

谭爱华,冉思邈,石和元,等. 阿尔茨海默病-痰瘀互结病证结合动物模型的建立与评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 39-46.

Tan AH, Ran SM, Shi HY, et al. Establishment of Alzheimer's disease with intermingled phlegm and blood stasis in a transgenic mice model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 39-46.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 006

阿尔茨海默病-痰瘀互结病证结合动物模型的建立与评价

谭爱华^{1,2,3}, 冉思邈², 石和元², 杨 硕^{1*}

(1.湖北中医药大学附属黄冈中医医院,湖北 黄冈 438000;2.湖北中医药大学老年医学研究所,武汉 430065;
3.北京中医药大学博士后流动站,北京 100029)

【摘要】 目的 本研究以探索建立一种可靠的阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)与痰瘀互结证的病证结合动物模型为目的,为中医药防治 AD 提供相应的动物模型以及为建立病证结合动物模型的研究提供借鉴。**方法** 以 APP/PS1 双转基因小鼠为 AD 模型动物,并以冰水浴模拟“瘀”的病理状态;给予高脂饮食饲喂模拟“痰”的病理状态;二者结合以模拟“痰瘀互结”的病理状态。不同组小鼠给予不同的处理,分别建立 AD-疾病模型组、AD-痰证组、AD-瘀证组、AD-痰瘀互结组。同系非转基因 C57BL/6J 小鼠为对照组。造模 14 d 后检测不同组小鼠的 AD 样行为学改变、舌象的客观变化、血液流变学和血脂改变,以及海马组织中相关蛋白含量的差异。**结果** 造模 14 d 后,与对照组比较,AD 各组小鼠行为学均存在明显改变、相关蛋白含量均升高。与 AD-模型组比较,AD-各病理状态组小鼠舌色偏暗红、AD-瘀证组血液流变指标及 AD-痰证组血脂指标均升高,其中 AD-痰瘀互结组相关指标均显著升高。**结论** 通过冰水浴联合高脂饮食饲喂处理 APP/PS1 双转基因小鼠 14 d,可以成功建立 AD-痰瘀互结证的病证结合动物模型,此方法建模成型率高、与临床症状相贴合,可为后续相关研究提供稳定的动物实验载体。

【关键词】 阿尔茨海默病;痰瘀互结证;病证结合;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0039-08

Establishment of Alzheimer's disease with intermingled phlegm and blood stasis in a transgenic mice model

TAN Aihua^{1,2,3}, RAN Simiao², SHI Heyuan², YANG Shuo^{1*}

(1. Huanggang Hospital of TCM, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Huanggang 438000, China.

2. Institute of Geriatrics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065. 3. Postdoctoral Station,

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

【Abstract】 Objective This study aimed to establish a reliable animal model of Alzheimer's disease (AD) with phlegm and stagnation to provide a corresponding animal model for the prevention and treatment of AD by Chinese medicine and to provide a reference on animal modelling method ology for the establishment of animal models combining disease and TCM evidence. **Methods** APP/PS1 2×Tg mice were used as AD model animals. The pathological state of “stasis” was simulated by ice water bath and the pathological state of “phlegm” was simulated by high-fat diet feeding. The two were

[基金项目] 国家重点研发计划中医药现代化重点专项(2019YFC1708502)。

[作者简介] 谭爱华(1991—),男,博士,在站博士后。研究方向:中医药防治老年病。E-mail:evan2018@stmail.hbctm.edu.cn

[通信作者] 杨硕(1991—),男,硕士,研究方向:中医药防治老年病及方剂作用机制。E-mail:734916256@qq.com

combined to simulate the pathological state of “phlegm and stasis interconnection”. The mice in different groups were treated differently: the AD-phlegm group was given a high-fat diet, the AD-stasis group was given an ice-water bath, the AD-phlegm-stasis group was given both a high-fat diet and an ice-water bath, and the AD-disease model group was left untreated. Non-transgenic C57BL/6J mice with the same genetic background were the control group. The differences in AD-like behavioral changes, objective changes in tongue image, blood rheology and lipid alterations and relevant protein content in hippocampal tissue were examined at 14 days after modeling. **Results** After 14 days of modeling, the AD-like behavioral changes and relevant protein content of mice in the AD groups were significantly changed compared with those in the control group. The tongue color was dark red in the AD-disease model group compared with result in the AD-model group; the hemorheology index of the AD-stasis group and the blood lipid index of the AD-phlegm group were increased. The related indexes of AD-phlegm-stasis interconnection group were significantly increased. **Conclusions** The combination of ice-water bath and high-fat diet to treat APP/PS1 mice for 14 days successfully established the combined animal model of AD-phlegm-stasis syndrome. This method has a high modeling rate, fits well with clinical symptoms and may represent a useful experimental animal system for subsequent studies.

【Keywords】 Alzheimer's disease; phlegm and stagnation syndrome; combination of disease and syndrome; animal model

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种认知及行为障碍进行性加重的神经系统疾病^[1]。据 2018 国际阿尔茨海默病报告显示,全球共有 5000 万 AD 患者,平均每 3 s 就能增加一例新患者^[2]。年龄是 AD 的重要发病因素,随着我国老龄化的加剧,我国将成为 AD 的重灾区^[3]。AD 属中医学中“痴呆”“健忘”“不慧”等范畴,“痴呆”之名首见于《华佗神医秘传·治痴呆神方》^[4]。AD 病机总属本虚标实,肾精不足为发病基础,痰、瘀为主要致病因素,痰瘀互结,经脉不畅,精元不能上达于脑,脑窍失养,发为本病^[5]。目前 AD-痰瘀互结证尚无标准动物模型,本研究以 APP/PS1 双转基因小鼠为 AD 模型动物,通过冰水浴联合高脂饮食饲喂干预,构建 AD-痰瘀互结模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

20 只 SPF 级 3 月龄 APP/PS1 双转基因雄性小鼠,5 只 SPF 级 3 月龄同遗传背景的 C57BL/6J 雄性小鼠,体重均为 (25 ± 5) g,均订购于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008],饲养于湖北中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障环境独立通气笼中[SYXK(鄂)2017-0067]。饲养室温度 $22^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$,湿度 $45\%\sim 55\%$,12 h/12 h 昼夜交替。本研究通过了湖北中医药大学动物实验伦理审查([2020]IEC(012)号),实验期间按照 3R 原则给予小鼠人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

小鼠血生化检测试剂集成夹片(美国 IDEXX);

RIPA 裂解液、50×cook tail、PMSF(100 mmol/L)、磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量检测试剂盒、5×蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、脱脂奶粉、ECL、显影定影试剂、 β -actin、GAPDH、Histone H3、HRP 标记山羊抗兔、HRP 标记驴抗山羊、HRP 标记山羊抗小鼠、HRP 标记山羊抗大鼠、转移缓冲液、电泳缓冲液、TBS 缓冲液均由武汉 Servicebio 公司提供;PVDF 膜(Millipore, 0.45 μm , 0.22 μm);TWEEN 20 (Solarbio, T8220);T-Tau 抗体(Servicebio, GB11178);TNF- α 抗体(武汉三鹰, 17590-1-ap);IL-10(武汉三鹰, 60269-1-ap);IL-1- β (武汉 Abclonal, A11369)。

动物独立通气笼架(浙江苏杭, IVC-BP5 型);高脂饲料(北京华阜康, D12492);制冰机(广州思克, MIYA-ICS60 型);玻璃筒(四川蜀牛, 60 cm/1500 mL);Morris 水迷宫视频分析系统(安徽正华, ZH0065 型);血流变分析仪(北京赛科希德, SA-7000);Catalyst one 动物全自动生化分析仪(美国 IDEXX);酶标检测仪(BIO-RED);冷冻离心机(湖南凯达);双垂直电泳仪(BIO-RED);转印电泳仪(BIO-RED);感光胶片(日本 kodak);灰度分析软件(美国 Protein Simple, Alpha Ease FC);匀浆仪(上海测博);数码单反相机、镜头(日本 Canon, EOS 6D Mark II; 24 ~ 70 mm f/2.8 L USM);140 Color Checker(美国, X-RITE);D65 国际标准人工日光灯管(荷兰 PHILIPS, 6500 k/18 w/30 cm);摄影箱(浙江昕昱发, Hakutatz 101260cm/LED);图片分析软件 Photoshop CC(美国 Adobe)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

按照随机数表法将 20 只 APP/PS1 双转基因小鼠分为 4 组:AD-疾病模型组 (Alzheimer's disease model group, 记作 AD-Model 组)、AD-痰证组 (AD-Phlegm syndrome group, 记作 AD-Ps 组)、AD-瘀证组 (AD-Blood stasis syndrome group, 记作 AD-Bss 组)、AD-痰瘀互结组 (AD-Phlegm and blood stasis group, 记作 AD-Pbs 组), 每组 5 只。同系非转基因 C57BL/6J 小鼠 5 只作为空白对照组 (Blank control group, 记作 Control 组)。

1.3.2 实验动物造模

各组小鼠适应性喂养 1 周后开始造模。AD-Ps 组小鼠于入室后第 8 天开始饲喂高脂饮食, 自由饮水, 持续 14 d。AD-Bss 组小鼠于入室后第 8 天开始, 每天 14:00, 将小鼠放入底面直径为 10 cm、深 25 cm、壁厚 0.2 cm 的玻璃圆桶内, 冰水混合物深 12 cm 左右, 以小鼠后肢不能直接触到桶底为宜, 冰水混合物温度控制在 0℃~4℃。待小鼠在冰水混合物中挣扎动作明显减少, 即将沉至桶底时立即捞出。每天 1 次, 持续 14 d^[6]。AD-Pbs 组同时予高脂饮食和冰水浴处理, 持续 14 d。AD-Model 组和 Control 组正常饲养, 不予处理。

1.3.3 模型评价

(1) Morris 水迷宫法检测各组小鼠行为学变化

测试程序主要包括定位航行试验和空间探索试验两个部分, 主要检测小鼠的运动能力及空间记忆能力。定位航行试验共历时 5 d, 每天训练 4 次。记录最后一日上平台潜伏期 (单位: s), 同时记录各组小鼠抵达平台前或 90 s 内游泳的总路程 (单位: cm), 计算平均游泳速度 (单位: cm/s)。记录每只小鼠在水池中的运动路线, 生成定位航行试验运动轨迹图。空间探索试验在定位航行试验后, 撤去池中水下平台, 记录各组小鼠穿越原平台所在位置的次数, 记作穿越平台次数 (单位: 次), 并记录每只小鼠在水池中的运动路线, 生成空间探索试验运动轨迹图。

(2) 分析比色反应各组小鼠舌色客观变化

将小鼠用 0.3% 的戊巴比妥钠溶液 (0.15 mL/10 g) 麻醉术后移入摄影箱内, 充分暴露小鼠舌头, 标准人工日光下拍照。相同条件下, 拍摄 140 色 Color Checker 标准比色卡。用 Photoshop CC (Adobe) 处理小鼠舌面区域图像, 统一调整为成大

小为 500×500 px 的图片, 颜色选择 sRGB 模式。校正拍摄的标准比色卡, 将校正后的各组小鼠舌象图片分隔为 5×5 的区域, 分别提取每个区域中心位置 R、G、B 数值并计算平均值和 r 值, $r = R / (R + G + B)$, 用于反映各组小鼠舌色的客观变化。

(3) 血液流变学反应各组小鼠血液粘稠度

各组小鼠实验前撤去食物, 禁食 12 h, 不禁水。将小鼠用 0.3% 的戊巴比妥钠溶液 (0.25 mL/10 g) 麻醉术后, 心脏采血, 分装为两支, 其中一支置于含有肝素的抗凝管中, 血液流变分析仪分别检测血液高切 (200/s)、中切 (50/s)、低切 (1/s) 的全血黏度及血浆黏度。

(4) 生化分析反应各组小鼠血脂变化

上述采得另外一支血液, 分离血清, Catalyst one 全自动生化分析仪, 分别测定各组小鼠血清中的 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 的含量。

(5) Western blot 法检测各组小鼠海马组织相关蛋白含量

采血后的小鼠迅速断头取脑, 剥离出海马组织, 提取海马组织总蛋白, 用 Western blot 法检测 TNF- α 、IL-1 β 及 T-Tau 蛋白含量。

1.4 统计学方法

所有实验数据均使用 SPSS 23.0 软件进行分析, Graph Pad Prism 8.0 软件和 Adobe AI 2020 软件绘制统计图。结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所有数据均保留小数点后 3 位。方差齐性检验 $P > 0.05$ 时, 采用 t 检验, 方差齐性检验 $P < 0.05$ 时采用 T_2 检验; 两组间比较采用 LSD。以 $P < 0.05$ 判定差异为有统计学意义, $P < 0.01$ 判定为差异具有高度统计学意义, $P > 0.05$ 判定为差异无统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验结果

与 Control 组小鼠比较, AD 各组小鼠的平均游泳速度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。AD 各组小鼠的游泳总路程和上平台潜伏期明显更多, 穿越平台次数明显更少, 其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

与 AD-Model 组小鼠比较, 各组小鼠的平均游泳速度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。AD 各组小鼠的游泳总路程、上平台潜伏期和穿越平台次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

说明各组小鼠运动能力没有明显差异。与 C57 小鼠相比, APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆能力明显降低, 从统计数据来看, 虽然冰水浴和高脂饮食造模处理后的各组小鼠学习记忆能力存在一定的差异, 但这些差异并没有统计学意义 ($P>0.05$)。统计结果如表 1, 各组小鼠定位航行试验和空间探索试验的运动轨迹代表图如图 1。

2.2 舌色客观化比较实验结果

与 Control 组小鼠相比, AD-Model 组小鼠舌色偏暗红, 但 r 值差异并没有统计学意义 ($P>0.05$)。其余各组小鼠舌色偏暗红, r 值差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

与 AD-Model 组小鼠相比, AD 各组小鼠舌色偏暗红, r 值差异有统计学意义 ($P<0.05$)。对 AD-Ps 组、AD-Bss 组和 AD-Pbs 组进行两两 LSD 比较, AD-Ps 组、AD-Bss 组小鼠舌色无明显差异, r 值差异也

没有统计学意义 ($P>0.05$), 而 AD-Ps 组和 AD-Pbs 组、AD-Bss 组和 AD-Pbs 组之间的差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。各组小鼠舌面 R、G、B 值及 r 值统计见表 2, 小鼠舌象图片见图 2。

2.3 血液流变学检测实验结果

与 Control 组小鼠相比, AD-Model 组与 AD-Ps 组小鼠全血黏度和血浆黏度较高, 但其差异无统计学意义 ($P>0.05$)。AD-Bss 组和 AD-Pbs 小鼠全血黏度和血浆黏度明显升高, 具有统计学意义 ($P<0.05$)。

与 AD-Model 组小鼠相比, AD-Ps 组小鼠的全血黏度和血浆黏度均有不同程度升高, 但其差异不具有统计学意义 ($P>0.05$); AD-Bss 组和 AD-Pbs 小鼠全血黏度和血浆黏度明显升高, 具有统计学意义 ($P<0.05$)。这说明冰水浴处理可以明显改变小鼠的血液流变, 能够较好地模拟“瘀”的病理状态。各组小鼠全血黏度和血浆黏度比较见表 3。

表 1 各组小鼠 Morris 水迷宫检测结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 1 Results of Morris maze test for each group of mice

组别 Groups	平均游泳速度 (cm/s) Average swimming speed	游泳总路程 (cm) Total distance swam	上平台潜伏期 (s) Time taken to reach the platform for the first time	穿越平台次数 (n) Number of crossings of the platform area
空白对照组 Control group	7.76 $\pm$ 1.01	207.08 $\pm$ 40.60 [△]	20.72 $\pm$ 7.46 [△]	2.62 $\pm$ 1.33 [△]
AD-疾病模型组 AD-Model group	7.31 $\pm$ 0.35	480.81 $\pm$ 42.42 [*]	59.43 $\pm$ 7.90 [*]	0.89 $\pm$ 0.78 [*]
AD-痰证组 AD-Ps group	7.22 $\pm$ 0.62	504.28 $\pm$ 52.92 [*]	67.11 $\pm$ 14.05 [*]	0.77 $\pm$ 0.45 [*]
AD-瘀证组 AD-Bss group	6.75 $\pm$ 0.71	483.14 $\pm$ 44.78 [*]	65.15 $\pm$ 10.79 [*]	0.85 $\pm$ 0.47 [*]
AD-痰瘀互结组 AD-Pbs group	6.94 $\pm$ 0.66	497.23 $\pm$ 40.26	62.09 $\pm$ 9.18 [*]	0.73 $\pm$ 0.42 [*]

注: 与空白对照组比较, $^*P<0.05$; 与 AD-疾病模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。

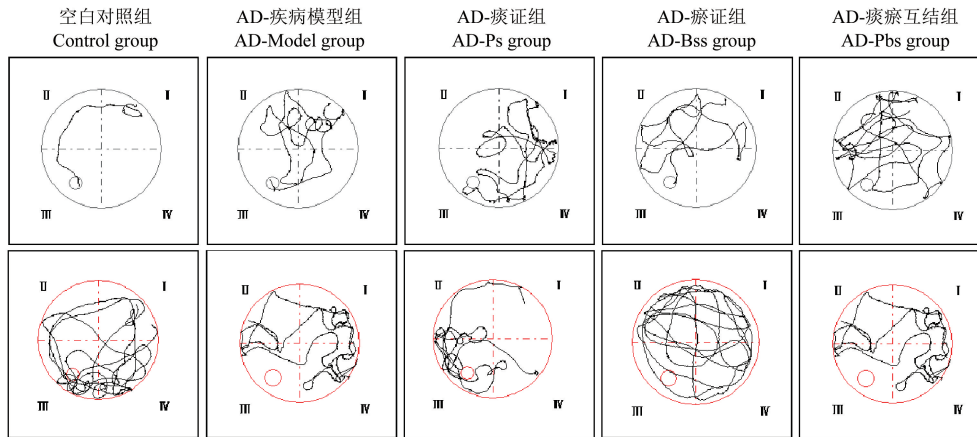
Note. Compared with the control group, $^*P<0.05$. Compared of with the AD-Model group, $^{\Delta}P<0.05$.

表 2 各组小鼠舌面 R、G、B 值及 r 值 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 2 R, G, B and r values of the tongue photos of mice in each group

组别 Groups	R 值 R value	G 值 G value	B 值 B value	r 值 r value
空白对照组 Control group	206.001 $\pm$ 4.072	83.680 $\pm$ 1.145	88.160 $\pm$ 1.434	0.545 $\pm$ 0.005
AD-疾病模型组 AD-Model group	183.280 $\pm$ 2.979	66.480 $\pm$ 2.027	93.000 $\pm$ 4.830	0.535 $\pm$ 0.010
AD-痰证组 AD-Ps group	170.000 $\pm$ 5.694	71.520 $\pm$ 2.013	98.400 $\pm$ 7.848	0.500 $\pm$ 0.012 [*] $^{\Delta}$
AD-瘀证组 AD-Bss group	189.440 $\pm$ 0.961	86.400 $\pm$ 1.414	102.080 $\pm$ 2.397	0.501 $\pm$ 0.004 [*] $^{\Delta}$
AD-痰瘀互结组 AD-Pbs group	174.040 $\pm$ 3.506	81.560 $\pm$ 1.609	110.360 $\pm$ 6.474	0.468 $\pm$ 0.011 [*] $^{\Delta}$

注: 与空白对照组比较, $^*P<0.05$; 与 AD-疾病模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, $^*P<0.05$. Compared of with the AD-Model group, $^{\Delta}P<0.05$.



注:上行图:定位航行试验;下行图:空间探索试验。
图 1 各组小鼠 Morris 水迷宫试验轨迹图
Note. Upper figure, Positioning navigation test. Lower figure, Space exploration test.

Figure 1 Action trajectory diagram of each group of mice in Morris test

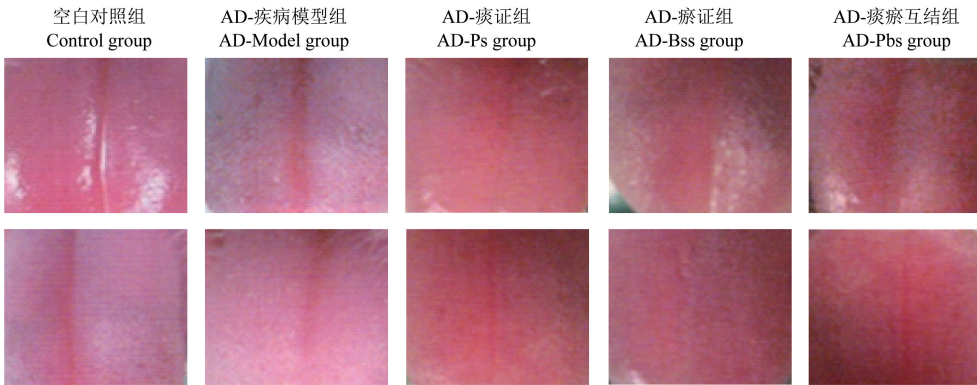


图 2 各组小鼠舌象图片
Figure 2 Tongue images of mice in each group

表 3 各组小鼠全血黏度、血浆黏度比较($\bar{x} \pm s$, mpa/s, $n=5$)
Table 3 Comparison of whole blood viscosity and plasma viscosity of mice in each group

组别 Groups	冰水浴处理 Ice and water mixture	全血黏度 Full blood viscosity			血浆黏度 Plasma viscosity
		高切 (200/s) High-cutting viscosity	中切 (50/s) Middle-cutting viscosity	低切 (1/s) Low-cutting viscosity	
空白对照组 Control group	-	5.88±0.10	8.22±0.08	15.74±0.33	1.78±0.06
AD-疾病模型组 AD-Model group	-	5.97±0.04	8.24±0.14	16.06±0.13	1.95±0.05
AD-痰证组 AD-Ps group	-	6.07±0.06	8.30±0.34	17.55±0.32	2.05±0.07
AD-痰证组 AD-Bss group	+	6.41±0.12 * Δ	9.32±0.29 * Δ	22.78±0.47 * Δ	3.52±0.37 ** $\Delta\Delta$
AD-痰瘀互结组 AD-Pbs group	+	6.84±0.59 * Δ	9.23±0.55 * Δ	23.67±0.51 ** $\Delta\Delta$	3.66±0.04 ** $\Delta\Delta$

注:+:进行冰水浴处理,-:不进行冰水浴处理。各组小鼠与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 AD-疾病模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。
Note. +, Ice and water mixture treatment. -, No Ice and water mixture treatment. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared of with the AD-Model group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$.

2.4 血脂检测实验结果

与 Control 组小鼠相比,AD-Model 与 AD-Bss 组小鼠血脂指标差异无统计学意义($P>0.05$)。AD-Ps 组和 AD-Pbs 组小鼠的各项血脂指标均明显升高,差异均具有高度统计学意义($P<0.01$)。

与 AD-Model 组小鼠相比,AD-Bss 组小鼠虽然在血脂指标上略有升高,但其差异不具有统计学意义($P>0.05$)。AD-Ps 组和 AD-Pbs 组小鼠的各项血脂指标均明显升高,差异均具有高度统计学意义($P<0.01$)。

对 AD-Ps 组和 AD-Pbs 组进行 LSD 分析,两者之间的差异不具有统计学意义($P>0.05$)。这说明高脂饮食饲喂可以明显改变小鼠的血脂指标,能够较好地模拟“痰”的病理状态。各组小鼠血脂指标比较见表 4。

2.5 Western blot 实验结果

与 Control 组相比,APP/PS1 双转基因的各组小鼠的海马组织的炎症指标 TNF- α 、IL-1 β 和 AD 病理改变指标 T-Tau 均明显升高,其差异均有统计学意义($P<0.05$),这说明转基因小鼠海马组织内发生了炎症反应,并产生了 AD 样病理改变。与 AD-Model 组比,AD-Bss 组和 AD-Ps 组在炎症指标和 AD 病理改变指标上虽然略有区别,但其差异不具有统计学意义($P>0.05$);而 AD-Pbs 组中的炎症指标和 AD 病理改变指标明显升高,其差异具有统计学意义($P<0.05$)。这说明同时模拟“痰”和“瘀”病理状态的小鼠 AD 病变程度更为严重,脑神经炎症的发生更加明显。各组小鼠海马区不同蛋白 WB 电泳条带图和相对灰度值统计见图 3。

3 讨论

AD 是一种神经系统疾病,以记忆减退、痴呆、生活能力减弱等为主要临床表现。目前,其发病机制尚不明确,主流观点认为炎症反应、Tau 蛋白的过度磷酸化、氧化应激等均可对其造成影响^[7]。中医学认为,老年人脾肾虚弱,无力运化水湿,聚湿成痰。《辨证录》记载:“痰积于胸中,盘踞于心外,使神明不清而成呆病矣”。老年人气血虚弱,无力推动血液流转,血停则成瘀。《景岳全书》曰:“凡心有瘀血,亦令健忘”^[8]。痰瘀互结,阻滞经脉,使气血精微不能上达脑窍,脑失所养,发为本病。因此,本研究以痰瘀互结证为切入点,建立 AD-痰瘀互结证病证结合动物模型。

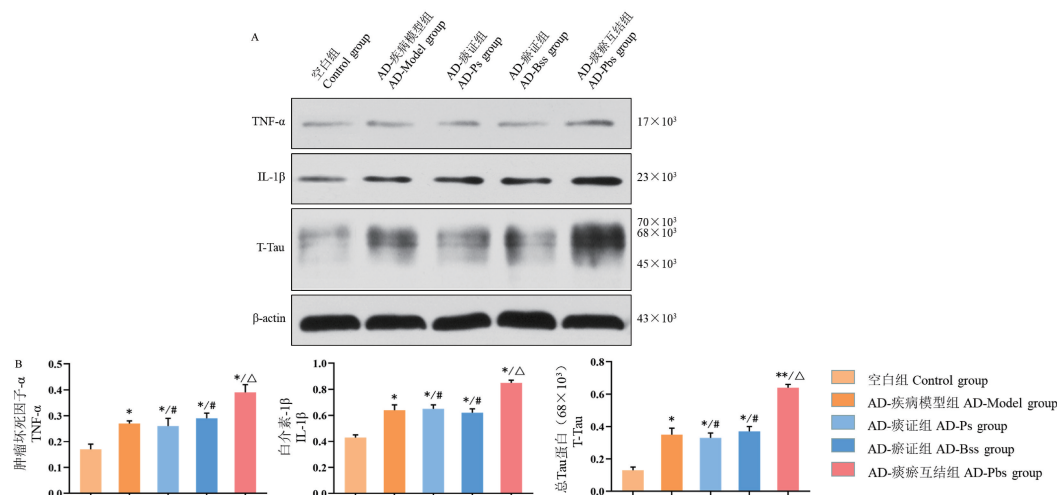
《医林改错·积块》曰:“血受寒则凝结成块”。寒邪克表,引起经脉痉挛、瘀阻,血行不畅,进而形成瘀证。郭文鹤、王丹丹等通过降低大鼠体表温度,获得瘀证动物模型^[9-10]。对于瘀证动物模型的评价可以观察舌苔的改变,也可通过检测血液流变学的改变,常选取的指标有血液粘稠度、血浆粘稠度、血沉等^[11]。“脾为生痰之源”,过食肥甘厚腻,损伤脾胃,而致脾胃生化失司,聚液为痰。彭丹虹等通过喂养大鼠高脂饮食,可以获得以血脂升高为主的痰证动物模型^[12]。Lee 等^[13]、Han 等^[14]通过喂养小鼠高脂饮食,可以稳定的升高小鼠血脂。痰证动物模型的评价,主要通过检测血脂的改变^[15]。辨证论治为中医的核心思想,以往涉及到 AD 的动物实验主要以病为主,鲜有症状的辨识。痰瘀互结

表 4 各组小鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平比较($\bar{x}\pm s$, mmol/L, $n=5$)
Table 4 Comparison of serum levels of TC, TG, HDL-C and LDL-C in various groups of mice

组别 Groups	食物类型 Feed types	总胆固醇 TC	甘油三酯 TG	高密度脂蛋白 HDL-C	低密度脂蛋白 LDL-C
空白对照组 Control group	普通饲料 General feed	2.22 $\pm$ 0.27	1.47 $\pm$ 0.19	1.75 $\pm$ 0.45	0.18 $\pm$ 0.05
AD-疾病模型组 AD-Model group	普通饲料 General feed	2.14 $\pm$ 0.13	1.41 $\pm$ 0.56	1.72 $\pm$ 0.25	0.18 $\pm$ 0.04
AD-痰证组 AD-Ps group	高脂饲料 High-fat feed	8.37 $\pm$ 1.75 ** $\Delta\Delta$	4.72 $\pm$ 0.58 ** $\Delta\Delta$	0.95 $\pm$ 0.07 ** $\Delta\Delta$	1.95 $\pm$ 0.07 ** $\Delta\Delta$
AD-瘀证组 AD-Bss group	普通饲料 General feed	2.52 $\pm$ 1.06	1.78 $\pm$ 0.99	1.86 $\pm$ 0.12	0.21 $\pm$ 0.08
AD-痰瘀互结组 AD-Pbs group	高脂饲料 High-fat feed	9.75 $\pm$ 1.37 ** $\Delta\Delta$	5.81 $\pm$ 1.05 ** $\Delta\Delta$	0.68 $\pm$ 0.17 ** $\Delta\Delta$	1.02 $\pm$ 0.18 ** $\Delta\Delta$

注:各组小鼠与空白对照组比较,** $P<0.01$;与 AD-疾病模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared of with the AD-Model group, $\Delta\Delta P<0.01$.



注:A:各组小鼠海马区不同蛋白 Western blot 电泳条带图;B:各组小鼠海马区不同蛋白相对灰度值统计图。各组小鼠与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 AD-疾病模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

图3 各组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、T-Tau 蛋白表达水平比较

Note. A, Western blot electrophoresis band of different proteins in the hippocampal region of each group of mice. B, Relative grayscale values of different proteins in the hippocampal region of each group of mice. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the AD-Model group, $\Delta P<0.05$.

Figure 3 Comparison of TNF- α , IL-1 β and T-Tau protein expression levels in various groups of mice

为 AD 的主要症状,本次研究主要通过冰水浴加高脂饮食干预 APP/PS1 双转基因小鼠来制造 AD-痰瘀互结证动物模型。通过观察小鼠舌色变化、血液流变学改变、血脂改变等评价造模情况,通过水迷宫实验以及 Western blot 实验评价 AD-痰瘀互结证小鼠与正常小鼠的差别。

本次研究结果表明,与 Control 组相比较,AD 各组小鼠的平均游泳速度无明显差异,表明各组小鼠的运动能力无差别。但 AD 各组小鼠游泳总路程和上平台潜伏期明显增多,穿越平台次数明显减少,表明 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆能力明显低于 C57 小鼠^[16]。AD 各组小鼠的 TNF- α 、IL-1 β 、T-Tau 的蛋白含量明显高于 Control 组,表明 AD 各组小鼠海马组织内发生了炎症反应,并产生了 AD 样病理改变^[17-18]。说明本次实验中 AD 各组小鼠模型均符合阿尔茨海默病的临床表现。其中,AD-Pbs 组各项指标改变最为明显,其 AD 病变程度更加严重。

未经过冰水浴及高脂饮食干预的 AD-Model 组与 Control 组在舌色、血液流变学及血脂方便无明显差别,表明在干预之前,小鼠无“痰”、“瘀”证的表现。干预之后,与 AD-Model 组相比较,AD-Bss 组、AD-Ps 组及 AD-Pbs 组小鼠舌色均偏暗红,AD-Bss

组与 AD-Pbs 组全血黏度和血浆黏度均升高,AD-Ps 组与 AD-Pbs 组血脂均升高,其中 AD-Pbs 组不但舌色更加暗红,而且全血黏度、血浆黏度、血脂均明显升高。实验表明只接受冰水浴的小鼠,只会形成“瘀”证的病理表现,只接受高脂饮食的小鼠,只会形成“痰”证的病理表现,只有同时接受冰水浴及高脂饮食的小鼠才能形成“痰瘀互结”的病理表现,而且痰瘀症状相互搏结,瘀阻经脉,致使“痰”、“瘀”症状表现的更加明显。

本次研究在借鉴以往“痰”、“瘀”动物模型的基础上,结合 AD 病因病机特点,创立 AD-痰瘀互结证动物模型。与普通 APP/PS1 双转基因小鼠相比较,本模型更加贴合中医辨证论治的思维体系,为相关中药或方剂研究提供更加准确的动物模型,以期达到方证对应。本模型制备可控性强,能做到统一化建模,且其证候表现与临床较一致。同时该方法也存在一定的缺点,如造模时间长,操作过程精细,过程繁琐等。通过以上分析,AD-痰瘀互结证动物模型可为相应研究提供可靠的动物载体。

参考文献:

- [1] The Alzheimer's Association. 2021 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(3): 327-406.
- [2] Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2018

- [EB/OL]. [2018-09-21]. <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2018/>.
- [3] 李笑阳, 刘冠含, 尹昊文, 等. 中国老年人群阿尔茨海默病发病危险因素的 Meta 分析 [J]. 现代预防医学, 2020, 47(6): 1100-1103, 1119.
- [4] 张译戈, 梁雨晴, 李雅黎, 等. 从“肾虚痰瘀”浅谈阿尔茨海默病的中医病机演变 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(1): 159-164.
- [5] 谭爱华, 宋子瑜, 胡玉萍, 等. 补肾化痰复方对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力及 SorLA 蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 4961-4964.
- [6] 刘校彤, 吕光华, 王巧稚, 等. 血瘀证动物模型制备的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 371-380.
- [7] Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell [J]. J Biol Chem, 2009, 284(19): 12845-12852.
- [8] 王玉璧, 郭蕾, 窦志芳, 等. 关于老年痴呆病的中医病因病机探讨 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(4): 743-745.
- [9] 王丹丹, 王东梅, 马青, 等. 温经化痰止痛法对寒凝血瘀证痛经大鼠 Th17、Treg 细胞分化及其细胞因子表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 308-310.
- [10] 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.
- [11] 刘校彤, 吕光华, 王巧稚, 等. 血瘀证动物模型制备的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 371-380.
- [12] 彭丹虹, 王燕萍, 刘晓琪, 等. 高脂血症痰证动物模型实验研究及思考 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(9): 2338-2341.
- [13] Lee HS, Nam Y, Chung YH, et al. Beneficial effects of phosphatidylcholine on high-fat diet-induced obesity, hyperlipidemia and fatty liver in mice [J]. Life Sci, 2014, 118(1): 7-14.
- [14] Han JM, Lee JS, Kim HG, et al. Synergistic effects of *Artemisia iwayomogi* and *Curcuma longa* radix on high-fat diet-induced hyperlipidemia in a mouse model [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 173: 217-224.
- [15] 赵宏艳, 胡明华, 从仁怀, 等. 可用于痰浊研究的动物模型探析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(12): 1694-1696, 1700.
- [16] 杨玉洁, 李玉姣, 李彬彬, 等. 用于评价小鼠学习记忆能力的迷宫实验方法比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 129-134.
- [17] 杨翠翠, 李林, 张兰. Tau 蛋白高度磷酸化致阿尔茨海默病动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(6): 71-74.
- [18] 高媛媛, 王旭, 任路. “肾脑相济”电针对阿尔茨海默病模型小鼠行为学及 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2020, 39(3): 359-364.

[收稿日期]2021-08-11