

中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

月刊 1993 年 6 月创刊

第 30 卷 第 7 期 2022 年 11 月 30 日出版

目次

研究报告

- 小鼠心肌梗死模型的建立及系统性评价 丁怡铭, 高杰, 邢元铭, 温尔刚, 夏聪聪, 赵四海, 刘恩岐, 袁祖贻, 白亮 (873)
- 血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠模型建立及其血管功能变化的研究 彭小勇, 周远群, 张紫森, 邓蒙生, 雷艳, 李涛, 刘良明, 王建民, 康建毅, 杨光明 (880)
- 基于数据挖掘的围绝经期抑郁症动物模型研究 高占, 高明周, 高冬梅, 王常麟, 乔明琦, 高杰, 王杰琼 (887)
- 代谢性疾病病证结合动物模型的探讨与思考 任志鑫, 王雨, 张冰, 林志健, 巨珊珊 (897)
- 苓术菟丝子丸抑制 IKK β /NF- κ B/MCP-1 通路减少阿霉素诱导的大鼠肾性蛋白尿 龙雯, 明瑶, 李茗西, 沈宏春 (909)
- 高血压和衰老为主要危险因素的脑小血管病动物模型的建立 刘彤彤, 张熙, 王泉冶, 方锐, 葛金文, 孟盼 (918)
- 肾原位抑制 miR-146b-5p 表达改善 UUO 小鼠肾纤维化 谢柯欢, 郭怀英, 韩壤乐, 王丽 (927)
- 基于“心脾同治”理论探讨益气活血方调控冠心病气虚血瘀证大鼠炎症反应的机制 王瑾茜, 喻嵘, 李薇, 杨蕙, 张田田, 蔺晓源, 胡国恒, 陈亚, 雷诗卉 (935)
- MST1/2 抑制剂促进大鼠脊髓损伤修复的实验研究 徐纪伟, 孙丹华, 陈旭东, 王宁, 孙壕烨 (942)

研究进展

- 双光子钙成像技术在非人灵长类动物大脑皮层神经元功能的研究现状 孙伟铭, 刘观秀, 董香丽, 冯珍, 马朝林 (949)
- 急性肾损伤动物模型构建方法与研究现状 张佳莉, 张岩 (955)
- 斑马鱼动物模型在眼科中的应用研究进展 胡海坚, 张旭 (966)
- 肠道菌群与肠屏障互作影响动脉粥样硬化形成的研究进展 徐雁云, 陈民利 (973)

动物继承牙发育调控机制研究进展 王贝嘉,刘刘钊,郭洁,李建营(983)

呼吸道合胞病毒感染动物模型的构建与评价 齐莉莉,刘宏,李剑(989)

血友病关节软骨发病机制的研究进展 陈爽,闫振宇(996)

通过链脉佐菌素诱导建立糖尿病骨质疏松大鼠模型的实验研究进展 孙立亚,刘北,奚悦(1003)

广告 (封二、内插)

主 管	照 排
中国科学技术协会	同方知网(北京)技术有限公司
主 办	印 刷
中国实验动物学会	北京博海升彩色印刷有限公司
中国医学科学院医学实验动物研究所	邮发代号
主 编	2-748
秦川	广告发布登记
编辑部主任	京朝工商广登字 20170142 号
董令赢	定 价
编 辑	每期 50.00 元,全年 300.00 元
《中国实验动物学报》编辑部	中国标准连续出版物号
出 版	ISSN 1005-4847
《中国实验动物学报》编辑部	CN 11-2986/Q
发 行	2022 年版权归中国实验动物学会所有
《中国实验动物学报》编辑部	本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子
100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号	杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网
电话:010-67779337	和中国实验动物学会网站等网络文献数据库,如不同意自己
传真:010-67770690	论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述
E-mail:bjb@cnilas.org	网站著作权使用费。
http://zgswdw.cnjournals.com/sydwbyjyx/ch/index.aspx	本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com
本期执行主编 代解杰	
本期责任编辑 董令赢 孙 烨 陈 慧	

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Monthly, Established in June 1993

Volume 30, Number 7, November, 2022

CONTENTS

- Establishment of a mouse myocardial infarction model and systematic evaluation *DING Yiming, GAO Jie, XING Yuanming, WEN Ergang, XIA Congcong, ZHAO Sihai, LIU Enqi, YUAN Zuyi, BAI Liang*(873)
- Vascular function in a heterozygous mouse model with conditional knockout of connexin 43 in vascular endothelial cells *PENG Xiaoyong, ZHOU Yuanqun, ZHANG Zisen, DENG Mengsheng, LEI Yan, LI Tao, LIU Liangming, WANG Jianmin, KANG Jianyi, YANG Guangming*(880)
- Animal model of perimenopausal depressive disorder based on data mining *GAO Zhan, GAO Mingzhou, GAO Dongmei, WANG Changlin, QIAO Mingqi, GAO Jie, WANG Jieqiong*(887)
- Animal models combining disease and syndromes related to metabolic diseases *REN Zhixin, WANG Yu, ZHANG Bing, LIN Zhijian, JU Shanshan*(897)
- Effects of Ling Zhu Tusizi Pills in inhibiting the I- κ B kinase β /nuclear factor- κ B/monocyte chemoattractant protein-1 signaling pathway to reduce adriamycin-induced proteinuria in rats *LONG Wen, MING Yao, LI Mingxi, SHEN Hongchun*(909)
- Establishment of an animal model of cerebral small vessel disease with hypertension and aging as the main risk factors *LIU Tongtong, ZHANG Xi, WANG Xiaoye, FANG Rui, GE Jinwen, MENG Pan*(918)
- Renal inhibition of miR-146b-5p expression *in situ* improves renal fibrosis in UUO mice *XIE Kehuan, GUO Huaiying, HAN Rangyue, WANG Li*(927)
- Inflammatory mechanism of Yiqi Huoxue recipe with qi deficiency and blood stasis syndrome of coronary heart disease based on the theory of simultaneous treatment of heart and spleen *WANG Jinxi, YU Rong, LI Wei, YANG Hui, ZHANG Tiantian, LIN Xiaoyuan, HU Guoheng, CHEN Ya, LEI Shihui*(935)
- MST1/2 inhibitor for spinal cord injury repair in rats *XU Jiwei, SUN Danhua, CHEN Xudong, WANG Ning, SUN Haoye*(942)
- Research status of two-photon calcium imaging of cortical neuronal functions in non-human primates *SUN Weiming, LIU Guanxiu, DONG Xiangli, FENG Zhen, MA Chaolin*(949)
- Research approaches and status of animal models for acute kidney injury *ZHANG Jiali, ZHANG Yan*(955)

Research progress on the application of zebrafish animal models in ophthalmology	
.....	<i>HU Haijian, ZHANG Xu</i> (966)
Research progress in the interaction between intestinal flora and the intestinal barrier in atherosclerosis	
.....	<i>XU Yanyun, CHEN Minli</i> (973)
Research progress in the regulatory mechanism of animal successional tooth development	
.....	<i>WANG Beijia, LIU Yizhao, GUO Jie, LI Jianying</i> (983)
Construction and evaluation of animal models of respiratory syncytial virus infection	
.....	<i>QI Lili, LIU Hong, LI Jian</i> (989)
Research progress on the pathogenesis of articular cartilage in hemophilia ...	<i>CHEN Shuang, YAN Zhenyu</i> (996)
Progress in experimental research on establishment of a diabetic osteoporosis rat model induced by streptozotocin	
.....	<i>SUN Liya, LIU Bei, XI Yue</i> (1003)

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

Institute of Laboratory Animal Sciences,

Chinese Academy of Medical Sciences

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Managing Editor

DONG Lingying(董令赢)

Editing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Publishing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Distributor

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021

Tel: 010-67779337

Fax: 010-67770690

E-mail: bjb@cnilas.org

<http://zgswydw.cnjournals.com/sydwbybjyx/ch/index.aspx>

CSSN

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

Copyright 2022 by the Chinese Association for Laboratory
Animal Sciences

丁怡铭,高杰,邢元铭,等. 小鼠心肌梗死模型的建立及系统性评价 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 873-879.

Ding YM, Gao J, Xing YM, et al. Establishment of a mouse myocardial infarction model and systematic evaluation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 873-879.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.001

小鼠心肌梗死模型的建立及系统性评价

丁怡铭^{1,2},高杰^{1,3},邢元铭^{1,2},温尔刚^{1,3},夏聪聪^{1,3},赵四海^{1,3},刘恩岐^{1,3},
袁祖贻^{1,2},白亮^{1,2,3*}

(1. 西安交通大学医学部转化研究院心血管研究所,西安 710061;2. 西安交通大学第一附属医院心血管内科,西安 710061;3. 西安交通大学医学部基础医学院实验动物学系,西安 710061)

【摘要】 目的 构建小鼠心肌梗死模型,并进行系统性评价。方法 42 只 C57BL/6J 小鼠分为两组:假手术组($n=8$)和模型组($n=34$)。采用挤心脏法结合冠状动脉左前降支(LCA)结扎建立小鼠心梗模型。术后 24 h、3 d、7 d 分别进行心动超声评价心功能,打开胸腔观察梗死情况;术后 24 h 留取心脏标本进行 TTC 染色明确梗死发生;术后 3 d 检测梗死区炎症标志基因表达情况;术后 7 d 进行 HE 染色并检测梗死区纤维化相关基因表达情况。结果 与假手术组比,模型组小鼠可明确观察到左室前壁发白,TTC 染色明确梗死区域,提示模型建立成功。术后心超可见模型组心功能显著下降,且随时间延长逐渐加重。术后 3 d 梗死区促炎基因 TNF- α 和 MCP-1 表达显著增加($P < 0.05$)。术后 7 d HE 染色见梗死区大量炎性细胞浸润,梗死区与非梗死区界线分明;梗死区纤维化基因 FN 和 COL3A1 表达显著增加($P < 0.01$)。结论 成功建立小鼠心梗模型及其基本评价体系,可作为模型建立的标志性指标。

【关键词】 心肌梗死;系统性评价;挤心脏法;心动超声;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 07-0873-07

Establishment of a mouse myocardial infarction model and systematic evaluation

DING Yiming^{1,2}, GAO Jie^{1,3}, XING Yuanming^{1,2}, WEN Ergang^{1,3}, XIA Congcong^{1,3}, ZHAO Sihai^{1,3}, LIU Enqi^{1,3},
YUAN Zuyi^{1,2}, BAI Liang^{1,2,3*}

(1. Institute of Cardiovascular Science, Translational Medicine Institute, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an 710061, China. 2. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061. 3. Department of Laboratory Animal Science, School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061)

Corresponding author: BAI Liang. E-mail: bailiang0922@mail.xjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a myocardial infarction mouse model for systematic evaluation. **Methods** A total of 42 C57BL/6J mice were divided into two groups: sham group ($n=8$) and model group ($n=34$). Myocardial infarction was induced by squeezing the heart and left anterior descending coronary artery ligation. Echocardiography was performed to evaluate cardiac functions at 24 h, 3 d and 7 d after surgery. Then, the chest was opened and the occurrence

【基金项目】 国家自然科学基金(82070470),中国博士后科学基金(2020M673424,2021T140541),陕西省创新能力支撑计划项目(2022PT-37)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(82070470), China Postdoctoral Science Foundation Grant(2020M673424, 2021T140541), Innovation Capability Support Program of Shaanxi(2022PT-37)。

【作者简介】 丁怡铭(1998—),女,在读博士研究生,研究方向:代谢性心血管疾病的分子机制和转化。

Email: dym19980105@stu.xjtu.edu.cn

【通信作者】 白亮(1981—),女,副教授,博士,研究方向:脂质代谢与动脉粥样硬化。Email: bailiang0922@mail.xjtu.edu.cn

of myocardial infarction was evaluated. Heart samples were collected for TTC staining to confirm the occurrence of infarction at 24 h after surgery. Heart sections were prepared for HE staining at 7 d after surgery. mRNA expression of inflammatory and fibrotic related genes in the infarct area was detected at 3 and 7 d after surgery, respectively. **Results** After surgery, the left ventricular anterior wall of the model group showed a whitish myocardium compared with the sham group. TTC staining showed a white infarct area, suggesting that the model was established successfully. Echocardiography indicated that cardiac functions of the model group were significantly decreased and gradually deteriorated over time. Expression of inflammatory genes, such as TNF- α and MCP-1, was increased significantly at 3 days postoperatively in the infarct area ($P < 0.05$). Histological analysis showed that many inflammatory cells had infiltrated into the infarct area at 7 days postoperatively, and the boundary between the infarct area and non-infarct area was clear. Expression of fibrotic genes, including FN and COL3A1, in the infarct area were increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusions** The MI mouse model and its evaluation were successfully established and refined, which provide insights for model establishment.

【Keywords】 myocardial infarction; systematic evaluation; squeeze the heart; echocardiography; mice

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

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 是冠状动脉血管堵塞导致心肌缺血缺氧的一种心血管疾病, 可导致心律失常、心力衰竭、致死等严重后果, 严重威胁人类生命健康^[1-2]。尽管近年来血管内介入等治疗显著提高了患者生存率^[3-5], 但其确切的发病机制尚不完全清楚, 加之心梗发生发展的复杂性^[6-7], 临床治疗过程中仍面临诸多挑战^[8]。因此建立合适的心梗动物模型对研究 MI 的发病机理及防治措施显得尤为重要^[9]。由于小鼠在建立基因工程动物及生命科学研究中的独特优势^[10-11], 故建立便捷可行的小鼠心梗模型及标准化的成模评价体系非常必要。心梗动物模型的构建方法以冠脉结扎为主^[12-13], 传统的冠脉结扎法需要腹腔麻醉联合气管插管通气^[14], 创伤大, 效率低。而且, 相较于兔、犬、猪等大动物^[11, 15], 小鼠体形和心脏较小导致造模难度较大, 本研究基于 Gao 等^[16]报道的挤心脏法, 结合自身实践经验对手术方法进行了改进和优化, 包括: 将皮肤缝合放在手术过程最后; 向右斜 30°做胸部切口而非右斜 45°; 手术过程中不挤出左心耳等, 可提高造模成功率、节约时间, 成功构建小鼠心梗模型。此外, 进一步完善了小鼠心梗模型的评价体系, 在不同时间点选取了不同手段对模型进行评估, 包括心脏形态学、功能学、组织病理学和分子生物学 4 个方面, 可作为模型建立的标志性指标, 为临床进一步研究心梗发生发展和转归, 以及药物研发提供了动物模型保障和方法学支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

42 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 不分雌雄, 8~11

周龄, 体重 22~25 g, 由西安交通大学实验动物中心【SCXK(陕)2018-001】提供, 并在本中心饲养和实验【SYXK(陕)2020-005】。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 湿度恒定, 温度控制在 22~25℃。42 只小鼠分为两组: 34 只小鼠为模型组, 进行 LCA 永久性结扎; 8 只小鼠为假手术组, 只过线不结扎, 其余操作步骤与模型组相同。实验项目经西安交通大学伦理委员会批准实施(2020-812), 所有实验过程遵循国家实验动物管理的相关法律和规定。

1.1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(瑞沃德, R500); TTC(Sigma, T5648-1G); TRIzol(AG, AG21102); SYBR(AG, AG11701); 引物由上海生物工程有限公司合成。气体麻醉机(瑞沃德, R510-22, 中国); 心超机(飞依诺, VINNO 6, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 MI 模型的建立

术前 24 h 用脱毛膏去除胸部及上腹部被毛。手术当日小鼠称重后, 放入吸入式麻醉剂的诱导麻醉盒, 5%异氟烷吸入诱导麻醉; 待小鼠麻醉后, 将小鼠仰卧位固定, 用吸入面罩吸入 2%异氟烷持续麻醉; 75%乙醇消毒手术区。自剑突与肋弓交界向右斜 30°做胸部切口, 切口长约 1.2 cm; 用弯头镊和弯头止血钳钝性分离胸大肌, 暴露胸大肌下的胸小肌; 在小鼠呼吸平稳时, 以弯头止血钳轻轻捅破 3/4 肋间隙肌肉, 逆时针旋转并微微撑开弯头止血钳, 同时借助手指挤压, 利用心脏跳动使心脏弹出胸腔; 翻转心脏找到左心耳, 在其下 2 mm 处, 用提前准备好的 6-0 带针缝线结扎左前降支冠脉, 心脏挤压出胸腔后在体外时间不超过 1 min; 迅速将心脏送回胸腔, 轻轻挤压胸腔排气; 缝合皮肤, 关闭胸腔。

取下面罩,放回干净笼盒,3~5 min 即可苏醒。术后密切关注小鼠状态。假手术组只过线,不结扎,其余操作步骤与模型组相同。

1.2.2 超声检查

术后 24 h、3 d、7 d,小鼠异氟烷吸入麻醉,使用高分辨率小动物超声影像系统测量射血分数(ejection fraction, EF)、缩短分数(fractional shortening, FS)、左室舒张末期容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)、左室收缩末期容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)、左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic dimension, LVIDd)、左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic dimension, LVIDs)、左室舒张末期后壁厚度(left ventricular end-diastolic posterior wall thickness, LVPWd)、左室收缩末期后壁厚度(left ventricular end-systolic posterior wall thickness, LVPWs),在 2~3 个心动周期上测量各指标,取平均值。

1.2.3 TTC 染色

术后 24 h 麻醉小鼠,打开胸腔,用生理盐水进行心脏灌流,留取心脏,置于-80℃至心脏变硬(约 30 min);无菌 PBS 配置 1% TTC,避光,37℃预热;取出心脏,将结扎线以下快速切成 1 mm 厚的薄片,浸泡于 1% TTC 染液中,37℃染色 30 min;PBS 清洗 2 次,对心脏切片进行扫描拍照。

1.2.4 HE 染色

术后 7 d 留取心脏标本,4%甲醛固定 48 h,组织脱水,石蜡包埋,石蜡切片(4 μm)。常规脱蜡后,苏木素染色 2 min,伊红染色 3 min,常规干燥、封片,显微镜下观察。

1.2.5 实时定量 PCR

取小鼠梗死心肌组织,提取总 RNA,逆转录为 cDNA。以 β-actin 为内参基因,计算术后 3 d 肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、单核细胞趋化因子-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)和术后 7 d 纤连蛋白(fibronectin, FN)、Ⅲ型胶原蛋白 α1 链(collagen alpha-1(Ⅲ) chain, COL3A1)基因相对表达量。PCR 引物由上海生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

1.3 统计学分析

用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,数据以平均值±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,两组间比较用 Student *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

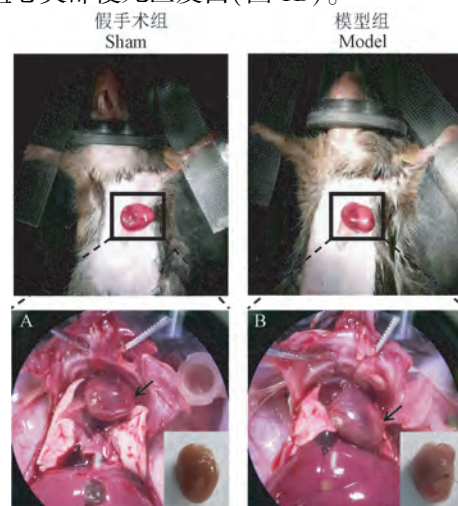
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequences
<i>TNF-α</i>	Forward: 5'-TGAGCACAGAAAGCATGATCC-3' Reverse: 5'-GCCATTTGGGAAGTCTCTCATC-3'
<i>MCP-1</i>	Forward: 5'-AGATGCAGTTAAGCGCCAC-3' Reverse: 5'-CCCATTCTCTTGGGGTCA-3'
<i>FN</i>	Forward: 5'-CCGGTGGCTGTCACTCAGA-3' Reverse: 5'-CCGTTCCCACTGCTGATTATC-3'
<i>COL3A1</i>	Forward: 5'-CCCAACCCAGAGATCCATT-3' Reverse: 5'-GAAGCACAGGAGCAGGTGTAGA-3'
<i>β-actin</i>	Forward: 5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3' Reverse: 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'

2 结果

2.1 成功构建小鼠心梗模型

对文献^[16]建立的手术方法进行优化,按实验方法所述,将小鼠心脏挤出胸腔后进行 LCA 结扎,与假手术组相比,片刻后可见结扎部位以下 LCA 供血范围内心肌变白,提示结扎成功。而假手术组心脏颜色基本正常,无白色区域(图 1A),术后 24 h 开胸,可见模型组心尖部梗死区发白(图 1B)。



注:A:术后 24 h 假手术组心脏原位及离体图;B:术后 24 h 模型组心脏原位及离体图;箭头:左心室壁。

图 1 小鼠心梗模型的建立及心脏大体观

Note. A. *In situ* and *ex vivo* diagram of the heart in the sham group at 24 h after surgery. B. *In situ* and *ex vivo* diagram of the heart in the model group at 24 h after surgery. Arrows. Left ventricular wall.

Figure 1 Establishment of mouse myocardial infarction model and general view of the heart

2.2 心动超声变化

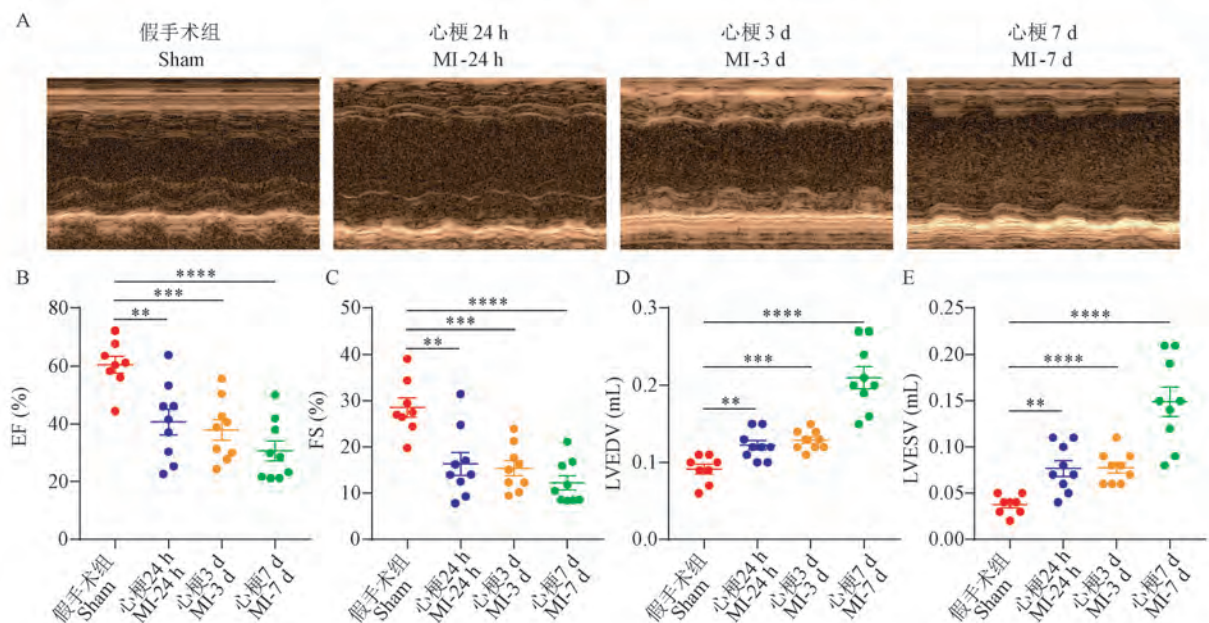
分别在术后 24 h、3 d、7 d 进行心动超声,结果可见,模型组左心室前壁、心尖部等 LCA 供血范围活动幅度明显减小甚至消失,提示心肌受损;左室壁变薄,左室腔变大,心梗术后 7 d 变化最为明显(图 2A)。对 3 个时间点的心功能指标进行分析,可见模型组 EF、FS 值较假手术组显著下降($P < 0.01$,图 2B, 2C),LVEDV、LVESV 值较假手术组显著升高($P < 0.01$,图 2D,2E),提示模型组心功能变差,且随心梗时间延长逐渐加重,具体心超指标详见表 2。

2.3 心脏 TTC 染色

术后 24 h,取心脏标本进行常规 TTC 染色,可观察到假手术组心脏切片均呈红色(图 3A),但模型组梗死区呈白色,非梗死区呈红色,从结扎位置到心尖,白色梗死区所占面积百分比逐渐增加,靠近心尖的心脏切片几乎全部变白(图 3B)。

2.4 心脏 HE 染色

术后 7 d 心脏 HE 染色可见,假手术组和模型组非梗死区心肌排列整齐、胞质丰富;模型组梗死区心肌排列紊乱,炎症细胞严重浸润,细胞萎缩甚



注:A:假手术组、心梗 24 h、心梗 3 d、心梗 7 d 心脏 M 超代表性图片;B ~ E:与假手术组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ 。(下图/表同)

图 2 术后心动超声变化

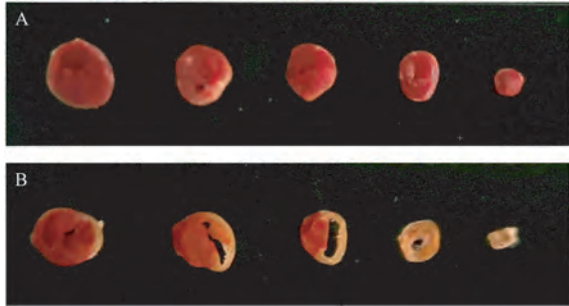
Note. A. Representative images of the cardiac M ultrasound of sham group and model group at 24 h, 3 d and 7 d after surgery. B ~ E. Compared with the sham group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures and tables)

Figure 2 Postoperative echocardiographic changes

表 2 心梗后心动超声指标

Table 2 Echocardiographic indexes after myocardial infarction

指标 Indexes	假手术组 Sham	术后 24 h MI-24 h	术后 3 d MI-3 d	术后 7 d MI-7 d
EF (%)	60.52 ± 7.77	40.72 ± 12.66 **	37.97 ± 9.98 ***	30.64 ± 9.84 ****
FS (%)	28.51 ± 5.57	16.34 ± 7.06 **	15.39 ± 4.63 ***	12.24 ± 4.38 ****
LVEDV (mL)	0.09 ± 0.02	0.12 ± 0.02 **	0.13 ± 0.01 ***	0.21 ± 0.04 ****
LVESV (mL)	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.02 **	0.08 ± 0.02 ****	0.15 ± 0.05 ****
LVIDd (mm)	3.30 ± 0.20	3.63 ± 0.18 **	3.69 ± 0.13 ***	4.38 ± 0.28 ****
LVIDs (mm)	2.36 ± 0.27	3.04 ± 0.36 ***	3.12 ± 0.21 ****	3.86 ± 0.42 ****
LVPWd (mm)	0.68 ± 0.10	0.56 ± 0.13	0.60 ± 0.10	0.58 ± 0.13
LVPWs (mm)	0.98 ± 0.17	0.73 ± 0.17 **	0.75 ± 0.12 **	0.79 ± 0.19



注:A:假手术组;B:模型组术后 24 h。

图 3 心脏 TTC 染色

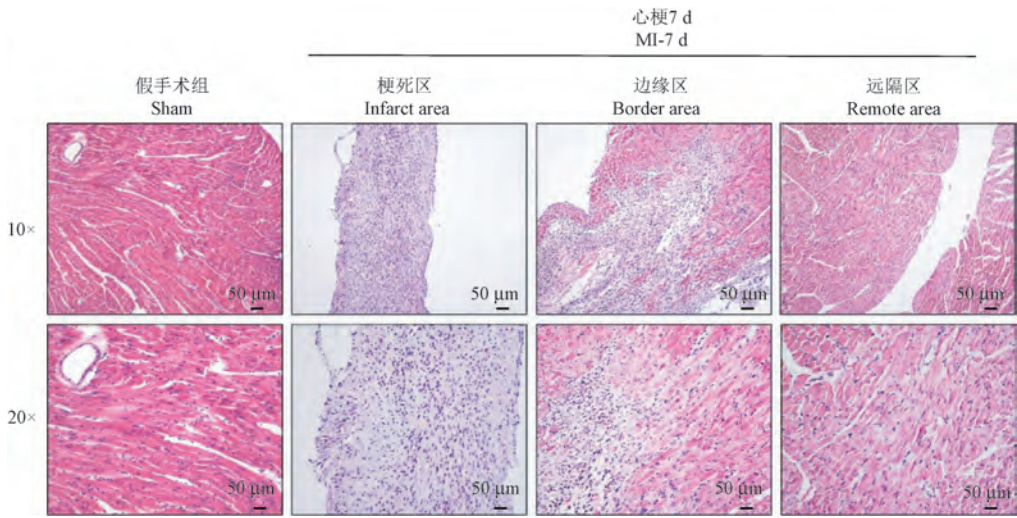
Note. A. Sham group. B. Model group after surgery for 24 h.

Figure 3 Heart TTC staining

至消失,代之以纤维瘢痕组织,左室壁明显变薄;梗死边缘区心肌细胞萎缩,从非梗死区到梗死区,可见心肌细胞从正常到萎缩直至消失的过渡现象,表现为明显的“红蓝交界”(图 4)。

2.5 梗死区炎症和纤维化水平

小鼠心肌梗术后 3 d,心脏梗死区 $\text{TNF-}\alpha$ 和 MCP-1 表达量较假手术组显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 5A),提示心脏梗死区炎症加重。小鼠心肌梗术后 7 d,心脏梗死区 FN 和 COL3A1 表达水平较假手术组明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.001$,图 5B),提示心脏梗死区纤维化程度加重。

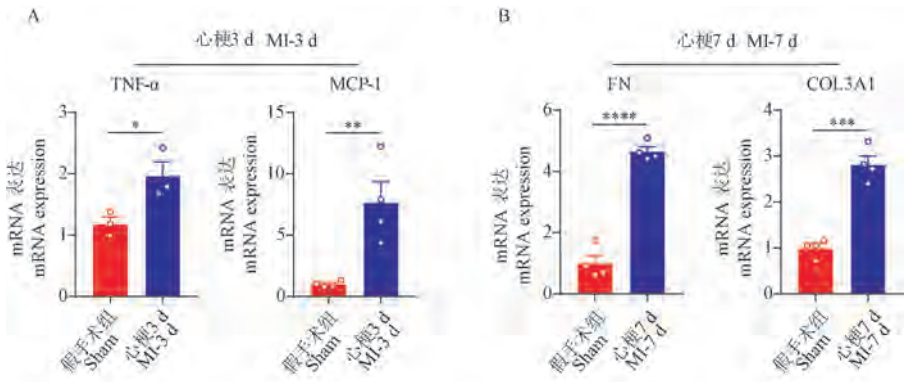


注:假手术组和心梗 7 d 心脏梗死区、边缘区、远隔区心脏 HE 染色 10 倍和 20 倍代表性图片。

图 4 心脏 HE 染色

Note. 10× and 20× representative images of cardiac infarct area, border area, and remote area of the heart HE staining at 7 days after surgery and the sham group.

Figure 4 Heart HE staining



注:A:心梗 3 d $\text{TNF-}\alpha$ 和 MCP-1 mRNA 表达量;B:心梗 7 d FN 和 COL3A1 mRNA 表达量。

图 5 心脏组织炎症和纤维化相关基因表达水平

Note. A. $\text{TNF-}\alpha$ 和 MCP-1 mRNA expression at 3 d after surgery. B. FN 和 COL3A1 mRNA expression at 7 d after surgery.

Figure 5 Expression levels of genes related to inflammation and fibrosis in heart

3 讨论

本研究在以往研究的基础上,对小鼠心梗模型的构建进行了深入的探究和优化,并完善和总结了一套详细和实用的新型心梗模型评价体系,通过形态学、功能学、组织病理学和分子生物学等多种常用手段,为在体心梗动物模型的构建提供了实践经验,为心梗病理生理学机制和临床转化研究提供了动物模型保障和方法学支持。

建立心梗模型的常用方法包括:冠状动脉结扎、介入栓塞、药物诱导、低温损伤等^[9,17]。其中,冠状动脉左前降支结扎最为常用,具体操作又以腹腔麻醉联合机械通气和挤心脏法为主^[14,16],前者需要打开胸腔在显微镜下诱导心肌梗死,创伤大且耗时长;后者由 Gao 等^[16]于 2010 年建立,通过小切口人工暴露,不经插管,因速度快、创伤小、手术死亡率低等优势,被广泛使用^[18-19]。此外,还可通过超声辅助结扎 LCA,但因复杂、实施难度大等问题尚未普及^[20]。在此基础上,本研究基于挤心脏法进行了三点探索和改进:第一,将缝合皮肤放在手术最后,与 Gao 等^[16]报道的心梗模型构建方法中先进行荷包缝合的做法相比,最后缝合可减少术中缝线对操作和视野的影响,且不影响手术成功率,这也提示皮肤缝合速度并非手术失败和小鼠死亡的直接原因,但前提是心脏回纳后胸大肌能完全覆盖肋间隙的创口,使胸腔完全闭合。先前 Andrade 等^[21]报道过用手术夹代替缝合线快速闭合皮肤的做法,此做法之所以能提高手术存活率,可能是因为快速闭合皮肤创口,有助于减少气胸的发生,但快速缝合皮肤并非避免气胸所必须的。第二,向右斜 30°做胸部切口而非右斜 45°,大量实践发现小鼠胸大肌边缘倾斜度通常为右斜 45°左右,做右斜 30°的皮肤切口(或略小于 30°)可与胸大肌边缘形成一定夹角,有利于回纳心脏后胸腔的闭合,减少气胸的发生。第三,可不挤出左心耳,通常心梗造模的结扎位置以左心耳为标准,在其下 2 mm 左右进行结扎,但实践发现左心耳在被挤出胸腔和回纳过程中极易受损出血,导致小鼠死亡,为避免这一现象,可通过练习建立多个心脏参照点进行结扎,术后取材时再观察结扎线与左心耳的距离,以确认结扎位置正确且所有小鼠结扎高度大致相同,有助于提高术中存活率和造模一致性。

此外,本研究在以往研究和实践的基础上,进

一步从多个角度完善了小鼠心梗模型的系统性评估体系。鉴于心梗发生发展的复杂性及其病理生理过程中存在的诸多变化^[6-7,22],心梗模型的评价方法较多,例如:梗死区心肌局部变化、心电图改变和血清肌钙蛋白等心梗标志物检测提示心梗发生;心动超声变化提示梗死后心功能改变^[23-24];MRI、PET/CT 检测心肌活力^[25-26];TTC 染色显示梗死区域;HE 染色及梗死区炎症相关基因检测提示心脏炎症情况;TUNEL 染色及凋亡相关基因检测提示心肌细胞凋亡;Masson 三色染色及纤维化相关基因检测提示心肌修复等。考虑到科学研究的严谨性和全面性,以及操作的可行性和实用性,本研究综合各个方面,选取了其中几种手段,尝试总结出心梗模型的基本评价体系,主要包括四个方面:心脏形态学评估、心脏功能学评估、组织病理学评估和分子生物学评估。第一,术中可以通过肉眼观察结扎后心脏局部变化,若结扎后心尖局部发白,说明结扎成功,但由于术中心脏在体外的时间不能过长,为提高手术成功率,术中观察梗死区发白不是必要的,可以选择术后取材时进行细致观察,且此时的梗死区变白现象一般比术中更明显。此外,还能观察到左室梗死区室壁变薄和炎症组织粘连,且心梗时间越长,室壁越薄,粘连越严重。第二,可运用心动超声检测心梗后心功能,心梗小鼠相对于假手术组而言,左心功能明显下降,一方面直观体现在动态超声图和 M 超中梗死部分心肌活动度下降甚至消失,室壁变薄,室腔变大,提示心肌受损;另一方面体现在左心室各项指标的变化,具体包括:EF、FS 显著下降,LVEDV、LVESV、LVIDd、LVIDs 显著升高。由于心动超声对操作者要求较高,且小鼠个体差异较大,建议每组至少 8 只,以减少误差。第三,组织病理学染色,其中 TTC 染色能明显区分梗死区与非梗死区,可在此基础上对梗死面积进行统计;HE 染色可观察到心梗后梗死区心肌萎缩、炎症浸润和边缘区的“红蓝交界”。第四,分子生物学评估,主要包括术后 3 d 炎症指标的检测和术后 7 d 纤维化指标的检测。通常认为,术后 3 d 内为小鼠心梗急性炎症期^[27-28],术后 7 d 进入修复期^[28-29],通过检测相关基因表达情况可侧面反映心梗严重程度。可检测的炎症指标包括:TNF- α 、MCP-1、IL-1 β 、IL-6 等;可检测的纤维化指标包括:FN、COL3A1、MMP-2/9、Postn、TIMP-1 等。

综上,本研究成功建立了小鼠心梗模型,并通

过一系列手段对其病变特征进行了评估,提出和总结了一套对小鼠心梗模型评价的方法体系,这将有助于研究心梗发生发展及其干预对策。

参 考 文 献(References)

- [1] Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, et al. Heart disease and stroke statistics-2022 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2022, 145(8): e153-e639.
- [2] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018) [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(18): 2231-2264.
- [3] Bhatt DL, Lopes RD, Harrington RA. Diagnosis and treatment of acute coronary syndromes; a review [J]. *JAMA*, 2022, 327(7): 662-675.
- [4] Alfonso F, Gonzalo N, Rivero F, et al. The year in cardiovascular medicine 2020: interventional cardiology [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(10): 985-1003.
- [5] Members WC, Lawton JS, Tamis-Holland JE, et al. 2021 ACC/AHA/SCAI guideline for coronary artery revascularization; executive summary: a report of the American college of cardiology/American heart association joint committee on clinical practice guidelines [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 79(2): 197-215.
- [6] Vogel B, Claessen BE, Arnold SV, et al. ST-segment elevation myocardial infarction [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5: 39.
- [7] Heusch G, Gersh BJ. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(11): 774-784.
- [8] Kornowski R, Orvin K. The clinical challenge of ST-segment elevation myocardial infarction and COVID-19 [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2021, 77(16): 2004-2006.
- [9] Tang YP, Liu Y, Fan YJ, et al. To develop a novel animal model of myocardial infarction; a research imperative [J]. *Animal Model Exp Med*, 2018, 1(1): 36-39.
- [10] Doncheva NT, Palasca O, Yarani R, et al. Human pathways in animal models; possibilities and limitations [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(4): 1859-1871.
- [11] Martin TP, MacDonald EA, Elbassioni AAM, et al. Preclinical models of myocardial infarction: from mechanism to translation [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(5): 770-791.
- [12] De Villiers C, Riley PR. Mouse models of myocardial infarction; comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion [J]. *Dis Model Mech*, 2020, 13(11): dmm046565.
- [13] Lindsey ML, Brunt KR, Kirk JA, et al. Guidelines for *in vivo* mouse models of myocardial infarction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2021, 321(6): H1056-H1073.
- [14] Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1995, 269(6): H2147-H2154.
- [15] Shin HS, Shin HH, Shudo Y. Current status and limitations of myocardial infarction large animal models in cardiovascular translational research [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 673683.
- [16] Gao E, Lei YH, Shang X, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse [J]. *Circ Res*, 2010, 107(12): 1445-1453.
- [17] van den Bos EJ, Mees BME, de Waard MC, et al. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(3): H1291-H1300.
- [18] Snider JC, Riley LA, Mallory NT, et al. Targeting 5-HT_{2B} receptor signaling prevents border zone expansion and improves microstructural remodeling after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2021, 143(13): 1317-1330.
- [19] Gan L, Liu D, Xie D, et al. Ischemic heart-derived small extracellular vesicles impair adipocyte function [J]. *Circ Res*, 2022, 130(1): 48-66.
- [20] Sicklinger F, Zhang Y, Lavine KJ, et al. A minimal-invasive approach for standardized induction of myocardial infarction in mice [J]. *Circ Res*, 2020, 127(9): 1214-1216.
- [21] Andrade JN, Tang J, Hensley MT, et al. Rapid and efficient production of coronary artery ligation and myocardial infarction in mice using surgical clips [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143221.
- [22] Reed GW, Rossi JE, Cannon CP. Acute myocardial infarction [J]. *Lancet*, 2017, 389(10065): 197-210.
- [23] Yang Y, Schena GJ, Wang T, et al. Postsurgery echocardiography can predict the amount of ischemia-reperfusion injury and the resultant scar size [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2021, 320(2): H690-H698.
- [24] Morra S, Pitisci L, Su F, et al. Quantification of cardiac kinetic energy and its changes during transmural myocardial infarction assessed by multi-dimensional seismocardiography [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 603319.
- [25] Jasmin NH, Thin MZ, Johnson RD, et al. Myocardial viability imaging using manganese-enhanced MRI in the first hours after myocardial infarction [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(11): e2003987.
- [26] Sun T, Wei L, Tian H, et al. Novel PET/CT tracers for targeted imaging of membrane receptors to evaluate cardiomyocyte apoptosis and tissue repair process in a rat model of myocardial infarction [J]. *Apoptosis*, 2021, 26(7-8): 460-473.
- [27] Ong SB, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, et al. Inflammation following acute myocardial infarction; multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 73-87.
- [28] Bacmeister L, Schwarzl M, Warnke S, et al. Inflammation and fibrosis in murine models of heart failure [J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(3): 19.
- [29] Jin K, Gao S, Yang P, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the temporal diversity and dynamics of cardiac immunity after myocardial infarction [J]. *Small Methods*, 2022, 6(3): e2100752.

[收稿日期] 2022-05-12

彭小勇,周远群,张紫森,等. 血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠模型建立及其血管功能变化的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 880-886.

Peng XY, Zhou YQ, Zhang ZS, et al. Vascular function in a heterozygous mouse model with conditional knockout of connexin 43 in vascular endothelial cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 880-886.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.002

血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠模型 建立及其血管功能变化的研究

彭小勇¹,周远群¹,张紫森¹,邓蒙生²,雷艳¹,李涛¹,刘良明¹,王建民²,
康建毅²,杨光明^{2*}

(1. 陆军军医大学大坪医院 野战外科研究部,战伤休克与输血研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042;
2. 陆军军医大学大坪医院 野战外科研究部,武器杀伤生物效应评估研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

【摘要】 目的 建立血管内皮细胞连接蛋白 43(connexin 43, Cx43)条件性敲除小鼠模型,并对其血管舒张/收缩功能进行检测。**方法** 将 8 只 Cx43^{flox/flox} 小鼠与 C57BL/6 品系野生型(wild type, WT)小鼠交配,子代小鼠继续与 C57BL/6 小鼠回交 9 代进行基因背景转换;再将 Cx43^{flox/+} 小鼠与血管内皮细胞特异性表达 Tie2-Cre 重组酶小鼠(以下简称 Cre 小鼠)交配,获得 Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 小鼠。利用鼠尾 PCR 试剂盒进行基因型鉴定,Western Blot 法和免疫荧光法检测小鼠肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA)中 Cx43 表达。利用离体张力测定技术检测 SMA 血管舒张/收缩功能,包括去甲肾上腺素诱导的收缩反应性和乙酰胆碱诱导的舒张反应性。**结果** PCR 电泳和血管蛋白表达检测结果证实 Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 小鼠成功构建,肠系膜上动脉中 Cx43 蛋白表达与野生型小鼠相比明显降低($P < 0.01$)。与 WT 小鼠相比,部分敲除血管内皮细胞 Cx43 后使乙酰胆碱诱导的内皮依赖的血管舒张反应性显著降低($P < 0.01$)。**结论** 采用 Cx43^{flox/flox} 小鼠与血管内皮细胞特异性表达 Tie2-Cre 重组酶小鼠成功构建血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠,该小鼠的肠系膜上动脉中 Cx43 表达降低,且舒张反应性明显降低,预期可为研究 Cx43 及其相关结构在血管功能调节中的作用提供动物模型。

【关键词】 血管内皮细胞;连接蛋白 43;基因型鉴定;血管反应性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)07-0880-07

Vascular function in a heterozygous mouse model with conditional knockout of connexin 43 in vascular endothelial cells

PENG Xiaoyong¹, ZHOU Yuanqun¹, ZHANG Zisen¹, DENG Mengsheng², LEI Yan¹, LI Tao¹, LIU Liangming¹,
WANG Jianmin², KANG Jianyi², YANG Guangming^{2*}

(1. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of Shock and Transfusion, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China. 2. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of Weapon Bioeffect Assessment, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042)

Corresponding author: YANG Guangming. E-mail: yanggm971@163.com

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金项目(81801905),国家自然科学基金面上项目(82072164),重庆市基础研究与前沿探索项目(cstc2018jcyjAX0555)。

Funded by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China(81801905), the National Natural Science Foundation for General Program of China(82072164), the Natural Science Foundation of Chongqing(cstc2018jcyjAX0555)。

【作者简介】 彭小勇(1986—),男,硕士,助理研究员,研究方向:战创伤休克心血管功能变化。Email:pxyp2016@163.com

【通信作者】 杨光明(1979—),男,博士,副研究员,研究方向:战创伤器官功能损害机理及防治研究。Email:yanggm971@163.com

【Abstract】 Objective To establish an endothelial conditional connexin 43 (Cx43)-knockout mouse model and use it to examine vascular relaxation/constriction. **Methods** Eight Cx43^{fllox/fllox} mice were crossed with C57BL/6 wild type (WT) mice and the offspring were backcrossed with C57BL/6 mice. This backcross process was repeated nine times, after which the Cx43^{fllox/+} mice were crossed with vascular endothelial-cell-specific Tie2-Cre recombinase mice to obtain Tie2-Cre/Cx43^{fllox/+} mice. The genotype was confirmed by mouse tail direct polymerase chain reaction (PCR). Expression of Cx43 in the superior mesenteric artery (SMA) was measured by Western Blot and immunofluorescence. SMA rings were used to measure vascular relaxation and the contractile response to acetylcholine (ACh) and norepinephrine. **Results** Tie2-Cre/Cx43^{fllox/+} offspring were obtained and identified by PCR, Western Blot and immunofluorescence. Cx43 expression and ACh-induced endothelium-dependent relaxation reactivity of the SMA were significantly decreased in Tie2-Cre/Cx43^{fllox/+} mice compared with WT mice ($P < 0.01$). **Conclusions** A mouse model with endothelium-specific Cx43-knockout was successfully established by intercrossing Tie2-Cre mice with Cx43^{fllox/fllox} mice. Cx43 expression in vascular tissues and the relaxation reactivity of SMA were decreased by conditional Cx43 knockout. These mice may thus provide an animal model for studying the link between Cx43 and vascular function.

【Keywords】 vascular endothelial cell; connexin 43; genotyping; vascular reactivity

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

连接蛋白 (connexin, Cx) 属于一种跨膜蛋白, 能在细胞膜上寡聚形成半通道, 该通道是细胞间连接和交流的重要结构, 并且具有调节环磷酸腺苷、钙离子以及三磷酸肌醇等小分子进出细胞的功能。根据其相对分子质量大小, 连接蛋白命名为 Cx26~Cx56^[1-3]。研究显示, 连接蛋白在心血管系统中有大量表达并且发挥重要的作用, 包括参与血管张力、血管生成以及心脏发育的调控等。心血管系统表达的连接蛋白主要有 Cx37、Cx40、Cx43 以及 Cx45, 其中, Cx43 在心血管系统中的作用受到广泛关注^[4-5]。为了深入研究 Cx43 在哺乳动物中的作用, Reaume 等^[6]首先利用基因编辑技术(先敲除胚胎干细胞中的 Cx43, 然后注射至 C57 小鼠胚囊中)构建了 Cx43 的杂合子敲除小鼠, 随后 Htet 等^[7]用该小鼠证实了 Cx43 在肺血管舒张反应性调节中发挥重要作用。但是这种方法获得的是全身性广泛敲除 Cx43 的小鼠模型, 由于 Cx43 在多个器官组织都有广泛分布且发挥不同的作用, 这种广泛敲除模型用于对特定组织器官的研究中具有一定的局限性。而目前有关血管特异性 Cx43 敲除小鼠模型构建及其功能研究的报道尚少。为此, 本研究采用 Cx43^{fllox/fllox} 小鼠、血管内皮细胞特异性表达 Tie2-Cre 重组酶小鼠以及 C57BL/6 品系野生型小鼠, 构建血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠(本研究未构建血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 纯合子小鼠的原因在于纯合子小鼠发育缓慢、出生后不久即死亡, 我们在下文结果与讨论中进行了叙述), 并通过 PCR 鉴定基因组 DNA、Western Blot 和免疫荧光染色检测血管 Cx43 表达等方法进行验证, 然后检测野

生型和血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠肠系膜上动脉 (superior mesenteric artery, SMA) 的血管反应性(包括收缩和舒张反应性)。希望为深入研究 Cx43 在血管功能中的作用提供更合适的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 只(雌雄各半)SPF 级 Cx43^{fllox/fllox} 小鼠购自美国 Jackson 实验室(动物检疫合格证号: 1611A14822), 2 只雄性 SPF 级 Tie2-Cre 重组酶小鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司(原南京大学-南京生物医药研究院)【SCXK(苏)2020-0004】, C57BL/6 小鼠由陆军特色医学中心实验动物中心提供, 均饲养于陆军特色医学中心实验动物中心 SPF 级动物饲养环境【SYXK(军)2017-0026】, 【SYXK(军)2017-0058】, 饲养期间自由饮水饮食。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 湿度恒定(40%~70%), 温度控制在 22~24℃。所有操作均符合陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会要求(AMUWEC2020034)。野生型和 Cx43 敲除杂合子小鼠各 10 只, 8~12 周龄, 体重 20~25 g, 实验时用 0.03% 的戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔麻醉, 处死后取血管进行后续实验。

1.1.2 主要试剂与仪器

鼠尾检测试剂盒(包括 DNA 提取试剂和 PCR 试剂)购自美国 Bimake 公司; 克-亨氏 (Krebs-Henseleit, K-H) 液自配, 配制所需药品均购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 去甲肾上腺素购

自远大医药(中国)有限公司,乙酰胆碱购自生工生物工程(上海)股份有限公司;蛋白提取液(RIPA)购自美国 MCE 公司,Cx43 一抗购自美国 Sigma 公司,山羊抗兔和抗小鼠荧光二抗购自美国 Jackson Immuno Research 公司,磷酸盐缓冲液(PBS)粉剂购自中杉金桥生物技术有限公司,免疫荧光二抗购自美国 CST 公司,DAPI 购自英国 abcam 公司。

PCR 仪(Bio-Rad,美国),双色红外成像激光系统(LI-COR,美国),石蜡切片机(Leica,德国),激光共聚焦显微镜(Leica,德国),微血管张力测定仪(AD Instrument,澳大利亚)。

1.2 方法

1.2.1 敲基因小鼠模型构建

Cx43^{flox/flox} 小鼠遗传背景转换:将 2 只雌性 Cx43^{flox/flox} 小鼠与 1 只雄性 C57BL/6 小鼠合笼饲养,得到 F1 子代小鼠,然后对所有子代小鼠基因型进行鉴定,选出基因型为 Cx43^{flox/+} 的 F1 小鼠作为亲本,待其性成熟后按雌:雄 = 2:1 的比例继续与新的 C57BL/6 小鼠合笼进行回交,得到 F2 子代小鼠,选出基因型为 Cx43^{flox/+} 的子代作为亲本进行回交,依次回交 9 次。选择基因型为 Cx43^{flox/+} 的 F10 不同性别小鼠进行互交,再选择基因型为 Cx43^{flox/+} 或者 Cx43^{flox/flox} 与 Cre 小鼠交配可获得 Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 小鼠^[8]。

1.2.2 基因型鉴定

小鼠出生后 2~3 周进行编号,并取 2 mm 长的鼠尾鉴定。将鼠尾放入 1.5 mL EP 管中按照试剂盒说明书按比例加入 DNA 提取液,放入 55℃ 水浴锅中 30 min,然后 95℃ 干浴 10 min 待用。Flox 引物:上游引物序列 5'-CTTTGACTCTGATTACAGAGC TTAA-3',下游引物序列 5'-GTCTCACTGTTACTT AACAGCTTGA-3';Tie2-Cre 引物:上游引物序列 5'-GCCTGCATTACCGGTCGATGC-3',下游引物序列 5'-CAGGGTGTATAAGCAATCCC-3'。反应体系均为 20 μL:2 × M-PCR Mix 10 μL,上游引物(10 μmol/L)1 μL,下游引物(10 μmol/L)1 μL,无酶水 6 μL,模板 DNA 2 μL。反应条件按照购买实验室提供的程序设置,Flox:94℃ 2 min;(94℃ 20 s,65℃ 15 s,每个循环降 0.5℃,68℃ 10 s)×10 循环;(94℃ 15 s,60℃ 15 s,72℃ 10 s)×28 循环,72℃ 2 min。Cre:95℃ 5 min;(95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s)×30 循环,72℃ 5 min。扩增结束后用 1.5%的

琼脂糖凝胶进行电泳(上样量为 10 μL),根据电泳结果来鉴定小鼠基因型。

1.2.3 Western Blot 法检测 Cx43 蛋白在 SMA 中表达

取小鼠 SMA 放入匀浆器中,加入预冷的含蛋白酶抑制剂 RIPA,研磨后在冰上裂解 30 min 后离心(12 000 r/min,15 min,4℃),取上清后加上样缓冲液,100℃ 干浴 5 min 使蛋白变性;然后制备 10% SDS-PAGE 分离胶,上样量每孔为 30 μg。Cx43(1:5000)和 β-actin(1:7000)使用一抗稀释液进行稀释,二抗为山羊抗兔和抗小鼠(1:10000)。用双色红外成像激光系统扫描,获得 Cx43 的蛋白表达图像。用 Quantity One 分析软件读取各组荧光值,并以 β-actin 作为内参计算相对表达量^[9]。对来源于不同个体的野生型和小鼠的血管组织样本进行检测,实验重复 3 次,对各组相对表达量进行统计学分析。

1.2.4 免疫荧光法检测 Cx43 蛋白在 SMA 中表达

快速取小鼠 SMA 放入冰的 4%多聚甲醛固定 24 h,然后用梯度浓度乙醇脱水,经石蜡包埋后切片,再经脱蜡、水化及抗原修复;用 0.3% TritonX-100 破膜 3 min,加 0.1%牛血清白蛋白室温封闭 2 h,然后孵育 Cx43 一抗(1:500)过夜;次日加二抗(Alexa Fluor 488,1:200)37℃ 孵育 2 h,DAPI 染核后再加抗淬灭封片剂封片,最后用共聚焦显微镜观察^[10]。

1.2.5 小鼠 SMA 血管舒张/收缩功能检测

取小鼠 SMA 制备血管环,并将其挂于盛有 K-H 液的恒温器官灌流槽。每 30 min 更换 1 次 K-H 液,更换 4 次后加入高钾溶液诱导血管预收缩,待收缩达到平台期后再换 K-H 液稳定 30 min,然后向恒温槽中依次加入去甲肾上腺素(NE,终浓度为 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L),待收缩达到平台期后向恒温槽中依次加入乙酰胆碱(ACh,终浓度为 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L)。读取加高钾溶液前的基础张力值为 T₁、高钾液刺激后血管环收缩达到平台期的张力值为 T₂,加 NE 前的基础张力值为 T₁'、加 NE 后血管环收缩达到平台期的张力值为 T₂'、加 ACh 后血管环舒张达到平台期的张力值为 T₃,分别采用最大收缩张力和舒张率来反映收缩和舒张反应性,血管收缩反应性 = (T₂' - T₁') / (T₂ - T₁) × 100%;血管舒张反应性 = (T₂' - T₃) / (T₂' - T₁') × 100%^[11-12]。

1.3 统计学分析

用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析,实验数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验比较两组之间的差异。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定

基因组中 Flox 纯合电泳结果为 580 bp 条带,杂合则为 580 bp 和 490 bp 双条带,野生型则为 490 bp 条带;Tie2-Cre 阳性电泳结果为 481 bp,阴性则无条带^[13]。图 1A 中编号 1~6 是同窝小鼠,1、2、3、4 号是 Tie2-Cre 阳性小鼠;2、3、5、6 号是 Cx43^{flox/flox} 小鼠。综合结果表明,2 号和 3 号是 Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} 小鼠。图 1B 中编号 7~12 是同窝小鼠:11 和 12 号是 Tie2-Cre 阳性小鼠;8 和 11 号是 Cx43^{flox/+} 小鼠。综合结果表明,11 号是 Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 小鼠。后续实验以同样的鉴定筛选方式,由于 Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} 纯合子小鼠发育缓慢、出生后不久即死亡,选取同窝中的野生型和杂合子敲

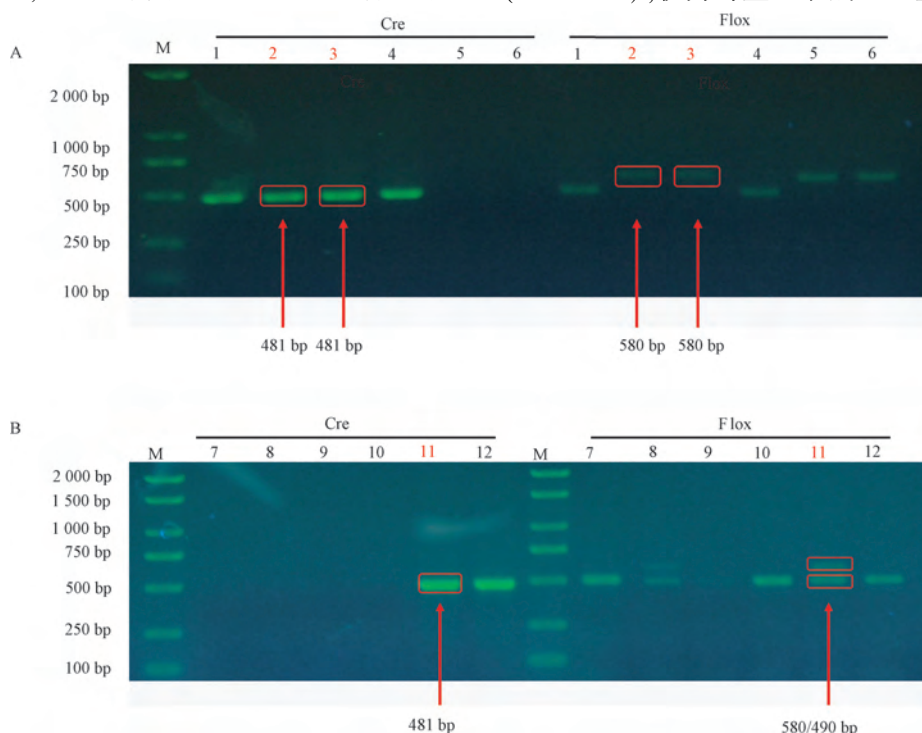
除型小鼠进行后续实验。

2.2 血管内皮 Cx43 敲除小鼠蛋白表达验证

图 2A 中 Western Blot 结果显示,Cx43 敲除杂合子小鼠 SMA 中 Cx43 蛋白表达水平明显降低,与野生型小鼠比较差异有显著性($P < 0.01$)。图 2B、2C 中免疫荧光结果显示,野生型小鼠 SMA 管腔内皮面 Cx43 连续表达,而 Cx43 敲除杂合子小鼠 SMA 管腔内皮面 Cx43 表达降低,连续性变差并出现断裂和缺失,与野生型小鼠比较明显降低。

2.3 敲除 Cx43 后对小鼠 SMA 血管舒张/收缩功能的影响

图 3A 为野生型和 Cx43 敲除杂合子小鼠 SMA 的代表性收缩/舒张曲线,图 3B 的血管收缩功能检测的统计结果显示,血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠 SMA 对 NE 诱导的收缩反应性与野生型小鼠相比无明显差异。而图 3C 的血管舒张功能检测的统计结果显示,Cx43 敲除杂合子小鼠 SMA 对 ACh 诱导的内皮依赖性的舒张反应性显著降低($P < 0.01$),仅为野生型小鼠 10%左右。

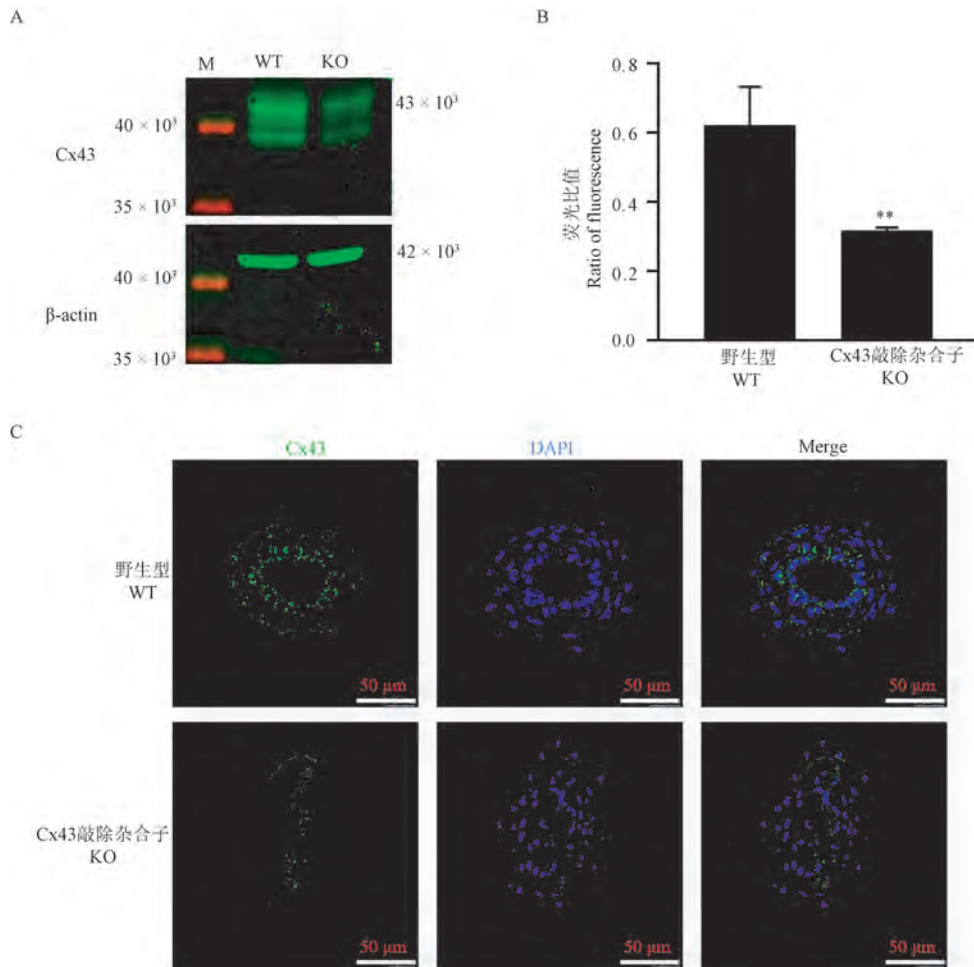


注:M:Marker (biomed, BM2000 或 BM2000⁺); A: Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} 小鼠鉴定图(1~6 为同窝小鼠的编号,其中,2 号和 3 号是 Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} 小鼠); B: Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 小鼠鉴定图(7~12 为同窝小鼠的编号,其中,11 号是 Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 小鼠)。

图 1 小鼠基因型的鉴定结果

Note. M. Marker (biomed, BM2000 or BM2000⁺). A. Identification of the genotype of Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} mice (1~6. The number of mice littermates, 2 and 3 are Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} mice). B. Identification of the genotype of Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} mice (7~12. The number of mice littermates, 11 is a Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} mouse).

Figure 1 Identification of the genotype of offspring mice

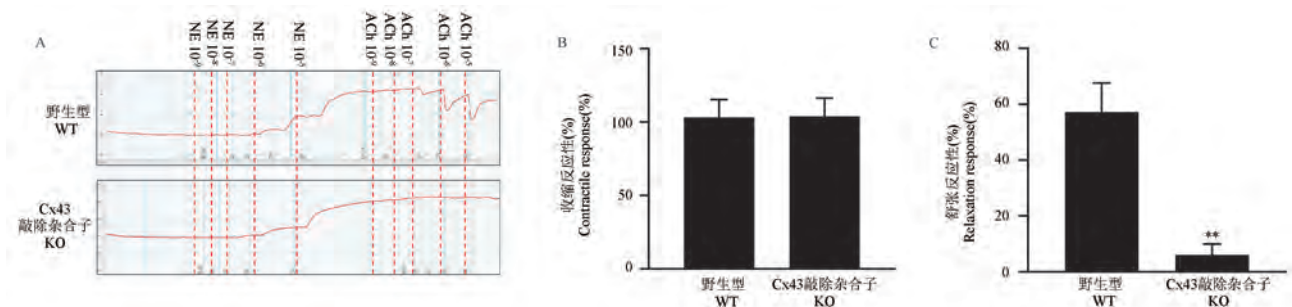


注: M: Marker (Thermo scientific, 26616); WT: 野生型; KO: Cx43 敲除杂合子; A: Western Blot 检测 SMA 中 Cx43 的表达; B: 荧光比值的统计图; 与野生型相比, ** $P < 0.01$; C: IF 检测 SMA 中 Cx43 的表达。

图 2 验证 Cx43 敲除杂合子小鼠 SMA 中 Cx43 的表达情况 ($n=3$)

Note. M. Marker (Thermo scientific, 26616). WT. Wild type mice. KO. Heterozygous Cx43 knockout mice. A. Expression of Cx43 in SMA detected by Western Blot. B. Statistical plot of fluorescent ratio. Compared with WT group, ** $P < 0.01$. C. Expression of Cx43 in SMA detected by IF.

Figure 2 Verification of Cx43 in SMA in heterozygous Cx43 knockout mice ($n=3$)



注: WT: 野生型; KO: Cx43 敲除杂合子; A: 代表性血管收缩/舒张曲线; B: 血管收缩反应性的统计图; C: 血管舒张反应性的统计图; 与野生型相比, ** $P < 0.01$ 。

图 3 敲除 Cx43 后对小鼠 SMA 血管舒张/收缩功能的影响 ($n=8$)

Note. WT. Wild type mice. KO. Heterozygous Cx43 knockout mice. A. Representative curve of vascular relaxation/constriction. B. Statistical plot of contractile response. C. Statistical plot of relaxation reactivity. Compared with WT group, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Effect of Cx43 knockout on the vascular relaxation/constriction of SMA ($n=8$)

3 讨论

近年来国内外研究表明,血管中连接蛋白 43 (Cx43) 的表达变化及其构成的缝隙连接通道与多种血管疾病(如高血压、动脉粥样硬化等)的发生发展密切相关^[14-16],但是其具体作用机制仍不十分清楚。血管平滑肌细胞和内皮细胞是构成血管的主要细胞,它们之间的相互调节是血管病理生理研究的重要内容。因此,构建血管平滑肌细胞或内皮细胞特异性敲除 Cx43 的动物模型对深入研究 Cx43 在血管功能中的作用机制具有重要意义。血管反应性(包括收缩和舒张反应性)是指在生理或病理条件下,器官毛细血管或中小动脉通过收缩或舒张调节器官血流量,以维持器官血流稳定、适应器官功能变化的能力,是反映血管舒缩功能以及血管储备功能的重要指标^[17-18]。血管平滑肌细胞或内皮细胞之间的缝隙连接通道所传导的信号能协调血管的收缩和舒张^[19]。

连接蛋白(connexin, Cx)属于高度保守的膜蛋白,可通过形成缝隙连接通道参与细胞内外及细胞间的物质信息交流(包括直接的电和化学交流等),进而调节细胞的增殖、分化及凋亡等多种病理生理反应^[20]。有研究显示,在哺乳动物中发现的连接蛋白有 21 种,心血管系统中表达的连接蛋白主要有 Cx43、Cx40、Cx37 以及 Cx45,其中, Cx43 因其在心血管系统中的重要作用而受到关注,它在血管平滑肌细胞与血管内皮细胞中都有分布^[19]。既往对广泛性敲除 Cx43 的杂合子小鼠的研究显示,乙酰胆碱诱导的肺血管舒张反应性与野生型小鼠比较明显降低^[7]。

Cre-loxP 重组系统目前是敲除效率相对较高、应用较广的一种位点特异性的条件性基因打靶系统。该系统是通过两类小鼠来获得条件性基因敲除小鼠模型,一类是基因锚定的 flox 小鼠(各种目的基因同源重组引入 loxP 位点),另一类是 Cre 重组酶转基因小鼠(各种组织/细胞特异性或可诱导调控表达 Cre 重组酶)^[21]。本研究将 Cx43^{flox/flox} 小鼠与血管内皮细胞特异性表达 Tie2-Cre 重组酶小鼠进行交配,先通过基因组 DNA 鉴定,筛选出血管内皮细胞 Cx43 敲除的杂合子小鼠,然后进一步验证 Cx43 在血管中的蛋白表达,并初步探讨了特异性敲除 Cx43 对血管舒缩功能的影响。研究结果显示,血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠肠系膜上

动脉中 Cx43 蛋白表达水平与野生型小鼠比较明显降低,其舒张反应性与野生型小鼠比较显著降低。本研究在早期实验中拟建立血管内皮特异性敲除 Cx43 的纯合子小鼠模型,但在实验过程中发现,虽然能够繁殖获得 Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} 纯合子小鼠,但其发育缓慢、体型与体重均明显不如同阶段其他基因型小鼠,并且均在 4~5 周内死亡。我们推测其可能原因在于 Cx43 在多种脏器(尤其是大脑与心血管系统)的发育与功能调节中起重要作用^[22],尽管我们采用了血管特异性的 Cre 小鼠进行杂交,但由于不是诱导型的 Cre 小鼠,仍然可能出现 Cx43 纯合子小鼠发生重要器官的发育畸形和功能异常的情况,这就导致纯合子小鼠在胚胎期或者出生后不久就会死亡。我们下一步拟采用诱导型的 Tie2-Cre 小鼠进行繁殖,以获得血管特异性敲除 Cx43 的纯合子小鼠模型。此外,基因组测序在研究中越来越受到人们的关注,具有高分辨率、结果精确等优点。我们拟在下一步研究中进一步完善对 Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 杂合子小鼠和其他基因型小鼠的测序检测实验,以更精确证明小鼠模型结果的正确性。

综上所述,本研究完成了血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠的构建并进行鉴定,对 Cx43 敲除的杂合子小鼠血管功能的研究也证实了 Cx43 在血管功能调节中的重要作用,尤其是对血管内皮依赖性的舒张功能的调节作用,可为深入研究 Cx43 在血管功能调节中的作用与机制提供较好的动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Martin PE, Evans WH. Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions [J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(2): 378-387.
- [2] Figueroa XF, Duling BR. Gap junctions in the control of vascular function [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(2): 251-266.
- [3] Morel S. Multiple roles of connexins in atherosclerosis-and restenosis-induced vascular remodelling [J]. J Vasc Res, 2014, 51(2): 149-161.
- [4] Johnstone S, Isakson B, Locke D. Biological and biophysical properties of vascular connexin channels [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2009, 278(3): 69-118.
- [5] Simon AM, Goodenough DA. Diverse functions of vertebrate gap junctions [J]. Trends Cell Biol, 1998, 8(12): 477-483.
- [6] Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43 [J]. Science, 1995, 267(5205): 1831-1834.
- [7] Htet M, Nally JE, Shaw A, et al. Connexin 43 plays a role in pulmonary vascular reactivity in mice [J]. Int J Mol Sci, 2018,

- 19(7): 1891-1911.
- [8] 吴玲玲, 朱晗玉, 洪权, 等. Mxi1 基因敲除小鼠遗传背景的背景转换研究 [J]. 军事医学, 2016, 40(6): 488-490, 511.
- Wu LL, Zhu HY, Hong Q, et al. Genetic background transformation in Mxi1 gene knockout mice [J]. Mil Med Sci, 2016, 40(6): 488-490, 511.
- [9] 龚姗, 李弘, 刘叶倩, 等. 复方七苜降压片对 TNF- α 诱导的与平滑肌细胞共培养的血管内皮细胞中炎症因子与 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 733-741.
- Gong S, Li H, Liu YQ, et al. Effects of compound Qishao Jiangya tablet on inflammatory factor, AP-1 and MCP-1 in vascular endothelial cells stimulated with TNF- α and co-cultured with smooth muscle cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 733-741.
- [10] Zheng D, Zhang J, Zhang Z, et al. Endothelial microvesicles induce pulmonary vascular leakage and lung injury during Sepsis [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 643.
- [11] 彭小勇, 周海军, 李涛, 等. 钙敏感性受体抑制剂 Calhex231 对创伤失血性休克大鼠的保护作用 [J]. 中华创伤杂志, 2018, 34(6): 555-561.
- Peng XY, Zhou HJ, Li T, et al. Protective effect of calcium-sensing receptor inhibitor Calhex231 Oil traumatic hemorrhagic shock rats [J]. Chin J Trauma, 2018, 34(6): 555-561.
- [12] 彭小勇, 李涛, 刘良明, 等. CaSR 在大鼠血管收缩/舒张反应性调节中的作用 [J]. 局解手术学杂志, 2016, 25(9): 629-632.
- Peng XY, Li T, Liu LM, et al. Effects of CaSR on vascular relaxation /constriction in rats [J]. J Reg Anat Oper Surg, 2016, 25(9): 629-632.
- [13] 黄艺滢, 张文龙, 石柱英, 等. 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA4) 敲除和人源化小鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 307-315.
- Huang YY, Zhang WL, Shi GY, et al. Establishment of CTLA4-knockout mice and CTLA4-humanized mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 307-315.
- [14] 吴立哈, 巫相宏, 闭奇, 等. PPAR- γ 激动剂干预 TLR4/PI3K 通路对脂多糖诱导人冠状动脉血管内皮细胞 Cx43 表达的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(6): 1124-1128.
- Wu LH, Wu XH, Bi Q, et al. Effect of PPAR- γ agonist on Cx43 expression in LPS-induced human coronary artery endothelial cells by regulating TLR4/PI3K pathway [J]. J Guangxi Med Univ, 2021, 38(6): 1124-1128.
- [15] 汪小英, 余艳荣, 王美玲, 等. 吴茱萸次碱抑制 Ang II 诱导的血管平滑肌 Cx43 表达上调 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(8): 1139-1145.
- Wang XY, Yu YR, Wang ML, et al. Rutaecarpine prevents up-regulation of Cx43 in vascular smooth muscle cells induced by angiotension II [J]. Chin Pharmacol Bull, 2018, 34(8): 1139-1145.
- [16] 吴亚辉, 乔梁, 林洪启. 基于 Cx43/mito-KATP 信号轴观察右美托咪定预处理对大鼠离体缺血再灌注心脏的保护机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 76-84.
- Wu YH, Qiao L, Lin HQ. The protective mechanism of dexmedetomidine preconditioning on ischemia-reperfusion of the isolated rat heart uses the connexin43/mito-KATP signaling axis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 76-84.
- [17] Wszedybyl-Winklewska M, Wolf J, Szarmach A, et al. Central sympathetic nervous system reinforcement in obstructive sleep apnoea [J]. Sleep Med Rev, 2018, 39(3): 143-154.
- [18] Bhogal AA, Philippens ME, Siero JC, et al. Examining the regional and cerebral depth-dependent BOLD cerebrovascular reactivity response at 7T [J]. Neuroimage, 2015, 114(8): 239-248.
- [19] 于学军, 何作云. 缝隙连接在血管内皮细胞和平滑肌细胞间信号传递的研究进展 [J]. 重庆医学, 2010, 39(11): 1448-1450.
- Yu XJ, He ZY. Research of gap junction in signal transmission between vascular endothelial cells and smooth muscle cells [J]. Chongqing Med, 2010, 39(11): 1448-1450.
- [20] 付艳琪, 伍宇思, 罗丹. Cx43 在血管平滑肌及血管重构中的研究进展 [J]. 重庆医科大学学报, 2016, 41(12): 1254-1257.
- Fu YQ, Wu YS, Luo D. Research of Cx43 in vascular smooth muscle and vascular remodeling [J]. J Chongqing Med Univ, 2016, 41(12): 1254-1257.
- [21] Ling YH, Ma JX, Qi XL, et al. Novel rat model of multiple mitochondrial dysfunction syndromes (MMDS) complicated with cardiomyopathy [J]. Anim Mod Exp Med, 2021, 4(4): 381-390.
- [22] 李行, 景雅, 李云华, 等. Cx43 敲除小鼠胚胎心脏流出道内第二生心区和心脏神经嵴来源间充质细胞减少 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(13): 2018-2024.
- Li H, Jing Y, Li YH, et al. A downtrend of mesenchymal cells derived from the second heart field and cardiac neural crest in the outflow tract of Cx43 knockout embryonic mouse heart [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2021, 25(13): 2018-2024.

[收稿日期] 2022-05-24

高占,高明周,高冬梅,等. 基于数据挖掘的围绝经期抑郁症动物模型研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 887-896.
Gao Z, Gao MZ, Gao DM, et al. Animal model of perimenopausal depressive disorder based on data mining [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 887-896.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.003

基于数据挖掘的围绝经期抑郁症动物模型研究

高占¹,高明周²,高冬梅¹,王常麟¹,乔明琦³,高杰^{1*},王杰琼^{4*}

(1. 山东中医药大学 中医学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学 中医药创新研究院, 济南 250355;
3. 山东中医药大学 中医基础理论研究所, 济南 250355; 4. 山东中医药大学 药学院, 济南 250355)

【摘要】 目的 综述围绝经期抑郁症动物模型制备方法及其评价指标,包括动物选择、卵巢摘除手术、CUMS 刺激因子使用情况、造模和治疗起始时间选择、行为学检测等。**方法** 收集 CNKI 和 PubMed 从建库到 2022 年 5 月期间关于围绝经期抑郁症动物模型的所有文献,依据纳入排除标准,筛选文献,提取相关信息,汇总信息、绘画图表。**结果** 共纳入 88 篇文献,中文文献 71 篇,英文文献 17 篇;大鼠模型 65 篇,小鼠模型 23 篇。造模方法多采用“OVX+CUMS”和“OVX+CUMS+孤养”。大鼠(OVX)宜选择 SD 品系,90~120 d 鼠龄,体重在 200 g 以上;小鼠宜选择 KM 品系,20 g 左右;76%的研究选取 7~8 种刺激因子,每天随机 1~2 种且 3~7 d 内不重复出现,推荐选用禁食、禁水、夹尾、冰水游泳、昼夜颠倒;依据行为学结果进行分组的方式可减少实验鼠个体差异对实验的影响;阴道涂片一般开始于 OVX 手术后 3 d,连续检测 5 d;89%的研究选择“治疗与造模同时进行”或“造模结束后进行治疗”,造模与治疗时长宜保持一致,一般为 21 d 或 28 d;阳性对照药多选取氟西汀或氟西汀结合雌激素;行为学实验多选用旷场实验、糖水偏好实验以及强迫游泳实验。**结论** 本文筛选出应用最广泛的围绝经期抑郁症模型制备方法和评价指标,描述了造模过程的具体细节,有助于提高围绝经期抑郁症动物模型制备的可重复性。

【关键词】 围绝经期抑郁症;数据挖掘;卵巢摘除;慢性不可预见刺激;刺激因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 07-0887-10

Animal model of perimenopausal depressive disorder based on data mining

GAO Zhan¹, GAO Mingzhou², GAO Dongmei¹, WANG Changlin¹, QIAO Mingqi³, GAO Jie^{1*}, WANG Jieqiong^{4*}

(1. Chinese Medicine College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China. 2. Institute of Traditional Chinese Medicine Innovation, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355.
3. Lab of Traditional Chinese Medicine Classical Theory, Ministry of Education, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355. 4. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355)
Corresponding author: GAO Jie. E-mail: jiegaosdutcm@163.com; WANG Jieqiong. E-mail: jieqiong2016@126.com

【基金项目】 国家科学技术部科技重大新药创制专项(2017ZX09301064),国家自然科学基金青年基金(82204958),山东省自然科学基金重点项目(ZR2020ZD17),山东省自然科学基金(ZR2021MH125),山东省医药卫生科技发展计划项目(202105010467),山东省大学生科研项目(22SSR113),山东中医药大学情志病证研究科研创新团队、山东中医药大学情志病证肝藏象药理青年科研创新团队的特别资助。

Funded by Special Project for the Creation of Major New Drugs in Science and Technology of the Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China (2017ZX09301064), National Natural Science Foundation of China (82204958), Key Project of Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020ZD17), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021MH125), Shandong Medical and Health Science and Technology Development Plan Project (202105010467), Shandong University Student Research Project (22SSR113), Special Support from the Research and Innovation Team of Emotional Disease and Syndrome of Shandong University of Traditional Chinese Medicine and the Young Research and Innovation Team of Liver Zang Xiang Pharmacology of Emotional Disease and Syndrome of Shandong University of Traditional Chinese Medicine.

【作者简介】 高占(1998—),男,硕士研究生,研究方向:肝藏象病机与调肝方药作用机制。Email: 1151712376@qq.com

【通信作者】 高杰(1974—),女,教授,博士,研究方向:肝藏象病机与调肝方药作用机制。Email: jiegaosdutcm@163.com;

王杰琼(1982—),女,副教授,博士,研究方向:中药药理学及情志病调肝方药药理研究,中药调肝方药药效物质基础及疗效机制研究。Email: jieqiong2016@126.com。

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To review the method used to prepare and evaluate animal models of perimenopausal depression, including animal selection, ovariectomy (OVX), chronic unpredictable mild stress (CUMS) stimulator use, modeling and treatment start time and behavioral testing. **Methods** We searched the CNKI and PubMed databases for studies of animal models of perimenopausal depression from the establishment of the databases to May 2022. Studies were screened according to defined inclusion and exclusion criteria, the relevant information was extracted and summarized, and charts were drawn. **Results** A total of 88 articles were identified, including 71 Chinese and 17 English articles. There were 65 rat models and 23 mouse models. The modeling method were OVX+CUMS and OVX+CUMS+solitary culture. Most studies in rats used SD rats (OVX), aged 90 ~ 120 days and weighing > 200 g; most studies in mice used KM mice, weighing about 20 g; 76% of the studies selected seven or eight stimulators, one or two of which were selected randomly each day and were not repeated within 3~7 days, with fasting, water deprivation, tail clipping, ice-water swimming, and day night reversal recommended method of simulation. Grouping according to behavioral result reduced the influence of individual differences. Vaginal smears were generally started 3 days after OVX and repeated for 5 days; 89% of the studies chose “treatment and modeling at the same time” or “treatment after modeling”, and modeling and treatment should be consistent, generally 21 or 28 days. Positive control drugs included fluoxetine or fluoxetine combined with estrogen. The most common behavioral experiments were open field, sugar preference, and forced swimming experiments. **Conclusions** We reviewed the most widely used preparation method and evaluation indicators for animal models of perimenopausal depression, including details of the modeling processes, to improve the repeatability of preparing animal models of perimenopausal depression.

【Keywords】 perimenopausal depressive disorder; data mining; ovariectomy; chronic unforeseen stimuli; stimulating factor

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

抑郁症是一类高发病率、高自杀率、高复发率的情感障碍性精神疾病,为危害人类健康的第二大疾病^[1-2]。临床上,女性患抑郁症的概率约为男性两倍;同为女性,围绝经期妇女患抑郁症的比例更高^[3-5]。当前,围绝经期抑郁症(perimenopausal depressive disorder, PDD)机制尚未明确,其治疗手段少且疗效有限,亟需研发新的治疗药物,而可靠的动物模型是药物研发过程中不可或缺的一环。啮齿类动物与人类基因组结构、解剖学结构、情绪等方面相似,且成本低、易操作,因此大多数动物实验的造模动物选用雌性大、小鼠,主要造模方法为“自然围绝经期结合慢性不可预见刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)”、“卵巢摘除(ovariectomy, OVX)结合慢性不可预见刺激”^[6]和“OVX+CUMS”结合孤养法^[7],造模方法诸多环节尚不统一,亟待解决。

本文通过检索 CNKI 和 PubMed 数据库获取相关文献资料,从造模动物选择、卵巢摘除手术、CUMS 刺激因子、造模和治疗起始时间选择、行为学检测方面进行归纳总结,筛选出应用最广泛的造模方法,为 PDD 动物模型制备提供参考。

1 材料与方法

1.1 文献检索

检索 CNKI 和 PubMed 数据库,收集从建库至 2022 年 5 月内有关“围绝经期抑郁症动物”的文献。检索方法均为高级检索,CNKI 的检索策略为(SU% = “围绝经期” OR SU% = “更年期”) AND(SU% = “抑郁症” OR SU% = “抑郁” OR SU% = “肝郁” OR SU% = “抑郁样行为”) AND (SU % = “大鼠” OR SU% = “小鼠”);PubMed 的检索策略见表 1。

1.2 方法

1.2.1 文献纳入标准

(1)关于围绝经期抑郁症动物模型的实验性文献;(2)造模时长和刺激因子等信息完整的文献。

1.2.2 文献排除标准

(1)剔除抑郁症合并其他疾病或症状(围绝经期综合征)的文献;(2)剔除会议论文、科技成果、临床试验、综述类型的文献;(3)剔除重复文献;(4)剔除无法获取全文的文献。

表 1 PubMed 的文献检索策略

Table 1 Search strategy of PubMed database	
编号 No	搜索项目 Search items
#1	围绝经期 (题目/摘要) Perimenopause (title/abstract)
#2	更年期 (题目/摘要) Menopause (title/abstract)
#3	更年期 (题目/摘要) Climacteric (title/abstract)
#4	#1 或 #2 或 #3 #1 or #2 or #3
#5	抑郁症 (题目/摘要) Depressive disorder (title/abstract)
#6	抑郁症 (题目/摘要) Depression (title/abstract)
#7	抑郁行为 (题目/摘要) Depressive behavior (title/abstract)
#8	#5 或 #6 或 #7 #5 or #6 or #7
#9	大鼠 (题目/摘要) Rat (title/abstract)
#10	小鼠 (题目/摘要) Mice (title/abstract)
#11	#9 或 #10 #9 or #10
#12	#4 和 #8 和 #11 #4 and #8 and #11

1.3 文献筛选流程与资料提取内容

根据文献纳入与排除标准,两位研究者独立筛选文献,并提取纳入文献信息,若遇到意见不统一,则进行相互讨论或寻求第三方意见。

2 结果

2.1 相关文献发表情况

本研究共纳入 88 篇(中文 71 篇,英文 17 篇)围绝经期抑郁症动物模型文献,其中大鼠模型 65 篇,小鼠模型 23 篇(图 1)。在 2008 年,文献发表数量呈波动式上升,其中 2017 年发表文献最多,之后逐渐趋于平稳(图 2)。

2.2 模型建立的调查结果

2.2.1 造模方法及模型动物的选择

数据挖掘结果显示:PDD 动物模型制备主要有 7 种方法,分别为“OVX+CUMS”^[8](55,62.5%)、“OVX+CUMS+孤养”^[9](21,23.9%)、“自然围绝经期+CUMS”^[10](5,5.7%)、“自然围绝经期+CUMS+孤养”^[11](4,4.6%)、“OVX+冰水刺激”^[12](1,1.1%)、“OVX+CUMS+睡眠剥夺”^[13](1,1.1%)、“OVX+慢性束缚应激”^[14](1,1.1%)。

在大、小鼠的选择上,73.9%的研究选择了大鼠,只有 26.1%的研究选择了小鼠。在大鼠品系的选择上,84.7%的研究选用了 SD 品系,15.4%的研究选用了 Wistar 品系。SD 大鼠是远交系封闭群白色大鼠,是学习记忆损伤实验研究的首选对象,能够更好地模拟人们面临各种压力所产生的抑郁状态,使模型更贴合抑郁症患者的病情^[15]。采用 OVX 法的大鼠一般选取 90~120 d,自然围绝经期的鼠龄选取 12~14 月龄;且大鼠体重均在 200 g 以上。对于小鼠品系的选择,除个别研究选用 ICR^[16](4,17.4%)和 C57BL/6^[17](6,26%)品系,其余研究均采用 KM(13,56.5%)品系,所有研究均未提及鼠龄,将体重限制在 20 g 左右。

2.2.2 卵巢摘除手术

研究表明:大(小)鼠双侧卵巢摘除后,体内卵巢源性雌激素的供应量大幅下降,能够很好模拟人类围绝经期激素变化,是制备围绝经期的常用方法

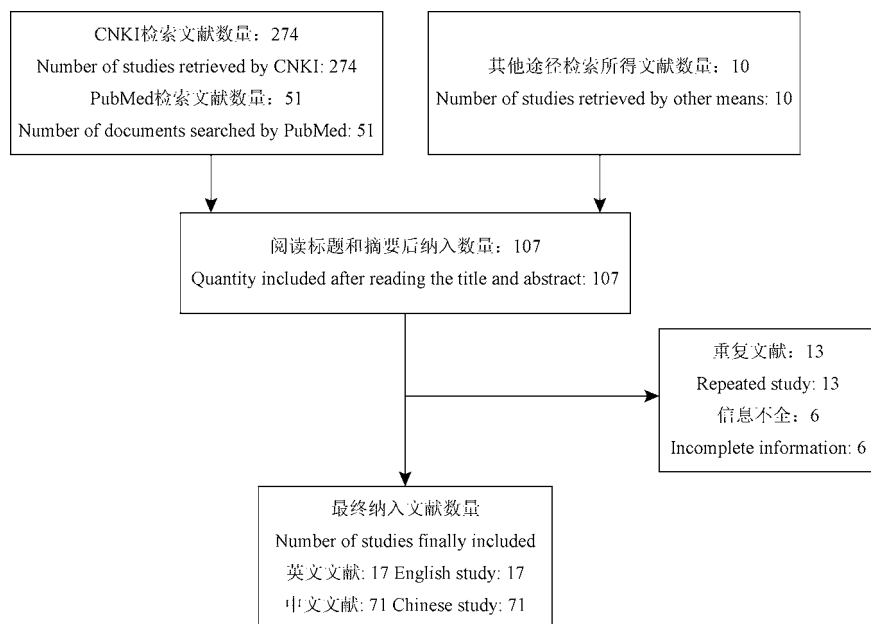


图 1 文献筛选流程图

Figure 1 Flow chart of literature screening

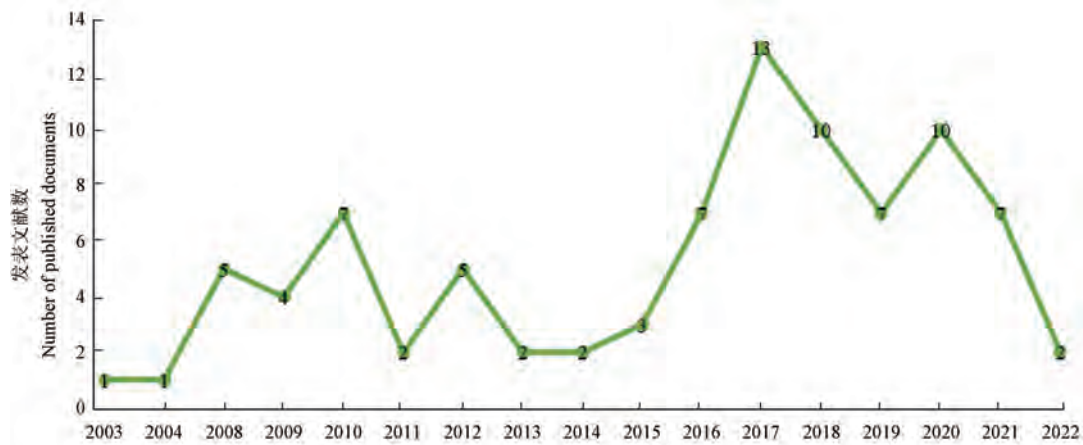


图2 PDD 动物模型相关文献按年份的分布情况

Figure 2 Distribution of PDD animal model related literature by year

之一^[6]。大(小)鼠进入实验室,适应喂养 1 周后进行 OVX,分组方式如图 3A 所示。通过夹捏脚趾的方法判断麻醉是否成功,当实验鼠无任何反应后,方可进行 OVX^[18]。OVX 后应用阴道涂片法判断去势是否成功,一般在手术后 3、5 或 7 d 开始进行阴道涂片检测,少数研究在手术后 1 d 或 6 d 进行(图 3B);检测天数一般为 5 d 或 7 d,少数研究检测 10 d(图 3C),当未检测出动情反应,即围绝经期模型制备成功^[19]。

2.2.3 CUMS 刺激因子的选择与使用情况

CUMS 造模是指反复无规律地给予大(小)鼠一系列外界刺激,这些刺激的多变性和不可预知性使该模型更接近人类每天面对的应激^[20]。

从图 4A 可见,53%的研究选择了 7 种刺激因子。使用刺激因子最少的是 5 种^[21],最多是 12

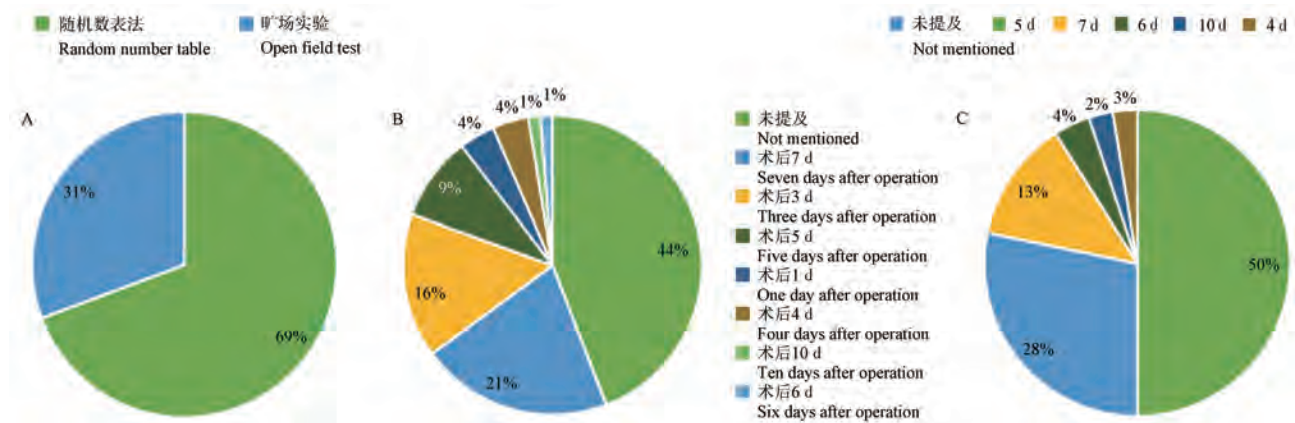
种^[17]。大多数研究每天随机抽取 1 种刺激因子^[22],每种刺激因子间隔 3~7 d^[23]。纳入文献中共涉及 16 种刺激因子,使用频率超过 50%的分别是禁食、禁水、夹尾、冰水游泳、昼夜颠倒(图 4B)。

(1) 饮食和饮水供应的调整

禁食、禁水、空瓶因操作简单,刺激效果明显,成为最常用的因子。通过归纳整理发现,禁食有单独禁食(66.7%)和禁食禁水同时进行(33.3%)两种类型;禁水有单独禁水(66.3%)和禁食禁水同时进行(33.7%)两种类型。单独禁食刺激时长以 24 h(46.4%)和 48 h(30.4%)多见。单独禁水的刺激时长以 24 h(79.2%)多见。禁食禁水的刺激时长以 24 h(71.4%)多见^[24]。空瓶刺激在禁水之后使用,是为了使动物更加饥渴和绝望,一般刺激时长为 1 h。

(2) 居住环境的改变

居住环境的改变包括鼠笼倾斜、潮湿垫料、鼠



注:A:分组方式;B:阴道涂片开始时间;C:阴道涂片检测天数。

图3 模型鼠分组及阴道涂片使用情况

Note. A. Grouping method. B. Start time of vaginal smear. C. Vaginal smear test days.

Figure 3 Grouping of model rats and use of vaginal smears

笼水平晃动、噪声、气味刺激、拥挤居住、无垫料、换笼、引入垫料。鼠笼倾斜也是常用因子之一,大多数研究倾斜角度为 45° ,少数研究为 30° [16,25],刺激时长多为 24 h,少数研究选择 12 h [26]。潮湿垫料(即在垫料上晒水,直至浸润),刺激时长多为 24 h,少数为 20 h [21]。有些实验将鼠笼倾斜与潮湿垫料同时使用,刺激时长为 24 h [27-28]。鼠笼水平晃动通过机器或手动使实验鼠达到不能站稳的程度,刺激时长多为 15 min [29];机器一般频率为 160 Hz,刺激时长为 5 min [30]。噪声刺激一般采用白噪声和超声,刺激时长为 2~4 h [25-26]。气味刺激是将樟脑丸等气味性强的物体放入鼠笼,刺激时长多为 12 h [31]。拥挤居住是将 2~5 只实验鼠放置同一鼠笼中,刺激时长为 2~3 h。无垫料的刺激时长为 18 h。换笼是改变居住环境的方法之一,刺激时长为 8 h。

(3) 昼夜节律的重新调整及光照性质改变

昼夜节律改变包括昼夜颠倒和夜间持续光照 [9,32]。频闪即光线有一定的闪动频率,一般为 120 beat/min [9],时长为 4 h [26],提及此刺激因子的文献较少,不具参考意义。

(4) 温度调整

温度变化包括冰水游泳、热应激。冰水游泳的温度一般为 4°C [33],部分小鼠实验采用 $8\sim 10^\circ\text{C}$ [16],刺激时长均为 5 min [34]。热应激是将实验鼠放入高温的烘箱或水中,一般温度为 45°C ,刺激时长为 5 min [35-36];有些实验温度为 30°C ,刺激时长为 20 min [16]。

(5) 其余刺激方式

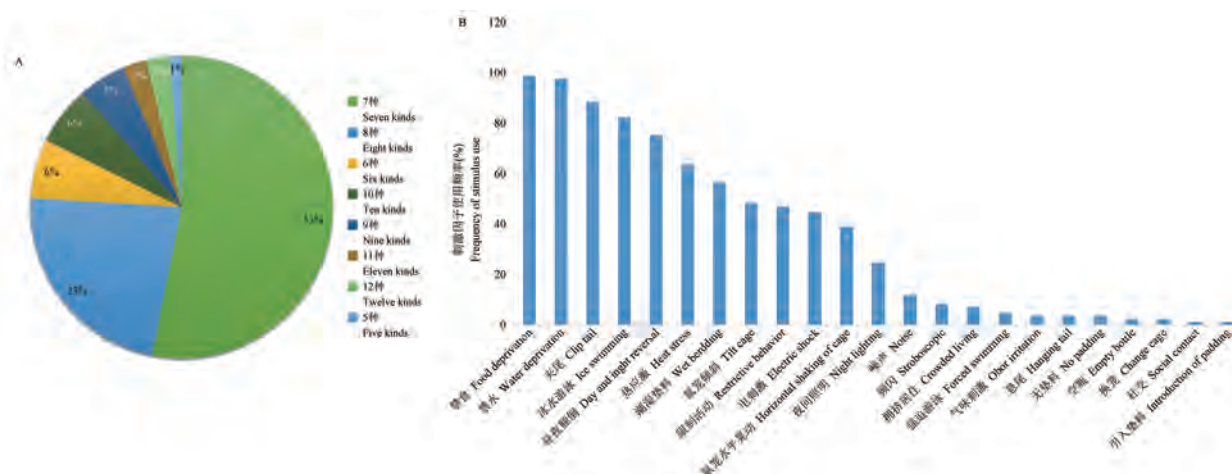
夹尾是指用夹子或者是止血钳一类物品夹在距离尾根 1 cm 处,实验鼠刚发出哀叫声为最佳 [37],刺激时长一般为 1~3 min [38]。束缚即通过束缚桶、塑料桶等物品限制实验鼠活动,刺激时长为 1~8 h。电击一般是电击实验鼠足底,选用 36 V 或 1 mA 交流电,每隔 1 min 刺激 1 次,持续 10 s,共 30 次 [29]。强迫游泳、悬尾和社交等刺激因子的操作同行为学实验。

2.2.4 造模时长及治疗情况

如图 5A 所示,CUMS 造模时长最短为 14 d [39],最长为 35 d [40],应用最广泛的是 21 d [30]。在验证疗效文献中,治疗时间多选择“与造模同时开始”或“造模结束后”(图 5B);治疗时长最短为 5 d [41],最长为 35 d [40],应用最广泛的是 21 或 28 d (图 5C);一般将盐酸氯米帕明、氟西汀、氟西汀结合雌激素设为阳性对照药(图 5D)。综合上述结果发现,推荐后续研究采用“造模时长为 21 d,治疗与造模同时开始,治疗时长为 28 d”模式或“造模时长为 21 d,造模结束后进行治疗,治疗时长 28 d”模式。

2.3 PDD 动物模型行为学评价

行为学主要评价实验动物与临床抑郁症标准相关的表现,如情绪低落、快感缺乏、绝望等 [42]。数据挖掘发现,旷场实验、糖水偏好实验、强迫游泳实验是最常用的抑郁症行为学检测方法(图 6)。旷场实验是基于探索的行为学检测方法,抑郁程度越高的大(小)鼠野外活动越少,其主要观

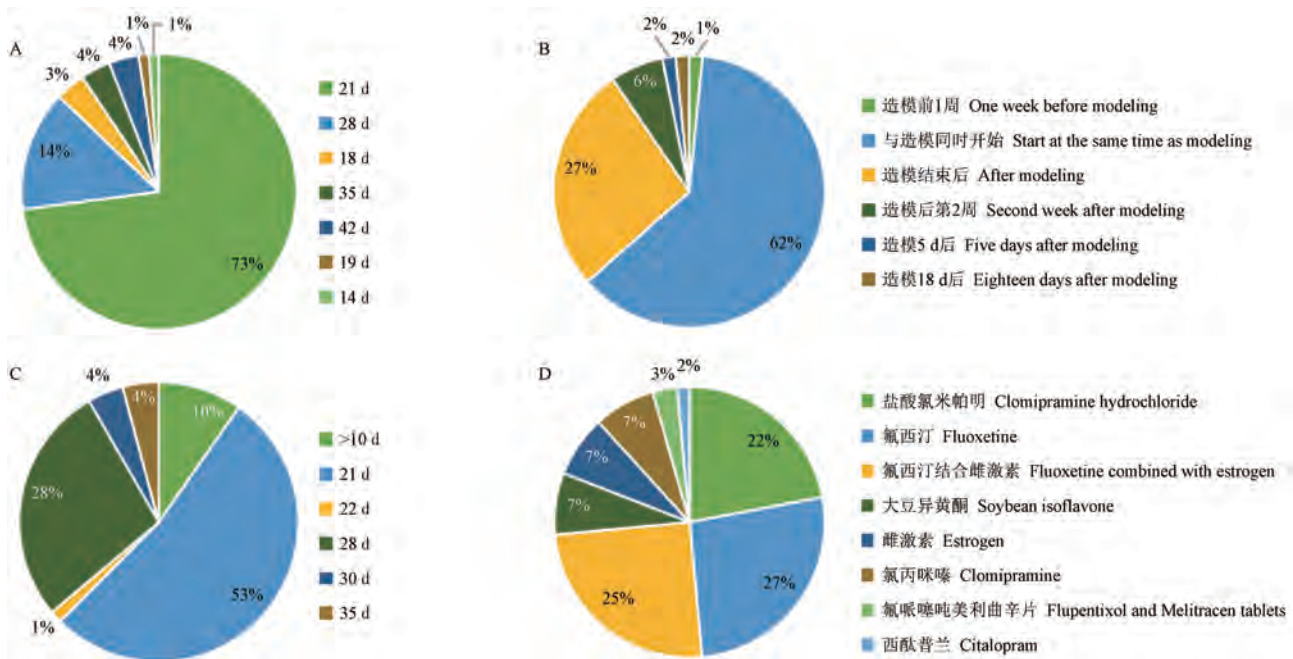


注:A: CUMS 中刺激因子使用量;B: 刺激因子使用频率。

图 4 CUMS 刺激因子的选择与使用情况

Note. A. Amount of stimulant used in CUMS. B. Frequency of stimulus use.

Figure 4 Selection and use of stimulating factors



注:A:造模时长;B:治疗开始时间;C:治疗时长;D:阳性对照药的选择。

图5 造模时长及治疗情况

Note. A. Molding time. B. Treatment start time. C. Treatment duration. D. Selection of positive control drugs.

Figure 5 Duration of modeling and treatment

察指标为运动距离、站立次数、进入中央区的次数和时间以及不动时间^[43-44]。糖水偏好实验是基于奖赏的行为学检测方法,其抑郁程度越高摄入糖水量越少^[43]。强迫游泳实验和悬尾实验是基于绝望的行为学检测方法,抑郁程度越高的大(小)鼠不动时间越长^[45]。

2.4 PDD 动物模型评价指标

通过对相关文献归纳整理,PDD 动物模型制备评价指标包括表观指标、生化指标和病理学指标^[6]。

2.4.1 表观指标

围绝经期制备成功的表观:不出现动情期反应;皮毛色黄、无光泽,毛发易脱落。

抑郁症制备成功的表观:呈现抑郁状态;体重减轻,食欲减退;参考旷场实验、糖水偏好实验、强迫游泳实验的检测结果。

2.4.2 生化指标

血清中雌二醇、黄体生成素、促卵泡素的含量是判别围绝经期的关键生化指标。模型制备成功后,雌二醇水平下降,黄体生成素和促卵泡素的水平上升。

血清和抑郁症发病关键脑区(海马)中多巴胺、去甲肾上腺素、五羟色胺、促性腺激素释放激素的

含量是判别抑郁症的关键生化指标。模型制备成功后多巴胺、去甲肾上腺素、五羟色胺的水平下降,促性腺激素释放激素水平升高。同时通过检测五羟吲哚乙酸、单胺氧化酶、色氨酸羟化酶的含量以及表达进行验证^[44]。

2.4.3 病理学指标

采用 HE 染色法,观察与围绝经期抑郁症相关的下丘脑、海马、前额叶皮质、垂体、胸腺、脾、肾上腺组织形态、子宫的病理变化。模型制备成功后,下丘脑、海马、前额叶皮质的神经细胞明显减少,包浆固缩,神经突触减少,胶质细胞固缩;腺垂体的组织细胞包浆减少,80%以上细胞核固缩,20%细胞嗜酸性变;神经垂体组织明显空泡状,赫令氏体 100%固缩或部分消失;胸腺皮质厚度变薄及皮质淋巴细胞个数显著减少;脾小结明显缩小,淋巴细胞显著减少,脾脏功能下降;肾上腺髓质消失,球状带呈条索状,束状带和网状带多数细胞呈现大小不一空泡变,部分细胞呈现萎缩状态;子宫萎缩,子宫内膜厚度降低^[6,44]。

采用尼氏染色法观察海马和前额叶神经细胞及尼氏小体形态结构。模型制备成功后,海马和前额叶中神经细胞数目减少,神经细胞胞浆内尼氏小体总面积、积分光密度和平均黑度均降低^[27,34]。

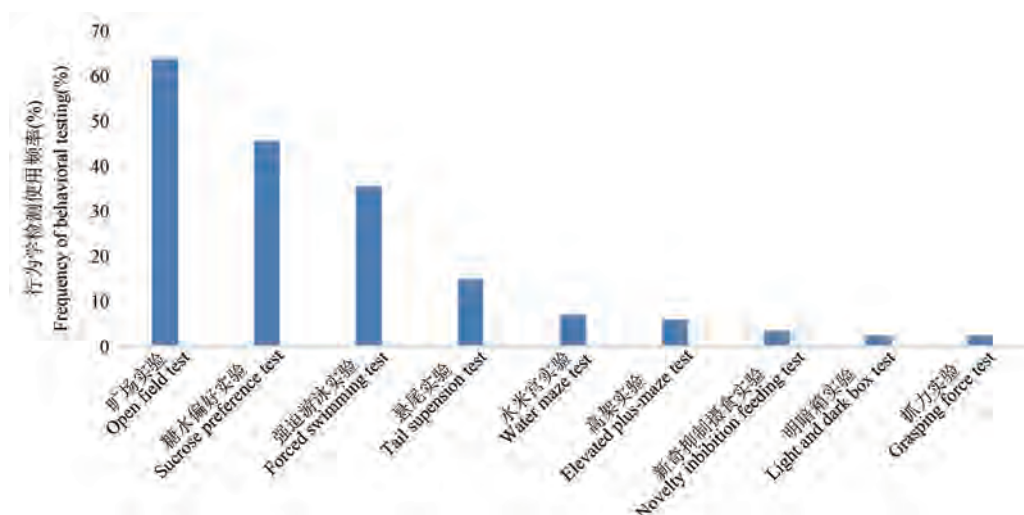


图 6 PDD 行为学测试使用频率分布图

Figure 6 Frequency distribution of PDD behavioral test

3 讨论

疾病动物模型制备是疾病机制研究和药物研发过程中不可或缺的一环,可靠的动物模型能更好贴合疾病的临床特征和生理指标,同时具有稳定性和可重复性^[45]。虽然 PDD 动物模型制备方法逐渐趋于成熟,但 PDD 动物模型重复性差,主要源于 CUMS 方法复杂多样^[46]。本文综述了有关 PDD 模型动物选择、造模和治疗起始时间选择时长及治疗情况、卵巢摘除手术、CUMS 刺激因子使用情况、行为学检测等模型制备与评价的细节,优化模型制备过程中的各个细节,以期提高 PDD 动物模型制备的重复性。

造模优化建议如下:(1)模型动物选择:对于大鼠,选择 SD 大鼠,卵巢摘除手术的大鼠一般选取 90~120 d,因为成熟雌性大鼠的鼠龄为 65~75 d^[47],所以卵巢摘除手术的鼠龄选择 10 周龄以上最佳,体重 200 g 以上;对于小鼠,KM 小鼠的使用频率明显高于 C57BL/6 和 ICR,若无特殊要求可以选取 KM 小鼠,20 g 左右;(2)造模方法:“OVX+CUMS”和“OVX+CUMS+孤养”使用频率高于其他造模方法,且造模成功率高,建议优先考虑这两种造模方法;(3)造模分组:为减少实验鼠个体差异对实验的影响,应基于行为学结果进行分组;(4)卵巢摘除手术:阴道涂片开始时间和检测天数需结合大(小)鼠术后恢复情况而定,“OVX 3 d 后开始阴道涂片检测,连续检测 5 d”的形式较为常见,但不要盲目选择,要视实验情况而定;(5)CUMS 刺激因子使用情

况:为保证刺激因子的可变性和不可预知性,刺激因子最好选 7~10 种,保证每天有 1~2 种且 3~7 d 内不重复;(6)造模时长及治疗情况:造模时长选取 21 或 28 d 比较合适;治疗开始时间选取“与造模同时开始”或“造模结束后”,治疗时长一般为 21 或 28 d,尽量使造模时长和治疗时长保持一致,阳性对照药可选取氟西汀或氟西汀结合雌激素;(7)行为学检测:大(小)鼠行为学检测首先要考虑旷场实验、糖水偏好实验和强迫游泳实验,其他行为学实验根据实验需求选取。

本研究通过文献梳理及数据分析,对 PDD 动物模型的制备与评价进行整理比较,总结了常用的 PDD 动物模型造模方式及检测指标。以期本文可以为广大研究者日后建立更加经济易行、成模率更高且更符合发病机理的动物模型提供参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] 尚立芝,李耀洋,谢文英,等. 抗抑郁仲景方药的作用机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(24): 25-32.
Shang LZ, Li YY, Xie WY, et al. Research progress on action mechanism of antidepressant Zhongjing prescription [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(24): 25-32.
- [2] 罗卓慧,庞硕,张连峰. 常见精神疾病的大、小鼠遗传模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 119-126.
Luo ZH, Pang S, Zhang LF. Research progress on genetic models of common mental diseases in rats and mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 119-126.
- [3] Willi J, Ehlert U. Symptoms assessed in studies on perimenopausal depression: A narrative review [J]. Sex Reprod

- Healthc, 2020, 26: 100559.
- [4] Stickel S, Wagels L, Wudarczyk O, et al. Neural correlates of depression in women across the reproductive lifespan-an fMRI review [J]. J Affect Disord, 2019, 246: 556-570.
- [5] Gordon JL, Eisenlohr-Moul TA, Rubinow DR, et al. Naturally occurring changes in estradiol concentrations in the menopause transition predict morning cortisol and negative mood in perimenopausal depression [J]. Clin Psychol Sci, 2016, 4(5): 919-935.
- [6] 苗明三, 曹利华, 苗艳艳, 等. 围绝经期抑郁症动物模型制备规范(草案) [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 3124-3128.
- Miao MS, Cao LH, Miao YY, et al. Preparation specification of animal model of perimenopausal depression (Draft) [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(7): 3124-3128.
- [7] 徐雪娇, 李天英, 马慧瑄, 等. 抑郁症动物模型概述 [J]. 医学综述, 2021, 27(7): 1345-1349.
- Xu XJ, Li TY, Ma YY, et al. Overview of animal models of depression [J]. Med Recapitul, 2021, 27(7): 1345-1349.
- [8] 蒋希荣, 任路. 电针疗法对围绝经期抑郁症模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴及 β -内啡肽的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(8): 1923-1925.
- Jiang XR, Ren L. Effects of Electroacupuncture on hypothalamic pituitary adrenal axis and its function in perimenopausal depression model rats β -effects of endorphins [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2016, 34(8): 1923-1925.
- [9] 李丽丽, 朱红梅. 柴郁地仙方对围绝经期抑郁症模型大鼠行为学及 HPG 轴的影响 [J]. 中医药通报, 2016, 15(5): 64-66.
- Li LL, Zhu HM. Effects of Chaiyu Dixian Recipe on behavior and HPG axis in perimenopausal depression model rats [J]. Tradit Chin Med J, 2016, 15(5): 64-66.
- [10] 王晓滨, 王秀霞, 丛慧芳, 等. 坤宁安对围绝经期抑郁大鼠模型大鼠行为的影响 [J]. 中国药物评价, 2012, 29(2): 118-119.
- Wang XB, Wang XX, Cong HF, et al. Effect of Kunningan on behavior of perimenopausal depression rat model [J]. Chin J Drug Eval, 2012, 29(2): 118-119.
- [11] 山书玲, 焦河玲, 范迎, 等. 二仙益坤汤对围绝经期抑郁模型大鼠生殖激素及 5-HT 受体 mRNA 表达的影响 [J]. 南阳理工学院学报, 2017, 9(2): 120-124.
- Shan SL, Jiao HL, Fan Y, et al. Effect of Erxian Yikun Decoction on reproductive hormone and 5-HT receptor mRNA expression in perimenopausal depression model rats [J]. J Nanyang Inst Technol, 2017, 9(2): 120-124.
- [12] 宋林, 李琬琛, 李宏峰, 等. 养血柔肝针法加减对围绝经期抑郁症小鼠雌激素水平的影响 [J]. 职业与健康, 2021, 37(7): 902-904.
- Song L, Li WC, Li HF, et al. Effect of blood nourishing and liver softening acupuncture on estrogen level in perimenopausal depression mice [J]. Occup Health, 2021, 37(7): 902-904.
- [13] 夏先锋, 刘庆义, 李敏, 等. 围绝经期抑郁小鼠模型的建立及评估 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2018, 27(7): 655-660.
- Xia XF, Liu QY, Li M, et al. Establishment and evaluation of perimenopausal depression mouse model [J]. Chin J Behav Med Brain Sci, 2018, 27(7): 655-660.
- [14] 张猛, 彭飞飞, 程应湘, 等. 星状神经节阻滞改善更年期大鼠抑郁行为及加速清除脑内损伤相关模式分子 [J]. 临床麻醉学杂志, 2021, 37(7): 747-751.
- Zhang M, Peng FF, Cheng YX, et al. Stellate ganglion block improves depressive behavior and accelerates the clearance of model molecules related to brain injury in climacteric rats [J]. Clin Anesthesiol, 2021, 37(7): 747-751.
- [15] 温小雨, 孙玉浩, 李卓娴, 等. 不同品系大、小鼠抑郁症模型研究进展 [J]. 海南医学院学报, 2021, 12(1): 1-15.
- Wen XY, Sun YH, Li ZX, et al. Research progress of depression models in different strains of rats and mice [J]. J Hainan Med Univ, 2021, 12(1): 1-15.
- [16] Zhang L, Li J, Chen Q, et al. Erxian decoction, a famous chinese medicine formula, ameliorate depression-like behavior in perimenopausal mice [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2021, 21(12): 2203-2212.
- [17] Amin N, Xie S, Tan X, et al. Optimized integration of fluoxetine and 7, 8-dihydroxyflavone as an efficient therapy for reversing depressive-like behavior in mice during the perimenopausal period [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2020, 101: 109939.
- [18] 苗明三, 田硕, 辛卫云, 等. 围绝经期综合征动物模型制备规范(草案) [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 996-1000.
- Miao MS, Tian S, Xin WY, et al. Preparation specification of perimenopausal syndrome animal model (Draft) [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(3): 996-1000.
- [19] 周歆. “肾脑相济”电针疗法激活 PDD 模型大鼠 BMSCs-Exo 脑靶向作用的机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2020.
- Zhou X. Study on the mechanism of “kidney brain combination” electroacupuncture activating BMSCs exo brain targeting in PDD model rats [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2020.
- [20] Antoniuk S, Bijata M, Ponimaskin E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 99: 101-116.
- [21] 张彦丽, 张景景, 叶松山. 更郁方对更年期抑郁症大鼠甘丙肽及性激素含量的影响 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(2): 79-81.
- Zhang YL, Zhang JJ, Ye SS. Effects of gengyu recipe on galanin and sex hormone contents in climacteric depression rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2015, 31(2): 79-81.
- [22] 蒋希荣, 任路, 毛亮. 以“肾脑相济”理论为指导的电针疗法对围绝经期抑郁症模型大鼠行为学及下丘脑-垂体-肾上腺影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(8): 1752-1754.

- Jiang XR, Ren L, Mao L. Effects of electroacupuncture guided by the theory of “kidney brain combination” on behavior and hypothalamus pituitary adrenal gland of perimenopausal depression model rats [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2016, 43(8): 1752–1754.
- [23] Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS [J]. Neuropsychobiology, 2005, 52(2): 90–110.
- [24] 邓雪, 任路. 以肾脑相济理论为指导的电针疗法对围绝经期抑郁症大鼠海马 Notch 通路的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(3): 595–601.
- Deng X, Ren L. Effect of electroacupuncture guided by the theory of kidney brain combination on Notch pathway in hippocampus of perimenopausal depression rats [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2017, 44(3): 595–601.
- [25] Li J, He P, Zhang J, et al. Orcinol glucoside improves the depressive-like behaviors of perimenopausal depression mice through modulating activity of hypothalamic-pituitary-adrenal/ovary axis and activating BDNF-TrkB-CREB signaling pathway [J]. Phytother Res, 2021, 35(10): 5795–5807.
- [26] Zhang K, Wang Z, Pan X, et al. Antidepressant-like effects of Xiaochaihutang in perimenopausal mice [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 248: 112318.
- [27] 荆秦, 林卉, 任路. “肾脑相济”电针疗法对围绝经期抑郁症大鼠海马 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(6): 1347–1350.
- Jing Q, Lin H, Ren L. Effect of “kidney brain combination” electroacupuncture on Wnt in hippocampus of perimenopausal depression rats/ β -influence of catenin signal pathway [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2018, 36(6): 1347–1350.
- [28] 皇甫伟玲, 任路, 林卉. “肾脑相济”电针疗法对围绝经期抑郁症模型大鼠海马及其内环境影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(7): 31–34.
- HuangFu WL, Ren L, Lin H. Effects of “kidney brain combination” electroacupuncture on hippocampus and its internal environment of perimenopausal depression model rats [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2018, 20(7): 31–34.
- [29] 周胜红, 孙付军, 陈忠, 等. 补肾针刺法对围绝经期抑郁模型大鼠单胺类神经递质含量的调节 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(9): 2299–2301.
- Zhou SH, Sun FJ, Chen Z, et al. Regulation of Bushen acupuncture on monoamine neurotransmitter content in perimenopausal depression model rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2015, 26(9): 2299–2301.
- [30] Wang T, Miao M, Li Y, et al. Effect of cynomorium flavonoids on morphology of perimenopausal depression mice model [J]. Saudi Pharm J, 2016, 24(3): 322–328.
- [31] 李杉杉, 刘新民, 王琼. 基于文献数据库的慢性不可预见性温和应激诱发抑郁症动物模型研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 77–83.
- Li SS, Liu XM, Wang Q. Study on animal model of chronic unpredictable mild stress-induced depression based on literature database [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 77–83.
- [32] 荆秦. 基于 Wnt/ β -catenin 通路探讨电针对围绝经期抑郁症大鼠海马 CA3 区神经再生的影响 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2019.
- Jing Q. Based on Wnt/ β -catenin to explore the effect of electroacupuncture on nerve regeneration in hippocampal CA3 region of perimenopausal depression rats through catenin pathway [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2019.
- [33] Chen Q, Li C, Tao E, et al. Exploration of a brain-liver-communication-related mechanism involved in the experimental perimenopausal depression rat model using Chaihu-Shugan-San [J]. Neurochem Res, 2022, 47(5): 1354–1368.
- [34] 邓雪, 任路, 王旭. 补肾健脑电针疗法对围绝经期抑郁症大鼠前额叶皮质神经细胞内尼氏小体及核仁影响的定量分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(9): 1797–1801.
- Deng X, Ren L, Wang X. Quantitative analysis of the effect of Bushen Jiannao electroacupuncture on Nissl bodies and nucleoli in prefrontal cortex neurons of perimenopausal depression rats [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2018, 45(9): 1797–1801.
- [35] 王戈, 任路, 贾连群. 电针对围绝经期抑郁症大鼠海马 Bcl-2 和 Bax 的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(6): 838–840.
- Wang G, Ren L, Jia LQ. Effects of Electroacupuncture on bcl-2 and Bax in hippocampus of perimenopausal depression rats [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2016, 22(6): 838–840.
- [36] Jing Q, Ren L, Deng X, et al. Electroacupuncture promotes neural proliferation in hippocampus of perimenopausal depression rats via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. J Acupunct Meridian Stud, 2020, 13(3): 94–103.
- [37] 卢雯婷. 更年安怡方对围绝经期抑郁模型大鼠行为学及单胺类神经递质的实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院; 2008.
- Lu WT. Experimental study of Gengnian Anyi formula on behavior and monoamine neurotransmitters in perimenopausal depression model rats [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine; 2008.
- [38] 董莉, 姜琳, 孟炜, 等. 补肾解郁清心方对围绝经期抑郁模型大鼠行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(5): 67–69.
- Dong L, Jiang L, Meng W, et al. Effect of Bushen Jieyu Qingxin Formula on Behavior and Hypothalamus pituitary adrenal axis of perimenopausal depression model rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2008, 14(5): 67–69.
- [39] Zhou XD, Yang XJ, Zheng Y, et al. Jie-Yu Pill, a proprietary herbal medicine, ameliorates mood disorder-like behavior and cognitive impairment in estrogen-deprived mice exposed to chronic unpredictable mild stress: implication for a potential therapy of menopause syndrome [J]. Front Psychiatry, 2020, 11: 579995.
- [40] 杨琴, 任昊阳, 朱寒雨, 等. 白杨素通过抑制 NLRP3 炎性小体信号通路对围绝经期抑郁症模型大鼠产生保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(7): 1006–1011.

- Yang Q, Ren HY, Zhu HY, et al. Chrysin has a protective effect on perimenopausal depression model rats by inhibiting NLRP3 inflammatory body signaling pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, 36(7): 1006-1011.
- [41] 李艺, 具紫勇, 夏勇, 等. 电针对围绝经期抑郁症模型大鼠的效应研究 [J]. *上海针灸杂志*, 2010, 29(10): 670-673.
- Li Y, Ju ZY, Xia Y, et al. Effect of electroacupuncture on perimenopausal depression model rats [J]. *Shanghai J Acupunct Moxibustion*, 2010, 29(10): 670-673.
- [42] 宇庆迎, 杨莹, 刘墨林, 等. 实验动物抑郁模型研究进展 [J]. *医学综述*, 2021, 27(8): 1574-1579.
- Yu QY, Yang Y, Liu ML, et al. Research progress of depression model in experimental animals [J]. *Med Recapitul*, 2021, 27(8): 1574-1579.
- [43] Roth KA, Katz RJ. Stress, behavioral arousal, and open field activity-a reexamination of emotionality in the rat [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1979, 3(4): 247-263.
- [44] 刘慧娟, 康乐, 留甜甜, 等. 基于数据挖掘的慢性不可预知温和刺激抑郁症动物模型特点分析 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 385(2): 1-12.
- Liu HJ, Kang L, Liu TT, et al. Analysis of characteristics of animal model of chronic unpredictable mild stimulus depression based on data mining [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2021, 38(2): 1-12.
- [45] 杨一帆, 王豆, 李涛, 等. 慢性不可预知温和刺激抑郁模型及其评价指标的研究进展 [J]. *山东医药*, 2021, 61(25): 96-99.
- Yang YF, Wang D, Li T, et al. Research progress of chronic unpredictable mild stimulation depression model and its evaluation index [J]. *Shandong Med J*, 2021, 61(25): 96-99.
- [46] 笪晓丽, 李晓娟, 邱文琪, 等. 抑郁症动物模型及中医药复方防治进展 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(10): 1582-1586.
- Da XL, Li XJ, Qiu WQ, et al. Progress in animal models of depression and prevention and treatment of traditional Chinese medicine [J]. *J Basic Chin Med*, 2020, 26(10): 1582-1586.
- [47] 崔淑芳, 陈学进, 汤球, 等. 实验动物学 [M]. 上海: 第二军医大学出版社; 2013.
- Cui SF, Chen XJ, Tang Q, et al. *Laboratory zoology* [M]. Shanghai: Second Military Medical University Press; 2013.

[收稿日期] 2022-04-13

任志鑫,王雨,张冰,等. 代谢性疾病病证结合动物模型的探讨与思考 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 897-908.

Ren ZX, Wang Y, Zhang B, et al. Animal models combining disease and syndromes related to metabolic diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 897-908.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.004

代谢性疾病病证结合动物模型的探讨与思考

任志鑫,王雨,张冰*,林志健,巨珊珊

(北京中医药大学中药学院,北京 102488)

【摘要】 目的 为选择合理、可靠的动物种类、造模方式、评价体系的病证结合动物模型提供参考,为中医药辨证论治提供可靠的病证结合动物模型。**方法** 系统检索 30 年来糖尿病、肥胖症、高脂血症、高血压、高尿酸血症与痛风六大疾病相关病证结合动物模型的文献,收集和整理相关文献报道,归纳、总结动物相关参数、造模方式、证型及评价体系。**结果** 收集到代谢性疾病病证结合动物模型的文献 243 篇,其中 132 篇涉及糖尿病(气阴两虚、湿热困脾、阴虚内热、内热偏盛型);3 篇涉及肥胖症(脾虚湿阻型);9 篇涉及高脂血症(痰浊阻滞、气滞血瘀、气郁血瘀型);7 篇涉及高尿酸血症及痛风(脾虚痰湿、瘀血、湿热蕴结型);92 篇涉及高血压(痰湿壅盛、肝阳上亢、肝火亢盛型)。实验动物以雄性大鼠应用最广泛(高尿酸血症及痛风多使用鹌鹑);造模方式有单因素、双因素及混合因素复制病证结合动物模型;评价体系分别从病理指标(糖、脂代谢、血清生化、肝肾功能等)和一般状态(精神状态、活动量、二便、舌色等)进行判定。**结论** 目前代谢性疾病相关的病证结合动物模型的造模方式及评价体系仍需进一步完善,为中医药辨证论治提供可靠的病证结合动物模型,以期为深入研究中医药辨证论治创造条件。

【关键词】 代谢性疾病;病证结合;动物模型;数据挖掘

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 07-0897-12

Animal models combining disease and syndromes related to metabolic diseases

REN Zhixin, WANG Yu, ZHANG Bing*, LIN Zhijian, JU Shanshan

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Corresponding author: ZHANG Bing. E-mail: zhangbing6@263.net

【Abstract】 Objective This article provides a reference for choosing a reasonable, reliable animal species, modeling method and evaluation index system, and provides a reliable animal model combining disease and syndrome for Chinese medicine syndrome differentiation. **Methods** We systematically searched the last 30 years for literature on animal models that combine a disease and a syndrome for six diseases related to diabetes mellitus, obesity, hyperlipidemia, hypertension, hyperuricemia, and gout. Then we collected and organized the relevant literature, and summarized animal-related parameters, modeling method, evidence types and evaluation systems. **Results** Among the 243 literatures retrieved, 132 literatures involved diabetes. The syndromes include deficiency of both qi and yin, damp heat trapped spleen type, internal heat due to yin deficiency, excessive internal heat; 3 literatures involved obesity. The syndromes include Spleen deficiency dampness resistance type; 9 literatures involved hyperlipidemia. The syndromes include Phlegm turbidity blocking type, qi stagnation and blood stasis type; 7 literatures involved hyperuricemia and gout. The syndromes include spleen deficiency phlegm dampness type, blood stasis type and damp heat accumulation type; 92 literatures involved hypertension. The syndromes include phlegm dampness essential, hyperactivity of the liver yang and vigorous liver fire

【基金项目】 国家自然科学基金项目(U20A20406),国家自然科学基金项目(82104475),中国博士后科学基金(2021M690475)。

Funded by National Natural Science Foundation of China Projects (U20A20406), National Natural Science Foundation of China Projects (82104475), China Postdoctoral Science Foundation (2021M690475).

【作者简介】 任志鑫,女(1996—),在读硕士研究生,研究方向:中药防治代谢性疾病研究。Email:renzx9@163.com

【通信作者】 张冰,女,博士,教授,博导,主任医师,研究方向:中药防治代谢性疾病研究。Email:zhangbing6@263.net

type. Male rats (SD rat, Wistar rat) are involved in the most widely used experimental animals, quail is also applied to hyperuricemia and gout. The modeling method involved are mainly single-factor, dual-factor and hybrid-factor. The main evaluation method of creditial card combining disease and syndrome is to judge and characterize animal model by macroscopic symptoms, signs (behavior experiments, mental status, livestock manure, tongue images, ect) and pathological indicators (glucolipid metabolism, serum biochemistry, liver and kidney function, ect). **Conclusions** The current modeling method and the main evaluation method of animal models that that combine a disease and a syndrome need to be improved to provide a reliable animal model combining diseases and syndromes for Chinese medicine syndrome differentiation and to establish conditions to study Chinese medicine syndrome differentiation.

【Keywords】 metabolic disease; combination of prescription and syndrome; animal model; data mining

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

近年来,随着人民生活水平的提高,代谢性疾病的发病率呈上升趋势,严重威胁人类健康,包括糖尿病(diabetes mellitus, DM)、高脂血症(hyperlipidemia)、高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)、痛风(gout)、肥胖症(obesity)、高血压(hypertension, HTN)等。中医药治疗代谢性疾病独具优势,以辨证论治为治疗特色,不仅可以从宏观角度对疾病的整体进行辨证论治,也可以从抑制炎症因子、调控信号通路、调节代谢相关因子等微观角度切入进行微观指标的考察^[1],如代谢组学、蛋白组学等检测方法。而病证结合的动物模型是中医药研究的基础,是沟通临床与基础研究的桥梁,体现出不同医学体系对疾病的不同认识角度^[2]。代谢性疾病病证结合动物模型研究较多,但目前的研究对动物个体差异、证型演变及评价体系方面是否健全、有无统一的标准存在一定局限。本研究系统地检索糖尿病、高血压、高脂血症、肥胖症、高尿酸血症及痛风的病证结合动物模型,从动物品系、性别、造模方式、指标评价体系等方面整理、归纳、分析、总结病证结合动物模型的特点,为中药防治代谢性疾病建立合理的、可靠的病证结合动物模型奠定基础。

1 方法

1.1 数据来源

本研究在中国期刊全文数据库(CNKI)、中国学术期刊数据库(万方)、中国科技期刊数据库(VIP)及PubMed数据库,对1990~2021年有关糖尿病、肥胖症、高脂血症、高尿酸血症与痛风、高血压的所有文献进行专业检索。检索字段定为篇摘 AND 主题 NOT 篇名的检索形式。篇摘即是在篇名、关键词、摘要范围内进行检索,该检索方式相较主题词检索较精确,但对于精确

检索篇名、关键词及摘要内容更为丰富,适合本文进行深入研究。检索式以篇摘检索:疾病 AND 证候 AND “中医证候”+“病证结合”+“证候”+“证型”+“型”+“辨证分型”AND 主题检索:动物模型 NOT 临床研究为基本格式确定各代谢性疾病的检索策略(如表1),共检索到糖尿病297篇,肥胖症6篇,高脂血症22篇,高尿酸血症及痛风17篇,高血压150篇。发现相关英文文献极少有证候模型的相关研究,筛选后没有符合条件的论文,故文中没有纳入。

1.2 数据处理

将所查找到的数据导入Note Express软件中,去除重复,并排除不相关文献,排除标准如下:(1)剔除综述、会议集、报纸等的文献;(2)剔除不涉及造模方法的文献;(3)剔除临床试验研究的文献。流程如图1所示。

2 结果

2.1 代谢性疾病相关的病证结合动物模型年发文章量统计

为整体把握代谢性疾病的病证结合动物模型的年度数量变化,对检索到的243篇文献统计分析,其中以糖尿病占比最高(54%),肥胖症占比最少(1%)(如图2)。病证结合的动物模型数量的疾病由高到低依次为:糖尿病>高血压>高脂血症>高尿酸血症及痛风>肥胖症(如图3)。

2.2 代谢性疾病相关的病证结合动物模型情况分析

病证结合动物模型是将西医的病与中医的证结合诱导出的动物模型,既有中医整体观的优势,又有西医病理生理的特点,故本研究针对代谢性疾病相关病证结合动物模型的动物品系、造模方式、指标评价等展开如下分析:

表 1 各代谢性疾病病证结合动物模型的检索式

Table 1 Retrieval formula of various metabolic disease syndromes combined with animal models

疾病 Disease	篇文摘检索 Abstracts search	主题检索 Subject search	篇名检索 Title search
糖尿病 Diabetes	(“糖尿病”+“2 型糖尿病”+“糖尿病”+“2 型”+“血糖控制”+“高血糖”+“消渴”)and(“阴虚热盛”+“气阴两虚”+“阴阳两虚”+“血瘀脉络”+“湿热困脾”+“心络瘀滞”+“瘀阻脑络”+“肾络瘀阻”+“目络瘀滞”+“络空风动”) (“Diabetes”+“Type 2 diabetes”+“Diabetes”+“Type 2”+“Glycemic control”+“Hyperglycemia”+“Diabetes”)and(“Extreme heat with yin asthenia”+“Qi and Yin deficiency”+“Yin and Yang deficiency”+“Blood stasis in collaterals pattern”+“Dampness heat trapping spleen”+“Stasis of the heart and collateral”+“Syndrome of static blood”+“Kidney collateral stasis”+“Eye collateral stasis”+“Wind in the air”)		
肥胖症 Obesity	(“肥胖”+“肥胖症”+“腹部”+“腹型肥胖”+“向心性肥胖”+“中心性肥胖”+“超重”)and(“脾虚湿阻”+“脾肾两虚”+“肝郁气滞”+“阴虚内热”+“胃热湿阻”) (“Obesity”+“Obesity”+“Abdominal”+“Abdominal obesity”+“Central obesity”+“Central obesity”+“Overweight”)and(“Dampness of spleen deficiency”+“Spleen-kidney deficiency”+“Liver depression and Qi stagnation”+“Yin deficiency and internal heat”+“Stomach heat and damp”)		
高脂血症 Hyperlipidemia	(“高脂血症”+“血脂异常”+“血脂过多”+“降血脂”+“血脂障碍”+“血脂”+“原发性高脂血症”+“继发性高脂血症”+“混合型高脂血症”)and(“湿热郁结”+“脾虚痰盛”+“胃热腑实”+“肝郁化火”+“脾肾两虚”+“气滞血瘀”+“气郁血瘀”) (“Hyperlipidemia”+“Dyslipidemia”+“Hyperlipemia”+“Lipid-lowering”+“Dyslipidemia”+“Blood lipid”+“Primary hyperlipemia”+“Secondary hyperlipidemia”+“Mixed hyperlipidemia”)and(“Damp-heat stagnation”+“Spleen deficiency and phlegm excess”+“The stomach is hot and the inner organs are solid”+“Liver stagnation transforming into fire”+“Spleen-kidney deficiency”+“Qi stagnation and blood stasis”+“Qi stagnation and blood stasis”)	“中医证候”+ “病证结合”+ “证候”+“证 型”+“型”+ “辨证分型” “Traditional Chinese medicine syndromes”+ “Combining disease and syndromes”+ “Syndrome”+ “Type of syndrome”+ “Type”+ “Differentiation syndrome”	“进展”+“临 床”+“疗效” +“Meta 分 析”+“近况” +“例”+“现 状” “Advance”+ “Clinic”+ “Efficacy”+ “Meta analysis”+ “Recent developments” +“Case” +“Status”
高尿酸血症及痛风 Hyperuricemia and gout	(“原发性痛风”+“无症状高尿酸血症”+“痛风性肾病”+“痛风性关节炎”+“高血尿酸”+“痹症”+“痹病”+“历节风”+“痛风病”+“高尿酸”+“高尿酸血症”+“高尿酸血症”+“痛风性炎症”+“尿酸性肾病”+“痛风石”+“尿酸盐沉积”+“痛风”)and(“风湿热痹”+“风寒湿痹”+“痰瘀痹阻”+“肝肾亏虚”+“脾虚湿盛”+“气滞血瘀”+“湿热蕴结”+“痰热阻滞”+“痰浊阻滞”+“肝肾阴虚”+“痰浊内阻”+“湿热壅盛”+“瘀血阻络”+“肝肾不足”+“湿浊内蕴”+“湿浊滞留”+“脾肾气虚”+“脾肾两虚”+“肝肾气滞”+“脾虚痰湿”) (“Primary gout”+“Asymptomatic hyperuricemia”+“Gouty nephropathy”+“Gouty arthritis”+“High blood uric acid”+“Arthralgia”+“Bi syndrome”+“Fierce wind”+“Gout disease”+“High uric acid”+“Hyperuricemia”+“Hyperuricemia”+“Gouty inflammation”+“Uric acid nephropathy”+“Tophus”+“Urate deposition”+“Gout”)and(“Wind-damp-heat arthralgia”+“Wind-Cold and fixed impediment”+“Phlegm and blood stasis”+“Liver-kidney deficiency”+“Spleen deficiency and dampness excess”+“Qi and blood stagnation”+“Damp-heat stagnation”+“Obstruction of phlegm-heat”+“Phlegm-turbidity obstruction”+“Yin deficiency of liver and kidney”+“Turbid phlegm and internal obstruction”+“Damp-heat accumulation”+“Static blood blocking collaterals”+“Liver and kidney deficiency”+“Turbid dampness stagnation”+“Wet and turbid retention”+“Spleen-Kidney Qi deficiency”+“Spleen-kidney deficiency”+“Liver and kidney Qi stagnation”+“Spleen deficiency and phlegm dampness”)		
高血压 Hypertension	(“高血压”+“高血压病”+“原发性高血压”+“阳亢”+“眩晕”+“头痛”)and(“肝阳上亢”+“肝肾阴虚”+“痰饮内停”+“肾阴亏虚”+“阴虚阳亢”+“痰湿壅盛”+“肝火亢盛”+“阴阳两虚”+“痰瘀互结”+“气虚血瘀”) (“Hypertension”+“Hypertensive disease”+“Essential hypertension”+“Yang hyperactivity”+“Vertigo”+“Headache”)and(“Liver-Yang hyperactivity”+“Yin deficiency of liver and kidney”+“Congestion of fluid-retention”+“Deficiency of kidney Yin”+“Yin deficiency and Yang hyperactivity”+“Phlegm-dampness syndrome”+“Hyperactive liver fire”+“Deficiency of Yin and Yang”+“Phlegm and stasis binding”+“Qi deficiency and blood stasis”)		

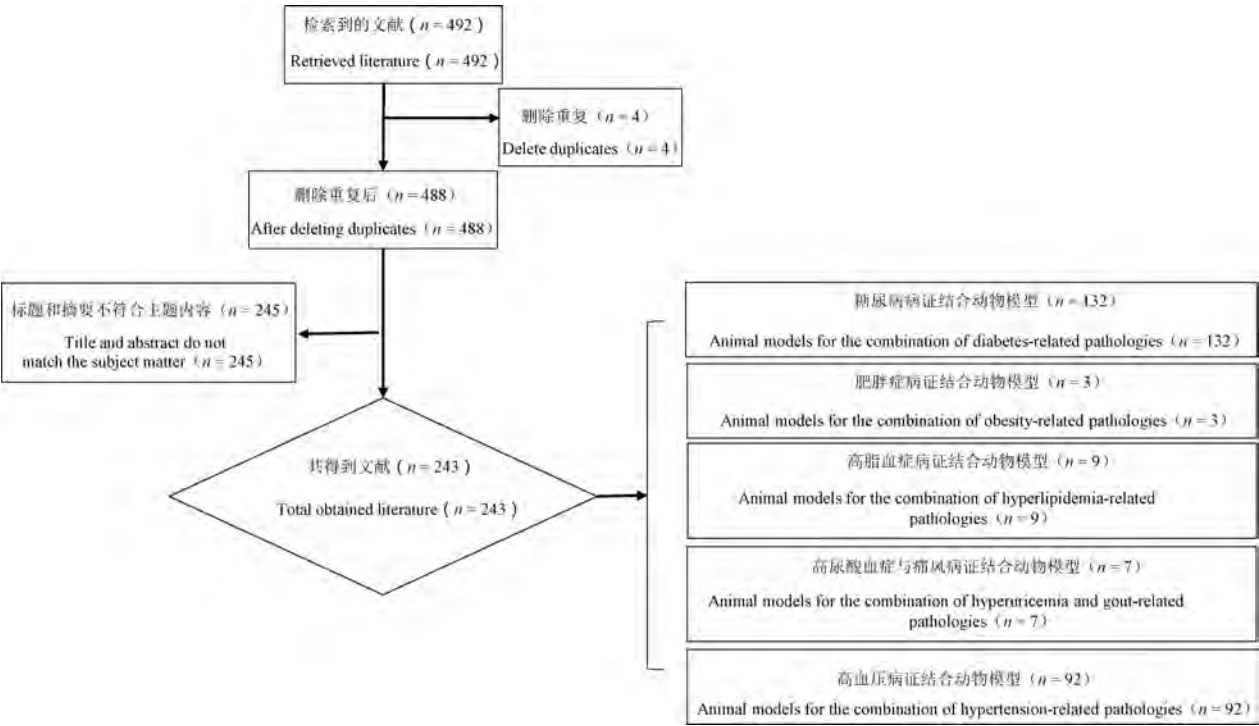


图 1 文献筛选结果

Figure 1 Document screening result

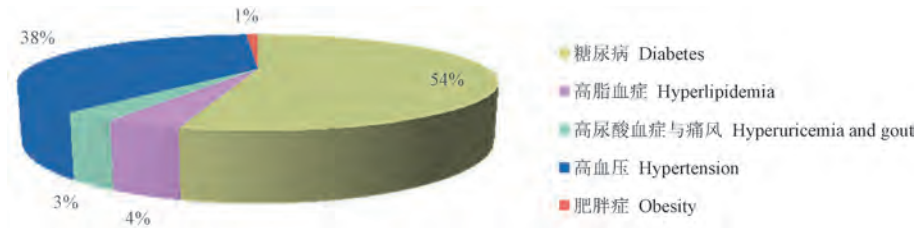


图 2 各代谢性疾病病证结合动物模型占比分布

Figure 2 Percentage distribution of animal model combining disease and syndrome related to metabolic diseases

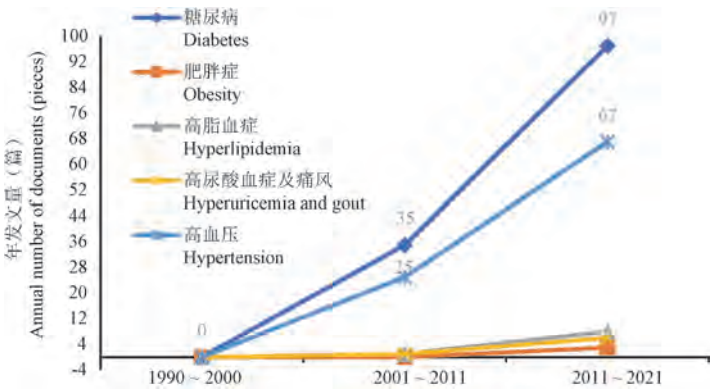


图 3 1990 ~ 2021 年代谢性疾病相关的病证结合动物模型年发文献统计

Figure 3 Animal model combining disease and syndrome related to metabolic diseases in 1990 ~ 2021 annual number of documents issued statistic

2.2.1 糖尿病相关的病证结合动物模型

临床上Ⅱ型糖尿病早期为热盛伤津、肝郁脾虚、痰浊中阻、湿热蕴结型;中期为肺肾阴虚、脾气亏虚、脾肾气虚型;晚期为肝肾阴虚、阴阳两虚型^[3],已有的病证结合动物模型主要有:气阴两虚型、内热偏盛型、湿热困脾型和阴虚内热型的模型(表2),并针对该疾病模型发现在一个疾病的不同阶段表现不同的证候,符合临床糖尿病早、中、晚期分型。

目前糖尿病病证结合动物模型多采用疾病因素与证候因素相叠加造模,链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)对动物的胰岛β细胞有选择性的破坏作用,饲喂高脂高糖饲料是从病理、生理角度接近人类糖尿病的动物模型。采用多次小剂量注射STZ可降低动物死亡率,观察到其疾病0~3周出现内热偏盛型,3周后兼有阳虚证、气虚

证,10周表现出阴阳两虚证,该模型提示证候存在经时自然演变过程,为中医证候模型研究提供一种思路,也为中医辨证用药研究提供一种证候模型,但造模周期长。联合其他造模因素可缩短其成模时间,如:多次小剂量STZ注射4周,加食高糖高脂饲料至14周较好地反映了Ⅱ型糖尿病气阴两虚证模型的研究^[4],该模型简单、可操作;连续9d注射STZ,同时灌胃温热药物,分别在14d出现阴虚热盛症状,35d出现气阴两虚症状;高脂高糖饮食、注射STZ结合耗气伤阴中药水煎剂4周,可制备气阴两虚证糖尿病^[5],以益气补阴方反证,具有明显的改善作用,该模型可缩短单纯高脂高糖饮食制备周期长的问题;高脂饲料联合小剂量注射3周STZ基础上,注射1周拮抗胰岛素的激素药物,增加体内各组织代谢活性,制备了内分泌性糖尿病动物模型,该模型模拟了阴虚内热型的证候,造模周期短、成本

表2 糖尿病相关病证结合动物模型现状

Table 2 Current status of animal models for the combination of diabetes-related pathologies

物种 Species	造模方式 Modeling mode	证型 Syndrome type	外观体征 Appearance signs	疾病指标 Disease indicators
SD大鼠 SD rats	链脲佐菌素(65 mg/kg) STZ(65 mg/kg)	早期内热偏盛兼有阳虚,3~5周气阴两虚,10周阴阳两虚 ^[8] Early stage of internal heat with Yang deficiency, 3~5 weeks for Qi and Yin deficiency, 10 weeks for Yin and Yang deficiency ^[8]	体重、食/水量、尿量、粪便性状、毛色毛态、行为状态、舌、爪、鼻 RGB 值、自主活动能力 Body weight, food intake, water consumption, urine output, fecal properties, hair color and hair state, behavioral status, RGB value of tongue, claw and nose, ability to move independently	空腹血糖、环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷、皮质醇、游离三碘甲状腺原氨酸、游离四碘甲状腺原氨酸 Fasting plasma sugar, cyclic adenosine monophosphate, cyclic guanosine monophosphate, cortisol, free triiodothyronine, free tetraiodothyronine
SD大鼠 SD rats	高脂饲料+左旋甲状腺素0.2 mg/(kg·d)+链脲佐菌素(25 mg/kg) High-fat feed + levothyroxine 0.2 mg/(kg·d) + STZ(25 mg/kg)	阴虚内热型 ^[9] Yin deficiency and internal heat type ^[9]	神态行为、背部温度、大便情况、舌/爪色、活动量 Appearance and behavior, back temperature, stool condition, tongue/claw color, activity volume	血糖 Glu
ICR小鼠 ICR mouse	高脂饲料+链脲佐菌素(120 mg/kg) high-fat feed + STZ(120 mg/kg)	湿热困脾型 ^[10] Damp heat trapped spleen type ^[10]	体重、尿量、饮水量、精神状态、活动量 Body weight, urine volume, water consumption, mental state, activity volume	血糖、糖耐量 Glu, glucose tolerance
ICR小鼠 ICR mouse	STZ(40 mg/kg)+附子:干姜:肉桂1:1:1水煎液 STZ(40 mg/kg)+aconite:dried ginger:cinnamon(1:1:1) water decoction	早期热盛型、中晚期气阴两虚型 ^[11] Early heat-rich type, middle and late stage Qi and Yin deficiency type ^[11]	活动次数、粪便性状、眼神、体重、食/水/尿量、肛温 Number of activities, fecal properties, eyes, body weight, food intake, water consumption, urine output, anal temperature	空腹血糖、胰岛素 Fasting plasma sugar, insulin
KK-Ay小鼠 KK-Ay mouse	高脂饲料 High-fat feed	气阴两虚型 ^[12] Qi and Yin deficiency type ^[12]	体重、尿量、精神状态、食/水量、抓力、舌像 GB 值、脉搏幅度 Body weight, urine output, mental state, food intake, water consumption, grip, GB value on the tongue, pulse amplitude	尿微白蛋白/肌酐、血糖 Urine albumin/creatinine, Glu

低、动物死亡率低。采用自发性糖尿病小鼠, KK-Ay 小鼠模型从发病(12 周)~20 周是气阴两虚证的最佳周期, 基因缺陷型动物模型在代谢途径中建立生物模型具有稳定性, 如 db 小鼠是自发性 II 型糖尿病模型, 其生理与行为特征与人类 II 型糖尿病的表现极为相似, 但是成本较高, 应用方面受到了一定限制。传统方式摘除单肾与“行为学”干预建立的糖尿病肾病病证结合动物模型^[6], 成本低、耗时短, 但操作复杂, 证候因素与疾病因素相叠加也增加了模型的不稳定性。目前已有的病证结合模型多是通过物理、化学、手术等因素诱导下模拟, 与机体自身或某种疾病状态下的自然演变差异大。而中医药强调整体观, 不同时期存在不同的证候。单一指标难以体现证候的动态性, 运用现代科技手段, 将微观与宏观指标相结合, 体现“病-证”结合的特点, 通过采用方药的多靶点、多效应的反证优势综合判定证候的动态性^[7]。

2.2.2 肥胖症相关的病证结合动物模型

临床上肥胖症证型分为脾虚湿阻、脾肾两虚、肝郁气滞、阴虚内热、胃热湿阻型五大类^[13]。目前肥胖症的造模方式主要模拟临床发病病因, 采用饮

食联合环境因素造模, 观察到模型动物中医证候为临床最常见的脾虚湿阻型(表 3)。

采用“饮食因素”、“高脂饮食+湿邪因素”等营养性肥胖的造模方式, 通过改变摄入量, 影响其内分泌。研究发现单纯性肥胖模型复制成功的基础上出现脾虚湿阻证, 该模型模拟临床脾虚湿阻型单纯性肥胖, 而胰岛素抵抗或去卵巢大鼠模型或引起代谢紊乱的复合肥胖模型也有相应的研究, 如林志健^[14]采用高嘌呤食饵建立高尿酸血症合并腹型肥胖病证结合鹌鹑模型, “四诊”合参分析该模型具有“脾虚痰湿”证型。

针对疾病模型的选择方面, 不仅可以采用饮食因素诱导, 也可对目前较为主流的瘦素缺陷型肥胖小鼠等基因缺陷型模型展开研究, 对已有的脾虚湿阻型单纯性肥胖应开展进一步药理药效、病理机制等研究, 为临床助力, 而对单纯性肥胖所表现的其他证候尚未涉足, 应结合中医理论建立证候模型, 并将四诊信息应尽量实现定量分析, 对精神状态、毛色、运动能力等指标也可采用量表的方法进行量化分析^[15]。

表 3 肥胖症相关病证结合动物模型现状

Table 3 Current status of animal models for the combination of obesity-related pathologies

物种 Species	造模方式 Modeling mode	证型 Syndrome type	外观体征 Appearance signs	疾病指标 Disease indicators
C57BL/6N 小鼠 C57BL/6N mouse	高脂饲料+水湿垫料(50 g 垫料加水 100 mL) High-fat feed + Water wet bedding (50 g of bedding with 100 mL of water)	脾虚湿阻型 ^[16] Spleen deficiency and dampness obstruction type ^[16]	精神状态、疲劳值、食/水量、粪便含水量、体重、体长、腰围、Lee's 指数 Mental state, fatigue value, food intake, water consumption, fecal water content, body weight, body length, waist circumference, Lee's index	血糖、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、脂肪分布体积、极低密度脂蛋白 Glu, total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, fat distribution volume, very low density lipoprotein
SD 大鼠 SD rats	高脂饲料 + 冰糖水每只 2 mL/d + 游泳 High-fat feed + Ice sugar water 2 mL/d + swimming	脾虚湿阻型 ^[17] Spleen deficiency and dampness obstruction type ^[17]	体重、舌质 Body weight, tongue quality	总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、肌酐、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、肠肽激素、胃动素 Total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, creatinine, alanine transaminase, aspartate transaminase, enteropeptide hormone, gastrin

2.2.3 高脂血症相关的病证结合动物模型

高脂血症是指血脂异常升高, 证型包括痰浊内阻、脾虚湿盛、气滞血瘀、肝肾阴虚型^[18]。目前高脂血症相关的病证结合动物模型主要为痰浊阻滞、气滞血瘀、气郁血瘀型(表 4), 符合中医理论中膏脂粘滞致气血运行阻滞, 引起脂浊, 是高脂血症的始动因素。

高脂饲料引起大鼠自身调节胆固醇能力变差,

诱发痰浊阻滞型高脂血症。分析现有模型, 过食高脂饮食 4 周, 并通过化浊调脂方给药 4 周观察对大鼠的血脂代谢及外观体征的改善, 可判定痰浊阻滞证型, 该模型适用于临床上饮食不节、过食肥甘饮食导致痰浊内生。灌胃脂肪乳剂摄入量均一, 8 周可有效引起大鼠脂代谢紊乱, 同时灌胃第 3 周尾静脉一次性注射小牛血清蛋白, 结合连续冰水浴 5 周

的方式能引起气滞血瘀的症状。该造模方法成模均匀、模拟了临床气滞血瘀证的病因病机,但周期长、操作繁琐且工作量大。结合行为学干预(如使其处在激怒、争斗状态),与临床情志失调,导致脾虚气结;夹尾实验结合饮食造模 8 周可出现与临床气郁血瘀证候相似的模型;电、光等应急刺激后大鼠的外观体征与临床气滞血瘀证的表征相似,可持续 6 周,第 9 周给予药物治疗可明显改善表征,但周期长、操作繁琐,且长期处于不间断的刺激环境,增

加了紧张、焦虑的情绪,影响正常进食及活动。目前研究发现 ApoE^{-/-}转基因小鼠,在高脂高胆固醇饮食下,加速高脂血症的发生,可节约造模时间。

通过以脂代谢相关指标既可以确定疾病模型的建立,同时也对痰浊证候有一定的阐释作用,将与疾病相关的生化指标纳入证候的诊断指标,强调了中医“病-证”整体观的概念,通过采用不同的理化指标组合变化模式来更好的体现证候的属性特点^[19]。

表 4 高脂血症相关病证结合动物模型的现状

Table 4 Current status of combined animal models of hyperlipidemia-related pathologies

物种 Species	造模方式 Modeling mode	证型 Syndrome type	外观体征 Appearance signs	疾病指标 Disease indicators
Wistar 大鼠 Wister rats	高脂饲料 High-fat feed	痰浊阻滞型 ^[20] Phlegm blocking type ^[20]	体重、腹围、体长、Lee's 指数 Body weight, abdominal circumference, body length, Lee's index	总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇 Total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol
Wistar 大鼠 Wister rats	冰水浴 + 小牛血清蛋白 (468. 75 mg/kg) + 脂肪乳 Ice bath + calf serum protein (468. 75 mg/kg) + fat milk	气滞血瘀型 ^[21] Qi stagnation and blood stasis type ^[21]	体重、食量、舌质、活动量 Body weight, food intake, tongue quality, activity volume	总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、凝血酶原时间、纤维蛋白原 Total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, prothrombin time, fibrinogen
SD 大鼠 SD rats	高脂饲料 + 维生素 D3 (600000 IU/kg) + 应激刺激 (声光、30 ~ 35 V 电压) High-fat feed + vitamin D3 (600000 IU/kg) + stressful stimuli (sound, light, 30 ~ 35 V)	气滞血瘀型 ^[22] Qi stagnation and blood stasis type ^[22]	自发活动、舌质、舌苔、毛 质、体重 Spontaneous activities, tongue quality, tongue, hair quality, body weight	纤维蛋白原、尿素氮、肌酐、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇、凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间、全血黏度低、中、高切 Fibrinogen, blood urea nitrogen, creatinine, low-density lipoprotein cholesterol, high- density lipoprotein cholesterol, total cholesterol, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, whole blood viscosity (low/middle/high shear)
SD 大鼠 SD rats	高脂饲料 + 维生素 D (60 0000 U/ kg) + 夹尾巴 (45 min) High-fat feed + vitamin D (60 0000 U/kg) + tail (45 min)	气郁血瘀型 ^[23] Stagnation of Qi and blood ^[23]	精神状态、毛质 Mental state, hair quality	总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇 Total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol

2. 2. 4 高尿酸血症与痛风相关的病证结合动物模型

《中医病证诊断疗效标准》将痛风的证候分为: 湿热蕴结、瘀热阻滞、痰浊阻滞、肝肾阴虚型^[24]。目前的高尿酸血症病证结合动物模型有脾虚痰湿、瘀血型, 痛风病证结合动物模型为湿热蕴结型 (见表 5)。

张冰等^[25]等观察到高尿酸血症鹌鹑的行为学表现及舌质变化, 发现其病理改变与中医理论认识有相似之处。分析现有模型, 高嘌呤饮食增加尿酸前体物质生成, 引起高尿酸血症, 选择与人类尿酸

代谢途径相似的鹌鹑为实验动物, 高果糖造模 28 d 后出现与临床“脾虚痰湿”证相似的症状, 选取健脾利湿的中药菊苣以药反证, 对该模型的证候进一步验证; 腺嘌呤导致肾脏损伤, 阻碍尿酸排泄, 引起高尿酸血症, 发现血府逐瘀汤改善作用最显著, 推断血瘀可能是该模型的证候特点。采用连续高脂高糖饮食 15 d、湿热环境下 5 d 的复合干预因素建立符合痹症湿热蕴结型的诊断标准的证候模型, 在证候模型上踝关节注射尿酸钠 (monosodium, MSU), 该方法虽然处于高尿酸血症状态下, 且简单、成模率高, 但其外源性注射 MSU 容易引起特异质炎症反

应,模型容易消退。没有在本质上模拟临床人类发病特征,忽略了痛风具有进展性、全过程的性质。

目前逐渐认识到高尿酸血症和痛风是一个疾病的不同阶段,而从整体认识高尿酸血症和痛风的病证结合动物模型亟待建立,以中医角度进一步阐释高尿酸血症和痛风之间的关系。优化指标

体系,如“热”的生理机制与血浆内皮素和降钙素基因相关肽的反馈调节密切相关^[26];对于脾虚型痛风,D-木糖可作为脾虚证实验室指标可作为诊断证候的重要指标^[27],但不能完全代表临床表征,研究证的本质还应结合动物的表征,寻找四诊量化的新方法。

表 5 高尿酸血症与痛风相关病证结合动物模型的现状

Table 5 Current status of combined animal models of hyperuricemia and gout-related pathologies

物种 Species	造模方式 Modeling mode	证型 Syndrome type	外观体征 Appearance signs	疾病指标 Disease indicators
SD 大鼠 SD rats	果糖水 Fructose water	脾虚痰湿型 ^[28] Spleen deficiency phlegm dampness type ^[28]	体重、运动能力、舌象 RI 值、 尿量 Body weight, athletic ability, RI value on the tongue, urine output	血尿酸 Serum uric acid
SD 大鼠 SD rats	蜂蜜水、油脂与无水乙醇交替 服用 + 智能气候箱 + 注射 MSU Hydromel, oil alternating with anhydrous ethanol + smart climate box + injection MSU	湿热蕴结型 ^[29] Dampness and heat accumulation type ^[29]	精神状态、毛质、食/水量、小 便颜色、大便性状、步态评分 Mental state, hair quality, food intake, water consumption, urine color, stool properties, gait scoring	白介素 6、白介素 1 β 、肿瘤坏死因 子 α Interleukin-6, interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α
Wistar 大鼠 Wister rats	腺嘌呤 100 mg/kg + 盐酸乙胺 丁醇 250 mg/kg Adenine 100 mg/kg + ethambutol hydrochloride tablets 250 mg/kg	瘀血型 ^[30] Blood stasis type ^[30]	体重 Body weight	血尿酸、甘油三酯、高密度脂蛋 白、胰岛素、血糖、肌酐、尿素氮 Serum uric acid, triglyceride, high- density lipoprotein cholesterol, insulin, Glu, creatinine, blood urea nitrogen
迪法克 鹌鹑 Difake quails	酵母粉 Yeast powder	脾虚痰湿型 ^[31] Spleen deficiency phlegm dampness type ^[31]	舌色、粪便性状、毛质、粪尿湿 重、干重、水分含量、体重 Tongue color, fecal properties, hair quality, fecaluria, dry weight, moisture, body weight	血尿酸 Serum uric acid

2.2.5 高血压相关的病证结合动物模型

高血压属于中医“眩晕”、“头痛”的范畴,临床上高血压的辨证分型包括气血亏虚、阴虚阳亢、肝火亢盛、气虚血瘀、痰湿壅盛、混合型^[32]。目前病证结合动物模型有阴虚阳亢、肝火亢盛、肝阳上亢型兼瘀血症、痰湿壅盛、肝亢痰滞型(见表 6),根据不同的造模方式所表现不同的证候与临床不同发病病因的高血压所表现的证候相一致,造模因素全面,贴近临床研究。

自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)应用最广,是研究高血压发病机制和筛选降压药物的理想动物模型,该模型 14 ~ 18 周龄以阳亢为主要证候^[33],该模型适用于对原发性高血压发病机制的探讨。通过该疾病模型物理、化学、手术等因素造模导致不同的证候出现,如:对 SHR 大鼠灌胃附子汤及高脂饲料连续 8 周后,表现出肝阳上亢及痰湿证;电刺激对 SHR 大鼠三叉神经节引起的偏头痛与瘀血型临床表征相似,造模时间短,

开颅时导致的出血符合外伤瘀血模型;以颈内动脉两次注入月桂酸钠损伤 SHR 大鼠脑内微小动脉血管内皮的方式,联合长期激怒法模拟临床阴虚阳亢、瘀血阻络的发病特点及病理改变,但手术过程复杂、难度较高、动物价格昂贵且饲养要求高。满足以病统证的情况下多种证型的研究,考虑造模因素全面,贴近临床研究。灌胃附子汤是模拟临床肝阳上亢型高血压动物模型的方式,简单、经济,持续 4 周可引起肝阳上亢症状,具有病理生理相结合的病证结合模型优势,其机制可能与降低血浆 Ang II 水平有关。局部注射聚桂醇注射液联合灌胃附子汤 3 周,可制造大鼠颈性眩晕的肝阳上亢模型^[34];夹闭大鼠左肾动脉 2 周加灌胃附子汤 4 周可诱导出肝阳上亢证高血压病,与临床肝阳上亢证的症状相一致^[35],但其在手术过程中存在操作复杂、极易导致动物死亡等问题,并且其形成的高血压主要是肾血管性高血压,与人类高血压发病情况不相符合。高脂高糖饮食法操作简单、安全

性高,模型表现出的症状符合临床痰湿壅盛型的症状,证候成模率高,但病证结合的成模率较低,停止喂食后可自行恢复,且造模时间长(分别为16、25周^[36])。

高血压动物模型包括遗传、手术干预或药物诱导等方式,其具备高血压临床特征,实质发病过程

与人类自发高血压病程有一定的差距,而饮食诱导的成模率低,因此,将各因素结合造模,寻找一种稳定可靠的高血压病证结合动物模型亟待解决。在不同证候下指标存在复杂的关系,应对实验室指标与证候指标进行相关性分析,为探讨中医药治疗高血压的作用机理奠定基础。

表 6 高血压相关病证结合动物模型的症状

Table 6 Current status of combined animal models for hypertension-related pathologies

物种 Species	造模方式 Modeling mode	证候分型 Syndrome type	外观体征 Appearance signs	疾病指标 Disease indicators
SHR 大鼠 SHR rats	电刺激 Electrical stimulation	肝阳上亢型兼瘀血型 ^[37] Hyperactive liver Yang with blood stasis ^[37]	咀嚼肌收缩力、精神状态、毛质、双眼结膜颜色、易激惹程度、舌质 Masticatory muscle contractility, mental state, hair quality, bilateral conjunctival color, irritability, tongue quality	收缩压、5-羟色胺、降钙素基因相关肽 Systolic blood pressure, 5-hydroxytryptamine, calcitonin gene-related peptide
	附子汤 + 高脂饲料 Fuzi decoction + high-fat feed	肝亢痰滞型 ^[38] Hyperliver and phlegm stagnation type ^[38]	体重、易激惹程度、双眼结膜颜色、旋转时间 Body weight, irritability, bilateral conjunctival color, time of revolution	血压、总胆固醇、甘油三酯、血管紧张素Ⅱ Blood pressure, total cholesterol, triglyceride, angiotensin Ⅱ
	月桂酸钠 1 mg/mL + 激怒法 Sodium laurate 1 mg/mL + anger method	阴虚阳亢型 ^[39] Yin deficiency and Yang hyperactivity type ^[39]	精神状态、毛发、尿量、粪便性状、肢体对称性、姿势反射试验、角落试验 Mental state, hair, urine output, fecal properties, limb symmetry, posture reflex test, corner test	收缩压、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、血清内皮素-1、纤溶酶原激活物抑制物 Systolic blood pressure, total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol, serum endothelin-1, plasminogen activator inhibitor type-1
SD 大鼠 SD rats	附子汤 (含麻黄碱 3.25、5 mg/mL) + 1% 盐水 Fuzi decoction (contains ephedrine 3.25, 5 mg/mL) + 1% salt water	肝阳上亢型 ^[40] Hyperactive liver Yang ^[40]	易激惹等级评分、毛发、面部温度、抓力 Irritability, hair, facial temperature, grip	收缩压、醛固酮、肾素、血管紧张素Ⅱ、心钠素、降钙素基因相关肽 Systolic blood pressure, aldosterone, renin, angiotensin Ⅱ, atrial natriuretic peptide, calcitonin gene-related peptide
	高脂高糖饮食 High fat and high sugar feed	痰湿壅盛型 ^[41] Phlegm-dampness congestion type ^[41]	活动能力、食/水量、精神状态、大便秘性状 Mobility, food intake, water consumption, mental state, stool properties	总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、体重、血压、空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数 Total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, body weight, blood pressure, fasting blood glucose, fasting insulin, HOMA-IR
Wistar 大鼠 Wister rats	高脂高糖饮食 High fat and high sugar feed	痰湿壅盛型 ^[41] Phlegm-dampness congestion type ^[41]	活动能力、食/水量、精神状态、大便秘性状 Mobility, food intake, water consumption, mental state, stool properties	总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、体重、血压、空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数 Total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, body weight, blood pressure, fasting blood glucose, fasting insulin, HOMA-IR

3 总结

病证结合模型在很大程度上弥补了中医药在动物模型上研究的空白,目前病证结合动物模型大多为疾病模型联合证候模型,导致出现单个疾病对应单个证候的现象,且造模大多采用行为学刺激,而临床上一个疾病相兼多个证候、涉及多个脏器,以及在不同的时期表现出不同的证候,具有进展性。所以构建病证结合的动物模型应根据疾病的

发病特征,通过饮食、环境等因素综合考虑构建具有进展性特点的模型,且因遵循伦理原则,避免或减少动物的应激、痛苦和伤害,采取痛苦最小的方法处置动物,有助于为临床治疗提供可靠的参考价值。

中医证候的研究向实验室转变,指标由宏观、定性逐渐向微观、定量转变。现有的模型采用创伤性的手段检测生化、免疫、酶学等实验室指标,导致无法动态跟踪疾病的全程证候。如关节炎类动物

关节液获取困难,采用“实时、动态、微创”的微透析仪器辅助,可实现对疾病进行全程观察。体现指标的客观化,如钱宏梁等^[42]将红外热像技术运用于观察小鼠阳盛阳衰的证候中,方肇勤等^[43]为大鼠小鼠创建中医诊法和辨证方法,其中通过使用影像设备,拍摄受试动物的舌、爪、尾的颜色,并使用 Photoshop 对图像进行定性定量分析。协同宏观表征与微观指标发挥判定作用,而非证候的特异性和病理指标的特异性。注重多学科交叉融合,如王恒和等^[44]提出“证治代谢组学”的假说,中医证候在辨证论治前后患者体内存在代谢物的特异性差异,由此为深入研究辨证论治创造条件。

综上所述,病证结合动物模型仍处于不断探索和发展的阶段,动物模型应贴近临床,通过对模型的干预因素、指标评价体系的不断探索、挖掘和解释,推动病证结合动物模型的不断发展,促进辨证论治的基础研究与发展,为中医药防治代谢性疾病的研究奠定基础。

参 考 文 献(References)

- [1] 王新苗,张海宇,魏秀秀,等. 糖脂代谢紊乱机制研究及中医药防治的进展[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(2): 214-217.
Wang XM, Zhang HY, Wei XX, et al. Mechanism of glucose and lipid metabolism disorder and research progress of TCM prevention and treatment [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2020, 47(2): 214-217.
- [2] 赵慧辉,王伟. 病证结合证候模型研究基本思路[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(12): 762-764.
Zhao HH, Wang W. Basic thoughts on syndrome model of combining disease with syndrome [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2006, 21(12): 762-764.
- [3] 庞国明,倪青,张芳. 2 型糖尿病病证结合诊疗指南[J]. 中医杂志, 2021, 62(4): 361-368.
Pang GM, Ni Q, Zhang F. Guideline for diagnosis and treatment of type II diabetes based on syndrome differentiation combining with disease differentiation [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 62(4): 361-368.
- [4] 张译心,王鑫,刘博,等. 2 型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 219-229.
Zhang YX, Wang X, Liu B, et al. Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi-Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 219-229.
- [5] 王航利,张梦迪,黄绳武. 益气补阴方对气阴两虚证糖尿病大鼠的降血糖作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(8): 912-917.
Wang HL, Zhang MD, Huang SW. Hypoglycemic effect of Yiqi Buyin formula on diabetic rats with Qi and Yin deficiency [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(8): 912-917.
- [6] 胡爱民,晏玲,张利芳,等. 2 型糖尿病肾病气阴两虚型动物模型的建立及评价[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(10): 1251-1253.
Hu AM, Yan L, Zhang LF, et al. Establishment and evaluation about rat models of Qi and Yin deficiency in type 2 diabetic nephropathy [J]. J Basic Chin Med, 2015, 21(10): 1251-1253.
- [7] 胡齐帅,张晓艳. 病证结合动物模型研究进展[J]. 中医学报, 2022, 37(2): 299-303.
Hu QS, Zhang XY. Research progress of animal model of disease and syndrome combination [J]. Acta Chin Med, 2022, 37(2): 299-303.
- [8] 赵瑛,王婕,杨明艳,等. 糖尿病大鼠中医证候表征的演变[J]. 中医药学报, 2020, 48(3): 11-16.
Zhao Y, Wang J, Yang MY, et al. Evolution of TCM syndrome characterization in DM rats [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2020, 48(3): 11-16.
- [9] 扶丽君. 青钱柳叶水提物对阴虚内热型糖尿病大鼠的调节作用研究[D]. 广州: 广州中医药大学; 2018.
Fu LJ. The effect of *Cyclocarya paliurus* water extract on type 2 diabetes mellitus rats with Yin deficiency [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine; 2018.
- [10] 程旻,许立,许波华,等. 四妙颗粒对湿热困脾型糖尿病模型小鼠血糖及糖耐量的影响[J]. 中南药学, 2011, 9(4): 245-248.
Cheng Y, Xu L, Xu BH, et al. Effect of Simiao Keli on blood glucose and glucose tolerance in diabetic mice model of hot and humid spleen [J]. Central South Pharm, 2011, 9(4): 245-248.
- [11] 吕依妍,李寒冰,马晓庆,等. 采用复合因素建立内热消渴小鼠模型的特点分析[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(8): 1187-1193.
Lü YY, Li HB, Ma XQ, et al. Establishment and characteristic analysis of interior heat and diabetes mouse model using compound factors [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(8): 1187-1193.
- [12] 蔺亚东. 糖尿病肾病气阴两虚证小鼠模型的建立及芪术颗粒的干预作用[D]. 北京: 中国中医科学院; 2020.
Lin YD. Establishment of the mouse model of diabetic nephropathy with Qi and Yin deficiency syndrome and the intervention of Qi-Zhu granule [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences; 2020.
- [13] 马建伟. 代谢病中医特色诊疗[M]. 北京: 人民军医出版社; 2014.
Ma JW. Metabolic diseases Chinese medicine specialized treatment [M]. Beijing: People's Army Medical Publishing House; 2014.
- [14] 林志健. 高尿酸并腹型肥胖鹌鹑模型证候特征及菊苣颗粒的作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学; 2012.
Lin ZJ. Study the features of hyperuricemia and abdominal

- obesity quail model and chicory therapeutic mechanism [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2012.
- [15] 王少贤, 白明华, 陈家旭, 等. 关于建立中医证候模型评价量表的思考 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(3): 531-534. Wang SX, Bai MH, Chen JX, et al. Thinking of establishing scales for animal models with syndromes of TCM [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2011, 26(3): 531-534.
- [16] 朱梦梦, 王立鑫, 封若雨, 等. 脾虚湿阻型单纯性肥胖小鼠模型的构建及评价 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(2): 247-250, 328. Zhu MM, Wang LX, Feng RY, et al. Construction and evaluation of a mouse model of simple obesity with spleen deficiency and damp stagnation [J]. J Basic Chin Med, 2021, 27(2): 247-250, 328.
- [17] 陈浩, 刘志勇, 侯吉华, 等. 脾虚湿阻型单纯性肥胖动物模型建立及客观性评价 [J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31(6): 84-86, 112. Chen H, Liu ZY, Hou JH, et al. Establishment and objective evaluation of simple obesity animal model with spleen deficiency and dampness resistance [J]. J Jiangxi Univ Tradition Chin Med, 2019, 31(6): 84-86, 112.
- [18] 安冬青, 吴宗贵, 梁春, 等. 血脂异常中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国全科医学, 2017, 20(3): 262-269. An DQ, Wu ZG, Liang C, et al. Expert consensus on the diagnosis and treatment of dyslipidemia by combination of traditional Chinese and western medicine [J]. Chin Gen Pract, 2017, 20(3): 262-269.
- [19] 于婧. 冠心病慢性心力衰竭血瘀证临床表征及其与理化指标关联分析 [D]. 郑州: 郑州大学; 2018. Yu J. Coronary heart disease chronic heart failure blood stasis syndrome clinical characterization and its association with physical and chemical indicators [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University; 2018.
- [20] 尹湘君. 血脂异常证候演变规律及运脾化浊法对血脂异常大鼠作用机制的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2016. Yin XJ. Study on the law of syndrome evolution of dyslipidemia and the mechanism of action of spleen-activating and turbidity-removing therapy on dyslipidemia rats [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2016.
- [21] 郭文鹤, 黄娜娜, 张晓亮, 等. 动脉粥样硬化(气滞血瘀证)病证结合大鼠模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 32-41. Guo WH, Huang NN, Zhang XL, et al. A study on a rat model of atherosclerosis with qi stagnation and blood stasis syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(9): 32-41.
- [22] 樊华. 灯盏花中野黄芩苷对气滞血瘀型动脉粥样硬化的干预作用及机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2018. Fan H. Study on the intervention effect and mechanism of scutellarin from Erigeron breviscapus on atherosclerosis of qi stagnation and blood stasis type [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2018.
- [23] 孟繁魁, 陶雪飞, 王大伟, 等. 气郁血瘀型高脂动物模型的研究 [J]. 中国中医急症, 2005, 14(9): 878. Meng FS, Tao XF, Wang DW, et al. Study on hyperlipidemia animal model of Qi stagnation and blood stasis [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2005, 14(9): 878.
- [24] 倪青. 高尿酸血症和痛风病证结合诊疗指南(2021-01-20) [J]. 世界中医药, 2021, 16(2): 183-189. Ni Q. Guideline for diagnosis and treatment of hyperuricemia and gout (2021-01-20) [J]. World Chin Med, 2021, 16(2): 183-189.
- [25] 张冰, 刘小青, 丁正磊, 等. 鹤鹑高尿酸血症中医证候学研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(10): 676-678. Zhang B, Liu XQ, Ding ZL, et al. Symptomatology study of Chinese medicine in quail with hyperuricacidemia [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2006, 29(10): 676-678.
- [26] 吴仕九, 廖礼兵, 文小敏, 等. 温病湿热证湿热量化的相关性实验研究 [J]. 中医杂志, 2003, 44(9): 688-690. Wu SJ, Liao LB, Wen XM, et al. Experimental study on correlativity of damp-heat quantification in damp-heat syndrome of epidemic febrile disease [J]. J Tradit Chin Med, 2003, 44(9): 688-690.
- [27] 张声声, 胡玲, 李茹柳. 脾虚证中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. 中医杂志, 2017, 58(17): 1525-1530. Zhang SS, Hu L, Li RL. Expert consensus opinion on Chinese medicine treatment of spleen deficiency evidence (2017) [J]. J Tradit Chin Med, 2017, 58(17): 1525-1530.
- [28] 朱文静, 张冰, 刘小青, 等. 大鼠高尿酸血症证候学特征及菊苣的干预研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(12): 3636-3639. Zhu WJ, Zhang B, Liu XQ, et al. Study on the syndrome characteristics of hyperuricemia rat model and the effects of chicory extract [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2013, 28(12): 3636-3639.
- [29] 孙霞. 火针点刺对急性痛风性关节炎湿热蕴结型大鼠的抗炎机制研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学; 2018. Sun X. Investigation on that anti-inflammatory mechanism of fire needle prick in the acute gouty arthritis rat model with syndrome of accumulated dampness-heat [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine; 2018.
- [30] 李延平. 高尿酸血症的中医证候规律及其易患因素的研究 [D]. 福州: 福建中医学院; 2007. Li YP. Study on regularity of TCM syndromes and risk factors in hyperuricemia [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine; 2007.
- [31] 林志健, 刘小青, 张冰, 等. 基于指标量化的高尿酸血症鹤鹑模型中医证候分型研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1072-1076. Lin ZJ, Liu XQ, Zhang B, et al. Study on syndrome categorization of hyperuricemia quail model base on quantitative analysis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2011, 26(5): 1072-1076.
- [32] 刘霖, 邓松波, 田文敬. 高血压中医诊疗信息管理系统的设计与应用 [J]. 中医研究, 2020, 33(6): 63-66.

- Liu L, Deng SB, Tian WJ. Construction and application of TCM diagnosis and treatment information management system for hypertension [J]. Tradit Chin Med Res, 2020, 33(6): 63-66.
- [33] 杨佩, 李君玲, 李玉波, 等. 角音干预对肝火亢盛型自发性高血压大鼠宏观表征及易激惹程度的影响 [J]. 世界中医药, 2018, 13(9): 2102-2106.
- Yang P, Li JL, Li YB, et al. Effects of Jue tone music on macroscopic characterization and irritability of hypertensive rats with liver-fire hyperactivity syndrome [J]. World Chin Med, 2018, 13(9): 2102-2106.
- [34] 姜炳辰, 沈佳莹, 莫文. 一种新型病证相结合肝阳上亢证颈性眩晕大鼠模型的制备方法 [J]. 中国骨伤, 2020, 33(2): 178-180.
- Jiang BC, Shen JY, Mo W. A method to create a new rat model of combination of disease and syndrome with cervical vertigo hyperactivity of liver-Yang syndrome [J]. Chin J Orthop Traumatol, 2020, 33(2): 178-180.
- [35] 李娇. 风眩宁方 3 对肝阳上亢型高血压大鼠胰岛素抵抗等影响的实验研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学; 2016.
- Li J. Experimental study on the effect of Feng Xuan Ning Fang 3 on insulin resistance in rats with hyperactive liver yang hypertension [D]. Changsha: Hunan University Chinese Medicine; 2016.
- [36] 吴赛, 姜月华, 杨传华, 等. 痰湿壅盛证高血压大鼠模型的建立与评价 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(2): 222-228.
- Wu S, Jiang YH, Yang CH, et al. Establishment and evaluation of hypertensive rat model with excessive accumulation of phlegmdampness syndrome [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2016, 36(2): 222-228.
- [37] 刘顶鼎, 常露露, 杨菁, 等. 肝阳上亢兼瘀血型偏头痛病证结合大鼠模型建立的研究 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(5): 1253-1256.
- Liu DD, Chang LL, Yang J, et al. Study on the establishment of rat model of hyperactivity of liver and migraine with blood stasis syndrome [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(5): 1253-1256.
- [38] 李林. 肝亢痰滞型高血压大鼠模型的建立 [J]. 青岛大学医学院学报, 2015, 51(1): 90-91.
- Li L. Creation of a liver-syndrome-phlegm-stagnation type hypertension model in rats [J]. Acta Acad Med Qingdao Univ, 2015, 51(1): 90-91.
- [39] 何聪. HLIC 阴虚阳亢、瘀血阻络证动物模型的建立及中药干预 [D]. 长沙: 湖南中医药大学; 2019.
- He C. Establishment of animal model of HLIC syndrome of Yin deficiency and Yang hyperactivity and blood stasis blocking collaterals and intervention of traditional Chinese medicine [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine; 2019.
- [40] 陈素红, 吕圭源, 吴海峰, 等. 潜阳方对高血压肝阳上亢证大鼠相关指标的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(07): 973-976.
- Chen SH, Lv GY, Wu HF, et al. Effect of Qianyang recipe on correlated indices of hypertension rats of Gan-yang hyperactivity syndrome [J]. Chin J Integr Trad West Med, 2011, 31(7): 973-976.
- [41] 陈腾蛟, 徐男. 自发性高血压痰湿壅盛型大鼠动物模型的构建和分析评价 [J]. 药学研究, 2015, 34(9): 503-506.
- Chen TJ, Xu N. Construction and analysis of phlegm dampness type spontaneously hypertensive rat animal model [J]. J Pharm Res, 2015, 34(9): 503-506.
- [42] 钱宏梁, 潘志强, 方肇勤. 红外热像技术在小鼠阳虚证研究中的运用及其评价体系 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 733-739.
- Qian HL, Pan ZQ, Fang ZQ. Application of infrared thermography in the evaluation of mouse Yangxu Syndrome and its evaluation criteria [J]. Acta Lab AnimSci Sin, 2019, 27(6): 733-739.
- [43] 方肇勤, 潘志强, 汤伟昌, 等. 小鼠“四诊工作站”构建与操作标准探讨 [J]. 上海中医药大学学报, 2006, 20(1): 42-46.
- Fang ZQ, Pan ZQ, Tang WC, et al. Construction and operational standard of four diagnostic methods workstation for mice [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2006, 20(1): 42-46.
- [44] 王恒和, 张富赓, 程刚, 等. “证治代谢组学”假说的研究思路与实践 [J]. 中国全科医学, 2016, 19(19): 2344-2347.
- Wang HH, Zhang FG, Cheng G, et al. Research and practice of the hypothesis of “treatment by syndrome and metabonomics” [J]. Chin Gen Pract, 2016, 19(19): 2344-2347.

[收稿日期] 2022-03-10

龙雯,明瑶,李茗西,等. 苓术菟丝子丸抑制 IKK β /NF- κ B/MCP-1 通路减少阿霉素诱导的大鼠肾性蛋白尿 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 909-917.

Long W, Ming Y, Li MX, et al. Effects of Ling Zhu Tusizi Pills in inhibiting the I- κ B kinase β /nuclear factor- κ B/monocyte chemoattractant protein-1 signaling pathway to reduce adriamycin-induced proteinuria in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 909-917.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.005

苓术菟丝子丸抑制 IKK β /NF- κ B/MCP-1 通路减少阿霉素诱导的大鼠肾性蛋白尿

龙雯^{1,3}, 明瑶², 李茗西¹, 沈宏春^{3*}

(1. 西南医科大学中西医结合学院, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学附属中医医院内分泌科, 四川 泸州 646000; 3. 西南医科大学附属中医医院肾病科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨苓术菟丝子丸对阿霉素肾病蛋白尿的影响及机制。**方法** 将 36 只雄性 SD 大鼠纳入实验。随机分为 6 组(6 只/组)。包括空白、模型组和 PDTC(NF- κ B 抑制剂)组(100 mg/(kg·d)), 以及苓术菟丝子丸低、中、高剂量组(14、28、56 g/(kg·d))。除空白组外的大鼠均用阿霉素造成肾病模型。造模成功后, 连续用药 6 周。记录一般生命体征; 收集检测 24 h 尿蛋白, 血浆白蛋白(Alb)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)和 C 反应蛋白(CRP); HE、Masson、PAS 染色, 透射电镜观察肾病理形态变化; ELISA 检测血清 IL-6、TNF- α 水平; Western Blot 检测 IKK β /NF- κ B/MCP-1 通路相关蛋白。**结果** 模型组大鼠生存状态差。Alb 降低, 24 h 尿蛋白升高。肾小管广泛肿胀, 肾小球足突融合; 大量纤维沉积, 基底膜增厚。血清 IL-6、TNF- α 和 CRP 升高; 肾 p-IKK β 、p-NF- κ B、MCP-1 表达水平, 及 p-IKK β /IKK β 、p-NF- κ B/NF- κ B 比值升高, nephrin、podocin 表达减少($P < 0.05$)。给药组除高剂量组外, 大鼠一般状况良好。体重升高, 24 h 尿蛋白降低, Alb 升高。肾小管肿胀减轻, 肾小球足突融合改善。肾小管、小球纤维化减少, 基底膜无增厚。血清 IL-6、TNF- α 和 CRP 降低; 肾 p-IKK β 、p-NF- κ B、MCP-1 表达水平, 及 p-IKK β /IKK β 、p-NF- κ B/NF- κ B 比值减少, nephrin、podocin 表达增多($P < 0.05$)。**结论** 苓术菟丝子丸减少阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白, 降低血清炎症因子, 其作用机制可能与抑制 IKK β /NF- κ B/MCP-1 信号通路有关。

【关键词】 蛋白尿; 苓术菟丝子丸; 阿霉素肾病; NF- κ B

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 07-0909-09

Effects of Ling Zhu Tusizi Pills in inhibiting the I- κ B kinase β /nuclear factor- κ B/monocyte chemoattractant protein-1 signaling pathway to reduce adriamycin-induced proteinuria in rats

LONG Wen^{1,3}, MING Yao², LI Mingxi¹, SHEN Hongchun^{3*}

(1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. 2. Department of Endocrinology, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000. 3. Department of Nephrology, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

Corresponding author: SHEN Hongchun. E-mail: shenhongchun79@163.com

【基金项目】 四川省大学生创新创业训练项目(202010632057), 西南医科大学科研项目(2019ZQN082)。

Funded by the Innovative Entrepreneurship Training Program for College Students in Sichuan Province (202010632057), Scientific Research Project of Southwest Medical University (2019ZQN082).

【作者简介】 龙雯(1995—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治肾脏疾病基础与临床。Email: 2934205892@qq.com

【通信作者】 沈宏春(1979—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 中医药防治肾脏疾病基础与临床。Email: shenhongchun79@163.com

【Abstract】 Objective To examine the potential mechanism of Ling Zhu Tusizi Pills in a rat model of adriamycin-induced proteinuria. **Methods** Thirty-six specific-pathogen-free male SD rats were divided randomly into six groups ($n=6$ rats per group), including blank, model, low-dose Ling Zhu Tusizi (14 g/(kg·d)), medium-dose Ling Zhu Tusizi (28 g/(kg·d)), high-dose Ling Zhu Tusizi (56 g/(kg·d)), and pyrrolidine dithiocarbamate (PDT; nuclear factor- κ B inhibitor; 100 mg/(kg·d)) groups. The last five groups also received two injections of adriamycin into the tail vein to develop the nephropathy model, with one dose of 4 mg/kg and another dose of 2 mg/kg given 1 week apart. After successful establishment of the model, Ling Zhu Tusizi Pills were administered for 6 weeks. We examined general vital signs and body weights of the rats, as well as 24 h urine protein, plasma albumin, serum creatinine, blood urea nitrogen, and C-reactive protein. Morphological alterations of the renal tubules and glomeruli, renal fibrosis and basement membrane thickness were observed by hematoxylin and eosin, Masson, and periodic-acid Schiff staining. Modification of the foot process in glomerular podocytes was observed by transmission electron microscopy. Serum levels of pro-inflammatory molecules including interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. I- κ B kinase β (IKK β)/nuclear factor (NF)- κ B/monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) pathway-related proteins and nephrin and podocin proteins were detected by Western Blot. **Results** General health was poorer in the model group compared with the control group, as evidenced by body weight loss, increased 24 h urine protein, and decreased albumin. Renal tubule enlargement, disorganized glomerular visceral cell arrangement, diffuse foot process fusion, podocyte death, extensive fiber deposition, and basement membrane thickening were also noted in the model group. Serum levels of the pro-inflammatory markers IL-6, TNF- α and CRP were increased, renal-tissue phosphorylated (p)-IKK β , p-NF- κ B and MCP-1 protein expression levels and the p-IKK β /IKK β and p-NF- κ B/NF- κ B ratios were increased, while nephrin and podocin expression levels were decreased ($P < 0.05$) in model compared with control rats. Rats in each treatment group experienced variable degrees of symptom relief compared with the model group, with medium-dose Ling Zhu Tusizi Pills having the best therapeutic effect. Rats in this group were generally healthy, with increased body weight and albumin and decreased 24 h urine protein. There were also notable reductions in fibrosis and renal tubule edema, a smooth arrangement of cells in the glomerular visceral layer, enhanced foot process fusion, and no thickening of the basement membrane. Serum levels of IL-6, TNF- α , and CRP were decreased, nephrin and podocin expression were increased, and p-IKK β , p-NF- κ B, MCP-1, p-IKK β /IKK β and p-NF- κ B/NF- κ B expression were all significantly decreased in renal tissues in this group ($P < 0.05$). **Conclusions** Ling Zhu Tusizi Pills reduced 24 h urine protein and serum pro-inflammatory markers in rats with adriamycin-induced nephropathy, possibly via inhibition of the IKK β /NF- κ B/MCP-1 signaling pathway.

【Keywords】 proteinuria; Ling Zhu Tusizi Pills; adriamycin nephropathy; NF- κ B

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

慢性肾病 (CKD) 是全球性公共卫生问题^[1]。其患病群体庞大,且在全球造成的生命损失仍在逐年增加^[2]。不但给患者带来疾病困扰,给社会造成的经济负担更加不容小觑,尤其在发展中国家^[3]。肾性蛋白尿几乎是所有类型 CKD 的共同临床表现^[4],伴随炎症反应^[5],表现为炎症因子 IL-6、TNF- α 、CRP 及 MCP-1 增多^[4,6-7],与 NF- κ B 通路激活密切相关^[4,8]。目前临床治疗 CKD 的西药疗效常常受限,因此中国医学的独特优势值得我们深入挖掘和发扬。中医认为蛋白尿的本质为“脾肾亏虚,精微不固”^[9],治当补肾固精,且此法指导临床收效明显^[10]。苓术菟丝子丸作为该法代表方。本文意在探究其对肾性蛋白尿的影响。同时基于 NF- κ B 探究其发挥作用的可能机制。以期为祖国医学补肾固精法减少 CKD 蛋白尿提供部分实验支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

36 只 6~8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 (210~240 g)。采购并饲养于西南医科大学实验动物中心【SCXK(川)2018-17】、【SYXK(川)2018-065】。水和食物充足,昼夜各半交替。环境温度 19~22℃,湿度 45%~60%。适应性饲养 1 周。实验获西南医科大学实验动物伦理中心审批 (201903-210)。

1.1.2 主要试剂与仪器

盐酸阿霉素 (纯度 $\geq 98\%$, 索莱宝, D8740, 中国北京); PDT (纯度 $>99\%$, 碧云天, S1809, 中国北京)。苓术菟丝子丸原方组成^[11]: 莲肉 (四两)、盐杜仲 (三两)、盐菟丝子 (十两)、茯苓 (四两)、白术 (四两)、人参 (二两)、山药 (二两)、五味子 (二两)、

炙甘草(五钱)。灌胃药物为免煎颗粒(四川新绿色药业科技发展有限公司, 中国成都)。IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒(Cloud-clone; SEA079Ra 中国武汉、SCA133Ra 美国)。NF- κ B 抗体(CST, 8242 T, 美国); p-NF- κ B、IKK β 、p-IKK β 、NPHS2、Nephrin、MCP-1 抗体(Abcam; ab86299、ab124957、ab59195、ab50339、ab216341、ab7202, 英国); GAPDH 抗体(Thermo Fisher Scientific, MA5-15738, 美国)。电泳、转膜仪(Bio-Rad; Mini PROTEAN[®] Tetra System, 美国); 石蜡切片机(Leica; RM2245, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与阿霉素肾病模型构建

共分 6 组, 每组 6 只。苓术菟丝子丸低、中、高剂量组(阿霉素+苓术菟丝子丸); PDTC 组(阿霉素+PDTC); 空白组(蒸馏水); 模型组(阿霉素+蒸馏水)。模型和药物干预组大鼠用阿霉素造模。经尾静脉先后 2 次(分别按 4 mg/kg、2 mg/kg, 间隔 1 周)注射阿霉素^[12-13]。造模后, 每周监测 24 h 尿蛋白。以正常组和其余组尿蛋白定量存在差异($P < 0.05$)为造模成功的标志^[14]。本实验于第 2 次尾静脉注射后 1 周造模成功。造模及实验过程中, 各组动物无死亡。

1.2.2 实验干预

造模成功后干预 6 周。大鼠给药量按人-大鼠体表面积折算系数换算。换算后免煎颗粒的 1、2、4 倍分别作为低、中、高剂量组(14、28、56 g/kg), 灌胃前 30 min 用蒸馏水将免煎颗粒制成混悬液, 水量按 3 mL/只计算, 1 日 1 次。PDTC 组腹腔注射给药, 按 100 mg/kg 计算, 1 日 1 次。PDTC 组另在 2 次造模前 1 h 预给药, 剂量同前。空白、模型组蒸馏水灌胃, 水量和频率同前。

1.2.3 记录大鼠一般状态

观察精神状态、摄食饮水情况。测量并记录体重。观察比较肢体水肿等情况。

1.2.4 标本采集与检测

大鼠 24 h 尿液收集: 禁食不禁饮情况下, 将其置于代谢笼 1 昼夜。血液肾标本收集: 1% 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 采血针连负压管行腹主动脉采血。部分血清、肾冻存于 -80℃; 4% 多聚甲醛、2.5% 戊二醛固定肾。尿液及部分血液标本送西南医科大学附属医院中医医院检验科, 测 24 h 尿蛋白、BUN、Scr、CRP 和 Alb。

1.2.5 各组大鼠肾病理学改变

多聚甲醛固定肾组织 24 h, 冲水过夜。先经乙醇、二甲苯处理。然后浸蜡、包埋成石蜡块。切片、脱蜡、复水后, 按文献及说明书做 HE^[15]、Masson、PAS 染色。封片后光镜观察并拍照。透射电镜标本制作参见^[16]。

1.2.6 ELISA 检测血清 IL-6、TNF- α

按说明书稀释标准品制作标准曲线, 然后每孔加入 100 μ L 血清样品, 按说明书进行孵育洗板显色操作。终止反应后用酶标仪测 IOD 450 的值, 最后计算分析。

1.2.7 Western Blot 检测肾 IKK β /NF- κ B/MCP-1 通路蛋白及足细胞标志蛋白水平

先将肾组织提取的蛋白液变性备用。每梳孔加入蛋白样品电泳后转膜。将膜封闭后一抗过夜。次日孵育二抗、显影拍照。最后用 Image J 定量统计。

1.3 统计学分析

用 SPSS 23.0 进行 ANOVA 单因素方差分析, 采用 LSD 方法进行组间比较, 定量资料用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。用 GraphPad Prism 8 作图。

2 结果

2.1 苓术菟丝子丸改善阿霉素肾病大鼠一般生命体征

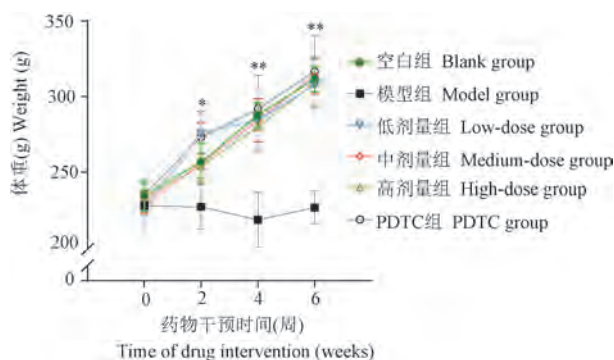
空白组大鼠体征无异常。模型组大鼠精神困倦、食少迟钝。眼眶、鼻、牙龈及消化道均有出血表现, 毛发干枯脱落, 腹部鼓胀、后肢水肿, 日渐消瘦。给药组大鼠除高剂量组外病情缓解; 状态良好, 纳食可, 反应迅速, 无出血表现, 毛发光滑浓密, 腹部无鼓胀, 后肢水肿减轻。大鼠体重记录见图 1。

由图 1 知, 药物干预第 0 周, 大鼠体重无差异。随药物干预时间延长, 给药组大鼠体重持续增长。模型组无增长。第 2 周时, 模型组大鼠体重轻于其他组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。第 4、6 周时体重差异明显($P < 0.01$)。表明苓术菟丝子丸改善阿霉素肾病大鼠一般生命体征, 保持体重增长。

2.2 苓术菟丝子丸使阿霉素肾病大鼠尿蛋白丢失减少, 血浆白蛋白升高

2.2.1 苓术菟丝子丸减少阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白

第 2 次尾静脉注射后 1 周, 各组 24 h 尿蛋白较空白组显著升高($P < 0.01$), 此时计为药物干预第



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

图1 各组大鼠体重记录

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

(The same in the following figures)

Figure 1 Body weight records of rats in each group

0 周(图 2A)。药物干预 6 周后,给药组 24 h 尿蛋白显著降低($P < 0.01$)(图 2B)。提示阿霉素肾病大鼠尿蛋白丢失被苓术菟丝子丸部分逆转。给药后,Scr、BUN(图 2C, 2D)较模型组降低,差异无统计学意义。

2.2.2 苓术菟丝子丸升高阿霉素肾病大鼠血浆白蛋白

图 2E 为血浆白蛋白。模型组显著低于正常组($P < 0.01$),药物干预后血浆白蛋白较模型组明显升高($P < 0.01$)。提示阿霉素肾病大鼠血浆白蛋白

降低,可被苓术菟丝子丸缓解。

2.3 苓术菟丝子丸使阿霉素肾病大鼠肾病变减轻

2.3.1 HE 染色

空白组肾未见异常改变。模型组肾小管肿胀挤压变形,边界融合界限不清,小管间质炎性细胞浸润。肾小球皱缩塌陷,球囊粘连。中剂量组 and PDTC 组,小管改善明显,炎性细胞浸润减少,小球结构清晰。低剂量组小管病变部分改善,少量蛋白管型。高剂量组无明显改善(图 3)。

2.3.2 Masson 染色

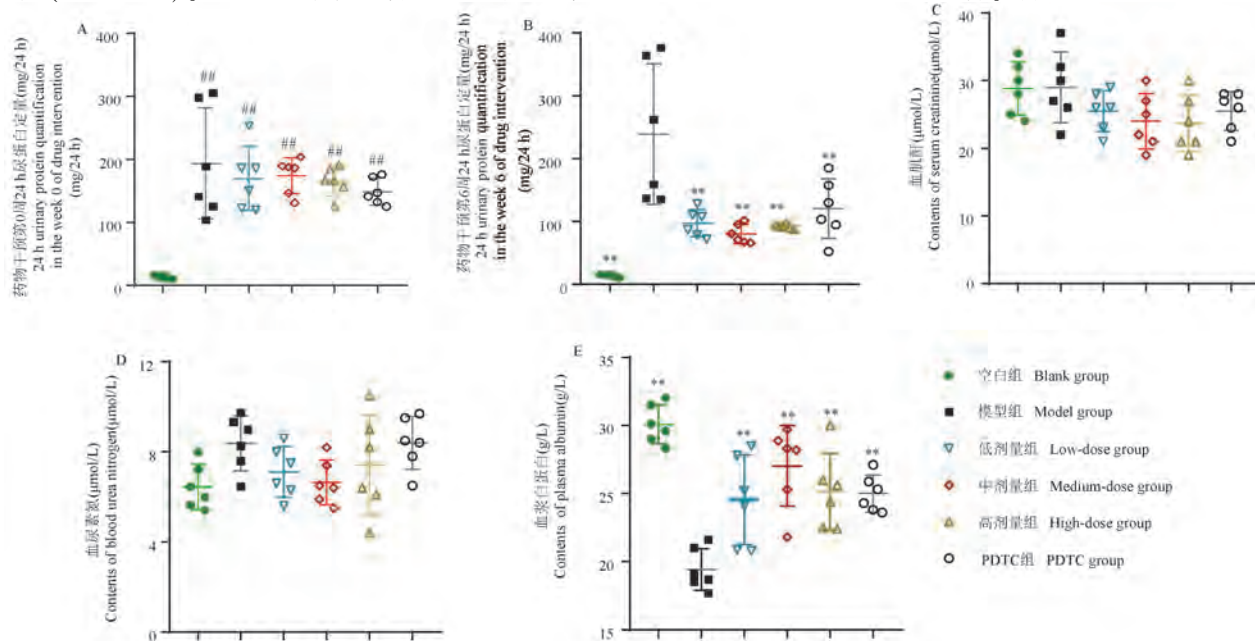
空白组未见异常。模型组肾小球肾小管均见大量纤维蓝染,且小球小管结构严重破坏。与模型组相比,低、中剂量组纤维化程度明显减轻,PDTC 组纤维化部分减少。高剂量组改善不明显(图 4)。

2.3.3 PAS 染色

空白组未见异常。模型组血管袢紊乱增厚,基底膜明显增厚,小管间可见大量细胞外基质沉积伴炎性细胞弥漫分布。低、中剂量组和 PDTC 组,肾小球血管袢清晰而薄,基底膜正常,管间边界清晰协调。高剂量组基本无改善(图 5)。

2.3.4 透射电镜

空白组无异常。模型组呈典型微绒毛改变,足细胞足突融合。伴足细胞剥落,足细胞数量减少。PDTC 组足突未见明显融合。低剂量组毛细血管襻



注:与空白组相比,### $P < 0.01$ 。(下同)

图2 大鼠肾功能相关检测

Note. Compared with the blank group, ### $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Detection of renal function in rats

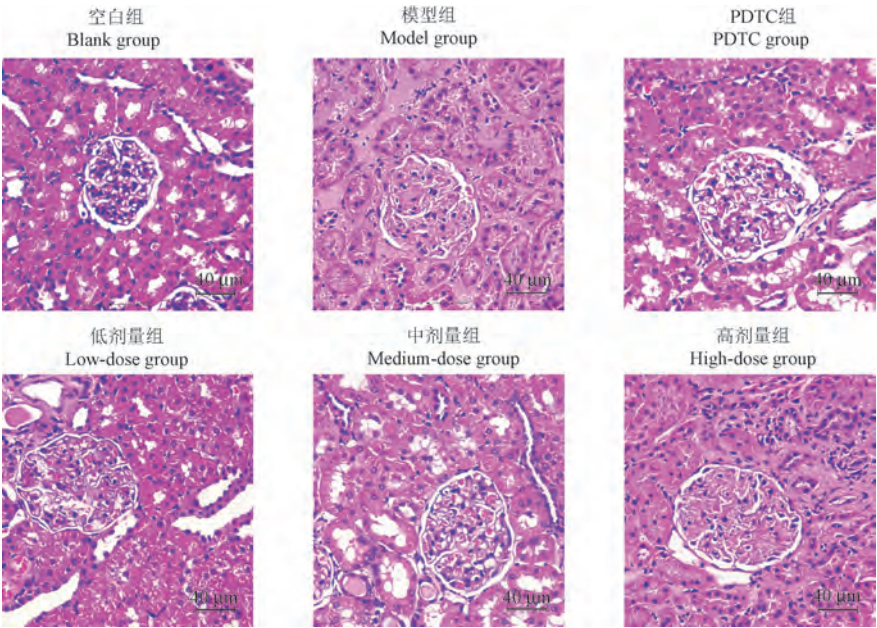


图 3 大鼠肾 HE 染色
Figure 3 HE staining of kidneys in rats

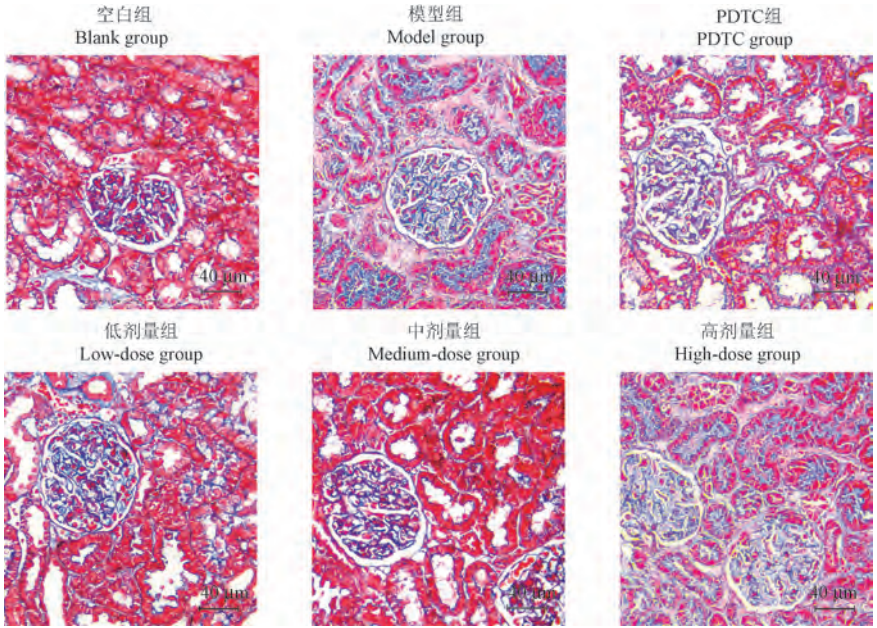


图 4 大鼠肾 Masson 染色
Figure 4 Masson staining of kidneys in rats

开放,足突部分融合。中剂量组,足突清晰可见,少量融合。高剂量组足突融合无改善(图 6)。

2.4 苓术菟丝子丸使循环炎症因子减少

模型组炎症因子普遍升高($P < 0.01$)。给药后 TNF- α 有所下降(图 7A)。其中,中剂量组和 PDTC 组显著减少($P < 0.01$);低剂量组减少($P < 0.05$)有统计学意义;高剂量组无统计学意义。给药后各组 IL-6 均显著减少($P <$

0.01),有统计学意义(图 7B)。中剂量组 CRP 减少($P < 0.05$),PDTC 组 CRP 显著减少($P < 0.01$),有统计学意义(图 7C);其余组无统计学意义。

2.5 苓术菟丝子丸抑制阿霉素肾病大鼠 IKK β /NF- κ B/MCP-1 通路并上调足细胞标志蛋白

IKK β 、NF- κ B 总体表达水平组间无统计学意义(图 8)。与空白组相比,模型组 p-IKK β 、p-NF- κ B、

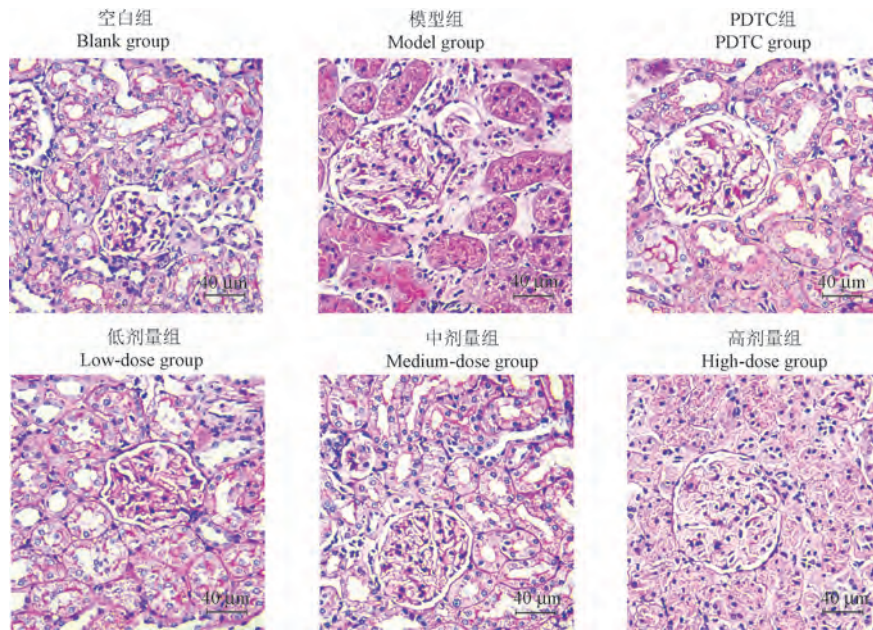


图 5 大鼠肾 PAS 染色

Figure 5 PAS staining of kidneys in rats

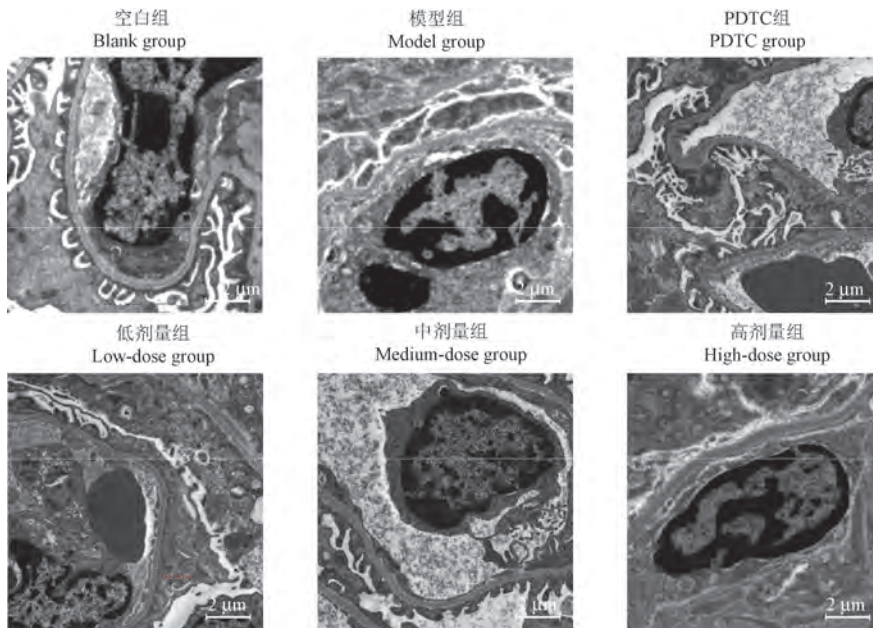


图 6 大鼠肾电镜图

Figure 6 Electron microscopic pictures of kidneys in rats

MCP-1 表达增多 ($P < 0.01$); p-IKK β /IKK β 、p-NF- κ B/NF- κ B 比值上升 ($P < 0.01$); nephrin、podocin 表达减少 ($P < 0.01$), 有统计学意义。与模型组相比, 苓术菟丝子丸低剂量组, pNF- κ B/NF- κ B 比值、MCP-1 表达水平降低 ($P < 0.05$); nephrin、podocin 表达增多 ($P < 0.05$), 有统计学意义; p-IKK β /IKK β 比值降低, 无统计学意义。苓术菟丝子丸中剂量组, pNF- κ B/NF- κ B 比值、p-IKK β /IKK β 比值、MCP-1 表

达均显著降低 ($P < 0.01$); nephrin、podocin 表达显著增多 ($P < 0.01$), 有统计学意义。PDTC 组, pNF- κ B/NF- κ B 比值及 MCP-1 表达显著减少 ($P < 0.01$); p-IKK β /IKK β 比值降低 ($P < 0.05$); nephrin、podocin 表达增多 ($P < 0.05$), 有统计学意义。苓术菟丝子丸高剂量组, pNF- κ B/NF- κ B 比值减少 ($P < 0.05$), 有统计学意义, 其余指标无明显改善。

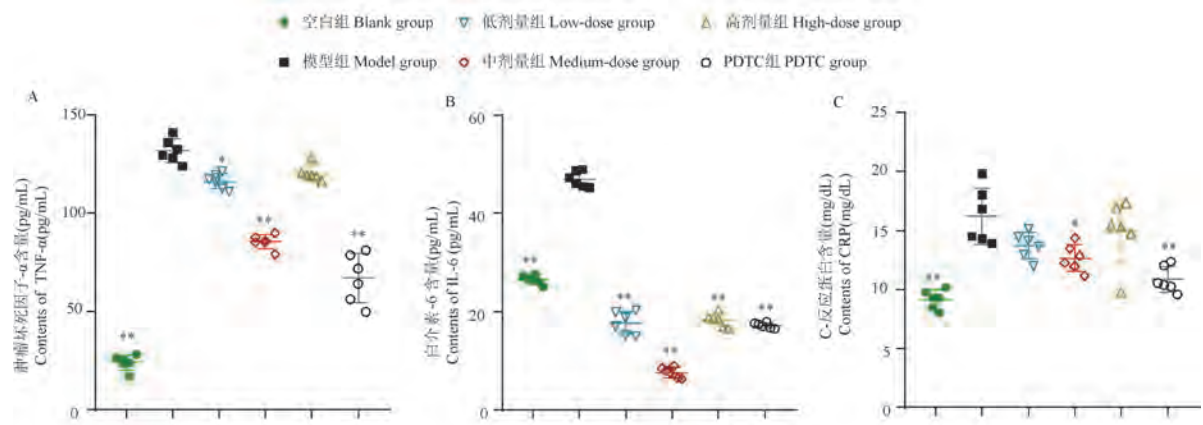


图 7 大鼠循环炎症因子水平
Figure 7 Levels of circulating inflammatory cytokines in rats

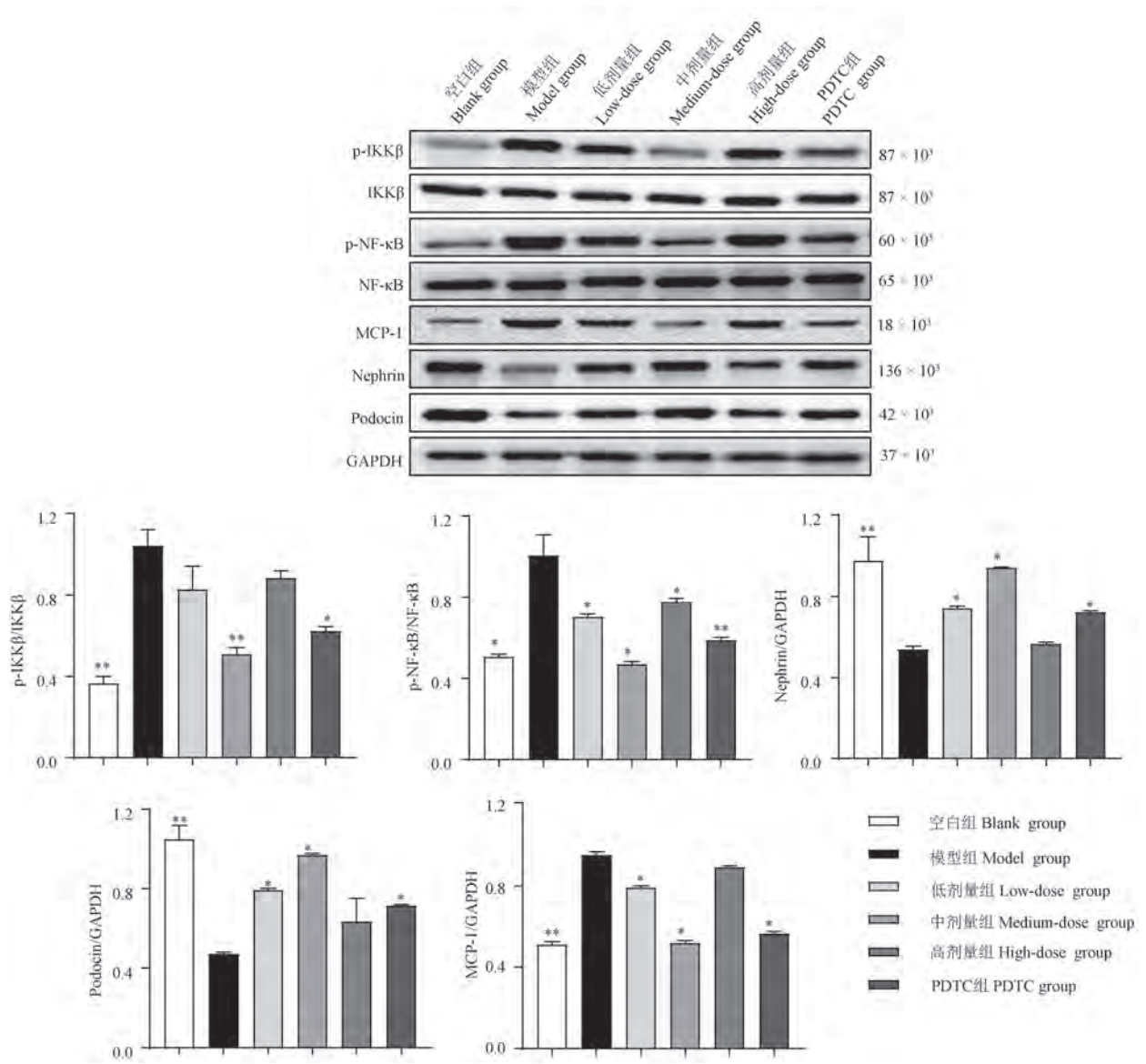


图 8 大鼠肾组织 IKKβ/NF-κB/MCP-1 通路相关蛋白表达水平
Figure 8 Protein expression level of IKKβ/NF-κB/MCP-1 signaling pathway related in kidney tissue of rats

2 讨论

NF- κ B 作为 CKD 的潜在药物靶点和生物标志物,IKK β 是其经典上游^[17]。一项阿霉素损伤足细胞的体外实验表明,NF- κ B/MCP-1 信号通路与之相关^[4]。足细胞受损时 MCP-1 增多^[18],足细胞损伤缓解时 MCP-1 减少^[19]。蛋白尿的主要原因是足细胞损伤^[4]。由此可知,IKK β /NF- κ B/MCP-1 通路与 CKD 蛋白尿息息相关。

苓朮菟丝子丸出自《景岳全书》^[11]。治脾肾虚损之滑脱。“气虚神倦,不能收摄,加人参三四两。”脾肾亏虚,化源与固摄失度,则精失且无以为继。方中菟丝子补益肝肾而固精。白朮、茯苓补脾气而助健运。加人参大补元气,增益气之固涩之功。携诸药行脾肾双补固精填髓之效。体现了开源节流、标本兼治的治法。

尿蛋白作为肾损伤的标志物,对肾小管间质损伤有直接毒性作用,可加强肾局部微炎症,降低尿蛋白是缓解 CKD 的有效措施^[5]。NF- κ B 是足细胞损伤产生蛋白尿的关键介质^[20]。Nephrin、podocin 均为足细胞标志蛋白,对维持肾滤过功能至关重要^[21]。抗 MCP-1 治疗可减轻肾小管间质炎症^[5]。Boels 等^[22]发现,在糖尿病持续损伤的情况下,抑制 MCP-1 可以恢复肾小球内皮细胞糖基化和屏障功能,并减少组织炎症。一定程度抑制 NF- κ B 对足细胞有保护作用,但 NF- κ B 过度抑制会导致足细胞死亡^[4]。因而苓朮菟丝子丸高剂量组肾病理表现出肾小球结构无改善、足突融合成片的现象,可考虑该组药物剂量过大,对 NF- κ B 产生了过度抑制,导致足细胞死亡。加快了疾病进程,使肾小球几近失去滤过功能,提前进入肾衰竭少尿期,尿液减少,故该组 24 h 尿蛋白减少,血浆白蛋白升高。这与临床急性肾衰竭少尿期病人的表现相符合。

本实验结果表明,阿霉素肾病大鼠体重减轻。24 h 尿蛋白升高,炎症因子 IL-6、TNF- α 、CRP 增多。肾组织中 IKK β /NF- κ B/MCP-1 通路激活,足细胞受损,足突成片融合呈绒毛样改变。Nephrin、podocin 表达减少。除高剂量组外,低、中剂量给药组大鼠肾 p-IKK β 、p-NF- κ B、MCP-1 蛋白表达减少,下游炎症因子降低。Nephrin、podocin 蛋白表达增多。足突融合改善,24 h 尿蛋白减少。表明阿霉素肾病蛋白尿和炎症因子增多可被苓朮菟丝子丸部分逆转。可能与 IKK β /NF- κ B/MCP-1 信号通路的抑制,和保护足细胞有关。

在适宜的剂量下,祖国医学补肾固精法改善肾

性蛋白尿疗效显著由此可见一斑。CKD 治疗周期长费用高,特别是低收入国家的肾衰患者常因无法获得肾替代疗法而过早死亡^[3]。祖国医学的适当应用可延缓病情。也在一定程度上减轻患者医疗负担。本研究没有连续检测药物干预期间的 24 h 尿蛋白定量,因此不能就药物对 24 h 尿蛋白的影响做动态评估。此外本研究的总时长为 8 周,故而未能对长期的药效走向进行把控。

参 考 文 献 (References)

- [1] Glasscock RJ, Warnock DG, Delanaye P. The global burden of chronic kidney disease: estimates, variability and pitfalls [J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13(2): 104-114.
- [2] Luyckx VA, Cherney DZ, Bello AK. Preventing CKD in developed countries [J]. Kidney Int Rep, 2019, 5(3): 263-277.
- [3] Yang C, Wang HB, Zhao XJ, et al. CKD in China: evolving spectrum and public health implications [J]. Am J Kidney Dis, 2020, 76(2): 258-264.
- [4] Bao H, Ge Y, Peng A, et al. Fine-tuning of NF- κ B by glycogen synthase kinase 3 β directs the fate of glomerular podocytes upon injury [J]. Kidney Int, 2015, 87(6): 1176-1190.
- [5] Liu D, Lv LL. New understanding on the role of proteinuria in progression of chronic kidney disease [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165: 487-500.
- [6] Amdur RL, Feldman HI, Gupta J, et al. Inflammation and progression of CKD: The CRIC study [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2016, 11(9): 1546-1556.
- [7] Kayser GA. The microinflammatory state in uremia: causes and potential consequences [J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(7): 1549-1557.
- [8] Sun HJ, Xiong SP, Cao X, et al. Polysulfide-mediated sulfhydrylation of SIRT1 prevents diabetic nephropathy by suppressing phosphorylation and acetylation of p65 NF- κ B and STAT3 [J]. Redox Biol, 2021, 38: 101813.
- [9] 王娟, 刘蕊, 韩世盛, 等. 基于足细胞损伤探讨益气补肾固涩药对蛋白尿的作用及其机制 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(8): 189-193.
Wang J, Liu R, Han SS, et al. Function and mechanism of Yiqi Bushen guse drugs on proteinuria based on study of podocyte damage [J]. Asia Pac Tradit Med, 2020, 16(8): 189-193.
- [10] 沈翀奇. 补肾益精法治疗蛋白尿 55 例 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019, 7(32): 159, 161.
Shen CQ. Treatment of 55 cases of proteinuria with the method of tonifying kidney and nourishing essence [J]. Cardiovasc Dis Electron J Integr Tradit Chin West Med, 2019, 7(32): 159, 161.
- [11] 李志庸. 张景岳医学全书 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2015.
Li ZY. Zhang Jingyue's complete book of medicine [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine; 2015.
- [12] de Fátima Pereira W, Brito-Melo GEA, de Almeida CAS, et al.

- The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents; an update [J]. *Inflamm Res*, 2015, 64(5): 287–301.
- [13] Ma HL, Wu YJ, Zhang WF, et al. The effect of mesenchymal stromal cells on doxorubicin-induced nephropathy in rats [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(6): 703–711.
- [14] 张勇, 张蓓, 宁华英, 等. 单次尾静脉注射法阿霉素大鼠肾病模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(1): 1–4, 107.
- Zhang Y, Zhang B, Ning HY, et al. Establishment of a rat model of nephrosis induced by single tail vein injection of doxorubicin [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2013, 21(1): 1–4, 107.
- [15] Wick MR. The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology-an often-neglected focus of quality assurance in the laboratory [J]. *Semin Diagn Pathol*, 2019, 36(5): 303–311.
- [16] Luan PP, Zhuang JH, Zou J, et al. NLRC5 deficiency ameliorates diabetic nephropathy through alleviating inflammation [J]. *FASEB J*, 2018, 32(2): 1070–1084.
- [17] Rangan G, Wang YP, Harris D. NF- κ B signalling in chronic kidney disease [J]. *Front Biosci*, 2009, 14(9): 3496–3522.
- [18] Wang YH, Liu JX, Zhang QQ, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuate podocyte injury under high glucose via TLR2 and TLR4 signaling [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2021, 173: 108702.
- [19] Son SS, Kang JS, Lee EY. Paclitaxel ameliorates palmitate-induced injury in mouse podocytes [J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2020, 26: e928265.
- [20] Ke GB, Chen XQ, Liao RY, et al. Receptor activator of NF- κ B mediates podocyte injury in diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2021, 100(2): 377–390.
- [21] Tung CW, Hsu YC, Shih YH, et al. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2018, 23(4): 32–37.
- [22] Boels MGS, Koudijs A, Avramut MC, et al. Systemic monocyte chemotactic protein-1 inhibition modifies renal macrophages and restores glomerular endothelial glycocalyx and barrier function in diabetic nephropathy [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(11): 2430–2440.

[收稿日期] 2022-06-06

刘彤彤,张熙,王泉冶,等. 高血压和衰老为主要危险因素的脑小血管病动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30 (7): 918-926.

Liu TT, Zhang X, Wang XY, et al. Establishment of an animal model of cerebral small vessel disease with hypertension and aging as the main risk factors [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 918-926.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.006

高血压和衰老为主要危险因素的脑小血管病动物模型的建立

刘彤彤¹, 张熙³, 王泉冶³, 方锐², 葛金文^{2*}, 孟盼^{1*}

(1. 湖南中医药大学科技创新中心, 长沙 410208; 2. 湖南省中医药研究院, 长沙 410006;
3. 湖南省脑科医院, 长沙 410007)

【摘要】 目的 以 SHR 大鼠为研究对象, 采用不同时间的 D-半乳糖诱导的方法构建以高血压和衰老为主要危险因素的脑小血管病动物模型。**方法** 18 只 SHR 大鼠按体重随机分为 3 组: D-半乳糖 150 mg/(kg·d) + 4 周组、D-半乳糖 150 mg/(kg·d) + 8 周组、D-半乳糖 150 mg/(kg·d) + 12 周组, 每组 6 只。另设 6 只 WKY 大鼠为空白对照组。造模期间, 每周采用无创血压计监测大鼠血压变化; 造模结束后, 采用 Morris 水迷宫检测大鼠认知功能变化; 称重法检测大鼠脑指数、胸腺指数、脾指数和肝指数; ELISA 法检测大鼠血清中 T-SOD、GSH-Px、MDA、NEFL 含量和 CALB/SALB 指数; HE 和 LFB 染色观察大鼠脑组织前额叶皮质细胞形态、脑室微出血以及胼胝体髓鞘损伤情况。**结果** 与 WKY 组比较, 随着 D-半乳糖注射时间的增加, 各组 SHR 大鼠血压升高; 学习记忆能力明显下降; 脑、胸腺、脾、肝各脏器指数降低; 血清中 T-SOD、GSH-Px 含量减少, MDA、NEFL 水平和 CALB/SALB 指数上升; 脑组织前额叶皮质细胞病变数量增多, 血管周围间隙和三脑室背侧微出血量增大以及胼胝体髓鞘空泡化加重。其中以 D-半乳糖 150 mg/(kg·d) 注射 12 周组大鼠的病理生理变化最显著。**结论** SHR 大鼠注射 D-半乳糖 150 mg/(kg·d) 12 周可复制与人类 CSVD 疾病状态接近的 CSVD 动物模型。

【关键词】 脑小血管病; 高血压; 衰老; D-半乳糖

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 07-0918-09

Establishment of an animal model of cerebral small vessel disease with hypertension and aging as the main risk factors

LIU Tongtong¹, ZHANG Xi³, WANG Xiaoye³, FANG Rui², GE Jinwen^{2*}, MENG Pan^{1*}

(1. Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China.
2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006. 3. Brain Hospital of Hunan Province, Changsha 410007)
Corresponding author: GE Jinwen. E-mail: 001267@hnucm.edu.cn; MENG Pan. E-mail: 403642392@qq.com

【基金项目】 湖南省自然科学基金优秀青年项目 (2020JJ3027), 湖南省科技创新人才计划优秀博士后创新人才项目 (2020RC2060), 长沙市杰出创新青年培养计划 (kq2009018), 湖南中医药大学研究生创新课题 (0002012054)。

Funded by Outstanding Youth Project of Natural Science Foundation of Hunan Province (2020JJ3027), Outstanding Postdoctoral Innovative Talents Project of Science and Technology Innovation Talents Project of Hunan Province (2020RC2060), Outstanding Innovative Youth Training Project of Changsha (kq2009018), Postgraduate Innovation Project of Hunan University of Chinese Medicine (0002012054)。

【作者简介】 刘彤彤 (1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 神经精神疾病的机制研究及防治。Email: 15236914662@163.com

【通信作者】 孟盼 (1987—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 神经精神疾病的机制研究及防治。Email: 403642392@qq.com;

葛金文 (1965—), 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中西医结合防治心脑血管疾病。Email: 001267@hnucm.edu.cn。

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective Establish an animal model of small cerebral vascular disease (CVD) in SHR rats induced by D-galactose at various times. **Methods** Eighteen SHR rats were randomly divided into three groups according to body weight: D-galactose 150 mg/(kg · d) + 4 week, D-galactose 150 mg/(kg · d) + 8 week, and D-galactose 150 mg/(kg · d) + 12 week groups with six rats in each group. Another 6 WKY rats were used as the blank control group. A non-invasive sphygmomanometer was used to monitor blood pressure of rats every week during modeling. The Morris water maze was used to assess the cognitive function of rats after modeling. Brain, thymus, spleen, and liver indexes were measured by the weighing method. T-SOD, GSH-Px, MDA, NEFL and CALB/SALB contents in rat serum were determined by ELISA. HE and LFB staining were used to observe cell morphology of the prefrontal cortex, ventricular microhemorrhage, and myelin sheath injury of the corpus callosum. **Results** Compared with the WKY group, the blood pressure of SHR rats was increased with the increase in D-galactose injection time. Learning and memory abilities were decreased significantly. Brain, thymus, spleen, and liver indexes were decreased. T-SOD and GSH-Px contents in serum were decreased, while MDA and NEFL, and CALB/SALB levels were increased. The number of cytopathic lesions in the prefrontal cortex was increased, the amount of perivascular space and dorsal microbleeding of the third ventricle were increased, and vacuolization of the myelin sheath of the corpus callosum was increased. The most significant pathophysiological changes were observed in rats treated with 150 mg/(kg · d) D-galactose for 12 weeks. **Conclusions** SHR rats injected with 150 mg/(kg · d) D-galactose for 12 weeks are a CSVD animal model similar to the human CSVD disease status.

【Keywords】 cerebral small vessel disease; hypertension; aging; D-galactose

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

脑小血管病 (cerebral small vessel disease, CSVD) 是一系列影响脑小血管 (包括毛细血管、小动脉和小静脉) 结构或功能的神经影像学、病理和相关临床综合征^[1]。据研究统计, CSVD 导致了全球 25% 的中风及 45% 的痴呆, 且其已成为我国居民首位死因^[2]。流行病学调查显示, 69% ~ 75% 的中风患者患有高血压^[3]。而长期的高血压是导致颅内小动脉和小静脉管壁增厚的主要因素, 可致使管腔直径减小, 引起脑内低灌注, 进而形成 CSVD^[4]。研究表明, CSVD 多发于老年群体, 是引起老年认知功能障碍的最常见原因之一^[5], 其中, 67.92% 的老年 CSVD 认知障碍患者患有长期高血压^[6]。近年来, 针对 CSVD 可能发病机制构建了脑低灌注损伤、微小栓子栓塞、慢性高血压损伤、高脂饮食动脉硬化以及遗传基因突变等 CSVD 动物模型。然而, 有关 CSVD 的生物学机制至今尚无相关实验研究, 仅局限于临床领域^[7-8]。究其根本, 是因为缺乏一种可最大限度模拟人类 CSVD 临床发病特征的动物模型, 且基于某一因素构建的 CSVD 动物模型可能与人类疾病状态下的 CSVD 存在差异。目前年龄和高血压被公认为 CSVD 的高危因素, 且二者并非独立危险因素, 而是联合作用导致疾病的发生^[8]。因此, 复合动物模型比单一的躯体应激或药物刺激更能模拟 CSVD 的临床表征。本实验拟基于衰老和高血压为主要危险因素, 为 CSVD 的机制研究构建一种相对可靠的两因素复合动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 14 周龄雄性 SHR 大鼠 18 只和 WKY 大鼠 6 只, 体重 260 ~ 280 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2021-0006】, 饲养于湖南中医药大学动物会【SYXK(湘)2019-0009】, 饲养条件: 室温 (25 ± 2) °C, 光暗周期为 12 h/12 h 环境中适应性喂养 5 d, 自由获取饲料与水。实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准 (LLBH-202011090001)。

1.1.2 主要试剂与仪器

D-半乳糖 (Sigma-Aldrich, V900922), 髓鞘染液试剂盒 (Servicebio, G1030), T-SOD、GSH-Px、MDA、ALB、NEFL 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, E-BC-K020-M、E-BC-K096-M、E-BC-K025-M、E-EL-R0362c、E-EL-R2536c)。大小鼠智能无创血压计 (北京软隆生物技术有限公司, BP-2010A)、多功能酶标仪 (Thermo Scientific, MK3)、生物组织包埋机 (湖北孝感宏业医用仪器有限公司, BM-I)、生物组织切片机 (美国 THERMO SCIENTIFIC, HM430)、光学显微镜 (德国 ZEISS, Stemi 508)、数字玻片扫描系统 (匈牙利 3DHISTECH 公司, Panoramic MIDI)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模

18 只 SHR 大鼠随机分为 3 组: D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 150 mg/(kg · d) + 4 周组、D-gal 150 mg/(kg · d) + 8 周组、D-gal 150 mg/(kg · d) + 12 周组, 另设 WKY 组作为对照。每组 6 只。

SHR 大鼠背部皮下注射 D-gal 150 mg/(kg · d) 4 周、8 周、12 周, 建立以衰老和高血压为危险因素的 CSVD 大鼠模型 (D-gal 注射液浓度为 80 mg/mL)。WKY 大鼠背部皮下注射 0.9% NaCl。

1.2.2 大鼠鼠尾血压监测

每周测量 SHR 大鼠和 WKY 大鼠收缩压、舒张压。血压测量采用大小鼠智能无创血压计测量大鼠鼠尾血压, 每次血压测量时间相对固定 (8:00 ~ 14:00)。在 5 min 内, 重复测量 5 次, 舍去离群值, 取剩余数值均值作为血压测量值。每次血压测量均保证测量数据的可重复性和可对照性。

1.2.3 大鼠一般情况观察

每天观察记录大鼠体重及注射 D-半乳糖后饮食、活动、毛色等情况。

1.2.4 Morris 水迷宫检测

造模结束后, 对各组大鼠进行水迷宫学习训练。从同一位置将大鼠面壁放入水中, 若 1 min 未找到平台, 则将其牵引至平台处停留 20 s, 学习持续 4 d。于第 5 天将大鼠从平台正对的象限处面壁放入后, 记录其在 2 min 内爬上平台的时间, 即逃避潜伏期; 第 6 天撤除平台, 由同一入水点将大鼠面壁放入水中, 记录其 2 min 内在目标象限的游动时间和目标象限的潜伏时间。

1.2.5 脏器指数检测

大鼠麻醉后, 完整剥离出脑组织、胸腺、脾、肝组织, 见图 1。称取脏器质量, 计算脑指数、胸腺指数、脾指数、肝指数。各脏器指数 = 脏器重量 (mg)/体重 (g)。



图 1 大鼠的脑组织、胸腺、脾、肝

Figure 1 Brain tissue, thymus, spleen and liver of rats

1.2.6 ELISA 法检测各组大鼠血清中 T-SOD、GSH-Px、MDA、NEFL 含量及 CALB/SALB 指数

大鼠麻醉后, 腹主动脉采集血液, 3000 r/min 离心 15 min 后取上清。根据比色试剂盒中的说明书进行操作, 检测各组大鼠血清中 T-SOD、GSH-Px、MDA、NEFL、脑脊液/血清白蛋白 (CALB/SALB) 含量变化。

1.2.7 脑组织病理检测

HE 染色: 取 4% 多聚甲醛固定的脑组织, 包埋, 4 μm 切片后进行染色。脱蜡、复水、苏木素染色、盐酸乙醇分化、伊红复染、无水乙醇脱水、二甲苯透明, 中性树胶封片。玻片晾干后, 显微镜下观察各组大鼠脑组织病理变化。

LFB 染色: 取 4 μm 脑组织石蜡切片, 根据髓鞘染色试剂盒说明书进行操作。脱蜡、水化、染色、分化、脱水、透明, 中性树胶封片。玻片晾干后, 显微镜下观察各组大鼠脑组织髓鞘损伤情况。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析, 计量资料采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD 和 Dunnett 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况观察

实验过程中发现, SHR 大鼠连续背部皮下注射 D-半乳糖后, 随着注射时间的增加, 大鼠毛色失去光泽, 变得灰暗杂乱、行动缓慢、饮食量减少、精神萎靡不振、体重增长幅度减小 (见表 1)。

2.2 各组大鼠学习记忆能力变化

与 WKY 组比较, D-gal 150 mg/(kg · d) + 8、12 周组大鼠逃避潜伏期和目標象限潜伏期明显延长, 在目標象限的游动时间显著缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。即随着 D-gal 注射时间的增加, 大鼠的学习记忆能力下降, 认知功能发生障碍 (见图 2, 3)。

2.3 各组大鼠血压变化

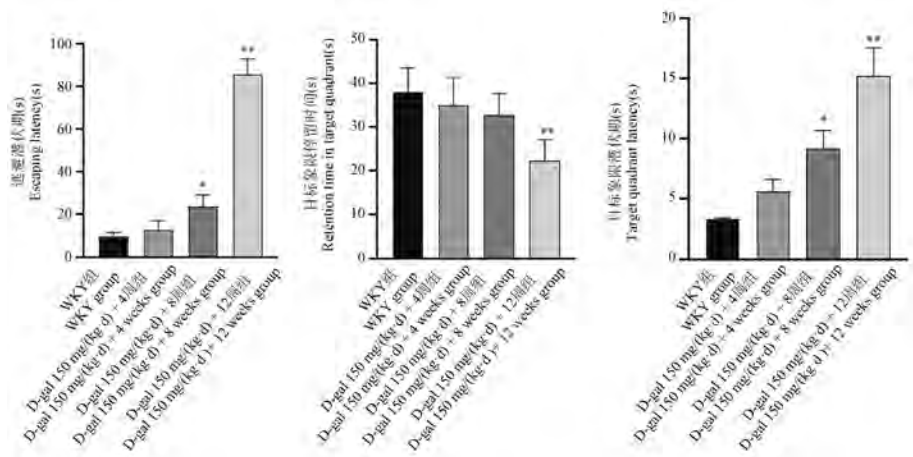
与 WKY 组比较, 各模型组大鼠收缩压和舒张压均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中, 随着 D-gal 注射时间的增加, 大鼠的收缩压和舒张压均有不同程度的上升 (见图 4)。

表 1 各组大鼠体重变化

Table 1 Changes of weight of rats in each group

组别 Groups	初始体重(g) Initial weight (g)	最终体重(g) Final weight (g)	体重增长率(g/d) Weight growth rate (g/d)	F 值 F value	P 值 P value
WKY 组 WKY group	472.00 ± 2.20	621.00 ± 9.55	1.74 ± 0.12	/	/
D-gal 150 mg/(kg · d) + 4 周组 D-gal 150 mg/(kg · d) + 4 weeks group	285.00 ± 3.60	329.00 ± 7.87	1.57 ± 0.15	4.07	0.0800
D-gal 150 mg/(kg · d) + 8 周组 D-gal 150 mg/(kg · d) + 8 weeks group	284.50 ± 2.25	361.50 ± 7.20	1.38 ± 0.14 **	14.87	0.0040
D-gal 150 mg/(kg · d) + 12 周组 D-gal 150 mg/(kg · d) + 12 weeks group	278.00 ± 1.91	389.50 ± 6.37	1.32 ± 0.11 **	31.03	0.0005

注:与 WKY 组比较, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with WKY group, ** $P < 0.01$.

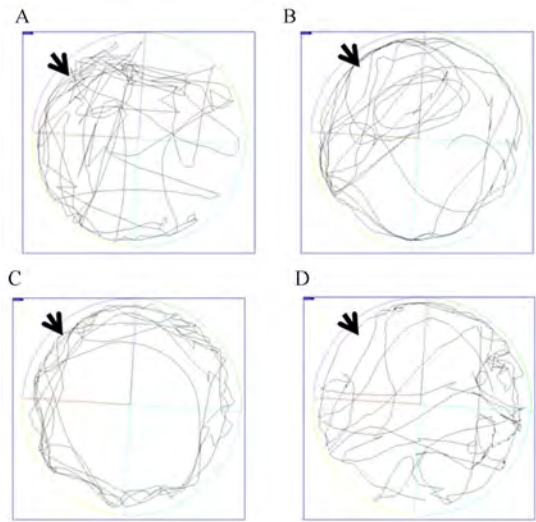


注:与 WKY 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠逃避潜伏期、目标象限游动时间和目标象限潜伏期

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

Figure 2 Escape latency, retention time in target quadrant and target quadrant latency of rats in each group

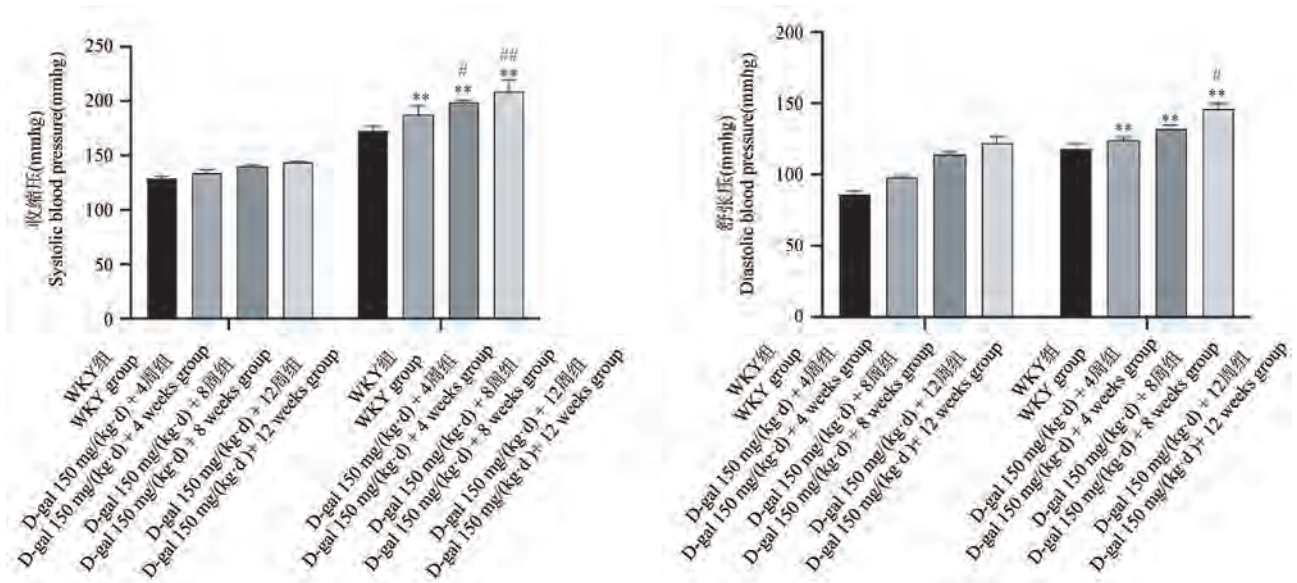


注:A:WKY 组;B:D-gal 150 mg/(kg · d) + 4 周组;C:D-gal 150 mg/(kg · d) + 8 周组;D:D-gal 150 mg/(kg · d) + 12 周组;左上象限为目标象限。

图 3 各组大鼠水迷宫游动轨迹图

Note. A. WKY group. B. D-gal 150 mg/(kg · d) + 4 weeks group. C. D-gal 150 mg/(kg · d) + 8 weeks group. D. D-gal 150 mg/(kg · d) + 12 weeks group. Upper left quadrant is target quadrant.

Figure 3 Swimming track of morris water maze of rats in each group



注:与 WKY 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 D-gal 150 mg/(kg·d) 0 周比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下同)

图 4 各组大鼠血压变化

Note. Compared with WKY group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with D-gal 150 mg/(kg·d) 0 weeks, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 4 Changes of blood pressure in each group

2.4 各组大鼠脏器指数变化

随着 D-gal 注射时间的增加,各组大鼠的脑指数、胸腺指数、脾指数、肝指数下降。其中,与 WKY 组比较,D-gal 150 mg/(kg·d) + 8、12 周组大鼠的脑指数、胸腺指数、脾指数、肝指数的降低具有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$) (见图 5)。

2.5 各组大鼠血清中 T-SOD、GSH-Px、MDA、NEFL 含量以及 CALB/SALB 指数变化

与 WKY 组比较,D-gal 150 mg/(kg·d) + 8、12 周组大鼠血清中 T-SOD、GSH-Px 含量明显下降(P

< 0.05 , $P < 0.01$);MDA、NEFL 含量和 CALB/SALB 比值显著上升($P < 0.05$, $P < 0.01$) (见图 6)。

2.6 各组大鼠脑组织病理变化

镜检脑组织病理切片可见,WKY 组大鼠的前额皮质细胞形态呈现正常圆球形、细胞核轮廓清晰,三脑室背侧无明显微出血状况,胼胝体区域髓鞘结构清晰完整;而各模型组造模后随着时间的增加,大鼠前额皮质细胞形态变化为锥形、核固缩;三脑室背侧出现大量微出血状况;血管周围间隙增大;胼胝体发生不同程度的髓鞘结构疏松,并伴空泡样

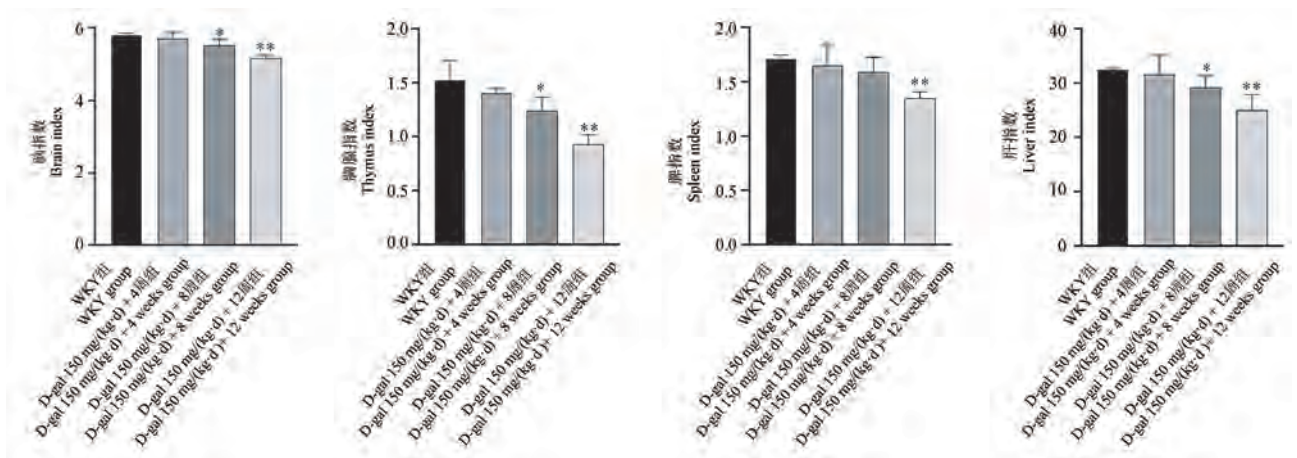


图 5 各组大鼠脑指数、胸腺指数、脾指数、肝指数变化

Figure 5 Changes of brain index, thymus index, spleen index and liver index in each group

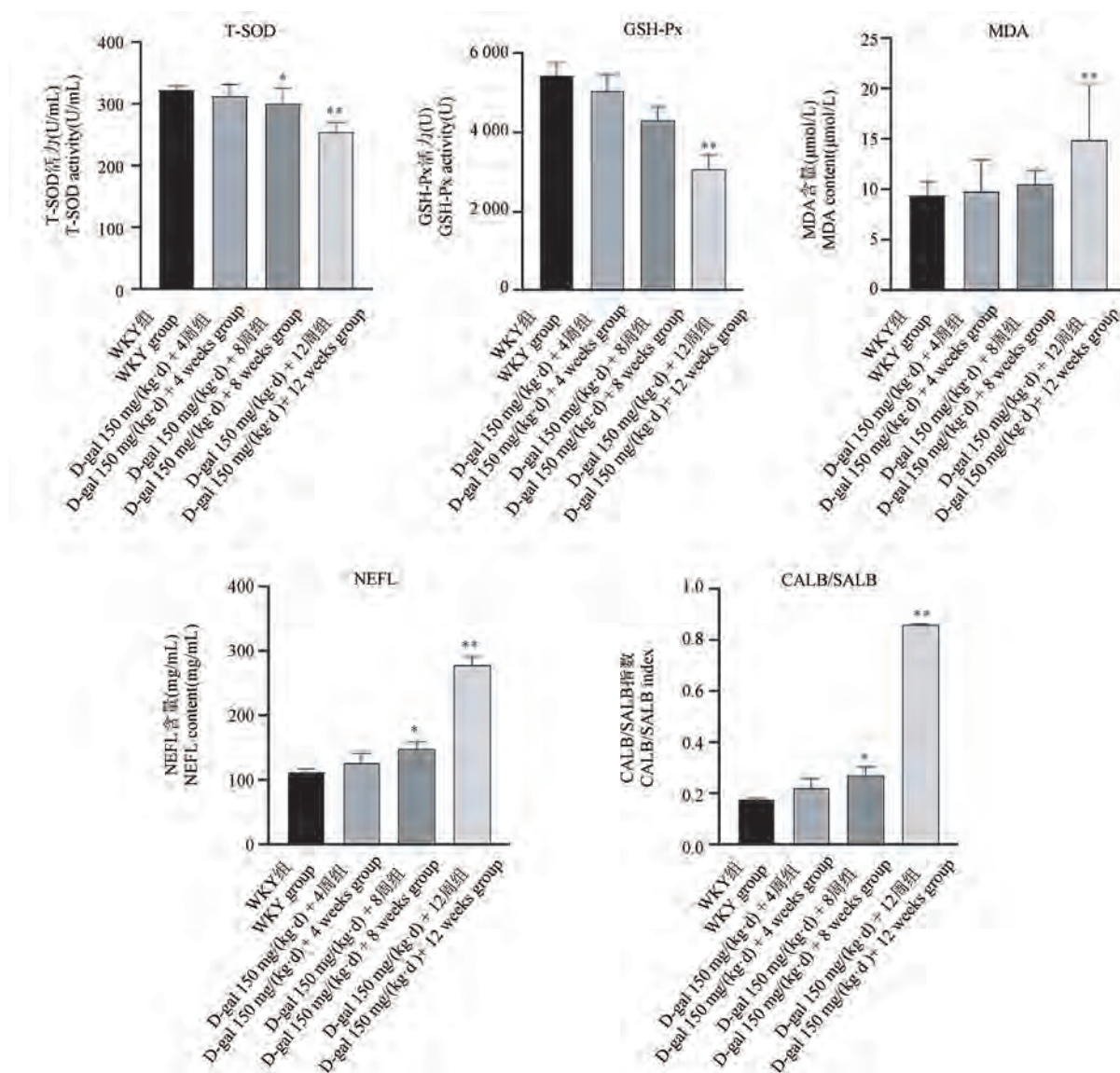


图 6 各组大鼠血清中 T-SOD、GSH-Px、MDA、NEFL 含量及 CALB/SALB 指数变化

Figure 6 Contents of T-SOD, GSH-Px, MDA, NEFL and CALB/SALB index in serum of rats in each group

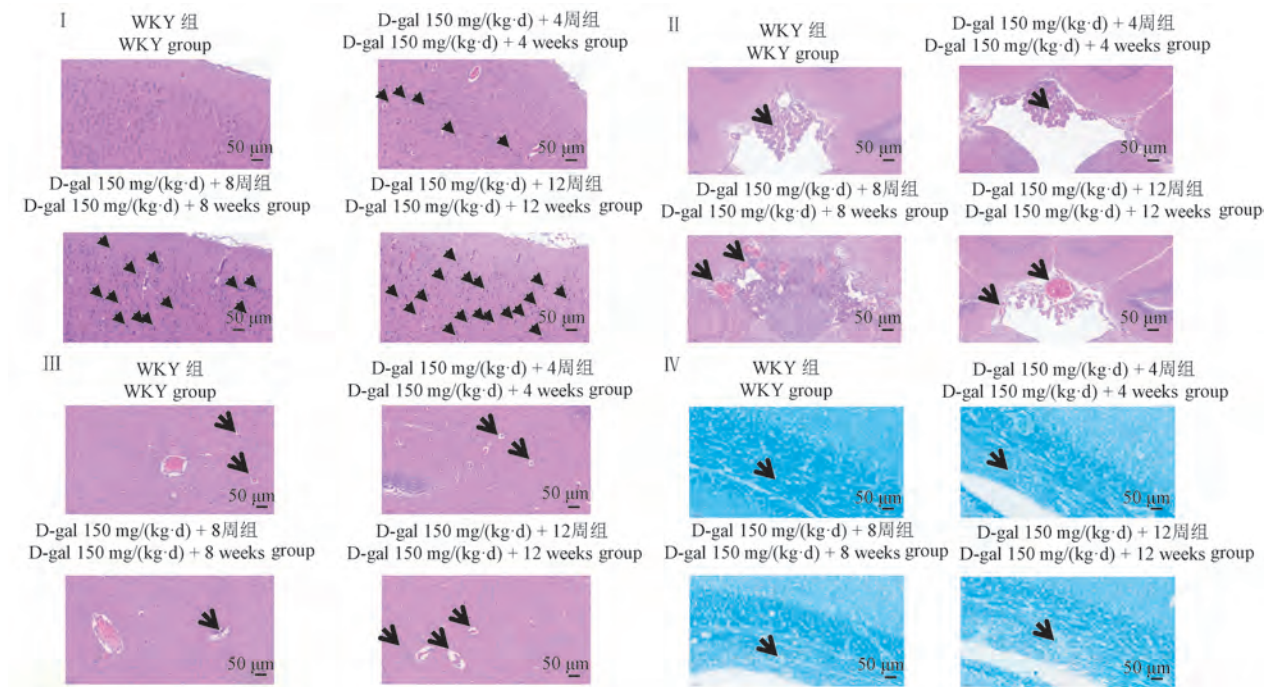
改变。其中 D-gal 150 mg/(kg·d) + 12 周组大鼠脑组织损伤与 WKY 相比最为显著 (见图 7)。

3 讨论

CSVD 是老年人中常见的一种慢性脑血管疾病,临床上常表现为脑白质高信号、腔隙性脑梗死、近期皮质下小梗死、血管周围间隙扩大、脑微出血及脑萎缩等影像学特征,具有起病隐匿、早期症状不典型、易被忽视等特点,一旦发展为痴呆或中风将不可逆^[9]。然而,CSVD 动物模型的建立尚未统一,严重阻碍了 CSVD 研究进程。因此,建立简便、可靠、稳定的 CSVD 动物模型,对于研究 CSVD 的发病机制及临床诊疗具有重要意义。

SHR 大鼠可在自然条件下产生高血压状态且其病理生理改变与人类原发性高血压病极度相似^[10]。D-半乳糖可通过氧化应激导致脑部细胞结构发生改变,使模型近似于人类自然衰老或产生相近的生理生化功能改变^[11]。本实验以 SHR 大鼠为研究对象,背部皮下注射 D-半乳糖诱导 SHR 大鼠衰老,基于衰老和高血压为主要危险因素建立 CSVD 动物模型,可最大程度模拟人类 CSVD 认知障碍、轻度卒中等临床表征。

Morris 水迷宫是一种检测大鼠学习记忆能力的经典行为学考察,能系统全面地考察动物空间认知功能^[12]。临床研究表明,CSVD 患者发生认知功能障碍的概率极高。本实验对各组模型大鼠进行水



注: I: 前额叶皮质细胞形态变化; II: 三脑室背侧出血量变化; III: 血管周围间隙扩大情况; IV: 胼胝体髓鞘损伤情况。

图 7 各组大鼠脑组织病理变化

Note. I. Morphological changes of prefrontal cortex cells. II. Changes in dorsal blood loss of the third ventricle. III. Expansion of perivascular space. IV. Injury of myelin sheath in corpus callosum.

Figure 7 Pathological changes of brain tissue in each group

迷宫测试,结果显示,随着 D-半乳糖时间的增加,大鼠神经功能损伤加重,学习记忆能力下降,其中以 D-半乳糖 150 mg/(kg·d) 注射 12 周的 SHR 大鼠认知障碍最显著。

脑是人体最复杂的器官,可调节人体多种重要生理功能;胸腺和脾是中枢免疫器官,为免疫反应提供重要场所;肝是机体最重要的代谢器官之一,随着年龄的增长,各器官结构和生理功能发生改变,如体积缩小、功能紊乱等^[13]。本实验结果显示,D-半乳糖可降低 SHR 大鼠的脑指数、胸腺指数、脾指数和肝指数,且随着 D-半乳糖注射时间的增加,各脏器指数逐渐下降,其中以 D-半乳糖 150 mg/(kg·d) 注射 12 周的 SHR 大鼠脏器指数的降低最显著。

氧化应激损伤发生在衰老过程中, T-SOD、GSH-Px 可调节机体的氧化和抗氧化平衡,而 MDA 可间接反映脂质过氧化程度^[14]。氧化应激被认为是 CSVD 的主要病理机制之一^[15]。研究表明,脂质过氧化产物 CSVD 患者血浆中的含量显著高于正常人群^[16],且氧化应激标志物与 CSVD 认知功能损伤密切相关,随着认知功能损伤的加重,血清中 T-SOD、GSH-Px 等水平明显降低^[17]。本实验结果显

示,D-半乳糖可诱发 SHR 大鼠氧化应激,引起 T-SOD、GSH-Px 水平下降和 MDA 水平升高,且随着 D-半乳糖注射时间的增加,大鼠氧化损伤加重,其中以 D-半乳糖 150 mg/(kg·d) 注射 12 周的 SHR 大鼠氧化损伤最显著。

血脑屏障损伤是 CSVD 的始动病理环节。Zhang 等^[18]利用动态增强磁共振检测 CSVD 血脑屏障渗透率发现,CSVD 患者血脑屏障渗透率增强区域多,面积广,且其通透性随白质高信号程度的增加而增加。血脑屏障损伤程度一般以脑脊液白蛋白与血清白蛋白的比值 (cerebrospinal fluidalbumin/serumalbumin, CALB/SALB) 变化来评价,比值越大,提示血脑屏障损伤越严重^[19]。轻肽神经丝蛋白 (neurofilament light, NEFL) 主要存在于轴突白质中,可维持神经细胞形态和促进髓鞘轴突再生。研究表明,颅脑损伤患者血清中 NEFL 水平显著高于正常组^[20],而损伤后血清中 NEFL 含量的增加可能是由持续的血脑屏障破坏引起的^[21]。本实验结果显示,给予 D-半乳糖注射的 SHR 大鼠,随着注射时间的增加,CALB/SALB 比值逐渐增大,血清中 NEFL 水平上升,其中以 D-半乳糖 150 mg/(kg·d) 注射 12 周的 SHR 大鼠 CALB/SALB 比值和 NEFL 水平

变化最显著。

脑微出血、血管周围间隙扩大以及白质高信号是 CSVD 的重要表现。脑微出血是指血管周围少量含铁血黄素沉积引起脑实质损伤。研究表明,脑深部出现微出血病灶与高血压相关,且其发生率随着年龄增长而增加^[22]。Renard 等^[23]和 Lyu 等^[24]将研究对象按照不同年龄和高血压水平分组,通过比较各组微出血病灶数量,进一步证实,高血压和高龄是影响脑微出血的重要因素。血管周围间隙扩大是 CSVD 的早期影像学标志之一,与年龄密切相关^[25]。研究显示,老年人群较青年人的血管腔更细,慢性脑缺血和血管周围间隙扩大的发生率更高^[26]。Zhang 等^[27]证实随着年龄的增加,高血压等基础疾病可加速小血管老化过程,促进血管周围间隙扩大。脑白质高信号分布于脑室周围、胼胝体、深部和皮层下白质,与脱髓鞘、脑内低灌注等病理相关^[28]。纵向研究显示,随着年龄增长,脑白质高信号风险增加,CSVD 患病率升高^[29]。此外,高血压患者易发生脑内低灌注,并促使少突胶质细胞功能异常,引起广泛脱髓鞘,从而导致脑白质病变^[30]。本实验病理结果显示,给予 D-半乳糖注射的 SHR 大鼠,随着注射时间的增加,大鼠前额叶皮质细胞死亡数量增多,血管周围间隙扩大,脑室微出血严重,胼胝体区髓鞘空泡化加重,其中以 D-半乳糖 150 mg/(kg·d) 注射 12 周的 SHR 大鼠脑组织病变最显著。

综上所述,采用 SHR 大鼠注射 D-半乳糖 150 mg/(kg·d) 12 周的方法可复制与人类 CSVD 疾病状态较相似的动物模型,为人类 CSVD 机制的进一步研究奠定基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Pinter D, Ritchie SJ, Döbner F, et al. Impact of small vessel disease in the brain on gait and balance [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41637.
- [2] Uiterwijk R, van Oostenbrugge RJ, Huijs M, et al. Total cerebral small vessel disease MRI score is associated with cognitive decline in executive function in patients with hypertension [J]. *Front Aging Neurosci*, 2016, 8: 301.
- [3] Lorus N, Locascio JJ, Rentz DM, et al. Vascular disease and risk factors are associated with cognitive decline in the Alzheimer disease spectrum [J]. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2015, 29(1): 18-25.
- [4] 刘春燕, 李勇, 唐茜茜. 脑小血管病患者认知功能障碍与 H 型高血压及脑血流动力学相关性分析 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2021, 16(2): 86-89.
- [5] Liu CY, Li Y, Tang QQ. Correlation analysis of cognitive impairment of cerebral small vessel disease and H-type hypertension and cerebral hemodynamics [J]. *Neural Inj Funct Reconstr*, 2021, 16(2): 86-89.
- [5] 陈玮琪, 潘岳松, 陈霞, 等. 脑小血管病治疗药物临床试验设计专家共识 [J]. *中国卒中杂志*, 2021, 16(3): 288-297.
- [6] Chen WQ, Pan YS, Chen X, et al. Design specifications for clinical trials of testing drugs for cerebral small vessel disease: a consensus statement [J]. *Chin J Stroke*, 2021, 16(3): 288-297.
- [6] 计畅, 杨云红, 刘彬. 影响老年脑小血管病患者发生认知功能障碍的危险因素分析 [J]. *中国老年保健医学*, 2020, 18(1): 44-47.
- [7] Ji C, Yang YH, Liu B. Risk factors affecting cognitive impairment in patients with cerebral small vessel disease [J]. *Chin J Geriatr Care*, 2020, 18(1): 44-47.
- [7] 崔明恩, 王丽娟, 刘炎, 等. 近期皮质下小梗死患者的敏感血管征与脑小血管病的相关性研究 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2022, 24(4): 347-350.
- [8] Cui MY, Wang LJ, Liu Y, et al. Association between susceptibility vessel sign and cerebral small vessel disease in patients with recent small subcortical infarction [J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2022, 24(4): 347-350.
- [8] 吴睿, 甄娜, 王欣丽, 等. 老年脑小血管病患者认知障碍发生率及影响因素分析 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2022, 29(2): 89-92, 97.
- [9] Wu R, Zhen N, Wang XL, et al. Analysis of incidence and influencing factors of cognitive impairment in elderly patients with cerebral small vessel disease [J]. *Chin J Neuroimmunol Neurol*, 2022, 29(2): 89-92, 97.
- [9] 中华医学会老年医学分会老年神经病学组, 脑小血管病认知功能障碍诊疗指南中国撰写专家组. 脑小血管病相关认知功能障碍中国诊疗指南 (2019) [J]. *中华老年医学杂志*, 2019, 38(4): 345-354.
- [10] Geriatric Neurology Group, Chinese Society of Geriatrics; Clinical Practice Guideline for cognitive impairment of cerebral small vessel disease writing group. Clinical practice guideline for cognitive impairment of cerebral small vessel disease of China (2019) [J]. *Chin J Geriatr*, 2019, 38(4): 345-354.
- [10] 夏晓莉. 自发性高血压大鼠代谢综合征动物模型的建立及其特征分析 [A]. 2011 中国医师协会中西医结合医师分会学术会议论文汇编 [C]; 2011.
- [11] Xia XL. Establishment and characteristic analysis of metabolic syndrome animal model in spontaneously hypertensive rats [A]. 2011 Chinese medical doctor association integrated traditional Chinese and Western medicine branch academic conference papers [C]; 2011.
- [11] Kong SZ, Li JC, Li SD, et al. Anti-aging effect of chitosan oligosaccharide on d-galactose-induced subacute aging in mice [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(6): 181.

- [12] Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice [J]. J Vis Exp, 2011, 53: 2920.
- [13] Kim IH, Xu J, Liu X, et al. Aging increases the susceptibility of hepatic inflammation, liver fibrosis and aging in response to high-fat diet in mice [J]. AGE, 2016, 38(4): 291-302.
- [14] Lin L, Zhu Q, Zhao M, et al. Purification of peptide fraction with antioxidant activity from *Moringa oleifera* leaf hydrolysate and protective effect of its *in vitro* gastrointestinal digest on oxidatively damaged erythrocytes [J]. Int J Food Sci Technol, 2019, 54(1): 84-91.
- [15] Litak J, Mazurek M, Kulesza B, et al. Cerebral small vessel disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9729.
- [16] Bir LS, Demir S, Rota S, et al. Increased serum malondialdehyde levels in chronic stage of ischemic stroke [J]. Tohoku J Exp Med, 2006, 208(1): 33-39.
- [17] 王雅楠, 姚琳, 毛文静, 等. 脑小血管病患者氧化应激标志物、磁共振总负担与血管性认知障碍的相关性 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2020, 29(10): 898-903.
- Wang YN, Yao L, Mao WJ, et al. Association of oxidative stress markers and MRI overall burden with vascular cognitive impairment in patients with ischemic cerebral small-vessel diseases [J]. Chin J Behav Med Brain Sci, 2020, 29(10): 898-903.
- [18] Zhang CE, Wong SM, van de Haar HJ, et al. Blood-brain barrier leakage is more widespread in patients with cerebral small vessel disease [J]. Neurology, 2017, 88(5): 426-432.
- [19] 顾可梁. 脑脊液检查的几个新问题 [J]. 临床检验杂志, 1998, 16(3): 187-188.
- Gu KL. Several new problems in cerebrospinal fluid examination [J]. J Clin Lab Sci, 1998, 16(3): 187-188.
- [20] 李全春. 血清神经丝蛋白轻链多肽水平预测急性颅脑损伤患者临床预后的研究 [J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(2): 104-106.
- Li QC. Study on the level of serum neurofilament protein light chain polypeptide in predicting the clinical prognosis of patients with acute craniocerebral injury [J]. Neural Inj Funct Reconstruct, 2019, 14(2): 104-106.
- [21] 吴纪霞, 温振东, 梁友宝, 等. 血清神经丝蛋白轻链对卒中后认知障碍的临床意义 [J]. 蚌埠医学院学报, 2021, 46(9): 1187-1191.
- Wu JX, Wen ZD, Liang YB, et al. Clinical significance of serum neurofilament protein light chain on post-stroke cognitive impairment [J]. J Bengbu Med Coll, 2021, 46(9): 1187-1191.
- [22] Poels MMF, Vernooij MW, Ikram MA, et al. Prevalence and risk factors of cerebral microbleeds: an update of the Rotterdam scan study [J]. Stroke, 2010, 41: S103-S106.
- [23] Renard D, Tatu L, Thouvenot E. Infratentorial cerebral microbleeds in patients with cerebral amyloid angiopathy [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27(9): 2534-2537.
- [24] Lyu L, Shen J, Zeng C, et al. Cerebral microbleeds are associated with blood pressure levels in individuals with hypertension [J]. Clin Exp Hypertens, 2020, 42(4): 328-334.
- [25] Wardlaw JM, Benveniste H, Nedergaard M, et al. Perivascular spaces in the brain: anatomy, physiology and pathology [J]. Nat Rev Neurol, 2020, 16(3): 137-153.
- [26] Brown R, Benveniste H, Black SE, et al. Understanding the role of the perivascular space in cerebral small vessel disease [J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(11): 1462-1473.
- [27] Zhang C, Chen Q, Wang Y, et al. Risk factors of dilated Virchow-Robin spaces are different in various brain regions [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105505.
- [28] Fowler JH, McQueen J, Holland PR, et al. Dimethyl fumarate improves white matter function following severe hypoperfusion: involvement of microglia/macrophages and inflammatory mediators [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2018, 38(8): 1354-1370.
- [29] Basile AM, Pantoni L, Pracucci G, et al. Age, hypertension, and lacunar stroke are the major determinants of the severity of age-related white matter changes. The LADIS (Leukoaraiosis and Disability in the Elderly) Study [J]. Cerebrovasc Dis, 2006, 21(5-6): 315-322.
- [30] 陈亚丽, 刘红霞, 王娟, 等. 替米沙坦联合瑞舒伐他汀对老年高血压患者脑白质损害的影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2018, 20(2): 145-148.
- Chen YL, Liu HX, Wang J, et al. Effect of telmisartan combined with rosuvastatin on white matter lesion in elderly hypertensive patients [J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2018, 20(2): 145-148.

[收稿日期] 2022-05-11

谢柯欢,郭怀英,韩壤乐,等. 肾原位抑制 miR-146b-5p 表达改善 UUO 小鼠肾纤维化 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 927-934.

Xie KH, Guo HY, Han RY, et al. Renal inhibition of miR-146b-5p expression *in situ* improves renal fibrosis in UUO mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 927-934.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.007

肾原位抑制 miR-146b-5p 表达改善 UUO 小鼠肾纤维化

谢柯欢,郭怀英,韩壤乐,王丽*

(中西医结合研究中心,西南医科大学附属中医医院,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 明确 miR-146b-5p 在小鼠肾纤维化模型中的表达情况,并探讨体内敲低 miR-146b-5p 对小鼠肾损伤及纤维化的影响。**方法** 将 24 只 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠随机分为假手术组 (sham), UUO 模型组 (UUO), UUO+肾 miR-146b-5p 电转敲低组 (UUO-KD), 每组 8 只。Sham 组仅切开皮肤,暴露且游离右侧肾输尿管,不做结扎或离断处理。UUO 组,行单侧输尿管梗阻 (UUO) 动物模型。UUO-KD 组通过先电转 CRISPR/RfxCas13 d 质粒于小鼠肾进行特异性 miR-146b-5p 敲低,24 h 后按模型组方法建立 UUO 小鼠模型,7 d 后处死小鼠收集肾标本。HE 染色观察肾病理变化,Masson 检测肾间质纤维化程度,免疫组化检测纤维化相关蛋白 (α -SMA、FN、Col-1) 表达,Western Blot、Real-time PCR 检测 miR-146b-5p、 α -SMA、FN、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等基因的变化。**结果** miR-146b-5p 在 UUO 模型中显著升高,电转敲低 miR-146b-5p 后该基因显著下降 ($P<0.05$),同时,IL-1、IL-6、TNF- α 等炎症因子表达出现显著下调 ($P<0.05$) 经 HE、Masson 染色后观察到,UUO-KD 组较 UUO 组相比肾结构良好,肾小管变形轻微,肾损伤及纤维化程度均明显改善。且免疫组化结果发现: α -SMA、FN、Col-1 等纤维化指标在 UUO-KD 组也显著降低 ($P<0.0001$)。**结论** 抑制 UUO 中高表达的 miR-146b-5p 可明显改善肾纤维化,miR-146b-5p 可能是肾纤维化的一个潜在治疗靶标。

【关键词】 miR-146b-5p;靶向电转敲低技术;肾纤维化;慢性肾疾病

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 07-0927-08

Renal inhibition of miR-146b-5p expression *in situ* improves renal fibrosis in UUO mice

XIE Kehuan, GUO Huaiying, HAN Rangyue, WANG Li*

(Research Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Affiliated Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Corresponding author: WANG Li. E-mail:wangli120@swmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate miR-146b-5p expression in mice model of renal fibrosis induced by unilateral renal ureteral ligation, and to suppress miR-146b-5p expression to improve renal fibrosis induced by unilateral renal ureteral ligation in mice. **Methods** Twenty-four 8-week-old C57BL/6 male mice were randomly divided into sham operation group (sham), UUO model group (UUO), UUO+kidney miR-146b-5p knockdown group (UUO-KD), 8 mice in each group. In the sham group, the skin was only cut to expose and free the right kidney and ureter without ligation or disconnection. In the UUO group, the animal model of unilateral ureteral obstruction (UUO) was performed. In the UUO-KD group, miR-146b-5p was specifically knocked down by electrotransferring the CRISPR/RfxCas13 d plasmid in the mouse kidney. After 24 hours, the UUO mouse model was established according to the method of the model group, and the mice were sacrificed 7 days later to collect kidney samples. HE staining was used to observe renal pathological changes, Masson was used to detect the degree of renal interstitial fibrosis, immunohistochemistry was used to detect the expression of

【基金项目】 四川省科技厅项目 (21ZDYF0348, 2020YJ0442), 西南医科大学校级项目 (2021ZKQN124, 2021ZKZD022)。

Funded by Sichuan Provincial Department of Science and Technology Project (21ZDYF0348, 2020YJ0442), Project of Southwest Medical University (2021ZKQN124, 2021ZKZD022).

【作者简介】 谢柯欢 (1996—), 女, 硕士, 研究方向: 中西医结合防治肾纤维化。Email: 554017658@qq.com

【通信作者】 王丽 (1976—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 慢性肾脏病基础与临床研究。Email: wangli120@swmu.edu.cn

fibrosis-related proteins (α -SMA, FN, Col-1), and Western Blot and Real-time PCR were used to detect miR-146b-5p, α -SMA, FN, IL-1 β , IL-6, TNF- α and other gene changes. **Results** Real-time PCR showed that miR-146b-5p was significantly increased in UUO model, and the gene was significantly decreased after electroporation knockdown of miR-146b-5p ($P < 0.05$). Meanwhile, the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and other inflammatory factors was significantly down-regulated ($P < 0.05$). It was observed after HE and Masson staining. Compared with the UUO group, the UUO-KD group had a better kidney structure, slightly deformed renal tubules, and less severe renal damage. The degree of fibrosis was significantly improved. And the results of immunohistochemistry showed that α -SMA, FN, Col-1 and other fibrosis indicators were also significantly reduced in the UUO-KD group ($P < 0.0001$). **Conclusions** Inhibition of highly expressed miR-146b-5p in UUO can significantly improve renal fibrosis, and miR-146b-5p may be a potential therapeutic target for renal fibrosis.

【Keywords】 miR-146b-5p; targeted electro-knockdown technology; renal fibrosis; chronic kidney disease

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

近年来,以肾间质纤维化为特征的慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 发病率显著增加,全球发病率超过 10%,其中 70 岁以上患者占 50% 以上,目前尚缺乏有效的临床治疗手段^[1]。深入挖掘 CKD 潜在的发病机制,并开发新颖的治疗方法,对于防治 CKD 的发生发展至关重要^[2]。microRNA (miRNA) 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,它们在动植物中广泛参与转录后基因表达调控。多项研究已证实,miRNA 在包括糖尿病肾病、肾小球病变、肾囊肿和肾癌等多种肾疾病的发生和发展中起调控作用^[3]。本课题组前期通过转录组测序,在小鼠 UUO 模型中筛选出包括 miR-146b-5p 在内的多个 miRNA 在肾组织中高表达。有研究报道,miR-146b-5p 可调节肾细胞癌的发生,阻断其表达可长期负向调节肿瘤生长,但 miR-146b-5p 在肾纤维化中的作用和功能未知^[4-5]。电转技术是一种高效的细胞转染技术,其通过脉冲电流在细胞膜上打孔后将目的核酸导入细胞内^[6]。电转不仅用于体外培养细胞的转染,还被广泛用于敲除小鼠的生产、肿瘤治疗、基因治疗和基于细胞的治疗中^[7]。值得注意的是,电转技术已被证明可用于体内组织原位的高效基因转染。为探索 miR-146b-5p 在肾纤维化中的作用,本研究建立 UUO 小鼠模型,观察 miR-146b-5p 在小鼠肾纤维化模型中的表达情况,并通过原位电转技术在肾抑制 miR-146b-5p 的表达,探讨下调其表达对小鼠肾纤维化的改善作用,为 CKD 肾纤维化的防治研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 24 只,8 周龄,体重

22~25 g,购自重庆腾鑫生物有限公司【SCXK(川)2020-030】,饲养于西南医科大学实验动物中心【SYXK(川)2020-065】。小鼠均自由摄食饮水,环境温度 20~24℃,相对湿度 50%~60%,12 h/12 h 明暗交替,适应性饲养 1 周开始实验。研究获得西南医科大学动物伦理委员会的批准(2021DW027)。

1.1.2 主要试剂与仪器

TRIzol 试剂(天根生化科技有限公司, Lot# P5207, 中国),无内毒素质粒大提试剂盒(天根生化科技有限公司, Lot#W9623, 中国),兔抗小鼠 α -SMA 抗体 (proteinch, 00096457),兔抗小鼠 Gapdh 抗体 (Abways, AB0037),兔抗小鼠 College-1 (Col-1) 抗体 (Cell Signaling Technology, 4060),兔抗小鼠 Fibronectin (FN) 抗体 (Abmart, 334482) 小鼠抗小鼠 IL-1 β 抗体 (Santa cruz, sc-52012)、小鼠抗小鼠 IL-6 抗体 (Santa cruz, sc-32296)、小鼠抗小鼠 TNF- α 抗体 (Santa cruz, sc-52746)、兔抗小鼠 Wnt-5a 抗体 (Affinity biosciences, DF-6856),兔抗小鼠 β -catenin 抗体 (Affinity biosciences, AF6266),荧光定量 PCR 染料试剂 (Promega, LS2068),HE 染色试剂盒 (Beyotime Biotechnology, C0105),中杉金桥免疫组化试剂盒 (ZSGB-BIO, PV-6000),Masson 染色试剂盒 (贝索生物公司, BA-40798)。LightCycle 96 荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士),正置光学显微镜 (尼康, Nikon Eclipse E100, 日本),电泳槽和湿转转膜系统 (Bio-Rad, 美国),质粒电转仪器 (Pulse Generator CUYEDIT II, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

实验分为正常组 (WT)、假手术组 (sham)、模型组 (UUO) 和 UUO + miR-146b-5p 靶向电转敲低组 (UUO-KD),及 sham + miR-146b-5p 靶向电转敲低组 (KD-1day)、绿色荧光质粒电转组

(Electrotransfection)。假手术组仅切开右侧背部皮肤,暴露且游离右侧肾输尿管,不做结扎或离断处理。模型组按参考文献^[8]建立单侧输尿管梗阻小鼠模型,方法如下:腹腔注射 1%戊巴比妥钠成功麻醉小鼠后,在小鼠右侧背部脊柱旁约 1 cm 处切开背部皮肤,分离暴露右肾,游离右侧近端输尿管,于靠近肾门处和输尿管下 1/3 水平分别以 4-0 号丝线结扎输尿管后离断输尿管,缝合腹腔。UUO-KD 组,首先对小鼠进行质粒注射及肾原位电转操作,24 h 后建立单侧输尿管梗阻小鼠模型,具体如下:麻醉小鼠后分离暴露右肾,游离小鼠肾静脉、肾动脉,于近心端处夹闭肾动静脉后,用 36 G 针头注入已提取的质粒约 100 μ L(质粒浓度 = 1 μ g/ μ L),观察肾膨胀且色泽变苍白,即为注射成功。将无菌纸剪成约肾面积大小,浸生理盐水湿润后,覆于肾两侧,用电极轻夹住湿无菌纸包裹的肾,观察电阻 < 500 Ω 时,即可开始电转(参数:电转电压(Pd V) = 50 V,电转电流(Pd A) = 300 mA,瞬时电转持续时长(Pd on) = 50.0 ms,瞬时电转休息时长(Pd off) = 1000 ms,总电转次数(Pd N) = 4 次。常规饲养 24 h 后,观察状况良好,按模型组构建方法,建立肾间质纤维化模型。KD-1 day 组仅对小鼠进行质粒注射及肾原位电转操作,Electrotransfection 组仅进行肾原位电转绿色荧光质粒。造模 1 d 或 7 d 后处死小鼠,取出手术侧肾组织,将 1/4 肾组织置于 4% 多聚甲醛中固定,用于后期病理染色,剩余肾组织迅速置于 -80℃ 冰箱中冻存,用于提取组织蛋白及 RNA。

1.2.2 CRISPR/RfxCas13 d 敲除载体构建

取构建好的质粒 10 μ L 加入 DH5 α 感受态细胞,间歇振荡每次 5 min,共 6 次,置于 42℃ 水浴锅中热激 90 s,加入 LB 培养基 500 μ L,于摇床中震荡 50 min (100 r/min、37℃),后离心 5 min (3000 r/min),倒掉上清液,留 100 μ L 进行重悬后铺板于 AMP 抗性平板上,倒置培养过夜。筛选阳性菌株,培养收集菌液,按质粒提取试剂盒要求提取、纯化质粒(sgRNA 序列(5' $\rightarrow$ 3')): ATGGAATTCAGTTCTCAGAGCCA)。

1.2.3 Real-time PCR 检测各组小鼠肾组织中 miR-146b-5p 的表达

取冻存肾组织,TRIzol 法提取肾组织中总 RNA,Nanodrop 测定总 RNA 浓度。取 1 μ g 总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书操作逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,用 miR-146b-5p 引物参照 PCR 试剂盒说明书构建 PCR 体系后进行 PCR 反应,PCR 反应条件:95℃,30 s;95℃,3~10 s;60℃,10~30 s;

40 个循环后结束。以 U6 作为 miR-146b-5p 的内参基因,GAPDH 作为 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、 α -SMA 的内参基因。根据内参表达量检测计算目标基因的相对表达,相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法算。序列见表 1。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers	
基因名 Gene names	序列(5' $\rightarrow$ 3') Sequences(5' $\rightarrow$ 3')
miR-146b-5p	F:CGCGTGAGAACTGAATTCCA R:AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
IL-1 β	F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG R: AAGGTCCACGGGAAAGACAC
IL-6	F: AAAGAGTTGTGCAATGGCAATTCT R: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
TNF- α	F: CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA R: TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
α -SMA	F: CTCTGTTGTGTGACAATGGTCC R: CGAAGCTCGTTATAGAAGGAGTG
U6	F: CAAATTCGTGAAGCGTTCCAT R: AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTC R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

1.2.4 小鼠肾 HE 染色及 Masson 染色

HE 染色:将小鼠肾组织取出后用 4% 多聚甲醛溶液固定 48 h,经梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,石蜡浸润包埋,并用切片机制备 4 μ m 切片,行 HE 染色,镜下观察肾组织的病理改变。

Masson 染色:染色前对切片进行常规脱腊复水后,铁苏木素染色 5 min,水洗,1% 盐酸酒精分色,0.5% 氨水促黑 2 min,水洗,丽春红染色 8 ~ 10 min,磷钼酸分色 1 ~ 5 min,加入甲苯胺蓝后水洗,1% 冰醋酸 1 min 后脱水封片,观察镜下肾组织间质纤维化程度。

1.2.5 蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测肾组织纤维化相关蛋白表达

采用蛋白印记法检测 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA),取肾组织 0.1 g 置于裂解液中,并将其置于冰上碾碎,裂解 20 ~ 30 min,后离心取上清液,采用考马斯亮蓝测蛋白浓度法,测出蛋白浓度,并将每个样本蛋白浓度调整为 10 μ g/ μ L,后加入 8 μ L,到 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,转膜至 PVDF 膜后按 1:1000 的稀释比例加入多克隆抗体 α -SMA 于 4℃ 孵育过夜,后加入 HRP 偶联二抗常温孵育 1 h。加入 ECL 显色,凝胶成像分析仪成像,结果以目标蛋白/内参相对灰度值表分析。

1.2.6 小鼠肾组织免疫组化

将小鼠肾组织取出后用 4% 多聚甲醛溶液固定 48 h, 经梯度乙醇脱水, 二甲苯透明后, 石蜡浸润包埋, 并用切片机制备 4 μm 厚度石蜡切片。经脱蜡复水, 抗原修复后, 封闭, 滴加多克隆抗体 α -SMA、Col-1、FN 并按 1 : 200 稀释比例, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 再滴加生物素化二抗, 室温孵育 15 min, DAB 显色, 苏木素复染, 流水冲洗反蓝 15 min, 脱水透明后, 封片, 镜下观察 α -SMA、Col-1、FN 表达。

1.2.7 基于全转录组的 miRNA 测序

测序工作由广州基迪奥生物公司完成, 提取高质量 RNA 后采用 Illumina HiSeq 测序仪进行测序。

1.3 统计学分析

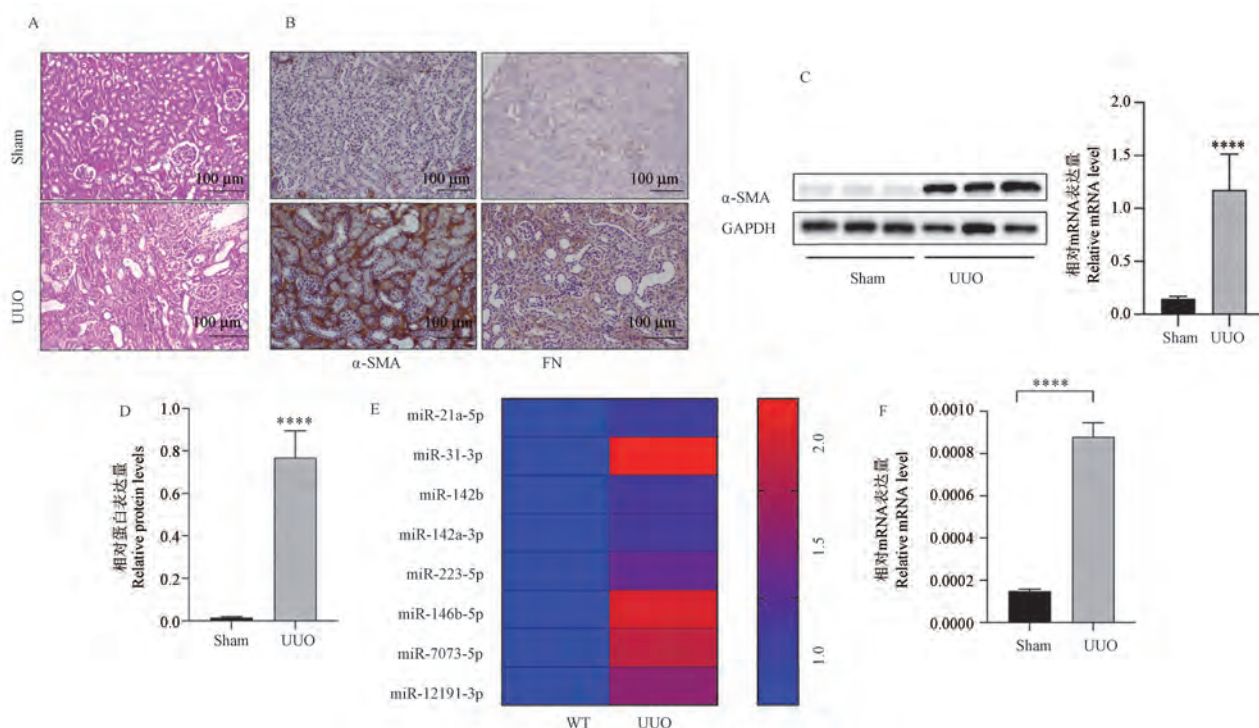
采用 SPSS 21.0 对数据进行统计分析, 计量资料若符合正态分布采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 若不符合正态分布采用中位数表示。两组间差异性的比较, 服从正态分布且方差齐则采用非配对 t 检验, 方差不齐采用 Welch's 校正非配对 t 检验。多组间差异性的比较, 各组均符合正态分布且方差

齐则采用单因素 ANOVA 检验, 组间多重比较采用 LSD 法, 各组资料不符合正态分布或方差不齐, 采用 Kruskal-Wallis H 检验, 若提示组间存在差异, 进一步采用独立样本的非参数检验进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 测序分析 UUO 部分 miRNA 表达, miR-146b-5p 在 UUO 中显著增高

HE 染色结果显示 UUO 小鼠较 sham 组小鼠肾小管扩张明显, 肾小球变形破坏严重, 肾间质增宽。免疫组化结果显示 UUO 组较 sham 组肾间质 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA), FN 纤维蛋白沉积显著增多与免疫印记、PCR 结果一致 ($P < 0.0001$)。采用全转录组测序发现多种 miRNA 在 UUO 小鼠肾中高表达, 其中 miR-146b-5p 的上升幅度最为明显, PCR 结果验证 miR-146b-5p 在 UUO 小鼠体内表达增加与测序结果一致, 较 sham 组显著增加 ($P < 0.0001$), 见图 1。



注: A: HE 染色结果; B: 免疫组化结果; C: α -SMA 的 Western Blot 结果; D: α -SMA 的 PCR 结果; E: 测序结果图; F: miR-146b-5p 的 PCR 结果; 与 Sham 组相比, **** $P < 0.0001$ 。

图 1 miR-146b-5p 在 UUO 小鼠肾中显著增高

Note. A. HE staining result. B. Immunohistochemistry result. C. Western Blot result of α -SMA protein. D. PCR result of α -SMA. E. Sequencing result. F. PCR result of miR-146b-5p. Compared with sham group, **** $P < 0.0001$.

Figure 1 miR-146b-5p is significantly increased in UUO mice kidney

2.2 原位肾电转效率检测

采用肾原位电转的方式将绿色荧光质粒电转染至肾中,并观察到了大量荧光信号,说明肾原位电转效率高,可为后续 miRNA 敲低质粒的原位电转染提供良好的实验基础。其有效电转参数为:正反向电转模式,电转电压(Pd V)= 50 V,电转电流(Pd A)= 300 mA,瞬时电转持续时长(Pd on)= 50.0 ms,瞬时电转间隔时长(Pd off)= 1000 ms,总电转次数(Pd N)= 2,见图 2。

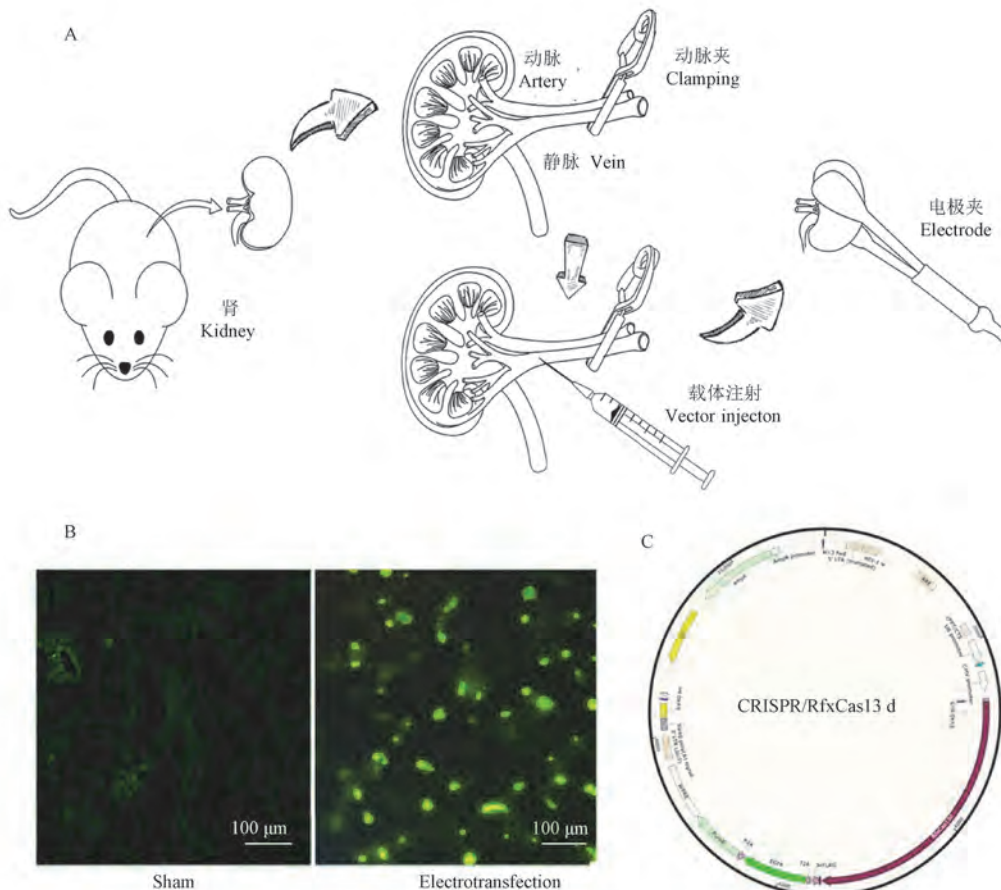
2.3 电转抑制 miR-146b-5p 对 UUO 肾病理改变的影响

正常小鼠肾电转 miR-146b-5p 敲低质粒 1 d 后,通过 Real-time PCR 检测到 miR-146b-5p 表达量显著下降($P < 0.01$);且电转 7 d 后肾功能变化差异无显著性,证实电转不会对肾造成病理损伤。电转 7 d 后,免疫印记结果显示 UUO-KD 组 α -SMA 蛋白表达显著下降($P < 0.01$),且与 PCR 结果显示一致

($P < 0.001$),HE 染色结果及 Masson 染色结果显示 UUO 组小鼠肾组织中,肾小管明显扩张,肾小球破坏明显,且间质增宽,经电转靶向敲低后,小鼠肾病理损伤显著好转。且经 miR-146b-5p 靶向电转敲低后小鼠肾间质损伤明显减轻,胶原成分减少,间质纤维化面积显著降低,见图 3。

2.4 电转抑制 miR-146b-5p 后可降低 UUO 小鼠炎症及纤维化改变

UUO-KD 组较 UUO 组可显著下调 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 炎症指标 mRNA 表达量,且差异具有显著性($P < 0.01$);免疫组化结果显示:UUO-KD 组较 UUO 组肾间质 α -SMA、Col-1 沉积显著减少,且肾组织结构完整,损伤轻微,Western Blot 结果发现,UUO 组中 wnt5a、 β -catenin 在蛋白水平上均高表达,UUO-KD 组 wnt5a、 β -catenin 表达均显著下降,说明电转抑制 miR-146b-5p 后可显著下调 UUO 小鼠炎症及纤维化,见图 4。

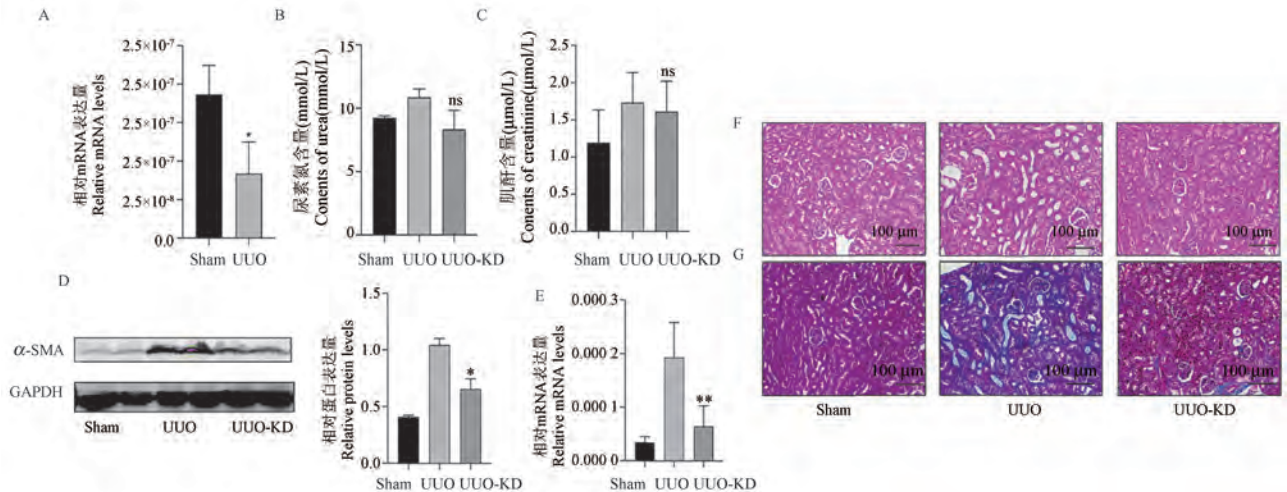


注:A:小鼠电转流程示意图;B:为光镜下肾原位电转后荧光图;C:CRISPR/RfxCas13 d 载体序列示意图。

图 2 原位肾电转流程

Note. A. Schematic diagram of mouse electroporation process. B. Luorescence image of kidney *in situ* electroporation under light microscope. C. Schematic diagram of CRISPR/RfxCas13 d vector sequence.

Figure 2 Process of renal electroporation

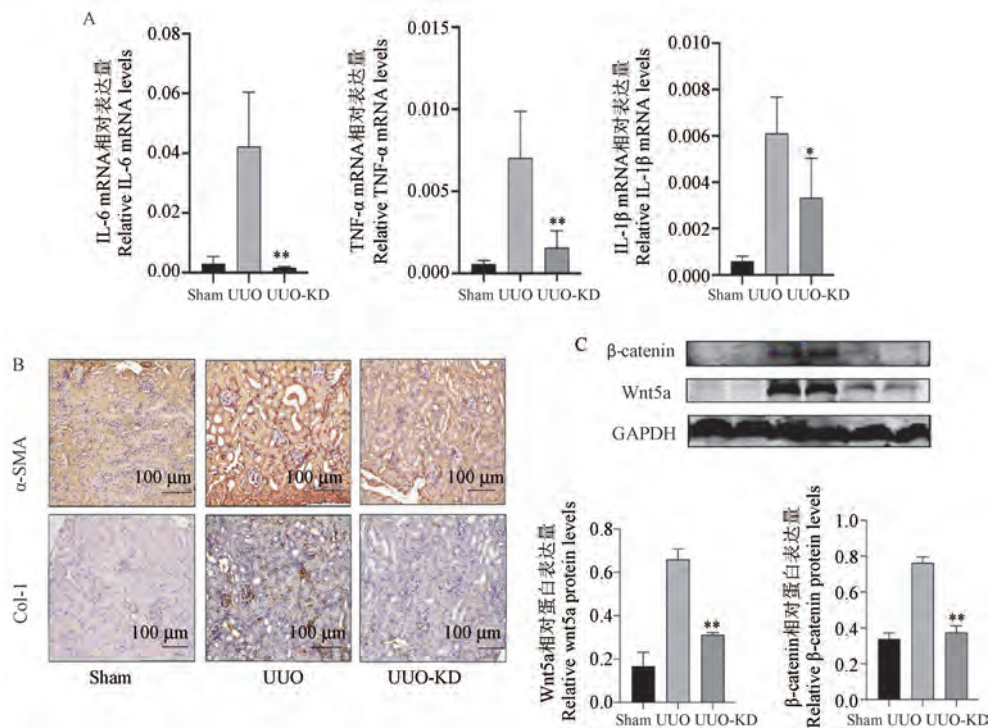


注:A;KD-1day 组电转后 1 d,小鼠肾 miR-146b-5p PCR 结果;B;尿素氮结果;C:肌酐测试结果;D:α-SMA 的 Western Blot 结果,蛋白量化结果;E:UUO 小鼠电转后 PCR 结果;F:HE 染色结果;G:Masson 染色结果。与 UUO 组相比,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$ 。(下同)

图 3 电转抑制 miR-146b-5p 对 UUO 肾病理改变的影响

Note. A. One day after electroporation, the PCR results of miR-146b-5p mRNA expression in mouse kidney. B. Urea nitrogen results. C. Creatinine test results. D. Western Blot results of α-SMA, protein quantification results. E. PCR results after electroporation of UUO mice. F. HE staining results. G. Masson staining results. Compared with UUO group, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 3 Effect of electrotransduction inhibition of miR-146b-5p on the pathological changes of UUO kidney



注:A:各炎症指标 PCR 结果;B:α-SMA、Col-1 免疫组化结果;C:Wnt5a、β-catenin 的 Western Blot 结果和蛋白量化结果。

图 4 电转抑制 miR-146b-5p 后可降低 UUO 小鼠炎症及纤维化改变

Note. A. PCR results of inflammation indexes. B. Immunohistochemistry results of α-SMA and Col-1. C. Western Blot results of wnt5a, β-catenin, protein quantification results.

Figure 4 Electrotransduction inhibition of miR-146b-5p can reduce inflammation and fibrosis in UUO mice

3 讨论

肾小管间质纤维化是一个慢性进行性的疾病过程,是慢性肾疾病发展为终末期肾病的必经途径,其机制复杂多样。纤维化是正常伤口愈合过程的病理性扩展,特征为组织损伤及炎症,成纤维细胞活化和迁移以及基质沉积和重塑^[8]。在 CKD 的发病过程中,肾小管间质纤维化基质沉积进行性加重,最终破坏器官结构,减少血液供应导致肾衰竭。目对于肾纤维化的治疗及控制,在临床上的进展仍然十分缓慢,除了部分支持治疗可提高患者的生存质量外,尚且缺乏有效的治疗措施。

国内外大量研究表明,microRNA 与多种器官的纤维化相关,且是参与器官纤维化的一个重要成分^[9-10]。microRNA 是小型非编码 RNA,具有巨大潜力的生物学功能,参与各种生理和病理过程^[11]。且 miRNA 介导 mRNA 的抑制或去稳定作用,并导致翻译抑制,是基因表达的重要调节剂^[12],参与了多种肾疾病的纤维化进程。本团队通过前期转录组测序筛选出多个 miRNA 在肾纤维化 UUO 小鼠模型中高表达,通过前期实验验证后发现 miR-146b-5p 的表达变化尤为显著。目前国内外的相关研究已证实 miR-146b-5p 参与多种肾病理过程。研究表明,miR-146b-5p 在狼疮性肾病中激活 NF- κ B 的表达加重了肾炎症表型^[13]。Ichii 等^[14]和 Paterson 等^[15]报道,慢性肾病肾中 miR-146b 的表达及其尿液排泄与肾间质病变的发展相关,并与炎症细胞浸润相关,镉肾毒性与大鼠肾皮质 miR-146b-5p 的表达改变有密切关系。然而 miR-146b-5p 在肾纤维化中的作用未知。为此,本团队计划探索 miR-146b-5p 在肾纤维化中的作用。本研究发现,肾纤维化病理状态时,miR-146b-5p 显著升高,电转敲低 miR-146b-5p 会明显减轻 UUO 模型肾纤维化程度。这些结果提示 miR-146b-5p 可能促进肾纤维化的进程。

为了研究 miR-146b-5p 在小鼠肾纤维化中的作用,我们计划采用肾原位转染敲低质粒的方法下调 miR-146b-5p 在 UUO 小鼠肾中的表达。目前肾原位转染技术主要包括病毒转染、超声微泡转染、电转染等方法。其中电转染是目前一种新型基因转染技术,早在 1982 年,Neumann 等^[16-17]第一次利用电转脂质双分子层理论对小鼠进行基因转染。电转染是指在外加电场的作用下,使细胞膜具有高通透

性,从而将基因导入细胞或组织中的方法,较传统的病毒载体编辑基因的方法具有成本低、效率高、方便安全的优点^[18],相比较超声靶向微泡技术而言,超声微泡所需试剂价格昂贵,且超声过程中探头易产热对组织造成二次损伤,加重组织病理损伤改变^[19]。本研究在前期实验中验证了电转染与超声微泡转染技术的转染效率,其中电转染体现了优良的转染效率,特别是在摸索出合适的电转参数后,电转染较超声微泡法的效率高,经 HE 染色及肾功能检测后发现经原位电转的肾较模型组比,组织结构完整,形态规则,无明显病理损伤,血肌酐、尿素氮测试显示经电转后,小鼠肾功能与假手术组基本一致,无明显变化,证明经电转后,对小鼠肾无特别损伤。经过前期摸索测试,我们发现采用电转染法可以成功敲低小鼠肾 miR-146b-5p,且明显抑制 UUO 小鼠肾小管间质纤维化的病理改变,进而揭示:靶向电转敲低 miR-146b-5p 后可抑制 miR-146b-5p 的表达从而改善小鼠单侧肾输尿管结扎诱导的肾纤维化。

目前,对于肾纤维化机制及通路的探讨存在多样性,本研究前期我们通过测序发现 miR-146b-5p 在 UUO 小鼠肾中显著增加,并验证了肾纤维化模型中 miR-146b-5p 表达结果与前期预测一致,大量研究显示,wnt/ β -catenin 信号通路参与肾损伤及各种损伤后的修复,激活肾小管中的 wnt/ β -catenin 可防止肾小管细胞死亡和 AKI 的发生,而肾小管中 Wnt/ β -catenin 的持续激活可能导致进行性肾纤维化^[20-21],通过 Western Blot 结果发现,模型组中 wnt5a、 β -catenin 在蛋白水平上均高表达,经靶向电转敲低后,wnt5a、 β -catenin 表达均显著下降,我们猜想 miR-146b-5p 可能是通过此机制调控了小鼠肾纤维化的进程及转变,并产生了以 α -SMA、Col-1 为标志的纤维化改变,后期我们将在肾小管上皮细胞中下调 miR-146b-5p 表达,检测纤维化相关 mRNA 的变化,预测其信号通路证实相关的纤维化机制。

综上所述,miR-146b-5p 在小鼠单侧肾输尿管结扎诱导的肾纤维化模型中高表达,肾原位抑制 miR-146b-5p 的表达可改善小鼠单侧肾输尿管结扎诱导的肾纤维化。表明 miR-146b-5p 可能是肾纤维化的治疗靶标,从而为肾纤维化的治疗提供新的研究方向。

参 考 文 献 (References)

- [1] Cho MH. Renal fibrosis [J]. Korean J Pediatr, 2010, 53(7):

- 735–740.
- [2] Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, et al. Targeting the progression of chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(5): 269–288.
- [3] Petrillo F, Iervolino A, Zaccchia M, et al. MicroRNAs in renal diseases: a potential novel therapeutic target [J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2017, 3(3): 111–119.
- [4] Meng G, Li G, Yang X, et al. Inhibition of miR146b-5p suppresses CT-guided renal cell carcinoma by targeting TRAF₆ [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 10: 11–16.
- [5] Matis S, Recchia AG, Colombo M, et al. MiR-146b-5p regulates IL-23 receptor complex expression in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Blood Adv*, 2022, 6(20): 5593–5612.
- [6] Huang CC, Carcagno A. Electroporation of postimplantation mouse embryos in utero [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018, 2018(2): prot094060.
- [7] Kobayashi R, Endo K, Ohmori Y, et al. A novel method of gene transduction to the murine endometrium using *in vivo* electroporation [J]. *J Vet Med Sci*, 2017, 79(9): 1573–1577.
- [8] Humphreys BD. Mechanisms of renal fibrosis [J]. *Annu Rev Physiol*, 2018, 80: 309–326.
- [9] Zhao Z, Lin CY, Cheng K. siRNA- and miRNA-based therapeutics for liver fibrosis [J]. *Transl Res*, 2019, 214: 17–29.
- [10] Conserva F, Barozzino M, Pesce F, et al. Urinary miRNA-27b-3p and miRNA-1228-3p correlate with the progression of kidney fibrosis in diabetic nephropathy [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11357.
- [11] Li ML, Li RN, Ma YM, et al. MiRNA-1297 inhibits myocardial fibrosis by targeting ULK1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(4): 2070–2076.
- [12] Fan Y, Chen H, Huang Z, et al. Emerging role of miRNAs in renal fibrosis [J]. *RNA Biol*, 2020, 17(1): 1–12.
- [13] Zhang LH, Xiao B, Zhong M, et al. LncRNA NEAT1 accelerates renal mesangial cell injury via modulating the miR-146b/TRAF6/NF- κ B axis in lupus nephritis [J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 382(3): 627–638.
- [14] Ichii O, Otsuka S, Sasaki N, et al. Altered expression of microRNA miR-146a correlates with the development of chronic renal inflammation [J]. *Kidney Int*, 2012, 81(3): 280–292.
- [15] Paterson MR, Geurts AM, Kriegel AJ. miR-146b-5p has a sex-specific role in renal and cardiac pathology in a rat model of chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2019, 96(6): 1332–1345.
- [16] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, et al. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields [J]. *EMBO J*, 1982, 1(7): 841–845.
- [17] Neumann E, Judex M, Kullmann F, et al. Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1 α and IL-10 involves the activin pathway [J]. *Gene Ther*, 2002, 9(22): 1508–1519.
- [18] Qin S, Caskey CF, Ferrara KW. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering [J]. *Phys Med Biol*, 2009, 54(6): R27–R57.
- [19] Dauba A, Goulas J, Colin L, et al. Evaluation of capacitive micromachined ultrasonic transducers for passive monitoring of microbubble-assisted ultrasound therapies [J]. *J Acoust Soc Am*, 2020, 148(4): 2248.
- [20] Feng Y, Ren J, Gui Y, et al. Wnt/ β -catenin-promoted macrophage alternative activation contributes to kidney fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(1): 182–193.
- [21] 严颖, 谭睿彤, 赵长英, 等. 姜黄素对 5/6 肾结扎诱导的慢性肾病小鼠模型肾纤维化的保护作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 52–58.
- Yan Y, Tan RZ, Zhao GY, et al. Protective effect of curcumin on renal fibrosis induced by 5/6 kidney ligation in the mouse model of chronic renal disease [J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2019, 27(1): 52–58.

[收稿日期] 2021–11–08

王瑾茜,喻嵘,李薇,等. 基于“心脾同治”理论探讨益气活血方调控冠心病气虚血瘀证大鼠炎症反应的机制[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 935-941.

Wang JX, Yu R, Li W, et al. Inflammatory mechanism of Yiqi Huoxue recipe with qi deficiency and blood stasis syndrome of coronary heart disease based on the theory of simultaneous treatment of heart and spleen [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 935-941. Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.008

基于“心脾同治”理论探讨益气活血方调控冠心病 气虚血瘀证大鼠炎症反应的机制

王瑾茜¹, 喻嵘², 李薇¹, 杨蕙¹, 张田田², 蔺晓源¹, 胡国恒², 陈亚¹, 雷诗卉^{1*}

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

【摘要】 目的 本研究拟探讨益气活血方调控冠心病气虚血瘀证大鼠免疫炎症的机制。**方法** 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、中药组。模型组和中药组均采用“力竭+控食+冠状动脉左前降支结扎法”制备冠心病气虚血瘀证模型,造模周期为 22 d,中药组在造模第 8 天起予以益气活血方预处理 14 d。于第 25 天取大鼠血清、脾、主动脉及缺血区心肌组织。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组大鼠血清中 IL-35、IL-37 含量;HE 染色观察脾、心肌组织病理形态;Masson 染色观察主动脉病理形态;免疫组化法、Western Blot 分别检测脾、心、主动脉 IL-35、IL-37 光密度表达及蛋白表达。**结果** (1)模型组较正常组血清中 IL-37、IL-35 显著降低($P < 0.00001$);中药组较模型组 IL-37、IL-35 均显著升高($P < 0.00001$)。(2)HE 染色显示模型组心肌间质可见大量炎性细胞浸润;脾组织红髓区域变小,白髓可见边缘区(marginal zone, MZ)和动脉周围淋巴鞘之间淋巴小结大量增多。中药组心肌组织炎性浸润较模型组明显减少,脾组织可见正常分布的脾小梁(trabecula, T)、血窦(splenic sinus, SS),且脾中央动脉(central artery, CA)形态规则。Masson 染色显示模型组主动脉内膜增生,结构紊乱并存在泡沫细胞、脂质沉淀;中药组主动脉内膜变薄,纤维破损处可见修复痕迹。(3)模型组大鼠心肌、主动脉、脾组织 IL-35、IL-37 平均光密度值及蛋白含量显著低于正常组($P < 0.00001$);中药组大鼠心肌、主动脉、脾组织 IL-35、IL-37 平均光密度及蛋白含量显著高于模型组($P < 0.00001$)。**结论** CHD 气虚血瘀证模型大鼠可为“心脾同治”理论提供模型支撑;益气活血方对 CHD 气虚血瘀证炎症状态有改善作用,其机制与上调 IL-35、IL-37 水平相关。

【关键词】 心脾同治;冠心病;气虚血瘀证;免疫炎症反应;益气活血方

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 07-0935-07

Inflammatory mechanism of Yiqi Huoxue recipe with qi deficiency and blood stasis syndrome of coronary heart disease based on the theory of simultaneous treatment of heart and spleen

WANG Jinxi¹, YU Rong², LI Wei¹, YANG Hui¹, ZHANG Tiantian², LIN Xiaoyuan¹, HU Guoheng², CHEN Ya¹, LEI Shihui^{1*}

(1. the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China. 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208)

Corresponding author: LEI Shihui. E-mail:273067155@qq.com

【基金项目】 湖南省自然科学基金项目(2021JJ40418), 湖南省中医药科研项目(2021179, 2021172), 长沙市科技计划项目(kq2014222, kq2014224), 湖南省卫健委科研计划项目(202103010864), 湖南中医药大学校级科研基金项目(2019XJJ057)。

Funded by Hunan Natural Science Foundation Project (2021JJ40418), the Scientific Research Project of Traditional Chinese Medicine in Hunan Province (2021179, 2021172), Changsha Science and Technology Planning Project (kq2014222, kq2014224), Scientific Research Program of Hunan Provincial Health Commission (202103010864), University Level Scientific Research Fund Project of Hunan University of Traditional Chinese Medicine (2019XJJ057).

【作者简介】 王瑾茜(1991—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 心血管疾病的中医药防治。Email: wjx0929@hotmail.com

【通信作者】 雷诗卉(1993—), 女, 实验师, 学士, 研究方向: 心脑血管疾病的中医药防治。Email: 273067155@qq.com

【Abstract】 Objective The aim of this study was to explore the mechanism of Yiqi Huoxue recipe in regulating immune inflammatory response in rats with coronary heart disease syndrome of qi deficiency and blood stasis. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into control group, model group, and recipe group. The model of qi deficiency and blood stasis syndrome of coronary heart disease was prepared by exhaustion, food control, and ligation of the left anterior descending branch of the coronary artery in model group, and recipe group. recipe group was pretreated with Yiqi Huoxue Recipe for 14 days from day 8 of modeling. On day 25, serum, heart, spleen, and aorta were collected for cytokine quantification and histopathological examination. **Results** (1) Serum levels of IL-37 and IL-35 were significantly lower in model group, than control group ($P < 0.00001$). (2) After treatment, the serum levels of IL-37 and IL-35 were significantly higher in recipe group than model group ($P < 0.00001$). HE staining showed a large degree of inflammatory cell infiltration in the myocardial stroma in model group. The red pulp area of spleen tissue was smaller, and a large number of lymph nodes between marginal zone (MZ) and the periarterial lymph sheath were seen in white pulp. Hyperplasia, structural disorder, the presence of foam cells, and lipid deposition were seen in the aortic intima in model group. Inflammatory cell infiltration of myocardial tissue was significantly lower in recipe group than in the model group. The intima of the aorta was thin, and scars were seen at damaged fibers. A normal distribution of trabecula (T) and splenic sinus (SS) was seen in spleen tissue and central artery (CA) morphology was regular in recipe group. (3) The average optical densities and protein contents of IL-35 and IL-37 in the myocardium, aorta, and spleen of model group were significantly lower than those in control group ($P < 0.00001$). The average optical densities and protein contents of IL-35 and IL-37 in the myocardium, aorta, and spleen of rats in recipe group were significantly higher than those in control group ($P < 0.00001$). **Conclusions** CHD model rats with qi deficiency and blood stasis syndrome support the theory of simultaneous treatment of heart and spleen, Yiqi Huoxue recipe improves the inflammatory state of CHD with qi deficiency and blood stasis syndrome, and its mechanism is related to the upregulation of IL-35 and IL-37.

【Keywords】 simultaneous treatment of heart and spleen; coronary heart disease; qi deficiency and blood stasis syndrome; immune inflammation; Yiqi Huoxue recipe

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

冠心病(coronary heart disease, CHD)是我国导致死亡的主要原因之一^[1],美国心脏协会的一项研究表明,由于衰老、吸烟及其他风险因子的影响,到2030年,中国的CHD患者复发和死亡的风险将增加3.3倍^[2]。现代医学研究证实,免疫炎症反应在CHD的发生发展中起重要作用^[3]。脾作为机体最大的免疫器官,含有大量的巨噬细胞^[4-5]。脾来源的巨噬细胞活化后,可吞噬大量胆固醇从而转变为泡沫细胞,后者积聚于血管内膜形成脂质斑块,进而加速CHD的进程。上述过程被认为是促进炎症反应、加速动脉硬化斑块形成的关键所在^[6-7]。CHD在中医学中归属于“胸痹”、“心痛”等范畴^[8]。中医学认为心脾两脏存在“母子相及”的关系,并认为心、脾两脏相互为病,是胸痹心痛的内在病机之一^[9]。《金匱要略》一书中首次提出“心脾同治”之法,认为脾与心存在母子相及的关系,膏脂的生成转化与脾的运化功能密切相关,脾虚可加重脂浊生成,脂浊浸淫血脉则血脉壅滞,遂发为胸痹心痛^[10]。有研究证实了脾虚证患者免疫功能降低,导致机体炎症反应加重,进而加速了胸痹心痛的进程^[11]。亦有研究表明,脾虚患者血管内皮易损、修复能力减

弱,使胸痹心痛的易患性增加^[12]。结合现代医学及中医视角,课题组认为,“心脾同治”治法的科学依据可能与调控脾介导的免疫炎症反应失衡密切相关。

益气活血方是湖南省名老中医胡国恒教授的经验方,临床治疗CHD疗效显著^[13]。全方由黄芪、当归、丹参、川芎四药组成。黄芪性温,补气而使脾阳复辟。当归性温味甘,养血合营。两者合用,体现“若实其脾,则化得其正”的用药精髓。丹参可破宿血,补新生血;川芎为血中气药,可使血闭者能通。诸药相互为用,共奏心脾同治、气血并补之效,是“心脾同治”法的具体体现形式。本研究中,我们采用“游泳力竭+控制饮食+结扎冠状动脉左前降支”制备CHD气虚血瘀证病证结合动物模型,观察益气活血方干预后大鼠一般状态及血清中白介素-35(interleukin-35, IL-35)、白介素-37(interleukin-37, IL-37)的改变,检测脾组织、心肌组织及主动脉病理形态及IL-35、IL-37的平均光密度及蛋白含量表达,以期探寻益气活血方调控CHD气虚血瘀证炎症反应的机制所在,为“心脾同治”理论提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

16 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只, 体重(280 ± 20)g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。饲养于湖南中医药大学第一附属医院 SPF 级动物房【SYXK(湘)2020-0010】。实验动物饲养条件为: $18 \sim 21^{\circ}\text{C}$, 湿度保持 40% ~ 70%, 环境空气控制为每分钟 10 次换气; 保持每天 12 h 光照和 12 h 黑暗环境。本文涉及动物实验, 均经湖南中医药大学医学伦理委员会监管和批准实施(IACUC20201010-3), 实验过程遵循 3R 原则。

1.1.2 主要试剂与仪器

益气活血方由黄芪 30 g, 当归 12 g, 川芎 15 g, 丹参 15 g 组成, 中药饮片购自湖南中医药大学第一附属医院。

注射用青霉素钠(华北制药, 86347), IL-35 ELISA 测定试剂盒(FY2081-A)、IL-37 ELISA 测定试剂盒(FY2083-A)均购自于江苏菲亚生物科技有限公司; DAB 显色液(北京中杉金桥, ZLI-9018), 总蛋白提取试剂盒(22865-23)、酶标二抗(23876-26)、ECL 显色液(21278-34)均购自于默克美国 sigma 试剂公司。

酶标仪(Perkinelmer, Enspire, 美国), 小动物呼吸机(奥尔科特, ALC-V10, 中国), 电子天平(湘仪, TP-2200B, 中国), 台式冷冻离心机(贺默, Z32HK, 德国), 水浴锅(Blue pard, DK-8AD, 中国), 心电图机(徠卡, BL-420, 德国), 荧光显微镜(奥林巴斯, BX43, 日本), 生物组织包埋机(宏业, BM-V III, 中国), 手动轮转式切片机(赛默飞, HM325, 英国), 染色机(赛默飞, Gemini AS, 英国), 样本匀浆处理系统(耶拿, SPEEDMILL PLUS, 德国), 蛋白印迹系统(伯乐, Mini Trans-Blot, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组实验干预

大鼠按体重随机分为 3 组: 正常组、模型组和中药组, 每组各 10 只。参考课题组既往经验^[14], 正常组大鼠正常饲养, 模型组于实验第 1 ~ 21 天采用“力竭+控食”制备气虚血瘀证模型: 于正式实验第 1 天进行力竭游泳造模, 以大鼠头不能露出水面开始计时 10 s 为力竭标准, 频率为每天 1 次; 力竭游泳造模同时进行控食造模,

每日摄食量为正常食量的 1/2 的饲料, 连续 21 d。于第 22 天采用“冠状动脉左前降支结扎法”制备冠心病病理模型。造模结束后, 以第 25 天上午 8:00 为取材时间点。

1.2.2 益气活血方灌胃液的制备

取益气活血方加入处方剂量 10 倍水, 浸泡 30 min 后, 沸水文火慢煎 2 次, 每次 40 min, 合并 2 次药液, 过滤, 浓缩至 1.6 g/mL, 4°C 冰箱保存。

1.2.3 检测指标与检测方法

第 25 天麻醉大鼠, 取大鼠血清、脾组织、主动脉及缺血区心肌组织进行如下检测: (1) 观察各组大鼠一般状态。(2) ELISA 法检测大鼠血清中 IL-37、IL-35 的水平。(3) HE 染色法观察大鼠心、脾组织病理形态学改变; Masson 染色法观察主动脉病理形态学改变。(4) 免疫组化法观察大鼠心肌、主动脉、脾组织 IL-37、IL-35 光密度表达。(5) Western Blot 法检测大鼠心、主动脉、脾组织 IL-37、IL-35 蛋白含量的变化。

1.3 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 22.0 分析实验数据, 根据不同的数据特点采用不同的检验法: 计数资料采用 χ^2 检验; 计量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 如果满足正态及方差齐性, 采用成组 t 检验, 不满足者采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状态比较

正常组大鼠精神状态良好, 毛发润泽, 反应灵敏; 模型组精神萎靡、毛发粗糙无光泽, 反应迟钝, 消瘦; 中药组毛发蓬松、稍有光泽, 精神状态有所改善, 体重略有增加, 见图 1。



注: A: 正常组; B: 模型组; C: 中药组。

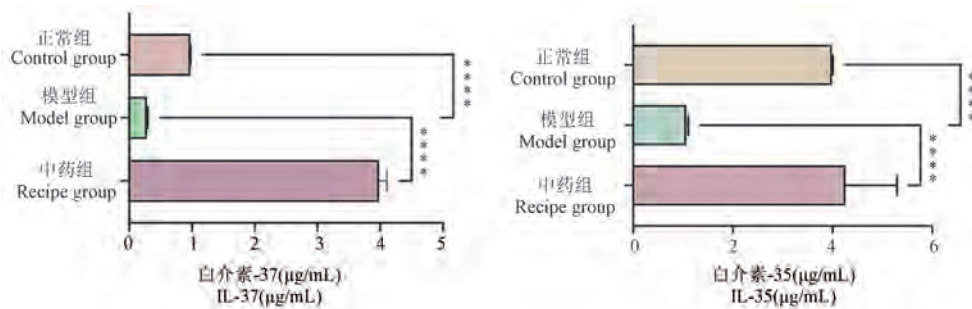
图 1 各组大鼠一般状态比较

Note. A. Control group. B. Model group. C. Recipe group.

Figure 1 Comparison of general state of rats in each group

2.2 各组大鼠血清中 IL-37、IL-35 水平比较

与正常组比较, 模型组大鼠 IL-37、IL-35 显著降低 ($P < 0.00001$); 与模型组相比, 中药组大鼠 IL-37、IL-35 显著升高 ($P < 0.00001$), 见图 2。



注:两组间比较,**** $P < 0.00001$ 。

图2 酶联免疫吸附实验法检测结果

Note. Compared between the two groups, **** $P < 0.00001$.

Figure 2 Test results of enzyme linked immunosorbent assay

2.3 各组大鼠心肌、主动脉、脾组织病理形态学比较

2.3.1 心肌组织 HE 染色病理观察

正常组 HE 染色可见心肌细胞整齐、致密、均匀排列,无核固缩甚至碎裂溶解。模型组心肌细胞排列紊乱,心肌纤维走行较为紊乱,间质可见大量炎症细胞浸润。中药组炎症浸润较模型组明显减少,可见组织纤维修复痕迹,见图 3A。

2.3.2 主动脉 Masson 染色病理观察

正常组动脉内膜平整,中膜平滑肌细胞排列致密整齐,无炎症细胞浸润,纤维清晰,无增生。模型组外膜增厚、胶原纤维增生,中膜平滑肌细胞排列紊乱,局部有轻微增殖表现,内膜增生,结构紊乱并

存在脂质沉淀。中药组内膜变薄,纤维破损处可见修复痕迹,见图 3B。

2.3.3 脾组织 HE 染色病理观察

正常组大鼠红髓可见脾小梁 (trabecula, T) 为灰白色,呈条索状,红髓内可见大量分布的血窦 (splenic sinus, SS), SS 外侧分布有较多的巨噬细胞。脾中央动脉 (central artery, CA) 表面光滑形圆,周边分布大量的脾小体 (splenic corpuscle, SCor), 可见大量的 B 细胞。模型组见脾内结缔组织增生, T 增厚,红髓区域变小, CA 增生。白髓可见边缘区 (marginal zone, MZ) 和动脉周围淋巴鞘之间淋巴小结大量增多,提示抗原侵入脾内引起体液免疫应答。中药组可见正常分布的 T、SS, 且 CA 形态规则, 见图 3C。

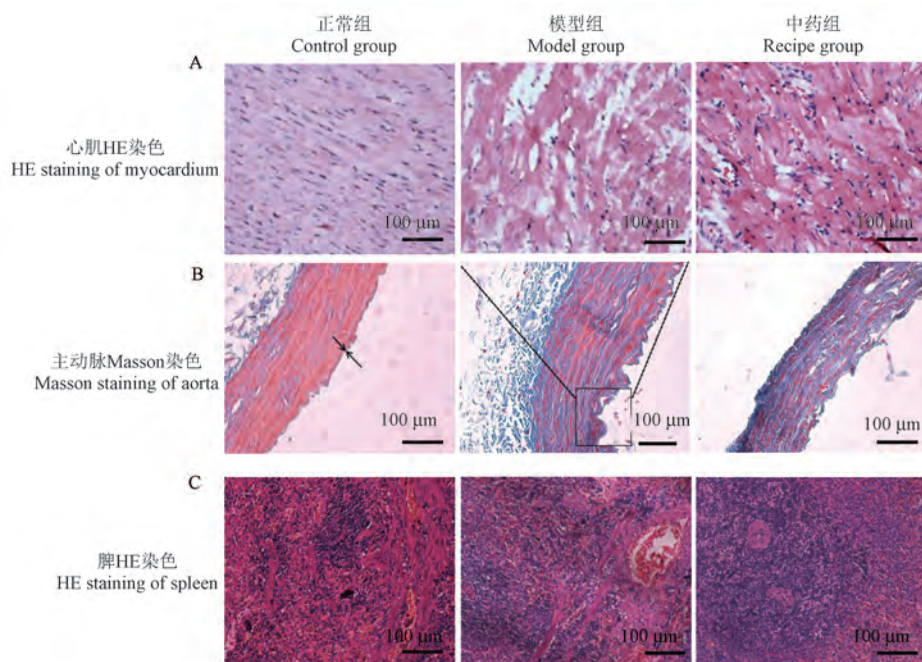


图3 各组大鼠组织病理学

Figure 3 Histopathology of rats in each group

2.4 各组大鼠心、主动脉、脾组织 IL-35、IL-37 免疫组化染色比较

2.4.1 心肌组织免疫组化病理观察

与正常组相比,模型组大鼠 IL-35、IL-37 均显著降低($P < 0.00001$)。与模型组相比,中药组大鼠 IL-35、IL-37 均显著升高($P < 0.00001$),见图 4A, 4B, 4G, 4H。

2.4.2 主动脉免疫组化病理观察

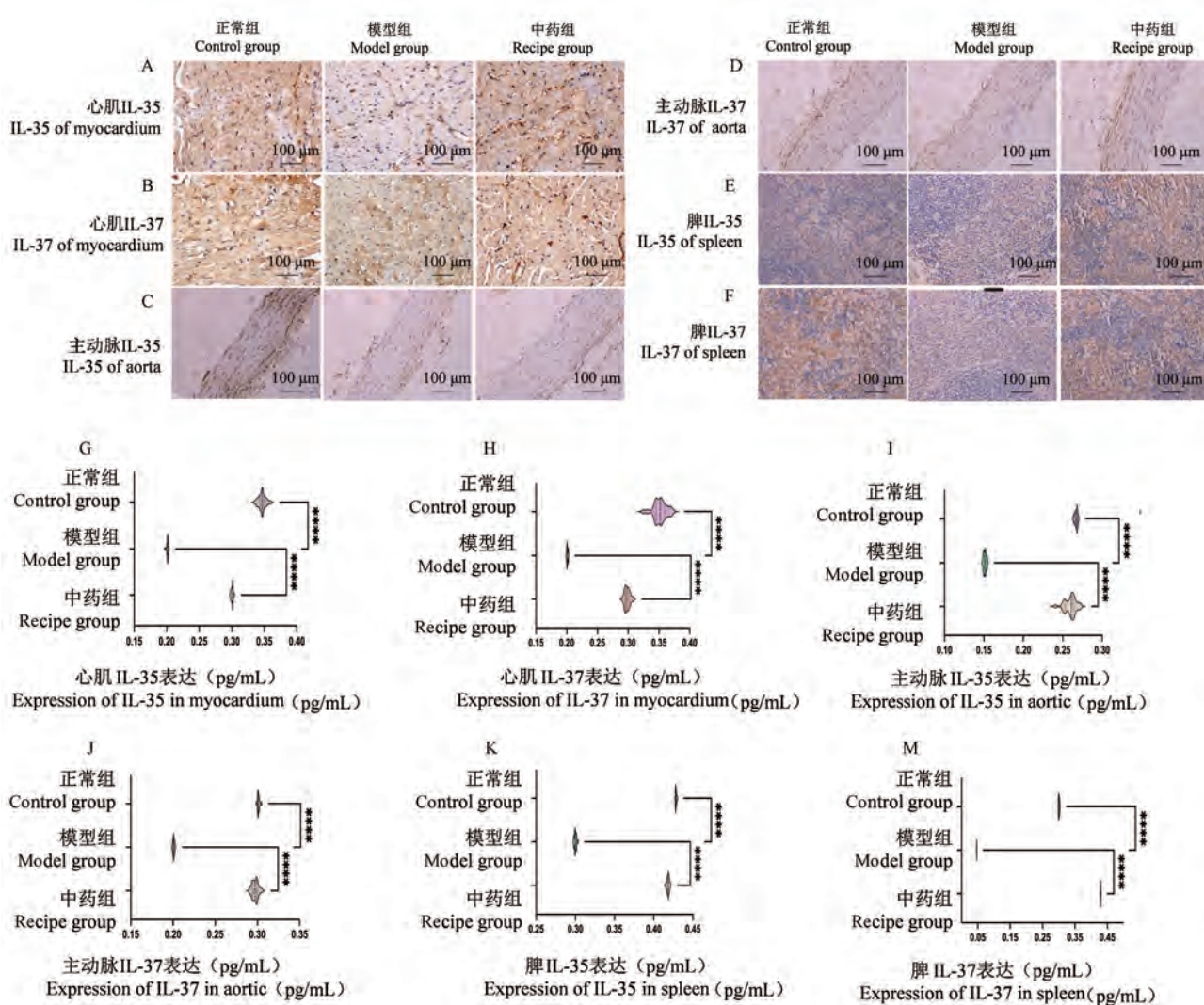
与正常组相比,模型组大鼠 IL-35、IL-37 均显著降低($P < 0.00001$)。与模型组相比,中药组大鼠 IL-35、IL-37 均显著升高($P < 0.00001$),见图 4C, 4D, 4I, 4J。

2.4.3 脾组织免疫组化病理观察

与正常组相比,模型组大鼠 IL-35、IL-37 均显著降低($P < 0.00001$)。与模型组相比,中药组大鼠 IL-35、IL-37 均显著升高($P < 0.00001$),见图 4E, 4F, 4K, 4M。

2.5 各组大鼠心、主动脉、脾组织 IL-35、IL-37 蛋白含量比较

在心、血管、脾组织中,与正常组比较,模型组大鼠 IL-35、IL-37 均显著降低($P < 0.00001$);与模型组相比,中药组大鼠 IL-35、IL-37 均显著升高($P < 0.00001$)。见图 5。



注:两组间比较,**** $P < 0.00001$ 。

图 4 各组大鼠心、主动脉、脾组织中 IL-35、IL-37 的表达

Note. Comparison between the two groups, **** $P < 0.00001$.

Figure 4 Expression of IL-35 and IL-37 in myocardium, aorta and spleen of rats in each group

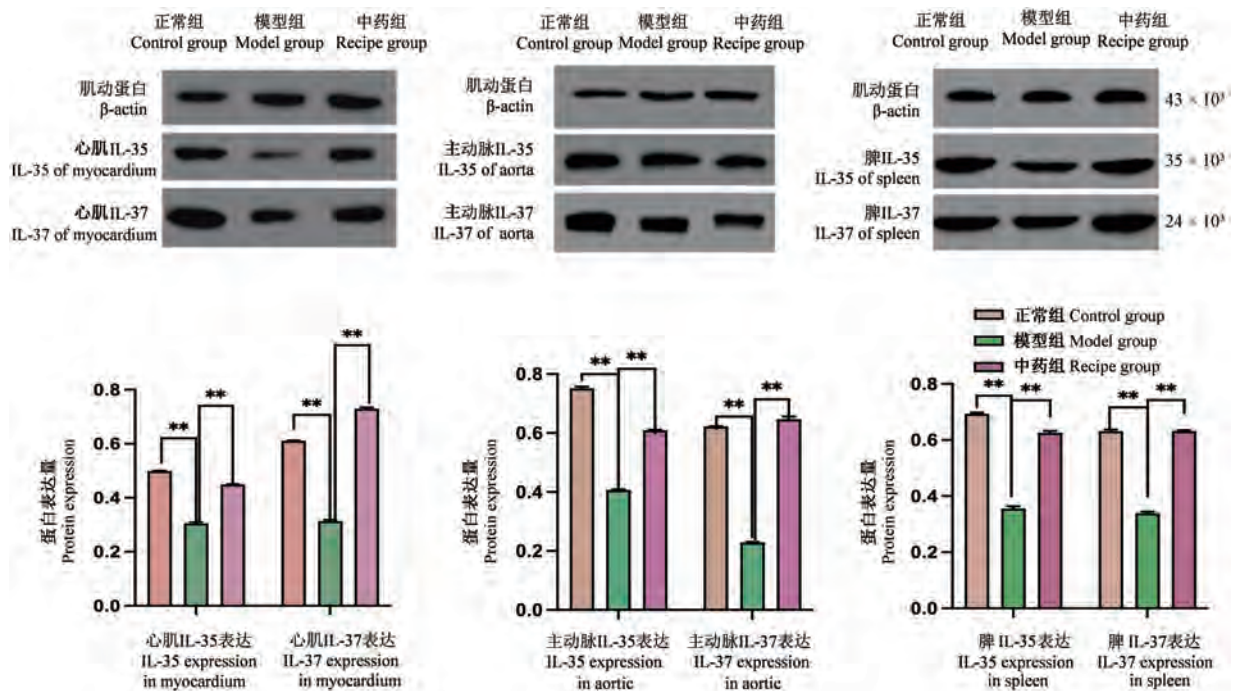


图5 各组大鼠心、主动脉、脾组织中 IL-35、IL-37 的蛋白表达

Note. Comparison between the two groups, ** $P < 0.001$.

Figure 5 Protein expression of IL-35 and IL-37 in myocardium, aorta and spleen of rats in each group

3 讨论

沿用前期制备的“力竭+饥饿+结扎冠状动脉左前降支”造模方式复制 CHD 气虚血瘀证模型。造模后大鼠出现如精神萎靡、毛发粗糙无光泽、反应迟钝及消瘦等脾虚的一般状态变化。这些表现与临床上脾虚患者倦怠乏力、形体消瘦和面色萎黄相似,与“劳倦”、“饮食过于饥饱”为损伤脾胃主要原因的观点相符。本研究观察模型大鼠脾组织的病理改变,发现其脾内结缔组织增生, T 增厚、红髓区域变小, CA 增生以及 MZ 淋巴小结大量增多,提示脾作为免疫器官,参与了 CHD 免疫炎症反应。本研究观察模型组大鼠主动脉病理改变,结果提示其主动脉外膜增厚、胶原纤维增生,中膜平滑肌细胞排列紊乱,局部有轻微增殖表现,内膜增生,结构紊乱并存在脂质沉淀。继而,本研究观察模型组大鼠心肌组织病理改变,发现其心肌细胞排列紊乱,心肌纤维走行较为紊乱,间质可见大量炎性细胞浸润,上述改变可为脾与心两脏存在“母子相依、气血相济”的关系提供科学依据。此外,还发现模型组血清中 IL-35、IL-37 水平较正常组显著下降;模型组大鼠心、动脉、脾组织与正常组相比 IL-35、IL-37 光密

度值及蛋白水平显著降低,这可能与 CHD 发生后, IL-35、IL-37 分泌被抑制有关。因此,本研究得出结论, CHD 气虚血瘀证大鼠存在“心脾两虚”的病理改变,可为“心脾同治”理论提供模型支撑。

目前中药预处理成为心血管疾病防治领域的研究热点^[15],课题组前期在造模第 8 天起连续 14 d 运用益气活血方对模型进行预处理,发现益气活血方可改善 CHD 气虚血瘀证模型大鼠心肌细胞损伤,记忆力减退、健忘及疲劳、反应迟钝的症状,并改善血液高凝状态^[16]。本研究结果显示以益气活血方干预后,大鼠毛发蓬松、稍有光泽,精神状态有所改善,体重略有增加。提示益气活血方可改善脾虚的一般状态变化。益气活血方干预后,心肌组织炎症浸润较模型组明显减少,可见组织纤维修复痕迹;主动脉内膜变薄,纤维破损处可见修复痕迹;脾组织可见正常分布的 T、SS,且 CA 形态规则。提示益气活血方能减轻 CHD 气虚血瘀证大鼠心脏、脾、血管靶器官的损害。益气活血方干预后能上调血清中 IL-35、IL-37 水平,且中药组大鼠心、动脉、脾组织与模型组相比 IL-35、IL-37 光密度值及蛋白水平显著升高,提示益气活血方抑制组织炎症反应的分子机制可能与上调 IL-35、IL-37 表达有关。

参 考 文 献(References)

- [1] Zhao L, Wang L, Zhang D, et al. Puerarin alleviates coronary heart disease via suppressing inflammation in a rat model [J]. *Gene*, 2021, 771: 145354.
- [2] Lawson JS, Glenn WK. Infection and food combine to cause atherosclerotic coronary heart disease-Review and hypothesis [J]. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2021, 35: 100807.
- [3] Kou JY, Li Y, Zhong ZY, et al. Berberine-sonodynamic therapy induces autophagy and lipid unloading in macrophage [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1): e2558.
- [4] Fujiyama S, Nakahashi-Oda C, Abe F, et al. Identification and isolation of splenic tissue-resident macrophage sub-populations by flow cytometry [J]. *Int Immunol*, 2019, 31(1): 51-56.
- [5] 钟玲, 苏伟. 单核细胞亚群与冠心病的相关性研究进展 [J]. *医学理论与实践*, 2021, 34(22): 3884-3886.
- Zhong L, Su W. Research progress of correlation between monocyte subsets and coronary heart disease [J]. *J Med Theory Pract*, 2021, 34(22): 3884-3886.
- [6] 王美琪, 张胜男, 孙勇. 巨噬细胞的自噬在动脉粥样硬化中的作用 [J]. *心肺血管病杂志*, 2017, 36(10): 826-828.
- Wang MQ, Zhang SN, Sun Y. The role of macrophage autophagy in atherosclerosis [J]. *J Cardiovasc Pulm Dis*, 2017, 36(10): 826-828.
- [7] Satti HS, Hussain S, Javed Q. Association of interleukin-6 gene promoter polymorphism with coronary artery disease in Pakistani families [J]. *Sci World J*, 2013, 2013: 538365.
- [8] 姜丽红, 魏岩. 冠心病从脾论治剖析 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(10): 2073-2076.
- Jiang LH, Wei Y. Analysis on treatment of coronary heart disease from spleen [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2019, 46(10): 2073-2076.
- [9] 刘悦, 张帆, 王洋, 等. 基于“心受气于脾”理论探讨冠心病的发病机制 [J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(7): 1675-1677.
- Liu Y, Zhang F, Wang Y, et al. Discussion on the pathogenesis of coronary heart disease based on the theory of “heart is affected by qi and spleen” [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2019, 30(7): 1675-1677.
- [10] 高晓宇, 张哲, 王洋, 等. 基于脾虚生痰理论探讨巨噬细胞自噬与动脉粥样硬化的关系 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(22): 1902-1905.
- Gao XY, Zhang Z, Wang Y, et al. Exploring the relationship between macrophage autophagy and atherosclerosis based on the theory of spleen deficiency generating phlegm [J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 58(22): 1902-1905.
- [11] 侯文华, 肖传宇, 谢强. 冠心病患者血清 LDL-C、NK- κ B、IL-6 水平与 annexin A1 的相关性研究 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2018, 25(8): 1148-1150, 1171.
- Hou WH, Xiao CY, Xie Q. A correlational analysis for changes of sera LDL-C, NK- κ B, IL-6 and annexin A1 of patients with coronary heart disease [J]. *Labeled Immunoass Clin Med*, 2018, 25(8): 1148-1150, 1171.
- [12] Olivera-Toro A, Fossion R, Li L, et al. Changes in heart rate variability in patients with spleen-qi deficiency syndrome [J]. *J Acupunct Meridian Stud*, 2019, 12(4): 111-121.
- [13] 胡国恒, 王瑾茜, 刘侃, 等. 益气活血组方治疗冠心病心肌缺血临床观察 [J]. *中国中医急症*, 2016, 25(10): 1940-1942.
- Hu GH, Wang JX, Liu K, et al. Observation of Yiqi Huoxue Decoction on coronary artery disease myocardial ischemia [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2016, 25(10): 1940-1942.
- [14] 王瑾茜, 蔺晓源, 刘侃, 等. 冠心病气虚血瘀证病证结合大鼠模型的建立研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(5): 602-609.
- Wang JX, Lin XY, Liu K, et al. Study on the establishment of a rat model of coronary heart disease with qi deficiency and blood stasis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(5): 602-609.
- [15] 刘铭扬. 针药结合预处理对急性心肌梗死大鼠 ATP 敏感性钾离子通道 Kir6.1、Kir6.2 表达的影响 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2021.
- Liu MY. Effect of acupuncture combined with drug pretreatment on the expression of ATP-sensitive potassium channels Kir6.1 and Kir6.2 in rats with acute myocardial infarction [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2021.
- [16] 王瑾茜, 胡国恒, 蔺晓源, 等. 益气活血方对气虚血瘀型冠心病模型大鼠的影响研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(5): 529-534.
- Wang JX, Hu GH, Lin XY, et al. Effects of Yiqi Huoxue formula on coronary heart disease rats with qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2020, 40(5): 529-534.

[收稿日期] 2022-05-12

徐纪伟,孙丹华,陈旭东,等. MST1/2 抑制剂促进大鼠脊髓损伤修复的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 942-948.

Xu JW, Sun DH, Chen XD, et al. MST1/2 inhibitor for spinal cord injury repair in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 942-948.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.009

MST1/2 抑制剂促进大鼠脊髓损伤修复的实验研究

徐纪伟¹, 孙丹华^{1*}, 陈旭东¹, 王宁¹, 孙壕烨²

(1. 漯河医学高等专科学校基础医学部, 河南 漯河 462000; 2. 漯河医学高等专科学校第三附属医院, 河南 漯河 462000)

【摘要】 目的 探讨 MST1/2 抑制剂对大鼠脊髓损伤后 Yes 相关蛋白 YAP、神经生长相关蛋白 43、神经胶质纤维蛋白 GFAP、细胞凋亡因子 Caspase3 表达及运动功能恢复的影响。**方法** 选取 105 只体重 180 ~ 200 g 成年雌性 SD 大鼠, 对 35 只仅做椎板切除手术且不注射药物为假手术组, 对 70 只大鼠建立脊髓顿挫损伤模型, 分为生理盐水组、MST1/2 抑制剂组, 腹腔注射生理盐水、1 mg/kg XMU-MP-1。在手术后第 1、3、7、14、21、28 天, 进行斜板实验及 BBB 运动功能评分, 然后处死大鼠收集脊髓损伤区周围组织, 进行免疫荧光染色和免疫印迹检测, 观察各组大鼠脊髓组织中 YAP、GAP43、Caspase3、GFAP 表达变化情况。**结果** 斜板实验与 BBB 运动功能评分结果显示, 从术后第 7 天起, MST1/2 抑制剂组评分明显高于生理盐水组, 一直持续到术后第 28 天, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。免疫印迹结果显示, 术后第 14 天 MST1/2 抑制剂组的 YAP 表达明显高于生理盐水组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 术后第 14 天 MST1/2 抑制剂组 GFAP、Caspase3 表达明显低于生理盐水组, 同时发现 GAP43 出现表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。荧光染色显示, MST1/2 抑制剂组较少炎症细胞浸润、形成神经组织结构框架, 生理盐水组明显炎症细胞浸润、形成大量神经胶质瘢痕。免疫荧光染色结果显示, 假手术组 YAP 在神经细胞中出现表达, 生理盐水组和 MST1/2 抑制剂组 YAP 在神经胶质细胞出现表达, 且 MST1/2 抑制剂组 YAP、GAP43 阳性细胞数量明显高于其他两组, MST1/2 抑制剂组成熟肥大的星形胶质细胞数量明显少于生理盐水组; 免疫荧光双标结果显示, YAP 与 GFAP 出现共同表达。**结论** 脊髓损伤后大剂量应用 MST1/2 抑制剂能明显促进 YAP 表达, 减轻炎症损伤反应, 抑制神经细胞凋亡, 改善脊髓损伤区微环境, 促进星形胶质细胞形成原始神经组织结构框架, 有利于神经突起再生修复, 促进运动功能恢复。

【关键词】 MST1/2 抑制剂; 脊髓损伤; Yes 相关蛋白

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 07-0942-07

MST1/2 inhibitor for spinal cord injury repair in rats

XU Jiwei¹, SUN Danhua^{1*}, CHEN Xudong¹, WANG Ning¹, SUN Haoye²

(1. Faculty of Basic Medicine, Luohe Medical College, Luohe 462000, China. 2. Luohe Medical College Third Affiliated Hospital, Luohe 462000)

Corresponding author: SUN Danhua. E-mail: danhua6699@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of an MST1/2 kinase inhibitor on expression of YAP, GAP43, Caspase 3, and GFAP in rats with acute spinal cord contusion (SCC). **Methods** A total of 105 adult female SD rats

【基金项目】 河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目 (2017GGJS285), 河南省科技厅科技攻关项目 (182102310083), 河南漯河医学高等专科学校创新创业发展能力提升工程项目 (2019LYZKYD008)。

Funded by Henan Provincial Key Young Teachers Training Program (2017GGJS285), Science and Technology Project of Henan Science and Technology Department (182102310083), Innovation and Entrepreneurship Development Ability Improvement Project of Henan Luohe Medical College (2019LYZKYD008)。

【作者简介】 徐纪伟 (1984—), 男, 副教授, 研究方向: 脊髓损伤与修复研究。E-mail: xjwabc@163.com

【通信作者】 孙丹华 (1983—), 女, 副教授, 研究方向: 脊髓损伤与修复研究。E-mail: danhua6699@126.com

weighing 180 ~ 200 g were used, of which 35 rats were subjected to a laminectomy and no drug injection as the sham operation group, whereas 70 rats were subjected to spinal cord contusion and divided into normal saline and MST1/2 inhibitor groups injected with normal saline or 1 mg/kg XMU-MP-1, respectively. Western Blot and immunofluorescence were used to observe YAP, GAP43, Caspase3 and GFAP expression. BBB and inclined plane tests were used to observe motor functions in rats. **Results** The inclined plane test and BBB scoring showed the scores of the MST1/2 inhibitor group were significantly better than those of normal saline group from day 7 to 28 ($P < 0.05$). Western Blot showed that YAP expression in the MST1/2 inhibitor group was significantly higher than that the normal saline group from day 14. GFAP and Caspase3 expression in the MST1/2 inhibitor group was significantly lower than that in the normal saline group from day 14. GAP43 expression was also observed in the MST1/2 inhibitor group from day 14. These differences were statistically significant ($P < 0.05$). Immunofluorescence showed that the MST1/2 inhibitor group had less infiltration of inflammatory cells and formed a structural framework of nerve tissue, whereas the normal saline group had obvious infiltration of inflammatory cells and formed a large number of glial scars. Immunofluorescence also showed that YAP was expressed in nerve cells in the Sham operation group. Moreover, the number of YAP and GAP43-positive cells in the MST1/2 inhibitor group was significantly higher than that in the other two groups, and the number of mature and hypertrophic astrocyte cells in the MST1/2 inhibitor group was significantly lower than that in the normal saline group; double immunofluorescent staining showed that YAP and GFAP were co-expressed. **Conclusions** A high dose of the MST1/2 inhibitor decreased YAP expression, activated reactive astrocytes, reduced the inflammatory injury response, inhibited apoptosis of nerve cells, improved the microenvironment of the injured area, and promoted neurite regeneration and function recovery.

【Keywords】 MST1/2 inhibitor; spinal cord injury; YAP

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

脊髓损伤会引起损伤段以下感觉、运动和括约肌功能丧失,使患者出现截瘫、尿便功能障碍等症状,是致残率极高的中枢神经系统创伤,但目前尚无有效治疗脊髓损伤的方法。Hippo 信号通路是哺乳动物发育过程中调控细胞生长、胞间信息连接,细胞蛋白骨架形成、细胞运动机制及激素调节的重要通路,其中 MST1/2 是 Hippo 信号通路中的核心激酶,Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)是 Hippo 信号通路的下游分子,正常机体内 Hippo 通路主要通过抑制 YAP 的转录活性来调控细胞增殖分化与调亡^[1-2]。本实验通过在脊髓损伤后给予 MST1/2 抑制剂(XMU-MP-1),观察脊髓内 YAP、GAP43、GFAP、Caspase3 表达变化及评估运动功能的恢复情况,探讨其对神经突起再生及胶质瘢痕的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选取 105 只 SPF 级雌性 SD 大鼠,4 周龄,体重 180 ~ 200 g,由河南省实验动物中心提供【SCXK(豫)2017-0001】。实验动物饲养于河南省实验动物中心【SYXK(豫)2018-0007】,动物饲养条件:每只大鼠给予 12 h/12 h 光照/黑暗循环,自由获取水

和标准饮食,(20 ± 2)℃和($60\% \pm 5\%$)湿度环境下饲养。该实验经漯河医学高等专科学校医学伦理委员会批准(LYZLLSC2019032602),并遵循实验动物的 3R 原则。

1.1.2 主要试剂与仪器

MST1/2 抑制剂 XMU-MP-1 (Apexbio, A8735); YAP 抗体 (Santa Cruz, sc7568)、GFAP 抗体 (Santa Cruz, sc33673); GAP43 抗体 (武汉博士德生物技术公司, ba0878); Caspase3 抗体 (Bioss, bsm33199M); MAP2 抗体 (Abnova, MAB11155); FITC 标记荧光二抗 (Bioss, AG09011170); TRITC 标记 (北京中杉金桥生物技术公司, 106374)。

荧光显微镜 (尼康, TS-100F, 日本), 全自动凝胶成像系统 (VilberINFINITY3000, 法国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及方法

105 只大鼠按每组 35 只随机分成假手术组、生理盐水组、MST1/2 抑制剂组,腹腔注射戊巴妥钠 (30 mg/kg) 麻醉大鼠,呈俯卧位固定于手术台,沿背部正中线剪开皮肤,钝性分离肌肉,去除 T9/10 水平椎板,暴露硬脊膜,对 MST1/2 抑制剂组和生理盐水组动物用 10 g 冲击棒自 30 mm 高处自由坠落打击脊髓节段,制备脊髓钝挫伤模型,对假手术组动

物仅咬除椎板暴露脊髓^[3-4]。逐层缝合肌肉和皮肤切口,然后每天 3 次按摩膀胱,助排尿直到膀胱恢复功能。各组于术后 1 h 按照 2×10^4 U/kg 体重腹腔注射青霉素,每天注射两次,连续注射 3 d。MST1/2 抑制剂组 XMU-MP-1 溶解在 DMSO 中按照 1 mg/kg 腹腔注射,生理盐水组注射等量生理盐水,每天注射 1 次,连续注射 3 d。假手术组不作其他处理。

1.2.2 观测指标

(1) 运动功能评价

手术后第 1、3、7、14、21、28 天,取大鼠进行斜板实验、BBB 运动功能评分,评价大鼠肢体运动功能恢复情况^[5-6]。

(2) 免疫荧光染色观察

术后 6 个时间点每组取 5 只大鼠,腹腔注射戊巴妥钠 (30 mg/kg) 麻醉大鼠,从主动脉快速注入 250 mL 生理盐水,再注入 250 mL 4% 多聚甲醛,收集损伤部位脊髓组织,进行石蜡切片。切片分别加入 YAP 抗体、GAP43 抗体、GFAP 抗体、Caspase3 抗体、MAP2 抗体,放置 4℃ 冰箱过夜,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,加入 FITC 或 TRITC 标记荧光二抗,放置 4℃ 冰箱孵育 12 h,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,甘油封片,荧光显微镜下观察计数。

(3) Western Blot 检测

手术后第 14 天,各组取 5 只大鼠,收集损伤区上下各 0.5 cm 脊髓组织,加入裂解液匀浆,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液备用,采用聚丙烯酰胺凝胶不连续缓冲系统进行电泳,然后将蛋白转移到 PVDF 膜上,放置 50 g/L 脱脂奶粉 TBST 液封闭 2 h,漂洗 3 次,每次 5 min。分别滴加 YAP 抗体、GAP43 抗体、GFAP 抗体、Caspase3 抗体,放置 4℃ 冰箱过夜;甩掉抗体,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,滴加生物素化二抗,室温 20℃ 放置 2 h,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;滴加 ABC 试剂显色,观察结果,重复 3 次。测定目的蛋白的相对表达量 (相对表达量 = $A_{\text{目的蛋白}} / A_{\beta\text{-actin}} \times 100\%$)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较应采用 SNK 检测,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 运动功能评价

斜板实验与 BBB 运动功能评分结果显示,从术后第 7 天起,MST1/2 抑制剂组评分明显高于生理盐水组 ($P < 0.05$),一直持续到术后第 28 天,具有显著性差异 (图 1,图 2)。

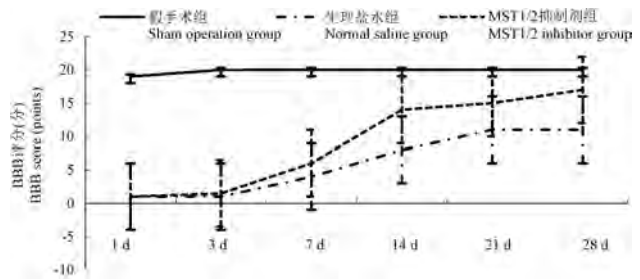


图 1 术后各组 BBB 评分结果比较

Figure 1 Comparison of experimental results of BBB test in each group after operation

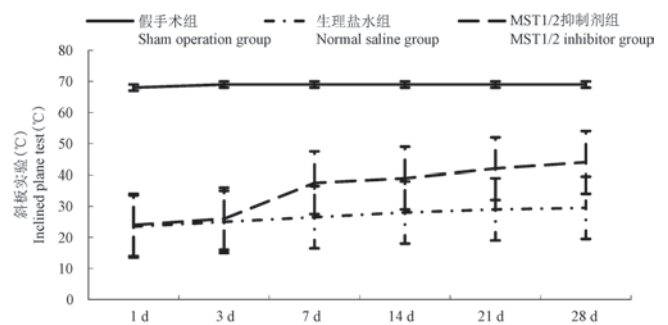


图 2 术后各组斜板实验结果比较

Figure 2 Comparison of experimental results of inclined plane test in each group after operation

2.2 损伤区荧光染色观察

荧光染色显示,MST1/2 抑制剂组较少炎症细胞浸润、形成神经组织结构框架,生理盐水组明显炎症细胞浸润、形成大量神经胶质瘢痕 (见图 3)。

2.3 免疫荧光染色观察

免疫荧光染色显示,假手术组 YAP 在神经细胞中出现表达,生理盐水组和 MST1/2 抑制剂组 YAP 在神经胶质细胞出现表达,且 MST1/2 抑制剂组 YAP 阳性细胞数量明显高于其他两组 ($P < 0.05$),见表 1;MST1/2 抑制剂组 GFAP 阳性细胞数量明显低于生理盐水组,且 MST1/2 抑制剂组成熟肥大的星形胶质细胞数量明显少于生理盐水组 ($P < 0.05$),见表 2;MST1/2 抑制剂组 GAP43 阳性细胞数量明显高于生理盐水组 ($P < 0.05$) (见图 4)。

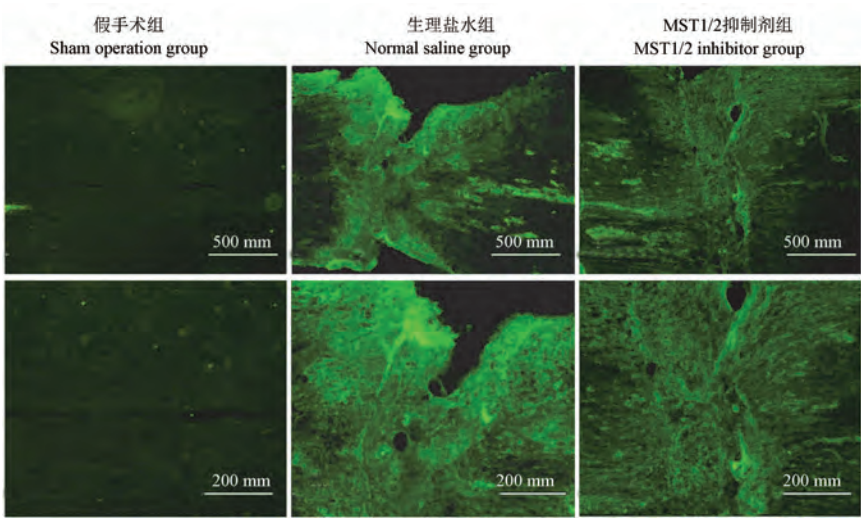


图 3 术后 14 d 各组脊髓组织 MAP2 免疫荧光染色观察

Figure 3 Immunofluorescence staining observation of each group after SCC at 14 days

表 1 各组术后各时间点免疫荧光染色检测 YAP 阳性细胞数量 (n = 35, 个)

Table 1 Number of YAP in 3 groups at each time point after SCC by immunofluorescence staining (n = 35, number)

分组 Groups	D1	D3	D7	D14	D21	D28
假手术组 Sham operation group	2.0 ± 0.5	2.0 ± 0.5	2.5 ± 0.5	2.5 ± 0.5	2.0 ± 0.5	2.0 ± 0.5
生理盐水组 Normal saline group	4.5 ± 0.5	5.5 ± 0.5	9.5 ± 0.5	15.5 ± 0.5	14.5 ± 0.5	14.0 ± 0.5
MST1/2 抑制剂组 MST1/2 inhibitor group	6.5 ± 0.5 [#]	10.0 ± 0.5 [#]	18.0 ± 0.5 [#]	30.0 ± 0.5 [#]	27.0 ± 0.5 [#]	28.5 ± 0.5 [#]

注:与生理盐水组比较, [#]P < 0.05。(下表同)

Note. Compared with the normal saline group, [#]P < 0.05. (The same in the following tables)

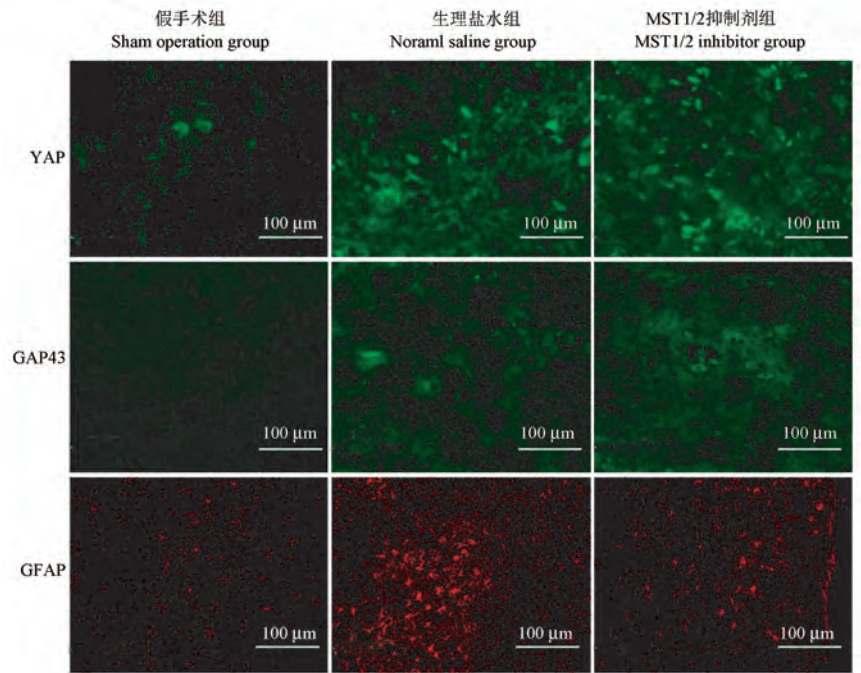


图 4 术后 14 d 各组 YAP、GAP43、GFAP 免疫荧光染色观察

Figure 4 Immunofluorescence staining observation YAP、GAP43、GFAP of each group after SCC at 14 d

表 2 各组术后各时间点免疫荧光染色检测 GFAP 阳性细胞数量($n=35$, 个)Table 2 Number of GFAP in 3 groups at each time point after SCC by immunofluorescence staining($n=35$, number)

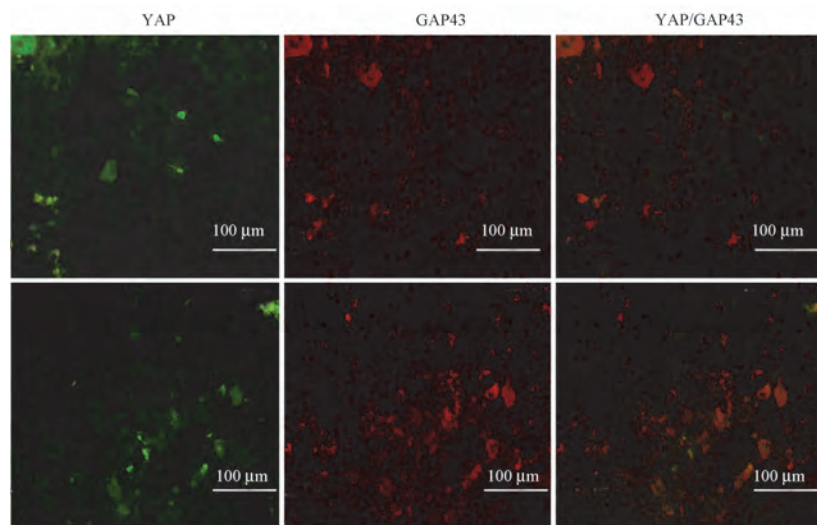
分组 Groups	D1	D3	D7	D14	D21	D28
假手术组 Sham operation group	5.0 ± 0.5	6.5 ± 0.5	6.0 ± 0.5	5.0 ± 0.5	4.5 ± 0.5	5.0 ± 0.5
生理盐水组 Normal saline group	20.5 ± 0.5	36.5 ± 0.5	45.5 ± 0.5	58.0 ± 0.5	53.0 ± 0.5	54.0 ± 0.5
MST1/2 抑制剂组 MST1/2 inhibitor group	15.0 ± 0.5	$20.0 \pm 0.5^{\#}$	$25.0 \pm 0.5^{\#}$	$32.0 \pm 0.5^{\#}$	$29.5 \pm 0.5^{\#}$	$27.5 \pm 0.5^{\#}$

2.4 免疫荧光双标观察

脊髓损伤后 14 d, YAP 与 GFAP 在星形胶质细胞共同表达, YAP 与 GAP43 未共表达(见图 5)。

2.5 Western Blot 检测

免疫印记结果显示, 术后第 14 天 MST1/2 抑制剂组的 YAP、GAP43 表达明显高于生理盐水组($P < 0.05$), 术后第 14 天 GFAP、Caspase3 表达明显低于生理盐水组($P < 0.05$)(见图 6)。



注: YAP; 细胞质内呈绿色; GAP43、GFAP; 细胞质内呈红色。

图 5 术后 14 d 免疫荧光双标染色观察

Note. YAP. Green in cytoplasm. GAP43, GFAP. Red in cytoplasm.

Figure 5 Immunofluorescence double staining observation of each group after SCC at 14 days

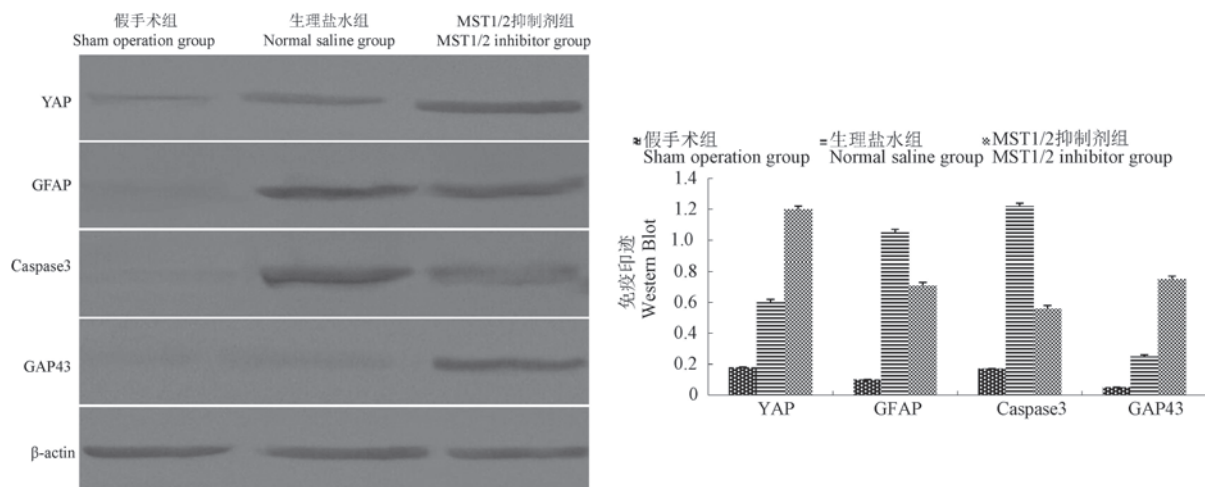


图 6 Western Blot 检测术后 14 d 各组 YAP、GAP43、GFAP、Caspase3 蛋白表达

Figure 6 YAP, GAP43, GFAP, Caspase3 expression by Western Blot in each group at 14 d

3 讨论

脊髓损伤会引起损伤段以下感觉、运动和括约肌功能丧失,使患者出现截瘫、尿便功能障碍等症状,是致残率极高的中枢神经系统创伤,但目前尚无有效治疗脊髓损伤的方法。神经系统损伤受损后,星形胶质细胞会处于一种“激活”的状态,其形态、数量及生物学功能发生改变,由良性“静息星形胶质细胞”转变为“反应性星形胶质细胞”,但是反应性星形胶质细胞是善或恶曾经一直没有被确定。2012 年, Liddelow 等^[7]发现两种不同类型的反应性星形胶质细胞 A1 和 A2,炎症如细菌脂多糖能诱导星形胶质细胞变成有害的一型细胞 A1,而缺氧则可以诱导出二型 A2。在神经损伤早中期,星形胶质细胞主要是 A2 型,可以在缺血组织附近产生支持神经元生长的营养物质,构筑原始神经组织结构框架,引导神经细胞突起再生修复,清除组织碎片和坏死细胞^[8],防止微生物感染的传播和炎症反应,它们还刺激血管重塑^[9],以增强对神经组织的营养和代谢支持。在神经损伤晚期,星形胶质细胞进入完全成熟的 A1 状态,分泌大量蛋白聚糖、一氧化氮等有害因子,胶质细胞过度增生肥大形成化学性胶质屏障,影响神经突起再生、延长和融合^[10-11]。

Hippo 信号通路由上游调控因子、丝氨酸/苏氨酸激酶核心组分和下游效应分子三部分组成,其中 MST1/2、Lats1/2 激酶及其下游的 YAP/TAZ 转录激活因子是该通路的核心成分,主要负责调控细胞生长分化、胞间信息传递、细胞骨架形成、细胞凋亡及激素分泌等过程,是维持器官组织形态结构和功能的重要调控机制^[12]。正常机体内 Hippo 通路主要通过抑制 YAP 转录活性来调控细胞增殖分化与细胞凋亡,具体机制是通过 MST 和 LATS 一系列激酶的磷酸化反应,使 YAP/TAZ 转录激活因子与细胞质 14-3-3 蛋白结合从而失去活性,泛素化降解磷酸化 YAP,同时伴随着细胞分化凋亡^[13-14]。

我们的结果显示,在正常脊髓中 YAP 主要出现在神经细胞胞浆中,在脊髓损伤后 YAP 在神经胶质细胞主要出现在胞浆和细胞核中;脊髓损伤后采用 MST1/2 激酶抑制剂,发现术后第 14 天 YAP 表达水平明显高于生理盐水组,而此时 Caspase3、GFAP 表达水平明显低于生理盐水组,且同时在术后第 14 天还发现神经细胞 GAP43 出现表达。我们分析这是由于 XMU-MP-1 通过抑制 Hippo 通路 MST1/2 激

酶,YAP 无法通过磷酸化被降解,大量 YAP 与 TAZ 结合从细胞质转入细胞核,通过与 tead1-4 转录因子相互作用,上调 miR-29a 调控 PTEN 蛋白,激活 PI3K 信号通路,促进神经生长蛋白 GAP43 大量表达^[15-16],此外通过 YAP 转录辅因子激活髓鞘鞘末端的极性蛋白 Crb3,促进髓鞘髓磷脂和非髓磷脂基因的转录,有利于髓鞘节间长度和厚度的发育^[17],从而促使神经细胞突起和髓鞘生长发育;脊髓损伤后采用 MST1/2 激酶抑制剂,可以导致 SOD1 活性降低,减少了丝裂原活化蛋白激酶 P38 和 Caspase3 的表达,抑制凋亡基因表达减少神经细胞凋亡^[18-19]。Baia 等^[20]研究发现大量活化 YAP 分子不仅可以促进神经细胞增殖,而且抑制神经细胞凋亡,诱导脑膜细胞表型的转换,有利于神经细胞增殖分化发生,这也证实了 YAP 对神经细胞的保护作用。我们的结果显示,在脊髓损伤后,当 YAP 分子在细胞核中表达时,说明星形胶质细胞处于幼稚活化状态;脊髓损伤后采用 MST1/2 激酶抑制剂,发现术后第 14 天 GFAP 表达水平明显低于生理盐水组。我们分析这是由于细胞核内 YAP/TAZ 可与 Smad1/5/8 结合,通过稳定 Smad1 信号,促进星形胶质细胞分化发育为 A2 型,构筑原始神经组织结构框架,引导神经细胞突起再生修复,延缓 A1 型星形胶质细胞肥大成熟,减少神经胶质酸性蛋白表达^[21-22],抑制胶质细胞之间相互重叠和致密的胶质瘢痕形成,抑制小胶质细胞活化,减少神经凋亡因子表达,重建神经系统血脑屏障、减轻神经组织炎症损伤,促使神经生长因子表达,改善脊髓损伤区域的内环境。Huang 等^[23]研究发现小鼠大脑敲除 YAP 后 p-Smad1/5/8 不稳定,易被泛素化降解,导致 BMP2/Smad1 信号不稳定,从而引起星形胶质细胞分化减少,Qu 等^[24]研究发现在蛛网膜下腔出血后通过敲除 MST1 基因抑制基质金属蛋白酶 9 和核因子 NF- κ B 激活,减少小胶质细胞的活化,减轻神经功能障碍、重建血脑屏障,这些研究进一步证实了推论。

综上所述,脊髓损伤后大剂量应用 MST1/2 抑制剂能明显促进 YAP 表达,减轻炎症损伤反应,抑制神经细胞凋亡,改善脊髓损伤区微环境,促进星形胶质细胞形成原始神经组织结构框架,有利于神经突起再生修复,促进运动功能恢复。

参 考 文 献(References)

- [1] 董锐. Yes 相关蛋白 1 在膀胱癌发展中的作用及其机制研究[D]. 武汉: 武汉大学; 2018.
Dong R. The study of role and mechanism of Yes-associated

- protein 1 in the development of bladder cancer [D]. Wuhan; Wuhan University; 2018.
- [2] 齐海霞, 柴艳芬. Hippo 信号通路相关分子与肿瘤发生的研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(4): 683-689.
- Qi HX, Chai YF. Advances in study of hippo signaling pathway related molecules and tumor genesis [J]. Med Recapitul, 2020, 26(4): 683-689.
- [3] 魏延虎, 任淑婷, 张可妍, 等. 番茄红素通过上调 Beclin1-Atg 5 通路激活自噬发挥对脊髓损伤大鼠的神经保护作用 [J]. 延安大学学报(医学科学版), 2022, 20(2): 22-25.
- Wei YH, Ren ST, Zhang KY, et al. Neuroprotective effect of lycopene on spinal cord injury rats by upregulating Beclin1-Atg 5 pathway to activate autophagy [J]. J Yan'an Univ Med (Sci Ed), 2022, 20(2): 22-25.
- [4] 李沁轩, 王一枝, 徐艳, 等. 地塞米松联合雌激素干预脊髓钝挫伤大鼠白细胞素 6、Caspase3 和 Bcl-2 的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(17): 2680-2685.
- Li QX, Wang YZ, Xu Y, et al. Effects of dexamethasone combined with estrogen on the expression of interleukin-6, Caspase3 and Bcl-2 after spinal cord contusion in rats [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2020, 24(17): 2680-2685.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.
- [6] 黄帅杰. 督脉电针联合跑台训练对脊髓损伤大鼠功能恢复的研究 [D]. 昆明: 云南师范大学; 2020.
- Huang SJ. Investigation on the functional recovery of spinal cord injury in rats by du meridian electroacupuncture combined with treadmill training [D]. Kunming; Yunnan Normal University; 2020.
- [7] Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia [J]. Nature, 2017, 541(7638): 481-487.
- [8] 党睿. Neuroligin-3 在星形胶质细胞中的功能研究 [D]. 南京: 东南大学; 2019.
- Dang R. The function of neuroligin-3 in astrocytes [D]. Nanjing; Southeast University; 2019.
- [9] 刘沫. 血清结合珠蛋白、神经元特异性烯醇化酶与急性脑梗死神经元损伤和预后的相关性研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学; 2018.
- Liu M. The correlation between serum haptoglobin, neuron-specific enolase and the neuron injury and prognosis of acute cerebral infarction [D]. Changsha; Hunan Normal University; 2018.
- [10] 周静. ApoE 在小鼠脊髓损伤修复过程中的表达变化及其对星形胶质细胞的作用研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学; 2017.
- Zhou J. Dynamic change about apolipoprotein E synthetic and the mechanism of ApoE on astrocytes after spinal cord injury [D]. Kunming; Kunming Medical University; 2017.
- [11] 李剑锋, 闫金玉, 夏润福, 等. 脊髓损伤胶质瘢痕形成及星形胶质细胞作用的研究与转化意义 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(37): 5609-5616.
- Li JF, Yan JY, Xia RF, et al. Glial scar formation and astrocyte role in spinal cord injury [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2016, 20(37): 5609-5616.
- [12] 廖光红. H3K4 甲基化酶 SET1A 甲基化修饰 YAP 的机制和生物学功能的研究 [D]. 上海: 华东师范大学; 2016.
- Liao GH. The function and mechanism of H3K4 methylase SET1A upregulate YAP [D]. Shanghai; East China Normal University; 2016.
- [13] 方昌. VGLL-4 在口腔鳞状细胞癌中的表达及与预后意义 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学; 2019.
- Fang C. Prognostic implication and significance of VGLL4 expression in OSCC [D]. Urumqi; Xinjiang Medical University; 2019.
- [14] 牛庆慧. HIPPO-YAP 通路及 miRNA-186 在胰腺癌中的表达及意义 [D]. 青岛: 青岛大学; 2017.
- Niu QH. Expression and significance of HIPPO-YAP pathway and miRNA-186 in pancreatic cancer [D]. Qingdao; Qingdao University; 2017.
- [15] Gong P, Zhang Z, Zou C, et al. Hippo/YAP signaling pathway mitigates blood-brain barrier disruption after cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Behav Brain Res, 2019, 356: 8-17.
- [16] 余常麟. Yes 相关蛋白对小鼠来源神经瘤母细胞神经轴突生长调控的研究 [D]. 苏州: 苏州大学; 2016.
- Yu CL. Research on YAP regulating the neurite axon of N2a cells [D]. Suzhou; Soochow University; 2016.
- [17] Fernando RN, Cotter L, Perrin-Tricaud C, et al. Optimal myelin elongation relies on YAP activation by axonal growth and inhibition by Crb3/Hippo pathway [J]. Nat Commun, 2016, 7: 12186.
- [18] Lee JK, Shin JH, Hwang SG, et al. MST1 functions as a key modulator of neurodegeneration in a mouse model of ALS [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(29): 12066-12071.
- [19] 叶丽虹, 张伟英, 靳天志, 等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白在肿瘤发生发展中的作用 [J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(9): 1086-1099.
- Ye LH, Zhang WY, Jin TZ, et al. Roles of hepatitis B X-interacting protein in tumor development [J]. Sci Sin Vitae, 2019, 49(9): 1086-1099.
- [20] Baia GS, Caballero OL, Riggins GJ. The Hippo signaling pathway and translational opportunities for brain cancers [J]. CNS Oncol, 2012, 1(2): 113-115.
- [21] 包笑妹, 何晴, 王莹, 等. Hippo/YAP 信号通路在神经系统中的作用及机制研究进展 [J]. 遗传, 2017, 39(7): 630-641.
- Bao XM, He Q, Wang Y, et al. The roles and mechanisms of the Hippo/YAP signaling pathway in the nervous system [J]. Hereditas, 2017, 39(7): 630-641.
- [22] Zeng Q, Hong W. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals [J]. Cancer Cell, 2008, 13(3): 188-192.
- [23] Huang Z, Sun D, Hu JX, et al. Neogenin promotes BMP2 activation of YAP and Smad1 and enhances astrocytic differentiation in developing mouse neocortex [J]. J Neurosci, 2016, 36(21): 5833-5849.
- [24] Qu J, Zhao H, Li Q, et al. MST1 suppression reduces early brain injury by inhibiting the NF- κ B/MMP-9 pathway after subarachnoid hemorrhage in mice [J]. Behav Neurol, 2018, 2018: 6470957.

孙伟铭,刘观秀,董香丽,等. 双光子钙成像技术在非人灵长类动物大脑皮层神经元功能的研究现状[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 949-954.

Sun WM, Liu GX, Dong XL, et al. Research status of two-photon calcium imaging of cortical neuronal functions in non-human primates [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 949-954.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.010

双光子钙成像技术在非人灵长类动物大脑皮层 神经元功能的研究现状

孙伟铭^{1,2,3,4}, 刘观秀^{3,4}, 董香丽⁵, 冯珍^{3,4}, 马朝林^{1,2*}

(1. 南昌大学生命科学学院, 南昌 330031; 2. 南昌大学生命科学研究院, 南昌 330031; 3. 南昌大学第一附属医院康复医学科, 南昌 330006; 4. 南昌大学第一临床医学院, 南昌 330031; 5. 南昌大学第二附属医院心身医学科, 南昌 330006)

【摘要】 钙离子是生物体神经系统中重要的信使,可产生多种细胞信号,对神经元兴奋性的调控起着关键作用;钙离子在明确的细胞亚区发挥着高度特异性功能。钙信号间接反映神经元的活性,检测神经元钙信号对研究大脑皮层功能尤为重要。双光子钙成像技术对检测大脑皮层中的钙信号有独特的优势,可在体以单细胞分辨率实时观测皮层神经元的活动。研究非人灵长类动物的大脑皮层对提高人类神经系统的高级认知、精神疾病的治疗及推动康复医学的发展有重大意义。本文综述了双光子钙成像技术在非人灵长类动物皮质功能研究中的应用。

【关键词】 双光子钙成像技术;非人灵长类动物;大脑皮层;神经生物学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 07-0949-06

Research status of two-photon calcium imaging of cortical neuronal functions in non-human primates

SUN Weiming^{1,2,3,4}, LIU Guanxiu^{3,4}, DONG Xiangli⁵, FENG Zhen^{3,4}, MA Chaolin^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China. 2. Institute of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031. 3. Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006. 4. the First Clinical School, Nanchang University, Nanchang 330031. 5. Department of Psychosomatic Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang University, Nanchang 330006)

Corresponding author: MA Chaolin. E-mail: chaolinma@ncu.edu.cn

【Abstract】 Calcium ions are important messengers in the nervous system, which produce various cellular signals and play an important role in the regulation of neuronal excitability. Calcium ions in the clear cell area perform highly specific functions. Calcium signals indirectly reflect the activity of neurons, calcium signal detection in neurons is especially important to study cerebral cortex functions. Two-photon calcium imaging in the cerebral cortex has a unique advantage by revealing real-time *in vivo* activity of cortical neurons at the single cell resolution. This article reviews the application of two-photon calcium imaging in the study of cortical functions in non-human primates.

【Keywords】 two-photon calcium imaging; nonhuman primates; cerebral cortex; neurobiology

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

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31760276, 31960171), 江西省自然科学基金项目(20171BAB204019, 20192ACB20022), 江西省研究生创新专项资金项目(YC2021-B021)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31760276, 31960171), Jiangxi Natural Science Foundation (20171BAB204019, 20192ACB20022), Jiangxi Provincial Graduate Student Innovation Special Fund Project (YC2021-B021).

【作者简介】 孙伟铭(1989—), 男, 博士, 讲师, 主管技师, 研究方向: 认知神经生物学与神经康复。Email: sunweiming@email.ncu.edu.cn

【通信作者】 马朝林(1967—), 男, 博士, 教授, 研究员, 研究方向: 认知神经生物学。Email: chaolinma@ncu.edu.cn

钙离子可以产生多种细胞信号,介导着多条信号通路的传导,对神经元的调控起着关键作用^[1]。当皮层神经元受到刺激时,胞内钙离子的浓度会发生变化,随即转化为细胞信号,引起细胞响应。钙信号间接反映神经元的活性,精确测量钙离子利于对神经元功能的研究。目前,检测钙信号比较常见的方法有双光子钙成像、光纤记录和深脑显微钙成像等技术^[2]。双光子钙成像起初是一项用于记录啮齿类动物体内神经活动的高分辨率技术,尤其在啮齿类动物视觉皮层的研究中发挥了重要的作用^[3-5]。近年来,研究人员克服了由非人灵长类动物大脑的大小、曲率、生理脉动和免疫系统防御作用等问题带来的挑战^[6],成功将双光子钙成像技术应用用于非人灵长类动物大脑皮层的研究。

非人灵长类动物的大脑皮层是生物体的高级中枢,具有多种高级功能^[7],是研究人类高级认知功能和神经康复机制的理想模型动物。在早期非人灵长类动物大脑皮层功能的研究中,常使用电生理技术来研究皮层神经元的活动。该技术存在着若干不足,如在长期记录神经元活动方面相对不稳定,电极的位置会随着时间改变导致多次记录的神经元不一致,影响信号记录^[8]。双光子钙成像技术可在较大程度上弥补电生理技术主要不足,使单个细胞反应特性可被准确检测。采用双光子钙成像技术检测各皮层神经元的钙信号,为探索神经元的功能提供帮助。本文就双光子钙成像技术在非人灵长类动物大脑皮层神经元功能的研究现状作一综述。

1 双光子钙成像技术概述

神经元钙成像技术的原理就是借助钙离子浓度与神经元活动之间的严格对应关系,利用特殊的荧光染料或者蛋白质荧光探针,将神经元当中的钙离子浓度通过荧光强度表现出来,从而达到检测神经元活动的目的^[9]。

双光子显微镜是结合了激光扫描共聚焦显微镜和双光子激发技术的一种新技术^[10]。双光子显微镜主要由激光发射器、光速扩展器、二向色镜、物镜、探测系统和数据采集系统组成^[11]。双光子激发的基本原理是^[10]:在高光子密度的情况下,荧光分子可以同时吸收 2 个长波长的光子,在经过一个很短的所谓激发态寿命的时间后,发射出一个波长较短的光子;其效果和使用一个波长为长波长一半的

光子去激发荧光分子是相同的。双光子激发需要很高的光子密度,为了不损伤细胞,双光子显微镜使用高能量锁模脉冲激光器。这种激光器发出的激光具有很高的峰值能量和很低的平均能量。在使用高数值孔径的物镜将脉冲激光的光子聚焦时,物镜的焦点处的光子密度是最高的,双光子激发只发生在物镜的焦点上,所以双光子显微镜不需要共聚焦针孔,提高了荧光检测效率。

双光子钙成像技术有许多优点,例如具有高分辨率的特性,可以在亚细胞水平上探索神经元;不仅可以观测到神经元和胶质细胞的活动,还可以观测到树突和轴突的功能结构和动态变化^[6];并且还可以在同一脑区对几百个神经元的活动进行监测^[12];还允许对清醒非人灵长类动物进行长时程观测^[13-14],在该模型动物大脑皮层研究中得到了广泛的应用。

2 非人灵长类动物脑功能研究的重要性

在康复医学临床实践中,中枢神经系统受损的患者大多会伴有认知功能障碍等高级脑功能受损表现。虽然,已有非侵入性神经调控、认知功能障碍训练等多种康复治疗技术手段可帮助患者改善认知功能,但具体神经元机制尚不明确。大脑皮层神经元编码机制的深入研究对康复治疗技术的优化至关重要。非人灵长类动物的脑结构和认知功能、感官系统等脑功能与人有高度的相似性^[15],利用非人灵长类动物的高级脑功能来解释认知功能的机制很有必要,这将推动康复医学的长足进步。

3 双光子钙成像技术在非人灵长类动物大脑皮层研究中的应用

3.1 在视觉皮层研究中的应用

3.1.1 视觉皮层的可塑性

突触的稳定性严重影响脑回路的功能,并可能是维持神经元功能特性的完整性所必需的。与此同时,在感知学习过程中观察到的皮层反应的改变或感觉输入的中断可能是由于需要突触可塑性的连接性的变化造成的。前人对成人大脑皮层突触稳定性的研究主要集中在树突上,但轴突的变化程度尚不清楚。为探究这个问题,Stettin 等^[16]重复对猕猴初级视觉皮层(V1)进行双光子成像,发现轴突大规模的分支模式是稳定的,但每周都有 1 个与末端扣相关的小分支(small branches),以及 1 个传递

扣的子集出现和消失。为适应经验改变,大脑的可塑性会延伸到初级感觉皮层区域,这在感觉丧失后的相应皮层改变中表现得最为显著。Marik 等^[17]使用双光子钙成像研究成年猕猴视网膜病变后病变投射区(lesion projection zone, LPZ)神经元的结构变化,发现位于病变投射区内的抑制性神经元的轴突经过修剪(pruning)和生长(growth)跨越了病变投射区的界限。证明病变投射区的抑制性神经元通过轴突结构的变化与周围区域产生的兴奋相平衡。这就引出了一个问题:视网膜病变后出现的轴突变化是否也可以解释知觉学习过程中发生的功能改变。而后,该团队为解决这个问题在猕猴知觉学习过程中对轴突进行双光子成像,发现在与视觉训练相关视皮层区域神经元的轴突树枝发生了发芽(sprouting)和修剪(pruning)^[18]。这表明轴突树枝结构的变化是知觉学习回路机制的组成的一部分,为学习到的信息至少部分编码在初级视觉皮层的观点提供了新的依据。

3.1.2 视觉皮层的功能性

(1) 颜色识别功能

从视网膜锥光感受器输入的信息包括形状和颜色,在初级视觉皮层转换为方向选择性和颜色选择性。对此,一般模型认为颜色和方向是由初级视觉皮层的不同神经元提取的。事实上,结果是相反的。Garg 等^[19]使用双光子钙成像探测了一个非常大的彩色视觉刺激空间,并以单细胞分辨率绘制了数千个神经元的功能微结构。发现相对于消色差刺激,V1 神经元更倾向于均匀颜色和定向选择,结果表明 V1 中单个神经元可以精确并明确地编码颜色和方向,方向和颜色是由重叠神经元环路相互处理的。该研究还发现在 V1 中,细胞更喜欢红色和蓝色,但未能识别斑点之间的颜色异质性。有研究通过电生理技术表明标准颜色通路从 V1 的 CO 斑点通过 V2(次级视觉皮层)的 CO 细条纹传递到 V4(第四视觉皮层)的颜色专一区域和后颞下皮层(PIT),然而解剖颜色模块中的色调映射是如何随着从 V1 到 V4 的分层处理而进化的尚不清楚。为研究此问题,Liu 等^[20]对清醒猕猴 V1、V2 和 V4 的钙信号进行了更高分辨率的双光子成像。发现与 V1 相比,V2 中的色素特异性细胞聚集增强。一种在 V1 中清晰的端谱(红蓝)响应现象,在 V2 中消退,而在 V4 中几乎不存在。这表明视觉皮层中对色差的处理是具有层次性的,由每个区域统一的点

状结构对颜色进行表征。与此类似,Chatterjee 等^[21]给予猕猴不同空间均匀的颜色刺激,同时使用双光子钙成像技术检测 V1 神经元的活动,发现对空间均匀的颜色刺激有反应的神经元形成了明确的簇,与斑点相一致。运用双光子成像清晰地展示了颜色表征的结构。非人灵长类动物的脑结构和认知功能、感官系统等脑功能与人有高度的相似性^[15],人类在色彩空间的 3 个维度上感知数百万种颜色:色相、亮度和色度。大脑皮层中这些特定的维度是如何代表的,以及它们之间是如何联系的尚不清楚。为研究这些问题,Li 等^[22]使用双光子钙成像对 V1 区神经元进行成像,发现色调和亮度在皮质图上呈正交方向排列,色度由神经元反应的强度表示。

(2) 选择性特征

视觉皮层的神经元不仅对颜色有选择性,还对一些特征,如定向、眼部优势和空间频率具有高度选择性。定向和空间频率调谐是 V1 神经元的显著特征。这些特殊的皮层空间调谐特性的组合组织将强烈地塑造 V1 群体对不同视觉输入的反应,但具体是如何组织的尚不清楚。Nauhaus 等^[23]利用双光子钙成像展示了猕猴 V1 的空间频率和方向调谐的 3D 细胞逐个细胞布局,并对其结构进行了更深的观察和研究,推断出方向和空间频率映射是密切相关的。然而,这个观点在最近的研究中受到反驳,Guan 等^[24]利用双光子钙成像以单细胞分辨率构建了 5 只清醒固定猕猴 V1 浅层的第一个空间频率图,并研究了空间频率神经元的调节特征和功能组织特性。发现空间频率有关神经元在 V1 猕猴中的聚集性太弱的结果,这无法支持 Nauhaus 的观点:空间频率和方向功能映射正交重叠。Nauhaus 等^[25]还通过双光子钙成像揭示了猕猴 V1 区空间频率和眼优势之间:空间频率和眼优势区域梯度平行,但各自具有独特的空间周期。Chen 等^[26]使用双光子钙成像揭示了首选空间频率的局部可变性与整体空间射频之间的联系:V1 的首选空间频率和感受场的大小差异很大,随着偏心度以尺度不变的方式增加。证明了表面 V1 中的体系结构可以用一个集成比例不变感受野的模型来描述,称之为集合比例不变。

猴 V1 中的大部分神经元都是根据刺激方向调整的。不同的 V1 神经元偏好不同的方向和调节强度。V1 神经元是如何通过定向调节强度来排列的,

以及神经元定向调节强度的排列是否与定向偏好图有关,目前仍存在争议。Ikezo^[27]通过双光子钙成像检测了单细胞水平上方向调节的局部空间组织。发现 V1 第 2 层和第 3 层附近的神经元在偏好方向和调谐强度方面都很相似。在邻近神经元间偏好取向不同的区域(如取向断裂),定向调节强度较弱,而在偏好取向相似的区域(即取向域),定向调节强度不同。后来发现 V2 中也存在方向选择性神经元,Hu^[28]通过猴 V2 区的双光子钙成像详细描述了猕猴方向选择神经元的反应特性。与之类似,Ju^[29]利用双光子钙成像研究了 5 只清醒猕猴 V1 浅层的方向功能神经元的微观结构(microstructures)和群体调节特性。

(3) 形状识别功能

形状提取是物体识别的关键,是灵长类视觉皮层的主要功能之一。许多视觉皮层的神经元能选择性地对复杂的形状特征做出反应,然而这些形状选择神经元的分布仍不清楚。叶芷^[15]利用双光子钙成像首次对 V1 区中发现了弧形视觉刺激有特异反应的弧形识别神经元。Guan^[30]用双光子钙成像记录了清醒猕猴对光栅和平台的 V1 反应,结果表明格子和光栅反应神经元是不同的亚群。Tang^[31]用双光子钙成像观察到 V4 的亚毫米功能域,其中包含的神经元更偏好曲线轮廓而不是直线轮廓。Jiang^[32]利用双光子钙成像以单细胞分辨率证实了曲线或角选择神经元在空间上聚集成功能域。

3.1.3 视觉皮层的结构特点

感觉信息处理的一个基本原则是,大脑必须通过减少处理相同信息的神经元的数量来优化效率。神经元群中感觉表征的稀疏性反映了神经编码的效率^[33]。Tang^[33]对非人灵长类动物呈现大量的自然视觉刺激,同时使用双光子钙成像来检查表层 V1 区大量神经元的反应。发现,有 0.5% 的神经元对任何给定的自然图像都有明显的反应,证明了 V1 区神经编码是超稀疏和高效的。Ikezo^[34]在向猕猴展示自然电影剪辑的同时利用双光子钙成像技术记录了来自 V1 区神经元的荧光信号。对于每个记录下来的神经元,构建了一个编码模型。进一步分析发现,V1 区附近神经元间兴奋性射频亚场(excitatory RF subfields)的范围和分布是共享的,而抑制性射频亚场(suppressive RF subfields)的范围和分布不同。证明他们的编码模型分析应用于神经

元对自然电影反应的双光子钙成像,提供了一种可靠和有效的方法来分析局部区域多个成像神经元的广泛感受野特性。

3.2 在其他大脑皮层研究中的应用

(1) 躯体感觉皮层:Sadakane^[35]使用双光子钙成像技术检测了躯体感觉皮层中树突和轴突对特定触觉刺激的选择性活动,证明了神经元对触觉刺激的反应可以在亚细胞分辨率成像。Santisakultarm^[36]使用双光子钙成像技术纵向显示了躯体感觉皮层表面以下 500 μm 的血管系统和神经元。对清醒和麻醉猕猴大脑血流动力学和神经活动进行了研究。丁冉^[37]利用双光子钙成像技术记录猕猴躯体感觉皮层神经元树突树突棘钙信号特点。

(2) 运动皮层:行为动物的双光子钙成像技术揭示了在单细胞分辨率下与行为和认知功能相关的神经元活动。Ebina^[38]训练头部固定的普通猕猴执行上肢运动任务和同时对运动皮层 2/3 层神经元进行双光子钙成像,并在细胞和亚细胞分辨率下检测多个神经元的任务相关活动。Trautmann^[39]通过双光子钙成像技术对恒河猴的顶端树突成像,实现了对通过背侧前运动区和脑回初级运动皮质的大量深层和浅表皮层神经元的神经元环路。

(3) 听觉皮层:Zeng^[40]利用体内双光子钙成像来检测麻醉猕猴的初级听觉皮层(A1)神经元种群的张力偏好,发现猕猴 A1 神经元在宏观和微观水平上都以张力位的方式分布。在初级听觉皮层中存在特定物种的局部张力位组织,这种组织可能对灵长类动物大脑的听觉回路的组织很重要。

(4) 前额叶皮层:Xie^[41]利用双光子钙成像技术记录猕猴在执行序列记忆过程中,前额叶皮层数千个神经元的活动。发现序列记忆维持期间的神经活动状态空间,由相互正交的顺序子空间(rank subspace)构成,每个事件(item)存储在对应的顺序子空间中,各顺序子空间采用分布式群体编码。该研究揭示了大脑神经元群存储序列记忆的简单编码规则。

4 总结与展望

近年来,双光子钙成像技术在研究神经元的功能方面变得越来越重要。随着新钙指示剂的发现和植入式人工硬膜窗设计的成功^[42],双光子钙成像技术在非人灵长类动物大脑皮层功能结构研究中

起到了巨大的推动作用。尽管该技术得到了广泛的应用,但仍存在一些局限性。例如:该技术目前仅能观测到皮层表层,想要观测更深的皮层还比较难;另外使用该技术时,受双光子显微镜体积的影响,清醒非人灵长类的活动会受到限制,这使行为认知活动与神经元活动之间联系的研究受到了很大的限制。该技术下一步发展可能会与梯度折射率透镜折射系统 (GRIN) 结合来达到观测更深的皮层的目的;也有望利用微型的双光子显微镜对清醒非人灵长类动物成像,扩大动物的活动范围。将来该技术不仅可以在上述提到的皮层中应用,还可以用于研究更多的脑区,如顶叶和颞叶;或可以做到同时观测多个脑区。除此之外,还可以应用于研究自闭症等神经精神类障碍模式动物。总之,双光子钙成像技术在神经生物学和神经康复领域中是一个很有应用前景的技术,它将推动神经系统研究的快速发展。

参 考 文 献 (References)

- [1] Grienberger C, Konnerth A. Imaging calcium in neurons [J]. *Neuron*, 2012, 73(5): 862–885.
- [2] 李谦, 毕爱玲, 王兴荣, 等. 模型动物神经元钙信号检测技术研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(1): 104–109.
Li Q, Bi AL, Wang XR, et al. Research and development of *in vivo* detection technology for calcium signals in model animal neurons [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(1): 104–109.
- [3] 王聪, 马腾飞, 张晨, 等. 双光子显微镜用于在体监测小鼠视交叉上核 Ca^{2+} 动态变化的方法学研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(11): 1583–1587.
Wang C, Ma TF, Zhang C, et al. Methodological study in the dynamic changes of Ca^{2+} signals of suprachiasmatic nucleus *in vivo* with two-photon microscopy [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2017, 52(11): 1583–1587.
- [4] 李谦, 毕爱玲, 刘德政, 等. 双光子钙成像技术在模型动物视皮层 II/III 层神经元功能研究中的应用 [J]. *国际眼科杂志*, 2020, 20(9): 1529–1532.
Li Q, Bi AL, Liu DZ, et al. Roles of two-photon calcium imaging technology for visual cortex II/III layer neurons in model animals [J]. *Int Eye Sci*, 2020, 20(9): 1529–1532.
- [5] 张文豪, 李建军, 杨德刚, 等. 双光子显微镜在小动物活体光学成像中的研究进展 [J]. *中国康复理论与实践*, 2017, 23(1): 37–41.
Zhang WH, Li JJ, Yang DG, et al. Research progress of two-photon microscopy in small animals *in vivo* imaging (review) [J]. *Chin J Rehabil Theory Pract*, 2017, 23(1): 37–41.
- [6] Choi J, Goncharov V, Kleinbart J, et al. Monkey-MIMMS: towards automated cellular resolution large-scale two-photon microscopy in the awake macaque monkey [J]. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2018, 2018: 3013–3016.
- [7] 黄志伟. 非人灵长类动物模型的开发与应用 [A]. 2019 年生殖毒理学理论及科技产品研发学术交流大会暨 2019 年中国实验灵长类养殖开发协会第五届二次全体会员大会论文集 [C]; 2019.
Huang ZW. The development and application of non-human primate models [A]. 2019 reproductive toxicology pharmacology theory and technology and scientific product R&D academic exchange conference and 2019 china experimental primate breeding and development association fifth second general assembly proceedings [C]; 2019.
- [8] Stringer C, Pachitariu M, Steinmetz NA, et al. Inhibitory control of correlated intrinsic variability in cortical networks [J]. *eLife*, 2016, 5: e19695.
- [9] 史娟, 李继硕. 细胞内钙成像和钙测定的基本原理及应用 [J]. *神经解剖学杂志*, 2006, 22(4): 455–462.
Shi J, Li JS. Basic principle and application of intracellular calcium imaging and calcium determination [J]. *Chin J Neuroanat*, 2006, 22(4): 455–462.
- [10] 李培. 基于共聚焦原理的双焦面双光子荧光显微成像系统研究 [D]. 武汉: 华中科技大学; 2018.
Li P. Study on two-photon fluorescence microscopic imaging system with dual focal plane based on confocal principle [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology; 2018.
- [11] Birkner A, Konnerth A. Deep two-photon imaging *in vivo* with a red-shifted calcium indicator [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1929: 15–26.
- [12] Heider B, Nathanson JL, Isacoff EY, et al. Two-photon imaging of calcium in virally transfected striate cortical neurons of behaving monkey [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13829.
- [13] Ju N, Jiang R, Macknik SL, et al. Long-term all-optical interrogation of cortical neurons in awake-behaving nonhuman primates [J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(8): e2005839.
- [14] Li M, Liu F, Jiang H, et al. Long-term two-photon imaging in awake macaque monkey [J]. *Neuron*, 2017, 93(5): 1049–1057.
- [15] 叶芷. 猕猴初级视觉皮层中弧形识别神经元的发现与研究 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2017.
Ye Z. Discovery and research of arc recognition neurons in primary visual cortex of *Macaca mulatta* [D]. Beijing: Peking Union Medical College; 2017.
- [16] Stettler DD, Yamahachi H, Li W, et al. Axons and synaptic boutons are highly dynamic in adult visual cortex [J]. *Neuron*, 2006, 49(6): 877–887.
- [17] Marik SA, Yamahachi H, Meyer zum Alten Borgloh S, et al. Large-scale axonal reorganization of inhibitory neurons following retinal lesions [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(5): 1625–1632.
- [18] van Kerkoerle T, Marik SA, Meyer zum Alten Borgloh S, et al. Axonal plasticity associated with perceptual learning in adult macaque primary visual cortex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(41): 10464–10469.
- [19] Garg AK, Li P, Rashid MS, et al. Color and orientation are

- jointly coded and spatially organized in primate primary visual cortex [J]. *Science*, 2019, 364(6447): 1275–1279.
- [20] Liu Y, Li M, Zhang X, et al. Hierarchical representation for chromatic processing across macaque V1, V2 and V4 [J]. *Neuron*, 2020, 108(3): 538–550.
- [21] Chatterjee S, Ohki K, Reid RC. Chromatic micromaps in primary visual cortex [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2315.
- [22] Li M, Ju N, Jiang R, et al. Perceptual hue, lightness, and chroma are represented in a multidimensional functional anatomical map in macaque V1 [J]. *Prog Neurobiol*, 2022, 212: 102251.
- [23] Nauhaus I, Nielsen KJ, Disney AA, et al. Orthogonal micro-organization of orientation and spatial frequency in primate primary visual cortex [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(12): 1683–1690.
- [24] Guan SC, Ju NS, Tao L, et al. Functional organization of spatial frequency tuning in macaque V1 revealed with two-photon calcium imaging [J]. *Prog Neurobiol*, 2021, 205: 102120.
- [25] Nauhaus I, Nielsen KJ, Callaway EM. Efficient receptive field tiling in primate V1 [J]. *Neuron*, 2016, 91(4): 893–904.
- [26] Chen Y, Ko H, Zemelman BV, et al. Uniform spatial pooling explains topographic organization and deviation from receptive-field scale invariance in primate V1 [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6390.
- [27] Ikezoe K, Mori Y, Kitamura K, et al. Relationship between the local structure of orientation map and the strength of orientation tuning of neurons in monkey V1: a2-photon calcium imaging study [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(42): 16818–16827.
- [28] Hu J, Ma H, Zhu S, et al. Visual motion processing in macaque V2 [J]. *Cell Rep*, 2018, 25(1): 157–167.
- [29] Ju NS, Guan SC, Tao L, et al. Orientation tuning and end-stopping in macaque V1 studied with two-photon calcium imaging [J]. *Cereb Cortex*, 2021, 31(4): 2085–2097.
- [30] Guan SC, Zhang SH, Zhang YC, et al. Plaid detectors in macaque V1 revealed by two-photon calcium imaging [J]. *Curr Biol*, 2020, 30(5): 934–940.
- [31] Tang R, Song Q, Li Y, et al. Curvature-processing domains in primate V4 [J]. *eLife*, 2020, 9: e57502.
- [32] Jiang R, Andolina IM, Li M, et al. Clustered functional domains for curves and corners in cortical area V4 [J]. *eLife*, 2021, 10: e63798.
- [33] Tang S, Zhang Y, Li Z, et al. Large-scale two-photon imaging revealed super-sparse population codes in the V1 superficial layer of awake monkeys [J]. *eLife*, 2018, 7: e33370.
- [34] Ikezoe K, Amano M, Nishimoto S, et al. Mapping stimulus feature selectivity in macaque V1 by two-photon Ca^{2+} imaging: Encoding-model analysis of fluorescence responses to natural movies [J]. *NeuroImage*, 2018, 180: 312–323.
- [35] Sadakane O, Masamizu Y, Watakabe A, et al. Long-term two-photon calcium imaging of neuronal populations with subcellular resolution in adult non-human primates [J]. *Cell Rep*, 2015, 13(9): 1989–1999.
- [36] Santisakultarn TP, Kersbergen CJ, Bandy DK, et al. Two-photon imaging of cerebral hemodynamics and neural activity in awake and anesthetized marmosets [J]. *J Neurosci Methods*, 2016, 271: 55–64.
- [37] 丁冉. 快速 GABA 干预在细胞、亚细胞及受体水平抑制活体动物癫痫发作的机制研究 [D]. 天津: 天津医科大学; 2018.
- Ding R. The mechanism of rapid GABA intervention in inhibiting seizures in cellular, subcellular and receptor levels in living animals [D]. Tianjin: Tianjin Medical University; 2018.
- [38] Ebina T, Masamizu Y, Tanaka YR, et al. Two-photon imaging of neuronal activity in motor cortex of marmosets during upper-limb movement tasks [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1879.
- [39] Trautmann EM, O'shea DJ, Sun X, et al. Dendritic calcium signals in *Rhesus macaque* motor cortex drive an optical brain-computer interface [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3689.
- [40] Zeng HH, Huang JF, Chen M, et al. Local homogeneity of tonotopic organization in the primary auditory cortex of marmosets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(8): 3239–3244.
- [41] Xie Y, Hu P, Li J, et al. Geometry of sequence working memory in macaque prefrontal cortex [J]. *Science*, 2022, 375(6581): 632–639.
- [42] Trautmann E, O'Shea DJ, Shrestha S, et al. Design of an implantable artificial dural window for chronic two-photon optical imaging in non-human primates [J]. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2015, 2015: 7554–7557.

[收稿日期] 2022-03-02

张佳莉,张岩. 急性肾损伤动物模型构建方法与研究现状 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 955-965.

Zhang JL, Zhang Y. Research approaches and status of animal models for acute kidney injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 955-965.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.011

急性肾损伤动物模型构建方法与研究现状

张佳莉,张岩*

(上海中医药大学附属龙华医院,上海 200032)

【摘要】 急性肾损伤(AKI)是临床中的常见疾病,其发生率逐年增加的同时也伴随着较高的死亡率,因而,建立可靠、稳定、重复性高的 AKI 动物模型是深入研究该类疾病的基础与关键。AKI 的造模方式根据实验目的不同而具有多样性。本文将主要从药物诱导、单侧输尿管结扎术、缺血再灌注、5/6 肾切除术及感染诱导等五种造模方式,分类讨论和总结各种 AKI 动物模型的构建方法与研究现状,并从病理机制探讨相应诱导方式的优缺点及其对应的临床 AKI 类型,为 AKI 动物模型的标准化管理奠定基础,同时,为肾疾病的体内研究提供理论依据与实验基础。

【关键词】 急性肾损伤;动物模型;肾血流量;肾纤维化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 07-0955-11

Research approaches and status of animal models for acute kidney injury

ZHANG Jiali, ZHANG Yan*

(Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Corresponding author: ZHANG Yan. E-mail:medicineyan@aliyun.com

【Abstract】 Acute kidney injury (AKI) is a common disease in clinical practice, and its incidence is increasing yearly along with a high mortality rate. Therefore, establishment of reliable, stable and reproducible AKI models is the basis to study kidney diseases. AKI modeling method are diverse in accordance with different experimental purposes. In this review, we describe the approaches to establish AKI models, namely drugs, unilateral ureteral obstruction, ischemia-reperfusion, 5/6 nephrectomy, and infection. The purpose of this review is to discuss and summarize the current status and method to establish various AKI models, and to discuss the advantages and disadvantages of the induction method and their corresponding clinical signs in terms of their pathological mechanisms. This review provides a foundation for standardization of AKI animal models and the theoretical principles and experimental basis for *in vivo* studies of kidney diseases.

【Keywords】 acute kidney injury; animal model; renal blood flow; renal fibrosis

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

以高死亡率及高发病率为主要特征的急性肾损伤(acute kidney injury, AKI),也可被称作急性肾功能衰竭。作为近年来发病率逐渐攀升的一组临

床综合征,AKI 已经成为一种常见的全球公共卫生问题^[1]。AKI 不仅增加住院患者病死率、延长住院时间、增加医疗花费以及心血管事件发生风险,尚

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82074468),上海市科技创新行动计划(21400760400),上海市优秀学术带头人计划(19XD1423800),上海市医院中药制剂产业转化协同创新中心。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82074468), Scientific and Innovative Action Plan from Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (21400760400), Program of Shanghai Academic Research Leader (19XD1423800), Shanghai Collaborative Innovation Center of Industrial Transformation of Hospital TCM Preparation.

【作者简介】 张佳莉(1995—),女,博士研究生,研究方向:中药药理学。Email:Zhangjiali168323@163.com

【通信作者】 张岩,研究员,博士生导师,研究方向:药理学。Email:medicineyan@aliyun.com

可增加远期慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 和终末期肾病 (end-stage renal disease, ESRD) 的患病风险^[2]。作为一种常见的难治性疾病, AKI 在全球范围仍旧缺乏有效的治疗措施及药物, 并且, AKI 进展至 CKD 是多种细胞参与和多种分子信号通路调控的复杂致病过程, 研究 AKI 进展至 CKD 的机制有利于发现潜在的靶点并进行早期的治疗和干预, 延缓 AKI 向 CKD 的发展进程, 减轻 CKD 患者的疾病负担^[2-3]。因而, 稳定的 AKI 动物模型的建立能够帮助科学家们进一步探究其病理机制及治疗方法。本文将从 AKI 的多种动物模型的建立及评价方法入手, 系统地分析归纳肾损伤常用的实验动物模型, 旨在为研究相关肾疾病机理及药物的研发提供模型选择的科学理论及实验依据。

1 药物诱导的肾损伤模型

1.1 造影剂

AKI 是临床过程中应用造影剂后引起的常见并发症, 造影剂肾损伤已经成为 AKI 损伤的第三大原因^[4]。由于造影剂在冠心病等心脏疾病的应用中越来越广泛, 因而肾病学, 心脏病学甚至影像学及药学专家等对造影剂引起的 AKI 等肾并发症愈发重视起来。

在 2019 年的一项实验中, Lamby 等^[5]反复多次给猪注射造影剂后发现猪的肾血流动力学的改变, 并引起了随后的肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 的下降及肾的缺血缺氧的表现。除了对肾血流动力学方面的间接影响外, Zhao 等^[6]发现连续 7 d 尾静脉注射造影剂导致雄性 SD 大鼠肾小管空泡状, 肾细胞线粒体破裂损伤, 而线粒体功能的障碍使得 SD 大鼠肾活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 分泌增加和线粒体 mtDNA 分泌增多, 细胞凋亡加剧, 引发大鼠肾严重的氧化应激反应, 进而导致大鼠 AKI 的发生, 这是造影剂引起实验动物引起肾损伤的又一间接因素。对肾小管上皮细胞的毒性损伤是造影剂引起 AKI 的直接肾损伤机制, 有研究者认为, 所有的造影剂均会对肾, 尤其是肾髓质处造成损害, 造影剂通过破坏肾小管上皮细胞的细胞膜, 增加胞内 Ca^{2+} 水平, 抑制三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 释放并下调 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 诱导肾小管上皮细胞的凋亡及坏死, 造成肾小管的堵塞引起 AKI^[7]。

1.2 顺铂

顺铂 (cisplatin, CP) 是临床常用的一种顺式金属铂类络合物。CP 作为广谱抗癌代表药, 在单次中、大剂量用药后会出现轻微但可逆的肾功能障碍, 但在多次反复及高剂量用药后, 会出现不可逆的肾损伤^[8]。临床研究发现, 使用 CP 治疗癌症的患者虽在短期不会发生严重的肾损伤, 但是患者罹患 CKD 的长期风险大大增加, 而即使在临床中未发生 AKI 事件, 那些应用 CP 超过五年的患者, 其肾功能也会显著降低^[9]。

研究者们利用 CP 肾毒性的性质, 主要通过短期大剂量 (20~30 mg/kg, 3~7 d) 或长期低剂量 (5~15 mg/kg, 2~4 次/3~4 周) 两种方式, 将其广泛用于小鼠、大鼠甚至是猪的肾损伤模型的建立。例如, 张怡等^[10]选用雄性 ICR 小鼠, 通过 3 d 连续腹腔注射 CP (25 mg/kg) 的方式复制肾损伤模型, 而周莎莎等^[11]给 SD 大鼠一次性尾静脉注射 7.5 mg/kg 的 CP 后, 于 24 h 检测发现尿蛋白量和血清肌酐 (serum creatinine, Scr)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 含量均显著升高, 且病理切片结果显示大鼠肾小球肿胀、球囊结构模糊, 肾小管可见蛋白管型, 肾间质炎性细胞浸润, 细胞膜破裂、细胞核固缩或消失等肾损伤的显著特征。早年的报道还显示, 给贵州小型猪一次性腹腔注射 4 mg/kg 的 CP 后第 3 h 起, 贵州小型猪的尿量减少, Scr 及 BUN 排出显著降低, 并出现明显的肾小球出血及肾近曲小管上皮细胞的严重浊肿和空泡, 管腔内出现大量蛋白管型, 提示一次性腹腔注射 CP 成功诱导了贵州小型猪的肾损伤^[12]。近日还有研究应用单次腹腔注射 20 mg/kg 的 CP 诱导了雄性 C57/BL6 小鼠和雄性 BALB/c 小鼠 AKI^[13-14]。具体来讲, 研究发现经 CP 诱导 72 h 后的 C57/BL6 小鼠, Scr 含量显著升高, 肾切片染色显示肾小球及肾小管损伤严重, 肾炎症因子白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的 mRNA 表达及细胞凋亡显著增加, 并且肾 ATP 水平显著降低而脂质堆积显著增加, 提示肾出现氧化应激及炎症损伤^[13]。CP 诱导的 BALB/c 小鼠肾损伤表现为肾小管上皮细胞的坏死, 肾小球萎缩, 胞内炎性浸润及蛋白管腔显著增加等^[14]。还进一步对 CP 诱导的 AKI 的作用机制做了相关探讨, 主要发现 CP 可以通过刺激肾细胞五羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)

合成,促进线粒体 5-HT 降解,进而刺激线粒体 ROS 合成,CP 还可以抑制法尼酯衍生物 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 的活化,从而抑制脂肪酸氧化,并激活肠道菌群诱导的 PI3K/AKT 信号通路,进而促进肾氧化应激,炎症,细胞凋亡等,引起肾损伤^[10-14]。

CP 诱导实验动物肾损伤的成模性主要依据于给药方式及剂量,但是,实验动物不同品系间对其敏感程度也不尽相同,例如, Sears 等^[15]发现 C57BL/6 小鼠比 FVB/N 小鼠的 CP 敏感性较差,因而 C57BL/6 往往需要更高剂量 CP 以诱发肾纤维化。由此可见,利用 CP 构建 AKI 动物模型需要保持一致的给药计划,这仍需研究者们进一步的研究与确证。

1.3 甘油

利用甘油诱导的肾损伤模型表现为急性的肾损伤,这是利用了甘油高渗透性的原理^[16]。甘油局部注射可以引起局部肌肉坏死及血管内溶血进而使肌红蛋白和血红蛋白游离释放,而肌红蛋白和血红蛋白会引起肾血管的收缩,导致肾血流量和 GFR 的下降,引起肾缺血导致肾损伤^[17]。

由于甘油的经济型,易获得性,且甘油诱导的肾损伤模型操作简易,动物生存率高,因而也是研究者们常用的肾损伤造模手段。朱晓娜等^[18]给健康的雄性大鼠双侧后肢注射 50% 甘油溶液 (10 mL/kg) 3 h 后,观察到造模大鼠血清 Scr 及 BUN 的显著升高,并观察到模型大鼠的肾小管的显著性损伤及肾小球的肿胀和肾间质的炎性浸润。Madkour 等^[19]同样给予雄性 SD 大鼠单次注射 50% 甘油溶液 (10 mL/kg) 诱导了 AKI,不同的是,该研究中采用了肌肉注射的给药方式,给药后大鼠出现蛋白尿症状,且肾湿重系数及 Scr 和 BUN 含量均显著增加。与此同时,甘油诱导的大鼠肾坏死及炎症改变显著,相应指标如 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3), 肾损伤分子-1 (kidney injury molecule-1, KIM-1), 胱天蛋白酶-3 (caspase-3) 等表达均显著增加,这可能是由于甘油刺激了肾炎症/凋亡/氧化应激通路,引起 AKI。相似的肾损伤结果也在家兔模型中被发现,吴祖强^[20]给健康的新鲜大白兔双后肢注射 50% 的 15 mL/kg 的甘油溶

液后 3 h 也观察到血清 Scr 及 BUN 升高,于 24 h 观察到肾小管上皮细胞的肿胀坏死及肾小球淤血。

甘油的致病机理兼具肾缺血及内毒素对肾损伤的双重作用,因而常被应用于异型输血及挤压综合征等引起的 AKI 的研究中。

1.4 肾毒性成分中药

《中国药典 (2015 年)》中收录了 83 种有毒中药,其中包括 24 种具有肾毒性中药,各个中药引起肾毒性的方式都不尽相同^[21]。肾毒性成分的积累作为其中的引发肾毒性的诱因之一,被研究者们提取用以建立肾损伤的动物模型,其中最为常见的就是马兜铃酸 (aristolochic acids, AAs) 的使用。AAs 常见于多种中药中,上世纪 60 年代,我国由吴松寒^[22]首次报道两例由木通引起的急性肾衰竭患者。随后,国内外研究者相继发现马兜铃、关木通、广防己、青木香、朱砂莲等中草药中均含有具有肾毒性的 AAs 成分^[23-24]。学者们为了探究 AAs 的肾毒性机理进行了相应的动物模型的研究。

Cosyns 等^[25]最先利用了 AAs 诱导新西兰白兔的肾损伤症,但其建立该模型历时了 17 ~ 21 个月。而后,随着科学研究的发展,AAs 诱导的动物肾损伤模型也逐渐成熟稳定,例如,2021 年,谭微等^[26]给 BALB/c 小鼠以 5 mg/kg 的剂量腹腔注射 AAs 后,分别于第 1、3、7、14、28、42 天评估小鼠肾损伤状态,发现 AAs 对 BALB/c 小鼠肾的损伤于第 7 天最为严重,表现为小鼠体重的降低,血清 Scr、BUN 的显著升高,并在第 14 天后的肾切片中,以 Masson 染色和 PAS 染色后观察到造模小鼠肾小管的萎缩、间质炎症细胞的浸润及肾小管上皮细胞的大量脱落坏死,基底膜裸露,间质水肿等病理表现。Wang 等^[27]给雄性 C57BL/6J 小鼠腹腔注射 AAs (10 mg/kg) 后,小鼠肾近端小管刷状缘明显消失,近端小管上皮严重萎缩,肾小管坏死显著且细胞外基质沉积明显增加。进一步研究发现,AAs 引起肾损伤的作用机制,主要是由于 AAs 诱导了 miR-382 的过表达,进而引起 NF- κ B/miR-382/PTEN/AKT 轴的激活,导致肾一系列的损伤症状。AAs 致肾损伤的动物模型的成功建立为进一步探明 AAs 的肾毒性机制奠定了理论与实践基础,并且为实验模拟中药引起人肾损伤的病理发生发展过程提供了良好的动物模型基础。

2 肾缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, I/R) 模型

I/R 模型是一种典型的缺氧型肾小管损伤动物模型,也是目前用于研究 AKI 及 CKD 的最主要的动物模型,在临床中,大约 50% 的 AKI 的发生都是由肾缺血造成的,肾的 I/R 往往发生在手术、器官移植及烧伤等情形中,虽然短时间的缺血不会造成器官等器质性的损伤,但再灌注所引起的微血管的破裂及细胞的损伤却是十分严重甚至是不可逆的^[28]。

肾的 I/R 模型已在多种动物上成熟稳定地应用,在啮齿动物中,肾的 I/R 主要依靠微型动脉夹以制造肾缺血缺氧环境,例如,陈健文等^[29]在雄性 C57BL/6 小鼠缺血不同时间(0、15、25、30、45 min)后再灌注 24 h,随即取材进行肾功能的检测及病理学评价,发现 I/R 造模后,缺血 30 min 及 45 min 小鼠体重下降明显,并且血清 Scr、BUN 均显著升高,病理染色结果也发现缺血 30 min 的小鼠肾近端小管出现大量脱落的肾小管上皮细胞或脱落的刷状缘,肾皮髓交界处可见大量被坏死细胞堵塞的肾小管;相似的实验操作及结果也被广泛应用于大鼠模型中。家兔肾 I/R 模型的建立,主要应用于肾疾病的影像、血流动力等方面的研究,如宣吉晴等^[30]选用 I/R 造模的家兔利用彩色多普勒超声评价其血流动力变化与肾功能之间的关系,并且认为,随着家兔肾 I/R 损伤加重,各级肾动脉收缩期峰值流速、搏动指数、阻力指数及血清 Scr、BUN 逐渐升高,并会在 24 h 达到高峰。研究者们应用多种实验动物的 I/R 模型构建 AKI,并通过研究多种信号通路如 Keap1/Nrf2/ARE 通路, TGF- β /Smad 通路, Wnt/ β -catenin 通路等阐释了 AKI 的病理机制,并结合了广泛的药理学研究为临床中缺血缺氧性肾损伤的治疗提供了充分的理论依据^[31-33]。

当然,肾 I/R 模型在既往研究中造模方式多样,主要集中于单侧或双侧的肾 I/R,肾缺血时间的参差(文献报道包括 18 ~ 35 min 不等),但双侧肾 I/R 所导致肾损伤结果的报道结果不尽相同,这可能与实验对象,实验对象的体重,体温,甚至基因背景及海拔等因素均相关^[34-35]。

3 单侧输尿管结扎术 (unilateral ureteral obstruction, UUO)

肾纤维化作为慢性肾衰竭进展的终末归宿之一,其发生及发展一直是学术界的热点研究课题。UUO 于 1970 年首次被用于研究家兔的肾间质纤维化后发展至今,研究者们已经可以熟练应用该手术成功模拟肾小管间质纤维化,并且 UUO 具有重复率高、对动物损伤小、死亡率低等优点,因而,该法目前是公认最理想的构建肾纤维化的模型^[36-38]。

UUO 可以应用于多种实验动物中,包括小鼠、大鼠、豚鼠、家犬及灵长类动物等,并且, UUO 在短期内就可构建出良好的肾小管和肾间质的纤维化症状,通常为 7~14 d;在第 7 天左右所观察到的疾病发展通常为 AKI 的早期阶段,14 d 后是晚期阶段^[39-40]。研究发现,利用 UUO 造模的动物肾往往呈现促纤维化因子丰度增加,以转化生长因子(transforming growth factor beta, TGF- β)为靶点的纤维化信号通路的活化,细胞外基质沉积,肾上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)及肾氧化应激等^[41-44]。本课题组前期研究中也应用 UUO 成功诱导了小鼠 AKI,并且发现 UUO 术后小鼠肾损伤显著,主要表现为肾小管萎缩及肾小管间质纤维化明显,细胞外基质蛋白如纤维化因子(fibronectin)及 I 型胶原蛋白丰度显著增加,促纤维化因子及炎症相关因子如 TGF- β , 结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)及单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)等均被明显诱导,并且肾 EMT 被显著活化,进一步的机制研究中发现 UUO 引起的肾损伤可能与维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)/肾素血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)轴有着密不可分的关系^[45]。

虽然 UUO 是一项成熟的 AKI 造模方式,但其也具有一定的缺点,例如:UUO 造成的输尿管梗阻会使取尿困难,造成难于对肾的尿液标志物进行检测,因而,实验者们往往多使用大鼠作为实验造模对象进行研究。

传统大鼠 UUO 模型的造模方式会将游离的输尿管在紧靠肾盂处约 1 厘米的肾下极处两次结扎并剪断,但冯翮飞等^[46]认为,大鼠肾的输尿管为弧线

状并完全由腹壁脂肪包裹,并且该解剖位置紧挨肝、脾及胰,因而手术操作具有操作繁琐并且易导致脏器感染、黏连、发炎甚至引起大鼠死亡。因而他设计将输尿管中段进行两处间隔小于 1 cm 但不间断的结扎,并发现,改良后的 UUO 法成模率与传统方法相当,并具有手术创面更小,术后并发症少,死亡率低的优点。虽然传统的造模方式更接近临床发病特征,但改良的 UUO 法仍是值得进一步研究探索的手术方式。

4 5/6 肾切除术

5/6 肾切除术是一种经典的诱导肾损伤的模型,早在 1952 年,有学者就利用 5/6 肾切除术成功构建大鼠肾 AKI 模型^[47]。该手术是通过手术方式直接减少有效肾单位数目,从而引起术后造模动物肾的血流的高滤过率,高血压及高灌注,并进而引其肾小球的硬化及剩余肾单位的破坏,随着术后的推移,动物的肾损伤就将会由 AKI 逐渐发展为慢性肾功能衰竭^[48]。

传统 5/6 肾切除法采用两期手术法,在一期手术时,切除一侧肾的上下三分之一部分,或者采用弧形切除法切除 2/3 部分的单侧肾,在七天后,实行二期手术将另一侧肾摘除^[49]。但两期手术存在手术操作复杂繁琐,并且容易引起失血感染等术后不良后果。因而张健等^[49]使用一步法建立了大鼠 5/6 肾切除的肾损伤模型,并与两步法 5/6 肾切除术做了相应比较。研究结果发现,一步法和两步法造模的实验大鼠均在第 4、8、12 周时表现出显著性升高的血 Scr 和 BUN 水平,说明一步法造模方式的成模性好,并且,一步法手术可以降低大鼠的应激次数及麻醉次数,降低了手术对实验大鼠的伤害次数,而两步法手术会大大增加麻醉、手术和感染风险的几率,并且还增加了操作者的工作量,因而一步法手术可能优于两步造模方式。但近些年,利用 5/6 肾切除术造模的研究大多应用两步法或改良型两步法,一步法手术并未普及。因而,5/6 肾切除的肾损伤造模法仍需进一步的研究与实践。

在 5/6 肾切除术的实验动物选择中,研究者们认为,大鼠、兔、狗等实验动物均是理想的实验对象,并且,鉴于大鼠与人体的解剖结构的相似性,所以大鼠的应用更为广泛^[50]。相对于以上实验动物

而言,小鼠由于其体型较小,手术操作困难及生存率低等原因,不适合利用该法构造肾损伤模型。

5 感染诱导的肾损伤模型

感染是诱发 AKI 的病因之一。流行病学研究显示,脓毒症是引起肾感染性损伤的最主要的原因。据统计,在脓症患者中,急性肾功能衰竭的发生率高达 51%,其中危重型急性肾功能衰竭的发生率约为 5%,这些数据提示脓毒症引起的肾损伤是一个非常值得关注的医学问题^[51-52]。目前,由感染方式构建的肾损伤模型主要是以研究脓毒症为目的,包括手术诱导或内毒素诱导,主要应用的实验动物包括大鼠、小鼠、家兔及家犬等^[53]。

5.1 手术诱导感染损伤

盲肠结扎穿孔术(cecal ligature and perforation, CLP)是一种经济且简便的脓毒症 AKI 模型,主要用于大鼠及老年小鼠的肾损伤的模型建立^[54]。该法是将暴露腹部的实验动物的回盲瓣远端游离后,于盲肠 1/3 处结扎,在结扎处远端以针贯通穿刺并挤出少量内容物后,将盲肠还纳腹中,后续可应用液体复苏或抗生素以防止实验动物早期死亡^[54]。

CLP 术后导致的脓毒症对肾血流量、细胞因子数量及全身血液动力学的影响是具有时间依赖性的。Lewis 等^[55]和 Seymour 等^[56]均利用 HD-X11 无线传感器检测了经 CLP 造模的 C57BL/6 小鼠的心率、体温及活动能力,并分析了相应血液样本中的炎症细胞因子等指标。Lewis 等^[55]发现,接受 CLP 的小鼠在术后不久首先出现心率增加,并产生白介素类炎症细胞因子的堆积,术后 5~8 h 出现了严重的休克及 AKI 症状。Seymour 等^[56]发现造模小鼠在 CLP 术后大约 7 h 表现出全身器官的恶化,并且心率显著降低,出现炎症因子风暴如 IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等的高水平上升。Holthoff 等^[57]则发现 CLP 造模小鼠术后 2~3 h 肾血流量开始下降,并在 24 h 下降至基线以下水平。

CLP 诱导的脓毒症性 AKI 虽然与临床发病进程相似,能够很好的模拟临床脓毒症所致 AKI 的发生发展,但是由于手术标准化困难,例如:盲肠结扎长度、手术时间、穿刺针的粗细甚至麻醉药的选择等均具有一定的差异,造成 CLP 手术后感染的自体

细菌量难以控制,造成研究者们构建的 AKI 模型均一性差,因而,CLP 造模方式的统一化及可重复性亟需进一步研究并提高。

5.2 内毒素诱导感染损伤

脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)作为一种革兰氏阴性杆菌的细胞壁成分,是一种最简单的用于构建脓毒症感染性肾损伤的内毒素,通常被用于小型啮齿类动物 AKI 模型的建立^[58]。应用 LPS 诱导实验动物的 AKI 的标准化程度高,一致性强,重复性好。Seemann 等^[59]给 C57BL/6 小鼠腹腔注射 LPS (5 mg/kg)后 24 h 内观察到小鼠肾血流量、体重及体温的降低。血清促炎细胞因子水平在 LPS 注射后 12 h 迅速上升,并伴随血糖的显著下降。值得注意的是,在注射 LPS 仅 2 h 后,小鼠 TNF- α 上升了 4500%,干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 及 IL-6 水平也显著升高,并随后导致肾出现严重的氧化应激反应^[59]。除了以上炎症相关症状的发生,LPS 注射后引起的小鼠 GFR 的降低,血清 Scr 及 BUN 的显著升高,甚至蛋白尿和少尿,肾血管通透性的增加等也被多位研究者报道^[59-62]。

但是,来源于不同细菌的 LPS 在应用中也会产生不同的效果,这也与 LPS 的使用剂量及给药方式相关^[58]。例如,LPS 的常见的给药方式包括灌胃、腹腔注射及团注等。研究者发现快速大剂量注射 LPS,容易引发实验动物严重低血压,并在数小时内死亡,而低剂量的 LPS 注射虽可短暂导致肾功能的损伤,但是无法引起缺氧性肾小管损伤,导致模型失败^[63]。因而,LPS 诱导的感染性肾损伤应用剂量区间窄,并且有学者认为,LPS 注射后立即应用液体复苏会逆转其引起的 AKI^[64]。由此可见,由 LPS 诱导的感染性 AKI 模型虽可应用于脓毒症肾病的研究中,但应注意其使用的剂量及注射后操作以免造模失败。

6 展望

前文所述的模型中,由药物构建的 AKI 模型虽然操作简便,但起效所需时间较长,且个体间差异较大,造成各实验动物肾损伤成模时间及程度均不一致,导致其应用受限。UUO 及 I/R 模型操作相对简便,且模型均一性及重复性好,并且病程、病变程度可控,因而这两种造模方式应用广泛,是公认的

AKI 致肾纤维化,甚至是 CKD 的最佳造模方式。5/6 肾切除术由于感染风险高,操作繁琐,并且近年来伦理审查认为该法对实验动物引起的损害较大,已逐渐建议使用其他造模方式取代。感染诱导的 AKI 模型主要用于对脓毒症的研究中,在其他肾损伤疾病中使用较少(见表 1)。

除了上述的 AKI 模型以外,还有许多其他可以导致肾损伤的动物模型方法,例如药物诱导所致 AKI 模型中,还可以应用诸如蛇毒^[65-66]、腺嘌呤^[67-68]、庆大霉素^[69-70]、阿霉素^[71-73]、氯化汞^[74-75]等;甚至利用化学试剂构建动物肾损伤模型,如乙二醇^[76-77]、对苯二甲酸^[78]等;郭莲敏等^[79]还发现过度训练可以构建肾小管损伤模型。随着基因技术的发展,特定基因敲除的动物模型也初步应用于肾疾病的研究,如研究者们将细胞浸润及增殖相关因子包括:骨桥蛋白(osteopontin)、CD44、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 CIP/KIP 家族 P21 及 P27 因子等敲除后,实验动物出现实验动物出现肾细胞凋亡显著增加,肾积水,肾小管萎缩,肾小管间质纤维化加剧等 AKI 症状^[80-82]。Zhang 等^[83]将 EMT 相关因子尿激酶细胞受体(urokinase cellular receptor, uPAR)敲除后,小鼠肾 EMT 加剧,且肾小管上皮细胞凋亡显著增加,肾小管间质纤维化显著,细胞外基质相关蛋白如 fibronectin 及 I 型前胶原 α -1 的 mRNA 表达上升,成功构建了小鼠 AKI 模型。Ma 等^[84]敲除了小鼠的血管紧张素受体 2 后,该基因突变小鼠肾肾小管间质纤维化明显,胶原沉积显著增加,并且在术后第五天肾胶原合成显著增加,同时表现出免疫细胞的过量浸润等,也有学者将纤维化相关信号通路 TGF- β /Smad 信号通路中的核心蛋白聚糖(decorin)敲除后,发现小鼠的炎症及凋亡症状加剧,肾小管萎缩严重,并且肾纤维化明显,成功构建了相关 AKI 模型^[85]。

以上所述 AKI 造模方式各具其优势及缺点,在肾疾病的动物模型构建中起到了重要作用并在实验研究中广泛实践应用。在科研工作中,应该针对研究的特点与目的结合不同模型的优缺点及造模可行性,选择适合的 AKI 模型,这不仅有利于实验研究的顺利发展,并可以令研究的结果具有可信性及指导临床实践的意义。

表 1 急性肾损伤(AKI)模型构建方式优缺点比较

Table 1 Comparisons of the advantages and disadvantages of acute kidney injury (AKI) model construction methods

造模方式分类 Classification	模型构建方法 Research approaches	临床诱发 AKI 原因 Clinical causes of AKI	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
药物诱导 Drug induction	造影剂 Contrast media	心脏造影并发症 Cardiac angiography complications	能较好地应用于造影剂引发 AKI 的研究中 Better application in the study of contrast-triggered AKI	无法完全复制临床疾病状态 Inability to fully replicate clinical disease states
	顺铂(CP) Ciplatin	CP 抗癌副作用 Anti-cancer side effects	能较好地复制临床 CP 所致的 AKI 进程 Better replication of AKI processes due to CP	CP 毒性大造成动物的全身毒性及高致死率 Causes systemic toxicity and high lethality in animals
	甘油 Glycerinum	异型输血及挤压综合征 Heterotypic blood transfusion and crush syndrome	经济方便,操作简便,实验动物生存率高 Low cost, easy to operate, and high survival rate of experimental animals	适用性有限 Limited applicability
	肾毒性成分中药 Renal toxic traditional Chinese medicine	马兜铃酸类中药 Aristolochic acid herbs	良好地模拟肾毒性中药引起的 AKI 的进程 Good simulation of AKI induced by nephrotoxic herbal medicines	适用性有限 Limited applicability
肾缺血再灌注损伤(I/R) Renal ischemia-reperfusion injury		器官移植、手术缺血缺氧、烧伤 Organ transplantation, surgical ischemia and hypoxia, burn injuries	应用广泛,造模周期短,操作相对简便 Wide range of applications, short mold making cycle, relatively easy to operate	易导致全身血压波动,无法完全复制临床疾病状态 Proned to systemic blood pressure fluctuations, inability to fully replicate clinical disease states
单侧输尿管结扎术(UUO) Unilateral ureteral obstruction		肾梗阻性肾病 Renal obstructive nephropathy	重复性好,动物损伤小,死亡率低 Good repeatability, low animal damage, low mortality	动物尿液样本收取困难,难于检测尿液标志物 Difficult to collect animal urine samples and difficult to detect urine markers
5/6 肾切除术 5/6 Nephrectomy		肾切除、孤肾等 Nephrectomy, solitary kidney, etc.	能良好模拟临床肾切除及孤肾 AKI 进程 Good simulation of clinical nephrectomy and orphan kidney AKI process	手术难度大,容易造成实验动物感染死亡 Difficult to operate, easy to cause death of experimental animals by infection
感染诱导 Infection induction	手术诱导感染 Surgically induced infection	脓毒症 Sepsis	经济,操作简便 Low cost and easy to operate	手术标准化差,重复性低 Poor surgical standardization and low reproducibility
	内毒素诱导感染 Endotoxin-induced infection		标准化程度高,一致性好,重复性强 High degree of standardization, good consistency and repeatability	内毒素应用剂量范围窄 Narrow dose range for endotoxin application

参 考 文 献(References)

[1] Kellum JA, Ronco C, Bellomo R. Conceptual advances and evolving terminology in acute kidney disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2021, 17(7): 493-502.

[2] 张承宁, 张波, 毛慧娟, 等. 2020 年肾脏病学临床研究进展 [J]. 中华肾病研究电子杂志, 2021, 10(1): 14-19.

Zhang CN, Zhang B, Mao HJ, et al. Advances in clinical research on nephrology in 2020 [J]. Chin J Kidney Dis Investig Electron Ed, 2021, 10(1): 14-19.

[3] 李青, 袁杨刚, 张波, 等. 2020 年肾脏病学基础研究进展 [J]. 中华肾病研究电子杂志, 2021, 10(1): 25-30.

Li Q, Yuan YG, Zhang B, et al. Advances in the basic research on nephrology in 2020 [J]. Chin J Kidney Dis Investig (Electron Ed), 2021, 10(1): 25-30.

[4] Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency [J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39(5): 930-936.

[5] Lamby P, Krüger-Genge A, Franke RP, et al. Effect of iodinated contrast media on the oxygen tension in the renal cortico-medullary region of pigs [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2019, 73(1): 261-270.

[6] Zhao F, Feng LX, Liu Q, et al. Stanniocalcin-1 alleviates contrast-induced acute kidney injury by regulating mitochondrial

- quality control via the Nrf2 pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1898213.
- [7] 邵柳, 王雪芹, 钟婷婷, 等. 造影剂相关急性肾损伤的研究进展 [J]. *局解手术学杂志*, 2022, 31(3): 270-273.
- Shao L, Wang XQ, Zhong TT, et al. Research progress of contrast-associated acute kidney injury [J]. *J Reg Anat Oper Surg*, 2022, 31(3): 270-273.
- [8] Holditch SJ, Brown CN, Lombardi AM, et al. Recent advances in models, mechanisms, biomarkers, and interventions in cisplatin-induced acute kidney injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 3011.
- [9] Latcha S, Jaimes EA, Patil S, et al. Long-term renal outcomes after cisplatin treatment [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2016, 11(7): 1173-1179.
- [10] 张怡, 关晶, 徐凡, 等. 鹿血晶通过降低肾小管上皮细胞的 5-羟色胺合成及降解抑制顺铂诱导的肾损伤 [J]. *中草药*, 2021, 52(24): 7501-7510.
- Zhang Y, Guan J, Xu F, et al. Deer blood crystal inhibits cisplatin-induced kidney injury by reducing synthesis and degradation of 5-HT in renal tubular epithelial cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(24): 7501-7510.
- [11] 周莎莎, 郭志远, 杨智勇, 等. 芹菜素对顺铂化疗所致肾损伤及 Nrf2/HO-1 通路的影响 [J]. *肿瘤药学*, 2021, 11(5): 554-560.
- Zhou SS, Guo ZY, Yang ZY, et al. Effects of apigenin on cisplatin chemotherapy-induced renal injury and Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Anti Tumor Pharm*, 2021, 11(5): 554-560.
- [12] 董小君, 丁斗, 吴曙光, 等. 顺铂致小型猪急性肾衰模型 [J]. *实验动物科学*, 2011, 28(5): 26-28.
- Dong XJ, Ding D, Wu SG, et al. Established acute renal failure model in Guizhou miniature pigs [J]. *Lab Anim Sci*, 2011, 28(5): 26-28.
- [13] Xu S, Jia P, Fang Y, et al. Nuclear farnesoid X receptor attenuates acute kidney injury through fatty acid oxidation [J]. *Kidney Int*, 2022, 101(5): 987-1002.
- [14] Shi HH, Chen LP, Wang CC, et al. Docosahexaenoic acid-acylated curcumin diester alleviates cisplatin-induced acute kidney injury by regulating the effect of gut microbiota on the lipopolysaccharide- and trimethylamine-N-oxide-mediated PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway in mice [J]. *Food Funct*, 2022, 13(11): 6103-6117.
- [15] Sears SM, Sharp CN, Krueger A, et al. C57BL/6 mice require a higher dose of cisplatin to induce renal fibrosis and CCL2 correlates with cisplatin-induced kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 319(4): 674-685.
- [16] 何鹏飞, 高敏, 张娅, 等. 急慢性肾功能衰竭动物模型研究进展 [J]. *云南中医中药杂志*, 2017, 38(12): 80-84.
- He PF, Gao M, Zhang Y, et al. Research progress of animal models of acute renal failure [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med*, 2017, 38(12): 80-84.
- [17] 刘翔, 张白玉, 王荣. 四种急性肾衰竭模型的制作与体会 [J]. *实验动物科学*, 2009, 26(4): 16-19, 69.
- Liu X, Zhang BY, Wang R. Experiences in creating four types of acute renal failure models [J]. *Lab Anim Sci*, 2009, 26(4): 16-19, 69.
- [18] 朱晓娜, 韩琳. 松花粉对甘油诱导大鼠急性肾衰竭的保护作用 [J]. *药学与临床研究*, 2015, 23(3): 232-234.
- Zhu XN, Han L. Protective effects of pollen pini against glycerol-induced acute renal failure in rats [J]. *Pharm Clin Res*, 2015, 23(3): 232-234.
- [19] Madkour AH, Helal MG, Said E, et al. Dose-dependent renoprotective impact of Lactoferrin against glycerol-induced rhabdomyolysis and acute kidney injury [J]. *Life Sci*, 2022, 302: 120646.
- [20] 吴祖强. 甘油诱导家兔肾损害与死亡后影像演变实验研究 [D]. 泸州: 泸州医学院; 2014.
- Wu ZQ. Glycerol-induced rabbit kidney damage and caused death: evolution of imaging experimental study [D]. Luzhou: Southwest Medical University; 2014.
- [21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2015.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's Republic of China. Part one [M]. Beijing: China Medical Science Press; 2015.
- [22] 吴松寒. 木通所致急性肾功能衰竭二例报告 [J]. *江苏中医*, 1964, 10: 12-13.
- Wu SH. Two cases of acute renal failure caused by *Akebia trifoliata* [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 1964, 10: 12-13.
- [23] Yang B, Xie Y, Guo M, et al. Nephrotoxicity and Chinese herbal medicine [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2018, 13(10): 1605-1611.
- [24] Kiliš-Pstrušínska K, Wiela-Hojeńska A. Nephrotoxicity of herbal products in Europe-a review of an underestimated problem [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4132.
- [25] Cosyns JP. Aristolochic acid and 'Chinese herbs nephropathy': a review of the evidence to date [J]. *Drug Saf*, 2003, 26(1): 33-48.
- [26] 谭微, 邓军辉, 吴志芬, 等. 马兜铃酸和缺血再灌注所致急性肾损伤后慢性肾脏病小鼠模型的比较 [J]. *重庆医学*, 2021, 50(13): 2182-2186, 2193.
- Tan W, Deng JH, Wu ZF, et al. Comparison of mouse models of chronic kidney disease after acute kidney injury caused by aristolochic acid and ischemia-reperfusion [J]. *Chongqing Med*, 2021, 50(13): 2182-2186, 2193.
- [27] Wang X, Xue N, Zhao S, et al. Upregulation of miR-382 contributes to renal fibrosis secondary to aristolochic acid-induced kidney injury via PTEN signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8): 620.
- [28] Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. Animal models of renal dysfunction: acute kidney injury [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2009, 4(6): 629-641.
- [29] 陈健文, 王雷, 李怀康, 等. 小鼠单侧肾缺血再灌注缺血时间与急性肾损伤发生的关系研究 [J]. *解放军医学院学报*, 2021, 42(12): 1286-1292.

- Chen JW, Wang L, Li HK, et al. Relationship between acute kidney injury and ischemia time after unilateral renal ischemia reperfusion in mice [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2021, 42(12): 1286–1292.
- [30] 宣吉晴, 彭莉晴, 李明星, 等. 彩色多普勒超声评价肾缺血再灌注后模型兔肾动脉血流动力学变化及与肾功能的关系 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(53): 9981–9985.
- Xuan JQ, Peng LQ, Li MX, et al. Correlation between renal arterial hemodynamic alterations and renal functions evaluated by color Doppler ultrasound using a rabbit renal ischemia reperfusion model [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2011, 15(53): 9981–9985.
- [31] Sun D, Cui S, Ma H, et al. Salvianolate ameliorates renal tubular injury through the Keap1/Nrf2/ARE pathway in mouse kidney ischemia-reperfusion injury [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 293: 115331.
- [32] Cho S, Yu SL, Kang J, et al. NADPH oxidase 4 mediates TGF- β 1/Smad signaling pathway induced acute kidney injury in hypoxia [J]. PLoS One, 2019, 14(7): e0219483.
- [33] Xu ZH, Wang C, He YX, et al. Hypoxia-inducible factor protects against acute kidney injury via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2022, 322(6): 611–624.
- [34] Ferenbach DA, Bonventre JV. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD [J]. Nat Rev Nephrol, 2015, 11(5): 264–276.
- [35] Soranno DE, Kirkbride-Romeo L, Wennersten SA, et al. Acute kidney injury results in long-term diastolic dysfunction that is prevented by histone deacetylase inhibition [J]. JACC Basic Transl Sci, 2021, 6(2): 119–133.
- [36] Schainuck LI, Striker GE, Cutler RE, et al. Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations [J]. Hum Pathol, 1970, 1(4): 631–641.
- [37] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283(5): 861–875.
- [38] Vaughan ED Jr, Marion D, Poppas DP, et al. Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York [J]. J Urol, 2004, 172(6): 2563–2569.
- [39] 周才芳, 曾庆义, 周俊. 单侧输尿管梗阻家犬双肾内动脉血流动力学变化的研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(2): 121–124.
- Zhou CF, Zeng QY, Zhou J. Research of the hemodynamic changes of double renal artery in dogs with unilateral ureteral obstruction [J]. J Clin Exp Med, 2018, 17(2): 121–124.
- [40] Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM, et al. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models [J]. Pediatr Nephrol, 2012, 27(8): 1233–1247.
- [41] Manucha W. Biochemical-molecular markers in unilateral ureteral obstruction [J]. Biocell, 2007, 31(1): 1–12.
- [42] Lan HY, Mu W, Tomita N, et al. Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(6): 1535–1548.
- [43] Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy [J]. Kidney Int, 2009, 75(11): 1145–1152.
- [44] Manucha W, Vallés PG. Apoptosis modulated by oxidative stress and inflammation during obstructive nephropathy [J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2012, 11(4): 303–312.
- [45] Zhang Y, Kong J, Deb DK, et al. Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(6): 966–973.
- [46] 冯鹏飞, 郭涛, 黄敏, 等. 改良构建大鼠单侧输尿管梗阻肾间质纤维化模型 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(17): 2706–2711.
- Feng HF, Guo T, Huang M, et al. Improvement for the construction of renal interstitial fibrosis model with unilateral ureteral obstruction in rats [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2020, 24(17): 2706–2711.
- [47] Zhao J, Wang L, Cao A, et al. Renal tubulointerstitial fibrosis: a review in animal models [J]. J Integr Nephrol Androl, 2015, 2: 75–80.
- [48] Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, et al. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats [J]. Kidney Int, 1996, 49(3): 666–678.
- [49] 张健, 李冀军, 宋岩. 一步法和两步法建立 5/6 肾切除肾衰竭模型的对比研究 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2017, 11(11): 1886–1888.
- Zhang J, Li JJ, Song Y. A comparative study of one-step and two-step approach in establishing 5/6 nephrectomy model of renal failure [J]. Chin J Clin (Electron Ed), 2017, 11(11): 1886–1888.
- [50] Gretz N, Meisinger E, Strauch M. Experimental models to assess the influence of low protein diets on the progression of chronic renal failure [J]. Contrib Nephrol, 1986, 53: 7–20.
- [51] Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study [J]. JAMA, 1995, 273(2): 117–123.
- [52] Silvester W, Bellomo R, Cole L. Epidemiology, management, and outcome of severe acute renal failure of critical illness in Australia [J]. Crit Care Med, 2001, 29(10): 1910–1915.
- [53] Bejoy J, Qian ES, Woodard LE. Tissue culture models of AKI: from tubule cells to human kidney organoids [J]. J Am Soc Nephrol, 2022, 33(3): 487–501.
- [54] 黎李俊, 杨国辉. 一种改良盲肠结扎穿刺致大鼠脓毒症模型的方法 [J]. 中国医学科学院学报, 2020, 42(4): 468–476.
- Li LJ, Yang GH. Establishment of an improved rat model of Sepsis induced by cecal ligation and puncture [J]. Acta Acad Med Sin, 2020, 42(4): 468–476.
- [55] Lewis AJ, Yuan D, Zhang X, et al. Use of biotelemetry to define physiology-based deterioration thresholds in a murine cecal ligation and puncture model of Sepsis [J]. Crit Care Med, 2016, 44(6): e420–e431.

- [56] Seymour CW, Kerti SJ, Lewis AJ, et al. Murine sepsis phenotypes and differential treatment effects in a randomized trial of prompt antibiotics and fluids [J]. Crit Care, 2019, 23(1): 384.
- [57] Holthoff JH, Wang Z, Patil NK, et al. Rolipram improves renal perfusion and function during sepsis in the mouse [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2013, 347(2): 357-364.
- [58] Hukriede NA, Soranno DE, Sander V, et al. Experimental models of acute kidney injury for translational research [J]. Nat Rev Nephrol, 2022, 18(5): 277-293.
- [59] Seemann S, Zohles F, Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation [J]. J Biomed Sci, 2017, 24(1): 60.
- [60] Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S, et al. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice [J]. Infect Immun, 1996, 64(3): 769-774.
- [61] Tidjane N, Hachem A, Zaid Y, et al. A primary role for kinin B1 receptor in inflammation, organ damage, and lethal thrombosis in a rat model of septic shock in diabetes [J]. Eur J Inflamm, 2015, 13(1): 40-52.
- [62] 谭继翔, 何进, 秦文熠, 等. 槲皮素通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路缓解脂多糖诱导的急性肾损伤 [J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(5): 598-602.
- Tan JX, He J, Qin WY, et al. Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in mice by suppressing TLR4/NF- κ B pathway [J]. J South Med Univ, 2019, 39(5): 598-602.
- [63] Heyman SN, Rosen S, Darmon D, et al. Endotoxin-induced renal failure. II. A role for tubular hypoxic damage [J]. Exp Nephrol, 2000, 8(4-5): 275-282.
- [64] Legrand M, Bezemer R, Kandil A, et al. The role of renal hypoperfusion in development of renal microcirculatory dysfunction in endotoxemic rats [J]. Intensive Care Med, 2011, 37(9): 1534-1542.
- [65] 文君, 吴玲玲, 涂卫平, 等. 竹叶青蛇毒诱导不同品系小鼠系膜增生性肾炎模型的比较研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(12): 1043-1046.
- Wen J, Wu LL, Tu WP, et al. Comparative research of murine habu snake venom-induced glomerulonephritis in different mouse strains [J]. Chin J Int Tradit West Nephrol, 2014, 15(12): 1043-1046.
- [66] 胡建华, 刘熙林, 何建忠. 硫化氢改善蝮蛇毒引起的急性肾损伤的实验研究 [J]. 名医, 2021, 10: 163-164.
- Hu JH, Liu XL, He JZ. Experimental study on improving acute kidney injury caused by hydrogen sulfide and *Agkistrodon halys* venom [J]. Renowned Dr, 2021, 10: 163-164.
- [67] 张明康, 周燕, 陈宇玥, 等. 槲皮素对尿酸性肾病大鼠肾损伤的作用机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(2): 142-146.
- Zhang MK, Zhou Y, Chen YY, et al. Effect and mechanism of quercetin on the renal injury in uric acid nephropathy rats [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2022, 38(2): 142-146.
- [68] Ito S, Manabe E, Dai Y, et al. Juzentaihoto improves adenine-induced chronic renal failure in BALB/c mice via suppression of renal fibrosis and inflammation [J]. J Pharmacol Sci, 2022, 148(1): 172-178.
- [69] 徐祖清, 于晴, 王泉, 等. 橙皮苷对庆大霉素致小鼠急性肾损伤的保护作用及对氧化应激的影响 [J]. 中药材, 2021, 44(12): 2943-2946.
- Xu ZQ, Yu Q, Wang X, et al. Protective effect of hesperidin on gentamicin-induced acute kidney injury in mice and its effect on oxidative stress [J]. J Chin Med Mater, 2021, 44(12): 2943-2946.
- [70] Sharma I, Liao Y, Zheng X, et al. Modulation of gentamicin-induced acute kidney injury by myo-inositol oxygenase via the ROS/ALOX-12/12-HETE/GPR31 signaling pathway [J]. JCI Insight, 2022, 7(6): e155487.
- [71] 李天祯, 杨扬, 万珊杉, 等. 骨髓间充质干细胞经肾动脉移植对阿霉素慢性肾病大鼠肾脏炎症的影响 [J]. 介入放射学杂志, 2021, 30(9): 915-919.
- Li TY, Yang Y, Wan SS, et al. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation via renal artery on renal inflammation in experimental rats with adriamycin-induced chronic kidney disease [J]. J Interv Radiol, 2021, 30(9): 915-919.
- [72] Amarasiri SS, Attanayake AP, Mudduwa LKB, et al. Nephroprotective mechanisms of *Ambrette* (*Abelmoschus moschatus* Medik.) leaf extracts in adriamycin mediated acute kidney injury model of Wistar rats [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 292: 115221.
- [73] 高家荣, 施苗苗, 陈浩, 等. 芪藤消浊颗粒介导 miR-339-5p 对慢性肾小球肾炎大鼠炎症指标的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(4): 457-465.
- Gao JR, Shi MM, Chen H, et al. Effect of Qiteng Xiaozhuo Granule mediating miR-339-5p on inflammatory indexes in rats with chronic glomerulonephritis [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2022, 27(4): 457-465.
- [74] 孙琳, 李侠, 赵玉军, 等. 氯化汞所致肾病综合征及氧化损伤机制的实验研究 [J]. 工业卫生与职业病, 2020, 46(3): 230-235.
- Sun L, Li X, Zhao YJ, et al. Experimental study on the mechanism of nephrotic syndrome and oxidative damage caused by mercuric chloride [J]. Ind Health Occup Dis, 2020, 46(3): 230-235.
- [75] Sabir S, Saleem U, Akash MSH, et al. Thymoquinone induces Nrf2 mediated adaptive homeostasis; implication for mercuric chloride-induced nephrotoxicity [J]. ACS Omega, 2022, 7(8): 7370-7379.
- [76] 李德荣, 刘云龙, 王翔, 等. 自噬在乙二醇诱导的大鼠肾内晶体形成中的调控作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(3): 515-521.
- Li DR, Liu YL, Wang X, et al. Role of autophagy in formation of intrarenal crystals induced by ethylene glycol in rats [J]. Chin J Pathophysiol, 2019, 35(3): 515-521.

- [77] Li X, Chen S, Feng D, et al. Calcium-sensing receptor promotes calcium oxalate crystal adhesion and renal injury in Wistar rats by promoting ROS production and subsequent regulation of P-selectin, OPN, KIM-1, and ERK expression [J]. *Ren Fail*, 2021, 43(1): 465–476.
- [78] 彭娟娟, 金复生, 马国云. 乙二醇、对苯二甲酸对大鼠的联合肾损伤作用 [J]. *环境与职业医学*, 2005, 22(1): 35–38, 88.
- Peng JJ, Jin FS, Ma GY. Nephrotoxic effects of ethylene glycol combined with terephthalic acid [J]. *J Labour Med*, 2005, 22(1): 35–38, 88.
- [79] 郭莲敏, 黄旭东, 刘小明, 等. 补体-中性粒细胞反馈在过度训练致急性肾损伤中的作用研究 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2020, 21(4): 298–301, 378.
- Guo LM, Huang XD, Liu XM, et al. The role of complement-neutrophil feedback in over-training induced acute kidney injury [J]. *Chin J Int Tradit West Nephrol*, 2020, 21(4): 298–301, 378.
- [80] Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gordon K, et al. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis [J]. *Kidney Int*, 1999, 56(2): 571–580.
- [81] Rouschop KMA, Sewnath ME, Claessen N, et al. CD44 deficiency increases tubular damage but reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(3): 674–686.
- [82] Hughes J, Brown P, Shankland SJ. Cyclin kinase inhibitor p21CIP1/WAF₁ limits interstitial cell proliferation following ureteric obstruction [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(6): F948–F956.
- [83] Zhang G, Kim H, Cai X, et al. Urokinase receptor deficiency accelerates renal fibrosis in obstructive nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(5): 1254–1271.
- [84] Ma J, Nishimura H, Fogo A, et al. Accelerated fibrosis and collagen deposition develop in the renal interstitium of angiotensin type 2 receptor null mutant mice during ureteral obstruction [J]. *Kidney Int*, 1998, 53(4): 937–944.
- [85] Schaefer L, Macakova K, Raslik I, et al. Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(3): 1181–1191.

[收稿日期] 2022-04-01

综述: COVID-19 动物模型的特点

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 是 2019 年冠状病毒病 (COVID-19) 的病原体, 新冠疫情的全球大流行是当今世界最大的安全威胁。在历次传染病疫情流行时, 动物模型研究在阐明发病机制和传播机制、筛选有效疫苗和药物方面做出突出贡献。在 SARS-CoV 和 MERS-CoV 大流行期间开发的动物模型构建技术被迅速应用于 COVID-19 动物模型的建立中。

目前为止, 研究者建立了多物种 COVID-19 的动物模型, 包括小鼠、仓鼠、貂和非人灵长类动物等。感染性疾病根据病原体的特点和感染方式的不同而产生独特的表现形式。本文围绕 SARS-CoV-2 的感染途径对动物模型资源进行了分类, 汇总了通过经鼻、定位、模拟传播途径感染构建的动物模型的特点。根据动物的解剖结构及生理学特征, 为直接模拟新冠肺炎的疾病特征, 针对非人灵长类等大动物研究者一般使用气管感染的方式以制备肺炎模型。除此之外, 为探究 SARS-CoV-2 的传播机制, 研究者利用小鼠、水貂、猫、非人灵长类等动物资源建立了模拟传播方式的动物模型。

综上所述, 本文从感染途径方式入手, 汇总了目前建立的新冠动物模型特点, 并指出虽然目前没有 SARS-CoV-2 感染动物模型能够完全复制严重 COVID-19 的所有关键特征, 但人源化/基因敲除一体化以及病毒可持续复制但不诱发严重病理的动物模型的建立和探索, 有助于开展对 COVID-19 发病机制的多维分析, 并为新药开发及安全性评价提供支持。

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*, 2022, 8(5): 401–409; <https://doi.org/10.1002/ame2.12278>)。

胡海坚,张旭. 斑马鱼动物模型在眼科中的应用研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 966–972.

Hu HJ, Zhang X. Research progress on the application of zebrafish animal models in ophthalmology [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 966–972.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.012

斑马鱼动物模型在眼科中的应用研究进展

胡海坚,张旭*

(南昌大学附属眼科医院,江西省眼科学与视觉科学研究所,江西省眼科疾病临床医学研究中心,
国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心江西省分中心,南昌 330006)

【摘要】 斑马鱼已成为一种广泛用于研究脊椎动物发育、疾病遗传机制和药物毒理学的模式生物。由于斑马鱼与人类的眼睛在形态、生理、功能和基因表达的相似性,胚胎容易获得、发育很快而且易于观察和操作等特点,使其成为人类眼科疾病的良好动物模型,并为进一步探究疾病发生机制和治疗方法提供新的见解。本综述将介绍斑马鱼的眼部特征、斑马鱼动物模型在眼科疾病及药物疗效、药物眼毒性评估中的应用。

【关键词】 斑马鱼;动物模型;眼科疾病;药物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 07-0966-07

Research progress on the application of zebrafish animal models in ophthalmology

HU Haijian, ZHANG Xu*

(Affiliated Eye Hospital of Nanchang University, Jiangxi Research Institute of Ophthalmology and Visual Science, Jiangxi Clinical Research Center of Ophthalmic Disease, Jiangxi Branch of National Clinical Research Center for Ocular Diseases, Nanchang 330006, China)

Corresponding author: ZHANG Xu. E-mail: xuzhang19@163.com

【Abstract】 Zebrafish has become a widely used model organism to study vertebrate development, genetic mechanisms of diseases, and drug toxicology. There is high similarity in the morphology, physiology, functions, and gene expression of zebrafish and human eyes. Furthermore, zebrafish embryos are easy to obtain, develop rapidly, and easily observed and manipulated. Therefore, zebrafish has become a good animal model for human ophthalmic diseases and provide new insights to further explore the pathogenesis of diseases and treatment method. This review introduces the ocular characteristics of zebrafish, the application of zebrafish animal models in ophthalmic diseases, and evaluation of ophthalmic drug efficacy and ocular toxicity of drugs.

【Keywords】 zebrafish; animal models; ophthalmic diseases; drugs

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

斑马鱼已成为一种广泛用于研究脊椎动物发育、疾病遗传机制和药物毒理学的模式生物,其原因在于斑马鱼体外发育的胚胎透明,使发育的可视化成为可能^[1-2]。此外,斑马鱼世代时间很短,每周可产生约 200 个后代,可以大量繁殖,

并且易于维护,成本相对较低^[3]。而且,斑马鱼胚胎发育很快,大脑、心脏、肝、肠道和眼睛等大部分器官在受精后 1 d 内发育并在 7 dpf (day post fertilization, dpf) 内发挥作用,胚胎在 3 dpf 左右孵化并且可以自由游动,5 dpf 左右显示出功能性视

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81860170),江西省自然科学基金项目 (20181ACG70010)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81860170), Jiangxi Provincial Natural Science Foundation (20181ACG70010).

【作者简介】 胡海坚 (1995—),男,博士,研究方向:青光眼。Email:863148576@qq.com

【通信作者】 张旭,男,博士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:青光眼。Email:xuzhang19@163.com

觉^[4]。斑马鱼的眼睛与体型大小相比,相对较大,使得在早期胚胎发生过程中进行眼芽操作是可行的^[1]。同时,斑马鱼所具备的强大的视觉行为,包括视动反应、眼动反应、趋光反应、惊恐反应和逃避反应等,使视功能结果容易获得^[5]。基因组测序表明,71.4%的人类基因及82%的人类致病基因至少有一种斑马鱼直系同源物^[6]。综上所述,斑马鱼已成为人类眼科疾病的良好动物模型,并为进一步探究疾病发病机制和治疗方

法提供新的见解。本综述将介绍斑马鱼的眼部特征,斑马鱼动物模型在眼科疾病及药物疗效、药物眼毒性评估中的应用。

1 斑马鱼的眼部特征

斑马鱼眼睛在形态、生理、功能和基因表达上与人类眼睛相似,但同时也存在一些差异(见表1),以下将通过角膜、前房角、晶状体、视网膜和视神经等方面进行阐述。

表 1 斑马鱼与人类眼部特征比较

Table 1 Comparison of the eye features between zebrafish and human

结构 Structure	人类 Human	斑马鱼 Zebrafish
角膜 Cornea	基质层较厚,存在角膜神经纤维 Thicker corneal stroma, included corneal nerve fibers	基质层较薄,缺乏角膜神经纤维 Thinner corneal stroma, absent corneal nerve fibers
前房角 Anterior chamber angle	小梁网结构 Trabecular meshwork	腹侧管状网络结构 Ventral canalicular network
晶状体 Lens	椭圆形 Ellipsoidal	接近球形 Nearly spherical
视网膜 Retina	厚度较厚,神经节细胞高度密集,包含黄斑结构 Thicker retina, highly populated ganglion cells, included macula	厚度较薄,神经节细胞相对稀少,缺乏黄斑结构 Thinner retina, less densely populated ganglion cells, absent macula
髓鞘 Myelination	视网膜内轴突无髓鞘,而视神经轴突有髓鞘 Retinal axons are unmyelinated, while optic nerve axons are myelinated	全部轴突都有髓鞘 Whole axons are myelinated
视神经纤维 投射 Optic nerve fiber projection	每只眼睛一半视神经纤维投射到大脑同侧,另一半穿过视交叉,投射到大脑对侧 Half of the optic nerve fibers in each eye project to the same side of the brain, while the other half project to the opposite side of the brain through the optic chiasm	每只眼睛所有的视神经纤维都穿过视交叉,并延伸到大脑对侧 All of the optic nerve fibers in each eye pass through the optic chiasm and extend to the opposite side of the brain
视觉 Vision	视锥细胞主导的三色视觉,缺乏紫外线敏感的视锥细胞 Cone-dominated trichromatic vision, absent UV-sensitive cones	视锥细胞主导的四色视觉,包含紫外线敏感的视锥细胞 Cone-dominated tetrachromatic vision, included UV-sensitive cones
眼位 Eye position	双眼高度重叠视觉的正视眼 Frontal eyes with highly overlapped binocular vision	双眼较少重叠视觉的侧视眼 Lateral eyes with less overlapped binocular vision

1.1 角膜

斑马鱼和人类的角膜都包括五层:角膜上皮层、前弹力层、基质层、后弹力层和角膜内皮层。而且与其他脊椎动物一样,斑马鱼角膜也是无血管的^[7]。但斑马鱼角膜与人类角膜相比也存在一定的差异,如角膜神经纤维缺乏,基质层厚度较薄等^[8]。

1.2 前房角

大多数哺乳动物介导房水产生和清除的组织在前房角呈对称分布,房水主要通过前房角向四周流动^[9]。而斑马鱼房水从背侧睫状体上皮产生,流到腹侧管状网络和玻璃体-视网膜血管^[10]。虽然斑马鱼前房角的整体结构与哺乳动物不同,但睫状体

上皮细胞和房水流出通路的细胞仍具有高度的保守性^[10]。

1.3 晶状体

斑马鱼和人类的晶状体均由紧密排列的晶状体纤维组成,它们在前外周被单层晶状体上皮细胞包围^[3]。哺乳动物晶状体上皮细胞的末端位于晶状体赤道附近,而斑马鱼晶状体上皮细胞的末端则进一步向后延伸^[3]。此外,斑马鱼的晶状体形状也比人类更接近球形,几乎负责所有光折射,而其他脊椎动物大部分光折射由角膜完成^[11]。人类和斑马鱼中都有 α 、 β 和 γ 三种晶状体蛋白,晶状体蛋白的相似性使其成为研究活体动物晶状体的绝佳模型^[12]。

1.4 视网膜

与人类相似,斑马鱼光感受器由视锥细胞和视杆细胞组成。斑马鱼视锥细胞可分为蓝色、绿色、红色和紫外线敏感视锥细胞,因此斑马鱼的视觉是四色的。而人眼缺乏紫外线敏感视锥细胞,只有三色视觉^[5]。虽然斑马鱼和啮齿动物都没有黄斑,但由于斑马鱼有白天活动的节律,而且视网膜以视锥细胞为主,因此具有良好的色觉^[4]。斑马鱼视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)密度大于大鼠和小鼠,具有较高的视力,因此更接近人类视觉^[5]。与哺乳动物不同,斑马鱼能够再生受损的视网膜,其再生的关键是 Müller 胶质细胞,它能够分裂并产生多能视网膜祖细胞和再生主要的视网膜神经元^[13]。

1.5 视神经

人类筛板前的视神经轴突没有髓鞘,筛板后的视神经轴突有髓鞘,而斑马鱼全部视神经轴突都有髓鞘,视网膜内轴突有松散的单层髓鞘,视神经轴突则由致密的髓鞘包绕^[14]。人类每只眼睛一半视神经纤维投射到大脑同侧,另一半穿过视交叉,投射到大脑对侧,而斑马鱼每只眼睛所有的视神经纤维都穿过视交叉并延伸到大脑对侧^[15]。

2 斑马鱼动物模型在眼科疾病的应用

斑马鱼已广泛用于了解人类疾病相关基因的生物活性,去除斑马鱼基因功能的方法包括基于吗啉代寡核苷酸(morpholino oligonucleotides, Mos)的基因敲除技术来影响靶基因的翻译或剪接、使用成簇的规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)及其相关蛋白 9(CRISPR-associated protein 9, Cas9)的基因编辑技术来实现靶基因的突变。此外,一些基于药物、光照或机械损伤等诱因建立的斑马鱼动物模型在眼科疾病中也得到了良好的应用。以下将对斑马鱼动物模型在角膜疾病、白内障、青光眼、视网膜疾病和视神经损伤等眼科疾病中的应用进行阐述。

2.1 角膜疾病

角膜营养不良是一组具有遗传异质性的疾病。人类 MAB21L 基因突变会导致角膜营养不良,斑马鱼 *mab21l1* 基因突变表现为角膜变薄,并随着年龄的增长而发展,还表现为角膜细胞死亡增加,角膜转化为皮肤样上皮细胞^[16]。Zebrafish 是一组能够对整个生物体或特定的组织进行多色标记的转基因

斑马鱼,有研究者使用 Zebrafish 成功实现了角膜细胞的可视化和跟踪,这些发现对于深入了解这些细胞在角膜疾病如角膜缘干细胞缺乏症中的作用至关重要^[17]。此外, Ikkala 等^[18]使用机械损伤的方法建立了一种可重复操作的斑马鱼角膜上皮擦伤模型,该模型中角膜上皮伤口可以快速愈合,具有强大的上皮再生能力,使其成为揭示角膜上皮再生具体机制的有用模型。

2.2 青光眼

青光眼疾病风险表型在斑马鱼中得到了很好的研究,低密度脂蛋白受体相关蛋白 2(low density lipoprotein receptor-related protein 2, *lrp2*) 基因突变的斑马鱼表现为成年发病的严重近视,眼球突出,眼压升高和进行性 RGCs 死亡^[19]。细胞色素 P450 家族 1B1(recombinant cytochrome P450 1B1, *CYP1B1*) 基因突变是原发性婴儿型青光眼常见原因,斑马鱼研究揭示了 *cyp1b1* 基因是通过改变神经嵴迁移来影响眼前段的发育^[20]。Axenfeld-Rieger 综合征(axenfeld-rieger syndrome, ARS)是一组眼前段发育不良,并可伴全身发育异常的疾病,而眼前节畸形常导致继发性青光眼, *foxc1* 和 *pitx2* 基因突变斑马鱼可表现出 ARS 眼相关表型^[21]。我们使用 N-甲基 D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 玻璃体腔注射或水浴建立了一种青光眼兴奋性毒性模型,表现为视网膜神经纤维层和 RGCs 层厚度增加,而 RGCs 数量减少^[22-23]。另有研究使用过氧化氢玻璃体腔注射建立了一种青光眼氧化应激模型,表现为 RGCs 层凋亡细胞增加^[24]。

2.3 白内障

白内障在老年人群中最为普遍,但具有遗传易感性的儿童也会发生先天性白内障。斑马鱼晶状体蛋白基因突变体可表现为晶状体中可见散在圆形闪亮液滴或晶状体中央可见大小不规则的突起^[25]。转录调节因子包括热休克蛋白转录因子 4(heat shock factor 4, *HSF4*)^[26],同源盒基因 3(pituitary homeobox 3, *PITX3*)等基因突变可导致晶状体发育不良而引起晶状体混浊^[27]。晶状体膜蛋白包括水通道蛋白 0(aquaporin 0, *AQP0*)^[28],缝隙连接蛋白 $\alpha 8$ (gap junction protein alpha 8, *GJA8*)^[29]等基因突变,可引起膜蛋白结构异常,导致细胞间营养物质运输和通讯障碍,晶状体发生代谢紊乱而混浊。此外,在斑马鱼前房内注射过氧化氢,几乎可以立即形成高度不透明的白内障,且随着时间的

推移,晶状体清晰度逐渐恢复^[30]。

2.4 视网膜疾病

2.4.1 糖尿病视网膜病变

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见的微血管并发症。斑马鱼中参与糖代谢的器官如胰腺、肝等在进化上具有保守性,使其成为糖代谢研究的理想动物模型^[31]。斑马鱼暴露于2%和0%葡萄糖交替条件下1个月后,血糖水平增加3倍,内丛状层和外丛状层厚度增加,视网膜电图受损^[32]。缺氧用于模拟增殖性DR,斑马鱼在相对空气饱和度为10%的水中保持10 d,可导致视网膜新生血管和血管通透性改变^[33]。链脲霉素(streptozotocin, STZ)可通过破坏胰岛 β 细胞而导致高血糖^[34]。斑马鱼腹腔内注射STZ,可引起血糖升高,表现出类似于人类DR的视网膜退化^[35]。乙二醛酶1(glyoxalase 1, *GLO1*)缺失会导致甲基乙二醛水平升高和糖尿病表型,*glo1*^{-/-}斑马鱼表现为空腹血糖水平升高,视网膜血管芽增加^[36]。

2.4.2 年龄相关性黄斑变性

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)分为干性和湿性。Saito等^[37]将斑马鱼暴露在高强度白光下,建立了一种干性AMD模型,表现为视网膜外核层厚度和细胞核数量减少,凋亡细胞增加,而抗氧化剂可有效逆转这些变化。Cao等^[38]将斑马鱼暴露于不同浓度空气饱和水并分析血管生成反应,建立了一种血管生成与缺氧呈剂量依赖性关系的湿性AMD模型,且抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物可阻断新生血管的生成。丝氨酸蛋白酶1(high-temperature requirement factor A1, *HTRA1*)与AMD有很强的遗传相关性,过表达*htra1*基因的斑马鱼表现出视网膜色素上皮细胞形态变化,脂褐素积累和光感受器细胞死亡,这些特征与早期AMD相似^[39]。希佩尔-林道(von hippel-lindau, *vhl*)基因突变的斑马鱼在大脑、眼睛和躯干中形成严重的新生血管,出现视网膜新生血管、血管渗漏、黄斑水肿和视网膜脱离,而抗VEGF药阻断了眼部的血管生成,提示*vhl*^{-/-}斑马鱼是湿性AMD的一个很好的模型^[40]。

2.4.3 早产儿视网膜病变

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)是婴儿失明的常见原因。Wu等^[41]使用缺氧诱导剂建立了斑马鱼ROP模型,表现为视网膜血管

出现更多的分支和芽,血管渗漏增加,且与缺氧诱导剂呈剂量依赖性关系,而VEGF抑制剂可减轻新生血管生成和渗漏。缺氧是病理性新生血管形成的关键驱动力,而视网膜新生血管生成是DR、AMD和ROP的共同特征,因此缺氧可作为这些疾病的共同诱因^[33,38]。

2.4.4 视网膜色素变性

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一组视杆细胞退行性疾病。视蛋白视紫红质(rhodopsin, *rho*)基因突变的斑马鱼表现为视杆细胞在发育后不久即出现退化并持续到成年,而视锥细胞不受影响^[42]。人类USH2A基因突变是RP的常见原因,其中最常见的两个突变均位于第13号外显子,外显子跳跃是指一个外显子和它两端的内含子被剪接而不出现在成熟mRNA中。基于MOs技术的第13号外显子跳跃后的斑马鱼可恢复正常的蛋白质表达和视觉功能,该研究为RP等遗传性疾病的基因治疗提供了可能^[43]。N-甲基-N-亚硝基脲(N-methyl-N-nitrosourea, MNU)是一种烷化剂,可将其甲基转移到核酸上,导致DNA突变和损伤,MNU诱导的斑马鱼可产生类似于RP的视杆细胞退化^[44]。

2.4.5 先天性色觉障碍

先天性色觉障碍也称为色盲,是由视锥细胞特异性光转导机制或离子通道的异常改变引起,并阻止视锥细胞将信息传递给下游神经元。生物钟基因2(period2, *PER2*)是一种光调节基因,*per2*基因突变的斑马鱼表现为视网膜带状突触结构异常,视锥细胞视蛋白表达降低,视功能下降^[45]。

2.5 视神经损伤

视神经损伤(optic nerve injury, ONI)也称为外伤性视神经病变。与哺乳动物不同,斑马鱼中枢神经系统具有很强的神经再生能力,可在ONI后完全恢复视觉功能,RGCs及其轴突再生是主要原因^[14]。Diekmann等^[46]构建了生长相关蛋白(growth associated protein-43, GAP-43)启动子调控绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达的转基因斑马鱼,该模型可在ONI后,显著诱导GFP高表达于RGCs及其轴突,使轴突再生的可视化成为可能,并且该模型与基因敲除或药物处理相结合,可以分析轴突再生过程中的信号级联反应和特定蛋白的作用。还有研究者使用GFP-微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light 3, LC3)转基因

斑马鱼,观察 ONI 后不同时间点的 RGCs 及其轴突的自噬反应,并且证明了自噬参与 RGCs 及其轴突再生的过程,而自噬抑制剂可以促进轴突再生,这些证据表明自噬反应可作为中枢神经系统再生的潜在治疗靶点^[47]。因此,进一步明确斑马鱼视神经再生机制,有望为人类视神经损伤等疾病治疗提供新的见解^[48]。

2.6 其他

斑马鱼还广泛应用到其他眼部疾病的研究中。眼皮肤白化病 2 (oculocutaneous albinism 2, *OCA2*) 基因突变患者头发、皮肤和眼睛的黑色色素沉着下降,斑马鱼 *oca2* 基因突变表现为皮肤、视网膜色素上皮、虹膜载黑素细胞数量下降,黑色素产生减少^[49]。性别决定相关基因簇 2 (sex-determining region Y-box 2, *SOX2*) 基因突变占人类无眼症或小眼症等出生缺陷的 20%,斑马鱼 *sox2* 基因突变导致眼部发育缺陷,引起无眼症或小眼症,类似于人类 *SOX2* 基因缺陷的表现^[50]。

3 斑马鱼动物模型在药物疗效和眼毒性评估中的应用

3.1 斑马鱼动物模型在眼科药物疗效评估中的应用

斑马鱼动物模型为筛选治疗眼部疾病的药物提供了可能。由于斑马鱼的眼睛与人类的眼睛的相似性,并且斑马鱼还表现出强大的视觉行为,使其成为视网膜变性疾病如 AMD、RP 等疾病的药物筛选的合适的动物模型^[51]。缺氧诱导的斑马鱼视网膜新生血管模型被用于测试抗 VEGF 药物的作用,该药逆转了视网膜新生血管^[38]。此外,抗 VEGF 药物阻断了 *vhl*^{-/-} 斑马鱼眼部的新生血管生成^[40]。高强度白光诱导的斑马鱼干性 AMD 模型中,抗氧化剂可以有效逆转视网膜的退行性改变,且与药物浓度呈剂量依赖性^[37]。这些研究表明斑马鱼可以作为新药疗效评估的有效工具。

3.2 斑马鱼动物模型在药物眼毒性评估中的应用

斑马鱼可作为一种临床前阶段预测药物眼毒性的动物模型。在一项研究中,3 dpf 的斑马鱼暴露于 6 种已知具有眼毒性的药物 2 d 后,其中 5 种药物导致斑马鱼视觉功能受损,从而证实了这些药物对人眼的潜在毒性^[52]。由于许多药物表现出较差的水溶性,需要有机溶剂来溶解以保证适当的生物利用率,斑马鱼胚胎可作为评估有机溶剂眼毒性的良好动物模型^[53]。此外,斑马鱼还可作为小分子的

筛选工具,有研究使用斑马鱼胚胎成功从大约 2000 种小分子中筛选出 4 种在特定浓度下会影响视网膜血管形态的小分子^[54]。这些研究表明斑马鱼成功地反映了药物眼毒性的特征,并可作为预测新药眼毒性的工具。

4 结语

视力障碍是世界范围内的主要健康问题,疾病相关发病机制的理解对于开发新的治疗方法至关重要。许多人类视觉障碍相关的表型已在斑马鱼中重现,斑马鱼动物模型有助于了解人类疾病的发病机制,为更好的诊断、治疗开辟途径。此外,斑马鱼还广泛用于眼科药物疗效和药物眼毒性的评估中,成为筛选新药越来越有吸引力的模型。虽然斑马鱼眼睛在形态、生理、功能和基因表达上与人类相似,但在某些情况下,斑马鱼的基因功能差异,足以破坏斑马鱼突变体和人类疾病综合征的表型相似性,并且斑马鱼的生理学差异也会使疾病模型复杂化。而且与哺乳动物相比,斑马鱼在解释人类眼科疾病,以及评估眼科药物疗效和药物眼毒性时,通常需要面临更大的挑战。尽管斑马鱼可能存在这些不足之处,但其仍然是广泛用于人类眼部疾病和药物评估的良好动物模型。未来,基因治疗技术的发展,以及进一步明确斑马鱼视网膜和视神经再生的关键参与者,有望为人类眼部疾病治疗提供新的见解。

参 考 文 献 (References)

- [1] Richardson R, Tracey-White D, Webster A, et al. The zebrafish eye-a paradigm for investigating human ocular genetics [J]. Eye (Lond), 2017, 31(1): 68-86.
- [2] 王明亮,丁永芳,印鑫,等. 斑马鱼在毒理学中的应用研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 390-396.
Wang ML, Ding YF, Yin X, et al. Research progress regarding the application of zebrafish in toxicology [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 390-396.
- [3] Bibliowicz J, Tittle RK, Gross JM. Toward a better understanding of human eye disease insights from the zebrafish, *danio rerio* [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011, 100: 287-330.
- [4] Chhetri J, Jacobson G, Gueven N. Zebrafish-on the move towards ophthalmological research [J]. Eye (Lond), 2014, 28(4): 367-380.
- [5] Stella SL Jr, Geathers JS, Weber SR, et al. Neurodegeneration, neuroprotection and regeneration in the zebrafish retina [J]. Cells, 2021, 10(3): 633.
- [6] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference

- genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496(7446): 498–503.
- [7] Gestri G, Link BA, Neuhauss SCF. The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases [J]. Dev Neurobiol, 2012, 72(3): 302–327.
- [8] Puzzolo D, Pisani A, Malta C, et al. Structural, ultrastructural, and morphometric study of the zebrafish ocular surface: a model for human corneal diseases? [J]. Curr Eye Res, 2018, 43(2): 175–185.
- [9] Goel M, Picciani RG, Lee RK, et al. Aqueous humor dynamics: a review [J]. Open Ophthalmol J, 2010, 4: 52–59.
- [10] Gray MP, Smith RS, Soules KA, et al. The aqueous humor outflow pathway of zebrafish [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(4): 1515–1521.
- [11] Wang K, Vorontsova I, Hoshino M, et al. Optical development in the zebrafish eye lens [J]. FASEB J, 2020, 34(4): 5552–5562.
- [12] Hong Y, Luo Y. Zebrafish model in ophthalmology to study disease mechanism and drug discovery [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2021, 14(8): 716.
- [13] Wan J, Goldman D. Retina regeneration in zebrafish [J]. Curr Opin Genet Dev, 2016, 40: 41–47.
- [14] Zou S, Tian C, Ge S, et al. Neurogenesis of retinal ganglion cells is not essential to visual functional recovery after optic nerve injury in adult zebrafish [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57280.
- [15] Maurer CM, Huang YY, Neuhauss SC. Application of zebrafish oculomotor behavior to model human disorders [J]. Rev Neurosci, 2011, 22(1): 5–16.
- [16] Seese SE, Deml B, Muheisen S, et al. Genetic disruption of zebrafish mab2111 reveals a conserved role in eye development and affected pathways [J]. Dev Dyn, 2021, 250(8): 1056–1073.
- [17] Adil MT, Henry JJ. Understanding cornea epithelial stem cells and stem cell deficiency: lessons learned using vertebrate model systems [J]. Genesis, 2021, 59(1–2): e23411.
- [18] Ikkala K, Stratoulas V, Michon F. Unilateral zebrafish corneal injury induces bilateral cell plasticity supporting wound closure [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 161.
- [19] Veth KN, Willer JR, Collery RF, et al. Mutations in zebrafish *lrp2* result in adult-onset ocular pathogenesis that models myopia and other risk factors for glaucoma [J]. PLoS Genet, 2011, 7(2): e1001310.
- [20] Williams AL, Eason J, Chawla B, et al. *Cyp11b1* regulates ocular fissure closure through a retinoic acid-independent pathway [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(2): 1084–1097.
- [21] French CR. Mechanistic insights into axenfeld-riege syndrome from zebrafish *foxc1* and *pitx2* mutants [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 10001.
- [22] Sheng W, Lu Y, Mei F, et al. Effect of resveratrol on sirtuins, OPA1, and Fis1 expression in adult zebrafish retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(11): 4542–4551.
- [23] Luo ZW, Wang HT, Wang N, et al. Establishment of an adult zebrafish model of retinal neurodegeneration induced by NMDA [J]. Int J Ophthalmol, 2019, 12(8): 1250–1261.
- [24] Giannaccini M, Usai A, Chiellini F, et al. Neurotrophin-conjugated nanoparticles prevent retina damage induced by oxidative stress [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(7): 1255–1267.
- [25] Wu SY, Zou P, Fuller AW, et al. Expression of Cataract-linked γ -crystallin variants in zebrafish reveals a proteostasis network that senses protein stability [J]. J Biol Chem, 2016, 291(49): 25387–25397.
- [26] Cui XK, Du CX, Wan SM, et al. Deficiency of heat shock factor 4 promotes lens epithelial cell senescence through upregulating p21(cip1) expression [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2021, 1867(11): 166233.
- [27] Sorokina EA, Muheisen S, Mlodik N, et al. Mip/aquaporin 0 represents a direct transcriptional target of *pitx3* in the developing lens [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21122.
- [28] Wang KH, Vorontsova I, Hoshino M, et al. Aquaporins have regional functions in development of refractive index in the zebrafish eye lens [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(3): 23.
- [29] Ping XY, Liang JC, Shi KX, et al. Rapamycin relieves the cataract caused by ablation of *gja8b* through stimulating autophagy in zebrafish [J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3323–3337.
- [30] Prior HM, Letwin K, Tuininga A, et al. A simple method of cataract induction in adult zebrafish [J]. Zebrafish, 2018, 15(2): 211–212.
- [31] 王雪, 韩利文, 何秋霞, 等. 斑马鱼模型在糖尿病研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 1–5.
Wang X, Han LW, He QX, et al. Application of zebrafish models in research of diabetes [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(8): 1–5.
- [32] Tanvir Z, Nelson RF, DeCicco-Skinner K, et al. One month of hyperglycemia alters spectral responses of the zebrafish photopic electroretinogram [J]. Dis Model Mech, 2018, 11(10): dmm035220.
- [33] Ali Z, Mukwaya A, Biesecker A, et al. Intussusceptive vascular remodeling precedes pathological neovascularization [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(7): 1402–1418.
- [34] 王娇娇, 李苗, 史平玲, 等. 糖尿病视网膜病变动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 681–688.
Wang JJ, Li M, Shi PL, et al. Research progress of animal model of diabetic retinopathy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 681–688.
- [35] Wang S, Du SS, Wang WZ, et al. Therapeutic investigation of quercetin nanomedicine in a zebrafish model of diabetic retinopathy [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 130: 110573.
- [36] Lodd E, Wigganhauser LM, Morgenstern J, et al. The combination of loss of glyoxalase1 and obesity results in hyperglycemia [J]. JCI Insight, 2019, 4(12): e126154.
- [37] Saito Y, Tsuruma K, Shimazawa M, et al. Establishment of a

- drug evaluation model against light-induced retinal degeneration using adult pigmented zebrafish [J]. J Pharmacol Sci, 2016, 131(3): 215-218.
- [38] Cao RH, Jensen LD, Soll I, et al. Hypoxia-induced retinal angiogenesis in zebrafish as a model to study retinopathy [J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2748.
- [39] Oura Y, Nakamura M, Takigawa T, et al. High-temperature requirement a 1 causes photoreceptor cell death in zebrafish disease models [J]. Am J Pathol, 2018, 188(12): 2729-2744.
- [40] Van Rooijen E, Voest EE, Logister I, et al. Von hippel-lindau tumor suppressor mutants faithfully model pathological hypoxia-driven angiogenesis and vascular retinopathies in zebrafish [J]. Dis Model Mech, 2010, 3(5-6): 343-353.
- [41] Wu YC, Chang CY, Kao A, et al. Hypoxia-induced retinal neovascularization in zebrafish embryos: a potential model of retinopathy of prematurity [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e126750.
- [42] Zelinka CP, Sotolongo-Lopez M, Fadool JM. Targeted disruption of the endogenous zebrafish *rhodopsin* locus as models of rapid rod photoreceptor degeneration [J]. Mol Vis, 2018, 24: 587-602.
- [43] Dulla K, Slijkerman R, van Diepen HC, et al. Antisense oligonucleotide-based treatment of retinitis pigmentosa caused by USH2A exon 13 mutations [J]. Mol Ther, 2021, 29(8): 2441-2455.
- [44] Tappeiner C, Balmer J, Iglicki M, et al. Characteristics of rod regeneration in a novel zebrafish retinal degeneration model using N-methyl-N-nitrosourea (MNU) [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71064.
- [45] Huang DF, Wang MY, Yin W, et al. Zebrafish lacking circadian gene *per2* exhibit visual function deficiency [J]. Front Behav Neurosci, 2018, 12: 53.
- [46] Diekmann H, Kalbhen P, Fischer D. Characterization of optic nerve regeneration using transgenic zebrafish [J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 118.
- [47] Beckers A, Vanhunsel S, Van Dyck A, et al. Injury-induced autophagy delays axonal regeneration after optic nerve damage in adult zebrafish [J]. Neuroscience, 2021, 470: 52-69.
- [48] 陈维昕, 金铭, 张旭. 斑马鱼视觉损伤和视神经再生的研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2021, 21(10): 1711-1715.
- Chen WX, Jin M, Zhang X. Research progress on visual impairment and optic nerve regeneration in zebrafish [J]. Int Eye Sci, 2021, 21(10): 1711-1715.
- [49] Beirl AJ, Linbo TH, Cobb MJ, et al. Oca2 Regulation of chromatophore differentiation and number is cell type specific in zebrafish [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2014, 27(2): 178-189.
- [50] Dash S, Brastrom LK, Patel SD, et al. The master transcription factor SOX2, mutated in anophthalmia/microphthalmia, is post-transcriptionally regulated by the conserved RNA-binding protein RBM24 in vertebrate eye development [J]. Hum Mol Genet, 2020, 29(4): 591-604.
- [51] Ganzen L, Venkatraman P, Pang CP, et al. Utilizing zebrafish visual behaviors in drug screening for retinal degeneration [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6): 1185.
- [52] Deeti S, O'Farrell S, Kennedy BN. Early safety assessment of human ocultoxic drugs using the zebrafish visualmotor response [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2014, 69(1): 1-8.
- [53] 邸亚男, 朱丽英, 沈婕, 等. 四种有机溶剂对斑马鱼眼睛发育的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 75-80.
- Di YN, Zhu LY, Shen J, et al. Effects of four carrier solvents on eye development in zebrafish embryos [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 75-80.
- [54] Kitambi SS, McCulloch KJ, Peterson RT, et al. Small molecule screen for compounds that affect vascular development in the zebrafish retina [J]. Mech Dev, 2009, 126(5-6): 464-477.

[收稿日期] 2022-05-11

徐雁云,陈民利. 肠道菌群与肠屏障互作影响动脉粥样硬化形成的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 973-982.

Xu YY, Chen ML. Research progress in the interaction between intestinal flora and the intestinal barrier in atherosclerosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 973-982.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.013

肠道菌群与肠屏障互作影响动脉粥样硬化形成的研究进展

徐雁云¹, 陈民利^{2*}

(1. 浙江中医药大学 药学院, 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学 动物实验研究中心/比较医学研究所, 杭州 310053)

【摘要】 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症代谢性疾病,与高血压、高血脂、高血糖、高尿酸等危险因素联系密切。肠道屏障功能对维持人体肠道功能稳态发挥着重要调节作用,肠道菌群是肠道屏障的重要组成部分,肠道菌群紊乱会导致肠道屏障受损、肠道通透性增加,同时菌群相关产物如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、短链脂肪酸(short chain fatty acid, SCFAs)、胆汁酸(bile acids, BAs)、氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO)等发生改变,可引发机体炎症反应、氧化应激等不良反应,影响AS的发生发展。本文就肠道菌群与肠屏障互作对于AS的形成及其危险因素的影响作一综述,为研究和防治AS提供参考。

【关键词】 动脉粥样硬化;肠道菌群;肠道屏障;危险因素

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 07-0973-10

Research progress in the interaction between intestinal flora and the intestinal barrier in atherosclerosis

XU Yanyun¹, CHEN Minli^{2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China. 2. Laboratory Animal Research Center/Institute of Comparative Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

Corresponding author: CHEN Minli. E-mail: cmli991@zcmu.edu.cn

【Abstract】 Atherosclerosis (AS) is a chronic inflammatory metabolic disease closely associated with risk factors such as hypertension, hyperlipidemia, hyperglycemia, and hyperuricemia. The intestinal barrier function plays an important regulatory role in maintaining intestinal homeostasis, and intestinal flora is an important component. Disturbance of intestinal flora can lead to intestinal barrier damage and an increase of intestinal permeability. The related products, such as lipopolysaccharide, short chain fatty acids, bile acids, and trimethylamine oxide change and can cause inflammation, oxidative stress, and other adverse reactions that then affect the occurrence and development of AS. In this article, we review the interaction between intestinal flora and the intestinal barrier in AS development and its risk factors, and provide a reference for the study and prevention of AS.

【Keywords】 atherosclerosis; intestinal flora; the intestinal barrier; risk factors

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

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)是严重危害人类健康的重大疾病。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是众多CVD的病理基础,也是

以炎症反应和脂质沉积为基础的代谢性疾病,与高血压、高血脂、高血糖、高尿酸等危险因素密切相关。然而,目前AS发生发展机制仍未被阐明,面对

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(31970514)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31970514).

【作者简介】 徐雁云(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:实验动物与比较药理。Email: xuyanyun_123@163.com

【通信作者】 陈民利(1963—),女,教授,博士生导师,研究方向:实验动物与比较医学。Email: cmli991@zcmu.edu.cn

严峻的形势,深入研究 AS 的发病机制和影响因素对发现新型有效的防治方案有着重要意义。

大量研究发现,肠道菌群结构和肠道通透性与 AS 及其危险因素密切相关^[1]。肠道中有益菌数量下降和有害菌数量上升,可导致肠道屏障损伤以及菌群相关产物脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、短链脂肪酸(short chain fatty acid, SCFAs)、胆汁酸(bile acids, BAs)、氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO)等物质发生变化,继而促使更多有害物质进入循环系统,引起炎症反应、氧化应激,影响 AS 进展^[2]。本文将从肠道菌群与肠道屏障互作对 AS 及其危险因素发生发展的影响加以阐述,为研究和防治 AS 提供参考。

1 肠道菌群与肠道屏障

1.1 肠道屏障

肠道屏障由肠道皮下向肠腔内可依次细分为免疫屏障、机械屏障、化学屏障和生物屏障。免疫屏障主要由肠道相关淋巴细胞组织及其分泌的抗体组成,能抵御病原微生物入侵。由肠道上皮细胞和紧密连接(tight junction, TJ)等结构形成的机械屏障,能将机体与外界环境分隔,有效的阻挡大分子及有害物质进入。TJ 的完整性是肠道通透性保持健康状态的关键所在。化学屏障主要由肠道黏膜绒毛下侧的隐窝组织分泌的黏液、酶以及消化液构成,能消灭外来病原微生物^[3]。生物屏障即肠道菌群,肠道菌群一直处于动态变化的状态,在免疫和营养吸收等方面发挥无可取代的作用^[3]。

1.2 肠道菌群

肠道菌群作为肠道屏障的特殊部分,组成复杂且数量庞大,包含 1000 多种细菌,多达 100 万亿个细胞。肠道中 99% 微生物是厌氧菌,随着人类一起进化至今。肠道内存在共生菌和条件性致病菌,共生菌与宿主保持着共生关系,两者互惠互利,并且抑制条件性致病菌繁殖。肠道菌群的组成主要包括厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门、梭杆菌门、变形菌门、疣微菌门、蓝藻菌门,其中厚壁菌门和拟杆菌门占 92% 以上^[4]。

1.3 肠道菌群与肠道屏障的互作

正常情况下,生物屏障中有益菌和有害菌保持稳态,并以争夺营养的方式对外来病原体起到拮抗作用,阻止致病菌定植^[5]。肠道菌群是肠道屏障最初的关卡,坚守生物屏障这道关卡有利于维持肠道

其他屏障结构功能完整性,防止致病菌及其有害物质入侵。

1.3.1 肠道菌群影响机械屏障

在细菌与细菌之间、菌群与肠道上皮细胞之间存在粘附现象,形成占位性保护对机械屏障有协助和加强作用^[6]。肠道菌群组成的改变直接影响菌群相关产物的变化,并且通过各个途径影响屏障结构。例如,当革兰阴性杆菌丰度增加,细菌膜表面的主要毒力因子 LPS 随之增加。LPS 能降低空肠跨上皮电阻,使机械屏障 TJ 相关蛋白 claudin-1、occludin 和闭锁连接蛋白(zona occludens 1, ZO-1)的表达降低,导致肠道通透性增加(表 1,图 1)^[7]。同时,LPS 具有交感神经兴奋作用,引起肠黏膜血管收缩供血、供氧缺乏,并且使肠上皮细胞代谢紊乱,进一步导致肠道机械屏障功能受损。随着肠道通透性增加,肠道内的 LPS 更易进入机体,而后会被 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)识别激活核转录因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)引起免疫反应,增加单核巨噬细胞表达,促进凝血因子、炎症因子、氧自由基释放,并下调 TJ 蛋白使肠道通透性增加的情况进一步恶化,最终导致更多 LPS 入侵机体,形成恶性循环(图 1)^[3,8]。同样的,部分菌群产生的三甲胺(trimethylamine, TMA)在肝被黄素单氧酶 3(flavin monooxygenase, FMO3)氧化为氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO),TMAO 也会引起机体炎症反应,降低 TJ 蛋白表达量(图 1)^[9]。与之相反,双歧杆菌等益生菌能将难以消化的膳食纤维和抗性淀粉分解成 SCFAs,如乙酸、丙酸和丁酸,是肠道微生物区系以及肠道上皮细胞的重要碳能源,也是肠黏膜屏障的保护剂,能通过腺苷酸激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)来调节 TJ 的组装,增强肠道屏障(表 2,图 1)^[10-11]。

1.3.2 肠道菌群影响化学屏障

肠道上皮存在多种分泌细胞,肠腔中的粘液主要由杯状细胞分泌,潘氏细胞位于肠隐窝底部分泌抗菌肽、溶菌酶和磷脂酶等,可以阻止致病菌附着在上皮细胞边界并具有杀菌作用。粘蛋白 2(Mucin 2, MUC2)是粘液层的主要组成部分,有部分共生菌喜好定植在外层粘液层,这可能与它们能利用 MUC2 为自身生长功能有关,而内层粘液层与上皮细胞贴合且较为致密起到抵抗致病菌等作用^[12-13]。例如嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*Akkermansia muciniphila*, Akk)具有很强的分解黏蛋白的能力能在黏蛋白上生长,

并且能产生乙酸盐和丙酸盐。*Akk* 本身能增加杯状细胞以及抗菌肽的数量,同时产生的 SCFAs 能够刺激 MUC2 基因的表达和肠道粘蛋白的释放(表 2,图 1)^[14]。在小鼠模型中发现,结肠粘液的粘度由近端向远端增加,而这恰恰限制了细菌的运动,赋予细菌种群的空间结构分布^[15]。另外,BAs 作为化学屏障主要成分之一,能破坏有害细菌细胞膜起到抑菌作用^[16]。

1.3.3 肠道菌群影响免疫屏障

在免疫屏障中,微皱褶细胞也可称为 M 细胞,能摄取并转运肠腔内 LPS 等抗原,从而激活派尔集合淋巴结中的树突状细胞(dendritic cell, DC),后者能有效帮助幼稚 CD₄⁺ T 细胞分化为调节性 T 细胞(T regulatory cell, Treg),分泌白介素-10(interleukin-10, IL-10)等进一步诱导产生免疫球蛋白 A(immunoglobulin A, IgA)结合病原体特异性受体使其凝集困于黏液中,并中和毒素和病原体,阻止它们直接接触上皮细胞^[17]。SCFAs 通过刺激巨噬细胞和 DC 来促进 IL-10 的分泌。另外,肠道共生菌与病原体的种群密度或与其相关的内源性分子共同决定肠道中 IgA 的分泌。例如,梭状芽胞杆菌和脆弱拟杆菌的内源性多糖 A 和 SCFAs 促进杯状细胞分泌的粘蛋白,均可激活 Treg 细胞介导的抗炎反应,以加强免疫屏障功能^[18]。肠杆菌科和相关肠道致病菌株的丰度增加相当于病原体的爆发,破坏免疫系统耐受性并激活促炎反应^[19]。近期研究发现乳杆菌株具有抗菌活性,并通过增加小鼠体内的分泌型 IgA 来增强黏膜免疫力^[20]。

2 肠道菌群与肠道屏障互作对 AS 的影响

肠道保持稳态与肠黏膜屏障、内环境及其代谢产物等因素有关,在肠道稳态被破坏的情况下菌群结构相继发生变化,肠道菌群及其代谢产物能影响各个层次肠道屏障。此时肠腔内的益生菌减少,致病菌大量增殖,遵循肠道渗漏概念,肠道屏障功能受损导致细菌产物易位进入宿主循环,这可能导致促炎状态,进一步增加肠道通透性,造成恶性循环^[21]。相反,有益菌能抑制致病菌繁殖,可通过提高 TJ 蛋白含量、促使上皮细胞增殖分化、促进粘液和抗炎因子产生来维持肠道菌群稳态、肠道屏障完整、炎症水平稳定,有利于降低 AS 及其危险因素等疾病的危险性^[2]。

2.1 影响 AS 危险因素

AS 逐渐被认为是一种慢性炎症性疾病,在 AS 疾病的发生发展中炎症免疫反应参与全过程,促进疾病进程、血栓形成以及斑块不稳定性。另外,氧化应激和脂质代谢受各种危险因素影响,影响 AS 斑块发生直至破裂,与血管内皮损伤、粘附分子表达等机制有关,促使单核细胞粘附血管内皮,发展为巨噬细胞并吞噬脂质转为泡沫细胞参与 AS 斑块形成^[22]。高血脂、肥胖、高血压、高血糖、胰岛素抵抗、高尿酸等慢性代谢类疾病是近些年困扰人们健康的重要危险因素,也是增加心血管突发事件的元凶,并与 AS 联系密切,均存在慢性低度炎症、氧化应激等现象。随着对各疾病的深入研究,不断有文献报道肠道菌群在 AS 危险因素疾病中扮演着关键角色(表 1)。

2.1.1 影响高脂血症

高脂血症是脂质代谢紊乱所引起的疾病,不仅是 AS 的病理基础之一,也是众多 CVD 高危因素。高脂血症的肠道菌群改变表现为链球菌、产气肠杆菌、瘤胃球菌、脱硫弧菌增加,双歧杆菌属、普拉梭菌、*Akk* 等产 SCFAs 菌减少、LPS 增加^[23]。在高脂饮食条件下,肠道中 LPS 能伪装成磷脂参与组装乳糜微粒脂蛋白进入机体,并且参与毛细血管内皮的脂蛋白胞吞作用,进入各个组织(表 1)^[24]。

SCFAs 能保护肠道屏障,并通过 G 蛋白偶联受体 43(G protein-coupled receptor 43, GPR43)和 GPR41 促进糖脂代谢。相应受体能刺激胰高血糖素样肽-1(glucagon peptide-1, GLP-1)和胃肠肽类激素酪酪肽(peptide YY, PYY)分泌,进而增加瘦素释放,瘦素和各类肽能增加饱腹感、控制饮食,从而减少高脂血症的发生(表 1,图 1)^[25]。因此,肠道菌群紊乱导致 SCFAs 产生减少、LPS 增加,不利于脂肪分解以及肠道屏障完整性的维持。

正常情况下,双歧杆菌、乳杆菌可使初级 BAs 转化为石胆酸和脱氧胆酸等次级 BAs,若肠道菌群失调则导致 BAs 代谢改变,影响胆汁酸的解偶联、转化和脱硫作用进一步破坏肠道稳态和通透性,还会使次级 BAs 合成减少导致其受体法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)活化被抑制,对肠上皮炎症、脂质稳态产生负面影响^[26]。肠道菌群不仅参与了次级 BAs 代谢,而且可抑制肝 BAs 合成^[27]。另外,BAs 在脂代谢方面发挥着至关重要的作用,有利于胆固醇代谢,FXR 可以抑制脂肪生成、增加脂

解作用(表 1,图 1)^[28]。

2.1.2 影响高血糖

高血糖症往往伴随高脂血症一起出现,同样对 AS 产生影响,且长期的高血糖症还会发展为糖尿病,另外随着年龄增长 AS 患者的高血糖生物标志物也呈上升趋势^[29]。LPS 是胰岛素抵抗的触发因素之一,还能增加促炎因子、损害胰腺 β 细胞功能,提高患糖尿病风险(表 1)^[30]。另外,TMAO 能通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路加剧高血糖病症和胰岛素抵抗(表 1)^[9,31]。

双歧杆菌等益生菌可增加糖原合成并降低肝糖异生相关基因的表达,其产物 SCFAs 能保护 β 细胞,刺激胰岛素分泌促进血糖稳态^[32-33]。*Akk* 被认为是一种很有前途的益生菌,是治疗肥胖和糖尿病的候选物。*Akk* 不仅可以改善葡萄糖耐量和胰岛素敏感性,还强效抑制相关酶活性,有效的阻止碳水化合物化合物的分解,有利于降低餐后的血糖水平^[33-34]。BAs 已被证实是葡萄糖代谢的重要调节物,有助于建立糖尿病的血糖控制,下游受体 FXR 能提高葡萄糖耐量和胰岛素敏感性,并刺激胰腺 β 细胞产生胰岛素(表 1,图 1)^[35]。

2.1.3 影响高血压

高血脂和高血糖是高血压的诱发因素,三种疾病互存的情况十分常见,能共同促进 AS。菌群改变使 LPS 升高,引发心率增加、去甲肾上腺素水平增加、压力反射敏感性降低等现象,还具有促炎、交感神经激活、促进神经炎症作用,以上反应均与高血压发病机制有关(表 1)^[36]。

SCFAs 能激活 GPR 和嗅觉相应受体增加肾素释放促进血压升高,然而由于 SCFAs 具有舒张血管作用,因此血压在各因素共同作用下保持相对稳定(表 1)^[37]。丁酸经相应受体作用与迷走神经能发挥一定的降压效果^[36]。最新研究证实 TMAO 能通过激活蛋白激酶 R 样内质网激酶以及下游活性氧(ROS)等相关通路来实现收缩小动脉,并使血压对 Ang II 反应敏感并降低肾小球滤过率,从而增强 Ang II 诱导的血管收缩,且 TMAO 能延长 Ang II 对高血压的作用(表 1)^[38-39]。

2.1.4 影响高尿酸

高尿酸与前三者一样均是 AS 的独立危险因素且相互关联,能加速 AS 进程。在 AS 斑块中存在较高的尿酸,推断尿酸对 AS 存在直接作用。机体尿酸过高可形成尿酸盐结晶直接损伤血管内皮,引起

炎症和氧化应激,刺激平滑肌细胞增殖、血小板聚集,促进 AS^[40]。高尿酸患者的肠道菌群中双歧杆菌、乳酸杆菌等细菌分泌的活性蛋白酶、转运酶以及 SCFA 减少,嘌呤分解代谢和转运降低,利于尿酸形成(表 1)^[41]。

高尿酸极易导致痛风、肾病的机制与 LPS 有关。LPS 诱导的 TLR 相关炎症反应不仅增加肠道通透性,肾通透性也增加,为肠源性 LPS 损害肾提供可能^[42]。近期研究发现,可溶性尿酸可以增加 ROS 的释放,使线粒体膜电位去极化,激活 NLRP3 炎症小体和 NF- κ B 信号,进一步导致 TJ 蛋白对肠屏障功能产生不良影响^[43]。此外,部分革兰阴性变形菌在高尿酸血症中丰度较高^[44]。进一步的研究发现, LPS 和尿酸生成关键酶黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD) 以及尿酸呈正相关(表 1)^[45]。然而,高尿酸和肠道菌群的相互作用机制还需要进一步探讨。

2.2 影响 AS 的发生发展

目前,在 AS 斑块中的研究发现来自口腔和肠道的五十多种细菌,如链球菌、假单胞菌肺炎支原体、幽门螺旋杆菌和、牙周病原菌,可见细菌可以通过某些途径进入定植于 AS 斑块并影响其稳定性^[47]。实验动物和人群的肠道菌群 16sRNA、宏基因组等测序结果显示,AS 患者以及高血脂、高血压、高血糖、高尿酸疾病患者的肠道菌群组成与正常状态相比存在明显差异,厚壁菌门和拟杆菌门的比值(F/B)显著增加且菌群多样性降低^[48]。AS 患者肠道菌群在门水平主要表现为厚壁菌门丰度增加以及拟杆菌门丰度减少,F/B 比值增加^[36](表 2)。

肠道菌群在 AS 及其危险因素疾病中,各菌门菌属的变化趋势相似程度较大。表现为双歧杆菌属、罗斯氏菌、普拉梭菌以及 *Akk* 等益生菌丰度的降低,而克雷伯氏菌、埃希氏菌、产气肠杆菌、脱硫弧菌等条件致病菌丰度升高,另外,瘤胃球菌作为肠道优势菌群在 AS 及其危险因素疾病中也表现为明显升高趋势(表 2)^[49-50]。这说明了肠道菌群的改变确与疾病的发生发展密切相关,也进一步说明了 AS 与危险因素在肠道菌群方面存在一定联系。例如,AS 以及其危险因素类疾病研究中均有报道 LPS 水平在循环系统中升高,且 LPS 与 TMAO 一样对机体最严重的影响是激活 NF- κ B 等炎症反应、氧化应激,进一步导致肠道通透性增加的恶性循环(表 2)^[51-52]。

表 1 肠道菌群对 AS 危险因素的影响

Table 1 Effects of intestinal flora on risk factors of AS

疾病 Disease	菌门 Phylum	菌属 Genus	影响疾病 Effects on disease
高血脂 Hyperlipidemia	厚壁菌门 ↑	链球菌属 ↑、产气肠杆菌属 ↑	产 SCFAs 菌 ↓ 不利于调节脂肪组织分解、瘦素分泌以及抑制食欲 ^[25] 。 LPS 增加乳糜微粒脂蛋白进入机体 ^[24] 。 双歧杆菌 ↓ 降低 BAs 转化, 不利于脂质代谢 ^[28] 。 The decrease of SCFAs producing bacteria is not conducive to the regulation of adipose tissue decomposition, leptin secretion and appetite suppression ^[25] . LPS increases the entry of chylomicron lipoprotein into the body ^[24] . <i>Bifidobacterium</i> reduction reduces BAs transformation, which is not conducive to lipid metabolism ^[28] .
	拟杆菌门 ↓	脱硫弧菌属 ↑、双歧杆菌属 ↓	
	变形菌门 ↑	瘤胃球菌属 ↑、普拉梭菌属 ↓	
	疣微菌门 ↓	嗜黏蛋白阿克曼菌属 ↓	
	<i>Firmicutes</i> ↑	<i>Streptococcus</i> ↑	
高血糖 Hyperglycemia	<i>Bacteroidetes</i> ↓	<i>Enterobacter aerogenes</i> ↑	产 SCFAs 菌 ↓ 不利于提高胰岛素分泌和敏感性, 并降低葡萄糖耐受性。 BAs 减少, 其下游受体 FXR 能促进葡萄糖耐量和胰岛素敏感性 ^[35] 。 产 LPS 菌 ↑ 胰岛炎症使 β 凋亡, 胰岛素分泌不足, 并引发胰岛素抵抗 ^[46] 。 TMAO 通过 PI3K/Akt 信号通路加剧高血糖和胰岛素抵抗 ^[9,31] 。 The decrease of SCFAs producing bacteria was not conducive to the improvement of insulin secretion and sensitivity, and decreased glucose tolerance. BAs transformation decreased and its downstream receptor FXR promoted glucose tolerance and insulin sensitivity ^[35] . Lps-producing bacteria increase islet inflammation, leading to β apoptosis, insufficient insulin secretion, and insulin resistance ^[46] . TMAO exacerbates hyperglycemia and insulin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway ^[9,31] .
	<i>Proteobacteria</i> ↑	<i>Desulfovibrio</i> ↑, <i>Bifidobacterium</i> ↓	
	<i>Verrucomicrobia</i> ↓	<i>Ruminococcus</i> ↑, <i>F. prausnitzii</i> ↓	
		<i>Akk</i> ↓	
		柯林斯氏菌 ↑、脱硫弧菌属 ↑	
高血压 Hypertension	厚壁菌门 ↓	瘤胃球菌属 ↑、双歧杆菌属 ↓	LPS 会造成心率增加、去甲肾上腺素水平增加、压力反射敏感性降低等, 还具有促炎、交感神经激活、神经炎症作用, 均与高血压发病机制有关 ^[36] 。 TMAO 增强 Ang II 诱导的血管收缩, 持续高血压过程 ^[38-39] 。 SCFAs 具有舒张血管作用 ^[37] 。 LPS can increase heart rate, increase the level of norepinephrine, decrease the sensitivity of pressure reflex, and also have pro-inflammatory, sympathetic nerve activation and neuroinflammation effects, all of which are related to the pathogenesis of hypertension ^[36] . TMAO enhances Ang II induced vasoconstriction and continues the hypertension process ^[38-39] . SCFAs have vasodilatory effects ^[37] .
	拟杆菌门 ↑	罗斯氏菌 ↓、拟杆菌属 ↓	
	变形菌门 ↓	嗜黏蛋白阿克曼菌 ↓	
	<i>Firmicutes</i> ↑	普雷沃氏菌属 ↓	
	<i>Bacteroidetes</i> ↓	<i>Collinsella</i> ↑, <i>Desulfovibrio</i> ↑	
高尿酸 Hyperuricemia	<i>Proteobacteria</i> ↓	<i>Ruminococcus</i> ↑	双歧杆菌、乳酸杆菌等细菌能分泌活性蛋白酶、转运酶、SCFAs, 参与嘌呤分解代谢和转运, LPS 和尿酸生成关键酶以及尿酸呈正相关 ^[41,45] 。 Bacteria such as <i>Bifidobacterium</i> and <i>Lactobacillus</i> can secrete active protease, transporter and SCFAs, and participate in purine catabolism and transport. LPS is positively correlated with key enzyme of uric acid production and uric acid ^[41,45] .
		<i>Bifidobacterium</i> ↓	
		<i>Roseburia</i> ↓	
		<i>Bacteroides</i> ↓	
		<i>Akk</i> ↓, <i>Prevotella</i> ↓	
	厚壁菌门 ↑	链球菌属 ↑、克雷伯氏菌属 ↑	
	拟杆菌门 ↓	脱硫弧菌属 ↑、瘤胃球菌属 ↑	
	变形菌门 ↓	柯林斯氏菌 ↑、粪杆菌属 ↓	
	<i>Firmicutes</i> ↑	罗斯氏菌 ↓、普拉梭菌 ↓	
	<i>Bacteroidetes</i> ↓	双歧杆菌属 ↓、真杆菌属 ↓	
	<i>Proteobacteria</i> ↓	嗜黏蛋白阿克曼菌 ↓	
		普雷沃氏菌属 ↑	
		<i>Streptococcus</i> ↑, <i>Klebsiella</i> ↑	
		<i>Desulfovibrio</i> ↑, <i>Ruminococcus</i> ↑	
		<i>Collinsella</i> ↑, <i>Faecalibacterium</i> ↓	
		<i>Roseburia</i> ↓, <i>F. prausnitzii</i> ↓	
		<i>Bifidobacterium</i> ↓, <i>Eubacterium</i> ↓	
		<i>Akk</i> ↓, <i>Prevotella</i> ↓	
		拟杆菌属 ↑、狄氏副拟杆菌 ↑	
		双歧杆菌属 ↓、乳酸杆菌 ↓	
	厚壁菌门 ↓	普拉梭菌 ↓	
	拟杆菌门 ↑		
	<i>Firmicutes</i> ↓	<i>Bacteroides</i> ↑, <i>Parabacteroides</i> ↑	
	<i>Bacteroidetes</i> ↑	<i>Bifidobacterium</i> ↓, <i>Lactobacillus</i> ↓	
		<i>F. prausnitzii</i> ↓	

注: “↑”表示菌群丰度增加; “↓”表示菌群丰度降低。
Note. “↑”represents increased abundance of flora. “↓”represents decreased abundance of flora.

TMAO 不仅参与炎症反应、氧化应激、糖代谢, 还参与胆固醇和胆汁酸代谢、泡沫细胞形成以及血小板活化。最近 Cai 等^[53]通过宏基因组等手段发现, 在 AS 患者肠道中有两种细菌显著高于健康人群, 它们含有最丰富的 CutC 同源序列, CutC 是 TMA 裂解酶基因负责与胆碱相关的 TMA 转化, 后续小鼠实验发现血清 TMAO 水平显著升高会导致斑块明显堆积。原因是 TMAO 能下调胆汁酸合成酶胆固

醇 7α-羟化酶 (cholesterol 7α-hydroxylase, CYP7A1) 的表达, 造成胆固醇转运障碍、细胞内脂质堆积 (图 1)^[54]。且巨噬细胞胆固醇反向转运的关键途径可以被 TMAO 抑制, 事实上, FMO3 作为 TMAO 合成酶在胆固醇代谢和反向胆固醇转运的调节方面发挥着强大作用^[55]。另外, TMAO 还能导致血小板过度活化来增加血栓形成^[56]。由此可见, TMAO 不仅影响 AS 的斑块形成还影响斑块稳定性。

同样在脂代谢方面发挥作用的还有 BAs, 除在糖脂代谢等方面发挥有益作用外, BAs 还通过 FXR 等受体抑制 NF- κ B 的促炎反应, 并且 FXR 能在转录水平诱导一氧化氮合酶表达, 增加血管扩张剂一氧化氮的产生达到扩充血管的作用^[57-58]。另外, FXR 能诱导 MUC2 表达, 且 NF- κ B 也参与其中^[59]。SCFAs 不仅能抑制 NF- κ B 活化, 还能通过激活 GPR43 等受体从而诱导 Treg 细胞, 并由 Treg 和 DC 产生 IL-10 等抗炎细胞因子^[60]。而且高浓度 SCFAs 可以降低结肠肠腔中的 pH 值, 抑制潜在病原体生

长, 并促进有益细菌例如乳酸杆菌和双歧杆菌的生长, 从而影响微生物群落, 降低心血管疾病的风险^[23]。无论在 AS 或者其危险因素中, 炎症、氧化应激对疾病的影响都处于重要地位, SCFAs 的有益作用表现为有助于维稳肠道菌群、修复肠道通透性、改善炎症以及氧化应激。Yuan 等^[61]研究了 SCFAs 对 NLRP3 炎症小体的形成和激活的影响, 结果显示丁酸盐能阻断含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1 (caspase-1) 的活化, caspase-1 活化被抑制可减少 IL-1 β 等炎症因子, 对血管损伤有保护作用(表 2)。

表 2 肠道菌群对 AS 的影响
Table 2 Effects of intestinal flora on AS

菌门 Phylum	菌属 Genus	对 AS 影响 Impact on the AS
厚壁菌门 ↑ Firmicutes ↑	瘤胃球菌属 ↑、乳杆菌属 ↑	链球菌 ↑ 炎症因子表达增加, 产生活性氧、激活 NLRP3 炎症小体和血小板, 促进泡沫细胞形成, 促使 AS 斑块形成堆积, 影响斑块不稳定性 ^[62] 。 普拉梭菌、真杆菌 ↓ 产 SCFAs 减少, 抗炎、抗氧化作用减弱, 修复肠道屏障能力降低, 无法抑制 NLRP3 形成 ^[60] 。 The increase of <i>Streptococcus</i> leads to increased expression of inflammatory factors, production of reactive oxygen species, activation of NLRP3 inflammasome and platelets, and promotion of foam cell formation, accumulation of AS plaques, affecting plaque instability ^[62] . The decrease of <i>F. prausnitzii</i> and <i>Eubacterium</i> reduced SCFAs production, which weakened the anti-inflammatory and antioxidant effects, reduced the ability to repair the intestinal barrier, and could not inhibit NLRP3 formation ^[60] .
	链球菌属 ↑、罗斯氏菌 ↓	
	乳杆菌属 ↓、气球菌科 ↓	
	真杆菌属 ↓、粪杆菌属 ↓	
	普拉梭菌属 ↓	
	<i>Ruminococcus</i> ↑	
	<i>Lactobacillaceae</i> ↑	
	<i>Streptococcus</i> ↑	
	<i>Roseburia</i> ↓, <i>Lactococcus</i> ↓	
	<i>Aerococcaceae</i> ↓	
拟杆菌门 ↓ Bacteroidetes ↓	<i>Eubacterium</i> ↓	普雷沃氏菌、拟杆菌 ↓ 产 SCFAs 减少, 降低生物转化降解胆酸作用, 影响脂质代谢泡沫细胞形成。普雷沃氏菌与 LPS 以及炎症呈负相关 ^[60] 。 The decrease of <i>Prevotella</i> and <i>Bacteroidetes</i> reduced SCFAs production, which reduced the biotransformation of cholic acid degradation, and affected the formation of lipid metabolism foam cells. <i>Prevotella</i> was negatively correlated with LPS and inflammation ^[60] .
	<i>Faecalibacterium</i> ↓	
	<i>F. prausnitzii</i> ↓	
	拟杆菌属 ↓	
放线菌门 ↑ Actinobacteria ↑	普雷沃氏菌属 ↓	柯林斯氏菌 ↑ 增加炎症水平以及肠道通透性。诱导趋化因子产生以及中性粒细胞募集, 促使斑块形成 ^[63] 。双歧杆菌 ↓ 减少胆汁酸水解酶以及次级 BAs 的产生, 增加炎症反应和肠道通透性 ^[60] 。 Increased numbers of <i>Collinsella</i> bacteria lead to increased levels of inflammation as well as increased intestinal permeability. Chemokine production and neutrophil recruitment promote plaque formation ^[63] . The reduction of <i>Bifidobacterium</i> resulted in the reduction of bile acid hydrolase and secondary BAs production, and increased inflammatory response and intestinal permeability ^[60] .
	<i>Bacteroides</i> ↓	
	<i>Prevotella</i> ↓	
	柯林斯氏菌 ↑	
	伊格尔兹氏菌属 ↑	
	双歧杆菌属 ↓	
变形菌门 ↓ Proteobacteria ↓	<i>Collinsella</i> ↑	产气肠杆菌、脱硫弧菌属、肺炎克雷伯氏 ↑ 增加 TMA 的产生, 引起炎症因子表达, LPS 升高 ^[9,31] 。 The increase of <i>E. aerogenes</i> , <i>Desulfovibrio</i> and <i>Klebsiella pneumonia</i> promotes the production of TMA, causes the expression of inflammatory factors and increases LPS ^[9,31] . Elevated <i>Desulfovibrio</i> can decompose SCFAs and produce H ₂ S, which is toxic to the intestinal epithelium and triggers inflammation ^[64] .
	<i>Eggerthella</i> ↑	
	<i>Bifidobacterium</i> ↓	
	克雷伯氏菌属 ↑	
	埃希氏菌属 ↑	
	产气肠杆菌 ↑	
	脱硫弧菌属 ↑	
疣微菌门 ↓ Verrucomicrobia ↓	<i>Klebsiella</i> ↑	Akk ↓ 产 SCFAs 能力以及肠道屏障保护能力降低, 不利于降低血液 LPS 水平。细胞间粘附分子的表达增加, 促炎细胞因子和巨噬细胞浸润的作用增加, AS 斑块增加 ^[65] 。 The decrease of <i>Akk</i> reduces the ability of SCFAs production and intestinal barrier protection, which is not conducive to reducing blood LPS levels. The expression of intercellular adhesion molecules increased, the role of pro-inflammatory cytokines and macrophage infiltration increased, and AS plaques increased ^[65] .
	<i>Escherichia</i> ↑	
	<i>E. aerogenes</i> ↑	
	<i>Desulfovibrio</i> ↑	
嗜黏蛋白阿克曼菌属 ↓ <i>Akk</i> ↓	嗜黏蛋白阿克曼菌属 ↓	
	<i>Akk</i> ↓	

注: “↑”表示菌群丰度增加; “↓”表示菌群丰度降低。

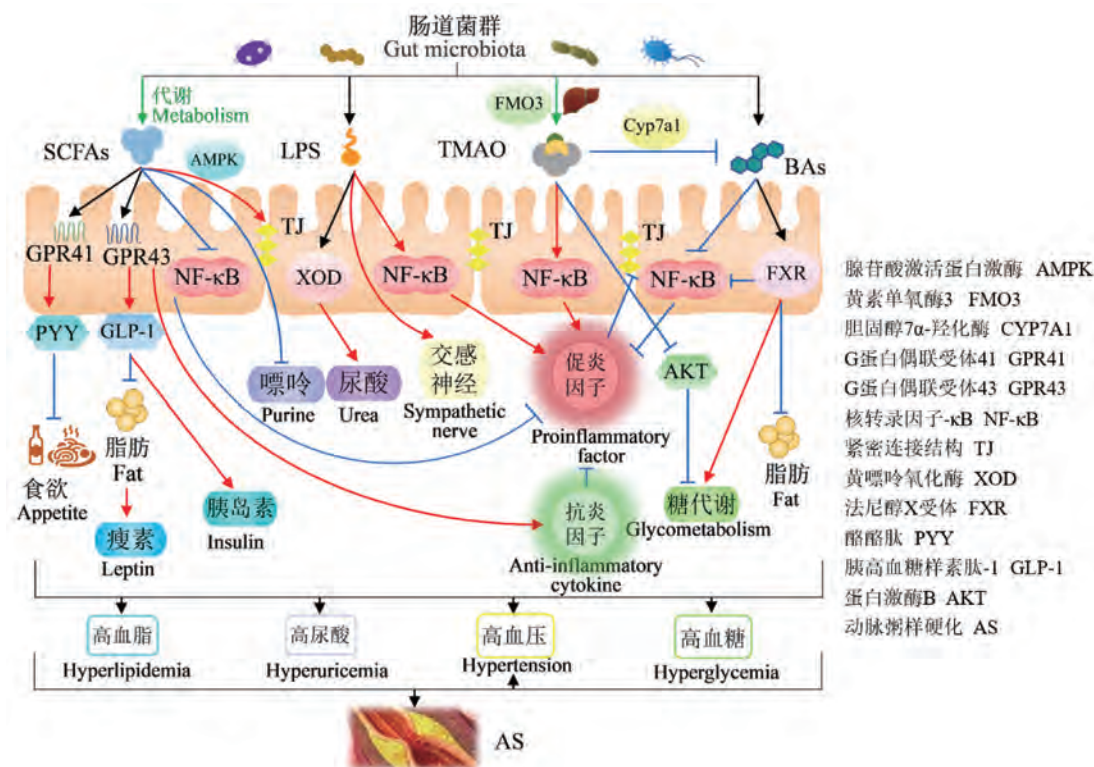
Note. “↑”represents increased abundance of flora. “↓”represents decreased abundance of flora.

3 结语

综上所述,AS 以及高血脂、高血糖、高血压、高尿酸等相关疾病存在菌群紊乱的现象,例如革兰阴性细菌和产 TMAO 菌增加,而产 SCFAs、BAs 的益生菌减少,相应的菌群相关产物 LPS、TMAO 增加,SCFAs、BAs 减少,导致菌群占位性保护减弱、TJ 蛋白降低、粘液层减少以及炎症等反应,使肠道屏障受损、肠道通透性增加,大量有害物质进入机体,并进一步促使肠道菌群紊乱。有害物质进入机体后影响炎症反应、氧化应激、脂质代谢、血糖代谢、血

栓形成等机制,促进高血脂、高血糖、高血压、高尿酸以及 AS 的发生发展。由此可见,肠道菌群相关产物作为桥梁在各个机制中影响疾病发生发展,AS 与其危险因素互为因果、相互促进(图 1)。因此,通过改善肠道状态来治疗 AS 以及相关疾病或可成为新型治疗手段。

目前已知益生菌对机体有利,但其具体作用机制有待进一步探究,例如 *Akk* 可通过促进 SCFAs 增加来调节人体的能量代谢、葡萄糖耐量、免疫系统等功能,但涉及的分子机制尚未确定。最近 Yoon 等^[66]研究发现,*Akk* 能分泌一种 84×10^3 大小,名



注:红色箭头表示促进作用;绿色箭头表示代谢产生;蓝色表示抑制作用。肠道菌群代谢产物 SCFAs 通过激活 GPR41、GPR43 分别起到抑制食欲、脂肪形成以及促进瘦素和胰岛素分泌的作用;GPR41、GPR43 还能促进抗炎因子分泌;另外,SCFAs 能抑制嘌呤的形成,保护 TJ 结构;并通过抑制 NF-κB 减少促炎因子分泌。LPS 能通过 XOD 促进尿酸形成,激活交感神经以及 NF-κB,促进促炎因子分泌,而炎症反应会破坏 TJ 结构。肝代谢产生的 TMAO 以同样方式引发炎症反应,并通过抑制 AKT 通路阻碍糖代谢;TMAO 还通过 CYP7A1 抑制 BAs 形成。BAs 能通过 FXR 等途径抑制促炎因子分泌、脂肪形成并促进糖代谢。

图 1 肠道菌群与 AS 以及危险因素的关系

Note. The red arrow indicates the promoting effect; green arrow indicates metabolic production; blue indicates inhibition. SCFAs, a metabolite of intestinal flora, can inhibit appetite and fat formation and promote leptin and insulin secretion by activating GPR41 and GPR43, respectively; GPR41 and GPR43 can also promote the secretion of anti-inflammatory factors; In addition, SCFAs can inhibit purine formation and protect TJ structure; and SCFAs can also reduce proinflammatory factor secretion by inhibiting NF-κB. LPS can promote uric acid formation through XOD, activate sympathetic nerve and NF-κB to promote the secretion of proinflammatory factors, while inflammatory reaction will destroy TJ structure. TMAO produced by liver metabolism triggers inflammatory reaction in the same way, and hinders sugar metabolism by inhibiting AKT pathway; TMAO also inhibits BAs formation through CYP7A1. BAs can inhibit the secretion of proinflammatory factors, fat formation and promote glucose metabolism through FXR and other ways.

Figure 1 Relationship between intestinal flora and AS and risk factors

为 P9 的蛋白, P9 能诱导 GLP-1 分泌、褐色脂肪组织产热, 可改善小鼠的葡萄糖稳态和代谢疾病, 作者还发现 P9 与细胞间粘附分子 2 存在相互作用, 这在未来可能成为代谢疾病治疗的新靶点。

事实上, 肠道菌群相关代谢产物的产生机制尚不明确, 如细菌是如何利用膳食纤维产生 SCFAs 的。最新研究证实肠道菌群能产生新的微生物结合型 BAs, 这种有微生物介导形成的结合 BAs 其确切机制并不明了, 但可能对回肠受体或 BAs 转运蛋白的结合机制产生空间位阻^[16]。这类微生物结合型 BAs 还是强效的人类 FXR 激动剂, 并且当给予小鼠时, 负责肝中胆汁酸产生的 FXR 靶基因的表达降低^[67]。当然, 对于这种新发现 BAs 仍需要更多的研究来探索其对人类健康以及 FXR 相关疾病的潜在影响。

肠道菌群与肠道屏障互作可能还与多种疾病密切相关, 多项研究表明肠菌群在心血管疾病、代谢性疾病、神经退行性疾病、肠道疾病等多种疾病中有重要作用^[2, 68-71]。随着更加深入的研究, 通过调节肠道菌群稳态来改善肠道屏障以及肠道通透性来治疗相关疾病的策略越来越有吸引力。

参 考 文 献 (References)

- [1] Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(2): 79-87.
- [2] Witkowski M, Weeks TL, Hazen SL. Gut microbiota and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2020, 127(4): 553-570.
- [3] 尉浩斌, 张小丹, 李苏宜. 肠屏障功能损伤机制及其临床检测方法研究现状 [J]. *肿瘤代谢与营养电子杂志*, 2020, 7(4): 407-414.
Yu HB, Zhang XD, Li SY. Research status of the mechanism of intestinal barrier function injury and its clinical detection methods [J]. *Electron J Metab Nutr Cancer*, 2020, 7(4): 407-414.
- [4] Liu BN, Liu XT, Liang ZH, et al. Gut microbiota in obesity [J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(25): 3837-3850.
- [5] Coyne MJ, Comstock LE. Type VI secretion systems and the gut microbiota [J]. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(2): 10.
- [6] Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(8): 1-9.
- [7] Cao S, Zhang Q, Wang C, et al. LPS challenge increased intestinal permeability, disrupted mitochondrial function and triggered mitophagy of piglets [J]. *Innate Immun*, 2018, 24(4): 221-230.
- [8] 李嘉慧, 王欣佩, 冷静. TLR4/NF-κB 参与动脉粥样硬化发生发展机制的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 137-142.
- Li JH, Wang XP, Leng J. The mechanism of TLR4/NF-κB in atherosclerosis [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(4): 137-142.
- [9] Zeisel SH, Warrier M. Trimethylamine N-Oxide, the microbiome, and heart and kidney disease [J]. *Annu Rev Nutr*, 2017, 37: 157-181.
- [10] Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, et al. Corrigendum: short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1486.
- [11] Peng L, Li ZR, Green RS, et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers [J]. *J Nutr*, 2009, 139(9): 1619-1625.
- [12] Chen Z, Luo J, Li J, et al. Foxo1 controls gut homeostasis and commensalism by regulating mucus secretion [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(9): e20210324.
- [13] Yao D, Dai W, Dong M, et al. MUC₂ and related bacterial factors: Therapeutic targets for ulcerative colitis [J]. *EBioMedicine*, 2021, 74: 103751.
- [14] Fernández-Tomé S, Ortega Moreno L, Chaparro M, et al. Gut microbiota and dietary factors as modulators of the mucus layer in inflammatory bowel disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10224.
- [15] Fang J, Wang H, Zhou Y, et al. Slimy partners: the mucus barrier and gut microbiome in ulcerative colitis [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(5): 772-787.
- [16] Guzior DV, Quinn RA. Review: microbial transformations of human bile acids [J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 140.
- [17] Shi N, Li N, Duan X, et al. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system [J]. *Military Med Res*, 2017, 4(1): 14.
- [18] Wang L, Zhu L, Qin S. Gut microbiota modulation on intestinal mucosal adaptive immunity [J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 4735040.
- [19] Wu W, Sun M, Chen F, et al. Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43 [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(4): 946-56.
- [20] Ghoneum M, Abdulealek S. KDP, a *Lactobacilli* product from kimchi, enhances mucosal immunity by increasing secretory IgA in mice and exhibits antimicrobial activity [J]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 3936.
- [21] Kinashi Y, Hase K. Partners in leaky gut syndrome: intestinal dysbiosis and autoimmunity [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 673708.
- [22] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2021, 592(7855): 524-533.
- [23] Vourakis M, Mayer G, Rousseau G. The Role of gut microbiota on cholesterol metabolism in atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8074.

- [24] Hersoug LG, Møller P, Loft S. Role of microbiota-derived lipopolysaccharide in adipose tissue inflammation, adipocyte size and pyroptosis during obesity [J]. *Nutr Res Rev*, 2018, 31(2): 153–163.
- [25] Zhi C, Huang J, Wang J, et al. Connection between gut microbiome and the development of obesity [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019, 38(11): 1987–1998.
- [26] Pushpass RG, Alzoufari S, Jackson KG, et al. Circulating bile acids as a link between the gut microbiota and cardiovascular health: impact of prebiotics, probiotics and polyphenol-rich foods [J]. *Nutr Res Rev*, 2021, 30: 1–20.
- [27] Wahlström A, Kovatcheva-Datchary P, Stahlman M, et al. Induction of farnesoid X receptor signaling in germ-free mice colonized with a human microbiota [J]. *J Lipid Res*, 2017, 58(2): 412–419.
- [28] Shen C, Pan Z, Wu S, et al. Emodin palliates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice via activating the farnesoid X receptor pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114340.
- [29] Warren B, Rawlings AM, Lee AK, et al. Increases in biomarkers of hyperglycemia with age in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study [J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(8): e96–e97.
- [30] Han H, Li Y, Fang J, et al. Gut microbiota and type 1 diabetes [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 995.
- [31] Jie Z, Xia H, Zhong SL, et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 845.
- [32] McNabney SM, Henagan TM. Short chain fatty acids in the colon and peripheral tissues: a focus on butyrate, colon cancer, obesity and insulin resistance [J]. *Nutrients*, 2017, 9(12): 1348.
- [33] Gurung M, Li Z, You H, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51: 102590.
- [34] Zhang T, Li Q, Cheng L, et al. *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic [J]. *Microb Biotechnol*, 2019, 12(6): 1109–1125.
- [35] Ding L, Yang Q, Zhang E, et al. Notoginsenoside Ft1 acts as a TGR5 agonist but FXR antagonist to alleviate high fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(6): 1541–1554.
- [36] Verhaar BJH, Prodan A, Nieuwdorp M, et al. Gut microbiota in hypertension and atherosclerosis: a review [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 2982.
- [37] Kimura I, Inoue D, Maeda T, et al. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(19): 8030–8035.
- [38] Jiang S, Shui Y, Cui Y, et al. Gut microbiota dependent trimethylamine N-oxide aggravates angiotensin II-induced hypertension [J]. *Redox Biol*, 2021, 46: 102115.
- [39] Ufnal M, Jazwiec R, Dadlez M, et al. Trimethylamine-N-oxide; a carnitine-derived metabolite that prolongs the hypertensive effect of angiotensin II in rats [J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30(12): 1700–1705.
- [40] Zhao J, Chen H, Liu N, et al. Role of hyperhomocysteinemia and hyperuricemia in pathogenesis of atherosclerosis [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2017, 26(12): 2695–2699.
- [41] 纪泽敏. 基于临床病例筛选高尿酸血症相关的肠道菌群 [D]. 北京: 中央民族大学; 2020.
- Ji ZM. Screening intestinal flora associated with hyperuricemia based on clinical cases [D]. Beijing: Central University for Nationalities; 2020.
- [42] Huang W, Lan X, Li X, et al. Retraction notice to “Long non-coding RNA PVT1 promote LPS-induced septic acute kidney injury by regulating TNF α and JNK/NF- κ B pathways in HK-2 cells” [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107672.
- [43] Ma C, Yang X, Lv Q, et al. Soluble uric acid induces inflammation via TLR4/NLRP3 pathway in intestinal epithelial cells [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(6): 744–750.
- [44] Liu X, Lv Q, Ren H, et al. The altered gut microbiota of high-purine-induced hyperuricemia rats and its correlation with hyperuricemia [J]. *Peer J*, 2020, 8: e8664.
- [45] Guo Z, Zhang J, Wang Z, et al. Intestinal microbiota distinguish gout patients from healthy humans [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20602.
- [46] Salazar J, Angarita L, Morillo V, et al. Microbiota and diabetes mellitus: role of lipid mediators [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 3039.
- [47] Herrema H, Nieuwdorp M, Groen AK. Microbiome and cardiovascular disease [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2022, 270: 311–334.
- [48] Takagi T, Naito Y, Kashiwagi S, et al. Changes in the gut microbiota are associated with hypertension, hyperlipidemia, and type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 2996.
- [49] Kumar D, Mukherjee SS, Chakraborty R, et al. The emerging role of gut microbiota in cardiovascular diseases [J]. *Indian Heart J*, 2021, 73(3): 264–272.
- [50] de Vos WM, Tilg H, Van Hul M, et al. Gut microbiome and health: mechanistic insights [J]. *Gut*, 2022, 71(5): 1020–1032.
- [51] Shen X, Li L, Sun Z, et al. Gut microbiota and atherosclerosis-focusing on the plaque stability [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 668532.
- [52] Gorabi AM, Kiaie N, Khosrojerdi A, et al. Implications for the role of lipopolysaccharide in the development of atherosclerosis [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2021, 9: S1050–S1738.
- [53] Cai YY, Huang FQ, Lao X, et al. Integrated metagenomics identifies a crucial role for trimethylamine-producing *Lachnospirillum* in promoting atherosclerosis [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2022, 8(1): 11.
- [54] Ding L, Chang M, Guo Y, et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced atherosclerosis is associated with bile acid

- metabolism [J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1): 286.
- [55] Warrier M, Shih DM, Burrows AC, et al. The TMAO-generating enzyme flavin monooxygenase 3 is a central regulator of cholesterol balance [J]. *Cell Rep*, 2015, 10(3): 326–338.
- [56] Duttaroy AK. Role of gut microbiota and their metabolites on atherosclerosis, hypertension and human blood platelet function; a review [J]. *Nutrients*, 2021, 13(1): 144.
- [57] Gai Z, Visentin M, Gui T, et al. Effects of farnesoid X receptor activation on arachidonic acid metabolism, NF- κ B signaling, and hepatic inflammation [J]. *Mol Pharmacol*, 2018, 94(2): 802–811.
- [58] Li J, Wilson A, Kuruba R, et al. FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 77(1): 169–177.
- [59] Yu JH, Zheng JB, Qi J, et al. Bile acids promote gastric intestinal metaplasia by upregulating CDX2 and MUC₂ expression via the FXR/NF- κ B signalling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(3): 879–892.
- [60] van den Munckhof ICL, Kurilshikov A, ter Horst R, et al. Role of gut microbiota in chronic low-grade inflammation as potential driver for atherosclerotic cardiovascular disease; a systematic review of human studies [J]. *Obes Rev*, 2018, 19(12): 1719–1734.
- [61] Yuan X, Wang L, Bhat OM, et al. Differential effects of short chain fatty acids on endothelial Nlrp3 inflammasome activation and neointima formation; Antioxidant action of butyrate [J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 21–31.
- [62] Hashizume-Takizawa T, Yamaguchi Y, Kobayashi R, et al. Oral challenge with *Streptococcus sanguinis* induces aortic inflammation and accelerates atherosclerosis in spontaneously hyperlipidemic mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 520(3): 507–513.
- [63] 王淙玉. 高血压患者肠道菌群变化特点的研究 [D]. 西安: 西安医学院; 2020.
- Wang CY. Study on the characteristics of intestinal microflora change in hypertensive patients [D]. Xi'an: Xi'an Medical University; 2020.
- [64] Xie D, Zhang M, Wang B, et al. Differential analysis of hypertension-associated intestinal microbiota [J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(6): 872–881.
- [65] Li J, Lin S, Vanhoutte PM, et al. *Akkermansia muciniphila* protects against atherosclerosis by preventing metabolic endotoxemia-induced inflammation in Apoe^{-/-} mice [J]. *Circulation*, 2016, 133(24): 2434–2446.
- [66] Yoon HS, Cho CH, Yun MS, et al. *Akkermansia muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice [J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6(5): 563–573.
- [67] Quinn RA, Melnik AV, Vrbanc A, et al. Global chemical effects of the microbiome include new bile-acid conjugations [J]. *Nature*, 2020, 579(7797): 123–129.
- [68] Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(1): 55–71.
- [69] Qian XH, Song XX, Liu XL, et al. Inflammatory pathways in Alzheimer's disease mediated by gut microbiota [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 68: 101317.
- [70] Sampson TR, Debelius JW, Thron T, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease [J]. *Cell*, 2016, 167(6): 1469–1480.
- [71] Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(4): 223–237.

[收稿日期] 2022-05-11

王贝嘉, 刘刘钊, 郭洁, 等. 动物继承牙发育调控机制研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 983–988.
Wang BJ, Liu YZ, Guo J, et al. Research progress in the regulatory mechanism of animal successional tooth development [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 983–988.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.014

动物继承牙发育调控机制研究进展

王贝嘉¹, 刘刘钊², 郭洁¹, 李建营^{1*}

(1. 浙江省器官发育与再生技术研究重点实验室, 杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 311121;
2. 杭州师范大学附属医院口腔科, 杭州 310015)

【摘要】 牙齿的发育涉及口腔上皮和间充质之间的相互作用, 并通过复杂的调控网络来实现。牙齿发育调控分子的时空表达异常可能会导致牙齿发育起始和继承牙更替异常, 进而影响牙齿数量, 造成牙缺失和多生牙等。除了利用传统的小鼠模型, 近年来, 小型猪、猴子、雪貂等动物也越来越多的应用于牙齿发育研究。本文主要概述了脊椎动物继承牙发育的模型和分子调控网络, 以期系统地理解人类牙齿数量异常疾病的成因。

【关键词】 继承牙; 牙齿更替; 牙齿数量; 机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 07-0983-06

Research progress in the regulatory mechanism of animal successional tooth development

WANG Beijia¹, LIU Yizhao², GUO Jie¹, LI Jianying^{1*}

(1. Zhejiang Key Laboratory for Organogenesis and Regenerative Technology, College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China. 2. Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015)

Corresponding author: LI Jianying. E-mail: jianying_li@hznu.edu.cn

【Abstract】 Tooth development involves reciprocal interactions between oral epithelium and mesenchyme, and is achieved through complex regulatory networks. Abnormal spatiotemporal expression of the molecules involved in regulating tooth development may lead to abnormalities of tooth development initiation and successional tooth replacement, which in turn affect the number of teeth, resulting in tooth agenesis and hyperplasia. In addition to using traditional mouse models, in recent years, animals such as miniature pigs, monkeys, and ferrets have been increasingly used in tooth development research. Here, we summarize tooth development models and molecular regulatory networks of vertebrate successional teeth to systematically understand the causes of abnormalities of the tooth number in humans.

【Keywords】 successional tooth; tooth replacement; tooth number; mechanism

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

牙齿作为人体最坚硬的器官, 除了担负切咬、咀嚼的功能外, 还起到保持面部外形和辅助发音等作用。哺乳动物的牙向上皮 (dental epithelium, DE) 和牙间充质 (dental mesenchyme, DM) 之间高

度调控的相互作用, 产生了牙齿这一具有特定形状和大小的高度矿化的结构。Wnt、Bmp、Fgf、Shh 等多个信号通路在牙齿发育过程中都发挥着关键作用, 这些通路与其下游靶基因一起组成了复杂的分子

[基金项目] 浙江省自然科学基金 (LY21C120002)。

Funded by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY21C120002).

[作者简介] 王贝嘉 (1995—), 女, 硕士, 研究方向: 颌颌面器官发育与再生。Email: 100950202@qq.com

[通信作者] 李建营, 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 颌颌面器官发育与再生。Email: jianying_li@hznu.edu.cn

调控网络,该网络受到干扰会导致牙齿发育异常^[1-2]。对各类突变小鼠的分析表明,一些单基因突变就可以对牙齿的发育造成很强的影响(如 *Msx1*、*Pax9*、*Lef1*、*Pitx2* 等);而有些是同源基因组合突变的表型明显。比如,*Gli2*^{-/-} *Gli3*^{+/-} 突变小鼠缺乏上颌切牙,*Gli2*^{-/-} *Gli3*^{-/-} 小鼠缺失所有牙齿,*Dlx1*^{-/-} *Dlx2*^{-/-} 小鼠没有上颌磨牙^[3-4]。

牙齿数量异常是人类最常见的发育缺陷之一,主要包括牙缺失(tooth agenesis, TA)和多生牙(supernumerary teeth, ST)等,根据缺失数量不同,牙缺失又分为缺牙(hypodontia),少牙(oligodontia)和无牙(anodontia)^[5]。本文将主要论述与脊椎动物牙齿数量控制有关的,继承牙发育的细胞和分子调控机制。

1 继承牙(successional teeth)发育的模型

所有脊椎动物第一颗牙齿的发育都是从初级牙板(primary dental lamina, PDL)起始,而其它牙胚(继承牙)都起源于初级牙板的延伸(继发牙板, successional dental lamina, SDL),并与上一颗牙齿相关联^[6]。人类的继承牙形成有两种模式:(1)牙齿替换;(2)连续增加牙齿,但两者牙板延伸的方向和新牙形成的方向都是不同的^[5,7]。牙齿替换的启动是从舌侧的表皮性牙柄(dental stalk, DS)的继发牙板萌发开始的,然后继发牙板内陷入间充质^[8]。Wang 等^[9]以双牙列(diphyodont)的小型猪为例,研究了牙齿替换的过程。当乳牙第一磨牙(Dm1)处于钟状后期时,第二前磨牙(P2)的继发牙板起始发育。第三(P3)、四(P4)前磨牙的发育与 P2 类似,而连续增加的牙齿起源于连续性牙板(continual lamina, CL)的水平方向和向后部的延伸。此外,在牙齿形态发生过程中,乳牙胚通过齿间板(interdental lamina, IL)相互连接^[5],而在小鼠牙齿发育过程中不存在齿间板,小鼠第二(M2)、三(M3)磨牙在第一磨牙(M1)到达钟状期后才开始发育。

1.1 小鼠连续增加磨牙的发育模型

基于小鼠磨牙的发育过程,Kavanagh 等^[10]提出了抑制级联(inhibitory cascade, IC)模型,可以解释继承牙发育过程中激活剂和抑制剂的平衡逻辑,以及如何控制牙齿的数量和大小。研究表明,M1 牙胚在发育早期就抑制了 M2 的发育^[10-11]。M2 的发育延迟是由于缺少了间充质分泌的激活因子,如 Bmp4 和 Activin-A。磨牙发育的启动始终是依次发

生的,前一磨牙会抑制后一磨牙的发育,这与激活因子和抑制因子之间的动态平衡有关^[10]。Cho 等^[12]提出了一种反应扩散(reaction-diffusion, RD)模型,他们证明野生型小鼠的每颗磨牙都有 Wnt-Shh-Ectodin 负反馈调控回路产生的激活区域(表达 *Lef1*)和抑制区域(表达 *Ectodin*),可以将 M1、M2、M3 分隔开。阻断 Shh 活性后体外培养的 M2 发育加速,可能就是间充质中 *Ectodin*(又名 *Sostdc1*, *Wise* 或 *Usag-1*)的表达下调引起的。同时, Wnt、Shh、Wise 之间的负反馈回路在小鼠无牙区 R2 退化过程中也扮演关键角色^[7]。另外, Sánchez 等^[13]利用器官体外培养实验发现,糖类物质透明质酸(hyaluronan, HA)可以通过控制小鼠 M1 的增殖和迁移来影响 M2 的发育,达到牙齿大小和数量的平衡。小鼠不会更换牙齿,但已经证明小鼠后磨牙(M2 和 M3)的启动与人类中替换牙齿的启动具有相同的形态学和分子特征^[11]。因此,小鼠的 M2 和 M3 可以作为研究继承牙形成分子机制的模型。

1.2 双牙列动物牙齿替换的发育模型

尽管如此,小鼠缺乏人类和一些哺乳动物的牙齿发育特征,如更换牙齿、齿间板等。近年来,其它一些动物模型,比如小型猪、猴子、雪貂等双牙列动物已在哺乳动物的牙齿替换等生物医药领域被逐渐应用^[14-19]。Wu 等^[16]利用与人类牙齿发育相似的小型猪牙齿发育模型,提出了“组织应力调控牙齿替换”学说。尽管人类的恒牙牙板早在胚胎期就已经形成,但恒牙牙胚的发育大约要持续 6 ~ 12 年才会萌出。他们认为这是因为乳牙萌出前内应力通过调控 integrin β 1-ERK1-Runx2 通路在周围间充质中的表达水平和活性来抑制恒牙发育。乳牙萌出后,该通路活性下降,而间充质内的 Wnt 通路信号转位至恒牙上皮,恒牙上皮中的 Wnt 通路活性提高,从而激活恒牙发育。他们指出,与生物力学应力相关的 Wnt 调节是器官更新的关键启动因子。然而,这一机制是否可以解释其它外胚层来源器官的再生? Wnt 是如何实现间充质到表皮信号传导^[20]? 以及是否存在其它机械力传导通路,比如 FAK(focal adhesion kinase)信号通路^[21],来参与牙齿替换过程等还需要深入研究。

2 继承牙发育的调控机制

2.1 牙缺失和多生牙的成因

牙缺失可能是由于牙齿发育启动失败、牙板的

成牙潜力降低或早期发育停滞等原因造成的。目前,我们已知几十个基因的突变会导致先天性牙缺失,包括 *Wnt10a*、*Msx1*、*Pax9*、*Axin2*、*Eda*、*Edar*、*Edaradd*、*Ltp3*、*Lrp6*、*Wnt10b*、*Grem2* 和 *Smoc* 等^[5-6]。其中最常见 *Wnt10a* 突变在超过一半的非综合征性缺牙病例中被发现^[5]。此外,*Wnt* 反馈抑制因子 *Axin2* 的功能缺失也会导致严重的牙缺失^[22]。该表型揭示了 M1 的牙向间充质中 *Wnt*/β-catenin 活性的增强会抑制后侧磨牙 M2 和 M3 的发育^[22], Jarvinen 等^[11] 的研究也证实了这一结论。而且, *Axin2* 和 *Runx2* 的拮抗作用调节了间充质中 *Wnt*/β-catenin 通路的表达水平,在 M2 的起始和形态发生过程中, *Axin2* 在牙向间充质中强烈表达^[11]。

多生牙也是一种常见的发育性牙齿异常,主要是由于牙齿发育起始和早期阶段受到干扰导致的。然而,确切的病因仍不清楚。有人认为多生的牙齿是由于继发牙板的分裂而形成的,但也有可能是牙板过度增殖或牙板碎片未分解,以及过度诱导的间充质导致的^[5]。牙板成牙潜力的标志基因 *Sox2* 的突变与人类多生牙的形成有关,表明 *Sox2* 对继承牙的发育具有抑制作用^[5]。大多数报道的小鼠多生牙都发生在牙间隙 (diastema) 区域,这是对退化的牙胚结构的恢复^[1]。多个单基因突变,包括 *Eda*、*Gas1*、*Jfi88*、*Lrp4*、*Spry2* 和 *Spry4* 等的突变体小鼠都出现了牙间隙多生牙^[23]。*Ectodin* 作为 *Bmp* 信号的拮抗因子,其敲除小鼠是一种多生牙模型小鼠,在其中可以观察到增强的 *Bmp* 信号以及减少的细胞凋亡^[24]。而 *Runx2* 和 *Usag-1* 双敲除小鼠可以挽救 *Runx2* 敲除小鼠中牙缺失的表型^[25]。这些结果表明,单一分子如 *Usag-1* 的缺失或抑制,有通过挽救退化牙胚再生整个齿列的潜力^[26]。

2.2 牙齿发育的启动机制

脊椎动物中最早形成的牙齿起着“启动牙”的作用,也被称为“牙齿决定因素”,是后续牙齿形成所必需的。例如,斑马鱼中形成的第一个牙齿是作为信号中心,诱导了齿列的形成,这也适用于哺乳动物齿列的形成^[27-28]。牙板 (dental lamina, DL) 的形成被认为是牙齿发育的第一个信号,特征为口腔上皮的明显增厚^[29-30],并表达许多重要基因,包括转录因子 *Pitx2*、*Dlx2*、*Msx1*, 信号分子 *Bmp4*、*Shh*、*Fgf8*、*Wnt10a* 等。其中, *Pitx2* 是牙齿发育的第一个转录标志,小鼠上皮细胞中敲除 *Pitx2* 会延迟牙向上皮内陷,减少成牙祖细胞的增殖和分化。*Pitx2* 的转

录活性是被 *Sox2* 抑制的,这种相互作用控制了 *Sox2* 和 *Pitx2* 共表达的成牙祖细胞区域的基因表达。在蕾状期, *Pitx2* 促进 *Shh* 在下切牙信号中心 (表达 *Lef1* 的细胞) 的表达,而 *Shh* 刺激表达 *Sox2* 的干细胞的增殖和分化^[31]。另外,牙向上皮的增厚还受早期表达的 *Bmp4* 和 *Fgf8* 的调控^[32], *Bmp4* 首先定位于增厚的口腔上皮,调节 *Msx1* 和 *Msx2* 的表达。随后, *Msx1* 与转录因子 *Tbx2* 的拮抗作用导致 *Bmp4* 表达向间充质转移^[33]。同时,转录因子 *Pitx2* 和 *Pax9* 的表达最初也受 *Bmp4* 和 *Fgf8* 之间拮抗作用的控制^[2,34]。在 *Pitx2* 基因敲除小鼠中, *Fgf8* 表达减少, *Bmp4* 表达上调,牙齿发育在蕾状期受阻^[34]。另外, *Shh* 信号从牙齿发育的起始阶段就开始起作用,它可以诱导牙向上皮细胞的增殖,并产生牙蕾。化学抑制 *Shh* 信号可以抑制牙向上皮的生长和内陷,并诱导表达 *Fgf8* 的细胞分布更分散^[34]。

目前的证据显示, *Wnt* 通路可能是牙齿发育启动的最上游信号通路和诱导因子^[6,11]。在牙板期的上皮细胞中特异性地激活 *Wnt* 信号通路会导致多生牙^[11]; 相反地,在早期牙向上皮中抑制 *Wnt*/β-catenin 信号通路会导致早期牙齿发育的停滞。而且,在过表达 *Wnt* 通路抑制因子 *Dkk1* 的转基因小鼠中,牙板的形成受到抑制^[35]。同样地,在斑马鱼第一牙齿 (V4) 发育起始阶段短暂激活表皮中 *Dkk1* 的表达来抑制 *Wnt*/β-catenin 信号会造成表皮和间充质中 *Wnt* 活性的丧失,导致第二牙齿 (V3) 发育启动被终止^[36]。最近,有研究发现 *Wnt*/β-catenin 通路通过抑制 *Sema3A* 的表达,负向调控牙源性上皮细胞的增殖,并诱导未成熟牙蕾结构的生成^[37]。以上研究表明, *Wnt*/β-catenin 信号通路在牙齿发育启动和牙齿数量控制中起着至关重要的作用^[11,38]。

除了信号分子和转录因子外,其它一些基因也会参与牙齿发育的启动。最近, Wu 等^[39] 发现,与人类牙髓钙化病 (dental pulp calcification, DPC) 相关的 *Fam20b* 基因突变会导致多生牙形成。*Fam20b* 可以催化牙向上皮中的粘多糖 (glycosaminoglycan, GAG), 而 GAG 以非自主的方式限制表达 *Sox2* 的口腔上皮干细胞/祖细胞的稳态。在 *Fam20b* 缺失的牙向上皮中抑制 *Fgf2b* 信号, *Fgf* 通路的下游靶基因 *Shh* 扩张的表达范围缩小到正常大小,并可挽救多生牙的表型。表明在牙齿发育的起始阶段通过限制 *Fgf2b* 信号转导,可以调节牙向上皮干细胞/祖细胞的命运,从而控制小鼠的牙齿数量。

最近研究发现,在小鼠磨牙初级釉结(primary enamel knot, PEK)形成之前,短暂存在的增厚牙向上皮中存在一个起始釉结(initiation knot, IK),是牙齿发育过程中所必需的^[40]。作者认为,磨牙基板处产生的起始釉结,对应经典牙齿退化假说中提到的暂时存在的、退化的牙蕾,在 M1 之前无牙区的 MS 并不是发生了退化,而是作为完整牙蕾的一部分推动牙胚生长,并成熟为 R2^[40]。

2.3 继承牙发育的细胞和分子机制

小鼠是应用最为广泛的研究动物牙齿发育分子调控机制的模型。在牙向间充质中条件性敲除 *Bmp4* 或过表达 *Noggin* (*Bmp* 的拮抗因子)会造成小鼠 M2 和/或 M3 缺失^[41]。在牙向间充质中, *Bmp4* 信号抑制了牙齿发育抑制因子 *Dkk2* 和 *Osr2*, 并与 *Msx1* 协同激活牙向间充质的生牙潜能,促进牙齿形态发生和继承牙形成^[42]。小鼠中 *Osr2* 缺失导致在 M1 的舌侧出现多生牙,在 *Osr2*^{-/-} 胚胎中,牙源性因子 *Pitx2*、*Shh*、*Msx1* 和 *Lef1* 的表达上调,而在突变小鼠中去除 *Msx1* 可以抑制多生牙的形成,这表明 *Osr2* 突变胚胎中牙源性区域的扩展需要 *Msx1*, 间充质中的 *Bmp4*-*Msx1*-*Bmp4* 通路驱动牙源性区域的扩展,形成了第二排磨牙^[43]。我们在牙向间充质中敲除 *Shh* 通路抑制因子 *Sufu* 来激活该信号,发现它可以通过 *Gli1*-*Fgf3*-*Shh* 和 *Gli1*-*Bmp4*-*Shh* 的调控回路来抑制磨牙的发育^[44],而 *Shh* 对牙齿数量的控制则是通过与 *Wnt* 通路之间的负反馈回路来实现的^[11-12, 45]。

另外,双牙列动物的继发牙板表达干细胞/祖细胞标志基因 *Sox2*,并且在顶端有激活的 *Wnt*/ β -catenin 信号。相比之下,尽管小鼠磨牙舌侧短暂存在退化的继发牙板,并且表达 *Sox2*,但这些细胞没有 *Wnt*/ β -catenin 信号,因而无法启动舌侧继承牙的发育。*Sox2* 与 *Wnt* 信号之间的负反馈回路及在牙板中的表达模式影响了动物齿列的进化,在继承牙发育和再生过程中起着至关重要的作用^[46-48]。最近,Salomies 等^[49] 利用同时具有单牙列(monophyodont)和多牙列(polyphyodont)的松狮蜥来研究牙齿更换机制,发现了在牙板和口腔上皮中存在两群不同来源的干细胞/祖细胞,分别表达 *Sox2*/*Lgr5*/*Igf1bp5* 和 *Sox2*,这可能是其独特的牙齿更换策略的细胞和分子基础。在兔子模型中,研究人员发现 *Sox2* 在继发牙板,和非替换性磨牙退化的继发牙板中都有表达,表明 *Sox2* 不足以起始和维持

牙齿替换,而是与表达 *Lef1* 的细胞以及间充质中的 *Runx2* 和表皮中表达 *Sostdc1* 的细胞有关^[8]。

3 小结与展望

通过研究参与动物牙齿数量调控的信号通路,已经发现了一些与牙齿替换调控有关的候选基因,例如 *Runx2*、*Usag-1* 等。更好地理解单个基因在继承牙形成中的作用,将为人类继承牙形成的分子遗传机理和牙齿缺陷的发病机制提供理论基础。目前,缺牙的基本治疗方法是依赖合成材料的种植牙或安装假牙^[26, 50]。近年来,随着干细胞,尤其是 iPS 细胞的研究愈发流行^[51],新的干细胞技术已经开始应用于缺牙疾病的治疗研究^[50, 52]。最近,有研究报道通过敲除 *Usag-1* 基因或注射 *Usag-1* 的抗体,成功挽救了由不同遗传缺陷造成的先天性牙缺失的小鼠,这种靶向分子疗法为治疗先天性牙齿缺陷提供了新的思路^[26, 53]。因此,从遗传和分子层面了解牙齿发育的调控机制,结合干细胞研究新技术,利用小鼠等模式动物和大型哺乳动物来研究牙齿的替换和再生,将有力促进牙齿修复和功能性牙齿再生的临床转化。

参 考 文 献 (References)

- [1] Wang XP, Fan J. Molecular genetics of supernumerary tooth formation [J]. *Genesis*, 2011, 49(4): 261-277.
- [2] Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 499-508.
- [3] Hosoya A, Shalehin N, Takebe H, et al. Sonic hedgehog signaling and tooth development [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1587.
- [4] Ramanathan A, Srija TC, Sukumaran P, et al. Homeobox genes and tooth development: understanding the biological pathways and applications in regenerative dental science [J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 85: 23-39.
- [5] Juuri E, Balic A. The biology underlying abnormalities of tooth number in humans [J]. *J Dent Res*, 2017, 96(11): 1248-1256.
- [6] Thesleff I. Current understanding of the process of tooth formation: transfer from the laboratory to the clinic [J]. *Aust Dent J*, 2014, 59(Suppl 1): 48-54.
- [7] Ahn Y, Sanderson BW, Klein OD, et al. Inhibition of *Wnt* signaling by *Wise* (*Sostdc1*) and negative feedback from *Shh* controls tooth number and patterning [J]. *Development*, 2010, 137(19): 3221-3231.
- [8] Bertonnier-Brouty L, Viriot L, Joly T, et al. Gene expression patterns associated with dental replacement in the rabbit, a new model for the mammalian dental replacement mechanisms [J].

- Dev Dyn, 2021, 250(10): 1494–1504.
- [9] Wang F, Xiao J, Cong W, et al. Morphology and chronology of diphyodont dentition in miniature pigs, *Sus Scrofa* [J]. Oral Dis, 2014, 20(4): 367–379.
- [10] Kavanagh KD, Evans AR, Jernvall J. Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development [J]. Nature, 2007, 449(7161): 427–432.
- [11] Jarvinen E, Shimomura-Kuroki J, Balic A, et al. Mesenchymal Wnt/ β -catenin signaling limits tooth number [J]. Development, 2018, 145(4): 158048.
- [12] Cho SW, Kwak S, Woolley TE, et al. Interactions between Shh, Sostdc1 and Wnt signaling and a new feedback loop for spatial patterning of the teeth [J]. Development, 2011, 138(9): 1807–1816.
- [13] Sánchez N, González-Ramírez MC, Contreras EG, et al. Balance between tooth size and tooth number is controlled by hyaluronan [J]. Front Physiol, 2020, 11: 996.
- [14] Wang F, Li G, Wu Z, et al. Tracking diphyodont development in miniature pigs *in vitro* and *in vivo* [J]. Biol Open, 2019, 8(2): bio037036.
- [15] Jussila M, Crespo Yanez X, Thesleff I. Initiation of teeth from the dental lamina in the ferret [J]. Differentiation, 2014, 87(1–2): 32–43.
- [16] Wu X, Hu J, Li G, et al. Biomechanical stress regulates mammalian tooth replacement via the integrin β 1-RUNX2-Wnt pathway [J]. EMBO J, 2020, 39(3): e102374.
- [17] 陈雨荣, 安星兰, 张胜, 等. 中国小型猪在生物医药领域的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 695–706. Chen YR, An XL, Zhang S, et al. Progress in the use of Chinese miniature pigs in biomedical research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 695–706.
- [18] 吴晓珊, 王福, 李昂, 等. 哺乳动物双牙列替换模式及调控机制 [J]. 中华口腔医学杂志, 2020, 55(6): 367–372. Wu XS, Wang F, Li A, et al. The pattern and regulatory mechanism of mammalian diphyodont tooth replacement [J]. Chin J Stomatol, 2020, 55(6): 367–372.
- [19] 刘行云, 张刘陶, 韩冬. 双牙列哺乳动物的牙齿发育研究进展 [J]. 中华口腔医学杂志, 2021, 56(5): 497–501. Liu XY, Zhang LT, Han D. Research progress in studies on tooth development based on diphyodont mammals [J]. Chin J Stomatol, 2021, 56(5): 497–501.
- [20] Wu X, Wang S. Biomechanical stress regulates mammalian tooth replacement [J]. Cell Stress, 2020, 4(3): 64–65.
- [21] Ransom RC, Carter AC, Salhotra A, et al. Mechanoresponsive stem cells acquire neural crest fate in jaw regeneration [J]. Nature, 2018, 563(7732): 514–521.
- [22] Yue HT, Liang J, Yang K, et al. Functional analysis of a novel missense mutation in AXIN₂ associated with non-syndromic tooth agenesis [J]. Eur J Oral Sci, 2016, 124(3): 228–233.
- [23] Kawasaki M, Kawasaki K, Blackburn J, et al. Molecular mechanisms regulating tooth number [M]. Singapore: Springer; 2017.
- [24] Kassai Y, Munne P, Hotta Y, et al. Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin [J]. Science, 2005, 309(5743): 2067–2070.
- [25] Togo Y, Takahashi K, Saito K, et al. Antagonistic functions of USAG-1 and RUNX2 during tooth development [J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0161067.
- [26] Takahashi K, Kiso H, Murashima-Suginami A, et al. Development of tooth regenerative medicine strategies by controlling the number of teeth using targeted molecular therapy [J]. Inflamm Regen, 2020, 40: 21.
- [27] Gibert Y, Samarut E, Ellis MK, et al. The first formed tooth serves as a signalling centre to induce the formation of the dental row in zebrafish [J]. Proc Biol Sci, 2019, 286(1904): 20190401.
- [28] Sadier A, Jackman WR, Laudet V, et al. The vertebrate tooth row: is it initiated by a single organizing tooth? [J]. Bioessays, 2020, 42(6): e1900229.
- [29] Balic A, Thesleff I. Tissue interactions regulating tooth development and renewal [J]. Curr Top Dev Biol, 2015, 115: 157–186.
- [30] 董宁, 刘岩, 张田田, 等. ICR 小鼠下颌第一磨牙牙胚发育的动态组织学观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(4): 63–68. Dong N, Liu Y, Zhang TT, et al. Establishment of first mandibular molar development of the time sequence in ICR mice [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(4): 63–68.
- [31] Yu W, Sun Z, Sweat Y, et al. Pitx2-Sox2-Lef1 interactions specify progenitor oral/dental epithelial cell signaling centers [J]. Development, 2020, 147(11): dev186023.
- [32] Yuan Y, Chai Y. Regulatory mechanisms of jaw bone and tooth development [J]. Curr Top Dev Biol, 2019, 133: 91–118.
- [33] Saadi I, Das P, Zhao M, et al. Msx1 and Tbx2 antagonistically regulate Bmp4 expression during the bud-to-cap stage transition in tooth development [J]. Development, 2013, 140(13): 2697–2702.
- [34] Yu TS, Klein OD. Molecular and cellular mechanisms of tooth development, homeostasis and repair [J]. Development, 2020, 147(2): dev184754.
- [35] Järvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, et al. Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/ β -catenin signaling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(49): 18627–18632.
- [36] Shim JS, Kim B, Park HC, et al. Temporal control of WNT activity regulates tooth number in fish [J]. J Dent Res, 2019, 98(3): 339–346.
- [37] Fujii S, Nagata K, Matsumoto S, et al. Wnt/ β -catenin signaling, which is activated in odontomas, reduces Sema3A expression to regulate odontogenic epithelial cell proliferation and tooth germ development [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 4257.
- [38] Balic A. Concise review: cellular and molecular mechanisms regulation of tooth initiation [J]. Stem Cells, 2019, 37(1): 26–32.

- [39] Wu J, Tian Y, Han L, et al. FAM20B-catalyzed glycosaminoglycans control murine tooth number by restricting FGFR2b signaling [J]. BMC Biol, 2020, 18(1): 87.
- [40] Mogollón I, Moustakas-Verho JE, Niittykoski M, et al. The initiation knot is a signaling center required for molar tooth development [J]. Development, 2021, 148(9): dev194597.
- [41] Plikus MV, Zeichner-David M, Mayer JA, et al. Morphoregulation of teeth: modulating the number, size, shape and differentiation by tuning Bmp activity [J]. Evol Dev, 2005, 7(5): 440–457.
- [42] Jia S, Zhou J, Gao Y, et al. Roles of Bmp4 during tooth morphogenesis and sequential tooth formation [J]. Development, 2013, 140(2): 423–432.
- [43] Zhang ZY, Lan Y, Chai Y, et al. Antagonistic actions of Msx1 and Osr2 pattern mammalian teeth into a single row [J]. Science, 2009, 323(5918): 1232–1234.
- [44] Li J, Xu J, Cui Y, et al. Mesenchymal Sufu regulates development of mandibular molars via Shh signaling [J]. J Dent Res, 2019, 98(12): 1348–1356.
- [45] Lan Y, Jia S, Jiang R. Molecular patterning of the mammalian dentition [J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 25–26: 61–70.
- [46] Popa EM, Buchtova M, Tucker AS. Revitalising the rudimentary replacement dentition in the mouse [J]. Development, 2019, 146(3): dev171363.
- [47] Kim EJ, Jung SY, Wu Z, et al. Sox2 maintains epithelial cell proliferation in the successional dental lamina [J]. Cell Prolif, 2020, 53(1): e12729.
- [48] Martin KJ, Rasch LJ, Cooper RL, et al. Sox²⁺ progenitors in sharks link taste development with the evolution of regenerative teeth from denticles [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(51): 14769–14774.
- [49] Salomies L, Eymann J, Khan I, et al. The alternative regenerative strategy of bearded dragon unveils the key processes underlying vertebrate tooth renewal [J]. Elife, 2019, 8: e47702.
- [50] Zhang W, Yelick PC. Tooth repair and regeneration: potential of dental stem cells [J]. Trends Mol Med, 2021, 27(5): 501–511.
- [51] 才文道力玛, 伊敏娜, 王希生, 等. 大动物多能干细胞建立研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 695–701. Caiwendaolima, Yi MN, Wang XS, et al. Research progress on the establishment of pluripotent stem cells in large animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 695–701.
- [52] Gao ZH, Hu L, Liu GL, et al. Bio-root and implant-based restoration as a tooth replacement alternative [J]. J Dent Res, 2016, 95(6): 642–649.
- [53] Murashima-Suginami A, Kiso H, Tokita Y, et al. Anti-USAG-1 therapy for tooth regeneration through enhanced BMP signaling [J]. Sci Adv, 2021, 7(7): eabf1798.

[收稿日期] 2022-03-17

齐莉莉,刘宏,李剑. 呼吸道合胞病毒感染动物模型的构建与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 989-995.

Qi LL, Liu H, Li J. Construction and evaluation of animal models of respiratory syncytial virus infection [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 989-995.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.015

呼吸道合胞病毒感染动物模型的构建与评价

齐莉莉¹, 刘宏², 李剑^{3*}

(1. 河北医科大学教学实验中心, 石家庄 050017; 2. 河北医科大学第二医院, 石家庄 050000; 3. 河北医科大学基础医学院, 石家庄 050017)

【摘要】 人类呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, hRSV)是在世界范围内引起呼吸道疾病和婴儿住院的主要原因。目前尚无有效的 hRSV 疫苗或治疗药物。针对 hRSV 易感人群的候选疫苗已经处于开发阶段,因此 hRSV 的动物模型在 hRSV 候选疫苗的临床前试验中发挥着重要作用。尽管许多模型在临床前研究中显示了有效性,但很少有模型进入临床试验,或者它们的成功率较低。这在一定程度上是由于缺乏完全重现人类 hRSV 感染发病机制的动物模型。本文分析了 hRSV 动物模型的优点和局限性,包括用 hRSV 感染非人类哺乳动物宿主,以及非人类肺病毒动物模型的研究进展,以期 hRSV 感染动物模型的合理构建提供思路。

【关键词】 呼吸道合胞病毒;动物模型;疫苗;肺损伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 07-0989-07

Construction and evaluation of animal models of respiratory syncytial virus infection

QI Lili¹, LIU Hong², LI Jian^{3*}

(1. Teaching Experiment Center of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China. 2. the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000. 3. Basic Medicine College of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

Corresponding author: LI Jian. E-mail: 834036516@qq.com

【Abstract】 Human respiratory syncytial virus (hRSV) is a major cause of respiratory disease and infant hospitalization worldwide. At present, there is no effective hRSV vaccine or therapeutic drug. A candidate vaccine for the hRSV susceptible population is currently being developed, and an animal model of hRSV would therefore play an important role in the preclinical trials of a hRSV candidate vaccine. Although many models have shown effectiveness in preclinical studies, few have entered clinical trials and their success rate has been low. Animal models to date have been unable to fully reproduce the pathogenesis of hRSV infection. Here, we analyze the advantages and limitations of hRSV animal models, including the use of hRSV to infect non-human mammalian hosts and the development of non-human pulmonary virus animal models. The aim of this review is to provide a rational strategy for the construction of an effective animal model of hRSV infection.

【Keywords】 respiratory syncytial virus; animal model; vaccine; lung injury

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

【基金项目】 河北省自然科学基金(C2021206004), 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2021098), 河北省中医药管理局科研计划项目(2021118), 河北省大学生创新性实验计划项目(CXSY2020002), 河北医科大学“春雨计划”项目(CYCZ2021002)。

Funded by Natural Science Foundation of Hebei Province (C2021206004), Science and Technology Research Project of Hebei Higher Education Institutions (QN2021098), Scientific Research Project of Hebei Traditional Chinese Medicine Administration (2021118), Innovative Experimental Project of Hebei College Students (CXSY2020002), Hebei Medical University “Project Spring Rain” (CYCZ2021002).

【作者简介】 齐莉莉(1983—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 病原生物学与免疫学研究。Email: qilili1983@126.com

【通信作者】 李剑(1982—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 病原生物学研究。Email: 834036516@qq.com

人类呼吸道合胞病毒 (human respiratory syncytial virus, hRSV) 是儿童下呼吸道感染 (lower respiratory tract infection, LRTI) 最常见原因之一, 每年致全球 270 万 ~ 380 万儿童住院, 94 600 ~ 149 400 名 5 岁以下儿童死亡^[1]。尽管病毒抗原变异较少, 但由 hRSV 诱导的免疫持续时间很短, 所以会在整个生命周期内反复感染^[2]。hRSV 疫苗开发的障碍主要有: 自然感染未能防止再感染、接种福尔马林灭活的 hRSV 疫苗 (formalin-inactivated, FI-hRSV) 会使幼儿病情加重^[3], 以及缺乏能完全重现 hRSV 感染发病机制的动物模型等。由于难以在临床前研究中可靠的证明其安全性和有效性, 所以疫苗的开发受到重重阻碍。

除黑猩猩外, 其他非人类灵长类动物仅对 hRSV 复制呈半容许水平, 大剂量病毒的实验性感染只导致轻微的肺部病变。其他动物模型, 如棉鼠、小鼠、雪貂和羔羊, 也只能半容许 hRSV 复制。尽管如此, 棉鼠和小鼠对于开发单克隆抗体, 预防高危婴儿感染 hRSV 具有重要价值, 并为深入了解 hRSV 的发病机制提供了方向^[4]。

对非人类肺炎病毒在其自然宿主中的研究, 例如感染牛呼吸道合胞病毒 (bovine respiratory syncytial virus, bRSV) 的犊牛模型和感染鼠肺炎病毒 (pneumonia virus of mice, PVM) 的小鼠模型^[5-6], 它们不仅在探讨肺炎病毒感染的发病机制中具有价值, 而且还被用于评估 hRSV 疫苗的效果。

1 人类感染 hRSV 的特点

hRSV 主要经空气飞沫或直接接触传播。最初病毒复制发生在鼻咽, 潜伏期 4 ~ 5 d, 随后可传播到下呼吸道。人感染 hRSV 的临床表现可以从普通感冒到毛细支气管炎, 婴儿会出现气道阻塞、缺氧、哮喘和肺炎, 1% ~ 24% 的婴儿会有呼吸暂停^[7]。hRSV 主要在纤毛气道上皮细胞及 I 型和 II 型肺泡细胞中复制。感染 hRSV 重症患者的肺组织病理学变化以细支气管周围和血管周围单核细胞积聚、间质性肺炎、细支气管上皮细胞坏死脱落、巨噬细胞、中性粒细胞、纤维蛋白和粘蛋白阻塞细支气管腔为特征^[8]。毛细支气管炎患儿的支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage, BAL) 中以中性粒细胞为主, 气道分泌物中含有高水平的促炎细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞

介素-1 α (IL-1 α)、CXC/CC 趋化因子 (如 IL-8、MIP-1 α 、MCP-1 和 RANTES), 及干扰素 (IFN)、IL-4、IL-5、IL-10、IL-9 和 IL-17^[9], 表明强烈的炎症反应有助于推进 hRSV 致病过程。而不同病毒株本身的特性也可能导致疾病严重程度的变化^[10]。

2 呼吸道合胞病毒感染的动物模型

hRSV 的动物模型包括使用 hRSV 感染非人类哺乳动物的模型, 以及在自然宿主中研究非人类肺病毒的模型。主要使用的非人类哺乳动物有非人类灵长类动物、棉鼠、小鼠和羔羊。除了黑猩猩之外, 这些动物对 hRSV 的复制都是半允许的, 所以在实验中大剂量病毒感染仅会导致很少甚至无临床症状。相反, 非人类肺病毒的自然宿主对病毒的复制和感染致病是完全允许的。

2.1 非人类灵长类动物 (non-human primates, NHP)

2.1.1 黑猩猩

hRSV 最初是从 20 只圈养黑猩猩中分离出来的^[11], 人们后来发现这种病毒不仅能在黑猩猩之间传播, 还能从黑猩猩传播给人。实验室感染 10^4 pfu hRSV 的黑猩猩可以排出大量病毒 (鼻咽拭子样本和 BAL 分别为 10^5 和 10^6 pfu/mL) 并持续 6 ~ 10 d, 这与在儿童身上看到的情况一致^[12]。尽管在实验中感染的黑猩猩未出现下呼吸道感染症状, 但在动物园圈养的黑猩猩和科特迪瓦一个研究站饲养的黑猩猩身上已经报告了 hRSV 相关支气管肺炎的重症病例, 其中一些还合并肺炎链球菌感染^[13-14]。广泛支气管肺炎和间质性肺炎的组织病理学样本中可以检测到 hRSV 抗原, 偶尔出现的合胞体细胞与人类婴儿的病变相似^[13]。肺炎链球菌已经被证明在体外和棉鼠中都能加重气道上皮细胞中 hRSV 的感染^[15]。

黑猩猩已经被用来评估 hRSV 减毒活疫苗的毒力和保护效力^[16]。减毒 hRSV 在黑猩猩体内的复制和遗传稳定性与血清阴性的儿童相似, 而且减毒株能够诱导黑猩猩抵抗随后的野生型 hRSV 攻击^[17]。然而, 接种表达 hRSV 表面糖蛋白 F 和 G 的重组痘苗病毒 (rVV) 的黑猩猩只产生了低水平的中和抗体, 而且对抵抗 hRSV 攻击的保护力很差。这些现象与相同的 rVV 对小鼠、棉鼠和猫头鹰猴几乎完全的保护效力形成了鲜明对比^[18]。

2.1.2 非洲绿猴

为了评估 hRSV 候选疫苗,许多研究选用了半允许 hRSV 复制的非洲绿猴(African green monkeys, AGMs)^[19]。hRSV 感染后,AGMs 仅在肺部出现轻微的组织病理学改变,临床症状不明显^[20]。感染 hRSV 孟菲斯 M37 株的猴子 BAL 中的中性粒细胞比例仅增加到 9%^[21],而中性粒细胞却是 hRSV 感染儿童 BAL 中的主要细胞^[22]。

Kakuk 等^[23]发现,接种 FI-hRSV 的 AGMs 被 hRSV 感染后,会出现疫苗增强的肺部病理改变。接种了福尔马林灭活的单纯疱疹病毒(FI-HSV)的 AGMs,如若感染 hRSV 也会出现增强的组织病理学变化,只是其严重程度低于接种 FI-hRSV 的动物。这些现象表明,对疫苗中存在的细胞培养成分的免疫反应和 hRSV 刺激,可能是 FI-hRSV 接种动物出现增强的病理学改变的原因。

虽然一些 hRSV 疫苗已被证明可诱导小鼠或棉鼠对 hRSV 产生完全的保护作用,但 Eyles 等^[21]用这些疫苗免疫 AGMs,发现其保护效力并不相同。只有在用表达 F 或 G 蛋白的复制缺陷型重组腺病毒(rAdV)初次免疫、纯化的 hRSV F 和 G 蛋白加强接种后,上、下呼吸道才能获得完全保护。以氢氧化铝和 CpG 为佐剂的 F/G 蛋白会使病毒复制显著减少。然而,在接种疫苗的猴子中,没有任何证据表明肺部炎症增强。这些观察结果表明,小动物模型无法预测 hRSV 疫苗在 AGMs 中的效力。

2.1.3 其他 NHP

尽管对 hRSV 半允许复制,许多 NHP 已被用作 hRSV 的感染模型。感染 hRSV 的猫头鹰猴会出现鼻炎,其症状轻于黑猩猩,病毒能够在鼻咽中有效复制 8 ~ 17 d^[24]。猫头鹰猴对 hRSV 减毒活疫苗的反应与黑猩猩相似,治疗性地给予含有病毒中和抗体的人 IgG 可以显著降低肺病毒载量,但肺病理损伤未见改善^[25]。

经气管接种大剂量 hRSV ($10^{7.9}$ pfu) 的幼狒狒会出现 LRTI^[26],BAL 中的病毒滴度在接种后 24 h 达到最大值,随后下降。肺部显示血管充血和水肿,镜下特征为间质性肺炎、细支气管上皮脱落、细支气管管腔阻塞和炎性细胞浸润。病毒抗原主要分布于肺实质,少量散在分布于肺上皮细胞。感染后 24 h BAL 的中性粒细胞迅速增加,第 3 天开始下降,随后巨噬细胞数量上升。人们需要进一步的研

究,以确定肺部炎症反应是病毒复制的结果,还是对高剂量接种物的非特异性炎症反应。

2.2 绵羊

hRSV A2 感染新生羔羊后,会引起轻微发热和咳嗽,肺部主要病理特征是肉眼可见的多灶实变,以及与 hRSV 感染儿童相似的显微镜下病变^[27]。在纤毛支气管上皮细胞和合胞体细胞中可以检测到病毒抗原。感染后第 3 ~ 6 天,BAL 中的病毒 mRNA 从较低水平增加到峰值,并在第 14 天消退。感染高剂量 hRSV M37 的羔羊会出现喘息的症状。从感染第 1 ~ 6 天,羔羊 BAL 中的病毒滴度增加了 100 倍,肺部巨噬细胞、CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞数量增加,IFN- γ 、IL-8、MCP-1、MIP-1 α 和 RANTES 的 mRNA 水平有所增加^[28]。

接种 FI-hRSV 疫苗可预防羔羊感染病毒,并能防止肺组织病变的发展^[29]。接种疫苗后,虽然羔羊会出现广泛的细支气管周围细胞积聚,但其他肺病理损伤显著减少。母源抗体(maternally derived serum antibodies, MDA)可以通过初乳转移到羔羊体内^[30],用 hRSV F 蛋白免疫怀孕母羊,在其血清和初乳中可诱导出高水平的病毒中和抗体。羔羊从接种疫苗的母羊获得初乳,其病毒中和抗体滴度比未接种疫苗的母羊所生羔羊高 50 倍左右。2 ~ 3 日龄的羔羊受到 hRSV 攻击后,与对照组相比,接种疫苗的母羊生出的羔羊肺病毒载量减少了 70%,并且肺病理损伤明显减轻。这些研究表明,母体免疫接种是一种安全有效的方法,可降低 hRSV 对婴幼儿下呼吸道的损伤作用。

2.3 啮齿类动物

2.3.1 棉鼠

虽然棉鼠对病毒复制是半容许的,但它们每次接种病毒的剂量可以比 BALB/c 小鼠高 100 倍,但棉鼠并不出现临床症状^[31]。接种后,病毒在鼻、肺部呈高滴度复制,在气管呈低滴度复制。棉鼠一生都对 hRSV 易感,但病毒在 3 d 龄棉鼠鼻腔中的复制量更大,持续时间也更长。病毒抗原可以在鼻和肺纤毛上皮细胞中检测到,但在气管中检测不到病毒抗原,hRSV 感染会引起棉鼠肺部 IFN- γ 、IL-10、IL-6、MCP-1 和生长调节癌基因(growth-regulated oncogene, GRO)的 mRNA 增加,并伴有鼻炎和轻度细支气管炎^[32]。在环磷酸腺苷免疫抑制的棉鼠体内,病毒载量更大,病毒排出时间更长,而且动物会产

生以泡沫巨噬细胞、支气管和气管内碎片为特征的更严重的炎症反应^[33]。

棉鼠和婴儿血清中的病毒中和抗体水平极为相似。在被动免疫棉鼠的血清中,病毒中和抗体大于 1:380 就具有保护作用,而类似水平的母源抗体能够增强 2 月龄以内人类婴儿对 hRSV 的抵抗力^[34]。棉鼠在单克隆抗体类药物的研发中发挥了重要作用,是一种成熟的 FI-hRSV 疫苗导致疾病加重的动物模型。尽管 FI-hRSV 疫苗减少了 hRSV 的复制,但棉鼠出现了严重的毛细支气管炎、肺炎和间质性肺炎。毛细支气管炎被认为是免疫介导的抵御 hRSV 感染的正常组成部分,而在棉鼠模型中肺炎被认为是疫苗加重疾病的主要标志。然而,FI-hRSV 免疫棉鼠肺炎的严重程度与非病毒抗原特异性 T 细胞的启动有关,同时 hRSV 抗原加重了这种反应^[35]。这些发现表明,在评估人类 hRSV 候选疫苗的安全性时,不能完全套用棉鼠模型的结果。

2.3.2 小鼠

尽管近交系小鼠对 hRSV 的易感性存在差异,但呈现中等易感性的 BALB/c 小鼠已被广泛用于研究 hRSV 的致病机制^[36]。鼻饲接种 hRSV 后,病毒在小鼠的鼻腔和肺部复制。小鼠一生都对 hRSV 易感,但老年鼠比幼年鼠易感性更强^[37]。高剂量的 hRSV ($> 10^6$ pfu) 是诱发疾病所必需的,其特征是体重减轻、毛发褶皱和驼背。显微镜下的病变包括血管周围和细支气管周围单核细胞聚集,以及粘液分泌增加。在感染急性期,促炎细胞因子和趋化因子水平升高。小鼠的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞充当了“双刃剑”的角色,即在清除病毒和加重疾病中均发挥作用。缺失 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 细胞,都会延长病毒感染时间,但却有利于症状缓解并减轻肺病理损伤^[36]。然而,这些观察结果与免疫抑制人群中出现的长时间排出病毒、严重的呼吸系统疾病和巨细胞肺炎形成了鲜明对比。

FI-hRSV 疫苗导致疾病加重的小鼠模型与引发 Th2 反应有关,其特征是肺嗜酸性粒细胞增多、大量粘液分泌、体重减轻、气道阻塞、气道高反应性 (airway hyper responsiveness, AHR) 增加以及肺病毒载量减少。当 CD4⁺ 细胞缺失或敲除 IL-4 和 IL-10 时,疫苗加重的病理表现就会消失^[38]。由 FI-hRSV 疫苗诱导的小鼠低亲和力非中和抗体,也被证明有

助于加重 AHR 和肺部病理损伤。正如在其他动物模型中所见,对非病毒抗原的免疫反应会导致接种疫苗的小鼠病变增强。然而,由于小鼠和人类在先天免疫和适应性免疫反应方面存在许多差异^[39],小鼠对疫苗接种的反应可能与高等物种大不相同。例如,表达 hRSV F 或 G 蛋白的重组痘苗病毒可完全保护小鼠免受 hRSV 感染^[16,40],但对猕猴却没有诱导出保护作用^[41]。

一个缺乏功能性 CD8⁺ T 细胞的人源化小鼠模型,在感染 hRSV 10^6 pfu 时,可导致小鼠体重减轻和肺组织损伤,其病理特征为细支气管周围炎症, BAL 中以中性粒细胞占优势,粘液增多,这与 hRSV 感染的儿童相似。但野生型 BALB/c 感染 hRSV 后, BAL 中性粒细胞的比例仅为 10%^[42]。所以,与普通小鼠相比,人源化小鼠模型可能是评估 hRSV 候选疫苗更适宜的模式。

2.4 非人宿主肺炎病毒的动物模型

2.4.1 bRSV 感染的犍牛模型

在天然宿主中研究非人类肺炎病毒的一个优势是宿主对病毒是完全允许的。bRSV 感染的最高发病率出现在 6 月龄以下的小牛,虽然母源抗体不能保护犍牛免受 bRSV 感染,但呼吸系统疾病的发病率和严重程度与母源抗体水平呈负相关^[43]。感染潜伏期在 2 ~ 5 d,临床症状包括鼻腔分泌物增加、咳嗽、呼吸急促、呼吸困难和发热。bRSV 主要在纤毛气道上皮细胞和肺泡 II 型细胞中复制,并诱导间质性肺炎、上皮坏死、渗出性或增殖性肺炎以及偶见合胞体的显微镜下病变。中性粒细胞、脱落的上皮细胞、巨噬细胞和粘蛋白组成的细胞碎片会阻塞支气管和细支气管^[44]。

bRSV 和 hRSV 在整个基因组的同源性约为 80%,而且对 hRSV 具有特异性的多克隆抗体通常可识别 bRSV 蛋白^[5]。目前犍牛已经被用于 hRSV 疫苗的评估^[45],如 DNA 疫苗、亚单位疫苗、减毒活疫苗、重组病毒载体以及与佐剂混合的灭活 bRSV,并用于确定母源抗体对疫苗接种的影响^[43]。犍牛也可以作为 hRSV 候选疫苗临床前评估的一部分,这些候选疫苗含有 hRSV 和 bRSV 之间保守的蛋白质。例如,用表达 hRSV 融合蛋白 F、N 和 M2-1 的 rAdV 鼻饲接种犍牛,并肌肉接种表达相同抗原的重组痘苗病毒加强免疫,可以使犍牛完全抵御 bRSV 的攻击^[45]。

2.4.2 PVM 感染的小鼠模型

PVM 最初是从小鼠肺组织分离出来的^[46], 实验室小鼠感染 PVM 导致疾病的严重程度取决于病毒剂量、小鼠品系和年龄。BALB/c 鼠对 PVM 易感, 而 C57BL/6 鼠对 PVM 相对抵抗。用小剂量 (60~600 pfu) PVM 鼻饲接种 BALB/c 鼠, 病毒能在小鼠肺部复制到较高的滴度并引起严重的临床表现^[6]。病毒复制最初发生在肺泡细胞, 随后在支气管上皮细胞, 并诱导 BAL 嗜酸性粒细胞增加, 随后出现以中性粒细胞增加为主的反应。肺组织病理改变包括肺泡上皮细胞凋亡、支气管上皮坏死、出血和粒细胞浸润。PVM 感染小鼠肺部的促炎趋化因子和细胞因子反应与 hRSV 感染小鼠相似。然而, MIP-1 α 参与 PVM 诱导的炎症反应, 却不能调控 hRSV 诱导的小鼠炎症反应^[47]。这表明肺炎病毒在自然宿主和非自然的、半容许的动物模型中致病机理是存在差异的。

虽然 PVM 小鼠模型的优势在于能够研究自然宿主中的肺病毒感染, 但小鼠和人类之间先天性和适应性免疫反应的许多差异、肺部解剖结构的差异以及病毒蛋白的抗原差异限制了其与人类 hRSV 的相关性。尽管如此, 了解 PVM 的致病机制可以为更高级动物物种的研究提供参考。

3 结语

动物模型的选择必须基于多种因素, 包括方法、试剂的费用和可用性。此外, 在设计动物实验时我们还要考虑其他因素, 如病毒易感性和病毒对宿主免疫防御的适应性, 这也决定了该模型对于理解人类病毒致病机制和免疫机制的适用性。

黑猩猩是唯一对 hRSV 复制完全允许的动物宿主, 允许动物间传播, 但对实验硬件环境及研究经费要求较高; 尽管我们可以使用分子生物学和遗传学方法对小鼠模型进行基因改造, 但仍然无法使 hRSV 完全适应小鼠, 所以小鼠模型与 hRSV 感染的相关性仍存在疑问; 棉鼠更易受到 hRSV 感染, 并提供了上下呼吸道感染的模型, 但目前的瓶颈是: 可用于棉鼠研究的实验工具相对较少。

尽管对大型动物进行实验操作存在实际困难, 但鉴于我们无法使 hRSV 适应啮齿类动物模型, 再加上 hRSV 和 bRSV 的密切关系, 以及病毒传播动力学的相似性, 所以 bRSV 的致病机制和免疫特点

等信息可以转化为治疗 hRSV 感染和疫苗接种的改进策略。那么为了保证病原体的宿主特异性, 明智的做法是利用 bRSV 及犊牛作为研究 hRSV 的基础。此外与啮齿类动物相比, 牛的寿命更长, 因此应该能够研究在数年而不是数周内记忆 B 和 T 细胞群对 bRSV 抗原的反应, 以及疫苗接种对牛寿命的影响。

综上所述, 虽然每一种动物模型都有其适用的范围, 但人们可依据研究目的综合考虑。例如, 在研究 hRSV 疫苗过程中, 研究人员可以首先选择 bRSV 感染的犊牛作为动物模型进行长期的深入探讨, 当获得稳定可靠的试验效果时, 可将动物模型转向 hRSV 感染的黑猩猩, 以评估 hRSV 疫苗的毒力和保护效力, 为接下来临床试验的开展奠定基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study [J]. *Lancet*, 2017, 390(10098): 946-958.
- [2] Pangesti KNA, Abd El Ghany M, Walsh MG, et al. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus [J]. *Rev Med Virol*, 2018, 28(2): 1-11.
- [3] Mejias A, Rodríguez-Fernández R, Oliva S, et al. The journey to a respiratory syncytial virus vaccine [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2020, 125(1): 36-46.
- [4] Altamirano-Lagos MJ, Díaz FE, Mansilla MA, et al. Current animal models for understanding the pathology caused by the respiratory syncytial virus [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 873.
- [5] Yunus AS, Krishnamurthy S, Pastey MK, et al. Rescue of a bovine respiratory syncytial virus genomic RNA analog by bovine, human and ovine respiratory syncytial viruses confirms the "functional integrity" and "cross-recognition" of bRSV cis-acting elements by hRSV and oRSV [J]. *Arch Virol*, 1999, 144(10): 1977-1990.
- [6] Dyer KD, Garcia-Crespo KE, Glineur S, et al. The pneumonia virus of mice (pvm) model of acute respiratory infection [J]. *Viruses*, 2012, 4(12): 3494-3510.
- [7] Battles MB, McLellan JS. Respiratory syncytial virus entry and how to block it [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(4): 233-245.
- [8] Pickles RJ, DeVincenzo JP. Respiratory syncytial virus (RSV) and its propensity for causing bronchiolitis [J]. *J Pathol*, 2015, 235(2): 266-276.
- [9] Wiseman DJ, Thwaites RS, Drysdale SB, et al. Immunological and inflammatory biomarkers of susceptibility and severity in adult

- respiratory syncytial virus infections [J]. J Infect Dis, 2020, 222(7): S584-S591.
- [10] Thompson TM, Roddam PL, Harrison LM, et al. Viral specific factors contribute to clinical respiratory syncytial virus disease severity differences in infants [J]. Clin Microbiol, 2015, 4(3): 206.
- [11] Blount RE Jr, Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1956, 92(3): 544-549.
- [12] Belshe RB, Richardson LS, London WT, et al. Experimental respiratory syncytial virus infection of four species of primates [J]. J Med Virol, 1977, 1(3): 157-162.
- [13] Clarke CJ, Watt NJ, Meredith A, et al. Respiratory syncytial virus-associated bronchopneumonia in a young chimpanzee [J]. J Comp Pathol, 1994, 110(2): 207-212.
- [14] Unwin S, Chatterton J, Chantrey J. Management of severe respiratory tract disease caused by human respiratory syncytial virus and *Streptococcus pneumoniae* in captive chimpanzees (pan troglodytes) [J]. J Zoo Wildl Med, 2013, 44(1): 105-115.
- [15] Nguyen DT, Louwen R, Elberse K, et al. *Streptococcus pneumoniae* enhances human respiratory syncytial virus infection *in vitro* and *in vivo* [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127098.
- [16] Pierantoni A, Esposito ML, Ammendola V, et al. Mucosal delivery of a vectored RSV vaccine is safe and elicits protective immunity in rodents and nonhuman primates [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2015, 2: 15018.
- [17] Karron RA, Buchholz UJ, Collins PL. Live-attenuated respiratory syncytial virus vaccines [J]. Curr Top Micro Immunol, 2013, 372: 259-284.
- [18] Collins PL, Purcell RH, London WT, et al. Evaluation in chimpanzees of vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of human respiratory syncytial virus [J]. Vaccine, 1990, 8(2): 164-168.
- [19] Mackman RL, Hui HC, Perron M, et al. Prodrugs of a 1'-CN-4-Aza-7, 9-dideazaadenosine C-Nucleoside leading to the discovery of remdesivir (GS-5734) as a potent inhibitor of respiratory syncytial virus with efficacy in the african green monkey model of RSV [J]. J Med Chem, 2021, 64(8): 5001-5017.
- [20] González-Parra G, Dobrovolny HM. Modeling of fusion inhibitor treatment of RSV in african green monkeys [J]. J Theor Biol, 2018, 456: 62-73.
- [21] Eyles JE, Johnson JE, Megati S, et al. Nonreplicating vaccines can protect african green monkeys from the memphis 37 strain of respiratory syncytial virus [J]. J Infect Dis, 2013, 208(2): 319-329.
- [22] Green CA, Sande CJ, de Lara C, et al. Humoral and cellular immunity to RSV in infants, children and adults [J]. Vaccine, 2018, 36(41): 6183-6190.
- [23] Kakuk TJ, Soike K, Brideau RJ, et al. A human respiratory syncytial virus (RSV) primate model of enhanced pulmonary pathology induced with a formalin-inactivated RSV vaccine but not a recombinant FG subunit vaccine [J]. J Infect Dis, 1993, 167(3): 553-561.
- [24] Prince GA, Suffin SC, Prevar DA, et al. Respiratory syncytial virus infection in owl monkeys: viral shedding, immunological response, and associated illness caused by wild-type virus and two temperature-sensitive mutants [J]. Infect Immun, 1979, 26(3): 1009-1013.
- [25] Hemming VG, Prince GA, Groothuis JR, et al. Hyperimmune globulins in prevention and treatment of respiratory syncytial virus infections [J]. Clin Microbiol Rev, 1995, 8(1): 22-33.
- [26] Ivanov V, Oomens AGP, Papin JF, et al. Intranasal and intrapulmonary vaccination with an m protein-deficient respiratory syncytial virus (RSV) vaccine improves clinical signs and reduces viral replication in infant baboons after an RSV challenge infection [J]. Vaccine, 2021, 39(30): 4063-4071.
- [27] Sithicharoenchai P, Alnajjar S, Ackermann MR. A model of respiratory syncytial virus (RSV) infection of infants in newborn lambs [J]. Cell Tissue Res, 2020, 380(2): 313-324.
- [28] Larios Mora A, Detalle L, Gallup JM, et al. Delivery of ALX-0171 by inhalation greatly reduces respiratory syncytial virus disease in newborn lambs [J]. MAbs, 2018, 10(5): 778-795.
- [29] Ackermann MR. Lamb model of respiratory syncytial virus-associated lung disease: insights to pathogenesis and novel treatments [J]. ILAR J, 2014, 55(1): 4-15.
- [30] Garg R, Latimer L, Wang Y, et al. Maternal immunization with respiratory syncytial virus fusion protein formulated with a novel combination adjuvant provides protection from RSV in newborn lambs [J]. Vaccine, 2016, 34(2): 261-269.
- [31] Martinez ME, Harder OE, Rosas LE, et al. Pulmonary function analysis in cotton rats after respiratory syncytial virus infection [J]. PLoS One, 2020, 15(8): e0237404.
- [32] Wen X, Mo S, Chen S, et al. Pathogenic difference of respiratory syncytial virus infection in cotton rats of different ages [J]. Microb Pathog, 2019, 137: 103749.
- [33] Boukhvalova M, Blanco JC, Falsey AR, et al. Treatment with novel RSV ig RI-002 controls viral replication and reduces pulmonary damage in immunocompromised sigmodon hispidus [J]. Bone Marrow Transplant, 2016, 51(1): 119-126.
- [34] Blanco JCG, Pletneva LM, McGinnes-Cullen L, et al. Efficacy of a respiratory syncytial virus vaccine candidate in a maternal immunization model [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1904.
- [35] Boukhvalova MS, Yim KC, Blanco J. Cotton rat model for testing vaccines and antivirals against respiratory syncytial virus [J]. Antivir Chem Chemother, 2018, 26: 2040206618770518.
- [36] van Erp EA, Lakerveld AJ, Mulder HL, et al. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice differs between intratracheal and intranasal inoculation [J]. Viruses,

- 2019, 11(6): 508.
- [37] Graham BS, Perkins MD, Wright PF, et al. Primary respiratory syncytial virus infection in mice [J]. J Med Virol, 1988, 26(2): 153–162.
- [38] Connors M, Giese NA, Kulkarni AB, et al. Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10 [J]. J Virol, 1994, 68(8): 5321–5325.
- [39] Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology [J]. J Immunol, 2004, 172(5): 2731–27318.
- [40] Wyatt LS, Whitehead SS, Venanzi KA, et al. Priming and boosting immunity to respiratory syncytial virus by recombinant replication-defective vaccinia virus MVA [J]. Vaccine, 1999, 18(5–6): 392–397.
- [41] de Waal L, Wyatt LS, Yüksel S, et al. Vaccination of infant macaques with a recombinant modified vaccinia virus ankara expressing the respiratory syncytial virus F and G genes does not predispose for immunopathology [J]. Vaccine, 2004, 22(8): 923–926.
- [42] Sharma A, Wu W, Sung B, et al. Respiratory syncytial virus (RSV) pulmonary infection in humanized mice induces human anti-RSV immune responses and pathology [J]. J Virol, 2016, 90(10): 5068–5074.
- [43] Valarcher JF, Hägglund S, Näslund K, et al. Single-shot vaccines against bovine respiratory syncytial virus (bRSV): comparative evaluation of long-term protection after immunization in the presence of brsv-specific maternal antibodies [J]. Vaccines (Basel), 2021, 9(3): 236.
- [44] Guzman E, Taylor G. Immunology of bovine respiratory syncytial virus in calves [J]. Mol Immunol, 2015, 66(1): 48–56.
- [45] Cortjens B, de Jong R, Bonsing JG, et al. Human respiratory syncytial virus infection in the pre-clinical calf model [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2019, 65: 213–218.
- [46] Horsfall FL, Hahn RG. A latent virus in normal mice capable of producing pneumonia in its natural host [J]. J Exp Med, 1940, 71(3): 391–408.
- [47] Watkiss ER, Shrivastava P, Arsic N, et al. Innate and adaptive immune response to pneumonia virus of mice in a resistant and a susceptible mouse strain [J]. Viruses, 2013, 5(1): 295–320.

[收稿日期] 2022-01-25

陈爽, 闫振宇. 血友病关节软骨发病机制的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 996–1002.

Chen S, Yan ZY. Research progress on the pathogenesis of articular cartilage in hemophilia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 996–1002.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.016

血友病关节软骨发病机制的研究进展

陈爽¹, 闫振宇^{1,2*}

(1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000)

【摘要】 本文就血友病关节软骨发病机制的研究进展做一综述, 以期进一步理解血友病软骨损伤发生发展的独特机制, 旨在为修复软骨新的治疗手段提供新思路。遴选 PubMed、Web of Science、SpringerLink、Google Scholar 等英文数据库和中国知网、维普网、万方网等中文数据库, 英文检索关键词为“hemophilic、Joint bleeding、cartilage、Pathogenesis、cytokine、immunocyte、iron、synovitis、blood、plasmin、signaling pathway”, 中文检索关键词为“血友病、关节出血、软骨、发病机制、细胞因子、免疫细胞、铁、滑膜炎、血液、纤溶酶、信号通路”, 根据入选标准及排除标准, 检索自 1981 年 1 月~2022 年 3 月血友病关节软骨病理生理学相关度较高的文献, 排除内容陈旧或重复性文献, 最终纳入相关文献 60 篇。多种细胞因子、免疫细胞、铁离子沉积、慢性滑膜炎、血液、纤溶酶、信号通路等均会导致软骨细胞凋亡, 从而导致血友病软骨损伤, 其中铁离子沉积是造成血友病软骨损伤的关键; 各个影响因素在发病之间相互联系, 复杂交错, 如何调控各个影响因素对关节软骨的损害, 有望成为修复软骨的重要方法。

【关键词】 血友病; 关节出血; 软骨; 发病机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 07-0996-07

Research progress on the pathogenesis of articular cartilage in hemophilia

CHEN Shuang¹, YAN Zhenyu^{1,2*}

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China. 2. the Affiliated Hospital of

North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

Corresponding author: YAN Zhenyu. E-mail: hbyzy2011@163.com

【Abstract】 This review summarizes the research progress of joint cartilage pathogenesis in hemophilia patients to further understand the unique mechanism of the development of cartilage damage to the occurrence of blood friends, and aims to provide new ideas to repair cartilage. English language databases, such as PubMed, Web of Science, SpringerLink, Google Scholar and Chinese language databases, such as CNKI, VIP and Wanfang, were selected. The English search key words were hemophilic, Joint bleeding, cartilage, Pathogenesis, cytokine, immunocyte, iron, synovitis, blood, plasma and signaling pathway. The Chinese search key words were hemophilia, joint hemorrhage, cartilage, pathogenesis, cytokines, immune cells, iron, synovitis, blood, plasmin and signal pathway. In accordance with the inclusion and exclusion criteria, literature with a high correlation of joint soft bone pathophysiology of hemophilia from January 1981 to March 2022 were searched, older or repetitive literature was excluded, and 60 related articles were finally included. and Conclusion Various cytokines, immune cells, iron ion deposition, chronic synovitis, blood, plasmin, and signaling pathways lead to chondrocyte apoptosis, leading to hemophilia cartilage injury in which iron ion deposition is critical for hemophilic cartilage injury. Various influencing factors are interrelated and complex. How to regulate the

【基金项目】 2019 年河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目。

Funded by the Government Funded Clinical Excellence Training Program of Hebei Province in 2019.

【作者简介】 陈爽 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 血液内科学。Email: tydwly@163.com

【通信作者】 闫振宇 (1974—), 男, 主任医师, 教授, 博士, 研究方向: 止血与血栓。Email: hbyzy2011@163.com

damage of various influencing factors in articular cartilage is expected to become an important method to repair cartilage.

【Keywords】 hemophilic; hemarthrosis; cartilage; pathogenesis

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

血友病是一类罕见的终身出血性疾病,其中 70% 左右病例表现为伴 X 染色体连锁隐性遗传的出血性疾病,另外 30% 表现为没有家族遗传病史的散发性病例。根据世界血友病联合会 (World Federation of Hemophilia, WFH) 近几年的调查报告结果显示,全球有男性血友病患者 1 255 000 人左右,其中约有 418 000 人患有重型血友病^[1]。其主要症状表现为关节骨骼肌肉长期反复出血,以及小部分表现为内脏或粘膜出血。其主要病因是凝血因子Ⅷ缺乏(血友病 A)和凝血因子Ⅸ缺乏(血友病 B)。A 型血友病占总的类型约 4/5^[2]。出血的严重程度与血浆凝血因子的浓度有一定的关联,重度(凝血因子 < 1%)血友病患者出血超过一半表现为关节内自发性出血,其中最容易累及的是膝关节、踝关节和肘关节^[3]。半年内同一关节频繁出血 3 次以上,即为靶关节形成,随后慢性滑膜炎、关节软骨及软骨下骨遭到破坏,这是因为关节积液引发的。若没有及时且有效的处理,关节活动将会受限、肌肉逐渐萎缩、骨密度下降等最终导致血友病性关节炎(Hemophilia arthropathy, HA)^[4-5]。对于重度血友病预防性的应用重组凝血因子的长期效果来看,有显著的疗效但并不能起到完全预防关节作用^[6]。另外,对于重度血友病儿童来讲,凝血因子替代疗法主张在 2 岁以内就开始预防,但是这种治疗方法不仅价格高昂,而且容易治疗过度使患者体内产生抑制物^[7-8]。软骨再生修复是一个历史难题,软骨组织工程备受研究者的青睐,但是植入的支架材料需要较好的相容性和降解性^[9]。HA 关节软骨破坏的机制是复杂且独特的,是滑膜炎、关节出血、铁沉积和细胞因子等共同作用所导致的。因此,笔者将对血友病关节软骨病变的发病机制最新研究做出总结,旨在为治愈关节软骨病变提供新思路。

1 血友病软骨

软骨组织是一种缺乏血管的组织,由 95% 软骨基质和 5% 软骨细胞构成,起着吸收和缓冲应力的作用^[10]。关节软骨维持平衡是由于软骨细胞可以分泌多种胶原、多种酶以及黏蛋白。据相关资料显示,保持软骨细胞稳定性的关键因素是细胞外基

质。因此,维持软骨细胞的正常运行有赖于细胞外基质的功能完整^[11]。关节软骨是一种透明软骨,其中构成透明软骨的细胞外基质主要是蛋白聚糖和Ⅱ型胶原,后者可承受一定程度的机械力,可能与免疫反应有关^[12]。

软骨损伤以关节软骨断裂、软骨细胞肥大、钙化层肥大和血管侵犯为特征。依据软骨损伤的程度可以分为 3 个等级,依次为微损伤、软骨表面破损和骨软骨骨折。微损伤是软骨基质和软骨细胞的超微结构改变,而软骨表面不受影响。软骨表面破损是软骨表面有裂缝和缺陷,但无法穿透整个软骨层。骨软骨骨折是指软骨缺损穿透最深,可达软骨下骨。有研究表明,当关节腔内出血,在显微镜下可观察到,软骨表面的番红染色逐渐缺失,软骨细胞排列呈簇状且结构混乱,提示关节软骨发生严重的软骨退化^[13-14]。另外,检查 HA 血清生物学标志物,表现为血和尿液中尿Ⅱ型胶原 C 末端肽(CTX-Ⅱ)的表达增加,提示该骨质标志物可作为检测血友病软骨降解的可靠指标之一^[15]。

2 血友病软骨的发病机制

2.1 细胞因子

目前,IL-1、TNF- α 和 IL-6 是参与 HA 发病机制最常用的炎性细胞因子,已被证实与软骨破坏有关。它们促进缺氧诱导因子(HIF)和基质金属蛋白酶(MMPs)的表达,从而诱导关节软骨降解,HA 反复关节内出血使这一过程更加严重^[16-19]。在 MMPs 家族中,MMP-13 是降解关节软骨的主要成员,其作用方式是激活Ⅱ型胶原和蛋白聚糖^[20-21]。有研究证实,选择性 MMP-13 抑制剂对狗 OA 模型的软骨具有保护作用^[22]。关节软骨的功能和完整性主要取决于软骨下骨的机械和营养支持。软骨下骨的退化会影响软骨的代谢平衡,表现为 MMP-13 的表达增加和关节软骨中细胞外基质紊乱^[23-24]。

IL-1 主要产生于巨噬细胞,IL-1 分为 IL-1 α 和 IL-1 β 两种形式。其中 IL-1 β 是介导软骨损伤关键性的炎性细胞因子^[25],诱导软骨细胞中一氧化氮合酶(INOS)和环氧化酶-2(COX-2)的表达增加,进而引起一氧化氮(NO)和前列腺素 E2(PGE2)水平的升高,最终通过上调 MMPs 导致软骨基质降解。同

时, IL-6 的协同作用增强了这种损伤作用^[16]。Hooiveld 等^[26]在模拟关节内出血的模型上, IL-1 β 对关节软骨的影响得到了证实, 并报告了 IL-1 β 对软骨细胞减少和关节软骨细胞外基质蛋白聚糖合成的影响。Sambrano 等^[27]证实红细胞被破坏溶解, 并刺激单核细胞/巨噬细胞分泌炎性细胞因子, 而炎性因子主要是由 IL-1 β 介导的。由此可以得出结论, IL-1 β 可能在血友病引起的软骨破坏过程中起关键性作用。

IL-6 由两种糖蛋白链组成(即 α 链、 β 链), 形成一种复合物, 能迅速与 β 链结合, 并通过 β 链将信息传递给细胞。Narkbunnam 等^[28]应用 IL-6 受体拮抗剂作为凝血因子替代物治疗血友病关节出血是否有效的实验中发现, 接受抗 IL-6R 作为 FVIII 替代物治疗的动物较对照组表现出最佳的存活率和最轻的急性关节肿胀, 对软骨检查发现仅有少量的含铁血黄素沉积和巨噬细胞浸润, 这说明抗 IL-6R 可以减缓血友病软骨退化, 而 IL-6 对其有破坏作用。

TNF- α 是另一种与关节软骨分解代谢密切相关的炎性细胞因子^[29]。它的生物学功能与软骨细胞抑制蛋白聚糖和 II 型胶原的合成有关^[30]。此外, Henderson 等^[31]通过动物实验发现, TNF- α 和 IL-1 β 在关节炎发病机制中具有显著的协同作用。Roosendaal 等^[32]研究证实, HA 患者滑膜组织细胞培养上清液中 TNF- α 水平高于 OA 和 RA 研究组及对照组。与 IL-1 β 不同的是, TNF- α 表达仅在滑膜组织而不是在关节软骨中发生。

2.2 免疫细胞

关节出血导致的铁沉积激活局部免疫系统, 促进血管结节的形成, 并通过招募更多单核细胞/巨噬细胞、中性粒细胞和活化 T 细胞, 促进大量损伤软骨的炎性因子释放^[27]。在软骨损伤过程中, 首先被招募过来的是中性粒细胞, 它能够分泌炎性介质和弹性蛋白酶。此外, 这个过程破坏软骨细胞基质, 导致软骨细胞凋亡。干扰素- γ 在激活 NK 细胞和辅助 T 细胞后释放, 将浸润性巨噬细胞转化为 M1 巨噬细胞。随后, M1 巨噬细胞分泌促炎因子干预骨髓间充质干细胞向软骨分化。树突状细胞诱导 Th1 和 Th17 活化, 导致软骨变性, 肥大细胞则促进细胞外基质降解^[33]。免疫机制在血友病软骨发病过程中不容小觑, 但由于免疫微环境的复杂性, 值得引起研究者的重视。

2.3 铁离子

血友病滑膜炎含铁血黄素沉积是 HA 的标志之一, 代表铁在关节的累积程度^[34-35]。有研究证实, 关节软骨中也含有铁离子沉积^[36-37]。Zhou 等^[38]发现血友病患者的核磁共振成像结果显示软骨下囊肿中存在含铁血黄素, 进一步证实了铁离子不仅存在于滑膜中, 而且存在于临近的软骨组织中。含铁血黄素引发多种炎性介质, 如 TNF- α 、血管内皮生长因子- α (VEGF- α)、基质细胞衍生因子 1- α (SDF1- α)、缺氧诱导因子 1- α (HIF-1 α) 和 MMP-9, 加剧滑膜增生和新生血管, 导致不可逆转的软骨损伤^[39]。Camacho 等^[40]研究人员将 WT 和 Hfe-KO 细胞分别暴露于 50 μ mol/L 浓度的柠檬酸铁中, 发现铁离子显著促进 MMP3、MMP13、聚糖酶的表达, 并与软骨细胞外基质 (EMC) 显著减少有关。有研究发现, 铁超载可导致软骨细胞因铁死亡而凋亡, 进一步引起关节软骨退化, 在体内观察到骨赘形成和软骨下骨硬化的增加^[41-42]。此外, 暴露于铁的原代软骨细胞培养显示软骨细胞肥大标记物(如骨钙素和胶原 1A1)上调和 Sox9 下调, Sox9 是一种与软骨发育至关重要的转录因子, 结果提示关节软骨倾向于肥大方向分化^[43]。在血友病患者中, 凝血因子的表达缺陷可会加剧与输血相关的铁超载^[35, 44-45], 进而影响关节软骨。

2.4 滑膜炎

滑膜炎的病理特征是含铁血黄素沉积、滑膜增生肥大、炎性细胞浸润以及血管增生^[5, 39]。当血友病患者有出血倾向后, 滑膜细胞会将血液从关节腔慢慢吸收, 参与这一过程的还有巨噬细胞以及其他的炎性细胞。然而, 若出现持续或反复出血, 这些细胞来不及吸收多余的血液, 就会触发慢性滑膜炎。血友病软骨改变主要与慢性滑膜炎有关, 因为增生的血管会在软骨表面形成, 并分泌大量组织破坏性介质(如细胞因子和酶), 它们对血友病软骨具有较强的破坏作用^[34]。慢性滑膜炎介导血友病软骨的大部分长期损害。

2.5 血液

van Meegeren 等^[46]在犬实验中发现, 首先, 关节内注射凝固血液比注射抗凝血液相比, 会导致更严重的软骨损伤。将软骨暴露于没有滑膜参与的血液中的体外实验表明, 至少有一些凝血作用是直接作用于软骨的, 且与炎症无关。关节内注射凝固血液导致蛋白聚糖减少 6%。其次, 为了研究抗凝

剂肝素对软骨损害的影响,还进行了膝关节一侧注射抗凝剂和对侧注射等量生理盐水的研究,发现注射肝素化盐水的膝关节比对照组释放更多的蛋白聚糖,这说明肝素导致软骨中蛋白聚糖增多。抗凝血液比凝固血液造成的血液诱导的关节损伤更小,是因为肝素抗凝通过激活抗凝血酶来抑制凝血酶的形成^[47]。凝血酶本身会直接损害软骨,因为在体外培养时发现凝血酶会促进人和牛软骨外植体中蛋白聚糖的释放^[48]。最后,在比较血清和血浆对软骨损害的影响时发现,来自健康对照组的血清中含有较低水平的多种细胞因子,如 IL-1 和 TNF- α ,而与软骨破坏有关的 MMP-1 和 MMP-13 的水平在血清和血浆中没有差异^[49]。研究表明,暴露于 50% 的血清和血浆中的软骨不会造成长期的、不可逆转的软骨损伤,尽管暴露在血浆的蛋白聚糖释放水平高于暴露在血清。这表明了血清和血浆中均含有导致暂时性软骨损伤的不同成分。

人或犬软骨在体外短时间接触全血后,糖胺聚糖(GAG)的合成受到 98% 以上的抑制,并持续约 10 周^[36],这种影响是不可逆转的,不依赖于 IL-1 的产生,这可能会影响血友病关节软骨的 GAG 代谢。软骨细胞受到刺激生成过氧化氢与红细胞相互作用,在软骨细胞周围形成羟基自由基。软骨细胞凋亡,由半胱天冬酶介导,然后不可逆地降解软骨基质和形成功能失调基质,导致关节软骨损伤,提示细胞毒性氧化代谢产物对软骨的损害作用。Pulles 等^[50]研究发现在血友病动物模型中应用³⁵SO₄²⁻定量检测蛋白聚糖发现血液诱导的早期软骨损伤,当单侧膝关节血液暴露后第 4 天、第 16 天检测蛋白聚糖合成受到抑制,另外,第 16 天检测发现对侧膝关节的蛋白聚糖合成也受到抑制。这说明,蛋白聚糖是检测早期软骨损伤的敏感指标。关节软骨是早期血友病人关节内出血的靶点。当反复发生关节内出血,如果血液成分没有及时清除并积聚在关节中,软骨的破坏会更快更严重。Jansen 等^[51]通过将血液注入到犬的膝关节实验发现,血液在 48 h 内被迅速清除,关节腔内的红细胞浓度降低到 5% 以下,尽管清除得很快,但仍对软骨的损害是不可逆的,然而遗憾的是目前这种清除机制尚不明确。另外,关节急剧出血会使关节腔机械压力骤升,损害关节内部的纤维结构,导致软骨损伤。

2.6 纤溶酶

纤溶酶是指能专一降解纤维蛋白凝胶的蛋白

水解酶,在出血性关节疾病起关键作用,尤其是软骨损伤的发生。关节血肿导致滑膜纤维蛋白溶解系统的激活,纤溶酶可以通过释放蛋白聚糖直接作用于软骨,也可以通过活化 MMPs 而间接造成软骨损害。Nieuwenhuizen 等^[52]在一项评估血友病小鼠和人类关节出血中蛋白酶激活受体(PARs)表达,以及评估针对受体的 siRNA 治疗是否能减轻滑膜炎和软骨损伤的实验中,观察到在小鼠滑膜 PAR1、PAR-2 和 PAR-4 表达增加,在软骨细胞 PAR2 和 PAR-3 表达增加,PAR1-4 siRNA 通过沉默带有互补序列的信使 RNA 可抑制 PAR1-4 的表达,用 PAR1-4 siRNA 治疗血友病小鼠关节出血可减轻滑膜炎和软骨损伤,其作用机制可能是纤溶酶能够通过激活 PARs 介导各种细胞效应,或对 PAR 进行负向调节^[53],进一步表明纤溶酶可诱发软骨损伤。

2.7 信号通路

Hu 等^[54]最近研究发现,软骨下骨血管内皮生长因子(VEGF)和血小板衍生生长因子 β (PDGF- β) 高表达,从而促进了血管生成,这些在病理下生成的血管会进一步破坏软骨,软骨细胞会在数小时内对损伤作出反应,早期损伤的特点是激活与成骨和关节的形成有关的信号通路。研究表明,受损的软骨可以释放成纤维细胞生长因子 2(FGF-2),从而诱导细胞外信号调节激酶(ERK)的磷酸化,从而保护软骨。此外,转化生长因子- β (TGF- β) 和骨形态发生蛋白(BMPs)信号通路迅速激活。TGF- β 信号通路在调节关节内环境平衡中起重要作用,通过细胞内介质 SMAD-2 或 SMAD-3 转导其信号,这可以促进软骨细胞相对稳态的维持,并诱导蛋白聚糖和 II 型胶原的产生^[55]。BMPs 在软骨形成和修复中具有重要的作用,BMPs 信号通路上调,作用机制是经丝氨酸/苏氨酸激酶受体转导,磷酸化 R-Smad 蛋白,调节靶基因的转录^[56]。因此,应用 BMP 抑制剂阻断 BMP 信号通路可以抑制软骨的生长板修复。

众所周知,Wnt 信号分子调节各种细胞的增殖、分化和生长。Wnt 途径通过调节软骨下骨的结构间接影响软骨,主要是通过影响软骨细胞中 MMPs 的表达^[57]。研究显示,Wnt/ β -连环蛋白信号通路与软骨损伤后的炎症有关,在软骨损伤期间异常激活,从而导致软骨损害^[58]。另一研究显示,抑制软骨细胞中的 β -连环蛋白信号可导致软骨细胞凋亡,这也会导致软骨破坏^[59]。两项研究结果显示相反的结论,由此可以推断适合的 Wnt 蛋白浓度对于软骨的

生理维持是非常关键的, Wnt 通路可能与血友病软骨损伤有关。Sen 等^[60]实验发现, 在关节血友病急性损伤模型中, 损伤 3 h 后分离出的关节特异性 RNA 的全球基因表达序列显示, NF- κ B 是触发炎症的一种重要转录因子。随后, 为进一步证实, 在多次性损伤模型后 1 h ~ 90 d, 筛选了 NF- κ B 相关通路, 发现 NF- κ B 相关因子显著上调, 导致损伤关节内缺氧, 血管生成和软骨细胞凋亡, 表明 NF- κ B 相关通路可能与血友病软骨损伤有关。

3 总结与展望

近年来, 国内外学者 HA 的发病机制引起了足够的重视, 对其发病机制有了一定的认识, 但对于其复杂的发病机制尚不完全清楚, 尤其是血友病关节软骨的修复一直是一个无法攻克的难题。目前认为, 多种细胞因子、免疫细胞、铁离子沉积、慢性滑膜炎、血液、纤溶酶、多条信号通路等可能与血友病软骨细胞凋亡有关, 从而导致软骨受损。对于其复杂的发病机制的研究和认识还有待提高。软骨的修复软骨组织工程备受研究者的青睐, 软骨组织工程指的是向关节腔内植入支架材料, 由于需要良好的相容性和降解性, 考虑成本 and 安全性实施较为困难。另外, 移植具有软骨分化向的干细胞似乎可行, 但需要特定的条件刺激, 如缺氧、机械负荷、软骨生长因子等。随着临床和动物体内实验研究的深入展开, 研发新的药物和新的治疗技术策略应用于血友病软骨的修复指日可待。

参 考 文 献 (References)

- [1] Iorio A, Stonebraker JS, Chambost H, et al. Establishing the prevalence and prevalence at birth of hemophilia in males: a meta-analytic approach using national registries [J]. *Ann Intern Med*, 2019, 171(8): 540-546.
- [2] Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH guidelines for the management of hemophilia panelists and co-authors. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition [J]. *Haemophilia*, 2020, 26(6): 1-158.
- [3] Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, et al. Treatment guidelines working group on behalf of the world federation of hemophilia. guidelines for the management of hemophilia [J]. *Haemophilia*, 2013, 19(1): e1-e47.
- [4] Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, et al. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH [J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(11): 1935-1939.
- [5] Melchiorre D, Manetti M, Matucci-Cerinic M. Pathophysiology of hemophilic arthropathy [J]. *J Clin Med*, 2017, 6(7): 63.
- [6] Kenet G, Chen YC, Lowe G, et al. Real-World rates of bleeding, factor VIII use, and quality of life in individuals with severe haemophilia a receiving prophylaxis in a prospective, noninterventional study [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(24): 5959.
- [7] Pratt KP, Arruda VR, Lacroix-Desmazes S. Inhibitors-recent insights [J]. *Haemophilia*, 2021, 27(3): 28-36.
- [8] 王天有, 吴润晖. 迈进儿童血友病关怀新时代 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2017, 32(1): 18-22.
Wang TY, Wu RH. Entry into the new era of care for children with hemophilia [J]. *Chin J Practical Pediatr*, 2017, 32(1): 18-22.
- [9] Zhao X, Hu DA, Wu D, et al. Applications of biocompatible scaffold materials in stem cell-based cartilage tissue engineering [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 603444.
- [10] 史冬泉, 李嘉威. 软骨修复临床转化的挑战与机遇 [J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(9): 897-903.
Shi DQ, Li JW. Clinical transformation of cartilage tissue engineering: challenges and opportunities [J]. *J Med Postgrad*, 2019, 32(9): 897-903.
- [11] Hou M, Zhang Y, Zhou X, et al. Kartogenin prevents cartilage degradation and alleviates osteoarthritis progression in mice via the miR-146a/NRF2 axis [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5): 483.
- [12] Street M, Thambyah A, Dray M, et al. Augmentation with an ovine forestomach matrix scaffold improves histological outcomes of rotator cuff repair in a rat model [J]. *J Orthop Surg Res*, 2015, 10(1): 1-11.
- [13] 郭文娟, 赵永强. 血友病关节病的发病机制及危险因素 [J]. *血栓与止血学*, 2012, 18(1): 42-44.
Guo WJ, Zhao YQ. Haemophilic arthropathy: pathogenesis and risk factors [J]. *Chin J Thrombosis Hemostasis*, 2012, 18(1): 42-44.
- [14] 黄云梅, 陈文列, 黄美雅, 等. 多种特殊染色法在骨关节炎组织形态学研究中的应用比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(5): 45-49.
Huang YM, Chen WL, Huang MY, et al. Comparison of several special stainings on osteoarthritis morphology [J]. *Chin J Comp Med*, 2011, 21(5): 45-49.
- [15] Hua B, Olsen EHN, Sun S, et al. Serological biomarkers detect active joint destruction and inflammation in patients with haemophilic arthropathy [J]. *Haemophilia*, 2017, 23(4): e294-e300.
- [16] Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17 [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47(11): 1635-1640.
- [17] Niki Y, Yamada H, Kikuchi T, et al. Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice [J]. *J Immunol*, 2004, 172(1): 577-584.
- [18] Srivastava A. Inflammation is key to hemophilic arthropathy [J]. *Blood*, 2015, 126(19): 2175-2176.
- [19] Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Nauman P, et al. Cytokines

- in the pathogenesis of hemophilic arthropathy [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2018, 39: 71–91.
- [20] Mehana EE, Khafaga AF, El-Blehi SS. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review [J]. Life Sci, 2019, 234: 116786.
- [21] Ma CH, Wu CH, Jou IM, et al. PKR activation causes inflammation and MMP-13 secretion in human degenerated articular chondrocytes [J]. Redox Biol, 2018, 14: 72–81.
- [22] Settle S, Vickery L, Nemirovskiy O, et al. Cartilage degradation biomarkers predict efficacy of a novel, highly selective matrix metalloproteinase 13 inhibitor in a dog model of osteoarthritis: confirmation by multivariate analysis that modulation of type II collagen and aggrecan degradation peptides parallels pathologic changes [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(10): 3006–3015.
- [23] Mahmoudian A, Lohmander LS, Mobasheri A, et al. Early-stage symptomatic osteoarthritis of the knee-time for action [J]. Nat Rev Rheumatol, 2021, 17(10): 621–632.
- [24] Yu D, Xu J, Liu F, et al. Subchondral bone changes and the impacts on joint pain and articular cartilage degeneration in osteoarthritis [J]. Clin Exp Rheumatol, 2016, 34(5): 929–934.
- [25] van Vulpen LF, Schutgens RE, Coelevelt K, et al. IL-1 β , in contrast to TNF α , is pivotal in blood-induced cartilage damage and is a potential target for therapy [J]. Blood, 2015, 126(19): 2239–2246.
- [26] Hooiveld MJ, Roosendaal G, van den Berg HM, et al. Haemoglobin-derived iron-dependent hydroxyl radical formation in blood-induced joint damage: an *in vitro* study [J]. Rheumatology (Oxford), 2003, 42(6): 784–790.
- [27] Sambrano GR, Terpstra V, Steinberg D. Independent mechanisms for macrophage binding and macrophage phagocytosis of damaged erythrocytes. Evidence of receptor cooperativity [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(12): 3442–3448.
- [28] Narkbunnam N, Sun J, Hu G, et al. IL-6 receptor antagonist as adjunctive therapy with clotting factor replacement to protect against bleeding-induced arthropathy in hemophilia [J]. J Thromb Haemost, 2013, 11(5): 881–893.
- [29] Park J, Park H, Lee YL, et al. Blocking TNF α attenuates progressive cartilage matrix degradation in inflammatory arthritis [J]. Exp Ther Med, 2021, 22(2): 808.
- [30] Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(1): 128–135.
- [31] Henderson B, Pettipher ER. Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines *in vivo* [J]. Clin Exp Immunol, 1989, 75(2): 306–310.
- [32] Roosendaal G, van Rinsum AC, Vianen ME, et al. Haemophilic arthropathy resembles degenerative rather than inflammatory joint disease [J]. Histopathology, 1999, 34(2): 144–153.
- [33] Li M, Yin H, Yan Z, et al. The immune microenvironment in cartilage injury and repair [J]. Acta Biomater, 2022, 140: 23–42.
- [34] Calcaterra I, Iannuzzo G, Dell'Aquila F, et al. Pathophysiological role of synovitis in hemophilic arthropathy development: a two-hit hypothesis [J]. Front Physiol, 2020, 11: 541.
- [35] van Vulpen LF, Roosendaal G, van Asbeck BS, et al. The detrimental effects of iron on the joint: a comparison between haemochromatosis and haemophilia [J]. J Clin Pathol, 2015, 68(8): 592–600.
- [36] Hooiveld M, Roosendaal G, Vianen M, et al. Blood-induced joint damage: longterm effects *in vitro* and *in vivo* [J]. J Rheumatol, 2003, 30(2): 339–344.
- [37] Cooke EJ, Zhou JY, Wyseure T, et al. Vascular permeability and remodelling coincide with inflammatory and reparative processes after joint bleeding in factor VIII-deficient mice [J]. Thromb Haemost, 2018, 118(6): 1036–1047.
- [38] Zhou JY, Wong JH, Berman ZT, et al. Bleeding with iron deposition and vascular remodelling in subchondral cysts: a newly discovered feature unique to hemophilic arthropathy [J]. Haemophilia, 2021, 27(6): e730–e738.
- [39] Acharya SS, Kaplan RN, Macdonald D, et al. Neoangiogenesis contributes to the development of hemophilic synovitis [J]. Blood, 2011, 117(8): 2484–2493.
- [40] Camacho A, Simão M, Ea HK, et al. Iron overload in a murine model of hereditary hemochromatosis is associated with accelerated progression of osteoarthritis under mechanical stress [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(3): 494–502.
- [41] Burton LH, Radakovich LB, Marolf AJ, et al. Systemic iron overload exacerbates osteoarthritis in the strain 13 guinea pig [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2020, 28(9): 1265–1275.
- [42] Jing X, Lin J, Du T, et al. Iron Overload is associated with accelerated progression of osteoarthritis: the role of DMT1 mediated iron homeostasis [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 8: 1–15.
- [43] Simão M, Gavaia PJ, Camacho A, et al. Intracellular iron uptake is favored in Hfe-KO mouse primary chondrocytes mimicking an osteoarthritis-related phenotype [J]. Biofactors, 2019, 45(4): 583–597.
- [44] Choi YC, Hough AJ, Morris GM, et al. Experimental siderosis of articular chondrocytes cultured *in vitro* [J]. Arthritis Rheum, 1981, 24(6): 809–823.
- [45] Hakobyan N, Enockson C, Cole AA, et al. Experimental hemophilic arthropathy in a mouse model of a massive haemarthrosis: gross, radiological and histological changes [J]. Haemophilia, 2008, 14(4): 804–809.
- [46] van Meegeren ME, Roosendaal G, Barten-van Rijbroek AD, et al. Coagulation aggravates blood-induced joint damage in dogs [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(10): 3231–3239.
- [47] Mourier PA, Guichard OY, Herman F, et al. New Insights in thrombin inhibition structure-activity relationships by characterization of octadecasaccharides from low molecular weight

- heparin [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 428.
- [48] Furmaniak-Kazmierczak E, Cooke TD, Manuel R, et al. Studies of thrombin-induced proteoglycan release in the degradation of human and bovine cartilage [J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(2): 472–480.
- [49] Stroncek D, Slezak S, Khuu H, et al. Proteomic signature of myeloproliferation and neutrophilia: analysis of serum and plasma from healthy subjects given granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(10): 1109–1117.
- [50] Pulles AE, Vøls KK, Christensen KR, et al. Proteoglycan synthesis rate as a novel method to measure blood-induced cartilage degeneration in non-haemophilic and haemophilic rats [J]. *Haemophilia*, 2020, 26(3): e88–e96.
- [51] Jansen NW, Roosendaal G, Wenting MJ, et al. Very rapid clearance after a joint bleed in the canine knee cannot prevent adverse effects on cartilage and synovial tissue [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(4): 433–440.
- [52] Nieuwenhuizen L, Schutgens RE, Coeleveld K, et al. Silencing of protease-activated receptors attenuates synovitis and cartilage damage following a joint bleed in haemophilic mice [J]. *Haemophilia*, 2016, 22(1): 152–159.
- [53] Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors [J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 130(3): 248–282.
- [54] Hu W, Chen Y, Dou C, et al. Microenvironment in subchondral bone: predominant regulator for the treatment of osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80(4): 413–422.
- [55] van der Kraan PM. Inhibition of transforming growth factor- β in osteoarthritis discrepancy with reduced TGF- β signaling in normal joints [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 4(1): 100238.
- [56] Thielen NGM, van der Kraan PM, van Caam APM. TGF β /BMP signaling pathway in cartilage homeostasis [J]. *Cells*, 2019, 8(9): 969.
- [57] Claudel M, Jouzeau JY, Cailotto F. Secreted Frizzled-related proteins (sFRPs) in osteo-articular diseases: much more than simple antagonists of Wnt signaling? [J]. *FEBS J*, 2019, 286(24): 4832–4851.
- [58] Chung R, Wong D, Macsai C, et al. Roles of Wnt/ β -catenin signalling pathway in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats [J]. *Bone*, 2013, 52(2): 651–658.
- [59] Shi T, Fu X, Wang F, et al. The WNT/ β -catenin signalling pathway induces chondrocyte apoptosis in the cartilage injury caused by T-2 toxin in rats [J]. *Toxicol*, 2021, 204: 14–20.
- [60] Sen D, Chapla A, Walter N, et al. Nuclear factor (NF)- κ B and its associated pathways are major molecular regulators of blood-induced joint damage in a murine model of hemophilia [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(2): 293–306.

[收稿日期] 2022-03-12

孙立亚,刘北,奚悦. 通过链脲佐菌素诱导建立糖尿病骨质疏松大鼠模型的实验研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 1003-1012.

Sun LY, Liu B, Xi Y. Progress in experimental research on establishment of a diabetic osteoporosis rat model induced by streptozotocin [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 1003-1012.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.017

通过链脲佐菌素诱导建立糖尿病骨质疏松大鼠模型的实验研究进展

孙立亚¹, 刘北¹, 奚悦^{2*}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 锦州医科大学附属第三医院, 辽宁 锦州 121001)

【摘要】 糖尿病骨质疏松症 (diabetic osteoporosis, DOP) 是由糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 诱发的慢性骨代谢疾病, 其特征为骨量减少、骨脆性增加、强度降低以及易于发生骨折等。为更好地探索糖尿病骨质疏松发病机制, 并为其治疗研究提供依据, 建立出能够模拟人类糖尿病骨质疏松病理学的动物模型具有重要价值。通过链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导建立糖尿病骨质疏松动物模型的方式具有操作简单、用时短、成模率高、稳定性相对较高等优势, 本文从动物选择、饲料喂养、链脲佐菌素的应用、造模方法、成模标准及检测指标等方面进行综述, 希望能够为更加深入研究糖尿病骨质疏松致病机制提供基础和依据。

【关键词】 链脲佐菌素; 糖尿病骨质疏松症; 大鼠模型; 研究进展

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 07-1003-10

Progress in experimental research on establishment of a diabetic osteoporosis rat model induced by streptozotocin

SUN Liya¹, LIU Bei¹, XI Yue^{2*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China. 2. the Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001)

Corresponding author: XI Yue. E-mail: xiyue-ln@163.com

【Abstract】 Diabetic osteoporosis (DOP) is a chronic bone metabolic disease induced by diabetes mellitus, which is characterized by a decreased bone mass, increased bone fragility, decreased strength, and fracture tendency. To better explore the pathogenesis of DOP and develop treatments, it is important to establish an animal model that mimics the pathology of human DOP. The method of establishing a DOP animal model induced by streptozotocin has the advantages of simple operation, short time, high molding rate and relatively high stability. This article reviews animal selection, feeding, streptozotocin application, modeling method, modeling criteria, and testing indexes to provide a basis for more in-depth research of DOP pathogenesis.

【Keywords】 streptozotocin; diabetic osteoporosis; rat model; research advances

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

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种以高血糖为特征的常见病, 在世界范围内发病率较高。预计

到 2030 年, 世界人口约为 85 亿, 而全球糖尿病患病率将达到 9%^[1], 这意味着大约有 7.65 亿人患有糖

[作者简介] 孙立亚 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 糖尿病骨代谢疾病的中西医结合临床与基础研究。

Email: 952762386@qq.com

[通信作者] 奚悦 (1973—), 女, 博士, 教授, 主任医师, 研究方向: 糖尿病及其并发症的中西医结合治疗。Email: xiyue-ln@163.com

尿病。与非糖尿病人群相比,这些人的死亡率有所增加,例如,冠心病死亡率增加了 28%^[2]。糖尿病骨质疏松症(diabetic osteoporosis, DOP)是其严重并发症之一,临床多表现为疼痛、相应部位功能活动障碍、畸形、甚至骨折等,患者生命质量大大降低^[3]。Oei 等^[4]发现 DM 患者的骨折发生率比非 DM 患者高 47% ~ 62%。因此建立稳定、简便、高效的 DOP 动物模型是寻找治疗 DOP 新药的重要保证。目前 DOP 建模的方法有三种,分别是诱导型、自发型和转基因/基因敲除型^[5],其中链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导型因其相对便宜、高效、简便而被经常运用,然而,STZ 致糖尿病也是多因素的,取决于各种实际方面,如动物种类、性别、年龄、STZ 的稳定性、给药途径和剂量等^[6]。下面就 STZ 诱导建立 DOP 大鼠模型的方法及相关研究进展进行综述,旨在为科研及临床相关研究提供进一步的指导。

1 动物选择及饲料喂养

斑马鱼^[7]、羊^[8]、兔^[9]、猪^[10]、大鼠^[11]、小鼠^[12]等是常用于制作骨质疏松模型的动物,由于大鼠与人类骨骼的病理生理相似且比较经济、重复检验度高,所以多采用大鼠制作 DOP 动物模型^[13],SD 和 Wistar 大鼠应用最广。STZ 易受雌激素干扰^[14],雄性的胰岛 β 细胞比雌性更容易受到 STZ 诱导的细胞毒性,对胰岛细胞毒素更加敏感,且选用雄性大鼠制备模型的成模率明显高于雌性大鼠,此外雄性大鼠可排除雌激素这一因素对疾病的干扰,因此雄性动物更受欢迎^[15]。在制备 DOP 模型时,为提高成模率,部分选择雌性大鼠的研究者为排除雌激素干扰,还会对大鼠去卵巢^[16-19]。大鼠寿命一般为 2~3 年,在 3 月龄达到性成熟,6 月龄达到骨成熟,17 月龄以后进入老年时期。因 1 型糖尿病骨质疏松症(type 1 diabetic osteoporosis, T1DOP)多发生于青少年,故多选择小于 3 月龄大鼠制作模型,2 型糖尿病骨质疏松(type 2 diabetic osteoporosis, T2DOP)模型大鼠多选用 3 月龄及以后的。

高糖和高脂是糖尿病发病因素,高糖高脂饲料可模拟人肥胖、胰岛素抵抗和/或糖耐量不足等状态,实验员在通过 STZ 诱导建立 T2DOP 模型时,先将大鼠或小鼠适应性喂养 1 周,再予高糖高脂或者高脂饲料喂养以诱导胰岛素抵抗,为注射 STZ 作前期准备。高糖高脂饲料未有统一的配制方法及材料组成。目前主要有两类,一种是在普通饲料的基

础上添加一定比例的动物油、糖、胆固醇、胆酸盐等,成分比例多为 10% ~ 20% 猪油、10% ~ 20% 蔗糖、1.5% ~ 5% 胆固醇、0.4% ~ 1% 胆酸盐、60% ~ 80% 普通饲料、5% ~ 10% 其他^[20-21]。另一种为纯化饲料,其细分了各组分营养物质的配比,配方明确规范,但价格昂贵。除了种类,各高脂饲料的脂肪比也不同,通常认为脂肪供能比 30% ~ 50% 为高脂饮食,而大于 50% 被认为是极高脂肪饮食^[22]。王继等^[23]发现高脂饲养的时间对建立糖尿病大鼠模型的特征有较大影响,喂养时间的长短和胰岛素抵抗程度、血脂异常程度正相关,和 STZ 用量负相关,但需根据饲料脂肪比、动物生命周期、慢性并发症的发展及后续实验具体情况来确定具体时间,建议 4 ~ 12 周为宜^[24]。

2 STZ 的应用

STZ 是一种广谱抗生素,本质是一种氨基葡萄糖一亚硝基脲,能通过 GLUT2 葡萄糖转运蛋白进入细胞内。在用于诱发糖尿病的几种可用化学物质中,STZ 最适合在动物中模拟人类糖尿病。在 STZ 诱导的糖尿病中观察到的结构、功能和生化变化类似于人类糖尿病中通常出现的变化。因此,STZ 诱导的糖尿病代表了一种临床相关模型,用于研究实验动物中糖尿病的发病机制和相关并发症^[25]。其引发糖尿病的机制与一氧化氮与亚硝化应激、乌头酸酶抑制、活性氧与氧化应激、DNA 烷基化、O-GlcNA 酶抑制、高血糖状态和葡萄糖代谢途径、炎症和细胞存活途径、NAD⁺/ATP 耗竭和过度刺激的 DNA 修复机制等有关^[26]。其致糖尿病特性表现为选择性破坏 β 细胞、胰岛素缺乏、高血糖、多饮和多尿,与人类糖尿病相似^[27]。

目前相关实验研究所用的 STZ 品牌多为 Sigma,纯度 $\geq 98\%$,对于其他品牌、纯度以及不同品牌、纯度 STZ 对成模效果的具体影响需要我们进一步研究。既往报道称^[28],STZ 应储存在 -20°C 以防止降解,称重后,装有 STZ 样品的微量离心管必须用铝箔覆盖以避光。由于 STZ 在溶液中不稳定,即使在酸性 pH 值下,也只能在即将注射前将其混入柠檬酸盐缓冲液中。STZ 溶液应在溶解后 5 min 内新鲜制备并注入,因为 15 ~ 20 min 内它在柠檬酸盐缓冲液中分解。

STZ 的给药途径可决定糖尿病诱导程度,酶对 STZ 的降解和肠道的强酸性环境限制了其通过口服途径给药,可以通过尾静脉、腹腔、皮下将 STZ 注射到大鼠体内。Takeda 等^[29]选用尾静脉注射 STZ 来

造模,黎娅等^[30]、Tay 等^[31]研究发现尾静脉注射 STZ 比腹腔注射有更好的稳定性,且更直观,可以避免腹腔注射时药物进入皮下、肠道,降低大鼠死亡率增加的风险。此外,黄波等^[32]发现尾静脉注射成模率远大于腹腔注射,推测可能与药物的吸收利用更直接有关。然而,张汝学等^[33]、沈亚非等^[34]研究证实两种方式的成模率相差不大。由于尾静脉注射药物利用率高,对剂量的准确性要求较高,且尾静脉较细,不易操作,易造成药物损耗,不易控制速度,皮下注射需要药物剂量较大,故多选用腹腔注射给药。

因禁食可增加胰岛细胞对 STZ 的敏感性,与不禁食组相比糖尿病成模率更高^[35],所以,研究人员在注射 STZ 之前将大鼠禁食,但具体的禁食时间 4~24 h 不等^[36-38]。叶桐江等^[39]通过实验观察不同禁食时间(12、16、20、24 h)对建立 1 型糖尿病大鼠模型的影响,结果显示禁食 20 h 大鼠成模率最高,死亡率较低,为最佳禁食时间。Furman 等^[28]认为,在注射 STZ 之前大鼠应禁食 6~8 h。STZ 给药可能导致大量 β 细胞的快速破坏和肝糖原存储的消耗,进而导致释放到血液中的胰岛素增加和短暂的低血糖,如果不予干预,可能会使动物致命,此时可通过在 STZ 施用后 48 h 内向动物施用 10% 蔗糖溶液来避免这种情况^[40]。

STZ 的剂量和给药次数是其致糖尿病作用程度的决定因素。在注射时,通常分为大剂量单次、小剂量多次、小剂量单次。其中大剂量单次,如一次性腹腔注射 STZ 60 mg/kg,则直接损伤胰岛 β 细胞,更倾向于 T1DOP 的表型特点^[41],主要用于 T1DM 的药物实验,小剂量多次主要用于胰岛坏死及增殖机制的研究^[42],和前者相比,能更好的模拟 T1DM 的发病过程,使死亡率降低,但工作量和总误差大,造模周期较长^[43]。小剂量单次注射 STZ 如 35 mg/kg,常应用在给大鼠喂养高糖高脂饮食之后,辅助部分破坏胰岛 β 细胞,使机体失去足够的代偿能力,更接近于 T2DOP 模型^[44]。然而,剂量也因种间差异而变化。在较低剂量时,可能不会诱发理想的糖尿病,高剂量时,可能会引起动物死亡。因此,STZ 的剂量应根据个体动物的体重进行优化,以获得令人满意的糖尿病模型,并且没有显著的死亡率。

综上,通过 STZ 诱导建立 DOP 模型在实验开始前一定要做好充分的准备工作,注意 STZ 的作用功效、储存方法、给药方式、给药剂量、禁食时间等,建立出适合自己实验的模型。

3 造模方法、成模标准及检测指标

3.1 1 型糖尿病骨质疏松模型

何佳等^[45]选用体重(230 ± 10)g 的 8 周龄雌性 SD 大鼠,适应性饲养 1 周后,模型组采用单次左下空腹腹腔注射 STZ 60 mg/kg 建立 T1DOP 动物模型。造模 72 h 后,大鼠尾静脉取血,当随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L,并出现多饮多食多尿症状时,符合糖尿病诊断标准,判定为糖尿病大鼠。造模成功 8 周后处死大鼠,收集血清检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活力,对胰腺和股骨组织进行病理学观察,并对股骨组织进行形态计量学测定。结果与正常组大鼠相比,模型组血糖、进食量与饮水量明显升高,而体重显著降低,胰岛细胞形状不规则、边界模糊、体积缩小,股骨骨小梁稀疏,出现不同程度的断层,骨小梁厚度及面积百分率显著降低、间距显著增加,血清中 ALP 活力极显著上升。该模型符合 T1DOP 成模动物诊断标准。证明腹腔一次性快速注射 STZ 60 mg/kg 8 周后可成功构建 T1DOP 动物模型。

张丽媛等^[46]选取体重(201 ± 20)g 的 3 月龄雄性 SD 大鼠,常规饲料喂养 1 周,第 1 周末禁食 12 h 后,进行腹腔注射 STZ 60 mg/kg,注射部位选择在下腹部后 1/3 处避开中部膀胱。造模 72 h 后,以随机血糖 ≥ 17.6 mmol/L 作为成模标准。分别于造模成功后 1、4、8、12、16 周各随机选取 6 只糖尿病模型大鼠和周龄相匹配的 6 只对照组大鼠麻醉处死,检测指标。从血糖、体重、骨密度(bone mineral density, BMD)、骨组织形态计量学(骨小梁面积、骨小梁厚度、骨小梁数量及骨小梁分离度)证实该方法可以成功制备 T1DOP 大鼠模型。在第 4~8 周模型骨质疏松相关指标变化最快,此方法成模率高,模型稳定。

An 等^[47]选用 8 周龄雄性 SD 大鼠,禁食不禁水后对大鼠腹腔注射 STZ 60 mg/kg 体重。糖尿病的诊断是基于空腹血糖 > 11.1 mmol/L。在注射 STZ 后 3 周,收集血液、尿液、股骨和胫骨。测定葡萄糖、胰岛素、Ca、P、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(tartrate-resistant acid phosphatase-5b, TRACP-5b)、组织蛋白酶 K 和骨钙素(osteocalcin, OC)的浓度以及脱氧吡啶啉的水平。对股骨进行生化分析和组织学分析。结果显示,与正常组比较,糖尿病大鼠体重、股骨和胫骨的重量降低,血清 Ca 和 P 水平存在显著差异,OC 水平显著降低;相反,TRACP-5b、组织蛋白酶 K 和尿脱氧吡啶啉的活性水平显著增加。糖尿病大

鼠的 BMD 和骨矿物质含量 (BMC) 显著降低。胫骨近端的干细胞具有更多的 TRAP 阳性细胞。骨小梁厚度和破骨细胞数量显著减少。该实验证实了注射 STZ 后 3 周 DOP 模型即可成立。

综上, T1DOP 动物模型在制备过程中通常不需要进食高糖高脂饲料, 适应性喂养一周后直接选用腹腔单次注射大剂量 STZ 60 mg/kg 使其胰岛细胞破坏的方法复制模型, 此方法目前证实最快 3 周即可造模成功, 可根据血糖升高, 进食量、饮水量、尿量增多, 体重减轻, 骨重降低, 血清 Ca、P、OC 水平降低, TRACP-5b、组织蛋白酶 K 和尿脱氧吡啶啉增加, ALP 活力极上升, TRAP 阳性细胞增多, 胰腺、股骨组织病理结构损伤, BMD、BMC 降低, 骨组织形态计量学参数如骨小梁面积、数量减少, 厚度降低, 分离度增加等指标变化来评价模型效果。未来需进一步研究出建立 T1DOP 模型的最佳造模方法, 确定最适 STZ 剂量及成模金标准, 建立出一套用来评价模型稳定性、安全性、高效性的评价体系。

3.2 2 型糖尿病骨质疏松模型

研究发现, 高糖、高脂饮食可以在不改变胰岛素受体亲和力的情况下导致胰岛素受体总体减少^[48], 诱导出糖尿病患者前期的肥胖、胰岛素抵抗和/或葡萄糖耐受不良状态, 低剂量 STZ 可以特异性地损伤少量胰岛细胞^[28,49]。高糖高脂肪饮食联合低剂量 STZ 诱导的糖尿病大鼠模型是 2 型糖尿病的常见模型, 也是区别 1 型或 2 型糖尿病的关键点, 具有经济、高效、稳定等特点。近年来, 许多学者利用该模型研究了 T2DOP, 发现糖尿病大鼠出现了骨代谢异常和严重的骨质流失。

张燕等^[50]选用体重 (200 ± 24) g 的雄性 SD 大鼠, 模型组高糖高脂饲料 (10% 猪油、20% 蔗糖、2% 胆固醇、1% 胆酸钠、67% 普通饲料) 喂养 5 周后禁食 12 h, 一次性左下腹腔注射 STZ 35 mg/kg, 72 h 后测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为造模成功。造模 4 周后检测糖脂代谢和骨代谢相关指标, 结果显示与正常对照组比较, 糖尿病组大鼠体质量下降、空腹血糖明显升高, 并呈持续状态; 血胆固醇、三酰甘油、ALP、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数明显升高, 胰岛素敏感指数下降; 血清 P、Ca、OC、I 型胶原交联 C 末端肽与正常组比较无显著性差异; 骨小梁稀疏、变细, 数量减少, 间隙增大, 连续性破坏, 常见游离断增多; 骨密度明显下降。说明高糖高脂喂养 5 周基础上联合小剂量 STZ 35 mg/kg 在造模后 4 周可以诱导 T2DOP 大鼠模型。该模型具有高糖、高脂、胰岛素抵抗及骨密度下降, 骨形态学检查呈骨吸收

增加改变的特点。

唐辉等^[51]选择体重 (238 ± 12) g 的 7 周龄雄性 SD 大鼠, 模型组采用高脂高糖饲料 (配方不明) 喂养 4 周, 按 35 mg/kg 一次性腹腔注射 STZ 诱导 T2DOP 模型。于 STZ 注射后 3、7、10、14 d、21 d 测量模型组大鼠空腹血糖, 连续 3 次测得空腹血糖均 ≥ 16.7 mmol/L, 则为糖尿病造模成功。8 周后取材发现与对照组大鼠比较, 模型组大鼠在注射 STZ 后, 体重呈现出先下降、后稍回升的趋势; 大鼠表现出多饮、多尿、多食等糖尿病症状; 空腹血糖明显升高, 并呈持续状态; 胰岛细胞明显稀疏; 股骨组织学切片可见骨小梁稀疏; 胫骨 Micro-CT 扫描及三维重建显示大鼠骨体积分数及骨小梁数量显著降低, 骨小梁分离度显著升高, 出现明显骨质疏松影像。说明, 7 周龄雄性 SD 大鼠在高糖高脂饲料喂养 4 周基础上, 联合采用小剂量 STZ (35 mg/kg), 可以成功建立 T2DOP 大鼠模型。造模后 8 周从形态学、组织学、影像学等几方面可以确定 DOP 模型的建立。

Guo 等^[52]在研究葛根素是否通过 HDAC1/HDAC3 信号通路抑制炎症和细胞凋亡减轻 STZ 诱导的大鼠骨质疏松症时, 选用体重 180 ~ 190 g, 7 ~ 8 周龄雄性 SD 大鼠。驯化 1 周后, 给予糖尿病组和葛根素治疗组大鼠喂饲高脂饮食 (脂肪比 45%) 诱导胰岛素抵抗, 共 4 周。4 周后, 连续 2 d 腹腔注射 STZ 35 mg/kg 体重, 建立 2 型糖尿病模型。注射 STZ 后, 大鼠接受溶剂对照组或葛根素治疗 14 周。每周测量体重。检测糖代谢及骨生成和骨吸收指标。使用微型计算机断层扫描 (μCT) 评估左股骨或右股骨远端骨小梁结构, 进行 BMD 的测量。结果显示 STZ 处理的大鼠血糖、胰岛素水平增加, 体重、BALP 和 OPG 下降, TRACP-5b 和 β-CTX 水平升高, BMD 下降, 降低了骨体积/组织体积和骨小梁数量, 上调了小梁分离度和结构模型指数, 表明此法造模模型复制成功。

Yang 等^[53]研究土贝母苷甲对 2 型糖尿病诱导的骨丢失的影响时, 选用体重 (100 ± 20) g 的 4 周龄雄性无特异性病原体 SD 大鼠, 模型大鼠接受高糖高脂饮食 (配方不明) 5 周。禁食 12 h 后, 大鼠腹腔注射 35 mg/kg 的 STZ。一周后, 当空腹血糖水平 ≥ 11.1 mmol/L 时, 确认为糖尿病大鼠。接下来给药 6 周, 治疗 6 周后, 收集其胫骨进行显微 CT 分析、苏木精-伊红染色等, 结果显示与正常组比较模型组大鼠骨体积/组织体积和骨小梁数量、骨小梁厚度降低, 骨小梁分离度上升。

Ying 等^[54]研究杨梅素对 STZ 诱导的 DOP 大鼠

的骨保护作用,选用体重 180 ~ 190 g 的雌性 Wistar 大鼠,适应性喂养 1 周,模型组大鼠喂高糖高脂饲料(脂肪比 45%)4 周,大鼠腹腔注射 STZ 35 mg/kg 体重,连续 2 d,建立 2 型糖尿病模型。72 h 后测定随机血糖,高于 16.7 mmol/L 为糖尿病模型。造模成功后,给予安慰剂对照或杨梅素治疗 12 周。每周检测静脉血糖,确保血糖水平在 16.7 mmol/L 以上。给药 12 周后,评估血清生化指标、股骨微结构和组织学变化。结果显示糖尿病组大鼠体重下降,血糖升高,BMD 下降,血清 ALP 和 OC 明显降低,骨小梁体积分数、数目和厚度均低于对照组,结构模型指数和骨小梁间距均高于对照组。苏木精-伊红染色显示股骨小梁断裂,数量减少。Wang 等^[55]在研究水飞蓟宾对 STZ 所致大鼠 DOP 的保护作用时采取了同样的造模办法,包括大鼠的品种、体重,高糖高脂饲料脂肪比、STZ 注射前喂养时间、STZ 的剂量、注射次数、成模标准、成模时间等均一样。

Lu 等^[56]选用体重 180 ~ 230 g 的雄性 SD 大鼠,适应性喂养 1 周,模型组高脂饲料(37% kcal 脂肪、46% kcal 碳水化合物、17% kcal 蛋白质和 4.40 kcal/g 食物)喂养 4 周后腹腔注射 35 mg/kg 体重 STZ 诱导 T2DM。STZ 注射 72 h 后,禁食 8 h,收集尾静脉血以测空腹血糖和空腹胰岛素。口服灌胃 50%葡萄糖水溶液后,进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)。空腹血糖超过 11.1 mmol/L 为糖尿病模型造模成功。8 周后,将大鼠的股骨、胫骨和血液收集供进一步分析。结果显示,与正常组比较,糖尿病大鼠出现糖耐量异常、胰岛素抵抗,体重、BMD、BMC、OC 和骨 ALP 显著降低,空腹血糖、TRACP-5b、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 以及脂肪细胞和破骨细胞的数量上升/增多,骨体积/组织体积、骨小梁数量下降,小梁分离度和结构模型指数显著增加。证明此法造模糖尿病大鼠出现骨代谢异常和严重的骨质流失。

柳辰玥^[20]选用体重(180 $\pm$ 20)g 的 Wistar 大鼠适应性喂养 7 d 后,模型组予高糖高脂饲料(20%蔗糖,2.5%胆固醇,10%猪油,1%胆酸钠,66.5%基础饲料)饲养。10 周后,大鼠禁食不禁水 12 h,模型组按 20 mg/kg 体重腹腔注射 1% STZ 柠檬酸缓冲液。注射 STZ 7 d 后,尾静脉取血测空腹血糖,选血糖值 $\geq$ 12 mmol/L 且血清骨转换指标(IGF-1、TRAP)与正常对照组大鼠相比有显著统计学差异的大鼠作为 DOP 模型大鼠。12 周后,与对照组比较,模型组大鼠空腹血糖、AUC 升高,血清 OC、IGF-1、OPG/

RANKL 含量显著降低,ALP、TRAP 含量显著升高。Micro-CT 示大鼠皮质骨面积比、皮质骨厚度、骨小梁面积比显著降低。股骨生物力学显示股骨的最大载荷、弹性模量和弯曲强度均显著降低。苏木精-伊红染色示模型组大鼠股骨头部位骨小梁结构紊乱、变细、断裂、松散。说明模型构建成功。

许建国等^[21]、Zhang 等^[57]在基于 Wnt 及 NF- κ B 信号通路研究补肾健脾活血汤对 DOP 大鼠作用机制时选择体重 210 ~ 260 g 的 3 月龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,适应性喂养 1 周后,随机抽取 10 只作为正常对照组,给予常规饲料饲养。余 45 只大鼠给予高糖高脂饲料(常规饲料中加入 20%蔗糖、15%熟猪油、2.5%胆固醇、1.0%胆酸盐)喂养 8 周,禁食不禁水 12 h 后,左下腹腔给予 STZ 30 mg/kg 注射。腹腔注射 STZ 1 周后取尾血,以血糖值 $\geq$ 7.8 mmol/L 且伴有胰岛素抵抗为 2 型糖尿病造模标准。糖尿病大鼠成模后与正常对照组大鼠继续普通饮食喂养 20 周,采用双能 X 线骨密度仪对正常对照组及余符合 2 型糖尿病诊断标准的大鼠股骨 BMD 进行测定。取骨密度小于正常对照组大鼠平均 BMD2.5 个标准差的作为 T2DOP 模型大鼠。成模 12 周后采用血生化分析仪及双能 X 线骨密度测量仪检测指标。结果显示模型组大鼠空腹血糖、胰岛素、P、ALP 水平升高、Ca 无差异,胰岛素抵抗增强,股骨近端 BMD 下降。

综上,研究人员在选择高糖高脂饮食联合 STZ 建立 T2DOP 模型时,高糖高脂饲料配方中脂肪比(40% ~ 60%)、组成中是否含有蔗糖、注射 STZ 之前高糖高脂饲料的持续时间(4 ~ 10 周)、STZ 的剂量、给药次数,糖尿病、糖尿病骨质疏松成模标准检测指标等存在差异,STZ 剂量多选用 35 mg/kg,小剂量单次或者 2 次,糖尿病成模标准主要看血糖、胰岛素水平,多饮多食多尿症状,通常多为注射 STZ 后 3 d 或 7 d 空腹血糖 $\geq$ 11.1 mmol/L 或随机血糖 $\geq$ 16.7 mmol/L,成模后评价糖尿病骨质疏松模型的指标和方式有体重、血糖、胰岛素、OGTT 水平,骨生成(ALP、BALP、OC、OPG)和骨吸收(TRACP、 β -CTX)耦联中的分子变化、骨密度、骨组织生物力学相关指标(最大载荷、弹性模量和弯曲强度)、股骨、胰腺组织病理形态、骨组织形态计量学参数(骨体积/组织体积、骨小梁数量、厚度、分离度、结构模指数)等。发现与 1 型糖尿病骨质疏松模型相比在造模过程中最大的区别为 STZ 的给药剂量以及注射 STZ 之前是否喂食高糖高脂饲料。具体见表 1。

表 1 通过链脲佐菌素诱导建立糖尿病骨质疏松大鼠模型的实验研究

Table 1 Experimental study on establishment of diabetic osteoporosis rat model induced by streptozotocin

类型 Type	动物 Animal	高脂高糖饮食 High-fat/ high-sugar diet	链脲佐菌素 STZ	DM 成模标准 Molding standard of DM	DOP 成模时间和指标选取 Modeling time and index selection of DOP
1 型 ^[45] Type 1 ^[45]	雌性 SD 大鼠, 8 周龄, (230 ± 10) g Female SD rats, 8 weeks old, (230 ± 10) g	0 周 0 week	单次腹腔注射 60 mg/kg A single intraperitoneal injection of 60 mg/kg	链脲佐菌素 链脲佐菌素注射 72 h 后随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L + 多饮、多食、多尿症状 72 h after STZ injection, random blood glucose ≥ 16.7 mmol/L + symptoms of polydipsia, polyphagia, and polyuria	8 周 血糖、饮水量、进食量、体重、碱性磷酸酶活力、胰腺、股骨组织病理学 8 weeks Blood glucose, water intake, food intake, body weight, ALP activity, histopathology of pancreas and femur
1 型 ^[46] Type 1 ^[46]	雄性 SD 大鼠, 3 月龄, (201 ± 20) g Male SD rats, 3 months old, (201 ± 20) g	0 周 0 week	单次腹腔注射 60 mg/kg A single intraperitoneal injection of 60 mg/kg	链脲佐菌素注射 72 h 后随机血糖 ≥ 17.6 mmol/L 72 h after STZ injection, blood glucose ≥ 17.6 mmol/L	4 ~ 8 周 血糖、体重、骨密度、骨组织形态计量学(骨小梁面积、厚度、数目及分离度) 4 ~ 8 weeks Blood glucose, body weight, BMD, bone histomorphometry (trabecular bone area, thickness, number and separation)
1 型 ^[47] Type 1 ^[47]	雄性 SD 大鼠, 8 周龄 Male SD rats, 8 weeks old	0 周 0 week	单次腹腔注射 60 mg/kg A single intraperitoneal injection of 60 mg/kg	空腹血糖 > 11.1 mmol/L Fasting blood glucose > 11.1 mmol/L	3 周 葡萄糖、胰岛素、钙、磷 抗酒石酸性磷酸酶 5b、组织蛋白酶 K、骨钙素、脱氧吡啶啉、体重、骨重、骨密度、骨矿物质含量、骨组织学分析 3 weeks Glucose, insulin, Ca, P, TRACP-5b, cathepsin K, OC, deoxypyridinoline, body weight, bone weight, BMD, BMC, bone histological analysis
2 型 ^[50] Type 2 ^[50]	雄性 SD 大鼠, (200 ± 24) g Male SD rats, (200 ± 24) g	5 周, — 5 weeks, —	单次腹腔注射 35 mg/kg A single intraperitoneal injection of 35 mg/kg	链脲佐菌素注射 72 h 后随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 72 h after STZ injection, random blood glucose ≥ 16.7 mmol/L	4 周 体重、胆固醇、三酰甘油、空腹血糖、空腹胰岛素、血钙、血磷、碱性磷酸酶、骨钙素、I 型胶原交联 C 末端肽、骨密度、股骨病理学 4 weeks Body weight, cholesterol, triacylglycerol, fasting blood glucose, fasting insulin, blood Ca, P, ALP, OC, type I collagen cross-linked C-terminal peptide, BMD, femoral pathology
2 型 ^[51] Type 2 ^[51]	雄性 SD 大鼠, 7 周龄, (238 ± 12) g Male SD rats, 7 weeks old, (238 ± 12) g	4 周, — 4 weeks, —	单次腹腔注射 35 mg/kg A single intraperitoneal injection of 35 mg/kg	链脲佐菌素注射后 3 d, 7 d, 10 d, 14 d, 21 d 连续 3 次空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 3 d, 7 d, 10 d, 14 d, 21 d after STZ injection, fasting blood glucose ≥ 16.7 mmol/L for 3 consecutive times	4 ~ 8 周 饮水量、进食量、尿量、体重、空腹血糖、胰腺、股骨组织病理学、股骨影像学 4 ~ 8 weeks Water intake, food intake, urine output, body weight, fasting blood glucose, histopathology of pancreas and femur, femoral imaging
2 型 ^[52] Type 2 ^[52]	雄性 SD 大鼠, 7 ~ 8 周龄, 180 ~ 190 g Male SD rats, 7 ~ 8 weeks old, 180 ~ 190 g	4 周, 45% 脂肪比 4 weeks, fat ratio 45%	连续 2 d 腹腔注射 35 mg/kg Intraperitoneal injection of 35 mg/kg for two consecutive days	—	14 周 血糖、胰岛素、体重、骨特异性碱性磷酸酶、骨保护素、抗酒石酸性磷酸酶 5b、I 型胶原羧基端肽 β 特殊序列、骨密度、骨体积/组织体积、骨小梁数量、分离度和结构模型指数 14 weeks Blood glucose, insulin, body weight, BALP, OPG, TRACP-5b, β-CTX, BMD, bone volume/tissue volume, trabecular number, trabecular separation and trabecular structural model index

续表 1

类型 Type	动物 Animal	高脂高糖饮食 High-fat/ high-sugar diet	链脲佐菌素 STZ	DM 成模标准 Molding standard of DM	DOP 成模时间和指标选取 Modeling time and index selection of DOP
2 型 ^[53] Type 2 ^[53]	雄性 SD 大鼠, 4 周龄, (100 ± 20) g Male SD rats, 4 weeks old, (100 ± 20) g	5 周, — 5 weeks, —	单次腹腔注射 35 mg/kg A single intraperitoneal injection of 35 mg/kg	链脲佐菌素注射 1 周后, 空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L One week after STZ injection, fasting blood glucose ≥ 11.1 mmol/L	6 周 胫骨病理学、影像学分析骨体积/组织 体积、骨小梁数量、厚度、分离度和结 构模型指数 6 weeks Tibial pathology, imaging analysis of bone volume/tissue volume, trabecular number, trabecular thickness, trabecular separation, trabecular structural model index
2 型 ^[54-55] Type 2 ^[54-55]	雌性 Wistar 大 鼠, 180~190 g Female Wistar rats, 180~190 g	4 周, 45% 脂 肪比 4 weeks, fat ratio 45%	连续 2 d 腹腔 注射 35 mg/kg Intraperitoneal injection of 35 mg/kg for two consecutive days	链脲佐菌素注射 72 h 随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 72 h after STZ injection, random blood glucose ≥ 16.7 mmol/L	12 周 体重、血糖、BMD、血清 ALP 和骨钙素、 股骨影像学病理学分析骨小梁 12 weeks Body weight, blood glucose, BMD, serum ALP and osteocalcin, femoral imaging pathological analysis of trabecular bone
2 型 ^[56] Type 2 ^[56]	雄性 SD 大鼠, 180~230 g Male SD rats, 180~230 g	4 周, 37% 千 卡脂肪 4 weeks, 37% kcal fat	单次腹腔注射 35 mg/kg A single intraperitoneal injection of 35 mg/kg	链脲佐菌素注射 72 h 空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L 72 h after STZ injection, fasting blood glucose ≥ 11.1 mmol/L	8 周 血糖、葡萄糖耐量试验、胰岛素、体重、 骨密度、骨矿物质含量、血清骨钙素和 骨碱性磷酸酶、炎症因子、骨小梁骨体 积/组织体积、骨小梁数量、分离度和 结构模型指数 8 weeks Blood glucose, OGTT, insulin, body weight, BMD, BMC, serum osteocalcin and bone ALP, inflammatory factors, trabecular bone volume/tissue volume, trabecular number, trabecular separation, trabecular structural model index
2 型 ^[20] Type 2 ^[20]	Wistar 大 鼠, (180 ± 20) g Wistar rats, (180 ± 20) g	10 周, — 10 weeks, —	单次腹腔注射 20 mg/kg A single intraperitoneal injection of 20 mg/kg	链脲佐菌素注射 7 d 后空腹血糖 ≥ 12 mmol/L, IGF-1、TRAP 与对 照组大鼠相比, 有显著统计学差异 Seven days after STZ injection, fasting blood glucose ≥ 12 mmol/L, compared with control rats, IGF-1 and TRAP have significant statistical differences	12 周 空腹血糖、药时曲线下面积、血清骨 钙素、胰岛素样生长因子-1、骨保护 素/核因子 κB 受体活化因子配体、碱 性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶、骨组 织影像学、生物力学、病理学 12 weeks Fasting blood glucose, AUC, serum OC, IGF-1, OPG/RANKL, ALP, TRAP, bone tissue imaging, biomechanics, pathology
2 型 ^[21-57] Type 2 ^[21-57]	雄性 Wistar 大 鼠, 3 月龄, 210 ~ 260 g Male Wistar rats, 3 months old, 210 ~ 260 g	8 周, — 8 weeks, —	单次腹腔注射 30 mg/kg A single intraperitoneal injection of 30 mg/kg	链脲佐菌素注射 7 d 后血糖 ≥ 7.8 mmol/L 且伴有胰岛素抵抗, 继续 普通饮食喂养 20 周, 骨密度小于 正常对照组大鼠平均骨密度 2.5 个标准差 After 7 days of STZ injection, blood glucose was ≥ 7.8 mmol/L and accompanied by insulin resistance. After 20 weeks of normal diet feeding, the BMD was less than the average BMD of the normal control group by 2.5 standard deviations.	12 周 大鼠空腹血糖、胰岛素、磷、碱性磷酸 酶、钙、胰岛素抵抗指数、骨密度 12 weeks Fasting blood glucose, insulin, P, ALP, Ca, insulin resistance index, BMD

注: —: 脂肪比不明。

Note. —. Fat ratio unknown.

4 小结

以上实验性研究充分证实,STZ 诱导建立 DOP 大鼠模型的方法与大鼠的性别、年龄、是否喂食高糖高脂饲料以及高糖高脂饲料的配方、脂肪比、喂养时间,STZ 的品牌、纯度、储存配制方式、给药途径、给药剂量、给药次数、给药前是否禁食、禁食时间长短等众多因素密切相关,成模标准、检测指标多样,发病机制尚未完全阐明,国际上尚未有统一、系统、规范的制备 DOP 模型的推荐剂量和标准。因此,需要我们根据研究目的、实验要求,通过预实验来确定最佳条件,在实验过程中,严格要求,规范操作,避免人为因素影响实验结果。此外,此种方法造模也存在骨组织病理改变、微结构损伤发生较慢,不能很准确的还原其病理过程和发病机制等局限,因此未来需要我们更加注重能够研究出模拟 DOP 的发病机制和过程,协同多基因和环境因素的模式,更好的为 DOP 的防治研究提供基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Wou C, Unwin N, Huang Y, et al. Implications of the growing burden of diabetes for premature cardiovascular disease mortality and the attainment of the Sustainable Development Goal target 3.4 [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2019, 9(2): 140-149.
- [2] de Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, et al. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies [J]. *BMJ*, 2015, 351: 3978.
- [3] Schwartz AV, Pavo I, Alam J, et al. Teriparatide in patients with osteoporosis and type 2 diabetes [J]. *Bone*, 2016, 91: 152-158.
- [4] Oei L, Zillikens MC, Dehghan A, et al. High bone mineral density and fracture risk in type 2 diabetes as skeletal complications of inadequate glucose control: the Rotterdam Study [J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(6): 1619-1628.
- [5] 梁燕龙, 杜敏群, 赖文秀, 等. 2 型糖尿病性骨质疏松的鼠类模型的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(9): 1164-1167.
- [6] Liang YL, Du MQ, Lai WX, et al. Research progress in the rodent model of type 2 diabetic osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporos*, 2016, 22(9): 1164-1167.
- [7] Koulmanda M, Qipo A, Chebrolo S, et al. The effect of low versus high dose of streptozotocin in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. *Am J Transplant*, 2003, 3(3): 267-272.
- [8] Cao YJ, Wang K, Wang ZL, et al. Pharmacodynamics study of polysaccharide from *Polygonatum cyrtoneuma* on zebrafish model with type 2 diabetic and osteoporosis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(21): 6545-6551.
- [9] Coelho CA, Bordelo JP, Camassa JA, et al. Evaluation of hematology, general serum biochemistry, bone turnover markers and bone marrow cytology in a glucocorticoid treated ovariectomized sheep model for osteoporosis research [J]. *An Acad Bras Cienc*, 2020, 92(4): e20200435.
- [10] 侍方, 倪磊. 粉防己碱靶向 TNF- α 介导 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路抑制骨质疏松症的作用研究 [J]. *解放军医药杂志*, 2021, 33(9): 6-10.
- [11] Shi F, Ni L. A effect study of tetrandrine in inhibition of osteoporosis by targeting TNF- α -mediated PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. *Med Pharm J Chin PLA*, 2021, 33(9): 6-10.
- [12] 张梦丹, 罗俊崇, 黎晓雯, 等. 中药复方制剂对大鼠和母猪骨质疏松症的防治效果试验 [J]. *动物医学进展*, 2019, 40(6): 64-68.
- [13] Zhang MD, Luo JC, Li XW, et al. Effect of prevention and treatment on osteoporosis in rats and pigs with Chinese herbal compound [J]. *Prog Vet Med*, 2019, 40(6): 64-68.
- [14] Qi SS, Shao ML, Sun Z, et al. Chondroitin sulfate alleviates diabetic osteoporosis and repairs bone microstructure via anti-oxidation, anti-inflammation, and regulating bone metabolism [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 759843.
- [15] Cao Y, Han X, Wang Z, et al. TLR4 knockout ameliorates streptozotocin-induced osteoporosis in a mouse model of diabetes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 546: 185-191.
- [16] 张奕奋, 耿倚云, 段莉, 等. 构建骨质疏松动物模型研究进展 [J]. *生物骨科材料与临床研究*, 2021, 18(2): 62-66.
- [17] Zhang YF, Geng YY, Duan L, et al. Development of the establishment of animal models of osteoporosis [J]. *Orthop Biomech Mater Clin Study*, 2021, 18(2): 62-66.
- [18] Kang HS, Yang H, Ahn C, et al. Effects of xenoestrogens on streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2014, 65(2): 273-282.
- [19] Kautzky-willer A, Harreiter J, Pacini G. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus [J]. *Endocrine Reviews*, 2016, 37(3): 278-316.
- [20] Liu B, Feng W, Hasegawa T, et al. Type 1 diabetes mellitus induced low bone turnover in ovariectomized rats [J]. *Histol Histopathol*, 2019, 34(1): 57-67.
- [21] Wang X, Mi Y, He W, et al. Down-regulation of miR-340-5p promoted osteogenic differentiation through regulation of runt-related transcription factor-2 (RUNX2) in MC3T3-E1 cells [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 1126-1137.
- [22] Wen B, Zhao L, Zhao H, et al. Liraglutide exerts a bone-protective effect in ovariectomized rats with streptozotocin-induced diabetes by inhibiting osteoclastogenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6): 5077-5083.

- [19] Zhang Z, Ren H, Shen G, et al. IGF-1R/ β -catenin signaling axis is implicated in streptozotocin exacerbating bone impairment in ovariectomized rats [J]. *Climacteric*, 2021, 24(2): 179–186.
- [20] 柳辰玥. 基于 AGEs/RAGE/Nox4/NF- κ B 和 TRPV6/CaBP-28k/VDR 通路探讨桑叶对 DOP 大鼠作用机制 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2018.
- Liu CY. To investigate the mechanism of mulberry leaf on DOP rats based on AGEs/RAGE/Nox4/NF- κ B and TRPV6/CaBP-28k/VDR pathways [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2018.
- [21] 许建国. 基于 Wnt 及 NF- κ B 信号通路探讨补肾健脾活血汤对糖尿病骨质疏松大鼠作用机制的研究 [D]. 济南: 山东中医药大学; 2015.
- Xu JG. The research of the mechanism of Bushen Jianpi Huoxue Decoction in the diabetic osteoporosis rats based on the NF-kappa B and Wnt signaling pathways [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 2015.
- [22] 黎娅, 吴穹, 马晓雨, 等. 高脂饮食和链脲佐菌素建立 2 型糖尿病大鼠模型的影响因素 [J]. 菏泽医学专科学校学报, 2020, 32(1): 91–93.
- Li Y, Wu Q, Ma XY, et al. Influencing factors of high-fat diet and streptozotocin in establishing type 2 diabetic rat model [J]. *J Heze Med Coll*, 2020, 32(1): 91–93.
- [23] 王继, 杨中亚, 张龙. 高脂饲养联合链脲佐菌素注射建立 2 型糖尿病大鼠模型的骨骼肌特征分析 [J]. 实验动物科学, 2020, 37(4): 39–43.
- Wang J, Yang ZY, Zhang L. Analysis of skeletal muscle characteristics of type 2 diabetic rats induced by hyperlipidemic feeding combined with streptozotocin injection [J]. *Lab Anim Sci*, 2020, 37(4): 39–43.
- [24] 林燕超, 吴佩文, 林东. 链脲佐菌素诱导 SD 大鼠糖尿病模型的影响因素 [J]. 中国社区医师, 2017, 33(35): 7–8, 11.
- Lin YC, Wu PW, Lin D. Influencing factors of streptozotocin induced diabetes mellitus in SD rats [J]. *Chin Community Dr*, 2017, 33(35): 7–8, 11.
- [25] Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, et al. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2013, 12(1): 60.
- [26] Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, et al. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes-A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 244: 49–63.
- [27] Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats [J]. *Curr Protoc Pharmacol*, 2008, 5: 47.
- [28] Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats [J]. *Curr Protoc*, 2021, 1(4): e78.
- [29] Takeda S, Saito M, Sakai S, et al. Eldecalcitol, an active vitamin D₃ derivative, prevents trabecular bone loss and bone fragility in type I diabetic model rats [J]. *Calcif Tissue Int*, 2017, 101(4): 433–444.
- [30] 黎娅, 范培云, 马晓雨, 等. 长期稳定的 SD 大鼠 2 型糖尿病模型制备方法 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 364–369.
- Li Y, Fan PY, Ma XY, et al. A long-term and stable method for the preparation of a type 2 diabetes Sprague-Dawley rat model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(3): 364–369.
- [31] Tay YC, Wang Y, Kairaitis L, et al. Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? [J]. *Kidney Int*, 2005, 68(1): 391–398.
- [32] 黄波, 刘学政, 庞东渤. 不同途径注射链脲佐菌素致大鼠糖尿病模型的研究 [J]. 锦州医学院学报, 2003, 24(1): 19–21.
- Huang B, Liu XZ, Pang DB. Study on diabetic model in rats induced by streptozotocin in different ways [J]. *Jinzhou Med Univ*, 2003, 24(1): 19–21.
- [33] 张汝学, 贾正平, 李茂星, 等. 实验性 2 型糖尿病大鼠模型的建立和评价(Ⅲ、Ⅳ)—血脂水平和血浆糖代谢相关激素的变化 [J]. 西北国防医学杂志, 2008, 29(6): 401–404.
- Zhang RX, Jia ZP, Li MX, et al. Establishment and evaluation of type 2 diabetic rat model(Ⅲ、Ⅳ)—the changes of plasma lipids level and hormone levels related to glucose metabolism [J]. *Med J National Defending Forces Northwest Chin*, 2008, 29(6): 401–404.
- [34] 沈亚非, 徐焱成. 链脲佐菌素诱导实验性糖尿病大鼠模型建立的研究 [J]. 实用诊断与治疗杂志, 2005, 19(2): 79–80.
- Shen YF, Xu YC. Study on experimental diabetes animal model in rats induced by streptozotocin [J]. *J Pract Diagn Ther*, 2005, 19(2): 79–80.
- [35] 黄琛, 顾志峰, 曹晓蕾, 等. 1 型糖尿病大鼠模型建立及稳定性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(3): 49–51.
- Huang C, Gu ZF, Cao XL, et al. Establishment and stability of type 1 diabetic rat model [J]. *J Mod Lab Med*, 2007, 22(3): 49–51.
- [36] Guo XX, Wang Y, Wang K, et al. Stability of a type 2 diabetes rat model induced by high-fat diet feeding with low-dose streptozotocin injection [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2018, 19(7): 559–569.
- [37] 汪群红, 何贤君, 胡敏, 等. 黄连和葛根联合抗糖尿病的药效学研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(3): 676–679.
- Wang QH, He XJ, Hu M, et al. Pharmacodynamic study of combination of rhizoma coptidis and *Radix puerariae* on diabetes [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2019, 37(3): 676–679.
- [38] 邓戈, 韩博. 苡苡菜水煎液对糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(2): 155–160.
- Deng G, Han B. Hypoglycemic effect and mechanism of endive decoction on diabetic rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2020, 37(2): 155–160.
- [39] 叶桐江, 郑博文, 赵琳, 等. 链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病大鼠模型的最佳禁食时间与最优剂量 [J]. 兰州大学学报(医学版), 2019, 45(2): 52–55.
- Ye TJ, Zheng BW, Zhao L, et al. Optimal fasting time and dose

- of streptozotocin-induced diabetic rat model [J]. J Lanzhou Univ (Med Sci), 2019, 45(2): 52-55.
- [40] Ramzy MM, El-Sheikh AAK, Kamel MY, et al. Mechanism of testicular protection of carvedilol in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Indian J Pharmacol, 2014, 46(2): 161-165.
- [41] Rivoira M, Rodríguez V, Picotto G, et al. Naringin prevents bone loss in a rat model of type 1 Diabetes mellitus [J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 637: 56-63.
- [42] 陈昕涛, 王敏君, 严文韬, 等. 1 型糖尿病动物模型和干细胞治疗的研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 31(4): 327-330.
- Chen XT, Wang MJ, Yan WT, et al. Research progress of animal model and stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus [J]. Carcinog Teratog Mutagen, 2019, 31(4): 327-330.
- [43] 韩旭, 王璇, 余芝, 等. STZ 制备糖尿病大鼠模型影响因素的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 716-725.
- Han X, Wang X, Yu Z, et al. Research progress on factors influencing streptozotocin-induced diabetic rat models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 716-725.
- [44] Zhang ZD, Ren H, Wang WX, et al. IGF-1R/ β -catenin signaling axis is involved in type 2 diabetic osteoporosis [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2019, 20(10): 838-848.
- [45] 何佳, 祁珊珊, 郑红星, 等. 链脲佐菌素诱导 SD 大鼠 1 型糖尿病性骨质疏松模型的建立 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(12): 1716-1720.
- He J, Qi SS, Zheng HX, et al. Establishment of type 1 diabetic osteoporosis model induced by streptozotocin in SD rats [J]. Chin J Osteoporos, 2019, 25(12): 1716-1720.
- [46] 张丽媛, 纳青青, 吴天秀, 等. 1 型糖尿病骨质疏松大鼠模型的建立及评价 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(5): 532-535.
- Zhang LY, Na QQ, Wu TX, et al. Establishment and evaluation of rat type I diabetes and osteoporosis model [J]. Chin J Osteoporos, 2016, 22(5): 532-535.
- [47] An Y, Zhang H, Wang C, et al. Activation of ROS/MAPKs/NF- κ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis [J]. FASEB J, 2019, 33(11): 12515-12527.
- [48] Grundleger ML, Thenen SW. Decreased insulin binding, glucose transport, and glucose metabolism in soleus muscle of rats fed a high fat diet [J]. Diabetes, 1982, 31(3): 232-237.
- [49] Skovsø S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin [J]. J Diabetes Investig, 2014, 5(4): 349-358.
- [50] 张燕, 杨秋萍, 赵燕, 等. 2 型糖尿病大鼠骨质疏松模型的建立 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(40): 6041-6047.
- Zhang Y, Yang QP, Zhao Y, et al. Establishing a rat model of type 2 diabetes: its bone metabolism level [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2016, 20(40): 6041-6047.
- [51] 唐辉, 姚志浩, 罗道文, 等. 高脂高糖饮食结合链脲佐菌素建立 2 型糖尿病性骨质疏松症大鼠模型 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(8): 1207-1211.
- Tang H, Yao ZH, Luo DW, et al. High fat and high sugar diet combined with streptozotocin to establish a rat model of type 2 diabetic osteoporosis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2021, 25(8): 1207-1211.
- [52] Guo CJ, Xie JJ, Hong RH, et al. Puerarin alleviates streptozotocin (STZ)-induced osteoporosis in rats through suppressing inflammation and apoptosis via HDAC1/HDAC3 signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 115: 108570.
- [53] Yang M, Xie J, Lei X, et al. Tuberousin I suppresses diabetes-induced bone loss in rats, osteoclast formation, and RANKL-induced nuclear factor- κ B pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80: 106202.
- [54] Ying X, Chen X, Wang T, et al. Possible osteoprotective effects of myricetin in STZ induced diabetic osteoporosis in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 866: 172805.
- [55] Wang T, Cai L, Wang Y, et al. The protective effects of silibinin in the treatment of streptozotocin-induced diabetic osteoporosis in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 681-688.
- [56] Lu R, Zheng Z, Yin Y, et al. Genistein prevents bone loss in type 2 diabetic rats induced by streptozotocin [J]. Food Nutr Res, 2020, 9: 64.
- [57] Zhang Y, Liu M, Li H, et al. Traditional Chinese medicine Bushen-Jianpi-Huoxue Decoction prevents diabetic osteoporosis in rats via Wnt and nuclear factor- κ B signaling pathways [J]. Int J Rheum Dis, 2017, 20(8): 941-948.

[收稿日期] 2022-05-10