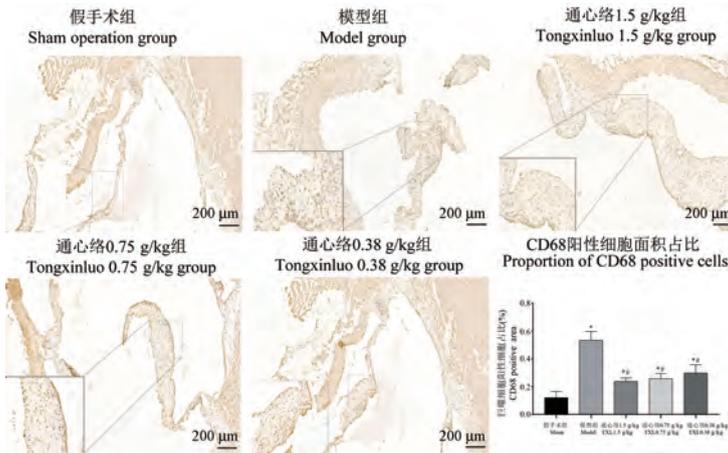


图 2 各组主动脉瓣小叶茜素红钙盐染色

Figure 2 Alizarin red calcium salt staining of aortic leaflets in each group

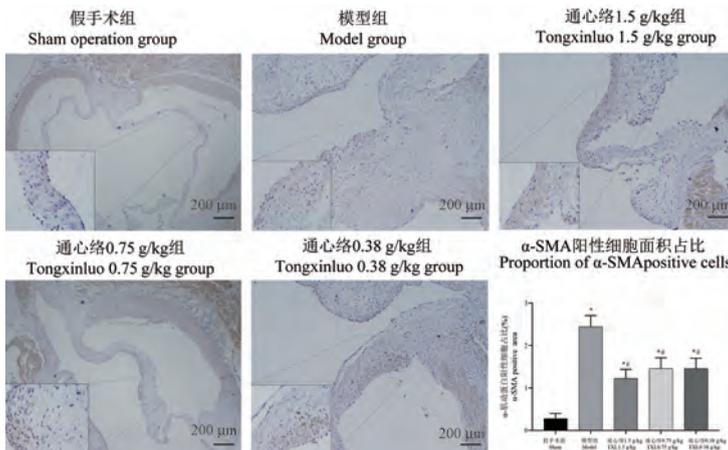


注:与假手术组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 主动脉瓣内巨噬细胞免疫组化 DAB 染色

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Immunohistochemical DAB staining of macrophages in aortic valve

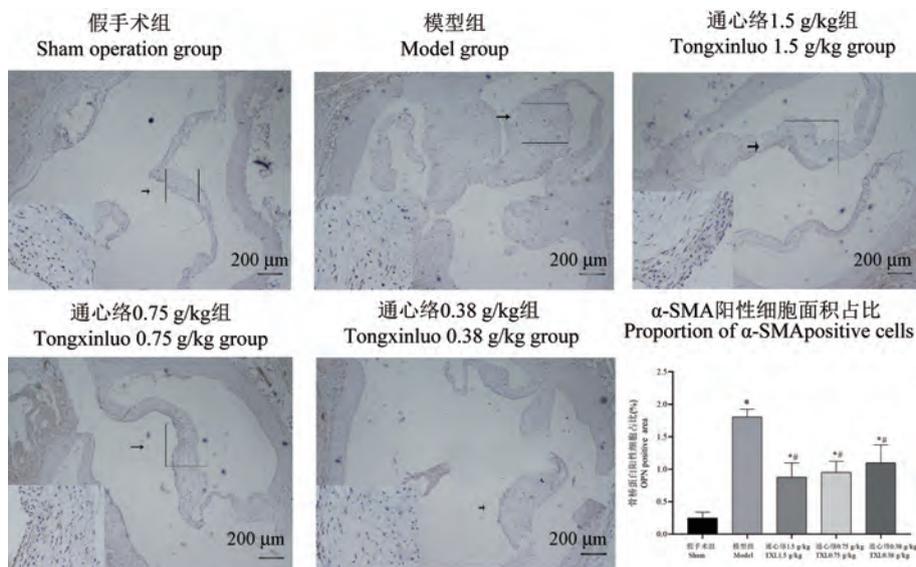


注:与假手术组相比, * $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.01$ 。

图 4 主动脉瓣内 α-SMA 免疫组化 DAB 染色

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.01$. Compared with model group, # $P < 0.01$.

Figure 4 Immunohistochemical DAB staining of α-SMA in aortic valve



注:与假手术组相比, * $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.01$ 。

图 5 主动脉瓣内 OPN 免疫组化 DAB 染色

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.01$. Compared with model group, # $P < 0.01$.

Figure 5 Immunohistochemical DAB staining of OPN in aortic valve

3 讨论

CAVD 是一个慢性演变过程,涉及遗传易感性、内皮切应力、慢性炎症、脂质沉积和瓣膜钙化,并以进行性纤维化组织重塑和矿化为特征^[8-9]。在初期阶段由于机械和(振荡)剪切应力会诱发瓣膜内皮细胞层(VEC)的内皮功能障碍,从而导致脂蛋白在内皮下的沉积并引起炎症细胞浸润^[10-11]。基于 CAVD 与动脉硬化性疾病早期发病机制的相似性,他汀类药物也被应用于 CAVD 中,非常可惜的是在多个大型临床研究中证实是不能减缓钙化性瓣膜病的进展^[12-13],原因可能是干预时已经进展到钙化不可逆阶段。近年来有研究发现在 CAVD 的早期进行他汀药物的干预能够延缓疾病的进程^[14],而且在疾病早期阶段能够有效延缓病程进展这一假设在其他动物实验已经被验证。本实验研究通过超声引导下导丝损伤瓣膜内皮细胞,并在早期阶段使用通心络药物干预 CAVD 动物模型发现:通心络能够通过抑制炎性巨噬细胞的产生,减少超氧化物的氧化应激以及抑制瓣膜骨化的信号通路中主要蛋白的表达;实验证实通心络能够在早期对 CAVD 的钙化具有延缓作用。

通心络作为心血管疾病中最常用的中成药已在临床实践中用于治疗心绞痛患者十多年了^[15],其主要成分包括人参、赤芍、冰片和酸枣仁等。正是

因为由多味草药合制而成,导致提取物中多种化合物的累积或协同作用,这也是为什么通心络具有包括改进内皮功能、降脂、抗氧化、血管舒张、抗血栓、抗炎、抗凋亡和增强血管生成等多效性作用的原因^[16-17]。例如,通心络药物中的人参,其主要成分为人参皂甙。据报道,人参皂苷 Rb1 可有效阻断高半胱氨酸诱导的猪冠状动脉内皮功能障碍,超氧阴离子产生和内皮一氧化氮合酶下调^[18];人参皂甙 Rb2 能够降低经高脂培养基中 3T3-L1 脂肪细胞的 TC 和 TG 的水平^[19]。研究发现,赤芍同样具有抗氧化、血管舒张、抗血小板、降脂和抗炎能力^[20-21]。此外,酸枣仁也具有提升免疫力和降脂的作用。

目前研究表明瓣膜内皮细胞的破坏是 CAVD 形成的首要因素^[22-23]。同动脉粥样硬化一样,CAVD 的触发事件是机械应力增加和剪切应力减少引起的内皮损伤。剪应力改变后的内皮损伤允许脂质的浸润,尤其是 LDL 和脂蛋白-a(Lp-a),开始将炎症细胞招募到瓣膜中。在手术切除的钙化主动脉瓣中发现炎症浸润主要是有巨噬细胞、肥大细胞、CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞组成^[24]。这些炎症是先天免疫的主要反应,发生在内皮细胞受损后,伴随着炎症的激活和脂质沉积。先天性免疫反应及其它细胞和体液反应都牵涉到这一过程。作为对外来生物体、细胞残骸或物理刺激物引起的损伤的反应,先天免疫系统代表了对外部或内部触发的

第一反应,并启动了组织再生的过程。一旦炎症过程被触发,它将沿着一定的过程进行,直到炎症刺激被根除,愈合机制可以开始。然而,如果炎症源不能被消除,炎症将会进展,随着时间的推移强度不同^[25]。CAVD 中的先天性免疫反应最初是由几种氧化类脂物质通过 toll 样受体和 NF- κ B 途径引起的。VICs 表达 TLRs,已知在炎症和抗原特异性适应性免疫反应的启动中起关键作用。TLRs 可以被几种脂类物质激活,特别是 ox-LDL,信号通过特定适配分子的补充进而激活转录因子 NF- κ B^[26]。通过这种方式 TLRs 信号通过核因子 NF- κ B 途径调整炎症,对维持组织内环境稳定至关重要。通心络不仅能够下调 TLR4、NF- κ B 的表达,而且可以通过抑制血管损伤引起的巨噬细胞浸润,分泌炎症因子 TNF- α 下调转录因子 KLF5 而改善新生内膜的形成,从而起到保护内皮细胞的作用^[27],这与我们的实验结果相一致。

我们的实验研究和其他人一样存在不足之处。首先,由于对导丝损伤瓣膜的力度无法做到严格的一致性,导致对瓣膜损伤程度的差异性;对此我们在建立模型时此部分操作都有同一人完成,同时根据术后瓣膜流速的变化进行区组随机分组以保证实验各组间的可比性。第二,由于小鼠瓣膜组织较小并且在该实验中样本量较少,我们没有对主要蛋白进行蛋白质定量分析的蛋白质印迹分析。第三,尽管已经验证了通心络的降脂,抗炎,抗氧化作用对早期 CAVD 的影响,但这些作用背后的详细分子机制仍需进一步大样本量验证。

参考文献:

[1] Katz R, Wong ND, Kronmal R, et al. Features of the metabolic syndrome and diabetes mellitus as predictors of aortic valve calcification in the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2006, 113(17): 2113-2119.

[2] Owens DS, Katz R, Takasu J, et al. Incidence and progression of aortic valve calcium in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) [J]. *Am J Cardiol*, 2010, 105(5): 701-708.

[3] Zhang Y, Pan T, Zhong X, et al. Tongxinluo prevents endothelial dysfunction induced by homocysteine thiolactone *in vivo* via suppression of oxidative stress [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 929012.

[4] Zhang L, Liu Y, Lu XT, et al. Traditional Chinese medication Tongxinluo dose-dependently enhances stability of vulnerable plaques: a comparison with a high-dose simvastatin therapy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(6): 2004-2014.

[5] Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, et al. A novel mouse model

of aortic valve stenosis induced by direct wire injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(2): 270-278.

[6] 宗永辉,刘新灿.钙化性主动脉瓣膜病小鼠模型比较及应用研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(11): 133-139, 145.

[7] Niepmann ST, Steffen E, Zietzer A, et al. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype [J]. *Clin Res Cardiol*, 2019, 108(8): 847-856.

[8] Mathieu P, Bouchareb R, Boulanger MC. Innate and adaptive immunity in calcific aortic valve disease [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 851945.

[9] Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(19): 1854-1863.

[10] Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, et al. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies [J]. *Circulation*, 1994, 90(2): 844-853.

[11] Yearwood TL, Misbach GA, Chandran KB. Experimental fluid dynamics of aortic stenosis in a model of the human aorta [J]. *Clin Phys Physiol Meas*, 1989, 10(1): 11-24.

[12] Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, et al. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial [J]. *Circulation*, 2010, 121(2): 306-314.

[13] Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, et al. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(23): 2389-2397.

[14] Antonini-Canterin F, Hirsu M, Popescu BA, et al. Stage-related effect of statin treatment on the progression of aortic valve sclerosis and stenosis [J]. *Am J Cardiol*, 2008, 102(6): 738-742.

[15] 徐贵成,高荣林,吴以岭,等.通心络胶囊治疗冠心病心绞痛临床研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1997, 17(7): 414-416.

[16] 吴以岭,游佳华,袁国强,等.通心络超微粉对高脂饮食兔胸主动脉 NF- κ B、胞间黏附分子 1 及血管细胞黏附分子 1 表达的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(3): 271-274.

[17] Zhang L, Wu Y, Jia Z, et al. Protective effects of a compound herbal extract (Tong Xin Luo) on free fatty acid induced endothelial injury: implications of antioxidant system [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2008, 14(8): 39.

[18] Zhou W, Chai H, Lin PH, et al. Ginsenoside Rb1 blocks homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries [J]. *J Vasc Surg*, 2005, 41(5): 861-868.

[19] Kim EJ, Lee HI, Chung KJ, et al. The ginsenoside-Rb2 lowers cholesterol and triacylglycerol levels in 3T3-L1 adipocytes cultured under high cholesterol or fatty acids conditions [J]. *BMB Rep*, 2009, 42(4): 194-199.

周澧, 秦川. 2019新型冠状病毒肺炎凝血异常机制与中医血瘀证候 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 89-96.

Zhou L, Qin C. Coagulation dysfunction in coronavirus disease 2019 and blood stasis symptom of traditional Chinese medicine [J].

Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 89-96.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.012

2019 新型冠状病毒肺炎凝血异常机制与中医血瘀证候

周 澧, 秦 川*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 新型冠状病毒肺炎(COVID-19)是由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的急性呼吸道传染病。新冠病毒已在全球范围内大流行,遍及全球200多个国家和地区。尽管肺炎是COVID-19的主要症状,研究发现将近20%的COVID-19患者会出现凝血功能异常,而几乎所有的重型和危重型患者均存在凝血功能紊乱。凝血功能异常和血栓形成成为COVID-19患者死亡的重要原因之一。对COVID-19与凝血功能关系的探讨,对临床治疗和基础研究有重要的指导价值,本文主要从凝血异常机制的角度对COVID-19与凝血异常进行综述,并结合中医血瘀理论进行分析,为中药用于新冠防治提供科学证据并对COVID-19凝血异常相关研究提供帮助。

【关键词】 新型冠状病毒肺炎;新冠病毒;凝血异常;血栓;血瘀

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0089-08

Coagulation dysfunction in coronavirus disease 2019 and blood stasis symptom of traditional Chinese medicine

ZHOU Li, QIN Chuan*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of the People's Republic of China, Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an acute respiratory infectious disease caused by infection with the novel coronavirus SARS-CoV-2, which has spread worldwide. Although pneumonia is the primary symptom of COVID-19, nearly 20% of patients and almost all severe and critical patients have an abnormal coagulation function. Coagulation dysfunction and thrombosis have emerged as major causes of death in COVID-19 patients. A detailed understanding of the relationship between COVID-19 and coagulation dysfunction deserves urgent exploration for clinical treatment and basic research. In this article, the mechanism of coagulation dysfunction in COVID-19 were reviewed on the basis of molecular mechanistic pathways and the theory of blood stasis in traditional Chinese medicine to provide scientific evidence for the application of traditional Chinese medicine and a reference for future studies of COVID-19-associated coagulopathy.

【Keywords】 COVID-19; SARS-CoV-2; Coagulation dysfunction; thrombosis; blood stasis

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-2-006)。

【作者简介】 周澧(1986—),男,助理研究员,研究方向:中医动物模型及中药药理机制。E-mail: zhouli@cnilas.org

【通信作者】 秦川(1959—),女,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型、神经退行性疾病、传染性疾。

E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

2020 年 1 月 30 日世界卫生组织宣布新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 为国际关注的突发公共卫生事件,之后在世界范围内大流行,成为百年一遇的全球性健康危机。截至目前,全球新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 感染累积确诊人数已达 2.3 亿,累计死亡人数超 4 百万。SARS-CoV-2 是一种高度传染性和致病性的冠状病毒,其主要致病机制是通过与血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 受体结合从而感染和破坏 II 型肺泡上皮细胞而引起呼吸道症状。进行性呼吸衰竭是 COVID-19 致死的主要原因,然而增加的证据表明,凝血功能障碍和血栓形成是 COVID-19 重症患者主要临床特征之一并与死亡风险密切相关。由于炎症、缺氧、血管内皮损伤等因素所致凝血系统异常,加上高龄、基础疾病 (如高血压病、肥胖症等)、卧床、留置深静脉导管等其他高危因素,使得 COVID-19 患者易出现深静脉血栓、肺栓塞、心肌梗死和脑梗死等血栓性并发症^[1]。大量尸检结果显示 COVID-19 病人肺内存在广泛的血栓形成并伴有内皮损伤、血管增生等微血管病变。COVID-19 病人的肺泡毛细血管血栓发生率是流感患者的 9 倍 ($P < 0.001$)^[2]。凝血异常和血栓形成主要发生于重症 COVID-19 患者,可引起肺栓塞、心梗、脑梗、休克、弥散性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulation, DIC)、多器官衰竭等严重并发症,与病情严重程度和致死率密切相关。COVID-19 的中医病机为“湿、热、毒、瘀、虚”,凝血异常归属于血瘀的范畴。本综述将围绕 COVID-19 患者凝血异常发生机制进行探讨并结合中医血瘀理论进行分析,为中药用于新冠防治提供科学证据并对临床干预和科研探索提供帮助。

1 COVID-19 病人凝血异常的机制

D-二聚体水平升高是 COVID-19 患者高凝状态最典型的表现,COVID-19 重症患者 D-二聚体水平和纤维蛋白降解产物 (fibrin degradation products, FDP) 显著高于轻症患者,并与患者死亡率显著相关^[1,3-5]。凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 和活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 在 COVID-19 患者中轻微延长或不变,但也有少部分患者 PT 和 APTT 缩短^[1]。血小板计数在大多数 COVID-19 患者中处于正常水平,而重症患者血小板减少症发生率增加,并与疾病严重程度和致死率相关^[6]。COVID-19 患者的凝血异常与

细菌性脓毒症所致凝血系统异常不同,后者的突出表现并非以 D-二聚体水平升高为主,而是以血小板减少和 PT 时间延长为重要特征,提示 COVID-19 相关凝血异常的独有特征^[7-8]。

目前认为新冠肺炎凝血功能紊乱可能与免疫炎症、内皮损伤和功能失调、血小板活化、ACE2 相关信号通路异常、组织缺氧等多因素相关。

1.1 免疫炎症

SARS-CoV-2 感染后可诱发宿主免疫反应,导致免疫细胞分泌大量促炎细胞因子,如 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、GM-CSF 等,引发炎症细胞因子风暴,触发巨噬细胞和中性粒细胞及血管内皮细胞表达组织因子,进而引发微血管血栓形成。与其他呼吸系统感染病毒相比,SARS-CoV-2 显示出 I 型和 III 型干扰素信号通路激活缺陷和更高的 IL-6 和趋化因子表达水平^[9]。尸检病理检查显示 COVID-19 病人肺组织炎症细胞浸润主要以单核巨噬细胞主,而淋巴细胞和浆细胞浸润相对少见,提示单核细胞可能是炎症因子的主要来源^[10]。在 SARS-CoV-2 感染过程中,干扰素信号缺陷导致抗病毒先天免疫应答异常而趋化因子表达持续升高,以单核细胞为主的非特异性免疫过度活化是 COVID-19 炎症风暴的重要原因。炎症和凝血系统之间具有紧密联系。一方面,TNF- α 和白介素等炎症因子可以诱导血细胞和内皮细胞组织因子的表达,抑制 TFPI 的活性,损伤内皮细胞,激活血小板,启动和增强凝血级联反应^[11]。另一方面,炎症因子还可促进血管壁白细胞粘附,影响微血管活性和微循环血流动力学,促进血栓形成。另外,炎症因子还可激活中性粒细胞释放中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs)。NETs 其独特的网状结构不仅可为血栓的形成提供支架,还可以通过黏附和激活血小板,激活凝血因子,抑制 TFPI 的活性,损伤内皮细胞,活化补体系统等多种机制促进血栓的形成^[12]。另外,病理染色显示在 COVID-19 病人肺及肺外组织血管部位存在补体系统的激活,提示补体系统激活在内皮损伤和凝血异常中的潜在作用^[13-16]。除此之外,抗磷脂抗体和狼疮抗凝物增加等自身免疫反应异常也可能与 COVID-19 凝血异常有关^[17]。

1.2 内皮细胞损伤和功能失调

血栓形成 3 要素包括凝血功能亢进、血管壁损伤和血流状态改变,其中血管内皮细胞损伤是血栓

发生的关键因素之一。病理检查显示, COVID-19 患者肺部存在广泛的血栓形成并伴有微血管内皮炎^[2,18]。除肺部血管外, 皮肤、心脏、脑、肝、小肠和肾等脏器也有报道存在微血管内皮损伤和血栓^[18-19]。内皮细胞表面糖萼结构的损伤导致正常内皮细胞抗凝性质丢失是内皮损伤导致凝血激活的重要原因。危重症 COVID-19 病人血浆中硫酸软骨素、Syndecan-1 和透明质酸水平的升高及肝素酶活性增加提示内皮细胞表面糖萼降解和丢失^[20-21]。Fernandez 等^[22]研究显示 COVID-19 病人血浆内皮损伤标记物 sVACM1、vWF、硫酸乙酰肝素水平与疾病严重程度显著相关; 同时与败血症休克病人相比血浆 $\alpha 2$ -抗纤溶酶和 ADAMTS13 活性相对较高。血管内皮表达 ACE2 蛋白, 一些研究结果显示 SARS-CoV-2 可直接感染内皮细胞导致内皮细胞损伤和激活^[2,18,23]。但是, 目前尚存在一定争议, 一些研究对内皮细胞 ACE2 的表达水平、病毒感染效率及检测到的病毒颗粒的可靠性提出了质疑^[24-26]。炎症损伤等间接因素可能是 COVID-19 病人血管内皮损伤和凝血增强的主要原因。血管内皮损伤可影响 NO、vWF、组织型纤溶酶原激活剂 (tissue-type plasminogen activator, tPA)、PAI1、TFPI、前列环素 PGI2、血栓调节蛋白等相关因子的表达, 导致血管收缩和通透性增加, 组织因子释放和胶原暴露, 促进血小板激活、粘附和聚集, 最终引起凝血异常和血栓风险^[27]。

1.3 血小板激活

Manne 等^[28]研究显示 COVID-19 住院病人血小板计数和平均血小板体积没有显著改变, 但血小板转录组测序结果显示蛋白泛素化、抗原呈递和线粒体功能失调等相关的基因表达谱存在明显改变。同时, COVID-19 病人血小板和中性粒细胞、单核细胞和 T 细胞的聚集均显著增加, P-选择素表达增加, 血小板活性和聚集能力显著增强并可显著增加单核细胞组织因子的表达^[28-29]。Zhang 等^[30]研究显示血小板表达 ACE2 和 TMPRSS2, SARS-CoV-2 病毒和 S 蛋白可以直接作用于血小板, 剂量依赖性的增强胶原、凝血酶或 ADP 诱导的血小板聚集。相反, Shen 等^[31]研究显示血小板不表达 ACE2 和 TMPRSS2, 但 SARS-CoV-2 可通过 ACE2 非依赖的方式直接作用于血小板, 增加 P 选择素的转位和糖蛋白 GPIV、血小板因子 PF4 和趋化因子 RANTES 的表达, 并可低效感染体外培养的血小板和巨核细

胞。Zaid 等^[32]研究显示血小板可能是 COVID-19 病人炎症因子水平升高的来源之一, 并发现血小板病毒 RNA 检测率与病人年龄密切相关。这些研究表明 SARS-CoV-2 可能通过 ACE2 或非 ACE2 依赖的方式与血小板发生作用, 促进血小板活化聚集和炎症因子的释放, 参与凝血异常和血栓形成。

1.4 ACE2 相关信号通路异常

ACE2 是 SARS-CoV-2 入侵细胞的受体, 同时也是 RAS 的重要组成部分。SARS-CoV-2 通过 ACE2 感染细胞后, 可通过 ADAM17 和 TMPRSS2 对 ACE2 进行剪切, 引起细胞表面 ACE2 蛋白表达降低, 可能导致 RAS 失衡引起机体损伤^[33-34]。Kuba 等^[35]研究发现除完整病毒体外, S 蛋白本身即可引起 ACE2 表达的下调, 并加重酸诱导的急性肺损伤而 AT1 受体抑制剂氯沙坦可消除 S 蛋白的效应。Lei 等^[36]研究显示气管内给与编码 S 蛋白的假病毒可导致肺泡隔增厚和单核细胞浸润, 伴随 ACE2 和磷酸化 ACE2 蛋白表达下调。Liu 等^[37]研究发现 COVID-19 病人血浆 Ang II 水平显著升高, 并与疾病严重程度及预后相关。Ang II 不仅可引起肺毛细血管收缩和通透性增加, 诱导内皮细胞和单核细胞组织因子和 PAI1 的表达影响凝血平衡, 而且可作为重要的促炎细胞因子激活 NF- κ B 和 ADAM17 导致 IL-6 信号的超活化, 加重炎症风暴和内皮损伤^[38-39]。

除 RAS 外, ACE2 还参与缓激肽信号通路调节, ACE2 可以降解 des-Arg9 缓激肽生成无活性代谢产物, 而抑制 ACE2 可增强 des-Arg9 缓激肽相关信号并加重 LPS 诱导的肺损伤和炎症反应^[40]。COVID-19 患者 ACE2 表达下调可能导致 des-Arg9 缓激肽的蓄积, 增强血管通透性和炎症反应从而促进肺损伤和凝血级联。缓激肽具有血管舒张作用。与常见 ARDS 不同, 研究显示 COVID-19 患者常出现肺血管的扩张, 可引起严重的肺通气/血流不匹配, 并可能导致肺微血栓的循环播散, 导致肺外器官微循环堵塞和系统性微血栓形成^[41-43]。

1.5 低氧及其他

COVID-19 病人因肺部病变可出现不同程度缺氧症状, 可促进凝血异常和血栓形成。Pilli 等^[44]研究显示低氧诱导的血栓风险与抗凝蛋白 S 下调, 抑制凝血因子 IXa 活性有关。Stoichitoiu 等^[45]研究显示 COVID-19 病人血浆抗凝蛋白 S 活性显著降低, 并与疾病严重程度及预后相关, 其机制可能与缺氧及白介素 6 相关炎症信号有关。低氧还可引起内皮

细胞损伤和活化,上调 Toll 样受体 TLR3 的表达,调节免疫炎症反应,增加中性粒细胞 NETs 的释放,降低血栓调节蛋白的活性,增加 PAI1 的表达及抑制纤溶系统等多种机制导致凝血紊乱^[46-49]。此外,COVID-19 病人发热、腹泻等症状造成体液丢失和血液浓缩以及卧床、活动减少、血管穿刺置管、机械通气治疗等临床特征均可导致血栓风险和凝血异常。

2 COVID-19 病人凝血异常与中医血瘀

2.1 COVID-19 病人中医病机

COVID-19 在中医中属于“疫病”范畴,其基本病机为:疫毒外侵,肺经受邪,正气亏虚,病机特点为“湿、热、毒、瘀、虚”,其传变规律符合中医温病学卫气营血的演变规律^[50-51]。其中 COVID-19 病人凝血异常属于中医血瘀范畴,热毒引起的微循环障碍是其主要原因,贯穿于气分、营分、血分等不同阶段。气分阶段主要是热毒袭肺过程,以发热、咳、喘为主要临床表现,热毒对应机体的免疫炎症应答过程,此阶段为微循环障碍早期,以白细胞黏附于血管壁及炎症因子释放为主;随着炎症细胞的浸润和炎症因子的释放,微血管通透性逐渐增加,血管活性发生改变,出现脉细、舌绛、神昏等表现进入营分阶段;热毒和免疫损伤持续,可导致微血管损伤加重和疫毒入血引起出血和凝血异常,热入血分,病变进入重症阶段^[52]。

2.2 COVID-19 与活血化瘀

COVID-19 病人凝血异常可归属于中医血瘀范畴。中医治疗血瘀证的药物根据作用程度可分为 3 大类:和血类药物,包括当归、丹皮、丹参、生地黄、赤芍、鸡血藤等以养血和血作用为主;活血类药物,包括川芎、蒲黄、红花、刘寄奴、五灵脂、郁金、三七、穿山甲、大黄、姜黄、益母草、泽兰、苏木、牛膝、延胡索、鬼箭羽、羽香、没药、蛭螭、王不留行、紫薇等以活血行血通瘀作用为主;破血类药物,包括水蛭、虻虫、三棱、莪术、血竭、桃仁、干膝、土鳖虫、蟅虫等以破血消癥攻坚作用为主。对《新型冠状病毒诊疗方案》中推荐中医药方进行分析,发现临床治疗 COVID-19 的中药方剂中涉及的活血化瘀类中药主要是和血活血类药物,包括赤芍(血必净、化湿败毒方、气营两燔方)、红花(血必净)、川芎(血必净)、丹参(血必净)、当归(血必净)、郁金(安宫牛黄丸、醒脑静)、生地黄(气营两燔方)、丹皮(气营两燔方)和大黄(化湿败毒方、莲花清瘟胶囊)等,主要用于病

入营分血分的重症和危重症阶段。其中,血必净注射液是活血化瘀法治疗 COVID-19 的典型方药,以血府逐瘀汤为基础研制而成,由红花、赤芍、川芎、丹参、当归等活血化瘀药组成,对 COVID-19 病人炎症风暴及凝血功能障碍具有遏制作用,可明显降低重症肺炎患者的死亡率^[53-54]。血必净具有拮抗内毒素、调节免疫反应、保护内皮细胞、改善微循环、纠正凝血功能紊乱等作用,对脓毒症等感染诱发的全身炎症反应综合征和多器官损伤具有良好疗效^[55-56]。

赤芍具有活血祛瘀、清热凉血的功效,研究表明赤芍提取液可明显抑制内源、外源凝血系统,抑制凝血酶活性,具有良好的抗凝和抗血栓作用,其机制与其降低血粘度,延长大鼠凝血酶原时间、部分凝血活酶时间以及降低血纤维蛋白原浓度,抑制血小板聚集有关^[57-58]。丹参为活血化瘀代表药物,具有改善微循环,抑制血小板聚集,抑制凝血,促进纤溶,保护血管内皮,扩张血管和改善血液流变学等多种药理作用^[59]。红花黄色素是红花的主要活性成分之一,药理研究表明其可通过抑制血小板的聚集与释放发挥抗凝血和抑制血栓形成的作用^[60]。阿魏酸是当归和川芎的有效成分之一,可抑制血小板血栓素和 5-HT 的释放,抑制血小板聚集和活化,延长凝血酶原时间,抑制血栓形成^[61]。川芎嗪是川芎的主要成分之一,具有扩张血管,保护内皮细胞,抗血小板聚集和血栓形成等作用^[62]。除直接抗凝作用外,活血化瘀类中药还多具有抗炎、抗氧化应激等作用,可抑制白细胞黏附和血管内皮损伤,参与凝血相关机制的调节。同时,与西医抗凝药相比,活血化瘀中药多具有多靶点和双向调节作用,如大黄、丹参、赤芍等都在抗凝的同时具有纤溶抑制作用,可有效防止过度纤溶反应和出血风险^[63]。

2.3 清热凉血与活血化瘀

中医血瘀证可分为气虚血瘀证、血虚血瘀证、气滞血瘀证、寒凝血瘀证、痰浊血瘀证、热毒血瘀证等 6 大类型,COVID-19 病人凝血异常可归为热毒血瘀证型,中医以清热解毒凉血活血为主要治法。清解热毒是治疗和预防热毒血瘀证的根本,可阻断或减轻产生淤血的原因而间接的起到治疗血瘀的作用。金花清感颗粒、连花清瘟颗粒、清肺排毒汤、化湿败毒方、宣肺败毒方以及喜炎平注射液、痰热清注射液和热毒宁注射液等 COVID-19 治疗方药均具有清热解毒之功效,可能通过免疫调节减轻炎症风

暴而改善或预防 COVID-19 病人出现热毒血瘀证候。伤寒论经典古方麻杏石甘汤,是金花清感颗粒、连花清瘟颗粒、清肺排毒汤、化湿败毒方、宣肺败毒方等 COVID-19 治疗方药的主要底方之一,研究显示其可显著清除 LPS 引起的肺微血管白细胞黏附,减轻小鼠肺组织炎症细胞浸润和肺微血管通透性的增加,提示减少炎症损伤和改善微循环是清热凉血方药的主要药理机制之一^[64]。网络药理学等研究显示多种 COVID-19 治疗方药的活性成分还可能与 ACE2 相互作用及具有潜在的直接抗病毒效应^[65-69]。

此外除免疫炎症引起的热毒血瘀外,COVID-19 病人还可损伤肺气,导致肺气亏虚,或痰液引流不畅,堵塞气道,致使肺气壅滞,而肺气不足则行血无力,可能出现气虚血瘀的表现。

在 COVID-19 凝血障碍过程中,热毒血瘀是其

主要表现,在病变早期进行清热解毒干预可有效调节免疫反应,减轻非特异性免疫损伤,阻断疾病向营分血分等重症阶段转化,而在重症和危重症阶段,应用血必净等活血化瘀类药物可有效改善微循环和凝血障碍,减轻全身炎症反应综合征和多器官功能衰竭,降低死亡率。同时,除清热凉血解毒化瘀外,在治疗过程中尚须辨证施治清肺、化湿、扶正、补气固脱、养阴生津等治法对 COVID-19 病人各种证候进行综合治疗以取得满意疗效。

目前,国内 COVID-19 病例较少,除一些网络药理学的理论分析外,关于中医治疗 COVID-19 凝血异常的实验研究存在欠缺。SARS-CoV-2 感染的实验动物如恒河猴、K18-hACE2 转基因小鼠和老年仓鼠等可出现肺微血栓、D-二聚体水平升高和凝血异常等表现^[70-72]。利用实验动物模型研究探讨中医活血化瘀药物对 COVID-19 凝血异常的预防和治疗

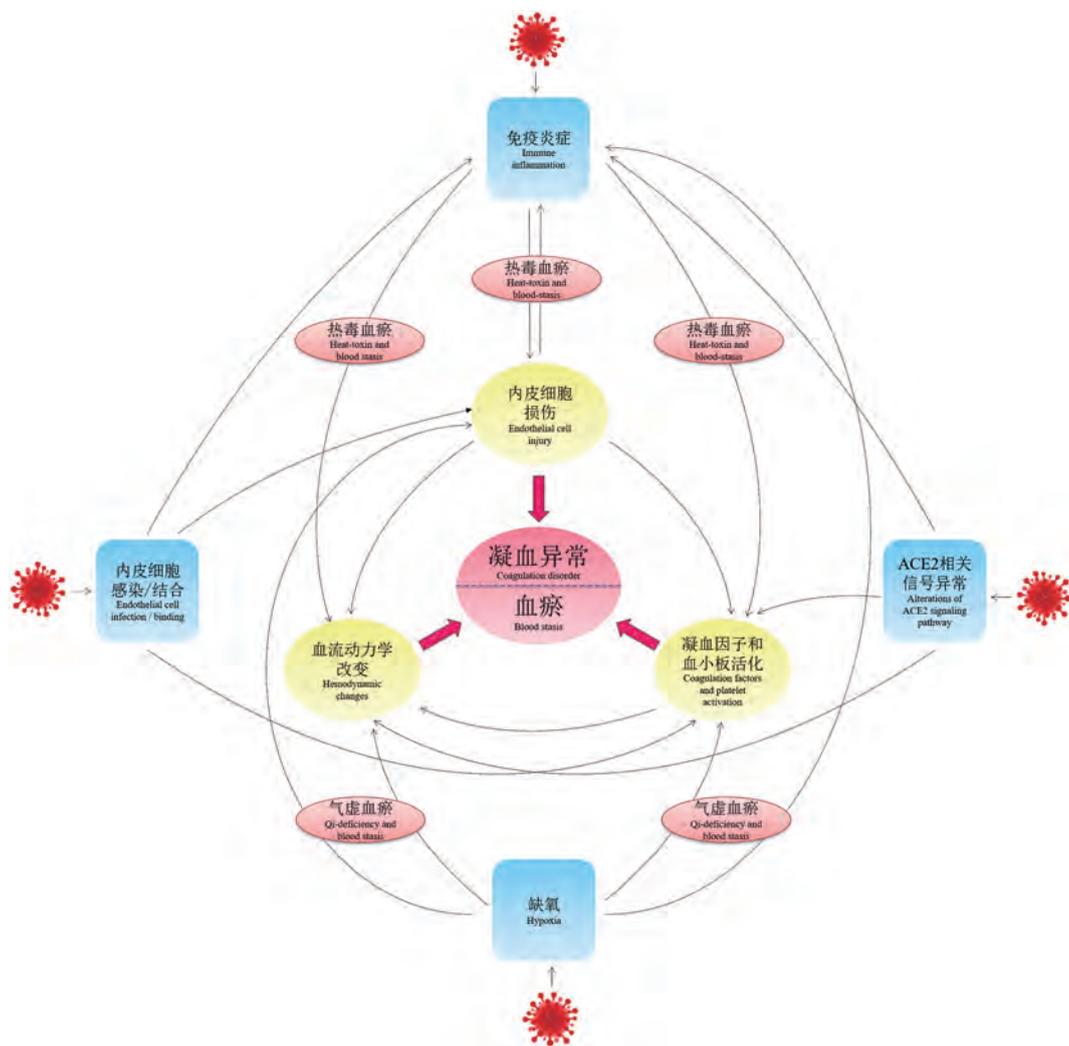


图 1 COVID-19 凝血异常机制

Figure 1 Mechanism of coagulation dysfunction in COVID-19

作用,明确其作用机制是中医药现代化和推广的现实需要,值得进一步深入研究。

3 结论

COVID-19 病人尤其是重症 COVID-19 病人出现明显的凝血异常和血栓风险是 COVID-19 病人病情恶化、多器官衰竭和死亡的重要原因。免疫炎症、缺氧、补体活化、血管紧张素系统失衡、内皮损伤和血小板活化等多种机制相互作用共同导致机体凝血和纤溶系统功能紊乱,见图 1。其中免疫炎症可能是 COVID-19 病人或其他感染性疾病患者出现凝血异常的关键原因和中心环节,SARS-CoV-2 感染后独特的免疫特征产生的炎症因子和趋化因子与凝血系统的相互作用加上 SARS-CoV-2 病毒或 S 蛋白对内皮损伤和 ACE2 相关信号通路的直接影响以及缺氧、机械通气、静卧和活动减少等因素的共同作用最终导致了 COVID-19 病人的凝血异常和血栓风险。在中医诊治中,热毒血瘀是 COVID-19 凝血异常的主要病机,在治疗过程中运用清热凉血解毒药物预防和阻断病程向热毒血瘀发展,在治疗早期积极干预,尽早加入活血化瘀药物,将有助于降低 COVID-19 病人凝血异常和血栓风险,减少重症转化率及死亡率。与西医相比,中医药治疗具有多靶点治疗优势,可能在免疫炎症、凝血系统和内皮保护等多方面发挥作用,进一步深入研究中医药防治 COVID-19 凝血异常的药理机制,将有助于提高 COVID-19 及凝血异常的临床疗效并加速中医药的发展和推广。

参考文献:

- [1] Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation [J]. *Blood*, 2020, 135(23): 2033-2040.
- [2] Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(2): 120-128.
- [3] 孙昀, 孙伟, 叶珺, 等. 168 例新型冠状病毒肺炎患者临床特点及重症进展的影响因素分析 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2020, 29(7): 901-907.
- [4] Arachchillage DRJ, Laffan M. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia [J]. *J Thromb Haemost*, 2020, 18(5): 1233-1234.
- [5] Zhang L, Yan X, Fan Q, et al. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19 [J]. *J Thromb Haemost*, 2020, 18(6): 1324-1329.
- [6] Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 506: 145-148.
- [7] Rahi MS, Jindal V, Reyes SP, et al. Hematologic disorders associated with COVID-19: a review [J]. *Ann Hematol*, 2021, 100(2): 309-320.
- [8] 季赞, 李立斌. 加强对新型冠状病毒肺炎相关性凝血病的认识 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2021, 30(3): 261-264.
- [9] Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19 [J]. *Cell*, 2020, 181(5): 1036-1045.
- [10] 姚小红, 李廷源, 何志承, 等. 新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 三例遗体多部位穿刺组织病理学研究 [J]. *中华病理学杂志*, 2020, 49(5): 411-417.
- [11] Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2016, 26(4): 297-303.
- [12] Blanch-Ruiz MA, Ortega-Luna R, Martinez-Cuesta MA, et al. The neutrophil secretome as a crucial link between inflammation and thrombosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4170.
- [13] Pfister F, Vonbrunn E, Ries T, et al. Complement activation in kidneys of patients with COVID-19 [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 594849.
- [14] Magro C, Mulvey JJ, Berlin D, et al. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases [J]. *Transl Res*, 2020, 220: 1-13.
- [15] Carvelli J, Demaria O, Vely F, et al. Association of COVID-19 inflammation with activation of the C5a-C5aR1 axis [J]. *Nature*, 2020, 588(7836): 146-150.
- [16] Paniz-Mondolfi A, Bryce C, Grimes Z, et al. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(7): 699-702.
- [17] Foret T, Dufrost V, du Mont LS, et al. Systematic review of antiphospholipid antibodies in Covid-19 patients: culprits or bystanders? [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2021, 23(8): 65.
- [18] Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19 [J]. *Lancet*, 2020, 395(10234): 1417-1418.
- [19] Magro CM, Mulvey J, Kubiak J, et al. Severe COVID-19: A multifaceted viral vasculopathy syndrome [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2021, 50: 151645.
- [20] Fraser DD, Patterson EK, Slessarev M, et al. Endothelial injury and glycocalyx degradation in critically ill coronavirus disease 2019 patients: implications for microvascular platelet aggregation [J]. *Crit Care Explor*, 2020, 2(9): 194.
- [21] Buijssers B, Yanginlar C, de Nooijer A, et al. Increased plasma heparanase activity in COVID-19 patients [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 575047.
- [22] Fernandez S, Moreno-Castano AB, Palomo M, et al. Distinctive biomarker features in the endotheliopathy of COVID-19 and septic

- syndromes [J]. Shock, 2021, 57(1): 95-105.
- [23] Bhatnagar J, Gary J, Reagan-Steiner S, et al. Evidence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 replication and tropism in the lungs, airways, and vascular endothelium of patients with fatal coronavirus disease 2019: an autopsy case series [J]. J Infect Dis, 2021, 223(5): 752-764.
- [24] Nicosia RF, Ligresti G, Caporarello N, et al. COVID-19 vasculopathy: mounting evidence for an indirect mechanism of endothelial injury [J]. Am J Pathol, 2021, 191(8): 1374-1384.
- [25] Dittmayer C, Meinhardt J, Radbruch H, et al. Why misinterpretation of electron micrographs in SARS-CoV-2-infected tissue goes viral [J]. Lancet, 2020, 396(10260): e64-e65.
- [26] McCracken IR, Saginc G, He L, et al. Lack of evidence of angiotensin-converting enzyme 2 expression and replicative infection by SARS-CoV-2 in human endothelial cells [J]. Circulation, 2021, 143(8): 865-868.
- [27] Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation [EB/OL]. (2021-02-24) [2021-05-20]. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00441-021-03471-2>.
- [28] Manne BK, Denorme F, Middleton EA, et al. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19 [J]. Blood, 2020, 136(11): 1317-1329.
- [29] Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19 [J]. Blood, 2020, 136(11): 1330-1341.
- [30] Zhang S, Liu Y, Wang X, et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19 [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 120.
- [31] Shen S, Zhang J, Fang Y, et al. SARS-CoV-2 interacts with platelets and megakaryocytes via ACE2-independent mechanism [J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 72.
- [32] Zaid Y, Puhm F, Allaey S, et al. Platelets can associate with SARS-CoV-2 RNA and are hyperactivated in COVID-19 [J]. Circ Res, 2020, 127(11): 1404-1418.
- [33] Zipeto D, Palmeira JDF, Arganaraz GA, et al. ACE2/ADAM17/TMPRSS2 interplay may be the main risk factor for COVID-19 [J]. Front Immunol, 2020, 11: 576745.
- [34] 方奕鹏, 郭喆, 柴彦, 等. 2019 新型冠状病毒和肾素-血管紧张素系统失衡与新型冠状病毒肺炎 [J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(5): 613-617.
- [35] Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury [J]. Nat Med, 2005, 11(8): 875-879.
- [36] Lei Y, Zhang J, Schiavon CR, et al. SARS-CoV-2 spike protein impairs endothelial function via downregulation of ACE 2 [J]. Circ Res, 2021, 128(9): 1323-1326.
- [37] Liu Y, Yang Y, Zhang C, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury [J]. Sci China Life Sci, 2020, 63(3): 364-374.
- [38] Miesbach W. Pathological role of angiotensin II in severe COVID-19 [J]. TH Open, 2020, 4(2): e138-e144.
- [39] Hirano T, Murakami M. COVID-19: a new virus, but a familiar receptor and cytokine release syndrome [J]. Immunity, 2020, 52(5): 731-733.
- [40] Sodhi CP, Wohlford-Lenane C, Yamaguchi Y, et al. Attenuation of pulmonary ACE2 activity impairs inactivation of des-Arg(9) bradykinin/BKB1R axis and facilitates LPS-induced neutrophil infiltration [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018, 314(1): L17-L31.
- [41] Reynolds AS, Lee AG, Renz J, et al. Pulmonary vascular dilatation detected by automated transcranial doppler in COVID-19 pneumonia [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2020, 202(7): 1037-1039.
- [42] Lang M, Som A, Mendoza DP, et al. Hypoxaemia related to COVID-19: vascular and perfusion abnormalities on dual-energy CT [J]. Lancet Infect Dis, 2020, 20(12): 1365-1366.
- [43] McGonagle D, Bridgewood C, Ramanan AV, et al. COVID-19 vasculitis and novel vasculitis mimics [J]. Lancet Rheumatol, 2021, 3(3): e224-e233.
- [44] Pilli VS, Datta A, Afreen S, et al. Hypoxia downregulates protein S expression [J]. Blood, 2018, 132(4): 452-455.
- [45] Stoichitoiu LE, Pinte L, Balea MI, et al. Anticoagulant protein S in COVID-19: low activity, and associated with outcome [J]. Rom J Intern Med, 2020, 58(4): 251-258.
- [46] Evans CE. Hypoxia and HIF activation as a possible link between sepsis and thrombosis [J]. Thromb J, 2019, 17: 16.
- [47] Walton HL, Corjay MH, Mohamed SN, et al. Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors $\alpha_{v\beta_3}$ and $\alpha_{v\beta_5}$ in cultured human endothelial cells [J]. J Cell Biochem, 2000, 78(4): 674-80.
- [48] Liao H, Hyman MC, Lawrence DA, et al. Molecular regulation of the PAI-1 gene by hypoxia: contributions of Egr-1, HIF-1 α , and C/EBP α [J]. FASEB J, 2007, 21(3): 935-949.
- [49] McInturf AM, Cody MJ, Elliott EA, et al. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 α [J]. Blood, 2012, 120(15): 3118-3125.
- [50] 李晓宇, 谢立科, 郝晓凤, 等. 中医药诊治新型冠状病毒肺炎研究进展 [J]. 世界中医药, 2020, 15(3): 320-324.
- [51] 中国中西医结合急救医学专业委员会, 《中国中西医结合急救杂志》编辑委员会. 中医“三证三法”诊治新型冠状病毒肺炎专家意见 [J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(6): 641-645.
- [52] 刘博通, 李泉, 韩晶岩. 微血管屏障损伤引起的微血管渗漏及中医固摄理论和方药的机理 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(9): 1679-1692.
- [53] Luo Z, Chen W, Xiang M, et al. The preventive effect of Xuebijing injection against cytokine storm for severe patients with COVID-19: A prospective randomized controlled trial [J]. Eur J Integr Med, 2021, 42: 101305.
- [54] Song Y, Yao C, Yao Y, et al. XueBijing Injection versus

- placebo for critically ill patients with severe community-acquired pneumonia; a randomized controlled trial [J]. *Crit Care Med*, 2019, 47(9): e735-e743.
- [55] 荆珊珊, 陈小侗, 刘姿, 等. 血必净治疗重症肺炎作用机制研究进展 [J]. *中国现代药物应用*, 2017, 5: 193-194.
- [56] Xie S, Yan P, Yao C, et al. Efficacy and safety of Xuebijing injection and its influence on immunomodulation in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2019, 20(1): 136.
- [57] 王玉琴, 马立显. 赤芍对血液凝固纤溶系统酶活性的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1990, 2: 102-107.
- [58] 邱灿华, 陈健文, 蓝秀健, 等. 赤芍总苷抗血栓作用的研究 [J]. *热带医学杂志*, 2007, 7(11): 43-45, 57.
- [59] 董宠凯, 马丙祥, 王怡珍. 丹参注射液改善血流变学及凝血功能的实验研究进展 [J]. *河南中医*, 2016, 36(2): 355-357.
- [60] 刁丽, 苏素文, 赵敏, 等. 红花黄色素抗血栓作用研究进展 [J]. *海峡药学*, 2017, 29(7): 124-126.
- [61] 张欣, 高增平. 阿魏酸的研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2020, 22(1): 138-147.
- [62] 高宗桂, 梁淑梅. 川芎嗪在心脑血管方面的药理作用与研究进展 [J]. *台湾中医科学杂志*, 2011, 5(2): 58-68.
- [63] 谢文光, 魏钰书, 王会信, 等. 活血化痰中药的纤溶和纤溶抑制作用 [J]. *中国医药学报*, 1996, 6: 18-21.
- [64] Ma LQ, Pan CS, Yang N, et al. Posttreatment with Ma-Xing-Shi-Gan-Tang, a Chinese medicine formula, ameliorates lipopolysaccharide-induced lung microvessel hyperpermeability and inflammatory reaction in rat [J]. *Microcirculation*, 2014, 21(7): 649-663.
- [65] 郑雅, 刘志强, 朱晓芹, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨血必净注射液治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的作用机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(7): 57-64.
- [66] 王法财, 沈炳香, 何春远, 等. 连花清瘟颗粒对新型冠状病毒肺炎的临床疗效及其机制的网络药理学研究 [J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(2): 93-101.
- [67] 赵静, 田赛赛, 杨健, 等. 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制的网络药理学探讨 [J]. *中草药*, 2020, 51(4): 829-835.
- [68] 王毅, 李翔, 张俊华, 等. 基于网络药理学的宣肺败毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(10): 2249-2256.
- [69] 宋红新, 王汉, 马旭冉, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的化湿败毒方抗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的潜在机制研究 [J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(23): 1761-1769.
- [70] Aid M, Busman-Sahay K, Vidal SJ, et al. Vascular disease and thrombosis in SARS-CoV-2-infected rhesus macaques [J]. *Cell*, 2020, 183(5): 1354-1366.
- [71] Ohno M, Sasaki M, Orba Y, et al. Abnormal blood coagulation and kidney damage in aged hamsters infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [J]. *Viruses*, 2021, 13(11): 2137.
- [72] Winkler ES, Bailey AL, Kafai NM, et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(11): 1327-1335.

[收稿日期]2021-12-06

(上接第 74 页)

- [17] Olivares-Urbano MA, Griñán-Lisón C, Marchal JA, et al. CSC radioresistance; A therapeutic challenge to improve radiotherapy effectiveness in cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1651.
- [18] Zhao D, Wang S, Chu X, et al. LncRNA HIF2PUT inhibited osteosarcoma stem cells proliferation, migration and invasion by regulating HIF2 expression [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1342-1348.
- [19] Park JH, Kim YH, Shim S, et al. Radiation-activated PI3K/AKT pathway promotes the induction of cancer stem-like cells via the upregulation of SOX2 in colorectal cancer [J]. *Cells*, 2021, 10(1): 135.
- [20] Fan Z, Qin J, Wang D, et al. Complement C3a promotes proliferation, migration and stemness in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3097-3107.
- [21] Vella V, Nicolosi ML, Cantafio P, et al. DDR1 regulates thyroid cancer cell differentiation via IGF-2/IR-A autocrine signaling loop [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2019, 26(1): 197-214.

[收稿日期]2021-03-26

魏媛媛, 张艳楠, 樊艺萌, 等. 中兽药创新研发与实验动物模型应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 97-103.

Wei YY, Zhang YN, Fan YM, et al. Innovative research and development of Chinese veterinary drugs and application of experimental animal models [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 97-103.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.013

中兽药创新研发与实验动物模型应用

魏媛媛¹, 张艳楠¹, 樊艺萌¹, 袁玉¹, 王惠茹¹, 韩俊成², 郝智慧^{1*}

(1. 中国农业大学 动物医学院 中兽药创新中心, 北京 100081; 2. 新疆农业大学 动物医学院, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 动物与人类健康息息相关, 中兽药在健康养殖、动物性食品安全中扮演重要的角色, 我国应用中兽药防病治病、提高机体免疫力有数千年的历史, 近年来随着标准化、规模化健康养殖发展和动物性食品安全的需要, 需要在传统应用经验的基础上结合现代养殖需要研发创新中兽药, 更好的服务动物健康、保障人类健康。在现代中兽药的研究过程中, 实验动物模型在开发新型中兽药和有效性、安全性以及作用机理等方面有着巨大的贡献, 现已被广泛的应用于研究中兽药的相关研究中, 基于这样的一个背景下, 本文围绕中兽药创新研发的实验动物应用研究进展展开综述。

【关键词】 动物模型; 中兽药; 创新研发; 实验动物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0097-07

Innovative research and development of Chinese veterinary drugs and application of experimental animal models

WEI Yuanyuan¹, ZHANG Yannan¹, FAN Yimeng¹, GA Yu¹, WANG Huiru¹, HAN Juncheng², HAO Zhihui^{1*}

(1. China Agricultural University, School of Animal Medicine, Chinese Veterinary Medicine Innovation Center, Beijing 100081, China. 2. Xinjiang Agricultural University, College of Animal Medicine, Wulumuqi 830000)

【Abstract】 Animals are closely related to human health. Chinese veterinary medicine plays an important role in healthy breeding and animal food safety. Veterinary medicine has been used in China for thousands of years to prevent and treat diseases and improve immunity. With the recent development of standardized, large-scale healthy breeding and the needs of animal food safety, combined with the needs of modern breeding, we need to develop innovative Chinese veterinary medicine to better serve animal health and protect human health on the basis of traditional application experience. In the research process of modern Chinese veterinary medicine, experimental animal models have made great contributions to the development of new Chinese veterinary drugs and their effectiveness, safety and action mechanism. They have been widely used in the research of Chinese veterinary medicine. So, we summarized and discussed the development of experimental animals for innovative research and development of Chinese veterinary medicine.

【Keywords】 animal model; Chinese veterinary medicine; innovation; experimental animal

中兽药在动物保健、食品安全、公共卫生安全等方面起着重要作用。应用中兽药防治动物疾病保障动物健康已有两千年的历史, 随着当前规模化、标准化健康养殖的快速发展和人们生活水平的提高, 与人类健康密切相关的兽医公共卫生安全问

题的凸显, 其所关注的减少动物源细菌耐药、保障动物源性食品安全、防控动物疫病都需要更好的发挥中兽药的作用。如今, 国内外越来越多的人开始认识、研究和应用中兽药^[1]。而实验动物在中兽药的创新研究尤其是现代中兽药的研究中扮演着重

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(32172897); 中央本级重大增減支项目(名贵中药资源可持续利用能力建设项目(2060302))。

【作者简介】 魏媛媛(1994—), 女, 博士研究生, 研究方向: 中兽药药理相关研究。E-mail: vyyhebeia@163.com

【通信作者】 郝智慧(1980—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中兽药创新及机理研究。E-mail: haozhihui@cau.edu.cn

要的作用。实验动物应用于中药研究已有两千多年的历史,早在公元前《国语》中就有用狗来验乌头毒性的记载^[2-3]。纵观中医药实验动物认知和使用的发展历程,先后经历了古代时期的学科萌芽阶段、随着现代科学实验方法体系的建立与发展的方法探索阶段、随着现代科学实验方法的融入、中医药特色实验动物方法建立的理论总结阶段以及中医药实验动物模型建立为标志的广泛应用阶段这 4 个阶段^[4]。综上,建立中兽药相关的动物模型对中兽药作用机制等相关问题的系统研究至关重要。下面本文将就中兽药创新研发中相关动物模型的发展与用途做一综述。

1 中兽药发展历史

中兽药起源,应追溯到一万年以前的原始社会,人们把野生动物驯化成家畜后,便逐渐将“神农”尝百草治疗人病的经验,引用于家畜。唐代《司牧安骥集》卷二记载:“昔神农皇帝,创制药草八百余种,留传人间,救疗马病”,这是兽医古籍中有关兽医中药起源的最早记载。兽医中药方剂的发展,是随着人医中药方剂不断积累而发展,在先秦时期很多古籍如《周礼》、《诗经》、《山海经》均有人畜通用药物记载,如《山海经》就记载了 120 多种,如“流赭(代赭石)以涂牛马无病”等。《神农本草经》初步奠定了人医中药和兽医中药(学)的理论基础,有“牛扁,杀牛虱小虫,又疗牛病”、“柳叶,主马疥痂疮”、“桐花,主付猪疮”等兽医用药的明确记载^[4];《流沙坠简》和《居延汉简》有十几篇记载着治马牛病的医方,并已有了汤剂、膏剂和丸剂应用。随着中国兽药典的颁布,中兽药材与人用药真是分离开来,并对其靶动物及使用剂量有了明确规定。

2 中兽药产品研发现状

基于中兽药在动物疾病防治方面的有效性、应用前景与需求,新中兽药研发也在加快推进中。近十年来获批的中兽药用于防病治病已有百余种。基于中兽药在动物促生长、保健方面的可行性和有效性,可在饲料中长期添加使用的中兽药近年来也有获批,有单方类和复方类,如博落回提取物、山花黄芩提取物散、女贞子提取物散、裸花紫珠末等。

通过对 2011 年到 2020 年这 10 年间中国农业农村部获批的中兽药产品分析可以发现,中兽药产品的研发获批数量从 2011 年到 2016 年呈上升趋势,

其中 2016 年获批产品数最多,有 15 项,从 2016 年到 2018 年获批中兽药产品数量略有下降,而在 2019 年到 2020 年期间,中兽药产品数量有上升趋势。在这 10 年间,获批的中兽药产品数量是曲折而上升的趋势(图 1)。

2011 年到 2020 年间获批的中兽药产品用于提高动物免疫力的产品最多,有 28 种,占总产品数 25.93%,其次是治疗鸡大肠杆菌病,有 12 种,占比 11.11%;仔猪白痢病 8 种,占比 7.41%(图 2)。对这期间获批的 108 种中兽药产品的中药组成进行分析,发现黄芪使用最为频繁,出现频次 27 次,占比 25%,其次分别是黄芩(20, 18.52%)、板蓝根(15, 13.89%)、黄连(14, 12.96%)、甘草(13, 12.04%),均高于平均频次(12.8)水平(图 3)。可见,目前中兽药研发中,补气类和清热类中药较常作为研发对象。

3 中兽药创新研发中常用实验动物

实验动物主要用于急性毒性实验和长期毒性实验,也有极少部分的新药开发过程中将实验动物用于药效学实验和药理学实验^[5]。为了解近年来中兽药创新研究中实验动物模型的应用情况,笔者分别以近 20 年农业农村部获批中兽药名称为关键词在中国知网(CNKI)进行检索,共检索到 358 篇文献,排除靶动物及药学相关研究,从中得到与实验动物相关的 47 篇有效文献。从检索结果来看,新中兽药新药研发过程中最常用的试验动物为小鼠和大鼠,此外,比格犬、家兔、SPF 鸡和猫也有少数的使用。

3.1 小鼠

啮齿类动物是新兽药研发过程中毒性实验的首选实验动物,这其中小鼠因其性状稳定,且价格便宜,被广泛应用^[6]。几乎所有中兽药新药研发的急性毒性实验均是使用小鼠完成^[7-16],部分中兽药新药也用其进行长期慢性毒性实验,但由于其寿命较短的原因,在慢性毒性实验中的应用不如大鼠广泛。此外,小鼠还被应用于胃肠蠕动实验、腹泻实验、抗炎实验和镇痛实验等多种药效学和药理学的实验中^[11,14,17-25]。具有代表性的应用见表 1。

3.2 大鼠

大鼠作为啮齿科类的实验动物,因为其体型合适,给药容易,采样方便,广泛用于中兽药的新药开发过程中的安全性评价研究,以及药效和药理学研究^[29]。而与小鼠不同的是大鼠价格较贵,但是寿命

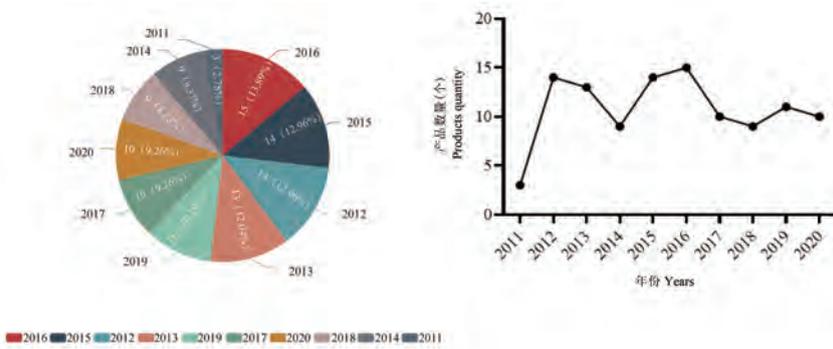


图 1 2011~2020 年中国农业农村部获批中兽药品种的时间分布统计结果

Figure 1 Statistical results of time distribution of veterinary drug varieties approved by the ministry of agriculture and rural areas of China from 2011 to 2020

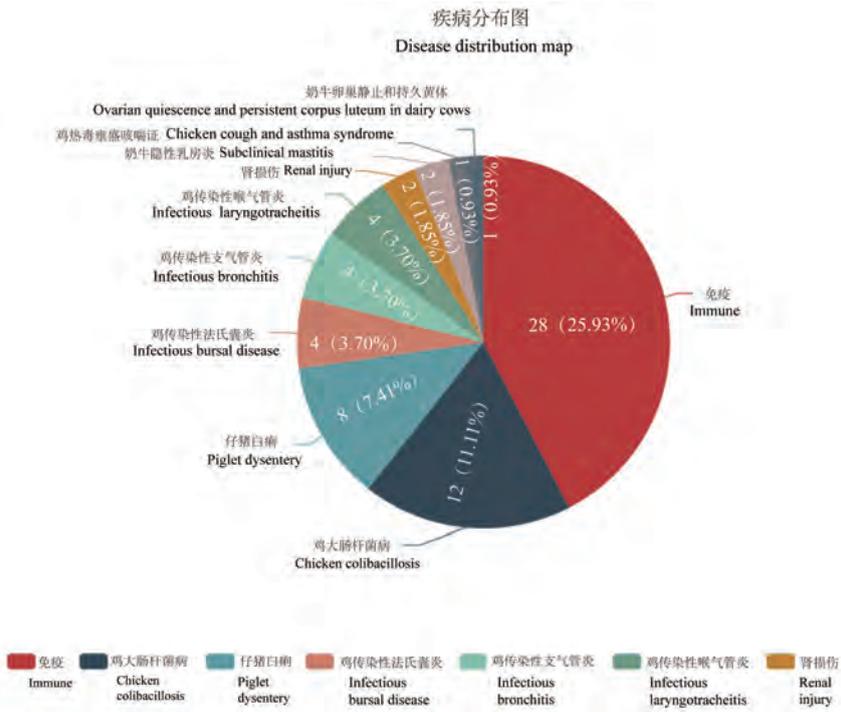


图 2 2011~2020 年中国农业农村部获批新兽药品种用途分布前 10 名统计结果

Figure 2 Top 10 statistical results of application distribution of new veterinary drug varieties approved by the Ministry of agriculture and rural areas of China from 2011 to 2020

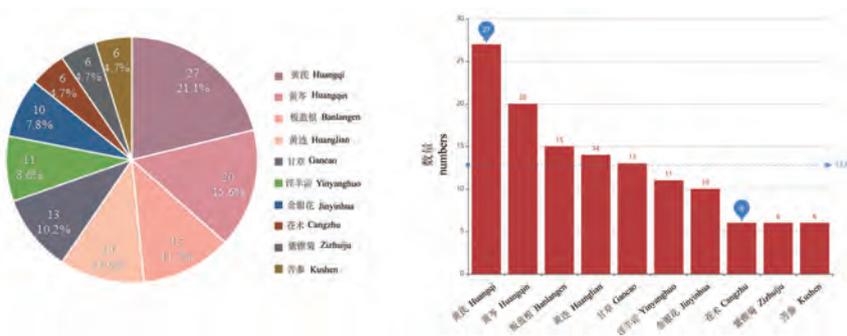


图 3 2011~2020 年中国农业农村部获批新兽药品种中药分布前 10 名统计结果

Figure 3 Top 10 statistical results of traditional Chinese medicine distribution of new veterinary drugs approved by the Ministry of agriculture and rural areas of China from 2011 to 2020

比小鼠长的多,因此,更多的适合用于长期的慢性实验和解热镇痛等相关药效学实验。具有代表性毒性实验研究。同样,大鼠也被用于抗炎抗菌药理的应用见表 2。

表 1 实验动物小鼠在新兽药研发中的应用情况

Table 1 Application of experimental animals and mice in the research and development of new veterinary drugs

新兽药 New veterinary medicine	实验动物用途 Purpose of laboratory animals	参考文献 References
苦参苍术口服液 Kushen cangzhu oral liquid	急性毒性实验 Acute toxicity test	[7]
苦参苍术口服液 Kushen Cangzhu oral liquid	长期毒性实验 Long term toxicity test	[8]
紫锥菊 Zizhujiu (<i>Echinacea</i>)	急性毒性实验 Acute toxicity test	[9]
益蒲灌注液 Yipu perfusion fluid	急性毒性实验 Acute toxicity test	[10]
白头翁颗粒 Baitouweng granules	急性毒性实验, 抗炎和抗腹泻药理实验 Acute toxicity test, anti inflammatory and anti diarrhea pharmacological test	[11]
按薄溶液 Anbo solution	急性毒性实验 Acute toxicity test	[12]
射干地龙颗粒 Shegan Dilong granules	急性毒性实验 Acute toxicity test	[13]
苦参止痢颗粒 Kushenzhixie granules	胃肠蠕动实验、腹泻实验、抗炎实验和镇痛实验 Gastrointestinal peristalsis test, diarrhea test, anti inflammatory test and analgesic test	[14]
苍朴口服液 Cangpu oral liquid	腹泻实验, 急性毒性实验 Diarrhea test, acute toxicity test	[15]
蒲地蓝消炎颗粒 Pudilanxiaoyan granules	急性毒性实验 Acute toxicity test	[16]
藿芪灌注液 Huoqi perfusion liquid	生殖机能药效学实验 Reproductive function pharmacodynamics test	[17]
鱼腥草苈蓝口服液 Yuxingcaoqinlan oral liquid	急性毒性实验 Acute toxicity test	[18]
博落回 Boluohui (<i>Macleaya cordata</i>)	肠道菌群和血液指标的影响, 腹泻模型代谢物 Effects of intestinal flora and blood indicators, diarrhea model metabolites	[19-20]
裸花紫珠 Luohuazizhu	耳肿胀度实验抗炎作用 Anti inflammatory effect of ear swelling test	[21]
黄芩注射液 Huangqin injection	对小鼠腹腔注射毒素 SLT-IIe 建立水肿病模型的治疗作用 Therapeutic effect of intraperitoneal injection of toxin SLT-IIe on edema disease model in mice	[22]
双葛止泻口服液 Shuanggezhiexie oral liquid	抗炎止泻药效学研究 Study on pharmacodynamics of anti inflammation and antidiarrheal	[23]
乌锦颗粒剂 Wujin granules	急性毒性实验 Acute toxicity test	[24]
肿节风三清颗粒 Zhongjiefengsanqing granules	急性毒性, 抗炎和抗哮喘实验 Acute toxicity test	[25-26]
金香颗粒 Jinxiang granules	小鼠大肠杆菌性腹泻 <i>Escherichia coli</i> diarrhea in mice	[27]
银黄二陈合剂 Yinhuangergen oral liquid	解热止咳祛痰作用 Antipyretic cough expectorant effect	[28]

3.3 其他

除了啮齿类实验动物在中兽药新药研发中广泛应用,其他实验动物也可用于兽药研发过程中,但因为其价格比较昂贵,且遗传稳定比较差而受到限制。不过也有少数中兽药研发过程中用到了其

他实验动物,例如,比格犬,猫等就被用于呼吸系统和心血管系统毒性实验,以及部分药代动力学实验^[45-47];而家兔也可用于药代动力学的研究^[48]。此外,SPF 鸡和 SPF 猪可作为实验动物用于各种禽病和猪病的造模实验中^[49-53],其具体情况见表 3。

表 2 实验动物大鼠在新兽药研发中的应用情况

Table 2 Application of experimental animals and rats in the research and development of new veterinary drugs

新兽药 New veterinary medicine	实验动物用途 Purpose of laboratory animals	参考文献 References
紫锥菊 Zizhujiu (<i>Echinacea</i>)	长期毒性实验,胚胎毒性 Long term toxicity test, embryotoxicity	[30]
人参叶口服液 Renshenye oral liquid	亚慢性毒性实验 Subchronic toxicity test	[31]
益蒲灌注液 Yipu perfusion fluid	长期毒性实验 Long term toxicity test	[10]
党参多糖口服液 Codonopsis pilosula polysaccharide oral liquid	长期毒性实验 Long term toxicity test	[32]
地锦草颗粒 Dijincao granules	亚急性毒性实验 Subacute toxicity test	[33]
夏枯草注射液 Xikucuo injection	长期毒性实验,抗炎抗菌药理实验 Long term toxicity test, anti inflammatory antibacterial pharmacological test	[34-35]
芪草乳康颗粒 Qicao rukang granules	抗炎药效学实验 Anti inflammatory pharmacodynamics test	[36]
桉薄溶液 Anbo solution	长期毒性实验 Long term toxicity test	[12]
五加芪粉 Wujiaqi powder	长期毒性实验 Long term toxicity test	[37]
苍朴口服液 Cangpu oral liquid	长期毒性实验 Long term toxicity test	[15]
蒲地蓝消炎颗粒 Pudilanxiaoyan granules	长期毒性实验 Long term toxicity test	[16]
鱼腥草苈蓝口服液 Yuxingcaoqinlan oral liquid	长期毒性实验,解热药效学实验 Long term toxicity test, antipyretic pharmacodynamic test	[38]
茯苓多糖散 Fuling polysaccharide powder	长期毒性实验 Long term toxicity test	[39]
博落回 Boluohui (<i>Macleaya cordata</i>)	药物代谢动力学实验,胎鼠的毒性实验 Pharmacokinetics test, toxicity test of fetal rats	[40-41]
裸花紫珠 Luohuazizhu	长期毒性实验 Long term toxicity test	[21]
乌锦颗粒剂 Wujin granules	亚慢性毒性 Subchronic toxicity test	[42]
肿节风三清颗粒 Zhongjiefengsanqing granules	亚慢性毒性实验 抗炎和平喘作用 Subchronic toxicity test, anti inflammatory and anti asthmatic effects	[43]
柴黄口服液 Chaihuang oral liquid	长期毒性实验 Long term toxicity test	[44]
银黄二陈合剂 Yinhuangerchen oral liquid	二甲苯建立炎症模型抗炎作用 Establishment of inflammatory model and anti inflammatory effect of xylene	[28]

表 3 其他实验动物在新兽药研发中的应用情况

Table 3 Application of other experimental animals in the research and development of new veterinary drugs

实验动物 Laboratory animal	中兽药 New veterinary medicine	实验动物用途 Laboratory animal use	参考文献 Reference
比格犬 Beagle dogs	紫锥菊 Zizhujie (<i>Echinacea</i>)	呼吸系统和心血管系统毒性实验 Respiratory and cardiovascular toxicity test	[45]
猫 Cat	紫锥菊 Zizhujie (<i>Echinacea</i>)	呼吸系统和心血管系统毒性实验 Respiratory and cardiovascular toxicity test	[46]
家兔 Rabbit	黄连解毒粉 Huanglianjiadu powder	药代动力学实验 Pharmacokinetic test	[47]
	板蓝根颗粒 Banlangen granules	防治法氏囊药效学实验 Pharmacodynamic test of prevention and treatment of bursa fabricius	[48]
	博落回 Boluohui (<i>Macleaya cordata</i>)	鸡大肠杆菌病的疗效研究 Study on curative effect of chicken colibacillosis	[49]
SPF 鸡 SPF chicken	女贞子 Nvzhenzi (<i>Ligustrum lucidum</i>)	保肝作用, 促进免疫, 抗氧化 Protect liver, promote immunity and antioxidation	[50-51]
	金苓蓝口服液 Jinqinlan oral liquid	探究对 H9N2 AIV 与脂多糖 (LPS) 为诱导因素 人工建立鸡风热犯肺证的治疗作用 To explore the treatment of chicken wind heat invading the lung syndrome artificially established with H9N2 AIV and LPS as inducing factors	[52]
猪 Pig	黄芩注射液 Huangqin injection	探究人工感染猪水肿病的治疗作用 To explore the therapeutic effect of artificial infection on porcine edema disease	[53]

4 讨论和小结

中兽药研究的进展依赖于使用实验动物模型作为临床假说的实验基础。因为各种动物疾病的发生发展是非常复杂的, 而直接使用靶动物探讨其发病机理及兽药疗效机理常会受到操作方面或者经济方面等的限制。可以通过对实验动物的研究, 进而推用到相应靶动物, 以控制动物疾病发生及进展过程, 降低畜牧业损失。

实验动物在中兽药研发中的应用可见于主要药效学研究, 安全药理学研究以及毒性研究, 其中毒性研究包括一般毒性实验(急性毒性实验、长期毒性实验)和特殊毒性实验(致突变实验、生殖毒性实验、致癌实验, 特殊安全性等), 目前中兽药研究中, 多应用大小鼠模型进行药物毒性实验, 药效学实验和药理学实验, 其药理机制研究也多围绕于抗炎, 抗氧化应激及凋亡相关方面^[6], 近些年研究者对各类细胞死亡方式, 比如自噬、炎性坏死、焦亡等也有一定关注。因为研发成本的问题, 其他大型的实验动物很难应用到新型中兽药的开发中去。而随着中兽药的深入研究, 其他实验动物的应用也更加完善。此外, 兽药开发应用的实验动物多用于实验, 而药理实验中实验动物模型的选择和评价仍存在以下问题: 缺乏各种造模因素之间的对比研究, 难以明确造模因素的选择。研究者根据各自的理

解, 基于同一理论选择的中兽药、途径和强度差异较大, 造模方法尚不成熟, 存在“一因多证”。模型评价主观性强, 多数模型评价简单以动物表现出来的症状为依据, 导致建立的模型认可度不高, 各个实验间缺乏可比性。实验动物模型与临床疾病变化表现并不完全相同, 造模后多种表现交叠出现而难以明确区分, 增加了模型评价的难度。实验动物模型种类不足, 相对于临床复杂多样的证候而言, 现阶段能复制的实验动物模型, 不能满足中兽药研究的需要。

目前中兽药的研发需要进一步深入研究动物模型评价方法, 为病证结合动物模型提供一些客观化标准, 突破目前的瓶颈, 造模评定标准体系规范化, 真正做到指标量化、客观化、宏微观相结合, 不断发展。构建出更加贴近临床实际符合统一规范的国际公认的实验动物模型。

参考文献:

- [1] 朱绯. 中国近代兽医发展研究(1904-1949) [D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- [2] 李小茜, 何建成. 充血性心力衰竭中医证候动物模型研究思考 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 831-836.
- [3] 王琦婷, 吴曙光, 陈明飞, 等. 贵州小型猪肾虚阳虚动物模型的建立 [J]. 贵州科学, 2019, 37(5): 48-51.
- [4] 牛家藩. 试论清代兽医本草学的发展特色 [J]. 中国农史, 1989, 4: 82-84.
- [5] 黄勇其. 药理学与中药药理学实验教程 [M]. 北京: 中国中

- 医药出版社, 2014.
- [6] 吴剑平, 杨斐, 胡樱. 啮齿类实验动物在比较医学研究中的应用 [A]. 华东地区实验动物科学学术交流会暨实验动物规范化、标准化研讨会论文集汇编 [C]; 2010.
- [7] 范强, 刘自扬, 万仁玲, 等. 气相色谱法测定苦参苍术口服液三氯甲烷残留量 [J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(2): 31-33.
- [8] 高艳艳, 王祝义, 王芳, 等. 苦参苍术口服液长期毒性试验 [J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(1): 17-19.
- [9] 张伟, 石达友, 吕伟杰, 等. 紫锥菊根末的安全药理学研究 [J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(9): 34-36.
- [10] 苗小楼, 李芸, 潘虎, 等. 益蒲灌注液毒性实验研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2010, 29(6): 47-49.
- [11] 张颖. 白头翁颗粒的制备及其药效学研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [12] 吕淑荣, 李晶, 李渤南, 等. 桉薄溶液急性毒性与亚慢性毒性的试验研究 [J]. 中国兽医杂志, 2014, 50(5): 85-87.
- [13] 王贵波, 罗永江, 罗超应, 等. 射干地龙颗粒的安全药理学分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(12): 1969-1977.
- [14] 邢玉娟, 高亚军, 秦俊杰. 苦参止痢颗粒的药效作用研究 [J]. 动物医学进展, 2017, 38(12): 91-94.
- [15] 王海军. 苍朴口服液的制备和药理毒理学研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [16] 侯丽丽, 陈文云, 栗荣霞, 等. 蒲地蓝消炎颗粒的毒性研究 [J]. 中兽医学杂志, 2018, 202(3): 10-13.
- [17] 喻琴. 藜苈灌注液对雌鼠生殖机能的影响及其作用机理 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2018.
- [18] 喻琴, 陈玲, 尹伶灵, 等. 鱼腥草苈蓝口服液的毒理学研究 [J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(9): 27-34.
- [19] 徐海燕, 汪孟娟, 王京京, 等. 博落回对小鼠肠道菌群及血液生化指标的影响 [J]. 饲料博览, 2014, 1: 41-44.
- [20] 黄嘉璐. 博落回提取物干预腹泻模型小鼠的作用机制研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018.
- [21] 庄汝柏. 裸花紫珠末部分药效学、毒理学及临床效果观察 [D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [22] 胡汐柔. 黄芩注射液对猪水肿病的治疗作用研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [23] 桑卡娜, 李召斌, 晏磊, 等. 双葛止泻口服液对小鼠的抗炎止泻药效学研究 [J]. 中国动物保健, 2020, 22(11): 57-59.
- [24] 李胜坤, 王胜义, 崔东安, 等. 乌锦颗粒剂的急性毒性与亚慢性毒性试验研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(5): 1203-1210.
- [25] 文雪梅, 赖胜基, 胡庭俊, 等. 肿节风三清颗粒安全性试验研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(9): 2600-2609.
- [26] 梁正敏, 李锦辉, 崔玉梅, 等. 肿节风三清颗粒抗炎和抗哮喘作用 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(7): 2008-2014.
- [27] 赵宝凯, 耿健, 钟灵, 等. 金香颗粒预防小鼠大肠杆菌性腹泻的效果观察 [J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(12): 108-112, 134.
- [28] 郭阳. 银黄二陈合剂药理与毒性研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2018.
- [29] 李超, 赵化佳, 赵德明, 等. 2014 年北京地区啮齿类实验动物质量的病理学评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(5): 67-70.
- [30] 赵丹, 汤仁想, 孙雨, 等. 紫锥菊粉对大鼠的致畸性作用试验 [J]. 中国兽医科学, 2010, 40(5): 523-527.
- [31] 郭迎春, 邸静, 胡松华, 等. 人参叶口服液对大鼠的亚慢性毒性试验 [J]. 动物医学进展, 2011, 32(5): 59-63.
- [32] 侯丽丽, 韩立, 巩忠福, 等. 党参多糖口服液对大鼠的长期毒性研究 [J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(12): 40-44.
- [33] 张传津, 杨修镇, 高迎春. 地锦草颗粒的急性亚急性毒性试验 [J]. 山东农业科学, 2014, 46(6): 128-130.
- [34] 侯丽丽, 程建国, 米彦飞, 等. 夏枯草注射液对大鼠的长期毒性研究 [J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(4): 51-55.
- [35] 侯丽丽, 卢香玲, 王成, 等. 夏枯草注射液抗炎和抗菌药理作用的研究 [J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(10): 29-32.
- [36] 钟英杰, 庞云露, 张会梅, 等. 芪草乳康颗粒的主要药效学试验 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, 15: 192-194.
- [37] 卞愧, 高艳艳, 周德刚. 五加芪粉长期毒性试验研究 [J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(7): 41-45.
- [38] 宋朋杰, 武小虎, 张世栋, 等. 鱼腥草苈蓝口服液的解热试验 [J]. 动物医学进展, 2019, 40(10): 133-136.
- [39] 杨阳. 茯苓多糖的临床前和临床研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [40] 黄亚军. 博落回中主要生物碱在大鼠和猪的代谢及组织残留研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- [41] 赵征. 博落回总碱对胎鼠的生殖毒性及博落散对种蛋的毒性研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- [42] 李胜坤. 乌锦颗粒剂的制备与药效毒理学研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [43] 文雪梅, 赖胜基, 胡庭俊, 等. 肿节风三清颗粒安全性试验研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(9): 2600-2609.
- [44] 刘静, 刘欣, 魏丽娟, 等. 柴黄口服液长期毒性试验研究 [J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(2): 36-42.
- [45] 庞云露, 钟英杰, 付海宁, 等. 口服紫锥菊对清醒比格犬心率、心电、血压和呼吸的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(8): 165-169.
- [46] 张英涛, 王弘, 刘文芝, 等. 松果菊属药用植物的应用基础研究 [J]. 北京大学学报(医学版), 2004, 36: 90-93.
- [47] 马玉芳, 林雪玲, 俞道进, 等. 黄连解毒散超微粉有效成分小檗碱在家兔体内的药代动力学研究 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 875-879.
- [48] 邢玉娟, 高亚军, 秦俊杰, 等. 苦参止痢颗粒的药效作用研究 [J]. 动物医学进展, 2017, 38(12): 91-94.
- [49] 张玥, 王广泽, 陈燕乐, 等. 博落回生物碱对鸡大肠杆菌病的疗效观察 [J]. 中兽医医药杂志, 2021, 40(2): 71-75.
- [50] 张云露, 张海涵, 谷雪玲, 等. 女贞子改善家禽肝脏损伤的作用机制 [J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(1): 6-10.
- [51] 洪玲玲, 印遇龙, 肖定福. 女贞子的生物学功能及其在畜禽生产中的应用 [J]. 动物营养学报, 2020, 32(8): 3489-3495.
- [52] 邓锐滔, 周紫冲, 杨艳艳, 等. 金苓蓝口服液对鸡热犯肺证的疗效研究 [J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(2): 46-52.
- [53] 廖远军, 崔玉梅, 胡汐柔, 等. 黄芩注射液对人工感染猪水肿病的治疗 [J]. 中国兽医学报, 2016, 36(5): 823-826.

李磊, 刘建勋, 任钧国, 等. 中医药动物模型研究现状及展望 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 104-110.

Li L, Liu JX, Ren JG, et al. Research status and perspective of animal models in research and development traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 104-110.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.014

中医药动物模型研究现状及展望

李磊, 刘建勋*, 任钧国, 付建华

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 国家中医心血管病研究中心, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

【摘要】 随着中医药现代化研究的不断深入,越来越多的疾病动物模型被广泛用于揭示中医基础理论、中药疗效评价及中药作用机制等研究中。本文梳理了中医药疾病动物模型的研究和发展现状,对中医药疾病动物模型建立和评价研究中常见的思路方法以及存在的问题进行介绍,为建立适合中医药特点的动物模型提供参考。

【关键词】 中医药;疾病动物模型;证候;病证结合

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0104-07

Research status and perspective of animal models in research and development traditional Chinese medicine

LI Lei, LIU Jianxun*, REN Junguo, FU Jianhua

(Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital China Academy of Chinese Medical Sciences, National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Beijing 100091, China)

【Abstract】 With the deepening of research on the modernization of Chinese medicine, disease animal model are widely used to study the basic theories of traditional Chinese medicine, treatment evaluation and mechanism of traditional Chinese medicine efficacy. This article comprehensive review the research and development status of disease animal models of traditional Chinese medicine, concluded the research ideas and method for the establishment and evaluation of disease animal models of traditional Chinese medicine and discusses the existing problems. The future development directions in this field are pointed out and may provide reference for further research.

【Keywords】 traditional Chinese medicine; disease animal model; syndrome; integration of disease and syndrome

实验动物模型是指以实验动物为载体,模拟医学、生命科学、食品安全和军事医学等科学研究,以及生物医药和健康产品研发中应用的与人类疾病、功能紊乱发生机制和临床表现高度相似的生物样本。中医药动物模型指用于中医药相关研究中的动物模型,其广泛应用于中医药的现代化研究,在

揭示中医药基础理论、中药作用机制、中药新药研究等方面发挥了重要作用,同时也丰富了动物疾病模型^[1]。目前用于中医药研究的疾病动物模型已有上百种,在中医证候动物模型、病证结合动物模型等方面也取得了长足的发展,但由于中医临床证候本质尚未明确、动物模型验证手段缺乏、动物模

【基金项目】 国家自然科学基金(82030124, 82174015); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-C-202007); 中国中医科学院科技创新工程项目资助(CI2021A00912)。

【作者简介】 李磊(1982—),男,副研究员,研究方向:中药心血管药理学。E-mail: lilei0502@126.com

【通信作者】 刘建勋(1955—),男,研究员,博士生导师,研究方向:中药药理学。E-mail: liujx0324@sina.com

型的临床相关性较差等问题依然存在,中医证候、病证结合动物模型仍然是制约中医药现代化的瓶颈问题。笔者概述了中医药疾病动物模型研究的历程、模型建立思路及评价方法,对研究中存在的问题进行了讨论,为建立适合中医药特点的疾病动物模型提供参考。

1 中医药动物模型发展历史

中国古代就有用动物观察验证中药作用以及中药治疗家畜疾病的记载。北宋《本草衍义》:“有人以自然铜饲折翅胡雁,后遂飞去。今人(以之治)打扑损。”明代兽医学专著《元亨疗马集》创立了八证论,即寒证论、热证论、虚证论、实证论、表证论、里证论、邪证论、正证论,用于动物疾病的中医辨证论治。1923 年,陈克恢用实验动物进行一系列的实验,发现麻黄碱具有增加心肌收缩力、促进血管收缩、舒张支气管、中枢神经兴奋等作用,确认了麻黄碱的兴奋交感神经作用,开创了现代中药药理研究的先河^[2]。1960 年,邝安堃发现过量使用肾上腺皮质激素的小白鼠一系列病态与中医阳虚证的临床特征基本相似:体重下降、萎靡、耐寒力低,1963 年又发现助阳药物附子、肉桂、肉苁蓉、淫羊藿等能减轻或纠正这种状态^[3]。自从中医阳虚证动物模型建立后,国内外学者开始致力于具有中医药特色的证候动物模型研究,其中具有代表性的是肾虚证、脾虚证及血瘀证动物模型。随着中西医结合研究的发展,病证结合动物模型体现了临床辨病辨证相结合,被认为是中医药现代研究中比较理想的动物模型^[4]。近

年来,刘建勋提出了病证结合动物模型拟临床研究的思路和方法(见图 1),即在临床文献的基础上,分析证候临床表现和实验室客观指标变化的特点,选择恰当动物模型诱发因素在实验动物进行模拟,以最大可能模拟中医临床实际操作过程,从四诊表现和临床客观变化特征两方面评价病证结合动物模型的可靠性,采用病证结合动物模型对复方中药功效和主治进行拟临床评价^[5-6]。该研究模式被认为促进了中医基础与临床研究的密切结合,标志着病证结合动物模型的研究达到了一个新的高度^[7]。

2 中医药动物模型的建立

中医药动物模型根据造模的因素可以分为单因素造模和复合因素造模,根据造模的病因特点可以分为西医疾病动物模型、证候动物模型以及病证结合动物模型。不同的病因建立的模型均有一定的优势和存在的问题(见表 1),总体来说病证结合动物模型即有西医疾病的病理特点,又有中医证候的特征,能实现中医和现代医学的结合,逐渐成为中医药动物模型发展的方向。

2.1 西医疾病动物模型

西医疾病动物模型是最早在中医药科研中应用的一类疾病动物模型,至今在中医药的研究中仍有广泛的应用,也是很多中医证候模型、病证结合动物模型的基础。采用模拟西医病因病理施加于实验动物,复制出西医的疾病动物模型,如采用冠脉结扎复制大鼠心肌缺血(再灌注)模型,在此基础上用中医药进行干预,可以开展中药作用机制、中

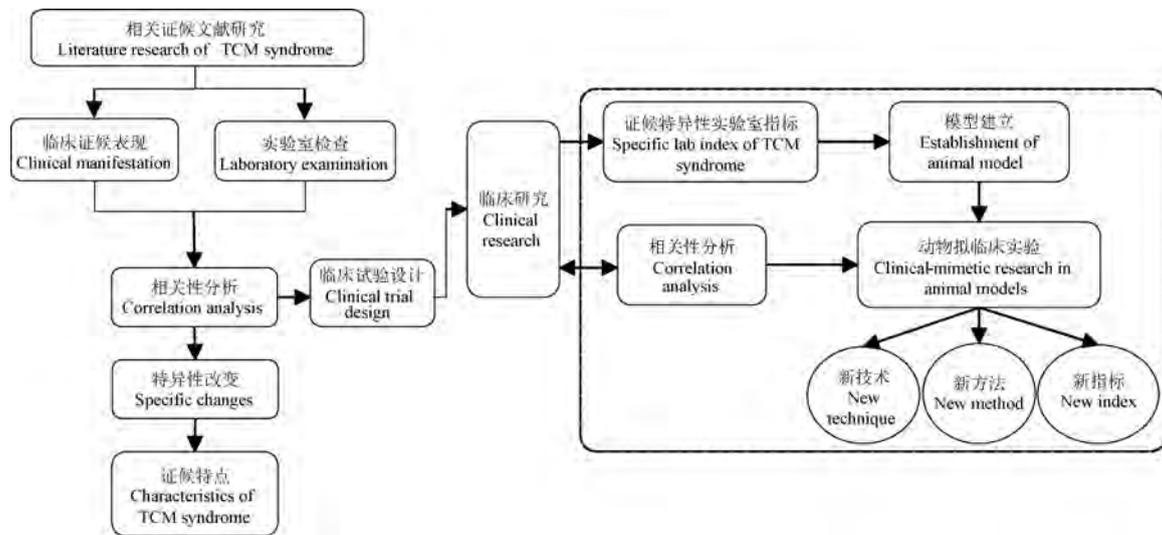


图 1 病证结合动物模型拟临床研究

Figure 1 Clinically derived study on an animal model combining disease and syndrome

药药效物质基础、针灸疗效评价等研究^[8-9]。这类模型具有较好的确认性、可控性和重复性,实验指标明确可靠,实验结果可信,容易被国际医学界所认同。实验动物除了整体动物之外,还包括实验动物的某一部分:器官、组织、细胞等。因此,采用实验动物来源的离体器官模型、组织模型,细胞株模型等进行的研究也应属于疾病动物模型的一部分,如离体心脏缺血-再灌注模型、心肌细胞缺氧复氧模型等。离体疾病动物模型排除了神经和体液因素的影响,可控制性强,可以相对独立地观察某一个因素(比如某种中药提取物)对器官的直接作用,在深入探索中药作用机制及有效物质的发现等方面做出了一定贡献^[10]。西医疾病动物模型有可以直接和现代医学接轨的特点,便于西医、中西医结合以及生物医药相关学科人员开展中医药研究,可以预计在今后还会有学者继续采用西医疾病动物模型开展中医药研究。然而,西医疾病动物模型在中医药研究中的应用存在着较为突出的问题,越来越

多的研究人员认为应该用更具有中医特色的疾病动物模型进行中医药研究。

采用西医疾病动物模型研究中医药会面临着两个主要的问题:一是模型与临床患者不一致,二是容易脱离中医理论。第 1 个问题是西医疾病动物模型的普遍性问题,即使研究西药同样存在。如临床上最常见的冠心病和脑卒中,其病理基础是动脉粥样硬化,冠心病和脑卒中是长期动脉粥样硬化、器官血流灌注不足的引发的,心脏和脑的内源性保护物质可能消耗殆尽或异常诱导。然而大多数的西医疾病动物模型是在没有动脉粥样硬化的动物上结扎冠脉或机械阻断脑血流建立的,这就可能存在药物对实验动物心肌梗死、脑卒中有效,但对临床上动脉粥样硬化基础上发展起来的冠心病、脑卒中无效^[11]。第 2 个问题是西医疾病动物模型在中医药领域应用的特殊性问题,即缺少中医药理论的指导,疾病动物模型的制作与中医学的治病因素、发病机制有较大差异,在模型评价指标方面也缺乏中医药的特色。

表 1 中医药研究中的动物模型

Table 1 Animal model in the research of traditional Chinese medicine (TCM)

分类 Category	造模方法 Modeling methods	优势 Advantage	存在问题 Problems and deficiencies
西医疾病动物模型 Western medicine disease animal model	西医病因病理造模 Western medicine etiological and pathological modeling	较好的确认性、可控性和重复性,与现代医学研究结果具有可比性 Good confirmation, controllability and repeatability, comparable to the results of modern medical research	脱离中医药理论指导,造模与评价缺乏中医药特色 Without TCM theoretical guidance, model building and evaluation have no TCM characteristics
证候动物模型 TCM syndromes animal model	西医病因病理造模 Western medicine etiological and pathological modeling	操作简便、模型稳定,与现代医学研究具有可比性 Experiment is easy to be operated and the model is stable, which is comparable to modern medical research	用西药造成病理状态或中毒反应造模,与中医学理论有较大差异 Pathological state or toxic reaction caused by Western medicine possess profound differences from the theory of TCM
	中医病因病机造模 TCM etiological and pathological modeling	突出中医药理论的指导,造模因素具有中医药特色 Outstands the guidance of traditional Chinese medicine theory, modeling factors are full of traditional Chinese medicine characteristics	受中医病因的非特异性影响,模型的证候判别困难 Due to the non-specific influence of TCM etiology, it is difficult to distinguish the syndromes of the model
病证结合动物模型 Animal model of western medicine diseases and TCM syndromes integrated	西医疾病动物模型基础上中医辨证 TCM syndrome differentiation based on western medicine disease animal model	一定程度上模拟了临床实际诊疗中病证一体的特点 To some extent, it simulates the characteristics of the integration of disease and syndrome in clinical practice	模型的证候判别模糊 It is vague when it comes to judging the syndrome of the model
	西医疾病复合中医证候动物模型 Animal modeling of western medicine diseases combining TCM syndromes	即具备中医证候的特点,又有西医疾病的病理改变 It has both the characteristics of TCM syndromes and the pathological changes of western medicine diseases	病、证因素施加时序性问题,模型的证候判别困难 When disease and syndrome factors coexist with temporal problems, syndrome identification of the model can be difficult

2.2 西医病因病理造模的证候动物模型

依据西医的病因病理,施加化学、物理或生物等因素,造成实验动物的组织器官损伤,复制出类似于中医临床证候的动物模型。这类模型中最常见的为化学药物干预方法造模,如大鼠皮下注射肾上腺素后全血及血浆粘度、红细胞压积、血浆纤维蛋白原等指标均明显升高,血液流变性呈“浓、粘、凝、聚”状态,复合临床血瘀证特征,是较为常用的血瘀证模型^[12]。利血平是一种用于高血压治疗的肾上腺素能神经抑制药,其不良反应常见腹泻、腹痛、大便次数增多、食欲缺乏等,可用于消化道溃疡动物模型的建立,给予利血平建立大鼠脾虚证模型常用于四君子汤、理中丸、参苓白术散等中药复方的疗效及作用机制研究^[13]。

西医病因病理建立的证候动物模型操作简便、模型稳定,与现代医学研究结果具有可比性。然而这类动物模型也存在着一定的争议,有学者认为用西药所造成的病理状态或中毒反应来模拟证候的表象与中医证候理论有较大差距,难以模拟人体证候的本质^[14]。也有研究人员认为,临床上中医证候构成的主要因素是临床表现,而不是病因。因此,中医证候动物模型建立的关键在于造模动物所产生的病变和中医证候表现是否能反映中医证的特点^[15]。

2.3 中医病因病机造模的证候动物模型

依据中医传统的病因病机理论,模拟中医证候的形成原因,将六淫外邪、劳逸失度、饮食不节等治病因素施加在实验动物上,模拟出与证候表现基本类似的动物模型,如将大鼠置于冰水造成寒凝血瘀模型、恐伤肾的肾虚模型以及饮食失节的脾虚证模型等。除了单因素模拟中医病因病机,多因素复合造模能缩短造模时间、提高造模的效率与质量。例如,采用疲劳、饥饿及受寒同时作用于小鼠,由于劳则气耗、饥则伤脾、伤脾则寒邪内袭,可建立虚寒证模型。通过模拟中医病因病机建立的证候动物模型,突出了中医药理论的指导,一定程度上体现了中医辨证论治的特点,除药物研究之外还可用于中医证候研究,有学者在证候动物评价中引入了舌象、脉象等中医特色的观察指标,使得研究更加贴近中医临床实际。

此类证候动物模型的不足之处在于,中医传统病因病机不一定能直接造出相应的证候动物模型。中医的病因大多是非特异性的治病因素,同一病因

可能导致多个不同证候,而多种病因又可导致同一种证候。如给动物施加冰水游泳因素,动物可能会出现寒邪犯肺而形成表证,也可能出现寒凝血瘀证,还可能由于游泳耗气出现气虚证。这会严重影响实验动物的同质性,降低动物模型的规范性和可重复性^[16]。同时,由于中医临床证候本质研究尚处于探索阶段,中医证候的规范和评价标准体系尚未建立,这也造成了动物模型的中医证候属性判别的难度。

2.4 病证结合动物模型

传统意义的病证结合是指中医辨病与中医辨证的结合,现代的病证结合是在中西医结合体系下,在西医的辨病的基础上结合中医辨证论治。为适应中医临床辨病与辨证相结合的实际情况,建立病证结合动物模型也日益受到关注,并逐渐成为中医实验动物模型发展的新领域。常见的病证结合动物模型制备思路有两种:单纯西医疾病动物模型观测法,西医病因病理复合中医病因病机造模法^[17]。

有学者认为,疾病与证候不可完全割裂看待,疾病发展过程本身就存在着中医证候的变化。在建立西医疾病动物模型基础上,观察疾病形成过程中的证的演变及疾病模型建立后表现的中医证型,进而确定某一特定的病证结合模型。例如,冯玄超等^[18]通过结扎大鼠左冠状动脉前降支建立心力衰竭模型,术后 4 周模型组大鼠心功能下降,术后多时点动态观察显示模型大鼠呼吸频率增加,口唇、耳廓、足部颜色逐渐紫暗,运动距离及速度降低,研究者将该模型术后第 7~28 天辨证为气虚血瘀证。这类动物模型人为干预因素较少,模型的稳定性和可靠性较高。在临床诊疗中,由于中西医认识角度的不同,同一患者西医给出疾病诊断为冠心病,中医可给出证候诊断为气虚血瘀证,上述动物模型在一定程度上模拟了临床实际诊疗中病证统一、病证一体的特点^[19]。

西医病理复合中医病因建立病证结合动物模型根据“病”、“证”因素施加顺序可分为:先证后病、先病后证及病证同步。一部分学者认为应采用先病后证的模式,原因是病模型的稳定性较好,证相对于病具有不稳定性,在病模型的制作过程中很难确保不会受到影响而引起证型的变化,对于病来说,变化的可能性相对较小,也与临床诊断先辨病再辨证的思路相吻合。如杨硕等^[20]采用冠状动脉

结扎后,配合饥饿、游泳等 4 周的方法造成了气虚血瘀证慢性心衰模型。但在实际研究过程中,有不少病证结合的模型是以先证后病或病证同步的模式制作,并且顺利制成了相应模型。如王磊沙等^[21]采用力竭游泳加睡眠剥夺建立大鼠气虚血瘀证动物模型,在此基础上向颈内动脉注射栓塞微球导致多发脑梗死形成脑梗气虚血瘀证模型。武曲星等^[22]同步采用睡眠剥夺复合免疫法建立免疫性血小板症气不摄血证模型。此类模型吸收了中、西医在造模方面的成功经验,发挥了各自学科对病证产生的致病特色,有利于中西医结合理论研究的发展。然而,由于中西医理论存在差异,两者结合的切入点相对较少。同时,中医证候是疾病某一阶段病因、病位、病理的概括,缺乏逻辑关系的将西医病理因素和中医病因因素强行叠加,可能造成证候与期待建立模型证候的阶段不一致。

病证结合动物模型即具备中医证候的特点,又有西医疾病的病理改变,较单纯的西医疾病模型和单纯证候模型更符合中医药的理论和临床实际。然而,病证结合动物模型仍然存在着与单纯证候模型一样的证候认定障碍问题,也存在着单纯西医疾病模型与临床患者不一致问题。例如,在小型猪左冠状动脉前降支放置 Ameroid 缩窄环制成冠心病小型猪气虚血瘀证模型,该模型需要开胸手术放置缩窄环与临床冠心病实际发生有很大差异^[23]。针对病证结合动物模型建立过程中存在忽略了中医临床对模型建立和评价的指导作用等问题,刘建勋及研究团队提出了病证结合动物拟临床研究思路与方法。在拟临床病证结合动物研究思路的指导下,结合前期冠心病痰瘀互结证文献和临床研究的结果,在小型猪高脂血症的基础上,采用心导管介入的方法造成冠脉前降支血管内皮损伤,促使内膜下的脂质沉积和动脉粥样硬化发生发展。通过脂质代谢,心肌缺血面积改变、心肌和冠脉组织病理学分析对冠心病小型猪模型进行评价。同时将中医反映痰多体胖的体重指数、舌象 RGB 三原色分析、脉象的无创血流动力学分析、胸痛的体表心电图等用于证候评价,建立的动物模型无论在冠心病客观检查方面,还是在痰瘀互结证的证候客观化指标方面都与临床非常吻合^[24-26]。该研究模式受到越来越多行业内的借鉴,如郭文鹤等^[27]参照相关资料及文献研究,结合动脉粥样硬化病因病机的演变规律,发病机制的现代研究,用冰水浴、灌胃脂肪乳和

尾静脉注射牛血清蛋白复合诱导方法建立了动脉粥样硬化气滞血瘀证大鼠模型,该模型与患者临床症状和体征表现相近。

3 中医药动物模型的评价

西医疾病动物模型多采用现代医学的评价指标体系,其模型评价因缺乏中医药特色在中医药研究领域的受到较多质疑。中医证候动物模型评价研究已有 30 余年的历史,1987 年陈小野^[28]就提出了中医证候动物模型评价 5 方面依据:症状(本证)、病因(正证)、治疗(反证)、相关因素(佐证)和客观指标(佐证)。当前,中医证候动物模型评价研究中,通过对动物模型进行“四诊”信息的采集,参照临床诊断、辨证的方法来辨识动物模型的证候是中医证候模型评价的主要手段。同时,将临床和基础研究中能够较客观地反映证候特征的客观指标、特异性指标,体现到动物模型评价中^[29]。如利用心电图变化反应动物心肌缺血情况,根据动物体重、抓力、旷场活动等程度不同进行半定量评分反应动物的饮食、体力、活动度等表现。通过宏观辨证与客观指标结合可以对动物模型进行较为有效的证候评价,然而上述方法仍存在症状选择判定尚无统一标准,与临床已形成的全国辨证标准也存在着差异,理化指标选择带有主观性,特异性差且具有直接临床证据的较少等问题。

以方测证作为动物模型宏观辨证、客观指标辨证方法的补充,广泛的应用在中医证候动物模型研究中。如宋红等^[30]以大黄法、游泳力竭法、饥饿法多因素复合建立了脾气虚证大鼠模型,在造模因素撤去后大鼠消瘦、大便溏泄、倦怠乏力等脾气虚证症状仍存在,血清木糖浓度、CPK 等客观指标未见明显改善,而给予黄芪建中汤动物则得到了恢复,研究者认为这是一种经得起药物反证、可行而稳定的脾气虚证造模方法。有学者对病证结合动物模型药物反证是只选用单一方药提出了质疑,认为方剂具有多效性,没有设置“方不对证”治疗组,得出的结论缺乏说服力。因此,在开展以方测证研究时除了使用方证相应药物外,还应根据造模的具体因素,选择疗效可靠、功效明确但与动物模型方证不应的经典方剂进行对照研究^[31]。笔者比较了丹莪片(方证相应)和生脉胶囊(方证不相应)对于小型猪冠心病痰瘀互结证的影响^[32],结果显示用于痰瘀互结证胸痹的丹莪片可显著降低动物血脂水平、改

善血液流变学、减小梗死面积、保护心功能、改善中医四诊评分;而用于气阴两虚证冠心病的生脉胶囊虽然也有一定的疗效,如改善心功能,改善血液流变学及降低舌象和脉象评分,但在作用效果不及丹萎片,而且在血脂代谢、心梗面积及主症和兼症评分等方面更是受益甚小。

随着现代科学技术的发展,越来越多的研究技术应用到中医证候模型评价中,如基因组学、代谢组学、蛋白质组学等“组学”技术能弥补以往采用少数几个观察指标评价的不足,可以与临床患者相关数据进行比对进一步增加动物模型的可信性。如苗兰等^[33]采用冠状动脉球囊拉伤结合高脂饲料喂养建立中国小型猪痰瘀互结证冠心病模型,发现模型组冠状动脉组织与正常组相比共有蛋白差异点 35 个,14 个上调点,17 个特异表达点,另外有 4 个点发生未知修饰变化,认为发现的差异蛋白可能与痰瘀互结证冠心病的形成、发展相关。李静等^[34]采用结扎大鼠左冠状动脉前降支方法制备冠心病血瘀证模型,利用超高效液相色谱-质谱联用技术检测尿液样本小分子内源代谢物,发现冠心病血瘀证模型大鼠尿液代谢组学出现改变,涉及能量代谢失衡,以及氨基酸代谢,糖代谢,嘌呤代谢紊乱及脂质堆积等多个层面。蛋白质组、基因组学、转录组学及宏基因组等多层面的组学数据并非相互独立,任一单组学都不足以系统地阐释中医药疾病动物模型与临床实际的对应关系。多组学联合具有系统性、关联性、动态性、整体性等优势,为中医药研究提供了新的平台,给了我们更多研究复杂疾病和中医证候的思路^[35]。目前,中医药多组学联合多集中在临床研究,随着系统生物学研究的日渐普及,可以预计多组学联合也将是中医疾病动物模型研究的必然趋势。很多非传统生命科学领域的技术也运用到实验动物研究中,如无线遥测技术可采集实验动物清醒状态下的连续生理信号^[36];计算机视觉技术和模式识别技术,使分析实验动物复杂行为模式成为可能^[37];有研究显示人工智能程序具有类似哺乳动物一样的寻路能力,研究人员甚至认为在将来可以用人工智能代替实验动物来进行研究^[38]。探索将这些新技术、新方法应用于建立和评价适合中医药特点动物模型可能是中医药动物研究的发展方向。

4 展望

一个好的疾病动物模型须尽可能满足与人类

疾病比较的“三性”特征,即发病机理同源性、行为表象一致性、药物治疗预见性,同时具有创建易行性、重现性与经济性的特点^[11]。因此,与临床紧密结合是中医药研究用疾病动物模型建立和评价中最重要的一个环节,在今后的研究中应继续加强动物模型与临床的相关性分析。在传统的动疾病物模症状、体征、客观指标等“像不像”研究基础上,运用现代生物信息学、组学等技术开展疾病动物模型生物学基础“像不像”的研究。

病证结合动物模型的建立研究是连接中医基础和临床的桥梁与纽带,是深化证候认识的方法,同时也是有效中药的筛选、药物作用机制深入研究的手段。然而,病证结合动物模型的建立和评价仍存在不少不足或者可探索之处,如绝大多数制造的是一病一证的病证结合模型。即围绕一种现代医学疾病,叠加中医干预因素后制作一个证的动物模型。如冠心病气虚血瘀证、高血压肝阳上亢证模型、2 型糖尿病气阴两虚证模型等等。这些病证结合模型研究中几乎很少从同种疾病的不同证候差异、不同病的同种证候异同角度进行过探索^[39]。因此,运用比较医学思想构建病证结合动物模型,通过对比、优选建立规范化、系统化的病证结合动物模型体系可能是今后中医药疾病动物模型的研究方向。

完美的动物模型几乎是不存在的,选择最适合的实验动物模型开展中医药研究是必然的方式。虽然有部分学者认为动物不能开口说话没有主诉,难以采集四诊资料,对中医证候、病证结合动物模型持怀疑和否认态度。但是,大多数中医药研究人员还是坚持中医动物模型是具有可行性的,能在一定程度上模拟中医临床的实际。目前,西医疾病动物模型尚未做到完全模拟西医临床患者,对具有中医药动物模型要求成熟规范、面面俱到就显得过于苛刻。通过妥善设计和仔细观察,具有中医药特色的疾病动物模型无疑是可以用于中医药理论和应用研究的。相信随着科技的发展和中医药研究的深入,具有中医药特色的证候动物模型、病证结合动物模型建立与评价的重视程度和研究水平将不断提高,这对于扩大中医药的国际认可度、明确中医证候本质、创新中药开发等方面具有巨大的学术价值和经济意义。

参考文献:

[1] 彭紫凝,邢玉凤,庞欣,等.病证结合动物模型研究进展

- [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(7): 93-98.
- [2] 赵际勳. 近代中药药理研究与传统中医学 [J]. 中华医史杂志, 2012, 42(2): 79-83.
- [3] 邝安堃. 某些助阳药对于大剂量皮质激素所致耗竭现象的影响 [J]. 中华内科杂志, 1963, 2(2): 113.
- [4] 宋亚刚, 李艳, 崔琳琳, 等. 中医药病证结合动物模型的现代应用研究及思考 [J]. 中草药, 2019, 8(16): 3971-3978.
- [5] 刘建勋, 李欣志, 任建勋. 中医证候模型拟临床研究概念的形成及应用 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1772-1776.
- [6] 刘建勋, 于震, 李欣志. 疾病模型动物拟临床研究概念的形成及其应用——自体血栓法制备小型猪心肌缺血模型的研究 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 207-209.
- [7] 邓文龙. 中医药临床与基础研究的紧密结合——《病证结合动物模型拟临床研究思路与方法》读后感 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 265-266.
- [8] 赵雨薇, 付建华, 李磊, 等. 双参宁心胶囊通过调控线粒体 ATP 敏感性钾通道减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13): 112-118.
- [9] 朱建刚, 宋先斌, 杨红娟, 等. 针灸预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用 [J]. 心脑血管病防治, 2019, 19(2): 18-21, 99.
- [10] 王勇, 刘学武, 代志, 等. 参附注射液对大鼠离体心肌缺血再灌注心肌组织自噬的调控作用 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(24): 3010-3015.
- [11] 薛丽香, 张凤珠, 孙瑞娟, 等. 我国疾病动物模型的研究现状和展望 [J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(9): 851-860.
- [12] 赵玲, 魏海峰, 李雅莉, 等. 从血液流变学的改变分析肾上腺素致血瘀证大鼠模型的建立 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(2): 188-190.
- [13] 张帆, 伍春, 明海霞, 等. 参苓白术散对利血平所致脾虚小鼠血清蛋白质组影响 [J]. 中成药, 2013, 35(12): 2586-2591.
- [14] 徐海波. 中医证候动物模型研究中的几个误区 [J]. 山东中医药大学学报, 1999, 23(5): 338-340.
- [15] 张栋, 孙静. 中医证候动物模型复制方法的研究 [J]. 吉林中医药, 2009, 29(8): 655-658.
- [16] 马程功, 马跃荣. 中医药证候动物模型的研究进展 [J]. 成都中医药大学学报, 2018, 41(1): 119-123.
- [17] 钟森杰, 李静, 李琳, 等. 病证结合动物模型研究思路述评 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(8): 141-144.
- [18] 冯玄超, 郭淑贞, 武志黔, 等. 慢性心力衰竭模型大鼠气虚血瘀证相关信息的评价 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(5): 1563-1567.
- [19] 陈燕清, 杨晶晶, 曹卓青, 等. 病证结合动物模型的思考 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(5): 628-629.
- [20] 杨硕, 张艳, 王思尹, 等. 参草通脉颗粒逆转慢性心衰气虚血瘀证大鼠模型药效分析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(5): 50-53.
- [21] 王磊沙, 徐立, 宋文婷, 等. 多因素复合建立多发性脑梗死气虚血瘀证大鼠模型的探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 105-111.
- [22] 武曲星, 王攀, 王冬芝, 等. 免疫性血小板减少症气不摄血证小鼠模型血管内皮活性物质变化动态研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(12): 56-61.
- [23] 张会永, 庞琳琳, 张哲, 等. 小型猪中医动物模型进展及在中医药研究中的应用 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(6): 1266-1269.
- [24] 李磊, 林成仁, 任建勋, 等. 痰瘀同治方对痰瘀互结证冠心病小型猪心功能的改善作用 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 483-487.
- [25] 林成仁, 李磊, 任建勋, 等. 痰瘀同治方对小型猪痰瘀互结证冠心病血液流变性及血脂的改善作用 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 300-303.
- [26] 李磊, 林成仁, 任建勋, 等. 小型猪痰瘀互结证冠心病证候诊断研究 [J]. 世界中医药, 2013, 8(10): 1132-1136.
- [27] 郭文鹤, 黄娜娜, 张晓亮, 等. 动脉粥样硬化(气滞血瘀证)病证结合大鼠模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 32-41.
- [28] 陈小野. 证候动物模型诊断依据的设想预评价 [J]. 中国医药学报, 1987, 2(1): 2357-2359.
- [29] 王靖怡, 高嘉良, 王阶. 病证结合动物模型研究概述 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(7): 42-46.
- [30] 宋红, 郑小伟, 王颖. 多因素复合建立脾气虚证大鼠模型及以方测证研究 [J]. 浙江中医杂志, 2008, 43(3): 136-138.
- [31] 唐仕欢, 杨洪军, 黄璐琦. “以方测证”方法应用的反思 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(3): 259-262.
- [32] 李磊, 刘建勋, 任建勋. 小型猪痰瘀互结证冠心病的方证相应研究 [J]. 药学报, 2017, 52(11): 1698-1704.
- [33] 苗兰, 刘建勋, 曹进, 等. 中国小型猪痰瘀互结证冠心病模型的冠状动脉组织蛋白质组学研究 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(1): 97-101.
- [34] 李静, 钟森杰, 李亮, 等. 基于尿液代谢组学的冠心病血瘀证模型大鼠生物学基础研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(3): 63-68.
- [35] 姜云耀, 孙明谦, 马博, 等. 组学技术在现代中药药理研究中的应用与思考 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(8): 1287-1295.
- [36] 姚元生, 郑丽飞, 朱进霞. 采用植入式生理信号无线遥测系统记录清醒大鼠自由活动状态下胃的肌电信号 [J]. 首都医科大学学报, 2017, 38(2): 227-231.
- [37] 李丹, 陈一飞, 李行健, 等. 计算机视觉技术在猪行为识别中应用的研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(7): 59-69.
- [38] Marblestone AH, Wayne G, Kording KP. Toward an integration of deep learning and neuroscience [J]. Front Comput Neurosci, 2016, 10: 94.
- [39] 梁茂新, 范颖. 中医证和病证结合动物模型研制的利弊与症结 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(7): 1656-1664.

谭骏岚, 易健, 王飞英, 等. 病证结合模式下肺癌实验动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 111-119.
Tan JL, Yi J, Wang FY, et al. Progress in experimental lung cancer animal model under the combination of disease and syndrome [J].
Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 111-119.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.015

病证结合模式下肺癌实验动物模型的研究进展

谭骏岚¹, 易健^{1,3}, 王飞英¹, 万佳婧¹, 覃丽^{1,2*}, 戴爱国^{1,3*}

(1. 湖南中医药大学医学院-血管生物学与转化医学湖南省高校重点实验室, 长沙 410208;
2. 湖南中医药大学干细胞中药调控与应用实验室, 长沙 410208;
3. 湖南中医药大学第一附属医院呼吸科, 长沙 410021)

【摘要】 肺癌(lung cancer)的高发病率与高死亡率对人民健康造成了极大的危害。中医药在恶性肿瘤的防治方面具有广泛的临床经验,在治疗肺癌方面也显示出明显的优势。实验动物模型是肺癌研究领域必不可少的一部分。构建中医特色的病证结合动物模型是以中医辨证论治理论为基础,将中医证候纳入了评价标准,使动物模型既符合西医疾病特征又具备中医证候的特点。本文总结了当前常用的肺癌动物模型和病证结合动物模型的构建方法与特点,以期从事肺癌科学研究的中西医科研工作者提供参考。

【关键词】 肺癌;病证结合;实验动物模型;造模方法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0111-09

Progress in experimental lung cancer animal model under the combination of disease and syndrome

TAN Junlan¹, YI Jian^{1,3}, WANG Feiying¹, WAN Jiajing¹, QIN Li^{1,2*}, DAI Aiguo^{1,3*}

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Vascular Biology and Translational Medicine, Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China. 2. Division of Stem Cell Regulation and Application, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208. 3. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410021)

【Abstract】 Lung cancer is a malignant tumor with high mortality and morbidity and causes great harm to human health. Traditional Chinese medicine (TCM) has extensive clinical experience in the prevention and treatment of malignant tumor, and it also shows clear advantages in the treatment of lung cancer. Experimental animal models are an essential part of the lung cancer research field. The construction of the animal model of disease and syndrome combination with TCM characteristics is based on the theory of syndrome differentiation and treatment in TCM, and the TCM symptoms are included in the evaluation criteria, so that the animal model conforms to the characteristics of western medicine disease and has the characteristics of TCM symptoms. This review summarizes the method and characteristics of commonly used lung cancer animal models and disease syndrome combination models to provide a reference for researchers engaged in lung cancer experimental research.

【Keywords】 lung cancer; integration of disease and syndrome; animal model; modeling method

【基金项目】 国家自然科学基金(81973668);血管生物学与转化医学湖南省普通高等学校重点实验室(湘教通[2021]241号)。

【作者简介】 谭骏岚(1995—),男,博士研究生,研究方向:呼吸系统疾病中西医结合防治研究。E-mail: 369580297@qq.com

【通信作者】 覃丽(1977—),女,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药抗肿瘤药理。E-mail: lqin1011@126.com

戴爱国(1966—)男,博士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:呼吸系统疾病中西医结合防治研究。

E-mail: daiaiguo@126.com

* 共同通信作者

肺癌(lung cancer)主要包括小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),是临床常见的呼吸系统恶性肿瘤。据最新的全球癌症流行病学调查显示^[1]:全球肺癌的总体发病率排所有癌症中的第 2 位,约占 11.4%,而我国肺癌的发病率和死亡率仍位居所有肿瘤中的第 1 位。化疗、靶向治疗、手术治疗、放疗以及新兴的免疫治疗是当前现代医学对肺癌的主要治疗手段^[2],但治疗的有效性、复发率及药物所产生的耐药问题和不良反应,尤其是相当一部分患者无法承担高昂的治疗费用,使肺癌的治疗仍面对较大挑战。中医药作为肺癌综合治疗中的重要组成部分,在提高肺癌晚期患者的生存期^[3]及生活质量^[4]、减轻放化疗毒副反应^[5-6]、缓解临床症状^[7]、调节免疫^[8-9]方面发挥了重要作用。

动物模型是医学实验研究的重要载体。由于当前现代医学中的肺癌动物模型并不能较好的贴合中医临床辨证论治的核心特点,使得当前中医药治疗肺癌的机制研究零散及滞后,且缺乏全面系统的深入研究^[10]。近年来,随着既符合西医疾病特征又具备中医证候特点的肺癌病证结合动物模型的构建成功,并逐渐应用于中医药治疗肺癌的机制研究,为充分揭示中医药治疗肺癌的疗效及深入了解其作用的相关机制奠定了基础。

1 肺癌动物模型

临床上,肺癌的发病机制较为复杂,因其高发病率与高死亡率,所以肺癌一直是肿瘤领域的研究热点。经过长期的研究探索,肺癌动物模型的构建技术已趋于成熟和稳定。目前肺癌动物模型的种类较多,常用的动物也具有多样性,常用的有裸鼠、A/J 小鼠、C57BL/6 小鼠、SD 大鼠、Wistar 大鼠、BALB/c 小鼠、转基因鼠等。目前肺癌动物模型中应用最多的为小鼠,因为其基因与人类的同源性高达 90%以上,常被用于制备移植性肺癌模型。其中肺癌鼠类模型如:化学诱导小鼠肺癌模型(苯并芘诱导^[11-12]、香烟烟雾诱导^[13-14]、N-甲基-N-硝基亚脲(MNU)诱导^[15-16]、氨基甲酸乙酯诱导法^[17-18]、反式-2,4-癸二烯醛(tt-DDE)诱导^[19]、4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶)-1-丁酮(NNK)诱导^[20]、化学诱导大鼠肺癌模型(3-甲基胆蒎(MCA)+二乙基亚硝胺(DEN)诱导^[21]、二甲基苯并蒎(DMBA)诱导^[22]等)、肺癌异位移植模型^[23-26]、肺癌原位移植模

型^[27-29]、基因修饰肺癌模型^[30-31]、肺癌转移模型^[32-34](见表 1)。不同肺癌动物模型的造模时间具有较大区别,化学诱导的肺癌模型和基因修饰肺癌动物模型的成瘤周期较长,而肺癌移植模型成瘤周期较短。不同的肺癌动物模型因研究的内容不同而具有各自不同的特点,如化学诱导的大、小鼠肺癌模型常适用于肿瘤预防药物的相关研究。转基因及移植性肺癌模型常用于肺癌病因学的研究。肺癌转移模型可用于新药研发。总的来说,理想的肺癌模型需具备以下特点:(1)模型的构建方法简单,可操作性强,造模周期适中,能较好的模拟肺癌病理过程。(2)模型具有较强的可重复性和稳定性,能较好的反映人体的机能状态,且模型构建费用适合。目前对于肺癌动物模型的评价方法主要通过动物的症状、生物荧光显像、肿瘤组织病理学及影像学的检查来进行评价^[35]。

2 病证结合肺癌动物模型

中医古籍中虽没有出现“肺癌”这一病名,但在众多古书籍中所记载的“肺癰”、“肺积”、“息贲”与现代医学中肺癌的临床特点相符。正气不足是肺癌的主要发病机制和病因,正如《内经》云“正气存内,邪不可干”、“邪之所凑,其气必虚”。当机体肺气亏虚,邪毒可乘虚入肺,进而邪滞胸中,肺气郁闭,宣降功能失调,气机不畅,血行瘀滞,津液输布失调,聚而为痰,痰凝气滞,阻塞络脉,久则痰瘀胶结于肺而形成肺积。肺癌的发生发展是多个脏腑共同作用所致,病位虽在肺,与脾、肾密切相关。肺、脾、肾 3 脏相互联系、相互影响,共同参与肺癌的病理生理全过程。总的来说,肺癌属“本”虚“标”实,虚实夹杂性疾病,“本”虚为气阴两虚,“标”实为痰浊、瘀血、气滞。肺癌虚证以气阴两虚证、阴虚证为多见,实证以血瘀、气滞、痰凝为主。中医药治疗肺癌疗效确切,临床上根据肺癌的病因病机特点常以“扶正祛邪”为主要治法,“扶正”以补肺益气养阴、健脾益肾为主,“祛邪”以活血化瘀、清热解毒、化痰散结为要^[36],姜怡等^[37]研究表明通过益气养阴以扶正固表,清热解毒标本兼顾的方法并基于此理论指导下的益气养阴解毒方可以抑制小鼠肺癌原位移植瘤模型的肿瘤生长,并延长小鼠的生存期,其他的经典名方如具有清燥润肺、益气养阴功效的清燥救肺汤的临床疗效同样显著^[38],并能通过干扰肺癌细胞的能量代谢来抑制 Lewis 肺癌荷瘤小

鼠肿瘤的增殖^[39]。陈晓波等^[40]根据“肾为先天之本、脾为后天之本”的理论创立的脾肾颗粒,具有培补脾肾、益气生血功效,可通过增强 NK 细胞的活性、提高 CD4⁺T 细胞数目和 CD4⁺/CD8⁺ 比值来抑制 Lewis 肺癌小鼠肿瘤的增殖。

动物模型已成为医学研究的重要手段。近年来,不断有研究者在基于中医基础理论上建立了具有中医特色的病证结合肺癌动物模型。目前肺癌病证结合动物模型有 4 种:气阴两虚证、脾气虚证、肾虚证、气滞血瘀证(见表 2)。

表 1 肺癌常见动物模型的构建方法
Table 1 Common animal model construction method for lung cancer

模型类型 Model types	造模方法 Modeling methods	动物类型 Animal types	特点 Characteristics	评价 Evaluations	参考文献 References
化学诱导小鼠肺癌模型 Chemical induced lung cancer mice models	苯并芘诱导法:小鼠腹腔内注射苯并芘。 Benzopyrene induction method, mice were injected intraperitoneally with benzopyrene.	A/J 小鼠、裸鼠、C57BL/6 小鼠 A/J mice, nude mice, C57BL/6 mice	利用生活中的化学致癌物诱导小鼠产生自发性肿瘤。 Use of chemical carcinogens in life to induce spontaneous tumors in mice.	此类模型临床吻合度高,能较好的模拟肿瘤微环境的形成,但造模周期较长,基因不稳定且不能发生转移。 This type of model has a high degree of clinical anastomosis and can better simulate the formation of the tumor microenvironment but the modeling cycle is long, the gene is unstable, and the tumor cannot metastasize.	[11-20]
	香烟烟雾诱导法:小鼠暴露于香烟烟雾中。 Cigarette smoke induction method, mice are exposed to cigarette smoke. MNU 诱导法:小鼠腹腔内注射 MNU。 MNU induction method, mice are injected with MNU intraperitoneally. 氨基甲酸乙酯诱导法:小鼠腹腔注射氨基甲酸乙酯。 Ethyl carbamate induction method, mice were injected with ethyl carbamate intraperitoneally.				
化学诱导大鼠肺癌模型 Chemical induced lung cancer rat models	tt-DDE 诱导法:小鼠气管内灌注油烟中主要致癌成分 tt-DDE。 tt-DDE induction method, tt-DDE, the main carcinogenic component of oil fume perfused into the trachea of mice. NNK 诱导法:腹腔注射烟草中致癌物 NNK。 NNK induction method, intraperitoneal injection of the carcinogen NNK in tobacco.	Wistar 大鼠、SD 大鼠 Wistar rat, SD rat	化合物通过诱导基因突变导致肺癌的发生。 Compound induces the occurrence of lung cancer by inducing gene mutation.	此方法能很好的模拟临床 NSCLC 的形成过程,但造模周期长且不能发生转移。 This method can simulate the formation process of clinical NSCLC very well, but the modeling cycle is long and the metastasis cannot occur.	[21-22]
	MCA+DEN 诱导法:MCA 和 10% DEN 碘化油混悬液经气管插管喷入大鼠肺中; MCA + DEN induction method, a suspension of MCA and 10% DEN iodized oil was sprayed into the lungs of rats through a tracheal intubation. DMBA 诱导法:大鼠气管内滴注 DMBA。 DMBA induction method, instill DMBA into the trachea of rats.				

续表 1

模型类型 Model types	造模方法 Modeling methods	动物类型 Animal types	特点 Characteristics	评价 Evaluations	参考文献 References
肺癌异位移植模型 Lung cancer heterotopic transplantation models	将肺癌细胞悬液或者肺癌肿瘤组织碎块移植到小鼠的腋下、背部或后肢等。 Lung cancer cell suspension or lung cancer tumor tissue fragments were transplanted into the armpit, back or hind limbs of mice.	C57BL/6、BALB/c 小鼠、裸鼠等 C57BL/6, BALB/c mice, nude mice, etc	肿瘤在皮下生长成瘤。 Tumor cells grow into tumors under the skin.	此造模方法简单,有较高的成瘤率,能较好的模拟人肺癌组织病理学,但临床吻合度低,很难发生转移且与肺脏本身的肿瘤微环境存在差异。 This modeling method is simple, has a high tumor formation rate, and can better simulate the histopathology of human lung cancer. However, the clinical anastomosis is low, metastasis is difficult to occur, and the tumor microenvironment of the lung itself is different.	[23-26]
肺癌原位移植模型 Lung cancer orthotopic transplantation models	将肺癌细胞悬液或肺癌组织碎块注射接种于小鼠的支气管或肺内。 Lung cancer cell suspension or lung cancer tissue fragments were injected into the bronchus or lungs of mice.	裸鼠、C57 小鼠等 Nude mice, C57 mice, etc	在肺脏和支气管内形成肿瘤。 Tumors form in the lungs and bronchi.	此方法临床吻合度高,具有很高的成瘤率,能发生侵袭转移,较好的模拟了人体肺癌的肿瘤微环境。但操作难度大,容易导致小鼠气胸死亡。 This method has high clinical anastomosis, high tumor formation rate, invasion and metastasis, and a good simulation of the tumor microenvironment of human lung cancer. But the operation is difficult, and it is easy to cause the death of mice pneumothorax.	[27-29]
基因修饰肺癌模型 Genetically modified lung cancer models	特异性敲除某特定基因或将某基因过表达导入老鼠体内从而构建肺癌动物模型。 Knock out a specific gene or introduce overexpression of a gene into mice to construct an animal model of lung cancer.	转基因鼠 Transgenic mice	在老鼠特定组织或全身过表达癌基因,或敲除抑癌基因从而形成肿瘤。 Overexpress oncogenes in specific tissues or the whole body of mice, or knock out tumor suppressor genes to form tumors.	该模型临床吻合度高,老鼠所呈现的肿瘤微环境很接近自发肿瘤状态,但成瘤时间长,小鼠间异质性差异大使得重复率低于同系肿瘤模型。 This model has a high degree of clinic anastomosis. The tumor microenvironment presented by the mice is very close to the spontaneous tumor state, but the tumor formation time is long, and the heterogeneity difference between mice is so large that the repetition rate is lower than that of the homologous tumor model.	[30-31]
肺癌转移模型 Lung cancer metastasis models	将肺癌细胞悬液可通过尾静脉注射或通过右后肢胫骨结节注射到老鼠体内构建肺癌转移瘤模型。 Lung cancer cell suspension can be injected into mice through the tail vein or through the tibial tubercle of the right hind limb to construct a lung cancer metastasis model.	裸鼠、NOD/SCID 小鼠、C57BL/6 小鼠、BALB/c 小鼠 Nude mice, NOD/SCID mice, C57BL/6 mice, BALB/c mice	肿瘤细胞通过形成血管内的癌栓经血液循环到肺组织,并粘附在血管上,逐步侵入肺实质演变成肺转移瘤。 Tumor cells circulate to the lung tissues through the blood through the formation of tumor thrombi in blood vessels, and adhere to the blood vessels, gradually invade the lung parenchyma and evolve into lung metastases.	尾静脉注射的转移率高,造模周期短,但容易出现过早转移。通过胫骨结节注射所构建的模型更符合人类肿瘤发生肺转移的临床病理过程,但操作难度较大。 Tail vein injection has a high metastasis rate and a short modeling cycle, but it is prone to premature metastasis. The model constructed by the tibial tubercle injection is more in line with the clinical pathological process of lung metastasis of human tumors, but the operation is more difficult.	[32-34]

2.1 气阴两虚证

气阴两虚证是肺癌患者临床最为常见的证型^[41],通过肺癌病证结合动物模型对该证型的模拟具有广泛的应用价值。吴海良等^[42]采用温热中药给予小鼠灌胃加“刨花烟熏”与 Lewis 肺癌荷瘤模型结合起来构建了肺癌气阴两虚病证结合模型,并通过观察小鼠的症状体征,检测白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)、丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 水平及对肿瘤组织进行病理学检测等方法对模型进行评价。与对照组相比,病证结合模型组小鼠出现毛发逐渐脱落,无光泽,运动量下降,饮食减少,疲倦乏力,体重下降,气短等气阴两虚症状,且 IL-1、MDA 水平升高,病理学观察瘤组织均呈现中低分化的腺癌特征,肿瘤细胞呈浸润生长,坏死较少。同时进行以方测证,采用具有益气养阴作用的金复康口服液进行干预,发现益气养阴中药组的小鼠肿瘤相比较对照组明显缩小,进一步验证了气阴两虚肺癌模型的构建成功。除此之外,后续逐渐也有学者在此模型基础上,进行了益气养阴中药治疗肺癌的作用机制研究^[43-48]。因此初步判断,该造模方法具有一定的稳定性和可靠性。

2.2 脾气虚证

脾为肺之母,“脾气散精,上归于肺”,所以肺癌病位虽在肺,但与脾密切相关,脾气虚证在肺癌患者中也是十分常见^[41,49]。钱钧等^[50]采用“苦寒泻下法+饥饿法+疲劳法”建立小鼠脾气虚证模型,可在造模 3、4 d 后陆续观察到小鼠的脾虚症状,并在造模后第 15 天通过血清检测发现脾气虚模型组小鼠血清 D-木糖和胃泌素水平明显低于对照组。随后将小鼠 Lewis 肺癌肿瘤细胞株接种于小鼠右腋下构建脾气虚肺癌模型。该课题组的其他成员也同样采取此方法构建脾气虚证肺癌模型,并以此为基础来对益气健脾中药如黄芪建中汤^[51]、加味黄芪建中汤^[52]、加味四君子汤^[53]进行抗肺癌的作用机制研究。

2.3 肾虚证

肺癌乃“本虚标实”之疾病,而正气亏虚之根本在于肾虚^[54],因此肾虚所形成的机体内环境也可能是导致肺癌发生发展的重要病因。豆萌萌等^[55]采用手术去势和 Lewis 肺癌荷瘤模型结合构建肺癌肾虚病证结合模型,并动态观察小鼠的行为表现、肿瘤生长情况,检测雌二醇、睾酮和肿瘤组织病理等。结果发现肾虚肺癌模型小鼠出现怕光、胆小易惊,

毛发干枯且光泽度降低,体重下降,活动时间减少等肾虚证候。与假手术组相比,肾虚肺癌模型组小鼠的肿瘤增长速度明显增快、肿瘤体积明显增大,血清雌二醇、睾酮明显下降,肺内转移率升高和肺转移结节数量增多,结果表明此模型是可行的,并且干扰因素较少,使模型的可操作性和可控性较强。

2.4 气滞血瘀证

吸烟、环境污染等可导致肺失宣降,气机失常,血行瘀滞,瘀毒气血胶结导致肺癌的发生^[56],所以气滞血瘀证也是肺癌患者主要证型之一。彭召云等^[57]采用“肾上腺素+束缚法”与 Lewis 肺癌荷瘤模型结合构建了肺癌气滞血瘀病证结合模型,动态观察小鼠的行为表现,并通过检测小鼠的瘤体体积和重量来进行评价。结果发现气滞血瘀肺癌模型组小鼠出现聚堆、易激惹、形体消瘦,进食量和活动量减少,口周、爪甲、肛周及耳缘出现散在脉络瘀血等与临床证候类似的气滞血瘀证候表现,与对照组相比,气滞血瘀肺癌模型组小鼠的肿瘤体积增大,血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达升高,该模型在一定程度上与临床的发病特点相符合,具备可行性。

3 讨论和展望

病证结合动物模型是病证结合药理学研究体系中的关键一环,也是中医药现代化研究中的重要组成部分。

3.1 病证结合肺癌动物模型的关键问题

肺癌病证结合动物模型在当前已有的疾病造模的基础上虽取得了一定的研究进展与成绩,但同时也存在较多的问题与争议。(1)造模思路单一,均采用“先证后病”的造模方法。目前肺癌的病证结合动物模型基本都是在先根据中医的病因建立证候模型,然后再通过皮下注射 LEWIS 肺癌细胞复制肺癌疾病模型。该方法可能存在人为所施加的干预因素对疾病模型造成改变,且病与证二者相互影响并非独立,增加了干扰因素从而降低了模型的稳定性和准确性。“先证后病”的复合造模方法与中医临床的病证结合存在偏差。临床上辨证常通过“望、闻、问、切”四诊合参全面收集患者的诊疗信息,而在肺癌病证结合动物模型中,研究者大多只通过对动物的简单观察或进行一些相关检测来收集证候信息,因而无法对肺癌临床证型进行客观的复制。此外,“先证后病”的造模方法无法阐明

表 2 肺癌常用病证结合模型总结

Table 2 Summary of the syndrome combination model commonly used in lung cancer

辨证分型 Syndrome Differentiation	造模方法 Modeling methods	周期 Cycles	症状 Symptoms	评价 Evaluations	参考文献 References
气阴两虚证 Dual deficiency of qi yin syndrome	C57BL/6 小鼠用温热中药(麻黄、制附子、细辛、天南星各 9 g, 灌胃浓度为 20 g/kg)灌胃加“刨花烟熏”(每天 1 次, 每次 10 min)持续干预 10 d, 然后将小鼠 Lewis 肺癌肿瘤细胞株接种于小鼠右腋皮下。 C57BL/6 mice were treated with warm traditional Chinese medicine (Ephedra, Fuzi, Asarum, Araceae, 9 g each, with an intragastric concentration of 20 g/kg) plus “shaving smoked” (1 time a day, every 10 minutes) continuous intervention After 10 days, the mice Lewis lung cancer tumor cell line was inoculated into the right axillary skin of the mice.	3 周左右 About 3 weeks	小鼠表现出明显的气阴两虚症状, 如毛发脱落、竖立、无光泽, 运动力明显下降, 反应灵敏度降低, 气短喘粗、神疲乏力、体重下降、饮食减少等。 Mice showed obvious symptoms of deficiency of both qi and yin, such as hair loss and dullness, significantly decreased exercise capacity, decreased response sensitivity, shortness of breath, breath lessness, fatigue, weight loss, and reduced diet.	操作简单, 但干扰因素多, 临床证型模拟度一般。 This method is simple to operate, but there are many interfering factors, and the degree of clinical syndrome simulation is average.	[42-48]
脾气虚证 Spleen qi deficiency syndrome	C57BL/6 小鼠用大黄浓缩液灌胃(每只小鼠 50 mL/(kg·d)), 同时每天游泳至力竭、间隔 1 d 节食(下午 4:00 至第二天早晨 8:30), 连续干预 14 d, 随后在小鼠右腋皮下接种 Lewis 肺癌瘤株。 C57BL/6 mice were gavaged with rhubarb concentrate (50 mL/(kg·d) per mice), and at the same time, they swim to exhaustion every day, and eat at intervals of 1 day (4:00 pm to the next morning 8:30), continuous intervention for 14 days, followed by inoculation of Lewis lung cancer strain into the right axilla of mice.	3~4 周左右 3~4 weeks	开始建立脾虚证模型后第 2、3 天起, 小鼠出现便溏, 并逐渐出现食欲减退、嗜卧、蜷缩、不好动、反应迟钝、毛色微发黄。 From the second and third days after the establishment of the spleen-deficiency syndrome model, the mice developed loose stools, and gradually appeared loss of appetite, lying down, curled up, not moving, unresponsive, and slightly yellowish coat.	该方法与临床证型的模拟度相对较高, 但操作步骤复杂, 干扰因素多。 This method has a relatively high degree of simulation with clinical syndromes, but the operation steps are complicated and there are many interference factors.	[50-53]
肾虚证 Kidney deficiency syndrome	雄性 C57BL/6 小鼠, 剥离并结扎输精管和摘除睾丸予以去势, 2 周后在小鼠右腋皮下接种 Lewis 肺癌瘤株。 Male C57BL/6 mice were castrated by stripping and ligating the vas deferens and removing the testicles. Two weeks later, the mice were inoculated with the Lewis lung cancer strain under the skin of the right axilla.	5 周左右 About 5 weeks	小鼠怕光、胆小易惊、活动时间较少, 毛色光亮度和体重下降。肾虚肺癌组小鼠相比较对照组成瘤速度更快, 肿瘤体积更大。 Mice appear to be afraid of light, timid and easily startled, less active time, brilliance of coat color and weight loss. In addition, mice in the kidney-deficiency lung cancer group formed tumors faster and larger tumors than the control.	干扰因素少, 可重复性高, 但模拟度一般, 具有一定的操作难度。 There are few interference factors and high repeatability, but the simulation degree is average and it has certain operation difficulty.	[55]

续表 2

辨证分型 Syndrome Differentiation	造模方法 Modeling methods	周期 Cycles	症状 Symptoms	评价 Evaluations	参考文献 References
气滞血瘀证 Qi stagnation and blood stasis syndrome	C57BL/6 小鼠, 使用 0.1% 盐酸肾上腺素按照 0.08 mg/kg 剂量注射到颈背部皮下, 每天 1 次, 0.2 mL/d, 同时用绷带细条束缚小鼠四肢, 并加笼外木棒敲击 5 min, 连续干预 1 周后在小鼠右腋皮下接种 Lewis 肺癌瘤株。 In C57BL/6 mice, 0.1% epinephrine hydrochloride was injected into the back of the neck subcutaneously at a dose of 0.08 mg/kg, once a day, 0.2 mL/d. At the same time, the limbs of the mice were restrained with a thin bandage and added outside the cage knock on the wooden stick for 5 min, and after continuous intervention for 1 week, inoculate the Lewis lung cancer strain into the right axilla of the mice.	3 周左右 About 3 weeks	小鼠聚堆、易激惹、活动少、进食量减少, 体重明显减轻, 形体显瘦, 毛发散乱, 口周、齿印、爪甲、耳缘以及肛周有 1~3 处不同程度的脉络瘀血。 Mice are crowded, irritable, less active, eating less, weight loss is obvious, the body is thin, the hair is scattered, there are 1~3 different levels of veins around the mouth, tooth prints, paw nails, ears and perianal. Blood stasis.	操作简单, 但与临床证型的模拟度不高。 Operation is simple, but the degree of simulation with the clinical syndrome is not high.	[57]

不同肺癌病理类型与证型之间的关联性。(2) 缺乏客观、统一的模型评价标准。在肺癌病证结合动物模型中, 造模目前主要采用肿瘤组织病理学、血液学指标检测等手段, 对动物的证候评价主要通过观察动物的一般行为、宏观表征及行为学, 缺乏成熟完善的证候指标评价体系。所以, 目前学术界对病证结合动物模型的认可度不高。(3) 肺癌疾病模型单一, 病证结合模型应用较少。目前报道的肺癌病证模型中肺癌的疾病模型均是采用的肺癌异位移植模型, 且细胞原位移植模型等其他肺癌疾病模型未见报道。目前报道的肺癌病证结合模型有 4 种, 运用较多的为气阴两虚证、和脾气虚证, 而“瘀血”致病理论在肺癌的发病中同样意义重大, 但目前报道较少。此外, 肺癌本质上来说是本虚标实, 虚实夹杂性疾病, 而目前虚证与实证相结合的复合证型模型尚未见报道。

3.2 病证结合肺癌动物模型的发展思路

在未来肺癌病证结合动物模型的研究中, 笔者认为:(1) 造模思路与方法上认为可以尝试采用将病因和证因同时干预模型动物, 从而达到病证同期的造模效果。这样更为贴合临床上病证的演变规律, 减少了干扰因素。但同时也得注意多因素的同时干预可能会造成动物的死亡, 从而降低模型构建的成功率。同时可以引入单因素造模方法, 即在不同病理类型的肺癌动物模型上动态观察动物的行为表征以及进行相关的指标检测等来判断“证”的

类型, 这样表现出来的“证”是疾病演变过程中自然的证候表现, 符合中医临床“证”的概念, 同时也能观察到不同病理类型的肺癌模型所表现出来的证的异同, 并能在一定程度上能揭示肺癌不同证型与病理类型的关系。(2) 动物的物种存在差异, 造模因素繁杂各异, 不同证型之间界定存在分歧等问题, 可借助临床指南的制定思路对动物的类别的选择及不同证型的干预手段进行标准化建设去实现肺癌病证结合动物模型的“病-证-症”统一。(3) 在模型评价方面, 可以借助现代的系统生物学技术。系统生物学的“整合”思想与中医学的整体观念相切合, 且弥补了传统四诊方法的不足与局限^[58]。当肺癌病证结合模型建立后, 一方面收集小鼠的行为学表现特征, 另一方面利用代谢组学、蛋白质组学、基因组学技术筛选模型动物不同证候的特异性生物标记物从而将中医的证候指标进行客观的量化, 并可以此为药物靶点用以检验方药的有效性。同时, “以方测证”反向验证评价肺癌模型缺乏针对性, 且方证之间的紧密性不足, 所以当使用“以方测证”反向验证法时, 应当充分考虑到中药多靶点和一方可治疗对证的特点, 因此需设置对照试验来增加研究结果的特异性。

综上所述, 肺癌病证结合动物模型目前仍处于起步的摸索阶段, 动物模型的总体稳定性较差, 且模型构建操作技术不够成熟。因此, 必须在遵循动物模型必备的稳定性、可重复性、可行性、客观真实

性等原则条件下,不断去优化现有的肺癌病证结合模型构建技术和方法,并借助现代分子生物学技术完善模型的评价标准,加大研发力度,提高肺癌病证模型的创新性,构建出符合中医临床辨证特点的高认可度的肺癌病证结合动物模型。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Thai AA, Solomon BJ, Sequist LV, et al. Lung cancer [J]. Lancet, 2021, 398(10299): 535-554.
- [3] Liao YH, Li CI, Lin CC, et al. Traditional Chinese medicine as adjunctive therapy improves the long-term survival of lung cancer patients [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143(12): 2425-2435.
- [4] 王学谦, 侯炜, 郑佳彬, 等. 中医综合治疗方案维持治疗晚期非小细胞肺癌的多中心、大样本、前瞻性队列研究 [J]. 中医杂志, 2020, 61(8): 690-694.
- [5] Li Y, Xiong C, Qin E, et al. Effectiveness of traditional Chinese medicine on chemo-radiotherapy induced leukaemia in patients with lung cancer: a meta-analysis [J]. J Tradit Chin Med, 2018, 38(5): 661-667.
- [6] Shen S, Jiang S. Chinese herbal medicines of supplementing Qi and nourishing Yin combined with chemotherapy for non-small cell lung cancer: a meta-analysis and systematic review [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 8841-8848.
- [7] Yang J, Zhu X, Yuan P, et al. Efficacy of traditional Chinese medicine combined with chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): a meta-analysis of randomized clinical trials [J]. Support Care Cancer, 2020, 28(8): 3571-3579.
- [8] Wen J, Yang T, Wang J, et al. Kanglaite injection combined with chemotherapy versus chemotherapy alone for the improvement of clinical efficacy and immune function in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020(1): 8586596.
- [9] 张朋, 刘苓霜, 姜怡, 等. 病证结合的中医药维持治疗方案干预晚期非小细胞肺癌免疫逃逸的临床研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(11): 5234-5239.
- [10] 王菊勇, 郑展, 王青, 等. 肺癌病证结合动物模型研究的思考 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(6): 1256-1258.
- [11] Alzahrani AM, Rajendran P. Pinocembrin attenuates benzo(a) pyrene-induced CYP1A1 expression through multiple pathways: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(4): e22695.
- [12] Lou Y, Guo Z, Zhu Y, et al. *Houttuynia cordata* Thunb. and its bioactive compound 2-undecanone significantly suppress benzo(a) pyrene-induced lung tumorigenesis by activating the Nrf2-HO-1/NQO-1 signaling pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 242.
- [13] Cedillo JL, Bordas A, Arnalich F, et al. Anti-tumoral activity of the human-specific duplicated form of $\alpha 7$ -nicotinic receptor subunit in tobacco-induced lung cancer progression [J]. Lung Cancer, 2019, 128: 134-144.
- [14] Wang GZ, Zhang L, Zhao XC, et al. The Aryl hydrocarbon receptor mediates tobacco-induced PD-L1 expression and is associated with response to immunotherapy [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1125.
- [15] Saggese P, Martinez CA, Tran LM, et al. Genotoxic treatment enhances immune response in a genetic model of lung cancer [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(14): 3595.
- [16] Westcott PM, Halliwill KD, To MD, et al. The mutational landscapes of genetic and chemical models of Kras-driven lung cancer [J]. Nature, 2015, 517(7535): 489-492.
- [17] Jiang Y, Martin J, Alkadhimi M, et al. Olaparib increases the therapeutic index of hemithoracic irradiation compared with hemithoracic irradiation alone in a mouse lung cancer model [J]. Br J Cancer, 2021, 124(11): 1809-1819.
- [18] Zheng J, Guo X, Nakamura Y, et al. Overexpression of PRDX4 modulates tumor microenvironment and promotes urethane-induced lung tumorigenesis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 8262730.
- [19] Wang CK, Chang LW, Chang H, et al. Pulmonary changes induced by trans, trans-2,4-decadienal, a component of cooking oil fumes [J]. Eur Respir J, 2010, 35(3): 667-675.
- [20] Stabile LP, Farooqui M, Kanterewicz B, et al. Preclinical evidence for combined use of aromatase inhibitors and NSAIDs as preventive agents of tobacco-induced lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(3): 399-412.
- [21] Zhang T, Chen Y, Ge Y, et al. Inhalation treatment of primary lung cancer using liposomal curcumin dry powder inhalers [J]. Acta Pharm Sin B, 2018, 8(3): 440-448.
- [22] Kumar K, Ghanghas P, Sanyal SN. Chemopreventive action of Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor in the regulation of angiogenesis and apoptosis in rat model of lung cancer [J]. Mol Cell Biochem, 2018, 447(1-2): 47-61.
- [23] Konen JM, Rodriguez BL, Padhye A, et al. Dual inhibition of MEK and AXL targets tumor cell heterogeneity and prevents resistant outgrowth mediated by the epithelial-to-mesenchymal transition in NSCLC [J]. Cancer Res, 2021, 81(5): 1398-1412.
- [24] Wang J, Chen H, Li W, et al. Cordyceps acid alleviates lung cancer in nude mice [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(3): e22670.
- [25] Zheng Y, Wang Z, Wei S, et al. Epigenetic silencing of chemokine CCL₂ represses macrophage infiltration to potentiate tumor development in small cell lung cancer [J]. Cancer Lett, 2021, 499: 148-163.
- [26] 司海龙, 陈玉, 苟涛, 等. 培元抗癌汤通过 PI3K-AKT-mTOR

- 信号通路调节 Lewis 肺癌自噬抑制肿瘤生长和转移的实验研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(8): 722-728.
- [27] Ishiwata T, Seki T, Gregor A, et al. A preclinical research platform to evaluate photosensitizers for transbronchial localization and phototherapy of lung cancer using an orthotopic mouse model [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2021, 10(1): 243-251.
- [28] Nakajima T, Anayama T, Matsuda Y, et al. Orthotopic lung cancer murine model by nonoperative transbronchial approach [J]. *Ann Thorac Surg*, 2014, 97(5): 1771-1775.
- [29] 杨晓华, 郭莉莉, 路丽明. 耐紫杉醇肺原位小鼠移植瘤模型的建立和鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 275-283.
- [30] Augert A, Mathsaraja H, Ibrahim AH, et al. MAX functions as a tumor suppressor and rewires metabolism in small cell lung cancer [J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(1): 97-114.
- [31] Mollaoglu G, Jones A, Wait SJ, et al. The lineage-defining transcription factors SOX2 and NKX2-1 determine lung cancer cell fate and shape the tumor immune microenvironment [J]. *Immunity*, 2018, 49(4): 764-779.
- [32] Li B, Zhu L, Lu C, et al. circNDUFB2 inhibits non-small cell lung cancer progression via destabilizing IGF2BPs and activating anti-tumor immunity [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 295.
- [33] Uzunalli G, Dieterly AM, Kemet CM, et al. Dynamic transition of the blood-brain barrier in the development of non-small cell lung cancer brain metastases [J]. *Oncotarget*, 2019, 10(59): 6334-6348.
- [34] 王静, 刘芳, 杨晓琼. BMP9 对裸鼠非小细胞肺癌骨转移的影响 [J]. 检验医学与临床, 2018, 15(23): 3566-3569.
- [35] 张娜, 刘学芳, 冯素香, 等. 肺癌骨转移动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 128-131, 137.
- [36] 王丹阳, 闫斌, 田国庆. 近五年中医药治疗原发性支气管肺癌临床研究概况 [J]. 中医杂志, 2021, 62(18): 1643-1647.
- [37] 姜怡, 张朋, 蔡雨晴, 等. 益气养阴解毒方及其联合抗 CTLA-4 单抗对肺癌原位模型小鼠生存期及瘤体组织 Foxp3、CTLA-4 蛋白表达的影响 [J]. 中医杂志, 2021, 62(10): 908-913.
- [38] 顾芳红, 周建伟, 谢立芳. 清燥救肺汤加减对晚期非小细胞肺癌化疗患者生活质量和生存期的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(11): 142-147.
- [39] 陈江涛, 余功, 谢斌. 清燥救肺汤对肺癌磷酸戊糖能量代谢途径的关键酶 G6PD 活性及其调控因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 59-63.
- [40] 陈晓波, 郝世凯, 王玉亮, 等. 健脾益肾颗粒对 Lewis 肺癌小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(2): 237-241.
- [41] 刘文瑞, 冯贞贞, 李建生. 基于文献的不同分期非小细胞肺癌患者中医证候、证素分布规律研究 [J]. 中医杂志, 2021, 62(18): 1635-1639.
- [42] 吴海良, 田静. 气阴两虚型肺癌动物模型的建立和评价 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2012, 22(12): 941-942.
- [43] 蓝巧玉, 蒋锐沅, 姚菲, 等. 基于 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路探究补肺消积饮对气阴两虚型炎症肺癌荷瘤小鼠的肿瘤抑制作用 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 524-528.
- [44] 李杨, 杨玲玲, 白彦丽, 等. 黄芪多糖对气阴两虚 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长、转移及细胞周期的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2018, 45(3): 131-137.
- [45] 师林, 黄圆圆, 柯斌. 加味龟鹿二仙胶汤联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠免疫功能的影响 [J]. 中药材, 2021, 27(18): 454-457.
- [46] 师林, 黄圆圆, 柯斌. 加味龟鹿二仙胶汤联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠耐药相关基因及 IL-7 介导的 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 66-72.
- [47] 师林, 柯斌, 黄圆圆, 等. 加味龟鹿二仙胶汤联合顺铂对小鼠 Lewis 肺癌组织、骨髓组织 TGF- β_1 /Smad 信号通路的影响 [J]. 中药材, 2017, 40(10): 2419-2423.
- [48] 师林, 柯斌, 黄圆圆, 等. 加味龟鹿二仙胶汤联合顺铂对小鼠 Lewis 肺癌 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响 [J]. 中成药, 2017, 39(10): 2148-2152.
- [49] 郭雯, 冯贞贞, 王露, 等. 基于文献的肺癌常见中医证候研究 [J]. 中医杂志, 2021, 62(16): 1447-1454.
- [50] 钱钧, 姜涛, 包素珍, 等. 加味黄芪建中汤通过 miR-574-5p 对脾气虚 Lewis 肺癌小鼠 Wnt/ β -catenin 信号转导途径的调控机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 298-301.
- [51] 艾叶盛, 包素珍. 黄芪建中汤抑制脾气虚证肺癌小鼠肿瘤转移的实验研究 [J]. 山西中医学院学报, 2013, 14(2): 16-18.
- [52] 包素珍, 张誉引, 陈淇. 加味黄芪建中汤对脾虚证肺癌小鼠 VEGF 的表达及 MVD 的影响 [J]. 陕西中医药大学学报, 2016, 39(1): 99-101.
- [53] 包素珍, 李恒楠. 加味四君子汤干预脾气虚肺癌 survivin 基因研究 [J]. 山西中医学院学报, 2015, 16(6): 8-10.
- [54] 田建辉, 上官文姬. 补肾治则在肺癌治疗中应用探讨 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(4): 9-11.
- [55] 豆萌萌, 王淑玲, 周学良, 等. 去势小鼠肾虚肺癌模型建立后性激素对肺癌发生的作用机制探讨 [J]. 肿瘤, 2017, 37(9): 917-923, 952.
- [56] 徐杉智, 余功, 谢斌. 肺癌的病机分析及方剂应用探索 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(2): 270-272.
- [57] 彭召云, 郑心, 鲁兴隆. 肺抑瘤膏对气滞血瘀质 Lewis 肺癌小鼠肿瘤生长及 VEGF-C 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(12): 2895-2896.
- [58] 袁顺, 王宁, 孟丹丹, 等. 系统生物学在中医证候模型评价方法中的应用与研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(10): 1252-1257.

[收稿日期] 2021-11-04

赵倩, 李劲草, 王萧, 等. 实验动物在评价天王补心丹防治失眠中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 120-126.
Zhao Q, Li JC, Wang X, et al. Role of experimental animals in evaluating prevention and treatment of insomnia with Tianwang Buxin Dan [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 120-126.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.016

实验动物在评价天王补心丹防治失眠中的作用

赵倩^{1,2}, 李劲草², 王萧^{1*}, 张有志^{2*}

(1. 广州中医药大学动物实验中心, 广州 511400; 2. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京 100089)

【摘要】 失眠作为常见的神经精神疾病, 发病率逐年上升。天王补心丹是补心安神治疗失眠的经典中医方剂, 临床应用广泛。对天王补心丹的药理作用评价与作用机制研究需以适当的动物模型为基础。本文对近 10 年相关文献进行汇总, 针对多平台水环境模型、对氯苯丙氨酸 (parachlorophenylalanine, PCPA) 失眠模型、光照节律紊乱模型和中医证候复合模型的优缺点、造模方法、评价指标等特点进行阐述。探讨天王补心丹及组方单味药材改善睡眠的指标与中医证候的内在联系, 为建立符合中医特点的失眠动物模型提供参考, 为天王补心丹用于失眠治疗提供借鉴。

【关键词】 失眠模型; 天王补心丹; 中医证候

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0120-07

Role of experimental animals in evaluating prevention and treatment of insomnia with Tianwang Buxin Dan

ZHAO Qian^{1,2}, LI Jincan², WANG Xiao^{1*}, ZHANG Youzhi^{2*}

(1. Laboratory Animal Center of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, China.

2. State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100089)

【Abstract】 Insomnia is a common neuropsychiatric disease with increasing incidence in recent years. Tianwang Buxin Dan (TWBXD) is a traditional Chinese medicine (TCM) prescription to invigorate the heart and calm nerves for the treatment of insomnia, which is widely used in clinical practice. Investigation of the pharmacological effects and action mechanism of TWBXD is based on the establishment of proper animal models. This article summarizes relevant literature in the past 10 years with a focus on multiple insomnia animal models (platform over water, parachlorophenylalanine, light rhythm disturbance, and TCM syndrome) and their strengths and weaknesses, methodology, and evaluation properties. The sleep-improving effects of TWBXD and its signal herbs are associated with TCM syndrome to establish animal models that fit the characteristics of TCM syndrome and provide a reference for the clinical application of TWBXD.

【Keywords】 insomnia model; Tianwang Buxin Dan; TCM syndrome

失眠症是指在睡眠时间充足、环境适宜的情况下发生入睡或睡眠维持困难, 并导致日间功能障碍的神经精神疾病, 以入睡困难、频繁觉醒、早醒和非

恢复性睡眠为主要症状^[1]。作为最常见的睡眠障碍, 失眠在我国发病率约为 40%, 其中 6%~10% 的人被确诊为长期失眠^[2]。临床常用苯二氮卓类和

【基金项目】 国家科技重大专项课题 (2018ZX09739-008)。

【作者简介】 赵倩 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 失眠模型。E-mail: 20201110932@stu.gzucm.edu.cn

【通信作者】 王萧 (1972—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: xwang72@gzucm.edu.cn

张有志 (1971—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 精神药理学。E-mail: bcczyz@163.com

* 共同通信作者

非苯二氮卓类等化学药物进行治疗,作用范围有限且依赖性,无法从根本上治愈睡眠问题,而天王补心丹具有治疗广泛、不易产生成瘾性和耐药性,在失眠防治上具有潜在独特优势。

中医对失眠的认识和治疗历史悠久,中医称失眠为“不寐”、“不得卧”、“目不瞑”,认为由心神失养或心神不安所致。天王补心丹源起于宋代《校注妇人良方》,方可“宁心保神,益血固精……祛烦热,除惊悸”,有补心安神,滋阴养血的功效,是治疗阴亏血少,虚烦少寐的经典名方^[3]。大量临床及实验研究证实,天王补心丹和方中生地,酸枣仁、五味子、茯苓等可显著提高睡眠质量,但发病机制尚不清楚,基于患者的临床实验有一定的局限性,因此建立理想动物模型十分必要。理想动物模型应具备 3 个原则,即表观效度、结构效度、预测效度,即疾病动物模型应与人类疾病具有相似的症状表现和病理生理机制,并且对经典治疗药物产生相似的反应性。目前研究常用的失眠模型较为单一。本文对近 10 余年失眠动物模型在天王补心丹中的应用文献进行了汇总,从实验动物种类、造模方法、评价指标等方面总结天王补心丹在失眠动物模型的研究进展,为此方在治疗失眠的基础研究与临床应用中提供新的思路和方法。

1 文献分析

通过 3 大数据库,以“失眠”“模型”和“天王补心丹”为主题,时间设定为 2010 年 1 月~2021 年 12 月进行检索,其中 CNKI 数据库检索到期刊文献 25 篇,万方数据库 5 篇,维普数据库 0 篇,选择研究失眠的全部动物实验文献、硕博论文、排除综述类文献及 3 大数据库中重复的文献,最终有 12 篇文献符合检索要求。同理,将“天王补心丹”替换为“地黄”“酸枣仁”“五味子”“茯苓”后依次有 3 篇、13 篇、7 篇、3 篇文献符合检索要求。笔者对其组方及方中单药对实验动物种类、动物模型、造模方法、评价指标及模型使用频次进行整理如表 1 和表 2。

2 PCPA 模型

对氯苯丙氨酸(PCPA)作为 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)合成抑制剂,在失眠模型中应用广泛。戊巴比妥钠阈上或阈下剂量协同实验是评价药物镇静催眠的常用方法。给予实验动物 PCPA 后一般可出现持续 48 h 的失眠,表现为白日

活动量增加,摄食减少,昼夜节律消失,此模型优点是可以模拟完全睡眠剥夺表型,准确定位改变脑内神经递质,但还可以产生其他病理症状及代谢失衡^[12],且因 PCPA 药性难溶制备困难,药效难以保证,对操作者技术要求较高,现今文献报到多使用阿拉伯树胶与蓖麻油作为促溶剂,采用腹腔注射的方法最利于吸收,常使用 200~220 g SD 大鼠和 18~22 g 多种品系成年小鼠制备此失眠模型^[13]。

2.1 PCPA 模型在天王补心丹方剂研究中的应用

谢光璟等^[4]利用该模型研究天王补心丹加减方对氧化应激通路的作用。向大鼠腹腔内注射 150 mg/kg 的 PCPA 溶液 7 d,利用戊巴比妥钠协同催眠实验对模型评估,当大鼠发生睡眠时翻正反射消失,觉醒时大鼠在 1 min 之内连续完成 3 次自主翻转视为翻正反射恢复,15 min 内模型组大鼠较正常对照组大鼠的睡眠潜伏期延长、睡眠持续时间缩短、睡眠发生率降低,证明造模成功。给予天王补心丹后发现,模型组大鼠的 SOD 与 GSH-Px 活性增加,MDA 表达下降、硫氧环蛋白 2 含量增加而硫氧环蛋白还原酶 2 含量减少,其昼夜节律紊乱现象明显改善。每天 8:00 使用 400 mg/kg PCPA 混悬液注射 2 d,也可使大鼠出现昼夜节律紊乱表现。刘珊等^[11]利用此模型研究天王补心丹调控炎症因子的作用,发现其可以调节大鼠的 TLR4、MyD88 表达,使外周血核因子 NF- κ B、TRIF、TNF- α 、IL-1 水平下降,证实天王补心丹的镇静安神作用机制可能与调节炎症因子,改善机体免疫力有关。

2.2 PCPA 模型在单味药研究中的应用

天王补心丹组方复杂,其广泛的治疗效用与多靶点的药理作用是建立在单药的基础之上的。药理学研究表明地黄的中枢神经抑制作用研究最早见于 1989 年^[14],利用 PCPA 与戊巴比妥钠协同催眠实验证实地黄和酸枣仁可作用于脑内 5-HT、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、多巴胺(dopamine, DA)等神经递质发挥中枢神经抑制作用。向小鼠腹腔注射 35 mg/kg 戊巴比妥钠溶液,利用翻正反射验证是否造模成功,从开始注射到翻正反射消失时间为入睡潜伏期,翻正反射消失到恢复时间为睡眠时间。以翻正反射消失达 1 min 为入睡标志,30 s 内连续翻转 3 次为睡眠结束标志。记录 30 min 内入睡只数、入睡潜伏期及睡眠时间,计算睡眠发生率。王婷婷等^[15]给予模型组小鼠腹腔注射 40 mg/100 g PCPA,连续 2 d,实验结果显示地黄与酸枣仁的潜伏

期和睡眠持续时间相似,而睡眠发生率地黄组明显高于酸枣仁组,提示在临床应用中,酸枣仁、地黄对睡后易醒的失眠患者疗效最佳,而不适用于入睡困难的失眠患者。刘彦飞^[16]利用该模型评价证明了地黄各部位均有不同程度的镇静催眠作用。武锦春等^[17]使用该模型发现酸枣仁中的主要物质斯皮诺素、阿魏酸等物质可以作用于 NE 能系统和 5-HT

能系统发挥镇静作用。

研究证实五味子木质素可以下调脑中 5-HT、 γ 氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)与谷氨酸(γ -glutamate, Glu)比例以及其受体水平发挥镇静作用。利用戊巴比妥钠协同催眠实验,在小鼠腹腔注射 PCPA 混悬液 24 h 后给予五味子素灌胃,30 min 后进行戊巴比妥协同催眠实验,以 1 min 小鼠翻正

表 1 天王补心丹常用实验动物种类、动物模型、造模方法及评价指标

Table 1 Animal models, modeling methods and evaluation indexes of common experimental animals of TWBXD

参考文献 References	实验动物 Experimental animals	动物模型 Animal models	造模方法 Building methods	评价指标 Evaluation index
[4]	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	PCPA 模型 Parachlorophenylalanine model	腹腔注射 150 mg/kg PCPA 间断注射 7 d Intraperitoneal injection of 150 mg/kg PCPA was performed intermittently for 7 days	翻正反射法 Righting reflex
[5-6]	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	多平台水环境模型(柱台直 径 8 cm) Modified multiple platform method (the diameter of the column is 8 cm)	光照 400 lx 睡眠剥夺每天 20 h, 连续 7 d/28 d Light 400 lx Sleep deprivation for 20 hours daily for 7 days or 28 days	脑电总睡眠时间和慢波睡眠时间 减少且精神萎靡 Total EEG sleep time and slow wave sleep time decreased and lethargy
[7]	雄性 C57BL/6 小鼠 Male C57BL/ 6 mice	多平台水环境模型(柱台直 径 6 cm) Modified multiple platform method (the diameter of the column is 6 cm)	睡眠剥夺每天 18 h, 持续 56 d Sleep deprivation for 18 hours daily for 56 days	
[8]	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	咖啡因模型联合多平台水 环境模型 Caffeine model and modified multiple platform method	腹腔注射咖啡因 30 mg/kg 睡眠剥夺每天 18 h, 持续 14 d Intraperitoneal injection of caffeine 30 mg/kg Sleep deprivation for 18 hours daily for 14 days	精神萎靡、 背毛粗糙、 掉毛、 体重增加幅度减少、 摄食减少、 易怒、 爪甲颜色暗淡 等
[9]	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	咖啡因模型、环磷酰胺模型 联合多平台水环境模型 Caffeine model and cyclophosphamide model and modified multiple platform method	咖啡因 60 mg/kg 环磷酰胺 100 mg/kg 睡眠剥夺每天 18 h, 持续 14 d Caffeine 60 mg/kg Cyclophosphamide 100 mg/kg Sleep deprivation for 18 hours daily for 14 days	Lethargy、 coarse back hair、 hair loss、reduced weight gain、 reduced food intake、irritability、 dull nail color and so on
[10]	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	衰老模型 咖啡因模型 多平台水环境模型 Aging model, caffeine model and modified multiple platform method	颈背部皮下注射 D-半乳糖 60 mg/kg 咖啡因 30 mg/kg D-galactose 60 mg/kg was injected subcutaneously into the neck and back Caffeine 60 mg/kg	
[11]	SD 大鼠雌雄 各半 SD rats were divided into male and female	PCPA 模型 Parachlorophenylalanine model	PCPA 400 mg/kg, 连续 2 d PCPA 400 mg/kg, continuous 2 days	昼夜节律消失 Loss of circadian rhythm

表 2 天王补心丹中单味药-地黄、酸枣仁、五味子、茯苓的常用实验动物种类、动物模型、药物剂量及模型使用频次
Table 2 Common experimental animal species, animal model, drug dose and model use frequency of single drug in Tianwang Buxin Dan-rehmannia glutinosa, jujube seed, schisandra fruit and tuckahoe

中药 Traditional Chinese medicine	实验动物 Experimental animals	动物模型 Animal models	造模方法与给药剂量 Modeling method and dosage	使用频次 Frequency of usage
地黄 Rehmannia glutinosa	雄性昆明小鼠 Male Kunming mice	戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test	戊巴比妥钠 23 mg/kg Sodium pentobarbital 23 mg/kg	2
	雄性昆明小鼠 Male Kunming mice	PCPA 和戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test and Parachlorophenylalanine model	戊巴比妥钠 35 mg/kg PCPA 40 mg/100 g, 连续 2 d Sodium pentobarbital 35 mg/kg Parachlorophenylalanine 40 mg/100 g continuous 2 d	1
	雄性 Wistar/SD 大鼠 Male SD or Wistar rats	PCPA 模型 Parachlorophenylalanine model	PCPA 400 mg/kg 3 d 或 350 mg/kg 2 d Parachlorophenylalanine 400 mg/kg, continuous 2 d or 350 mg/kg continuous 2 d	7
	雄性 SD 大鼠 Male SD rats	多平台水环境模型 Modified multiple platform method	连续剥夺 48 h Sleep deprivation for 48 hours daily	1
酸枣仁 Ziziphus jujube	雄性 ICR 小鼠 Male ICR mice	戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test	戊巴比妥钠 50 mg/kg Sodium pentobarbital 50 mg/kg	2
	黑腹果蝇雌雄各半 Drosophila melanogaster is split between males and females	光照模型 Illumination model	20:00 开始, 每小时光照 10 min 至第 2 天 7:00, 光照强度 650 lx From 8 pm to 7 am the next day, the light intensity is 650 lx	1
	雄性 Wistar 大鼠 Male Wistar rats	PCPA 和戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test and Parachlorophenylalanine model	28 mg/kg 戊巴比妥钠 150 mg/kg PCPA 28 mg/kg sodium pentobarbital	1
五味子 Schisandra chinensis	雄性 Wistar 大鼠/昆明小鼠 Male Wistar rats or Kunming mice	D-半乳糖致急性衰老模型、环磷酰胺及氢化可的松模型 D-galactose induced subacute aging, cyclophosphamide and hydrocortisone models	D-半乳糖致 60 mg/kg 16 周 环磷酰胺 100 mg/kg 5 d 氢化可的松 50 mg/kg 5 d D-galactose to 60 mg/kg for 16 weeks Cyclophosphamide 100 mg/kg for 5 d Hydrocortisone 50 mg/kg for 5 d	1
	雄性 Wistar 大鼠/昆明小鼠 Male Wistar rats or Kunming mice	PCPA 和戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test and Parachlorophenylalanine model	PCPA 300 mg/kg 戊巴比妥钠 28 mg/kg 和 35 mg/kg Sodium pentobarbital 28 mg/kg and 35 mg/kg	3
茯苓 Poria coxburghii	雄性昆明小鼠 Male Kunming mice	PCPA 和戊巴比妥钠协同催眠实验 Sodium pentobarbital combined with hypnosis test and Parachlorophenylalanine model	PCPA 300 mg/kg 戊巴比妥钠 45 mg/kg Sodium pentobarbital 45 mg/kg	3

反射消失率为模型成功标准^[18-19]。贾颖等^[20]基于此模型的基础上利用超临界 CO₂ 萃取方法制备酸枣仁挥发油,发现含有油酰胺等内源性睡眠诱导物可以增加动物模型的慢波睡眠,且酸枣仁油的镇静催眠作用优于皂苷。徐飞飞等^[21]发现枣仁-茯苓-党参水提物也可以调节 GABA/Glu 比例。徐煜彬

等^[22]进一步研究,证实其主要成分茯苓粗多糖能显著缩短 50 mg/kg 及 80 mg/kg 戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠潜伏期,延长小鼠睡眠持续时间。王天合等^[23]使用茯苓水提物连续灌胃 7 d 后,给予戊巴比妥钠,发现其麻醉时间与小鼠睡眠持续时间增加,以猪苓酸 C 等 10 种成分与镇静催眠药效密切相

关。方中其它中药柏子仁、人参、远志也采用此模型所以并未一一阐述^[24-27]。综上所述,利用 PCPA 失眠模型证实天王补心丹中的生地、酸枣仁、五味子、茯苓等单味药可能通过对神经递质的调控而发挥镇静安神作用。

3 多平台水环境模型

多平台水环境模型是实现非快速眼动睡眠剥夺(REM)的常用模型。现今研究实验动物多为大、小鼠,大鼠常采用直径 6.5 cm 柱台^[28],而小鼠以 4.5 cm~5.0 cm 居多^[29],其原理是根据大、小鼠畏水的天性,无法在充满水的环境中进入完全睡眠状态,实验动物可以在各柱台间自由活动、饮水、摄食,当其进入深睡眠时由于肌张力降低而落入水中,迅速惊醒进而剥夺其 REM 睡眠,此模型相对保留慢波睡眠,但小鼠死亡率高,常因落入水中后体力不支浸泡在水中失温溺水而亡。常用 18~22 g 的 C57BL/6 雄性小鼠或 180~220 g SD 雄性大鼠。

黄晓宇等^[5]使用该模型探究天王补心丹加减方与能量代谢、糖代谢及脂质代谢的关系。将大鼠放置在箱中的柱台上,水面在柱台下 1 cm 处,箱子上方放置充足的水和饲料,连续睡眠剥夺 7 d,每天 20 h,以脑电植入子图谱显示的总睡眠时间和慢波睡眠时间减少作为模型成功的标准,结果显示天王补心丹可使此模型大鼠的 MAPK 信号转导通路中的调节因子(如双特异性磷酸酶 1)表达水平恢复正常,激活 p38 MAPK 信号通路,改善睡眠质量。将上述造模时间延长至 28 d,将脑电芯片植入皮层下,根据脑电特征分析大鼠的睡眠时相,模型组大鼠较正常对照组的总睡眠时间和慢波睡眠时间皆减少时,则造模成功。该模型证明天王补心丹通过调节单核细胞趋化因子-1(MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和促炎因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)等炎症因子水平,增加慢波睡眠时长进而改善学习记忆力^[6]。将剥夺时间延长至 56 d,每天剥夺 18 h,并于造模 28 d 后开始给药,发现天王补心丹加减方可以降低模型组小鼠下丘脑中食欲素表达,降低血糖值及甘油三酯(TG)、总胆固醇(TCH)和游离脂肪酸(FFA)的含量,证明此方在调控睡眠的同时可以影响糖代谢与脂质代谢^[5]。单药使用该模型较少,赵翠等^[30]利用水平平台连续造模 4 d,发现酸枣仁提取物可以调节 T 淋巴细胞亚群平衡,使 CD4⁺T 淋巴细胞比例升高,CD8⁺T 淋巴细胞比例降低,抑制 TNF- α 、IL-6、IL-2、IL-1 β 炎症因子表达,增强免疫功能,即“正气存内,邪不可干”,“气充则神旺”。

4 中医阴虚证的复合模型

中医理论认为不寐的病因病机复杂多端,如思虑劳倦则耗伤心脾;心胆气虚则心神不安;心肾不交则水火不济;阴虚火旺则肝阳上扰等。在不寐众多证型中,以阴虚火旺型不寐最为常见,约占 20.2%^[31]。模拟临床阴虚火旺的证型对失眠的研究具有重大意义。大小鼠作为最常见的模型制备哺乳类动物,与人类具有睡眠相似状态,适应于中医阴虚证型的研究。多使用 Wistar 或 SD 成年雄性大鼠制备此类模型^[32]。

实验动物研究中常用环磷酸胺或咖啡因建立中医阴虚证型,研究显示注射环磷酸胺后,实验动物的大部分体征符合中医阴虚体质的临床表现,包括精神不振,毛粗黄、掉毛、摄食量减少、消瘦、易被激怒等,生理指标则显示其红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、血小板(PLT)数量均减少^[33]。咖啡因作为腺苷受体拮抗剂,与抑制性神经递质腺苷 A2A 受体结合进而抑制睡眠增强觉醒。在多平台水环境模型的基础上联合咖啡因注射组成慢性复合型睡眠剥夺,可以更好地模拟阴虚不寐患者的临床表现。该模型常用于探究天王补心丹对下丘脑视交叉上核(SCN)中各种参与昼夜节律调节的肽能神经元的表达,如血管活性肠肽(VIP)、精氨酸加压素(AVP)^[8]。提示天王补心丹可以用来治疗轮班工作睡眠障碍及对咖啡因依赖的患者,但目前对于天王补心丹节律调控的研究较少,需要更深入的探讨。咖啡因、环磷酸胺与多平台水环境的复合模型考察天王补心丹影响大鼠海马区记忆与学习的功能,采用腹腔注射 60 mg/kg 的咖啡因及 100 mg/kg 环磷酸胺,连续 7 d 后进行多平台水环境睡眠剥夺,共剥夺 14 d,每天 18 h。结果表明天王补心丹可以调节脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)表达^[9]。

根据中医阴阳学说理论,老年人多血虚阴亏,由 D-半乳糖制备的衰老模型体征符合上述中医阴血亏虚的辨证要点。黄攀攀等^[10]将大鼠颈背部皮下注射 D-半乳糖 60 mg/kg 持续 28 d,于第 21 天开始叠加腹腔注射 30 mg/kg 咖啡因至第 28 天,第 29 天时利用多平台水环境法连续睡眠剥夺 7 d,每天 12 h。根据大鼠体重减轻、力竭性游泳时间减少等指标反应大鼠乏力,同时大鼠心率加快、血压升高、耳温升高证明阴虚发热的中医症状表现,口唇爪甲耳颜色浅淡以及血象特征表明其同时出现血虚的

表现。张舜波等^[34]给予模型组大鼠相同剂量的 D-半乳糖 16 周、环磷酸腺苷 5 d 后再注射 50 mg/kg 氢化可的松 5 d,置于箱内连续剥夺 48 h,证实酸枣仁总皂苷可以调节老年失眠大鼠皮层及海马部位的 Glu、GABA 神经递质及受体含量,对临床老年失眠患者意义重大。

5 光照节律紊乱模型

光照模型是通过扰乱实验动物的光周期,达到睡眠剥夺的目的,常应用于睡眠节律紊乱研究。常见的模型动物有斑马鱼、黑腹果蝇等^[35]。果蝇的光照模型日趋成熟,当果蝇在第 1 天晚上被睡眠剥夺时,第 2 天白天则会出现睡眠代偿,与年幼果蝇相比,日龄越大的果蝇拥有更多的片段化睡眠和较少的睡眠持续时间,这与人类睡眠极为相似,且与人类基因高度同源^[36],被广泛使用。杨波等^[37]使用果蝇光照模型证明酸枣仁皂苷 A 与 B 的作用机制不同,皂苷 B 可以显著减少白天睡眠时间。选用 5~7 日龄野生型 Canton S 果蝇,早 7 点至晚 7 点为正常光照,晚 8 点开始,每小时光照 10 min 至第 2 天早 7 点,光照强度设置为 650 lx,通过间断性光照使果蝇睡眠片段化达到睡眠剥夺的目的。当果蝇静止状态超于 5 min 时发生睡眠。以睡眠时间、次数和深度指数等作为果蝇睡眠评价指标。

6 总结

天王补心丹对失眠的防治有较好的作用,作为中医临床经典方剂一直沿用至今。比较分析失眠模型特征发现,环磷酸腺苷联合多平台水环境睡眠剥夺等复合模型可以更加准确的模拟中医阴虚的证候体征,也常用于其他中医方剂治疗失眠的模型制备^[38]。注射环磷酸腺苷后导致免疫缺陷,即中医理论的正气不足,气虚日久累及到阴血,可以复刻阴虚证型。中医阴阳体质学说认为“阴虚则热”“耗伤津血”,则出现消瘦、烦热等症状与模型动物的摄食减少,毛发枯槁,抓取时反抗强烈相对应,血液亏虚则表现为贫血,反映在血小板、红细胞等生理指标的数量减少。

天王补心丹中单味药生地、酸枣仁、五味子、茯苓等常使用 PCPA 与戊巴比妥钠协同催眠实验探究其对中枢神经抑制作用,适用于神经递质的研究。药理学研究已证实以上中药使模型动物的旷场、水迷宫等行为学发生改变,认知和学习能力得到提高^[21-22,30]。中医理论认为“阴为血,阳为气”,生地、酸枣仁、五味子均为滋阴之药,通过滋生阴液而补

充血液,而“血养神”“血主濡之”,《灵枢·营卫生会》曰“血者,神气也”。血有濡养和化神的作用,是神志活动的物质基础,血液充盈,则精力充沛,思维敏捷,认知与学习能力正常。若血液亏虚,则神志不安,出现不寐、健忘、惊悸、梦遗等症状^[39]。现代研究也证实,睡眠与记忆都是大脑的基本功能,失眠则会影响 GABA、NE 等与记忆认知密切相关的神经递质^[40]。

多平台水环境模型作为失眠的经典模型,脑电分析证实其结构效度较为理想,实验动物表现出的大部分表型与中医阴虚证相符,但还存在心理应激等影响因素。光照模型在此方剂的研究中应用较少,但果蝇的分子遗传学优势明显、饲养成本低、寿命短,且模型的表现效度与人类睡眠高度相似性,适用于睡眠节律的研究。

失眠的发病机制十分复杂,研究已证实其发病机制与炎症因子、氧化应激及神经递质密切相关^[41],天王补心丹及单药可以作用于以上通路发挥镇静安神作用。失眠动物模型根据其自身特点被应用于不同研究,但实验动物的生理、病理、解剖结构始终与人存在着差异。并非人类所有致病因素均能在动物模型中复制,如喜怒忧思悲恐惊七情而导致的情志内伤难以在动物模型中有所体现。应采用多种因素复合的造模方法,充分模拟失眠复杂的临床发病机制,同时重点关注模型动物一般行为和生理指标与中医证候之间的联系,建立符合中医辨证理论的失眠动物模型,实现对中药复方失眠治疗作用的针对性评价。

参考文献:

- [1] Sateia MJ, Buysse DJ, Krystal AD, et al. Clinical practice guideline for the pharmacologic treatment of chronic insomnia in adults: an american academy of sleep medicine clinical practice guideline [J]. J Clin Sleep Med, 2017, 13(2): 307-349.
- [2] 张鹏,李雁鹏,吴惠涓,等.中国成人失眠诊断与治疗指南(2017 版)[J].中华神经科杂志,2018,51(5):324-335.
- [3] 陈克正.天王补心丹方源再考[J].中成药研究,1986,8:40-41.
- [4] 谢光璟,黄攀攀,王平.天王补心丹加减改善 PCPA 失眠大鼠 Trx 系统氧化损伤的机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(6):32-38.
- [5] 黄晓宇,谢光璟,黄攀攀.天王补心丹加减干预睡眠剥夺大鼠能量代谢机制的生物信息学分析[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(22):172-180.
- [6] 黄晓宇,谢光璟,李浩,等.天王补心丹加减对睡眠剥夺大鼠学习记忆及炎症因子表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(23):56-62.

- [7] 黄晓宇, 谢光璟, 李浩, 等. 天王补心丹加减通过 orexin A/OX1R 对慢性睡眠剥夺小鼠糖脂代谢的干预作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 121-127.
- [8] 谢光璟, 薄文集, 黄攀攀, 等. 天王补心丹对慢性睡眠剥夺模型大鼠心肌、下丘脑视交叉上核 VIP、AVP 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 323-326.
- [9] 谢光璟, 黄攀攀, 王平. 基于 cAMP/CREB 信号通路探讨天王补心丹对复合失眠模型大鼠学习记忆水平及神经因子的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(9): 1991-1994, 2016.
- [10] 黄攀攀, 王平, 李贵海, 等. 老年阴虚失眠动物模型的建立与评价 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(8): 1719-1723.
- [11] 刘珊, 敬秀平, 谢安卫, 等. 天王补心丹对失眠模型鼠的疗效及部分机制研究 [J]. 世界中医药, 2021, 16(5): 775-778.
- [12] Ren XJ, Wang QQ, Zhang XP, et al. Establishment of a rat model with ageing insomnia induced by D-galactose and parachlorophenylalanine [J]. Exp Ther Med, 2020, 20(4): 3228-3236.
- [13] Kaswan NK, Mohammed Izham N, Tengku Mohamad T, et al. Cardamonin modulates neuropathic pain through the possible involvement of serotonergic 5-HT1A receptor pathway in CCI-induced neuropathic pain mice model [J]. Molecules, 2021, 26(12): 3677.
- [14] 吴尚魁, 刘鹤香, 刘春霞, 等. 怀地黄对中枢神经系统的抑制效应 [J]. 新乡医学院学报, 1989, 1: 12-14.
- [15] 王婷婷, 王芮, 杨伟丽, 等. 六味安神中药对小鼠镇静催眠作用影响的研究 [J]. 河北中医药学报, 2021, 36(2): 1-5.
- [16] 刘彦飞. 地黄活性物质与功能研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.
- [17] 武锦春, 杜晨晖, 秦雪梅, 等. UHPLC/Q-Orbitrap-MS 结合化学计量学方法研究酸枣仁入血成分 [J]. 分析测试学报, 2021, 40(1): 19-26.
- [18] 张羽翀, 王梦阳, 林慧娇, 等. 五味子木脂素对氯苯丙氨酸致失眠大鼠的催眠作用 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(4): 861-863.
- [19] Zhu H, Zhang L, Wang G, et al. Sedative and hypnotic effects of supercritical carbon dioxide fluid extraction from Schisandra chinensis in mice [J]. J Food Drug Anal, 2016, 24(4): 831-838.
- [20] 贾颖, 郭亚菲, 孙胜杰, 等. 超临界 CO₂ 萃取酸枣仁挥发油的镇静催眠作用研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(9): 4181-4183.
- [21] 徐飞飞, 田雅娟, 李钦青, 等. 酸枣仁-茯苓-党参水提物对小鼠睡眠的改善作用及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 300-308.
- [22] 徐煜彬, 徐志立, 李明玉, 等. 茯苓及其化学拆分组分学习记忆及镇静催眠的性味药理学研究 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1577-1584.
- [23] 王天合, 李慧君, 张丹丹, 等. 茯苓水提物 UPLC 指纹图谱的建立及其镇静催眠作用的谱效关系研究 [J]. 中国药房, 2021, 32(5): 564-570.
- [24] 马欣悦, 李瑞海, 贾天柱. 柏子仁总萜类成分药理活性及提取工艺研究 [J]. 实用药物与临床, 2017, 20(1): 65-68.
- [25] 苏文雅, 王文婷, 林向辉, 等. 运用协同戊巴比妥钠模型探讨鲜人参膏对小鼠的促睡眠作用 [J]. 吉林农业大学学报, 2021, 43(3): 349-354.
- [26] 孙胜杰. 酸枣仁-远志活性部位镇静安神作用与机理研究 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2019.
- [27] 王颖, 陈英红, 徐宏, 等. 人参糖蛋白的结构及其镇静安神作用研究 [J]. 特产研究, 2017, 39(2): 1-4, 8.
- [28] 孟欣欣, 范贵民, 王景涛. 改良多平台水环境法制作大鼠 REM 睡眠剥夺模型的研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2013, 36(2): 99-100.
- [29] 尹超, 游秋云, 张美娅, 等. 生慧汤对慢性睡眠剥夺小鼠学习记忆及海马 IL-6、TNF- α 、COX-2 基因表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 96-100.
- [30] 赵翠, 张颖, 王璐, 等. 酸枣仁提取物对睡眠剥夺大鼠免疫功能的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(16): 1941-1945.
- [31] 张娅, 黄俊山, 吴松鹰, 等. 1379 例原发性失眠中医症状和证型临床特征分析 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1704-1707.
- [32] 吴九如. 熟眠方对失眠模型大鼠 IL-1 β 、PGD2 和 GABA 表达的影响 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2014.
- [33] 徐章猛, 周静, 冯栋宏, 等. 环磷酸腺苷诱导气虚体质大鼠模型的探索性研究 [J]. 四川中医, 2020, 38(5): 90-94.
- [34] 张舜波, 王平, 田代志, 等. 酸枣仁总皂苷对失眠老年大鼠脑氨基酸类神经递质及受体表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 124-127.
- [35] Belfer SJ, Bashaw AG, Perlis ML, et al. A *Drosophila* model of sleep restriction therapy for insomnia [J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(2): 492-507.
- [36] Dai X, Zhou E, Yang W, et al. Molecular resolution of a behavioral paradox: sleep and arousal are regulated by distinct acetylcholine receptors in different neuronal types in *Drosophila* [J]. Sleep, 2021, 44(7): zsab017.
- [37] 杨波, 张爱华, 王萍, 等. 基于果蝇模型的酸枣仁皂苷 A、B 治疗失眠症的实验研究 [J]. 中医药信息, 2013, 30(5): 55-57.
- [38] 张莉. 基于益气养血法的芪归补血颗粒对环磷酸腺苷所致小鼠脾脏氧化应激损伤的保护机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
- [39] 王雪, 赵燕, 吴昊, 等. 中医心、血、神三者间关系的理论探讨 [J]. 环球中医药, 2018, 11(12): 1909-1913.
- [40] González-Rueda A, Pedrosa V, Feord RC, et al. Activity-dependent downscaling of subthreshold synaptic inputs during slow-wave-sleep-like activity *in vivo* [J]. Neuron, 2018, 97(6): 1244-1252.
- [41] 张曼, 戴建业, 唐乾利. 白背桐黄钻方调控失眠剥夺大鼠脑电活动、神经递质、炎症因子和氧化应激的促眠机制研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(11): 2432-2435.

曹喻灵, 宋厚盼, 曾建国, 等. 基于化学诱导炎症性肠病动物模型的中药研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 127-131.

Cao YL, Song HP, Zeng JG, et al. Research progress of traditional Chinese medicine on the basis of animal models of chemically-induced inflammatory bowel disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 127-131.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.017

基于化学诱导炎症性肠病动物模型的中药研究进展

曹喻灵¹, 宋厚盼¹, 曾建国², 廖端芳^{1*}

(1.湖南中医药大学湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室,长沙 410208;2.湖南农业大学,长沙 410128)

【摘要】 炎症性肠病(IBD)是遗传、环境及免疫等多种因素共同作用的结果。该疾病虽归为西医难治性疾病,但中医辨证治疗 IBD 优势显著。因此,针对探索中医药治疗 IBD 作用及机制研究中如何选择动物模型十分重要。化学诱导的小鼠 IBD 模型是研究 IBD 发病机制的最常用模型,本文就近年来中医药对该类模型的研究进展进行了整理,从模型特征、致病机制、研究思路和用途等方面进行了论述,以期 IBD 基础研究设计提供帮助。

【关键词】 中医药;炎症性肠病;化学诱导;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0127-05

Research progress of traditional Chinese medicine on the basis of animal models of chemically-induced inflammatory bowel disease

CAO Yuling¹, SONG Houpan¹, ZENG Jianguo², LIAO Duanfang^{1*}

(1. Hunan Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Medicinal Materials Produced in Hunan, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China. 2. Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

【Abstract】 Inflammatory bowel disease (IBD) is the result of a combination of genetic, environmental and immune factors. Although the disease is classified as a refractory disease in modern medicine, it has significant advantages in treating IBD on the basis of traditional Chinese medicine syndrome differentiation. Therefore, it is very important to explore appropriate animal models to study the effects and mechanisms of traditional Chinese medicine in the treatment of IBD. The chemically induced IBD model is the most commonly used to study the pathogenesis of IBD. This article summarizes the recent research progress of this type of model in Chinese medicine and discusses the characteristics of the model, pathological mechanism, research ideas and applications to facilitate the design of basic research of IBD.

【Keywords】 traditional Chinese medicine; inflammatory bowel disease; chemically-induced; animal model

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种特发性肠道炎症性疾病,因遗传、环境及免疫等多种因素共同作用而发病。IBD以克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative

colitis, UC)两种主要形式为特征,临床均可表现为慢性腹泻和腹痛,甚至便血,但在疾病病理方面,UC的炎症主要发生于结肠的粘膜和粘膜下层^[1],CD的炎症通常表现为跨壁和不连续性,可发生于胃肠

【基金项目】国家自然科学基金(81773736);中央引导地方科技发展专项(019XF5076)。

【作者简介】曹喻灵(1983—),女,博士研究生,研究方向:调脂抗炎研究。E-mail: connie_yu1998@163.com

【通信作者】廖端芳(1956—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:调脂抗炎药理机制研究。E-mail: dfliao@hnuem.edu.cn

道的任何部分,其中又以回肠末端、升结肠和直肠最常见^[2]。IBD 可归属于中医学“痢疾”、“肠澼”范畴。基于循证医学的临床研究表明,IBD 虽被世界卫生组织列为现代医学的难治疾病,但中医药在改善 IBD 患者临床症状、促进缓解、抑制复发、减少并发症和提高生活质量方面呈现出一定特色和优势^[3]。IBD 的临床常见证型包括大肠湿热证、脾气虚弱证、脾肾阳虚证、肝郁脾虚证、寒热错杂证、热毒炽盛证^[4]。

在 IBD 发病机制的探索过程中,IBD 的疾病模型的建立是极其关键的环节。目前已经建立了至少 66 种不同的动物模型^[5],这些模型分为化学诱导模型、细胞转移模型、基因突变模型和基因工程模型。其中,化学诱导模型是最常用的 IBD 疾病模型,因为该类模型具有快速诱导炎症、易操作性和花费少的基本特点,更重要得是它模拟人类 IBD 的典型临床症状的同时也具备一些关键免疫学和组织病理学特征。本文综述近 6 年中医药在常见化学诱导 IBD 模型应用的进展,旨在为中医药在 IBD 的基础实验研究提供参考。

1 TNBS 诱导的 IBD 模型

2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱导的 IBD 模型是由动物直肠灌注 TNBS 和乙醇混合液,乙醇损伤肠黏膜屏障,提供 TNBS 穿透肠壁,进入肠上皮细胞的通道, TNBS 在肠黏膜作为半抗原与大分子物质结合形成全抗原以启动免疫应答^[5],是一种以 Th1 亚群细胞占优势的肠黏膜局部免疫紊乱的模型。该模型既可以模拟急性炎症,也可模拟慢性炎症,此外,作为自限性肠道炎症模型, TNBS 诱导的 IBD 模型可用于更为复杂的 IBD 缓解和复发的研究。安肠汤是广西中医药大学肖振球教授治疗溃疡性结肠炎的经验方。该方基于肖教授认为,UC 属中医“痢疾”范畴,疾病致脾肾阳虚为主,湿毒瘀邪停滞胃肠为标,创立安肠汤旨在扶正祛邪^[6]。安肠汤可缓解 TNBS 诱导 UC 模型大鼠的炎症程度,促进肠黏膜的修复,其作用机制可能与安肠汤通过 miRNA-146a 调控 IRAK-1/NF- κ B 信号通路有关^[7]。乌梅丸是寒热错杂证的基础方^[8],近年来经方-乌梅丸加减方在临床和实验中均被广泛地有效用于溃疡性结肠炎的治疗,针对乌梅丸在 IBD 中作用机制的探索研究多以 TNBS 诱导的 UC 模型,在该模型中证明乌梅丸核心

作用为保护与修复肠道黏膜屏障和抗炎镇痛,其机制探索关联 STAT6 信号通路、Notch 信号通路、TLR4/NF- κ B 信号通路和 IL-6/JAK/STAT3 通路等多个信号通路^[9]。在近期的研究中,郭琴等^[10]基于该模型探索了乌梅丸中酸、苦、甘、辛 4 类药物对 UC 大鼠的治疗作用及相互关系,其结果提示酸味药物(乌梅)对大鼠 UC 模型具有主要的调节作用,体现了其作为方中君药的作用,其次为甘、辛,而苦味药物对大鼠 UC 模型具有负调节作用。这项研究为进一步研究 TNBS 诱导的 IBD 大鼠模型的阳虚证证候属性提供了参考。

2 DSS 诱导的 IBD 模型

葡聚糖硫酸钠盐(dextran sulfate sodium salt, DSS)是一种水溶性、带负电荷的硫酸多糖。予饮用水中添加分子量 $40 \times 10^3 \sim 50 \times 10^3$ 的 DSS,根据其给药浓度、持续时间和频率的不同,可建立急性、慢性和复发性的 IBD 模型^[11]。DSS 诱导 IBD 模型的发生机制还不清楚,目前认为是 DSS 中的硫酸基团生成高负电荷破坏肠黏膜屏障完整性,使肠上皮通透性增加进而诱导肠道炎症;此外, DSS 的抗凝血特性会进一步加重肠道出血^[12]。四君子汤作为健脾益气经典方,在该模型中发现可通过增加肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达以修复肠黏膜的机械屏障^[13-15]。芍药汤治疗 IBD 以清热燥湿,调和气血为目的,在研究中证实芍药汤能够有效的抑制 DSS 诱导的 UC 小鼠的肠道炎症反应,进一步机制研究中发现 Notch 信号通路中 Notch-1 和 Hes-1 的表达下降,Math-1 和 Muc-2 的表达增加^[16]。中药有效成分在 DSS 诱导 IBD 模型中的作用更广泛和深入。实验表明,与 DSS 治疗的小鼠相比,姜黄素和白藜芦醇治疗可延长 UC 小鼠的生存期,减少体重减轻的比率,减轻疾病的严重程度。姜黄素和白藜芦醇可显著下调结肠组织中自噬相关蛋白 12(ATG12)、Beclin-1 和微管相关蛋白轻链 3II(LC3II)的表达,并上调磷酸化 mTOR 和 SIRT1 的表达。这些结果提示姜黄素和白藜芦醇对 DSS 诱导的 UC 具有保护作用,其机制跟减少自噬和调节 SIRT1/mTOR 信号通路有关^[17]。小檗碱具有抗菌、抗炎、抗氧化、调节免疫和修复肠道屏障等作用^[18],在治疗 IBD 显示出重要价值。因为其多方面的作用,小檗碱在 IBD 相关实验设计中,模型的选择亦是多样性的。在 DSS 诱导的 IBD 模型中,已经证实小檗碱可通过抑制

TLRs/NF- κ B、JAK/STAT 信号通路和激活胰岛素样生长因子 1 (IGF-1)/胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBPs) 信号通路,缓解 IBD 引起的肠黏膜损伤^[19]。

在 DSS 诱导的急性结肠炎中,T 细胞和 B 细胞在结肠炎的发展中是非必需的^[20],这使得急性 DSS 结肠炎模型对研究先天免疫系统在肠道炎症发展中的机制有特别优势。Sun 等^[21]使用带有 WT 和 T 细胞缺陷 RAG 小鼠(RAG^{-/-})的 DSS 结肠炎模型,广泛评估青蒿琥酯对先天免疫的影响。实验数据显示^[21],青蒿琥酯显著改善 WT 和 RAG1^{-/-}小鼠的 DSS 结肠炎,其作用效果相似,表明其机制主要涉及先天免疫而非适应性免疫。青蒿琥酯可显著诱导 DSS 结肠炎固有层中巨噬细胞(M Φ)和树突状细胞(DC)凋亡,且抑制 M Φ s 分泌 TNF- α 和 DCs 分泌 IL-12p40/70。

与大多数其他 IBD 模型相比,DSS 模型的一个明显不同之处在于肠道菌群与该模型的紧密联系。早在 Okayasu 等^[11]建立 DSS 诱导的 IBD 模型时,就观察到受 DSS 诱导结肠炎的小鼠的结肠中肠杆菌科、拟杆菌科和梭状芽胞杆菌的数量增加。许多研究表明证实中药具有改善 IBD 肠道菌群紊乱的作用。中药复方中,大黄牡丹汤^[22]、半夏泻心汤^[23]、黄连解毒汤^[24]、黄芩汤^[25]和八味锡类散^[26]等均有清热的功效,且在不同实验中证实可调节 DSS 诱导 IBD 的肠道菌群紊乱。小檗碱的最新研究则显示其可以缓解 DSS 诱导大鼠结肠炎的肠道菌群失调,且进一步的靶向代谢组学分析发现胃肠道微生物色氨酸分解代谢产物水平发生显著变化,而小檗碱可以通过调节肠道微生物群相关色氨酸代谢物激活 AhR 来治疗大鼠结肠炎,从而大大改善被破坏的肠道屏障功能。这项研究阐明了小檗碱改善肠道屏障功能的新机制^[27]。

3 噁唑酮诱导的 IBD 模型

噁唑酮诱导的 IBD 模型是基于 Th2 细胞因子过度产生探索 IBD 发病机制的理想模型^[28]。造模时,直肠给药溶于 30%~50%乙醇的噁唑酮,乙醇破坏肠黏膜屏障后,噁唑酮作为半抗原介导 Th2 驱动的免疫应答以诱导结肠急性炎症反应。穿心莲内酯(andrographolide, AND)是药用植物穿心莲的主要活性成分,Zhang 等^[29]的研究通过噁唑酮(OXZ)诱导 UC 大鼠模型,探讨了 AND 对 UC 的作用。结

果显示 AND 治疗该模型大鼠后,明显改善了损伤组织的隐窝结构和减少了炎症细胞的浸润,抗炎机制则可能通过减少 IL-4/IL-13 与 IL-4R 的特异性结合,从而抑制信号转换器和转录激活因子 6(p-STAT6)的磷酸化,阻断信号转导。康复新液是由美洲大蠊(*Periplaneta Americanal*)提取物制得的一种纯中药制剂,具有通利血脉,养阴生肌之功效,在临床应用中对胃肠道黏膜的保护及修复作用明确,但是其作用机制尚不清楚^[30]。杜雯雯等^[31]通过噁唑酮诱导 UC 大鼠,初步探索康复新液对 IBD 的作用发现其机制可能与上调 IL-4 表达水平和下调 IL-13 水平有关。蒲公英作为一种药食两用的菊科植物,具有抗炎、抗氧化和免疫调节等作用。陈金虎等^[32]依据中医治疗 UC 的特点将美洲大蠊与具有抗炎功效的蒲公英进行配伍,组成抗炎和促修复作用更为显著的动植物药复方 Ento-PB,通过噁唑酮诱导的大鼠 UC 模型评价复方 Ento-PB 对活动期 UC 的作用。实验结果显示,复方 Ento-PB 可以降低 TNF- α 、IL-13 水平,而 IL-4、IL-10 和 EGF 水平升高,且在促进黏膜修复方面优于柳氮磺吡啶。陆允敏^[33]的研究同时使用了两种化学诱导的 IBD 模型,即 TNBS 诱导的 CD 大鼠模型和噁唑酮诱导的 UC 小鼠模型。实验首先从细胞凋亡、Th1/Th2 比值检测两方面证实了 TNBS 诱导的 CD 大鼠模型是一种以 Th1 亚群细胞占优势的肠粘膜局部免疫紊乱的模型;而噁唑酮诱导的 UC 小鼠模型是一种以 Th2 亚群占优势的肠粘膜局部免疫紊乱的模型。在加入不同浓度的川芎嗪后,发现 2 mg/mL 川芎嗪可显著诱导 LPMC 凋亡和抑制 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-33、VCAM-1、IL-2、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 、ICAM-1、iNOS 和 P-selectin 细胞因子的表达,提示川芎嗪可能具有诱导 LPMC 凋亡以及干预 Th1/Th2 动态平衡的作用。

4 其他化学诱导的 IBD 模型

4.1 乙酸诱导的 IBD 模型

动物经直肠给予乙酸,可导致上皮损伤、黏膜通透性增加以及透壁炎症反应,其病变局限于结肠,病变程度与剂量和浓度相关。乙酸诱导的 IBD 模型虽然具备易于诱导,价格低廉的特点,但该模型对 IBD 的免疫特性的影响有限,且不宜建立观察慢性或复发的 IBD 动物模型。康复新液的研究是先证实其对经典 TNBS^[34]及 2,4-二硝基氯苯联合乙酸诱导的慢性大鼠 UC 模型^[35]具有显著的疗效,

再使用乙酸诱导的大鼠 UC 模型^[36]探索康复新液灌肠对急性 UC 的作用及机制。

4.2 碘乙酰胺诱导的 IBD 模型

碘乙酰胺 (iodoacetamide, IA) 是一种巯基化合物的阻滞剂。该模型的建立是基于 Satoh 等^[37]在实验中发现,内源性的巯基化合物(如谷胱甘肽)具有保护胃黏膜的作用。经结肠内注入可以诱发结肠炎症,并且随着巯基化合物的减少,会出现腹泻、结肠扩张及粘连、黏膜损伤、体重减轻等。该模型因为大鼠的体质量、IA 剂量、实验周期以及是否采用麻醉均会影响 IA 诱导 UC 模型的成功率^[38],且模型病理改变会影响后续实验的进行,故该模型现在已较少使用。

5 小结

近年来,炎症性肠病因其发病率的逐年上升,日益受到学者们的关注。中医药对 IBD 治疗具有疗效稳定、副反应少、价格亲民等优势,因此中医药治疗 IBD 的实验药效学研究及分子生物学机制研究亟待更深入的探讨。在以往研究中^[39-41],有学者使用 IBD 中医证候模型进行基础研究,这些模型虽以中医基础理论为前提,但是模型干预措施复杂且不具一致性,在模型评价中亦缺乏统一标准,因此,作为现代医学模式下的基础实验研究,更倾向使用经典的 IBD 模型进行实验设计。

现今,分子生物学方法在中医药治疗 IBD 的实验研究中已十分普遍,化学诱导的 IBD 模型作为运用最广泛的 IBD 模型在实验研究中也见得很常见。因此,在中医药治疗 IBD 的实验设计中,选择该类模型时应考虑以下几点:(1)实验所选模型症状及病理特征与中医药的 IBD 临床证型的相似性;(2)不同化学诱导 IBD 动物模型的免疫反应特点中医药治疗 IBD 临床证型的相关性;(3)综合考虑实验动物的遗传背景,尤其是在混合型小鼠 IBD 模型建立中;(4)不同实验设施对造模的干扰情况。随着遗传学及免疫学研究的不断深入,IBD 发病机制远比先前预测的复杂,无论中医还是西医,目前都没有单一的 IBD 模型与人类 IBD 的所有方面相吻合,不断积累来自每个模型系统的数据将弥补彼此的缺陷,并为实验合理选择模型以及临床开发新的治疗措施提供有效参考。

参考文献:

[1] Boyapati RK, Rossi AG, Satsangi J, et al. Gut mucosal DAMPs

in IBD: from mechanisms to therapeutic implications [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(3): 567-582.

- [2] Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease [J]. *Lancet*, 2012, 380: 220-220.
- [3] 沈洪,唐志鹏,唐旭东,等. 消化系统常见病溃疡性结肠炎中医诊疗指南 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(9): 4155-4160.
- [4] 陈治水,王新月. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗共识 [J]. *现代消化及介入治疗*, 2011, 16(1): 66-70.
- [5] Benoit F, Nutten S, Steidler L, et al. Recommendations for improved use of the murine TNBS-induced Colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: technical and microbiological aspects [J]. *Dig Dis Sci*, 2006, 51(2): 390-400.
- [6] 肖振球,何译生,吕小平,等. 自拟安肠汤治疗溃疡性结肠炎 50 例 [J]. *广西中医药*, 1993, 16(3): 3-6.
- [7] 梁运特,廖志远,赖斯华,等. 安肠汤对正虚邪恋型溃疡性结肠炎大鼠 miRNA-146a/ IRAK-1/ NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(16): 1717-1722, 1749.
- [8] 李军祥,陈詒. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗共识意见(2017 年) [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2018, 26(2): 105-111, 120.
- [9] 周步高,刘馥春,张晓云,等. 乌梅丸治疗溃疡性结肠炎作用机制的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(11): 2731-2733.
- [10] 郭琴,张立石,王颖,等. 乌梅丸及其拆方对 TNBS 致溃疡性结肠炎大鼠的作用研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(7): 1099-1103.
- [11] Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice [J]. *Gastroenterology*, 1990, 98(3): 694-702.
- [12] Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104: 1-14.
- [13] 黄婧瑜,农辉,裴菱,等. 四君子汤对溃疡性结肠炎小鼠模型肠黏膜屏障的作用机制 [J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(27): 4326-4334.
- [14] 何爱明,张涛. 四君子汤对溃疡性结肠炎模型小鼠 claudin-1/3 的影响 [J]. *医药导报*, 2016, 35(11): 1190-1194.
- [15] 黄晓燕,郑超伟,罗莉川,等. 四君子汤对溃疡性结肠炎小鼠模型 occludin 和 claudin-1 表达的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(5): 829-833.
- [16] 迟宏罡,于丰彦,张轶,等. 芍药汤对实验性结肠炎小鼠 Notch 信号通路的影响 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2017, 19(4): 694-700.
- [17] Zhang L, Xue H, Zhao G, et al. Curcumin and resveratrol suppress dextran sulfate sodium-induced colitis in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 3053-3060.
- [18] Habtemariam S. Berberine and inflammatory bowel disease: A concise review [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 113: 592-599.
- [19] 唐煌尧,杨亭,赵华,等. 小檗碱对炎症性肠病肠道屏障的

- 影响及其信号通路 [J]. 动物营养学报, 2020, 32(2): 523-529.
- [20] Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, et al. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice [J]. *Gastroenterology*, 1994, 107: 1643-1652.
- [21] Sun W, Han X, Wu S, et al. Unexpected mechanism of colitis amelioration by artesunate, a natural product from *Artemisia annua* L [J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(4): 851-868.
- [22] Luo S, Wen R, Wang Q, et al. Rhubarb Peony Decoction ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating gut microbiota to restoring Th17/Treg balance [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 231(3): 39-49.
- [23] 陈健, 张梁坤, 谷文超, 等. 半夏泻心汤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2871-2880.
- [24] Yuan Z, Yang L, Zhang X, et al. Therapeutic effect of n-butanol fraction of Huang-lian-Jie-du Decoction on ulcerative colitis and its regulation on intestinal flora in colitis mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121(1): 109638.
- [25] Li MY, Luo HJ, Wu X, et al. Anti-inflammatory effects of Huangqin Decoction on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice through regulation of the gut microbiota and suppression of the Ras-PI3K-Akt-HIF-1 α and NF- κ B pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1552.
- [26] Wen J, Teng B, Yang P, et al. The potential mechanism of Bawei Xileisan in the treatment of dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 188: 31-38.
- [27] Jing W, Dong S, Luo X, et al. Berberine improves colitis by triggering AhR activation by microbial tryptophan catabolites [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 164: 105358.
- [28] Weigmann B, Neurath MF. Oxazolone-induced colitis as a model of Th2 immune responses in the intestinal mucosa [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422: 253-261.
- [29] Zhang L, Cao N, Wang Y, et al. Improvement of Oxazolone-induced ulcerative colitis in rats using andrographolide [J]. *Molecules*, 2019, 25(1): 76.
- [30] 王琳, 陈思敏. 康复新液辅助治疗溃疡性结肠炎的研究进展 [J]. 中药与临床, 2017, 8(5): 63-66.
- [31] 杜雯雯, 刘衡, 张汉超, 等. 康复新液对噁唑酮诱导溃疡性结肠炎大鼠治疗作用及机制初探 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 126-131.
- [32] 陈金虎, 余万鑫, 耿福能, 等. 复方蜚蠊提取物缓解噁唑酮诱导大鼠活动期溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. 中成药, 2021, 43(2): 337-343.
- [33] 陆允敏. 实验性炎症性肠病动物模型的建立及川芎嗪药物干预研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2016.
- [34] 张汉超, 王朋川, 刘衡, 等. 康复新液缓解三硝基苯磺酸致大鼠溃疡性结肠炎及其机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(4): 496-501.
- [35] 杜雯雯, 刘衡, 张汉超, 等. 康复新液对噁唑酮诱导溃疡性结肠炎大鼠治疗作用及机制初探 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 126-131.
- [36] 严长宝, 余万鑫, 赵好, 等. 康复新液缓解乙酸诱导大鼠急性溃疡性结肠炎及机制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(12): 1456-1461.
- [37] Satoh H, Sato F, Takami K, et al. New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of anti-inflammatory drugs on the colitis [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1997, 73(4): 299-309.
- [38] 王师英, 孙博云, 袁建业, 等. 造模因素对碘乙酰胺致大鼠溃疡性结肠炎模型的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(8): 1995-1999.
- [39] 张晓松, 马琪, 文艳巧, 等. 苦苣草治疗大肠湿热证大鼠血清代谢组学研究 [J]. 药学报, 2018, 53(1): 111-120.
- [40] 王焱霏, 朱莹, 高昂. 溃结宁膏穴位敷贴对溃疡性结肠炎(脾肾阳虚证)大鼠 Th17/Treg 平衡的影响 [J]. 中国中医急症, 2018, 27(9): 1527-1530.
- [41] 朱亚珍, 厉启芳, 李鹤, 等. 痛泻要方对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎大鼠炎性因子表达量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(5): 1053-1057.

[收稿日期] 2021-11-10

苗明三, 彭孟凡, 刘思哲, 等. 基于文献分析的中医药动物模型评价方法介绍 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 132-140.
Miao MS, Peng MF, Liu SZ, et al. Introduction of evaluation methods of animal models of traditional Chinese medicine on the basis of literature analysis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 132-140.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.018

基于文献分析的中医药动物模型评价方法介绍

苗明三*, 彭孟凡, 刘思哲, 张媛鑫, 刘思琪, 石琪, 罗茂丽

(河南中医药大学药学院, 郑州 450046)

【摘要】 动物模型因其在科学研究、产业发展中的重要性,被广泛应用于各类现代医学实验研究中。动物模型在现代医学实验中的使用可有效的帮助人类认识疾病的发生发展规律,探讨疾病防治措施。文章通过筛选2010年~2021年中医药动物模型评价方法并分析其特点,归纳总结出常用中医药动物模型评价方法,探讨各类模型评价分析方法的特点,以促进中医药动物模型评价方法的标准化、规范化,逐步建立起一套符合中医理论和现代科学观念的中医药动物模型评价方法,促进中医药事业的发展。

【关键词】 数据挖掘;动物模型;评价方法;优缺点

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0132-09

Introduction of evaluation methods of animal models of traditional Chinese medicine on the basis of literature analysis

MIAO Mingsan*, PENG Mengfan, LIU Sizhe, ZHANG Yuanxin, LIU Siqi, SHI Qi, LUO Maoli
(School of pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 Animal models are widely used in all kinds of modern medical experimental research because of their importance in scientific research and industrial development. The use of animal models in modern medical experiments can effectively help us to understand the occurrence and development law of diseases and explore disease prevention and control measures. By screening the relevant literature on animal model evaluation and analysis from 2010 to 2021, this article summarizes the common animal model evaluation and analysis methods, and discusses the characteristics of various model evaluation and analysis methods. To promote the standardization of animal model evaluation methods, and gradually establish a set of model evaluation method in line with traditional Chinese medicine theory and modern scientific concepts to promote the development of traditional Chinese medicine.

【Keywords】 data mining; animal model; evaluation method; advantages and disadvantages

动物模型通过实验动物,模拟医学、生命科学等科学研究,是医药生物技术和健康产品研发中应用的与人类疾病、功能紊乱发生机制和临床表现高度相似的生物样本。动物模型是我国医疗健康与生物科技产业中不可替代的核心生物资源,在疾病预防、药物筛选、毒副作用探究与规避、发病机制解析等方面具有重要作用。近年来,已建立多种动物模型用于相应疾病的研究,并广泛应用于中医药领域。现今,用于中医药研究的动物模型基本有3种,即中医证候动物模型、现代医学动物模型、病证结合动物模型3大类。又有学者将用于中医药研究的

动物模型总结为“基于现代医学理论复制的病理模型”、“传统病因动物模型”和“在现代医学理论疾病模型基础上根据中医药理论施加中医的干预因素复制的证候模型”3大类^[1]。动物模型构建成功与否影响中药药效和作用特点的评价,不少文献也有对动物模型评价方法进行探讨。如崔宁等^[2]将中医药动物模型评价方法总结为以两独立样本 t 检验、非参数检验为主的单因素方差分析和以因子分析为主的多元统计分析方法两种,任珍等^[3]将中医药动物模型评价方法大致分为单纯“证”的评价方法(四诊表征)、中医“证”结合西医指标、以药(方)

【基金项目】 国家中医药管理局标准化项目(GZY-FJS-2020-219);河南省重大公益专项(201300310100);河南省药品监督管理局科技计划项目(2020DB050-55)。

【作者简介】 苗明三(1965—),男,教授,博士,研究方向:中药药理教学与研究。E-mail: miaomingsan@163.com

测证、基于“组学”技术和基于中西医病症特点 5 种等。但由于中医药动物模型的特殊性,单一的动物模型评价方法难以全面反映模型动物的中医证候特点,体现中医“辨证论治”的独特优势。有必要对中医药动物模型评价方法进行系统总结,寻找适合中医药研究的动物模型评价体系,探讨体现中医药特点的动物模型的构建。本文就 2010 年~2021 年期间文献中涉及的中医动物模型评价方法进行总结,分析其优缺点,以期促进中药研究的科学发展。

1 数据来源

在“中国知网”数据库高级检索界面,设置主题为“动物模型”并且含有“评价”或“分析”,时间为 2010.01~2021.10,进行检索。初次检索,共得到文献 2206 篇,经筛选,纳入符合标准文献 1090 篇。

纳入标准:选用动物实验研究的全部文献;具体描述单个动物模型的部分综述。排除标准:文中出现多个动物模型的综述;资料不齐全的文獻;会议性论文;硕士、博士相关学位论文。

2 文献分析

2.1 动物模型评价涉及的疾病类型分析

对纳入符合标准的 1090 篇文献中涉及的动物模型和疾病类型进行分析,经系统归类,发现以“心脑血管疾病、骨与关节疾病、神经系统疾病和消化系统疾病”居多,涉及疾病类型频次共计 1015 次,另 75 篇仅有中医“证/症候或证/症型”,未有具体疾病,详见表 1。

由表 2 知:频次大于 50 的动物模型依次为骨与关节、心脑血管、神经系统、消化系统、内分泌系统、呼吸系统和肿瘤。上述现象的可能原因有:(1)研究频次较高的疾病具有较高的发病率,且发病机制和临床表现复杂多样,单一造模方法难以体现临床病症特点,有必要进行深入研究,以贴合临床实际。(2)研究频次较高的疾病危害率高,或病情反复、难以根治,需要从多层次、多角度进行研究。(3)目前的治疗方法效果有限,难以满足临床需求,或者目前尚无确切有效的治疗方法,一旦患

表 1 文献中疾病类型总结

Table 1 Summary of disease types in the literature

疾病类型 Disease type	频次 Frequency	疾病类型 Disease type	频次 Frequency	疾病类型 Disease type	频次 Frequency
心脑血管 Cardiovascular and cerebrovascular	152	皮肤疾病 Skin diseases	34	外伤 Trauma	14
骨与关节 Bone and joint	145	免疫疾病 Immune diseases	33	眼科 Ophthalmic	14
神经系统 Nervous system	99	肾脏疾病 Kidney disease	28	耳鼻喉科 Otorhinolaryngologic	13
消化系统 Digestive system	95	齿科疾病 Dental diseases	23	泌尿系统 Urinary system	12
内分泌 Endocrine	71	妇科及乳腺疾病 Gynecological and breast diseases	22	生殖疾病 Reproductive diseases	12
呼吸系统 Respiratory	67	循环系统 Circulatory	22	传染病 Infectious diseases	10
肿瘤 Tumour	59	血液系统 Hematological	19	急性慢性中毒 Acute and chronic poisoning	8
肛肠疾病 Anorectal diseases	37	细菌与病毒感染 Bacterial and viral infections	18	其它 Other	8

表 2 动物模型评价方法

Table 2 Animal model evaluation method

评价方法 Evaluation method	频次 Frequency	评价方法 Evaluation method	频次 Frequency
病理 Pathology	613	基因评价 Gene evaluation	72
疾病评价 Disease evaluation	586	证候学评价 Syndrome evaluation	44
病证结合 Combination of disease and syndrome	349	基于中西医临床特点 Based on the clinical characteristics of traditional Chinese and Western medicine	33
行为学 Behavioural	108	以方测证 Syndrome detecting from recipe used	28

病,难以长期生存。如随着生活方式的改变,经济压力,导致体力劳动和脑力劳动力度均剧增,长期久坐、负重过大导致骨缺损、软骨损伤、股骨头坏死、脊髓损伤、腰椎间盘突出、颈椎病和关节损伤、关节受累等引发的骨与关节疾病逐年增多,促进实验研究相应增多^[4];心脑血管疾病具有较高的发病率、致残率、死亡率和复发率,同时伴随各类并发症,是威胁健康的“头号杀手”^[5],因其发病率高、治愈率低且危害性大,故其相应的实验研究也较多。

2.2 动物模型评价方法分析

对纳入符合标准的 1090 篇文献中涉及到的动物模型评价方法进行分析,若一篇文献中有 2 种或以上不同的评价方法,则分别统计,结果共得到相应模型评价方法 8 种。进一步分析发现,以“病理”、“疾病评价”和“病证结合”为主,3 者频次分别为 613、586 和 349 次,见表 2。

为更好理解不同评价方法在模型中的评价特

点,现对频次>40 的动物模型评价方法进行部分举例分析,详见表 3。

2.3 各类模型评价分析方法总结

“病理”评价方法:对于器质性病变,“病理”评价可作为此类疾病临床诊断的“金指标”^[24]。病理学分析能与表观、生化等数据互为补充,对于器质性病变动物模型研究是必不可少的。如多囊卵巢综合征(PCOS)临床特征为性激素分泌失衡、不排卵或排卵障碍、月经异常、不孕,以卵巢囊性改变为临床主要诊断依据。评价 PCOS 动物模型以卵巢组织病理观察为主,判断成模指标主要为早期发育小卵泡、闭锁卵泡和囊性扩张卵泡多,颗粒细胞和黄体减少^[25];因卵巢卵泡发育障碍会导致月经紊乱,故 PCOS 动物模型整体体会表现出动情周期紊乱的现象;此外,卵泡发育受促性腺激素释放激素、促性腺激素和性激素的调控,故激素类生化指标和相应受体蛋白的改变可侧面反应卵巢病变程度,体现模型构建是否符合临床表现^[26]。前列腺炎临床表现为

表 3 频次>40 的造模方法和评价方法举例

Table 3 Examples of modeling methods and evaluation methods with frequency > 40

评价方法 Evaluation method	动物模型 Animal model	造模方法 Modeling method	评价指标 Evaluating indicator
	宫腔粘连 ^[6] Intrauterine adhesion	机械损伤合并感染 Mechanical injury complicated with infection	子宫内膜的厚度、腺体数目和纤维化面积比率等子宫内膜病理改变,并通过子宫的妊娠率及胚胎着床数目检测子宫生殖功能。 Endometrial pathological changes such as endometrial thickness, number of glands and fibrotic area ratio, and uterine reproductive function was detected by uterine pregnancy rate and number of embryo implantation.
病理评价方法 Pathological evaluation method	肺动脉高压合并肺缺血再灌注损伤 ^[7] Pulmonary hypertension complicated with pulmonary ischemia-reperfusion injury	腹腔注射野百合碱结合血管夹关闭肺门 Intraperitoneal injection of monocalamine combined with vascular clamp closed the hilus of lung	肺组织形态、外观、弹性改变,肺组织血管内皮层有无增生、肺泡间有无水肿、炎性细胞浸润等病理学表现。 Changes in the morphology, appearance and elasticity of lung tissue, proliferation of vascular endothelial layer of lung tissue, edema between alveoli, inflammatory cell infiltration and other pathological manifestations.
	肝纤维化 ^[8] Hepatic fibrosis	肝门静脉注射多房棘球蚴 Hepatic portal vein injection of <i>Echinococcus multilocularis</i>	肝组织形态有无结构改变,是否伴有炎性细胞浸润及纤维组织增生及增生程度。 Whether there are structural changes in the morphology of liver tissue, whether there are inflammatory cell infiltration, fibrous tissue proliferation and degree of proliferation.
疾病评价方法 Disease evaluation method	燃煤型氟中毒 ^[9] Coal burning fluorosis	病区拌泥煤饲料喂养 Feeding with peat feed in sick area	机体尿氟、骨氟含量,以及血清钙、磷离子含量。 Contents of urinary fluoride, bone fluoride and serum calcium and phosphorus ions.
	慢性萎缩性胃炎 ^[10] Chronic atrophic gastritis	去氧胆酸钠饮用配合乙醇灌胃 Sodium deoxycholate drinking combined with ethanol gavage	胃蛋白酶活性、胃液 H 值,胃液分泌量以及幽门部、胃体部微循环血流量。 Pepsin activity, pH value of gastric juice, gastric juice secretion and microcirculatory blood flow of pylorus and gastric body.
	前列腺增生 ^[11] Benign prostatic hyperplasia	手术切除睾丸并注射睾酮 Surgical removal of testis and injection of testosterone	观测前列腺体积、重量、含水量,检测血清和前列腺组织中睾酮、酸性磷酸酶和前列腺特异性抗原水平。 Volume, weight and water content of prostate were observed, and the levels of testosterone, acid phosphatase and prostate specific antigen in serum and prostate tissue were detected.

续表 3

评价方法 Evaluation method	动物模型 Animal model	造模方法 Modeling method	评价指标 Evaluating indicator
	溃疡性结肠炎 (UC) 湿热证 ^[12] Ulcerative colitis damp heat syndrome	疾病因素叠加高脂饲料喂养或/和每天 8 h 的气候箱放置 Disease factors superimposed on high-fat feed feeding or / and daily 8 h climate box placement	一般情况 (外观、精神状态及活动状态、体重、饮水量、腹泻程度) 以及结肠长度和重量、脾重、结肠组织外观及病理改变。 General conditions (appearance, mental and activity status, weight, amount of drinking water, degree of diarrhea), length and weight of colon, weight of spleen, appearance and pathological changes of colon tissue.
病证结合评价方法 Evaluation method of combination of disease and syndrome	高尿酸血症脾虚证 ^[13] Hyperuricemia spleen deficiency syndrome	氧嗪酸钾+高嘌呤肥甘厚味饲料喂养+小笼环境 Potassium oxazinate combined with high purine fertilizer, sweet and thick feed feeding and small cage environment	行为评分、血清 D-木糖水平、力竭游泳时间、血清尿酸含量变化程度。 Behavior score, serum D-xylose level, exhaustive swimming time and serum uric acid content.
	脾虚证高乳糖腹泻 ^[14] High lactose diarrhea of spleen deficiency syndrome	梯度增加高乳糖浓度喂养合并小平台站立 Gradient increased high lactose concentration feeding combined with small platform standing	一般状态 (体重、进食量、饮水量及粪便含水量测定)、抓力测定、血清 D-木糖水平。 General status (body weight, food intake, drinking water and fecal water content), grip measurement, serum D-xylose level.
	肝郁脾虚型抑郁症 ^[15] Liver depression and spleen deficiency depression	随机外力刺激配合大黄灌胃 Random external stimulation combined with rhubarb gavage	通过旷场实验、蔗糖偏好实验、悬尾实验和强迫游泳实验观测行为指标差异评价抑郁程度。 The degree of depression was evaluated by observing the difference of behavioral indexes through open field experiment, sucrose preference experiment, tail hanging experiment and forced swimming experiment.
行为学评价方法 Behavioral evaluation method	心理亚健康 ^[16] Psychological sub-health	复合应激因素造模 Compound stress factor modeling	糖水偏爱实验、高架十字迷宫实验、明暗箱实验、旷场实验评价快感缺乏及焦虑程度。 Sugar water preference test, elevated cross maze test, light and dark box test and open field test were used to evaluate the lack of pleasure and anxiety.
	阿尔兹海默病 ^[17] Alzheimer's disease	Aβ25 ~ 35 溶液或联合谷氨酸注射 Aβ25 ~ 35 solution or combined with glutamate injection	Morris 水迷宫行为学检测模型定位航行和空间探索能力检测记忆学习能力。 Morris water maze behavior was used to detect the ability of positioning navigation and spatial exploration, and the ability of memory and learning.
	脂肪肝 ^[18] Fatty liver	高脂高蛋白饲料配合甲硫氨酸 High fat and high protein feed with methionine	PCR 检测瘦素基因在小鼠肝细胞及脂肪细胞中表达。 Expression of leptin gene in mouse hepatocytes and adipocytes was detected by PCR.
基因评价方法 Gene evaluation method	肥胖 ^[19] Obesity	高脂饲料喂养 High fat feed	PCR 测下丘脑组织 orexin A mRNA 表达。 Expression of orexin A mRNA in hypothalamus was analyzed by PCR.
	心肌细胞凋亡 ^[20] Cardiomyocyte apoptosis	腹主动脉不完全结扎法 Incomplete ligation of abdominal aorta	检测心肌细胞中心房钠尿肽 (ANP) 和脑钠肽 (BNP) mRNA 和蛋白水平。 mRNA and protein levels of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) in cardiomyocytes were detected.

续表 3

评价方法 Evaluation method	动物模型 Animal model	造模方法 Modeling method	评价指标 Evaluating indicator
	胃肠积热型 ^[21] Gastrointestinal accumulation type	积热饲料喂食联合洛哌丁 胺灌胃 Heat accumulation feed feeding combined with loperamide gavage	观察尿液颜色、排便次数及形状、肛温情况及一般体征(分泌物、口唇、四肢颜色、呼吸频率、被毛光泽程度)。 Color of urine, the number and shape of defecation, anal temperature and general signs (secretion, lip, limb color, respiratory rate and coat luster) were observed.
证候学评价 方法 Syndrome evaluation method	性早熟痰湿壅滞证 ^[22] Syndrome of phlegm dampness stagnation in precocious puberty	高脂饲料喂食联合皮下注 射达那唑 High fat diet combined with subcutaneous injection of Danazol	观察活动度改变、排泄物形状、毛发色泽光滑程度及体重。 Changes of mobility, the shape of excreta, the smoothness of hair color and body weight were observed.
	肾阳虚 ^[23] Kidney Yang-deficiency	腺嘌呤灌胃 Adenine gavage	皮肉松弛、畏寒、弓背、竖毛、毛发枯疏无光泽、多尿、溏便等情况,甚至 阴囊收缩,精神萎靡,迟钝,活动少,体重下降。 Loose skin and flesh, fear of cold, arched back, erect hair, dry and lusterless hair, polyuria, loose stool and other conditions, even scrotal contraction, mental depression, retardation, less activity and weight loss.

尿频、尿急、尿痛、排尿困难、夜尿多、骨盆区域不适或疼痛等症状,其动物模型可首先依据动物整体排尿情况、尿动力学(排尿阈值压、排尿间隔和排尿最大压)情况进行初步评价,然后结合前列腺组织病理观察(腺体扩张、上皮细胞排列紊乱、增生情况,腔内炎性浸润现象等)为主进行是否成模的评价;其次,因为前列腺炎会造成患者不同程度的焦虑、诱发机体炎症反应,故常结合旷场实验(运动时间、周边滞留时间、抬腿次数、跨越方格总数)和炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 等)水平进行动物模型的辅助评价^[27-28]。病理评价方法能够最大化实验获得的数据,减少实验所需动物数量,符合动物福利 3R(减少、替代和优化)原则^[29-30]。病理评价作为器质性病变疾病相关模型评价方法,虽一定程度能体现中医药动物模型的特点,但也有明显的局限。如中医认为“肾主骨”,若仅以“胫骨、股骨”病理或/和胫骨力学强度及股骨骨密度作为骨质疏松症成模与否的评价指标难以解释“肾主骨”的中医认识,难以解释采用补肾中药治疗骨质疏松症的中医药内涵,增加中医“肾”的相关指标则更能贴合中医药的特点。综上,采用病理评价结合中医因素进行动物模型的评价更有利于体现中医药的特点。

“疾病评价”方法:“疾病评价”以脏器重量(长度)、外观,血清、血浆、尿液、组织等中的指标变化趋势与临床患者的一致性为判断依据,可以从多个发病机制和实验角度进行动物模型评价。血清、尿液等中的指标变化在一定程度可反应组织器官是否发生实质性病变,而减少对相应器官组织的取材进行病理鉴定,简化诊断流程。如以结肠长度、结肠重量、疾病活动指数评分(便血结合体重变化)、

结肠组织外观和病理学改变作为溃疡性结肠炎疾病的评价依据^[12],以血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)活性升高,作为肝损伤的标志^[31]。以血清或尿液尿酸、肌酐、尿素氮的异常作为肾功能异常、肾损伤的评价依据^[32]。结合文献知,“疾病评价”较少纳入中医相关因素。且受限于造模因素的单一性,难以反应不同发病阶段生化指标变化特点,即生化指标变化高低难以量化疾病严重程度。如仅以空白为对照,以 ALT、AST 作为评价肝损伤依据,但如何利用 ALT、AST 偏离正常动物幅度判断肝损伤严重程度(轻度、中度或重度损伤)尚无明确定论,必要时还需结合病理指标进行判断。

“病证结合”评价方法:“病证结合”评价方法既包含证候学指标如一般情况、活动、进食、大小便、体质量等,也包含疾病指标如发病情况、血清、尿液等指标变化程度等,从多个角度说明疾病变化过程,可以反应部分疾病中医证候变化特点,指导临床研究。如通过观察食蟹猴精神状态,活动情况,大便颜色、成形度、黏滞或燥结情况,皮肤有无湿疹瘙痒等证候学指标判断食蟹猴脾胃湿热证情况,通过 B 超测定肝脏回声、血管纹理,HE 观察肝组织病理学改变,全自动生化分析仪测血清 AST、ALT、TG、TC 含量观察肝脏是否有脂肪性病变,ELISA 检测血清脑肠肽激素 GAS 和 MTL,反映胃肠功能,最终判断食蟹猴急性酒精性脂肪肝脾胃湿热证模型是否成功。其中,众多学者将 GAS 作为脾胃湿热证的首选指标,将 GAS 升高作为“脾胃湿热证”的微观证据之一^[33]。研究表明,阴虚患者交感神经-肾上腺系统功能偏高,表现为环磷酸腺苷(cAMP)升高、环磷酸鸟苷(cGMP)降低、cAMP/cGMP 比值升高,并将

cAMP 水平升高、cGMP 水平降低或 cAMP/cGMP 比值升高作为肾阴虚的微观指标。如 cAMP 水平升高、cGMP 水平降低或 cAMP/cGMP 比值升高结合空腹血糖大于 11.1 mmol/L 是常用的评价肾阴虚型糖尿病大鼠成模的依据^[34]。病证结合动物模型是目前能够体现中医药特点的动物模型,因此,完善病证结合动物模型评价体系是中医药研究的发展趋势。

“行为学评价”评价方法:行为学评价一般常用于抑郁症、焦虑、应激状态等动物模型的评价,在相关动物实验中,行为学通常是研究后续机制的重要前提^[35],可在一定程度反应疾病的发生,从而使模型呈现出更好的表观效应。如抑郁症以情绪低落、兴趣丧失、思维迟缓为临床主要特征,实验室研究常利用强迫游泳时间、悬尾实验中的“行为绝望”时间,电击逃避失败次数,旷场实验、糖水偏好实验、新奇食物探索实验等评价模型是否成功;抑郁是情绪相关疾病的一种,受大脑的调控,脑组织和血清中生化指标(单胺类神经递质 NE、DA,脑源神经营养因子 BDNF,下丘脑-垂体-肾上腺轴促肾上腺皮质激素分泌激素、促肾上腺皮质激素、皮质激素等),脑组织中海马区域小胶质细胞活化情况、p-JAK1/JAK1 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达情况均可作为辅助评价指标^[36-37]。焦虑是一种情绪障碍性疾病,实验室研究常用高架零迷宫(利用动物对高悬敞开臂的害怕和对新异环境的好奇特性形成矛盾冲突的行为考察动物的焦虑状态)、旷场实验(总路程、中央区停留时间、垂体活动次数、跨格数)、高架十字迷宫(开放臂停留时间和进入开放臂的次数)等行为学表现评价模型是否成功;此外,5-HT、DA、NE 等神经递质的表达水平与焦虑症的发生密切相关,因此海马组织 5-HT、MAO、NE 的表达,血清 GABA、Glu 也常作为辅助指标用于模型和药效的评价^[38-39]。行为学评价以动物的症状、行为学和体征等表观指标评价为主,可反映中医“望”的特点,能在一定程度体现中医药临床特色;有些情况下行为学评价在模型评价中可占据主导地位。

“基因评价”评价方法:基因突变与疾病的发生密切相关,基因评价能从基因层面反应病变对机体影响,并可突出药物对生物遗传形状的改变。基因评价还表现在其存在脱靶效应上(对非目标基因序列进行识别并切割),不仅在一定程度上影响实验动物模型的构建,还影响了其在临床基因治疗中的

应用。如以 IL-6 和 TNF- α mRNA 的变化作为大鼠体内炎症反应的评价指标,结合肝形态、病理学改变,血清转氨酶 ALT 和 AST 水平作为评价 D-氨基半乳糖联合 Pam3CSK4 诱导的 SD 大鼠急性肝损伤及炎症反应的评价依据^[40];DMPK 相关基因人源化大鼠模型可以减少大鼠和人类在药物代谢上的种属差异,提高动物实验的可信度^[41-42]。基因评价缺少中医相关特色,具有一定片面性。但是,一种疾病涉及多个基因突变,单个或几个基因评价难以反应疾病整体性。且基因技术评价指标相对单一、相关设备造价昂贵、操作复杂繁琐,重复实验的可行性较低,在实际应用中可将其作为辅助评价手段。

“基于中西医临床特点”评价方法:基于临床中西医病症特点的评价方法,将表观、生化和病理等指标均考虑在内,又按“主次”以及交互作用进行模型评价。基于中西医临床特点评价方法,不仅纳入了西医的临床症状特点,将西医病理、疾病和基因评价方法涵盖在内,全面反应动物模型的西医临床表现;还纳入了中医的证候,同时将动物的行为学表现、表观指标等纳入评价范围,最大程度反应动物模型的证候、行为学,是目前较为全面的评价动物模型的方法之一。在一定程度上,补充了实验相关疾病的中医学理论依据,为相关疾病的中药新药研究、成药配伍、组方剂量提供新的方法思路,一定程度上促进了中医的发展。但中医理论体系中一些特有的体征无法在动物身上进行收集和评价,且造模过程中无法完全复刻相关因素(舌象和脉象特点)^[43],其次,体征收集不全造成四诊信息不完善,导致临床评价具有较大的主观性,没有统一的判断模型成功标准。现今,动物模型多数是在西医指导下建立的,与中医证候吻合度普遍较低,难以全面反映中医学整体观念,因此在构建证候动物模型的同时应对疾病的发展进行动态监测,不断进行证候诊断,从而提高与中医证型的匹配度^[44]。

“证候学”评价方法:中医证候动物模型是探索证候发生与演变的重要载体,是中医药现代化研究的基本前提之一。中医“证”可追溯至中医中的望闻问切,又称“四诊”,可由动物的症状和体征进行反映。如徐小荟等^[45]根据造模后大鼠出现“寒凝血瘀表征”——蜷缩少动、迟钝、呼吸弱、皮毛蓬乱无光泽、耳色和舌暗红、皮肤青紫瘀斑、大便湿烂等确定寒凝血瘀证造模成功;以氢化可的松灌胃后大鼠出现体重下降、易惊易怒、潮热、多汗、大便干结和毛

发枯燥等症状确定肾阴虚证造模成功^[46];以腺嘌呤灌胃后大鼠出现皮肉松弛、畏寒、弓背、竖毛、掉毛等现象,毛发枯疏无光泽,饮食减少,多尿、溏便等情况,甚至阴囊收缩,精神萎靡,迟钝,活动少,体重下降等确定肾阳虚证造模成功^[23]。随着证型研究的深入,中医“证”也可由现代医学检测手段体现,如结合“四诊”,以微观指标血清中 T 降低,FSH 和 LH 升高, E_2/T 和 $cAMP/cGMP$ 比例失衡作为肾阴虚或肾阳虚的评价依据^[23,34];利用基因组学发现线粒体介导的细胞凋亡信号通路系列相关基因表达下调与邪毒壅盛证小鼠有关^[47],利用代谢组学发现亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸水平上调,琥珀酸、马尿酸水平下调可能是脾肾阳虚证的生物标志物^[48]。中医“证”的评价以“四诊”为主,并逐渐采用生化指标、组织病理、基因和蛋白等指标为辅,有一定的科学性和实用性。

“以方测证”评价方法:“以药(方)测证”是利用药效反应,推知病机,是现阶段验证证候模型成功与否、推测疾病模型证候属性的重要手段。证候是在疾病基础上额外施加因素致原有疾病出现变化,运用“以药(方)测证”验证动物模型证候,可增加模型的可信度和说服力。疾病发展伴随证的动态变化,证与病相互存在,若不施加“证”的致病因素,在牢靠的疾病模型基础上采用“以药(方)测证”可进行动物模型证候的推测^[49]。如以茵陈蒿汤和六味地黄丸为参照,推测四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠模型属于阴虚证^[50];以乌头汤验证风寒湿痹证模型的成功,同时以四妙丸作为反证,从反证角度证明风寒湿痹证动物模型的成功^[51]。但鉴于中药方剂的多效应性、多成分、多靶点等特点,方与证之间并非一一对应的锁定关系,即同一方剂可适用多种证候,同一证候的有效方剂亦有多个。故有学者指出方-证之间可能是复杂的“一多关系”,因此从某方必然推断出某证的逻辑思维也是不严谨的^[52]。考虑到中药方剂的多效性,“以药(方)测证”缺乏其它方药的多方对照,否定了可能存在的其它证候^[53]。

3 讨论

动物模型的效度评价是动物模型研究中十分重要的一项环节,目前较为权威的评价方式是依据鉴定和评价三效度进行动物模型效度评价,即从表观、结构、预测 3 方面对动物模型的效度进行分

析^[54]。表观效度指模型动物与人类之间现象学的相似性,一般包括被毛光泽度、活动度、精神状态、体重、饮食状况、大小便情况等症状和体征变化以及行为学指标。结构效度体现在动物模型与研究疾病具有相似的原因或生物学机制,如脑内神经递质改变、下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴系统激活等。结构效度是三效度中的理论基础,也是动物模型建立过程中最基本、最重要的一个方面,决定了动物模型的有效性。预测效度指对动物模型相应症状进行有效干预所产生的反应性,其作用一般体现在临床药物的筛选中^[55]。理想的动物模型应该符合上述 3 个效度标准。如徐小荟等^[45]采用冰水冷冻法制备寒凝血瘀证大鼠模型:从大鼠活动度、饮水量、被毛光泽度、心率、耳廓血管颜色及舌色、大便性状改变反应表观效度,从大鼠炎症因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 升高等生理指标改变反应结构效度,以附子或附子配伍当归、香附灌胃观察治疗效果反应模型的预测效度。郭文鹤等^[56]采用复合因素造模构建气滞血瘀型动脉粥样硬化大鼠模型:从大鼠体型、舌象、耳廓血管颜色、活动度、进食量改变情况反应表观效度;从大鼠血脂水平、凝血四项、升主动脉及肝组织病理学结果反应结构效度;给予辛伐他丁及通脉颗粒灌胃治疗观察治疗效果反应模型的预测效度。但目前较多的动物模型评价尚不能完全涵盖上述 3 个效度标准,如张泽丹等^[12]采用高脂饲料喂养配合潮湿环境制备溃疡性结肠炎湿热证小鼠模型:从小鼠反应度、饮水量、肛门清洁度、大小便情况、有无粘液脓血便等反应表观效度;从小鼠结肠长度、远端结肠组织病理学改变、炎症性指标 $IL-6$ 、 $IL-10$ 、血清 SC、CRP 等病理学改变及生化指标方面反应结构效度。张潇等^[16]采用复合因素造模制备心理亚健康大鼠模型:从大鼠行为学实验(糖水偏好实验、高架十字迷宫实验、明暗箱实验)及一般体征改变(精神状态、被毛光泽度、活动度)反应表观效度;从大鼠脏器指数反应结构效度。

各类疾病的发生发展受内外环境、饮食、情志等多因素影响,其对应的动物模型也应考虑多因素作用及与临床证型和病症的吻合程度。中医药动物模型评价未来的重点方向应基于中医证型及西医疾病按照“主次”及交互作用全面考虑表观指标、生化指标和病理指标等因素,参考目前疾病诊疗的现状,并结合中医“辨证治疗”“标本兼治”等相关理论进行评价。同时,可将基于临床中西医结合特

点的评价方法与代谢组学或“以药(方)测证”进行结合,进一步完善评价体系。中医药动物模型评价体系的完善与发展可以增加中医药相关理论的科学性、有效性和实用性,促进中医药研究现代化。

参考文献:

- [1] 宋亚刚,李艳,崔琳琳,等. 中医药病证结合动物模型的现代应用研究及思考 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3971-3978.
- [2] 崔宁,史周华. 基于文献计量学的中医药动物模型评价方法研究 [J]. 中医药信息, 2018, 35(4): 77-80.
- [3] 任珍,彭孟凡,苗明三. 中医药动物模型评价方法的现状与思考 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 219-222.
- [4] Lotte S, Fabio M. Inflammasomes contributing to inflammation in arthritis [J]. Immunol Rev, 2020, 94(1): 48-62.
- [5] Yingru L, Lin L, Jianguo C, et al. Medical travel of cardiovascular and cerebrovascular diseases inpatients in central China [J]. Appl Geogr, 2021, 127: 102391.
- [6] 祖珍玉,罗敏,申东翔,等. 四种新西兰大白兔宫腔粘连模型的建立与评价及其对子宫内膜容受性的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 30-38.
- [7] 丁运,涂鹏杰,陈龙,等. 肺动脉高压合并肺缺血再灌注损伤大鼠模型的建立与评价 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2021, 50(4): 483-487.
- [8] 李文定,温浩,侯娇,等. 细胞外基质蛋白 1 在多房棘球蚴感染小鼠肝纤维化过程中的作用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2021, 39(3): 296-303.
- [9] 张震,韦艳,杨军,等. 燃煤型氟中毒大鼠钙磷代谢变化 [J]. 中国工业医学杂志, 2013, 26(5): 363-365.
- [10] 姚瑶,林晓春,雷晓林,等. 慢性萎缩性胃炎大鼠模型的建立及稳定性评价 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(4): 162-166.
- [11] 吴建辉,徐斯翀,潘琦,等. 自发性及睾酮诱导犬前列腺增生模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(3): 21-26, 94.
- [12] 张泽丹,王凤云,张佳琪,等. 溃疡性结肠炎湿热证动物模型的建立与评价 [EB/OL]. (2021-12-30) [2021-12-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2787.R.20211110.1452.004.html>.
- [13] 尚家驹,孙淳,刘华一. 高尿酸血症脾虚证证结合大鼠模型的建立与评价初探 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(8): 1076-1079.
- [14] 薛红,王凤云,张敏,等. 脾虚证高乳糖腹泻模型建立和评价 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(10): 1220-1224.
- [15] 童萍,李玉芳,李睿博,等. 基于“病证结合”构建与评价一种新的抑郁症肝郁脾虚证小鼠模型 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(1): 50-53.
- [16] 张潇,武嫣斐,高耀,等. 心理亚健康大鼠模型的建立及评价 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 610-616.
- [17] 史利利,冯建军,杨维娜,等. 淀粉样蛋白联合 L-型谷氨酸诱导类阿尔茨海默病模型 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(10): 2096-2098.
- [18] 杨汇娟,海广范,徐保福,等. 胰岛素抵抗伴非酒精性脂肪性肝病动物模型脂肪细胞瘦素的表达规律 [J]. 广东医学, 2011, 32(24): 3167-3169.
- [19] 赵玉红,吴丽霞,关心,等. 营养性肥胖大鼠的脂代谢紊乱与下丘脑中增食欲素 A 的表达分析 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(5): 1000-1002.
- [20] 曹景丽,吴英凤,刘革铭,等. 过表达脑源性神经生长因子(BDNF)抑制血管紧张素 II 诱导的 SD 大鼠心肌细胞凋亡 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(3): 218-224.
- [21] 封聪,王思映,殷晨晖,等. 牛黄解毒片验证胃肠积热大鼠模型实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(11): 2755-2759.
- [22] 赵霄,叶进. 性早熟痰湿壅滞证大鼠模型评价方法的探索 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(6): 773-778.
- [23] 黎祖荣,郑宝玉,王瑞国,等. 巴戟天经不同比例甘草炮制后对腺嘌呤致肾阳虚模型大鼠 HPG 轴改善作用的比较 [EB/OL]. (2021-12-30) [2021-12-30]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=ZSFX20211213003&uniplatform=NZKPT&v=Zoxzm1HRskzsC91MbBSn4Vz9efklKGS3zzOmA2Emc54y2crZW2bX0wYPNhCtfoq>.
- [24] Scudamore CL. Integrating pathology into human disease modelling-how to eat the elephant [J]. Dis Model Mech, 2014, 7(5): 495-497.
- [25] 崔姣,匡继林,孙劲松,等. 消囊促卵丸对多囊卵巢综合征模型大鼠性激素水平的影响及相关作用机制研究 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(11): 74-79.
- [26] 苗明三,彭孟凡,闫晓丽,等. 菟丝子总黄酮对来曲唑致多囊卵巢综合征大鼠模型的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 17-23.
- [27] 李欢. 迎春花总黄酮对慢性非细菌性前列腺炎模型大、小鼠的药效机制研究 [D]. 郑州:河南中医药大学, 2018.
- [28] 陈豪特,高瞻,蔡斌斌,等. 益气活血托毒方对慢性非细菌性前列腺炎大鼠前列腺组织炎症的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 562-565.
- [29] Robinson NB, Krieger K, Khan FM, et al. The current state of animal models in research: A review [J]. Int J Surg, 2019, 72: 9-13.
- [30] Xie H, Zhao J, Lian N, et al. Clinical characteristics of non-ICU hospitalized patients with coronavirus disease 2019 and liver injury: a retrospective study [J]. Liver Int, 2020, 40(6): 1321-1326.
- [31] 刘潭,夏骏,刘伯毅,等. 薯蓣皂苷对硫代乙酰胺诱导急性肝损伤模型大鼠的保护作用 [J]. 中国药业, 2021, 30(23): 44-48.
- [32] Ommati MM, Farshad O, Mousavi K, et al. Agmatine alleviates hepatic and renal injury in a rat model of obstructive jaundice [J]. Pharma Nutrition, 2020, 13: 100212.
- [33] 梁丹,李晓红,唐耀平,等. 食蟹猴急性酒精性脂肪肝脾胃湿热证模型的建立与评价初探 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1374-1378.
- [34] 张红英,郑绍琴,苏颖杭,等. 连梅颗粒对肾阴虚型糖尿病

- 大鼠的降糖作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(11): 1291-1295.
- [35] 李榕. 大鼠颈脊髓半侧挫伤模型的建立及其行为学组织学和神经电生理特征的实验研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [36] 薛涛, 鄢丽莎, 刘新民, 等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3): 321-326.
- [37] 马丹凤, 陈蕾, 张传香, 等. 木犀草素调控 JAK1/STAT3 通路对抑郁症大鼠海马小胶质细胞极化的影响 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(12): 2587-2594.
- [38] 段鹏, 陈丽, 胡浩, 等. 瘦素改善慢性应激导致青春期小鼠焦虑样行为的研究 [J]. 中国儿童保健杂志, 2020, 28(9): 989-992.
- [39] 李贺, 李宁, 刘聪, 等. 五味子乙素对 ICR 小鼠的抗焦虑作用及其作用机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(1): 78-82.
- [40] 武丽涛, 孙娟, 王愉涵, 等. 二甲双胍对 D-氨基半乳糖联合 Pam3CSK4 诱导的 SD 大鼠的急性肝损伤及炎症反应的作用及机制 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2018, 39(1): 41-46.
- [41] Barzi M, Pankowicz FP, Zorman B, et al. A novel humanized mouse lacking murine P450 oxidoreductase for studying human drug metabolism [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 39.
- [42] Kazuki Y, Kobayashi K, Hirabayashi M, et al. Humanized UGT2 and CYP3A transchromosomal rats for improved prediction of human drug metabolism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116: 3072-3081.
- [43] 唐维我, 张会永, 李芹, 等. 肾阳虚证动物模型造模方法及模型评价 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(4): 1317-1324.
- [44] 李思汉, 李书楠, 周福, 等. 关于中医证候动物模型研究的思考 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3357-3361.
- [45] 徐小荟, 熊丽辉. 以药测证法对大鼠寒凝血瘀证关键证素的研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(4): 656-658.
- [46] 余欢迎, 高海燕, 金传山, 等. 黄精生品及不同炮制品对糖皮质激素致肾阴虚模型大鼠的作用比较 [J]. 安徽中医药大学学报, 2021, 40(6): 58-62.
- [47] 王艳明, 方肇勤, 潘志强, 等. 同病异证 H22 肝癌小鼠肿瘤组织细胞凋亡通路基因差异表达的特征 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(8): 1622-1625.
- [48] 梁谋, 钟建瑜, 张震. 基于代谢组学的难治性肾病综合征脾肾阳虚证尿液生物标志物筛选研究 [J]. 河北中医, 2019, 41(2): 191-194.
- [49] 钟森杰, 李静, 李琳, 等. “以方测证”在中医证候模型研究中的应用述评 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 48-50.
- [50] 陶庆, 孙明瑜, 冯琴, 等. 基于以方测证的四氯化碳所致大鼠肝纤维化模型的证型探讨 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(3): 246-250.
- [51] 林也, 戴宗顺, 张婷, 等. 基于“以方测证”的类风湿关节炎风寒湿痹证动物模型的构建研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(5): 668-672.
- [52] 李奕, 沈照波. 从逻辑关系角度考察“以方测证”法 [J]. 中医学报, 2019, 34(4): 714-716.
- [53] 卢林竹, 胡志希, 李琳, 等. “以方测证”法在动物模型研究中的运用 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(5): 570-573.
- [54] 高明周, 孙慧, 张长龙, 等. 中医典型情志病证之 PMS/PMDD 病证结合动物模型研究现状 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(12): 5804-5808.
- [55] 邱连丽, 戚荣丰, 卢光明. 创伤后应激障碍啮齿动物模型的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2021, 34(6): 629-633.
- [56] 郭文鹤, 黄娜娜, 张晓亮, 等. 动脉粥样硬化(气滞血瘀证)病证结合大鼠模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 32-41.

[收稿日期]2021-11-26

(上接第 88 页)

- [20] Ghayur MN, Gilani AH, Rasheed H, et al. Cardiovascular and airway relaxant activities of peony root extract [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2008, 86(11): 793-803.
- [21] Li H, Dai M, Jia W. Paeonol attenuates high-fat-diet-induced atherosclerosis in rabbits by anti-inflammatory activity [J]. Planta Med, 2009, 75(1): 7-11.
- [22] Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, et al. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease [J]. Circulation, 2007, 115(3): 377-386.
- [23] Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, et al. Bone formation and inflammation in cardiac valves [J]. Circulation, 2001, 103(11): 1522-1528.
- [24] Passos LSA, Lupieri A, Becker-Greene D, et al. Innate and adaptive immunity in cardiovascular calcification [J]. Atherosclerosis, 2020, 306: 59-67.
- [25] Hakansson A, Molin G. Gut microbiota and inflammation [J]. Nutrients, 2011, 3(6): 637-682.
- [26] García-Rodríguez C, Parra-Izquierdo I, Castaños-Mollor I, et al. Toll-Like receptors, inflammation, and calcific aortic valve disease [J]. Front Physiol, 2018, 9: 201.
- [27] Wen J, Zheng B, Zhang XH, et al. Tongxinluo inhibits neointimal formation by regulating the expression and post-translational modification of KLF5 in macrophages [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(11): 4778-4790.

[收稿日期]2021-09-10

苗明三, 马林纳, 彭孟凡, 等. 中医药动物模型研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 141-146.

Miao MS, Ma LN, Peng MF, et al. Animal model research and applications in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 141-146.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.019

中医药动物模型研究现状

苗明三*, 马林纳, 彭孟凡, 刘福宇, 屈秉聪, 王爽

(河南中医药大学 药学院, 郑州 450046)

【摘要】 中医药动物模型的发展史,从直接引用西医疾病动物模型,到中医证型动物模型,直至形成基于中西医临床病症(证)特点的动物模型,经历了相当长一段路程。本文基于对中医药动物模型文献的系统归纳,对动物模型的建立、评价和应用进行分析,对存在的问题和不足提出探讨,以期促进中医药动物模型的完善和发展。

【关键词】 中医药动物模型;模型建立;模型评价;模型应用

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0141-06

Animal model research and applications in traditional Chinese medicine

MIAO Mingsan*, MA Linna, PENG Mengfan, LIU Fuyu, QU Bingcong, WANG Shuang

(Henan University of Chinese Medicine, College of Pharmacy, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 The history of animal model development for traditional Chinese medicine has progressed from directly using animal models of disease from western medicine to animal models of syndrome types of traditional Chinese medicine, as well as animal models on the basis of the characteristics of clinical symptoms of traditional Chinese and western medicine. Based on the systematic summary of animal model of Chinese medicine in the literature, this article analyzes the establishment, evaluation and application of animal models, and discusses the existing problems and shortcomings to promote the improvement and development of Chinese medicine animal models.

【Keywords】 traditional Chinese medicine animal model; model establishment; model evaluation; model application

中医药动物模型是指在中医药理论的指导下所建立的动物模型,通过在实验动物身上建立与人类疾病病理现象相同或相似的状态,以便对相关疾病进行研究^[1],其主要目的是服务于临床疾病的治疗和中药药理、毒理的研究^[2]。有关中医模型建立的记载早已有之,而中医动物模型的建立始于上世纪60年代著名的内科学家邝安堃先生。他创造性的建立了可的松致阳虚模型,同时也是世界上第一个阳虚动物模型^[3]。从第一个中医药动物模型创

立成功至今,中医药动物模型的发展已取得了长足的进步。现今中医药动物模型的建立由单纯参照西医动物模型进行造模向中医与西医方法相结合发展,由单个证候模型变为证候与疾病相结合的模式研究。中医药动物造模已经从单个学科内容向多个学科交叉方向发展,更加规范化、具体化、科学化。当前医院治疗模式以“中西医辨病辨证+中西医结合治疗”为主,以临床趋势作为实验性研究的风向标,建立一种科学、合理,具有高操作性、高可行

【基金项目】 国家中医药管理局标准化项目(GZY-FJS-2020-219);河南省重大公益专项(201300310100);河南省药品监督管理局科技计划项目(2020DB050-55)。

【作者简介】 苗明三(1965—),男,教授,博士,研究方向:中药药理教学与研究。E-mail: miaomingsan@163.com

性、高稳定性、高重复性的中医药动物模型是大势所趋。针对目前中医药动物模型现状、发展和应用,对有关中医药动物模型的建立、评价、应用体系进行分析,探讨其不足之,以期进一步完善中医药动物模型。

1 中医药动物模型的建立

在中国知网(CNKI)以“主题”为搜索前提,以“中医药模型”为检索词,设置时间范围“2020年12月~2011年01月”,排除硕博、会议、外文文献、非实验性文章后,最后纳入符合标准文献745篇。经分析,中医药动物模型大致可分为3类:基于现代医学疾病的动物模型、基于中医药理论建立的动物模型、基于中西医结合(证)建立的动物模型。

1.1 基于现代医学疾病建立的动物模型

基于现代医学疾病建立的动物模型,是指依照所谓西医的理论体系、药物和技术操作构建动物模型,使动物产生与临床病人病理表现相近的状态。在745篇文献中,有532篇现代医学疾病的动物实验性文章,涉及144种疾病。选取高频疾病前12名,并展示其高频造模方法。按照西医临床疾病分

类、进行归纳,高频造模方法举例见表1。

虽然此种动物模型易获得国际社会的广泛认可,但其发病机制与中医病因病机相差较大,检测的客观指标与“证”的特异性低、关联性差^[4]。

1.2 基于中医药理论建立的动物模型

基于中医药理论建立的动物模型,是模拟中医基础理论中的致病因素对实验动物进行造模,使实验动物出现与临床症候一致的表现。在745篇文献中,中医药理论动物模型142篇,包括中医病证和病症模型45种。选取高频模型前9种,对其高频造模方法,按照中医病位和病证进行分类归纳,高频造模方法举例见表2。

1.3 基于中西医结合临床病症(证)特点的动物模型

近年来,中、西医药从理论到实践结合逐渐紧密,中、西医结合治疗在临床实践中效果显著,而中西医疾病的对照也从一般学术专著发展为医学院校课本^[5-6]。随之应运而生了中西医临床病症(证)特点动物模型,此模型是将西医疾病和中医证型、中医症候的指标相互对照并同时体现在动物模型。在745篇文献中,符合中西医临床病症(证)特点动物模型71篇。选取高频模型前12种,并将其高频

表1 基于现代医学疾病建立的动物模型

Table 1 Animal models based on modern medical diseases

疾病分类 Disease classification	疾病名称 Disease name	造模方法 Modeling method
内分泌疾病 Endocrine diseases	糖尿病 Diabetes	注射链脲佐菌素 Streptozotocin injection
	抑郁 Depressed	慢性不可预知刺激联合孤养方法 Chronic unpredictable stimulation combined with solitary culture
	高血脂 Hyperlipidemia	高脂饲料喂养 High fat feed
神经内科 Internal medicine-neurology	脑缺血 Cerebral ischemia	线栓结扎颈动脉法 Ligation of carotid artery with thread plug
	阿兹海默症 Alzheimer's disease	海马区注射 Aβ1-40 Hippocampal injection Aβ1-40
	慢阻肺 Chronic obstructive pulmonary disease	气管注射脂多糖加熏香烟 Tracheal injection of lipopolysaccharide combined with cigarette smoking
呼吸科 Respiratory department	流感 Influenza	流感病毒接种 Vaccination with influenza virus
	哮喘 Asthma	卵清蛋白致敏 Ovalbumin sensitization
	关节炎 Arthritis	ACLT 手术 ACLT operation
骨科 Orthopaedics	骨质疏松 Osteoporosis	卵巢去势手术 Ovariectomy
	消化科疾病 Digestive diseases	溃疡性结肠炎 Ulcerative colitis
心内科 Internal medicine-cardiovascular department	心衰 Heart failure	腹主动脉缩窄法 Abdominal aortic coarctation

造模方法(频次占比≥60%),按照中西医临床病症(证)特点进行分类归纳,高频造模方法举例见表 3。

2 中医药动物模型的评价

中医药动物模型的评价主要分为 3 大类:现代

医学疾病动物模型评价、中医药证候模型评价、中西医结合模型评价。

2.1 现代医学疾病动物模型评价

现代医学疾病动物模型的建立多是以形成目标疾病的关键性诊断指标为造模目的,采用手术或

表 2 基于中医药理论建立的动物模型

Table 2 Animal model based on traditional Chinese medicine theory

病位 Disease location	病证 Disease syndrome	造模方法 Modeling method
肾 Kidney	肾阳虚 Kidney Yang deficiency	房劳法 Excessive sexual intercourse
脾 Spleen	脾虚 Spleen deficiency	大黄煎煮液灌胃法 Intragastric administration of Rhubarb Decoction
胃 Stomach	胃实寒 Stomach excess cold	冰水灌胃法 Ice water gavage
	胃实热 Stomach excess heat	辣椒汁联合白酒 Pepper juice combined with Baijiu
脾胃 Spleen and stomach	脾胃湿热 Damp heat of spleen and stomach	高脂高糖饲料喂养联合乙醇灌胃 High fat and high sugar feed combined with ethanol gavage
肝 Liver	肝气逆 Liver Qi inversion	夹尾法 Tail clamping method
	寒凝血瘀 Cold coagulation and blood stasis	盐酸肾上腺注射联合冰水浴法 Adrenaline hydrochloride injection combined with ice water bath
全身性 Systemic	气滞血瘀 Qi stagnation and blood stasis	寒冷气候箱 Cold climate box
	寒热错杂 Mixed cold and heat	饥饿联合寒湿气候箱、惊恐及强迫游泳法 Hunger combined with cold and wet climate box, panic and forced swimming

表 3 基于中西医临床病症(证)特点的动物模型

Table 3 Animal model based on the characteristics of clinical symptoms (syndromes) of traditional Chinese and western medicine

现代医学疾病名称 Name of modern medical diseases	病证 Disease syndrom	造模方法 Modeling method
胃溃疡 Gastric ulcer	实寒 Excess cold	灌服冰水联合 NaOH 溶液及醋酸涂抹法 Ice water combined with NaOH solution and acetic acid smearing
	实热 Excess heat	灌服 8% 干辣椒粉的 60% 乙醇混悬液联合醋酸涂抹法 Application of 60% ethanol suspension containing 8% dry pepper powder combined with acetic acid
便秘 Constipation	脾虚 Spleen deficiency	番泻叶联合限水及控制饮食 Senna combined with water restriction and diet control
经前综合征 Premenstrual syndrome	肝气逆 Liver Qi inversion	动情期雌鼠电刺激法 Electrical stimulation in estrous female rats
痛经 Dysmenorrhea	寒凝 Cold coagulation	冰水浴联合苯甲酸雌二醇 Ice water bath combined with estradiol benzoate
冠心病 Coronary heart disease	气虚血瘀 Qi deficiency and blood stasis	力竭游泳联合结扎冠状动脉左前降支 Exhaustive swimming combined with ligation of left anterior descending coronary artery
哮喘 Asthma	肾气虚 Kidney Qi deficiency	鸡卵清白蛋白联合氢氧化铝凝胶及恐伤肾 Chicken ovalbumin combined with Aluminium Hydroxide Gel and fear of kidney injury
鼻炎 Rhinitis	肺气虚 Lung Qi deficiency	烟熏法结合卵清白致敏法 Fumigation combined with ovalbumin sensitization
关节炎 Arthritis	肾虚 Kidney deficiency	双侧卵巢切除术并切断右后肢前交叉韧带 Bilateral oophorectomy and transection of the anterior cruciate ligament of the right hind limb
慢性阻塞性肺疾病 Chronic obstructive pulmonary disease	痰热 Phlegm heat	烟熏联合气候箱及细菌滴鼻法 Fumigation combined with climate box and bacterial nasal drip
偏头痛 Migraine	肝阳上亢 Hyperactivity of liver Yang	附子汤灌胃联合硝酸甘油皮下注射 Fuji Decoction by gavage combined with nitroglycerin subcutaneous injection
糖尿病 Diabetes	脾胃湿热 Damp heat of spleen and stomach	高脂高糖饲料联合 STZ STZ high fat and high sugar feed combined with STZ

化药注射等方式使实验动物出现与临床病人相同、相似的疾病关键指征。如在糖尿病的临床诊断中,其核心指标是病理性的血糖升高^[7]。在糖尿病动物模型中,评价糖尿病动物模型是否成功的标准也以动物的血糖检测为主,选用 STZ 注射造模,其原理是通过葡萄糖转运蛋白-2,将胰岛 β 细胞中 DNA 烷基化,诱导实验动物产生血糖升高的病理现象^[8]。除去血清等检测指标,与临床病人的表现符合度,也是评价现代医学疾病动物模型重要依据之一,如根据糖尿病病人临床多出现“多饮、多食、多尿、体重减少”症状,在糖尿病动物实验中往往也需要监测每日的饮食、饮水、排尿量和体重变化情况^[9]。临床中脑缺血发病原因是供应脑部血液的动脉血管供血不足,引起相应脑组织发生功能性障碍^[10]。而脑缺血动物模型中,采用结扎颈动脉方式造成实验动物脑部缺血的病理现象。对于实验动物的成模评价主要以脑神经功能评分和脑部组织染色观察梗死面积为主要指标。与之相对照的是临床中患者初到医院就诊采用神经系统查体对患者病情严重程度进行评估,此查体在后续治疗过程中也作为预后指标。脑部缺血梗死面积多以核磁共振成像进行观察^[11]。哮喘在临床上表现为哮鸣音亢进和呼吸困难、咳嗽等症状,是由过敏原导致气道多种细胞炎性浸润的气道高反应疾病^[12]。哮喘动物模型多以致敏原鼻滴或雾化激发实验动物过敏反应,在造模过程中观察到实验动物出现类似临床患者所表现出的哮鸣音呼吸、头面部瘙痒则视为造模成功标志,后期实验结束时取血清指标检测 IgE 等免疫反应指标和肺部病理组织进行中粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞水平观察^[13]。此类模型评价多是文献引用、模式借鉴等,对于关键性病

理指标的范围认定还缺少行业的公认。在使用相同造模方法的不同实验中,有时会出现对于关键性病理指标的界定不同。

2.2 中医药证候模型评价

基于中医药理论建立的动物模型评价方法,造模多以中医病因病机理论进行造模,如肾虚造模方法选用房劳法,是以《黄帝内经》中“入房过度,汗出浴水,则伤肾”为依据进行造模^[14]。在进行评价时以中医理论中对于阳虚外在表现进行评价,如根据动物出现倦怠懒动^[15](“腰者,肾之府,转摇不能,肾将惫矣”)、体形消瘦^[16](“肾,在体合骨”)、毛发稀疏^[17](“肾藏精,精生血,发为血之余”)、体温下降^[18](“阳虚则外寒”)等表现,则可鉴定为阳虚证动物模型构建成功。《景岳全书·泄泻》^[19]:“泄泻之本,无不由于脾胃”为依据,又云“大忌苦寒之药损其脾胃”,大黄性味苦寒,归胃经,是苦寒泻下法常用中药。因此脾虚动物模型采用灌胃大黄水煎液进行建立,在进行评价时以观察动物出现大便质稀(“脾运化失司,水谷精微不能布散全身,糟粕不能下达,遂成泄泻”)、摄食量减少导致体重减轻(不思饮食)、毛发暗淡稀疏(面色萎黄)、活动减少(倦怠懒言)^[20]。胃实寒的动物模型以冰水灌胃法是参照“嗜食生冷,寒邪直中所致阴寒凝滞胃腑”的致病原因所建立的实验方法,在评价时多参照临床胃实寒病人表现对实验动物进行评估,如动物性情改变(神疲乏力)、爪甲和舌颜色变淡(苍白无华)、饮水量减少(不喜冷饮)^[21]。此类模型造模的方式过于依赖动物自觉性,且疾病程度统一性难以控制,成模后对于模型指标的评价多依靠实验观察者自身的判定,带有明显的主观性,误差较大。且对于实

表 4 中西医临床病症(证)特点动物模型评价

Table 4 Characteristics of clinical symptoms (syndromes) of traditional Chinese and western medicine and evaluation of animal models

诊疗指标分类 Classification of diagnosis and treatment indicators	指标类型 Indicator type	权重占比 Weight proportion
中医诊疗标准 TCM diagnosis and treatment standards (100%)	主证:该病症主要表现 Main syndrome; the main manifestations of the disease	60%
	次证:非直接相关表现/舌象/脉象 Secondary syndrome; non directly related manifestations / tongue / pulse	40%
西医诊疗指标 Western medicine diagnosis and treatment index (100%)	I 类指标:临床病理金指标 Class I index; clinical pathological gold index	60%
	II 类指标:该病主要临床症状 Class II indicators; the main clinical symptoms of the disease	30%
	III 类指标:生化指标 Class III index; biochemical index	10%

验动物的病理表现多采用组间、组内对比,实验动物的种类、谱系对实验结果的影响程度未有较多探讨。

2.3 基于中西医临床病症(证)特点的评价

中西医临床病症(证)特点的评价体系是通过中、西医临床诊断指标进行对照,在经由系统评分来选取最佳模型。中西医临床病症(证)特点动物模型的评价标准有两大类:中医评价指标和西医评价指标,占各自权重 100%。中医评价部分参照中医临床中“望、闻、问、切”,即临床中“望”病人神色、形、态、舌象^[22],在动物模型中“望”实验动物毛发色泽、稀疏程度,反应敏捷度、舌下络脉等;临床中“闻”病人声音和气味,在动物模型中“闻”实验动物叫声是否孱弱、狂躁,大小便及自身气味是否异常等;临床中“问”病人主证诉求,在动物模型中“问”即对动物进行观察,如对患处的舔舐等^[23];临床中“切”脉、触按病人躯体,在动物模型中“切”实验动物脉搏、心率、体重、腹围等。中医指标分为中医症候和中医证型两部分,症候的成模标准以国家中医药管理局发布的中医诊断标准;与疾病直接相关的临床表现为主证(I 级指标)、与疾病间接相关的临床表现、舌象等为次证(II 级指标)作为参照标准^[24],中医证型则是根据动物的中医症候表现进行判定,如实验动物舌下脉络粗大青紫、体温下降可判断为血瘀证,详见表 4。西医评价指标为西医疾病诊断标准;指标以 WHO 和中华人民共和国卫健委发布的西医诊断标准如临床表现、主诉、体格检查、生化检查、影像学检查、病理检查为主,以上指标按权重 100%对各指标权重占比进行分配。表中所附的权重只是相对值,可根据具体模型评价的特点进行适度调整。

此类模型评价的特点是引入官方(权威)的认证标准,较以往单一西医或中医特点的动物模型,中西医临床病症(证)特点动物模型评价方式解决了一方评价占比过高,导致另一方的评价数据偏差,数据参考失真的现象。在将中西医模式结合互补的同时,利用基因组学检测证候基因表达谱差异,判断在不同证型中相关基因的表达水平^[25],在功能组学层面研究不同证型中差异性蛋白质的表达水平^[26],并在转录组学层面结合症候的时间性、空间性后对中医证候开展的细胞、组织转录及调控规律的研究^[27],利用实验动物的代谢产物如尿液、

血液等,研究疾病在产生病理结果时与代谢物、代谢通路间的内在关系^[24],可进行深入的机制研究。

3 讨论和小结

通过对目前较多的现代医学疾病动物模型、中医药理论动物模型、中西医临床病症(证)特点动物模型的高频造模方法和评价体系进行系统总结,可以看出,现代医学疾病动物模型应用于中医药领域多是研究中药对于现代医学疾病的药效机制,此类型研究最大的不足是无法体现中医药为指导的治疗理念。中医药理论动物模型虽然符合中医病因病机,但因无法解决主观因素占比过大的问题,一定程度受限。中西医病证(症)临床特点的动物模型因在传统中医药理论和现代疾病研究方面的高关联度和高匹配度而拥有较高的应用率,它是指在中医“证”的基础上建立西医的病。通过中、西医临床诊断指标进行对照,并由系统评分后建立最佳模型,在关注临床指标改善的同时,对体现中医望的特点的表观指标有一定研究价值。但此种模型评价方法还在进行中,有待进一步完善提升;动物模型评价指标在“病症”和“病证”两方面侧重点区分不明显^[28];对造模方法相似但属不同现代医学疾病的动物模型还未能探明其区别^[29-31]。

因为人类疾病的发病机制研究尚处于不断探索、发展的阶段,所以中医药动物模型的建立、评价和应用结果也应进行及时反馈,以便于修改、完善造模方式,提高模型的吻合度。从理论探讨回归至动物实验,再通过实践对评价体系和建立方法进行修正,以期建立成熟度、吻合度更高的中医药动物模型。

参考文献:

- [1] 宋亚刚,李艳,崔琳琳,等. 中医药病证结合动物模型的现代应用研究及思考[J]. 中草药, 2019, 50(16): 3971-3978.
- [2] 黄小娇. 美国实验动物医学发展简史以及对对中国实验动物医学发展的思考[J]. 当代畜牧, 2015, 29: 37-38.
- [3] 旺建伟,叶虹玉,胥风华,等. 中医动物模型建立的研究进展及思路[J]. 中医药信息, 2014, 31(4): 80-84.
- [4] 张锡纯. 医学中中参西录[M]. 北京:中国古籍出版社, 2016.
- [5] 杜惠兰. 中西医结合妇产科学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2016.
- [6] 赵凤鸣,黄艳,吴铭杰,等. 出血性中风瘀热证患者炎症、凝血相关基因的表达特征[J]. 中医杂志, 2018, 59(20): 1753-1757.

- [7] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版) [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344.
- [8] 成龙, 申竹芳, 孙桂波, 等. 糖尿病动物模型研究进展及在中药研究中的应用 [J]. 药理学学报, 2015, 50(8): 951-958.
- [9] 陈晨, 王洪新, 张英杰, 等. 黄芪甲苷通过 AMPK/mTOR 信号通路改善 STZ 诱导的糖尿病大鼠的心肌损害 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(3): 80-85.
- [10] 张艾嘉, 王爽, 王萍, 等. 缺血性脑卒中的病理机制研究进展及中医药防治 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(5): 227-240.
- [11] 李静娴, 杨筱倩, 唐标, 等. 黄芪甲苷和三七总皂苷配伍抗大鼠脑缺血再灌注损伤及其药动学的研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3786-3794.
- [12] 孙洮玉, 任军华, 杨斌, 川芎嗪对咳嗽变异性哮喘大鼠气道平滑肌组织转化生长因子通路相关蛋白表达的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(23): 3266-3268, 3278.
- [13] 吴瑞, 李秀敏, 苗明三. 基于数据挖掘的哮喘动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 89-93.
- [14] 刘春英, 王浩浩, 王传航. 对《黄帝内经》肾藏精的再认识及男性不育临证心悟 [J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(8): 633-636.
- [15] 武峻艳, 王杰. 肾的概念演变与功能应象 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1200-1202.
- [16] 柴勇, 赵宏艳, 刘红, 等. 基于脏腑辨证理论探讨骨质疏松症的中医治疗 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(3): 302-304.
- [17] 李森, 任路, 曹灵修. 基于“肾其华在发”理论探讨情志与斑秃的相关性 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(6): 168-170.
- [18] 金锐, 张冰. 基于机体对寒冷刺激的适应性改变原理探讨阳虚畏寒肢冷实质 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(5): 696-700.
- [19] 王耀光. 方证相应与辨证求本——读《景岳全书》的点滴体会 [J]. 中医学报, 2012, 40(5): 122-125.
- [20] 肖怡, 邓向亮, 傅南琳, 等. 脾虚型功能性腹泻大鼠模型的建立 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(96): 219-221.
- [21] 杨万斌, 文彬, 张凌杭, 等. 大鼠胃寒证模型造模方法探索 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 4031-4036.
- [22] 高思华, 王键. 中医基础理论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [23] 刘保松, 白明, 彭孟凡, 等. 基于中西医临床病症特点的糖尿病肾病动物模型分析 [J]. 中医学报, 2018, 33(12): 2397-2400.
- [24] 杨超, 程红亮, 薛晓婕, 等. 针刺对血管性痴呆大鼠 TNF- α 水平及神经行为学的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(4): 645-648.
- [25] 宋明, 陈家旭, 刘玥芸, 等. 论蛋白质组学与中医证候研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(11): 4804-4807.
- [26] 刘文琛, 李国铭, 何春华, 等. 急性缺血性中风阴阳类证的血清转录组学特征分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 122-130.
- [27] 王昕泰. 基于 UPLC-MS 技术的小儿病毒性肺炎痰热闭肺证代谢模式研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [28] 洪静, 陈聪, 许朝霞, 等. 冠心病痰瘀互结证的研究进展探析 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(1): 109-113.
- [29] 衡晴晴, 曹亮, 李娜, 等. 桂枝茯苓胶囊及其活性成分组合物抗大鼠子宫肌瘤作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2206-2209.
- [30] 常秀娟, 周军, 张帅, 等. 桂枝茯苓胶囊对乳腺增生大鼠性激素水平和乳腺组织的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4139-4142.
- [31] 武晏屹, 田硕, 苗明三. 基于数据挖掘的黄褐斑动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 70-75.

[收稿日期] 2021-11-26

全文娟, 廖端芳, 庾勤慧. 动脉粥样硬化病证结合动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 147-150.
Quan WJ, Liao DF, Tuo QH. Advances in integrated animal models of atherosclerosis combined with disease and syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 147-150.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.020

动脉粥样硬化病证结合动物模型研究进展

全文娟¹, 廖端芳^{1*}, 庾勤慧^{2*}

(1. 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208;
2. 湖南中医药大学医学院, 长沙 410208)

【摘要】 动脉粥样硬化是多种急慢性心脑血管疾病的共同发病机理, 受感人群广泛。近年来, 祖国医学在防治动脉粥样硬化上发挥重要作用, 深入探究中医药治疗动脉粥样硬化的药理机制有利于指导临床用药及新药开发。因此, 如何精准建立动脉粥样硬化的病证结合动物模型亟待解决。本文就动脉粥样硬化病证结合动物模型的研究进展进行综述, 以期为中医实验研究动物模型的制备提供依据。

【关键词】 动脉粥样硬化; 病证结合; 动物模型; 中医药; 综述

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0147-04

Advances in integrated animal models of atherosclerosis combined with disease and syndrome

QUAN Wenjuan¹, LIAO Duanfang^{1*}, TUO Qinhui^{2*}

(1. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, the School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China. 2. Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208)

【Abstract】 Atherosclerosis is the common pathogenesis of many acute and chronic cardiovascular and cerebrovascular diseases, which are affected by a wide range of people. In recent years, Chinese medicine has played an important role in the prevention and treatment of atherosclerosis, and in-depth exploration of the pharmacological mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of atherosclerosis is beneficial to guide clinical drug use and new drug development. Therefore, it is urgent to establish accurate animal model of atherosclerosis combining disease and syndrome. This paper reviews the research progress of animal models of atherosclerosis combining disease and syndrome to provide basis for animal models of traditional Chinese medicine experimental research.

【Keywords】 atherosclerosis; combination of disease and syndrome; animal models; TCM; reviews

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)以动脉粥样硬化斑块形成为特征, 是缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD)、缺血性中风(ischemic stroke)、外周动脉疾病(peripheral arterial disease, PAD)^[1]

等多种疾病的病理基础。据最新统计, AS 相关疾病每年占全球死亡人数的 1/3, 其发病率和流行率居高不下, 给全球医疗保健带来巨大负担^[2-4]。

中医在防治动脉粥样硬化上发挥重要作用, 根

【基金项目】 湖南省科技创新计划资助(2021RC4064); 湖南省科技厅重点项目(2022SK2011); 湖南教育厅重点项目(20A379)。

【作者简介】 全文娟(1994—), 女, 博士研究生, 研究方向: 心血管药理机制。E-mail: 506919875@qq.com

【通信作者】 廖端芳(1956—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 调脂抗炎药理机制。E-mail: dfliao@hnuocm.edu.cn

庾勤慧(1974—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 心血管药理机制。E-mail: qhtuo@aliyun.com

* 共同通信作者

据症状和疾病的不同,动脉粥样硬化归属于中医“胸痹”“脉痹”“血痹”、“中风-中经络”等范畴^[5]。外邪入侵、饮食失调、情志不节、劳倦久病等均可导致“痰”、“瘀”、“毒”、“浊”沉积脉管,痹阻阳气^[6],随阻滞部位不同,发为“胸痹”、“脉痹”、“血痹”等。中医从整体观念入手,注重病证结合,辨证论治,疗效显著,但具体分子机制不明。深入探究中医药分子作用机制离不开病证结合动物模型的精准建立,近年来,病证结合动物模型的研究取得了一定的进展,本文旨在对目前动脉粥样硬化病证结合动物模型进行综述,为动物模型的制备提供依据。

1 常用的病症结合模型(9种)

1.1 痰湿血瘀毒损证

“痰”、“瘀”、“毒”存在于 AS 病理过程的各个阶段,应根据病邪的轻重主次遣方用药,临床可表现为眩晕头痛、痰多气短、胸闷作恶,身热、口渴等症。白云绮等^[7]结合中西医理论评价 ApoE^{-/-}基因敲除小鼠动脉粥样硬化模型的中医证型为痰湿血瘀毒损证。通过检测血清血脂水平,观察主动脉和肝脏的病理变化,评价是否为血瘀痰湿证;通过 IL-6、TNF- α 炎症因子免疫组学变化评价是否为毒损证。该模型选用客观指标评价痰湿、血瘀、毒损证型的建立,并用具有清热解毒功效的四妙勇安汤进行反证,从正反两个方面对模型进行验证,模型的建立方法有一定的可取性。

1.2 气滞血瘀证

情志不节是动脉粥样硬化的始因,忧思伤脾,脾失健运,津液不布,聚而生痰;或郁怒伤肝,进而化火,灼津成痰,均可使血行失畅,脉络不利,而致气滞血瘀。临床可见胸闷胁胀、喜太息,可见刺痛,随情绪波动,舌紫暗,可见瘀斑瘀点。樊华^[8]采用高脂饲料喂养和应激性刺激联合诱导 SD 大鼠气滞血瘀型动脉粥样硬化模型。采用高脂饲料饲喂成年 SD 大鼠 12 周,在第 1~3 天腹腔注射 600 000 IU/kg 维生素 D₃,并对大鼠施加额外物理刺激,刺激因素包括光刺激:每 2 h 给予闪烁光刺激大鼠 5 min,每天 2 次;声刺激:每 2 h 给予声音刺激大鼠 5 min,每天 2 次;电刺激:每 2 h 在 30~35 V 电压下给予电刺激大鼠 5 min,刺激过程中每 25 s 通电流刺激 0.3 s,每天 2 次。通过组织血流量、血流动力学、凝血因子及生物学表征指标和胸主动脉病变情况评价气滞血瘀证及斑块形成情况,以血脂指

标、动脉硬化指数、肝肾功能指标及肝组织病理学检查评价体内脂代谢和肝脂肪变情况。采用声、光、电等因素对大鼠进行慢性刺激,使大鼠产生紧张焦虑情绪,模拟现代快节奏生活对机体产生的慢性刺激,符合中医学对气滞证的理解,气滞久则血瘀,形成气滞血瘀证,具有创新性。

1.3 秽浊痰阻证

“高粱之变,足生大丁”,饮食不节,嗜食肥甘厚味之品,以致脾胃损伤,聚湿生痰,阻滞气血,损伤脉络,清气不升,浊气不降,发为秽浊痰阻证,临床可见痰多气短,肢体沉重,舌胖大,边有齿痕,苔浊腻或白滑。古丽加玛力等^[9]采用寒燥环境联合高脂饲喂对 ApoE^{-/-}基因敲除小鼠动脉粥样硬化秽浊痰阻证动物模型进行探索性造模。将雄性 ApoE^{-/-}小鼠每天定时放入气候箱(温度:(6 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度:25%~32.8%)11 h 并予高脂饲料喂养。采用宏观表现(体重、饮水量、进食量、情绪变化、大便、舌象、被毛)与微观表现(血脂、主动脉形态学)相结合的方式对模型进行评价,符合秽浊痰阻证的表现。病证造模方式联合中医多病因因素进行造模,考虑新疆地区气候差异对模型的影响,针对性强,具有因地制宜的优点。

1.4 痰瘀互结证

《医宗必读》云“脾土虚弱,清者难升,浊者难降,留中滞膈,瘀而成痰”。“痰”、“瘀”皆为阴邪,两者常兼夹致病,病程较长,胶着难解,临床表现为神疲乏力、身体困重、痰多、唇色紫暗,舌黯有瘀点,苔滑腻,脉滑涩。陈丽娟等^[10]采用高脂饲料喂联合腹腔注射维生素 D₃ 的方法复制 SD 大鼠动脉粥样硬化痰瘀互结证模型。高脂饲料喂饲 SD 大鼠,并同时一次性腹腔注射 400000 IU/kg 维生素 D₃。陈洁等^[11]同样采用高脂饲料联合大剂量腹腔注射 VD₃ 方法,但在此基础上配合球囊损伤内膜可加快脂质斑块的快速形成。张方申等^[12]采用腹腔注射大剂量维生素 D₃ 联合高脂乳剂长期灌胃的方法建立痰瘀互结型 AS 大鼠模型。6 周龄 Wistar 大鼠按 700000 IU/kg 的总剂量分 3 次腹腔注射 VD₃,1 次/天,连续 3 d;第 1、2 天给予 200000 IU/kg,第 3 天 300000 IU/kg。第 4 天采用高脂乳剂灌胃,10 mL/kg,1 次/天,连续 60 d。灌胃第 60 天,大鼠禁食 12 h,断尾取血,离心后取血浆。酶法测定 TC、选择性沉淀法测定 HDL,根据公式(TC-HDL)/HDL 计算动脉硬化指数(AI)。将 AI \geq 4.0 并且爪、唇、舌体暗紫,舌下脉络紫胀,苔腻或黄或白滑,流涎者确定为

痰瘀互结型 AS 成模大鼠。痰瘀互结证是动脉粥样硬化中常见的证候表现,高脂饮食损伤脾胃,久而酿湿成痰,阻滞气血,痰瘀互结,无需外界刺激因素诱导,造模方式相对简单。

1.5 热毒证

毒邪致病,若自外而来,其势必急,灼血伤津;若自内发,则是日久化热之故,临床可见身热较甚。王县委等^[13]采用静脉注射脂多糖(LPS)联合高脂饲料喂养建立热毒型动脉粥样硬化模型。逐渐添加高脂饲料对新西兰白兔进行适应性喂养,1 周后更换高脂饲料喂养,同时静脉注射 200 ng/kg LPS,1 次/周,第 5 周始给予不同药物或蒸馏水灌胃处理。通过血脂水平、心组织病理形态观察 AS 形成情况;通过骨髓穿刺对自体内皮祖细胞(EPCs)进行体外培养,并制备黄连解毒汤含药血清进行干预,观察黄连解毒汤对 EPCs 的影响。LPS 加高脂饲料联合应用是动脉粥样硬化的造模方法之一^[14-15],模型组可见显著斑块形成,但 LPS 静注过快容易造成高死亡率,注射时应注意小剂量缓慢静注。LPS 是强致炎性物质,符合中医“热毒致病”理论。

1.6 湿热证

因于湿,首如裹,湿热不攘,湿与热相兼致病,热势不扬,临床表现可见口渴,痛如针刺,舌质暗红夹瘀紫,苔黄腻或厚,脉数或涩。李亮^[16]采用高脂高糖饲喂 SD 大鼠,并连续 3 d 给予维生素 D3 (700000 U/kg),在此基础上尾静脉注射 LPS(2 μg/kg,2 次/周,持续 6 周)复制 SD 大鼠湿热证动脉粥样硬化模型,大鼠出现食欲欠佳和(或)便溏和(或)小便黄浊即可判定为湿热证。湿热证与热毒证的造模方式类同,但从证候辨析,热毒证与湿热证,均有热,独异在湿邪轻重,在临床上湿热证在热证的基础上同时兼具身热不扬、出汗粘腻不爽等症状,故在造模上也应予以辨析。

1.7 气虚血瘀证

病至后期,心气不足,阴血亏耗,血行涩滞,临床表现为胸闷气短,神倦乏力,舌质淡黯或有瘀斑瘀点,脉弱而涩。潘继兴等^[17]采用高糖高脂饲料联合腹腔注射垂体后叶素制备冠心病气虚血瘀证模型。高糖高脂饲料喂养 5 周,第 6 周给予垂体后叶素 6 U/kg(浓度为 2 U/mL)进行造模给药,30 min 后对大鼠体温、心电图等指标观察。若大鼠出现以下症状为造模成功:(1)体征:大鼠唇周、爪子颜色紫暗,爪温下降,耳壳、尾巴变白发凉,大便湿烂。(2)体温:体温显著下降。(3)心电图:J 点位移显著增加,心率减慢。单次腹腔注射垂体后叶素诱导

AS 模型容易出现造模不稳定的情况^[18],该造模方式在此基础上进行改进,通过多次腹腔注射垂体后叶素联合高脂饲料成功建立疾病模型,并通过具体指标对疾病、气虚证、血瘀证模型建立进行评价,造模方法具有创新性。

1.8 脾虚痰浊证

“脾虚不运清浊,停留津液而痰生”,且脾居中州,为全身水道、气机之枢纽,脾之一病,百病丛生,从而产生痰、饮、湿等病理产物。临床可表现为头身困重,食少纳呆、短气懒言、乏力,苔白腻、脉滑。王佳等^[19]采用中医经典复合因素造模法:饮食不节加劳倦过度造脾虚模型,配合现代医学冠脉内皮损伤手术造动脉粥样硬化模型,建立动脉粥样硬化脾虚痰浊证动物模型。根据 6~8 月雄性广西巴马小型猪体重的不同,每天给予体重 3% 的高脂高热量喂饲共喂养 48 周(每周称重 1 次更改喂饲量);第 2 周予冠脉机械损伤干预建立 AS 模型:LAD 中远段 1/3 处进行球囊挤压伴拉伤手术;第 6 周开始加入跑步过劳干预建立脾虚模型。第 24 周末行冠脉血管内超声(IVUS)检查见斑块明显增大,平均面积狭窄率(39.55±4.56)%,提示 AS 模型构建成功。LDL-C、TC 等指标数值均显著升高,提示模型动物脂质代谢异常亦切合中医的痰浊证的概念。同时根据自制脾虚痰浊证模型评价量表进行打分,统计结果有显著差异。饮食不节最易损伤脾胃,脾在体合肉,在此基础上加入跑步损伤肌肉,诱导脾虚模型建立,该法值得借鉴。

1.9 阳虚血瘀证

阳虚不振,阴寒之邪趁虚上乘,阻滞气血,脉络不畅,临床可见胸闷气短,面色晄白,四肢欠温。常艳鹏^[20]采取高脂饮食、脑垂体后叶素皮下注射及寒冷刺激的造模方法,建立阳虚血瘀证动物模型。造模方法为高脂饮食+脑垂体后叶素(Pit)大剂量皮下注射+可调冰柜(-2℃~4℃ 2 h/d 冷藏)。同时运用彩色多普勒、心电图等诊察方法及生化、光镜等现代检测技术,分析验证模型的成功建立。该方法主要采用高脂饲喂药物诱导联合寒冷刺激造模,模拟冠心病发病病机,避免了手术损伤内膜对机体造成应激反应。

2 总结与展望

动物是科学研究的主要手段之一,有效动物模型的建立是保障实验顺利进行的基石。目前中医药的相关实验以病证结合模型为主,在建立疾病模型的基础上给予不同证型的病因刺激。动脉粥样

硬化的病证结合模型主要有以上 9 种,疾病的造模方式与文献报道一致,主要是通过高脂饮食联合机械损伤、药物诱导或选用易感型 ApoE^{-/-} 基因敲除小鼠进行复刻^[21-22],动脉斑块的显著形成、血脂水平的显著升高标志着疾病模型的成功建立。相较于手术和药物造模方式,笔者建议采用 ApoE^{-/-} 基因敲除小鼠,造模更稳定成功率更高。证型的造模方式主要是联系中医理论施加刺激因素,可根据不同证型给予单因素或复合因素进行造模:气滞证采用声光电慢性刺激,脾虚证采用跑步过劳干预,热毒证采用 LPS 静注,阳虚证采用低温刺激等,通过血脂水平评价痰浊证的建立,炎症因子水平评价热毒证的建立,并综合体征、心电图、心脏超声及模型评价量表评价证型模型的建立。

但中医病证结合动物模型存在以下问题:(1)无标准量化指标评价不同证型动物模型成功与否;(2)无标准量化指标区分相近证型动物模型,缺乏证型金指标;(3)实验模型稳定性、重复性差;(4)所造模型能否真正反映疾病的病理机制存疑。笔者认为可以从以下几点模型的评价指标进行完善:(1)使用特定功效方剂对模型进行反证时可以设置相反功效的方剂进行辅助证明证型模型的成功建立。(2)热毒证和湿热证在使用炎症因子进行体内评价时可以辅助红外探测仪对小鼠体温进行整体评估,从体内体外两个方面说明热证模型的建立。未来随着科技的飞跃进步,研究者们能对评价体系进行不断完善,使病证结合模型更接近疾病发病机制,中医证型发病机理,为深入挖掘中医药的广袤宝库夯实基础。

参考文献:

- [1] Libby P, Buring JE, Badimon L, et al. Atherosclerosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56.
- [2] Herrington W, Lacey B, Sherliker P, et al. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease [J]. Circ Res, 2016, 118(4): 535-546.
- [3] Hu P, Dharmayat KI, Stevens C, et al. Prevalence of familial hypercholesterolemia among the general population and patients with atherosclerotic cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis [J]. Circulation, 2020, 141(22): 1742-1759.
- [4] Ismaiel A, Dumitrascu DL. Cardiovascular risk in fatty liver disease: the liver-heart axis-literature review [J]. Front Med (Lausanne), 2019, 6: 202.
- [5] 尤心怡,王文凤,徐霞,等.补阳还五汤治疗动脉粥样硬化的物质基础及作用机制研究进展 [J]. 中药新药与临床药

理, 2021, 32(10): 1575-1581.

- [6] 梁雨洁,胡镜清,李国信.通阳化浊方与四妙勇安汤干预动脉粥样硬化模型家兔的粪便代谢组学比较研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 7(1): 1-11.
- [7] 白云绮,李慧,宋珂,等. ApoE^(-/-) 小鼠动脉粥样硬化模型的中医证型 [J]. 世界中医药, 2021, 16(1): 71-76.
- [8] 樊华. 灯笼花中野黄芩苷对气滞血瘀型动脉粥样硬化的干预作用及机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2018.
- [9] 古丽加玛力·尼亚孜,安冬青,李梅. 动脉粥样硬化秽浊痰阻证动物模型的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 265-269.
- [10] 陈丽娟,杜莹,贾连群,等. 动脉粥样硬化痰瘀互结证大鼠脂蛋白亚类分布特征研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 159-162.
- [11] 陈洁,缪静,周鑫斌,等. 大鼠动脉粥样硬化痰瘀互结病证结合模型的建立及方药干预研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(9): 22-27, 87.
- [12] 张方申,彭欣,秦林,等. 痰瘀互结型动脉粥样硬化大鼠视网膜和肠系膜微循环观察 [J]. 微循环学杂志, 2015, 25(1): 10-13, 22, 83.
- [13] 王县委,桑文凤,裴强,等. 黄连解毒汤对热毒所致兔动脉粥样硬化及内皮祖细胞的影响 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(9): 2121-2124.
- [14] Zhou L, Long J, Sun Y, et al. Resveratrol ameliorates atherosclerosis induced by high-fat diet and LPS in ApoE^(-/-) mice and inhibits the activation of CD4⁽⁺⁾ T cells [J]. Nutr Metab (Lond), 2020, 17: 41.
- [15] Lu Z, Li Y, Syn WK, et al. Amitriptyline inhibits nonalcoholic steatohepatitis and atherosclerosis induced by high-fat diet and LPS through modulation of sphingolipid metabolism [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020, 318(2): E131-E144.
- [16] 李亮. 基于自噬探讨小檗碱抗湿热证动脉粥样硬化的机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [17] 潘继兴,邓文祥,曾光,等. 加味生脉补心丹对冠心病气虚血瘀证大鼠动脉粥样硬化的影响 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(7): 1303-1306.
- [18] Belous AA. Effect of pituitrin on the development of experimental atherosclerosis [J]. Biull Eksp Biol Med, 1959, 47(3): 27-30.
- [19] 王佳,贾连群,宋囡,等. 健脾化痰祛瘀方对动脉粥样硬化巴马猪小肠线粒体呼吸链复合物及 ATP 活性的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(11): 2677-2681.
- [20] 常艳鹏. 冠心病阳虚血瘀证病证结合研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2008.
- [21] Asare Y, Koehncke J, Selle J, et al. Differential role for activating FcγRIII in neointima formation after arterial injury and diet-induced chronic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Front Physiol, 2020, 11: 673.
- [22] Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer G, et al. Animal models of atherosclerosis [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 816: 3-13.