

苗田雨,帕丽达·买买提,努尔比亚·克其克,等. 中药松弛膏联合运动康复对关节挛缩大鼠关节纤维化 ROM 及炎症反应的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 1-8.

Miao TY, Palida MMT, Nuerbiya KQK, et al. Study on songchi ointment combined with exercise rehabilitation on ROM expression and the inflammatory response in articular fibrosis of articular contracture rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.001

中药松弛膏联合运动康复对关节挛缩大鼠关节纤维化 ROM 及炎症反应的研究

苗田雨¹, 帕丽达·买买提^{1*}, 努尔比亚·克其克², 王宁宁¹, 李晶晶¹, 史凌云²,
夏热帕·阿不都拉¹, 阿斯古丽·图尔荪¹,

(1.新疆医科大学护理学院, 乌鲁木齐 830000; 2.新疆医科大学第一附属医院护理部, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 探讨中药松弛膏联合跑台运动康复干预方案对关节挛缩大鼠关节纤维化中 ROM、IL-6、IL-17 和 TGF- β 1 表达的影响。**方法** 44 只 Wistar 大鼠, 随机取 8 只大鼠为正常对照组 (NC 组), 其余 36 只大鼠建立关节挛缩模型。将 32 只造模成功的大鼠分为模型对照组 (MC 组)、中药松弛膏干预组 (SC 组)、跑台运动康复干预组 (RE 组)、中药松弛膏+跑台运动康复干预组 (SR 组), 每组 8 只。MC 组不进行任何干预; SC 组给予药物涂抹按摩; RE 组给予跑台训练; SR 组给予跑台训练后再进行药物涂抹按摩, 干预均为每天 1 次, 每周 6 d。于干预前、干预 42 d 后测量所有大鼠 ROM; 干预 42 d 后采用 ELISA 法检测大鼠 IL-6、IL-17 含量及 TGF- β 1 含量。**结果** 干预前模型组大鼠 ROM 与 NC 组相比显著降低 ($P < 0.05$); 干预 42 d 后, 与 MC 组 ROM 相比, SR 组 ROM 和 SC 组 ROM 显著增加, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。干预后与 MC 组比, SC 组、RE 组及 SR 组 IL-6、IL-17 含量显著降低, 其中 SR 组显著低于 SC 组及 RE 组 ($P < 0.05$); SR 组 TGF- β 1 含量均较 MC 组、SC 组及 RE 组显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 中药松弛膏联合跑台运动康复干预能协同改善关节挛缩大鼠的关节活动度, 减轻炎症因子释放, 减少与纤维化有关的 TGF- β 1 的分泌, 从而改善关节挛缩大鼠关节纤维化的程度。

【关键词】 关节挛缩; 关节纤维化; 关节活动度; 白细胞介素-6; 白细胞介素-17; 转化生长因子- β 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0001-08

Study on songchi ointment combined with exercise rehabilitation on ROM expression and the inflammatory response in articular fibrosis of articular contracture rats

MIAO Tianyu¹, PALIDA Maimaiti^{1*}, NUERBIYA Keqike², WANG Ningning¹, LI Jingjing¹, SHI Lingyun²,
XIAREPA Abudoula¹, ASIGULI Tuersun¹

(1. School of Nursing, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China.

2. Nursing Department, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of songchi ointment combined with running platform exercise rehabilitation on range of motion (ROM) and expression of interleukin (IL)-6, IL-17 and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in articular fibrosis of rats with articular contracture. **Methods** Among 44 Wistar rats, eight rats were

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (82060417, 81660380)。

【作者简介】 苗田雨 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 关节挛缩的防治。E-mail: 278145683@qq.com

【通信作者】 帕丽达·买买提 (1976—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 康复护理, 老年护理, 护理教育。E-mail: parida7301@126.com

randomly selected as the normal control group (NC group), and the other 36 rats were established joint contracture model. A total of 32 rats were divided into the model control group (MC group), songchi ointment intervention group (SC group), running platform exercise intervention group (RE group), and songchi ointment + running platform exercise intervention group (SR group) by the random number table method, with eight rats in each group. The MC group did not subjected to any intervention; the SC group was subjected to a drug smear massage, the RE group was subjected to running platform exercise; the SR group was subjected to running platform exercise, followed by drug smear massage, intervention was once a day, 6 days a week. Before intervention and after 42 days of intervention, ROM was measured in all rats. After 42 days of intervention, IL-6, IL-17 and TGF- β 1 contents of the rats were measured by ELISA. **Results** Before intervention, ROM of the model group was significantly lower than that of the NC group ($P < 0.05$). After 42 days of intervention, compared with the MC group, ROM of SR and SC groups was significantly increased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). After intervention, compared with the MC group, IL-6 and IL-17 contents in SC, RE, and SR groups were significantly decreased, and those in the SR group was significantly lower than those in the SC and RE groups ($P < 0.05$). TGF- β 1 content in the SR group was significantly lower than that in the MC, SC, and RE groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Songchi ointment combined with running platform exercise rehabilitation improves joint ROM, reduces the release of proinflammatory factors, and reduces the secretion of TGF- β 1 related to fibrosis in rats with joint contracture to improve the degree of joint fibrosis.

【Keywords】 joint contracture; arthrofibrosis; range of motion; IL-6; IL-17; TGF- β 1

关节挛缩 (joint contracture) 是临床上一种常见的慢性关节疾病,常伴随关节僵硬、畸形、功能受损等症状,是神经肌肉疾病与骨关节疾病的常见并发症^[1]。其症状为伴随关节主动或被动活动范围的丧失^[2],临床上表现为患者关节活动度 (range of motion, ROM) 下降,持续的主动及被动活动范围受限^[3]及步态异常等功能障碍^[4],严重影响患者日常生活自理能力 (activity of daily living, ADL)。关节挛缩可分为神经源性挛缩、关节源性挛缩与肌肉源性挛缩^[5],其中关节纤维化 (arthrofibrosis) 在关节挛缩形成中起到重要作用^[6]。在纤维化过程中,白细胞介素 (interleukin, IL) 6 (IL-6) 和 17 (IL-17) 及转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 引起的细胞因子失衡起关键作用^[7-9]。细胞外基质的大量沉积是纤维化的病理特点之一^[10],炎症细胞分泌细胞趋化因子,使细胞外基质过度沉积^[11],TGF- β 1 信号传导也参与细胞外基质的发育、迁移和沉积^[12],促使细胞外基质合成增加,最终关节囊内形成纤维化瘢痕组织以及纤维粘连。关节纤维化主要采用药物干预、物理干预以及外科干预等综合康复方法,致力于恢复关节的病理结构,改善关节活动度^[13]。然而,目前大多关节纤维化的治疗效果不佳。在本课题组的前期研究中发现,中药松弛膏外敷结合西医康复护理疗法能有效改善患者的下肢关节活动度^[14],减轻炎症反应^[15],但其改善病理变化的机制尚不清楚。本研究通过采用中药松弛膏联合跑台运动干预的综合康复干预方法,

探讨其对关节挛缩关节纤维化大鼠中 ROM、IL-6、IL-17 和 TGF- β 1 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

44 只 6~8 周龄,SPF 级,体重为 180~220 g 的雄性 Wistar 大鼠,购自新疆医科大学实验动物中心 [SCXK (新)2018-0003],实验场所为新疆医科大学实验动物中心屏障环境动物实验室 [SYXK (新)2019-0004],饲养室照度 150~200 lx,室温控制在 18℃~22℃,相对湿度:50%±10%。动物房进行严格消毒,正常昼夜交替节律。本实验已通过新疆医科大学第一附属医院伦理委员会的审核 (20200326-03),并按实验动物使用的 3R 原则给予实验动物人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

本课题组研制的中药松弛膏 (专利号 2018114781048),由多种具有消炎退肿、解痉祛风、止痛活血作用的动物油及中草药成分组成,该药物每 500 g 由原料亚麻籽 20 g、没药 20 g、葫芦巴 20 g、羊乳香 20 g、药蜀葵子 20 g、洋甘菊 20 g、秋水仙 20 g、马油 200 g 和牛骨髓 200 g 组成。其具有副作用小、对机体无创伤、使用便捷的特点,对消肿抗炎、软筋生肌、润肤防腐、化脓愈伤有积极作用。

义齿聚托聚合物自凝牙托粉 (上海贝琼齿材有限公司);义齿聚托聚合物自凝牙托水 (上海贝琼齿材有限公司);苏木素 (Sigma 公司,美国);伊红 (国

药集团化学试剂公司);IL-6 试剂盒(江莱生物);IL-17 试剂盒(江莱生物);TGF- β 1 试剂盒(江莱生物);戊巴比妥钠(默克公司,德国);0.9%生理盐水(利尔康医疗科技);碘伏(利尔康医疗科技)。

FT-200 型动物跑步机(成都泰盟软件有限公司);0.8 mm 带螺纹定制骨牵引针(天津希翼器械公司);骨科电钻(盐城奥瑞公司);冰冻切片机(LEICA 公司,德国);液氮罐(乌鲁木齐制氧厂);手持式组织匀浆机(PRO Scientific 公司,法国);超声波破碎仪(宁波新芝);普通光学显微镜(尼康公司,美国);电子天平(PL403)(Mettler Toledo 公司,美国);精密电子天平(Sartorius 公司,德国);超低温冰箱(994)(Thermo Scientific 公司,美国);台式低温冷冻高速离心机(Thermo Scientific 公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备方法

按照 Nagai 等^[16]法,复制本次课题所需的关节挛缩模型,具体步骤如下:采用随机数字表法将 44 只大鼠分为正常对照组(normal control group, NC 组)8 只和模型组 36 只。取模型组 36 只大鼠,腹腔注射 3%戊巴比妥钠(3 mg/kg)深度麻醉后将左后肢脱毛并消毒;分别在股骨和胫骨 1/2 和 1/3 处进针,将 0.8 mm 带螺纹的克氏针垂直穿过但未穿破内侧皮肤,再将外露的克氏针剪至超出皮肤约 1.8 cm;用量角器使股骨和胫骨夹角固定于 45°,用无菌软铁丝连接股骨和胫骨外露的克氏针;将自凝牙托粉和自凝牙托水按比例混合,包裹软铁丝和外露的克氏针。固定结束后对所有大鼠进行 X 线拍摄(如图 1),36 只大鼠固定成功。复制关节挛缩模型 3 周后,随机抽取 2 只大鼠,处死大鼠后剥离关节囊滑膜,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,判断已发生挛缩,拆除固定装置,发现 2 只大鼠骨折,最终 32 只大鼠制模成功。

1.3.2 HE 染色验证模型制备是否成功

常规包埋切片,脱蜡、脱二甲苯、返蓝、染色、封片,在光学显微镜下观察切片形态并记录。

1.3.3 干预方法

采用随机数字表法将 32 只大鼠分为模型对照组(model control group, MC 组)、中药松弛膏干预组(songchi ointment intervention group, SC 组)、跑台运动干预组(running platform exercise intervention group, RE 组)、中药松弛膏+跑台运动干预组

(songchi ointment + running platform exercise intervention group, SR 组)。

(1)MC 组:去除固定装置后,不给予特殊干预;(2)SC 组:去除固定装置后,在造模侧膝关节周围涂抹中药松弛膏约 18 g 并采用指揉法按摩 3 min,每日 1 次,1 周 6 次,共 6 周;(3)RE 组:将大鼠置于跑步机上,结合已有文献报道^[15],将速度设定在 1 km/h,每次 20 min,每日 1 次,1 周 6 次,共 6 周;(4)SR 组:先按照运动康复干预组的方法进行跑台训练,训练结束后按照中药松弛膏干预组的方法进行药物涂抹与按摩,每日 1 次,1 周 6 次,共 6 周。

1.3.4 ROM 的测量

分别于取出固定装置后、干预 42 d 后对所有大鼠进行 X 片拍摄,给每只大鼠腹腔注射 3%的戊巴比妥钠(3 mg/kg)进行深度麻醉,右侧卧位于 X 片机台上并左后肢踝关节悬挂 0.5 N 砝码固定以保证每一只大鼠受力均匀,砝码必须与大鼠正中线平行悬挂,避免接触任何物品,以保证每一只大鼠均使用同等大小的拉力,X 光下拍摄股骨与胫骨夹角,并用 Image J 软件测量大鼠左膝关节 ROM。

1.3.5 ELISA 检测 IL-6、IL-17、TGF- β 1 含量

干预 42 d 后进行取材,取材前 24 h 禁食不禁水,腹腔注射 3%的戊巴比妥钠麻醉后,采大鼠腹主动脉血室温静置 2 h 后以 3000 r/min 离心 10 min 并抽取上清液置于-80℃冰箱内;取各组大鼠血清样本,根据试剂盒说明书要求处理样本后,采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测各组大鼠血清中 IL-6 及 IL-17 含量;取大鼠滑膜组织液,由于大鼠滑膜组织液量极少,不足以达到检测的最低样本量,因此添加灭菌用水稀



图 1 复制关节挛缩模型后大鼠 X 线拍摄

Figure 1 After the joint contracture model was reproduced, the rats were photography by X-ray

释至 10%, 采用 ELISA 检测试剂盒检测 TGF- β 1 含量。

ELISA 检测方法:按照 ELISA 试剂盒说明书检测,从室温平衡 60 min 后的铝箔袋中取出所需板条;配置标准液;标准品孔、样品孔内分别加入标准品、待测样本 50 μ L,空白孔不加;每孔加入 50 μ L 的抗体工作液后孵育;洗涤后每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体 100 μ L;加酶后孵育加终止液,读取吸光度,制作标准曲线。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。经正态性检验和方差齐性检验后,服从正态分布的计量资料用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两组间比较采用组间 t 检验,检验水准取 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为有统计学意义。实验分析图使用 Graphpad prism 9.02 绘制。

2 结果

2.1 干预前、模型制备后 HE 染色验证结果

模型制备 3 周后,通过 HE 染色观察大鼠关节囊滑膜发现,大量炎性细胞浸润,纤维组织排列紊乱,滑膜内壁可见增厚萎缩等改变,复制大鼠关节挛缩模型成功(如图 2)。

2.2 各组大鼠左膝关节 ROM 比较

取出固定装置后、实验干预前 NC 组和模型组大鼠 ROM 比较(见表 1):与 NC 组大鼠 ROM (113.35 ± 6.56) $^{\circ}$ 相比,模型组大鼠 ROM (97.59 ± 7.99) $^{\circ}$ 明显下降,差异具有统计学意义($t=4.861$, $P<0.05$),故复制大鼠关节挛缩模型成功。

2.3 干预前、干预 42 d 后各组大鼠 ROM 比较

干预 42 d 后 RE 组与 SR 组比较, $t=-2.307$, $P<0.05$,与 MC 组比较, $t=2.788$, $P<0.05$;MC 组与 SR 组比较, $t=-5.817$, $P<0.05$,与 SC 组比较, $t=-3.222$, $P<0.05$,差异均具有统计学意义;RE 组与 SC 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与干预前相比(见表 2),干预 42 d 后 SC 组、RE 组、SR 组 ROM 均较干预前显著提高,差异具有统计学意义(如图 3)。

2.4 各组大鼠 IL-6、IL-17 水平

通过两两组间比较发现(如图 4),MC 组 IL-6 (1.184 ± 0.056) pg/mL、IL-17 (0.703 ± 0.019) pg/mL 含量均较 NC 组显著升高($P<0.01$);RE 组 IL-6

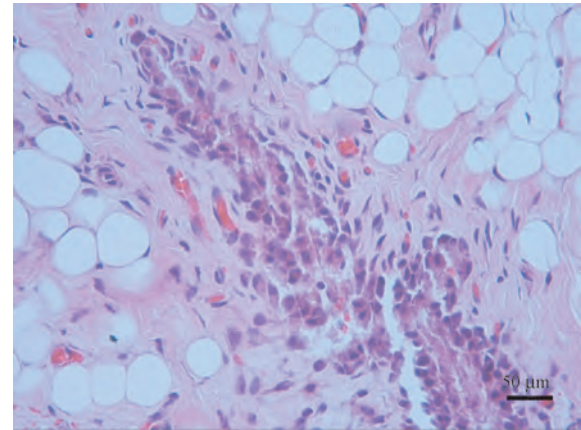


图 2 模型制备后大鼠关节囊滑膜组织 HE 染色观察(滑膜)

Figure 2 Observation of synovial tissue of rat joint capsule after model preparation(Synovial membrane)

表 1 正常对照组与模型组在取出固定装置后、实验干预前 ROM 比较($^{\circ}$, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of ROM between normal control group and model group after removal of fixed device and before experimental intervention

分组 Groups	取出固定装置后、干预前 After removal of fixed device and before experimental intervention
NC 组($n=7$) NC group	113.35 ± 6.56
模型组($n=32$) Model group	97.59 ± 7.99
t 值 t value	$t=4.861$
P 值 P value	$P<0.05$

注:正常对照组一只大鼠依从性较差,数据淘汰;经 2~3 次麻醉药追加达不到麻醉效果,导致达不到实验要求,因此淘汰。

Note. Compliance of a rat in the normal control group was poor, and the data were eliminated; the anesthesia effect could not be achieved after 2~3 times of anesthesia addition, which led to the failure to meet the requirements of the experiment, so it was eliminated.

表 2 各组大鼠在干预前、干预 42 d 后 ROM 比较($^{\circ}$, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 ROM comparison of rats in each group before and 42 days after intervention

分组 Groups	干预前 Before experimental intervention	干预 42 d 后 After 42 days of intervention
NC 组 NC group	113.35 ± 6.56 ($n=7$)	122.42 ± 3.39 ($n=6$)
MC 组 MC group	93.60 ± 7.14 ($n=8$)	104.51 ± 4.48 ($n=7$)
SC 组 SC group	102.41 ± 9.92 ($n=8$)	112.16 ± 4.68 ($n=8$)
RE 组 RE group	97.03 ± 5.89 ($n=8$)	111.47 ± 4.85 ($n=7$)
SR 组 SR group	97.33 ± 7.29 ($n=8$)	116.43 ± 3.45 ($n=8$)

注:NC 组一只大鼠依从性较差,数据淘汰;NC 组、MC 组、RE 组各一只大鼠麻醉死亡。

Note. Compliance of one rat in NC group was poor and the data were eliminated. One rat in NC group, MC group and RE group died of anesthesia.

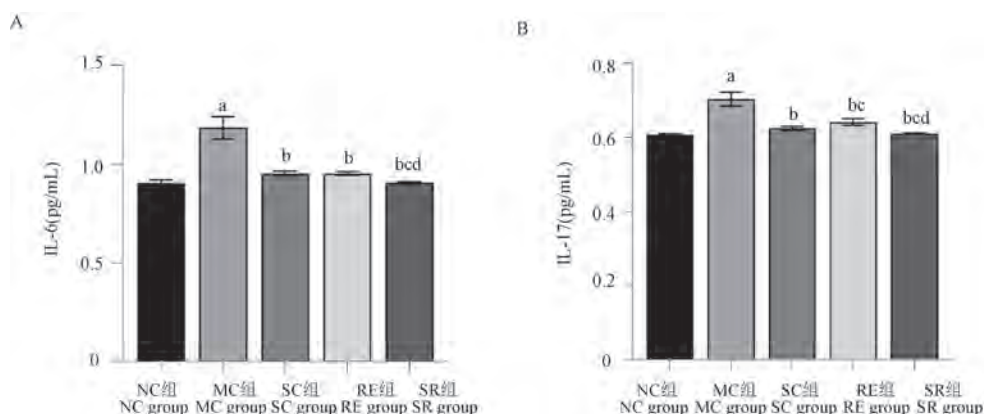


注:A;SR 组取出固定装置后左下肢 ROM(105.68°);B;SR 组干预 42 d 后左下肢 ROM(115.53°)。标注黄线;测量角度。

图 3 取出固定装置后、干预 42 d 后大鼠 X 线拍摄

Note. A, Left lower limb ROM (105.68°) in the SR group after removal of the fixation device. B, Left lower limb ROM (115.53°) in the SR group after 42 days of intervention. Yellow line, Measurement angle.

Figure 3 After removing the fixation device and 42 days after intervention, the rats were photographed by X-ray



注:A;IL-6 含量;B;IL-17 含量。与 NC 组比较, ^a $P<0.05$;与 MC 组比较, ^b $P<0.05$;与 SC 组比较, ^c $P<0.05$;与 RE 组比较, ^d $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠血清样本 IL-6 及 IL-17 含量比较

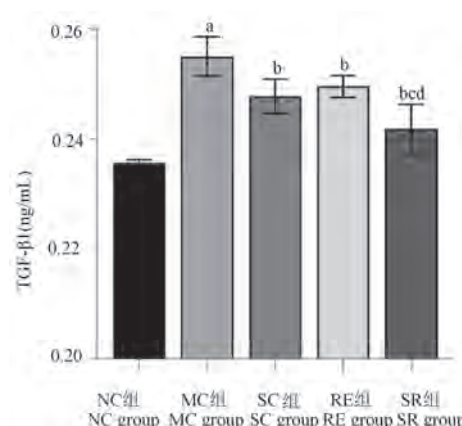
Note. A, IL-6 content. B, IL-17 content. Compared with NC group, ^a $P<0.05$. Compared with MC group, ^b $P<0.05$. Compared with SC group, ^c $P<0.05$. Compared with RE group, ^d $P<0.05$.

Figure 4 Comparison of IL-6 and IL-17 contents in serum samples of rats in each group

(0.952±0.010) pg/mL, IL-17 (0.642±0.009) pg/mL 含量, SC 组 IL-6 (0.952±0.012) pg/mL、IL-17 (0.625±0.005) pg/mL 含量, SR 组 IL-6 (0.905±0.005) pg/mL、IL-17 (0.610±0.002) pg/mL 含量均较 MC 组明显降低, 组间差异均具有统计学意义 ($P<0.01$); SR 组 IL-6 及 IL-17 含量均数显著低于 SC 组、RE 组, 组间差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.5 各组大鼠滑膜液中 TGF-β1 的含量

通过两两组间比较发现(如图 5), MC 组 TGF-β1 含量 (0.255±0.004) ng/mL, 较 NC 组 (0.236±0.001) ng/mL 显著升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); SC 组 (0.248±0.003) ng/mL、RE 组 (0.250±0.002) ng/mL 及 SR 组 (0.242±0.005) ng/mL TGF-β1 含量均较模型对照组显著降低, 组间差异均具有统计学意义 ($P<0.01$); SR 组 TGF-β1 含量均数显著低于 SC 组、RE 组, 组间差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。



注:与 NC 组比较, ^a $P<0.05$;与 MC 组比较, ^b $P<0.05$;与 SC 组比较, ^c $P<0.05$;与 RE 组比较, ^d $P<0.05$ 。

图 5 各组大鼠滑膜液 TGF-β1 含量比较

Note. Compared with NC group, ^a $P<0.05$. Compared with MC group, ^b $P<0.05$. Compared with SC group, ^c $P<0.05$. Compared with RE group, ^d $P<0.05$.

Figure 5 Comparison of TGF-β1 content in synovial fluid of rats in each group

3 讨论

随着人类社会的不断发展,交通事故频繁发生、户外运动持续增多、生活方式改变使慢性病的患病率逐年升高,骨关节疾病发生率也呈逐年上升趋势,尤其是关节挛缩患者大幅增加。关节固定是临床上引起关节挛缩最常见的原因^[17]。当骨折、关节脱位、韧带损伤发生后,常采用关节固定^[17]。然而,不正确的固定或过长的固定时间使关节缺乏活动,引起组织的退变或萎缩性改变,如关节周围软组织纤维化^[18],导致关节挛缩^[19]、关节活动受限等,其极大降低患者生活质量,给患者重回社会带来严峻挑战。目前临床上治疗关节纤维化的方法很多,但其治疗效果均不理想,手术治疗获益与风险并存,药物治疗的病理机制尚需进一步深入研究^[13]。自各国相继发现新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)以来,慢性非传染性疾病患者的用药、诊疗及康复需求得不到满足^[20]。在这种形势下,无需设备及专业人员便可执行的康复方案的独特优势尤为凸显。近年来,中药疗法的使用越来越广泛,中药外敷以省时省力、贴敷方便、副作用小、可与其他康复方案联合应用的独特优势备受青睐^[21-22]。因此本研究采用课题组成熟的关节挛缩动物模型,将大鼠制动 3 周后拆除外固定,通过中药松弛膏联合跑台运动康复的干预方法,探究其对关节挛缩大鼠关节纤维化的影响。

本研究在模型制备成功后、干预前测量大鼠膝关节 ROM,结果显示,与 NC 组相比,模型组大鼠关节活动度显著减小,进一步说明关节固定是关节挛缩发生的首要原因。干预 42 d 后,测量大鼠膝关节 ROM,结果显示,SC 组、RE 组、SR 组 ROM 均较模型对照组显著提高,提示适宜的运动有利于关节功能的恢复,维持正常的关节活动,对改善关节功能减退、关节畸形具有重要意义。中药松弛膏中主要成分秋水仙碱可抑制炎症因子释放,阻断中性粒细胞释放至关节腔内,消除关节肿胀^[23-24]、没药与乳香具有消肿生肌、活血止痛的功效^[25-27]、亚麻籽中富含的 omega-3 可减轻炎症、激活肌纤维细胞加速肌肉再生^[28],对改善大鼠 ROM 起到一定疗效。本研究结果显示,中药松弛膏联合跑台运动康复干预组 ROM 显著高于单纯跑台运动康复干预组与中药松弛膏干预组,提示中药松弛膏与运动疗法具有协同作用,可进一步改善关节挛缩大鼠关节纤维化的 ROM。

关节挛缩和纤维化是复杂的病理生理过程,与

多种细胞因子驱动的炎症反应有关,研究发现^[29-30],IL-6、IL-17 在各种疾病和组织中显示出纤维化活性。IL-6 由巨噬细胞及 T 细胞产生,可促进中性粒细胞聚集于炎症反应部位,释放蛋白酶及氧自由基^[31],介导免疫病理损伤参与纤维化发展,反应纤维化程度^[32]。IL-17 主要作用于间充质来源的细胞^[33],分泌各种前炎症细胞因子及抗菌肽,诱导内质网应激,促进上皮细胞损伤,引起纤维化。TGF- β 1 是纤维化的主要参与物,其由巨噬细胞、内皮细胞产生,通过自分泌、旁分泌调控细胞生长,是最主要的致纤维化因子之一^[34]。在早期阶段,组织通过大量释放 TGF- β 1^[35],与多种细胞相互作用^[36],形成复杂的纤维化网络。在本研究中,MC 组 TGF- β 1 含量较正常对照组显著升高,表明在关节纤维化的形成中,TGF- β 1 发挥着重要作用。在复杂的纤维化网络中,TGF- β 1 通路被广泛认为可诱导组织的纤维化^[37]。

本研究中,模型制备当日大鼠关节囊滑膜 HE 染色显示,纤维组织排列紊乱,滑膜内壁可见增厚萎缩等改变,大量炎症细胞浸润,提示模型制备成功。干预 42 d 后模型对照组炎症因子水平显著高于其余四组,提示单核吞噬细胞、中性粒细胞聚集,引起并加重炎症与纤维化活性。运动疗法是防治关节纤维化的有效手段,研究表明,作为重要的有氧运动方式之一,跑台运动对炎症因子水平、制动引起的关节挛缩大鼠关节纤维化有明显的改善作用^[38-40],故本研究采用跑台训练,结果显示 RE 组 IL-6、IL-17 以及 TGF- β 1 含量较 MC 组显著降低,运动疗法可显著改善炎症反应及纤维化。在中药松弛膏干预时采用按摩手法,促进关节周围组织血液循环,松解组织粘连,放松肌肉^[41],有利于药物吸收,充分发挥药物成分抗炎消肿,活血止痛的效用。在干预 42 d 后,SR 组的炎症因子含量、TGF- β 1 含量显著低于 MC 组、SC 组及 RE 组,提示中药松弛膏联合运动疗法能通过抑制炎症因子分泌,降低大鼠关节纤维化水平。

本研究为中医药联合运动的干预方案对关节挛缩大鼠纤维化的防治提供新思路,后续研究中,TGF- β /Smad 信号传导调控中药松弛膏联合跑台运动康复的干预方案对关节挛缩大鼠的关节纤维化的机制值得进一步研究。综上所述,中药松弛膏联合跑台运动康复的干预方案可通过改善关节活动度,减轻炎症因子释放,减少 TGF- β 1 的分泌来改善关节挛缩大鼠的关节纤维化。因此,通过中药松弛膏联合跑台运动康复干预对关节挛缩大鼠关节纤

维化中 IL-6、IL-17 和 TGF- β 1 表达的影响研究,正确认识该疾病的康复模式,制定合理的康复方案,并采取有针对性的干预措施,对于提高这类患者生活质量及生存率至关重要。

参考文献:

- [1] 王璐,贾子善,张立宁. 关节挛缩的发病机制及治疗进展[J]. 中国骨伤, 2020, 33(8): 788-792.
- [2] Offenbächer M, Sauer S, Rieß J, et al. Contractures with special reference in elderly: definition and risk factors-a systematic review with practical implications [J]. Disabil Rehabil, 2014, 36(7): 529-538.
- [3] Mack M, Yanagita M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis [J]. Kidney Int, 2015, 87(2): 297-307.
- [4] 张全兵,周云,钟华璋,等. 关节挛缩的发病机制和治疗进展[J]. 中华创伤骨科杂志, 2017, 19(6): 548-552.
- [5] Tokuda K, Yamanaka Y, Kosugi K, et al. Development of a novel knee contracture mouse model by immobilization using external fixation [J]. Connect Tissue Res, 2022, 63(2): 169-182.
- [6] 卢国强. 创伤后的关节挛缩[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(39): 7345-7349.
- [7] Vaamonde-Garcia C, Malaise O, Charlier E, et al. 15-Deoxy- Δ -12, 14-prostaglandin J2 acts cooperatively with prednisolone to reduce TGF- β -induced pro-fibrotic pathways in human osteoarthritis fibroblasts [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 165: 66-78.
- [8] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6): 325-338.
- [9] 陆丹丹,韩晓燕,张晗,等. 类风湿性关节炎药理实验模型的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 107-114.
- [10] Li J, Yao W, Zhang L, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in lung fibroblasts co-cultured with silica-exposed alveolar macrophages [J]. Respir Res, 2017, 18(1): 91.
- [11] Serrano AL, Mann CJ, Vidal B, et al. Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease [J]. Curr Top Dev Biol, 2011, 96: 167-201.
- [12] Ozawa J, Kaneguchi A, Tanaka R, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib attenuates joint contracture following immobilization in rat knees [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2016, 17(1): 446.
- [13] 代显葵,尹文哲,胡道然,等. 膝关节纤维化治疗方法的研究进展[J]. 医学综述, 2021, 27(12): 2413-2417, 2423.
- [14] 帕丽达·买买提,武云云,茹克亚古丽·买买提,等. 综合康复治疗干预对废用综合征患者的效果评价[J]. 中国康复医学杂志, 2018, 33(3): 340-342.
- [15] 古哈尔·艾思拉洪,帕丽达·买买提,武云云,等. 康复治疗干预对关节挛缩大鼠模型的作用探讨[J]. 中国实用护理杂志, 2020, 36(18): 1415-1420.
- [16] Nagai M, Aoyama T, Ito A, et al. Contributions of biarticular myogenic components to the limitation of the range of motion after immobilization of rat knee joint [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2014, 15: 224.
- [17] Kaneguchi A, Ozawa J. Inflammation and fibrosis induced by joint remobilization, and relevance to progression of arthrogenic joint contracture: a narrative review [J]. Physiol Res, 2022, 71(4): 447-488.
- [18] Zhang QB, Zhou Y, Zhong HZ, et al. Effect of stretching combined with ultrashort wave diathermy on joint function and its possible mechanism in a rabbit knee contracture model [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2018, 97(5): 357-363.
- [19] Born CT, Gil JA, Goodman AD. Joint contractures resulting from prolonged immobilization: etiology, prevention, and management [J]. J Am Acad Orthop Surg, 2017, 25(2): 110-116.
- [20] Basu S. Non-communicable disease management in vulnerable patients during Covid-19 [J]. Indian J Med Ethics, 2020, 2: 103-105.
- [21] Wang S, Xiong Z, Liu Y, et al. Efficacy and safety of acupuncture and moxibustion combined with the external application of traditional Chinese medicine in the treatment of primary liver cancer: a protocol for systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100(43): e27659.
- [22] 胡雷,钟飞,张彩霞,等. 现代化中药安全性评价和关键技术研究体系的建立与应用[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 12-15.
- [23] 韦业娟,吕白,雷雅然,等. 秋水仙碱缓释微丸对痛风性关节炎急性发作的预防作用研究[J]. 广西医科大学学报, 2022, 39(1): 21-27.
- [24] Wang W, Pang J, Ha EH, et al. Development of novel NLRP3-XOD dual inhibitors for the treatment of gout [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2020, 30(4): 126944.
- [25] 杨宝,陈志超,陈芳有,等. 没药化学成分及生物活性研究进展[J]. 中药材, 2021, 44(10): 2476-2484.
- [26] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
- [27] 宿树兰,缪晓冬,李佳响,等. 乳香与没药相须配伍特征分析及其现代研究进展与展望[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(21): 5789-5796.
- [28] Isesele PO, Mazurak VC. Regulation of skeletal muscle satellite cell differentiation by *Omega*-3 polyunsaturated fatty acids: a critical review [J]. Front Physiol, 2021, 12: 682091.
- [29] Blease K, Jakubzick C, Westwick J, et al. Therapeutic effect of

- IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma [J]. *J Immunol*, 2001, 166(8): 5219–5224.
- [30] Aliprantis AO, Wang J, Fathman JW, et al. Transcription factor T-bet regulates skin sclerosis through its function in innate immunity and via IL-13 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(8): 2827–2830.
- [31] Wang J, Li X, Zhong M, et al. MiR-301a suppression within fibroblasts limits the progression of fibrosis through the TSC1/mTOR pathway [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 21: 217–228.
- [32] Moitra S, Puri R, Paul D, et al. Global perspectives of emerging occupational and environmental lung diseases [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2015, 21(2): 114–120.
- [33] 杨元, 袁正洲, 吕志宇, 等. 血管活性肠肽(VIP)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)大鼠脑组织 IL-17A 含量的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(10): 32–35, 68.
- [34] Li N, Wu K, Feng F, et al. Astragaloside IV alleviates silica-induced pulmonary fibrosis via inactivation of the TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(3): 16.
- [35] 李睿, 江扬帆, 童琳, 等. 龙血竭总黄酮对免疫性肝纤维化大鼠肝脏中 TGF- β ₁ 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(4): 549–553.
- [36] 王飞, 刘克敏, 刘四海, 等. 康复治疗对创伤后膝关节僵直活动度及肌肉组织的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2017, 25(6): 534–538.
- [37] 刘阿英, 张全兵, 周云, 等. 电刺激对兔膝关节挛缩的治疗作用及其抗纤维化机制研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(10): 1570–1575.
- [38] Sakai H, Kimura M, Isa Y, et al. Effect of acute treadmill exercise on cisplatin-induced muscle atrophy in the mouse [J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(11): 1495–1505.
- [39] Urquhart DS, Saynor ZL. Exercise testing in cystic fibrosis: who and why? [J]. *Paediatr Respir Rev*, 2018, 27: 28–32.
- [40] Liu M, Lin X, Wang X. Decrease in serum chemerin through aerobic exercise plus dieting and its association with mitigation of cardio-metabolic risk in obese female adolescents [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2018, 31(2): 127–135.
- [41] Bervoets DC, Luijsterburg PA, Alessie JJ, et al. Massage therapy has short-term benefits for people with common musculoskeletal disorders compared to no treatment: a systematic review [J]. *J Physiother*, 2015, 61(3): 106–116.

[收稿日期]2022-07-08

张怡,张弅宁,张紫微,等.雷帕霉素通过抑制细胞焦亡缓解缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞损伤 [J].中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 9-15.

Zhang Y, Zhang XN, Zhang ZW, et al. Rapamycin alleviates HT22 cell injury after oxygen and glucose deprivation/reoxygenation by inhibiting pyrolysis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 9-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.002

雷帕霉素通过抑制细胞焦亡缓解缺氧缺糖/复氧 复糖 HT22 细胞损伤

张 怡,张弅宁,张紫微,周晓红,高维娟*

(河北中医学院 河北省心脑血管病中医药防治研究重点实验室,石家庄 050091)

【摘要】 目的 观察自噬激活剂——雷帕霉素对缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞焦亡的影响。**方法** 取对数生长期的 HT22 细胞,随机分为 4 组:正常组、模型组、溶剂对照组、雷帕霉素组,除正常组外,其余各组细胞均进行缺氧缺糖 6 h、复氧复糖 24 h 处理。倒置显微镜观察细胞形态,CCK-8 法检测细胞活性,LDH 法检测细胞损伤情况,免疫荧光染色法观察细胞内 NLRP3 阳性表达,Western blot 法检测细胞内 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-18、IL-1 β 蛋白表达。**结果** 正常组细胞胞体饱满、折光性强,细胞突触较多且相互间连接成网状;模型组及溶剂对照组细胞皱缩、变圆,大量脱落、漂浮,细胞间连接大幅减少;雷帕霉素组细胞损伤情况较模型组显著缓解。与正常组比较,模型组细胞活力显著降低,LDH 漏出率、NLRP3 阳性率、细胞内 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-18、IL-1 β 蛋白表达均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,雷帕霉素组细胞活力显著升高,LDH 漏出率、NLRP3 阳性率、细胞内 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-18、IL-1 β 蛋白表达均显著降低($P<0.01$)。溶剂对照组与模型组比较无显著差异($P>0.05$)。**结论** 雷帕霉素可能通过抑制细胞焦亡发挥对缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞的保护作用。

【关键词】 雷帕霉素;缺氧缺糖/复氧复糖;焦亡;自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0009-07

Rapamycin alleviates HT22 cell injury after oxygen and glucose deprivation/ reoxygenation by inhibiting pyrolysis

ZHANG Yi, ZHANG Xuening, ZHANG Ziwei, ZHOU Xiaohong, GAO Weijuan*

(Hebei University of Chinese Medicine, Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardio-cerebrovascular Disease, Shijiazhuang 050091, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the autophagy activator rapamycin (RAPA) on pyrolysis of neuronal HT22 cells after oxygen and glucose deprivation/reoxygenation. **Methods** HT22 cells in logarithmic growth phase were divided randomly into four groups: Control group, Model group, Solvent Control group and RAPA group. Apart from the Control group, cells in the other groups were reoxygenated 24 h after oxygen and glucose deprivation for 6 h. Cell morphology was observed under an inverted microscope. Cell viability was determined by Cell Counting Kit 8 assay, cell

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目(82104963);河北省普通高等学校青年拔尖人才计划项目(BJ2020027);河北中医学院优秀青年教师基础 Research 计划项目(YQ2020004);河北中医学院博士科研基金项目(BSZ2020013);河北省中医药管理局科研计划项目(2021103);河北中医学院基本科研业务费项目(YTZ2019002);河北中医学院科技能力提升项目(KTY2019052)。

【作者简介】 张怡(1988—),女,博士,研究方向:缺血性脑血管病的发生机制及中医药防治。E-mail:734910343@163.com

【通信作者】 高维娟(1966—),女,博士,教授,研究方向:缺血性脑血管病的发生机制及中医药防治。E-mail:gwj6088@163.com

damage was determined by the lactate dehydrogenase method, and NLR family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) protein expression was detected by immunofluorescence staining. NLRP3, Cleaved Caspase-1, interleukin (IL)-18 and IL-1 β expression in cells were detected by Western blot. **Results** Control cells were bipolar or multipolar with obvious synapses, multiple synapses were woven into a network, and cells showed obvious refractivity. In contrast, cells in the Model and Solvent Control groups showed decreased synapses, the cells were shrunken and rounded, a large number of cells float and fall off, and the number of intercellular connections was decreased. Cell damage was significantly relieved in the RAPA group compared with the Model group. Compared with the Control group, cell viability was significantly reduced and the LDH-leakage rate, NLRP3-positive rate, and intracellular NLRP3, Cleaved Caspase-1, IL-18 and IL-1 β protein expression levels increased significantly in the Model group ($P < 0.01$). Compared with the Model group, cell viability was significantly increased and the LDH leakage rate, NLRP3-positive rate, intracellular NLRP3, and Cleaved Caspase-1, IL-18 and IL-1 β protein expression levels were all significantly decreased in the RAPA group ($P < 0.01$). There was no significant difference between the Solvent Control group and the Model group ($P > 0.05$). **Conclusions** RAPA may protect HT22 cells following oxygen and glucose deprivation/reoxygenation by inhibiting cell pyrolysis.

【Keywords】 rapamycin; oxygen and glucose deprivation/reoxygenation; pyrolysis; autophagy

脑卒中(stroke)是一种由脑血管破裂或脑供血中断引起的脑损伤,是全球第二位、我国首位致死原因^[1]。其中导致脑供血中断的缺血性脑卒中是主要的卒中类型,约占所有脑卒中的 85%^[2]。目前,再灌注是恢复脑缺血血液供应和保护大脑免受缺血损伤的最佳方法。但大量研究显示,有时再灌注会对脑组织造成严重的继发性损伤,即脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤^[3]。细胞自噬(autophagy)是一种重要的生物学机制,可通过促进非功能蛋白和某些细胞器的更新来维持细胞稳态^[4]。细胞焦亡(pyroptosis)是一类程序性、溶解性细胞死亡方式,其激活涉及多个细胞因子和多条信号通路,其中经典焦亡途径依赖于Caspase-1激活后诱导的炎症反应,以细胞肿胀、破裂,胞膜破坏并释放促炎细胞因子为特征^[5]。研究表明,细胞自噬和细胞焦亡均是脑 I/R 损伤的重要机制^[6-7]。雷帕霉素(rapamycin, RAPA)为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抑制剂,可通过抑制 mTORC1 诱导自噬的发生,多应用于心脑血管疾病的治疗^[8]。我们前期研究证实,雷帕霉素可通过激活细胞自噬有效缓解脑 I/R 损伤后细胞凋亡从而发挥神经保护作用。近几年研究发现,细胞自噬和细胞焦亡间同样存在复杂串话,但自噬激活剂——雷帕霉素对脑 I/R 损伤后细胞焦亡的影响鲜有报道。因此,本研究采用小鼠海马神经元细胞系 HT22 细胞进行缺氧缺糖/复氧复糖(oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)处理,制备脑 I/R 损伤体外模型,探讨雷帕霉素对 OGD/R 损伤后细胞焦亡的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞

小鼠海马神经元细胞系 HT22 细胞(河北医科大学附属第一医院许顺江教授惠赠)。

1.2 主要试剂与仪器

雷帕霉素(rapamycin, RAPA),购于美国 Sigma 公司;DMEM 高糖、无糖培养基为美国 Gibco 公司产品;胎牛血清购买于浙江天杭生物科技股份有限公司;NLRP3 单克隆抗体(ab270449)、IL-18 单克隆抗体(ab207323)均购买于 Abcam 公司;IL-1 β 多克隆抗体(A11369)由 Abclonal 公司提供;Cleaved Caspase-1 多克隆抗体(AF4005)购自 Affinity 公司;CCK-8 试剂盒来自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;LDH 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

细胞培养箱、多功能微孔板读数仪(Thermo);倒置显微镜、荧光显微镜(Leica);电泳仪(Bio-Rad);双色红外激光成像系统(Licor)。

1.3 实验方法

1.3.1 HT22 细胞培养

将 HT22 细胞接种于含 4 mL 完全培养基(10% 胎牛血清+1%青链霉素混合液+89% DMEM 高糖培养基)的细胞培养瓶中、置于 37%、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养。

1.3.2 HT22 细胞缺氧缺糖/复氧复糖模型的建立

弃去完全培养基,采用无菌 PBS 冲洗 2 次后,更换为 DMEM 无糖培养基并置于无氧环境(94%

$N_2+5\% CO_2+1\% O_2$ 的 $37^\circ C$ 三气培养箱) 中培养 6 h, 氧糖剥夺结束后, 加入完全培养基并放回 $37^\circ C$ 、 $5\% CO_2$ 培养箱中继续培养 24 h^[9]。雷帕霉素组于氧糖剥夺结束后给予含雷帕霉素(终浓度为 250 nmol/L) 的完全培养基, 溶剂对照组给予含等体积的 DMSO 的完全培养基。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞活性

将 HT22 细胞接种于 96 孔板中, 不同实验组均设置 6 组重复, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 反应 45 min, 测定 OD_{450 nm} 值(A)。按照 $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 公式计算各组细胞活性。

1.3.4 LDH 活性检测

参照 LDH 试剂盒说明书, 收集细胞上清液与 LDH 试剂进行混匀, 反应 5 min 后于 450 nm 处测定上清液中 LDH 值(A)。采用 1% Tritonx-100 对细胞进行破膜, 将细胞破膜液与 LDH 试剂进行反应, 450 nm 处测定细胞破膜液 LDH 值(B)。LDH 漏出率 $(\%) = A / (A+B) \times 100\%$ 。

1.3.5 NLRP3 免疫荧光检测

将固定好的细胞爬片采用 1% Triton X-100 破膜; 随后加入 BSA 并在室温条件下孵育 30 min; 滴加配好的 NLRP3 抗体(1:50), $4^\circ C$ 避光孵育过夜; 加入二抗反应完毕后, 滴加 DAPI 避光孵育; 荧光显微镜拍照。

1.3.6 Western blot 检测相关蛋白表达

收集细胞, 低温条件下对细胞进行裂解后 12000 r/min, $4^\circ C$ 离心取上清; 蛋白样品定量后进行 SDS-PAGE 电泳, 电转至 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶室温封闭 2 h; 分别加入 NLRP3 抗体(1:1000), Cleaved Caspase-1 抗体(1:1000), IL-18 抗体(1:1000) 及 IL-1 β 抗体(1:1000), $4^\circ C$ 孵育过夜; 加入二抗(1:3000) 室温下孵育 40 min; 化学发光法对条带进行显影。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 不同实验组之间的比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

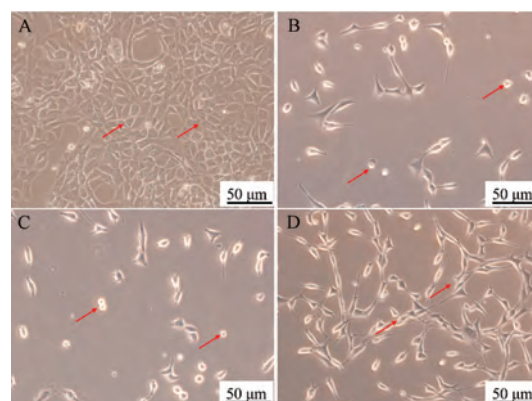
2.1 雷帕霉素显著改善缺氧缺糖/复氧复糖细胞损伤

正常组细胞贴壁生长, 细胞形态饱满、折光性

强, 胞体突触较多且相互间连接成网状; 与正常组细胞比较, 模型组及溶剂对照组细胞大量脱落, 细胞密度显著降低, 细胞皱缩、变圆, 突触断裂, 胞体折光性下降; 与模型组比较, 雷帕霉素组细胞损伤显著改善, 见图 1。

2.2 雷帕霉素有效提高缺氧缺糖/复氧复糖细胞活性

与正常组比较, 模型组细胞活性明显下降($P < 0.01$); 与模型组比较, 雷帕霉素组细胞活性明显升高($P < 0.01$), 溶剂对照组细胞活性无差别($P > 0.05$), 见图 2。

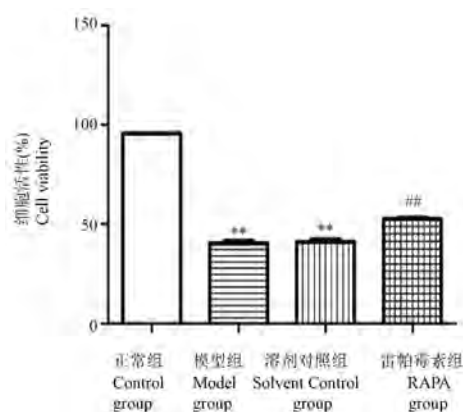


注: A: 正常组; B: 模型组; C: 溶剂对照组; D: 雷帕霉素组。

图 1 光学显微镜下各组细胞形态学观察

Note. A, Control group. B, Model group. C, Solvent Control group. D, RAPA group.

Figure 1 Morphological observation under optical microscope in each group



注: 与正常组比较, $** P < 0.01$; 与模型组比较, $## P < 0.01$ 。

图 2 CCK-8 法检测各组细胞活性($\bar{x} \pm s, n=6$)

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

Figure 2 Cell viability in each group was detected by CCK-8 method

2.3 雷帕霉素有效降低缺氧缺糖/复氧复糖细胞 LDH 漏出率

与正常组相比,模型组细胞 LDH 大量漏出($P < 0.01$);与模型组比较,雷帕霉素组细胞 LDH 漏出率明显降低($P < 0.01$),溶剂对照组细胞 LDH 漏出率与模型组比较无显著差别($P > 0.05$),见图 3。

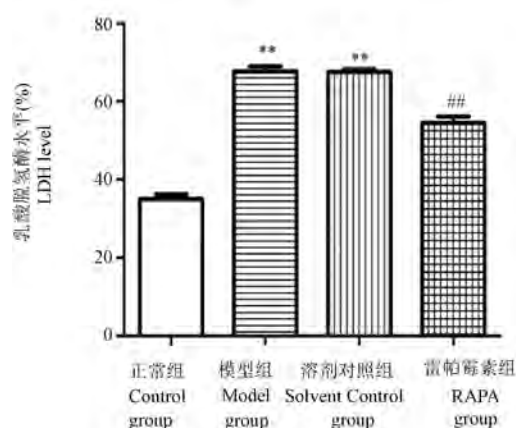
2.4 雷帕霉素有效降低缺氧缺糖/复氧复糖细胞内 NLRP3 阳性表达

与正常组比较,模型组细胞中 NLRP3 荧光强度显著提高($P < 0.01$);与模型组比较,雷帕霉素组细胞 NLRP3 荧光强度明显降低($P < 0.01$),溶剂对照组细胞 NLRP3 荧光强度与模型组无显著差别($P > 0.05$),见图 4。

2.5 雷帕霉素有效降低缺氧缺糖/复氧复糖细胞内焦亡相关蛋白 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 表达

与正常组比较,模型组细胞中 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白表达显著提高($P < 0.01$);与模型组比较,雷帕霉素组细胞中 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白表达显著降

低($P < 0.01$),溶剂对照组与模型组比较无显著差异($P > 0.05$),见图 5。



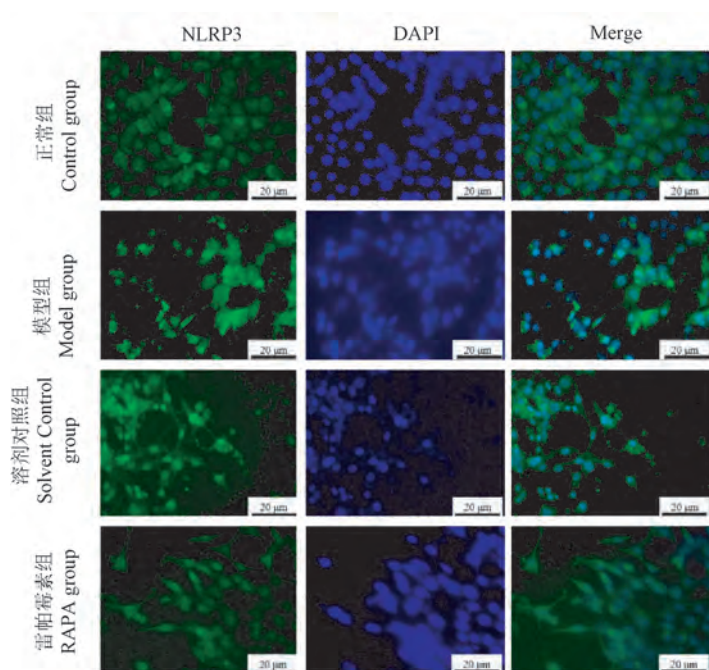
注:与正常组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 3 LDH 法检测各组细胞 LDH 漏出率($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

Compared with the model group, ## $P < 0.01$.

Figure 3 LDH leakage in each group of cells was detected by LDH method

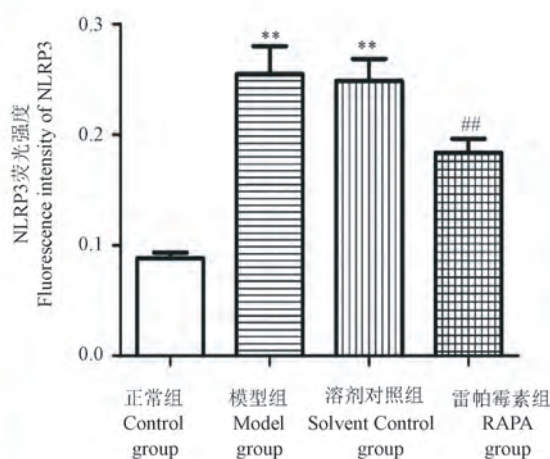


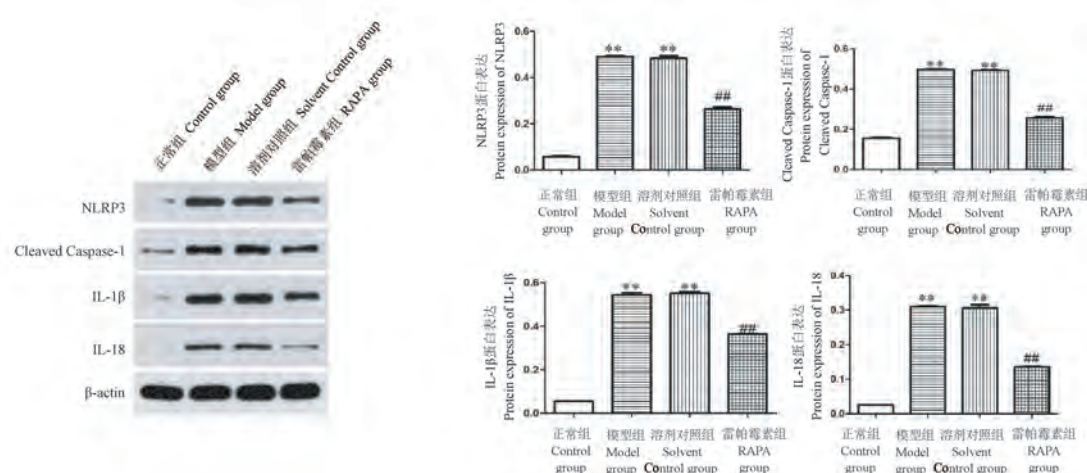
注:与正常组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 4 免疫荧光染色法观察各组细胞 NLRP3 阳性表达($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

Figure 4 Expression of NLRP3 in each group of cells was detected by immunofluorescence staining





注:与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图 5 Western blot 法观察各组细胞内 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

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

Figure 5 Expression of NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β and IL-18 in each group of cells was detected by Western blot

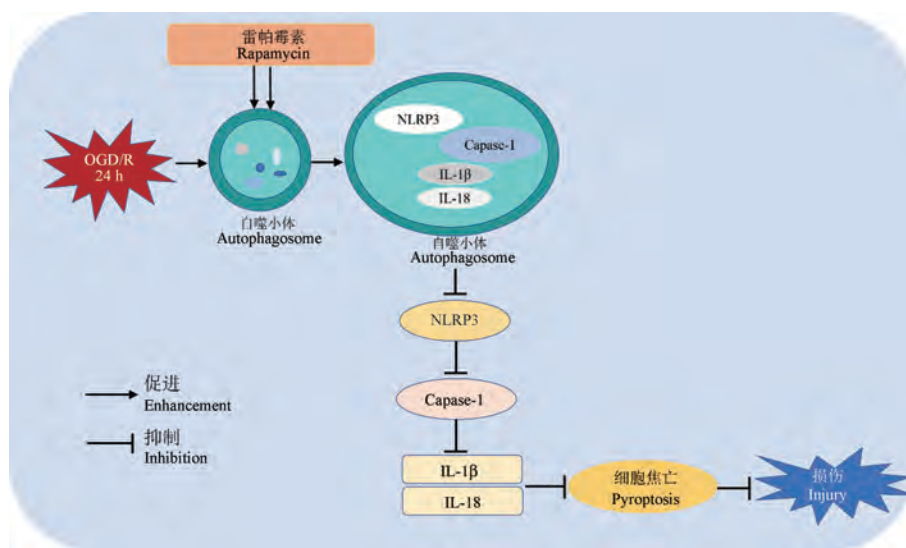


图 6 雷帕霉素抗缺氧缺血/复氧复糖损伤的作用机制

Figure 6 Mechanisms of rapamycin against oxygen and glucose deprivation/reoxygenation injury

3 讨论

脑 I/R 损伤是缺血性脑卒中的常见并发症,是一种动态、复杂的病理生理过程^[10]。其发生机制复杂,涉及氧化应激、炎症反应、细胞凋亡、细胞自噬及细胞焦亡等多个方面。大量研究发现,脑 I/R 损伤过程中,不同发病机制间彼此重叠、相互影响,在一定程度上增加了本病的治疗难度,目前关于脑 I/R 损伤的有效治疗手段仍相对缺乏^[11-12]。缺氧缺血/复氧复糖 (OGD/R) 法是体外模拟脑 I/R 损伤的常用方法,可有效模拟脑 I/R 损伤的病理生理过

程^[13]。因此,本研究选用 HT22 细胞为研究对象,通过 OGD/R 法建立脑 I/R 损伤体外模型。研究显示,与正常组比较,模型组细胞大量脱落,细胞密度显著降低,细胞皱缩、变圆,突触断裂,胞体折光性下降,细胞活性显著降低,LDH 漏出率明显增加、细胞膜损伤严重。大量研究表明,雷帕霉素具有较好的神经保护作用,可促进缺血性脑卒中后神经血管单位的修复,但其具体作用机制仍待进一步探究^[14]。本研究发现,雷帕霉素能够有效提高 OGD/R 细胞活性,降低 LDH 漏出率,缓解 OGD/R 造成的细胞损伤。

细胞焦亡是脑 I/R 损伤的机制之一。研究表明, Caspase-1 介导的经典焦亡途径参与了脑 I/R 后神经元损伤, 采用药物或基因手段阻断 Caspase-1 表达后脑组织损伤得到显著缓解^[15]。一系列能形成炎症小体的模式识别受体会触发 Caspase-1 的激活, 其中 Nod 样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 是中枢神经系统中最丰富的炎症小体, 可被包括三磷酸腺苷、钾外流、线粒体 DNA 和活性氧等多种因素激活, 是脑 I/R 损伤的主要参与者之一^[16-17]。NLRP3 可通过炎症小体衔接蛋白 ASC 促进炎症小体的形成和 Caspase-1 的活化。Caspase-1 的激活可诱导细胞膜穿孔, 促进细胞溶解坏死, 引发早期炎症反应; 同时活化的 Caspase-1 调节促炎因子白介素 IL-1 β 和 IL-18 的释放, 导致细胞焦亡^[18]。秦灵芝等^[19]研究证实, 氧糖剥夺后的神经元中 NLRP3 表达升高, IL-1 β 和 IL-18 释放增加, 神经元大量焦亡。Hong 等^[20]研究发现, 抑制经典焦亡途径可有效缓解 MCAO/R 大鼠脑组织损伤。本研究发现, 对 HT22 细胞进行 OGD/R 处理后, 细胞内 NLRP3 阳性表达增多, NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达明显上调, 说明 Caspase-1 介导的经典焦亡途径参与了 OGD/R 导致的细胞损伤。

脑 I/R 损伤后, 大量活性氧、自由基等所引起的氧化应激等因素, 也会引发自噬的发生^[21]。自噬在脑 I/R 损伤不同时期可发挥不同作用。我团队前期研究证实, 细胞自噬在脑 I/R 损伤 24 h 明显增强, 进一步提高自噬水平可有效缓解脑组织及神经细胞损伤^[22]。大量研究发现, 细胞自噬和细胞焦亡间存在密切联系, 两者相互“串话”, 在减轻脑 I/R 损伤中发挥重要作用^[23]。脑 I/R 损伤后适度自噬, pro-IL-1 β 、pro-IL-18、ASC 和 NLRP3 等 NLRP3 炎症小体组件可被自噬双层膜识别并吞噬, 然后通过自噬溶酶体途径将这些炎症小体组件降解, 从而缓解细胞焦亡, 减轻脑组织损伤^[24]。雷帕霉素为 mTOR 通路抑制剂, 可与 mTOR 靶向结合, 阻滞信号向下传递, 从而对自噬起促进作用^[25]。大量研究证实雷帕霉素能够通过激活神经元自噬, 缓解缺血带来的脑损伤, 起到对脑组织的保护作用。本研究发现, 雷帕霉素可有效提高 OGD/R 细胞活性、减少细胞 LDH 漏出率、抑制细胞内 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 等焦亡相关蛋白表达, 缓

解 OGD/R 导致的细胞损伤。

综上所述, 雷帕霉素可能通过调控 Caspase-1 介导的经典焦亡途径缓解神经细胞焦亡, 实现对脑组织的保护作用(图 6), 为雷帕霉素对脑 I/R 损伤的治疗提供了实验基础。但细胞焦亡是受多信号通路及因子调控的复杂过程, 除经典焦亡途径外, 雷帕霉素是否可通过其他焦亡途径发挥抗脑 I/R 损伤的作用, 仍待深入探索。脑 I/R 损伤机制复杂, 雷帕霉素除我们前期研究已经证实的对脑 I/R 损伤后细胞自噬和凋亡具有调控作用, 以及本研究发现的对细胞焦亡具有抑制作用外, 其他相关作用以及机制有待进一步探究。

参考文献:

- [1] Cao Y, Zhang H, Lu X, et al. Overexpression of microRNA-9a-5p ameliorates NLRP1 inflammasome-mediated ischemic injury in rats following ischemic stroke [J]. *Neuroscience*, 2020, 444: 106-117.
- [2] Liu B, Cao W, Xue J. LncRNA ANRIL protects against oxygen and glucose deprivation (OGD)-induced injury in PC-12 cells: potential role in ischaemic stroke [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1384-1395.
- [3] Hu L, Feng H, Zhang H, et al. Development of novel *N*-hydroxypyridone derivatives as potential anti-ischemic stroke agents [J]. *J Med Chem*, 2020, 63(3): 1051-1067.
- [4] 王瑜, 王天龙, 赵磊, 等. 局部脑缺血再灌注损伤对小鼠 TMEM166 基因和神经细胞自噬的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7): 28-32.
- [5] 张钊, 葛乃嘉, 马新月, 等. 细胞焦亡在肝损伤微环境中的作用研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(4): 133-136.
- [6] Sheng R, Zhang LS, Han R, et al. Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning [J]. *Autophagy*, 2010, 6(4): 482-494.
- [7] 余颜, 胡雨琴, 张荆, 等. 细胞焦亡参与脑缺血再灌注损伤的初步研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(8): 1379-1386.
- [8] 巩江, 贺学, 沙莎, 等. 雷帕霉素介导丝裂原活化蛋白激酶信号通路对肝癌细胞的影响 [J]. *解剖学杂志*, 2021, 44(4): 307-311.
- [9] 张怡, 周晓红, 靳晓飞, 等. 黄芪甲苷通过抑制细胞凋亡减轻缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞损伤的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4): 46-51.
- [10] 丁实, 赵学荣, 李宝群, 等. 基于 Bcl-2/Beclin-1 复合体探讨黄连素对脑缺血再灌注损伤大鼠模型的保护作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 651-657.
- [11] Kotleńga D, Gołańb-Janowska M, Masztalewicz M, et al. The emotional stress and risk of ischemic stroke [J]. *Neurol*

- Neurochir Pol, 2016, 50(4): 265-270.
- [12] 石巧娟, 郭红刚, 楼琦, 等. 半胱氨酰白三烯受体拮抗剂通过下调自噬减轻长爪沙鼠的全脑缺血再灌注损伤 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(1): 57-64.
- [13] Morán J, Perez-Basterrechea M, Garrido P, et al. Effects of estrogen and phytoestrogen treatment on an *in vitro* model of recurrent stroke on HT22 neuronal cell line [J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(3): 405-416.
- [14] 吴致远, 邓仪昊, 张永杰, 等. 雷帕霉素促进缺血性脑卒中后神经血管单位修复 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(9): 1709-1714.
- [15] Fann DY, Lim YA, Cheng YL, et al. Evidence that NF- κ B and MAPK signaling promotes NLRP inflammasome activation in neurons following ischemic stroke [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(2): 1082-1096.
- [16] Jiang CT, Jiang LP, Li QN, et al. Acrolein induces NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis and suppresses migration via ROS-dependent autophagy in vascular endothelial cells [J]. Toxicology, 2018, 410: 26-40.
- [17] Zhang L, Li X, Zhang H, et al. Agnuside alleviates synovitis and fibrosis in knee osteoarthritis through the inhibition of HIF-1 α and NLRP3 inflammasome [J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 5534614.
- [18] 张瑞芳, 李雅琦, 张广龙, 等. 从细胞焦亡角度探讨 6-姜酚、6-姜烯酚对化疗性小肠上皮细胞损伤的保护作用机制 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(6): 26-31.
- [19] 秦灵芝, 李玮, 王晓娟, 等. 白藜芦醇预处理减轻神经元焦亡及对神经元缺血性损伤的保护作用 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2019, 48(1): 38-41.
- [20] Hong P, Li FX, Gu RN, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in diabetic mice [J]. Neural Plast, 2018, 2018: 9163521.
- [21] Qin L, Wang Z, Tao L, et al. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy [J]. Autophagy, 2010, 6(2): 239-247.
- [22] Zhang Y, Zhang Y, Jin XF, et al. The role of astragaloside IV against cerebral ischemia/reperfusion injury: suppression of apoptosis via promotion of P62-LC3-autophagy [J]. Molecules, 2019, 24(9): 1838.
- [23] Tuo QZ, Zhang ST, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications [J]. Med Res Rev, 2022, 42(1): 259-305.
- [24] 胡笑桑, 张增乔, 何静, 等. 炎症小体介导细胞焦亡和自噬的相关研究 [J]. 现代免疫学, 2020, 40(5): 412-418.
- [25] 曹相玫, 徐辉, 武艳玮, 等. 雷帕霉素通过活化 MAPK 促进神经胶质瘤 U87-MG 细胞自噬 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(4): 654-660.
- [收稿日期] 2022-03-10

一例罕见大熊猫癌症的报道: 胰腺导管腺癌 (PDAC)

大熊猫为我国特有物种, 被誉为“中国国宝”。大熊猫对现生环境适应能力不佳是其濒危的重要内在因素之一, 其中, 疾病死亡也可能引起大熊猫数量减少。胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 属于胰腺癌中较为常见的一种组织分型, 恶性程度极高。在人类中, PDAC 的发生率约占胰腺癌的 90% 以上, 但 PDAC 在野生动物中并不常见。本文介绍了一例大熊猫 PDAC 病理诊断案例, 以期为今后野生动物肿瘤的诊断提供参考意见。

本病例, 雌性, 死亡时 32 岁。对其进行组织病理学观察, 胰腺组织内可见大量泡沫样管状腺癌结构; 腺上皮呈透明样, 细胞核大小差异明显; 腺管结构不规则, 呈乳头状生长, 乳头表面为单层上皮细胞; 部分胰腺导管上皮被高柱状黏液细胞取代, 黏液细胞呈假复层样柱状上皮结构。Masson 染色可以更清晰地观察到肿瘤组织中细胞核大小差异明显、核异型性、核分裂像, 以及杂乱、不规则的腺管结构。据此初步判定该胰腺为高分化或中分化导管腺癌, 伴随胰腺上皮内肿瘤的癌前病变。为进一步进行胰腺导管腺癌与慢性胰腺炎的鉴别诊断, 本研究进行了肿瘤特异性标记物 CK7、CK19 免疫组化染色, 结果显示胰腺组织 CK7、CK19 呈阳性表达, 据此判定该大熊猫患 PDAC。

近年来, 关于动物原发性 PDAC 的报道较为少见, 且报道以胰腺外分泌肿瘤为主, 患病动物多见于犬、牛等。野生动物未见相关报道, 这可能与野生动物 PDAC 罕见有关。现阶段关于大熊猫疾病的病理报告也很少见, 关于大熊猫肿瘤的文章则更少, 大熊猫肿瘤的患病风险至今仍是未知数, 导致大熊猫肿瘤发生的因素也不清楚, 这方面的工作应当进一步推进。

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, 5(6): 582-586; <https://doi.org/10.1002/ame2.12269>)。

刘洋,李剑奎,沙伟君,等. 牙本质基质蛋白 1 糖基化形式在颌骨损伤中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 16-23.

Liu Y, Li JK, Sha WJ, et al. Role of proteoglycan form of dentin matrix protein 1 in jaw defects [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 16-23.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.003

牙本质基质蛋白 1 糖基化形式在颌骨损伤中的作用

刘 洋¹, 李剑奎¹, 沙伟君¹, 崔立然¹, 王 辉¹, 徐 浩², 张怀胜², 宋 波², 薛 徽^{1*}

(1. 齐齐哈尔医学院附属第一医院, 黑龙江 齐齐哈尔 161041; 2. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

【摘要】 目的 探讨牙本质基质蛋白 1 糖基化形式(proteoglycan form of dentin matrix protein 1, DMP1-PG)在下颌骨损伤中的重要作用。**方法** 分别构建对照组野生型(wild type, WT)小鼠及实验组牙本质基质蛋白 1 糖基化点突变(S89G-DMP1)小鼠下颌骨缺损模型。模型构建完成后 7 d、14 d 及 28 d 收取样本, 显微计算机断层 micro-CT 扫描, 组织切片及染色, 观察二者之间组织愈合差异; 通过免疫荧光染色, 观察成骨相关蛋白在组织损伤区的表达变化差异; 应用实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)技术, 对比实验组与对照组在术后成骨相关基因表达变化情况; 分别提取实验组与对照组颌骨髓间充质干细胞, 进行成骨诱导分化, 观察二者之间成骨分化能力差异。**结果** 同对照组相比, 实验组小鼠下颌骨损伤愈合能力明显减弱, 骨损伤区成骨相关蛋白表达减低, 术后 7 d 及 14 d 成骨相关基因表达水平较对照组明显下调。通过提取两组小鼠下颌骨髓间充质干细胞进行成骨诱导分化, 结果显示同对照组相比, 实验组小鼠骨髓间充质干细胞成骨向分化能力明显减弱。**结论** DMP1-PG 参与颌骨损伤修复, 缺乏 DMP1-PG 可导致小鼠颌骨缺损愈合延迟。

【关键词】 颌骨缺损; 蛋白聚糖; 牙本质基质蛋白 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0016-08

Role of proteoglycan form of dentin matrix protein 1 in jaw defects

LIU Yang¹, LI Jiankui¹, SHA Weijun¹, CUI Liran¹, WANG Hui¹, XU Hao², ZHANG Huaisheng², SONG Bo², XUE Hui^{1*}

(1. the First Affiliated Hospital of Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161041, China.

2. Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161006)

【Abstract】 Objective To investigate the role of proteoglycan form of dentin matrix protein 1 (DMP1-PG) in mandibular bone injury. **Methods** We created mandibular bone defects in wild-type mice (control group) and DMP1 glycosylation point mutant (S89G-DMP1) mice (experimental group). Samples of mandibles were collected at 7, 14 and 28 days after model construction and subjected to micro-computed tomography scans, tissue sectioning, and hematoxylin eosin and toluidine blue staining to compare defect healing between the two groups. We also examined differences in the expression of osteogenesis-related proteins in the injured areas by immunofluorescence staining, and compared osteogenesis-related gene expression levels between the experimental and control groups post-surgery using real-time quantitative polymerase chain reaction. Mandibular bone marrow mesenchymal stem cells were extracted from both groups and their osteogenic differentiation abilities were compared. **Results** Mandibular injury healing was significantly reduced in the experimental compared with the control mice, and expression levels of osteogenesis-related proteins in the bone-injury area

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金资助项目(LH2020H128); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(2019-KYYWF-1218)。

[作者简介] 刘洋(1981—), 女, 硕士, 研究方向: 颌骨创伤及牙周损伤。E-mail: liuyang811001@126.com

[通信作者] 薛徽(1982—), 男, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 牙发育, 骨损伤及骨修复。E-mail: xuehui820512@126.com

were decreased. In addition, the osteogenic differentiation ability of bone marrow mesenchymal stem cells from the experimental group was significantly weaker than that of cells from the control group. **Conclusions** DMP1-PG is involved in the repair of jaw injury, and lack of DMP1-PG can lead to delayed healing of jaw defects in mice.

【Keywords】 jaw defect; proteoglycan; dentin matrix protein 1

颌骨损伤是口腔颌面外科与创伤外科的常见病与多发病,常因直接暴力,间接暴力,肿瘤,炎症及医源性损伤等引起^[1]。颌骨损伤后主要表现为开口受限,咬合关系错乱,面部肿胀等临床特征,因其特殊解剖位置及功能特点,颌骨缺损修复过程近年来备受关注^[2-3],如何快速、安全、有效治疗口腔颌面部损伤,促进缺损区新骨形成已成为目前亟待解决的科学问题。骨损伤发生后,骨组织内血管断裂,血小板、纤维蛋白及大量红细胞自血管内释放,在损伤区激活凝血系统进而形成血肿^[4],与此同时,中性粒细胞,巨噬细胞及淋巴细胞等炎症细胞迅速募集至骨损伤区,吞噬组织碎片及病原体,释放大量的趋化因子及炎症因子^[5-6]。来自骨膜及骨髓腔内的间充质干细胞在多种炎症因子的刺激下,迅速聚集至骨损伤区并向成骨细胞、成软骨细胞及成纤维细胞分化,进而形成骨痂,最终骨痂在成骨细胞及破骨细胞的共同作用下被板层状骨取代,骨损伤修复完成^[7]。

骨痂在骨组织损伤修复过程中具有维持组织形态、调控损伤区初期稳定性及提供基质矿化空间等重要作用。蛋白聚糖是构成骨痂的重要组成部分之一,能够有效维持骨痂机械强度,并为损伤组织提供保护性屏障。DMP1-PG 是一类新发现的蛋白聚糖,通过对骨损伤样本进行高通量测序,我们发现其与骨损伤修复关系密切。DMP1 是在牙本质 cDNA 克隆过程中发现的一类酸性细胞外基质蛋白, DMP1-PG 是其糖基化形式^[8]。DMP1-PG 在软骨基质及骨基质中呈高表达, DMP1-PG 缺失后,四肢长骨发育呈现老龄化骨病特征,此外颌骨及颅骨发育异常,表现为颞下颌关节过度磨损及颅骨颅缝早闭特征。然而 DMP1-PG 在颌面部骨组织中的损伤修复作用暂无相关研究及报道。

前期研究过程中,通过构建颌骨骨缺损模型,我们发现 DMP1-PG 在野生型小鼠颌骨缺损修复组织中大量表达,为进一步探讨 DMP1-PG 在颌骨缺损修复中的作用,我们构建 DMP1-PG 点突变 (S89G-DMP1) 小鼠,通过对比二者在颌骨创伤修复中的差异,探究 DMP1-PG 对小鼠颌骨损伤修复的影响及相关作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验组 S89G-DMP1 小鼠, SPF 级, 雄性, 8 周龄 30 只, 体重 24~26 g, 由上海同济大学口腔医学院孙瑶教授课题组设计, 辽宁长生生物技术股份有限公司 [SCXK(辽)2020-001] 培育, 对照组 WT 小鼠为 C57BL/6J 品系, SPF 级, 雄性, 8 周龄 30 只, 体重 24~26 g, 购于辽宁长生生物技术股份有限公司 [SCXK(辽)2020-001], 在齐齐哈尔医学院实验动物中心屏障环境 [SYXK(黑)2021-013] 饲养, 上述实验动物饲养给与 12 h 无光/12 h 人工光照饲养环境, 饲养温度 22℃~25℃, 自由进食与饮水。所有动物相关实验方案均经齐齐哈尔医学院伦理委员会批准 (QMU-AECC-2021-56)。所有实验设计及操作均符合动物实验学“3R”原则。

1.2 主要试剂与仪器

HE 染液 (上海生工生物工程有限公司, 批号 E607318); 甲苯胺蓝染液 (上海生工生物工程有限公司, 批号 A600962); TRIzol 试剂盒 (Invitrogen 公司, 批号 15596018); anti-DMP1-C 及 anti-DMP1-N (爱玛特医药科技上海有限公司); anti-ALP (Abcam 公司, 批号 ab224355); anti-RUNX2 (Abcam 公司, 批号 ab76956); 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司, 批号 PR036A)。

实时荧光定量 PCR 仪 (Lightcycler 96); Bio-Rad PCR 仪 (C1000 Touch); 石蜡切片机 (Thermo, HM325); 倒置荧光显微镜 (尼康, TS2R); 显微计算机断层 micro-CT 机 (SCANCO, Switzerland)。

1.3 实验方法

1.3.1 S89G-DMP1 小鼠的构建

根据野生型小鼠 (C57BL/6J) 全基因组序列, 构建所有 DMP1 蛋白糖基化位点外显子上、下游 6.6 kb 及 8.2 kb 基因序列同源重组臂, 在 DMP1 第 6 外显子下游 179 bp 敲入 Neo 阳性序列, 质粒构建完成后, 通过电转技术, 将质粒转入小鼠胚胎干细胞, 后将 3 个阳性克隆移植入 Balb/c 假孕小鼠子宫内。已获得 5 个嵌合体的雄性小鼠与野生型小鼠 (C57BL/6J) 杂交, 获取 F1 代小鼠。通过杂交获得

的雄性小鼠与 B6.129S4-Gt (ROSA) 26-Sortm1 (FLP1) Dym/Rain J 雌性小鼠杂交,确定移除 Neo 序列,通过基因型鉴定确定 Neo 移除序列的子代小鼠。经鉴定获得的 S89G-DMP1 小鼠在实验使用时均须经过基因型鉴定。

1.3.2 下颌骨缺损模型构建

根据相关文献^[9]建立下颌骨缺损模型。选用 8 周龄雄性 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠,作为实验对象。腹腔注射戊巴比妥钠(剂量:50 mg/kg,浓度:0.3%),麻醉显效后,将右侧下颌骨表面皮肤备皮并充分消毒,切开下颌表面皮肤,钝性分离咬肌,暴露下颌骨,使用牙科涡轮机在下颌骨体部构建直径 1.2 mm 的缺损洞形,该缺损洞形需穿通下颌骨。洞形制备完成后生理盐水局部冲洗,分层缝合咬肌与表面皮肤。术中需注意保护下颌骨骨膜,避免因人为手术因素造成二组之间的差异。术后 3 d 内腹腔注射镇痛药及抗生素。

1.3.3 Micro-CT 扫描

颌骨损伤模型构建完成后 14 d 及 28 d 收取样本,选择合适管径的扫描管,扫描精度选取 10 μm ,扫描功率 14 W,扫描电流 200 μA ,扫描电压 70 kV。

1.3.4 样本脱钙,包埋,HE,甲苯胺蓝染色及免疫荧光染色

颌骨损伤模型构建后 7 d、14 d 及 28 d 收取组织样本,将下颌骨置于 4℃ 浓度为 4% 的多聚甲醛溶液中 24 h 后,放入 10% 乙二胺四乙酸溶液中脱钙 14 d。样本脱钙完成后置入自动样本脱水仪脱水、浸蜡,组织包埋机包埋后切片,切片厚度为 4 μm 。根据 HE 及甲苯胺蓝试剂盒要求进行相应染色,中性树胶封片,显微镜拍照。

石蜡切片水化后,透明质酸抗原修复,山羊血清封闭处理。将组织切片与以下一抗: anti-ALP (1:500), anti-RUNX2 (1:500), anti-DMP1-N (1:500), anti-DMP1-C (1:500) 进行共同孵育并 4℃ 过夜, PBS 溶液洗涤三次后与荧光二抗 Alexa Fluor 546 IgG (1:1000) 室温孵育 1 h,使用 DAPI 进行细胞核复染,荧光显微镜下观察、拍照。

1.3.5 RT-qPCR 检测

下颌骨缺损模型构建完成后 7 d 及 14 d 收取样本,将样本放入含 1 mL TRIzol (Invitrogen) 溶液的 EP 管中,根据试剂盒要求提取损伤样本 RNA,紫外分光光度仪测量 RNA 浓度,使用 TaKaRa 逆转录

试剂盒 20 μL 体系将 RNA 逆转录为 cDNA。根据 RT-qPCR 试剂盒使用说明书配置 10 μL 扩增体系,分析靶基因 mRNA 表达水平,引物序列见表 1。

1.3.6 细胞培养与 ALP 染色

选取 8 周龄 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠,提取下颌骨骨髓间充质干细胞 (mandible bone marrow stromal cells, mBMSCs)。充分麻醉诱导后,将小鼠下颌骨分离,剪碎,反复冲洗,1200 r/min 离心 5 min 后,将上清液及碎骨片吸出,用含有 α -MEM, 10% 胎牛血清及 1% 青霉素/链霉素的普通培养基再次离心重悬,置于培养皿中培养,当细胞密度达到 80% 以上时进行传代。P3 代后,将细胞置于含有 β -甘油磷酸钠的成骨诱导培养基中成骨诱导 21 d,根据 ALP 试剂盒使用说明对其进行 ALP 染色,显微镜拍照。

1.4 统计学方法

所有实验样本应用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析并绘制条形图,计量资料通过平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,使用 t 检验进行两组间数据比较分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

基因 Genes	引物序列 (5'-3') Primer sequences
<i>Dmp1</i> -F	AGTGAGTCATCAGAAGAAAGTCAAGC
<i>Dmp1</i> -R	CTATACTGGCCTCTGTCTAGCC
<i>Opn</i> -F	GATCAGGACAACAACGAAAGG
<i>Opn</i> -R	GCTGGCTTTGGAAGTTGCTT
<i>Ocn</i> -F	GAGGACCATCTTTCTGCTCACTCT
<i>Ocn</i> -R	TTATTGCCCTCTGCTTGGAA
<i>Alp</i> -F	GATCATTTCCACGTTTTTACATT
<i>Alp</i> -R	TTCACCGTCCACACCTTGT
<i>Opg</i> -F	CCAAGAGCCCAGTGTTTCTT
<i>Opg</i> -R	CCAAGCCAGCCATTGTTAAT
<i>Acan</i> -F	CGCCACTTTCATGACCGAGA
<i>Acan</i> -R	TCATTTCAGACCGATCCACTGGTAG
<i>Bgn</i> -F	CCTGAGACCCTGAACGAAC
<i>Bgn</i> -R	GTGACCTAAGCCCAACCTGT
<i>Dcn</i> -F	TGAGCTTCAACAGCATCACC
<i>Dcn</i> -R	AAGTCATTTTGCCCAACTGC
<i>Vcan</i> -F	TGAGCTTCAACAGCATCACC
<i>Vcan</i> -R	ATAGAATTGCTCTTTGCGGATGAGG

2 结果

2.1 DMP1-PG 在下颌骨损伤区的表达

DMP1-PG 为 DMP1 糖基化形式,即 DMP1-N 端通过共价键与糖胺聚糖链连接,通过对组织样本进行 DMP1-N 抗体免疫荧光染色,可观察 DMP1-PG 在组织中的表达。首先构建 WT 小鼠下颌骨骨缺损模型,在术后 14 d 收取样本,通过对骨缺损样本进行免疫荧光染色,研究发现 DMP1-PG 在缺损组织内及缺损周围骨组织间大量表达。骨缺损后 14 d,提取缺损组织范围内 RNA,结果显示同未损伤区下颌骨相比,*Dmp1* 基因表达显著上调,上述结果表明 DMP1-PG 可能在颌骨缺损修复过程中发挥重要的作用,见图 1。

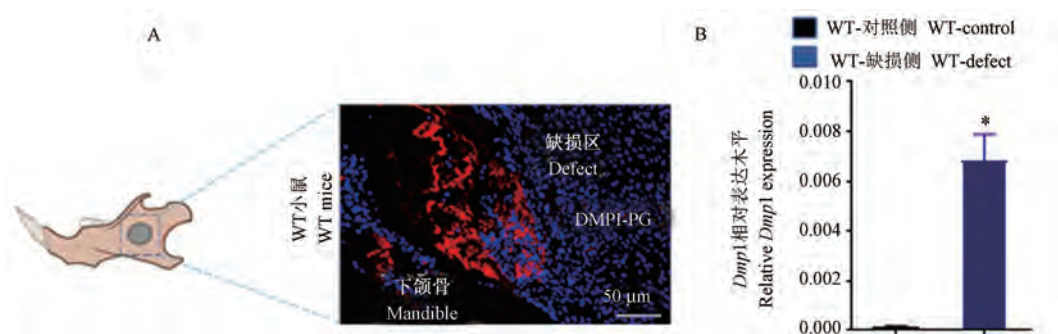
2.2 S89G-DMP1 小鼠基因型鉴定

S89G-DMP1 小鼠构建完成后进行基因型鉴定,组织样本凝胶电泳结果显示 DMP1-Neo 为 260 bp 条带,DMP1-WT 为 250 bp 条带,WT 小鼠显示为

DMP1-WT 250 bp 单条带,S89G-DMP1 小鼠纯合子显示为 DMP1-Neo 260 bp 单条带,S89G-DMP1 小鼠杂合子显示为 260 bp 与 250 bp 双条带。根据实验结果,6 号小鼠为 S89G-DMP1 阳性对照,1~5 号小鼠为 S89G-DMP1 纯合子,见图 2。

2.3 DMP1-PG 缺失抑制下颌骨损伤修复

为进一步探究 DMP1-PG 在颌骨损伤中的作用,课题组同时构建 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠颌骨缺损模型,在术后 7 d、14 d 及 28 d 收取样本,进行组织学染色。结果显示,颌骨缺损后 7 d,WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠骨缺损区域内均未见明显骨组织生成,损伤区内可见大量纤维样结构。术后 14 d,WT 小鼠颌骨缺损区内可见部分点、片状骨小梁生成,相较于 WT 小鼠,S89G-DMP1 小鼠损伤区骨组织生成能力明显减弱,损伤区仅可见极少数量的新生骨小梁,新生骨组织细小、散在的分布于颌骨缺损区;颌骨缺损后 28 d,WT 小鼠颌骨缺损区内可见大量新生骨组织,主要为骨小梁样结构,新生骨



注:A:DMP1-PG 在 WT 小鼠下颌骨缺损区表达情况。B:*Dmp1* 基因在 WT 小鼠下颌骨缺损后 14 d 表达变化差异。与对照侧比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 DMP1-PG 在下颌骨损伤区大量表达

Note. A, Expression of DMP1-PG in the mandibular defect area of WT mice. B, *Dmp1* gene expression difference in WT mice after mandibular defect 14 days. Compared with WT-control mice, * $P < 0.05$.

Figure 1 DMP1-PG is abundantly expressed in the mandibular injury area

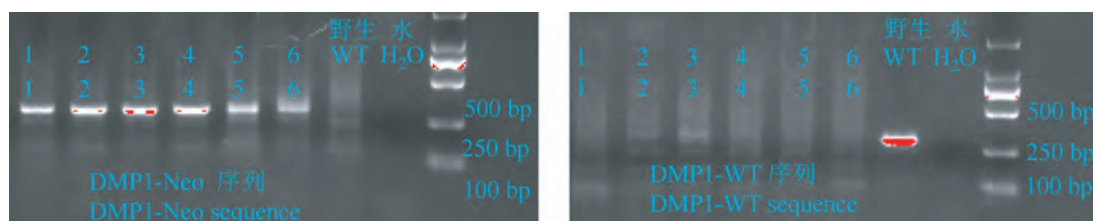


图 2 S89G-DMP1 小鼠基因型鉴定

Figure 2 Genotypic identification of S89G-DMP1 mice

组织已完整覆盖缺损区,与周围组织无明显界限,骨小梁结构成熟,HE 染色显示新生骨小梁无明显淡染,与正常下颌骨组织染色无明显差异。同 WT 小鼠相比,S89G-DMP1 小鼠在颌骨损伤后 28 d 尚不能完成有效损伤修复,缺损区内新生骨小梁数量较术后 14 d 略增加,但仍明显少于 WT 小鼠,骨小梁不能完整覆盖缺损组织,新生骨组织主要表现为类骨质样结构,HE 染色表现为明显的淡染状态。术后 14 d 及 28 d 收取样本,进行 Micro-CT 扫描,结果显示,WT 小鼠颌骨缺损区内新生骨组织量显著高于 S89G-DMP1 小鼠,见图 3。

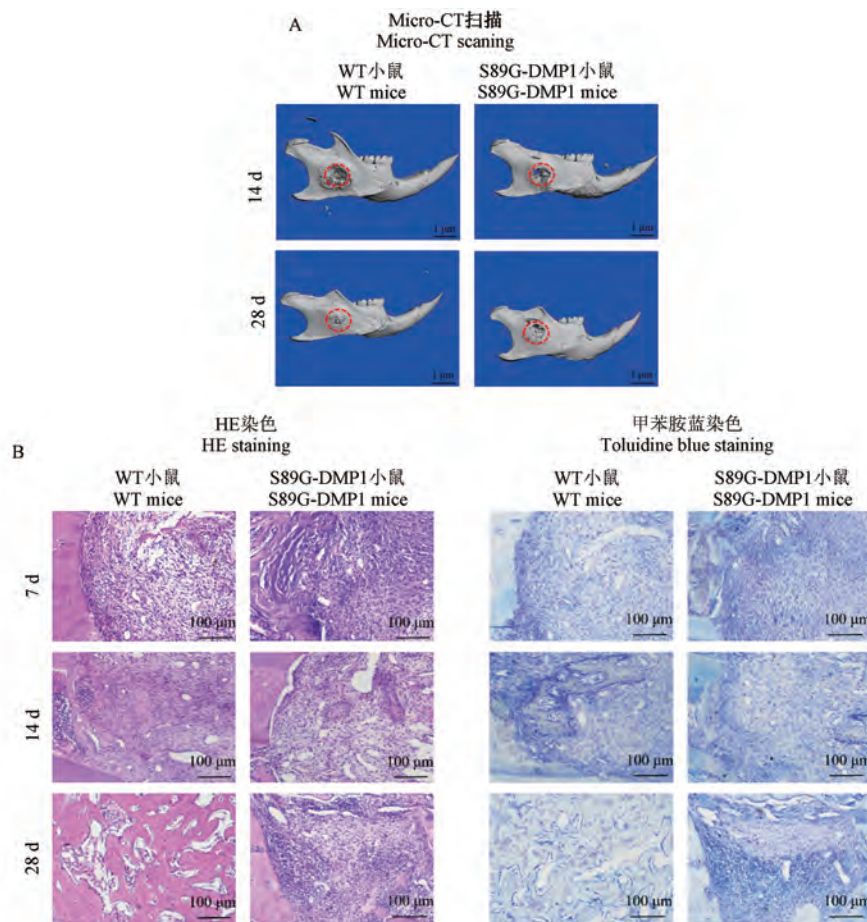
2.4 DMP1-PG 缺失抑制成骨蛋白表达

通过使用免疫荧光染色技术,观察 DMP1-PG 缺失后对小鼠颌骨缺损区成骨相关蛋白表达的影响。

结果显示,下颌骨损伤后 14 d,成骨相关蛋白 DMP1-C,ALP 及 RUNX2 在 WT 小鼠颌骨缺损区表达量较高,表现为染色较深的红染区,主要分布于新生骨小梁周围区域。在 S89G-DMP1 小鼠颌骨损伤区,上述蛋白表达量明显减低,尤其在 ALP 蛋白表达方面,S89G-DMP1 小鼠仅呈现极个别散在点样红染。上述结果进一步证实 DMP1-PG 缺失后,成骨相关蛋白在骨损伤区生成明显减弱,见图 4。

2.5 DMP1-PG 缺失抑制小鼠成骨相关因子表达

为进一步探究 DMP1-PG 影响颌骨损伤修复的相关机制,应用 RT-qPCR 技术对比观察颌骨损伤后 7 d 及 14 d 成骨相关基因及蛋白聚糖生成相关基因表达变化情况。结果显示术后 7 d,WT 小鼠与蛋白



注:A:术后 14 d 及 28 d Micro-CT 扫描;B:WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠在下颌骨缺损后 7 d、14 d 及 28 d 组织学切片 HE 染色及甲苯胺蓝染色。

图 3 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠下颌骨缺损组织学及影像学差异

Note. A, Micro-CT scans at 14 d and 28 d post-operation. B, HE staining and toluidine blue staining of histological sections of WT mice and S89G-DMP1 mice at 7 d, 14 d and 28 d after mandibular defect.

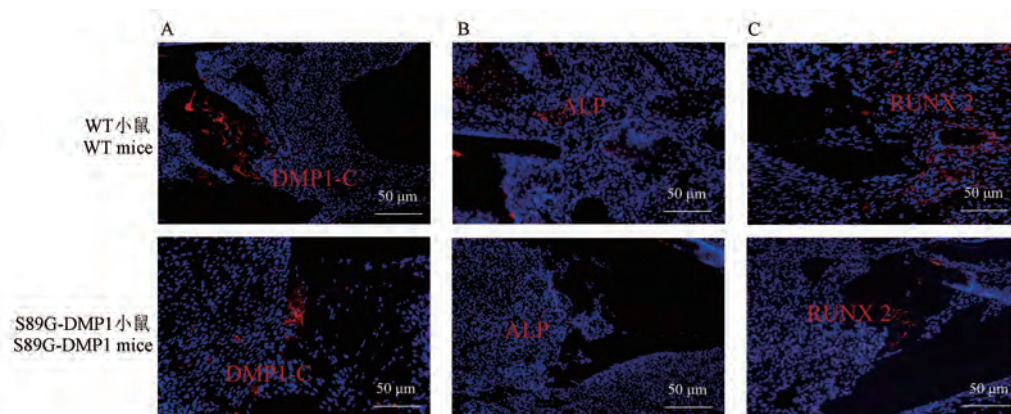
Figure 3 Histological and iconography differences of mandibular defects in WT mice and S89G-DMP1 mice

聚糖生成相关基因 (*Acan*、*Bgn*、*Dcn* 及 *Vcan*) 及骨生成相关基因 (*Alp*、*Ocn*、*Opn* 及 *Runx2*) 显著高于 S89G-DMP1 小鼠, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义。术后 14 d, *Dcn*、*Alp*、*Ocn* 及 *Opn* 在 WT 小鼠缺损骨组织内表达量高于 S89G-DMP1 小鼠, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义, 见图 5。

2.6 DMP1-PG 缺失抑制骨髓间充质干细胞分化

骨髓间充质干细胞在骨损伤修复过程中发挥

重要的作用, 通过提取下颌骨来源的 BMSCs, 观察 DMP1-PG 缺失后对其成骨分化能力的影响。ALP 染色显示 DMP1-PG 缺失后 BMSCs 成骨活性降低。此外, 来源于 S89G-DMP1 小鼠 mBMSCs 培养聚集物的成骨及蛋白聚糖相关的 mRNA 表达水平较 WT 小鼠表达明显降低。S89G-DMP1 小鼠 BMSCs 异常的成骨能力进一步证实了 DMP1-PG 在调节颌骨缺损愈合中的重要作用, 见图 6。

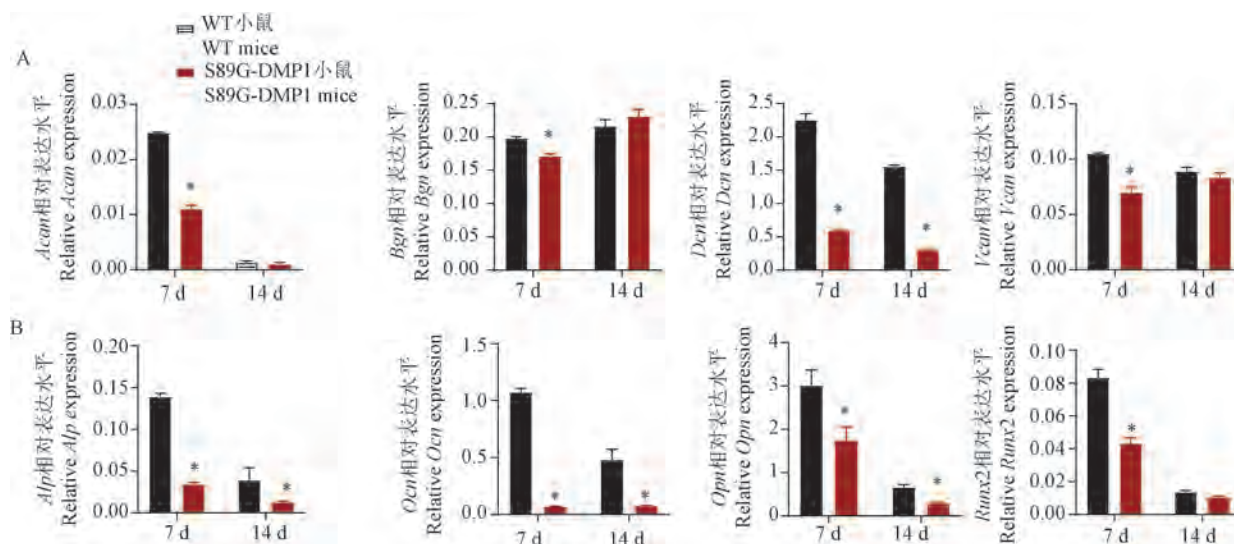


注: A: DMP1-C 端免疫荧光染色; B: ALP 免疫荧光染色; C: RUNX 2 免疫荧光染色。

图 4 成骨相关蛋白在下颌骨缺损区免疫荧光染色

Note. A, DMP1-C-terminal immunofluorescence staining. B, ALP immunofluorescence staining. C, RUNX 2 immunofluorescence staining.

Figure 4 Immunofluorescence staining of osteogenesis-related proteins in the mandibular defect area

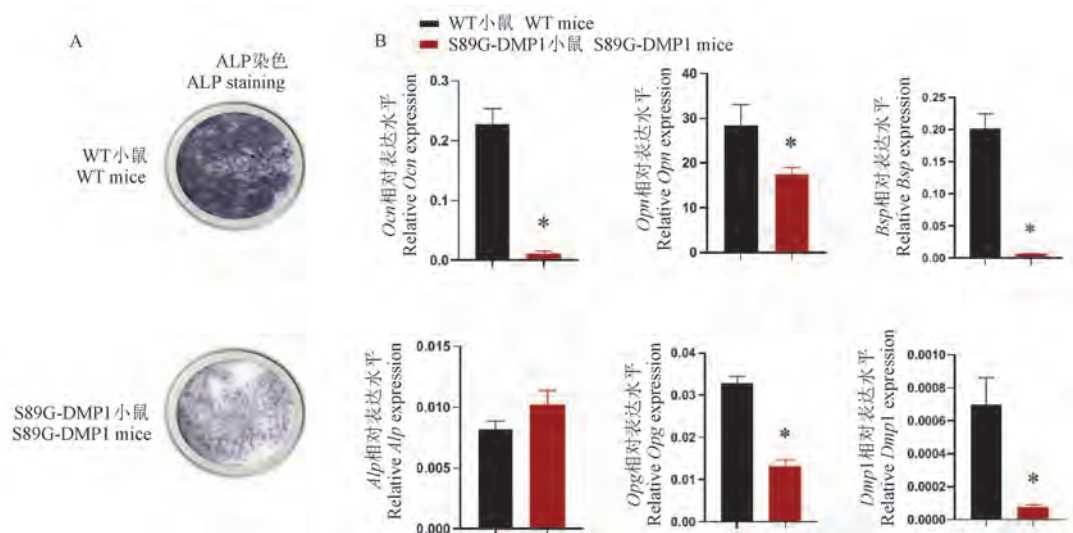


注: A: 蛋白聚糖生成相关基因在 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠下颌缺损后 7 d 及 14 d 表达变化差异; B: 成骨相关基因在 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠下颌缺损后 7 d 及 14 d 表达变化差异。与 WT 小鼠比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠下颌骨缺损后相关基因表达变化

Note. A, Expression changes of proteoglycan-related genes in WT mice and S89G-DMP1 mice after mandibular defect at 7 d and 14 d. B, Osteogenesis-related genes in WT mice and S89G-DMP1 mice at 7 d and 14 d after mandibular defect. Compared with WT mice, * $P < 0.05$.

Figure 5 Changes in the expression levels of related genes after mandibular defect in WT mice and S89G-DMP1 mice



注:A:WT小鼠及S89G-DMP1小鼠下颌骨骨髓间充质干细胞成骨诱导后ALP染色;B:二组骨髓间充质干细胞成骨诱导后相关基因表达差异。与WT小鼠比较,* $P < 0.05$ 。

图6 DMP1-PG缺失后骨髓间充质干细胞成骨能力下降

Note. A, ALP staining of mBMSCs osteogenic induction of WT mice and S89G-DMP1 mice. B, Differences in the expression levels of related genes after osteogenic induction of mBMSCs between the two groups. Compared with WT mice, * $P < 0.05$.

Figure 6 Decreased osteogenic ability of bone marrow mesenchymal stem cells after DMP1-PG deletion

3 讨论

因多种原因导致的颌骨缺损,不仅对患者的语言、咀嚼及吞咽等功能造成影响,同时也给患者造成极大的心理及社会适应障碍。颌骨缺损发生后,血肿即刻形成同时伴有炎症细胞浸润,体内间充质干细胞向成纤维细胞、成软骨细胞及成骨细胞分化,形成软骨及硬骨骨痂,最终完成骨组织再生过程^[10]。在这一过程中,骨组织细胞外基质成分发挥重要的作用,包括在愈合过程中提供支撑结构,调控成骨细胞行为及功能等^[11]。蛋白聚糖是细胞外基质的重要组成部分之一,尽管其在细胞外基质中含量较低,但其参与多种细胞组织活动,包括维持骨矿化基质强度,充填组织细胞间隙,粘附生长因子,调控基质矿化及骨损伤修复^[12-14]。

DMP1是最初在牙本质中被发现的酸性蛋白,在随后的相关研究中,人们发现其不仅在牙本质中表达,在其他组织包括皮肤、肌肉、乳腺、脑组织及骨组织^[15]中均有表达,尤其在骨组织中呈高表达,表达量明显高于牙本质。DMP1在体内以四种形式存在:DMP1全长片段及水解后产物DMP1-C端,DMP1-N端,DMP1-N端尚可以通过共价键与糖胺聚糖链连接,形成DMP1糖基化形式,即DMP1-PG。作为一类新发现的蛋白聚糖,DMP1-PG在肌肉组

织^[16]、骨组织矿化前沿及软骨基质中大量表达^[17]。相关研究表明,DMP1-PG缺失可导致小鼠骨脆性增加,骨组织过度衰老。

在前期研究中,我们发现DMP1-PG在颌骨骨缺损修复组织内及周围大量表达,Dmp1基因表达水平在损伤修复过程中显著上调,上述结果表明DMP1-PG参与颌骨损伤修复过程。为进一步探究DMP1-PG调控颌骨损伤修复的重要意义及机制,课题组构建WT小鼠及DMP1-PG点突变(S89G-DMP1)小鼠下颌骨骨缺损模型,该缺损模型为稳定的颌骨膜内成骨模型。通过对二组小鼠颌骨损伤后7 d、14 d及28 d样本进行组织切片、染色,研究发现,DMP1-PG缺失后,小鼠成骨能力明显减弱,WT小鼠在建模后28 d,新生骨组织几乎完全覆盖缺损区,而S89G-DMP1小鼠仅表现为部分骨组织修复,修复周期明显延长。上述结果表明DMP1-PG在颌骨损伤修复过程中发挥重要的调控作用。利用RT-qPCR技术,我们检测颌骨损伤修复过程中成骨相关基因表达变化,结果显示损伤后7 d及14 d,S89G-DMP1小鼠成骨相关基因表达均明显低于对照组WT小鼠,颌骨修复过程中,除成骨相关基因在DMP1-PG缺失后发生变化,与蛋白聚糖生成相关基因同样出现表达减低趋势,这种趋势在损伤修复早期表现更加明显。上述结果表明,DMP1-PG缺失后

不仅影响骨组织生成,同样参与调控其他类型与损伤修复密切相关的蛋白聚糖的合成。

相关研究表明,骨髓来源的间充质干细胞具有较强的修复骨组织缺损的能力^[18-20]。间充质干细胞在骨损伤修复过程中可直接向成骨细胞分化,同时可调控组织修复过程中的免疫活动,促进血管生成及其他类型细胞向损伤区募集^[21]。本次研究中,我们提取两组小鼠下颌骨骨髓间充质干细胞并进行成骨诱导,ALP 染色可见 S89G-DMP1 小鼠来源的间充质干细胞成骨能力显著低于 WT 小鼠,此外,成骨相关基因及蛋白聚糖合成相关基因表达同样显著低于对照组。上述结果表明,在细胞水平,DMP1-PG 可能参与调控干细胞分化能力,进而调控骨组织损伤修复过程。

综上所述,DMP1-PG 作为一类新发现的蛋白聚糖,在颌骨组织损伤修复过程中发挥重要的正向调控作用,其机制可能与干细胞分化及蛋白聚糖合成有关,本研究为治疗颌骨损伤修复提供新的研究方向及治疗靶点。

参考文献:

- [1] 王亚楠,吴旋,贾婷婷,等. 2 型糖尿病对小鼠下颌骨骨再生及辅助性 T 细胞 17、调节性 T 细胞相关因子表达的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2021, 39(6): 642-650.
- [2] 黄佳倩,马国武. 他汀类药物在颌骨缺损再生中的骨代谢及免疫调控研究进展[J]. 口腔医学研究, 2021, 37(7): 592-594.
- [3] 熊学鹏,赵怡芳. 上颌骨缺损修复后的功能与形态评估[J]. 中国实用口腔科杂志, 2021, 14(5): 536-540.
- [4] Sivaraj KK, Majev PG, Jeong HW, et al. Mesenchymal stromal cell-derived septoclasts resorb cartilage during developmental ossification and fracture healing [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 571.
- [5] Knox AM, McGuire AC, Natoli RM, et al. Methodology, selection, and integration of fracture healing assessments in mice [J]. J Orthop Res, 2021, 39(11): 2295-2309.
- [6] Lukač N, Katavić V, Novak S, et al. What do we know about bone morphogenetic proteins and osteochondroprogenitors in inflammatory conditions? [J]. Bone, 2020, 137: 115403.
- [7] 薛徽,孙瑶. 影响骨折愈合的生物因素研究新进展[J]. 口腔医学, 2018, 38(11): 1043-1047.
- [8] 孙瑶. 骨基质酸性蛋白 DMP1 在骨发育中的作用[J]. 口腔颌面外科杂志, 2014, 24(2): 85-89.
- [9] Wong SA, Hu DP, Slocum J, et al. Chondrocyte-to-osteoblast transformation in mandibular fracture repair [J]. J Orthop Res, 2021, 39(8): 1622-1632.
- [10] Hixon KR, Miller AN. Animal models of impaired long bone healing and tissue engineering- and cell-based *in vivo* interventions [J]. J Orthop Res, 2022, 40(4): 767-778.
- [11] Lu X, Li W, Fukumoto S, et al. The ameloblastin extracellular matrix molecule enhances bone fracture resistance and promotes rapid bone fracture healing [J]. Matrix Biol, 2016, 52-54: 113-126.
- [12] Xue H, Tao D, Weng Y, et al. Glycosylation of dentin matrix protein 1 is critical for fracture healing via promoting chondrogenesis [J]. Front Med, 2019, 13(5): 575-589.
- [13] Weng Y, Liu Y, Du H, et al. Glycosylation of DMP1 is essential for chondrogenesis of condylar cartilage [J]. J Dent Res, 2017, 96(13): 1535-1545.
- [14] Gao Y, Liu S, Huang J, et al. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 648459.
- [15] Jing B, Zhang C, Liu X, et al. Glycosylation of dentin matrix protein 1 is a novel key element for astrocyte maturation and BBB integrity [J]. Protein Cell, 2018, 9(3): 298-309.
- [16] 周梦琪,范琪琪,孙瑶. 牙本质基质蛋白 1 糖基化修饰对小鼠骨骼肌损伤修复的影响[J]. 同济大学学报(医学版), 2020, 41(2): 198-204.
- [17] Sun Y, Weng Y, Zhang C, et al. Glycosylation of dentin matrix protein 1 is critical for osteogenesis [J]. Sci Rep, 2015, 5: 17518.
- [18] Aghali A. Craniofacial bone tissue engineering: current approaches and potential therapy [J]. Cells, 2021, 10(11): 2993.
- [19] Liang W, Han B, Hai Y, et al. Mechanism of action of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the intervertebral disc degeneration treatment and bone repair and regeneration [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 833840.
- [20] Shin RL, Lee CW, Shen OY, et al. The crosstalk between mesenchymal stem cells and macrophages in bone regeneration: a systematic review [J]. Stem Cells Int, 2021, 2021: 8835156.
- [21] Oryan A, Kamali A, Moshiri A, et al. Role of mesenchymal stem cells in bone regenerative medicine: what is the evidence? [J]. Cells Tissues Organs, 2017, 204(2): 59-83.

[收稿日期]2022-03-24

崔莉莉,梅晓峰,卢瑞龙,等.不同刺激因素诱导的慢性阻塞性肺疾病小鼠模型肺小血管重塑的比较研究[J].中国比较医学杂志,2022,32(12):24-31.

Cui LL, Mei XF, Lu RL, et al. Comparative study of pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease mouse models induced by different stimuli [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 24-31.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.004

不同刺激因素诱导的慢性阻塞性肺疾病小鼠模型 肺小血管重塑的比较研究

崔莉莉¹,梅晓峰¹,卢瑞龙¹,徐可心¹,田燕歌^{1,2*}

(1.河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心,河南省中医药防治呼吸病重点实验室,郑州 450046;

2.河南中医药大学中医药科学院,郑州 450046)

【摘要】 目的 比较香烟烟雾(cigarette smoke,CS)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*,KP)和CS联合KP(CS+KP)三种方法建立的慢性阻塞性肺疾病(COPD)小鼠模型肺小血管重塑变化,为进一步研究提供依据。**方法** 将72只雄性小鼠随机分为正常组(Normal组)、细菌组(KP组)、香烟烟雾组(CS组)、香烟烟雾联合细菌组(CS+KP组),每组18只。CS组采用CS暴露(3000 ± 500 ppm),KP组采用KP稀释液(5×10^9 CFU/L,每7d一次)滴鼻,CS+KP组给予联合处理,Normal组给予生理盐水滴鼻,共8周。停止刺激后观察至第16周,分别于第4、8、16周结束后取材。检测肺功能呼气中期流速(50% expiratory flow,EF50)、潮气量(tidal volume,TV),观察肺组织病理及肺小血管结构,包括管壁厚度百分比(WT%)、管腔面积百分比(LA%)和管壁面积百分比(WA%)变化,免疫组化法检测肺组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达。**结果** 与Normal组比较,CS组TV第8~12周降低,EF50第8~16周降低($P<0.05$),WT%第8~16周升高,WA%及VEGF蛋白表达仅第8周升高、LA%仅第8周降低($P<0.05$);KP组肺功能无显著变化,WT%仅第8周升高,LA%第8周降低($P<0.05$);CS+KP组TV第4~12周降低,EF50第8~16周降低($P<0.05$),WT%、WA%、VEGF蛋白表达在第4~16周升高,LA%第4~16周降低($P<0.05$)。与CS组比较,CS+KP组WT%及VEGF蛋白表达第8~16周升高,WA%第16周升高,LA%第16周降低($P<0.05$)。与KP组比较,CS+KP组WT%、WA%及VEGF表达第8~16周升高,LA%第4~16周降低($P<0.05$);CS组WT%第8周升高、LA%第8周降低,VEGF蛋白表达第16周升高($P<0.05$)。**结论** CS、KP及其联合刺激8周小鼠均出现肺泡破裂、炎性细胞浸润、肺血管重塑等COPD病理特征,但各有特点:CS组第8周出现肺功能下降、肺泡结构断裂融合增厚,并在第16周仍存在,但肺血管重塑仅第8周明显;KP组肺功能下降不明显,肺组织炎症细胞浸润明显并持续存在,肺泡结构改变及肺血管重塑仅第8周存在;CS+KP组第4周即出现肺功能下降、肺泡结构的破坏及肺血管重塑,第16周仍持续存在。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;肺血管重塑;香烟烟雾;肺炎克雷伯杆菌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0024-08

Comparative study of pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease mouse models induced by different stimuli

CUI Lili¹, MEI Xiaofeng¹, LU Ruilong¹, XU Kexin¹, TIAN Yange^{1,2*}

(1. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan Education Ministry of P. R, Henan University of Chinese Medicine, Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Academy of Chinese Medicine Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【基金项目】河南省自然科学基金项目(202300410262);国家自然科学基金项目(82074406)。

【作者简介】崔莉莉(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。E-mail:cuilili022022@163.com

【通信作者】田燕歌(1984—),女,博士,副教授,研究方向:中医药防治呼吸疾病机制及配伍规律。E-mail:yange0910@126.com

【Abstract】 Objective To compare differences in pulmonary vascular remodeling among chronic obstructive pulmonary disease (COPD) mouse models established via different method, cigarette smoke (CS) exposure, *Klebsiella pneumoniae* (KP) infection, and CS combined with KP (CS+KP), at different time points and to provide the basis for further study. **Methods** A total of 72 male mice were randomly divided into normal, CS, KP and CS+KP groups, with 18 per group. Mice in the CS group were exposed to cigarette smoke (3000 ± 500 ppm) twice per day. KP was dripped into the nasal cavities of mice in the KP group (5×10^9 CFU/L, times/7 d). Mice in the CS+KP group were subjected to CS exposure and KP nasal administration. Stimulation was stopped at the end of week 8. The mice were observed until week 16 and sacrificed at the end of weeks 4, 8, and 16. Lung function, including 50% expiratory flow (EF50) and tidal volume (TV), was measured every 4 weeks. Pulmonary small-vessel structures, including wall thickness percentage (WT%), lumen area percentage (LA%), and wall area percentage (WA%), were assessed by lung histopathology. Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in lung tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal group, the CS group showed decreased TV from weeks 8 to 12, decreased EF50 from weeks 8 to 16, increased WT% from weeks 8 to 16, increased WA% and VEGF in week 8 only, and decreased LA% in week 8 only ($P < 0.05$). In the CS+KP group, TV decreased from weeks 4 to 12; EF50 decreased from weeks 8 to 16; WT%, WA%, and VEGF increased from weeks 4 to 12; and LA% decreased from weeks 4 to 16 ($P < 0.05$). In the KP group, lung function did not change significantly, WT% increased only in week 8, and LA% decreased only in week 8 ($P < 0.05$). Compared with the CS group, the CS+KP group showed increased WT% and VEGF from weeks 8 to 16, increased WA% in week 16, and decreased LA% in week 16 ($P < 0.05$). Compared with the KP group, the CS+KP group showed increased WT%, WA%, and VEGF from weeks 8 to 16 and decreased LA% from weeks 4 to 16 ($P < 0.05$). In the CS group, WT% increased in week 8, VEGF increased in week 16, while LA% decreased in week 8 ($P < 0.05$). **Conclusions** Mice in the CS, KP, and combination groups had significant pathological COPD characteristics, including alveolar destruction, inflammatory infiltration, and pulmonary vascular remodeling, but each had its own characteristics. In the CS group, lung function decreased, and alveolar structure showed destruction and thickening in week 8 and were still observed in week 16, while pulmonary vascular remodeling was only observed in week 8. In the KP group, lung function did not decrease significantly, inflammatory infiltration was evident and persistent in lung tissue, but alveolar structure destruction and pulmonary vascular remodeling were only observed in week 8. In the CS+KP group, lung function decreased and alveolar structure destruction and pulmonary vascular remodeling were observed in week 4 and were still observable in week 16.

【Keywords】 chronic obstructive pulmonary disease; pulmonary vascular remodeling; cigarette smoke; *Klebsiella pneumoniae*

肺血管结构和功能的改变是慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的主要病理特征,可损害气体交换功能、引起肺动脉高压,影响患者预后^[1]。研究发现,在轻度 COPD 患者或肺气肿易感的吸烟人群中即出现肺小血管血流异常,且随疾病进展而恶化^[2]。香烟烟雾、细菌等有害物质进入机体,细小颗粒随气体交换进入肺小血管,促进炎症细胞的募集及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的释放,引起内皮和血管平滑肌增殖,形成肺血管重塑,终致肺动脉高压、肺源性心脏病^[3-6]。通过 CT 观察发现,肺小血管的改变能反映患者肺气肿程度及是否存在肺动脉高压,且对于判断患者预后具有重要意义^[7]。可见,肺小血管改变发生较早,并与 COPD 疾病进展及预后关系密切。本研究在前期研究基础上^[8],比较了在香烟烟雾、细菌及其联合的刺激

因素下,不同时间点肺小血管重塑情况,以期为进一步研究 COPD 合并肺血管病变机制及相关治疗提供模型依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 72 只,雄性,体重为 20~22 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2021-0006],并饲养于河南中医药大学实验动物实验中心 [SYXK(豫)2021-0015]。本实验均通过河南中医药大学实验动物福利伦理审查委员会审查 (DWLL202003210),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 细菌

肺炎克雷伯杆菌 (46114) 由中国生物制品检验

鉴定所提供,使用前将细菌浓度调整为 5×10^9 CFU/L。

1.2 主要试剂与仪器

红旗渠牌过滤嘴香烟,由河南中烟工业有限责任公司生产,焦油量 10 mg,烟气烟碱量 0.8 mg,烟气一氧化碳量 12 mg。

SABC 免疫组化试剂盒 (Boster, 批号: 16K13E28J0922); DAB 显色试剂盒 (Boster, 批号: 16K04A27); VEGF 抗体 (proteintech, 批号: 00062384)。动物肺功能检测系统 (FinePointe, 美国); Leica-DM6000B 光学显微镜及 LAS V4.7 照相系统 (Leica, 德国); Image-Pro Plus (IPP) 6.0 专业图像分析系统 (Cybernetics, 美国); CaseViewer (C. V) 2.4 切片浏览分析系统 (3D histech, 匈牙利)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及小鼠模型制备

72 只 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠,适应性饲养 7 d 后,通过随机数字法分为 4 组:正常组 (Normal 组)、细菌组 (KP 组)、香烟烟雾组 (CS 组)、香烟烟雾联合细菌组 (CS+KP 组),每组 18 只。CS 暴露方法:使用烟熏系统装置进行烟雾暴露,使烟雾浓度达到 (3000 ± 500) ppm,每次 40 min,每天 2 次 (早晚各 1 次); KP 感染方法:每只小鼠鼻腔滴入 20 μ L KP 稀释液,每 7 d 一次。正常组给予过滤空气加生理盐水滴鼻,CS 组给予香烟烟雾暴露及生理盐水滴鼻, KP 组给予过滤空气和 KP 稀释液滴鼻,香烟烟雾联合细菌组,采用上述 CS 暴露和反复 KP 感染法联合处理。第 1~8 周造模,观察至第 16 周。分别于第 4、8、16 周结束后各组随机选取 6 只,进行分批取材。

1.3.2 肺功能测定

第 0、4、8、12、16 周末采用全身体积描记系统,检测小鼠肺功能,观察呼气中期流速 (50% expiratory flow, EF50) 和潮气量 (tidal volume, TV) 指标。

1.3.3 肺组织病理改变

左肺经 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋切片并采用 HE 染色。光学显微镜下观察 $100 \mu\text{m} \leq \text{直径} \leq 300 \mu\text{m}$ 肺小动脉的形态变化,测量肺血管直径 (vessel diameter, VD)、管壁厚度 (wall thickens, WT),血管总面积 (total area, TA)、管壁面积 (wall area, WA=TA-LA)、管腔面积 (luminal area, LA),计算管壁厚度占血管直径百分比 ($\text{WT}\% = \text{WT}/\text{VD} \times$

100%)、管壁面积占血管总面积百分比 ($\text{WA}\% = \text{WA}/\text{TA} \times 100\%$) 及管腔面积占血管总面积百分比 ($\text{LA}\% = \text{LA}/\text{TA} \times 100\%$) 进行量化分析。

1.3.4 免疫组化检测血管 VEGF 的蛋白表达

肺组织石蜡包埋切片后,进行烤片、脱蜡、抗原修复、血清封闭后,加 VEGF 一抗 (1:5000) 4℃ 过夜,次日滴加二抗、DAB 显色液、苏木素复染后,采用 Leica-DM6000B 光学显微镜及 LAS V4.7 照相系统进行观察 VEGF 血管阳性表达并拍照记录。Image-Pro-Plus6.0 软件计算光密度并量化比较。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行各组数据分析。数据处理结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;不同组间采用单因素方差分析,符合正态分布且方差齐者采用 LSD 分析,方差不齐者采用 Dunnett's T_3 进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验观察期间,正常组小鼠毛色光亮、呼吸均匀、精神良好且食量正常,CS 组从第 8 周出现毛发微黄、精神不振且呼吸浅快, KP 组仅第 8 周出现精神不振、食量减少,CS+KP 组从第 4 周出现毛发干枯发黄、呼吸急促、精神萎靡且食量减少。各组观察至第 16 周,未出现动物死亡现象。

2.2 各组小鼠肺功能变化

第 0~16 周,各组小鼠肺功能 TV、EF50 随时间均有升高趋势,但正常组升高较为显著,其余组升高缓慢。与正常组比较,CS 组 TV 在第 8 周显著降低并持续到第 12 周,EF50 在第 8 周显著降低且持续到第 16 周 ($P < 0.05$); CS+KP 组 TV 在第 4 周显著降低并持续到第 16 周 ($P < 0.05$), EF50 在第 8 周显著降低且持续到第 16 周 ($P < 0.05$); KP 组无显著差异。见表 1、表 2。

2.3 各组小鼠肺组织病理变化

正常组各时期镜下观察肺泡结构完整、间隔均匀,无炎性细胞浸润。CS 组第 8 周肺泡间隔破裂明显且有炎性细胞浸润持续到第 16 周; KP 组第 8 周肺泡出现部分破裂融合且有少量炎性细胞浸润,炎症浸润第 16 周仍存在; CS+KP 组第 4 周肺泡腔已出现不规则扩张融合、炎性细胞浸润并持续到第 16 周。见图 1。

表 1 各组小鼠不同时间点 TV 的比较($\bar{x}\pm s$, mL/s, $n=6$)
Table 1 Comparison of TV in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 0 周 0 week	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 12 周 12 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	0.21±0.05	0.24±0.03	0.26±0.04	0.28±0.02	0.30±0.02
香烟烟雾组 CS group	0.20±0.03	0.22±0.03	0.23±0.02 [#]	0.24±0.03 [#]	0.27±0.02
细菌组 KP group	0.22±0.01	0.22±0.03	0.23±0.04	0.25±0.03	0.27±0.03
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	0.21±0.02	0.19±0.02 [#]	0.21±0.01 [#]	0.24±0.04 [#]	0.26±0.05 [#]

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$.

表 2 各组小鼠不同时间点 EF50 的比较($\bar{x}\pm s$, mL/s, $n=6$)
Table 2 Comparison of EF50 in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 0 周 0 week	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 12 周 12 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	0.17±0.05	0.18±0.04	0.22±0.02	0.22±0.18	0.22±0.03
香烟烟雾组 CS group	0.17±0.03	0.16±0.02	0.18±0.03 [#]	0.18±0.03 [#]	0.19±0.04 [#]
细菌组 KP group	0.17±0.05	0.17±0.02	0.19±0.02	0.19±0.03	0.20±0.02
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	0.17±0.04	0.16±0.03	0.16±0.03 [#]	0.18±0.02 [#]	0.18±0.03 [#]

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$.

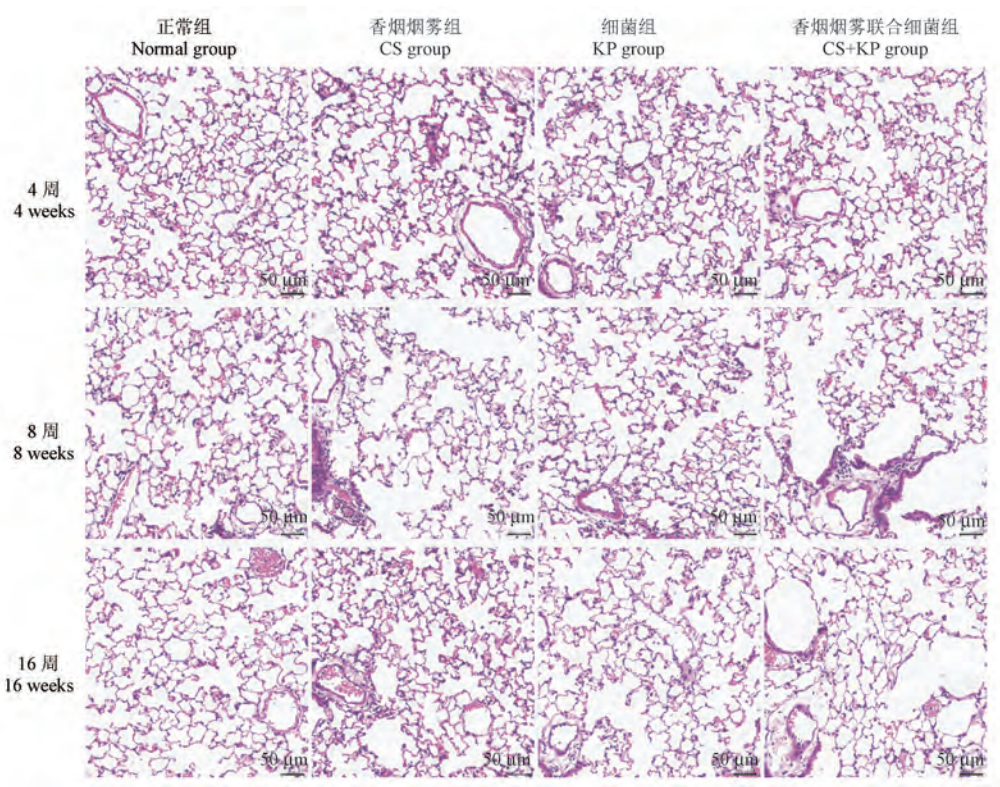


图 1 不同时期各组小鼠肺组织病理变化(HE 染色)

Figure 1 Histopathological changes of lung in each group of mice in different periods(HE staining)

2.4 各组小鼠肺组织血管结构变化

正常组各时期镜下观察小鼠肺血管未见明显的病理改变,血管管腔形态及管壁厚度正常,未见

明显的炎性浸润;CS 组在第 8 周,肺小动脉可见中膜增厚、管腔狭窄、周围炎性浸润明显并持续到第 16 周;KP 组仅第 8 周,肺小动脉出现管壁增厚、管

腔狭窄等病理变化;CS+KP 组在第 4 周,肺小动脉就已出现中膜增厚且呈肌化、管腔狭窄及大量炎性细胞浸润并持续到第 16 周。

与正常组比较,CS 组 WT% 在第 8 周显著升高并持续到第 16 周,WA% 仅第 8 周显著升高、LA% 仅第 8 周显著降低 ($P<0.05$);CS+KP 组 WT%、WA% 自第 4 周显著升高且并持续到第 16 周,LA% 自第 4 周显著降低且持续到第 16 周 ($P<0.05$);KP 组 WT% 仅第 8 周显著升高,LA% 仅在第 8 周显著降低 ($P<0.05$);CS+KP 组较 CS 组,WT% 在第 8 周持续显著升高并持续到第 16 周,WA% 第 16 周显著升

高,LA% 第 16 周显著降低 ($P<0.05$);CS+KP 组较 KP 组,WT%、WA% 在第 8 周持续显著升高且持续到第 16 周,LA% 在第 4 周持续显著降低且持续到第 16 周 ($P<0.05$),CS 组较 KP 组,WT% 仅第 8 周升高、LA% 仅第 8 周降低 ($P<0.05$)。见图 2、表 3、表 4、表 5。

2.5 各组小鼠肺组织 VEGF 蛋白表达变化

与正常组比较,CS 组 VEGF 阳性表达仅第 8 周显著增加 ($P<0.05$);CS+KP 组 VEGF 阳性表达自第 4 周显著升高并持续到第 16 周 ($P<0.05$);KP 组 VEGF 阳性表达无显著趋势。见图 3、表 6。

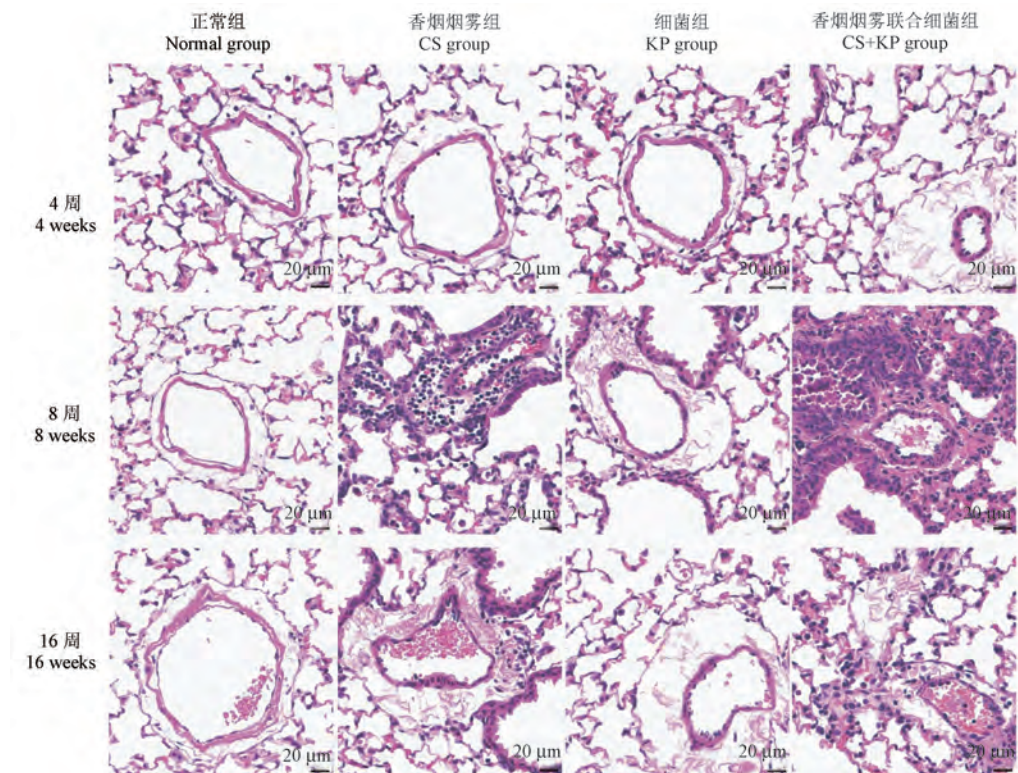


图 2 不同时期各组小鼠肺血管病理变化(HE 染色)

Figure 2 Changes in pulmonary vascular pathology in each group of mice at different periods(HE staining)

表 3 各组小鼠不同时间点 WT% 比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Comparison of WT% in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	26.85±2.45	27.03±1.15	27.00±2.12
香烟烟雾组 CS group	28.97±2.41	30.72±0.47 ^{#Δ}	29.56±2.20 [#]
细菌组 KP group	28.88±2.32	29.13±1.11 [#]	28.26±2.55
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	31.41±2.03 [#]	33.80±1.85 ^{#*Δ}	34.50±0.83 ^{#*Δ}

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$;与香烟烟雾组比较, ^{*} $P<0.05$;与细菌组比较, ^Δ $P<0.05$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$. Compared with CS group, ^{*} $P<0.05$. Compared with KP group, ^Δ $P<0.05$.

表 4 各组小鼠不同时间点 WA% 比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 4 Comparison of WA% in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	77.52±2.72	78.10±3.41	76.08±4.55
香烟烟雾组 CS group	80.58±3.23	83.91±2.31 [#]	78.04±3.76
细菌组 KP group	79.82±3.33	80.43±4.56	76.69±1.11
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	84.55±3.08 [#]	87.72±3.62 ^{#Δ}	90.46±1.57 ^{#*Δ}

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$;与香烟烟雾组比较, ^{*} $P<0.05$;与细菌组比较, ^Δ $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$. Compared with CS group, ^{*} $P<0.05$. Compared with KP group, ^Δ $P<0.05$.

表 5 各组小鼠不同时间点 LA% 比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 5 Comparison of LA% in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	22.22±1.69	24.63±2.29	25.55±4.84
香烟烟雾组 CS group	19.42±2.93	14.16±1.48 ^{#Δ}	22.15±4.35
细菌组 KP group	19.70±3.47	19.68±3.31 [#]	23.13±2.47
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	16.53±1.54 ^{#Δ}	12.73±2.48 ^{#Δ}	11.6±1.86 ^{#*Δ}

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$;与香烟烟雾组比较, ^{*} $P<0.05$;与细菌组比较, ^Δ $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$. Compared with CS group, ^{*} $P<0.05$. Compared with KP group, ^Δ $P<0.05$.

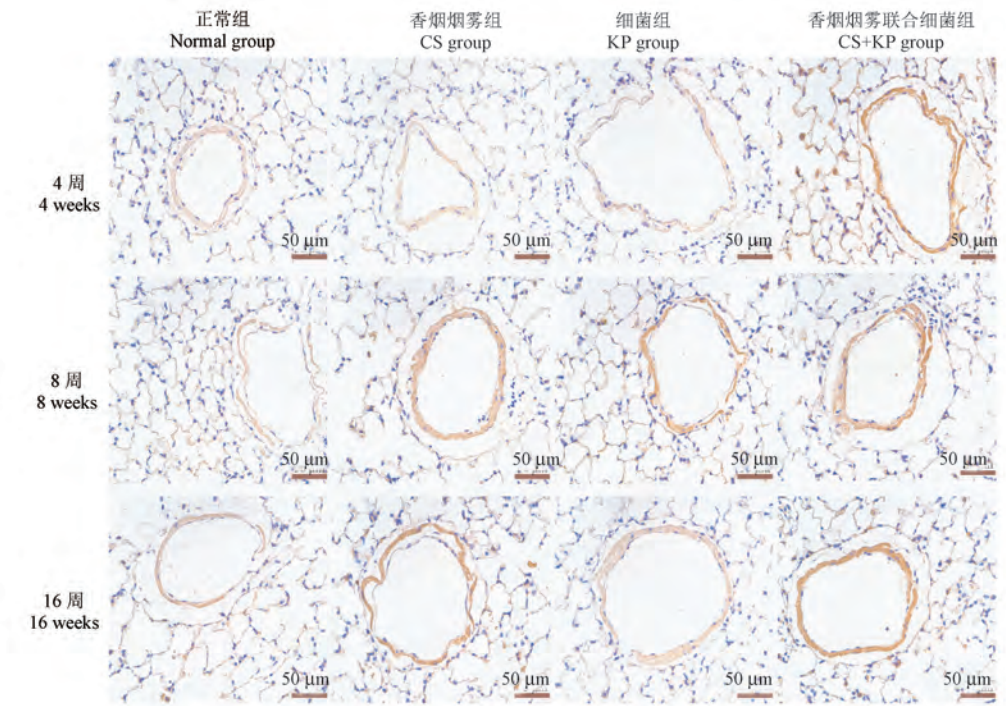


图 3 各组小鼠肺组织 VEGF 表达变化(IHC)
Figure 3 Changes in VEGF expression in lung tissues in each group of mice

表 6 各组小鼠不同时间点 VEGF 比较 ($\bar{x} \pm s, n=5 \sim 6$)
Table 6 Comparison of VEGF in each group of mice at different time points

组别 Groups	第 4 周 4 weeks	第 8 周 8 weeks	第 16 周 16 weeks
正常组 Normal group	2.98±0.24	3.88±0.46	3.34±0.89
香烟烟雾组 CS group	4.37±0.96	5.03±1.21 [#]	4.94±1.26 ^Δ
细菌组 KP group	4.35±0.94	4.93±1.00	3.37±0.42
香烟烟雾联合细菌组 CS+KP group	4.73±0.64 [#]	6.19±0.90 ^{#*Δ}	6.43±1.38 ^{#*Δ}

注:与正常组比较, [#] $P<0.05$;与香烟烟雾组比较, ^{*} $P<0.05$;与细菌组比较, ^Δ $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, [#] $P<0.05$. Compared with CS group, ^{*} $P<0.05$. Compared with KP group, ^Δ $P<0.05$.

3 讨论

COPD 是一种以气流受限、慢性进行性气道炎症为特点的肺部疾病,肺血管病变在 COPD 患者中普遍存在^[2]。临床研究发现,约 30%~70% 的 COPD 患者存在显著肺血管病变,加重疾病恶化程度^[9]。此外,肺小动脉缺氧性收缩可促进血管内膜增厚、平滑肌增生,导致血管结构改变,最终形成肺动脉高压^[10]。香烟烟雾、环境污染物等多种致病因素可引起肺小血管的改变^[11]。香烟烟草中含有大量有毒成分,长期香烟烟雾刺激引起气道平滑肌细胞增殖的同时,还可通过血小板衍生生长因子诱导肺小动脉平滑肌层的增厚、管腔变窄、增加右心室收缩压,从而引起肺血管重构,继发肺动脉高压^[12-13]。细菌感染也是 COPD 发生发展的重要致病因素,其中,肺炎克雷伯杆菌为常见的病原菌,可导致支气管炎、气道重塑及肺小动脉管壁增厚明显等病理特征,与患者进展和预后密切相关^[14-16]。目前, COPD 模型制备方法包括单一因素诱导的模型,例如 CS 暴露^[17]、细菌感染^[18]、病毒感染^[19],及复合因素诱导的模型,例如 CS 联合细菌^[15,20-21]或病毒感染^[8]、CS 联合脂多糖^[22]等。课题组前期比较了香烟、细菌、病毒及香烟联合细菌或病毒因素建立的 COPD 小鼠模型,发现均可引起肺功能下降、肺组织结构损伤^[8]。本研究在此基础上,选取 CS、KP 及其联合三种方法诱导 COPD 小鼠模型,以肺血管结构变化为主要指标,观察不同诱导因素下肺血管的动态变化,为深入探讨 COPD 血管病变机制、药物对肺血管的作用及远后效应评价、药物作用机制研究提供模型依据。

肺功能下降不仅反映气流受限程度,还与肺血管重构程度有关,当肺实质破坏和血管管壁发生异常改变时,损害了肺泡腔中气体交换功能,导致肺功能逐渐下降^[23-24]。EF50 作为衡量气道阻力指标,反映小鼠支气管阻塞程度,TV 反映肺通气功能^[25-26]。本研究发现,单独香烟烟雾暴露在第 8 周,TV 明显降低,小鼠出现呼吸浅快,在第 16 周仍存在;EF50 在第 8 周降低,出现明显气道阻塞并在第 16 周仍存在。单独细菌感染 EF50、TV 降低并不明显,提示小鼠无明显气道阻力,且呼吸无明显异常。香烟烟雾联合细菌感染在第 4 周,TV 明显降低,小鼠即出现呼吸浅快,在第 16 周持续存在;EF50 在第 8 周降低,出现明显气道阻力且在第 16

周仍持续存在。说明香烟烟雾或其联合细菌感染可明显降低小鼠肺通气功能,引起气道阻塞,且在去除刺激因素(比如戒烟)后难以逆转。

多种刺激因素导致的缺氧、慢性炎症,促进血管壁分泌 VEGF 等细胞因子,并通过肺血管平滑肌细胞表型转化,刺激血管病理性生成,破坏血管内皮屏障,从而出现管壁内膜增厚、管腔狭窄甚至闭塞等病理表现,最终导致肺血管结构重塑^[27-30]。本研究以管壁厚度、管壁面积、管腔面积为肺血管重塑指标,并选取直径小于 300 μm 的接近于肺小动脉范围的血管,通过测量分析发现,单独香烟烟雾暴露在第 8 周,出现肺小动脉管壁增厚、管腔狭窄,VEGF 表达明显增加,第 16 周管壁增厚仍存在,而管腔狭窄仅第 8 周存在;单独细菌感染仅第 8 周出现管壁增厚、管腔狭窄的病理变化;香烟烟雾联合细菌感染 4 周即出现肺小动脉管壁增厚、管腔狭窄及 VEGF 表达明显现象,并在第 16 周仍存在。说明香烟烟雾、细菌及其联合均可引起肺小动脉重塑,但复合因素诱导的模型肺小动脉重塑发生较早,持续时间较长。

综上,香烟烟雾、肺炎克雷伯杆菌及其联合刺激 8 周均能诱导小鼠出现肺泡破裂、炎性细胞浸润、肺血管重塑等 COPD 病理特征,但各有特点:单独香烟刺激 8 周出现肺功能下降、肺泡结构断裂融合,并在第 16 周仍存在,但肺血管重塑仅第 8 周明显;单独细菌感染肺功能下降不明显,肺组织炎症细胞浸润明显并持续存在,肺泡结构改变及肺血管重塑仅第 8 周存在;香烟烟雾联合细菌感染复合刺激 4 周即出现肺功能下降、肺泡结构的破坏及肺血管重塑,第 16 周仍持续存在。因此,对于 COPD 合并肺血管病理机制及药物作用机制的研究可选用单独香烟暴露或者香烟烟雾联合细菌感染模型,对于药物作用特点、远后效应评价的研究选用香烟烟雾联合细菌感染复合模型较为妥当。

参考文献:

- [1] Westergren-Thorsson G, Bagher M, Andersson-Sjöland A, et al. VEGF synthesis is induced by prostacyclin and TGF- β in distal lung fibroblasts from COPD patients and control subjects: Implications for pulmonary vascular remodelling [J]. *Respirology*, 2018, 23(1): 68-75.
- [2] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease [EB/OL]. [2021-11-15]. [http://www. goldcopd](http://www.goldcopd).

- [3] Shi J, Yang Y, Cheng A, et al. Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020, 319(3): H613-H631.
- [4] Jolly AJ, Lu S, Strand KA, et al. Heterogeneous subpopulations of adventitial progenitor cells regulate vascular homeostasis and pathological vascular remodeling [J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(6): 1452-1465.
- [5] Hassoun PM. Pulmonary arterial hypertension [J]. N Engl J Med, 2021, 385(25): 2361-2376.
- [6] You L, Niu H, Huang K, et al. Clinical features and outcomes of acute exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease patients with pulmonary heart disease; a multicenter observational study [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2021, 16: 2901-2910.
- [7] Ma J, Yu N, Shen C, et al. A three-dimensional approach for identifying small pulmonary vessels in smokers [J]. J Xray Sci Technol, 2017, 25(3): 391-402.
- [8] 梅晓峰, 赵鹏, 卢瑞龙, 等. 慢性阻塞性肺疾病小鼠模型制备方法的比较研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(1): 178-185.
- [9] Rahaghi FN, Wells JM, Come CE, et al. Arterial and venous pulmonary vascular morphology and their relationship to findings in cardiac magnetic resonance imaging in smokers [J]. Comput Assist Tomogr, 2016, 40(6): 948-952.
- [10] Sakao S, Voelkel NF, Tatsumi K. The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations [J]. Eur Respir Rev, 2014, 23(133): 350-355.
- [11] Sapey E, Bafadhel M, Bolton CE, et al. Building toolkits for COPD exacerbations: lessons from the past and present [J]. Thorax, 2019, 74(9): 898-905.
- [12] Sun X, Feng X, Zheng D, et al. Ergosterol attenuates cigarette smoke extract-induced COPD by modulating inflammation, oxidative stress and apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. Clin Sci, 2019, 133(13): 1523-1536.
- [13] Su Y, Han W, Kovacs-Kasa A, et al. HDAC6 activates ERK in airway and pulmonary vascular remodeling of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2021, 65(6): 603-614.
- [14] Riquelme SA, Ahn D, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* adaptation to innate immune clearance mechanisms in the lung [J]. J Innate Immun, 2018, 10(5-6): 442-454.
- [15] Li Y, Li SY, Li JS, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(10): 1752-1760.
- [16] Fei ZY, Wang J, Liang J, et al. Analysis of bacterial spectrum, activin A, and CD64 in chronic obstructive pulmonary disease patients complicated with pulmonary infections [J]. World J Clin Cases, 2022, 10(8): 2382-2392.
- [17] Scholl A, Ndoja I, Jiang L. *Drosophila trachea* as a novel model of COPD [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12730.
- [18] Wen W, Wang AM, Liu DL, et al. Expression of connective tissue growth factor and bone morphogenetic protein-7 in *Pseudomonas aeruginosa*-induced chronic obstructive pulmonary disease in rats [J]. COPD, 2013, 10(6): 657-666.
- [19] Marsh EK, Prestwich EC, Williams L, et al. Pellino-1 regulates the responses of the airway to viral infection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 456.
- [20] Zhang LX, Tian YG, Zhao P, et al. Network pharmacology analysis uncovers the effect on apoptotic pathway by Bu-Fei formula for COPD treatment [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 289: 115022.
- [21] Zhang LX, Tian YG, Zhao P, et al. Electroacupuncture attenuates pulmonary vascular remodeling in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease via the VEGF/PI3K/Akt pathway [J]. Acupunct Med, 2022, 40(4): 389-400.
- [22] 丁念, 郑承红. 慢性阻塞性肺疾病合并骨质疏松大鼠模型建立与评价 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(7): 1470-1473.
- [23] Harkness LM, Kanabar V, Sharma HS, et al. Pulmonary vascular changes in asthma and COPD [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2014, 29(2): 144-155.
- [24] 李树民, 张敏, 王朋, 等. 小鼠无创性肺功能的测定及其意义 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(5): 548-553.
- [25] Glaab T, Braun A. Noninvasive measurement of pulmonary function in experimental mouse models of airway disease [J]. Lung, 2021, 199(3): 255-261.
- [26] Ramírez-Ramírez E, Torres-Ramírez A, Alquicira-Mireles J, et al. Characteristic plethysmographic findings in a guinea pig model of COPD [J]. Exp Lung Res, 2017, 43(2): 57-65.
- [27] Luo L, Liu Y, Chen D, et al. CD30 is highly expressed in chronic obstructive pulmonary disease and induces the pulmonary vascular remodeling [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 3261436.
- [28] Morris HE, Neves KB, Montezano AC, et al. Notch3 signalling and vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension [J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(24): 2481-2498.
- [29] Laddha AP, Kulkarni YA. VEGF and FGF-2: Promising targets for the treatment of respiratory disorders [J]. Respir Med, 2019, 156: 33-46.
- [30] de Mendonça L, Felix NS, Blanco NG, et al. Mesenchymal stromal cell therapy reduces lung inflammation and vascular remodeling and improves hemodynamics in experimental pulmonary arterial hypertension [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 220.

[收稿日期] 2022-05-17

潘晓慧,张朋辉,江国健,等.缺血时间差异对大鼠肠缺血再灌注损伤的影响研究[J].中国比较医学杂志,2022,32(12):32-36.

Pan XH, Zhang PH, Jiang GJ, et al. Effects of ischemia time on intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 32-36.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.005

缺血时间差异对大鼠肠缺血再灌注损伤的影响研究

潘晓慧,张朋辉,江国健,李娟,陈桂煌,姚欣伶,冯学轩*

(广东省医学实验动物中心,广州 528248)

【摘要】 目的 从氧化损伤途径及组织病理学层面评价小肠缺血时间对小肠缺血再灌注模型的影响,为该疾病的研究提供建模条件及基础数据。**方法** 24只雄性SD大鼠随机分为假手术组、缺血30 min组、缺血1 h组、缺血2 h组,各造模组结扎肠系膜上动脉使缺血一定时间后,再灌注4 h诱导缺血再灌注损伤模型。恢复供血4 h后大鼠安乐死,取10%肠组织匀浆后通过试剂盒对应检测,比较小肠组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽(GSH)水平,HE染色观察肠组织形态,并测量小肠绒毛高度及黏膜厚度。**结果** 与假手术组比较,缺血30 min组及缺血1 h组的SOD、GSH-Px、MDA水平显著升高($P<0.05$),缺血30 min、1 h及2 h均可使炎性细胞浸润加重,病理Chiu's评分显著升高($P<0.05$),此外,缺血1 h及2 h还可显著降低小肠绒毛高度及黏膜厚度($P<0.01$)。但缺血2 h可引起动物死亡(死亡率33.3%)。**结论** 缺血1 h再灌注4 h建立的小肠缺血再灌注模型的氧化指标及肠道组织形态最为理想,该条件下建立的小肠缺血再灌注模型适用于疾病研究及药物开发。

【关键词】 小肠缺血再灌注损伤;缺血时间;氧化指标;组织病理学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0032-05

Effects of ischemia time on intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat model

PAN Xiaohui, ZHANG Penghui, JIANG Guojian, LI Juan, CHEN Guihuang, YAO Xinling, FENG Xuexuan*

(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangzhou 528248, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of ischemia time on intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat model by assessing oxidative damage and histopathology, to provide optimal modeling conditions and basic data for future studies. **Methods** Twenty-four male SD rats were divided randomly into a sham operation group, 30 min ischemia group, 1 h ischemia group and 2 h ischemia group. Ischemia-reperfusion injury models were induced by ischemia of the superior mesenteric artery for the noted time, followed by reperfusion for 4 h. After resumption of the blood supply, the rats were euthanized. Then, take 10% intestinal tissue homogenate and test with kit, test the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione were determined. The morphology of the intestinal tissue was observed by hematoxylin and eosin staining, and villus height and mucosa thickness were measured. **Results** SOD, GSH-Px and MDA were all significantly increased in the 30 min and 1 h ischemia groups compared with the sham operation group ($P<0.05$). Inflammatory cell infiltration was aggravated and the pathological Chiu's score was significantly increased in the ischemia groups ($P<0.05$). In addition, 1 h and 2 h of ischemia significantly reduced the villus height and mucosal thickness in the small intestine ($P<0.01$), while 2 h of ischemia could cause death (death rate

[基金项目] 广东省中医药局科研项目(20211056);广东省医学科学技术研究基金项目(A2021396)。

[作者简介] 潘晓慧(1995—),女,药师,本科,研究方向:毒理药理学研究。E-mail:KiritoAsunaForever@126.com

[通信作者] 冯学轩(1990—),男,主管药师,硕士,研究方向:药理药效学研究。E-mail:hinfung@126.com

33.3%)。 **Conclusions** An intestinal ischemia-reperfusion model established by 1 h ischemia and 4 h reperfusion had the most ideal oxidation index and intestinal tissue morphology, and is thus suitable for disease research and drug development.

【Keywords】 intestinal ischemia-reperfusion injury; ischemia time; oxidation index; histopathology

小肠缺血再灌注损伤 (intestinal ischemia-reperfusion injury, IIRI) 主要是指由于肠道疾病或肠道外科手术等原因引起肠道缺血,在恢复血流供应时,产生大量的氧自由基,由于组织细胞内线粒体功能未恢复,对氧自由基清除能力不足,引起氧化应激压力上升,导致细胞损伤,进而加速细胞凋亡^[1-3]在临床上表现为肠道功能紊乱和结构损伤、全身炎性反应综合征、多器官功能衰竭等,最终可导致死亡,肠黏膜损伤且伴有肠系膜缺血的患者死亡率可高达 59%~93%^[4-5],其死亡率之高及预后不良使得 IIRI 成为了临床上研究的热点。如何成功建立与临床症状相一致的 IIRI 模型,将有助于推动该类疾病的基础研究,包括临床症状研究及预后研究,也将有利于药物干预研究。但目前针对 IIRI 建模的研究较为薄弱,缺血时间对于 IIRI 模型的成立起着至关重要的作用,缺血时间的长短决定了机体内自由基的多少及氧化应激压力的高低,缺血时间过短未必能造成损伤,缺血时间过长会使组织直接在缺血期发生不可逆损伤甚至坏死,目前针对 IIRI 建模的研究较为薄弱,而缺血时间对于 IIRI 模型的成立起着至关重要的作用。因此,本实验主要研究关键因素——缺血时间,对 IIRI 模型建立的影响,并从发病机制、氧化损伤层面及组织病理学方面评价模型的适用性,为用于缺血再灌注损伤防治药物的研发提供相应的模型工具及基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只 SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重 221.2~230.6 g,购于广东省医学实验动物中心 [SCXK(粤)2018-0002]。动物饲养在广东省医学实验动物中心 SPF 级动物房 [SYXK(粤)2018-0002],饲养温度与湿度:20℃~26℃,40%~70%,采用 10 h:14 h 昼夜间断照明。动物自由进食和饮水,所有饲料和饮用水均由广东省医学实验动物中心提供。本实验经广东省医学实验动物中心动物伦理委员会批准 (B202005-6),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠:批号 P3761,德国默克生产;乌来

糖:批号 20171219,国药集团化学试剂有限公司生产;氯化钠注射液,批号:201207136,安徽丰原药业股份有限公司淮海药厂生产;SOD 试剂盒,批号:20210604,南京建成生物工程研究所生产;GSH-Px 试剂盒,批号:20210603,南京建成生物工程研究所生产;MDA 试剂盒,批号:20210605,南京建成生物工程研究所生产;GSH 试剂盒,批号:20210605,南京建成生物工程研究所生产。

BS-3000A 电子分析天平,感量:0.1 g,上海友声衡器有限公司生产;BSA224S 电子分析天平,感量:0.1 mg,赛多利斯科学仪器(北京)科技有限公司生产;KDC-2046 低速冷冻离心机:科大创新股份有限公司中佳分公司生产;RM2135 轮转切片机:德国 LEICA 公司生产;ASP300S 生物组织全自动脱水机:德国 LEICA 公司生产;EG1150 生物组织包埋机及冷冻机:德国 LEICA 公司生产;CS-VI 摊片烤片机:湖北孝感医用仪器有限公司生产;AutoStainer-XL 生物组织全自动染色机:德国 LEICA 公司生产;BX43 型生物显微镜:日本 OLYMPUS 生产;CellSens Standard 显微图像软件:日本奥林巴斯公司提供。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

将 24 只 SD 大鼠检疫结束后,根据体重随机分为假手术组、缺血 30 min 组、缺血 1 h 组、缺血 2 h 组,6 只/组。

1.3.2 模型制备

按 2 mL/kg 体重的剂量腹腔注射 3% 的戊巴比妥钠溶液将 SD 大鼠麻醉,先腹部剃毛备皮,之后仰卧位固定,于腹部正中,腹白线处开腹,分离肠系膜上动脉,用 4 号手术线活结结扎根部使缺血,直至见肠系膜血管颜色变浅,即为缺血成功。动物按 20 mL/kg 体重腹腔注射氯化钠注射液进行补液在缺血开始及再灌注开始时,假手术组只分离肠系膜上动脉,不进行缺血再灌注。各实验组缺血对应时间后,将活结解开,恢复供血 4 h 后大鼠按 60 mL/kg 体重腹腔注射 20% 乌来糖溶液麻醉,腹主动脉采血后处死,取小肠进行氧化指标及组织病理学检测。

1.3.3 指标检测

(1) 肠道组织大体剖检观察

大鼠大体剖检肉眼观察肠道变化。

(2) 氧化指标检测

取 10% 肠组织匀浆, 按各试剂盒说明, 测定 SOD、GSH-Px 活性及 MDA、GSH 含量。

(3) 肠组织病理学观察及肠组织损伤评分

动物安乐死后取小肠固定于 4% 中性甲醛固定液, 进行常规石蜡切片, HE 染色观察, 并测量小肠绒毛高度及粘膜厚度, 观察炎症细胞聚集情况并进行炎症细胞浸润情况评分, 见表 1。参照 Chiu's 6 级评分法对小肠组织进行半定量评分, 见表 2。

1.4 统计学方法

所有数据采用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析; 计量资料数据方差齐, 或数据经转换后方差齐, 则采用 LSD 组间两两比较的单因素方差分析方法; 若数据经转换后方差仍不齐, 采用秩和检验进行统计分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 动物死亡情况

缺血 2 h 组其中两只大鼠缺血 2 h 恢复供血后出现严重拉稀, 并于缺血 3 h 后死亡, 剖检发现小肠出血, 瘀黑, 死亡动物实验结果未参与统计。

2.2 大体剖检结果比较

假手术组小肠表面红润有光泽, 回肠至盲肠处内容物成型; 缺血 30 min 组小肠轻微胀气, 内容物偏软; 缺血 1 h 组肛门处可见稀便, 小肠肠壁变薄, 小肠内胀气明显, 内容物呈黄色嗜喱状, 偶见出血点; 缺血 2 h 组, 拉稀严重, 小肠内可见明显出血, 小肠肠壁变薄且全部肠段胀气明显, 内容物呈红色嗜喱状。

2.3 SOD、GSH-Px 活性及 MDA、GSH 含量比较

与假手术组比较, 缺血 30 min 组和缺血 1 h 组 MDA 含量升高 ($P < 0.05$) (图 1A), 缺血 1 h 组 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$) (图 1B), 各缺血组 GSH-Px 活性升高 ($P < 0.01$) (图 1C), 缺血 30 min 组和缺血 2 h 组 GSH 含量降低 ($P < 0.05$) (图 1D)。

2.4 肠组织病理学结果比较

2.4.1 组织病变

假手术组小肠黏膜层、肌层完整, 黏膜上皮细胞排列整齐、未见变性、坏死、炎症, 部分黏膜下层见淋巴小结, 血管未见扩张、出血; 缺血 30 min 组小肠绒毛顶端上皮间隙增宽、毛细血管淤血, 黏

表 1 炎症细胞浸润情况评分标准
Table 1 Inflammatory cell infiltration scoring standard

评分 Score	病理学改变 Pathological changes
1	最轻微: 炎症细胞浸润面积占整个视野的比例 $< 10\%$ 。 Slightest, Infiltrated area of inflammatory cells accounted for $< 10\%$ of the whole field of vision.
2	轻微: 炎症细胞浸润面积占整个视野的比例 $11\% \sim 20\%$ 。 Slight, Infiltrated area of inflammatory cells accounted for $11\% \sim 20\%$ of the whole field of vision.
3	中度: 炎症细胞浸润面积占整个视野的比例 $21\% \sim 40\%$ 。 Medium, Infiltrated area of inflammatory cells accounted for $21\% \sim 40\%$ of the whole field of vision.
4	重度: 炎症细胞浸润面积占整个视野的比例 $41\% \sim 100\%$ 。 Heavy, Infiltrated area of inflammatory cells accounted for $41\% \sim 100\%$ of the whole field of vision.

表 2 小肠组织损伤 Chiu's 评分量表
Table 2 Intestinal tissue injury Chiu's score

评分 Score	病理学改变 Pathological changes
0	正常小肠上皮绒毛。 Normal small intestinal epithelial villi.
1	小肠绒毛顶端上皮间隙增宽, 伴毛细血管瘀血。 Widening of the subepithelial space at the apex of the villi, accompanied by capillary stasis.
2	小肠绒毛顶端上皮间隙扩展, 伴上皮层与固有层中度分离。 Apical subepithelial space of the small intestine villi expanded with moderate separation of the superior cortex and lamina propria.
3	小肠绒毛两侧上皮层与固有层大量分离, 绒毛顶端部分破损。 Upper cortex on both sides of the small intestinal villi separated from the lamina propria, and the apical part of the villi was damaged.
4	小肠绒毛破损, 伴固有层毛细血管暴露及炎性细胞增多。 Small intestine villi damage accompanied by lamina propria capillary exposure and increased inflammatory cells.
5	固有层破坏, 出血和溃疡。 Lamina propria damage, bleeding and ulceration.

膜层极少量炎细胞浸润;缺血 1 h 组小肠绒毛顶端上皮间隙增宽或绒毛顶端部分破损、毛细血管淤血,个别样本黏膜上皮细胞坏死、溃疡、固有层破坏、固有层及黏膜下层血管淤血、出血,黏膜层极少量至轻度炎细胞浸润;缺血 2 h 组小肠黏膜上皮细胞坏死、溃疡、固有层破坏、固有层及黏膜下层血管淤血、出血,黏膜层轻度炎细胞浸润,见图 2。

2.4.2 绒毛高度

与假手术组比较,缺血 1 h 组、缺血 2 h 组小肠绒毛高度降低,有统计学差异($P<0.01$),见表 3。

2.4.3 黏膜厚度

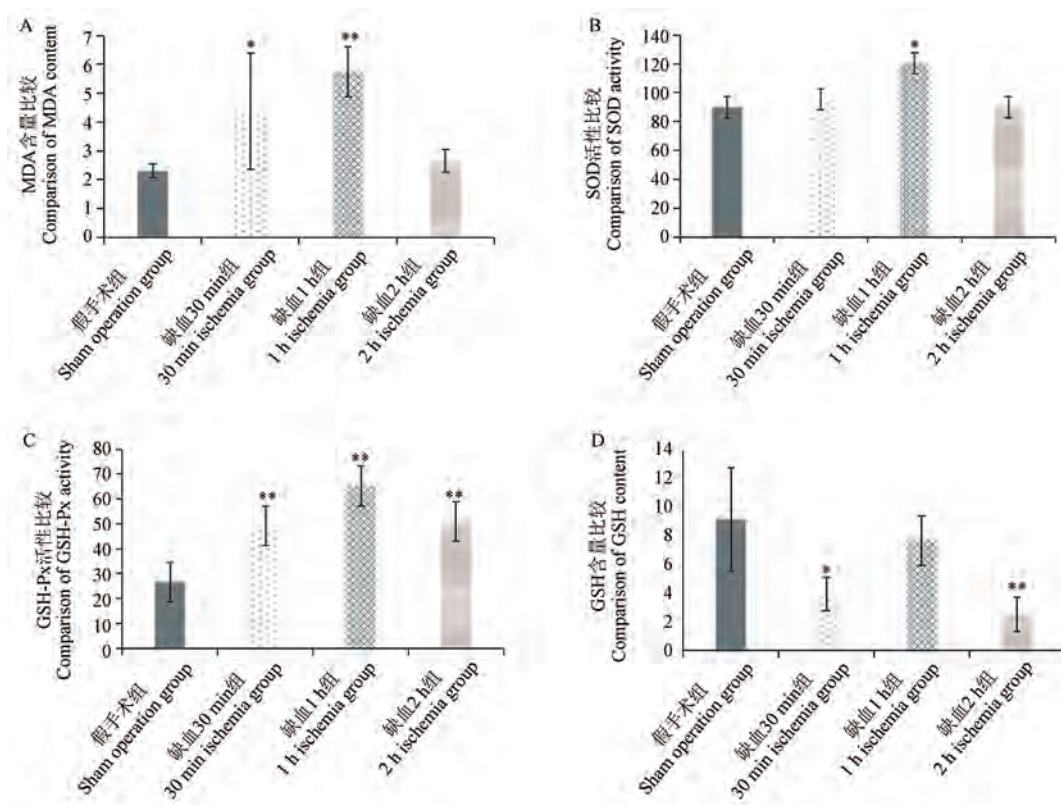
与假手术组比较,缺血 1 h 组、缺血 2 h 组小肠黏膜厚度减小,有统计学意义($P<0.01$),见表 3。

2.4.4 炎症细胞浸润情况评分

与假手术组比较,各缺血组小肠均有不同程度的炎症细胞浸润,且有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.4.5 Chiu's 评分

与假手术组比较,各缺血组小肠均有不同程度的病理学改变,且有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

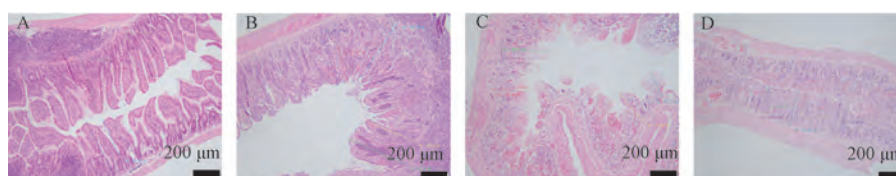


注:与假手术组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 不同组别 MDA、GSH 含量及 SOD、GSH-Px 活性比较

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

Figure 1 Comparison of MDA and GSH contents and SOD and GSH-Px activities in different groups



注:A:假手术组;B:缺血 30 min 组;C:缺血 1 h 组;D:缺血 2 h 组。

图 2 不同组别小肠组织病理学变化情况(HE 染色)

Note. A, Sham operation group. B, 30 min ischemia group. C, 1 h ischemia group. D, 2 h ischemia group.

Figure 2 Histopathological changes of intestine in different groups(HE staining)

表 3 肠组织病理学结果 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Intestinal histopathology results

组别 Groups	<i>n</i>	绒毛高度 Villus height	黏膜厚度 Thickness of mucosa	炎症细胞浸润评分 Infiltration of inflammatory cells score	Chiu's 评分 Chiu's score
假手术组 Sham operation group	6	387.98±44.56	540.52±73.64	0.0±0.0	0.0±0.0
缺血 30 min 组 30 min ischemia group	6	338.20±57.15	468.88±73.55	1.3±0.5 *	1.8±1.6 *
缺血 1 h 组 1 h ischemia group	6	217.67±18.40 **	307.93±31.45 **	1.3±0.5 *	2.0±1.7 *
缺血 2 h 组 2 h ischemia group	4	193.26±43.42 **	268.14±66.41 **	2.0±0.0 **	4.0±2.0 **

注:与假手术组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

3 讨论

据报道,氧化应激、炎症反应及继发性细胞凋亡是小肠缺血再灌注损伤发生发展的重要病理机制^[6-8]。小肠动脉缺血情况下,氧供给下降,导致氧自由基大量产生并激活炎症因子,引起炎细胞在病灶上聚集^[9-11],因此,不同缺血时间下机体的氧化应激水平以及小肠黏膜结构的改变及炎细胞浸润程度能很好反映 IIRI 的情况。以此为切入点,本研究从氧化水平和病理层面探讨了 IIRI 模型的建模条件。

在研究中发现,短时间缺血情况下,氧自由基产物 MDA 含量明显升高,且升高幅度与缺血时间呈正相关,证明机体内已产生大量的自由基。MDA 的急剧升高,正反馈调节抗氧化酶类 SOD 和 GSH-Px 的产生,以抵抗体内的氧化应激压力,使得 SOD、GSH-Px 的产生呈现与 MDA 相似的趋势,因此可见在缺血 1 h 时,模型动物 MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活性均高于缺血 30 min,且与正常动物有显著差异。另外,在实验过程中发现缺血 2 h 时,MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活性不升反降,结合病理结果和动物临床表现,我们得知,在缺血 2 h 时,小肠病理损伤严重,上皮细胞坏死、溃疡、固有层破坏,炎症细胞浸润明显,小肠绒毛高度及黏膜厚度显著降低,且损伤程度较缺血 1 h 时要严重,且动物临床状态较差,个别动物肠道肉眼可见出血,出现了动物死亡的情况,正因此,机体对各项刺激的反应性下降,导致 MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活性不升反降的结果出现。病理结果同时显示,缺血 30 min 及 1 h 均可见小肠组织的病理变化,且变化程度与缺血时间呈正相关性,缺血 1 h 更可见小肠绒毛高度及黏膜厚度明显下降,但病变程度均弱于缺血 2 h 组。

综上所述可知,缺血 30 min, IIRI 模型症状较

轻,小肠绒毛高度及黏膜厚度未见明显变化;缺血 2 h,动物死亡率较高,且小肠病理损伤十分严重,不适用于 IIRI 建模;缺血 1 h,可见氧化指标明显变化,MDA 含量显著升高,同时小肠病理变化明显,小肠绒毛高度、黏膜厚度显著降低,炎性细胞轻度浸润,可见 IIRI 模型程度适中,相对理想,因此在 IIRI 疾病研究时,建议采用缺血 1 h 再灌注 4 h 的条件进行造模。

参考文献:

- [1] 杨凤蕊,林秀珍. 肠缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2002, 8(4): 319-319.
- [2] 武向鹏,崔薇. 大蒜素对小肠缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 实用药物与临床, 2018, 21(9): 1007-1010.
- [3] 谭杨波,李通,甘嘉亮. 番茄红素对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(23): 2512-2515.
- [4] Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock [J]. J Intern Med, 2015, 277(3): 277-293.
- [5] Ferencz A, Weber G, Helyes Z, et al. Presence of endogenous PACAP-38 ameliorated intestinal cold preservation tissue injury [J]. J Mol Neurosci, 2010, 42(3): 428-434.
- [6] 杨洁,张海霞,赵东伟,等. 参附注射液对肠缺血再灌注大鼠肝肾功能及 TNF- α 、IL-6 水平的影响 [J]. 山东医药, 2012, 52(19): 27-28.
- [7] 谢云飞,徐亮. 小肠缺血再灌注研究进展 [J]. 西南军医, 2012, 14(1): 90-92.
- [8] 陈建雷,孙庆林. 白藜芦醇对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中华小儿外科杂志, 2011, 32(2): 139-142.
- [9] van der Vliet A, Bast A. Role of reactive oxygen species in intestinal diseases [J]. Free Radic Biol Med, 1992, 12(6): 499-513.
- [10] 张臣,连树华,柳宏. 肠缺血再灌注损伤的病理机制研究进展 [J]. 临床小儿外科杂志, 2018, 17(2): 141-145.
- [11] 肖玲燕,刘宁. 缺氧与炎症 [J]. 中国急救医学, 2012, 32(12): 1133-1135.

[收稿日期] 2022-05-16

王婷, 刘志勇, 罗黎明, 等. 当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠中医证候的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 37-48.

Wang T, Liu ZY, Luo LM, et al. Effects of decoction of *Angelica sinensis*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and mutton on traditional Chinese medicine symptoms of IBS-D female rats with spleen-kidney Yang deficiency [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 37-48.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.006

当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠中医证候的影响

王 婷^{1,2#}, 刘志勇^{3#}, 罗黎明³, 张 鸿⁴, 徐 磊³, 曾宪保⁴, 郑梓泓^{1,2}, 刘志勇^{1,2*}

(1.江西中医药大学中医学院,南昌 330004;2.江西省中医基础理论教研室,南昌 330004;
3.江西中医药大学实验动物科技中心,南昌 330004;4.江西中医药大学药学院,南昌 330004)

【摘要】 目的 探讨脾肾阳虚模型的中医证候表现并观察当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚 IBS-D 雌性大鼠中医证候的改善作用。**方法** 以腺嘌呤和冰番泻叶联合灌胃制作脾肾阳虚雌性大鼠模型,成模后随机分成 5 组,分别为低、中、高 3 个剂量的当归生姜羊肉汤组,真武汤为阳性组,脾肾阳虚模型组,另设空白对照正常组。连续给药 4 周,每天记录各组大鼠的饮水量和摄食量,每周对其体重和肛温进行测量,于实验结束对其中医一般证候进行评价、做旷场实验和在同一光线、同一位置对大鼠的舌、尾、足底进行拍照并分析,综合探讨当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚 IBS-D 雌性大鼠中医证候的改善作用。**结果** 低、中、高 3 个剂量组与模型组相比,精神状态、眼睛、耳尾颜色、毛发、粪便都有所改善,其中精神状态、眼睛、毛发、粪便都有显著性差异($P < 0.05$),各组的体重和肛温都在逐渐上升,于实验结束时各组之间无显著性差异($P > 0.05$),各组(除正常组)大鼠的饮水量趋势线逐渐下降,但与正常组大鼠相比还是明显较高,具有显著性差异($P < 0.05$),通过旷场实验发现,低、中、高 3 个剂量组在中心区域和周边区域的时间、距离、快速移动时间、慢速移动时间与模型组比较都有明显提高,其中中、高剂量大鼠的在中心区域和周边区域的时间、中心区域移动的距离、在周边休息的时间与模型组都具有显著性差异($P < 0.05$),从 RGB 值数据来看,低、中、高剂量组大鼠尾部、足底、舌面的 R、G、B 值与模型组比较更高,其中尾部的 R、B 值具有显著性差异($P < 0.05$),高剂量组大鼠的 G 值更高,也具有显著性差异($P < 0.05$),其中足底的 R 值具有显著性差异($P < 0.05$),同时,阳性组和中、高剂量组的 G 值比模型组更高,具有显著性差异($P < 0.05$),中、高两个剂量组大鼠舌面的 R 值更高,具有显著性差异($P < 0.05$),提示灌胃当归生姜羊肉汤均改善 IBS-D 大鼠尾部、足底、舌面的色泽。**结论** 当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚 IBS-D 雌性大鼠中医证候的改善作用,以高剂量当归生姜羊肉汤组的改善作用最强。

【关键词】 当归生姜羊肉汤;IBS-D;真武汤;脾肾阳虚;中医证候

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0037-12

Effects of decoction of *Angelica sinensis*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and mutton on traditional Chinese medicine symptoms of IBS-D female rats with spleen-kidney Yang deficiency

WANG Ting^{1,2#}, LIU Zhiyong^{3#}, LUO Liming³, ZHANG Hong⁴, XU Lei³, ZENG Xianbao⁴,
ZHENG Zihong^{1,2}, LIU Zhiyong^{1,2*}

【基金项目】 江西省教育厅重点项目(20180642);江西中医药大学校级科技创新团队发展计划(CXTD-22004);江西中医药大学校级大学生创新创业训练计划项目(2022042)。

【作者简介】 王婷(1991—),女,在读硕士研究生,研究方向:中医基础理论。E-mail:458902921@qq.com

刘志勇(1969—),研究员,教授,研究方向:药食两用中药药理药效。E-mail:liuzhiyong0791@163.com #共同第一作者

【通信作者】 刘志勇(1977—),教授,研究方向:中医基础理论。E-mail:469241547@qq.com

(1. School of TCM Under Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China. 2. Teaching and Research Office of Basic Theory on TCM in Jiangxi Province, Nanchang 330004. 3. Experimental Animal Science and Technology Center of Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004. 4. School of Pharmacy, Jiangxi University of TCM College of Pharmacy, Nanchang 330004)

【Abstract】 Objective To investigate manifestations of traditional Chinese medicine (TCM) symptoms in a model of spleen-kidney Yang deficiency and observe the effects of decoction of *Angelica sinensis*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and mutton on TCM symptoms of Sprague Dawley (SD) female rats with spleen-kidney Yang deficiency. **Methods** A female rat model of spleen-kidney Yang deficiency was established by combined gavage with adenine and ice senna. After model establishment, rats were randomly divided into five groups: low, medium, and high dose decoction of *Angelica sinensis*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and mutton groups; Zhenwu decoction positive-control group; spleen-kidney Yang deficiency model group; and blank control normal group. After continuous administration for 4 weeks, the water and food intake of rats was recorded daily, and their body weight and rectal temperatures were measured weekly. At the end of the experiment, general TCM symptoms were evaluated; an open field test was performed; and the tongue, tail, and soles of each rat were photographed and analyzed under the same light and in the same position. The effects of the decoction of *Angelica sinensis*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and mutton on TCM symptoms of SD female rats with spleen-kidney Yang deficiency were comprehensively discussed. **Results** Compared with the model group, the groups given low, medium, or high doses showed improvements in mental status, eyes, ear and tail color, hair, feces, and there were significant differences in their mental state, eyes, hair and feces ($P < 0.05$). The body weight and rectal temperature of each group gradually increased, and there were no significant differences between the groups at the end of the experiment ($P > 0.05$). Water intake by rats in each group (except in the normal group) gradually decreased but was still significantly higher than that of the normal group ($P < 0.05$). In the open field test, the time, distance, fast movement time, and slow movement time in the central and peripheral areas of the low, medium and high dose groups were significantly improved over those of the model group. Time spent in the central and peripheral areas, distance moved in the central area, and time spent resting in the peripheral area of the middle and high dose rats were significantly different from those of the model group ($P < 0.05$). According to the RGB color mode, the R, G and B values of the tail, soles, and tongue surfaces of the rats in the low, medium, and high dose groups were higher than those in the model group, and the R and B values of the tails were significantly higher ($P < 0.05$). The G value was highest in the rats in the high dose group, and there was a significant difference ($P < 0.05$). The R value of the soles was significantly different ($P < 0.05$). The G values of the positive group and middle and high dose groups were significantly higher than that of the model group ($P < 0.05$). The R values of tongue surfaces of the middle and high dose groups were significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$), suggesting that the gavage of decoction of *Angelica sinensis*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and mutton significantly improved the color of the tails, soles, and tongues of the rats. **Conclusions** Decoction of *Angelica sinensis*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and mutton improved TCM symptoms in SD female rats with spleen-kidney Yang deficiency, and the effect was strongest in the high-dose decoction of *Angelica sinensis*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and mutton group.

【Keywords】 Decoction of *Angelica sinensis*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and mutton; IBS-D; Zhenwu decoction; spleen-kidney Yang deficiency; TCM symptoms

腹泻型肠易激综合征 (irritable bowel syndrome with predominant diarrhea, IBS-D) 是一种常见的胃肠道功能紊乱性疾病, 是肠易激综合征 (IBS) 中最普遍的亚型。其特点是在没有特定的器质性病理情况下, 以腹痛、腹泻、腹胀为主要症状, 常伴有排便习惯及大便性状的改变, 呈持续存在或反复发作^[1]。现代研究发现, 该病发病机制尚不明确, 但是与肠道动力异常、脑肠轴功能紊乱、肠道菌群失调、内脏高敏感性、粘膜免疫和炎症反应等因素有关^[2]。如今, 肠易激综合征的发病率已在功能性疾

病中位居第一位^[3], 经过文献数据整理显示, 全球 IBS 的总患病率为 8.8%, 北美、欧洲、澳大利亚、新西兰等地区为 8.1%、亚洲为 9.6%、拉丁美洲最高, 患病率为 17.5%^[4], 其中, 腹泻型肠易激综合征占比大, 据惠州市中心人民医院在 2015 年 3 月~2018 年 6 月调查发现符合 Rome II 诊断标准的 54 例肠易激综合征患者, 腹泻为主要症状患者 30 例, 占 55.6%; 便秘为主导的患者 18 例, 占 33.3%; 交替型患者 6 例, 占 11.1%^[5]。可见, 肠易激综合征患病范围广、人口多, 并据相关文献研究, 女性的患病率

明显高于男性^[6],女性更容易感到疲劳,抑郁,焦虑等情绪,从而影响他们的生活质量。目前,西医多以对症治疗为主,药物治疗副作用大、不良反应多,且停药后易复发^[7]。因此,肠易激综合征是当今医学领域研究是重点课题之一,其中腹泻型肠易激综合征更加应该引起我们的重视。

当归生姜羊肉汤作为药膳名方,原方由当归、生姜、羊肉组成,当归能补血活血,调经止痛,生姜温中散寒,羊肉能温补脾胃,补血益肾。具有补益气血、温中散寒止痛的功效。本方在张仲景的《金匮要略》记载:“寒疝,腹中痛及胁痛里急者,当归生姜羊肉汤主之”,以及《金匮要略·妇人产后病脉证》曰:“产后腹中痛,当归生姜羊肉汤主之;并治腹中寒疝,虚劳不足”^[8],该方以脾胃为本,使驱邪而不伤正,以食物协助药物发挥效力,既能治愈疾病,而又不损伤脾胃,主要用于病机为虚寒性疝气、腹痛及妇女痛经、产后的调理。经现代文献研究发现,当归生姜羊肉汤已用于呼吸、消化、免疫等系统疾病,均取得了较好的治疗作用^[9]。

近年来中医受到越来越多人的关注,中医治疗腹泻型肠易激综合征以辨证论治和整体观念出发,有其副作用小和不易复发的优势。由于该病女性发病率更多,因此本研究以雌性大鼠作为研究对象,通过研究当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠中医证候的影响,探讨当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚 IBS-D 大鼠脾肾阳虚证的改善作用,为当归生姜羊肉汤用于临床一些疾病证候的应用提供实验基础,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 2 月龄 SD 雌性大鼠 72 只,体重 180~220 g,江西中医药大学实验动物科技中心提供[SCXK(赣)2018-0003],实验大鼠饲养在江西中医药大学实验动物科技中心 SPF 级屏障系统内[SYXK(赣)2017-0004],饲养环境条件为环境温度为 20℃~25℃、湿度 45%~55%。整个实验通过江西中医药大学实验动物伦理委员会的审查(JZLLSC20210053),并接受其监督,实验过程中做到了 3R 原则并对实验动物进行伦理关怀。

1.2 主要试剂与仪器

上海麦克林生化科技有限公司提供的腺嘌呤(批号:20210307)。大鼠旷场箱,旷场装置由 3 部

分构成:长 100 cm、宽 100 cm、高 40 cm 的箱体;视频录制系统及 SMARTv 2.5.21 行为实验分析软件(西班牙 Panlab 公司);医用电子体温计(TDB-1,深圳雅岚科技有限公司);华为手机(荣耀 p20,深圳华为公司);Image J 图像分析软件(National Institutes of Health, NIH 研发);个人手提式电脑(HUAWEI MateBook D15,华为);量尺(普通市售,精度 1 mm);电子天平(JH03K2,北京京衡伟业科技有限公司,最小称量 0.1 g)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备方法

由江西古汉精制中药饮片有限公司提供煎制的番泻叶水煎液(批号:20210411),将腺嘌呤和蒸馏水配置成浓度为 20 mg/mL 的腺嘌呤药液,番泻叶水煎液浓度为 2 g/mL,以腺嘌呤和冰番泻叶水复合灌胃(各 1 mL/100 g)30 d 造成脾肾阳虚型 IBS-D 模型。

1.3.2 受试物

(1) 当归生姜羊肉汤的制备

当归生姜羊肉汤,按照《中华方剂本源剂量大典》方源东汉张仲景《金匮》卷上,组成:当归 3 两(45 g)生姜 5 两(75 g)羊肉 1 斤(250 g)用法:上三味,以水 8 升(1600 mL),煮取 3 L(600 mL),温服 7 合(140 mL),浓缩为 1:2:4 比例的当归生姜羊肉汤,其低、中、高剂量分别为 4.2、8.4、16.8 g/kg,用于本实验。

(2) 真武汤的制备

真武汤为治疗脾肾阳虚,水湿泛滥的基础方,全方以助阳气,利小便以祛水邪,主治阳虚水泛证。畏寒肢厥,小便不利,心下悸动不宁,头目眩晕,身体筋肉瞤动,站立不稳,四肢沉重疼痛,浮肿,腰以下为甚;或腹痛,泄泻,故本实验采用真武汤做为对照。真武汤药液的制备:参考全国高等医药院校教材《方剂学》(第五版),即茯苓 9 g、芍药 9 g、生姜 9 g、附子(炮)9 g、白术 6 g,置于凉水中浸泡 1 h,蒸煮 30 min 后浓缩至质量浓度为 2 g/mL,全过程由江西古汉精制中药饮片有限公司代煎制备。

1.3.3 动物分组

大鼠检疫 5 d,选取营养良好、健康活泼大鼠 72 只,将 72 只 SD 雌性大鼠随机分为 6 组,脾肾阳虚 IBS-D 造模成功后将大鼠分组为正常组、模型组、阳性组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组 12 只,进行灌胃。正常组和模型组每天不限饮食,阳性组每天给予真武汤,低、中、高 3 个剂量组分

别给与不同剂量的当归生姜羊肉汤,连续灌胃 4 周。

1.3.4 外观检查和中医证候积分评价

造模过程中,观察动物的生长情况,对动物饮食饮水和二便情况进行观察。于给药 4 周时(即实验结束时),分别在对应时间点观察各组大鼠中医证候。参照文献^[10-11],根据国家卫生部《中药新药

临床指导原则》及《中医虚证辨证参考标准》中脾肾阳虚证判断标准,拟定脾肾阳虚证大鼠模型证候积分评价量表(见表 1),分值越高,提示中医证候越严重。从大鼠精神状态、眼睛、耳尾颜色、毛发、粪便等项目评价灌胃真武汤阳性组和灌胃当归生姜羊肉汤低、中、高 3 个剂量组对脾肾阳虚 IBS-D 证候的改善情况。

表 1 脾肾阳虚 IBS-D 大鼠模型证候积分评价量表

Table 1 Syndrome integral evaluation scale of IBS-D rat model of spleen kidney Yang deficiency

证候项目 Syndrome items	评分标准 Marking criterion	评分 Marking
精神状态 Mentality	正常:活泼好动 Normal, Lively	0
	轻度异常:反应稍迟钝、自主活动减少 Mild abnormalities, Slightly slow reaction and reduced autonomous activity	1
	中度异常:倦怠乏力、四肢蜷缩、行动迟缓 Moderate abnormalities, Fatigue, limbs curled up and slow movement	2
	重度异常:精神萎靡、攻击性及对抗行为消失 Severe abnormalities, Mental depression, aggressive and confrontation albehavior disappeared	3
眼睛 Eye	正常:眼光红亮有神、灵活 Normal, Red, bright, divine and flexible eyes	0
	轻度异常:眼光乏神 Mild abnormalities, Dull eyes	1
	中度异常:眼光呆滞 Moderate abnormalities, Sluggish	2
	重度异常:眼光无神 Severe abnormalities, Dull eyes	3
耳尾颜色 Ear and tail color	正常:红润光泽 Normal, Red, luster	0
	轻度异常:淡红少泽 Mild abnormalities, Reddish, lusterless	1
	中度异常:淡白少泽 Moderate abnormalities, White, lusterless	2
	重度异常:苍白或透青色 Severe abnormalities, Pale or green	3
毛发 Hair	正常:毛发光亮柔顺、满目皆是白色 Normal, Bright and soft hair, white all over the eyes	0
	轻度异常:毛发无光泽,白中少有黄色 Mild abnormalities, Dull hair, white with little yellow	1
	中度异常:毛发毛躁,白中有较多黄色 Moderate abnormalities, Dry hair with much yellow in white	2
	重度异常:毛发干枯,满目皆有黄色,稀疏脱落 Severe abnormalities, Dry hair, yellow everywhere, sparse and falling off	3
粪便 Feces	正常:粪便干、成形 Normal, Dry and shaped feces	0
	轻度异常:粪便黏软有形 Mild abnormalities, Soft and shaped feces	1
	中度异常:粪便不成形,但不稀溏 Moderate abnormalities, Soft and tangible feces	2
	重度异常:粪便稀溏,黄褐恶臭 Severe abnormalities, Loose feces, yellowish brown and malodorous	3

1.3.5 体重和肛温以及肠道病理

每周对各组大鼠的体重和肛温进行称重和测量,测肛温是用医用电子体温计 TDB-1 放入大鼠肛门,待声音提示时进行读数并记录,以观察其体重和肛温变化情况。当归生姜羊肉汤给药结束后取肠道进行固定并做组织切片,光镜下观察肠道的组织学变化。

1.3.6 饮水量和摄食量

每天记录各组大鼠饮水量及摄食量,检查鼠笼、水瓶,确保无漏水情况后,每天早上 9:00 投放定量的 500 mL 水和 300 g 的饲料,于第 2 天 9:00 对所剩的水和饲料进行称重和测量,以观察其饮水量和摄食量变化情况。计算方法为:平均日进食量(g)=(添加的饲料量-剩余量)/每笼只数;平均日饮水量(mL)=(添加的水量-剩余量)/每笼只数。

1.3.7 旷场实验

行为实验在安静的环境下进行,实验开始将动物放入角落区,同时进行摄像和计时,记录 6 min 内动物的活动状态,用 SMARTv2.5.21 行为实验分析软件对后 4 min 的活动状态进行分析。

1.3.8 RGB 值

大鼠爪、尾、舌拍照及图像处理,将大鼠的左后爪、尾巴中末端及舌面置于同一位置、同一亮度下采用华为手机拍照。图像处理:将照片输入电脑,用 Image J 图像分析软件对图片进行白平衡,用不规则曲线工具,分别框定出大鼠舌面、足底和尾部范围,检测其 RGB 模式下的 R (red, 红色), G (green, 绿色), B (blue, 蓝色) 分量值。

1.4 统计学方法

实验结果的统计分析采用 SPSS 20.0 统计软件,实验数据均表示为平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)。多组

数据若全部满足正态分布而且方差齐,采用单因素方差分析法比较组间的差异,组间两两比较则选择用 LSD 法进行多重比较;如果没有完全满足,那么就选择采用非参数检验。两组数据的比较采取独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有研究统计学意义。最后采用 GraphPad Prism 8.0.1 做图。

2 结果

2.1 动物整体情况的观察

造模结束后,模型大鼠出现喜欢扎堆,垫料潮湿污秽加重的情况,模型鼠粪便出现稀软便溏现象,还可见到大便具有不消化的颗粒状,见图 1。

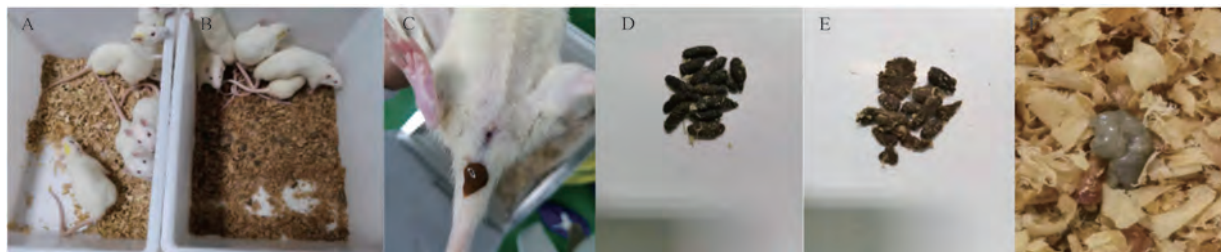
2.2 中医证候积分评价结果

正常组的精神状态、眼睛、耳尾颜色、毛发、粪便都为正常状态,模型组与正常组相比,精神状态、眼睛、耳尾颜色、毛发、粪便都有异常,具有显著性差异($P < 0.05$),阳性组和低、中、高 3 个剂量组大鼠的中医证候积分评价结果见表 2。

与模型组相比,精神状态、眼睛、耳尾颜色、毛发、粪便的积分有所改善,其中精神状态、眼睛、毛发、粪便的积分都有显著性差异($P < 0.05$),而低、中、高剂量组与阳性组相比,精神状态、眼睛、耳尾颜色、毛发、粪便均较好,各组之间无显著性差异($P > 0.05$) (见表 2)。

2.3 体重和肛温

从数据来看,正常组、模型组、阳性组和 3 个剂量组大鼠的体重都呈缓慢上涨趋势,各组之间的体重无显著性差异($P > 0.05$) (见表 3)。从数据来看,造模后模型组、阳性组和 3 个剂量组大鼠的肛温与正常组相比都有所下降,其中模型组、阳性组和低、中剂量组大鼠的肛温与正常组相比具有显著性差异($P < 0.05$),在第 3 周,模型组大鼠的肛温与正常



注:A:正常大鼠;B:造模后大鼠出现畏冷扎堆现象;C:模型鼠粪便情况;D:正常大鼠大便;E:造模过程中粪便出现含水略多质软的情况;F:造模成功大鼠粪便不成形的情况。

图 1 脾肾阳虚 IBS-D 模型鼠的表现及粪便状况的改变

Note. A, Normal rats. B, Fear of cold and pile up after modeling. C, Looses tool of model rats. D, Stool of normal rats. E, Slightly watery and soft feces during modeling. F, Feces of rats with successful modeling.

Figure 1 Performance of IBS-D model rat with spleen kidney Yang deficiency and the changes of fecal status

组相比明显更低,具有显著性差异($P<0.05$);中、高剂量组大鼠肛温与模型组相比明显更高,具有显著

性差异($P<0.05$);低、中、高 3 个剂量组大鼠的肛温与阳性组相比无显著性差异($P>0.05$)(见表 4)。

表 2 各组大鼠中医证候积分评价结果($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Evaluation results of TCM syndrome score of rats in each group

组别 Groups	精神状态 Mentality	眼睛 Eye	耳尾颜色 Ear and tail color	毛发 Hair	粪便 Feces
正常组 Normal group	/	/	/	/	/
模型组 Model group	2.33±0.47****	2.25±0.43****	2.42±0.49****	2.67±0.47****	2.58±0.49****
阳性组 Positive group	0.83±0.37***####	0.75±0.43***####	0.92±0.64**####	1.25±0.43****####	1.08±0.28****####
低剂量组 Low dose group	0.92±0.49****####	0.83±0.55****####	1.25±0.43****####	1.42±0.49****####	1.58±0.49****####
中剂量组 Medium dose group	1.08±0.64****####	0.75±0.60***####	1.17±0.55****####	1.25±0.43****####	1.42±0.49****####
高剂量组 High dose group	0.83±0.37***####	0.83±0.37***####	0.92±0.64**####	1.17±0.55****####	1.25±0.43****####

注:与正常组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$;与模型组比较, #### $P<0.0001$ 。

Note. Compared with normal group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with model group, #### $P<0.0001$.

表 3 各组雌性大鼠体重变化趋势($n=12$)

Table 3 Body weight change trend of female rats in each group

组别 Groups	始重(g) Initial body weight	第 1 周(g) First week	第 2 周(g) Second week	第 3 周(g) Third week	第 4 周(g) Fourth week
正常组 Normal group	265.20±12.64	269.80±15.40	274.60±15.80	277.90±17.30	282.00±18.00
模型组 Model group	246.60±19.70	262.10±21.10	267.40±17.50	271.30±17.10	271.60±15.90
阳性组 Positive group	250.30±11.55	259.38±13.62	265.80±13.35	267.90±10.95	269.20±11.60
低剂量组 Low dose group	257.70±19.10	269.30±15.70	276.30±13.50	281.10±15.50	278.50±16.80
中剂量组 Medium dose group	249.30±21.30	262.10±19.60	267.70±19.20	272.90±19.30	271.50±19.30
高剂量组 High dose group	250.80±9.30	258.10±12.10	273.80±9.80	279.60±8.70	278.30±8.20

表 4 各组雌性大鼠肛温变化趋势($n=12$)

Table 4 Change trend of anal temperature of female rats in each group

组别 Groups	造模后(℃) After molding	第 1 周(℃) First week	第 2 周(℃) Second week	第 3 周(℃) Third week	第 4 周(℃) Fourth week
正常组 Normal group	38.03±0.58	37.03±0.55	37.22±0.40	38.46±0.61	37.88±0.46
模型组 Model group	36.58±0.87**	37.02±0.50	36.69±0.69	37.76±0.76*	37.41±0.47
阳性组 Positive group	36.17±1.07****	37.02±0.85	36.42±2.52	38.44±0.41	37.70±0.43
低剂量组 Low dose group	36.51±0.75**	37.33±0.52	37.56±0.84	37.84±0.33	37.76±0.62
中剂量组 Medium dose group	36.23±0.16***	37.44±0.49	37.34±0.74	38.17±0.44 [#]	37.91±0.48
高剂量组 High dose group	37.43±0.72	37.52±0.64	37.60±0.51	38.45±0.41 [#]	37.77±0.37

注:与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$;与模型组比较, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$.

2.4 饮水量和摄食量

由图可知,在第 1 周,阳性组大鼠的摄食量与正常组相比明显更高,具有显著性差异($P<0.05$),高剂量组大鼠的摄食量与模型组和阳性组相比都明显更低,均具有显著性差异($P<0.05$);在第 2 周,高剂量组大鼠的摄食量与模型组和阳性组相比均更低,都具有显著性差异($P<0.05$),在第 3 周和第 4 周,高剂量组大鼠的摄食量与正常组、模型组、阳性组相比都更低,均具有显著性差异($P<0.05$),提示可能由于灌胃高剂量的当归看生姜羊肉汤和高比例的羊肉导致高剂量组大鼠摄食量的减少(见图 2)。

从图 2 可知,模型组、阳性组和 3 个剂量组大鼠的饮水量趋势线逐渐下降,但与正常组大鼠相比还是明显较高,具有显著性差异($P<0.05$),其中,在第 1 周,高剂量组和阳性组大鼠的饮水量与模型组相比都具有显著性差异($P<0.05$);在第 2 周,高剂量组大鼠的饮水量明显高于阳性组,具有显著性差异($P<0.05$);在第 3 周,中、高剂量组大鼠的饮水量与阳性组相比明显更高,具有显著性差异($P<0.05$);

在第 4 周,阳性组大鼠的饮水量与模型组相比明显更低,具有显著性差异($P<0.05$),中、高剂量组大鼠的饮水量明显高于阳性组,具有显著性差异($P<0.05$),提示 3 个剂量组的饮水量可能与灌胃当归生姜羊肉汤有关(见图 2)。

2.5 肠道组织病理学改变

肠道光镜下可见,正常组织结构正常、无或少炎性细胞浸润,而模型鼠肠道粘膜下层出现大量淋巴细胞浸润,喂食当归生姜羊肉汤后炎性浸润明显减少,阳性对照组也基本正常(图 3A~3F);模型动物的肠绒毛紊乱,柱状绒毛破坏,肠隐窝基底部有破坏现象,黏膜下层,黏膜下基层,肌层增宽,结构疏松,喂食当归生姜羊肉汤后结构有所恢复(图 3G~3L)。

2.6 旷场实验

从运动轨迹来看,正常组大鼠在箱中快速移动,频繁经过中心区域;模型组大鼠运动度明显降低,在箱中移动速度缓慢,几乎不经过中心区域,停留角落区域时间长,表现出明显的倦怠乏力;阳性组大鼠通过灌胃真武汤,与模型组相比,运动度明

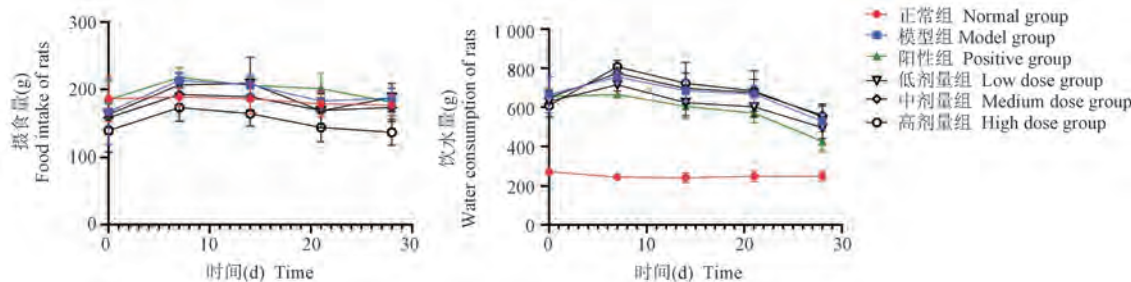
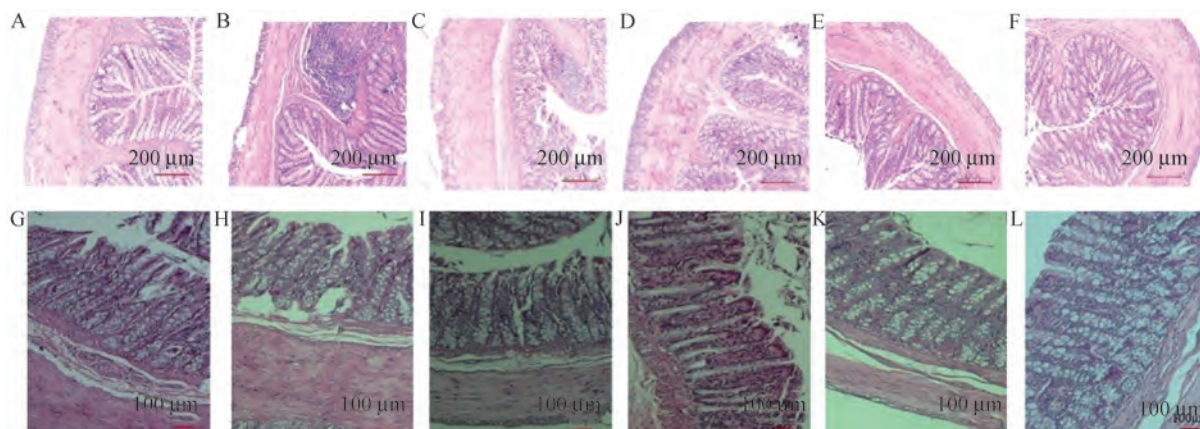


图 2 各组大鼠每周摄食量和饮水量变化图

Figure 2 Changes of weekly food intake and water consumption of rats in each group



注:A、G:正常组;B、H 模型组;C、I 低剂量组;D、J 中剂量组;E、K 高剂量组;F、L 阳性对照组。

图 3 各组大鼠肠道的病理组织的变化

Note. A/G, Normal group. B/H, Model group. C/I, Low dose group. D/J, Medium dose group. E/K, High dose group. F/L, Positive group.

Figure 3 Pathological changes of intestinal tract of rats in each group

显提升,在箱中移动速度较快,较多经过中心区域,频繁在周边地区移动;低、中、高 3 个剂量组较模型组从运动轨迹来看都有较大的改善,移动速度有依次提升的趋势,其中中剂量和高剂量大鼠较频繁经过中心区域(见图 4)。

从数据结果分析,与正常组比较,模型组大鼠在周边区域时间过长,在中心区域时间明显下降,具有显著性差异($P<0.05$),在周边区域爬行的距离更短,具有显著性差异($P<0.05$),同时长时间在周边区域休息,具有显著性差异($P<0.05$),且无论在周边区域还是在中心区域都行动过慢,其中在中心区域的行动过慢具有显著性差异($P<0.05$),表明番泻叶和腺嘌呤造模引起大鼠精神萎靡,活动度下降,倦怠乏力;阳性组和低、中、高 3 个剂量组在中心区域和周边区域的时间、距离、快速移动时间、慢速移动时间与模型组比较都有明显提高,其中阳性组和中、高剂量大鼠的在中心区域和周边区域的时间、中心区域移动的距离、在周边休息的时间与模型组都具有显著性差异($P<0.05$);与阳性组相比,低、中剂量组大鼠在周边区域更长和在中心区域时间更短,都具有显著性差异($P<0.05$),高剂量组大鼠在周边区域更短和在中心区域时间更长,具有显著性差异($P<0.05$),可见阳性组灌胃真武汤和 3 个剂量组灌胃的当归生姜羊肉汤都明显改善了大鼠的自主活动状态,而且高剂量组的活动状态比阳性组更佳,为该方缓解倦怠乏力的脾肾阳虚症状提供了实验依据(见图 5)。

2.7 RGB 值

2.7.1 尾部

从图片来看,正常组大鼠的尾部红润,模型组大鼠的尾部苍白,近尾尖稍红,阳性组和低、中、高 3 个剂量组大鼠的尾部较模型组红,高剂量组明显更红(见图 6)。

从 RGB 值数据来看,模型组的 R、G、B 值与正常组比较,均有明显下降,其中 G、B 值具有显著性差异($P<0.05$);与模型组比较,阳性组和低、中、高剂量组大鼠的 R、G、B 值更高,其中 R、B 值具有显著性差异($P<0.05$),高剂量组大鼠的 G 值更高,也具有显著性差异($P<0.05$),提示灌胃真武汤和当归生姜羊肉汤都明显改善了大鼠尾部的色泽(见图 6)。

2.7.2 足底

从图片来看,正常组大鼠足底红润,模型组足底苍白,阳性组和低、中、高 3 个剂量组较模型组红,高剂量组明显更红(见图 7)。

从 RGB 值数据来看,模型组大鼠足底的 R、G、B 值与正常组比较有明显下降,其中 R 值具有显著性差异($P<0.05$);阳性组和低、中、高 3 个剂量组的 R、G、B 值与模型组比较有明显提高,其中 R 值具有显著性差异($P<0.05$),同时,阳性组和中、高剂量组的 G 值比模型组更高,具有显著性差异($P<0.05$);低剂量的 G 值稍低于阳性组,具有显著性差异($P<0.05$),提示灌胃真武汤和当归生姜羊肉汤都明显改善了大鼠足底的色泽(见图 7)。

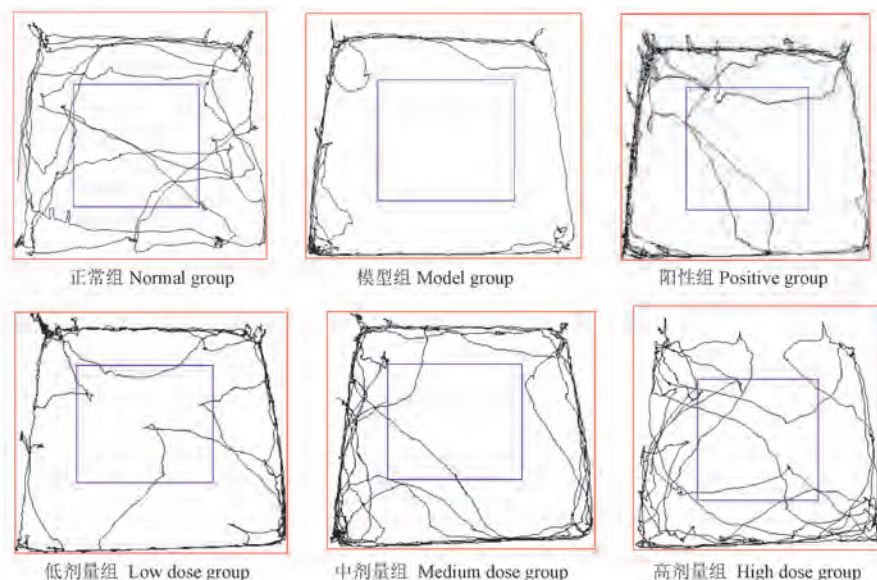
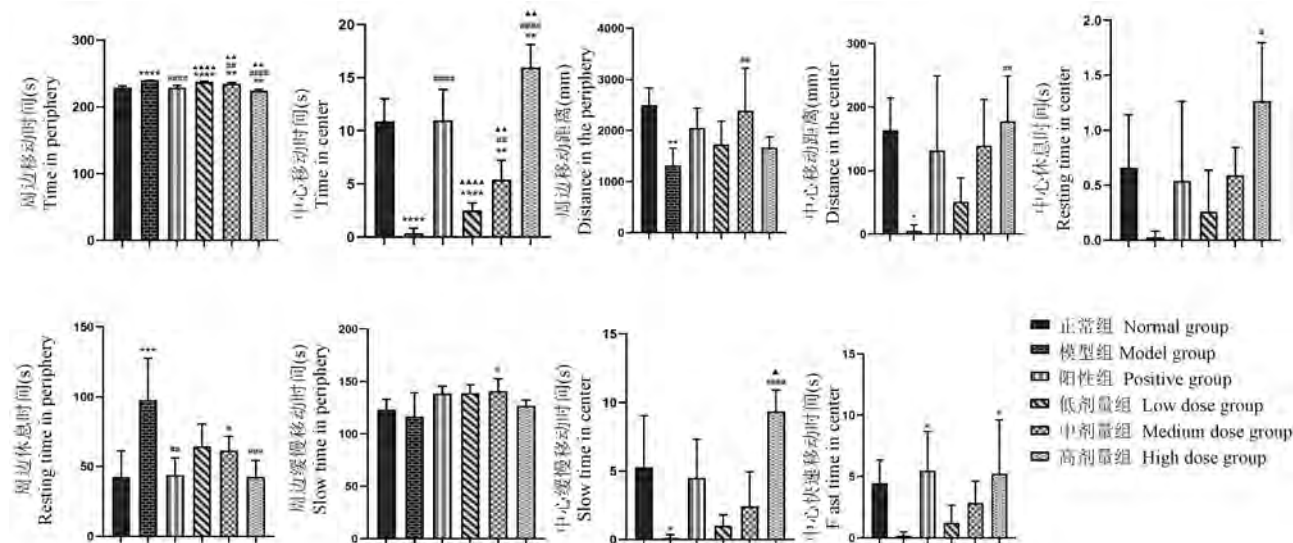


图 4 旷场实验中各组大鼠典型运动轨迹图

Figure 4 Typical trajectories of rats in each group in open field experiments

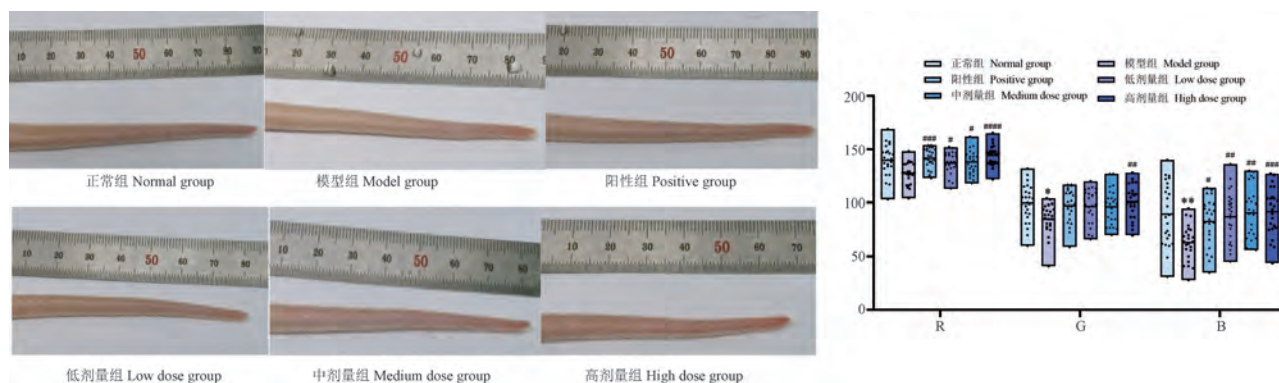


注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$;与阳性组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, ▲▲▲ $P < 0.0001$ 。

图5 各组大鼠旷场实验结果

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$. Compared with positive group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, ▲▲▲ $P < 0.0001$.

Figure 5 Open field experiment results of rats in each group



注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ 。

图6 各组大鼠尾部图片和尾部色度比较图

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$.

Figure 6 Comparison of tail pictures and tail chromaticity of rats in each group

2.7.3 舌面

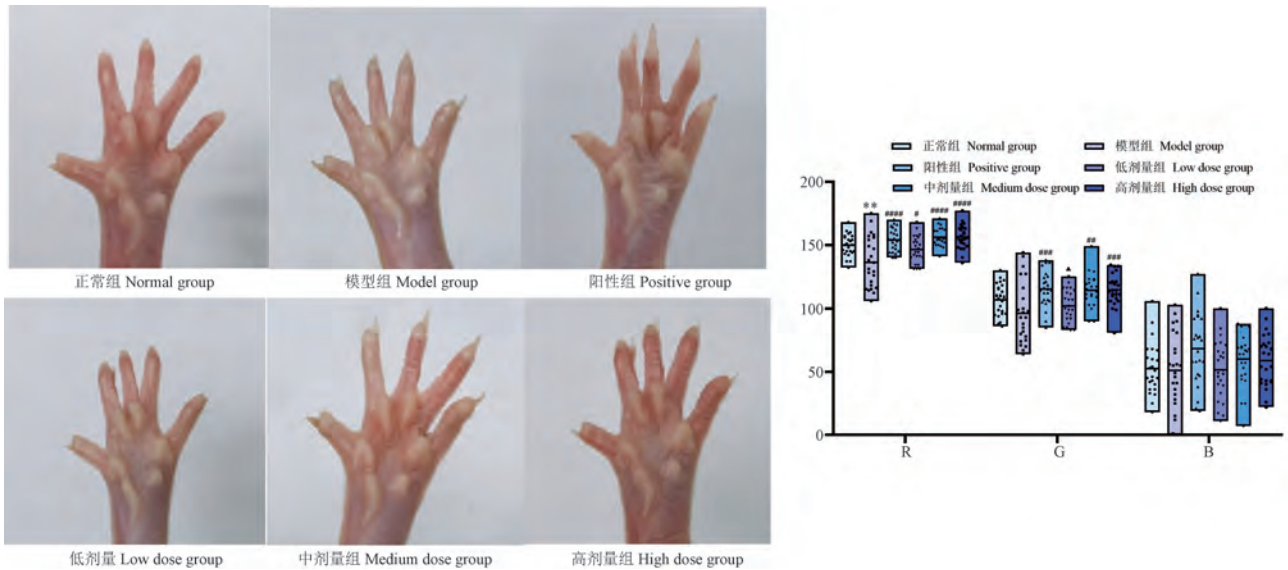
从图片来看,正常组大鼠舌面淡红、薄白苔,模型组舌面胖大暗红,薄白苔,少泽,阳性组低剂量组舌面淡红、薄白苔,中、高剂量组舌面稍红(见图8)。

从RGB值数据来看,与正常组相比,中剂量组大鼠的舌面B值更高,具有显著性差异($P < 0.05$),与模型组比,中、高2个剂量组大鼠舌面的R值更高,具有显著性差异($P < 0.05$),与阳性组比较,低剂量组的G值更低,具有显著性差异($P < 0.05$),提示

灌胃真武汤和当归生姜羊肉汤都明显改善了大鼠舌面的色泽(见图8)。

3 讨论

本研究采用腺嘌呤和番泻叶水煎液的方法成功建立脾肾阳虚IBS-D的雌性大鼠模型,用中医证候来探究当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚IBS-D的干预作用,而真武汤由炮附子、白术、茯苓、芍药、生姜组成,功效温补脾肾阳气、利水消肿。主治阳虚水泛,

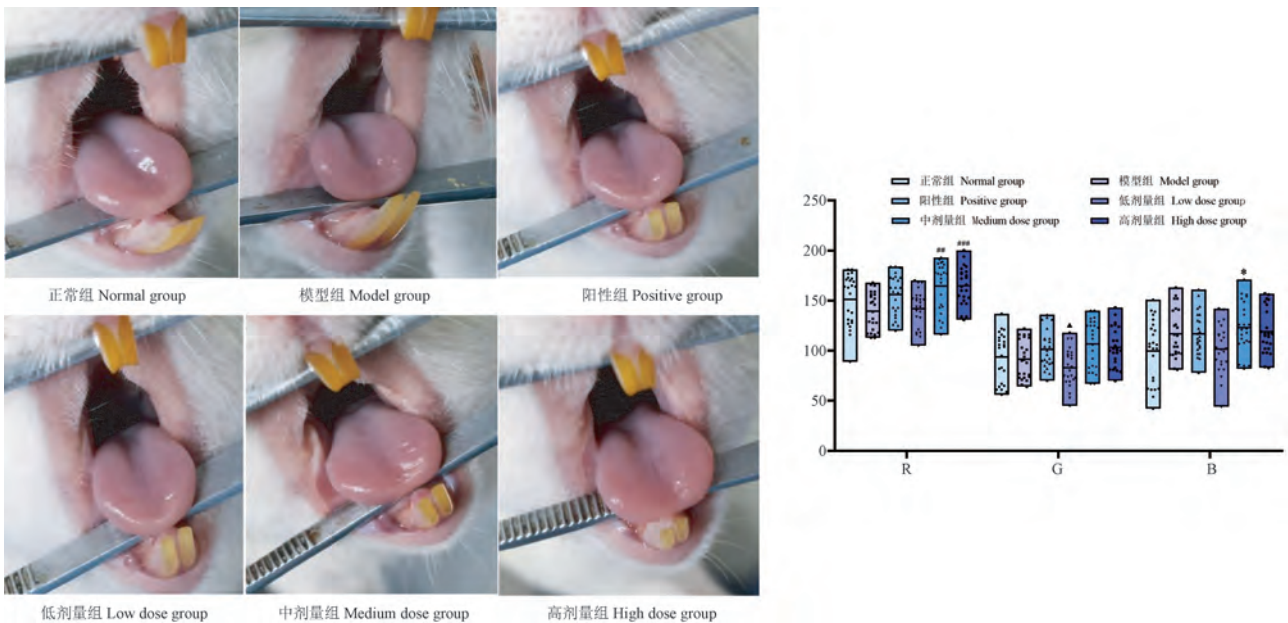


注:与正常组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$;与阳性组比较, ▲ $P < 0.05$ 。

图 7 各组大鼠足底图片和足底色度比较图

Note. Compared with normal group, ** $P < 0.01$. Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$. Compared with positive group, ▲ $P < 0.05$.

Figure 7 Comparison of plantar pictures and plantar chromaticity of rats in each group



注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$;与阳性组比较, ▲ $P < 0.05$ 。

图 8 各组大鼠舌面图片和舌面色度比较图

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with model group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. Compared with positive group, ▲ $P < 0.05$.

Figure 8 Comparison of tongue surface pictures and tongue surface chromaticity of rats in each group

临床应用于小便不利、腹痛、泄泻等症,王晓东^[12]用真武汤合小青龙汤治疗腹泻型 IBS-D 和张连文^[13]用真武汤合柴胡疏肝散治疗腹泻型 IBS-D 均取得了较好的临床疗效。因此,本研究选其作为阳性药。

脾肾阳虚型 IBS-D 是一种消化系统疾病,中医认为,本病属“腹痛”、“泄泻”等范畴。《素问·举

痛论篇》曰:“寒气客于小肠,小肠不得成聚,故后泄腹痛矣”,且《医宗必读》也指出“无湿不成泄”,可见该病与寒和湿有关。脾肾阳虚作为该病的证,《内经》记载,“脾居中央以灌四旁”,脾主司运化之职,是机体消化饮食、吸收输布水谷精微和代谢津液的枢纽。《素问》曰:“肾者主蛰,封藏之本,精之处

也。”肾藏精,精化气,肾气是生气之源,是生命力活动的原动力,具有推动人体生长发育、促进人体生殖功能、防御外邪入侵的作用。脾与肾的关系主要表现在先后天相互滋生和水液代谢方面,脾运化水谷精微,依赖于肾阳的温煦蒸化,才能健运,肾精依赖于脾运化的水谷精微不断补充,才能充盛。而脾肾两脏的阳气亏虚,会引起消化机能失调和水液代谢的紊乱,出现腹痛、腹泻等临床表现。辨证论治是中医理论的核心和精髓,中医治病以辨证论治为基本原则,治疗主要是温肾健脾、化湿止泻。

当归生姜羊肉汤,本方当归能补血活血、温中止痛,在《名医别录》中记载,“能温中止痛,补五脏,生肌肉”李时珍认为当归可补血活血,甄权认为凡虚寒证,宜重用当归,经现代研究发现当归能抗炎、促进造血功能,保肝、护肾,调节免疫等药理作用^[14];生姜能温中散寒,驱除表邪,《食疗本草》中记载生姜“除壮热,治转筋、心满”《珍珠囊》中生姜“益脾胃,散风寒”有抗炎、抗肿瘤,增强免疫功能,抗动脉粥样硬化等药理作用^[15];羊肉暖中补虚,补中益气,益肾气,治虚劳寒冷,五劳七伤。三者合用,具有补益气血、温中散寒、调经止痛的功效,此方药借食味,食助药性,有“药食同源”、“寓药于食”的特点,以脾胃为本,以后天滋养先天,补益脾肾,促进脾运化水谷精微、统摄血液的功能,提高机体免疫应答和造血的能力,肾为一身元阳之本,能提高肾温煦机体的作用,推动人体的生命活动。经查文献可知,当归生姜羊肉汤对寒性疾病有良好的治疗效果^[16-17]。基于此,本研究立足于中医基础理论,探讨当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠中医证候的影响,为中医治疗脾肾阳虚 IBS-D 提供实验支撑和指导临床实验,为进一步研究 IBS-D 的作用机制打下基础。本研究采用雌性大鼠,为扩大当归生姜羊肉汤适用人群提供一定的实验基础。

从实验结果来看,给雌性大鼠灌胃低、中、高不同剂量的当归生姜羊肉汤后中医证候评分明显低于模型组,具有显著性差异($P<0.05$),体重、肛温、摄食量、饮水量也有相应的恢复,可见当归生姜羊肉汤补益脾肾,提高机体免疫能力,有效的改善脾肾阳虚所引起大鼠精神萎靡、眼睛乏神、毛发稀疏发黄、粪便稀溏、食欲不振的症状。

旷场实验可以用于实验动物的虚证的探索,通过旷场实验可见,灌胃当归生姜羊肉汤后,低、中、高 3 个剂量组大鼠的活动度与模型组比明显提高,

具有显著性差异($P<0.05$),提示当归生姜羊肉汤有其温中散寒的作用,能有效的改善脾肾阳虚所引起的畏寒肢冷,倦怠乏力懒动的症状。腺嘌呤造模肾阳虚对肾造成损害,经药理研究发现当归对肾具有保护作用,尤其在肾小球的过滤与肾小管的重吸收作用中有很明显的效果,减轻肾损伤^[18]。旷场实验有助于我们对由于脾肾原因导致的气虚活动度减少的定量评价具有重要的参考意义。

中医四诊是中医诊病的重要方法,动物的四诊等由于实验动物的特殊性,难以定性和定量判断,建立图像和软件分析的方法可以帮助进行诊断。从 RGB 值数据来看,低、中、高剂量组大鼠尾部、足底、舌面的 R、G、B 值与模型组比较更高,具有显著性差异($P<0.05$)。表明当归生姜羊肉汤具有补血活血的作用,能明显改善了大鼠尾部、足底、舌面的色泽。这可能其中当归含有的多糖有关,它能推动脾脏内源性结节的生长,使得 MSCs 增殖,促进骨髓细胞 DNA 的合成,刺激机制的造血功能,从而缓解缺血性症状^[19]。

本研究表明,使用旷场实验和舌、爪、尾的 RGB 值可以在一定程度上和中医的四诊在实验动物上进行定量分析,有助于实验动物模型的中医证候指标的建立。结合实验中的大鼠的中医证候的表现,当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚 SD 雌性大鼠中医证候具有改善作用,且呈现出一定的剂量效应关系。

参考文献:

- [1] 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组,中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 中国肠易激综合征专家共识意见(2015 年,上海) [J]. 中华消化杂志, 2016, 36(5): 299-312.
- [2] 解坤. 从脾肾阳虚辨治腹泻型肠易激综合征的 Meta 分析 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2021.
- [3] 李海燕, 施思, 孙红, 等. 灵龟八法择时取穴雷火灸治疗脾肾阳虚腹泻型肠易激综合征的临床效果 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(23): 135-139.
- [4] Sperber AD, Dumitrascu D, Fukudo S, et al. The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: a rome foundation working team literature review [J]. Gut, 2017, 66(6): 1075-1082.
- [5] 曾书君, 程进伟, 罗程. 肠易激综合征流行病学系列研究 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2019, 29(13): 98-99.
- [6] 赵尔樱, 周佳玮, 褚海云, 等. 肠易激综合征流行病学与致病因素研究进展 [J]. 中国公共卫生, 2021, 37(4): 764-768.
- [7] 张子悦, 马书进, 贺新月, 等. 肠易激综合征的发病机制及治疗研究进展 [J]. 临床消化病杂志, 2019, 31(1): 60-63.

- [8] 李克光. 金匱要略讲义 [M]. 上海: 上海科学技术出版社; 1985.
- [9] 谢敏. 基于古今文献的当归生姜羊肉汤应用探析 [J]. 理论前沿, 2014, 9: 282.
- [10] 侯建媛. 附子理中汤合四神丸治疗脾肾阳虚型腹泻型肠易激综合征疗效及对直肠黏膜蛋白酶激活受体的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(18): 2022-2025.
- [11] 叶艳. 补虚劳药膳神仙粥对脾肾阳虚证慢性疲劳综合征患者的干预研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [12] OKYOTO(王晓东). 真武汤合小青龙汤治疗腹泻型肠易激综合征的疗效评价 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [13] 张连文. 真武汤合柴胡疏肝散治疗腹泻型肠易激综合征 52 例临床观察 [J]. 河北中医, 2012, 34(10): 1493-1495.
- [14] 李曦, 张丽宏, 王晓晓, 等. 当归化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(6): 1023-1028.
- [15] 王颖, 李东伟. 生姜的研究进展 [J]. 中国药业, 2006, 15(9): 62-63.
- [16] 刘倩, 廉永红, 李玉婷, 等. 当归生姜羊肉汤治疗寒凝型原发性痛经的临床观察 [J]. 中国民间疗法, 2020, 28(24): 65-69.
- [17] 高大硕. 当归生姜羊肉汤治疗虚寒咳嗽举隅 [J]. 时珍国药研究, 1997, 8(1): 93.
- [18] 唐维我, 张会永, 李芹, 等. 肾阳虚证动物模型造模方法及模型评价 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(4): 1317-1324.
- [19] 马艳春, 吴文轩, 胡建辉, 等. 当归的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2022, 50(1): 111-114.

[收稿日期] 2022-07-27

《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R 国际刊号 ISSN 1671-7856 邮局代号 82-917

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊)。征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。栏目设置包括研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等栏目。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、被《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、中国生物医学期刊数据库等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章正文字数在 5000 字左右。

投稿网址: <http://zgsgydw.cnjournals.com/zgbjyxzz/ch/index.aspx>

期待您的来稿!

马雪莉,魏锦慧,马鸿斌. 萆薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠足细胞 podocalyxin、 α -actinin-4 的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 49-56.

Ma XL, Wei JH, Ma HB. Effect of Bixie Fenqing granules on podocalyxin and α -actinin-4 in podocytes in rats with adriamycin-induced nephropathy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 49-56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.007

萆薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠足细胞 podocalyxin、 α -actinin-4 的影响

马雪莉,魏锦慧,马鸿斌*

(甘肃中医药大学附属医院,兰州 730000)

【摘要】 目的 探讨萆薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠蛋白尿及肾组织足细胞足糖萼蛋白(podocalyxin)、 α -辅肌动蛋白-4(α -actinin-4)的影响。**方法** 将 60 只 SPF 级 SD 大鼠,随机分为空白组 12 只和造模组 48 只,造模组大鼠采用分两次尾静脉注射的方法建立阿霉素肾病大鼠模型。造模成功后随机分为模型组、萆薢分清颗粒(6.56 mL/kg)组(中药组)、泼尼松组(6.3 mL/kg)、萆薢分清颗粒+泼尼松组(结合组)进行灌胃,空白组及模型组予以同等量生理盐水灌胃,每日 1 次,连续灌胃 4 周。给药结束后检测大鼠 24 h 尿蛋白定量(24 h-UTP)、血清总胆固醇(TC)、白蛋白(ALB)水平;采用苏木素-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色观察肾组织病理形态学变化,应用免疫组化法(IHC)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾组织中足细胞相关蛋白 podocalyxin、 α -actinin-4 表达水平。**结果** 空白组比较,模型组大鼠 24 h-UTP、血清中 TC 显著升高($P<0.05$);ALB 显著降低($P<0.05$);肾小球可见局灶节段性瘢痕形成,系膜细胞及系膜基质增生,肾小管空泡变性,管腔内可见蛋白管型,间质纤维细胞增生伴炎性细胞浸润;podocalyxin 阳性表达明显减弱, α -actinin-4 呈强阳性表达($P<0.05$);podocalyxin 蛋白表达量显著下降($P<0.05$), α -actinin-4 蛋白表达量显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,各治疗组 24 h-UTP、血清 TC 水平均有不同程度的下降,ALB 升高($P<0.05$);肾小球及小管间质病变较轻,少许肾间质水肿、纤维化,伴有少量炎性细胞浸润;podocalyxin 阳性表达增强, α -actinin-4 阳性表达减弱($P<0.05$);podocalyxin 蛋白表达量显著升高($P<0.05$), α -actinin-4 蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。**结论** 萆薢分清颗粒可通过上调 podocalyxin、下调 α -actinin-4 表达水平,从多靶点修复受损的足细胞,减少尿蛋白排泄量,保护肾。

【关键词】 阿霉素肾病大鼠;萆薢分清颗粒;足细胞;podocalyxin; α -actinin-4

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0049-08

Effect of Bixie Fenqing granules on podocalyxin and α -actinin-4 in podocytes in rats with adriamycin-induced nephropathy

MA Xueli, WEI Jinhui, MA Hongbin*

(Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

【Abstract】 Objective To explore the effects of Bixie Fenqing granules on proteinuria and podocyte podocalyxin and α -actinin-4 expression in renal tissues of rats with adriamycin-induced nephropathy. **Methods** Sixty specific-pathogen-free SD rats were divided randomly into a blank group ($n=12$) and model group ($n=48$). A rat model of

[基金项目] 甘肃中医药大学附属医院院内创新基金项目(gzfy-2018-02, gzfy-2020-12)。

[作者简介] 马雪莉(1994—),女,硕士,研究方向:中医药防治肾小球疾病。E-mail:1729784163@qq.com

[通信作者] 魏锦慧(1978—),男,副主任医师,研究方向:中西医结合防治肾脏疾病。E-mail:wjh780cool@163.com

adriamycin-induced nephropathy was established by two injections of adriamycin into the tail vein. After successful establishment of the model, the rats were divided randomly into a model group, Bixie Fenqing granules group (6.56 mL/kg) (Chinese medicine group), prednisone group (6.3 mL/kg), and Bixie Fenqing granules + prednisone group (combination group). Treatments were administered once a day for 4 weeks and the blank and model groups were given the same amount of normal saline. Levels of 24 h urinary protein (24 h-UTP), serum total cholesterol (TC), and albumin were measured and pathomorphological changes in renal tissue were observed by hematoxylin and eosin and Masson staining. Expression levels of the podocyte-associated protein podocalyxin and α -actinin-4 in rat kidney tissues were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Serum TC and 24 h-UTP were significantly increased and albumin was significantly decreased in the model group compared with the blank group ($P < 0.05$). Renal tissues in model rats showed focal segmental scar formation, proliferation of mesangial cells and mesangial matrix, vacuolar degeneration of renal tubules and protein tubules in the lumen, and interstitial fibrous cell proliferation with inflammatory cell infiltration. Podocalyxin expression was significantly decreased and α -actinin-4 expression was increased ($P < 0.05$) in the model group compared with the control group. Conversely, compared with the model group, 24 h-UTP and serum TC were decreased and albumin was increased to different degrees in each treatment group ($P < 0.05$), glomerular and tubulointerstitial lesions were mild, with little renal interstitial edema and fibrosis, accompanied by a small amount of inflammatory cell infiltration, and podocalyxin expression was increased and α -actinin-4 expression was decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Bixie Fenqing granules can repair damaged podocytes via multiple targets, reduce UTP excretion, and protect the kidney by up-regulating podocalyxin and down-regulating the expression of α -actinin-4.

【Keywords】 adriamycin nephropathy rats; Bixie Fenqing granules; podocyte; podocalyxin; α -actinin-4

肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)是临床常见的肾疾病之一,病理变化表现为肾小球基底膜通透性增高,电荷屏障受损,以大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症和不同程度的水肿为主要临床表现。由于NS与基因突变、免疫功能紊乱、细胞因子表达异常及足细胞受损等多种因素有关,其发病机制复杂且具体的细胞分子生物学免疫机制尚不明确,故目前临床上针对NS的一线用药方案多以抑制免疫炎症反应为主,即给予糖皮质激素、细胞毒性药物及生物制剂等基础用药。然而,近年来的临床实践证实,免疫抑制剂在带来疗效的同时,尤其糖皮质激素亦会使部分患者产生激素依赖及激素抵抗等问题,加之激素的副作用,严重影响患者后期生活质量^[1-2]。中医以“整体调节、辨证施治”为方向,在慢性肾脏病的治疗上发挥着独特的诊疗优势,故进一步探索中医药对本病的作用机制具有极为重要的临床意义。

草薢分清颗粒是导师马鸿斌教授继承刘宝厚教授肾病“湿热不除,蛋白难消”的学术思想,结合现代医学研究及自身临床体会,在清代医学大家程钟龄所撰《医学心悟》之古方程氏草薢分清饮的基础上加减化裁而来,方由丹参12 g、车前草30 g、茯苓15 g、关黄柏12 g、绵草薢12 g、续断12 g、槲寄生12 g、石菖蒲10 g、甘草10 g组成。全方共奏健脾益肾、清热利湿之效,使气虚得复,瘀祛湿利,精微封

藏。导师临床运用此方治疗肾虚湿热之肾疾病均屡获良效,临床证实其能减少NS患者尿蛋白的排泄率,为其常用之验方。而其具体作用机制尚不明确。因此本研究拟通过观察草薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠足细胞相关蛋白podocalyxin、 α -actinin-4表达的影响,探讨其治疗肾病综合征蛋白尿的具体作用机制,为客观评价此药疗效提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性SD大鼠60只,SPF级,6周龄,体重(200±20)g,购自甘肃中医药大学实验动物中心[SCXK(甘)2020-0001],饲养于甘肃中医药大学实验动物中心[SYXK(甘)2020-0009],光照明暗各12 h,每日予以新鲜水及饲料。经由甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(2021-234;2021-235),实验操作遵循3R原则。

1.2 主要试剂与仪器

草薢分清颗粒(绵草薢12 g、续断12 g、槲寄生12 g、茯苓15 g、关黄柏12 g、丹参12 g、车前草30 g、石菖蒲10 g、甘草10 g,以上均选用中药配方颗粒剂):购于甘肃中医药大学附属医院制剂中心。醋酸泼尼松片(prednisone acetate, PRE),购自山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司,规格:每片5 mg,国药准字:H20033023,生产批号:210122;注射用盐酸

多柔比星(阿霉素 Adriamycin,ADR);酷儿化学科技(北京)有限公司,规格:每支 25 mg,国药准字 RE294501,生产批号:HY613701。

α -actinin-4 抗体(美国 Genetex 公司,批号 402205);podocalyxin 抗体(美国 Genetex 公司,批号 822102958); β -actin 抗体(美国 Immunoway 公司,批号 B2804);PVDF 膜(Millipore 公司,批号 IRVH00010);ECL 发光液(上海翊圣生物科技有限公司,批号 36208-A/B);蛋白电泳 Marker(上海翊圣生物科技有限公司,批号 26616);BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,批号 20210419);RIPA 蛋白裂解液(北京索莱宝生物科技有限公司,批号 20210911)。MiniChemi 610 型全自动化学发光成像系统(北京六一生物科技有限公司);5424R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf);KD-P 组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);RM2016 病理切片机(上海莱卡仪器有限公司);JB-P5 石蜡包埋机(俊杰电子有限公司);DW-HL528 超低温冰箱(中科美菱低温科技公司);iMark 酶标仪(美国 Bio Rad 公司);Cobasc701 全自动生化分析仪(瑞士 Roche 公司);SK-O180-E 摇床(SCILOGEX 公司);BX43+sc50 显微拍照系统(奥林巴斯有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 制备模型、动物分组、给药与取样

SD 大鼠适应性喂养 1 周后,随机选取 12 只作为空白组,余 48 只大鼠为造模组。造模组采用分 2 次隔周尾静脉注射阿霉素(0.4 ± 0.1) mg/100 g 的方法建立阿霉素肾病大鼠模型^[3],空白组大鼠注射同等剂量的生理盐水,以尿蛋白定量 ≥ 100 mg/24 h 提示模型复制成功。

按随机数字表法将造模成功的大鼠分为模型组、中药组、泼尼松组、结合组,每组 12 只,进行灌胃。依据大鼠的等效剂量相当于人的 6.3 倍,中药组:草薢分清颗粒成人每天服用 125 g/60 (kg·d)。大鼠的等效剂量为 $125 \text{ g/60 (kg·d)} \times 6.3 = 13.125 \text{ g/(kg·d)}$ 。制备为 2 g/mL 溶液,则需要 6.56 mL/kg。泼尼松组:泼尼松成人用量为 1 mg/(kg·d),换算后大鼠等效剂量为 6.3 mL/(kg·d),配置为浓度 1 mg/mL 的药液,需要 6.3 mL/kg。结合组给予中药量 6.56 mL/kg 和泼尼松溶液 6.3 mL/kg 灌胃。空白组及模型组予等体积生理盐水灌胃。每日灌胃 1 次,连续 4 周。给药期间每天测体重并调整灌

胃剂量,每 2 周检测 1 次 24 h-UTP。

干预 4 周后,大鼠禁食水 12 h 后,麻醉大鼠,心脏采血,静置 30 min 后转速离心 10 min,取上层血清,放于 -80°C 冰箱保存。取血完毕后,打开腹腔,剥离肾周围组织,摘取大鼠双侧肾,用 0.9% 生理盐水冲洗干净后,剔除肾被膜,一侧置于装有 4% 多聚甲醛固定液的小离心管中进行固定,用于 HE、Masson 染色观察。另一侧置于冻存管中,液氮速冻后移至 -80°C 冰箱,用于免疫组化和 Western blot 检测。

1.3.2 检测 24 h-UTP 水平

取收集的 24 h 尿液,送至甘肃中医药大学附属医院检验科,使用比浊法测定 24 h 尿蛋白定量。

1.3.3 生化指标检测

血 TC、ALB,使用全自动生化分析仪,由甘肃中医药大学附属医院检验科生化实验室检测。

1.3.4 HE、Msaaon 染色观察大鼠肾组织病理学改变

4% 多聚甲醛固定肾组织,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡包埋、切片($4 \mu\text{m}$)、烤片后分别进行 HE、Msaaon 染色处理,光镜下观察肾组织病理学变化。

1.3.5 免疫组织化学法(IHC)法检测大鼠肾组织 podocalyxin、 α -actinin-4 蛋白表达

取出 4% 多聚甲醛固定的肾组织,梯度乙醇洗脱切片,滴加 3% H_2O_2 冲洗,配制 0.01 mol/L 柠檬酸钠缓冲溶液($\text{pH}=6.0$) 90°C 进行抗原修复。加入一抗(podocalyxin, 1:100; α -actinin-4, 1:100), 4°C 孵育过夜, PBS 液洗 3 次,每次 5 min, 37°C 孵育二抗 1 h, PBS 液洗 5 次。DAB 显色,苏木素复染、梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。染色结果呈棕黄色颗粒为阳性。使用 Image J 计算各张片子灰度值,最终平均光密度值以 $\text{AOD} = \text{IOD}/\text{Area}$ (即 $\text{intDen}/\text{area}$) 表示。

1.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾组织 podocalyxin、 α -actinin-4 蛋白表达水平

取 100 mg 冷冻组织,剪碎,加入 1 mL 预冷的生理盐水,冲洗两遍,置于低温匀浆仪中充分匀浆, 4°C 12000 r/min 离心 15 min,留上清备用。根据 BCA 蛋白定量试剂盒检测组织总蛋白浓度;上样、电泳、转膜。用 5% 脱脂牛奶封闭后分别用 podocalyxin (1:1000), α -actinin-4 (1:1500), 内参 β -actin (1:5000) 加入相应的一抗 4°C 孵育过

夜,使用封闭液按 1 : 5000 稀释二抗,室温孵育 1 h,洗脱,置于化学发光仪中曝光,使用 Image 软件分析相关蛋白表达。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,计量资料进行正态性及方差齐性检验,满足正态性和方差齐性时,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析,方差齐时,用 LSD 检验;方差不齐时,用 Games-Howell 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状态改变

实验过程中,空白组大鼠一般状态良好,精神佳,反应灵敏,皮毛有光泽,进食量正常;模型组大鼠精神差,活动量减少,毛发干枯,反应迟钝,时有大便质稀,阴囊水肿,部分烂尾,体重增加缓慢;各药物干预组初期和模型组有相同表现,随着用药,后期诸症逐渐改善,活动量增多,进食量增加,大便形质正常。

2.2 萆薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白定量的影响

造模 2 周末,与空白组比,造模组大鼠 24 h 尿蛋白定量升高($P<0.05$),提示成功复制模型;灌胃 2、4 周时,模型组 24 h 尿蛋白水平进一步升高,各药物干预组比同期模型组不同程度减少($P<0.05$),结合组降低趋势最为显著($P<0.05$),见表 1。

2.3 萆薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠血清 TC、ALB 的影响

灌胃 4 周末,与空白组比较,模型组大鼠 TC 值升高,ALB 下降($P<0.05$);与模型组比较,各药物干预组大鼠 TC 值均有不同程度下降,ALB 不同程度

升高($P<0.05$);与中药组和泼尼松组比较,结合组大鼠血清 TC 值明显降低,ALB 明显升高($P<0.05$),见表 2。

2.4 光镜下 HE、Masson 染色后阿霉素肾病大鼠肾组织的病理变化

经 HE、Masson 染色后,使用 200 倍光镜观察,结果显示:空白组大鼠肾小球形态结构清晰,基质部未见增生、坏死,小管及间质无明显病理学改变;模型组肾小球可见局灶节段性瘢痕形成,系膜细胞及系膜基质增生,肾小管空泡变性,管腔内可见蛋白管型,间质纤维细胞增生伴炎性细胞浸润;各药物干预组间肾小球及肾小管病变均有所改善,结合组改善最为明显。见图 1、图 2。

2.5 免疫组化法检测肾组织 podocalyxin、 α -actinin-4 的表达

肾组织 podocalyxin、 α -actinin-4 蛋白结果显示,与空白组相比,模型组和各药物干预组大鼠 podocalyxin 表达均明显降低, α -actinin-4 表达明显升高($P<0.05$);与模型组相比,各药物干预组 podocalyxin 表达均升高, α -actinin-4 表达均有所下降($P<0.05$);且结合组 podocalyxin 表达高于中药组、泼尼松组, α -actinin-4 表达低于中药组、泼尼松组($P<0.05$),见表 3、图 3、图 4。

2.6 Western blot 检测 podocalyxin、 α -actinin-4 蛋白的相对表达量

与空白组相比,模型组和各药物干预组大鼠 podocalyxin 表达强度降低, α -actinin-4 表达强度升高($P<0.05$);与各模型组相比,各药物干预组 podocalyxin、组有达强度均升高, α -actinin-4 表达强度均降低($P<0.05$);且结合组 podocalyxin、表达优于中药组、泼尼松组, α -actinin-4 表达弱于中药组、泼尼松组($P<0.05$),见表 4、图 5。

表 1 不同时间各组大鼠 24 h 尿蛋白定量($\bar{x}\pm s$,mg/24 h)

Table 1 24 h urinary protein in each group at different time

组别 Groups	造模 2 周 Building 2 weeks	给药 2 周 Treatment for 2 weeks	给药 4 周 Treatment for 4 weeks
空白组 Blank group	12.82 $\pm$ 2.66	13.34 $\pm$ 2.75	12.89 $\pm$ 2.23
模型组 Model group	121.53 $\pm$ 2.77 $^{\Delta}$	162.94 $\pm$ 6.13 $^{\Delta}$	173.49 $\pm$ 4.25 $^{\Delta}$
中药组 Chinese medicine group	120.90 $\pm$ 4.38 $^{\Delta}$	156.14 $\pm$ 4.44 $^{\Delta\#}$	152.70 $\pm$ 2.68 $^{\Delta\#}$
泼尼松组 Prednisone group	119.19 $\pm$ 4.95 $^{\Delta}$	153.78 $\pm$ 5.75 $^{\Delta\#}$	144.98 $\pm$ 3.40 $^{\Delta\#}$
结合组 Combination group	120.69 $\pm$ 4.24 $^{\Delta}$	149.32 $\pm$ 6.58 $^{\Delta\#}$	139.98 $\pm$ 4.98 $^{\Delta\#}$

注:与空白组相比, $^{\Delta}P<0.05$;与模型组相比, $^{\#}P<0.05$ 。

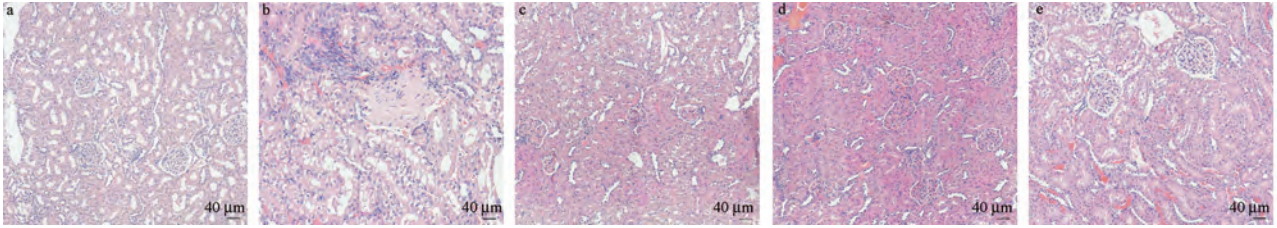
Note. Compared with the blank group, $^{\Delta}P<0.05$. Compared with the model group, $^{\#}P<0.05$.

表 2 各组大鼠 TC、ALB 水平($\bar{x}\pm s$)
Table 2 TC and ALB levels of rats in each group

组别 Groups	<i>n</i>	血清总 胆固醇 (mmol/L) TC	血清 白蛋白 (g/L) ALB
空白组 Blank group	12	1.66±0.59	33.91±2.46
模型组 Model group	12	6.46±1.24 [△]	21.27±2.37 [△]
中药组 Chinese medicine group	10	3.88±1.14 ^{△#}	25.69±5.39 ^{△#}
泼尼松组 Prednisone group	12	4.09±1.08 ^{△#}	26.07±2.89 ^{△#}
结合组 Combination group	11	2.61±0.67 ^{△#}	30.51±2.32 ^{△#}

注:与空白组相比, [△] $P<0.05$;与模型组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, [△] $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$.

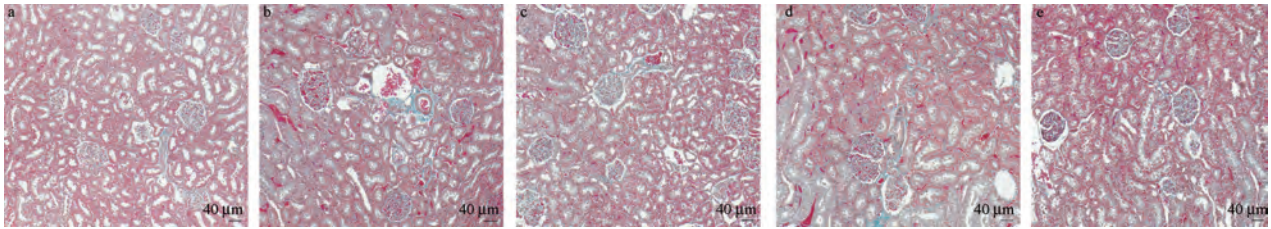


注:a:空白组;b:模型组;c:中药组;d:泼尼松组;e:结合组。

图 1 各组大鼠 HE 染色

Note. a, Blank group. b, Model group. c, Chinese medicine group. d, Prednisone group. e, Combination group.

Figure 1 HE staining of rats in each group



注:a:空白组;b:模型组;c:中药组;d:泼尼松组;e:结合组。

图 2 各组大鼠 Masson 染色

Note. a, Blank group. b, Model group. c, Chinese medicine group. d, Prednisone group. e, Combination group.

Figure 2 Masson staining of rats in each group

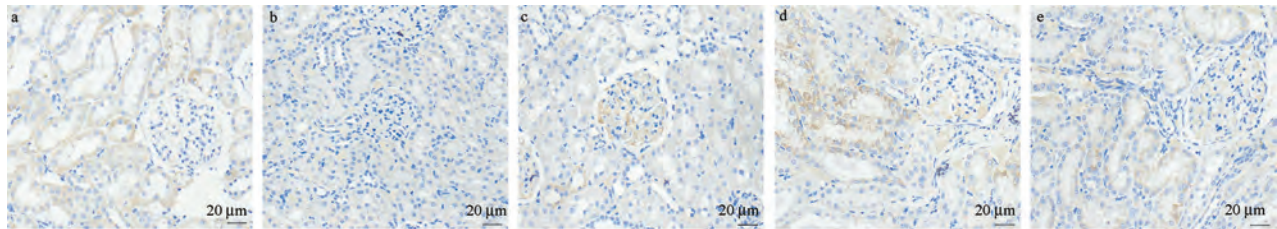
表 3 各组大鼠肾组织 podocalyxin、 α -actinin-4 蛋白表达比较(平均光密度, $\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of podocalyxin and α -actinin-4 protein expression in kidney tissues of rats in each group(Mean optical density)

组别 Groups	<i>n</i>	足萼糖蛋白 Podocalyxin	α -actinin-4
空白组 Blank group	12	0.072±0.001	0.061±0.001
模型组 Model group	12	0.047±0.001 [△]	0.088±0.002 [△]
中药组 Chinese medicine group	10	0.051±0.001 ^{△#}	0.069±0.001 ^{△#}
泼尼松组 Prednisone group	12	0.066±0.001 ^{△#}	0.067±0.002 ^{△#}
结合组 Combination group	11	0.069±0.001 ^{△#}	0.064±0.001 ^{△#}

注:与空白组相比, [△] $P<0.05$;与模型组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, [△] $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$.

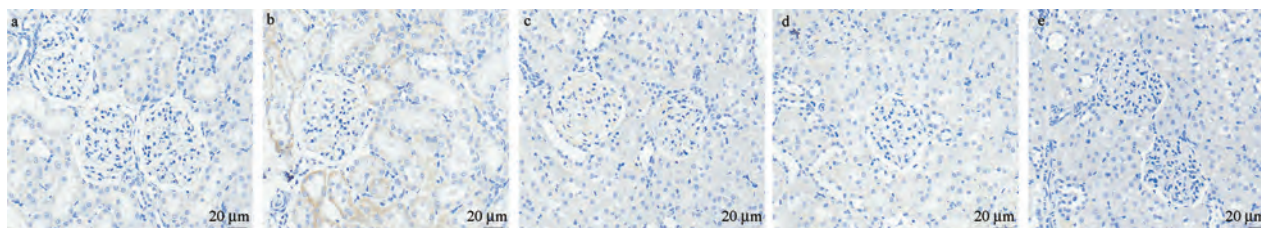


注:a:空白组;b:模型组;c:中药组;d:泼尼松组;e:结合组。

图 3 免疫组化法测肾组织 podocalyxin 的表达

Note. a, Blank group. b, Model group. c, Chinese medicine group. d, Prednisone group. e, Combination group.

Figure 3 Immunohistochemical staining of renal tissue expression of podocalyxin



注:a:空白组;b:模型组;c:中药组;d:泼尼松组;e:结合组。

图 4 免疫组化法测肾组织 α-actinin-4 的表达

Note. a, Blank group. b, Model group. c, Chinese medicine group. d, Prednisone group. e, Combination group.

Figure 4 Immunohistochemical staining of renal tissue expression of α-actinin-4

表 4 各组大鼠肾组织 podocalyxin、α-actinin-4 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Podocalyxin and α-actinin-4 protein expression intensity in renal tissues of rats in each group

组别 Groups	n	足萼糖蛋白 Podocalyxin	α-actinin-4
空白组 Blank group	12	1.305±0.007	0.583±0.066
模型组 Model group	12	0.558±0.002 [△]	1.213±0.009 [△]
中药组 Chinese medicine group	10	0.922±0.002 ^{△#}	1.016±0.027 ^{△#}
泼尼松组 Prednisone group	12	0.929±0.006 ^{△#}	0.998±0.007 ^{△#}
结合组 Combination group	11	1.161±0.005 ^{△#}	0.719±0.059 ^{△#}

注:与空白组相比, [△] $P < 0.05$;与模型组相比, [#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, [△] $P < 0.05$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$.

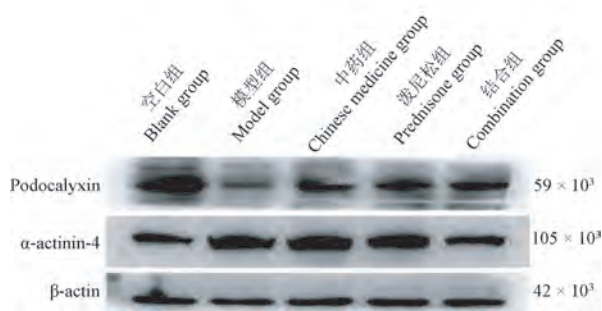


图 5 各组大鼠肾组织 podocalyxin、α-actinin-4 蛋白表达

Figure 5 podocalyxin and α-actinin-4 protein expression in renal tissue of rats in each group

3 讨论

根据病理表现,阿霉素肾病模型可分为急性阿霉素肾病模型与慢性阿霉素肾病模型,急性阿霉素肾病模型病理改变与人类微小病变肾病相似^[4]。本实验根据文献报道^[3]采用分 2 次隔周尾静脉注射阿霉素(0.4+0.1) mg/100 g 的方法制备阿霉素肾病模型。模型组动物在造模后第 15 天 24 h 尿蛋白定量显著上升,第 28 天出现明显的组织病理学改变,与空白组比较有统计学意义,表明本次实验复制阿霉素肾病模型较为理想。

NS 临床表现为持续大量蛋白尿,而足细胞结构及功能的改变是导致蛋白尿及 NS 发病和进展的关键环节。长期持续大量蛋白尿可造成肾小球硬化、

肾小管损伤和肾间质炎症细胞浸润及纤维化,导致足细胞病变,最终肾功能下降,从慢性肾病发展为终末期肾病^[5-6]。因此,开展对 podocalyxin、α-actinin-4 等足细胞蛋白的研究,寻找安全有效降低尿蛋白的方法,防止肾病理损伤的恶化,延迟肾替代治疗的时间,逐渐成为治疗肾病综合征蛋白尿的新靶点。

NS 属于中医“水肿”、“关格”等范畴。本病病机为本虚标实,虚以肺、脾、肾三脏气血阴阳亏虚为主,邪实则以湿、热、瘀为甚,三者相互胶结,致疾病反复迁延难愈。本研究采用临床经验方草薢分清颗粒进行干预,方中绵草薢利湿通淋,分清去浊为君药;车前草通利小便,清膀胱湿热;续断补肝肾,强筋骨。二药合用,补肾清热利湿,达标本兼治之功,共为臣药;茯苓利水渗湿健脾;黄柏清泻下焦湿热;加用槲寄生以增强续断补肾之力;石菖蒲交通心肾,化湿通窍;丹参通心窍、清血热;五药合用,加强补肾清热利湿之力,共为佐药;生甘草一味以调和诸药亦增清热解毒之力为使药;诸药合而成方,使得此方配伍严谨,疗效显著。共奏健脾益肾、清热利湿之效,使气虚得复,瘀祛湿利,精微封藏,以调节脏腑阴阳动态的平衡。现代药理研究表明,草薢水提物可通过减少肾组织中 TNF-α、MCP-1 和 ICAM-1 的表达及血清 MCP-1 蛋白合成水平,起到保护肾的作用^[7]。车前草有抗氧化和免疫调节作

用^[8];续断可增强小鼠非特异性免疫功能^[9];茯苓多糖可通过激活 PPAR- γ 表达,抑制 p38 MAPK 磷酸化,从而延缓 db/db 小鼠肾小球硬化,保护肾损伤^[10];黄柏中的主要成分黄柏碱可明显降低大鼠血清中 Scr、BUN 含量,抑制炎症因子的释放,减轻肾的病理损伤,改善肾功能^[11]。丹参多酚酸盐可通过抑制糖尿病肾病小鼠体内氧化应激反应及调控 TGF- β 1/Smad 信号通路的活化状态,减轻肾纤维化,延缓肾组织病理学改变^[12]。本实验中,模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量升高,肾小球可见局灶节段性瘢痕形成,系膜细胞及系膜基质增生,肾小管空泡变性,管腔内可见蛋白管型,间质纤维细胞增生伴炎性细胞浸润;经革藓分清颗粒干预后,24 h 尿蛋白、血清 TC 明显下降、ALB 升高,肾组织病理明显改善,提示革藓分清颗粒能降低阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白量、血清 TC 值,升高 ALB 及减轻肾病理变化进而延缓疾病进展的作用,并且中西医结合用药效果显著。

足细胞是一种附着在基底膜上的高度终末分化上皮细胞,位于肾小球毛细血管壁最外层,由胞体、主突和足突构成。足细胞之所以能在基底膜上稳定附着并发挥其正常功能,主要依赖于足细胞相关蛋白的维持。目前研究较多的是顶膜区蛋白 podocalyxin 和骨架区蛋白 α -actinin-4。足细胞 podocalyxin、 α -actinin-4 与裂孔膜一起构成滤过屏障,共同维持足细胞的形态结构以及足细胞与 GBM 的功能完整,podocalyxin 的缺失及 α -actinin-4 表达改变可引起足突融合,引发蛋白尿。podocalyxin 是一种带有大量负电荷的 CD34 家族的唾液酸蛋白,位于足细胞的胞膜顶端,也是维持肾小球滤过屏障结构和功能正常发挥的最主要物质基础^[13]。临床研究发现微小病变、IgA 肾病等各种肾小球疾病患者,其肾组织穿刺病理活检中肾小球足细胞 podocalyxin 表达明显降低,并与蛋白尿严重程度相关^[14]。实验研究表明 podocalyxin 蛋白与肾小球足细胞关系密切,podocalyxin 的表达减少可引起足突融合,并与蛋白尿产生关系密切^[15]。骨架蛋白 α -actinin-4 是收缩蛋白超家族成员,是维持足细胞骨架和裂隙隔膜功能的重要肌动蛋白相关分子,可将松散的肌动蛋白纤维交联成可收缩束状结构^[16]。 α -actinin-4 特异表达于肾小球脏层上皮细胞即足细胞^[17], α -actinin-4 能将细胞骨架与裂孔隔膜分子连接起来,在保持足细胞生理结构中起核心作用。其

中,肌动蛋白细胞骨架的改变与 α -actinin-4 分子表达和分布的异常密切相关。近年的许多实验证实足细胞功能及结构的异常,滤过膜的损伤及蛋白尿的出现是由 α -actinin-4 的异常表达所导致^[18]。本实验中,模型组大鼠免疫组化结果显示 podocalyxin 阳性表达明显减弱, α -actinin-4 呈强阳性表达;免疫印迹结果显示 podocalyxin 表达强度降低, α -actinin-4 表达强度升高;药物干预后,各治疗组 podocalyxin 阳性表达增强, α -actinin-4 阳性表达减弱,podocalyxin 表达强度升高, α -actinin-4 表达强度下降。且结合组表现出明显的优势。这提示革藓分清颗粒能通过下调大鼠肾组织足细胞骨架 α -actinin-4 及上调足细胞顶膜区 podocalyxin 表达,修复受损的足细胞,稳定足细胞结构与功能,减少尿蛋白的排泄,延缓慢性肾病的发展。

综上,革藓分清颗粒可能通过上调阿霉素肾病大鼠肾组织中足细胞 podocalyxin 表达,下调 α -actinin-4 表达,修复受损的足细胞,减轻大鼠肾病理损伤,减少尿蛋白排泄,延缓肾病综合征大鼠病情进展。

参考文献:

- [1] 马天娇. 细胞因子与原发肾病综合征发病机制研究进展 [J]. 国际儿科学杂志, 2019, 46(11): 815-818.
- [2] 侯玲, 傅桐, 何学慧, 等. 地氯雷他定辅助糖皮质激素治疗儿童肾病综合征疗效观察 [J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(12): 1082-1084, 1090.
- [3] 李爱平, 张王宁, 秦雪梅. 阿霉素肾病大鼠模型的优化 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 151-159.
- [4] 刘练, 张高福, 李秋, 等. 阿霉素肾病小鼠的肾脏病理转变过程 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 13-16.
- [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] Erkan E. Proteinuria and progression of glomerular diseases [J]. Pediatr Nephrol, 2013, 28(7): 1049-1058.
- [7] 苏筠霞, 李建华, 刘天喜, 等. 革藓水提物对尿酸性肾病大鼠 TNF- α 、MCP-1 和 ICAM-1 表达的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(5): 1088-1091.
- [8] 李冲冲, 龚苏晓, 许浚, 等. 车前子化学成分与药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1233-1246.
- [9] 周炳鑫, 张雷, 李颜桃, 等. 川续断水煎液对小鼠非特异性免疫功能的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 2021, 48(5): 796-800.
- [10] 李佳丹, 周迪夷. 茯苓多糖对 db/db 小鼠肾脏保护作用及其对 p38 MAPK/PPAR- γ 信号通路的影响 [J]. 中国中医药科技, 2019, 26(3): 346-350.

- [11] 姜盈盈, 林岳. 黄柏碱改善脓毒症大鼠急性肾损伤的作用及机制研究 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2019, 25(6): 882-887.
- [12] 杨冰, 高飞, 刘令今, 等. 丹参多酚酸盐减轻糖尿病肾病小鼠肾纤维化的机制研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(5): 1018-1024.
- [13] Ling L, Chen L, Zhang C, et al. High glucose induces podocyte epithelial-to-mesenchymal transition by demethylation-mediated enhancement of MMP9 expression [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5642-5651.
- [14] Kavoura E, Gakiopoulou H, Paraskevaki H, et al. Immunohistochemical evaluation of podocalyxin expression in glomerulopathies associated with nephrotic syndrome [J]. Hum Pathol, 2011, 42(2): 227-235.
- [15] 查冬青, 陈铖, 张静静, 等. Podocalyxin 在大鼠嘌呤霉素肾病模型中的表达及其意义 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2012, 33(2): 154-157.
- [16] Perico L, Conti S, Benigni A, et al. Podocyte-actin dynamics in health and disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(11): 692-710.
- [17] 陶花, 顾乐怡. 足细胞骨架相关蛋白的调节及其在细胞生物学中的作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(7): 641-645.
- [18] 何泽云, 熊志胜, 李旭华, 等. 禾肾丸对阿霉素肾病大鼠肾脏 podocalyxin 及 α -actinin-4 蛋白表达的影响 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(10): 140-144.

[收稿日期] 2022-04-28

《中国实验动物学报》稿约

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

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgxydw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!

吴玥,魏强,张连峰,等. 比较医学大数据平台的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 57-65.

Wu Y, Wei Q, Zhang LF, et al. Establishment the comparative medicine big-data platform [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 57-65.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.008

比较医学大数据平台的建立

吴 玥, 魏 强, 张连峰, 薛 婧, 鲍琳琳, 刘江宁, 向志光, 孟爱民, 杨志伟,
高 苒, 孔 琪*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 国家人类疾病动物模型资源库, 国家卫生健康
委员会人类疾病比较医学重点实验室, 新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,
北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立国内外首个比较医学大数据平台服务系统, 为研究人员获得有效的实验动物和动物模型科学数据提供服务, 为决策者提供数据支撑, 解决研究中对于数据的获取及分析问题。**方法** 制定元数据和数据采集相关表格, 对实验动物相关数据、比较医学相关数据资源进行整合。集成大规模实验动物、动物模型、表型数据、动物实验数据, 构建基于 PHP (hypertext preprocessor) 的比较医学大数据平台。**结果** 比较医学大数据平台 (<https://com-med.org.cn/>) 基于国内外比较医学相关研究成果, 系统梳理了实验动物、动物模型和动物实验数据, 形成多维度跨时空数据比较分析结果。以比较医学科学数据为主体内容, 提供实验动物、人类疾病、比较医学、动物实验和相关产品数据。**结论** 本文建立了比较医学大数据平台, 实现了科学数据资源的统一保存及比较医学大数据的集成共享。

【关键词】 比较医学; 实验动物; 动物模型; 数据库

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0057-09

Establishment the comparative medicine big-data platform

WU Yue, WEI Qiang, ZHANG Lianfeng, XUE Jing, BAO Linlin, LIU Jiangning, XIANG Zhiguang, MENG Aimin,
YANG Zhiwei, GAO Ran, KONG Qi*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS & PUMC, National Human Diseases Animal Model Resource Center,
NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and
Reemerging Infectious Diseases, Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical
Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective Establish the first comparative medicine big-data platform at home and abroad to provide services for researchers to obtain effective scientific data on laboratory animals and animal models, provide data support for decision makers, and solve the problems of data acquisition and analysis. **Methods** Formulate metadata and data collection forms, integrate data resources related to laboratory animals and comparative medicine. Integrate large-scale laboratory animals, animal models, phenotypic data, and animal experimental data to build a PHP-based (hypertext preprocessor) comparative medicine big-data platform. **Results** Based on the research result of comparative medicine at home and abroad, the comparative medicine big-data platform systematically sorts out laboratory animals, animal models

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-034); 北京市自然科学基金资助项目 (M21027); 国家重点研发计划项目 (2021YFF0702800)。

【作者简介】 吴玥 (1993—), 女, 助理研究员, 研究方向: 比较医学数据库建设。E-mail: wuyue@cnilas.org

【通信作者】 孔琪 (1978—), 男, 研究员, 研究方向: 比较医学, 生物信息学。E-mail: kongqi@cnilas.org

and animal experimental data, and forms multi-dimensional cross-temporal comparative analysis result. Taking comparative medicine data as the main content, it provides data on laboratory animals, human diseases, comparative medicine, animal experiments and related products. **Conclusions** In this study, we established the comparative medicine big-data platform, and realized the unified preservation, the integration and sharing of comparative medicine scientific data resources.

【Keywords】 comparative medicine; laboratory animal; animal model; database

比较医学是对不同种动物(包括人)之间健康和疾病现象进行类比研究的科学。通过实验动物来研究人类各种疾病,揭示实验动物与人类正常和疾病状态之间的联系,从而了解疾病发生发展机制和规律^[1-2]。比较医学的概念在 19 世纪末最早由生物学、兽医学和医学的一些先驱者提出,并在医学领域得到发展^[3-4]。发展至今,比较医学已经成为实验动物学与兽医学、医学的交叉学科,是联系基础医学和临床医学的桥梁。随着实验动物行业快速发展,基于实验动物和动物模型产生的比较医学数据爆发式增长,积累了丰富的大数据资源。海量科学数据对包括实验动物学和比较医学在内的生命科学、医学、药学等多个科学领域带来了冲击性影响^[5-6]。

我国实验动物资源及动物模型研究缺乏成规模的资源数据库或大数据平台。建立比较医学大数据平台,对这些资源和数据进行保存,并实现有效共享,对于国内科研人员充分利用现有实验动物和比较医学大数据资源进行人类疾病研究与防治及科学性研究具有积极意义。实验动物及比较医学大数据资源的保存、利用和共享也是全球性的发展趋势。

1 材料和方法

1.1 数据来源

本平台的原始数据主要来源于中国医学科学院医学实验动物研究所自有数据,实验动物研究机构,以及已经公开发表的期刊文献、图书专著、公共数据库和研究报告等。经过专家组论证,制定元数据和数据采集相关表格,确定数据结构和数据标准。

1.2 数据收集方法

全国范围内联络实验动物行业科研机构、高等院校、行业企业等相关单位按照比较医学大数据平台数据格式要求及采集规范采集对应数据,对收集的信息进行汇总,形成从资源研制、表型分析、研究应用等可公开的实验动物/动物模型、动物实验、比较医学等科研大数据。数据管理员对提交的数据从内容、格式、完整性和质量等方面进行审核,数据管理负责人进行复审。最后交由比较医学领域专

家以会议或函审等方式审核确认后收录到数据库中进行共享,可保障数据质量。

1.3 数据库建立

比较医学大数据平台基于 B/S (browser/server) 架构进行设计开发,系统部署在 linux 操作系统,整个平台的设计基于 HTML5 内核,采用 TP5.0 框架,底层采用关系型数据库 MySQL 进行基础数据存储,使用 lvs (linux virtual server)、keepalive 实现集群高可用,保障系统的稳定性。系统采用以角色为基础的权限管理设计模型 RBAC (role-based access control),实现通过多角色对系统功能的访问控制。基于当前系统架构孵化了含有多个子库的网络平台。

1.4 访问方式

比较医学大数据平台网址: <https://com-med.org.cn/>。可公开获取,免费使用。

2 结果

2.1 比较医学大数据平台架构与内容

比较医学大数据平台系统分为四个层次:数据源层、数据抽取层、数据存储层、应用层,包括用户管理、系统监控等支撑功能(见图 1)。(1)数据源层主要包含了比较医学研究产生的各种源数据,包括实验数据,以及数据分析和共享为目的进行的数据采集、录入、整合、处理、存储、发布的过程。(2)数据抽取层主要包括内部、外部数据源到比较医学大数据平台的数据采集、传输、校验、转换、加载等几个过程。(3)数据存储层包括缓存数据库、数据仓库。(4)应用层由数据分析与数据展示两部分构成。(5)网页门户方便用户通过浏览器录入、查询、分析数据。(6)按照用户的角色,对其进行分类,进行多级权限分配与权限控制。(7)系统安全监控包括:网络监控、服务器监控、数据库监控与日志监控等。(8)提供数据备份机制,以保证全系统的稳定性和可靠性。

比较医学大数据平台包含网站首页、数据库、分析工具、比较分析、外部资源、资料中心 6 个一级栏目,对应不同的功能模块(见图 2)。首页包含全局检索功能,可输入关键词,对所有子库数据进行查询。比较医学数据库、比较医学分析工具、外部

资源的分类导航功能可引导用户浏览并跳转至对应内页。网站介绍、新闻动态、相关文献、数据库引用等信息可帮助用户快速了解网站整体情况及行

业相关动态。此外,还包含注册登录、数据提交、人类疾病动物模型、实验动物品系、基因工程动物 3 个数据集的数据下载以及全站数据统计功能。

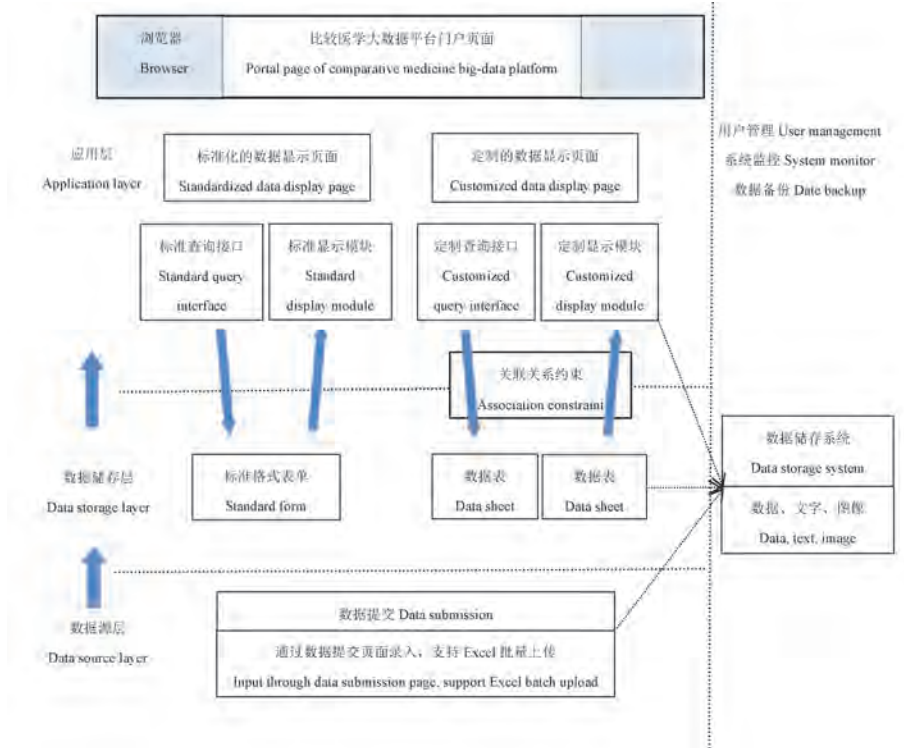


图 1 比较医学大数据平台架构

Figure 1 Framework of comparative medicine big-data platform



图 2 比较医学大数据平台首页

Figure 2 Home page of comparative medicine big-data platform

2.2 主题数据库

比较医学大数据平台的主题数据库分为八类,包括 32 个子库(见图 3),其中平台主题数据库 21 个(见表 1),通过整合比较医学相关数据资源,制定元数据和数据采集规范及相关表格,根据各子库的特点,设置了不同的字段。提供查询、显示、数据录入、数据审核等功能,为获得有效的实验动物和动物模型科学数据提供服务。外链子库 11 个,为比较医学框架体系子库。平台主题数据库通过关联的动物模型、品系、物种、微生物数据库,实现数据词条相互关联,用户可

点击查看被关联的数据。子库与字段均可以通过网站后台进行修改及扩展。

2.3 生物信息学在线工具

比较医学大数据平台“分析工具”栏目按照在线工具、比对工具、互作工具、预测工具、富集工具、作图工具集成生物信息学工具,包含分类目录、简介、工具列表,可以外链到对应工具页面。通过网站后台可以不断录入新的生物信息学分析工具,目前已收录 46 个常用的生物信息学分析工具,例如 BLAST、clustal omega、MUSCLE、JBrowse、circos 等(见图 4)。



图 3 比较医学大数据平台数据子库

Figure 3 Sub-database of comparative medicine big-data platform

表 1 比较医学大数据平台主题数据库
Table 1 Subject database of comparative medicine big-data platform

主题数据库 Subject databases	数据描述 Data description
实验动物物种数据库 Laboratory animal species database	物种名称、分类、特征描述、基因组、蛋白质组、图片、参考文献 Species name, classification, characterization, genome, proteome, picture, reference
实验动物品系数据库 Laboratory animal strain database	实验动物品系名称、种属、类别、基因型、描述、传代、外观特征、遗传特征、培育历程、相关亚系、图片、生物学特征、寿命与疾病、应用领域、饲养与繁殖、保种单位、参考文献 Strain name, species, category, genotype, description, generation, appearance features, genetic characteristics, cultivation, related substrain, picture, biological characteristics, life-span and disease, application area, breeding and reproduction, preserving unit, reference
实验动物替代数据库 Laboratory animal alternatives database	实验动物替代产品或方法的名称、类型分类、相关图片、学科范围、方法描述、性能评价、购买价格、应用领域、生产单位、供应商、提供者、参考文献 Name, type classification, related pictures, discipline scope, method description, performance evaluation, purchase price, application area, production unit, supplier, provider, reference
实验动物生物学特性数据库 Laboratory animal biological characteristics database	一般性说明、生理学性状、解剖学性状、血液学性状、血生化性状、尿生化性状、繁殖学性状、遗传学性状、免疫学性状、自发肿瘤、自发异常、饲料营养、提供者、参考文献 General description, physiological characters, anatomy characters, hematologic traits, blood biochemical characters, urinary biochemical characters, reproductive traits, genetic character, immunological character, spontaneous tumor, spontaneous anomaly, feed nutrition, provider, reference
基因工程动物数据库 Genetically engineered animal database	基因工程动物名称、基因信息、疾病名称、品系类型、制作方法、背景品系、表型特征、引物序列、应用领域、繁殖方式、保存状态、提供单位、提供者、参考文献 Name, genetic information, disease name, production type, making method, background lines, phenotypic characteristics, primer sequence, application area, mode of reproduction, save state, provide unit, provider, reference
动物实验数据库 Animal experiment database	实验名称、英文名称、实验分类、所属行业、许可证、IACUC、实验背景、实验目的、实验方法、实验动物、动物福利、操作人员、实验条件、实验结果、统计分析、主要结论、结果讨论、提供者、参考文献 Chinese name, English name, experimental classification, owned industry, licence No, IACUC approval, background, objective, method, animal strains, animal welfare, operator, facility and equipment, results, statistical analysis, conclusion, discussion, provider, reference
动物模型数据库 Animal model database	动物模型名称、物种、品系、人类疾病、传染性、微生物、类别、造模因素、制作方法、评价标准、生物学特征、医学用途、临床表现、发病过程、临床诊断、病理表现、保藏单位、参考文献 Animal model, species name, strain name, human diseases, infectivity, microorganism, category, modeling factors, making method, evaluation metrics, biological characteristics, medical use, clinical manifestation, pathogenesis process, clinical diagnosis, pathology, preservation unit, reference
比较微生物学数据库 Comparative microbiology database	微生物名称、属名、历史来源、NCBI 物种编号、分离基物、培养基、主要特征、保存方法、生物危害、实物状态、共享方式、参考文献 Microbial name, genus name, historical source, NCBI classification number, isolated base, culture medium, main features, save method, biological hazard, physical state, sharing mode, reference
比较生理学数据库 Comparative pathology database	实验动物名称、疾病名称、性别、年龄、体重、体温、总血量、全血比重、收缩压等信息数据 Laboratory animal, disease name, gender, age, weight, temperature, total blood, volume, whole blood specific gravity, systolic pressure
比较生物化学数据库 Comparative biochemical database	实验动物名称、疾病名称、总胆红素、间接胆红素、直接胆红素、尿素氮、肌酐(血清)、肌酸、尿酸等信息数据 Laboratory animal, disease name, total bilirubin, indirect bilirubin, direct bilirubin, urea nitrogen, creatinine (serum), creatine uric acid, uric acid
比较病理学数据库 Comparative pathology database	动物模型名称、疾病名称、病理图、病理特征、参考文献 Animal model, disease name, category pathologic map, pathologic feature, reference
比较影像学数据库 Comparative imageology database	动物模型名称、疾病名称、影像类型、影像、影像特征说明、参考文献 Animal model, disease name, image type, image, image feature description, reference
比较解剖学数据库 Comparative anatomy database	实验动物名称、一般性说明、大体解剖、脏器重量、骨骼系统、消化系统、呼吸系统、淋巴系统、循环系统、神经系统、生殖系统、内分泌系统、提供者、参考文献 Laboratory animal, general description, gross anatomy, viscera weight, skeletal system, digestive system, respiratory system, lymphatic system, circulatory system, nervous system, reproductive system, endocrine system, provider, reference

续表 1

主题数据库 Subject databases	数据描述 Data description
比较行为学数据库 Comparative behavioral database	动物模型名称、疾病名称、实验装置、实验原理、实验方法、评价方法、评价指标、行为表现、应用、提供者、参考文献 Animal model, disease name, experimental devices, experimental principles, experimental methods, evaluation methods, evaluating indicator, behavior performance, application, provider, reference
比较疾病学数据库 Comparative medicine of human disease database	人类疾病名称、别名、类别、ICD-11 编号、OMIM 编号、MeSH 编号、DO 编号、传染病、微生物、概述、流行病学、病因、发病机制、临床表现、临床分期、并发症、临床诊断、参考文献 Name of human disease, alias name, category, ICD-11 number, OMIM Number, MeSH number, DO number, infectious diseases, microorganism, summary, epidemiology, pathogeny, pathogenesis, clinical sign, clinical stages, complication, clinical diagnosis, reference
比较基因与表型学数据库 Comparative gene and phenotype database	基因名称、基因编号、其它名称、物种、图谱定位、表型分析、GO 分析、Pathway 分析、参考文献 Gene name, gene number, other name, species, map location, phenotype analysis, GO analysis, Pathway analysis, reference
比较医学文献数据库 Comparative medicine literature database	文献名、PMID 编号、作者、中文摘要、英文摘要、关键词、发表杂志、发表年份 Literature name, PMID number, author, abstract in Chinese, abstract in English, keyword, journal, year
比较免疫学数据库 Comparative immunology database	实验动物名称、疾病名称、免疫器官、免疫细胞、免疫球蛋白、细胞因子、抗体、参考文献 Laboratory animal, disease name, immune organ, immune cells, immunoglobulin, cytokine, antibody, reference
实验动物技术数据库 Laboratory animal technology database	实验技术名称、技术原理、技术方法、操作示例、技术应用、成果展示、注意事项、参考文献 Technical name, technical principle, technical method, operation example, application technology, results show, matters needing attention, reference
实验动物产品数据库 Laboratory animal product database	产品名称、英文名称、产品分类、产地/品牌、产品规格、功能介绍、制作方法、产品标准、性能参数、应用领域、生产单位、经销商、参考报价、提供者、参考文献 Product name, English name, product classification, origin/brand, product specifications, function introduction, making method, product standards, performance parameter, application area, production unit, distributor, reference quotation, provider, reference
实验动物设施数据库 Laboratory animal facility database	动物相关设施名称、设施类别、设施地址、所属行业、许可证、许可范围、设施介绍、设施管理、业务范围、实验动物、资源供应、技术规范、设施设备、科技成果、使用人员、提供者、参考文献 Facility name, facility category, facility address, owned industry, licence No, permission scope, introduction of facilities, facility management, scope of business, animal strains, resources, technical specifications, facility equipment, achievements, personnel provider, reference



图 4 比较医学大数据平台生物信息学工具

Figure 4 Bioinformatics tools of comparative medicine big-data platform

2.4 基于动物模型数据的比较分析

比较医学大数据平台以动物模型数据库为核心,提供指定“动物模型”的同类数据比较功能,可通过输入动物模型全称、动物模型的物种或品系、动物模型类别、动物模型涉及的微生物名称进行检索并选择动物模型(最多可选择 10 条),调取比较生理、比较生化、比较病理、比较影像、比较行为、比较解剖 6 个子库的数据,提供对动物模型生理学、生物化学、病理学、影像学、解剖学、行为学层面的比较分析。将同类型数据在一个页面以多列的形式进行比较,每种属性一行,比较结果相同数据显示红色,不同则显示黑色。例如可以检索并选择“PDGF- α -SynucleinA53T 转基因小鼠帕金森模型”

与“单侧纹状体注射 6-OHDA 诱导帕金森小鼠模型”,选择“比较行为学数据库”,将两个模型的行为学数据进行比较分析,生成分析结果(见图 5)。

2.5 外部资源

比较医学大数据平台“外部资源”栏目按照基因组学数据库(genome database)、基因表达数据库(gene expression database)、转录组学数据库(transcriptomics database)、蛋白组学数据库(proteomics database)、蛋白互作数据库(protein interaction database)、代谢组学数据库(metabonomics database)、实验动物资源数据库(laboratory animal resource database)、人类疾病数据库(human disease database)的分类汇总已建立的公

当前位置: 首页 > 比较分析

比较分析 comparative analysis

比较医学大数据平台提供对动物模型生理学、生物化学、病理学、解剖学、行为学层面的比较分析功能,对动物模型发生发展过程的异同进行比较,生成比较生理、比较生化、比较病理、比较影像、比较解剖学、比较行为学等方面数据。

操作步骤:

1. 选择动物模型(最多可选择 10 条);
2. 选择数据库(可从比较生理学、比较生物化学、比较病理学、比较解剖学、比较行为学数据库中进行单选或多选);
3. 点击“比较分析”,显示分析结果。

请选择动物模型 Please select an animal model

PDGF- α -SynucleinA53T 转基因小鼠帕金森模型

搜索 Search

中文名称 Chinese name	物种 Species name	品系 Strain name	微生物 Microorganism	类别 Category	保存单位 Preservation unit
☐ PDGF- α -SynucleinA53T 转基因小鼠帕金森模型	小鼠	C57BL/6J 小鼠		转基因小鼠模型	中国医学科学院实验动物研究所

上一页 1 下一页

比较行为学数据库 Comparative Behavioral Database

编号 Number	疾病动物模型 Animal model of diseases	疾病名称 Name of human disease	中文名称 Chinese name	英文名称 English name	评价方法 Evaluation methods	实验方法 Experimental methods	评价指标 Evaluating indicator	行为表现 Behavior performance	应用 Application	
CMBP-BE-000003	单侧纹状体注射 6-OHDA 诱导帕金森小鼠模型	帕金森氏病	单侧纹状体注射 6-OHDA 诱导帕金森小鼠模型	Unilateral striatal injection of 6-OHDA induced Parkinson's disease mice model	圆棍实验, 平衡木实验	圆棍实验: 将圆棍放在工作台上, 将一圆棍子垂直放在圆棍前面的墙上, 小鼠面对圆棍子时, 也可以通过圆棍子看到并量化小鼠的活动。将小鼠放入圆棍, 录像 3 分钟, 并分析小鼠站立次数、前肢活动、碰触次数。为了进一步评价小鼠的运动功能, 进行平衡木实验。将 3 只小鼠放在圆棍等距放在实验台上, 连接 4 个不同宽度的平衡木(从最宽至最窄部分), 将连接的平衡木放在空鼠台上。将实验小鼠的窄端(内放圆棍)放置在平衡木最窄端。在平衡木上放置圆棍, 小鼠在圆棍上行走, 穿越平衡木。记录并分析小鼠的爪子落在圆棍内或圆棍外面的错误次数, 计算错误百分率。	圆棍实验: 站立次数	圆棍实验显示, 6-OHDA 小鼠模型圆棍次数增加; 模型小鼠站立次数减少, 右前肢碰触圆棍次数增加, 左前肢碰触圆棍次数减少; 向右转圆棍次数增加, 向左转圆棍碰触圆棍次数减少; 平衡木实验显示, 模型圆棍碰触圆棍次数增加, 穿越平衡木总时间延长。	平衡木实验: 穿越平衡木总时间, 圆棍实验圆棍次数: 站立次数	用于帕金森病理机制研究及药物研发
CMBP-BE-000007	PDGF- α -SynucleinA53T 转基因小鼠帕金森模型	帕金森氏病	PDGF- α -SynucleinA53T 转基因小鼠帕金森模型	PDGF- α -SynucleinA53T transgenic mouse model of Parkinson's disease	Rotating rod 实验	分别取 2 月、4 月和 7 月龄 SYN-A53T 及同窝阴性对照小鼠, 每组 12 只, 测试小鼠在圆棍上停留的时间。	协同能力, 运动能力	2 月龄开始出现行为改变但尚不明显, 4 月龄时较阴性对照小鼠表现出协同能力差, 运动能力下降。在圆棍上可停留的时间明显短于对照小鼠。7 月龄时运动能力下降更加明显, 与阴性对照小鼠相比下降了 45.4%。	帕金森氏病的发病机制, 帕金森氏病药物疗效评价, 活性筛选等相关研究。	

图 5 比较医学大数据平台比较分析功能

Figure 5 Comparative analysis function of comparative medicine big-data platform

共数据库。数据库目录列表内容包括:数据库名称、标签、介绍、关键词、网址,可以外链到对应数据库。左侧为数据库分类导航栏,右侧为数据库浏览列表,点击列表可打开相应详情页,查看对应数据库详细信息及相关的其他数据库;可通过标题、关键词、介绍进行检索,通过网站后台可以添加新的分类并且不断录入新的数据库,目前已收录 122 个公共数据库信息(见图 6)。

3 讨论

科学数据是当代传播速度最快、影响面最宽、开发利用潜力最大的战略性、基础性科技资源。科技创新越来越依赖于大量、系统、高可信度的科学数据。国务院在 2015 年发布了《促进大数据发展行动纲要》(国发〔2015〕50 号)^[7]。2018 年 3 月国务院办公厅发布了《科学数据管理办法》(国办发〔2018〕17 号)^[8]。国家科技部据此设立了科学数据共享平台,启动了“云计算和大数据”、“高性能计算”等重点专项。国家卫健委科教司在 2019 年 5 月发布了《医疗卫生机构卫生健康科学数据管理办法(征求意见稿)》,并指定中国医学科学院建立科学

数据中心^[9]。在此背景下,我们于 2015 年建立了比较医学大数据平台,并于 2020 年改版升级。

欧美等发达国家高度重视实验动物及人类疾病动物模型相关科学研究,建立了多个实验动物数据库以及资源平台^[10],例如美国 Jackson 实验室的小鼠遗传资源库(MGI)、小鼠表型数据库(MPD)、基因表达数据库(GXD)、小鼠肿瘤生物学数据库(MTB)、动物模型与人类疾病关联数据库(LAMHDI)等。美国密苏里大学的大鼠基因组数据库(RGD)。英国有“啮齿类基因组数据库”、“小鼠细胞遗传图谱”、“畸形人鼠同源性数据库”,以及欧洲小鼠突变资源库等,对实验动物品系资源及相关研究数据进行共享^[11]。

国内建立了啮齿类等 6 个实验动物资源库和国家人类疾病动物模型资源库^[12],也建立了实验动物资源数据库等少量的数据库^[13]。作者所在单位已建立了实验动物品系数据库、基因工程大鼠资源库。但是缺乏大规模动物模型、动物实验及比较医学相关数据,无法满足实验动物研究人员多层次全方位的实际需求^[14-16]。

我们建立了一个统一的比较医学大数据平台,



图 6 比较医学大数据平台外部资源栏目

Figure 6 External resources of comparative medicine big-data platform

实现了数据库、常规统计分析以及科学研究三者间的有机结合。进行人类疾病动物模型与相关比较医学数据的收集、处理和分析研究。有效整合来自研究所及相关单位的各种实验动物资源、疾病动物模型与比较医学相关数据,实现了比较医学相关科学数据资源的集成共享以及不同数据库的分级管理。弥补了我国在人类疾病动物模型资源供应和相关技术服务方面的劣势,为疾病的科学研究提供便利,对国内科研人员充分利用现有实验动物和比较医学大数据资源进行科学创新性研究具有积极意义。

通过调动各机构分散的动物模型资源,化零为整,实现了国内分散的疾病动物模型研究资源的整合和信息化。汇聚国内外的比较医学相关数据资源,围绕我国疾病动物模型发病机制、疾病诊断、治疗药物靶点、重大新药创制、疾病防治等领域的研究,进行实验动物资源、动物模型表型数据的集成,提供高水平的疾病动物模型资源支撑。解决临床医院、药物研究、基础研究等方面对实验动物与动物模型数据的共享、查询及分析问题。

世界上尚无比较医学相关的大数据平台。本研究建立的比较医学大数据平台,通过数据集中,满足不同层次、不同研究目的的需求。解决医学动物实验和临床医学研究结果数据存储和比较分析的科学问题,进而促进人类疾病基础医学、转化医学和临床医学研究,增强生物医药创新能力,最终提高我国生物医药领域的整体研究水平。研究者可以根据数据库中已有的实验方案和实验指标对实验进行优化,如选用合适的实验动物种类及品系、年龄、性别、规格、质量标准,采用适当的分组方法,选择科学、可靠的检测技术指标等,从而对实验方案进行优化^[17]。

比较医学大数据平台可服务于人类疾病动物模型资源制作、模型分析、药效学评价等相关的生物医药产业,为我国乃至全世界的生物医药研发服务,抢占较大的国内市场份额和一定的国际市场份额,产生巨大的经济效益。平台支撑的生物医药产业,将促进创新药物的产生,使我国具有自主知识产权的创新药物通过国际标准的平台评价,获得国际话语权,带动生物医药产业的进步,具有不可估量的经济贡献。

今后会将比较医学大数据平台的支撑能力不断放大,形成基于人类疾病动物模型大数据的支撑

性科学数据平台。基于比较医学大数据,智能预测动物模型可能产生的表型,揭示动物模型与人类正常和疾病状态之间的联系,根据医学问题研究需要进行动物模型选择或研制,为医药领域科技规划的实现、人口健康领域研究目标的顺利完成提供疾病动物模型资源保障。感谢中国医学科学院医学实验动物研究所秦川教授提出建立数据库并指导数据库完善。

参考文献:

- [1] Macy J, Horvath TL. Comparative medicine: an inclusive crossover discipline [J]. *Yale J Biol Med*, 2017, 90(3): 493-498.
- [2] 贺争鸣, 李冠民, 荣瑞章, 等. 我国比较医学研究的开创、发展及在现代医学科学发展中的意义和作用 [J]. *实验动物与比较医学*, 2019, 39(2): 90-93.
- [3] 施新猷. 比较医学 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社; 2003.
- [4] Mobasher A. Comparative medicine in the twenty-first century: where are we now and where do we go from here? [J]. *Front Vet Sci*, 2015, 2: 2.
- [5] 孔琪. 中国实验动物行业发展现状调查研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(5): 19-22.
- [6] 孔琪, 李继平, 赵永坤. 实验动物资源是生物医药产业创新的重要支撑条件 [J]. *科技导报*, 2016, 34(11): 12-13.
- [7] 杨凯. 《促进大数据发展行动纲要》印发, 大数据迎接产业化布局 and 战略抉择 [J]. *华东科技*, 2015, 10: 24-26.
- [8] 张保钢. 国务院办公厅印发《科学数据管理办法》[J]. *北京测绘*, 2018, 32(5): 577.
- [9] 赵安琪, 付少雄, 冯亚飞. 国外健康科学数据管理实践及启示 [J]. *图书情报知识*, 2020, 1: 105-114.
- [10] 孔琪, 夏霞宇, 赵永坤. 美国实验动物品种资源现状分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(5): 539-542.
- [11] 孔琪, 夏霞宇, 秦川. 实验动物品系数据库的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(4): 78-83.
- [12] 李会萍. 实验动物生物学特性数据库管理系统 [D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- [13] 黄红坤, 唐小江, 严家荣, 等. 人类疾病动物模型资源数据库的构建 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31(4): 36-40.
- [14] 黄韧, 薛成, 程树军, 等. 实验动物信息学与中国实验动物数据信息网建设 [J]. *中国实验动物学杂志*, 2000, 10(3): 189-192.
- [15] 赵心刚, 卢凡, 程革, 等. 我国实验动物资源建设的问题与展望 [J]. *中国科学院院刊*, 2019, 34(12): 1371-1378.
- [16] 贺争鸣, 李冠民, 李根平, 等. 浅谈我国实验动物资源共享 [J]. *实验动物与比较医学*, 2007, 27(3): 208-210, 214.
- [17] MacArthur Clark J. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement [J]. *Br J Nutr*, 2018, 120(1): S1-S7.

[收稿日期] 2022-02-25

杨非,姚文环,李慧,等. 银耳多糖的急性毒性、遗传毒性和亚慢性毒性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 66-76,102.

Yang F, Yao WH, Li H, et al. Study of acute toxicity, genetic toxicity and subchronic toxicity of *Tremella polysaccharide* [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 66-76,102.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.009

银耳多糖的急性毒性、遗传毒性和亚慢性毒性研究

杨 非¹,姚文环¹,李 慧¹,张 静¹,唐 慧¹,吕实波¹,郭婕¹,孙劲靖²,
陆 震³,程 东^{1*}

(1.山东省疾病预防控制中心,济南 250014;2.山东华熙海御生物医药有限公司,济南 250000;

3.华熙生物科技股份有限公司,济南 250000)

【摘要】 目的 研究银耳多糖的急性毒性、遗传毒性及亚慢性毒性,为银耳多糖开发利用提供科学数据。**方法** 依据食品安全国家标准,对银耳多糖进行急性经口毒性试验、三项遗传毒性试验和 90 d 经口毒性试验。**结果** 小鼠急性经口 $LD_{50} > 12.0 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{bw})$,属实际无毒级;三项遗传毒性试验结果均为阴性;大鼠 90 d 经口毒性实验中,各剂量组动物生长发育良好,体重、增重、进食量、食物利用率、血液学、血生化、尿常规、脏器湿重及脏/体比等指标与阴性对照组比较均无显著性差异 ($P > 0.05$),组织病理学观察未见与试验因素有关的变化,确定该银耳多糖最大未观察到有害作用剂量 (NOAEL) 为:雄性动物为 $7.21 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{bw})$,雌性动物为 $8.18 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{bw})$ 。**结论** 在本次条件下,银耳多糖未见急性毒性、遗传毒性及亚慢性毒性。

【关键词】 银耳多糖;急性毒性;遗传毒性;亚慢性毒性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0066-11

Study of acute toxicity, genetic toxicity and subchronic toxicity of *Tremella polysaccharide*

YANG Fei¹, YAO Wenhuan¹, LI Hui¹, ZHANG Jing¹, TANG Hui¹, LYU Shibo¹, GUO Jie¹, SUN Shaojing², LU Zhen³,
CHENG Dong^{1*}

(1. Shandong Provincial Center for Disease Prevention and Control, Jinan 250014, China.

2. Shandong Huaxi Haiyu Biomedical Co., LTD., Jinan 250000. 3. Huaxi Biotechnology Co., LTD., Jinan 250000)

【Abstract】 Objective To study the acute toxicity, genetic toxicity and subchronic toxicity of *Tremella polysaccharide* and to provide scientific bases for its safe application. **Methods** Acute oral toxicity, genetic toxicity, and 90 days oral toxicity tests were performed following the national standards of food safety. **Results** The LD_{50} of *Tremella polysaccharide* was more than $12.0 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{bw})$, and *Tremella polysaccharide* was a non-toxic substance. The result of the three genotoxicity tests were negative. In the subchronic toxicity test, compared with the negative control group, there were no significant differences ($P > 0.05$) in bw, weight gain, food intake, food utilization rate, hematological indexes, blood biochemical indexes, urine routine, organ weight, or organ coefficients. Histopathological observations showed no changes related to test factors. The no observed adverse effect level (NOAEL) of *Tremella polysaccharide* was $7.21 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{bw})$ for males and $8.18 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{bw})$ for females. **Conclusions** No evidence for acute toxicity, genetic toxicity, or subchronic toxicity was observed in this *Tremella polysaccharide* study.

【Keywords】 *Tremella polysaccharide*; acute toxicity; genetic toxicity; subchronic toxicity

[作者简介] 杨非 (1975—),女,主管技师,研究方向:安全性评价与毒理学研究。E-mail: yf2002zhx@163.com

[通信作者] 程东 (1975—),男,硕士,主任技师,研究方向:安全性评价与毒理学研究。E-mail: sdchd@aliyun.com

银耳为担子菌门真菌银耳的子实体,又称白木耳、雪耳。中国食用银耳历史悠久,可追溯到南北朝时期。银耳多糖(*Tremella polysaccharide*)是银耳的主要组成和活性成分,其种类较多,主要包括酸性、中性杂多糖、胞壁、胞外多糖、酸性低聚糖等五大类。目前,关于银耳多糖的研究主要集中在提取技术、多糖结构种类、保健作用方面,如调节机体免疫力、抗肿瘤、抗氧化、抗辐射、抗衰老、提高记忆力、皮肤保湿等^[1-16],而关于银耳多糖的食用安全性的毒理学资料极少。为此我们选用华熙生物科技股份有限公司从银耳孢子经发酵等环节获得的银耳多糖为研究对象,依照食品安全国家标准要求,进行急性经口毒性试验、遗传毒性试验和大鼠 90 d 经口毒性试验^[17-21]等毒理学试验,为初步确定银耳多糖的食用安全性,并为其开发利用提供基础毒理学资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

本研究均使用 SPF 级动物。90 d 经口毒性试验:SD 大鼠 140 只雌雄各半,体重 63~85 g,急性经口毒性试验:ICR 小鼠 20 只雌雄各半,体重 18.1~22.0 g,均来源于济南朋悦实验动物繁育有限公司[SCXK(鲁)2019-0003];哺乳动物红细胞微核试验:ICR 小鼠 50 只雌雄各半,体重 25.0~35.0 g,小鼠精原细胞染色体畸变试验:ICR 雄性小鼠 30 只,体重 31.0~34.0 g,均来源于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006]。动物均饲养于山东省疾病预防控制中心屏障环境[SYXK(鲁)2018-0014],实验动物饲料来源于北京华阜康生物科技股份有限公司。本次实验经山东省疾病预防控制中心实验动物伦理委员会批准(A20210312-2),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 菌株

组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌菌株购自上海宝录生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

银耳多糖,黄褐色粉末,由华熙生物科技股份有限公司提供,总糖含量 $\geq 61\%$,蛋白质含量为 $\geq 6.2\%$ 。

S9 混合液,上海宝录生物科技有限公司提供;

血液学试剂,SYSMEX 公司提供;血生化试剂,SIEMENS 公司提供。

CX21 生物显微镜,奥林巴斯公司提供;XN-1000 全自动血细胞分析仪,希思美康公司提供;Dimension Xpandplus 全自动生化分析仪,美国西门子子公司提供;CombiScan500 全自动尿液分析仪,Combi 公司提供;Coatron 3000 全自动血凝仪,TECO 公司提供;Multifuge 3plus 离心机, Heraeus 公司提供;病理设备,LEICA 公司提供;检眼镜,兰羚公司提供;电子天平,梅特勒-托利多公司提供等。

1.3 实验方法

1.3.1 急性经口毒性试验

按照限量法试验进行。受试物最大灌胃浓度为 100 mg/mL,按 0.4 mL/10 g 体重(bw),一日内 3 次进行经口灌胃(ig),每次间隔 4 h,合并一次剂量为 12.0 g/(kg·bw),观察动物一般表现并记录,持续 14 d。

1.3.2 细菌回复突变试验

考虑受试物对菌株的毒性和溶解度,最高剂量设置为每皿 5 mg,按等比组距原则下设 4 个剂量组(每皿 8、40、200、1000 μ g)和 4 个对照组(自发回变、溶剂对照、DMSO 对照组和阳性对照组)。分别在加/不加 S9 条件下用平板掺入法进行两次试验。

1.3.3 哺乳动物红细胞微核试验

受试物最大灌胃浓度为 100 mg/mL,按 0.2 mL/(kg·bw)灌胃,高剂量组为 2.0 g/(kg·bw),按 2 倍组距下设 2 个剂量组[即 1.0、0.5 g/(kg·bw)]。另设纯化水组和环磷酰胺组(40 mg/(kg·bw))。受试物按 0.2 mL/10 (g·bw)间隔 24 h 两次 ig 给予。第二次 ig 后 6 h 采集胸骨骨髓,制片。每只动物至少观察 200 个红细胞(RBC),同时计数嗜多染红细胞(PCE)在总红细胞中的比例。每只动物至少观察 2000 个 PCE,计数有微核的 PCE 频率。

1.3.4 精原细胞染色体畸变试验

受试物最大灌胃浓度为 100 mg/mL,按 0.2 mL/(kg·bw)灌胃,1 日内两次进行 ig(间隔 6 h),高剂量组为 4.0 g/(kg·bw),按 2 倍组距下设 2 个剂量组(即 2.0、1.0 g/(kg·bw))。另设纯化水对照组和环磷酰胺对照组(40 mg/(kg·bw),单次 ip)。高剂量组于末次 ig 后的第 24 h 和第 48 h 处死动物采样,其余各组动物于末次 ig 后第 24 h 处死动物采样。处死动物前 5 h,ip 秋水仙素(4 mg/(kg·bw))。常规制片。每只动物镜检 1000 个细胞以确定精原细胞有丝分裂指数。每只动物计数 100 个

中期分裂相细胞,记录每个中期分裂相细胞的畸变类型和数量,计算染色体畸变细胞率。

1.3.5 90 d 经口毒性试验

(1) 剂量选择与受试物给予方式

剂量组:大鼠 100 只,随机分为 5 组,每组 20 只,雌雄各半。根据《食品安全国家标准 90 d 经口毒性试验》要求设计试验剂量:大鼠每日摄食量按体重 8% 折算,受试物最高可掺入饲料比例为质量分数 10%,动物摄入剂量可达到 8.00 g/(kg·bw),以此为高剂量组。下设三个剂量,分别为 4.00、2.00、1.00 g/(kg·bw)。所有剂量组调整饲料配方,加酪蛋白使蛋白含量与对照组一致(蛋白含量约 19%)。卫星组:设卫星对照组和卫星 8.00 g/(kg·bw) 剂量组,每组 10 只,雌雄各 5 只,卫星对照组给予基础饲料,卫星 8.00 g/(kg·bw) 剂量组给予受试物高剂量组饲料。于试验第 45 天(试验中期)和停止给予受试物后(恢复期) 28 d 处死取材。

(2) 方法

每天观察大鼠一般表现,每周记录大鼠摄食量、体重。试验前和试验结束时,对高剂量组和对照组大鼠进行眼部检查(角膜、结膜、虹膜和晶状体);试验中期、试验结束、恢复期结束血液学检查、生化血检查和尿液检查。试验结束,麻醉解剖大鼠,称心脏、肝、肾、脾、胸腺、肾上腺、脑、睾丸、附睾、卵巢和子宫的绝对重量,计算脏/体比值和脏器

组织病理学检查。

1.4 统计学方法

统计学处理用 SPSS 22.0 软件进行分析,结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示。计量资料用方差分析、计数资料用卡方检验和 Poisson 分布进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果

2.1 急性经口毒性试验

各组小鼠饮水进食正常,未见中毒症状,体重逐日增加,14 d 内无死亡。结果显示雌雄小鼠的 LD_{50} 均大于 12.0 g/(kg·bw),属实际无毒级。

2.2 细菌回复突变试验

两次试验中受试物各剂量组回变菌落数均未大于自发回变菌落数的 2 倍,亦无剂量-反应关系,说明在加与不加 S9 时该受试物对五株试验菌株均未呈现遗传毒性(见表 1、表 2)。

2.3 哺乳动物红细胞微核试验

如表 3 所示,与阴性对照组比较,银耳多糖各剂量组对雌雄小鼠的含微核细胞率无统计学意义($P > 0.05$),结果为阴性。

2.4 小鼠精原细胞染色体畸变试验

如表 4、表 5 所示,与阴性对照组比较,银耳多糖各剂量组对小鼠的染色体畸变细胞率无统计学意义($P > 0.05$),结果为阴性。

表 1 细菌回复突变试验结果($\bar{x} \pm s$, 第一次)

Table 1 Results of bacterial reverse mutation test ($\bar{x} \pm s$, First time)

每皿剂量(μg) Dose	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
8	129±13.6	148±13.1	35±5.3	36±3.6	137±13.1	142±17.8	253±7.0	263±11.5	15±3.1	21±3.1
40	134±15.6	129±13.5	32±2.5	33±1.2	141±18.1	137±22.0	253±10.5	264±16.0	16±4.2	26±3.2
200	125±19.5	134±6.4	33±2.0	34±3.1	137±15.0	140±13.1	252±8.1	265±13.8	17±1.2	20±5.5
1000	119±7.9	135±25.0	35±3.6	34±4.0	146±18.4	133±4.5	253±14.0	271±9.5	18±3.8	19±1.5
5000	126±9.3	127±13.8	35±4.7	34±5.9	137±8.4	140±15.4	258±15.1	273±13.7	18±4.6	21±6.2
自发回变 Spontaneous mutation	121±12.5	136±12.2	33±2.0	38±1.5	133±5.5	138±12.3	258±13.1	268±13.5	18±2.1	23±3.8
溶剂对照 Solvent control	139±25.7	129±7.1	34±2.5	34±4.0	140±12.2	139±13.6	262±5.0	272±10.6	19±3.1	19±4.9
二甲基亚砷 DMSO control	126±5.9	127±33.3	33±2.1	35±3.6	146±4.0	141±10.1	260±4.9	257±14.0	19±6.6	22±5.0
阳性对照 Positive control	1953± 99.1 ⁽¹⁾	950± 73.5 ⁽²⁾	1159± 74.3 ⁽¹⁾	1989± 65.0 ⁽²⁾	959± 118.9 ⁽³⁾	1020± 222.0 ⁽²⁾	1978± 24.2 ⁽³⁾	944± 95.3 ⁽⁴⁾	377± 40.1 ⁽⁵⁾	424± 71.1 ⁽⁶⁾

注:(1):敌克松,每皿 50 μg ;(2):2-氨基芴,每皿 10 μg ;(3):甲基磺酸甲酯,每皿 0.5 μL ;(4):1,8-二羟基蒽醌,每皿 50 μg ;(5):叠氮钠,每皿 0.25 μg ;(6):2-氨基蒽,每皿 1 μg 。

Note. (1), Dioxone, 50 μg per dish. (2), 2-aminofluorene, 10 μg per dish. (3), Methyl sulfonic acid, 0.5 μL per dish. (4), 1, 8-dihydroxyanthraquinone, 50 μg per dish. (5), Sodium azide, 0.25 μg per dish. (6), 2-aminoanthracene, 1 μg per dish.

表 2 细菌回复突变试验结果($\bar{x}\pm s$,第二次)
Table 2 Results of bacterial reverse mutation test($\bar{x}\pm s$, Second time)

每皿剂量(μg) Dose	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
8	120 $\pm$ 12.0	121 $\pm$ 15.3	38 $\pm$ 5.8	36 $\pm$ 5.6	130 $\pm$ 3.5	135 $\pm$ 9.8	251 $\pm$ 11.2	274 $\pm$ 19.5	17 $\pm$ 5.0	17 $\pm$ 4.7
40	122 $\pm$ 15.5	125 $\pm$ 8.2	36 $\pm$ 5.7	34 $\pm$ 6.4	137 $\pm$ 11.9	134 $\pm$ 9.1	269 $\pm$ 19.1	256 $\pm$ 17.8	19 $\pm$ 5.6	20 $\pm$ 9.6
200	128 $\pm$ 8.4	138 $\pm$ 3.5	35 $\pm$ 4.7	38 $\pm$ 4.0	132 $\pm$ 3.2	138 $\pm$ 12.0	260 $\pm$ 20.1	268 $\pm$ 19.0	17 $\pm$ 4.5	16 $\pm$ 4.6
1000	114 $\pm$ 8.2	111 $\pm$ 17.0	36 $\pm$ 4.6	37 $\pm$ 5.5	132 $\pm$ 11.0	140 $\pm$ 4.9	256 $\pm$ 8.5	266 $\pm$ 12.2	21 $\pm$ 5.5	19 $\pm$ 5.1
5000	106 $\pm$ 6.5	133 $\pm$ 23.6	36 $\pm$ 1.5	36 $\pm$ 6.7	127 $\pm$ 8.9	132 $\pm$ 8.5	266 $\pm$ 20.6	286 $\pm$ 12.7	18 $\pm$ 8.7	21 $\pm$ 5.6
自发回变 Spontaneous mutation	115 $\pm$ 16.5	140 $\pm$ 21.5	36 $\pm$ 5.5	35 $\pm$ 4.6	133 $\pm$ 11.5	137 $\pm$ 13.4	267 $\pm$ 18.5	265 $\pm$ 11.9	18 $\pm$ 6.1	18 $\pm$ 2.1
溶剂对照 Solvent control	112 $\pm$ 12.7	124 $\pm$ 9.2	38 $\pm$ 1.7	39 $\pm$ 2.3	129 $\pm$ 4.2	133 $\pm$ 8.7	266 $\pm$ 19.5	257 $\pm$ 17.6	20 $\pm$ 5.3	18 $\pm$ 7.2
二甲基亚砷 DMSO control	117 $\pm$ 22.5	126 $\pm$ 21.5	39 $\pm$ 5.7	38 $\pm$ 3.1	146 $\pm$ 27.4	149 $\pm$ 9.0	264 $\pm$ 21.1	264 $\pm$ 11.7	19 $\pm$ 3.1	18 $\pm$ 2.1
阳性对照 Positive control	1962 $\pm$	932 $\pm$	921 $\pm$	1921 $\pm$	1054 $\pm$	982 $\pm$	1953 $\pm$	1073 $\pm$	361 $\pm$	426 $\pm$
	115.1 ⁽¹⁾	107.2 ⁽²⁾	36.3 ⁽¹⁾	50.0 ⁽²⁾	211.1 ⁽³⁾	137.2 ⁽²⁾	69.5 ⁽³⁾	85.9 ⁽⁴⁾	24.2 ⁽⁵⁾	65.2 ⁽⁶⁾

注:(1):敌克松,每皿 50 μg ; (2):2-氨基芴,每皿 10 μg ; (3):甲基磺酸甲酯,每皿 0.5 μL ; (4):1,8-二羟基蒽醌,每皿 50 μg ; (5):叠氮钠,每皿 0.25 μg ; (6):2-氨基蒽,每皿 1 μg 。

Note. (1), Dioxone, 50 μg per dish. (2), 2-aminofluorene, 10 μg per dish. (3), Methyl sulfonic acid, 0.5 μL per dish. (4), 1, 8-dihydroxyanthraquinone, 50 μg per dish. (5), Sodium azide, 0.25 μg per dish. (6), 2-aminoanthracene, 1 μg per dish.

表 3 小鼠哺乳动物红细胞微核试验($n=5$)
Table 3 Results of mammalian erythrocyte micromucleus test

性别 Sex	剂量($\text{kg}\cdot\text{bw}$) Dose	检查细胞数(个) Number of observed cell(n)	含微核细胞数(个) Number of MN cell(n)	含微核细胞率 ($\bar{x}\pm s, \%$) Rate	PCE/(PCE+NCE)
雄 Male	0.50	10000	20	2.0 $\pm$ 1.27	0.54 $\pm$ 0.04
	1.00	10000	22	2.2 $\pm$ 0.91	0.55 $\pm$ 0.05
	2.00	10000	18	1.8 $\pm$ 0.76	0.57 $\pm$ 0.05
	阴性对照组 Negative control group	10000	20	2.0 $\pm$ 0.79	0.57 $\pm$ 0.05
	阳性对照组 Positive control group	10000	232	23.2 $\pm$ 3.17**	0.53 $\pm$ 0.08
	0.50	10000	20	2.0 $\pm$ 1.46	0.57 $\pm$ 0.05
雌 Female	1.00	10000	18	1.8 $\pm$ 1.20	0.54 $\pm$ 0.06
	2.00	10000	20	2.0 $\pm$ 0.79	0.58 $\pm$ 0.05
	阴性对照组 Negative control group	10000	17	1.7 $\pm$ 1.15	0.56 $\pm$ 0.03
	阳性对照组 Positive control group	10000	210	21.5 $\pm$ 7.25**	0.54 $\pm$ 0.08

注:与阴性对照组比较, ** $P<0.01$

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

表 4 小鼠精原细胞染色体畸变试验结果(个,%)
Table 4 Results of mouse spermatogonial chromosomal aberration test($n, \%$)

剂量($\text{kg}\cdot\text{bw}$) Dose	断裂 Break	断片 Fragment	微小体 Micio body	无着丝点环 Acentric ring	环状染色体 Circular chromosom	双或多着丝点染色体 Double or multiple centromeric chromosom	单体交换 Exchange
1.00(24 h)	14(87.50)	0(0)	1(6.25)	0(0)	0(0)	0(0)	1(6.2)
2.00(24 h)	17(89.47)	1(5.26)	1(5.26)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
4.00(24 h)	15(83.33)	1(5.56)	1(5.56)	0(0)	0(0)	0(0)	1(5.5)
4.00(48 h)	13(81.25)	1(6.25)	1(6.25)	0(0)	0(0)	0(0)	1(6.2)
阴性对照组 Negative control group	13(76.47)	1(5.88)	1(5.88)	1(5.88)	0(0)	0(0)	1(5.88)
阳性对照组 Positive control group	100(85.47)	3(2.56)	3(2.56)	4(3.42)	1(0.85)	2(1.71)	4(3.42)

2.5 90 d 经口毒性试验

2.5.1 动物的一般观察

90 d 试验期间和 28 d 恢复期间,各组动物生长状况良好,体重逐周增长,被毛光滑、皮肤无溃破、眼、黏膜、分泌物和排泄物(大小便)无异常,呼吸、神经系统、自主活动,无实验动物死亡。

2.5.2 对大鼠体重、食物利用率的影响

与阴性对照组比较,银耳多糖各剂量组的每周

体重、进食量、食物利用率和体重增重、总进食量、总食物利用率均无统计学意义($P>0.05$)(表 6)。

2.5.3 眼部检查

试验前后,8.00 g/(kg·bw)剂量组和对照组大鼠的角膜、晶状体、虹膜和结膜表面光滑,无充血水肿等异常表现。

表 5 小鼠精原细胞染色体畸变试验结果($n=5$)

Table 5 Results of mouse spermatogonial chromosomal aberration test

剂量(kg·bw) Dose	受检细胞数(个) Number of observed cell(n)	畸变细胞数(个) Number of aberrant cell(n)	畸变细胞率(%) Rate of aberrant cell	有丝分裂指数(%) Mitotic index
1.00(24 h)	5×100	16	3.20±0.45	18.00±2.12
2.00(24 h)	5×100	19	3.80±0.84	18.60±1.95
4.00(24 h)	5×100	18	3.60±0.55	18.20±1.92
4.00(48 h)	5×100	15	3.00±1.22	18.80±1.64
阴性对照组 Negative control group	5×100	17	3.40±0.89	18.40±3.21
阳性对照组 Positive control group	5×100	76	15.20±1.79**	17.60±1.82

注:与阴性对照组比较,** $P<0.01$ 。

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

表 6 90 d 经口毒性试验对大鼠总食物利用率的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Results of total food utilization rate of rats in 90 d oral toxicity test

性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	体重增重(g) Weight gain	进食量(g) Food intake	食物利用率(%) Food utilization
雄 Male	/	426.8±22.5	2404.8±129.7	17.76±0.58
	1.00	424.2±28.8	2396.1±120.9	17.70±0.72
	2.00	433.8±27.5	2496.7±114.1	17.37±0.64
	4.00	435.9±27.1	2538.3±111.0	17.19±1.13
	8.00	415.0±28.7	2367.8±164.4	17.54±0.84
雌 Female	/	209.6±22.6	1712.6±35.3	12.23±1.22
	1.00	217.8±20.4	1681.6±84.0	12.95±0.96
	2.00	199.5±17.6	1671.5±144.8	11.96±0.81
	4.00	225.5±20.0	1725.4±116.1	13.08±0.99
	8.00	214.0±18.0	1719.5±92.4	12.45±0.97

表 7 90 d 经口毒性试验中期血液学检查结果($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Results of hematological examination for mid-term in 90 d oral toxicity test

性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	白细胞计数 ($\times 10^9/L$) WBC	红细胞计数 ($\times 10^{12}/L$) RBC	血红蛋白 (g/L) HGB	红细胞压积 (%) HCT	血小板计数 ($\times 10^9/L$) PLC
雄 Male	/	12.07±2.75	8.34±0.20	154.0±4.2	46.0±1.6	1047±107.0
雌 Female	8.00	10.08±2.96	8.42±0.47	159.8±6.6	48.0±2.4	1101±173.8
雄 Male	/	6.68±1.24	8.37±0.53	154.4±5.6	46.2±2.2	1040±82.6
雌 Female	8.00	6.03±2.64	8.18±0.53	151.4±10.5	45.4±3.0	1059±73.5
性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	中性粒细胞 百分比(%) NEU	淋巴细胞 百分比(%) LYM	单核细胞 百分比(%) MON	嗜酸细胞 百分比(%) EOS	嗜碱细胞 百分比(%) BASO
雄 Male	/	24.6±5.6	67.6±5.4	6.42±0.79	1.18±0.29	0.14±0.05
雌 Female	8.00	26.1±7.1	64.5±6.3	7.96±1.68	1.36±0.34	0.10±0.00
雄 Male	/	15.8±4.3	77.0±5.2	6.38±0.76	0.74±0.54	0.06±0.09
雌 Female	8.00	14.7±3.9	78.5±4.6	6.02±0.72	0.62±0.28	0.16±0.11
性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	网织红细胞总数 ($\times 10^{12}/L$) RET	网织红百分比(%) Ret percentage	未成熟比率(%) Immature ratio	凝血酶原时间(s) PT	活化部分凝血酶时间(s) APTT
雄 Male	/	0.24±0.03	2.89±0.43	51.4±4.0	20.2±0.5	13.8±1.7
雌 Female	8.00	0.22±0.02	2.57±0.09	48.5±3.0	19.2±1.0	14.1±1.4
雄 Male	/	0.24±0.03	2.84±0.39	45.2±4.9	21.1±0.9	14.7±1.0
雌 Female	8.00	0.23±0.03	2.78±0.45	48.4±4.1	21.3±0.8	14.3±1.4

2.5.4 血液学测定结果

与阴性对照组比较,试验末期雄性 4.00 g/(kg·bw) 剂量组白细胞分类嗜酸(%)升高、2.00 g/(kg·bw) 剂量组 PT 降低和 8.00 g/(kg·bw) 剂量组 PT 降低,雌性 4.00 g/(kg·bw) 剂量组白细胞分类中性(%)升高、淋巴(%)降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$) (表 7、表 8、表 9)。

2.5.5 血液生化测定结果

试验中期,雌性实验动物 8.00 g/(kg·bw) 剂量组氯离子与对照组比较有显著性差异($P<0.05$),但仍在本研究室正常值范围内,不认为存在生物学意义;试验末期和恢复期,剂量组动物各项指标与对照组比较均无显著性差异($P>0.05$),且其值均在本实验室正常值范围内(表 10、表 11、表 12)。

表 8 90 d 经口毒性试验末期血液学检查结果($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 8 Results of hematological examination for final-term in 90 d oral toxicity test

性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	白细胞计数 ($\times 10^9/L$) WBC	红细胞计数 ($\times 10^{12}/L$) RBC	血红蛋白 (g/L) HGB	红细胞压积 (%) HCT	血小板计数 ($\times 10^9/L$) PLC
雄 Male	/	9.46 $\pm$ 2.45	8.67 $\pm$ 0.91	149.1 $\pm$ 13.3	44.4 $\pm$ 6.0	934 $\pm$ 107.9
	1.00	8.38 $\pm$ 1.32	9.09 $\pm$ 0.25	153.1 $\pm$ 5.3	47.3 $\pm$ 1.7	945 $\pm$ 77.8
	2.00	9.57 $\pm$ 1.85	8.68 $\pm$ 0.40	145.8 $\pm$ 7.3	45.5 $\pm$ 2.0	892 $\pm$ 149.6
	4.00	9.38 $\pm$ 1.48	8.90 $\pm$ 0.71	149.1 $\pm$ 13.1	46.9 $\pm$ 3.9	958 $\pm$ 161.6
	8.00	8.21 $\pm$ 2.10	8.75 $\pm$ 0.28	149.8 $\pm$ 5.3	47.0 $\pm$ 1.3	937 $\pm$ 115.3
雌 Female	/	5.48 $\pm$ 1.95	8.45 $\pm$ 0.28	148.6 $\pm$ 4.8	44.8 $\pm$ 1.3	908 $\pm$ 73.7
	1.00	5.22 $\pm$ 1.90	8.30 $\pm$ 0.46	145.9 $\pm$ 8.1	44.0 $\pm$ 2.4	896 $\pm$ 141.6
	2.00	5.14 $\pm$ 1.73	8.20 $\pm$ 0.22	145.4 $\pm$ 4.0	44.0 $\pm$ 1.2	883 $\pm$ 109.2
	4.00	5.31 $\pm$ 2.01	8.30 $\pm$ 0.28	146.3 $\pm$ 2.3	44.0 $\pm$ 1.1	890 $\pm$ 98.4
	8.00	5.36 $\pm$ 2.17	8.37 $\pm$ 0.47	146.5 $\pm$ 7.5	44.3 $\pm$ 2.3	909 $\pm$ 81.6
性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	中性粒细胞 百分比(%) NEU	淋巴细胞 百分比(%) LYM	单核细胞 百分比(%) MON	嗜酸细胞 百分比(%) EOS	嗜碱细胞 百分比(%) BASO
雄 Male	/	33.0 $\pm$ 9.1	59.3 $\pm$ 9.0	6.68 $\pm$ 1.07	0.91 $\pm$ 0.59	0.12 $\pm$ 0.08
	1.00	29.2 $\pm$ 8.4	61.1 $\pm$ 9.1	8.73 $\pm$ 1.85	0.94 $\pm$ 0.37	0.12 $\pm$ 0.06
	2.00	32.7 $\pm$ 4.0	57.2 $\pm$ 5.4	8.72 $\pm$ 2.10	1.26 $\pm$ 0.47	0.20 $\pm$ 0.11
	4.00	31.9 $\pm$ 7.9	57.6 $\pm$ 8.0	8.57 $\pm$ 2.45	1.79 $\pm$ 0.59**	0.17 $\pm$ 0.09
	8.00	38.0 $\pm$ 10.5	53.1 $\pm$ 9.1	7.31 $\pm$ 2.24	1.43 $\pm$ 0.90	0.22 $\pm$ 0.11
雌 Female	/	19.3 $\pm$ 3.9	72.8 $\pm$ 4.0	6.68 $\pm$ 1.37	1.08 $\pm$ 0.76	0.16 $\pm$ 0.10
	1.00	25.9 $\pm$ 7.7	65.4 $\pm$ 8.1	7.34 $\pm$ 0.96	1.24 $\pm$ 0.46	0.16 $\pm$ 0.18
	2.00	23.1 $\pm$ 5.9	67.2 $\pm$ 6.8	8.23 $\pm$ 1.53	1.40 $\pm$ 0.72	0.10 $\pm$ 0.14
	4.00	29.0 $\pm$ 8.6*	62.6 $\pm$ 9.9*	8.31 $\pm$ 1.14	1.03 $\pm$ 0.50	0.13 $\pm$ 0.15
	8.00	23.2 $\pm$ 6.9	67.8 $\pm$ 6.3	7.86 $\pm$ 2.15	1.02 $\pm$ 0.55	0.11 $\pm$ 0.17
性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	网织红细胞总数 ($\times 10^{12}/L$) RET	网织红百分比 (%) Ret percentage	未成熟比率 (%) Immature ratio	凝血酶原时间 (s) PT	活化部分凝血 酶时间(s) APTT
雄 Male	/	0.20 $\pm$ 0.03	2.41 $\pm$ 0.75	47.0 $\pm$ 6.2	21.5 $\pm$ 1.0	18.5 $\pm$ 1.1
	1.00	0.21 $\pm$ 0.03	2.27 $\pm$ 0.32	45.2 $\pm$ 4.2	21.3 $\pm$ 1.1	18.9 $\pm$ 1.6
	2.00	0.19 $\pm$ 0.02	2.23 $\pm$ 0.21	46.1 $\pm$ 3.2	19.7 $\pm$ 1.5**	19.6 $\pm$ 1.5
	4.00	0.19 $\pm$ 0.02	2.16 $\pm$ 0.46	45.9 $\pm$ 5.4	21.1 $\pm$ 1.1	17.3 $\pm$ 1.9
	8.00	0.18 $\pm$ 0.03	2.07 $\pm$ 0.32	46.1 $\pm$ 6.1	20.0 $\pm$ 1.3*	18.4 $\pm$ 1.0
雌 Female	/	0.21 $\pm$ 0.04	2.47 $\pm$ 0.42	38.5 $\pm$ 6.4	21.9 $\pm$ 1.7	13.4 $\pm$ 1.5
	1.00	0.18 $\pm$ 0.03	2.23 $\pm$ 0.40	40.6 $\pm$ 7.7	20.3 $\pm$ 1.0	14.7 $\pm$ 1.2
	2.00	0.20 $\pm$ 0.03	2.42 $\pm$ 0.32	41.8 $\pm$ 9.3	20.5 $\pm$ 0.8	13.4 $\pm$ 1.3
	4.00	0.19 $\pm$ 0.03	2.32 $\pm$ 0.34	43.2 $\pm$ 4.0	20.9 $\pm$ 1.5	14.7 $\pm$ 1.3
	8.00	0.19 $\pm$ 0.03	2.24 $\pm$ 0.37	40.4 $\pm$ 5.4	21.0 $\pm$ 1.2	13.0 $\pm$ 1.4

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

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

2.5.6 尿液检查结果

与对照组比较, 试验中期雄性 8.00 g/(kg·bw) 剂量组尿蛋白有显著性差异 ($P<0.05$); 试验末期雌性 2.00 g/(kg·bw) 剂量组 pH 值有显著性差异 ($P<0.05$), 但均在本研究室正常值范围内, 不认为存在生物学意义。其余各剂量组各项指标均无显著性差异。

2.5.7 病理解剖

(1) 大体解剖

90 d 经口毒性试验结束后, 大体观察各剂量组动物的脑、垂体、甲状腺、胸腺、肺、心脏、肝、脾、肾、肾上腺、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、胰腺、肠系膜淋巴结、卵巢、子宫、睾丸、附睾、前列腺和膀胱等组织器官均未见明显异常。

表 9 90 d 经口毒性试验恢复期结束血液学检查结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 9 Results of hematological examination for recovery-term in 90 d oral toxicity test

性别 Sex	剂量 (kg·bw) Dose	白细胞计数 ($\times 10^9/L$) WBC	红细胞计数 ($\times 10^{12}/L$) RBC	血红蛋白 (g/L) HGB	红细胞压积 (%) HCT	血小板计数 ($\times 10^9/L$) PLC
雄 Male	/	10.89 $\pm$ 2.32	8.89 $\pm$ 1.09	137.8 $\pm$ 16.0	43.5 $\pm$ 5.0	801 $\pm$ 85.5
雌 Female	8.00	9.55 $\pm$ 2.63	9.35 $\pm$ 0.76	146.0 $\pm$ 7.2	46.7 $\pm$ 2.4	879 $\pm$ 113.3
雄 Male	/	5.18 $\pm$ 1.71	8.64 $\pm$ 0.26	150.0 $\pm$ 3.5	46.1 $\pm$ 1.1	784 $\pm$ 46.3
雌 Female	8.00	5.48 $\pm$ 1.95	8.49 $\pm$ 0.42	149.6 $\pm$ 6.5	45.8 $\pm$ 2.3	848 $\pm$ 101.9
性别 Sex	剂量 (kg·bw) Dose	中性粒细胞 百分比 (%) NEU	淋巴细胞 百分比 (%) LYM	单核细胞 百分比 (%) MON	嗜酸细胞 百分比 (%) EOS	嗜碱细胞 百分比 (%) BASO
雄 Male	/	24.6 $\pm$ 5.6	67.6 $\pm$ 5.4	6.42 $\pm$ 0.79	1.18 $\pm$ 0.29	0.14 $\pm$ 0.05
雌 Female	8.00	26.1 $\pm$ 7.1	64.5 $\pm$ 6.3	7.96 $\pm$ 1.68	1.36 $\pm$ 0.34	0.10 $\pm$ 0.00
雄 Male	/	15.8 $\pm$ 4.3	77.0 $\pm$ 5.2	6.38 $\pm$ 0.76	0.74 $\pm$ 0.54	0.06 $\pm$ 0.09
雌 Female	8.00	14.7 $\pm$ 3.9	78.5 $\pm$ 4.6	6.02 $\pm$ 0.72	0.62 $\pm$ 0.28	0.16 $\pm$ 0.11
性别 Sex	剂量 (kg·bw) Dose	网织红细胞总数 ($\times 10^{12}/L$) RET	网织红百分比 (%) Ret percentage	未成熟比率 (%) Immature ratio	凝血酶原时间 (s) PT	活化部分凝血 酶时间 (s) APTT
雄 Male	/	0.24 $\pm$ 0.03	2.89 $\pm$ 0.43	51.4 $\pm$ 4.0	20.2 $\pm$ 0.5	13.8 $\pm$ 1.7
雌 Female	8.00	0.22 $\pm$ 0.02	2.57 $\pm$ 0.09	48.5 $\pm$ 3.0	19.2 $\pm$ 1.0	14.1 $\pm$ 1.4
雄 Male	/	0.24 $\pm$ 0.03	2.84 $\pm$ 0.39	45.2 $\pm$ 4.9	21.1 $\pm$ 0.9	14.7 $\pm$ 1.0
雌 Female	8.00	0.23 $\pm$ 0.03	2.78 $\pm$ 0.45	48.4 $\pm$ 4.1	21.3 $\pm$ 0.8	14.3 $\pm$ 1.4

表 10 90 d 经口毒性试验中期血液生化结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 10 Results of biochemistry examination for mid-term in 90 d oral toxicity test

性别 Sex	剂量 (kg·bw) Dose	丙氨酸氨基 转移酶 (U/L) ALT	门冬氨酸氨基 转移酶 (U/L) AST	尿素 (mmol/L) BUN	肌酐 (μ mol/L) CR	胆固醇 (mmol/L) CHO
雄 Male	/	56.6 $\pm$ 9.8	173.2 $\pm$ 33.9	6.76 $\pm$ 0.44	26.98 $\pm$ 5.07	1.43 $\pm$ 0.18
雌 Female	8.00	51.4 $\pm$ 3.8	195.2 $\pm$ 33.5	6.30 $\pm$ 0.34	26.90 $\pm$ 3.87	1.52 $\pm$ 0.28
雄 Male	/	49.0 $\pm$ 8.9	159.4 $\pm$ 18.3	6.51 $\pm$ 0.51	29.81 $\pm$ 3.01	1.48 $\pm$ 0.32
雌 Female	8.00	49.4 $\pm$ 8.4	142.2 $\pm$ 16.5	6.46 $\pm$ 0.63	32.66 $\pm$ 4.55	1.80 $\pm$ 0.37
性别 Sex	剂量 (kg·bw) Dose	甘油三酯 (mmol/L) TG	血糖 (mmol/L) GLU	总蛋白 (g/L) TP	白蛋白 (g/L) ALB	白蛋白/球蛋白 ALB/GLB
雄 Male	/	0.56 $\pm$ 0.12	7.38 $\pm$ 0.88	56.6 $\pm$ 1.6	28.4 $\pm$ 1.7	1.01 $\pm$ 0.07
雌 Female	8.00	0.55 $\pm$ 0.10	7.00 $\pm$ 0.68	56.0 $\pm$ 1.2	29.1 $\pm$ 0.5	1.08 $\pm$ 0.06
雄 Male	/	0.35 $\pm$ 0.11	6.16 $\pm$ 0.63	59.0 $\pm$ 0.9	29.7 $\pm$ 0.9	1.01 $\pm$ 0.09
雌 Female	8.00	0.49 $\pm$ 0.18	6.05 $\pm$ 0.80	58.8 $\pm$ 2.1	30.1 $\pm$ 2.4	1.06 $\pm$ 0.15
性别 Sex	剂量 (kg·bw) Dose	碱性磷酸酶 (U/L) ALP	谷氨酰转氨酶 (U/L) GGT	钾 (mmol/L) K ⁺	钠 (μ mol/L) Na ⁺	氯 (mmol/L) Cl ⁻
雄 Male	/	88.6 $\pm$ 11.9	2.22 $\pm$ 0.34	6.02 $\pm$ 0.28	140.2 $\pm$ 0.45	104.4 $\pm$ 0.55
雌 Female	8.00	90.4 $\pm$ 14.1	2.34 $\pm$ 0.38	6.30 $\pm$ 0.48	140.0 $\pm$ 2.00	105.0 $\pm$ 2.24
雄 Male	/	50.4 $\pm$ 9.0	2.64 $\pm$ 0.33	5.96 $\pm$ 0.86	139.8 $\pm$ 1.92	103.8 $\pm$ 0.84
雌 Female	8.00	45.4 $\pm$ 9.8	2.30 $\pm$ 0.26	6.40 $\pm$ 0.54	141.6 $\pm$ 1.34	105.6 $\pm$ 1.34 [*]

注: 与对照组比较, * $P<0.05$ 。

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

(2) 组织病理学检查

对照组和高剂量组大鼠各脏器病理切片检查发现对照组和高剂量组有少数动物出现肝、肺和肾轻微病理改变: 雄性对照组和雌性高剂量组、对照组各 1 只大鼠可观察到肝小叶内点状的炎症灶, 灶内炎细胞浸润, 个别肝细胞坏死, 雄性高剂量组、对照组各 1 只内可见汇管区内点状的炎症灶; 雄性高剂量组 1 只大鼠可观察到肺气肿, 部分肺泡腔融合成肺大泡, 雄性对照组和雌性高剂量组、对照组各

有 1 只可观察到肺间质炎, 肺泡上皮增生, 肺泡壁变厚, 肺泡腔和肺泡壁有炎细胞浸润; 雄性高剂量组、对照组各 1 只大鼠可观察肾小管变性, 小管上皮细胞肿胀, 嗜碱性染色增强, 胞浆内出现透明空泡样区, 胞核疏松淡染, 小管管腔变窄。

(3) 脏器系数测定结果

试验末期及恢复期, 脑、心脏、胸腺、肾上腺、肝、脾、肾、睾丸、附睾、子宫、卵巢等脏器的重量和脏器系数与对照组比较均无显著性差异 ($P>0.05$) (表 13~表 16)。

表 11 90 d 经口毒性试验末期血液生化结果 ($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 11 Results of biochemistry examination for final-term in 90 d oral toxicity test

性别 Sex	剂量 (kg · bw) Dose	丙氨酸氨基转移酶 (U/L) ALT	门冬氨酸氨基转移酶 (U/L) AST	尿素 (mmol/L) BUN	肌酐 (μmol/L) CR	胆固醇 (mmol/L) CHO
雄 Male	/	51.4±10.0	150.4±23.0	5.53±0.29	37.35±6.15	1.37±0.23
	1.00	52.0±10.4	149.8±22.4	5.45±0.57	36.57±5.97	1.26±0.27
	2.00	56.3±8.4	161.6±20.2	5.99±0.69	40.28±6.65	1.30±0.22
	4.00	56.1±9.6	173.5±30.0	5.66±0.41	39.83±5.24	1.38±0.22
	8.00	51.2±6.1	174.5±29.5	5.64±0.56	35.68±6.03	1.24±0.23
雌 Female	/	48.6±7.5	168.8±23.4	6.79±0.51	47.62±7.25	1.56±0.26
	1.00	47.2±7.5	176.3±30.1	6.12±0.70	52.60±7.05	1.55±0.31
	2.00	50.7±7.3	167.8±19.0	6.20±0.63	43.98±5.38	1.66±0.26
	4.00	45.4±7.1	163.3±19.1	6.33±0.54	43.22±7.86	1.65±0.32
	8.00	50.4±6.7	160.9±16.4	6.35±0.82	44.69±5.38	1.58±0.30
性别 Sex	剂量 (kg · bw) Dose	甘油三酯 (mmol/L) TG	血糖 (mmol/L) GLU	总蛋白 (g/L) TP	白蛋白 (g/L) ALB	白蛋白/球蛋白 ALB/GLB
雄 Male	/	0.50±0.11	7.58±1.02	56.4±3.7	25.7±2.2	0.84±0.07
	1.00	0.50±0.15	7.41±1.02	56.7±3.5	26.3±2.7	0.87±0.09
	2.00	0.43±0.16	7.82±0.87	59.4±4.0	26.9±2.3	0.83±0.09
	4.00	0.51±0.20	7.81±1.11	55.4±3.7	25.5±2.2	0.86±0.09
	8.00	0.45±0.17	7.91±0.71	57.8±3.9	26.7±2.0	0.86±0.07
雌 Female	/	0.47±0.14	7.26±1.00	64.3±3.7	33.1±1.3	1.07±0.09
	1.00	0.42±0.14	6.87±0.94	63.6±3.2	32.9±2.6	1.08±0.10
	2.00	0.51±0.14	6.66±1.00	65.0±3.2	34.2±1.8	1.11±0.09
	4.00	0.45±0.14	6.90±0.93	64.8±3.6	34.1±2.4	1.11±0.09
	8.00	0.48±0.16	6.67±0.94	63.7±5.4	33.4±2.1	1.11±0.09
性别 Sex	剂量 (kg · bw) Dose	碱性磷酸酶 (U/L) ALP	谷氨酰转氨酶 (U/L) GGT	钾 (mmol/L) K ⁺	钠 (μmol/L) Na ⁺	氯 (mmol/L) Cl ⁻
雄 Male	/	56.4±10.1	2.68±0.32	5.84±0.66	142.2±3.91	105.6±2.5
	1.00	56.7±11.7	2.70±0.36	5.62±0.46	139.5±5.80	104.2±6.5
	2.00	53.2±11.8	2.64±0.37	5.99±0.69	142.6±3.06	106.6±2.7
	4.00	50.2±10.3	2.41±0.45	5.40±0.46	138.8±3.7	103.3±2.3
	8.00	54.7±9.8	2.45±0.35	5.50±0.49	142.4±2.8	105.7±2.2
雌 Female	/	31.2±5.9	2.34±0.37	5.70±0.67	142.9±1.5	105.1±2.4
	1.00	28.9±4.3	2.37±0.42	5.27±0.66	143.1±1.7	105.3±2.1
	2.00	29.5±4.6	2.29±0.35	5.61±0.67	142.6±1.0	105.5±1.2
	4.00	28.1±4.6	2.15±0.31	5.50±0.80	142.4±1.0	105.3±1.5
	8.00	29.9±4.5	2.31±0.44	5.79±0.42	142.5±1.0	105.8±1.5

表 12 90 d 经口毒性试验恢复期结束血液生化结果($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 12 Results of biochemistry examination for recovery-term in 90 d oral toxicity test

性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	丙氨酸氨基转移酶(U/L) ALT	门冬氨酸氨基转移酶(U/L) AST	尿素(mmol/L) BUN	肌酐(μ mol/L) CR	胆固醇(mmol/L) CHO
雄 Male	/	63.8 $\pm$ 11.3	203.2 $\pm$ 38.8	5.79 $\pm$ 0.62	51.40 $\pm$ 6.53	1.28 $\pm$ 0.14
	8.00	57.4 $\pm$ 9.2	174.0 $\pm$ 29.3	5.64 $\pm$ 0.82	50.92 $\pm$ 7.70	1.35 $\pm$ 0.19
雌 Female	/	41.4 $\pm$ 6.5	128.2 $\pm$ 17.7	6.28 $\pm$ 0.86	48.74 $\pm$ 8.67	1.63 $\pm$ 0.18
	8.00	41.0 $\pm$ 4.8	131.8 $\pm$ 18.1	5.77 $\pm$ 0.68	51.74 $\pm$ 8.11	1.75 $\pm$ 0.26
性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	甘油三酯(mmol/L) TG	血糖(mmol/L) GLU	总蛋白(g/L) TP	白蛋白(g/L) ALB	白蛋白/球蛋白 ALB/GLB
雄 Male	/	0.73 $\pm$ 0.14	9.65 $\pm$ 1.80	61.0 $\pm$ 3.2	30.4 $\pm$ 2.3	1.00 $\pm$ 0.08
	8.00	0.70 $\pm$ 0.12	9.56 $\pm$ 1.45	59.0 $\pm$ 3.0	28.5 $\pm$ 2.3	0.93 $\pm$ 0.08
雌 Female	/	0.56 $\pm$ 0.16	9.01 $\pm$ 0.33	67.1 $\pm$ 4.0	33.8 $\pm$ 3.0	1.02 $\pm$ 0.09
	8.00	0.55 $\pm$ 0.17	8.87 $\pm$ 0.85	67.7 $\pm$ 4.6	33.8 $\pm$ 2.2	1.00 $\pm$ 0.10
性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	碱性磷酸酶(U/L) ALP	谷氨酰转氨酶(U/L) GGT	钾(mmol/L) K ⁺	钠(μ mol/L) Na ⁺	氯(mmol/L) Cl ⁻
雄 Male	/	63.4 $\pm$ 9.9	2.58 $\pm$ 0.55	5.72 $\pm$ 0.50	142.2 $\pm$ 7.9	106.0 $\pm$ 3.5
	8.00	59.6 $\pm$ 9.1	2.42 $\pm$ 0.20	5.38 $\pm$ 0.53	141.6 $\pm$ 4.3	105.2 $\pm$ 2.5
雌 Female	/	24.0 $\pm$ 4.4	3.38 $\pm$ 0.56	5.76 $\pm$ 0.99	140.0 $\pm$ 4.1	104.4 $\pm$ 2.6
	8.00	22.4 $\pm$ 3.6	2.87 $\pm$ 0.41	5.60 $\pm$ 0.92	143.6 $\pm$ 5.2	106.4 $\pm$ 2.8

表 13 90 d 经口毒性试验末期脏器重量($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 13 Organ weight for final-term in 90 d oral toxicity test

性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	脑(g) Brain	心脏(g) Heart	胸腺(g) Thymus	肾上腺(g) Adrenal gland	肝(g) Liver
雄 Male	/	1.914 $\pm$ 0.185	1.342 $\pm$ 0.141	0.474 $\pm$ 0.117	0.061 $\pm$ 0.008	13.034 $\pm$ 1.303
	1.00	1.918 $\pm$ 0.047	1.349 $\pm$ 0.180	0.484 $\pm$ 0.100	0.061 $\pm$ 0.006	12.269 $\pm$ 1.070
	2.00	1.824 $\pm$ 0.152	1.296 $\pm$ 0.084	0.505 $\pm$ 0.102	0.064 $\pm$ 0.013	12.789 $\pm$ 1.412
	4.00	1.859 $\pm$ 0.145	1.341 $\pm$ 0.145	0.451 $\pm$ 0.094	0.060 $\pm$ 0.005	12.629 $\pm$ 0.966
	8.00	1.933 $\pm$ 0.140	1.251 $\pm$ 0.125	0.433 $\pm$ 0.099	0.064 $\pm$ 0.015	12.239 $\pm$ 1.407
雌 Female	/	1.766 $\pm$ 0.068	0.841 $\pm$ 0.098	0.382 $\pm$ 0.089	0.086 $\pm$ 0.018	6.908 $\pm$ 0.953
	1.00	1.722 $\pm$ 0.069	0.828 $\pm$ 0.096	0.380 $\pm$ 0.053	0.079 $\pm$ 0.022	6.897 $\pm$ 0.628
	2.00	1.746 $\pm$ 0.065	0.831 $\pm$ 0.100	0.354 $\pm$ 0.075	0.075 $\pm$ 0.004	6.413 $\pm$ 0.260
	4.00	1.787 $\pm$ 0.073	0.848 $\pm$ 0.074	0.386 $\pm$ 0.060	0.080 $\pm$ 0.016	6.713 $\pm$ 0.828
	8.00	1.757 $\pm$ 0.097	0.846 $\pm$ 0.078	0.383 $\pm$ 0.076	0.078 $\pm$ 0.013	6.859 $\pm$ 0.582
性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	肾(g) Kidney	脾(g) Spleen	睾丸/子宫(g) Testis/Uterus	附睾/卵巢(g) Epididymis/Ovary	
雄 Male	/	3.247 $\pm$ 0.314	0.922 $\pm$ 0.135	3.124 $\pm$ 0.290	1.317 $\pm$ 0.115	
	1.00	3.270 $\pm$ 0.272	0.850 $\pm$ 0.042	3.135 $\pm$ 0.275	1.381 $\pm$ 0.171	
	2.00	3.183 $\pm$ 0.294	0.864 $\pm$ 0.100	2.984 $\pm$ 0.200	1.350 $\pm$ 0.181	
	4.00	3.196 $\pm$ 0.222	0.851 $\pm$ 0.083	2.898 $\pm$ 0.466	1.259 $\pm$ 0.158	
	8.00	3.056 $\pm$ 0.354	0.838 $\pm$ 0.102	2.917 $\pm$ 0.130	1.274 $\pm$ 0.143	
雌 Female	/	1.787 $\pm$ 0.179	0.576 $\pm$ 0.049	0.682 $\pm$ 0.119	0.175 $\pm$ 0.028	
	1.00	1.749 $\pm$ 0.165	0.555 $\pm$ 0.055	0.685 $\pm$ 0.126	0.171 $\pm$ 0.019	
	2.00	1.636 $\pm$ 0.177	0.526 $\pm$ 0.043	0.701 $\pm$ 0.160	0.172 $\pm$ 0.036	
	4.00	1.645 $\pm$ 0.164	0.553 $\pm$ 0.059	0.774 $\pm$ 0.210	0.188 $\pm$ 0.032	
	8.00	1.692 $\pm$ 0.170	0.561 $\pm$ 0.058	0.754 $\pm$ 0.272	0.177 $\pm$ 0.037	

表 14 90 d 经口毒性试验末期脏器系数($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 14 Organ coefficient for final-term in 90 d oral toxicity test

性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	空腹体重(g) Fasting weight	脑/体重(%) Brain/bw(%)	心/体重(%) Heart/bw(%)	胸腺/体重(%) Thymus/bw(%)	肾上腺/体重(%) Adrenal gland/bw(%)
雄 Male	/	479.3±22.1	0.40±0.04	0.28±0.02	0.10±0.03	0.013±0.001
	1.00	475.3±27.8	0.40±0.03	0.28±0.04	0.10±0.02	0.013±0.002
	2.00	482.8±27.2	0.38±0.04	0.27±0.02	0.10±0.02	0.013±0.003
	4.00	488.9±27.6	0.38±0.04	0.27±0.02	0.09±0.02	0.012±0.001
	8.00	472.7±27.7	0.41±0.04	0.26±0.02	0.09±0.02	0.014±0.003
雌 Female	/	269.1±18.3	0.66±0.03	0.31±0.03	0.14±0.03	0.032±0.007
	1.00	275.2±17.1	0.65±0.05	0.30±0.03	0.14±0.02	0.029±0.008
	2.00	254.3±18.6	0.69±0.05	0.33±0.04	0.14±0.03	0.030±0.003
	4.00	272.7±15.2	0.66±0.05	0.31±0.03	0.14±0.02	0.029±0.005
	8.00	269.9±18.2	0.65±0.04	0.31±0.03	0.14±0.02	0.029±0.006
性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	肝/体重(%) Liver/bw(%)	肾/体重(%) Kidney/bw(%)	脾/体重(%) Spleen/bw(%)	睾丸(子宫)/体重(%) Testis(Uterus)/bw(%)	附睾(卵巢)/体重(%) Epididymis(Ovary)/bw(%)
雄 Male	/	2.72±0.23	0.68±0.07	0.19±0.02	0.65±0.05	0.31±0.03
	1.00	2.58±0.15	0.69±0.05	0.18±0.01	0.66±0.05	0.33±0.03
	2.00	2.65±0.23	0.66±0.05	0.18±0.02	0.62±0.07	0.31±0.04
	4.00	2.58±0.14	0.65±0.05	0.17±0.02	0.59±0.09	0.29±0.03
	8.00	2.58±0.20	0.65±0.06	0.18±0.02	0.62±0.04	0.31±0.04
雌 Female	/	2.56±0.20	0.66±0.05	0.21±0.02	0.25±0.04	0.08±0.01
	1.00	2.51±0.15	0.64±0.06	0.20±0.01	0.25±0.05	0.08±0.01
	2.00	2.53±0.12	0.65±0.07	0.21±0.02	0.28±0.06	0.09±0.02
	4.00	2.46±0.22	0.60±0.05	0.20±0.02	0.28±0.07	0.08±0.01
	8.00	2.54±0.15	0.63±0.05	0.21±0.02	0.28±0.10	0.08±0.01

表 15 90 d 经口毒性试验恢复期结束脏器重量($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 15 Organ coefficient for recovery-term in 90 d oral toxicity test

性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	脑(g) Brain	心脏(g) Heart	胸腺(g) Thymus	肾上腺(g) Adrenal gland	肝(g) Liver
雄 Male	/	101.965±0.102	1.338±0.186	0.486±0.130	0.052±0.011	12.407±1.717
雌 Female	8.00	101.934±0.085	1.317±0.095	0.435±0.099	0.057±0.010	11.955±1.138
雄 Male	/	101.720±0.046	0.823±0.116	0.350±0.049	0.075±0.019	7.072±0.561
雌 Female	8.00	101.677±0.146	0.858±0.095	0.357±0.067	0.075±0.006	6.936±0.667
性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	肾(g) Kidney	脾(g) Spleen	睾丸/子宫(g) Testis/Uterus	附睾/卵巢(g) Epididymis/Ovary	
雄 Male	/	103.041±0.442	0.781±0.125	3.130±0.226	1.312±0.317	
雌 Female	8.00	102.917±0.195	0.814±0.115	2.891±0.207	1.358±0.164	
雄 Male	/	101.741±0.142	0.562±0.058	0.726±0.164	0.169±0.028	
雌 Female	8.00	101.716±0.102	0.567±0.079	0.679±0.098	0.163±0.015	

表 16 90 d 经口毒性试验恢复期结束脏器系数($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 16 Organ coefficient for recovery-term in 90 d oral toxicity test

性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	空腹体重(g) Fasting weight	脑/体重(%) Brain/bw	心/体重(%) Heart/bw	胸腺/体重(%) Thymus/bw	肾上腺/体重(%) Adrenal gland/bw
雄 Male	/	10468.2±22.6	0.42±0.03	0.29±0.03	0.10±0.03	0.011±0.002
雌 Female	8.00	10464.0±17.9	0.42±0.02	0.29±0.01	0.09±0.02	0.012±0.002
雄 Male	/	10267.8±22.0	0.65±0.06	0.31±0.05	0.13±0.03	0.028±0.007
雌 Female	8.00	10263.2±14.0	0.64±0.04	0.33±0.03	0.14±0.03	0.029±0.003
性别 Sex	剂量(kg·bw) Dose	肝/体重(%) Liver/bw	肾/体重(%) Kidney/bw	脾/体重(%) Spleen/bw	睾丸(子宫)/体重(%) Testis(Uterus)/bw	附睾(卵巢)/体重(%) Epididymis(Ovary)/bw
雄 Male	/	102.64±0.26	0.65±0.08	0.17±0.02	0.67±0.02	0.28±0.06
雌 Female	8.00	102.59±0.24	0.63±0.04	0.18±0.02	0.63±0.06	0.30±0.04
雄 Male	/	102.65±0.26	0.65±0.08	0.21±0.02	0.27±0.06	0.06±0.01
雌 Female	8.00	102.64±0.23	0.65±0.06	0.22±0.04	0.26±0.03	0.06±0.01

3 讨论

银耳多糖生理活性广泛,具有广阔的市场价值,但作为食品原料开发利用还缺乏充分的毒理安全评价资料。现仅查阅到贾汉卿等^[22-25]报道的关于银耳多糖 J 的小鼠急性毒性、慢性毒性、生殖毒性、致癌试验文章,其采用的试验方法参考文献为 1978 年人民卫生出版社出版的《食品毒理》。报道未对受试物银耳多糖来源、性状等作出说明,实验动物选用小鼠,未标明小鼠品系、来源、饲养环境等,在慢性毒性试验中,未提供每周体重、进食量、食物利用率、血液学、血生化学、尿液检查、脏器湿重、脏器比等多项指标数据,也未设置卫星组,研究不够深入系统。本次研究依据最新的食品安全国家标准^[17-21]对华熙生物科技股份有限公司生产的银耳多糖开展毒理学试验,初步研究银耳多糖的食用安全性。急性毒性试验采用限量法^[17],24 h 内经口累积给予小鼠 12.0 g/(kg·bw) 的银耳多糖,小鼠无一死亡,无明显的毒性症状,可见银耳多糖属实际无毒级。在遗传毒性试验中,无论原核细胞试验还是真核细胞试验,无论体内试验还是体外试验,结果均为阴性,初步判断该银耳多糖没有遗传毒性。在 90 d 经口毒性试验中,各剂量组动物每周体重、体重增重、进食量、总进食量、食物利用率和总食物利用率与对照组比较均无统计学意义,可见银耳多糖对大鼠生长发育、进食、营养吸收没有不良影响。血液学、血生化、尿液检查中,个别剂量白细胞分类嗜酸、中性、淋巴、PT,氯离子、尿蛋白、尿 PH 值等与对照组比较出现统计学差异,但没有剂量反应关系,时间没有连续性,与性别无关,且其值均在本研究室正常值范围内,不认为有生物学意义和毒理学意义,可能与动物个体差异有关。组织病理学检查对照组和高剂量组少数动物的标本出现病理改变,但这些病理改变程度较轻且无组间特异性分布,考虑与动物质量有关,不认为与银耳多糖作用有关。

综合以上结果,在本次条件下,本次所研究的银耳多糖属于实际无毒级物质,未见遗传毒性效应,根据银耳多糖的实际摄入剂量初步确定该样品最大未观察到有害作用剂量(NOEL)为:雄性动物为 7.21 g/(kg·bw),雌性动物为 8.18 g/(kg·bw)。本次对华熙生物科技股份有限公司生产的银

耳多糖开展的毒理学安全研究为银耳多糖开发利用提供了科学数据,为进行下一步的毒理学试验提供了剂量参考依据。

参考文献:

- [1] Ge X, Huang W, Xu X, et al. Production, structure, and bioactivity of polysaccharide isolated from *Tremella fuciformis* XY [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 148: 173-181.
- [2] Wu YJ, Wei ZX, Zhang FM, et al. Structure, bioactivities and applications of the polysaccharides from *Tremella fuciformis* mushroom; a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 121: 1005-1010.
- [3] 薛蔚. 银耳多糖提取纯化技术及功能性质探究 [J]. *南方农业*, 2020, 14(21): 141-142.
- [4] 史振伟, 许焱, 李晓璐, 等. 银耳多糖改善脓毒症小鼠调节性 T 细胞的免疫活性 [J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(3): 313-317.
- [5] 李玮, 刘庆阳, 彭浩. 银耳多糖干预后脓毒症小鼠脾脏 DCregs 对 CD₄⁺ T 细胞分泌功能的影响 [J]. *山东医药*, 2015, 55(27): 24-26.
- [6] 宋思媛, 王欣, 王泽旭, 等. 银耳多糖对免疫抑制小鼠肠道菌群的保护作用 [J]. *中国微生态学杂志*, 2020, 32(7): 772-776.
- [7] 苏巧玲, 李秀敏. 银耳多糖抗 B16 黑色素瘤肺转移的作用及机理研究 [J]. *药学与临床研究*, 2021, 29(5): 331-335.
- [8] 李璐, 毕富勇, 吕俊. 银耳多糖诱导肝癌 HepG-2 细胞凋亡的研究 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(7): 1033-1035.
- [9] 解方为, 欧阳学农, 彭永海, 等. 银耳孢多糖对小鼠大肠癌的抑制作用及机理研究 [J]. *中药药理与临床*, 2009, 25(2): 54-56.
- [10] 蔡东联, 沈卫, 曲丹, 等. 银耳多糖对 D-半乳糖致衰老模型小鼠抗氧化能力的影响 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2008, 30(4): 52-54.
- [11] Li M, Ma F, Li R, et al. Degradation of *Tremella fuciformis* polysaccharide by a combined ultrasound and hydrogen peroxide treatment: process parameters, structural characteristics, and antioxidant activities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 160: 979-990.
- [12] Zhang Z, Wang X, Zhao M, et al. Free-radical degradation by Fe²⁺/Vc/H₂O₂ and antioxidant activity of polysaccharide from *Tremella fuciformis* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 112: 578-582.
- [13] Shen T, Duan C, Chen B, et al. *Tremella fuciformis* polysaccharide suppresses hydrogen peroxide-triggered injury of human skin fibroblasts via upregulation of SIRT1 [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1340-1346.
- [14] 王靖雅, 常刘杨, 贾艺悦, 等. 真菌多糖的辐射防护作用研究 [J]. *食品与药品*, 2019, 21(3): 235-238.

(下转第 102 页)

张志妮, 杨力衡, 严楚, 等. 高校实验动物中心动物质量控制研究与创新实践 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 77-81.
Zhang ZN, Yang LH, Yan C, et al. Research and innovation in the practice of animal quality control in a university laboratory animal center [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 77-81.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.010

高校实验动物中心动物质量控制研究与创新实践

张志妮¹, 杨力衡¹, 严楚², 蔡卫斌^{1*}

(1. 中山大学实验动物中心, 广州 510006; 2. 广州市白云区畜牧兽医站, 广州 510550)

【摘要】 目的 实验动物质量直接关系着研究和评价数据的准确性和可重复性, 亦是公共卫生安全的主要部分。**方法** 针对高校动物中心来源复杂、人员流动性大、需求多样等特点, 从管理体系建立和病原检测角度提升实验动物质量。**结果** 建立并执行了实验动物准入制度、哨兵动物监测制度、动物用品监测制度等系列管理体系, 自 2018 年以来, 检测了 1481 批次非活体动物样本, 106 批次病原阳性, 检测了 395 例活体动物样本, 38 例病原阳性, 检测了 363 份动物相关用品。**结论** 禁止了数批烈性传染病病原阳性动物的进入、严密监视了条件致病细菌阳性动物的来源单位、及时调整和更新了大小鼠监测病原谱, 从而提升了实验动物质量。

【关键词】 实验动物; 质量控制; 病原; 高校

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0077-05

Research and innovation in the practice of animal quality control in a university laboratory animal center

ZHANG Zhini¹, YANG Liheng¹, YAN Chu², CAI Weibin^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China.

2. Animal Husbandry and Veterinary Station of Guangzhou Baiyun District, Guangzhou 510550)

【Abstract】 Objective The quality of laboratory animals directly affects the quality of data they provide and has a substantial impact on public health and safety. **Methods** To improve the quality of laboratory animals, a management system and pathogen-detection scheme were implemented for the unique conditions in a university laboratory animal center with animals from different sources and high personnel traffic. **Results** The laboratory animal accreditation system, etiology surveillance system and animal-related supplies, was established and implemented. Since 2018, 1481 non-living animal samples were detected, 106 of which were pathogen-positive. In addition, 395 live animal samples were detected, 38 of which were pathogen-positive. A total of 363 animal-related supplies were monitored. **Conclusions** Several severe infectious-disease-agent-positive animals were forbidden to enter; opportunistic-agent-positive supply units were closely monitored; and the objective monitoring of pathogen genealogy in rats and mice was adjusted and updated. Hence, the quality of the laboratory animals was evaluated in time to prevent false result.

【Keywords】 laboratory animal; quality control; pathogen; university

【基金项目】 国家重点研发计划 (2019YFA0801403); 国家自然科学基金 (82170261, 81970219, 82000250); 广东省自然科学基金 (2021A1515011005, 2021B1212040006); 中国博士后基金 (2020M672976)。

【作者简介】 张志妮 (1983—), 女, 助理实验师, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物微生物学、预防兽医学。E-mail: zhzhin@mail.sysu.edu.cn

【通信作者】 蔡卫斌 (1976—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 心脏发育与损伤修复基础研究、疾病模式动物研发与标准化。

E-mail: caiwb@mail.sysu.edu.cn

实验动物作为“活的精密仪器”,是生命科学研究中必须具备的四大基本条件之一,涉及疾病机制研究、治疗方法研究、疫苗研究与评价等多个领域。截止至 2019 年 7 月,在过去 30 年里,涉及实验动物论文中,PubMed 论文数据库论文 154 万篇,占生物医学论文的 79%,药学尤其是毒理、安全性评价论文占 85%,Nature、Science、Cell、Nature Medicine、Nature Genetics、Nature Cell Biology、Nature Biotechnology、Journal of Experimental Medicine 等国际一流学术杂志有 22 万篇、占 77%,而我国在 2013~2015 年间则有 32844 篇、占 7%,从 1901~2018 年的 81 年度(占颁奖年度的 75%)诺贝尔生理学或医学奖涉及 25 种动物,被应用了 168 次^[1]。

实验动物质量直接关系着研究和评价数据的准确性、可靠性和可重复性,动物感染烈性传染病后极易集体死亡、实验中断,且携带人畜共患传染病动物不仅威胁实验人员健康,一旦扩散还将产生严重的公共卫生安全。如实验室源性感染事件有 2019 年某研究所布鲁氏菌感染、2011 年某高校教学山羊布氏杆菌感染^[2],实验动物获得性病原感染事件有 2006 年某高校流行性出血热感染^[3]、2004 年实验室人员感染流行性出血热^[4]、20 世纪末全国各地实验大鼠和工作人员流行性出血热高阳性率^[5]等。

高校实验动物中心,为集教学、科研及生产三位一体的公共服务性平台,支撑了学校及附属医院的医学、药学、生命科学、化工、农学、材料等多学科教学和科研的重要技术服务。随着新技术、新研究方法的不断发展,基因修饰动物亦被作为重要、常用的研究对象,多从不同国家、研究机构引入。动物来源复杂,高校科研多学科、多方向,实验类型复杂,实验时间不确定性,学生为主体的实验人员流量大、流动性强等等,均易造成病原菌的传入、交叉感染和传播扩散^[6]。本研究旨在总结和探讨近年来的病原控制制度和检测工作成效和心得。

1 建立了病原控制制度

建立并执行了《实验动物准入制度》,从制度方面加强实验动物来源管理和质量控制,规范实验动物进入动物设施。具体措施如下。

1.1 规范动物来源

切断传染源,是传染病控制最有效措施,安全、

可靠的动物来源,是实验动物病原控制的源头和关键。据监测病原检出率将动物来源分等级:一级(最高级):即至少连续暗检 3 次,病原检测均为阴性的生产设施动物来源;二级:不满足一级、三~五级来源的生产设施动物来源;三级:自检、暗检、抽检和常规检疫中出现非人蓄共患病病原、非动物烈性传染病病原、一般为条件致病菌阳性的生产设施动物来源,动物退出设施,6 个月内不接收相同来源动物;四级:动物烈性传染病病原阳性的生产设施动物来源,1 年内禁止该来源动物进入设施;五级:人蓄共患病病原阳性的生产设施动物来源,按国家相关法律法规处理。

进入动物设施的常规动物(含突变系),需提供实验动物质量合格证明,销售清单、送货单/签收单、近 3~6 个月内的实验动物质量检测报告(包含实验动物国家标准要求的相应等级单位病原检测项目,结果均为合格),境外来源需提供来源机构的兽医报告(标明病原检测项目及结果)和海关认可的入关隔离检疫场所隔离检疫报告;基因修饰动物原则上均需通过生物净化(一般是经典的剖宫产代乳净化技术或体外受精及胚胎移植技术)达 SPF 级,或达国标清洁级+SPF 级必须检测和必要时检测病原检测合格(以下称“活检”)的相关证明材料^[7-9]。

1.2 动物实验设施功能分区和检疫管理

高校动物中心可能因历史原因、不同校区的需求、转基因动物繁育保种、科研多学科和多方向、实验类型和来源复杂、学生流动性大等情况,动物设施分布于不同校区、不同楼宇,可按功能进行分区并执行针对性管理措施:

1.2.1 屏障环境繁育区

繁育区使用于基因修饰动物的保种繁育,不涉及动物实验。进入该区的基因修饰动物必须执行生物净化或活检(动物不适用于活检时,可用同笼饲养至少 30 d 以上的哨兵动物活检替代);进入该区的野生型动物,一级来源的常规动物(含突变系)需经检测证实监测病原为阴性(监测病原项目详见表 1,每年综合检测成本、病原菌的致病性、对常见动物实验的干扰程度及过往检测数据,及时持续更新监测病原谱。);二级来源动物则执行活检。其余情况执行“1.1 规范动物来源”的内容。

表 1 2018~2021 年大、小鼠监测病原谱
Table 1 Objective monitoring pathogen genealogy of rat and mouse form 2018 to 2021

内容 Content	2018 年 2018 Year	2019 年 2019 Year	2020 年 2020 Year	2021 年* 2021 Year*
小鼠肝炎病毒 <i>Mouse hepatitis virus</i>	1,2	1,2	1,2	1,2
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1,2	1,2	1	/
绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,2	1,2	1	1
肺炎克雷伯杆菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3
嗜肺巴斯德杆菌 <i>Pasteurella pneumophila</i>	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3
小鼠诺如病毒 <i>Murine Norwalk virus</i>	/	/	2	2
牛棒状杆菌 <i>Corynebacterium bovis</i>	/	/	2	2
鞭毛虫 <i>Flagellates</i>	/	/	/	1
汉坦病毒 <i>Hantavirus</i>	3	3	3	3
支原体 <i>Mycoplasma spp.</i>	3	3	3	3
支气管鲍特杆菌 <i>Bordetella bronchis</i>	3	3	3	3

注:1:繁育区小鼠病原检测项目;2:实验区小鼠病原检测项目;3:大鼠病原检测项目。*:2021 年统计日期截止 6 月份。
Note. 1, Objective monitoring pathogen genealogy of mouse for breeding area. 2, Objective monitoring pathogen genealogy of mouse for experimental area. 3. Objective monitoring pathogen genealogy of rat. *, 2021 statistics date ends in June.

1.2.2 屏障环境实验区

该区仅开展动物实验,禁止繁殖。执行“边检疫、边实验、重防范”原则,动物进入该区前,一级来源动物需经检疫期的健康观察;二级来源动物经检测证实监测病原为阴性。其余情况执行“1.1 规范动物来源”的内容。

1.2.3 普通环境实验区

该区仅开展动物实验,禁止繁殖。进入该区的动物需经检疫期的健康观察。其余情况执行“1.1 规范动物来源”的内容。

1.2.4 暂养区

该区执行屏障设施的硬件及管理要求,仅用于动物经影像检测、手术、行为学观察或其他屏障外操作后,需短期饲养、但又无法返回屏障设施的情况,管理人员严格把控实验动物的饲养规模和周期。

1.3 在养动物的病原监测

1.3.1 病原监测

繁殖区采用哨兵动物监测(脏垫料法)^[10-12],监测现行国标清洁级+SPF 级病原,增添国内外流行且对动物实验影响较大的病原,如小鼠诺如病毒、牛棒状杆菌等,据监测结果,提供快速预警从而控制

病原微生物感染和扩散,并为检疫期监测病原谱的更新提供数据支持;其他区域主要执行个性化的兽医护理^[13]。

1.3.2 兽医护理

在兽医指导、培训下,每位饲养工作人员、设施管理人员执行日常兽医护理、巡房工作,观察动物日常健康状况,发现异常动物及时上报兽医,经检测诊断后执行相应的防控、处理措施。兽医则对设施进行定期的巡视检查、兽医护理工作现场指导、病原控制和动物福利措施的落实情况监督等^[13]。

1.4 实验动物的“点对点”运输

1.4.1 动物进入设施

因动物来源复杂、实验者流动性大等情况,动物的运输除符合国标要求外^[9],执行“点对点”动物转运管理制度,即实验者联系供应商订购动物后,供应商与待进入设施的管理人员执行实验动物交接,实验者与设施工作人员将动物接收入设施内。

1.4.2 动物离开设施

屏障设施内待移出的动物,应满足包装规范、保障生存环境、有专用通道、不被周围人群直视等要求,用专用包装盒,在屏障设施内包装后方可移

出,普通环境移出的动物,需于运输笼具上覆盖透气遮布^[9]。

1.5 动物相关用品的监测

应根据国标要求,需定期监测的项目可有:设施环境技术因子、动物相关用品如动物饮水和垫料、高压炉的灭菌效果和饲料等^[9,14]。

2 病原检测工作

2018 年以来,在检测了 1481 批次非活体检实验动物样本中,包括动物粪便、皮肤拭子、鼻咽拭子、血清、毛发等,有 106 批次病原阳性,其中的 15 批小鼠肝炎病毒(*Mouse hepatitis virus*, MHV)阳性小鼠立即撤场,动物执行安乐死后经高压灭菌器灭菌,动物尸体装入专用尸体袋存放于尸体冷藏柜,集中作无害化处理。检疫饲养区域处理如下:管制进出,封闭送风、排风口;使用杀灭病原菌浓度的消毒液(如 0.13 ~ 0.26 mol/L 过氧乙酸按 0.008 L/m³)对饲养空间、角落、缝隙和物品表面进

行喷雾消毒,密封 24 h 后,开启送风、排风口;移出的动物笼具、相关物品及废弃物等先行高压灭菌或杀灭病原菌浓度消毒液浸泡消毒后,执行实验废弃物相关规定处理;管制进出至少 3 个月,重新启用前,封闭送风、排风口执行区域净化处理,空气洁净度和落下菌数合格后方可投入使用。同时,严密监控饲养区域的其他动物,并一年内禁止同来源的实验动物进入;检测了 395 份活体动物样本,其中 38 例病原阳性,检疫期病原检测阳性动物均立即退出了设施。非活体动物样本的监测病原阳性批次比例至 2021 年达 17.72%,说明动物入场前的病原监测是非常必要的。活体检测的阳性率自 2019 年出现下降,则主要是部分基因修饰动物执行了生物净化。具体情况详见表 2。

从动物来源方面看,2018 年监测的动物来源有 12 家,2021 年已达 27 家,呈逐年上升趋势,动物来源愈趋复杂、多样,动物质量良莠不齐,但总体质量水平有所提高。详见表 3。

表 2 2018~2021 年病原检测
Table 2 Pathogen detection form 2018 to 2021

内容 Content	2018 年 2018 Year	2019 年 2019 Year	2020 年 2020 Year	2021 年* 2021 Year*
非活体样本 Non-living animal samples	442	301	439	299
病原阳性 Pathogen positive	31	6	16	53
阳性率(%) Positive rate	7.01	1.99	3.64	17.72
小鼠肝炎病毒阳性 MHV positive	7	2	2	4
活体样本 Living animal samples	101	60	135	99
病原阳性 Pathogen positive	20	7	6	5
阳性率(%) Positive rate	19.8	11.66	4.44	5.05

注: *:2021 年统计日期截止 6 月份。

Note. *, 2021 statistics date ends in June.

表 3 2018~2021 年供应单位来源
Table 3 Supply units form 2018 to 2021

内容 Content	2018 年 2018 Year	2019 年 2019 Year	2020 年 2020 Year	2021 年* 2021 Year*
供应单位 Supply units	12	21	20	27
病原阳性 Pathogen positive	6	5	5	6

注: *:2021 年统计日期截止 6 月份。

Note. *, 2021 statistics date ends in June.

3 讨论

在上述实验动物的病原检测和质量控制过程中,我们发现病原监测是保障实验动物质量的有效防线。首先,能有效地切断传染源,通过设施的功能分区,不同功能区域执行了不同的检疫管理制度、监测病原谱的及时更新、动物相关用品等的定期检测,杜绝了携带阳性病原的动物和动物用品的进入,使得设施规避了污染风险;检疫期严密监控小鼠肝炎病毒,将数批阳性动物排除在设施之外,哨兵动物的检测结果也证实了此举的必要性;鞭毛虫为阳性检出率较高的寄生虫之一,而检疫期的检测排除、哨兵动物的监测、在养动物的粪便排查和抽查工作,也是控制该寄生虫的有效措施;动物饮用水的定期无菌检测、高压炉灭菌效果和环境技术因子的定期监测,为设施的水机和高压炉使用效果是否合格、维护措施是否得当、日常消毒管理工作是否到位等做出客观的数据支持。其次,阳性病原的检出,为设施消除了病原传播隐患,中心曾在老旧设施的动物粪便中,检出 MHV、鞭毛虫阳性,尔后返回至其饲养区域进行合并样本排查,发现阳性后,对阳性样本的覆盖区域的课题组信息梳理、归类后,进行课题组合并样本检测或单笼检测,均发现病原阳性动物集中于某一课题组、甚至于同一品系,经综合分析后考虑,病原为课题组违规操作携带进入设施所致。随之进行的全面排查、定点抽查和哨兵动物监测结果均提示,该病原阳性动物转入设施的时间较短,发现及时,均未造成扩散传播。可见有效的病原检测措施,在阻止病原于设施内的传播隐患方面效果显著。

随着时代的发展,各领域基础研究突飞猛进,产业发展异常迅猛,各学科交叉融合,国内实验设施呈井喷状建设,实验动物需求量更是暴增,高校实验动物中心作为重要的基础性支撑服务平台,保

障实验动物质量和生物安全防控是平台核心工作,通过有效的病原控制、优质的科研服务,以期为学校“双一流”建设和国家相关学科领域发展做出更大的贡献。

参考文献:

- [1] 秦川,谭毅,孔琪,等. 医学实验动物学. 第3版[M]. 北京:人民卫生出版社;2017.
- [2] 李志红. 100起实验室安全事故统计分析及其对策研究[J]. 实验技术与管理, 2014, 31(4): 210-213, 216.
- [3] 秦锋,黄强,袁久洪. 浅析高校实验室生物安全事件的原因与管理对策[J]. 实验室研究与探索, 2017, 36(8): 302-306.
- [4] 尹萍,李志军. 实验室人员因动物实验感染流行性出血热九例[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2007, 25(7): 428-429.
- [5] 何明忠,潘永全,赖国旗,等. 实验大鼠流行性出血热感染的综合预防措施探讨[J]. 四川动物, 2005, 24(2): 197-198, 196.
- [6] 彭丽娜,王朝霞. 高校实验动物屏障设施微生物监控管理[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(2): 154-159.
- [7] 全国实验动物标准化技术委员会. 实验动物微生物学等级及监测. GB 14922. 2-2011[S]. 2011.
- [8] 中国实验动物学会. 实验动物寄生虫学等级及监测. GB 14922. 1-2001[S]. 2002.
- [9] 全国实验动物标准化技术委员会. 实验动物环境及设施. GB 14925-2010[S]. 2011.
- [10] 赵勇,范春,朱闽娟,等. 屏障环境的哨兵动物应用[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(1): 70-73.
- [11] 黄小燕,潘裕,樊海艇,等. 大鼠、小鼠微生物学质量监测中的哨兵动物设置[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(8): 67-69.
- [12] 彭丽娜,王朝霞. 高校实验动物屏障设施微生物监控管理[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(2): 154-159.
- [13] 沈智,庞万勇. 浅论实验动物兽医的职责及实践[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(6): 1-6.
- [14] 中国实验动物学会. 实验动物无菌动物生活环境及粪便标本的检测方法. GB/T 14926. 41-2001[S]. 2002.

[收稿日期]2022-01-05

杨文,宋丹,宋纯东,等.异种蛋白诱导法建立 IgA 肾病动物模型研究进展[J].中国比较医学杂志,2022,32(12):82-87.

Yang W, Song D, Song CD, et al. Research progress on establishment of animal model of IgA nephropathy by heterogeneous protein induction [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 82-87.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.011

异种蛋白诱导法建立 IgA 肾病动物模型研究进展

杨文¹,宋丹²,宋纯东^{3*},郭婷³,段凤阳³,王宁丽³,张博³,杨濛³

(1.河南中医药大学儿科医学院,郑州 450046;2.河南中医药大学,郑州 450046;

3.河南中医药大学第一附属医院儿科,郑州 450003)

【摘要】 本文总结了目前常见的异种蛋白诱导法建立 IgA 肾病(IgAN)动物模型的各种造模方法,指出其各自的特色与不足及各模型间的异同点,并提出了模型改良思路,以期建立更加安全、稳定、成功率高、可重复性强、且与人类更为相似的 IgAN 动物模型提供思路。

【关键词】 IgAN;动物模型;异种蛋白诱导;研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0082-06

Research progress on establishment of animal model of IgA nephropathy by heterogeneous protein induction

YANG Wen¹, SONG Dan², SONG Chundong^{3*}, GUO Ting³, DUAN Fengyang³, WANG Ningli³, ZHANG Bo³, YANG Meng³

(1. College of Pediatrics, Medicine Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Medicine Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046. 3. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003)

【Abstract】 This paper summarizes various methods for establishing animal models of IgA nephropathy (IgAN) by immune induction. The models' respective characteristics and shortcomings and the similarities and differences between them are discussed. We propose that improvements to models are needed and provide ideas for establishing safer, more stable animal models with a higher success rate and robust repeatability that more closely mimic human IgAN.

【Keywords】 IgAN; animal model; immune induction; research progress

IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)是我国最为常见的原发性肾小球疾病,以免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA)或 IgA 免疫复合物(immune complex, IC)沉积于肾小球系膜区为特征^[1]。临床主要表现为血尿,部分患者可出现蛋白尿^[2]。全球 IgAN 约占原发性肾小球疾病的 52.66%^[3],约

30%~40% 的 IgAN 患者最终会进展为终末期肾病^[4]。其发病机制迄今尚不完全明确,亦无特效治疗方案。由于伦理所限,学者们多通过建立 IgAN 动物模型不断探索此病。动物模型是研究疾病的重要载体,理想的动物模型是研究疾病发病机制或药物疗效的前提。IgAN 动物模型主要包括 4 种,即

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82074493);河南省中医药学科领军人才项目(豫卫中医函(2021)8号);河南省卫生健康委员会中医药青苗人才(豫卫中医函[2021]16号);河南省中医管理局国家中医临床研究基地科研专项重点课题(2018JDZX119);河南省中医药管理局国家中医临床研究基地科研专项普通课题(2018JDZX017)。

【作者简介】 杨文(1996—),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合治疗小儿肾病。E-mail:1937472946@qq.com

【通信作者】 宋纯东(1967—),男,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:肾小球疾病的中西医诊治机制研究。

E-mail:scd670918@126.com

免疫诱导型、自发病变型、继发病变型、糖基化缺陷型。其中免疫诱导型动物模型根据诱导剂种类不同可分为异种蛋白诱导、病原微生物诱导、免疫复合物诱导 3 种类型,异种蛋白诱导法所建立的 IgAN 动物模型由于模型病理改变与人类相似、经济成本低而被国内学者广泛采用。然而,医学界关于此法建立 IgAN 动物模型的用药剂量及给药时间的意见尚不统一^[5]。目前,国外学者多采用自发病变型 IgAN 动物模型,造模成本较高。基于此,本文对异种蛋白诱导法构建 IgAN 动物模型展开综述,以期研究者建立 IgAN 动物模型提供参考。

目前国内多采用异种蛋白诱导法构建 IgAN 动物模型^[6],即口服牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)诱导动物体内产生过量的 IgA 分子,沉积于肾小球系膜区诱发 IgAN^[7]。IgAN 动物模型成功建立主要表现为血尿、肾功能下降等,光镜下显示系膜细胞增生、系膜基质增多,免疫荧光检测可见肾小球系膜区 IgA 大量沉积。该模型可用于研究 IgAN 的发病机制、治疗方案等。

1 溯源及改良过程

1.1 溯源

IgAN 动物模型由 Rifai 等^[8]最早建立,国内 IgAN 动物模型的建立,最早可追溯至 1988 年王丽等^[9]使用 BSA 口服,建立以轻度系膜增生为特征的肾病模型,造模后小鼠肾出现 IgA 荧光强度增强,电镜下电子致密物沉积,系膜基质增生,为该模型的建立奠定了基础。

1.2 异种蛋白诱导建立 IgAN 动物模型改良过程

1996 年,刘震等^[10]通过对比 4 种不同造模方法,提出采用口服 BSA+尾静脉注射 SEB+皮下注射弗氏佐剂,所建立的大鼠增殖性肾小球肾炎模型病变最典型。该研究通过口服 BSA 诱导动物体内产生过量的 IgA 分子,沉积于肾小球系膜区诱发 IgAN,弗氏佐剂用于增强 BSA 免疫原性,加速肾组织病理改变。该模型造模时间短,系膜增生明显,亦因实验时间仅 8 周可能影响结果的判定。

聂莉芳等^[11]认为,在口服 BSA 诱导胃肠粘膜免疫的基础上加以静脉注射 BSA 诱导的 IgAN 模型更符合人类特征,进一步改进了 IgAN 造模方法。具体方法:于第 1~6 周按 200 mg/kg 隔日口服 BSA(以 0.1%盐酸酸化水稀释),于第 6 周开始隔日 1 次按 20 mg/kg 尾静脉注射 BSA,连续注射 3 次,以后仍隔日

口服 200 mg/kg BSA 到第 12 周末。该方法采用口服加尾静脉注射 BSA,目的在于增强胃肠粘膜免疫反应。该造模方法易于操作,在 12 周末模型出现蛋白尿,病理切片可观察到系膜细胞增生,系膜基质增多,系膜区有 IgA、免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)、补体 C₃ 沉积,但数量有限。此模型通过反复给模型鼠灌服 0.1%的稀盐酸酸化水,破坏具有碱性环境的肠道粘膜,进而促进免疫球蛋白 IgA 抗体的产生,形成大量免疫复合物(immune complex, IC)。此后,宋纯东等^[12]、赵刃等^[13]皆参考此法成功复制 IgAN 动物模型。然而,此模型所引起的血尿与 IgAN 血尿的发生机制有所差别。

南方医科大学南方医院彭伟等^[14]通过对比两种不同的造模方法,A 组口服 BSA+静脉注射 SEB+注射弗氏佐剂,B 组口服 BSA+静脉注射 SEB+注射弗氏佐剂+皮下注射 CCl₄,发现 B 组大鼠系膜增生较 A 组明显,IgA 分子沉积强度更高。该研究将口服 BSA 剂量增加至 400 mg/kg,SEB 剂量减少至 0.3 mg/kg,增强了免疫原性,降低了毒性,将 CCl₄ 由腹腔注射改为皮下注射且剂量减半,减轻了其肝损伤,两组对比证明了 B 组血尿、蛋白尿出现更早,模型组肾病理改变更为显著。但由于 BSA 剂量仍较低且 SEB 毒性较大,该方法所建立的 IgAN 动物模型仍不理想。

考虑到 SEB 毒性较大,汤颖等^[15]进一步改进 IgAN 动物模型,联合应用 BSA+脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)+CCl₄造模。造模方法:BSA(400 mg/kg,连续 6 周隔天灌胃)+LPS(分别于第 6、8 周尾静脉注射 LPS 0.05 mg)+CCl₄(下注射 CCl₄ 0.1 mL+蓖麻油 0.5 mL,每周 1 次,持续 9 周)。该法以 LPS 代替 SEB,BSA 剂量较前增加一倍,CCl₄ 给药方法改为皮下注射且减少剂量至诱导肝硬化剂量的 1/3。该模型动物成模率高,可重复性强,目前国内研究者复制 IgAN 动物模型多沿用此法。然而,该模型在造模时长、药物剂量上仍存在争议。

陆慧瑜等^[16]对汤颖等^[15]的造模方法进一步改进,具体方案为:持续 8 周隔日灌胃 BSA 400 mg/kg,每周一次皮下注射蓖麻油 0.3 mL+CCl₄ 0.1 mL 持续 9 周,于第 6 周尾静脉注射 LPS 0.05 mg。该方案将隔日灌服 BSA 的时间由 6 周改为 8 周,以增强动物免疫原性,尾静脉注射 LPS 由 2 次改为 1 次以减轻 LPS 累计毒性对模型的损伤,加速模型大鼠肾病变的同时降低死亡率,9 周后成功建立 IgAN 动物模型。

为精准把握造模剂量与时长,有学者提出 BSA+LPS+CCl₄ 分剂量、时间造模法^[17],即将 BSA 分为高剂量组(600 mg/kg)和低剂量组(400 mg/kg)隔日灌胃,并在第 8 周和 12 周观察病理变化。实验发现,造模 8 周后,大鼠肾病理出现系膜细胞和系膜基质轻度增生,12 周末更为显著并伴轻度肾间质纤维化,低剂量组病变较轻,12 周末可见免疫荧光,高剂量组荧光表达强于低剂量组。BSA+LPS+CCl₄ 造模法,可在 12 周建立病理表现及生化指标趋近人类 IgAN 的动物模型,且高剂量 BSA (600 mg/kg)模型更为典型。

为解决在不同时间节点、口服不同剂量 BSA、BSA 溶剂不同以及在不同节点注射免疫佐剂对建立 IgAN 大鼠模型影响有差异这些问题上存在的争议,马思佳等^[18]将酸化水作为 BSA 溶剂,将 BSA 分 400 mg/kg 和 600 mg/kg 两种剂量对大鼠进行灌胃,分多个时间节点尾静脉注射 LPS。该研究通过对比发现,纯化水与酸化水相比作为溶剂效果更加突出,隔日灌服以纯化水溶解的高剂量 BSA (600 mg/kg),每周 1 次皮下注射 CCl₄,连续 12 周,联合第 8、10 周每周 1 次尾静脉注射 LPS 所建立的 IgAN 大鼠模型更接近人类病理。该实验造模成功率高于 90%,在操作过程中无大鼠死亡,所提出的造模方法是有待进一步验证。

诸多临床和实验研究表明,肠粘膜免疫系统的激活是 IgAN 的重要发病机制,肠-肾轴也参与 IgAN 的发病^[19-22],故有学者提出将异种蛋白加入到饮水中喂养动物以激活免疫反应^[23]。Zou 等^[24]将牛丙种球蛋白(bovine gamma globulin, BGG)加入饮水中喂养动物 9 周,12 周后模型出现明显的蛋白尿,肾病理见系膜细胞和系膜基质弥漫性增殖,免疫荧光显示大量 IgA 沉积,提示造模成功。通过自由饮水建立动物模型,动物存活率高,实验可重复性强,但无法控制饮水量可能会对模型造成影响,且模型未出现明显血尿。

近年来,随着胸腺肽被广泛应用于各种疾病的辅助治疗中,有学者尝试将胸腺肽应用于建立 IgAN 动物模型。胸腺作为人体重要的免疫器官,其中存在大量免疫细胞,可分泌抗体。胸腺肽可促进胸腺发育,增强机体免疫,使免疫细胞产生的抗体增多。基于此,高明等^[25]对 IgAN 动物模型进行改进,造模方法为:持续 12 周隔天灌胃 BSA 600 mg/kg,每周皮下注射 CCl₄ 0.1 mL、蓖麻油 0.3 mL 及胸腺肽 3

mg,分别于第 6、8、10 周尾静脉注射 LPS 0.05 mg。观察 12 周后大鼠均出现蛋白尿,并可见典型病理改变,验证了造模成功。与其他模型相比,该研究首次将胸腺肽用于建模,增强了模型的免疫反应。该模型免疫荧光强度较强,且病理与人 IgAN 相似,操作简单,造模成功率高,但大部分模型病理仅呈轻至中度病变,未能出现重度系膜增生、新月体形成等病变,仍需进一步探索。

以上是目前常见的学者们运用异种蛋白诱导法建立 IgAN 动物模型的方法,通过异种蛋白诱导造模机制复杂,造模能否成功易受多种因素影响,如动物实验室环境、研究员专业素养、动物自身耐受性、药物等。此外,导致异种蛋白诱导法造模失败还有一个重要原因在于动物本身存在一定的自愈能力。在实验过程中,若已造模成功的动物长时间未再次给予外源性抗原,体内的免疫细胞可能会将原有 IC 清除,从而导致造模失败。实验动物的个体差异性也可能导致模型病变程度不一,病理结果有轻有重,不易控制。模型总结见表 1。

2 模型间的异同点

总结上述动物模型的异同点,以供读者参考,具体如下:(1)实验动物主要有大鼠、小鼠,其中 SD 雄性大鼠最为常用。(2)实验动物大致为 6~8 周龄。(3)造模时长不等,造模时长最短为 8 周,最长造模时长可达 12 周。(4)造模方法上均采用异种蛋白诱导法造模,造模均通过口服联合注射药物诱发动物体免疫反应增强、IC 沉积于肾小球系膜区,具体药物种类、剂量、给药时间各有不同。(5)判断造模成功的方法主要集中在以下方面:①一般情况:体重、毛发、精神、食欲、饮水量、尿量及气味、粪便颜色等;②实验室指标:血常规、尿常规、肝功能、肾功能、24 h 尿蛋白定量、炎症因子、循环 IC 等;③肾病理:光镜、免疫荧光、电镜。

3 IgAN 中医研究模型改良思路

IgAN 是以系膜区大量沉积 IgA 或 IgAIC 为病理特征的原发性肾小球疾病,血尿为其主要临床表现,可兼有蛋白尿、高血压等^[26]。在中医古籍中并未记载有 IgAN 的病名,但根据其临床表现可归属于“尿血”、“虚劳”、“腰痛”、“肾风”等范畴^[27]。其病因无外乎先天禀赋不足与外感病邪两个方面,异

表 1 IgAN 常见动物模型总结
Table 1 Summary of common animal models of IgAN

动物品系 Animal strains	造模周期 Modeling cycles	干预措施 Intervention measures	特点 Characteristic	参考文献 References
雄性 SD 大鼠 Male SD rat	8 周 8 weeks	以 BSA 20 mg 隔日灌胃 1 次至 8 周末,于实验的第 1、8 天分别于皮下注射含有 2 mg BSA 的弗氏佐剂 0.2 mL,分别于实验的第 8、15 天尾静脉注射 SEB (0.4 mg/kg)。 BSA 20 mg was administered by gavage every other day until the end of the 8th week. Freund's adjuvant containing 2 mg BSA was injected subcutaneously on the 1st and 8th days of the experiment 2 mL, SEB (0.4 mg/kg) was injected into caudal vein on the 8th and 15th days of the experiment.	造模时间短,系膜增生明显,但造模时间短可能会影响结果判定。 Short modeling time and obvious mesangial hyperplasia, but short modeling time may affect the judgment of results.	[10]
雄性昆明小鼠 Male KM mice	12 周 12 weeks	于第 1~6 周按 200 mg/kg 隔日口服 BSA (以 0.1% 盐酸酸化水稀释),于第 6 周开始隔日 1 次按 20 mg/kg 尾静脉注射 BSA,连续注射 3 次,以后仍隔日口服 200 mg/kg BSA 到第 12 周末。 BSA was orally administered at 200 mg/kg every other day from the 1st to the 6th week (diluted with 0.1% hydrochloric acid acidified water). BSA was injected once every other day at 20 mg/kg tail vein from the 6th week for three consecutive times. After that, BSA was still orally administered at 200 mg/kg every other day until the end of the 12th week.	操作简单,但通过口服盐酸酸化水来破坏肠道粘膜,所引起的血尿与 IgAN 血尿的发生机制有差别。 Operation is simple, but the mechanism of hematuria caused by oral hydrochloric acid acidified water is different from IgAN hematuria.	[11]
雌性 SD 大鼠 Female SD rat	10 周 10 weeks	持续 10 周隔日灌胃 BSA 400 mg/kg,第 8~10 每周尾静脉注射 SEB 0.3 mg/kg,持续 8 周每周 1 次皮下注射蓖麻油 0.5 mL+CCl ₄ 0.1 mL,第 1 天皮下注射完全弗氏佐剂 0.2 mL (含 BSA 2 mg),第 14、28 天腹腔注射不完全弗氏试剂 0.2 mL (含 BSA 2 mg)。 BSA 400 mg/kg was administered by gavage every other day for 10 weeks, and SEB 0.3 mg/kg was injected into caudal vein every week from 8 to 10 weeks for 8 weeks, subcutaneous injection of castor oil 0.5 mL and CCl ₄ 0.1 mL once a week for 8 weeks, subcutaneously injected complete Freund's adjuvant on the first day 0.2 mL (containing 2 mg of BSA), intraperitoneal injection of incomplete Freund's reagent on the 14th and 28th days 2 mL (containing BSA 2 mg).	方法较复杂,操作难度较大,BSA 剂量仍较低且 SEB 毒性较大,动物模型不理想。 Method is complicated and difficult to operate, the dose of BSA is still low and the toxicity of SEB is high, so the animal model is not ideal.	[14]
雄性 SD 大鼠 Male SD rat	9 周 9 weeks	BSA (400 mg/kg, 连续 6 周隔天灌胃) + 脂多糖 (LPS, 分别于第 6、8 周尾静脉注射 LPS 0.05 mg) + CCl ₄ (皮下注射 CCl ₄ 0.1 mL + 蓖麻油 0.5 mL, 每周 1 次,持续 9 周)。 BSA (400 mg/kg, gavage every other day for 6 weeks) + lipopolysaccharide (LPS, LPS was injected into caudal vein at 6 and 8 weeks, respectively 0.05mg) + CCl ₄ (0.1 mL of CCl ₄ , 0.5 mL of castor oil subcutaneously, once a week for 9 weeks).	模型与临床吻合度较高,动物肝损害轻,成模率高,可重复性强,造模剂量与时长仍存在争议。 There is a high coincidence between the model and clinic, mild liver damage, high modeling rate and strong repeatability, and the dosage and duration of modeling are still controversial.	[15]
雄性 SD 大鼠 Male SD rat	9 周 9 weeks	持续 8 周隔日灌胃 BSA 400 mg/kg,持续 9 周每周皮下注射 1 次蓖麻油 0.3 mL+CCl ₄ 0.1 mL,第 6 周尾静脉注射 LPS 0.05 mg。 BSA 400 mg/kg was administered by gavage every other day for 8 weeks. 0.3 mL castor oil and CCl ₄ 0.1 mL was injected subcutaneously once a week for 9 weeks. LPS 0.05 mg was injected into caudal vein at the 6th week 0.5 mg.	模型与临床吻合度较高,动物死亡率降低,动物免疫原性增强,病变较前典型,但造模时长仍较短。 Model is in good agreement with the clinic, the animal mortality is reduced, the animal immunogenicity is enhanced, and the lesion is more typical than before, but the modeling time is still short.	[16]

续表 1

动物品系 Animal strains	造模周期 Modeling cycles	干预措施 Intervention measures	特点 Characteristic	参考文献 References
雌性 SD 大鼠 Female SD rat	12 周 12 weeks	BSA 600 mg/kg 持续 12 周隔天灌胃,持续 12 周皮下注射蓖麻油 0.3 mL+CCl ₄ 0.1 mL,每周 1 次,联合第 8 周尾静脉注射 LPS 0.05 mg。 BSA 600 mg/kg for 12 weeks, intragastric administration every other day, subcutaneous injection of 0.3 mL castor oil and CCl ₄ 0.1 mL for 12 weeks, once a week, combined with tail vein injection of LPS for the eighth week 0.5 mg.	通过对比探索出较精确的造模剂量与时长,高剂量、长组长组模型与临床吻合度较高、肾病变较显著,模型可重复性强。 Through comparison to explore a more accurate modeling dose and time, high dose, long-term group model and clinical coincidence degree is higher, kidney disease is more significant, the model repeatability is strong.	[17]
雄性 SD 大鼠 Male SD rat	12 周 12 weeks	隔日以纯化水溶解 600 mg/kg BSA 灌胃,每周 1 次,连续 12 周皮下注射 CCl ₄ ,在第 8、10 周尾静脉注射 LPS 各 1 次。 600 mg/kg BSA dissolved in purified water was given to the stomach every other day. CCl ₄ was injected subcutaneously once a week for 12 weeks, and LPS was injected into the tail vein once at the 8th and 10th week.	模型与临床吻合度较高,造模成功率高,动物死亡率低,模型有待进一步验证。 The model has high coincidence with clinic, high success rate and low animal mortality, so the model needs to be further verified.	[18]
雄性 Lewis 大鼠 Male Lewis rat	9 周 9 weeks	将 0.1% BGG 溶于 6 mmol/L 的 HCl 中作为饮用水口服 9 周,在第 2 周连续 3 d 尾静脉注射 1 mg BGG (溶于 0.3 mL 6 mmol/L HCl)。 0.1% BGG was dissolved in 6 mmol/L HCl for 9 weeks, and 1 mg BGG (dissolved in 0.3 mL 6 mmol/L HCl) was injected into caudal vein for 3 days in the second week.	操作简单,病变显著,动物存活率高,但模型未出现明显血尿,模型稳定性一般。 Operation is simple, the lesion is significant, and the animal survival rate is high, but there is no obvious hematuria in the model and the stability of the model is general.	[24]
雌性 SD 大鼠 Female SD rat	12 周 12 weeks	持续 12 周隔天灌胃 BSA 600 mg/kg,每周皮下注射 CCl ₄ 0.1 mL、蓖麻油 0.3 mL 及胸腺肽 3 mg,分别于第 6、8、10 周尾静脉注射 LPS 0.05 mg。 For 12 weeks, 600 mg/kg BSA was administered by gavage every other day, and CCl ₄ 0.1 mL, castor oil 0.3 mL and 3 mg thymosin was injected subcutaneously every week, and LPS 0.5 mg were injected into tail vein at 6, 8 and 10 weeks, respectively.	症状与临床相似,造模成功率高,模型可重复性强,但病变程度较轻。 Symptoms are similar to the clinic, the success rate of modeling is high, the repeatability of the model is strong, but the degree of lesion is light.	[25]

种蛋白诱导法造模主要通过影响后天来制备模型。然而目前此法成模评判标准多采用病理评价方法,即以病理作为诊断的金标准,对病证结合模型探索甚少。中医强调辨证论治,同病异治和异病同治的实质是通过逆转证的变化来改变疾病发展趋势,辨证选方治疗可显著提高治疗有效率,大幅度改善模型实验室指标及病理结果^[28]。现有的免疫异种蛋白诱导法建立 IgAN 动物模型,模型稳定性好,但证候可控性差,无法确保得到实验研究所对应的证型,以此为基础的中药疗效评价说服力有限。

因此,将病因、症状、体征等中医要素与现代医学之客观指标有机统一起来建立病证结合模型是进一步改良 IgAN 模型的必然要求。构建病证结合模型要尽可能贴近临床,将疾病造模因素与证候造模因素相结合,充分考虑到环境、体质、饮食、情志

等因素对机体的影响,提高造模成功率^[29]。同时,要不断完善证候评价体系,探索建立模型动物四诊信息客观化采集方法,以保证模型的稳定性。

4 结语

综上,IgAN 发病机制复杂,其动物模型建立方法尚未完全统一,目前尚无与人类 IgAN 临床表现及病理特征完全一致的动物模型。经过学者们的不断探索,提出了多种 IgAN 模型的造模方法,方法各有千秋。虽然异种蛋白诱导法建立 IgAN 动物模型可操作性及重复性强,但造模过程中易受多种因素影响,且因动物本身有自愈能力而存在诱导失败的可能。此外,现有造模方法评价标准单一,尚无研究者提出病证结合模型。

IgAN 动物模型是研究 IgAN 发病机制、诊断、治

疗的前提,相信随着现代医学的进步和人们对 IgAN 病理机制的深入探究,IgAN 实验动物模型会不断革新,愈加符合人类特征。

参考文献:

- [1] Jebali H, Ghabi H, Mami I, et al. Prognostic value of mesangial C4d staining in IgA nephropathy: a Tunisian study [J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2021, 32(3): 691-698.
- [2] Li Y, Fu R, Gao J, et al. Effect of pulsed intravenous methylprednisolone with alternative low-dose prednisone on high-risk IgA nephropathy: a 18-month prospective clinical trial [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 255.
- [3] Zhan X, Deng F, Wang AY, et al. HLA-DQB1 and HLA-DRB1 expression is associated with disease severity in IgAN [J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(9): 9453-9466.
- [4] Li Z, Han Q, Ye H, et al. Serum homocysteine is associated with tubular interstitial lesions at the early stage of IgA nephropathy [J]. BMC Nephrol, 2022, 23(1): 78.
- [5] 金迪, 张守琳, 邹迪. IgA 肾病动物模型的研究进展 [J]. 长春中医药大学学报, 2020, 36(5): 1088-1092.
- [6] 刘建新, 唐鑫, 徐向宇, 等. 实验性 IgA 肾病动物模型的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(2): 257-263.
- [7] 王宗隅, 范琦强, 周芸. IgA 肾病实验动物模型的研究进展 [J]. 中华肾脏病杂志, 2021, 37(12): 1020-1024.
- [8] Rifai A, Small PA Jr, Teague PO, et al. Experimental IgA nephropathy [J]. J Exp Med, 1979, 150(5): 1161-1173.
- [9] 王丽, 章友康, 王海燕, 等. 肝脾和(或)胃肠粘膜免疫在肾小球系膜区 IgA 沉积中的作用 [J]. 中华内科杂志, 1988, 27(4): 216-220, 260-261, 266.
- [10] 刘震, 周树录, 谭建三, 等. 大鼠系膜增殖型肾小球肾炎模型的改进 [J]. 华西医科大学学报, 1996, 27(2): 182-184.
- [11] 聂莉芳, 余仁欢, 林秀彬, 等. 益气滋肾冲剂对 IgA 肾病小鼠肾小球超微结构的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(12): 737-739.
- [12] 宋纯东, 丁樱. 肾必宁颗粒对 IgA 肾病小鼠肾小球系膜细胞凋亡的影响 [J]. 陕西中医, 2004, 25(10): 951-952.
- [13] 赵刃, 朱晓菲, 吴迪, 等. 紫蓟益肾颗粒对 IgA 肾病模型大鼠的治疗作用 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(11): 1778-1780.
- [14] 彭伟, 刘郑荣. 两种 IgA 肾病大鼠模型的比较 [J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(10): 1842-1845.
- [15] 汤颖, 姜探奇, 成彩联, 等. 实验性 IgA 肾病模型的改进 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2006, 27(2): 184-187.
- [16] 陆慧瑜, 张巧玲, 蒋小云, 等. IgA 肾病大鼠模型的建立 [J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(6): 1264-1267.
- [17] 张静, 李静, 桑晓红, 等. 运用两种 BSA 剂量建立 IgA 肾病大鼠模型观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(1): 13-16, 96-97.
- [18] 马思佳, 杨斌, 赵明明, 等. 免疫球蛋白 A 肾病大鼠模型建立的方法学研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(17): 2049-2054.
- [19] Sallustio F, Curci C, Leo VD, et al. A new vision of IgA nephropathy: the missing link [J]. Int J Mol Sci, 2019, 21(1): 189.
- [20] Selvaskandan H, Barratt J, Cheung CK. Immunological drivers of IgA nephropathy: exploring the mucosa-kidney link [J]. Int J Immunogenet, 2022, 49(1): 8-21.
- [21] Gesualdo L, Di LV, Coppo R. The mucosal immune system and IgA nephropathy [J]. Semin Immunopathol, 2021, 43(5): 657-668.
- [22] Monteiro RC, Berthelot L. Role of gut-kidney axis in renal diseases and IgA nephropathy [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2021, 37(6): 565-571.
- [23] Emancipator SN, Gallo GR, Lamm ME. Experimental IgA nephropathy induced by oral immunization [J]. J Exp Med, 1983, 157(2): 572-582.
- [24] Zou JN, Xiao J, Hu SS, et al. Toll-like receptor 4 signaling pathway in the protective effect of pioglitazone on experimental immunoglobulin A nephropathy [J]. Chin Med J (Engl), 2017, 130(8): 906-913.
- [25] 高明, 张连栋, 张莉, 等. 改良大鼠 IgA 肾病模型建立及氧化应激状态评估 [J]. 临床肾脏病杂志, 2018, 18(4): 243-247.
- [26] Chen Y, Yang Y, Liang Y, et al. Retrospective analysis of crescent score in clinical prognosis of IgA nephropathy [J]. Open Med (Wars), 2022, 17(1): 205-215.
- [27] 龚永杰, 占永立. 从肺、脾、肾论治 IgA 肾病 [J]. 中医杂志, 2020, 61(11): 1000-1003.
- [28] 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.
- [29] 李磊, 刘建勋, 任钧国, 等. 中医药动物模型研究现状及展望 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 104-110.

[收稿日期]2022-03-29

王世琦,岳亮,谢文鹏,等. 非编码 RNA 在骨性关节炎中对软骨细胞和胞外基质影响的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 88-94.

Wang SQ, Yue L, Xie WP, et al. Research progress on the effect of non-coding RNA on chondrocytes and the extracellular matrix in osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 88-94.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.012

非编码 RNA 在骨性关节炎中对软骨细胞和胞外基质影响的研究进展

王世琦¹, 岳亮², 谢文鹏^{2*}, 蔡余力^{1,2*}

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院骨科, 济南 250014)

【摘要】 骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是致残率最高的慢性疾病,由于肥胖率增加和老龄化的到来,OA 对人们的生活和社会资源产生越来越大的负面影响。随着高通量技术的发展,非编码 RNA 的研究逐渐成为 OA 领域的热点,近来的研究表明软骨细胞凋亡及细胞外基质的降解是 OA 主要的病理基础,非编码 RNA 与软骨细胞存在密切联系,但其分子机制尚未完全阐明。本文就非编码 RNA 对软骨细胞和胞外基质的影响做一综述,以期进一步了解软骨退变的机制,为 OA 的早期诊疗提供新思路。

【关键词】 骨性关节炎;非编码 RNA;微小 RNA;长链非编码 RNA;环状 RNA

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0088-07

Research progress on the effect of non-coding RNA on chondrocytes and the extracellular matrix in osteoarthritis

WANG Shiqi¹, YUE Liang², XIE Wenpeng^{2*}, CAI Yuli^{1,2*}

(1. the First Clinical Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China.

2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014)

【Abstract】 Osteoarthritis (OA) is a chronic disease with a high disability rate. With the increase in the obesity rate and an aging patient population, OA is having more and more negative impacts on peoples' lives and social resources. With the development of high-throughput technology, the study of non-coding RNA has gradually become a hot spot in the field of OA. Recent studies have shown that chondrocyte apoptosis and extracellular matrix degradation are the main pathological bases of OA. Non-coding RNA is closely related to chondrocytes, but the molecular mechanism has not been fully clarified. This article reviews the effects of non-coding RNA on chondrocytes and the extracellular matrix to further understand the mechanisms of cartilage degeneration and provide new ideas for the early diagnosis and treatment of OA.

【Keywords】 osteoarthritis; non-coding RNA; miRNA; lncRNA; circRNA

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目(82104897);山东省中医药科技发展计划项目(2019-0084);山东省自然科学基金青年项目(ZR2020QH312)。

【作者简介】 王世琦(1997—),男,硕士研究生,研究方向:骨与关节疾病诊治。E-mail:ture406@163.com

【通信作者】 蔡余力(1972—),男,教授,硕士研究生导师,研究方向:骨与关节疾病诊治。E-mail:280647730@qq.com

谢文鹏(1990—),男,医学博士,副主任医师,研究方向:骨与关节损伤的临床与基础研究。E-mail:xiewenpeng0925@163.com

* 共同通信作者

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是世界上最常见的关节疾病,其发病率随着年龄的增长而增加。膝关节是最主要的受影响关节,可导致进行性加重的功能丧失、疼痛以及僵硬。据统计,在我国 60 岁以上人群患病率约 50%,75 岁以上约 80%,女性的患病率为男性的 2.46 倍,致残率高达 53%^[1]。尽管骨关节炎对个人、经济和社会方面造成了相当大的损失,但其并未引起人们的重视,更有甚者错误地认为骨关节炎是衰老必不可少的一部分^[2]。软骨细胞是软骨中发现的唯一细胞,它受到严格的调控来维持生长、分化和凋亡之间的平衡。然而在 OA 发病过程中,这种动态平衡会导致软骨基质的退化和软骨细胞的过度损伤,软骨细胞外基质的丢失也会导致软骨的异常重塑,最终演变为 OA^[3]。如何早期诊断和治疗软骨退变既是目前临床上亟需解决的关键,也是问题的难点。因此,从生物学上寻找 OA 作用于软骨细胞的特异性靶点,对 OA 的早期诊断和治疗是十分重要的。

随着测序技术的进步,多种 mRNA 以外的 RNA 被发现,这些新发现的 RNA 并不参与蛋白的编码,被统称为非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)^[4]。非编码 RNA 主要分为微小 RNA (microRNA, miRNA)、长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 和环状 RNA (circular RNA, circRNA)。它们与诸多分子靶目标结合形成调控网络,进而启动特定的细胞生物应答,从而调控基因表达、影响细胞内信号传递、参与表观遗传修饰等多种生命活动的功能,进而在 OA 等疾病的发生、发展中发挥作用^[5]。近年越来越多的证据表明,ncRNA 与 OA 的发生、发展、诊断和治疗等密切相关,本文就 ncRNA 对软骨细胞和胞外基质的影响进行归纳总结,为探

索其对 OA 发病机制的影响提供新思路。

1 miRNA 与 OA 软骨细胞和胞外基质的关系

miRNA 是一种长度为 21~23 个核苷酸的小片段非编码单链 RNA,自从在秀丽隐杆线虫中鉴定出首个 miRNA 后,已有超过 1000 个 miRNA 在人类和小鼠中被发现,miRNA 调控人类 60% 以上的蛋白质编码基因,在基因表达的调控中发挥重要作用。miRNA 在 OA 软骨细胞中的作用机制见图 1。

1.1 miRNA 与软骨细胞的增殖、凋亡的关系

OA 的发生与软骨细胞的增殖、凋亡有着密切的联系。上调或下调的 miRNA 可调控软骨细胞的增殖、凋亡过程。值得注意的是,miRNA 可同时介导多个生物学过程来调控 OA 的进程,比如 miR-34a 除与 miR-108a 协同以提高 NF- κ B (p50) 活性,降低 Bcl-2 的表达,进而促进软骨细胞凋亡外^[6],还可以靶向诱导产生 CyR61,以抑制软骨细胞的增殖^[7]。Zhang 等^[8]的大鼠实验表明向关节腔中注射 miR-34a 能降低软骨细胞的死亡,减少软骨的丢失。敲除 MF12-AS1 基因后,过表达的 miR-130a-3p 会下调 TCF4,抑制脂多糖诱导的细胞损伤,达到抑制细胞凋亡、炎症反应和细胞外基质降解的功能,从而达到缓解 OA 的作用^[9]。

1.2 miRNA 与软骨细胞自噬的关系

自噬是机体在应激状态下防止细胞死亡的保护机制,有利于维持细胞活性与稳态^[10]。PI3K/AKT/mTOR 和 NF- κ B 信号通路在 miRNA 调控软骨细胞自噬中发挥重要作用,miR-155 可抑制前者以诱导自噬的发生,miR-27a 的过表达可通过后者诱导自噬,miR-107 则可作用于两种通路^[11-13]。miR-30b 可下调促自噬基因并上调促凋亡基因,应用

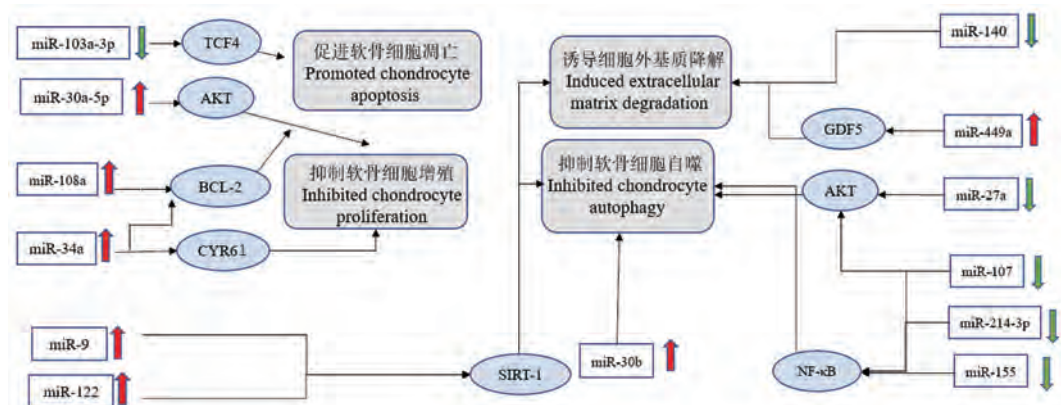


图 1 miRNA 在 OA 软骨细胞和胞外基质中的作用

Figure 1 Mechanism of miRNA on OA chondrocyte and extracellular matrix

antimiR-30b 后不仅起到明显的反转作用,还可以提高炎症期间的细胞存活率^[14],这表明 antimiR-30b 具有治疗 OA 的潜力。miR-9 是沉默信息调节因子 1(SIRT-1)的调节因子,可通过调控 SIRT1 来影响软骨细胞的自噬^[15]。除 miRNA 对自噬进行调节外,自噬还可调节 miRNA 的生物学功能,例如,自噬选择性地针对 miRNA 机制的关键组件来调节 miRNA 的稳定性和功能。DICER1 和主要的 miRNA 效应器 AGO2 通过选择性自噬受体 CALCOCO2/NDP52 降解^[16];mTORC1 途径和自噬控制着 RNA 诱导沉默复合体(RISCs)的正确组装,从而影响 miRNA 的功能^[17]。

1.3 miRNA 与细胞外基质降解的关系

基质金属蛋白酶 13(MMP13)与人血小板反应蛋白整合素肽酶 5(ADAMTS-5)是导致关节软骨细胞外基质降解的主要水解酶,是诱发 OA 的关键原因。Cao 等^[18]的研究揭示了 miR-214-3p 的减少会激活 NF- κ B 信号通路促进 ECM 的降解和软骨细胞凋亡进而促进 OA 的发生。促炎症细胞因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)可通过刺激基质降解的蛋白的表达参与 OA 的发生和发展,抑制 miR-30a 的表达可通过 IL-1 β /AP-1/MIR-30a/ADAMTS-5 轴缓解 IL-1 β 诱导的软骨细胞外基质降解,可见 miR-30a 是软骨稳态的关键调节剂,是 OA 的潜在诊断和治疗靶点^[19]。Zhang 等^[15]发现在 OA 患者中,miR-9 的表达受抑制,而 MMP-13 呈高表达,并证实 miR-9 可抑制 MMP13 的表达降低细胞外基质的降解。miR-140 不仅可直接作用于 Adamts-5 靶点,还可能通过其他生物轴来调控细胞外基质的降解^[20]。miR-122 过表达可抑制 SIRT1,从而增加细胞外基质的降

解^[21]。miR-449a 可直接靶向生长分化因子 5(GDF5)促进软骨细胞的降解^[22],在大鼠实验中,关节腔内注射 miRNA-140 可以通过调节细胞外基质的稳态来缓解大鼠骨性关节炎的进展,这可能成为治疗 OA 的新方法^[23]。

2 lncRNA 与 OA 软骨细胞和胞外基质的关系

lncRNA 是一类分布在细胞核和细胞质中超过 200 个核苷酸的 ncRNA,由 RNA 聚合酶 II 转录而来,因此 lncRNA 在来源和结构上类似于 mRNA,都具有 5' 帽状结构、3' polyA 结构和可变剪接体。lncRNA 可分为基因间 lncRNA、内含子 lncRNA、正义 lncRNA、双向 lncRNA、反义 lncRNA^[24]。lncRNA 通常参与骨和软骨的形成,现有证据表明 lncRNA 是炎症反应的中心调节因子,可能是 OA 诊断和治疗的潜在生物标志物^[25]。lncRNA 在 OA 软骨细胞中的作用机制见图 2。

2.1 lncRNA 与软骨细胞的增殖、凋亡的关系

目前已知有 4717 种 lncRNA 在 OA 软骨中差异表达^[26],lncRNA 通常通过调节 miRNA 来发挥作用。lncRNA HOTAIR 能促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡,在最近的研究中发现它通过调节 miR-1277-5p 和 miR-130a-3p 来调控软骨细胞的增殖和凋亡^[27-29],此外有报道沉默 lncRNA HOTAIR 可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制 OA 滑膜炎和在滑膜细胞增殖,促进滑膜细胞凋亡^[30],这表明 lncRNA HOTAIR 不仅通过调节不同 miRNA 影响软骨细胞凋亡,还可作用于 OA 进程的其它病理活动,是 OA 的早期诊疗的潜力靶点。IL-6 β 作为一种促炎因子在多种炎症性疾病中上调,过表达

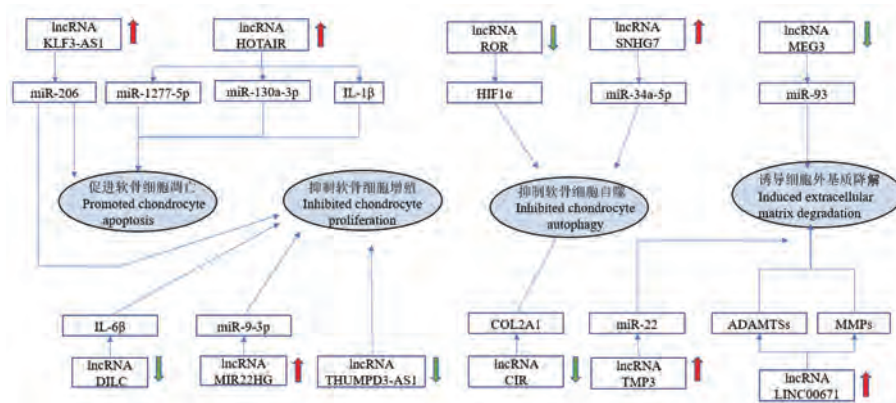


图 2 lncRNA 在 OA 软骨细胞和胞外基质中的作用

Figure 2 Mechanism of lncRNA on OA chondrocytes and extracellular matrix

lncRNA DILC 能使 IL-6 β 水平降低^[31]。lncRNA MIR22HG 可作为 miR-9-3p 的海绵基因,抑制 lncRNA MIR22HG 会通过 miR-9-3p/ADAMTS5 轴促进软骨细胞的增殖,抑制软骨细胞的凋亡^[32]。过表达 lncRNA THUMP3-AS1 虽然能减少软骨细胞的凋亡,但却会提高细胞周期蛋白 E2、细胞周期蛋白依赖性激酶 4、B 细胞淋巴瘤 2、肿瘤坏死因子- α 、一氧化碳和 IL-6 的水平,加重炎症反应^[33],由此可见 ncRNA 调控 OA 网络的复杂性。目前研究表明 lncRNA-KLF3-AS1 可通过海绵 miR-206 促进 GIT1 的表达而发挥 ceRNA 的作用,外源性 lncRNA-KLF3-AS1 可以作用于 miR-206/GIT1 轴调控软骨细胞的增殖诱导和凋亡抑制^[34]。

2.2 lncRNA 与软骨细胞自噬的关系

Tian 等^[35]发现,lncRNA SNHG7 在 OA 软骨细胞中呈低表达状态,lncRNA SNHG7 的缺失会使 miR-34a-5p 水平升高,促进软骨细胞的自噬体内和体外研究均显示 lncRNA-CIR 是控制软骨自噬的关键因素,lncRNA-CIR 的上调会导致 II 型胶原基因 (COL2A1) 水平降低,MMP3 水平升高,最终导致软骨退变^[36]。Yang 等^[37]发现 lncRNA-ROR 可通过 HIF1 α 和 P53 调控软骨细胞自噬,其过表达对软骨细胞的自噬有促进作用,从而缓解 OA 发病。

2.3 lncRNA 与细胞外基质降解的关系

越来越多的研究表明 lncRNA 通过海绵 miRNA 来发挥调控作用。lncRNA MEG3 可以靶向作用于 miR-93/TGFBR2 轴,其过表达可缓解细胞外基质的降解^[38]。有报道 lncRNA LINC00671 可通过 SMURF2/GSK-3 β 轴调控细胞外基质,当 lncRNA LINC00671 表达上调时,可导致 MMP3、MMP13、ADAMTS-4 以及 ADAMTS-5 水平提高进而使细胞外基质降解增加,在 小鼠骨性关节炎模型中使用 sh-LINC00671 可显著抑制 MMPs 和 ADAMTS 的表达,从而降低软骨细胞外基质的降解,缓解 OA 的进展^[39]。Li 等^[40]在体外实验中发现 lncRNA TMP3 可作为 miR-22 的海绵基因,影响 ALK1 的表达,导致 Smad1/5 的表达增加,从而上调 MMP13 的表达和细胞外基质的降解。

3 circRNA 与 OA 软骨细胞和胞外基质的关系

circRNA 是一种存在闭环结构的内源性非编码 RNA,根据基因组起源和产生方式的不同,可大致分为三种类型:内含子 circRNA、外显子 circRNA 和外显

子-内含子 circRNA。circRNA 可调节亲本基因、调控 miRNA、与蛋白质结合形成功能复合体,而且 circRNA 在细胞的增殖、分化、侵袭、迁移、自噬和凋亡等方面发挥重要作用^[41-42]。人工调节 circRNA 有望成为对抗 OA 发展的基因疗法。circRNA 在 OA 软骨中的作用见表 1。

3.1 circRNA 与软骨细胞的增殖与凋亡的关系

有报道抑制 circRNA_0092516 可通过 miR-337-3p/PTEN 轴调控软骨细胞的增殖,抑制细胞凋亡^[43]。circ_0134111 在 OA 软骨细胞中过表达,并作为 miR-515-5p 的海绵基因靶向调控 SOCS1,敲除 circ_0134111 可减轻 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡及炎症反应^[44]。circATRNL1 可通过调节 miR-153-3p/KLF5 轴来改善 OA 的进程,当 circATRNL1 过表达时可抑制 miR-153-3p,缓解软骨细胞的凋亡^[45]。Shen 等^[46]在研究中发现,circCDK14 在关节磨损位置下调明显,Smad2 能诱导 Sox9 和 II 型胶原蛋白的表达并调节软骨细胞的增殖和分化,circCDK4 的过表达可通过 miR-125a-5p/Smad2 轴调节软骨细胞的增殖和凋亡。Zhu 等^[47]的研究表明存在 circGCN1L1/miR-330-3p/TNF 轴,且在大鼠模型中抑制 circGCN1L1 可减少软骨细胞的凋亡。

3.2 circRNA 与软骨细胞自噬的关系

在 OA 大鼠模型中,敲除 circRHOT1 可促进 II 型胶原和蛋白聚糖的表达,并逆转 LC3 和 beclin1 的抑制状态,circ RHOT1 可通过海绵化 miR-142-5p 增强 CCND1 的表达从而抑制软骨细胞的自噬并促进软骨细胞的增殖^[48]。circ_0005567 的过表达可减弱 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡,但这种作用可以被 3-甲基腺嘌呤 (自噬抑制剂) 清除,这表明 circ_0005567 过表达通过诱导自噬抑制软骨细胞凋亡,此外 circ_0005567 可与 miR-495 竞争性结合,抑制早期自噬标记物 ATG14 的表达^[49]。Sui 等^[50]报道 circ_0037658 在 IL-1 β 诱导的软骨细胞中显著上调,沉默 circ_0037658 可以通过调节诸多自噬因子 LC3、P62、Beclin1、ATG5 和 AIF 以诱导自噬,保护软骨细胞免受 IL-1 β 的损伤。

3.3 circRNA 与细胞外基质降解的关系

一项研究表明过表达 circSERPINE2 可减轻 IL-1 β 引起的 OA 进程,circSERPINE2 可靶向调控 miR-495,而 miR-495 靶向调控 TGFBR2。TGFBR2 可以减弱经 IL-1 β 诱导的软骨细胞外基质的降解^[51]。NAMPT 是一种限速酶,可由受 IL-1 β 刺激的 OA 软

表 1 circRNA 对 OA 软骨细胞的作用
Table 1 Effects of circRNA on OA chondrocytes

circRNA 名称 circRNA name	表达水平 Expression level	作用靶点 Target of action	作用 Function
circRNA_0092516	上调 Up-regulation	miR-337-3p	抑制软骨细胞增殖、促进软骨细胞凋亡 Inhibited chondrocyte proliferation and promotes chondrocyte apoptosis
circRNA_0134111	下调 Downgrade	miR-515-5p	抑制软骨细胞凋亡 Inhibited chondrocyte apoptosis
circATRNL1	上调 Up-regulation	miR-153-3p	抑制软骨细胞凋亡 Inhibited chondrocyte apoptosis
circCDK14	上调 Up-regulation	miR-125a-5p	抑制软骨细胞凋亡、促进软骨细胞增殖 Inhibited chondrocyte proliferation and promotes chondrocyte apoptosis
circGCN1L1	上调 Up-regulation	miR-330-3p	抑制软骨细胞凋亡 Inhibited chondrocyte apoptosis
circRHOT1	上调 Up-regulation	miR-142-5p	抑制软骨细胞自噬、促进软骨细胞增殖 Inhibited chondrocyte proliferation and promotes chondrocyte apoptosis
circ_0005567	上调 Up-regulation	miR-495	诱导自噬、抑制软骨细胞凋亡 Induced autophagy and inhibits chondrocyte apoptosis
circ_0037658	/	/	诱导自噬 Induced autophagy
circSERPINE2	上调 Up-regulation	miR-495	抑制 ECM 降解 Inhibited ECM degradation
circRNA_0008956	下调 Downgrade	miR-149-5p	抑制 ECM 降解 Inhibited ECM degradation
circRNA_0020093	上调 Up-regulation	miR-23b	抑制 ECM 降解 Inhibited ECM degradation
circRNA_0045714	上调 Up-regulation	miR-218-5p	抑制 ECM 降解 Inhibited ECM degradation

注：/：未提及。
Note. /, Not mentioned.

骨细胞产生,并增强 MMPs 的表达促进细胞外基质的降解,在受 IL-1 β 刺激形成的 OA 软骨细胞中,NAMPT 过表达可阻断 miR-149-5p 的再表达,抑制细胞凋亡,促进细胞周期,circRNA_0008956 则可通过 miR-149-5p/NAMPT 轴参与细胞外基质的降解^[52]。Feng 等^[53]在体外细胞模型中发现 circRNA_0020093 通过靶向 miR-23b 正向调控 SPRY1 的表达,降低 MMP13 和 ADAMTS-5 介导的细胞外基质降解。Jiang 等^[54]研究发现,过表达 circRNA_0045714 可阻断肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的 MMP13 和 ADAMTS-4 的积聚以及 II 型胶原和聚集蛋白聚糖分解代谢因子的减少,从而防止细胞外基质的降解。

4 结语

OA 是最常见的慢性退行性关节疾病,随着我

国逐渐步入老龄化社会,逐年增多的 OA 患者不仅严重影响患者的生活质量,还会给社会医疗资源带来巨大挑战^[55]。目前 OA 缺乏早期诊断和治疗手段,ncRNA 因其参与软骨细胞的多种活动,具有成为新的诊疗标志物的潜力。由关节软骨损伤导致的细胞外基质的分解代谢失衡是 OA 的直接原因^[56],因此本文从软骨细胞的增殖与凋亡、软骨细胞的自噬和细胞外基质降解 3 个方面介绍了 ncRNA 对软骨细胞和胞外基质的调控。现有的研究多以细胞实验和大鼠实验为主,缺乏直接临床证据,且多着重于单向 lncRNA-miRNA-circRNA 的调控网络的构建,细胞生理功能对 ncRNA 的影响鲜有提及,这还不足以完全揭示 ncRNA 在软骨退变中的作用机制。目前的研究表明 ncRNA 可调节 OA 的多种生理病理过程,随着 ncRNA 在 OA 领域的深入,ncRNA 多靶点多层面的调控机制也会得到更全面地构建。

参考文献:

- [1] 王伟康, 刘晓冬, 周长林, 等. MiRNAs 在骨关节炎发生发展中的调控作用 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(35): 5709-5715.
- [2] Hunter DJ, March L, Chew M. Osteoarthritis in 2020 and beyond: a lancet commission [J]. Lancet, 2020, 396(10264): 1711-1712.
- [3] Jiang S, Liu Y, Xu B, et al. Noncoding RNAs: new regulatory code in chondrocyte apoptosis and autophagy [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2020, 11(4): e1584.
- [4] Li C, Wang Z, Zhang J, et al. Crosstalk of mRNA, miRNA, lncRNA, and circRNA and their regulatory pattern in pulmonary fibrosis [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 18: 204-218.
- [5] Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones [J]. Cell, 2014, 157(1): 77-94.
- [6] Chelieschi S, Tenti S, Mondanelli N, et al. MicroRNA-34a and microRNA-181a mediate visfatin-induced apoptosis and oxidative stress via NF- κ B pathway in human osteoarthritic chondrocytes [J]. Cells, 2019, 8(8): 874.
- [7] Gao F, Peng C, Zheng C, et al. miRNA-101 promotes chondrogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 175-180.
- [8] Zhang W, Hsu P, Zhong B, et al. MiR-34a enhances chondrocyte apoptosis, senescence and facilitates development of osteoarthritis by targeting DLL1 and regulating PI3K/AKT pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(3): 1304-1316.
- [9] Luo X, Wang J, Wei X, et al. Knockdown of lncRNA MFI₂-AS1 inhibits lipopolysaccharide-induced osteoarthritis progression by miR-130a-3p/TCF₄ [J]. Life Sci, 2020, 240: 117019.
- [10] Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease [J]. N Engl J Med, 2013, 368(19): 1845-1846.
- [11] Zhao X, Li H, Wang L. MicroRNA-107 regulates autophagy and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes by targeting TRAF₃ [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 71: 181-187.
- [12] Decressac M, Björklund A. TFEB: Pathogenic role and therapeutic target in Parkinson disease [J]. Autophagy, 2013, 9(8): 1244-1246.
- [13] Zhang FQ, Wang Z, Zhang H, et al. MiR-27a alleviates osteoarthritis in rabbits via inhibiting inflammation [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3): 89-95.
- [14] Chen Z, Jin T, Lu Y. AntimiR-30b inhibits TNF- α mediated apoptosis and attenuated cartilage degradation through enhancing autophagy [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(5): 883-894.
- [15] Zhang H, Song B, Pan Z. Downregulation of microRNA-9 increases matrix metalloproteinase-13 expression levels and facilitates osteoarthritis onset [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3): 3708-3714.
- [16] Ghafouri-Fard S, Shoorei H, Mohaqiq M, et al. Exploring the role of non-coding RNAs in autophagy [J]. Autophagy, 2022, 18(5): 949-970.
- [17] La Rocca G, Olejniczak SH, González AJ, et al. *In vivo*, Argonaute-bound microRNAs exist predominantly in a reservoir of low molecular weight complexes not associated with mRNA [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(3): 767-772.
- [18] Cao Y, Tang SA, Nie X, et al. Decreased miR-214-3p activates NF- κ B pathway and aggravates osteoarthritis progression [J]. EBioMedicine, 2021, 65: 103283.
- [19] Ji Q, Xu X, Zhang Q, et al. The IL-1 β /AP-1/miR-30a/ADAMTS-5 axis regulates cartilage matrix degradation in human osteoarthritis [J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(7): 771-785.
- [20] Miyaki S, Sato T, Inoue A, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis [J]. Genes Dev, 2010, 24(11): 1173-1185.
- [21] Bai Y, Chen K, Zhan J, et al. MiR-122/SIRT1 axis regulates chondrocyte extracellular matrix degradation in osteoarthritis [J]. Biosci Rep, 2020, 40(6): BSR20191908.
- [22] Wu J, Zou M, Ping A, et al. MicroRNA-449a upregulation promotes chondrocyte extracellular matrix degradation in osteoarthritis [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 105: 940-946.
- [23] Si HB, Zeng Y, Liu SY, et al. Intra-articular injection of microRNA-140 (miRNA-140) alleviates osteoarthritis (OA) progression by modulating extracellular matrix (ECM) homeostasis in rats [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2017, 25(10): 1698-1707.
- [24] 冯志国, 孙海飏, 韩晓强. 长链非编码 RNA 对骨相关细胞增殖、分化、凋亡的调控 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(1): 112-118.
- [25] Abbasifard M, Kamiab Z, Bagheri-Hosseiniabadi Z, et al. The role and function of long non-coding RNAs in osteoarthritis [J]. Exp Mol Pathol, 2020, 114: 104407.
- [26] Fu M, Huang G, Zhang Z, et al. Expression profile of long noncoding RNAs in cartilage from knee osteoarthritis patients [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(3): 423-432.
- [27] Zhang C, Wang P, Jiang P, et al. Upregulation of lncRNA HOTAIR contributes to IL-1 β -induced MMP overexpression and chondrocytes apoptosis in temporomandibular joint osteoarthritis [J]. Gene, 2016, 586(2): 248-253.
- [28] Wang B, Sun Y, Liu N, et al. LncRNA HOTAIR modulates chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis via regulating miR-1277-5p/SGTB axis [J]. Wound Repair Regen, 2021, 29(3): 495-504.
- [29] He B, Jiang D. HOTAIR-induced apoptosis is mediated by sponging miR-130a-3p to repress chondrocyte autophagy in knee osteoarthritis [J]. Cell Biol Int, 2020, 44(2): 524-535.
- [30] Mao T, He C, Wu H, et al. Silencing lncRNA HOTAIR declines synovial inflammation and synovocyte proliferation and promotes synovocyte apoptosis in osteoarthritis rats by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Cell Cycle, 2019, 18(22): 3189-3205.

- [31] Huang J, Liu L, Yang J, et al. lncRNA DILC is downregulated in osteoarthritis and regulates IL-6 expression in chondrocytes [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 16019–16024.
- [32] Long H, Li Q, Xiao Z, et al. LncRNA MIR22HG promotes osteoarthritis progression via regulating miR-9-3p/ADAMTS5 pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 3148–3158.
- [33] Wang Y, Li T, Yang Q, et al. LncRNA THUMP3-AS1 enhances the proliferation and inflammatory response of chondrocytes in osteoarthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100: 108138.
- [34] Liu Y, Lin L, Zou R, et al. MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(21/22): 2411–2422.
- [35] Tian F, Wang J, Zhang Z, et al. LncRNA SNHG7/miR-34a-5p/SYVN1 axis plays a vital role in proliferation, apoptosis and autophagy in osteoarthritis [J]. *Biol Res*, 2020, 53(1): 9.
- [36] Wang CL, Peng JP, Chen XD. LncRNA-CIR promotes articular cartilage degeneration in osteoarthritis by regulating autophagy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(3): 692–698.
- [37] Yang Z, Tang Y, Lu H, et al. Long non-coding RNA reprogramming (lncRNA-ROR) regulates cell apoptosis and autophagy in chondrocytes [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 8432–8440.
- [38] Chen K, Zhu H, Zheng MQ, et al. LncRNA MEG3 inhibits the degradation of the extracellular matrix of chondrocytes in osteoarthritis via targeting miR-93/TGFBR2 axis [J]. *Cartilage*, 2021, 13(2): 1274S–1284S.
- [39] Chen C, Xu Y. Long noncoding RNA LINC00671 exacerbates osteoarthritis by promoting ONECUT2-mediated Smurf2 expression and extracellular matrix degradation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 106846.
- [40] Li Y, Li Z, Li C, et al. Long noncoding RNA TM1P3 is involved in osteoarthritis by mediating chondrocyte extracellular matrix degradation [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 12702–12712.
- [41] 林振浩, 唐敏娜, 胡嘉禄, 等. 非编码 RNA 与血脂代谢的研究进展 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2020, 47(1): 122–127.
- [42] 谢文鹏, 孙晓栋, 梁延琛, 等. 非编码 RNA 在骨肉瘤中的研究进展 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2021, 37(8): 972–976.
- [43] Huang Z, Ma W, Xiao J, et al. CircRNA_0092516 regulates chondrocyte proliferation and apoptosis in osteoarthritis through the miR-337-3p/PTEN axis [J]. *J Biochem*, 2021, 169(4): 467–475.
- [44] Wu R, Zhang F, Cai Y, et al. Circ_0134111 knockdown relieves IL-1 β -induced apoptosis, inflammation and extracellular matrix degradation in human chondrocytes through the Circ_0134111-miR-515-5p-SOCS1 network [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107495.
- [45] Wang KF, Shi ZW, Dong DM. CircATRNL1 protects against osteoarthritis by targeting miR-153-3p and KLF5 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96: 107704.
- [46] Shen P, Yang Y, Liu G, et al. CircCDK14 protects against Osteoarthritis by sponging miR-125a-5p and promoting the expression of Smad2 [J]. *Theranostics*, 2020, 10(20): 9113–9131.
- [47] Zhu H, Hu Y, Wang C, et al. CircGCN1L1 promotes synovial cell proliferation and chondrocyte apoptosis by targeting miR-330-3p and TNF- α in TMJ osteoarthritis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 284.
- [48] Man G, Yang H, Shen K, et al. Circular RNA RHOT1 regulates miR-142-5p/CCND1 to participate in chondrocyte autophagy and proliferation in osteoarthritis [J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 4370873.
- [49] Zhang J, Cheng F, Rong G, et al. Hsa_circ_0005567 activates autophagy and suppresses IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis by regulating miR-495 [J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7: 216.
- [50] Sui C, Liu D, Que Y, et al. Knockdown of hsa_circ_0037658 inhibits the progression of osteoarthritis via inducing autophagy [J]. *Hum Cell*, 2021, 34(1): 76–85.
- [51] Zhang Q, Qiao X, Xia W. CircSERPINE2 weakens IL-1 β -caused apoptosis and extracellular matrix degradation of chondrocytes by regulating miR-495/TGFBR2 axis [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(11): BSR20201601.
- [52] Fu S, Fan Q, Xu J, et al. Circ_0008956 contributes to IL-1 β -induced osteoarthritis progression via miR-149-5p/NAMPT axis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107857.
- [53] Feng M, Jing L, Cheng J, et al. Circ_0020093 ameliorates IL-1 β -induced apoptosis and extracellular matrix degradation of human chondrocytes by upregulating SPRY1 via targeting miR-23b [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(10): 3623–3633.
- [54] Jiang H, Dai J, Zhang C, et al. Circ_0045714 alleviates TNF- α -induced chondrocyte injury and extracellular matrix degradation through miR-218-5p/HRAS axis [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2021, 53(1): 97–107.
- [55] Yu CX, Sun S. An emerging role for circular RNAs in osteoarthritis [J]. *Yonsei Med J*, 2018, 59(3): 349–355.
- [56] Hawker GA. Osteoarthritis is a serious disease [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 37(5): 3–6.

[收稿日期]2022-04-12

王梦楠,秦合伟,郭宁,等. 下一代益生菌防治动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 95-102.
Wang MN, Qin HW, Guo N, et al. Research progress in the prevention and treatment of atherosclerosis using next-generation probiotics [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 95-102.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.013

下一代益生菌防治动脉粥样硬化的研究进展

王梦楠¹, 秦合伟^{2*}, 郭 宁¹, 宋雪梅¹, 牛雨晴¹, 孙孟艳¹

(1.河南中医药大学, 郑州 450046; 2.河南省中医院康复医学科, 郑州 450002)

【摘要】 动脉粥样硬化是脂质和复合糖类沉积于大中动脉内壁的慢性代谢性疾病, 其病机复杂且受多种危险因素影响, 是心血管疾病的主要病理基础。近些年研究发现, 肠道内的微生物可以通过多种途径如调节宿主代谢和炎症影响动脉粥样硬化进程, 通过饮食干预、益生菌、益生元、粪菌移植等方式维持肠道菌群的动态平衡能够有效延缓动脉粥样硬化进展。其中下一代益生菌包括嗜黏蛋白阿克曼菌、小克里斯滕森氏菌、普拉梭菌等非传统肠道菌群及经过基因编辑的设计型益生菌成为新的预防和治疗工具, 是防治动脉粥样硬化的潜在的诊断和药理学靶点。

【关键词】 下一代益生菌; 设计型益生菌; 动脉粥样硬化; 肠道菌群

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0095-08

Research progress in the prevention and treatment of atherosclerosis using next-generation probiotics

WANG Mengnan¹, QIN Hewei^{2*}, GUO Ning¹, SONG Xuemei¹, NIU Yuqing¹, SUN Mengyan¹

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Department of Rehabilitation Medicine, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002)

【Abstract】 Atherosclerosis is a chronic metabolic disease in which lipids and complex carbohydrates are deposited on the inner wall of large and medium arteries. Its pathogenesis is complex and affected by various risk factors, and it is the main pathological basis of cardiovascular disease. Recent studies showed that the gut microbiota can affect the process of atherosclerosis through various mechanisms, including regulating host metabolism and inflammation. Maintaining the dynamic balance of the intestinal flora through dietary interventions, probiotics, prebiotics, and fecal-bacteria transplantation can effectively delay the progression of atherosclerosis. Among these approaches, next-generation probiotics, including *Akkermansia muciniphila*, *Christensenia minuta*, *Faecalibacterium prausnitzii* and other non-traditional intestinal flora and gene-edited designer probiotics, have become new prevention and treatment tools. The gut microbiota thus presents a potential diagnostic and pharmacological target for the prevention and treatment of atherosclerosis.

【Keywords】 next-generation probiotics; designer probiotics; atherosclerosis; gut microbiota

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81704030); 河南省科技攻关计划项目 (212102310359); 河南省中医药科学研究专项课题 (20-21ZY1023); 河南省中医药拔尖人才培养项目专项课题 (2022ZYBJ15); 中原英才计划中原青年拔尖人才资助项目 (豫组通[2021]44号)。

【作者简介】 王梦楠 (1998—), 女, 硕士, 研究方向: 心血管疾病的预防与治疗。E-mail: 198255365@qq.com

【通信作者】 秦合伟 (1982—), 男, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 心脑血管疾病与常见内科疾病的治疗与康复。

E-mail: qinhewei2012@126.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种发生在大中动脉内膜的全身炎症性疾病,该疾病周期较长,往往始于童年时期,受血糖、血脂、年龄、性别、遗传等多种因素影响,是脑卒中、冠心病等心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)的主要病理基础。CVD 是人类健康的头号杀手,至 2020 年我国患此类疾病的人数已超 3 亿,其发病率及死亡率均居首位^[1]。深入研究 AS 的发病机制对防治 CVD 具有重要意义。

随着高通量测序技术和生物信息学技术的应用,科学家们发现肠道菌群紊乱参与 AS 的发生、发展,而维持宿主肠道微生物群的平衡对降低肠道屏障通透性、调节宿主代谢、预防肠道及全身炎症至关重要。益生菌可以平衡和调节肠道微生物多样性,与专注于人体肠道健康的传统益生菌相比,下一代益生菌(next-generation probiotics, NGPs)被视为活体生物药(live biotherapeutic product, LBP),其研究与开发针对特定疾病。研究表明,嗜黏蛋白阿克曼菌、拟杆菌等下一代益生菌可以协助和参与与肠道微生物相关的各种有益生化途径从而起到抗 AS 作用。本文对下一代益生菌防治动脉粥样硬化的作用机制和研究进展作一综述,以期对临床上防治 AS 提供新的研究方向。

1 动脉粥样硬化与肠道微生物

动脉粥样硬化是由多种因素引起的慢性炎症性疾病,始于大中动脉内膜发生的脂肪浸润及复合糖类沉积,进而内膜呈灶状纤维化并出现钙质沉着,形成 AS 斑块,导致血管壁变硬增厚并伴随管腔狭窄。该过程涉及内膜纤维化、脂肪斑块的形成、平滑肌细胞的增殖、单核细胞和 T 淋巴细胞的趋化、血小板过度活跃和胆固醇积累,其特征是对内源性抗原(如热休克蛋白)和外源性微生物抗原产生免疫反应^[2-3]。目前临床上采用他汀类药物对 AS 患者进行降脂治疗,但该方法会引起肝损伤、肌痛等不良反应,无法满足所有需求。

人类胃肠道中存在 100 万亿(10^{14})个微生物,包括细菌、古细菌、真菌、原生动物和病毒。作为一种能够调节宿主代谢的活性器官,肠道微生物已被证明与 AS 进展密切相关。与健康人群相比,动脉粥样硬化患者肠道微生物群中柯林氏菌属、肠杆菌科、链球菌科和克雷伯氏菌属的丰度较高,而产生短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)的真杆菌

属、罗斯氏菌属和瘤胃球菌属的丰度较低^[4]。Szabo 等^[5]发现与患有亚临床动脉粥样硬化的受试者相比,颈动脉内膜中层厚度值正常的人群中普雷沃菌科的丰度更高,且厚壁菌门/拟杆菌门的比例与颈动脉内膜中层厚度呈正相关。肠道微生物的结构成分及其代谢产物包括脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO)、胆汁酸(bile acids, BAs)、SCFAs、马尿酸盐、吲哚硫酸盐等也可通过调控宿主免疫、炎症反应,影响血管内皮功能和调节脂质代谢等途径改变动脉粥样硬化的进程^[6]。

2 下一代益生菌

2.1 下一代益生菌的含义

随着对肠道微生物与疾病关系的深入认识和生物测序技术的快速发展,科学家们提出了新的概念即“下一代益生菌”,是指从健康供体肠道菌群中识别、分离出的有别于传统益生菌的新型细菌及通过添加、删除或过表达特定基因而开发的转基因微生物,它们符合益生菌的定义,但未曾应用于促进人体健康^[7-8]。人类胃肠道中细菌密集,可通过比对健康人和患者肠道中的微生物群组成差异来筛选 NGPs,分子生物学、宏基因组测序、16S rRNA 高通量测序等尖端测序技术和生物信息学技术能够对微生物群进行全面的分析,以鉴定、分离出潜在的 NGPs,随后进行成分分析、宏基因组学研究和宿主反应来选择有效的益生菌,并对选定的新益生菌进行体外细胞系试验、动物试验或人体临床试验来验证其功能,以便阐明潜在的分子改善机制。

2.2 下一代益生菌的来源及候选菌群

2.2.1 人类肠道菌群

NGPs 来源于人类肠道和粪便中细菌的不同种属,大多数来自拟杆菌门和厚壁菌门,较为典型的菌株有霍氏真杆菌、普氏菌、小克里斯滕森氏菌、普拉梭菌以及来自疣微菌门的嗜黏蛋白阿克曼菌^[9]。详见表 1。

古细菌又名古生菌、古菌,是除细菌域和真核生物域外的第三大生命领域,一些在人体肠道中自然生长的特定古细菌——产甲烷菌被认为是潜在的下一代益生菌,从大型人类队列的宏基因组分析中推断出产甲烷菌约占肠道微生物总量的 1.5%^[31]。详见表 2。

表 1 肠道细菌中的下一代益生菌候选者
Table 1 Next-generation probiotic candidates in intestinal bacteria

候选细菌 Candidate bacteria	种属 Species	有益影响 Beneficial effects	参考文献 References
非产毒素脆弱拟杆菌 <i>NTBF-Bacteroides fragilis</i>	拟杆菌门, 拟杆菌科, 拟杆菌属 <i>Bacteroides, Bacteroidaceae, Bacteroides</i>	调节肠道免疫反应, 抗炎, 产生 SCFAs Modulates intestinal immune response, anti-inflammatory, and produces SCFAs	[10-11]
多形拟杆菌 <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	拟杆菌门, 拟杆菌科, 拟杆菌属 <i>Bacteroides, Bacteroidaceae, Bacteroides</i>	产生叶酸, 降低血浆甘油三酯水平, 减轻肥胖 Produces folic acid, lowers plasma triglyceride levels and reduces obesity	[12-13]
单形拟杆菌 <i>Bacteroides uniformis</i>	拟杆菌门, 拟杆菌科, 拟杆菌属 <i>Bacteroides, Bacteroidaceae, Bacteroides</i>	产生叶酸, 减轻体重, 改善免疫系统和肠道屏障通透性 Produces folic acid, reduces obesity, improves immune system and gut barrier permeability	[14-15]
解木聚糖拟杆菌 <i>Bacteroides xylanisolvens</i>	拟杆菌门, 拟杆菌科, 拟杆菌属 <i>Bacteroides, Bacteroidaceae, Bacteroides</i>	合成叶酸, 减轻脂肪肝变性 Produces folic acid, reduces liver steatosis	[12]
金氏副拟杆菌 <i>Parabacteroides goldsteini</i>	拟杆菌门, 拟杆菌科, 副拟杆菌属 <i>Bacteroides, Parabacteroides</i>	修复肠道黏膜屏障, 抑制炎症, 降血脂, 减轻肥胖 Repairs intestinal barrier, inhibits inflammation, lowers blood lipids and reduces obesity	[16]
狄氏副拟杆菌 <i>Parabacteroides distasonis</i>	拟杆菌门, 拟杆菌科, 副拟杆菌属 <i>Bacteroides, Parabacteroides</i>	改善代谢性内毒素血症和肠道屏障通透性, 降低血浆胆固醇水平 Improves metabolic endotoxemia and gut barrier permeability, reduces plasma cholesterol levels	[17-18]
普氏菌 <i>Prevotella copri</i>	拟杆菌门, 普雷沃氏菌科, 普雷沃氏菌属 <i>Bacteroides, Prevotellaceae, Prevotella</i>	产生琥珀酸, 改善葡萄糖稳态 Produces succinic acid and improves glucose homeostasis	[19]
嗜黏蛋白阿克曼氏菌 <i>Akkermansia muciniphila</i>	疣微菌门, 阿克曼氏菌科, 阿克曼氏菌属 <i>Verrucomicrobia, Akkermansiaceae, Akkermansia</i>	修复肠道黏膜屏障, 改善代谢性内毒素血症 Repairs intestinal barrier and improves metabolic endotoxemia	[5, 20]
小克里斯滕森氏菌 <i>Christensenella minuta</i>	厚壁菌门, 克里斯滕森菌科, 克里斯滕森菌属 <i>Firmicutes, Christensenellaceae, Christensenella</i>	保持肠道上皮完整性, 降低血浆胆固醇水平, 改善肠道微生物多样性 Maintains the integrity of intestinal epithelium, reduces plasma cholesterol levels, improves intestinal microbial diversity	[21-22]
霍氏真杆菌 <i>Eubacterium hallii</i>	厚壁菌门, 真杆菌科, 真杆菌属 <i>Firmicutes, Eubacteriaceae, Eubacterium</i>	促进肠道上皮完整性和调节免疫反应, 改善胰岛素抵抗 Maintains the integrity of intestinal epithelium, regulates immune response and improves insulin resistance	[15]
罗氏弧菌 <i>Roseburia intestinalis</i>	厚壁菌门, 毛螺菌科, 罗氏菌属 <i>Firmicutes, Lachnospiraceae, Roseburia</i>	调节肠道免疫反应, 抑制炎症 Modulates intestinal immune response, inhibits inflammation	[23-24]
颤螺菌 <i>Oscillospira</i>	厚壁菌门, 瘤胃球菌科, 颤螺菌属 <i>Firmicutes, Ruminococcaceae, Oscillospira</i>	产生丁酸盐, 抑制炎症, 减轻肥胖 Produces butyrate, inhibits inflammation and reduces obesity	[25]
瘤胃球菌 <i>Ruminococcus bromii</i>	厚壁菌门, 瘤胃球菌科, 瘤胃球菌属 <i>Firmicutes, Ruminococcaceae, Ruminococcus</i>	产生 SCFAs, 抑制炎症, 降解抗性淀粉, 促进脂肪代谢 Produces SCFAs, inhibits inflammation, reduces resistant starch and promotes fat metabolism	[26-27]
普拉梭菌 <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	厚壁菌门, 瘤胃球菌科, 梭菌属 <i>Firmicutes, Ruminococcaceae, Faecalibacterium</i>	修复肠道屏障, 改善脂蛋白代谢, 减轻体重 Repairs intestinal barrier, improves lipoprotein metabolism and reduces obesity	[28-29]
丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	厚壁菌门, 瘤胃球菌科, 梭菌属 <i>Firmicutes, Ruminococcaceae, Clostridium</i>	产生丁酸盐, 保护肠道屏障完整性和免疫功能 Produces butyrate, protects the intestinal barrier and immune function	[30]

表 2 肠道古生菌中的下一代益生菌候选者
Table 2 Next-generation probiotic candidates in intestinal archaea

候选古细菌 Candidate archaea	种属 Species	有益影响 Beneficial effects	参考文献 References
史氏甲烷短杆菌 <i>Methanobrevibacter smithii</i>	甲烷杆菌目, 甲烷杆菌科, 甲烷短杆菌属 <i>Methanobacteriales</i> , <i>Methanobacteriaceae</i> , <i>Methanobrevibacter</i>	降低血浆氧化三甲胺含量, 调节免疫反应, 改善肠道微生物多样性 Reduces plasma TMAO levels, modulates immune response, and improves intestinal microbial diversity	[22, 32]
<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	马赛球菌目, 马赛甲烷球菌科, 马赛甲烷球菌属 <i>Methanomassiliicoccales</i> , <i>Methanomassiliicoccaceae</i> , <i>Methanomassiliicoccus</i>	降低机体三甲胺和氧化三甲胺含量 Reduces the level of trimethylamine and trimethylamine oxide	[31, 33]

注: *Methanomassiliicoccus luminyensis* 无中文学名。

Note. *Methanomassiliicoccus luminyensis* has no Chinese scientific name.

2.2.2 设计型益生菌

NGPs 还包括通过添加、删除或过表达特定基因的设计型益生菌, 涉及新陈代谢、技术压力耐受性、在人类肠道中的生存能力及治疗和预防分子的粘膜定向递送, 以确定对宿主的一种或多种健康益处, 从而衍生出用于防治各种疾病的“活体生物药”概念^[8]。使用基因组编辑工具可以对现有的益生菌进行进一步的修改与探索, 如转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 技术与锌指核酸酶 (zinc-finger nuclease, ZFN) 技术能够完成一系列遗传学编辑修饰操作, 近些年出现的 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) 技术可以完成 RNA 导向的 DNA 识别和编辑, 且更易于操作, 为基因组编辑提供了一个更好的平台。

2.3 下一代益生菌的局限性

由于 NGPs 发现历史短暂且未进行过大规模发酵, 大部分 NGPs 的安全性尚未明确。此外, 大多数 NGPs 候选者对需氧条件高度敏感, 现有的工业厂房设计和工艺流程不能创造适宜的厌氧环境, 一些细菌和古细菌在肠道中也无法长时间定殖; 并且培养 NGPs 的具体营养需求尚未阐明, 已知的经过充分研究的 NGPs 则需要复杂的营养需求, 这需要实验室规模的粘蛋白、瘤胃液、血红素肉汤等, 这些技术因素成为了大规模开发及生产新益生菌的障碍^[8]。另一方面, 微生物组的功能取决于其结构和多样性, 这在多因素的影响下在个体中是高度独特的, 将新的微生物引入肠道需考虑其有效性和不同个体之间的差异性反应。新的微生物是否会对已建立的肠道菌群结构带来意想不到的结果, 对宿主

产生不可控的有害影响, 是下一代益生菌广泛应用于临床前需解决的重要问题^[34]。

3 下一代益生菌防治动脉粥样硬化的作用机制

3.1 改善肠道屏障通透性

肠道屏障是抵御病原微生物和有毒物质入侵人体的第一道防线, 由粘液层、上皮层和固有层组成, 若肠道屏障的通透性增加导致革兰阴性菌外膜上的 LPS 进入血液, 就会促进炎症细胞因子表达和泡沫细胞形成, 从而加速 AS 进程。肠道屏障的粘液层主要由上皮层杯状细胞分泌的黏蛋白 (mucoprotein, MUC) 组成, *A. muciniphila* 的黏蛋白降解能力可刺激 MUC 的产生, 增加粘液层的厚度, 改善内毒素血症^[20]。研究显示下一代益生菌 *R. intestinalis*、*Parabacteroides*、*Oscillospira*、*R. bromii*、*C. minuta*、*F. prausnitzii*、*C. butyricum* 及无毒的 *B. fragilis* 等菌株能够有效改善肠道屏障功能, 可能是这些菌株能够产生 SCFAs 丁酸盐, 丁酸盐被证明能够下调促炎细胞因子的肠道转录水平并增加 MUC 和上皮层紧密连接 (tight junction, TJ) 蛋白的表达量, 保护屏障的完整性, 而丁酸盐可通过脂肪酸氧化为机体提供能量并增加氧气的消耗和缺氧诱导因子的稳定性, 增强上皮屏障功能^[10, 21, 23, 27, 30, 35]。功能性免疫反应参与调节肠道屏障的完整性, *R. intestinalis* 的结构成分鞭毛蛋白与 Toll 样蛋白受体 5 (toll-like receptor, TLR5) 相结合能够调节免疫反应, 提升 TJ 的表达^[23]。*A. muciniphila* 和 *Clostridium* 产生的色氨酸代谢产物吲哚-3-丙酸 (indole-3-propionic acid, IPA) 同样能够改善肠道屏障功能, 当动脉粥样硬化发生时, IPA 的合成减少^[36-37]。

肠道屏障在预防、阻止肠道及全身炎症的过程中发挥重要作用, 丁酸盐的供能、抗炎、抗氧化作用

帮助维持正常的肠道屏障功能,低膳食纤维会使丁酸盐的产生减少,而富含纤维的饮食可以提高肠道中产丁酸盐细菌的丰度。到目前为止,直接使用产丁酸盐的菌株作为益生菌补充剂仍面临许多技术挑战,因为大多数丁酸盐生产者都是高度厌氧的,而创造适宜这些菌株生存的无氧环境仍受到许多技术因素限制。

3.2 调节胆固醇合成与代谢

脂质沉积于人体大中动脉内膜是 AS 形成的关键步骤。部分来自毛螺菌科和瘤胃菌科的 NGPs 能够产生 SCFAs 丙酸盐进而抑制胆固醇合成限速酶 3-羟基-3-甲基-戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGCR) 的活性,减少胆固醇合成;SCFAs 还可以上调肝脏胆固醇调节元件结合蛋白 2 (sterol-regulatory element binding protein 2, SREBP2) mRNA 的表达,激活低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受体,进而增强循环 LDL 的清除^[38]。BAs 是胆固醇的下游代谢产物,肠道菌群可以参与 BAs 的代谢,包括水解初级结合胆汁酸和将游离的初级胆汁酸暂时脱羟基转化为重吸收效率较低的次级胆汁酸,从而影响肝中胆固醇向 BAs 的转化,调节血浆胆固醇水平,参与上述过程的菌属有拟杆菌属、梭菌属、乳酸杆菌属、双歧杆菌属和真杆菌属等^[2,39]。除此之外,小克里斯滕森氏菌新菌株 *C. minuta* DSM33407 也能够促进初级胆汁酸的去结合进而增加次级胆汁酸的合成^[21]。而 *Parabacteroides* 丰度与血浆胆固醇水平和小鼠主动脉斑块大小呈负相关,其中的 *P. distasonis* 同样具有广泛的胆酸转化功能,可以将多种结合型胆酸水解,并使其转化为次级胆酸,进而激活肠道 FXR 信号通路,缓解高脂血症^[17-18]。Kashanova 等^[28]发现血液中高水平的极低密度脂蛋白和中密度脂蛋白胆固醇与内膜中层增厚有关,且此二者含量分别与 *F. prausnitzii* 与 *P. copri* 的丰度呈负相关;但也有研究表明,*P. copri* 和 LDL 呈正相关,其高丰度与胰岛素抵抗、肥胖、高血压及非酒精性脂肪肝有关^[40]。

3.3 影响血浆 TMAO 水平

高胆碱饮食中的营养物质经肠道中多种微生物酶复合物代谢产生三甲胺 (trimethylamine, TMA), TMA 进入门静脉,经过肝中宿主酶进一步代谢产生 TMAO;血浆 TMAO 浓度升高会激活巨噬细胞流入胆固醇,导致泡沫细胞形成,还会使血小板过度活

跃并促进内皮细胞衰老、血管老化和氧化应激反应从而加快 AS 进展。TMAO 水平与光杆菌属、脱硫弧菌属、梭杆菌属、普雷沃氏菌属、瘤胃球菌科等 13 种粪便菌群丰度显著相关^[41]。减少 TMA 的合成或将其转化为惰性化合物可限制后续产生的不良影响,研究表明,一些人类肠道的古细菌——嗜温产甲烷杆菌可以使用 TMA 作为末端电子受体,氢气作为电子供体,通过三甲胺甲基转移酶 (MttB) 产生甲烷,以此来减少 TMAO 的合成,如 *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10,而以二氧化碳作为末端电子受体产生甲烷且不具备 MttB 基因的 *M. smithii* 也可以降低小鼠血浆中 TMAO 浓度^[31-32]。在产甲烷古菌的三甲胺甲基转移酶中发现的由终止密码子 UAG 有义编码生成的吡咯氨基酸 (pyrrolysine, Pyl) 是 MttB 的必要成分,对大肠杆菌进行工程改造以正确编码和合成 Pyl 能够促进肠道中 MttB 的原位合成和递送,从而促进 TMA 向甲烷转化,减少 TMA 扩散至肝的量^[33]。

TMAO 是肠道菌群失调和血管病变之间的主要介质,目前临床常使用 TMA 裂解酶抑制剂 3-3-二甲基-1-丁醇 (3, 3-dimethyl-1-butanol, DMB) 来减少 TMA 产生,进而降低血浆 TMAO 水平,而对产甲烷菌及重组益生菌的深入研究让我们认识到该问题的新的解决方法。随后可将研究焦点聚集在消除产甲烷菌的最终产物甲烷带来的不良影响,如食物通过肠道的速度减慢;以及利用设计型益生菌减少肠道中 TMA 的表达,从而发挥稳定的降 TMAO 作用。

3.4 调节氨基酸代谢

氨基酸代谢失调会影响葡萄糖和脂质代谢及巨噬细胞、泡沫细胞形成,在 AS 中起到重要作用。同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 作为蛋氨酸和半胱氨酸的中间代谢产物,是一种毒性氨基酸,可通过损伤血管内皮细胞,促进血管平滑肌细胞增殖及诱发炎症和氧化应激反应等途径引发 AS。研究表明, *Bacteroides* 成员 *B. thetaiotaomicron*、*B. xylanisolvens*、*B. dorei* 和 *B. uniformis* 可产生叶酸并促进其代谢,叶酸的代谢产物 5-甲基四氢叶酸能够为 Hcy 提供甲基,使之重新转化为蛋氨酸^[12,14]。支链氨基酸 (branched chain amino acids, BCAAs) 循环水平升高会出现胰岛素抵抗,促进炎症反应和活性氧的生成导致内皮功能障碍,还会增加血小板活性致使血栓形成,用 *B. thetaiotaomicron* 灌胃可降低血液

中 BCAAs 的浓度并减轻饮食引起的小鼠体重增加和肥胖^[42-43];但 Cho 等^[44]学者的研究却表明该菌株会增加小肠中脂肪酶活性,促进脂质消化吸收和体重增加,并加重代谢紊乱。*Clostridium*、*Bacteroides*、*A. muciniphila* 等菌属参与肠道中芳香族氨基酸(aromatic amino acids, AAAs)如色氨酸代谢为吲哚及其衍生物的过程,这些产物与芳香烃受体(aromatic hydrocarbon receptor, AhR)相结合可有效抑制肠道炎症并降低 CVD 风险因素^[45-46]。

越来越多的研究关注 Hcy 与 AS 的相关性,高同型半胱氨酸血症已被认为是 CVD 的独立危险因素,补充叶酸和维生素 B₆、维生素 B₁₂ 是临床常用的下调机体 Hcy 水平的方法,应注意的是叶酸的补充剂量因人而异,不要在一段时间内大剂量使用,以免导致哮喘、皮疹。适当应用 NGPs 使其在宿主肠道内原位合成叶酸可能成为降低血浆 Hcy 水平,减轻高同型半胱氨酸血症及其并发症的主要研究方向。

3.5 改善肠道微生物多样性

下一代益生菌可以通过平衡和调节肠道微生物的多样性及丰度来影响 AS 的发生与发展。如 *C. minuta* DSM33407 的长期给药显著减少了高脂饮食诱导的微生物易位,改善了远端结肠的微生物多样性,还恢复了接种肥胖者粪便微生物群的个体中厚壁菌门/拟杆菌门的比例^[21]。除此之外,克里斯滕森菌科成员在发酵过程中可以产生大量的氢气,从而促进某些氢营养产甲烷菌如 *M. smithii* 的肠道定殖,并向其他丁酸盐生产者提供乙酸盐来塑造肠道微生物的组成,*B. thetaiotaomicron* 也已被证明能够支持 *M. smithii* 的生长,在无菌小鼠体内同时接种上述两种微生物,可增加果聚糖的发酵,促进 *M. smithii* 生长代谢,从而改善宿主的肠道功能^[22,47]。

肠道菌群失调与动脉粥样硬化之间存在紧密的关联,通过饮食干预、粪菌移植或服用益生菌、益生元等方式调整肠道菌群结构使肠道保持健康、稳定状态能够有效延缓动脉粥样硬化进程。NGPs 的发展与特定疾病密切相关,利用 NGPs 来定向重塑肠道微生物群结构是一种防治 AS 的新方法,但要注意不能盲目干预患者的肠道菌群结构,以免造成胃肠道紊乱等诸多不良后果。

3.6 其他

动脉粥样硬化病变的免疫组织化学研究表明,肠道中存在 *R. intestinalis* 定殖的小鼠的巨噬细胞数

量减少但胶原蛋白水平增加,表明该菌株促进了 AS 斑块的稳定性;同时在这些小鼠体内检测到了较高水平的酮体 β -羟基丁酸酯,它可以通过抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)的激活和释放来抑制慢性炎症过程^[24]。表达灵芝 8 蛋白(lingzhi 8 protein, LZ8)的重组乳酸乳球菌可以降低主动脉中 IL-1 β 的基因表达,减少主动脉内膜厚度和内皮下泡沫细胞数量,从而表现出对 AS 的改善作用^[48]。Deshpande 等^[3]对耻垢分枝杆菌进行基因改造,使其成为表达载脂蛋白 B、热休克蛋白 60 和肺炎衣原体外膜蛋白的三肽多抗原重组分子,重组的耻垢分枝杆菌具有免疫原性,在口服给药时激活树突状细胞并产生持久的记忆 T 细胞,促进调节性免疫反应发生,减缓了小鼠模型中 AS 的发展。

4 总结与展望

通过操纵肠道共生菌来影响宿主的各项生理功能进而改善健康或治疗疾病目前已成为医学学科的热门研究领域。本文阐述了 NGPs 对动脉粥样硬化产生的积极作用,提示 NGPs 可能成为调节机体代谢、免疫等功能的新趋势。但由于技术因素限制和缺乏先验知识,许多微生物菌群仍然无法在体外培养;除此之外,很多实验研究成果未得到验证,还不能指导个人健康、公共卫生及临床实践,大众对服用经过基因编辑的微生物的接受度如何目前也没有定论。肠道菌群是一个复杂的生态系统,迄今为止,科学家们尚未完全揭示各菌株之间和菌群与宿主之间的相互作用机制,这是肠道菌群所需研究的焦点内容,同时全面了解 NGPs 的有效性、安全性、药物敏感性模式、潜在的毒力因素及利用 NGPs 防治疾病的生理学、基因组学和代谢组学特征也是不可或缺的。

参考文献:

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要 [J]. 中国循环杂志, 2021, 36(6): 521-545.
- [2] 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.
- [3] Deshpande V, Krishnan R, Philip S, et al. Oral administration of recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing a tripeptide construct derived from endogenous and microbial antigens

- prevents atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. Cardiovasc Ther, 2016, 34(5): 314-324.
- [4] Verhaar BJH, Prodan A, Nieuwdorp M, et al. Gut microbiota in hypertension and atherosclerosis: a review [J]. Nutrients, 2020, 12(10): 2982.
- [5] Szabo H, Hernyes A, Piroška M, et al. Association between gut microbial diversity and carotid intima-media thickness [J]. Medicina (Kaunas), 2021, 57(3): 195.
- [6] 杜李宇, 李倩滢, 陈伟哲, 等. 肠道菌群促炎与动脉粥样硬化关系研究进展 [J]. 食品科学, 2022, 43(3): 325-332.
- [7] 李有宸, 高海女, 李兰娟. 从粪菌移植到下一代益生菌: 挑战与进展 [J]. 中国微生物生态学杂志, 2022, 34(2): 223-227.
- [8] Singh TP, Natraj BH. Next-generation probiotics: a promising approach towards designing personalized medicine [J]. Crit Rev Microbiol, 2021, 47(4): 479-498.
- [9] Lin TL, Shu CC, Lai WF, et al. Investiture of next generation probiotics on amelioration of diseases-strains do matter [J]. Med Microecol, 2019, 1-2: 100002.
- [10] Qu D, Sun F, Feng S, et al. Protective effects of *Bacteroides fragilis* against lipopolysaccharide-induced systemic inflammation and their potential functional genes [J]. Food Funct, 2022, 13(2): 1015-1025.
- [11] Tan H, Zhao J, Zhang H, et al. Novel strains of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides ovatus* alleviate the LPS-induced inflammation in mice [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(5): 2353-2365.
- [12] Qiao S, Bao L, Wang K, et al. Activation of a specific gut *Bacteroides*-folate-liver axis benefits for the alleviation of nonalcoholic hepatic steatosis [J]. Cell Rep, 2020, 32(6): 108005.
- [13] Liu R, Hong J, Xu X, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention [J]. Nat Med, 2017, 23(7): 859-868.
- [14] Liu S, Zhao W, Liu X, et al. Metagenomic analysis of the gut microbiome in atherosclerosis patients identify cross-cohort microbial signatures and potential therapeutic target [J]. FASEB J, 2020, 34(11): 14166-14181.
- [15] De Filippis F, Esposito A, Ercolini D. Outlook on next-generation probiotics from the human gut [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(2): 76.
- [16] Cason CA, Kuntz TM, Chen EB, et al. Microbiota composition modulates inflammation and neointimal hyperplasia after arterial angioplasty [J]. J Vasc Surg, 2020, 71(4): 1378-1389.
- [17] Ezeji JC, Sarikonda DK, Hopperton A, et al. *Parabacteroides distasonis*: intriguing aerotolerant gut anaerobe with emerging antimicrobial resistance and pathogenic and probiotic roles in human health [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1922241.
- [18] Huang K, Liu C, Peng M, et al. Glycoursodeoxycholic acid ameliorates atherosclerosis and alters gut microbiota in apolipoprotein E-deficient mice [J]. J Am Heart Assoc, 2021, 10(7): e019820.
- [19] De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, et al. Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis [J]. Cell Metab, 2016, 24(1): 151-157.
- [20] Katiraei S, de Vries MR, Costain AH, et al. *Akkermansia muciniphila* exerts lipid-lowering and immunomodulatory effects without affecting neointima formation in hyperlipidemic APOE * 3-Leiden. CETP mice [J]. Mol Nutr Food Res, 2020, 64(15): e1900732.
- [21] Mazier W, Le Corf K, Martinez C, et al. A new strain of *Christensenella minuta* as a potential biotherapy for obesity and associated metabolic diseases [J]. Cells, 2021, 10(4): 823.
- [22] Ruaud A, Esquivel-Elizondo S, de la Cuesta-Zuluaga J, et al. Syntrophy via interspecies H₂ transfer between *Christensenella* and *Methanobrevibacter* underlies their global cooccurrence in the human gut [J]. mBio, 2020, 11(1): e03235-e03219.
- [23] Nie K, Ma K, Luo W, et al. *Roseburia intestinalis*: a beneficial gut organism from the discoveries in genus and species [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 757718.
- [24] Kasahara K, Krautkramer KA, Org E, et al. Interactions between *Roseburia intestinalis* and diet modulate atherogenesis in a murine model [J]. Nat Microbiol, 2018, 3(12): 1461-1471.
- [25] Yang J, Li Y, Wen Z, et al. *Oscillospira*-a candidate for the next-generation probiotics [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1987783.
- [26] Lordan C, Thapa D, Ross RP, et al. Potential for enriching next-generation health-promoting gut bacteria through prebiotics and other dietary components [J]. Gut Microbes, 2020, 11(1): 1-20.
- [27] Liu F, Shan S, Li H, et al. Millet shell polyphenols prevent atherosclerosis by protecting the gut barrier and remodeling the gut microbiota in ApoE^{-/-} mice [J]. Food Funct, 2021, 12(16): 7298-7309.
- [28] Kashtanova DA, Klimenko NS, Tkacheva ON, et al. Subfractional spectrum of serum lipoproteins and gut microbiota composition in healthy individuals [J]. Microorganisms, 2021, 9(7): 1461.
- [29] Maioli TU, Borrás-Nogues E, Torres L, et al. Possible benefits of *Faecalibacterium prausnitzii* for obesity-associated gut disorders [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 740636.
- [30] Stoeva MK, Garcia-So J, Justice N, et al. Butyrate-producing human gut symbiont, *Clostridium butyricum*, and its role in health and disease [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1-28.
- [31] Brugère JF, Ben Hania W, Arnal ME, et al. Archaea: microbial candidates in next-generation probiotics development [J]. J Clin Gastroenterol, 2018, 52(1): S71-S73.
- [32] Fu BC, Hullar MAJ, Randolph TW, et al. Associations of plasma trimethylamine N-oxide, choline, carnitine, and betaine with inflammatory and cardiometabolic risk biomarkers and the fecal microbiome in the multiethnic cohort adiposity phenotype study [J]. Am J Clin Nutr, 2020, 111(6): 1226-1234.
- [33] Fadhlou K, Arnal ME, Martineau M, et al. Archaea, specific

- genetic traits, and development of improved bacterial live biotherapeutic products: another face of next-generation probiotics [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(11): 4705-4716.
- [34] Mousa WK, Chehadeh F, Husband S. Recent advances in understanding the structure and function of the human microbiome [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 825338.
- [35] Ghosh S, Whitley CS, Haribabu B, et al. Regulation of intestinal barrier function by microbial metabolites [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 11(5): 1463-1482.
- [36] Konopelski P, Mogilnicka I. Biological effects of indole-3-propionic acid, a gut microbiota-derived metabolite, and its precursor tryptophan in mammals' health and disease [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1222.
- [37] Cason CA, Dolan KT, Sharma G, et al. Plasma microbiome-modulated indole-and phenyl-derived metabolites associate with advanced atherosclerosis and postoperative outcomes [J]. J Vasc Surg, 2018, 68(5): 1552-1562.
- [38] 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, 2022, 35(2): 161-180.
- [39] 唐洪玉, 宋馨, 夏永军, 等. 益生菌中胆盐水解酶作用机制研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(13): 286-292.
- [40] Liu Z, Li J, Liu H, et al. The intestinal microbiota associated with cardiac valve calcification differs from that of coronary artery disease [J]. Atherosclerosis, 2019, 284: 121-128.
- [41] Cho CE, Aardema NDJ, Bunnell ML, et al. Effect of choline forms and gut microbiota composition on trimethylamine-*N*-oxide response in healthy men [J]. Nutrients, 2020, 12(8): 2220.
- [42] Xu Y, Jiang H, Li L, et al. Branched-chain amino acid catabolism promotes thrombosis risk by enhancing tropomodulin-3 propionylation in platelets [J]. Circulation, 2020, 142(1): 49-64.
- [43] Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(1): 55-71.
- [44] Cho SH, Cho YJ, Park JH. The human symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* promotes diet-induced obesity by regulating host lipid metabolism [J]. J Microbiol, 2022, 60(1): 118-127.
- [45] Zhu Y, Shui X, Liang Z, et al. Gut microbiota metabolites as integral mediators in cardiovascular diseases (Review) [J]. Int J Mol Med, 2020, 46(3): 936-948.
- [46] 王丽群, 庞日朝, 胡晓敏, 等. 肠道菌群对色氨酸代谢的影响研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 129-136.
- [47] 马思彦, 王俊平, 董丽娜, 等. 无菌动物在宿主肠道菌群研究中的应用 [J]. 实验动物科学, 2020, 37(2): 78-82.
- [48] Lee MF, Chiang CH, Lin SJ, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* expressing Ling Zhi 8 protein ameliorates nonalcoholic fatty liver and early atherogenesis in cholesterol-fed rabbits [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 3495682.

[收稿日期] 2022-04-23

(上接第 76 页)

- [15] 马素好, 赵建华. 银耳多糖对反复脑缺血再灌注小鼠学习记忆的影响 [J]. 河南医学高等专科学校学报, 2016, 28(2): 65-67.
- [16] 曹铭, 费维成, 杨升平. 银耳多糖 WSK 在强化皮肤屏障中的应用研究 [J]. 当代化工研究, 2020, 14: 106-108.
- [17] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准: 急性经口毒性试验 非书资料: GB 15193.3-2014 [S]. 2015.
- [18] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准: 细菌回复突变试验 非书资料: GB 15193.4-2014 [S]. 2015.
- [19] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准: 哺乳动物红细胞微核试验 非书资料: GB 15193.5-2014 [S]. 2015.
- [20] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准: 小鼠精原细胞或精母细胞染色体畸变试验 非书资料: GB 15193.8-2014 [S]. 2015.
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 90 天经口毒性试验 非书资料: GB 15193.13-2015 [S]. 2015.
- [22] 贾汉卿, 安英林, 郑淑芹. 银耳多糖 J 的急性毒性实验 [J]. 佳木斯医学院学报, 1990, 13(2): 99.
- [23] 贾汉卿, 安英林, 郑淑芹. 银耳多糖 J₁ 的慢性毒性实验 [J]. 佳木斯医学院学报, 1990, 13(2): 99.
- [24] 贾汉卿, 安英林, 郑淑芹. 银耳多糖 J₁ 对小白鼠生殖的影响 [J]. 佳木斯医学院学报, 1990, 13(2): 100.
- [25] 贾汉卿, 安英林, 郑淑芹. 银耳多糖 J 致癌实验 [J]. 佳木斯医学院学报, 1990, 13(2): 100.

[收稿日期] 2022-05-19

严一苇,戚菲菲,鲍琳琳. 新冠病毒是否经消化道传播的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 103–107.

Yan YW, Qi FF, Bao LL. Research progress on whether SARS-CoV-2 can be transmitted through the digestive tract [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 103–107.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.014

新冠病毒是否经消化道传播的研究进展

严一苇,戚菲菲,鲍琳琳*

(国家人类疾病动物模型资源库,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,国家动物模型技术创新中心,
中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021)

【摘要】 新型冠状病毒肺炎(corona virus disease, COVID-19)疫情在全球持续蔓延,严重影响了经济发展和人民生活质量,对世界公共卫生安全造成了极大威胁。严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)主要通过飞沫、接触和气溶胶进行传播,此外,流调显示公共卫生间可能是部分确诊病例的风险点,有研究者在 COVID-19 患者粪便中检测到病毒,但是 SARS-CoV-2 是否存在消化道传播的可能,目前尚无定论。基于此,本文汇总 COVID-19 病例的消化道排毒情况,总结 SARS-CoV-2 消化道感染动物模型的研究进展,探讨 SARS-CoV-2 通过消化道途径传播的可能性,并进行风险评估,为疫情防控提供建议。

【关键词】 SARS-CoV-2; COVID-19; 动物模型; 传播途径

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0103-05

Research progress on whether SARS-CoV-2 can be transmitted through the digestive tract

YAN Yiwei, QI Feifei, BAO Linlin*

(National Human Diseases Animal Model Resource Center, NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine,
National Center of Technology Innovation for Animal Model, Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS & PUMC,
Beijing 100021, China)

【Abstract】 The global corona virus disease 2019 (COVID-19) epidemic is still spreading, compromising human well-being and economic progress and posing a significant risk to global public health security. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is mainly transmitted through droplets, contact and aerosols. Epidemiological studies indicate that using public restrooms may be risky, and researchers have discovered the virus in the feces of COVID-19 patients, but it is unknown if SARS-CoV-2 can be transmitted through the digestive system. Based on this, this review describes the gastrointestinal detoxification of COVID-19 cases, summarizes relevant research using SARS-CoV-2 animal models, considers the possibility of SARS-CoV-2 transmission through the gastrointestinal tract, evaluates the risk, and offers suggestions for COVID-19 prevention.

【Keywords】 SARS-CoV-2; COVID-19; animal model; transmission route

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 传染性强,传播速度快,对全球公共卫生体系和

世界经济发展造成严重影响。SARS-CoV-2 原始毒株传播系数(basic reproduction number, R_0)为 2.2,

【基金项目】 国家重点研发计划(SQ2020YFA070013);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-035)。

【作者简介】 严一苇(1998—),女,硕士研究生,研究方向:呼吸系统传染病动物模型的研制。E-mail: yyw_yan@163.com

【通信作者】 鲍琳琳(1979—),女,研究员,博士生导师,研究方向:新发及再发传染病动物模型创制及比较医学的研究。

E-mail: bllmsl@aliyun.com

即在未加干预的情况下,一个新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)患者平均感染 2~3 个健康人^[1]。新冠病毒不断变异,目前的主要流行株 Omicron 传播系数为 8.2,比原始毒株提高了近 4 倍^[2]。SARS-CoV-2 不断变异及快速传播给人类生命安全和身体健康带来极大的威胁,全面了解新冠病毒的传播途径,抓住防控关键环节,有效阻止疫情蔓延,将最大限度减少疫情对人民健康及经济社会发展的影响。

1 新型冠状病毒的传播方式

COVID-19 患者的唾液和痰液中含有高浓度的 SARS-CoV-2,其在咳嗽或者打喷嚏时产生的飞沫或气溶胶能够被易感人群吸入,或者沉积在物体表面形成污染物,在易感人群触摸污染物后再接触口腔、鼻腔、眼睛等黏膜造成感染。患者产生的气溶胶中可检测到 SARS-CoV-2,且气溶胶具有传染性,可在空中停留 16 h,飘移 4 m^[3-6]。在相对封闭的环境中,可能聚集高浓度的气溶胶,导致人群感染。因此,SARS-CoV-2 主要通过接触、飞沫和气溶胶等方式传播。

同时,研究者利用小鼠、仓鼠、非人灵长类等动物模型进行验证了 SARS-CoV-2 可能的传播途径。设计健康小鼠与感染鼠同居或飞沫传播实验,检测发现部分小鼠 SARS-CoV-2 特异性 IgG 抗体阳性;另外,将小鼠暴露在高浓度 SARS-CoV-2 气溶胶中 25 min 以上,小鼠鼻咽拭子中检测到 SARS-CoV-2^[7]。仓鼠鼻内感染 8×10^4 TCID₅₀ SARS-CoV-2,感染后 1 d 仓鼠咽拭子和直肠拭子中检测到高载量 SARS-CoV-2;将仓鼠暴露于 1.5×10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2 气溶胶 10 min,感染后 2 d 仓鼠咽拭子病毒载量达到峰值;在仓鼠笼中放入含 3.2×10^5 TCID₅₀ SARS-CoV-2 污染物的培养皿,感染后 1 d 部分仓鼠咽拭子中检测到 SARS-CoV-2^[8]。鼻内和气溶胶途径感染的仓鼠肺部出现中度病变,并分离出感染性病毒;接触污染物感染的仓鼠肺部炎症较轻,未分离出活病毒^[8]。恒河猴和非洲绿猴通过鼻内和气管联合途径感染 SARS-CoV-2,感染后 1 d 咽拭子中均检测到 SARS-CoV-2,且非洲绿猴的咽拭子病毒载量较高,持续时间较长^[9]。恒河猴、非洲绿猴和食蟹猴暴露于 SARS-CoV-2 气溶胶中,鼻咽拭子中均能检测到 SARS-CoV-2,且出现肺部病变^[10]。相比鼻内和气管联合途径感染,气溶胶途径感染的猴发

病更慢,持续时间更久^[9]。尽管 SARS-CoV-2 传播效率在不同物种中存在差异,动物模型研究进一步证明 SARS-CoV-2 能够通过接触、飞沫和暴露于高浓度气溶胶途径传播。

2 SARS-CoV-2 是否存在消化道传播的风险

消化道传播,又称为粪口传播,指病原体随传染源的粪便排出体外,污染水源或食物,再由易感者摄食进入体内的传播过程^[11]。研究报道,部分流感病毒和鼻病毒能通过粪便排出病毒,经消化道途径传播^[12]。广州高层公寓在封闭期间接连出现 COVID-19 病例,且在患者的卫生间、通风和排水管道均检测到 SARS-CoV-2^[13]。环境采样显示,COVID-19 患者所处环境中,卫生间 SARS-CoV-2 核酸阳性率最高^[14]。模拟实验发现,马桶中的 SARS-CoV-2 颗粒能够大量向上传播,40%~60% 的病毒颗粒到达马桶座上方^[15]。公寓楼中出现多人感染,可能因为卫生间中的排风扇吸入 SARS-CoV-2 颗粒,通过管道进行传播,造成上下楼层感染,推测 SARS-CoV-2 可能存在其他潜在传播途径^[16]。因此 SARS-CoV-2 是否也存在消化道传播的可能?若 SARS-CoV-2 能够通过消化道途径传播,COVID-19 患者粪便排出的 SARS-CoV-2,可污染食物、水源等,极大增加感染风险。因此,需要对 COVID-19 患者和动物模型的消化道排毒情况分析,探讨 SARS-CoV-2 通过消化道传播的风险。

2.1 COVID-19 患者消化系统排毒情况

COVID-19 患者主要表现咳嗽、鼻塞、流涕等呼吸道症状,部分 COVID-19 患者出现腹泻症状,甚至有部分患者没有呼吸道症状,只出现腹泻、腹痛等胃肠道症状^[17-18]。流行病学统计 COVID-19 患者出现胃肠道症状的概率为 17.6%,主要表现为食欲不振、腹泻、呕吐、腹痛等症状。21.2% 的 COVID-19 患者在肛拭子中检测到 SARS-CoV-2,48.1% 的 COVID-19 患者在粪便中检测到 SARS-CoV-2,甚至分离出活病毒^[19-21]。在呼吸道样本中检测不到 SARS-CoV-2 时,仍有 40% 左右的 COVID-19 患者在粪便中能检测到 SARS-CoV-2。COVID-19 患者的胃肠道症状可能与粪便中 SARS-CoV-2 的长期存在有关,这提示 SARS-CoV-2 可能通过消化道传播。

对 COVID-19 患者的消化道器官活检取样进行 RT-qPCR 检测,发现在部分 COVID-19 患者的胃、十二指肠、直肠等消化道组织中检测到 SARS-CoV-2,

肠道中检测到浸润性浆细胞和间质性水肿淋巴细胞^[19,22]。对 COVID-19 死亡患者进行尸检,组织进行病毒载量检测,发现食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠等消化道组织中检测到 SARS-CoV-2,且回肠和结肠的病毒载量较高,但胃肠道组织损伤较轻,仅发现缺血性肠炎^[23-24]。

以上研究表明,部分 COVID-19 患者伴有消化道症状,且能在粪便和胃、结肠、回肠等消化道组织中检测到 SARS-CoV-2 核酸和抗原。但是,患者出现胃肠道症状并不说明 SARS-CoV-2 能通过消化道途径传播,这需要进一步证实。由于部分病毒实验不能在人体开展,且 COVID-19 患者个体差异较大,难以通过人群流调和临床数据确定病毒可经消化道传播。因此,研究者利用动物模型,检测 SARS-CoV-2 动物模型的消化系统感染表现,设计模拟消化道传播实验,深入探究了 SARS-CoV-2 通过消化道途径传播的可能性和风险。

2.2 COVID-19 动物模型的消化系统感染表现

对感染 SARS-CoV-2 的动物各组织进行病毒学及病理学等分析,能够了解 SARS-CoV-2 在不同组织系统中的感染情况。研究者目前已建立了多物种的 SARS-CoV-2 感染的动物模型,如仓鼠^[25]、水貂^[26]、小鼠^[27]和非人灵长类^[28]等,广泛用于 SARS-CoV-2 致病机理、传播机制、药物筛选等研究。

自然状态下小鼠不能感染 SARS-CoV-2 原始毒株,通过基因修饰的方法,研究者构建 hACE2-ICR 小鼠^[27]、K18-hACE2 小鼠^[29]、Ad5-hACE2 小鼠^[30]等小鼠模型,探索了 SARS-CoV-2 消化道感染的可能及传播的风险。基因修饰小鼠经鼻感染 SARS-CoV-2 后 1 d 肠道中检测到病毒阳性,但病毒载量较低,未发现明显病变,且未能分离出 SARS-CoV-2 活病毒^[27,29]。仓鼠经鼻感染 SARS-CoV-2 后,回肠、结肠中检测到 SARS-CoV-2,肠道固有层炎性细胞浸润,且粪便中能够检测到高水平的 SARS-CoV-2,同样未能分离出活病毒^[25]。水貂模型经气管感染后,连续 8 d 可在肛拭子检测到 SARS-CoV-2,胃肠道出现炎性细胞浸润,SARS-CoV-2 抗原阳性^[26]。非人灵长类在器官结构、生理构造和生化代谢等方面与人类有高度相似性,在研究病毒感染机制、传播途径等方面有重要作用。恒河猴经气管途径感染 SARS-CoV-2 后,在肛拭子和肠道中检测到 SARS-CoV-2,消化系统出现炎性细胞浸润^[31]。部分感染的非洲绿猴在直肠拭子中检测到 SARS-CoV-2,且能

分离出活病毒^[32]。老年恒河猴感染后,肛拭子检测到更高的 SARS-CoV-2 载量^[33]。研究显示多种新冠动物感染 SARS-CoV-2 后,胃肠道 SARS-CoV-2 抗原呈现阳性,并不能说明 SARS-CoV-2 能够通过消化道传播,推测可能是因为带有 SARS-CoV-2 的鼻黏膜残留物通过吞咽转移到肠道,或者 SARS-CoV-2 通过淋巴组织转移到肠道。然而,小鼠、仓鼠模型粪便中并没有分离到活病毒,其中一只非洲绿猴感染后分离出活病毒,但是病毒滴度较低,说明 SARS-CoV-2 通过粪便造成其他动物被感染的可能性较低。

研究者设计消化道单一途径感染 SARS-CoV-2,进一步探索病毒能否通过消化道感染。基因修饰小鼠灌胃感染高浓度的 SARS-CoV-2 后,部分小鼠肺和气管中检测到低载量的 SARS-CoV-2^[34]。仓鼠灌胃感染 SARS-CoV-2 后,部分仓鼠出现轻度肺炎,并在肺中检测到 SARS-CoV-2,但胃肠道中未发现病变,且食管、胃、肠道中检测不到 SARS-CoV-2^[35]。恒河猴灌胃感染 SARS-CoV-2 后,在各组织中未能检测到 SARS-CoV-2^[28]。

以上研究说明,SARS-CoV-2 难以通过消化道途径感染动物模型。消化道途径感染 SARS-CoV-2 的动物肺部出现轻度感染,可能是因为 SARS-CoV-2 能够通过消化道感染动物,也可能是因为消化道途径病毒感染剂量过高,高剂量的病毒由消化道进入淋巴结,扩散到肺部。

2.3 SARS-CoV-2 消化道感染的可能机制

SARS-CoV-2 刺突蛋白(spike protein, S protein)与宿主细胞表面的血管紧张素转化酶 II 受体(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)结合后,跨膜丝氨酸蛋白酶 2(transmembrane protease serine 2, TMPRSS2)对 S 蛋白进行切割激活,促使病毒进入宿主细胞^[36]。在 SARS-CoV-2 感染宿主细胞的过程中,ACE2 和 TMPRSS2 的表达至关重要,高表达 ACE2 和 TMPRSS2 的细胞更容易受到 SARS-CoV-2 感染。单细胞转录组测序结果发现,回肠、结肠、十二指肠、食管细胞中均表达 ACE2 和 TMPRSS2^[37-38]。COVID-19 患者表现胃肠道症状,并在肠道和粪便中检测到 SARS-CoV-2,这一现象可能与肠道细胞表面的 ACE2 和 TMPRSS2 有关。

研究者建立体外细胞培养模型和类器官探究 SARS-CoV-2 在肠道的生存情况。SARS-CoV-2 可在人结肠腺癌肺转移细胞 T84 和人结肠上皮癌细胞

Caco-2 中复制^[39-40]。此外, SARS-CoV-2 易于感染蝙蝠小肠类器官,并能维持病毒复制能力^[41]。利用人类原代肠道有机物和原代肠道上皮干细胞建立的人肠道类器官, SARS-CoV-2 感染 24 h 后病毒载量显著增加,透射电镜观察到细胞内存在不同生命周期的病毒颗粒^[40,42]。以上研究说明, SARS-CoV-2 能够通过 ACE2 受体感染肠道细胞,这可能是 COVID-19 患者出现胃肠道症状,并在消化系统中检测到 SARS-CoV-2 的原因。

3 总结与展望

呼吸道是 SARS-CoV-2 进入机体的门户,呼吸道分泌物可能通过吞咽进入胃肠道, SARS-CoV-2 与食物、黏膜混合,可能在一定程度上抵抗低 pH 环境,使得少量病毒进入胃肠道;此外, SARS-CoV-2 感染的抗原呈递细胞残留少量病毒,因此患者粪便中 SARS-CoV-2 核酸检测阳性。然而, RT-qPCR 技术不能判定病毒是否具传染性。研究者利用电子显微镜观察到粪便悬浮液中具有冠状病毒典型形态的病毒颗粒^[43-44]。但粪便中分离出活病毒的难度较大,即使分离出活病毒,病毒滴度及生长复制效率水平较低^[45]。此外,研究者在 COVID-19 患者的卫生间马桶、水槽和通风管道检测到 SARS-CoV-2 核酸阳性^[14],可能不仅仅由粪便中病毒脱落,也可能是患者在咳嗽、咳痰过程中产生飞沫的沉积。体外实验证实 SARS-CoV-2 在模拟胃液中失去活性^[37],动物实验数据表明, SARS-CoV-2 在粪便中存活足够时间达到足够浓度才可能通过消化道途径进行传播。

研究表明 SARS-CoV-2 通过消化道传播的可能性较小,风险较低。SARS-CoV-2 在流行中不断变异,病毒致病力和传播力发生巨大变化。当前流行的 Omicron 变异株主要表现为上呼吸道感染症状,具有更高的免疫逃逸能力和传播力。SARS-CoV-2 在变异累计过程中,是否产生其他可能的传播途径? 传播能力如何变化? 我们应动态监测和评估病毒变异和传播风险,由此制定科学有效的防控策略。

参考文献:

- [1] Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia [J]. N Engl J Med, 2020, 382(13): 1199-1207.
- [2] Liu Y, Rocklöv J. The effective reproductive number of the

- Omicron variant of SARS-CoV-2 is several times relative to Delta [J]. J Travel Med, 2022, 29(3): taac037.
- [3] Yoon JG, Yoon J, Song JY, et al. Clinical significance of a high SARS-CoV-2 viral load in the saliva [J]. J Korean Med Sci, 2020, 35(20): e195.
- [4] Coleman KK, Tay DJW, Tan KS, et al. Viral load of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in respiratory aerosols emitted by patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) while breathing, talking, and singing [J]. Clin Infect Dis, 2022, 74(10): 1722-1728.
- [5] Fears AC, Klimstra WB, Duprex P, et al. Persistence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in aerosol suspensions [J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(9): 2168-2171.
- [6] Guo ZD, Wang ZY, Zhang SF, et al. Aerosol and surface distribution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in hospital wards, Wuhan, China, 2020 [J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(7): 1583-1591.
- [7] Bao L, Gao H, Deng W, et al. Transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 via close contact and respiratory droplets among human angiotensin-converting enzyme 2 mice [J]. J Infect Dis, 2020, 222(4): 551-555.
- [8] Port JR, Yinda CK, Owusu IO, et al. SARS-CoV-2 disease severity and transmission efficiency is increased for airborne compared to fomite exposure in Syrian hamsters [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4985.
- [9] Fears AC, Beddingfield BJ, Chirichella NR, et al. Exposure modality influences viral kinetics but not respiratory outcome of COVID-19 in multiple nonhuman primate species [J]. PLoS Pathog, 2022, 18(7): e1010618.
- [10] Johnston SC, Ricks KM, Jay A, et al. Development of a coronavirus disease 2019 nonhuman primate model using airborne exposure [J]. PLoS One, 2021, 16(2): e0246366.
- [11] 柯天华, 谭长强. 临床医学多用辞典 [M]. 江苏: 江苏科学技术出版社; 2006.
- [12] Minodier L, Masse S, Capai L, et al. Clinical and virological factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with acute respiratory infection: a two-year prospective study in general practice medicine [J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 729.
- [13] Kang M, Wei J, Yuan J, et al. Probable evidence of fecal aerosol transmission of SARS-CoV-2 in a high-rise building [J]. Ann Intern Med, 2020, 173(12): 974-980.
- [14] Ong SWX, Tan YK, Chia, et al. Air, surface environmental, and personal protective equipment contamination by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a symptomatic patient [J]. JAMA, 2020, 323(16): 1610-1612.
- [15] Li YY, Wang JX, Chen X. Can a toilet promote virus transmission? From a fluid dynamics perspective [J]. Phys Fluids, 2020, 32(6): 065107.
- [16] Guo Y, Li X, Luby S, et al. Vertical outbreak of COVID-19 in high-rise buildings: the role of sewer stacks and prevention measures [J]. Curr Opin Environ Sci Health, 2022,

- 29: 100379.
- [17] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497–506.
- [18] Mao R, Qiu Y, He JS, et al. Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(7): 667–678.
- [19] Xiao F, Tang M, Zheng X, et al. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2 [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(6): 1831–1833.
- [20] Chen Y, Chen L, Deng Q, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(7): 833–840.
- [21] Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, et al. Gastrointestinal manifestations of SARS-CoV-2 infection and virus load in fecal samples from a Hong Kong cohort: systematic review and meta-analysis [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(1): 81–95.
- [22] Lin L, Jiang X, Zhang Z, et al. Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection [J]. *Gut*, 2020, 69(6): 997–1001.
- [23] Deinhardt-Emmer S, Wittschieber D, Sanft J, et al. Early postmortem mapping of SARS-CoV-2 RNA in patients with COVID-19 and the correlation with tissue damage [J]. *Elife*, 2021, 10: e60361.
- [24] Skok K, Stelzl E, Trauner M, et al. Post-mortem viral dynamics and tropism in COVID-19 patients in correlation with organ damage [J]. *Virchows Arch*, 2021, 478(2): 343–353.
- [25] Song Z, Bao L, Yu P, et al. SARS-CoV-2 Causes a systemically multiple organs damages and dissemination in hamsters [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 618891.
- [26] Song Z, Bao L, Deng W, et al. Integrated histopathological, lipidomic, and metabolomic profiles reveal mink is a useful animal model to mimic the pathogenicity of severe COVID-19 patients [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 29.
- [27] Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice [J]. *Nature*, 2020, 583(7818): 830–833.
- [28] Deng W, Bao L, Gao H, et al. Ocular conjunctival inoculation of SARS-CoV-2 can cause mild COVID-19 in Rhesus macaques [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4400.
- [29] Zheng J, Wong LR, Li K, et al. COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice [J]. *Nature*, 2021, 589(7843): 603–607.
- [30] Sun J, Zhuang Z, Zheng J, et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment [J]. *Cell*, 2020, 182(3): 734–743.
- [31] Deng W, Bao L, Liu J, et al. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in Rhesus macaques [J]. *Science*, 2020, 369(6505): 818–823.
- [32] Cross RW, Agans KN, Prasad AN, et al. Intranasal exposure of African green monkeys to SARS-CoV-2 results in acute phase pneumonia with shedding and lung injury still present in the early convalescence phase [J]. *Res Sq*, 2020, 17(1): 125.
- [33] Yu P, Qi F, Xu Y, et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19 [J]. *Animal Model Exp Med*, 2020, 3(1): 93–97.
- [34] Sun SH, Chen Q, Gu HJ, et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28(1): 124–133.
- [35] Lee AC, Zhang AJ, Chan JF, et al. Oral SARS-CoV-2 inoculation establishes subclinical respiratory infection with virus shedding in golden syrian hamsters [J]. *Cell Rep Med*, 2020, 1(7): 100121.
- [36] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271–280.
- [37] Zang R, Gomez Castro MF, McCune BT, et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes [J]. *Sci Immunol*, 2020, 5(47): eabc3582.
- [38] Zhang H, Kang Z, Gong H, et al. Digestive system is a potential route of COVID-19: an analysis of single-cell coexpression pattern of key proteins in viral entry process [J]. *Gut*, 2020, 69(6): 1010–1018.
- [39] Bojkova D, Klann K, Koch B, et al. Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets [J]. *Nature*, 2020, 583(7816): 469–472.
- [40] Stanifer ML, Kee C, Cortese M, et al. Critical role of type III interferon in controlling SARS-CoV-2 infection in human intestinal epithelial cells [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(1): 107863.
- [41] Zhou J, Li C, Liu X, et al. Infection of bat and human intestinal organoids by SARS-CoV-2 [J]. *Nat Med*, 2020, 26(7): 1077–1083.
- [42] Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes [J]. *Science*, 2020, 369(6499): 50–54.
- [43] Zhang Y, Chen C, Zhu S, et al. Isolation of 2019-nCoV from a stool specimen of a laboratory-confirmed case of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) [J]. *China CDC Wkly*, 2020, 2(8): 123–124.
- [44] Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens [J]. *JAMA*, 2020, 323(18): 1843–1844.
- [45] Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 [J]. *Nature*, 2020, 581(7809): 465–469.

[收稿日期]2022-11-14

张雄,郭文文,张彩勤. 免疫系统人源化的非小细胞肺癌异种移植小鼠模型临床前研究应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (12): 108-114.

Zhang X, Guo WW, Zhang CQ. Preclinical application of a xenotransplantation mouse model of non-small cell lung cancer with a humanized immune system [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 108-114.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.015

免疫系统人源化的非小细胞肺癌异种移植小鼠模型 临床前研究应用

张 雄¹, 郭文文^{1,2}, 张彩勤^{1*}

(1.空军军医大学实验动物中心,西安 710032;2.陕西省咸阳市中心医院,陕西 咸阳 712000)

【摘要】 肺癌是世界上发病率和死亡率最高的癌症之一,而非小细胞肺癌则是肺癌中恶性程度和占比相对较高的亚型。近年来,非小细胞肺癌的免疫治疗成为热点方向,涌现出大量的免疫单药及联合治疗方案,这些方案的开展亟需临床前验证。因此,提供可靠的临床前实验动物模型以评估治疗效果、探索最佳用药方案以及推动个体化医疗是目前急需解决的问题。基于免疫系统人源化的异种移植小鼠模型由于同时具有人体免疫系统和肿瘤细胞,能够高度模拟人体内肿瘤免疫微环境,在肿瘤免疫治疗研究中具有广阔的应用前景。本文主要从人源化模型在非小细胞肺癌治疗的应用方面进行综述,为各种非小细胞肺癌免疫治疗方案的临床前实验提供指导,以期推进这些方案的临床试验。

【关键词】 免疫系统人源化;非小细胞肺癌;免疫检查点;免疫联合治疗;新辅助治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0108-07

Preclinical application of a xenotransplantation mouse model of non-small cell lung cancer with a humanized immune system

ZHANG Xiong¹, GUO Wenwen^{1,2}, ZHANG Caiqin^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032, China.

2. Xianyang Central Hospital, Xianyang 712000)

【Abstract】 Lung cancer has one of the highest morbidity and mortality rates. Non-small cell lung cancer is a subtype with a relatively high degree of malignancy and proportion. In recent years, immunotherapy for non-small cell lung cancer has become a research focus. Numerous immune monotherapies and combined therapies have emerged. The development of these therapies requires preclinical verification. Therefore, reliable animal models are needed to evaluate therapeutic effects, explore optimal drug regimens and promote individualized medical treatment. Because a xenotransplantation model with a humanized immune system has both a human immune system and human tumor cells, it closely recapitulates the tumor immune microenvironment in the human body, which has a broad application prospect in the research of oncological immunotherapy. This article mainly reviews the application of humanized models and provides guidance for preclinical trials of various immunotherapy schemes for non-small cell lung cancer to promote clinical trials of these schemes.

【Keywords】 humanized immune system; non-small cell lung cancer; immune checkpoints; combination immunotherapy; neoadjuvant therapy

[基金项目] 陕西省科技创新支撑项目(2020PT-005)。

[作者简介] 张雄(2001—),男,本科,研究方向:人源化动物模型的制备与应用。E-mail:zx18334825632@163.com

[通信作者] 张彩勤(1981—),女,副教授,硕士生导师,研究方向:人源化动物模型的制备与应用。E-mail:zhangcaiqin-beibei@163.com

肺癌是一种起源于肺部支气管黏膜或腺体的恶性肿瘤,依据其肿瘤细胞形态,可将肺癌分为两类,一类为小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC),约占肺癌确诊患者的 15%,另一类为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC),约占肺癌确诊患者的 85%。其中非小细胞肺癌又可具体分为鳞状细胞癌、腺癌以及大细胞癌 3 类。据最新临床数据显示^[1],全球几乎近 1/4 的癌症死亡患者属于肺癌患者,且约 57% 的肺癌患者会出现相应肿瘤转移症状,其五年生存率低于 5%。究其原因在于肺癌的临床表现复杂,无法通过相关的早期诊断对患者进行筛查,而大多数肺癌患者诊断明确时,病情已发展至晚期,确诊率与死亡率几近并驾齐驱。因此,肺癌的临床治疗仍面临着巨大的挑战^[2-3]。

近年来,随着以免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 为代表的免疫治疗的发展^[4-6],肺癌治疗进入了免疫治疗的时代。随之而来,有大量的免疫单药治疗及联合治疗的策略亟待进行临床前或临床试验以检验治疗效果。早期临床前研究中,研究人员通常将研究焦点集中于肿瘤细胞本身,主要采用裸鼠、C57BL/6J 等小鼠进行荷瘤实验以检测药物的治疗效果。然而,这种模型不仅缺乏完整的肿瘤免疫微环境 (tumor immune microenvironment, TME)^[7],且其与人类肿瘤细胞及免疫系统也存在种属差异,造成了实验室结果难以转化为临床疗法的困境。因此,选择能够最大程度模拟人体肿瘤微环境的临床前动物模型变得至关重要。为真实模拟人体肿瘤免疫微环境,以研究药物的作用机制及确定最佳的诊治方案,免疫系统人源化小鼠应运而生^[8],主要包括 Hu-PBL (humanized-peripheral blood mononuclear cells) 小鼠模型、Hu-HSCs (humanized-hematopoietic stem cells) 小鼠模型、Hu-BLT (humanized-bone marrow, liver, thymus) 小鼠模型。由于免疫系统人源化小鼠模型构建已有多篇文章进行介绍,因此本文重点综述肺癌研究过程中构建的具有人免疫系统的非小细胞肺癌异种移植模型在相关治疗中的具体应用,并综合现阶段临床难点问题,对其潜在应用及发展方向进行探讨。

1 免疫检查点抑制剂的临床前研究

随着越来越多免疫检查点的发现和研究,新型

的免疫检查点抑制剂药物不断研发,与此同时伴随着的是需要开展大量临床前药物评估研究以明确药物疗效,以及观察药物的毒副作用并确定最佳用药方案。已有研究证明人源性组织异种移植 (patient-derived xenografts, PDX) 模型对于常规用于肿瘤治疗的化疗药物的临床预测准确度高达 97%^[9],因此可以推测异种移植的肺癌免疫系统人源化小鼠作为一种具有巨大潜力的转化医学平台,是解决上述两大难题的关键所在。

目前已被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准上市的非小细胞肺癌的免疫检查点抑制剂药物 pembrolizumab、nivolumab、atezolizumab、durvalumab 和 avelumab 主要抑制 PD-1 和 PD-L1 结合通路,而 ipilimumab 主要抑制 CTLA-4 和 CD80/86 结合通路,大量的异种移植的非小细胞肺癌免疫系统人源化小鼠被应用到免疫抑制剂药物的研究过程中,并显现出独特的优势。

在治疗效果评估方面,多项研究证明人源化小鼠模型具有真实存在的临床转化应用价值。上海交通大学附属胸科医院的周箴团队的研究表明,肺癌 Hu-PBL-PDX 模型的肿瘤生长能被 PD-1 单抗抑制,并且早期 PD-L1 表达水平越高,肿瘤体积抑制率 (tumor growth inhibition value, TGI) 越大,因此该模型或可帮助指导临床用药,预测非小细胞肺癌患者从 PD-1/PD-L1 免疫治疗中获益的可能性^[10]。Wang 等^[11]在免疫缺陷小鼠 (NSG) 辐照 4 h 后,将胎肝来源的 CD34⁺ HPSC (human pluripotent stem cells) 通过静脉注射移植入小鼠体内,并移植患者来源的肺癌组织构建 Onco-HuNSG-PDX 模型。在 Onco-HuNSG-PDX 小鼠中,13 只小鼠中有 11 只对 pembrolizumab 治疗有反应,进一步通过与单纯 NSG 小鼠组的对比发现,Onco-HuNSG 小鼠中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞含量显著增加,pembrolizumab 的肿瘤抑制作用在缺乏人类免疫细胞的 NSG 小鼠和 hCD8⁺ T 细胞耗尽的 Onco-HuNSG 小鼠中不存在,因此可初步得出 pembrolizumab 的功效取决于 Onco-HuNSG 小鼠中 hCD8⁺ T 细胞的人类免疫系统的重建,为其成为研究免疫检查点抑制剂在 T 细胞活化中功效的新平台提供了进一步的依据。此外,虽已明确靶向 PD-1/PD-L1 通路可恢复 T 细胞功能,但其对于肿瘤细胞生物学特征的影响仍需更加深入的研究^[12],部分研究人员通过构建此类模型证实免疫检

查点抑制剂可通过上调血清中的 IL-4 和 IFN- γ 水平实现对 NSCLC 的治疗作用^[13-14]。

在模型构建以及模型优化拓展应用方面,不同的实验设计需要选择不同的模型构建方法。在研究 PD-L1/PD-1 靶向免疫治疗效果的人源化肺癌小鼠模型的实验过程中^[15],研究人员通过模型构建难度、T 细胞重建水平以及抗肿瘤药物治疗效果综合对比首次发现, Hu-PBL-CDX 模型优于 Hu-HSCs-CDX 模型,且后期所建立的 Hu-PBL-PDX 模型可应用于对免疫功能已经受到 PD-1/PD-L1 通路抑制的 T 细胞重新恢复功能的探索性研究中。而探究新型的造模方式,也是目前解决人源化小鼠模型局限性的最佳方案,如患者自体免疫系统人源化小鼠模型 auto-PBMC-PDX 小鼠已成为研究癌症免疫疗法的新兴平台^[15-17],用于评估抗 PD-L1/PD-1 抗体疗法的疗效,帮助指导临床决策,如建议患者是否可以从 PD-L1/PD-1 靶向免疫疗法中获得临床益处等。

在模型潜在应用价值方面,我们发现移植患者来源肺癌组织的 Hu-PBL 和 Hu-HSCs 模型个体中进行的免疫检查点抑制剂如 pembrolizumab、nivolumab 疗效评估^[11,14,18],其应答率与临床试验中的应答率基本一致,因此该类模型可能代表了一种理想的对病人的选择和对治疗反应的预测因子评估平台,可用于对于肿瘤标志物的筛选。日本学者 Fukui 等^[19]在驱动基因突变显著的患者人群临床研究发现,中性粒细胞-淋巴细胞比率(neutrophil-to-lymphocyte rate, NLR)可用于前瞻性预测,作为筛选对于 PD-1 以及 PD-L1 阻断治疗有效的患者的指标,但由于样本量不足以及实验样本具有特殊性的原因,并不能完美转化为临床标准。NLR 真正作为预测指标在临床上得到应用有较多工作需要,如成本-效果评价、NLR 在肿瘤以及外周血一致性评价、预期设计 NLR 具体界限评价等^[20-22]。异种移植的免疫系统人源化小鼠可为推动 NLR 生物标志物研究,解决此类问题提供良好的临床前研究模型。

2 免疫联合治疗

免疫检查点抑制剂的出现极大程度上改善了非小细胞肺癌患者的生存率,但仍有大量患者对于单一免疫检查点抑制剂药物的作用效果不明显,因此急需基于免疫治疗的联合化疗、放疗、靶向药物治疗等的联合治疗方案来提高免疫治疗的效果。

目前较为常见的非小细胞肺癌的联合治疗方案包括双免疫检查点联合治疗^[23-24]、PD-1/PD-L1 与抗血管生成药物联合治疗^[25-26]、PD-1/PD-L1 与含铂类药物联合治疗^[27]等。但大多联合治疗缺乏临床前实验证据,具体的用药方案也有待进一步明确和优化。目前的免疫系统和肿瘤双人源化的小鼠模型可作为此类研究的一种有效的临床前动物模型,该类模型的应用可为新药研发和新型治疗方案的确立提供可靠的数据基础。

2.1 免疫联合代谢阻断治疗

除了与传统的治疗方案的联合,还可针对肿瘤细胞糖酵解代谢的关键途径来促进免疫治疗效果。Oxamate 是一种能够阻断肿瘤细胞糖酵解的抗癌药物,有研究通过构建 Hu-PBL-CDX 非小细胞肺癌模型,研究 Oxamate 与免疫检查点抑制剂 pembrolizumab 联合治疗对肺癌肿瘤细胞的作用^[28],证实 Oxamate 与 pembrolizumab 虽在单独治疗时均可起到延迟肿瘤生长的作用,但当二者合用时,Oxamate 可通过抑制 LDH-A 的活性来阻断肿瘤细胞糖酵解过程以及增加肿瘤中心 CD8⁺ T 细胞浸润,抑制肿瘤细胞活性,进而增强 pembrolizumab 的抗肿瘤疗效,且该联合疗法即使在剂量较大的情况下,也不会对机体正常细胞造成过度影响。因此,人源化异种移植小鼠模型还可作为靶向代谢途径和免疫联合治疗方案的临床前模型,利用该模型来进行免疫联合代谢阻断治疗的全面评估,评估结果可为临床研究的顺利开展奠定坚实的数据基础。

2.2 双免疫联合治疗

T 细胞双特异性抗体(T-cell bispecific antibodies, TCB)通过将 T 细胞与靶向肿瘤细胞交联来引发抗肿瘤反应,且其介导的多克隆 T 细胞活化与 T 细胞受体特异性无关,无需共刺激信号介导。肺癌免疫治疗的研究中^[29],研究人员先将健康人来源的 PBMC 注射到 NCG 小鼠体内,并移植高表达 PD-L1 的 HCC827 肺肿瘤细胞成功构建肺癌的 Hu-PBL-CDX 小鼠模型,然后当小鼠接种肿瘤后 4 d 静脉给予双特异性抗体 ACE-05 治疗,发现在 10 只 ACE-05 治疗的小鼠中,有 9 只预先建立的肿瘤在第 12 天完全消退,表明双特异性抗体 ACE-05 可有效诱导非小细胞肺癌肿瘤消退,在后续研究中也证明了其可降低脱靶毒性。此外,在人胃腺癌异种移植小鼠模型(Hu-HSCs-CDX)中 TCB 已被证明可以上调 T 细胞上的 PD-1 表达和癌细胞上 PD-L1 表达,

且与 TCB 单药治疗或抗 PD-L1 单药治疗相比,TCB 与抗 PD-L1 的联合用药具有更强的抗肿瘤作用^[30],因此利用肺癌异种移植小鼠模型进一步探索双免疫联合方案具有较好的应用价值。

3 新辅助/辅助治疗

新辅助治疗是指在肿瘤患者接受手术前进行一定治疗处理,达到缩小肿瘤体积、减少肿瘤转移复发、提高耐受性和手术治疗等可能目的的一种新治疗手段,主要包括新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy, NACT)、新辅助免疫治疗(neoadjuvant the immune checkpoint inhibition, NAICI)以及新辅助内分泌治疗(neoadjuvant hormonal therapy, NAHT)。针对非小细胞肺癌而言,已有多种新辅助治疗手段开始逐步应用,例如新辅助化疗已经获批非小细胞肺癌患者的一线应用,但对于患者的长期生存改善并不明显。另外,如何根据患者人群的异质性,选择合适的药物或确定合适治疗时机,及其是否存在相关治疗不良效应仍是临床工作的巨大障碍。研究人员用 4 周大的雄性无胸腺 NMRI-Foxn1 nu/nu 小鼠(JanvierTM)和 C57BL/6J(JanvierTM)小鼠通过移植人肺癌细胞系(A549 或 LNM-R)构建 Hu-CDX 模型,然后进行新辅助化疗,并联合进行免疫治疗。结果显示,基于顺铂的 NACT 可通过 AKT 激活以剂量依赖性方式快速增加 PD-L1 表达,且延缓肿瘤的生长,与单药治疗相比,肿瘤体积减少了 47%^[31],虽结果比较理想,但若想在临床前实验中较为可靠地评估新辅助治疗疗效和最佳治疗时机,则需进一步研究微环境中免疫细胞的数量和功能对联合 ICI 和 NAC 结果的影响,而免疫人源化的异种移植小鼠模型则是进一步探究的首选动物模型。本研究也通过构建免疫人源化的异种移植小鼠模型发现 CD8⁺ PD-1⁺ T 细胞水平与后续治疗积极结果密切相关,具体而言,外周血中 CD8⁺ PD-1⁺ T 细胞的变化可以预测肿瘤微环境的重编程,进一步有助于确定手术的最佳时间。

4 CAR-T 免疫疗法的临床前研究

嵌合抗原受体修饰 T 细胞(chimeric antigen receptor modified T cells, CAR-T cells)疗法是一种过继性细胞免疫治疗。该疗法是用基因工程合成受体转导患者 T 细胞以靶向癌细胞表面抗原,进而介导抗肿瘤作用。CAR-T 目前主要应用于血液系统

恶性肿瘤^[32],而在 NSCLC 等实体瘤中效果不甚显著,其原因是大多实体瘤的肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)靶标在覆盖率和特异性方面呈现出异质性,即大多实体瘤无真正的肿瘤特异性抗原。

为了更好地将 CAR-T 疗法应用于实体瘤,需选择和确定具有相对广的覆盖率和较强的特异性的靶标。在早期研究中发现, LunX (即 BPIFA1、PLUNC、SPLUNC1) 在肺癌细胞中高度表达^[33]。前期细胞实验中,使用 LunX 抗体可以通过诱导 LunX 表达下调和阻断 LunX 下游通路抑制 LunX 阳性的肺癌肿瘤细胞生长^[34],因此研究人员构造了以 LunX 为靶标的 CAR-T 细胞进行深入研究^[35],同时构建 Hu-PDX 模型对其疗效进行评估,与 PBS 组以及非特异性靶标 CAR-T^{CD19} 比较发现 CAR-T^{LunX} 疗法不仅可以减缓肿瘤引起的小鼠体重减轻的症状,而且有效延长荷瘤小鼠的生存时间,通过 Log-rank 时序检验分析可得出 CAR-T^{LunX} 疗法大大提高了荷瘤小鼠存活率的结论。为了进一步研究其潜在的治疗机制,研究者进行了免疫荧光分析,结果显示 CAR-T^{LunX} 在首次治疗 7 d 后可以充分渗透进入 PDX 肿瘤模型内部,进而实现对肿瘤细胞有效的杀伤。因此,异种移植小鼠 PDX 模型为开展大量此类靶标检测实验^[36]以及研究新型 CAR 如可转换 CAR、抑制性 CAR、靶向双 TAA 的 CAR 等提供了平台^[37-40]。

5 纳米药物临床前评估

除免疫治疗和手术治疗外,化疗仍是临床上使用较为广泛的延长非小细胞肺癌患者生存率的手段,但传统的抗肿瘤药物缺乏对肿瘤细胞的特异性,其伴随产生的细胞毒素则较易诱导机体产生耐药性。纳米靶向药物是一种以纳米材料作为药物载体,通过对其表面进行修饰,使其可特异性靶向选择肿瘤细胞,对于提高药物的利用率以及减少对正常组织细胞损伤有着重要的意义。而其在研究过程中,需要大量人源化模型对其治疗效果以及适宜人群进行评断。

含钆金属富勒醇是一种新型纳米药物,其微粒直径约为 1 nm,主要特点是能够在各种 pH 浓度中通过非共价键凝集成为 20~120 nm 的颗粒药物,可抑制多种肿瘤活性。中国人民解放军总医院尹东涛^[41]课题组通过构建 Hu-PDX 模型对含钆金属富勒醇纳米

药物的生物安全性以及对不同类型非小细胞肺癌作用效果差别进行研究,结果显示含钆金属富勒醇对生长速度相对缓慢的鳞癌有较好的抑制效果(80.34%, $P < 0.01$),而对大细胞肺癌抑制效果则相对较弱(53.26%, $P < 0.05$),但总体治疗效果要优于单纯顺铂治疗(33.86%, $P < 0.05$)。同时,在模型构建过程中发现^[42],鳞癌的构建成功率要略高于腺癌,而患者性别、吸烟史、肿瘤分化程度、TNM 分期、移植方法对肺癌 PDX 模型成功率均无显著性影响。

此外,纳米技术也开始和其他治疗手段联合达到靶向治疗的目的。如 *KRAS/TP53* 突变是导致肺腺癌出现的主要原因,因此抑制 *KRAS* 致癌基因和恢复 p53 功能是肺腺癌最有力的治疗策略。Gu 等^[43]通过核糖核酸 RNAi 与纳米技术结合构成 LbL 模式药物,靶向作用于 *KRAS/TP53*,致力于探究该方案可行性。研究人员通过构建原位异种移植小鼠模型 Hu-PDX 研究肿瘤治疗效果,结果显示该治疗药物在荷瘤小鼠的肺中优先摄取,且用 LbL 模式药物治疗的小鼠其中位生存期达 23.5 d,与任何单独的核糖核酸治疗(中位生存期 9.0 d)或顺铂治疗(中位生存期 15.5 d)相比,可观察到明显增强的抗肿瘤功效和延长的存活时间,进一步的分子实验证实了该模式药物可降低单纯顺铂治疗带来的肝毒性和肾毒性的影响。因人源化异种移植小鼠模型可高度拟和人体病变经过,故其应用显示出 LbL 模式药物在肺腺癌治疗上具有直接的转化潜力,有望进入临床试验阶段。除核糖核酸可与化疗药物结合起到靶向治疗的作用外,美国丹娜-法伯癌症研究所在一项国际性 NSCLC 临床试验中使用了一种名为 trastuzumab deruxtecan 的抗体偶联药物^[44],该药物将化疗药物与高度靶向 *HER2* 基因突变的抗体相结合对患者进行治疗,结果显示超过一半的带有 *HER2* 基因突变的非小细胞肺癌患者体内的肿瘤在较长的一段观察期内停止生长,甚至出现缩小的现象,进一步表明了抗体偶联药物的治疗前景。而该药物的进一步疗效评估可通过免疫系统和肿瘤双人源化的动物模型进行研究,以期进入临床试验阶段奠定良好基础。

6 展望

目前有报道称肿瘤干细胞是造成肿瘤复发和转移的主要细胞亚群^[45],对于肿瘤的发生与发展起作用,但具体调节机制并不明确。目前已有团队通

过结肠癌患者的 PDX 模型进行相关研究^[46],力图发现克服免疫抑制屏障的新方法,因此人源化模型或可在靶向肿瘤干细胞联合免疫治疗晚期肺癌,以及新辅助/辅助治疗早期肺癌的临床前研究中发挥不可替代的作用。此外,在免疫联合化疗、免疫联合放疗的临床前研究阶段所采用的肿瘤、免疫系统及治疗抗体大多都是鼠源性的而非人源性的^[47-48],与人体免疫相应的过程存在一定的差别,因此实验结果虽有指导意义,但并不能充分证明其临床应用价值和前景,需在进一步的临床前研究中使用基于免疫系统人源化的小鼠异种移植模型则可能更加高度拟和临床患者表现,则可为治疗方案的临床转化应用提供更加有力的证据,如在三阴性乳腺癌的临床前研究中,研究团队通过构建免疫系统人源化小鼠来比较免疫单药治疗和免疫联合治疗的效果差异,结果显示 OKI-179 和 nivolumab 的组合比单独使用 nivolumab 显著抑制肿瘤生长($TGI = 77\%$),且 OKI-179 的使用会增加肿瘤浸润细胞的表达,与临床患者表型具有显著的一致性^[49]。因此在非小细胞肺癌的相关研究中,也期望能够通过免疫和肿瘤双人源化的小鼠模型获得有效的临床前研究数据,来加速新型治疗药物或新型治疗方案的临床转化。

7 总结

基于免疫系统人源化小鼠在非小细胞肺癌研究中的应用正如火如荼地开展,关于肺癌的治疗手段也在一步步的趋向于个体化。因此针对非小细胞肺癌的治疗手段的临床前分析也应该逐步向个体化治疗、靶向治疗迈进。选择特异肿瘤标志物、搭建高效靶向转运体、确定合理联合治疗给药系统、制定合适免疫治疗方案以及选取恰当新辅助/辅助治疗的时机仍为目前尚待解决的棘手难题,需进行详细的临床前研究,以期获得更加完善的实验数据。

另外,虽现阶段人源化小鼠模型在各种治疗手段的临床前评估体现了独特的优越性,但其也存在各种亟待解决的问题,如 B 细胞、NK 细胞重建水平不高、供体来源受限、不能完全拟合人体内免疫微环境以及部分模型重建效果稳定性不强等^[11]。因此,我们研究室致力于进一步改进模型构建方法中存在的一些问题,以期构建更为完备有效的临床前评估模型^[28,50],帮助其进一步在非小细胞肺癌的治疗研究中焕发新的活力。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.
- [2] Lim SM, Pyo KH, Kim JH, et al. Promising preclinical platform for evaluation of immuno-oncology drugs using Hu-PBL-NSG lung cancer models [J]. Cancer Res, 2018, 78(13): 1148-1148.
- [3] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. Nature, 2018, 553(7689): 446-454.
- [4] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264.
- [5] Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors [J]. Br J Cancer, 2018, 118(1): 9-16.
- [6] Wang M, Herbst RS, Boshoff C. Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer [J]. Nat Med, 2021, 27(8): 1345-1356.
- [7] Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [J]. Nat Med, 2013, 19(11): 1423-1437.
- [8] Walsh NC, Kenney LL, Jangalwe S, et al. Humanized mouse models of clinical disease [J]. Annu Rev Pathol, 2017, 12: 187-215.
- [9] Byrne AT, Alf  rez DG, Amant F, et al. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts [J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(4): 254-268.
- [10] 周箴, 徐云华, 张菲菲, 等. 人源化免疫肺癌小鼠模型的建立及其在程序性死亡受体 1 抑制剂疗效评估中的作用 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 40(1): 37-43.
- [11] Wang M, Yao LC, Cheng M, et al. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy [J]. FASEB J, 2018, 32(3): 1537-1549.
- [12] Stewart DJ. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(1): 356.
- [13] Nguyen N, Bellile E, Thomas D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma [J]. Head Neck, 2016, 38(7): 1074-1084.
- [14] Kametani Y, Ohno Y, Ohshima S, et al. Humanized mice as an effective evaluation system for peptide vaccines and immune checkpoint inhibitors [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): E6337.
- [15] Lin S, Huang G, Cheng L, et al. Establishment of peripheral blood mononuclear cell-derived humanized lung cancer mouse models for studying efficacy of PD-L1/PD-1 targeted immunotherapy [J]. MAbs, 2018, 10(8): 1301-1311.
- [16] Fiseha T. Cystatin C-a biomarker for early nephropathy in type 2 diabetic patients [J]. J Mol Biomark Diagn, 2016, 1(8): 010.
- [17] Jespersen H, Lindberg MF, Donia M, et al. Clinical responses to adoptive T-cell transfer can be modeled in an autologous immune-humanized mouse model [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 707.
- [18] Sobarzo A, Roisman L, Pikovsky O, et al. A36 patient-specific humanized PDX model for overcoming tumor resistance to immune checkpoint inhibitors in NSCLC patients [J]. J Thorac Oncol, 2020, 15(2): S24.
- [19] Fukui T, Okuma Y, Nakahara Y, et al. Activity of nivolumab and utility of neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictive biomarker for advanced non-small-cell lung cancer: a prospective observational study [J]. Clin Lung Cancer, 2019, 20(3): 208-214.
- [20] Park W, Kwon D, Saravia D, et al. Developing a predictive model for clinical outcomes of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab [J]. Clin Lung Cancer, 2018, 19(3): 280-288.
- [21] Bagley SJ, Kothari S, Aggarwal C, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as a marker of outcomes in nivolumab-treated patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2017, 106: 1-7.
- [22] Wungki P, Laura M, Naoyuki O, et al. Predicting outcomes of advanced non-small cell lung cancer patients treated with PD-1/PD-L1 inhibitors: independent international validation of the iSEND model [J]. J Clin Oncol, 2018, 36(15): 3015.
- [23] Hellmann MD, Rizvi NA, Goldman JW, et al. Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): results of an open-label, phase 1, multicohort study [J]. Lancet Oncol, 2017, 18(1): 31-41.
- [24] Aggarwal C, Prawira A, Antonia S, et al. Dual checkpoint targeting of B7-H3 and PD-1 with enoblituzumab and pembrolizumab in advanced solid tumors: interim results from a multicenter phase I/II trial [J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(4): e004424.
- [25] Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, et al. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC [J]. N Engl J Med, 2018, 378(24): 2288-2301.
- [26] Martinez-Usatorre A, Kadioglu E, Boivin G, et al. Overcoming microenvironmental resistance to PD-1 blockade in genetically engineered lung cancer models [J]. Sci Transl Med, 2021, 13(606): eabd1616.
- [27] Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 378(22): 2078-2092.
- [28] Qiao T, Xiong Y, Feng Y, et al. Inhibition of LDH-A by oxamate enhances the efficacy of anti-PD-1 treatment in an NSCLC humanized mouse model [J]. Front Oncol, 2021, 11: 632364.
- [29] Jang S, Song J, Kim N, et al. Development of an antibody-like T-cell engager based on VH-VL heterodimer formation and its application in cancer therapy [J]. Biomaterials, 2021, 271: 120760.
- [30] Sam J, Colombetti S, Fauti T, et al. Combination of T-cell bispecific antibodies with PD-L1 checkpoint inhibition elicits

- superior anti-tumor activity [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 575737.
- [31] Fournel L, Wu Z, Stadler N, et al. Cisplatin increases PD-L1 expression and optimizes immune check-point blockade in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2019, 464: 5–14.
- [32] Metzinger MN, Verghese C, Hamouda DM, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy: reach to solid tumor experience [J]. *Oncology*, 2019, 97(2): 59–74.
- [33] Zheng X, Tian Z, Wei H. Lung specific X protein as a novel therapeutic target for lung cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(12): e1052931.
- [34] Zheng X, Cheng M, Fu B, et al. Targeting LUNX inhibits non-small cell lung cancer growth and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(6): 1080–1090.
- [35] Hu Z, Zheng X, Jiao D, et al. LunX-CAR T cells as a targeted therapy for non-small cell lung cancer [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 17: 361–370.
- [36] Tokarew N, Ogonek J, Endres S, et al. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells [J]. *Br J Cancer*, 2019, 120(1): 26–37.
- [37] Chen N, Li X, Chintala NK, et al. Driving CARs on the uneven road of antigen heterogeneity in solid tumors [J]. *Curr Opin Immunol*, 2018, 51: 103–110.
- [38] Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(3): 147–167.
- [39] MacKay M, Afshinnekoo E, Rub J, et al. The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(2): 233–244.
- [40] Lindner SE, Johnson SM, Brown CE, et al. Chimeric antigen receptor signaling: functional consequences and design implications [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(21): eaaz3223.
- [41] 尹东涛. 人源肺癌异种移植模型的建立及其在纳米药物临床应用研究中的应用 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2018.
- [42] Izumchenko E, Paz K, Ciznadija D, et al. Patient-derived xenografts effectively capture responses to oncology therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(10): 2595–2605.
- [43] Gu L, Deng ZJ, Roy S, et al. A combination RNAi-chemotherapy layer-by-layer nanoparticle for systemic targeting of KRAS/P53 with cisplatin to treat non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(23): 7312–7323.
- [44] Li BT, Smit EF, Goto Y, et al. Trastuzumab deruxtecan in *HER2*-mutant non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(3): 241–251.
- [45] Perry JM, Tao F, Roy A, et al. Overcoming Wnt- β -catenin dependent anticancer therapy resistance in leukaemia stem cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(6): 689–700.
- [46] He X, Smith SE, Chen S, et al. Tumor-initiating stem cell shapes its microenvironment into an immunosuppressive barrier and pro-tumorigenic niche [J]. *Cell Rep*, 2021, 36(10): 109674.
- [47] Hu M, Zhang J, Kong L, et al. Immunogenic hybrid nanovesicles of liposomes and tumor-derived nanovesicles for cancer immunochemotherapy [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(2): 3123–3138.
- [48] Herter-Sprie GS, Koyama S, Korideck H, et al. Synergy of radiotherapy and PD-1 blockade in Kras-mutant lung cancer [J]. *JCI Insight*, 2016, 1(9): e87415.
- [49] Capasso A, Lang J, Pitts TM, et al. Characterization of immune responses to anti-PD-1 mono and combination immunotherapy in hematopoietic humanized mice implanted with tumor xenografts [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 37.
- [50] Guo W, Zhang C, Qiao T, et al. Strategies for the construction of mouse models with humanized immune system and evaluation of tumor immune checkpoint inhibitor therapy [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 673199.

[收稿日期]2022-04-10

马枫茜,陈瑞枫,丁寿鹏,等. 外泌体的抗感染作用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 115-119.

Ma FQ, Chen RF, Ding SP, et al. Research progress into the anti-infective effect of exosomes [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 115-119.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.016

外泌体的抗感染作用研究进展

马枫茜,陈瑞枫,丁寿鹏,李祥芳,吴利先*

(大理大学基础医学院微生物学与免疫学教研室,云南 大理 671000)

【摘要】 外泌体是由多种细胞分泌的纳米囊泡,能够传递蛋白质、脂质和核酸等生物活性大分子,在细胞间信息传递中起着重要作用。越来越多的研究表明,某些类型细胞如间充质干细胞、NK 细胞和中性粒细胞等细胞来源的外泌体具有治疗潜力,参与调节免疫系统,能够增强免疫细胞的杀伤能力;另外从感染细胞释放的外泌体也能促进抗原提呈和免疫细胞活化,激活多种细胞免疫因子,介导细胞免疫反应。本文就外泌体在抗病毒感染、细菌感染和真菌感染中的直接或间接作用进行了综述,为临床应用提供依据。

【关键词】 外泌体;病毒;细菌;真菌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0115-05

Research progress into the anti-infective effect of exosomes

MA Fengqian, CHEN Ruifeng, DING Shoupeng, LI Xiangfang, WU Lixian*

(Department of Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, China)

【Abstract】 Exosomes are nanovesicles secreted by various cells, which can transfer bioactive macromolecules such as proteins, lipids, and nucleic acids, and play an important role in intercellular information transfer. Increasing studies have shown that exosomes derived from some cell types, such as mesenchymal stem cells, natural killer cells, and neutrophils, have therapeutic potential, by participating in the regulation of the immune system and enhancing the killing ability of immune cells. In addition, exosomes released from infected cells can promote antigen presentation and immune cell activation, activate a variety of cellular immune factors, and mediate the cellular immune response. We review the direct and indirect roles of exosomes in viral, bacterial, and fungal infections to provide evidence for their clinical application.

【Keywords】 exosome; virus; bacteria; fungi

外泌体是起源于内吞途径的纳米级微小囊泡的一种,直径约为 30~150 nm,其表面表达 CD63、CD9 和 CD81 等生物标志物^[1-3]。由人体几乎所有类型细胞分泌,如间充质干细胞、NK 细胞和 T 细胞以及中性粒细胞,它们具有母细胞的许多显著特征,同时具有自己的独特特征,含有 DNA、RNA、蛋白质、脂质、核酸和代谢产物等生物活性大分子,并且能够将这些物质转移到其他受体细胞,调节受体细胞的功能^[4-6]。外泌体存在于正常或病理状态的各种体液中,因此,可以在不同的体液中检测外泌

体并可用作潜在诊断生物标志物,此外,其向受体细胞传递的物质有效地改变了受体细胞的生物反应,可以促进或抑制疾病的进展^[6-7]。近年来,研究者逐渐阐明免疫细胞衍生的外泌体在健康生理过程和病理条件中的作用。例如,在遇到感染时,受感染的宿主细胞会释放外泌体,其中包含源自病原体的物质,这些物质可以诱导针对病原体的免疫反应^[8]。此外,NK 细胞衍生的外泌体还含有典型的分子,如 CD56、激活受体自然杀伤组 2D (nature kill G2D,NKG2D)和诱导凋亡的 FAS 配体 (Fas ligand,

【基金项目】 云南省地方本科高校基础研究重点项目 (202101BA0710001-038)。

【作者简介】 马枫茜 (1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:感染与免疫。E-mail:mafengqianq@163.com

【通信作者】 吴利先 (1972—),女,博士,教授,研究方向:感染与免疫。E-mail:w_lixian@163.com

FASL), 以及穿孔素和颗粒酶等, 在体外诱导肿瘤细胞系凋亡^[9]。另一方面, 外泌体也可以作为 miRNA、mRNA 或药物的载体或运载工具, 从而促进细胞间通讯和免疫调节^[3,10]。鉴于外泌体的生物学特性, 以及其在病毒、细菌、真菌的发病机制、传播和缓解中发挥着至关重要的作用, 本综述旨在为一些重要的外泌体如何影响感染性疾病进展提供更广泛的视角。

1 外泌体的抗病毒作用

外泌体有独特的生物医学应用潜力, 在抗病毒感染中, 由于抗病毒药物必须穿过细胞屏障, 如胎盘屏障或血脑屏障, 才能到达靶细胞, 从而发挥更好的治疗效果, 而外泌体作为跨膜转运治疗剂的纳米载体, 有望成为正在研究的针对抗病毒感染的潜在治疗方法, 为临床治疗提供可靠的治疗途径^[11]。

1.1 外泌体在抗病毒中的作用

早在 2013 年, Li 等^[12]就提出 T 细胞释放的外泌体对人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染有抑制作用。与来源于 CD4⁺ T 细胞的 CD4 分子缺失的外泌体相比, 含有 CD4⁺ 的外泌体可以抑制 HIV-1 感染, 这可能是由于含有 CD4 分子的外泌体掩盖了 HIV-1 包膜蛋白, 从而抑制了 HIV 感染。同样, CD8⁺ T 细胞分泌的外泌体也可以抑制感染细胞内的 HIV 的转录。另一项研究发现感染了 HSV-1 的细胞会分泌更多的外泌体, 并且其中含有多余细胞内两倍多的 CD63 四肽, 而 CD63 对 HSV-1 感染存在影响, CD63 阳性的外泌体可以控制病毒在宿主中的传播, 虽然病毒可以利用外泌体生物发生的机制进行自身组装, 但它也可以刺激 CD63 阳性外泌体的释放以限制感染^[13]。迄今为止, 外泌体抑制病毒感染的实例越来越多, 并且得到了证实。据报道, Conzelmann 等^[14]研究表明唾液分泌的纯化的外泌体能够抑制寨卡病毒的感染。寨卡病毒可以通过体液, 埃及伊蚊和白伊蚊传播, 但研究者发现它不能通过深吻传播。唾液分泌的外泌体表达典型的外泌体标志物, 如 CD9、CD63 和 CD81, 并在唾液中高度富集, 能防止寨卡病毒的附着并且竞争性地阻断寨卡病毒与靶细胞的连接, 从而抑制病毒感染。但同时也发现唾液分泌的外泌体对 SARS-CoV-2 的传播没有影响。

除了以上提到的, 最近很多研究表明, 外泌体作为一种输送系统, 用于递送小分子物质, 如

mRNA、RNA、肽、蛋白质和许多其他生物分子, 用于治疗各种病毒性疾病^[15-18]。之后, Gu 等^[19]研究发现源自脐带间充质干细胞 (hucMSC) 的外泌体通过激活 AMPK/mTOR 介导的自噬通路减轻柯萨奇病毒 3 (coxsackievirus 3, CVB3) 诱导的心肌炎, 从而减轻心肌细胞凋亡, 这将有利于脐带间充质干细胞的外泌体治疗心肌炎。在该研究中, 体内结果显示, hucMSC-外泌体显著减轻了心肌损伤, 减少了促炎细胞因子的产生并改善了心脏功能。此外, 体外数据显示, hucMSC-外泌体通过增加 pAMPK/AMPK 比值和上调自噬蛋白 LC3II/I、BECLIN-1 和抗凋亡蛋白 BCL-2 来抑制 CVB3 感染的 HCM 的凋亡。以及降低 pmTOR/mTOR 比值, 促进自噬蛋白 P62 的降解和下调凋亡蛋白 BAX。外泌体在抗病毒感染和抗肿瘤中都发挥着无法忽视的作用, 但它也并不是单独发挥相应的作用, 在一些病毒相关肿瘤中也抑制该病毒引起的肿瘤的发生发展。例如, 去年的一项研究表明, $\gamma\delta$ T2 细胞可以直接杀伤爱泼斯坦-巴尔病毒 (EB 病毒) 相关的肿瘤细胞。并且, Wang 等^[20]还发现同种异体的 $\gamma\delta$ T2 细胞外泌体比自体外泌体具有更强的活性, 不仅能直接杀伤 EB 病毒相关的肿瘤细胞, 而且可以通过增强 T 细胞介导的抗肿瘤活性, 间接抑制肿瘤的发生和发展。此外, 该研究还发现 $\gamma\delta$ T2 细胞源性外泌体在治疗 EB 病毒相关肿瘤方面优于 DC 源性外泌体和 NK 源性外泌体, 因为 $\gamma\delta$ T2 细胞既有细胞毒性又有刺激 T 细胞的抗肿瘤能力。

1.2 外泌体的间接抗病毒作用

外泌体除了直接抗病毒作用外, Jungbauer^[21]在 2018 年报道的一项基于外泌体的疫苗研究表明, 一种外泌体衍生的候选疫苗 (由表达人乳头瘤病毒 E7 蛋白的 DNA 载体与携带 Nef 蛋白的外泌体 C 末端融合而成) 能够刺激细胞毒性 T 淋巴细胞对人乳头瘤病毒 E7 蛋白的反应。外泌体还参与病毒的发病机制与免疫反应, 想要更好的利用外泌体进行相应的疾病治疗, 还需更加了解它参与的发病机制, 才能更好的为临床治疗服务。

2 外泌体的抗菌作用

许多有关外泌体的研究都集中在抗肿瘤和抗病毒上。然而, 新的研究表明外泌体或感染病原体的细胞来源的外泌体也可以促进抗原提呈和巨噬细胞活化, 诱导抗菌反应, 从而控制细菌复制。

2.1 外泌体在抗分枝杆菌中的作用

Bhatnagar 等^[22]研究表明,感染细胞内病原体如结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、BCG 的巨噬细胞释放出的外泌体中包含有病原体相关分子模式(PAMPs)。这些外泌体在接触未感染的巨噬细胞时,会通过 Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)和髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MYD88)依赖性方式刺激受体幼稚巨噬细胞的促炎反应,发挥抗细胞内病原体感染的作用。同样,感染鸟分枝杆菌巨噬细胞的外泌体能够增强巨噬细胞 CD80 和 CD86 的表达以及 TNF- α 和 IFN- β 的分泌,从而引起免疫激活^[23]。在此基础上, Wang 等^[24]也发现未感染的巨噬细胞在用感染鸟分枝杆菌的巨噬细胞分泌的外泌体刺激后增加了 CD40、CD80、CD81、CD86、HLA-DR, 尤其是 CD195 的表达,同时也增强了 IL-6、IL-8、IL-10、IFN-I 和 TNF-I 的分泌。以上这些研究表明,来自分枝杆菌感染巨噬细胞的外泌体可以充当 PAMPs,诱导幼稚巨噬细胞活化,刺激抗分枝杆菌免疫反应。如上所述,结核分枝杆菌感染巨噬细胞衍生的外泌体刺激幼稚巨噬细胞并诱导促炎细胞因子的分泌,激活机体免疫系统,继而引起结核分枝杆菌的自噬清除^[25]。

2.2 外泌体在抗其他细菌中的作用。

除了分枝杆菌外,在嗜肺军团菌感染的情况下,外泌体不仅激活周围的肺泡上皮细胞发挥细胞

间通讯作用,还通过 Toll 样受体 2 (TLR2) 激活静息状态的巨噬细胞,导致增强的 CXCL8 释放,有利于创造促炎环境以产生免疫反应,最终通过募集中性粒细胞来清除病原体感染^[26]。此外,有研究发现,受感染的巨噬细胞在感染 2 h 后会产生 CD63 阳性和 CD9 阳性的外泌体,并且通过 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 依赖性触发来自幼稚巨噬细胞和树突状细胞的肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α), 同时也刺激 RANTES、IL-1ra、MIP-2、CXCL1、MCP-1、sICAM-1、GM-CSF 和 G-CSF 等细胞因子的分泌。Hui 等^[27]表明,促炎外泌体是在鼠伤寒沙门氏菌感染巨噬细胞的早期形成的,它们可用于将物质转移到幼稚巨噬细胞,导致其激活参与免疫反应。近年来,越来越多的研究正向细胞源性外泌体的治疗性作用开展。Jia 等^[28]研究发现在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)肺部感染的小鼠模型中,NK 细胞源性外泌体通过促进 M1 巨噬细胞极化来改善 PA 诱导的肺损伤。他们推测,在肺 PA 感染的早期,M1 极化促进巨噬细胞对铜绿假单胞菌的吞噬作用。同样,骨髓间充质干细胞来源的外泌体也可治疗男性衣原体感染性^[29]。

外泌体除了直接发挥的抗菌作用之外,也可作为药物载体用于递送抗生素等靶向治疗细菌感染。例如,在如今滥用抗生素的大背景下,细胞内耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant

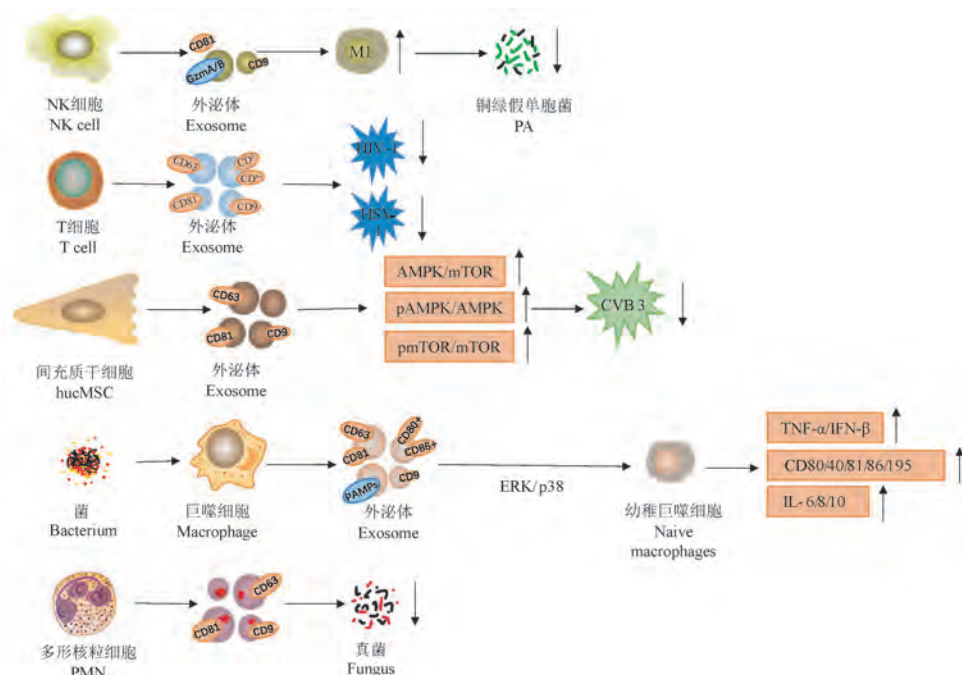


图 1 不同细胞来源外泌体作用

Figure 1 Role of exosomes of different cell sources

Staphylococcus aureus, MRSA) 极难被普通抗生素清除,导致感染复发和耐药情况的发生。Yang 等^[30]研究提出,利用甘露糖化的外泌体将溶葡萄球菌素和万古霉素递送至细菌感染部位以根除细胞内 MRSA。其中,甘露糖化的外泌体作为药物载体可以优先被巨噬细胞吸收,以至药物在细菌感染部位积累,另一方面,溶葡萄球菌素针对葡萄球菌属,没有毒性,联合杀菌策略将减少万古霉素的剂量,从而降低毒性和耐药性,增强细胞内细菌的根除能力。在外泌体上装载抗菌化合物靶向递送的方法为对抵抗 MRSA 等侵袭性强且耐药性广的胞内细菌感染开辟了一条新的治疗途径,但在联合用药策略的使用以及药物吸收情况等方面还有待研究。

无论是外泌体本身发挥的抗菌作用,还是运载物质靶向抗菌,其机制都还未得到更加深入的阐述,在未来的研究中,更多的科学研究应该注重于杀菌机制的提出,为临床提供可靠的治疗思路。

3 外泌体的抗真菌作用

外泌体等细胞外囊泡已逐渐成为杀死真菌的一种武器。Andriantsitohaina 等^[31]和 Reales-Calderón 等^[32]研究表明,无论是来自念珠菌感染的还是来自未感染的 THP1 巨噬细胞衍生的外泌体,都对其他 THP1 分化的巨噬细胞具有类似的效应功能,即激活 ERK 和 p38 激酶途径,并增加促炎细胞因子的分泌和念珠菌酸活性;而在 THP1 非分化的单核细胞中,只有来自感染巨噬细胞的外泌体显著增加了 TNF- α 的分泌,这对小鼠和人类巨噬细胞白色念珠菌感染控制起重要作用。此外,一项研究发现新生隐球菌感染的巨噬细胞也能产生外泌体,增强感染隐球菌的小鼠的炎症反应,有着较高的杀菌生物学效应^[33]。除了巨噬细胞外,多形核粒细胞 (polymorphonuclears, PMN) 产生的细胞外囊泡对于控制真菌感染也是至关重要的。人类致病性真菌烟曲霉触发 PMN 释放一组独特的抗真菌外泌体,通过蛋白质组分析表明这些外泌体富含抗菌蛋白,能够与真菌结合,限制生长,并通过输送抗真菌药物引起细胞损伤,从而起到杀菌作用^[34]。

真菌产生的外泌体也能刺激免疫反应,发挥杀菌作用。Brauer 等^[35]研究发现曲霉菌能够产生外泌体,这些外泌体具有免疫原性,能够刺激巨噬细胞的杀菌功能并且引起 M1 极化,并对黄曲霉感染具有保护作用。他们认为这可能是治疗由曲霉菌引起的曲霉病的治疗靶点。外泌体能够抵抗真菌

感染这一发现为临床提供了一个有效的,以前被忽视的抗真菌防御的方法,但其应用广泛性仍需进一步研究。

4 结语与展望

外泌体由各种类型细胞分泌,包括间充质干细胞、NK 细胞和 T 细胞、中性粒细胞以及已感染巨噬细胞;可以转运蛋白质、脂质、miRNA、mRNA 或药物,在细胞间信号转导中发挥着重要作用。外泌体与各种疾病间的联系越来越紧密,是目前研究的热点之一。而有关外泌体的抗感染作用研究仍处在发展阶段,如上所述,在感染性疾病中,外泌体可以引起促炎反应,能够激活机体免疫系统,增强免疫细胞的杀伤能力,有着较高的杀菌生物学效应,且能够抑制病毒的复制和感染,但是具体作用机制仍然需要进一步阐述。目前已知细胞来源的外泌体能通过表达 CD4⁺、CD8⁺ 等表面分子,激活相应的信号通路如 AMPK/mTOR、pAMPK/AMPK 和 ERK 和 p38 激酶途径,以及 TNF- α 和 IFN- β 、IL-6、IL-8、IL-10、IFN-I 和 TNF-I 等细胞因子抑制细菌、病毒、真菌的感染,发挥杀伤作用(见图 1),除了现有研究表明的机制之外,在其他易感染病毒或细菌如结核分枝杆菌感染等方面的作用机制仍需进一步研究外泌体作为外分泌体,其最明显的作用是靶向运输物质,继而发挥抗感染作用,这也是未来研究外泌体在抗感染方面的重要着手点。但外泌体的富集、分离和储存方法及如何提高外泌体的获得量也是目前面临的挑战之一。此外,外泌体抗感染作用的相关机制、治疗潜力以及递送效率等方面都值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Yamashita T, Takahashi Y, Takakura Y. Possibility of exosome-based therapeutics and challenges in production of exosomes eligible for therapeutic application [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(6): 835-842.
- [2] Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis [J]. Cells, 2019, 8(7): 727.
- [3] Johnstone RM. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins [J]. Biochem Cell Biol, 1992, 70(3-4): 179-190.
- [4] Veerman RE, Güçlüler Akpınar G, Eldh M, et al. Immune cell-derived extracellular vesicles-functions and therapeutic applications [J]. Trends Mol Med, 2019, 25(5): 382-394.
- [5] Li F, Wang Y, Lin L, et al. Mast cell-derived exosomes promote Th2 cell differentiation via OX40L-OX40 ligation [J]. J Immunol Res, 2016, 2016: 3623898.

- [6] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367 (6478) : eaau6977.
- [7] H Rashed M, Bayraktar E, K Helal G, et al. Exosomes: from garbage bins to promising therapeutic targets [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3) : 538.
- [8] Spencer N, Yeruva L. Role of bacterial infections in extracellular vesicles release and impact on immune response [J]. Biomed J, 2021, 44(2) : 157–164.
- [9] Wu CH, Li J, Li L, et al. Extracellular vesicles derived from natural killer cells use multiple cytotoxic proteins and killing mechanisms to target cancer cells [J]. J Extracell Vesicles, 2019, 8(1) : 1588538.
- [10] Barile L, Vassalli G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases [J]. Pharmacol Ther, 2017, 174 : 63–78.
- [11] Griffiths SK, Campbell JP. Placental structure, function and drug transfer [J]. Contin Educ Anaesth Crit Care Pain, 2015, 15(2) : 84–89.
- [12] Li J, Liu K, Liu Y, et al. Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN- α -induced antiviral activity [J]. Nat Immunol, 2013, 14(8) : 793–803.
- [13] Dogramatzis C, Deschamps T, Kalamvoki M. Biogenesis of extracellular vesicles during *Herpes simplex* virus 1 infection: role of the CD63 tetraspanin [J]. J Virol, 2019, 93 (2) : e01850–e01818.
- [14] Conzelmann C, Groß R, Zou M, et al. Salivary extracellular vesicles inhibit Zika virus but not SARS-CoV-2 infection [J]. J Extracell Vesicles, 2020, 9(1) : 1808281.
- [15] Garofalo M, Villa A, Rizzi N, et al. Extracellular vesicles enhance the targeted delivery of immunogenic oncolytic adenovirus and paclitaxel in immunocompetent mice [J]. J Control Release, 2019, 294 : 165–175.
- [16] Pinky, Gupta S, Krishnakumar V, et al. Mesenchymal stem cell derived exosomes: a nano platform for therapeutics and drug delivery in combating COVID-19 [J]. Stem Cell Rev Rep, 2021, 17(1) : 33–43.
- [17] Kumar S, Zhi K, Mukherji A, et al. Repurposing antiviral protease inhibitors using extracellular vesicles for potential therapy of COVID-19 [J]. Viruses, 2020, 12(5) : 486.
- [18] Antimisiaris SG, Mourtas S, Marazioti A. Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery [J]. Pharmaceutics, 2018, 10(4) : 218.
- [19] Gu X, Li Y, Chen K, et al. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate viral myocarditis through activating AMPK/mTOR-mediated autophagy flux pathway [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(13) : 7515–7530.
- [20] Wang X, Xiang Z, Liu Y, et al. Exosomes derived from V82-T cells control Epstein-Barr virus-associated tumors and induce T cell antitumor immunity [J]. Sci Transl Med, 2020, 12(563) : eaaz3426.
- [21] Jungbauer A. Exosomes enter vaccine development: strategies meeting global challenges of emerging infections [J]. Biotechnol J, 2018, 13(4) : e1700749.
- [22] Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, et al. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo* [J]. Blood, 2007, 110(9) : 3234–3244.
- [23] Wang JJ, Chen C, Xie PF, et al. Proteomic analysis and immune properties of exosomes released by macrophages infected with *Mycobacterium avium* [J]. Microbes Infect, 2014, 16 (4) : 283–291.
- [24] Wang J, Yao Y, Xiong J, et al. Evaluation of the inflammatory response in macrophages stimulated with exosomes secreted by *Mycobacterium avium*-infected macrophages [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015 : 658421.
- [25] Sun YF, Pi J, Xu JF. Emerging role of exosomes in tuberculosis: from immunity regulations to vaccine and immunotherapy [J]. Front Immunol, 2021, 12 : 628973.
- [26] Jung AL, Herkt CE, Schulz C, et al. *Legionella pneumophila* infection activates bystander cells differentially by bacterial and host cell vesicles [J]. Sci Rep, 2017, 7(1) : 6301.
- [27] Hui WW, Hercik K, Belsare S, et al. *Salmonella enterica* serovar typhimurium alters the extracellular proteome of macrophages and leads to the production of proinflammatory exosomes [J]. Infect Immun, 2018, 86(2) : e00386–e00317.
- [28] Jia R, Cui K, Li Z, et al. NK cell-derived exosomes improved lung injury in mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection [J]. J Physiol Sci, 2020, 70(1) : 50.
- [29] Izadi M, Dehghan Marvast L, Rezvani ME, et al. Mesenchymal stem-cell derived exosome therapy as a potential future approach for treatment of male infertility caused by *Chlamydia* infection [J]. Front Microbiol, 2021, 12 : 785622.
- [30] Yang X, Xie B, Peng H, et al. Eradicating intracellular MRSA via targeted delivery of lysostaphin and vancomycin with mannose-modified exosomes [J]. J Control Release, 2021, 329 : 454–467.
- [31] Andriantsitohaina R, Papon N. Extracellular vesicles: new bullets to fight fungal infections [J]. Trends Cell Biol, 2020, 30 (8) : 289–590.
- [32] Reales-Calderón JA, Vaz C, Monteoliva L, et al. *Candida albicans* modifies the protein composition and size distribution of THP-1 macrophage-derived extracellular vesicles [J]. J Proteome Res, 2017, 16(1) : 87–105.
- [33] Zhang L, Zhang K, Li H, et al. *Cryptococcus neoformans*-Infected macrophages release proinflammatory extracellular vesicles: insight into their components by multi-omics [J]. mBio, 2021, 12(2) : e00279–e00221.
- [34] Shopova IA, Belyaev I, Dasari P, et al. Human neutrophils produce antifungal extracellular vesicles against *Aspergillus fumigatus* [J]. mBio, 2020, 11(2) : e00596–e00520.
- [35] Brauer VS, Pessoni AM, Bitencourt TA, et al. Extracellular vesicles from *Aspergillus flavus* induce M1 polarization *in vitro* [J]. mSphere, 2020, 5(3) : e00190–e00120.

〔 收稿日期 〕 2022-03-25

刘雨然,连科迅,谷新利. 几种炎症模型的小鼠造模方法研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 120–126.

Liu YR, Lian KX, Gu XL. Research progress in mouse models of inflammatory diseases [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 120–126.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.017

几种炎症模型的小鼠造模方法研究进展

刘雨然,连科迅*,谷新利*

(石河子大学动物科技学院,新疆 石河子 832003)

【摘要】 动物炎症性疾病在疾病中比例最大,无论是传染性疾病还是免疫性疾病在临床上都会有炎症的发生。为了更加深入的了解疾病发生发展的机制以及寻找更好的预防治疗途径,采用体内试验非常必要。小鼠模型因其经济便宜,饲养周期短,操作简单以及与人类基因、生理结构等方面的相似性而广泛运用。本文以此为背景,主要围绕肺炎模型、结肠炎模型以及乳房炎模型的小鼠造模方法研究进展展开综述,以期后续研究提供便捷。

【关键词】 小鼠模型;肺炎模型;结肠炎模型;乳房炎模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0120-07

Research progress in mouse models of inflammatory diseases

LIU Yuran, LIAN Kexun*, GU Xinli*

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

【Abstract】 Inflammatory diseases account for a high proportion of all diseases in animals, including infectious and immune diseases. *In vivo* experiments are required to gain a deeper understanding of the mechanisms of disease occurrence and development and to find better preventive and therapeutic approaches. Mouse models are widely used for this purpose because of their relatively low cost, short feeding cycle, easy handling, and genetic and physiological similarities with human. In this context, we review research progress into the creation of mouse models of inflammation, pneumonia, colitis, and mastitis, as a reference for subsequent research.

【Keywords】 mouse model; pneumonia model; colitis model; mastitis model

炎症是多种生理反应及病理状态的基础,实质上是活的机体对于外界环境中不利因素的一种防御反应,是机体与外界刺激的损伤与抗损伤的病理过程,其目的是使机体内环境处于一种相对平衡的生理状态。

炎症在有利干预下一般是可控的,且对机体而言是有利的反应,但由于在生产生活中对炎症发现不及时或是治疗方法有误会导致炎症病情恶化,通

常会由急性炎症转变为慢性炎症。在慢性炎症持续过程中,一些细胞因子持续分泌(例如 TNF- α 、IL-11、IL-12 等)会加重对机体的损伤,严重时对机体产生恶劣且不易逆转的影响,对畜牧业而言则会导致严重的经济损失^[1]。因此,为了能更全面的了解不同炎症的特点,更快速有效的研发治疗药物从而减少经济损失,开展动物实验是行之有效的解决方案。

【基金项目】 兵团重大科技项目(2014AA001)。

【作者简介】 刘雨然(1998—),男,硕士,研究方向:中兽药的研发与应用。E-mail:454809951@qq.com

【通信作者】 连科迅(1986—),男,博士,研究方向:新型生物制剂的研发与应用。E-mail:lianhexun@shzu.edu.cn

谷新利(1963—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中草药防治动物疾病和中草药饲料添加剂的研究与应用等。

E-mail:xlgu@shzu.edu.cn * 共同通信作者

小鼠与人有 95% 的基因具有同源性,与其他经济动物基因也有高度的同源性且其生理结构也大致相同(例如小鼠乳腺与奶牛乳腺生理结构几乎相同),并且由于小鼠具有价格低廉,繁殖性能强等优势,因而无特定要求下通常以小鼠作为实验动物。在此,本文将主要介绍肺炎模型、结肠炎模型以及乳房炎模型的小鼠造模方法以及相关研究进展。

1 肺炎模型

肺是陆生动物进行气体交换的主要器官及场所。由于肺是机体与外界直接接触器官,从而为病原体入侵与定植提供了条件,虽然肺部的非特异性免疫系统可以消灭绝大多数的病原体,但也有一部分会逃脱免疫系统从而诱发肺炎等一系列疾病。肺炎是严重的、有时危及生命的主要疾病之一,其发生严重影响了人类健康以及畜牧业的发展。肺炎的生理病理学已被广泛研究,为这种疾病的新治疗方法的开发提供了信息。除了体外研究,动物模型已广泛应用于肺炎领域。

1.1 肺炎模型动物选择

在肺炎模型中,因哺乳动物在肺部的解剖结构以及生理功能大致相同,所以通常作为受试对象。在评估整体的生理心血管监测和血流动力学时,由于要进行肺的力学性测量,肺炎模型首选大型哺乳动物,如兔子、狗、猪、狒狒等^[2],虽然已经在狒狒身上得到了成功的验证,但仔猪是目前使用最频繁的模型。相比之下,多菌感染主要在啮齿动物中进行评估,特别是小鼠和大鼠。啮齿动物体型小,繁殖率快,有利于实验室研究的许多实用性。近亲交配的小鼠品系(如 BALB/c 小鼠、C57BL/6J 小鼠等)通常用于排除基因的干扰,这些动物有助于使用遗传方法来了解疾病的分子机制。目前基因工程在小鼠胚胎干细胞的应用已有成功案例,并且已经产生了各种各样的携带功能丧失、功能获得的转基因小鼠^[3]。本节就小鼠的肺炎模型构建方法进行综述。

1.2 肺炎模型造模方法

目前,已成功构建出一些可以很好模拟肺炎的动物模型,其中包括直接接触法、气雾接种法、气管注射法及经口插管法以及鼻腔滴入法,每种模型都有其优点以及缺点(见表 1),因此需要根据实验具体实际情况进行妥善选择。在此对小鼠肺炎模型的各种造模方法进行综述。

1.2.1 直接接触法

一些呼吸道病原体可以通过液滴核或身体接

触传播,方法是将未感染的动物与已感染动物放在相对密闭的环境中。这种方法具有模仿传染性感染的自然传播的吸引力,并且病原体可通过小鼠可以提高毒力^[4]。小鼠微弱的咳嗽反射可能限制了呼吸道病原体的群居传播,这可能对自然的小鼠病原体最有用。这种实验设计的缺点包括无法控制接种量、感染时间或感染动物的数量。

1.2.2 气雾剂接种法

许多下呼吸道感染是通过吸入传染性气雾剂而获得的,包括结核病、军团菌病、支原体和衣原体感染、真菌肺炎和呼吸道病毒感染。可通过将小鼠暴露于全身或仅鼻腔中的雾化微生物来模仿空气传播模式。在全身暴露系统中,将实验动物置于有窗或网状隔间的封闭房间内,由一个或多个喷雾器产生的可呼吸气雾剂被负压吸引进入到鼠笼中。调节总风量以满足动物的通风需求,并可通过控制湿度以优化微生物的生存能力。暴露的时间通常为 30~60 min。此外还可以将小鼠置于只暴露鼻子的特定装置或底部开口的 50 mL 离心管中,以便只有它们的鼻子暴露在气雾室中,暴露时间通常较短(5~15 min)^[5]。通过此方法接种的微生物可在小鼠肺中均匀分布。

1.2.3 气管注射法及经口插管法

这两种方法都需要全身麻醉。气管注射法是通过手术暴露已麻醉小鼠的气管,然后用针头为 25~30 G 规格的注射器,将微生物悬浮液按 5~50 μL 的体积注入气管内,然后对伤口进行缝合^[6]。经口插管法是通过口-气管途径获得感染,第一步是将小鼠上门牙悬吊,使其处于垂直悬挂状态,然后用一个牵引器将舌头向前移位,在动物处于麻醉且稳定状态时,用 1 mm 金属钝针管与大小相似的塑料软管链接插入到小鼠气管内,将微生物悬浮液按 5~50 μL 的体积注入气管内。接种后的小鼠保持垂直姿势(细菌在重力作用下向肺泡的远端迁移),直到麻醉消失。这项技术已被证明可将 99% 以上的接种物输送到肺部,但由于操作人员的手法及技术不同,有可能导致接种的微生物在小鼠左右两肺的分布沉积不均匀^[7]。

1.2.4 鼻腔滴入法

鼻腔滴入法是目前来说较为普及的一种小鼠肺炎模型构造方法,此方式可以很好的模拟上呼吸道以及下呼吸道的感染。在此方法中,使麻醉的小鼠保持垂直位置,将微生物悬浮液沉积在鼻孔中,

表 1 肺炎模型构建方法及其优缺点

Table 1 Pneumonia model construction method and its advantages and disadvantages

方法 Method	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
直接接触法 Direct contact	(1) 可以很好的还原传染性感染的自然传播 (1) Can well restore the natural spread of infectious infections (2) 病原体通过种鼠可以提高毒力, 从而减少二次感染的感染剂量 (2) Virulence of pathogens can be increased by breeding mice, thereby reducing the infectious dose of secondary infection	(1) 无法控制接种量 (1) Amount of inoculation cannot be controlled (2) 感染时间及感染动物的数量无法统一 (2) Time of infection and the number of infected animals cannot be unified
气雾剂接种法 Aerosol vaccination	(1) 模拟空气传播感染的自然传播 (1) Simulate the natural spread of airborne infections (2) 可以使动物群体的同时感染 (2) Simultaneous infection of animal populations (3) 病原体在两侧肺分布均匀 (3) Pathogen is evenly distributed in both lungs (4) 不需要麻醉 (4) No need for anesthesia	(1) 气雾剂造模系统比较昂贵 (1) Aerosol modeling systems are more expensive (2) 病原体会在小鼠皮毛、眼睛等处沉积 (2) Pathogens deposit on mouse fur, eyes, etc. (3) 病原体在气雾中存活率较低 (3) Pathogens survive less in aerosols (4) 对病原体可接种量有限制 (4) There is a limit to the amount of pathogens that can be inoculated
气管注射法 Tracheal injection	(1) 模仿口咽吸入感染 (1) Mimics oropharyngeal inhalation infection (2) 可以给予下呼吸道进行精确给药 (2) Allows precise dosing to the lower respiratory tract (3) 试验程序比较简单 (3) Test procedure is relatively simple	(1) 需要进行麻醉和气管暴露手术 (1) Requires anesthesia and tracheal exposure surgery (2) 病原体在两侧肺分布不均匀 (2) Pathogens are unevenly distributed in both lungs (3) 试验开始时间不一致, 不能同步进行 (3) Start time of the test is inconsistent and cannot be carried out synchronously
经口插管法 Oral intubation	(1) 模仿口咽吸入感染 (1) Mimics oropharyngeal inhalation infection (2) 可以给予下呼吸道进行精确给药 (2) Allows precise dosing to the lower respiratory tract (3) 试验程序比较简单 (3) Test procedure is relatively simple (4) 没有手术创伤 (4) No surgical trauma	(1) 需要全身麻醉才能进行 (1) Requires general anesthesia to perform (2) 技术难度较大 (2) Technically difficult (3) 病原体在两侧肺分布不均匀 (3) Pathogens are unevenly distributed in both lungs (4) 试验开始时间不一致, 不能同步进行 (4) Start time of the test is inconsistent and cannot be carried out synchronously (5) 有口腔细菌污染的风险 (5) Risk of oral bacterial contamination
鼻腔滴入法 Nasal instillation	(1) 模仿口咽吸入感染 (1) Mimic oropharyngeal inhalation infection (2) 可以构建小鼠上、下呼吸道感染模型 (2) Can constructed a mouse model of upper and lower respiratory tract infection (3) 试验程序比较简单 (3) Test procedure is relatively simple	(1) 需要全身麻醉才能进行 (1) Requires general anesthesia to perform (2) 肺内病原体沉积密度较大且不易控制 (2) Pathogen deposition in the lungs is dense and difficult to control (3) 病原体在两侧肺分布不均匀 (3) Pathogens are unevenly distributed in both lungs (4) 有鼻腔细菌污染的风险 (4) Risk of nasal bacterial contamination

滴入后静止 1 min 左右, 以确保接种病原体被吸入到呼吸道中。接种量从 5~50 μL 不等, 但较小的接种量往往局限于上呼吸道。

2 炎症性肠炎模型

肠道是机体最大的免疫器官, 能对进入肠道的

病原体进行有效的免疫应答, 是机体抵抗外来入侵物的第一道防线, 而且还是机体进行全身性免疫功能调节的场所。肠道是与外界相通的器官, 每天都有不同的病原体、微生物入侵肠道, 当机体发生应激、创伤或者机体抵抗力下降时, 这些外来分子进入肠道, 破坏肠粘膜屏障, 使肠绒毛变短或者消

失,肠上皮细胞坏,导致炎性细胞大量聚集,释放出大量的促炎因子如 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等,这些炎性因子能使巨噬细胞发生趋化作用,进一步合成环氧化酶,导致动物肠道炎症的发生,进而导致腹痛、腹泻、便血的发生。

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是发生于肠道的慢性炎症性肠病,根据其发生部位以及病理学特点的不同,分为克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 以及溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC),两者均出现腹泻、血便、体重减轻、精神不振、食欲减退、发热等症状。UC 在肠镜下可以发现其病变部位的溃疡主要发生在结肠粘膜,其组织学病变通常表现为粘膜溃疡,固有层炎性浸润和肉芽肿发展;而 CD 在病变处的粘膜观察不到明显的炎症症状,组织学观察科发现病变处有非干酪样肉芽肿性炎症^[8]。因此在临床上 IBD 主要诊断方法采用肠镜以及活检相结合的方式来进行区分。

虽然有很多文献已经记录了 IBD 的发病机制,但仍然存在一些分歧。研究发现,结肠上皮细胞、粘膜屏障和上皮屏障缺陷与溃疡性结肠炎的发病机制密切相关^[9]。由于对 IBD 诱发原因不甚了解,对预防疾病发生的工作造成了很大的困难,所以目前针对 IBD 的方法主要为药物以及手术治疗法^[10]。为了开发出针对 IBD 的新型药物避免手术对身体造成的危害,动物模型成为此方法的关键,由于小鼠与人以及畜牧业经济动物的肠道结构及发病症状几乎相同,所以用小鼠构建 IBD 模型成为大众潮流。目前研究 IBD 的小鼠模型主要有基因工程类 IBD 模型、化学诱导类 IBD 模型、细菌诱导类 IBD 模型以及自发类 IBD 模型^[11]。由于化学诱导的肠道炎症模型炎症的发生是即刻的且操作相对简单,所以常用化学诱导来模拟 IBD 疾病。

2.1 三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导结肠炎造模方法

通过灌肠方法将溶解在乙醇中的 TNBS 注入小鼠直肠内,可以诱导结肠炎。乙醇作用是破坏肠道粘膜屏障,而 TNBS 作为半抗原与小鼠体内蛋白结合,使之宿主免疫系统产生免疫原性。由于 CD4⁺ T 细胞已被证明在慢性 TNBS 结肠炎中起中心作用,该模型有助于研究 T 辅助细胞依赖的粘膜免疫反应^[12]。

先将丙酮和橄榄油以 4 : 1 的体积比充分混合,随后将 4 体积的丙酮/橄榄油与 1 体积的 5% TNBS 溶液充分混合后得到 1% (w/v) 的 TNBS 预敏液。

在背部或肩部预剃毛的小皮肤处均匀涂抹 150 μ L TNBS 预敏液进行预致敏。在第 8 天,用肛门导管将 100 μ L 与无水乙醇 1 : 1 混合的 5% TNBS 溶液注入已麻醉小鼠肛门内 4 cm 左右处,缓慢拔出肛门导管,保持小鼠头部朝下姿势约 60 s^[13]。TNBS 是一种危险化合物,易燃易爆且有致癌作用,因此在实验操作过程中要严格遵守实验室安全规定以及个人防护。

2.2 恶唑酮 (Oxazolone) 诱导结肠炎造模方法

直肠注射溶解于乙醇恶唑酮半抗原试剂可引起小鼠的严重结肠炎,症状为体重减轻、腹泻和杯状细胞明显丢失,在 SJL/J 小鼠中,炎症只影响远端结肠,特别是粘膜层^[14]。未受刺激和 α CD3/ α CD28 刺激的固有层 T 细胞的组织学特征和 Th2 细胞因子 (IL-4、IL-5 和 IL-13) 的产生在某些方面与人类 UC 相似。与其他几种小鼠结肠炎模型相比,中和抗 IL-4 抗体或诱骗 IL-13R α 2-Fc 蛋白治疗可以改善疾病^[15]。因此,该模型常被用来研究 Th2 依赖的免疫反应在肠道炎症中的作用。

将丙酮和橄榄油以 4 : 1 的体积比充分混合,将 60 mg 恶唑酮盐溶于 2 mL 丙酮/橄榄油中,充分混合后得到 3% (w/v) 的恶唑酮预敏液。在背部或肩部预剃毛的小皮肤处均匀涂抹 150 μ L TNBS 预敏液进行预致敏。第 8 天,用肛门导管将 100 μ L 将溶于 50% 乙醇中的 1% (w/v) 恶唑酮盐溶液注入已麻醉小鼠肛门内 4 cm 左右处,缓慢拔出肛门导管,保持小鼠头部朝下姿势约 60 s。恶唑酮是一种危险化合物,易燃易爆且有致癌作用,因此在实验操作过程中同样要严格遵守实验室安全规定以及个人防护。

2.3 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导结肠炎造模方法

在饮用水中给小鼠喂食 DSS 聚合物几天会导致以血性腹泻、溃疡和粒细胞渗入为特征的高度重复性急性结肠炎。研究认为,DSS 对肠道上皮的隐窝细胞有直接毒性从而影响肠道粘膜屏障的完整性^[16]。由于此模型在缺乏 B 细胞和 T 细胞的 C. B17 SCID 以及 RAG1^{-/-}小鼠中同样可以引发严重的 IBD,适应性免疫系统在此模型中起的作用微乎其微^[17]。因此,急性 DSS 结肠炎模型对于研究先天性免疫机制在结肠炎发病中的作用尤为有用。此外,DSS 模型已被证明适用于对结肠上皮修复机制的研究。

2.3.1 急性 UC 造模方法

选取分子量 (MW) 为 36000 ~ 50000 的 DSS 试

剂,与无菌水配制呈 2%~5% 的溶液,按每只小鼠每天 5 mL 的饮水量自由饮用 DSS 溶液,连续 7 d,期间每天都要更换新的 DSS 溶液,第 8 天更换为正常饮用水^[18-19]。在造模过程中,有些小鼠采食量并没有太大变化,但是仍会出现便血消瘦症状,因此不宜通过采食量来估计造模成功与否。由于实验条件不同,所以造模浓度不是固定的,浓度过大小鼠会极度消瘦且一般会在 4 d 后陆续死亡,可能会对实验产生消极影响,通过在合理范围内调整浓度,找到适宜浓度,以此来减少损失保证试验的顺利进行。

2.3.2 慢性 UC 造模方法

药物配制同急性 UC 造模方法,当饮用 DSS 溶液连续 7 d 后(期间每天都要更换新的 DSS 溶液),于第 8 天更换为正常饮用水,连续 14 d。在第 22 天重新将小鼠饮水更换为相同浓度的 DSS 溶液至第 28 天;第 29 天时用正常饮水替代 DSS 溶液同样连续 14 d。在连续造模 50 d 后更换为正常饮水^[19]。造模浓度同样需要根据实际情况合理调整。

3 乳房炎模型

奶牛乳房炎是指在奶牛乳腺中发生炎症的一种传染性疾病,可导致围产期奶牛产奶量降低、产奶质量下降,且慢性乳房炎可导致奶牛产奶量不可逆转的降低。虽然有研究表明噬菌体可以作为治疗奶牛乳房炎的新型治疗方法,但目前主要的治疗方法是抗生素疗法,而细菌耐药性的产生和休药期的必要性并不能有效的缓解全球奶牛乳房炎的发病率,对全球乳业产生的巨大的经济影响^[20]。

为了更好的了解奶牛乳房炎的发病机制以及寻找更好的治疗药物,体内实验模型提供了有效的方法。虽然使用奶牛作为实验动物可以更好地还原疾病,但是由于奶牛价格昂贵,体积较大,操作困难等原因一般不用奶牛进行造模。啮齿动物如小鼠,具有 5 对乳腺,胸部 3 对,腹部 2 对,每对乳腺相对独立,一个乳头开口对应一条乳导管这与奶牛的乳腺结构相似,且在小鼠乳腺中的细菌计数、中性粒细胞和组织学上的变化与奶牛相似^[21]。早在 1970 年 Chandler^[21]通过实验成功建立了细菌性乳腺炎模型,随后该模型被广泛的运用于乳房炎的研究。随着研究的不断深入,构建了更多的乳腺炎模型例如浆细胞性乳腺炎模型、EchAMP 转基因小鼠乳腺炎模型等^[22]。金黄色葡萄球菌和大肠杆菌是

主要的乳房炎病原菌,已被证明分别用于奶牛亚临床性乳房炎和临床性乳房炎的体内研究模型^[23-24]。

3.1 小鼠乳房炎模型病原体选择

奶牛乳房炎主要由细菌引起,但真菌、病毒或孢子也可引起乳房内感染。但小鼠乳房炎模型通常还是用细菌作为病原体来诱导,此外,有研究表明真菌也可以用来诱导小鼠乳房炎,然而在真菌研究中,小鼠乳房炎模型是研究念珠菌病的合适工具^[25]。在临床上,大多数奶牛乳房炎的是由细菌引起的,因此细菌性奶牛乳房炎的研究尤为重要。引起奶牛乳房炎的细菌主要分为 3 类。第一类为传染性细菌,最具代表性的是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),在所有反刍动物的乳房内感染中,这种病原体的比例最大^[26]。由于金葡菌的耐药性以及小菌落变异株(small colony variants, SCV)的产生,使得亚临床性奶牛乳房炎往往发展成为慢性奶牛乳房炎,给治疗带来了极大的困难。研究表明,金黄色葡萄球菌引起的小鼠乳房炎主要是急性型,动物通常在感染后几天内死亡,为了模拟在奶牛身上观察到的慢性感染,可以在小鼠接种细菌之前注射内毒素或脂多糖^[26]。另一种奶牛乳房炎传染性细菌为无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*),与金葡菌相比,无乳链球菌对抗生素非常敏感,在临床上可以很好地控制,因此只有少数研究使用无乳链球菌构建乳房炎模型^[27]。引起奶牛乳房感染的第二种是环境细菌,与传染性细菌不同的是,这些细菌长期在奶牛体内存活和繁殖但并不会引起炎症的发生与机体处于互利共生的状态。在动物免疫力低下或免疫功能异常时会打破这种动态平衡,此时就可能发生环境病原体的感染,这些细菌主要引起奶牛的临床性乳房炎,而不是亚临床感染。大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)是一种广为人知的革兰氏阴性杆菌,可引起结肠性乳腺炎。有研究表明,通过在小鼠乳腺接种大肠杆菌可以用来构建乳房炎模型,其特征非常类似于奶牛临床性乳房炎的特征^[21]。第三类可归结为次要病原体,主要包括牛棒状杆菌(*Corynebacterium bovis*),凝固酶阴性葡萄球菌(coagulase-negative *Staphylococci*, CoNS)等。与前两种致病菌相比,这一类细菌的致病性是微弱的,不会产生严重的感染症状,因此通常不用这类细菌来构建乳房炎模型^[28-29]。

3.2 小鼠乳腺内接种技术

一般都使用乳腺注射技术来实现诱导小鼠乳

腺炎的目的,所有的接种方法都需要在小鼠麻醉后进行。第一种方法是将高浓度菌液滴在小鼠的乳头尖端,病原体沉积在乳头尖端后通过乳头开口,顺着乳导管进入到乳腺,从而诱导乳房炎^[30]。由于病原体进入小鼠乳腺的机会不同,所以此方法的发病率较低。第二种方法是在体式显微镜下找到乳头管开口,随后用针头直径小于 75 μm 的注射器将病原体注射到小鼠乳腺内即可诱发小鼠乳房炎^[31]。需要注意的是,哺乳期小鼠的乳口开口通常很容易观察到,而非哺乳期的小鼠其乳头覆盖有一层死皮,因此在操作前应该去除。此外,还可以先将小鼠乳头尖端剪去,用针头不大于 30 G 的注射器,通过乳导管插入几毫米(不宜过深以防穿过乳腺注射乳腔)将病原体输送到小鼠乳腺内。对于后两种技术,可以使用低至 10 个集落形成单位(CFU)来诱导乳房炎,而发病率很容易达到 100%^[32]。尽管如此,接种数量的减少反而会导致更广泛的免疫反应,因此,需要接种更高数量的细菌,最高可达 10^8 CFU^[33]。当然为了更好的反映乳房炎的病理状况,造模用的小鼠最好选用哺乳期 10~14 d 的雌鼠。

4 结语与展望

炎症一直以来都困扰着我们的生活,对畜牧业的生产也造成了巨大的危害。当然近年来通过科技工作者的不断努力创新在抗炎药物的研究上也已有了突出的成果。Veber 等^[34]将肺炎链球菌 P4241 菌株通过气管注射法构建出小鼠急性肺炎模型,在此模型基础上对各抗生素疗效进行了比较即:阿奇霉素 > 螺旋霉素 = 克拉霉素 > 罗红霉素 = 红霉素,这一研究结果为治疗急性肺炎的治疗提供了有利的理论依据,对治疗急性肺炎是一项里程碑式的结果;Wang 等^[35]在小鼠 DSS 急性溃疡性结肠炎模型中证明,中药方剂葛根芩连汤可以提高产短链脂肪酸肠道微生物的菌落丰度来调节肠道 Treg/Th17 平衡从而缓解急性溃疡性结肠炎的症狀,这项研究为结肠炎的治疗提供了新思路;Geng 等^[36]通过研究噬菌体 vBSM-A1 与 vBSP-A2 对金黄色葡萄球菌诱导的小鼠乳腺炎发现其治疗效果与头孢噻夫钠有相当的治疗效果,该发现开创了新型的治疗方案,且在日后有望取代抗生素疗法从而避免细菌耐药性的产生。

目前,对于各种炎症的机制还没有完全研究透彻且不同小鼠模型都具有不可避免的局限性。因

此,为了更加客观真实的反映炎症的发生发展,新型动物模型的建立刻不容缓,转基因小鼠模型因为其更符合动物临床客观标准必定是未来发展的趋势。此外在构建所需动物模型过程中,前人的造模方法以及用药剂量仅作为参考,在实际实践工作中需以此为基础在不断发现以及探索的过程中找到与自己所处实验环境以及实验内容相契合的方式以及剂量。本文着重介绍了肺炎模型、结肠炎模型、乳房炎模型近几年的造模方法研究进展,以期后续科研工作者的研究带来便利以及参考。

参考文献:

- [1] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 860-867.
- [2] Hraiech S, Papazian L, Rolain JM, et al. Animal models of polymicrobial pneumonia [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 3279-3292.
- [3] Muñoz-Fontela C, Dowling WE, Funnell SGP, et al. Animal models for COVID-19 [J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 509-515.
- [4] Goldblatt DL, Flores JR, Valverde Ha G, et al. Inducible epithelial resistance against acute Sendai virus infection prevents chronic asthma-like lung disease in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(10): 2256-2273.
- [5] Jakab GJ, Green GM. The effect of Sendai virus infection on bactericidal and transport mechanisms of the murine lung [J]. *J Clin Invest*, 1972, 51(8): 1989-1998.
- [6] 张毅,程晨,苏景超,等. 急性肺损伤大鼠模型制备及不同时段肺损伤比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(1): 27-34.
- [7] Gingerich AD, Mousa JJ. Diverse mechanisms of protective anti-pneumococcal antibodies [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 824788.
- [8] 方磊,乔立超,顾一帆,等. 克罗恩病大小鼠动物模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(5): 688-694.
- [9] Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [10] Miao Z, Chen L, Feng H, et al. Baitouweng Decoction ameliorates ulcerative colitis in mice partially attributed to regulating Th17/treg balance and restoring intestinal epithelial barrier [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 531117.
- [11] Bang B, Lichtenberger LM. Methods of inducing inflammatory bowel disease in mice [J]. *Curr Protoc Pharmacol*, 2016, 72: 547-558.
- [12] Wang S, Bai M, Shu Q, et al. Modulating effect of paeonol on piglets with ulcerative colitis [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 846684.
- [13] 赖慧敏,黄敏聪,楼招欢,等. 天台乌药对 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎模型大鼠的抗炎作用研究 [J]. *中国比较医学杂*

- 志, 2021, 31(2): 37-44.
- [14] Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, et al. Oxazolone colitis; a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4 [J]. J Exp Med, 1998, 188(10): 1929-1939.
- [15] Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, et al. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells [J]. Immunity, 2002, 17(5): 629-638.
- [16] Ordás I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2012, 380(9853): 1606-1619.
- [17] Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, et al. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice [J]. Gastroenterology, 1994, 107(6): 1643-1652.
- [18] 马琪, 翁与竞, 李佳, 等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎模型小鼠的疗效评价 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 785-792.
- [19] Wirtz S, Popp V, Kindermann M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation [J]. Nature protocols, 2017, 12(7): 1295-1309.
- [20] Shi Y, Zhao W, Liu G, et al. Bacteriophages isolated from dairy farm mitigated *Klebsiella pneumoniae*-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells cultured *in vitro* [J]. BMC Vet Res, 2021, 17(1): 37.
- [21] Chandler RL. Experimental bacterial mastitis in the mouse [J]. J Med Microbiol, 1970, 3(2): 273-282.
- [22] Neerukonda M, Pavuluri S, Sharma I, et al. Functional evaluation of a monotreme-specific antimicrobial protein, EchAMP, against experimentally induced mastitis in transgenic mice [J]. Transgenic Res, 2019, 28(5-6): 573-587.
- [23] Chen Q, Wang S, Guo J, et al. The protective effects of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0344 on LPS-induced mastitis *in vitro* and *in vivo* [J]. Front Immunol, 2021, 12: 770822.
- [24] Li YP, Yuan SF, Cai GH, et al. Patchouli alcohol dampens lipopolysaccharide induced mastitis in mice [J]. Inflammation, 2014, 37(5): 1757-1762.
- [25] Ingman WV, Glynn DJ, Hutchinson MR. Mouse models of mastitis-how physiological are they? [J]. Int Breastfeed J, 2015, 10: 12.
- [26] De UK, Mukherjee R. Activity of cyclooxygenase-2 and nitric oxide in milk leucocytes following intramammary inoculation of a bio-response modifier during bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis [J]. Vet Res Commun, 2014, 38(3): 201-207.
- [27] Sherwin VE, Egan SA, Green MJ, et al. Survival of *Streptococcus uberis* on bedding substrates [J]. Vet J, 2021, 276: 105731.
- [28] Ayemele AG, Tilahun M, Lingling S, et al. Oxidative stress in dairy cows: insights into the mechanistic mode of actions and mitigating strategies [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(12): 1918.
- [29] Taponen S, Liski E, Heikkilä AM, et al. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli* [J]. J Dairy Sci, 2017, 100(1): 493-503.
- [30] Anderson JC. The mouse mastitis model: observations relevant to the treatment and control of coliform mastitis [J]. Vet Res Commun, 1983, 7(1-4): 223-227.
- [31] Lai JL, Liu YH, Liu C, et al. Indirubin inhibits LPS-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. Inflammation, 2017, 40(1): 1-12.
- [32] Notebaert S, Meyer E. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis. A review [J]. Vet Q, 2006, 28(1): 2-13.
- [33] Kan X, Liu J, Chen Y, et al. Protective effect of myricetin on LPS-induced mastitis in mice through ERK1/2 and p38 protein author [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2021, 394(8): 1727-1735.
- [34] Veber B, Vallée E, Desmonts JM, et al. Correlation between macrolide lung pharmacokinetics and therapeutic efficacy in a mouse model of pneumococcal pneumonia [J]. J Antimicrob Chemother, 1993, 32(3): 473-482.
- [35] Wang Y, Zhang J, Xu L, et al. Modified Gegen Qinlian Decoction regulates treg/Th17 balance to ameliorate DSS-induced acute experimental colitis in mice by altering the gut microbiota [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 756978.
- [36] Geng H, Zou W, Zhang M, et al. Evaluation of phage therapy in the treatment of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice [J]. Folia Microbiol (Praha), 2020, 65(2): 339-351.

[收稿日期]2022-05-31

黎伟文,邓少东,陈建英. 非编码 RNA 在扩张型心肌病中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 127-133.

Li WW, Deng SD, Chen JY. Review of the role of non-coding RNAs in dilated cardiomyopathy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 127-133.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.018

非编码 RNA 在扩张型心肌病中的研究进展

黎伟文^{1,3}, 邓少东^{2,3}, 陈建英^{1*}

(1. 广东医科大学附属第一医院 结构性心脏病专科, 广东 湛江 524001; 2. 广东医科大学附属东莞第一医院 中医科, 广东 东莞 523710; 3. 广东医科大学 第二临床医学院, 广东 东莞 523808)

【摘要】 非编码 RNA(ncRNA)包括微 RNA(miRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)和环状 RNA(circRNA)调控心肌发育、分化、代谢、死亡和重构等病理生理过程,因此可能参与扩张型心肌病(DCM)的发病机制。近年来,关于 ncRNA 在 DCM 中的研究主要集中于表达谱分析、标志物筛选和作用机制等方面,本文就此做一综述。概括而言,虽然大量研究已从循环血和心肌组织中筛选出一批有潜力的差异表达 ncRNA,但目前仅对 miRNA 和 lncRNA 作为 DCM 的诊断和预后标志物及治疗靶点进行了鉴定,迄今对于 circRNA 在 DCM 中的作用却不明确。考虑到 DCM 的病因复杂且具有异质性,今后研究应从更多临床样本中挖掘信息并通过基础研究进一步验证。阐释 ncRNA 尤其是 circRNA 在 DCM 中的潜在作用及机制将可为 DCM 的诊疗提供新方法和理论依据。

【关键词】 非编码 RNA;扩张型心肌病;表达谱;标志物;治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0127-07

Review of the role of non-coding RNAs in dilated cardiomyopathy

LI Weiwen^{1,3}, DENG Shaodong^{2,3}, CHEN Jianying^{1*}

(1. Department of Structural Cardiology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China.

2. Department of Traditional Chinese Medicine, First Dongguan Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Dongguan 523710. 3. the Second Clinical Medical College, Guangdong Medical University, Dongguan 523808)

【Abstract】 Non-coding RNAs (ncRNAs), including microRNAs (miRNAs), long-chain non-coding RNAs, and circular RNAs (circRNAs), regulate myocardial development, differentiation, metabolism, death, remodeling, and other pathophysiological processes, and may thus be involved in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy (DCM). We review recent research into the role of ncRNA in DCM, which has mainly focused on expression profiling, marker screening, and mechanistic exploration. Several differentially expressed ncRNAs have been screened out from circulating blood and myocardial tissue as potential diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets for DCM; however, studies of circRNAs are limited. Considering the complex and heterogeneous etiology of DCM, further studies including more clinical samples are needed to supplement and validate current findings. Elucidating the potential role and mechanism of ncRNAs, especially circRNAs, in DCM will provide new method and a theoretical basis for the diagnosis and treatment of DCM.

【Keywords】 non-coding RNA; dilated cardiomyopathy; expression profile; marker; therapy

【基金项目】 广东医科大学学科建设项目(4SG21229GDGFY01)。

【作者简介】 黎伟文(1986—),男,主治医师,本科,研究方向:结构性心脏病。E-mail:512908311@qq.com

【通信作者】 陈建英(1969—),男,主任医师,硕士,研究方向:结构性心脏病。E-mail:jychen271@126.com

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一种不可逆转的心肌疾病,其特征为左心室增大和收缩功能障碍,从而导致心脏泵血功能降低,最终进展为心力衰竭(heart failure, HF)甚至死亡。DCM 具有异质性,与遗传异常、病毒感染、心肌炎症和其他病因有关^[1-2],但其发病机制尚不明确。因此,探究与 DCM 相关的致病基因及其作用机制对防治具有重要意义。据报道,非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)包括微 RNA(microRNA, miRNA)、长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和环状 RNA(circular RNA, circRNA)参与调控心肌发育、分化、代谢、死亡及重构等病理生理过程^[3]。笔者查阅了近五年的相关研究论文,对 ncRNA 在 DCM 中的作用及调控机制展开综述。

1 DCM 相关 ncRNA 的表达谱分析

微阵列和 RNA 测序(RNA sequencing, RNA-seq)作为转录组学研究的革命性工具,可以通过分析与特定疾病相关的差异表达基因(differentially expressed genes, DEG)来鉴定标志物,而且有助于发现参与疾病的信号通路及调控机制。目前,针对全转录组和特定 ncRNA 组的检测和分析已广泛应用于 DCM 的研究中,但具体作用机制有待进一步明确。

1.1 DCM 相关小 RNA

miRNA 是一种小 RNA 分子,被预测在转录后水平调节近 30% 的基因表达,并与真核生物的发育和代谢广泛相关^[4-5]。miRNA 在各种心血管疾病的发生和发展中也发挥着重要作用,如心律失常、心脏肥厚、心肌纤维化、动脉粥样硬化、心肌梗死等^[6]。最近, Huang 等^[7]用小 RNA 测序分析发现 DCM 患者外周血中 48 个表达失调的 miRNA 可能通过调节神经元分化过程和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路参与 DCM 的发病机制。Enes 等^[8]则使用微阵列检测到 DCM 患儿的血浆 miR-618、miR-875-3p、miR-205、miR-194、miR-302a、miR-147 和 miR-544 表达水平降低,而 miR-518f 和 miR-454 表达水平升高。此外, Toro 等^[9]采用 PCR 验证携带核纤层蛋白 A/C(lamin A/C, LMNA)基因致病性突变的家族性扩张型心肌病(familial dilated cardiomyopathy, FDCM)患者的循环 miRNA 表达谱,发现突变携带者的 let-7a-5p、miR-142-3p、miR-145-5p 和 miR-454-3p 水平显著升高。

相较于微阵列和测序需要采集足量数量的样本并投入较高的成本,应用生物信息学分析方法从数据库中挖掘已知信息已成为一种节省实验成本并快速获取有效信息的手段。Wang 等^[10]对 GEO 数据库中获取的基因表达谱数据进行生物信息学分析,发现与 DCM 相关的 miRNA 包括 miR-9、miR-200 家族和 miR-30 家族。Huang 等^[11]通过分析数据库中 miRNA-mRNA 相互作用网络来识别 DCM 的核心基因和 miRNA,发现 miR-144-3p、miR-363-3p、miR-9-3p、miR-21-3p、miR-144-5p、miR-338-3p 和 miR-770-5p 是重要的调节因子。

以上研究提示,多种 miRNA 可能是 DCM 的潜在标志物和治疗靶点。然而,不同的 DCM 的类型以及检测和分析方法均可能得出不同的结果,因此,需要进一步在更多临床样本和疾病模型中验证这些 miRNA 的作用及机制。

1.2 DCM 相关 lncRNA

lncRNA 是一组长度>200 nt 且不能编码蛋白质的 RNA,通过与 miRNA 建立联系并与蛋白质相互作用来调节与其邻近或遥远的靶基因。研究已证实, lncRNA 通过调节心脏发育、体内稳态和再生对心血管疾病的进展发挥关键作用^[12-13]。2018 年, Haas 等^[14]通过评估全基因组中结构变异(structural variation, SV)与人类心脏中基因表达的联系,首次确认 DCM 导致 HF 相关的 SV 包括 3758 个 lncRNA 和 1756 个蛋白编码转录本,说明基因遗传变异引起的 lncRNA 表达变化控制表型变异。Huang 等^[15]通过病例对照研究发现在 DCM 患者中差异表达的循环 lncRNA 主要与系统发育、器官形态发生和代谢调节有关。除了关于循环 lncRNA 的研究, Li 等^[16]取 DCM 患者的心脏样本进行微阵列分析,并鉴定 RP11-21.2 和 XLOC_014288 等 lncRNA 在人心肌细胞、心脏成纤维细胞和心脏微血管内皮细胞中发挥不同的作用,而且可能影响患者的左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。Cai 等^[17]研究 DCM 患儿外周血中 lncRNA 的差异表达情况及其与左心室功能的关系,发现 NONHSAT252242.1、ENST00000596816、NONHSAT215378.1 和 NONHSAT137060.2 在心脏功能不同的患者中存在显著差异,但研究者未做进一步相关性分析。

最近研究表明, lncRNA 可以与 miRNA 相互作用,并通过(competing endogenous RNA, ceRNA)机

制间接与 mRNA 相互作用^[13]。Tao 等^[18]发现 DCM 患者的心脏样本中 miR-144-3p 和 miR-451a 下调而 miR-21-5p 上调,进一步分析发现,靶向 miR-144/451 的两个 lncRNA (NONHSAT001691 和 NONHSAT006358) 与 DCM 高度相关,此外,靶向 miR-21 的 4 个 lncRNA (NONHSAT026953、NONHSAT006250、NONHSAT133928 和 NONHSAT041662) 也与 DCM 显著相关。Chen 等^[19]通过研究 DCM 相关的心脏 lncRNA 表达谱发现 8 个候选 lncRNA (FGD5-AS1、AC009113.1、WDFY3-AS2、NIFK-AS1、ZNF571-AS1、MIR100HG、AC079089.1 和 EIF3J-AS1) 也可能通过 ceRNA 机制发挥功能。此外,Qiu 等^[20]筛选并验证了 DCM 患者左心室组织差异表达的关键 lncRNA 如 KB1299A7.2、RP11-13E1.5、AC061961.2、LING01AS1、RP11-557H15.4、AC061961.2、LING01AS1、RP11-1313E1.5 等主要与 DCM 的疾病状态和进展有关。

此外,Charles 等^[4]通过从 NCBI SRA 数据库中挖掘信息构建的 ceRNA 网络中鉴定出 3 个主要枢纽节点,包括 lncRNA (XIST)、miRNA (hsa-miR-195-5p) 和 mRNA (neuro oncological ventral antigen 1, NOVA1)。

以上研究揭示 DCM 中 lncRNA 的作用极其广泛,提示其既可作为 DCM 的标志物也是影响 DCM 病理生理的关键因素,但是迄今仅有少数研究者做了后续研究,大多数差异表达 lncRNA 的功能仍然未知,因此值得进一步探究。

1.3 DCM 相关 circRNA

circRNA 与包含 5' 和 3' 端的线性 RNA 不同,其具有共价连接端,形成一个闭合连续环。由于环状结构,circRNA 对 RNA 酶(RNase)的降解具有抵

抗力,因而比其他 RNA 更加稳定。circRNA 在调节转录、转录后、翻译和翻译后水平的基因表达中发挥重要作用。最近,circRNA 的 ceRNA 功能已成为一个研究热点。Lin 等^[21]用来自 DCM 患者和健康对照组的心脏样本通过 RNA-seq 分析揭示,差异表达 circRNA 调控的 mRNA 与细胞大分子代谢、蛋白质修饰、细胞信号转导和蛋白质结合有关。Sun 等^[22]使用 RNA 微阵列结合 PCR 验证检测出 DCM 患儿外周血中 circ_0067735 和 circ_0069972 下调而 circ_0070186 上调,其功能主要与心肌肥厚、重构、纤维化和自身免疫有关。此外,Dong 等^[23]从 NCBI SRA 数据库中获取信息,分析出参与 DCM 异常调控的 circALMS1_6 与 miR-133 的结合潜力最高。

以上研究表明,circRNA 也同样地在 DCM 中发挥复杂作用。然而,目前关于 circRNA 与 DCM 之间的联系缺乏更深入的临床验证及机制研究,亟待今后研究来填补此空白。

2 ncRNA 作为 DCM 标志物的潜力

转录组学数据表明差异表达的 ncRNA 可能参与 DCM 的发病过程,因此三种主要的 ncRNA 理论上均可以作为 DCM 的标志物,虽然 circRNA 具有比 miRNA 和 lncRNA 更稳定的结构,但迄今为止仅有 miRNA 和 lncRNA 被报道,主要体现为对 DCM 诊断和预后的预测价值(见表 1)。检测样品可以来源于患者的外周血或心肌组织,相比而言,心肌组织的特异性更高,但对外周血进行检测更为方便快捷,因此,循环 ncRNA 作为一种非侵入性的生物标志物具有良好的应用前景。

2.1 ncRNA 的诊断价值

miRNA 和 lncRNA 都是外泌体携带的主要成分,由于,外泌体能够保护其免被血液中的 RNase 降

表 1 ncRNA 在 DCM 诊断和预后预测中的作用
Table 1 Roles of ncRNA in the diagnosis and prognosis of DCM

作用 Roles	非编码 RNA ncRNA				参考文献 References
诊断 Diagnosis	miR-3135b	miR-3908	miR-5571-5p	miR-92b-5p	[9, 21, 24-30]
	miR-142-5p	miR-143-3p	miR-27b-3p	miR-126-3p	
	miR-320a	miR-29-5p	miR-154-5p	miR-182-5p	
	miR-182-5p	let-7a-5p	miR-142-3p	miR-145-5p	
	miR-454-3p	miR-454-3p	AC016722.3	AL589986.2	
	AC006007.1	AC092687.3	GS1-124K5.4	AC007126.1	
预后 Prognosis	XIST	IDI2-AS1	/	/	[32-35]
	miR-185	miR-133a	ENST00000507296	ENST00000532365	
	HAND2-AS1	/	/	/	

解,因此二者均可作为潜在的 DCM 标志物用于更准确的早期和鉴别诊断。Wang 等^[24]检测出 DCM 患者血浆中显著升高的 miR-3135b、miR-3908 和 miR-5571-5p 有较好的诊断潜力,而且 miR-5571-5p 水平升高与 DCM 的严重程度有关。Wu 等^[25]发现,DCM 并发急性心力衰竭患者的血清外泌体 miR-92b-5p 表达增加,并可作为 DCM 并发急性心力衰竭的潜在生物标志物。Jiao 等^[26]证实,DCM 患儿的循环 miR-142-5p、miR-143-3p、miR-27b-3p 和 miR-126-3p 可能是诊断儿童 DCM 和评估 HF 的潜在生物标志物,重要的是,miR-126-3p 增加与 LVEF 呈显著负相关。最近,Zaragoza 等^[27]研究表明,与 FDCM 突变致病基因 Bcl2 关联永生基因 3 (Bcl2 associated athanogene 3, BAG3) 相关的循环 miR-154-5p 和 miR-182-5p 组合具有诊断价值,然而进一步研究将需要长期随访,并扩大人群进行验证。此外,Toro 等^[9]证实,let-7a-5p、miR-142-3p、miR-145-5p、miR-454-3p 以及它们的组合可以区分健康人、DCM 表型阴性的 LMNA 基因突变携带者和 LMNA 相关的 DCM 患者。关于 lncRNA 作为 DCM 诊断标志物的研究较少。Zhang 等^[28]构建了基于 ceRNA 网络中 6 个 lncRNA (AC016722.3、AL589986.2、AC006007.1、AC092687.3、GS1-124K5.4 和 AC007126.1) 的多元 Logistic 回归模型,证实这些 lncRNA 在训练集和验证集中均显示出对 DCM 诊断的高灵敏度和特异性。Luo 等^[29]则利用生物信息学方法获得了 107 个有潜力的 lncRNA,并鉴定出中上调的 IDI2-AS1 和下调的 XIST 对 DCM 均具有良好的诊断价值。这些研究提示,无论上调还是下调的 ncRNA 都可作为 DCM 的新型诊断标志物,而且单用和联用均具有较好的诊断价值。

除了 DCM,缺血性心肌病 (ischemic cardiomyopathy, ICM) 也是引起 HF 的一个主要原因,因此需要在分子水平进行鉴别。Lin 等^[21]应用微阵列分析 DCM 和 ICM 患者的循环 lncRNA 表达谱,发现 3,222 个 lncRNA 具有显著差异。但是该研究未扩大样本量验证相关 lncRNA 的鉴别诊断能力。此外,Brundin 等^[30]研究发现,循环 miR-320a 增加 DCM 患者与健康对照之间的鉴别,而循环 miR-29-5p 则增加 DCM 与缺血性心脏病之间的鉴别。由于目前的研究有限,将来有必要筛选更多有效标志物用以鉴别诊断 DCM 和其它类型心肌病。

2.2 ncRNA 的预后价值

B 细胞通过诱导心肌细胞损伤和心肌纤维化,

促进 DCM 的发展,Yu 等^[31]曾报道,miR-185 参与人类 B 细胞的激活。后续研究显示,DCM 患者血浆 miR-185 的平均水平明显高于健康对照组,而且高表达 miR-185 患者的 LVEF、左心室舒张末直径 (left ventricular end diastolic diameter, LVEDD) 和脑钠肽前体 (N-terminal pro-B type natriuretic peptide, NT-proBNP) 有显著改善,心血管死亡率和 HF 再入院率显著下降,可能与抗 $\beta 1$ -肾上腺素能受体 ($\beta 1$ -adrenoceptor, $\beta 1$ -AR) 抗体和分泌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 的 B 细胞水平降低有关^[32]。此外,Rubiš 等^[33]研究与纤维化相关的 miRNA 是否与 DCM 的心血管结局相关,发现 DCM 与循环冠状动脉旁路移植术患者心肌中的 miR-26、miR-29 和 miR-133a 表达水平存在差异,而相应的循环和心肌 miRNA 之间不相关,循环 miRNA 均不是联合终点的预测因子,而心肌 miR-133a 却是独立的预测因子。这些研究提示,miRNA 可能通过调节炎症和纤维化影响 DCM 的预后。

lncRNA 参与心血管疾病的发病机制,因此也可作为 DCM 的预后生物标志物。Zhang 等^[34]评估循环 lncRNA 水平与 DCM 患者的 HF 严重程度之间的相关性,发现 ENST00000507296 和 ENST00000532365 与心脏功能显著相关,并可在至少一种人类心脏源性细胞中检测到二者表达,重要的是,循环 ENST00000507296 低水平与 DCM 患者的高生存率相关,因此可作为 DCM 患者预后的生物标志物。胰岛素样生长因子-1 (isulin-like growth factor 1, IGF-1) 信号在终末期 DCM 中受到抑制,Cheng 等^[35]研究分析 IGF-1 和 HAND2-AS1 水平之间的相关性,发现终末期 DCM 患者的血浆 IGF-1 和 HAND2-AS1 水平明显低于健康对照组,随访研究显示,低水平的 IGF-1 或 HAND2-AS1 与低生存率具有显著相关,提示 HAND2-AS1 可能参与终末期 DCM。但是该研究未阐明 IGF-1 与 HAND2-AS1 之间的关系。总而言之,lncRNA 作为 DCM 的预后标志物在调控机制方面仍存在很大的未知空间。

3 ncRNA 作为 DCM 治疗靶点的潜力

迄今,关于 ncRNA 在 DCM 中的作用和机制研究较少,文献报道其主要与心肌细胞死亡、心肌重构和免疫炎症有关 (见表 2),因此可能作为 DCM 治疗的潜在靶点。

表 2 ncRNA 在 DCM 病理生理中的调控作用
Table 2 Regulatory roles of ncRNA in DCM pathophysiology

作用 Roles	非编码 RNA ncRNA				参考文献 References
心肌细胞凋亡 Myocardial apoptosis	miR-21 miR-133a AC061961.2	miR-29a miR-133b H19	miR-29b miR-16 /	miR-29c miR-675 /	[20, 36-40]
心肌重构 Cardiac remodeling	miR-208a	miR-26	miR-30	miR-133a	[42-43]
免疫炎症 Immune inflammation	miR-451a	miR-146a-5p	/	/	[44-45]

3.1 ncRNA 对心肌细胞凋亡的影响

DCM 与心源性猝死和 HF 有关,但关于 DCM 的发病机制仍不明确。Wang 等^[36]观察到 DCM 患者的心脏组织中存在广泛的纤维化和细胞凋亡,且 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 表达显著增加,此外,miR-21 上调而 miR-29 家族(miR-29a、miR-29b 和 miR-29c) 和 miR-133 家族(miR-133a 和 miR-133b) 下调,表明 Bcl-2 和特异性 miRNA 可能参与 DCM 的发病机制,并可能作为治疗靶点。Calderon-Dominguez 等^[37]检测发现缺血性扩张型心肌病 (IDCM) 患者的血浆 miR-16 表达水平上调,进一步在体外实验中证实 miR-16 过表达增加心肌细胞凋亡,与其上调蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PRKR-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)/C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 通路从而诱导内质网应激有关。

lncRNA 的表达水平改变可能影响 DCM 的病理进程,然而,其作用的详细机制需要进一步研究。Chen 等^[19]曾报道,DCM 患者的 lncRNA AC061961.2 下调。最近, Qiu 等^[38]继续研究 AC061961.2 对 DCM 的影响,发现阿霉素诱导大鼠 DCM 模型的心脏组织中细胞凋亡有所增加而 AC061961.2 表达减少,进一步研究证实, AC061961.2 通过激活 Wnt/ β -链蛋白 (β -catenin) 通路抑制内质网应激介导的 DCM 大鼠心肌细胞凋亡。Gabory 等^[39]则在同样的 DCM 模型中发现, lncRNA H19 在心肌组织中的表达显著上调。Zhang 等^[40]在此基础上进一步探讨 H19 在阿霉素诱导 DCM 中的潜在作用机制,研究结果显示, H19 敲除可降低心肌细胞凋亡, H19/miR-675 轴通过靶向增殖关联蛋白 2G4 (PA2G4) 促进心肌细胞凋亡,该作用机制可为阿霉素诱导 DCM 提供了一种新的治疗策略。

以上研究表明 miRNA 和 lncRNA 均参与调节

DCM 心肌细胞凋亡,而且两种 ncRNA 之间存在一定的联系,因此靶向调节相关信号轴可能比单一靶向具有更好的改善效果。

3.2 ncRNA 对心肌重构的影响

已有研究表明,抑制 miR-208a 可以改善 HF 小鼠的心脏功能和生存率^[41]。Zhou 等^[42]应用 miRNA 微阵列分析发现 DCM 小鼠和 DCM 患者心肌的 miR-208b 表达上调,进一步研究其对心脏重构的影响,发现 miR-208b 过表达会导致心脏肥厚, ETS 类转录因子则是 miR-208b 的潜在靶点,提示 miR-208b 在心脏发育和生长中起重要作用。该研究表明, miR-208b 通过转录后基因表达调控参与 DCM 的心肌重构过程和发病机制,因此 miR-208b 可能是 DCM 的一个新治疗靶点。此外, Rubiś 等^[43]发现外周血中与纤维化相关的 miRNA 包括 miR-21、miR-26、miR-29、miR-30 和 miR-133a 在 DCM 患者与对照组之间存在显著差异,但在新发和慢性以及心肌纤维化和非心肌纤维化的 DCM 患者中表达相似,其中 miR-26 与胞外基质纤维化相关, miR-26 和 miR-30 与胶原体积分数相关, miR-133a 与细胞外基质代谢相关, miR-26 和 miR-133a 与纤维化相关。但是该研究未在细胞或动物实验模型中进一步探讨 miRNA 的作用机制。

3.3 ncRNA 对免疫炎症的影响

CD4⁺ T 细胞在 DCM 患者中异常激活,可能与该疾病的免疫发病机制有关。Zeng 等^[44]研究 miRNA 失调是否与 DCM 中 CD4⁺ T 细胞的激活有关,发现 DCM 患者的 CD4⁺ T 细胞中 miR-451a 水平显著降低,而 miR-451a 下调通过靶向转录因子 Myc 促进 DCM 患者的 CD4⁺ T 细胞激活和增殖,因此,调控 CD4⁺ T 细胞中的 miR-451a 表达可能成为一种治疗 DCM 的新方法。研究表明,心肌球来源细胞 (cardiosphere-derived cells, CDC) 能改善生理性单心

室患者的心功能和预后, Hirai 等^[45] 确定 CDC 在猪 DCM 模型中的安全性和有效性后, 在 I 期临床试验中进一步评估了 CDC 治疗的安全性和对心功能的影响; 进一步的机制研究揭示, CDC 改善心功能并减轻心肌纤维化归功于其外泌体携带的 miR-146a-5p 可抑制促炎细胞因子, 此外, 通过转录组学分析鉴定出 CDC 来源外泌体中显著富集的 miRNA 主要包括 miR-126-5p、miR-132、miR-146a-5p、miR-181b、miR-210 和 miR-451, 提示其可能通过激活内源性心脏修复机制诱导抗纤维化、抗凋亡和促血管生成。

4 总结与展望

不同类型的 ncRNA 在 DCM 中发挥不同的作用, 而且它们之间也存在着相互作用。此外, 样本来源不同以及 DCM 的复杂病因均可能影响转录组学结果, 因此, 大样本多中心临床研究和生物大数据分析都是必要的。虽然 ncRNA 的作用广泛, 但目前关于其影响 DCM 发生、进展和转归的机制仍知之甚少。目前关于 ncRNA 与 DCM 的大多数研究仅停留在转录组学和生物信息学分析阶段, 大样本验证及更深入的机制研究不够, 目前功能较为明确的多是 miRNA, lncRNA 的研究相对较少, 而 circRNA 的作用和机制几乎未知。因此, 今后的研究应结合临床和生物信息学数据并通过基础研究深入挖掘 ncRNA 的作用机制, 从而寻找更多有效的潜在标志物和治疗靶点。此外, DCM 的异质性决定该疾病的发病机制极其复杂, 在研究 ncRNA 的调控机制时需要进一步对该疾病从病因上进行细分。

参考文献:

- [1] McNally EM, Mestroni L. Dilated cardiomyopathy: genetic determinants and mechanisms [J]. *Circ Res*, 2017, 121(7): 731-748.
- [2] Schultheiss HP, Fairweather D, Caforio ALP, et al. Dilated cardiomyopathy [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5: 32.
- [3] Mushtaq I, Ishtiaq A, Ali T, et al. An overview of non-coding RNAs and cardiovascular system [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1229: 3-45.
- [4] Charles S, Natarajan J. Integrated regulatory network based on lncRNA-miRNA-mRNA-TF reveals key genes and sub-networks associated with dilated cardiomyopathy [J]. *Comput Biol Chem*, 2021, 92: 107500.
- [5] Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [6] Wojciechowska A, Braniewska A, Kozar-Kamińska K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26(5): 865-874.
- [7] Huang G, Cao M, Huang Z, et al. Small RNA-sequencing identified the potential roles of neuron differentiation and MAPK signaling pathway in dilated cardiomyopathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108826.
- [8] Enes Coşkun M, Kervancıoğlu M, Öztüzcu S, et al. Plasma microRNA profiling of children with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. *Biomarkers*, 2016, 21(1): 56-61.
- [9] Toro R, Blasco-Turrión S, Morales-Ponce FJ, et al. Plasma microRNAs as biomarkers for lamin A/C-related dilated cardiomyopathy [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2018, 96(8): 845-856.
- [10] Wang L, Zhu L, Luan R, et al. Analyzing gene expression profiles in dilated cardiomyopathy via bioinformatics methods [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2016, 49(10): e4897.
- [11] Huang K, Wen S, Huang J, et al. Integrated analysis of hub genes and miRNAs in dilated cardiomyopathy [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8925420.
- [12] Uchida S, Dimmeler S. Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases [J]. *Circ Res*, 2015, 116(4): 737-750.
- [13] Huang Y. The novel regulatory role of lncRNA-miRNA-mRNA axis in cardiovascular diseases [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(12): 5768-5775.
- [14] Haas J, Mester S, Lai A, et al. Genomic structural variations lead to dysregulation of important coding and non-coding RNA species in dilated cardiomyopathy [J]. *EMBO Mol Med*, 2018, 10(1): 107-120.
- [15] Huang G, Liu J, Yang C, et al. RNA sequencing discloses the genome-wide profile of long noncoding RNAs in dilated cardiomyopathy [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 2569-2580.
- [16] Li H, Chen C, Fan J, et al. Identification of cardiac long non-coding RNA profile in human dilated cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(5): 747-758.
- [17] Cai D, Han B, Sun W, et al. Differential expression profiles and functional analysis of long non-coding RNAs in children with dilated cardiomyopathy [J]. *Front Pediatr*, 2021, 9: 617298.
- [18] Tao L, Yang L, Huang X, et al. Reconstruction and analysis of the lncRNA-miRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA reveal functional lncRNAs in dilated cardiomyopathy [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 1149.
- [19] Chen YX, Ding J, Zhou WE, et al. Identification and functional prediction of long non-coding RNAs in dilated cardiomyopathy by bioinformatics analysis [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 648111.
- [20] Qiu Z, Ye B, Yin L, et al. Downregulation of AC061961.2, LINC01-AS1, and RP11-13E1.5 is associated with dilated cardiomyopathy progression [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4460-4471.
- [21] Lin Z, Zhao Y, Dai F, et al. Analysis of changes in circular RNA expression and construction of ceRNA networks in human dilated cardiomyopathy [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(5): 2572-2583.

- [22] Sun W, Han B, Cai D, et al. Differential expression profiles and functional prediction of circular RNAs in pediatric dilated cardiomyopathy [J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7: 600170.
- [23] Dong K, He X, Su H, et al. Genomic analysis of circular RNAs in heart [J]. *BMC Med Genomics*, 2020, 13(1): 167.
- [24] Wang H, Chen F, Tong J, et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for dilated cardiomyopathy [J]. *Cardiol J*, 2017, 24(1): 65–73.
- [25] Wu T, Chen Y, Du Y, et al. Serum exosomal miR-92b-5p as a potential biomarker for acute heart failure caused by dilated cardiomyopathy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(5): 1939–1950.
- [26] Jiao M, You HZ, Yang XY, et al. Circulating microRNA signature for the diagnosis of childhood dilated cardiomyopathy [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 724.
- [27] Zaragoza C, Saura M, Hernández I, et al. Differential expression of circulating miRNAs as a novel tool to assess BAG3-associated familial dilated cardiomyopathy [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(3): BSR20180934.
- [28] Zhang H, Chen X, Zhang D, et al. Identification of a novel six-long noncoding RNA signature for molecular diagnosis of dilated cardiomyopathy [J]. *DNA Cell Biol*, 2020; 39(12): 2174–2183.
- [29] Luo X, Luo P, Zhang Y. Identification of differentially expressed long non-coding RNAs associated with dilated cardiomyopathy using integrated bioinformatics approaches [J]. *Drug Discov Ther*, 2020, 14(4): 181–186.
- [30] Brundin M, Wågsäter D, Alehagen U, et al. Circulating microRNA-29-5p can add to the discrimination between dilated cardiomyopathy and ischaemic heart disease [J]. *ESC Heart Fail*, 2021, 8(5): 3865–3874.
- [31] Yu M, Liang W, Wen S, et al. EphB2 contributes to human naive B-cell activation and is regulated by miR-185 [J]. *FASEB J*, 2014, 28(8): 3609–3617.
- [32] Yu M, Liang W, Xie Y, et al. Circulating miR-185 might be a novel biomarker for clinical outcome in patients with dilated cardiomyopathy [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33580.
- [33] Rubiś P, Totoń-Żurańska J, Wiśniowska-Śmiałek S, et al. The relationship between myocardial fibrosis and myocardial microRNAs in dilated cardiomyopathy: a link between miR-133a and cardiovascular events [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(4): 2514–2517.
- [34] Zhang X, Nie X, Yuan S, et al. Circulating long non-coding RNA ENST00000507296 is a prognostic indicator in patients with dilated cardiomyopathy [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 82–90.
- [35] Cheng X, Jiang H. Long non-coding RNA HAND2-AS1 downregulation predicts poor survival of patients with end-stage dilated cardiomyopathy [J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(8): 3690–3698.
- [36] Wang Y, Li M, Xu L, et al. Expression of Bcl-2 and microRNAs in cardiac tissues of patients with dilated cardiomyopathy [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1): 359–365.
- [37] Calderon-Dominguez M, Mangas A, Belmonte T, et al. Ischemic dilated cardiomyopathy pathophysiology through microRNA-16-5p [J]. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2021, 74(9): 740–749.
- [38] Qiu Z, Chen W, Liu Y, et al. LncRNA AC061961.2 overexpression inhibited endoplasmic reticulum stress induced apoptosis in dilated cardiomyopathy rats and cardiomyocytes via activating Wnt/ β -catenin pathway [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(5): 494–503.
- [39] Gabory A, Jammes H, Dandolo L. The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development [J]. *Bioessays*, 2010, 32(6): 473–480.
- [40] Zhang Y, Zhang M, Xu W, et al. The long non-coding RNA H19 promotes cardiomyocyte apoptosis in dilated cardiomyopathy [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 28588–28594.
- [41] Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, et al. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure [J]. *Circulation*, 2011, 124(14): 1537–1547.
- [42] Zhou Q, Schötterl S, Backes D, et al. Inhibition of miR-208b improves cardiac function in titin-based dilated cardiomyopathy [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 230: 634–641.
- [43] Rubiś P, Totoń-Żurańska J, Wiśniowska-Śmiałek S, et al. Relations between circulating microRNAs (miR-21, miR-26, miR-29, miR-30 and miR-133a), extracellular matrix fibrosis and serum markers of fibrosis in dilated cardiomyopathy [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 231: 201–206.
- [44] Zeng Z, Wang K, Li Y, et al. Down-regulation of microRNA-451a facilitates the activation and proliferation of CD4⁺ T cells by targeting Myc in patients with dilated cardiomyopathy [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(14): 6004–6013.
- [45] Hirai K, Ousaka D, Fukushima Y, et al. Cardiosphere-derived exosomal microRNAs for myocardial repair in pediatric dilated cardiomyopathy [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(573): eabb3336.

[收稿日期]2022-04-29

中国比较医学杂志目次索引

2022 年第 32 卷 1~12 期

第 1 期

开篇词

“实验动物与中医药”专刊-开篇词 张伯礼(1)

研究报告

人冠状病毒 229E 寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠模型的建立及评价
..... 耿子涵,包蕾,郭姗姗,时宇静,鲍岩岩,赵荣华,孙静,高英杰,崔晓兰(3)戊己丸单次与多次给药对肠易激综合征大鼠体内药代动力学行为的影响
..... 杨紫玉,巩仔鹏,王娅杰,董宇,董李晋川,陈颖,杨庆,蔡维艳,李琦,翁小刚,郭雨轩,朱晓新(13)

槟榔对小鼠的抗抑郁作用影响及机制研究 裴海月,姜宁,王孟迪,王凤忠,敖冬梅,王琼(24)

白香丹胶囊对大鼠卵巢摘除所致的经前期焦虑症的改善作用
..... 郝志,胡明会,邢影,刘坤,张浩,杨焕新,李自发,耿希文,魏盛(33)杜仲提取物多次给药后在正常大鼠和 SHR 模型体内的药动学比较研究
..... 张青,李梦婷,李梅,鲍红松,黄勇,郑林,李月婷,陈颖,巩仔鹏(41)金钗石斛对 MPTP 诱导 PD 小鼠的神经保护作用及机制研究
..... 王孟迪,魏山山,姜宁,Alberto Carlos Pires Dias,刘新民,王琼(48)

参味宁郁片对三种药物诱发动动物模型的抗抑郁作用研究 王雅欣,郭姗姗,高英杰,图娅,崔晓兰(57)

蒺藜淫羊藿复合物对大鼠性功能及精子活力的影响
..... 梁志健,严家荣,陈桂煌,张建军,陈润红,邱少松(62)

紫草素通过调节 PI3K/AKT 途径抑制骨肉瘤生长和作用机制研究 杨志强,陈路,张雅茜,夏先学(68)

苦杏仁苷对新生大鼠坏死性小肠结肠炎的保护作用 曾信豪,谢东可,郑皓,徐沛,王小勇(75)

通心络对小鼠钙化性主动脉瓣膜病早期病变的影响研究 宗永辉,李欣欣,张宁,陈云,刘新灿(82)

研究进展

2019 新型冠状病毒肺炎凝血异常机制与中医血瘀证候 周澧,秦川(89)

中兽药创新研发与实验动物模型应用 魏媛媛,张艳楠,樊艺萌,冯玉,王惠茹,韩俊成,郝智慧(97)

中医药动物模型研究现状及展望 李磊,刘建勋,任钧国,付建华(104)

病证结合模式下肺癌实验动物模型的研究进展 谭骏岚,易健,王飞英,万佳婧,覃丽,戴爱国(111)

实验动物在评价天王补心丹防治失眠中的作用 赵倩,李劲草,王萧,张有志(120)

基于化学诱导炎症性肠病动物模型的中药研究进展 曹喻灵,宋厚盼,曾建国,廖端芳(127)

基于文献分析的中医药动物模型评价方法介绍 苗明三,彭孟凡,刘思哲,张媛鑫,刘思琪,石琪,罗茂丽(132)

中医药动物模型研究现状 苗明三,马林纳,彭孟凡,刘福宇,屈秉聪,王爽(141)

动脉粥样硬化病证结合动物模型研究进展 全文娟,廖端芳,度勤慧(147)

简讯 (61)

第 2 期

研究报告

- 尿酸性肾病大鼠模型建立的研究 严美霞, 霍帅, 田瑞敏, 徐鹏, 黎创, 胡天祥, 陈达豪, 陈小玲, 毛炜 (1)
- 三叶香茶菜介导 IkB- α 磷酸化对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化的影响 周至品, 农汝楠, 覃乐, 刘代华, 王竞静, 陈勇, 王晓源 (10)
- 膜细胞对化疗损伤性粒细胞的影响及左归丸含药血清干预作用 孙晓峰, 黄欣怡, 曾贵荣, 龚力民, 乔江, 阳松威, 周琳 (16)
- 银杏蜜环口服溶液对大鼠心肌微血管内皮细胞血管新生能力的影响 韩笑, 姚明江, 任建勋, 付建华, 任钧国, 金龙, 郭浩, 赵步长, 王益民, 刘建勋 (22)
- 改良后 Hult 法和 II 型胶原酶注射法建立兔膝关节炎模型的比较研究 欧宝芳, 别亚男, 陈千晴, 陈柏羽, 许佳欢, 谢水林, 吴少瑜 (29)
- 长链非编码 RNA TUG1 调控 miR-137 参与局灶性脑缺血大鼠神经损伤的作用机制 陈俊, 周赤忠, 张玲, 乔木 (38)
- 基于 miR-223/NLRP3 轴研究柚皮素对氧诱导视网膜病变中小胶质细胞活化的影响 楚瑞雪, 孙先桃, 王惠 (46)
- 骨肽类注射剂类过敏反应评价研究 杨奇涛, 吴殷因, 汪玉馨, 孟长虹, 宗卫峰, 陆益红, 史清水 (53)
- 异丙肾上腺素诱导恒河猴心肌损伤模型的初步研究 李艳艳, 杨凤梅, 王俊斌, 陈丽雄, 靳玮华, 和占龙, 杨飞, 赵远 (60)
- 七氟醚调控 NRF2/HO-1/HMGB1 通路减轻缺氧诱导的小胶质细胞炎症反应 温翔宇, 张军宏, 朱存良 (66)
- LncRNA SNHG1 对 IL-6 诱导的皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖和迁移的影响 钟咪, 张佳音, 饶美荣, 曾芬 (74)

设施设备

- ABSL-3 实验室中恒河猴饲养的微生物风险控制 梁燕, 刘龙丁, 杨梦莉, 李敬美, 郭磊, 李恒, 郑惠文, 李菁, 施海晶 (80)

研究进展

- 甲状腺疾病动物模型的研究进展 夏宗霄, 刘海鹏, 张艳娇, 范源 (87)
- Kruppel 样因子 2 与心血管疾病的研究进展 黄欣欣, 应燕萍 (94)
- 基于 TRIM 家族讨论泛素连接酶 TRIM46 研究进展 盛瀚莹, 张连峰, 张丽 (99)
- 肝纤维化小鼠模型研究现状 王娟, 杨晶晶, 周仁鹏, 胡伟, 鲁超 (105)
- 胆道闭锁实验动物模型的比较 韩晓燕, 邱建利 (111)
- 免疫衰老影响牙周炎细胞免疫的研究进展 姚燕子, 胡欢, 王倩, 刘建国, 周学东 (116)
- M2 型小胶质细胞极化促进少突胶质祖细胞的分化——促进多发性硬化症髓鞘再生的有效途径 刘丽, 李琦, 杜欣珂, 冉庆森, 孙立东, 杨庆, 李玉洁, 陈颖, 王娅杰, 翁小刚, 蔡维艳, 朱晓新 (126)
- 线粒体损伤与慢性阻塞性肺疾病骨骼肌功能障碍及中医药治疗进展 赵高远, 苗玉芳, 侯润苏, 李康沉, 田燕歌 (133)
- 浅述干细胞治疗慢性肾疾病的潜力 蒋超, 王超, 任晓楠, 周晓辉 (138)
- 简讯 (37)

第 3 期

研究报告

- YAP 在特发性膜性肾病中的表达及其对 C5b-9 诱导足细胞损伤的作用 史添立, 罗贞, 焦石 (1)
- 淫羊藿苷对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞凋亡及炎症的影响 李藤藤, 徐东升, 李琪, 吴迪, 张洋, 任立群, 李相军 (9)
- 槲皮素预处理调节 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬途径改善大鼠肝缺血再灌注损伤 沈钦海, 张盟辉, 秦召敏, 刘军 (16)
- 胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和纤维化 卢迎宏, 王丹, 井海云, 王梦超, 李智慧 (23)
- 辣椒素通过上调 MTSS1 表达抑制结肠癌细胞侵袭、迁移的实验研究 黄虹, 黄蝶, 王瑞杰, 余壮明 (31)
- 复方天麻蜜环糖肽片对原发高血压大鼠 T 淋巴细胞亚群、早期肾损伤及 AT1R/Smad3 蛋白作用机制研究 冯静, 张贤春 (38)
- ORMDL3 通过内质网应激介导的细胞自噬在中性粒细胞哮喘中的作用机制研究 王龙梅, 孙永显, 张新鹏, 陈晓艳 (46)
- 补肾益气化痰冲剂对去卵巢骨质疏松模型大鼠血管形成的影响及机制研究 王君, 吴滨滨, 王晓东, 赵璇, 张鑫, 王若霖, 修晓光 (54)
- 卡托普利对 SHR 大鼠 eNOS、iNOS 表达的影响 蒋嘉烨, 栗源, 可燕 (62)
- 腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型中 HIF-1 α 、RhoA、SOX9 的表达及意义 毛海霞, 康婷, 吴蔚桦, 朱婷婷, 张丽玲, 欧三桃 (70)
- 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 通过抑制 TLR2/NF- κ B 信号通路保护实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺功能研究 赵慧, 陈文文, 朱丽萍, 葛鸿 (78)

教学管理

- 实验动物伦理教学中翻转课堂模式的探讨 张茜, 肖新华 (87)

研究进展

- 非编码 RNA 调控口腔鳞状细胞癌葡萄糖代谢重编程的研究进展 杨一言, 高继萍, 续国强, 王晓堂, 宋国华 (91)
- 白三烯在动脉粥样硬化形成及治疗中的作用 吕莎, 叶子芯, 陈欢, 杨树龙, 洪芬芳 (98)
- 外源性诱导原发性胆汁性胆管炎动物模型研究进展 陈海洋, 张玮 (105)
- 社会挫败动物模型研究进展 王静茹, 曾贵荣, 常露露, 姜宁, 朱菁, 刘顶鼎, 林新文 (112)
- 中性粒细胞离子通道及其功能的研究进展 李雪, 范俊芬, 王雨晴, 罗玉敏, 赵海革 (117)
- MMP2 在肿瘤侵袭和转移中的调控机制研究 柳森森, 毛玉宁, 张彩勤, 师长宏 (123)
- 脑缺血性卒中血脑屏障破坏模型建立与功能障碍的定量检测方法及其进展 杨净松, 吕梁, 宋巍, 刘兴利 (129)
- 不同物种端粒结合蛋白和端粒酶的研究进展 石桂英, 黄艺滢, 雷雪裴, 李欣悦, 白琳 (136)
- 发作性睡病动物模型研究进展 王笑冉, 郑攀 (143)
- 简讯 (69)

第 4 期

研究报告

- 四物合剂对缩宫素所致原发性痛经模型小鼠的影响研究 刘子馨, 贾飞凡, 孟红旭, 韩笑, 李玲美, 尤越, 王奥奥, 王紫艳, 杨斌, 李磊, 付建华, 刘建勋(1)
- 黑质 LAMP2A 过表达改善帕金森病恒河猴模型的运动功能 朱旭超, 窦长松, 张钰, 秦川, 张玲(7)
- 多柔比星致小鼠慢性心脏毒性模型的构建及评估 金翠柳, 柴钰, 凌望, 吴美平, 金素安(14)
- 基于自噬探讨芬太尼复合丙泊酚对大鼠心脏缺血再灌注损伤的影响 严琳, 李亚萍, 王冬, 贾文琴, 阎文军(22)
- 三点金中黄酮类化合物对溃疡性结肠炎小鼠的干预作用及其对肠道菌群的影响 李婷, 邹秋萍, 毛泽伟, 吴石丽, 何红平, 李艳平(29)
- 阿尔茨海默病-痰瘀互结病证结合动物模型的建立与评价 谭爱华, 冉思邈, 石和元, 杨硕(39)
- 小鼠第 13.5 天胚肝细胞诱导 HepG2 细胞分化的作用机制 肖志刚, 郑丽, 王梓瀛, 刘昆, 王瑜, 齐锦生, 栗彦宁(47)
- 慢病毒介导的 HNRNPK 下调对肝癌细胞 HepG2 增殖及迁移的影响 李梦媛, 张文龙, 杨星九, 朱紫薇, 张国新, 魏育敏, 高苒(54)
- 基于植入式渗透泵经异丙肾上腺素诱导心肌肥厚模型大鼠条件的改进及评价 姜笑雨, 刘梦迪, 马嘉昕, 董伟, 张旭, 张连峰, 吕丹(60)
- 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠髓鞘修复及 RhoA/Rock1 通路的影响 张沁丽, 王玉芬, 刘红, 刘博雯(68)
- 基于 miR-34a/SIRT1 轴研究柚皮素对 H₂O₂ 诱导的人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的保护作用 魏抗抗, 董伟华, 帖红艳, 何章彪, 赵琳(78)
- 和厚朴酚通过 Notch 信号通路抑制慢性阻塞性肺疾病小鼠免疫失衡并提供肺保护作用 李彬, 甘德堃, 王璐璐(86)
- 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 改善东莨菪碱致小鼠认知障碍的作用比较 魏山山, 王孟迪, 姜宁, Ayaz Ahmed, 刘新民, 王琼(94)
- 小型猪肺部三维重建与脉管 3D 打印模型 张润东, 赵琳娜, 姚华(102)

设施设备

- 小动物神经行为学实验平台规划设计原则及施工建设要求 魏盛, 耿希文, 徐凯勇, 张浩, 赵峰, 胡明会, 艾志福, 贺文彬, 秦冬冬, 王晓良, 葛加兵, 王斌, 徐子翔, 苏茜茜, 李自发, 王可洲(107)

继续教育

- 实验动物从业人员培养体系调查分析 邱冉, 刘佩琳, 杨海龙, 石英杰(116)

研究进展

- 去甲基化酶 JARID1D 在前列腺癌侵袭和转移中的研究进展 谢清华, 张永斌, 师长宏(120)
- TAAR1, CNS 单胺神经元调控新靶点 蔡晓雯, 赖惠芹, 梁开勇, 黄泳(126)
- 细胞焦亡在肝损伤微环境中的作用研究进展 张钊, 葛乃嘉, 马新月, 刁佳雯, 全吉淑(133)
- 病原体感染角膜炎机制及动物模型研究进展 陈柳, 邱敏, 代解杰(137)
- Nrf2-ARE 信号通路在帕金森病中的作用 刘继红, 邵思迈, 赵振荣, 史洺, 郝莉, 张紫娟, 张振强(145)
- 简讯 (93)

第 5 期

研究报告

- PDCD2 促进 TRAIL 刺激下 T 细胞及 HIV 潜伏感染 T 细胞的凋亡 余雯惠, 杨晨波, 丛喆, 薛婧 (1)
- 血清剥夺反应因子 (*Sdpr*) 敲除及转基因小鼠的建立与表型分析 李欣悦, 石桂英, 雷雪裴, 黄艺滢, 李珂雅, 侯丽雅, 王凯瑜, 汤家鸣, 白琳 (7)
- 基于大鼠 OVX 模型研究雌激素缺乏对终板软骨细胞退变的影响 孙尚, 邹达, 赵振达, 蒋媛, 杨子欢, 陈龙艇, 李危石, 宋纯理, 冷慧杰 (16)
- 烟酰胺 (NAM) 对 SIV/SHIV 感染猴 CD4⁺T 细胞中潜伏病毒的激活作用研究 党翠, 陆佳涵, 魏强, 薛婧, 丛喆 (23)
- Apb1* 基因对心肌细胞增殖影响的探究 刘俊, 孙佳, 刘维静, 郝琰琰, 廉虹, 王玉瑶 (29)
- 藤黄酸对不同表型前列腺癌细胞生长的影响 周丽桂, 谢清华, 巩森森, 张永斌, 师长宏 (39)
- 豨莶通栓胶囊减轻慢性脑缺血大鼠认知功能损伤的机制研究 闫峰, 田悦, 黄语悠, 钟丽媛, 罗玉敏 (47)
- 内质网应激-线粒体自噬通路在大鼠肺动脉高压中的作用观察 武云, 闫倩芝, 王捷, 张敏芳, 王瑞, 王世超 (53)
- 柚皮素通过抑制 miR-29b 的过表达对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响 王元, 曾凯宏, 邓波, 余雪梅, 周雪, 宋怡, 黄璐娇 (60)
- 冬凌草甲素调控 miR-200c/*EZH2* 轴抑制黑色素瘤细胞上皮-间质转化的机制研究 赵汴霞, 任红, 晋佳路, 曹杰 (67)
- 人脐带间充质干细胞治疗小鼠急性肺损伤的安全性及有效性研究 陈千晴, 别亚男, 陈柏羽, 许佳欢, 欧宝芳, 谢水林, 吴少瑜 (77)
- 蛋白酶抑制因子对大鼠帕金森病造模条件探讨 胡玉英, 韦晓芸, 宋曦, 钟洁, 刘永辉, 罗荣卿 (85)
- miR-4539 通过靶向作用于叉头盒转录因子 1 抑制胶质瘤细胞生长的实验研究 王宏欣, 付苏, 淳雪莉, 张帆 (91)

经验交流

- 浅谈实验动物屏障设施的建设及管理体会——以广州中医药大学中药学院实验动物屏障设施为例 陈秋荷, 刘晓玲 (98)

研究进展

- 肿瘤中 HAGLR 反义长链非编码 RNA 的表达与机制研究 刘浪, 王海存, 刘广麟, 高欣, 赵俞乔, 姜兴明 (102)
- 类风湿性关节炎药理实验模型的研究进展 陆丹丹, 韩晓燕, 张晗, 李霖, 房士明 (107)
- 空气污染对男性生育能力的影响及其机制 胡建英, 狄娟, 曹亿会, 张瑞仙 (115)
- 血管性认知障碍和卒中后认知障碍动物模型初步评价 牛雨晴, 秦合伟, 姬令山, 李伟峰, 郭宁, 宋雪梅 (121)
- 心房颤动的机制与代谢组学研究 史宝燕, 孙洪胜, 李玥, 李彦, 张学顺 (128)
- miRNA 在缺血性脑血管病中作用的研究进展 梁紫君, 张雪儿, 黄健, 张林杰, 安红伟 (132)
- 急性心肌梗死后非梗死区心肌功能障碍研究进展 吴晗, 于波, 孙欢 (138)
- 长链非编码 RNA 参与调控细胞程序性死亡的研究进展 汪贝贝, 张文波, 蒋鹏程 (147)
- 简讯 (114)

第 6 期

研究报告

- 橙皮素通过 Nrf2/HO-1 信号通路对非酒精性脂肪肝体外模型氧化应激的保护作用 罗娟, 楼迪栋, 肖巧巧, 李晓杰, 李毅, 周谊霞(1)
- 小鼠烧伤创面脓毒症模型的建立与评价 范仕郡, 吴丹, 夏林, 魏燕, 陈倩, 彭曦(7)
- 天门冬水提物对人结肠癌细胞增殖、凋亡、迁移的影响 赵嘉宁, 梁惠玲, 杨娟, 李艳菊, 王飞清, 陶奕汐, 王琨, 严雪梅, 刘洋(14)
- 基于代谢组学技术筛选与血压升高相关的差异性代谢物 李淑敏, 蒋海强, 齐冬梅, 杨雯晴(23)
- 弗氏完全佐剂肌肉注射诱发炎症痛敏及免疫应答的转录组测序分析 石惊涛, 张晓宁, 曹婉莹, 何伟, 刘一寒, 王睿, 宿杨帅, 万红叶, 曲正阳, 景向红, 王晓宇(31)
- 咪喹莫特致不同免疫状态小鼠银屑病模型比较研究 赵亚, 吴亚运, 刘丽娟, 赵瑞芝(41)
- 树鼯睾丸间质细胞的分离培养及寨卡病毒感染特性的研究 邓伟, 金亮子, 奎秀莹, 王文广, 李娜, 全品芬, 代解杰(48)
- MMP-9、TIMP-1 水平变化参与 FIRS 早产儿心肌损伤的机制研究 闫祎炜, 江莲, 李梅, 张文浩, 张文婷, 王晓玲, 张原芬, 张会芬(55)
- 新冠肺炎寒湿疫小鼠模型的建立及其评价* 朱淑敏, 宁为民, 董明国, 欧健钊, 黄海阳, 侯少贞, 高洁(62)
- 精氨酸加压素 1b 受体敲除对雌性大鼠焦虑和社交行为的影响 赵崇机, 樊圃(69)
- 两个 CBA 亚系流产模型数据比较 王蕾, 吴旭颖, 高玉龙, 张文明, 李斌, 刘云波(76)

设施设备

- 非人灵长类动物口鼻式气溶胶暴露系统运行效果评价* 李庆妮, 陈云丰, 刘元浪, 唐定, 华婉璐, 张瑞安, 卢佳, 李新国(80)

研究进展

- 多物种中非肌肉肌球蛋白 II A 相关功能的研究进展 黎国安, 钟望涛, 张晶晶(87)
- DMD 的肌膜损伤机制及其修复治疗的研究进展 赵治鹏, 李善刚(93)
- 新型冠状病毒非人灵长类动物感染模型的评价指标* 唐定, 张瑞安, 卢佳, 李新国(100)
- 抗冠状病毒药物研究进展* 秦圣乐, 王玉涛, 蔡雪君, 王新华, 杨子峰(105)
- 膳食乳化剂对结直肠癌影响的研究进展 王晨曦, 王秀宏(111)
- 线粒体动力相关蛋白 1 与帕金森病相关性研究 赵振荣, 史滔, 刘继红, 邵思迈, 游言文, 张紫娟, 郝莉, 张振强(117)
- SARS-CoV-2 奥密克戎变异株的研究进展* 刘宏, 凌子旭, 张净, 李思雨, 白天科, 李剑(122)
- 伊维菌素用于新型冠状病毒肺炎防治的研究* 葛沐子, 伍一军(128)
- 猴痘病毒感染动物模型研究及应用进展 刘江宁(137)
- 医用激光设备动物试验的决策与审评要求探讨 刘柏东, 申高, 邱宏, 陈民利(148)
- 简讯 (147)

* “新冠动物模型及转化应用”专题

第 7 期

研究报告

- 槲皮素通过 Pink1/Parkin 信号通路减轻阿霉素心肌损伤的作用机制研究 郭红, 王少玮, 谢文静, 周俊, 蒋书云, 刘金成, 杨剑, 金屏(1)

基于数据挖掘的慢性阻塞性肺疾病模型应用分析	李磊, 吴东良, 李尚点, 阎玥, 史琦, 李春雷, 李友林(10)
连翘提取物通过调节巨噬细胞凋亡和极化抑制 LPS 诱导的炎症作用	罗福龙, 李文举, 吴小会, 钟武, 范蓓, 贯东艳, 王凤忠, 王琮(18)
真武汤对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K-AKT 通路的影响	王兴, 陈子琪, 李林, 廖金花, 王晓琳, 刘江源, 廖东华(27)
PD98059 抑制哮喘中 TGF- β 1 诱导的人支气管上皮细胞上皮间质转化进程	吴文棋, 庄旭辉, 王姝晨, 李静静, 王霞, 王勇, 马武华(34)
不同运动方式对大鼠骨骼肌 MSTN 和 IGF1 的影响比较	刘秀娟, 盛蕾, 张念云, 王子艺, 申雪纯(41)
全塑型塑胶跑道面层材料对大鼠静式吸入毒性研究	李培宁, 刘香梅, 黄静怡, 李光先, 刘颖, 孙侠, 何树锋, 梁俊杰, 刘冬虹(49)
miR-30b 在高磷诱导的血管平滑肌细胞凋亡中的作用	刘兰, 张东雪, 张胜雷, 白亚玲(58)
miR-219a-5p 在胃癌中的甲基化调控及生物学功能研究	罗敏, 章帆, 王利民, 李红霞, 卿克勤(66)
大豆皂苷 Bb 预处理对脑缺血再灌模型大鼠的神经保护作用	高倩, 王建宇, 孟伟建, 李静, 崔永健, 魏琰(74)
白黎芦醇对小鼠卵巢早衰的干预作用及可能机制	修银玲, 孙凯旋, 于月新(81)
高原寒冷环境大鼠急性肺水肿模型的建立	杨欣悦, 李佳佳, 董翔, 是文辉, 李建瑛, 魏雪梅, 刘江伟(87)
槲皮素治疗大鼠肺纤维化的作用及相关机制研究	薛兰, 毛春迎, 王慧, 王守福, 张争辉, 郭新庆(94)
技术方法	
基于 CRISPR/Cas9 技术构建 <i>Plcz1</i> 基因敲除小鼠模型	曹彬彬, 蔡瑶, 王宝珠, 饶喻, 王超, 苟克勉, 王涛(101)
研究进展	
阳和汤治疗恶性肿瘤的研究进展	韩懿存, 武颖烁, 尚艺婉, 陈玉龙(109)
基于中西医临床病症特点的慢性咽炎动物模型分析	余琳静, 谢逸轩, 刘茜茜, 苗明三, 白明(118)
<i>PTEN</i> 基因在周围神经损伤修复中的作用机制研究进展	褚云峰, 于红燕, 杨琪, 彭艳斌, 陈仲, 于斐(124)
长链非编码 RNA 在胰腺癌吉西他滨耐药研究中的作用	郭晨博, 毛玉宁, 张延英, 汪永锋, 师长宏(131)
初级纤毛相关信号通路在小鼠腭发育中的机制研究进展	廉舒博, 陈珏蓉, 何苇(137)
ALPPS 动物模型构建及相关研究的新进展	陈穴, 陈耿(142)
缺血-再灌注氧化损伤机制及其对不同器官功能的影响	李昕, 王芷宁, 付璐, 张林波, 肖盛元, 张文慧(149)
简讯	(40)

第 8 期

研究报告

基于 nNOS/CAPON 相互作用探讨参枝苓口服液对拟散发性 AD 小鼠海马突触的影响	田梅静, 高晨艳, 郑明翠, 和雁南, 王蓬文(1)
基于 SDF-1/CXCR4 轴观察济生肾气汤对肝硬化大鼠 BMSCs 归巢的影响	周晓玲, 王月明, 吴腾, 陈峭, 余静芳, 李灿, 李泽鹏, 陆世银, 张悦, 覃凤传, 沈新辉(11)
肾气丸减轻糖尿病 ZDF 大鼠的肾损伤研究	刘雨梦, 李姝玉, 冯婧, 车宇娥, 张晓凤, 刘嘉鹏, 王谦(19)
长期外用或系统应用糖皮质激素对小鼠代谢水平及器官的影响	陈利红, 潘萌, 郑捷, 徐牧迟(27)

玉朗伞查尔酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 NF- κ B 信号通路的影响	梁杏梅, 刘喜华, 黄建春, 陈春霞, 陈兆霓, 黄仁彬(35)
右美托咪定复合舒芬太尼对大鼠肺缺血再灌注损伤的作用探究	李亚萍, 严琳, 丁培炎, 臧宏刚, 阎文军(42)
斑马鱼小头震颤突变体 <i>mise</i> 的鉴定与基因定位	何嘉玲, 王天奇, 暴国, 张长勇, 李楠, 孙德明(48)
3D 培养细胞球快速石蜡切片方法建立及应用 ...	冯珊珊, 金毅, 姜东晓, 魏孟超, 谢泳娇, 王汝仙, 李静(57)
主动脉夹层中巨噬细胞表型变化研究	张立魁, 杨灵波, 王学宁(62)
<i>FAH/GSTZ1</i> 双基因突变肝细胞模型的建立	刘艳, 顾鹏, 叶行, 梁春锦, 关雅今, 张映辉, 邹庆剑, 顾为望(71)
金银花水提物改善脓毒血症的物质基础研究	李文举, 罗福龙, 王凤忠, 贯东艳, 范蓓, Alberto Carlos Pires Dias, 王琮, 钟武(79)
基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨重组 BPI 对肺炎支原体感染小鼠肺炎反应的影响	韩红, 陈旭霞, 逯建立, 韩艳珺(90)

研究进展

自噬及相关信号通路在脊髓损伤中的作用机制研究进展	李志超, 李念虎, 薛海鹏, 陈仁场, 高尚(98)
MNNG 溶液联合多因素诱导胃癌前病变大鼠模型研究进展	陈心怡, 舒劲(104)
TIM-3 在肿瘤免疫及免疫治疗中的研究进展	许康, 白丽(109)
I 型超敏反应新型诊断技术及免疫疗法研究进展	刘益, 沙爱龙(116)
缺血性脑卒中非人灵长类动物模型研究进展	孙宇航, 管博文, 魏强, 孟爱民(123)
糖尿病心肌病体内与体外模型研究进展	刘倩, 姚雨峰, 蔡琳, 张冬卉(131)
铁死亡在百草枯中毒中的研究进展	张帆, 陈星澎, 赵敏(137)
AD 动物模型及其相关指标评价方法研究进展	谢晓露, 陈秀, 寇利秋, 李亚玲(145)
简讯	(10, 108, 115, 130, 154)

第 9 期

研究报告

miR-488-3p 靶向调控 RAP1A 在同型半胱氨酸介导肝细胞自噬的作用研究	高源, 揭育祯, 马天龙, 汪乐新, 杨慧霞, 周瑜瑾, 焦运, 卢冠军, 马胜超(1)
达格列净对动脉粥样硬化的影响以及与钠氢交换体 1 相关机制	张书萍, 莫显刚, 张诗悦, 陈举海, 王兰, 杨卉, 刘大男(10)
含服硝石雄黄散保护小鼠缺血心肌的实验研究	黄汕梅, 李畅, 马梓珊, 郭玉洪, 赵洋洋, 刘原, 银帮巧, 刘鹰, 唐耀平(19)
甲型 H1N1 流感病毒小鼠肺炎-肠炎模型的建立及验证 ...	杜宝香, 于钦辉, 孙启慧, 王立清, 杨勇, 容蓉(27)
缺氧诱导因子 1 α 对小胶质细胞 M1 极化的影响及其机制研究	张雪儿, 安红伟(34)
miR-214 对异丙酚麻醉大鼠术后神经元损伤的保护作用	杨继梅, 卢文江, 周娇洁(39)
PGC-1 α 在槲皮素通过雌激素样作用减轻 FFA 诱导肝细胞脂肪变性中的机制	李丽红, 李欣, 李硕, 杨艳萍, 郭建红(47)
银杏叶提取物对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的脑保护作用	胡哲, 赵军, 宋菟, 闫旭升, 杨占君, 贾建新(55)
罗汉果皂苷 V 对胎粪吸入综合征大鼠的保护作用及其初步机制研究	曹银利, 孙亚洲, 崔清洋, 何晓敬, 李珍珍(62)

- miR-30 靶向调控 Zeb2 相关通路抑制胆囊癌细胞 EMT 进程 唐津天, 唐润娟 (69)
- 紫菀酮改善 OVA 诱导哮喘 SD 幼鼠的免疫反应及 TLRs 的表达 艾奎, 李桢 (76)
- 塞来昔布调节 miR-129-5p/HMGB1 抑制 TNF- α 诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子分泌
..... 时萍, 陶野, 王晨静, 李欣, 柳艳平, 曹玉 (82)
- 褪黑素调控 NF- κ B 信号通路调节胃癌小鼠 Th1/Th2 免疫平衡及其机制 付佳, 曹宇勃, 刘飒 (90)

研究进展

- 细胞焦亡与心血管疾病的关系及中医药干预研究进展
..... 尤越, 李玲美, 李磊, 韩笑, 孟红旭, 付建华, 刘建勋 (97)
- 抑郁症动物模型及其在中医药研究运用进展 刘志恒, 袁霞红, 刘林 (109)
- 外泌体在系统性硬化症中的研究进展 丁甜甜, 吕凤凤, 赵巧英, 孙晓林, 王永福 (115)
- TSPAN7 在癌症、神经系统疾病、HIV、I 型糖尿病中的作用 庞硕, 罗卓慧, 张连峰 (122)
- miRNA-125 家族与自身免疫性疾病关系的研究进展 武志慧, 孙晓林, 王慧 (128)
- 基于中西医临床病症特点的乳腺癌动物模型分析 王雪, 张媛鑫, 田硕, 彭孟凡, 武香香, 苗明三 (137)
- 4T1 细胞成瘤的乳腺癌小鼠模型临床转化过程中的几个问题 刘梓昕, 牛东芹, 王东 (145)
- 简讯 (152)

第 10 期

研究报告

- Minor CCI 与经典 CCI 大鼠模型成模特点的比较研究
..... 王厚融, 刘志凤, 于天源, 张英琦, 焦谊, 刘迪, 徐亚静, 官乾 (1)
- 冠心病气虚血瘀证模型大鼠与临床患者舌象特征的比对研究
..... 王瑾茜, 雷诗卉, 李薇, 杨蕙, 杨益, 刘侃, 蔺晓源, 胡国恒, 郭纯, 陈亚 (8)
- 黄连解毒汤活性成分保护帕金森症脑神经细胞损伤机制的研究
..... 张忠文, 陈国华, 黄露麒, 梅俊华, 邵卫, 梅瑰 (17)
- 中心静脉导管监测肺动脉压的兔急性肺栓塞模型的制备 龙嘉琪, 赵文丽, 彭发全, 吴蓓, 李跃兵 (24)
- 妊娠期糖尿病致子代先天性肾脏及尿路畸形大鼠模型的建立
..... 欧阳辰昕, 王城, 朱芮樟, 廖君左, 敬鹏, 何文飞, 赵丹 (32)
- 基于 miR-146a/Sirt6 信号介导的自噬探讨右美托咪定抗肠缺血再灌注的作用
..... 周瑜, 贾静, 王璐, 周敏 (40)
- 过表达 miR-202-5p 通过抑制 PCSK9 减轻阿尔茨海默病神经损伤
..... 徐沛沛, 赵树华, 王江波, 姚先丽, 白金 (49)
- TNFAIP1 对 RhoA 的泛素化调节在黑色素瘤进展中的作用 肖潇, 冯浩, 唐桦, 李可, 李蓝 (59)
- 高糖高脂食物对 BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠生长和代谢指标改变影响的研究
..... 戴丽军, 黄月玲, 叶炳飞, 邝桂星, 侯敏, 安胜利 (69)
- 开心散对双侧海马 CA1 区注射 A β_{1-42} 致 AD 大鼠的治疗作用及机制研究
..... 裴海鸾, 马贝贝, 王婷婷, 李瑞吉, 刘金辉,
于尚玥, 姜天宇, 左泽平, 田时秋, 李依林, 王晨晓, 田颖颖, 田骄, 赵新月, 刘闯, 郭玉东, 王晶, 王志斌 (78)
- 苦参碱对妊娠高血压大鼠内皮损伤和 JAK2/STAT3/SOS1 信号通路的影响
..... 李玲, 武建利, 李珊, 曲广第 (91)
- 对香豆酸诱导弥漫性大 B 细胞淋巴瘤细胞内质网应激介导的凋亡
..... 侯著法, 赵冰洁, 车虹, 易文静, 刘培佳, 刘松山 (98)

研究进展

- 过敏性紫癜动物实验模型的对比分析及建模思路探讨 段凤阳,徐闪闪,丁樱,郭婷,宋纯东,张霞(104)
- 不同化学物质建立肝损伤动物模型的作用机制 王雨欣,王倩,田颖(109)
- 肿瘤心脏病学动物模型的研究进展 张钰,孟婷婷,田鹏,郑燕,苏国海(115)
- 基于中西医临床病证特点的病毒性肺炎动物模型分析 狄培琰,张双丽,康乐,苗明三(123)
- 肠道菌群在抑郁症发生中的调控机制研究进展 陈文璐,闫晓如,高继萍,宋国华(130)
- 抗新型冠状病毒的药物疗法 柴华锋,王珂,宋淑亮(136)
- 银屑病病证结合模型的研究进展 赵宁,底婷婷,齐聪,王亚卓,李萍(142)
- 胃食管反流病分子生物学的研究进展 董茗茗,柴秀坤,刘学臣,何云,李艾迪,蒋树林(148)
- 简讯 (122,129)

第 11 期

研究报告

- LncRNA FAM83A-AS1 调控 FAM83A 表达对乳腺癌细胞增殖、侵袭与迁移的影响[#] 张秀清,刘娟,刘斌,刘平(1)
- 肺转移灶源性 Lewis 肺癌在 C57BL/6 小鼠体内生长及转移特性的研究[#] 张娜,刘学芳,冯妍妍,郭凤悦,冯素香(12)
- 大麻二酚减轻甲基苯丙胺诱导的大鼠单胺类神经递质改变 沈宝玉,任雁明,杨根梦,于浩,董文娟,洪仕君,张瑞林(18)
- 基于细胞和动物实验的新疆 5 种阿魏抗结肠癌的作用研究[#] 张柏生,郭萍萍,叶晨雨,张海英(26)
- 过表达 microRNA-26a 大鼠表皮干细胞来源外泌体对深 II 度烧伤大鼠创面愈合的影响 王献珍,李毅,吴晓伟,崔强(34)
- 白藜芦醇通过 HIF-1 α /BNIP3 介导的自噬信号通路促进小鼠缺氧性脑损伤修复^{*} 王晓宏,孙凯,朴丽,徐兆宁,于秀丽,林佳楠,周莉,夏美慧(43)
- 鹿茸多肽介导 TGF- β /samds 对心梗后心肌缺血损伤大鼠保护作用及机制研究^{*} 周高峰,肖静,周佳,刘俊秀,律广富,王雨辰,林贺,黄晓巍(49)
- miR-218-5p 靶向 EGLN3 抑制肺腺癌增殖、迁移和侵袭[#] 王江波,梁皓,陆允平(57)
- 甘参复方抗肝纤维化作用机制的代谢组学研究^{*} 侯玉娇,张杰,赵超阳,徐天娇,李美谦,洪博,李文静(68)
- CD44 基因敲除对小鼠行为能力的影响 张睿,张竞丹,舒瑶,邢晓雯,王翠,刘志强,张剑宁(75)

研究进展

- 脂多糖结合蛋白和杀菌/通透性增加蛋白:脓毒症的潜在治疗靶点 杨泽,王可洲,于杨(86)
- MicroRNA 调控肠道屏障机制的研究进展 侯雨君,王楷,陈颖,王路,蒋慧灵,李璵,周思远(95)
- 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征与炎症相关性研究进展 赵莎,雷璇,熊佳敏,杨树龙,洪芬芳(101)
- 实验动物伦理新原则的框架分析与我国相关立法发展方向 苏达,高利红(107)
- 脓毒症急性肺损伤模型研究进展 刘春慧,梁群(113)
- LncRNA 在食管癌中的双重调控机制及其临床价值[#] 彭孟凡,李鸣,苗晋鑫,田硕,苗明三(121)
- 静脉畸形动物模型建立的研究进展 李艺,李永生(128)
- 人工智能在动物实验中应用的研究进展^{*} 王星,赵静怡,张钰,沈璐妍(135)
- Beta 属冠状病毒亚基因组检测及应用进展 张亚青,戚菲菲,鲍琳琳(142)

简讯 (67)

* “东北三省优秀论文”专题

“癌症增殖、迁移与侵袭的调控研究”专题

第 12 期

研究报告

- 中药松弛膏联合运动康复对关节挛缩大鼠关节纤维化 ROM 及炎症反应的研究
苗田雨, 帕丽达·买买提, 努尔比亚·克其克, 王宁宁, 李晶晶, 史凌云, 夏热帕·阿不都拉, 阿斯古丽·图尔荪(1)
- 雷帕霉素通过抑制细胞焦亡缓解缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞损伤
张怡, 张弋宁, 张紫微, 周晓红, 高维娟(9)
- 牙本质基质蛋白 1 糖基化形式在颌骨损伤中的作用
刘洋, 李剑奎, 沙伟君, 崔立然, 王辉, 徐浩, 张怀胜, 宋波, 薛徽(16)
- 不同刺激因素诱导的慢性阻塞性肺疾病小鼠模型肺小血管重塑的比较研究
崔莉莉, 梅晓峰, 卢瑞龙, 徐可心, 田燕歌(24)
- 缺血时间差异对大鼠肠缺血再灌注损伤的影响研究
潘晓慧, 张朋辉, 江国健, 李娟, 陈桂煌, 姚欣伶, 冯学轩(32)
- 当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠中医证候的影响
王婷, 刘志勇, 罗黎明, 张鸿, 徐磊, 曾宪保, 郑梓泓, 刘志勇(37)
- 草薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠足细胞 podocalyxin、 α -actinin-4 的影响 马雪莉, 魏锦慧, 马鸿斌(49)
- 比较医学大数据平台的建立
吴玥, 魏强, 张连峰, 薛婧, 鲍琳琳, 刘江宁, 向志光, 孟爱民, 杨志伟, 高苒, 孔琪(57)
- 银耳多糖的急性毒性、遗传毒性和亚慢性毒性研究
杨非, 姚文环, 李慧, 张静, 唐慧, 吕实波, 郭婕, 孙劲靖, 陆震, 程东(66)

教学管理

- 高校实验动物中心动物质量控制研究与创新实践 张志妮, 杨力衡, 严楚, 蔡卫斌(77)

研究进展

- 异种蛋白诱导法建立 IgA 肾病动物模型研究进展
杨文, 宋丹, 宋纯东, 郭婷, 段凤阳, 王宁丽, 张博, 杨濛(82)
- 非编码 RNA 在骨性关节炎中对软骨细胞和胞外基质影响的研究进展
王世琦, 岳亮, 谢文鹏, 蔡余力(88)
- 下一代益生菌防治动脉粥样硬化的研究进展 王梦楠, 秦合伟, 郭宁, 宋雪梅, 牛雨晴, 孙孟艳(95)
- 新冠病毒是否经消化道传播的研究进展 严一苇, 戚菲菲, 鲍琳琳(103)
- 免疫系统人源化的非小细胞肺癌异种移植小鼠模型临床前研究应用 张雄, 郭文文, 张彩勤(108)
- 外泌体的抗感染作用研究进展 马枫茜, 陈瑞枫, 丁寿鹏, 李祥芳, 吴利先(115)
- 几种炎症模型的小鼠造模方法研究进展 刘雨然, 连科迅, 谷新利(120)
- 非编码 RNA 在扩张型心肌病中的研究进展 黎伟文, 邓少东, 陈建英(127)
- 简讯 (15)

《中国比较医学杂志》2022 年总目次 (134)

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

INDEX OF CONTENTS

Vol. 32 No. 1 ~ 12, 2022

Issue 1

Experimental animal and traditional Chinese medicine——special issue	ZHANG Boli(1)
Establishment and evaluation on a mouse model combining disease with syndrome of hCoV-229E pneumonia with “Hanshi Yidu Xifei” syndrome	GENG Zihan, BAO Lei, GUO Shanshan, SHI Yujing, BAO Yanyan, ZHAO Ronghua, SUN Jing, GAO Yingjie, CUI Xiaolan(3)
Comparison of pharmacokinetics after single and multiple oral administrations of Wuji Wan in irritable bowel syndrome rats	YANG Ziyu, GONG Zipeng, WANG Yajie, DONG Yu, DONG Lijinchuan, CHEN Ying, YANG Qing, CAI Weiyan, LI Qi, WENG Xiaogang, GUO Yuxuan, ZHU Xiaoxin(13)
Antidepressant effect of <i>Areca catechu</i> L. on mice and its mechanism	PEI Haiyue, JIANG Ning, WANG Mengdi, WANG Fengzhong, AO Dongmei, WANG Qiong(24)
Effect of Baixiangdan capsule on premenstrual anxiety caused by ovariectomy in rats	HAO Zhi, HU Minghui, XING Ying, LIU Kun, ZHANG Hao, YANG Huanxin, LI Zifa, GENG Xiwen, WEI Sheng(33)
Pharmacokinetic comparison of active components in an <i>Eucommia ulmoides</i> extract by multiple administrations between normal and spontaneously hypertensive rats	ZHANG Qing, LI Mengting, LI Mei, BAO Hongsong, HUANG Yong, ZHENG Lin, LI Yueting, CHEN Ying, GONG Zipeng(41)
Neuroprotective effects of <i>Dendrobium nobile</i> Lindl on MPTP-induced PD mice	WANG Mengdi, WEI Shanshan, JIANG Ning, Alberto Carlos Pires Dias, LIU Xinmin, WANG Qiong(48)
Antidepressant effect of Shenwei Ningyu tablets on animal models induced by three drugs	WANG Yaxin, GUO Shanshan, GAO Yingjie, TU Ya, CUI Xiaolan(57)
Effect of <i>Tribulus terrestris</i> and the Epimedium complex on sexual function and sperm viability in male rats	LIANG Zhijian, YAN Jiarong, CHEN Guihuang, ZHANG Jianjun, CHEN Runhong, KUANG Shaosong(62)
Study on the mechanism of shikonin inhibiting osteosarcoma growth by regulating PI3K/AKT pathway	YANG Zhiqiang, CHEN Lu, ZHANG Yaxi, XIA Xianxue(68)
Protective effect of amygdalin against necrotizing enterocolitis in neonatal rats	ZENG Xinhao, XIE Dongke, ZHENG Hao, XU Pei, WANG Xiaoyong(75)
Effect of Tongxinluo on early lesions of calcified aortic valve disease in mice	ZONG Yonghui, LI Xinxin, ZHANG Ning, CHEN Yun, LIU Xincan(82)
Coagulation dysfunction in coronavirus disease 2019 and blood stasis symptom of traditional Chinese medicine	ZHOU Li, QIN Chuan(89)
Innovative research and development of Chinese veterinary drugs and application of experimental animal models	WEI Yuanyuan, ZHANG Yannan, FAN Yimeng, GA Yu, WANG Huiru, HAN Juncheng, HAO Zhihui(97)
Research status and perspective of animal models in research and development traditional Chinese medicine	LI Lei, LIU Jianxun, REN Junguo, FU Jianhua(104)
Progress in experimental lung cancer animal model under the combination of disease and syndrome	TAN Junlan, YI Jian, WANG Feiying, WAN Jiajing, QIN Li, DAI Aiguo(111)
Role of experimental animals in evaluating prevention and treatment of insomnia with Tianwang Buxin Dan	ZHAO Qian, LI Jincan, WANG Xiao, ZHANG Youzhi(120)

Research progress of traditional Chinese medicine on the basis of animal models of chemically-induced inflammatory bowel disease	CAO Yuling, SONG Houpan, ZENG Jianguo, LIAO Duanfang(127)
Introduction of evaluation methods of animal models of traditional Chinese medicine on the basis of literature analysis	...
..... MIAO Mingsan, PENG Mengfan, LIU Sizhe, ZHANG Yuanxin, LIU Siqi, SHI Qi, LUO Maoli(132)	
Animal model research and applications in traditional Chinese medicine	
..... MIAO Mingsan, MA Linna, PENG Mengfan, LIU Fuyu, QU Bingcong, WANG Shuang(141)	
Advances in integrated animal models of atherosclerosis combined with disease and syndrome	
..... QUAN Wenjuan, LIAO Duanfang, TUO Qinhuai(147)	

Issue 2

Establishment of a rat model of uric acid nephropathy	YAN Meixia, HUO Shuai, TIAN Ruimin, XU Peng, LI Chuang, HU Tianxiang, CHEN Dahao, CHEN Xiaoling, MAO Wei(1)
<i>Isodon ternifolius</i> (D. Don) Kudo alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats by downregulating IkB- α phosphorylation	
ZHOU Zhipin, NONG Runan, QIN Le, LIU Daihua, WANG Jingjing, CHEN Yong, WANG Xiaoyuan(10)	
Effect of theca cells on granulosa cells injured by chemotherapy and intervention with serum containing Zuogui pill components	SUN Xiaofeng, HUANG Xinyi, ZENG Guirong, GONG Limin, QIAO Jiang, YANG Songwei, ZHOU Lin(16)
Effect of Yinxing Mihuan oral solution on angiogenesis of rat cardiac microvascular endothelial cells	
..... HAN Xiao, YAO Mingjiang, REN Jianxun, FU Jianhua, REN Junguo, JIN Long, GUO Hao, ZHAO Buchang, WANG Yimin, LIU Jianxun(22)	
Comparison of the modified Hulth model and intra-articular type II collagenase injection as established rabbit models of knee osteoarthritis	
OU Baofang, BIE Yanan, CHEN Qianqing, CHEN Boyu, XU Jiahuan, XIE Shuilin, WU Shaoyu(29)	
Role of the long non-coding RNA TUG1 in the regulation of miR-137 and neural injury in rats with focal cerebral ischemia	CHEN Jun, ZHOU Chizhong, ZHANG Ling, QIAO Mu(38)
Effects of naringenin on microglial activation in oxygen-induced retinopathy based on the miR-223/NLRP3 axis	CHU Ruixue, SUN Xiantao, WANG Hui(46)
Evaluation of anaphylactoid reactions induced by osteopeptide injections	
YANG Qitao, WU Yinnan, WANG Yuxin, MENG Changhong, ZONG Weifeng, LU Yihong, SHI Qingshui(53)	
Preliminary study of an isoproterenol-induced myocardial injury model in rhesus monkeys	LI Yanyan, YANG Fengmei, WANG Junbin, CHEN Lixiong, JIN Weihua, HE Zhanlong, YANG Fei, ZHAO Yuan(60)
Sevoflurane regulates the NRF2/HO-1/HMGB1 pathway and reduces hypoxia-induced inflammatory responses in microglia	WEN Xiangyu, ZHANG Junhong, ZHU Cunliang(66)
Effect of the lncRNA SNHG1 on the proliferation and metastasis of skin squamous cell carcinoma induced by interleukin-6	ZHONG Mi, ZHANG Jiayin, RAO Meirong, ZENG Fen(74)
Microbiological risk control for rhesus monkeys in animal biosafety level 3 laboratories	LIANG Yan, LIU Longding, YANG Mengli, LI Jingmei, GUO Lei, LI Heng, ZHENG Huiwen, LI Jing, SHI Haijing(80)
Research progress on animal models of thyroid disease	
..... XIA Zongxiao, LIU Haipeng, ZHANG Yanjiao, FAN Yuan(87)	

- Research progress on Kruppel like factor 2 and cardiovascular disease HUANG Xinxin, YING Yanping(94)
- Research progress on the ubiquitin ligase TRIM46: a review based on the TRIM family SHENG Hanxuan, ZHANG Lianfeng, ZHANG Li(99)
- Current status of research on mice models of liver fibrosis WANG Juan, YANG Jingjing, ZHOU Renpeng, HU Wei, LU Chao(105)
- Comparison of experimental animal models of biliary atresia HAN Xiaoyan, QIU Jianli(111)
- Advances in the research on immunosenescence that affects cellular immunity of periodontitis YAO Yanzi, HU Huan, WANG Qian, LIU Jianguo, ZHOU Xuedong(116)
- M2 microglia promote oligodendrocyte precursor cell differentiation: an effective therapy for stimulating remyelination in multiple sclerosis LIU Li, LI Qi, DU Xinke, RAN Qingsen, SUN Lidong, YANG Qing, LI Yujie, CHEN Ying, WANG Yajie, WENG Xiaogang, CAI Weiyan, ZHU Xiaoxin(126)
- Progress on mitochondrial injury in skeletal muscle induced by chronic obstructive pulmonary disease and treatment with traditional Chinese medicine ZHAO Gaoyuan, MIAO Yufang, HOU Runsu, LI Kangchen, TIAN Yange(133)
- A brief review on the development of stem cells as therapeutics for chronic kidney disease JIANG Chao, WANG Chao, REN Xiaonan, ZHOU Xiaohui(138)

Issue 3

- Expression of YAP in idiopathic membranous nephropathy and its role in C5b-9-induced podocyte injury SHI Tianli, LUO Zhen, JIAO Shi(1)
- Effect of icariin the apoptosis and inflammation of RAW264.7 cells induced by ox-LDL LI Tengting, XU Dongsheng, LI Qi, WU Di, ZHANG Yang, REN Liqun, LI Xiangjun(9)
- Quercetin pretreatment modulates the autophagy pathway mediated by the AMPK/mTOR signaling pathway and improves liver ischemia-reperfusion injury in rats SHEN Qin Hai, ZHANG Menghui, QIN Zhaomin, LIU Jun(16)
- Pancreatic kininogenase relieves oxidative stress and fibrosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury LU Yinghong, WANG Dan, JING Haiyun, WANG Mengchao, LI Zhihui(23)
- Capsaicin inhibits invasion and migration of colon cancer cells by upregulating MTSS1 expression HUANG Hong, HUANG Die, WANG Ruijie, YU Zhuangming(31)
- Mechanism of compound Gastrodia honey cyclic glycopeptide tablets in T lymphocyte subsets, early kidney damage and AT1R/Smad3 proteins in essential hypertensive rats FENG Jing, ZHANG Xianchun(38)
- Role and mechanism of ORMDL3 in neutrophil asthma through endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy WANG Longmei, SUN Yongxian, ZHANG Xinjuan, CHEN Xiaoyan(46)
- Effect of Bushen Yiqi Huayu granules on blood vessel formation in ovariectomized rats with osteoporosis and the mechanism WANG Jun, WU Binbin, WANG Xiaodong, ZHAO Xuan, ZHANG Xin, WANG Ruolin, XIU Xiaoguang(54)
- Effect of captopril on expression of eNOS and iNOS in spontaneously hypertensive rats JIANG Jiaye, LI Yuan, KE Yan(62)
- Expression and significance of HIF-1 α , RhoA and SOX9 in rats with adenine-induced chronic kidney disease MAO Haixia, KANG Ting, WU Weihua, ZHU Tingting, ZHANG Liling, OU Santao(70)
- 1,25(OH) $_2$ D $_3$ protects thyroid functions in experimental autoimmune thyroiditis rats by inhibiting the TLR2/NF- κ B

signaling pathway	ZHAO Hui, CHEN Wenwen, ZHU Liping, GE Hong(78)
Flipper classroom mode taking and teaching of animal ethics	ZHANG Qian, XIAO Xinhua(87)
Research progress on the regulation of non-coding RNA in glucose metabolism re-editing in oral squamous cell carcinoma	YANG Yiyan, GAO Jiping, XU Guoqiang, WANG Xiaotang, SONG Guohua(91)
Roles of leukotriene in pathogenesis and treatment of atherosclerosis	LYU Sha, YE Zixin, CHEN Huan, YANG Shulong, HONG Fenfang(98)
Research progress on animal models of exogenously induced primary biliary cholangitis	CHEN Haiyang, ZHANG Wei(105)
Research progress on animal models of social defeat	WANG Jingru, ZENG Guirong, CHANG Lulu, JIANG Ning, ZHU Qiang, LIU Dingding, LIN Xinwen(112)
Research progress on ion channels and their functions in neutrophils	LI Xue, FAN Junfen, WANG Yuqing, LUO Yumin, ZHAO Haiping(117)
The role of MMP-2 in tumor invasion and metastasis	LIU Sensen, MAO Yuning, ZHANG Caiqin, SHI Changhong(123)
Establishment of blood-brain barrier damage model for cerebral ischemic stroke and the quantitative detection methods and progress of its dysfunction	YANG Jingsong, LYU Liang, SONG Wei, LIU Xingli(129)
Research progress of telomere-binding protein and telomerase in different species	SHI Guiying, HUANG Yiyang, LEI Xuepei, LI Xinyue, BAI Lin(136)
Research progress on animal models of paroxysmal narcolepsy	WANG Xiaoran, ZHENG Pan(143)

Issue 4

Effect of Siwu mixture on primary dysmenorrhea model mice induced by oxytocin	LIU Zixin, JIA Feifan, MENG Hongxu, HAN Xiao, LI Lingmei, YOU Yue, WANG Aoao, WANG Ziyang, YANG Bin, LI Lei, FU Jianhua, LIU Jianxun(1)
Overexpression of LAMP2A in substantia nigra improves motor function in rhesus monkey models of Parkinson's disease	ZHU Xuchao, DOU Changsong, ZHANG Yu, QIN Chuan, ZHANG Ling(7)
Construction and evaluation of a doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity mouse model	JIN Cuiliu, CHAI Yu, LING Wang, WU Meiping, JIN Suan(14)
The effects of fentanyl combined with propofol on heart ischemia-reperfusion injury in rats via autophagy	YAN Lin, LI Yaping, WANG Dong, JIA Wenqin, YAN Wenjun(22)
Therapeutic effect of flavonoids from <i>Desmodium triflorum</i> on an ulcerative colitis mouse model and the influence on intestinal flora	LI Ting, ZOU Qiuping, MAO Zewei, WU Shili, HE Hongping, LI Yanping(29)
Establishment of Alzheimer's disease with intermingled phlegm and blood stasis in a transgenic mice model	TAN Aihua, RAN Simiao, SHI Heyuan, YANG Shuo(39)
The effect and mechanism of differentiation of HepG2 cells induced by mouse embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation	XIAO Zhigang, ZHENG Li, WANG Ziyang, LIU Kun, WANG Yu, QI Jinsheng, LI Yanning(47)
Effect of HNRNPK downregulation mediated by lentivirus infection on HepG2 cell proliferation and migration	LI Mengyuan, ZHANG Wenlong, YANG Xingjiu, ZHU Ziwei, ZHANG Guoxin, WEI Yumin, GAO Ran(54)
Establishment and evaluation of a cardiac hypertrophy rat model induced by ISO administered through a	

subcutaneously implanted osmotic pump	
... JIANG Xiaoyu, LIU Mengdi, MA Jiaxin, DONG Wei, ZHANG Xu, ZHANG Lianfeng, LYU Dan(60)	
Effects of atorvastatin on myelin repair and the RhoA/Rock1 pathway in mice with autoimmune encephalomyelitis	ZHANG Qinli, WANG Yufen, LIU Hong, LIU Bowen(68)
The protective effect of naringenin on H ₂ O ₂ -induced oxidative damage of human retinal pigment epithelial cells via the miR-34a/SIRT1 axis	
..... WEI Kangkang, DONG Weihua, TIE Hongyan, HE Zhangbiao, ZHAO Lin(78)	
Honokiol inhibits immune imbalance and provides lung protection in mice with chronic obstructive pulmonary disease through the Notch signaling pathway	LI Bin, GAN Dekun, WANG Lulu(86)
Comparison of the effects among ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg1+Rb1 on scopolamine-induced cognitive impairment in mice	WEI Shanshan, WANG Mengdi, JIANG Ning, Ayaz Ahmed, LIU Xinmin, WANG Qiong(94)
Three-dimensional modeling of pulmonary and 3D printing of vessels and bronchus in Bama minipigs	
..... ZHANG Rundong, ZHAO Linna, YAO Hua(102)	
Planning and design principles and construction requirements of small animal neurobehavior experiment platform	
WEI Sheng, GENG Xiwen, XU Kaiyong, ZHANG Hao, ZHAO Feng, HU Minghui, AI Zhifu, HE Wenbin, QIN Dongdong, WANG Xiaoliang, GE Jiabing, WANG Bin, XU Zixiang, SU Xixi, LI Zifa, WANG Kezhou(107)	
Investigation and analysis on the training system of laboratory animal employees	
..... DI Ran, LIU Peilin, YANG Hailong, SHI Yingjie(116)	
Research progress of the JARID1D demethylase in the invasion and metastasis of prostate cancer	
..... XIE Qinghua, ZHANG Yongbin, SHI Changhong(120)	
Trace amine-associated receptor 1 is a new regulating target of monoamine neurons in the central nervous system	CAI Xiaowen, LAI Huiqin, LIANG Kaiyong, HUANG Yong(126)
Research progress on the role of pyroptosis in the microenvironment of liver injury	
..... ZHANG Zhao, GE Naijia, MA Xinyue, DIAO Jiawen, QUAN Jishu(133)	
Research progress on the mechanism and animal models of keratitis caused by pathogen infection	
..... CHEN Liu, QIU Min, DAI Jiejie(137)	
The role of the Nrf2-ARE pathway in Parkinson's disease	
LIU Jihong, SHAO Simai, ZHAO Zhenrong, SHI Ming, HAO Li, ZHANG Zijuan, ZHANG Zhenqiang(145)	

Issue 5

PDCD2 promotes apoptosis of T cells and HIV latent-infected T cells induced by TRAIL	
..... YU Wenhui, YANG Chenbo, CONG Zhe, XUE Jing(1)	
Establishment and phenotypic analysis of <i>Sdpr</i> -knockout mice and transgenic mice	LI Xinyue, SHI Guiying, LEI Xuepei, HUANG Yiyang, LI Keya, HOU Liya, WANG Kaiyu, TANG Jiaming, BAI Lin(7)
Degeneration of chondrocytes in cartilage endplate due to estrogen deficiency based on rat OVX model	
..... SUN Shang, ZOU Da, ZHAO Zhenda, JIANG Ai, YANG Zihuan, CHEN Longting, LI Weishi, SONG Chunli, LENG Huijie(16)	
Reactivation effect of NAM on latent reservoir in CD4 ⁺ T cells from SIV/SHIV-infected monkeys	
..... DANG Cui, LU Jiahua, WEI Qiang, XUE Jing, CONG Zhe(23)	
The effect of <i>Apbb1</i> gene on cardiomyocyte proliferation	
..... LIU Jun, SUN Jia, LIU Weijing, HAO Yanyan, LIAN Hong, WANG Yuyao(29)	

- Effect of gambogic acid on the growth of prostate cancer cells with different phenotypes
 ZHOU Ligui, XIE Qinghua, GONG Miaomiao, ZHANG Yongbin, SHI Changhong(39)
- Use of xi-xian-tong-shuan capsules for alleviating vascular cognitive impairment in rats with chronic cerebral hypoperfusion
 YAN Feng, TIAN Yue, HUANG Yuyou, ZHONG Liyuan, LUO Yumin(47)
- Effect of endoplasmic reticulum stress-mitochondrial autophagy pathway on pulmonary hypertension in rats
 WU Yun, YAN Qianzhi, WANG Jie, ZHANG Minfang, WANG Rui, WANG Shichao(53)
- Effect of naringenin on insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting overexpression of miR-29b
 WANG Yuan, ZENG Kaihong, DENG Bo, YU Xuemei, ZHOU Xue, SONG Yi, HUANG Lujiao(60)
- Mechanism by which oridonin regulates miR-200c/EZH2 axis to inhibit epithelial-mesenchymal transition of melanoma cells
 ZHAO Bianxia, REN Hong, JIN Jialu, CAO Jie(67)
- Study on the safety and effectiveness of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of acute lung injury in mice
 CHEN Qianqing, BIE Yanan, CHEN Boyu, XU Jiahuan, OU Baofang, XIE Shuilin, WU Shaoyu(77)
- Exploration of the conditions for establishing proteasome inhibitor I-induced mouse model of Parkinson's disease
 HU Yuying, WEI Xiaoyun, SONG Xi, ZHONG Jie, LIU Yonghui, LUO Rongqing(85)
- miR-4539 inhibits the growth of glioma cells by targeting Foxp1
 WANG Hongxin, FU Su, CHUN Xueli, ZHANG Fan(91)
- Construction and management experience of laboratory animal barrier facilities: Case study of specific pathogen-free barrier facility for laboratory animals in the School of Pharmaceutical Sciences of Guangzhou University of Chinese Medicine
 CHEN Qiuhe, LIU Xiaoling(98)
- Expression and regulatory mechanisms of HAGLR opposite-strand long non-coding RNA in tumors
 LIU Lang, WANG Haicun, LIU Guanglin, GAO Xin, ZHAO Yuqiao, JIANG Xingming(102)
- Research and progress of rheumatoid arthritis experimental models
 LU Dandan, HAN Xiaoyan, ZHANG Han, LI Lin, FANG Shiming(107)
- Effects of air pollution on male fertility and associated mechanisms
 HU Jianying, DI Juan, CAO Yihui, ZHANG Ruixian(115)
- Preliminary evaluation of animal models of vascular and post-stroke cognitive impairments
 NIU Yuqing, QIN Hewei, JI Lingshan, LI Weifeng, GUO Ning, SONG Xuemei(121)
- Mechanism and metabonomics of atrial fibrillation
 SHI Baoyan, SUN Hongsheng, LI Yue, LI Yan, ZHANG Xueshun(128)
- Research progress of miRNA in ischemic cerebrovascular disease
 LIANG Zijun, ZHANG Xueer, HUANG Jian, ZHANG Linjie, AN Hongwei(132)
- Research progress of non-infarct myocardial dysfunction after acute myocardial infarction
 WU Han, YU Bo, SUN Huan(138)
- Advances in research on lncRNAs involved in the regulation of programmed cell death
 WANG Beibei, ZHANG Wenbo, JIANG Pengcheng(147)

Issue 6

- Protective effect of hesperidin against oxidative stress via the Nrf2/HO-1 signaling pathway in an *in vitro* model of non-alcoholic fatty liver ... LUO Juan, LOU Didong, XIAO Qiaoqiao, LI Xiaojie, LI Yi, ZHOU Yixia(1)

Establishment and evaluation of a murine burn wound sepsis model	
..... FAN Shijun, WU Dan, XIA Lin, WEI Yan, CHEN Qian, PENG Xi(7)	
Effects of aqueous extract of asparagus on the proliferation, apoptosis and migration of colon cancer HCT116 cell	
..... ZHAO Jianing, LIANG Huiling, YANG Xu, LI Yanju, WANG Feiqing, TAO Yixi, WANG Kun, YAN Xuemei, LIU Yang(14)	
Screening of differential metabolites related to elevated blood pressure according to metabolomics technology	
..... LI Shumin, JIANG Haiqiang, QI Dongmei, YANG Wenqing(23)	
RNA-sequencing analysis of inflammatory pain hypersensitivity and immune response induced by complete Freund's adjuvant intramuscular injection	
..... SHI Jingtao, ZHANG Xiaoning, CAO Wanying, HE Wei, LIU Yihan, WANG Rui, SU Yangshuai, WAN Hongye, QU Zhengyang, JING Xianghong, WANG Xiaoyu(31)	
Comparative study on imiquimod-induced psoriasis models in mice with different immune states	
..... ZHAO Ya, WU Yayun, LIU Lijuan, ZHAO Ruizhi(41)	
Isolation and culture of Leydig cells from tree shrews and studies on the characteristics of Zika virus infection ...	
..... DENG Wei, JIN Liangzi, KUI Xiuying, WANG Wenguang, LI Na, TONG Pinfen, DAI Jiejie(48)	
Study on the mechanism by which MMP-9 and TIMP-1 levels are involved in myocardial injury in premature infants with FIRS	
..... YAN Yiwei, JIANG Lian, LI Mei, ZHANG Wenhao, ZHANG Wenting, WANG Xiaoling, ZHANG Yuansu, ZHANG Huifen(55)	
Establishment and evaluation of a mouse model of COVID-19 as "cold-dampness epidemic"	
..... ZHU Shumin, NING Weimin, DONG Mingguo, OU Jianzhao, HUANG Haiyang, HOU Shaozhen, GAO Jie(62)	
Effects of arginine vasopressin 1b receptor knockout on anxiety behavior and social behavior in female rats	
..... ZHAO Yinji, FAN Pu(69)	
Comparison of abortion model data between two CBA mouse sub-strains	
..... WANG Lei, WU Xuying, GAO Yulong, ZHANG Wenming, LI Bin, LIU Yunbo(76)	
Evaluation of an oral and nasal aerosol exposure system for non-human primates	
..... LI Qingni, CHEN Yunfeng, LIU Yuanlang, TANG Ding, HUA Wanlu, ZHANG Ruian, LU Jia, LI Xinguo(80)	
Research progress on the function of non-muscle myosin IIA in distinct species	
..... LI Guoan, ZHONG Wangtao, ZHANG Jingjing(87)	
Research progress on the mechanism of sarcolemma damage and repair treatment of Duchenne muscular dystrophy	
..... ZHAO Zhipeng, LI Shangang(93)	
Evaluation index for non-human primate SARS-CoV-2 infection models	
..... TANG Ding, ZHANG Ruian, LU Jia, LI Xinguo(100)	
Research progress on anti-coronavirus drugs	
..... QIN Shengle, WANG Yutao, CAI Xuejun, WANG Xinhua, YANG Zifeng(105)	
Research progress on the effect of dietary emulsifiers on colorectal cancer	
..... WANG Chenxi, WANG Xiuhong(111)	
Mitochondrial dynamin-related protein 1 and Parkinson's disease	
..... ZHAO Zhenrong, SHI Ming, LIU Jihong, SHAO Simai, YOU Yanwen, ZHANG Zijuan, HAO Li, ZHANG Zhenqiang(117)	
Research progress on the SARS-CoV-2 Omicron mutant	
..... LIU Hong, LING Zixu, ZHANG Jing, LI Siyu, BAI Tianke, LI Jian(122)	
Can ivermectin be used in the prevention and treatment of COVID-19? — A review study	
..... GE Muzi, WU Yijun(128)	
Research progress on the development and application of animal models for Monkeypox ...	
..... LIU Jiangning(137)	

- Discussion on the decision and evaluation requirements of animal experiment of medical laser equipment
 LIU Bodong, SHEN Gao, QIU Hong, CHEN Minli(148)

Issue 7

- Protective role of Quercetin on Pink1/Parkin-dependent mitophagy against doxorubicin-induced cardiotoxicity ...
 GUO Hong, WANG Shaowei, XIE Wenjing, ZHOU Jun, JIANG Shuyun, LIU Jincheng, YANG Jian, JIN Ping(1)
- Application analysis of a chronic obstructive pulmonary disease model by data mining
 LI Lei, WU Dongliang, LI Shangdian, YAN Yue, SHI Qi, LI Chunlei, LI Youlin(10)
- Forsythia suspensa* extract inhibits LPS-induced inflammation by regulating macrophage apoptosis and polarization
 LUO Fulong, LI Wenju, XU Xiaohui, ZHONG Wu, FAN Bei, GUAN Dongyan, WANG Fengzhong, WANG Qiong(18)
- Effect of Zhenwu decoction on cardiomyocyte apoptosis and the PI3K-AKT pathway in rats with congestive heart failure
 WANG Xing, CHEN Ziqi, LI Lin, LIAO Jinhua, WANG Xiaolin, LIU Jiangyuan, LIAO Donghua(27)
- PD98059 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of human bronchial epithelial cells in asthma
 WU Wenqi, ZHUANG Xuhui, WANG Shuchen, LI Jingjing, WANG Xia, WANG Yong, MA Wuhua(34)
- Comparison of the effects of different exercise modes on MSTN and IGF1 of rat skeletal muscle
 LIU Xiujuan, SHENG Lei, ZHANG Nianyun, WANG Ziyi, SHEN Xuechun(41)
- Static inhalation toxicity of plastic racetrack surface materials in rats LI Peining, LIU Xiangmei,
 HUANG Jingyi, LI Guangxian, LIU Ying, SUN Xia, HE Shufeng, LIANG Junjie, LIU Donghong(49)
- High phosphorus promotes apoptosis of vascular smooth muscle cells by inhibiting miR-30b
 LIU Lan, ZHANG Dongxue, ZHANG Shenglei, BAI Yaling(58)
- Methylated regulation and biological function of miR-219a-5p in gastric cancer
 LUO Min, ZHANG Fan, WANG Limin, LI Hongxia, QING Keqin(66)
- Neuroprotective effect of soyasaponin Bb pretreatment in cerebral ischemia/reperfusion model rats
 GAO Qian, WANG Jianyu, MENG Weijian, LI Jing, CUI Yongjian, WEI Yan(74)
- Effect of resveratrol on premature ovarian failure in mice and its possible mechanism
 XIU Yinling, SUN Kaixuan, YU Yuexin(81)
- Establishment of a rat model of acute pulmonary edema in cold environment at high altitude
 YANG Xinyue, LI Jiajia, DONG Xiang, SHI Wenhui, LI Jianying, WEI Xuemei, LIU Jiangwei(87)
- Effects of quercetin on pulmonary fibrosis in rats and its related mechanism
 XUE Lan, MAO Chunying, WANG Hui, WANG Shoufu, ZHANG Zhenghui, GUO Xinqing(94)
- Generation of a *Plcz1* gene knockout mouse by using the CRISPR/Cas9 system
 CAO Binbin, CAI Yao, WANG Baozhu, RAO Yu, WANG Chao, GOU Kemian, WANG Tao(101)
- Research progress of Yanghe decoction for the treatment of malignant tumors
 HAN Yicun, WU Yingshuo, SHANG Yiwan, CHEN Yulong(109)
- Analysis of chronic pharyngitis animal models by clinical symptoms in Chinese and Western medicine
 SHE Linjing, XIE Yixuan, LIU Qianqian, MIAO Mingsan, BAI Ming(118)
- Research progress on the mechanism of *PTEN* in the repair of peripheral nerve injury
 CHU Yunfeng, YU Hongyan, YANG Qi, PENG Yanbin, CHEN Zhong, YU Fei(124)
- Role of long noncoding RNAs in gemcitabine resistance of pancreatic cancer
 GUO Chenbo, MAO Yuning, ZHANG Yanying, WANG Yongfeng, SHI Changhong(131)

- Research progress on the mechanism of primary cilia and related signaling pathways in mouse palatal development LIAN Shubo, CHEN Juerong, HE Wei(137)
- New progress in establishment of an ALPPS animal model and its research CHEN Xue, CHEN Geng(142)
- Oxidative injury mechanism of ischemia-reperfusion and its effect on various organ functions LI Xin, WANG Zhining, FU Lu, ZHANG Linbo, XIAO Shengyuan, ZHANG Wenhui (149)

Issue 8

- Effects of Shenzhiling oral liquid on the interaction between neuronal nitric oxide synthase and carboxy-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal synapses in a mouse model of sporadic Alzheimer's disease TIAN Meijing, GAO Chenyan, ZHENG Mingcui, HE Yannan, WANG Pengwen(1)
- Effects of Jisheng Shenqi decoction on homing of bone marrow mesenchymal stem cells based on the SDF-1/CXCR4 axis in rats with liver cirrhosis ZHOU Xiaoling, WANG Yueming, WU Teng, CHEN Qiao, YU Jingfang, LI Can, LI Zepeng, LU Shiyin, ZHANG Yue, QIN Fengchuan, SHEN Xinhui(11)
- Effect of ShenQiWan in alleviating renal injury in diabetic ZDF rats LIU Yumeng, LI Shuyu, FENG Jing, CHE Yue, ZHANG Xiaofeng, LIU Jiapeng, WANG Qian(19)
- Influence of long-term topical or systemic glucocorticoid administration on the metabolism and organs of rats ... CHEN Lihong, PAN Meng, ZHENG Jie, XU Muchi(27)
- Effect of yulangsan chalcone on the nuclear factor- κ B signaling pathway in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury LIANG Xingmei, LIU Xihua, HUANG Jianchun, CHEN Chunxia, CHEN Zhaoni, HUANG Renbin(35)
- Effect of dexmedetomidine combined with sufentanil on pulmonary ischemia-reperfusion injury in rats LI Yaping, YAN Lin, DING Peiyan, ZANG Honggang, YAN Wenjun(42)
- Identification and gene localization of a microcephaly and microcephaly and suspected epilepsy mutant *mise* in zebrafish HE Jialing, WANG Tianqi, BAO Guo, ZHANG Changyong, LI Nan, SUN Deming(48)
- Establishment and application of a rapid paraffin sectioning method for 3D cellular spheroids FENG Shanshan, JIN Yi, LOU Dongxiao, WEI Mengchao, XIE Yongjiao, WANG Ruxian, LI Jing(57)
- Phenotypic changes of macrophages in aortic dissection ZHANG Likui, YANG Lingbo, WANG Xuening(62)
- Establishment of *FAH/GSTZ1* dual-gene knockout hepatocyte cell lines LIU Yan, GU Peng, YE Xing, LIANG Chunjin, GUAN Yajin, ZHANG Yinghui, ZOU Qingjian, GU Weiwang(71)
- Exploring the mechanism of *Lonicerae japonicae flos* water extract in the treatment of sepsis LI Wenju, LUO Fulong, WANG Fengzhong, GUAN Dongyan, Fan Bei, Alberto Carlos Pires Dias, WANG Qiong, ZHONG Wu(79)
- The effect of recombinant BPI on pneumoniae in mice infected with *Mycoplasma pneumoniae* and the TLR4/NF- κ B signaling pathway HAN Hong, CHEN Xuxia, LU Jianli, HAN Yanjun(90)
- Research progress on the mechanism of autophagy and relevant signaling pathways in spinal cord injury LI Zhichao, LI Nianhu, XUE Haipeng, CHEN Renchang, GAO Shang(98)
- Research progress of MNNG solution combined with multi-factor induction of gastric precancerous lesion in rats CHEN Xinyi, SHU Jin(104)
- Research progress on TIM-3 in tumor immunity and immunotherapy XU Kang, BAI Li(109)

Research progress of new diagnostic technology and immunotherapy for type I hypersensitivity	LIU Yi, SHA Ailong(116)
Research progress of non-human primate model of ischemic stroke	SUN Yuhang, GUAN Bowen, WEI Qiang, MENG Aimin(123)
Research progress of diabetic cardiomyopathy in <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> models	LIU Qian, YAO Yufeng, CAI Lin, ZHANG Donghui(131)
Research progress in the study of ferroptosis in paraquat poisoning	ZHANG Fan, CHEN Xingpeng, ZHAO Min(137)
Research progress on animal models and evaluation methods of Alzheimer's disease	XIE Xiaolu, CHEN Xiu, KOU Liqiu, LI Yaling(145)

Issue 9

Role of miR-488-3p targeting regulation of RAP1A in homocysteine-mediated hepatocyte autophagy	GAO Yuan, JIE Yuzhen, MA Tianlong, WANG Lexin, YANG Huixia, ZHOU Yujin, JIAO Yun, LU Guanjin, MA Shengchao(1)
Effect of dapagliflozin on atherosclerosis and the mechanism related to sodium hydrogen exchanger 1	ZHANG Shuping, MO Xiangang, ZHANG Shiyue, CHEN Juhai, WANG Lan, YANG Hui, LIU Danan(10)
Protection of ischemic myocardium in mice by buccal administration of Xiaoshixionghuang San	HUANG Shanmei, LI Chang, MA Zishan, GUO Yuhong, ZHAO Yangyang, LIU Yuan, YIN Bangqiao, LIU Ying, TANG Yaoping(19)
Establishment and validation of a pneumonia-enteritis model in mice infected with influenza H1N1 virus	DU Baoxiang, YU Qinhui, SUN Qihui, WANG Liqing, YANG Yong, RONG Rong(27)
Effect of hypoxia-inducible factor 1 α on microglia M1 polarization and its mechanism	ZHANG Xueer, AN Hongwei(34)
Protective effect of miR-214 on neuronal injury in propofol-anesthetized thoracotomy rats	YANG Jimei, LU Wenjiang, ZHOU Jiaojie(39)
Quercetin protects against free fatty acid-induced hepatocyte steatosis by an estrogen-like effect involving PGC-1 α	LI Lihong, LI Xin, LI Shuo, YANG Yanping, GUO Jianhong(47)
Protective effect of ginkgo biloba extract on the brain in a cerebral ischemia-reperfusion injury rat model	HU Zhe, ZHAO Jun, SONG Wei, YAN Xusheng, YANG Zhanjun, JIA Jianxin(55)
Protective effect and possible mechanism of mogroside V in rats with meconium aspiration syndrome	CAO Yinli, SUN Yazhou, CUI Qingyang, HE Xiaojing, LI Zhenzhen(62)
miR-30 inhibits EMT of gallbladder cancer cells via Zeb2-related pathways	TANG Jintian, TANG Runjuan(69)
Shionone improves immune responses and Toll-like receptor expression in ovalbumin-induced asthmatic rats	AI Kui, LI Zhen(76)
Celecoxib regulates miR-129-5p/HMGB1 to inhibit TNF- α -induced rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cell inflammatory cytokine secretion	SHI Ping, TAO Ye, WANG Chenjing, LI Xin, LIU Yanping, CAO Yu(82)
Melatonin regulates the NF- κ B signaling pathway to regulate Th1/Th2 immune balance in mice with gastric cancer and its mechanism	FU Jia, CAO Yubo, LIU Sa(90)

Relationship and Traditional Chinese Medicine intervention of pyroptosis and cardiovascular diseases	
..... YOU Yue, LI Lingmei, LI Lei, HAN Xiao, MENG Hongxu, FU Jianhua, LIU Jianxun(97)	
Progress on depressive animal models and their application in Traditional Chinese Medicine	
..... LIU Zhiheng, YUAN Xiahong, LIU Lin(109)	
Research progress of exosomes in systemic sclerosis	
..... DING Tiantian, LYU Fengfeng, ZHAO Qiaoying, SUN Xiaolin, WANG Yongfu(115)	
Role of TSPAN7 in cancer, neurological diseases, HIV and type I diabetes	
..... PANG Shuo, LUO Zhuohui, ZHANG Lianfeng(122)	
Research progress on the relationship between miRNA-125 family and autoimmune diseases	
..... WU Zhihui, SUN Xiaolin, WANG Hui(128)	
Analysis of animal models of breast cancer based on clinical symptoms of Traditional Chinese and Western Medicine	
..... WANG Xue, ZHANG Yuanxin, TIAN Shuo, PENG Mengfan, WU Xiangxiang, MIAO Mingsan(137)	
Several problems in clinical transformation of 4T1 cell tumorigenic breast cancer mouse model	
..... LIU Zixin, NIU Dongqin, WANG Dong(145)	

Issue 10

Comparison of the characteristics of Minor and classic CCI models	
..... WANG Hourong, LIU Zhifeng, YU Tianyuan, ZHANG Yingqi, JIAO Yi, LIU Di, XU Yajing, GUAN Qian(1)	
Comparative study of tongue features between model rats and clinical patients with Qi deficiency and blood stasis syndrome of coronary heart disease	
..... WANG Jinxi, LEI Shihui, LI Wei, YANG Hui, YANG Yi, LIU Kan, LIN Xiaoyuan, HU Guoheng, GUO Chun, CHEN Ya(8)	
Mechanism of the active ingredients in Huanglian Jiedu decoction in protecting against brain nerve cell damage in Parkinson's disease	
..... ZHANG Zhongwen, CHEN Guohua, HUANG Luqi, MEI Junhua, SHAO Wei, MEI Gui(17)	
A rabbit model of acute pulmonary embolism using central venous catheter to monitor pulmonary artery pressure	
..... LONG Jiaqi, ZHAO Wenli, PENG Faquan, WU Bei, LI Yuebing(24)	
Establishment of a rat model of congenital abnormalities of the kidney and urinary tract in offspring due to gestational diabetes mellitus	
..... OUYANG Chenxin, WANG Cheng, ZHU Ruizhang, LIAO Junzuo, JING Peng, HE Wenfei, ZHAO Dan(32)	
Effect of dexmedetomidine on intestinal ischemia-reperfusion injury based on miR-146a/Sirt6 signaling-mediated autophagy	
..... ZHOU Yu, JIA Jing, WANG Lu, ZHOU Min(40)	
Overexpression of miR-202-5p attenuates nerve damage in Alzheimer's disease by inhibiting PCSK9	
..... XU Peipei, ZHAO Shuhua, WANG Jiangbo, YAO Xianli, BAI Jin(49)	
Regulation of RhoA ubiquitination by TNFAIP1 in melanoma progression	
..... XIAO Xiao, FENG Hao, TANG Hua, LI Ke, LI Lan(59)	
Effects of a high sucrose-high fat diet on alterations of growth and metabolism in BALB/c and C57BL/6J mice	
..... DAI Lijun, HUANG Yueling, YE Bingfei, KUANG Guixing, HOU Min, AN Shengli(69)	
Therapeutic effect and mechanisms of Kaixin San in AD rats induced by bilateral A β ₁₋₄₂ injection into the CA1 area of the hippocampus	
..... PEI Hailuan, MA Beibei, WANG Tingting, LI Ruiji, LIU Jinhui, YU Shangyue, LOU Tianyu, ZUO Zeping, TIAN Shiqiu, LI Yilin, WANG Chenxiao, TIAN Yingying, TIAN Jiao, ZHAO Xinyue, LIU Chuang, GUO Yudong, WANG Jing, WANG Zhibin(78)	

- Effect of matrine on endothelial injury and the JAK2/STAT3/SOSC1 signaling pathway in rats with pregnancy-induced hypertension *LI Ling, WU Jianli, LI Shan, QU Guangdi*(91)
- Induction of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma cells by *p*-coumaric acid *HOU Zhufa, ZHAO Bingjie, CHE Hong, YI Wenjing, LIU Peijia, LIU Songshan*(98)
- Comparative analysis of animal models of Henoch-Schönlein purpura and discussion on modeling ideas *DUAN Fengyang, XU Shanshan, DING Ying, GUO Ting, SONG Chundong, ZHANG Xia*(104)
- Mechanisms of chemicals in establishing animal models of liver injury *WANG Yuxin, WANG Qian, TIAN Ying*(109)
- Research progress on animal models of cardio-oncology *ZHANG Yu, MENG Tingting, TIAN Peng, ZHENG Yan, SU Guohai*(115)
- Analysis of animal models of viral pneumonia based on clinical syndrome characteristics of traditional Chinese and Western medicines *DI Peiyan, ZHANG Shuangli, KANG Le, MIAO Mingsan*(123)
- Research progress on the regulatory mechanism of intestinal flora in the occurrence of depression *CHEN Wenlu, YAN Xiaoru, GAO Jiping, SONG Guohua*(130)
- Drug treatment against coronavirus disease 2019 *CHAI Huafeng, WANG Ke, SONG Shuliang*(136)
- Research progress of disease-syndrome combination models of psoriasis *ZHAO Ning, DI Tingting, QI Cong, WANG Yazhuo, LI Ping*(142)
- Research progress on molecular biology of gastroesophageal reflux disease *DONG Mingming, CHAI Xiukun, LIU Xuechen, HE Yun, LI Aidi, JIANG Shulin*(148)

Issue 11

- Effects of lncRNA FAM83A-AS1 in regulating the expression of FAM83A and proliferation, invasion and migration by breast cancer cells *ZHANG Xiuqing, LIU Juan, LIU Bin, LIU Ping*(1)
- Study on the growth and metastasis characteristics of Lewis lung cancer derived from lung metastases in C57BL/6 mice *ZHANG Na, LIU Xuefang, FENG Yanyan, GUO Fengyue, FENG Suxiang*(12)
- Cannabidiol attenuates methamphetamine-induced changes in monoamine neurotransmitters in rats *SHEN Baoyu, REN Yanming, YANG Genmeng, YU Hao, DONG Wenjuan, HONG Shijun, ZHANG Ruilin*(18)
- Cell and animal studies on the anti-colon cancer effects of five species of *Ferula* from Xinjiang *ZHANG Bosheng, GUO Pingping, YE Chenyu, ZHANG Haiying*(26)
- Effect of microRNA-26a-overexpressed rat epidermal-stem-cell-derived exosomes on wound healing in rats with deep second-degree burns *WANG Xianzhen, LI Yi, WU Xiaowei, CUI Qiang*(34)
- Protective effect and mechanism of resveratrol on hypoxic brain injury in mice *WANG Xiaohong, SUN Kai, PIAO Li, XU Zhaoning, YU Xiuli, LIN Jianan, ZHOU Li, XIA Meihui*(43)
- Protective effect and mechanism of TGF- β /samds mediated by antler polyskin on post-infarction myocardial ischemic injury in rats *ZHOU Gaofeng, XIAO Jing, ZHOU Jia, LIU Junxiu, LYU Guangfu, WANG Yuchen, LIN He, HUANG Xiaowei*(49)
- miR-218-5p inhibits proliferation, migration and invasion by lung adenocarcinoma cells by targeting EGLN3 *WANG Jiangbo, LIANG Hao, LU Yunping*(57)
- Metabolomic study on the mechanism of anti-hepatic fibrosis of glycyrrhiza uralensis-salvia miltorrhiza prescription *HOU Yujiao, ZHANG Jie, ZHAO Chaoyang, XU Tianjiao, LI Meiqian, HONG Bo, LI Wenjing*(68)

Effects of CD44 gene knockout on behavioral abilities in mice	
<i>ZHANG Rui, ZHANG Jingdan, SHU Yao, XING Xiaowen, WANG Cui, LIU Zhiqiang, ZHANG Jianning</i> (75)	
Lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein: potential therapeutic targets in sepsis	<i>YANG Ze, WANG Kezhou, YU Yang</i> (86)
Research progress on the mechanism of microRNA-regulation of intestinal barrier	
..... <i>HOU Yujun, WANG Kai, CHEN Ying, WANG Lu, JIANG Huiling, LI Ying, ZHOU Siyuan</i> (95)	
Research progress on the correlation between obstructive sleep apnea syndrome and inflammation	
..... <i>ZHAO Sha, LEI Xuan, XIONG Jiamin, YANG Shulong, HONG Fenfang</i> (101)	
Analysis of the framework of new principles of laboratory animal ethics and the direction of relevant legislative development in China	<i>SU Da, GAO Lihong</i> (107)
Research progress in acute lung injury models of sepsis	<i>LIU Chunhui, LIANG Qun</i> (113)
Dual regulation mechanism of LncRNA in esophageal cancer and its clinical value	
..... <i>PENG Mengfan, LI Ming, MIAO Jinxin, TIAN Shuo, MIAO Mingsan</i> (121)	
Research progress on the establishment of animal models of venous malformations ...	<i>LI Yi, LI Yongsheng</i> (128)
Research progress in application of artificial intelligence in animal experimental data	
..... <i>WANG Xing, ZHAO Jingyi, ZHANG Yu, SHEN Luyan</i> (135)	
Research progress on subgenome of beta-coronavirus	<i>ZHANG Yaqing, QI Feifei, BAO Linlin</i> (142)

Issue 12

Study on songchi ointment combined with exercise rehabilitation on ROM expression and the inflammatory response in articular fibrosis of articular contracture rats	<i>MIAO Tianyu, PALIDA Maimaiti, NUERBIYA Keqike, WANG Ningning, LI Jingjing, SHI Lingyun, XIAREPA Abudoula, ASIGULI Tuersun</i> (1)
Rapamycin alleviates HT22 cell injury after oxygen and glucose deprivation/reoxygenation by inhibiting pyrolysis	<i>ZHANG Yi, ZHANG Xuening, ZHANG Ziwei, ZHOU Xiaohong, GAO Weijuan</i> (9)
Role of proteoglycan form of dentin matrix protein 1 in jaw defects	<i>LIU Yang, LI Jiankui, SHA Weijun, CUI Liran, WANG Hui, XU Hao, ZHANG Huaisheng, SONG Bo, XUE Hui</i> (16)
Comparative study of pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease mouse models induced by different stimuli	<i>CUI Lili, MEI Xiaofeng, LU Ruilong, XU Kexin, TIAN Yang</i> (24)
Effects of ischemia time on intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat model	
<i>PAN Xiaohui, ZHANG Penghui, JIANG Guojian, LI Juan, CHEN Guihuang, YAO Xinling, FENG Xuexuan</i> (32)	
Effects of decoction of <i>Angelica sinensis</i> , <i>Zingiberis Rhizoma Recens</i> , and mutton on traditional Chinese medicine symptoms of IBS-D female rats with spleen-kidney Yang deficiency	<i>WANG Ting, LIU Zhiyong, LUO Liming, ZHANG Hong, XU Lei, ZENG Xianbao, ZHENG Zihong, LIU Zhiyong</i> (37)
Effect of Bixie Fenqing granules on podocalyxin and α -actinin-4 in podocytes in rats with adriamycin-induced nephropathy	<i>MA Xueli, WEI Jinhui, MA Hongbin</i> (49)
Establishment the comparative medicine big-data platform	
..... <i>WU Yue, WEI Qiang, ZHANG Lianfeng, XUE jing, BAO Linlin, LIU Jiangning, XIANG Zhiguang, MENG Aimin, YANG Zhiwei, GAO Ran, KONG Qi</i> (57)	
Study of acute toxicity, genetic toxicity and subchronic toxicity of <i>Tremella polysaccharide</i>	
..... <i>YANG Fei, YAO Wenhuan, LI Hui, ZHANG Jing, TANG Hui, LYU Shibo, GUO Jie, SUN Shaojing, LU Zhen, CHENG Dong</i> (66)	

- Research and innovation in the practice of animal quality control in a university laboratory animal center
 ZHANG Zhini, YANG Liheng, YAN Chu, CAI Weibin(77)
- Research progress on establishment of animal model of IgA nephropathy by heterogeneous protein induction
 YANG Wen,
 SONG Dan, SONG Chundong, GUO Ting, DUAN Fengyang, WANG Ningli, ZHANG Bo, YANG Meng(82)
- Research progress on the effect of non-coding RNA on chondrocytes and the extracellular matrix in osteoarthritis
 WANG Shiqi, YUE Liang, XIE Wenpeng, CAI Yuli(88)
- Research progress in the prevention and treatment of atherosclerosis using next-generation probiotics
 WANG Mengnan, QIN Hewei, GUO Ning, SONG Xuemei, NIU Yuqing, SUN Mengyan(95)
- Research progress on whether SARS-CoV-2 can be transmitted through the digestive tract
 YAN Yiwei, QI Feifei, BAO Linlin(103)
- Preclinical application of a xenotransplantation mouse model of non-small cell lung cancer with a humanized
 immune system ZHANG Xiong, GUO Wenwen, ZHANG Caiqin(108)
- Research progress into the anti-infective effect of exosomes
 MA Fengqian, CHEN Ruifeng, DING Shoupeng, LI Xiangfang, WU Lixian(115)
- Research progress in mouse models of inflammatory diseases LIU Yuran, LIAN Kexun, GU Xinli(120)
- Review of the role of non-coding RNAs in dilated cardiomyopathy
 LI Weiwen, DENG Shaodong, CHEN Jianying(127)