

肖秋萍,钟友宝,喻松仁,等.脾虚湿蕴证溃疡性结肠炎模型构建及T淋巴细胞变化的研究[J].中国实验动物学报,2023,31(10):1241-1249.

Xiao QP, Zhong YB, Yu SR, et al. Model of ulcerative colitis with spleen deficiency and dampness syndrome, and changes in T lymphocytes [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1241-1249.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.001

# 脾虚湿蕴证溃疡性结肠炎模型构建 及T淋巴细胞变化的研究

肖秋萍<sup>1</sup>,钟友宝<sup>2,3</sup>,喻松仁<sup>2</sup>,李姗姗<sup>2</sup>,罗小泉<sup>2</sup>,刘璇<sup>2</sup>,陈丽玲<sup>2\*</sup>

(1. 江西中医药大学药学院,南昌 330004;2. 江西中医药大学实验动物科技中心,南昌 330004;  
3. 江西中医药大学方证中心,南昌 330004)

**【摘要】 目的** 构建脾虚湿蕴证溃疡性结肠炎小鼠模型及探明T淋巴细胞在该模型中的特征。**方法** C57BL/6小鼠,随机分为Control组、FXY组、3%DSS组、FXY+3%DSS组和FXY+2%DSS组。采用DSS联合番泻叶(FXY)建立脾虚湿蕴证溃疡性结肠炎小鼠模型,造模结束后,HE染色观察结肠组织结构变化;ELISA法检测结肠组织炎症细胞因子的浓度,流式细胞术测定CD4/CD8 T淋巴细胞、Th1/Th2、Th17/Treg细胞水平。**结果** FXY组小鼠的临床症状以腹泻为主,3%DSS组的小鼠以便血为主,而FXY+3%DSS组和FXY+2%DSS组小鼠表现出腹泻和便血同行,但FXY+3%DSS组小鼠生存率低至50%。与Control组相比,3%DSS组、FXY+3%DSS组和FXY+2%DSS组体重、结肠长度及抗炎性细胞因子IL-10、TGF- $\beta$ 1浓度均显著降低,而DAI、结肠重量、促炎性细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6浓度均显著上升;FXY+3%DSS组和FXY+2%DSS组肠系膜淋巴结中的CD4、Th1、Th17细胞百分比显著上升,而CD8、Th2、Treg细胞显著下降。**结论** 番泻叶联合2%DSS诱导能成功构建脾虚湿蕴证溃疡性结肠炎小鼠模型,并表现出典型的CD4/CD8 T细胞、Th1/Th2、Th17/Treg细胞失衡特征。

**【关键词】** 脾虚湿蕴证;溃疡性结肠炎;模型构建;T淋巴细胞

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023)10-1241-09

## Model of ulcerative colitis with spleen deficiency and dampness syndrome, and changes in T lymphocytes

XIAO Qiuping<sup>1</sup>, ZHONG Youbao<sup>2,3</sup>, YU Songren<sup>2</sup>, LI Shanshan<sup>2</sup>, LUO Xiaoquan<sup>2</sup>, LIU Xuan<sup>2</sup>, CHEN Liling<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China. 2. Laboratory Animal Research Center for Science and Technology, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004.

3. Formula-Pattern Research Center, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004)

Corresponding author: CHEN Liling. E-mail: 20101066@jxutcm.edu.cn

**【Abstract】 Objective** A mouse model of ulcerative colitis with spleen deficiency and dampness syndrome was established, and the function of T lymphocytes in this model was studied. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into Control, FXY (folium sennae), 3%DSS (dextran sulfate sodium salt, DSS), FXY + 3%DSS, and FXY + 2%DSS

**【基金项目】**国家自然科学基金(82260863),江西省自然科学基金(20232BAB206172),江西中医药大学博士启动基金(2019WBZR011)。Funded by the National Natural Science Foundation of China (82260863), Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20232BAB206172), Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine Doctoral Starting Fund (2019WBZR011).

**【作者简介】**肖秋萍(1991—),女,在读博士研究生,研究方向:中医证候动物模型。Email: 1933067805@qq.com

**【通信作者】**陈丽玲(1983—),女,博士,副教授,研究方向:肠道健康。Email: 20101066@jxutcm.edu.cn

groups. A mouse model of ulcerative colitis with spleen deficiency and dampness syndrome was established by DSS and senna leaf. At the end of modeling, HE (hematoxylin-eosin) staining was performed to observe structural changes in colon tissues. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) was performed to measure the concentrations of proinflammatory cytokines in colon tissues. Flow cytometry was used to analyze CD4/CD8 T lymphocytes, Th1/Th2 cells, and Th17/Treg cells. **Results** In the FXY group, the clinical symptoms of mice with spleen deficiency and dampness were mainly diarrhea, and mice treated with 3%DSS colitis mostly showed blood in stool, whereas mice with spleen deficiency and dampness colitis in FXY + 3%DSS and FXY + 2%DSS groups mostly showed diarrhea and blood in stool, but the survival rate of mice in the FXY + 3%DSS group was as low as 50%. Compared with the Control group, body weight, colon length, and concentrations of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$ 1 were significantly lower in 3%DSS group, FXY + 3%DSS group, and FXY + 2%DSS group, while the DAI (disease activity index) concentration, colon weight, colon weight index, colon weight/colon length, and proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 were significantly increased, and significant ulcer formation and inflammatory cell infiltration were observed by light microscopy. Compared with the Control group, the percentages of CD4, Th1, and Th17 cells in mesenteric lymph nodes of FXY + 3%DSS group and FXY + 2%DSS group were significantly increased, while CD8, Th2, and Treg cells were significantly decreased. **Conclusions** The combination of senna and 2%DSS successfully establishes a model with ulcerative colitis with spleen deficiency and dampness evidence in mice, showing typical CD4/CD8, Th1/Th2, and Th17/Treg cell imbalances.

**【Keywords】** spleen deficiency and dampness; ulcerative colitis; model establishment; T lymphocytes

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 属于慢性非特异性肠道炎症<sup>[1]</sup>, 临床上多表现为消化不良、腹泻、脓血便、腹痛、里急后重等症状, 使患者生活质量明显下降<sup>[2]</sup>。近年来, 随着工业化进程加快、饮食结构西化、生活方式转变, 我国 UC 的发病率和患病率逐年攀升<sup>[3]</sup>。反复发作、迁延不愈等典型特征是当前治疗 UC 的主要困境之一<sup>[4]</sup>。因此, 寻找更安全、有效、易获取的 UC 治疗策略迫在眉睫。中医学将 UC 列为“痢疾”“泄下”“肠辟”等范畴, 中医药在治疗 UC 上展现了良好疗效, 然而其模糊的作用机制制约发展。

中华中医药学会脾胃病分会制定了《UC 中医诊疗共识意见》, 将 UC 辨证分为脾虚湿蕴证、大肠湿热证、热毒炽盛证、脾肾阳虚证、寒热错杂证、阴血亏虚证和肝郁脾虚证 7 型<sup>[5]</sup>; 据流行病学调查, 脾虚湿蕴证是 UC 临床发病的主要证型之一<sup>[6-8]</sup>。脾虚湿蕴证动物模型常采用大黄、芒硝和番泻叶诱导, 具腹泻症状, 但结肠病理变化不明显; 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 自由饮水法常用于诱导小鼠 UC<sup>[9]</sup>, 容易复制且稳定性好, 但此法仅部分结肠炎小鼠表现为脾虚湿蕴证。因此, 既贴合临床症状又符合病理变化的脾虚湿蕴证型 UC 动物模型仍待开发, 此模型的成功建立将有利于阐明中医药治疗 UC 的有效性, 助力中医药现代化和国际化发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

60 只 7 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 20 ~ 24 g, 购买于南京集萃药康生物科技股份有限公司【SCXK(苏)2018-0008】。小鼠自由饮水和采食标准全价饲料, 昼夜各半, 温度 22 ~ 24℃, 湿度 50% ~ 60%, 饲养于江西中医药大学实验动物科技中心 SPF 屏障环境内【SCXK(赣)2022-0002】。本研究方案得到江西中医药大学动物伦理委员会的批准 (JZLLSC2020-344), 整个实验操作过程遵守实验动物标准操作规范。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

番泻叶 (江苏永健医药, 300174-170226); DSS (美国 MP Biomedicals, 16011); 4% 多聚甲醛、苏木素-伊红染色液、BCA 蛋白检测试剂盒、RMP1640 培养基 (北京索莱宝); 小鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TGF- $\beta$ 1 酶联免疫吸附试验试剂盒 (美国 Thermo); 流式细胞 PerCP-Anti-Mouse CD3、BV510-Anti-Mouse CD4、PE-Anti-Mouse CD4、FITC-Anti-Mouse CD8、AF488-Anti-Mouse CXCR3、BV421-Anti-Mouse CCR4、BV510-Anti-Mouse CCR6、AF647-Anti-Mouse CD25、PE-Cy7-Anti-Mouse Foxp3 抗体 (美国 BD Biosciences)。

全自动包埋机 (Leica, 型号: HistoCore\_Arcadia, 德国); 石蜡切片机 (Leica, 型号: Leica2245, 德国); 徕卡多人共览显微镜 (Leica, 型号: DM2500, 德国); 全波长酶标仪 (Thermo, 型号: Multiskan Spectrum, 美国); MinQ 超纯水仪 (密理博, 型号: Milli-Q Advantage A10, 美国); 流式细胞仪 (BD, 型号: FACS Verse, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 造模试剂制备

100 g 番泻叶, 置于 500 mL 的水浸泡 30 min, 加

热至沸腾后持续 10 min, 四层纱布过滤收集药液<sup>[10]</sup>。将药液浓缩至生药含量为 0.2 g/mL, 置于 4℃ 冰箱中保存。DSS 溶液直接溶于正常饮水水中, 每天现配现用。

1.2.2 动物分组与模型建立

将 60 只小鼠随机分成 Control 组、FXY 组、3% DSS 组、FXY + 3% DSS 组和 FXY + 2% DSS 组, 每组 12 只, 适应性饲养 3 d 后开始持续 21 d 的实验。5 组的小鼠处置方法如图 1 所示。

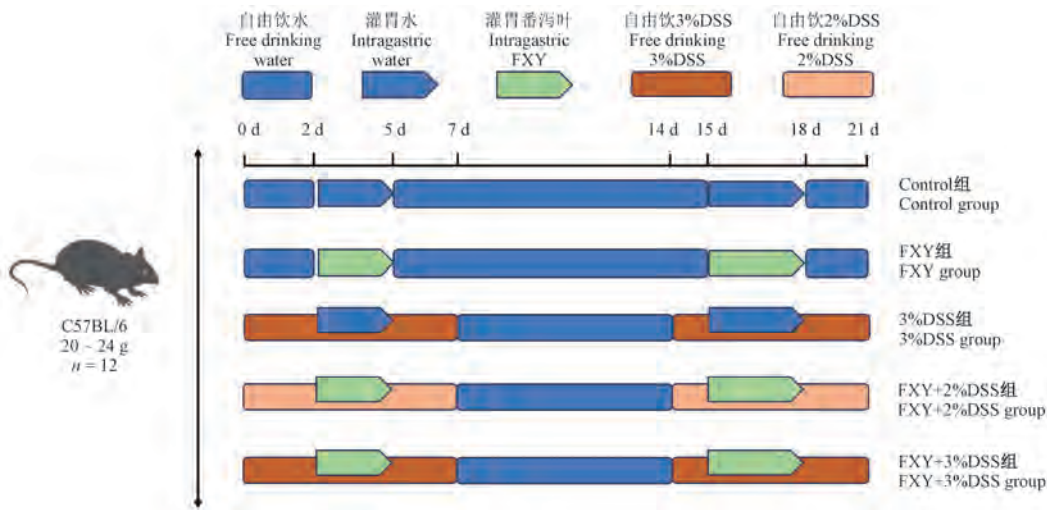


图 1 小鼠分组及模型建立方法  
Figure 1 Methods of grouping and model establishment of mice

1.2.3 脾虚湿蕴证辨证分型标准

小鼠脾虚湿蕴模型体征诊断标准<sup>[11]</sup>: (1) 黏液脓血, 白多赤少; 粪便时软、时溏。 (2) 便溏泄泻, 夹有不消化食物。 (3) 食少纳呆, 消瘦, 体重减轻。 (4) 神态萎靡, 四肢不收, 毛色枯槁。 (5) 脘腹胀满, 腹部隐痛, 卷缩聚堆。 (6) 易疲劳。第 (1) (2) 项为主证, 第 (3) ~ (6) 项为兼证。具备 2 项主证和 2 项兼证时, 即认为造模成功。

1.2.4 疾病活动指数测定

实验过程中, 每天同一时间对小鼠称重, 并观察粪便粘稠度、便血情况, 进行 DAI (disease activity index) 评价观察,  $DAI = \text{体重损失评分} + \text{粪便粘稠度评分} + \text{便血情况评分}$ , 标准执行: 体重损失依据无明显下降、下降 1% ~ 5%、下降 6% ~ 10%、下降 11% ~ 20%、下降超过 20% 依次评判为 0 ~ 4 分; 粪便粘稠度: 正常粪便为 0 分、松软便 (干性) 为 2 分、稀便或腹泻 (水样便) 为 4 分; 便血情况: 无出血为 0 分、大便潜血阳性为 2 分、粪便带血为 3 分、肛门出血为 4 分。

1.2.5 结肠及脾指数测定

第 21 天小鼠 2% 戊巴比妥钠深度麻醉安乐死, 分离结肠、脾, 测量结肠长度; 脾、结肠称重并计算其重量指数 (脾重量指数 =  $\text{脾重量} / \text{小鼠体重} \times 100\%$ , 结肠重量指数 =  $\text{结肠重量} / \text{小鼠体重} \times 100\%$ )。

1.2.6 结肠组织损伤评分

近端结肠组织经 4% 多聚甲醛溶液固定、冲洗、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 制成 4 μm 厚切片, 常规苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 病理学家基于炎性细胞浸润和溃疡形成<sup>[12]</sup>, 随机盲法对结肠病理图片进行病理损伤评分。

1.2.7 炎性细胞因子水平检测

结肠组织经裂解、匀浆、离心后取上清液, BCA 法检测上清总蛋白浓度, 根据 ELISA 检测试剂盒说明书, 测定结肠组织中炎性细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10 和 TGF-β1 浓度。

1.2.8 流式细胞术检测 T 细胞水平

收集小鼠肠系膜淋巴结, 经碾磨、过滤、洗涤后制备为单细胞悬液; CD16/CD32 抗体封闭 15 min;



流式抗体 (CD3、CD4、CD8、CXCR3、CCR4、CCR6), 室温避光孵育 30 min; stain buffer 洗涤 2 次, Fix/Perm 溶液孵育 30 min 固定; stain buffer 重悬, Perm/Wash 溶液孵育 15 min 破核; 流式抗体 Foxp3 室温孵育 30 min 胞内染色; Perm/Wash 溶液重悬, stain buffer 洗涤 2 次; stain buffer 定容 500  $\mu$ L, 流式上机检测; Flowjo 7.6.1 软件分析流式结果。

### 1.3 统计学分析

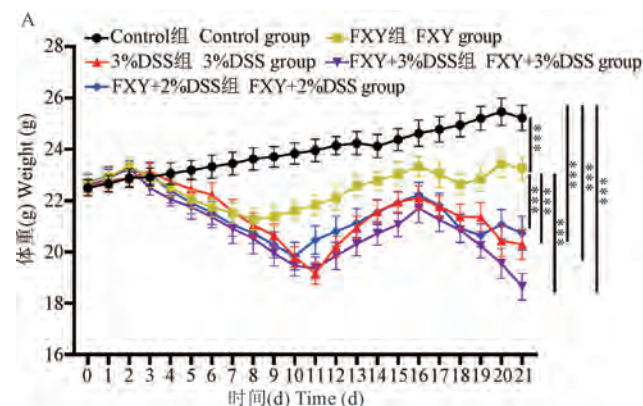
采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示; 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 组间差异,  $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脾虚湿蕴证型结肠炎小鼠体重及 DAI 的变化

整个实验期内 Control 组小鼠被毛光泽、饮水、

采食及精神状态良好, FXY 组小鼠被毛粗糙、腹泻严重。3%DSS 组结肠炎小鼠精神沉郁、蜷缩、采食下降、消瘦, 50% 小鼠伴有肛血且 OB 检测阳性。FXY + 3%DSS 组和 FXY + 2%DSS 组小鼠精神很差、水样腹泻、便血且 OB 检测呈强阳性。与 Control 组 (图 2A) 相比, FXY 组、3%DSS 组、FXY + 3%DSS 组和 FXY + 2%DSS 组小鼠体重从在实验中均有显著下降 ( $P < 0.001$ )。与 Control 组小鼠 DAI (图 2B) 相比, FXY 组从实验第 3 天开始显著上升, 3%DSS 组、FXY + 3%DSS 组和 FXY + 2%DSS 组从实验第 2 天开始显著上升 ( $P < 0.001$ )。与 FXY 组小鼠 DAI 相比, FXY + 3%DSS 组从第 7 天开始显著上升, 3%DSS 组和 FXY + 2%DSS 组从实验第 8 天开始显著性上升 ( $P < 0.001$ )。可见, FXY + 3%DSS 组和 FXY + 2%DSS 组小鼠符合脾虚湿蕴证辨证分型标准。



注: Control 组 ( $n = 12$ )、FXY 组 ( $n = 11$ )、3%DSS 组 ( $n = 8$ )、FXY + 3%DSS 组 ( $n = 6$ ) 和 FXY + 2%DSS 组 ( $n = 9$ ); LSD 法进行组间两两比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。(下图同)

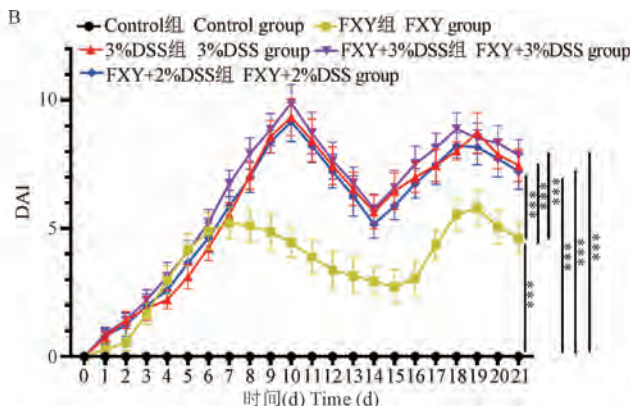
图 2 小鼠体重和 DAI 的变化趋势 ( $\bar{x} \pm s$ )

Note. Control group ( $n = 12$ ), FXY group ( $n = 11$ ), 3%DSS group ( $n = 8$ ), FXY + 3%DSS group ( $n = 6$ ) and FXY + 2%DSS group ( $n = 9$ ). LSD method for comparisons between two groups, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . (The same in the following figures)

Figure 2 Trends in daily body weight and DAI of mice for each group ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.2 脾虚湿蕴证结肠炎小鼠生存率、结肠和脾指数

如图 3A 所示, Control 组、FXY 组、3%DSS 组、FXY + 2%DSS 组和 FXY + 3%DSS 组小鼠的生存率依次为 100%、91.67%、75%、66.67%、50%。与 Control 组结肠长度 (图 3B, 3C) 相比, FXY 组、3%DSS 组、FXY + 3%DSS 组和 FXY + 2%DSS 组显著下降 ( $P < 0.001$ ); 与 FXY 组结肠长度相比, 3%DSS 组、FXY + 3%DSS 组和 FXY + 2%DSS 组显著下降 ( $P < 0.01$ )。与 Control 组结肠重量 (图 3D) 相比, 3%DSS 组和 FXY + 2%DSS 组显著上升 ( $P < 0.05$ ); 与 FXY + 3%DSS 组结肠重量相比, 3%DSS 组和 FXY + 2%



DSS 组显著上升 ( $P < 0.05$ )。FXY、DSS 干预后结肠重量/结肠长度、结肠重量指数、脾重量及其指数亦出现了显著增加 ( $P < 0.05$ ) (见图 3E ~ 3H)。

### 2.3 脾虚湿蕴证结肠炎小鼠结肠组织病理分析

Control 组结肠组织黏膜完整, 隐窝清晰可见, 无明显炎性细胞浸润; FXY 组结肠组织黏膜较完整, 偶见少量炎性细胞弥散性浸润, 未见明显溃疡形成; 3%DSS 组、FXY + 3%DSS 组和 FXY + 2%DSS 组结肠组织黏膜上皮脱落, 隐窝增生, 有明显的溃疡形成, 大量的炎性细胞浸润, 其病理组织损伤评分均高于 Control 组和 FXY 组 ( $P < 0.001$ ) (见图 4)。

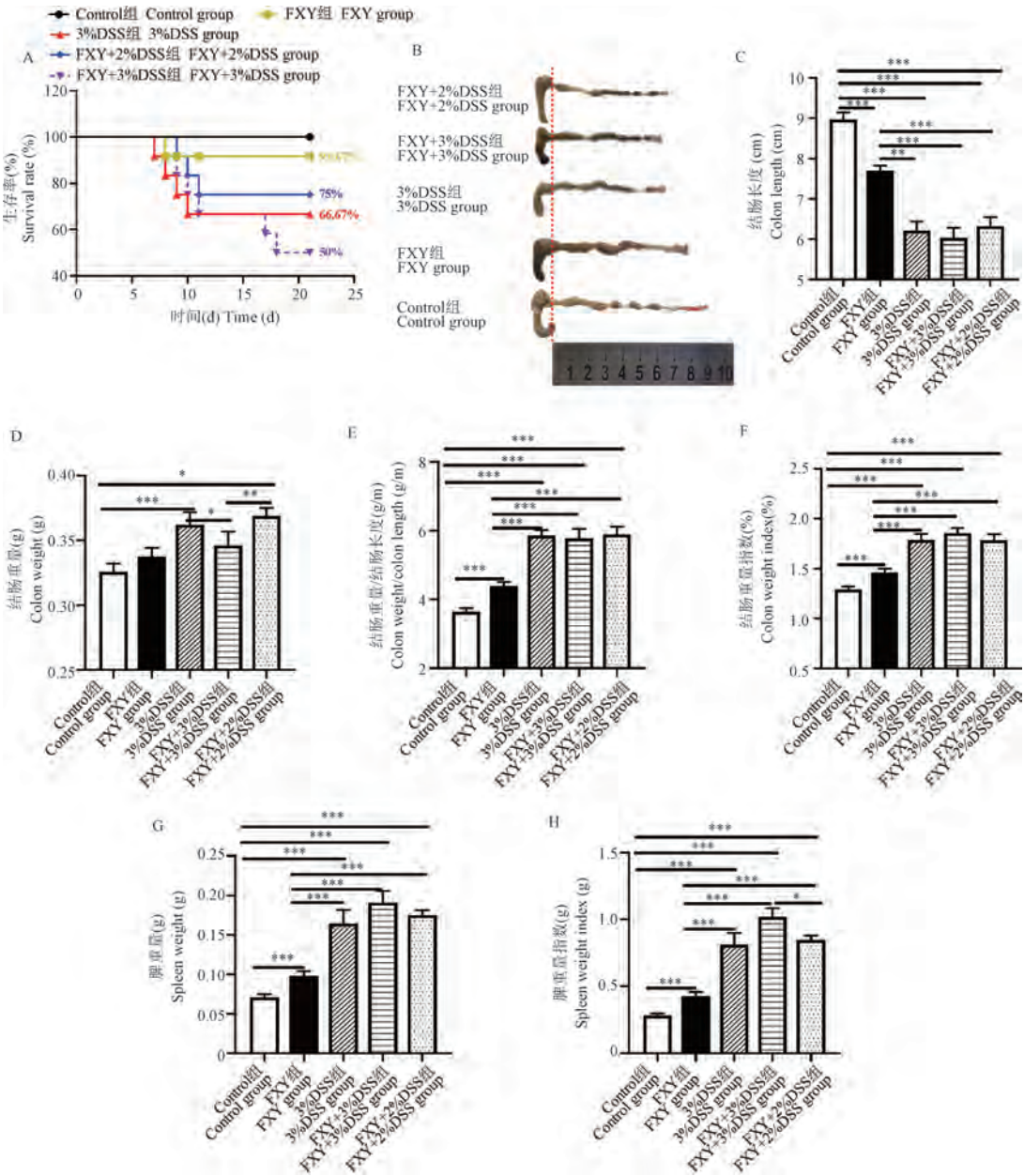


图 3 各组生存率、结肠和脾指数的比较

Figure 3 Comparison of survival rates, colon index and spleen index parameters among groups

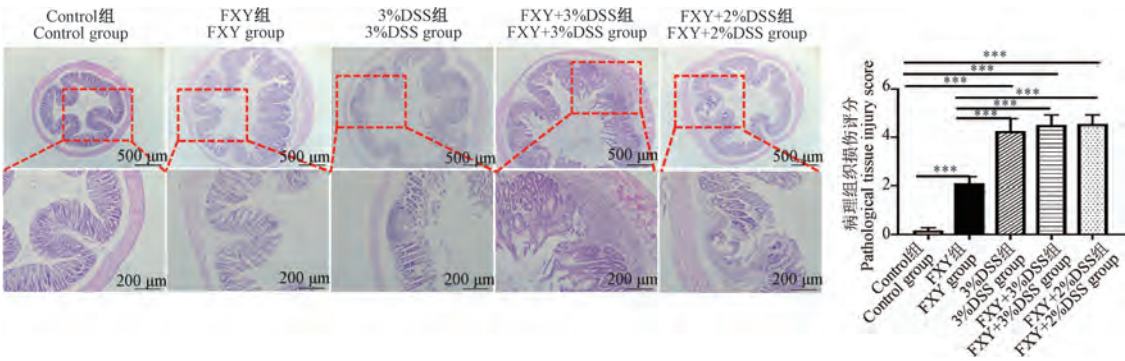


图 4 结肠组织形态结构

Figure 4 Histomorphological structure of the colon in each group



## 2.4 脾虚湿蕴证结肠炎小鼠结肠组织炎症细胞因子表达

促炎性细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)和抗炎性细胞因子(IL-10、TGF- $\beta$ 1)动态失衡导致的炎症因子风暴是 UC 发病的典型特征<sup>[13]</sup>。如图 5 所示,3% DSS 组、FXy + 3% DSS 组和 FXy + 2% DSS 组结肠组织中的促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的浓度均显著性高于 Control 组和 FXy 组,而抗炎性细胞因子 IL-10、TGF- $\beta$ 1 显著性下降( $P < 0.05$ )。此外,Control 组的炎症细胞因子与 FXy 组相比,无显著性差异( $P \geq 0.05$ )。

## 2.5 脾虚湿蕴证结肠炎小鼠肠系膜淋巴结中的 T 细胞水平

与 Control 组和 FXy 组比,3% DSS 组、FXy + 3% DSS 组和 FXy + 2% DSS 组的 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>T 细胞百分比(图 6A)均显著性上升( $P < 0.05$ )。3% DSS 组、FXy + 3% DSS 组和 FXy + 2% DSS 组的 T 细胞百分比(图 6B)均显著性低于 Control 组( $P < 0.05$ ),而与 FXy 组比,无显著性差异( $P \geq 0.05$ )。

## 2.6 脾虚湿蕴证结肠炎小鼠肠系膜淋巴结中的 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞水平

3% DSS 组、FXy + 3% DSS 组和 FXy + 2% DSS 组的 CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> Th1 细胞(图 7A)百分比均显著高于 Control 组和 FXy 组( $P < 0.05$ )。3% DSS 组、FXy + 3% DSS 组和 FXy + 2% DSS 组的 CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CCR4<sup>+</sup> Th2 细胞(图 7B)百分比均显著低于 Control 组( $P < 0.05$ ),而与 FXy 组相比,无显著性差异( $P \geq 0.05$ )。与 Control 组相比,FXy 组、3% DSS 组、FXy + 3% DSS 组和 FXy + 2% DSS 组 CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> Th17 细胞百分比均显著性上升( $P < 0.05$ );此外,FXy + 3% DSS 组和 FXy + 2% DSS 组的 Th17 细胞百分比均显著性高于 FXy 组( $P < 0.05$ )(见图 7C)。与 Control 组相比,FXy 组、3% DSS 组、FXy + 3% DSS 组和 FXy + 2% DSS 组的 CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞百分比均显著性下降( $P < 0.05$ );此外,FXy + 3% DSS 组和 FXy + 2% DSS 组的 Treg 细胞百分比亦显著性低于 FXy 组( $P < 0.05$ )(见图 7D)。

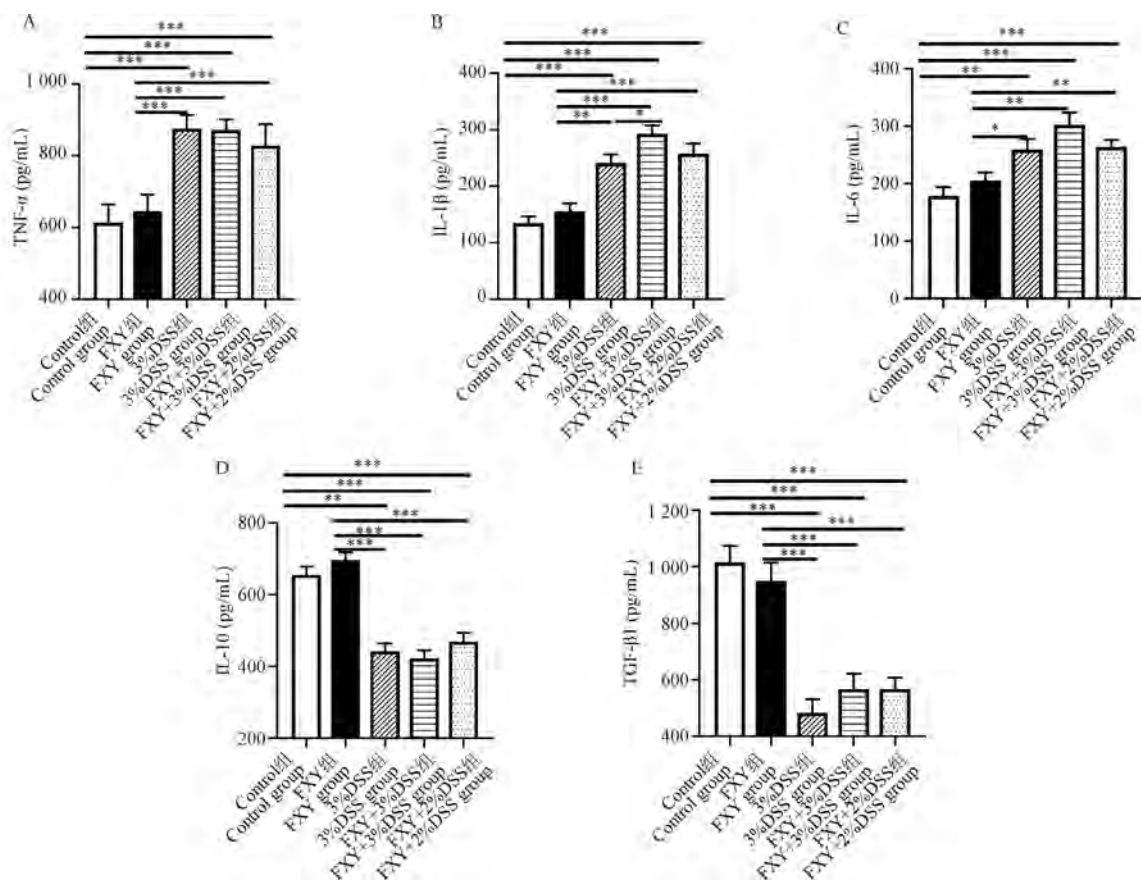


图 5 各组结肠组织中的炎症细胞因子浓度

Figure 5 Concentrations of inflammatory cytokines in colonic tissues of each group

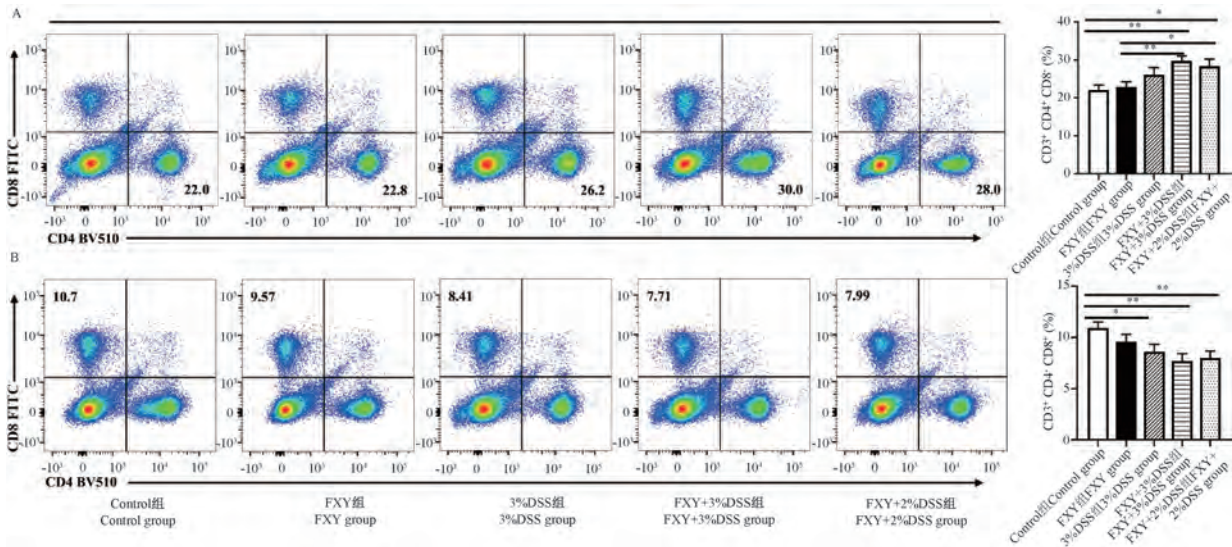


图 6 各组肠系膜淋巴结中的 T 细胞水平

Figure 6 Levels of T cells in mesenteric lymph nodes of various groups

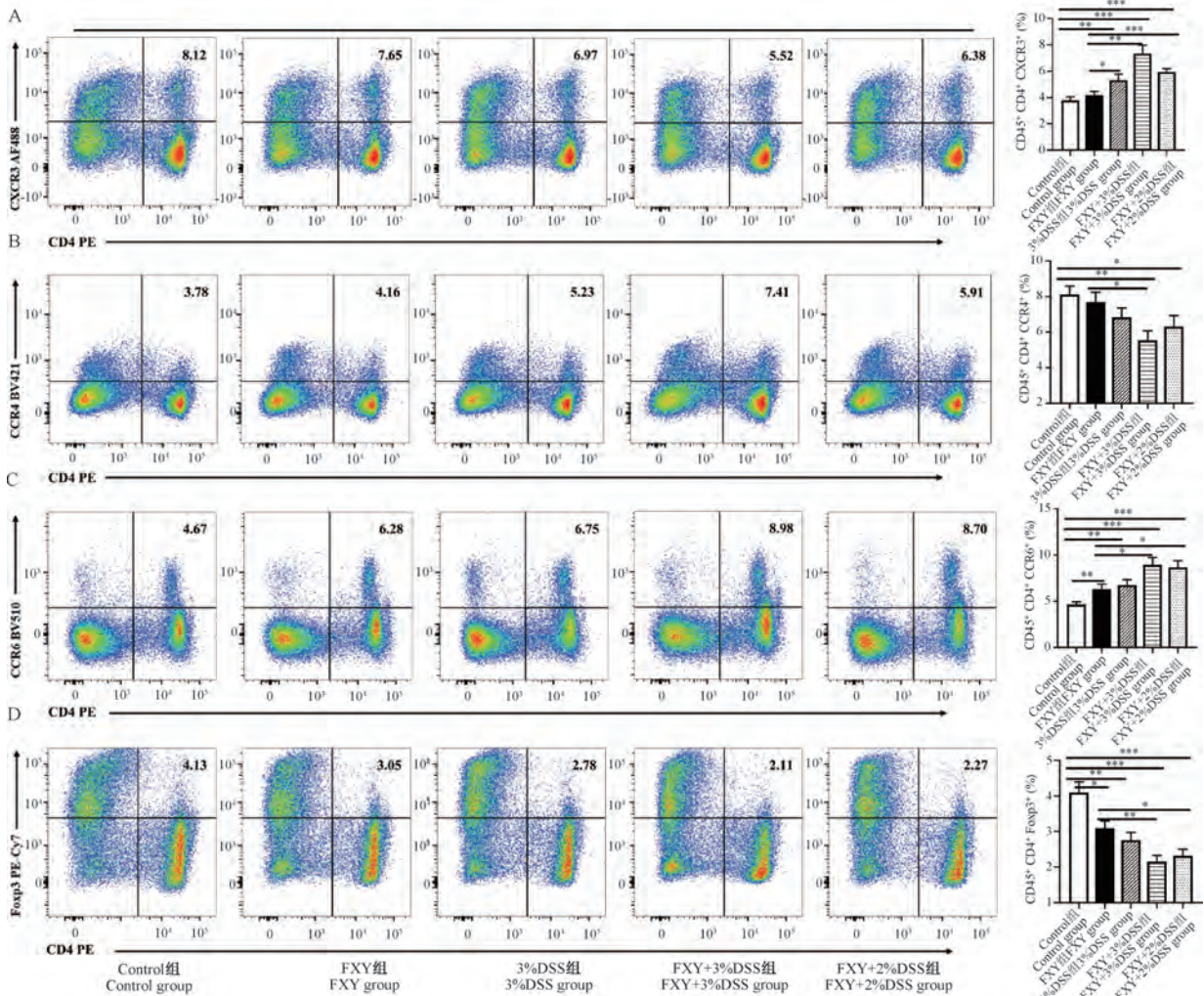


图 7 各组肠系膜淋巴结中的 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞水平

Figure 7 Levels of Th1/Th2 and Th17/Treg cells in mesenteric lymph nodes of various groups



### 3 讨论

脾胃运化水谷精微,转化精、气、血、津液并维持生命活动。脾居中央,喜燥恶湿,脾虚则易被湿邪所困<sup>[12]</sup>。UC 的病位在大肠,但其病机根本在脾。饮食不节,损伤脾胃,运化失健,湿浊内生,形成脾虚湿蕴证<sup>[11]</sup>。脾虚湿蕴证 UC 的主要病机为脾虚湿困、湿阻中焦,症见脘腹胀满,食欲不振,神疲乏力,肢体困重,大便溏薄或泄泻,脉缓等<sup>[5]</sup>。

UC 已被世界卫生组织列入十大难治性疾病<sup>[14-15]</sup>,主要累及结肠,表现为浅表性、弥漫性结肠炎症,光学显微镜下可观察到结肠组织明显的溃疡及炎性细胞浸润<sup>[2,16]</sup>。本研究发现,单用番泻叶或 DSS 不足以诱导典型的脾虚湿蕴证 UC,番泻叶诱导的小鼠多表现为体重下降、腹泻;3% DSS 诱导的小鼠多表现为便血、消瘦;而采用番泻叶联合 DSS 诱导的小鼠多表现出黏液脓血、便溏泄泻、消化不良、体重减轻、精神萎靡、卷缩聚堆等症状,呈典型的脾虚湿蕴证 UC。

尽管番泻叶可诱导小鼠结肠重量指数显著性增大,但结肠组织的溃疡形成和炎性细胞浸润并不明显,且炎性细胞因子没有显著性差异。然而,番泻叶联合 DSS 诱导的脾虚湿蕴证 UC 小鼠不仅出现结肠缩短并增重,结肠组织还存在明显的溃疡及大量炎性细胞浸润,促炎性细胞因子浓度显著上升,而抗炎性细胞因子显著下降。值得一提的是,这些指标变化在 FXY + 3% DSS 组与 FXY + 2% DSS 组之间无显著性差异,但 FXY + 3% DSS 组小鼠生存率更低(66.67% VS 50%)。综合考虑模型的临床吻合度及动物损耗,认为番泻叶联合 2% DSS 诱导脾虚湿蕴证 UC 效果更佳。

众所周知,UC 的发病机制涉及遗传易感性、肠道菌群失调及免疫反应异常等<sup>[17]</sup>。近年来,T 淋巴细胞亚群分化异常在 UC 的发病机制中备受关注<sup>[18]</sup>。UC 患者的外周血液中 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞显著高于健康个体,而活动期 UC 患者结肠固有层组织亦存在此种变化<sup>[19-21]</sup>。在 DSS 和三硝基苯磺酸诱导的实验性结肠炎模型中,脾和肠系膜淋巴结中的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 的数量明显增多,结肠固有层 CD4<sup>+</sup> T 细胞高表达 IFN- $\gamma$ 、IL-17A<sup>[22]</sup>。本研究首次发现脾虚湿蕴证结肠炎小鼠肠系膜淋巴结中的 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T 淋巴细胞明显增多,而 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T 细胞明显减少。

UC 过度的炎症反应是由多种类型的免疫细胞所介导的,包括 CD4<sup>+</sup> T 细胞,在 UC 的发生、维持、缓解中扮演关键性角色<sup>[23]</sup>;而效应性 T 细胞亚群(Th1、Th2 和 Th17 细胞)和调节亚群(Treg 细胞)通过调节肠道的免疫平衡而影响 UC 的进程<sup>[24]</sup>。肠道巨噬细胞分泌的 IL-12 和 IL-18 刺激 Th1 细胞表达 T-bet 转录因子,并诱导分泌 IL-2 和 IFN- $\gamma$ <sup>[25]</sup>。Th2 细胞表达 GATA3 并分泌 IL-4、IL-5 和 IL-13,其中 IL-4 有助于维持免疫耐受,而 IL-13 参与肠道炎症反应<sup>[26]</sup>。Th17 细胞的发育和分化需要两个关键的转录因子,即维甲酸相关孤儿受体(ROR)  $\gamma$ t 和 ROR $\alpha$ ,并分泌 IL-17、IL-21 和 IL-22<sup>[27]</sup>。另外,Treg 细胞主要表达转录调节因子 Foxp3,同时分泌 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1 抑制宿主的免疫反应,从而诱导自我耐受,而 Treg 细胞功能缺陷或遏制能力低下可导致 UC 更易复发<sup>[28]</sup>。活动期 UC 患者外周血中 Th1、Th17 细胞的百分比显著增多,而 Th2、Treg 细胞明显减少,DSS 诱导的结肠炎小鼠结肠组织中 Th1/Th2 细胞和 Th17/Treg 细胞明显失衡<sup>[29]</sup>,本研究中 DSS 诱导的结肠炎小鼠肠系膜淋巴结中亦表现出了此失衡状态。另外,研究发现脾虚湿蕴证结肠炎小鼠肠系膜淋巴结中 CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> Th1、CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> Th17 细胞显著增多,而 CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CCR4<sup>+</sup> Th2、CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞显著减少,Th1/Th2 细胞和 Th17/Treg 细胞失衡程度也严重于单纯 DSS 诱导的结肠炎。

综上,番泻叶联合 2% DSS 能成功建立脾虚湿蕴证溃疡性结肠炎小鼠模型,且表现出典型的 T 细胞失衡特征。后期,将应用此模型探讨中医药治疗脾虚湿蕴证 UC 的疗效及机制,同时验证此模型的稳定性和有效性。

### 参 考 文 献(References)

- [1] Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, et al. Ulcerative colitis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 74.
- [2] Feuerstein JD, Moss AC, Farraye FA. Ulcerative colitis [J]. Mayo Clin Proc, 2019, 94(7): 1357-1373.
- [3] Ng SC, Shi HY, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies [J]. Lancet, 2017, 390(10114): 2769-2778.
- [4] 黄彪, 谢璐霜, 吴巧凤. 溃疡性结肠炎的中西医治疗进展及思考 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34(13): 2267-2269, 2274. Huang B, Xie LS, Wu QF. Progress and thinking on treatment of ulcerative colitis with traditional Chinese and western medicine [J]. J Pract Med, 2018, 34(13): 2267-2269, 2274.



- [ 5 ] 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(基层医生版) [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4155-4160.
- Shen H, Tang ZP, Tang XD, et al. Guide to diagnosis and treatment of ulcerative colitis, a common disease in digestive system (basic doctors edition) [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(9): 4155-4160.
- [ 6 ] 姜丰, 王惠娟. 溃疡性结肠炎中医证型与肠外表现的相关性研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2022, 30(5): 360-363.
- Jiang F, Wang HJ. Study on the correlation between traditional Chinese medicine syndromes and extra-intestinal manifestations of ulcerative colitis [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2022, 30(5): 360-363.
- [ 7 ] 郑安锐, 顾园, 王品发, 等. 溃疡性结肠炎的中医证候与内镜分型及黏膜组织分期的相关性研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(9): 2209-2210.
- Zheng AR, Gu Y, Wang PF, et al. Correlation between TCM syndromes of ulcerative colitis and endoscopic classification and mucosal tissue staging [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(9): 2209-2210.
- [ 8 ] 朱玉梅. 溃疡性结肠炎中医证型和相关理化检查的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学; 2021.
- Zhu YM. The study on the relationship between TCM syndrome and related physical and chemical examination of ulcerative colitis [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine; 2021.
- [ 9 ] Katsandegwaza B, Horsnell W, Smith K. Inflammatory bowel disease: a review of pre-clinical murine models of human disease [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9344.
- [ 10 ] 李姿慧. 健脾化湿法对脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠水通道蛋白 3、4 表达的影响及机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2012.
- Li ZH. Effect of invigorating spleen and removing dampness on aquaporin 3 and aquaporin 4 expression in ulcerative colitis rats with spleen deficiency and dampness stagnation and its mechanism [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2012.
- [ 11 ] 张声生, 沈洪, 郑凯, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3585-3589.
- Zhang SS, Shen H, Zheng K, et al. Consensus opinion of TCM diagnosis and treatment experts on ulcerative colitis (2017) [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [ 12 ] 张晓明, 柳越冬, 都静, 等. 中医学理论指导下的溃疡性结肠炎病因病机研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(9): 46-52.
- Zhang XM, Liu YD, Du J, et al. Research progress on etiology and pathogenesis of ulcerative colitis under guidance of traditional Chinese medicine theory [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(9): 46-52.
- [ 13 ] Nakase H, Sato N, Mizuno N, et al. The influence of cytokines on the complex pathology of ulcerative colitis [J]. Autoimmun Rev, 2022, 21(3): 103017.
- [ 14 ] Ananthakrishnan AN. Upadacitinib for ulcerative colitis [J]. Lancet, 2022, 399(10341): 2077-2078.
- [ 15 ] Ulcerative colitis: management [M]. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE); 2019.
- [ 16 ] Fedor I, Zold E, Barta Z. Microscopic colitis in older adults: impact, diagnosis, and management [J]. Ther Adv Chronic Dis, 2022, 13: 20406223221102821.
- [ 17 ] Eisenstein M. Ulcerative colitis: towards remission [J]. Nature, 2018, 563(7730): S33.
- [ 18 ] Di Sabatino A, Lenti MV, Giuffrida P, et al. New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract [J]. Autoimmun Rev, 2015, 14(12): 1161-1169.
- [ 19 ] Smids C, Horjus Talabur Horje CS, Drylewicz J, et al. Intestinal T cell profiling in inflammatory bowel disease: linking T cell subsets to disease activity and disease course [J]. J Crohns Colitis, 2018, 12(4): 465-475.
- [ 20 ] Huang J, Zhang J, Wang F, et al. Comprehensive analysis of cuproptosis-related genes in immune infiltration and diagnosis in ulcerative colitis [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1008146.
- [ 21 ] Giuffrida P, Corazza GR, Di Sabatino A. Old and new lymphocyte players in inflammatory bowel disease [J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(2): 277-288.
- [ 22 ] Li G, Wu X, Gao X, et al. Long-term exclusive enteral nutrition remodels the gut microbiota and alleviates TNBS-induced colitis in mice [J]. Food Funct, 2022, 13(4): 1725-1740.
- [ 23 ] Neurath MF. Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease [J]. Nat Immunol, 2019, 20(8): 970-979.
- [ 24 ] Van Unen V, Ouboter LF, Li N, et al. Identification of a disease-associated network of intestinal immune cells in treatment-naïve inflammatory bowel disease [J]. Front Immunol, 2022, 13: 893803.
- [ 25 ] Gomez-Bris R, Saez A, Herrero-Fernandez B, et al. CD4 T-cell subsets and the pathophysiology of inflammatory bowel disease [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2696.
- [ 26 ] Zeng WP. 'All things considered': transcriptional regulation of T helper type 2 cell differentiation from precursor to effector activation [J]. Immunology, 2013, 140(1): 31-38.
- [ 27 ] Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma [J]. Immunity, 2008, 28(1): 29-39.
- [ 28 ] Giuffrida P, Di Sabatino A. Targeting T cells in inflammatory bowel disease [J]. Pharmacol Res, 2020, 159: 105040.
- [ 29 ] Chen YF, Zheng JJ, Qu C, et al. *Inonotus obliquus* polysaccharide ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis involving modulation of Th1/Th2 and Th17/Treg balance [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 757-766.

单文婷,王潇,杨晓龙,等. 基于 OPG/RANK/RANKL 信号通路探讨铁筷子对 CIA 大鼠骨破坏的防护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1250-1260.

Shan WT, Wang X, Yang XL, et al. Exploring the protective effect of *helleborus thibetanus* franch alcohol extract on bone destruction in CIA rats based on the OPG/RANK/RANKL signaling pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1250-1260.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2023. 10. 002

# 基于 OPG/RANK/RANKL 信号通路 探讨铁筷子对 CIA 大鼠骨破坏 的防护作用

单文婷,王潇,杨晓龙,艾飞,刘杨,魏鑫,刘霞\*

(贵州中医药大学,贵阳 550025)

**【摘要】 目的** 探讨铁筷子对胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis,CIA)模型大鼠的抗炎作用及对 OPG/RANK/RANKL 信号通路的影响。**方法** 雌性 Wistar 大鼠 60 只分为:正常组、模型组、阳性药物组(甲氨蝶呤,MTX)、低剂量组、中剂量组和高剂量组。采用胶原抗体诱导法于大鼠尾根部注射牛Ⅱ型胶原蛋白建立 CIA 大鼠模型,模型建立成功后进行灌胃给药,正常组:给予 10 mL/(kg·d)生理盐水;模型组:给予 10 mL/(kg·d)生理盐水;阳性药物组每次给予 2.0 mL/(kg·d) MTX,每周 3 次;铁筷子低、中、高剂量组每次分别给予 0.25 g/(kg·d)、0.5 g/(kg·d)、1.0 g/(kg·d);连续灌胃治疗 25 d。通过记录大鼠体重;观察大鼠足肿胀程度;大鼠踝关节炎指数评分;micro-CT 观察踝关节骨组织病理改变;苏木素-伊红(HE)染色对大鼠踝关节骨组织和滑膜病理变化;抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)染色法检测观察破骨细胞数量的改变;PCR 检测骨保护素(OPG)、核因子-κB 受体激活剂(RANK)、RANK 配体(RANKL)、肿瘤坏死因子(TNF-α)和骨形成蛋白 2(BMP-2)的 mRNA 水平,OPG、RANK、RANKL、TNF-α 和 BMP-2 蛋白相对表达量检测用蛋白免疫印迹法(Western Blot),以确定铁筷子对类风湿关节炎大鼠的治疗作用及其对骨关节保护的潜在药理机制。**结果** 数据统计结果表明,与正常组相比,CIA 大鼠体重增长减慢( $P < 0.05$ ),足底厚度增加( $P < 0.05$ ),踝关节出现关节腔变窄,骨组织啃噬样骨质破坏、滑膜的病理性变化,如炎性细胞增生和滑膜异常增生浸润;Micro-CT 结果显示:与正常组相比,模型组、低剂量组、中剂量组,踝关节表面凹凸不平、外形不完整,踝关节表面出现啃噬样骨质破坏,高剂量组与正常组相比,各项指标变化都不明显;HE 染色发现模型组大鼠踝关节出现关节腔变窄,骨组织啃噬样骨质破坏,滑膜组织增生和炎性细胞浸润等病理改变;与模型组相比,低、中、高剂量组大鼠踝关节骨组织增生和炎性浸润显著改善;TRAP 染色观察与正常组比,模型组破骨细胞数量最多,低、中、高剂量组干预下 TRAP 染色阳性破骨细胞数量逐渐减少;qRT-PCR 的结果,与模型组相比,低、中、高剂量组 OPG、BMP-2 mRNA 相对表达量升高( $P < 0.05$ ),RANK、RANKL、TNF-α mRNA 相对表达量降低( $P < 0.05$ );Western Blot 结果,与模型组比,低、中、高剂量组 OPG、BMP-2 蛋白相对表达量升高( $P < 0.05$ ),RANK、RANKL、TNF-α 蛋白相对表达量降低( $P < 0.05$ )。**结论** 铁筷子可能通过调节 OPG/RANK/RANKL 信号通路缓解 RA 大鼠体内炎症反应,发挥其抗类风湿关节炎机制的作用。

**【关键词】** 类风湿关节炎;铁筷子;骨破坏;OPG/RANK/RANKL 信号通路

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1250-11

[基金项目] 国家自然科学基金(81760738),贵州中医药大学 2021 年国家自然科学基金后补助资金科研创新探索专项基金(2018YFC170810524)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81760738), Guizhou University of Traditional Chinese Medicine 2021 National Natural Science Foundation Subvention Fund for Research Innovation and Exploration Special Fund (2018YFC170810524).

[作者简介] 单文婷(1994—),在读硕士研究生,研究方向:中医药治疗炎性疾病的物质基础及分子机制。  
Email:shantingtingmile@163.com

[通信作者] 刘霞(1980—),教授,硕士导师,博士,研究方向:中药药效物质基础。Email:liuxia0851@126.com

# Exploring the protective effect of *helleborus thibetanus* franch alcohol extract on bone destruction in CIA rats based on the OPG/RANK/RANKL signaling pathway

SHAN Wenting, WANG Xiao, YANG Xiaolong, AI Fei, LIU Yang, WEI Xin, LIU Xia \*

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guizhou 550025, China)

Corresponding author: LIU Xia. E-mail: liuxia0851@126.com

**[Abstract]** **Objective** To investigate the anti-inflammatory effect of *helleborus thibetanus* franch on collagen-induced arthritis (CIA) model rats and its effect on the OPG/RANK/RANKL signaling pathway. **Methods** Sixty female Wistar rats were divided into normal group, model group, positive drug methotrexate (MTX) group, low dose group, medium dose group, and high dose group. The CIA model was established by injecting bovine type II collagen into the tail root of rats using the collagen antibody induction method, and drugs were administered by gavage after the model was successfully established. In the normal group, 10 mL/(kg·d) saline was administered. In the model group, 10 mL/(kg·d) saline was administered. In the positive drug group, 2 mg/(kg·d) MTX was administered three times a week. In low, medium, and high dose group, 0.25, 0.5, and 1.0 g/(kg·d) were administered, respectively. Continuous gavage treatment was applied for 25 days. Body mass of rats was recorded to observe the degree of foot swelling. The ankle arthritis index score was calculated. Micro-CT was used to observe histopathological changes in the ankle joint bone. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe pathological changes in ankle joint bone tissue and synovial membrane. Changes in the number of osteoclasts were determined by tartaric acid phosphatase (TRAP) staining. PCR was used to measure mRNA levels of osteoprotegerin (OPG), nuclear factor- $\kappa$ B receptor activator (RANK), RANK ligand (RANKL), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). Relative protein expression of OPG, RANK, RANKL, TNF- $\alpha$ , and BMP-2 was measured by Western Blot. *helleborus thibetanus* franch on rats with rheumatoid arthritis and its potential pharmacological mechanism for osteoarthritic protection. **Results** Compared with the normal group, CIA rats had a lower body mass ( $P < 0.05$ ), increased thickness of the plantar foot ( $P < 0.05$ ), narrowing of the joint cavity in the ankle joint, gnawing-like bone destruction, and pathological changes in the synovium, such as inflammatory cell proliferation and abnormal synovial hyperplasia infiltration. Micro-CT showed that, compared with the normal group, model, low and medium-dose groups showed an uneven ankle joint surface with an incomplete shape and gnawing-like bone destruction, and the high-dose group showed no significant changes in all indexes. HE staining revealed that the ankle joint of the model group showed joint cavity narrowing, gnawing-like bone destruction, synovial tissue proliferation, and inflammatory cell infiltration. Pathological changes, such as destruction of bone tissue, synovial tissue hyperplasia, and inflammatory cell infiltration, were found in the ankle joint of rats in the model group. Compared with the model group, bone tissue hyperplasia and inflammatory cell infiltration in the ankle joint of rats in low, medium, and high dose groups were significantly improved. TRAP staining showed that the model group had the largest number of osteoclasts, and the number of TRAP-positive osteoclasts was reduced in low, medium, and high dose groups compared with the normal group. qRT-PCR showed that, compared with the model group, relative mRNA expression of OPG and BMP-2 was increased in low, medium, and high dose groups ( $P < 0.05$ ), and relative mRNA expression of RANK, RANKL, and TNF- $\alpha$  was decreased in low, medium, and high dose groups ( $P < 0.05$ ). Western Blot showed that, compared with the model group, relative protein expression of OPG and BMP-2 was increased in low, medium, and high dose groups ( $P < 0.05$ ), and relative protein expression of RANK, RANKL, and TNF- $\alpha$  was decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** *Helleborus thibetanus* franch may alleviate the inflammatory response in RA rats through an anti-rheumatoid arthritis mechanism involving the OPG/RANK/RANKL signaling pathway.

**[Keywords]** rheumatoid arthritis; *helleborus thibetanus* franch; bone destruction; OPG/RANK/RANKL signaling pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.



类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 属于一种慢性进行自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>, 其病理特点包括慢性炎症浸润、血管翳形成、进行性骨侵蚀、骨丢失和关节破坏, 在疾病晚期可导致多脏器的并发症<sup>[2]</sup>, 且 RA 女性的发病率高于男性, 致残率约占全球人口的 1% ~ 2%<sup>[3]</sup>。目前临床上用于治疗 RA 主要以抗风湿病药物、糖皮质激素及生物制剂为主, 如甲氨蝶呤、肿瘤坏死因子 (TNF)  $\alpha$  抑制剂、白细胞介素 (IL-6) 抑制剂、羟氯喹、甲泼尼龙<sup>[4]</sup>, 这些药物对于 RA 的关节改善有限, 而脏器的不良反应较多且价格昂贵, 因此需要找到在治疗 RA 方面更具有临床意义和研究价值的药物。

中医认为 RA 引起骨破坏的发生与发展属于气滞血瘀证范畴, 而活血化瘀、理气止痛类药物在该类疾病的临床应用中可取得较好疗效<sup>[5]</sup>。苗药铁筷子 (*helleborus thibetanus franch*) 又名黑毛七、小桃儿七、九龙丹、见春花、九朵云、九莲灯, 为腊梅科腊梅 (*Chimonanthus*) 属植物腊梅 (*chimonanthus praecox* L. Link) 及山腊梅 (*chimonanthusitens* Oliv) 的干燥根<sup>[6]</sup>。药用部位为植物干燥的根部, 性温味辛, 具有理气止痛、活血化瘀的功效<sup>[7]</sup>, 是苗族人民常用于治疗 RA、跌打损伤、疮疡肿毒的传统用药。目前临床研究和实验研究均已证明铁筷子醇提物能够显著改善血管翳异常增生以及骨关节的生理特性和功能异常<sup>[8]</sup>, 但目前对其作用机制的认识还不够深入。

骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 是肿瘤坏死因子受体 (tumor necrotic factor receptor, TNFR) 之一, 通过与核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL) 竞争性结合 RANK (NF- $\kappa$ B 受体激活子), 阻断 RANK 与其配体结合, 抑制破骨细胞的活化和成熟, 诱导破骨细胞凋亡<sup>[9]</sup>。由此, OPG/RANKL/RANK 信号通路构成新的调控网络, 不仅调控破骨细胞的激活和骨重建, 还在骨破坏相关疾病中起至关重要的作用。研究表明, 类风湿关节炎组织中破骨细胞数量与活性明显增加, 提示活化的破骨细胞参与 RA 的骨破坏。可见抑制破骨细胞的活化可能是治疗该疾病的关键。基于此, 本研究采用胶原和不完全弗氏佐剂复制 CIA 大鼠模型<sup>[10]</sup>, 通过观察铁筷子对 CIA 大鼠的治疗效果及 OPG/RANK/RANKL 信号通路关键因子的检测, 以探讨铁筷子对模型大鼠骨组织的防护机制, 为铁筷子治疗 RA 奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

60 只 5 周龄 SPF 级 Wistar 雌性健康大鼠, 体重 110 ~ 150 g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供【SCXK (京) 2019-0010】。本研究于室内温度 21 ~ 25℃, 相对湿度 40% ~ 50%, 每日光照时间 5 h 环境进行, 饲养于贵州中医药大学动物实验中心【SYXK (黔) 2021-0005】。通过贵州中医药大学实验动物伦理委员会的批准 (20220108)。

#### 1.1.2 药物

铁筷子购于贵阳市乌当区三江镇农场, 经贵州中医药大学药学院生药教研室进行初步鉴定, 铁筷子为山腊梅科腊梅属植物腊梅的根茎。购来的铁筷子用水清洗弃其杂质后, 进行晒干, 将其打成粗粉。称取粉碎后铁筷子 1000 g, 7 倍量甲醇回流提取 2 次, 每次 3 h, 甲醇热回流提取蒸干, 将混合的滤液过滤以获得总提取物, 减压浓缩后在水浴锅将提取物平铺于托盘蒸干浓缩得浸膏, 将其放入 4℃ 冰箱保存, 动物给药时用 25% 乙醇溶解以达到所需生药浓度, 以 0.25、0.50、1.00 g/kg 作为后续实验的药物浓度, 记为低剂量组、中剂量组、高剂量组。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

甲氨蝶呤 (上海上药信谊药厂有限公司, 197220704); 牛 II 型骨胶原蛋白 (美国 chondrex 公司, 20022)、不完全弗氏佐剂 (美国 chondrex 公司, 7002); Molpure<sup>®</sup> Cell/Tissue Total RNA Kit (YEASEN 公司, 19221ES50); PrimeScript<sup>RT</sup> reagent Kit (宝日医生物技术有限公司, RR047A)、TB Green<sup>TM</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus) (宝日医生物技术有限公司, RR820A); 苏木素染液 (武汉塞维尔生物科技有限公司, G1004); 伊红染液 (合肥博美生物科技有限责任公司, YE2080); TRAP 染色试剂盒 (德国 Sigma-Aldrich, 387A-1KT); 预染蛋白 Marker (abclonalRM, 19001)、RANKL (abclonal, A2550)、 $\beta$ -actin (abclonal, AC033)、OPG (abclonal, A12997)、RANK (abclonal, A2100)、HRP Goat Anti-Mouse IgG (H + L) (abclonal, AS003); TNF- $\alpha$  (booster, BA0131); BMP-2 (proteintech, 66383-1-Ig); Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) HRP (Affinity, S0001)。实时荧光定量 (qRT-PCR) 仪 (四川西陇科学有限公司); 转轮式切片机 (2016 德国徕卡); 组织包埋机

(常州郊区中威电子仪器);JY-SCZ4 + 型垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组及实验干预

随机将大鼠分为正常组(Control)、模型组(Model)、阳性药物组(MTX)、低剂量组、中剂量组和高剂量组,共6组,每组10只。用戊巴比妥钠(50 mg/kg)对正常组以外的剩余大鼠进行腹腔注射麻醉后,进行第1次免疫(Day 0):在每只大鼠的尾根部3 cm的位置进行皮下注射0.2 mL的牛Ⅱ型胶原蛋白乳剂;在1次免疫后7 d进行2次免疫:在大鼠的尾根部3 cm的位置用0.4 mL牛Ⅱ型胶原蛋白乳剂以加强免疫刺激。胶原蛋白乳剂的配制:将等体积的2 mg/mL牛Ⅱ型胶原溶液与1 mg/mL不完全弗氏佐剂混合在冰浴状态下用匀浆器搅拌均匀,使其充分混合乳化,待牛Ⅱ型胶原蛋白乳液完全乳化后(乳化条件为:乳液滴水面成球状,不分散),置于冰上待用,以避免胶原蛋白的变性和失活。CIA模型构建成功后(模型成功标准:用游标卡尺法测定造模大鼠踝关节肿胀 $\geq 6$  mm),于一次免疫第14天,正常组与模型组分别灌胃10 mL/(kg·d)浓度0.9%生理盐水;阳性药物组给予MTX,每周3次,均按照实时体重计算给药量;低剂量组、中剂量组和高剂量组大鼠,0.25、0.50、1.00 g/kg浓度铁筷子每天1次,连续灌胃给药25 d。

### 1.2.2 形态指标检测及取材

末次给药后,禁食禁饮1 d,用戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射全麻基础上断颈处死大鼠,于冰上取左踝关节骨组织,做好标记,放入-80℃冰箱中保存。取右踝关节骨组织,多聚甲醛固定一部分骨组织,做石蜡切片。将包埋好的石蜡切成6  $\mu$ m厚的石蜡切片备用。于冰上取骨组织并置入配制好10% EDTA脱钙溶液中1个月。PBS缓冲液冲洗3次,将1 mL蛋白提取液添加到试管中,骨组织蛋白液超声匀浆化,离心,取上清,以备测定。

### 1.2.3 一般情况的观察

大鼠体重、进食量、行为状态、毛发等一般状况。用游标卡尺分别在7、14、20、26、32、38 d测量大鼠双侧后肢肿胀程度。

### 1.2.4 Micro-CT检测

造模成功后RA大鼠取材,对各组大鼠关节损伤进行Micro-CT检测,扫描胫骨和踝关节骨组织获

取骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨密度(bone mineral density, BMD)及骨表面面积比(bone surface area/bone volume, BS/BV)。

### 1.2.5 踝关节组织病理学观察(HE染色)

4%多聚甲醛将大鼠踝关节骨组织固定48 h后,将组织取出放入配制好的10% EDTA脱钙溶液中1个月。脱钙组织置于75%乙醇脱水30 h、85%乙醇脱水4 h、95%乙醇脱水8 h、100%乙醇脱水2 h、100%乙醇脱水1 h,二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ各45 min进行透明处理后进行石蜡包埋,石蜡切片(厚为4  $\mu$ m),用常规脱蜡至水,将各标本的蜡块各取5张切片,再于苏木精-伊红(HE)染色下用光学显微镜观察,收集图像并进行分析。

### 1.2.6 踝关节组织病理学观察(TRAP染色)

石蜡切片常规脱蜡至水,切片于纯水洗5 min后,吸水纸吸干。置于盛有纯水的湿盒中,用纯水37℃孵育2 h。倒去组织上纯水后,切片重新放入湿盒,加现配好的trap工作液完全覆盖于切片组织上,放于37℃烤箱避光染色20~30 min。倾去染液,水洗玻片,用抗酒石酸酸性磷酸酶浸染1~2 min(破骨细胞呈酒红色,细胞核呈蓝色)水洗;切片经3次无水乙醇,每次5 min,放入二甲苯2次,每次5 min。待染色切片透明后,滴加中性树脂封片剂密封切片,切片干燥后在显微镜下对其进行观察,并进行图像采集和分析。

### 1.2.7 qRT-PCR技术测定踝关节组织中OPG、RANK、RANKL、TNF- $\alpha$ 、BMP-2基因表达

从-80℃超低温冰箱取出冻存的踝关节骨组织,液氮下研磨成粉,按TRIzol试剂盒说明提取总RNA,根据逆转录试剂盒说明书进行操作获取cDNA,以 $\beta$ -actin作为内参。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司设计并合成,序列如表1所示。RT-qPCR扩增体系为20  $\mu$ L; Template(DNA)2  $\mu$ L,上下游引物各0.8  $\mu$ L,加无菌蒸馏水6.4  $\mu$ L。反应条件:42℃预变性2 min;扩增反应:95℃反应35 s,55℃反应30 s,72℃反应30 s,收集荧光信号,共45个循环;熔点曲线55~95℃,扩增反应在QuantStudio多重实时荧光定量PCR仪上进行。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,比较各组OPG、RANKL、RANK、BMP-2、TNF- $\alpha$  mRNA相对表达水平。

### 1.2.8 Western Blot技术检测踝关节组织中OPG、RANK、RANKL、TNF- $\alpha$ 、BMP-2蛋白表达

在-80℃下,将保存的骨组织放入含有2% SDS

表 1 实时定量荧光 PCR 引物

Table 1 Real-time quantitative fluorescent PCR primers

| 引物名称<br>Primer name | 上游<br>Upstream                  | 下游<br>Downstream                |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>β-actin</i>      | 5'-GGGAAATCGTGCCTGACATT-3'      | 5'-GCGGCACTGGCCATCTC-3'         |
| <i>BMP-2</i>        | 5'-AAGCGTCAAGCCAAACACAAACAG-3'  | 5'-CCCCACATCACTGAAGTCCACATAG-3' |
| <i>OPG</i>          | 5'-TGTGTCCCTTGCCCTGACTACTC-3'   | 5'-CTCGGTTGTGGGTGCGGTTG-3'      |
| <i>RANK</i>         | 5'-CAAGGGACGACGGAATCAGATGTG-3'  | 5'-TGAAGAGGAGCAGGACGATGAGAC-3'  |
| <i>RANKL</i>        | 5'-GAGCGAAGACACAGAAGCACTACC-3'  | 5'-GAGCCACGAACCTTCCATCATAGC-3'  |
| <i>TNF-α</i>        | 5'-CACCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC-3' | 5'-TGGGCTACGGGCTTGTCCTACTC-3'   |

裂解液的 Ep 管中,试管内加入钢珠,用匀浆装置研磨,室温放置 20 min,在室温下以 10 000 r/min 离心 30 min。取上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量,并对其总浓度进行测定,各实验组取 50 μL,在 95℃ 条件下变性 15 min,取 30 μg 蛋白样品,用 10% SDS-PAGE 电泳分离 1 h,之后将样品转移到 PVDF 膜上,在室温下,用 5%脱脂奶粉将 PVDF 膜封闭 1 ~ 2 h,TBST 洗膜 3 次,并在 4℃ 时加入针对靶蛋白 OPG(1:2000)、RANK(1:2000)、RANKL(1:2000)、TNF-α(1:2000)、BMP-2(1:2000)、β-actin(1:50000)的一抗孵育过夜,将膜用 TBST 洗涤 3 次后,与辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗体 IgG 稀释缓冲剂(1:5000)在室温孵育 2 ~ 3 h,采用 ECL 荧光显像技术,以 β-actin 的表达量作为内参,应用 Image J 软件进行条带灰度值分析,并以正常组结果为 1,对各组蛋白表达结果进行归一化处理。

1.3 统计学分析

结果用平均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,所有数据均使用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 6 统计软件展

开数据分析。两组样本间的比较采用 *t* 检验;以单因子方差分析/重复计量方差分析(ANOVA)进行多组之间的比较,以 *P* < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况及足肿胀度的影响

药物铁筷子有毒性,将总提取物以 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 g/kg 的浓度梯度进行动物急性毒性检测,发现 1.00 g/kg 以上浓度可致大鼠死亡,在急性毒性浓度梯度进行动物检测时发现 1.00 g/kg 以上大鼠出现毒性反应,将 1.00 g/kg 记为安全范围。故选择低剂量组(0.25 g/kg)、中剂量组(0.50 g/kg)、高剂量组(1.00 g/kg)。

一次免疫的第 7 天记录测量足肿胀度、关节炎指数、体重(表 2),各组大鼠体重增长率变化情况(图 1A)、足底厚度改变情况(见图 1B,1C)。正常组大鼠发育良好、被毛致密光亮,日常活动及食、水摄入量均正常;与正常组相比,模型组大鼠在二次免疫后,被毛变黄无光泽,精神躁动不安,食、水摄入量减少,后肢沉重呈拖行状态、四肢明显肿胀,体

表 2 给药结束时各组小鼠的体重、足趾肿胀度测定结果( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Results of body mass and toe swelling of mice in each group at the end of drug administration  
were measured( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别<br>Groups                 | 左足趾肿胀度(mm)<br>Swelling of left toe(mm) | 右足趾肿胀度(mm)<br>Swelling of right toe(mm) | 关节炎评分(分)<br>Arthritis score(score) | 体重(g)<br>Wight(g)          |
|------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| 正常组<br>Normal group          | 2.24 ± 0.21                            | 2.23 ± 0.19                             | 0                                  | 233.37 ± 3.75              |
| 模型组<br>Model group           | 5.33 ± 0.83 <sup>a</sup>               | 5.32 ± 0.87 <sup>a</sup>                | 7.30 ± 1.57 <sup>a</sup>           | 194.08 ± 1.52 <sup>a</sup> |
| 阳性药物组<br>Positive drug group | 4.21 ± 0.54 <sup>b</sup>               | 4.87 ± 0.86                             | 5.00 ± 2.08 <sup>b</sup>           | 192.94 ± 4.20              |
| 低剂量组<br>Low dose group       | 4.83 ± 1.03                            | 4.78 ± 0.91                             | 5.67 ± 1.91 <sup>b</sup>           | 203.49 ± 5.06              |
| 中剂量组<br>Medium dose group    | 4.41 ± 1.02                            | 4.67 ± 1.15                             | 5.33 ± 2.07 <sup>b</sup>           | 200.96 ± 3.72              |
| 高剂量组<br>High dose group      | 3.75 ± 0.76 <sup>b</sup>               | 3.80 ± 0.73 <sup>b</sup>                | 5.03 ± 2.26 <sup>b</sup>           | 208.46 ± 3.07 <sup>b</sup> |

注:与正常组相比,<sup>a</sup>*P* < 0.05;与模型组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.05。(下图/表同)  
Note. Compared with normal group, <sup>a</sup>*P* < 0.05. Compared with model group, <sup>b</sup>*P* < 0.05. (The same in the following figures and tables)



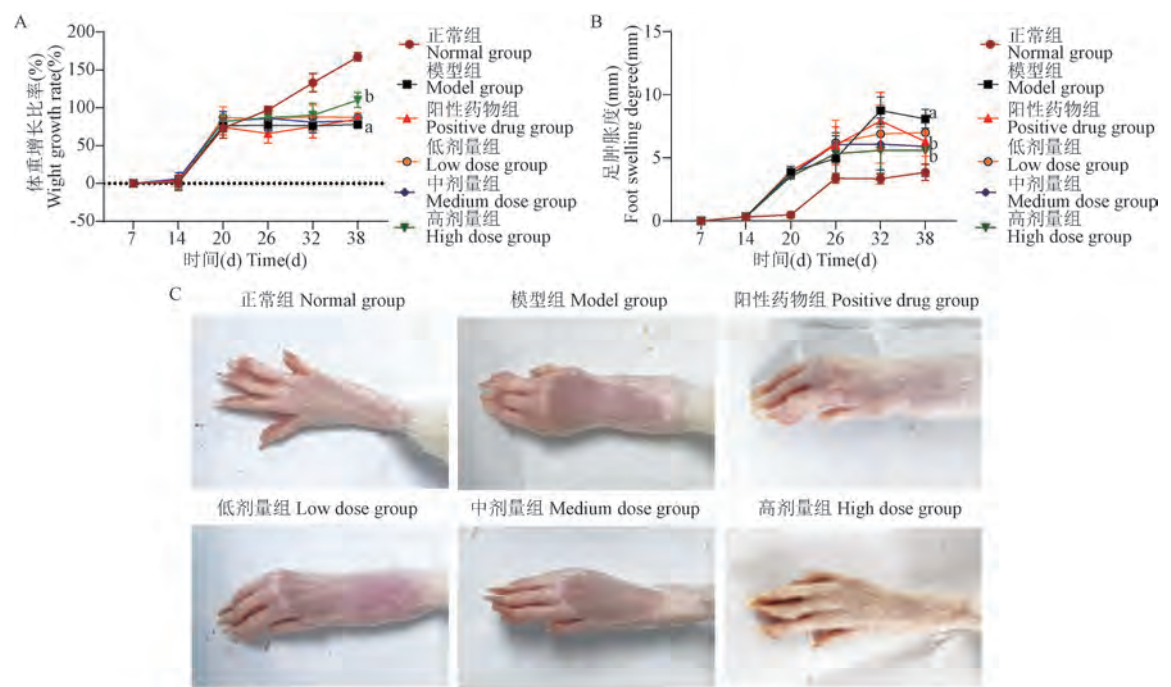


图 1 铁筷子对 RA 大鼠体重和足肿胀度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

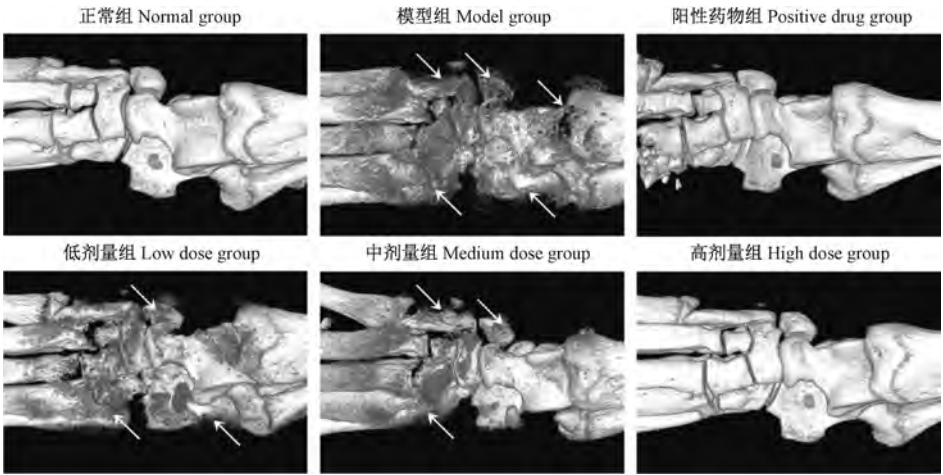
Figure 1 Effect of *helleborus thibetanus* franch on body mass, foot and plantar swelling in rats with RA( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

重下降( $P < 0.05$ );与模型组相比,阳性药物组与高剂量组大鼠一般状况、体重( $P < 0.05$ )、足肿胀度( $P < 0.05$ )均显著改善。

2.2 踝关节 microCT 的影响

正常组踝关节表面光滑、外形完整(图 2)。与正常组比,模型组踝关节表面凹凸不平、外形不完整,骨组织表面出现啃噬样骨质破坏。骨密度(BMD)和骨体积分数(BV/TV)均显著下降( $P <$

0.05),骨表面积体积比(BS/BV)则明显升高( $P < 0.05$ )。与模型组比,阳性药物组踝关节表面光滑,外形完整。相比 BS/BV 均降低( $P < 0.05$ );BMD、BV/TV 升高( $P < 0.05$ )。与阳性药物组相比,低、中剂量组踝关节表面较凹凸不平,外形不完整,骨组织表面出现啃噬样骨质破坏;BS/BV 降低( $P < 0.05$ );BMD、BV/TV 升高较明显( $P < 0.05$ )。高剂量组踝关节表面光滑,外形完整。BS/BV 明显降低



注:白色箭头:骨组织破坏。

图 2 铁筷子对类风湿关节炎大鼠骨组织 Micro-CT 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. White arrow. Bone tissue destruction.

Figure 2 Effect of *helleborus thibetanus* franch on Micro-CT of bone tissue in rheumatoid arthritis rats( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

( $P < 0.05$ ),BMD、BV/TV 明显升高( $P < 0.05$ ),高剂量组效果与阳性药物组接近(表 3)。可见随着铁筷子剂量加大,BS/BV 降低更加明显,BMD、BV/TV 升高明显,说明铁筷子药物作用呈量效关系。

表 3 铁筷子对类风湿关节炎大鼠骨组织 Micro-CT 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| Table 3 Effect of <i>helleborus thibetanus</i> franch on Micro-CT of bone tissue in rheumatoid arthritis rats( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) |                                     |                                    |                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| 组别<br>Groups                                                                                                                            | 骨量百分比(%)<br>Bone mass percentage(%) | 骨表面体积(%)<br>Bone surface volume(%) | 骨密度(%)<br>Bone density(%) |
| 正常组<br>Normal group                                                                                                                     | 84.07 ± 4.81                        | 6.87 ± 0.28                        | 0.76 ± 0.01               |
| 模型组<br>Model group                                                                                                                      | 59.66 ± 7.21 <sup>a</sup>           | 12.41 ± 1.90 <sup>a</sup>          | 0.59 ± 0.09 <sup>a</sup>  |
| 阳性药物组<br>Positive drug group                                                                                                            | 69.71 ± 2.85 <sup>b</sup>           | 10.77 ± 0.76 <sup>b</sup>          | 0.68 ± 0.15 <sup>b</sup>  |
| 低剂量组<br>Low dose group                                                                                                                  | 83.87 ± 7.04 <sup>b</sup>           | 8.25 ± 1.97 <sup>b</sup>           | 0.76 ± 0.07 <sup>b</sup>  |
| 中剂量组<br>Medium dose group                                                                                                               | 81.21 ± 9.38 <sup>b</sup>           | 7.80 ± 2.05 <sup>b</sup>           | 0.76 ± 0.10 <sup>b</sup>  |
| 高剂量组<br>High dose group                                                                                                                 | 83.18 ± 3.55 <sup>b</sup>           | 7.10 ± 0.52 <sup>b</sup>           | 0.78 ± 0.02 <sup>b</sup>  |

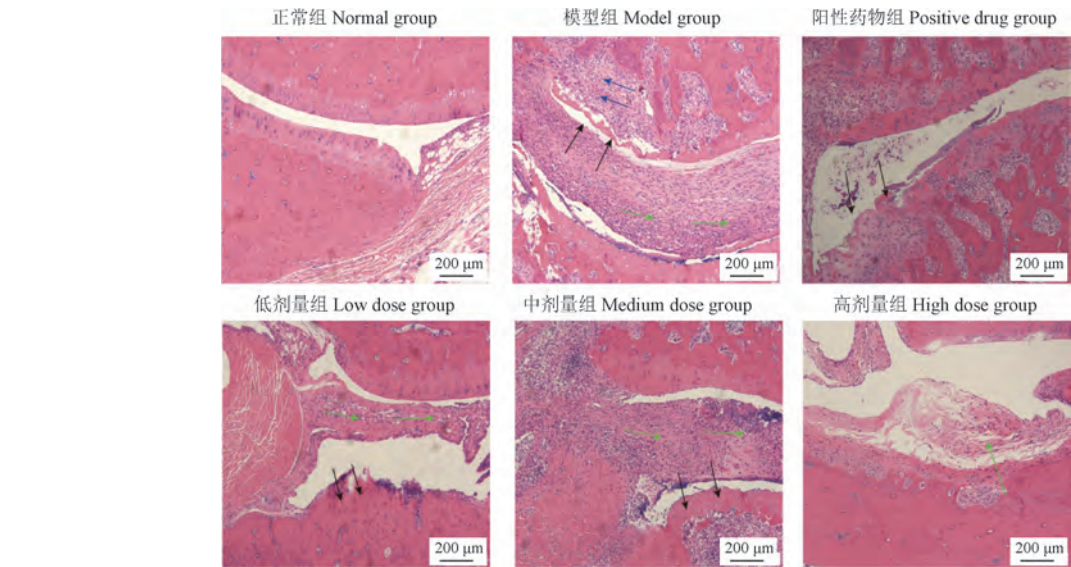
2.3 踝关节组织病理学的影响(HE 染色)

正常组大鼠踝关节骨组织中的成骨细胞和骨细胞均有规整排列,且结构完整,滑膜表面光滑,没有明显增生,亦无炎性浸润(见图 3);模型组骨关节腔内有大量的成纤维细胞和大量的炎症细胞浸润,滑膜表面可见“啃噬”样病理改变,滑膜上的细胞排列不规则,关节腔增生、肿胀明显。低、中、高剂量组较模型组明显减轻了滑膜的炎性细胞浸润和增生;其中,铁筷子高剂量组对踝关节滑膜组织和骨

组织有显著的保护作用。

2.4 踝关节组织( TRAP 染色)

铁筷子低、中、高剂量组作用于 RA 大鼠,破骨细胞的 TRAP 染色结果,正常组破骨细胞数目明显较少;模型组破骨细胞数目显著增加(图 4),有明显的骨破坏形成;与模型组相比,铁筷子中剂量组和铁筷子高剂量组干预下破骨细胞数量减少,大鼠骨损伤程度减轻,证明了铁筷子可以抑制 RANK 诱导的破骨细胞的生成。

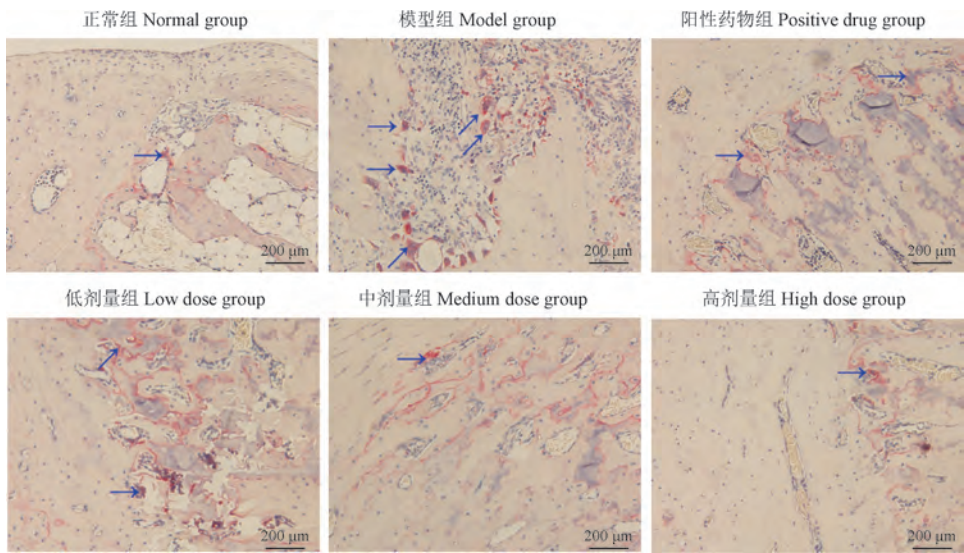


注:黑色箭头:啃噬样骨破坏;蓝色箭头:炎症细胞浸润;绿色箭头:骨关节腔滑膜组织。

图 3 各组大鼠踝关节不同组织病理形态学观察(HE 染色)( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. Black arrow. Gnawing bone destruction. Blue arrow. Inflammatory cell infiltration. Green arrow. Synovial tissue.

Figure 3 Observations on different histopathologic morphology of ankle joints of rats in various groups(HE staining)( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



注：蓝色箭头：破骨细胞。  
图 4 各组大鼠踝关节破骨细胞活化情况观察 (TRAP 染色) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. Blue arrow. Osteoclasts.

Figure 4 Observation of osteoclast activation in the ankle joint of rats in each group (TRAP staining) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

2.5 踝关节骨组织 OPG、RANK、RANKL、TNF-α、BMP-2 基因表达的影响

采用 qRT-PCR 对类风湿关节炎大鼠踝关节骨组织中 *TNF-α*、*RANKL*、*RANK*、*OPG*、*BMP-2* mRNA 水平进行检测 (图 5)。结果显示,与正常组相比 (表 4),模型组大鼠踝关节骨组织 *OPG* mRNA 表达水平显著下降 ( $P < 0.05$ ),*TNF-α*、*RANKL*、*RANK*、*BMP-2* mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.05$ );与模型组相比,铁筷子高剂量组大鼠踝关节骨组织 *OPG*、*BMP-2* mRNA 表达升高,*TNF-α*、*RANKL*、*RANK* 表达降低,改善效果最为明显 ( $P < 0.05$ )。与阳性药物组相比,铁筷子中

剂量组 *OPG*、*BMP-2* mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ ),*TNF-α*、*RANK* 表达降低 ( $P < 0.05$ );铁筷子低剂量组大鼠踝关节骨组织 *OPG*、*BMP-2* mRNA 表达升高,*TNF-α* 表达降低,具有一定的改善作用 ( $P < 0.05$ )。

2.6 踝关节骨组织 OPG、RANK、RANKL、TNF-α、BMP-2 蛋白表达的影响

与正常组相比 (表 5),模型组大鼠踝关节骨组织中 *TNF-α*、*RANKL*、*RANK* 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ ),*OPG*、*BMP-2* 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,阳性药物组、铁筷子中、高剂量组大鼠踝关节滑膜组织中 *TNF-α*、*RANKL*、*RANK* 蛋白表

表 4 铁筷子对类风湿关节炎大鼠骨组织中 OPG/RANK/RANKL 通路 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effects of *helleborus thibetanus* franch on mRNA expression levels of OPG/RANK/RANKL pathway in bone tissue of rheumatoid arthritis rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

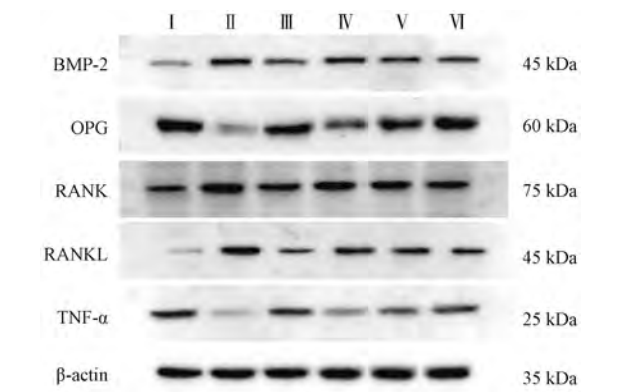
| 组别<br>Groups                 | OPG                      | RANK                     | RANKL                    | BMP-2                    | TNF-α                    |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常组<br>Normal group          | 1.00 ± 0.00              | 1.00 ± 0.00              | 1.00 ± 0.00              | 1.00 ± 0.00              | 1.00 ± 0.00              |
| 模型组<br>Model group           | 0.27 ± 0.05 <sup>a</sup> | 1.63 ± 0.02 <sup>a</sup> | 2.59 ± 0.28 <sup>a</sup> | 0.46 ± 0.07 <sup>a</sup> | 4.46 ± 0.04 <sup>a</sup> |
| 阳性药物组<br>Positive drug group | 0.76 ± 0.09 <sup>b</sup> | 1.04 ± 0.12 <sup>b</sup> | 1.05 ± 0.13 <sup>b</sup> | 0.34 ± 0.01 <sup>b</sup> | 1.02 ± 0.13 <sup>b</sup> |
| 低剂量组<br>Low dose group       | 0.28 ± 0.01              | 1.94 ± 0.03 <sup>b</sup> | 2.76 ± 0.05              | 0.23 ± 0.01 <sup>b</sup> | 3.44 ± 0.06 <sup>b</sup> |
| 中剂量组<br>Medium dose group    | 0.31 ± 0.04              | 1.60 ± 0.06              | 1.41 ± 0.05 <sup>b</sup> | 0.29 ± 0.02 <sup>b</sup> | 2.27 ± 0.08 <sup>b</sup> |
| 高剂量组<br>High dose group      | 0.60 ± 0.02 <sup>b</sup> | 0.88 ± 0.14 <sup>b</sup> | 1.00 ± 0.04 <sup>b</sup> | 0.31 ± 0.02 <sup>b</sup> | 1.42 ± 0.05 <sup>b</sup> |



表 5 铁筷子对类风湿关节炎大鼠骨组织中 OPG/RANK/RANKL 通路关键蛋白表达水平( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| Table 5 Expression levels of key proteins of OPG/RANK/RANKL pathway in the bone group of rheumatoid arthritis rats by <i>helleborus thibetanus</i> franch( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) |                              |                              |                              |                              |                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 组别<br>Groups                                                                                                                                                                        | OPG                          | RANK                         | RANKL                        | BMP-2                        | TNF- $\alpha$                |
| 正常组<br>Normal group                                                                                                                                                                 | 1.25 $\pm$ 0.13              | 0.24 $\pm$ 0.02              | 0.50 $\pm$ 0.09              | 0.64 $\pm$ 0.04              | 0.11 $\pm$ 0.01              |
| 模型组<br>Model group                                                                                                                                                                  | 0.44 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup> | 0.56 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup> | 0.78 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup> | 0.19 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> | 0.59 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup> |
| 阳性药物组<br>Positive drug group                                                                                                                                                        | 1.06 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup> | 0.40 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> | 0.64 $\pm$ 0.06              | 0.56 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> | 0.28 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> |
| 低剂量组<br>Low dose group                                                                                                                                                              | 0.69 $\pm$ 0.05              | 0.51 $\pm$ 0.03              | 0.73 $\pm$ 0.06              | 0.31 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> | 0.47 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> |
| 中剂量组<br>Medium dose group                                                                                                                                                           | 0.91 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup> | 0.43 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> | 0.64 $\pm$ 0.05              | 0.40 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> | 0.41 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> |
| 高剂量组<br>High dose group                                                                                                                                                             | 1.03 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup> | 0.41 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> | 0.61 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup> | 0.52 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> | 0.34 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> |

达水平降低( $P < 0.05$ ),OPG、BMP-2 蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ ),而铁筷子低剂量组与阳性药物组比较差异无显著性( $P > 0.05$ )。



注: I: 正常组; II: 模型组; III: 阳性药物组; IV: 低剂量组; V: 中剂量组; VI: 高剂量组。

图 5 铁筷子对类风湿关节炎大鼠骨组织中 OPG/RANK/RANKL 通路关键蛋白表达水平( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. I. Normal group. II. Model group. III. Positive drug group. IV. Low dose group. V. Medium dose group. VI. High-dose group.

Figure 5 *helleborus thibetanus* franch on the Western Blot expression level of OPG/RANK/RANKL pathway in bone tissue of rheumatoid arthritis rats( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3 讨论

RA 是一种以关节腔内滑膜异常增生、血管翳组织增多,骨破坏为病理特征的对称性慢性自身免疫疾病<sup>[11]</sup>。其基本病理机制是滑膜组织炎症过程中滑膜细胞增生,伴有血管翳形成,软骨和骨受损,最后导致关节畸形和功能丧失<sup>[12]</sup>。病理变化可能

是由滑膜细胞损伤、滑膜组织浸润过程中炎症细胞释放的促炎细胞因子、趋化因子等因素共同作用引起的<sup>[13]</sup>。有研究报道,炎症因子在 RA 的发展中起着重要作用<sup>[14]</sup>。RA 发病初期患者会感到关节肿胀、屈伸不利、晨僵产生疼痛、关节变形、严重会导致残疾并伴随全身性并发症、脏腑功能的紊乱<sup>[15]</sup>。尽管 RA 在临床治疗中取得一定的进展,如利用生物制剂、激酶抑制剂、MTX 等进行治疗,但上述药物均存在因众多不良反应,总体疗效仍不理想,因此寻找副作用小且疗效确切的抗 RA 药物十分重要。

在 RA 的模型中,CIA 模型被研究得最为广泛,与人类 RA 在形态学上有许多相似之处,包括血管翳的形成、滑膜炎和软骨的模式以及骨侵蚀<sup>[16]</sup>。因此,本研究采用抗体牛 II 型胶原和不完全弗氏佐剂配成胶原蛋白乳剂诱导 RA 大鼠模型,模型组大鼠出现食欲不振、体重减轻、足爪肿胀度升高等典型症状,提示 RA 大鼠模型的成功建立。

苗药铁筷子是一种具有理气止痛、祛风解毒作用的药物,主治风湿痹痛、胃痛、腹痛等常见的疼痛病症,是苗族常用于治疗风湿痹痛、跌打损伤的药物之一,对于消除关节肿胀,改善关节功能具有较好的疗效<sup>[17]</sup>。在此疗效上,贵州许多医药企业还在此基础上以铁筷子为主开发了“筋骨伤喷雾”“通络骨宁”等药物,具有祛风除湿、通经活血、败毒止痛的功效,此外,铁筷子还是苗药透骨香方中的主要方药<sup>[18]</sup>。

研究证实,铁筷子具有抗菌、抗炎症、抗肿瘤和止痛等多方面的功能,其提取物对 RA 有着较好的治疗作用,能减轻关节肿胀程度、抑制血清炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PAF,还能明显下调关节组织中

HIF-1 $\alpha$  及 VEGF、MMP-3 的表达<sup>[19-20]</sup>。

RA 局灶骨破坏主要发生在关节表面骨血管翳附着处和软骨及骨小梁处,且破坏处组织中破骨细胞数量与活性明显增加<sup>[21]</sup>,研究显示破骨细胞的活化是 RA 的骨质破坏的关键环节。RANKL/RANK/OPG 信号通路是破骨细胞分泌的一种跨膜信号分子,在 RA 发病的骨破坏过程中发挥着重要作用。RANKL、RANK 及 OPG 均属于糖蛋白,RANKL、OPG 在成骨细胞中发挥重要作用,抑制破骨细胞的分化和活性。而 RANK 蛋白在破骨细胞前体细胞有高表达。RANKL 可以通过诱导破骨细胞参与促进骨质破坏,而 OPG 则可以通过抑制 RANKL 与其受体 RANK 的结合来阻止骨质破坏,RA 病理过程中产生的多种促炎细胞因子上调该信号通路,刺激破骨细胞的活性,从而导致骨破坏。因此防治 RA 骨破坏的调节 RANKL 和 OPG 表达之间的相对平衡有助于预防和治疗骨破坏。本实验通过 Micro-CT 检测:在铁筷子各治疗组中,相对于低剂量组,高剂量组铁筷子的大鼠骨量和骨密度明显增高,骨表面体积指数显著降低;高剂量组对 RA 大鼠的关节骨质破坏起到了保护作用<sup>[22]</sup>。TRAP 染色结果提示:与低剂量组相比,中剂量组和高剂量组干预下 TRAP 染色阳性破骨细胞数量减少,铁筷子有效抑制了 RA 大鼠关节破骨细胞的生成和活化。进一步检测结果显示:在 qRT-PCR 结果中,铁筷子不同剂量 3 组对比,只有铁筷子高剂量组 OPG mRNA 相对表达明显上调( $P < 0.05$ ),证明铁筷子可以有效抑制 RANK 的转录和表达,同时促进 OPG、BMP-2 的转录和表达,其中以铁筷子高剂量组改善效果最为明显。上述结果提示,铁筷子可能通过调节 OPG/RANKL/RANK 信号通路,抑制破骨细胞的生成与活化,从而对 RA 大鼠的骨关节起到保护作用。

本项目以 RANKL/RANK/OPG 系统为切入点,从防治骨质破坏的角度,综合运用植物化学、药理学以及分子生物学等研究手段,观察铁筷子对 RA 的治疗作用,探索其治疗机制,为充实铁筷子治疗 RA 的科学内涵提供新的思路。

## 参 考 文 献(References)

[1] Weyand CM, Yang Z, Goronzy JJ. T-cell aging in rheumatoid arthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2014, 26(1): 93-100.

[2] McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2017, 389(10086): 2328-2337.

[3] Gibofsky A. Epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of

rheumatoid arthritis: A Synopsis [J]. Am J Manag Care, 2014, 20(7): S128-S135.

- [4] Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis [J]. Cells, 2020, 9(4): 880.
- [5] 朱成香, 周欣, 陈华国. 苗药治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(21): 2669-2677.
- Zhu CX, Zhou X, Chen HG. Advances on treatment of rheumatoid arthritis with Miao medicine [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(21): 2669-2677.
- [6] 李姝臻, 李媛, 刘晓龙, 等. 贵州蜡梅属药用植物化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(6): 59-65.
- Li SZ, Li Y, Liu XL, et al. Phytochemical and pharmacological progress on genus *Chimonanthus* in Guizhou [J]. Chin J Ethnomedicine Ethnopharmacy, 2021, 30(6): 59-65.
- [7] 邓颖, 金璨, 段志豪, 等. 资本瓜总苷对 RA 模型小鼠的骨保护作用及机制 [J]. 中国药房, 2023, 34(9): 1042-1047.
- Deng Y, Jin C, Duan ZH, et al. The osteoprotective effects and mechanisms of RA model mice by total saponins of *Chaenomeles speciosa* [J]. Chin Pharm, 2023, 34(9): 1042-1047.
- [8] 罗进芳, 吴秋妹, 黄聪, 等. 苗药铁筷子的研究进展 [J]. 贵州中医药大学学报, 2023, 45(2): 75-80.
- Luo JF, Wu QM, Huang C, et al. Research progress of Miao medicine *Radix chimonanthi praecox* [J]. J Guizhou Univ Tradit Chin Med, 2023, 45(2): 75-80.
- [9] 刘晓婷, 刘建军, 安文博, 等. 基于 OPG/RANK/RANKL 信号通路防治股骨头坏死的中医药研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(16): 274-282.
- Liu XT, Liu JJ, An WB, et al. Traditional Chinese medicine in prevention and treatment of osteonecrosis of femoral head based on OPG/RANK/RANKL signaling pathway: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(16): 274-282.
- [10] 谭日钊, 牛国栋, 赵振达, 等. 关节软骨与软骨下骨改变在不同骨关节炎动物模型中的特点 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 450-455.
- Tan QZ, Niu GD, Zhao ZD, et al. Alterations of articular cartilage and subchondral bone in different rat models of osteoarthritis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 450-455.
- [11] 姜刚刚, 漆文霞, 李志婷, 等. 基于“肾主骨”理论探讨中药干预类风湿关节炎骨破坏与 OPG/RANK/RANKL 的相关性进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(12): 58-62.
- Jiang GG, Qi WX, Li ZT, et al. Based on the theory of “kidney governs bone”, this paper discusses the progress of correlation between Chinese medicine intervention on bone destruction of rheumatoid arthritis and OPG/RANK/RANKL [J]. Rheum Arthritis, 2022, 11(12): 58-62.
- [12] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. Nature, 2003, 423(6937): 356-361.
- [13] 施佳君, 陈方明, 马全鑫, 等. 胶原诱导 Wistar 和 Lewis 大鼠类风湿关节炎模型病理特点的比较 [J]. 中国比较医学杂

- 志, 2018, 28(4): 19–26, 37.
- Shi JJ, Chen FM, Ma QX, et al. Comparison of pathological characteristics of Wistar and Lewis rat models of collagen-induced rheumatoid arthritis [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(4): 19–26, 37.
- [14] Xu R, Liu Z, Hou J, et al. Osthole improves collagen-induced arthritis in a rat model through inhibiting inflammation and cellular stress [J]. Cell Mol Biol Lett, 2018, 23: 19.
- [15] 褚乙晓, 李秀文, 杜进璇. 自拟散寒化瘀通络方对湿寒痹阻型 RA 效果观察 [J/OL]. 辽宁中医杂志: 1–10 [2023–06–12].  
Chu YX, Li XW, Du JX. Effect of self-developed formula for dispersing cold, resolving stasis, and clearing ligaments on damp-cold paralysis and blockage type RA [J/OL]. Liaoning J Traditi Chin Med: 1–10 [2023–06–12].
- [16] 王珊珊, 袁嘉丽, 牛海涛. 基于中西医理论指导的类风湿关节炎动物模型分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1114–1120.  
Wang SS, Yuan JL, Niu HT. Analysis of animal models of rheumatoid arthritis based on theories of traditional Chinese and Western medicine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1114–1120.
- [17] Ho TY, Santora K, Chen JC, et al. Effects of relaxin and estrogens on bone remodeling markers, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG), in rat adjuvant-induced arthritis [J]. Bone, 2011, 48(6): 1346–1353.
- [18] 郭川英. 苗药透骨香方治疗类风湿性关节炎实验研究 [D]. 贵阳: 贵阳中医学院; 2015.  
Guo CY. Experimental study on Miao medicine Touguxiang recipe in treating rheumatoid arthritis [D]. Guiyang: Guiyang College of Traditional Chinese Medicine; 2015.
- [19] 李梦, 李亚烽, 钱海兵. 铁筷子醇提取物对大鼠佐剂性关节炎作用及机制研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(3): 19–21.  
Li M, Li YF, Qian HB. Effects of alcohol extract from *Chimonanthus praecox* on adjuvant arthritis rats and their mechanisms [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2017, 19(3): 19–21.
- [20] 李梦, 钱海兵. 铁筷子醇提取物对佐剂性关节炎大鼠 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 和 MMP-3 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(9): 1326–1327.  
Li M, Qian HB. Effect of alcohol extract of *Dictyophora ferruginea* on the expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and MMP-3 in adjuvant arthritis rats [J]. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(9): 1326–1327.
- [21] 张引红, 李美宁, 王春芳, 等. 补骨脂素对类风湿性关节炎小鼠模型的免疫调节作用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(2): 207–210.  
Zhang YH, Li MN, Wang CF, et al. Immunoregulatory effect of Psoralen on collagen-induced arthritis in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(2): 207–210.
- [22] 赵海玥, 王雅哲, 施依璐, 等. 多模态超声在类风湿性关节炎动物模型中的应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 861–866.  
Zhao HY, Wang YX, Shi YL, et al. Advances in the application of multimodal ultrasound in animal models of rheumatoid arthritis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 861–866.

[收稿日期] 2023–07–13



冷雪,李阳. TMAO 对脾虚高脂血症大鼠脂代谢的影响及香砂六君子汤的干预作用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1261-1270.

Leng X, Li Y. Effect of TMAO on lipid metabolism in spleen-deficiency hyperlipemia rats and the therapeutic effect of Xiangsha Liujunzi Decoction [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1261-1270.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.003

# TMAO 对脾虚高脂血症大鼠脂代谢的影响及香砂六君子汤的干预作用

冷雪<sup>1\*</sup>, 李阳<sup>2</sup>

(1. 辽宁中医药大学中西医结合学院, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学实验动物医学与科学学院, 沈阳 110847)

**【摘要】 目的** 本研究拟探讨肠道菌群代谢物 TMAO 对脾虚高脂血症大鼠肝脂质代谢的影响,并进一步探讨香砂六君子汤干预肝脂质代谢紊乱的可能机制。**方法** SD 大鼠分为:空白对照组(C 组);空白对照组 + DMB (C + D 组),DMB 为 TMAO 抑制剂;脾虚高脂血症组(PG 组);脾虚高脂血症 + DMB 组(PG + D 组);脾虚高脂血症 + 香砂六君子汤组(PG + XS 组)。除 C 组、C + D 组外各组构建以劳倦过度和高脂饲料相结合建立脾虚高脂血症模型(造模 12 周),模型建立后 C + D 组、PG + D 组每天饮用水中给予 1%DMB,PG + XS 组每天灌胃香砂六君子汤(每天 11.34 g 生药/kg),其余给予等量生理盐水,4 周后进行取材检测。全自动生化仪检测大鼠血脂含量;HE 染色、油红 O 染色观察大鼠肝变化及脂质沉积情况;ELISA 法检测大鼠肝 FFA 变化;试剂盒法检测各组大鼠 TG、TC 含量;LC-MS 法检测大鼠血浆 TMAO 含量;qRT-PCR 法检测大鼠肝 PERK、FOXO1、SREBP-2、ABCA1、miR-33 mRNA 相对表达水平;Western Blot 检测大鼠肝 SREBP-2、ABCA1 蛋白表达。**结果** (1) PG 组大鼠血清中 TC、TG 和 LDL-C 含量较 C 组升高明显,HDL-C 含量较 C 组下降显著;PG 大鼠肝组织中 FFA、TG、TC 含量较 C 组增加显著;肝脂质沉积较 C 组加深,脂肪空泡数量大幅度增加;以上指标中 C + D 组较 C 组比较无显著性差异;PG + D 组、PG + XS 组与 PG 组相比可显著降低大鼠血清中 TC、TG 和 LDL-C 含量,升高 HDL-C 含量,降低肝组织中 FFA、TG、TC 含量,缓解肝组织脂质沉积现象,减少肝空泡;PG + D 组与 PG + XS 组之间比较无显著性差异。(2) 与 C 组比较,PG 组大鼠血浆中 TMAO 含量增加显著,肝 PERK 和 FOXO1、miR-33a mRNA 相对含量明显增加,肝 SREBP-2、ABCA1 mRNA 和蛋白表达均降低显著;以上指标中 C + D 组较 C 组比较无显著性差异;PG + D 组及 PG + XS 组与 PG 组相比可显著降低大鼠血浆中 TMAO 含量,降低肝 PERK 和 FOXO1、miR-33a mRNA 表达,升高肝 SREBP-2、ABCA1 基因 mRNA 和蛋白表达;PG + D 组与 PG + XS 组之间无显著性差异。**结论** TMAO 可能通过 PERK/FOXO1 轴调控 SREBP-2/miR-33a/ABCA1 信号通路引起大鼠肝脂代谢紊乱,香砂六君子汤可能通过抑制 TMAO 含量达到抑制肝脂代谢紊乱。

**【关键词】** 氧化三甲胺;脾虚高脂血症;脂代谢;香砂六君子汤;大鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1261-10

## Effect of TMAO on lipid metabolism in spleen-deficiency hyperlipemia rats and the therapeutic effect of Xiangsha Liujunzi Decoction

LENG Xue<sup>1\*</sup>, LI Yang<sup>2</sup>

(1. College of Integrative Chinese and Western Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China. 2. College of Laboratory Animal Medicine and Science, Liaoning

University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847)

Corresponding author: LENG Xue. E-mail: 290404025@qq.com

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82104552)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82104552).

**【作者简介】** 冷雪(1983—),女,高级实验师,博士,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合基础。Email:290404025@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of TMAO, a metabolite of intestinal flora, on hepatic lipid metabolism in rats with splenic deficiency and hyperlipidemia, and to further explore the possible mechanism of Xiangsha Liujunzi Decoction in the treatment of hepatic lipid metabolism disorder. **Methods** SD rats were divided a blank control group (C group), blank control + TMAO inhibitor DMB group (C + D group), spleen deficiency hyperlipidemia group (PG group), spleen deficiency hyperlipidemia + DMB group (PG + D group), and spleen deficiency hyperlipidemia + Xiangsha Liujunzi Decoction group (PG + XS group). Except C group and C + D group, the other groups were used to establish a spleen deficiency hyperlipidemia model (12 weeks of modeling) by combining excessive fatigue and a high fat diet. After model establishment, C + D group and PG + D group were administered 1%DMB in drinking water every day, and the PG + XS group was administered Xiangsha Liujunzi Decoction (11.34 g crude drug/kg) every day. The other groups were administered the same amount of normal saline. Blood lipid levels were measured by an automatic biochemical method after 4 weeks of intragastric administration. Morphological changes of the liver were observed by HE staining. Lipid deposition in the liver was observed by oil red O staining. Liver FFA, TG, and TC were measured by ELISA. Plasma TMAO content was measured by LC-MS. Relative mRNA expression levels of PERK, FOXO1, SREBP-2, ABCA1, and miR-33 in the liver were measured by qRT-PCR. SREBP-2 and ABCA1 contents in the liver were measured by Western Blot. **Results** Serum contents of TC, TG, and LDL-C in the PG group were significantly higher than those in the C group, and HDL-C was content was significantly lower than that in the C group. FFA, TG, and TC contents in liver tissue of PG rats were significantly increased compared with those the C group. Compared with the C group, lipid deposition in the liver was aggravated and vacuoles were increased significantly. There was no difference in the above indexes between group C + D group and C group. Compared with the PG group, PG + D group and PG + XS group had significantly reduced serum contents of TC, TG, and LDL-C, increased HDL-C content, reduced FFA, TG, and TC contents in liver tissue, alleviated lipid deposition in liver tissue, and reduced liver vacuoles. No significant difference was observed between PG + D group and PG + XS group. Compared with the C group, the plasma TMAO content of the PG group was significantly increased, mRNA expression PERK, FOXO1, and miR-33a in the liver was significantly increased, and liver SREBP-2 and ABCA1 mRNA and protein expression was significantly decreased. No difference in the above indexes was observed between C + D and C groups. Compared with the PG group, PG + D group and PG + XS group had significantly reduced plasma TMAO content, decreased mRNA expression of PERK, FOXO1, and miR-33a in the liver, and increased SREBP-2 and ABCA1 mRNA and protein expression in the liver. No significant difference was observed between PG + D group and PG + XS group. **Conclusions** TMAO may regulate the SREBP-2/miR-33a/ABCA1 signaling pathway through the PERK/FOXO1 axis to cause liver lipid metabolism disorder in rats, and Xiangsha Liujunzi Decoction may inhibit liver lipid metabolism disorder by reducing TMAO content.

**【Keywords】** TMAO; spleen deficiency and hyperlipidemia; lipid metabolism; Xiangsha Liujunzi Decoction; rat  
**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

血脂代谢异常是动脉粥样硬化等心血管疾病发生的潜在独立因素之一,随着人们日常饮食变化,血脂异常的发生率呈现逐年升高的趋势<sup>[1]</sup>。中医多认为血脂代谢异常与脾失健运膏脂转输障碍密切相关<sup>[2]</sup>,脾气失运,膏脂滞留体内,聚化痰浊,痰浊又加剧脾运失司,往复循环,致使膏脂内摄而难化。脾虚引起的血脂代谢异常通常引起肝脂质沉积现象<sup>[3]</sup>,可见脾、血脂代谢、肝脂代谢之间存在一定关联,研究脂代谢紊乱引起血脂代谢异常类疾病的作用机制具有重要意义。

氧化三甲胺(trimethylamine oxide,TMAO)<sup>[4-5]</sup>为肠道菌群产生的代谢物。研究发现 TMAO 水平与血脂代谢存在明显相关性<sup>[6]</sup>,同时 TMAO 可以作为多种心血管疾病发生的潜在关键生物标志物<sup>[7]</sup>,关

键受体-蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase,PERK)为内质网跨膜蛋白,其可通过启动未折叠蛋白反应达到保护细胞损伤的作用<sup>[8]</sup>;叉头框蛋白 O1(forkhead box O1,FoxO1)是 FOX 家族 FOXO 亚科中成员之一<sup>[9]</sup>,控制介导代谢调节的下游基因转录<sup>[10]</sup>;FOXO1 可调控下游固醇调节元件结合蛋白-2(sterol-regulatory element-binding protein-2,SREBP-2)<sup>[11]</sup>,SREBP-2 进而可调控下游 miR-33a<sup>[12]</sup>,同时 miR-33a 参与下游三磷酸腺苷结合盒转运体 A(ATP-binding cassette transporter A1,ABCA1)的调控,进而 FOXO1 可通过 SREBP-2/miR-33a/ABCA1 信号轴影响肝脂代谢调控过程<sup>[13]</sup>;Chen 等<sup>[14]</sup>发现 TMAO/PERK/FOXO1 信号轴可能与脂代谢调控密切相关,前期研究也发现

TMAO 与肝甘油三酯形成有一定的关联性<sup>[15]</sup>。因此,通过预防和/或恢复 TMAO 水平可能是预防肝和血脂代谢异常发生发展的有效策略。健脾益气降浊之名方香砂六君子汤可干预脾虚高脂血症大鼠血脂代谢异常及肝代谢紊乱的作用<sup>[16]</sup>。但是肠道菌群 TMAO 如何影响血脂及肝脂代谢异常及香砂六君子汤是否通过调控肠道菌群代谢物 TMAO 进行的干预机制还需要深层次探究。本研究以 TMAO 为主要切入点,探讨其通过 PERK/FOXO1 轴调控 SREBP-2/miR-33/ABCA1 信号通路影响肝脂代谢紊乱的作用机制,以及探讨香砂六君子汤对干预脂代谢异常的机制是否与 TMAO 有关,以为中医药防治血脂代谢异常类疾病提供一定的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

50 只 7 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 180 ~ 220 g,购于辽宁长生生物技术股份有限公司【SCXK(辽)2020-0001】。辽宁中医药大学动物实验室【SYXK(辽)2019-0004】进行常规饲养(恒温 22 ~ 25℃,恒湿 40% ~ 60%,昼夜各半照明),饲料由小泰有泰(北京)生物科技有限公司提供。实验通过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审批(21000042022008)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

Anti-SREBP-2(Proteintech, 28212-1-AP), Anti-ABCA1(Abcam, ab66217), DMB(3,3-二甲基-1-丁醇,上海麦克林, D832026), 4%多聚甲醛、苏木素染液、油红 O 染液(上海碧云天 P0099、C0105S、C0158S),胆固醇试剂盒、甘油三酯试剂盒,(南京建成 20210806、20210809);大鼠游离脂肪酸(FFA)ELISA 试剂盒(上海源桔, YJ566656)。

全自动生化分析仪(日立, 7180 型, 日本)、多功能全波长酶标仪(SpectraMaxi3, MD, 美国);高性能组织脱水机(ASP 6025, Leica, 日本)、数字扫描显微成像系统(M8, Precipoint, 德国);实时荧光定量 PCR 仪(7500, ABI, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组及实验干预

50 只大鼠适应 1 周后,随机分为 5 组,分别为:①空白对照组(C 组):普通饲料饲喂,正常饮水;

②空白对照 + DMB 组(C + D 组):普通饲料饲喂,饲养 12 周后饮水中加入 1% DMB(TMAO 抑制剂),饮用 4 周;③脾虚高脂血症组(PG 组):采用高脂饲料+脾虚复合造模方法<sup>[17]</sup>,造模 12 周;④脾虚高脂血症 + DMB 组(PG + DMB 组):采用高脂饲料 + 脾虚复合造模方法<sup>[17]</sup>,造模 12 周,之后给予 DMB(饮水中加入 1% DMB),4 周;⑤脾虚高脂血症 + 香砂六君子汤组(PG + XS 组):采用高脂饲料 + 脾虚复合造模方法<sup>[17]</sup>,造模 12 周,灌胃香砂六君子汤 4 周,据前期结果<sup>[15]</sup>取最高剂量每天 11.34 g 生药/kg,为本实验给药剂量,每组 10 只。

#### 1.2.2 取材

模型构建及给药干预完成后,腹主动脉采血,全血一部分静置 2 h 后离心 20 min(3000 r/min)取上清为血清备用,一部分全血用抗凝管采血(3000 r/min 离心 20 min)取上清血浆,肝组织分别分装固定于 4%多聚甲醛中及冻存在 -80℃ 冰箱中。

#### 1.2.3 全自动生化仪检测大鼠血清血脂变化

应用全自动生物化学分析仪进行大鼠血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C 含量的检测。

#### 1.2.4 形态学染色法(HE 染色、油红 O 染色)观察肝变化

取固定好的组织进行石蜡切片,操作按照 HE 染色试剂盒进行,光学显微镜 10 × 40 倍镜下拍照;固定好的肝组织用 OCT 包埋上机进行冰冻切片(6 μm),根据油红 O 染色试剂盒进行操作,甘油明胶封片后,10 × 40 倍镜下拍照。

#### 1.2.5 ELISA 法及酶标仪试剂盒法检测肝 TG、TC、FFA 含量

按照 ELISA 试剂盒和酶标仪试剂盒的操作要求,取离心后的肝组织上清液进行操作,之后绘制标准曲线并计算肝中 FFA、TG、TC 水平。

#### 1.2.6 LC-MS 法检测血浆 TMAO 水平

将样本溶液、内标溶液、80%乙腈水溶液进行混合沉淀;再取 25 μL 空白血浆,作为空白基质样本,加入 25 μL 内标溶液和 50 μL 80%乙腈水溶液进行沉淀;将上述样本分别涡旋混匀后,4℃ 离心 30 min(3500 r/min),提取 50 μL 上清液操作上机。

#### 1.2.7 qRT-PCR 法检测肝 PERK、FOXO1、SREBP-2、ABCA1、miR-33 mRNA 表达水平

RNA 后提取后反转录成 mRNA 之后进行扩增。内参为 GAPDH、U6, 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行最后统计分析,引物序列(表 1)。



表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

| 基因<br>Gene | 上游引物(5'-3')<br>Forward primer(5'-3') | 下游引物(5'-3')<br>Reverse primer(5'-3') |
|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| GAPDH      | AGGTTGTCTCTGTGACTTCAA                | CTGTTGCTGTAGCCATATTCATTG-3           |
| PERK       | TCCGATACGGCATTTGGCTT                 | CGTCTTCCACGGTCACCTCG                 |
| FOXO1      | CAGCCAGGCACCTCATAACA                 | TCAAGCGGTTTCATGGCAGAT                |
| ABCA1      | GCAGCGACCATGAAAGTGAC                 | GAGGCGGTCATCAATCTCGT                 |
| SREBP-2    | GGGACATCGACGAGATGCTA                 | CCAGGGAAGGAGCTACATAGT                |
| U6         | CTCGCTTCGGCAGCAC                     | AACGCTTCACGAATTTGCGT                 |
| miR-33a    | ACACTCCAGCTGGGTGCAATGCAACTACA        | TGGTGTCTGGAGTCG                      |

1.2.8 Western Blot 检测肝 SREBP-2、ABCA1 蛋白含量

提取肝蛋白,蛋白定量(BCA 法)后依次进行上样、电泳、转膜、4℃ 过夜一抗孵育、TBST 洗涤、二抗 1 h、TBST 洗涤、曝光操作等步骤,最后应用 Image Studio 软件分析。

1.3 统计学分析

SPSS 19.0 统计结果数据,以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较应用单因素方差分析, $P < 0.05$  表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂变化

与 C 组相比,PG 大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平

升高明显,HDL-C 水平降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),C + D 组无显著变化;与 PG 组相比,分别给予 TMAO 抑制剂 DMB 及灌胃香砂六君子汤后,PG + D 组和 PG + XS 组大鼠血清中的 TG、LDL-C 水平明显降低,HDL-C 水平升高 ( $P < 0.01$ ),各组 TC 含量有降低趋势无显著性差异;与 PG + D 组相比,PG + XS 组除 LDL-C 含量减少程度较低 ( $P < 0.01$ ),其余无变化(表 2)。

2.2 肝 HE 染色

HE 染色可见,C 组及 C + D 组肝细胞质地均匀,无脂质空泡出现;与 C 组相比,PG 组出现肝空泡现象;与 PG 组相比,PG + D 组及 PG + XS 组大鼠肝组织内细胞脂质空泡数量显著减少,细胞空隙有所恢复(图 1)。

表 2 各组大鼠血脂水平( $\bar{x} \pm s$ ,mmol/L, $n = 6$ )

Table 2 Serum lipid levels of rats in each group( $\bar{x} \pm s$ ,mmol/L, $n = 6$ )

| 分组<br>Groups               | TC            | TG             | LDL-C            | HDL-C          |
|----------------------------|---------------|----------------|------------------|----------------|
| C 组<br>C group             | 1.62 ± 0.23   | 1.47 ± 0.14    | 0.34 ± 0.05      | 0.59 ± 0.07    |
| C + D 组<br>C + D group     | 1.63 ± 0.35   | 1.35 ± 0.33    | 0.32 ± 0.06      | 0.54 ± 0.08    |
| PG 组<br>PG group           | 2.00 ± 0.35 * | 2.16 ± 0.17 ** | 0.51 ± 0.05 **   | 0.30 ± 0.05 ** |
| PG + D 组<br>PG + D group   | 1.72 ± 0.28   | 0.58 ± 0.08 ## | 0.35 ± 0.05 ##   | 0.45 ± 0.10 ## |
| PG + XS 组<br>PG + XS group | 1.73 ± 0.30   | 0.67 ± 0.40 ## | 0.44 ± 0.05 ##ΔΔ | 0.52 ± 0.06 ## |

注:与 C 组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与 PG 组相比,## $P < 0.01$ ;与 PG + D 组相比,ΔΔ $P < 0.01$ 。(下表同)  
Note. Compared with C group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Compared with PG group, ## $P < 0.01$ . Compared with PG + D group, ΔΔ $P < 0.01$ . (The same in the following tables)

2.3 肝脂质沉积情况

通过油红 O 染色进行观察发现 C 组、C + D 组大鼠肝无脂质沉积;与 C 组相比,PG 组大鼠肝红色油滴出现,具有明显的脂质沉积现象;与 PG 组相比,PG + D 组及 PG + XS 组大鼠肝内脂质沉积现象有一定程度的减弱(图 2)。

2.4 肝 FFA、TG、TC 含量

与 C 组相比,PG 组大鼠肝 FFA、TG、TC 水平升

高明显( $P < 0.01$ ),C + D 组无显著性差异;与 PG 组相比,给予 TMAO 抑制剂 DMB、香砂六君子汤分别干预后,PG + D 组及 PG + XS 组大鼠 FFA、TG、TC 水平降低明显 ( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );与 PG + D 组相比,PG + XS 组无显著性差异(表 3)。

2.5 血浆 TMAO 含量及肝 PERK、FOXO1 mRNA 变化

如表 4 所示,与 C 组相比,PG 组大鼠血浆

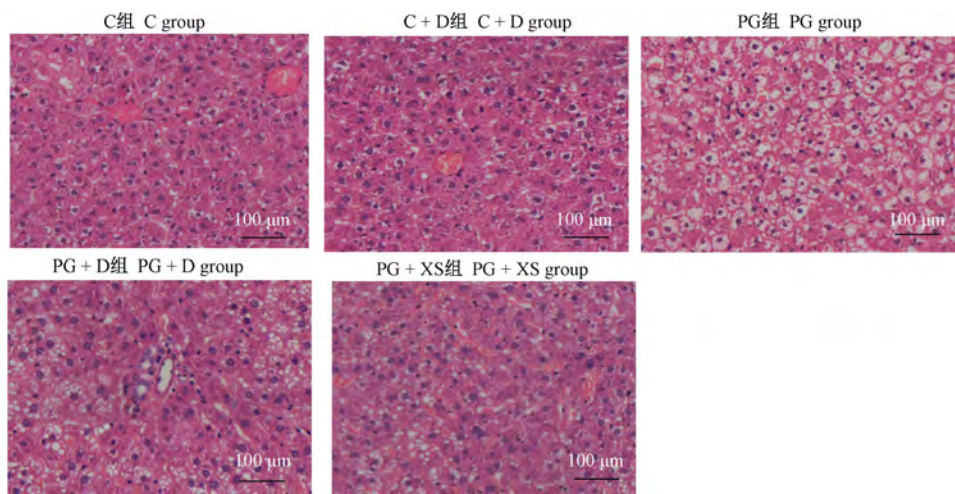


图 1 各组大鼠肝 HE 染色

Figure 1 HE staining of liver of rats in each group

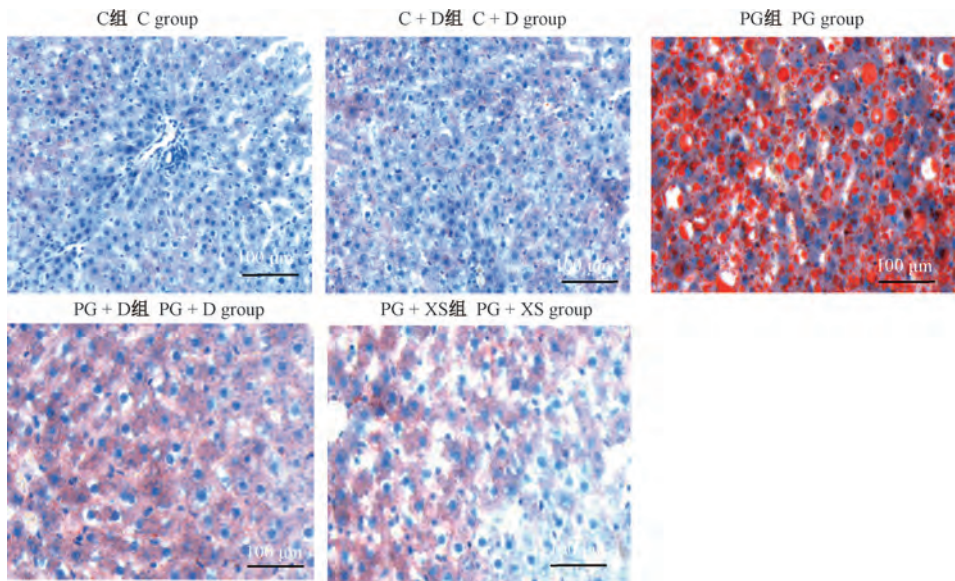


图 2 各组大鼠肝脂质沉积情况

Figure 2 Liver lipid deposition of rats in each group

表 3 各组大鼠肝 FFA、TG、TC 含量( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Liver FFA, TG and TC contents of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 分组<br>Groups               | FFA (μmol/L)       | TC (mmol/L)   | TG (mmol/L)    |
|----------------------------|--------------------|---------------|----------------|
| C 组<br>C group             | 1442.11 ± 129.64   | 1.31 ± 0.05   | 18.23 ± 3.12   |
| C + D 组<br>C + D group     | 1466.08 ± 80.52    | 1.41 ± 0.16   | 15.68 ± 1.18   |
| PG 组<br>PG group           | 1754.82 ± 218.48** | 2.90 ± 1.18** | 24.80 ± 2.87** |
| PG + D 组<br>PG + D group   | 1374.35 ± 64.19##  | 1.73 ± 0.17## | 21.48 ± 3.25#  |
| PG + XS 组<br>PG + XS group | 1383.73 ± 115.19## | 1.62 ± 0.22## | 19.61 ± 2.27## |

注:与 PG 组相比, \* $P < 0.05$ 。(下表同)

Note. Compared with PG group, \* $P < 0.05$ . (The same in the following tables)

TMAO 水平、肝 PERK、FOXO1 mRNA 表达水平升高显著( $P < 0.01$ ), C + D 组并无显著性差异;与 PG 组相比,PG + D 组和 PG + XS 组大鼠肝血浆 TMAO 水平、肝 PERK、FOXO1 mRNA 表达水平均降低明显( $P < 0.01$ );与 PG + D 组相比,PG + XS 组 PERK mRNA 表达降低明显( $P < 0.01$ )。

2.6 肝中 SREBP-2、miR-33a、ABCA1mRNA 变化

与 C 组相比,PG 组大鼠肝 SREBP-2、ABCA1 mRNA 表达降低( $P < 0.01$ ), miR-33a mRNA 表达升高( $P < 0.01$ ), C + D 对照组无显著性差异;与 PG 组比,PG + D 组大鼠肝 SREBP-2 mRNA 表达升高( $P < 0.05$ ), miR-33a mRNA 表达降低( $P < 0.01$ ), ABCA1 mRNA 表达也升高但是无显著性差异,PG + XS 组大鼠肝 SREBP-2、ABCA1 mRNA 表达升高( $P < 0.01$ ), miR-33a mRNA 表达降低( $P < 0.01$ );与 PG + D 组比,PG + XS 组 SREBP-2、ABCA1 mRNA 表达进一步升高( $P < 0.01$ ), miR-33a mRNA 表达有进一步降低趋势,但无显著性差异(表 5)。

2.7 肝 SREBP-2、ABCA1 蛋白表达变化

如表 6、图 3 所示,与 C 组相比,PG 组大鼠肝

SREBP-2、ABCA1 蛋白表达降低明显( $P < 0.01$ ), C + D 对照组并无显著性差异;与 PG 组比,PG + D 组 SREBP-2、ABCA1 蛋白表达升高明显( $P < 0.05$ ), PG + XS 组 SREBP-2、ABCA1 蛋白表达升高( $P < 0.01$ );与 PG + D 组比,PG + XS 组 SREBP-2、ABCA1 蛋白表达升高( $P < 0.01$ )。

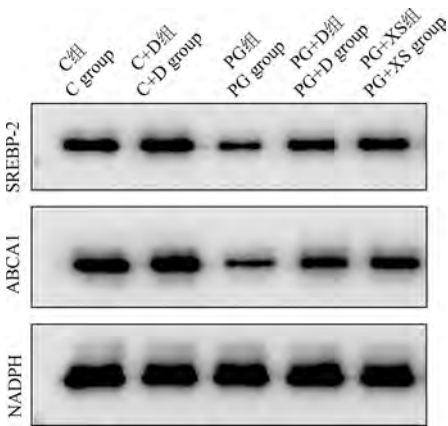


图 3 大鼠肝 SREBP-2、ABCA1 蛋白表达变化

Figure 3 Relative contents of SREBP-2 and ABCA1 protein expression in liver of rats in each group

表 4 各组大鼠血浆中 TMAO 及肝 PERK、FOXO1 mRNA 变化( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| Table 4 Plasma TMAO content and liver PERK and FOXO1 mRNA expression levels of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) |                  |                 |               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|---------------|
| 分组<br>Groups                                                                                                                | TMAO(ng/L)       | PERK            | FOXO1         |
| C 组<br>C group                                                                                                              | 344.86 ± 17.40   | 1.00 ± 0.02     | 1.00 ± 0.08   |
| C + D 组<br>C + D group                                                                                                      | 328.38 ± 46.93   | 1.11 ± 0.16     | 1.06 ± 0.06   |
| PG 组<br>PG group                                                                                                            | 721.52 ± 3.26**  | 9.11 ± 0.50**   | 2.22 ± 0.10** |
| PG + D 组<br>PG + D group                                                                                                    | 194.78 ± 10.54## | 3.17 ± 0.06##   | 1.49 ± 0.18## |
| PG + XS 组<br>PG + XS group                                                                                                  | 193.86 ± 3.33##  | 1.54 ± 0.02##ΔΔ | 1.37 ± 0.25## |

表 5 各组肝 SREBP-2、miR-33a、ABCA1 mRNA 的表达水平( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| Table 5 mRNA expression levels of SREBP-2, miR-33a and ABCA1 in liver of each group( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) |                 |               |                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------|-----------------|
| 分组<br>Groups                                                                                                  | SREBP-2         | miR-33a       | ABCA1           |
| C 组<br>C group                                                                                                | 1.00 ± 0.02     | 1.08 ± 0.54   | 1.00 ± 0.07     |
| C + D 组<br>C + D group                                                                                        | 0.96 ± 0.07     | 1.11 ± 0.31   | 1.07 ± 0.11     |
| PG 组<br>PG group                                                                                              | 0.15 ± 0.02**   | 7.23 ± 0.41** | 0.25 ± 0.02**   |
| PG + D 组<br>PG + D group                                                                                      | 0.21 ± 0.02#    | 2.70 ± 0.39## | 0.26 ± 0.01     |
| PG + XS 组<br>PG + XS group                                                                                    | 0.38 ± 0.02##ΔΔ | 2.51 ± 0.14## | 0.53 ± 0.03##ΔΔ |



表 6 各组大鼠肝 SREBP-2、ABCA1 蛋白表达相对含量( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| Table 6 Relative contents of SREBP-2 and ABCA1 protein expression in liver of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) |                    |                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| 分组 Groups                                                                                                                  | SREBP-2            | ABCA1                       |
| C 组<br>C group                                                                                                             | 1.17 $\pm$ 0.13    | 1.09 $\pm$ 0.16             |
| C + D 组<br>C + D group                                                                                                     | 1.29 $\pm$ 0.04    | 1.16 $\pm$ 0.11             |
| PG 组<br>PG group                                                                                                           | 0.74 $\pm$ 0.11 ** | 0.57 $\pm$ 0.01 **          |
| PG + D 组<br>PG + D group                                                                                                   | 0.92 $\pm$ 0.01 #  | 0.84 $\pm$ 0.04 ##          |
| PG + XS 组<br>PG + XS group                                                                                                 | 1.01 $\pm$ 0.21 ## | 1.07 $\pm$ 0.07 ## $\Delta$ |

注:与 PG + D 组相比,  $\Delta P < 0.05$ 。  
Note. Compared with PG + D group,  $\Delta P < 0.05$ .

3 讨论

脂代谢紊乱极易引起脂肪肝、动脉粥样硬化、高脂血症等疾病,也给患者带来了巨大的经济负担<sup>[18]</sup>,因此调控血脂代谢是迫切之需。《素问·经脉别论篇》说:“饮入于胃,游溢精气,上输于脾。脾气散精,上归于肺,通调水道,下输膀胱,水津四布……”,可见脾运化的重要性<sup>[19]</sup>。“血脂”类似于中医的“膏脂”<sup>[20]</sup>,脾的运化功能也与血脂代谢、脂代谢等密切相关,“脾失运化,浊滞血脉”<sup>[21-22]</sup>。《杂病源流犀烛·痰饮源流》云:“好食油面猪脂,以至脾气不利,壅滞为痰。”可见常油腻饮食,引起脾虚导致运化功能减弱,进一步引起痰浊内生,而大量的痰浊凝滞于肝脉,造成肝脂代谢紊乱。近期研究发现肠道菌群可产生代谢物 TMAO<sup>[23-24]</sup>。目前研究显示 TMAO 与脂代谢紊乱引起 ASCVD 的发生发展具有一定相关性,其参与了动脉粥样硬化<sup>[25]</sup>、冠心病<sup>[26]</sup>、糖尿病<sup>[27]</sup>等多种疾病的发生、发展及相关并发症的产生过程。汤景辉等<sup>[28]</sup>发现植物乳杆菌 ZDY04 可减轻 TMAO 诱导的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠体内的动脉粥样硬化,其机制可能是通过促进 RCT 过程;此外发现 TMAO 含量与斑块的形成有相关性,并能抑制胆固醇的逆向转运,进而导致脂代谢异常<sup>[29]</sup>;靳步等<sup>[30]</sup>发现 TMAO 可通过影响微管蛋白聚合、T 小管重构等促进心力衰竭的发生。提示 TMAO 水平变化与 ASCVD 疾病的发展至关重要,TMAO 的调控是治疗 ASCVD 疾病的有效策略之一。香砂六君子汤出自《古今名医方论》,可对脾失健运引起的膏脂代谢异常起到一定的干预作用<sup>[31-32]</sup>。课题组前期发现香砂六君子汤对肝脂代谢异常具有一定的

干预作用,具体机制还未明晰<sup>[16]</sup>。

本实验造模方法遵循以往团队方法,在脾虚高脂血症模型基础上分别给予 TMAO 抑制剂(DMB)、香砂六君子汤进行干预,观察 TMAO 对脾失健运引起膏脂运输障碍引起的肝脂质沉积的影响及香砂六君子汤的干预机制研究。本次发现 PG 组大鼠血脂变化、形态学变化及血浆中 TMAO 变化与团队前期结果一致<sup>[15]</sup>,同时大鼠肝 TG、TC、FFA 水平明显增加;给予 DMB 对 TMAO 进行干预,发现 DMB 可以显著抑制 TMAO 的生成,此外 TMAO 被抑制后,可缓解血脂代谢水平,同时改善了肝脂代谢紊乱现象。研究发现给予香砂六君子汤可通过降低血浆 TMAO 含量,进而改善血脂代谢紊乱、肝脂代谢紊乱的现象,其效果类似于 TMAO 抑制剂 DMB。体外实验发现 TMAO 对内质网应激过程具有一定的干扰<sup>[33]</sup>;Saaoud 等<sup>[34]</sup>同样发现抑制内质网(ER)应激介质 PERK (TMAO 受体),会抑制 TMAO 诱导的 HAECs 激活。叉头框(forkhead box FOX)家族参与代谢的关键蛋白转录因子<sup>[35]</sup>,研究显示 FOXO1 参与小鼠肝细胞脂质沉积的调节<sup>[36]</sup>,同时也是调控心脑血管疾病的关键作用靶点<sup>[37]</sup>,FOXO1 通路功能障碍易导致非酒精性脂肪肝、动脉粥样硬化等疾病<sup>[9]</sup>。Chen 等<sup>[14]</sup>发现 PERK 与 TMAO 结合,通过激活 PERK 分支,可进一步诱导转录因子 FOXO1,进而影响血脂异常类疾病的发生发展,提示 TMAO/PERK/FOXO1 信号轴可能与脂代谢调控密切相关。

本研究显示,PG 组大鼠血浆 TMAO 含量升高,通路轴上 PERK、FOXO1 mRNA 及蛋白表达明显增加,提示 TMAO 可以启动 PERK/FOXO1 轴参与 FOXO1 对下游脂代谢的调节;给予 DMB 后可以显著降低 TMAO 的含量从而抑制下游 PERK、FOXO1 的表达;同样给予香砂六君子汤后,可以通过抑制 TMAO 来抑制 TMAO/PERK/FOXO1 轴的表达。

FOXO1 可参与下游多种因子代谢调节,研究显示固醇调节元件结合蛋白-2(SREBP-2)可以在转录水平上被 FOXO1 调控<sup>[11]</sup>,SREBP-2 参与胆固醇代谢调控过程,通常特异性结合 LDLR、HMGCR 等基因<sup>[38]</sup>,研究显示电针可通过调控 SCAP/SREBP-2 通路干预高脂血症大鼠胆固醇代谢紊乱的现象<sup>[39]</sup>;此外小鼠巨噬细胞脂质蓄积也与 SREBP2 表达相关<sup>[40]</sup>;课题组前期发现脾虚高脂血症大鼠肝脂质沉积、血脂紊乱可能与 miR122a/SREBP-2 通路有关<sup>[41]</sup>。miRNAs 是一类非编码 RNA,参与机体内多

种代谢调控过程<sup>[42]</sup>。miR-33a 由 SREBP 基因内含子编码,参与肝脂代谢调控过程<sup>[12]</sup>。研究发现 miR-33a 可与 SREBP-2 联合提高细胞内胆固醇水平,并加剧肝脂代谢紊乱<sup>[42]</sup>,可见 miR-33a 与 SREBPs 协同作用是促进肝脂质合成的关键步骤。三磷酸腺苷结合盒转运体 A (ABCA1) 参与 HDL 生成过程<sup>[43]</sup>,其可受到 miR-33 的调控,miR-33a 水平降低可增加 ABCA1 表达和细胞内胆固醇流出<sup>[44]</sup>;小鼠体内注射 miR-33 腺病毒抑制 ABCA1 表达,相反注射反义寡核苷酸 miR-33 腺病毒的小鼠体内 ABCA1 表达增高,可见 ABCA1 是 miR-33 真正的靶标基因<sup>[45]</sup>。

SREBP-2/miR-33a/ABCA1 三个关键基因,形成调控脂代谢的代谢通路,这对肝脂质沉积的形成至关重要。本实验研究发现,在 PG 组大鼠肝中 SREBP-2、ABCA1 mRNA 及蛋白表达均不同程度降低,miR-33a mRNA 表达显著上升;给予 DMB 后可以进一步促进 SREBP-2、ABCA1 mRNA 及蛋白表达,抑制 miR-33a mRNA 表达,同样香砂六君子汤对 SREBP-2/miR-33a/ABCA1 轴的调控作用与 DMB 一致。可见 DMB 可以通过抑制 TMAO 的表达从而影响 TMAO/PERK/FOXO1 轴介导的下游 SREBP-2/miR-33a/ABCA1 通路从而抑制肝脂代谢紊乱导致的脂质沉积现象;香砂六君子汤也可通过抑制 TMAO 的表达起到影响 TMAO/PERK/FOXO1 轴介导的下游 SREBP-2/miR-33a/ABCA1 通路作用,进而干预脂代谢紊乱的作用,起到抑制大鼠肝脂沉积发生和发展。

综上所述,TMAO 可能通过参与调控 PERK/FOXO1 代谢轴,靶向下流的 SREBP-2/miR-33a/ABCA1 信号通路,影响 ABCA1 表达,进而引起肝脂沉积;香砂六君子汤可通过抑制 TMAO 的表达,调控 PERK/FOXO1 代谢轴,影响下游 SREBP-2/miR-33a/ABCA1 通路,进而改善肝脂代谢紊乱现象。但本研究也存在一定的局限性,香砂六君子汤是否通过干预肠道菌群来干预 TMAO 的作用机制达到调控脂代谢紊乱的作用,仍需深入研究。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] 柏帆,唐露霖,尚文斌. 高脂血症的中医分类治疗探讨[J]. 中医药学报, 2022, 50(2): 10-13.
- Bai F, Tang LL, Shang WB. Discussion on TCM classification and treatment of hyperlipemia [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2022, 50(2): 10-13.
- [2] 贾连群,杨关林,张哲,等. 从“脾主运化”理论探讨膏脂转

输与胆固醇逆向转运[J]. 中医杂志, 2013, 54(20): 1793-1795.

Jia LQ, Yang GL, Zhang Z, et al. Discussion on the transfer of ointment and fat and the reverse transfer of cholesterol from the theory of “spleen governing transport and transformation” [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 54(20): 1793-1795.

- [3] 李鑫, 曹慧敏, 宋因, 等. 基于胆固醇逆向转运探讨脾虚对高脂血症的影响及时效关系[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(7): 55-59.

Li X, Cao HM, Song N, et al. Effect of spleen deficiency on hyperlipidemia and its time-effect relationship based on reverse transport of cholesterol [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(7): 55-59.

- [4] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease [J]. Nature, 2011, 472(7341): 57-63.

- [5] Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(2): 79-87.

- [6] Xiong X, Zhou J, Fu Q, et al. The associations between TMAO-related metabolites and blood lipids and the potential impact of rosuvastatin therapy [J]. Lipids Health Dis, 2022, 21(1): 60.

- [7] Konieczny R, Kuliczowski W. Trimethylamine N-oxide in cardiovascular disease [J]. Adv Clin Exp Med, 2022, 31(8): 913-925.

- [8] Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease [J]. Circ Res, 2010, 107(9): 1071-1082.

- [9] Xing YQ, Li A, Yang Y, et al. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression [J]. Life Sci, 2018, 193: 124-131.

- [10] Peng S, Li W, Hou N, et al. A review of FoxO1-regulated metabolic diseases and related drug discoveries [J]. Cells, 2020, 9(1): 184.

- [11] Guo Y, Zhao M, Bo T, et al. Blocking FSH inhibits hepatic cholesterol biosynthesis and reduces serum cholesterol [J]. Cell Res, 2019, 29(2): 151-166.

- [12] Rottiers V, Näär AM. microRNAs in metabolism and metabolic disorders [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(4): 239-250.

- [13] Babashamsi MM, Koukhaloo SZ, Halalkhor S, et al. ABCA1 and metabolic syndrome; a review of the ABCA1 role in HDL-VLDL production, insulin-glucose homeostasis, inflammation and obesity [J]. Diabetes Metab Syndr, 2019, 13(2): 1529-1534.

- [14] Chen S, Henderson A, Petriello MC, et al. Trimethylamine N-oxide binds and activates PERK to promote metabolic dysfunction [J]. Cell Metab, 2019, 30(6): 1141-1151.

- [15] 王杰, 宋因, 陈丝, 等. 基于肠道菌群调控 TMAO/PERK/FOXO1 途径探讨香砂六君子汤对脾虚高脂血症大鼠肝脏甘油三酯合成的影响及机制[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(2): 286-291.

Wang J, Song N, Chen S, et al. Based on the regulation of TMAO/PERK/FOXO1 by intestinal flora, this paper discusses the effect and mechanism of Xiangsha Liujunzi Decoction on the synthesis of liver triglyceride in rats with spleen deficiency and

- hyperlipidemia [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33 (2): 286–291.
- [16] 冷雪, 曹媛, 王莹, 等. 香砂六君子汤通过调控 miR-182/FOXO1 对脾虚高脂血症大鼠肝脏脂质沉积的影响及可能的机制 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(7): 2677–2683.
- Leng X, Cao Y, Wang Y, et al. Effect of Xiangsha Liujunzi Decoction on liver lipid deposition in rats with spleen deficiency and hyperlipidemia by regulating miR-182/FOXO1 and its possible mechanism [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 24(7): 2677–2683.
- [17] 陈丝, 宋囡, 崔馨月, 等. 香砂六君子汤对脾虚高脂血症模型大鼠胆固醇逆向转运的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60 (17): 1493–1498.
- Chen S, Song N, Cui XY, et al. Effect of Xiangsha Liujunzi Decoction on reverse cholesterol transport of spleen deficiency and hyperlipidemia model rats [J]. J Tradit Chin Med, 2019, 60 (17): 1493–1498.
- [18] 王增武, 刘静, 李建军, 等. 中国血脂管理指南(2023 年) [J]. 中国循环杂志, 2023, 38(3): 237–271.
- Wang ZW, Liu J, Li JJ, et al. Chinese guidelines for lipid management(2023) [J]. Chin Circ J, 2023, 38(3): 237–271.
- [19] 周佳, 陈娇, 韦双双. 从脾论治高脂血症 [J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(2): 309–312.
- Zhou J, Chen J, Wei SS. Traditional Chinese medicine based on spleen for treating hyperlipidemia [J]. J Changchun Univ Chin Med, 2016, 32(2): 309–312.
- [20] 王洋, 刘悦, 孔德昭, 等. 基于“脾气散精”理论探讨健脾祛痰法对膏脂转运障碍的调节机制 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(6): 111–114.
- Wang Y, Liu Y, Kong DZ, et al. Based on the theory of “Spleen Qi Distribute Essence” to explore the regulating mechanism of “Jian Pi Qu Tan” method on the grease transport disorder [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2021, 23(6): 111–114.
- [21] 李维娜, 冯玲. 高脂血症从脾论治探幽 [J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(4): 577–580.
- Li WN, Feng L. Discussion of the treatment of hyperlipidemia on the basis of spleen theory [J]. World J Integr Tradit West Med, 2017, 12(4): 577–580.
- [22] 张蕾, 张琪, 游云, 等. 基于代谢组学技术探讨高脂血症及动脉粥样硬化痰瘀证候的演变规律 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(7): 823–833.
- Zhang L, Zhang Q, You Y, et al. Investigation of evolution rules of phlegm and blood stasis syndrome in hyperlipidemia and atherosclerosis by NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2015, 35(7): 823–833.
- [23] Zeisel SH, Warrier M. Trimethylamine N-oxide, the microbiome, and heart and kidney disease [J]. Annu Rev Nutr, 2017, 37: 157–181.
- [24] Koeth RA, Levison BS, Culley MK, et al.  $\gamma$ -Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO [J]. Cell Metab, 2014, 20(5): 799–812.
- [25] 李铁男, 裴汉军. 氧化三甲胺促进动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2022, 43(6): 542–546.
- Li YN, Pei HJ. Trimethylamine N-oxide promoting atherosclerosis [J]. Adv Cardiovasc Dis, 2022, 43(6): 542–546.
- [26] 韩嘉明, 高中山, 段豪亮, 等. 氧化三甲胺在冠心病中的研究进展 [J]. 中国心血管病研究, 2022, 20(7): 643–649.
- Han JM, Gao ZS, Duan HL, et al. Research progress of TMAO in coronary heart disease [J]. Chin J Cardiovasc Res, 2022, 20 (7): 643–649.
- [27] Zhuang R, Ge X, Han L, et al. Gut microbe-generated metabolite trimethylamine N-oxide and the risk of diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis [J]. Obes Rev, 2019, 20(6): 883–894.
- [28] 汤景辉, 秦嫚嫚, 唐乐, 等. 植物乳杆菌 ZDY04 促进胆固醇逆向转运减轻 TMAO 诱导的 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化 [J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(3): 249–256.
- Tang JH, Qin MM, Tang L, et al. *Lactobacillus plantarum* ZDY04 reduces trimethylamine N-oxide-induced atherosclerosis by promoting reverse cholesterol transport in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. Chin J Microecol, 2022, 34(3): 249–256.
- [29] Senthong V, Wang Z, Li XS, et al. Intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide and 5-year mortality risk in stable coronary artery disease: the contributory role of intestinal microbiota in a COURAGE-like patient cohort [J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(6): e002816.
- [30] 靳步, 纪方方, 左安俊, 等. 氧化三甲胺通过促进成年小鼠心肌细胞 T 小管重构加重心力衰竭 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(6): 1034–1041.
- Jin B, Ji FF, Zuo AJ, et al. TMAO aggravates heart failure by promoting T-tubule remodeling in adult mouse cardiomyocytes [J]. Chin J Pathophysiol, 2020, 36(6): 1034–1041.
- [31] 吕美君, 贾连群, 王志丹, 等. 香砂六君子汤的文献分析研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(7): 1620–1623.
- Lyu MJ, Jia LQ, Wang ZD, et al. Philological study and analysis of Xiangsha Liujunzi Decoction [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2016, 34(7): 1620–1623.
- [32] 奚锦要, 朱永钦, 朱永革, 等. 香砂六君子汤联合针刺疗法治疗功能性消化不良临床疗效观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 157–162.
- Xi JY, Zhu YQ, Zhu YP, et al. Clinical efficacy of Xiangsha Liujunzi Tang combined with acupuncture therapy in treatment of syndrome of deficiency of spleen qi and stomach qi of functional dyspepsia [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2017, 23 (20): 157–162.
- [33] 温仁辉, 柯世业, 石光耀, 等. 内质网应激在氧化三甲胺促人脐静脉内皮细胞氧化应激中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(2): 193–199.
- Wen RH, Ke SY, Shi GY, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in trimethylamine N-oxide-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells [J]. Chin J Pathophysiol, 2020, 36(2): 193–199.



- [34] Saaoud F, Liu L, Xu K, et al. Aorta- and liver-generated TMAO enhances trained immunity for increased inflammation via ER stress/mitochondrial ROS/glycolysis pathways [J]. JCI Insight, 2023, 8(1): e158183.
- [35] 李晞璠, 陈吉. 叉头框 (FOX) 基因家族的概述及进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(52): 72-73.  
Li XF, Chen J. Overview and progress of FOX gene family [J]. World Latest Med Inf, 2017, 17(52): 72-73.
- [36] Liu YZ, Peng W, Chen JK, et al. FoxO1 is a critical regulator of hepatocyte lipid deposition in chronic stress mice [J]. Peer J, 2019, 7: e7668.
- [37] Menghini R, Casagrande V, Iuliani G, et al. Metabolic aspects of cardiovascular diseases: is FoxO1 a player or a target? [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2020, 118: 105659.
- [38] 李玉杰. 1 CRTC2 通过 FoxO1/SREBP-2/HMGCR 调节肝脏胆固醇合成的研究 2 TSH 通过上调肝脏中 CRTC2 的表达促进肝脏糖异生的研究 [D]. 济南: 山东大学; 2017.  
Li YJ. 1 study on CRTC2 regulating the synthesis of hepatic cholesterol through FoxO1/SREBP-2/HMGCR 2 study on TSH promoting hepatic gluconeogenesis by up-regulating the expression of CRT C2 in liver [D]. Jinan: Shandong University; 2017.
- [39] 武欢, 张照庆, 陈丽, 等. 基于 SCAP/SREBP-2 通路探讨电针对高脂血症大鼠胆固醇代谢的影响 [J]. 针刺研究, 2023, 48(4): 325-330, 338.  
Wu H, Zhang ZQ, Chen L, et al. Electroacupuncture mitigates hyperlipidemia via improving cholesterol metabolism mediated by SCAP/SREBP-2 signaling in liver tissue in rats [J]. Acupunct Res, 2023, 48(4): 325-330, 338.
- [40] 蒋思怿, 张瑞, 李晓歌, 等. PLIN2 通过调控 SREBP2 促进 RAW<sub>264.7</sub> 巨噬细胞脂质蓄积 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(1): 1-9.
- [41] Jiang SP, Zhang R, Li XG, et al. PLIN<sub>2</sub> promotes lipid accumulation in RAW<sub>264.7</sub> macrophages by regulating SREBP2 [J]. Chin J Pathophysiol, 2021, 37(1): 1-9.
- [42] 宋囡, 贾连群, 杨关林, 等. 脾虚高脂血症大鼠肝脏 miRNA-122a 的表达及其与 SREBP-2 通路调控的关系 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(3): 975-979.  
Song N, Jia LQ, Yang GL, et al. Expression of miRNA-122a in liver of hyperlipidemia rats with syndrome of spleen deficiency and its regulation correlated with SREBP-2 signaling pathway [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 31(3): 975-979.
- [43] 魏鸿瞻, 钟连超, 高炳宏. microRNAs 通过调节肝脏糖脂代谢调控肝脏胰岛素抵抗 [J]. 中国细胞生物学报, 2020, 42(6): 1063-1070.  
Wei HZ, Zhong LC, Gao BH. MicroRNAs regulate hepatic insulin resistance by regulating hepatic glycolipid metabolism [J]. Chin J Cell Biol, 2020, 42(6): 1063-1070.
- [44] Gerin I, Clerbaux LA, Haumont O, et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation [J]. J Biol Chem, 2010, 285(44): 33652-33661.
- [45] Zhao GJ, Mo ZC, Tang SL, et al. *Chlamydia pneumoniae* negatively regulates ABCA1 expression via TLR2-Nuclear factor-kappa B and miR-33 pathways in THP-1 macrophage-derived foam cells [J]. Atherosclerosis, 2014, 235(2): 519-525.
- [46] 张海滨, 朱磊. miRNA-33 对脂代谢的调节 [J]. 体育世界, 2018, 7: 189-190.  
Zhang HB, Zhu L. Regulation of miRNA-33 on lipid metabolism [J]. Sports World, 2018, 7: 189-190.

[收稿日期] 2023-07-13

范正媛,李亚,李素云,等. 慢性阻塞性肺疾病合并慢性肾病大鼠模型建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1271-1277.

Fan ZY, Li Y, Li SY, et al. Model establishment and evaluation of chronic obstructive pulmonary disease complicated with chronic kidney disease in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1271-1277.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.004

# 慢性阻塞性肺疾病合并慢性肾病大鼠 模型建立与评价

范正媛<sup>1,2</sup>, 李亚<sup>2,3</sup>, 李素云<sup>3,4\*</sup>, 李高峰<sup>1</sup>, 李景梅<sup>1</sup>

(1. 河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院  
中药药理(呼吸)实验室河南省呼吸病防治中医药重点实验室, 郑州 450000;  
3. 河南中医药大学第一附属医院呼吸科, 郑州 450000; 4. 河南中医药大学  
呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450046)

**【摘要】 目的** 建立与评价慢性阻塞性肺疾病(COPD)合并慢性肾病(CKD)大鼠模型。**方法** 将 40 只雌雄各半 SPF 级 SD 大鼠随机分为对照组(Control 组)、COPD 组、CKD 组、COPD 合并 CKD 模型组(COPD + CKD 组), 每组 10 只。采用香烟烟雾暴露联合细菌滴注法制备 COPD 大鼠模型, 利用腺嘌呤诱导建立 CKD 大鼠模型, 两种方法协同制备 COPD 合并 CKD 的大鼠模型, 8 周后取材检测肺、肾功能, 观察组织形态学及血清炎症因子的表达水平。**结果** 造模成功后 COPD + CKD 组大鼠肺功能指标 FVC、FEV<sub>0.1</sub> 及 FEV<sub>0.1</sub>/FVC 显著降低( $P < 0.01$ ), 肺组织病理学表现为肺泡壁断裂、融合的肺气肿改变及炎细胞浸润; 血 Cr、BUN 及 24 h 尿蛋白显著升高( $P < 0.01$ ), 肾组织病理学表现为肾小球系膜增生, 基底膜增厚, 肾小管扩张及间质纤维化, 超微结构显示肾小球毛细血管襻部分闭合, 足突融合, 肾小管线粒体融合崩解, 溶酶体增多; 血清 IL-6、IL-13、IL-1 $\beta$  和 TGF- $\beta$ 1 水平显著升高( $P < 0.01$ ), 且明显高于单一模型组( $P < 0.01$ )。**结论** 采用香烟烟雾暴露联合细菌感染合并 2.5%腺嘌呤诱导的方法可成功构建 COPD 合并 CKD 的大鼠模型, 炎症反应可能在 COPD 合并 CKD 过程中起关键作用。

**【关键词】** 慢性阻塞性肺疾病; 慢性肾病; 大鼠模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1271-07

## Model establishment and evaluation of chronic obstructive pulmonary disease complicated with chronic kidney disease in rats

FAN Zhengyuan<sup>1,2</sup>, LI Ya<sup>2,3</sup>, LI Suyun<sup>3,4\*</sup>, LI Gaofeng<sup>1</sup>, LI Jingmei<sup>1</sup>

(1. the First Clinic School, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Chinese Medicine Pharmacology (Respiratory) Laboratory, Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for the Prevention and Treatment of Respiratory Diseases, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000. 3. Respiratory Department of the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000. 4. Co-Construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

Corresponding author: LI Suyun. E-mail: lisuyun2000@126.com

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(82074413, 82374416), 河南省科技研发计划联合基金项目(222301420081)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82074413, 82374416), Science and Technology R&D Program Joint Fund Project of Henan Province (222301420081).

**【作者简介】** 范正媛(1994—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病。Email: fanzhengyuan0225@163.com

**【通信作者】** 李素云(1965—), 教授, 主任医师, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病。Email: lisuyun2000@126.com

**【Abstract】 Objective** To establish and evaluate a model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) combined with chronic kidney disease (CKD) in rats. **Methods** Forty SPF grade SD rats were randomly divided into Control group, COPD group, CKD group, and COPD combined with CKD model (COPD + CKD) group, with 10 rats in each group. The COPD rat model was prepared by cigarette smoke exposure combined with the bacterial drip method, the CKD rat model was established by adenine induction, and the COPD combined with CKD rat model was prepared by both method. **Results** After successful modeling, lung function indexes including forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in 0.1 s ( $FEV_{0.1}$ ), and  $FEV_{0.1}/FVC$  were significantly reduced in the COPD + CKD group ( $P < 0.01$ ), and lung histopathology showed emphysematous changes with alveolar wall fracture and fusion as well as inflammatory cell infiltration. Serum Cr, BUN, and 24 h urine protein were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Renal histopathology showed glomerular mesentery proliferation, basement membrane thickening, tubular dilatation, and interstitial fibrosis. The ultrastructure showed that glomerular capillary loops were partially closed, foot processes were fused, renal tubule mitochondria were fused and disintegrated, and lysosome was increased. Serum IL-6, IL-13, IL-1 $\beta$ , and TGF- $\beta$ 1 levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ) and were significantly higher than those in single model groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Cigarette smoke exposure combined with bacterial infection and 2.5% adenine induction successfully establishes a model of COPD complicated with CKD in rats, and the inflammatory response might play a major role in the process of COPD complicated with CKD.

**【Keywords】** chronic obstructive pulmonary disease; chronic kidney disease; rat model

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种进行性发展的慢性气道疾病, 由于气道和 (或) 肺泡暴露于有害颗粒或气体而导致不完全可逆的气流受限和相应的呼吸系统症状, 已成为我国和全球第三大疾病死亡原因<sup>[1-2]</sup>。COPD 的病理生理变化不仅局限于气道和肺部, 更是一种累及全身, 具有多种合并症的系统性炎症综合征, 其中慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 是 COPD 常见的并发症之一<sup>[3-4]</sup>, 发病率 6.5% ~ 26.2%<sup>[5]</sup>, 老年 COPD 患者发病率高达 31%<sup>[6]</sup>。CKD 是一种慢性进行性肾疾病, 以肾结构和功能改变为特征, 全球患病率超过 10%, 预计 2040 年将成为全球第五大疾病死亡原因<sup>[7-8]</sup>, COPD 合并 CKD 可进一步增加患者的住院时间、死亡风险和经济负担<sup>[9]</sup>。然而目前有关 COPD 合并 CKD 的研究多集中于临床流行病学调查, 相关的实验研究仍非常有限, 因此本研究拟建立 COPD 合并 CKD 大鼠模型, 为深入探讨其发病机制、寻求有效治疗方法提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

40 只 6 ~ 8 周龄 SPF 级 SD 健康大鼠, 体重 180  $\pm$  20 g, 雌雄各半, 由北京斯贝福生物技术有限公司提供【SCXK (京) 2019-0010】。饲养环境湿度为

45% ~ 55%, 维持 25℃ 恒温, 每天 12 h 光照, 适应性喂养 1 周, 饲养于河南省中医药大学第一附属医院中心实验室 SPF 级动物房【SYXK (豫) 2017-0001】。本研究由河南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会审查通过 (YFYDW2021002)。

#### 1.1.2 细菌

肺炎克雷伯杆菌 (46117), 购自中国医学细菌保藏管理中心。

#### 1.1.3 红旗渠过滤嘴香烟

购自河南中烟工业有限责任公司, 焦油量 10 mg, 烟气一氧化碳含量 12 mg, 烟碱量 1.0 mg。

#### 1.1.4 药物

腺嘌呤 (V900471) 购自美国 Sigma 公司。

#### 1.1.5 主要试剂与仪器

HE 染液 (CR2203235)、PAS 染液 (CR2206022)、Masson 染液 (CR2203222) 试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司。大鼠白细胞介素-6 (IL-6, E-EL-R0015c)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , E-EL-R0012c)、白细胞介素-13 (IL-13, E-EL-R0563c)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , E-EL-R2856c) 试剂盒购自武汉 Elabscience 公司; 转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1, KE20010) 试剂盒购自美国 Proteintech 公司。

IVC-II 型独立送风隔离笼具 (江苏冯氏实验动物设备有限公司); FinePointe™ 型 PFT 测量系统及全身体积描记系统 (美国 BUXCO 公司); URIT-1600 型全自动尿液分析仪 (桂林优利特医疗电子有限公



司); C8000 全自动生化仪(美国雅培公司); Donatello 型脱水机、Giotto 型染色机(意大利 Diapath 公司); SpectraMax i3x 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); RM2245 型切片机、DM6000B 光学显微镜、全自动树脂处理机、全自动超薄切片机(德国 Leica 公司); EM-1400 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司); BS210S 电子天平(德国赛多利斯公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组与处理

将大鼠随机分为对照组(Control 组)、慢性阻塞性肺疾病模型组(COPD 组)、慢性肾病模型组(CKD 组)、COPD 合并 CKD 模型组(COPD + CKD 组), 每组各 10 只。

### 1.2.2 COPD 模型的制备

1 ~ 8 周, 将大鼠连接熏烟箱, 使箱内烟雾浓度达到  $3000 \pm 500$  ppm, 熏吸暴露 30 min, 每天 2 次, 同时将浓度为  $6 \times 10^8$  CFU/mL 的肺炎克雷伯杆菌液滴入大鼠鼻腔, 每只 0.1 mL, 5 d 1 次。Control 组给与等体积的生理盐水滴鼻。

### 1.2.3 CKD 模型的制备

1 ~ 2 周不予处理, 3 ~ 6 周给予大鼠含有 2.5% 腺嘌呤的 CMC-Na 混悬液, 250 mg/(kg·d) 灌胃, 7 ~ 8 周减为 125 mg/(kg·d) 灌胃。Control 组给予等体积 0.5% CMC-Na 溶液灌胃。

### 1.2.4 建立 COPD 合并 CKD 模型

采用香烟暴露联合细菌感染合并腺嘌呤诱导的方法协同建立 COPD 合并 CKD 大鼠模型。1 ~ 2 周先给予香烟暴露联合细菌感染, 3 ~ 8 周在此基础上进行 2.5% 腺嘌呤灌胃。

### 1.2.5 留取血、尿、肺、肾组织标本

造模结束后, 收集大鼠 24 h 尿液测定 24 h 尿蛋白; 经腹主动脉取血, 分离血清检测肾功能及炎症因子水平; 处死动物后取肺、肾组织进行组织形态学观察。

### 1.2.6 肺功能检测

以 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠(60 mg/kg, 腹腔注射)后, 气管插管检测大鼠用力肺活量(FVC)、第 0.1 秒用力呼气容积( $FEV_{0.1}$ )及  $FEV_{0.1}/FVC$ 。

### 1.2.7 肺组织病理学观察

将大鼠左右肺分离, 结扎右主支气管, 左肺连灌流系统, 用 4% 甲醛溶液灌注固定 20 min, 脱水, 固定, 石蜡包埋, 切片后进行 HE 染色, 观察大鼠肺泡、细支气管、小血管的结构变化。

### 1.2.8 肾功能检测

应用全自动生化仪检测大鼠血清尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)水平。

### 1.2.9 肾组织病理学观察

将大鼠左肾去除包膜, 取一部分组织切成  $1\text{ mm}^3$  小块, Gluta 固定液固定, 经脱水、渗透、包埋、聚合、切片、染色后进行投射电镜观察肾组织超微结构变化(电镜图片由河南中医药大学电镜中心提供)。将剩余肾组织横切厚度为 3 mm 的组织块, 固定、石蜡包埋、切片分别进行 HE、PAS 及 Masson 染色, 观察大鼠肾基本病理形态、基底膜及间质纤维化改变。

### 1.2.10 炎症因子检测

取大鼠血清, 按试剂盒说明书, ELISA 法检测血清炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-13 和 TGF- $\beta$ 1 水平。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件分析数据, 结果以平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较使用单因素方差分析, 方差齐使用最小显著值法, 方差不齐使用 Dunnett's T3 法, 以  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠肺功能情况

与 Control 组相比, COPD 组大鼠肺功能值显著降低( $P < 0.01$ )。CKD 组大鼠肺功能呈降低趋势, 但与 Control 组相比无显著性差异。COPD + CKD 组大鼠肺功能显著低于 Control 组( $P < 0.01$ ), 且  $FEV_{0.1}$  及  $FEV_{0.1}/FVC$  显著低于 COPD 组( $P < 0.01$ )。见表 1。

### 2.2 大鼠肺组织病理变化

Control 组肺泡结构完整, 大小均匀, 气管管周存在少量炎性细胞。COPD 组肺泡壁断裂, 肺泡腔融合, 出现肺大疱, 肺泡腔内及气管管周炎性细胞浸润, 结合肺功能情况说明成功构建 COPD 大鼠模型。CKD 组肺泡结构较完整, 但与 Control 组相比气道及肺泡内存在大量的炎性细胞。COPD + CKD 组病理改变同 COPD 组, 且肺气肿、炎细胞浸润更明显, 可见红细胞漏出。见图 1。

### 2.3 大鼠肾功能情况

与 Control 组相比, COPD 组大鼠血 Cr 及 24 h 尿蛋白定量显著升高( $P < 0.05$ )。CKD 组及 COPD + CKD 组大鼠血 Cr、BUN 及 24 h 尿蛋白均显著高于 Control 组( $P < 0.05$ ), 且 COPD + CKD 组大鼠血

表 1 大鼠肺功能情况( $\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$ )

Table 1 Pulmonary function of rats( $\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$ )

| 组别<br>Groups                     | 用力肺活量(mL)<br>FVC(mL)      | 第 0.1 秒用力呼气容积(mL)<br>FEV <sub>0.1</sub> (mL) | FEV <sub>0.1</sub> /FVC(%)    |
|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------|
| Control 组<br>Control group       | 8.19 ± 1.46               | 7.51 ± 1.03                                  | 92.28 ± 3.79                  |
| COPD 组<br>COPD group             | 6.07 ± 0.44 <sup>aa</sup> | 4.70 ± 0.14 <sup>aa</sup>                    | 77.66 ± 5.13 <sup>aa</sup>    |
| CKD 组<br>CKD group               | 8.05 ± 1.70               | 6.77 ± 1.04                                  | 84.97 ± 5.14                  |
| COPD + CKD 组<br>COPD + CKD group | 4.80 ± 0.71 <sup>aa</sup> | 2.72 ± 0.76 <sup>aabb</sup>                  | 57.36 ± 15.54 <sup>aabb</sup> |

注:与 Control 组相比, <sup>aa</sup> $P < 0.01$ ;与 COPD 组相比, <sup>bb</sup> $P < 0.01$ 。(下表同)  
Note. Compared with Control group, <sup>aa</sup> $P < 0.01$ . Compared with COPD group, <sup>bb</sup> $P < 0.01$ . (The same in the following tables)

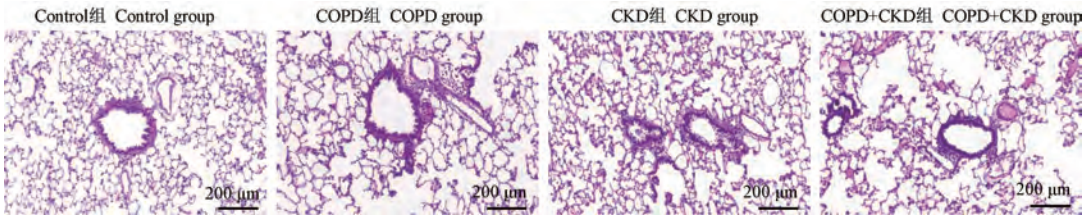


图 1 大鼠肺组织病理

Figure 1 Lung pathology of rats

Cr、BUN 及 24 h 尿蛋白水平较 COPD 组及 CKD 组均显著升高( $P < 0.05$ )。见表 2。

2.4 大鼠肾组织病理变化

Control 组肾小球、肾小管及肾间质未见明显异常。CKD 组肾小球系膜增生,基底膜增厚,球囊腔扩张,肾小管细胞脱落坏死,管腔扩张,可见褐色结晶沉积,肾间质炎细胞浸润,纤维组织增生,结合肾功能表现说明 CKD 大鼠模型构建成功。COPD 组肾小球未见明显异常,肾小管上皮细胞排列紊乱,细胞肿胀,胞质染色不均,肾间质有纤维组织增生。COPD + CKD 组病理改变同 CKD 组,可见更明显的肾小管扩张和间质纤维化。见图 2。

2.5 大鼠肾组织超微结构改变

与 Control 组相比,COPD 组大鼠肾小球足细胞

部分足突融合,肾小管细胞间隙增大,线粒体减少。CKD 组肾小球内皮细胞增生,毛细血管襻部分闭合,基底膜厚度不均,足细胞足突融合、微绒毛化,肾小管细胞破裂,线粒体融合崩解、脊模糊减少,溶酶体增多。COPD + CKD 组超微结构改变同 CKD 组,且肾小管细胞内出现脂滴沉积。见图 3。

2.6 大鼠血清炎症因子表达

如表 3 所示,COPD 组、CKD 组及 COPD + CKD 组血清 IL-6、IL-13 和 IL-1 $\beta$  水平均显著高于 Control 组( $P < 0.05$ )。CKD 组及 COPD + CKD 组血清 TGF- $\beta$ 1 表达均较 Control 组显著升高( $P < 0.01$ )。其中,COPD + CKD 组血清 IL-6、IL-13、IL-1 $\beta$  和 TGF- $\beta$ 1 水平不仅高于 COPD 组,也高于 CKD 组( $P < 0.01$ )。

表 2 大鼠肾功能情况( $\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$ )

Table 2 Renal function of rats( $\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$ )

| 组别<br>Groups                     | 尿素氮 (mmol/L)<br>BUN (mmol/L)  | 肌酐 ( $\mu$ mol/L)<br>Cr ( $\mu$ mol/L) | 24 h 尿蛋白定量 (g/24 h)<br>24 h urine protein (g/24 h) |
|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 对照组<br>Control group             | 9.39 ± 1.73                   | 69.85 ± 29.23                          | 27.91 ± 6.22                                       |
| COPD 组<br>COPD group             | 14.23 ± 1.02                  | 179.50 ± 27.36 <sup>a</sup>            | 70.59 ± 14.60 <sup>aa</sup>                        |
| CKD 组<br>CKD group               | 17.40 ± 2.44 <sup>a</sup>     | 299.60 ± 47.86 <sup>aa</sup>           | 166.70 ± 22.95 <sup>aa</sup>                       |
| COPD + CKD 组<br>COPD + CKD group | 32.48 ± 7.33 <sup>aabbc</sup> | 577.20 ± 111.30 <sup>aabbc</sup>       | 194.60 ± 26.52 <sup>aabbc</sup>                    |

注:与 Control 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 CKD 组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>cc</sup> $P < 0.01$ 。(下表同)  
Note. Compared with Control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with the CKD group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>cc</sup> $P < 0.01$ . (The same in the following tables)

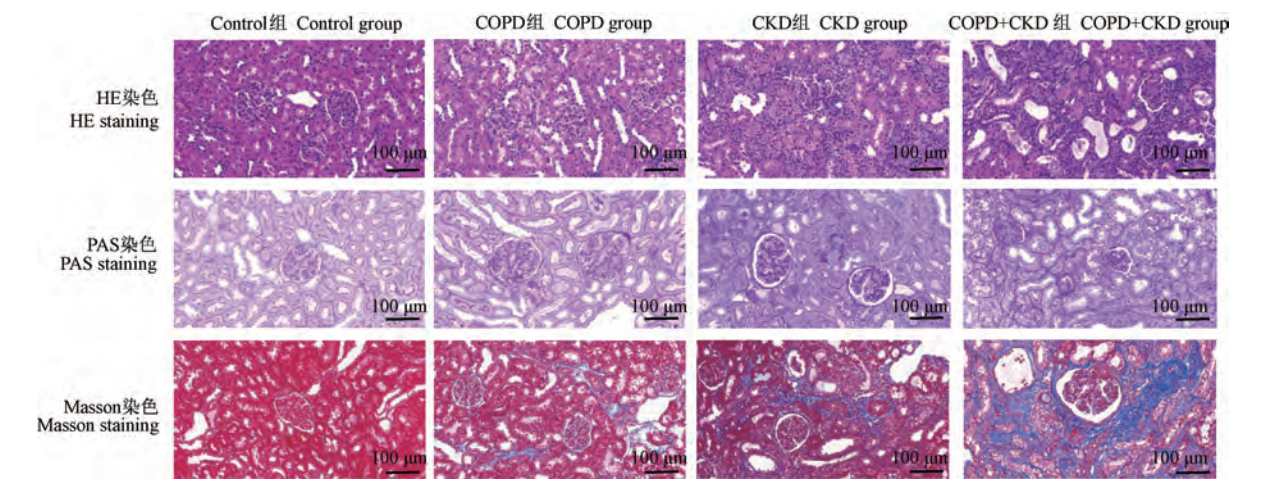


图 2 大鼠肾组织病理  
Figure 2 Renal pathology of rats

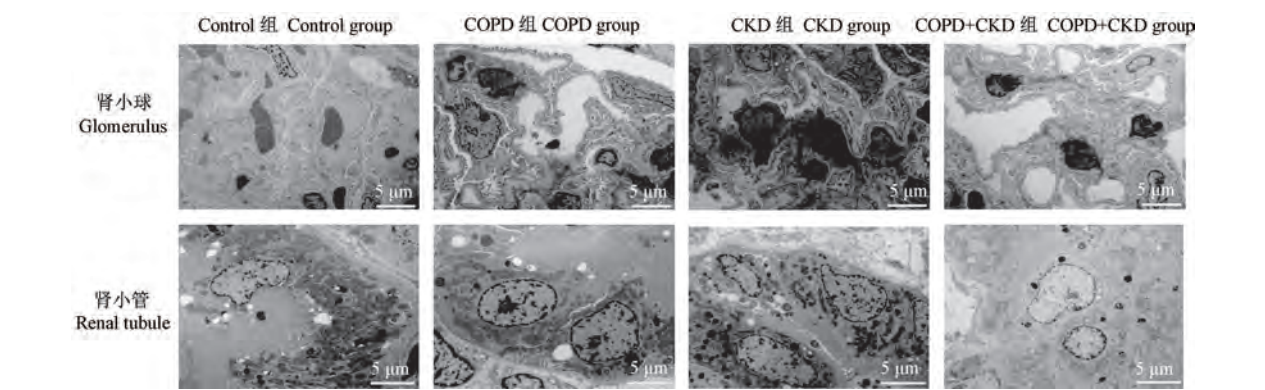


图 3 大鼠肾组织超微结构  
Figure 3 Renal ultrastructure of rats

表 3 大鼠血清炎症因子表达( $\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$ )  
Table 3 Serum inflammatory factor expression of rats( $\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$ )

| 组别<br>Groups                     | 白介素-6(pg/mL)<br>IL-6(pg/mL)     | 白介素-13(pg/mL)<br>IL-13(pg/mL)  | 白介素-1β(pg/mL)<br>IL-1β(pg/mL)  | 转化生长因子-β1(pg/mL)<br>TGF-β1(pg/mL) |
|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 对照组<br>Control group             | 63.06 ± 12.47                   | 22.80 ± 2.99                   | 5.95 ± 3.70                    | 4.62 ± 0.58                       |
| COPD 组<br>COPD group             | 103.40 ± 13.04 <sup>aa</sup>    | 35.32 ± 3.22 <sup>a</sup>      | 48.34 ± 20.82 <sup>aa</sup>    | 11.88 ± 1.69                      |
| CKD 组<br>CKD group               | 119.90 ± 10.93 <sup>aa</sup>    | 47.03 ± 3.45 <sup>aa</sup>     | 44.41 ± 15.42 <sup>aa</sup>    | 22.21 ± 7.83 <sup>aa</sup>        |
| COPD + CKD 组<br>COPD + CKD group | 176.30 ± 21.00 <sup>aabbc</sup> | 65.41 ± 15.61 <sup>aabbc</sup> | 91.58 ± 16.04 <sup>aabbc</sup> | 54.45 ± 8.98 <sup>aabbc</sup>     |

3 讨论

越来越多的研究表明,CKD 是 COPD 的重要合并症之一,由于 CKD 起病隐匿,早期常无明显临床症状,被发现时肾功能大多受损较重进入终末期,除肾替代治疗,尚无有效的措施以延缓肾功能恶化<sup>[10]</sup>,CKD 在 COPD 合并症医疗花费支出中排在首位,也加大了 COPD 的死亡风险和治疗难度<sup>[11-12]</sup>。

因此,建立 COPD 合并 CKD 大鼠模型,对阐释 COPD 引发 CKD 的分子机制,寻求新的治疗手段至关重要。

COPD 大鼠模型分为单因素及复合因素诱导<sup>[13]</sup>,课题组前期建立的香烟暴露联合细菌鼻腔滴注的复合方法,可成功构建 COPD 大鼠模型,较单因素诱导的 COPD 模型更符合人类 COPD 的病理生理特征,且造模时间更短<sup>[14]</sup>。本研究采用 COPD 诊断



金标准的肺功能检测结合肺病理学观察发现 COPD 大鼠模型制备成功<sup>[15]</sup>,且 COPD + CKD 组肺功能指标  $FEV_{0.1}$ 、 $FEV_{0.1}/FVC$  显著低于 COPD 组,肺组织肺气肿及炎细胞浸润更明显。

近年来研究报道单一 COPD 模型即可引发肾损伤。张伟等<sup>[16]</sup>以改良烟熏加气管滴注脂多糖法干预 28 d 建立 COPD 大鼠模型,发现 COPD 组大鼠尿 Cys-C 表达显著升高,肾病理表现可见肾小管上皮细胞肿胀,超微结构改变;Pabón 等<sup>[17]</sup>以单纯香烟暴露 6 个月建立 COPD 小鼠模型,发现慢性香烟暴露导致肾小球基底膜增厚、间质胶原沉积和肾小管细胞脂质沉积。本研究结果与以上研究基本一致,COPD 组大鼠血 Cr 及 24 h 尿蛋白定量显著升高,肾小球部分足突融合,肾小管细胞肿胀,线粒体脊减少,肾间质胶原纤维增多。

CKD 的造模方法有手术干预、化学诱导等,考虑到手术操作死亡率较高、可用肾组织较少等因素,本研究采用腺嘌呤诱导建立 CKD 大鼠模型<sup>[18]</sup>。肾功能指标 Cr、BUN、24 h 尿蛋白定量在 CKD 的临床诊断、疗效判定、动物模型构建中具有较为重要的地位<sup>[19]</sup>。腺嘌呤可代谢生成难溶性的 2,8-二羟基腺嘌呤,在肾小管中形成晶体,增加血清 Cr 和 BUN 水平,产生蛋白尿,并诱发肾小管萎缩和间质纤维化,这与 CKD 患者的临床病理特征相似<sup>[20]</sup>,因此腺嘌呤诱导法被广泛应用于探索 CKD 发病机制和治疗靶点的研究<sup>[21]</sup>。本研究结合肾功能及肾组织病理变化证实 CKD 大鼠模型复制成功,同时 COPD + CKD 组肾功能指标显著高于 CKD 组,肾小管扩张及间质纤维化更明显,电镜结果显示肾小管细胞内出现脂滴沉积。以上结果均证实 COPD 合并 CKD 大鼠模型制备成功。

研究表明多种病理生理机制促进 COPD 与 CKD 的关联性,其中炎症因子诱发的免疫炎症反应可能在 COPD 合并 CKD 中起到重要作用<sup>[22]</sup>。气道上皮作为天然免疫的第一道防线,受各种外界环境刺激的影响。香烟烟雾中的有害成分、细菌等可刺激巨噬细胞、中性粒细胞和 T 细胞等多种免疫细胞高度活化,释放 IL-6、IL-1 $\beta$  等多种促炎细胞因子和趋化因子,不仅导致肺组织破坏,产生肺气肿、气流受限等肺内炎症表现<sup>[23]</sup>,还可造成全身炎症状态,引发血管生成、内源性生长因子 TGF- $\beta$  等释放、成纤维细胞募集,促进肾实质细胞损伤,诱导肾间质纤维化<sup>[24]</sup>。据报道,CKD 患者体内 IL-6、IL-13、IL-

1 $\beta$  及 TGF- $\beta$  水平升高,且炎症状态的加重与肾功能下降呈正相关<sup>[25-28]</sup>。同时,肾损伤后由于炎症介质的清除不足,又可进一步加重肺部疾病,研究报道 CKD 小鼠肺组织炎细胞浸润,间质纤维化,氧化应激水平升高<sup>[29]</sup>;肾缺血再灌注大鼠模型中,肺 TNF- $\alpha$  水平升高,诱发肺部炎症损伤,形成肺肾串扰的恶性循环<sup>[30]</sup>。本研究结果发现 COPD、CKD、COPD + CKD 组血清炎症因子水平均升高,联合组升高最为显著,高于单一模型组,这些结果进一步证实了炎症反应在 COPD 合并 CKD 中的关键作用。

综上,通过对大鼠肺肾功能及组织病理学的检测表明采用香烟烟雾暴露联合细菌感染合并 2.5% 腺嘌呤诱导的方法可成功构建 COPD 合并 CKD 的大鼠模型。相较于单一模型,合并模型在肺、肾功能、组织形态学、炎症指标方面表现出明显的差异,说明两种造模方法联合可进一步促进疾病进展,与临床相符合,可应用于 COPD 合并 CKD 的基础研究。但由于目前对该合并模型的相关研究尚不充分,有待进一步研究评估其稳定性和代表性。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of COPD. GOLD Reports [EB/OL]. [2023-05-30]. <http://www.goldcopd.org/>.
- [2] Mortality and global health estimates. WHO [EB/OL]. [2023-06-03]. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>.
- [3] Putcha N, Drummond MB, Wise RA, et al. Comorbidities and chronic obstructive pulmonary disease: prevalence, influence on outcomes, and management [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2015, 36(4): 575-591.
- [4] Kiani FZ, Ahmadi A. Prevalence of different comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease among Shahrekord PERSIAN cohort study in southwest Iran [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 1548.
- [5] Recio Iglesias J, Díez-Manglano J, López García F, et al. Management of the COPD patient with comorbidities: an experts recommendation document [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2020, 15: 1015-1037.
- [6] Yoshizawa T, Okada K, Furuichi S, et al. Prevalence of chronic kidney diseases in patients with chronic obstructive pulmonary disease; assessment based on glomerular filtration rate estimated from creatinine and cystatin C levels [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2015, 10: 1283-1289.
- [7] Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, et al. Chronic kidney disease [J]. *Lancet*, 2021, 398(10302): 786-802.
- [8] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017

- [J]. Lancet, 2020, 395(10225): 709–733.
- [9] Gembillo G, Calimeri S, Tranchida V, et al. Lung dysfunction and chronic kidney disease: a complex network of multiple interactions [J]. J Pers Med, 2023, 13(2): 286.
- [10] Visconti L, Santoro D, Cernaro V, et al. Kidney-lung connections in acute and chronic diseases: current perspectives [J]. J Nephrol, 2016, 29(3): 341–348.
- [11] Lisspers K, Larsson K, Johansson G, et al. Economic burden of COPD in a Swedish cohort: the ARCTIC study [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2018, 13: 275–285.
- [12] Chen W, FitzGerald JM, Sin DD, et al. Excess economic burden of comorbidities in COPD: a 15-year population-based study [J]. Eur Respir J, 2017, 50(1): 1700393.
- [13] 张迪, 夏艺, 范丽, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 230–235.
- Zhang D, Xia Y, Fan L, et al. Establishment and evaluation of rat models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 230–235.
- [14] Li Y, Li SY, Li JS, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(10): 1752–1760.
- [15] Bouwens JDM, Bischoff EWMA, In't Veen JCCM, et al. Diagnostic differentiation between asthma and COPD in primary care using lung function testing [J]. NPJ Prim Care Respir Med, 2022, 32(1): 32.
- [16] 张伟, 韩佳, 姚玉强, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠尿 Cys-C mRNA 表达及肺肾之间的相关性探讨 [J]. 生物医学工程研究, 2012, 31(4): 224–228.
- Zhang W, Han J, Yao YQ, et al. The expression of the cys-c mRNA of copd rats' urine and the study of correlation between lung and kidney [J]. J Biomed Eng Res, 2012, 31(4): 224–228.
- [17] Pabón MA, Patino E, Bhatia D, et al. Beclin-1 regulates cigarette smoke-induced kidney injury in a murine model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. JCI Insight, 2018, 3(18): e99592.
- [18] Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats [J]. Nephrology, 2018, 23(1): 5–11.
- [19] Shuvy M, Nyska A, Beer R, et al. Histopathology and apoptosis in an animal model of reversible renal injury [J]. Exp Toxicol Pathol, 2011, 63(4): 303–306.
- [20] López-Novoa JM, Rodríguez-Peña AB, Ortiz A, et al. Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications [J]. J Transl Med, 2011, 9: 13.
- [21] Corremans R, Neven E, Maudsley S, et al. Progression of established non-diabetic chronic kidney disease is halted by metformin treatment in rats [J]. Kidney Int, 2022, 101(5): 929–944.
- [22] Satta E, Alfaroni C, de Maio A, et al. Kidney and lung in pathology: mechanisms and clinical implications [J]. Multidiscip Respir Med, 2022, 17(2): 819.
- [23] Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 388(4): 621–625.
- [24] Lv W, Booz GW, Wang Y, et al. Inflammation and renal fibrosis: recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 820: 65–76.
- [25] 姚登湖, 向海燕, 张明霞. 2 型固有淋巴细胞与肾脏病 [J]. 临床肾脏病杂志, 2021, 21(9): 780–784.
- Yao DH, Xiang HY, Zhang MX. Type 2 innate lymphoid cell and kidney disease [J]. J Clin Nephrol, 2021, 21(9): 780–784.
- [26] Dai Y, Zhang W, Wen J, et al. A2B adenosine receptor-mediated induction of IL-6 promotes CKD [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(5): 890–901.
- [27] Nowak KL, Chonchol M, Ikizler TA, et al. IL-1 inhibition and vascular function in CKD [J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(3): 971–980.
- [28] Soomro A, Khajehei M, Li R, et al. A therapeutic target for CKD: activin A facilitates TGFβ1 profibrotic signaling [J]. Cell Mol Biol Lett, 2023, 28(1): 10.
- [29] Nemmar A, Karaca T, Beegam S, et al. Lung oxidative stress, DNA damage, apoptosis, and fibrosis in adenine-induced chronic kidney disease in mice [J]. Front Physiol, 2017, 8: 896.
- [30] Yousefi H, Ahmadiasl N, Alihemmati A, et al. Effect of renal ischemia-reperfusion on lung injury and inflammatory responses in male rat [J]. Iran J Basic Med Sci, 2014, 17(10): 802–807.

[收稿日期] 2023-06-29

杨光勇,杜海洋,张庚鑫,等. 基于血清代谢组学研究黄连解毒汤对 SD 大鼠胆汁酸代谢的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1278–1286.

Yang GY, Du HY, Zhang GX, et al. Study on the effect of Huanglian Jiedu Decoction on bile acid metabolism in SD rats based on serum metabolomics [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1278–1286.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.005

# 基于血清代谢组学研究黄连解毒汤 对 SD 大鼠胆汁酸 代谢的影响

杨光勇,杜海洋,张庚鑫,苏钢,涂小华,何光志\*

(贵州中医药大学基础医学院,贵阳 550025)

**【摘要】 目的** 通过血清非靶向代谢组学技术研究黄连解毒汤对健康 SD 大鼠生理功能的影响。**方法** 大鼠 24 只适应性喂养 7 d 后,随机分为空白组(N 组)、黄连解毒汤高剂量组(H 组)、中剂量组(M 组)、低剂量组(L 组),每组 6 只。N 组灌胃生理盐水,H 组、M 组、L 组分别按照每次 6.250 g/kg、3.125 g/kg、1.560 g/kg 剂量灌胃 1 mL、每天 2 次、连续 21 d。采取大鼠血清样本前禁食禁水 12 h,经麻醉后腹主动脉取血并分离血清。通过 GC-TOF-MS 检测各组大鼠血清中代谢产物的变化,采用多元分析 OPLS-DA 以及单变量统计学方法筛选其差异代谢物,再经过 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析。**结果** 与 N 组相比,H 组、M 组、L 组大鼠血清中显著改变的代谢小分子主要有胆固醇、胆酸、核糖、白皮杉醇、皮质醇、油酸、琥珀酸、亚麻酸、醋酸和丙酮醇等( $P < 0.05$ )。相关分析表明黄连解毒汤能显著影响机体的初级胆汁酸代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、 $\alpha$ -亚麻酸代谢、甘油磷脂代谢,且其发挥体内作用可能与摄入的剂量有关,为深入揭示黄连解毒汤促进胆汁酸代谢的作用机制提供一定参考。**结论** 黄连解毒汤能促进体内初级胆汁酸生成并增强胆汁酸代谢通路的作用。

**【关键词】** 血清代谢组学;黄连解毒汤;气相色谱-飞行时间质谱;胆汁酸代谢

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1278-09

## Study on the effect of Huanglian Jiedu Decoction on bile acid metabolism in SD rats based on serum metabolomics

YANG Guangyong, DU Haiyang, ZHANG Gengxin, SU Gang, TU Xiaohua, HE Guangzhi\*

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine School of Basic Medicine, Guiyang 550025, China)

Corresponding author: HE Guangzhi. E-mail: 39272454@qq.com

**【基金项目】** 国家自然科学基金地区科学基金项目(82060796),贵州省科学技术基金项目(黔科合基础[2020]1Y392),贵州省中医药管理局中医药民族医药科学技术研究课题(QZYY-2022-005),贵州省科技创新人才团队建设专项(黔科合平台人才[2020]5010),贵州省发展和改革委员会工程研究中心建设项目[黔发改高技(2020)896号]。

Funded by Regional Science Foundation Project of the National Natural Science Foundation of China (82060796), Guizhou Provincial Science and Technology Foundation Project (Qiankehe Foundation [2020] 1Y392), Guizhou Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Science and Technology Research Project for Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine (QZYY-2022-005), Guizhou Provincial Science and Technology Innovation Talent Team Construction Project (Qiankehe Platform Talent [2020] 5010), Construction Project of Engineering Research Center of Guizhou Development and Reform Commission [Qianfagai Gaoji (2020) 896]。

**【作者简介】** 杨光勇(1988—),男,实验师,硕士,研究方向:中西医结合学基础。Email:768305874@qq.com

**【通信作者】** 何光志(1977—),男,博士生导师,博士,教授,研究方向:实验动物,预防兽医学,中医学,中西医结合。

Email:39272454@qq.com



**[Abstract] Objective** To study the effect of Huanglian Jiedu Decoction (HLJD) on the physiological function of healthy SD rats through serum non-targeted metabolomics. **Methods** After 7 days of adaptive feeding, 24 rats were randomly divided into blank group (group N) and high-dose HLJD group (group H), medium-dose HLJD group (group M), and low-dose HLJD group (group L) with six rats per group. Group N was gavaged with physiological saline, group H, group M, and group L were gavaged with 6.250 g/kg, 3.125 g/kg, and 1.560 g/kg HLJD, respectively. Rats were gavaged with 1 mL twice per day for 21 d. Before collecting serum samples, fasting and water deprivation were performed for 12 h. After anesthesia, blood was collected from the abdominal aorta, and serum was separated. Changes in metabolic products in the serum were detected by Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC-TOF-MS). Multivariate analysis by Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) and univariate statistical method were used to screen differential metabolites, and then metabolic pathway analysis was conducted using the Metabo Analyst platform. **Results** Compared with the group N, metabolic small molecules were significantly altered in the serum of group H, group M, and group L, which mainly included cholesterol, cholic acid, ribose, paclitaxel, cortisol, oleic acid, succinic acid, linolenic acid, acetic acid, and acetone alcohol ( $P < 0.05$ ). Correlation analysis showed that HLJD significantly affected the metabolism of primary bile acids, alanine, aspartic acid, and glutamate in  $\alpha$ -linolenic acid and glycerol phospholipid metabolism, and its *in vivo* effects may be related to the intake dose, providing a reference to further reveal the mechanism of HLJD in promoting bile acid metabolism. **Conclusions** HLJD promotes the production of primary bile acids *in vivo* and enhances the effects of the bile acid metabolic pathway.

**[Keywords]** serum metabolomics; Huanglian Jiedu Decoction; GC-TOF-MS; bile acid metabolism

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

黄连解毒汤 (Huanglian Jiedu Decoction, HLJD) 由黄连、黄芩、黄柏、栀子四味中药组成,功效为清热燥湿、泻火解毒,用于病机为实热火毒、三焦热盛之证。中医基础理论中强调“异病同治”,故而黄连解毒汤在临床上广泛地用于实热火毒、三焦热盛之证的治疗,在现代医学的研究中常用于心脑血管病、糖尿病、阿尔茨海默病等疾病的研究。大量文献证实黄连解毒汤具有降糖、降脂、抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗内毒素、抗脑缺血及抗氧化等药理学作用<sup>[1-4]</sup>。在代谢组学的研究方面主要是从肠道菌群以及肠道内代谢产物、血清学代谢组学以及相关细胞因子检测等方面对其作用机制进行验证与论述。血清代谢组学是对血清成分中所包含的生物标志物的组成进行研究,从而发现这些标志物在健康与疾病中的重要意义。而胆汁酸是机体糖类、脂质和氨基酸这些能量代谢过程中能够共同影响到的物质,可调节这三大类物质在体内代谢过程中的相互转换。血清中总胆汁酸含量较低,检测方法以 LC-MS/MS 的灵敏度、精密度最高<sup>[5-6]</sup>,而血清代谢组学属于非靶向检测,通常检测不出明显的胆汁酸变化,但能检测出与胆汁酸代谢相关的其他物质,与粪便代谢组学结果结合综合分析,从而更加全面地发现胆汁酸代谢的作用机制。

本研究探讨方向为黄连解毒汤对健康大鼠血清代谢组的影响,实验中采用气相色谱-飞行时间质

谱 (gas chromatography tandem time-of flight mass spectrometry, GC-TOF-MS) 非靶向代谢组学技术进行检测,筛选并鉴定差异代谢物,发现黄连解毒汤可能干预与胆汁酸代谢相关的代谢通路,进而分析总结其在机体内影响胆汁酸调节的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 24 只,10 ~ 12 周龄,体重 200 g 左右,雌雄各半,购于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。饲养期间自由饮水,饲喂普通维持饲料由贵州中医药大学实验动物研究所提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定 40% ~ 70%,温度控制在 22 ~ 25℃,饲养于贵州中医药大学实验动物研究所【SYXK(黔)2021-0005】。所有操作均符合贵州中医药大学实验动物研究所实验伦理学要求 (IACUC 20210091)。

#### 1.1.2 药物

黄连、栀子、黄柏和黄芩 (购买于北京同仁堂贵阳分店)。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

L-2-氯苯丙氨酸 (批号 103616-89-3,上海恒柏生物科技)。气相色谱仪 (Agilent 7890A; Agilent 公司,美国);质谱仪 (PEGASUS HT, LECO; LECO 公

司,美国);色谱柱(DB-5 MS,30 m × 250 μm × 0.25 μm;Agilent 公司美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 黄连解毒汤的制备

取黄连 90 g、栀子 90 g、黄柏 60 g、黄芩 60 g,置于煎药锅内,加 10 倍量的纯水浸泡 1 h,加热沸腾后改中火煎煮 40 min,倒出药液,然后加 4 倍量的纯水中火煎煮 30 min,合并药液,最后分别浓缩至 0.63、0.31、0.16 g/mL(为生药量计算)即得黄连解毒汤,冷却分装后于 4℃ 冰箱保存备用。

### 1.2.2 动物分组及样本采集

SD 大鼠适应性喂养 7 d 后,随机分为 4 组:空白组(N 组)、HLJD 高剂量组(H 组)、中剂量组(M 组)、低剂量组(L 组),每组 6 只。H 组、M 组、L 组分别以 6.25、3.125、1.56 g/kg 的 HLJD 煎剂灌胃,每次 1 mL,每天 2 次,H 组、M 组、L 组每次灌胃量 0.63、0.31、0.16 g/mL,N 组灌胃生理盐水,各自连续给药 21 d。实验结束禁食不禁水 12 h 后,麻醉后,腹主动脉取血,室温静置 40 min,3500 r/min 离心 15 min,取上清即为血清。

### 1.2.3 代谢物萃取

在 1.5 mL 无菌无酶的 Ep 管中依次加入 50 μL 血清样本、200 μL 色谱级甲醇、5 μL L-2-氯苯丙氨酸(1.0 mg/mL),再依次进行如下操作:涡旋混匀 30 s,冰水浴中超声 10 min,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。质控(quality control, QC)样本由每个样本各取 40 μL 混合而成,移取 200 μL 上清液于 1.5 mL Ep 管中,在真空浓缩器中干燥提取物,再用 30 μL 甲氧胺盐试剂( $\text{CH}_3\text{ClNO}$  20 mg/mL,溶质  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ )溶解,轻轻混匀后在 80℃ 环境下孵育 0.5 h,而后向每个样品中加入 40 μL  $\text{C}_2\text{H}_2\text{F}_3\text{NO}$ (1%  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{ClSi}$ ),每组随机选取 6 个样本,进行上机检测<sup>[7]</sup>。

### 1.2.4 上机检测

进样量:1 μL;分流模式:Splitless Mode;隔垫吹扫流量 3 mL/min;载气氦气;柱流量 1 mL/min;柱箱升温程序:50℃ 保持 1 min,以 20℃/min 的速率升到 310℃,保持 6 min;前进样口温度 280℃;传输线温度 280℃;离子源温度 250℃;电离电压-70 eV;质量范围( $m/z$ ):50 ~ 500;扫描速率每秒 12.5 光谱;溶剂延迟 4.78 min。

### 1.2.5 数据处理

数据峰提取、基线校正、解卷积、峰积分、峰对齐等分析采用 Chroma TOF 软件(V 4.3X,LECO)进

行<sup>[8]</sup>。质谱、保留时间指数匹配等物质进行定性分析采用 LECO-Fiehn Rtx 5 数据库。数据降噪采用基于四分位数距对偏离值为主进行过滤,峰面积数据删除单组空值大于 50%的结果,缺失值用最小值的 1/2 填充,最后利用内标进行归一化处理<sup>[9]</sup>。

## 1.3 统计学分析

使用 SIMCA 15.2 软件对降噪后的数据进行正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least-squares-discriminant analysis, OPLS-DA),通过第一主成分的变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP)值找到两组差异的变量<sup>[10]</sup>。同时采用 Student's *T* 检验比较各组间差异的显著性,并计算差异倍数  $\log_2(\text{fold change})$ 。最后以  $\text{VIP} > 1$  和  $P < 0.05$  分别筛选出差异代谢物。对于筛选出来的代谢物导入 MetaboAnalyst 平台进行拓扑分析<sup>[11]</sup>,找到最相关代谢通路。

## 2 结果

### 2.1 原始数据的预处理

原始数据包含 6 个 QC 样本和 30 个实验样本,从中共提取到 586 个峰。

### 2.2 OPLS-DA 分析

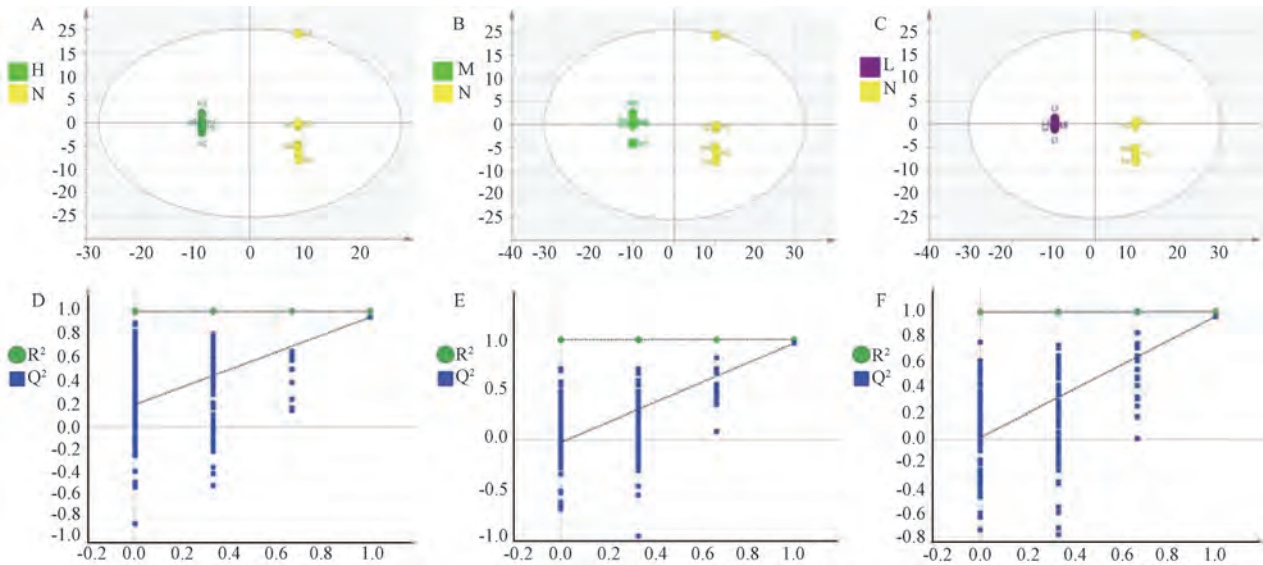
各组间样本区分显示,样本全部处于 95% 置信区间内。在置换检验中(200 次),与空白组比较,H 组  $R^2 = 0.693$ ,  $Q^2 = 0.95$ ;M 组  $R^2 = 0.652$ ,  $Q^2 = 0.964$ ;L 组  $R^2 = 0.654$ ,  $Q^2 = 0.963$ ,结果表明模型组间差异具有显著性(图 1)。

### 2.3 差异代谢物的筛选

OPLS-DA 分析各组大鼠肠道内容物,  $\text{VIP} > 1$  被认为是具有潜在差异的代谢物,组间样本 *t* 检验中,  $P < 0.05$  被认为是组间的差异代谢物,选用上述两种统计方法及阈值进行差异代谢物筛选提高数据可信度(见图 2,表 1)。从检测结果发现,H 组、M 组、L 组大同小异,3 组分别筛选出 16、27、25 种差异代谢物。

### 2.4 差异代谢物的代谢通路分析

通过 MetaboAnalyst 4.0 对差异代谢物进行通路分析(图 3);图中纵坐标轴为  $\lg p(-\log(P))$ ,来自通路富集分析,代表通路的显著性水平,  $P$  越小即  $\lg p$  越大,节点的颜色越深;横坐标轴为通路的影响值(Impact),来自通路拓扑分析,代表代谢通路的影响程度的重要性,Impact 值越大,节点半径越大。以  $\text{Impact} > 0.05$  为标准筛选主要代谢通路,即潜在的



注:A ~ C:分别为 H 组、M 组、L 组与 N 组分散点图;D ~ F:分别为 H 组、M 组、L 组与 N 组模型置换检验图。

图 1 各组 OPLS-DA 模型的分散点图及置换检验

Note. A ~ C. Scattered point plots for group H, group M, group L and group N. D ~ F. Permutation test graphs of group H, group M, group L and group N models respectively.

Figure 1 Scatter plot and permutation test of OPLS-DA model scores in each group

表 1 血清差异代谢物比较

Table 1 Comparison of serum metabolites

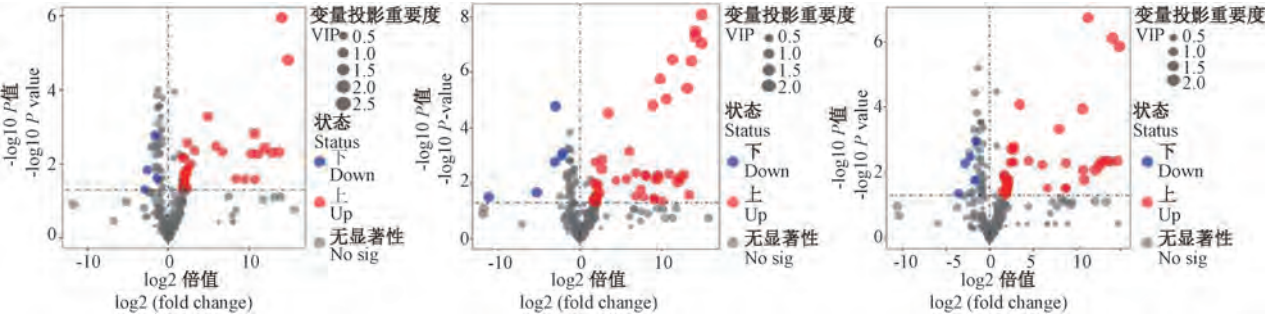
| 物质<br>Substance                                           | 保留时间 (min)<br>H 组/M 组/L 组<br>Retention time (min)<br>group H/group M/group L | P 值<br>P value       | 变量投影重要度<br>VIP | 趋势<br>Trend |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------|-------------|
| 2-酮-异戊酸 1<br>2-ketone isovalerate 1                       | -/5.75/5.75                                                                  | -/0.0362/0.0299      | -/1.40/1.48    | ↑           |
| 硫酸<br>Sulphuric acid                                      | -/6.15/-                                                                     | -/0.0048/-           | -/1.61/-       | ↑           |
| 琥珀酸半醛 2<br>Succinic semialdehyde 2                        | 6.29/6.29/6.29                                                               | 0.0333/0.0345/0.0263 | 1.98/1.72/1.81 | ↑           |
| 萘<br>Naphthalene                                          | 6.58/6.58/6.58                                                               | 0.0407/0.0472/0.0314 | 2.10/1.81/1.81 | ↑           |
| N-环己基甲酰胺 1<br>N-cyclohexylformamide 1                     | 7.04/7.04/7.04                                                               | 0.0417/0.0454/0.0317 | 2.22/1.92/2.03 | ↑           |
| 马来酸<br>Maleic acid                                        | -/-/7.14                                                                     | -/-/0.0011           | -/-/1.01       | ↓           |
| 1,4-环己二酮<br>1,4-cyclohexanedione                          | -/-/7.22                                                                     | -/-/0.0453           | -/-/1.67       | ↑           |
| 琥珀酸<br>Succinic acid                                      | -/7.24/-                                                                     | -/0.0008/-           | -/1.09/-       | ↓           |
| 双(2-羟丙基)胺<br>Bis (2-hydroxypropyl) amine                  | 7.3/7.3/7.3                                                                  | 0.0015/0.0422/0.0168 | 2.22/1.23/1.67 | ↑           |
| 胸腺嘧啶<br>Thymine                                           | 7.83/-/-                                                                     | 0.0027/-/-           | 1.58/-/-       | ↑           |
| 2-脱氧四烯酸<br>2-deoxytetraenoic acid                         | 8/8/8                                                                        | 0.0067/0.0098/0.0143 | 1.69/1.45/1.52 | ↑           |
| 苏糖<br>Suose                                               | -/-/8.02                                                                     | -/-/0.0434           | -/-/1.28       | ↓           |
| 4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮<br>4-hydroxy-6-methyl-2-neneneba pyranone | 8.46/8.46/8.46                                                               | 0.0001/0.0001/0.0001 | 2.56/2.21/2.34 | ↑           |



续表 1

| 物质<br>Substance                                            | 保留时间 (min)<br>H 组/M 组/L 组<br>Retention time (min)<br>group H/group M/group L | P 值<br>P value       | 变量投影重要度<br>VIP | 趋势<br>Trend |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------|-------------|
| 谷氨酰胺<br>Glutamine                                          | -/8.75/8.74                                                                  | -/0.0001/0.0044      | -/2.27/1.98    | ↑           |
| 苏木-β-羟天冬氨酸<br>Sumu-β-hydroxy aspartic acid                 | -/9.09/-                                                                     | -/0.0286/-           | -/1.23/-       | ↑           |
| β-谷氨酸<br>β-glutamate                                       | -/9.15/9.15                                                                  | -/0.0017/0.0053      | -/1.45/1.30    | ↓           |
| 洋地黄毒糖 1<br>Digitalis toxin 1                               | -/9.17/9.17                                                                  | -/0.0485/0.0392      | -/1.53/1.62    | ↑           |
| 核糖<br>Ribose                                               | 9.42/-/9.42                                                                  | 0.0054/-/0.0086      | 1.87/-/1.70    | ↑           |
| 丙酮醇<br>Acetone alcohol                                     | -/9.67/-                                                                     | -/0.005/-            | -/1.50/-       | ↑           |
| 丙酮 4<br>Acetone 4                                          | 9.67/-/-                                                                     | 0.0258/-/-           | 1.39/-/-       | ↑           |
| D-(甘油 1-磷酸)<br>D-(glycerol 1-phosphate)                    | 9.98/9.98/9.98                                                               | 0.121/0.0014/0.0019  | 1.45/1.62/1.69 | ↑           |
| 扁桃醇二环氧化物<br>Mandelic oxide                                 | -/-/11.04                                                                    | -/-/0.0175           | -/-/1.08       | ↓           |
| 鸟嘌呤<br>Guanine                                             | -/-/11.33                                                                    | -/-/0.0372           | -/-/1.34       | ↑           |
| 棕榈油酸<br>Palmitoleic acid                                   | 11.42/-/11.42                                                                | 0.0243/-/0.0034      | 1.03/-/1.04    | ↓           |
| 尿酸<br>Uric acid                                            | 11.72/11.72/-                                                                | 0.0016/0.001/-       | 1.14/1.31/-    | ↓           |
| D-葡萄糖庚糖<br>D-glucose heptose                               | -/12.00/11.97                                                                | -/0.0066/0.0061      | -/2.04/2.18    | ↑           |
| 植物醇<br>Plant alcohol                                       | 12.10/12.10/12.10                                                            | 0.0053/0.0001/0.0001 | 1.8/1.91/2.03  | ↑           |
| 油酸<br>Oleic acid                                           | -/12.32/-                                                                    | -/0.0394/-           | -/1.05/-       | ↑           |
| 亚麻酸<br>Linolenic acid                                      | 12.31/12.31/12.31                                                            | 0.0043/0.0001/0.0001 | 1.55/1.71/1.80 | ↑           |
| 胱氨酸<br>Cystine                                             | -/12.61/-                                                                    | -/0.0305/-           | -/1.07/-       | ↑           |
| 白皮杉醇<br>Piceatannol                                        | -/13.57/-                                                                    | -/0.0389/-           | -/1.15/-       | ↑           |
| 1-单棕榈精<br>1-monopalmitol                                   | -/13.85/-                                                                    | -/0.0069/-           | -/1.19/-       | ↑           |
| 2'-脱氧鸟苷<br>2'-deoxyguanosine                               | -/14.53/14.53                                                                | -/0.0064/0.03        | -/1.50/1.20    | ↑           |
| 4-雄甾烯-11β-醇-3,17-二酮<br>4-androstene-11β alcohol-3,17-dione | -/15.53/15.53                                                                | -/0.0147/0.005       | -/1.32/1.44    | ↑           |
| 二十六(烷)酸<br>Hexadecanoic acid                               | 15.80/15.80/15.80                                                            | 0.0005/0.0079/0.0044 | 1.73/1.02/1.51 | ↑           |
| 3,7,12-三羟基粪甾烷<br>3,7,12-trihydroxy coprostane              | 16.81/16.82/16.81                                                            | 0.0194/0.0368/0.0167 | 2.36/2.03/2.15 | ↑           |
| 胆固醇<br>Cholesterol                                         | 17.03/-/-                                                                    | 0.044/-/-            | 1.13/-/-       | ↑           |

注: ↑: 含量上升; ↓: 含量下降。  
Note. ↑. Content increases. ↓. Content decreases.



注:从左至右依次为 N 组与 H 组、N 组与 M 组、N 组与 L 组的对比结果。

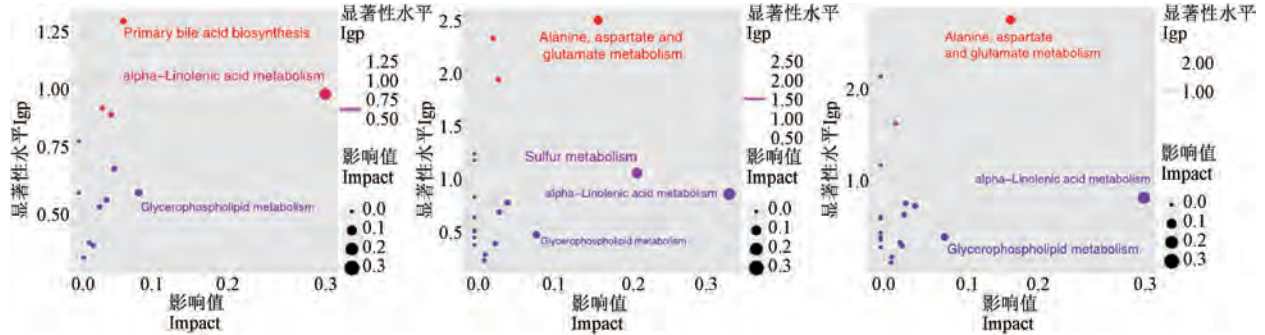
图 2 各剂量的 HLJD 与空白组差异代谢物的火山图

Note. Comparison results of group N and group H, group N and group M, group N and group L from left to right.

Figure 2 Volcanic map of different metabolites between HLJD and blank group

靶标代谢路径。与 N 组相比,H 组筛选得到潜在靶标代谢路径为:初级胆汁酸生物合成(primary bile acid biosynthesis)、甘油磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism)、 $\alpha$ -亚麻酸代谢(alpha-linolenic acid metabolism);M 组与正常组相比,筛选得到潜在靶标代谢路径为:甘油磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(alanine, aspartate and glutamate metabolism)、硫代谢(sulfur metabolism)、 $\alpha$ -亚麻酸

代谢(alpha-linolenic acid metabolism);L 组与正常组相比,筛选得到潜在靶标代谢路径为:甘油磷脂代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、 $\alpha$ -亚麻酸代谢。在结果中发现,H 组相较于 M 组和 L 组显示出高剂量 HLJD 才能让初级胆汁酸生物合成代谢路径产生强相关性,M 组和 L 组丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢路径相关性基本相同,H 组、M 组、L 组 3 个组对于  $\alpha$ -亚麻酸代谢和甘油磷脂代谢的相关性基本相同。



注:从左至右依次为 N 组与 H 组、N 组与 M 组、N 组与 L 组的对比结果。

图 3 差异代谢的代谢通路图

Note. Comparison results of group N and group H, group N and group M, group N and group L from left to right.

Figure 3 Metabolic pathway diagram of differential metabolism

3 讨论

肝细胞内由胆固醇合成初级胆汁酸后排泄到肠道中被肠道菌群代谢成次级胆汁酸参与机体多种正常生理机能活动,而进入血液中胆汁酸含量极低很难检测。胆汁酸的生成代谢可通过血清中代谢物进行综合分析来推断药物对胆汁酸代谢的作用机制,不过血清与粪便中的代谢物变化存在不一致,这需要进行一定的分析总结。

首先,经过代谢通路分析可知各剂量黄连解毒汤都可干预  $\alpha$ -亚麻酸代谢和甘油磷脂代谢。Bar 等<sup>[12]</sup>对人类血清代谢组研究发现肠道菌可独立于饮食因素来调控血清代谢物的生成,而高剂量黄连解毒汤促进了初级胆汁酸生成,却并未对丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢路径产生强相关作用。对比课题组前期实验中粪便代谢组学的检测结果发现,H 组、M 组、L 组都存在与硫代谢的强相关性,但关联性强弱与剂量成反比,H 组和 M 组都与类固醇

激素生物合成强相关,H 组和 M 组都与半乳糖代谢强相关,而 H 组还具有与淀粉和蔗糖代谢、脂肪酸生物合成的强相关性,M 组还有与三羧酸循环、二羧酸代谢、酪氨酸代谢、初级胆汁酸生成的强相关性<sup>[13]</sup>。因此,粪便代谢组学和血清代谢组学代谢通路预测结果中具有关联的主要是初级胆汁酸生成<sup>[14]</sup>,而丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢路径<sup>[15]</sup>、半乳糖代谢<sup>[16]</sup>、淀粉和蔗糖代谢<sup>[17]</sup>、脂肪酸生物合成<sup>[18]</sup>、三羧酸循环<sup>[19]</sup>、二羧酸代谢<sup>[20]</sup>、酪氨酸代谢<sup>[21]</sup>、硫代谢<sup>[22]</sup>都可以在生物体内的代谢相互转化关系中影响胆固醇的生成,进而影响初级胆汁酸的合成。

其次,对比前期实验粪便代谢产物结果发现<sup>[13]</sup>(表 2),胆固醇含量显著增加的情况分别是粪便样本 M 组及血清样本 H 组。胆固醇是初级胆汁酸生成的原料,与胆酸同是胆汁酸生成及代谢的重要部分,而胆酸是胆汁酸池的重要组成部分<sup>[23]</sup>,H 组粪

便样本中胆酸含量显著增加说明了体内胆汁酸生成量相应升高。此外,比较特别的是 2-酮-异戊酸 1 分别在粪便样本 H 组和血清样本 M 组、L 组中上升,α-酮异戊酸是一种由支链氨基酸缬氨酸不完全分解代谢产生的中间异常代谢产物,正常情况下缬氨酸应该代谢产生 α-酮戊二酸并参与三羧酸循环<sup>[24]</sup>,这也从另一方面说明了黄连解毒汤促进氨基酸代谢增强进而引起初级胆汁酸生成增加。硫酸在粪便样本中含量全部下降,而在血清样本中只有 M 组上升,硫酸还原和硫酸化是两条硫代谢的重要途径,而硫酸还原是多种菌群的主要能量来源,同时菌群又可以通过硫酸化将含硫废物转化为无害的硫酸盐,硫酸盐在激活和解毒异生物素、类固醇、神经递质和胆汁酸方面起着重要的生理作用,硫酸化的胆汁酸盐是胆汁酸池的重要组成部分<sup>[22,25]</sup>,粪便样本中硫酸含量降低而血清样本中含量升高说明硫酸还原和硫酸化途径增强。

表 2 血清与粪便差异代谢物中相同物质  
Table 2 Same substance in differential metabolites of serum and feces

| 物质<br>Substance                                  | 保留时间 (min)<br>H 组/M 组/L 组<br>Retention time (min)<br>group H/group M/group L | P 值<br>P value       | 变量投影重要度<br>VIP       | 趋势<br>Trend |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-------------|
| 2-酮-异戊酸 1<br>2-ketone isovalerate 1              | 7. 968/-/-                                                                   | 0. 002/-/-           | 1. 755/-/-           | ↑           |
| 硫酸<br>Sulphuric acid                             | 8. 863/8. 863/8. 863                                                         | 0. 017/0. 019/0. 014 | 1. 544/1. 387/2. 107 | ↓           |
| 马来酸<br>Maleic acid                               | -/14. 239/-                                                                  | -/0. 025/-           | -/1. 198/-           | ↑           |
| 2-脱氧四烯酸<br>2-deoxytetraenoic acid                | 12. 470/12. 470/12. 470                                                      | 0. 008/0. 007/0. 009 | 1. 313/1. 739/1. 383 | ↓           |
| 4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮<br>4-hydroxy-6-methyl-2-neneneba | 13. 373/-/-                                                                  | 0. 027/-/-           | 1. 50/-/-            | ↑           |
| 核糖<br>Ribose                                     | 15. 513/15. 513/-                                                            | 0. 004/0. 045/-      | 2. 374/2. 152/-      | ↑           |
| 胆酸<br>Cholic acid                                | 29. 526/-/-                                                                  | 0. 008/-/-           | 2. 094/-/-           | ↑           |
| 棕榈油酸<br>Palmitoleic acid                         | 19. 396/19. 181/-                                                            | 0. 020/0. 016/-      | 1. 538/1. 105/-      | ↓           |
| 胆固醇<br>Cholesterol                               | -/28. 569/-                                                                  | -/0. 046/-           | -/1. 303/-           | ↑           |

注: ↑: 含量上升; ↓: 含量下降。粪便差异物数据来源于已发表的前期研究<sup>[13]</sup>。  
Note. ↑. Content increases. ↓. Content decreases. The data is sourced from previously published research<sup>[13]</sup>.

胆汁酸代谢与糖尿病、肥胖、血脂异常、动脉粥样硬化等多种疾病相关,具有潜在治疗作用<sup>[26-27]</sup>。核糖在细胞内的遗传和能量结构上有着重要作用,比如,D-核糖是一种天然存在的 5-碳单糖,其五边形环结构(呋喃糖)是核酸(DNA 和 RNA)、辅酶(NADH、NADPH、FADH2 和乙酰辅酶 A)和能量分

子(ATP、GTP 等)结构的前体,在补充 D-核糖的心力衰竭动物模型研究中发现可以增强心肌缺血后的心肌代谢和性能<sup>[28]</sup>,本实验结果发现核糖在粪便和血清样本中的基本趋势都是上升,证明黄连解毒汤能够改善心脏功能。Bermúdez 等<sup>[29]</sup>研究发现血浆中游离棕榈油酸的高水平与糖尿病和肥胖相关,



可被视为非糖尿病患者胰岛素敏感性、 $\beta$  细胞功能和葡萄糖耐量的独立决定因素,且血浆中含棕榈油酸的磷脂水平与 HDL-胆固醇升高、LDL-胆固醇降低但三酰基甘油水平升高有关。本研究结果中大鼠血清和粪便样本棕榈油酸都下降,证明黄连解毒确有改善心血管及糖尿病相关疾病的作用。马来酸和苹果酸的区别在于苹果酸是饱和二羧酸而马来酸是不饱和二羧酸,是二羧酸代谢的产物,与延胡索酸互为顺反异构物,在三羧酸循环中可抑制酵素,有一定的毒性<sup>[30]</sup>,在粪便样本 M 组其含量上升,而血清样本 L 组则下降,说明黄连解毒汤能够清除一定的马来酸,促进三羧酸循环。2-脱氧四烯酸在粪便中全部检测出上升但在血清样本中则全部下降,4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮在血清样本中都上升,但在粪便样本中上升的只有 H 组,相关生物活性研究较少,目前在体内的作用还没有明确,但其在血清和粪便中显著相反的变化可作为潜在标志物。从以上对比结果可以发现,两种代谢组学中存在不一致的关联性,就如同 Deng 等<sup>[31]</sup>在进行粪便和血液代谢产物的比较肠道微生物群发现的与心脏代谢疾病的非一致关联类似,而出现这种情况的原因是黄连解毒汤剂量的不同导致对机体产生的效果不同。

在前期研究中发现提纯的黄连解毒汤比未提纯方剂对大鼠结肠内容物中胆汁酸生成的影响更大,这可能是因为提纯的黄连解毒汤中栀子苷含量丰富。王坤等<sup>[32]</sup>研究黄连解毒汤中促进胆汁酸生成的物质是栀子苷,但栀子苷有一定的肝毒性,过量使用栀子可诱导肝细胞的坏死与凋亡,而黄连解毒汤中其他成分可通过去除自由基酶的活性以及抑制炎症反应等作用缓解这种肝毒性。刘毓等<sup>[33]</sup>在使用栀子苷单体对大鼠血清及粪便胆汁酸的研究发现,基于大鼠 400 mg/kg 的栀子苷即可导致肝损伤,但对粪便和血清样本中同种胆汁酸的含量的影响却存在一定的差异,这与本研究结果相似,但是否只有栀子苷促进胆汁酸代谢及黄连解毒汤的保护机制还需要进一步研究。

综合以上结果分析得出结论,从血清代谢物中筛选出的潜在的差异代谢产物和靶标代谢途径分析研究发现,黄连解毒汤可通过正向调节血清中胆固醇、胆酸、核糖、白皮杉醇、皮质醇、亚麻酸和油酸等水平促进体内初级胆汁酸生成进而增强胆汁酸代谢通路。

## 参 考 文 献(References)

- [1] 刘保光, 谢苗, 董颖, 等. 黄连解毒汤作用机制研究进展 [J]. 中医学报, 2022, 37(9): 1861-1868.  
Liu BG, Xie M, Dong Y, et al. Research progress on mechanism of Huanglian Jiedu Decoction [J]. Acta Chin Med, 2022, 37(9): 1861-1868.
- [2] 赵莹, 黄晓巍, 唐秋竹, 等. 黄连解毒汤研究进展 [J]. 人参研究, 2022, 34(4): 40-44.  
Zhao Y, Huang XW, Tang QZ, et al. Research progress of Huanglian Jiedu Decoction [J]. Ginseng Res, 2022, 34(4): 40-44.
- [3] 董颖, 刘保光, 许二平. 黄连解毒汤抗炎作用与临床应用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 245-250.  
Dong Y, Liu BG, Xu EP. Anti-inflammatory effect of Huanglian jiedutang and clinical application: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(12): 245-250.
- [4] Yin B, Bi YM, Fan GJ, et al. Molecular mechanism of the effect of Huanglian Jiedu Decoction on type 2 diabetes mellitus based on network pharmacology and molecular docking [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 5273914.
- [5] 刘雅楠, 雷凯, 向东, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中 26 种胆汁酸 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1767-1774.  
Liu YN, Lei K, Xiang D, et al. HPLC-MS/MS simultaneous analysis of 26 bile acids in rat plasma [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(10): 1767-1774.
- [6] 王猛猛, 俞蕴莉, 屈昱晨, 等. LC-MS/MS 测定大鼠血清中 15 种胆汁酸成分 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1030-1034.  
Wang MM, Yu YL, Qu YC, et al. Determination of fifteen bile acids concentration in rats' serum by LC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(9): 1030-1034.
- [7] Li Q, Wang Y, Wu S, et al. CircACC1 regulates assembly and activation of AMPK complex under metabolic stress [J]. Cell Metab, 2019, 30(1): 157-173.
- [8] Kind T, Wohlgemuth G, Lee DY, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2009, 81(24): 10038-10048.
- [9] Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. Nat Protoc, 2011, 6(7): 1060-1083.
- [10] Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models [J]. Anal Chem, 2008, 80(1): 115-122.
- [11] Pang Z, Chong J, Li S, et al. MetaboAnalystR 3.0: toward an optimized workflow for global metabolomics [J]. Metabolites, 2020, 10(5): 186.
- [12] Bar N, Korem T, Weissbrod O, et al. A reference map of

- potential determinants for the human serum metabolome [J]. Nature, 2020, 588(7836): 135–140.
- [13] 杜海洋, 杨光勇, 张庚鑫, 等. 基于 GC-TOF-MS 代谢组学研究黄连解毒汤对大鼠粪便代谢的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(9): 3356–3364.
- Du HY, Yang GY, Zhang GX, et al. Effects of Huanglian Jiedu Decoction on fecal metabolism in rats based on GC-TOF-MS metabolomics [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2021, 23(9): 3356–3364.
- [14] Fiorucci S, Carino A, Baldoni M, et al. Bile acid signaling in inflammatory bowel diseases [J]. Dig Dis Sci, 2021, 66(3): 674–693.
- [15] Altiné-Samey R, Antier D, Mavel S, et al. The contributions of metabolomics in the discovery of new therapeutic targets in Alzheimer's disease [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2021, 35(3): 582–594.
- [16] Coelho AI, Berry GT, Rubio-Gozalbo ME. Galactose metabolism and health [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2015, 18(4): 422–427.
- [17] Ruan YL. Sucrose metabolism; gateway to diverse carbon use and sugar signaling [J]. Annu Rev Plant Biol, 2014, 65: 33–67.
- [18] Currie E, Schulze A, Zechner R, et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer [J]. Cell Metab, 2013, 18(2): 153–161.
- [19] Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 68(3): 475–478.
- [20] Ranea-Robles P, Houten SM. The biochemistry and physiology of long-chain dicarboxylic acid metabolism [J]. Biochem J, 2023, 480(9): 607–627.
- [21] Taddei ML, Pardella E, Pranzini E, et al. Role of tyrosine phosphorylation in modulating cancer cell metabolism [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1874(2): 188442.
- [22] 张宏, 李颖杰, 王文颖, 等. 微生物硫循环网络的研究进展 [J]. 微生物学报, 2021, 61(6): 1567–1581.
- Zhang H, Li YJ, Wang WY, et al. Research progress of the microbial sulfur-cycling network [J]. Acta Microbiol Sin, 2021, 61(6): 1567–1581.
- [23] Guzior DV, Quinn RA. Review: microbial transformations of human bile acids [J]. Microbiome, 2021, 9(1): 1–13.
- [24] Li R, Sakir HG, Li J, et al. Rational molecular engineering of l-amino acid deaminase for production of  $\alpha$ -ketoisovaleric acid from l-valine by *Escherichia coli* [J]. RSC Adv, 2017, 7(11): 6615–6621.
- [25] Sangaraju D, Shi Y, van Parys M, et al. Robust and comprehensive targeted metabolomics method for quantification of 50 different primary, secondary, and sulfated bile acids in multiple biological species (human, monkey, rabbit, dog, and rat) and matrices (plasma and urine) using liquid chromatography high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2021, 32(8): 2033–2049.
- [26] Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, et al. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease [J]. Gastroenterology, 2017, 152(7): 1679–1694.e3.
- [27] Guan B, Tong J, Hao H, et al. Bile acid coordinates microbiota homeostasis and systemic immunometabolism in cardiometabolic diseases [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(5): 2129–2149.
- [28] Krueger KJ, Rahman FK, Shen Q, et al. Mitochondrial bioenergetics and D-ribose in HFpEF: a brief narrative review [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(19): 1504.
- [29] Bermúdez MA, Pereira L, Fraile C, et al. Roles of palmitoleic acid and its positional isomers, hypogeic and sapienic acids, in inflammation, metabolic diseases and cancer [J]. Cells, 2022, 11(14): 2146.
- [30] Zager RA, Johnson AC, Naito M, et al. Maleate nephrotoxicity: mechanisms of injury and correlates with ischemic/hypoxic tubular cell death [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(1): F187–F197.
- [31] Deng K, Xu JJ, Shen L, et al. Comparison of fecal and blood metabolome reveals inconsistent associations of the gut microbiota with cardiometabolic diseases [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 571.
- [32] 王坤, 金若敏, 陈长勋. 栀子与黄连解毒汤肝毒性的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 2365–2369.
- Wang K, Jin RM, Chen CX. Comparative study on hepatic toxicity of Gardeniae Fructus and Huanglian Jiedu Decoction [J]. Chin J Chin Mater Med, 2013, 38(14): 2365–2369.
- [33] 刘毓, 张聪聪, 胡永红, 等. 栀子苷对大鼠肝损伤及血清、肝脏、粪便中胆汁酸的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 63–75.
- Liu Y, Zhang CC, Hu YH, et al. Effect of geniposide on liver injury and bile acid profile in serum, liver and excrement of rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(11): 63–75.

黄玉叶,蔡艳贞,蔡春梅,等. 强直性脊柱炎食蟹猴膝关节及肠道组织病理变化分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1287-1295.

Huang YY, Cai YZ, Cai CM, et al. Pathological changes in the knee joint and intestinal tissue in ankylosing spondylitis monkeys [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1287-1295.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.006

# 强直性脊柱炎食蟹猴膝关节及肠道组织病理变化分析

黄玉叶<sup>1</sup>,蔡艳贞<sup>1</sup>,蔡春梅<sup>1</sup>,祝合朋<sup>1</sup>,丁煌冠<sup>1</sup>,贾欢欢<sup>2</sup>,肖文德<sup>3</sup>,  
陈珺<sup>1</sup>,李文德<sup>2\*</sup>,卢丽<sup>1\*</sup>

(1. 广东药科大学,广州 511400;2. 广东省实验动物监测所(广东省实验动物重点实验室),  
广州 510663;3. 广州市第一人民医院,广州 510180)

**【摘要】 目的** 强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种免疫介导的累及中轴关节、周围关节和肠道的慢性疾病,但外周膝关节和肠道的病因病机未明。本研究旨在研究 AS 食蟹猴膝关节和肠道主要病理变化及机制。**方法** 通过组织形态学分析及免疫组化实验,研究 AS 外周膝关节及肠道组织的关键特征并初步分析其发病机制。**结果** AS 食蟹猴外周膝关节病理特征在早期主要表现为关节表面软骨侵蚀、软骨下骨暴露、关节表面呈锯齿状;晚期主要表现为软骨表层肥大软骨细胞异位增生,通过软骨成骨和纤维成骨形成骨赘,软骨基本丢失。软骨和血管中 MMP-3 的表达上调,引起软骨破坏并刺激血管增生。AS 食蟹猴小肠绒毛严重萎缩且隐窝增生明显,空肠和回肠的黏膜肠腺中可见大量  $\gamma\delta$ T 细胞。**结论** 本研究通过对 AS 食蟹猴膝关节和肠道的病理分析,获得了该自发模型膝关节与肠道组织的关键特征,并提出可能的发病机制。为探讨 AS 的骨骼病变与外周疾病间的潜在关联,以及 AS 的治疗提供新的见解。

**【关键词】** 强直性脊柱炎;食蟹猴;膝关节;基质金属酶 3

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1287-09

## Pathological changes in the knee joint and intestinal tissue in ankylosing spondylitis monkeys

HUANG Yuye<sup>1</sup>, CAI Yanzhen<sup>1</sup>, CAI Chunmei<sup>1</sup>, ZHU Hepeng<sup>1</sup>, DING Huangguan<sup>1</sup>, JIA Huanhuan<sup>2</sup>,  
XIAO Wende<sup>3</sup>, CHEN Jun<sup>1</sup>, LI Wende<sup>2\*</sup>, LU Li<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 511400, China. 2. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute (Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals), Guangzhou 510663.  
3. Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510180)

Corresponding author: LU Li. E-mail: 541608180@qq.com; LI Wende. E-mail: gdmcli@qq.com

**【基金项目】**2021 年国家重点研发计划(2021YFF0702605),广东省自然科学基金(2022A1515010014,2023A1515010470),2021 年广州市南沙区民生科技计划项目(2021MS002)。

Funded by the 2021 National Key R&D Program of China (2021YFF0702605), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2022A1515010014, 2023A1515010470), 2021 Nansha District, Guangzhou City, People's Livelihood Science and Technology Program Projects (2021MS002).

**【作者简介】**黄玉叶(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:药学研发与转化。Email: 1401905793@qq.com

**【通信作者】**李文德(1977—),男,博士,教授,研究方向:基础医学。Email: gdmcli@qq.com;

卢丽(1980—),女,博士,副教授,研究方向:生物医药。Email: 541608180@qq.com。

\* 共同通信作者



**【Abstract】 Objective** Ankylosing spondylitis (AS) is an immune-mediated chronic disease involving axial joints, peripheral joints, and intestines, but the etiology of peripheral knees and intestines is unknown. This study examined the main pathological changes and mechanisms of knee joints and intestines in cynomolgus monkeys with AS. **Methods** The main characteristics of peripheral knee joint and intestinal tissues of AS were examined and the possible pathogenesis was preliminarily analyzed by histomorphology and immunohistochemistry. **Results** The pathological characteristics of peripheral knee joints in AS cynomolgus monkeys were mainly cartilage erosion on the joint surface, exposed subchondral bone, and a jagged joint surface in the early stage. In the late stage, the knee joints mainly manifested as ectopic hyperplasia of cartilage superficial hypertrophy of chondrocytes, osteophytes formed through chondrogenesis and fibrogenesis, and loss of cartilage. MMP-3 expression in cartilage and blood vessels was upregulated, causing cartilage destruction and stimulating angiogenesis. AS cynomolgus monkeys had severe atrophy of small intestinal villi and obvious crypt hyperplasia, and a large number of  $\gamma\delta$ T cells was seen in the mucosal intestinal glands of the jejunum and ileum. **Conclusions** Pathological analysis of knee joints and intestines in AS cynomolgus monkeys revealed their main characteristics in this spontaneous model and suggested the possible pathogenesis. This study provides new insights into the potential link between autoimmunity in bone tissue and intestinal tissue lesions in AS.

**【Keywords】** ankylosing spondylitis; cynomolgus monkeys; knee joint; MMP-3

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)以中轴关节的疼痛、僵直为主要临床特征,包括骶髂关节和脊柱,也会累及外周关节,尤其是伴随出现的膝关节肿胀、疼痛。目前 AS 的病因病机尚未明确,除与已知的 HLA-B27 的相关性外,近年来基质金属酶(matrix metalloproteinase, MMP)参与 AS 发病的作用机理也逐渐引起关注<sup>[1]</sup>。有报道称,部分 AS 患者最先发病于外周关节,例如膝关节,逐渐累及髋关节,甚至几年后才出现脊柱的病变,年龄越小首发外周关节的概率越高。由于对 AS 外周关节病理变化及诊断方法的认识不足,临床上容易误诊为类风湿性关节炎和骨关节炎等,严重影响 AS 早期的诊断和治疗<sup>[2]</sup>。通过研究 AS 膝关节的病理变化及进程,有助于更好地认识 AS 在外周关节的发生发展,减少误诊漏诊的发生,并尽早治疗疾病,具有重要的临床实用价值及社会效益。

在 AS 患者中,炎症性肠病是常见的关节外表现,约 70% AS 患者存在肠道黏膜炎症,其中 5% 进展为临床炎症性肠病<sup>[3]</sup>,与之对应的是 10% ~ 20% 炎症性肠病患者同时患有 AS。这提示 AS 和炎症性肠病具有相似的遗传风险因素和病因,在临床遗传和免疫学方面都有重叠,AS 患者肠道炎症是否与脊柱发病相关也引起了关注。近年来对肠道微生物的多项研究表明肠道菌群失调与 AS 的发生、发展有着密切关联,然而,尚不清楚这种微生物失调是炎症的起因还是结果,而微生物失调是如何调节 AS 的免疫反应也有待研究,因此使肠道-脊柱关节炎成为研究的新兴领域<sup>[4]</sup>。目前许多学者认为,微生物

感染是脊柱关节病或 AS 疾病活动的诱发因素,也就是说,肠道可能是抗原暴露的第一个位置,随后是关节内致病机制的激活<sup>[5]</sup>。

构建疾病动物模型是研究疾病发生机理以及防治策略的基础,但对于病因不明的病种而言,缺乏病因相似的动物模型,是阻碍该病种基础研究发展的瓶颈。近年来对强直性脊柱炎病因病机的研究主要是在啮齿类动物模型上进行的,但与 AS 患者临床表现具有较大差异,在啮齿类动物模型获得的实验结果,很难真正“落地”到临床。本实验是在课题组已建立的自发性强直性脊柱炎食蟹猴模型上开展的,前期研究已明确了 AS 食蟹猴脊柱病程进展以及血液学、影像学及分子生物学方面的相关改变<sup>[6]</sup>,对该自发性疾病模型有夯实的研究背景数据。本文将探讨 AS 食蟹猴膝关节及肠道病因及病程中主要病理变化,有助于更好地认识 AS 在外周关节及肠道炎症的病程发展,为进一步阐明 AS 病程中复杂的网络调控机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

13 只普通级雌性食蟹猴,年龄( $15.22 \pm 3.00$ )岁,体重  $4.46 \pm 1.93$  kg 均购自广东春盛生物科技发展有限公司【SCXK(粤)2019-0027】。饲养条件:群居饲养于广东春盛生物研究院有限公司【SYXK(粤)2019-0152】,环境温度 18 ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 70%,定时定量饲养,自然采光。课题组前

期对 20 000 只食蟹猴的筛查过程中发现并确立一个自发性 AS 食蟹猴疾病模型种群,进一步对这些出现关节异常的食蟹猴进行了长达 3 年的追踪性检查,通过比对血液学指标检查、影像学(X 线、MRI 及 CT)检查、家族复发性分析、基因检测及病理学分析,最终建立了非人灵长类自发性 AS 实验动物种群的病理资料库,筛选并鉴定了 57 只自发性强直性脊柱炎食蟹猴模型(雄性 19 只,雌性 38 只),其发病率为 0.275%,与人相似<sup>[6]</sup>。在 57 只强直性脊柱炎食蟹猴中,外周关节炎发病率约为 45.61%,发病率与强直性脊柱炎患者外周关节发病率接近。基于实验动物研究的“3R”原则,本研究中各组实验动物的数量分别为:正常对照组 3 只、AS 早期组 3 只、AS 晚期组 7 只。所有操作均已通过广东省实验动物监测所 IACUC 的审查(IACUC2018002)。

### 1.1.2 主要试剂与仪器

MMP-3 一抗(武汉三鹰,中国)、H-41 一抗(Santa Cruz,美国)、兔/鼠通用型链霉亲和素-HRP(江苏康为世纪,中国)、透明质酸酶(源叶,中国);Mikasa HF400VA X 光机(Mikasa,日本)、石蜡包埋机(Leica,德国)、石蜡切片机(Leica,德国);病理组织漂烘仪(Histoline laboratory,米兰);倒置显微镜(Olympus,日本)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组

对食蟹猴进行体格检查,使用测角仪初步筛查自发性 AS 食蟹猴,评估动物脊柱曲率和膝关节和髋关节活动度(ROM),随后进行 X 线检查,判断标准与临床相同,本研究参照 1984 年美国纽约修订 X 线诊断分级标准进行分级(mNY):0 级:影像学检查无病变,骨骼结构正常;Ⅰ级:疑似骨关节硬化、糜烂;Ⅱ级:可见明显的硬化和侵蚀,有轻微异常,但关节间隙不是很明显;Ⅲ级:骨硬化和浸润明显,骨异常严重,关节间隙明显改变,部分强直改变;Ⅳ级:大部分脊柱出现强直性改变或完全强直,表现为严重的骨关节结构异常<sup>[7-8]</sup>。结合细胞因子检查和排除其他疾病影响,根据 mNY 分级系统进行双盲评分,按不同等级将食蟹猴分为两组,评分 0 级为正常组( $n = 3$ ),评分Ⅱ级为 AS 早期组( $n = 3$ )、评分Ⅲ级及以上为 AS 晚期组( $n = 7$ ),且本实验所用 AS 食蟹猴均伴发外周关节及肠道病变。

1.2.2 食蟹猴膝关节样本的取材固定、脱钙与包埋  
安乐死后,取食蟹猴膝关节放入 4%多聚甲醛

中常温固定 48 h 以上,固定完毕后流水冲洗 9 h 以上去除多余固定液后用 EDTA-2Na 脱钙直至组织变得柔软说明达到脱钙终点,进行常规脱水包埋,4℃保存备用。

### 1.2.3 食蟹猴肠道样本的取材固定与包埋

动物经安乐死后取出不同的肠段,包括小肠和大肠,将肠腔清洗干净后放入 4%多聚甲醛中常温固定 48 h 以上,固定完毕后流水冲洗 9 h 以上去除多余固定液后分装于包埋盒中,进行常规脱水包埋,4℃保存备用。

### 1.2.4 番红-固绿染色法(safranin O-fast green stain, SO)

切片常规脱蜡至水后,苏木素染色 1 min,流水清洗后 1%盐酸乙醇分化 15 s。0.05%固绿染色 5 min,1%乙酸酸化。蒸馏水清洗后,0.5%番红 O 染色液 2 min。脱水透明,封片。通风橱过夜后拿至显微镜下观察,根据需求,使用 Olympus 倒置显微镜在不同倍镜下进行拍摄,每张切片均观察了 5 个视野,并对软骨厚度和关节直径进行定量。

### 1.2.5 苏木精-伊红染色(HE 染色)

切片常规脱蜡至水后,苏木素染色 8 min,流水浸洗 1 min 后浸入 1%盐酸乙醇分化 3 ~ 8 s,肉眼观察组织为淡紫色即可,流水冲洗返蓝 10 min,再浸入水性伊红染色液染色 3 min。脱水透明,封片。通风橱过夜后拿至显微镜下观察,根据需求,使用 Olympus 倒置显微镜在不同倍镜下进行拍摄,每张切片均观察了 5 个视野。

### 1.2.6 食蟹猴小肠绒毛长度和隐窝深度的测量

使用 Olympus 倒置显微镜拍摄并测量从绒毛顶端至隐窝开口处的垂直距离为小肠绒毛长度,隐窝开口至隐窝基部的垂直距离为隐窝深度,每张切片均选取了 5 个视野。

### 1.2.7 免疫组织化学染色

经常规烤片、脱蜡获水流程后,采用酶修复法进行抗原修复,5%BSA 封闭,滴加 MMP-3(1:100)一抗,4℃湿盒孵育过夜后回收,PBS 清洗后滴加二抗,置于湿盒避光孵育 10 min,经 DAB 显色、苏木素复染后脱水、透明及封片,置于通风橱过夜后显微镜下观察。

## 1.3 统计学分析

运用 GraphPad Prism 6 软件对实验数据进行统计学比较分析。两组独立样本比较采用  $t$  检验, $P < 0.05$  认为是有统计学意义。



## 2 结果

### 2.1 外周膝关节 X 线及大体标本观察

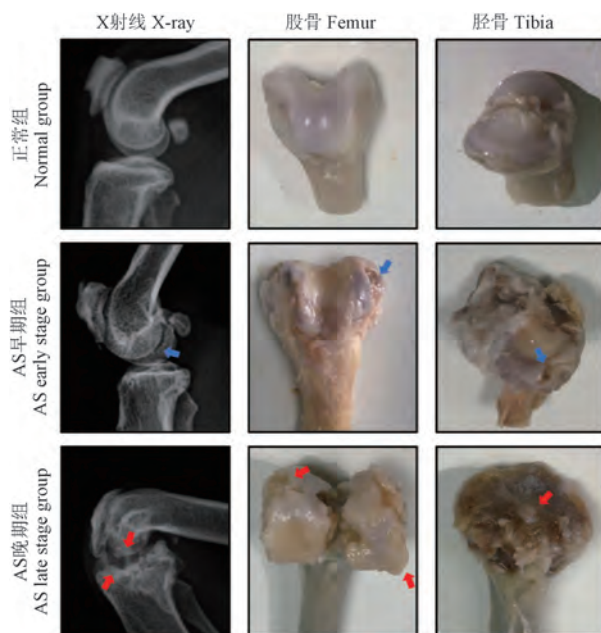
X 线检查发现,正常组食蟹猴关节表面完整,未见明显破损,AS 早期食蟹猴病变位置关节表面为锯齿状,软骨损伤(蓝色箭头指示),AS 晚期关节间隙变窄,软骨边缘骨赘生成明显(红色箭头指示)。由膝关节的大体外观可见,正常组食蟹猴股骨下段和胫骨上段关节软骨透明,关节面光滑有光泽,呈蓝白色,关节边缘整齐。AS 早期组食蟹猴股骨下段和胫骨上段软骨层变薄,表面粗糙,色泽暗淡,偶见软骨缺损溃疡面,暴露软骨下骨,弹性差。AS 晚期组食蟹猴股骨下段和胫骨上段周围骨赘明显,关节间隙狭窄,关节软骨层结构基本完全丢失(见图 1)。

### 2.2 外周膝关节的病理变化

关节软骨主要由软骨细胞、软骨基质及纤维构成的透明软骨。膝关节软骨主要分为透明软骨层、钙化软骨层及软骨下骨层。

#### 2.2.1 股骨下端病理变化

食蟹猴股骨下段 HE 染色发现,正常组股骨软骨表面光滑平整,软骨下骨未见增生血管(图 2A, 2B)。AS 食蟹猴软骨基质随病情加重逐渐剥落,软骨层变薄变性,表面纤维增生,可明显观察到成骨(图 2C, 2D, 2E),随着病情加重可观察到异位肥大软骨细胞向软骨下骨层方向进展(图 2G, 2H),大面



注:蓝色箭头:软骨破损位置;红色箭头:骨赘形成位置。

图 1 AS 食蟹猴膝关节 X 线及标本外观

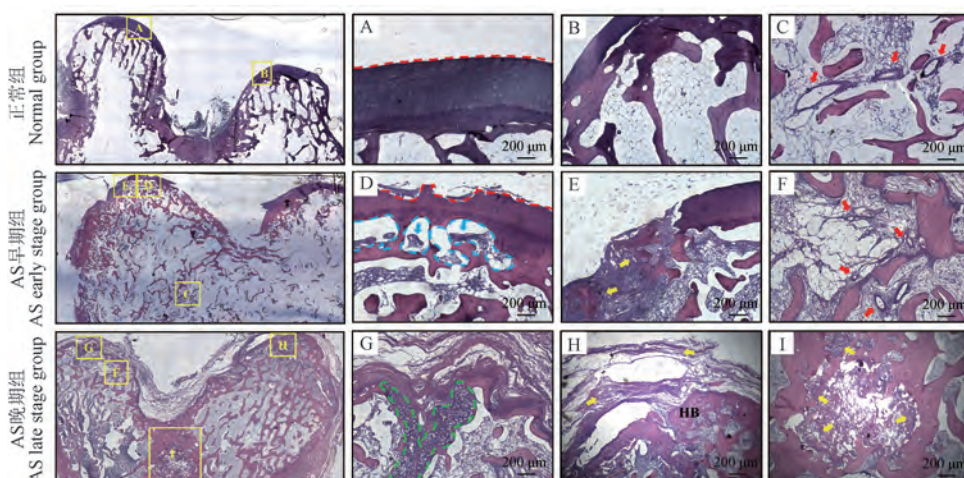
Note. Blue arrow. Location of cartilage breakage. Red arrow. Location of bone fragment formation.

Figure 1 AS cynomolgus monkey knee joint X-ray and specimen appearance

积的纤维成骨导致松质骨增多,并在钙化软骨层附近发现密集分布的血管(图 2F, 2I)。

#### 2.2.2 胫骨上段病理变化

食蟹猴胫骨上段 HE 染色发现,正常组胫骨上



注:HB:异位骨;红色虚线:透明软骨边界;蓝色虚线:软骨侵蚀空洞;绿色虚线:异位肥大软骨团;红色箭头:血管;蓝色箭头:炎症细胞和骨髓样细胞;黄色箭头:纤维成骨。

图 2 AS 食蟹猴股骨下段病理进展(HE 染色)( $n = 3$ )

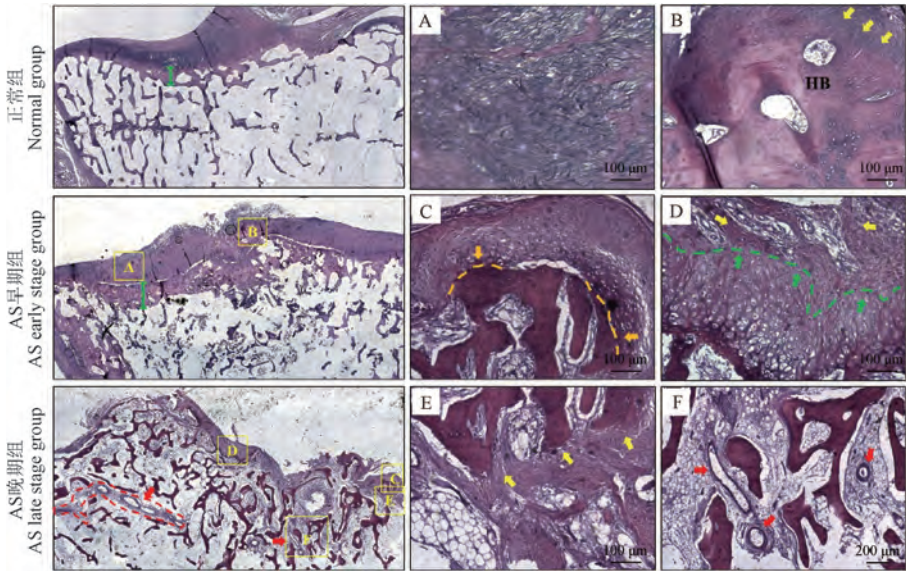
Note. HB. Heterotopic bone. Red dashed line. Hyaline cartilage border. Blue dashed line. Cartilage erosion cavity. Green dashed line. Ectopic hypertrophic cartilage mass. Red arrow. Blood vessel. Blue arrow. Inflammatory cells and bone marrow-like cells. Yellow arrow. Fibro-osteogenesis.

Figure 2 Pathological progression of the lower femur in AS cynomolgus monkeys (HE staining) ( $n = 3$ )



段软骨表面完整,AS 食蟹猴组透明软骨层纤维素乱甚至中断,异常增生,软骨内部可观察到纤维成骨(图 3A,3B),钙化软骨层厚度明显增加,随着病情

发展,可观察到异位肥大软骨细胞向成骨方向发展以及向纤维化方向分化(图 3C,3D),以及分布密集的血管(图 3E,3F)。



注:HB:异位骨;绿色线段:钙化软骨层;橘色虚线:肥大软骨细胞与新生骨的边界;绿色虚线:肥大软骨细胞与纤维细胞的边界;红色虚线:新生血管网络;黄色箭头:纤维成骨;红色箭头:血管。

图 3 AS 食蟹猴胫骨上段病理进展(HE 染色)(n = 3)

Note. HB. Heterotopic bone. Green line segment. Calcified cartilage layer. Orange dashed line. Border between mast chondrocytes and new bone. Green dashed line. Border between mast chondrocytes and fibroblasts. Red dashed line. Neovascular network. Yellow arrow. Fibro-osteogenesis. Red arrow. Blood vessels.

Figure 3 Pathological progression of the upper tibia of the AS cynomolgus monkey (HE staining) (n = 3)

2.3 股骨下段表面软骨厚度及直径的变化

为了更好地观察与评估关节表面软骨层的变化,对食蟹猴股骨下段进行 SO 染色。结果如图 4 所示,正常对照组软骨细胞排列有序,软骨基质层呈明显桔红色;AS 组软骨基质丢失,蛋白多糖含量减少,软骨内成骨明显,纤维增生明显,以炎性肉芽组织为主要特征(图 4A),在软骨下骨区域可见纵向发展的大面积肥大软骨细胞,往成骨方向进展活跃(图 4B)。随着病程发展,AS 晚期动物股骨下段软骨层完全被破坏,取而代之的是表面增生的纤维组织。图 4C 为表面软骨厚度及直径的测量结果,AS 组股骨下段表面软骨层的厚度显著下降;关节直径有逐渐上升趋势,但无显著性差异,提示 AS 食蟹猴膝关节软骨面被破坏的主要原因是软骨内骨化及纤维增生。

2.4 股骨下段 MMP-3 的表达变化

食蟹猴股骨下段 MMP-3 的 IHC 染色如图 5 所示,正常组表面软骨细胞染色呈现弱阳性;生长板也观察到阳性染色,血管平滑肌细胞染色为阴性。

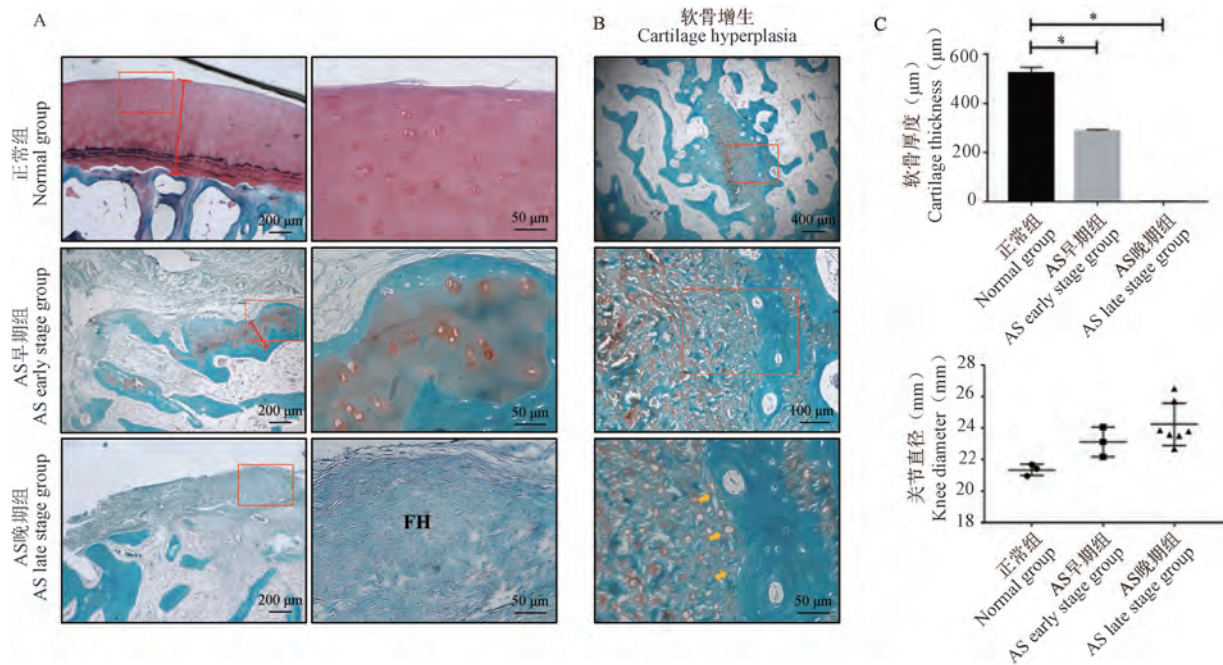
与正常组相比,AS 组软骨表面和生长板中 MMP-3 的表达明显增强,软骨表面可见排列紊乱的阳性软骨细胞和异位肥大软骨细胞团;软骨表面纤维增生处血管中也检测到较高的 MMP-3。

2.5 外周肠道的组织学特征

食蟹猴外周小肠样本的 HE 染色发现,小肠绒毛出现严重绒毛萎缩、增粗,同时隐窝增生明显。与正常组相比,AS 组十二指肠、空肠、回肠的绒毛长度显著变短,隐窝深度显著增大(见图 6),与目前临床上 AS 患者的病理特征一致<sup>[9]</sup>。

2.6 肠道 γδT 细胞数量的变化

γδT 细胞的免疫组织化学染色发现,与对照组相比,AS 组肠道粘膜肠腺处可观察到大量的 γδT 细胞。γδT 细胞可参与 IL-17 介导的免疫反应。实验结果表明,AS 组只有空肠和回肠可见 γδT 细胞阳性染色,结肠和盲肠中并未见(见图 7)。这提示浸润在空肠和回肠处的 γδT 细胞可能透过受损的肠黏膜屏障和肠血管屏障,通过血液运输或直接转移到脊柱,引起脊柱局部的炎症<sup>[10]</sup>。

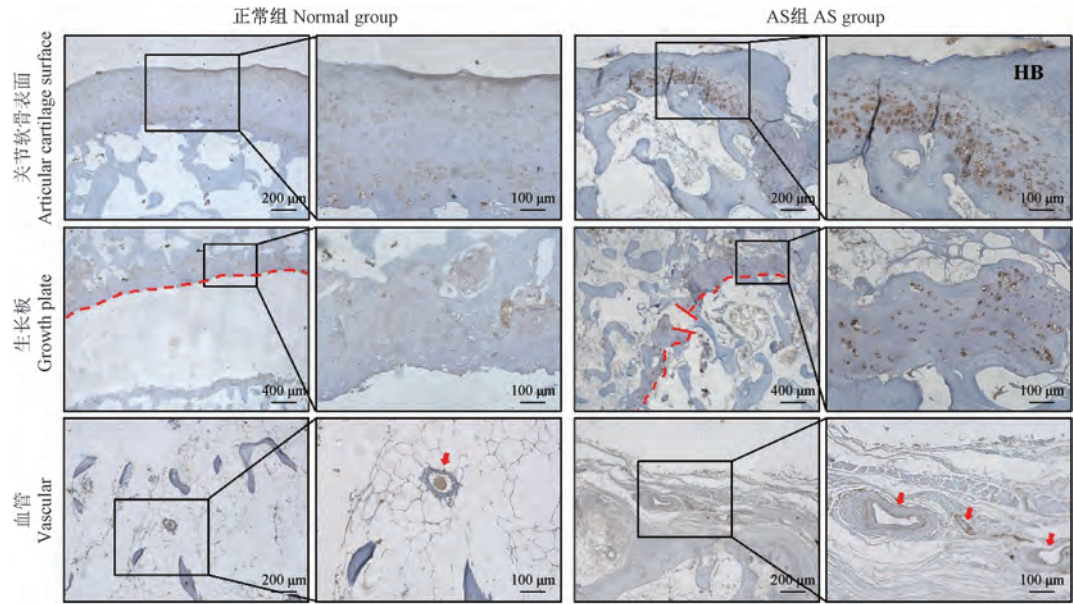


注: FH: 纤维增生; 黄色箭头: 纤维成骨; 红色线段: 股骨表面软骨的厚度; 软骨厚度在 × 40 视野下进行测量, 关节直径采用游标卡尺测量; 与正常组相比, \*  $P < 0.05$ 。(下图同)

图 4 AS 食蟹猴股骨下段表面软骨厚度及直径的变化(SO 染色) ( $n = 3$ )

Note. FH. Fibrous hyperplasia. Yellow arrow. Fibrous osteogenesis. Red line segment. Thickness of cartilage on the surface of the femur. Cartilage thickness was measured in × 40 field of view and joint diameter was measured using vernier calipers. Compared with normal group, \*  $P < 0.05$ . (The same in the following figures)

Figure 4 Variation in cartilage thickness and diameter on the surface of the lower femur in AS cynomolgus monkeys (SO staining) ( $n = 3$ )



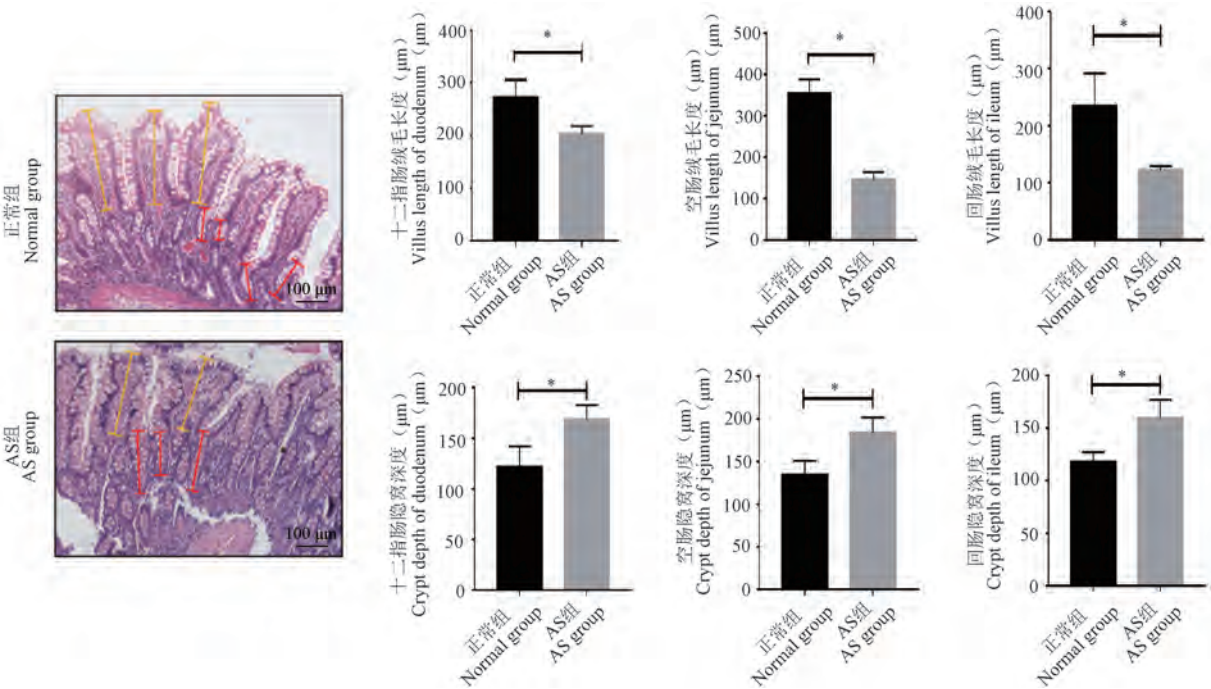
注: HB: Heterotopic bone 异位骨; 红色虚线: 生长板边界; 红色箭头: 血管。

图 5 AS 食蟹猴股骨下段 MMP-3 的表达(IHC 染色) ( $n = 3$ )

Note. HB. Heterotopic bone ectopic bone. Red dashed line. Growth plate boundary. Red arrow. Blood vessels.

Figure 5 Expression of MMP-3 in the lower femur of AS cynomolgus monkeys (IHC staining) ( $n = 3$ )





注:橘色:绒毛长度;红色:隐窝深度。

图6 AS食蟹猴小肠绒毛和隐窝的测量(HE染色)(n=3)

Note. Orange. Villi length. Red. Crypt depth.

Figure 6 Measurement of small intestinal villi and crypt foci in AS cynomolgus monkeys (HE staining)(n=3)

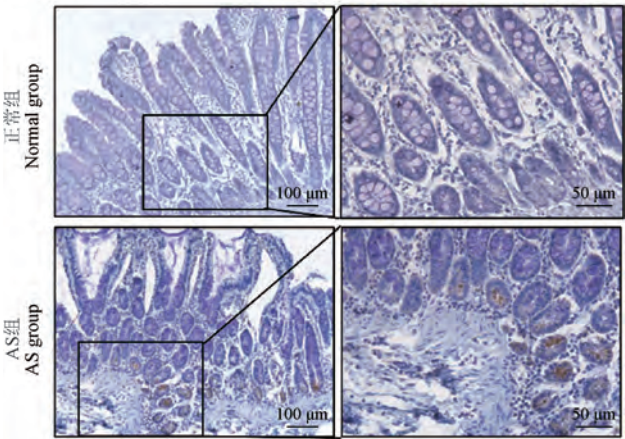


图7 AS食蟹猴肠道γδT细胞的IHC染色(n=3)

Figure 7 IHC staining of intestinal γδT cells in AS cynomolgus monkeys(n=3)

3 讨论

AS发病隐匿,部分首发于外周关节,而在目前的啮齿类AS模型中对外周关节的研究还较少,并且肠道免疫细胞浸润与AS的发生、发展有着密切的关联。本研究以AS食蟹猴膝关节和肠道样本为对象,探讨了外周膝关节病理进展及肠道炎症可能的发生机制。

本研究基于影像学 and 膝关节大体外观的检查结果,可以初步确定早期膝关节的病变主要以软骨表面破损为主,晚期病变主要以软骨表面的骨形成为主。通过对膝关节股骨下段和胫骨上段形态学的分析发现,随着AS病程进展,膝关节从软骨表面轻微纤维化、软骨破损及成骨进一步发展为软骨退化,表面纤维成骨,异位肥大软骨成骨,炎症细胞侵袭以及血管增生。经组织学测量结果表明,AS组食蟹猴股骨下段肿大,表面软骨厚度显著下降。IHC结果显示,AS组股骨下段MMP-3表达上调,这提示滑膜增生以及软骨侵蚀和破坏是由于AS食蟹猴中MMP-3的表达上调导致的。这与AS患者脊柱中MMP3表达增强的结果一致<sup>[11]</sup>。MMPs则是一组具有许多共同生化性质的可降解细胞外基质酶,能降解细胞外基质的多种成分,包括蛋白多糖和糖蛋白。据报道,AS关节滑液中MMP-3水平升高,其血清水平与AS疾病活动指数BASDAI及AS疾病功能指数BASFI呈正相关;而血清MMP-3水平无论在临床患者治疗前后MMP-3的表达水平与ESR和CRP有很好的相关性,体现了MMP-3与AS患者疾病的活动性密切相关。因此,MMP-3可能是AS的潜在诊断生物标志物,甚至可以作为AS患者结构损伤进展的独立预测因子<sup>[7,12-16]</sup>。本研究从成骨相



关研究 AS 外周膝关节,增强了炎症和骨进展之间的潜在联系,为日后治疗外周关节疾病提供新的参考方向。

T 细胞抗原受体 (TCR) 有  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  四种肽链。根据 TCR 异二聚体的不同组成,可将其分为 TCR  $\alpha\beta$  和 TCR  $\gamma\delta$  两种类型,特性和功能各不相同。其中 TCR  $\gamma\delta$  细胞主要分布在黏膜和上皮组织中,而在人外周血中仅占 T 细胞总数的 1% ~ 5%,具有抗感染、识别和杀伤靶细胞的功能,又可被其识别的抗原激活,产生分泌 IL-2、3、4、5、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  等多种细胞因子参与免疫调节,介导炎症反应,增强机体早期非特异性免疫防御功能,在研究一些慢性疾病的机制中受到关注。本研究中,主要关注  $\gamma\delta$ T 细胞在患病动物中肠道组织的作用。研究表明,IL-23 受体基因 (IL-23R) 与 AS 的遗传多态性有关<sup>[17]</sup>。AS 患者外周血中表达 IL-23R 的  $\gamma\delta$ T 细胞数量比正常人高出 3 ~ 5 倍,AS 患者通过 IL-23R 刺激  $\gamma\delta$ T 细胞产生 IL-17,表现出 Th17 样免疫反应。 $\gamma\delta$ T 细胞数量在患有回肠炎的 SpA 患者的上皮和黏膜,以及在 SpA 患者的炎症关节中升高,这表明  $\gamma\delta$ T 细胞可能在 AS 的发病机制中有着重要的作用<sup>[10,18-19]</sup>。因此,本研究通过检测肠道中  $\gamma\delta$ T 细胞的数量,显示 AS 食蟹猴空肠和回肠与炎症相关的  $\gamma\delta$ T 细胞数量增多,基于肠道组织学检查表明 AS 小肠均有一定程度的绒毛萎缩和隐窝增生。本研究结果增加了 AS“肠漏发病假说”的佐证证据<sup>[20]</sup>,即引发 AS 的抗原或炎症细胞可能由于“肠漏”机制由肠道迁移至脊柱等患病部位,AS 患者中肠道来源的抗原呈递细胞可能在驱动 AS 患者的全身炎症中起核心作用。而  $\gamma\delta$ T 在肠道组织中所扮演的角色是作为抗原呈递细胞介导了炎症反应,还是在肠道组织中作为效应细胞,直接识别和杀伤靶细胞则有待进一步实验探讨。

肠道炎症的发生是由于肠道免疫系统失去对正常菌群某些抗原的耐受而引起的,可以通过淋巴系统扩散到骶髂关节和进入体循环而引起系统性症状,如周围关节、肌腱等的强直性改变。已有研究表明,约有 70% 的强直性脊柱炎患者患有肠道炎症疾病,其中有 57% ~ 70% 会发展为外周关节炎<sup>[21]</sup>,并且,肠道病变与 AS 的病情及预后相关,肠道炎症症状重的患者其关节炎症状也较重,治疗肠道疾病也可以间接缓解关节病变<sup>[22]</sup>。这说明在强直性脊柱炎病程发展中,外周关节的病变与肠道炎

症的发展密不可分。据文献报道,20% ~ 45% 的 AS 患者首先有外周关节病变,数年后才出现腰背痛。外周关节肿、痛常较明显,以膝关节及踝关节受累居多,肩、肘及手、足小关节偶有受累。

将外周膝关节发病及肠道炎症与 AS 关联起来的历史由来已久,三者在遗传背景、发病机制及治疗药物上均有较大的重叠部分,然而,在外周膝关节及肠道炎症的发病机制研究上仍存在局限性,因此,本研究通过对 AS 食蟹猴的外周组织进行病理组织研究,发现 AS 食蟹猴膝关节病变主要是 MMP-3 上调所致,肠道病变特征以  $\gamma\delta$ T 细胞上调为主,而在其他啮齿类动物 AS 模型上仍以肠道菌群研究为主<sup>[23]</sup>,对肠道  $\gamma\delta$ T 细胞的研究甚少,综合对 AS 食蟹猴肠道菌群变化的研究,发现本研究所用的自发性食蟹猴 AS 模型与临床上患者具有更高的相似性<sup>[9]</sup>,对日后研究 AS 治疗能提供新的实验基础和研究方向。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] 王巧宏, 张松照, 薛静, 等. 基质金属蛋白酶-3 在评价 Etanercept 治疗强直性脊柱炎疗效中的价值 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2010, 39(4): 409-414.  
Wang QH, Zhang SZ, Xue J, et al. Serum metalloproteinase-3 levels in assessing efficacy of Etanercept in patients with ankylosing spondylitis [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2010, 39(4): 409-414.
- [2] 赵治友, 郭亚军. 以外周关节疼痛为首表现的强直性脊柱炎临床诊断回顾研究 [J]. 临床军医杂志, 2010, 38(6): 1042-1043.  
Zhao ZY, Wu YJ. Retrospective study on clinical diagnosis of ankylosing spondylitis with peripheral joint pain as the first manifestation [J]. Clin J Med Off, 2010, 38(6): 1042-1043.
- [3] Costello ME, Ciccio F, Willner D, et al. Brief report: intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis [J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(3): 686-691.
- [4] Martín-Esteban A, Sanz-Bravo A, Guasp P, et al. Separate effects of the ankylosing spondylitis associated ERAP1 and ERAP2 aminopeptidases determine the influence of their combined phenotype on the HLA-B \* 27 peptidome [J]. J Autoimmun, 2017, 79: 28-38.
- [5] Ranganathan V, Gracey E, Brown MA, et al. Pathogenesis of ankylosing spondylitis-recent advances and future directions [J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13(6): 359-367.
- [6] Jia H, Chen M, Cai Y, et al. A new and spontaneous animal model for ankylosing spondylitis is found in cynomolgus monkeys [J]. Arthritis Res Ther, 2022, 24(1): 1.
- [7] Raychaudhuri SP, Deodhar A. The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis [J]. J Autoimmun, 2014, 48-49: 128-133.

[ 8 ] Norkin C, White D. Measurement of joint motion: a guide to goniometry, 4th ed. [ M ]. Philadelphia; PA: F. A. Davis Company; 2009.

[ 9 ] Toğrol RE, Nalbant S, Solmazgöl E, et al. The significance of coeliac disease antibodies in patients with ankylosing spondylitis: a case-controlled study [ J ]. J Int Med Res, 2009, 37(1): 220–226.

[ 10 ] Cuvelier CA, De Wever N, Mielants H, et al. Expression of T cell receptors alpha beta and gamma delta in the ileal mucosa of patients with Crohn’s disease and with spondylarthropathy [ J ]. Clin Exp Immunol, 1992, 90(2): 275–279.

[ 11 ] Zhang Y, Xu H, Hu X, et al. Histopathological changes in supraspinous ligaments, ligamentum flava and paraspinal muscle tissues of patients with ankylosing spondylitis [ J ]. Int J Rheum Dis. 2016, 19(4): 420–429.

[ 12 ] 杜琳, 高延征. 强直性脊柱炎诊断及治疗新进展 [ J ]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(7): 629–631.

Du L, Gao YZ. New progress in the diagnosis and treatment of ankylosing spondylitis [ J ]. J Chin Pract Diagn Ther, 2019, 33(7): 629–631.

[ 13 ] Lee JH, Jung JH, Kim J, et al. Proteomic analysis of human synovial fluid reveals potential diagnostic biomarkers for ankylosing spondylitis [ J ]. Clin Proteomics, 2020, 17: 20.

[ 14 ] Zhu Y, Li S, Huang Z, et al. Association study between matrix metalloproteinase-3 gene (*MMP3*) polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility [ J ]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(7): e00752.

[ 15 ] Mou YK, Zhang PP, Li QX, et al. Changes of serum levels of MMP-3, sRANKL, and OPG in juvenile-onset ankylosing spondylitis patients carrying different HLA-B27 subtypes [ J ]. Clin Rheumatol, 2015, 34(6): 1085–1089.

[ 16 ] Maksymowych WP, Landewé R, Conner-Spady B, et al. Serum matrix metalloproteinase 3 is an independent predictor of structural damage progression in patients with ankylosing spondylitis [ J ]. Arthritis Rheum, 2007, 56(6): 1846–1853.

[ 17 ] di Meglio P, di Cesare A, Laggner U, et al. The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans [ J ]. PLoS One, 2011, 6(2): e17160.

[ 18 ] Jansen DT, Hameetman M, van Bergen J, et al. IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells are increased in early, active axial spondyloarthritis including patients without imaging abnormalities [ J ]. Rheumatology, 2015, 54(4): 728–735.

[ 19 ] Kenna TJ, Davidson SI, Duan R, et al. Enrichment of circulating interleukin-17-secreting interleukin-23 receptor-positive  $\gamma/\delta$  T cells in patients with active ankylosing spondylitis [ J ]. Arthritis Rheum, 2012, 64(5): 1420–1429.

[ 20 ] Wright PB, McEntegart A, McCarey D, et al. Ankylosing spondylitis patients display altered dendritic cell and T cell populations that implicate pathogenic roles for the IL-23 cytokine axis and intestinal inflammation [ J ]. Rheumatology, 2016, 55(1): 120–132.

[ 21 ] Mielants H, Veys EM, Cuvelier C, et al. Ileocolonosopic findings in seronegative spondylarthropathies [ J ]. Br J Rheumatol, 1988, 27(2): 95–105.

[ 22 ] El Maghraoui A. Extra-articular manifestations of ankylosing spondylitis: prevalence, characteristics and therapeutic implications [ J ]. Eur J Intern Med, 2011, 22(6): 554–560.

[ 23 ] Shen J, Yang L, You K, et al. Indole-3-acetic acid alters intestinal microbiota and alleviates ankylosing spondylitis in mice [ J ]. Front Immunol, 2022, 13: 762580.

[ 收稿日期 ] 2023-04-13

程怡怡, 赵伟伟, 宋振峰, 等. 胶原蛋白肽联合海藻酸钠通过下调 NLRP3 炎症小体表达改善小鼠宫腔粘连 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1296-1303.

Cheng YY, Zhao WW, Song ZF, et al. Collagen peptide combined with sodium alginate improve intrauterine adhesions in mice by downregulating expression of NLRP3 inflammasome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1296-1303.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.007

# 胶原蛋白肽联合海藻酸钠通过下调 NLRP3 炎症小体表达改善 小鼠宫腔粘连

程怡怡<sup>1,2</sup>, 赵伟伟<sup>2</sup>, 宋振峰<sup>2</sup>, 童福雯<sup>2,3</sup>, 刘刚<sup>4</sup>, 张花<sup>1</sup>, 施磊磊<sup>5</sup>,  
郭志坤<sup>4</sup>, 王现伟<sup>1,2,4</sup>, 潘莹<sup>1\*</sup>, 孙永琨<sup>1,2,4\*</sup>

(1. 新乡医学院第三附属医院, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003;  
3. 新乡医学院三全学院, 河南 新乡 453003; 4. 河南省医用组织再生重点实验室, 河南 新乡 453003;  
5. 南通业盟新材料股份有限公司, 江苏 南通 226000)

**【摘要】 目的** 探讨胶原蛋白肽(collagen peptide, CP)联合海藻酸钠(sodium alginate, SA)对子宫内膜损伤的修复作用及机制。**方法** 将 48 只 SPF 级雌性 C57BL/6N 小鼠随机分为假手术组、模型组和治疗组, 每组各 16 只。模型组采用微创法经小鼠子宫颈向宫腔注射 95%乙醇造成子宫内膜损伤, 制备小鼠宫腔粘连模型; 假手术组向宫腔注射 0.9%生理盐水; 治疗组向宫腔注射 95%乙醇后给予宫腔注射 CP + SA 混合液。于造模 7 d 后每组分别取 8 只小鼠采集样本用于各项检测。HE 染色观察小鼠子宫组织病理形态学变化; 改良 Masson 三色染色观察子宫内  
膜纤维化情况; Western Blot 检测子宫组织中炎症因子 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白表达水平; ELISA 检测小鼠血清中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的表达。各组剩余的 8 只小鼠按照雄雌比例为 1:2 合笼, 记录各组小鼠妊娠数量, 于妊娠第 14 天处死妊娠小鼠, 记录胚胎数量。**结果** (1)与假手术组相比, 模型组小鼠子宫内膜厚度变薄, 子宫内  
膜纤维化增加, 并有炎症细胞浸润。此外, 模型组子宫组织中炎症因子 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 IL-18 蛋白表达水平以及血清中炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平均显著高于假手术组( $P < 0.05$ )。(2)与模型组相比, 治疗  
组小鼠子宫内膜损伤程度、子宫内  
膜纤维化程度及炎症细胞浸润均减轻; 此外, 治疗组子宫组织中炎症因子 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 IL-18 蛋白表达水平及血清中炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平均显著低于模型组( $P < 0.05$ )。(3)与假手术组相比, 模型组小鼠生殖能力下降( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 治疗组小鼠生殖能力明显改善( $P < 0.01$ )。**结论** CP 和 SA 联合应用可有效改善宫腔粘连模型小鼠子宫组织病理改变, 减轻子宫内  
膜损伤、炎症反应及纤维化程度, 改善小鼠生殖能力, 其作用机制可能与下调 NLRP3 炎症小体表达有关, 为 CP 和 SA 联合应用治疗宫腔粘连提供可靠的实验依据。

**【关键词】** 宫腔粘连; 胶原蛋白肽; 海藻酸钠; NLRP3 炎症小体

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 10-1296-08

**【基金项目】** 国家重点研发计划资助(2018YFC1105800), 新乡医学院第三附属医院开放课题(KFKTYB202127, KFKTZD202106), 新乡医学院研究生科研创新支持计划(YJSCX202124Z)。

Funded by the National Key R&D Program Grant (2018YFC1105800), Open Project of the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University (KFKTYB202127, KFKTZD202106), Postgraduate Scientific Research Innovation Support Program of Xinxiang Medical University (YJSCX202124Z).

**【作者简介】** 程怡怡(1990—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 宫腔粘连。Email: 1397339622@qq.com

**【通信作者】** 潘莹(1970—), 女, 博士, 研究方向: 妇产科学。Email: panying@xxmu.edu.cn;

孙永琨(1981—), 女, 博士, 研究方向: 创伤修复, 再生医学与组织工程。Email: sun@xxmu.edu.cn。

\* 共同通信作者



Collagen peptide combined with sodium alginate improve intrauterine adhesions in mice by downregulating expression of NLRP3 inflammasome

CHENG Yiyi<sup>1,2</sup>, ZHAO Weiwei<sup>2</sup>, SONG Zhenfeng<sup>2</sup>, TONG Fuwen<sup>2,3</sup>, LIU Gang<sup>4</sup>, ZHANG Hua<sup>1</sup>,  
SHI Leilei<sup>5</sup>, GUO Zhikun<sup>4</sup>, WANG Xianwei<sup>1,2,4</sup>, PAN Ying<sup>1\*</sup>, SUN Yongkun<sup>1,2,4\*</sup>

(1. the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China. 2. School of Basic Medical Sciences College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003. 3. Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003. 4. the Key Laboratory of Medical Tissue Regeneration in Henan Province, Xinxiang 453003. 5. Nantong Yemeng New Material Co., Ltd, Nantong 226000)  
Corresponding author: PAN Ying. E-mail: panying@xxmu.edu.cn; SUN Yongkun. E-mail: sun@xxmu.edu.cn

**[Abstract] Objective** To investigate the repairing effect and mechanism of collagen peptide (CP) combined with sodium alginate (SA) on endometrial injury. **Methods** Forty-eight SPF female C57BL/6N mice were randomly divided into sham, model, and CP + SA groups, with 16 mice in each group. In the model group, the intrauterine adhesion model was established by injecting 95% ethanol into the uterine cavity through the cervix to induce endometrial injury. In the sham operation group, 0.9% normal saline was injected into the uterine cavity. The treatment group was injected with a mixture of CP and SA after injection of 95% ethanol into the uterine cavity. At 7 days after modeling, eight mice in each group were selected to provide samples. HE staining was used to observe pathological changes in mouse uterine tissue. Modified Masson tricolor staining was used to observe endometrial fibrosis. Western Blot was used to measure protein expression levels of proinflammatory factors NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in uterine tissues. ELISA were used to measure IL-1 $\beta$  and IL-18 in serum. The remaining eight mice in each group were cohoused in accordance with a male : female ratio of 1 : 2, and the number of pregnant mice in each group was recorded. Pregnant mice were euthanized on day 14 of pregnancy, and the number of embryos was recorded. **Results** (1) Compared with the sham operation group, the model group had a thinner endometrial thickness and increased endometrial fibrosis and inflammatory cell infiltration. Additionally, the protein expression levels of proinflammatory factors NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in uterine tissue and the serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in the model group were significantly lower than those in the sham operation group ( $P < 0.05$ ). (2) Compared with the model group, the treatment group showed reductions in the degree of endometrial injury, endometrial fibrosis, and inflammatory cell infiltration. Additionally, the protein expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in uterine tissue and the serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in the model group were significantly lower than those in the sham operation group ( $P < 0.05$ ). (3) Compared with the sham group, the reproductive ability of the model group was decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the reproductive ability of the treatment group was significantly improved ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Combined application of CP and SA effectively improved pathological changes of uterine tissue, reduced endometrial injury, inflammatory responses and fibrosis, and improved the reproductive ability of mice. The mechanism may be related to downregulation of NLRP3 inflammasome expression, which provides a reliable experimental basis for combined application of CP and SA for treatment of intrauterine adhesion.

**[Keywords]** intrauterine adhesions; collagen peptide; sodium alginate; NLRP3 inflammasome  
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

育龄期女性子宫内膜在性激素的作用下经历周期性的脱落、修复和再生,其中子宫内膜修复不会形成瘢痕<sup>[1]</sup>。然而当子宫内膜基底层损伤后易导致子宫内膜修复障碍从而形成宫腔内粘连<sup>[2-3]</sup>。宫腔粘连(intrauterine adhesion, IUA)是女性生殖系统中常见的一种子宫内膜纤维化疾病,主要因子宫内膜损伤或感染引起子宫内膜基底层损伤,诱发异

常的炎症反应,造成大量胶原纤维沉积在子宫腔内,导致子宫内膜纤维化,主要表现为宫腔堵塞、盆腔疼痛、月经紊乱、闭经、继发性不孕、妊娠异常等,严重影响女性的身心健康<sup>[4-5]</sup>。目前,尚缺乏有效治疗 IUA 的方法,因此有效预防 IUA,减少 IUA 并发症,对提高 IUA 患者的生活质量具有重要的临床意义<sup>[6]</sup>。NLRP3 炎症小体是涉及免疫调节和炎症

反应的蛋白质复合物,主要是由 NLRP3 受体蛋白、凋亡相关的斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 和效应蛋白半胱氨酸的天冬氨酸酶-前体 (Pro-caspase-1) 3 种不同类型的蛋白质组成,在机体免疫和疾病发生过程中起到重要作用<sup>[7-8]</sup>。研究发现 NLRP3 炎症小体参与肾、肝、肺等多器官纤维化的发生发展,而抑制 NLRP3 炎症小体活化可减轻炎症反应和纤维化程度<sup>[9-11]</sup>。然而,NLRP3 炎症小体在 IUA 中的作用尚未见报道。研究显示胶原蛋白肽 (collagen peptide, CP) 和海藻酸钠 (sodium alginate, SA) 具有抗炎、促进创面的愈合等功能<sup>[12-14]</sup>,但其对 IUA 的作用机制还需要进一步的研究。因此,本研究将 CP 和 SA 应用于损伤后的小鼠子宫内膜,探讨其对 IUA 形成的影响,为临床防治 IUA 提供新的治疗思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

48 只 SPF 级性成熟且未交配雌性 C57BL/6N 小鼠,9 ~ 12 周龄,体重 19 ~ 24 g,购于河南斯克贝斯生物科技股份有限公司动物实验中心【SCXK (豫)2020-0005】。每笼 5 只,饲养环境:温度 20 ~ 26℃,湿度 40% ~ 70%,光照明暗时间为 12 h/12 h,循环照明,饲养期间各组小鼠自由获取标准鼠食和水,饲养于新乡医学院实验动物中心 SPF 级环境【SYXK (豫)2020-0011】。常规适应 1 周后用于实验。实验中所涉及操作均符合新乡医学院第三附属医院实验动物伦理学的相关要求 (K2021-033-01)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

胶原蛋白肽和海藻酸钠 (南通业盟新材料股份有限公司,中国),异氟烷 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司,中国),多聚甲醛 (国药集团化学试剂有限公司,中国),HE 染色试剂盒 (Beyotime, C105S, 中国),改良 Masson 三色染色试剂盒 (Solarbio, G1345, 中国),NLRP3/NALP3 (Adipogen, AG-20B-0014-C100, 美国),ASC (ABclonal, A11433, 中国),Anti-Caspase-1 (Abcam, ab138483, 英国),Anti-IL-1 $\beta$  (Abcam, ab9722, 英国),IL-18 (ABclonal, A20473, 中国),GAPDH (Proteintech, 6004-1-1, 中国), $\beta$ -Actin (Beyotime, AF5003, 中国),辣根酶标记山羊抗兔 (ZSGB-BIO, ZB-2301, 中国),辣根酶标记山羊抗小鼠 (ZSGB-BIO, ZB-2305, 中国),小鼠 IL-1 $\beta$  ELISA

试剂盒 (CUSABIO, CSB-E08054m, 中国),小鼠 IL-18 ELISA 试剂盒 (MULTI SCIENCES, EK218-96, 中国)。小动物呼吸麻醉机 (瑞沃德, 中国),研究级正置多功能显微镜 (Nikon NI-U, 日本),小型垂直电泳转印系统 (Bio-Rad, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠 IUA 模型的建立

本模型的构建以 95% 乙醇作用于子宫内膜引起子宫内膜化学性损伤、炎症反应及纤维化为基础,构建稳定且有效的小鼠 IUA 模型<sup>[15-16]</sup>。选取正常发情周期的小鼠,于动情期造模,操作步骤如下:使用小动物呼吸麻醉机进行麻醉,令小鼠吸入 2% ~ 3% 浓度的异氟烷麻醉剂诱导麻醉后,将小鼠置于小动物操作台上给予持续吸入 1.5% ~ 2.5% 异氟烷维持麻醉,再使用连接注射器的灌胃针探查宫颈口,经宫颈注入 95% 乙醇直至观察到有乙醇从阴道口流出,维持 1 min,再经宫颈注射 0.9% 生理盐水 2 mL 冲洗子宫腔内残余的乙醇。

#### 1.2.2 实验动物分组及处理

将 48 只小鼠随机分为 3 组,分别为假手术组、模型组和治疗组 (CP + SA),每组 16 只。模型组按上述方法经小鼠子宫颈宫腔注射 95% 乙醇进行子宫内膜损伤,制备 IUA 模型。假手术组经小鼠子宫颈向宫腔注射 0.9% 生理盐水。治疗组 (CP + SA) 经小鼠子宫颈向宫腔注射 95% 乙醇进行造模后再向宫腔注射 5% CP + 2.5% SA 混合液。各组小鼠造模后均饲予正常食物和水。

#### 1.2.3 样本取材及处理

造模 7 d 后每组随机取 8 只小鼠取材,采用 2% ~ 3% 异氟烷吸入麻醉,取血后,离心,取上层血清冻存,用于 ELISA 实验。取子宫组织,部分置于 -80℃ 保存备用,用于蛋白含量测定;部分置入新鲜配置的 4% 多聚甲醛液中固定,常规石蜡包埋切片,用于后续组织形态学染色以及改良 Masson 三色染色。

#### 1.2.4 生殖能力检测

剩余各组小鼠于造模 7 d 后按照雄鼠与雌鼠比例 1:2 于 20:00 合笼,第 2 天 8:00 阴道涂片检查,以显微镜下见精子记为妊娠第 1 天,观察小鼠怀孕情况,记录各组妊娠小鼠数量,于妊娠第 14 天处死妊娠小鼠,记录胚胎数量。

#### 1.2.5 苏木素-伊红 (HE) 染色观察子宫内膜形态学变化

子宫组织切片常规脱蜡至水,苏木素染色

5 min, 浸入流动自来水中冲洗约 10 min, 伊红染色 1 min, 脱水透明, 中性树胶封固, 随后在 10 × 4 倍和 10 × 20 倍显微镜下观察子宫内膜病理形态学变化并拍照, 用 Image J 软件计数子宫内膜腺体数量。

1.2.6 改良 Masson 三色染色观察子宫内膜纤维化程度

子宫组织切片常规脱蜡至水, 切片入 Bouin 液媒染 2 h, 天青石蓝染色 2 min, Mayer 苏木素染色 2 min, 酸性乙醇分化液分化 10 s, 磷钼酸溶液处理 10 min, 苯胺蓝染色 5 min, 弱酸处理 2 min, 脱水透明, 中性树胶封片后, 在显微镜下观察子宫内膜纤维化程度, 10 × 4 倍和 10 × 20 倍显微镜下拍照, 用 Image J 软件分析各组子宫内膜纤维化程度。

1.2.7 Western Blot 检测各组子宫组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白表达情况

将各组小鼠子宫组织匀浆后, 提取蛋白后测定蛋白浓度, 依次进行配胶、上样、电泳、电转、封闭, 分别孵育对应的一抗和二抗, 洗膜后在 Azure 电化学发光成像系统显影, 用 Image-Pro Plus 软件分析计算目的蛋白及内参蛋白的灰度值。

1.2.8 ELISA 检测血清 IL-1β 和 IL-18 的含量

取各组小鼠血清, 严格按照 ELISA 检测试剂盒的操作流程, 检测各组小鼠血清 IL-1β 和 IL-18 的含量, 以标准品浓度作纵坐标, 以 OD 值作横坐标, 作标准曲线, 计算各血清样本中所测指标的水平。

1.3 统计学分析

本研究数据以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 Image J、Image pro-plus 进行定量分析, 采用

GraphPad Prism 8.0 进行统计学分析作图。多组间数据比较采用单因素方差分析 (One way-ANOVA) 和多重比较检验进行分析。以  $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 小鼠子宫组织 HE 染色形态学观察

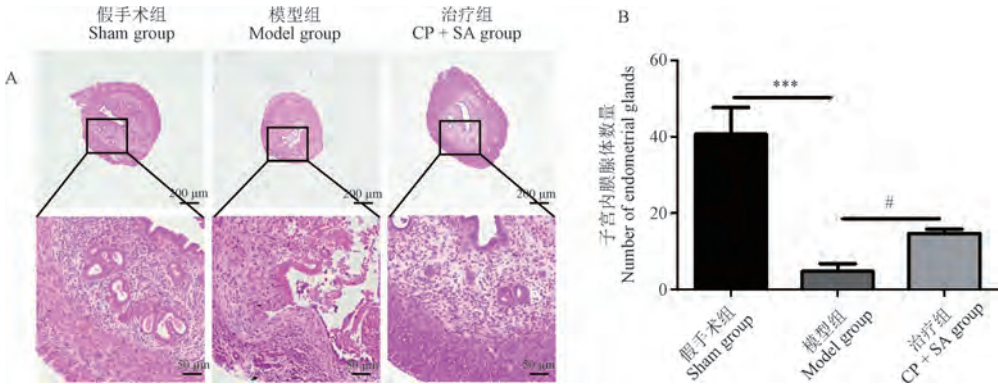
由图 1 可见, 与假手术组相比, 模型组子宫内膜变薄、破坏, 子宫腔上皮消失, 子宫内膜腺体数量减少, 差异具有显著性 ( $P < 0.001$ ), 并伴有较多炎性细胞浸润。与模型组相比, 治疗组子宫内膜损伤程度明显改善, 子宫内膜厚度较前增加, 炎性细胞浸润减轻, 子宫内膜腺体数量也相应增加, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。

2.2 小鼠子宫组织改良 Masson 三色染色结果

由图 2 可见, 与假手术组相比, 模型组显示子宫组织内可见蓝染面积明显增加, 提示胶原纤维增多, 差异具有显著性 ( $P < 0.001$ )。子宫内膜间质细胞和胶原纤维排列紊乱, 分布不均, 且胶原纤维与肌层粘连, 子宫腔内炎性细胞浸润增多, 提示小鼠子宫腔粘连造模成功。与模型组相比, CP + SA 治疗组子宫组织内蓝染胶原纤维面积明显减少, 差异具有显著性 ( $P < 0.001$ )。

2.3 Western Blot 检测小鼠子宫组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白表达量

由图 3 可见, 与假手术组相比, 模型组小鼠子宫组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白相对表达量均明显升高, 差异具有显著性 ( $P < 0.001$ ,



注: A: HE 染色评估子宫组织形态学变化; B: 用 Image J 量子宫内膜腺体数量; 与假手术组相比, \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与模型组相比, #  $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 子宫组织横切形态学观察

Note. A. HE staining was used to evaluate the morphological changes of uterine tissues. B. Image J was used to quantify the number of endometrial glands. Compared with sham group, \*\*\*  $P < 0.001$ . Compared with model group, #  $P < 0.05$ . (The same in the following figures)

Figure 1 Morphological observation of transverse section of uterine tissue



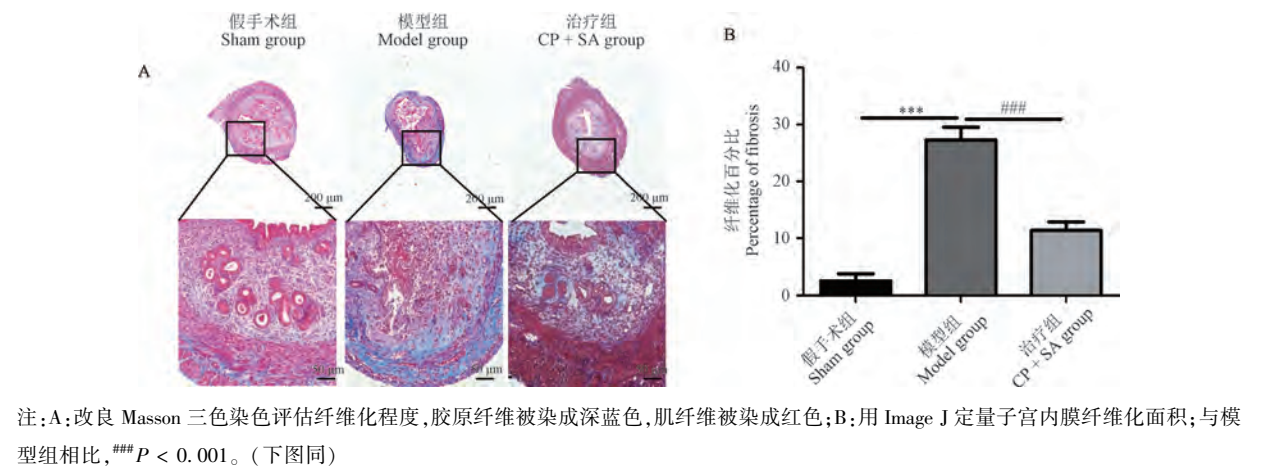


图 2 子宫组织横切纤维程度观察

Note. A. Modified Masson tri-color staining was used to assess the degree of fibrosis. The collagen fibers were dyed blue and the muscle fibers were dyed red. B. Image J was used to quantify the area of endometrial fibrosis. Compared with the model group, \*\*\* $P < 0.001$ . (The same in the following figures)

Figure 2 Observation of the degree of transverse fibrosis in uterine tissue

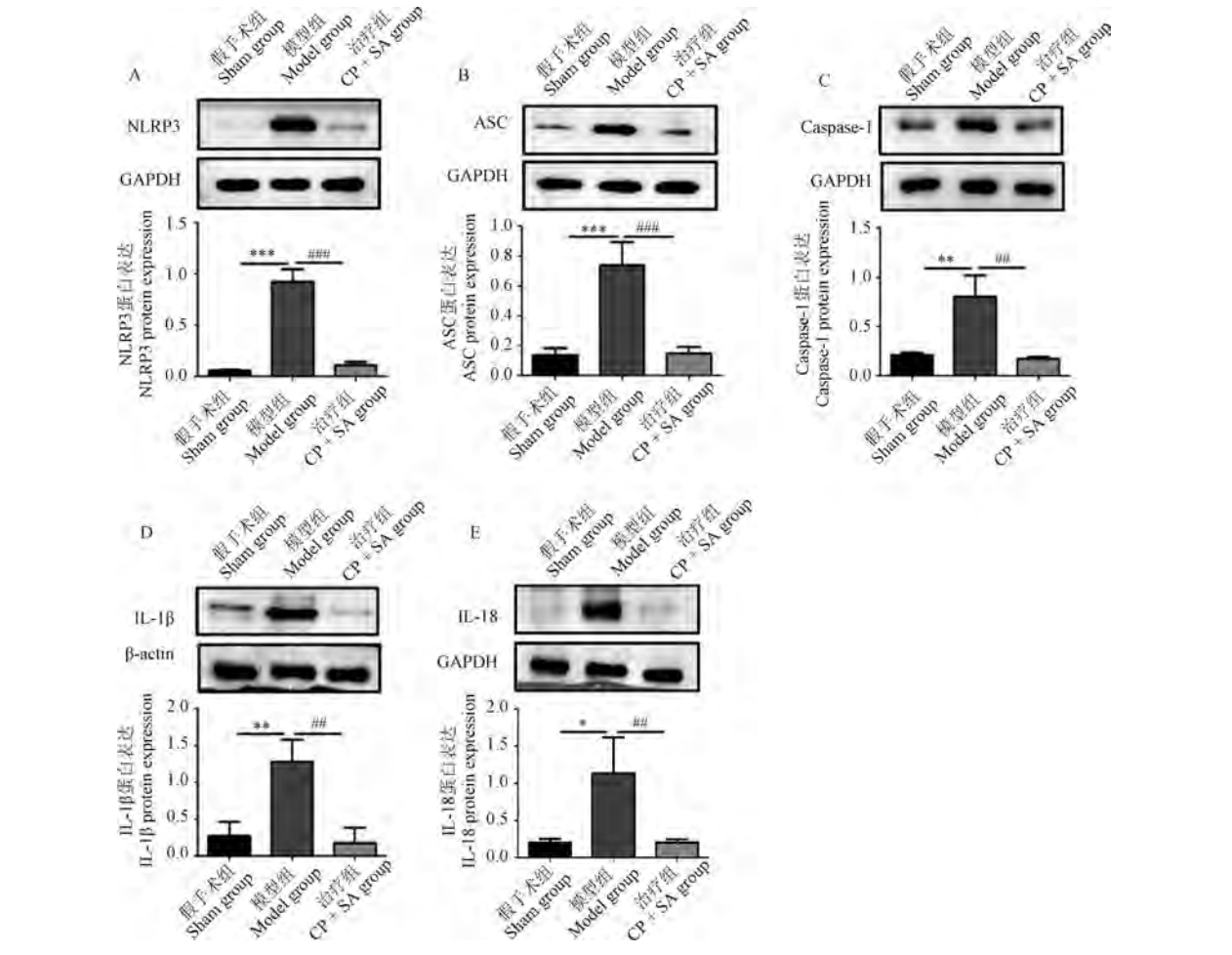


图 3 各组子宫组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 的蛋白表达

Note. Compared with sham group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Compared with the model group, ## $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

Figure 3 Protein expression electrophoresis of NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1β and IL-18 in uterine tissues of each group

$P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。与模型组相比,CP + SA 治疗组小鼠子宫组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白相对表达量均明显降低,差异具有显著性( $P < 0.001$  或  $P < 0.01$ )。

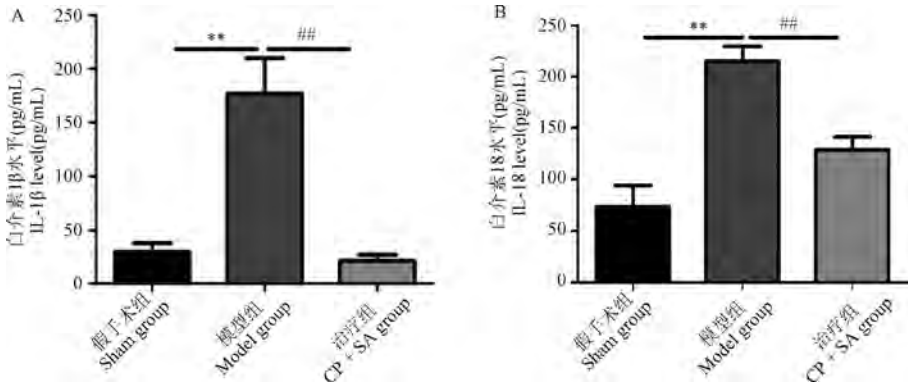
2.4 小鼠血清中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 炎症因子分泌水平的影响

由图 4 可见,与假手术组相比,模型组小鼠血清中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的水平均明显升高,差异具有显著性( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。与模型组相比,治疗

组小鼠血清中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的水平均明显降低,差异具有显著性( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。

2.5 小鼠生殖能力检测

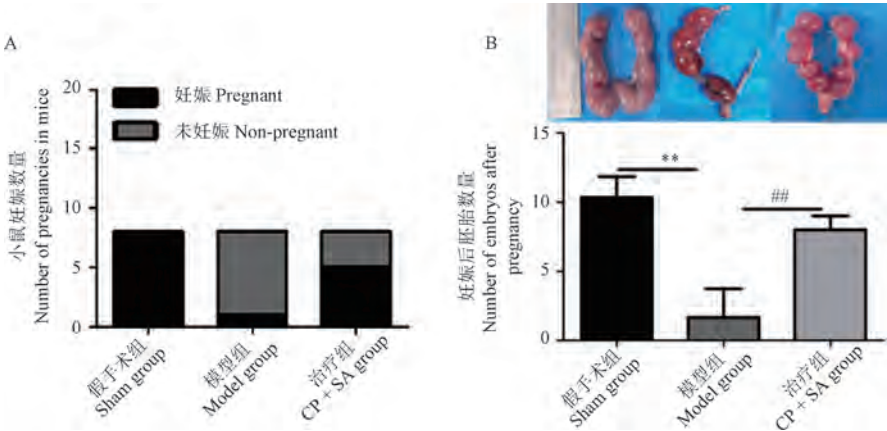
由图 5 可见,与假手术组相比,模型组小鼠妊娠能力下降,子宫呈现不同程度受损,子宫内妊娠胚胎数量也相应降低,差异具有显著性( $P < 0.01$ )。与模型组相比,CP + SA 治疗组小鼠妊娠能力改善,子宫内妊娠胚胎数量明显升高,差异具有显著性( $P < 0.01$ )。



注:A:血清中 IL-1 $\beta$  的分泌水平;B:血清中 IL-18 的分泌水平。  
图 4 各组小鼠血清中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的分泌水平

Note. A. Serum IL-1 $\beta$  secretion level. B. Serum IL-18 secretion level.

Figure 4 Secretion levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in serum of mice in each group



注:A:小鼠妊娠数量;B:妊娠后胚胎数量量化图。  
图 5 各组小鼠妊娠情况

Note. A. Number of pregnancies in mice. B. Quantitative map of number of embryos after pregnancy.

Figure 5 Pregnancy of mice in each group

3 讨论

IUA 是多种子宫手术或感染后的严重并发症,最终引起子宫腔内异常纤维化。患有 IUA 的女性可伴有因月经不调引起的周期性盆腔疼痛、月经过少、闭经,甚至出现月经逆行导致子宫内膜异位症

的发生,还会出现不孕不育或反复流产,导致胎儿宫内生长受限和胎盘植入<sup>[6,17]</sup>。目前在临床上对于 IUA 的预防措施,主要包括术后宫腔内放置节育器、子宫球囊支架、生物屏障、干细胞移植以及药物综合治疗等<sup>[18]</sup>。其中生物屏障因其刺激性小、可降解性、低毒性、低免疫原性等优点,在 IUA 的防治中发

挥着重要作用。CP 是从动物组织中提取的一种具有抗氧化特性的生物活性肽,具有较高的营养价值、良好的保湿性能、良好的生物相容性和生物降解性等特性,可促进成纤维细胞的生长和透明质酸的合成,减轻炎症反应,从而促进伤口的愈合,在制药、保健和食品保鲜等方面应用广泛<sup>[19-20]</sup>。SA 作为一种从褐藻中获得的天然存在的阴离子多糖聚合物,能与阳离子接触形成凝胶,在制药中得到了广泛的应用。因其具有低毒、低成本、良好的生物相容性和生物降解性而成为创面敷料的首选材料<sup>[13,21]</sup>。

因此,在本研究中,通过制备了一种由 CP 和 SA 组成的可注射混合液,作用于受损后的小鼠子宫内膜,观察 CP 和 SA 联合应用对子宫内膜修复的影响。结果显示,与假手术组相比,模型组小鼠子宫内膜明显受损,子宫内膜腺体数量减少,子宫内膜呈现纤维化改变,符合临床 IUA 特征。与模型组相比,CP 和 SA 治疗组小鼠子宫内膜损伤程度明显改善,子宫内膜腺体数量明显增加,且子宫内膜纤维化程度减轻。提示 CP 和 SA 联合应用对 IUA 的形成有明显的改善作用。

以往研究表明,炎症反应与组织再生修复过程密切相关,如皮肤再生修复、血管再生修复和神经再生修复<sup>[22-24]</sup>。多种生物材料,如 CP、SA 等,已被证明能够调节伤口愈合中的炎症反应<sup>[14,25]</sup>。胶原蛋白肽混合物可通过降低炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的水平促进糖尿病小鼠的创面愈合<sup>[14]</sup>。载药 SA 水凝胶可通过抑制巨噬细胞的聚集降低炎症反应<sup>[26]</sup>。本研究结果显示,CP 和 SA 联合应用可减少由 95% 乙醇诱导的 IUA 所产生的炎症反应。

NLRP3 炎症小体信号通路在炎症过程中发挥重要作用。NLRP3 炎症小体是由 NLRP3、ASC 和 Pro-caspase-1 组成的多蛋白质复合体。正常情况下,NLRP3 炎症小体处于抑制状态,当机体受到炎症等刺激后,NLRP3 与 ASC 之间相互作用,ASC 与 Pro-caspase-1 之间相互作用,激活 Caspase-1 诱导自我切割,促进促炎症细胞因子的成熟和分泌,如 IL-1 $\beta$  和 IL-18<sup>[27]</sup>。本研究显示,与假手术组相比,IUA 模型小鼠子宫组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 IL-18 蛋白表达水平显著升高,血清中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的水平也显著升高。与模型组相比,CP 和 SA 治疗组小鼠子宫组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 IL-18 蛋白表达水平不同程度降低,血清中 IL-

1 $\beta$  和 IL-18 的水平也显著降低。此外,还检测了造模后小鼠的生殖能力,发现模型组小鼠妊娠数量及妊娠后胚胎数量下降,而 CP 和 SA 治疗组小鼠妊娠数量及妊娠后胚胎数量明显高于模型组,提示 CP 和 SA 联合应用可有效改善小鼠生殖能力。以上研究表明,CP 和 SA 联合应用明显抑制 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 IL-18 的表达,提示 CP 和 SA 联合应用可能通过抑制 NLRP3 炎症小体,进而抑制了 IL-1 $\beta$  和 IL-18 炎症因子的分泌,减轻了产生的炎症级联反应,促进子宫内膜修复,从而提高小鼠生殖能力。

综上所述,CP 和 SA 联合应用可有效抑制子宫内膜损伤后的炎症反应,加速子宫内膜修复,改善小鼠生殖能力。其作用机制可能与下调 NLRP3 炎症小体表达有关。CP 和 SA 联合应用有助于改善受损后子宫内微环境,提高其在子宫内膜损伤中的治疗效果,为预防 IUA 的发生提供了一种新的途径。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] Salamsen LA, Hutchison JC, Gargett CE. Cyclical endometrial repair and regeneration [J]. Development, 2021, 148 (17): dev199577.
- [2] Yao Y, Chen R, Wang G, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells reverse EMT via TGF- $\beta$ 1/Smad pathway and promote repair of damaged endometrium [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 225.
- [3] 陈醒, 毛乐乐, 周应芳, 等. 三种胶原纤维染色法评价宫腔粘连的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(5): 34-38, 45.  
Chen X, Mao LL, Zhou YF, et al. Comparison of three special staining methods for collagen fibers in evaluation of intrauterine adhesion [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(5): 34-38, 45.
- [4] Zheng S, Wang J, Wang X, et al. Feasibility analysis of treating severe intrauterine adhesions by transplanting menstrual blood-derived stem cells [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 2201-2212.
- [5] 郭罗培, 隋龙. 子宫内膜损伤修复与宫腔粘连形成机制研究进展 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(6): 706-709.  
Guo LP, Sui L. Research progress on mechanism of endometrial injury repair and intrauterine adhesion [J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2019, 35(6): 706-709.
- [6] Mentula M, Männistö J, Gissler M, et al. Intrauterine adhesions following an induced termination of pregnancy: a nationwide cohort study [J]. BJOG, 2018, 125(11): 1424-1431.
- [7] Fu J, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. Annu Rev Immunol, 2023, 41: 301-316.



- [ 8 ] Schieffer L, Manzl C, Schatz C, et al. Nrf2 in the field of dentistry with special attention to NLRP3 [J]. Antioxidants, 2022, 11(1): 149.
- [ 9 ] He S, Wang Y, Liu J, et al. Activating SIRT1 deacetylates NF- $\kappa$ B p65 to alleviate liver inflammation and fibrosis via inhibiting NLRP3 pathway in macrophages [J]. Int J Med Sci, 2023, 20(4): 505–519.
- [ 10 ] Huang G, Zhang Y, Zhang Y, et al. Chronic kidney disease and NLRP3 inflammasome: Pathogenesis, development and targeted therapeutic strategies [J]. Biochem Biophys Rep, 2023, 33: 101417.
- [ 11 ] Zhang X, Zhang W, Chen X, et al. Prevention of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice by bilobalide [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2023, 2023: 1973163.
- [ 12 ] Zhang Z, Li Z, Li Y, et al. Sodium alginate/collagen hydrogel loaded with human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes wound healing and skin remodeling [J]. Cell Tissue Res, 2021, 383(2): 809–821.
- [ 13 ] Zhang M, Qiao X, Han W, et al. Alginate-chitosan oligosaccharide-ZnO composite hydrogel for accelerating wound healing [J]. Carbohydr Polym, 2021, 266: 118100.
- [ 14 ] Xiong X, Liang J, Xu Y, et al. The wound healing effects of the *Tilapia* collagen peptide mixture TY001 in streptozotocin diabetic mice [J]. J Sci Food Agric, 2020, 100(7): 2848–2858.
- [ 15 ] Zhang S, Sun Y, Jiang D, et al. Construction and optimization of an endometrial injury model in mice by transcervical ethanol perfusion [J]. Reprod Sci, 2021, 28(3): 693–702.
- [ 16 ] 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.
- Zu ZY, Luo M, Shen DX, et al. Establishment and evaluation of four models of intrauterine adhesion and its effects on endometrial receptivity in New Zealand white rabbits [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 30–38.
- [ 17 ] March CM. Management of asherman's syndrome [J]. Reprod Biomed Online, 2011, 23(1): 63–76.
- [ 18 ] Kou L, Jiang X, Xiao S, et al. Therapeutic options and drug delivery strategies for the prevention of intrauterine adhesions [J]. J Control Release, 2020, 318: 25–37.
- [ 19 ] Sato K. The presence of food-derived collagen peptides in human body-structure and biological activity [J]. Food Funct, 2017, 8(12): 4325–4330.
- [ 20 ] Xie Z, Wang X, Yu S, et al. Antioxidant and functional properties of cowhide collagen peptides [J]. J Food Sci, 2021, 86(5): 1802–1818.
- [ 21 ] Jadach B, Świetlik W, Froelich A. Sodium alginate as a pharmaceutical excipient: novel applications of a well-known polymer [J]. J Pharm Sci, 2022, 111(5): 1250–1261.
- [ 22 ] Tian H, Lu Y, Shah SP, et al. Autacoid 14S, 21R-dihydroxy-docosahexaenoic acid counteracts diabetic impairment of macrophage prohealing functions [J]. Am J Pathol, 2011, 179(4): 1780–1791.
- [ 23 ] Baba N, Wang F, Iizuka M, et al. Induction of regional chemokine expression in response to human umbilical cord blood cell infusion in the neonatal mouse ischemia-reperfusion brain injury model [J]. PLoS One, 2019, 14(9): e0221111.
- [ 24 ] Tao B, Lin C, Qin X, et al. Fabrication of gelatin-based and Zn<sup>2+</sup>-incorporated composite hydrogel for accelerated infected wound healing [J]. Mater Today Bio, 2022, 13: 100216.
- [ 25 ] Raguvaran R, Manuja BK, Chopra M, et al. Sodium alginate and gum acacia hydrogels of ZnO nanoparticles show wound healing effect on fibroblast cells [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 96: 185–191.
- [ 26 ] Wang X, Guan S, Zhang K, et al. Benlysta-loaded sodium alginate hydrogel and its selective functions in promoting skin cell growth and inhibiting inflammation [J]. ACS Omega, 2020, 5(18): 10395–10400.
- [ 27 ] Rathinam VAK, Chan FK. Inflammasome, inflammation, and tissue homeostasis [J]. Trends Mol Med, 2018, 24(3): 304–318.

[ 收稿日期 ] 2023-05-03

吴启鑫,赵小亮,焦玥,等. 小鼠血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的 HPLC-MS/MS 定量分析方法建立与药代动力学特征研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1304-1313.

Wu QX, Zhao XL, Jiao Y, et al. Establishment of HPLC-MS/MS quantitative analysis method and pharmacokinetic characteristics of Flavokawain B of plasma in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1304-1313.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.008

# 小鼠血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的 HPLC-MS/MS 定量分析方法建立与药代动力学特征研究

吴启鑫<sup>1#</sup>,赵小亮<sup>1#</sup>,焦玥<sup>1</sup>,罗明珠<sup>1</sup>,王怡婷<sup>1</sup>,李晶哲<sup>1</sup>,  
王靖怡<sup>1</sup>,马琰岩<sup>1</sup>,李涛<sup>1,2\*</sup>,刘长振<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院医学实验中心,北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室,北京 100700;2. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

**【摘要】 目的** 建立小鼠血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的高效液相色谱-质谱联用 (HPLC/MS-MS) 定量分析方法,并研究其小鼠体内的药代动力学特征。**方法** KM 小鼠采用尾静脉注射 (20 mg/kg)、腹腔注射 (20、40 和 60 mg/kg) 和灌胃 (200、400 和 600 mg/kg) 给药后,在 0、5、30 min 及 1、2、4、6、8、12、16 和 24 h 眼底静脉丛取血,分离血浆样品,HPLC-MS/MS 分析样品中黄卡瓦胡椒素 B 的浓度,计算药代动力学参数,并评价不同途径给药下黄卡瓦胡椒素 B 的生物利用度。**结果** 在 0.2 ~ 800.0 ng/mL 浓度范围内,黄卡瓦胡椒素 B 线性关系良好 ( $r = 0.9995$ ),定量下限为 0.2 ng/mL,准确度在 -8.50% ~ 12.50%,精密度在 1.73% ~ 12.03%,且无明显基质效应 (88.68% ~ 102.04%),确证该方法适用于小鼠血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的定量分析。药代动力学结果显示,黄卡瓦胡椒素 B 腹腔注射和灌胃给药后在体内吸收迅速,血药浓度在给药 0.083 h 即为峰值,在腹腔注射 20 ~ 60 mg/kg 和灌胃 200 ~ 600 mg/kg 给药范围内呈现良好的线性药代动力学过程。黄卡瓦胡椒素 B 的绝对生物利用度腹腔注射给药为 53.29%,灌胃给药为 1.38%。**结论** 本研究建立的 HPLC-MS/MS 定量分析方法,操作简便、准确、灵敏度高,成功应用于小鼠血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的药代动力学特征研究。

**【关键词】** 黄卡瓦胡椒素 B;药代动力学;生物利用度;HPLC-MS/MS

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1304-10

## Establishment of HPLC-MS/MS quantitative analysis method and pharmacokinetic characteristics of Flavokawain B of plasma in mice

WU Qixin<sup>1#</sup>, ZHAO Xiaoliang<sup>1#</sup>, JIAO Yue<sup>1</sup>, LUO Mingzhu<sup>1</sup>, WANG Yiting<sup>1</sup>,  
LI Jingzhe<sup>1</sup>, WANG Jingyi<sup>1</sup>, MA Yanyan<sup>1</sup>, LI Tao<sup>1,2\*</sup>, LIU Changzhen<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Key Laboratory of TCM Basic Research on Prevention and Treatment of Major Disease, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China. 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700)

Corresponding author: LIU Changzhen. E-mail:lcz0220@163.com; LI Tao. E-mail:hndxlitao@163.com

**【基金项目】** 中国中医科学院科技创新工程项目资助 (CI2021A05021), 中央级公益性科研院所基本科研业务专项资金资助 (JBGS2021004, ZZ2018009), 北京市自然科学基金资助项目 (7212187)。

Funded by CACMS Innovation Fund (CI2021A05021), the Fundamental Research Funds for the Central Public Welfare Research Institutes (JBGS2021004, ZZ2018009), Beijing Municipal Natural Science Foundation (7212187).

**【作者简介】** 吴启鑫 (1995—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药活性物质的筛选及分析。Email: pharmacy\_wu@163.com;

赵小亮 (1982—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 中药药代动力学。Email: 13215372@qq.com。

#共同第一作者

**【通信作者】** 刘长振 (1974—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 中药活性物质的筛选及分析。Email: lcz0220@163.com;

李涛 (1987—), 男, 副研究员, 硕士, 研究方向: 中药药效物质基础、药代动力学及代谢流分析。Email: hndxlitao@163.com。

\* 共同通信作者

**[Abstract] Objective** To create a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the quantitative analysis of Flavokawain B in plasma, and to investigate its pharmacokinetic characteristics in mice. **Methods** Flavokawain B was administered to KM mice via intravenous injection (20 mg/kg), intraperitoneal injection (20, 40, and 60 mg/kg), and intragastric (200, 400, and 600 mg/kg) routes. Blood was drawn from the venous plexus of the eye fundus at 0, 5, 30 min and 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, and 24 h and then the plasma was separated. Flavokawain B levels in the plasma samples were analyzed by HPLC-MS/MS, and its pharmacokinetic parameters and bioavailability following the different routes of administration were calculated. **Results** Flavokawain B showed a good linear relationship in plasma ( $r = 0.9995$ ), with a low limit of quantification of 0.2 ng/mL, accuracy  $-8.50\% \sim 12.50\%$ , precision  $1.73\% \sim 12.03\%$ , and no obvious matrix effect ( $88.68\% \sim 102.04\%$ ). HPLC-MS/MS was verified as a suitable method for the quantitative evaluation of Flavokawain B in mice plasma. Flavokawain B showed rapid absorption *in vivo*, with a peak of plasma concentrations at 0.083 h after intraperitoneal or intragastric administration. Flavokawain B showed good linear pharmacokinetics following intraperitoneal injection of 20 ~ 60 mg/kg and intragastric administration of 200 ~ 600 mg/kg. The absolute bioavailability of Flavokawain B was 53.29% following intraperitoneal injection and 1.38% following intragastric administration. **Conclusions** The current quantitative HPLC-MS/MS technique provides a straightforward, precise, and sensitive method for investigating the pharmacokinetics of Flavokawain B in mice.

**[Keywords]** Flavokawain B; pharmacokinetics; bioavailability; HPLC-MS/MS

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

卡瓦胡椒 (*Piper methysticum*) 是一种原产于南太平洋地区的药食同源植物, 属胡椒科, 入药部位主要为根及根茎。在当地, 卡瓦胡椒作为一种失眠、焦虑和更年期症状的自然疗法, 现临床多用于镇静催眠、抗痉挛、局部麻醉、抗真菌等方面<sup>[1-2]</sup>。近年, 其相关制剂已作为非处方药或食品添加剂进入欧美国家, 我国亦有相关报道<sup>[2]</sup>。黄卡瓦胡椒素 B (Flavokawain B, FKB) 是从卡瓦胡椒中分离出来的一种天然甲氧基化查耳酮, 具有抗炎<sup>[3-4]</sup>、抗癌<sup>[5-6]</sup>、镇痛<sup>[7]</sup>、抗血管生成<sup>[8-9]</sup> 和免疫调节等多种治疗作用。FKB 在治疗恶性肿瘤方面表现出色, 尤其是胃癌、肺癌、前列腺癌和乳腺癌, 其开发前景令人瞩目, 引起了全球的广泛关注<sup>[5, 10-14]</sup>。另外, FKB 有潜在的肝毒性报道<sup>[9, 15]</sup>。但截至目前, 对 FKB 的体内过程了解尚不充分, 为阐明 FKB 的药代动力学特征, 本研究利用高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS/MS) 建立血药浓度定量分析方法, 并进一步比较了静脉给药、腹腔注射和灌胃给药后血浆中 FKB 的药代动力学特征和生物利用度数据, 这将为 FKB 药理机制、安全性研究和进一步开发提供方法和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

168 只 SPF 级雄性 KM 小鼠, 7 ~ 8 周龄, 体重 (31.0 ± 1.5) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司

公司【SCXK(京)2019-0008】。在昼夜交替照明、恒温 (23 ~ 25℃)、恒湿 (49% ~ 51%) 环境中喂养 3 d, 适应饲养环境, 自由饮食饮水。实验前禁食 12 ~ 16 h, 自由饮水。所有动物饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所【SYXK(京)2021-0017】, 实验均经过中国中医科学院医学实验中心伦理委员会批准 (ERCCACMS21-2106-08)。

1.1.2 主要试剂与仪器

木犀草素 (批号: RDD-00702005014)、黄卡瓦胡椒素 B (批号: RDD-H-02802301004) 购于成都瑞芬思德丹生物科技有限公司, 纯度均大于 98%; 二甲亚砜 (Sigma 公司, 批号: 103209528), 羧甲基纤维素钠 (国药集团, 批号: 20120330), Tween80 (MCE 公司, 批号: HYS000006634), PEG-300 (MCE 公司, 批号: HYW000084018); 甲醇、乙腈 (LC/MS 级, 北京迪马公司), 甲酸 (LC/MS 级, 美国 Sigma 公司), 甲酸铵 (LC/MS 级, 美国 Sigma 公司), 其他试剂均为分析纯。

Targin VX-Ⅲ 多管涡旋振荡器 (北京踏锦科技有限公司); Milli-Q Integral 5 超纯水制备仪 (美国 Millipore 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Rotanta 460R 高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司)。HPLC-MS/MS 系统 (美国 AB Sciex 公司), 包括 ExionLC-20AC 高效液相色谱仪、Ion Drive™ Turbo V 离子源、Sciex6500+ 三重四极杆检测器、Analyst 1.7 数据采集系统和 MutiQuant 3.0.3 数据处理系统等。



## 1.2 方法

### 1.2.1 药品配制

(1)尾静脉注射组和腹腔注射组:称取适量的 FKB,加入所需药液体积的 4%二甲基亚砜,充分振荡使药物完全溶解,再加入所需药液体积的 40% PEG-300 和 5% Tween80,最后加入剩余体积的生理盐水,振荡并超声处理 60 s,配制成 4 mg/mL、8 mg/mL、12 mg/mL 的 FKB 溶液。

(2)灌胃组:称取适量的 FKB,加入 4%二甲基亚砜和 5% Tween80,混合后溶于 0.5%羧甲基纤维素钠,振荡并超处理声 60 s,最终配制成 40 mg/mL、80 mg/mL、120 mg/mL 的 FKB 溶液。

### 1.2.2 动物实验

7 周龄雄性 KM 小鼠,随机分成 7 个组:(1)尾静脉注射组(*i.v.* 20 mg/kg)、(2)低剂量腹腔注射组(*i.p.* 20 mg/kg)、(3)中剂量腹腔注射组(*i.p.* 40 mg/kg)、(4)高剂量腹腔注射组(*i.p.* 60 mg/kg)、(5)低剂量灌胃组(*i.g.* 200 mg/kg)、(6)中剂量灌胃组(*i.g.* 400 mg/kg)、(7)高剂量灌胃组(*i.g.* 600 mg/kg),每个组由 24 只小鼠组成 11 个取血时间点(每只小鼠 3 个取血时间点),每个时间点平行 6 只小鼠。实验于小鼠给药后 0、5、30 min 及 1、2、4、6、8、12、16、24 h,于眼底静脉丛取血 100  $\mu$ L,迅速装入 EDTA·Na<sub>2</sub>抗凝管中,在 4℃ 4362 r/min 条件下离心 15 min,弃沉淀,取上层血浆装于新 Ep 管中,-80℃ 保存备用。

### 1.2.3 样品溶液配制

(1)对照品溶液配制:精密称取 FKB 对照品约 10 mg,倒入 5 mL 容量瓶中,加入甲醇,超声 5 min 助溶,将溶液稀释至刻度,摇匀即得。所配制贮备液浓度为 2 mg/mL,逐级稀释后得到 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、61.5、125.0、250.0、500.0、1000.0、2000.0 和 4000.0 ng/mL 浓度的对照品系列溶液,置于-80℃ 保存备用。

(2)内标溶液配制:精密称取木犀草素对照品约 10 mg,倒入 5 mL 容量瓶中,后加入甲醇,超声 5 min 助溶,将溶液稀释至刻度,摇匀即得内标母液,-80℃ 冰箱中备用。临用前用甲醇将内标母液稀释成 10  $\mu$ g/mL 的内标溶液。

(3)质量控制(QC)样品的配制:取低、中、高 3 个浓度的对照品溶液,加入一定量的空白血浆充分混合,摇匀即得低浓度质控(LQC,0.5 ng/mL)、中浓度质控(MQC,20 ng/mL)和高浓度质控(HQC,

600 ng/mL)样品,置于-80℃ 条件下保存备用。

### 1.2.4 血浆样品的处理

血浆样品在室温下融化后,充分混匀,精密量取 50  $\mu$ L,置于 0.6 mL 干净离心管中,精密加入 10  $\mu$ L 内标溶液和 140  $\mu$ L 乙腈,6000 r/min 涡旋混合 5 min,4℃ 13 795 r/min 离心 10 min,取上清液,4℃ 13 795 r/min 再次离心 10 min,取上清待测。

### 1.2.5 HPLC-MS/MS 条件

(1)色谱条件:色谱柱为 XSelect<sup>®</sup> HSS T3 色谱柱(2.5  $\mu$ m,2.1  $\times$  50 mm,美国 Waters 公司);流动相为 A(水,含 0.1%甲酸):B(乙腈-异丙醇[50:50]),梯度洗脱程序如下:0 ~ 4.0 min,20% ~ 100% B;4.0 ~ 6.0 min,100% B ~ 100% B;6.0 ~ 6.1 min,100% B ~ 20% B;6.1 ~ 8.0 min,20% B ~ 20% B。柱温为 35℃;样品室温度为 4℃;流速为 0.3 mL/min;进样量为 2  $\mu$ L。

(2)质谱条件:电喷雾离子源(ESI),气帘气(N<sub>2</sub>)为 40 psi,碰撞气(N<sub>2</sub>)为 9 psi,喷雾电压为 +5500 V,雾化温度为 550℃,雾化气(GS1,N<sub>2</sub>)和辅助气(GS2,N<sub>2</sub>)均为 55 psi。实验采用多反应监测(MRM)模式正离子扫描,FKB 和内标木犀草素离子对及相应的去簇电压、碰撞能量、保留时间等质谱参数见表 1。

### 1.2.6 方法学的建立与验证

(1)选择性:随机取 6 只小鼠空白血浆,除不加内标(等体积纯水替代)外,按“1.2.4”项下方法操作,进行 HPLC-MS/MS 分析,并记录相应的色谱图。通过色谱图比较定量限(limit of quantification,LOQ)样品、小鼠空白血浆样品和小鼠给药后血浆样品,考察该方法的选择性。

(2)线性范围及定量限:取 FKB 对照品系列溶液,分别随机加入小鼠空白血浆,得到 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.1、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 和 800.0 ng/mL 的模拟生物样品,同样按“1.2.4”项下方法操作,进行 HPLC-MS/MS 分析。横坐标 X 为血浆样品中待测物的浓度,纵坐标 Y 为待测物与内标的峰面积比值,1/X 为权重系数,回归分析采用加权最小二乘法,最终得到各成分的标准曲线和线性范围。各成分的 LOQ 经信噪比 S/N = 10 计算,并以 LOQ 作为标准曲线的最低浓度点。

(3)基质效应与提取回收率:取 QC 和 LOQ 样品,每一浓度配制 6 份,按“1.2.4”项下方法操作,进样分析得到 FKB 与内标的色谱峰面积比值 A;取

用纯水配制以上等浓度的样品,进样分析得到 FKB 与内标的色谱峰面积比值 B;另随机取空白血浆,按“1.2.4”项下方法操作,上述相应等浓度的对照品和内标溶液分别加入于经提取的上清液中,进样分析后可得 FKB 与内标的色谱峰面积比值 C。A 与 B 的比值即基质效应,A 与 C 的比值即提取回收率。

(4)准确度与精密度:LOQ 样品和 QC 样品 1 d 之内测定 6 次,且连续 3 d 检测,计算日内、日间精密度及准确度。

(5)残留:取定量上限样品,按“1.2.4”项下方法操作,然后进样空白样品;该循环连续操作 3 次,之后统一分析各待测物的残留。

(6)稀释可靠性:配制 6 份模拟生物样品,约 10 倍 QC 样品浓度(6000 ng/mL),稀释到 600 ng/mL (使用空白血浆稀释),如“1.2.4”的步骤操作,进样以分析,并计算稀释后样品的准确度及精密度。

(7)稳定性:配制 3 份相同浓度的 QC 样本,按“1.2.4”步骤操作,考察室温稳定性是通过室温放置 0.5 h 和 2 h;考察后期稳定性是通过 4℃ 条件下放置 12 h 和 24 h;考察冻融稳定性是通过-80℃ 冻存,室温融化,重复 3 次;考察长期稳定性是通过-80℃ 冻存 1 个月。

取 QC 样品,每一浓度配制 3 份,并按“1.2.4”项下方法操作,在 4℃ 放置 12 h 和 24 h,考察后期稳定性;在室温下放置 0.5 h 和 2 h,考察室温稳定性;经历 3 次冻融(-80℃ 冻存,室温融化),考察冻融稳

定性;在-80℃ 条件下冷冻 1 个月,考察长期稳定性。

1.3 统计学分析

本实验使用 MutiQuant(版本:3.0.3,美国 AB Sciex 公司)处理数据,Origin Pro 2016(版本:b9.3.226,美国 OriginLab 公司)和 ChemBioDraw Ultra(版本:14.0,美国 PerkinElmer 公司)绘图 DAS 软件(版本:3.0,上海博佳医药)的非房室模型计算药代参数。最大血药浓度( $C_{max}$ )和达峰时间( $T_{max}$ )均为实测值,采用梯形法计算时间浓度曲线下面积(AUC),使用  $AUC_{0-t}$  和相应给药剂量进行多剂量线性关系分析。

2 结果

2.1 质谱分析

选择低分子质量模式下进行 FKB 的质谱分析,结果正离子模式监测优于负离子模式,在正离子模式下 FKB 主要生成 $[M+H]^+$ 峰。对 $[M+H]^+$ 峰的主要碎片离子进行扫描分析,结果见图 1。

选择丰度最高且稳定性好的离子对(285.1/181.1)作为定量离子对用于 FKB 的定量分析,另外选择一对丰度高且稳定性好的离子对(285.1/131.1)作为定性离子对用于 FKB 的确认。

由于 FKB 尚无商业化的稳定同位素标记物可供使用,本实验选择的内标是黄酮类化合物木犀草素,在正离子模式下对木犀草素进行离子扫描和离子对优化,结果见图 1。在 MRM 模式下,FKB 和内

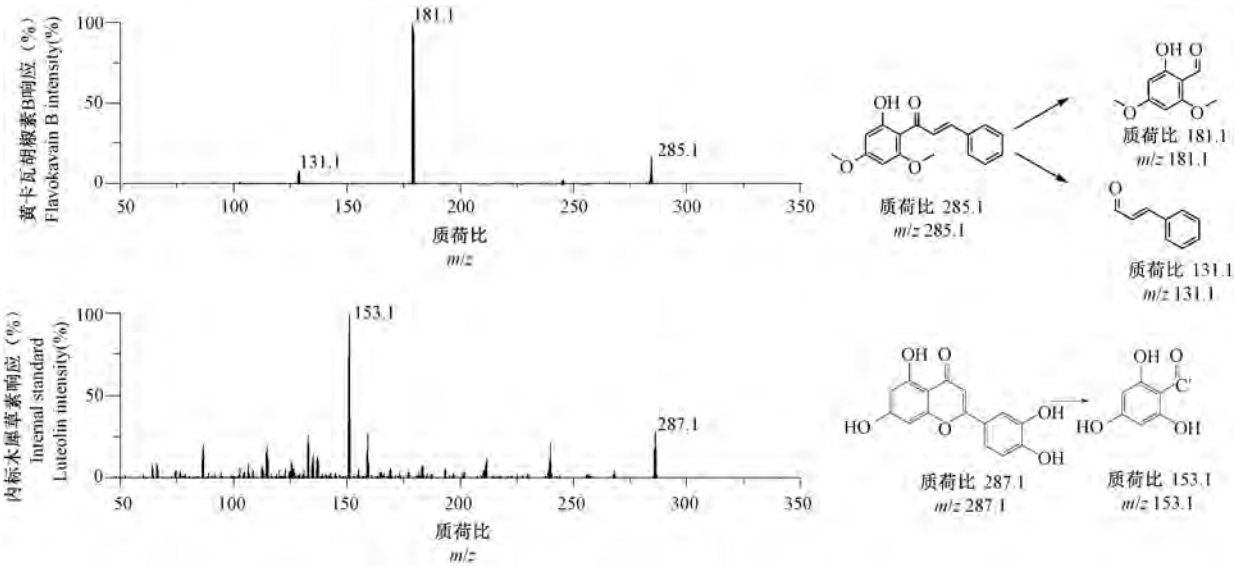


图 1 质谱碎片及可能的裂解过程

Figure 1 Product ion spectra and chemical structures with the fragmentation pattern

标本犀草素的各离子对的保留时间、碰撞能量和去簇电压等液相-质谱参数结果见表 1。

2.2 方法学考察

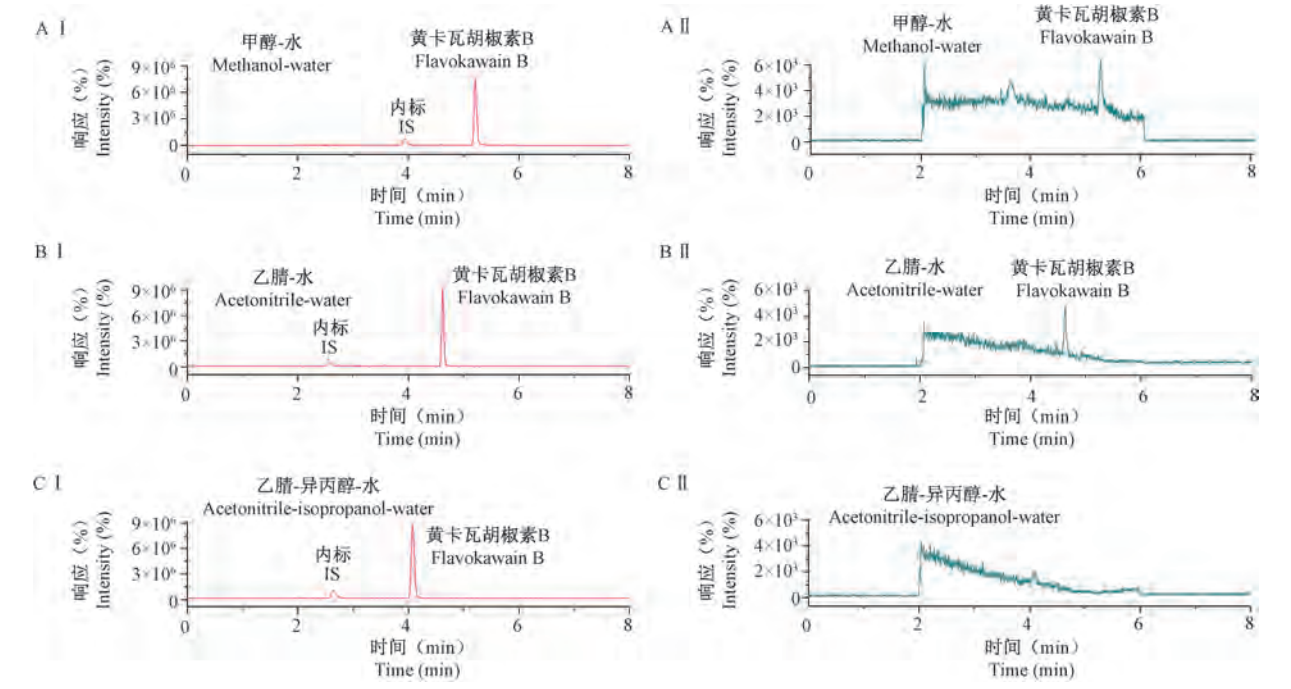
2.2.1 残留效应

使用含高浓度 FKB 的模拟生物样品 (800 ng/mL) 及内标, 考察 XSelect® HSS T3、XSelect® HSS

PFP 等不同色谱柱的残留, 结果 XSelect® HSS T3 色谱柱残留最少; 考察甲醇-水、乙腈-水、乙腈-异丙醇-水等不同洗脱体系下系统的残留, 结果乙腈-异丙醇-水洗脱条件下残留最少, 结果见图 2。因此使用 XSelect® HSS T3 色谱柱以乙腈-异丙醇-水为洗脱相来进行方法学的验证。

表 1 黄卡瓦胡椒素 B 和内标本犀草素优化后的液相质谱质谱参数

| 分析物<br>Analyte                            | 离子对<br>Ion pair | 驻留时间 (ms)<br>Dwell time (ms) | 去簇电压 (V)<br>De-clustering voltage (V) | 碰撞能量 (eV)<br>Collision energy (eV) | 保留时间 (min)<br>Retention time (min) |
|-------------------------------------------|-----------------|------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 黄卡瓦胡椒素 B<br>Flavokawain B                 | 285. 1/181. 1   | 100                          | 105                                   | 27                                 | 4. 06                              |
| 木犀草素 (内标)<br>Luteolin (Internal standard) | 287. 1/153. 1   | 100                          | 150                                   | 44                                 | 2. 65                              |



注: A I, A II: 黄卡瓦胡椒素 B (800 ng/mL)/内标 (IS) 在甲醇-水洗脱体系下残留的离子流图; B I, B II: 黄卡瓦胡椒素 B (800 ng/mL)/内标 (IS) 在乙腈-水洗脱体系下残留的离子流图; C I, C II: 黄卡瓦胡椒素 B (800 ng/mL)/内标 (IS) 在乙腈-异丙醇-水洗脱体系下残留的离子流图。

图 2 不同洗脱体系下的残留色谱图

Note. A I, A II. Extracted ion chromatogram of Flavokawain B (800 ng/mL) / internal standard (IS) in methanol-water elution system. B I, B II. Extracted ion chromatogram of Flavokawain B (800 ng/mL) / internal standard (IS) in acetonitrile-water elution system. C I, C II. Extracted ion chromatogram of Flavokawain B (800 ng/mL) / internal standard (IS) in acetonitrile isopropanol water elution system.

Figure 2 Carry-over results under different elution systems

2.2.2 提取溶剂选择

将含 FKB 的模拟生物样品 (100 ng/mL) 按“1.2.4”项下方法操作, 考察 FKB 和内标本犀草素在 3 倍甲醇和 3 倍乙腈提取条件下的提取率。提取率结果表明 3 倍乙腈 (FKB 为 97.08% ± 6.60%、IS 为 92.12% ± 4.24%) 稍优于 3 倍甲醇 (FKB 为

84.70% ± 1.89%、IS 为 96.83% ± 4.50%), 因此采用 3 倍乙腈作为提取溶剂进行后续方法学验证。

2.3 方法学确证

2.3.1 方法的选择性

如图 3 所示, 待测成分峰形和分离效果较好, FKB 出峰时间约为 4.06 min, 内标出峰时间约为



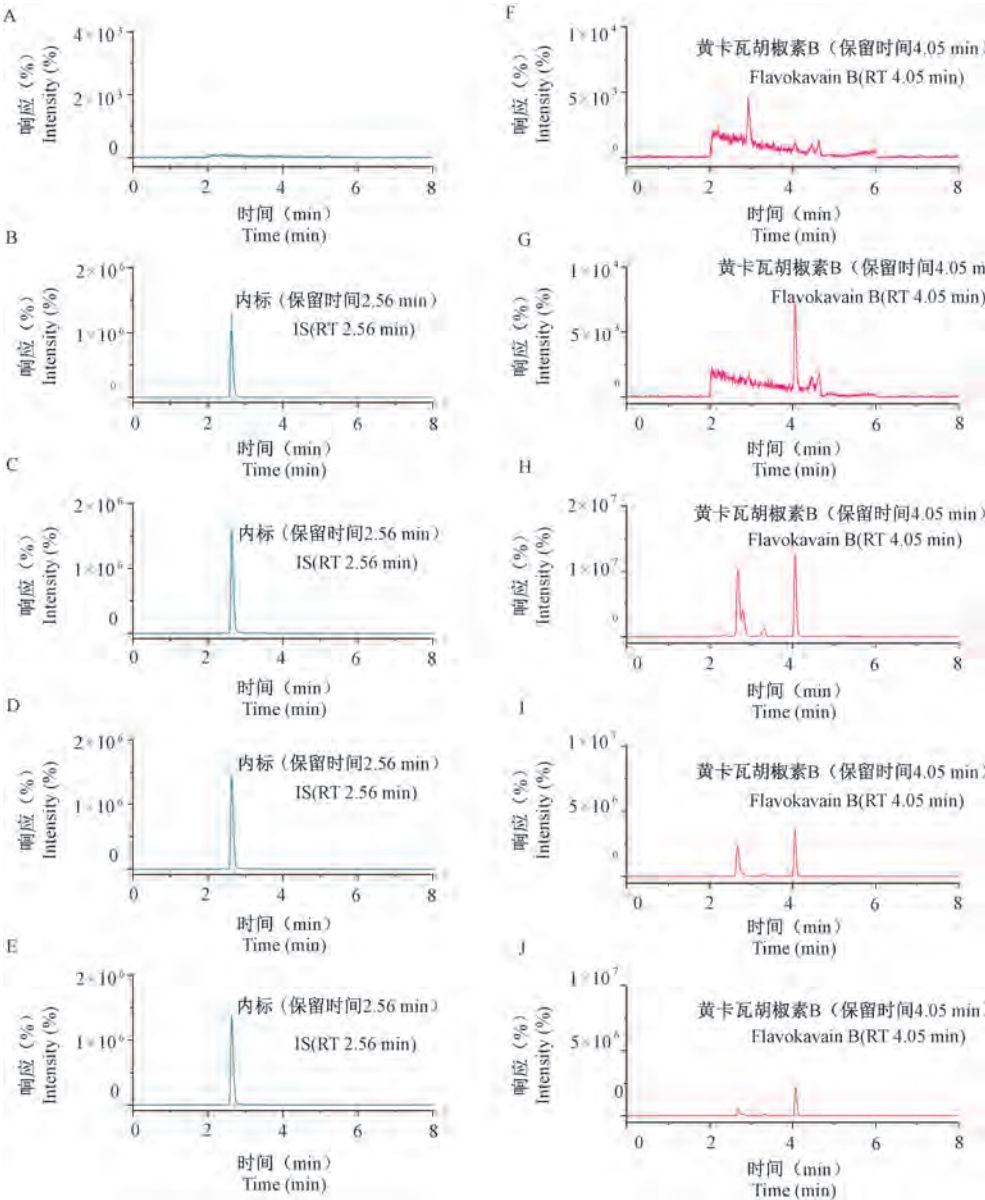
2. 65 min,小鼠血浆和脑组织中的内源性物质、代谢产物等基本不干扰以上成分的检出。

2. 3. 2 线性范围及定量限

血浆中 FKB 典型的标准曲线回归方程为  $Y = 0.010X + 0.0033$ , 相关系数  $r$  为 0.9995, 在 0.2 ~ 800 ng/mL 范围内线性关系良好, 经信噪比  $S/N = 10$  计算的 LOQ 为 0.2 ng/mL。

2. 3. 3 基质效应与提取回收率

LOQ 样品及各浓度 QC 样品的基质效应为 88.68% ~ 102.04%, 提取回收率在 95.42% ~



注:A,F:空白血浆样品提取离子流图;B,G:空白血浆样品加入内标(IS,木犀草素)和FKB(LOQ浓度,0.2 ng/mL)的提取离子流图;C,H:小鼠尾静脉注射给药0.083 h后的血浆样品提取离子流图;D,I:小鼠腹腔注射给药0.083 h后的血浆样品提取离子流图;E,J:小鼠灌胃给药0.083 h后的血浆样品提取离子流图。

图3 血浆中黄卡瓦胡椒素B和内标的MRM色谱图

Note. A, F. Extracted ion chromatogram of blank plasma sample. B, G. Blank plasma samples spiked with internal standard (IS, luteolin) and Flavokawain B (LOQ concentration, 0.2 ng/mL). C, H. Extracted ion chromatogram of plasma sample obtained 0.083 h after intravenous injection in mice. D, I. Extracted ion chromatogram of plasma sample obtained 0.083 h after intraperitoneal injection in mice. E, J. Extracted ion chromatogram of plasma sample obtained 0.083 h after intragastric administration in mice.

Figure 3 Multiple reactions monitoring chromatogram of Flavokawain B and internal standard in plasma

101.55%,表明样品提取和分析方法良好。

### 2.3.4 准确度与精密度

结果显示, LOQ 相对误差在  $-4.45\% \sim 12.50\%$ ,各浓度 QC 样品相对误差在  $-8.50\% \sim 9.70\%$ ;日内和日间精密度 LOQ 样品的 RSD 在  $13.00\%$  以内,各浓度 QC 样品的 RSD 在  $10.00\%$  以内,表明分析方法准确、稳定可行。

### 2.3.5 残留与稀释效应

进样高浓度 QC 样品后,空白样品的残留均低于内标响应的  $0.03\%$ ,低于 LOQ 样品的  $11.03\%$ ;稀释后样品准确度为  $2.43\% \sim 8.62\%$ ,精密密度为  $2.48\%$ ,表明分析方法的残留及稀释可靠性良好。

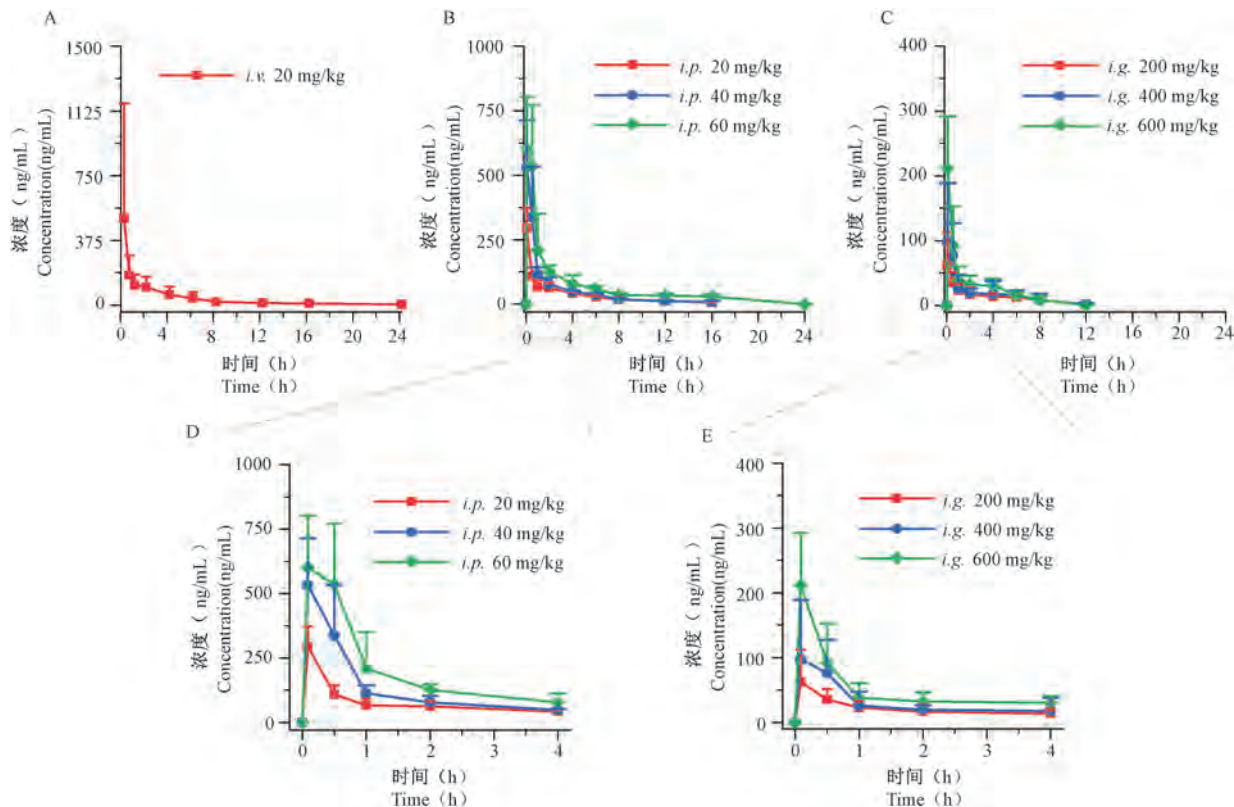
### 2.3.6 稳定性

测定低、中、高浓度 QC 样品在不同处理条件的

稳定性,实验结果表明 FKB 在室温放置 2 h(回收率: $92.89\% \sim 109.20\%$ ),经过 3 次冻融(回收率: $95.69\% \sim 103.98\%$ ), $-80^{\circ}\text{C}$  条件下储存 1 个月(回收率: $90.86\% \sim 103.46\%$ ),及处理后的样品在进样室内放置 24 h(回收率: $109.04\% \sim 111.70\%$ ),稳定性基本良好。

## 2.4 药代动力学结果

小鼠在静脉( $20\text{ mg/kg}$ )、腹腔注射( $20$ 、 $40$  和  $60\text{ mg/kg}$ )和灌胃( $200$ 、 $400$  和  $600\text{ mg/kg}$ )给药后未发现明显不良反应,FKB 的平均药时浓度曲线见图 4,计算的主要药代动力学参数见表 2。FKB 在小鼠体内吸收速度很快,各给药组在第 1 个采血时间点  $0.083\text{ h}$  即为峰值;体内滞留时间  $\text{MRT}_{0-t}$  较短,为  $2.78 \sim 4.51\text{ h}$ ;表观分布容积较大,均高于  $243.63\text{ L/kg}$ 。与尾静脉注射和腹腔注射给药(半衰期:



注:A:小鼠尾静脉注射给药后黄卡瓦胡椒素 B 的平均药时浓度曲线;B:小鼠腹腔注射给药后黄卡瓦胡椒素 B 的平均药时浓度曲线;C:小鼠灌胃给药后黄卡瓦胡椒素 B 的平均药时浓度曲线;D:小鼠腹腔注射给药后黄卡瓦胡椒素 B 在  $0 \sim 4\text{ h}$  的平均药时浓度曲线局部放大图;E:小鼠灌胃给药后黄卡瓦胡椒素 B 在  $0 \sim 4\text{ h}$  的平均药时浓度曲线局部放大图。

图 4 小鼠给药后黄卡瓦胡椒素 B 的平均药时浓度曲线( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Note. A. Mean concentration-time curve of Flavokawain B after intravenous injection in mice. B. Mean concentration-time curve of Flavokawain B after intraperitoneal injection in mice. C. Mean concentration-time curve of Flavokawain B after intragastric administration in mice. D. Partially enlarged plot of the mean concentration-time curve of Flavokawain B from  $0 \sim 4\text{ h}$  after intraperitoneal injection in mice; E. Partially enlarged view of the mean concentration-time curve of Flavokawain B in mice after intragastric administration from  $0 \sim 4\text{ h}$ .

Figure 4 Mean concentration-time curve of Flavokawain B in mice after administration( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

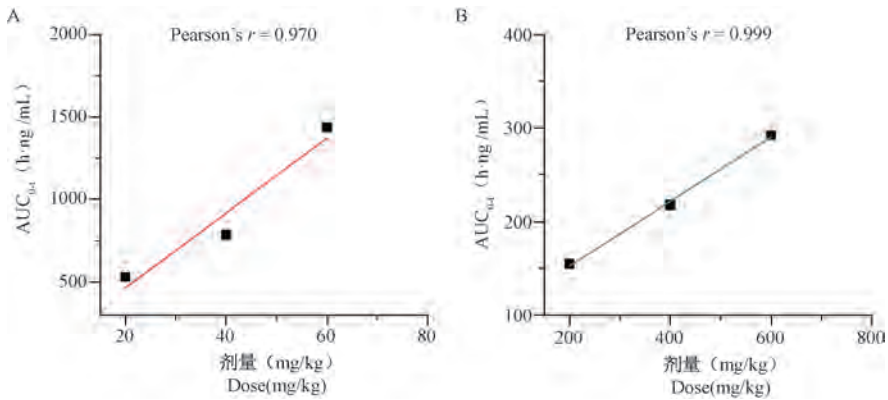
表 2 小鼠尾静脉注射、腹腔注射和灌胃黄卡瓦胡椒素 B 后血浆中药代动力学参数( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Pharmacokinetic parameters of plasma Flavokawain B in mice after intravenous injection, intraperitoneal injection, and intragastric administration ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 参数<br>Parameter                                | <i>i.v.</i> 20<br>(g/kg) | <i>i.p.</i> 20<br>(mg/kg) | <i>i.p.</i> 40<br>(mg/kg) | <i>i.p.</i> 60<br>(mg/kg) | <i>i.g.</i> 200<br>(mg/kg) | <i>i.g.</i> 400<br>(mg/kg) | <i>i.g.</i> 600<br>(mg/kg) |
|------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| AUC <sub>0-1</sub> (h·ng/mL)                   | 852.940                  | 529.320                   | 786.960                   | 1436.280                  | 154.490                    | 217.640                    | 292.130                    |
| AUC <sub>0-∞</sub> (h·ng/mL)                   | 898.820                  | 578.840                   | 898.560                   | 1437.080                  | 158.310                    | 341.190                    | 299.710                    |
| MRT <sub>0-1</sub> (h)                         | 4.510                    | 4.220                     | 3.270                     | 5.090                     | 3.730                      | 3.580                      | 2.780                      |
| MRT <sub>0-∞</sub> (h)                         | 6.060                    | 5.830                     | 6.350                     | 5.100                     | 3.990                      | 11.250                     | 3.090                      |
| t <sub>1/2α</sub> (h)                          | 7.600                    | 4.890                     | 8.330                     | 2.040                     | 1.810                      | 8.840                      | 2.180                      |
| T <sub>max</sub> (h)                           | 0.083                    | 0.083                     | 0.083                     | 0.083                     | 0.083                      | 0.083                      | 0.083                      |
| V <sub>z</sub> /F (L/kg)                       | 244.060                  | 243.630                   | 534.920                   | 122.950                   | 329.080                    | 1495.880                   | 630.400                    |
| CL <sub>z</sub> /F L/(h·kg)                    | 22.250                   | 34.550                    | 44.520                    | 41.750                    | 126.340                    | 117.240                    | 200.200                    |
| C <sub>5 min</sub> or C <sub>max</sub> (ng/mL) | 503.860                  | 294.160                   | 532.460                   | 602.390                   | 62.290                     | 97.510                     | 211.440                    |
| F (%)                                          | —                        | 62.060                    | 46.130                    | 56.130                    | 1.810                      | 1.280                      | 1.140                      |

4.89 ~ 9.70 h;清除率:22.25 ~ 44.23 L/(h·kg) 相比,FKB 灌胃给药体内半衰期(1.71 ~ 2.78 h)明显减小;清除率(1263.38 ~ 2001.95 L/(h·kg))明显加快。与静脉给药相比,腹腔注射 FKB 的绝对生物利用度为 46.31% ~ 62.06%,灌胃 FKB 的绝对生物

利用度仅为 1.14% ~ 1.81%。腹腔注射和灌胃给药 FKB 多剂量线性关系分析结果见图 5,可知小鼠在腹腔注射 20 ~ 60 mg/kg 及灌胃 200 ~ 600 mg/kg 给药剂量范围内,药代动力学过程呈明显的线性关系(Pearson's  $r > 0.97$ )。



注:A:小鼠腹腔注射给药后血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的 AUC<sub>0-1</sub>与给药剂量间的线性关系;B:小鼠灌胃给药后血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的 AUC<sub>0-1</sub>与给药剂量间的线性关系。

图 5 小鼠给药后血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的 AUC<sub>0-1</sub>与给药剂量间的线性关系( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Note. A. The linear relationship between AUC<sub>0-1</sub> and dosage of Flavokawain B in plasma after intraperitoneal injection in mice. B. The linear relationship between AUC<sub>0-1</sub> and dosage of Flavokawain B in plasma after intragastric administration in mice.

Figure 5 Linear relationship between AUC<sub>0-1</sub> and the dosage of Flavokawain B in the plasma of mice after administration( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

3 讨论

关于卡瓦胡椒相关制剂中 FKB 的含量测定方法有多种,如 HPLC-紫外光谱法、高效薄层色谱法、核磁共振波谱法和 HPLC-MS 法等<sup>[16-19]</sup>,但 FKB 在生物样品中检测方法的报道相对较少。Kanumuri 等<sup>[17]</sup>报道了健康志愿者血浆中 FKB 的超高效液相(UHPLC)-MS 方法,Yang 等<sup>[20]</sup>报道了大鼠血浆中 FKB 的 UHPLC-MS 方法,以上检测方法的血浆样品

来源分别为人和大鼠,定量限分别为 0.25 ng/mL 和 0.53 ng/mL,在小鼠血浆中 FKB 的检测方法尚未见报道。为深入了解 FKB 在小鼠体内的药代动力学特征,本研究利用 HPLC-MS/MS 建立灵敏、准确度高的血药浓度分析方法,并进一步探讨该方法在小鼠尾静脉注射、腹腔注射和灌胃给药不同剂量后血药浓度分析的适用性,这将为后期 FKB 在小鼠体内药理机制和安全性研究提供依据。在前期实验中,发现 FKB 容易在色谱柱残留,因此优化了不同色谱



柱和不同洗脱条件的残留,提高了 FKB 的检测准确度,同时还考察了样品的稀释效应,控制定量上限,达到进一步减少 FKB 残留的目的。并且,通过色谱柱等液相条件和质谱参数的优化,本方法检测 FKB 的 LOQ 低至 0.20 ng/mL,和上述方法相比有一定的提高。本文建立的 FKB 的 HPLC-MS/MS 分析方法,经验证符合中国药典《生物样品分析方法指导原则》的要求<sup>[21]</sup>,可同时满足小鼠尾静脉注射、腹腔注射和灌胃给药不同剂量 FKB 后血浆中药物浓度的样品检测(0.34 ~ 1814.32 ng/mL),并完整绘制了各给药途径血浆中 FKB 的药时曲线,成功用于 FKB 的药代动力学特征及生物利用度研究。

文献报道 FKB 小鼠灌胃剂量为 500 mg/kg<sup>[22]</sup>,在此基础上依据初步的急性毒性结果对剂量进行了探索,FKB 的最终剂量范围设计为腹腔注射 20 ~ 60 mg/kg、灌胃 200 ~ 600 mg/kg,尾静脉注射为 20 mg/kg。在整个实验过程中小鼠状态良好,未发现明显不良反应。

小鼠灌胃和腹腔注射后,FKB 吸收速度很快,血药浓度在给药后第一个采血时间点 5 min 即为峰值,通过 PubChem 网站查询 FKB 的油水分分配系数 LogP 为 3.8,说明 FKB 的脂溶性高、渗透性高,这可能是其体内迅速吸收的重要原因。FKB 表观分布容积(高于 243.63 L/kg)远大于小鼠的体液体积(0.73 L/kg)<sup>[23]</sup>,说明 FKB 在小鼠体内的分布极为广泛。FKB 灌胃给药的绝对生物利用度极差(1.38%),这与灌胃给药的体内消除半衰期较短及清除率较快有关。文献报道查尔酮等黄酮类成分代谢稳定性差,口服后以原型形式吸收入血少,并且药物极易受胃酸、消化酶和肠道菌群的影响<sup>[24-25]</sup>,亦能导致进入体循环的药量相对变少,这提示在后期 FKB 的相关制剂开发过程中对生物利用度需要特别关注。另外,在 FKB 质谱检测的 285.1/181.1 离子对通道上约 2.69 min 处有一色谱峰(图 3H ~ 3J),并随 FKB 的浓度变化而呈规律性变化,推断可能是 FKB II 相代谢物,如 FKB 的葡萄糖醛酸苷等进一步电离而形成的。关于 FKB 体内主要代谢物及相关活性的研究,课题组未来将进一步探索。FKB 腹腔注射给药的绝对生物利用度为 53.29%,相比灌胃给药有很大提升,并且在 20 ~ 60 mg/kg 给药剂量范围内呈现线性的药代动力学过程,这为使用腹腔给药进行 FKB 相关药理机制的探索提供了依据。

在研究中,发现受试药物 FKB 溶解度低(0.012 g/L, 25℃),几乎不溶于水,因而使用 5% Tween80 和 4% DMSO 辅料助溶。虽然 Tween80 和 DMSO 是科研常用的助溶剂,但我国近年临床研究发现,不少品种中药注射剂出现的严重不良反应均与使用了 Tween80 相关<sup>[26-27]</sup>。此外,高剂量的 DMSO 静脉注射可能也会带来副作用<sup>[28]</sup>。因此,本研究中静脉注射方式给药在助溶剂用量上存在一定的不足之处。在未来研究中,将尝试通过化学修饰等手段增加 FKB 溶解度或减少药物起效浓度等方式来减少助溶剂的用量,进而再次开展其药代动力学相关研究。总之,本研究建立的 HPLC/MS-MS 测定小鼠血浆中 FKB 的方法简便、准确、灵敏度高,适用于 FKB 在小鼠血浆中药代动力学特征和生物利用度研究,研究结果为 FKB 相关制剂的进一步研究开发提供了新方法和数据参考。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] 韦琨, 窦德强, 裴玉萍, 等. 胡椒的化学成分、药理作用及与卡瓦胡椒的对比 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5): 328-333.  
Wei K, Dou DQ, Pei YP, et al. Chemical constituents and pharmacological effects of pepper and comparison with kava pepper [J]. Chin J Chin Mater Med, 2002, 27(5): 328-333.
- [2] 王厄舟, 潘胜利, 张淑芳. 卡瓦胡椒化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(9): 855-858.  
Wang EZ, Pan SL, Zhang SF. Advances in chemical and pharmacological studies on kava *Piper methysticum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2001, 32(9): 855-858.
- [3] Lin CT, Senthil Kumar KJ, Tseng YH, et al. Anti-inflammatory activity of Flavokawain B from *Alpinia pricei* Hayata [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(14): 6060-6065.
- [4] Yiannis C, Huang K, Tran AN, et al. Protective effect of kava constituents in an *in vitro* model of oral mucositis [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(7): 1801-1811.
- [5] Abu N, Mohamed NE, Yeap SK, et al. *In vivo* antitumor and antimetastatic effects of Flavokawain B in 4T1 breast cancer cell-challenged mice [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 1401-1417.
- [6] Celentano A, Tran A, Testa C, et al. The protective effects of Kava (*Piper methysticum*) constituents in cancers: a systematic review [J]. J Oral Pathol Med, 2019, 48(7): 510-529.
- [7] Mohamad AS, Akhtar MN, Zakaria ZA, et al. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, Flavokawain B on chemical and thermal models of nociception in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 647(1-3): 103-109.
- [8] Rossette MC, Moraes DC, Sacramento EK, et al. The *in vitro* and *in vivo* antiangiogenic effects of Flavokawain B [J]. Phytother Res, 2017, 31(10): 1607-1613.

- [ 9 ] Abu N, Mohameda NE, Tangarajoo N, et al. *In vitro* toxicity and *in vivo* immunomodulatory effects of Flavokawain A and flavokawain B in balb/C mice [J]. Nat Prod Commun, 2015, 10 (7): 1199–1202.
- [ 10 ] Hua R, Pei Y, Gu H, et al. Antitumor effects of Flavokawain B flavonoid in gemcitabine resistant lung cancer cells are mediated via mitochondrial-mediated apoptosis, ROS production, cell migration and cell invasion inhibition and blocking of PI3K/AKT Signaling pathway [J]. J BUON, 2021, 26(2): 645.
- [ 11 ] Palko-Łabuz A, Kostrzewa-Susłow E, Janeczko T, et al. Cyclization of flavokawain B reduces its activity against human colon cancer cells [J]. Hum Exp Toxicol, 2020, 39(3): 262–275.
- [ 12 ] Hseu YC, Lin RW, Shen YC, et al. Flavokawain B and doxorubicin work synergistically to impede the propagation of gastric cancer cells via ROS-mediated apoptosis and autophagy pathways [J]. Cancers, 2020, 12(9): 2475.
- [ 13 ] Li X, Pham V, Tippin M, et al. Flavokawain B targets protein neddylation for enhancing the anti-prostate cancer effect of Bortezomib via Skp2 degradation [J]. Cell Commun Signal, 2019, 17(1): 25.
- [ 14 ] Zhu Y, Fan W, Wang Y, et al. Flavokawain B weakens gastric cancer progression via the TGF- $\beta$ 1/SMAD4 pathway and attenuates M2 macrophage polarization [J]. J Immunol Res, 2022, 2022: 4903333.
- [ 15 ] Jhoo JW, Freeman JP, Heinze TM, et al. *In vitro* cytotoxicity of nonpolar constituents from different parts of kava plant (*Piper methysticum*) [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(8): 3157–3162.
- [ 16 ] Zenger K, Agnolet S, Schneider B, et al. Biotransformation of Flavokawains A, B, and C, chalcones from kava (*Piper methysticum*), by human liver microsomes [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(28): 6376–6385.
- [ 17 ] Kanumuri SRR, Mamallapalli J, Nelson R, et al. Clinical pharmacokinetics of kavalactones after oral dosing of standardized kava extract in healthy volunteers [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 297: 115514.
- [ 18 ] Meissner O, Häberlein H. HPLC analysis of Flavokavins and kavapyrones from *Piper methysticum* forst [J]. J Chromatogr B, 2005, 826(1–2): 46–49.
- [ 19 ] Dharmaratne HR, Dhammika Nanayakkara NP, Khan IA. Kavalactones from *Piper methysticum*, and their  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic analyses [J]. Phytochemistry, 2002, 59(4): 429–433.
- [ 20 ] Yang X, Zan T, Yan H, et al. UPLC-MS/MS determination of flavokawain B, a novel anti-tumor chemotherapeutic agent in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study in rats [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33(2): e4391.
- [ 21 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
- National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Part IV [M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press; 2020.
- [ 22 ] Narayanapillai SC, Leitzman P, O'Sullivan MG, et al. Flavokawains A and B in kava, not dihydromethysticin, potentiate acetaminophen-induced hepatotoxicity in C57BL/6 mice [J]. Chem Res Toxicol, 2014, 27(10): 1871–1876.
- [ 23 ] Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans [J]. Pharm Res, 1993, 10(7): 1093–1095.
- [ 24 ] Wang X, Chen B, Xu D, et al. Molecular mechanism and pharmacokinetics of flavonoids in the treatment of resistant EGF receptor-mutated non-small-cell lung cancer: a narrative review [J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(6): 1388–1406.
- [ 25 ] Rudrapal M, Khan J, Dukhyil AAB, et al. Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics [J]. Molecules, 2021, 26(23): 7177.
- [ 26 ] 邱玲, 段为钢. 注射用聚山梨酯 80 的安全性分析 [J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(6): 90–95.
- Qiu L, Duan WG. Analysis on the safety of the excipient polysorbate 80 for injection [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2018, 41(6): 90–95.
- [ 27 ] 张伟, 殷华, 李月, 等. 中药注射剂中增溶性辅料聚山梨酯 80 的安全性问题分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (20): 160–165.
- Zhang Y, Yin H, Li Y, et al. Analysis on safety of polysorbate 80 as a solubilizing excipient in traditional Chinese medicine injections [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25 (20): 160–165.
- [ 28 ] 贾国荣, 谢波. 二甲基砒临床应用的国内研究现状 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1284–1286.
- Jia GR, Xie B. Research status of safety of clinical application of dimethyl sulfoxide at home and abroad [J]. Int J Lab Med, 2010, 31(11): 1284–1286.

[收稿日期] 2023-03-03

杨宗统,孙铁锋,李晓晶,等. 基于肠道菌群和短链脂肪酸代谢探讨不同饮食条件下高脂血症大鼠发病机制 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1314-1323.

Yang ZT, Sun TF, Li XJ, et al. Pathogenesis of hyperlipidemia in rats under various dietary conditions based on intestinal flora and short-chain fatty acid metabolism [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1314-1323.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.009

# 基于肠道菌群和短链脂肪酸代谢探讨不同饮食条件下高脂血症大鼠发病机制

杨宗统<sup>1,2</sup>, 孙铁锋<sup>2\*</sup>, 李晓晶<sup>2</sup>, 徐东川<sup>2</sup>, 袁敏<sup>2</sup>, 靳光乾<sup>2</sup>, 王雯慧<sup>1\*</sup>

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014)

**【摘要】 目的** 本研究拟对比两种不同高脂饮食方式诱导的高脂血症大鼠肠道菌群变化与短链脂肪酸代谢特征,以宿主-肠道菌群-代谢角度探讨高脂血症可能的微观机制。**方法** SPF 级 SD 大鼠分为:正常饮食组(CG 组);饲喂大鼠维持饲料;高脂饮食组(HFD1 组):每天足量饲喂高脂饲料;限饲高脂饮食组(HFD2 组):每天限量饲喂高脂饲料 80 g,不限量饲喂维持饲料。8 周后检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平;苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠肝组织和肾周脂肪病理学变化;取结肠内容物进行 16S rDNA 高通量测序,观察肠道菌群结构与功能的变化,并检测结肠内容物中短链脂肪酸的含量。**结果** 与 CG 组相比,HFD1 组和 HFD2 组大鼠摄食量下降,体重升高;血清中 TC、TG、LDL-C 均显著升高;肝组织发生明显脂肪变性,肾周脂肪出现炎性病变;高脂干预后大鼠肠道菌群相对丰度显著变化,其中乳杆菌属相对丰度明显降低,菌群结构和功能变化明显,总短链脂肪酸、乙酸、丁酸、异丁酸下降显著。**结论** 两种高脂饮食方式均能引起大鼠高脂血症,且发病机制基本一致,均与脂质代谢以及肠道菌群紊乱有关。每日限制一定的高脂饲料饲喂量不仅能够降低高脂饲料对大鼠食欲的影响,还能提高大鼠高脂血症模型制备的稳定性,是一种值得推广应用的大鼠高脂模型制备方法。

**【关键词】** 高脂血症;肠道菌群;短链脂肪酸;发病机制

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1314-10

## Pathogenesis of hyperlipidemia in rats under various dietary conditions based on intestinal flora and short-chain fatty acid metabolism

YANG Zongtong<sup>1,2</sup>, SUN Tiefeng<sup>2\*</sup>, LI Xiaojing<sup>2</sup>, XU Dongchuan<sup>2</sup>,  
YUAN Min<sup>2</sup>, JIN Guangqian<sup>2</sup>, WANG Wenhui<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China.

2. Shandong Academic of Chinese Medicine, Jinan 250014)

Corresponding author: SUN Tiefeng. E-mail: suntiefenglove@163.com; WANG Wenhui. E-mail: ww777@126.com

**【基金项目】** 山东省技术创新引导计划(鲁渝科技协作)(2020LYXZ011)。

Funded by Shandong Provincial Technology Innovation Guidance Plan (Shandong Chongqing Science and Technology Cooperation) (2020LYXZ011)。

**【作者简介】** 杨宗统(1992—),男,助理研究员,研究方向:中药免疫药理及药效学。Email:YangZT2021@163.com

**【通信作者】** 王雯慧(1962—),女,教授,博士生导师,研究方向:动物黏膜免疫学、黏膜免疫病理学与动物疾病病理学。

Email:ww777@126.com;

孙铁锋(1989—),男,在读博士研究生,助理研究员,研究方向:中西医结合基础。Email:suntiefenglove@163.com。

\* 共同通信作者



**【Abstract】 Objective** To compare changes in intestinal flora and the characteristics of short-chain fatty acid metabolism in hyperlipidemic rats induced by two different high fat diets, and to explore the possible mechanism of hyperlipidemia from the viewpoint of host-intestinal flora metabolism. **Methods** SPF SD rats were divided into a normal diet group (CG) and two high fat diet groups (HFD1 and HFD2). Rats were fed an 80 g high fat diet and unlimited maintenance diet. After 8 weeks, serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were measured. Pathological changes in liver tissue and perirenal fat were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Colon contents were collected for 16S rDNA high-throughput sequencing to assess changes in the structure and function of intestinal flora and the intestinal contents of short-chain fatty acids. **Results** Compared with the CG group, food intake was decreased and body weight was increased, serum TC, TG, and LDL-C were increased significantly, liver tissue showed obvious steatosis and perirenal fat showed inflammatory lesions in HFD1 and HFD2 groups. After high fat intervention, the relative abundance of intestinal microflora in rats was changed significantly and sex differences were observed, in which the relative abundance of *Lactobacillus* was decreased significantly, and the structure and function of *Lactobacillus* were decreased significantly, including total short-chain fatty acids, acetic acid, butyric acid, and isobutyric acid. **Conclusions** The two kinds of high-fat diet caused hyperlipidemia in rats. The pathogenesis was essentially the same and related to lipid metabolism and intestinal flora disorder. Daily restriction of a certain amount of high fat diet reduced the effect of high fat on appetite and improved stability of rat hyperlipidemia model establishment.

**【Keywords】** hyperlipidemia; gut microbiota; short-chain fatty acids; pathogenesis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

高脂血症 (hyperlipidemia, HLP) 是一种常见的代谢紊乱性疾病, 由于脂肪代谢紊乱而造成血浆脂质失衡<sup>[1]</sup>, 临床上主要表现为血液中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) 水平升高或高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) 水平降低。这种血脂异常会增加多种疾病发生的潜在风险, 如心脑血管疾病<sup>[2]</sup>、脂肪肝<sup>[3]</sup>和动脉粥样硬化<sup>[4]</sup>等。目前人们生活质量大大提高, 生活方式也发生了很大的变化, 生活节奏加快以及不健康的饮食方式等导致了高脂血症的发生率逐渐增加, 年轻趋势明显, 已日益凸显为影响健康的重要因素<sup>[5]</sup>。

研究表明疾病的发生和发展过程受肠道菌群和宿主代谢表型改变的影响<sup>[6]</sup>。肠道微生态具有参与食物消化吸收、营养与物质代谢过程, 增强宿主的免疫等功能, 可影响高脂血症、肥胖及其相关代谢性疾病的发生和发展过程<sup>[7-8]</sup>。禁食和热量限制会降低肠道菌群的总量及多样性, 改变肠道菌群数目, 有利于宿主代谢健康<sup>[9]</sup>。短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFA) 和肠道微生物代谢直接相关, 可为宿主代谢提供能量, 是维持机体健康的重要信息介质<sup>[10]</sup>。在肠道中发挥着维持水和电解质

平衡、调节肠道菌群平衡、改善肠道功能、抗炎、抗肿瘤和调控基因表达等重要作用<sup>[11]</sup>。短链脂肪酸大多数产生在盲肠和近端结肠, 肠道菌群可通过代谢产物短链脂肪酸来影响脂代谢, 因此现代研究提出肠道微生态与机体健康密切相关, 肠道菌群可能是高脂血症防治的新靶点<sup>[12-15]</sup>。

制备高效、合理、稳定的高脂血症动物模型以及探讨实验中高脂血症的发病机制对于预防和治疗高脂血症至关重要。目前国内外研究中最常见建立方法是高脂饲喂法, 即通过高脂膳食诱导在饮食方面进行干预, 该方法的形成机制与大多数高脂血症患者的高血脂病因和发病机制相似, 但是在实验中发现长期的高脂膳食导致大鼠的食欲下降、摄食量不足以及进食个体差异较大, 从而造成模型不稳定, 降低了模型制备的效率<sup>[16-17]</sup>。因此, 本研究中采用高脂饲料限制饲喂和不限量饲喂的两种喂养方式建立高脂血症大鼠模型, 基于肠道菌群变化与短链脂肪酸代谢特征分析从宿主-肠道菌群-代谢角度探讨高脂血症可能的微观机制, 以期高脂血症发病机制的研究提供新方向; 并对两种高脂饲喂方式建立的模型大鼠血清生化指标、肝病理、肠道菌群及短链脂肪酸的变化进行比较分析, 以期降脂药物的研发建立一种新的动物模型制备方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

30 只 5 周龄 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重 150 ~ 200 g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司【SCXK(鲁)20190003】。饲养期间各组大鼠自由饮水,维持饲料(含蛋白质 23.76%,粗纤维 5%,脂肪 3.5%),高脂饲料(含蛋白质 26%,粗纤维 8%,脂肪 21.5%)。室温 22 ~ 25℃,相对湿度 50% ~ 60%,每 12 h 明暗交替的环境中,饲养于山东省食品药品检验研究院动物实验室【SYXK(鲁)2018-0013】。本动物实验经山东省中医药研究院实验动物福利与伦理委员会批准(SDZYY20210106001),且严格按照替代、减少和优化的“3R”原则。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Sparkjade, EC0001); 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (Sparkjade, EE0012); 戊巴比妥钠 (上海化学试剂采供供应站分装厂, 120505); T-CHO 测试盒 (20220110)、TG 测试盒 (20220111)、HDL-C 测试盒 (20220110)、LDL-C 测试盒 (20220110) 均购自南京建成生物工程研究所; 磁珠法提取试剂盒 (Qiagen, Valencia, California, USA); Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with CG Buffer (New England Biolabs, M0531S); Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, M0530S); DNA 纯化回收试剂盒 (TianGen, DP214); 建库试剂盒 (Illumina, E7370L)。乙酸乙酯 (Sigma, CG-MS 级, 240370); 乙酸 (Sigma, A6283); 丙酸 (Sigma, 402907); 丁酸 (Sigma, B103500); 异丁酸 (Sigma, I1754); 戊酸 (Sigma, 240370); 异戊酸 (Sigma, 129542); 己酸 (Sigma, 153745)。

高速冷冻离心机 (VELOCITY 18R; Dynamica, 德国); 微孔板分光光度计 (EPOCH; BioTek, 美国); 电子天平 (BSA224S-C; Wsartorius, 德国); 封闭式自动组织脱水机 (Excelsior AS; ThermoFisher Scientific, 美国); 组织包埋机 (HistoStar; ThermoFisher Scientific, 美国); 轮转式切片机 (531CM-Y43; Leica, 德国); Bio-rad T100 梯度 PCR 仪 (T100; Bio-Rad, 美国); 基因测序仪 (Novaseq 6000; Illumina, 美国); 气-质联用仪 (Agilent 7890A/5975C; Agilent, 美国); 色谱柱 (Agilent DB-WAX; Agilent, 美国) 毛细管柱 30 m ×

0.25 mm ID × 0.25 μm。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组及模型制备

30 只 SD 大鼠,雌雄各半,适应性喂养大鼠维持饲料 3 d,禁食不禁水 12 h 后称定体重,根据体重随机分成 3 组:正常饮食组 (CG 组)、高脂饮食组 (HFD1 组)、限饲高脂饮食组 (HFD2 组),每组 10 只。CG 组:每天不限量饲喂维持饲料;HFD1 组:每天不限量饲喂高脂饲料;HFD2 组:每天定量饲喂高脂饲料 80 g,高脂饲料吃完后不限量饲喂维持饲料。为了验证大鼠高脂血症模型是否成功建立,观察模型建立后继续饲喂高脂饲料对各项检测指标的影响,4 周后分别测定各组大鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平,与正常对照组相比,血清 TG 或 TC 或 LDL-C 升高,差异具有显著性,判定模型成立;高脂饲料持续饲喂 8 周。

#### 1.2.2 样本采集及处理

(1) 血清样本:分别于高脂饲料喂养的第 4 周和第 8 周取血,每次取血前禁食 12 h,第 4 周采用眼眶后静脉丛采血法取血;第 8 周采用戊巴比妥钠麻醉后,腹主动脉取血。得到全血样品之后,室温下静置 30 min 之后,4℃ 3000 r/min 离心 10 min 收集上清液,-20℃ 保存备用。(2) 脂肪和肝组织:大鼠腹主动脉取血处死后解剖取肾周围脂肪和肝,用镊子夹住肝门部门静脉根部剪断血管和韧带取出肝,分离左外叶,将大鼠肾与肾门周围脂肪组织一并摘出,分离左肾周围棕黄色脂肪组织,分离后的组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。(3) 肠道内容物:用无菌解剖刀,在无菌状态下取出整个肠道;在无菌操作台内切取结肠部位,用无菌手术刀挖取内容物,立即放在冰上进行分装并标记;分装好后立即进行液氮速冻,置于-80℃ 保存。

#### 1.2.3 大鼠体重、摄食量及血脂检测

每天观察大鼠一般状态(毛色、活动量、排便、死亡情况等),每周称量并记录大鼠体重 1 次,每天称量并计算各笼大鼠的饲料摄食量,计算各笼的平均摄食量。依照试剂盒说明书方法检测第 4 周和第 8 周各组大鼠血清 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 含量。

#### 1.2.4 大鼠肝、脂肪组织形态学观察

大鼠肝和脂肪组织进行苏木精-伊红 (HE) 染色,光镜下观察其形态学变化。

#### 1.2.5 大鼠肠道内容物 16S rDNA 扩增子测序

采用 CTAB 方法从结肠内容物中提取总 DNA,

并对 DNA 的纯度和浓度进行检测。16S rDNA 扩增子测序(16S rDNA amplicon sequencing),检测各组大鼠肠道菌群变化情况。

1.2.6 大鼠肠道内容物短链脂肪酸检测

基于气相色谱-质谱联用(CG-MS)技术检测各组大鼠肠道内容物菌群关键代谢产物短链脂肪酸含量。

1.3 统计学分析

所有数据以平均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 9.0 统计学软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂饮食对大鼠体重、摄食量及血脂水平的影响

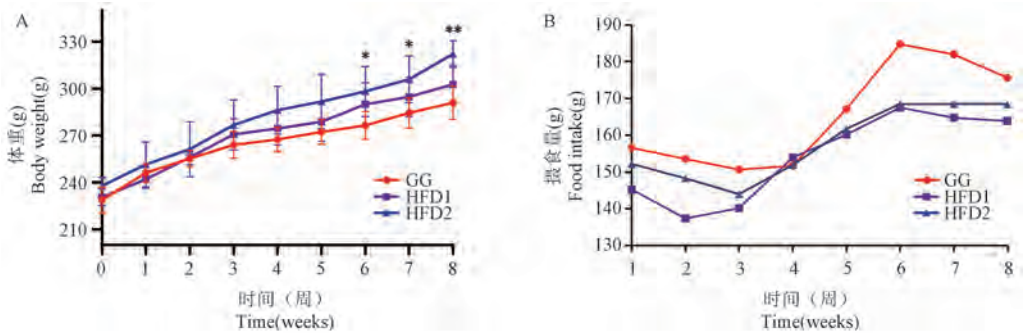
各组大鼠皮毛光泽度好,正常进食饮水和排便,活动自如,无死亡现象。由图 1 可知,各组大鼠体重均有不同程度变化,饲喂高脂饲料 3 周后 HFD1 组和 HFD2 组的大鼠体重均高于 CG 组,6 周后 HFD2 组的大鼠体重显著高于 CG 组( $P <$

0.01)。各组大鼠的摄食量也存在不同程度变化,饲喂高脂饲料 4 周后,HFD1 组和 HFD2 组大鼠的摄食量均低于 CG 组,且 HFD1 组大鼠的摄食量低于 HFD2 组(图 1B)。分析高脂饮食对大鼠体重和摄食量影响的结果发现,长期饲喂高脂饲料影响大鼠食欲,降低了大鼠的摄食量,每天限量饲喂高脂饲料可以减轻高脂饲料对大鼠食欲的影响,增加体重增长速度。

检测第 4、8 周各组大鼠血清 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 含量,与 CG 组相比,第 4 周 HFD1 组和 HFD2 组大鼠血清中 TC、TG 均显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),两组大鼠血清 LDL-C 均显著升高( $P < 0.01$ ),HFD1 组 HDL-C 水平显著降低( $P < 0.05$ );第 8 周 HFD1 组和 HFD2 组大鼠血清中 TC、TG 和 LDL-C 均显著升高( $P < 0.01$ ),HDL-C 水平显著降低( $P < 0.01$ ),结果显示改变高脂饮食方式均引起大鼠体内血脂代谢紊乱,发生高脂血症(表 1)。

2.2 高脂饮食对大鼠肝和脂肪组织形态学的影响

剖检各组大鼠肝组织发现 CG 组肝表面光滑呈暗褐色,质地柔软;HFD1 组颜色微黄,出现黑褐色点斑,HFD2 组整个肝颜色较黄,边缘圆钝。肝 HE



注:A:高脂饮食对大鼠体重的影响;B:高脂饮食对大鼠摄食量的影响;与 CG 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。(下图/表同)

Figure 1 Effects of high-fat diet on body weight and food intake of rats( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Note. A. Effect of high-fat diet on the body mass of rats. B. Effect of high-fat diet on food intake of rats. Compared with CG group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . (The same in the following figures and tables)

表 1 高脂饮食对肥胖大鼠血脂水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effects of high-fat diet on blood lipids in obese rats( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别<br>Groups | 时间<br>Time     | 总胆固醇 (mmol/L)<br>TC (mmol/L) | 甘油三酯 (mmol/L)<br>TG (mmol/L) | 高密度脂蛋白 (mmol/L)<br>HDL-C (mmol/L) | 低密度脂蛋白 (mmol/L)<br>LDL-C (mmol/L) |
|--------------|----------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| CG           |                | 2.249 ± 0.054                | 0.967 ± 0.050                | 1.288 ± 0.178                     | 0.486 ± 0.079                     |
| HFD1         | 4 周<br>4 weeks | 2.690 ± 0.103 *              | 1.321 ± 0.063 *              | 0.810 ± 0.139 *                   | 1.088 ± 0.039 **                  |
| HFD2         |                | 3.458 ± 0.218 **             | 1.410 ± 0.135 **             | 1.214 ± 0.155                     | 1.096 ± 0.073 **                  |
| CG           |                | 2.271 ± 0.108                | 0.765 ± 0.035                | 1.785 ± 0.199                     | 0.708 ± 0.055                     |
| HFD1         | 8 周<br>8 weeks | 3.638 ± 0.304 **             | 1.470 ± 0.204 **             | 0.655 ± 0.150 **                  | 1.348 ± 0.146 **                  |
| HFD2         |                | 4.160 ± 0.224 **             | 1.542 ± 0.145 **             | 0.762 ± 0.163 **                  | 1.372 ± 0.182 **                  |



染色表明,CG 组肝小叶中肝细胞排列正常,肝小叶结构清晰,肝细胞板呈放射状排列,未见细胞变性和炎细胞浸润;HFD1 和 HFD2 组肝小叶均出现脂肪变性,肝脂滴较多,可见明显气球样变(见图 2),HFD2 组出现肝索排列紊乱,部分肝细胞破裂,肝小

叶结构模糊(见图 2)。肾周脂肪 HE 染色表明,CG 组肾周脂肪组织细胞排列紧密,大小均匀;HFD1 组和 HFD2 组脂肪组织细胞大小不均,少量细胞胞质断裂,脂滴空泡融合,脂肪细胞有损伤(见图 3),HFD2 组脂肪组织多灶状炎细胞浸润(见图 3)。

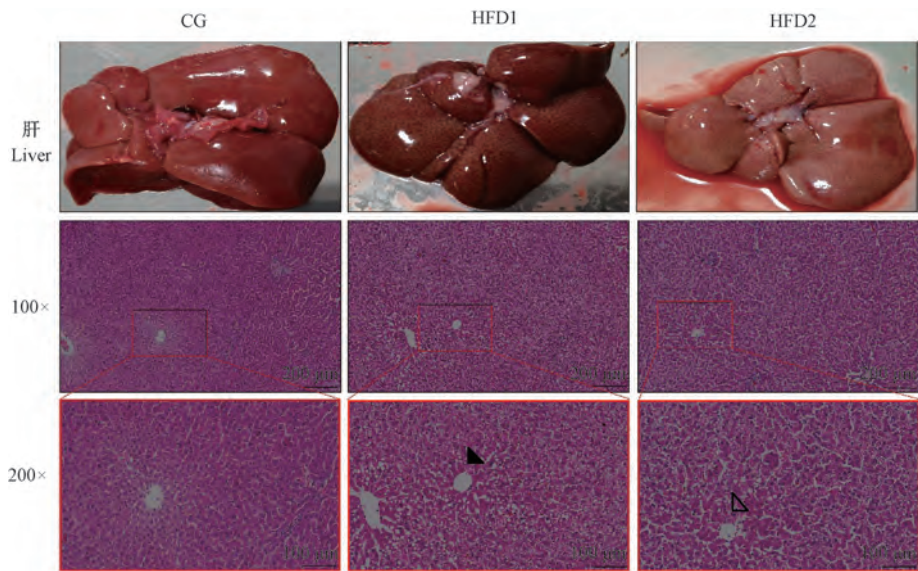


图 2 高脂饮食对大鼠肝组织的影响

Figure 2 Effect of high-fat diet on liver tissue of rats

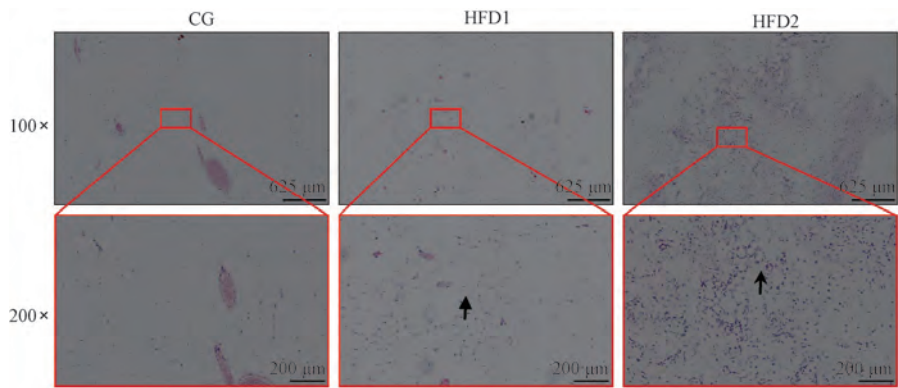


图 3 高脂饮食对大鼠肾周脂肪组织的影响

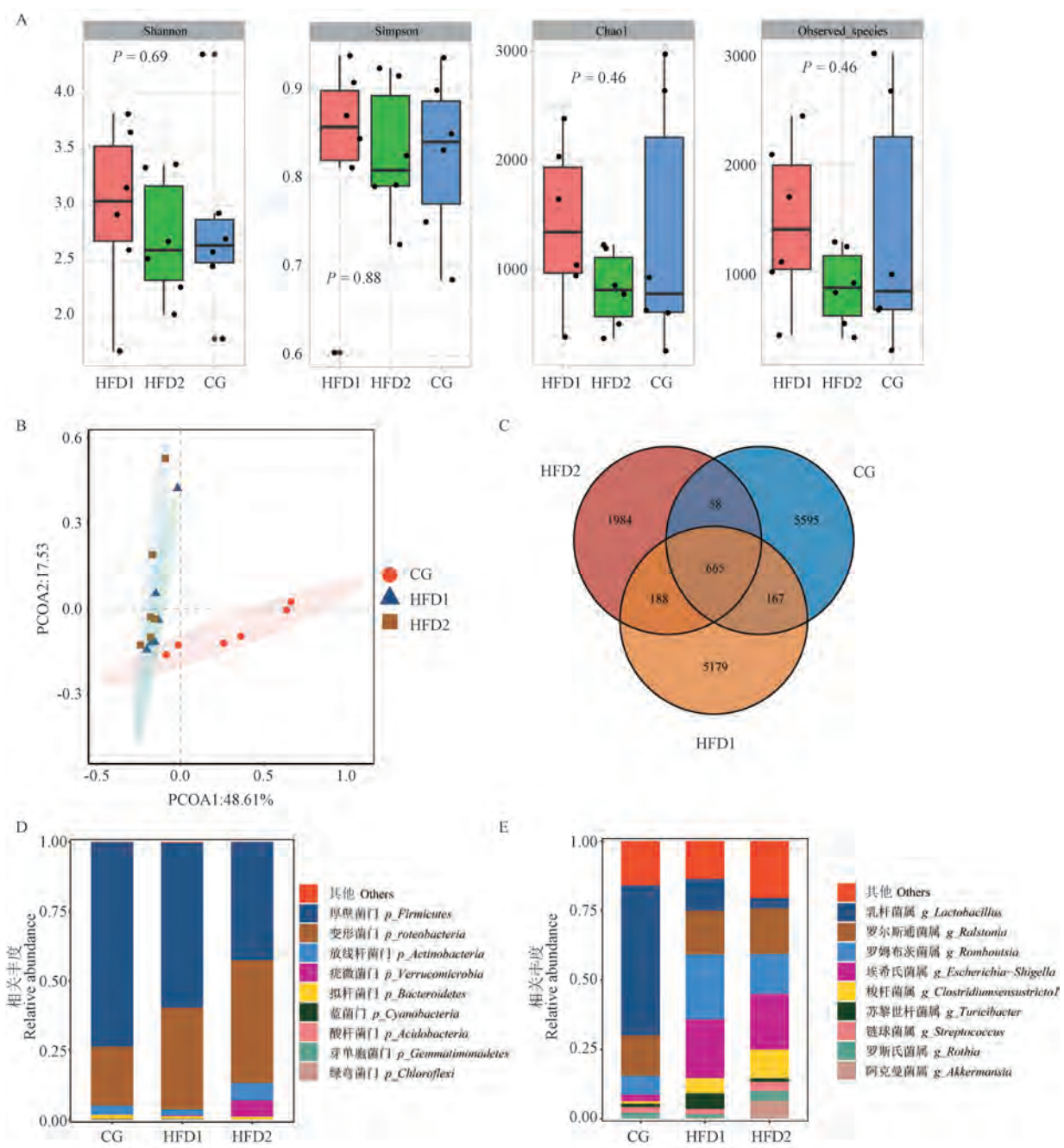
Figure 3 Effect of high-fat diet on perirenal adipose tissue in rats

2.3 高脂饮食对肠道菌群多样性的影响

收集各组新鲜粪便,采用 16S rDNA 测序方法分析菌群多样性。主坐标分析(principal coordinates analysis, PcoA)用于分析样本群落组成的相似性或相异性,是一种非约束性的数据降维分析方法。对测序数据进行 Alpha 多样性分析,绘制大鼠肠道菌群的 Chao1 指数、Simpson 指数、Shannon 指数、Observed species 指数箱线图,可以看出高脂饲料喂养后,α 多样性降低,但无统计学意义( $P >$

0.05)(见图 4A)。本次实验各组间 PcoA 分析显示 HFD1 组与 HFD2 组和 CG 组在主坐标 1(PC1)上相距较远,说明 HFD1 组和 HFD2 组与 CG 组间菌群组成有差异;HFD1 组与 HFD2 组重合度较高,说明 HFD1 组与 HFD2 组菌群组成相似(见图 4B)。韦恩图显示了 CG、HFD 和 HFD2 各组之间的 ASV 分布。3 个组共有的 ASV 有 665 个,HFD 物种数量较 CG 组物种数量有所减少(见图 4C)。在门分类水平上,共挑选出丰度前 10 的菌门,由图可知厚壁菌

门(*p \_\_ Firmicutes*)、变形菌门(*p \_\_ Proteobacteria*)、放线杆菌门(*p \_\_ Actinobacteria*)、疣微菌门(*p \_\_ Verrucomicrobia*)、拟杆菌门(*p \_\_ Bacteroidetes*)、蓝菌门(*p \_\_ Cyanobacteria*)、酸杆菌门(*p \_\_ Acidobacteria*)、芽单胞菌门(*p \_\_ Gemmatimonadetes*)、绿弯菌门(*p \_\_ Chloroflexi*)是优势菌门(见图 4D)。在属分类水平上,共挑选出丰度前 10 的菌属,由图可知,乳杆菌属(*g \_\_ Lactobacillus*)、罗尔斯通菌属(*g \_\_ Ralstonia*)、罗姆布茨菌属(*g \_\_ Romboutsia*)、埃希氏菌属(*g \_\_*



注:A:各组样本菌群α多样性分析;B:各组样本菌群PcoA分析;C:ASV维恩图;D:门水平上的肠道微生物群组成;E:属水平上的肠道微生物群组成。

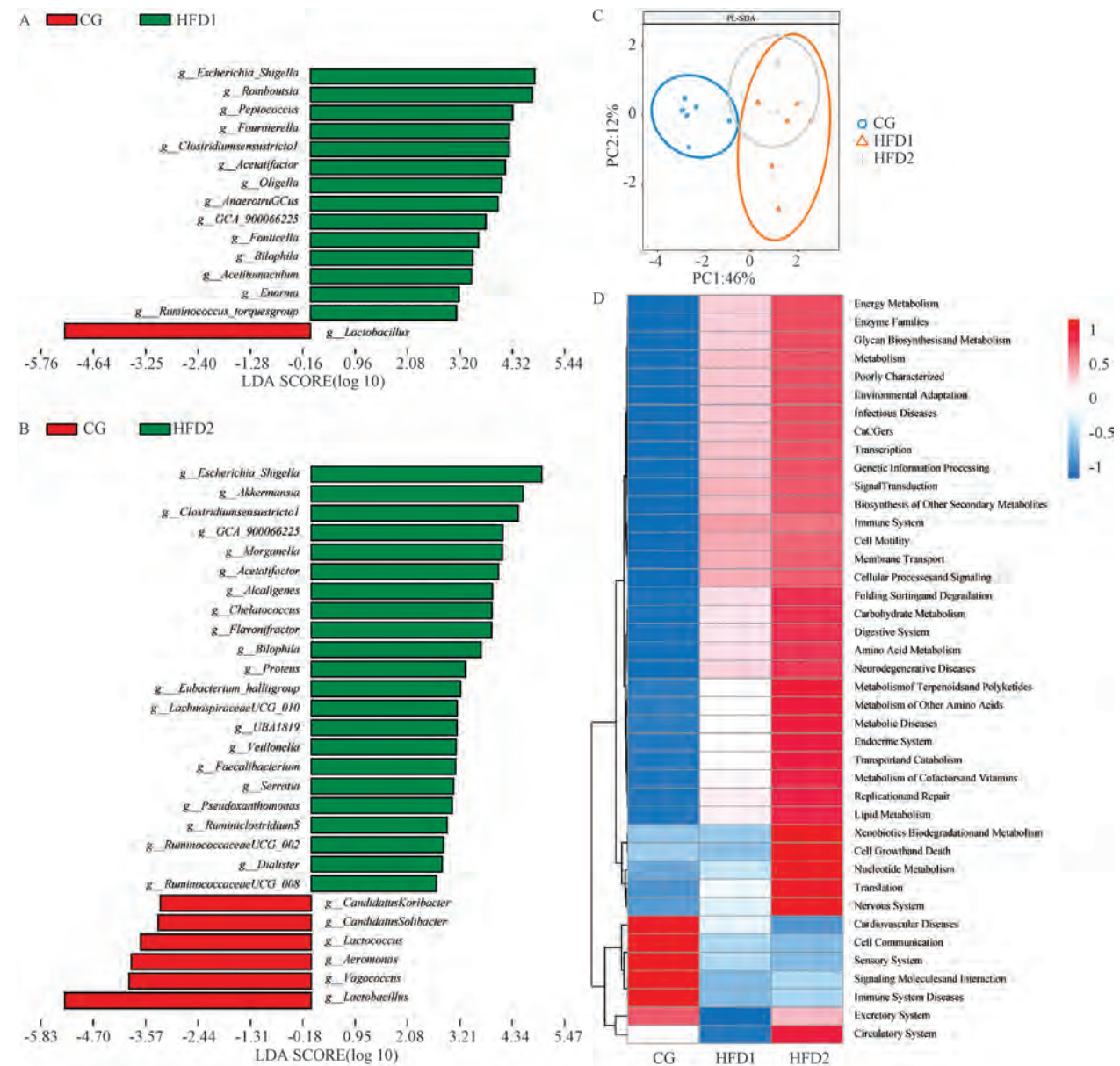
图 4 高脂饮食对大鼠肠道菌群的影响(n = 6)

Note. A. Analysis of α diversity of microflora in each sample. B. PcoA analysis of microflora in each group. C. ASV Venn diagram. D. Composition of intestinal microflora at the gate level. E. Composition of intestinal microflora at the level.

Figure 4 Effect of high-fat diet on gut microbiota in rats(n = 6)



*Escherichia-Shigella* )、梭杆菌属 ( *g* \_\_ *Clostridiumsensustricto1* )、苏黎世杆菌属 ( *g* \_\_ *Turicibacter* )、链球菌属 ( *g* \_\_ *Streptococcus* )、罗斯氏菌属 ( *g* \_\_ *Rothia* )、阿克曼菌属 ( *g* \_\_ *Akkermansia* ) 是优势菌属 (见图 4E)。



注:A:CG 组和 HFD 组间生物标志物的 LDA 值分布直方图,LDA 评分阈值为 > 4;B:CG 组和 HFD2 组间生物标志物的 LDA 值分布直方图, LDA 评分阈值为 > 4;C:基于 Bray-Curtis 相似性的肠道微生物群功能单元的 PLS-DA,椭圆置信度为 0.95;D:组间肠道菌群差异代谢通路,颜色强度代表物种在各样本中的丰度分布(红色:相应丰度高;蓝色:相应丰度低)。

**Figure 5** Effect of high-fat diet on the abundance and function of regulating biomarkers at the level of intestinal contents in rats

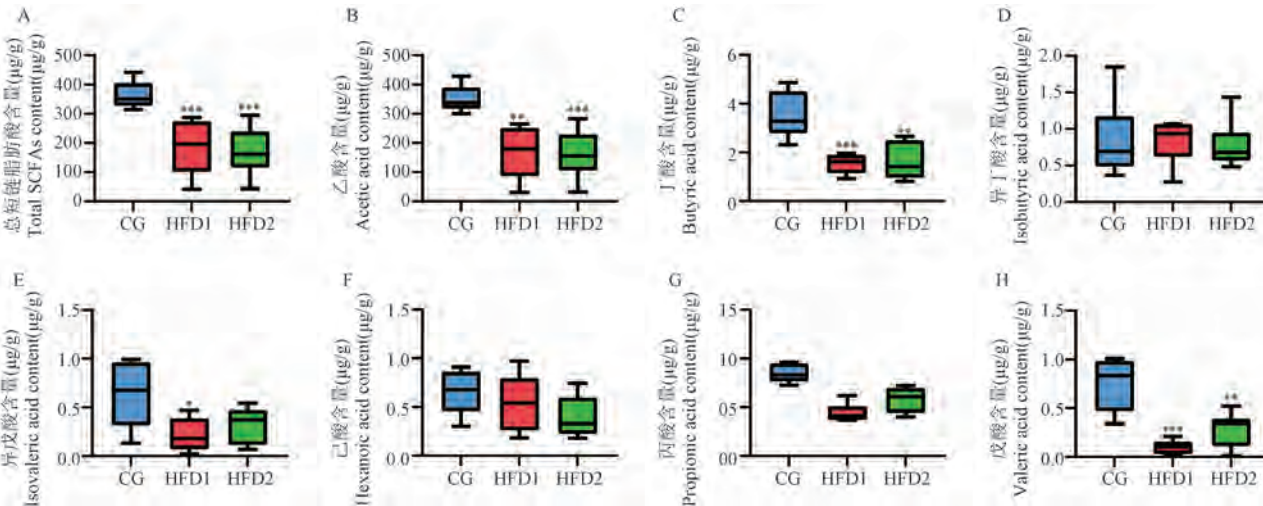


(effect size)相结合的分析手段可以深入到不同的子分组(subgroup)中,挑取在不同子分组中表现一致的标志微生物类群,通过图 5A 和图 5B 发现乳杆菌属(*g* \_\_ *Lactobacillus*),在 CG 组、HFD 组、HFD2 组中发挥重要作用。其中图 5A 可以看出乳杆菌属在 CG 组的丰度高于 HFD 组,图 5B 中乳杆菌属在 CG 组的丰度高于 HFD2 组,乳杆菌属可能是发挥重

要作用的菌属。图 5C 表明 3 组可以在功能上有较好的区分。差异菌属主要在能量代谢、酵素家族和糖的生物合成与代谢发挥重要作用(图 5D)。

2.5 高脂饮食对大鼠肠道内容物短链脂肪酸含量的影响

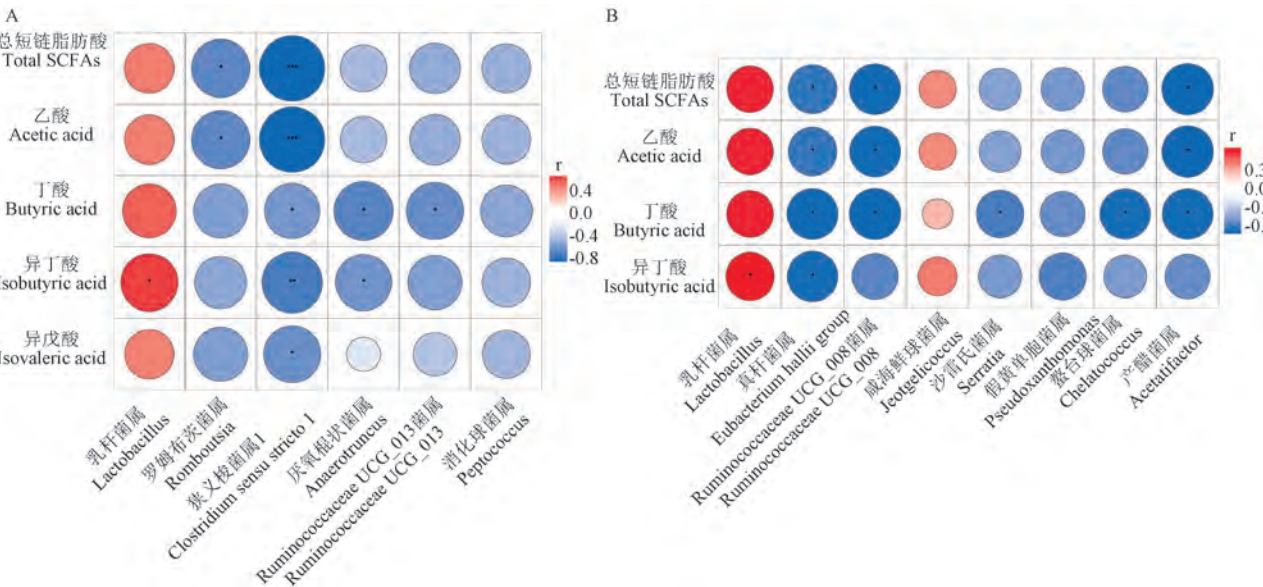
通过 GC-MS 方法检测肠道内容物短链脂肪酸,结果如图 6 所示,HFD1 组与 CG 组间相比,短链脂



注:与 CG 组相比,\*\*\*  $P < 0.001$ 。(下图同)  
图 6 高脂饮食对大鼠肠道短链脂肪酸含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Note. Compared with CG group, \*\*\*  $P < 0.001$ . (The same in the following figures)

Figure 6 Effect of high-fat diet on the content of intestinal short-chain fatty acids in rats( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



注:A:HFD1 组与 CG 组中差异菌群与差异短链脂肪酸皮尔森相关性分析;B:HFD2 组与 CG 组中差异菌群与差异短链脂肪酸皮尔森相关性分析,颜色表示相关性。

图 7 高脂饮食中肠道菌群与短链脂肪酸相关性分析

Note. A. Correlation analysis between differential microflora and differential short-chain fatty acid Pearson in HFD1 group and CG group. B. Correlation analysis between differential microflora and differential short-chain fatty acid Pearson in HFD2 group and CG group. Color indicated correlation.

Figure 7 Analysis of the relationship between intestinal flora and short-chain fatty acids in high-fat diet

肪酸含量均有所下降,其中总短链脂肪酸、乙酸、丁酸、异戊酸和戊酸含量下降显著( $P < 0.01$ ,其中异戊酸  $P < 0.05$ )。HFD2 组与 CG 组相比,短链脂肪酸含量也均有下降,其中总短链脂肪酸、乙酸、丁酸和戊酸含量下降显著( $P < 0.01$ )(见图 6)。

## 2.6 高脂饮食中肠道菌群与短链脂肪酸相关性分析

基于上文对大鼠的肠道微生物组成变化分析以及短链脂肪酸含量分析,对 HFD1 组与 CG 组间差异菌群和差异短链脂肪酸进行皮尔森相关分析,如图 7A 发现 *Lactobacillus* 菌与所有差异短链脂肪酸均呈现正相关(红色),其中与异丁酸呈显著性正相关( $P < 0.05$ )。其余菌属与所有差异短链脂肪酸呈负相关(蓝色)。其中 *Clostridium sensu stricto* 1 菌与乙酸和总短链脂肪酸呈极其显著性负相关( $P < 0.001$ )。对 HFD2 组与 CG 组间差异菌群和差异短链脂肪酸进行皮尔森相关分析,如图 7B,发现 *Lactobacillus* 菌和 *Jeotgalicoccus* 菌与所有差异短链脂肪酸均呈现正相关(红色),但 *Lactobacillus* 菌只与异丁酸具有显著性( $P < 0.05$ )。其余菌属与所有差异短链脂肪酸呈负相关(蓝色)。

## 3 讨论

SCFAs 来源于肠道内菌群对未消化的碳水化合物的进一步发酵,是肠道微生物的重要代谢产物之一。SCFAs 由乙酸、丙酸和丁酸等组成,可调控肠道内多种营养物质的吸收,同时对改善肥胖、糖尿病等慢性代谢病,维持肠道内的酸性环境十分重要<sup>[18-19]</sup>。研究发现不同饲喂方式的高脂模型均显著降低了总短链脂肪酸、乙酸、丁酸和异丁酸的含量。对于乙酸来讲,有研究表明乙酸可以通过分泌肠激素影响宿主能量代谢,从而通过降低全身脂解作用和全身促炎性细胞因子水平来影响食欲,并增加能量消耗和脂肪氧化<sup>[20]</sup>。通过与肠道菌群进行关联分析,发现乳酸杆菌(*Lactobacillus*)与短链脂肪酸含量呈正相关,与先前报道的相关研究结论相似。乳酸杆菌作为益生菌中广泛应用的一种,其对肠道菌群的调节显著<sup>[21]</sup>。

本研究发现与 CG 组相比,HFD1 组和 HFD2 组大鼠摄食量下降,体重升高;血清中 TC、TG、LDL-C 均显著升高;肝组织发生明显脂肪变性,肾周脂肪出现炎性病变;高脂饮食明显降低乳杆菌相对丰度、高脂干预后大鼠肠道菌群相对丰度变化显著,

菌群结构和功能变化明显,其中总短链脂肪酸、乙酸、丁酸、异丁酸下降显著。结果表明两种高脂饮食方式均能引起大鼠发生高脂血症,且发病机制基本一致,均与脂质代谢以及肠道菌群紊乱有关。但与高脂饲料不限量饲养的造模方式相比,每日限制一定的高脂饲料饲喂量不仅能够降低高脂饲料对大鼠食欲的影响,还能更大程度地增加体重,升高血液中 TC 和 TG 的含量,从而提高了大鼠高脂血症模型制备的稳定性,降低了模型制备的成本,是一种值得推广应用的大鼠高脂模型制备方法。

## 参 考 文 献(References)

- [1] Dembowski E, Freedman I, Grundy SM, et al. Guidelines for the management of hyperlipidemia: how can clinicians effectively implement them? [J]. Prog Cardiovasc Dis, 2022, 75: 4-11.
- [2] Balling M, Afzal S, Davey Smith G, et al. Elevated LDL triglycerides and atherosclerotic risk [J]. J Am Coll Cardiol, 2023, 81(2): 136-152.
- [3] Yu YC, Paragomi P, Wang R, et al. High serum magnesium is associated with lower risk of hepatocellular carcinoma among patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Cancer, 2023, 129(15): 2341-2347.
- [4] Fomina K, Beduleva L, Menshikov I, et al. Atherosclerosis-like changes in the rabbit aortic wall induced by immunization with native high-density lipoproteins [J]. Immun Inflamm Dis, 2020, 8(4): 559-567.
- [5] Husain MJ, Spencer G, Nugent R, et al. The cost-effectiveness of hyperlipidemia medication in low- and middle-income countries: a review [J]. Glob Heart, 2022, 17(1): 18.
- [6] Jia X, Xu W, Zhang L, et al. Impact of gut microbiota and microbiota-related metabolites on hyperlipidemia [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 634780.
- [7] Nagahisa T, Kosugi S, Yamaguchi S. Interactions between intestinal homeostasis and NAD<sup>+</sup> biology in regulating incretin production and postprandial glucose metabolism [J]. Nutrients, 2023, 15(6): 1494.
- [8] Sanchez-Gimenez R, Ahmed-Khodja W, Molina Y, et al. Gut microbiota-derived metabolites and cardiovascular disease risk: a systematic review of prospective cohort studies [J]. Nutrients, 2022, 14(13): 2654.
- [9] Ducarmon QR, Grundler F, Le Maho Y, et al. Remodelling of the intestinal ecosystem during caloric restriction and fasting [J]. Trends Microbiol, 2023, 31(8): 832-844.
- [10] Sowah SA, Riedl L, Damm-Machado A, et al. Effects of weight-loss interventions on short-chain fatty acid concentrations in blood and feces of adults: a systematic review [J]. Adv Nutr, 2019, 10(4): 673-684.
- [11] Parada Venegas D, de la Fuente MK, Landskron G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases [J].

Front Immunol, 2019, 10: 277.

[ 12 ] Hrnecir T, Hrnecirova L, Kverka M, et al. Gut microbiota and NAFLD: pathogenetic mechanisms, microbiota signatures, and therapeutic interventions [ J ]. Microorganisms, 2021, 9 ( 5 ): 957.

[ 13 ] Moszak M, Szulińska M, Bogdański P. You are what You eat-the relationship between diet, microbiota, and metabolic disorders-a review [ J ]. Nutrients, 2020, 12 ( 4 ): 1096.

[ 14 ] Ding QY, Tian JX, Li M, et al. Interactions between therapeutics for metabolic disease, cardiovascular risk factors, and gut microbiota [ J ]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 530160.

[ 15 ] Chen J, Chi B, Ma J, et al. Gut microbiota signature as predictors of adverse outcomes after acute ischemic stroke in patients with hyperlipidemia [ J ]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 1073113.

[ 16 ] Guo Z, Ali Q, Abaidullah M, et al. High fat diet-induced hyperlipidemia and tissue steatosis in rabbits through modulating ileal microbiota [ J ]. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, 106 ( 21 ): 7187-7207.

[ 17 ] Mao H, Wang W, Xiang X, et al. Analysis of metabolite distribution in rat liver of high-fat model by mass spectrometry imaging [ J ]. Metabolites, 2023, 13 ( 3 ): 411.

[ 18 ] Palmnäs-Bédard MSA, Costabile G, Vetrani C, et al. The human gut microbiota and glucose metabolism: a scoping review of key bacteria and the potential role of SCFAs [ J ]. Am J Clin Nutr, 2022, 116 ( 4 ): 862-874.

[ 19 ] Zou J, Chassaing B, Singh V, et al. Fiber-mediated nourishment of gut microbiota protects against diet-induced obesity by restoring IL-22-mediated colonic health [ J ]. Cell Host Microbe, 2018, 23 ( 1 ): 41-53.

[ 20 ] Li G, Xie C, Lu S, et al. Intermittent fasting promotes white adipose browning and decreases obesity by shaping the gut microbiota [ J ]. Cell Metab, 2017, 26 ( 4 ): 672-685.

[ 21 ] Xue C, Li G, Gu X, et al. Health and disease: *Akkermansia muciniphila*, the shining star of the gut flora [ J ]. Research, 2023, 6: 107.

[ 收稿日期 ] 2023-04-24

# 《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

## 一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

## 二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>  
期待您的来稿!



易楚,詹莎,马昕怡,等. 卵巢癌动物模型的特点及应用分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1324-1333.

Yi C, Zhan S, Ma XY, et al. Characteristics and application analysis of animal models of ovarian cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1324-1333.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.010

# 卵巢癌动物模型的特点及应用分析

易楚<sup>1</sup>,詹莎<sup>1</sup>,马昕怡<sup>2</sup>,伍洋杰<sup>3</sup>,布筠艺<sup>1</sup>,马民<sup>1</sup>,颜显欣<sup>1\*</sup>

(1. 暨南大学中医学院,广州 510632;2. 南方医科大学第一临床医学院,广州 510515;  
3. 暨南大学第一临床医学院,广州 510630)

【摘要】 目的 研究卵巢癌动物模型的特点及应用现况,为当下卵巢癌模型的规范化制备提供参考指导。

方法 通过从中国知网、万方、维普以及 PubMed 数据库中以“卵巢癌”和“动物模型”为主题词,PubMed 数据库中检索建库至 2023 年 3 月 1 日的卵巢癌动物实验性期刊文献,均进行建库至今的文献搜索,共收集相关文献共 1428 篇。从实验动物种类、年龄、实验造模方法、检测指标等方面进行总结,建立数据库进行系统分析。结果 筛选后共获得符合标准的实验性研究文献 178 篇。构建建立卵巢癌动物模型多选用 BALB/c 品种的雌性鼠;大部分周龄选择 4 ~ 6 周龄,6 ~ 8 周龄;造模方法使用最普遍的是异位移植,多接种在腋部皮下;在卵巢癌动物模型造模方法的使用上,以移植性模型使用最多,其中异位移植远高于原位移植的使用量;使用的细胞株或卵巢癌组织多为人源。检测指标检测最多的是肿瘤组织的外观指标、肿瘤病理及免疫组化。结论 卵巢癌动物模型在卵巢癌研究中应用广泛,但缺少专业规范的制备和评价标准,本文通过文献整理、数据归类分析,对卵巢癌的动物模型应用现状进行了详细分析,以期构建规范化卵巢癌动物模型提供参考。实验多选用 BALB/c 品系鼠,以浓度为  $1 \times 10^7$ /mL 的人卵巢癌 SKOV3 细胞注射于腋部皮下进行为期 10 d 异位移植造模,短时间内能获得大量模型,成瘤率高且个体差异小,可为研究卵巢癌提供参考。

【关键词】 卵巢癌;动物模型;模型特点;应用分析;检测指标

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2023) 10-1324-10

## Characteristics and application analysis of animal models of ovarian cancer

YI Chu<sup>1</sup>, ZHAN Sha<sup>1</sup>, MA Xinyi<sup>2</sup>, WU Yangjie<sup>3</sup>, BU Junyi<sup>1</sup>, MA Min<sup>1</sup>, YAN Xianxin<sup>1\*</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China.  
2. the First Clinical College of Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515.  
3. the First Clinical College of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510630)

Corresponding author: YAN Xianxin. E-mail: 871655006@ qq.com

【Abstract】 **Objective** To study the characteristics and application status of animal models of ovarian cancer and provide guidance for standardized preparation of ovarian cancer models. **Methods** Using “ovarian cancer” and “animal model” as the main topics in CNKI, Wanfang, VIP, and PubMed databases, the databases were searched for animal experimentation literature on ovarian cancer from establishment of the database to March 1, 2023. A total of 1428 relevant

【基金项目】国家自然科学基金项目(81803979,82074430),广东省基础与应用研究基金项目(2022A1515011674),广东省中医药局科研项目(20241062),暨南大学 2022 年度国家级大学生创新创业训练计划项目(202210559067)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81803979,82074430), Basic and Applied Research Foundation of Guangdong Province (2022A1515011674), Scientific Research Project of Traditional Chinese Medicine Bureau of Guangdong Province (20241062), Jinan University 2022 National College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program Project (202210559067).

【作者简介】易楚(2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治女性恶性肿瘤。Email:yichu@ stu2022.jnu.edu.cn

【通信作者】颜显欣(1986—),男,博士,讲师,研究方向:中医药防治女性恶性肿瘤。Email:871655006@ qq.com

articles were collected. From the experimental animal species, age, experimental modeling method, detection indicators, and other aspects of the summary, we established a database for systematic analysis. **Results** A total of 178 studies were obtained after screening. Female BALB/c mice were selected to establish the animal model of ovarian cancer. Most choices were 4 ~ 6 and 6 ~ 8 weeks of age. The most common modeling method was ectopic transplantation, which was mostly subcutaneous injection in the axilla. In terms of modeling method of ovarian cancer in animals, transplantable models were the most used, and ectopic transplantation was more often employed than orthotopic transplantation. Ovarian cancer cell lines used were mostly human. Most detection indexes were the appearance of tumor tissue, tumor pathology, and immunohistochemistry. **Conclusions** Animal models of ovarian cancer are widely used in ovarian cancer research, but standard preparation and evaluations are lacking. We analyzed the application status of animal models of ovarian cancer in detail through literature collation and data classification analysis to provide a reference to establish standardized animal models of ovarian cancer. BALB/c mice are the most selected, and human ovarian cancer cell line SKOV3 at  $1 \times 10^7$  cells/mL is commonly injected into the subcutaneous axillary area for 10 days. A large number of models can be obtained in a short time with a high tumor formation rate and small individual differences, which provide a reference to study ovarian cancer.

**【Keywords】** ovarian cancer; animal model; model characteristic; application analysis; detection index  
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是全球最常见的妇科恶性肿瘤之一,其死亡率在妇科癌症中排名第二,在年轻女性中的发病率有上升趋势<sup>[1-2]</sup>。其病因尚未明确,已知有关的风险因素主要包括卵巢癌或有其他癌症的家族史、绝经年龄晚、肥胖、缺乏运动、吸烟等<sup>[3]</sup>。卵巢癌发病较为隐匿,初起症状不明显,发现时往往已到晚期,且治疗后复发率高<sup>[4]</sup>。因此,对卵巢癌进行深入研究势在必行。然而,构建标准的卵巢癌动物模型是进行卵巢癌实验研究的前提条件。使用卵巢癌动物模型不仅能够避免给人体带来的风险,还能有效地控制各种影响因素,短时间内可获得大量的卵巢癌动物模型,方法学上的可比性增加。动物模型的使用,还使得样品收集和结果分析更加简便,进一步提高了实验结果的可靠性。另外,卵巢癌动物模型能够模拟卵巢癌发生发展的全过程,并表现出相应病理特征,有助于人们进行更全面且更深入的卵巢癌发病机制研究。然而,当前卵巢癌动物模型的构建方法还有待进一步完善。根据已有研究表明,诱发性卵巢癌动物模型是最符合卵巢癌临床症状的动物模型,但依旧存在临床贴切不完全的情况<sup>[5]</sup>。本文通过收集截至目前国内外在卵巢癌领域所发表的实验性研究文献,对卵巢癌动物模型进行归纳总结,以期为构建标准化的卵巢癌动物模型提供思路线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

在中国知网、万方、维普数据库中,以“卵巢癌”和“动物模型”为主题词,进行两个主题词呈并列关

系的高级检索。在 PubMed 数据库中,以“ovarian cancer” AND “animal model”为检索语法进行检索。时间范围均设置为自建库以来至 2023 年 3 月 1 日,共得到文献 1428 篇。

### 1.2 纳入标准

筛选出使用了卵巢癌动物模型的相关实验性文献,选用卵巢癌造模方法叙述清晰且完整的文章,符合纳入条件的文章具体可表现为具备卵巢癌动物模型的种类、造模方式及检测指标等造模基本要素,且可获得全文。

### 1.3 排除标准

排除资料不全面、综述、会议、报纸、硕博学位论文以及细胞实验等文献,重复发表的文献选取发表时间最早的文献。最终得到符合标准的文献 178 篇。文献检索流程见图 1。

### 1.4 数据处理及分析

将实验所选实验动物名称、种类均按照《实验动物和动物实验技术》进行规范,将动物年龄、造模方法、癌细胞株种类、浓度、实验造模方法、实验结果检测指标等数据录入 Excel 中,对每项数据进行频数、百分比统计分析。需要说明的是,在统计过程中,一篇文章中可能出现两种或多品种鼠类,也可能出现多品种细胞株、不同接种浓度、接种部位及不同给药周期等。

## 2 结果

### 2.1 卵巢癌模型实验动物种类

从入选的 178 篇实验文献中,对卵巢癌实验动物模型的应用情况进行统计,按照动物种类、频次分布

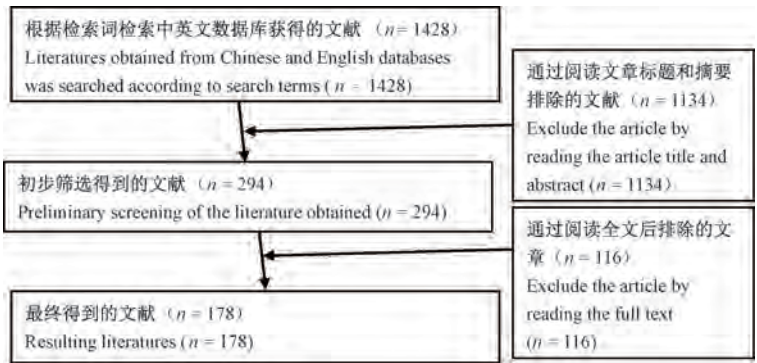


图 1 文献检索流程

Figure 1 Flowchart of literature search

及相应百分比进行列表。由于研究内容为卵巢癌,实验动物性别均为雌性。实验动物种类分布具体情况见表 1,其中 2 篇文章中出现 2 种不同动物种类。

使用频数超过 15 次的共有 3 种,累计出现 127 次。使用频数较高的前 3 位分别是 BALB/c 鼠(93

次,51.67%)、重度联合免疫缺陷(SCID)鼠(19 次,10.56%)、C57BL/6 鼠(15 次,8.33%)。其他品种中包括家兔、东方田鼠、蛋鸡等动物,以及未注明具体品系的裸鼠,共出现 29 次。而实验动物周龄多选用 4~6 周龄、6~8 周龄。

表 1 卵巢癌动物模型实验动物应用情况分布表

| 动物种类<br>Animal species                                          | 频数(次)<br>Frequency( times ) | 百分比<br>Percentage | 年龄<br>Age                           |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| BALB/c 鼠<br>BALB/c mouse                                        | 93                          | 51.67%            | 4~6 周、6~8 周<br>4~6 weeks, 6~8 weeks |
| 重度联合免疫缺陷(SCID)鼠<br>Severe combined immunodeficiency (SCID) mice | 19                          | 10.56%            | 6~8 周、4~6 周<br>6~8 weeks, 4~6 weeks |
| C57BL/6 鼠<br>C57BL/6 mice                                       | 15                          | 8.33%             | 6~8 周<br>6~8 weeks                  |
| Fisher 344 大鼠<br>Fisher 344 rats                                | 14                          | 7.78%             | 8~10 周<br>8~10 weeks                |
| Wistar 大鼠<br>Wistar rats                                        | 5                           | 2.78%             | 8 周、10~12 周<br>8 weeks, 10~12 weeks |
| B6C3F1 小鼠<br>B6C3F1 mice                                        | 3                           | 1.66%             | 4~6 周、6~8 周<br>4~6 weeks, 6~8 weeks |
| SD 大鼠<br>SD rats                                                | 2                           | 1.11%             | 3~6 个月<br>3~6 months                |
| 其他品种<br>Other varieties                                         | 29                          | 16.11%            | —                                   |

2.2 动物模型建模方法分类

卵巢癌动物模型构建中,有 4 种构建动物模型的方式:移植性卵巢癌动物模型、诱发性卵巢癌动物模型、自发性卵巢癌动物模型和转基因卵巢癌动物模型(表 2)。以移植性卵巢癌动物模型使用频率最高,占比高达 88%。

2.3 卵巢癌细胞株应用情况

在筛选出来的 178 篇文献中,使用细胞株构建模型的共有 140 篇(表 3)。其中,人源性卵巢癌细胞株 SKOV3 使用率最高,出现 67 次,占比 47.86%;其次是人源卵巢癌 HO-8910 细胞,出现频次达 24

次,占比 17.14%。鼠源细胞株使用最多的是来自 Fischer344 大鼠的 NUTU-19 细胞;其次是成年 C57BL/6 小鼠卵巢上皮在体外恶性转化形成的 ID-8 细胞。

140 篇使用细胞株构建卵巢癌动物模型的文章中共出现 152 次细胞株接种,存在同一篇文章中一种细胞株接种不同部位的情况。其中,有 6 篇文章出现 2 个部位,3 篇文章出现 3 个部位。在卵巢癌动物模型构建中,以腋部皮下接种癌细胞最为常见,其次是腹腔注射,见表 4。

注射细胞悬液时,使用较多的量是每只鼠每次



表 2 卵巢癌动物模型造模方法应用情况

| Table 2 Application of modeling methods for ovarian cancer animal models |                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                    |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 动物模型分类<br>Classification of animal models                                |                                                                  | 制备方法<br>Preparation method                                                                                                                                                                                                                                                          | 应用百分比<br>Percentage of application |
| 移植性模型<br>Model of transplantation                                        | 原位移植 <sup>[6]</sup><br>Orthotopic transplantation <sup>[6]</sup> | 将肿瘤组织或细胞悬液移植到与动物器官组织相对应的部位。<br>The tumor tissue or cell suspension is transplanted to the site corresponding to the animal organ tissue.                                                                                                                                            | 17%                                |
|                                                                          | 异位移植<br>Heterotopic graft                                        | 将肿瘤组织或细胞悬液接种到实验动物体内非卵巢部位。<br>Tumor tissues or cell suspensions were inoculated into non-ovarian sites in experimental animals.                                                                                                                                                      | 71%                                |
|                                                                          | 诱发性模型<br>Model of elicitation                                    | 在致癌因素条件下诱使动物发生肿瘤,常用二甲苯并蒽试剂诱发 <sup>[7]</sup> 。<br>To induce tumor in animals under the condition of carcinogenic factors, dimethyl benzoanthracene reagent is commonly used to induce <sup>[7]</sup> .                                                                               | 6%                                 |
|                                                                          | 自发性模型<br>Spontaneous model                                       | 自然发生。<br>Spontaneous generation.                                                                                                                                                                                                                                                    | 4%                                 |
| 转基因模型<br>Transgenic animal models                                        |                                                                  | 通过重组 DNA 技术将外源肿瘤基因或相关基因导入动物染色体基因组,使之稳定表达并能遗传给后代的一类肿瘤动物模型。<br>A kind of tumor animal model in which foreign tumor genes or related genes are introduced into animal chromosome genome by recombinant DNA technology to make them stably expressed and can be passed on to offspring. | 2%                                 |

0.2 mL,这或许与实验动物的体重相关。癌细胞浓度使用最多的是 1 × 10<sup>7</sup>/mL,癌细胞浓度具体情况见表 5。

表 3 卵巢癌造模癌细胞株应用情况

| Table 3 Application of ovarian cancer model cell lines |              |                            |                   |
|--------------------------------------------------------|--------------|----------------------------|-------------------|
| 细胞株<br>Cell strain                                     | 来源<br>Source | 频次(次)<br>Frequency (times) | 百分比<br>Percentage |
| SKOV3                                                  | 人<br>Human   | 67                         | 47.86%            |
| HO-8910                                                | 人<br>Human   | 24                         | 17.14%            |
| NUTU-19                                                | 鼠<br>Mice    | 11                         | 7.86%             |
| ID8                                                    | 鼠<br>Mice    | 10                         | 7.14%             |
| A2780                                                  | 人<br>Human   | 7                          | 5.00%             |
| 3AO                                                    | 人<br>Human   | 6                          | 4.29%             |
| OVCAR-3                                                | 人<br>Human   | 3                          | 2.14%             |
| SW626                                                  | 人<br>Human   | 2                          | 1.43%             |
| OVHM                                                   | 鼠<br>Mice    | 2                          | 1.43%             |
| RMG-1                                                  | 人<br>Human   | 2                          | 1.43%             |
| ES-2                                                   | 人<br>Human   | 2                          | 1.43%             |
| COC1                                                   | 人<br>Human   | 2                          | 1.43%             |
| COC2                                                   | 人<br>Human   | 1                          | 0.71%             |
| OC-3-VGH                                               | 人<br>Human   | 1                          | 0.71%             |

表 4 细胞株接种部位及各部位应用频次分布情况

| Table 4 Cell line inoculation site and application frequency distribution of each site |                                                                  |                            |                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------|
| 序号<br>Number                                                                           | 接种部位<br>Site of inoculation                                      | 频次(次)<br>Frequency (times) | 百分比<br>Percentage |
| 1                                                                                      | 腋部皮下<br>Subcutaneous axilla                                      | 49                         | 32.24%            |
| 2                                                                                      | 腹腔注射<br>Intraperitoneal injection                                | 32                         | 21.05%            |
| 3                                                                                      | 腋背部皮下<br>Subcutaneous on the back of the axilla                  | 17                         | 11.18%            |
| 4                                                                                      | 背部皮下<br>Subcutaneous on the back                                 | 10                         | 6.58%             |
| 5                                                                                      | 卵巢深部<br>Deep ovary                                               | 30                         | 19.73%            |
| 6                                                                                      | 肾包膜下<br>Under the renal capsule                                  | 3                          | 1.97%             |
| 7                                                                                      | 上、下肢皮下<br>Upper and lower limbs were subcutaneous                | 3                          | 1.97%             |
| 8                                                                                      | 爪垫<br>Palmula                                                    | 2                          | 1.32%             |
| 9                                                                                      | 右臀<br>Right buttock                                              | 2                          | 1.32%             |
| 10                                                                                     | 侧腹壁皮下<br>Lateral abdominal wall subcutaneous                     | 2                          | 1.32%             |
| 11                                                                                     | 腹膜后右髂血管周围<br>Retroperitoneal surrounding the right iliac vessels | 1                          | 0.66%             |
| 12                                                                                     | 右胸壁皮下<br>Right chest wall was subcutaneous                       | 1                          | 0.66%             |

2.4 卵巢癌鼠类动物模型阳性药

去除未使用阳性药的研究性文章,使用阳性药

的有 41 篇文献。根据收集文献数据库中统计显示, 卵巢癌实验研究中阳性药主要选择的是顺铂, 剂量多选用 2 mg/(kg·d)。其次为紫杉醇、卡铂、环磷酰胺、5-氟尿嘧啶等阳性药, 具体使用情况见表 6。给药方式包括灌胃、腹腔注射、尾静脉注射。

表 5 癌细胞株浓度使用频次分布情况

Table 5 Cancer cell line concentration and use frequency distribution

| 序号<br>Number | 癌细胞浓度 (/mL)<br>Concentration of cancer cells (/mL) | 频次 (次)<br>Frequency (times) | 百分比<br>Percentage |
|--------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| 1            | 1 × 10 <sup>7</sup>                                | 45                          | 29.61%            |
| 2            | 2 × 10 <sup>7</sup>                                | 32                          | 21.05%            |
| 3            | 5 × 10 <sup>6</sup>                                | 18                          | 11.84%            |
| 4            | 1 × 10 <sup>6</sup>                                | 13                          | 8.55%             |
| 5            | 5 × 10 <sup>7</sup>                                | 6                           | 3.95%             |
| 6            | 3 × 10 <sup>7</sup>                                | 6                           | 3.95%             |
| 7            | 2 × 10 <sup>5</sup>                                | 6                           | 3.95%             |
| 8            | 1 × 10 <sup>8</sup>                                | 5                           | 3.29%             |
| 9            | 2 × 10 <sup>6</sup>                                | 4                           | 2.63%             |
| 10           | 4 × 10 <sup>7</sup>                                | 3                           | 1.97%             |
| 11           | 1 × 10 <sup>10</sup>                               | 2                           | 1.32%             |
| 12           | 其他<br>Others                                       | 12                          | 7.89%             |

表 6 卵巢癌动物模型阳性药使用情况

Table 6 Positive drug use in animal models of ovarian cancer

| 序号<br>Number | 阳性药名称<br>Positive drug name      | 频次 (次)<br>Frequency (times) | 百分比<br>Percentage |
|--------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| 1            | 顺铂<br>Cis-platinum               | 27                          | 65.85%            |
| 2            | 紫杉醇<br>Paclitaxel                | 8                           | 19.51%            |
| 3            | 卡铂<br>Carboplatin                | 2                           | 4.88%             |
| 4            | 环磷酰胺<br>Cyclophosphamide         | 1                           | 2.44%             |
| 5            | 5-氟尿嘧啶<br>5-fluorouracil         | 1                           | 2.44%             |
| 6            | 吉西他滨<br>Gemcitabine              | 1                           | 2.44%             |
| 7            | 脂质体多柔比星<br>Liposomal doxorubicin | 1                           | 2.44%             |

### 2.5 卵巢癌鼠类动物模型给药周期

排除非药物实验性文章及未说明给药周期的文献后, 含受试药的文献有 44 篇, 其中 2 篇存在 3 种给药周期, 2 篇存在 2 种给药周期, 共计频次 50 次, 具体给药周期情况见表 7。根据数据库统计显示, 卵巢癌受试药以灌胃、腹腔注射和尾静脉注射的方式进行给药。统计文献中各给药周期后, 10 d 1 次的给药周期最为常见。

表 7 卵巢癌动物模型给药周期

Table 7 Administration cycle of ovarian cancer animal model

| 给药周期<br>Cycles of administration | 频数 (次)<br>Frequency (times) | 百分比<br>Percentage |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| 5 d                              | 1                           | 2%                |
| 6 d                              | 1                           | 2%                |
| 7 d                              | 1                           | 2%                |
| 8 d                              | 1                           | 2%                |
| 10 d                             | 9                           | 18%               |
| 12 d                             | 1                           | 2%                |
| 13 d                             | 1                           | 2%                |
| 14 d                             | 5                           | 10%               |
| 16 d                             | 1                           | 2%                |
| 18 d                             | 5                           | 10%               |
| 27 d                             | 1                           | 2%                |
| 30 d                             | 3                           | 6%                |
| 21 d                             | 7                           | 14%               |
| 28 d                             | 6                           | 12%               |
| 31.5 d                           | 1                           | 2%                |
| 35 d                             | 1                           | 2%                |
| 42 d                             | 1                           | 2%                |
| 50 d                             | 1                           | 2%                |
| 56 d                             | 1                           | 2%                |
| 60 d                             | 1                           | 2%                |
| 126 ~ 168 d                      | 1                           | 2%                |

### 2.6 卵巢癌鼠类动物模型检测指标

主要从小鼠表观表现、肿瘤组织表观表现、肿瘤组织病理学检查、免疫组织检查、肿瘤组织蛋白免疫印迹实验、抑瘤率、血清学检查、转移情况、肿瘤组织凋亡情况等方面进行统计描述, 不同检测指标与文章研究的不同内容有关, 具体分析见表 8。统计数据表明, 当前构建动物模型多关注的是肿瘤组织的表观指标、肿瘤组织病理及免疫组化结果。在构建卵巢癌动物模型中, 人们更关注的是肿瘤的生长状况及肿瘤组织的病理结果, 而对于模型动物表观表现的重视度不高。然而, 模型动物的精神状态、活动等这类表观指标不仅易于获得而且能直观地反映动物模型的构建状况。另外, 这对构建中医证候相关的动物模型也有一定的参考意义。因此, 除了重视肿瘤组织的变化, 在今后的模型构建中, 还可加强对动物本身状态的关注。此外, 还可加强荧光成像、彩色多普勒超声及核磁共振等技术的应用, 拓宽构建卵巢癌动物模型的评价方式, 从而促进卵巢癌动物模型的应用发展。

## 3 讨论

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤。卵巢癌患者早期常无明显症状或轻微不适, 晚期常出现腹

表 8 卵巢癌动物模型检测指标应用情况

Table 8 Application of detection indicators in animal models of ovarian cancer

| 检测指标类型<br>Types of detection indicators                                                                                        | 频数(次)<br>Frequency (times) | 百分比<br>Percentage |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------|
| 肿瘤组织表观指标(肿瘤体积、直径、个数等)<br>Apparent indicators of tumor tissue(tumor volume, diameter, number, etc.)                             | 121                        | 21.12%            |
| 肿瘤组织病理<br>Tumor histopathology                                                                                                 | 90                         | 15.71%            |
| 免疫组化<br>Immunohistochemical                                                                                                    | 71                         | 12.39%            |
| 小鼠表观(精神状态、活动、排便、饮食、对外界反应等)<br>Mouse epigenetics(mental state, activity, defecation, diet, response to the outside world, etc.) | 55                         | 9.60%             |
| 蛋白免疫印迹法(VEGF、NF-KB、Bcl-2、Caspase-3 等)<br>Western Blot (VEGF, NF-KB, Bcl-2, Caspase-3, etc.)                                    | 35                         | 6.11%             |
| 肿瘤标志物(如 CA125、CEA、AFP、CA-199 等)<br>Tumor markers(such as CA125, CEA, AFP, CA-199, etc.)                                        | 33                         | 5.76%             |
| 抑瘤率<br>Anti-tumor rate                                                                                                         | 30                         | 5.24%             |
| 血清中生化指标(ALT、乳酸脱氢酶、血肌酐、尿素氮等)<br>Biochemical indicators in serum(ALT, LDH, SCR, BUN, etc.)                                       | 28                         | 4.89%             |
| 肿瘤组织细胞凋亡率<br>Apoptosis rate of tumor tissue                                                                                    | 25                         | 4.36%             |
| 脏器转移情况(肝、肾、脾等)<br>Organ metastasis(liver, kidney, spleen, etc.)                                                                | 24                         | 4.19%             |
| 癌症相关基因及其蛋白检测(P53、P16、Fas、KI-67 等)<br>Detection of cancer-related genes and proteins (P53, P16, Fas, KI-67, etc.)               | 21                         | 3.66%             |
| 活体组织或立体组织荧光成像<br>Fluorescence imaging of living or stereoscopic tissues                                                        | 20                         | 3.49%             |
| 肿瘤微血管密度(MVD)<br>Tumor microvessel density(MVD)                                                                                 | 11                         | 1.92%             |
| 彩色多普勒超声<br>Color doppler ultrasound                                                                                            | 7                          | 1.22%             |
| 核磁共振(MRI)<br>Magnetic resonance imaging(MRI)                                                                                   | 2                          | 0.34%             |

胀、腹部肿块、胃肠道症状及与肿瘤浸润或压迫相关的症状<sup>[8]</sup>。其症状具体可表现为腹部膨隆、便秘、腹泻、早饱、疲劳、恶心、背部疼痛、骨盆疼痛等, 身体检查结果有腹部肿块, 腹股沟淋巴结肿大, 盆腔或附件包块等<sup>[9]</sup>。传统中医学认为卵巢癌是由于正气亏虚, 邪毒侵犯冲任而导致病理产物蓄积于胞宫致病<sup>[10]</sup>。并将卵巢癌归属中医学“腹痛”“积聚”“癥瘕”等范畴<sup>[11]</sup>。在治疗上, 以扶正祛邪为基本治疗原则, 调肝理脾解毒为卵巢癌基本治法<sup>[12]</sup>。目前, 西医学对卵巢癌的具体病因和发病机制尚未清晰, 初次肿瘤细胞减灭术配以铂基化疗是当下对于卵巢癌患者治疗的标准方法<sup>[4]</sup>。不论中医还是西医, 当前医疗手段对卵巢癌的治疗均未达到令人十分满意的效果, 患者依旧存在疗效不佳的问题和复发的风险。因此, 深入对卵巢癌的实验研究, 构建贴切的卵巢癌实验动物模型, 有助于明确卵巢癌的病因及发病机制, 为治疗及预防打下坚实基础。

3.1 卵巢癌动物模型属性

3.1.1 动物种类

在实验研究中, 鼠类是卵巢癌的动物模型使用最多的动物品种类型。通过统计分析显示, 卵巢癌实验动物模型主要以 BALB/c 品系的鼠类使用最多, 其次是 SCID 小鼠。BALB/c 属近交系小鼠, 个体间差异小, 基因高度纯合, 基因型稳定, 且 BALB/C 对致癌因子敏感, 生产性能良好, 繁殖期长, 实验结果具有规律性和可重复性<sup>[13]</sup>。SCID 小鼠是一种细胞和体液严重联合免疫缺陷为特征的近交系小鼠, 既可携带人类肿瘤, 又可利用人类淋巴细胞进行免疫功能重建, 是较为理想的免疫治疗临床前实验动物模型<sup>[14]</sup>。

3.1.2 动物周龄

在实验动物的周龄选择上, 小鼠多选用 4 ~ 6 周龄或 6 ~ 8 周龄; 大鼠平均选用周龄周期均大于小鼠周龄周期, 多在 8 周龄左右。根据鼠类的生长



特点,小鼠在成长到 4 ~ 6 周龄时,身体器官已慢慢成熟<sup>[15]</sup>。实验时可根据人源细胞系成瘤的难易程度适当降低周龄,如 4 ~ 6 周龄,此时小鼠的免疫系统还尚不完善,更容易成瘤,提高实验的成功率,有利于节约时间,减少成本。

### 3.2 造模方式及特点

在卵巢癌动物模型造模方法的使用上,以移植性模型使用最多,其中异位移植远高于原位移植的使用量。移植性卵巢癌动物模型使用的细胞株或卵巢癌组织多为人源,对人类肿瘤具有高保真度<sup>[16]</sup>。移植性卵巢癌动物模型遗传操作简单,且肿瘤生长迅速,将癌细胞通过皮下、腹膜内或囊内接种到实验动物体内,因此,成为卵巢癌研究中使用最广泛的体内模型<sup>[17]</sup>。动物移植性肿瘤模型的优点有生长速率基本一致、个体差异小、接种成活率高,可传代移植<sup>[18]</sup>。原位移植虽能更客观反映肿瘤的生物学特征,但存在操作困难、时间成本高,且成瘤率较皮下移植瘤成瘤率低<sup>[19]</sup>。移植性模型多选用裸鼠,不能贴合人的免疫微环境,也存在一定局限性<sup>[20]</sup>。

诱发性卵巢癌动物模型对小鼠创伤较大,需要将卵巢分离,置入化学药物缝合<sup>[21-23]</sup>。虽存在一定缺点,但也有自身独特优势。如沈忠飞等<sup>[24]</sup>的研究中 DMBA 构建的诱发性卵巢癌原发肿瘤灶以腺癌为主,局部浸润、腹膜、肠系膜、横膈和腹腔脏器种植转移等充分显示了卵巢癌恶性肿瘤的内在生物学特性。

相较于诱发性动物模型而言,自发性动物模型通常与人类所患的卵巢癌更为相似,自发性发生条件比较自然,且有可能通过观察和统计分析发现新的致癌因素。但此种方式肿瘤发生情况参差不齐,不能短时间内获得大量数据材料、时间周期长、精力耗费也大,因此使用较少。

卵巢癌基因工程模型又称转基因小鼠模型,本质是将目的基因注入到小鼠的受精卵,再将受精卵置入实验动物输卵管内(或子宫),构建含有外源基因的转基因小鼠<sup>[25]</sup>。Teng 等<sup>[26]</sup>结合体内电穿孔和 CRISPR-9 介导的基因组编辑生成体细胞卵巢癌小鼠模型,这种方法在选择突变组合和靶向区域非常灵活,对卵巢癌的深入研究有重要意义。CRISPR/Cas9 技术在卵巢癌上的应用繁多,能够简便地制备基因敲除模式的卵巢癌转移动物模型,节约时间和资源成本,而且还能利用敲除基因控制症状<sup>[27-28]</sup>。

卵巢癌的转基因动物模型前景广阔,可通过基因层面的编辑操作构建不同基因卵巢癌动物模型。

#### 3.2.1 造模材料及应用

卵巢癌动物模型构建中,以人源性细胞株 SKOV3 细胞株使用率最高(67, 47.86%),其次是 HO-8910(24, 17.14%)。目前对这两种细胞株研究较为深入,建立的卵巢癌动物模型较为成熟。经统计,在卵巢癌细胞浓度的选择上,使用频次最高的浓度是  $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。在接种部位上以腋部皮下移植率最高,其次是腹腔和腋背部皮下接种较多。选用皮下注射操作不仅简单方便,还可以很大程度上避免小鼠自身活动对种植部位造成干扰,也易于观察和测量<sup>[29]</sup>。在对卵巢癌动物模型进行药物实验研究的文献中,统计分析发现,给药周期最常见的是 10 d。铂类药物属卵巢癌标准治法中的必用药物<sup>[30]</sup>。在化疗药物使用上,阳性药多选用顺铂,其次是紫杉醇<sup>[31]</sup>。

#### 3.2.2 造模周期及建模成功的特点

据统计分析,卵巢癌建立动物模型的周期短可达 1 d,长可达 14 个月。苏丹等<sup>[32]</sup>建立迷你人源性肿瘤移植模型,将肿瘤细胞接种于 BALB/c 裸鼠背部皮下 1 d 后即开始进行用药实验。葛海良等<sup>[33]</sup>构建卵巢癌 SCID 小鼠模型时,用人新鲜浆液性乳头状腺癌的组织接种于小鼠,待原代移植瘤长至  $1 \text{ cm}^3$  左右时,处死动物取肿瘤进行鼠间传代,连续 5 代,历时 14 个月构建人卵巢癌移植瘤动物模型。

根据数据统计显示,模型建模是否成功当前主要包括以下判断方式:(1)肿瘤大小体积:袁金等<sup>[34]</sup>在构建上皮性卵巢癌裸鼠移植瘤模型时,每日测量裸鼠肿瘤大小体积,将裸鼠在接种细胞后第 10 天,移植瘤平均体积达到  $145 \sim 155 \text{ mm}^3$  判定为造模成功。(2)肿瘤最长直径。如徐蕾等<sup>[35]</sup>研究葡萄籽原花青素对人卵巢癌裸鼠移植瘤细胞增殖和凋亡的影响时,以皮下移植瘤长至直径约 3 mm 时即为构建卵巢癌动物模型建模成功。(3)症状及病理检验符合:模型鼠如果出现大量腹水,肿瘤细胞与腹壁及周围组织黏连,肿瘤的组织学类型与卵巢浆液性腺癌或黏液性腺癌一致,即符合临床卵巢上皮性腺癌的诊断标准<sup>[36]</sup>。(4)一般状态:毛发乱、反应迟钝、耳廓苍白、消瘦、腹部可触及肿块等外观表现<sup>[37]</sup>也被应用于判断模型是否建立成功。

### 3.3 检测指标

成功构建动物模型后,会出现最典型的卵巢癌

临床表现,如消瘦、蛙状腹、血性腹水<sup>[38]</sup>。这类指标易于观察且可给予研究者一些直观判断信息。各文献根据不同研究内容,对卵巢癌动物模型的指标进行了相关检测,肿瘤组织表观指标记录最多,其次是肿瘤组织病理检查、免疫组化等。

## 4 卵巢癌动物模型当前存在的不足及改进方法

### 4.1 缺少对病因模型的构建

除了自发性动物模型需通过研究者仔细观察、发现致病因素,诱发性、基因性、移植性卵巢癌动物模型均不能很好地体现卵巢癌的发病整个过程,不能模拟人类患病的特点,缺少外界致病因素的干扰,不能完全贴合临床。这点可采纳中医的思维方法,重视对疾病病因病机的认识,应用卵巢癌动物模型时加入病因因素,提高模型构建的完整性。如买鹏宇等<sup>[39]</sup>利用湿热病因建造自身免疫性前列腺炎模型,选用定时置入湿热的环境作为研究背景,对正常组给予常规普通饲料结合自由饮水饲养,模型组采用高脂饲料喂食,饮水给予米酒、蜂蜜饲养。此种建模方式在环境、饮食的因素上促进和完善了模型的构建。

### 4.2 缺少统一量化的造模因素及造模周期、给药周期长短

多数指标杂乱不规范,尚无统一衡量标准。针对这种情况,可构建对各症状的评分表格进行量化分析,以科学量化的形容方式规范描述。通过本文所归纳的信息,可进一步规范卵巢癌动物模型的构建与使用。

### 4.3 缺少系统规范的评价方式

仅在观察动物体重变化情况及一般状态表现后即分组治疗<sup>[40]</sup>,未明确动物体重具体应改变多少,或是改变至什么范围,一般状态表现为何种程度才算模型构建成功,成瘤率的多少等均无具体的说明。因此,制定系统规范的评价方式有助于标准化卵巢癌动物模型。当前,如何进行规范化评价还需要不断深入研究,构建统一完善的标准卵巢癌动物模型有待实现。

### 4.4 对中医证候的重视度不够

统计发现,当前结合中医证候构建的卵巢癌动物模型不多,且缺乏对中医证候指标的描述。结合中医证候构建模型,加入单因素、多因素不同方法造模,将中医证型对造模表现的描述加入至造模成

功指标的统计中,结合西医指标共同分析,可使模型更贴切临床<sup>[41]</sup>。构建“病证结合”的卵巢癌动物模型,能够同时满足西医疾病特点和中医证候特征,实现中西医完美结合<sup>[42]</sup>。

## 5 结语

本文通过数据挖掘对目前卵巢癌动物模型的应用情况进行分析,得出卵巢癌动物实验中构建卵巢癌动物模型使用 4 ~ 6 周龄或 6 ~ 8 周龄的 BALB/c 雌性鼠居多;移植性卵巢癌动物模型使用率最高;多注射  $1 \times 10^7/\text{mL}$  浓度的人卵巢癌细胞 SKOV3 于小鼠腋部皮下构建卵巢癌异种移植动物模型;模型构建成功后,检测肿瘤组织表观指标,检验肿瘤组织病理等结果,佐证模型的成功构建。

当前,对于卵巢癌的研究依旧处于不断探索中。本文深入分析了当前卵巢癌动物模型研究现状,为进一步规范卵巢癌动物模型的建立方法提供思路与线索,非常具有指导意义。

### 参 考 文 献 (References)

- [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] Huang J, Chan WC, Ngai CH, et al. Worldwide burden, risk factors, and temporal trends of ovarian cancer: a global study [J]. Cancers, 2022, 14(9): 2230.
- [3] Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 41: 3–14.
- [4] Kuroki L, Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer [J]. BMJ, 2020, 371: m3773.
- [5] 易楚, 马昕怡, 伍洋杰, 等. 基于中西医临床病证特点的卵巢癌动物模型分析[J/OL]. 中国实验方剂学杂志: 1–14. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20231325.
- [6] Yi C, Ma XY, Wu YJ, et al. Analysis of animal model of ovarian cancer based on clinical characteristics of traditional Chinese and Western medicine [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 1–14. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20231325.
- [7] Lv X, Dobrolecki LE, Ding Y, et al. Orthotopic transplantation of breast tumors as preclinical models for breast cancer [J]. J Vis Exp, 2020, 159: e61173.
- [8] Hoyer PB, Davis JR, Bedmicek JB, et al. Ovarian neoplasm development by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in a chemically-induced rat model of ovarian failure [J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(3): 610–615.
- [9] Zhang W, Lei P, Dong X, et al. Advances in tumor markers of ovarian cancer for early diagnosis [J]. Indian J Cancer, 2014, 51(7): 72.

- [9] Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: an overview [J]. Am Fam Physician, 2009, 80(6): 609-616.
- [10] 韩凤娟, 王小玉. 基于命门学说探究卵巢癌的发病机制 [J]. 四川中医, 2022, 40(4): 18-20.
- Han FJ, Wang XY. Explore the pathogenesis of ovarian cancer based on the theory of life [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2022, 40(4): 18-20.
- [11] 杨霖, 王笑民, 杨国旺, 等. “虚、痰、瘀、毒”在卵巢癌发生发展及转移过程中的理论探讨 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(8): 1951-1952.
- Yang L, Wang XM, Yang GW, et al. Discussion on the theory of “deficiency, phlegm, stasis and poison” in the development and metastasis of ovarian cancer [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2018, 29(8): 1951-1952.
- [12] 刘新敏. 朴炳奎治疗卵巢癌经验 [J]. 中医杂志, 2015, 56(22): 1907-1909.
- Liu XM. PIAO bingkui's experience in treating ovarian cancer [J]. J Tradit Chin Med, 2015, 56(22): 1907-1909.
- [13] 李冰冰, 刘雁峰, 和翔宇, 等. BALB/c 小鼠子宫内腺异位症模型建立和异位病灶纤维化评价 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(29): 3197-3201.
- Li BB, Liu YF, He XY, et al. Establishment of BALB/c mouse endometriosis model and evaluation of endometriotic lesions fibrosis [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2019, 28(29): 3197-3201.
- [14] 赵卫东, 张爱君, 凌斌, 等. 免疫重建荷人卵巢癌-SCID 鼠模型的建立 [J]. 中国肿瘤, 2006, 15(8): 558-560.
- Zhao WD, Zhang AJ, Ling B, et al. Establishment of hu-PBL-SCID mice model of ovarian carcinoma [J]. Bull Chin Cancer, 2006, 15(8): 558-560.
- [15] Dutta S, Sengupta P. Men and mice: relating their ages [J]. Life Sci, 2016, 152: 244-248.
- [16] Yoshida GJ. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 4.
- [17] Tsang SI, Hassan AA, To SKY, et al. Experimental models for ovarian cancer research [J]. Exp Cell Res, 2022, 416(1): 113150.
- [18] 陈语柔, 陈莹. 卵巢癌动物实验模型造模方法概述 [J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(5): 103-106.
- Chen YR, Chen Y. An overview of modeling methods on the experimental animal model of ovarian carcinoma [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2022, 36(5): 103-106.
- [19] 岳静, 李静, 邢辉, 等. 三种人卵巢癌动物模型的生物学特性比较 [J]. 现代妇产科进展, 2002, 11(5): 334-336.
- Yue J, Li J, Xing H, et al. Comparison of biological features of three models of human ovarian carcinoma in athymic nude mice [J]. Curr Adv Obstet Gynecol, 2002, 11(5): 334-336.
- [20] 李冬冬, 王莉, 钟洁, 等. 卵巢癌动物模型制备的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2): 259-264.
- Li DD, Wang L, Zhong J, et al. Research progress on establishment of animal models of ovarian cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(2): 259-264.
- [21] Huang Y, Zhang X, Jiang W, et al. Discovery of serum biomarkers implicated in the onset and progression of serous ovarian cancer in a rat model using iTRAQ technique [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012, 165(1): 96-103.
- [22] 姜伟, 徐丛剑, 邵志敏, 等. 动脉灌注 GE7 系统介导  $\beta$ -半乳糖苷酶基因导入大鼠诱发性卵巢肿瘤细胞的研究 [J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(5): 338-341.
- Jiang W, Xu CJ, Shao ZM, et al. Study of GE7-transferring system mediated  $\beta$ -galactosidase gene transfer in a rat model of ovarian tumor by intraarterial route [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2004, 39(5): 338-341.
- [23] 邱雨楠, 韩凤娟, 范明明, 等. 两种诱发 Fischer344 大鼠卵巢癌动物模型建立方法的比较 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(6): 488-490.
- Qiu LN, Han FJ, Fan MM, et al. Comparison of two methods for the modeling of ovarian cancer in fisher 344 rats [J]. World J Integr Tradit West Med, 2010, 5(6): 488-490.
- [24] 沈忠飞, 方马荣, 张梅光, 等. 二甲苯并蒽诱发卵巢恶性肿瘤的动物实验 [J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(8): 572-573.
- Shen ZF, Fang MR, Zhang MG, et al. Animal experiment of ovarian malignant tumor induced by dimethylbenzoxazine [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2006, 41(8): 572-573.
- [25] 朱沁怡, 汪希鹏. 卵巢癌动物模型的建立进展 [J]. 现代妇产科进展, 2014, 23(5): 403-406.
- Zhu QY, Wang XP. Progress in establishing animal models of ovarian cancer [J]. Prog Obstet Gynecol, 2014, 23(5): 403-406.
- [26] Teng K, Ford MJ, Harwalkar K, et al. Modeling high-grade serous ovarian carcinoma using a combination of *in vivo* fallopian tube electroporation and CRISPR-Cas9-mediated genome editing [J]. Cancer Res, 2021, 81(20): 5147-5160.
- [27] 程得洛. CRISPR/Cas9 基因编辑技术及其在肿瘤治疗方面的研究进展 [J]. 系统医学, 2020, 5(20): 195-198.
- Cheng DL. CRISPR/Cas9 gene editing technology and its research progress in tumor therapy [J]. Syst Med, 2020, 5(20): 195-198.
- [28] 戴桂明, 姜翊. CRISPR/Cas9 技术在卵巢癌诊疗及其转移相关机制研究中的进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(3): 587-590.
- Dai GM, Jiang H. Research progress of CRISPR/Cas9 technology in the diagnosis and treatment of ovarian cancer and related mechanism of cancer metastasis [J]. J Mod Oncol, 2023, 31(3): 587-590.
- [29] 卢晓莉, 成乐楠, 秦方圆, 等. 人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立 [J]. 河南医学研究, 2020, 29(9): 1542-1544.
- Lu XL, Cheng LN, Qin FY, et al. Establishment of subcutaneous transplanted tumor model of human ovarian cancer in nude mice [J]. Henan Med Res, 2020, 29(9): 1542-1544.
- [30] Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, et al. Ovarian cancer [J]. Lancet, 2014, 384(9951): 1376-1388.



- [31] 国春蕾, 姚水平, 尹学敬, 等. 紫杉醇缓释微球通过作用 PI3K/AKT/p53 途径对卵巢癌动物模型抑瘤效果及病理组织学的影响 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2021, 22(5): 514-515.
- Guo CL, Yao SP, Yin XJ, et al. Effect of paclitaxel sustained-release microspheres on tumor inhibition and histopathology of ovarian cancer animal model through PI3K/AKT/p53 pathway [J]. Chin J Clin Obstet Gynecol, 2021, 22(5): 514-515.
- [32] 苏丹, 刘屹, 崔慢慢, 等. 基于 miniPDX 动物模型筛选化疗方案治疗卵巢癌的临床效果评价 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(3): 731-739.
- Su D, Liu Y, Cui MM, et al. Evaluation of clinical effect of screening chemotherapy regimens in treatment of ovarian cancer based on miniPDX animal models [J]. J Jilin Univ Med Ed, 2021, 47(3): 731-739.
- [33] 葛海良, 冯荻, 马安伦, 等. 人卵巢癌 SCID 小鼠移植瘤模型、细胞系建立及其生物学特性研究 [J]. 中国实验动物学报, 2001, 9(3): 134-138.
- Ge HL, Feng D, Ma AL, et al. Biological characteristics studies of an established model of xenografted human ovarian carcinoma in SCID mice and its homologous cell lines *in vitro* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2001, 9(3): 134-138.
- [34] 袁金, 康佳丽, 王小霞, 等. MAP2K6-FP 和紫杉醇对上皮性卵巢癌裸鼠移植瘤的抑制作用 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(21): 3373-3378.
- Yuan J, Kang JL, Wang XX, et al. Inhibition effect of mitogen-activated protein kinase kinase 6-fusion protein (MAP2K6-FP) and paclitaxel on human ovarian cancer in nude mice xenograft [J]. J Mod Oncol, 2018, 26(21): 3373-3378.
- [35] 徐蕾, 钟玲, 胡琴琴, 等. 葡萄籽原花青素对人卵巢癌裸鼠移植瘤细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2120-2123.
- Xu L, Zhong L, Hu QQ, et al. Grape seed proanthocyanidin inhibits human ovarian cancer xenograft in nude mice [J]. Acta Acad Med Mil Tertiae, 2009, 31(21): 2120-2123.
- [36] 胡志勇, 李冰燕, 冯晓青, 等. 二甲基苯蒽卵巢被膜下注射诱发小鼠卵巢肿瘤模型 [J]. 环境与职业医学, 2011, 28(8): 496-498.
- Hu ZY, Li BY, Feng XQ, et al. A murine ovarian tumor model induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene injection in mice [J]. J Environ Occup Med, 2011, 28(8): 496-498.
- [37] 彭幼玲, 郭爱林, 肖敏. 超声造影剂促进野生型 p53 基因转染抑制大鼠卵巢癌生长的实验研究 [J]. 中华超声影像学杂志, 2006, 15(1): 61-64.
- Peng YL, Guo AL, Xiao M. Experimental gene therapy study on rat ovarian cancer with naked human wild type p53 plasmid delivered by echo contrast agent mediated by ultrasound [J]. Chin J Ultrason, 2006, 15(1): 61-64.
- [38] 魏薇, 沈铿, 赵丽红, 等. Fischer344 大鼠上皮性卵巢癌动物模型的建立 [J]. 首都医科大学学报, 2007, 28(1): 52-55.
- Wei W, Shen K, Zhao LH, et al. Establishment of Fisher344 rat animal model of epithelial ovarian cancer [J]. J Cap Med Univ, 2007, 28(1): 52-55.
- [39] 买鹏宇, 徐楠, 朱闽, 等. 前列消汤对 EAP 湿热证模型前列腺内 NF- $\kappa$ B 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(8): 128-132.
- Mai PY, Xu N, Zhu M, et al. Effect of qianliexiao decoction on expression of NF- $\kappa$ B in prostate of EAP damp-heat mice [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(8): 128-132.
- [40] 尹艳英. 腹腔热化疗对大鼠卵巢癌血清 CA125 表达水平影响的研究 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2010, 31(22): 3529-3532.
- Yin YY. Research of intraperitoneal hyperthermic chemotherapy (IPHC) effect on CA125 expression of rats ovarian carcinoma [J]. J Qiqihar Med Univ, 2010, 31(22): 3529-3532.
- [41] 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.
- Liu XT, Lyu GH, Wang QZ, et al. Research progress of blood stasis syndrome animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 371-380.
- [42] 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.

[收稿日期] 2023-05-04

白旭峰,王姝雯,曹清雨,等. 不同干预因素建立小鼠动脉粥样硬化模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1334-1341.

Bai XF, Wang SW, Cao QY, et al. Research progress on establishment of a mouse atherosclerosis model by various intervention factors [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1334-1341.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.011

# 不同干预因素建立小鼠动脉粥样硬化模型的研究进展

白旭峰<sup>1</sup>,王姝雯<sup>1</sup>,曹清雨<sup>2</sup>,刘亚丽<sup>2,3</sup>,胡慧明<sup>2,1,4\*</sup>

(1. 江西中医药大学,南昌 330004;2. 南昌医学院,南昌 330052;  
3. 江西省中医药管理局抗炎类中药药效与质量评价重点实验室,南昌 330052;  
4. 江西省卫生健康药效与安全性评价重点实验室,南昌 330052)

**【摘要】** 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是常见心脑血管疾病的潜在危险因素,严重威胁着人类的健康和生命。AS 的防治和抗 AS 新药的研发是医药学界一直关注的热点。选择理想的 AS 动物模型是研究 AS 防治措施及新药研发的关键。理想的 AS 动物模型应是与人 AS 发病机理相似,病理及生化反应一致,且 AS 模型复制的重复性高、操作简便、易于推广。小鼠具有繁殖性强、遗传性高、可塑性好、AS 成模性快等特点,成为了 AS 研究的理想动物。本文就不同干预因素建立小鼠 AS 模型的复制方法进行了比较分析,以期开展 AS 防治和中药新药研发提供参考和思路。

**【关键词】** 动脉粥样硬化;干预因素;小鼠;动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1334-08

## Research progress on establishment of a mouse atherosclerosis model by various intervention factors

BAI Xufeng<sup>1</sup>, WANG Shuwen<sup>1</sup>, CAO Qingyu<sup>2</sup>, LIU Yali<sup>2,3</sup>, HU Huiming<sup>2,1,4\*</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China. 2. Nanchang Medical College, Nanchang 330052. 3. Key Laboratory of Pharmacodynamics and Quality Evaluation on Anti-Inflammatory Chinese Herbs, Jiangxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330052. 4. Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation, Health Commission of Jiangxi Province, Nanchang 330052)

Corresponding author: HU Huiming. Email: huhm913@163.com

**【Abstract】** Atherosclerosis (AS) is a potential risk factor for common cardiovascular and cerebrovascular diseases. Prevention and treatment of AS and research and development of anti-AS drugs have been a focus in the field of medicine. Selection of the ideal AS animal model is important to study prevention and control measures of AS and to research and develop traditional Chinese medicine for AS. The ideal animal model of AS should have similar pathogenesis to human AS, consistent pathological and biochemical reactions, high repeatability, simple operation, and easy adoption. Mice have the characteristics of strong reproduction, high heritability, good plasticity, and fast modeling of AS, and they have become ideal animals for AS research. In this article, the replication method of the mouse AS model established by various

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82260794),江西省自然科学基金(20212BAB206013),江西省教育厅科技项目(GJJ2203502)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82260794), Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20212BAB206013), Science and Technology Project of Jiangxi Provincial Department of Education (GJJ2203502).

**【作者简介】** 白旭峰(1998—),男,在读硕士研究生,研究方向:中药抗心血管及代谢性疾病。Email:baixufeng2021@163.com

**【通信作者】** 胡慧明(1986—),女,博士,副教授,研究方向:中药抗心血管及代谢性疾病。Email:huhm913@163.com

intervention factors were compared and analyzed to provide a reference and ideas for prevention and treatment of AS and research and development of traditional Chinese medicine for AS.

**【Keywords】** atherosclerosis; intervention factors; mice; animal model

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是心脑血管疾病的潜在危险因素, 是全球死亡和发病的主要原因<sup>[1]</sup>。AS 被认为是由多种因素引起的, 包括遗传和环境因素, 其特征是动脉腔硬化和狭窄, 因在动脉内壁上形成了称为斑块的脂肪沉积物<sup>[2]</sup>。人类 AS 的起始机制虽未被完全阐明, 但从 AS 病变标本和动物模型角度来看, AS 已被定义为一种慢性炎症性疾病, 涉及内皮细胞功能障碍、脂质浸润、巨噬细胞募集和血管平滑肌细胞迁移<sup>[3]</sup>。

研究表明, 高水平的血浆低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL-C) 是 AS 最主要的危险因素之一<sup>[4]</sup>。LDL-C 倾向于积聚在动脉壁的内皮下空间, 通过逐步氧化过程, 产生最小修饰的低密度脂蛋白 (minimally modified low density lipoprotein, mm-LDL), 其中只有脂质成分被氧化, 然后是完全氧化的低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)<sup>[5]</sup>。ox-LDL 通过氧化低密度脂蛋白受体-1 (oxidized low-density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 作用于内皮细胞, 从而诱发内皮功能障碍, 细胞表面粘附分子过表达, 包括血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)、细胞内粘附分子 1 (intracellular adhesion molecule 1, ICAM-1) 和内皮白细胞粘附分子 (endothelial leukocyte adhesion molecule, E-selectin), 最终诱导动脉壁的炎症反应<sup>[6]</sup>。炎症反应促使循环单核细胞附着在受损的内皮上, 将单核细胞迁移到脉管系统内皮下基质下方的内膜层, 浸润的单核细胞进一步分化为巨噬细胞, 巨噬细胞通过清道夫受体识别和摄取 ox-LDL 形成泡沫细胞, 这种泡沫细胞内皮下的积聚也被称为“脂肪条纹形成”, 这就是 AS 形成的早期阶段<sup>[7-8]</sup>。炎症反应还能促进循环单核细胞和 T 细胞的募集, 刺激血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 从血管壁内侧层迁移到内膜层, 表现出异常高的增殖并分泌细胞外基质蛋白, 在 AS 晚期形成纤维帽以稳定脆弱的斑块<sup>[9-10]</sup>。在 AS 晚期, 随着斑块的进化, 泡沫细胞和 VSMC 发生死亡, 细胞外脂质从垂死或死细胞的碎片中积聚并积累脂蛋白, 在许多斑块中形成脂质核心。纤维帽通常在脂质核心上方形成, 由于合成减少和细胞

外基质大分子 (如胶原蛋白) 的分解增加, 使得这种纤维帽变薄, 形成薄帽 AS<sup>[11]</sup>。这种高风险脆弱斑块的纤维帽一旦破裂, 叠加的血栓形成可能会阻塞动脉腔并破坏血流, 最终导致心肌梗死、中风或猝死, 这也是 AS 发病率和死亡率最高的原因之一<sup>[12]</sup>。

AS 动物模型是提高对 AS 斑块形成与斑块破裂及其相关心血管事件发生认识的重要工具。因此, 选择合适的 AS 动物模型至关重要。理想的 AS 动物模型应尽可能与人类临床发病机理相似, 并可用于医学与药物研究, 且成本合理、重复性高。小鼠是 AS 研究中使用最广泛的动物模型, 具有繁殖性强、遗传性高、转基因的可塑性好、以及 AS 病变部位形成快等优势<sup>[13]</sup>。本文简要介绍饮食、转基因、新技术、遗传和环境等不同干预因素对小鼠 AS 模型的研究进展并进行比较分析, 以期 AS 的基础研究提供新的参考和思路。

## 1 饮食与小鼠 AS 模型

AS 是一种慢性的炎症过程, 饮食对高脂血症促进 AS 斑块形成的影响颇大<sup>[14]</sup>。长期高胆固醇饮食会引起小鼠血清胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平升高, 其与主动脉病变的不断加剧呈正相关<sup>[15]</sup>。自 20 世纪 90 年代以来, 21% 脂肪结合 0.15% 胆固醇的西方饮食是 AS 动物模型常用的饲料配方<sup>[16]</sup>。

早在 20 世纪 60 年代末, 学者们就开始探究小鼠 AS 模型建立的方法。Vesselinovitch 等<sup>[17]</sup>通过高脂饮食、辐射诱导 CF1 小鼠 AS 病变。但是, 在高脂饮食和辐射及环境因素的共同作用下, 使得这项研究个体差异极大, 甚至伴随着较高死亡率。随后, Thompson<sup>[18]</sup>率先采用高胆固醇高脂肪 (high-fat/high-cholesterol, HFHC) 的饲料喂养近交系小鼠 (C57BL/6) 诱导 AS, 25 周后, 小鼠的存活率高达 100%, 并且发现 AS 模型小鼠泡沫细胞普遍出现在主动脉瓣区域。从此, 近交系小鼠逐渐成为 AS 模型的研究基础<sup>[19]</sup>。1985 年, Paigen 等<sup>[20]</sup>以 (15% 脂肪 + 1.25% 胆固醇 + 0.5% 胆酸) 饮食诱导 10 种近交系 C57BL/6, 结果发现小鼠 14 周后就形成高胆固醇血症, 且主动脉瓣大量细胞内脂肪沉积, 并含有大量泡沫细胞, 同时病变已开始侵入下层介质形成



脂肪条纹。以半合成高脂肪饮食诱导 9 种近交系小鼠 18 周,同样发现 C57BL/6 是最容易发生 AS 病变的小鼠<sup>[21]</sup>。可见,C57BL/6 小鼠是 AS 模型基础研究的常用研究对象。

## 2 基因敲除小鼠 AS 模型

### 2.1 经典 ApoE<sup>-/-</sup>、LDLR<sup>-/-</sup> AS 模型

载脂蛋白 E(ApoE)是一种双域抗 AS 脂质转运蛋白,作为低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体的配体,可以介导含载脂蛋白 B(apolipoprotein B, ApoB)的致 AS 脂蛋白的清除,包括极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)、中密度脂蛋白(intermediate-density lipoprotein, IDL)的受体,从而降低血浆脂质水平<sup>[22-23]</sup>。Plump 等<sup>[24]</sup>基于 C57BJ/6 菌株制备了 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠模型。该模型身体健康,在外形上与 C57BJ/6 小鼠并无差异。采用普通饮食分别喂养 ApoE<sup>-/-</sup>和 C57BJ/6 小鼠 16 周后, ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的 LDL、TC 水平较 C57BJ/6 小鼠升高数倍,同时 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉血管伴随脂质沉积<sup>[25]</sup>。这表明在没有环境刺激的情况下, ApoE 的缺乏能引起脂蛋白代谢的巨大变化。研究发现, ApoE<sup>-/-</sup>小鼠在正常饮食下, 10 周后出现了动脉僵硬, 15 周后 TC 水平提高了 50%, 20 周后斑块出现在胸主动脉及其主要的分叉节点处;而在西方饮食下则会加快 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AS 病变的进程,如大量胶原沉积、主动脉僵硬程度成倍增加、钙化严重, 40 周后主动脉完全受损<sup>[26-27]</sup>。

低密度脂蛋白受体敲除(LDLR<sup>-/-</sup>)小鼠是另一种常用的 AS 研究的动物模型。LDLR 是一种膜受体,可介导含有载脂蛋白 ApoB100 或 ApoE 的血浆脂蛋白的肝清除率,从而维持血浆 LDL 的水平<sup>[28]</sup>。1994 年, Ishibashi 等<sup>[29]</sup>率先建立了 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠模型,与 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠不同, LDLR<sup>-/-</sup>小鼠不会在普通饮食的基础上发生 AS 病变,但 TC 水平通常保持在 250 mg/dl 左右<sup>[30-31]</sup>。而采用西方饮食(21%的脂肪、0.15%的胆固醇)喂养 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠 12 周后,小鼠血浆 TC、甘油三酯(triglyceride, TG)、LDL-C 的水平远远高于普通饮食喂养的 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠,并且其主动脉根部有大量脂质沉积<sup>[32]</sup>。

### 2.2 复杂 ApoE<sup>-/-</sup>、LDLR<sup>-/-</sup> AS 病变模型

研究表明,采用高脂饲料喂养 ApoE<sup>-/-</sup>与 LDLR<sup>-/-</sup>双敲除小鼠(dKO),结果发现小鼠溶栓活性

因素减少,增加了 AS 的进展;采用普通饲料喂养 ApoE<sup>-/-</sup>与 LDLR<sup>-/-</sup>受体双敲除小鼠,其 AS 的形成或病变比单敲除 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠更明显,说明 ApoE<sup>-/-</sup>与 LDLR<sup>-/-</sup>受体双敲除小鼠比 ApoE<sup>-/-</sup>单敲除小鼠更易形成 AS<sup>[33-34]</sup>。亦有学者研究发现, IL-19/LDLR dKO 小鼠和 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠高脂饲料共同喂养 14 周后, IL-19/LDLR dKO 小鼠巨噬细胞和 VSMC 的炎症因子表达增加,油红 O 染色发现 IL-19/LDLR dKO 小鼠主动脉根部病变的面积是 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠的 2 倍,这表明在 LDLR<sup>-/-</sup>的基础上缺乏 IL-19 更易形成或加重 AS 的病变<sup>[35]</sup>。ApoE<sup>-/-</sup>小鼠与含有原纤维蛋白-(Fbn1)基因的突变(C1039G+/-)的小鼠杂交,成为 ApoEFbn1<sup>-/-C1039G+/-</sup>小鼠,其中原纤维蛋白-1的 Fbn1 基因突变导致马凡综合征(MFS),突变的 FBN1 蛋白可能导致弹性结构不稳定,从而扰乱 TGF- $\beta$  信号通路,导致主动脉表型受累更严重,主动脉根部直径更大,扩张速度更快,死亡和夹层风险往往增加<sup>[36-39]</sup>,同时加剧了 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AS 高度不稳定斑块表型形成。在西方饮食的影响下, ApoEFbn1<sup>-/-C1039G+/-</sup>小鼠核心扩大,纤维帽薄,胶原纤维大量损失,在头臂动脉、升主动脉均发生了斑块破裂,表现出临床终末期 AS 患者的许多特征。随着西方饮食的饲养周期延长, ApoEFbn1<sup>-/-C1039G+/-</sup>小鼠不可避免地出现了 1/5 的死亡<sup>[39]</sup>。Wang 等<sup>[40]</sup>研究发现,将 Fbn1<sup>-/-C1039G+/-</sup>小鼠与 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠杂交以获得 AS 易感斑块的新模型,相较于 ApoEFbn1<sup>-/-C1039G+/-</sup>小鼠在整个高脂肪饮食喂养期间,所有小鼠都处于良好状态,并且没有记录到神经系统并发症或急性心血管事件,避免了在 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠中观察到的高死亡率问题。但是 LDLRFbn1<sup>-/-C1039G+/-</sup>实验研究仅使用少量小鼠用于斑块染色实验,缺乏有力的证据。

### 2.3 SR-BI<sup>-/-</sup> AS 模型

清道夫受体 B 类 I 型(SR-BI/SCARB1)最初被发现是一种清除蛋白,可与一系列天然和修饰的脂蛋白结合,同时 SR-B I 是一种高亲和力高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)生理膜蛋白受体,其通过肝细胞介导 HDL 颗粒中胆固醇酯(cholesteryl ester, CEs)的选择性摄取<sup>[41]</sup>。SR-B I 是促进细胞和 HDL 之间游离胆固醇(free cholesterol, FC)的双向通量<sup>[42]</sup>。除肝外, SR-B I 在巨噬细胞和内皮细胞中大量表达<sup>[43]</sup>。研究表明, SR-B I 和 ATP 结合盒转运蛋白 A1(ATP binding

cassette transporter A1, ABCA1) 负责胆固醇从单核细胞衍生巨噬细胞向 HDL 外排<sup>[44]</sup>。采用高胆固醇饲料喂养 SR-B I 敲除 (SR-B I<sup>-/-</sup>) 小鼠, 结果发现小鼠血浆 VLDL 大小范围内富含 FC 和 ApoE 的 HDL 颗粒显著积累, 血浆胆固醇接近 1000 mg/dl, 促进了 AS 的发展<sup>[45]</sup>。因此, SR-B I<sup>-/-</sup> 高脂血症背景的小鼠能促进 AS 的形成, 但其更容易导致冠状动脉闭塞、心肌梗死甚至死亡<sup>[46]</sup>。

## 2.4 载脂蛋白 (Apo) E3-Leiden AS 模型

突变的 ApoE 亚型 ApoE3-Leiden 与人类显性遗传形式的  $\beta$ -脂蛋白血症有关, 过表达 ApoE3-Leiden 的转基因小鼠极易发生饮食诱导的高脂血症和 AS, 还能表现出从胸主动脉和腹主动脉的早期脂肪条纹到主动脉弓的晚期病变<sup>[47-50]</sup>。因此, ApoE3-Leiden 转基因小鼠也可以用作 AS 的模型。转基因 ApoE3-Leiden.CETP 小鼠是人类脂蛋白代谢的成熟模型, 具有人源化的脂蛋白代谢和对 AS 病变的异质反应, 含 ApoB 脂蛋白中的胆固醇更多, HDL 胆固醇水平相对较低, 类似于人类, 能导致肝对循环中富含甘油三酯的脂蛋白残留物的摄取减少<sup>[49]</sup>。与 ApoE3-Leiden 小鼠相比, 高脂饲料喂养 19 周后, ApoE3-Leiden.CETP 小鼠体内 VLDL 和 LDL 水平明显升高, 主动脉根部 AS 病变面积增加, 是评估 AS 药物治疗的成熟模型<sup>[50]</sup>。

## 2.5 一种 MicroRNA AS 模型的新探索

MicroRNA (miRs) 是一类短的非编码 RNA, 与 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 结合, 并与靶 mRNA 的互补序列 (通常在 3' UTR 中) 结合, 通过抑制转录和转录后编码基因的表达来影响许多生物学途径, 许多 miRNA 已被证明参与生物途径并影响发病机制<sup>[51]</sup>。miRNA 参与调节脂质代谢、炎症反应、细胞周期、氧化应激、血小板活化、内皮及 VSMC 功能, 从而影响 AS 的发生与发展<sup>[52]</sup>。研究表明, miR-33 在体内的拮抗作用会增加循环 HDL 和 RCT, 从而抑制 AS 的发生与发展, 并增强其消退<sup>[53]</sup>。采用高脂饲料喂养 C57BL/6 小鼠和 miR-33 (miR-33<sup>-/-</sup>) 敲除小鼠 12 周, 结果发现 miR-33<sup>-/-</sup> 小鼠体内 TG 水平和肝中的脂质积累增多, 引发了中度肝脂肪变性和高甘油三酯血症<sup>[54]</sup>。此外, miR-27b、miR-144 也代表了 miRNA 作为胆固醇稳态的关键介质, 其可能作为 AS 的潜在生物标志物<sup>[55]</sup>。研究显示高脂饮食诱导 miR-144 基因敲除小鼠 (miR-144<sup>-/-</sup>) 的 AS 病变

是正常小鼠的 1.5 倍<sup>[56]</sup>。

## 3 新技术 AAV-PCSK9 的 AS 模型

作为脂蛋白代谢的关键调节因子, 蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin kexin 9, PCSK9) 可以增强肝 LDL 受体的降解, 从而导致 LDL 水平升高<sup>[57]</sup>。腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体可以有效地、特异性地将转基因递送到肝, 且能够持续表达<sup>[58]</sup>。AAV-PCSK9 小鼠是 10 年前开发的一种无种系基因工程的致 AS 小鼠模型新品系<sup>[59]</sup>, 高脂喂养同时注射 AAV-PCSK9 的 C57BL/6N 小鼠 3 个月, 显示 TC 浓度升高至 1000 mg/dl 以上, 远远高于普通饮食组小鼠 TC 浓度, 油红 O 染色结果显示接受 AAV-PCSK9 注射的小鼠主动脉根部斑块和脂肪明显增加; 同时确定, 在西方饮食的基础上注射 AAV-PCSK9 病毒载量为  $1.0 \times 10^{11}$  VG 是诱发 AS 病变的最佳剂量<sup>[60]</sup>。与 ApoE<sup>-/-</sup> 或 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠的常规杂交相比, 单次 AAV 注射足以在更快的时间内产生新的 AS 小鼠模型。

## 4 遗传和环境因素

### 4.1 母体遗传导致后代 AS 病变发展

长期以来, 人们一直认为胎儿发育期间的致病事件会影响 AS 相关的疾病<sup>[61]</sup>。研究发现, 不论在人类还是动物体内, AS 病变在胎儿期间开始形成, 并且这一病变过程因母亲高胆固醇血症而加速<sup>[62]</sup>。通过以 C57BL/6J 雌性小鼠为研究对象, 在其整个交配、妊娠期与哺乳期之间, 补充外源性胆固醇, 观察其雄性后代, 结果发现雄性后代血清 VLDL 颗粒数量与大小均增加, 肝脂谱的早期变化 (单不饱和脂肪酸浓度较低, 多不饱和脂肪酸浓度较高), 并持续到成年期<sup>[63]</sup>。研究人员给 8 周龄 ApoE<sup>-/-</sup> 雌鼠在妊娠与哺乳期间喂养高脂饲料, 6 个月后其生产的雄性后代中, 整个主动脉 AS 病变是普通饲料喂养的雌鼠组的 2 ~ 3 倍<sup>[64]</sup>。

### 4.2 慢性应激加速 AS 的发展

慢性应激是指当身体长时间受到各种内部和外部的负面因素刺激下发生的非特异性全身反应。长期以来, 在慢性应激下暴露的生理反应一直被认为与 AS 发生有着密切联系<sup>[65]</sup>。研究表明, 慢性应激能增加血管疾病的发展及冠状动脉疾病的发病率和死亡率, 其机制可能是由于慢性应激引起内皮损伤, 直接激活巨噬细胞, 促进泡沫细胞形成并产

生 AS 斑块<sup>[66]</sup>。Figueiro 等<sup>[67]</sup>给予 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠高脂饮食的同时,每周连续 4 d 的逆转明暗、3 d 的常规明暗( rotating shift schedules, RSS)模式,持续 11 周,结果发现 RSS 模式下的小鼠出现较大的 AS 病变,同时,原纤维胶原减少,并增加了内质网应激、细胞凋亡和病变内的坏死区域,加速了 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠 AS 的发展。此外, ApoE<sup>-/-</sup>在轻度慢性应激暴露 12 周后,与未暴露 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠相比,暴露的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的 AS 斑块面积增加了一倍<sup>[68]</sup>。说明慢性应激和高脂饮食复合因素对基因编辑小鼠 AS 病变发展具有很强的协同作用。

5 结语

综上,实验性 AS 小鼠模型复制方法种类较多,

且不同干预因素建立小鼠 AS 模型各有优劣(表 1)。ApoE<sup>-/-</sup>小鼠可以自发性的产生 AS 病变,是建立 AS 的经典模型。LDLR 受体的缺失更加符合高脂血症诱导的 AS,但其需要高脂喂养或物理操作才能较好地实现 AS 病变。ApoE3-Leiden.CETP 小鼠克服了经典小鼠模型中非人类脂蛋白代谢的缺陷,但仍需要高脂喂养。SR-BI<sup>-/-</sup>、ApoE/LDLR dKO、IL-19/LDLR dKO 小鼠 TC 水平升高,加速 AS 斑块形成,是实现 AS 快速造模的方法,但易造成严重管腔闭塞,导致过早死亡。而 ApoEFbn1<sup>-/-</sup>C1039G<sup>+/+</sup>、LDLRFbn1<sup>-/-</sup>C1039G<sup>+/+</sup>小鼠模型能够自发性 AS 斑块破裂,给晚期病变和自发性斑块破裂在经典小鼠中的发生提供了可用模型,但复杂病变的证据较少,尚待进一步深入研究。MicroRNA 敲除小鼠能加快 AS 病变

表 1 不同 AS 模型小鼠的优势与弊端

| 干预因素<br>Intervention factors                                                                                                                                                                     | 优势<br>Advantage                                                                                                                      | 弊端<br>Disadvantage                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ApoE <sup>-/-</sup> 小鼠<br>ApoE <sup>-/-</sup> mice                                                                                                                                               | 无需高脂饲养自发性形成 AS 病变,高脂饲养下加重<br>No need for high-fat feeding to spontaneously form AS lesions, which worsens under high-fat feeding     | ApoE 的多重功能、不能自发性形成斑块破裂和心肌梗死 <sup>[69]</sup><br>ApoE multiple functions, inability to spontaneously form plaque rupture, and myocardial infarction <sup>[69]</sup> |
| LDLR <sup>-/-</sup> 小鼠<br>LDLR <sup>-/-</sup> mice                                                                                                                                               | 更加符合人类的脂质谱,LDL 受体的缺失对炎症没有影响<br>More in line with the human lipid profile, the absence of LDL receptors has no effect on inflammation | 病变过程需要高脂喂养或物理干预<br>Pathological process requires high-fat feeding or physical intervention                                                                        |
| dKO( ApoE <sup>-/-</sup> 、LDLR <sup>-/-</sup> 、IL-19 <sup>-/-</sup> 、SR-B1 <sup>-/-</sup> 小鼠)<br>dKO( ApoE <sup>-/-</sup> 、LDLR <sup>-/-</sup> 、IL-19 <sup>-/-</sup> 、SR-B1 <sup>-/-</sup> mice) | AS 的严重程度增加,能自发性形成斑块破裂和心肌梗死<br>Severity of AS increases and can spontaneously form plaque rupture and myocardial infarction           | 易发生严重管腔闭塞,导致过早死亡 <sup>[70]</sup><br>Prone to severe lumen occlusion, leading to premature death <sup>[70]</sup>                                                   |
| AAV-PCSK9 小鼠<br>AAV-PCSK9 mice                                                                                                                                                                   | 无需基因操作,经济性高<br>No genetic manipulation required, high economy                                                                        | 病变需要饮食干预,可能存在抗病毒宿主免疫反应 <sup>[71]</sup><br>Pathological changes require dietary intervention, and there may be an antiviral host immune response <sup>[71]</sup>   |
| ApoE3-Leiden 小鼠<br>ApoE3-Leiden mice                                                                                                                                                             | CETP 表达脂质代谢更加贴近“人源化”<br>CETP expression of lipid metabolism is closer to “humanization”                                              | 病变过程需要高脂喂养,并且缺乏复杂病变的证据<br>Pathological process requires high-fat feeding and lacks evidence of complex lesions                                                    |
| MicroRNA 小鼠<br>MicroRNA mice                                                                                                                                                                     | 更加符合 AS 病变的过程<br>More in line with the process of AS lesions                                                                         | 缺乏复杂病变的证据 <sup>[72]</sup><br>Lack of evidence for complex lesions <sup>[72]</sup>                                                                                 |
| SR-BI <sup>-/-</sup> 小鼠<br>SR-BI <sup>-/-</sup> mice                                                                                                                                             | 加速 AS 的形成<br>Accelerate the formation of AS                                                                                          | 存活率低<br>Low survival rate                                                                                                                                         |
| ApoEFbn1 <sup>-/-</sup> C1039G <sup>+/+</sup> 小鼠<br>ApoEFbn1 <sup>-/-</sup> C1039G <sup>+/+</sup> mice                                                                                           | 自发性形成斑块破裂和心肌梗死<br>Spontaneous formation of plaque rupture and myocardial infarction                                                  | 随着饲养周期延长,易出现死亡<br>As the feeding cycle prolongs, death is prone to occur                                                                                          |
| LDLRFbn1 <sup>-/-</sup> C1039G <sup>+/+</sup> 小鼠<br>LDLRFbn1 <sup>-/-</sup> C1039G <sup>+/+</sup> mice                                                                                           | 自发性形成斑块破裂和心肌梗死<br>Spontaneous formation of plaque rupture and myocardial infarction                                                  | 缺乏有力的证据<br>Lack of strong evidence                                                                                                                                |
| 母体遗传后代至 AS 小鼠<br>Maternal inheritance of offspring to AS mice                                                                                                                                    | 模拟胎儿发育期间的致病过程,后代病变率高<br>Simulate the pathogenic process during fetal development, resulting in a high incidence of offspring lesions | 操作复杂,不确定因素多<br>Complex operation with many uncertain factors                                                                                                      |
| 慢性应激小鼠<br>Chronic stress mice                                                                                                                                                                    | 符合当下人们的工作方式<br>In line with the current way people work                                                                              | 单独使用压力或高脂喂养无法成功诱导 AS 病变<br>Use of pressure or high-fat feeding alone cannot successfully induce AS lesions                                                        |



的进程,但目前并未见到 MicroRNA 在小鼠体内动态影响 AS 病变的报道,仍需进一步研究。除基因缺失,以 AAV 为载体注射 PCSK9,导致体内 LDL 积聚,从而建立 AS 小鼠模型,该模型操作简便,但可能存在抗病毒宿主免疫反应。从现有的小鼠 AS 模型来看,用于评价或筛选防治 AS 中药新药研发的模型动物是经典的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,同时结合高脂饲料长期喂养,则更易形成 AS 斑块破裂或心肌梗死。

### 参 考 文 献(References)

- [1] Keeter WC, Ma S, Stahr N, et al. Atherosclerosis and multi-organ-associated pathologies [J]. *Semin Immunopathol*, 2022, 44(3): 363–374.
- [2] Zhang S, Liu Y, Cao Y, et al. Targeting the microenvironment of vulnerable atherosclerotic plaques: an emerging diagnosis and therapy strategy for atherosclerosis [J]. *Adv Mater*, 2022, 34(29): e2110660.
- [3] Pedro-Botet J, Climent E, Benaiges D. Atherosclerosis and inflammation. New therapeutic approaches [J]. *Med Clin*, 2020, 155(6): 256–262.
- [4] Makover ME, Shapiro MD, Toth PP. There is urgent need to treat atherosclerotic cardiovascular disease risk earlier, more intensively, and with greater precision; a review of current practice and recommendations for improved effectiveness [J]. *Am J Prev Cardiol*, 2022, 12: 100371.
- [5] Lowhalidanon K, Khunkaewla P. Discrimination between minimally modified LDL and fully oxidized LDL using monoclonal antibodies [J]. *Anal Biochem*, 2021, 619: 114103.
- [6] Luchetti F, Crinelli R, Nasoni MG, et al. LDL receptors, caveolae and cholesterol in endothelial dysfunction: oxLDLs accomplices or victims? [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(16): 3104–3114.
- [7] Libby P, Buring JE, Badimon L, et al. Atherosclerosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 56.
- [8] Malekmohammad K, Sewell RDE, Rafieian-Kopaei M. Antioxidants and atherosclerosis: mechanistic aspects [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(8): 301.
- [9] Zhao Y, Qu H, Wang Y, et al. Small rodent models of atherosclerosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110426.
- [10] Ahn BY, Jeong Y, Kim S, et al. Cdon suppresses vascular smooth muscle calcification via repression of the Wnt/Runx2 Axis [J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(1): 120–131.
- [11] Libby P. Inflammation during the life cycle of the atherosclerotic plaque [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(13): 2525–2536.
- [12] Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, et al. Mechanistic insights into the oxidized low-density lipoprotein-induced atherosclerosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 5245308.
- [13] Zhang Y, Fatima M, Hou S, et al. Research methods for animal models of atherosclerosis (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(6): 871.
- [14] Poznyak A, Grechko AV, Poggio P, et al. The diabetes mellitus-atherosclerosis connection: the role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1835.
- [15] Zhang F, Liu P, He Z, et al. Crocin ameliorates atherosclerosis by promoting the reverse cholesterol transport and inhibiting the foam cell formation via regulating PPAR $\gamma$ /LXR-A [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(2): 202–218.
- [16] Wang J, Shan S, Lyu A, et al. A novel model of myocardial infarction based on atherosclerosis in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 576: 100–107.
- [17] Vesselinovitch D, Wissler RW. Experimental production of atherosclerosis in mice. 2. Effects of atherogenic and high-fat diets on vascular changes in chronically and acutely irradiated mice [J]. *J Atheroscler Res*, 1968, 8(3): 497–523.
- [18] Thompson JS. Atheromata in an inbred strain of mice [J]. *J Atheroscler Res*, 1969, 10(1): 113–122.
- [19] Roberts A, Thompson JS. Inbred mice and their hybrids as an animal model for atherosclerosis research [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1976, 67: 313–327.
- [20] Paigen B, Morrow A, Brandon C, et al. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice [J]. *Atherosclerosis*, 1985, 57(1): 65–73.
- [21] Simo OK, Berrougui H, Fulop T, et al. The susceptibility to diet-induced atherosclerosis is exacerbated with aging in C57Bl/6 mice [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(5): 487.
- [22] Horn JVC, Kakutani LM, Narayanawami V, et al. Insights into the C-terminal domain of apolipoprotein E from chimera studies with apolipoprotein III [J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(1): 173–183.
- [23] Krauss RM, King SM. Remnant lipoprotein particles and cardiovascular disease risk [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2023, 37(3): 101682.
- [24] Plump AS, Smith JD, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells [J]. *Cell*, 1992, 71(2): 343–353.
- [25] Wang H, Zhang L, Zhang X, et al. Prediction model for different progressions of Atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice based on lipidomics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 214: 114734.
- [26] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14(1): 133–140.
- [27] Cilla M, Pérez MM, Peña E, et al. Effect of diet and age on arterial stiffening due to atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *Ann Biomed Eng*, 2016, 44(7): 2202–2217.
- [28] Koerner CM, Roberts BS, Neher SB. Endoplasmic reticulum quality control in lipoprotein metabolism [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 498: 110547.
- [29] Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, et al. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice [J]. *J Clin Invest*, 1994, 93

- (5): 1885–1893.
- [30] Merat S, Casanada F, Sutphin M, et al. Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(5): 1223–1230.
- [31] Moore RE, Kawashiri MA, Kitajima K, et al. Apolipoprotein A-I deficiency results in markedly increased atherosclerosis in mice lacking the LDL receptor [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(10): 1914–1920.
- [32] Zhang Y, Ding J, Wang Y, et al. Guanxinkang Decoction attenuates the inflammation in atherosclerosis by regulating efferocytosis and MAPKs signaling pathway in LDLR<sup>-/-</sup> mice and RAW<sub>264.7</sub> cells [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 731769.
- [33] Sato T, Yoshimura M, Sanda T, et al. Changes in spontaneous thrombolytic activity during progression of atherosclerosis in Apo<sup>-/-</sup> and LDLR<sup>-/-</sup> double knockout mice [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(9): 4521–4528.
- [34] Busnelli M, Manzini S, Colombo A, et al. Lack of ApoA-I in ApoEKO mice causes skin xanthomas, worsening of inflammation, and increased coronary atherosclerosis in the absence of hyperlipidemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2022, 42(7): 839–856.
- [35] Ray M, Gabunia K, Vrakas CN, et al. Genetic deletion of IL-19 (interleukin-19) exacerbates atherogenesis in *Il19<sup>-/-</sup> × Ldlr<sup>-/-</sup>* double knockout mice by dysregulation of mRNA stability protein HuR (human antigen R) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(6): 1297–1308.
- [36] Oller J, Gabandé-Rodríguez E, Ruiz-Rodríguez MJ, et al. Extracellular tuning of mitochondrial respiration leads to aortic aneurysm [J]. *Circulation*, 2021, 143(21): 2091–2109.
- [37] Zhang X, Alanazi YF, Jowitt TA, et al. Elastic fibre proteins in elastogenesis and wound healing [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4087.
- [38] Roth L, Rombouts M, Schrijvers DM, et al. Acetylsalicylic acid reduces passive aortic wall stiffness and cardiovascular remodelling in a mouse model of advanced atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 404.
- [39] van der Donckt C, van Herck JL, Schrijvers DM, et al. Elastin fragmentation in atherosclerotic mice leads to intraplaque neovascularization, plaque rupture, myocardial infarction, stroke, and sudden death [J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(17): 1049–1058.
- [40] Wang X, Fu Y, Xie Z, et al. Establishment of a novel mouse model for atherosclerotic vulnerable plaque [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 642751.
- [41] Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, et al. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor [J]. *Science*, 1996, 271(5248): 518–520.
- [42] Yu H. HDL and scavenger receptor class B type I (SRBI) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2022, 1377: 79–93.
- [43] Huang L, Chambliss KL, Gao X, et al. SR-BI drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis [J]. *Nature*, 2019, 569(7757): 565–569.
- [44] Dergunov AD, Baserova VB. Different pathways of cellular cholesterol efflux [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2022, 80(3): 471–481.
- [45] Huby T, Doucet C, Dachet C, et al. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(10): 2767–2776.
- [46] Braun A, Trigatti BL, Post MJ, et al. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circ Res*, 2002, 90(3): 270–276.
- [47] Parma L, Peters HAB, Sluiter TJ, et al. bFGF blockade reduces intraplaque angiogenesis and macrophage infiltration in atherosclerotic vein graft lesions in ApoE3 \* Leiden mice [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 15968.
- [48] Sier VQ, de Jong A, Quax PHA, et al. Visualization of murine vascular remodeling and blood flow dynamics by ultra-high-frequency ultrasound imaging [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13298.
- [49] Tarasco E, Pellegrini G, Whiting L, et al. Phenotypical heterogeneity in responder and nonresponder male ApoE \* 3Leiden.CETP mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2018, 315(4): G602–G617.
- [50] Westerterp M, van der Hoogt CC, de Haan W, et al. Cholesteryl ester transfer protein decreases high-density lipoprotein and severely aggravates atherosclerosis in APOE \* 3-Leiden mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(11): 2552–2559.
- [51] Ho PTB, Clark IM, Le LTT. microRNA-based diagnosis and therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7167.
- [52] Tao J, Xia L, Cai Z, et al. Interaction between microRNA and DNA methylation in atherosclerosis [J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(1): 101–115.
- [53] Nguyen MA, Wyatt H, Susser L, et al. Delivery of microRNAs by chitosan nanoparticles to functionally alter macrophage cholesterol efflux *in vitro* and *in vivo* [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(6): 6491–6505.
- [54] Goedeke L, Salerno A, Ramírez CM, et al. Long-term therapeutic silencing of miR-33 increases circulating triglyceride levels and hepatic lipid accumulation in mice [J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(9): 1133–1141.
- [55] Pereira-da-Silva T, Napoleão P, Costa MC, et al. Circulating miRNAs are associated with the systemic extent of atherosclerosis: novel observations for miR-27b and miR-146 [J]. *Diagnostics*, 2021, 11(2): 318.
- [56] He Q, Wang F, Honda T, et al. Ablation of miR-144 increases vimentin expression and atherosclerotic plaque formation [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6127.
- [57] Xiao J, Deng YM, Liu XR, et al. PCSK9: a new participant in

- lipophagy in regulating atherosclerosis? [J]. Clin Chim Acta, 2019, 495: 358–364.
- [58] Rodríguez-Márquez E, Meumann N, Büning H. Adeno-associated virus (AAV) capsid engineering in liver-directed gene therapy [J]. Expert Opin Biol Ther, 2021, 21(6): 749–766.
- [59] Keeter WC, Carter NM, Nadler JL, et al. The AAV-PCSK9 murine model of atherosclerosis and metabolic dysfunction [J]. Eur Heart J Open, 2022, 2(3): oead028.
- [60] Achner L, Klersy T, Fels B, et al. AFM-based nanoindentation indicates an impaired cortical stiffness in the AAV-PCSK9<sup>DY</sup> atherosclerosis mouse model [J]. Pflugers Arch, 2022, 474(9): 993–1002.
- [61] Staff AC, Fjeldstad HE, Fosheim IK, et al. Failure of physiological transformation and spiral artery atherosclerosis: their roles in preeclampsia [J]. Am J Obstet Gynecol, 2022, 226(2S): S895-S906.
- [62] Jayalekshmi VS, Ramachandran S. Maternal cholesterol levels during gestation: boon or bane for the offspring? [J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(1): 401–416.
- [63] Mathew J, Huang SC, Dumolt JH, et al. Maternal hypercholesterolemia programs dyslipidemia in adult male mouse progeny [J]. Reproduction, 2020, 160(1): 1–10.
- [64] Miyawaki D, Yamada H, Saburi M, et al. Maternal high-fat diet promotes calcified atherosclerotic plaque formation in adult offspring by enhancing transformation of VSMCs to osteochondrocytic-like phenotype [J]. Heliyon, 2022, 8(9): e10644.
- [65] Gao S, Wang X, Meng LB, et al. Recent progress of chronic stress in the development of atherosclerosis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 4121173.
- [66] Yao BC, Meng LB, Hao ML, et al. Chronic stress: a critical risk factor for atherosclerosis [J]. J Int Med Res, 2019, 47(4): 1429–1440.
- [67] Figueiro MG, Goo YH, Hogan R, et al. Light-dark patterns mirroring shift work accelerate atherosclerosis and promote vulnerable lesion phenotypes [J]. J Am Heart Assoc, 2021, 10(2): e018151.
- [68] Hu GF, Wang X, Meng LB, et al. SGLT1/2 as the potential biomarkers of renal damage under Apoe<sup>-/-</sup> and chronic stress *via* the BP neural network model and support vector machine [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 948909.
- [69] Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease [J]. Pathology, 2019, 51(2): 165–176.
- [70] Liao J, Guo X, Wang M, et al. Scavenger receptor class B type 1 deletion led to coronary atherosclerosis and ischemic heart disease in low-density lipoprotein receptor knockout mice on modified western-type diet [J]. J Atheroscler Thromb, 2017, 24(2): 133–146.
- [71] Naso MF, Tomkowicz B, et al. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy [J]. BioDrugs, 2017, 31(4): 317–334.
- [72] Rotllan N, Zhang X, Canfrán-Duque A, et al. Antagonism of miR-148a attenuates atherosclerosis progression in APOB<sup>TG</sup> Apobec<sup>-/-</sup> Ldlr<sup>+/-</sup> mice: a brief report [J]. Biomedicine Pharmacother, 2022, 153: 113419.

[收稿日期] 2023-06-06



刘昊,王馨媛,李文静,等. 病证结合的功能性消化不良动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1342-1350.

Liu H, Wang XA, Li WJ, et al. Research progress of functional dyspepsia animal models based on the combination of disease and syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1342-1350.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.012

# 病证结合的功能性消化不良动物模型的研究进展

刘昊<sup>1</sup>,王馨媛<sup>1</sup>,李文静<sup>1</sup>,吴亚轩<sup>1</sup>,王晨琪<sup>1</sup>,肖洪玲<sup>2\*</sup>

(1. 天津中医药大学研究生院,天津 301600;2. 天津中医药大学护理学院,天津 301600)

**【摘要】** 功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是以胃和十二指肠区域功能障碍为主的非器质性疾病,中医学将其归为“痞满”和“胃脘痛”等范畴,并分为脾虚气滞、肝郁(肝胃不和、肝郁脾虚、肝郁气滞)、脾胃湿热、脾胃虚寒(弱)与寒热错杂等证型。中医药治疗 FD 效果明显且接受度高,而病证结合的动物模型是开展相关研究的基础和前提。因此,本文对现有的 FD 病证结合动物模型的研究进行整理和归纳,对具体造模方式和评价指标的选择原因进行探讨,同时提出目前研究的不足之处,以期为今后 FD 病证结合动物模型的研究提供支持。

**【关键词】** 功能性消化不良;动物模型;病证结合;中医证候

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1342-09

## Research progress of functional dyspepsia animal models based on the combination of disease and syndrome

LIU Hao<sup>1</sup>, WANG Xinai<sup>1</sup>, LI Wenjing<sup>1</sup>, WU Yaxuan<sup>1</sup>, WANG Chenqi<sup>1</sup>, XIAO Hongling<sup>2\*</sup>

(1. Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600, China.  
2. School of Nursing, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600)  
Corresponding author: XIAO Hongling. E-mail: dingxiyuan303@sina.com

**【Abstract】** Functional dyspepsia (FD) is a non-organic disease that is mainly due to regional dysfunction of the stomach and duodenum. In traditional Chinese medicine (TCM), it is classified as epigastric fullness and epigastric pain, and divided into the syndrome types of spleen deficiency and qi stagnation, spleen-stomach deficiency-cold (weak), spleen-stomach damp-heat, liver-stomach disharmony, and cold-heat complicated. TCM has a significant effect and high acceptance for treatment of FD, and the animal model with the combination of disease and syndrome is the basis and prerequisite for relevant research. Therefore, we organized and summarized the existing research on animal models of FD combined with disease and syndrome and explored the reasons for selection of specific modeling method and evaluation indicators. We identified the shortcomings of the current research to provide support for future research on animal models of FD combined with disease and syndrome.

**【Keywords】** functional dyspepsia; animal model; combination of disease and syndrome; TCM syndrome

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是以胃和十二指肠区域功能障碍为主的一种非器质性疾病,其病因尚未明确,但研究表明,幽门螺杆菌感 染<sup>[1]</sup>、十二指肠嗜酸性粒细胞增多<sup>[2]</sup>和脑-肠互动障碍<sup>[3]</sup>等因素均与其发病机制相关。中医学则将其归于“胃脘痛”和“痞满”等范畴,认为其病机在于中

[基金项目] 国家自然科学基金(81403312)。  
Funded by National Natural Science Foundation of China(81403312).  
[作者简介] 刘昊(1997—),男,硕士,研究方向:功能性消化不良。Email:liuhao1953@outlook.com  
[通信作者] 肖洪玲,女,博士,教授,研究生导师,研究方向:功能性消化不良。Email:dingxiyuan303@sina.com

焦气机失衡,脾胃升降失职所导致。

中医辨证分型是治疗 FD 的重要步骤之一,直接决定治疗方式和中药方剂的选择。目前 FD 动物模型更倾向于模拟疾病的病理特点,但与中医证型相联系进行造模仍占少数。病证结合的 FD 动物模型是指在中医理论指导下,采用西医辨病与中医辨证相结合,制备出同时具备西医病理特征与中医证候特点的动物模型<sup>[4]</sup>。稳定而可靠的动物模型是开展 FD 中医研究的关键和基础,病证结合的 FD 动物模型可以优化 FD 的中医治疗方案,促进中医药治疗 FD 的机制研究。因此,本文对病证结合的 FD 动物模型造模方式进行收集和归纳,并对具体造模措施的选择原因进行分析,以期对今后 FD 的中医药研究提供动物模型基础。

## 1 FD 的中医分型

现代医学多参考 Rome 标准将 FD 划分为上腹痛综合征和餐后窘迫综合征两类,但其标准制订的样本来源仅包含少部分我国人群<sup>[5]</sup>,因此 Rome 标准并不能完全地代表我国 FD 人群的发病症状,而立足于我国人群并更贴合症状表现的中医辨证分型对 FD 的治疗则更为适用。

刘汶等<sup>[6]</sup>对 247 例 FD 患者进行中医辨证分型发现,肝气犯胃者占 26.2%,肝气郁结者占 25.8%,湿热滞胃者和脾胃气虚者分别占 24.7%和 23.2%。由于生活环境的不同和饮食文化差异,我国不同区间存在证型的侧重。因此,应根据具体的研究目的或治疗方式,选择合适的证型后进行对应造模更为科学。目前 FD 的中医分型尚未有统一定论,主要参考《功能性消化不良中医诊疗专家共识意见(2017)》<sup>[7]</sup>中的诊断分型,包括脾虚气滞证、肝胃不和证、脾胃湿热证、脾胃虚寒(弱)证和寒热错杂证 5 种证型。但未有研究表明,选择何种证型进行造模可以代表 FD 患者的临床表现。因此,本文对 FD 动物模型的证型归纳采用专家共识分类与常用临床证型相结合,以期更为全面地归纳且贴近临床患者的真实情况。

## 2 不同证型 FD 动物模型的制备方法

### 2.1 脾虚气滞型 FD 动物模型

脾虚气滞,胃失和降是 FD 的主要病机之一。中医学认为脾主运化,而胃主受纳,脾升胃降,则运化无阻,饮食不节(洁)或过度倦劳伤脾则气机阻

滞。《丹溪心法》云“脾气不和,中央痞塞”,现代医学研究表明 FD 患者胃排空延迟肠蠕动减慢,与中医学中脾虚气滞导致胃降失和的理论相一致。

何桂花等<sup>[8]</sup>在 SD 大鼠 10 ~ 16 日龄时,每天给予含 0.1%碘乙酰胺的 2%蔗糖混合液 0.2 mL 灌胃 1 次,16 d ~ 6 周龄期间常规喂养,6 周龄后采用水环境小平台站立联合隔日禁食,继续喂养 14 d 后进行模型评价,并应用此模型成功验证健脾理气颗粒治疗 FD 大鼠的疗效。此外,甘国兴等<sup>[9]</sup>、吴晓芳等<sup>[10]</sup>采用“慢性束缚 + 游泳 + 不规则饮食”的多因素复合造模法进行模型制备,具体为每日束缚 2.5 h,游泳 10 min,隔日禁食,持续 21 d,并采用此模型成功验证五磨饮的治疗效果。

对于脾虚气滞证动物模型,目前造模方式主要分为两类:一类是选择碘乙酰胺蔗糖混合液灌胃结合水环境小平台站立,造模多从动物幼年开始,利用碘乙酰胺将胃肠蛋白组织烷基化造成内脏炎症,胃肠敏感性升高,模拟 FD 内脏高敏状态,同时采取水中小平台站立使动物长期疲倦,二者结合进行模型制备;另一类则更为贴合脾虚的病机,即采用慢性束缚、强迫游泳、水环境小平台站立和不规则饮食等多因素慢性不可预知性刺激,使模型动物长期倦劳和饮食不节,导致脾气不升、胃气不降、脾胃运化失调产生“痞满”“胃痞”等症状。结合临床实际情况和脾虚气滞的产生病机,动物造模方式可从过度倦劳与饮食不节(洁)入手,延长造模时间,同时避免规律性刺激使实验动物产生耐受,影响最终成模水平。

### 2.2 肝郁型 FD 动物模型

肝胃不和型、肝郁脾虚型和肝郁气滞型是临床中较为常见的肝郁型 FD 证型,主要由于情志改变造成肝郁进而影响胃肠功能。中医学认为肝属木主疏泄,喜条达而恶抑郁,脾属土主运化,肝郁将直接导致脾胃运化失司,是为“木郁戕土”。现代医学认为 FD 是脑-肠互动紊乱而产生的疾病,且 FD 患者常伴焦虑、抑郁等精神症状,胃肠症状与精神疾病互联互通,但其具体机制仍不明确,而通过中医学中“怒伤肝,思伤脾”和“郁而生热,或素有热,虚热相搏,结郁于胃脘而痛”等理论则能得到较好的解释。

#### 2.2.1 肝胃不和型

早期研究者多采用单因素夹尾刺激制备肝胃不和型 FD 动物模型<sup>[11-12]</sup>,因其急性刺激直接激怒

动物,使之产生愤怒情绪后相互打斗,长期刺激导致动物暴躁易怒,使之“郁怒”,是早先最为常用且便捷的 FD 模型制备方法。随着对 FD 研究的深入,潜在的发病机制和脑肠轴等概念的提出,FD 动物的造模方式逐步由单一的夹尾刺激产生“郁怒”,转变为多因素复合刺激产生“肝郁”。如龚彦溶等<sup>[13]</sup>采用慢性束缚、电击和强迫游泳联用,使小鼠产生疲倦状态,连续干预 30 d 后,通过糖水消耗实验证明小鼠产生抑郁状态,成功制备出肝胃不和型小鼠模型。

### 2.2.2 肝郁脾虚型

“夹尾刺激 + 饮食失节”<sup>[14-15]</sup>是目前常用的肝郁脾虚证造模方式,夹尾刺激可激怒实验动物使之相互厮打产生“郁怒”,而单双日不规则饮食可使脾胃运化失调,脾升胃降失司,二者结合可对肝郁脾虚证的病机进行模拟。范明明等<sup>[16]</sup>采取“慢性疲劳 + 夹尾刺激 + 饮食失节”联用,连续造模 28 d 后进行模型评价,评价指标包括实验动物一般情况、胃肠动力、胃窦组织学形态和胃肠激素含量,结果表明其成功制备出肝郁脾虚型 FD 大鼠模型,并成功验证中药方剂柴术理胃饮对 FD 大鼠的疏肝健脾疗效。龙飘等<sup>[17]</sup>采用“慢性束缚 + 夹尾刺激 + 游泳 + 饮食不节”联用,通过慢性不可预知性刺激连续对大鼠造模 21 d,结果表明大鼠同样出现肝郁脾虚证的临床表现。

### 2.2.3 肝郁气滞型

谭树慧等<sup>[18]</sup>采用慢性不可预知性刺激对实验动物进行造模,具体措施包括慢性束缚、食物剥夺和过度疲劳,每日选择上述刺激中的一种,相邻两日刺激不能重复,持续 21 d 后进行模型评价表明造模成功,并验证传统理气药乌药、木香对肝郁气滞型 FD 大鼠的理气作用。

中医学认为“肝为起病之源,胃为传病之所”,脾胃病的产生和治疗多强调肝的重要性。因此,FD 动物模型的制作也多从情志干预入手,如单因素造模法中的夹尾刺激,但单纯夹尾刺激导致动物产生的暴躁情绪并不符合 FD 患者长期低迷的精神状态。而慢性不可预知性刺激已被证明可以诱导动物产生抑郁样行为<sup>[19]</sup>,使实验动物产生焦虑、抑郁情绪导致肝郁。同时,长期慢性刺激也会使动物疲倦导致脾虚气滞,二者结合制备肝郁型动物模型。需要注意的是,由于造模周期长、刺激温和且相对无创,慢性不可预知性刺激有时难以建立 FD 动物

模型,如采用水环境小平台站立剥夺动物睡眠,每日应至少剥夺 8 h,持续最少 3 周<sup>[20]</sup>,对于干预水平的降低和造模周期的缩短将直接影响实验动物的成模结局。因此,对选择何种刺激联用、具体某一刺激产生的应激程度的把控、造模总周期的选择等问题,仍需进一步研究。此外,脾虚型和肝郁型动物模型都可采用慢性不可预知性刺激进行造模,在具体刺激因素的选择上应格外注意,采用何种刺激联用模拟不同证型仍是需要解决的关键问题。

### 2.3 脾胃湿热型 FD 动物模型

目前,脾胃湿热证动物多作为器质性胃肠疾病的研究模型,而对于非器质性的 FD 尚未有可靠的脾胃湿热证动物制备方法。脾胃湿热证可通过“内因湿热 + 外因湿热”<sup>[21]</sup>或“内因湿热 + 外因湿热 + 外邪入侵”<sup>[22]</sup>的多因素复合造模法进行模拟,“肥甘饮食 + 湿热环境”是研究者选择较多的造模方式,即采用高脂高糖饮食模拟内湿,结合 32℃、95%湿度的环境模拟外湿进行造模,检测指标多选取粪便性状、舌苔颜色、体温、皮色等外在症状和体征进行成模评价<sup>[23]</sup>。此外,“肥甘饮食 + 湿热环境 + 生物因子”也是常用的湿热证模型制备方法,在内湿和外湿的基础上,采用幽门螺杆菌<sup>[24]</sup>或大肠埃希菌<sup>[25]</sup>等致病因子灌服使其出现病毒感染症状,同时具备湿热证特征。

朱洁等<sup>[26]</sup>采用高脂饲料(84%玉米粉 + 15.5%猪油 + 0.5%胆固醇)喂养 SD 大鼠 2 周进行 FD 模型制备,评价结果表明大鼠出现毛发干枯、活跃度低、急躁易怒或抑郁焦虑等情况,胃肠动力学检测表明其胃排空率和小肠推进比均有所降低。刘成全等<sup>[27]</sup>采用食积内热法对 FD 腹泻模型进行造模,将肉松、蛋黄粉、玉米粉、猪油、白糖和牛奶粉等比例混合,连续喂养 42 d 后进行模型评价,观测结果表明大鼠出现毛色枯黄、体重减轻、精神萎靡、稀便和进食减少等症状,尿 D-木糖排泄率和血清胃泌素含量降低,血清乳酸含量升高。尽管以上研究都采用高脂高糖饮食对实验动物进行饲养,但均未表明其动物模型为湿热证 FD 模型,也未有湿热证的评价指标出现。因此,脾胃湿热证的 FD 动物模型制备方法仍在研究中,对于该证型的成模方式值得更多研究者予以重视。

### 2.4 脾胃虚寒(弱)型 FD 动物模型

对相关文献进行整理发现,有关脾胃虚寒(弱)型 FD 动物模型的研究较少,但有数据表明<sup>[28]</sup>,仅



在广州 326 例 FD 人群中就有 36 例 (11.04%) 患者属脾胃虚寒证,因此该证型的动物模型制备需要研究者予以重视。中医学认为“阴盛伤阳,阳盛伤阴”,脾胃虚寒(弱)的成模方式可依据“寒邪直中脾胃”进行选择,使寒邪伤阳导致脾胃虚弱。

邱赛红等<sup>[29]</sup>采用冷水灌胃 + 冰氢氧化钠灌胃结合进行造模,在持续造模期间大鼠出现脾胃虚寒证,但造模结束后相关指标迅速回归正常,模型持久性差,而采用 4℃ 的冷食醋以 10 mL/kg 连续灌胃 10 d 则可以在造模后维持较长时间。陈苏宁等<sup>[30]</sup>采用该法成功制备出脾胃虚寒型 FD 大鼠模型,证明其可行性较好。此外,何杰滢等<sup>[31]</sup>采用 25℃ HCl、8℃ HCl、8℃ NaCl 和 0 ~ 4℃ NaCl 对大鼠灌胃分别进行模型制备,结果表明 8℃ HCl 灌胃 + 夹尾刺激 + 不规则饮食可以成功制备出脾胃虚寒型 FD 动物模型。目前,脾胃虚寒型动物模型的制作难点在于灌胃溶液类型和温度的选择上,有研究者采用番泻叶水煎剂灌胃<sup>[32]</sup>制作脾胃虚寒型动物模型,但其掌握不当会造成不同程度的胃肠黏膜损伤,并不符合 FD 的病理表现。《素问》中提到“味过于酸,肝气以津,脾气乃绝”,食醋作为常见的调味品,可以有效地防止动物产生病理性损伤,采取凉食醋灌胃可同时达到脾虚胃寒的目的。

对相关文献的整理结果表明,脾胃虚寒证 FD 动物模型的制备方式仍存在不足之处,仅从现代医学的角度出发进行模型制备仍不完善,合理选用中医理论进行指导可以对造模方法的选择提供不同的思路。

## 2.5 寒热错杂型 FD 动物模型

在临床证候分型中,患者同一时间出现寒证和热证交错表现为寒热错杂证,但同时对实验动物采取冷热刺激易导致作用相抵,造模难度大、实验周期长、动物死亡率高等原因使寒热错杂型 FD 动物模型的研究相对较少。

廖志成<sup>[33]</sup>采用夹尾刺激 + 不规则饮食 + 冷热水喂养法连续造模 14 d,选择 4℃ 和 40℃ 冷热水交替喂养,通过冷热刺激影响大鼠正常的胃肠功能,研究者认为该方法可以成功建立 FD 模型。但对文献进行阅读后发现,造模方式中冷热水喂养的效果并不明确,且评价指标仅包含胃排空率、乙酰胆碱及其酯酶和转移酶含量的改变,其结果难以证明寒热错杂证的产生。

宋捷民等<sup>[34]</sup>依据“虚寒为本,表热为标”的理

论指导,采用凉中药石膏 + 知母 + 番泻叶灌胃 4 周制备虚寒证大鼠模型,并在第 29 天皮下注射 20% 干酵母混悬液 10 mL/kg 模拟热证。有研究表明,酵母菌可激活内源性致热源 (endogenous pyrogen, EP) 细胞产生和释放 EP,直接影响体温调节中枢释放发热性中枢介质,从而升高体温<sup>[35]</sup>。检测结果表明大鼠血清 T3、T4、NO、SOD 含量降低,体温持续升高约 40 h,综合其他研究者对虚寒证的评价指标显示造模成功<sup>[36-39]</sup>。在未来,研究者可以据此对 FD 模型进行优化,进一步制作出更具寒热错杂证型特点的 FD 动物模型。

## 3 思考与展望

近年来,随着中医药现代化进程的快速发展,病证结合的动物模型制备方法也在随之完善。但作为研究体系中的重要组成部分,病证结合动物模型应同时符合西医病理特点,又满足中医证候表现,二者缺一不可。因此造模方式的选择和评价指标的选取是当下亟需解决的重点和难点。常见的 FD 病症结合动物模型见表 1。

在评价指标的选择上,病证结合模型的评价维度仍局限在西医病理特点的检测,而缺少对中医证候维度的评价指标。尽管多数研究者在造模完成后都对动物外在表现及精神状态等进行观测,但仍是从现代医学角度出发,仅与正常组模型进行对照,观测结果未侧重于四诊辨证,也未对所模拟证型的证候表现进行科学的评价。中医证候模型的评价指标体系仍在研究中,由于无法收集实验动物的主诉,研究者可采取客观指标对其进行评价。如李灿等<sup>[44]</sup>将唾液淀粉酶分泌比值和 D-木糖排泄率作为脾虚证模型的评价指标;钟宇晨等<sup>[45]</sup>将血液流变学、凝血功能等作为血瘀证的模型评价指标。需要注意的是,客观指标只能对特定证型的某一方面进行量化评价,采用多指标结合可以增加模型的科学性与可靠性,但实验动物与人类、不同品系间实验动物存在的差异性,使证候评价的实施过程产生较大阻碍,因此,选择合适的证候评价指标是未来急需解决的首要问题之一。

对文献进行整理发现,目前的研究仍存在以下不足:(1)造模方式与证型不符:部分文献标注为病证结合动物模型,但造模方式仍按研究者的经验进行选择,所选的刺激因素并不符合该证型的发病机制。应结合中医相关理论,根据该证型的病机选择

表 1 FD 常见病证结合动物模型归纳

Table 1 Induction of FD common diseases and syndromes combined with animal models

| 证型<br>Syndrome type                                     | 动物品系<br>Animal strain                                               | 造模方式<br>Modeling method                                                                                                                | 造模时间<br>Modeling time | 评价指标<br>Evaluating indicator                                                                                                                                                                            | 文献来源<br>Literature source |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 脾虚气滞型<br>Spleen deficiency<br>and qi<br>stagnation type | SD 大鼠(雄性)<br>SD rat (male)                                          | 碘乙酰胺蔗糖混合液 + 水环境小平<br>台站立<br>Iodoacetamide sucrose mixture + small<br>platform standing in water environment                            | 20 d                  | 一般情况,胃排空率,血清 Ghrelin、<br>MTL、VIP、CCK8、IL-6、IL-10<br>General condition, gastric emptying<br>rate, serum Ghrelin, MTL, VIP,<br>CCK8, IL-6, IL-10                                                          | [8]                       |
|                                                         | SD 大鼠(雄性)<br>SD rat (male)                                          | 慢性束缚 + 游泳 + 饮食不节<br>Chronic restraint + swimming +<br>improper diet                                                                    | 21 d                  | 血 浆 Ghrelin、MTL、GAS、VIP、<br>CCK、CGRP<br>Plasma Ghrelin, MTL, GAS, VIP,<br>CCK, CGRP                                                                                                                     | [10]                      |
|                                                         | SD 大鼠(雌雄各<br>半)<br>SD rats (half male<br>and half female)           | 慢性束缚 + 过度疲劳 + 饮食不节<br>Chronic restraint + excessive fatigue +<br>improper diet                                                         | 21 d                  | 体重,胃排空率,病理学形态,小肠推<br>进比,血清 MTL、GAS、CCK<br>Weight, gastric emptying rate,<br>pathological morphology, small<br>intestine propulsion ratio, serum MTL,<br>GAS and CCK                                     | [18]                      |
|                                                         | Wistar 大鼠(雌雄<br>各半)<br>Wistar rat (half<br>male and half<br>female) | 夹尾刺激<br>Pinch-tail stimulation                                                                                                         | 14 d                  | 一般情况,进食量,胃排空率,下丘脑<br>和胃窦 Ghrelin 表达<br>General condition, food intake, gastric<br>emptying rate, Ghrelin expression in<br>hypothalamus and antrum                                                       | [40]                      |
|                                                         | SD 大鼠(雄性)<br>SD rat (male)                                          | 慢性疲劳 + 夹尾刺激 + 饮食不节<br>Chronic fatigue + tail-clamping<br>stimulation + improper diet                                                   | 28 d                  | 一般情况,进食量,体重,胃排空率,<br>小肠推进率,病理学形态,血清<br>GAS、MTL<br>Generally, food intake, weight, gastric<br>emptying rate, small intestine<br>propulsion rate, pathological<br>morphology, serum gas and MTL           | [41]                      |
| 肝郁型<br>Liver stagnation<br>type                         | SD 大鼠(雄性)<br>SD rat (male)                                          | 慢性束缚 + 游泳 + 电刺激 + 脑震荡<br>+ 饮食不节<br>Chronic restraint + swimming +<br>electrical stimulation + concussion +<br>improper diet            | 28 d                  | 一般情况,海马组织 NPRB、BDNF<br>表达<br>General condition, expression of NPRB<br>and BDNF in hippocampus                                                                                                           | [42]                      |
|                                                         | SD 大鼠(雄性)<br>SD rat (male)                                          | 夹尾刺激 + 饮食不节<br>Tail-clamping stimulation +<br>improper diet                                                                            | 21 d                  | 一般情况,胃残留率,小肠推进率,下<br>丘脑和胃窦 5-HT 表达<br>General condition, gastric residual<br>rate, small intestine propulsion rate, 5-<br>HT expression in hypothalamus<br>and antrum                                   | [15]                      |
|                                                         | SD 大鼠(雌雄各<br>半)<br>SD rat (half male<br>and half female)            | 慢性束缚 + 夹尾刺激 + 游泳 + 饮食<br>不节<br>Chronic restraint + tail-clamping<br>stimulation + swimming + improper diet                             | 21 d                  | 一般情况,旷场实验,尿 D-木糖排泄<br>率,下丘脑和胃窦 CCK、CGRP 表达<br>General situation, open field<br>experiment, urinary D-xylose excretion<br>rate, CCK and CGRP expression in<br>hypothalamus and gastric antrum            | [17]                      |
|                                                         | KM 小鼠(雌性)<br>KM mice (female)                                       | 慢性束缚 + 夹尾刺激 + 游泳 + 电刺<br>激 + 过度疲劳<br>Chronic restraint + tail-clamping<br>stimulation + swimming + electrical<br>stimulation + fatigue | 30 d                  | 旷场实验,糖水偏好实验,胃残留率,<br>病理学形态,血清 MTL、SP、5-HT、脑<br>组织 5-HT<br>Open field test, sugar water preference<br>test, gastric residual rate, pathological<br>morphology, serum MTL, SP, 5-HT,<br>brain tissue 5-HT | [13]                      |

续表 1

| 证型<br>Syndrome type                                            | 动物品系<br>Animal strain                                 | 造模方式<br>Modeling method                                                                                                   | 造模时间<br>Modeling time | 评价指标<br>Evaluating indicator                                                                                                                                                                                               | 文献来源<br>Literature source |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 脾胃虚寒(弱)型<br>Spleen and stomach deficiency and cold (weak) type | SD 大鼠(雌雄各半)<br>SD rat (half male and half female)     | 夹尾刺激 + 8℃ HCl + 饮食不节<br>Tail-clamping stimulation + 8℃ HCl + improper diet                                                | 14 d                  | 一般情况,进食量,糖水偏好实验,旷场实验,胃排空率,小肠推进率,血清 5-HT,病理学形态<br>General situation, food intake, sugar water preference test, open field test, gastric emptying rate, small intestine propulsion rate, serum 5-HT, pathological morphology | [31]                      |
|                                                                | Wistar 大鼠(雌性)<br>Wistar rat (female)                  | 4℃ 食醋<br>4℃ vinegar                                                                                                       | 10 d                  | 一般情况,进食量,病理学形态<br>General condition, food intake, pathological morphology                                                                                                                                                  | [30]                      |
|                                                                | SD 大鼠(雄性)<br>SD rat (male)                            | 碘乙酰胺蔗糖混合液 + 游泳 + 饮食不节<br>Iodoacetamide sucrose mixture + swimming + improper diet                                         | 14 d                  | 一般情况,体重,进食量,胃排空率,病理学形态<br>General condition, weight, food intake, gastric emptying rate, pathological morphology                                                                                                           | [43]                      |
| 寒热错杂型<br>Cold and heat mixed type                              | Wistar 大鼠(雌雄各半)<br>SD rat (half male and half female) | 夹尾刺激 + 冷热水(40℃ 和 4℃)喂养 + 饮食不节<br>Tail-clamping stimulation + feeding with hot and cold water (40℃ and 4℃) + improper diet | 14 d                  | 胃排空率,血清乙酰胆碱、乙酰胆碱酯酶、乙酰胆碱转移酶<br>Gastric emptying rate, serum acetylcholine, acetylcholinesterase, acetylcholinetransferase                                                                                                   | [33]                      |

具体刺激因素单用或联用,尽可能模拟真实患者的起病过程。(2)部分证型的研究存在不足:有关脾胃虚寒型和寒热错杂型的制备研究较少,这与造模周期长、刺激因素相互冲突、实验动物易死亡等原因有关。因此,造模周期的选择和干预因素的刺激程度仍需更多实验予以验证。此外,目前尚未有科学可靠的脾胃湿热型 FD 动物模型制备方法,可以采取“异病同治”的中医学思想,完善部分证型制备方式的短缺情况。(3)成模指标的选择主观性强,评价体系不完善,且缺少对中医证候的评价维度:FD 模型制备的成功与否尚未有公认的评价标准,成模指标多依据研究者自身的经验进行选择,模型评价主观性较强。此外,评价指标仍依据以往病理特点进行选择,未与中医证型特点相联系。尽管无法收集动物主诉,但仍可根据体表症状进行证候评价,如观察动物耳廓、鼻唇、舌质颜色等<sup>[46]</sup>。未来,需建立统一的评价体系,选取贴合西医病理特征和中医证候特点的检测指标,增加模型评价的客观性与科学性,完善评价指标的多系统与多维度。

参 考 文 献(References)

[ 1 ] Shah R, Dhir V, Banka NH. Su1262-prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with functional dyspepsia and effects of eradication on symptoms-urban Indian scenario [ J ]. Gastroenterology, 2019, 156(6) : S523.

[ 2 ] Wauters L, Ceulemans M, Frings D, et al. Proton pump inhibitors reduce duodenal eosinophilia, mast cells, and permeability in patients with functional dyspepsia [ J ]. Gastroenterology, 2021, 160(5) : 1521-1531.

[ 3 ] Schmulson MJ, Drossman DA. What is new in Rome IV [ J ]. J Neurogastroenterol Motil, 2017, 23(2) : 151-163.

[ 4 ] 代蕊,杜晓泉,刘力,等.慢性萎缩性胃炎病证结合动物模型研究进展[ J ].吉林中医药,2022,42(9) : 1112-1116.

[ 5 ] 方秀才.罗马Ⅳ功能性肠病诊断标准的修改对我国的影响[ J ].胃肠病学和肝病学杂志,2017,26(5) : 481-483.

[ 6 ] 刘汶,范萌,王仲霞,等.功能性消化不良中医辨证与西医分型的调查分析[ J ].北京中医药,2008,27(10) : 764-765.

[ 7 ] 张声生,赵鲁卿.功能性消化不良中医诊疗专家共识意见(2017) [ J ].中华中医药杂志,2017,32(6) : 2595-2598.

[ 8 ] 何桂花,钟子劭,叶振昊,等.健脾理气颗粒对脾虚气滞证功能性消化不良大鼠胃肠运动功能及胃肠激素的影响[ J ].广西医学,2020,42(8) : 985-989.

[ 5 ] Dai R, Du XQ, Liu L, et al. Research progress in establishing CAG animal models combining the disease and its syndromes [ J ]. Jilin J Chin Med, 2022, 42(9) : 1112-1116.

[ 6 ] Fang XC. Do the changes of Rome IV diagnostic criteria for functional bowel diseases impact our practice [ J ]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2017, 26(5) : 481-483.

[ 7 ] Liu W, Fan M, Wang ZX, et al. Investigation and analysis of TCM syndrome differentiation and western medicine classification of functional dyspepsia [ J ]. Beijing J Tradit Chin Med, 2008, 27(10) : 764-765.

[ 8 ] Zhang SS, Zhao LQ. Consensus opinion of TCM diagnosis and treatment experts on functional dyspepsia (2017) [ J ]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(6) : 2595-2598.



- He GH, Zhong ZS, Ye ZH, et al. Effect of Jianpi Liqi Granules on gastrointestinal motility and gastrointestinal hormones in rats suffering from functional dyspepsia with spleen deficiency and qi stagnation syndrome [J]. Guangxi Med J, 2020, 42(8): 985–989.
- [9] 甘国兴, 吴晓芳, 冯伟勋, 等. 五磨饮对脾虚气滞证功能性消化不良大鼠的干预作用 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(19): 20–24.
- Gan GX, Wu XF, Feng WX, et al. Intervention effect of Wumoyin Decoction on functional dyspepsia rats of spleen deficiency and Qi stagnation syndrome [J]. Chin Med Her, 2019, 16(19): 20–24.
- [10] 吴晓芳, 甘国兴, 冯伟勋, 等. 五磨饮对脾虚气滞证功能性消化不良大鼠脑肠肽的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(7): 814–820.
- Wu XF, Gan GX, Feng WX, et al. Effect of wumoyin decoction on regulating brain-gut peptide in functional dyspepsia rats with spleen deficiency and qi stagnation syndrome [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(7): 814–820.
- [11] 李蕙, 李国成. 肝胃不和型功能性消化不良大鼠胃动素和 P 物质的表达及中药情志舒的干预作用 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2003, 11(1): 12–15.
- Li H, Li GC. Changes of plasma MOT and antroduodenal SP expression in rats with functional dyspepsia and effect of qingzhishu [J]. Chin J Integr Trad West Med Dig, 2003, 11(1): 12–15.
- [12] 伍阜安, 李国成, 胡道松. 肝胃不和型功能性消化不良大鼠幽门括约肌乙酰胆碱酯酶及一氧化氮合酶的表达 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2004, 12(1): 8–10.
- Wu ZA, Li GC, Hu DS. Expression of AChE and NOS in pyloric sphincter in rats with functional dyspepsia [J]. Chin J Integr Trad West Med Dig, 2004, 12(1): 8–10.
- [13] 龚彦溶, 梁晓霞, 王术玲. 肝胃不和型功能性消化不良小鼠模型的建立 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 218–222.
- Gong YR, Liang XX, Wang SL. Establishment of a novel mouse model of functional dyspepsia on account of “ganweibuhe” syndrome [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(1): 218–222.
- [14] 范梦男, 张博, 陈苏宁. 胃痛消痞方对肝郁脾虚型功能性消化不良大鼠 5-HT 及其受体表达影响的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(11): 229–232, 299.
- Fan MN, Zhang B, Chen SN. Effect of Weitong Xiaopi prescription on expressions of 5-HT and receptor in rats with liver-qi depression and spleen-deficiency type of functional dyspepsia [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(11): 229–232, 299.
- [15] 范梦男, 张博, 陈苏宁. 胃痛消痞方对肝郁脾虚型功能性消化不良大鼠胃及下丘脑 BDNF 影响的实验研究 [J]. 实用药物与临床, 2020, 23(7): 589–593.
- Fan MN, Zhang B, Chen SN. Experimental study on the effect of Weitongxiaopi prescription on the BDNF of gastric antrum and hypothalamus in FD rats with liver depression and spleen deficiency [J]. Pract Pharm Clin Remedies, 2020, 23(7): 589–593.
- [16] 范明明, 林伟, 韩海瑞, 等. 疏肝健脾法对肝郁脾虚型功能性消化不良大鼠 SP、GAS、MTL、VIP 的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(8): 1027–1033.
- Fan MM, Lin W, Han HR, et al. Effects of soothing liver and fortifying spleen method on SP, GAS, MTL and VIP of functional dyspepsia rats of type of liver stagnation and spleen deficiency [J]. Modern J Integr Tradit Chin West Med, 2022, 31(8): 1027–1033.
- [17] 龙飘, 睢世聪, 邹旭峰, 等. 小柴胡汤对肝郁脾虚型功能性消化不良大鼠 CCK、CGRP 蛋白的影响 [J]. 山东中医药大学学报, 2020, 44(3): 296–300, 332.
- Long P, Ju SC, Zou XF, et al. Effect of Xiaochaihu Decoction on CCK and CGRP in rats with functional dyspepsia of liver depression and spleen deficiency pattern [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2020, 44(3): 296–300, 332.
- [18] 谭树慧, 任卫琼, 夏伯候, 等. 醋炙乌药-木香对肝郁气滞型功能性消化不良模型大鼠胃排空及胃肠激素的影响 [J]. 中国药房, 2019, 30(5): 684–688.
- Tan SH, Ren WQ, Xia BH, et al. Effects of *Lindera aggregate* of Stir-baking with Vinegar-*Aucklandia lappa* on gastric emptying and gastrointestinal hormones in functional dyspepsia liver depression and qi stagnation model rat [J]. Chin Pharm, 2019, 30(5): 684–688.
- [19] 陈亚婷, 雷梦珠, 张波, 等. 慢性应激诱导动物抑郁样行为机制研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 811–819.
- Chen YT, Lei MZ, Zhang B, et al. Research progress on mechanisms underlying chronic-stress-induced depressive-like behavior in animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 811–819.
- [20] 刁华琼, 张婧, 王敏, 等. 改良的多平台水环境法在睡眠剥夺动物模型中的应用与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 120–128.
- Diao HQ, Zhang J, Wang M, et al. Application and evaluation of the modified multi-platform method in animal model of sleep deprivation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 120–128.
- [21] 于静波, 韩越, 谢新, 等. 脾胃湿热证大鼠模型的尿液代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(10): 166–173.
- Yu JB, Han Y, Xie X, et al. Metabolomic analysis of urine in rat model with spleen-stomach damp-heat syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(10): 166–173.
- [22] 李威堂, 吴威, 孟岩, 等. 湿热证动物模型造模方法及评价研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(12): 4441–4451.
- Li WY, Wu W, Meng Y, et al. Study on modeling method and evaluation of animal model of damp-heat syndrome [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2021, 23(12): 4441–4451.

- [23] 陈佳美, 朱青, 朴胜华, 等. 湿热证动物模型造模方法的文献挖掘研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(9): 1399-1404.
- Chen JM, Zhu Q, Piao SH, et al. Research on literature mining of animal models with damp-heat syndrome [J]. J Basic Chin Med, 2021, 27(9): 1399-1404.
- [24] 王红梅, 胡锦洋, 肖梅英, 等. 脾胃湿热型幽门螺杆菌相关性胃炎小鼠模型建立的初步研究 [J]. 新中医, 2014, 46(12): 200-201.
- Wang HM, Hu JY, Xiao MY, et al. Preliminary study on the establishment of mouse model of *Helicobacter pylori*-related gastritis with damp-heat type in spleen and stomach [J]. New Chin Med, 2014, 46(12): 200-201.
- [25] 陈阳, 崔波, 范燕豪, 等. 葛根芩连汤中各成分在正常与大肠湿热证模型大鼠的肠吸收差异研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(1): 169-178.
- Chen Y, Cui B, Fan YH, et al. Differences in intestinal absorption of Gegen Qinlian Decoction between normal rats and rats with large intestinal damp-heat syndrome [J]. Chin J Chin Mater Med, 2020, 45(1): 169-178.
- [26] 朱洁, 王叶, 郭璇, 等. 新型造模法制备功能性消化不良肝郁脾虚证大鼠模型 [J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(4): 372-375.
- Zhu J, Wang Y, Guo X, et al. A new method for building the model of functional dyspepsia rats with liver depression and spleen deficiency syndrome [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2018, 38(4): 372-375.
- [27] 刘成全, 邓青, 谭志超, 等. 四磨汤口服液对幼年大鼠功能性消化不良腹泻的影响 [J]. 中南药学, 2017, 15(1): 8-12.
- Liu CQ, Deng Q, Tan ZC, et al. Effect of Simo decoction on functional dyspepsia with diarrhea in juvenile rats [J]. Central South Pharm, 2017, 15(1): 8-12.
- [28] 胡学军, 何桂花, 钟子劭. 广州地区功能性消化不良的中医证型分布特点及相关性研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(4): 475-478.
- Hu XJ, He GH, Zhong ZX. Distribution of traditional chinese medicine syndrome types of functional dyspepsia in guangzhou and their correlation with some factors [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2017, 34(4): 475-478.
- [29] 邱赛红, 李飞艳, 尹健康, 等. 两种大鼠脾胃虚寒模型制备方法的比较研究 [J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(6): 30-33.
- Qiu SH, Li FY, Yin JK, et al. A comparative study on two kinds of methods preparing animal model with the pattern of spleen-stomach deficient cold [J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan, 2004, 24(6): 30-33.
- [30] 陈苏宁, 梁靓靓, 史业东. 胃痛消痞方对脾胃虚寒型功能性消化不良大鼠胃肠动力和胃动素的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(7): 699-702.
- Chen SN, Liang LL, Shi YD. Influence of Weitongxiaopi Decoction on gastrointestinal motility and plasma motilin levels in rats with functional dyspepsia caused by spleen-stomach deficiency-cold [J]. World Chin J Dig, 2010, 18(7): 699-702.
- [31] 何杰滢, 桂蓓, 李梦秋, 等. 胃寒型功能性消化不良大鼠模型的构建 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(2): 212-217.
- He JY, Gui P, Li MQ, et al. Construction of functional dyspepsia models of Wei-han syndrome in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(2): 212-217.
- [32] 宋厚盼, 曾梅艳, 陈小娟, 等. 脾胃虚寒型胃溃疡病证结合大鼠实验模型的建立及评价研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(4): 468-473.
- Song HP, Zeng MY, Chen XJ, et al. Establishment and evaluation of the combination of disease and syndrome experimental model of spleen stomach deficiency cold type of gastric ulcer in rats [J]. J Basic Chin Med, 2020, 26(4): 468-473.
- [33] 廖志成. 黄连吴茱萸不同比例配伍对寒热错杂型功能性消化不良大鼠胆碱能神经系统的影响机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2013.
- Liao ZC. Effect of *Coptis chinensis* and *Evodia rutaecarpa* in different proportions on cholinergic nervous system in rats with cold-heat mixed functional dyspepsia [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; 2013.
- [34] 宋捷民, 钱旭武, 滕晔, 等. “寒热并见”大鼠模型的建立及评价 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(1): 39-41.
- Song JM, Qian XW, Teng Y, et al. Establishment and evaluation of cold-heat combined model in rats [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2014, 20(1): 39-41.
- [35] 卢芳, 董培良, 陈平平, 等. 三种热病证候模型最佳造模方法的探索与评价 [J]. 山东中医杂志, 2009, 28(2): 114-116.
- Lu F, Dong PL, Chen PP, et al. Exploration and evaluation of the best modeling methods of three fever syndrome models [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2009, 28(2): 114-116.
- [36] 李敏, 张冰, 刘小青, 等. 虚寒状态大鼠 cAMP 变化机制的实验研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(2): 33-34.
- Li M, Zhang B, Liu XQ, et al. Experimental study on the potential changing mechanism of cAMP in *Asthenia* cold syndrome rats [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2010, 17(2): 33-34.
- [37] 薛春苗, 张冰, 金锐, 等. 虚寒状态动物模型的评价研究 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(8): 2037-2042.
- Xue CM, Zhang B, Jin R, et al. Evaluative research of animal model with deficiency cold status [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2012, 27(8): 2037-2042.
- [38] 黄仕文, 戴启刚. 乌头赤石脂丸对寒凝胸痹大鼠血液黏度、TXB<sub>2</sub>、6-keto-PGF<sub>1α</sub>、ET、NO、SOD 及 MDA 的影响 [J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(3): 56-58.
- Huang SW, Dai QG. Effects of *Aconitum* Chishizhi Pill on blood viscosity, TXB<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, ET, NO, SOD and MDA in rats with chest obstruction due to cold coagulation [J]. J Shanxi Univ Chin Med, 2012, 13(3): 56-58.
- [39] 苏健, 杜惠兰. 月经病寒凝血瘀证与 ET、NO 的关系及加减温经汤对其影响 [J]. 中成药, 2007, 29(11): 1571-1574.

- Su J, Du HL. Relations between ET, NO and blood stasis due to cold accumulation of emmeniopathy [J]. Chin Tradit Pat Med, 2007, 29(11): 1571-1574.
- [40] 张鑫, 刘阳, 姜巍, 等. 和胃理气方对肝郁型功能性消化不良大鼠 Ghrelin 表达的影响 [J]. 云南中医中药杂志, 2021, 42(4): 63-66.
- Zhang X, Liu Y, Jiang W, et al. Effect of Hewei Liqi Decoction on ghrelin expression in rats with liver-stagnation type of functional dyspepsia [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med, 2021, 42(4): 63-66.
- [41] 范明明, 林伟, 韩海瑞, 等. 柴术理胃饮对肝郁脾虚型功能性消化不良大鼠血清 MTL、GAS 的影响 [J]. 中医药信息, 2021, 38(10): 18-22.
- Fan MM, Lin W, Han HR, et al. Effect of CZLWY on serum MTL and GAS in FD rats with liver depression and spleen deficiency [J]. Inf Tradit Chin Med, 2021, 38(10): 18-22.
- [42] 胡俊秀, 蔡正旭, 郭慧淑. 肝郁脾虚型功能性消化不良大鼠海马组织钠尿肽 B 受体与脑源性神经营养因子关系探讨及逍遥散的干预作用 [J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(2): 194-198, 224.
- Hu JX, Cai ZX, Guo HS. Relationship between natriuretic peptide receptor b and brain-derived neurotrophic factor in rat hippocampus with functional dyspepsia of liver stagnation and spleen deficiency and interventional effect of *Xiaoyao* powder [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2020, 47(2): 194-198, 224.
- [43] 刘梦雅, 成映霞, 白敏, 等. 香砂六君子汤调控 RhoA/ROCK2/MYPT1 信号通路改善功能性消化不良大鼠胃动力的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(4): 1-8.
- Liu MY, Cheng YX, Bai M, et al. Mechanism of Xiangsha Liujunzi Tang in regulation of RhoA/ROCK2/MYPT1 pathway to improve gastric motility in rats with functional dyspepsia [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(4): 1-8.
- [44] 李灿, 张海艇, 陈玉龙. 采用唾液淀粉酶和 D-木糖排泄率对利血平脾虚证模型的评价研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(7): 746-748.
- Li C, Zhang HT, Chen YL. Evaluation of reserpine spleen deficiency model using salivary amylase and D-xylose excretion rate [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2011, 17(7): 746-748.
- [45] 钟宇晨, 匡海学, 王秋红. 酒炙前后当归多糖对血瘀证大鼠的作用研究及机制探讨 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(5): 495-501.
- Zhong YC, Kuang HX, Wang QH. Study on effect and mechanism of angelica polysaccharide on blood stasis rats before and after wine-broiled [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(5): 495-501.
- [46] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 小鼠常见证候的辨证标准 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(7): 508-510.
- Fang ZQ, Pan ZQ, Lu WL, et al. Syndrome differentiation criteria of common syndromes in mice [J]. J Basic Chin Med, 2006, 12(7): 508-510.

[收稿日期] 2023-03-03



王雯,侯雨君,王路,等. 胃溃疡中医证候动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1351-1360.

Wang W, Hou YJ, Wang L, et al. Research progress on animal model establishment and evaluation of TCM syndromes of gastric ulcer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1351-1360.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.013

# 胃溃疡中医证候动物模型研究进展

王雯<sup>1</sup>,侯雨君<sup>1</sup>,王路<sup>1</sup>,鄢香芸<sup>1</sup>,李艳秋<sup>1</sup>,孙路强<sup>1</sup>,陈帅<sup>1</sup>,  
石云舟<sup>1</sup>,郑倩华<sup>1</sup>,李瑛<sup>2\*</sup>

(1. 成都中医药大学针灸推拿学院,成都 610075;2. 成都中医药大学研究生院,成都 610075)

**【摘要】** 胃溃疡是一种常见的消化系统疾病,中医药治疗该病效果显著,但其治疗机制至今尚未明确。建立一套科学客观的胃溃疡中医证候动物模型及模型评价体系,对促进中医药在此领域的发展以及进一步的研究具有重大意义。笔者对近 10 年中医药治疗胃溃疡相关文献进行整理,总结和分析了胃溃疡中医证候动物模型的制作与评价方法,对肝胃不和证、脾胃湿热证、胃络瘀阻证、脾胃虚寒证、胃阴不足证、肝郁脾虚证等动物模型的制作方法进行总结,发现目前的胃溃疡动物模型存在中医辨证分型不够统一、造模思路与证型局限、造模方法标准不一、模型病证结合不紧密、模型评价体系不规范等问题,并提出模型改进意见,以期为此领域的研究提供参考。

**【关键词】** 胃溃疡;中医证候;动物模型;评价方法

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1351-10

## Research progress on animal model establishment and evaluation of TCM syndromes of gastric ulcer

WANG Wen<sup>1</sup>, HOU Yujun<sup>1</sup>, WANG Lu<sup>1</sup>, YAN Xiangyun<sup>1</sup>, LI Yanqiu<sup>1</sup>, SUN Luqiang<sup>1</sup>,  
CHEN Shuai<sup>1</sup>, SHI Yunzhou<sup>1</sup>, ZHENG Qianhua<sup>1</sup>, LI Ying<sup>2\*</sup>

(1. College of Acupuncture and Massage, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China.  
2. Graduate School, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075)  
Corresponding author: LI Ying. E-mail: liying@cudtcm.edu.cn

**【Abstract】** Gastric ulcer is a common digestive system disease. Traditional Chinese medicine (TCM) has a significant effect in treatment of this disease. However, its treatment mechanism is unclear. Establishing a scientific and objective animal model and model evaluation system is of great significance to promote development of TCM in this field. This article organizes the literature related to treatment of gastric ulcer by TCM in the past 10 years and summarizes method for establishing and evaluating animal models of TCM syndromes relating to gastric ulcer. The method were reviewed for liver and stomach disharmony syndrome, spleen and stomach dampness-heat syndrome, blood stasis in stomach syndrome, deficiency cold of spleen and stomach syndrome, stomach Yin deficiency syndrome, and liver depression and spleen deficiency syndrome. The current animal models of gastric ulcer had the following problems: the typing of TCM syndromes was not unified, the method and syndrome types of the models were limited, the standards of model establishment method were different, the combination of disease and syndrome of models was not close enough, and the model evaluation system was not standardized. Suggestions for model improvement are proposed to provide a reference for research in this field.

**【Keywords】** gastric ulcer; TCM syndromes; animal models; evaluation methods

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2022YFC3500604)。  
Funded by National Key R&D Project(2022YFC3500604)。

[作者简介] 王雯(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:针灸治疗功能性胃肠病的效应及其机制。Email:1158001145@qq.com

[通信作者] 李瑛(1964—),女,教授,博士,研究方向:针灸治疗功能性胃肠病的效应及其机制。Email:liying@cudtcm.edu.cn

胃溃疡是一种常见的、多发的消化道疾病,属于消化性溃疡病中最常见的一种,其典型表现为饥饿不适、饱胀暖气、泛酸或者餐后定时的慢性中上腹痛,严重时可见黑便与呕血<sup>[1]</sup>,甚至诱发穿孔和癌变<sup>[2]</sup>。流行病学显示,胃溃疡全球发病率高达 5% ~ 10%<sup>[3]</sup>,严重影响患者的生活质量,加重社会的医疗负担,已成为亟待解决的健康问题。胃溃疡是现代医学病名,根据其临床特征可以归入祖国医学“胃脘痛”“痞证”“嘈杂”“吐酸”等病的范畴<sup>[4]</sup>。大量研究证明,中医药治疗胃溃疡有效<sup>[5]</sup>,中药、针灸等可显著缓解患者症状、缩小溃疡面积、降低溃疡复发率,在临床治疗上具有独特的优势,但其作用机制尚未完全明确。辨证论治是中医药理论的核心,科学可靠的不同证型的动物模型是中医药在胃溃疡领域进一步探索的前提和保障。本文整理分析近 10 年来胃溃疡中医证候动物模型的造模和评价方法,以期为今后的研究者制备模型提供参考。

# 1 模型的建立与评价

胃溃疡根据中医辨证分型主要分为肝胃不和证、脾胃湿热证、胃络瘀阻证、脾胃虚寒证、胃阴不

足证和肝郁脾虚证等,其中中医证候动物模型的评价方法主要包括动物模型表征、行为学测试、微观指标检测、病理学改变、以方测证等<sup>[6]</sup>。下面按证型虚实分类对模型的建立与评价进行归纳总结(表 1),并列出其余未分类的中医证候模型,补充从病理模型中筛选出病证模型的方法。

## 1.1 实证

胃溃疡实证包括肝胃不和证、脾胃湿热证、胃络瘀阻证。肝胃不和证表现为胃脘胀满或疼痛、两胁胀满,常因情志不畅而发作或加重;脾胃湿热证主要症状有脘腹痞满或疼痛,口干或口苦;胃络瘀阻证典型症状是胃脘胀痛或刺痛,痛处不移。

### 1.1.1 肝胃不和证模型

肝胃不和证为肝气郁滞、胃失和降所致。邓雪等<sup>[7]</sup>采用 Willner 慢性不可预见性刺激法 + 醋酸烧灼法建立肝郁气滞胃溃疡模型,刺激包括:断水 24 h、断食 24 h、夹尾 5 min、摇晃、昼夜颠倒、电击足底、束缚 2 h,每日随机选择 1 种刺激,每种刺激平均使用 3 次,同时规避相邻 2 d 使用同种刺激,共 21 d,同时在第 10 天进行冰醋酸注射手术以制备胃溃疡模型。徐寅等<sup>[8]</sup>在之前研究基础上增加刺

表 1 不同中医证型模型评价方法  
Table 1 Evaluation methods for different TCM syndrome models

| 证型<br>Type                                         | 动物表征<br>Animal characterization                                                                                                                                                      | 行为学测试<br>Behavioral testing                                                                                                                                          | 微观指标检测<br>Micro indicator detection                                                                                                                                         | 病理学改变<br>Pathological change                                                                                                         | 方药反证<br>Prescription                                                                 |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 肝胃不和证<br>Liver and stomach disharmony syndrome     | 毛发杂乱,缺乏光泽,色黑,大便颜色变深或便质干结<br>The hair is messy and lacks luster, the color of stool darkens or becomes dry                                                                            | 进食进食量减少、体重降低,易激惹,活动减少,喜扎堆,旷场实验评分减低<br>Reduced intake, weight loss, irritability, reduced activity, tendency to cluster, and reduced scores in open field experiments | 胃排空率降低,血清 5-HT 含量增高<br>Reduced gastric emptying rate and increased serum 5-HT content                                                                                       | 溃疡面大,覆白苔或黄苔,黏液湖呈黄色或黄绿色<br>The ulcer surface is large, covered with white or yellow moss, and the mucous lake is yellow or chartreuse | 肝胃百合汤、疏肝和胃丸、柴胡疏肝散<br>Ganwei Baihe decoction, Shugan Hewei pill, Chaihu Shugan powder |
| 脾胃湿热证<br>Spleen and stomach dampness-heat syndrome | 毛发无光,倦怠萎靡,肛温上升,大便稀溏<br>Matte hair, fatigue, increased rectal temperature, loose stool                                                                                                | 进食进食量减少、体重降低<br>Reduced intake, weight loss                                                                                                                          | 无特异性指标<br>No specific indicators                                                                                                                                            | 溃疡面大且深,周边充血水肿明显,上覆黄厚苔<br>The ulcer is large and deep, with obvious peripheral congestion and edema, covered with thick yellow moss   | 连朴饮、清中愈疡汤<br>Lianpo yin, Qingzhong Yuyang decoction                                  |
| 胃络瘀阻证<br>Blood stasis in stomach syndrome          | 毛发无光,爪尾紫暗,耳色暗红,寒战,小便色清,大便湿烂<br>The hair is matte, the paw tail is purple and dark, the ear color is dark red, shivering, the urine color is clear, and the stool is damp and rotting | 进食进食量减少、体重降低,蜷缩少动,喜扎堆<br>Reduced intake, weight loss, curling up with little movement, tendency to cluster                                                           | 胃黏膜血流量锐减,血液黏滞度、红细胞压积、血沉等指标上升<br>Gastric mucosa blood flow decreased sharply, and blood viscosity, hematocrit, erythrocyte sedimentation rate and other indicators increased | 溃疡面有出血或血痂,周围瘀肿暗胀,上覆污苔<br>The ulcer surface is bleeding or scabbing, with dark and swollen surrounding areas covered with dirty moss  | 失笑散合丹参饮、良附丸<br>Shixiao powder and Danshen Yin, Liangfu pill                          |

续表 1

| 证型<br>Type                                              | 动物表征<br>Animal characterization                                                                                                                                                                                                                               | 行为学测试<br>Behavioral testing                                                                                                                                                                                       | 微观指标检测<br>Micro indicator detection                                                                                      | 病理学改变<br>Pathological change                                                                                                                                                                                            | 方药反证<br>Prescription                                                                                                                                                                                                                |                                                        |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 脾胃虚寒证<br>Deficiency cold of spleen and stomach syndrome | 毛发枯槁,鼻唇、爪趾淡白无光,舌质暗紫,精神萎靡,畏寒怕冻,肛温降低,便溏脱肛<br>The hair is withered, the nose, lips, and claws are pale and colorless, the tongue is dark and purple, the spirit is weak, afraid of cold, the rectal temperature is reduced, and the stool is loose and prolapsed | 进水进食量减少、体重降低,行动缓慢,喜扎堆,耐寒能力下降<br>Reduced intake, weight loss, slow movement, tendency to cluster, and decreased cold tolerance                                                                                     | 血清 GAS 含量降低<br>Reduced serum GAS content                                                                                 | 溃疡较浅,范围不大,上覆少量白苔,周围黏膜水肿色淡湿润,反光性强<br>The ulcer is shallow and not extensive, with a small amount of white moss covering it. The surrounding mucosa is swollen and the color is light and moist, with strong reflectivity | 香砂六君子汤、黄芪建中汤、大建中汤、枳术姜参汤、附子理中汤、芪术建中汤、温胃饮、理中丸<br>Xiangsha Liujunzi decoction, Huangqi Jianzhong decoction, Dajian Zhong decoction, Zhizhu Ginseng ginger, Fuzi Lizhong decoction, Qizhu Jianzhong decoction, Wenwei yin, Lizhong pill |                                                        |
|                                                         | 胃阴不足证<br>Stomach Yin deficiency syndrome                                                                                                                                                                                                                      | 毛发蓬松无泽,结膜颜色深红,舌质暗红,鼻头出血,大便干,足温显著升高<br>The hair is fluffy and colorless, the conjunctivas and the tongue are dark red, the nose is bleeding, the stool is dry, and the foot temperature is significantly increased | 进水进食量减少、体重降低,易激怒<br>Reduced intake, reduced weight, irritability                                                         | 胃黏膜血流量、胃液分泌量均显著降低<br>Gastric mucosa blood flow and gastric juice secretion were significantly reduced                                                                                                                   | 溃疡面较小,多呈嫩红色<br>The ulcer surface is small and often appears tender red                                                                                                                                                              | 益胃汤、芍药甘草汤<br>Yiwei decoction, Shaoyao Gancao decoction |
|                                                         | 肝郁脾虚证<br>Liver depression and spleen deficiency syndrome                                                                                                                                                                                                      | 毛发枯黄,足蹠、鼻尖、耳缘黏膜苍白,精神萎靡,大便软溏<br>The hair is withered and yellow, the feet, nose tip, and the mucous membranes of ears are pale, the spirit is weak, and the stool is soft and loose                                | 进水进食量减少、体重降低,易激怒,拉尾排便反应阳性<br>Reduced intake, weight loss, irritability, and positive bowel movements due to tail pulling | 血清中 GAS、5-HT、D-木糖含量降低,NE 指标升高,血清和尿木糖排泄水平下降<br>The levels of GAS, 5-HT, and D-xylose in serum decreased, NE indicators increased, and serum and urine xylose excretion levels decreased                                  | 胃黏膜呈现溃疡征象<br>Gastric mucosa shows signs of ulcer                                                                                                                                                                                    | 痛泻要方、安胃汤<br>Tongxie Yaofang, Anwei decoction           |

激种类,包括潮湿垫料 + 倾斜喂养、热水泳、陌生物品、陌生气味等共 10 种因素作用于小鼠 4 周,刺激手段更为多样,造出模型更贴合于临床,但刺激因素过多,导致模型可控性和可重复性降低。张渊<sup>[9]</sup>、董俊<sup>[10]</sup>则只使用了 5 种刺激因素作用于大鼠:禁食不禁水 24 h、禁水不禁食 24 h、行为束缚 4 h、束缚水浸 4 h、冰水游泳 5 min,适当减少刺激因素,模型更为可控,5 周后成功制备了肝胃气滞证大鼠模型。此类证型通过多种刺激,使动物产生行为学应激以诱导肝郁,肝气郁结,木不疏土,胃失和降,符合肝胃不和证病机。且相邻 2 d 刺激不同,动物更不易产生耐受,造模成功率更高,更贴合于临床,但也存在周期较长、动物饲养成本较高等问题。

肝胃不和证胃溃疡动物模型的表征为毛发杂

乱,缺乏光泽,进食进水量减少,体重下降,易激惹,活动减少喜聚集,解黑便、大便颜色变深或大便质干结;指标上,模型组小鼠旷场实验水平穿越格子数、直立次数明显减少,静止时间明显延长,胃排空实验示胃排空率降低,血清中 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含量明显升高<sup>[9]</sup>;病理方面,模型组胃溃疡指数明显高于空白组,胃黏膜可见明显溃疡征象,溃疡面较大,上覆白苔或黄苔,并多见黄色或黄绿色黏液湖;可用于反证肝胃不和证的方药主要有肝胃百合汤<sup>[8-10]</sup>、疏肝和胃丸<sup>[11]</sup>、柴胡疏肝散等。

1. 1. 2 脾胃湿热证模型

脾胃湿热型胃溃疡因“热毒”滞于脾胃,湿热蕴久而肉腐。王洪京等<sup>[12]</sup>、傅斌等<sup>[13]</sup>将大鼠养育于



潮湿环境中,隔日进食,不限饮水,从第 5 天起将饮水替换为 10% 蜂蜜与 10% 白糖混合饮料,并自第 5 天起,隔日给予每只大鼠猪脂 20 g、每隔 3 日用 1 mL 白酒(酒精含量 56%)对大鼠进行灌胃。于造模第 30 天,灌无水乙醇 5 mL/kg 制备胃溃疡模型。徐敏等<sup>[14]</sup>在普通饲料喂养的基础之上,自由饮用质量浓度为 200 g/L 的蜂蜜水,并按照大鼠的体重进行 52°白酒(20 mL/kg)和猪油(10 g/kg)隔日交替灌胃 20 d。此外,李沁媚等<sup>[15]</sup>还将大鼠放入恒温恒湿箱(33 ~ 35℃)、中高温高湿度(95% ± 3%),每天 6 h 饲养,进一步加重大鼠湿热。该证型通过创造高脂高糖饮食的内热因素,再加湿热的外部因素,使“热毒”壅滞于脾胃,制备的动物模型贴合于临床。

该证动物模型一般表现为毛发无光,倦怠嗜卧,精神萎靡,进食、饮水量减少,体重下降,肛温上升,大便表现为粪质稀溏、湿粪数量和重量增多;病理上,模型组胃溃疡指数明显高于空白组,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法示胃黏膜明显溃疡征象,溃疡面较大较深,周边充血水肿明显,或有新鲜出血,上覆黄厚苔;常用于脾胃湿热证的方药有连朴饮、清中愈疡汤<sup>[13]</sup>等。

### 1.1.3 胃络瘀阻证模型

造成胃部血瘀的病理因素主要有气滞和寒凝。赵岑<sup>[16]</sup>、吴卓霖等<sup>[17]</sup>采用冷暴露结合吡啶美辛灌胃法建立寒凝血瘀证胃溃疡模型,具体方法是:置大鼠于冰柜-10 ± 2℃中,并将含氧 8.5%的氮氧混合气体袋放入冰柜内缓慢放气,冷冻 1 h 后将大鼠取出,随后使用吡啶美辛 10 mg/kg 灌胃,以制备胃溃疡模型,如此连续处理 5 d。寒为阴邪,主收引和凝滞,冷暴露使阳气受损,阴寒凝滞,气血不行,血脉停滞,形成寒凝血瘀之证。此种造模方法操作简便、成功率高、死亡率低、稳定性强、重复性好,值得推广运用。

寒凝血瘀证动物模型表征为被毛无光泽、爪尾部紫暗、耳色暗红、呼吸微弱、蜷缩少动、反应迟钝、寒战、喜扎堆、饮水量少、小便色清、大便湿烂等;微观指标上,模型组胃黏膜血流量锐减,血液黏滞度、红细胞压积、血沉等血液流变学指标上升<sup>[16]</sup>;病理方面,模型组胃溃疡指数明显高于空白组,胃黏膜可见明显溃疡征象,溃疡面有出血或血痂,周围瘀暗肿胀,上覆污苔;此证型可以用失笑散合丹参饮、良附丸等进行方药反证。

## 1.2 虚证

胃溃疡虚证包括脾胃虚寒证、胃阴不足证。脾胃虚寒证表现为胃脘隐痛,喜温喜按,得食痛减;胃阴不足症见胃脘痛隐隐,饥而不欲食。

### 1.2.1 脾胃虚寒证模型

饮食失节、喜食生冷、过度劳倦等均会导致脾胃虚寒,诱发胃溃疡。牛风云等<sup>[18]</sup>、刘敏等<sup>[19]</sup>采用饮食失节法建立模型,沈科书等<sup>[20]</sup>使用大黄苦寒泻下法,毕珺辉等<sup>[21]</sup>、白敏等<sup>[22]</sup>、范珉珏等<sup>[23]</sup>综合上述两种方法,采用了饥饱失常喂养 + 大黄苦寒泻下法。吴青等<sup>[24]</sup>、宋厚盼等<sup>[25]</sup>在此前基础上,将大黄换为番泻叶,加用劳倦过度法构建模型。邱赛红等<sup>[26]</sup>通过灌服冰氢氧化钠和冰食醋两种方法建立脾胃虚寒证胃溃疡模型,比较得出,食醋法造模制备的脾胃虚寒模型更接近于中医脾胃虚寒的临床表现,王琳<sup>[27]</sup>、余凌英等<sup>[28]</sup>便采用冰食醋法进行造模,邵占梅等<sup>[29]</sup>另加猪油脂灌胃,提高造模成功率。此外,与此证型相近的脾胃气虚模型的构建,杜娟等<sup>[30]</sup>采用厚朴三物汤耗气破气 + 饥饱失常法;孙虎等<sup>[31]</sup>采用耗气破气 + 过食酸味法;张泓等<sup>[32]</sup>使用了大黄苦寒泻下法。此类证型造模方法繁杂且混乱。例如,饮食失节法中,喂食频率和食物种类难以统一,用于苦寒泻下的药物也各不相同,且溶液浓度、剂量、频次等不一。因此更统一、规范、科学、简便的造模方法还有待进一步研究。

此类动物模型表征为毛发疏散枯槁,鼻唇、爪趾淡白无光泽,舌质暗紫,精神萎靡,行动缓慢,畏寒怕冻,喜扎堆,体重下降,进食及饮水量减少,肛温降低,便溏脱肛;指标上,模型组血清胃泌素(gastrin, GAS)降低,耐寒实验表明大鼠耐寒能力下降;病理上,模型组胃溃疡指数明显高于空白组,胃黏膜可见明显溃疡征象,溃疡一般较浅,范围不大,上覆少量白苔,周围黏膜水肿色淡湿润,反光性强;常用于脾胃虚寒证型的方药有香砂六君子汤<sup>[21]</sup>、黄芪建中汤<sup>[22]</sup>、大建中汤<sup>[33]</sup>、枳术姜参汤<sup>[27]</sup>、附子理中汤<sup>[19]</sup>、芪术建中汤<sup>[24]</sup>、温胃饮<sup>[20]</sup>、理中丸等。

### 1.2.2 胃阴不足证模型

胃阴不足是由于外感热邪、胃病久而不愈、情志不舒、过食辛辣等耗伤胃阴,胃络失于濡润。目前在胃溃疡的研究中尚无此类病症结合模型的建立,笔者通过查阅文献,发现胃阴不足证型常利用温燥伤阴的食物或药物刺激而成。陈青青等<sup>[34]</sup>用白酒和辣椒液的混合液(1:1)灌胃小鼠,第 1 天灌

30%白酒与 0.4 g/mL 的辣椒液混合液,0.01 mL/g 每天 2 次,此后每天白酒酒精度增加 10%,辣椒液质量浓度增加 0.2 g/mL,直至终浓度为 60%白酒和 1 g/mL 辣椒液混合液,共造模 30 d;方媛等<sup>[35]</sup>在构建阴虚型慢性萎缩性胃炎大鼠模型时,采用了复合温热药、复合甲状腺激素灌胃两种方法构造胃阴虚模型;李莉等<sup>[36]</sup>用燥热伤阴中药草乌水煎剂予以大鼠灌胃以造出胃热阴虚模型。

该证动物模型表征为被毛蓬松无光泽、双眼结膜颜色加深变红、舌质暗红、鼻头出血、易激惹等,摄食量、饮水量、体重、粪便含水率及粪便颗粒数均显著降低,足温显著升高;微观指标显示,胃黏膜血流量、胃液分泌量均显著降低;从病理上来看,模型组胃溃疡指数明显高于空白组,胃黏膜可见明显溃疡征象,溃疡面较小,多呈嫩红色;可用于胃阴不足证的方药有益胃汤、芍药甘草汤等。

### 1.3 虚实夹杂证

胃溃疡虚实夹杂证主要指肝郁脾虚证,症见胃脘胀满或疼痛,胁肋胀痛,腹痛泄泻,泻后痛减,常随情志变化发作或加重。

常用造模方法有多因素复合模拟中医病因,并联合乙酸烧灼法或配合阿司匹林灌胃法。郑小伟等<sup>[37]</sup>、朱梓铭等<sup>[38]</sup>、罗蔚等<sup>[39]</sup>采用多因素复合模拟中医病因结合乙酸法来建立大鼠模型,3 种模拟刺激因素为大黄泻下法:每只 3 mL、每天 1 次,尾关笼法:每只 30 min、每天 1 次,游泳力竭法:负体重 10% 的保险丝,置深 50 cm、水温 28℃ 的水槽中游泳,大鼠鼻尖没入水面 10 s 为准,第 14 天向胃部注射 50% 冰乙酸以制造胃溃疡。此种方法造模,兼顾了致肝实和致脾虚,如夹尾关笼可致肝郁,大黄泻下、游泳力竭可致脾虚,致病刺激因素全面,造出的模型基本符合肝郁脾虚证,但存在病机先后的问题。肝郁脾虚是由情志失调,气机郁结,肝失疏泄,木不疏土,脾失健运所致,理论上应先是肝郁,后发脾虚。上述造模方法并未体现出病机的先后,不能完全模拟临床上患者疾病发展过程。王敏等<sup>[40]</sup>通过多种情志刺激 + 阿司匹林灌胃法构建模型,此方法与肝胃不和证型造模方法相似,都采用应激刺激法造成肝郁,但此法致脾虚的刺激因素不显著,对病势难以把控,所以此方法可控性和稳定性较差。

肝郁脾虚证动物模型主要表现为毛发枯黄,足蹠、鼻尖、耳缘黏膜苍白,精神萎靡,反应迟钝,易激惹,食量减少,体重下降,拉尾排便反应阳性,大便

软溏;微观指标方面,模型血清中 GAS、5-HT、D-木糖含量降低,去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)含量升高<sup>[37,41]</sup>,血清和尿木糖排泄水平下降<sup>[42]</sup>;病理显示,模型组胃溃疡指数明显高于空白组,胃黏膜可见明显溃疡征象;常用于肝郁脾虚证的方药有痛泻要方<sup>[40]</sup>、安胃汤<sup>[38]</sup>等。

### 1.4 其他中医证候模型

其他证型有胃溃疡实寒证、实热证、寒热错杂证、脾肾阳虚证等。临床上较少出现单纯的实寒证、实热证,其往往伴随其他的致病因素,且其缺乏具体的辨证病位;其余证型在临床上占比较少,对应的基础研究也较缺乏,故一并论述。胃溃疡实寒证和实热证模型的构建方法是寒、热刺激因素加胃溃疡形成刺激因素,常用灌服冰水、0.3 mol/L 氢氧化钠 10 mL/kg,每天 1 次复制寒证模型,灌服 8% 干辣椒粉的 60% 乙醇混悬液 10 mL/kg,每天 2 次复制热证模型<sup>[43]</sup>。王江等<sup>[44]</sup>采用大承气汤苦寒泻下法 + 辣椒乙醇混合液灌胃法 + 乙酸注射法构建寒热错杂证胃溃疡模型。孙锋等<sup>[45]</sup>用灌服大黄粉悬液 + 乙酸烧灼法构造胃溃疡脾肾阳虚证模型。

### 1.5 从病理模型中筛选病证模型

现代医学中,制作胃溃疡模型的方法主要有幽门结扎法、束缚水浸法、乙酸乙醇、非甾体抗炎药等药物诱发法。研究者用以上传统方法制作出实验性胃溃疡动物模型,再采用已通过量化、标准化的动物辨证法、四诊检测法,计量辨证动物寒热、气血、阴阳程度,从病理模型中筛选出相应的病证结合模型。有研究者认为,幽门结扎法可致胃内气滞而血瘀,从而建成胃络瘀阻证模型<sup>[1]</sup>;卢文丽等<sup>[46]</sup>对比多种胃溃疡病理模型小鼠后发现,束缚水浸法构建模型阴阳气血损伤不显著,无明显证候偏向;乙酸型小鼠偏于胃寒阳竭、气血亏虚;乙醇早期致模型小鼠胃实热证明显,小鼠恢复后期出现气盛症状;消炎痛构建出的小鼠早期气阳两虚,后期持续性血虚;磷酸组胺小鼠模型仅在早期有胃热证的倾向;李金铭等<sup>[47]</sup>采用皮下注射利血平法构建出气血阴阳俱虚证胃溃疡小鼠模型。

## 2 讨论

### 2.1 存在的问题

#### 2.1.1 中医辨证分型不够统一

目前对于胃溃疡的中医辨证分型没有一个统一的标准。据《消化性溃疡中医诊疗专家共识意见

(2017)》<sup>[48]</sup>, 消化性溃疡辨证分型包括肝胃不和证、脾胃湿热证、肝胃郁热证、胃络瘀阻证、脾胃虚弱(寒)证、胃阴不足证, 并未将肝郁脾虚型胃溃疡放入其中, 但临床上较多患者辨证属肝郁脾虚型, 也有较多学者做了此证型方面的研究; 另外, 实寒证、实热证、寒热错杂证、脾肾阳虚证以及气血阴阳俱虚等, 未被归纳入分型中。建立一个统一的分型标准, 是中医药作用机制探索的重要前提。

### 2.1.2 造模思路与造模证型局限

当前用于造模的方法以病证结合法为主, 病理造模筛选法研究较少, 方法局限。不同病理造模法中医证候特点还不够明确, 且另有多种造模方法未被对应到“证”中, 包括常用的阿司匹林法, 同种药物不同给药方式如乙酸灌胃法、涂抹法、浆膜下注射法所造出的不同模型等; 目前的研究中, 可供选择的证候模型还不够全面。如胃络瘀阻模型, 目前仅有寒凝因素致血瘀的模型, 缺少气虚、气滞等因素的模型。再者, 虽然一些证型的实验性研究较为成熟, 但某些证型几乎没有实验性的研究, 如肝胃郁热、胃阴不足证。有研究显示, 肝胃郁热证在胃溃疡的中医证型分布中占 21.9%<sup>[49]</sup>, 因此, 深入此类型的研究有利于更好地服务临床, 更有利于中医药在此领域全面而充分地发展。

### 2.1.3 造模方法标准不一

对于同一个建模方法, 不同的研究学者采用不同的执行标准。例如在构建肝郁模型时, 研究者使用的刺激因素各不相同, 刺激方法繁多, 操作复杂, 虽然很好地模拟了人类多因素致病的现实情况, 但各种造模因素之间缺少对比研究, 无法为后续的研究者提供良好的造模选择。另外, 同一实验动物, 同一药物的使用量、使用频次等却各有不同, 而目前暂无研究表明最佳药物和最佳用量, 所以为提高实验的规范化、合理性和节约实验成本等, 还需要进一步实验对比<sup>[50]</sup>。

### 2.1.4 模型病证结合不紧密

胃溃疡中医证候模型通常采用病 + 证的方式构造, 即将中医病因造模和西医病理造模直接叠加在动物模型上, 但从中医整体观理论来讲, 病、证并不是截然对立的两种状态, 两者是密不可分的。在病证结合建模过程中, 病、证施加先后顺序也不统一, 有先证后病、先病后证、病证同步 3 种; 其次, 人类疾病的发生发展受多种因素影响, 而实验制备的动物模型与人类疾病的相似度仍有一定距离, 同一

个病因可导致不同的证候, 不同的病因也可能发展为相同的证候, 例如在寒凝血瘀证型中使用了冷暴露法, 动物不仅会寒凝血瘀, 也可能因为寒邪外袭而感冒; 再者, 中医药的诊疗需要根据病情阶段不断辨证施治, 而在动物建模过程中几乎不会考虑这个动态的过程, 实验过程中不会再次辨证。如何将病、证更好地在动物模型上结合、构建的动物模型更贴近于临床, 促进中医证候模型的科学合理性, 值得进一步探究。

### 2.1.5 模型评价体系不规范

在对动物模型表征以及行为学评价时, 其评价形式较为主观。虽然近些年已有研究者对此类评价进行了量化规范, 但量化打分还是以研究者自身的判断为主, 另外中医舌脉辨证在动物模型中仍难以实现, 且人类与动物模型在证型上的表现是否一致, 有待考证; 生化指标评价方面, 一些证型具有特异评价指标, 如肝郁模型可检测血清中 5-HT 和 NE 含量、脾虚模型可检测血清中 GAS 和 D-木糖水平、胃络瘀阻模型可观察血液流变学指标的改变, 但大部分模型缺乏特异性生化指标, 且缺少一个具体的量化标准; 病理改变方面, 不同证型的胃溃疡, 其病变黏膜在光镜下应呈现出特异性改变, 但尚无科学、权威的区分评价标准。

## 2.2 模型的改进建议

针对模型存在的问题, 可以考虑从以下角度来改进。

首先, 研究者应尽早制定统一的胃溃疡辨证分型, 重视先前未深入探究的证型、领域。统一辨证分型, 可从规范症状、证名、证症关系 3 个方面入手<sup>[51]</sup>; 对于暂时没有的动物模型, 可以参考其他相同证型不同疾病的造模方法, 如胃阴不足证型可参考慢性萎缩性胃炎胃阴不足模型, 肝胃郁热型可参照肝郁模型加热证模型。

其次, 开展更多的模型对比研究, 以确定最佳的造模方法, 包括实验动物选择标准、造模因素、药物剂量、时间周期等<sup>[6]</sup>。例如, 在动物选择方面, Wistar 大鼠相比于 SD 大鼠更容易受到外界因素的影响<sup>[52]</sup>, 故更适用于制作肝郁模型, 体重偏大、体脂偏高的中年雄性动物更易形成脾胃湿热模型<sup>[53]</sup>, 缩短造模周期; 在配比高脂高糖等饲料时, 兼顾饲料的口感、成型, 可以保证造模过程更稳定、可靠地进行<sup>[54]</sup>。

再次, 从中医角度出发, 侧重中医相关概念及



理论与证候模型的融合。建模前,应先掌握疾病本质及其病因病机,确定病、证施加的先后顺序,使其符合疾病的发生与发展;中医证的形成因素多样化,如脾胃气虚证病因有过食生冷、饥饱失常、过度劳倦等,研究者应根据实验目的合理选择致病因素;“辨证”是中医理论的核心,在实验过程中,应密切关注动物情况,对动物进行多次辨证,及时调整造模方案,以更好地模拟临床疾病发展过程。

最后,探索更客观、更全面、更规范的模型评判指标。中医“整体观念”和“藏象理论”提示,五脏六腑相连相通,一脏病变则引发全身,胃溃疡病位在胃,但也会累及肝、脾等,因此检测指标应同时关注多个脏腑,使评价更加全面;推广“以方测证”方法的应用,逆向判断证候模型是否成功,增加模型评价方式广度。“有是病便有是证”,“有是证,用是方”,实验中可将胃溃疡病理造模法和以方测证法联合使用。先根据动物四诊法和辨证法基本判断模型证候类型,再用证候对应方剂反作用于动物模型,观察症状是否好转,判断证候类型与动物模型贴合程度,增加从病理模型中挑选相应证候可靠度,为筛选病证结合模型拓宽思路。

建立病证结合的中医证候模型是中医药在胃溃疡领域现代化发展的关键,虽已有胃溃疡中医证候动物模型为研究者提供了参考,但仍需进一步完善。通过对前期模型的改进,以期建立更加统一、规范、可行的胃溃疡中医症候模型,推动胃溃疡的研究以及中医药现代化进程的发展。

参 考 文 献(References)

[ 1 ] 陈伟良,伍振峰,邓中银,等. 中医药在抗胃溃疡研究应用中的现状与进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 362-367.  
Chen WL, Wu ZF, Deng ZY, et al. Status and advance in study on anti-ulcer of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2013, 19(8): 362-367.

[ 2 ] Hansson LE, Nyrén O, Hsing AW, et al. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease [J]. N Engl J Med, 1996, 335(4): 242-249.

[ 3 ] Sverdén E, Agréus L, Dunn JM, et al. Peptic ulcer disease [J]. BMJ, 2019, 367: 15495.

[ 4 ] 王江. 关于胃溃疡病的中医释名及病因病机证候演变的文献研究 [J]. 现代中医药, 2013, 33(5): 137-139.  
Wang J. Literature research on the TCM explanation of gastric ulcer disease and the evolution of etiology, pathogenesis and syndrome [J]. Mod Chin Med, 2013, 33(5): 137-139.

[ 5 ] Teschke R, Wolff A, Frenzel C, et al. Herbal traditional Chinese medicine and its evidence base in gastrointestinal disorders [J].

World J Gastroenterol, 2015, 21(15): 4466-4490.

[ 6 ] 王楷,侯雨君,宋玮,等. 泄泻中医证候动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 823-829.  
Wang K, Hou YJ, Song W, et al. Research progress on animal model construction and evaluation of different TCM syndromes of diarrhea [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 823-829.

[ 7 ] 邓雪,任路,李静,等. 电针“肝俞”穴对抑郁型胃溃疡大鼠胃窦黏膜、下丘脑组织 P 物质和海马 5-羟色胺的影响 [J]. 针刺研究, 2014, 39(2): 124-129.  
Deng X, Ren L, Li J, et al. Effect of electroacupuncture stimulation of “Ganshu”(BL 18) on locomotor, gastric mucosal and hypothalamic SP immunoactivity and hippocampal 5-HT content in rats with depression and gastric ulcer [J]. Acupunct Res, 2014, 39(2): 124-129.

[ 8 ] 徐寅,喻斌. 肝胃百合汤对慢性应激胃溃疡模型小鼠 Th1/Th2 细胞平衡及 HPA 轴的影响 [J]. 中医药学报, 2019, 47(4): 32-36.  
Xu Y, Yu B. Effect of Ganwei Baihe Decoction on Th1/Th2 cells balance and HPA axis in mice with chronic stress gastric ulcer [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2019, 47(4): 32-36.

[ 9 ] 张渊. 肝胃百合汤干预慢性应激性胃溃疡肝胃气滞证模型大鼠作用机制的蛋白组学研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学; 2021.  
Zhang Y. Proteomic study on the mechanism of intervention of Ganwei Baihe Decoction on chronic stress gastric ulcer model rats with liver-stomach qi stagnation syndrome [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine; 2021.

[ 10 ] 董俊. 肝胃百合汤干预慢性应激性胃溃疡肝胃气滞证模型大鼠的代谢组学研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学; 2021.  
Dong J. Metabonomics study on the intervention of Ganwei Baihe Decoction on chronic stress gastric ulcer model rats with liver and stomach qi stagnation syndrome [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University; 2021.

[ 11 ] 张国民,莫新民,刘慧萍,等. 疏肝和胃丸抑制胃溃疡大鼠胃酸和胃蛋白酶分泌作用的实验研究 [J]. 山西中医学院学报, 2007, 8(1): 16-17.  
Zhang GM, Mo XM, Liu HP, et al. Experimental research of Shugan hewei pill on inhibiting the secretion of gastric acid and pepsin of rats with gastric ulcer [J]. J Shanxi Coll Tradit Chin Med, 2007, 8(1): 16-17.

[ 12 ] 王洪京,赵明,杨瑞莲,等. 清热化湿愈疡合剂对实验性胃溃疡(脾胃湿热证)的影响 [J]. 中国中医急症, 2006, 15(7): 768-770, 812.  
Wang HJ, Zhao M, Yang RL, et al. The experimental study on the effect of qingrehuashiyuyang mixture for rats with peptic ulcer, spleen and stomach moist heat syndrome [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2006, 15(7): 768-770, 812.

[ 13 ] 傅斌,陈建章,范姝,等. 清中愈疡汤对脾胃湿热型胃溃疡作用的实验研究 [J]. 中国医学创新, 2022, 19(16): 28-34.  
Fu B, Chen JZ, Fan S, et al. Experimental study on the effect of qingzhong Yuyang Decoction on gastric ulcer of spleen and stomach damp-heat type [J]. Med Innov Chin, 2022, 19(16):

- 28-34.
- [14] 徐敏, 王凤仪, 赵党生, 等. 芍药汤对湿热内蕴型溃疡性结肠炎大鼠 TLR4, NF- $\kappa$ B p65 和 IL-6 表达的调控作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 53-58.
- Xu M, Wang FY, Zhao DS, et al. Effect of Shaoyao Tang on expressions of TLR4, NF- $\kappa$ B p65 and IL-6 in rats with damp-heat ulcerative colitis [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(14): 53-58.
- [15] 李沁媚, 王玉涵, 吕菲菲, 等. 溃疡性结肠炎与湿热证溃疡性结肠炎大鼠模型的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 354-363.
- Li QM, Wang YH, Lyu FF, et al. Comparative study of rat models with ulcerative colitis and ulcerative colitis plus damp-heat syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 354-363.
- [16] 赵岑. 寒凝血瘀型消化性溃疡大鼠模型建立及胃黏膜血流量、血流变学观察 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2011.
- Zhao C. Establishment of rat model of peptic ulcer with cold coagulation and blood stasis and observation of gastric mucosal blood flow and hemorheology [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2011.
- [17] 吴卓霖, 林一帆, 王承利, 等. 寒凝血瘀型胃溃疡大鼠模型的建立及冬胃颗粒保护作用的观察 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19(3): 141-144.
- Wu ZL, Lin YF, Wang CL, et al. Establishment of the rat model of gastric ulcer with blood stasis syndrome due to cold accumulation and protective effect of Dongwei Granule [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2011, 19(3): 141-144.
- [18] 牛风云, 田庆玲, 吴春萍. 脾胃虚寒型胃溃疡动物模型的初步探讨 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(2): 84-86.
- Niu FY, Tian QL, Wu CP. Establishment of rat model with gastric ulcer of deficiency cold of spleen and stomach type [J]. Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care, 2005, 12(2): 84-86.
- [19] 刘敏, 周亚滨, 孙世林, 等. 附子理中汤治疗脾胃虚寒型胃溃疡机制的研究 [J]. 中医药学报, 2012, 40(4): 42-44.
- Liu M, Zhou YB, Sun SL, et al. Fuzi Lizhong Decoction in the treatment of gastric ulcer of spleen-stomach deficiency cold type [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2012, 40(4): 42-44.
- [20] 沈科书, 董宇翔, 沈英字, 等. 温胃饮对脾胃虚寒型胃溃疡大鼠内分泌水平影响的实验研究 [J]. 吉林中医药, 2007, 27(12): 59-60.
- Shen KS, Dong YX, Shen YY, et al. Experimental study on the effect of Wenweiyin on endocrine level in rats with gastric ulcer of spleen-stomach deficiency-cold type [J]. Jilin J Chin Med, 2007, 27(12): 59-60.
- [21] 毕瑞辉, 杨天仁. 香砂六君子汤及其拆方对脾虚胃溃疡模型大鼠胃蛋白酶、SOD、MDA 水平的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(4): 280-282.
- Bi JH, Yang TR. The experimental research of xiangshaliujunzi Tang and its separated formulae on pepsin, SOD and MDA content of spleen deficiency gastric ulcer model rats [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2010, 26(4): 280-282.
- [22] 白敏, 段永强, 杨晓轶, 等. 黄芪建中汤对脾胃虚寒型胃溃疡大鼠作用机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(4): 397-400.
- Bai M, Duan YQ, Yang XY, et al. Effect and mechanism of Huangqi Jianzhong Decoction on gastric ulcer of spleen stomach deficiency cold type in rats [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(4): 397-400.
- [23] 范珉珉, 段永强, 虎峻瑞, 等. 景芪愈溃胶囊对脾胃虚寒型胃溃疡大鼠的作用及其机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(9): 1596-1602.
- Fan MJ, Duan YQ, Hu JR, et al. Effect of Jingqi-Yukui capsule on rats with gastric ulcer of spleen-stomach deficient cold type and its mechanism [J]. Chin J Pathophysiol, 2021, 37(9): 1596-1602.
- [24] 吴青, 陈继婷. 芪术建中汤对脾阳虚溃疡大鼠 IL-6 和 GAS 影响的实验研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2009, 33(1): 40-42.
- Wu Q, Chen JT. Experimental study on Qizhu Jianzhong Decoction influencing ulcerative rats' IL-6 and GAS in spleen Yang deficiency [J]. J Zhejiang Univ Tradit Chin Med, 2009, 33(1): 40-42.
- [25] 宋厚盼, 曾梅艳, 陈小娟, 等. 脾胃虚寒型胃溃疡病证结合大鼠实验模型的建立及评价研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(4): 468-473.
- Song HP, Zeng MY, Chen XJ, et al. Establishment and evaluation of the combination of disease and syndrome experimental model of spleen stomach deficiency cold type of gastric ulcer in rats [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2020, 26(4): 468-473.
- [26] 邱赛红, 李飞艳, 尹健康, 等. 两种大鼠脾胃虚寒模型制备方法的比较研究 [J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(6): 30-33.
- Qiu SH, Li FY, Yin JK, et al. A comparative study on two kinds of methods preparing animal model with the pattern of spleen-stomach deficient cold [J]. J Hunan Tradit Chin Med Univ Hunan, 2004, 24(6): 30-33.
- [27] 王琳. 枳术姜参汤对脾胃虚寒型胃溃疡大鼠模型的作用及机制研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2016.
- Wang L. Zhizhu Ginseng ginger for stomach deficiency type gastric ulcer role model and mechanism [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2016.
- [28] 余凌英, 李星, 蔡平君, 等. 干姜和炮姜对脾胃虚寒型胃溃疡大鼠药效学指标及肠道菌群的影响 [J]. 中国药房, 2022, 33(20): 2460-2465.
- Yu LY, Li X, Cai PJ, et al. Effects of *Zingiber officinale* and processed *Zingiber officinale* on pharmacodynamic indexes and intestinal flora on gastric ulcer rats with spleen-stomach deficiency and cold type [J]. Chin Pharm, 2022, 33(20): 2460-2465.
- [29] 邵占梅, 仲继冬, 房玉明, 等. 格瓦斯对脾胃虚寒型胃溃疡大鼠保护作用的研究 [J]. 中国酿造, 2022, 41(1): 64-69.

- Shao ZM, Zhong JD, Fang YM, et al. Protective effect of Kvass on gastric ulcer rats with spleen-stomach deficiency [J]. Chin Brew, 2022, 41(1): 64-69.
- [30] 杜娟, 王秀琴, 季凤清, 等. 脾气虚胃溃疡大鼠胃黏膜生长抑素相关信号转导分子的变化 [J]. 解剖学报, 2008, 39(6): 894-900.
- Du J, Wang XQ, Ji FQ, et al. Changes of somatostatin related signal transduction moleculars in rat gastric mucosa of spleen deficiency syndrome combined with gastric ulcer [J]. Acta Anat Sin, 2008, 39(6): 894-900.
- [31] 孙虎, 丁永伟, 王平, 等. 脾胃气虚型胃溃疡大鼠病证结合模型的制备 [J]. 山东中医杂志, 2015, 34(1): 47-50.
- Sun H, Ding YW, Wang P, et al. Preparation of the gastric ulcer rat model with deficiency of spleen and stomach [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2015, 34(1): 47-50.
- [32] 张泓, 郭华, 张雨辰, 等. 艾灸对脾虚胃溃疡模型大鼠胃组织表皮生长因子受体、磷酸化细胞外信号调节激酶的影响 [J]. 针刺研究, 2014, 39(5): 351-357.
- Zhang H, Guo H, Zhang YC, et al. Effect of moxibustion intervention on expression of gastric epidermal growth factor receptor and extracellular signal regulated kinase 1/2 expression in rats with gastric ulcer [J]. Acupunct Res, 2014, 39(5): 351-357.
- [33] 徐佳悦. 大建中汤及其拆方对脾胃虚寒胃溃疡模型大鼠影响的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2020.
- Xu JY. Study on the effect of dajianzhong decoction and its decomposed prescriptions on gastric ulcer model rats with deficiency of spleen and stomach cold [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2020.
- [34] 陈青青, 苏洁, 杜宇忠, 等. 铁皮石斛超微粉对“过食辛辣”致胃阴虚模型小鼠的影响 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(7): 1651-1657.
- Chen QQ, Su J, Du YZ, et al. Effect of *Dendrobium officinale* superfine powder on stomach Yin deficiency model mice induced by “spicy overeating” [J]. Chin J Chin Mater Med, 2021, 46(7): 1651-1657.
- [35] 方媛, 桂文琪, 聊晓玉, 等. 阴虚型慢性萎缩性胃炎大鼠病证结合模型的探索与评价 [J]. 中南药学, 2022, 20(3): 525-531.
- Fang Y, Gui WQ, Liao XY, et al. Evaluation of disease syndrome combination model of chronic atrophic gastritis with Yin deficiency in rats [J]. Central South Pharm, 2022, 20(3): 525-531.
- [36] 李莉, 王晓东, 李波, 等. 玉女煎对大鼠胃热阴虚型血热证候的疗效作用机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 16-19.
- Li L, Wang XD, Li B, et al. Study on therapeutic effect and mechanism of Yunv Decoction on blood heat syndrome of stomach-heat Yin deficiency type in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2014, 30(1): 16-19.
- [37] 郑小伟, 王颖, 宋红. 肝郁脾虚证胃溃疡大鼠胃窦组织差异蛋白质表达及柴黄胃溃宁的干预研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(12): 2840-2843.
- Zheng XW, Wang Y, Song H. Expression of gastric antrum proteins in gastric ulcer rats with syndrome of liver constraint and spleen deficiency and the effect of Chaihuang Weikuining [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2011, 26(12): 2840-2843.
- [38] 朱梓铭, 唐友明, 吴德坤, 等. 安胃汤干预肝郁脾虚证胃溃疡大鼠胃窦组织蛋白质组学研究 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34(21): 3533-3538.
- Zhu ZM, Tang YM, Wu DK, et al. A proteomic research in gastric ulcer rats with syndrome of liver constraint and spleen deficiency treated by Anwei Decoction [J]. J Pract Med, 2018, 34(21): 3533-3538.
- [39] 罗蔚, 唐友明, 韩叶芬, 等. 基于 iTRAQ 技术的安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠蛋白质组学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(1): 72-81.
- Luo W, Tang YM, Han YF, et al. iTRAQ based proteomics study of anwei decoction on gastric ulcer with liver depression and spleen *Asthenia* syndrome in rats [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2019, 30(1): 72-81.
- [40] 王敏, 刘杰民, 陈玲, 等. 痛泻要方对大鼠肝郁脾虚证胃溃疡的治疗作用及机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(10): 2361-2365.
- Wang M, Liu JM, Chen L, et al. Therapeutic effect and mechanism of Tongxie Yaofang on gastric ulcer with liver depression and spleen deficiency syndrome in rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2016, 27(10): 2361-2365.
- [41] 邓金钗, 郑小伟, 余王琴, 等. 柴黄胃溃宁对肝郁脾虚证胃溃疡模型大鼠脾 IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响 [J]. 新中医, 2014, 46(11): 205-207.
- Deng JC, Zheng XW, Yu WQ, et al. Effect of Chaihuang weikuining on the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA in spleen of gastric ulcer model rats with liver depression and spleen deficiency syndrome [J]. New Chin Med, 2014, 46(11): 205-207.
- [42] 徐曼丽, 邓金钗, 刘晓谷, 等. 柴黄胃溃宁对肝郁脾虚证胃溃疡模型大鼠脑组织 HSP70 mRNA 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(12): 2866-2868.
- Xu ML, Deng JC, Liu XG, et al. Effect of Chaihuang weikuining on HSP70 and Caspase-3 mRNA expression in gastric ulcer rats brain with liver constraint and spleen deficiency syndrome [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(12): 2866-2868.
- [43] 于海, 柴剑波, 赵伟国, 等. 大黄连泻心汤、理中丸对炎性胃痛胃溃疡寒热证模型大鼠胃组织 bFGF 和血清 VEGF 含量的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(8): 1637-1639.
- Yu H, Chai JB, Zhao WG, et al. Influence of Dahuang Huanglian Xiexin Decoction or Lizhong pill on VEGF contents in serum and bFGF contents in stomach tissue of gastric ulcer induced by indomethacin combined with cold or heat syndrome [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2012, 39(8): 1637-1639.
- [44] 王江, 周永学, 谢勇波. 半夏泻心汤拆方对胃溃疡大鼠胃组织 GAS、MTL 与血清 PAF、ET、NO 的影响及其寒热并用配伍的意义研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(11): 2776



- 2779.
- Wang J, Zhou YX, Xie YB. Effect of decomposed Banxia Xiexin Decoction on GAS and MTL in gastric tissue and PAF, ET and NO in serum of gastric ulcer rats and its significance of cold and heat compatibility [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2016, 34(11): 2776-2779.
- [45] 孙锋, 叶柏川, 陈辉, 等. 肾气丸治疗脾肾阳虚型胃溃疡动物模型的实验研究 [J]. 新中医, 2012, 44(8): 168-170.
- Sun F, Ye BC, Chen H, et al. Experimental study on Shenqi pill in treating animal model of gastric ulcer with spleen-kidney Yang deficiency [J]. New Chin Med, 2012, 44(8): 168-170.
- [46] 卢文丽, 方肇勤, 潘志强, 等. 6 种胃溃疡小鼠模型的证候特征及比较 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(8): 63-68.
- Lu WL, Fang ZQ, Pan ZQ, et al. Syndrome characteristics and comparison of six kinds of mice gastrelceosis models [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2007, 41(8): 63-68.
- [47] 李金铭, 高天悦, 杨旭, 等. 四君子汤合血府逐瘀汤对利血平胃溃疡模型小鼠胃黏膜、胃组织 SOD、MDA、NO 及气、血、阴盛衰影响随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(1): 56-60.
- Li JM, Gao TY, Yang X, et al. Randomized parallel contrast study of effects of sijunzi decoction plus xuefuzhuyu decoction on the gastric mucosa, gastric SOD, MDA, NO and exuberance and debilitation of Qi, blood and Yin, in reserpine induced gastric ulcer model mice [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2018, 32(1): 56-60.
- [48] 张声生, 王垂杰, 李玉锋, 等. 消化性溃疡中医诊疗专家共识意见 (2017) [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(9): 4089-4093.
- Zhang SS, Wang CJ, Li YF, et al. Consensus opinion of experts on diagnosis and treatment of peptic ulcer in traditional Chinese medicine (2017) [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(9): 4089-4093.
- [49] 王亚男, 麻春杰. 左金丸治疗胃溃疡研究进展 [J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(5): 103-106.
- Wang YN, Ma CJ. Research progress on treatment of gastric ulcer with Zuojin pill [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2021, 35(5): 103-106.
- [50] 王路, 许明敏, 曹炜, 等. 便秘中医证候动物模型研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(3): 419-422.
- Wang L, Xu MM, Cao W, et al. Research progress on animal models of TCM syndromes of constipation [J]. J Basic Chin Med, 2020, 26(3): 419-422.
- [51] 李影迪, 梁茂新. 消化性溃疡中医辨证存在的问题及解决策略 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(3): 1548-1551.
- Li YD, Liang MX. Problems and countermeasures of traditional Chinese medicine syndrome differentiation of peptic ulcer [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(3): 1548-1551.
- [52] 谭裕洁, 郭玲. 氟斑牙大鼠模型建立的影响因素 [J]. 口腔医学研究, 2019, 35(4): 316-318.
- Tan YJ, Guo L. Influencing factors on the establishment of rat model of dental fluorosis [J]. J Oral Sci Res, 2019, 35(4): 316-318.
- [53] 李威莹, 吴威, 孙凡雅, 等. 脾胃湿热证动物模型的构建与评价研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(11): 77-82.
- Li WY, Wu W, Sun FY, et al. Research progress on construction and evaluation of animal model of spleen-stomach damp-heat syndrome [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2022, 24(11): 77-82.
- [54] 姚俊鹏, 周思远, 陈丽萍, 等. 食源性肥胖大鼠模型制备中相关影响因素分析探讨 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(7): 2165-2172.
- Yao JP, Zhou SY, Chen LP, et al. Analysis and discussion on the related influencing factors in the preparation of food-borne obesity rat model [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2020, 22(7): 2165-2172.

[收稿日期] 2023-05-29

刘延英. 斑马鱼模型在神经退行性疾病研究中的应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1361-1367.

Liu YY. Progress in the application of the zebrafish models in the study of neurodegenerative diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1361-1367.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.014

# 斑马鱼模型在神经退行性疾病研究中的应用进展

刘延英\*

(青岛黄海学院医学院基础医学教研室, 山东 青岛 266427)

**【摘要】** 随着老龄化社会的进程加快,神经退行性疾病发病率呈现逐年上升趋势。斑马鱼因拥有其他模式动物所不具备的优点,作为模式动物被广泛应用于医学和生命科学的各个研究领域。本文就近年来斑马鱼在常见的神经退行性疾病,如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈症、肌萎缩侧索硬化、脊髓性肌萎缩、遗传性痉挛性截瘫及其他神经系统相关疾病的研究应用进行综述。

**【关键词】** 神经退行性疾病;斑马鱼;阿尔茨海默病;帕金森病;亨廷顿舞蹈症

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1361-07

## Progress in the application of the zebrafish models in the study of neurodegenerative diseases

LIU Yanying\*

(Department of Basic Medicine, School of Medicine, Qingdao Huanghai University, Qingdao 266427, China)

Corresponding author: LIU Yanying. E-mail: lldj2006@163.com

**【Abstract】** With the process of the aging society, the incidence rate of neurodegenerative diseases is increasing year by year. Zebrafish as a model organism has been widely used in various research fields of medicine and life science due to its many advantages that other model organisms do not have. This article reviews the application and progress of zebrafish in the research of several common neurodegenerative diseases in recent years, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, spinal muscular atrophy, hereditary spastic paraplegia, and other diseases related to the nervous system.

**【Keywords】** neurodegenerative diseases; zebrafish; Alzheimer's disease; Parkinson's disease; Huntington's disease

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

斑马鱼 (zebrafish, *Danio rerio*) 是原产于印度东部、巴基斯坦、尼泊尔等地的一种热带淡水硬骨鱼,属于辐鳍亚纲 (Actinopterygii)、鲤科 (Cyprinidae)、短担尼鱼属 (*Danio*), 因其体侧有类似斑马样条纹而得名。斑马鱼成鱼体长一般约为 3 ~ 5 cm, 寿命约为 2 ~ 3 年。19 世纪 70 年代, 美国俄勒冈大学著名遗传学家 George Streisinger 研究小组对斑马鱼进行了系统研究, 为斑马鱼日后能够成为一种模式动物奠定了基础。后来, 随着斑马鱼基因突变体筛选成功、测序技术和相关遗传操作技术的发展, 斑马鱼以其独特的优势成为一种能够将胚胎学、遗传学和分子生物学有机结合在一起的模式动物被用于

名遗传学家 George Streisinger 研究小组对斑马鱼进行了系统研究, 为斑马鱼日后能够成为一种模式动物奠定了基础。后来, 随着斑马鱼基因突变体筛选成功、测序技术和相关遗传操作技术的发展, 斑马鱼以其独特的优势成为一种能够将胚胎学、遗传学和分子生物学有机结合在一起的模式动物被用于

**【基金项目】** 青岛黄海学院博士科研启动基金项目 (2021boshi01), 青岛黄海学院教学改革研究项目 (hhxyjg2021), 山东省自然科学基金项目 (ZR2022MC192)。

Funded by the Doctoral Research Startup Funding from Qingdao Huanghai University (2021boshi01), School Teaching Reform Project of Qingdao Huanghai University (hhxyjg2021), the Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2022MC192).

**【作者简介】** 刘延英, 女, 博士, 研究方向: 神经退行性疾病研究。Email: lldj2006@163.com

神经发育、遗传学和毒理学等相关研究领域。由于斑马鱼的基因序列、信号传导通路与人类保持高度相似性,被用于某些疾病模型制备及药物筛选、器官发育与再生、生物安全等方面的研究<sup>[1-2]</sup>。研究表明,斑马鱼神经系统的基本解剖结构、包含的细胞群和化学成分与人类神经系统在整体上相似且在进化上保守<sup>[3]</sup>,已成为研究人类神经系统疾病发病机制的理想模式动物。本文就近年来,斑马鱼作为模式动物用于神经退行性疾病以及与神经系统相关疾病的研究进行综述。

## 1 斑马鱼

斑马鱼的生物学特性及特点包括:(1)体外发育、胚胎透明和强大的器官再生能力。随着活体成像技术和遗传学操作技术的发展,斑马鱼已为研究器官发育和再生及某些疾病的发病机制和病理过程提供了理想的操作平台。(2)极强的繁殖能力、成熟周期短和廉价的饲养成本等特点使斑马鱼在用于大规模遗传筛选、化合物筛选和小分子化合物的高通量筛选时优于小鼠等其他哺乳类动物。(3)与细胞培养时忽略内环境的影响不同,斑马鱼在被用于药物筛选时能够提供活的生物有机体整体的毒理信息,增加了获得信息的可靠性。此外,在斑马鱼早期胚胎中,其血脑屏障的不完整性有利于药物进入中枢神经系统,为研究人员进行大规模药物筛选提供了一个既经济又有效的筛选工具<sup>[4]</sup>。总之,与其他脊椎模式动物相比,斑马鱼的上述优势,

使其成为研究疾病发病机制的可靠动物模型,在人类某些疾病尤其是神经退行性疾病的发病机制等研究中经常应用。

## 2 斑马鱼与神经退行性疾病

中枢神经系统常见的神经退行性疾病主要有阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈症等。此外,由运动神经元损伤导致的运动系统疾病包括脊髓性肌萎缩、遗传性痉挛性截瘫和肌萎缩性侧索硬化症等患者最终也发生神经退行性病变。神经退行性疾病的发病机制至今不明。为了明确此类疾病的发病机制,研究者以不同类型的模式动物开展了大量研究。斑马鱼因具有上述不同于其他模式动物的特点,在神经退行性疾病模型的选择上,备受研究者青睐。已被广泛用于阿尔茨海默病等多种常见的神经退行性疾病的研(图1)。

### 2.1 阿尔茨海默病

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种起病隐匿、进行性发展的神经系统退行性疾病<sup>[5]</sup>。在疾病早期,患者仅表现为老年性健忘,随着病情的进展,患者逐渐出现认知能力损害、人格与性情改变等精神症状,最终死亡。尽管AD的发病机制不明确,但是,现已证明AD的发病与某些蛋白编码基因的改变密切相关<sup>[6]</sup>。这些蛋白包括淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP),早老素1(presenilin 1, PSEN1)、早老素2(presenilin 2, PSEN2)、Tau蛋白和载脂蛋白E(apolipoprotein E,

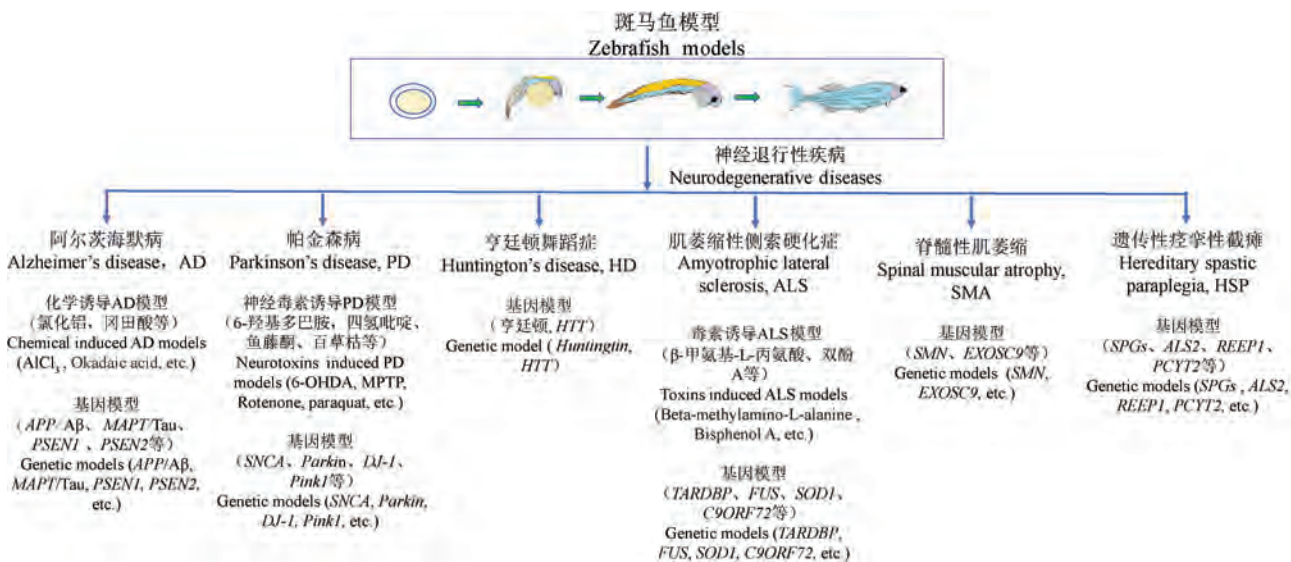


图1 斑马鱼模型用于神经退行性疾病的研究

Figure 1 Zebrafish models used in the study of neurodegenerative diseases



ApoE) 等。

迄今为止,不同的实验室用斑马鱼模式动物开展了上述与 AD 发病密切相关基因的研究,并取得了一些研究成果。在斑马鱼体内存在 *appa* 和 *appb* 两种基因。*Appa* 基因突变的斑马鱼表现为朊病毒依赖的惊厥反应性增强<sup>[7]</sup>。*Appa* 和 *appb* 的基因敲除导致反常的室管膜纤毛和小脑室的形成<sup>[8]</sup>。通过原位杂交证明两种淀粉样蛋白前体蛋白分别与不同的神经细胞外黏附分子结合,为脊椎动物感觉回路的形成奠定了基础<sup>[9]</sup>。此外,纳米药物在斑马鱼体内对 A $\beta$  毒性抑制作用的发现,为 AD 的治疗提供了新思路<sup>[10]</sup>。近期研究证明,在含有高度磷酸化 Tau 蛋白的斑马鱼模型中,Surfen 和 oxalyl surfen 可以降低 Tau 的磷酸化和减少神经元的丢失<sup>[11]</sup>。另外,利用斑马鱼模型探讨药物通过血脑屏障通透性及对 Tau 蛋白聚集影响的研究,对 AD 治疗药物的靶向传递和提高疗效具有意义<sup>[12]</sup>。最近, Kiper 等<sup>[13]</sup>对利用斑马鱼基因模型研究 AD 的病理进展进行了详细归纳和总结。

在斑马鱼体内,*psen1* 突变对机体的影响与年龄相关。例如,在年龄为 7 d 的斑马鱼,*psen1* 基因突变可影响机体内的氧化磷酸化、细胞外基质和铁离子稳态等<sup>[14]</sup>;而在成年斑马鱼(年龄:6 ~ 24 月)*psen1* 基因突变虽然改变了斑马鱼对低氧的反应<sup>[15]</sup>,但是其脑血管结构并未发生变化<sup>[16]</sup>。*Psen2* 是斑马鱼体内的另外一种 *psen* 基因。据报道,在正常的成年斑马鱼中,*psen2* 基因是黑色素性皮肤色素沉着所必需的<sup>[17]</sup>。*Psen2* 基因敲除的斑马鱼幼鱼表现为对刺激的过度运动反应和自噬作用的增强<sup>[18]</sup>。将人类 *PSEN2* 基因(K115fs)表达在斑马鱼体内,斑马鱼的大脑则快速衰老<sup>[19]</sup>。

斑马鱼除了作为上述基因模式动物研究 AD 的发病机制,也被用于研究其他因素对 AD 发病的影响。例如,以冈田酸(okadaic acid)诱导的 AD 斑马鱼模型发现了镧硫烯酮亚胺-5-乙酯(lanthionine ketimine-5-ethyl ester)的神经保护作用<sup>[20]</sup>。上述研究从不同的角度对 AD 的发病机制进行了探讨,证明了斑马鱼用于 AD 研究的可靠性和可行性。

## 2.2 帕金森病

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的进行性发展的神经系统退行性疾病。PD 的发生是由于中脑黑质-纹状体多巴胺能神经元通路的破坏,引起多巴胺能神经元的大量死亡,导致多巴胺

的合成和分泌减少所致。现已证明与 PD 的发生密切相关的基因包括 *SNCA* ( $\alpha$ -synuclein)、*DJ-1*、*PRKN* (parkin)、*PINK1* (PTEN-induced kinase 1) 和 *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2)<sup>[21]</sup> 等。据报道,在胚胎期,将突变 A30P 或 A53T 的  $\alpha$ -synuclein mRNA 注射入斑马鱼体内能够导致幼鱼体内嗅觉纤毛的数量减少和长度缩短<sup>[22]</sup>。某些基因敲除或缺失导致斑马鱼出现一些类似 PD 的病理改变。*Pink1* 基因敲除阻碍了多巴胺能神经元的再生<sup>[23]</sup>;敲除 *park7* (*dj-1*) 基因影响氧化磷酸化过程尤其是对脑转录组中铁反应元件(iron responsive element, IRE) 基因表达的影响,引起线粒体功能失常<sup>[24]</sup>;缺失 *parkin* 基因引起线粒体功能障碍和多巴胺能神经元丢失<sup>[25]</sup> 等。关于 *lrrk2* 基因的作用,至今备受争议。有报道称 *lrrk2* 基因敲除导致斑马鱼胚胎发育畸形,酪氨酸羟化酶阳性神经元数目的减少<sup>[26]</sup>。后来, Ren 等<sup>[27]</sup>在相同的实验条件下,未能重复出此实验结果。因此,关于 *lrrk2* 在斑马鱼中的作用需要进一步研究与探讨。

PD 的发生除了和上述基因因素有关,与环境因素也密切相关<sup>[28]</sup>。这些因素包括 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)、6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、鱼藤酮(rotenone)、百草枯(paraquat)和其他重金属离子如铁和锌等。近期,利用 MPTP 诱导的斑马鱼 PD 模型,研究者们分别探讨了银杏内酯 B(Ginkgolide B)<sup>[29]</sup> 和前花青素(procyanidins)<sup>[30]</sup> 的作用;以 6-OHDA 诱导的斑马鱼 PD 模型,不同的实验室分别研究了酪氨酸磷酸酶 1B<sup>[31]</sup> 和岩藻黄素的作用<sup>[32]</sup>;以鱼藤酮诱导的斑马鱼 PD 模型被用于探究益生菌的作用<sup>[33]</sup>;以百草枯制备的斑马鱼 PD 模型则被用于研究了黏附分子 L1 激动剂模拟物的作用<sup>[34]</sup> 等。近期的一篇综述对各种神经毒素分别诱导斑马鱼胚胎或幼鱼成为 PD 模型的神经行为功能进行了系统分析和比较,这将对研究者如何选择合适的神经毒素诱导理想的 PD 模型提供借鉴和参考<sup>[35]</sup>。上述这些研究证明,环境毒素作用于斑马鱼可以成功地模拟出 PD 的某些临床症状和/或病理学特征,为进一步明确 PD 的发病机制开辟了一条新途径。

## 2.3 亨廷顿舞蹈症

亨廷顿舞蹈症(Huntington's disease, HD)是一种常染色体显性遗传性疾病,大多数患者的临床症

状主要表现为进行性运动异常, 不自主的舞蹈样动作, 伴随智力的衰退和精神症状, 最终患者活动能力完全丧失直至死亡。亨廷顿舞蹈病基因同源染色体的成功克隆, 使明确该疾病的病理生理学成为可能。遗传学检查表明, 患者位于第 4 号染色体上的亨廷顿(Huntingtin, *HTT*) 基因有不稳定且数目大于 42 的 CAG 重复序列。因为斑马鱼对亨廷顿舞蹈症基因同源物缺失的反应不同于小鼠<sup>[36]</sup>, 所以更适合用于 HD 发病机制的研究。以往研究证明, 在发育期的 *htt* 基因缺陷将导致斑马鱼形态学异常和中枢神经系统坏死<sup>[37-38]</sup>。最近研究显示, *htt* 在斑马鱼胚胎发育的早期可有可无, 而在斑马鱼后期的发育中发挥重要作用<sup>[39]</sup>。斑马鱼模型的应用, 为明确 HD 的发病机制和有效防治 HD 的发生及降低该病的发病率带来希望。

2.4 肌萎缩性侧索硬化症

肌萎缩性侧索硬化症 (amyotrophic lateral

sclerosis, ALS) 是一个发生在脊髓、脑干和运动皮层的运动神经元选择性丢失和颅脑神经核及脊髓前角运动神经元受损的渐进性神经退行性疾病。患者主要表现为肌肉进行性萎缩, 肌张力减退和混合性瘫痪, 晚期可能出现吞咽困难, 最终因呼吸衰竭而死亡。家族遗传性 ALS 与超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 基因 *SOD1* 的突变有关<sup>[40]</sup>。近期研究表明, 一种合成的 SOD/过氧化氢酶模拟化合物可以将 *SOD1G93R* 突变斑马鱼 ALS 模型的运动能力提高 30%<sup>[41]</sup>。除了 *SOD1* 基因, 其他基因如 *FUS* (fused in sarcoma)、*TARDBP* 和 *C9orf72* 等也与 ALS 的发病有关。据报道, 斑马鱼 *fus* 基因突变模型已经成功构建<sup>[42]</sup>。斑马鱼体内 *tardbp* 编码的 TDP-43 寡聚体的形成加速了 ALS 的病理进程<sup>[43]</sup>。最近, 通过综合遗传分析 ALS 遗传的可能性, 研究者提供了核孔缺陷与 ALS 联系起来的重要遗传证据, 确定神经元剪接的改变在 ALS 的重要

表 1 斑马鱼模型用于其他神经系统相关疾病的研究

| 疾病<br>Disease                              | 斑马鱼模型<br>Zebrafish models                                                                                                                                                        | 主要效应/变化<br>Major effects/changes                                                                 | 参考文献<br>Reference |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 结节性硬化症<br>Tuberous sclerosis complex (TSC) | 野生型和 <i>Tsc2</i> <sup>-/-</sup><br>Wild type (WT) and <i>Tsc2</i> <sup>-/-</sup>                                                                                                 | 在结节性硬化症, 致病转录因子 SPI1/PU.1 上调<br>Upregulation of pathogenic transcription factor SPI1/PU.1 in TSC | [52]              |
| 视网膜疾病<br>Retina disease                    | 野生型, 转基因 ( <i>vsx1</i> ; Gal4) q26 和转基因 ( <i>14xUAS</i> ; memTagRFP-T)<br>WT, Tg ( <i>vsx1</i> ; Gal4) q26) and Tg ( <i>14xUAS</i> ; memTagRFP-T)                                | 神经再生和分化<br>Neurogenesis and differentiation                                                      | [53]              |
| 多发性硬化<br>Multiple sclerosis                | 野生型和 <i>myd88</i> <sup>-/-</sup><br>WT and <i>myd88</i> <sup>-/-</sup>                                                                                                           | 髓鞘和轴突损伤<br>Myelin and axonal damage                                                              | [54]              |
| 胎儿运动障碍<br>Fetal akinesia                   | 野生型和 <i>Nup88</i> <sup>sa2206</sup><br>WT and <i>Nup88</i> <sup>sa2206</sup>                                                                                                     | 运动行为和功能表型的变化<br>Changes in locomotor behavior and function phenotype                             | [55]              |
| 脊髓小脑性共济失调<br>Spinocerebellar ataxia        | TLN 系和 TLN 转基因 ( <i>la118Tg</i> ; Tg ( <i>aldoca</i> ; <i>gap43-Venus</i> ))<br>TLN strain and TLN transgenic line ( <i>la118Tg</i> ; Tg ( <i>aldoca</i> ; <i>gap43-Venus</i> )) | 发育中的浦肯野细胞<br>Purkinje cells in development                                                       | [56]              |
| 遗传性失明<br>Inherited blindness               | 失明幼鱼和对照<br>Dye larvae and controls                                                                                                                                               | 视觉功能和视网膜形态<br>Visual function and retinal morphology                                             | [57]              |
| 沃尔弗拉姆综合征<br>Wolfram syndrome               | 野生型、 <i>wfs1a</i> <sup>-/-</sup> 和 <i>wfs1b</i> <sup>-/-</sup><br>WT, <i>wfs1a</i> <sup>-/-</sup> and <i>wfs1b</i> <sup>-/-</sup>                                                | 视觉功能障碍和神经元发育迟缓<br>Visual dysfunction and delayed neuronal development                            | [58]              |
| 腓骨肌萎缩症<br>Charcot-Marie-Tooth disease      | 转基因 ( <i>ngn1</i> ; GFP)、转基因 ( <i>mnx1</i> ; mCherry)<br>Tg ( <i>ngn1</i> ; GFP), Tg ( <i>mnx1</i> ; mCherry)                                                                    | 发育中斑马鱼的运动神经元和感觉神经元<br>Motor and sensory neurons in developing zebrafish                          | [59]              |
| 骨质疏松症<br>Osteoporosis                      | 野生型 AB-系、转基因 ( <i>sp7</i> ; EGFP)<br>Wild type AB-strain, Tg ( <i>sp7</i> ; EGFP)                                                                                                | 骨损伤<br>Bone damage                                                                               | [60]              |
| 肥胖症<br>Obesity                             | 野生型 AB-系<br>Wild type AB-strain                                                                                                                                                  | 内脏脂肪组织、血浆甘油三酯和总胆固醇<br>Visceral adipose tissue, plasma triglycerides and total cholesterol        | [61]              |

性<sup>[44]</sup>。关于 *C9orf72* 基因与 ALS 之间关系的研究, Fortier 等<sup>[45]</sup>对 *c9orf72* 相关 ALS 病理学的斑马鱼模型进行了概括总结,讨论了在理解疾病的发病机制方面的价值以及在药物研发中的潜在用途。

## 2.5 脊髓性肌萎缩

脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)是一种常染色体隐性遗传的神经退行性疾病。患者的临床表现为进行性对称性以肢体近端为主的广泛性弛缓性麻痹和肌肉萎缩,但其智力发育及感觉均正常。研究证明, SMA 的发病机制与维持运动神经元存活的蛋白(survival motor neuron, SMN)水平下降有关。与人类拥有 *SMN1* 和 *SMN2* 两个基因不同,斑马鱼只有一个 *smn* 基因。Boyd 等<sup>[46]</sup>报道了在斑马鱼 SMA 模型中,体内生物能量状态调控运动神经元的敏感性和疾病病理进程。斑马鱼 SMA 模型经荧光相关光谱学分析显示其运动神经元轴突中并不存在 SMN 的主动转运<sup>[47]</sup>。在斑马鱼中, *exosc9* 基因的改变可以表现出人类脊髓性肌萎缩病的一些特征,影响 RNA 外泌体,导致大脑半球萎缩<sup>[48]</sup>。上述研究表明,斑马鱼 SMA 模型的成功建立,为明确该病的发病机制,进行有效的预防和治疗提供了新思路。

## 2.6 遗传性痉挛性截瘫

遗传性痉挛性截瘫(hereditary spastic paraplegia, HSP)是一种比较少见的家族遗传性疾病,以常染色体显性遗传多见。其病理改变主要是胸段脊髓双侧皮质脊髓束的轴索变性和/或脱髓鞘导致的进行性神经系统退行性疾病。Wood 等<sup>[49]</sup>对容易引起 HSP 的第 4 个基因座 *SPG4* 突变和该基因表达产物微管切割蛋白(spastin)的研究证明了对斑马鱼的 *spg4* 基因敲除会导致明显的运动神经元的突触障碍和其他类型神经元连接性下降及广泛的中枢神经细胞凋亡。这些研究成果有助于明确 HSP 的发病机制。*REEP1* 是与 HSP 发病相关的另一基因。在斑马鱼幼鱼中, *reep1* 基因敲除导致运动神经元轴突生长缓慢,运动障碍、线粒体功能失常和氧化应激<sup>[50]</sup>。Naef 等<sup>[51]</sup>对斑马鱼模型在 HSP 研究中的应用进行了概述。

## 2.7 斑马鱼模型在其他神经系统相关疾病研究中的应用

斑马鱼除了用于上述常见神经退行性疾病的研究,还用于其他与神经系统相关疾病的研究<sup>[52-61]</sup>。这些研究进一步证明,斑马鱼是一种广泛被认可的模

式动物,助力医学发展与进步(见表 1)。

## 3 结语

斑马鱼模式动物本身也存在不足和应用局限性,如缺乏人类某些重要组织器官,给药途径受限制,国际尚无斑马鱼行为学检测和分析判断的统一标准,检测斑马鱼的抗体制备繁琐且数量较少等,但是此种模式动物的建立为人类明确某些疾病,尤其是神经退行性疾病的发病机制提供了新选择和新途径。斑马鱼不但已经成为研究神经退行性疾病发病机制的一种理想的模式动物,而且在昼夜节律和学习记忆等复杂行为学研究和现代分子遗传机制研究中,也初步成为一种具有潜在应用价值的动物模型。未来,随着新研究技术手段的不断发现和研究策略的改进与完善,斑马鱼这一模式动物的应用将成为早日明确人类神经退行性疾病的发病机制,开发和评价治疗药物的技术工具。

## 参 考 文 献(References)

- [1] Marques IJ, Lupi E, Mercader N. Model systems for regeneration: zebrafish [J]. Development, 2019, 146(18): dev167692.
- [2] Wang X, Zhang JB, He KJ, et al. Advances of zebrafish in neurodegenerative disease: from models to drug discovery [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 713963.
- [3] Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders [J]. Trends Pharmacol Sci, 2014, 35(2): 63-75.
- [4] Vaz RL, Outeiro TF, Ferreira JJ. Zebrafish as an animal model for drug discovery in Parkinson's disease and other movement disorders: a systematic review [J]. Front Neurol, 2018, 9: 347.
- [5] Grøntvedt GR, Schröder TN, Sando SB, et al. Alzheimer's disease [J]. Curr Biol, 2018, 28(11): R645-R649.
- [6] Kamboh MI. Genomics and functional genomics of Alzheimer's disease [J]. Neurotherapeutics, 2022, 19(1): 152-172.
- [7] Kanyo R, Leighton PLA, Neil GJ, et al. Amyloid- $\beta$  precursor protein mutant zebrafish exhibit seizure susceptibility that depends on prion protein [J]. Exp Neurol, 2020, 328: 113283.
- [8] Chebli J, Rahmati M, Lashley T, et al. The localization of amyloid precursor protein to ependymal cilia in vertebrates and its role in ciliogenesis and brain development in zebrafish [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 19115.
- [9] Karuppan SJ, Vogt A, Fischer Z, et al. Members of the vertebrate contactin and amyloid precursor protein families interact through a conserved interface [J]. J Biol Chem, 2022, 298(2): 101541.
- [10] Javed I, Peng G, Xing Y, et al. Inhibition of amyloid beta toxicity in zebrafish with a chaperone-gold nanoparticle dual strategy [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3780.



- [11] Alavi Naini SM, Soussi-Yanicostas N. Heparan sulfate as a therapeutic target in tauopathies; insights from zebrafish [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 163.
- [12] Zhang W, Kandel N, Zhou Y, et al. Drug delivery of memantine with carbon dots for Alzheimer's disease; blood-brain barrier penetration and inhibition of tau aggregation [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2022, 617: 20–31.
- [13] Kiper K, Freeman JL. Use of zebrafish genetic models to study etiology of the amyloid-beta and neurofibrillary tangle pathways in Alzheimer's disease [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2022, 20(3): 524–539.
- [14] Dong Y, Newman M, Pederson SM, et al. Transcriptome analyses of 7-day-old zebrafish larvae possessing a familial Alzheimer's disease-like mutation in *psen1* indicate effects on oxidative phosphorylation, ECM and MCM functions, and iron homeostasis [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 211.
- [15] Newman M, Nik HM, Sutherland GT, et al. Accelerated loss of hypoxia response in zebrafish with familial Alzheimer's disease-like mutation of presenilin 1 [J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(14): 2379–2394.
- [16] Barthelson K, Newman M, Nowell CJ, et al. No observed effect on brain vasculature of Alzheimer's disease-related mutations in the zebrafish presenilin 1 gene [J]. *Mol Brain*, 2021, 14(1): 1–4.
- [17] Jiang H, Newman M, Lardelli M. The zebrafish orthologue of familial Alzheimer's disease gene Presenilin 2 is required for normal adult melanotic skin pigmentation [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0206155.
- [18] Barazzuol L, Cieri D, Facchinello N, et al. Unraveling presenilin 2 functions in a knockout zebrafish line to shed light into Alzheimer's disease pathogenesis [J]. *Cells*, 2023, 12(3): 376.
- [19] Hin N, Newman M, Kaslin J, et al. Accelerated brain aging towards transcriptional inversion in a zebrafish model of the K115fs mutation of human PSEN<sub>2</sub> [J]. *PLoS One*, 2020, 15(1): e0227258.
- [20] Koehler D, Shah ZA, Hensley K, et al. Lanthionine ketimine-5-ethyl ester provides neuroprotection in a zebrafish model of okadaic acid-induced Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Int*, 2018, 115: 61–68.
- [21] Ye H, Robak LA, Yu M, et al. Genetics and pathogenesis of Parkinson's syndrome [J]. *Annu Rev Pathol*, 2023, 18: 95–121.
- [22] Iqbal A, Baldrihi M, Murdoch JN, et al. Alpha-synuclein aggregates inhibit ciliogenesis and multiple functions of the centrosome [J]. *Biol Open*, 2020, 9(10): bio054338.
- [23] Brown SJ, Boussaad I, Jarazo J, et al. PINK1 deficiency impairs adult neurogenesis of dopaminergic neurons [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 6617.
- [24] Chin HY, Lardelli M, Collins-Praino L, et al. Loss of park7 activity has differential effects on expression of iron responsive element (*IRE*) gene sets in the brain transcriptome in a zebrafish model of Parkinson's disease [J]. *Mol Brain*, 2021, 14(1): 83.
- [25] Flinn L, Mortiboys H, Volkmann K, et al. Complex I deficiency and dopaminergic neuronal cell loss in parkin-deficient zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Brain*, 2009, 132(6): 1613–1623.
- [26] Sheng D, Qu D, Kwok KH, et al. Deletion of the WD40 domain of LRRK2 in Zebrafish causes Parkinsonism-like loss of neurons and locomotive defect [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(4): e1000914.
- [27] Ren G, Xin S, Li S, et al. Disruption of LRRK2 does not cause specific loss of dopaminergic neurons in zebrafish [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20630.
- [28] Liu Y, Yang H. Environmental toxins and  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2005, 31(1): 273–282.
- [29] Zhao Y, Xiong S, Liu P, et al. Polymeric nanoparticles-based brain delivery with improved therapeutic efficacy of ginkgolide B in Parkinson's disease [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 10453–10467.
- [30] Chen J, Chen Y, Zheng Y, et al. Protective effects and mechanisms of procyanidins on Parkinson's disease *in vivo* and *in vitro* [J]. *Molecules*, 2021, 26(18): 5558.
- [31] Feng CW, Chen NF, Chan TF, et al. Therapeutic role of protein tyrosine phosphatase 1B in Parkinson's disease via antineuroinflammation and neuroprotection *in vitro* and *in vivo* [J]. *Park Dis*, 2020, 2020: 8814236.
- [32] Wu W, Han H, Liu J, et al. Fucoxanthin prevents 6-OHDA-induced neurotoxicity by targeting Keap1 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6688708.
- [33] lie OD, Paduraru E, Robea MA, et al. The possible role of *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on locomotor activity and oxidative stress in a rotenone-induced zebrafish model of Parkinson's disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9629102.
- [34] Joseph TP, Jagadeesan N, Sai LY, et al. Adhesion molecule L1 agonist mimetics protect against the pesticide paraquat-induced locomotor deficits and biochemical alterations in zebrafish [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 458.
- [35] Bríñez-Gallego P, da Costa Silva DG, Cordeiro MF, et al. Experimental models of chemically induced Parkinson's disease in zebrafish at the embryonic larval stage: a systematic review [J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2023, 26(4): 201–237.
- [36] Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, et al. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue [J]. *Nat Genet*, 1995, 11(2): 155–163.
- [37] Lumsden AL, Henshall TL, Dayan S, et al. Huntingtin-deficient zebrafish exhibit defects in iron utilization and development [J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(16): 1905–1920.
- [38] Diekmann H, Anichtchik O, Fleming A, et al. Decreased BDNF levels are a major contributor to the embryonic phenotype of

- huntingtin knockdown zebrafish [J]. J Neurosci, 2009, 29(5): 1343–1349.
- [39] Sidik H, Ang CJ, Pouladi MA. Huntingtin confers fitness but is not embryonically essential in zebrafish development [J]. Dev Biol, 2020, 458(1): 98–105.
- [40] Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. Nature, 1993, 362(6415): 59–62.
- [41] Soll M, Goldshtein H, Rotkopf R, et al. A synthetic SOD/catalase mimic compound for the treatment of ALS [J]. Antioxidants, 2021, 10(6): 827.
- [42] Bourefis AR, Campanari ML, Buee-Scherrer V, et al. Functional characterization of a FUS mutant zebrafish line as a novel genetic model for ALS [J]. Neurobiol Dis, 2020, 142: 104935.
- [43] Asakawa K, Handa H, Kawakami K. Optogenetic modulation of TDP-43 oligomerization accelerates ALS-related pathologies in the spinal motor neurons [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1004.
- [44] Megat S, Mora N, Sanogo J, et al. Integrative genetic analysis illuminates ALS heritability and identifies risk genes [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 342.
- [45] Fortier G, Butti Z, Patten SA. Modelling C9orf72-related amyotrophic lateral sclerosis in zebrafish [J]. Biomedicines, 2020, 8(10): 440.
- [46] Boyd PJ, Tu WY, Shorrock HK, et al. Bioenergetic status modulates motor neuron vulnerability and pathogenesis in a zebrafish model of spinal muscular atrophy [J]. PLoS Genet, 2017, 13(4): e1006744.
- [47] Koh A, Sarusie MV, Ohmer J, et al. Fluorescence correlation spectroscopy reveals survival motor neuron oligomerization but No active transport in motor axons of a zebrafish model for spinal muscular atrophy [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 639904.
- [48] Burns DT, Donkervoort S, Müller JS, et al. Variants in EXOSC9 disrupt the RNA exosome and result in cerebellar atrophy with spinal motor neuronopathy [J]. Am J Hum Genet, 2018, 102(5): 858–873.
- [49] Wood JD, Landers JA, Bingley M, et al. The microtubule-severing protein Spastin is essential for axon outgrowth in the zebrafish embryo [J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(18): 2763–2771.
- [50] Naef V, Meschini MC, Tessa A, et al. Converging role for REEP1/SPG31 in oxidative stress [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3527.
- [51] Naef V, Mero S, Fichi G, et al. *Swimming in deep water*: zebrafish modeling of complicated forms of hereditary spastic paraplegia and spastic Ataxia [J]. Front Neurosci, 2019, 13: 1311.
- [52] Zimmer TS, Korotkov A, Zwakenberg S, et al. Upregulation of the pathogenic transcription factor SPI1/PU. 1 in tuberous sclerosis complex and focal cortical dysplasia by oxidative stress [J]. Brain Pathol, 2021, 31(5): e12949.
- [53] Engerer P, Suzuki SC, Yoshimatsu T, et al. Uncoupling of neurogenesis and differentiation during retinal development [J]. EMBO J, 2017, 36(9): 1134–1146.
- [54] Cunha MI, Su M, Cantuti-Castelvetri L, et al. Pro-inflammatory activation following demyelination is required for myelin clearance and oligodendrogenesis [J]. J Exp Med, 2020, 217(5): e20191390.
- [55] onnin E, Cabochette P, Filosa A, et al. Biallelic mutations in nucleoporin NUP88 cause lethal fetal akinesia deformation sequence [J]. PLoS Genet, 2018, 14(12): e1007845.
- [56] Hsieh JY, Ulrich BN, Issa FA, et al. Infant and adult SCA13 mutations differentially affect Purkinje cell excitability, maturation, and viability *in vivo* [J]. Elife, 2020, 9: e57358.
- [57] Leyk J, Daly C, Janssen-Bienhold U, et al. HDAC6 inhibition by tubastatin A is protective against oxidative stress in a photoreceptor cell line and restores visual function in a zebrafish model of inherited blindness [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8): e3028.
- [58] Cairns G, Burté F, Price R, et al. A mutant wfs1 zebrafish model of Wolfram syndrome manifesting visual dysfunction and developmental delay [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 20491.
- [59] Mullen P, Abbott JA, Wellman T, et al. Neuropathy-associated histidyl-tRNA synthetase variants attenuate protein synthesis *in vitro* and disrupt axon outgrowth in developing zebrafish [J]. FEBS J, 2021, 288(1): 142–159.
- [60] Luo Q, Liu S, Xie L, et al. Resveratrol ameliorates glucocorticoid-induced bone damage in a zebrafish model [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 195.
- [61] Zang L, Shimada Y, Nakayama H, et al. RNA-seq based transcriptome analysis of the anti-obesity effect of green tea extract using zebrafish obesity models [J]. Molecules, 2019, 24(18): 3256.

[收稿日期] 2023-03-27

吴志豪,杨露银,任维,等. 小鼠支气管肺泡灌洗术研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1368-1373.  
Wu ZH, Yang LY, Ren W, et al. Research progress of bronchoalveolar lavage in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1368-1373.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.015

# 小鼠支气管肺泡灌洗术研究进展

吴志豪<sup>1</sup>, 杨露银<sup>2</sup>, 任维<sup>2</sup>, 周雅楠<sup>2</sup>, 王红<sup>2</sup>, 雷云<sup>2</sup>, 于红<sup>1\*</sup>, 杨思进<sup>2\*</sup>

(1. 西南医科大学基础医学院, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学附属中医医院, 四川 泸州 646000)

**【摘要】** 支气管肺泡灌洗术是研究呼吸系统疾病的一项重要技术,已经在疾病研究中得到广泛运用。目前,临床患者的支气管肺泡灌洗操作流程已经逐步规范化,而小鼠作为研究肺部疾病重要的模型动物之一,尚缺乏针对小鼠的支气管肺泡灌洗液标准采集和检测流程,不规范的流程会导致该技术在研究中的推广和应用受阻,同时也会影响实验结果的准确性和可靠性。本文对国内外研究中小鼠支气管肺泡灌洗方法进行了系统总结,以期今后运用并建立规范的灌洗流程提供参考和指导。

**【关键词】** 支气管肺泡灌洗术;肺部疾病;小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1368-06

## Research progress of bronchoalveolar lavage in mice

WU Zhihao<sup>1</sup>, YANG Luyin<sup>2</sup>, REN Wei<sup>2</sup>, ZHOU Yanan<sup>2</sup>, WANG Hong<sup>2</sup>,  
LEI Yun<sup>2</sup>, YU Hong<sup>1\*</sup>, YANG Sijin<sup>2\*</sup>

(1. School of Basic Medical Science, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.

2. the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

Corresponding author: YANG Sijin. E-mail: ysjimn@sina.com; YU Hong. E-mail: hongyu@swmu.edu.cn

**【Abstract】** Bronchoalveolar lavage is an important technique to study respiratory diseases and has been widely used in disease research. Currently, the procedure of bronchoalveolar lavage in patients has been gradually standardized. However, in mice, as an important model animal for studying lung diseases, standard collection and testing procedures for bronchoalveolar lavage fluid are needed. An unstandardized procedure can hinder the promotion and application of this technique in research and affects the accuracy and reliability of experimental result. This review presents a systematic summary of domestic and international studies of bronchoalveolar lavage method for mice to provide a reference and guidance for researchers applying and establishing a standardized lavage procedure.

**【Keywords】** bronchoalveolar lavage; lung disease; mice

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

支气管肺泡灌洗术 (bronchoalveolar lavage, BAL) 在呼吸系统疾病中发挥着重要作用。医务人员可以借助这项技术了解患者肺部的炎症水平、细胞类型等信息,以便更准确地对呼吸系统疾病进行诊断和治疗<sup>[1]</sup>。同时,这项技术也可以用于评估药

物的疗效<sup>[2]</sup>、探索疾病的发病机制等<sup>[3]</sup>,为呼吸系统疾病的治疗提供更好地指导。目前,已有多项指南提出了临床患者支气管肺泡灌洗标准操作方法<sup>[4-5]</sup>,还包括支气管肺泡灌洗液的规范化检测流程等,这为临床操作提供了有益指导。

**【基金项目】** 四川省中医药管理局项目 (2021XYCZ006), 西南医科大学校级科研项目 (2023XGZX008)。

Funded by Project of Sichuan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (2021XYCZ006), School-Level Scientific Research Project of Southwest Medical University (2023XGZX008)。

**【作者简介】** 吴志豪 (1994—), 男, 硕士, 研究方向: 免疫学。Email: wzhykcg@163.com

**【通信作者】** 杨思进 (1962—), 男, 博士, 主任中医师, 研究方向: 中西医结合防治心脑血管系疾病的基础与临床。Email: ysjimn@sina.com; 于红, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 肿瘤的免疫治疗、抗病原真菌药物的免疫机制。Email: hongyu@swmu.edu.cn。

\* 共同通信作者



小鼠作为肺部疾病研究常用的模型动物,被广泛运用于肺部感染<sup>[6]</sup>、肺纤维化<sup>[7]</sup>、哮喘<sup>[8]</sup>等疾病的研究中。由于缺乏统一的小鼠支气管肺泡灌洗标准流程,研究者在实验小鼠支气管肺泡灌洗液的取样和检测方法上存在较大差别,不同的取样和 处理方法可能会对后续的检测 结果产生影响,这不仅限制了支气管肺泡灌洗术在领域内的推广和应用,还可能导致实验结果间缺乏可比性及可重复性。因此,建立一套规范并易于推广的支气管肺泡灌洗流程就显得尤为重要。本文系统地总结了国内外研究中小鼠支气管肺泡灌洗的操作方法,以期能为研究者运用并建立规范的小鼠支气管肺泡灌洗流程提供参考和指导。

1 麻醉

为了获得一份高质量的小鼠支气管肺泡灌洗液,研究者通常需要对实验小鼠进行适当的麻醉。常用的全身性麻醉药物从给药途径上大致分为两类:注射类麻醉药和吸入性麻醉药。注射类麻醉药物主要包括戊巴比妥钠、三溴乙醇、氯胺酮及甲苯噻嗪等,而吸入性麻醉药主要包括异氟烷、七氟烷等<sup>[9]</sup>。小鼠常用的麻醉剂及其剂量、特点等相关信息汇总见表 1。

由于支气管肺泡灌洗会对小鼠造成较大的损伤,并且为了确保插管被正确放置在气管内,多数研究者选择将实验小鼠安乐死后再进行解剖和灌洗。戊巴比妥钠是最常见的安乐死制剂。在使用戊巴比妥钠对小鼠进行安乐死时,联合使用局部麻醉药和抗惊厥药以帮助动物缓解疼痛是有必要的。同时,为了确保小鼠气管及肺部的完整并顺利完成后续的灌洗操作,一般不采用颈椎脱臼法和断头法处理小鼠。

对非临终小鼠进行支气管肺泡灌洗存在以下困难和挑战:(1)尽管灌洗方法在不断改进,但灌洗液总会残留一部分在肺内,导致小鼠出现急性肺损伤等并发症<sup>[11]</sup>;(2)研究者需要谨慎选择麻醉药物,应尽可能选择对小鼠呼吸、循环系统影响较小的药物,此外,对实验小鼠进行多次支气管肺泡灌洗时,研究者还应当注意麻醉剂可能会影响肺泡灌洗液中细胞总数或总蛋白水平<sup>[11]</sup>;(3)在手术操作和术后恢复过程中,研究者都需要注意对小鼠进行保温及生命体征监测,以确保其存活。

2 灌洗方式

小鼠支气管肺泡灌洗常用的操作方式包括在体灌洗和离体灌洗。离体灌洗是将动物支气管及

表 1 小鼠常用麻醉剂汇总

| Table 1 Common anesthetics for mice |                      |                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
|-------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 麻醉途径                                | 名称                   | 常用剂量                                                                                              | 特点                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 参考文献      |
| Types of anesthesia                 | Name                 | Usual dose                                                                                        | Characteristic                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Reference |
| 注射麻醉                                | 氯胺酮、甲苯噻嗪             | 氯胺酮 80 ~ 100 mg/kg、<br>甲苯噻嗪 5 ~ 10 mg/kg                                                          | 常用的注射麻醉组合,可实现有效镇痛等作用。对小鼠肺泡灌洗液中总细胞或总蛋白水平影响较小。<br>Ketamine/xylazine is a commonly used injectable anesthetic drug combination that can achieve an effective analgesia effect. It has little effect on total cell or total protein levels in the bronchoalveolar lavage fluid of mice.<br><br>麻醉起效快且维持时间较长。但可能引起动物的血压下降及呼吸抑制。<br>Although sodium pentobarbital has the advantages such as rapid onset and a long duration of anesthesia maintenance, it may cause a drop in blood pressure and respiratory depression in animals.<br><br>麻醉时间短、起效快。对动物的呼吸和心脏功能均有抑制作用且容易引起注射部位的炎症。<br>Tribromoethanol has a short anesthesia time and rapid onset of action, but it has inhibitory effects on respiration and cardiac function and is prone to cause inflammation at the injection site. | [9-10]    |
| Injectable anesthesia               | Ketamine, xylazine   | Ketamine 80 ~ 100 mg/kg,<br>Xylazine 5 ~ 10 mg/kg                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
| 注射麻醉                                | 戊巴比妥钠                | 30 ~ 50 mg/kg                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
| Injectable anesthesia               | Pentobarbital sodium |                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | [9]       |
| 注射麻醉                                | 三溴乙醇                 | 240 mg/kg                                                                                         | 可以快速诱导和恢复,并且能精确控制和调整麻醉水平。可能导致小鼠肺泡灌洗液中总细胞计数升高。<br>Isoflurane can induce anesthesia quickly and the recovery is rapid, and can also precisely control and adjust the level of anesthesia. It may cause elevated total cell counts in alveolar lavage fluid in mice.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | [9-10]    |
| Injectable anesthesia               | Tribromoethanol      |                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
| 吸入麻醉                                | 异氟烷                  | 诱导麻醉使用 2% ~ 3% 浓度,维持使用 1.5% ~ 2% 浓度<br>Induce anesthesia: 2% ~ 3%, Maintain anesthesia: 1.5% ~ 2% |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
| Inhalant anesthesia                 | Isoflurane           |                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |

肺部完整解剖分离后在体外进行灌洗,其优点是灌洗回收率相对较高,但可能会对灌洗液中的细胞活性产生影响。此外,离体灌洗的解剖过程耗时较长,要求研究者具有丰富的解剖经验,在过程中还需要注意避免手术器械刺伤肺叶等情况。

在体灌洗是多数研究者选用的灌洗方式,根据操作方式不同又可进一步分为气管切开灌洗和气管插管灌洗。气管切开灌洗是目前的主流灌洗方式<sup>[12-13]</sup>,主要包括麻醉小鼠、暴露小鼠气管并半剪开、导管插入气管后尼龙绳固定、灌洗等步骤。Luckow 等<sup>[14]</sup>提出,气管切开灌洗操作步骤复杂、耗时较长,操作者在实验前需要经过大量培训;而经口气管插管只需要使用导管从口咽插入气管即可开始灌洗,相对气管切开更为简便、花费时间较短,并且经口气管插管获得的灌洗液中细胞数量更多。值得注意的是,经口气管插管虽然较气管切开相对简便,但经口气管插管仍需要暴露小鼠肺部及气管,以确保插管正确进入并保持在合适的位置,并且小鼠气管插管存在一定难度,反复插管失败可能会导致小鼠咽喉部出现伤口,血液混入灌洗液中造成污染。在体灌洗的两种方法都有各自的优缺点,研究者可以结合自身操作经验并进行预实验以确定操作方式。最后,不论选择哪种方法,研究者都应仔细操作,避免破坏小鼠气管及肺部的完整性,导致灌洗液漏出或污染。

### 3 灌洗装置

目前,商业化的小鼠支气管肺泡灌洗装置尚未普及,研究者在进行实验时往往需要自行组装实验所需的操作设备,这些设备虽然更贴合实验者的个人习惯,但存在一定的缺陷。研究者组装所用的部分装置或工具,可能在其他国家或地区难以购买到,这会导致部分经过改良的灌洗装置难以在其他国家或地区推广和应用。因此,实验者在组装和改进灌洗装置时,应考虑到设备在其他国家或地区是否可获得并且易于组装。

灌洗设备主要依据实验者采用气管切开还是气管插管灌洗而组装,下面将分别论述不同灌洗方式所采用的基本装置组成。

气管切开灌洗:气管切开灌洗所用装置主要包括注液部分(注射器)、插管部分(针头和套管)、固定部分(尼龙绳)。注液部分由注射器构成,小鼠肺泡灌洗通常选择 1mL 注射器。插管部分由针头和

套管组成,套管较柔软,单独使用不能很好地进入小鼠气管;注射器针头尖锐,单独使用可能会损伤气管,并且也不能很好地堵塞气管。因此需要在注射器针头上套入一段硅胶软管,这样既可以避免针头戳伤气管,也能起到防止灌洗液漏出的作用。这种方法的弊端是套入的硅胶软管需要研究者自行裁剪,而且软管口径与针头口径存在差别,可能导致针头与软管之间难以固定。张效云等<sup>[15]</sup>将静脉滞留针用于气管灌洗,成功回收 89% 以上的肺泡灌洗液。此外,Sun 等<sup>[13]</sup>成功使用 22G 静脉穿刺针用于支气管肺泡灌洗。静脉留置针在临床中广泛使用,商业化产品丰富,可选用 22G 或 24G 型号的留置针进行支气管肺泡灌洗。静脉留置针与穿刺针都是使用具有一定硬度的针芯引导软管进入气管,可酌情选用。

气管插管灌洗:气管插管灌洗所用装置主要包括注液部分(注射器)、插管部分(插管针)。注液部分同样选用 1 mL 注射器,而插管针则可使用小鼠直头灌胃针或直型橄榄尖插管<sup>[14]</sup>。气管插管法虽然没有使用尼龙绳固定,但插管的钝端可堵住小鼠声门部,防止灌洗液倒流。

气管切开法适用于对临终小鼠进行支气管肺泡灌洗,而气管插管灌洗虽然也需要暴露气管部分,但完整地保留了小鼠气管,因此更适合于非临终小鼠的支气管肺泡灌洗。

### 4 灌洗液

一份高质量的灌洗液可以提高后续结果的准确性及可靠性,而灌洗液的种类、保存方法和处理方式等条件则是影响灌洗液质量的重要因素。

灌洗液通常为中性、等渗的液体,常用的灌洗液包括生理盐水、磷酸盐缓冲液(PBS)以及平衡盐溶液,其中生理盐水和磷酸盐缓冲液因为其生理特性更受国内外研究者喜爱<sup>[16-17]</sup>。对于灌洗液的温度设置,研究者们通常将灌洗液预冷后使用<sup>[18]</sup>,但并没有解释其原因。一般而言,以细胞收集、培养为目的的研究,可以将灌洗液保持在 37℃ 左右,这样做可能减少灌洗过程中对组织和细胞的刺激,如小鼠肺泡巨噬细胞的分离和培养,研究者多选择将灌洗液加热后使用<sup>[19-20]</sup>。另外值得参考的是,37℃ 预热的生理盐水在临床支气管肺泡灌洗中更为常用<sup>[5]</sup>;如果研究目的是对灌洗液中的细胞进行计数、分类以及检测上清中炎症因子,那么将灌洗液

预冷并将其低温保存则是更好的选择。因此,灌洗液的选择及温度控制需要依据实验目的进行选取和设定。相比于不含添加剂的生理盐水或者 PBS,复合型灌洗液通常具有提高酶和细胞活力等优势。常用的添加剂包括胎牛血清(FBS)<sup>[21]</sup>、乙二胺四乙酸(EDTA)<sup>[19]</sup>等,胎牛血清可以提高灌洗液中细胞的活性,而 EDTA 可以螯合钙、镁等金属离子,加速细胞的脱离,便于灌洗时尽可能多地采集到肺内的细胞。研究表明,复合 PBS 灌洗液(37℃,2 mmol/L EDTA 和 0.5% FBS)在灌洗中能收获更多数量的细胞<sup>[19]</sup>。此外,如果灌洗液中含有较多红细胞,可以加入红细胞裂解液以降低红细胞对后续结果的影响。总的来说,根据实验目的来选择合适的添加剂将有助于获得更高质量的灌洗液,提高检测结果的准确性。

对于灌洗液的保存装置,大多数研究者选择将灌洗液收集后置于塑料离心管中,并没有特别强调离心管的种类。一般而言,用于生化检测和细胞因子分析的液体可以保存在普通离心管中,而用于病原学分析则应使用无菌容器收集<sup>[22]</sup>,尤其在细胞分析时最好选用硅化玻璃容器或者无细胞粘附的塑料容器<sup>[10]</sup>,尽可能地减少细胞损失。

在获得肺泡灌洗液后,研究者需要及时对灌洗液进行处理,可以将灌洗液试管置于冰上或冷藏,

将灌洗液离心后分为细胞成分及上清液分别保存,以供后续检测。细胞成分可以通过总细胞或白细胞计数进行分析。不同方式获得的灌洗液中,其细胞总数可能存在差异,但不同细胞群的比例是相对固定的。传统的细胞计数法主要通过将细胞重悬后制成细胞涂片,利用瑞氏染液进行染色,再由研究者在显微镜下进行计数并进一步判断出中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞等细胞类型。这种方法目前正受到许多研究者的质疑,因为细胞的计数和分类可能因为人为错误而影响结果的准确性。相比而言,基于流式细胞术的细胞计数和分类法正成为一种更快速、更准确的检测方法。

上清液常用于生化及细胞因子检测,检测方法主要包括 ELISA、活性氧检测等。此外,基于流式的多因子检测法因为其高效、快速、所需样本量少等优点,正受到越来越多的研究者的关注。检测细胞因子时需要注意,多次的洗涤会稀释细胞因子的浓度,因此检测第一次灌洗所得灌洗液会更加合适。

若不能及时对灌洗液进行检测,则应将灌洗液进行保存,通常来说,细胞在灌洗液(4℃)中的保存时间应尽可能短,而上清液则可保存在-80℃条件中直至检测。

表 2 汇总了国内外部分研究中灌洗液的种类、处理方法等参数信息,可以看到,不同的研究之间

表 2 支气管肺泡灌洗参数汇总

Table 2 Summary of bronchoalveolar lavage parameters

| 小鼠<br>Mouse | 灌洗液<br>Lavage fluid                                                         | 灌洗部位<br>Lavage sites | 灌洗次数<br>Frequency | 离心参数<br>Centrifugation parameters | 参考文献<br>References |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------|
| C57BL/6     | PBS(预冷,0.4 mL)<br>PBS (pre-cooled, 0.4 mL)                                  | 左肺<br>Left lung      | 3                 | 4℃,350 g,5 min                    | [17]               |
| Balb/c      | 生理盐水(常温,0.8 mL)<br>Saline (normal temperature, 0.8 mL)                      | 左肺<br>Left lung      | 3                 | 4℃,1200 r/min,10 min              | [23]               |
| Balb/c      | 生理盐水(预冷,1.0 mL)<br>Saline (pre-cooled, 1.0 mL)                              | 右肺<br>Right lung     | 3                 | 4℃,1500 g,10 min                  | [24]               |
| C57BL/6     | PBS(0.4 mmol/L EDTA,预冷,0.5 mL)<br>PBS (0.4 mmol/L EDTA, pre-cooled, 0.5 mL) | 双肺<br>Whole lung     | 5                 | 4℃,200 g,5 min                    | [25]               |
| Balb/c      | PBS(预冷,0.5 mL)<br>PBS (pre-cooled, 0.5 mL)                                  | 左肺<br>Left lung      | 3                 | 4℃,1000 g,15 min                  | [26]               |
| Balb/c      | 生理盐水(预冷,0.8 mL)<br>Saline (pre-cooled, 0.8 mL)                              | 左肺<br>Left lung      | 5                 | 3000 r/min,10 min                 | [27]               |
| C57BL/6N    | PBS(预冷,0.5 mL)<br>PBS (pre-cooled, 0.5 mL)                                  | 双肺<br>Whole lung     | 3                 | 4℃,200 g,10 min                   | [28]               |
| Balb/c      | PBS(预冷,1.5 mL)<br>PBS (pre-cooled, 1.5 mL)                                  | 双肺<br>Whole lung     | 3                 | 4℃,1200 r/min,5 min               | [29]               |
| Balb/c      | PBS(常温,0.4 mL)<br>PBS (normal temperature, 0.4 mL)                          | 左肺<br>Left lung      | 3                 | 4℃,2500 r/min,5 min               | [30]               |
| Balb/c      | PBS(预冷,0.5 mL)<br>PBS (pre-cooled, 0.5 mL)                                  | 双肺<br>Whole lung     | 6                 | 4℃,2500 r/min,5 min               | [31]               |



灌洗液的处理条件存在较大差异,未来还需要更多的研究探讨不同的灌洗液处理条件对后续结果的影响,并且研究者也需要在文献中更加详细地描述灌洗液的参数,便于其他研究者参考和借鉴。

## 5 灌洗部位

由于小鼠支气管口径较小,难以使用支气管镜进行操作,通常采取全肺灌洗或灌洗单侧肺部以获得灌洗液。研究者若期望获得更多的灌洗标本,则需要采用全肺灌洗的方法进行操作,但这种方法的弊端是在一定程度上降低了动物组织标本的利用率,可能会导致实验动物数量增加,违反了实验动物减量化、再利用和再循环的原则<sup>[32]</sup>。同时还应该注意到,灌洗的过程对肺组织有一定的损伤,一些细胞或者分泌物可能被冲刷掉,虽然有部分研究者选择将灌洗后的肺叶用于组织学检查<sup>[28]</sup>,但夹闭小鼠单侧肺叶再进行灌洗,将未灌洗的肺叶用于组织学检查可能是更好的选择<sup>[26-27]</sup>,研究者应结合疾病模型特点等,选择病变显著侧肺叶进行灌洗。

## 6 灌洗量及速度

过量的灌洗液会导致小鼠肺内压力升高,可能会出现灌洗液从肺组织包膜渗入胸腔等情况,严重影响灌洗液回收。常用的单次小鼠支气管肺泡灌洗液量通常为 0.2 ~ 1.0 mL。研究表明,灌洗液产生的拉伸力和剪切力可能会对细胞造成一定的影响<sup>[33]</sup>,相比于 1 mL 灌洗液,0.5 mL 及 0.75 mL 的灌洗液收集到的细胞活性更高。

而对于灌洗液的推注速度,目前尚缺乏研究探讨这一参数对结果的影响。大部分研究者采用的是手工推注灌洗液而并非使用可调节流量速度的微量注射泵,因此难以对该参数进行量化和比较。较为公认的是,研究者在灌洗时应略缓慢地将灌洗液注入肺部,并仔细观察肺部膨胀程度,避免液体渗漏<sup>[10]</sup>。

## 7 回收率

灌洗液的回抽依赖于肺部的弹性。相比于急性肺损伤而言,一些疾病如肺气肿等会严重影响小鼠的肺部弹性,最终影响灌洗液的回收率。虽然灌洗液的回收率似乎可以作为评估实验操作成功与否的重要指标,但由于不同的实验者间灌洗的操作方法并不统一,而且动物疾病模型也不同,所以很

难对回收率进行比较。因此,是否可以将灌洗液的回收率作为小鼠支气管肺泡灌洗术成功的标准之一,还需要更进一步的讨论。

## 8 总结与结论

近年来,随着新型冠状病毒感染的流行,急性肺损伤、肺纤维化等疾病受到了越来越多研究者的关注。支气管肺泡灌洗作为呼吸疾病研究中的重要检测手段之一,目前仍存在许多亟待解决的问题,如灌洗液采集和检测流程的不统一,这些都可能限制该技术的传播和推广,同时也可能导致部分实验结果难以被复现,影响实验的可靠性。因此,推进小鼠支气管肺泡灌洗术标准化流程的建立便显得十分必要。

### 参 考 文 献 (References)

- [1] Garvin MR, Alvarez C, Miller JJ, et al. A mechanistic model and therapeutic interventions for COVID-19 involving a RAS-mediated bradykinin storm [J]. *Elife*, 2020, 9: e59177.
- [2] Hirano A, Kanehiro A, Ono K, et al. Pirfenidone modulates airway responsiveness, inflammation, and remodeling after repeated challenge [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 35 (3): 366-377.
- [3] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10224): 565-574.
- [4] Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185 (9): 1004-1014.
- [5] 王娟, 孙军, 高长龙, 等. 纤维支气管镜肺泡灌洗术治疗儿童难治性支原体肺炎疗效分析 [J]. *临床儿科杂志*, 2017, 35 (1): 16-18.  
Wang J, Sun J, Gao CL, et al. The effect of fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in the treatment of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children [J]. *J Clin Pediatr*, 2017, 35 (1): 16-18.
- [6] Lee JS, Lee YN, Lee YT, et al. Ginseng protects against respiratory syncytial virus by modulating multiple immune cells and inhibiting viral replication [J]. *Nutrients*, 2015, 7 (2): 1021-1036.
- [7] Deng J, He Y, Sun G, et al. Tanreqing injection protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibiting STING-mediated endoplasmic reticulum stress signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 305: 116071.
- [8] Ting NC, Huang WC, Chen LC, et al. *Descurainia sophia* ameliorates eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by reducing Th2 cytokine production in asthmatic mice [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47 (7): 1507-1522.
- [9] 卢晓, 于灵芝, 周聪颖, 等. 常用实验动物全身性麻醉药物

- 的使用 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(1): 18–25.
- Lu X, Yu LZ, Zhou CY, et al. General anesthetics commonly used for laboratory animals [J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(1): 18–25.
- [10] Tighe RM, Birukova A, Yaeger MJ, et al. Euthanasia- and lavage-mediated effects on bronchoalveolar measures of lung injury and inflammation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018, 59(2): 257–266.
- [11] Poitout-Belissent F, Grant SN, Tepper JS. Aspiration and inspiration: using bronchoalveolar lavage for toxicity assessment [J]. Toxicol Pathol, 2021, 49(2): 386–396.
- [12] Daubeuf F, Frossard N. Performing bronchoalveolar lavage in the mouse [J]. Curr Protoc Mouse Biol, 2012, 2(2): 167–175.
- [13] Sun F, Xiao G, Qu Z. Murine bronchoalveolar lavage [J]. Bio Protoc, 2017, 7(10): e2287.
- [14] Luckow B, Lehmann MH. A simplified method for bronchoalveolar lavage in mice by orotracheal intubation avoiding tracheotomy [J]. Biotechniques, 2021, 71(4): 534–537.
- [15] 张效云, 蔡晓峰, 王文栋. 制备小鼠支气管肺泡灌洗液方法的改进 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(1): 109–110.
- Zhang XY, Nian XF, Wang WD. Improvement of the method for preparing mouse bronchoalveolar lavage fluid [J]. Chin J Clin Exp Pathol, 2017, 33(1): 109–110.
- [16] 高琴琴, 丁子桐, 李友林, 等. 不同剂量卵蛋白诱发 BALB/c 小鼠支气管哮喘模型的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 52–57.
- Gao QQ, Ding ZT, Li YL, et al. Comparison of asthma models induced by different doses of ovalbumin in BALB/c mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 52–57.
- [17] Wang Y, Wang X, Li Y, et al. Xuanfei Baidu Decoction reduces acute lung injury by regulating infiltration of neutrophils and macrophages via PD-1/IL17A pathway [J]. Pharmacol Res, 2022, 176: 106083.
- [18] Shin JH, Han SG, Kim JK, et al. 5-Day repeated inhalation and 28-day post-exposure study of graphene [J]. Nanotoxicology, 2015, 9(8): 1023–1031.
- [19] Busch CJ, Favret J, Geirsdóttir L, et al. Isolation and long-term cultivation of mouse alveolar macrophages [J]. Bio Protoc, 2019, 9(14): e3302.
- [20] 雷文知, 桑军军, 潘炜华, 等. 新生隐球菌感染小鼠肺泡巨噬细胞相关细胞因子与疾病病程相关性研究 [J]. 中国真菌学杂志, 2014, 9(2): 65–69.
- Lei WZ, Sang JJ, Pan WH, et al. Correlation study on macrophage-derived cytokines and disease course in *Cryptococcus neoformans* infection mouse model [J]. Chin J Mycol, 2014, 9(2): 65–69.
- [21] Conde E, Bertrand R, Balbino B, et al. Dual vaccination against IL-4 and IL-13 protects against chronic allergic asthma in mice [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2574.
- [22] 周道银, 吴茅, 许绍强, 等. 支气管肺泡灌洗液细胞形态学检验中国专家共识(2020) [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(6): 4–8.
- Zhou DY, Wu M, Xu SQ, et al. Consensus of Chinese experts on morphological examination of bronchoalveolar lavage fluid cells (2020) [J]. J Mod Lab Med, 2020, 35(6): 4–8.
- [23] Peng XP, Li XH, Li Y, et al. The protective effect of oleanolic acid on NMDA-induced MLE-12 cells apoptosis and lung injury in mice by activating SIRT1 and reducing NF- $\kappa$ B acetylation [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 70: 520–529.
- [24] Fang Y, Gao F, Liu Z. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates inflammatory response and oxidative stress in hyperoxic lung injury by regulating NF- $\kappa$ B and Nrf2 pathways [J]. QJM, 2019, 112(12): 914–924.
- [25] Mo Y, Jiang M, Zhang Y, et al. Comparative mouse lung injury by nickel nanoparticles with differential surface modification [J]. J Nanobiotechnology, 2019, 17(1): 2.
- [26] Wu X, Kong Q, Zhan L, et al. TIPE2 ameliorates lipopolysaccharide-induced apoptosis and inflammation in acute lung injury [J]. Inflamm Res, 2019, 68(11): 981–992.
- [27] Wang Z, Yao N, Fu X, et al. Butylphthalide ameliorates airway inflammation and mucus hypersecretion via NF- $\kappa$ B in a murine asthma model [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 76: 105873.
- [28] Shin IS, Shin NR, Park JW, et al. Melatonin attenuates neutrophil inflammation and mucus secretion in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary diseases via the suppression of Erk-Sp1 signaling [J]. J Pineal Res, 2015, 58(1): 50–60.
- [29] 周朦静, 陈兰英, 胡宏辉, 等. 白头翁皂苷 B4 对脂多糖诱导的急性肺损伤的保护作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(6): 664–670.
- Zhou MJ, Chen LY, Hu HH, et al. Protective effect of *Pulsatilla* saponin B4 on lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2019, 30(6): 664–670.
- [30] 开沙尔江·麦麦提吐逊, 陈春丽, 娜迪热木·肖克拉提, 等. 阿里红调控 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路对过敏性哮喘小鼠的影响及作用机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(14): 1554–1559.
- Kaishaerjiang MMTS, Chen CL, Nadiremu XKLT, et al. Effect of *Fomes officinalis* on regulating MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway on allergic asthma in mice and its mechanism [J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(14): 1554–1559.
- [31] 陈思思, 于光远. 齐留通干预 ALOX5 对 RSV 感染后小鼠气道炎症与 AHR 的影响 [J]. 免疫学杂志, 2023, 39(4): 305–311.
- Chen SS, Yu GY. Zileuton alleviates the airway inflammation and AHR in RSV-infected mouse by interfering ALOX5 [J]. Immunol J, 2023, 39(4): 305–311.
- [32] Diaz L, Zambrano E, Flores ME, et al. Ethical considerations in animal research: the principle of 3R's [J]. Rev Invest Clin, 2020, 73(4): 199–209.
- [33] Sasaki E, Momose H, Furuhashi K, et al. Impact of injection buffer volume to perform bronchoalveolar lavage fluid collection for isolating alveolar macrophages to investigate fine particle-induced IL-1 $\alpha$  secretion [J]. J Immunotoxicol, 2021, 18(1): 163–172.

资峻,宁丽,周小青,等. 评价白蛋白相关药物动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1374-1380.  
Zi Y, Ning L, Zhou XQ, et al. Advances in animal models for albumin-related drug studies [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1374-1380.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.016

# 评价白蛋白相关药物动物模型的研究进展

资峻,宁丽,周小青,唐成程\*

(广东省医学大动物模型重点实验室,华南生物医药大动物模型研究院,  
生物科技与大健康学院,五邑大学,广东 江门 529000)

【摘要】许多肽或蛋白质药物治疗的一个主要挑战是血浆半衰期短。通过将该类药物与白蛋白结合获得的药物称为白蛋白相关药物,有效延长血浆半衰期。动物模型作为研究药物药代动力学的重要工具是药物研究中不可或缺的一部分。本综述概括了两大类动物模型:啮齿类(野生型小鼠、大鼠模型,基因修饰小鼠模型)与非啮齿(猴)在白蛋白相关药物药代动力学研究中的应用与发展,为其进一步研究发展提供参考。

【关键词】白蛋白相关药物;血浆半衰期;动物模型

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847(2023)10-1374-07

## Advances in animal models for albumin-related drug studies

ZI Yin, NING Li, ZHOU Xiaoqing, TANG Chengcheng\*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Large Animal Models for Biomedicine, South China Institute of Large Animal Models for Biomedicine, School of Biotechnology and Health Science, Wuyi University, Jiangmen 529000, China)

Corresponding author: TANG Chengcheng. E-mail: wyuchemtcc@126.com

【Abstract】The main challenge of therapeutic peptides and proteins is their short plasma half-life due to rapid protease degradation. Drugs combining such peptides and proteins with albumin are defined as albumin-related drugs. Such a combination effectively prolongs their plasma half-life. Animal models are an important and indispensable tool to study drug pharmacokinetics. This review summarizes the two main animal models, rodents (wildtype mice, gene-modified mouse models, and rat models) and non-human primates (monkeys), and their development and application in albumin-related drugs. This review provides a reference for further studies on albumin-related drugs.

【Keywords】albumin-related drugs; plasma half-life; animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是血浆中含量最丰富的蛋白质,占血浆蛋白总量的40%,与脂肪酸、激素和化学药物在内的多种物质进行可逆结合,调节这些物质在体内的运输,因此也是一种天然的运输载体<sup>[1]</sup>。白蛋白体内半衰期为19 d<sup>[2-4]</sup>,远高于除免疫球蛋白 G (immunoglobulin

G, IgG)以外的其他血浆蛋白, FcRn 受体(neonatal Fc receptor, FcRn)是白蛋白半衰期的主要调节因子<sup>[5-8]</sup>。FcRn 受体最初发现于肠道,功能主要为新生幼体提供被动免疫。随后发现 FcRn 是血液中 IgG 和白蛋白的特异性受体,几乎表达在所有细胞表面<sup>[9-11]</sup>。FcRn 与白蛋白的结合具有 pH 依赖性,

【基金项目】广东省自然科学基金(2019A1515110283),江门市科技计划项目(2021030101230004833,2021030101220004887)。

Funded by Natural Science Foundation of Guangdong Province of China (2019A1515110283), Science and Technology Planing Project of Jiangmen (2021030101230004833, 2021030101220004887).

【作者简介】资峻(1998—),男,硕士,研究方向:基因编辑和大动物模型。Email:15271856007@139.com

【通信作者】唐成程,女,博士,硕士生导师,研究方向:基因编辑与大动物模型。Email:wyuchemtcc@126.com



弱酸性环境下结合,中性或碱性条件下解离<sup>[12-13]</sup>。血管内皮细胞是 FcRn 介导白蛋白再循环的主要场所,包含白蛋白的细胞外液被血管内皮细胞非特异性胞饮后,白蛋白与含有 FcRn 的酸化内体结合形成复合物,随后该复合物被转运至细胞膜表面,暴露于血液中,由于血液中 pH 值为微碱性,复合物解离,白蛋白再次被释放至血液循环。而在酸化内体中未能与 FcRn 相结合的蛋白则会被运送至溶酶体中降解<sup>[7]</sup>。

由于在血浆中含量丰富、结合位点多、半衰期长、不会产生免疫原性等诸多优势使得白蛋白被广泛应用于药物载体研究,以延长药物的半衰期,改善药物的药代动力学特征<sup>[14-15]</sup>。目前基于白蛋白的药物研发主要有两种:(1)重组白蛋白药物:重组白蛋白药物又包括两类,一类是通过共价键作用针对白蛋白的氨基酸进行修饰,如目前正处于三期临床实验用于治疗癌症和关节炎疾病的人血清白蛋白偶联甲氨蝶呤(methotrexate-human serum albumin, MTX-HSA)<sup>[16]</sup>;另一类是通过基因融合技术<sup>[17]</sup>将治疗性多肽或者蛋白与白蛋白融合,这些治疗性多肽或者蛋白包括凝血因子<sup>[18]</sup>、干扰素<sup>[19]</sup>等。(2)白蛋白结合药物,即将药物进行脂肪酸化或亲白蛋白有机小分子修饰后,药物通过脂肪酸或有机小分子与内源性白蛋白结合位点结合,如已经上市的用于治疗糖尿病的药物 Levemir<sup>[20]</sup> 和 Victoza<sup>[21-22]</sup>,用于治疗癌症的 Abraxane<sup>[23]</sup>等。

建立用于评价白蛋白相关药物的动物模型是白蛋白相关药物开发与研究中的重要环节。随着对白蛋白认识的深入、实验动物学的不断发展以及基因编辑等技术的高速进步,用于评价白蛋白相关药物动物模型种类也更加全面。本综述概括了用于评价白蛋白相关药物药代动力学的啮齿类与非啮齿类动物模型,为白蛋白相关药物进一步研究发展提供一定参考。

## 1 白蛋白相关药物啮齿类动物模型

啮齿类动物模型因其操作简便、获得容易、繁殖周期短,具有经济、可重复性高等优势,被广泛应用于药物临床前药效评价。目前,白蛋白相关药物啮齿类动物模型主要包括野生型鼠模型和基因修饰小鼠模型两大类。

### 1.1 野生型小鼠模型

野生型(wild type, WT)小鼠(表 1)具有遗传背

景明确、品系多、价格便宜等优势,此外,鼠与人类有大约 90% 的相似基因,许多生理通路在临床上是相关的<sup>[24]</sup>,成为早期白蛋白相关药物药代动力学研究的一线模型<sup>[25]</sup>。例如,研究人员通过将锚蛋白重复结构域(designed ankryrin repeat proteins, DARPins)<sup>[26-29]</sup>与鼠白蛋白(mouse serum albumin, MSA)共价结合后注入到野生型小鼠中,使其血浆半衰期从原来的几分钟延长到 50 h 左右,而在进一步将与白蛋白结合的 DARPins 结构域与其他 DARPins 结构域结合时,白蛋白相关药物在小鼠的半衰期进一步提高了 48%<sup>[30-31]</sup>。除此之外,在 WT 小鼠中检测白蛋白结合多肽融合到其他蛋白质结构域的体内代谢,如将链球菌蛋白 G 结构域(albumin-binding domain, ABD)与 Herceptin 的 Fab(fragment of antigen binding, Fab)片段、二抗或者小螺旋蛋白结合,在小鼠体内检测发现血浆半衰期分别从 2.1 h 延长到 20.9 h、5.6 h 延长到 47.5 h 和 30 min 延长到 41 h<sup>[32-36]</sup>。

FcRn 是白蛋白长半衰期的主要调节因子,体外研究表明小鼠 FcRn(mouse FcRn, mFcRn)对 MSA 的结合能力比对 HSA 的结合能力高 25 倍<sup>[17,37]</sup>。因此,虽然白蛋白相关药物体内血浆半衰期延长在 WT 小鼠模型中被成功模拟,但 mFcRn 对于体内 MSA 的高结合力可能会使与 mFcRn 结合的白蛋白相关药物明显减少,导致用野生型小鼠评价重组白蛋白药物的半衰期所获得的数据可能低于实际值。已经证明,在低白蛋白患者中注射重组人白蛋白的循环半衰期相较于正常患者增加了 4 ~ 5 倍,这可能是由于患者中内源性白蛋白对 FcRn 受体的竞争较少<sup>[38]</sup>,导致注射的重组人白蛋白与 FcRn 受体的结合增加,从而导致其半衰期相较于正常患者有所增加。

mFcRn 对于 MSA 及 HSA 结合力的高差异性,使得 WT 小鼠模型用于评价白蛋白相关药物受到质疑,为此科学家开发了一系列的基因修饰动物模型用于白蛋白相关药物的药代动力学评价。

### 1.2 基因修饰小鼠模型

基因修饰小鼠模型是指通过基因编辑对小鼠特定基因进行改造而获得表达目的基因的小鼠,该类模型广泛应用于各类药物临床前研究。目前用于评估白蛋白相关药物药代动力学的基因修饰小鼠包括以下 3 类:(1)人 FcRn(human FcRn, hFcRn)单基因修饰(hFcRn<sup>+/+</sup>)小鼠;(2)hFcRn、小鼠白蛋

白基因 (mouse *albumin*, *mAlb*) 敲除双基因修饰 (*hFcRn*<sup>+/+</sup>, *mAlb*<sup>-/-</sup>) 小鼠; (3) *hFcRn*、人白蛋白 (human *albumin*, *hAlb*) 双基因修饰 (*hFcRn*<sup>+/+</sup>, *hAlb*<sup>+/+</sup>) 小鼠。

#### 1.2.1 *hFcRn* 单基因修饰 (*hFcRn*<sup>+/+</sup>) 小鼠

已有研究表明 *mFcRn* 对 MSA 及 HSA 的结合能力存在明显差异,为了更好地模拟白蛋白与 *FcRn* 之间的相互作用,科研工作者构建了 *hFcRn*<sup>+/+</sup> 小鼠模型,主要包括 Tg276 和 Tg32<sup>[39-40]</sup>。这两类小鼠都是通过 *mFcRn* 第一外显子处插入 Neomycin 破坏小鼠内源性 *mFcRn* 的完整表达。并且用 *hFcRn* 替换小鼠 *mFcRn* 基因。Tg276 小鼠在 CAG 启动子的控制下表达 *hFcRn* 基因 cDNA,而 Tg32 小鼠则在 *hFcRn* 启动子的控制下表达含有完整 *hFcRn* 基因组 DNA 序列<sup>[41]</sup>。HSA 的血浆半衰期对比于 WT 小鼠  $62.4 \pm 2.4$  h,在 Tg32 的血浆半衰期为  $139.2 \pm 12$  h<sup>[42-44]</sup>,与 HSA 在人类中的血浆半衰期更加接近,说明该模型相较于 WT 小鼠能够很好地模拟 HSA 在人体中的代谢情况。Tg32 小鼠高 *FcRn* 亲和力白蛋白变体 (K573P) 的血浆半衰期与 WT 小鼠相比,从 30.6 h 延长到了 95.2 h<sup>[43]</sup>;具有 3 种氨基酸取代的白蛋白突变体 QMP (E505Q/T527 M/K573P) Tg32 小鼠中的血浆半衰期 (4.8 d) 比 WT HSA 在该小鼠模型中 (2 d) 的两倍还多<sup>[12]</sup>。在 *hFcRn*<sup>+/+</sup> Tg276 小鼠中,也观察到了相似的结果。Schmidt 等<sup>[42]</sup>采用另外两种对 *FcRn* 具有高亲和力的白蛋白突变体:HSA5 (V547A) 和 HSA7 (V547A/E505 G) 于 Tg276 小鼠中检测相应的血浆半衰期,发现这两种 HSA 突变体的半衰期分别为 46.2 h 和 44.9 h,相较于 WT HSA 的半衰期 (29.2 ~ 31.4 h) 均延长了 1.5 倍左右。以上结果表明 *hFcRn*<sup>+/+</sup> 小鼠能更好地模拟对 *hFcRn* 具有较高亲和力的 HSA 变体在人体内的代谢情况。除此之外,*hFcRn*<sup>+/+</sup> 小鼠对比于 WT 小鼠也能够更好地模拟重组白蛋白在人体内的药代动力。例如,Lombardi 等<sup>[45]</sup>利用 QMP 与凝血因子 VII 结合,并在 Tg32 小鼠中检测,发现对比于与 HSA 结合的凝血因子 VII (2 d),其显著延长了血浆半衰期 (7 d)。

尽管 *hFcRn*<sup>+/+</sup> 小鼠增强了其对 HSA 的结合能力,能够更好地模拟包括 HSA 变体及重组白蛋白药物在人体内的代谢,但是已有研究表明 MSA 对 *hFcRn* 的结合力是 HSA 的 5 倍<sup>[25,37,43]</sup>。因此,*hFcRn*<sup>+/+</sup> 小鼠中内源性 MSA 会与 HSA 竞争性地结

合 *hFcRn*,从而 影响白蛋白药物药代动力学评估<sup>[17]</sup>。

#### 1.2.2 *hFcRn*、*mAlb* 双基因修饰 (*hFcRn*<sup>+/+</sup>, *mAlb*<sup>-/-</sup>) 小鼠

为了克服内源性 MSA 与 HSA 竞争性的结合 *hFcRn* 对白蛋白药物药代动力学评价带来的负面影响,Roopenian 等<sup>[44]</sup>通过 TALEN 技术在 *FcRn* 人源化 (Tg32) 小鼠的基础上进一步构建缺乏自身白蛋白表达的品系 (Tg32-*Alb*<sup>-/-</sup>),即在 Tg32 小鼠的基础上敲除小鼠内源性 MSA 基因 4 号外显子 2bp,使其过早形成终止密码子来实现自身白蛋白表达的缺陷,该小鼠模型排除了内源性 MSA 的影响,更加适合用于评估 HSA 药代动力学。借助该小鼠模型发现 HSA 的血浆半衰期为 24 d,与在人体中的半衰期 (19 d) 相当。因此,认为这种 *hFcRn*<sup>+/+</sup>、*mAlb*<sup>-/-</sup> (Tg32-*Alb*<sup>-/-</sup>) 小鼠模型是一种能够很好地模拟人体评估白蛋白药物药代动力学的啮齿类动物模型,这也说明了 *hFcRn* 的存在和缺乏竞争的内源性 MSA 竞争可有效地保护 WT HSA,防止被降解。

虽然 *hFcRn*<sup>+/+</sup>、*mAlb*<sup>-/-</sup> 小鼠模型能够使 HSA 的血浆半衰期延长至与在人体中相当,且在白蛋白药物评估中发挥着巨大作用,但是给白蛋白药物后,外源性白蛋白与内源性 HSA 会竞争性结合 *FcRn* 受体,而 *hFcRn*<sup>+/+</sup>、*mAlb*<sup>-/-</sup> 小鼠不能正常模拟内源性竞争,致使该类模型用于白蛋白药物评价受到质疑。

#### 1.2.3 *hFcRn*、*hAlb* 双基因修饰 (*hFcRn*<sup>+/+</sup>, *hAlb*<sup>+/+</sup>) 小鼠

虽然 *hFcRn*<sup>+/+</sup> 小鼠模型及 *hFcRn*<sup>+/+</sup>、*mAlb*<sup>-/-</sup> 小鼠可以模拟 *hFcRn* 对 HSA 的结合能力,但是 *hFcRn*<sup>+/+</sup> 小鼠 MSA 对 *hFcRn* 的亲和力远高于 HSA 对 *hFcRn* 的亲和力<sup>[25]</sup>,使内源性 MSA 比 HSA 更易结合 *hFcRn* 受体<sup>[17]</sup>,*hFcRn*<sup>+/+</sup>、*mAlb*<sup>-/-</sup> 小鼠缺乏内源性白蛋白与外源性白蛋白竞争性结合 *hFcRn* 受体。为了更加真实地模拟人体内白蛋白药物及 HSA 与 *hFcRn* 受体的竞争结合,Viuff 等<sup>[25]</sup>于 2016 年建立了第一个由内源性启动子控制并且同时携带 *hFcRn* 和 HSA 基因 (*hFcRn*<sup>+/+</sup>, *hAlb*<sup>+/+</sup>) 的双转基因小鼠模型,通过将 *hFcRn* cDNA 定点插入到鼠 *mFcRn* 基因的 2 号外显子处,同时将编码 HSA 的 cDNA 序列定点插入小鼠 MSA 基因 1 号外显子处,因此,*hFcRn* 和 HSA 的表达都受到小鼠对应基因内源性启动子的控制。该小鼠模型的血清 HSA 浓度

为 17 mg/mL,而另外 30 种血清成分的水平与野生型小鼠相当,体外实验发现来源于该基因修饰小鼠的血清白蛋白(501.9 ± 101.2 nmol/L)、来源于人的血清白蛋白(641.1 ± 89.7 nmol/L)和天然序列的重组人血清白蛋白(797.9 ± 155.0 nmol/L)对 hFcRn 有着相似的结合能力。进一步采用 *hFcRn*<sup>+/+</sup>,*hAlb*<sup>+/+</sup>小鼠进行体内实验,发现与 FcRn 具有低结合能力的低结合蛋白(low binding protein, LB)血清半衰期为 29 ± 3 h,高结合蛋白(high binding protein, HB)的半衰期为 80 ± 18 h,重组白蛋白半衰期为 57 ± 13 h<sup>[45]</sup>,当中 LB 的血浆半衰期最短,HB 的血浆半衰期最长。

该模型同时克服了 FcRn 和白蛋白结合存在物种差异及外源性与内源性白蛋白与 FcRn 结合存在竞争这两个难题,能更好地模拟人类生理条件,是白蛋白关联药物的药代动力学研究中较好的模型。

## 2 白蛋白相关药物非啮齿类动物模型

啮齿类动物虽然在药物药代动力学临床前研究中发挥着巨大作用,为白蛋白药物临床前研究提供了良好模型,但是啮齿类动物在生理特征上与人类之间差异较大,与之相对应的非啮齿类动物具有

与人类更加接近的生理特征,可以更好地反映药物在体内的药代动力学特征。目前,用于研究白蛋白相关药物的非啮齿类动物主要为食蟹猴、犬儒猴、猕猴等非人灵长类动物(nonhuman primates, NHPs)。

NHPs(食蟹猴、犬儒猴、猕猴等)在生理、病理等多方面与人类高度相似,其遗传物质最高可以与人类达到 98.5%的同源性<sup>[46-47]</sup>,因此,NHPs 能够更好地模拟人类体内代谢条件,有望促进各种 HSA 药物药代动力学研究进展。

在食蟹猴中,HSA 的半衰期为 131 ~ 169 h,而食蟹猴白蛋白在食蟹猴中的血浆半衰期为 144 h<sup>[2,42-43]</sup>,说明 HSA 在食蟹猴体内有着与食蟹猴白蛋白相似的竞争力。例如,Steiner 等<sup>[30]</sup>将 DARPins 结构域与白蛋白结合,使其在食蟹猴中的血浆半衰期相较于在 WT 小鼠中(3.42 d)延长至 20.7 d,这与类比到人体中的 50.3 d 更加接近,另一项报道中通过将凝血因子Ⅷ(FⅧ)与人白蛋白融合后静脉注射到犬儒猴中,发现重组 FⅧ的半衰期达到 56.1 ~ 66.1 h,比未重组的 FⅧ增加 2.6 ~ 5.0 倍<sup>[48]</sup>。

虽然 NHPs 对比于非啮齿类动物与人之间有着更加接近的亲缘关系,体型更大更便于监测,但是

表 1 白蛋白相关药物评价实验动物比较  
Table 1 Comparison of albumin-related drugs in laboratory animals

| 实验动物<br>Laboratory animal                                                                                                       | 优点<br>Advantage                                                                                                                                                                                                                   | 缺点<br>Shortcoming                                                                                                                                                                  | 参考文献<br>Reference |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 野生型小鼠<br>Wild type mice                                                                                                         | 成本相对较低、操作便捷、生长繁殖周期短、获取容易<br>Relatively low cost, convenient operation, short growth and breeding cycle, easy access                                                                                                               | 与人类的关系较远,白蛋白与 FcRn 受体结合存在明显物种差异<br>Relatively distant from humans, obvious species differences between albumin and FcRn binding                                                    | [25,49-51]        |
| <i>hFcRn</i> <sup>+/+</sup> 小鼠模型<br><i>hFcRn</i> <sup>+/+</sup> mouse                                                           | 成本相对较低、生长繁殖周期短、人源化 FcRn 受体<br>Relatively low cost, short growth and reproduction cycle, humanized FcRn receptor                                                                                                                   | 增强内源性 MSA 对 FcRn 受体的结合,存在内源性 MSA 会与 HSA 竞争 FcRn 受体从而影响药物评价结果<br>The binding force to MSA is improved. Endogenous MSA competes with HSA for FcRn, affecting the efficacy evaluation | [12,52]           |
| <i>hFcRn</i> <sup>+/+</sup> , <i>mAlb</i> <sup>-/-</sup> 小鼠模型<br><i>FcRn</i> humanized,MSA knock-out mouse                      | 成本相对较低、生长繁殖周期短、敲除 MSA,HSA 在 MSA 敲除模型小鼠中的半衰期与在人体中的相当<br>Relatively low cost, the growth and reproduction cycle are short, the MSA is knocked out, the half-life of HSA in MSA knock-out model mice is equivalent to that in humans | 人类 HSA 未敲除,与该模型不一致<br>HSA in human are not knocked out, which is inconsistent with this model                                                                                      | [44]              |
| <i>hFcRn</i> <sup>+/+</sup> , <i>hAlb</i> <sup>+/+</sup> 小鼠模型<br><i>hFcRn</i> <sup>+/+</sup> , <i>hAlb</i> <sup>+/+</sup> mouse | 生长繁殖周期短,同时人源化 MSA 与 FcRn 受体<br>Short growth and reproduction cycle, humanized MSA and FcRn                                                                                                                                        | 生理条件与人类差异较大<br>Physiological conditions differ greatly from human                                                                                                                  | [53]              |
| 非人灵长类<br>Nonhuman primates                                                                                                      | 与人的关系相对更加紧密,遗传物质与人类高度同源,其生理特性与人接近<br>The relationship with human is closer, the genetic material is highly homologous with human, physiological characteristics are close to human                                                | 成本相对较高、繁殖周期较长,通常单胎繁殖,存在较严格的伦理问题<br>Relatively high cost, long breeding cycle, general singleton reproduction, ethical and moral issues                                             | [43,46]           |



有研究表明,食蟹猴血清白蛋白对猴 FcRn 的亲合力高于人血清白蛋白对猴 FcRn 的亲合力<sup>[25]</sup>,这在一定程度上阻碍了猴 FcRn 与 HSA 的结合,同时由于伦理和经济的限制,猴子在非临床试验的广泛应用受到一定限制。

### 3 总结与展望

白蛋白作为药物载体的主要优势是通过与 FcRn 受体的相互作用来延长药物的血浆半衰期。动物模型作为研究药物药代动力学的重要工具是药物研究中不可或缺的一部分,目前用于评估白蛋白相关药物药代动力学的动物模型包括啮齿类(野生型小鼠、基因修饰小鼠模型)与非啮齿(猴)两大类。由于白蛋白与 FcRn 的结合存在物种差异,导致无论是使用野生型小鼠还是 *hFcRn*<sup>+/+</sup> 小鼠得到的药代动力学数据都不能很好地模拟白蛋白相关药物在人体内的药代动力学。因为内源性的小鼠白蛋白也会竞争性地与 FcRn 受体结合,为了更加真实地模拟人体内白蛋白药物及 HSA 与 *hFcRn* 受体的竞争结合,制备 *FcRn* 和白蛋白双人源化的动物模型至关重要,因此,Howard 团队建立了 FcRn 和白蛋白双人源化的小鼠模型,为白蛋白相关药物研究提供了较好的小鼠模型<sup>[25]</sup>。

但小鼠与人类在生长发育、生理代谢、体型大小等方面都相差较大,获得的实验数据不能真实反映蛋白药物在人体内的代谢过程。我国的《化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则》要求:新药临床前药代动力学研究应选用至少两种动物,包括啮齿类和非啮齿类。然而,迄今为止,基于白蛋白和 *FcRn* 双人源化的非啮齿类动物模型尚未建立,严重阻碍了白蛋白药物研究。双人源化小鼠模型为白蛋白评估模型提供了新的思路,该模型在一定程度上模拟了 HSA 与 FcRn 在人体内的相互作用及白蛋白相关药物进入人体后与源性 HSA 竞争性结合 FcRn 受体的生理状态。NHPs 与人有着极高的相似性,包括生理代谢水平等,在未来是否可以在伦理道德允许的范围构建 HSA 与 *FcRn* 双人源化的 NHPs 模型,理论上这种双人源化 NHPs 模型可以作为最理想的评价白蛋白相关药物药代动力学的动物模型。

总之,对于药物临床前研究,动物模型发挥着巨大作用,建立能够更好地模拟人类生理学特征的药物模型是任重道远的。随着各种实用技术的发

展与检测水平的提高,评价白蛋白相关药物动物模型将会更加完善,也能更真实地模拟临床特征,推进白蛋白药物更进一步的研究与发展。

### 参 考 文 献 (References)

- [1] Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems [J]. J Control Release, 2012, 157(2): 168-182.
- [2] Peters T. Serum albumin [J]. J Biol Chem, 1985, 37: 161-245.
- [3] Nilsen J, Sandlie I, Roopenian DC, et al. Animal models for evaluation of albumin-based therapeutics [J]. Curr Opin Chem Eng, 2018, 19: 68-76.
- [4] Zhang Y, Sun T, Jiang C. Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering [J]. Acta Pharm Sin B, 2018, 8(1): 34-50.
- [5] Chaudhury C, Brooks CL, Carter DC, et al. Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction [J]. Biochemistry, 2006, 45(15): 4983-4990.
- [6] Pyzik M, Sand KMK, Hubbard JJ, et al. The neonatal fc receptor (FcRn): a misnomer? [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1540.
- [7] Bern M, Sand KM, Nilsen J, et al. The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: implications for drug delivery [J]. J Control Release, 2015, 211: 144-162.
- [8] Howard KA. Albumin: the next-generation delivery technology [J]. Ther Deliv, 2015, 6(3): 265-268.
- [9] Li T, Balthasar JP. FcRn expression in wildtype mice, transgenic mice, and in human tissues [J]. Biomolecules, 2018, 8(4): 115.
- [10] Latvala S, Jacobsen B, Otteneder MB, et al. Distribution of FcRn across species and tissues [J]. J Histochem Cytochem, 2017, 65(6): 321-333.
- [11] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age [J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(9): 715-725.
- [12] Bern M, Nilsen J, Ferrarese M, et al. An engineered human albumin enhances half-life and transmucosal delivery when fused to protein-based biologics [J]. Sci Transl Med, 2020, 12(565): eabb0580.
- [13] Sand KM, Dalhus B, Christianson GJ, et al. Dissection of the neonatal Fc receptor (FcRn)-albumin interface using mutagenesis and anti-FcRn albumin-blocking antibodies [J]. J Biol Chem, 2014, 289(24): 17228-17239.
- [14] Karimi M, Bahrami S, Ravari SB, et al. Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2016, 13(11): 1609-1623.
- [15] Spada A, Emami J, Tuszyński JA, et al. The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery [J]. Mol Pharm, 2021, 18(5): 1862-1894.
- [16] Bolling C, Graefe T, Lübbling C, et al. Phase II study of MTX-HSA in combination with cisplatin as first line treatment in patients with advanced or metastatic transitional cell carcinoma

- [J]. Invest New Drugs, 2006, 24(6): 521–527.
- [17] Andersen JT, Cameron J, Plumridge A, et al. Single-chain variable fragment albumin fusions bind the neonatal Fc receptor (FcRn) in a species-dependent manner; implications for *in vivo* half-life evaluation of albumin fusion therapeutics [J]. J Biol Chem, 2013, 288(33): 24277–24285.
- [18] Astermark J, Wojciechowski P, Aballéa S, et al. Efficacy of rFIXFc versus rIX-FP for the treatment of patients with hemophilia B: matching-adjusted indirect comparison of B-LONG and PROLONG-9FP trials [J]. J Blood Med, 2021, 12: 613–621.
- [19] Morales J. Defining the role of insulin detemir in Basal insulin therapy [J]. Drugs, 2007, 67(17): 2557–2584.
- [20] Jacobsen LV, Flint A, Olsen AK, et al. Liraglutide in type 2 diabetes mellitus: clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. Clin Pharmacokinet, 2016, 55(6): 657–672.
- [21] Gianni L, Mansutti M, Anton A, et al. Comparing neoadjuvant nab-paclitaxel vs paclitaxel both followed by anthracycline regimens in women with ERBB2/HER2-negative breast cancer-the evaluating treatment with neoadjuvant abraxane (ETNA) trial: a randomized phase 3 clinical trial [J]. JAMA Oncol, 2018, 4(3): 302–308.
- [22] Liu H, Luo B, Chen X, et al. Preserved pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin degludec and liraglutide when administered as insulin degludec/liraglutide in a Chinese population [J]. J Diabetes Investig, 2022, 13(4): 652–656.
- [23] Pilati D, Howard KA. Albumin-based drug designs for pharmacokinetic modulation [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2020, 16(9): 783–795.
- [24] 周利润, 崔晓兰. 慢性阻塞性肺疾病相关动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1121–1127.
- Zhou LR, Cui XL. Development of an animal model for chronic obstructive pulmonary-related disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1121–1127.
- [25] Viuff D, Antunes F, Evans L, et al. Generation of a double transgenic humanized neonatal Fc receptor (FcRn)/albumin mouse to study the pharmacokinetics of albumin-linked drugs [J]. J Control Release, 2016, 223: 22–30.
- [26] Rasool M, Malik A, Hussain M, et al. DARPin bioengineering and its theranostic approaches: emerging trends in protein engineering [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(11): 1610–1615.
- [27] Shilova ON, Deyev SM. DARPin: promising scaffolds for theranostics [J]. Acta Nat, 2019, 11(4): 42–53.
- [28] Schilling J, Jost C, Ilie IM, et al. Thermostable designed ankyrin repeat proteins (DARPin) as building blocks for innovative drugs [J]. J Biol Chem, 2022, 298(1): 101403.
- [29] Sleep D, Cameron J, Evans LR. Albumin as a versatile platform for drug half-life extension [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(12): 5526–5534.
- [30] Steiner D, Merz FW, Sonderegger I, et al. Half-life extension using serum albumin-binding DARPin® domains [J]. Protein Eng Des Sel, 2017, 30(9): 583–591.
- [31] Stumpp MT, Amstutz P. DARPins: a true alternative to antibodies [J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2007, 10(2): 153–159.
- [32] Schlapschly M, Theobald I, Mack H, et al. Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino-acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life [J]. Protein Eng Des Sel, 2007, 20(6): 273–284.
- [33] Stork R, Müller D, Kontermann RE. A novel tri-functional antibody fusion protein with improved pharmacokinetic properties generated by fusing a bispecific single-chain diabody with an albumin-binding domain from streptococcal protein G [J]. Protein Eng Des Sel, 2007, 20(11): 569–576.
- [34] Tolmachev V, Orlova A, Pehrson R, et al. Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a <sup>177</sup>Lu-labeled HER2-specific affibody molecule [J]. Cancer Res, 2007, 67(6): 2773–2782.
- [35] Andersen JT, Pehrson R, Tolmachev V, et al. Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain [J]. J Biol Chem, 2011, 286(7): 5234–5241.
- [36] Mester S, Evers M, Meyer S, et al. Extended plasma half-life of albumin-binding domain fused human IgA upon pH-dependent albumin engagement of human FcRn *in vitro* and *in vivo* [J]. MAbs, 2021, 13(1): 1893888.
- [37] Andersen JT, Daba MB, Berntzen G, et al. Cross-species binding analyses of mouse and human neonatal Fc receptor show dramatic differences in immunoglobulin G and albumin binding [J]. J Biol Chem, 2010, 285(7): 4826–4836.
- [38] Shen BQ, Xu K, Liu L, et al. Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(2): 184–189.
- [39] Ko S, Jo M, Jung ST. Recent achievements and challenges in prolonging the serum half-lives of therapeutic IgG antibodies through fc engineering [J]. BioDrugs, 2021, 35(2): 147–157.
- [40] Sanches M, D'Angelo I, Jaramillo M, et al. AlbuCORE: an albumin-based molecular scaffold for multivalent biologics design [J]. MAbs, 2020, 12(1): 1802188.
- [41] Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, et al. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs [J]. J Immunol, 2003, 170(7): 3528–3533.
- [42] Schmidt MM, Townson SA, Andreucci AJ, et al. Crystal structure of an HSA/FcRn complex reveals recycling by competitive mimicry of HSA ligands at a pH-dependent hydrophobic interface [J]. Structure, 2013, 21(11): 1966–1978.
- [43] Andersen JT, Dalhus B, Viuff D, et al. Extending serum half-life of albumin by engineering neonatal Fc receptor (FcRn) binding [J]. J Biol Chem, 2014, 289(19): 13492–13502.
- [44] Roopenian DC, Low BE, Christianson GJ, et al. Albumin-deficient mouse models for studying metabolism of human albumin

- and pharmacokinetics of albumin-based drugs [J]. *MAbs*, 2015, 7(2): 344–351.
- [45] Lombardi S, Aaen KH, Nilsen J, et al. Fusion of engineered albumin with factor IX Padua extends half-life and improves coagulant activity [J]. *Br J Haematol*, 2021, 194(2): 453–462.
- [46] Yan G, Zhang G, Fang X, et al. Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(11): 1019–1023.
- [47] 田朝阳, 杨守凯. 非人灵长类动物在医学科学实验中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(6): 74–77.  
Tian CY, Yang SK. The use of non-human primates in medical scientific experiments [J]. *Chin J Comp Med*, 2009, 19(6): 74–77.
- [48] Pestel S, Beltz HW, Claar P, et al. FVIII half-life extension by coadministration of a D’ D3 albumin fusion protein in mice, rabbits, rats, and monkeys [J]. *Blood Adv*, 2020, 4(9): 1870–1880.
- [49] Merten H, Brandl F, Zimmermann M, et al. Half-life extension of efficiently produced DARPIn serum albumin fusions as a function of FcRn affinity and recycling [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2021, 167: 104–113.
- [50] 王琳, 沈嘉艳, 谢招虎, 等. 高尿酸血症动物模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(1): 112–119.  
Wang L, Shen JY, Xie ZH, et al. Progress of hyperuricemia animal model research [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(1): 112–119.
- [51] Ward ES, Ober RJ. Chapter 4: Multitasking by exploitation of intracellular transport functions the many faces of FcRn [J]. *Adv Immunol*, 2009, 103: 77–115.
- [52] Day YS, Myszkowski DG. Characterizing a drug’s primary binding site on albumin [J]. *J Pharm Sci*, 2003, 92(2): 333–343.
- [53] Sheng J, Wang Y, Turesky RJ, et al. Novel transgenic mouse model for studying human serum albumin as a biomarker of carcinogenic exposure [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(5): 797–809.

[收稿日期] 2023-04-23

## 一种动物联合模型测定生长猪在不同粗纤维水平下大肠挥发性脂肪酸的净吸收量

厌氧微生物在动物胃肠道中发酵一系列碳水化合物从而生成有机酸和气体等产物,而单胃动物主要在大肠(盲肠、结肠)中进行微生物厌氧发酵产生挥发性脂肪酸(VFAs)和乳酸等。有研究发现:猪大肠利用发酵产生的 VFAs 能满足自身约 5% ~ 20% 能量维持需求,除此之外,这部分 VFAs 还为动物肠道和动物健康提供营养。然而,大肠内微生物发酵生成 VFAs 的产量和模式受到多种因素的影响,如何监控大肠内内源性 VFAs 的产生情况是一大难点问题,这也是难以对动物进行精准营养调控的原因。

基于上述背景,武汉轻工大学湖北省动物营养与饲料科学重点实验室赵胜军团队研究构建“血管瘘-肠瘘”结合“同位素标记法”的动物联合模型,测定生长猪在不同粗纤维水平下大肠 VFAs 的净吸收量情况。其中为了动态检测 VFAs 吸收情况采用手术造肠系膜、门静脉、股左动脉血管瘘,来测定单位时间门静脉对 VFAs 的吸收量。为消除前肠道以及外源性 VFAs 的干扰,手术构建回肠瘘管并在测定期间灌注碳 13 标记的 VFAs(<sup>13</sup>C-VFAs),通过检测门静脉血液和大肠组织中<sup>13</sup>C-VFAs 含量来计算大肠对 VFAs 的动态净吸收量。

总的来说,本研究构建了一种新方法来探索动物大肠对 VFAs 的净吸收量,对精准监控大肠的营养吸收提供了新的思路并为进一步的研究奠定了基础。

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*, 2023, 6(4): 375–380. <http://doi:10.1002/ame2.12329>)。