

中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

月刊 1993 年 6 月创刊

第 31 卷 第 1 期 2023 年 1 月 30 日出版

目次

开篇词

《中国比较医学杂志》和《中国实验动物学报》新年发刊词…………… 主编 秦川

研究报告

小鼠骨髓间充质干细胞分离方法的比较与探讨…………… 廖新爱,蔡丹妮,游若兰,黄慧芳(1)

基于 TGF- β 1/Smad 信号通路初步探讨虎杖醇提物对腺嘌呤诱导小鼠肾间质纤维化的改善作用……………

…………… 段艳华,陈云祥,郑高利,温磊,陈浩,张丽丽,秦荔,王佳虹,刘芳,夏道宗,张立将(10)

肺孢子菌肺炎小鼠模型建立及免疫学评价…………… 邓书伟,杜春静,张玥,周妍希,张亮,秦秋实,朱缪雯(20)

骨髓间充质干细胞对类风湿关节炎小鼠干预效果研究……………

…………… 吴玉娥,曾业文,罗挺,凌雪莹,梁十,李航,贾欢欢(27)

大鼠真菌性中耳炎模型建立…………… 彭冬冬,陈相池,唐梓宁,肖洒,彭西湘,刘学武(35)

青春期丙烯酰胺暴露对小鼠肺组织氧化损伤的影响…………… 卜文婕,林爱琴,高继光,潘涛,任悦鸣,孙敏(43)

痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型的构建及代谢组学分析…………… 刘思美,强喆,吴思澜,涂如霞,李恒华,黄崇刚(51)

不同造模周期对羟基脲致肾阳虚动物模型的影响…………… 马小娟,马文礼,王丽新(64)

MEC-1 移植法构建慢性淋巴细胞白血病小鼠模型…………… 赵子璇,南苗苗,贺喜白乙,梁浩,郭旭东,刘东军(75)

基于 Sirt1/FoxO1 通路探讨瑞马唑仑减轻脓毒症小鼠脑损伤的机制研究……………

…………… 郭小丽,杨昌明,王婵,王先圆,刘荣莉(82)

研究进展

神经根型颈椎病动物模型研究进展…………… 成海燕,杨琛,何燕,段利冬,徐霞(91)

基于病证结合探讨动脉粥样硬化瘀毒证的模型构建与评价……………

…………… 张晓因,吴敏,孙长鑫,陈纪烨,李晓雅,刘龙涛(98)

模拟失重实验动物模型的建立与评价…………… 纪依澜,赵德明,王菲,阚广捍,吴斌,杨利峰(106)

高尿酸血症动物模型研究进展	王琳,沈嘉艳,谢招虎,秦冬冬,李兆福,马晓惠,吕小满(112)
改良的多平台水环境法在睡眠剥夺动物模型中的应用与评价	刁华琼,张婧,王敏,陈雨菲,朱庆生,李小黎(120)
美国农业部主导的实验动物管理政策演变和启示	徐国恒(129)
美国卫生署与国立卫生研究院 NIH 主导的实验动物管理体系的演变和启示	徐国恒(134)
广告	(内插)

主 管	照 排
中国科学技术协会	同方知网(北京)技术有限公司
主 办	印 刷
中国实验动物学会	北京博海升彩色印刷有限公司
中国医学科学院医学实验动物研究所	邮发代号
主 编	2-748
秦川	广告发布登记
编辑部主任	京朝工商广登字 20170142 号
董令赢	定 价
编 辑	每期 50.00 元,全年 600.00 元
《中国实验动物学报》编辑部	中国标准连续出版物号
出 版	ISSN 1005-4847
《中国实验动物学报》编辑部	CN 11-2986/Q
发 行	2023 年版权归中国实验动物学会所有
《中国实验动物学报》编辑部	本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子
100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号	杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网
电话:010-67779337	和中国实验动物学会网站等网络文献数据库,如不同意自己
传真:010-67770690	论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述
E-mail:bjb@cnilas.org	网站著作权使用费。
http://zgswdw.cnjournals.com/sydwbyjyx/ch/index.aspx	本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com
本期执行主编 王 强	
本期责任编辑 孙 烨 陈 慧 董令赢	

CONTENTS

Comparison and discussion of methods for isolating mouse bone marrow mesenchymal stem cells
..... LIAO Xinai, CAI Danni, YOU Ruolan, HUANG Huifang(1)

Ethanol extract of *Polygonum cuspidatum* attenuates renal fibrosis in a mouse model of adenine-induced renal
injury through inhibiting TGF-β1/Smad signaling
..... DUAN Yanhua, CHEN Yunxiang, ZHENG Gaoli, WEN Lei,
CHEN Hao, ZHANG Lili, QIN Li, WANG Jiahong, LIU Fang, XIA Daozong, ZHANG Lijiang(10)

Establishment and immunological evaluation of *Pneumocystis murina* pneumonia mouse model
..... DENG Shuwei, DU Chunjing, ZHANG Yue, ZHOU Yanxi, ZHANG Liang, QIN Qiushi, ZHU Liuluan(20)

Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice
..... WU Yue, ZENG Yewen, LUO Ting, LING Xueying, LIANG Shi, LI Hang, JIA Huanhuan(27)

Establishment of fungal otitis media model in rats
..... PENG Dongdong, CHEN Xiangchi, TANG Zining, XIAO Sa, PENG Xixiang, LIU Xuewu(35)

Effects of adolescent exposure to acrylamide on oxidative injury of lung tissue in mice
..... BU Wenjie, LIN Aiqin, GAO Jiguang, PAN Tao, REN Yueming, SUN Min(43)

Establishment and metabolomics analysis of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease with phlegm-damp-
ness syndrome LIU Simei, QIANG Zhe, WU Silan, TU Ruxia, LI Henghua, HUANG Chonggang(51)

Effect of different modeling periods on hydroxyurea-induced kidney-yang deficiency animal model
..... MA Xiaojuan, MA Wenli, WANG Lixin(64)

Preparation of mouse models of chronic lymphocytic leukemia by MEC-1 cells transplantation
..... ZHAO Zixuan, NAN Miaomiao, HEXIG Bayar, LIANG Hao, GUO Xudong, LIU Dongjun(75)

Mechanism of remazolam in reducing brain injury in sepsis mice based on Sirt1/FoxO1 pathway
..... GUO Xiaoli, YANG Changming, WANG Chan, WANG Xianyuan, LIU Rongli(82)

Advances in animal models of cervical spondylotic radiculopathy
..... CHENG Haiyan, YANG Chen, HE Yan, DUAN Lidong, XU Xia(91)

Construction and evaluation of a model of atherosclerotic blood-stasis and toxic syndrome based on a combination of disease and syndrome
..... ZHANG Xiaonan, WU Min, SUN Changxin, CHEN Jiye, LI Xiaoya, LIU Longtao(98)

Establishment and evaluation of experimental animal models simulating weightlessness
..... JI Yilan, ZHAO Deming, WANG Fei, KAN Guanghan, WU Bin, YANG Lifeng(106)

Progress of hyperuricemia animal model research
... WANG Lin, SHEN Jiayan, XIE Zhaohu, QIN Dongdong, LI Zhaofu, MA Xiaohui, LYU Xiaoman(112)

Application and evaluation of the modified multi-platform method in animal model of sleep deprivation
..... DIAO Huaqiong, ZHANG Jing, WANG Min, CHEN Yufei, ZHU Qingsheng, LI Xiaoli(120)

U.S. federal law: animal welfare act and animal welfare regulations and enlightenment XU Guoheng(129)

PHS/NIH policy on laboratory animal care and use in the United States XU Guoheng(134)

Responsible Institution China Association for Science and Technology	Distributor Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica 5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021 Tel: 010-67779337 Fax: 010-67770690 E-mail: bjb@cnilas.org http://zgswdw.cnjournals.com/sydwbybjyx/ch/index.aspx
Sponsor Chinese Association for Laboratory Animal Sciences Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences	CSSN ISSN 1005-4847 CN 11-2986/Q
Editor-in-Chief QIN Chuan(秦川)	Copyright 2023 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
Managing Editor DONG Lingying(董令赢)	
Editing Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica	
Publishing Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica	

廖新爱,蔡丹妮,游若兰,等. 小鼠骨髓间充质干细胞分离方法的比较与探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 1-9.

Liao XA, Cai DN, You RL, et al. Comparison and discussion of methods for isolating mouse bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 1-9.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.001

小鼠骨髓间充质干细胞分离方法的比较与探讨

廖新爱,蔡丹妮,游若兰,黄慧芳*

(福建医科大学附属协和医院 中心实验室,福州 350001)

【摘要】 目的 探讨可高效分离小鼠骨髓间充质干细胞(mBMSCs)的技术方法。**方法** 分别采用骨片消化爬片法、全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法等四种方法分离 7 ~ 9 周龄雄性 C57BL/6 小鼠的 mBMSCs;于倒置显微镜下观察原代 mBMSCs 形态;运用流式细胞术检测 mBMSCs 特征性免疫表型;采用多向分化诱导检测 mBMSCs 成骨分化能力与成脂分化能力。**结果** 分离获得的原代细胞首次换液后于倒置显微镜下观察:骨片消化爬片法分离的细胞,仅见大量骨碎片和杂细胞,该法所分离细胞不再进行后续检测评估;全骨髓贴壁法分离的细胞,仅可见少量多角形贴壁细胞,夹杂大量杂细胞;骨片消化液上清法分离的细胞也可见较多长梭形、三角形贴壁细胞,但杂细胞较多;骨片消化研钵法分离的细胞,可见较多长梭形、多角形贴壁细胞,杂细胞少。分离细胞经培养传代到第 3 代(P3 代)时,一方面采用流式细胞术分析 mBMSCs 特征性免疫表型,结果表明骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离的 mBMSCs 纯度均较高,全骨髓贴壁法不理想;另一方面,进行成骨分化诱导与成脂分化诱导,结果表明与全骨髓贴壁法分离的细胞相比,骨片消化液上清法和骨片消化研钵法所分离出的细胞具有较强的多向分化潜能。**结论** 骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离获得的 mBMSCs 纯度较高、质量较好。

【关键词】 小鼠骨髓间充质干细胞;骨片消化爬片法;全骨髓贴壁法;骨片消化液上清法;骨片消化研钵法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0001-09

Comparison and discussion of methods for isolating mouse bone marrow mesenchymal stem cells

LIAO Xinai, CAI Danni, YOU Ruolan, HUANG Huifang*

(Central Laboratory of Fujian Medical University Union Hospital, Fujian University, Fuzhou 350001, China)

Corresponding author: HUANG Huifang. E-mail:huanghuif@fjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To achieve the efficient isolation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (mBMSCs). **Methods** mBMSCs from C57BL/6 mice, aged 7 to 9 weeks, were isolated by four method: the bone fragment digestion and crawl method, whole-bone-marrow adherent method, bone fragment digestive fluid supernatant method, and bone fragment digestion and mortar method. An inverted microscope was used to observe the morphology of the mBMSCs, and their characteristic immunophenotype was detected by flow cytometry. The osteogenic and adipogenic differentiation abilities of mBMSCs were detected through multidirectional differentiation induction. **Results** Isolated primary cells were observed under an inverted microscope after the first fluid change. A large number of bone fragments and miscellaneous cells only were found in the primary cells isolated by the bone fragment digestion and crawl method, and this method was no longer evaluated. Only a small number of polygonal adherent cells and a large number of miscellaneous cells were observed in the whole-bone-marrow adherent-extracted sample. The cells isolated by the bone fragment digestive fluid supernatant method were longer spindle-shaped and triangular adherent cells, but there were many miscellaneous cells. The

[基金项目] 国家自然科学基金(82070145),高水平实验研究平台建设项目(闽 201704)。
Funded by National Natural Science Foundation of China(82070145), the Government-Funded of the Construction Project of High-Level Laboratory (Min201704)。

[作者简介] 廖新爱(1992—),女,在读博士研究生,研究方向:骨髓微环境与血液肿瘤化疗耐药。Email:lxanewlove@outlook.com

[通信作者] 黄慧芳(1971—),女,教授,研究方向:骨髓微环境与血液肿瘤化疗耐药。Email:huanghuif@fjmu.edu.cn

cells isolated by the bone fragment digestion and mortar method were longer spindle-shaped and polygonal adherent cells, and there were fewer miscellaneous cells. The isolated cells were cultured to passage 3, and the characteristic immunophenotypes of mBMSCs were analyzed by flow cytometry. The result showed that the purity of mBMSCs isolated via the bone fragment digestive fluid supernatant method and bone fragment digestion and mortar method was higher than that of cells isolated via the whole-bone-marrow adherent method. When osteogenic differentiation and adipogenic differentiation were induced, cells isolated by the bone fragment digestive fluid supernatant method and bone fragment digestion and mortar method had stronger multidirectional differentiation potential than those isolated with the whole-bone-marrow adherent method. **Conclusions** mBMSCs isolated using the bone fragment digestive fluid supernatant method and the bone fragments digestion and mortar method were of higher purity and quality than those from the other method.

【Keywords】 mouse bone-marrow mesenchymal stem cell; bone fragment digestion and crawl method; whole-bone-marrow adherent method; bone fragment digestive fluid supernatant method; bone fragment digestion and mortar method
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨髓间充质干细胞 (bone-marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是位于骨髓间质的非造血干细胞, 低免疫原性, 具有自我更新能力和多向分化潜能, 可分化为脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞、神经细胞、心肌细胞和上皮细胞等^[1-2]。BMSCs 可有效调节炎症组织中的免疫细胞, 促进血管生成, 重塑细胞外基质, 诱导祖细胞分化, 促进组织修复等^[3]; 已被应用于治疗移植抗宿主病^[4]、自身免疫性疾病^[1]、骨关节疾病^[5]和心肌梗死^[6]等疾病。同时, BMSCs 可通过分泌细胞因子、生长因子、抗炎因子和外泌体等, 影响肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移和化疗敏感性^[7]。体外研究探讨 BMSCs 的作用机制可为更好地将 BMSCs 运用于临床奠定坚实的理论基础, 要在体外开展相关研究的前提与关键是获得纯度较高、质量较好、数量充足的 BMSCs。

小鼠是开展基础研究最常用的一种实验动物, 小鼠骨髓间充质干细胞 (mouse bone-marrow mesenchymal stem cells, mBMSCs) 被广泛应用于体外实验研究^[8]。但 mBMSCs 在骨髓中含量低, 易受造血细胞污染, 较难获得较大数量高纯度的 mBMSCs^[9]。全骨髓贴壁法^[10-14]和骨片消化爬片法^[15-18]是目前较常用的 mBMSCs 分离方法, 但我们采用这两种方法分离获得的 mBMSCs 纯度均较低。有研究报道, 人骨小梁经胶原酶消化后, 可在消化液中获得 BMSCs, 所以我们收集了骨片经胶原酶处理后的消化液上清, 离心获得沉淀细胞进行培养, 并将该法命名为骨片消化液上清法^[19]。该法与骨片消化爬片法的主要区别在于: 骨片消化爬片法收集的是胶原酶消化后的骨片, 骨片消化液上清法收集的是胶原酶消化后的上清液。2012 年 Houlihan 等^[20]在 *Nat Protoc* 报道了可采用骨片消化研钵法分离 mBMSCs。因此, 本文比较分析了骨片消化爬片

法、全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法等四种方法所分离培养的 mBMSCs 的纯度和分化能力, 希望能从中筛选出高效分离 mBMSCs 的技术方法。

在形态上, mBMSCs 与成纤维细胞难以区分, 且 mBMSCs 表面缺乏特异标记分子^[21], 根据国际细胞治疗协会 (ICST) 提出的鉴定人间充质干细胞标准^[22], 目前比较公认的鉴定 mBMSCs 必须同时满足以下 3 点^[23]: (1) 在标准培养条件下, mBMSCs 贴壁, 呈成纤维细胞样; (2) mBMSCs 表达非造血干细胞表面抗原, 如 Sca-1、CD140a、CD29、CD44、CD54、NST、CD81、CD106 等, 同时不表达造血细胞、内皮细胞的表面抗原, 如 CD45、CD11b、CD31、CD48、CD117、CD135 等^[20, 24]; (3) 具有多向分化潜能, 可诱导分化为成骨细胞、脂肪细胞和成软骨细胞等。因此, 我们将从细胞形态学、免疫表型和分化潜能等 3 个指标评价不同方法所分离获得的 mBMSCs 的纯度与质量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7 ~ 9 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 12 只, 体重为 18 ~ 20 g, 购买于广东药康生物科技有限公司【SCXK(粤)2020-0054】。饲养期间小鼠自由饮水, 温度 22 ~ 25℃, 湿度恒定, 昼夜各半循环照明, 饲喂普通饲料由福建医科大学动物实验中心提供, 饲养于福建医科大学动物实验中心【SYXK(闽)2020-0005】。本实验所有操作均遵循福建医科大学实验动物伦理委员会的伦理批件(2021-0281)。

1.1.2 主要试剂与仪器

MEM Alpha Modification (1 ×) (SH30165.01,

Hyclone); DMEM 高糖培养基 (D5796, Sigma); 青、链霉素双抗 (CC-0111, 北京鼎国昌盛公司); 胶原酶 II (C8150, Solarbio); OriCell® 小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化试剂盒 (MUXMX-90031, Cyagen Biosciences); 抗坏血酸 (A103539, Aladdin); 地塞米松 (D1756, Sigma); β -磷酸甘油 (G9422, Sigma); 茜素红 (ALIR-10001, Cyagen Biosciences); 抗小鼠 FITC-CD45、PE-CD44、PE-CD140a、PerCP/Cyanine5.5-CD29、APC-Sca-1、APC-CD105、APC-CD54 (103107, 103023, 135905, 102227, 108111, 120413, 116119, Biolegend); 胎牛血清 (F8318, Sigma); 胰蛋白酶粉末 (ET355-25G, Genview); EDTA 粉末 (NEP046, Genview); 磷酸盐缓冲剂 (BF-0013, 北京鼎国昌盛公司); 4% 组织细胞固定液 (AR-0212, 北京鼎国昌盛公司); 10% 十六烷基氯化吡啶 (H108697, Aladdin); 异丙醇 (2020, 中国西陇科学); 三溴乙醇 (#HY-B1372/CS-4901, MCE); 叔戊醇 (A-103418, Aladdin)。

BD FACS Celesta (Becton, Dickinson and Company, 美国); 倒置显微镜及图像采集系统 (Leica, 德国); 酶标仪 (Agilent, 美国); 二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 美国); 多用途旋转摇床 (Kylin-Bell, 中国); 生物安全柜 (苏州安泰空气技术有限公司); 离心机 (湖南湘仪科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分离细胞

骨片消化爬片法^[25]、全骨髓贴壁法^[15]、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法^[20]分离 mBMSCs 具

体步骤, 详见表 1。

(1) 分离下肢骨和冲洗骨髓腔: 阿佛丁麻醉后颈椎脱臼法处死小鼠, 小鼠于 75% 乙醇浸泡 3 ~ 5 min, 用镊子捏起小鼠两髋关节之间腹部皮肤, 剪开, 分离两下肢皮肤, 向下在踝处, 向上在髋关节处剪断, 游离出两条下肢, 更换新的剪刀、镊子、纱布, 将附着于股骨和胫骨的肌肉和筋膜处理干净, 将处理好的股骨和胫骨放置于含 2% FBS 的 PBS 中, 移入生物安全柜, 剪开股骨、胫骨干骺端, 暴露骨髓腔, 用 1 mL 注射器吸取含 2% FBS 的 PBS 液反复冲洗小鼠股骨、胫骨髓腔, 直至变白。

(2) 过滤骨髓液: 冲出的骨髓液经 70 μ m 细胞过滤器过滤。

(3) 剪碎骨片: 骨倒入含 2% FBS 的 PBS 的研钵中, 剪刀将骨头剪碎至 1 ~ 3 mm³。

(4) 捣磨骨碎片: 骨片在研钵中用杵轻轻压碎, 捣磨骨髓的缓冲液弃去, 添加新鲜的含 2% FBS 的 PBS 重复捣磨并清洗 2 ~ 3 次后, 骨头碎片变成豆腐渣状并且捣磨骨髓的缓冲液清澈时可停止研钵。

(5) 胶原酶 II 消化: 用镊子将碎骨移至 15 mL 离心管, 加入含胶原酶 II (终浓度为 1 mg/mL) 的 DMEM 培养液 (加入量覆盖骨片), 多用途旋转摇床 110 r/min, 37℃ 孵育 1.5 h, 骨碎片松散时停止。

(6) 清洗骨碎片: 弃去上清消化液, α -MEM 完全培养基洗骨碎片 3 次, 将骨碎片移至 25 T 培养瓶, 加入 α -MEM 完全培养基。

(7) 过滤消化液并终止消化: 用 70 μ m 细胞过滤器过滤胶原酶消化过的细胞悬液于 50 mL 离心

表 1 四种方法分离 mBMSCs 步骤

Table 1 Specific steps of four separation methods for isolation of mBMSCs

分离方法 Isolation methods	步骤 Steps
骨片消化爬片法 Bone fragment digestion and crawl method	分离下肢骨和冲洗骨髓腔+剪碎骨片+胶原酶 II 消化+清洗骨碎片+细胞培养 Isolating lower limb bone and cleaning of bone marrow cavity + cutting bone + collagenase II digestion+ washing bone fragments + culturing cells
全骨髓贴壁法 Whole-bone-marrow adherent method	分离下肢骨和冲洗骨髓腔+过滤骨髓液+重悬细胞沉淀+细胞培养 Isolating lower limb bone and cleaning of bone marrow cavity + filtering bone marrow fluid + resuspending cell precipitation + culturing cells
骨片消化液上清法 Bone fragment digestive fluid supernatant method	分离下肢骨和冲洗骨髓腔+剪碎骨片+胶原酶 II 消化+过滤消化液并终止消化+ 重悬细胞沉淀+细胞培养 Isolating lower limb bone and cleaning of bone marrow cavity + cutting bone + collagenase II digestion + filtering digestive fluid and stopping digestion + resuspending cell precipitation + culturing cells
骨片消化研钵法 Bone fragment digestion and mortar method	分离下肢骨和冲洗骨髓腔+剪碎骨片+捣磨碎片+胶原酶 II 消化+过滤消化液并终止消化+ 再次捣磨并清洗收集细胞悬液+重悬细胞沉淀+细胞培养 Isolating lower limb bone and cleaning of bone marrow cavity + cutting bone + crushing bone fragments + collagenase II digestion + filtering digestive fluid and stopping digestion+ crushing again and washing to collect cell suspension+ resuspending cell precipitation + culturing cells

管,并将胶原酶细胞悬液置于冰上使胶原酶灭活。

(8)再次捣磨并清洗收集细胞悬液:将剩余骨碎片置于研钵中,用 5 mL 含 2% FBS 的 PBS 重悬,并用杵将骨碎片轻压 50 次,再加入 5 mL 含 2% FBS 的 PBS,吸出液体收集于离心管,重复该步骤,使总体积达到 50 mL 左右。

(9)重悬细胞沉淀:收集细胞悬液于 4℃, 1200 r/min 离心 10 min;弃上清,使用 α -MEM 完全培养基重悬细胞沉淀,种入 25 T 培养瓶中。

(10)细胞培养:放置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 d 换 1 次液。

1.2.2 细胞传代

分离培养的原代细胞生长至 80% ~ 90% 融合时,吸弃培养液,PBS 洗涤 2 遍,加入胰蛋白酶 1 mL 覆盖瓶底,37℃、5% CO₂ 培养箱消化 5 min,加入等量 α -MEM 完全培养基终止消化,1200 r/min 离心 8 min,弃上清,加入 α -MEM 完全培养基重悬,按 1:2 比例传代。

1.2.3 细胞形态学观察

原代细胞首次换液去除悬浮细胞后,在倒置显微镜下观察细胞形态和细胞成分组成,记录细胞生长至传代密度(80% ~ 90% 融合)所需时间,以及细胞形态和细胞成分组成的变化,运用图像采集系统拍照记录。

1.2.4 流式细胞术检测 mBMCs 特征性免疫表型

分离获得的细胞传至第三代(P3 代),采用胰蛋白酶消化,PBS 洗 2 遍。含 2% FBS 的 PBS 重悬细胞,每管 2×10^6 个细胞加入荧光标记的抗小鼠 FITC-CD45 (泛白细胞标志抗原)、PerCP/Cyanine5.5-CD29 (整合素家族类抗原标志分子 VLA β)、PE-CD44 (黏附分子家族类抗原标志分子 HCAM)、APC-CD54 (细胞黏附分子-1)、APC-Sca-1 (干细胞抗原 1)、PE-CD140a (血小板衍生生长因子 α),全程避光染色 30 min。流式细胞术检测细胞表面抗原表达。

1.2.5 诱导成骨分化和成脂分化

分离获得的细胞传至 P3 代,胰蛋白酶消化后将待诱导的细胞按照 1×10^4 cells/cm² 接种于经 0.1% 明胶处理过的 12 孔板,每孔加入 1 mL α -MEM 完全培养基,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱培养,当细胞汇合度达到 100% 时,小心吸弃孔内完全培养基,分别加入成骨(或成脂)分化诱导剂。

(1)体外诱导成骨分化

加入成骨分化诱导剂(含有 10% FBS、50 μ mol/L 抗坏血酸、 10^{-7} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -磷酸甘油的 DMEM),每 3 d 更换新鲜成骨分化诱导剂,诱导 3 周后,4% 组织细胞固定液室温固定 30 min,PBS 轻柔洗涤 3 次,茜素红染色 10 min,用 PBS 轻柔洗涤 3 次,充分洗去染色液,每孔加入 1 mL PBS,置显微镜下观察成骨染色效果。结束后用 100 μ L 10% 十六烷基氯化吡啶溶解钙结节上的茜素红、酶标仪检测 OD₅₆₂,对钙结节形成情况进行相对定量检测。

(2)体外诱导成脂分化

按照 OriCell® 小鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化试剂盒说明书操作,诱导 2 周后,4% 组织细胞固定液室温固定 30 min,PBS 轻柔洗涤 3 次,油红 O 染色 30 min,用 PBS 轻柔洗涤 3 次,充分洗去染色液,每孔加入 1 mL PBS,置显微镜下观察成脂染色效果。观察结束后用 100 μ L 异丙醇溶解脂滴上的油红 O,用酶标仪检测 OD₅₀₀,对脂肪细胞形成情况进行相对定量检测。

1.3 统计学分析

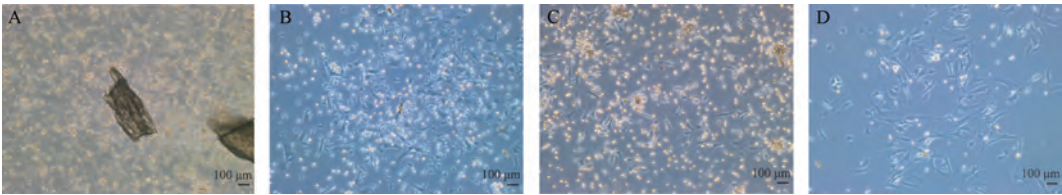
独立实验重复 3 次,采用 GraphPad Prism 9.1.1 软件进行统计分析和作图。满足正态分布、方差齐性前提下,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。实验结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 原代细胞的细胞成分组成

骨片消化爬片法、全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法 4 种方法分离培养的原代细胞首次换液后,倒置显微镜下观察细胞形态和细胞成分组成,结果详见图 1 与表 2。

比较 4 种方法分离培养的原代细胞生长至传代密度所需时间,除骨片消化爬片法,其余 3 种方法均可在 1 周内传代,结果详见表 3。在倒置显微镜下观察传代前细胞形态和细胞成分组成,结果详见图 2。与首次换液相比,全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离的细胞,形态与杂细胞占比均没有发生明显变化。骨片消化爬片法分离的原代细胞,增殖速度慢,第 20 天只有极少数骨片旁可见长梭形贴壁细胞成簇生长,呈放射状、均匀排列,其余部位存在大量杂细胞团;可见,该方法所分离获得的细胞质量并不理想,在后续实验中不再研究该方法。



注:A:骨片消化爬片法;B:全骨髓贴壁法;C:骨片消化液上清法;D:骨片消化研钵法。(下同)

图 1 倒置显微镜观察首次换液后原代细胞

Note. A. Bone fragment digestion and crawl method. B. Whole-bone-marrow adherent method. C. Bone fragment digestive fluid supernatant method. D. Bone fragment digestion and mortar method. (The same in the following figure)

Figure 1 Primary cells observed under the inverted microscope after the first fluid change

表 2 原代细胞中贴壁细胞及杂细胞形态和组成

Table 2 Morphology and content of adherent cells and heterocells in primary cells

分离方法 Isolation methods	贴壁细胞形态 Morphology of adherent cell	贴壁细胞占比 Proportion of adherent cells	杂细胞形态 Morphology of miscellaneous cells	杂细胞占比 Proportion of miscellaneous cells
骨片消化爬片法 Bone fragment digestion and crawl method	未见 None	无 None	圆形 Round	多 More
全骨髓贴壁法 Whole-bone-marrow adherent method	多角形 Polygonal	少 Few	圆形、短梭形 Round, short spindle	较多 Many
骨片消化液上清法 Bone fragment digestive fluid supernatant method	长梭形、三角形 Long spindle, triangular	较多 Many	圆形、短梭形 Round, short spindle	较多 Many
骨片消化研钵法 Bone fragment digestion and mortar method	长梭形、多角形 Long spindle, polygonal	多 More	圆形、短梭形 Round, short spindle	少 Few

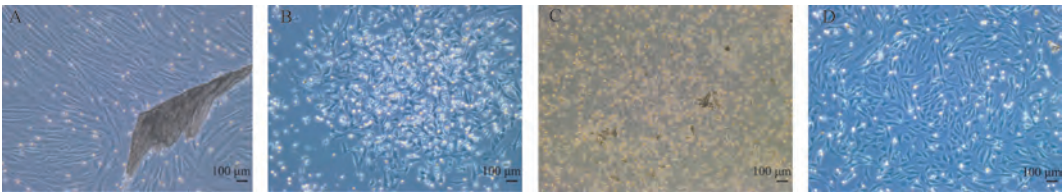


图 2 倒置显微镜观察传代时原代细胞形态

Figure 2 Primary cell morphology observed under inverted microscope during passage

2.2 mBMSCs 特征性免疫表型检测

mBMSCs 细胞表面特征性免疫表型是 CD45⁻ 和 CD44⁺、CD29⁺、CD54⁺、CD140a⁺、Sca-1⁺。全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法所分离的细胞,取 P3 代细胞,流式细胞术检测细胞免疫表型。结果如图 3 所示:全骨髓贴壁法分离的细胞,CD45⁻ 仅为 29.1%, CD29⁺ (15.4%)、CD44⁺ (33.8%)、CD54⁺(58.5%);骨片消化液上清法分离的细胞,CD45⁻ (90.6%)、CD29⁺ (99.0%)、CD44⁺ (98.1%)、Sca-1⁺ (99.3%)、CD140a⁺ (97.8%);骨片消化研钵法分离的细胞,CD45⁻ (90.2%)、CD29⁺ (98.0%)、CD44⁺ (97.6%)、Sca-1⁺ (93.1%)、CD140a⁺(98.4%)。说明骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离培养的 mBMSCs 纯度均较高,全骨髓贴壁法分离培养的 mBMSCs 纯度低。

表 3 四种方法分离培养的原代细胞传代时间

Table 3 Passage time of primary cells isolated and cultured by four methods

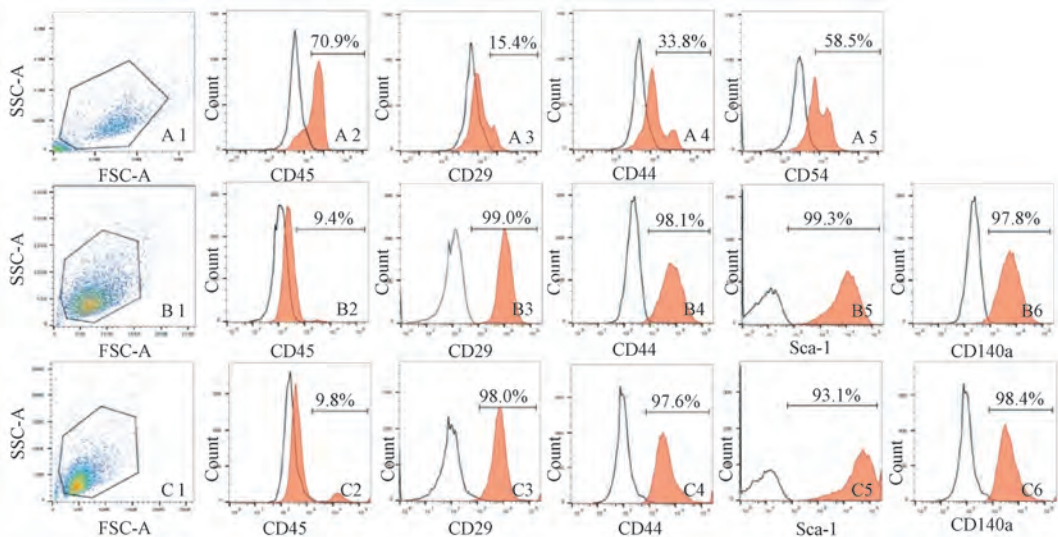
分离方法 Isolation methods	原代细胞传代时间 Passage time of primary cells
骨片消化爬片法 Bone fragment digestion and crawl method	第 20 天 Day 20
全骨髓贴壁法 Whole-bone-marrow adherent method	第 4 ~ 5 天 Day 4 ~ 5
骨片消化液上清法 Bone fragment digestive fluid supernatant method	第 5 ~ 6 天 Day 5 ~ 6
骨片消化研钵法 Bone fragment digestion and mortar method	第 6 ~ 8 天 Day 6 ~ 8

2.3 体外诱导成骨分化能力

全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离培养的 P3 代细胞经成骨诱导培养 3 周后,细胞排列紧密,体积变小,呈铺路石样改变。

3 种方法分离培养的 P3 代细胞成骨诱导后经茜素红染色,镜下可观察到橘红色钙结节,均表现出成骨分化特性(图 4)。且骨片消化液上清法和骨片消

化研钵法获得的钙结节数量明显较全骨髓贴壁法多(图 4),说明经这两种方法分离培养的细胞能获得更多的具有成骨分化能力的 mBMSCs。

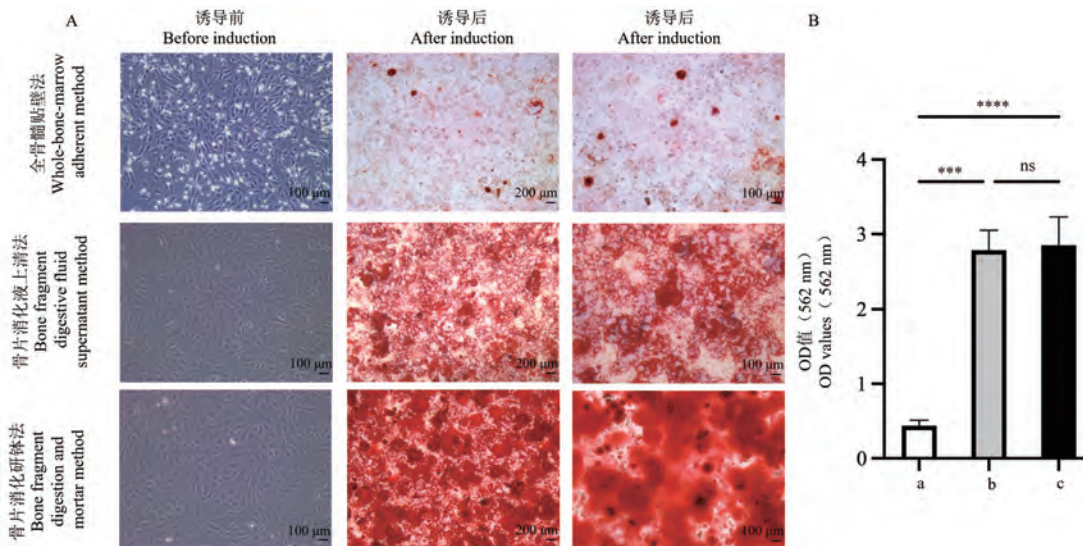


注:不同方法分离培养的 P3 代细胞 mBMSCs 特征性免疫表型流式检测结果。A1 ~ A5:全骨髓贴壁法;B1 ~ B6:骨片消化液上清法;C1 ~ C6:骨片消化研钵法。

图 3 流式细胞术检测细胞 mBMSCs 特征性免疫表型

Note. Characteristic immunophenotype of P3 mBMSCs isolated and cultured by different methods was detected by flow cytometry. A1 ~ A5. Whole-bone-marrow adherent method. B1 ~ B6. Bone fragment digestive fluid supernatant method. C1 ~ C6. Bone fragment digestion and mortar method.

Figure 3 Characteristic immunophenotype of mBMSCs was detected by flow cytometry



注:A:分离培养的 P3 代细胞成骨分化诱导前细胞形态和成骨分化诱导后茜素红染色观察到的钙结节;B:室温下,10%氯代十六烷基吡啶溶解茜素红染色后的钙结节,酶标仪检测波长 562 nm 吸光度值;a:全骨髓贴壁法;b:骨片消化液上清法;c:骨片消化研钵法;与全骨髓贴壁法比较,*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。(下图同)

图 4 体外诱导成骨分化能力的鉴定及茜素红染色定量比较

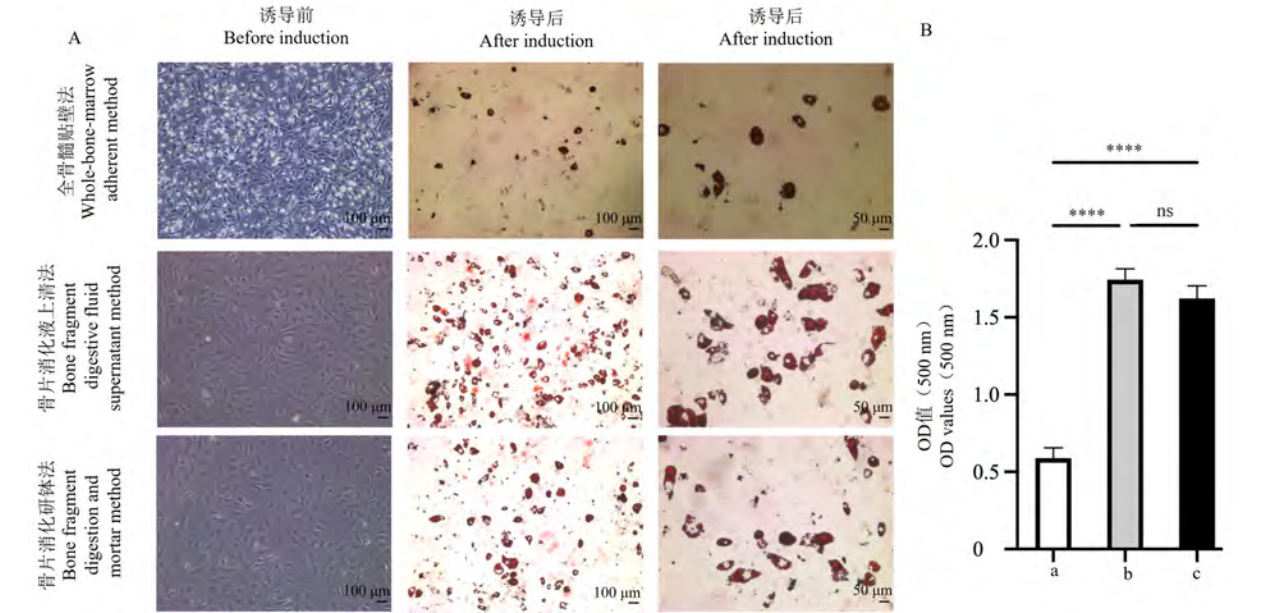
Note. A. Cell morphology before osteogenic differentiation induction and calcium nodules observed by alizarin red staining after osteogenic differentiation induction of isolated and cultured P3 cells. B. Absorbance value at 562 nm was detected by microplate reader after of 10% chlorocetylpyridine dissolved calcium nodules stained with alizarin red at room temperature. a. Whole-bone-marrow adherent method. b. Bone fragment digestive fluid supernatant method. c. Bone fragment digestion and mortar method. Compared with whole-bone-marrow adherent method, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

Figure 4 Identification of osteogenic differentiation ability and quantitative comparison of alizarine red staining *in vivo*

2.4 体外诱导成脂分化能力

全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离培养的 P3 代细胞经成脂诱导培养 2 周后,细胞出现回缩现象,细胞间隙变大,转变为圆形脂肪细胞。镜下可见胞浆内含有丰富脂滴的脂肪

细胞,油红 O 染色呈红色,3 种方法均表现出成脂分化特性(图 5)。且骨片消化液上清法和骨片消化研钵法油红 O 染色强度明显较全骨髓贴壁法强(图 5),说明经这两种方法分离培养的细胞能获得更多的具有成脂分化能力的 mBMSCs。



注:A:分离培养的 P3 代细胞成脂分化诱导前细胞形态和成脂分化诱导后油红 O 染色观察到的脂滴;B:室温下,异丙醇溶解油红 O 染色后的脂滴,酶标仪检测波长 500 nm 处吸光度值;a:全骨髓贴壁法;b:骨片消化液上清法;c:骨片消化研钵法;与全骨髓贴壁法比较, **** $P < 0.0001$ 。

图 5 体外诱导成脂分化能力的鉴定及油红 O 染色定量比较

Note. A. Cell morphology before adipogenic differentiation induction and lipid droplets observed by oil red O staining after adipogenic differentiation induction of isolated and cultured P3 cells. B. Absorbance value at 500 nm was detected by microplate reader after isopropanol dissolved lipid droplets stained with oil red O at room temperature. a. Whole-bone-marrow adherent method. b. Bone fragment digestive fluid supernatant method. c. Bone fragment digestion and mortar method. Compared with whole-bone-marrow adherent method, **** $P < 0.0001$.

Figure 5 Identification of adipogenic differentiation ability and quantitative comparison of oil red O staining in vitro

3 讨论

mBMSCs 在骨髓中含量少,分离细胞中往往存在多种杂细胞污染,不能满足研究需求。因此,需要建立一种有效分离培养 mBMSCs 的方法体系。本研究比较分析了骨片消化爬片法、全骨髓贴壁法、骨片消化液上清法和骨片消化研钵法等 4 种方法,希望实验结果能为从事 mBMSCs 相关研究的同道提供有价值的参考依据,避免因方法学选择不当造成时间和资源浪费,甚至影响研究结果的客观性和可靠性。

全骨髓贴壁法是利用 mBMSCs 的塑料贴壁特性进行分离培养,但这种方法分离的 mBMSCs 不纯,容易被多种杂细胞污染^[26],本研究的实验结果也是如此。有研究表明通过早期首次换液可以减

少杂细胞的黏附^[9],因此,本研究在应用全骨髓贴壁法时,曾采用第 1 天首次换液,但培养后 mBMSCs 数量极少,可能是由于在培养早期换液,在一定程度上会损失 mBMSCs。有文献报道,在培养第 4 天首次换液,比在培养第 1 天首次换液,会更容易获得高增殖能力的 mBMSCs^[27],与我们的实验结果一致。分离培养的原代细胞镜下形态和 P3 代细胞表面免疫表型分析结果均说明,全骨髓贴壁法获得的 mBMSCs 量少,且存在多种杂细胞。与 Cai 等^[26]的研究报道相似,本实验中全骨髓贴壁法分离培养的 mBMSCs 成骨成脂分化现象不及骨片消化液上清法和骨片消化研钵法。该现象可能与以下两个方面相关:一方面由于全骨髓贴壁法本身获得的 mBMSCs 纯度较低;另一方面也可能是体外培养时其他细胞混杂一定程度上抑制 mBMSCs 的分化潜

能。因此全骨髓贴壁法不适合用于 mBMSCs 体外研究。

骨密质中造血细胞稀少,从骨密质中分离 mBMSCs,可减少造血细胞与其他基质细胞的污染。冲洗骨髓腔,去除骨髓中大量造血细胞后,用胶原酶消化骨片,使密集结构的骨质松弛,可促进 mBMSCs 从骨片迁移到培养基中^[25]。骨片消化液上清法和骨片消化研钵法都是利用此原理分离 mBMSCs,分离后的 P3 代细胞表面免疫表型分析以及成骨分化能力、成脂分化能力检测均说明这两种方法分离获得的 mBMSCs 纯度较高、质量较好。且骨片消化研钵法所分离的细胞传至 P1 代时,镜下观察到细胞呈均一成纤维样形态,但该方法必须把握好研钵力度,否则容易导致细胞受损。骨片消化爬片法虽也是基于此特点,但所获得的 mBMSCs 极少且生长缓慢,无法满足研究需求,可能是经过消化后 mBMSCs 大部分存在胶原酶消化液中,也有可能是培养初期移动培养瓶时骨片受到晃动,影响 mBMSCs 爬出^[25]。

此外,参考人 BMSCs 的分离方法^[28-29],本研究也曾尝试收集小鼠全骨髓,通过 Ficoll 方法分离出小鼠骨髓单个核细胞进行贴壁后获取 mBMSCs,但贴壁细胞零星无几,难以进一步展开实验,因此,单个核细胞贴壁法不在本研究探讨范围内。

采用免疫磁珠分选法和流式细胞荧光分选法也可获得较高纯度的 mBMSCs 群体,但费用昂贵,操作繁琐,且影响 mBMSCs 的活力^[9]。mBMSCs 的体外生存活力不仅受到分离方法的影响,也与培养条件有关。mBMSCs 存在于骨髓基质中,受到骨髓微环境的调控,小鼠骨髓中的氧含量低于 5%^[30]。有研究表明,与 10%和 21%的氧含量相比,在 5%的氧含量条件下,mBMSCs 表现出更高的增殖活性和克隆形成能力。因此,要根据研究目的,探讨优化 mBMSCs 的培养条件。

总之,本文探讨的 4 种 mBMSCs 分离培养方法中,骨片消化液上清法和骨片消化研钵法在较短时间内可获得纯度较高、分化能力较强的 mBMSCs。虽然这两种方法步骤较全骨髓贴壁法繁琐,但能够满足后续实验对 mBMSCs 的质量和数量要求,且成本低。因此,推荐采用骨片消化液上清法和骨片消化研钵法分离培养 mBMSCs。

参 考 文 献 (References)

[1] 李宁,金世柱,杨宁宁. 间充质干细胞通过免疫调节机制治

疗炎症性肠病的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 121-125.

Li N, Jin SZ, Yang NN. Advances in the study of mesenchymal stem cells for the treatment of inflammatory bowel disease by immunoregulation [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 121-125.

[2] 路亚岚,石桂英,王克维,等. 骨髓间充质干细胞治疗阿尔兹海默病模型小鼠研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 122-127.

Lu YL, Shi GY, Wang KW, et al. Progress in research using mouse models of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 122-127.

[3] Shi Y, Wang Y, Li Q, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14(8): 493-507.

[4] Zhao L, Chen SQ, Yang PX, et al. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 182-195.

[5] Norambuena GA, Khoury M, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells in osteoarticular pediatric diseases: an update [J]. Pediatr Res, 2012, 71(4): 452-458.

[6] Zhang RF, Yu J, Zhang NK, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: single-blind, multicenter, randomized controlled trial [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 33-47.

[7] Hou DY, Wang B, You RL, et al. Stromal cells promote chemoresistance of acute myeloid leukemia cells via activation of the IL-6/STAT3/OXPHOS axis [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(21): 1346-1363.

[8] Abdallah BM, Alzahrani AM, Abdel-Moneim AM, et al. A simple and reliable protocol for long-term culture of murine bone marrow stromal (mesenchymal) stem cells that retained their *in vitro* and *in vivo* stemness in long-term culture [J]. Biol Proced Online, 2019, 21(1): 3-14.

[9] Abdallah BM, Khattab HM. Recent approaches to isolating and culturing mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal stem cells [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2021, 16(5): 599-607.

[10] 周家旺,陆国海,李晓林. BMP9 通过 Orai1 途径促进小鼠骨髓间充质干细胞骨向分化 [J]. 基础医学与临床, 2021, 41(10): 1470-1475.

Zhou JW, Lu GH, Li XL. BMP9 promotes bone differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via Orai1 pathway [J]. Basic Clin Med, 2021, 41(10): 1470-1475.

[11] 季健坤,李克文,赵宏涛,等. 骨髓间充质干细胞对膝关节炎大鼠软骨损伤及 KDM6A/SOX9 信号通路的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(4): 486-492.

Ji JK, Li KW, Zhao HT, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on cartilage damage and KDM6A/SOX9 signaling pathway in rats with knee osteoarthritis [J]. Chin J Osteopor, 2022, 28(4): 486-492.

[12] Wu YS, Xie L, Wang MY, et al. Mettl3-mediated m⁶A RNA methylation regulates the fate of bone marrow mesenchymal stem

- cells and osteoporosis [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4772.
- [13] Wang T, Bai JX, Lu M, et al. Engineering immunomodulatory and osteoinductive implant surfaces via mussel adhesion-mediated ion coordination and molecular clicking [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 160.
- [14] Wen ZZ, Mai Z, Zhu XL, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate cardiomyocyte apoptosis in hypoxic conditions through microRNA144 by targeting the PTEN/AKT pathway [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 36.
- [15] 杨燕美, 李红, 张雷, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞分离培养新方法 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(6): 1563–1567.
- Yang YM, Li H, Zhang L, et al. A new method for isolating and culturing mouse bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Chin J Exp Hematol, 2013, 21(6): 1563–1567.
- [16] 杨雷, 朱烁基, 刘健, 等. 两种骨髓间充质干细胞分离方法的对比研究 [J]. 岭南心血管病杂志, 2020, 26(2): 225–229.
- Yang L, Zhu SJ, Liu J, et al. Comparative analysis of two methods for isolation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. South China J Cardiovasc Dis, 2020, 26(2): 225–229.
- [17] Bai J, Li LJ, Kou N, et al. Low level laser therapy promotes bone regeneration by coupling angiogenesis and osteogenesis [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 432–450.
- [18] Li MH, Lan YJ, Gao J, et al. Rapamycin promotes the expansion of myeloid cells by increasing G-CSF expression in mesenchymal stem cells [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 779159.
- [19] Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al. Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates [J]. Blood, 2004, 104(9): 2728–2735.
- [20] Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, et al. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α [J]. Nat Protoc, 2012, 7(12): 2103–2111.
- [21] Liu YL, Wang LP, Fatahi R, et al. Isolation of murine bone marrow derived mesenchymal stem cells using Twist2 Cre transgenic mice [J]. Bone, 2010, 47(5): 916–925.
- [22] Dominici M, Blanc KL, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315–317.
- [23] 杨玉彦, 王录美, 孙铭学, 等. 建立 ICR 小鼠骨髓间充质干细胞的体外分离培养及鉴定方法 [J]. 药学服务与研究, 2016, 16(2): 90–93.
- Yang YY, Wang LM, Sun MX, et al. Establishment of the protocol for isolation, cultivation and identification of ICR mice bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. Pharm Care Res, 2016, 16(2): 90–93.
- [24] Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection [J]. J Cell Biochem, 2003, 89(6): 1235–1249.
- [25] Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone [J]. Nat Protoc, 2010, 5(3): 550–560.
- [26] Cai YT, Liu TS, Fang F, et al. Comparisons of mouse mesenchymal stem cells in primary adherent culture of compact bone fragments and whole bone marrow [J]. Stem Cells Int, 2015, 2015: 708906.
- [27] Hu YX, Lou B, Wu XF, et al. Comparative study on *in vitro* culture of mouse bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 6704583.
- [28] Drela K, Stanaszek L, Snioch K, et al. Bone marrow-derived from the human femoral shaft as a new source of mesenchymal stem/stromal cells; an alternative cell material for banking and clinical transplantation [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 262–275.
- [29] Zhang XY, Tu HJ, Yang YZ, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia via the IL-7/JAK1/STAT5 pathway [J]. J Biol Chem, 2019, 294(32): 12167–12179.
- [30] Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals [J]. Nature, 2014, 508(7495): 269–273.

[收稿日期] 2022-07-12

段艳华,陈云祥,郑高利,等. 基于 TGF- β 1/Smad 信号通路初步探讨虎杖醇提取物对腺嘌呤诱导小鼠肾间质纤维化的改善作用[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 10-19.

Duan YH, Chen YX, Zheng GL, et al. Ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* attenuates renal fibrosis in a mouse model of adenine-induced renal injury through inhibiting TGF- β 1/Smad signaling [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 10-19.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.002

基于 TGF- β 1/Smad 信号通路初步探讨虎杖醇提取物对腺嘌呤诱导小鼠肾间质纤维化的改善作用

段艳华^{1,2,3}, 陈云祥^{2,3}, 郑高利^{2,3}, 温磊^{2,3}, 陈浩^{2,3}, 张丽丽^{2,3}, 秦荔^{2,3},
王佳虹^{2,3}, 刘芳^{2,3}, 夏道宗^{1*}, 张立将^{2,3*}

(1. 浙江中医药大学 药学院, 杭州 310053; 2. 杭州医学院 安全性评价研究中心, 杭州 310053;
3. 浙江省药物安全性评价技术研究重点实验室, 杭州医学院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 研究虎杖醇提取物 (ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum*, PCE) 对小鼠肾间质纤维化的保护作用及其潜在分子机制。**方法** 将 50 只雄性 C57BL/6N 小鼠随机分为 5 组 ($n = 10$): 正常对照组、模型组、虎杖醇提取物低、中、高 (75、150、300 mg/kg) 剂量组。除正常对照组外, 其他各组灌胃腺嘌呤构建肾间质纤维化模型, 虎杖醇提取物低、中、高剂量组同时灌胃给予不同剂量的虎杖醇提取物混悬液。各组灌胃给药 42 d 后用生化试剂盒测定血清肌酐 (serum creatinine, Scr) 和尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平, 通过苏木精伊红染色和 Masson 三色染色分别观察小鼠肾组织病理学变化及胶原沉积情况, 采用 Western Blot 法检测小鼠肾组织中转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、Smad6、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白 (Collagen I) 的表达情况。**结果** 与正常对照组比较, 模型组小鼠 BUN、Scr 水平显著增高 ($P < 0.01$)。肾组织病理学 HE 染色可见肾小管结构破坏, 炎细胞浸润肾间质, 完整的健存肾单位明显减少; Masson 染色可见胶原纤维蓝色阳性染色面积明显增多。肾组织 TGF- β 1 的表达明显增多 ($P < 0.01$), 而 TGF- β /Smad 通路的负调节因子 Smad6 的表达显著下调 ($P < 0.01$)。上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 标志蛋白之一 α -SMA、细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白之一 Collagen I 的表达明显增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 虎杖醇提取物各给药组 BUN、Scr 水平以及肾组织 TGF- β 1、 α -SMA 及 Collagen I 的蛋白表达水平呈剂量依赖性降低, Smad6 的表达水平呈剂量依赖性升高。肾组织的病理改变及纤维沉积面积均有不同程度的改善。**结论** 虎杖醇提取物能减轻腺嘌呤诱导的小鼠肾功能损伤, 改善肾间质纤维化, 其机制与干预 TGF- β 1/Smad 信号通路, 抑制 EMT 及 ECM 蛋白沉积有关。

【关键词】 肾间质纤维化; 虎杖醇提取物; TGF β 1/Smad 信号通路; 上皮-间充质转化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 01-0010-10

Ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* attenuates renal fibrosis in a mouse model of adenine-induced renal injury through inhibiting TGF- β 1/Smad signaling

DUAN Yanhua^{1,2,3}, CHEN Yunxiang^{2,3}, ZHENG Gaoli^{2,3}, WEN Lei^{2,3}, CHEN Hao^{2,3}, ZHANG Lili^{2,3}, QIN Li^{2,3},
WANG Jiahong^{2,3}, LIU Fang^{2,3}, XIA Daozong^{1*}, ZHANG Lijiang^{2,3*}

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81673656), 浙江省重点研发计划项目 (2020C03053, 2021C03077)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China (81673656), Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2020C03053, 2021C03077).

【作者简介】 段艳华, 女, 实验师, 在读硕士研究生, 研究方向: 药物安全性评价与药理毒理学研究。Email: 307910220@qq.com

【通信作者】 夏道宗, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药代谢、抗炎与免疫药理研究。Email: xiadaozong@zemu.edu.cn;
张立将, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 药物安全性评价与药理毒理学研究。Email: zhanglj127@163.com。

* 共同通信作者

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China. 2. Center for Drug Safety Evaluation, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053. 3. Key Laboratory of Drug Safety Evaluation and Research of Zhejiang Province, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053)

Corresponding author: XIA Daozong. E-mail:xiadaozong@zcmu.edu.cn; ZHANG Lijiang. E-mail:zhanglj127@163.com

[Abstract] Objective This study aimed to test the efficacy of an ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* (PCE) against adenine-induced renal interstitial fibrosis (RIF) in C57BL/6N mice and reveal its underlying molecular mechanisms of action. **Methods** An RIF model was induced by gavaging C57BL/6N mice with adenine. Fifty male C57BL/6N mice were randomly divided into five groups ($n=10$ per group): normal control group, model group, PCE-L, PCE-M and PCE-H (75, 150, 300 mg/kg, respectively) groups. After treatment for 42 consecutive days, serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) levels were measured with commercially purchased kits. Histopathological changes to the kidneys were assessed by HE and Masson staining. The protein expression levels of TGF- β 1, Smad6, α -SMA, and type I collagen (Collagen I) in kidney tissue were detected by Western Blot. **Results** Compared with the normal control group, the model group had significantly increased BUN and Scr ($P < 0.01$). The protein expression level of TGF- β 1 was significantly increased ($P < 0.01$), while Smad6, a negative regulator of the TGF- β /Smad pathway, was significantly downregulated ($P < 0.01$). The expression of the epithelial-mesenchymal transformation (EMT) marker protein α -SMA and the extracellular matrix (ECM) protein Collagen I were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the drug intervention groups showed decreased levels of BUN and Scr; declining protein expression levels of TGF- β 1, α -SMA and Collagen I; increased levels of Smad6 protein; and the alleviation of pathological changes. **Conclusions** PCE treatment attenuated adenine-induced renal impairment and ameliorated renal interstitial fibrosis in mice. The mechanism of action may be related to changes to the TGF- β 1/Smad signaling pathway and the suppression of EMT and ECM protein deposition.

[Keywords] renal interstitial fibrosis; ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum*; TGF β 1/Smad signaling pathway; epithelial-mesenchymal transformation

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

慢性肾疾病(chronic kidney disease, CKD)具有发病率高、知晓率低、预后差、医疗费用高等特点,是心脑血管疾病、糖尿病、和恶性肿瘤之外又一严重危害人类健康的疾病,近年来,CKD 患病率逐年上升,全球一般人群患病率已达 14.3%^[1]。CKD 是由多种肾疾病,如肾盂肾炎、肾小球肾炎、肾结石,非肾疾病如痛风、糖尿病、高血压以及药物毒副作用引起的缓慢性进行性肾功能不全的临床综合征^[2],CKD 的发生又会增加痛风、糖尿病、高血压的发病率及死亡率,从而引发公共卫生问题。

CKD 的治疗方法有限,通常通过控制潜在的病因来减缓其进展,当 CKD 进展为终末期肾衰竭时(end stage renal disease, ESRD),通常使用肾替代治疗方法:透析和肾移植^[1]。然而,透析对 ESRD 的肾功能损伤及肾组织的病理改变修复作用有限;肾移植存在着供体短缺,不易获得、易发生移植排斥反应、价格昂贵等缺点^[3]。因此,人们需要寻找更有效的治疗方法来治疗 CKD,并减少医疗支出。

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)几

乎是所有肾疾病进展到 ESRD 的共同病理途径^[4],因此,深入探讨 RIF 疾病机制,积极寻找可以早期阻止甚至逆转 RIF 的药物具有重要的意义。许多信号转导分子和途径参与肾间质纤维化的发展,转化生长因子- β (TGF- β) 超家族信号转导通路是肾组织纤维化的中心介质,TGF- β 可通过 Smad 和非 Smad 依赖途径促进肾纤维化的进展。因此干预 TGF- β 通路及其下游靶点就成为治疗肾纤维化的理想选择。天然植物具有较好的抗纤维化效果,且价格低廉,容易获取,因此成为近年来研究的热点。

中医古籍中无 CKD 对应的病名,也无对应的文献记载,根据其临床表现及发病特点,当属“水肿”、“肾水”、“肾劳”、“肾积”、“腰痛”、“虚劳”、“关格”、“尿浊”等。CKD 起源于脾肾之气亏虚,日久由虚致实,可见湿热、湿邪、淤血等各种病理之气交杂。故在治疗上主张补益脾肾,益气养血以固其本,兼以清热利湿,活血化瘀以治其标^[5]。中药虎杖为蓼科多年生草本植物虎杖的干燥根茎和根,味微苦,性微寒,归肝、胆、肺经。具有利湿退黄、清热

解毒、散瘀止痛和止咳化痰等功效。用于湿热黄疸、淋浊、带下、风湿痹痛、痈肿疮毒、水火烫伤、经闭、癥瘕、跌打损伤、肺热咳嗽^[6]。临床上取其清热利湿、散瘀止痛的功效,用于治疗慢性肾病证属湿热瘀血者^[7]。尽管中医使用虎杖治疗慢性肾病的临床疗效确定,但其用于治疗 CKD 的作用机制尚不清楚。

现代药理学研究表明:虎杖中主要含有蒽醌类、二苯乙烯类、黄酮类、香豆素类以及一些脂肪酸类化合物,其主要活性成分白藜芦醇和虎杖苷具有抗氧化、抗炎、免疫调节作用^[8]。虎杖有效成分大黄素、白藜芦醇可以不同程度改善糖尿病肾病小鼠肾组织病理损伤,改善肾小管、肾小球病变,延缓肾小球细胞外基质增生,抑制肾小球硬化以及肾组织纤维化^[9]。虎杖苷可以通过调节 Toll 样受体 4 (TLR4)/核转录因子 (NF- κ B) 信号通路,下调炎症因子表达水平,改善糖尿病肾病大鼠肾的炎性损伤^[10]。

我们的研究使用腺嘌呤诱导 C57BL/6N 小鼠肾间质纤维化,并用虎杖醇提取物 (ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum*, PCE) 对其进行药物干预,观察 PCE 对肾间质纤维化模型小鼠肾功能指标及组织病理学变化的影响,以及其对 TGF- β 1/Smad 信号通路相关信号分子、EMT 和 ECM 蛋白沉积的干预作用,从而评估虎杖醇提取物对腺嘌呤诱导的肾间质纤维化的保护作用,探讨其逆转肾间质纤维化的分子机制及可能的治疗靶点。为虎杖的临床用药和新药开发提供实验依据,为治疗 CKD 的新药开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6N 小鼠 50 只,体重 24 ~ 30 g,12 周龄,购于浙江维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(浙)2019-0001】,饲养于杭州医学院安全性评价研究中心 SPF 级屏障系统【SYXK(浙)2017-0010】,屏障系统具有 12 h/12 h 光/暗循环周期,温度为 20 ~ 25℃,湿度为 40% ~ 5%。饲养期间,自由饮水,饲喂普通维持饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供。饲养管理符合国际 AAALAC 认证的要求。实验设计经杭州医学院安全性评价

研究中心实验动物管理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 批准 (KY-2021-020)。所有实验均按照相关指南和规定进行。

1.1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤:每瓶 25 g,纯度 >99%,购自 Sigma 公司,批号:WXBD2576V;磷酸酸水合物、酸性品红、亮绿 SF、苯胺蓝、伊红 Y 购自上海阿拉丁;肌酐测定试剂盒 (苦味酸法,批号:171044/50005547)、尿素氮测定试剂盒 (谷氨酸脱氢酶法,批号:27324/60134661) 购自德赛诊断系统有限公司;兔单克隆抗体:Anti-TGF- β 1 (货号:ab215715)、Anti-Smad6 (货号:ab273106)、Anti- α -SMA (货号:ab124964)、Anti-Collagen I (货号:ab270993)、Anti-GAPDH (货号:ab181603) 购自 Abcam 公司 (Cambridge, UK);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (货号:A0208)、RIPA 裂解液 (货号:P0013B)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X) (货号:P0015L)、PMSF (货号:ST506)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物 (货号:P1045)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号:P0010)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (货号:P0012A)、脱脂奶粉 (货号:P0216)、BeyoECL Star (货号:P0018AS) 购于上海碧云天生物技术有限公司;PageRuler 预染蛋白 Marker (货号:26616) 购于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。

HITACHI 7100 全自动生化仪 (日立公司,日本),Bio Tek® Synergy HT 全自动荧光酶标仪 (BioTek 公司,美国),DM3000 显微镜等病理全套设备 (Leica 公司,德国);IKA 组织匀浆机 (IKA 公司,德国);Bio-Rad 蛋白电泳系统 (Bio-Rad 公司,美国);Centrifuge 5424R 高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司,德国);ChemiScope 6000 化学发光成像仪 (上海勤翔科技有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 虎杖醇提取物的制备及给药剂量的确定

虎杖购自浙江中医药大学中药饮片厂,取 150 g 虎杖饮片粉碎后过 3 号筛,以 65% 乙醇,料液比 1:40,功率 350 W,频率 55 kHz 超声提取 20 min,提取液旋蒸后冷冻干燥,冻干粉冷藏,得到虎杖醇提取物 32.3 g,得率为 21.5%。根据中国药典 2020 年版一部^[6],虎杖的人用量为 9 ~ 15 g,中药饮片对小鼠的等效剂量为 1.16 ~ 1.93 g/kg,相当于虎杖醇提取物 249 ~ 414 mg/kg。结合预实验,最终确定虎杖醇

提物低剂量组、中剂量组、高剂量组的给药剂量分别为 75、150、300 mg/kg。

1.2.2 动物分组、造模及给药

50 只 C57BL/6N 小鼠进入屏障系统后适应性喂养 1 周,随机分为 5 组:正常对照组、模型组、虎杖醇提物低剂量组(PCE-L, 75 mg/kg)、中剂量组(PCE-M, 150 mg/kg)、高剂量组(PCE-H, 300 mg/kg),每组 10 只。各组小鼠每天称重 1 次,按体重 10 mL/kg 灌胃,每天上午虎杖醇提物低、中、高剂量组分别给予相应浓度的虎杖醇提物混悬液,正常对照组和模型组按体重给予纯水。下午对照组按体重给予纯水,其他各组均灌胃给予 60 mg/kg 的腺嘌呤混悬液,连续给药 42 d。

1.2.3 标本采集及取材

第 42 天给药后,禁食不禁水 12 h,所有动物在第 43 天麻醉,从腹主动脉获取血液,并在 4℃ 下以 3000 r/min 离心 10 min。分离血清,以进行生化分析。采血后,取下肾,冲洗并快速称重,观察 PCE 对肾表观的影响。肾组织分为两组,左肾福尔马林固定用于组织病理学评估、右肾液氮快速冷冻后,在 -80℃ 下保存,用于 Western Blot 分析。

1.2.4 常规肾损伤生化指标检测

按照试剂说明书的方法,使用全自动生化分析仪检测各组小鼠的血清尿素氮、肌酐水平。

1.2.5 肾组织病理形态学观察

取肾,用生理盐水冲洗后福尔马林固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,用切片机将包埋好的组织进行连续切片,切片厚度为 4~5 μm 。切片用苏木素和伊红染色(HE)以观察肾组织病理学改变,Masson 三色染色以观察肾间质纤维化胶原沉积程度,蓝色线状或颗粒状沉积物计为胶原蛋白阳性。每个实验组随机选择 3 个肾的 Masson 染色病理切片,在 200 倍放大率下每个肾随机选择不重叠的 10 个视野,避开肾内大血管,将呈现蓝色的纤维化区域作为阳性目标,使用 Image J 软件计算阳性面积与整个视野总面积的比值,对 Masson 三色染色胶原沉积面积进行量化并使用 SPSS 25.0 统计软件进行分析。

1.2.6 Western Blot 法检测 TGF- β 1/Smad 通路相关信号分子及 EMT、ECM 相关蛋白表达水平

分别取各实验组小鼠肾组织置于预冷的 RIPA 裂解缓冲液中,用电动匀浆机匀浆,匀浆后在 4℃ 下

持续震荡 1 h,随后 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min,从离心机中取出离心管置于冰上,吸取上清液采用 BCA 蛋白定量法测蛋白浓度,加上样缓冲液及 RIPA 缓冲液制备样品,使得 5 组蛋白样品浓度达到一致。每组上样量为 21 μg ,经 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,用 Bio-Rad 转膜装置将凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h,然后在 4℃ 下与一抗孵育过夜[抗体稀释浓度: TGF- β 1 (1 : 1000)、Smad6 (1 : 1000)、 α -SMA (1 : 10000)、Collagen I (1 : 1000)、GAPDH (1 : 10000)]。次日在室温下与辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育 1 h。用特超敏 ECL 化学发光试剂盒显影,化学发光显影仪进行曝光、扫描。以 GAPDH 为内参,通过 Image J 软件根据目的条带与内参的灰度值比值进行半定量分析。上述实验均使用来自不同小鼠的肾组织至少重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,计量资料数据采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。选用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行显著性分析,总体组间差异有统计学意义 $P < 0.05$ 时,进行组间两两比较。当方差齐性时,组间两两比较采用 LSD 法分析,当方差不齐时采用 Dunnett's T_3 法分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠一般精神状况和体重变化的影响

实验期间,正常对照组小鼠反应灵敏,毛发光泽顺滑,生长、进食及二便正常,模型组在灌服腺嘌呤后出现活动量减少,喜静蜷卧,反应迟钝,进食减少,日益消瘦,皮毛枯槁无光泽,小便增多等症状。PCE 给药各剂量组能不同程度地改善腺嘌呤给药后的一般状况,且呈剂量依赖性。

随机分组时,各组小鼠的体重差异无统计学意义($P > 0.05$),正常对照组在给药期间,体重一直呈自然增长,其他各组小鼠体重均有不同程度下降,实验第四周时,模型组小鼠体重明显低于同期对照组($P < 0.01$),PCE 低、中、高剂量组对腺嘌呤造模导致的体重下降具有改善作用,且呈剂量依赖性,其中 PCE 高剂量组与同期模型组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾纤维化小鼠体重变化的影响 (n = 10)

Table 1 Effects of PCE on body weight of mice with adenine-induced renal fibrosis (n = 10)

组别 Groups	体重(g) Weight(g)					
	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6
正常对照组 Normal control group	25.84 ± 2.00	27.01 ± 1.97	27.08 ± 1.78	27.10 ± 2.30	27.27 ± 2.17	27.20 ± 2.06
模型组 Model group	25.96 ± 1.47	26.76 ± 1.52	26.46 ± 1.64	24.79 ± 1.85 ^{##}	22.81 ± 2.78 ^{##}	22.72 ± 1.73 ^{##}
PCE-L 组 PCE-L group	25.10 ± 1.67	26.63 ± 1.89	24.89 ± 2.50 [#]	24.04 ± 2.89 ^{##}	23.75 ± 2.75 ^{##}	23.18 ± 2.90 ^{##}
PCE-M 组 PCE-M group	25.43 ± 1.56	27.05 ± 1.50	25.58 ± 1.54 [#]	24.62 ± 2.26 ^{##}	23.83 ± 2.28 ^{##}	23.52 ± 1.87 ^{##}
PCE-H 组 PCE-H group	25.26 ± 1.21	26.50 ± 1.85	25.97 ± 1.68	25.52 ± 1.11	25.81 ± 1.59 ^{**}	25.12 ± 1.88 ^{**}

注:与正常对照组比较,^{##}*P* < 0.01;与模型组比较,^{**}*P* < 0.01。(下表/图同)
Note. Compared with the normal control group,^{##}*P* < 0.01. Compared with the model group,^{**}*P* < 0.01. (The same in the following tables and figures)

2.2 虎杖醇提物对腺嘌呤诱导的肾间质纤维化小鼠血清肌酐、尿素氮水平的影响

由表 2 可见,与对照组相比,模型组血清肌酐、尿素氮(Scr、BUN)水平显著升高(*P* < 0.01)。虎杖醇提物各给药组小鼠血清肌酐、尿素氮与对照组相比,仍有不同程度的增高,但与模型组相比,血清肌酐、尿素氮水平呈剂量依赖性降低,其中虎杖醇提物高剂量组对腺嘌呤所导致的肌酐、尿素氮升高具有明显改善作用,与模型组相比差异具有统计学意义(*P* < 0.01)。

2.3 肾形态学改变

2.3.1 肉眼观察

正常对照组小鼠肾大小适中,颜色褐红,表面光洁、质地坚韧;而模型组小鼠肾略肿大,呈淡棕褐色,表面凹凸不平,可见颗粒状隆起。虎杖醇提物各给药组对肾外观具有不同程度的改善作用,呈剂量依赖性,以虎杖醇提物高剂量组对肾大体外观改善最明显(见图 1)。

表 2 PCE 对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠血清尿素氮、肌酐的影响 (n = 10)

Table 2 Effects of PCE on blood urea nitrogen and serum creatinine in mice treated with adenine (n = 10)

组别 Groups	血肌酐(μmol/L) Scr (μmol/L)	血尿素氮 (mmol/L) Bun (mmol/L)
正常对照组 Normal control group	38.95 ± 8.50	14.00 ± 5.50
模型组 Model group	89.19 ± 15.30 ^{##}	45.46 ± 8.04 ^{##}
PCE-L 组 PCE-L group	84.74 ± 8.09 ^{##}	44.82 ± 3.35 ^{##}
PCE-M 组 PCE-M group	71.24 ± 14.17 ^{##}	37.43 ± 10.19 ^{##}
PCE-H 组 PCE-H group	56.65 ± 13.46 ^{###}	26.31 ± 11.05 ^{**}

注:与正常对照组比较,[#]*P* < 0.05。(下表/图同)
Note. Compared with the normal control group,[#]*P* < 0.05. (The same in the following tables and figures)



图 1 虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾纤维化小鼠肾大体外观的影响

Figure 1 Effects of PCE on the general appearance of kidney in mice treated with adenine

2.3.2 肾组织病理形态学观察

(1)肾组织 HE 染色结果

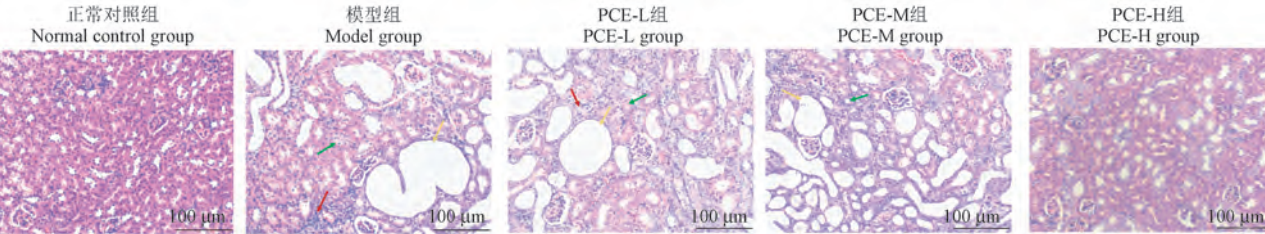
如图 2 所示,正常对照组小鼠肾组织结构正常,皮髓质分界清楚,肾小管上皮细胞大小一致、形态饱满、排列整齐,呈单层立方结构,肾小管以背对背(back to back)的方式排列,间质空间几乎不存在。模型组小鼠肾小管结构破坏,出现坏死,高度扩张的肾小管和萎缩的肾小管并存,部分肾小管上皮细胞扁平、缺失、坏死,脱落的肾小管上皮细胞在管腔内形成细胞碎片或细胞管型,肾小管分离,出现间质间隔。炎细胞浸润肾间质,完整的健存肾单位明显减少。与模型组相比,PCE 各剂量给药组的组织病理学改变有不同程度的改善,呈剂量依赖性。高剂量组肾小管上皮细胞大小一致,排列整齐,细胞形态饱满,高度扩张的肾小管和萎缩的肾小管较模型组明显减少。肾小球形态规则,未见炎细胞浸润,完整的健存肾单位较模型组有显著增多,对腺嘌呤所致肾组织的病理改变有很好的改善。

(2)肾组织 Masson 染色结果

Masson 染色是肾纤维化的主要染色方法之一。

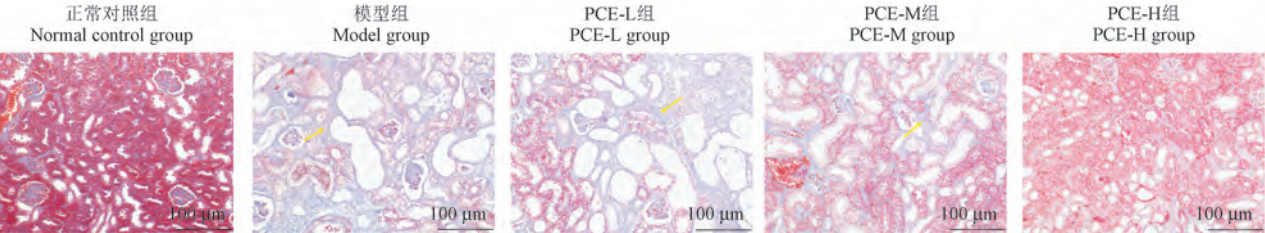
主要用于区分胶原纤维和肌原纤维,在肾穿刺活检标本中,用于显示肾小球沉淀的免疫复合物和基底膜、系膜基质及胶原纤维等^[11]。Masson 染色后,肾小球基底膜沉积物(免疫复合物)呈红色。基底膜、系膜、胶原纤维呈蓝色,肾小管管腔、胞质、红细胞呈鲜红色,细胞核呈棕褐色^[12]。肾间质纤维化发生时,肾间质中大量胶原纤维沉积,因此,蓝色阳性染色面积明显增多,通过比较每组蓝色区域的面积来确定肾病变产生纤维化的程度。

如图 3、图 4 所示,正常对照组肾小球和肾小管形态规则,肾小管上皮细胞排列规则整齐,无系膜增生,间质正常,除了肾内动脉周围、基底膜、系膜有预期的蓝色染色外,几乎没有蓝色染色;模型组小鼠肾间质显示出大量胶原纤维条纹,染色呈蓝色,提示明显的肾间质纤维化,与模型组相比,虎杖醇提物低、中、高剂量组蓝色阳性染色面积均有不同程度的减少,肾组织胶原沉积及肾间质纤维化较模型组改善。经统计学分析显示,虎杖醇提物低、中、高剂量组对腺嘌呤所致小鼠肾组织胶原沉积面积增加均有明显的改善作用($P < 0.01$)。



注:黄色箭头:高度扩张的肾小管;绿色箭头:萎缩的肾小管;红色箭头:炎细胞浸润。
图 2 肾切片的 HE 染色代表性显微图像反映虎杖醇提物对小鼠肾组织病理学变化的影响
Note. Yellow arrows. Highly dilated tubules. Green arrows. Atrophied tubules. Red arrows. Inflammatory cells infiltration.

Figure 2 Representative photomicrographs of HE staining of kidney sections reflect effects of PCE on histopathological changes in the kidneys of mice treated with adenine



注:黄色箭头:肾间质纤维化和胶原沉积。
图 3 肾组织切片的代表性 Masson 染色显微图像反映虎杖醇提物对肾间质纤维化小鼠胶原沉积的影响
Note. Yellow arrows. Areas of fibrosis and collagen deposition.

Figure 3 Representative photomicrographs of Masson's trichome staining of kidney sections reflect effects of PCE on the collagen deposition in mice treated with adenine

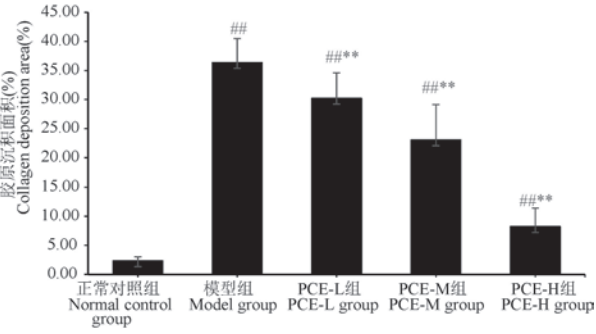


图 4 PCE 对肾间质纤维化小鼠胶原沉积面积的影响($n=3$)

Figure 4 Effects of PCE on the collagen deposition area in mice treated with adenine($n=3$)

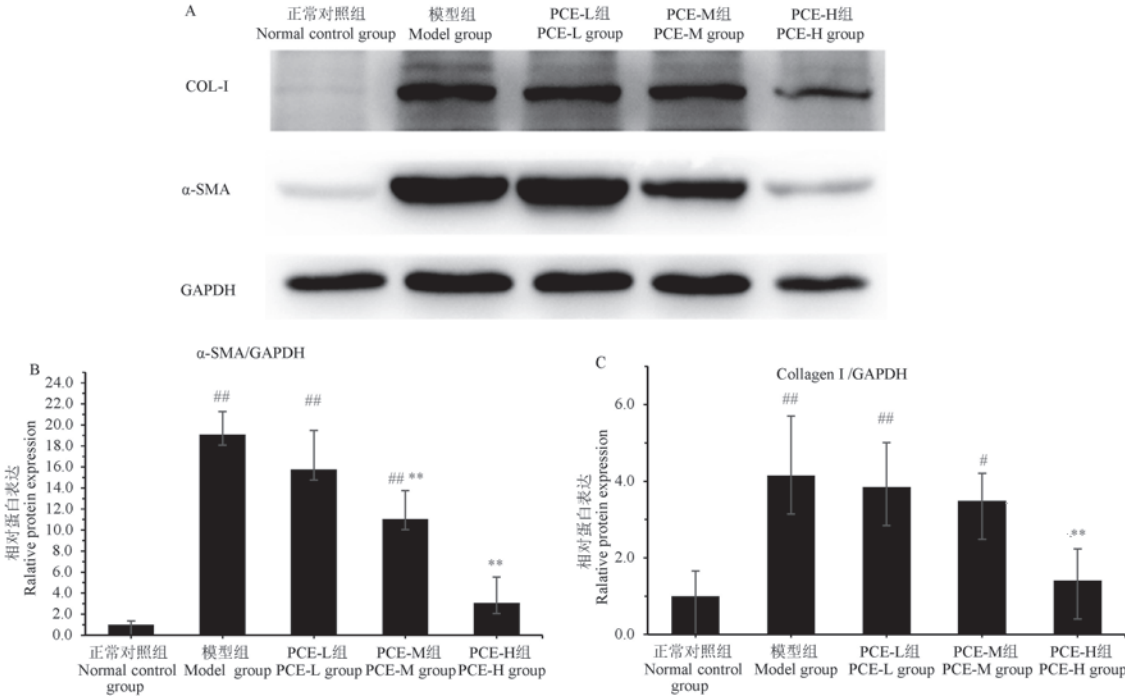
2.4 虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠的 EMT、ECM 蛋白沉积的影响

肾小管上皮细胞向间充质或成纤维细胞表型的转化或转分化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 是肾纤维化过程中的关键因素,其特征是肾小管细胞失去上皮表型,如 E-钙粘蛋白 (E-cadherin),并获得间充质性质的新特征如波形蛋白 (vimentin) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 等^[13]。所有纤维化疾病的共同特征是激活产生细

胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白的肌成纤维细胞^[14],在信号通路的参与下,经过 EMT 后的肾小管上皮细胞丢失了上皮表型、获得间质细胞表型,进而活化为肌成纤维细胞,肌成纤维细胞能分泌细胞 ECM 蛋白,主要包括 I 型和 IV 型胶原蛋白、层粘连蛋白、纤维连接蛋白等^[15]。当 ECM 合成增多或分解减少时,器官便会发生纤维化,甚至发生硬化^[15]。

为检测虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾纤维化小鼠的 EMT、ECM 蛋白沉积的影响,本研究使用 Western Blot 对 EMT 标志性蛋白 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA),ECM 的重要组成部分 Collagen I 进行了检测。

如图 5 所示,经 Western Blot 检测,与对照组相比,模型组小鼠给予腺嘌呤造模后肾组织中 α -SMA、Collagen I 的蛋白表达水平显著增加,(均为 $P < 0.01$)。表明腺嘌呤成功激活了肾小管上皮细胞上皮-间充质转化 (EMT),导致细胞外基质 (ECM) 蛋白过度沉积。与模型组比,虎杖醇提物给药组呈剂量依赖性的抑制腺嘌呤诱导的 α -SMA 及 Collagen



注: A: Western Blot 检测所得小鼠肾中 α -SMA、Collagen I 蛋白的代表性条带; B, C: α -SMA、Collagen I 蛋白印迹的半定量分析。
图 5 Western Blot 代表性条带反映虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠肾组织中的 α -SMA、Collagen I 蛋白水平的影响($n=3$)

Note. A. Representative Western Blot showed the expression of α -SMA, Collagen I in mouse kidneys. B, C. α -SMA, Collagen I levels in Western Blot were quantified via densitometry and were normalized to GAPDH.

Figure 5 Representative bands of Western Blot reflect the effect of PCE on the protein expression of α -SMA and Collagen I in kidney tissues of mice ($n=3$)

I 蛋白高表达, PCE-M 和 PCE-H 组能显著抑制 α -SMA 蛋白表达水平的升高 ($P < 0.01$); PCE-H 组能显著抑制 Collagen I 蛋白表达水平的升高 ($P < 0.01$)。因此虎杖醇提物可以抑制腺嘌呤所致的肾间质纤维化小鼠肾小管上皮细胞 EMT, 减少 ECM 蛋白沉积, 从而减轻肾间质纤维化进程, 发挥肾保护作用。

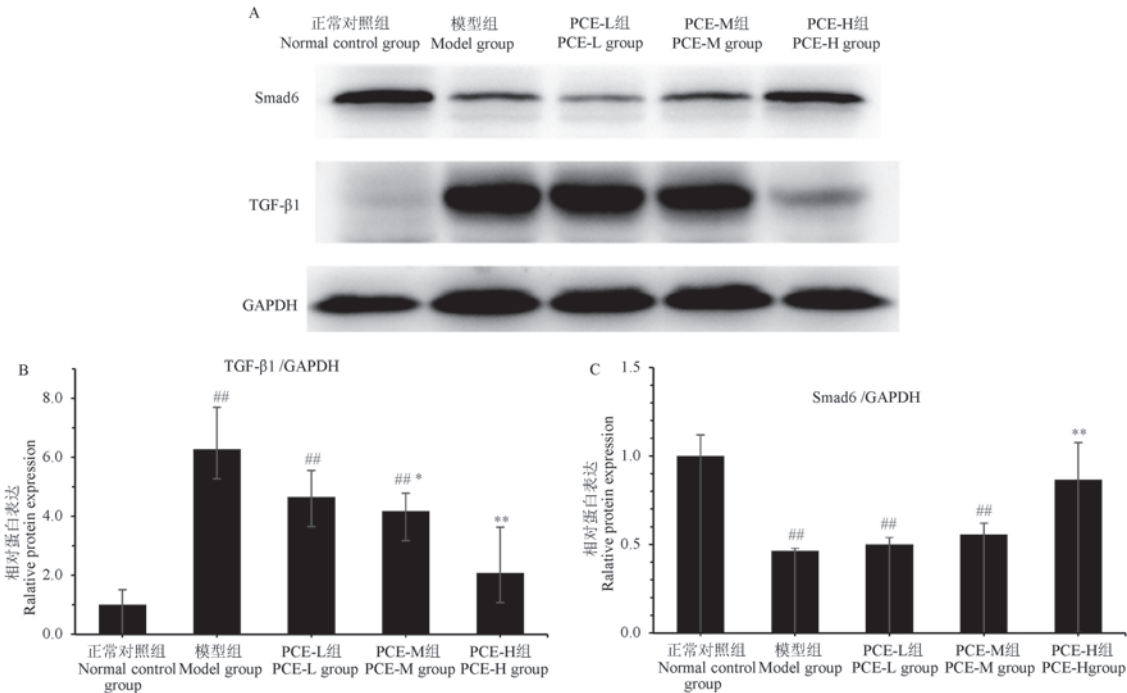
2.5 虎杖醇提物对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠的 TGF- β 1/Smad 信号通路相关信号分子的影响

转化生长因子- β (TGF- β) 超家族信号转导通路是肾组织纤维化的中心介质。哺乳动物体内存在 3 种 TGF- β 亚型: TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3, 其中 TGF- β 1 在肾中表达最多。TGF- β 通过转化生长因子- β 受体 II (T β RII)、转化生长因子- β 受体 I (T β RI) 及其细胞内介质 Smads 诱发 EMT, 并增加 ECM 蛋白如: I 型和 IV 型胶原蛋白、层粘连蛋白、纤维连接蛋白的合成和分泌, 发挥其促纤维化作用^[16]。

Smads 蛋白是将 TGF- β 信号从细胞质转移到细胞核的中转分子。Smads 家族依据其不同的作用被

划分为 3 类: 受体调控的 Smads (R-Smad; Smad 1、2、3、5、8), 共调节 Smads (Co-Smads; Smad4、Smad10), 抑制性 Smads (I-Smad; Smad6、Smad7)。磷酸化的 Smad2、Smad3 与 Co-Smad (Smad4) 形成复合物, 并转移到细胞核, 调节下游促纤维化因子的表达^[17]。I-Smads (Smad6 和 Smad7) 与活化的 T β RI 结合并竞争性阻止 T β RI 激活 R-Smads。此外, Smad6 还可与激活的 R-Smads 相互作用并干扰其与 Smad4 形成复合物, 抑制 R-Smad 的磷酸化, 从而减弱 EMT 诱导^[18]。为检测 TGF- β 1/Smad 信号通路是否参与了 PCE 的抗肾纤维化作用, 本研究采用 Western Blot 检测了各组小鼠肾组织中的 TGF- β 1、Smad6 蛋白表达水平。

如图 6 所示, Western Blot 代表性条带所示: 腺嘌呤造模 42 d 后, 模型组小鼠肾组织中的 TGF- β 1 水平显著高于对照组 ($P < 0.01$), PCE 给药组能呈剂量依赖性的抑制腺嘌呤给药导致的 TGF- β 1 水平升高; 与模型组相比, PCE-M 组和 PCE-H 组能显著抑制 TGF- β 1 蛋白表达 (分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$)。与对照组相比, 模型组小鼠肾组织中 TGF-



注: A: Western Blot 检测所得小鼠肾组织中 TGF- β 1、Smad6 蛋白的代表性条带; B, C: TGF- β 1、Smad6 蛋白印迹的半定量分析。与模型组相比, * $P < 0.05$ 。

图 6 Western Blot 代表性条带反映虎杖醇提物对小鼠肾组织中的 TGF- β 1、Smad6 蛋白水平的影响 ($n = 3$)
Note. A. Representative Western Blot showed the expression of TGF- β 1, Smad6 in mouse kidney tissues. B, C. α -SMA, Collagen I levels in Western Blot were quantified via densitometry and were normalized to GAPDH. Compared with the model group, * $P < 0.05$.

Figure 6 Representative bands of Western Blot reflect the effect of PCE on the protein expression of TGF- β 1 and Smad6 in kidney tissues of mice ($n = 3$)

β 信号通路的负调节因子 Smad6 的水平显著降低 ($P < 0.01$), PCE 给药组能呈剂量依赖性的改善腺嘌呤给药导致的 Smad6 水平降低, 其中 PCE-H 组能显著逆转 Smad6 蛋白表达水平的降低 ($P < 0.01$)。因此, PCE 可通过 TGF- β 1/Smad 信号通路发挥抗肾间质纤维化的作用。

3 讨论

肾间质纤维化是由肌成纤维细胞在慢性炎症反应中过度沉积细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白引起的疤痕和组织硬化^[14]。本研究采用腺嘌呤持续灌胃建立小鼠 CKD 肾间质纤维化模型, 目前常用的慢性肾损伤造模方法有生物法、化学法和物理法^[19]。早在 1986 年, 日本学者 Yokozawz 等^[20]就提出了用腺嘌呤饲养或灌胃的方式构建慢性肾损伤模型。当机体摄入大量腺嘌呤时, 异常高浓度的腺嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下转化为极难溶于水的 2,8 二羟基腺嘌呤 (2,8-DHA), 沉积于肾小管, 使肾小管梗阻, 肾单位大量丧失, 导致氮质血症、电解质和氨基酸代谢紊乱, 从而引起肾间质纤维化和肾功能损伤^[21]。本研究选用腺嘌呤诱导小鼠肾功能损伤, 和人类的慢性肾功能损伤病理过程相似, 且具有造模成功率高、操作方便的优点。经过多次预实验和众多文献的参考, 最终选择 60 mg/kg 的腺嘌呤连续灌胃给药 42 d, 经生化检测血清肌酐、尿素氮的含量及电镜观察组织病理学形态, 显示造模成功。

小鼠经腺嘌呤给药后出现活动量减少, 喜静蜷卧, 反应迟钝, 进食量减少, 日益消瘦等脾气亏虚的症状, 以及皮毛枯槁无光泽, 小便增多等肾气虚损的症状。脾主运化水湿, 脾虚则运化失调, 水湿痰饮之邪内困; 气为血之帅, 气能行血, 脾肾气虚则气不能行血, 血行不畅则瘀血内生。久之则痰湿、血瘀、浊毒内阻, 损伤肾络, 导致肾功能下降, 肾间质纤维化等病变。其中痰浊为肾纤维化的病理代谢产物, 瘀血为邪实之首, 既是病理产物, 又是加重病变发展的致病因素^[22]。本研究以中药虎杖清热利湿、活血散瘀为主要治疗原则, 祛除痰浊、瘀血等病理产物, 从而改善肾功能, 延缓肾纤维化的进展。

本研究显示: 虎杖醇提物高剂量组 (300 mg/kg) 对腺嘌呤所致肾间质纤维化小鼠的一般状况、体重、血清肾功能指标 (BUN、Scr) 以及肾组织病理学及胶原沉积面积的改变具有明显改善作用。且

可逆转模型组小鼠肾组织的 TGF- β 1 蛋白高表达, TGF- β 信号通路的负调节因子 Smad6 的低表达, 以及 EMT、ECM 相关蛋白: α -SMA、Collagen I 蛋白的高表达。研究结果表明虎杖醇提物可通过抑制 TGF- β 1 的表达, 阻断 TGF- β 下游信号效应因子的表达, 并增加负调节因子 Smad6 的表达, 抑制 R-Smad 的磷酸化, 减弱 EMT 诱导及 ECM 蛋白沉积, 从而发挥抑制肾纤维化保护肾的作用。本研究结果为中药虎杖的临床应用提供了一定的实验和理论依据, 但本实验仅选取了 TGF- β 1/Smad 信号通路的部分信号分子进行了研究, 未对 Smad6 是否与 R-Smads 相互作用并干扰其与 Smad4 形成复合物, 抑制 R-Smad 的磷酸化机制作进一步验证, 也未对非 Smad 依赖途径如 Erk、SAPK/JNK 和 p38 MAPK 通路, 以及与肾间质纤维化相关的其他通路如: Wnt/ β -catenin 信号通路作进一步研究。此外, 本次研究数据略显不足, 后续将进一步针对以上不足扩大研究范围, 进行更加深入的研究, 为中药虎杖治疗肾间质纤维化提供更加具体的干预环节和治疗靶点, 为开发肾间质纤维化的新药提供新思路。

参 考 文 献 (References)

- [1] 上海市肾内科临床质量控制中心专家组. 慢性肾脏病早期筛查, 诊断及防治指南 (2022 年版) [J]. 中华肾脏病杂志, 2022, 38(5): 453-464.
Expert Group of Shanghai Nephrology Clinical Quality Control Center. Guideline for screening, diagnosis, prevention and treatment of chronic kidney disease (2022 edition) [J]. Chin J Nephrol, 2022, 38(5): 453-464.
- [2] Ammirati AL. Chronic kidney disease [J]. Rev Assoc Med Bras, 2020, 66: s03-s09.
- [3] Saleh MA, Awad AM, Ibrahim TM, et al. Small-dose sunitinib modulates p53, Bcl-2, STAT3, and ERK1/2 pathways and protects against adenine-induced nephrotoxicity [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2020, 13(11): 397.
- [4] Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(11): 1819-1834.
- [5] 王珊. 基于数据挖掘探讨付滨教授运用和法治疗慢性肾脏病的用药规律 [D]. 天津: 天津中医药大学; 2020.
Wang S. Research on the prescription pattern of professor fubin in treatment for chronic kidney disease by harmonization method based on data mining [D]. Tianjin: Tianjin Chinese Medical University; 2020.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's republic of China. Vol I. [M]. Beijing: China Medical Science Press; 2020.

- [7] 赵静, 孙伟. 孙伟教授治疗慢性肾脏疾病经验集萃 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2022, 23(4): 286–287.
- Zhao J, Sun W. Highlights of professor sun wei's experience in treating chronic kidney disease [J]. Chin J Integr Tradit Western Nephrol, 2022, 23(4): 286–287.
- [8] 张云婷, 黄晓, 陈运中, 等. 虎杖主要化学成分及其生物合成机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(18): 4364–4372.
- Zhang YT, Huang X, Chen YZ, et al. Chemical constituents and their biosynthesis mechanisms of *Polygonum cuspidatum* [J]. Chin J Chin Mater Med, 2020, 45(18): 4364–4372.
- [9] 王达利, 孟凤仙, 商学征, 等. 虎杖有效成分对 DN 模型小鼠肾组织病理改变的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39(4): 441–445.
- Wang DL, Meng FX, Shang XZ, et al. Effects of Active ingredients of *Polygonum cuspidatum* on pathological changes of kidney tissue in DN model mice [J]. J Tianjin Univ of Tradit Chin Med, 2020, 39(4): 441–445.
- [10] 徐小惠, 郑妮. 虎杖苷通过 TLR4/NF- κ B 信号通路调控糖尿病肾病大鼠肾脏炎症作用的研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(16): 1677–1680.
- Xu XH, Zheng N. Polydatin protects diabetic nephropathy rats from renal inflammation by regulating the TLR4/NF- κ B signal pathway [J]. Chin J Hosp Pharm, 2018, 38(16): 1677–1680.
- [11] 凌启波. 实用病理特殊染色和组织化学技术 [M]. 广州: 广东高等教育出版社; 1989.
- Ling QB. Practical special staining and histochemical techniques for pathology [M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press; 1989.
- [12] 张威, 朱小兰, 王朝杰, 等. 改良 Masson 染色法在肾穿刺活检组织染色中的应用 [J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(6): 375–376.
- Zhang W, Zhu XL, Wang CJ, et al. Application of modified Masson staining method in staining of kidney puncture biopsy tissue [J]. Chin J Pathol, 2005, 34(6): 375–376.
- [13] Wang YJ, Chen YY, Hsiao CM, et al. Induction of autophagy by pterostilbene contributes to the prevention of renal fibrosis via attenuating NLRP3 inflammasome activation and epithelial-mesenchymal transition [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 436.
- [14] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis; therapeutic translation for fibrotic disease [J]. Nat Med, 2012, 18(7): 1028–1040.
- [15] 冯浩杰, 张占红, 杜秋沛, 等. 上皮间质转化与器官纤维化 [J]. 生理科学进展, 2022, 53(1): 51–56.
- Feng HJ, Zhang ZH, Du QP, et al. Epithelial-mesenchymal transition and organ fibrosis [J]. Prog Physiol Sci, 2022, 53(1): 51–56.
- [16] Kim MK, Maeng YI, Sung WJ, et al. The differential expression of TGF- β 1, ILK and wnt signaling inducing epithelial to mesenchymal transition in human renal fibrogenesis; an immunohistochemical study [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(9): 1747–1758.
- [17] Avila-Carrasco L, Majano P, Sánchez-Tomé JA, et al. Natural plants compounds as modulators of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Front Pharmacol. 2019, 10: 715.
- [18] Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, et al. Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling [J]. Genes Cells, 2002, 7(12): 1191–1204.
- [19] Nogueira A, Pires MJ, Oliveira PA. Pathophysiological mechanisms of renal fibrosis; a review of animal models and therapeutic strategies [J]. In Vivo, 2017, 31(1): 1–22.
- [20] Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, et al. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats [J]. Nephron, 1986, 44(3): 230–234.
- [21] Okabe C, Borges RL, de Almeida DC, et al. NF- κ B activation mediates crystal translocation and interstitial inflammation in adenine overload nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 305(2): F155–F163.
- [22] 江铭倩, 王利, 彭文, 等. 黄芪汤抗肾纤维化机制探讨 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(7): 733–736.
- Jiang MQ, Wang L, Peng W, et al. Discussion on the mechanism of astragalus decoction against renal fibrosis [J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2016, 36(7): 733–736.

[收稿日期] 2022-09-26

邓书伟,杜春静,张玥,等. 肺孢子菌肺炎小鼠模型建立及免疫学评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 20–26.

Deng SW, Du CJ, Zhang Y, et al. Establishment and immunological evaluation of *Pneumocystis murina* pneumonia mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 20–26.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.003

肺孢子菌肺炎小鼠模型建立及免疫学评价

邓书伟^{1,2,3}, 杜春静⁴, 张玥^{1,2,3}, 周妍希^{1,2,3}, 张亮⁵, 秦秋实⁶, 朱鏐变^{1,2,3,6*}

(1. 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所, 新发突发传染病北京市重点实验室, 北京 100015;
2. 北京市感染性疾病研究中心, 北京 100015; 3. 国家传染病医学中心, 北京 100015; 4. 首都医科大学附属北京地坛医院重症医学科, 北京 100015; 5. 首都医科大学附属北京地坛医院病理科, 北京 100015;
6. 北京大学地坛医院教学医院, 北京 100015)

【摘要】 目的 构建肺孢子菌肺炎(*Pneumocystis pneumonia*, PCP)小鼠模型并进行免疫学评价。**方法** 采用重度联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠气管滴注肺孢子菌构建 PCP 模型,通过实时荧光定量 PCR 及肺组织六胺银染色进行病原学鉴定,通过苏木素-伊红染色评估肺组织损伤程度,通过免疫荧光染色和流式细胞术进行免疫学评价。**结果** 模型组小鼠感染 6 周后,肺组织肺孢子菌 rRNA 拷贝数显著高于假手术组,六胺银染色可见肺孢子菌滋养体和包囊,肺组织肺泡壁增厚,肺间质增宽,大量 Gr-1⁺中性粒细胞 CD68⁺巨噬细胞浸润,中性粒细胞活化标志物髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和巨噬细胞活化标志物一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活化水平显著升高,肺内及肺泡灌洗液的中性粒细胞和单核细胞数量及比例显著高于对照组和假手术组。**结论** 采用 SCID 小鼠进行气管滴注肺孢子菌能构建稳定的 PCP 小鼠模型,该模型表现出与临床相似的免疫学特征。

【关键词】 肺孢子菌肺炎;动物模型;重度联合免疫缺陷小鼠;中性粒细胞;巨噬细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0020-07

Establishment and immunological evaluation of *Pneumocystis murina* pneumonia mouse model

DENG Shuwei^{1,2,3}, DU Chunjing⁴, ZHANG Yue^{1,2,3}, ZHOU Yanxi^{1,2,3}, ZHANG Liang⁵, QIN Qiushi⁶, ZHU Liuluan^{1,2,3,6*}

(1. Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China. 2. Beijing Infectious Diseases Research Center, Beijing 100015. 3. National Medical Center for Infectious Diseases, Beijing 100015. 4. Department of Critical Care Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015. 5. Pathology Department Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015. 6. Peking University Ditan Teaching Hospital, Beijing 100015)

Corresponding author: ZHU Liuluan. E-mail: zhuliuluan@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct a mouse model of *Pneumocystis pneumonia* (PCP) and evaluate the immunological characteristics of the model mice. **Methods** A PCP model was established by endotracheal infusion of *Pneumocystis murine* into severe combined immune deficiency mice. The etiology was identified by quantitative real-time PCR and silver hexaammonium staining of lung tissue. The degree of lung tissue injury was assessed by HE staining, and immunological evaluation was performed by immunofluorescence staining and flow cytometry. **Results** After six weeks of *P. murina* infection, there were significantly more lung tissue rRNA copies from *P. murina* in the experimental group than the sham group. *P. murina* trophozoites and cysts were detected in lung tissue sections from mice in the experimental group

【基金项目】 国家自然科学基金(81871586, 82202415)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China(81871586, 82202415).
【作者简介】 邓书伟(1998—),男,在读硕士研究生,研究方向:感染免疫。Email: dengshuwei@126.com
【通信作者】 朱鏐变(1982—),女,研究员,研究方向:感染免疫。Email: zhuliuluan@ccmu.edu.cn

by silver hexaammonium staining. HE staining showed the alveolar walls of lung tissues in the experimental group were thickened, the lung interstitium was widened, and a large number of Gr-1⁺ neutrophils and CD68⁺ macrophages had infiltrated the lungs. The levels of myeloperoxidase, a marker of neutrophil activation, and nitric oxide synthase, a marker of macrophage activation, were significantly increased. Flow cytometry showed that the number and proportion of neutrophils and monocytes in the lungs and alveolar lavage fluid were significantly higher in the experimental group than the control and sham groups. **Conclusions** A stable PCP mouse model was established by endotracheal infusion of *P. murina* into SCID mice, which showed immunological characteristics similar to clinical signs.

【 Keywords 】 *Pneumocystis* pneumonia; animal model; severe combined immunodeficiency mouse; neutrophil; macrophage

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

肺孢子菌肺炎 (*Pneumocystis* pneumonia, PCP) 是艾滋病、肿瘤放化疗和器官移植患者等免疫低下人群常见的机会性感染及致死原因^[1]。随着各类免疫低下人群数目的增多, PCP 的发病率逐年攀升, 使得 PCP 的预防、治疗以及发病机制等方面的研究成为多学科关注热点^[2-4]。而构建 PCP 动物模型是研究肺孢子菌在宿主内的生活史、致病机制、药物筛选和疫苗研制的基础。

既往国内外实验室常使用大鼠或者日本大耳兔等动物构建 PCP 模型。由于小鼠具有与人类更接近的生化 and 遗传背景, 同时具有价格低廉、可获取性高、易于操作等优势, 近年来更多小鼠品系被用于制备 PCP 动物模型^[5-6]。目前国内外常使用免疫功能正常的小鼠构建 PCP 模型, 主要采用腹腔注射、皮下注射或口服地塞米松、醋酸氢化可的松等免疫抑制剂后, 使小鼠发生自然感染的方法。但上述模型构建方法因存在耗时较长、死亡率较高、免疫抑制剂注射次数多等缺点而难于获得理想的实验资料。

为获得耗时较短、操作简单、死亡率低且稳定的 PCP 小鼠模型, 使用 BALB/c 重度联合免疫缺陷 (severe combined immunodeficiency, SCID) 小鼠气管接种肺孢子菌 (*Pneumocystis murina*, *P. murina*) 构建 PCP 模型, 并通过病原学、分子生物学、细胞生物学实验技术对模型小鼠进行免疫学评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

19 只 SPF 级雄性 SCID 小鼠, 18 ~ 20 g, 6 ~ 8 周龄, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】, 饲养期间各组小鼠自由饮水。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 湿度恒定, 温度

控制在 22 ~ 25℃。实验动物饲养及操作在中国食品药品检定研究院【SYXK(京)2022-0014】完成, 所有操作都符合首都医科大学动物实验及实验动物管理委员会的要求 (AEEI-2020-054)。

1.1.2 主要试剂与仪器

肺孢子菌 (*Pneumocystis murina*, ATCC, PRA-111™), 六胺银染色试剂盒 (源叶, R30435), HE 染色试剂盒 (Solarbio, G1120), 胶原酶 IV (Sigma, C5183), RPMI-1640 培养基 (Gibco, A1049101), PrimeDirect® Probe RT-qPCR Mix (TaKaRa, RR650A), DAPI (Servicebio, G1012), 抗体 CD45 FITC (ThermoFisher Scientific, 11-0451-85), Gr-1 PE (BD Bioscience, 553128), CD11b PerCP-Cy5.5 (Tonbo, 65-0112-U025), CD48 APC (ThermoFisher Scientific, 17-0481-82), CD11c APC-Cy7 (Biolegend, 117324), Gr-1 (Servicebio, GB11129), CD68 (Servicebio, GB11067), MPO (Servicebio, GB11224), FITC-TSA (Servicebio, G1222), Cy3 标记山羊抗兔抗体 (Servicebio, GB21303), HRP 标记山羊抗兔抗体 (Servicebio, GB23303)。多色流式细胞仪 (BD Bioscience, FACS Canto II, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪 (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems 7500, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 菌种保存及菌液制备

6 只 SCID 小鼠用于肺孢子菌保种传代, 参考 Zheng 等^[7]对肺孢子菌传代保种的方法, 将 1×10^6 的肺孢子菌包囊经鼻滴注 SCID 小鼠感染 6 周后麻醉处死小鼠, 取双侧肺组织剪碎, 使用 70 μm 细胞过滤器研磨滤过剪碎的肺组织, 使用无菌 PBS 吹吸过滤, 3000 r/min 离心 5 min 后弃去上清, 使用含 1% 链霉素及青霉素的 10% 二甲基亚砜和 90% 热灭活的胎牛血清制成的冻存液重悬, 液氮保存。

1.2.2 建立 PCP 动物模型

SCID 小鼠随机分为模型组 (Model)、假手术组 (Sham) 和空白对照组 (Control)。模型组和假手术组每组 5 只,空白对照组每组 3 只。模型组小鼠采用 200 μ L 的 0.8% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,使用 0.2 μ m 的 1 mL 胰岛素针气管内滴注 60 μ L 含有 10^6 的肺孢子菌核糖体 RNA (rRNA) 拷贝数的肺组织匀浆液。假手术组小鼠气管内滴注 60 μ L 正常 SCID 小鼠肺组织匀浆。空白对照组不做干预处理。

1.2.3 标本采集与制备

肺泡灌洗液细胞:模型组小鼠肺孢子菌感染 6 周,造模 6 周后,小鼠麻醉并行颈部脱臼处死,切开皮肤分离气管,引流管插入气管下端并固定,使用 1 mL 注射器插入引流管,吸取 500 μ L 无菌 PBS 反复抽吸灌洗 3 次,收集全部肺泡灌洗液,1200 r/min 离心 5 min,底层细胞使用 100 μ L PBS 重悬,获得肺泡灌洗液细胞。

肺组织:剪开小鼠胸腔行肺灌流,待全肺变白后取出双侧肺组织。左肺剪碎,加入 2 mL 消化液 (含 10% FBS 和 1 mg/mL 胶原酶 IV 的 RPMI-1640 培养基),37℃ 摇床消化 30 min,使用 70 μ m 细胞过滤器研磨,400 目滤网过滤,离心弃上清,收集肺组织白细胞,加入 300 μ L PBS 重悬,用于流式细胞术分析和计数。右肺使用 4% 多聚甲醛固定。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

使用 PrimeDirect® Probe RT-qPCR Mix 试剂盒检测小鼠肺组织匀浆中的肺孢子菌含量。探针序列为: 5'-FAM-CCCAGAATAATGAATAAAG-MGBNFQ-3'; 上游引物序列为: 5'-AGGTGAA AAGTCGAAAGGGAAC-3', 下游引物为 5'-AAA ACCTCTTTTCTTTCACTCAGTAACA-3'。以肺孢子菌 rRNA 为模板构建表达质粒,作为标准品。

1.2.5 肺组织切片染色

将右侧完整肺组织 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋及病理切片,行常规苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和六胺银染色,光镜下观察肺组织病理改变和肺孢子菌。

肺组织切片双重免疫荧光染色:肺组织切片脱蜡至水,抗原修复,牛血清白蛋白封闭,加入 1:200 稀释的一抗 Gr-1 湿盒内 4℃ 过夜,加入相应 Cy3 二抗避光孵育 50 min,切片稍甩干后加入 FITC-TSA 避光孵育 10 min,洗涤。切片置于抗原修复液中微波处理,滴加 1:2000 稀释的一抗 CD68 湿盒 4℃ 过夜,加入相应 HRP 二抗室温避光孵育 50 min,切片稍甩

干后滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色 10 min,封片,共聚焦显微镜观察。

1.2.6 流式细胞术

取 100 μ L PBS 重悬的肺泡灌洗液细胞和肺组织白细胞加入抗 CD45、Gr-1、CD11b、CD48、CD11c 混合抗体进行 4℃ 染色,清洗,重悬,加入计数微珠,使用 FACS Canto II 流式细胞仪进行细胞分型和计数,使用 Flowjo 10.6.2 软件进行流式数据分析。

1.3 统计学分析

符合正态分布的实验数据以平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,实验数据使用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学分析,三组组间实验数据使用单因素方差分析进行比较。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织肺孢子菌含量

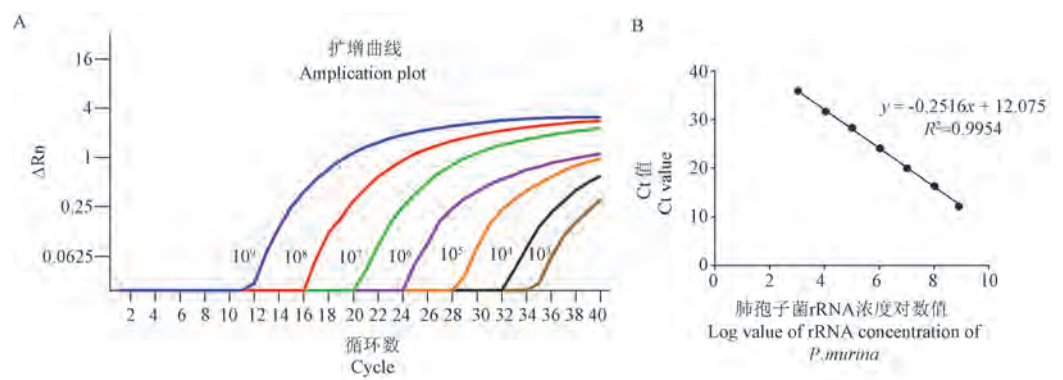
如图 1 所示,实时荧光定量 PCR 阳性质粒标准品的扩增曲线检测下限为 10^3 copies/ μ L,检测上限为 10^9 copies/ μ L,阳性标准品生成的标准曲线为 $y = -0.2516x + 12.075$, $R^2 = 0.9954$,线性关系良好。实时荧光定量 PCR 结果显示模型组的循环阈值 (Ct 值) 要明显低于空白对照组和假手术组,差异具有显著性 ($P < 0.01$)。同时模型组 Pc rRNA 拷贝数和空白对照组及假手术组相比较,差异具有显著性 ($P < 0.01$) (见表 1)。

2.2 肺组织原位病原学和病理检查

六胺银染色发现,模型组小鼠肺组织中可查见肺孢子菌子囊和滋养体 (图 2A),肺孢子菌阳性检出率为 80% (4/5),而空白对照组和假手术组六胺银染色镜检未见肺孢子菌滋养体或包囊。模型组小鼠肺组织六胺银染色可见肺孢子菌包囊呈圆形、椭圆形或月芽形,囊壁为淡褐色,囊内小体不着色,可见条索样结构。HE 染色可见空白对照组肺组织结构正常,假手术组肺组织结构可见轻度改变。与空白对照组和假手术组相比,模型组小鼠肺间质增宽,肺泡壁增厚,同时肺泡腔内可见泡沫样渗出,间质中有明显增多的中性粒细胞浸润 (图 2B)。

2.3 肺组织炎性细胞浸润分析

肺组织切片免疫荧光染色结果显示,空白对照组肺组织切片仅可见 DAPI 复染的细胞核,无 CD68 (绿色荧光) 和 Gr-1 (红色荧光) 阳性信号。假手术组中除可见 DAPI 复染的细胞核外,还可见少量



注:A:肺孢子菌 rRNA 阳性标准品的扩增曲线;B:肺孢子菌 rRNA 阳性标准品的标准曲线。

图 1 实时荧光定量 PCR 扩增曲线和标准曲线

Note. A. Amplification curve of the positive standard for the ribosomal RNA of *P. murina*. B. Standard curve of the ribosomal RNA positive standard for *P. murina*.

Figure 1 Quantitative real-time PCR amplification curve and standard curve

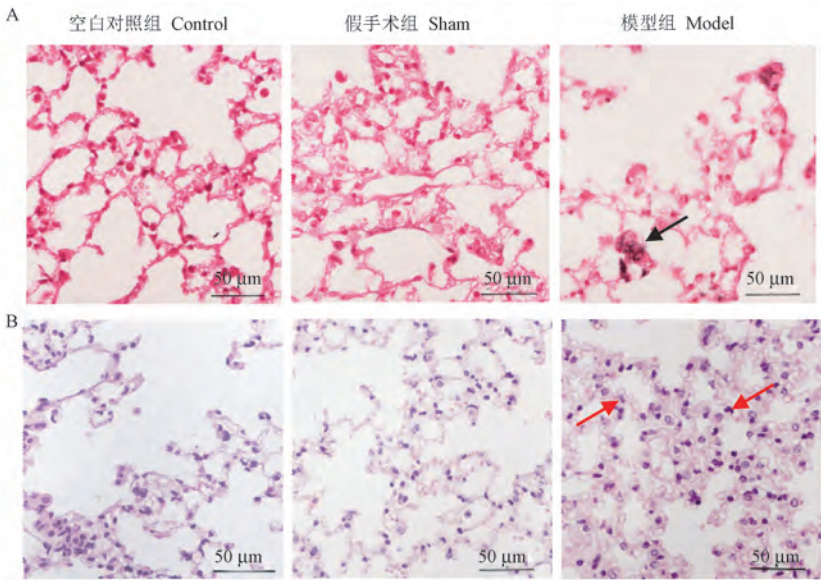
表 1 三组小鼠肺组织肺孢子菌检测结果比较

Table 1 Comparison of *P. murina* detection results in lung tissue of three groups of mice

指标 Index	空白对照组 Control	假手术组 Sham	模型组 Model	F 值 F value	P 值 P value
实时荧光定量 PCR (Ct value) qRT-PCR (Ct value)	30.83 ± 1.27	30.58 ± 0.56	21.92 ± 1.55 *	16.11	< 0.01
肺孢子菌 rRNA 浓度对数值 (Log10 copies/μL) Log value of rRNA concentration of <i>P. murina</i> (Log10 copies/μL)	3.03 ± 0.39	3.72 ± 0.31	6.56 ± 0.39 *	25.45	< 0.001
六胺银检测阳性率 Positive rate of gomori-methenamine silver stain	0	0	80%	/	/

注:六胺银检测阳性率:阳性样本量/检测的样本量;与假手术组相比, **P* < 0.05。

Note. Positive rate of gomori-methenamine silver stain. Positive samples divided by the tested samples. Compared with sham group, **P* < 0.05.



注:A:小鼠肺组织六胺银染色,黑色箭头所示为肺孢子菌包囊;B:小鼠肺组织 HE 染色,红色箭头所示为肺组织粒细胞浸润。

图 2 小鼠肺组织六胺银和 HE 染色

Note. A. Gomori-methenamine silver stain of mice lung tissue, and the cysts of *P. murina* are shown by the black arrow. B. HE staining of mouse lung tissue. The red arrow shows granulocytes infiltration.

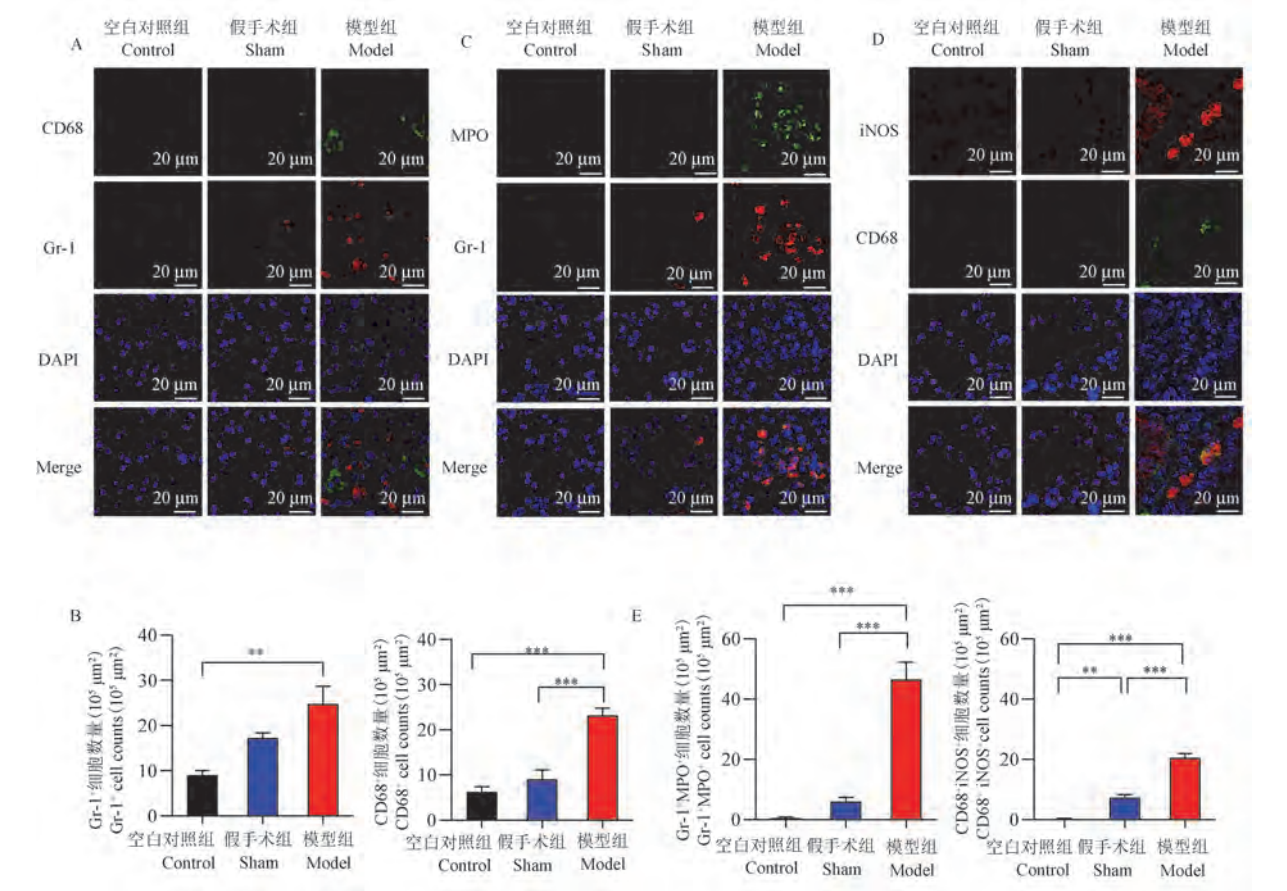
Figure 2 Gomori-methenamine silver and HE stain of mice lung tissue

CD68⁺巨噬细胞(绿色荧光)和 Gr-1⁺中性粒细胞(红色荧光)浸润于肺间质(图 3A)。与空白对照和假手术组相比,模型组小鼠肺组织切片 CD68⁺巨噬细胞(绿色荧光)和 Gr-1⁺中性粒细胞(红色荧光)浸润明显增多。显微计数统计分析结果显示,模型组小鼠肺组织中性粒细胞计数高于空白对照组,差异具有显著性($P < 0.01$);模型组巨噬细胞计数高于空白对照组和假手术组,差异具有显著性($P < 0.001$)(图 3B)。此外,中性粒细胞活化标志髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)在模型组小鼠肺组织中的表达水平显著高于空白对照组和假手术组(图 3C, 3E);同时,巨噬细胞活化标志一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)在模型组小鼠肺组织中的表达水平显著高于空白对照组和假手

术组,差异具有显著性(图 3D, 3E),提示在模型组中的中性粒细胞和巨噬细胞活化水平显著升高。

2.4 流式分析肺脏免疫细胞变化

空白对照组、假手术组、模型组小鼠肺组织和肺泡灌洗液中性粒细胞和单核细胞变化见表 2。统计结果显示,肺组织中,与空白对照组和假手术组相比,模型组中性粒细胞计数和中性粒细胞占白细胞百分比均显著升高($P < 0.05$);同时模型组单核细胞计数及单核细胞占白细胞百分比也显著高于空白对照组和假手术组($P < 0.05$)。在肺泡灌洗液中,与空白对照组和假手术组相比,模型组中性粒细胞计数和中性粒细胞占白细胞百分比显著升高($P < 0.05$);同时模型组单核细胞计数和单核细胞占白细胞百分比也显著升高($P < 0.05$)。



注:A:肺组织 CD68⁺巨噬细胞和 Gr-1⁺中性粒细胞免疫荧光染色;B:巨噬细胞和中性粒细胞计数;C:肺组织 Gr-1 和 MPO 免疫荧光染色;D:肺组织 CD68 和 iNOS 免疫荧光染色;E:肺组织 Gr-1⁺MPO⁺活化中性粒细胞和 CD68⁺iNOS⁺活化巨噬细胞计数。两组间比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 肺组织免疫荧光双重染色

Note. A. Lung tissue CD68⁺ macrophages and Gr-1⁺ neutrophils immunofluorescence staining. B. The counts of macrophages and neutrophils in the lung. C. Immunofluorescence staining for Gr-1 and MPO in lung tissue. D. Immunofluorescence staining for CD68 and iNOS in lung tissue. E. The counts of Gr-1⁺MPO⁺ activated neutrophils and CD68⁺iNOS⁺ activated macrophages in the lung. Compared between two groups, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Double immunofluorescence staining of lung tissue

表 2 流式细胞术分析 PCP 模型小鼠免疫学变化

Table 2 Immunological changes of PCP model mice analyzed by flow cytometry

样本类型 Sample types	指标 Index	空白对照组 Control	假手术组 Sham	模型组 Model
肺 Lung	粒细胞计数($\times 10^4$) Neutrophils count($\times 10^4$)	0.03 $\pm$ 0.01	1.81 $\pm$ 0.98	25.4 $\pm$ 4.10 *
	单核细胞计数($\times 10^2$) Monocytes count($\times 10^2$)	0.19 $\pm$ 0.18	0.75 $\pm$ 0.51	124.84 $\pm$ 26.68 *
	粒细胞百分比(%) Percentage of neutrophils(%)	6.02 $\pm$ 1.48	40.44 $\pm$ 19.07	84.86 $\pm$ 3.36 *
	单核细胞百分比(%) Percentage of monocytes(%)	0.31 $\pm$ 0.18	0.15 $\pm$ 0.08	4.23 $\pm$ 0.70 *
	粒细胞计数($\times 10^2$) Neutrophils count($\times 10^2$)	1.58 $\pm$ 0.34	3.87 $\pm$ 1.32	322.79 $\pm$ 143.09 *
	单核细胞计数($\times 10^2$) Monocytes count($\times 10^2$)	0.80 $\pm$ 0.13	0.91 $\pm$ 0.23	1.72 $\pm$ 1.04 *
肺泡灌洗液 Bronchoalveolar fluid	粒细胞百分比(%) Percentage of neutrophils(%)	0.07 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.04	32.52 $\pm$ 12.26 *
	单核细胞百分比(%) Percentage of monocytes(%)	0.04 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.10 *

注:粒细胞百分比;中性粒细胞占 CD45⁺白细胞的比例;单核细胞百分比;单核细胞占 CD45⁺白细胞的比例;与假手术组相比, * $P < 0.05$ 。
Note. Percentage of granulocytes. Percentage of neutrophils to CD45⁺ white blood cells. Percentage of monocytes. Percentage of monocytes to CD45⁺ white blood cells. Compared with sham group, * $P < 0.05$.

3 讨论

本研究通过对 SCID 小鼠气道内接种肺孢子菌获得稳定的 PCP 模型。qRT-PCR 检测肺孢子菌感染具有高灵敏度和特异度,该方法已成熟用于 PCP 动物模型肺样本的肺孢子菌载量检测,以及早期肺孢子菌感染的临床辅助诊断^[8-10]。本研究通过 qRT-PCR 发现,模型组小鼠肺孢子菌载量显著高于空白对照组和假手术组,表明该研究的模型构建方法可靠。

模型组小鼠肺组织切片六胺银染色查见肺孢子菌包囊和滋养体,阳性检出率为 80%,HE 结果显示,与空白对照组和假手术组相比,模型组小鼠肺组织损伤明显,模型组小鼠肺组织可见明显的肺间质增宽,肺泡壁增厚、肺泡内红细胞渗出,大量中性粒细胞浸润。模型组小鼠肺组织损伤程度可能与小鼠品系及免疫背景有关。Walzer 等^[11]发现皮下注射免疫抑制剂诱导小鼠发生肺孢子菌感染,C3H/HeN 品系小鼠能发生重度感染,而 BALB/c 和 C57BL/6N 小鼠发生中度的肺孢子菌感染。Wright 等^[12]发现重度免疫缺陷的 CB17 小鼠能发生正常的肺孢子菌感染,但未出现肺部炎症。同时发现与 CD4⁺CD8⁺T 细胞耗竭的小鼠相比,CD4⁺T 细胞耗竭的小鼠在肺孢子菌感染后出现更严重的肺部炎症。当然,PCP 模型小鼠肺组织病理改变可能与肺孢子菌接种菌量及感染时间相关。Zhang 等^[13]发现,

PD-1 敲除的小鼠经地塞米松诱导免疫抑制后气管内接种肺孢子菌,PCP 小鼠的肺组织 HE 染色结果显示 PD-1 敲除小鼠的肺部炎症情况在肺孢子菌感染早期较轻,接种后的 3 ~ 7 周内炎症细胞浸润不断增加。McKinley 等^[14]发现在 PCP 模型小鼠中,CD4⁺CD25⁺的调节性 T 细胞发挥控制炎症反应的作用,肺孢子菌感染的初期 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在 14 d 达到峰值,小鼠肺部炎症较轻,随着肺孢子菌接种时间的进展,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞开始降低,此时小鼠肺泡灌洗液中炎症细胞越来越多,肺损伤也越来越重。

多项研究显示,肺泡灌洗液中分离的中性粒细胞可作为非艾滋免疫缺陷 PCP 病人的预后评估指标,也能作为艾滋 PCP 病人短期预后的独立风险因素^[15-17]。Zhang 等^[18]发现,在非艾滋免疫缺陷的 PCP 病人的肺泡灌洗液中有大量增多的中性粒细胞,这些 PCP 病人循环血液中的中性粒细胞和 CD4⁺T 细胞分别高表达 PD-L1 和 PD-1 分子,提示中性粒细胞可能通过调节淋巴细胞功能发挥杀菌作用。虽然目前关于中性粒细胞在 PCP 疾病进展中的具体作用及其机制还未阐明,但是动物研究发现随着 PCP 进展,肺组织损伤都伴随着中性粒细胞的大量浸润^[19]。这些在临床艾滋和非艾滋 PCP 病人及 PCP 动物研究中的结果均提示,中性粒细胞参与肺脏组织损伤。此外,炎症单核细胞可被募集至感染部位发挥直接杀菌作用,同时它也是巨噬细胞

及树突状细胞的前体细胞,但关于炎性单核细胞在肺孢子菌感染模型中很少有报道。为了进一步明确 PCP 小鼠模型肺内免疫学变化,本研究对肺组织进行了免疫荧光双重染色,同时对肺组织内细胞及肺泡灌洗液分离的细胞进行流式细胞术检测。肺组织免疫荧光双重染色结果显示,与空白对照组和假手术组相比,模型组小鼠肺组织中中性粒细胞和巨噬细胞浸润明显增多,同时细胞活化程度显著升高。流式检测发现,在肺泡灌洗液和肺组织中的中性粒细胞计数和百分比均显著高于空白对照组和假手术组,与既往报道的 PCP 动物肺组织大量粒细胞浸润结果一致。

综上,使用 SCID 小鼠经气管切开接种定量的肺孢子菌,不仅能获得稳定的 PCP 动物模型资料,还能通过控制小鼠初始感染程度以缩短成模时间和提高模型小鼠的存活率,该模型方法有望成为未来开展 PCP 研究的基础。

参 考 文 献(References)

[1] Gillóniz C, Dominedò C, Álvarez-Martínez MJ, et al. *Pneumocystis pneumonia* in the twenty-first century: HIV-infected versus HIV-uninfected patients [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2019, 17(10): 787-801.

[2] Ghembaza A, Vautier M, Cacoub P, et al. Risk factors and prevention of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with autoimmune and inflammatory diseases [J]. *Chest*, 2020, 158(6): 2323-2332.

[3] Park JW, Curtis JR, Moon J, et al. Prophylactic effect of trimethoprim-sulfamethoxazole for *Pneumocystis pneumonia* in patients with rheumatic diseases exposed to prolonged high-dose glucocorticoids [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(5): 644-649.

[4] Wang J, Gigliotti F, Bhagwat SP, et al. Immune modulation with sulfasalazine attenuates immunopathogenesis but enhances macrophage-mediated fungal clearance during *Pneumocystis pneumonia* [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(8): e1001058.

[5] 郭鄂平,唐慕湘,宋明华. 小鼠卡氏肺孢子虫肺炎的实验研究 [J]. *陕西医学杂志*, 2004, 33(1): 12-13, 24.

Guo EP, Tang MX, Song MH. Experimental study on *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice [J]. *Shaanxi Med J*, 2004, 33(1): 12-13, 24.

[6] Consortium MGS, Waterston RH, Lindblad-Toh K, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome [J]. *Nature*, 2002, 420(6915): 520-562.

[7] Zheng M, Shellito JE, Marrero L, et al. CD4⁺ T cell-independent vaccination against *Pneumocystis carinii* in mice [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(10): 1469-1474.

[8] 刘文静,伊洁,窦亚玲,等. 实时荧光 PCR 和六胺银染色对肺孢子菌肺炎诊断价值的分析评价 [J]. *现代检验医学杂*

志, 2017, 32(5): 28-31.

Liu WJ, Yi J, Dou YL, et al. Evaluation of real-time PCR and gomori-methenamine silver stain for diagnosing of *Pneumocystis pneumonia* [J]. *J Mod Lab Med*, 2017, 32(5): 28-31.

[9] Alshahrani MY, Alfaiifi M, Ahmad I, et al. *Pneumocystis jirovecii* detection and comparison of multiple diagnostic methods with quantitative real-time PCR in patients with respiratory symptoms [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 27(6): 1423-1427.

[10] Gazonigues S, Bergeron A, Menotti J, et al. *Pneumocystis jirovecii* and quantitative PCR: pneumonia or colonization? [J]. *Rev Mal Respir*, 2020, 37(4): 299-307.

[11] Walzer PD, Powell RD Jr, Yoneda K. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in different strains of cortisonized mice [J]. *Infect Immun*, 1979, 24(3): 939-947.

[12] Wright TW, Gigliotti F, Finkelstein JN, et al. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(9): 1307-1317.

[13] Zhang C, Rong HM, Li T, et al. PD-1 deficiency promotes macrophage activation and T-helper cell type 1/T-helper cell type 17 response in *Pneumocystis pneumonia* [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62(6): 767-782.

[14] McKinley L, Logar AJ, McAllister F, et al. Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of *Pneumocystis pneumonia* [J]. *J Immunol*, 2006, 177(9): 6215-6226.

[15] Lee JY, Park HJ, Kim YK, et al. Cellular profiles of bronchoalveolar lavage fluid and their prognostic significance for non-HIV-infected patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(4): 1310-1316.

[16] Kim SJ, Lee J, Cho YJ, et al. Prognostic factors of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients without HIV infection [J]. *J Infect*, 2014, 69(1): 88-95.

[17] 李爱新,黄春洋,张宏伟,等. 艾滋病合并肺孢子菌肺炎患者近期预后危险因素分析 [J]. *中华医学杂志*, 2017, 97(11): 833-837.

Li AX, Huang CY, Zhang HW, et al. Research on risk factors of short-term outcome in AIDS patients with *Pneumocystis pneumonia* [J]. *Nation Med J Chin*, 2017, 97(11): 833-837.

[18] Zhang NN, Huang X, Zhang Y, et al. Programmed death ligand 1 is overexpressed by neutrophils in the blood of immunocompromised human immunodeficiency virus-negative patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132(10): 1237-1240.

[19] Vassallo R, Standing JE, Limper AH. Isolated *Pneumocystis carinii* cell wall glucan provokes lower respiratory tract inflammatory responses [J]. *J Immunol*, 2000, 164(7): 3755-3763.

吴玉娥,曾业文,罗挺,等. 骨髓间充质干细胞对类风湿关节炎小鼠干预效果研究[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 27-34.

Wu YE, Zeng YW, Luo T, et al. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 27-34.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.004

骨髓间充质干细胞对类风湿关节炎小鼠 干预效果研究

吴玉娥,曾业文,罗挺,凌雪荧,梁十,李航,贾欢欢*

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州 510663)

【摘要】 目的 利用自发类风湿关节炎小鼠模型(Tg-huTNF α 小鼠),探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)对类风湿关节炎及其继发骨量丢失的影响。**方法** 3周龄Tg-huTNF α 小鼠分为3组:(1)模型组(Model),每周腹腔注射1次0.1 mL/10 g的生理盐水;(2)huTNF α 抗体干预组(Anti-huTNF α),每周腹腔注射1次10 mg/kg的huTNF α 抗体;(3)BMSCs干预组(BMSCs),每周双侧膝关节腔各注射1次 5×10^6 Cells的BMSCs。干预期间每周称量1次动物体重,同时对踝关节进行临床评分,各组动物干预10周后处死取材。利用流式细胞仪分析外周血T细胞、B细胞、CD4⁺/CD8⁺T细胞比例,液相芯片法检测血清中huTNF α 、IL-4及IL-1 β 含量,HE染色后评价左侧膝关节和踝关节病理改变,骨形态计量学方法分析右侧股骨骨结构变化。**结果** 与模型组比较,BMSCs和Anti-huTNF α 干预均可缓解Tg-huTNF α 小鼠体重的下降,抑制小鼠关节肿大变形,下调外周血huTNF α 含量,降低Tg-huTNF α 小鼠的关节病理评分,减少关节滑膜和软骨损伤面积。此外,骨形态计量学分析发现,BMSCs干预可提高骨小梁数量和骨小梁面积百分数等,改善Tg-huTNF α 小鼠股骨骨结构。**结论** 关节腔注射BMSCs可以显著缓解Tg-huTNF α 小鼠类风湿关节炎症状,改善股骨骨结构,缓解RA继发的骨量丢失。

【关键词】 类风湿关节炎;骨髓间充质干细胞;Tg-huTNF α 小鼠;骨量丢失

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023)01-0027-08

Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice

WU Yue, ZENG Yewen, LUO Ting, LING Xueying, LIANG Shi, LI Hang, JIA Huanhuan*

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory of
Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

Corresponding author: JIA Huanhuan. E-mail:245089270@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on rheumatoid arthritis and secondary bone loss in a spontaneous rheumatoid arthritis mouse model (Tg-huTNF α mice). **Methods** 3-week-old Tg-huTNF α mice were divided into three groups: (1) Model group: 0.1 mL/10 g normal saline was intraperitoneally injected once a week; (2) huTNF α antibody intervention group (Anti-huTNF α): 10 mg/kg Anti-huTNF α

【基金项目】广东省平台基地及科技基础条件建设项目(2021B1212060002),广东省科技计划项目(2016A030303022)。

Funded by the Guangdong Provincial Platform Base and Science and Technology Infrastructure Construction Project (2021B1212060002), the Planned Science and Technology Project of Guangdong Province (2016A030303022).

【作者简介】吴玉娥(1978—),女,副主任药师,研究方向:疾病动物模型构建,药物非临床评价。Email:38936933@qq.com

【通信作者】贾欢欢(1984—),男,副研究员,研究方向:疾病动物模型构建,药物非临床评价。Email:245089270@qq.com

was intraperitoneally injected once a week; (3) BMSC intervention group (BMSCs): 5×10^6 BMSCs were injected into both knee joint cavities once a week. During the intervention period, the animals were weighed once a week, and ankle joint health was scored clinically. The animals were killed after 10 weeks of intervention. The percentages of T cells, B cells and $CD4^+/CD8^+$ T cells in the peripheral blood were analyzed by flow cytometry. The amounts of huTNF α , IL-4 and IL-1 β in peripheral blood serum were detected by liquid chip technique. Pathological changes to the left knee joint and ankle joint were evaluated by HE staining, and the right femur bone structure was analyzed by bone histomorphometry.

Results BMSCs and Anti-huTNF α provided relief from weight loss in Tg-huTNF α mice; inhibited joint swelling and deformation; and reduced the peripheral blood huTNF α content, joint pathology score, and extent of joint synovium and cartilage damage. Additionally, BMSCs improved the trabecular bone number and percentage trabecular bone area to different degrees and improved the femur bone structure in Tg-huTNF α mice. **Conclusions** Injection of BMSCs into the joint cavity significantly alleviated symptoms of rheumatoid arthritis in Tg-huTNF α mice, improved femur bone structure, and alleviated bone loss secondary to RA.

[Keywords] rheumatoid arthritis; bone marrow mesenchymal stem cells; Tg-huTNF α mice; bone loss

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

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因未明的慢性自身免疫性疾病,以炎性滑膜炎为主。RA 多发于对称性的手足小关节,表现为关节的红肿和疼痛,严重者可致关节畸形和功能丧失^[1-3]。根据世界卫生组织统计,全球 RA 发病率为 0.5% ~ 1%,患病 15 年的残疾率为 61.3%^[4]。RA 不仅严重影响患者的生活质量,也给患者家庭和社会带来了巨大的经济负担。传统的 RA 治疗药物包括非甾体抗炎药、抗风湿药及糖皮质激素等,长期使用会引起严重的胃肠道副作用、肾损伤及骨质疏松等^[5]。随着生物技术和 RA 发病机制的不断提出,多种细胞因子阻断剂已被报道或应用于临床,如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 拮抗剂(阿达木单抗、英夫利昔单抗、依那西普)、IL-1 拮抗剂(阿那白滞素)和 IL-6 拮抗剂等。这些药物的出现使许多难治性 RA 患者受益,然而这些药物价格昂贵,停药后容易复发,且有约 30% 的患者对这类药物无效^[6-7]。近年来,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)基于其强大的免疫调节和抗炎作用,可通过细胞相互作用和分泌多种因子来调节局部环境,修复受损组织,这些特征使 BMSCs 成为治疗 RA 的理想工具^[8-9]。

目前研究认为 TNF α 在 RA 的发病过程中起着关键作用,其作为一种主要的免疫调节因子和前炎性因子,广泛存在于 RA 患者的血清和关节滑膜中,可刺激纤维母细胞增殖,激活淋巴细胞活性,诱导 IL-1 β 、趋化因子和金属蛋白酶的释放,这些直接导致了关节炎病理症状的发生^[10-11]。此外, TNF α 可通过诱导骨髓基质细胞产生核因子 κ B 受体活化因

子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage-stimulating factor, M-CSF)和 IL-6 等,这些因子在促进破骨细胞形成和活化的同时,也抑制了破骨细胞的凋亡,使机体骨吸收大于骨形成,破坏了骨组织的偶联平衡,最终导致 RA 患者关节局部和全身性骨量的丢失^[12-14]。目前对 RA 治疗的研究,主要集中在对炎症的抑制以及对关节软骨和骨侵蚀的修复,较少关注对 RA 继发骨量丢失的影响。

课题组前期成功构建了国内首个高表达人 TNF α 的转基因小鼠模型(Tg-huTNF α 小鼠, FVB 背景),该模型可稳定地表现出典型的 RA 临床症状和病理特征,如踝关节、脚趾关节及指关节对称性肿大和畸形,关节滑膜增生,炎性细胞浸润,血管翳,关节软骨及软骨下骨的侵蚀等^[15]。本文拟利用 Tg-huTNF α 小鼠模型,探讨 BMSCs 对 RA 的治疗效果,同时考察其对 RA 继发骨量丢失的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 3 周龄雌性 Tg-huTNF α 小鼠 20 只,体重(11.0 ± 0.9)g, SPF 级 6 ~ 8 周龄 FVB 小鼠 30 只(作为 BMSCs 供体, Tg-huTNF α 小鼠的背景鼠),体重(22.7 ± 2.4)g,均由广东省实验动物监测所【SCXK(粤)2018-0044】提供,动物饲养于广东省实验动物监测所屏障环境动物房【SYXK(粤)2021-0122】。饲养期间各组小鼠自由饮食饮水,12 h/12 h 明暗交替,相对湿度 40% ~ 70%,温度 22 ~ 26℃。所有操作均符合广东省实验动物监测所

IACUC 伦理委员会要求 (IACUC 2017020)。

1.1.2 主要试剂与仪器

阿达木单抗注射液 (重组全人源化 TNF α 单克隆抗体, 艾伯维, 40 mg/0.8 mL, 批号 70228XH01), 蛋白酶 K (Merck, LZR3365), PrimeSTARTM HS DNA Polymerase (TaKaRa, R045A), 低糖 DMEM 培养基 (Thermo Fisher, 32561037), Fetal bovine serum (gidco, 16000-044), 苏木精 (Sigma, H3136), 伊红 Y (Sigma, 15086-94-9), Penicillin-streptomycin solution (HyClone, SV30010), 红细胞裂解液 (BD, 555899), Anti Mouse CD34 FITC (eBioscience, 11-0341-82), Anti Mouse CD29 PE (eBioscience, 12-0291-82), Anti Mouse CD44 APC (eBioscience, 17-0441-81), FITC Hamster Anti-Mouse CD3e (BD, 561827), APC Rat Anti-Mouse CD4 (BD, 561091), PerCP-CyTM 5.5 Rat Anti-Mouse CD8a (BD, 561109), PE-CyTM 7 Rat Anti-Mouse CD19 (BD, 561739), Luminex Mouse Magnetic Assay 试剂盒 (RND, LXSAMSM-06), Luminex Human Magnetic Assay 试剂盒 (RND, LXSAHM-01)。

CO₂ 恒温培养箱 (Thermo Scientific, Forma series II, 美国), 流式细胞仪 (BD, FACS Canto II, 美国), PCR 仪 (Bio-Rad, T100TM thermal cycler, 美国), 全自动组织脱水机 (Leica, TP1020, 德国), 石蜡包埋机 (Leica, EG1150H + C, 德国), 全自动轮转切片机 (Leica, RM2255, 德国), MAGPIX 液相芯片分析系统 (Luminex, 美国), 正置半自动显微镜 (Leica, DM3000LED, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 BMSCs 体外培养

6 ~ 8 周龄 FVB 小鼠颈椎脱臼法处死, 置于 75% 乙醇中浸泡 5 min, 无菌条件下分离双侧股骨和胫骨, 置于无菌 PBS 中, 剪开干骺端暴露骨髓腔, 用 1 mL 注射器吸取 PBS 冲洗骨髓至骨发白, 移液器吹打成单细胞悬液, 800 r/min 离心 5 min 弃上清, 用含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基重悬细胞, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 ~ 3 d 换液 1 次。当细胞生长接近培养瓶底 80% 时, 胰酶消化传代, 直至第 3 代备用。

1.2.2 小鼠 BMSCs 鉴定

取第 3 代生长良好的 BMSCs, 胰酶消化, 制备成单细胞悬液, 800 r/min 离心 5 min, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 取 5×10^5 个细胞于流式管中, 依次加入 CD34、CD29 和 CD44 荧光抗体, 同时设阴性对照, 避

光孵育 30 min, 800 r/min 离心 5 min, 重复 3 次, PBS 洗去未标记抗体。0.2 mL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测细胞表面标记物。

1.2.3 Tg-huTNF α 小鼠基因型 PCR 鉴定

剪 2 mm 小鼠尾巴, 加 0.1 mL lysis buffer 和 2 μ L 蛋白酶 K, 55℃ 消化 2 h, 95℃ 5 min 灭活蛋白酶 K, 12 000 r/min 离心 5 min, 加适量 DNA 稀释液。根据 PrimeSTARTM HS DNA Polymerase 说明书配制 PCR 反应体系, PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 以上循环 35 次; 72℃ 彻底延伸 10 min; 4℃ 保存。PCR 引物序列为 F: 5' -GAACTCCCTCGATGTTAACC A-3', R: 5' -GAACTCCCTCGATGTTAACCA-3'。制备 1.5% 琼脂糖凝胶, 设定 50 V, 35 min 电泳跑胶, 拍照。目标条带在 375 bp 可判定为阳性 Tg-huTNF α 小鼠。

1.2.4 动物分组及实验干预

SPF 级 3 周龄雌性 Tg-huTNF α 小鼠分为 3 组: (1) 模型组 (Model), 每周腹腔注射 1 次 0.1 mL/10 g 的生理盐水, 5 只; (2) huTNF α 抗体干预组 (Anti-huTNF α), 每周腹腔注射 1 次 10 mg/kg 的 huTNF α 抗体, 5 只; (3) BMSCs 干预组 (BMSCs), 每周双侧膝关节腔各注射 1 次共 5×10^5 个 BMSCs, 10 只。所有组别均干预 10 周。

1.2.5 动物称重及关节临床评分

给药期每周称量动物体重, 同时对踝关节进行临床评分。评分标准^[15]如下: 0 分, 无关节炎症 (外观正常, 关节无肿胀); 1 分, 轻度关节炎 (关节轻微发红、肿胀); 2 分, 中度关节炎 (关节明显发红、肿胀); 3 分, 重度关节炎 (关节严重发红、肿胀、变形)。当表现倾向于下一个严重表型时可在当前表型评分基础上增加 0.5 分。

1.2.6 外周血免疫细胞及细胞因子检测

干预 10 周后, 动物异氟烷麻醉后腹主动脉采血, 取 0.2 mL 全血, 加入 2 mL $1 \times$ 红细胞裂解液, 裂解 10 min, 800 r/min 离心 10 min, PBS 洗涤 3 次。加 0.1 mL PBS 重悬细胞, 之后加入 CD3、CD4、CD8、CD19 抗体避光孵育 20 min, 800 r/min 离心 10 min, PBS 洗涤 3 次, 最后加 0.1 mL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测外周血 T 细胞 (CD3)、B 细胞 (CD19)、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞的变化。外周血 4500 r/min 离心 10 min, 取血清, 液相芯片法检测血清中 huTNF α 、IL-4 及 IL-1 β 含量。

1.2.7 关节病理学分析

取小鼠左侧膝关节和踝关节中性福尔马林溶液固定 48 h 后,5%硝酸溶液脱钙,经常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色、封片后,镜下进行病理评价并测量关节腔(固定测量位置,测量范围 2.60 mm × 1.25 mm)滑膜面积和侵蚀面积。评分标准^[16]如下:0 分,无可检测的病理;1 分,滑膜增生,淋巴细胞浸润;2 分,血管翳,纤维组织形成并覆盖于软骨表面;3 分,软骨破坏和骨质侵蚀;4 分,扩大的软骨破坏和骨质侵蚀。

1.2.8 骨形态计量学方法分析右侧股骨骨结构的变化

取小鼠右侧股骨,中性福尔马林溶液固定 48 h 后,5%的硝酸溶液脱钙,经常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色、封片。选择生长板下 2 mm² 面积进行骨形态计量学测量^[17],测量参数包括骨小梁面积百分数、骨小梁宽度、骨小梁数量、骨小梁分离度和单位骨小梁周长破骨细胞数量。

1.3 统计学分析

结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据均用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5 软件处理,多组间比较使用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。如果数据不符合正态分布或方差不齐,则选择非参数统计方法。

2 结果

2.1 小鼠 BMSCs 体外培养及鉴定

原代培养 FVB 小鼠来源的 BMSCs,12 h 细胞开始贴壁,48 h 首次换液后有大量细胞贴壁。培养初期 BMSCs 呈短棒状,其后逐渐呈长梭形,3 ~ 5 d 开始出现集落样生长。传代 24 h 后细胞快速贴壁,至

第 3 代细胞形态单一,呈梭形,有较多的突起或丝突和颗粒物(图 1A)。流式细胞仪对细胞表面标记物检测结果显示,第三代小鼠 BMSCs 均一性较好,CD34 阴性细胞比例为 99.9%(图 1B),CD29 和 CD44 阳性细胞比例分别为 95.3%和 99.7%(图 1C,1D),综上,认为所培养的为 BMSCs。

2.2 BMSCs 对 Tg-huTNF α 小鼠体重和关节临床评分的影响

经 PCR 方法鉴定,所选择的 20 只 3 周龄小鼠均为 Tg-huTNF α 阳性小鼠,见图 2A。干预期间,huTNF α 抗体干预组和 BMSCs 组动物体重自第 7 周开始高于模型组,但组间比较无显著性差异,见图 2B。模型组临床评分自给药第 1 周开始逐步增加,第 6 周进展到中度关节炎,第 10 周维持在中度关节炎(2.3 分左右)。huTNF α 抗体干预组和 BMSCs 干预组从轻度关节炎(1 分左右)开始治疗用药,期间关节炎症状未见明显加重,第 10 周时仍维持在轻度关节炎,临床评分均显著低于模型组($P < 0.05$)。此外,第 5~10 周 huTNF α 抗体干预组临床评分显著低于 BMSCs 组,差异具有显著性($P < 0.05$)。结果见图 2C,2D。

2.3 BMSCs 对 Tg-huTNF α 小鼠外周血淋巴细胞及细胞因子的影响

流式细胞术检测发现,B 细胞百分比 BMSCs 组(41.0% ± 26.6%)显著低于模型组(96.9% ± 2.8%),差异具有显著性($P < 0.05$);外周血细胞因子检测发现,外周血 huTNF α 含量 BMSCs 组(1.42 pg/mL ± 0.59 pg/mL)和 huTNF α 抗体干预组(1.05 pg/mL ± 0.17 pg/mL)均显著低于模型组(2.25 pg/mL ± 1.44 pg/mL),差异具有显著性($P < 0.05$),其他细胞因子和外周血免疫细胞未见明显变化。结果见图 3A,3B。

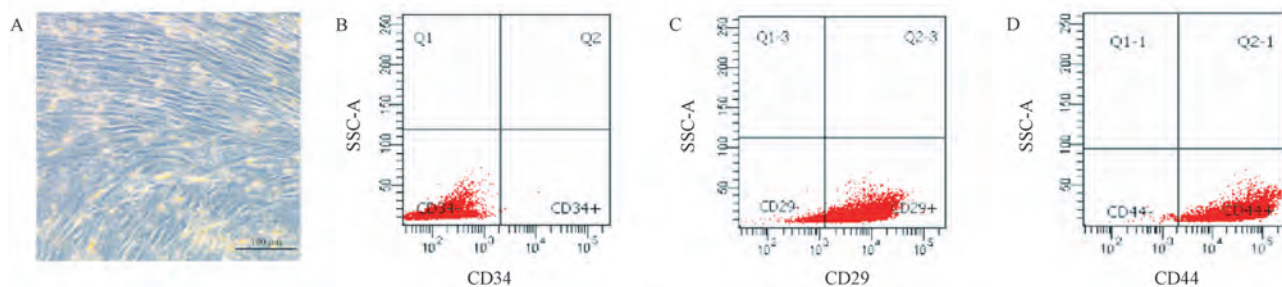


图 1 流式细胞仪鉴定第三代 BMSCs 细胞表面标记物

Figure 1 P3 BMSCs were identified by flow cytometry analysis of cell surface markers

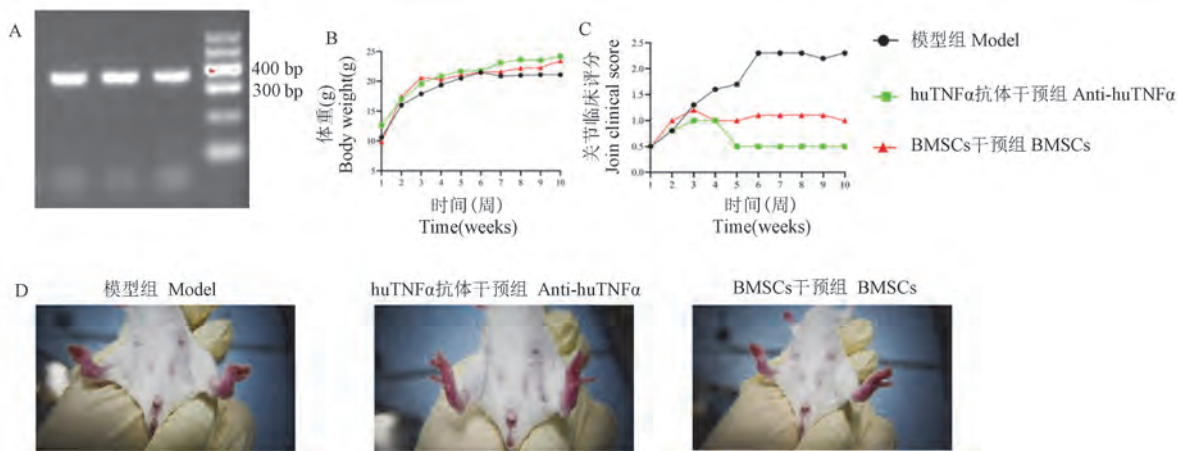
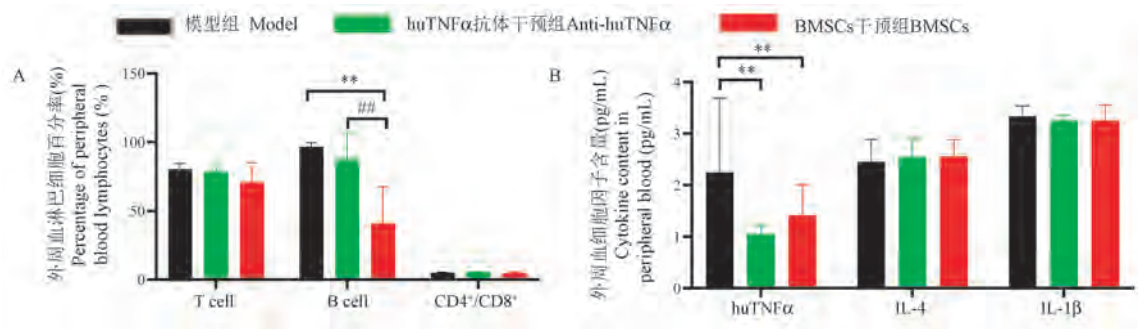


图2 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠体重及关节临床评分的影响

Figure 2 Effects of BMSCs on body weight and join clinical score of Tg-huTNFα mice



注:与模型组比较, ***P* < 0.01;与 huTNFα 抗体干预组比较, ##*P* < 0.01。

图3 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠外周血淋巴细胞及细胞因子的影响

Note. Compared with Model, ***P* < 0.01. Compared with Anti-huTNFα, ##*P* < 0.01.

Figure 3 Effects of BMSCs on peripheral blood lymphocytes and cytokines in Tg-huTNFα mice

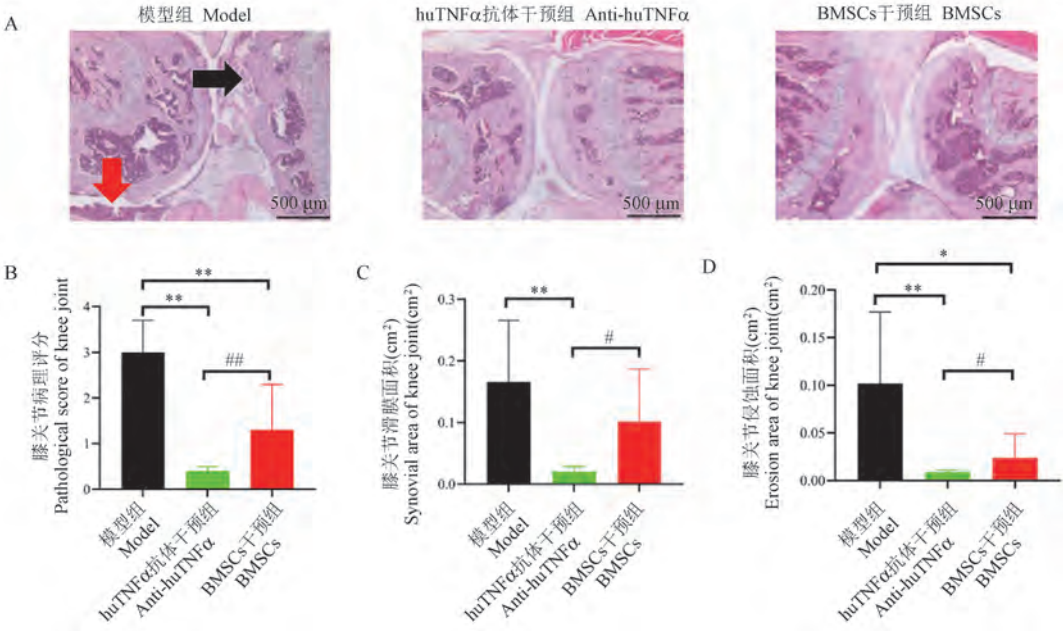
2.4 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠关节病理的影响

病理学研究发现 Tg-huTNFα 小鼠在膝关节和踝关节均表现出类风湿关节炎的典型病理症状,如关节滑膜增生、炎性细胞浸润、血管翳、关节软骨和软骨下骨的破坏等。关节病理学研究发现,膝关节病理评分 BMSCs 干预组 (1.3 ± 1.0) 和 huTNFα 抗体干预组 (0.4 ± 0.1) 均显著低于模型组 (3.0 ± 1.0),膝关节滑膜面积 BMSCs 干预组 (0.102 ± 0.085 cm²) 和 huTNFα 抗体干预组 (0.020 ± 0.010 cm²) 均显著低于模型组 (0.166 ± 0.102 cm²),膝关节侵蚀面积 BMSCs 干预组 (0.024 ± 0.025 cm²) 和 huTNFα 抗体干预组 (0.009 ± 0.002 cm²) 均显著低于模型组 (0.102 ± 0.075 cm²),差异具有显著性 (*P* < 0.05),结果见图 4;踝关节病理评分 BMSCs 组 (2.0 ± 0.4) 和 huTNFα 抗体干预组 (0.8 ± 1.1) 均显著低于模型组 (3.5 ± 0.6),踝关节滑膜面积 BMSCs 干预组 (0.578 ± 0.128 cm²) 和 huTNFα 抗

体干预组 (0.051 ± 0.012 cm²) 均显著低于模型组 (1.342 ± 0.903 cm²),踝关节侵蚀面积 BMSCs 组 (0.050 ± 0.061 cm²) 和 huTNFα 抗体干预组 (0.014 ± 0.002 cm²) 均显著低于模型组 (0.318 ± 0.146 cm²),差异具有显著性 (*P* < 0.05) (见图 5)。此外病理评价发现,在关节评分、滑膜增生面积及侵蚀面积等方面,huTNFα 抗体干预组明显少于 BMSCs 干预组,差异具有显著性 (*P* < 0.05)。

2.5 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠股骨骨结构的影响

骨形态计量学分析发现,BMSCs 干预 10 周后,提高了 Tg-huTNFα 小鼠股骨骨小梁面积百分数及骨小梁数量等骨形成指标 (*P* < 0.05),同时也降低了骨小梁分离度和单位面积破骨细胞数量等骨吸收指标 (*P* < 0.05)。与 BMSCs 类似,Anti-huTNFα 干预 10 周后,增加了骨小梁宽度,减少了单位面积破骨细胞数量,差异均具有显著性 (*P* < 0.05)。结果见表 1。

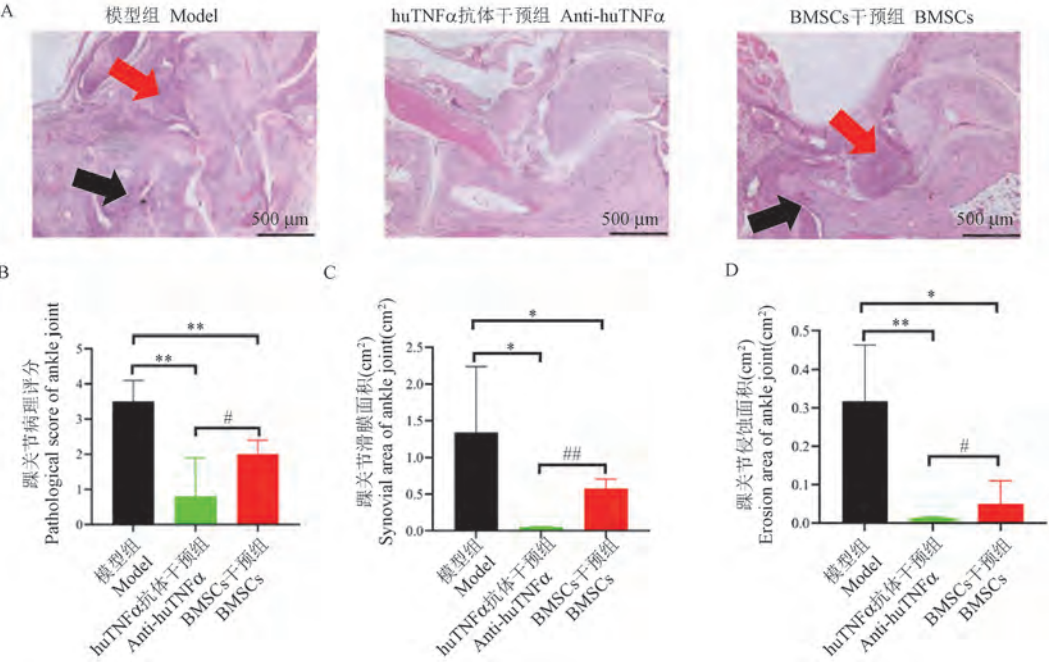


注:红色箭头:滑膜增生;黑色箭头:软骨或软骨下骨侵蚀;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 huTNF α 抗体干预组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 4 BMSCs 对 Tg-huTNF α 小鼠膝关节病理的影响

Note. Red arrows. Synovial hyperplasia. Black arrows. Cartilage or subchondral bone erosion. Compared with Model, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with Anti-huTNF α , # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 4 Effect of BMSCs on knee joint pathology in Tg-huTNF α mice



注:红色箭头:滑膜增生;黑色箭头:软骨或软骨下骨侵蚀。

图 5 BMSCs 对 Tg-huTNF α 小鼠踝关节病理的影响

Note. Red arrows. Synovial hyperplasia. Black arrows, Cartilage or subchondral bone erosion.

Figure 5 Effect of BMSCs on ankle joint pathology in Tg-huTNF α mice

表 1 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠股骨骨结构的影响

Table 1 Effect of BMSCs on bone mass of femur in Tg-huTNFα mice

组别 Groups	骨小梁面积百分数(%) Trabecular area percentage(%)	骨小梁宽度(μm) Trabecular width(μm)	骨小梁数量(#/mm) Trabecular number(#/mm)	骨小梁分离度(μm) Trabecular separation(μm)	单位骨小梁周长 破骨细胞数量(#/mm) Unit trabecular circumference osteoclast number(#/mm)
模型组 Model	11.4 ± 3.1	17.3 ± 0.9	6.5 ± 1.7	147.7 ± 52.1	0.9 ± 0.5
huTNFα 抗体干预组 Anti-huTNFα	15.0 ± 5.6	20.1 ± 2.9*	7.3 ± 1.5	120.5 ± 26.2	0.3 ± 0.1*
BMSCs 干预组 BMSCs	15.6 ± 4.6*	17.3 ± 2.7	9.0 ± 1.6**	97.3 ± 20.8*	0.3 ± 0.2**

3 讨论

目前研究认为,细胞因子和趋化因子是维持机体免疫平衡的两类重要物质,机体的免疫失衡直接导致了 RA 的发生^[18]。TNFα 作为一种重要的促炎因子,广泛存在于 RA 患者的血清和关节滑膜中,是 RA 发病机制的关键调控因子^[19]。TNFα 可由炎症关节中的巨噬细胞、滑膜成纤维细胞、T 细胞、B 细胞等多种细胞分泌产生,同时 TNFα 可以再次作用于这些细胞,不断放大和延续炎症过程^[20]。TNFα 功能的发挥与肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)相关, TNFα 与 TNFR1 结合后可通过 NF-κB 信号通路发挥促炎功能,而 TNFα 介导的 T 细胞迁移、增殖、激活和抗原呈递、组织修复和血管生成的调控则依赖于 TNFR2 的信号传导^[21-22]。TNFα 通过激活细胞因子和趋化因子的表达,增加内皮细胞粘附分子的表达,保护滑膜成纤维细胞,促进血管生成,抑制调节性 T 细胞并诱导疼痛,在 RA 的发病过程中起着核心作用^[23-24]。人们普遍认为免疫功能障碍在 RA 的发病机制和发病过程中起着重要的作用,因此常规的 RA 治疗药物多为免疫调节剂,如非甾体类抗炎药、抗风湿药和糖皮质激素等。然而,这些药物长期使用会导致一系列的副作用,如胃肠道副作用、肝肾损伤、骨质疏松及变态反应等^[5]。随着生物技术的不断发展,近年来出现了如 TNFα 和 IL-1 的拮抗剂,这类药物治疗效果明显,但价格昂贵,停药后易复发,且有约 30% 的患者对这类药物无效^[6-7]。因此,开发一种新的、更有效、低副作用的 RA 治疗方法,具有重要意义。近年来,间充质干细胞作为自身免疫性疾病新的治疗方法得到了广泛的研究和应用。特别是 BMSCs,因其具有较强的免疫调节和抗炎作用,可通过细胞相互作用和分泌多种因子来调节整体和局

部微环境,修复受损组织,使其成为治疗 RA 的理想工具^[8-9]。

本研究发现,BMSCs 经关节腔注射 10 周,可显著改善 Tg-huTNFα 小鼠关节炎肿大变形,抑制 RA 关节病理改变,同时下调外周血 huTNFα 含量,延缓小鼠体重的下降。研究也发现,BMSCs 治疗效果弱于 TNFα 拮抗剂(huTNFα 抗体),可能是由于 Tg-huTNFα 小鼠模型为高表达人 TNFα,该小鼠 RA 症状与机体分泌的 TNFα 强相关,因此 TNFα 拮抗剂在靶向性上强于 BMSCs。本研究利用流式细胞技术检测发现,BMSCs 显著下调了 Tg-huTNFα 小鼠外周血 B 细胞百分比。据研究报道,RA 患者的血液和滑膜中 B 细胞均有显著性增加,滑膜和关节内的 B 淋巴细胞来源于外周血,滑膜组织是 B 细胞积累、增殖、浆细胞分化和自身抗体产生的活性部位^[25]。目前研究认为,BMSCs 对 RA 的治疗作用除具有调控细胞因子的功能外,对免疫细胞也有一定的调节作用,BMSCs 通过可分泌细胞因子(旁分泌效应)和细胞-细胞直接接触效应,抑制 B 细胞的增殖和活化^[26]。本研究使用骨形态计量学方法,分析 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠继发骨量丢失的影响。研究发现,BMSCs 干预 10 周后,提高了 Tg-huTNFα 小鼠股骨骨小梁面积百分数、骨小梁数量等,同时也降低骨小梁分离度和单位面积破骨细胞数量等,与 model 比较骨量明显增加,说明 BMSCs 对 RA 继发的骨量丢失有一定的减缓作用。在正常的生理条件下,骨形成和骨吸收之间存在着一种偶联平衡。在 RA 患者中这种平衡被破坏,TNFα 刺激内皮细胞产生 IL-1、IL-6 和趋化因子,TNFα 和 IL-1 不仅改变滑膜成纤维细胞的功能,使其分泌各种促进骨吸收的炎症介质(如基质金属蛋白酶、IL-6 和前列腺素 E),而且可以诱导滑膜巨噬细胞分化为破骨细胞,这些原因导致了 RA 患者关节骨侵蚀和继发的整体

骨量下降^[18,27]。抑制细胞因子是抑制骨侵蚀和防止全身骨丢失的最有效方法之一,阻断 TNF α 在 RA 发病过程中的作用,可显著下调破骨细胞的活性,抑制骨吸收,缓解 RA 继发的全身骨量丢失。

本研究中,在自发 RA 的 Tg-huTNF α 小鼠双侧膝关节腔注射给予 5×10^5 个 BMSCs,可显著缓解该小鼠 RA 临床症状和病理特征,并改善其股骨骨结构,缓解 RA 继发的骨量丢失,这些改变与 BMSCs 的免疫调节作用密切相关,通过本研究可以为临床 BMSCs 治疗 RA 提供一定的研究基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Sparks JA. Rheumatoid arthritis [J]. Ann Intern Med, 2019, 170(1): ITC1-ITC16.
- [2] Zhang Q, Li Q, Zhu J, et al. Comparison of therapeutic effects of different mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice [J]. Peer J, 2019, 7: e7023.
- [3] Radu AF, Bungau SG. Management of rheumatoid arthritis: an overview [J]. Cells, 2021, 10(11): 2857.
- [4] Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [5] Gao J, Zhang G, Xu K, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells improve bone erosion in collagen-induced arthritis by inhibiting osteoclast-related factors and differentiating into chondrocytes [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 171.
- [6] Tamaddon M, Burrows M, Ferreira SA, et al. Monomeric, porous type II collagen scaffolds promote chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. Sci Rep, 2017, 7: 43519.
- [7] Favalli EG, Raimondo MG, Becciolini A, et al. The management of first-line biologic therapy failures in rheumatoid arthritis: current practice and future perspectives [J]. Autoimmun Rev, 2017, 16(12): 1185-1195.
- [8] Liu H, Li R, Liu T, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1912.
- [9] Hwang JJ, Rim YA, Nam Y, et al. Recent developments in clinical applications of mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. Front Immunol, 2021, 12: 631291.
- [10] Yokota K, Sato K, Miyazaki T, et al. Characterization and function of tumor necrosis factor and interleukin-6-induced osteoclasts in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2021, 73(7): 1145-1154.
- [11] Zhai Z, Yang F, Xu W, et al. Attenuation of rheumatoid arthritis through the inhibition of tumor necrosis factor-induced caspase 3/gasdermin E-mediated pyroptosis [J]. Arthritis Rheumatol, 2022, 74(3): 427-440.
- [12] Wysham KD, Baker JF, Shoback DM. Osteoporosis and fractures in rheumatoid arthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2021, 33(3): 270-276.
- [13] Croft M, Siegel RM. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases [J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13(4): 217-233.
- [14] Liu YQ, Liu Y, Chen ZY, et al. Rheumatoid arthritis and osteoporosis: a bi-directional Mendelian randomization study [J]. Aging, 2021, 13(10): 14109-14130.
- [15] Li G, Wu YE, Jia H, et al. Establishment and evaluation of a transgenic mouse model of arthritis induced by overexpressing human tumor necrosis factor alpha [J]. Biol Open, 2016, 5(4): 418-423.
- [16] Douni E, Sfikakis PP, Haralambous S, et al. Attenuation of inflammatory polyarthritis in TNF transgenic mice by diacerein: comparative analysis with dexamethasone, methotrexate and anti-TNF protocols [J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(1): R65-R72.
- [17] Recker RR, Lappe JM, Davies M, et al. Perimenopausal bone histomorphometry before and after menopause [J]. Bone, 2018, 108: 55-61.
- [18] Moelants EA, Mortier A, van Damme J, et al. Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis [J]. Immunol Cell Biol, 2013, 91(6): 393-401.
- [19] Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 10922.
- [20] Callard RE, Gearing AJH. The cytokine factsbook [M]. London: Academic Press; 1994.
- [21] Micheau O, Rizzi M, Smulski CR. Editorial: TNFR superfamily oligomerization and signaling [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 682472.
- [22] Belenguer G, Duart-Abadia P, Jordán-Pla A, et al. Adult neural stem cells are alerted by systemic inflammation through TNF- α receptor signaling [J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(2): 285-299.
- [23] Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis [J]. Cells, 2020, 9(4): 880.
- [24] Keffer J, Probert L, Cazlaris H, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis [J]. EMBO J, 1991, 10(13): 4025-4031.
- [25] Pala O, Diaz A, Blomberg BB, et al. B lymphocytes in rheumatoid arthritis and the effects of anti-TNF- α agents on B lymphocytes: a review of the literature [J]. Clin Ther, 2018, 40(6): 1034-1045.
- [26] Nakken B, Munthe LA, Kontinen YT, et al. B-cells and their targeting in rheumatoid arthritis-current concepts and future perspectives [J]. Autoimmun Rev, 2011, 11(1): 28-34.
- [27] Yi X, Liu X, Kenney HM, et al. TNF-polarized macrophages produce insulin-like 6 peptide to stimulate bone formation in rheumatoid arthritis in mice [J]. J Bone Miner Res, 2021, 36(12): 2426-2439.

彭冬冬,陈相池,唐梓宁,等. 大鼠真菌性中耳炎模型建立 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 35-42.

Peng DD, Chen XC, Tang ZN, et al. Establishment of fungal otitis media model in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 35-42.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.005

大鼠真菌性中耳炎模型建立

彭冬冬^{1,2}, 陈相池^{1,2}, 唐梓宁^{1,2}, 肖洒^{1,2}, 彭西湘^{1,2}, 刘学武^{1,2*}

(1. 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,长沙 410331;2. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司,长沙 410331)

【摘要】 目的 建立白色念珠菌诱导的大鼠真菌性中耳炎模型,为药效评价提供动物模型支持。**方法** SD 大鼠 50 只,雌雄各半,随机分为正常对照组、空白注射组、潮湿组、免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组,每组 10 只。实验开始 1 ~ 3 d,潮湿组每日对大鼠右侧耳部滴入 2 次 0.9%氯化钠注射液,免疫抑制组每日经口灌胃给予 0.81 mg/kg 醋酸地塞米松药液,潮湿+免疫抑制组每日对大鼠右侧耳部滴入两次 0.9%氯化钠注射液的同时每日经口灌胃给予 0.81 mg/kg 醋酸地塞米松药液。第 4 天,各组麻醉后,潮湿组、免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组将 1×10^{10} CFU/mL 白色念珠菌悬液经鼓膜穿刺注入到大鼠右侧中耳腔,每只 50 μ L,空白注射组大鼠注入等体积空白培养液,正常对照组不做任何处理;每日对潮湿组、潮湿+免疫抑制组大鼠右侧耳部滴入 2 次 0.9%氯化钠注射液。造模期间,观察各组大鼠一般症状;造模第 5、10、15 天采集耳道分泌物进行白色念珠菌培养和革兰氏染色计数,造模第 15 天 ELISA 检测耳道灌洗液中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β),HE 染色观察中耳组织病理学改变。**结果** 与空白注射组相比,潮湿组、免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组大鼠均出现不同程度中耳炎症状,IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),中耳出现不同程度的黏膜充血、水肿及炎性细胞浸润现象,且免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组大鼠耳道分泌物中白色念珠菌数量均显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 本实验使用鼓膜穿刺方式注射白色念珠菌建立真菌性中耳炎大鼠模型成功,在潮湿+免疫抑制条件效果更佳,可用来进行药效学作用的评价。

【关键词】 真菌性中耳炎;大鼠;白色念珠菌;炎症因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0035-08

Establishment of fungal otitis media model in rats

PENG Dongdong^{1,2}, CHEN Xiangchi^{1,2}, TANG Zining^{1,2}, XIAO Sa^{1,2}, PENG Xixiang^{1,2}, LIU Xuewu^{1,2*}

(1. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331, China.
2. Hunan Prima Pharmaceutical Research Center Co. Ltd, Changsha 410331)
Corresponding author: LIU Xuewu. E-mail: liuxuewu@hnse.org

【Abstract】 Objective To establish a model of fungal otitis media induced by *Candida albicans* and provide a useful animal model for drug efficacy evaluation. **Methods** Fifty healthy adult SD rats (50% male and 50% female) were randomly divided into a normal control group, blank injection group, moist group, immunosuppressive group, and moist immunosuppressive group, with 10 rats in each group. During the first 1 ~ 3 days of the experiment, a 0.9% sodium chloride injection was administered twice daily to the right ears of the rats in the moist group, 0.81 mg/kg dexamethasone acetate was given daily by oral gavage to the immunosuppressive group, and 0.81 mg/kg dexamethasone acetate along with 0.9% sodium chloride injection by oral gavage was given twice daily into the right ear of the rats in the moist immunosuppressive group. On day 4, after the animals in each group were anesthetized with diethyl ether, the moist, immunosuppressive, and moist immunosuppressive groups were injected with 1×10^{10} CFU/mL *C. albicans* solution (50

[基金项目] 湖南省高新技术产业科技创新引领计划(2020GK4083)。
Funded by Science and Technology Innovation Leading Plan of High-Tech Industry of Hunan Province(2020GK4083)。
[作者简介] 彭冬冬(1990—),男,在读硕士研究生,研究方向:新药药效与安全性评价。Email: pengdongdong@hnse.org
[通信作者] 刘学武(1988—),男,在读博士研究生,研究方向:药理学。Email: liuxuewu@hnse.org

μL to each rat), the blank group was injected with an equal volume of saline, the blank injection group was injected with an equal volume of blank culture solution, and the normal control group was given no treatment. Subsequently, a 0.9% sodium chloride injection was administered twice daily to the right ears of rats in the moist and moist immunosuppressive groups. During the model-creation period, the general state of the rats in each group was observed. On the 5th, 10th, and 15th days of modeling, ear canal secretions were collected for *C. albicans* culture and Gram stain counting. On the 15th day of modeling, ELISA was used to detect interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin- β (IL- β) in ear canal irrigation samples. HE staining was performed to observe pathological changes to the lung and middle ear tissues, and bacterial culture counts were performed. **Results** Compared with the blank injection group, the moist, immunosuppressive, and moist immunosuppressive groups all showed different degrees of otitis media symptoms, and the levels of IL-6, TNF- α , and IL-1 β were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with different degrees of mucosal congestion, edema, and inflammatory cell infiltration in the middle ear. The number of *C. albicans* in the ear canal secretions of rats was significantly increased in both the immunosuppressive and moist immunosuppressive groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** In this experiment, *C. albicans* was injected into the middle ear of rats through a tympanic membrane puncture to establish a model of fungal otitis media. The most effective model creation was under moist immunosuppressive conditions, and this model can be used to evaluate the effects of drugs.

【Keywords】 fungal otitis media; rats; *Candida albicans*; inflammatory factors

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

中耳炎是发生在中耳组织结构中的炎性病变,分为分泌性中耳炎、化脓性中耳炎、中耳胆脂瘤和特殊类型中耳炎 4 大类,该病不仅可导致注意力、认知感和听力下降,还可引起颅内并发症进而危及生命^[1-3]。近年来,随着临床上糖皮质激素和广谱抗菌药物的普遍使用,条件致病菌感染率不断增加,真菌检出率逐渐升高,真菌性中耳炎逐渐走入大众视野^[4]。真菌性中耳炎是以真菌为致病菌的中耳炎性疾病,《中耳炎临床分类和手术分型指南(2012)》首次出现这一分类,并将其归属至特殊类型中耳炎^[3]。但国内外学者对真菌相关的耳部疾病研究主要集中在外耳道真菌病方面,而真菌性中耳炎模型的建立与评价鲜有报道,对该病的鉴别诊断和药物应用有一定阻碍^[5-6]。在临床检验中, Pajor 等^[7]和伍众文等^[8]均在部分中耳炎患者耳分泌物样本中分离到白色念珠菌。白色念珠菌不仅是常见的机会性真菌病原体,也是真菌性中耳炎的常见菌株之一^[9-10]。本研究拟采用鼓膜穿刺法将白色念珠菌注入大鼠中耳腔,建立真菌性中耳炎模型,旨在真菌性中耳炎模型的建立提供参考依据,为该病药物的药效作用评价提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

50 只 8 周龄 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重 180 ~ 220 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公

司【SCXK(湘)2019-0004】。饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司 SPF 级动物房 ABSL-Ⅱ 实验室【SYXK(湘)2020-0015】,环境室温为 24 ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 60%,12 h 昼夜循环饲养,喂食普通饲料,自由进食、饮水。实验操作均符合湖南普瑞玛药物研究中心有限公司动物伦理审查委员会批准(IACUC-2021(3)062)。

1.1.2 实验菌株

白色念珠菌(*Candida albicans*,临床分离株),编号:17015177,由中南大学湘雅二医院赠予,在湖南普瑞玛药物研究中心有限公司 BSL-Ⅱ 实验室培养和扩增(实验室备案编号:长卫计实备字(2021)第 B010 号)。

1.1.3 主要试剂与仪器

醋酸地塞米松片,批号:2009202,规格:每片 0.75 mg,100 片/瓶,有效期至:2023 年 8 月,生产单位:安徽金太阳生化药业有限公司。0.9%氯化钠注射液,批号:21071401C,规格:每袋 100 mL,有效期至:2023 年 6 月,生产单位:湖南康源制药有限公司。沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA),批号:20200101,规格:每瓶 250 g,有效期至:2023 年 6 月,生产单位:青岛海博生物技术有限公司。革兰氏染色液,批号:G1060,规格:每盒 4 × 100 mL,有效期至:2022 年 7 月,生产单位:Solarbio。

BC-5000Vet 型兽用五分类血液细胞分析仪(深圳迈瑞公司)、Spectra Max i3x 型多功能酶标仪(上海美谷分子)、BCR-MI02-72-C11-PPSU 型大鼠独立

通气笼盒系统(山东新华医疗器械股份有限公司)、BSC1300-II-B2 型生物安全柜(山东新华医疗器械股份有限公司)、DMIL 倒置显微镜(德国 Leica 公司)、DFC 420C 病理成像系统(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与造模

按性别及体重将大鼠随机分为正常对照组、空白注射组、潮湿组、免疫抑制组、潮湿+免疫抑制组,每组 10 只,雌雄各半。正常对照组及空白注射组不做任何处理,潮湿组动物仅对大鼠右侧耳部滴入适量的 0.9%氯化钠注射液,2 次/日,保持耳部潮湿;免疫抑制组大鼠上午经口灌胃给予 0.81 mg/kg 醋酸地塞米松药液;潮湿+免疫抑制组对大鼠右侧耳部滴入适量的 0.9%氯化钠注射液,2 次/日,保持耳部潮湿,并在上午经口灌胃给予 0.81 mg/kg 醋酸地塞米松药液。以上操作连续 3 d,即前处理完毕。前处理完成后次日潮湿组、免疫抑制组、潮湿+免疫抑制组大鼠经异氟烷吸入麻醉(1% ~ 4%诱导麻醉,0.25% ~ 2%维持麻醉)后,通过耳镜将 1×10^{10} CFU/mL 白色念珠菌悬液经鼓膜穿刺注入到大鼠右侧中耳腔,每只 50 μ L,空白注射组大鼠按相同的方法注入等量的空白培养液。潮湿组、潮湿+免疫抑制组大鼠右侧耳部滴入适量的 0.9%氯化钠注射液,2 次/日,保持耳部潮湿,连续 14 d。

1.2.2 观察指标

(1)一般体征观察:每天观察大鼠外耳及一般行为活动,并通过耳镜观察大鼠中耳的症状。

(2)白色念珠菌培养及革兰氏染色计数:分别于注入后的第 5、10、15 天进行采样,具体如下:麻醉大鼠后,将无菌耳拭子蘸有少量的 0.9%氯化钠注射液,通过耳镜用耳拭子取耳道病灶部位分泌物,置于无菌拭子管内,进行白色念珠菌培养和革兰氏染色。白色念珠菌培养方法:将样本均匀涂布在沙氏葡萄糖琼脂培养板上,于恒温培养箱中倒置培养 24 h,观察菌落的形态。革兰氏染色法:取样品涂布于载玻片上,通过火焰固定,加上结晶紫染色 1 min,并加上碘液后染色 1 min,加上脱色液,摇动玻片,加上番红染色 1 min,吸干或晾干后,通过油镜镜检。

(3)耳道灌洗液 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平检测:末次观察后对各组大鼠安乐死后,中耳腔以每次 100 μ L PBS 进行 3 次灌洗,收集耳道灌洗液,根据大鼠 ELISA 试剂盒说明书操作,采用酶联免疫法检测耳道灌洗液中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平。

(4)组织病理学检查:取右侧耳部组织,置于 10%中性福尔马林溶液中固定,石蜡包埋切片,HE 染色,镜下观察中耳黏膜及骨壁组织病理学变化,根据中耳黏膜及炎性细胞浸润病变程度分为无异常(NSL)、轻度(+)、中度(++)及重度(+++)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本间的比较采用单因素方差分析,根据方差齐性检验,方差齐及不齐时分别使用 LSD 法和 Tamhane's T2 分析。等级资料以频数计,采用等级资料秩和检验进行统计。 $P < 0.05$ 说明差异具有显著性, $P < 0.01$ 说明差异极具显著性。

2 结果

2.1 一般体征观察

白色念珠菌注射前,免疫抑制组及潮湿+免疫抑制组大鼠经醋酸地塞米松注射 3 d 后,大鼠均出现竖毛,自主活动减少,潮湿组、正常对照组、空白注射组大鼠均无明显异常;潮湿组、免疫抑制组及潮湿+免疫抑制组大鼠经中耳腔注入白色念珠菌后,潮湿组大鼠于注入后第 3 天外耳均出现瘙痒、红肿,第 5 天大鼠耳部有浅黄色分泌物流出,第 10 天耳部无明显异常,免疫抑制组及潮湿+免疫抑制组大鼠于注入后第 3 天耳部均出现瘙痒、红肿,第 5 天耳部有大量浅黄色分泌物流出,第 10 ~ 15 天可见分泌物堵塞整个耳道,并伴有竖毛和自主活动减少。

2.2 中耳白色念珠菌定植

2.2.1 一般培养法

取大鼠耳道分泌物进行菌种培养并确认菌种定植,白色念珠菌注入后的第 5、10、15 天,正常对照组和空白注射组大鼠耳道分泌物培养鉴定均无明显菌落生长;潮湿组、免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组的大鼠耳道分泌物经培养鉴定均为白色念珠菌且没有发现其他菌落,培养的白色念珠菌呈乳白色,表面光滑有浓酵母气味,形成菌落(见图 1)。

2.2.2 革兰氏染色法

大鼠耳道分泌物经过革兰氏染色后,可见成群革兰氏染色阳性的卵圆形孢子和假菌丝(图 2)。造模后的第 5、10 和 15 天中,潮湿+免疫抑制组大鼠耳道分泌物染色均出现白色念珠菌,且随着时间的延长而增加;而免疫抑制组和潮湿组大鼠的耳道分泌物中均发现白色念珠菌,随着时间延长,白色念珠

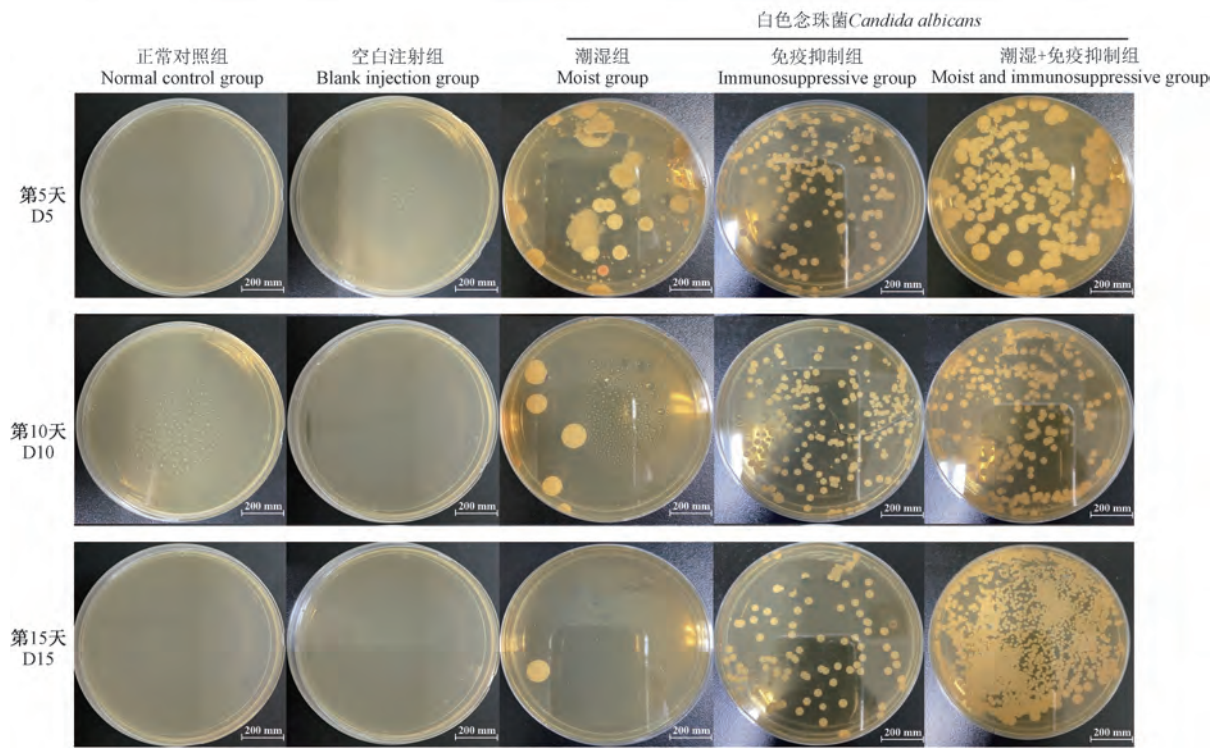


图 1 大鼠耳道分泌物培养

Figure 1 Culture of secretion from rat ear canal

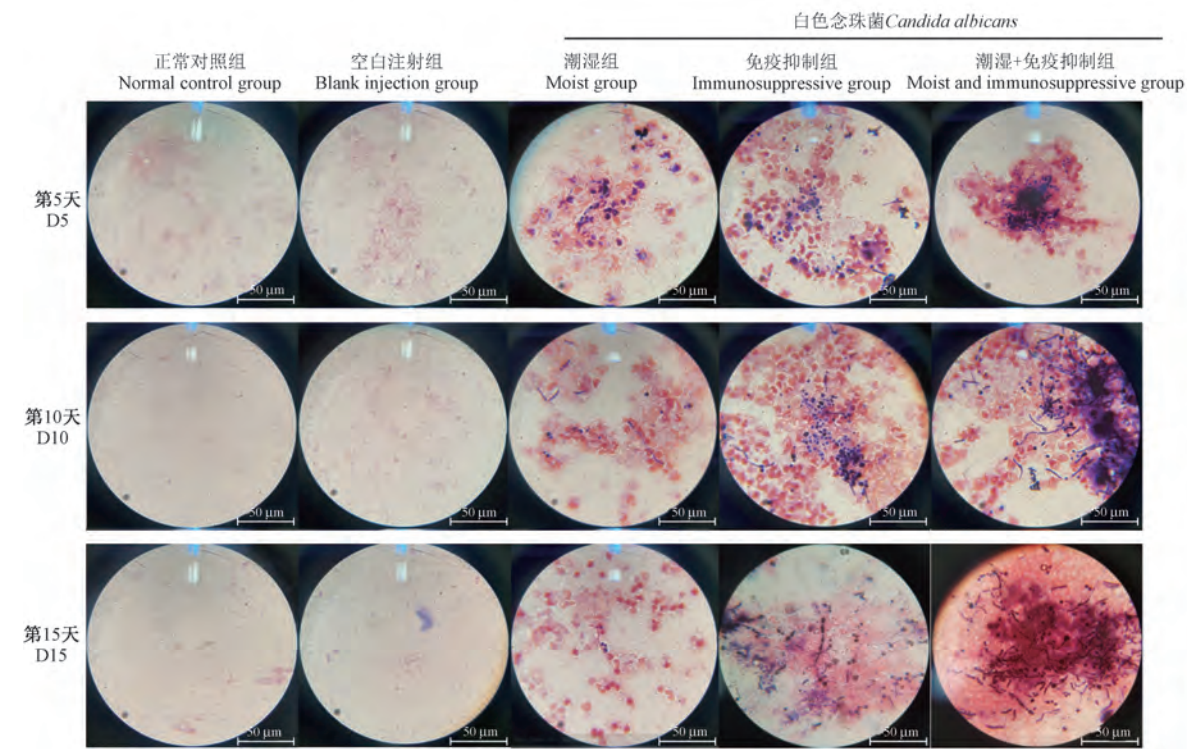
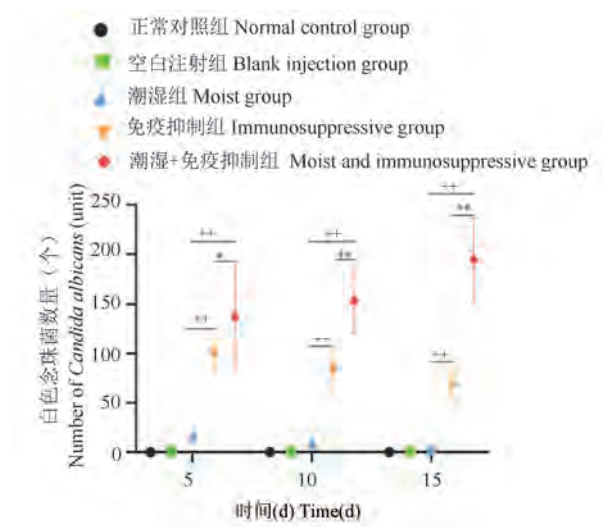


图 2 大鼠耳道分泌物(革兰氏染色,×100)

Figure 2 Gram stain of rat ear canal secretion(Gram staining,×100)

菌数量逐渐减少。与潮湿组比,免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组大鼠耳道分泌物白色念珠菌数量显著增加($P < 0.01$);与潮湿组和免疫抑制组比,潮湿+免疫抑制组大鼠耳道分泌物白色念珠菌数量均显著增加($P < 0.05, P < 0.01$)(图 3)。



注:与潮湿组比较, $^{**}P < 0.01$; 与免疫抑制组比较, $^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01$ 。

图 3 耳道分泌物白色念珠菌数量($n = 10$)

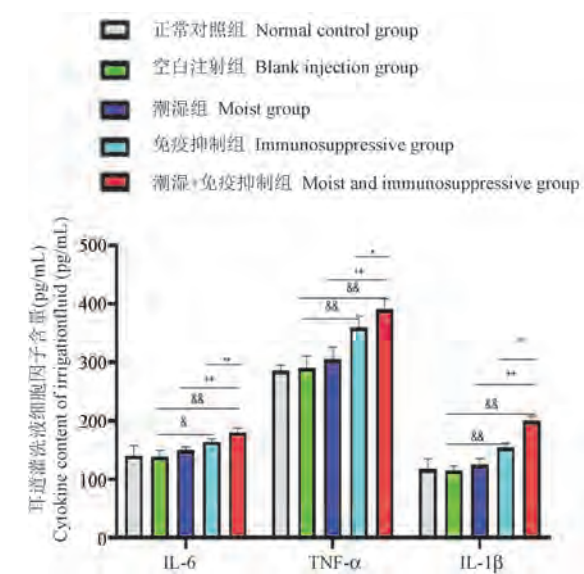
Note. Compared with the moist group, $^{**}P < 0.01$. Compared with immunosuppression group, $^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01$.

Figure 3 Number of *Candida albicans* in ear canal secretion($n = 10$)

2.3 耳道灌洗液 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平变化

如图 4 所示,与正常对照组比,空白注射组大鼠耳道灌洗液 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平均无明显差异;与空白注射组比,免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组大鼠耳道灌洗液中 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平均明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);与潮湿组和免疫抑制组比,潮湿+免疫抑制组大鼠耳道灌洗液中 IL-6、TNF-

α、IL-1β 水平均明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。



注:与空白注射组比较, $^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01$;与潮湿组比较, $^{**}P < 0.01$;与免疫抑制组比较, $^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01$ 。(下表同)

图 4 大鼠耳道灌洗液 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平变化($n = 10$)

Note. Compared with the blank injection group, $^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01$. Compared with the moist group, $^{**}P < 0.01$. Compared with immunosuppressive group, $^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01$. (The same in the following table)

Figure 4 Changes of IL-6, TNF-α and IL-1β levels in rat ear canal lavage fluid($n = 10$)

2.4 中耳病理变化

2.4.1 HE 染色

大鼠中耳 HE 染色结果如图 5 所示,正常对照组和空白注射组大鼠在潮湿组大鼠中耳黏膜有充血、出血、水肿、少量炎性细胞浸润现象;在免疫抑制组大鼠中耳出现黏膜充血、水肿、大量炎性细胞浸润;在潮湿+免疫抑制组大鼠中耳黏膜充血、水肿、大量炎性细胞浸润。

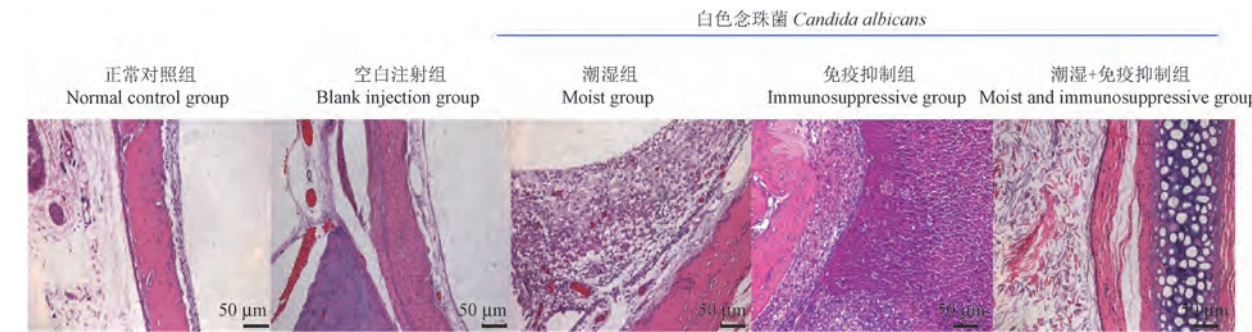


图 5 大鼠中耳组织病理切片(×100, HE 染色)

Figure 5 Histopathological section of rat middle ear(×100, HE staining)

2.4.2 对中耳组织病变程度的影响

正常对照组和空白注射组动物中耳组织无明显异常,潮湿组、免疫抑制组及潮湿+免疫抑制组动

物中耳组织病变程度明显加重($P < 0.01$);与潮湿组和免疫抑制组比,潮湿+免疫抑制组动物中耳组织病变程度均明显加重($P < 0.05, P < 0.01$)(表 1)。

表 1 白色念珠菌对大鼠中耳病变程度的影响($n = 10$)

组别 Groups	中耳组织病变等级 Grade of middle ear tissue lesion				P 值 P value
	NSL	+	++	+++	
正常对照组 Normal control group	10	0	0	0	--
空白注射组 Blank injection group	10	0	0	0	--
潮湿组 Moist group	1	3	4	2	0.024 ^{&}
免疫抑制组 Immunosuppressive group	1	2	3	4	0.004 ^{&&}
潮湿+免疫抑制组 Moist and immunosuppressive group	0	0	2	8	0.000 ^{&&+++*}

3 讨论

真菌性中耳炎与慢性化脓性中耳炎的临床症状极其相似,常被误诊为普通细菌性中耳炎,对其进行抗生素治疗,而广谱抗生素会抑制细菌簇,使真菌迅速繁殖,加重病情,为临床诊治带来困难,故此类动物模型的建立对真菌性中耳炎的鉴别诊断及抗真菌性中耳炎药物的评价均具有重要意义^[6,11]。因此本研究选用临床上较为常见的真菌白色念珠菌作为致病菌对大鼠进行鼓膜穿刺,建立真菌性中耳炎模型,通过观察各组大鼠体征、中耳真菌定植情况、耳道灌洗液炎症因子水平及中耳病理变化等指标,对不同处理组大鼠造模情况进行评价,筛选稳定、效果良好的真菌性中耳炎模型建立方式供研究者参考。

真菌性中耳炎的常见症状包括外耳道湿疹、耳痒、耳痛,患耳反复流白色、黄色或黑褐色脓性分泌物^[12]。本实验结果显示,每只模型组大鼠鼓膜穿刺 50 μ L 白色念珠菌悬液(1×10^{10} CFU/mL)后,潮湿组、免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组大鼠在第 3 天均出现外耳瘙痒、红肿等症状,且均于第 5 天有浅黄色分泌物流出;潮湿组大鼠耳部在第 10 天恢复正常,免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组在第 10 ~ 15 天可见分泌物堵塞整个耳道,并伴有竖毛和自主活动减少症状;结合中耳真菌定植情况可清晰发现潮湿+免疫抑制组大鼠耳道分泌物中白色念珠菌数量最

多。各模型组大鼠症状与前人对真菌性中耳炎症状描述相似,但潮湿处理组模型大鼠出现自愈趋势,提示免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组在模型建立方面效果更佳。

真菌性中耳炎分泌物中含有多种炎症因子,炎症因子与肉芽组织的生成密切相关,增生的肉芽组织常阻塞中耳,加重中耳积液,进而导致炎症分泌物吸收机化,使疾病恶性循环^[5]。在对中耳炎动物模型的研究中发现,TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 均是已知的与炎症相关的重要局部介质^[13]。Yellon 等^[14]研究发现,在中耳炎发病期间细胞因子在炎症中具有调节作用,且耳道分泌物中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量呈升高趋势,与中耳炎病情密切相关,其中 IL-6 和 IL-1 β 主要在中耳炎急性期发挥作用,而 TNF- α 主要在中耳炎慢性期发挥作用。本研究结果显示,造模第 15 天免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组大鼠耳道灌洗液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量均明显上升,其中潮湿+免疫抑制组大鼠耳道灌洗液的炎症因子含量上升更为明显,说明免疫抑制组和潮湿+免疫抑制组大鼠中耳出现炎症反应,且组织病理学观察显示 3 个模型组中耳均出现不同程度的黏膜充血、水肿及炎症细胞浸润现象,其中白色念珠菌在潮湿环境下对免疫抑制大鼠诱导真菌性中耳炎最为严重。综合实验结果可清晰发现白色念珠菌在潮湿+免疫抑制条件下的模型建立方面效果更佳,提示两方面因素:一方面是由于白色念珠菌属

于机会性和致病性真菌,在机体免疫功能低下时引起浅表感染和侵袭性感染的频率更高;另一方面是由于白色念珠菌在干燥环境的存活率很差,而在潮湿环境中存活时间更长^[15-16]。

近年来众多学者围绕中耳炎开展了许多相关动物实验研究,有多种方式复制中耳炎模型,但少有真菌性中耳炎的构建方法,在细菌诱导中耳炎时,邹艺辉等^[17]在大鼠听泡内注射致病菌成功复制化脓性中耳炎模型;李聪等^[18]经鼓膜注入致病菌建立大鼠化脓性中耳炎模型。文献报道在临床上真菌性中耳炎主要通过咽鼓管和外耳道鼓膜两个途径感染机体,因此本研究通过借鉴细菌诱导中耳炎的方式,采用鼓膜注入白色念珠菌的方式成功构建真菌性中耳炎模型;但与前人方式所不同的是本研究所采用的感染方法强调湿润环境和免疫抑制,尽可能真实的模拟真菌性中耳炎在临床中的感染过程,并清晰地展现了不同环境下真菌性中耳炎病程的长短和疾病发生的过程。在后续研究过程中,我们将探索白色念珠菌的接种剂量和菌株浓度与真菌性中耳炎之间的关系,使真菌性中耳炎模型既能接近临床,又能保证其相对稳定和可靠,为药物研发、疾病预防和临床指导用药等方面提供更多参考依据。

4 结论

综上所述,通过对各模型组大鼠的体征、中耳真菌定植情况、耳道灌洗液炎症因子水平及中耳病理变化等指标变化结果,认为在免疫抑制和潮湿+免疫抑制条件下使用鼓膜穿刺方式注射白色念珠菌均可成功建立真菌性中耳炎大鼠模型,且潮湿+免疫抑制条件效果更佳。

参 考 文 献(References)

- [1] Wald ER, DeMuri GP. Antibiotic recommendations for acute otitis media and acute bacterial sinusitis: conundrum no more [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2018, 37(12): 1255-1257.
- [2] 肖聪聪,李博,郑体花,等. 中耳炎小鼠模型的听力学特点 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(22): 5581-5585.
- Xiao CC, Li B, Zheng TH, et al. Audiological characteristics of otitis media model mouse [J]. *Chin J Gerontol*, 2019, 39(22): 5581-5585.
- [3] 孙建军,刘阳. 中耳炎临床分类和手术分型指南(2012)解读 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2013, 48(1): 5.
- Sun JJ, Liu Y. Interpretation of guidelines for clinical classification and surgical classification of otitis media (2012) [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2013, 48(1): 5.
- [4] 周详,谢鼎俊,姜顺民,等. 聚维酮碘治疗化脓性中耳炎真菌感染及对听力影响研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(14): 2194-2197, 2211.
- Zhou X, Xie DJ, Jiang SM, et al. Effect of povidone iodine on treatment of suppurative otitis media patients with fungal infection and its influence on hearing [J]. *Chin J Nosocomiol*, 2019, 29(14): 2194-2197, 2211.
- [5] 汪琳,张丹,张庆玲,等. 真菌性中耳炎患者血清炎症因子及中耳肉芽组织标本 TLR2、TLR4 蛋白表达与 mRNA 水平 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2022, 32(2): 247-251.
- Wang L, Zhang D, Zhang QL, et al. Serum inflammatory factors and expression levels of TLR2, TLR4 proteins and mRNA in middle ear granulation tissue specimens of patients with fungal otitis media [J]. *Chin J Nosocomiol*, 2022, 32(2): 247-251.
- [6] 刘明贺. 真菌性中耳炎及相关变应原研究 [D]. 荆州: 长江大学; 2017.
- Liu MH. Fungal otitis media and related allergens research [D]. Jingzhou: Yangtze University; 2017.
- [7] Pajor A, Durko M, Jankowski A, et al. Bacteriological evaluation in chronic otitis media [J]. *Otolaryngol Pol*, 2006, 60(5): 757-763.
- [8] 伍众文,陈玉婵,黄建宇,等. 广东省慢性化脓性中耳炎患者耳分泌物的病原体分布及药物敏感性分析 [J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(5): 620-624.
- Wu ZW, Chen YC, Huang JY, et al. Pathogen distribution and drug sensitivity analysis of ear secretions in patients with chronic suppurative otitis media in Guangdong province [J]. *Lab Med Clin*, 2021, 18(5): 620-624.
- [9] 郭东东,岳慧珍,魏羽佳,等. 白念珠菌生物被膜形成的遗传调控机制 [J]. *生物工程学报*, 2017, 33(9): 1567-1581.
- Guo DD, Yue HZ, Wei YJ, et al. Genetic regulatory mechanisms of *Candida albicans* biofilm formation [J]. *Chin J Biotechnol*, 2017, 33(9): 1567-1581.
- [10] 吴学文,王凤君,高可雷,等. 我国慢性化脓性中耳炎患者的病原学及其动态变化分析 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2016, 22(3): 193-197, 202.
- Wu XW, Wang FJ, Gao KL, et al. Analysis on etiology and dynamic change of chronic suppurative otitis media in China [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2016, 22(3): 193-197, 202.
- [11] 曾勇超. 真菌性中耳炎的发病危险因素分析与护理干预对策 [J]. *护理实践与研究*, 2019, 16(5): 97-98.
- Zeng YC. Analysis of risk factors of fungal otitis media and nursing intervention countermeasures [J]. *Nurs Pract Res*, 2019, 16(5): 97-98.
- [12] 刘新,谷京城,张玉梅,等. 真菌性中耳炎的临床分析 [J]. *医学信息*, 2011, 24(6): 3708.

Liu X, Gu JC, Zhang YM, et al. Clinical analysis of fungal otitis media [J]. Med Inf, 2011, 24(6): 3708.

[13] Cetinkaya EA, Ciftci O, Alan S, et al. The efficacy of hesperidin for treatment of acute otitis media [J]. Auris Nasus Larynx, 2019, 46(2): 172-177.

[14] Yellon RF, Doyle WJ, Whiteside TL, et al. Cytokines, immunoglobulins, and bacterial pathogens in middle ear effusions [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1995, 121(8): 865-869.

[15] Xu QR, Yan L, Lv QZ, et al. Molecular genetic techniques for gene manipulation in *Candida albicans* [J]. Virulence, 2014, 5(4): 507-520.

[16] Blaschke-Hellmessen R. Habitats for *Candida* in medical and hygienic respects [J]. Mycoses, 1999, 42: 22-29.

[17] 邹艺辉, 黄德亮, 孙建和, 等. 听泡内注射法建立大鼠化脓性中耳炎模型 [J]. 中华耳科学杂志, 2004, 2(1): 64-66.

Zou YH, Huang DL, Sun JH, et al. Injecting pneumococci into rats' tympanic bullae for establishing a model of suppurative otitis media [J]. Chin J Otol, 2004, 2(1): 64-66.

[18] 李聪, 程雪峰, 顾健, 等. 左氧氟沙星热敏性凝胶制备及局部治疗大鼠化脓性中耳炎的研究 [J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2013, 13(6): 372-375.

Li C, Cheng XF, Gu J, et al. Preparation of levofloxacin thermosensitive gel and local treatment of suppurative otitis media in rats [J]. Chin J Ophthalmol Otorhinolaryngol, 2013, 13(6): 372-375.

[收稿日期] 2022-08-29

《中国比较医学杂志》2023 年征订启事

《中国比较医学杂志》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。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。开设栏目: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。读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,140 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,共计 600 元。邮发代号:82-917。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

请注明订刊数量,并写明刊物寄往地址及收件人。收到汇款后,我们会及时将发票寄给您。

卜文婕,林爱琴,高继光,等. 青春期丙烯酰胺暴露对小鼠肺组织氧化损伤的影响[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 43-50.

Bu WJ, Lin AQ, Gao JG, et al. Effects of adolescent exposure to acrylamide on oxidative injury of lung tissue in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 43-50.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.006

青春期丙烯酰胺暴露对小鼠肺组织氧化损伤的影响

卜文婕¹, 林爱琴^{1*}, 高继光¹, 潘涛², 任悦鸣², 孙敏³

(1. 皖南医学院医学生物学教研室, 安徽 芜湖 241002; 2. 皖南医学院公共卫生学院, 安徽 芜湖 241002; 3. 安徽大学生命科学学院, 合肥 230601)

【摘要】 目的 探究丙烯酰胺(acrylamide, ACR)对小鼠肺组织的损伤及其可能机制。**方法** 以4周龄SPF级雄性小鼠为实验动物,随机分为对照组和ACR组(10 mg/(kg·d)组和20 mg/(kg·d)组),每组8只。对照组给予常规饮用水;ACR组按小鼠每日饮水5 mL来配制ACR的染毒浓度,每3 d更换1次,连续处理4周。实验结束后取肺组织制作切片,进行组织病理学分析;利用试剂盒检测其氧化损伤的相关指标;进一步利用免疫荧光与Western Blot技术检测Nrf2-ARE通路相关蛋白表达。**结果** 与对照组相比,随ACR摄入浓度的增加,小鼠体重逐渐下降($P < 0.01$);组织病理学分析发现,ACR组小鼠肺组织出现细支气管上皮肥大,肺泡上皮增生及肺泡腔面积明显减少,20 mg/(kg·d)组病理学改变更为明显;氧化应激指标检测发现,与对照组相比,随着ACR摄入浓度的增加,肺组织中GSH-PX活性逐渐下降($P < 0.05$),SOD活力逐渐下降($P < 0.05$),CAT活力逐渐下降($P < 0.01$),而MDA的含量明显上升($P < 0.01$);免疫荧光结果显示,与对照组相比,ACR组肺组织中Nrf2蛋白表达显著上升,在10 mg/(kg·d)组表达最高($P < 0.001$),且出现核转位现象,其伴侣蛋白Keap1蛋白表达显著下降,在10 mg/(kg·d)组表达最低($P < 0.001$);Western Blot结果显示,与正常对照组相比,ACR组肺组织中Nrf2基因及下游抗氧化基因HO-1蛋白表达升高,在10 mg/(kg·d)组最高($P < 0.01$),伴侣蛋白Keap1表达显著下降,在10 mg/(kg·d)组表达最低($P < 0.01$),而基因NQO-1蛋白表达随着ACR摄入浓度增加逐渐升高($P < 0.01$)。**结论** 青春期小鼠ACR暴露可导致肺组织损伤,该过程可能与肺组织氧化还原失衡有关。

【关键词】 丙烯酰胺;核因子红系2相关因子2;氧化损伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 01-0043-08

Effects of adolescent exposure to acrylamide on oxidative injury of lung tissue in mice

BU Wenjie¹, LIN Aiqin^{1*}, GAO Jiguang¹, PAN Tao², REN Yueming², SUN Min³

(1. Department of Medical Biology of Wannan Medical College, Wuhu 241002, China. 2. School of Public Health, Wannan Medical College, Wuhu 241002. 3. School of Life Science, Anhui University, Hefei 230601)
Corresponding author: LIN Aiqin. E-mail:601823268@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the toxic effects of acrylamide (ACR) on the lung tissue of mice and its possible mechanism of action. **Methods** 4-week-old SPF male mice were randomly divided into a control and two ACR groups (10 mg/(kg·d) group and 20 mg/(kg·d) group), with eight mice in each group. The control group was given conventional drinking water. In the ACR groups, the exposure concentration of ACR was prepared according to 5 mL of

[基金项目] 安徽省属本科医学院校公共卫生协同创新项目(GXXT-2020-025), 2021年度安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2021A0823), 2021年安徽省大学生创新创业训练计划(S202110368012)。

Funded by Collaborative Innovation Project of Public Health in Anhui Provincial Medical Universities (GXXT-2020-025), Key Project of Natural Science Research in Anhui Universities in 2021 (KJ2021A0823), Anhui Provincial College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program in 2021 (S202110368012).

[作者简介] 卜文婕(1989—),女,实验师,硕士,研究方向:动物学和细胞生物学。Email:buwj611@163.com

[通信作者] 林爱琴(1982—),女,高级实验师,硕士,研究方向:细胞生物学与分子遗传学。Email:601823268@qq.com

drinking water per day which was changed every 3 days for 4 weeks. At the end of the experiment, lung tissue was sectioned for histopathological analysis. Related indexes of oxidative damage were detected. Immunofluorescence and Western Blot were used to detect the expression of Nrf2-ARE-pathway-related proteins. **Results** Compared with the control group, the body weight of mice decreased gradually with an increase in ACR concentration ($P < 0.01$). Histopathological analysis showed that bronchiolar epithelial hypertrophy, alveolar epithelial hyperplasia, and the alveolar cavity area were significantly reduced in the ACR group, and the pathological changes were more obvious in the 20 mg/(kg·d) group. Compared with the control group, the activity of GSH-Px ($P < 0.05$), SOD ($P < 0.05$), and CAT ($P < 0.01$) in lung tissue decreased with an increase in ACR concentration, while the content of MDA increased significantly ($P < 0.01$). Immunofluorescence result showed that, compared with the control group, the ACR group's expression of Nrf2 protein in the lung tissue was significantly increased, and the highest expression was found in the 10 mg/(kg·d) group ($P < 0.001$). The nuclear translocation phenomenon occurred, and expression of the chaperone protein Keap1 was significantly decreased, with the lowest expression found in the 10 mg/(kg·d) group ($P < 0.001$). Western Blot result showed that, compared with the normal control group, expression of the Nrf2 gene and its downstream antioxidant protein HO-1 was increased in the lung tissue of the ACR group, and the highest level was found in the 10 mg/(kg·d) ($P < 0.01$). Expression of the chaperone protein Keap1 was significantly decreased, and the lowest expression was found in 10 mg/(kg·d) group ($P < 0.01$), but the expression of NQO-1 gradually increased with increased ACR intake concentration ($P < 0.01$). **Conclusions** Exposure of adolescent mice to ACR can lead to lung tissue injury, which may be related to a redox imbalance of the lung tissue.

[Keywords] acrylamide; nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2); oxidative damage

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

丙烯酰胺(acrylamide, ACR)是一种亲水性、无色无味的化合物^[1],青少年接触 ACR 主要来自饮食中摄入的碳水化合物,如薯片、面包等高淀粉食品在低湿度下进行烘烤、油炸和烧烤等热加工时均可产生大量的 ACR^[2],且摄入的量几乎是成年人的两倍(以食物质量/体重衡量)^[3]。由于已知的神经毒性、生殖毒性、基因毒性和潜在的致癌性^[4-5],食品中 ACR 对青少年健康造成的危害风险不容忽视。ACR 通过食物等进入生物体内后不久,其浓度在血液中升高,并与血红蛋白形成加合物,分布到不同器官。在体内,ACR 通过细胞色素 P-450(cytochrome P-450, CYP2E1)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)直接结合代谢,生物转化主要发生在肝脏和其他细胞色素 P450 活性高的组织中,其引起机体毒性主要通过氧化应激和 DNA 损伤等机制^[6]。作为气体交换的场所,肺组织中含有细胞色素 P450 活性较高,且由于其特殊的解剖和生理特性,肺组织容易受到氧化应激损伤。但目前有关 ACR 的摄入或职业暴露损伤肺组织的研究较少,仅有 2019 年 Batoryna 等^[7]研究发现小鼠经口摄入 ACR 可导致肺微结构改变,并伴有氧化还原失衡症状,但具体机制尚未研究。因此,探究 ACR 摄入是否引起青春期小鼠肺组织损伤及其可能机制具有重要意义,研究结果为阐明 ACR 肺组织损伤机制提供实验依据。

Nrf2-ARE 信号通路的激活在防止氧化应激诱导的细胞和组织损伤中发挥重要作用,转录因子核因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor, Nrf2)是抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)驱动的细胞保护蛋白表达的主要调节因子^[8],在肺中丰富,能驱动多种细胞防御途径来抵消肺疾病发病机制中涉及的有害刺激,包括氧化应激、炎症、凋亡和癌变^[9]。在神经细胞研究中发现,ACR 暴露能激活 Nrf2-ARE 信号通路,诱导 Nrf2 下游抗氧化基因血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)和醌氧化还原酶 1(quinone oxidoreductase 1, NQO-1)的表达,发挥细胞保护作用^[10-11]。本研究通过构建青春期小鼠 ACR 染毒模型,对小鼠肺组织进行病理学、氧化损伤指标检测,进一步利用免疫荧光与 Western Blot 技术分析 Nrf2-ARE 通路蛋白表达,探究 ACR 的摄入是否引起青春期小鼠肺组织损伤及其与氧化应激的关系,进一步分析相关的分子机制,以阐明 ACR 诱导氧化应激的具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

为保证小鼠周龄的准确性,本实验通过采购

SPF 级 KM 系成年雄鼠和雌鼠 24 只,体重 26 ~ 28 g 购于长沙市天生物技术有限公司【SCXK(湘)2019-0014】。在皖南医学院 SPF 动物实验室【SYXK(皖)2018-004】饲养并合笼,挑选 4 周龄子代雄鼠作为实验动物,整个饲养过程中保持小鼠自由饮水和进食,温度控制在 22 ~ 25℃,湿度恒定,光周期 12 h。所有操作均符合皖南医学院实验动物福利与伦理委员会要求(LLSC-2022-008)。

1.1.2 主要试剂与仪器

丙烯酰胺(ACR,纯度 > 99%,美国 Sigma 公司)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天,P0012)、SOD 测定试剂盒(WST-1 法,A001-3-1)、GSH-PX 测定试剂盒(比色法,A005-1-2)、MDA 测定试剂盒(TBA 法,A003-1-1)、CAT 测定试剂盒(紫外法,A007-2-1)等均购自南京建成,Nrf2 抗体(A0674)、Keap1 抗体(A17062)、HO-1 抗体(A19062)、NQO-1 抗体(A19586)均购自爱博泰克生物。

多功能微孔检测仪(TECAN, M200 PRO,瑞士),正置荧光显微镜(Nikon, Ni-E,日本),全自动核酸蛋白测定仪(DeNovix, DS-11,美国),台式高速冷冻离心机(Eppendorf, 5427R,德国),数字切片扫描仪(HAMAMATSU,日本),电泳和转膜系统(Bio-Rad,美国)荧光、化学发光凝胶成像系统(美国 ProteinSimple, FluorChem E)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

4 周龄雄鼠随机分为对照组和 ACR 组(10 mg/(kg·d)组和 20 mg/(kg·d)组),体重 26~28 g,每组 8 只。对照组给予常规饮用水;ACR 组按小鼠每日饮水 5 mL 来配制 ACR 的染毒浓度,分别达到 10 mg/(kg·d)和 20 mg/(kg·d)。由于存在诸多不确定因素,日常生活中 ACR 的耐受日摄入量不容易计算,本实验选择的染毒浓度参照已发表文献的剂量^[12],且每 3 d 根据每组小鼠平均体重配制饮用水中 ACR 浓度。以上条件连续喂养 4 周后对小鼠进行处理,进行后续实验。

1.2.2 组织取材与组织切片

小鼠麻醉后,将其固定,于腹部横开口,沿切口向上用剪刀逐层剪开,直至胸腔,暴露心脏;用连有注射器的 7 号针头从小鼠右心室插入后动脉夹固定,再剪开左心耳,用生理盐水灌注,直到肺组织颜色转白;取左右两侧肺,称重后,取部分肺组织浸泡于 4%多聚甲醛溶液中固定,固定后,制作石蜡包埋

切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理学变化;取部分肺组织制备组织匀浆;其他肺叶液氮速冻后-80℃冰箱中保存备用。

1.2.3 生化分析

取部分肺组织用预冷的生理盐水以重量体积比 1:10 制备成 10%组织匀浆,BCA 试剂盒检测其蛋白浓度后,按照各类试剂盒说明书操作流程,将组织匀浆稀释成不同检测浓度,分别检测肺组织中 SOD 活力、GSH-PX 活性、CAT 活力以及 MDA 含量。

1.2.4 免疫荧光检测

将制作好的石蜡切片经脱蜡与水化处理后置于柠檬酸钠-EDTA 抗原修复液中,水中煮沸 20 min 后自然冷却;PBS 洗涤 3 次后,加 10%牛血清白蛋白(BSA)溶液 37℃ 封闭 2 h。加入稀释的 Nrf2 (1:100)或 Keap1 (1:100)抗体,冰箱 4℃ 过夜,PBS 洗涤 3 次后加入 Dylight 488 荧光标记二抗(1:500),在湿盒中避光孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,加 DAPI 避光染色 5~10 min,漂洗 3 次后加抗荧光淬灭液进行封片,置于荧光显微镜下观察并拍照,用 Image J 软件对平均荧光强度进行定量分析。

1.2.5 蛋白提取与 Western Blot 检测

从-80℃冰箱中取出小鼠肺组织,称取 50 mg,加 RIPA 裂解液 600 μL(向裂解液中 1:100 加入 PMSF 工作液和蛋白酶抑制剂混合物 100×),12 000 r/min,离心 15 min,取上清液,提取出组织蛋白,BCA 蛋白浓度测定后,将蛋白浓度调整一致后加蛋白上样缓冲液,100℃,10 min 变性;变性后的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后,封闭,分别孵育不同的一抗过夜,二抗孵育,曝光,用 AlphaView SA 软件对蛋白质表达水平的相对定量进行分析。

1.3 统计学分析

实验数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 统计软件录入实验数据并分析,作图使用 GraphPad Prism 5 软件处理,所有实验至少独立进行重复 3 次。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 小鼠体重及肺指数比较

我们分析了 ACR 暴露对青春小鼠的体重及肺指数的影响,与对照组相比,ACR 组小鼠体重明

显下降,其中 20 mg/(kg·d)组下降更为显著,三者间差异有显著性($P < 0.01$),而其肺指数先降后升(均低于对照组),但三组之间无显著性差异($P > 0.05$)(见表 1)。这些结果表明,青春期暴露 ACR 可能会损害小鼠的生长发育,且与剂量正相关。

2.2 组织病理学检查结果

切片经显微镜观察,根据图 1 结果所示,对照组小鼠肺组织中肺泡结构正常,肺泡上皮细胞排列完整,肺泡壁厚度均匀,而不同浓度 ACR 刺激的小鼠肺组织出现肺泡结构损坏,细支气管上皮肥大和肺

泡上皮增生。与对照组相比较,ACR 组支气管壁厚度和肺泡上皮细胞数量明显增加,肺泡腔面积明显减少,且随着 ACR 刺激浓度的增加,细支气管周围炎症加重,有出血现象,肺泡腔面积减少明显。这些资料表明,青春期暴露 ACR 可引起小鼠肺组织病理学改变,且 ACR 摄入剂量越大,肺损伤越严重。

2.3 氧化损伤指标检测结果

如图 2 所示,我们发现暴露于不同浓度的 ACR 后,小鼠肺组织的氧化与抗氧化指标出现变化。与对照组相比,随着 ACR 刺激浓度的增加,肺组织中

表 1 小鼠的体重与肺指数($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 1 Body weight and lung index of mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	对照组 Control group	10 mg/(kg·d)组 10 mg/(kg·d) group	20 mg/(kg·d)组 20 mg/(kg·d) group
小鼠体重(g) Body weigh of mice (g)	38.30 ± 0.26	35.90 ± 0.70 ^{***}	33.20 ± 1.56 ^{**}
脏器指数(%) Index of mice(%)	0.65 ± 0.07	0.59 ± 0.07	0.64 ± 0.03

注:与对照组相比, ^{**} $P < 0.01$;与 20 mg/(kg·d)组相比, ^{***} $P < 0.01$ 。(下同)
Note. Compared with the control group, ^{**} $P < 0.01$. Compared with 20 mg/(kg·d) group, ^{***} $P < 0.01$. (The same in the following figures)

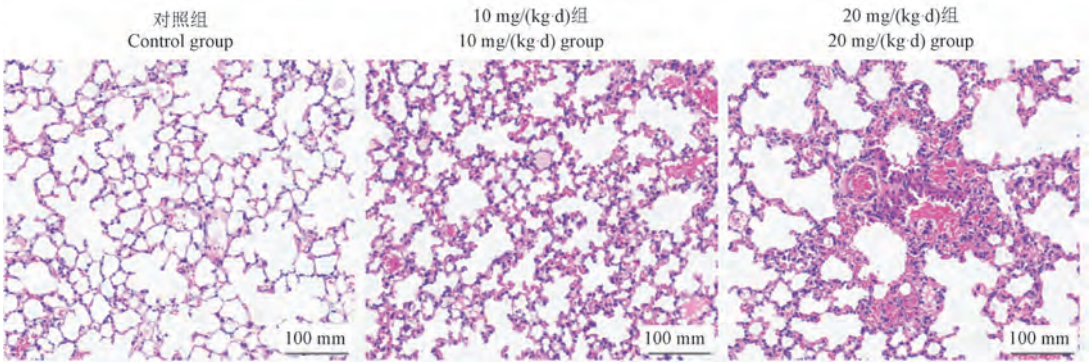
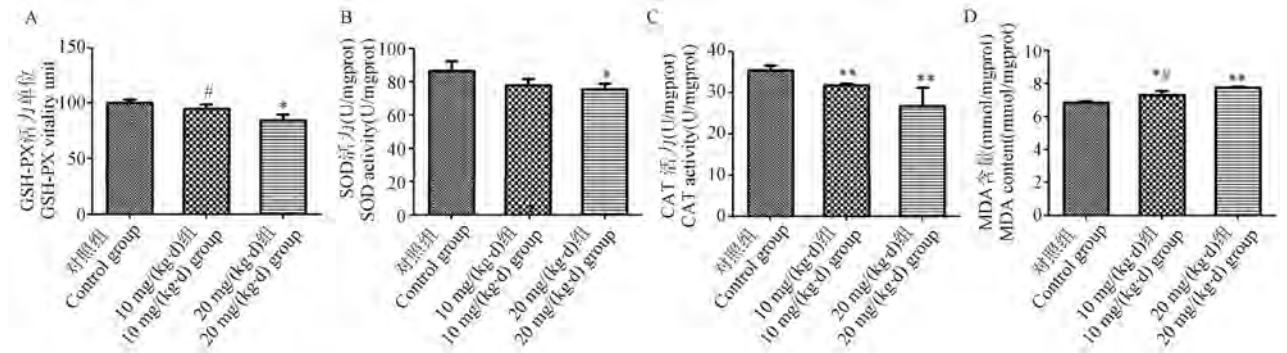


图 1 肺组织切片(HE 染色)
Figure 1 Lung tissue section (HE staining)



注:与对照组相比, ^{*} $P < 0.05$;与 20 mg/(kg·d)组相比, [#] $P < 0.05$ 。(下同)
图 2 ACR 刺激后小鼠肺组织中氧化与抗氧化指标变化($n=8$)
Note. Companed with the control group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with 20 mg/(kg·d) group, [#] $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes of oxidation and antioxidant indexes in lung tissues of mice after ACR stimulation ($n=8$)

GSH-PX 活性逐渐下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),SOD 活力逐渐下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),CAT 活力逐渐下降,差异有显著性($P < 0.01$),而脂质过氧化指标 MDA 的含量明显上升,差异且有显著性($P < 0.01$)。以上结果提示青春期暴露 ACR 可诱导肺部的氧化应激反应,且与剂量正相关。

2.4 免疫荧光与 Western Blot 技术检测 Nrf2-ARE 通路蛋白表达

为了进一步探讨 Nrf2-ARE 信号通路是否参与 ACR 在肺组织中诱导的氧化应激反应,我们通过免疫荧光与 Western Blot 技术检测了 Nrf2-ARE 通路相关蛋白的表达(图 3~图 7)。免疫荧光结果显示,与对照组相比,ACR 组小鼠肺组织细胞中 Nrf2 蛋白

表达显著上升($P < 0.001$),且出现核转位现象,伴侣蛋白 Keap1 蛋白表达显著下降($P < 0.01$),但相比于 20 mg/(kg·d)组,Nrf2 蛋白在 10 mg/(kg·d)组表达升高($P < 0.01$),而 Keap1 蛋白在 10 mg/(kg·d)组表达降低($P < 0.01$);Western Blot 结果显示,与对照组相比,ACR 组小鼠肺组织细胞中 Nrf2 基因及下游抗氧化基因 HO-1 蛋白表达升高($P < 0.01$),但相比于 20 mg/(kg·d)组,在 10 mg/(kg·d)组表达更高($P < 0.01$),伴侣蛋白 Keap1 表达显著下降($P < 0.01$),但相比于 20 mg/(kg·d)组,在 10 mg/(kg·d)组表达更低($P < 0.01$),而基因 NQO-1 蛋白表达随着 ACR 摄入浓度增加逐渐升高($P < 0.01$)。这些结果表明,ACR 刺激后能有效地激活 Nrf2-ARE 信号通路。

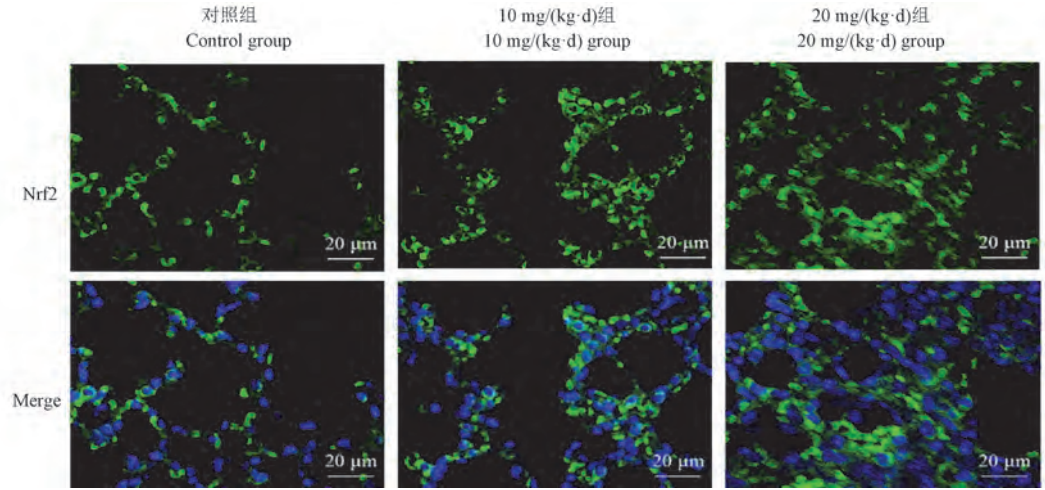


图 3 ACR 诱导的 Nrf2 蛋白在肺组织细胞中的表达($n=8$)
Figure 3 ACR-induced Nrf2 protein expression in lung tissue cells ($n=8$)

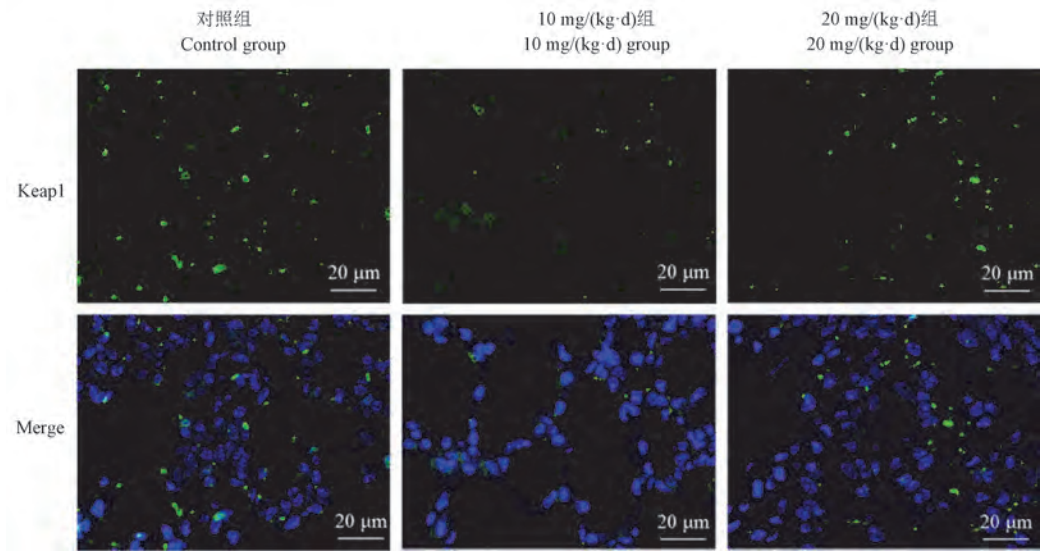
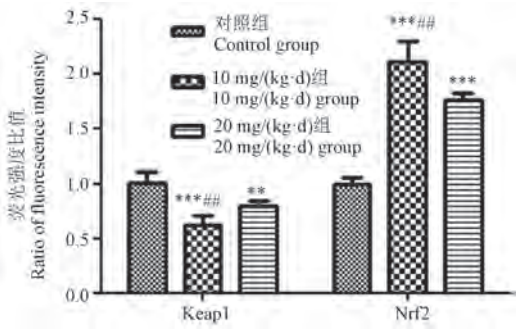


图 4 ACR 诱导的 Keap1 蛋白在肺组织细胞中的表达($n=8$)
Figure 4 ACR-induced Keap1 protein expression in lung tissue cells ($n=8$)



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 5 Keap1/Nrf2 蛋白的荧光强度比值图

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

Figure 5 Fluorescence intensity ratio of Keap1/Nrf2 protein

3 讨论

ACR 作为一种与生理功能和健康有关的常见毒素^[13],在人体中的代谢主要通过产生自由基和影响抗氧化剂诱导细胞内氧化还原失衡^[14]。肺泡细胞一方面具有机体中最高抗氧化剂组成活性,使得肺能有效地防止氧化应激;但另一方面在气体交换过程中,肺泡细胞直接接触到氧气,这也使它们易受到活性氧的高度威胁。有研究表明,肺部的氧化还原平衡可能受到多种不同因素的干扰,包括吸入的氧化剂(如环境臭氧、颗粒物、香烟烟雾)、血液中的氧化剂以及局部产生的自由基等^[15-16]。在本研究中我们发现,青春期小鼠经口摄入 ACR 后,小

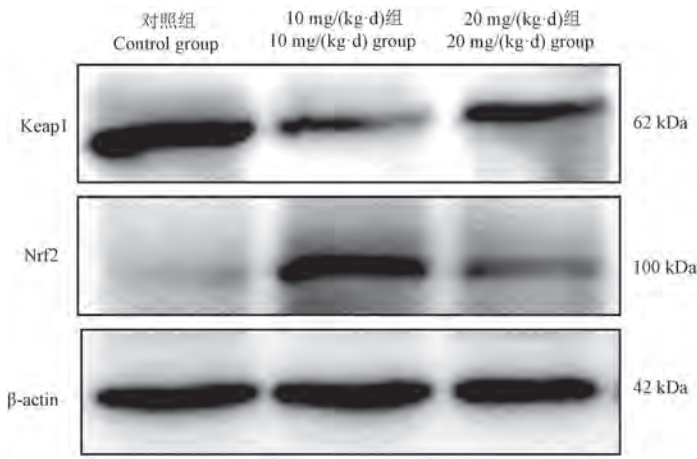


图 6 Keap1/Nrf2 蛋白的相对表达量

Figure 6 Relative expression of Keap1/Nrf2 protein

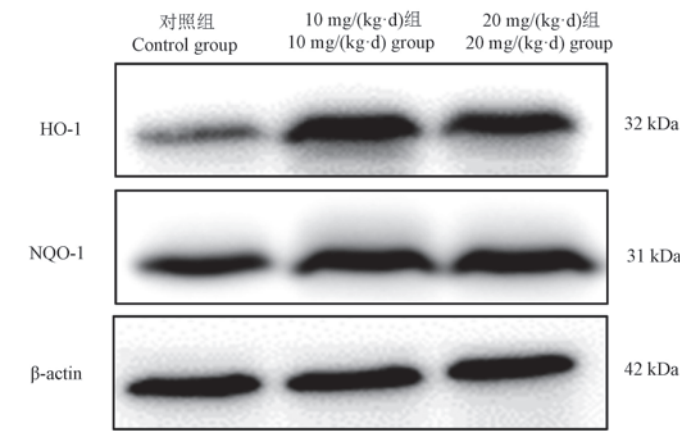
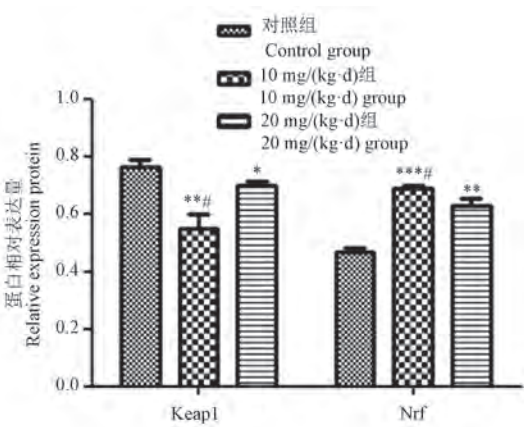
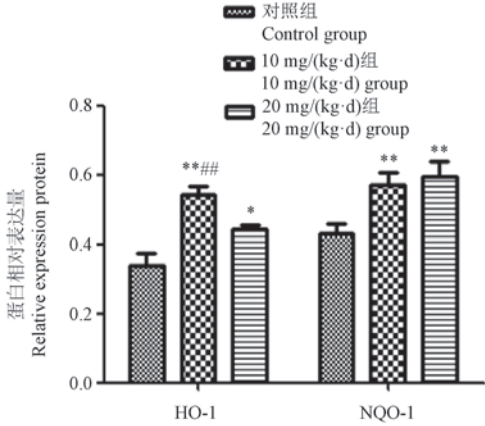


图 7 HO-1/NQO-1 蛋白的相对表达量

Figure 7 Relative expression of HO-1/NQO-1 protein



鼠体重明显下降,而其肺指数虽均低于正常对照组,但三组之间无显著性差异,说明 ACR 对肺的毒性作用不是特别明显,而是针对全身的,这与 Dilek 等^[17]在肝中的研究结果相一致。组织病理学检查结果发现,与对照组相比,ACR 摄入后小鼠肺组织微结构发生病理学改变,且 20 mg/(kg·d)组肺病理学改变更为严重,可见肺损伤的程度与 ACR 摄入浓度呈正相关。生化分析结果显示 ACR 摄入后可显著增加脂质过氧化损伤的重要指标 MDA 含量,以及降低抗氧化酶 SOD 活性、GSH-PX 活力和 CAT 活力。以上结果表明,青春期暴露 ACR 后,小鼠肺组织细胞的氧化与抗氧化系统失衡导致肺组织出现损伤,且损伤程度与剂量正相关,这与 Batoryna 等^[7]研究发现经口腔接触 ACR 后肺部出现氧化应激的结果相一致,不同的是在其研究中抗氧化系统在 24 h 和 48 h 后出现代偿性反应,导致在摄入 ACR 3 h 后 GSH 浓度、GPx 活性、SOD 活性、CAT 活性均出现升高的现象,这可能与不同的实验设计及 ACR 刺激的时间长短不同有关。

为进一步探讨青春期小鼠摄入 ACR 后诱导氧化应激的具体机制,我们通过免疫荧光和 Western Blot 技术分析确定 ACR 对 Nrf2 通路的激活作用。结果发现,与对照组相比,ACR 组肺组织中 Nrf2 蛋白表达显著上升,且出现核转位现象,伴侣蛋白 Keap1 蛋白表达显著下降,Nrf2 调控的下游 HO-1 和 NQO-1 蛋白表达均明显升高,可见 ACR 刺激后在细胞抗氧化防御系统中起重要作用的 Nrf2-ARE 信号通路被激活,以维持细胞氧化还原稳态并减少严重的氧化损伤,这与 Pan 等^[18]在神经组织细胞中的研究结果相一致,但由于 ACR 刺激时间较长,超过了机体的代谢能力,抗氧化反应能力不足以逆转肺部出现损伤。而 Zhang 等^[19]对肝细胞和脑细胞进行了体内研究,以寻找 Nrf2-ARE 通路在 ACR 处理时的变化,却与我们的结果不同,他们发现 ACR 并没有改变突触体、脑细胞质或肝细胞组分中 Nrf2 的表达,这可能与不同的组织细胞类型、实验条件或剂量方案有关。另外,在研究中发现 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达在 10 mg/(kg·d)组最高,20 mg/(kg·d)组有所下降,可能因为长期的高浓度 ACR 刺激导致 Nrf2 消耗增多,其调控下游的抗氧化基因 HO-1 的蛋白表达自然有所下降,而 NQO-1 基因蛋白表达在 20 mg/(kg·d)组最高,可能存在别的调控通路。因为保护机体的氧化损伤应激,除 Nrf2-ARE 信号通路,

MAPKs 通路、NF- κ B 通路在应激反应基因的转录调控中也起着关键作用,并与 Nrf2-ARE 信号通路存在交互作用^[18,20]。

综上所述,ACR 在青春期小鼠体内通过诱导氧化还原失衡引起肺组织损伤,在此过程中 Nrf2 蛋白表达上调,且出现核转位现象,以及其下游调控基因表达的变化提示 Nrf2-ARE 信号通路可能被激活来缓解 ACR 诱导的氧化损伤。因此,除了已报道的 ACR 毒性外,其对肺部组织的损伤作用也不容忽视。

参 考 文 献 (References)

- [1] Rifai L, Saleh FA. A review on acrylamide in food: occurrence, toxicity, and mitigation strategies [J]. Int J Toxicol, 2020, 39 (2): 93–102.
- [2] Stadler RH, Blank I, Varga N, et al. Acrylamide from maillard reaction products [J]. Nature, 2002, 419(6906): 449–450.
- [3] Matoso V, Bargi-Souza P, Ivanski F, et al. Acrylamide: a review about its toxic effects in the light of developmental origin of health and disease (DOHaD) concept [J]. Food Chem, 2019; 283, 422–430.
- [4] 张璐佳, 杨柳青, 王鹏璞, 等. 丙烯酰胺毒性研究进展 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(8): 274–276.
Zhang LJ, Yang LQ, Wang PP, et al. Research progress on toxicity of acrylamide [J]. J China Food Sci Tech, 2018, 18 (8): 274–276.
- [5] Taeymans D, Wood J, Ashby P, et al. A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2004, 44(5): 323–347.
- [6] Tareke E, Lyn-Cook B, Robinson B, et al. Acrylamide: a dietary carcinogen formed *in vivo*? [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(15): 6020–6023.
- [7] Batoryna M, Semla-kurzawa M, Zysk B, et al. Acrylamide-induced alterations in lungs of mice in relation to oxidative stress indicators [J]. J Environ Sci Health B, 2019, 54(9): 745–751.
- [8] Shaw P, Chattopadhyay A. Nrf2-ARE signaling in cellular protection: mechanism of action and the regulatory mechanisms [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4): 3119–3130.
- [9] Liu Q, Gao Y, Ci X. Role of Nrf2 and its activators in respiratory diseases [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019:7090534.
- [10] Davuljigari CB, Ekuban FA, Zong C, et al. Nrf2 activation attenuates acrylamide-induced neuropathy in mice [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 5995.
- [11] Ekuban FA, Zong C, Takikawa M, et al. Genetic ablation of Nrf2 exacerbates neurotoxic effects of acrylamide in mice [J]. Toxicology, 2021, 456: 152785.
- [12] Gao JG, Jiang Y, Zheng JT, et al. Pubertal exposure to acrylamide disrupts spermatogenesis by interfering with meiotic

- progression in male mice [J]. *Toxicol Lett*, 2022, 358:80–87.
- [13] Semla M, Goc Z, Martiniaková, M, et al. Acrylamide; a common food toxin related to physiological functions and health [J]. *Physiol Res*, 2017, 66(2): 205–217.
- [14] 杨柳青, 董丽, 罗颖华, 等. 氧化应激参与丙烯酰胺致神经细胞凋亡及炎症反应的研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(18): 6265–6269.
Yang LQ, Dong L, Luo YH, et al. Research progress of oxidative stress involved in apoptosis and inflammatory response of nerve cells induced by acrylamide [J]. *J Food Safe Qual Inspect*, 2020, 11(18): 6265–6269.
- [15] Yang D, Yang X, Deng F, et al. Ambient air pollution and biomarkers of health effect [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1017: 59–102.
- [16] Wiegman CH, Li F, Ryffel B, et al. Oxidative stress in ozone-induced chronic lung inflammation and emphysema: a facet of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1957.
- [17] Dilek BD, Sedat K, Ridvan B, et al. Protective effect of carnosic acid on acrylamide-induced liver toxicity in rats: Mechanistic approach over Nrf2-Keap1 pathway [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 8: e22524.
- [18] Pan XQ, Wu X, Yan DD, et al. Acrylamide-induced oxidative stress and inflammatory response are alleviated by N-acetylcysteine in PC12 cells: involvement of the crosstalk between Nrf2 and NF- κ B pathways regulated by MAPKs [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 288: 55–64.
- [19] Zhang LH, Gavin T, Barber DS, et al. Role of the Nrf2-ARE pathway in acrylamide neurotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2011, 205(1): 1–7.
- [20] Zhao MY, Wang FS, Hu XS, et al. Acrylamide-induced neurotoxicity in primary astrocytes and microglia: roles of the Nrf2-ARE and NF- κ B pathways [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 106: 25–35.

[收稿日期] 2022-09-19

小鼠背侧导水管周围灰质在先天胁迫下逃跑和僵立的不同编码特征

鼠类为了躲避天敌常常表现出逃跑 (flight) 或僵立 (freezing) 的先天防御行为, 该行为的产生与中脑导水管周围灰质 (periaqueductal gray, PAG) 有关。目前, 背侧 PAG (dorsal PAG, dPAG) 对这两种防御行为的神经编码机制尚需要进一步研究。

该研究采用模拟天敌迫近的 Looming 和模拟天敌掠过的 sweeping 两种视觉刺激范式诱导 C57BL/6 小鼠先天性防御行为, 并将 4×4 的微电极阵列植入 dPAG 记录小鼠产生两种防御行为的神经信号, 从胞外动作电位 (spike) 和局部场电位 (local field potential, LFP) 中分别提取和分析两种防御行为的神经编码特征。结果表明, dPAG 在 C57 小鼠逃跑和僵立时神经放电模式和编码特征不同: 逃跑行为比僵立行为的时间延迟更短, 逃跑时 dPAG 的 Spike 发放率显著升高, 而僵立行为的则显著下降; 此外, 两种防御行为的 dPAG 神经动作电位放电序列的峰峰间隔 (Inter Spike Interval, ISI) 分布差异主要表现在 2–10 ms 内, 且逃跑行为高于僵立行为。两种防御行为 dPAG 的 LFP 差异主要集中在 theta 频带, 其中逃跑行为 8–10 Hz, 而僵立行为则在 6–8 Hz。同步似然算法构建脑功能网络表明, 逃跑和僵立时 dPAG theta 频带的脑功能网络连接密度显著增强。

综上所述, 该研究揭示了视觉诱导的恐惧情绪在小鼠防御运动行为调制中发挥关键作用。Looming 刺激模拟天敌迫近, 诱发小鼠强烈的恐惧应激产生潜意识快速逃跑行为; 而 Sweeping 刺激模拟天敌掠过, 刺激相对较弱可能诱发僵立行, 揭示了小鼠 dPAG 在先天恐惧范式中诱发逃跑和僵立行为的神经编码机制, 证实了恐惧核团在哺乳动物行为调控中的发挥重要作用。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学 (英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 5(6): 491–501; <https://doi.org/10.1002/ame2.12276>)

刘思美,强喆,吴思澜,等. 痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型的构建及代谢组学分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 51-63.
Liu SM, Qiang Z, Wu SL, et al. Establishment and metabolomics analysis of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease with phlegm-dampness syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 51-63.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.007

痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型的构建及代谢组学分析

刘思美^{1,2,3}, 强喆^{1,2,3}, 吴思澜¹, 涂如霞¹, 李恒华¹, 黄崇刚^{1,3*}
(1. 重庆市中药研究院, 国家中医药管理局中药药理三级实验室, 重庆 400065;
2. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016; 3. 重庆中医药学院中药系, 重庆 402760)

【摘要】 目的 构建痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型, 并应用代谢组学技术揭示其代谢特征。**方法** 采用烟熏联合 LPS 气道滴注、强迫游泳和隔日禁食的方式构建痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型, 通过观察大鼠行为变化, 测定体重、肛温、血液指标、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量, 观察组织病理形态学变化对该模型进行评价; 应用 LC-MS 技术检测并筛选出正常组与模型组大鼠的血浆差异代谢物, 进行通路富集分析。**结果** 与正常组相比, 模型组大鼠出现不同程度的咳嗽、喘息、精神萎靡、行为倦怠、毛色干枯、体重减轻、饮水增加、体温升高、粪便稀溏、舌苔肥大白滑; 外周血中白细胞数和淋巴细胞数显著升高; BALF 中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量显著升高; 肺组织中炎性细胞浸润明显、肺泡腔体大小不一、结肠、十二指肠、回肠粘膜局部脱落; 正常组与模型组间共有 116 个差异代谢物, 主要涉及氨基酸生物合成和代谢、维生素消化吸收与代谢、脂质及类脂质合成与代谢等代谢通路。**结论** 本研究提供了一种成功构建痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型的方法及其相应评价体系, 并初步揭示了该模型的主要代谢特征。

【关键词】 痰湿阻肺; COPD; 动物模型; 证候指标; 代谢组学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0051-13

Establishment and metabolomics analysis of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease with phlegm-dampness syndrome

LIU Simei^{1,2,3}, QIANG Zhe^{1,2,3}, WU Silan¹, TU Ruxia¹, LI Henghua¹, HUANG Chonggang^{1,3*}
(1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chinese Medicine Management Bureau of the Three Grade Laboratory, Chongqing 400065, China. 2. Chongqing Medical University, College of Pharmacy, Chongqing 400016. 3. Chongqing College of Traditional Chinese Medicine, Department of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 402760)
Corresponding author: HUANG Chonggang. E-mail: hcg2091@163.com

【Abstract】 Objective To establish a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with phlegm-dampness syndrome. The metabolic characteristics of this rat model were revealed using metabolomics technology. **Methods** A rat model of COPD with phlegm-dampness syndrome was established by forced smoking combined with LPS airway infusion, forced swimming, and alternate-day fasting. The rat model was evaluated by observing behavioral changes; measuring the body weight, anal temperature, blood indexes, and IL-6, IL-1 β , and TNF- α contents; and observing tissues histopathological changes. Differential plasma metabolites between the normal group and the model group were detected and screened by liquid chromatography-mass spectrometry, and enrichment analysis was conducted for metabolic pathways. **Results** Compared with the normal group, COPD rats with phlegm-dampness syndrome showed different severities of symptoms, including coughing, wheezing, depression, fatigue, withered and dry hair color, weight loss, increased water intake, increased body temperature, production of loose feces containing fat, and a white and smooth tongue coating. In the model rat, the number of white blood cells and lymphocytes in the peripheral blood and the contents of IL-6, IL-1 β , and

【基金项目】 重庆市博士后科学基金项目 (cstc2021jcyj-bshX0188)。
Funded by Chongqing Postdoctoral Science Foundation Project (cstc2021jcyj-bshX0188).
【作者简介】 刘思美 (1992—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 中药药理学研究。Email: liu_simei0218@163.com
【通信作者】 黄崇刚 (1975—), 男, 研究员, 研究方向: 中医方、证与系统生物学及生物信息学的相关性研究。Email: hcg2091@163.com

TNF- α in the BALF significantly increased. In the lung tissue, there was obvious inflammatory cell infiltration; the alveolar lumens appeared as different sizes; and the mucous membranes of the colon, duodenum, and ileum were partially exfoliated. There were 116 metabolites that differed between the normal group and COPD group with phlegm-dampness syndrome. These metabolites mainly involved metabolic pathways, including amino acid biosynthesis and metabolism; vitamin digestion, absorption, and metabolism; lipid and lipoid biosynthesis and metabolism; and other metabolic pathways. **Conclusions** This study provides an effective method for establishing a rat model of COPD with phlegm-dampness syndrome and a corresponding evaluation system and has preliminarily revealed the main metabolic characteristics of this rat model.

【Keywords】 phlegm-dampness syndrome; COPD; animal model; syndrome index; metabolomics

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

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续性存在的气流受限为特征的常见呼吸系统疾病, 当今全球第四大致死病因^[1]。截至 2018 年, 我国 COPD 患者数已超 1 亿, 20 岁以上人群的患病率高达 8.6%, 是仅次于高血压、糖尿病的第三大慢性疾病^[2]。由于 COPD 还是心血管、糖尿病等重大疾病的高风险因素, 且伴随吸烟等危险因素的持续暴露以及空气污染和人口老龄化的加剧, 发病率与死亡率呈持续增长趋势。据估计, 到 2060 年全球每年将至少 540 万人死于 COPD 及其相关疾病^[3-4]。因此, 防治 COPD 已成为全球公共卫生领域的重点工作之一。

目前, COPD 的发病机制仍不完全清楚, 临床也尚无特效药物。近年来, 中医药因其安全性高、多层次、多靶点、多途径整体调节的特色与优势在 COPD 防治中日益受到重视。COPD 属中医“肺胀”、“咳嗽”、“喘证”等范畴, 外邪侵袭、情志失调、饮食失衡或过度劳倦等皆为其诱因, 其病位在肺, 病机虚实交错, 以肺、脾亏虚为本, 痰、瘀、热为标^[5]。中医药防治讲究辨证论治, 据《慢性阻塞性肺疾病中医诊疗指南》的划分, 痰湿阻肺是 COPD 急性加重期的常见证型之一, 然而, 目前尚无相应的证候动物模型, 在一定程度上限制对该证型生物学本质的认识以及相关中医药方剂治疗机制的阐释。因此, 本研究基于中医“咳喘之证, 多因久病肺虚, 累及脾, 致脾失健运, 聚湿成痰; 或因脾本虚, 湿停成痰, 乘肺而咳”的认识^[6], 依据“治痰先治脾”的中医理论, 采用脾虚证动物建模方法联合烟熏及 LPS 气道滴注的方法来构建痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型, 以经典的 COPD 大鼠模型为对照, 从行为、精神状态、毛发、粪便、舌苔、饮食和体重变化等中医证候指标进行证候评分, 以组织形态学和炎症因子等指标对该模型进行评价, 并借助代谢组学技术初步揭示痰湿阻肺型 COPD 模型大鼠的代谢特征。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

32 只 6 ~ 7 周龄 SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 180 ~ 200 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。饲养环境: 12 h 光暗交替, 温度控制在 22 ~ 25℃, 湿度约 55%, 饲养于重庆市中药研究院中药药理三级实验室【SYXK(渝)2017-0004】。本实验经重庆市中药研究院实验动物福利伦理审查委员会批准 (yls2021-16), 并遵循国家有关实验动物管理和使用的规定。

1.1.2 主要试剂与仪器

脂多糖 (LPS, 来源于大肠杆菌 055:B55, Sigma-Aldrich); 龙凤呈祥牌香烟 (焦油量: 11 mg, 一氧化碳量: 12 mg, 烟碱量: 1.1 mg, 重庆中烟工业有限责任公司); 大鼠 IL-6、IL-1 β 、TNF- α ELISA 试剂盒 (武汉基因美生物科技有限公司); 戊巴比妥钠 (Sigma-Aldrich); 苏木素染液和伊红染液 (北京博尔西科技有限公司); 0.9% 氯化钠注射液 (四川科伦药业股份有限公司); 甲酸 (LC-MS 级, TCI); 甲醇和乙腈 (LC-MS 级, CNW Technologies); L-2-氯苯丙氨酸 ($\geq 98\%$, 上海阿拉丁试剂有限公司)。ST-360 酶标仪 (上海科华实验系统有限公司, 中国); XT-2000i 全自动动物血液分析仪 (希森美康, 日本); ASP300S 组织自动脱水机、HistoCore Arcadia H 石蜡包埋机、RM2235 轮转切片机 (徕卡有限公司, 德国); DP260 全自动智能染色机 (深圳达科为医疗设备有限公司, 中国); BX53 光学显微镜 (奥林巴斯株式会社, 日本); Mias-2000 病理图像处理系统 (四川大学图像处理国家研究所, 中国); Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (1.8 μm 2.1 $\times$ 100 mm)、Waters Acquity I-Class PLUS 超高效液相仪、Waters Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱仪 (Waters Corporation, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模

SD 大鼠按体重随机分成 3 组;正常组 10 只、经典 COPD 组 10 只、痰湿型 COPD 组 12 只。造模方法参考相关文献并略作调整^[7-9],具体如下:第 1 天和第 15 天用 0.9%戊巴比妥钠(5 mL/kg)对经典 COPD 组和痰湿型 COPD 组大鼠进行腹腔麻醉,用细线固定大鼠上牙,拉出舌根,用去了针头的头皮针细管缓慢插入大鼠气道,经此气管滴注 LPS(1 mg/mL,0.2 mL)溶液。第 2~14、16~42 天,每天将模型组大鼠放入自制烟熏箱(85 cm×40 cm×45 cm)中进行烟熏,每次 4 支香烟,30 min,熏烟 2 次。其中,痰湿型 COPD 组大鼠熏烟的第 22 天起,每天

熏烟后 4 h,将痰湿型 COPD 组大鼠放入水温 25℃左右的水槽中游泳 15 min,隔日禁食,直至 42 d。正常组不做任何处理。

每周测定体重、肛温,观察进食、饮水、舌苔和粪便情况,以及各组大鼠是否出现咳嗽、喘息、倦怠、萎靡、嗜睡、行动迟缓、毛发干枯蓬松等现象。

1.2.2 证候评分

通过中医文献古籍及临床诊治经验中痰湿证或痰湿阻肺证的辨证要素整理,本研究设计如下中医证候评分量表(见表 1)作为动物模型证型判定参考^[10-13]。造模 6 周后,根据表 1 对各组大鼠进行评分,以证候评分≥8 为痰湿型 COPD 大鼠造模成功标准。

表 1 中医证候评分量表
Table 1 Traditional Chinese medicine syndrome score scale

评分 Score	行为 Behavior	精神状态 Mental state	毛发耳尾 Hair, ear, tail	粪便 Feces	舌苔 Tongue coating	饮食体重 Diet and body weight
0	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal
1	咳嗽、扎堆、倦怠、拱背、轻度动作迟缓 Cough, huddle, tiredness, arched back, mild slow movement	萎靡、嗜睡 Depression and fatigue, drowsiness	毛发稀疏、耳尾血色淡 Sparse hair, the color of ear and tail is pale	软便不成型、大便稀溏 Sloppy soft stool, loose feces	苔质淡红有薄苔 Thin and light red tongue coating	进食减少、饮水增加 Eating less and drinking more
2	喘息、重度动作迟缓 Wheezing, severe slow movement	反应迟钝 Sluggishness	毛色干枯无光泽、毛发蓬松 Dry withered and fluffy hair	水样便 Watery stool	舌苔肥大白滑 Fat, white and smooth tongue coating	体重减轻或增长缓慢 Weight loss or slow growth

1.2.3 指标检测

(1)外周血指标测定:取造模结束的各组大鼠,禁食 12 h 后经腹腔注射 0.9%的戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血于含抗凝剂的采血管中,轻轻摇匀后测定白细胞数、中性粒细胞数、单核细胞数、淋巴细胞数、红细胞数及血红蛋白量等血液指标。

(2)肺泡灌洗液中 IL-6、IL-1β、TNF-α 的含量测定:取腹主动脉取血后的实验大鼠,暴露胸腔,分离出右主支气管结扎,于颈部气管切“T”形口,将 12 号灌胃针插入管腔,用棉线结扎固定。用 5 mL 注射器吸取预冷的生理盐水 5 mL,缓慢注入管腔,反复抽吸 3 次为 1 次灌洗,重复灌洗 3 次,合并肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。将所得 BALF 于 4℃,5000 r/min 离心 10 min,取上清,按 ELISA 试剂盒说明分别测定 IL-6、IL-1β、TNF-α 含量。

(3)组织标本的采集及 HE 染色:待肺泡灌洗后,迅速分离并摘取心脏、肝、脾、肾、右肺和胸腺,称重,计算脏器指数。计算公式如下:脏器指数

(%)=脏器重量/体重×100%。
称重后,将肺、胸腺、脾及部分十二指肠、回肠和结肠一并放入 4%多聚甲醛固定 48 h,切取大小合适的组织样品进行石蜡包埋,切片,HE 染色,观察各组织器官的形态和变化,包括肺组织中肺泡结构的完整性、肺泡间隔的粗细、细支气管管腔的大小、气道炎症细胞的浸润情况以及肠内壁绒毛情况等。

1.2.4 血浆代谢组检测

(1)血浆样本的制备及预处理:分别收集正常组与痰湿型 COPD 组大鼠腹主动脉血于含 EDTA 抗凝剂的采血管中,各组混匀后,3000 r/min 离心 10 min,收集血浆于 1.5 mL EP 管中。移取 100 μL 样本至 1.5 mL EP 管中,加入 300 μL 甲醇,再加入 20 μL 内标,涡旋混匀 30 s,冰水浴超声 10 min,于-20℃静置 1 h,随后 4℃,12 000 r/min 离心 15 min,取出 200 μL 上清于 2 mL 进样瓶,每个样本各取 20 μL 混合成 QC 样本,再取 200 μL 上机检测。

(2)检测条件:色谱条件:Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(1.8 μm 2.1 $\times$ 100 mm),流动相 A:0.1%甲酸水溶液,流动相 B:0.1%甲酸乙腈,梯度洗脱(0 ~ 0.25 min,2% B;0.25 ~ 10 min,2% ~ 98% B;10 ~ 13 min,98% B;13 ~ 13.1 min,98% ~ 2% B;13.1 ~ 15 min,2% B),柱温 40℃,流速 0.4 mL/min。

质谱条件:Waters Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱仪在采集软件(MassLynx V4.2, Waters)控制下采用 MSE 模式进行一级、二级质谱数据采集。在每个数据采集循环中,同时对低碰撞能量及高碰撞能量进行双通道数据采集。低碰撞能量:2 V;高碰撞能量区间:10 ~ 40 V;扫描频率:0.2 s。ESI 离子源参数:毛细管电压:2000 V(正离子模式)或-1500 V(负离子模式);锥孔电压:30 V;离子源温度:150℃;脱溶剂气温度 500℃;反吹气流速:50 L/h;脱溶剂气流速:800 L/h。

(3)数据处理:MassLynx V4.2 采集的原始数据通过 Progenesis QI 软件做峰提取、峰对齐等数据处理操作,基于 Progenesis QI 软件在线 METLIN 数据库及百迈客自建库进行鉴定,同时进行理论碎片识别,质量数偏差均在 100 ppm 以内。将经过处理的代谢组数据导入 SIMCA-P 13.0 软件中进行主成分分析(principal component analysis,PCA)及正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),并以差异倍数 FC > 1.5, $P < 0.05$ 和 VIP > 1 为筛选条件,找出组间差异代谢产物,并通过 HMDB、KEGG 数据库对差异

代谢物进行功能注释和富集分析。

1.3 统计学分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Graphpad Prism 8.0 软件对实验数据进行统计学分析,两组间比较采用 Student's t 检验,多组间比较采用 One-way ANOVA(Dunnnett)检验。

2 结果

2.1 证候等级评分

根据证候评分,痰湿型 COPD 大鼠的成功构建率达 83.33%,正常组、经典 COPD 组及建模成功的痰湿型 COPD 组大鼠的证候得分分别为(0.50 $\pm$ 0.71)、(6.00 $\pm$ 1.15)和(9.30 $\pm$ 1.06)。

2.2 证候指标比较

与正常组相比,经典 COPD 组大鼠和痰湿型 COPD 组大鼠均有出现不同程度的咳嗽、喘息、倦怠、精神萎靡、嗜睡、扎堆、反应迟缓、毛色干枯蓬松等现象;相比经典 COPD 组,痰湿型 COPD 大鼠粪便多不成形、稀溏甚至水样便(图 1A),舌有薄苔或肥大白滑(图 1B),体重减轻(图 1C),饮水明显增加(图 1D);痰湿型 COPD 大鼠体温普遍低于经典 COPD 组大鼠,但多高于正常组(图 1E)。

2.3 外周血指标变化

经典 COPD 组和痰湿型 COPD 组大鼠的血液指标变化相似,两者间无显著性差异;与正常组比,经典 COPD 组和痰湿型 COPD 组大鼠外周血中白细胞数量和淋巴细胞数量均明显升高,有统计学意义($P < 0.01, P < 0.001$);红细胞数及血红蛋白量也略有

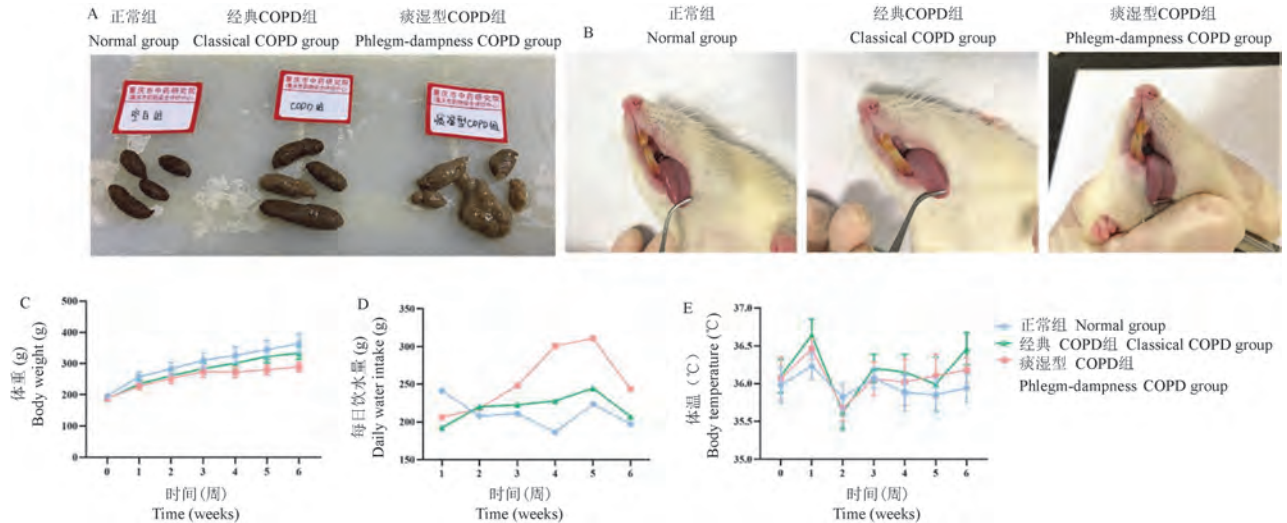


图1 各组大鼠的粪便、舌苔、体重、饮水量和体温变化情况

Figure 1 Changes in feces, tongue coating, body weight, water intake and body temperature of rats in each group

升高,血小板降低,但均无显著性差异(表 2)。

2.4 BALF 中 IL-6、IL-1β、TNF-α 的含量

如图 2 所示,经典 COPD 组和痰湿型 COPD 组大鼠 BALF 中 IL-6、IL-1β、TNF-α 的含量十分相近,与正常组相比,均显著升高,且有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

2.5 脏器指数

如表 3 所示,经典 COPD 组和痰湿型 COPD 组大鼠的脏器指数与正常组相比均无统计学意义,但经典 COPD 组和痰湿型 COPD 组大鼠的肺指数均较正常组略有增大,胸腺指数减小,以痰湿型 COPD 组变化明显,且痰湿型 COPD 组大鼠的心脏指数也略

有增加。

2.6 HE 组织染色情况

如图 3 所示,空白组肺泡完整,主支气管形态正常,未见炎症浸润;经典 COPD 组及痰湿型 COPD 组的肺间质及血管周围均可见明显炎症细胞浸润现象(黑色三角形),肺泡间隔增粗或塌陷断裂,肺泡形态大小不一,部分肺泡腔体较大,呈肺气肿样变化,部分腔体则塌陷,呈肺不张样变化。

相比正常组,经典 COPD 组的结肠和回肠粘膜仅有轻微损伤,差别不明显,而痰湿型 COPD 组的结肠、十二指肠、回肠粘膜损伤相对明显,局部粘膜脱落明显(黑色箭头);各组脾、胸腺则未见明显异常。

表 2 各组大鼠外周血指标变化
Table 2 Changes of peripheral blood indexes in each group rats

指标名称 Index name	正常组 Normal group	经典 COPD 组 Classical COPD group	痰湿型 COPD 组 Phlegm-dampness COPD group
白细胞 White blood cells	2.79 ± 1.05	4.73 ± 1.20**	4.38 ± 0.92**
红细胞 Red blood cells	7.74 ± 1.22	8.98 ± 0.72	8.85 ± 0.98
血红蛋白 Hemoglobin	143.90 ± 19.71	167.70 ± 10.00	165.20 ± 15.61
血小板 Platelet	873.60 ± 134.76	813.40 ± 93.81	829.30 ± 120.63
平均血红蛋白量 Mean amount of hemoglobin	18.66 ± 0.73	18.72 ± 0.54	18.69 ± 0.53
中性细胞比率 Percent of neutral cells	10.20 ± 3.42	7.19 ± 1.90	9.17 ± 2.05
淋巴细胞比率 Percent of lymphocyte	86.46 ± 4.19	89.76 ± 2.52	88.29 ± 1.92
单核细胞比率 Percent of monocyte	2.15 ± 0.91	1.75 ± 0.56	1.59 ± 1.01
嗜酸性粒细胞比率 Percent of eosinophilic granulocyte	1.15 ± 0.47	1.24 ± 0.53	0.92 ± 0.19
嗜碱性粒细胞比率 Percent of basophilic granulocyte	0.04 ± 0.07	0.06 ± 0.07	0.02 ± 0.04
中性细胞数 Neutral cells	0.29 ± 0.18	0.34 ± 0.13	0.40 ± 0.12
淋巴细胞数 Lymphocyte	2.40 ± 0.89	4.25 ± 1.09***	3.86 ± 0.80**
单核细胞 Monocyte	0.06 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.07 ± 0.05
嗜酸性粒细胞 Eosinophilic granulocyte	0.03 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01
嗜碱性粒细胞 Basophilic granulocyte	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

注:与正常组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。(下图同)
Note. Compared with normal group,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

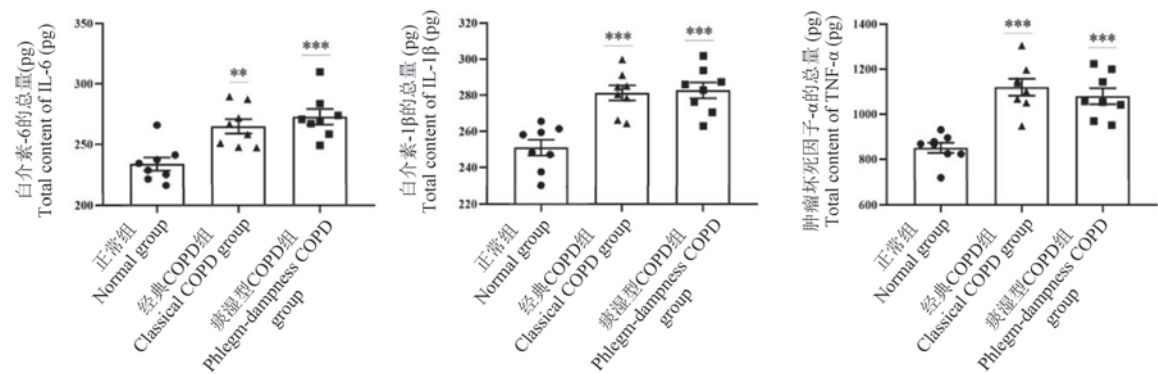


图 2 BALF 中 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 含量
Figure 2 Content of IL-6, IL-1β and TNF-α in BALF

表 3 脏器指数(%)
Table 3 Organ indexes(%)

组别 Groups	心脏 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	胸腺 Thymus
正常组 Normal group	0.303 ± 0.025	2.906 ± 0.411	0.171 ± 0.036	0.238 ± 0.044	0.697 ± 0.104	0.124 ± 0.025
经典 COPD 组 Classical COPD group	0.314 ± 0.024	2.931 ± 0.288	0.166 ± 0.030	0.286 ± 0.071	0.670 ± 0.049	0.095 ± 0.024
痰湿型 COPD 组 Phlegm-dampness COPD group	0.333 ± 0.032	2.899 ± 0.292	0.174 ± 0.034	0.315 ± 0.068	0.685 ± 0.046	0.091 ± 0.032

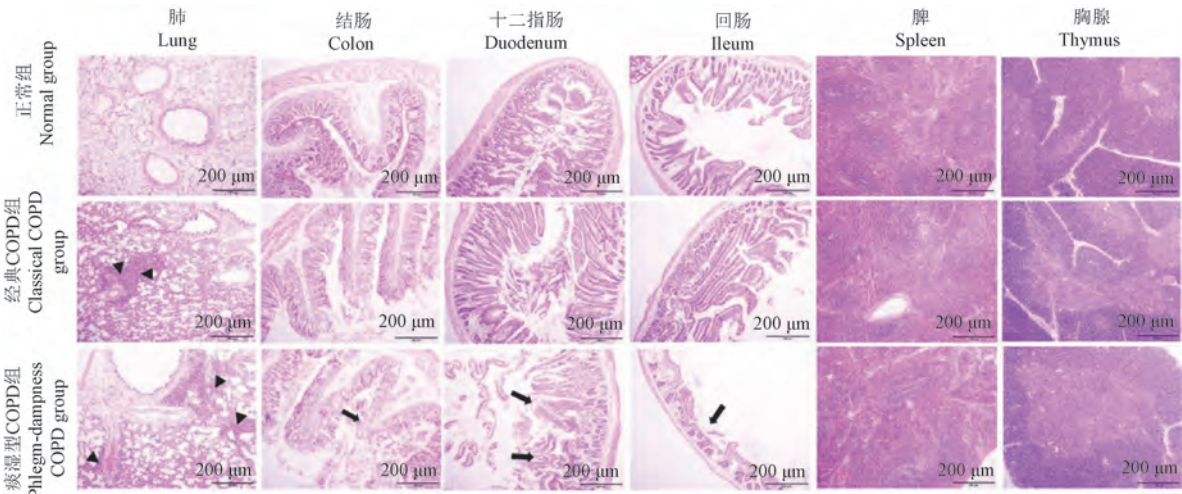


图 3 各组织的 HE 染色图
Figure 3 HE staining of each tissue

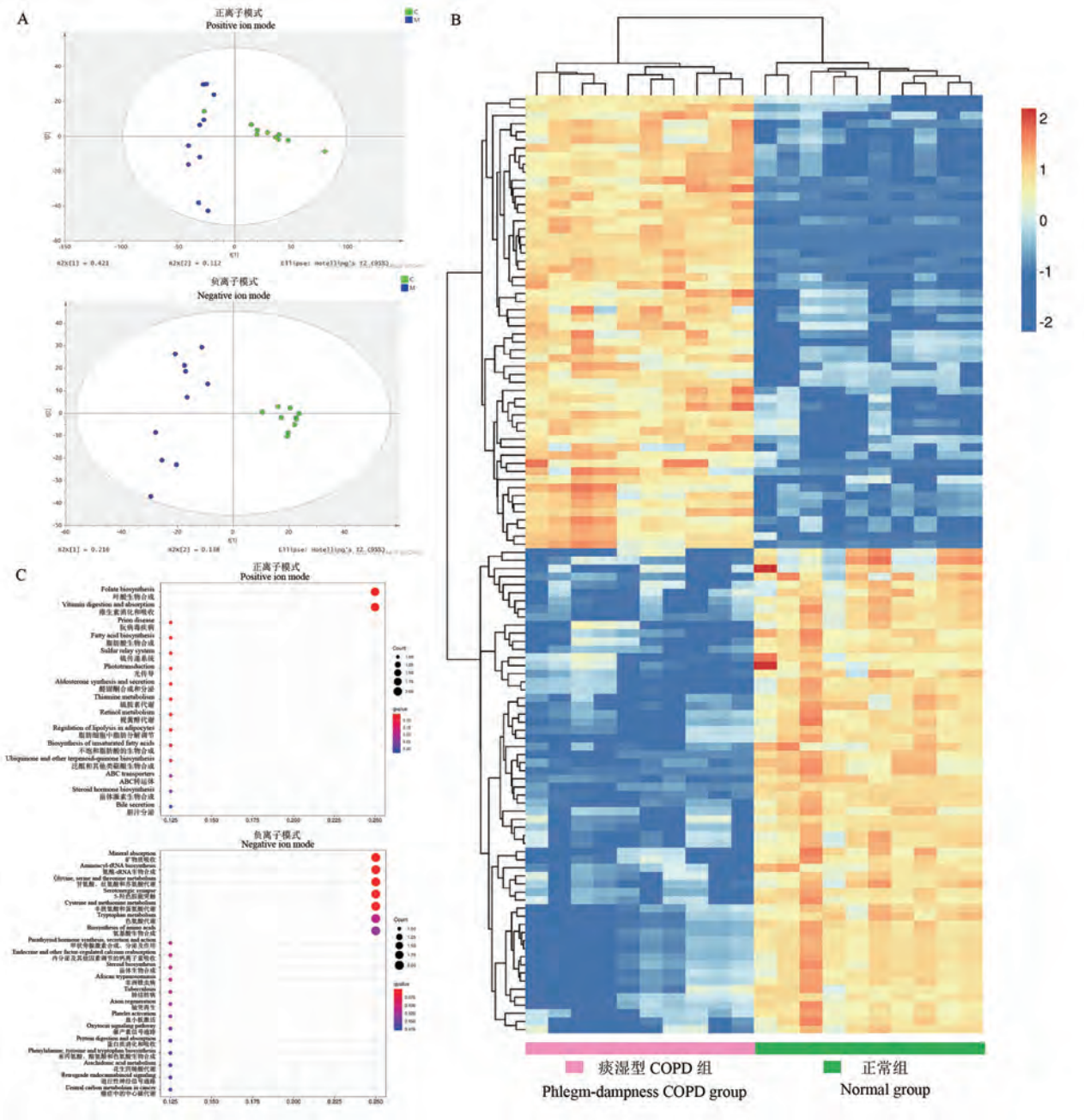
2.7 血浆代谢物的变化

为了探究痰湿型 COPD 大鼠内在的生物物质基础,本实验在不同离子模式下检测了正常组与痰湿型 COPD 组大鼠血浆代谢物的变化,并通过 PCA 得分图(见图 4A)可知,除正离子模式下正常组中一个样本与模型组有交叉外,在正负离子模式下,正常组与痰湿型 COPD 组大鼠的血浆代谢物均呈现出明显区别,表明造模后痰湿型 COPD 大鼠体内的

代谢模式发生了明显变化。再根据 OPLS-DA 分析,以 $VIP > 1$ 、 $FC > 1.5$ 和 $P < 0.05$ 为判定标准,共筛选出正负离子模式下的差异代谢产物 116 个,其中 56 个上调,60 个下调。对差异代谢物进行聚类分析,得到聚类热图(见图 4B)。聚类热图结果显示,正常组与痰湿型 COPD 组能够明显区分且组内聚类良好,进一步表明痰湿型 COPD 组大鼠的代谢模式发生显著变化。

与正常组相比,痰湿型 COPD 组大鼠血浆中的差异代谢物多为氨基酸类、脂质及类酯质(固醇脂类、孕烯醇酮脂类、脂肪酸类、甘油脂类及甘油磷脂类)、维生素类等化合物,表 4 所示为以 Log₂FC 排序前 50 的差异代谢物。这些差异代谢物主要参与了氨酰-tRNA 生物合成、维生素消化与吸收、叶酸生

物合成、脂肪酸和不饱和脂肪生物合成、5-羟色胺能突触通路、氨基酸代谢、矿物质吸收、类固醇生物合成、甲状旁腺激素的合成、分泌和作用、醛固酮合成与分泌、甾体激素生物合成、花生四烯酸代谢、内分泌等因素调节钙再吸收、血小板激活、胆汁分泌、脂质分解调节等代谢通路(见图 4C)。



注:A:PCA 得分图;B:热分析图;C:KEGG 通路富集气泡图。

图 4 正负离子模式下正常组与痰湿型 COPD 组大鼠血浆差异代谢物

Note. A. PCA score plots. B. Heatmap. C. Dot plots of KEGG enrichment pathway.

Figure 4 Analysis of rat plasma differential metabolites between normal group and phlegm-dampness COPD group in positive and negative ion mode

表 4 正常组与痰湿型 COPD 组大鼠的前 50 个血浆差异代谢物

Table 4 Information of the top 50 differential plasma metabolites between normal group and phlegm-dampness COPD group					
编号 Code	名称 Name	变化倍数的对数值 Log ₂ FC	P 值 P value	变量重要性投影 VIP	变化趋势 Variation trend
neg_1863	磷酸丝氨酸 Phosphoserine	32.52631	0.026115	2.062504	↑
pos_1299	青霉素 G Penicillin G	32.47632	0.018580	1.796625	↑
pos_2562	四甲基槲皮素 3-芦丁苷 Tetramethylquercetin 3-rutinoside	32.4067	0.002443	1.870454	↑
pos_4335	二香草基四氢呋喃阿魏酸酯 Divanillyltetrahydrofuran ferulate	31.40976	0.002156	1.898903	↑
neg_2030	13'-羟基-γ-生育酚 13'-hydroxy-gamma-tocopherol	26.46928	0.013679	2.092127	↑
neg_1553	精氨酸-蛋氨酸 Arginyl-methionine	26.24337	0.016987	2.084927	↑
neg_1730	15-酮-前列腺素 F1α 15-keto-PGF1α	25.88409	0.026307	2.045268	↑
pos_3317	酰基鞘氨醇己三糖苷 Trihexosylceramide (d18:1/25:0)	23.84513	0.032598	1.58712	↑
pos_1474	米多君前体 Desglymidodrine	21.15369	0.042414	1.547875	↑
pos_4683	环孢霉素 C1 Cycloalopin C1	21.07494	0.034641	1.710843	↑
neg_604	骨化三醇 Calcitriol	20.01818	0.023924	1.914841	↑
neg_1097	络石苷 Tracheloside	19.29657	0.010153	2.017631	↑
neg_903	25-羟基维生素 D ₂ 25-hydroxyvitamin D ₂	18.8566	0.048159	1.85501	↑
neg_3696	4'-甲氧嘧啶 4'-methoxymucidin	18.04965	0.021923	1.921556	↑
pos_2173	四苯那嗪 Tetrabenazine	12.91968	0.047331	1.712431	↑
pos_3450	神经节苷脂 GM3 (d18:0/20:0) Ganglioside GM3 (d18:0/20:0)	12.10493	0.044492	1.53408	↑
neg_1407	4α-羟甲基-5α-胆甾-8,24-二烯-3β-醇 4α-hydroxymethyl-5α-cholesta-8,24-dien-3β-ol	11.12063	0.04462	1.851845	↑
neg_1335	罗旦梅交酯 Jangomolide	10.51814	0.047914	1.758952	↑
neg_1243	生物菌素 A Biochanin A	9.855425	0.046205	1.928411	↑
neg_2354	脯氨酸谷氨酸 Prolyl-glutamate	3.729847	0.015175	1.978276	↑
neg_1432	还含蓍酸 Achimilic acid	3.117435	0.002407	2.139646	↑
neg_2286	甘油磷酸盐(20:3(8Z,11Z,14Z)/22:6 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) PS(20:3(8Z,11Z,14Z)/22:6 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	2.4774	0.031534	1.856498	↑
neg_24	L-色氨酸 L-tryptophan	2.079449	0.025912	1.911497	↑

续表4

编号 Code	名称 Name	变化倍数的对数值 Log ₂ FC	P 值 P value	变量重要性投影 VIP	变化趋势 Variation trend
neg_1342	櫻草皂甙元 A Priverogenin A	1. 969696	0. 040005	1. 833292	↑
neg_304	胆固醇硫酸盐 Cholesterol sulfate	1. 886648	0. 015859	1. 982189	↑
pos_1442	(3β,17α,23R)-17,23-环氧-3,29-羟基-27-去甲-8-羊毛甾烯-15,24-二酮 (3β,17α,23R)-17,23-epoxy-3,29-dihydroxy-27-norlanost-8-ene-15,24-dione	1. 687843	0. 033979	1. 653055	↑
neg_3679	4R,5R,6S-羟基-2-羟甲基-2-环己烯-1-酮 6-(2-羟基-6-苯甲酸甲酯) 4R,5R,6S-trihydroxy-2-hydroxymethyl-2-cyclohexen-1-one 6-(2-hydroxy-6-methylbenzoate)	1. 586371	0. 020491	1. 932792	↑
neg_2922	前列腺素 H2 Prostaglandin H2	1. 556637	0. 003931	2. 071205	↑
pos_1234	二羟基苯丙氨酸黄素 Dopaxanthin	1. 509986	0. 007126	1. 774986	↑
neg_1444	2-(3-甲基丁基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶 2-(3-Methylbutyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine	1. 503045	0. 04977	1. 941765	↑
neg_418	N-甲基-3-吡啶甲氨 N-Norgramine	1. 465035	0. 019909	1. 940964	↑
neg_3669	N-甲基血清素 N-methylserotonin	1. 436775	0. 008848	2. 01619	↑
pos_2254	去甲肾上腺素 Norepinephrine	-1. 48837	0. 044434	1. 597126	↓
pos_1097	假荆芥内酯甙 Nepetaside	-1. 63403	0. 00266	1. 873945	↓
pos_1002	蛋氨酰丝氨酸 Methionyl-serine	-1. 65053	0. 03224	1. 63651	↓
pos_759	肉桂酸乙酯 Ethyl cinnamate	-1. 69152	0. 005132	1. 799126	↓
pos_17	癸酸 Decanoic acid	-1. 73594	0. 005955	1. 745975	↓
neg_3585	5-甲硫核糖-1-磷酸 5-methylthioribose 1-phosphate	-1. 75006	0. 013133	2. 084158	↓
pos_2576	羟苯乙胺 Oxyphenonium	-1. 85043	0. 045289	1. 61051	↓
pos_1214	甲基丙二酰肉碱 Methylmalonylcarnitine	-1. 89993	0. 011689	1. 756108	↓
pos_3233	灰毛糖芥甙 Canescein	-2. 17149	0. 04465	1. 745698	↓
pos_1872	欧鼠李碱 Frangulanine	-2. 22201	0. 045293	1. 73797	↓
pos_405	丙基 1-(丙基亚磺基)丙基二硫 Propyl 1-(propylsulfinyl)propyl disulfide	-2. 62907	0. 015834	1. 802122	↓
pos_2061	大果桉醛 I Macrocarpal I	-2. 84443	0. 033629	1. 678141	↓
pos_2638	阿奇霉素 Azithromycin	-3. 20132	0. 044225	1. 585678	↓

续表4

编号 Code	名称 Name	变化倍数的对数值 Log ₂ FC	P 值 P value	变量重要性投影 VIP	变化趋势 Variation trend
neg_3008	甘油酯(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0) DG(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	-11.5937	0.000744	2.141226	↓
pos_677	氧代紫番荔枝碱 Oxopurpureine	-12.3541	0.041929	1.600101	↓
pos_3351	1-乙酸鳄梨碱 Avocadyne 1-acetate	-14.3976	0.03164	1.779555	↓
pos_3844	硫胺素 Thiamine	-21.4808	0.034783	1.585945	↓
pos_651	谷氨酰胺、丙氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸 Gln, Ala, Trp, Phe	-22.7937	0.042672	1.622985	↓

注: ↑表达水平上调; ↓表达水平下调。
Note. ↑ represents up-regulated expression level. ↓ represents down-regulated expression level.

3 讨论

依据中医理论,痰湿阻肺是 COPD 众多中医证候中较为常见的一种,与肺、脾亏虚密切相关。外邪侵袭,卫外不固,肺失宣发肃降,日久肺气虚损,累及脾,致脾失健运,水谷精微不化,痰湿丛生,深伏于肺;或脾本虚,湿困中焦,聚生成痰,乘肺而上,诱发咳嗽。故《丹溪·心法》云:“燥脾湿,是治痰之本法也。”^[14]《石室秘录》亦有“治肺之法,正治甚难,当转治以脾,脾气有养,则土自生金”的记载^[15]。脾乃后天之本,统气血生化,乃生痰之源,而肺乃贮痰之器,故治痰当先治脾。因此,本研究在经典 COPD 大鼠模型建模(烟熏联合 LPS 气道滴注)的基础上,结合脾虚动物模型的建模方法——“过度疲劳(强迫游泳)”和“饮食失节(隔日禁食)”,来共同构建痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型。实验结果显示,采用该复合因素连续造模 6 周,大鼠出现不同程度的咳嗽、喘息、精神倦怠、嗜睡、反应迟缓、毛色干枯蓬松、大便稀溏、舌质淡、苔白滑、体重减轻等现象,这与中医脾虚所致咳喘的证候表现类似;且该造模大鼠外周血中白细胞和淋巴细胞数量明显升高,BALF 中 IL-6、IL-1β、TNF-α 含量显著升高,肺组织出现明显炎症细胞浸润,肺泡腔体或塌陷不张,或膨大呈肺气肿样变化,符合 COPD 生化及病理指标变化特征;该模型大鼠的十二指肠、回肠、结肠粘膜损伤相对明显,局部粘膜脱落,这与脾虚所致的脘腹胀闷、大便稀溏相关。综上,采用烟熏联合 LPS 气道滴注、强迫游泳和隔日禁食的方式构建痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型是可行的,其中,粪便、舌苔、体重和饮水情况是该模型区别于经典 COPD 大鼠模型

的关键中医证候指标。

代谢组学作为系统生物学的重要组成部分之一,具有动态性与整体性的特征,它能从代谢网络的内在微观变化反映出机体外在的功能状态,与中医辨证论治和整体观十分契合^[16]。近年来,将代谢组学与证候结合形成的中医证候代谢组学研究方法为中医不同证型生物标志物的发现及“证候相关代谢谱群”的构建提供了有效路径,为中医证候的客观化、标准化提供了新的技术支持,为证候本质及中医辨证论治的科学阐述提供了客观的物质基础^[17]。本研究中,代谢组学结果显示,痰湿阻肺型 COPD 模型大鼠血浆中的氨基酸类、脂质及类脂质类、维生素类等代谢物水平发生了明显改变。氨基酸类中,磷酸丝氨酸、精氨酸-蛋氨酸、L-色氨酸含量明显增加,而谷氨酰胺、丙氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸含量显著降低,这与 Vincken 等^[18]的研究结果相一致。磷酸丝氨酸是丝氨酸的前体形式,丝氨酸可促进脂肪和脂肪酸的新陈代谢,有助于维持免疫系统,且能促进机体对钙、铁、锌等矿物质的吸收,调节钙、磷相关生理过程^[19];精氨酸对维持机体的氮平衡十分重要,且具有免疫调节功能,可影响吞噬细胞的活力^[20];蛋氨酸主要参与体内各种含硫化合物的代谢、甲基化反应、氧化还原维持、多胺合成以及叶酸代谢等,与许多细胞的功能紧密相关^[21];L-色氨酸是 5-羟色胺及烟酸等的重要前体,其含量的升高或可导致 5-羟色胺含量的变化,而 5-羟色胺是参与睡眠、体温、情绪、肠蠕动、支气管和血管平滑肌收缩等生理功能调节的重要物质^[22-23],这一结果与痰湿型 COPD 大鼠出现嗜睡、腹泻、体温升高及喘息等症状有着紧密联系;谷氨酰胺可参与谷胱甘肽合成,

影响机体的抗氧化能力,调节免疫应答及炎症因子水平,研究显示,谷氨酰胺能改善 COPD 患者的呼吸功能和预后,故其含量的降低或可造成 COPD 相关氧化损伤及炎症反应的加重^[24-25];丙氨酸是构成蛋白质的基本单位,在体内通过脱氨生成酮酸,再经葡萄糖代谢途径生成糖,进而参与糖代谢^[26];苯丙氨酸在体内可生成酪氨酸,并与酪氨酸一起参与肾上腺素、多巴胺和去甲肾上腺素等神经递质和激素的合成,参与机体糖代谢和脂肪代谢,酪氨酸具有调节情绪,刺激神经系统等作用,这两种氨基酸含量的降低会造成甲状腺功能低下、抑郁、慢性疲劳、新陈代谢缓慢等问题^[27-28],这与痰湿型 COPD 大鼠精神萎靡、倦怠、反应迟缓、体重降低关系紧密,且模型大鼠血浆中检测到去甲肾上腺素含量也显著降低,几者变化趋势相一致。总之,氨基酸是维持生命正常代谢的物质基础,对于机体组织蛋白质的合成、氮平衡的维持、脂肪、激素及能量的产生十分重要,其代谢水平的异常波动可引起机体相应的病理变化。维生素类中,13'-羟基- γ -生育酚、骨化三醇、25-羟基维生素 D₂ 含量显著升高,硫酸素含量显著降低。13'-羟基- γ -生育酚属维生素 E 类,维生素 E 在体内能促进血红素合成,参与氧化还原,调节与脂类摄取、胞外基质蛋白、细胞黏附、炎症以及细胞周期等相关基因的表达^[29-30];骨化三醇和 25-羟基维生素 D₂ 均属于维生素 D 类,是钙、磷吸收与代谢的关键调节因素,骨化三醇又名 1 α ,25-二羟基维生素 D₃,是维生素 D 的主要活化形式,除了参与钙、磷代谢,还可调节胰岛素分泌、影响细胞分化等^[31-32];硫酸素又名维生素 B₁,主要参与体内辅酶的合成与代谢,其体内活化形式焦磷酸硫酸素(TPP)是 α -酮酸脱氢酶系的辅助因子,参与 α -酮酸的氧化脱羧,故维生素 B₁ 主要参与糖代谢进而影响能量生成^[33];综上,维生素类成分的含量变化提示了痰湿型 COPD 大鼠体内血红素合成、钙磷代谢等过程或发生了改变,体内糖代谢和能量供给也受到了明显影响。脂类及类脂类中,15-keto-PGF1 α 、Trihexosylceramide(d18:1/25:0)、神经节苷脂 GM3(d18:0/20:0)、4 α -hydroxymethyl-5 α -cholesta-8,24-dien-3 β -ol、PS(20:3/22:6)、胆固醇硫酸盐、前列腺素 H₂ 等含量显著上升,DG(22:5/22:6/0:0)、甲基丙二酰肉碱、癸酸等含量显著降低。其中,15-keto-PGF1 α 和 PGH₂ 均为前列腺素类化合物,与炎症反应紧密相关,研究显示,PGH₂ 在酶的催化下可生成

PGE₂、PGI₂ 等化合物,进而介导炎症的发生发展^[34],这与痰湿型 COPD 大鼠 BALF 中炎症指标上升及肺组织 HE 切片中观察到炎症细胞浸润现象相吻合,也提示模型大鼠体内花生四烯酸代谢发生了改变;Trihexosylceramide(d18:1/25:0)属于鞘脂类,神经节苷脂 GM3(d18:0/20:0)属于糖脂,4 α -hydroxymethyl-5 α -cholesta-8,24-dien-3 β -ol、胆固醇硫酸盐均属于固醇类,PS(20:3/22:6)属甘油磷脂,DG(22:5/22:6/0:0)属于甘油酯,甲基丙二酰肉碱和癸酸均属于脂肪类,这些化合物等的含量变化表明了模型大鼠体内的脂质代谢发生了相应改变。综上,痰湿阻肺型大鼠体内的代谢特征主要体现在氨基酸生物合成与代谢、维生素消化吸收与代谢、脂类及类脂代谢等代谢途径改变。

综合上述分析,本研究为痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型的构建及评价提供了一种可行的方法,为痰湿阻肺型 COPD 动物模型的研究及客观认识该证型的本质奠定了基础,有助于相应中医药方剂治疗机制的阐释和中药新药的开发。当然,本研究中,证候模型动物的成模率还有待提高,建模方法需继续精进完善,代谢特征也有待进一步挖掘和细化。并且,本研究只采用了一种品系的大鼠建模,对于其他品系大鼠是否可成功复制模型还需进一步验证。

参 考 文 献(References)

- [1] Mirza S, Clay RD, Koslow MA, et al. COPD guidelines: a review of the 2018 GOLD report [J]. Mayo Clin Proc, 2018, 93(10): 1488-1502.
- [2] Wang C, Xu J, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health[CPH] study): a national cross-sectional study [J]. Lancet, 2018, 391(10131): 1706-1717.
- [3] Global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: 2022 report [EB/OL]. [2022-03-14]. <https://staging.goldcopd.org/2022-gold-reports-2/>.
- [4] Singh D, Agusti A, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease: the GOLD science committee report 2019 [J]. Eur Respir J, 2019, 53(5): 1900164.
- [5] 郑莉莉,李泽庚.从“肺主治节”探讨慢性阻塞性肺疾病病因病机[J].江西中医药大学学报,2017,29(4):1-3,8. Zheng LL, Li ZG. Exploring etiology and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease from lung governing management and regulation [J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 2017, 29(4): 1-3, 8.
- [6] 吴瑶,王飞,王全林,等.慢性阻塞性肺疾病从脾论治理论

- 探讨 [J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(12): 88-89.
- Wu Y, Wang F, Wang QL, et al. Discussion on the theory of treating chronic obstructive pulmonary disease from spleen [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2013, 20(12): 88-89.
- [7] Mizutani N, Fuchikami JI, Takahashi M, et al. Pulmonary emphysema induced by cigarette smoke solution and lipopolysaccharide in Guinea pigs [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(9): 1559-1564.
- [8] 程羽, 陶伟利, 张晓梅, 等. 建立慢性阻塞性肺疾病动物模型的实验研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(4): 445-448.
- Cheng Y, Tao WL, Zhang XM, et al. Experimental study on the building animal model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. World J Integr Tradit West Med, 2016, 11(4): 445-448.
- [9] 蒋琦, 彭怡雯, 沈淑怡, 等. 脾虚证动物模型的研究进展 [J]. 基层医学论坛, 2021, 25(13): 1903-1905.
- Jiang Q, Peng YW, Shen SY, et al. Research progress on animal models of spleen deficiency syndrome [J]. Med Forum, 2021, 25(13): 1903-1905.
- [10] 春柳, 李建生, 马锦地, 等. 基于现代名老中医经验的痰饮常见证候及其特征的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(3): 496-498.
- Chun L, Li JS, Ma JD, et al. Study on common syndromes and characteristics of phlegm retention based on the experience of modern famous and old Chinese medicine practitioners [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2018, 45(3): 496-498.
- [11] 罗齐军, 陈媛丽, 夏燕华, 等. 三子六君汤联合穴位贴敷治疗慢阻肺急性加重期临床研究 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(14): 142-144.
- Luo QJ, Chen YL, Xia YH, et al. Clinical observation of AECOPD treated by San zi Liu Jun decoction combined with acupoint application of Chinese herbal medicine [J]. Asia Pac Tradit Med, 2017, 13(14): 142-144.
- [12] 罗媛. 基于“治痰先治气”理论运用益气化痰方治疗肺癌气虚痰湿证的临床研究 [D]. 昆明: 云南中医药大学; 2021.
- Luo Y. Based on the theory of “treating Qi before phlegm”, the clinical study of treating qi deficiency and phlegm dampness syndrome of lung cancer with yiqihuatan decoction [D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine; 2021.
- [13] 林明欣. 痰湿证临床诊断标准研究 [EB/OL]. [2020-10-01]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=SNAD&dbname=SNAD&filename=SNAD000001918056&uniplatform=NZKPT&v=TjRX_0fSS4uOKKRG2NYHcbPgdfTdvLisJZAWX8GYbGJrCHv5gqTDe-9eXzBUJsEU3YMu4mRz-s%3dLin.MX. Study on clinical diagnostic criteria of phlegm-dampness syndrome [EB/OL]. [2020-10-01]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=SNAD&dbname=SNAD&filename=SNAD000001918056&uniplatform=NZKPT&v=TjRX_0fSS4uOKKRG2NYHcbPgdfTdvLisJZAWX8GYbGJrCHv5gqTDe-9eXzBUJsEU3YMu4mRz-s%3dLin.MX.
- [14] 朱震亨. 丹溪心法 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2005.
- Zhu ZH. Dan xi xin fa [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2005.
- [15] 陈士铎. 石室秘录 [M]. 北京: 人民军医出版社; 2009.
- Chen SD. Shi shi mi lu [M]. Beijing: People's Military Medical Publishing House; 2009.
- [16] 刘妍彤, 任爽, 曹奇, 等. 基于代谢组学“痰湿证”识别模式 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(10): 1-4.
- Liu YT, Ren S, Cao Q, et al. Recognition pattern of phlegm-dampness syndrome based on metabolomics [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2021, 48(10): 1-4.
- [17] 马素娜, 关亚奇, 张森, 等. 代谢组学技术在中医证候学研究中的应用优势 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(7): 1714-1716.
- Ma SN, Guan YQ, Zhang M, et al. The advantage of metabolomics in the study of TCM syndrome [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(7): 1714-1716.
- [18] Vincken W, van Noord JA, Greefhorst APM, et al. Improved health outcomes in patients with COPD during 1 yr's treatment with tiotropium [J]. Eur Respir J, 2002, 19(2): 209-216.
- [19] 李帅, 王丽, 梁兴伟, 等. 精氨酸代谢途径及其在畜牧生产中的应用研究 [J]. 动物营养学报, 2022, 34(4): 2156-2166.
- Li S, Wang L, Liang XW, et al. Metabolic pathways and application research of arginine in animal husbandry production [J]. Chin J Anim Nutr, 2022, 34(4): 2156-2166.
- [20] Newman AC, Maddocks ODK. Serine and functional metabolites in cancer [J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(9): 645-657.
- [21] Sanderson SM, Gao X, Dai Z, et al. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine [J]. Nat Rev Cancer, 2019, 19(11): 625-637.
- [22] Modoux M, Rolhion N, Mani S, et al. Tryptophan metabolism as a pharmacological target [J]. Trends Pharmacol Sci, 2021, 42(1): 60-73.
- [23] Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin [J]. Annu Rev Med, 2009, 60: 355-366.
- [24] 新峰妮. 谷氨酰胺在慢性阻塞性肺疾病治疗中的应用 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(84): 16630-16632.
- Jin FN. Application of glutamine in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Clin Med Lit, 2017, 4(84): 16630-16632.
- [25] 滑丽美, 邱建宏, 刘晓军, 等. 谷氨酰胺对慢性阻塞性肺疾病患者营养改善及抗氧化作用 [J]. 临床误诊误治, 2013, 26(9): 99-102.
- Hua LM, Qiu JH, Liu XJ, et al. Efficacy of glutamine on nutritional improvement and antioxidation in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Clin Misdiagn Misther, 2013, 26(9): 99-102.
- [26] 郑晓珂. 生物化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2016.
- Zheng XK. Biochemistry [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2016.
- [27] 李良铸, 李明晔. 现代生化药物生产关键技术 [M]. 北京:

化学工业出版社; 2006.

Li LZ, Li MY. Key technology of modern biochemical drug production [M]. Beijing: Chemical Industry Press; 2006.

[28] Hase A, Jung SE, aan het Rot M. Behavioral and cognitive effects of tyrosine intake in healthy human adults [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2015, 133: 1-6.

[29] 王磊. 维生素 E 的功能 [J]. 当代畜禽养殖业, 2021, 6: 28-29.

Wang L. The function of vitamin E [J]. Mod Anim Husb, 2021, 6: 28-29.

[30] 郭彤, 于凤芝, 胡平, 等. 维生素 E 调节抗氧化作用的研究进展 [J]. 山东畜牧兽医, 2021, 42(12): 42-49, 53.

Guo T, Yu FZ, Hu P, et al. Research progress of vitamin E regulating antioxidant effect [J]. Shandong J Anim Sci Vet Med, 2021, 42(12): 42-49, 53.

[31] 次仁旺拉, 琼卓玛, 仓决, 等. 维生素 D 的生理功能研究进展 [J]. 西藏医药, 2016, 37(3): 80-82.

Ci RWL, Qiong ZM, Cang J, et al. Research progress on physiological function of vitamin D [J]. Tibet Med, 2016, 37(3): 80-82.

[32] 杨春华. 维生素 D 简介 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(3): 243-244.

Yang CH. Introduction to vitamin D [J]. Chin Pract Med, 2009, 4(3): 243-244.

[33] 鲁飞翔, 胡南, 周仙杰, 等. 硫胺素与相关疾病的研究进展 [J]. 中华灾害救援医学, 2016, 4(5): 287-290.

Lu FX, Hu N, Zhou XJ, et al. Research progress on thiamine and related diseases [J]. Chin J Disaster Med, 2016, 4(5): 287-290.

[34] 陶迎秋, 梁统, 周克元. 花生四烯酸三条代谢通路在炎症反应中的作用 [J]. 国际免疫学杂志, 2010, 33(4): 303-306, 314.

Tao YQ, Liang T, Zhou KY. Three arachidonic acid metabolic pathways Involved in inflammation [J]. Int J Immunol, 2010, 33(4): 303-306, 314.

[收稿日期] 2022-10-13

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2020 年版(即第 9 版)生物科学类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为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》等数据库收录。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友们的厚爱与信任。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,谨遵办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。

马小娟,马文礼,王丽新. 不同造模周期对羟基脲致肾阳虚动物模型的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 64-74.
Ma XJ, Ma WL, Wang LX. Effect of different modeling periods on hydroxyurea-induced kidney-yang deficiency animal model [J].
Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 64-74.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.008

不同造模周期对羟基脲致肾阳虚动物模型的影响

马小娟^{1,2},马文礼^{1,2},王丽新^{1,2*}

(1. 宁夏医科大学 医学院,银川 750004;2. 宁夏少数民族医药现代化教育部重点实验室,银川 750004)

【摘要】 目的 通过研究不同造模周期对羟基脲致肾阳虚动物模型相关指标的影响,得出最佳造模时长,并对模型稳定性进行评价,为温补肾阳治疗肾阳虚证提供稳定的动物模型。**方法** 用 30 mg/mL 羟基脲混悬液灌胃,300 mg/kg 体重,每日 1 次,在灌胃的第 7、14、21、28 天分别对动物模型一般情况、肾阳虚相关生化指标、脏腑形态学等方面进行研究,得出最佳造模周期。**结果** 羟基脲致肾阳虚大鼠在羟基脲灌胃第 7 天,能量代谢:大鼠体温、肾 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性显著性降低、血清中 cAMP、cAMP/cGMP 比值均呈显著性降低($P < 0.05$),大鼠四肢末端及尾部温度、肾 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶与总 ATP 酶活力、cGMP 均无显著性差异($P > 0.05$);神经内分泌系统、免疫功能、泌尿生殖系统均无显著性差异。在羟基脲灌胃第 14 天,能量代谢:血清中 cGMP 显著性上升($P < 0.05$),总 ATP 酶活力显著性下降($P < 0.05$),大鼠四肢末端及尾部温度变化、肾 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力均无显著性差异($P > 0.05$);神经内分泌系统:血清 T、T4 均显著降低($P < 0.05$),尿 17-OH-CS、血清 T3 均无显著性差异($P > 0.05$);泌尿生殖系统:肾、睾丸均出现结构性病理变化,肾指数显著性下降($P < 0.05$);免疫功能:胸腺出现结构性病理变化,脾指数尚未出现显著降低($P > 0.05$)。在羟基脲灌胃第 21 天,能量代谢:大鼠四肢末端及尾部温度、肾 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力均显著降低($P < 0.05$);神经内分泌系统:尿 17-OH-CS、血清 T3 含量均呈显著降低($P < 0.05$);在羟基脲灌胃第 28 天,免疫功能:脾指数显著降低($P < 0.05$),胸腺病理变化显著且不可逆,泌尿生殖系统:肾、睾丸的病理变化显著且不可逆。能量代谢、神经内分泌系统、免疫功能、泌尿生殖系统各指标在第 28 天仍呈现下降趋势,与 21 d 相比,能量代谢、神经内分泌系统、泌尿生殖系统各指标均无显著性差异($P > 0.05$)。**结论** 羟基脲致肾阳虚大鼠模型各个检测指标出现显著性差异的时间段不尽相同,能量代谢、神经内分泌系统、免疫功能、泌尿生殖系统等多方面表现出显著性差异,最佳成模时间为 28 d。

【关键词】 羟基脲;肾阳虚;动物模型;造模周期

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0064-11

Effect of different modeling periods on hydroxyurea-induced kidney-yang deficiency animal model

MA Xiaojuan^{1,2}, MA Wenli^{1,2}, WANG Lixin^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China. 2. Ningxia Minority Medicine Modernization Ministry of Education Key Laboratory, Yinchuan 750004)
Corresponding author: WANG Lixin. E-mail: wxy2008.oye@163.com

【Abstract】 Objective By studying the effects of different modeling cycles on related indicators in a hydroxyurea-induced kidney-yang deficiency animal model, the optimal modeling time was obtained. The stability of the model was evaluated. We provide method for creating a stable animal model of warming and tonifying kidney-yang to treat yang-deficiency syndrome. **Methods** Rats were gavaged with 30 mg/mL hydroxyurea suspension (300 mg/kg body weight)

[基金项目] 宁夏教育厅宁夏医科大学中医学一流学科项目(NXYLXK2017A06),宁夏自然科学基金资助项目(2018AAC03082)。
Funded by Ningxia Education Department Ningxia Medical University First-Class Discipline Project of Traditional Chinese Medicine (NXYLXK2017A06), Ningxia Natural Science Fund Project (2018AAC03082)。
[作者简介] 马小娟(1994—),女,在读研究生,研究方向:中医药治疗皮肤病。Email: mxj18795182325@163.com
[通信作者] 王丽新(1981—),女,博士,副教授,研究方向:中医外科学。Email: wxy2008.oye@163.com

once daily for 28 days. On the 7th, 14th, 21st, and 28th days of gavage, the general condition, biochemical indexes related to kidney-yang deficiency, and the morphology of the internal organs were examined to determine the optimal modeling cycle. **Results** On the 7th day of hydroxyurea gavage, the energy metabolism of rats with kidney-yang deficiency induced by hydroxyurea was assessed, and their body temperature, activity of kidney $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, serum content of cAMP, and cAMP/cGMP ratio were significantly decreased ($P < 0.05$). There were no significant changes in the rats' neuroendocrine systems, immune functions, or urogenital systems. On the 14th day of hydroxyurea administration, serum cGMP increased significantly ($P < 0.05$) and total ATPase activity decreased significantly ($P < 0.05$). There were no significant changes in the temperature of the extremities or tails of the rats or kidney $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ activity ($P > 0.05$). Levels of the neuroendocrine system indicators serum T and T4 were significantly decreased ($P < 0.05$). In the urogenital system, there were structural pathological changes to the kidney and testis, and the kidney index decreased significantly ($P > 0.05$). On the 21st day of hydroxyurea gavage, the temperature of the extremities and tails of rats and the kidney activity of $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ were significantly decreased ($P < 0.05$). The neuroendocrine system indicators urine 17-OH-CS and serum T3 levels were significantly decreased ($P < 0.05$). On the 28th day of hydroxyurea gavage, the immune function indicator, the spleen index, decreased significantly ($P < 0.05$), and thymus pathological changes were significant and irreversible. In the urogenital system, pathological changes to the kidney and testis were significant and irreversible. Energy metabolism, neuroendocrine system, immune function, and urogenital system indexes still showed decreasing trends on day 28, but there were no significant differences in energy metabolism, neuroendocrine system, or urogenital system indicators compared with on day 21 ($P > 0.05$). **Conclusions** We found significant differences among the modeling time periods for each energy metabolism, neuroendocrine, immune, and urogenital function index, and other aspects, of a hydroxyurea-induced rat model of kidney-yang deficiency. The best modeling time was 28 days.

[Keywords] hydroxyurea; kidney-yang deficiency; animal model; modeling cycle

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

肾阳虚证是中医多种疾病的常见证型之一,而阳虚证动物模型是中医证型研究的必需条件,既往对肾阳虚动物模型的研究较为充分,但是羟基脲灌胃造模提及的较少。羟基脲为抗肿瘤药,但可造成一定的肾损伤和睾丸萎缩,使患者的免疫机能受到抑制,从而出现一系列的虚损症状,是通过对核苷酸代谢的抑制、DNA 合成的抑制,使蛋白质代谢发生相应的改变。关于羟基脲造模使用的灌胃剂量、造模时间各文献有所不同,同时对模型的客观评价标准、模型稳定性的论述较少,缺乏统一的量化标准,为进一步的研究带来了不确定性和一定程度的困惑。为了解决这一问题,建立更加稳定的肾阳虚动物模型,本研究旨在对不同造模周期羟基脲所致肾阳虚动物模型的一般情况、相关生化、脏腑形态学等方面的变化,来确定最佳的造模周期;通过观察模型成功后自然恢复期以上指标的变化,来判断模型的稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康的雄性 SD 大鼠 64 只,8 周龄,SPF 级动物,因本实验对所选用动物体重需进行严格把控,

故参考文献^[1-9],本实验所确定的实验动物体重范围为体重 180 ~ 220 g,购买于宁夏医科大学实验动物中心【SCXK(宁)2020-0001】实验条件:温度(22 ~ 24℃)、湿度(45% ~ 50%),昼夜各半更替照明,大鼠饮水及摄食自由,饲养于宁夏医科大学动物实验室【SYXK(宁)2020-0001】。实验研究相关的内容与实验动物均已通过宁夏医科大学动物伦理委员会审查(IACUC-NYLAC-2021-187)。

1.1.2 主要试剂与仪器

羟基脲(批号:H37021289),购自山东齐鲁光华制药厂;ATP 含量试剂盒(酶法)(JL-T0633)、 $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶试剂盒货号(JL-T0659)、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶试剂盒货号(JL-T0639)、17-OH-CS(JL11045)、大鼠三碘甲状腺原氨酸、大鼠甲状腺素、大鼠环磷酸腺苷、大鼠睾酮、大鼠环磷酸鸟苷(上海江莱生物科技有限公司)(批号分别为:20220703、20220704、20220711、20220743、2022070319)。

XB220A 电子分析天平(瑞士,Precisa 公司),BP310P 型称量天平(德国,Sartorius 公司) Synergy H1 酶标仪(美国,BioTek 公司),JY98-IIIN 细胞破碎仪(中国,SCIENTZ 公司),Eclipse Ci-L 电子显微镜(日本,Nikon 公司),Centrifuge5417R 型低温高速离心机(德国,Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

选用 SPF 级 8 周龄的雄性 SD 大鼠 64 只, 体重 180 ~ 220 g, 适应性饲养 4 d 后^[10], 无不良反应后即进入实验。随机分两组: 空白对照组 (简称空白组) 32 只, 肾阳虚组 32 只 (简称模型组), 两组各分四个亚组, 分别为第 7、14、21、28 天, 每组各 8 只。

1.2.2 建立肾阳虚模型

参考文献^[11]用 30 mg/mL 羟基脲混悬液灌胃, 300 mg/kg 体重, 每日 1 次, 建立肾阳虚动物模型, 空白组予以同等剂量生理盐水灌胃。

1.2.3 样本的制备

(1) 血清样本: 在第 7、14、21、28 天分别从空白组与肾阳虚组各随机抽取 8 只大鼠, 以 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后, 心尖取血, 血液 3000 r/min 离心 15 min, 分离血清。

(2) 尿液样本: 从空白组与肾阳虚组各随机抽取 8 只大鼠并标记, 在第 7、14、21、28 天于代谢笼中禁食不禁水, 收集并记录 24 h 尿量, 各取 1 mL 于无菌管内置于 -80℃ 冰箱冻存。

(3) 组织样本: 大鼠取血后置于冰面, 取胸腺、脾、及右侧肾、睾丸及背部脱毛区域无蓝斑皮肤用生理盐水冲洗, 脾、肾在吸水纸处理后经电子天平精密称定、记录, 分别置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 将睾丸置于睾丸专用固定液固定。将左侧肾、睾丸分装入冻存管, 保存于液氮中, -80℃ 冰箱贮存待检。

1.2.4 观察指标及测定方法

(1) 行为指标: 肾阳虚模型一般情况: 每天观察大鼠体重、四肢温度、毛发色泽、精神、尿量、活动状况分阶段对比, 根据肾阳虚模型的行为指标, 判断造模成功的最佳阶段。

(2) 体温变化: 每 7 d 用红外成像测温仪监测大鼠体温变化并记录。

(3) 血清检测: 血清 cAMP、cGMP、cAMP/cGMP; T₃、T₄、T 的表达。按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 用多功能酶标仪检测血清中以上指标的吸光度, 根据标准曲线方程计算血清中各指标的浓度。

(4) 尿 17-OHCS 同 1.2.4 中血清检测方法。

(5) 肾中 ATP 酶含量及活性检测: 称取约 0.1 g 肾组织加入研钵中, 加入 1 mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 12 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 取上清液。严格按照生化试剂盒说明书用酶标仪分别测定大鼠肾中 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶和总 ATP 酶活

性, 用微板法测定。

(6) 睾丸、胸腺、肾病理形态学观察: 将固定的组织脱水、包埋、切片 (厚度为 5 μm)、HE 染色后封片, 置于光学显微镜下观察。

(7) 脾指数与肾指数的测定: 按照公式^[12]计算各组大鼠脾与肾指数。脾指数 = 脾重量 (mg)/大鼠体重 (g); 肾指数 = 肾重量 (mg)/大鼠体重 (g)。

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 25.0 软件, 计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较若方差齐性选择 LSD, 方差不齐则使用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 组间比较进行均数 t 检验; 对于偏态分布者采用中位数 (25%, 75%) 表示采用。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

与空白组相比, 模型组大鼠第 7 天爪温略有降低, 未见其他明显异常表现; 造模第 14 天大鼠毛色光泽欠佳, 出现竖毛, 畏寒喜暖, 四肢温低, 活动减弱, 精神萎靡, 毛色无光泽; 造模第 21 天大鼠出现怕冷、弓背蜷缩喜扎堆, 活动减弱, 精神萎靡, 耳朵颜色变淡; 造模第 28 天大鼠毛发枯槁现象严重, 出现掉毛, 活动迟缓, 四肢、尾巴及耳朵颜色变白, 舌淡胖, 大便稀等症状, 符合肾阳虚模型的表现^[13]。空白组未出现上述表现 (图 1)。

2.2 大鼠红外成像测温, 体温与肢体末端温度比较

2.2.1 体温变化比较

与空白组相比, 模型各组大鼠体温显著下降 ($P < 0.01$) (表 1)。

模型组各亚组组内比较, 除第 7 天与第 14 天、第 21 天与第 28 天相比体温变化无显著性差异 ($P > 0.05$) 外, 其他两两相比较均有显著性差异 ($P < 0.01$), 但整体体温呈下降趋势 (图 2)。

2.2.2 四肢与尾巴温度比较

与空白组相比, 模型组大鼠在第 7 天时只有右上肢和尾巴的体温差异有显著性 ($P < 0.05$), 第 14 天时右上肢温度与空白组相比显著降低 ($P < 0.05$)。随造模时间的延长, 大鼠四肢末端温度呈显著性下降趋势, 在第 21、28 天时, 模型组大鼠四肢及尾巴温度显著下降, 与空白组相比, 差异具有显著性意义 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.3 各组大鼠肾中 ATP 酶活力比较

与同阶段的空白组相比, 模型组大鼠肾总 ATP

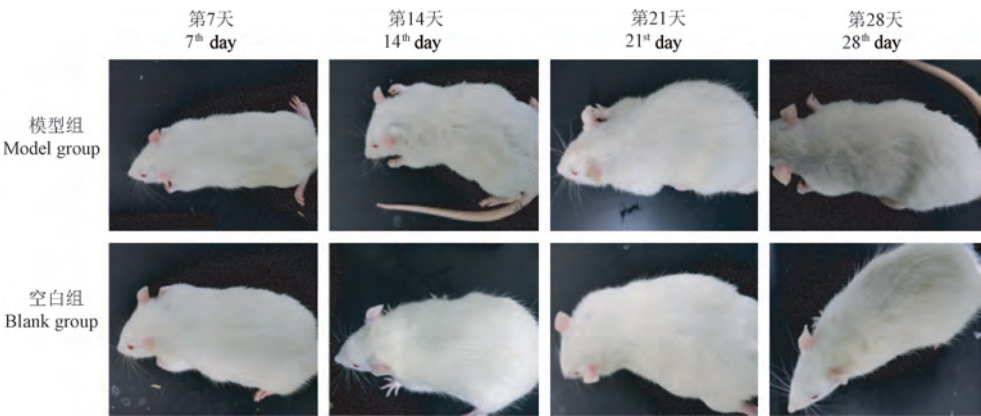


图 1 各组大鼠皮毛的变化

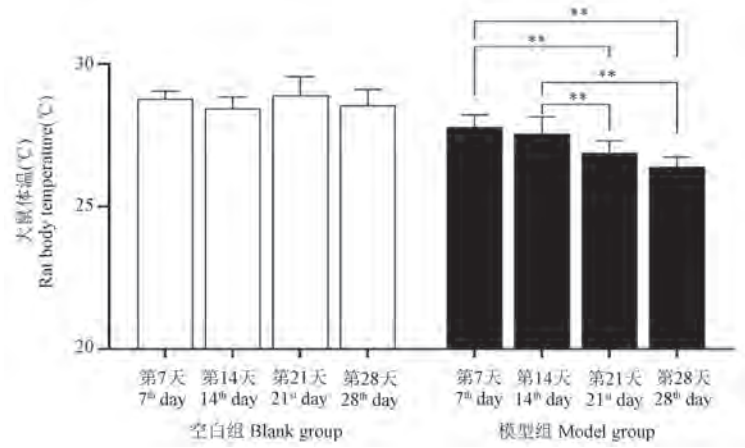
Figure 1 Changes in fur of rats in each group

表 1 各组大鼠体温变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Temperature changes of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	第 7 天(℃) 7 th day(℃)	第 14 天(℃) 14 th day(℃)	第 21 天(℃) 21 st day(℃)	第 28 天(℃) 28 th day(℃)	<i>F</i>	<i>P</i>
空白组 Blank group	28.78 ± 0.27	28.38 ± 0.51	29.10 ± 0.80	28.55 ± 0.56	1.526	0.246
模型组 Model group	27.79 ± 0.43 **	27.55 ± 0.60 **	26.88 ± 0.43 **	26.40 ± 0.34 **	9.525	0.001
<i>t</i>	4.334	2.344	5.515	7.352	—	—

注:与空白组的各亚组大鼠比较, ***P* < 0.01。(下图/表同)
Note. Compared with subgroup rats of blank group, ***P* < 0.01. (The same in the following figures and tables)



注:各亚组大鼠组内相互比较, ***P* < 0.01。

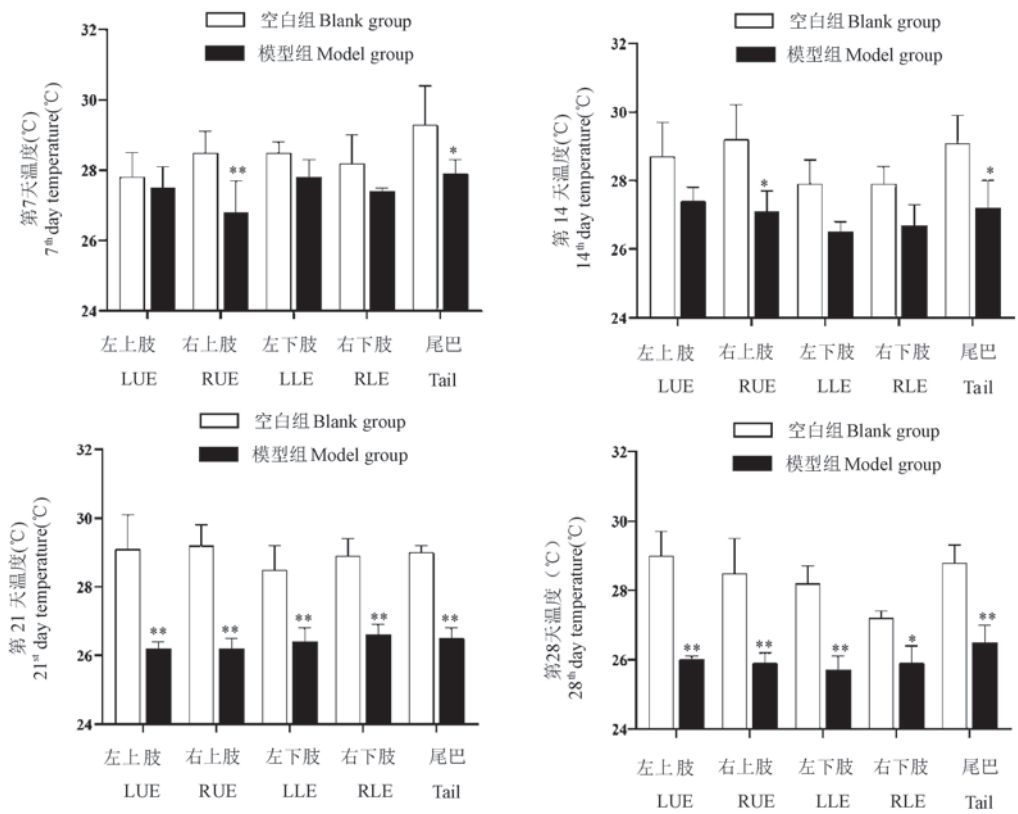
图 2 各组大鼠体温变化

Note. Compared within each subgroup of rats, ***P* < 0.01.

Figure 2 Temperature changes of rats in each group

酶活力呈稳步下降趋势,在第 14 天开始具有显著性差异(*P* < 0.05);Na⁺-K⁺-ATP 酶活力呈稳步下降趋势,在第 7 天开始具有显著性差异(*P* < 0.05);Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力呈稳步下降趋势,在第 21 天开始有显著性差异(*P* < 0.01)。以上结果提示,影响肾能量代谢的 3 种主要酶活力在肾阳虚模型中均显著性下降,但出现的时间并不完全相同:Na⁺-K⁺-

ATP 酶出现显著下降的时间最早(7 d),其次为 ATP 酶(14 d),再次为 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶(21 d),提示肾阳虚动物模型各类 ATP 酶的敏感性不同。
模型组各亚组组间比较,发现除第 7 天与第 14 天、第 21 天与第 28 天总 ATP 酶下降量无显著性差异(*P* > 0.05)外,第 7 天与第 21、28 天、第 14 天与第 21、28 天总 ATP 酶均有显著性差异(*P* < 0.05),



注:与空白组的各亚组大鼠比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图3 各组大鼠四肢及尾巴温度变化

Note. Compared with subgroup rats of blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 3 Temperature changes of limbs and tail of rats in each group

提示总 ATP 酶活力在肾阳虚造模第 14 ~ 21 天下降最快($P < 0.05$)。Na⁺-K⁺-ATP 酶在造模的各个周期均呈显著性下降($P < 0.05$),提示该酶敏感性最强。第 7 天与第 21、28 天,第 14 天与第 21、28 天 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力下降均有显著性差异($P < 0.05$),提示 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力在肾阳虚造模第 14 ~ 21 天下降最快($P < 0.05$)(表 2)。

2.4 各组大鼠血清中 T、T₃ 和 T₄ 含量比较

普遍认为,肾阳虚雄性动物中睾酮(T)含量降低,三碘甲状腺原氨酸(T₃)、四碘甲状腺原氨酸(T₄)含量的降低可作为肾阳虚的客观指标,用来检测肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-靶腺轴的功能^[14]。与空白组相比,模型各组大鼠血清中 T、T₄ 从第 14 天开始显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),T₃ 从第 21 天开始显著下降($P < 0.01$),提示 T、T₄ 较 T₃ 更早出现下降趋势;但在模型第 7 天开始,以上指标含量已出现稳步下降趋势。

模型组各组组间两两比较,发现大鼠血清 T、T₃ 除在第 21 天与第 28 天相比无显著性差异外($P >$

0.05),在第 7、14、21、28 天的 4 个不同时间段都呈显著下降趋势($P < 0.05$),结合模型组在第 7 天时 T、T₃ 含量与空白组相比无显著性差异的情况,提示 T、T₃ 在第 14、21 天这 2 个时间段内显著下降,第 28 天仍在稳步下降,但下降趋势减缓。T₄ 除第 14 天与第 21 天之间下降无显著性差异外,其余时间段呈显著下降趋势($P < 0.05$),提示 T₄ 在不同时间段内下降程度不完全一致(表 3)。

2.5 各组大鼠血清中 cAMP, cGMP and cAMP/cGMP 含量比较

作为评价肾阳虚模型的特异性标准^[15-16] 环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)参与机体的能量代谢。

与空白组相比,模型各组大鼠血清中 cAMP 第 7 天开始呈显著降低($P < 0.01$),随时间呈稳步下降趋势;cGMP 从第 21 天开始呈显著升高($P < 0.05$),cAMP/cGMP 比值从第 7 天开始呈显著下降($P < 0.05$),提示 cAMP 最早出现下降,敏感性较强。

表 2 各组大鼠肾中 ATP 酶活性的比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/g}, n=8$)

Table 2 Comparison of ATPase activity in kidney of rats in each group($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/g}, n=8$)

分组 Groups	亚组 Name of the subgroups	ATP	Na ⁺ -K ⁺ -ATP	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP
空白组 Blank group	7 th day	15.22 ± 2.95	36.90 ± 2.08	34.70 ± 1.76
	14 th day	15.49 ± 1.36	37.82 ± 1.01	34.97 ± 2.42
	21 st day	15.13 ± 2.89	36.77 ± 4.00	34.70 ± 3.88
	28 th day	16.02 ± 0.81	36.16 ± 3.07	34.15 ± 2.27
模型组 Model group	7 th day	12.90 ± 1.04	32.83 ± 0.37 *	33.23 ± 3.55
	14 th day	11.81 ± 0.39 *	27.96 ± 1.94 **	27.48 ± 4.94
	21 st day	9.21 ± 1.36 *	23.48 ± 1.94 **	21.29 ± 1.53 **
	28 th day	7.33 ± 1.86 **	18.74 ± 2.92 **	19.80 ± 2.55 **
F, P 值 F, P value	—	11.568, 0.003	26.949, 0.000	15.123, 0.001
P ₇₋₁₄ 值 P ₇₋₁₄ value	—	0.328	0.018	0.066
P ₇₋₂₁ 值 P ₇₋₂₁ value	—	0.008	0.000	0.001
P ₇₋₂₈ 值 P ₇₋₂₈ value	—	0.001	0.000	0.000
P ₁₄₋₂₁ 值 P ₁₄₋₂₁ value	—	0.038	0.026	0.021
P ₁₄₋₂₈ 值 P ₁₄₋₂₈ value	—	0.003	0.001	0.004
P ₂₁₋₂₈ 值 P ₂₁₋₂₈ value	—	0.111	0.020	0.329

表 3 各组大鼠在不同阶段血清 T、T₃ 和 T₄ 含量比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Comparison of serum testosterone T, T₃ and T₄ levels in rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组 Groups	亚组 Name of the subgroups	T (pg/mL)	T ₃ (ng/mL)	T ₄ (ng/mL)
空白组 Blank group	7 th day	1435.82 ± 102.83	2.23 ± 0.29	78.95 ± 3.82
	14 th day	1426.68 ± 150.90	2.12 ± 0.46	77.74 ± 5.77
	21 st day	1447.00 ± 44.69	2.14 ± 0.28	78.51 ± 4.14
	28 th day	1452.79 ± 176.97	2.18 ± 0.27	77.72 ± 3.36
模型组 Model group	7 th day	1342.60 ± 64.33	2.32 ± 0.25	75.43 ± 5.29
	14 th day	1219.50 ± 18.88 **	1.91 ± 0.17	63.32 ± 4.13 *
	21 st day	1118.40 ± 40.20 **	1.55 ± 0.21 **	65.43 ± 5.19 **
	28 th day	1070.61 ± 59.27 **	1.45 ± 0.07 *	56.99 ± 2.22 **
F, P 值 F, P value	—	18.089, 0.001	13.385, 0.002	22.811, 0.000
P ₇₋₁₄ 值 P ₇₋₁₄ value	—	0.015	0.029	0.010
P ₇₋₂₁ 值 P ₇₋₂₁ value	—	0.001	0.001	0.001
P ₇₋₂₈ 值 P ₇₋₂₈ value	—	0.000	0.000	0.000
P ₁₄₋₂₁ 值 P ₁₄₋₂₁ value	—	0.036	0.043	0.059
P ₁₄₋₂₈ 值 P ₁₄₋₂₈ value	—	0.006	0.016	0.002
P ₂₁₋₂₈ 值 P ₂₁₋₂₈ value	—	0.267	0.538	0.046

模型各亚组组间两两比较,发现 cAMP 除第 7 天与第 14 天、第 21 天与第 28 天外,其余时间段之间均存在显著差异($P < 0.05$),结合 cAMP 在第 7 天即与空白组有显著差异,提示 cAMP 从造模第 7 天开始呈稳步下降趋势,差异具有显著性($P < 0.05$)。cGMP 在第 14、21、28 天各个时间段均呈显著上升趋势($P < 0.05$),并随着造模时间延长稳步上升。cAMP/cGMP 比值在各个时间段稳步下降,除第 21 天与第 28 天差异无显著性外($P > 0.05$),其余不同时间段间均具有显著性差异($P < 0.05$),提示 cAMP/cGMP 比值在第 21 ~ 28 天期间下降幅度变小,这种情况是否会延续一段时间直至出现病

理性平稳状态尚需进一步研究(表 4)。

2.6 脾与肾指数

作为重要的外周免疫器官,脾在调节机体免疫功能中起着重要作用。已有文献报道肾虚动物可发生脾的萎缩,影响动物免疫功能^[17]。肾作为肾虚证主要的靶器官,其重量及脏器指数能客观反映模型的成模情况。与空白组相比,模型组肾指数在不同时间段呈稳定下降趋势,第 14、21、28 天指数显著下降($P < 0.05$)。

与空白组相比,模型组脾指数在第 7 天、第 14 天呈稳步下降,在第 28 天脾指数显著降低($P < 0.01$)(表 5),提示脾损伤出现的时间较晚,肾虚

表 4 各组大鼠血清 cAMP, cGMP and cAMP/cGMP 含量比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Comparison of serum cAMP, cGMP and cAMP/cGMP in each group of rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组 Groups	亚组 Name of the subgroups	cAMP(nmol/L)	cGMP(nmol/L)	cAMP/cGMP(nmol/L)
空白组 Blank group	7 th day	2. 23 ± 0. 18	0. 11 ± 0. 04	21. 17 ± 6. 39
	14 th day	2. 07 ± 0. 56	0. 16 ± 0. 07	13. 46 ± 4. 22
	21 st day	1. 99 ± 0. 29	0. 13 ± 0. 03	15. 47 ± 6. 39
	28 th day	1. 99 ± 0. 12	0. 16 ± 0. 01	12. 98 ± 2. 33
模型组 Model group	7 th day	1. 44 ± 0. 12 ^{**}	0. 11 ± 0. 01	13. 04 ± 2. 23 ^{**}
	14 th day	1. 15 ± 0. 05 ^{**}	0. 15 ± 0. 005	7. 80 ± 0. 56 ^{**}
	21 st day	0. 96 ± 0. 05 ^{**}	0. 18 ± 0. 003 [*]	5. 30 ± 0. 06 ^{**}
	28 th day	0. 82 ± 0. 08 ^{**}	0. 20 ± 0. 02 [*]	4. 15 ± 0. 99 ^{**}
<i>F, P</i> 值 <i>F, P</i> value	—	33. 725951, 0. 000	31. 507, 0. 000	29. 894, 0. 000
<i>P</i> ₇₋₁₄ 值 <i>P</i> ₇₋₁₄ value	—	0. 124	0. 008	0. 001
<i>P</i> ₇₋₂₁ 值 <i>P</i> ₇₋₂₁ value	—	0. 040	0. 001	0. 000
<i>P</i> ₇₋₂₈ 值 <i>P</i> ₇₋₂₈ value	—	0. 012	0. 000	0. 000
<i>P</i> ₁₄₋₂₁ 值 <i>P</i> ₁₄₋₂₁ value	—	0. 041	0. 014	0. 040
<i>P</i> ₁₄₋₂₈ 值 <i>P</i> ₁₄₋₂₈ value	—	0. 024	0. 000	0. 007
<i>P</i> ₂₁₋₂₈ 值 <i>P</i> ₂₁₋₂₈ value	—	0. 232	0. 036	0. 293

动物模型可影响脾的形态、功能和机体的免疫功能。

2.7 各组大鼠 24 h 尿量与 17-OH-CS 含量

17-OH-CS 反映下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能。与空白组相比,模型组尿量与 17-OH-CS 含量呈下降趋势,在第 7、14 天无显著性差异($P > 0. 05$),第 21、28 天尿量与 17-OH-CS 含量显著降低($P < 0. 05$),提示模型大鼠存在下丘脑-垂体-肾上腺轴功

能低下(见表 6)。

2.8 各组大鼠肾、睾丸、胸腺的病理结构观察

2.8.1 各组大鼠睾丸组织 HE 染色后病理变化

空白组睾丸组织中生精小管数量丰富、分布均匀,管壁上皮可见数量丰富的生精细胞、支持细胞,细胞形态正常,管腔内可见精子,上皮外均匀、界膜完整,管腔饱满;均匀排列的间质细胞,未见异常改变。

表 5 各组大鼠脾与肾指数($\bar{x} \pm s, n=32$)

Table 5 Comparison of spleen and kidney index in rats of group($\bar{x} \pm s, n=32$)

分组 Groups	第 7 天 7 th day		第 14 天 14 th day		第 21 天 21 st day		第 28 天 28 th day	
	肾指数(%) Kidney index (%)	脾指数(%) Spleen index (%)	肾指数(%) Kidney index (%)	脾指数(%) Spleen index (%)	肾指数(%) Kidney index (%)	脾指数(%) Spleen index (%)	肾指数(%) Kidney index (%)	脾指数(%) Spleen index (%)
空白组 Blank group	4. 86 ± 0. 49	2. 7 ± 0. 04	4. 72 ± 0. 13	2. 3 ± 0. 00	4. 61 ± 0. 16	2. 60 ± 0. 04	4. 75 ± 0. 07	2. 70 ± 0. 01
模型组 Model group	4. 46 ± 0. 20	2. 5 ± 0. 06	4. 27 ± 0. 22 [*]	1. 8 ± 0. 04	3. 98 ± 0. 05 ^{**}	2. 20 ± 0. 03	3. 91 ± 0. 05 ^{**}	1. 80 ± 0. 00 ^{**}

表 6 各组大鼠 24 h 尿量及 17-OH-CS 含量比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 6 Comparison of 24 h urine volume and 17-OH-CS content in urine in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组 Groups	第 7 天 7 th day		第 14 天 14 th day		第 21 天 21 st day		第 28 天 28 th day	
	24h 尿量 (mL)	尿 17-羟皮 质类固醇 (ng/mL)	24 h 尿量 (mL)	尿 17-羟皮 质类固醇 (ng/mL)	24 h 尿量 (mL)	尿 17-羟皮 质类固醇 (ng/mL)	24 h 尿量 (mL)	尿 17-羟皮 质类固醇 (ng/mL)
	24h urinary volume (mL)	17-OH-CS (ng/mL)	24 h urinary volume (mL)	17-OH-CS (ng/mL)	24 h urinary volume (mL)	17-OH-CS (ng/mL)	24 h urinary volume (mL)	17-OH-CS (ng/mL)
空白组 Blank group	33. 4 ± 6. 30	18. 64 ± 2. 84	38. 61 ± 2. 60	18. 63 ± 1. 36	36. 0 ± 10. 6	18. 07 ± 4. 27	40. 0 ± 8. 87	18. 47 ± 3. 37
模型组 Model group	30. 6 ± 15. 61	16. 99 ± 3. 26	28. 6 ± 13. 83	16. 18 ± 7. 34	21. 4 ± 9. 07 [*]	12. 44 ± 1. 80 [*]	21. 2 ± 4. 55 [*]	9. 41 ± 1. 60 ^{**}

与空白组相比较,模型第 7 天组大鼠睾丸组织被膜结构完整,可见生精小管,分界清晰,形状规则;未见明显异常;模型第 14 天组大鼠生精小管上皮细胞数量轻微减少,生精细胞坏死、脱落,胞核固缩深染,管腔内可见坏死的细胞碎片(红色箭头);其他未见明显差异;模型第 21 天组大鼠见少量生精上皮萎缩、生精细胞坏死脱落,各级生精细胞、支持细胞数量轻度减少,胞核固缩深染,管腔内可见坏死的细胞碎片(红色箭头),细胞排列紊乱(黑色箭头),偶见大小不等的空泡(黄色箭头)。在第 28 天,模型组大鼠睾丸内大量生精上皮萎缩,较多生精细胞坏死脱落;生精细胞、支持细胞数量重度减少,细胞排列紊乱(黑色箭头),胞核固缩深染,管腔内可见坏死的细胞碎片(红色箭头)及大小不等的空泡(黄色箭头)(图 4)。

2.8.2 各组大鼠肾 HE 染色后观察病理变化

空白组肾组织结构形态正常,皮髓质分界清晰;皮质中肾小球均匀分布,肾小球中细胞数量及

基质均匀,肾小管上皮细胞圆润、饱满,以及整齐排列的刷状缘,髓质未见明显异常。

与空白组相比,模型第 7 天组大鼠肾组织未见异常;肾小管、集合管轻度扩张见于第 14 天组大鼠,伴体积增生,形状不规则;局部肾小管排列不规则、上皮细胞坏死,胞核固缩深染、溶解消失(红色箭头),未见其他明显差异。第 21 天组大鼠肾小管上皮细胞坏死增多,溶解消失明显,血管周围少量淋巴细胞浸润(红色箭头)。第 28 天组大鼠见肾小管囊状扩张;腔内可见嗜酸性絮状物(黄色箭头),血管周围可见大量淋巴细胞浸润(红色箭头)(图 4)。

2.8.3 各组大鼠胸腺组织 HE 染色后观察病理变化

空白组胸腺组织皮髓质分界明显,皮质着色较深,含有数量丰富的小淋巴细胞,排列紧密,形态正常,髓质淋巴细胞大,排列相对疏松,故髓质着色较浅,组织未见明显异常。

与空白组相比较,模型第 7 天组大鼠胸腺组织

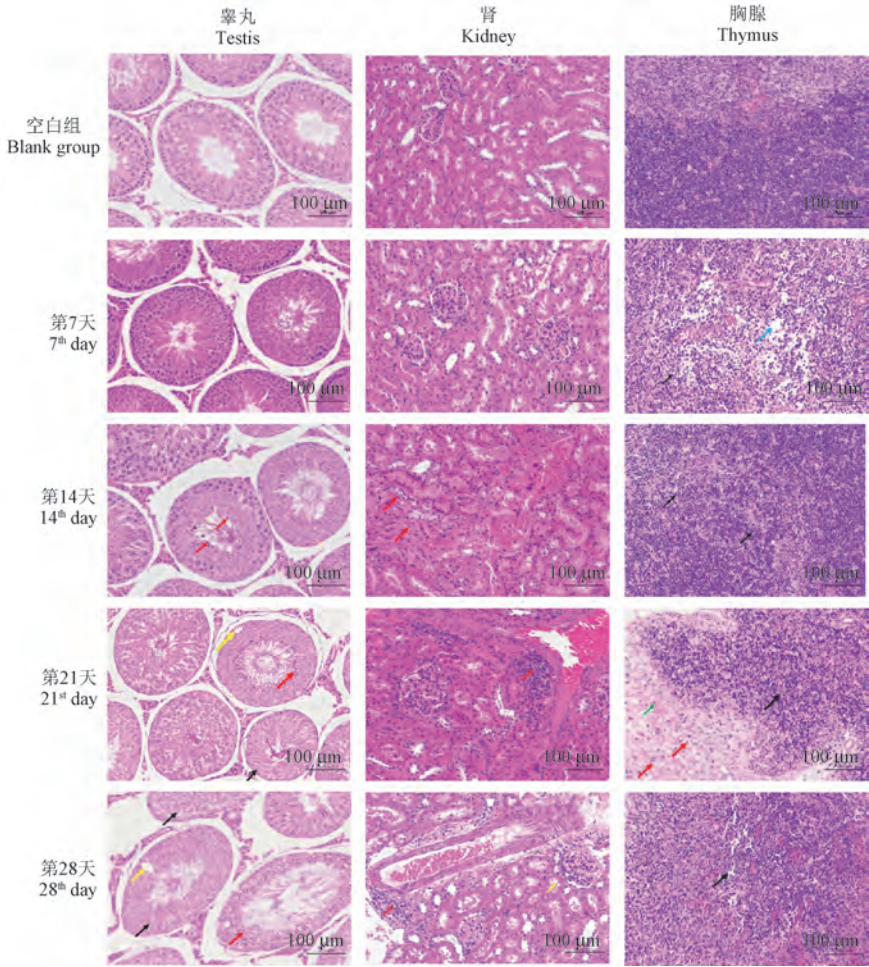


图 4 各组大鼠睾丸、肾、胸腺的组织 HE 染色(×100)

Figure 4 Pathological structure of testis kidney and thymus in rats of each group(×100)

皮、髓质分界不清晰,淋巴细胞数量轻度减少(黑色箭头),髓质局部细胞排列疏松(蓝色箭头);模型第 14 天组大鼠髓质内小淋巴细胞数量重度增多,分布不均匀(黑色箭头),髓质着色加深;未见其他明显差异。模型第 21 天组大鼠胸腺被膜可见结缔组织轻度增生(绿色箭头),伴有中性粒细胞、巨噬细胞点状浸润(红色箭头),皮质轻度变薄,淋巴细胞数量中度减少(黑色箭头);模型第 28 天组大鼠胸腺组织中度萎缩,体积变小;皮质变薄,皮、髓质分界不清,淋巴细胞数量重度减少(黑色箭头)(图 4)。

3 结论

羟基脲致肾阳虚大鼠模型各检测指标出现显著性差异的时间段不尽相同,具体如下:(1)体温出现显著性差异的时间较早(第 7 天),四肢末端温度出现显著性差异时间较晚(第 21 天);(2)肾能量相关酶类中,各类 ATP 酶的敏感性不同,按照时间先后顺序依次出现显著性差异($P < 0.05$)的酶分别是: $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶(第 7 天) $>$ 总 ATP 酶(第 14 天) $>$ $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶(第 21 天);(3)肾阳虚大鼠模型血清 T(第 14 天)、 T_4 (第 14 天)较 T_3 (第 21 天)更早出现显著性下降趋势,血清 T、 T_4 的敏感性强于 T_3 ;反映机体能量代谢的客观指标中,血清中 cAMP(第 7 天)较 cGMP(第 21 天)更早出现显著性差异,cAMP 的敏感性强于 cGMP;(4)肾指数(第 14 天)较脾指数(第 28 天)更早出现显著性差异,为中医肾与脾的先、后天关系提供了一定的理论依据;(5)睾丸、肾、胸腺组织在第 14 天开始出现结构性病理变化,第 28 天病理变化显著且不可逆,提示第 28 天模型成熟且稳定。

羟基脲致肾阳虚大鼠模型在多方面表现出显著性差异:(1)能量代谢方面:肾相关 ATP 酶活性显著性下降,同时反映全身能量代谢的体温、四肢末端温度,以及客观指标 cAMP 和 cGMP 均呈显著性差异;(2)神经内分泌系统方面:17-OH-CS(反映下丘脑-垂体-肾上腺轴功能)、 T_3 和 T_4 (反映下丘脑-垂体-甲状腺轴功能)、T(反映下丘脑-垂体-性腺轴功能)为代表的神经内分泌系统出现紊乱;(3)免疫功能方面:脾指数显著下降、胸腺病理性结构异常;(4)泌尿生殖系统:肾、睾丸病理性结构异常。

羟基脲致肾阳虚大鼠模型能较全面地反映中医肾阳虚证的临床表现,随着造模时间的延长,相关检测指标呈稳步上升或下降趋势,在 28 d 达到峰

值或趋于平稳,因此认为羟基脲致肾阳虚大鼠最佳成模时间为 28 d。

4 讨论

肾阳虚证是中医临床上重要的证候之一,很多疾病都可出现肾阳虚证,在中医基础研究中建立稳定的、能够全面反映中医肾阳虚证临床特点的动物模型,是十分重要的任务。既往学者对肾阳虚的造模方法进行了多方面的探索,有中医传统病因造模、药物造模、手术造模等。传统病因造模包括恐伤肾造模、房劳造模、年老动物自然造模,药物造模包括肌注糖皮质激素造模(通过抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能)、灌胃腺嘌呤造模(通过抑制下丘脑-垂体-性腺轴的功能)、灌胃抗甲状腺药物造模(通过抑制下丘脑-垂体-甲状腺轴的功能)以及羟基脲、卡那霉素、雷公藤多甙及利血平等的症状性造模;手术造模包括切除卵巢或睾丸的去势造模、甲状腺切除造模、肾上腺切除造模、肾切除加阿霉素造模^[18]。但是传统病因造模周期长,标准无法客观量化,同时涉及动物伦理方面的问题,研究中不易操作;肌注给药、手术方法造模对动物有一定的损害,操作过程中也容易引起动物的意外死亡。因此,在本实验中,最终选择用羟基脲灌胃进行肾阳虚动物造模。

羟基脲是能抑制 DNA 的合成和核酸代谢的核苷酸还原酶抑制剂,使机体能量代谢及脂类合成效率下降,会造成 HPTOA 轴(HPT 轴+HPO 轴+HPA 轴)的功能异常,通过产生细胞毒性作用的自由基,使造模大鼠出现毛发枯槁、消瘦和精神萎靡等状况^[19-20],符合中医肾阳虚模型。既往也有文献用羟基脲灌胃建立肾阳虚动物模型,但用药剂量和建模周期各不一样,另外模型的稳定性、对建模过程中动物的死亡率等问题未见阐释,评价标准不统一,对本研究造成了一定的困扰。为了建立稳定的、能全面反映肾阳虚证的动物模型,本研究拟对羟基脲致肾阳虚动物模型的建模周期进行深入研究。本项目前期预实验结果显示,羟基脲 210 mg/kg 灌胃大鼠造模时间过长,在后期模型动物甚至有自然恢复的迹象,因此本次研究将羟基脲的剂量确定为 300 mg/kg 灌胃。

现代医学研究发现肾阳虚的发生主要与下丘脑-垂体-靶腺轴功能的紊乱有关,主要包括下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)、下丘脑-垂体-性腺轴

(HPG)和下丘脑-垂体-甲状腺轴(HPT)三种^[21],而肾虚动物模型常用的微观指标有:17-OH-CS(反映下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能)、T₃和T₄(反映下丘脑-垂体-甲状腺轴的功能)、T(反映下丘脑-垂体-性腺轴的功能)、cAMP和cGMP(反映能量代谢的功能)等^[22],本研究为了全面反映羟基脲对肾虚大鼠模型的影响,对以上客观指标进行分别进行了检测,本实验结果显示,羟基脲对HPA、HPT、HPG这3条与内分泌系统相关的靶腺轴均有显著的干预作用,提示羟基脲对机体内分泌系统的影响是多方面的。本实验在模型第7、14、21、28天4个不同阶段,观察动物模型各项指标和主要脏器病理变化,发现在不同阶段肾虚相关指标的敏感性不同,同时羟基脲致肾虚模型在免疫系统、神经内分泌系统、泌尿生殖系统等多方面存在显著差异,提示该模型能够比较全面地反映出中医肾虚证的临床特点。当造模周期达到28d时,以上各项指标都出现了显著性差异,且趋于稳定,因此认为28d是羟基脲致肾虚动物最佳成模周期。

参 考 文 献(References)

- [1] 房磊臣,刘婧,韦祎,等.益智提取物对肾虚多尿模型大鼠的补肾缩尿影响[J].中华中医药学刊,2016,34(10):2346-2347.
Fang LC, Liu Q, Wei Y, et al. The effects of *Alpinia oxyphylla* extracts on the reducing urination and nourishing kidney in rats with kidney-Yang deficiency [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2016, 34(10): 2346-2347.
- [2] 朱叶,谢毅强,尹德辉.益智仁-乌药醚提取物对肾虚多尿模型大鼠血环磷酸腺苷和醛固酮水平的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(22):5498-5499.
Zhu Y, Xie YQ, Yin DH. Effect of the ether extract of the Yizhiren-Wuyao on Camp, ALD levels in polyuria model of Yang-deficiency rats [J]. Chin J Gerontol, 2017, 37(22): 5498-5499.
- [3] 陈红淑,杨元宵,戴世杰,等.肾气丸对肾虚证大鼠肾间质纤维化的作用研究[J].中华中医药杂志,2017,32(6):2700-2702.
Chen HS, Yang YX, Dai SJ, et al. Effects of Shenqi Pill on renal interstitial fibrosis in rat model with syndrome of kidney Yang deficiency [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(6): 2700-2702.
- [4] 卢文丽,方肇勤.阳虚证动物模型的造模方法与评析[J].上海中医药大学学报,2004,18(4):44-48.
Lu WL, Fang ZQ. Appraisal of the modeling methods of Yang-deficiency syndrome in animals [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2004, 18(4): 44-48.
- [5] 方萍,苏洁,陈炜,等.无比山药丸对腺嘌呤致肾虚模型大鼠肾脏病变的影响[J].中药药理与临床,2021,37(3):11-16.
Fang P, Su J, Chen W, et al. Effect of wubishanyao pills on renal lesion of shenyangxu model rats induced by adenine [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(3): 11-16.
- [6] 马晓宇,姜梦如,穆祥,等.温肾益精散对肾虚模型大鼠生长性能的影响[J].中国兽医科学,2018,48(9):1187-1195.
Ma XY, Jiang MR, Mu X, et al. Effect of Wenshen Yijing San on growth performance of kidney-Yang deficiency model rats [J]. Chin Vet Sci, 2018, 48(9): 1187-1195.
- [7] 林海雄,王晓彤,江明洁,等.不同构建方法对肾虚大鼠模型的影响[J].辽宁中医杂志,2016,43(4):855-857,898.
Lin HX, Wang XT, Jiang MJ, et al. Effects of different establishing methods of kidney Yang deficiency rats model [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2016, 43(4): 855-857, 898.
- [8] 张巍岚,谭从娥.右归丸对肾虚证大鼠肾脏线粒体功能的影响[J].中国中医药信息杂志,2021,28(8):73-76.
Zhang WL, Tan CE. Effects of Yougui pills on the function of kidney mitochondria in rats with kidney-Yang deficiency syndrome [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2021, 28(8): 73-76.
- [9] 许云姣,吴文笛,蔡悦青,等.基于补土伏火法的四逆汤及其拆方对肾虚证模型大鼠肝脏组织Na⁺-K⁺-ATP酶及Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶表达影响的研究[J].时珍国医国药,2020,31(11):2620-2622.
Xu YJ, Wu WD, Cai YQ, et al. Effects of Sini Decoction and its disassembled recipe based on tonifying soil and suppressing fire on the expression of Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase in liver of kidney-Yang deficiency model rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(11): 2620-2622.
- [10] 郑龙飞,韩玲,郝宇,等.金匱肾气丸加味膏、汤方干预肾虚模型大鼠的药效学对比研究[J].北京中医药大学学报,2018,41(7):567-571.
Zheng LF, Han L, Hao Y, et al. Comparison in pharmacodynamics between modified paste and decoction of Jinhui Shenqi Pill in rat model of kidney Yang deficiency [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2018, 41(7): 567-571.
- [11] 张子怡,陈宝军,张庆,等.肾虚证动物模型的造模方法与评价指标[J].福建中医药,2014,45(2):61-63.
Zhang ZY, Chen BJ, Zhang Q, et al. Modeling method and evaluation index of animal model with kidney-Yang deficiency syndrome [J]. Fujian J Tradit Chin Med, 2014, 45(2): 61-63.
- [12] Jiang J, Xiao S, Yan S, et al. Glycyrrhizae Radix et rhizoma processed by sulfur fumigation damaged the chemical profile accompanied by immunosuppression and liver injury [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 5439853.
- [13] Zeng Y, Li T, Zhang X, et al. Effects of Haima Duobian pill in a rat model of kidney Yang deficiency syndrome [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6696234.
- [14] 闵友江,姚海华,张辉,等.基于正交试验设计研究不同穴

- 位及刺激量对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(4): 236-240.
- Min YJ, Yao HH, Zhang H, et al. Influence of different acupoints and intensity of stimulus on HPT axis in rats with syndrome of kidney-Yang deficiency: a study based on orthogonal experimental design [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2015, 38(4): 236-240.
- [15] 陈津岩, 李志强, 赵慧, 等. 强肌健力饮对肾阳虚证大鼠环核苷酸水平的调节作用 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(11): 1761-1762.
- Chen JY, Li ZQ, Zhao H, et al. Regulation of qiangji Jianli Yin on cyclic nucleotide levels of rats with kidney-Yang deficiency syndrome [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2008, 35(11): 1761-1762.
- [16] Hu H, Chen T, Liu W, et al. Differentiation of Yin, Yang and stasis syndromes in severe aplastic *Anemia* patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and their correlation with iron metabolism, cAMP/cGMP, 17-OH-CS and thyroxine [J]. J Blood Med, 2021, 12: 975-989.
- [17] 徐何方, 杨颂, 李莎莎, 等. 菟丝子醇提取物对肾阳虚证模型大鼠免疫功能的影响 [J]. 中药材, 2015, 38(10): 2163-2165.
- Xu HF, Yang S, Li SS, et al. Effect of alcohol extract of *Cuscuta chinensis* on immune function of kidney-Yang deficiency model rats [J]. J Chin Med Mater, 2015, 38(10): 2163-2165.
- [18] 李威, 王顺谱, 杨风云. 肾阳虚证动物模型建立方法及评定标准研究进展 [J]. 江西中医药, 2021, 52(8): 74-76.
- Li W, Wang SP, Yang FY. Research progress on establishment method and evaluation standard of animal model of kidney Yang deficiency syndrome [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2021, 52(8): 74-76.
- [19] Saban N, Bujak M. Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64(2): 213-221.
- [20] Przybyszewski WM, Kasperczyk J. Radical mechanism of hydroxyurea side toxicity [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2006, 60: 516-526.
- [21] 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.
- Tang WW, Zhang HY, Li Q, et al. Modeling methods and model evaluation of animal models for kidney Yang deficiency syndrome [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2021, 23(4): 1317-1324.
- [22] Zhao L, Zhao A, Chen T, et al. Global and targeted metabolomics evidence of the protective effect of Chinese patent medicine Jinkui Shenqi pill on adrenal insufficiency after acute glucocorticoid withdrawal in rats [J]. J Proteome Res, 2016, 15(7): 2327-2336.

[收稿日期] 2022-10-24

赵子璇,南苗苗,贺喜白乙,等. MEC-1 移植法构建慢性淋巴细胞白血病小鼠模型 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 75-81.

Zhao ZX, Nan MM, Hexig BY, et al. Preparation of mouse models of chronic lymphocytic leukemia by MEC-1 cells transplantation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 75-81.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.009

MEC-1 移植法构建慢性淋巴细胞白血病小鼠模型

赵子璇[#], 南苗苗[#], 贺喜白乙^{*}, 梁浩^{*}, 郭旭东^{*}, 刘东军

(内蒙古大学省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室, 呼和浩特 010020)

【摘要】 目的 制备并评估慢性淋巴细胞白血病小鼠模型, 以期为慢性淋巴细胞白血病的治疗提供临床前模型。**方法** 通过文献查阅及实验确定环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 注射剂量以制备免疫抑制小鼠模型; 通过腹腔注射、尾静脉注射将 1×10^7 个 MEC-1 细胞连续 3 d 移植到小鼠体内, 以制备慢性淋巴细胞白血病小鼠; 应用流式细胞术、免疫组化等方法, 检测慢性淋巴细胞白血病小鼠外周血白细胞、CD19⁺CD5⁺B 淋巴细胞变化情况, 并分析肝、脾、胸腺、肺、淋巴及骨髓中 MEC-1 细胞浸润情况。**结果** 确定 CTX 注射剂量为 150 mg/kg 注射 4 d 能够显著降低小鼠免疫系统功能; 移植 MEC-1 细胞后小鼠表现慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 特征, 其白细胞及 B 淋巴细胞数量增多、骨髓细胞发生增殖。**结论** CTX 注射剂量为 150 mg/kg 连续注射 4 d, 可以使小鼠免疫功能显著下降; 成功制备 CLL 小鼠模型。

【关键词】 慢性淋巴细胞白血病; 小鼠模型; MEC-1; 环磷酰胺

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 01-0075-07

Preparation of mouse models of chronic lymphocytic leukemia by MEC-1 cells transplantation

ZHAO Zixuan[#], NAN Miaomiao[#], HEXIG Bayar^{*}, LIANG Hao^{*}, GUO Xudong^{*}, LIU Dongjun

(State Key Laboratory of Reproductive Regulation and Breeding of Grassland Livestock, Inner Mongolia University, Hohhot 010020, China)

Corresponding author: GUO Xudong. E-mail: xudguo@163.com; HEXIG Bayar. E-mail: bhexig@imu.edu.cn; LIANG Hao. E-mail: liangkaihao@aliyun.com

【Abstract】 Objective To prepare and evaluate a mouse model of chronic lymphocytic leukemia in order to provide a preclinical model for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. **Methods** The cyclophosphamide (CTX) injection dose was determined after a literature review and experiments to prepare an immunosuppressed mouse model; 1×10^7 MEC-1 cells were transplanted into mice for three consecutive days by intraperitoneal injection and tail vein injection to prepare mice with chronic lymphocytic leukemia. Flow cytometry, immunohistochemistry, and other method were used to detect changes in peripheral blood leukocytes and CD19⁺CD5⁺B lymphocytes in mice with chronic lymphocytic leukemia and to

[基金项目] 内蒙古自治区科技重大专项 (zdx2018044, 2020ZD0008)。
Funded by the Science and Technology Major Project of Inner Mongolia Autonomous Region (zdx2018044, 2020ZD0008)。
[作者简介] 赵子璇 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 生殖生物学与生物技术。Email: 1105186391@qq.com;
南苗苗 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 生殖生物学与生物技术。Email: 1406757891@qq.com。
[#]共同第一作者
[通信作者] 郭旭东, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 生殖生物学与生物技术。Email: xudguo@163.com;
贺喜白乙, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 生殖生物学与生物技术。bhexig@imu.edu.cn;
梁浩, 副研究员, 研究方向: 生殖生物学与生物技术。Email: liangkaihao@aliyun.com。
^{*} 共同通信作者

analyze the infiltration of MEC-1 cells into the liver, spleen, thymus, lungs, lymph, and bone marrow. **Results** It was determined that a CTX dose of 150 mg/kg injected for four days could significantly reduce the immune system function of mice. After transplantation with MEC-1 cells, mice exhibited chronic lymphocytic leukemia (CLL) characteristics. The number of white blood cells and B lymphocytes increased, and bone marrow cells multiplied. **Conclusions** A CTX dose of 150 mg/kg injected for four consecutive days significantly reduced the immune function of mice and led to the successful preparation of a mouse model of CLL.

【**Keywords**】 chronic lymphocytic leukemia; mouse model; MEC-1; CTX

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

白血病 (Leukemia) 是一种由于骨髓中的血细胞不断增殖, 导致骨髓细胞癌变的血液恶性肿瘤疾病^[1]。慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 是一种以 CD5⁺B 淋巴细胞在各免疫器官中进行恶性克隆增殖的血液系统疾病^[2]。多数患者完全没有症状, 出现不适症状的患者通常表现为体重减轻、疲劳、盗汗、频繁感染、发烧、出血及淋巴结、肝和脾肿大, 少数患者还可能会有血小板减少、出血等症状^[3]。虽然目前治疗 CLL 的药物非常丰富, 但仍无法根治 CLL, 因此还需探索新的治疗方法。

目前针对慢性淋巴细胞白血病的致病机制, 大部分采用临床研究, 周期较长。CLL 的动物模型非常难建立。目前, 最流行的 CLL 模型是将人 Tc1-1 基因插入免疫球蛋白重链可变区启动子和免疫球蛋白重链增强子控制下获得的转基因小鼠, 在较长时间 (13 ~ 18 个月) 后造模成功^[4]。文献报道, MEC-1 细胞和 MEC-2 细胞是处于两个不同阶段的 CLL 细胞系^[5], 是进行细胞移植的常用细胞系。有研究表明, 给裸鼠移植 MEC-2 细胞能使小鼠患慢性 B 淋巴细胞白血病 (B-CLL)^[6], 但目前尚未有文献提及给小鼠移植 MEC-1 是否也能使小鼠患 CLL。

本研究通过对免疫抑制小鼠模型腹腔注射和尾静脉注射 MEC-1 细胞以构建慢性淋巴细胞白血病小鼠模型, 并对模型进行效果评价, 以期后续研究提供简便、生产周期短的动物模型, 对临床实践及转化具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只清洁级 ICR 小鼠 (雌雄各半), 6 ~ 8 周龄, 体重约为 230 g, 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司【SCXK(苏)2018-0008】, 饲养于内蒙古大学省部共建国家重点实验室清洁级实验动物房

【SYXK(蒙)2020-0006】。昼夜各半循环照明, 湿度恒定, 温度控制在 22 ~ 25℃。所有操作均符合内蒙古大学实验伦理学要求 (伦审 2021 年第 039 号)。

1.1.2 细胞

本实验移植所使用的细胞 MEC-1 购自南京科柏生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂与仪器

环磷酰胺 (SIGMA, 德国)、EDTA-K2 (麦克林, 加拿大)、IMDM 培养液 (GIBCO, 美国)、红细胞裂解液、白细胞稀释液、HE 染色试剂盒、吉姆萨染色液 (均来自 SOLARBIO, 中国)、Caspase3 mouse monoclonal antibody (PROTEINTECH, 美国); 流式细胞仪 (BECKMAN COULTER, 美国)、石蜡切片机 (LEICA, 德国)、酶标仪 (THERMO, 美国)、化学发光成像分析系统 (TANON, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

本实验采用 6 ~ 8 周龄 ICR 小鼠共 30 只, 实验前分别将小鼠分为两大组, 即实验组和对照组, 每组各 15 只。再将两大组小鼠分别在组内随机分为 5 个小组, 每组 3 只。

1.2.2 免疫抑制小鼠模型的制备

用 ddH₂O 配制 5 种不同浓度的 CTX, 然后通过腹腔注射将 CTX 分别以 40 mg/kg 注射 10 d, 100 mg/kg 注射 3 d 及 5 d, 150 mg/kg 注射 4 d, 及 200 mg/kg 注射 24 h 的方式应用于实验组小鼠, 对照组注射相应剂量及天数的 PBS。

1.2.3 CLL 小鼠模型的制备

利用免疫抑制效果最好的 CTX 注射剂量来制备免疫抑制小鼠共 24 只, 其中 6 只作为 WT 对照, 6 只作为 PBS 对照, 其余 6 只进行腹腔细胞移植, 6 只进行尾静脉细胞移植。在小鼠免疫功能低下的时间内, 通过前期条件摸索和优化, 将 1×10^7 个 MEC-1 细胞分别通过腹腔及尾静脉连续 3 d 移植到

小鼠体内,对照组同时注射相应剂量的 PBS。

1.2.4 小鼠血液中白细胞数量检测

小鼠尾静脉取外周血 20 μL 镜检计数,每毫升细胞数=(X₁+X₂+X₃+X₄+X₅)×5×10⁴;采用吉姆萨染色法制作血涂片;小鼠取血检测外周血中 CD19⁺CD5⁺B 淋巴细胞数量。

1.2.5 小鼠各组织病变检测

取小鼠各器官制备组织石蜡切片,股骨制备骨髓石蜡切片,HE 染色后观察骨髓细胞数量变化。

1.2.6 小鼠骨髓细胞相关凋亡因子的鉴定

收集骨髓细胞,利用 qRT-PCR 及 Western Blot 检测 Bcl-2、Caspase3、Bax 的表达。

1.3 统计学分析

所有数据均至少进行 3 个生物学重复,实验数据通过 SPSS 22.0 整理分析,计量数据用平均值 ±

标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有显著性。统计数据采用 GraphPad Prism 8.0 进行绘图。

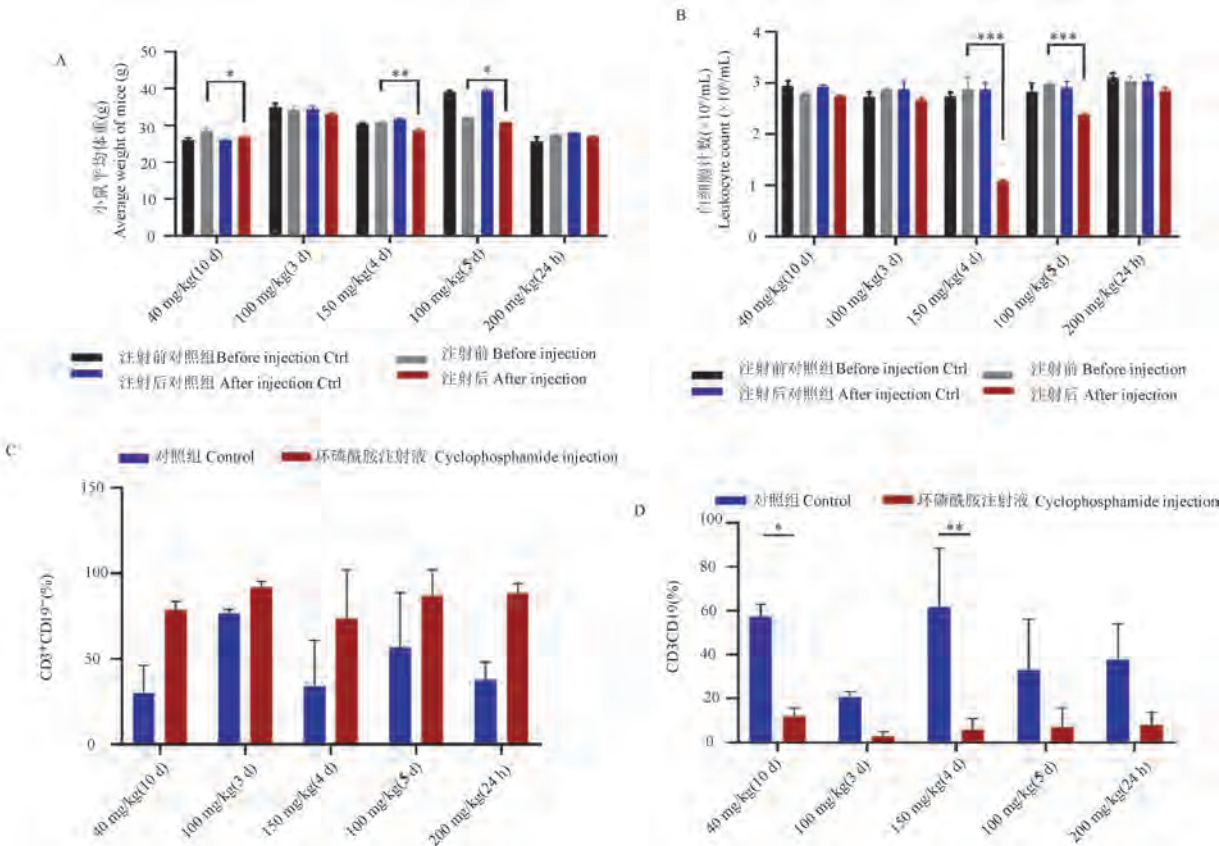
2 结果

2.1 成功制备免疫抑制小鼠模型

从细胞计数、血涂片、淋巴细胞分群分析,免疫器官 HE 染色等,如图 1 所示,得到 CTX 注射剂量为 150 mg/kg 注射 4 d 的注射方式对小鼠免疫系统的影响最显著,因此以 150 mg/kg 注射 4 d 的注射方式来制备免疫抑制小鼠模型,为后续 CLL 小鼠模型的制备提供了条件。

2.2 MEC-1 细胞移植影响小鼠生长

WT 小鼠与 PBS 注射组小鼠的体重变化不明显,保持相对稳定,经腹腔及尾静脉移植 MEC-1 细



注:A:小鼠平均体重;B:细胞计数统计小鼠外周血白细胞数量;C:T淋巴细胞百分比;D:B淋巴细胞百分比;与对照组、CTX注射前实验组相比,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001。(下图同)

图1 免疫抑制小鼠基础检测

Note. A. Average mouse weight. B. Peripheral blood white blood cell counting in mice. C. Percentage of T lymphocytes. D. Percentage of B lymphocytes. Compared with the control group, the experimental group before CTX injection, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. (The same in the following figures)

Figure 1 Basic testing in immunosuppressed mice

胞的小鼠,随着实验时间增加,小鼠体重总体呈下降趋势,并且经腹腔注射进行细胞移植的方法小鼠体重下降更明显(图 2, $P < 0.001$)。实验结果说明,给小鼠移植 MEC-1 细胞,能够影响小鼠的生长。

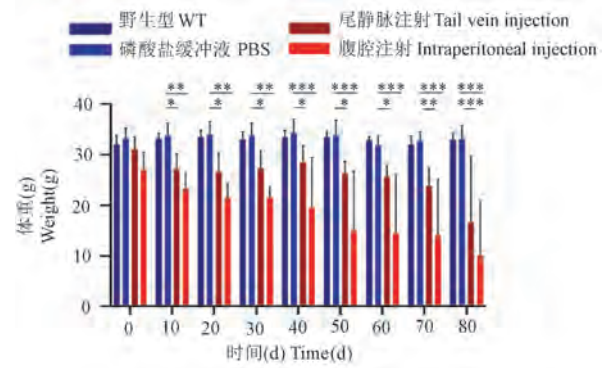


图 2 MEC-1 细胞移植对小鼠体重的影响
Figure 2 Effect of MEC-1 cell transplantation on body weight of mice

2.3 小鼠外周血白细胞数量检测

取小鼠外周血对其白细胞及 B 淋巴细胞数量进行监测,图 3 结果表明,移植 MEC-1 细胞,可以使小鼠白细胞及 B 淋巴细胞数量增多,并且尾静脉注射法进行细胞移植得到的效果更好。经流式细胞

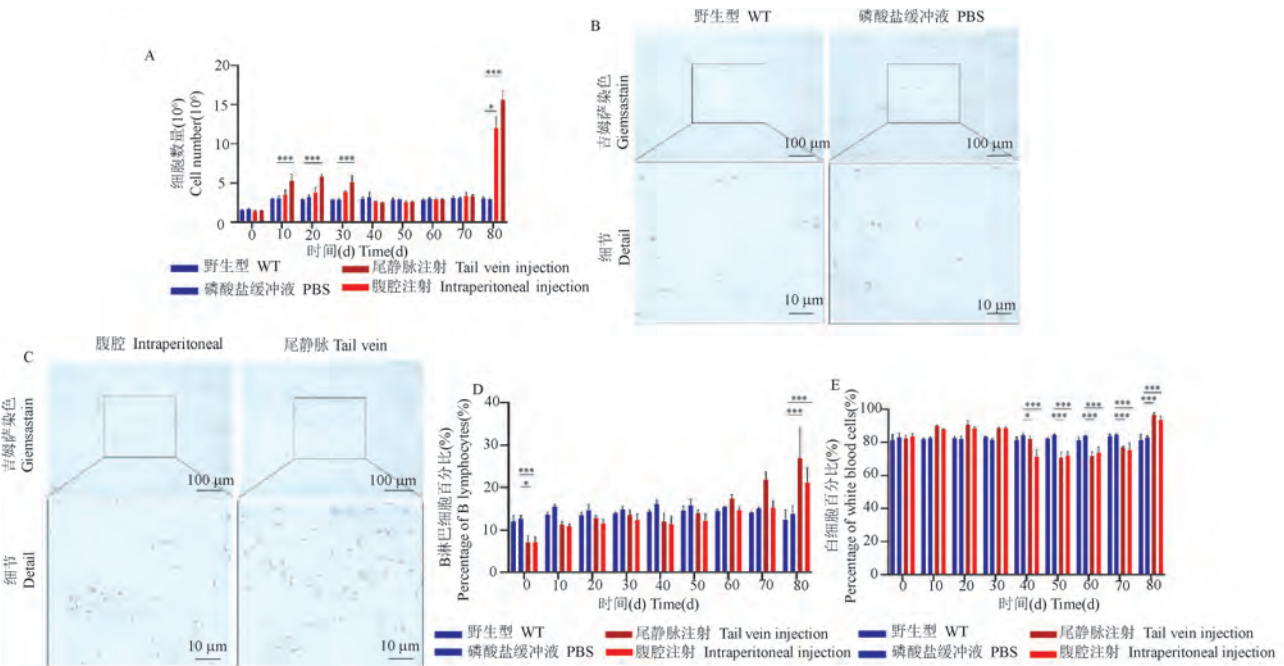
术分析,检测到实验组小鼠外周血中存在 $CD19^+CD5^+$ 的 B 淋巴细胞(图 4),结果说明,实验组小鼠外周血白细胞数量增多可能是外周血中出现了 $CD19^+CD5^+$ 的 B 淋巴细胞所致。

2.4 小鼠各组织 MEC-1 细胞浸润情况鉴定

以 CD19 为标记蛋白对 MEC-1 细胞进行追踪,实验发现,腹腔注射法进行细胞移植的小鼠中,在 3 只小鼠的外周血中检测到 $CD19^+$ 的 MEC-1 细胞;尾静脉注射法进行细胞移植的小鼠中,在 4 只小鼠的外周血中检测到 $CD19^+$ 的 MEC-1 细胞,同时发现,两种移植方法均能使 MEC-1 细胞浸润小鼠的肝、脾、肺、胸腺、淋巴和骨髓(图 5)。

2.5 小鼠骨髓细胞相关凋亡因子的鉴定

如图 6A 所示,实验组小鼠的肝和脾均大于对照组小鼠;两个实验组小鼠的骨髓细胞多于对照组小鼠(图 6B, 6C)。Real-time PCR 结果表明,实验组小鼠骨髓细胞 Bcl-2 的 mRNA 表达水平显著升高(图 6D),尾静脉注射法实验组小鼠骨髓细胞 Caspase3、Bax 的 mRNA 表达水平显著下降(图 6E);Western Blot 所显示的各基因表达趋势与 qRT-PCR 结果显示的表达趋势一致。



注: A、B: 外周血涂片; C: 外周血白细胞计数; D: 外周血 B 淋巴细胞百分比; E: 外周血白细胞百分比。
Figure 3 Effect of MEC-1 cell transplantation on leukocyte count
Note. A, B. Peripheral blood smears. C. Peripheral blood leucocyte count. D. Percentage of B lymphocytes in peripheral blood. E. Percentage of leukocytes in peripheral blood.

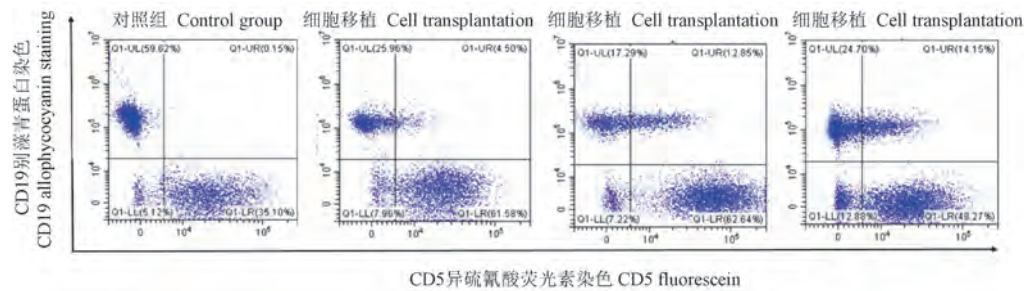
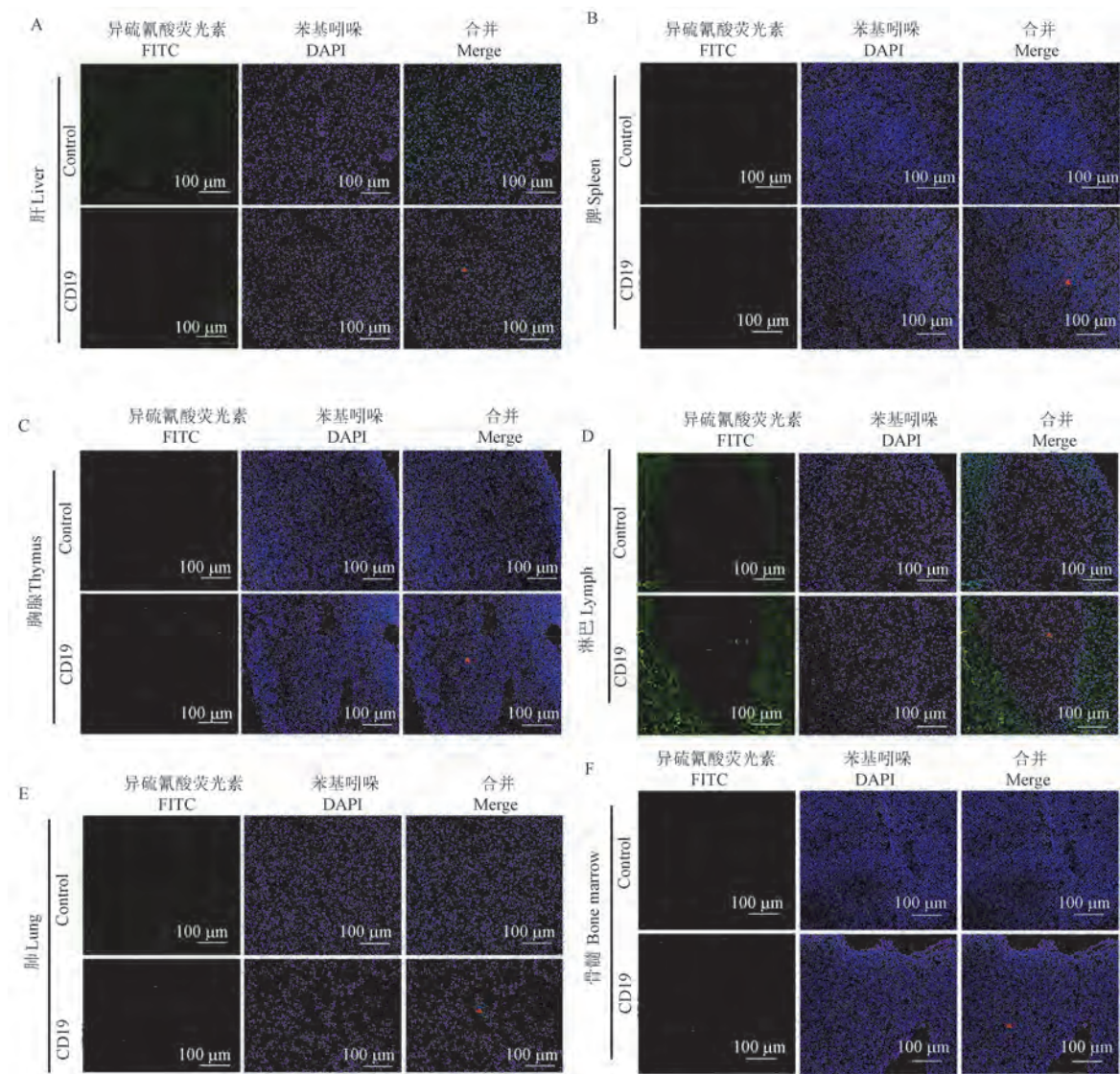


图 4 外周血 CD19⁺CD5⁺B 淋巴细胞百分比

Figure 4 Percentage of CD19⁺CD5⁺B lymphocytes in peripheral blood

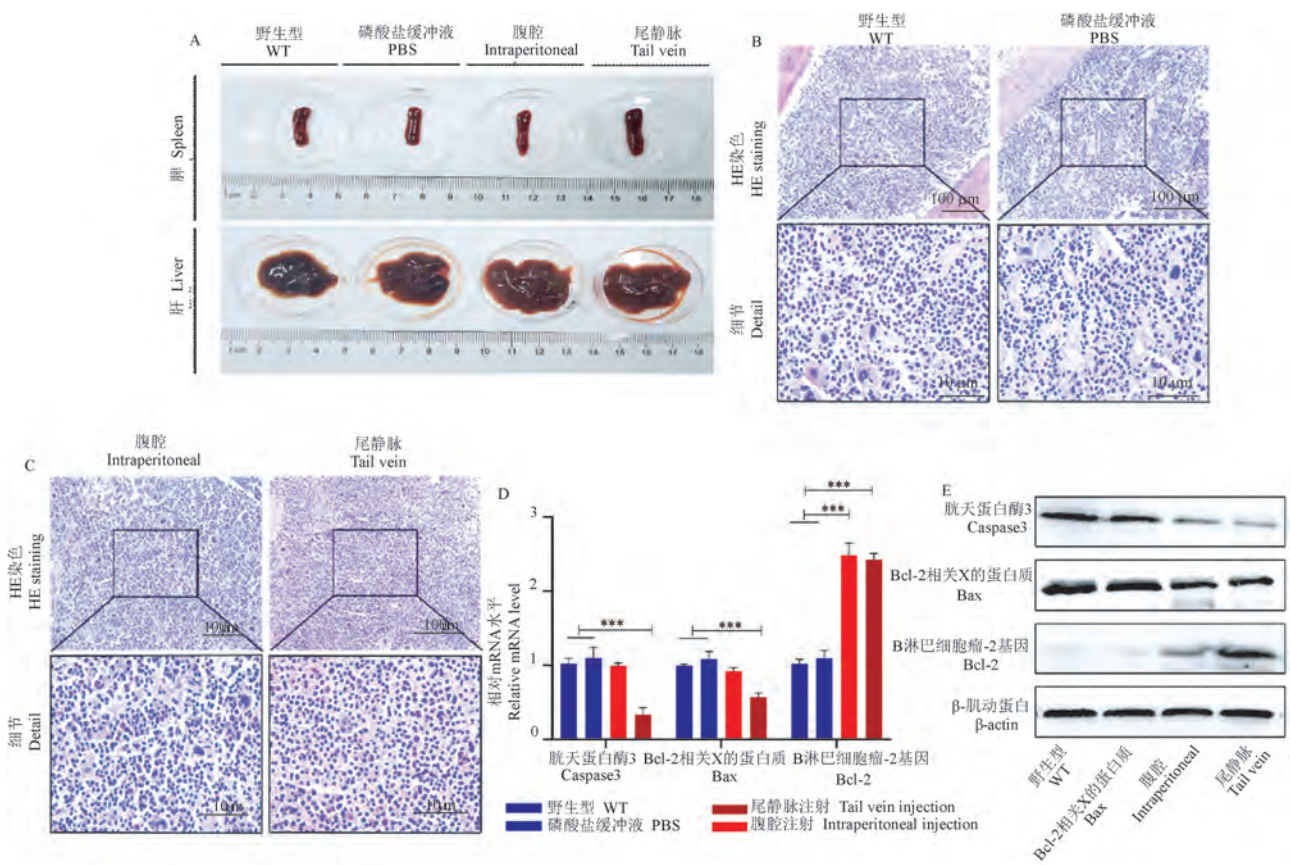


注:A:小鼠肝中 MEC-1 细胞鉴定;B:小鼠脾中 MEC-1 细胞鉴定;C:小鼠胸腺中 MEC-1 细胞鉴定;D:小鼠淋巴中 MEC-1 细胞鉴定;E:小鼠肺中 MEC-1 细胞鉴定;F:小鼠骨髓中 MEC-1 细胞鉴定。

图 5 MEC-1 细胞浸润小鼠各组织情况

Note. A. Identification of MEC-1 cells in mouse liver. B. Identification of MEC-1 cells in mouse spleen. C. Identification of MEC-1 cells in mouse thymus. D. Identification of MEC-1 cells in mouse lymph. E. Identification of MEC-1 cells in mouse lung. F. Identification of MEC-1 cells in mouse bone marrow.

Figure 5 Infiltration of MEC-1 cells in various tissues of mice



注:A:小鼠肝、脾形态;B、C:骨髓 HE 染色;D:骨髓细胞增殖相关基因表达情况;E:骨髓细胞增殖相关基因蛋白表达量。

图 6 MEC-1 细胞移植到小鼠体内对小鼠肝、脾及骨髓细胞的影响

Note. A. Liver and spleen morphology in mice. B, C. Bone marrow HE staining. D. Expression of bone marrow cell proliferation related genes. E. Expression of bone marrow cell proliferation related gene protein.

Figure 6 Effects of MEC-1 cell transplantation on liver, spleen and bone marrow cells in mice

3 讨论

CLL 小鼠模型的制备,为进一步探究 CLL 的发病机制及治疗方法提供实验材料。研究表明,CLL 的一个主要特征为,CD5⁺B 淋巴细胞在外周血、骨髓,及各免疫器官中进行恶性克隆增殖^[2],因此 CLL 细胞表达成熟 B 细胞标志抗原 CD19 及高水平的 CD5^[7-8]。CLL 患者通常有体重减轻,肝、脾肿大等特点^[3]。利用细胞移植法制备小鼠模型,免疫排斥是需要解决的首要问题。免疫抑制剂能够降低免疫排斥反应。在制备疾病模型之前,先经小鼠腹腔,通过注射免疫抑制剂来降低其免疫功能,再以此为基础来制备预期疾病模型。用此方法得到的动物模型,其生存期能够明显延长,有利于慢性疾病研究。

本研究发现,随着实验进行,实验组小鼠体重逐渐减轻。当小鼠死亡后取其主要免疫器官,能够看到小鼠胸腺和脾的体积减小。经 HE 染色后,能

够观察到各免疫器官中免疫细胞数量均减少。胸腺和脾体积减小及其中免疫细胞减少的原因可能是因为二者都属于淋巴器官,CTX 能够在抑制二者发育的同时溶解其中的淋巴细胞。以上实验结果与以往文献报道的内容均一致^[9-10]。白细胞计数和流式细胞术结果显示,实验组小鼠外周血白细胞数量及淋巴细胞数量均多于对照组,并且实验组小鼠外周血中存在 CD19⁺CD5⁺B 淋巴细胞;对照组小鼠的肝和脾均小于实验组小鼠。实验结果说明,本研究制备的模型小鼠均能够表现出 CLL 基本特征。

为确定移植的 MEC-1 细胞能否浸润到小鼠的各组织中,通过免疫荧光染色及流式细胞术以 CD19 为标记蛋白对 MEC-1 细胞进行追踪。实验发现,腹腔注射法进行细胞移植的小鼠中,在 3 只小鼠的外周血中检测到 CD19⁺的 MEC-1 细胞;尾静脉注射法进行细胞移植的小鼠中,在 4 只小鼠的外周血中检测到 CD19⁺的 MEC-1 细胞,同时发现,两种移植方法均能使 MEC-1 细胞浸润小鼠的肝、脾、肺、胸腺、

淋巴和骨髓。对照组小鼠的外周血及各器官均没有发现 CD19⁺MEC-1 细胞。实验结果说明,两种细胞移植方法均能使 MEC-1 细胞浸润小鼠各组织。

研究表明,Bax 与 Bcl-2 是一对拮抗基因,Bcl-2 表达量增加,相应的 Bax 表达量则减少,因此细胞色素 C 释放受阻,Caspase9 无法被完全激活,Caspase3 表达量也会相应减少^[9],进而影响细胞凋亡途径。本研究分别检测了 Bax 和 Caspase3 在 mRNA 及蛋白水平上的表达,结果显示,移植 MEC-1 细胞的小鼠其骨髓细胞 Bax 和 Caspase3 在 mRNA 及蛋白水平上的表达量均低于对照组;通过腹腔进行细胞移植的小鼠,其骨髓细胞 Caspase3、Bax 的 mRNA 表达水平与对照组相比差异性并不显著。本研究验证了实验组小鼠骨髓细胞 Bcl-2 表达较高,而 Bax 及 Caspase3 表达相对较低,此结果与 Packham 等^[11]在 2005 年的研究结果一致。

综上所述,CTX 注射剂量为 150 mg/kg 注射 4 d 是制备免疫抑制小鼠模型的最佳剂量。给小鼠移植外源 MEC-1 细胞,能够影响小鼠生长,使小鼠外周血白细胞、B 淋巴细胞数量增多,并且外周血中出现 CD19⁺CD5⁺的 B 淋巴细胞,引起小鼠骨髓细胞增殖。我们认为,通过 MEC-1 细胞移植能够成功制备慢性淋巴细胞白血病小鼠,可以为慢性淋巴细胞白血病治疗提供临床前模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Wan Z, Sun R, Moharil P, et al. Research advances in nanomedicine, immunotherapy, and combination therapy for leukemia [J]. J Leukoc Biol, 2021, 109(2): 425–436.
- [2] Scarfo L, Ferreri AJ, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2016, 104: 169–182.
- [3] Munir T. Chronic lymphocytic leukemia [J]. Hematology, 2015, 20(4): 245–246.
- [4] Bichi R, Shinton SA, Martin ES, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(10): 6955–6960.
- [5] Eahsan R, Daniel S, Noemi N, et al. The MEC1 and MEC2 lines represent two CLL subclones in different stages of progression towards polymphocytic leukemia [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e106008.
- [6] Loisel S, Ster KL, Quintin-Roue I, et al. Establishment of a novel human B-CLL-like xenograft model in nude mouse [J]. Leukemia Res, 2005, 29(11): 1347–1352.
- [7] Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia [J]. Lancet, 2018, 391(10129): 1524–1537.
- [8] Ghia P, Pluta A, Wach M, et al. ASCEND: Phase III, randomized trial of acalabrutinib versus idelalisib plus rituximab or bendamustine plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia [J]. J Clin Oncol, 2020, 38(25): 2849–2861.
- [9] Huan XH, Lin YP, Gao T, et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(9): 1293–1297.
- [10] 宋雁, 贾旭东, 崔文明, 等. 不同途径和剂量环磷酰胺建立小鼠免疫抑制模型的对比研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(3): 218–225.
- Song Y, Jia XD, Cui W, et al. Comparison research of immunosuppression models induced by different ways and doses of cyclophosphamide in mice [J]. Chin Food Hyg, 2013, 25(3): 218–225.
- [11] Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia [J]. Immunology, 2005, 114(4): 441–449.

[收稿日期] 2022-08-04

郭小丽,杨昌明,王婵,等. 基于 Sirt1/FoxO1 通路探讨瑞马唑仑减轻脓毒症小鼠脑损伤的机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 82-90.

Guo XL, Yang CM, Wang C, et al. Mechanism of remazolam in reducing brain injury in sepsis mice based on Sirt1/FoxO1 pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 82-90.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.010

基于 Sirt1/FoxO1 通路探讨瑞马唑仑减轻脓毒症小鼠脑损伤的机制研究

郭小丽¹,杨昌明¹,王婵¹,王先圆²,刘荣莉^{1*}

(1.荆门市第一人民医院 麻醉科,湖北 荆门 448001; 2.荆门市第一人民医院 重症医学科,湖北 荆门 448001)

【摘要】 目的 探究瑞马唑仑对脓毒症引起的脑损伤的影响及机制。**方法** 雄性 C57BL/6J 小鼠,采用随机数字表法分为假手术组、模型组、瑞马唑仑组(8 mg/kg)、瑞马唑仑+Sirt1 抑制剂(EX527)组(8 mg/kg 瑞马唑仑+5 mg/kg EX527)、EX527 组,每组 38 只。采用盲肠结扎穿孔法(CLP)制备脓毒症相关性脑病(SAE)小鼠模型。给予相应的干预后,观察并记录术后 7 d 内小鼠存活率,采用 Morris 水迷宫检测小鼠逃避潜伏期和穿越平台次数;手术后 24 h,通过伊文斯蓝(EB)渗漏量评估血脑屏障(BBB)通透性,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测脑组织白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-1 β 水平,化学比色法检测脑组织丙二醛(MDA)水平和超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性,HE 染色观察海马组织病理学变化,TUNEL 法检测神经元凋亡,蛋白免疫印迹(Western Blot)检测海马组织沉默信息调节因子 1(Sirt1)/叉头框蛋白 O1(FoxO1)通路相关蛋白表达。**结果** 与假手术组相比,模型组小鼠的存活率、穿越平台次数、SOD 和 CAT 活性、Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著下降,逃避潜伏期、脑组织 EB 含量、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 MDA 水平、海马神经元凋亡指数、乙酰化 FoxO1(Ac-FoxO1)/FoxO1 比值和乙酰化核因子- κ B p65(Ac-NF- κ B p65)、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高(均 $P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组小鼠的存活率、穿越平台次数、SOD 和 CAT 活性、Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高,逃避潜伏期、脑组织 EB 含量、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 MDA 水平、海马神经元凋亡指数、Ac-FoxO1/FoxO1 比值和 Ac-NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著降低(均 $P < 0.05$);EX527 可抑制 Sirt1 表达,显著减弱瑞马唑仑对 SAE 小鼠的上述保护作用(均 $P < 0.05$)。**结论** 瑞马唑仑可提高脓毒症小鼠存活率,通过维持 BBB 完整性、抑制神经炎症和氧化应激,减少神经元凋亡,减轻脓毒症引起的脑损伤;其作用机制可能与激活 Sirt1/FoxO1 通路,抑制 NF- κ B 活化有关。

【关键词】 瑞马唑仑;脓毒症相关性脑病;神经炎症;氧化应激;沉默信息调节因子 1;叉头框蛋白 O1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 01-0082-09

Mechanism of remazolam in reducing brain injury in sepsis mice based on Sirt1/FoxO1 pathway

GUO Xiaoli¹, YANG Changming¹, WANG Chan¹, WANG Xianyuan², LIU Rongli^{1*}

(1. Department of Anesthesiology, Jingmen First People's Hospital, Jinmen 448001, China. 2. Department of Critical Care Medicine, Jingmen First People's Hospital, Jinmen 448001)
Corresponding author: LIU Rongli. E-mail: r15072894595@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect and action of remazolam on brain injury caused by sepsis. **Methods** Male C57BL/6J mice were randomly separated into sham operation, model, remazolam (8 mg/kg), remazolam + Sirt1

【基金项目】 中国健康促进基金会鄂皖科研基金(202008-202208)。
Funded by the Hubei Anhui Scientific Research Fund of China Health Promotion Foundation (202008-202208).
【作者简介】 郭小丽(1988—),女,本科,主治医师,研究方向:老年患者麻醉。Email:gx188work@163.com
【通信作者】 刘荣莉(1981—),女,本科,副主任医师,研究方向:术后应激反应。Email:r15072894595@163.com

inhibitor (EX527) (8 mg/kg remazolam + 5 mg/kg EX527), and EX527 groups by the random number table method, with 38 rats in each group. A sepsis-associated encephalopathy (SAE) mouse model was established by cecal ligation and puncture. After the corresponding intervention was given, the survival rates of mice within seven days after the operation were observed and recorded, and a Morris water maze was used to detect the mice's escape latency and number of times crossing the platform. Twenty-four hours after surgery, blood-brain barrier (BBB) permeability was assessed by Evans blue (EB) leakage; the levels of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , and IL-1 β in brain tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; the levels of malondialdehyde (MDA) and activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in brain tissue were detected by chemical colorimetry. Histopathological changes to the hippocampus were observed by HE staining, and neuronal apoptosis was detected using the TUNEL method. Western Blot was used to detect the expression of silent information regulator 1 (Sirt1)/forkhead box O1 (FoxO1) pathway-related proteins in the hippocampus. **Results** Compared with the sham group, mice in the model group had a significantly decreased survival rate, platform crossing time, SOD and CAT activities, and Sirt1 and cytoplasmic NF- κ B p65 protein levels and significantly increased brain tissue EB content; IL-6, TNF- α , IL-1 β , and MDA levels; hippocampal neuron apoptosis index; acetylated FoxO1 (Ac-FoxO1)/FoxO1 ratio; and acetylated nuclear factor- κ B p65 (Ac-NF- κ B p65) and nuclear NF- κ B p65 protein levels (all $P < 0.05$). Compared with the model group, mice in the remazolam group had a significantly increased survival rate, platform crossing time, SOD and CAT activities, and Sirt1 and cytoplasmic NF- κ B p65 protein levels, and significantly decreased escape latency; brain tissue EB content; IL-6, TNF- α , IL-1 β , and MDA levels; hippocampal neuron apoptosis index; Ac-FoxO1/FoxO1 ratio; and Ac-NF- κ B p65 and nuclear NF- κ B p65 protein levels (all $P < 0.05$). EX527 inhibited the expression of Sirt1 and substantially attenuated the above protective effects of remazolam in SAE mice (all $P < 0.05$). **Conclusions** Remazolam improved the survival rate of mice with sepsis and reduced neuronal apoptosis and brain damage caused by sepsis by maintaining BBB integrity and inhibiting neuroinflammation and oxidative stress. Its mechanism of action may be related to the activation of the Sirt1/FoxO1 pathway and inhibition of NF- κ B activation.

【Keywords】 remazolam; sepsis-associated encephalopathy; neuroinflammation; oxidative stress; sirtuin 1; forkhead box O1

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

脓毒症是一种全身性炎症性疾病,与多种器官功能障碍的发展有关,包括脑功能障碍^[1]。脓毒症可增强血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性,促进神经毒性物质进入和神经炎症^[2]。研究表明,脓毒症后的炎症和氧化应激是脓毒症相关性脑病(sepsis-associated encephalopathy, SAE)的主要原因^[3]。最近,沉默信息调节因子 1(sirtuin 1, Sirt1)在脓毒症中的作用受到越来越多的关注。Sirt1 激活可以通过使组蛋白和非组蛋白如叉头框蛋白 O1(forkhead box O1, FoxO1)、核因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)去乙酰化来抑制炎症、减少氧化应激,减轻 SAE^[4-5]。

全身麻醉药,如丙泊酚^[6]、七氟醚^[7]和右美托咪定^[8],已被报道对 SAE 有保护作用。瑞马唑仑是一种新型苯二氮卓类镇静药物,具有诱导和维持全身麻醉作用,常用于重症监护室(ICU)的重症患者(尤其是脓毒症患者)^[9]。据报道,瑞马唑仑具有显著的神经保护作用,能有效改善大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经功能障碍^[10],还可减轻小鼠丘脑出血

性脑损伤^[11]。重要的是,瑞马唑仑可通过抑制炎症反应提高脓毒症小鼠的存活率^[9],并减轻脓毒症相关的急性肝损伤^[12]。此外,Sirt1 通路是全身麻醉药丙泊酚^[13]、七氟醚^[7]和右美托咪定^[14]发挥有益作用的关键。然而,瑞马唑仑是否减轻脓毒症相关脑损伤仍不清楚。因此,本研究旨在探讨瑞马唑仑对脓毒症引起的脑损伤的影响,并分析其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

190 只,雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】,体重(25 ~ 30)g,9 ~ 10 周龄,饲养在温度(22 ± 2)℃、湿度(60 ± 5)%和光照/黑暗循环为 12 h 的受控条件下,饲养于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SYXK(湘)2019-0017】。本研究经荆门市第一人民医院动物伦理委员会审核同意(2021-0168),并符合伦理规范要求。

1.1.2 主要试剂与仪器

瑞马唑仑(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 200814AK), EX527 (Sirt1 抑制剂, 美国 ApexBio, A4181); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) (A001-3-2)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) (A007-1-1)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) (A003-1-2) 试剂盒(南京建成生物工程研究所); 小鼠白细胞介素 (interleukin, IL)-6 (ml063159)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α (ml002095-J)、IL-1 β (ml301814) ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司); 苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒 (Solarbio, G1120); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (绿色荧光, 碧云天生物科技公司, C1088); 兔源一抗 Sirt1 (#9475)、FoxO1 (#2880) (美国 Cell Signaling Technology 公司); 乙酰化 FoxO1 (Ac-FoxO1) (PA5-104560)、NF- κ B p65 (PA1-186) (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 乙酰化 NF- κ B p65 (Ac-NF- κ B p65) (Q04206) (上海优宁维生物科技股份有限公司)。iMark680 多功能酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); BX61 电动显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SAE 模型建立

共分假手术组 (sham)、模型组 (model)、瑞马唑仑组 (8 mg/kg, remazolam)^[9]、瑞马唑仑+Sirt1 抑制剂 (EX527) 组 (8 mg/kg 瑞马唑仑+5 mg/kg EX527, remazdam+EX527)^[15]、EX527 组 (EX527), 每组 38 只。采用盲肠结扎穿孔法 (CLP) 建立小鼠 SAE 模型^[16]。用 40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠。将动物仰卧放在干净的工作台上, 脱去腹部毛发并使用 70% 乙醇溶液对腹部皮肤进行消毒, 沿腹中线做一个约 1 cm 的切口, 小心暴露盲肠, 以免损伤肠系膜血管。然后用 3/0 丝线在回盲瓣下方盲肠近端 1/2 处结扎盲肠, 并在结扎的盲肠中点处使用 20 号针头穿刺两次。挤出少量粪便以确保穿刺部位的通畅。将盲肠放回正常的腹内位置, 缝合腹部切口。术后腹腔注射 1 mL 预热 (37℃) 生理盐水, 以补充手术过程中损失的热量和水分。假手术组小鼠除未进行 CLP 外, 其余操作程序与模型组完全相同。术前 30 min、手术后 1 h 和 6 h, 瑞马唑仑组小鼠腹腔注射 8 mg/kg 的瑞马唑仑; 瑞马唑仑+EX527 组小鼠在腹腔注射 8 mg/kg 瑞马唑仑的同时腹腔注射 5 mg/kg EX527; EX527 组小鼠腹腔注射 5 mg/kg EX527; 假手术组、模型组腹腔注射等量生理盐水。

1.2.2 小鼠存活率

干预结束后, 每组随机选择 10 只小鼠, 常规饲养, 观察并记录术后 7 d 内小鼠的死亡率。

1.2.3 Morris 水迷宫

每组随机取 10 只小鼠, 分别于手术前 1 d、CLP 术后 3、5、7 d 进行测试。水池共分为 I、II、III、IV 等四个象限且均等, 圆形隐藏平台置于第 IV 象限中央。倒入墨水后随机将小鼠面朝池壁放入水中。其中定位航行中, 从各象限起始点放入小鼠, 并记录起点至目的点时间 (逃避潜伏期); 超过 120 s 内未找到, 则记 120 s。然后将其引导至平台并停留 30 s。每天训练 4 次, 每次间隔 30 min, 记录逃避潜伏期并取平均值。CLP 术后第 8 天, 撤平台后将小鼠由第 I 象限放入并记录 120 s 内穿过平台次数。若小鼠时间越短, 次数越多, 提示记忆能力越强。

1.2.4 BBB 通透性测量

通过伊文斯蓝 (EB) 染料测试 BBB 通透性。每组随机取 6 只小鼠, 手术后 24 h 通过尾静脉注射 EB (2%, 5 mL/kg), 60 min 后对小鼠进行深度麻醉, 并用生理盐水经心脏灌注以去除血管内染料。收获每只小鼠的海马体并分别称重。海马在 1 mL 50% 三氯乙酸中均质化, 在 4℃ 下孵育过夜, 并在 13 000 r/min 下离心 30 min。通过分光光度计在 620 nm 处定量上清液中 EB 含量。结果表示为每克海马组织重量的 EB 量 (μ g)。

1.2.5 脑组织炎症因子和氧化应激水平检测

术后 24 h, 每组取 6 只小鼠右侧海马组织, 并制备组织匀浆液 (10%)。保持离心 3000 r/min, 15 min, 收集上清液, 炎症细胞因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平采用酶联免疫吸附 (ELISA) 测定。化学比色法检测脑组织氧化应激指标 MDA 水平和 SOD、CAT 活性。

1.2.6 HE 染色观察海马组织病理学变化

将每组 6 只小鼠左侧海马组织用 4% 多聚甲醛固定, 并包埋在石蜡中, 行冠状切片 (4 μ m)。脱蜡、水合后, 苏木精染色 3 ~ 5 min, 在 1% 盐酸酒精中分化处理。在自来水中清洗切片 15 min 后, 用伊红染色 1 ~ 4 min。在光学显微镜下观察海马 CA1 区神经元形态学变化。

1.2.7 TUNEL 法检测神经元凋亡

取脑海马组织石蜡切片, 脱蜡后用 0.1% (v/v) Triton X-100 在 37℃ 下密封 15 min。PBS 洗涤, 在黑暗中用 TUNEL 溶液在 37℃ 下孵育 1 h。PBS 再次

洗涤后,将切片与 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)在 37℃下孵育 15 min。封片后,在 Olympus FV1000 共聚焦显微镜下观察 TUNEL 阳性神经元。每张切片随机选取海马 CA1 区 3 个视野计数 TUNEL 阳性神经元,计算凋亡指数。凋亡指数=(TUNEL 阳性神经元数/DAPI 阳性神经元总数)×100%。

1.2.8 蛋白免疫印迹(Western Blot)检测海马组织 Sirt1/FoxO1 通路相关蛋白表达

每组剩余 6 只小鼠在术后 24 h 处死,取脑后分离海马组织。组织在 RIPA 裂解液中于冰上进行匀浆。以 12 000 r/min 离心匀浆液 5 min(4℃),收集上清液并提取核蛋白。电泳分离后将蛋白质转至 PVDF 膜,与 5%脱脂牛奶(室温)一起振摇 1 h。将膜与以下一抗在 4℃下孵育过夜。一抗:Sirt1、Ac-FoxO1、FoxO1,1:1 000 稀释;Ac-NF-κB p65、NF-κB p65,1:500 稀释;GAPDH、Histone H3,1:5 000 稀释。随后,将膜与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗一起孵育 1 h,增强化学发光试剂(ECL)进行可视化,Image J 软件分析蛋白质条带的灰度值。内参蛋白分别为 GAPDH(细胞质),Histone H3(细胞核),计算灰度比的目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

实验所得数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析,单因素方差进行多组间比较,SNK-*q* 两两进一步比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

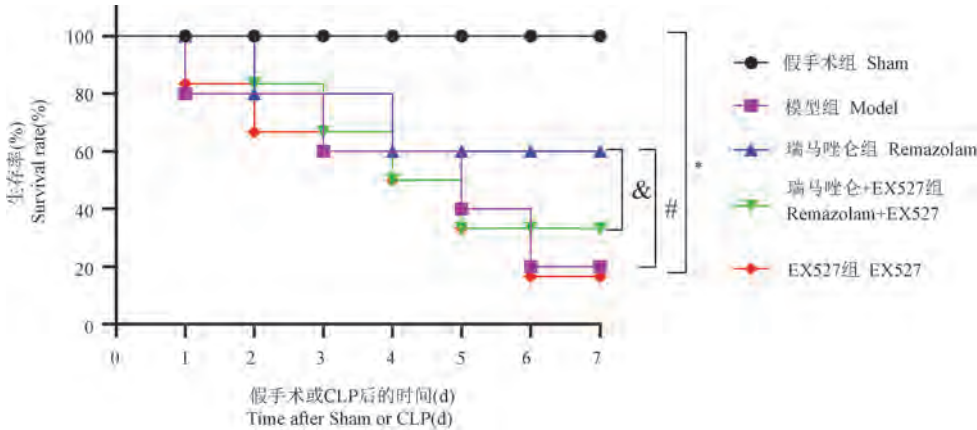
2 结果

2.1 瑞马唑仑对脓毒症小鼠存活率的影响

如图 1 所示,观察 7 d 后,假手术组小鼠全部存活(100%);与假手术组相比,模型组和 EX527 组小鼠手术后 7 d 的存活率(20%)显著下降($P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组小鼠的存活率显著升高($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠的存活率显著下降($P < 0.05$)。

2.2 瑞马唑仑对脓毒症小鼠认知功能的影响

模型组相对于假手术组,逃避潜伏期延长,穿越平台次数显著减少($P < 0.05$);瑞马唑仑组则逃避潜伏期相对模型组显著缩短,次数显著增多($P < 0.05$),EX527 组呈相反趋势($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组显著延长逃避潜伏期,减少次数($P < 0.05$)。见表 1。



注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与瑞马唑仑组比较,& $P < 0.05$ 。(下表同)

图 1 各组小鼠的存活率

Note. Compared with sham group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$. Compared with remazolam group, & $P < 0.05$. (The same in the following tables)

Figure 1 Survival rate of mice in each group

2.3 瑞马唑仑对脓毒症小鼠 BBB 通透性的影响

与假手术组相比,模型组小鼠脑组织 EB 含量显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组脑组织 EB 含量显著降低($P < 0.05$),EX527 组小鼠脑组织 EB 含量显著升高($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠脑组织 EB 含量显著升高($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 瑞马唑仑对脓毒症小鼠脑组织 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平的影响

对比各组 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平,模型组高于假手术组($P < 0.05$);瑞马唑仑组较模型组显著降低($P < 0.05$),EX527 组则显著升高($P < 0.05$);相对于瑞马唑仑组,瑞马唑仑+EX527 组小鼠显著升高($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 各组小鼠逃避潜伏期和穿越平台次数比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Comparison of escape latency and platform crossing times of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Groups	逃避潜伏期 (s) Escape latency (s)				穿越平台次数(次) Number of crossing platforms (times)
	CLP 前 Before CLP	3 d	5 d	7 d	
假手术组 Sham	21.80 ± 2.43	23.04 ± 2.59	22.18 ± 2.32	20.60 ± 2.27	10.60 ± 1.55
模型组 Model	23.19 ± 2.52	84.82 ± 10.31 *	75.76 ± 9.24 *	61.35 ± 7.48 *	2.57 ± 0.30 *
瑞马唑仑组 Remazolam	24.47 ± 2.61	52.39 ± 5.74 *#	43.20 ± 4.58 *#	32.41 ± 3.75 *#	5.86 ± 0.64 *#
瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	22.56 ± 2.48	76.50 ± 8.12 *△	68.15 ± 7.19 *△	55.06 ± 6.48 *△	3.01 ± 0.39 *△
EX527 组 EX527	23.95 ± 2.70	95.47 ± 9.85 *#&	87.42 ± 8.65 *#&	79.57 ± 8.25 *#&	1.39 ± 0.20 *#&

注:与 EX527 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with EX527 group, $^{\Delta}P < 0.05$. (The same in the following tables)

表 2 各组小鼠脑组织 EB 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of EB content in brain tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	EB(μg/g)
假手术组 Sham	1.91 ± 0.28
模型组 Model	5.40 ± 0.63 *
瑞马唑仑组 Remazolam	3.56 ± 0.41 *#
瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	5.17 ± 0.59 *△
EX527 组 EX527	6.82 ± 0.70 *#&

2.5 瑞马唑仑对脓毒症小鼠脑组织 MDA 水平和 SOD、CAT 活性的影响

与假手术组相比,模型组小鼠脑组织 MDA 水平显著升高, SOD 和 CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组脑组织 MDA 水平显著降低, SOD 和 CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$), EX527 组小鼠脑组织 MDA 水平显著升高, SOD 和 CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠脑组织 MDA 水平显著升高, SOD 和 CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 各组小鼠脑组织 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of the levels of IL-6, TNF-α and IL-1β in the brain tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	IL-6 (pg/mg)	TNF-α (pg/mg)	IL-1β (pg/mg)
假手术组 Sham	4.53 ± 0.62	80.65 ± 11.43	21.32 ± 2.75
模型组 Model	11.78 ± 1.14 *	231.49 ± 25.17 *	67.94 ± 7.40 *
瑞马唑仑组 Remazolam	6.90 ± 0.83 *#	125.30 ± 16.25 *#	35.08 ± 4.13 *#
瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	10.65 ± 0.96 *△	204.78 ± 23.19 *△	59.52 ± 6.29 *△
EX527 组 EX527	15.12 ± 1.07 *#&	269.24 ± 28.16 *#&	80.47 ± 8.11 *#&

表 4 各组小鼠脑组织 MDA 水平和 SOD、CAT 活性比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of levels of MDA and activities of SOD and CAT in brain tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	CAT (U/mg)
假手术组 Sham	12.50 ± 1.71	130.44 ± 12.06	25.30 ± 2.14
模型组 Model	39.43 ± 3.24 *	48.25 ± 6.37 *	8.49 ± 1.08 *
瑞马唑仑组 Remazolam	20.89 ± 2.55 *#	106.36 ± 10.84 *#	19.52 ± 1.77 *#
瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	34.25 ± 3.76 *△	59.07 ± 7.12 *△	10.16 ± 1.35 *△
EX527 组 EX527	50.18 ± 4.59 *#&	32.15 ± 5.60 *#&	5.27 ± 0.82 *#&

2.6 瑞马唑仑对脓毒症小鼠脑组织海马神经元病理损伤的影响

假手术组可见小鼠脑组织海马 CA1 区的神经元形态排列规则且紧密,细胞结构完整,细胞膜和

细胞核清晰,无明显肿胀和坏死;与假手术组比,模型组和 EX527 组小鼠脑组织海马 CA1 区神经元排列稀疏,大小、形状不规则,数量减少,细胞结构模糊,可见较多的神经元变性和核固缩,大量炎症细

胞浸润;与模型组比,瑞马唑仑组脑组织海马 CA1 区神经元数量增加,变性神经元数量和炎症细胞浸润减少;与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠脑组织海马 CA1 区神经元数量减少,炎症细胞浸润增加。见图 2。

2.7 瑞马唑仑对脓毒症小鼠脑组织海马神经元凋亡的影响

模型组小鼠脑组织海马 CA1 区相对于假手术组,TUNEL 阳性神经元数量增加,凋亡指数显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组脑组织海马 CA1 区 TUNEL 阳性神经元数量减少,凋亡指数显著降低($P < 0.05$),EX527 组小鼠脑组织海马 CA1 区 TUNEL 阳性神经元数量增加,凋亡指数显著升高($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠脑组织海马 CA1 区 TUNEL 阳性神经元数量增加,凋亡指数显著升高($P < 0.05$)(图 3、表 5)。

2.8 瑞马唑仑对脓毒症小鼠海马组织 Sirt1/FoxO1 通路相关蛋白表达的影响

与假手术组相比,模型组小鼠海马组织 Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著降低,Ac-FoxO1/FoxO1 比值和 Ac-NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组海马组织 Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高,Ac-FoxO1/FoxO1 比值和 Ac-NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著降低($P < 0.05$),EX527 组小鼠海马组织 Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著降低,Ac-FoxO1/FoxO1 比值和 Ac-NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠海马组织 Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著降低,Ac-FoxO1/FoxO1 比值和 Ac-NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高($P < 0.05$)。见图 4、表 6。

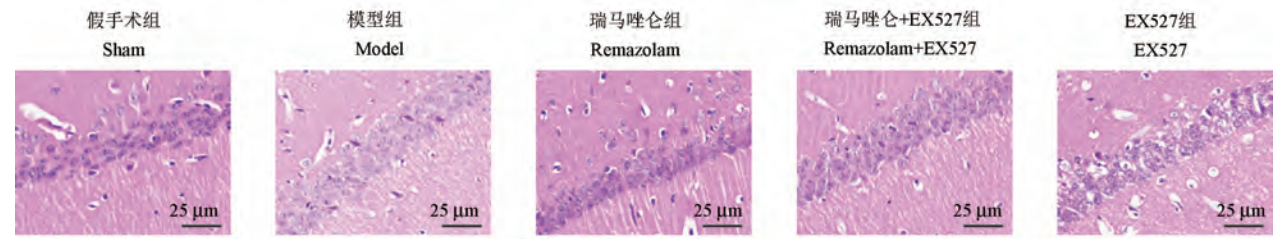


Figure 2 各组小鼠海马 CA1 区神经元的病理变化
Figure 2 Pathological changes of neurons in hippocampal CA1 area of mice in each group

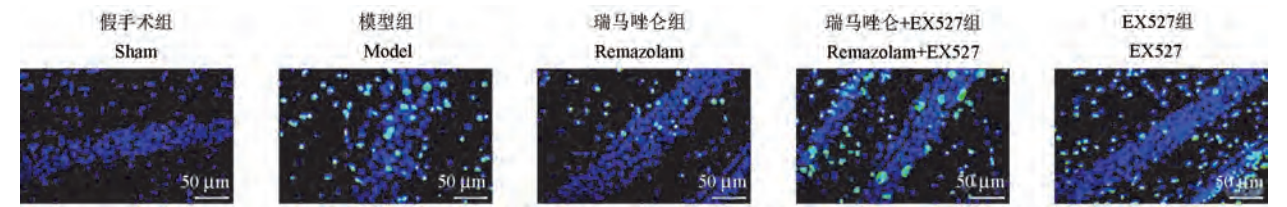


Figure 3 各组小鼠脑组织海马 CA1 区神经元凋亡
Figure 3 Apoptosis of neurons in hippocampal CA1 area of mouse brain in each group

表 5 各组小鼠脑组织海马 CA1 区神经元凋亡指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5	Comparison of apoptosis index of neurons in hippocampal CA1 area of mouse brain in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)	
	组别 Groups	凋亡指数 (%) Apoptosis index (%)
	假手术组 Sham	2. 39 $\pm$ 0. 28
	模型组 Model	24. 17 $\pm$ 2. 65 *
	瑞马唑仑组 Remazolam	10. 52 $\pm$ 1. 49 * #
	瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	20. 58 $\pm$ 2. 30 * & Δ
	EX527 组 EX527	31. 41 $\pm$ 2. 75 * # &

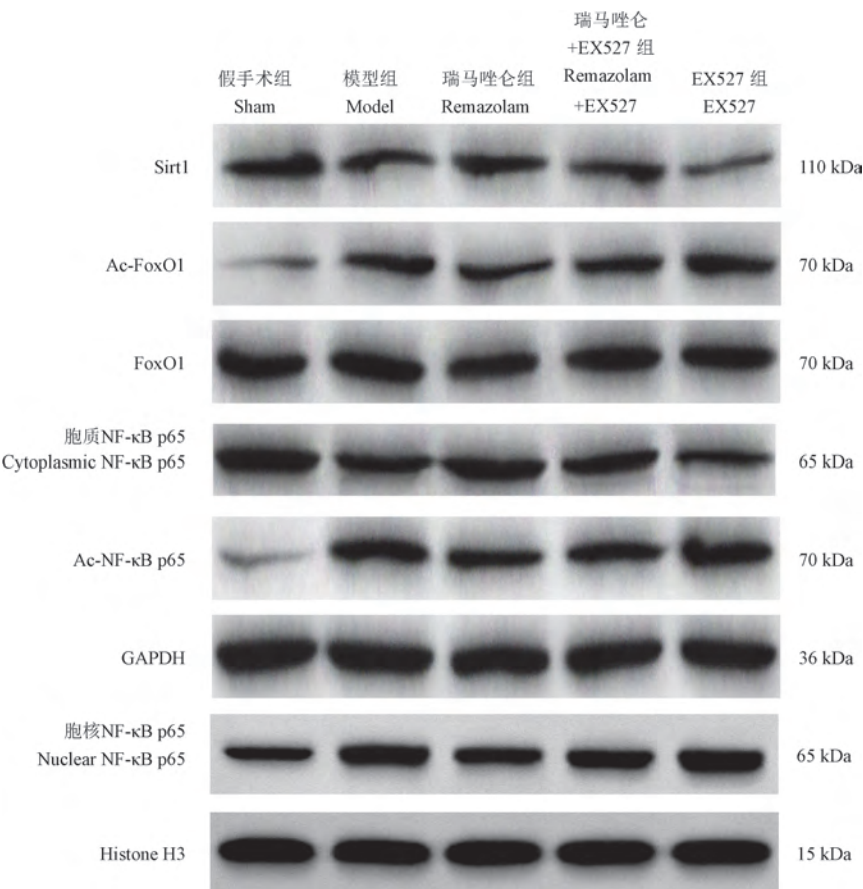


图 4 各组小鼠海马组织 Sirt1/FoxO1 通路相关蛋白表达

Figure 4 Expression of Sirt1/FoxO1 pathway-related proteins in the hippocampus of mice in each group

表 6 各组小鼠海马组织蛋白水平比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Comparison of protein levels in hippocampus of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	Sirt1	Ac-FoxO1/FoxO1	Ac-NF-κB p65	胞质 NF-κB p65 Cytoplasmic NF-κB p65	胞核 NF-κB p65 Nuclear NF-κB p65
假手术组 Sham	0.73 ± 0.08	0.18 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.84 ± 0.09	0.25 ± 0.04
模型组 Model	0.24 ± 0.04 *	0.56 ± 0.07 *	0.70 ± 0.08 *	0.21 ± 0.03 *	0.76 ± 0.08 *
瑞马唑仑组 Remazolam	0.58 ± 0.07 *#	0.32 ± 0.05 *#	0.38 ± 0.05 *#	0.53 ± 0.06 *#	0.40 ± 0.05 *#
瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	0.30 ± 0.05 *&Δ	0.49 ± 0.06 *&Δ	0.59 ± 0.07 *&Δ	0.25 ± 0.04 *&Δ	0.72 ± 0.08 *&Δ
EX527 组 EX527	0.13 ± 0.02 *#&	0.70 ± 0.08 *#&	0.84 ± 0.09 *#&	0.12 ± 0.02 *#&	0.89 ± 0.09 *#&

3 讨论

SAE 是脓毒症器官功能障碍的主要表现之一。越来越多的证据表明,过度炎症、氧化应激、BBB 破坏为脓毒症诱导的脑损伤的潜在机制^[2-3]。脓毒症会导致患者出现认知功能障碍,海马区是学习和记忆形成的重要位置,与认知功能密切相关。缺氧和缺血引起的脑损伤会增强炎症介质的合成和氧化应激;这些过程引发神经元炎症和氧化损伤,刺激神经元凋亡,导致海马损伤。因此,本研究评估了

瑞马唑仑对脓毒症引起的脑损伤小鼠认知功能、海马神经元炎症、氧化应激和细胞凋亡的影响。

瑞马唑仑是一种新型苯二氮卓类激动剂,它可以在提供快速麻醉和唤醒的同时稳定血流动力学,并且对呼吸产生较小的抑制作用;同时,长时间输注或更高剂量的瑞马唑仑不会积累和延长效果,代谢物没有任何药理作用^[17]。由于这些优势,瑞马唑仑的应用前景广阔。自 2020 年 12 月在中国获得国家药监局批准使用以来,瑞马唑仑广泛应用于包括脓毒症患者在内的成人全身麻醉和 ICU 镇静。据

报道,瑞马唑仑可显著抑制 LPS 诱导的炎症介质(如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)的释放,提高脓毒症小鼠的存活率,减轻肺和肝等多器官损伤^[9,12]。在本研究中,瑞马唑仑通过提高 CLP 术后 7 d 小鼠的存活率,挽救了脓毒症所致的死亡,并通过维持 BBB 完整性、抑制神经元凋亡,改善了小鼠的认知功能,减轻了小鼠 CLP 后脓毒症性脑损伤。此外,氧化应激和炎症都是在脓毒症期间触发神经细胞凋亡和坏死从而导致神经元丢失和脑损伤的重要因素^[18]。与之前的研究一致,CLP 手术显著促进了小鼠脑组织中的炎症反应和氧化应激。瑞马唑仑可减少脑海马组织中促炎细胞因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)的产生,降低 MDA 水平,升高 SOD 和 CAT 活性,抑制神经元炎症和氧化应激。表明瑞马唑仑对脓毒症具有潜在的治疗益处。

Sirt1 是一种重要的 NAD⁺ 依赖性脱乙酰酶,可调节氧化应激反应、炎症、凋亡和细胞衰老,其激活可保护神经系统疾病^[19]。研究表明 Sirt1 的激活可以减轻脓毒症引起的多器官损伤,包括脑^[4]、肾^[20]和肝^[21]。据报道,Sirt1 相关蛋白 FoxO1 可促进 SOD、CAT 合成,而 Sirt1 直接去乙酰化 FoxO1 后可刺激保护细胞基因表达^[22]。激活 NF- κ B 可增强 IL-6、IL-1 β 等促炎因子转录,并影响脓毒症进展。Sirt1 去乙酰化 NF- κ B 并激活,继而发挥保护神经作用^[23]。在本研究中,瑞马唑仑明显上调了 Sirt1 表达,降低了 Ac-FoxO1、Ac-NF- κ B p65 水平,并减少了细胞质 NF- κ B p65 向细胞核的迁移,显著减轻 CLP 诱导脓毒症小鼠脑组织氧化应激和炎症因子水平上调,及神经元凋亡。EX527 是一种 Sirt1 抑制剂,因此,本研究还探索了 EX527 诱导的变化。结果表明,EX527 的干预抑制了 Sirt1 表达,下调了海马中细胞质 NF- κ B p65 的表达,上调了 Ac-NF- κ B p65 和核 NF- κ B p65 表达,部分消除了瑞马唑仑对 SAE 小鼠的保护作用。提示,Sirt1 的激活和下游信号(FoxO1、NF- κ B)的调节与瑞马唑仑的神经保护作用有关。

综上所述,瑞马唑仑可提高脓毒症小鼠存活率,通过维持 BBB 完整性、抑制神经炎症和氧化应激,减少神经元凋亡,减轻脓毒症引起的脑损伤;其作用机制可能与激活 Sirt1/FoxO1 通路,抑制 NF- κ B 活化有关。然而,瑞马唑仑是否具有抗菌作用,以及能否作为一种抗生素用于脓毒症感染相关的辅助治疗,仍有待研究。此外,由于瑞马唑仑为短效

的苯二氮卓类药物,需要进一步研究以准确确定瑞马唑仑的最佳给药剂量和给药方式。

参 考 文 献(References)

- [1] Tauber SC, Djukic M, Gossner J, et al. Sepsis-associated encephalopathy and septic encephalitis: an update [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2021, 19(2): 215-231.
- [2] 邱名耀, 吴梅秋, 张玮芳, 等. 绞股蓝总皂苷经 PI3K/Akt/Bax 信号通路对脓毒症大鼠脑损伤的改善作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 23-29.
Qiu MY, Wu MQ, Zhang WF, et al. Gypenosides alleviate brain injury in septic rats via the PI3K/Akt/Bax signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 23-29.
- [3] Catarina AV, Branchini G, Bettoni L, et al. Sepsis-associated encephalopathy: from pathophysiology to progress in experimental studies [J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(6): 2770-2779.
- [4] Huang L, Chen J, Li X, et al. Polydatin improves sepsis-associated encephalopathy by activating Sirt1 and reducing p38 phosphorylation [J]. J Surg Res, 2022, 276(1): 379-393.
- [5] Zhu Y, Wang K, Ma Z, et al. SIRT1 activation by butein attenuates sepsis-induced brain injury in mice subjected to cecal ligation and puncture via alleviating inflammatory and oxidative stress [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 363(1): 34-46.
- [6] 罗涛, 付湘云, 黄蕊, 等. 丙泊酚通过激活 Nrf2/HO-1 减轻脓毒症小鼠脑损伤 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2022, 43(5): 721-726.
Luo T, Fu XY, Huang R, et al. Propofol attenuates brain injury in mice with sepsis by activating Nrf2/HO-1 [J]. Med J Wuhan Univ, 2022, 43(5): 721-726.
- [7] Chen H, Peng Y, Wang L, et al. Sevoflurane attenuates cognitive dysfunction and NLRP3-dependent caspase-1/11-GSDMD pathway-mediated pyroptosis in the hippocampus via upregulation of SIRT1 in a sepsis model [J]. Arch Physiol Biochem, 2020, 1(1): 1-8.
- [8] Sun YB, Zhao H, Mu DL, et al. Dexmedetomidine inhibits astrocyte pyroptosis and subsequently protects the brain in in vitro and in vivo models of sepsis [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3): 167-179.
- [9] Liu X, Lin S, Zhong Y, et al. Remimazolam protects against LPS-induced endotoxicity improving survival of endotoxemia mice [J]. Front Pharmacol, 2021, 12(1): 739603-739614.
- [10] Shi M, Chen J, Liu T, et al. Protective effects of Remimazolam on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting of NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis [J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16(1): 413-423.
- [11] 张震, 黄锦秀, 李长生, 等. 瑞马唑仑预先给药对小鼠丘脑出血性脑损伤的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2021, 41(12): 1518-1522.
Zhang Z, Huang JX, Li CS, et al. Effects of pre-administration of remazolam on thalamic hemorrhagic brain injury in mice [J]. Chin J Anaesthesiol, 2021, 41(12): 1518-1522.
- [12] Fang H, Zhang Y, Wang J, et al. Remimazolam reduces sepsis-

associated acute liver injury by activation of peripheral benzodiazepine receptors and p38 inhibition of macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101: 108331.

[13] Liu XB, Xia H, Wang G, et al. Propofol relieves oxidative stress response of cerebral ischemiareperfusion injury through SIRT1 signaling pathway [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(3): 435-443.

[14] Wang R, Xie Y, Qiu J, et al. The effects of dexmedetomidine in a rat model of sepsis-induced lung injury are mediated through the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/silent information regulator 1 (SIRT1) pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26(1): 919213-919221.

[15] Li L, Liu X, Li S, et al. Tetrahydrocurcumin protects against sepsis-induced acute kidney injury via the SIRT1 pathway [J]. *Ren Fail*, 2021, 43(1): 1028-1040.

[16] 郑李娜, 汪智玮, 王瑶琪, 等. 富氢液对脓毒症相关性脑病小鼠海马线粒体生物合成和动力学的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2022, 42(3): 333-337.

Zheng LN, Wang ZW, Wang YQ, et al. Effects of hydrogen-rich solution on mitochondrial biosynthesis and dynamics in the hippocampus of mice with sepsis-associated encephalopathy [J]. *Chin J Anaesthesiol*, 2022, 42(3): 333-337.

[17] Wesolowski AM, Zaccagnino MP, Malapero RJ, et al. Remimazolam: pharmacologic considerations and clinical role in anesthesiology [J]. *Pharmacotherapy*, 2016, 36(9): 1021-1027.

[18] Gu M, Mei XL, Zhao YN. Sepsis and cerebral dysfunction: BBB damage, neuroinflammation, oxidative stress, apoptosis and autophagy as key mediators and the potential therapeutic approaches [J]. *Neurotox Res*, 2021, 39(2): 489-503.

[19] 古春青, 张运克, 杨广华, 等. 虾青素预处理通过调控 Sirt1/miR-134 信号通路改善脑缺血再灌注大鼠认知功能 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(9): 1620-1627.

Gu CQ, Zhang YK, Yang GH, et al. Astaxanthin preconditioning improves cognitive function in rats with cerebral ischemia-reperfusion by regulating Sirt1/miR-134 signaling pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2021, 37(9): 1620-1627.

[20] Deng Z, Sun M, Wu J, et al. SIRT1 attenuates sepsis-induced acute kidney injury via Beclin1 deacetylation-mediated autophagy activation [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(2): 217-289.

[21] Su H, Ma Z, Guo A, et al. Salvianolic acid B protects against sepsis-induced liver injury via activation of SIRT1/PGC-1 α signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2675-2683.

[22] 朱仁英, 郎玉玲, 王久英, 等. 羟基红花黄色素 A 通过调控 Sirt1/FOXO1 信号通路减轻大鼠肝缺血再灌注损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(6): 1099-1106.

Zhu RY, Lang YL, Wang JY, et al. Hydroxysafflor yellow A attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by regulating Sirt1/FOXO1 signaling pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2021, 37(6): 1099-1106.

[23] Pan S, Wu Y, Pei L, et al. BML-111 reduces neuroinflammation and cognitive impairment in mice with sepsis via the SIRT1/NF- κ B signaling pathway [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12(1): 267-282.

[收稿日期] 2022-09-07

《中国实验动物学报》刊期变更通知

为缩短出版周期,及时反映本学科最新科技动态,应广大读者、作者要求,本刊向主管部门及北京市新闻出版局提出申请变更刊期。经批准《中国实验动物学报》自 2022 年 8 月份起由双月刊变更为月刊。从 2023 年期起全年共 12 期。

欢迎读者积极订阅! 欢迎各位学者踊跃投稿!

成海燕,杨琛,何燕,等. 神经根型颈椎病动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 91-97.
Cheng HY, Yang C, He Y, et al. Advances in animal models of cervical spondylotic radiculopathy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 91-97.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.011

神经根型颈椎病动物模型研究进展

成海燕¹, 杨琛², 何燕¹, 段利冬¹, 徐霞^{2*}

(1. 甘肃中医药大学护理学院, 兰州 730030; 2. 甘肃省中医院, 兰州 730050)

【摘要】 神经根型颈椎病(cervical spondylotic radiculopathy, CSR)是由颈椎小关节紊乱或颈椎间盘退行性改变而压迫神经根的一种疾病,典型症状表现为神经根支配区的颈肩部和上肢放射痛或麻木,严重影响着患者的生活质量。为深入研究该疾病病因病机、发展过程、健康防护和药物治疗等,正确地选择和建立符合疾病临床特征 的动物模型是解决问题至关重要的环节之一。本文查询国内外相关文献报道,将 CSR 动物模型的制备归纳总结为单纯压迫模型(血管钳钳夹法、丝线结扎法、L 形钢柱压迫法、硅胶片压迫法、自体骨压迫法、尼龙鱼线压迫法)、联合刺激模型(钳夹法联合铬制肠线压迫法、福尔马林定量滤纸刺激法、药物介导联合动静失衡法)和无创性干预模型(低头屈曲固定法)三类。将 CSR 动物模型制备进行总结概述,分析其特点和优劣势,以期 为临床前研究选择适宜的动物模型和探索理想模型提供重要参考依据。

【关键词】 神经根型颈椎病;动物模型;颈椎病;实验动物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0091-07

Advances in animal models of cervical spondylotic radiculopathy

CHENG Haiyan¹, YANG Chen², HE Yan¹, DUAN Lidong¹, XU Xia^{2*}

(1. Nursing College of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China. 2. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050)

Corresponding author: XU Xia. E-mail: 540713843@qq.com

【Abstract】 Cervical spondylotic radiculopathy (CSR) is a disease caused by cervical facet joint disorder or cervical disc degeneration, which compresses nerve roots. CSR is characterized by radiating pain or numbness in the cervical shoulder and upper limbs innervated by nerve roots and severely affects patients' quality of life. To further study the etiology, pathogenesis, developmental process, prevention, and drug treatment of the disease, the correct selection and establishment of animal models in line with the clinical characteristics of the disease are crucial. In the writing of this paper, relevant literature reports from China and abroad were consulted. The preparation of CSR animal models is summarized to include simple compression models (vascular forceps clamping method, wire ligation method, L-shaped steel column compression method, silica gel compression method, autologous bone compression method, and nylon fishing line compression method), combined stimulation models (clamping method and chrome intestinal wire compression method, formalin quantitative filter paper stimulation method, and drug-mediated and kinetic imbalance method), and a non-surgical intervention model (low head flexion fixation method). The preparation of CSR animal models is summarized, and their characteristics, advantages, and disadvantages are analyzed to provide an important reference for those selecting appropriate animal models for preclinical research.

【Keywords】 cervical spondylotic radiculopathy; animal model; cervical spondylosis; experimental animal

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

【基金项目】 国家自然科学基金(81960916)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81960916).

【作者简介】 成海燕(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:中医护理研究。Email:754679814@qq.com

【通信作者】 徐霞,女,硕士,副主任护师,研究生导师,研究方向:中医护理和循证护理的研究。Email:540713843@qq.com

神经根型颈椎病 (cervical spondylotic radiculopathy, CSR) 是颈椎间盘退行性病变和小关节紊乱导致出现骨赘增生、韧带钙化等病理改变,可直接或间接刺激神经根,使受累神经根支配区出现颈肩部钝痛、放射痛或麻木等异常感觉,后期主要表现为上肢肌力减退、活动受限和功能改变等^[1-3]。颈椎病的发病率在我国高达 17.6%,其中 CSR 是最常见的类型,约占 60% ~ 70%^[4]。CSR 存在发病率高、治愈率低、复发率高、低龄化等问题,严重影响患者的生活质量并带来沉重的经济负担^[5]。鉴于此,了解 CSR 的病因及发病机制,探寻诊疗方法,对于预防和治疗 CSR 具有重要的临床意

义。疾病动物模型是研究人类疾病病理机理、疾病诊治、药物疗效和健康防护不可或缺的部分^[6],建立理想的动物模型需尽可能满足与人类疾病比较的“三性”特征,即发病机制同源性、行为表象一致性和药物治疗预见性^[7]。

目前文献报道的 CSR 动物模型各具特点,本文根据 CSR 的发病机制和动物模型制备特点,将现有 CSR 动物模型分析归纳为单纯压迫模型、联合刺激模型和无创性干预模型(见图 1),并将模型制备方法进行详尽描述,以期临床前研究选择适宜的动物模型和探索理想模型提供重要参考依据。

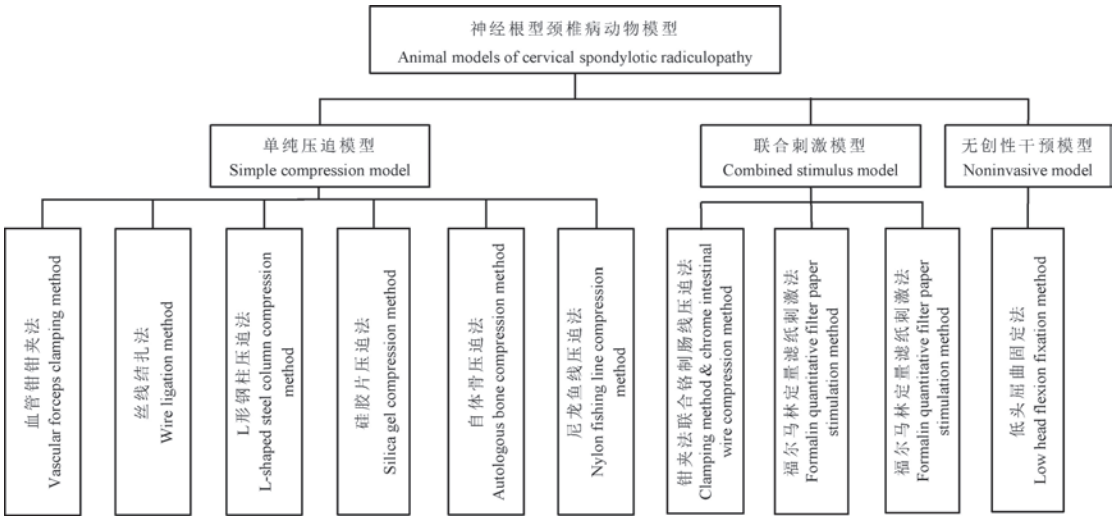


图 1 常见神经根型颈椎病动物模型的造模方法
Figure 1 Modeling methods of common animal models of CSR

1 单纯压迫模型

1.1 血管钳钳夹法

Hubbard 等^[8]研究描述了一种暂时性颈神经根压迫的大鼠模型,将大鼠俯卧位,从颅底至 T2 棘突处纵行切开皮肤,逐层分离肌肉和韧带以暴露右侧 C6-C7 椎板,切除其半椎板和部分小关节,暴露 C7 神经根,用微血管钳钳夹 15 min 后取出,研究结果显示,大鼠双侧前肢持续 7 d 出现痛觉超敏反应,脊髓胶质细胞激活增加可能与行为敏感性有关,并可能调节颈神经根性疼痛。为研究施加压迫的负荷和持续时间对大鼠的影响,Guarino 等^[9]通过给大鼠神经根施加不同的压力负荷(10 gf 和 60 gf)和压迫时间(3 min 和 10 min)进行实验,结果显示负荷曲线、机械性痛觉反应和星形胶质细胞激活均对压迫时间敏感,但对压迫的负荷不敏感,因此操作中对

压迫时间的掌控是影响造模成功与否的关键因素之一。CSR 的临床病理改变是一个慢性持续过程,这与此模型瞬时压迫所造成的损伤存在差异。综上该模型具有造模周期短、可重复性强、经济成本低等优势,国外有较多的文献报道中用血管钳钳夹法造模^[10-11]。

在国内的文献报道中也有相似的钳夹法造模,具体方法:选用雄性 Wistar 大鼠,暴露臂丛神经根,采用前端带有软塑料套的眼科显微止血钳各钳夹 C4-T1 神经根 1 次,扣紧 1 扣,持续约 30 s。梅荣军等^[12]采用此种方法从颈后、颈前锁骨上、颈前锁骨下三种不同的手术入路造模,根据造模过程中的难易程度和观察大鼠的成活率和形态改变,得出颈前锁骨下入路操作简单、用时短、损伤相对较小、科学合理,符合 CSR 实验研究需要。但该模型压迫臂丛神经根,这与临床 CSR 病变最常受累的是 C6-C7 神

经根存在差异,因此适用范围较小。

1.2 丝线结扎法

该模型参照 Dominguez 等^[13]制备腰椎神经受损动物模型而建立颈神经根持续压迫损伤模型,具体方法:在 SD 大鼠项部正中中线行纵行切口,分离软组织充分暴露右侧 C6-C7 椎骨,并钳除其半椎板,暴露 C7 神经根,然后用 6-0 丝线紧密结扎背根神经节远端的 C7 神经根,术后大鼠前爪出现退缩、舔舐或痉挛表现^[14]。由于颈椎比腰椎更接近大脑,施加相同损伤造成的影响有差异或者会引起更严重的反应,因此不能简单地将腰椎神经根受损的模型应用于颈椎^[15]。另外,人为结扎丝线存在松紧不一的问题,很难确保复制模型的损伤程度保持一致。

1.3 尼龙鱼线压迫法

尼龙鱼线压迫法是国内 CSR 保守治疗研究中常应用的一种模型^[16-18]。窦夏睿等^[19]将 Wistar 大鼠俯卧位,从 T2 向上沿项部正中中线做 3 cm 左右切口,逐层钝性分离组织和肌群至 C6-T2 左侧椎弓充分暴露,清除术野韧带组织,钳开 C7 左侧椎弓暴露脊髓,然后沿脊髓纵轴在 C7-T1 神经根腋下放置 1 根用酒精和多聚赖氨酸浸泡过的长 1.5 cm、直径 0.5 mm 尼龙鱼线。造模后大鼠感觉神经系统功能受到影响,出现痛觉过敏和诱发电位传导时间延长现象,病理检查显示胶质细胞激活增生、炎性物质释放导致雪旺细胞增生等异常状态。动物死亡率 1 周之内在 5% 以内,1 月之内在 20% 以内。该模型的优点在于操作简单、成模迅速、死亡率低、行为学异常改变突出等。用多聚赖氨酸浸泡过的尼龙鱼线增强对组织的粘附性,有效控制鱼线移位错位现象。但由于单根鱼线的卡压损伤较轻,而大鼠自我修复能力较快,因此只适用于 CSR 急性期。为克服该模型卡压较轻的局限性,谢炜等^[20]对此进行改良,以两根长 8 mm、直径 0.55 mm 的尼龙鱼线压迫神经根,两根鱼线部分重合一定程度加重损伤,这一方法值得推广应用。

1.4 L 形不锈钢柱压迫法

在实际生活中 97.5% 的 CSR 患者受到神经根性疼痛(cervical radiculopathic pain, CRP)的困扰,比运动功能障碍更常见,极难治疗^[21]。研究发现,神经根和背根神经节同时压迫才会导致 CRP^[22],而血管钳瞬时钳夹、鱼线压迫、丝线结扎等模型可能无法反映临床颈部背根神经节或神经根慢性压迫引起的 CRP 的病理过程^[23]。Liu 等^[24]描述一种稳定

机械压迫背根神经节的 CSR 模型,沿着 SD 大鼠的颈椎左侧切开皮肤,分离肌肉组织,清晰暴露左侧 C6-C7 椎骨和 C7-T1 椎间孔,用 L 形不锈钢柱(角度 60°,长 3 mm,直径 0.63 mm)插入 C6-C7 和 C7-T1 椎间孔内,以 90°角向背侧中线的头侧方向稳定压迫背根神经节。大鼠前爪表现出强烈的机械超敏反应、热痛觉过敏和自发痛行为,背根节的胞体释放大量的神经递质炎症因子,提示成功建立 CSR 动物模型。该模型的优势是反映临床颈部背根节或神经根慢性压迫所引起的 CRP 的病理生理过程。

1.5 硅胶片压迫法

椎间盘具有较大弹性和韧性的特点,具有缓冲震动作用,而用鱼线、丝线、钢柱等材料制作神经根压迫模型并不能完全模拟出颈椎间盘这一特性,因此有研究者将硅胶片应用于 CSR 模型制备,具体方法以大鼠的 C7 棘突为标志,沿项部正中中线向上行 4 cm 左右切口,切开皮下组织钝性分离各层肌肉,暴露左侧 C6 椎板,咬除其椎板和部分关节突,充分暴露神经根,将特制的硅胶片置于左侧 C6 神经根与硬膜囊交界处的位置,造成背根节神经压迫^[25-26]。通过光学显微镜、透射电镜、HRP(辣根过氧化物酶)标记、ELISA(酶联免疫吸附测定)法及 TUNEL(原位末端标记)法等观察结果发现神经根压迫损伤后出现一系列病理改变。该模型所用的硅胶片压迫物具有一定的弹性、韧性、组织相容性、免疫反应小且价格低廉等优点。

1.6 自体骨压迫法

实验动物模型制备应尽可能地模拟临床疾病的发生发展过程,而以上压迫模型用植入异物材料模拟自体组织压迫,产生混杂因素,存在一定局限性。若采用自体骨压迫,有效解决排异性,更接近临床病变特征。杨大志等^[27]建立一种自身骨性增生造成神经根慢性嵌压损伤的动物模型,其方法:选择家猫为造模对象,在下颈段做后正中纵行切口,分离皮下肌肉和韧带组织,显露右侧 C7 和 C8 神经根及其椎间孔内口,用牙髓钻破坏椎间孔周围骨皮质后,将咬除的棘突剪成 3 mm×10 mm 骨条并对折呈“V”形骨块,直视下从椎间孔内口向外,沿骨壁嵌于神经根通道内及侧隐窝后方。造模后影像学检测显示椎间孔均有不同程度狭窄,造成神经根管狭窄模型。观察发现家猫神经功能障碍有逐渐加重的现象,说明对神经根可产生持续性压迫作用,因此成功建立神经根慢性病理损伤模型。该模

型优势在于采用自体骨压迫模拟疾病渐进的病理改变过程,更接近于临床病变,但对手术的精细度要求较高,增加了操作的难度系数,更适用于像猫、狗等体型较大的实验动物,从经济性考虑成本较高。

2 联合刺激模型

2.1 钳夹法联合铬制羊肠线压迫法

该模型的制备方法是在 Hubbard 等^[8]微血管夹瞬时压迫的基础上改进,在暴露大鼠右侧 C7 神经根后,除了用微血管钳对其加压 15 min,还在神经根上额外放置 4 条 3-0 铬制羊肠线,模拟出微血管钳单纯机械压迫和铬制羊肠线化学刺激的双重作用。Rothman 等^[28]对大鼠 C7 神经根分别进行微血管钳压迫、铬制羊肠线刺激和两者联合干预,使用 GFAP (胶质纤维酸性蛋白) 和 OX-42 (小胶质细胞特异性标记物) 作为星形胶质细胞和小胶质细胞的标记物,通过免疫组织化学方法评估机械性异常疼痛,并检测脊髓组织中的胶质细胞反应性。结果显示,联合干预产生持续的双侧超敏反应、持续的同侧脊髓星形胶质细胞激活和迟发性双侧脊髓小胶质细胞激活。联合干预的效果不仅优于单一干预,且更加接近疾病发病机制。

2.2 福尔马林定量滤纸刺激法

炎症反应的介导在神经根症状的发生发展中具有重要的意义^[29],该模型通过物理化学双重刺激模拟 CSR 急性期的病理表现,明确反映颈神经根炎症因子的变化过程。具体方法为:以 SD 大鼠 T2 棘突为标志,以 C7 为中心,沿棘突纵行切开皮肤,分离皮下组织暴露 C6-C7 左侧椎板,逐渐剔除椎板至完全暴露 C6-C7 神经根,再将浸有福尔马林的定量滤纸片放至 C6-C7 神经根腋下。病理学观察到模型组大鼠与假手术组相比 SP (P 物质)、PGE₂ (前列腺素 E₂)、TXB₂ (血栓素 B₂) 和 6-酮-PGF1 α (6-酮前列腺素 F1 α) 的含量均具有显著性差异^[30]。该模型的特点是滤纸不易吸收,可进行持续的压迫,具有操作简单、造模周期短、可重复性强等优势。

2.3 药物介导联合动静失衡法

CSR 最常见的原因是颈椎骨性关节炎导致椎间孔变窄和椎间盘退行性改变^[31]。Butler 等^[32]认为关节突关节炎和椎间盘退变存在一定的相关性。基于此金哲峰等^[33]采用药物介导联合动静失衡法构建 CSR 动物模型。具体方法:在 SD 大鼠项部正中行 4 cm 纵行切口,依次切开皮肤及皮下组织,显

露两侧的关节突关节,先用输液泵以 4 μ L/min 的速度将配制好的胶原蛋白酶 (10 U/ μ L) 缓慢注入 C5-C6、C6-C7 关节突关节,用 34 号钝圆针头每个关节注入 5 μ L。然后切断颈背部深肌群颈夹肌和头、颈、寰最长肌,完全切除颈髂肋肌与头半棘肌,再依次切断 C2-C7 棘上和棘间韧带。大鼠行为学出现异常变化,术后 2 个月影像学显示椎间隙变窄、骨赘形成、椎间孔变小等椎间盘退变表现,神经根中可见大量炎性细胞浸润,神经传导速度明显慢于对照组。已有研究表明,胶原蛋白酶可使构成关节软骨的网状支架遭到破坏,加速骨性关节炎病程^[34],金哲峰等首先假设 II 型胶原蛋白酶注入颈椎关节突关节可出现类骨性关节炎变化。再通过破坏大鼠颈背部伸肌群使后肌力减弱,屈肌群力相应增强,动物保持屈颈状态,模拟出因长期低头工作而诱发的椎间盘退变。该模型是由关节突关节炎和椎间盘退变因素复加构建而成,操作不直接刺激神经根,动物成活率高,注射药物定量规范,可重复性强。

3 无创性干预模型

颈椎病的发生与颈椎长期处于异常应力环境有关,上班族长期伏案工作和低头族不良的电子设备使用习惯等导致颈椎生理曲度改变且长时间处于受力失衡状态^[35-36]。根据这一特征研究者建立低头屈曲固定法动物模型,将家兔置于特制的固定架上,颈椎处于低头屈曲 45°,每天 5 h,结束后笼中自由饲养,两个月完成造模^[37]。杨开洋等^[38]用此法造模后观察肌电图 F 波传导速度较正常家兔的传导速度明显减慢,提示造模成功。该模型是以颈部力学失衡和机械性压迫为病理基础建模,余家阔等^[39]应用家兔低头的姿势来改变其颈部的正常应力应变分布,观察对颈椎组织结构的影响,结果发现受应力应变的程度和作用时间不仅影响颈椎骨的形态学改变,而且使颈部软组织也发生相应改变。软组织的改变又使颈椎的应力应变异常而导致骨质增生,进而又刺激神经根等软组织,形成恶性循环。此模型避免了麻醉药物对动物的影响,具有操作技术简便和对动物损伤小等优势,但其病变的程度与干预的时间有关,相比直接刺激神经根的造模法,造模时间较长。

4 讨论

目前关于 CSR 发病机理有诸多不同的学说,认

同度较高的是机械压迫学说、化学性神经根炎学说和生物力学不稳学说。本文根据疾病的发病机制结合模型制备的方法流程,将现有 CSR 动物模型制备分为三类:单纯压迫模型、无创性干预模型和联合刺激模型。单纯压迫模型通过物理机械压迫使神经根受到压迫刺激,局部血管的渗透性增高和循环障碍,出现粘连、水肿、纤维化等病理改变^[40],导致动物出现神经根症状。无创性干预模型使颈伸肌群长期保持低头位而出现颈椎退行性改变,这与已证实的颈椎病好发因素长期低头工作相似^[41]。生物化学物质和神经肽类可直接激发疼痛和降低痛阈,在发生炎症时各种化学介质能诱使血管对蛋白质的通透性增加,组胺大量释放诱发根性疼痛^[42]。在联合刺激模型中利用物理方法结合化学方法直接刺激神经根亦或是药物联合动静失衡法间接刺激神经根,CSR 的发生发展是复杂多样的过程,采用多因素联合造模的方法,更贴合临床疾病的病理机制。其中福尔马林定量滤纸刺激法和钳夹联合铬制肠线压迫法都模拟物理压迫和化学刺激的双重影响,前者的机械压迫来源于定量滤纸对神经根产生压迫,而后者是微血管钳夹产生瞬时压迫,由于铬制羊肠线质量很小且极易被吸收,在与之接触时并没有产生直接的压迫,因此铬酸处理过的羊肠线只发挥化学刺激的作用,并且铬制羊肠线易被机体吸收,吸收后它所含的化学物质可使得大鼠产生与人类相似的炎性疼痛反应^[43]。相比于低头屈曲固定法借助外力使大鼠低头,药物介导联合动静失衡法中采用不可逆地过多破坏肌群的方法制备椎间盘退变模型对临床的指导意义较小,而自发性椎间盘退变模型与人类病理改变较为相似^[44],可借鉴创新。

CSR 实验动物模型在探讨疾病的病因或发病机制以及预防和改进治疗方法中发挥重要作用,尽管目前仍没有一种动物模型能完全呈现 CSR 的临床和病理特征,但可供选择的 CSR 模型种类较多且各具特点。研究者需结合实验设计,从模型制备的实用、技术、经济和周期等因素考量,选择适宜的动物模型。随着现代科学技术的发展,可将基因组学、蛋白质组学和转录组学等研究技术应用到模型的评价中增加模型的可信度^[45]。在未来的实验研究中,可借鉴前人模型研究的优势和劣势,应用新技术、新方法在原有的基础上改进或者进一步创新制作理想可行的 CSR 动物模型。

参 考 文 献 (References)

- [1] 刘迪, 郭辉, 于天源, 等. 于天源“四步六法”治疗神经根型颈椎病理论探析 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 901-904.
Liu D, Guo H, Yu TY, et al. Theoretical analysis of YU Tianyuan's 'four steps and six methods' in treating cervical spondylotic radiculopathy [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(2): 901-904.
- [2] Sheng SR, Wang K, Nisar M, et al. A novel technique for cervical facet joint hyperplasia-spondylotic radiculopathy by laminar and lateral mass screw cofixations [J]. World Neurosurg, 2018, 110: e490-e495.
- [3] Chen C, Dubin R, Kim MC. Emerging trends and new developments in regenerative medicine: a scientometric update (2000-2014) [J]. Expert Opin Biol Ther, 2014, 14(9): 1295-1317.
- [4] Chen B, Zhang C, Zhang RP, et al. Acupotomy versus acupuncture for cervical spondylotic radiculopathy: protocol of a systematic review and meta-analysis [J]. BMJ Open, 2019, 9(8): e029052.
- [5] 陈伟健, 陈泽华, 吴佳涛, 等. 新型肌肉定量评估仪评估神经根型颈椎病患者两侧肩胛肌肉的性能失衡 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(3): 430-434.
Chen WJ, Chen ZH, Wu JT, et al. Imbalance of mechanical properties about bilateral shoulder and neck muscle in patients with cervical spondylotic radiculopathy using MyotonPRO [J]. Chin J Tis Eng Res, 2022, 26(3): 430-434.
- [6] 王辉昊, 詹红生. 颈椎病中医实验动物模型的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6): 3335-3339.
Wang HH, Zhan HS. Research progress of animal models of cervical spondylosis in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2022, 37(6): 3335-3339.
- [7] 薛丽香, 张凤珠, 孙瑞娟, 等. 我国疾病动物模型的研究现状和展望 [J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(9): 851-861.
Xue LX, Zhang FZ, Sun RJ, et al. Research status and perspective of disease animal models in China [J]. Chin Sci: Life Sci, 2014, 44(9): 851-861.
- [8] Hubbard RD, Winkelstein BA. Transient cervical nerve root compression in the rat induces bilateral forepaw allodynia and spinal glial activation: mechanical factors in painful neck injuries [J]. Spine, 2005, 30(17): 1924-1932.
- [9] Guarino BB, Winkelstein BA. Transient nerve root compression load and duration differentially mediate behavioral sensitivity and associated spinal astrocyte activation and mGluR5 expression [J]. Neurosci, 2012, 209: 187-195.
- [10] Kartha S, Weisshaar CL, Philips BH, et al. Pre-treatment with meloxicam prevents the spinal inflammation and oxidative stress in DRG neurons that accompany painful cervical radiculopathy [J]. Neurosci, 2018, 15, 388: 393-404.
- [11] Quindlen-Hotek JC, Kartha S, Winkelstein BA. Immediate

- inhibition of spinal secretory phospholipase A2 prevents the pain and elevated spinal neuronal hyperexcitability and neuroimmune regulatory genes that develop with nerve root compression [J]. *Neuroreport*, 2020, 31(15): 1084–1089.
- [12] 梅荣军, 高新, 武亮, 等. 推拿治疗神经根型颈椎病的动物模型研究 [J]. *中医药信息*, 2007, 24(5): 58–59, 4.
- Mei RJ, Gao X, Wu L, et al. Research on animal models of cervical nerve root disease treated by massage [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2007, 24(5): 58–59, 4.
- [13] Dominguez E, Rivat C, Pommier B, et al. JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat [J]. *J Neurochem*, 2008, 107(1): 50–60.
- [14] Zheng N, Liu X, Zhang R, et al. Jingshu Keli attenuates cervical spinal nerve ligation-induced allodynia in rats through inhibition of spinal microglia and Stat3 activation [J]. *Spine J*, 2018, 18(11): 2112–2118.
- [15] Winkelstein BA, Rutkowski MD, Weinstein JN, et al. Quantification of neural tissue injury in a rat radiculopathy model: comparison of local deformation, behavioral outcomes, and spinal cytokine mRNA for two surgeons [J]. *J Neurosci Methods*, 2001, 111(1): 49–57.
- [16] 李宏龙, 马培. 毫刃针配合美式整脊治疗神经根型颈椎病临床观察 [J]. *临床研究*, 2022, 30(8): 132–135.
- Li HL, Ma P. Clinical observation of blade needle and American chiropractic in the cervicalspondylotic radiculopathy [J]. *Clin Res*, 2022, 30(8): 132–135.
- [17] 李强, 杜思邈, 李秋芬, 等. 芪麝丸对气虚血瘀神经根型颈椎病大鼠证型变化的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(4): 118–121.
- Li Q, Du SM, Li QF, et al. Effect of Qishe pill on syndrome changes of cervical spondylosis of nerve root type in rats with qi deficiency and blood stasis [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2013, 29(4): 118–121.
- [18] 林媛媛, 栗胜勇, 许铭杨, 等. 麦粒灸对神经根型颈椎病大鼠脊髓背角 Beclin-1/GRP78 表达的影响 [J]. *中国针灸*, 2022, 42(5): 533–539.
- Lin YY, Su SY, Xu YY, et al. Effect of wheat-grain moxibustion on the expression of Beclin-1/GRP78 in spinal dorsal horn in rats with cervical spondylotic radiculopathy [J]. *Chin Acupunct Moxibustion*, 2022, 42(5): 533–539.
- [19] 窦夏睿, 孙建宁, 王威, 等. 急性期神经根型颈椎病模型的建立 [J]. *北京中医药大学学报*, 2006, 29(5): 332–334, 343, 361.
- Dou XR, Sun JN, Wang W, et al. Establishment of model of acute cervical spondylotic radiculopathy [J]. *J Beijing Univ Chin Med Univ*, 2006, 29(5): 332–334, 343, 361.
- [20] 谢炜, 赵伟宏, 于林, 等. 川芎提取物对神经根型颈椎病模型大鼠根性疼痛的保护作用研究 [J]. *广东药学院学报*, 2008, 24(5): 496–499.
- Xie W, Zhao WH, Yu L, et al. Study on effects and mechanism of extract of *Rhizoma Chuanxiong* on radicular neuralgia in rats with cervical spondylotic radiculopathy [J]. *J Guangdong Coll Pharm*, 2008, 24(5): 496–499.
- [21] Schoenfeld AJ, George AA, Bader JO, et al. Incidence and epidemiology of cervical radiculopathy in the United States military: 2000 to 2009 [J]. *J Spinal Disord Tech*, 2012, 25(1): 17–22.
- [22] 孔微微. 小鼠 CCD 模型和颈椎神经根性病变模型建立及机制研究 [D]. 温州: 温州医学院; 2011.
- Kong WW. Animal models of low back pain and cervical radiculopathy: chronic compression of dorsal root ganglia in lumbar region in genetic mice and in cervical region in rats [D]. Wenzhou: Wenzhou Medical College; 2011.
- [23] Liu DL, Wang X, Chu WG, et al. Chronic cervical radiculopathic pain is associated with increased excitability and hyperpolarization-activated current (I_h) in large-diameter dorsal root ganglion neurons [J]. *Mol Pain*, 2017, 13: 1744806917707127.
- [24] Liu DL, Lu N, Han WJ, et al. Upregulation of I_h expressed in IB4-negative A δ nociceptive DRG neurons contributes to mechanical hypersensitivity associated with cervical radiculopathic pain [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16713.
- [25] Tang ZY, Shu B, Cui XJ, et al. Changes of cervical dorsal root ganglia induced by compression injury and decompression procedure: a novel rat model of cervical radiculoneuropathy [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(2): 289–295.
- [26] 唐占英, 周泉, 李晨光, 等. 大鼠颈神经背根节压迫性损伤模型的设计与建立 [A]. 第十六届全国中西医结合骨伤科学术研讨会论文汇编 [C]; 2008.
- Tang ZY, Zhou Q, Li CG, et al. Design and establishment of compression injury model of cervical nerve dorsal root ganglion in rats [A]. *Proceedings 16th National Symposium Integrated Medicine Orthopedics and Traumatology* [C]; 2008.
- [27] 杨大志, 王坤正, 陈君长, 等. 神经根慢性嵌压损伤的动物模型建立 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2004, 14(5): 34–38, 67.
- Yang DZ, Wang KZ, Chen JC, et al. The animal model of chronic compressive injury of spinal nerve roots [J]. *Chin J Spine Spinal Cord*, 2004, 14(5): 34–38, 67.
- [28] Rothman SM, Winkelstein BA. Chemical and mechanical nerve root insults induce differential behavioral sensitivity and glial activation that are enhanced in combination [J]. *Brain Res*, 2007, 1181: 30–43.
- [29] 卜寒梅, 王平, 杨光, 等. 神经根型颈椎病根性疼痛疗效评价方法研究进展 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41(3): 380–384.
- Bu HM, Wang P, Yang G, et al. Research progress on evaluation methods of curative effect of radicular pain in cervical spondylotic radiculopathy [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2021, 41(3): 380–384.
- [30] 张军, 孙树椿. 神经根型颈椎病(急性期)动物模型的建立 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2000, 8(1): 12–26.
- Zhang J, Sun SC. A acute stage model of the nerve root cervical

- spondylosis [J]. Chin J Tradit Medicinal Traumatol Orthop, 2000, 8(1): 12-26.
- [31] Nguyen C, Sanchez K, Roren A, et al. Anatomical specificities of the degenerated cervical spine; a narrative review of clinical implications, with special focus on targeted spinal injections [J]. Ann Phys Rehabil Med, 2016, 59(4): 276-281.
- [32] Butler D, Trafimow JH, Andersson GB, et al. Discs degenerate before facets [J]. Spine, 1990, 15(2): 111-113.
- [33] 金哲峰, 徐凡平, 朱立国, 等. 慢性神经根型颈椎病动物模型的建立 [J]. 天津中医药, 2015, 32(9): 558-562.
- Jin ZF, Xu FP, Zhu LG, et al. Establishment of chronic animal model of the nerve root cervical spondylosis [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2015, 32(9): 558-562.
- [34] Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits [J]. Osteoarthritis Cartilage, 1998, 6(3): 177-186.
- [35] 孙圆圆, 徐霞, 王亚洁, 等. 气血亏虚型神经根型颈椎病中医辨证施护疗效评价的 Meta 分析 [J]. 西部中医药, 2022, 35(5): 54-61.
- Sun YY, Xu X, Wang YJ, et al. Meta analysis of effects evaluation of TCM syndrome differentiation and nursing on cervical spondylotic radiculopathy of qi-blood deficiency pattern [J]. West J Tradit Chin Med, 2022, 35(5): 54-61.
- [36] 侯琳, 张若冰, 王詠. 颈肩推拿降低 II 型颈型颈椎病员工疼痛和抑郁水平 [J]. 基础医学与临床, 2018, 38(8): 1141-1144.
- Hou L, Zhang RB, Wang Y. Massage decreases pain and depression of employees with cervical spondylosis (type II) [J]. Basic Clin Med, 2018, 38(8): 1141-1144.
- [37] 应航, 陈立, 詹红生, 等. 实验性无创兔颈椎间盘退变模型的建立 [J]. 中国骨伤, 2004, 17(8): 466-470.
- Ying H, Chen L, Zhan HS, et al. Establishment of rabbits experimental model for cervical intervertebral disc degeneration [J]. Chin J Orthop Traumatol, 2004, 17(8): 466-470.
- [38] 杨开洋, 席莉, 刘智斌. 角度牵引对神经根型颈椎病家兔肌电图 F 波传导速度影响的实验研究 [J]. 陕西中医, 2012, 33(10): 1425-1427.
- Yang KY, Xi L, Liu ZB. Experimental study on the effect of angle traction on F wave conduction velocity of electromyography in rabbits with cervical spondylotic radiculopathy [J]. Shanxi J Tradit Chin Med, 2012, 33(10): 1425-1427.
- [39] 余家阔, 吴毅文, 汪发贵, 等. 实验性颈椎应力应变分布改变对颈椎组织结构的影响 [J]. 中华外科杂志, 1993, 31(8): 456-459.
- Yu JK, Wu YW, Wang FG, et al. Effect of experimental changes in stress and strain distribution of cervical spine on cervical tissue structure [J]. Chin J Surg, 1993, 31(8): 456-459.
- [40] Shedid D, Benzel EC. Cervical spondylosis anatomy: pathophysiology and biomechanics [J]. Neurosurgery, 2007, 60(1): S7-S13.
- [41] 王拥军, 施杞, 李家顺, 等. 大鼠退变颈椎间盘组织基因表达谱的研究 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(12): 1335-1338, 1393.
- Wang YJ, Shi Q, Li JS, et al. Gene expression pattern of cervical intervertebral disc degeneration in rats [J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2002, 23(12): 1335-1338, 1393.
- [42] Van Zundert J, Harney D, Joosten EAJ, et al. The role of the dorsal root ganglion in cervical radicular pain: diagnosis, pathophysiology, and rationale for treatment [J]. Reg Anesth Pain Med, 2006, 31(2): 152-167.
- [43] Maves TJ, Pechman PS, Gebhart GF, et al. Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. Pain, 1993, 54(1): 57-69.
- [44] 颜昊, 贾永伟, 翟伟峰. 椎间盘退变动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 387-392.
- Yan H, Jia YW, Zhai WF. Advances in animal models of intervertebral disc degeneration [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 387-392.
- [45] 李磊, 刘建勋, 任钧国, 等. 中医药动物模型研究现状及展望 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 104-110.
- Li L, Liu JX, Ren JG, et al. Research status and perspective of animal models in research and development traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 104-110.

[收稿日期] 2022-08-29

张晓因,吴敏,孙长鑫,等. 基于病证结合探讨动脉粥样硬化瘀毒证的模型构建与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 98-105.

Zhang XN, Wu M, Sun CX, et al. Construction and evaluation of a model of atherosclerotic blood-stasis and toxic syndrome based on a combination of disease and syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 98-105.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.012

基于病证结合探讨动脉粥样硬化瘀毒证的模型构建与评价

张晓因¹, 吴敏², 孙长鑫³, 陈纪烨¹, 李晓雅¹, 刘龙涛^{1*}

(1. 国家中医心血管病临床医学研究中心中国中医科学院西苑医院, 北京 100091;
2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 3. 北京中医药大学研究生院, 北京 100029)

【摘要】 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心脑血管疾病的共同病理基础,建立具有中医瘀毒证候特色的动脉粥样硬化动物模型及客观规范的评价体系是现代心脑血管疾病研究的重要内容,对中医药防治心脑血管疾病基础研发及药效机制评价具有重要意义。本文通过对动脉粥样硬化瘀毒证的动物模型构建及评价进行了多方面的总结和归纳,同时分析了当前模型构建及评价存在的问题,以期建立规范化的动物模型提供参考。

【关键词】 动脉粥样硬化;瘀毒证;动物模型;病证结合

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0098-08

Construction and evaluation of a model of atherosclerotic blood-stasis and toxic syndrome based on a combination of disease and syndrome

ZHANG Xiaonan¹, WU Min², SUN Changxin³, CHEN Jiye¹, LI Xiaoya¹, LIU Longtao^{1*}

(1. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, China Academy of Chinese Medical Sciences, Xiyuan Hospital, Beijing 100091, China. 2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Guang'anmen Hospital, Beijing 100053. 3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

Corresponding author: LIU Longtao. E-mail: liulongtao1976@126.com

【Abstract】 Atherosclerosis (AS) is a common pathological basis of cardiovascular and cerebrovascular diseases. Establishing an animal model of AS with the characteristics of blood-stasis toxin syndrome and a standardized evaluation system is an important part of modern cardiovascular and cerebrovascular disease research. This model and system are of great significance to research and development of traditional Chinese medicine for the prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases and the evaluation of drug efficacy mechanisms. This review summarizes and generalizes the construction and evaluation of animal models of atherosclerotic blood-stasis and toxic syndrome. The review

【基金项目】 国家自然科学基金(81973689, 82074254),北京市自然科学基金(7202176),首都卫生发展科研专项(2022-2-4172),国家中医药管理局青年岐黄学者支持项目。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81973689, 82074254), Beijing Natural Science Foundation(7202176), the Capital Health Development Research Project(2022-2-4172), the Supported Project of Young Qihuang Scholars of the State Administration of Traditional Chinese Medicine.

【作者简介】 张晓因(1993—),女,博士,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。Email: dr_zxn@foxmail.com

【通信作者】 刘龙涛(1976—),男,主任医师,博士研究生导师,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。

Email: liulongtao1976@126.com

further analyzes the problems existing with current model construction and evaluation to provide a reference for the establishment of standardized animal models.

[Keywords] atherosclerosis; blood-stasis and toxin syndrome; animal models; combination of disease and syndrome

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

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心脑血管疾病的共同病理基础,而易损斑块的炎性反应及血栓形成的病理过程与中医“毒”和“瘀”致病特点极其相似,表现为瘀毒蕴结致使血脉闭阻不通,甚或灼伤血脉,故瘀毒致变被认为是动脉粥样硬化斑块破裂引起急性心血管事件发生的重要病机^[1]。瘀毒证作为心脑血管疾病的一种常见中医证型,属中医学“内毒”范畴,由“瘀”和“毒”两种基本元素组成^[2]。自 20 世纪 60 年代以来,在陈可冀院士带领下对血瘀证进行了系统规范的研究,制定了血瘀证的理化指标诊断标准。随着研究的深入及“瘀毒致变”理论的提出,瘀毒证的相关诊断及量化标准也被创立^[3-4]。然而,在疾病不同的证候研究中,发现各证型间使用了相同的造模方式,对模型评价也缺乏客观规范,这忽视了证候的针对性,造成重病轻证、有病无证、病证分割等不足^[5],也很难客观评价中医证候的药效及作用机制。病证结合的模型构建及评价是完善中医药辨证诊治规范的难点与重点,也是中医药客观化、标准化研究的迫切需要,更是实现中医药国际化的关键。迄今,病证结合的模型构建及评价初步形成并日趋成熟,但动脉粥样硬化瘀毒证的相关研究仍相对匮乏。因此,本文旨在对动脉粥样硬化瘀毒证的科学内涵、模型构建及评价进行梳理,以期对临床诊断及客观评价提供参考。

1 动脉粥样硬化瘀毒证的科学内涵

1.1 传统医学对瘀毒证的认识

中医学典籍中有关瘀毒的记载较少,“瘀毒”、“毒瘀”之名并未明确提出,有关描述也多作为病因和病理产物记载。瘀毒病因学记载最早可追溯至东晋时期张湛《养生要集》(原书已佚),后《医心方》转引:“百病横生……触其禁忌成瘀毒,缓者积而成,急者交患暴至”,指出了瘀毒有缓积急发的致病特点^[2,6]。《验方新编·痧变癆瘵》云:“毒瘀心包络,更加凶险,不待时日”,同样描述了瘀毒作为致病因素的急骤性和凶险性^[7]。纵观古籍文献,历代医家对“瘀毒”论述可将其归属于中医学“内毒”范畴,即认为由瘀化生而来,蕴结日久化毒。正如

《金匱要略·心典》曰:“毒,邪气蕴结不解之谓”,故血瘀内停日久、脏腑功能失调,气血运行紊乱,则致毒邪内生。瘀可化毒,而毒亦可致瘀,如王清任在《医林改错》中言:“温毒在内烧炼其血,血受烧炼,其血必凝”,提出了因毒致瘀理论^[8]。又如《圣济总录》曰:“毒热内壅,则变生为瘀血”,表明了毒从火化,炼血成瘀的因果转化关系。由此可见,“瘀”、“毒”两者既可独立致病,又可相互搏结,互为因果,形成恶性循环,致使疾病胶结固化,缠绵难愈。

1.2 现代医学对动脉粥样硬化瘀毒证的认识

现代医家认为瘀毒是由多种致病因素相互作用,造成病因错综复杂、胶着难愈、病势酷烈、病情凶险的一类病邪,其既是致病因素,也是病理产物^[9]。动脉粥样硬化发生发展过程中,斑块炎性及血栓形成病理与中医“瘀毒”致病特点相似^[1]。陈可冀院士团队认为,血瘀日久易化热生毒,瘀毒互结致使血行不畅更甚,诱导血管内皮炎症反应,促炎因子释放增加,伴随脂质代谢及代谢产物异常^[10],导致动脉粥样硬化及其斑块进展,故提出“瘀毒致变”理论是动脉粥样硬化斑块破裂导致急性心血管事件发生的关键病机^[1,11]。此外,王永炎院士团队对“毒”概念也进行了界定,认为“毒”系脏腑功能和气血运行失常致使体内病理产物不能及时排出,蕴积日久,损伤血脉,从而引发炎症级联过程^[12]。在坚持宏观辨证与微观研究相结合的原则下,学者们发现血瘀证与高脂血症密切相关,且常伴有全血黏度、血浆黏度、血小板聚集性增强、血栓形成、微循环障碍及血液流变学异常等病理变化^[13-14],而炎症介质水平增高、血管活性物质过度释放及细胞死亡等变化与传统中医学的毒邪密切相关^[13]。因此,动脉粥样硬化瘀毒证可能是一组以脂质代谢紊乱、炎症、血流动力学障碍及血液流变学异常为主要临床表现的综合征。

2 动脉粥样硬化瘀毒证模型的构建方法

近年来,通过单因素或多因素复合造模手段已构建出症状、病因、病理及病证结合四种动物模

型^[15-17]。中医证候动物模型以糖皮质激素诱导的阳虚证动物模型为开端,现虽已拥有上百种证候动物模型^[18],但在模型构建方面仍有诸多不足。病因模拟符合中医致病特点,但在造模过程中仍难以建立统一规范性的标准;病理造模操作简单、重复性较强,利用客观指标评价较易获取符合西医病理变化,但中医对病证的认识并非局限某一组织或器官的病理改变^[19]。病证结合通过多因素复合方式可建立成熟、稳定、实用的动物模型,是中医药现代研究的核心内容,是探索病理生理变化与中医证候演变规律的基础,也是探索中医药起效机制的关键。基于此,本文分别对血瘀证、热毒证及动脉粥样硬化瘀毒证模型建立进行了阐述。

2.1 单因素构建血瘀证或热毒证模型

血瘀证往往可由多种原因造成,结合对证候的病因病机认识及辨证要点,分别通过模拟寒凝、气虚、气滞及热毒等病因对实验动物进行干预,可使其成功建立具有血瘀证表征的模型。例如,寒凝血瘀证模型可采用低温冰柜($-15 \sim 20^{\circ}\text{C}$ 条件下约 1 ~ 4 h,至大鼠出现寒战停止,持续 2 周)^[20-22],或冷水浸泡($0 \sim 1^{\circ}\text{C}$ 冰水中 20 min,持续 2 周)^[19-21];气虚血瘀证模型可采用强迫游泳(恒温水槽中游泳约 15 min,或大鼠游至动作不协调且沉入水中 10 s 以上不浮出,持续 2 周)^[21,23],或采用睡眠剥夺(随机安排昼光夜暗常相光照、昼暗夜光反相光照、昼夜持续光照及昼夜持续黑暗,4 个过程为 1 个阶段,每个阶段采用低电压刺激使大鼠保持清醒状态 48 h,每个阶段 7 d,持续 6 周)^[21,24];热毒血瘀证模型可采用注射内毒素(小鼠首次尾静脉注射脂多糖 3 mg/kg,20 h 后腹腔注射脂多糖 4 mg/kg,隔日 1 次,持续 6 周,大鼠先腹腔注射角叉菜胶 2.5 mL/kg,8 h 后尾静脉注射 1 mL/kg 的脂多糖)方法^[21]。“毒邪”包括外来毒邪和内生毒邪。从中医学角度分析,脂多糖内毒素和角叉菜胶作为外来之毒注射于机体后可产生内源性的炎性因子等有害物质,体现了中医热毒的基本性质,是目前较为常用的一种模拟中医“内毒”的造模剂^[25-26]。然而,针对不同疾病的证候模型,所需的“内毒”造模剂种类及剂量可能也具有一定的差异。既往研究显示,通过给大鼠腹腔注射角叉菜胶 50 mg/kg,16 h 后尾静脉注射脂多糖 5 $\mu\text{g/kg}$,同样成功复制出热毒致瘀的病理模型^[25]。尚有研究显示,角叉菜胶和干酵母单用或联合均可诱导体内炎症因子水平升高,大鼠通过腹腔

注射角叉菜胶 50 mg/kg,每日 1 次,连续 3 d,第 4 日皮下注射 0.1%干酵母悬液 10 mL/kg 后也可复制出热毒证模型^[27]。

2.2 复合因素构建动脉粥样硬化瘀毒证模型

目前,有关动脉粥样硬化瘀毒证的动物模型构建尚未见报道。复合因素模型构建是采用多种中医致病因素与西医病理相结合的途径诱导病症结合的动物模型^[28],更符合西医临床病理及中医证候的病因病机特点,在基础研究中占据主流地位。使用载脂蛋白 E 缺陷株(apolipoprotein E^{-/-}, ApoE^{-/-})小鼠,通过每天定时放入气候箱(温度(6 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 25% ~ 32.8%)11 h 并给予高脂饲料喂养 12 周后,可成功建立出动脉粥样硬化秽浊痰阻证动物模型^[29]。因此,动脉粥样硬化瘀毒证动物模型即可选用动脉粥样硬化模型+瘀毒证模型的方法进行制备。

既往研究显示,采用高脂、高糖、高热量及维生素 D₃ 等方式喂养实验动物可建立动脉粥样硬化模型^[30],例如 ApoE^{-/-}小鼠通过高脂饲料喂养 8 周^[31]、低密度脂蛋白受体缺陷株(low density lipoprotein receptor^{-/-}, LDL-R^{-/-})小鼠通过高脂饲料喂养 12 周^[32],Wistar 大鼠通过喂食高脂饲料并注射维生素 D₃(600 000 IU/kg)持续 12 周^[33]、SD 大鼠高脂饮食和维生素 D₃(600 000 IU/kg)喂养 17 周^[34]、广西巴马小型猪通过采用 CRISPR/Cas9 技术使载脂蛋白 E 基因缺失并给予高脂高胆固醇喂养 6 个月均可成功复制出动脉粥样硬化模型^[35]。尚有研究显示,角叉菜胶和脂多糖两种因素联合(大鼠腹腔注射角叉菜胶 50 mg/kg,16 h 后尾静脉注射脂多糖 5 $\mu\text{g/kg}$)诱导出的模型,与临床常见的热毒血瘀证表现极其相似,具有更明显的血栓和血瘀表现^[25]。研究显示,单用或复合使用肾上腺素、内毒素、角叉菜胶和干酵母菌均能够诱导体内炎症因子升高^[27]。进一步通过肾上腺素/内毒素(大鼠皮下注射 0.01%肾上腺素溶液 0.8 mg/kg,每日 1 次,连续 14 d,第 15 日大鼠尾静脉注射 50 $\mu\text{g/kg}$ 脂多糖溶液)、角叉菜胶(大鼠腹腔注射角叉菜胶 50 mg/kg,每日 1 次,连续 3 d)、角叉菜胶/干酵母菌(大鼠腹腔注射角叉菜胶 50 mg/kg,每日 1 次,连续 3 d,第 4 天背部皮下注射 0.1%干酵母悬液 10 mL/kg)3 组药物分别干预构建瘀毒互结模型,发现角叉菜胶和干酵母菌两种因素叠加,前者可用于致“血瘀”证,后者引起的炎症反应模拟热毒状态,能较好

地构建瘀毒互结证动物模型^[27,36]。此外,采用物理或化学单因素方式诱导的血瘀证模型联合注射内毒素,也是构建瘀毒证模型的重要手段,未来值得进一步深入研究以期建立完善的动脉粥样硬化瘀毒证动物模型。

3 动脉粥样硬化瘀毒证模型评价体系的建立

目前,国内外尚无公认的动脉粥样硬化瘀毒证模型,其原因与中医致病因素的非特异性密切相关,一种或两种因素外源性地强加在动物身上,动物自身的反应不同不一定能够得到理想的证候^[37]。模型评价是验证病证模型构建成功与否的关键,西医理化检测不能说明证候问题,实验动物自身又无法完成主观感受的描述,且中医外观表征评估具有主观性,很难得到国际学者认可^[19]。因此,我们需要通过结合外在的宏观表征和微观的理化指标结果评估模型的制备效果,以期建立规范的符合中医特色及西医病理的评价体系。

3.1 瘀毒证宏观表征评估

“有诸于内,必形诸于外”,证候的外在表征是模型评价的内容之一。中医动物宏观表征可通过“四诊”采集,即通过动物的精神状态、皮毛色泽、五官症状及分泌物、饮食饮水量、大小便情况、体长及体重变化、舌质颜色、体温(肛温)及心率等间接评估^[18]。有学者提出,利用中医实验动物证候表征采集系统,通过对动物症状、体征进行量化评分来辅助分析可判定证候构建的程度^[22]。瘀毒致病以发热、烦躁、骤发性疼痛、颜面口唇及指(趾)青紫或暗黑、肌肤甲错,病势急,病情凶险等为特点^[38-39]。如发现模型动物口唇、耳廓、四肢末梢及尾部皮肤颜色暗淡变紫,可说明动物体内已出现血流不畅、微循环障碍,“毒邪”致病来势凶猛,发病急骤,传变迅速,故短时间内上述症状明显加重,可说明模型符合瘀毒互结证的特点^[18,36]。

3.2 血脂和动脉粥样硬化病变检测

血脂异常是动脉粥样硬化病变早期的重要指标之一,它会导致内皮细胞功能障碍、通透性增加,加重胆固醇聚集和脂质沉积,促进动脉粥样硬化的发生和发展^[40-41]。现代医学也认为血脂与中医瘀毒密切相关,且已有研究将总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(high density

lipoprotein cholesterol, HDL-C)检测用于模型评价^[21,37]。此外,致动脉粥样硬化指数(atherogenic Index, AI)通过计算血脂比 $[(TC-HDL-C)/HDL-C]$,反映评价动脉粥样硬化发生的程度,是衡量动脉粥样硬化程度的一个可靠指标^[42-43]。病理形态学变化也是确定动脉粥样硬化模型是否成功的重要手段,可通过大体油红O染色、主动脉根部HE染色及油红O等染色定量测量计算斑块面积及脂质百分比^[31,44]。

3.3 炎症指标分析

《金匱要略》曰:“毒,邪气蕴结不解之谓”,由脏腑功能和气血运行失常致使体内病理产物蕴积日久,损伤血脉,从而引发炎症级联反应^[12]。从现代医学角度分析,瘀毒证中的“毒邪”类似于炎症因子。研究表明,在不同疾病的病理过程中,各种炎症因子的致病作用与瘀毒证之间具有密切的相关性,可见血管炎症因子大量释放,促进白细胞激活和黏附,进而诱导血栓的形成^[45]。白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-18、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、干扰素(interferon, IFN)- γ 及超敏C反应蛋白(high sensitive C-reactive protein, hs-CRP)等作为经典炎症因子,参与机体多项生理功能,是炎症的主要标志物^[46-47]。因此,IL-1 β 、IL-6、IL-18、hs-CRP、TNF- α 、IFN- γ 及中性粒细胞等指标常被用于评价炎症反应及相关程度^[17,45],其为评估瘀毒证模型提供参考依据。

3.4 血液指标检测

瘀毒损脉,阻遏气机,伤津耗液,导致血液流速和流量降低,并可造成全血黏度、血浆黏度增高,故血流动力学与血液流变学是反映机体血瘀证病理表现的重要指标^[48]。血液流变学检测包括全血比黏度(whole blood viscosity, WBV)、血浆比黏度(plasma viscosity, PV)、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)及血小板聚集性(platelet aggregation, PAG)等,反映了血液的黏滞性、浓稠性、聚集性和凝固性^[21,49-50]。其中,纤维蛋白原也是重要的凝血因子,既往研究表明血瘀证多伴随着血小板异常和凝血功能改变^[21]。因此,凝血四项可能是瘀毒证微观病理变化的重要参数^[21-22]。学者们发现全血黏度及血流阻力增加往往会导致微循环障碍^[19],通过检测血管形态、血管管径及毛细血管数等可进行评价^[37,50]。血管形态的改变也会导致血管舒缩功能

异常和血管内皮受损,血管活性因子包括内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)、血栓素 A₂ (thromboxane A₂, TXA₂)、血栓素 B₂ (thromboxane B₂, TXB₂)、血管紧张素 II (angiotensin II, AngII)、前列环素-2 (prostacyclin-2, PGI-2)、前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 及降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 也常被用于检测^[21]。

3.5 多组学联合分析

代谢组学、基因组学及蛋白质组学领域的研究为中医现代化发展提供了新契机,在“四诊”宏观表征评价的基础上,利用代谢组学对实验动物的血浆、尿液等进行分析,观察动物内源性标志物的代谢变化为判定模型成功与否提供了可靠依据^[18,51]。既往蛋白质组学研究发现,脂多糖致热毒血瘀证大鼠模型的血清在双向电泳胶上 13 个蛋白点发生显著的含量变化^[52],冠心病血瘀证患者的血清蛋白质学研究发现,同种型高分子量激肽原 1 (kininogen 1, KNG1) 的前体和过氧化物还原酶-1 (peroxidoreductase-1, PRDX1) 是“因瘀致毒”病机转变的重要蛋白^[53]。代谢组学研究发现,心血瘀证大鼠模型至少有 19 个代谢物明显异常,涉及氨基酸代谢、脂类代谢和嘌呤代谢等通路^[54];热毒证大鼠的能量代谢相关酶也发生显著变化,涉及糖酵解蛋白酶、三羧酸循环蛋白酶和氨基酸代谢相关酶等^[55]。组学前期进行盲选所需样本量大且技术要求较高,有关动脉粥样硬化瘀毒证的组学标志物可在上述结果中进一步深入研究和验证以挖掘潜在的标志物。

4 动脉粥样硬化瘀毒证模型的构建与展望

动脉粥样硬化瘀毒证是两种不同医学模式下对同一现象的不同认识,随着中医药防治动脉粥样硬化的现代化研究与深入,符合中医临床瘀毒特色的动脉粥样硬化动物模型亟待构建与完善。病证结合模型以中医病因病机理论为指导,西医病理改变为基础,采用多因素复合造模手段将病与证结合于同一动物模型,符合临床先诊病后辨证的实际,且模型稳定性和可靠性较高,是构建动脉粥样硬化瘀毒证模型的重要策略。结合现代研究,动脉粥样硬化瘀毒证模型构建可以在较为成熟稳定的动脉粥样硬化模型基础上,施加瘀毒证干预因素,即通过采用高脂饲料喂养,联合角叉菜胶和脂多糖或干

酵母菌进行诱导,也可以通过诱导血瘀证模型的物理或化学方法联合注射内毒素进行构建。然而,动物品系体质差异、耐受及反应程度不同,针对不同体系、不同周龄的动物建立动脉粥样硬化瘀毒证模型,未来仍有必要进行更为细致深入的研究。

在中医药现代化医学模式下,多因素复合构建的病证结合动物模型融合了西医的发病机制和中医致病因素,现有的疾病模型和中医证候表现具有独特性。模型评价既往多依据西医病理改变为主,且目前缺乏统一规范的病证结合动物模型评价标准,附加因素是否改变了模型的原有病理基础,中医“证”的动态性及阶段性特征是否稳定,以及模型的可靠性和可重复性是否会降低,值得对动脉粥样硬化瘀毒证的生物学基础及动物模型进行系统研究和评估。结合当前研究现状,瘀毒证的宏观评价指标、血脂、致动脉粥样硬化指数、病理形态学、炎症相关因子、血流动力学、血液流变学、血管内皮功能及组学等指标可能是动脉粥样硬化瘀毒证的重要生化基础,可作为模型构建成功与否的内在参考依据。然而,如何对瘀毒证动物模型的宏观表征参数进行量化,实现四诊指标的规范化、客观化及标准化仍是我们今后所需共同努力解决的难点。总之,建立客观、规范的动脉粥样硬化瘀毒证动物模型及评价体系是中医药防治心脑血管疾病研究的重点,可突显中医药特色解决方案及助力中医药走向国际化。

参 考 文 献 (References)

- [1] 张京春, 陈可冀. 瘀毒病机与动脉粥样硬化易损斑块相关的理论思考 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(4): 366-368.
Zhang JC, Chen KJ. Theoretical thinking on relationship between toxic-stasis pathogenicity and atherosclerotic vulnerable plaque [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2008, 28(4): 366-368.
- [2] 钟霞, 焦华琛, 李运伦, 等. 瘀毒概念探微 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2377-2380.
Zhong X, Jiao HC, Li YL, et al. Exploration on the concept on stasis toxin [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(6): 2377-2380.
- [3] 徐浩. 血瘀证与活血化瘀研究热点与展望 [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(6): 660-663.
Xu H. Research hotspot and prospect of blood stasis syndrome and activating blood and removing stasis [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2022, 42(6): 660-663.
- [4] 陈可冀, 史大卓, 徐浩, 等. 冠心病稳定期因毒致病的辨证诊断量化标准 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(3): 313-314.

- Chen KJ, Shi DZ, Xu H, et al. The criterion of syndrome differentiation and quantification for stable coronary heart disease caused by etiological toxin of Chinese medicine [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2011, 31(3): 313-314.
- [5] 杨清瑞, 胡泽玉, 杜晓泉, 等. 腹泻型肠易激综合征中医病证结合动物模型研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(12): 1981-1984.
- Yang QR, Hu ZY, Du XQ, et al. Review on disease and traditional Chinese medicine syndrome combined with animal model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. J Basic Chin Med, 2021, 27(12): 1981-1984.
- [6] 张海洋, 姚璠, 施维敏, 等. 基于“瘀毒”与血脂异常相关病症的关系探讨慢性疾病转归: 治未病理论的提出与思考 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(7): 65-68.
- Zhang HY, Yao F, Shi WM, et al. Discussion on outcome of chronic diseases based on relationship between “blood stasis and toxin” and dyslipidemia: proposal and thinking of preventive treatment of disease [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2021, 39(7): 65-68.
- [7] 薛丹, 张裕惠, 揭晓, 等. 从“瘀毒郁互结”探讨急性心脑血管事件伴抑郁的病因病机 [J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(3): 313-319.
- Xue D, Zhang YH, Jie X, et al. Discussion on etiology and pathogenesis of acute cardio-cerebrovascular events with depression based on “the combination of stasis-toxin-stagnation” [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2022, 45(3): 313-319.
- [8] 揭晓, 薛丹, 张海航, 等. 从“因郁致病”和“因病致郁”探讨冠心病的发病与治疗 [J]. 中医杂志, 2021, 62(23): 2102-2105.
- Jie X, Xue D, Zhang HH, et al. The pathogenesis and treatment of coronary heart disease from the theories of “disease caused by constraint” and “constraint caused by disease” [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 62(23): 2102-2105.
- [9] 李圣耀, 冒慧敏, 薛梅, 等. 刍议瘀毒内涵及其在冠心病事件发生中的意义 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(9): 1126-1128.
- Li SY, Mao HM, Xue M, et al. Blood-stasis and toxin: connotation and significance in acute cardiovascular events [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2017, 37(9): 1126-1128.
- [10] 王安璐, 徐浩, 陈可冀. 从肠道菌群及其代谢物探讨冠心病瘀毒理论 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(4): 490-492.
- Wang AL, Xu H, Chen KJ. Exploration on theory of stasis toxic in coronary heart disease from gut microbiota and its metabolites [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2020, 40(4): 490-492.
- [11] 徐浩, 曲丹, 郑峰, 等. 冠心病稳定期“瘀毒”临床表征的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(2): 125-129.
- Xu H, Qu D, Zheng F, et al. Clinical manifestations of “blood-stasis and toxin” in patients with stable coronary heart disease [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2010, 30(2): 125-129.
- [12] 李澎涛, 王永炎. 毒损络脉病机的理论内涵及其应用 [J]. 中医杂志, 2011, 52(23): 1981-1984.
- Li PT, Wang YY. Theoretical connotation and application of pathogenesis of toxic damage to collaterals [J]. J Tradit Chin Med, 2011, 52(23): 1981-1984.
- [13] 柳金英, 张惠敏, 田蕾, 等. “瘀毒”致心力衰竭心肌纤维化理论依据初探 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(9): 4027-4030.
- Liu JY, Zhang HM, Tian L, et al. Theoretical research on ‘stasis-toxin’ in myocardial fibrosis of heart failure [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(9): 4027-4030.
- [14] 周子严, 薛晓琳, 李鑫, 等. 从痰瘀论治血脂异常的文献研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1485-1488.
- Zhou ZY, Xue XL, Li X, et al. Literature study on dyslipidemia based on phlegm and blood stasis [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(4): 1485-1488.
- [15] 钟森杰, 李琳, 胡思远, 等. 中医病因型证候模型建立的思考 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(2): 310-314.
- Zhong SJ, Li L, Hu SY, et al. Thoughts on establishment of etiological syndrome model in Chinese medicine [J]. J Basic Chin Med, 2022, 28(2): 310-314.
- [16] 钟森杰, 李静, 李琳, 等. 证候动物模型的构建思路与评价方法述评 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 712-714.
- Zhong SJ, Li J, Li L, et al. A review on the construction idea and evaluation method for syndrome animal models [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(3): 712-714.
- [17] 章晓云, 顾兵, 陈玉年, 等. 关于痛风性关节炎病证结合动物模型的思考 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(11): 1490-1496.
- Zhang XY, Gu B, Chen YN, et al. Reflections on animal model integrated with disease and syndrome for gouty arthritis [J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(11): 1490-1496.
- [18] 任珍, 彭孟凡, 苗明三. 中医药动物模型评价方法的现状与思考 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 219-222.
- Ren Z, Peng MF, Miao MS. The Current situation and consideration of animal model evaluation methods in traditional Chinese medicine [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(4): 219-222.
- [19] 廖利, 赵兴桃, 王成, 等. 血瘀证模型研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(12): 7256-7260.
- Liao L, Zhao XT, Wang C, et al. Research progress of blood stasis syndrome model [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(12): 7256-7260.
- [20] 段练, 刘咏梅, 王阶. 血瘀证中医证候模型的现状与展望 [J]. 中医杂志, 2017, 58(4): 346-350, 353.
- Duan L, Liu YM, Wang J. Present situation and prospect of TCM syndrome model of blood stasis syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2017, 58(4): 346-350, 353.
- [21] 刘校彤, 吕光华, 王巧稚, 等. 血瘀证动物模型制备的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 371-380.
- Liu XT, Lyu GH, Wang QZ, et al. Research progress of blood stasis syndrome animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 371-380.
- [22] 宋晓丹, 成秀梅, 周湘, 等. 寒凝血瘀证动物模型研究现状

- [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 267-274.
- Song XD, Cheng XM, Zhou X, et al. Animal model of cold congeal and blood stasis syndrome: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(15): 267-274.
- [23] 罗慧, 焦文超, 王青, 等. 气虚血瘀型缺血性脑卒中动物模型建立与评价方法浅析 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 6375-6377.
- Luo H, Jiao WC, Wang Q, et al. Establishment and evaluation of ischemic stroke animal model with Qi deficiency and blood stasis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(12): 6375-6377.
- [24] 任建勋, 林成仁, 刘建勋, 等. 多因素复合刺激诱导建立大鼠气虚血瘀证动物模型的探索性研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(1): 72-76.
- Ren JX, Lin CR, Liu JX, et al. Experimental study on Qi deficiency and blood stasis induced by Multi-factor stimulation in rats [J]. China J Chin Mater Med, 2011, 36(1): 72-76.
- [25] 黎同明, 邓敏贞. 脉络宁注射液对脂多糖与角叉菜胶诱导热毒血瘀证模型大鼠的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 223-226.
- Li TM, Deng MZ. Effect of mailuoning injection on noxious heat stasis syndrome rat model induced by lipopolysaccharide in combination with carrageenan [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2013, 19(6): 223-226.
- [26] 王凤丽, 刘雪梅, 张允岭, 等. 缺血性脑卒中火毒证病证结合动物模型的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(6): 377-381.
- Wang FL, Liu XM, Zhang YL, et al. Establishment of disease-syndrome combination animal model of ischemia stroke-heat toxin syndrome [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2014, 37(6): 377-381.
- [27] 蒋成婷, 葛金文, 聂慧芳, 等. 缺血性中风瘀毒互结证病证结合动物模型研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(9): 69-74.
- Jiang CT, Ge JW, Nie HF, et al. Study on disease-syndrome combination animal model of ischemic stroke stasis toxin syndrome [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2020, 27(9): 69-74.
- [28] 王云姣, 张婉勤, 张军平, 等. 心气虚血瘀证动物模型的构建与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 405-412.
- Wang YJ, Zhang WQ, Zhang JP, et al. Construction and evaluation of an animal model of heart qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 405-412.
- [29] 古丽加玛力·尼亚孜, 安冬青, 李梅. 动脉粥样硬化秽浊痰阻证动物模型的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 265-269.
- Gulijiamali NYZ, An DQ, Li M. Study on establishing animal model of Huizhuo tanzu type atherosclerosis [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2013, 19(13): 265-269.
- [30] 林丰夏, 李亮, 曾志聪, 等. 动脉粥样硬化动物模型研究进展与中医病证结合的造模思路探析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(21): 3338-3342.
- Lin FX, Li L, Zeng ZC, et al. Research progress of atherosclerosis animal model and analysis of modeling thinking of combining disease and syndrome of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2019, 17(21): 3338-3342.
- [31] 彭立, 沈佳成, 王亚东, 等. 芪参益气滴丸对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化中调节性 T 细胞的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 907-910.
- Peng L, Shen JC, Wang YD, et al. Effects of Qishen Yiqi Dripping Pills on regulatory T cells in ApoE gene knockout mice with atherosclerosis [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(3): 907-910.
- [32] Zhai KF, Duan H, Shi Y, et al. miRNAs from plasma extracellular vesicles are signatory noninvasive prognostic biomarkers against atherosclerosis in LDLr^{-/-} Mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 6887192.
- [33] Zhang J, Liang R, Wang L, et al. Effects of an aqueous extract of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N. E. Br. fruit on experimental atherosclerosis in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(2): 563-569.
- [34] Geng P, Xu X, Gao Z. Sinomenine suppress the vitamin D3 and high fat induced atherosclerosis in rats via suppress of oxidative stress and inflammation [J]. J Oleo Sci, 2021, 70(12): 1815-1828.
- [35] Fang B, Ren X, Wang Y, et al. Apolipoprotein E deficiency accelerates atherosclerosis development in miniature pigs [J]. Dis Model Mech, 2018, 11(10): dmm036632.
- [36] 彭珣, 李定祥, 马若梦, 等. 化瘀解毒方对缺血性中风瘀毒互结证模型大鼠脑细胞自噬及脑屏障通透性的影响 [J]. 中医杂志, 2022, 63(9): 862-868.
- Peng X, Li DX, Ma RM, et al. Effects of Huayu Jiedu formula on brain cell autophagy and blood brain barrier permeability in ischemic stroke model rats with binding of stasis and toxin syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(9): 862-868.
- [37] 刘楠, 姜云耀, 李莹, 等. 气滞血瘀证动物模型研究现状 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 217-226.
- Liu N, Jiang YY, Li Y, et al. Current status of animal model research of qi stagnation and blood stasis syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(1): 217-226.
- [38] 刘龙涛, 史大卓, 陈可冀. 心血管血栓性疾病“瘀毒”致病临床表征初探 [J]. 世界中医药, 2012, 7(2): 152-154.
- Liu LT, Shi DZ, Chen KJ. Preliminary study on clinical manifestations of blood stasis and toxin in cardiovascular diseases [J]. World Chin Med, 2012, 7(2): 152-154.
- [39] 中国中西医结合学会活血化瘀专业委员会, 陈可冀, 徐浩, 等. 实用血瘀证诊断标准 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(10): 1163.
- Professional Committee of Activating Blood and Removing Stasis of Chinese Association of Integrative Medicine, Chen KJ, Xu H, et al. Practical diagnostic criteria of blood stasis syndrome [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2016, 36(10): 1163.

- [40] Li J, Yang Y, Jiao X, et al. The clinical role of angiopoietin-like protein 3 in evaluating coronary artery disease in patients with obstructive sleep apnea [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34(6): 773-780.
- [41] Shi X, Xie X, Sun Y, et al. Paeonol inhibits NLRP3 mediated inflammation in rat endothelial cells by elevating hyperlipidemic rats plasma exosomal miRNA-223 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 885: 173473.
- [42] 赵玲, 魏海峰, 张丽, 等. 中医痰浊血瘀证候的生物学基础研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(8): 680-683.
Zhao L, Wei HF, Zhang L, et al. Study on biological basis of phlegm and blood stasis syndromes in TCM [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2008, 23(8): 680-683.
- [43] 黄伦, 任泽萍, 赵俊康, 等. 应用因子分析和降秩回归评估膳食模式与血脂异常的关系 [J]. *现代预防医学*, 2021, 48(24): 4442-4446.
Huang L, Ren ZP, Zhao JK, et al. Evaluating relationship between dietary pattern and dyslipidemia using factor analysis and reduced rank regression [J]. *Mod Prev Med*, 2021, 48(24): 4442-4446.
- [44] 方岩, 张唯薇, 蒋梦婷, 等. 达格列净改善糖尿病动脉粥样硬化模型小鼠斑块的作用机制 [J]. *解放军医学院学报*, 2022, 43(2): 186-192, 198.
Fang Y, Zhang WW, Jiang MT, et al. Mechanism of dapagliflozin alleviating plaque in diabetic atherosclerotic model mice [J]. *Acad J Chin PLA Med Sch*, 2022, 43(2): 186-192, 198.
- [45] 杨威, 张学进, 郭勇. 热毒血瘀证与炎症相关性研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(10): 2168-2171.
Yang W, Zhang XJ, Guo Y. Research progress of correlation between toxic-heat-blood-stasis syndrome and inflammation [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2010, 28(10): 2168-2171.
- [46] 吴昆, 张君林, 汤琼, 等. 肠道菌群失调与原发肾小球疾病患者炎症反应及体液免疫的相关性 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(2): 220-223, 228.
Wu J, Zhang JL, Tang Q, et al. Study on the relationship between inflammatory reaction, humoral immunity and intestinal flora imbalance in patients with primary glomerular disease [J]. *J Pathog Biol*, 2022, 17(2): 220-223, 228.
- [47] 李思铭, 李金根, 徐浩. 从抑制炎症反应看中医药干预冠心病的新视角 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(4): 486-490.
Li SM, Li JG, Xu H. A new perspective of traditional Chinese medicine intervention in coronary heart disease from inhibiting inflammatory response [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2019, 39(4): 486-490.
- [48] 吕琴, 赵文晓, 王世军, 等. 黄芪活血功效及现代药理学研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(9): 215-224.
Lyu Q, Zhao WX, Wang SJ, et al. Effect of astragali *Radix membranaceus* in promoting blood circulation and its modern pharmacology research [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2020, 26(9): 215-224.
- [49] 陈可冀, 马晓昌. 关于传统血瘀证的现代分类 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2000, 20(7): 487.
Chen KJ, Ma XC. Modern classification of traditional blood stasis syndrome [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2000, 20(7): 487.
- [50] 姜晓西, 王凤, 张会永, 等. 气虚血瘀证动物模型研究现状 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(11): 68-74.
Jiang XX, Wang F, Zhang HY, et al. Research status of animal models of qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2021, 23(11): 68-74.
- [51] 陈德轩, 蔡红蝶, 宿树兰, 等. 中医病证相符的大鼠疮疡模型的建立及其血浆、尿液代谢组学研究 [J]. *中医药学报*, 2019, 47(1): 17-22.
Chen DX, Cai HD, Su SL, et al. Establishment of pyocutaneous model consistent with TCM syndrome in rats and its effect on plasma and urine metabolomics [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2019, 47(1): 17-22.
- [52] 谢文光, 马晓昌, 邵宁生, 等. 赤芍治疗热毒血瘀证的血清蛋白质组变化的初步研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2005, 25(6): 520-524.
Xie WG, Ma XC, Shao NS, et al. Preliminary study on change of serum proteome in noxious heat blood stasis syndrome treated by *Radix paeoniae Rubra* [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2005, 25(6): 520-524.
- [53] 尚青华, 徐浩, 史大卓, 等. 冠心病血瘀证“瘀毒”病机转变的蛋白质组学研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(22): 3825-3829.
Shang QH, Xu H, Shi DZ, et al. Proteomic study on pathogenesis of “blood-stasis and toxin” in patients with coronary heart disease and blood stasis syndrome [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2021, 19(22): 3825-3829.
- [54] 周曼丽, 钱舒乐, 胡伊蕾, 等. 冠心病心血瘀阻证大鼠心肌代谢组学研究 [J]. *中医杂志*, 2022, 63(10): 968-975.
Zhou ML, Qian SL, Hu YL, et al. Myocardial metabolomics in rats with coronary heart disease and blood stasis obstruction syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 63(10): 968-975.
- [55] 王凤丽, 刘雪梅, 傅晨, 等. 蛋白质组学技术分析缺血性脑卒中火毒证大鼠脑能量代谢相关蛋白 [J]. *北京中医药*, 2017, 36(7): 584-588.
Wang FL, Liu XM, Fu C, et al. Proteomic analysis of cerebral energy metabolism-related proteins of rats with cerebral ischemic stroke of heat-toxin syndrome [J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2017, 36(7): 584-588.

纪依澜,赵德明,王菲,等. 模拟失重实验动物模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 106-111.

Ji YL, Zhao DM, Wang F, et al. Establishment and evaluation of experimental animal models simulating weightlessness [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 106-111.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.013

模拟失重实验动物模型的建立与评价

纪依澜¹,赵德明¹,王菲²,阚广捍²,吴斌²,杨利峰^{1*}

(1. 中国农业大学,动物医学院,北京 100193;2. 中国航天员科研训练中心,北京 100094)

【摘要】 随着航天技术不断发展,航天员太空飞行的时长不断增加。研究发现,航天失重环境可能会使航天员的生理和心理发生一定变化,对航天员的身体健康产生一些影响。为探究这些影响的机制并找出合理的对抗措施,使用实验动物建立模拟失重模型进行深入研究至关重要,选择与人体组织器官、生理机能和习性相似的实验动物建立模拟失重模型,能更好地帮助相关研究。失重模型应参照能否模拟出由于失重引起心血管骨骼、肌肉等主要系统的变化,来评估模拟失重模型是否成功建立。本文对现有的地面模拟失重动物模型建立和相关研究情况进行了概述,以期开展相关研究工作提供参考借鉴。

【关键词】 模拟失重;动物模型;评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0106-06

Establishment and evaluation of experimental animal models simulating weightlessness

Ji Yilan¹, ZHAO Deming¹, WANG Fei², KAN Guanghan², WU Bin², YANG Lifeng^{1*}

(1. China Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Beijing 100193, China. 2. China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094)

Corresponding author: YANG Lifeng. E-mail: yanglf@cau.edu.cn

【Abstract】 Since the first space flights, the number of hours astronauts spend flying in space has increased. Studies have found that the weightlessness of space causes physiological and psychological changes in astronauts that influence their physical health. To explore the mechanisms of these effects and to identify reasonable countermeasures, it is essential to establish effective experimental animal models for simulating weightlessness and conduct in-depth studies. A successful weightlessness simulation model should mimic the changes that occur to major systems in humans, such as cardiovascular, bone, and muscle, due to weightlessness. This paper provides an overview of the existing ground-based weightlessness simulation models and related research to provide a rational strategy for the evaluation of weightlessness simulation models.

【Keywords】 simulated weightlessness; animal model; evaluation

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

航天员在航天飞行时,身体多个系统结构和功能可能会发生变化,如血液头向转移、心血管系统

及骨骼肌肉发生的适应性变化等等。这些变化给航天员在航天飞行过程中甚至返回地面后的身体、

【基金项目】十四五国家重点研发计划(2021YFF0702402),航天医学基础与应用国家重点实验室基金(SMFA22B05),后勤科研项目基金(BZZ21C001)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China (2021YFF0702402), State Key Laboratory of Space Medicine Fundamentals and Application(SMFA22B05), Logistics Research Project(BZZ21C001).

【作者简介】纪依澜(1997—),女,硕士研究生,研究方向:传染性海绵状脑病和兽医病理学。Email:sy20213050891@cau.edu.cn

【通信作者】杨利峰(1980—),女,教授,博士生导师,研究方向:基础兽医学。Email: yanglf@cau.edu.cn

心理健康状况可能带来一些影响,针对这些影响的机制进行深入研究以期探索出相应的对抗、治疗措施对航天医学发展至关重要。虽然地面模拟失重只能模拟出航天失重环境给动物带来的部分影响,但地面模拟失重研究与实际航天飞行相比较容易开展。不同实验动物的解剖结构、生活习性等各不相同,使用其建立模拟失重模型的方法也各不相同,模拟失重给动物机体带来的影响程度也不完全一致,故本文就现有主要的模拟失重模型建立方法及使用地面模拟失重实验进行后续研究的相关文章进行综述,以期模拟失重模型提供一定的评价标准。

1 模拟失重动物模型的建立

为研究航天失重环境给航天员心血管系统、骨骼和肌肉等带来的影响,各种模拟失重模型用于研究多个系统生理变化、具体机制以及对抗措施。目前模拟失重模型常用的动物包括大鼠、小鼠和豚鼠等啮齿类动物;兔子、犬、猕猴和恒河猴等中体型动物。常用的造模方式包括尾部悬吊、后肢去负荷和头低位卧床等。

1.1 啮齿类动物模拟失重模型

模拟失重模型使用的啮齿类动物主要包括大鼠、小鼠和豚鼠等。大鼠和小鼠是地面模拟失重模型中最常用的实验动物。大鼠-30°尾部悬吊法是国际公认、应用最为广泛的模拟失重的方法,能基本模拟失重条件下心血管、骨骼和肌肉等组织的变化^[1]。付子豪等^[2]改良了经典的大鼠尾部悬吊方法,在尾套内使用聚乙烯发泡棉隔层,缓解悬吊装置对尾部的挤压,保障远端血液循环、减少应激等引起的影响。

1.2 兔模拟失重模型

除了使用大鼠和小鼠建立模拟失重模型,兔-20°头低位限动也是一种常用的地面模拟失重模型^[3]。孙喜庆等^[4]使用兔子以-20°头低位倾斜的方法模拟失重,研究了间断性头高位对失重后动物血管结构的影响。沈湊云等^[5]使用兔头低位-20°倾斜的方法模拟失重,对失重对血液系统的影响进行研究。

1.3 犬模拟失重模型

在身体构造、组织器官的尺寸和生理习性上,犬与人类较相近,且犬类的皮质骨具有与人相似的哈弗氏系统,故实验犬也是用作模拟失重模型的选择之一,但目前相关文献较为罕见。刘书林等^[6]根据犬类的特殊习性和生理结构设计特制背心,分别以-6°和-12°悬吊实验犬,发现-12°后肢去负荷显著影响犬的骨骼及肌肉代谢,变化趋势与其他模拟失重模型的结果一致,成功建立比格犬模拟失重模型。

1.4 猴模拟失重模型

灵长目动物在进化过程、组织器官结构、生活习性和生理机能等方面与人类相似,作为实验动物被广泛应用于航天飞行、神经科学、生命科学等多方面研究中。头低位卧床为猴模拟失重模型最常用的方式,常用的头低位角度为-10°,研究表明该角度头低位卧床模拟失重能够使恒河猴腰椎发生骨质疏松变化,血清中 TRAP 含量显著上升等,与失重引起的机体变化趋势基本一致^[7]。

1.5 小型猪模拟失重模型

小型猪在解剖学、心血管系统、骨骼系统及神经系统与人体较为接近,是理想的医学研究实验动物,近年来在心血管疾病、神经退行性疾病等领域中应用诸多^[8]。目前,小型猪模拟失重模型及其后续研究相关文献较罕见,小型猪模拟失重模型的建立和完善对创新完善航天医学领域模拟失重动物模型体系具有重要意义,可推进深入研究。已有研究表明-6°四肢悬吊头低位未引起小型猪骨骼骨密度显著丢失,但骨骼抗动态载荷指标较对照组显著下降^[9],使用小型猪建立模拟失重模型的悬吊角度和方式还需进一步探索。

2 模拟失重动物模型的评价

模拟失重模型建立成功与否无法用准确的数值评价,要看所建立的模拟失重模型是否能模拟出失重环境下所造成的一系列主要生理变化,包括心血管系统、骨骼和肌肉系统。除此之外,失重环境还可能对人体神经系统、肝、胃肠道等其他组织器官产生影响。

2.1 心血管系统

研究发现,在多项航天任务结束后,航天员的心血管功能可能会发生变化。例如,心脏收缩功能下降,心律发生变化,上肢、下肢等部位的血管发生适应性变化,可能导致一系列后续影响。

现有的模拟失重动物模型研究发现,模拟失重可能导致动物体内部分血管发生适应性变化或受到损伤,包括主、肺动脉损伤,动脉内皮细胞空泡变

性,内弹力带内外胶原纤维和弹力纤维增多^[10];大脑中动脉肌源性紧张度上升,对 5-HT 收缩反应性增强^[11];区域性动脉结构重塑^[12];颈总动脉钙化,钙含量增加、钙盐沉积增多^[13];股动脉内皮细胞部分脱落,管壁变薄,平滑肌细胞层数减少,发生萎缩性变化^[4]等。

除了血管形态结构,模拟失重还会引起动物心肌结构、血压、心率和血液动力学等发生变化,包括:心血管系统节律紊乱^[14];心脏乳头状肌和心室心肌纤维横截面积显著减少,心肌纤维萎缩^[15];血液动力学发生变化,血液中内皮细胞、畸形红细胞增多,血粘度、血细胞比容、纤维蛋白原等均显著上升^[5]等。

2.2 骨骼

研究发现,航天员在飞行任务结束后,可能出现多处骨骼骨密度丢失现象,其中下肢骨骼骨密度丢失速度较快。对骨密度丢失的机制进行研究发现,失重环境会通过影响骨骼中破骨细胞和成骨细胞活动的平衡等方式,导致骨代谢加强,进而导致骨质丢失。

现有的模拟失重动物模型研究发现,不同模拟失重时长对骨骼的影响程度不同,短期模拟失重虽未使动物承重骨及非承重骨发生显著变化,但破骨细胞数量显著增加^[16]。延长模拟失重时间发现,尾吊 3 周的大鼠承重骨生长受到抑制,钙盐代谢障碍、生物力学性能降低^[17],同时模拟失重动物的承重骨骨组织及骨髓中骨钙素表达量下降幅度随时间延长增加,表明成骨细胞活性下降,承重骨骨皮质和软骨中的矿物盐明显丢失且钙盐沉积受到抑制^[18]。此外,研究发现模拟失重对动物身体不同部位的骨骼带来的影响可能不同,尾吊 14 d 和 28 d 后的大鼠股骨、骨盆、腰椎骨密度显著下降,而胸椎、桡尺骨骨密度无明显变化^[19],尾吊时间延长大鼠骨质疏松程度加剧,骨小梁厚度及数目下降^[20]。模拟失重对骨骼的影响还可能与实验动物的性别和年龄相关,赵赞延等^[21]发现雌、雄尾吊小鼠均出现骨质疏松样改变,除骨小梁厚度和数量外无明显的性别差异,而张恒等^[22]研究发现雌性尾吊大鼠骨质疏松更明显。谭雄进等^[23]研究发现,相较于成年鼠,使用年幼鼠建立模拟失重模型所观察到的骨骼变化趋势一致。

除了常用的啮齿类模拟失重动物模型外,−20°头低位限动模拟失重的兔骨骼未发现明显变化^[24],

在猴子、犬模拟失重动物模型可观察到上述骨骼骨密度等变化。刘书林等^[6]建立犬头低位后肢去负荷模拟失重模型,Bion 11 任务中搭乘的恒河猴^[25],王晓平等^[26]用的恒河猴−10°头低位卧床法中骨骼的变化趋势与其他模拟失重模型的结果一致。

2.3 骨骼肌

已有研究表明,航天员经历航天飞行后,骨骼肌会出现废用性萎缩等变化,包括抗重力肌萎缩、肌纤维横截面积减小等。现有的模拟失重动物模型显示,Cosmos 1887 任务中太空飞行 12.5 d 的大鼠靠近骨骼的肌肉萎缩程度大于外周的肌肉,还能够观察到比目鱼肌水肿、坏死及巨噬细胞增多等组织病理学变化^[27]。STS-48 任务中航天 5.8 d 的大鼠比目鱼肌萎缩,而非负重的长伸肌和胫骨前肌生长正常^[28]。研究发现,尾吊大鼠比目鱼肌、腓肠肌线粒体离子代谢和形态学发生改变^[29],比目鱼肌肌梭内神经营养因子-3(NT-3)含量下降,电镜观察发现随失重时间递增尾吊组大鼠肌梭的形态结构损伤加剧,尾吊 14 d 时可观察到明显的退行性变化^[30]。在兔、犬等其他模拟失重动物模型中也可观察到上述肌肉变化,研究发现头低位限动组兔的比目鱼肌水肿,部分肌纤维横纹消失,肌肉溶解^[24],刘书林等^[6]发现−12°头低位模拟失重 3 周的犬后肢周径、后肢肌肉含量显著降低,比目鱼肌原肌球蛋白、肌球蛋白等表达均显著下降。

2.4 神经系统

研究发现,失重会对脑结构、听觉、视觉、认知功能和情绪等产生一定的影响,包括引发动植物抑郁、焦虑等不良情绪,认知功能下降、视力下降或眼部疾病等等。

宫玉波等^[31]发现短期模拟失重 14 d 对大鼠眼底血流产生一定影响,大鼠脉络膜增厚,眼轴变短,但未见明显视网膜病变。戴旭锋等^[32]发现尾吊组的小鼠在 15 d 时出现暂时的视网膜微循环异常,但在尾吊 30 d 时视网膜微循环和神经生物电反应出现恢复。以上研究表明模拟失重会对视网膜造成的一定影响且与实验时长相关,但动物脱离模拟失重环境后可能会随自身调节恢复正常。

韩浩伦等^[33]研究发现模拟失重 5 d 内耳蜗毛细胞的结构和功能出现损伤,但在实验后期听觉功能有所恢复。李元超等^[34]研究发现模拟失重 4 周内,耳蜗带状突触数量减少但脱离失重环境后损伤可逆,短期内耳蜗带状突触数量恢复到一定程度。

以上研究表明模拟失重环境会对听觉造成的一定影响,但损伤可逆。

多项基于啮齿类模拟失重模型的研究发现,模拟失重会引发动动物抑郁、焦虑或认知能力下降,影响的机制包括:(1)动物体内神经递质及神经营养因子的表达和释放受到影响;(2)神经细胞氧化应激程度加重,导致细胞损伤或凋亡;(3)血液头向转移引起脑部及颈部血管适应性变化,引起其他神经症状等^[35]。

2.5 其他

失重环境除了会引起心血管系统、肌肉、骨骼变化以外,还可能给肝、脾和胃肠道等组织器官带来影响。例如,模拟失重动物肝细胞发生损伤性变化,进一步可能影响肝代谢^[36];模拟失重动物肝、脾和胸腺质量均下降,脾中淋巴细胞、巨噬细胞和粒细胞数量显著降低^[37];模拟失重大鼠小肠黏膜紧密连接蛋白表达量下降,电镜下观察发现小肠上皮细胞间隙增宽,紧密连接和微绒毛结构受到影响,使动物对肠道炎症易感性增加^[38]。

3 结语

现有的地面模拟失重模型使用的实验动物包括啮齿类动物、兔、猴和犬等。目前大、小鼠尾部悬吊地面模拟失重模型在国内外应用最为广泛,具有体型小、操作简便的优点,但啮齿类动物的身体尺寸、解剖结构及生物节律等与人类差异较大,具有一定局限性。除啮齿类动物外,犬的身体尺寸、身体构造、生理习性等更接近人类,且犬类等大动物的皮质骨具有哈弗氏系统,与人类相似。恒河猴等灵长目动物的器官结构、生理习性、代谢机能等与人类近似,在生命科学、医药等领域应用广泛,但研究成本昂贵。除此之外,小型猪在解剖学、神经生物学、心血管和胃肠道等方面均与人类相近,因此,是未来作为失重模型的优选动物之一。

地面模拟失重只能模拟出人类在航天飞行过程中的部分生理病理变化,且不同的实验动物的解剖结构、生理习性等各不相同,所以目前模拟失重模型建立成功与否没有唯一的指标,要根据模型动物是否表现出失重模拟状态下的主要生理效应进行判断,例如血液重新分布、心功能变化、骨质疏松和肌肉萎缩等。在此基础上,再对其他模拟失重状态下可能对动物造成的影响进行进一步探究。为完善和丰富现有的地面模拟失重模型,并进行深入

的机制研究及探究对抗措施,使用多种实验动物建立地面模拟失重模型具有重要意义。

参 考 文 献 (References)

- [1] Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects [J]. J Appl Physiol (1985), 2002, 92(4): 1367-1377.
- [2] 付子豪,王臻,吴洁,等. 改良的大鼠模拟失重模型制备方法 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(2): 189-192, 196.
Fu ZH, Wang Z, Wu J, et al. A modified protocol for generating the simulated weightlessness rat model [J]. Chin J Appl Physiol, 2019, 35(2): 189-192, 196.
- [3] 孟京瑞,沈凌云,向求鲁. 兔模拟失重装置的设计及其应用 [J]. 航天医学与医学工程, 1996, 9(1): 57-59.
Meng JR, Shen XY, Xiang QL. Design and application of apparatus for simulating weightlessness of rabbit [J]. Space Med Med Eng, 1996, 9(1): 57-59.
- [4] 孙喜庆,王冰,孙会品,等. 间断性头高位对模拟失重兔动脉内皮素表达和组织形态的影响 [J]. 航天医学与医学工程, 2006, 19(4): 265-268.
Sun XQ, Wang B, Sun HP, et al. Effects of intermittent head-up tilt on the endothelin expression and morphological changes of artery during simulated weightlessness in rabbits [J]. Space Med Med Eng, 2006, 19(4): 265-268.
- [5] 沈凌云,陈建和,孟京瑞,等. 模拟失重对兔血液系统影响的研究 [J]. 航天医学与医学工程, 1996, 9(3): 198-203.
Shen XY, Chen JH, Meng JR, et al. Influence of simulated weightlessness on hematological system of rabbit [J]. Space Med & Med Eng, 1996, 9(3): 198-203.
- [6] 刘书林,姚永杰,刘秋红,等. 犬头低位后肢去负荷模拟失重模型的建立与验证 [J]. 载人航天, 2021, 27(5): 596-602.
Liu SL, Yao YJ, Liu QH, et al. Establishment and validation of simulated weightlessness model of dog with head down hindlimb unloading [J]. Manned Spaceflight, 2021, 27(5): 596-602.
- [7] 杨超,徐子涵,李铠,等. 头低位卧床对恒河猴骨代谢、糖脂代谢的抑制效应及其相关性分析 [J]. 空间科学学报, 2020, 40(4): 540-546.
Yang C, Xu ZH, Li K, et al. Inhibitory effects of head-down bed rest on bone, glycolipid metabolism of Rhesus and their correlation analysis [J]. Chin J Space Sci, 2020, 40(4): 540-546.
- [8] 吴华莉,涂尾龙,曹建国,等. 小型猪在人类疾病模型方面的研究进展 [J]. 养猪, 2021(4): 63-67.
Wu HL, Tu WL, Cao JG, et al. Research progress of miniature pig in human disease models [J]. Swine Prod, 2021(4): 63-67.
- [9] 谈诚,李志利,汪德生,等. 四肢悬吊法对小型猪骨骼抗动态载荷功能的影响 [A]. 第八届全国生物力学学术会议论文集 [C]; 2006.
Tan C, Li ZL, Wang DS, et al. The effect of limb suspension on

- skeletal resistance to dynamic loading in minipig [A]. Proceedings of the 8th China National Conference on Biomechanics [C]; 2006.
- [10] 汪德生, 袁敏, 李志利, 等. 尾部悬吊大鼠胸主动脉、肺动脉超微结构变化的动态观察 [J]. 现代临床医学生物工程学杂志, 2006, 12(5): 416-419.
- Wang DS, Yuan M, Li ZL, et al. The dynamic observation of ultrastructural changes of the walls in aortae and pulmonary arteries from the rats under tail suspension [J]. J Mod Clin Med Bioeng, 2006, 12(5): 416-419.
- [11] 林乐健, 暴军香, 白云刚, 等. 模拟失重大鼠大脑中动脉与肠系膜小动脉肌源性紧张度的不同影响 [J]. 生理学报, 2009, 61(1): 27-34.
- Lin LJ, Bao JX, Bai YG, et al. Differential effect of simulated microgravity on myogenic tone of middle cerebral and mesenteric small arteries in rats [J]. Acta Physiol Sin, 2009, 61(1): 27-34.
- [12] 高放, 程九华, 薛军辉, 等. 模拟失重致大鼠弹力型大动脉血管区域特异性重塑及其重力性对抗措施 [J]. 生理学报, 2012, 64(1): 14-26.
- Gao F, Cheng JH, Xue JH, et al. *In-vivo* and *ex-vivo* studies on region-specific remodeling of large elastic arteries due to simulated weightlessness and its prevention by gravity-based countermeasure [J]. Acta Physiol Sin, 2012, 64(1): 14-26.
- [13] 刘煊, 茹凝玉, 吕强, 等. 中期及长期模拟失重大鼠颈总动脉钙化的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(1): 1-6.
- Liu H, Ru NY, Lv Q, et al. Mid-term and long-term simulated microgravity causes calcification of common carotid artery in rats [J]. Med J Chin PLA, 2021, 46(1): 1-6.
- [14] 陈励, 张斌, 杨璐, 等. 模拟失重大鼠动脉血压、心率昼夜节律的影响及其机制 [J]. 解放军医学杂志, 2016, 41(4): 289-294.
- Chen L, Zhang B, Yang L, et al. Effects of simulated microgravity on circadian rhythm of caudal arterial pressure and heart rate in rats and their underlying mechanism [J]. Med J Chin PLA, 2016, 41(4): 289-294.
- [15] Goldstein MA, Edwards RJ, Schroeter JP. Cardiac morphology after conditions of microgravity during COSMOS 2044 [J]. J Appl Physiol (1985), 1992, 73(2): 94-100.
- [16] Vico L, Chappard D, Alexandre C, et al. Effects of weightlessness on bone mass and osteoclast number in pregnant rats after a five-day spaceflight (COSMOS 1514) [J]. Bone, 1987, 8(2): 95-103.
- [17] 曹新生, 付崇建, 杨连甲, 等. 3 周模拟失重大鼠后肢骨生长代谢的影响 [J]. 中华航空航天医学杂志, 2000, 11(4): 221-224.
- Cao XS, Fu CJ, Yang LJ, et al. Effects of 3 wk simulated weightlessness on the growth and metabolism of hindlimb bones in rats [J]. Chin J Aerosp Med, 2000, 11(4): 221-224.
- [18] 付崇建, 郁冰冰, 杨连甲, 等. 尾悬吊大鼠骨和骨髓中钙素的变化 [J]. 航天医学与医学工程, 2003, 16(4): 260-263.
- Fu CJ, Yu BB, Yang LJ, et al. Changes of osteocalcin in bone and bone marrow in tail suspended rats [J]. Space Med Med Eng, 2003, 16(4): 260-263.
- [19] 佟海英, 胡素敏, 周鹏, 等. 悬吊模拟失重及解悬吊对大鼠骨密度及生物力学的影响 [J]. 中国骨伤, 2008, 21(4): 276-279.
- Tong HY, Hu SM, Zhou P, et al. Effects on rats' bone mineral density and bone biomechanics by suspensory simulated weightlessness and removing suspension [J]. Chin J Orthop Traumatol, 2008, 21(4): 276-279.
- [20] 刘宁, 崔赓, 雷伟, 等. 尾部悬吊大鼠骨质疏松模型骨的微观结构及力学性能变化的研究 [J]. 中国骨与关节杂志, 2012, 1(2): 169-173.
- Liu N, Cui G, Lei W, et al. A study on the changes of microstructural and mechanical properties of the bone in tail-suspended rats as osteoporosis models [J]. Chin J Bone Jt, 2012, 1(2): 169-173.
- [21] 赵赞延, 马宇, 张恒伟, 等. 模拟微重力效应下小鼠骨流失的性别差异 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2022, 15(2): 182-188.
- Zhao ZY, Ma Y, Zhang HW, et al. Gender differences in bone loss under microgravity effect in mice [J]. Chin J Osteoporos Bone Miner Res, 2022, 15(2): 182-188.
- [22] 张恒, 刘宁, 任宁涛, 等. 模拟失重状态下雌、雄大鼠骨质疏松模型骨结构及生物力学对比研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(9): 1076-1082.
- Zhang H, Liu N, Ren NT, et al. A study on the changes of microstructure and mechanical properties in rat osteoporotic model under the simulated weightlessness condition [J]. Chin J Osteoporos, 2015, 21(9): 1076-1082.
- [23] 谭雄进, 孙永建, 王前, 等. 模拟失重对不同发育阶段大鼠骨代谢的影响 [J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(7): 611-613, 623.
- Tan XJ, Sun YJ, Wang Q, et al. Effects of simulated weightlessness on bone metabolism in rats at different ages [J]. J First Mil Med Univ, 2002, 22(7): 611-613, 623.
- [24] 沈羡云, 孟京瑞, 王玉清, 等. 头低位-20°限制活动期间兔生理指标的变化 [J]. 航天医学与医学工程, 1994, 7(3): 186-191.
- Shen XY, Meng JR, Wang YQ, et al. Changes of physiological indice in rabbits during head-down-20° Immobilization [J]. Space Med Med Eng, 1994, 7(3): 186-191.
- [25] Zérath E, Grynpsas M, Holy X, et al. Spaceflight affects bone formation in rhesus monkeys: a histological and cell culture study [J]. J Appl Physiol (1985), 2002, 93(3): 1047-1056.
- [26] 王晓平, 陆明, 马培, 等. 模拟失重对恒猴腰椎运动单元生物力学的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(26): 3843-3848.
- Wang XP, Lu M, Ma P, et al. Effects of simulated weightlessness on biomechanics of motion unit of rhesus monkey lumbar vertebra [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2016, 20(26): 3843-3848.

- [27] Miu B, Martin TP, Roy RR, et al. Metabolic and morphologic properties of single muscle fibers in the rat after spaceflight, *Cosmos 1887* [J]. *FASEB J*, 1990, 4(1): 64-72.
- [28] Tischler ME, Henriksen EJ, Munoz KA, et al. Spaceflight on STS-48 and earth-based unweighting produce similar effects on skeletal muscle of young rats [J]. *J Appl Physiol* (1985), 1993, 74(5): 2161-2165.
- [29] 孙亚志, 黄丽昀, 张谦, 等. 尾吊大鼠骨骼肌线粒体钙、镁含量和体视学的变化 [J]. *航天医学与医学工程*, 1998, 11(4): 66-68.
- Sun YZ, Huang LY, Zhang Q, et al. Effect of tail suspension on mitochondrial Ca^{2+} , Mg^{2+} and parameters of electron microscopic morphometry in rats' skeletal muscle [J]. *Space Med Med Eng*, 1998, 11(4): 66-68.
- [30] 吴苏娣, 樊小力, 唐斌, 等. 模拟失重大鼠比目鱼肌肌梭超微结构的影响 [J]. *航天医学与医学工程*, 2002, 15(1): 32-35.
- Wu SD, Fan XL, Tang B, et al. Effects of simulated weightlessness on ultrastructure of soleus muscle spindle in rats [J]. *Space Med ed Eng*, 2002, 15(1): 32-35.
- [31] 宫玉波, 许永杰, 赵宏伟, 等. 14d 尾吊模拟失重大鼠眼底血流动力学及眼轴变化研究 [J]. *航天医学与医学工程*, 2019, 32(5): 401-405.
- Gong YB, Xu YJ, Zhao HW, et al. Study of simulated weightlessness by tail suspension on changes of ocular hemodynamics and axis in rats [J]. *Space Med Med Eng*, 2019, 32(5): 401-405.
- [32] 戴旭锋, 保金华, 陈晓萍, 等. 模拟失重对成年小鼠闪光视网膜电图和视网膜微循环的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2020, 20(1): 27-31.
- Dai XF, Bao JH, Chen XP, et al. Impact of simulated microgravity on flash electroretinogram and retinal microcirculation in adult mice [J]. *Int Eye Sci*, 2020, 20(1): 27-31.
- [33] 韩浩伦, 吴玮, 王鸿南, 等. 头低位模拟失重状态对豚鼠耳蜗听功能与超微结构的影响 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2012, 20(3): 269-271.
- Han HL, Wu W, Wang HN, et al. The effects of simulated weightlessness on auditory function and cochlea ultrastructure in Guinea pig [J]. *J Audiol Speech Pathol*, 2012, 20(3): 269-271.
- [34] 李元超, 吴玮, 王刚, 等. 模拟失重大鼠听功能及耳蜗带状突触的影响 [J]. *山西医科大学学报*, 2021, 52(5): 638-642.
- Li YC, Wu W, Wang G, et al. Effects of simulated weightlessness on auditory function and cochlear synapses of rats [J]. *J Shanxi Med Univ*, 2021, 52(5): 638-642.
- [35] 武强强, 张学英, 王德华, 等. 模拟失重对啮齿动物情绪和认知的影响及缓解措施研究进展 [J]. *航天医学与医学工程*, 2021, 34(2): 183-188.
- Wu QQ, Zhang XY, Wang DH, et al. Research progress in effects of simulated weightlessness on emotion and cognition of rodents and mitigating measures [J]. *Space Med Med Eng*, 2021, 34(2): 183-188.
- [36] 周金莲, 李成林, 易勇, 等. 模拟失重导致门静脉内毒素血症和肝脏超微结构改变 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2011, 20(12): 1140-1143.
- Zhou JL, Li CL, Yi Y, et al. Simulated weightlessness induces portal endotoxemia and hepatic ultrastructure changes in rats [J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 20(12): 1140-1143.
- [37] Baqai FP, Gridley DS, Slater JM, et al. Effects of spaceflight on innate immune function and antioxidant gene expression [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2009, 106(6): 1935-1942.
- [38] 陈英, 杨春敏, 毛高平, 等. 模拟失重大鼠小肠黏膜紧密连接蛋白表达的影响 [J]. *航天医学与医学工程*, 2011, 24(5): 327-331.
- Chen Y, Yang CM, Mao GP, et al. Impact of simulated weightlessness on expression of tight junction proteins of small intestine mucous membrane in rats [J]. *Space Med Med Eng*, 2011, 24(5): 327-331.

[收稿日期] 2022-08-25

王琳,沈嘉艳,谢招虎,等. 高尿酸血症动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 112-119.

Wang L, Shen JY, Xie ZH, et al. Progress of hyperuricemia animal model research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 112-119.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.014

高尿酸血症动物模型研究进展

王琳, 沈嘉艳, 谢招虎, 秦冬冬, 李兆福, 马晓惠, 吕小满*

(云南中医药大学, 昆明 650000)

【摘要】 随着经济的发展,人们生活方式和饮食结构发生改变,高尿酸血症的临床检出率逐年增加,高尿酸血症是继高血压、糖尿病、高血脂之后的“第四高”,其发病率已趋于年轻化,因此,建立合适的动物模型是研究高尿酸血症发病机制及预防疾病的重要渠道。近年来关于高尿酸血症模型建立的文献较多,笔者对近年相关文献进行了查阅,总结了常见的动物模型并对增加尿酸来源、抑制尿酸酶活性、抑制尿酸排泄及其他造模方法进行了综述。可为研究治疗、预防高尿酸血症相关药物以及模型的构建方法提供参考。

【关键词】 高尿酸血症;动物模型;禽类;啮齿类

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 01-0112-08

Progress of hyperuricemia animal model research

WANG Lin, SHEN Jiayan, XIE Zhaohu, QIN Dongdong, LI Zhaofu, MA Xiaohui, LYU Xiaoman*

(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650000, China)

Corresponding author: LYU Xiaoman. E-mail: lxm.cc@foxmail.com

【Abstract】 With the development of the world economy, people's lifestyles and dietary structure have changed, and the clinical detection rate of hyperuricemia is increasing year by year. Hyperuricemia has the “fourth highest” incidence after hypertension, diabetes, and hyperlipidemia, and its incidence rate tends to be higher in younger people. Therefore, the establishment of appropriate animal models is an important step in studying the pathogenesis of hyperuricemia and preventing related diseases. In recent years, extensive literature has been published on the establishment of hyperuricemia models. We consulted the relevant literature from recent years and summarized common animal models; we summarized the method for increasing the source of uric acid, inhibiting the activity of uricase, inhibiting the excretion of uric acid, and other modeling method. This paper provides a reference for the study of drugs related to the treatment and prevention of hyperuricemia and method for the construction of hyperuricemia models.

【Keywords】 hyperuricemia; animal model; poultry; rodent

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

【基金项目】 国家中医药管理局中医临床研究基地建设项目(国中医药科技函[2018]131号),云南省中医临床医学研究中心项目(202102AA310006),云南省王庆国专家工作站(202005AF150017),国家自然科学基金(8226150978),中医联合面上项目(11370101874),云南省科学技术厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项面上项目(202101AG070394),云南省中医联合专项项目(2019FF002(-052))。

Funded by Construction Project of TCM Clinical Research Base of State Administration of Traditional Chinese Medicine(Chinese Medicine Science and Technology Letter[2018]131), Project of Yunnan Clinical Research Center of Traditional Chinese Medicine(202102AA310006), Yunnan Wang Qingguo Expert Workstation(202005AF150017), National Natural Science Foundation of China(8226150978), Joint General Program of Traditional Chinese Medicine(11370101874), Joint Special General Project of Yunnan Provincial Department of Science and Technology and Yunnan University of Traditional Chinese Medicine on Applied Basic Research(202101AG070394), National Natural Science Foundation of China(8226150978), Yunnan Traditional Chinese Medicine Joint Special Projece(2019FF002(-052))。

【作者简介】 王琳(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理学。Email: 1227670850@qq.com

【通信作者】 吕小满(1986—),男,副教授,硕士生导师,研究方向:中医药防治代谢性疾病。Email: lxm.cc@foxmail.com

高尿酸血症是指嘌呤代谢紊乱,尿酸(uric acid, UA)水平高于正常值所导致的代谢性疾病,2021 年《高尿酸血症和痛风病证结合诊疗指南》中提出在正常嘌呤饮食状态下,非同日两次空腹血尿酸浓度 $> 420 \mu\text{mol/L}$ 、无论男女,即被认为是高尿酸血症^[1],高尿酸血症的发生主要是由于人体内尿酸增多或者尿酸排泄减少导致的,嘌呤物质在人体能量供应方面和促进人体代谢、排泄过程及组成辅酶中扮演着重要的角色。尿酸的生成量主要与体内参与嘌呤代谢过程中的关键酶活性有关,例如:磷酸核糖基转移酶焦磷酸盐合成酶(phosphoribosyltransferase pyrophosphate synthase, PRS)可以催化核酸核糖基转移酶焦磷酸盐(phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP),PRS 活性过高可加快 PRPP 和嘌呤核苷酸的合成,增加尿酸含量。次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine guanine-phosphoribosyltransferases, HPRT)的活性过高可使次黄嘌呤和鸟嘌呤进入到核苷酸和次黄嘌呤鸟嘌呤核苷酸的量减少,使体内尿酸增加^[2]。此外,尿酸被分为外源性尿酸和内源性尿酸,内源性尿酸由人体自身合成和分解,外源性尿酸主要从食物中摄取产生,高嘌呤食物如海鲜、肉类、豆类等的过量摄入使人体尿酸水平升高,增加了患高尿酸血症的风险。尿酸具有抗氧化性,可以清除氧化应激产生的氧自由基防止衰老^[3]。但是,当尿酸高于正常值时会导致内皮细胞损伤诱导致炎因子产生而引起一系列疾病如肾病综合征、代谢性疾病综合征,同时也是心脑血管疾病和糖尿病的独立危险因素,因此高尿酸血症的防治依然是目前临床和科研工作的重点和热点。动物实验是开展与疾病相关的机制探讨和药效评价等的重要实验手段和方法,而建立稳定的动物模型是实验成功的前提。人们对于高尿酸血症发病机制的认识过于局限,还处于早期阶段,虽然目前高尿酸血症的建模方法有很多种,但是其方法众说纷纭,尚无公认的模型方法,且还存在着许多的不足和缺陷,模型所致的症状比较单一,缺乏稳定性和持久性^[4],本文主要列举了常见的动物种类,对动物模型的药物和方法展开综述,对现有的模型问题做出了阐释,提出了更为合理的动物模型方法,为以后模型的筛选提供参考。

1 动物的种类

1.1 啮齿类

啮齿类动物属于哺乳类动物,最常用的是小鼠

和大鼠,它们遗传背景清晰、品种多样,由于其体型较小、饲养和繁殖方便、价格低廉、对药物的灵敏度高常被用作动物模型,啮齿类动物与人类有着相似的生理生化特性,但在选择用啮齿类来制备高尿酸血症模型时与人类存在着较大的差异,在人类进化过程中尿酸酶基因失活,最终的代谢产物为尿酸,而啮齿类动物由嘌呤代谢下产生的尿酸在尿酸酶的作用下进一步降解,生成溶解度更高的尿囊素通过尿液排出体外,不会在体内沉积形成痛风结石,且人类血清尿酸水平大约是啮齿类动物的 10 倍^[5]。虽然与理想的模型有些距离,但是动物模型仍多选用啮齿类,在选择啮齿类动物性别时,雌鼠尿酸水平易受外界的干扰且波动较大,可能与雌鼠分泌激素波动有关,雄鼠相比雌鼠更稳定些,因此选择雄鼠有益于实验的开展。此外,在成龄鼠和老龄鼠中,虽然老龄鼠尿酸代谢水平低易形成高尿酸血症,但是身体机能差不利于后续的研究,因此一般选择成龄鼠进行造模。有文献报道称,不同品系的小鼠对高尿酸血症模型的建立也有影响,KM 小鼠灵敏度高于 ICR 小鼠以及近交系的 C57BL/6J 小鼠^[6]。

1.2 家禽类

禽类最常用的模型是鸡和鹌鹑,禽类在尿酸合成和代谢过程与人类有着相似之处而成了选择的优势,核苷酸蛋白水解后产生的核酸降解为嘌呤物质,嘌呤物质在黄嘌呤氧化酶的作用下生成尿酸,禽类与人类一样缺乏尿酸酶,故尿酸是嘌呤代谢的最终产物^[7],由于禽类缺乏尿囊素,因此易形成自发性高尿酸血症和痛风,禽类可能是尿酸盐代谢和痛风研究的合适动物模型,禽类动物具有繁殖快、体外孵化快易于控制、实验成本低等优点成了常用的动物模型。在我国,SPF 级鸡和鹌鹑的应用与研究较晚技术尚不完善,在微生物净化和检测部分仍然与国外存在差异,不能满足研究者的需要,故在后期加强 SPF 级禽类的研究是十分重要且迫切的。此外,禽类不属于哺乳类动物,与人类的生理生化方面的差异较大,且饲喂条件特殊,动物在笼内活动时容易将饲料食物泼洒,可能会导致诱导剂不准确故具有一定的局限性^[8],在饲养环境方面,选择干燥、敞亮的环境利于模型的建立,潮湿阴暗和狭小的空间易造成禽类动物痛风。

2 建立模型的方法

动物模型的给药途径一般有五种,饲养、灌胃、

皮下注射、腹腔注射和基因敲除,禽类以饲养为主,基因敲除多见于小鼠,其他几种的给药方式大鼠和小鼠均有^[9]。

2.1 增加尿酸来源

2.1.1 尿酸前体物质

酵母被认为是促进尿酸生成的前体物质,酵母中富含丰富的蛋白质、B 族维生素和核苷酸,这些物质在体内能水解为可以产生含氮的有机碱如嘌呤碱、嘧啶碱和磷酸碱^[10],能干扰正常的嘌呤代谢从而增加了黄嘌呤氧化酶的活性,促进尿酸生成,嘌呤是尿酸生成的重要前体物质,沙丁鱼、肉类等高嘌呤食物常被加入到动物的饮食中,旨在增加动物的嘌呤摄入以加速尿的生成。赵振升等^[11]以酵母高蛋白饲料饲喂 40 日龄健康海兰褐蛋公雏鸡,在 40 d 时饲喂酵母高蛋白饲料,30 d 后尿酸和黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)升高,肠系膜表面有石灰样的尿酸盐沉淀物,肾肿大、颜色变淡、质地变硬,表面可见雪花纹。蔡萌^[12]用雄性迪法克鹌鹑来探讨摄取不同来源的高嘌呤饮食对其尿酸的影响,分别给予鹌鹑不同剂量的酵母、牛肉、蛤蜊、大豆喂养 60 d,结果表明通过不同剂量的高嘌呤饮食干预后,与正常组相比高剂量组比低剂量组的血清尿酸水平更高,说明嘌呤食物中的嘌呤含量能影响尿酸的水平导致高尿酸血症的发生。Hong 等^[13]选择 24 周龄的雄性白色亨来鸡在饲料中加入不同比例的高蛋白喂养,10 周后高剂量的尿酸盐水平相比低剂量明显升高,鸡爪的关节形态弯曲变形,滑液、其他组织液和肝均产生尿酸钠晶体,肾出现了不同程度的损伤。同时高蛋白饮食对鸡并没有额外的副作用,适合建立高尿酸血症模型,也为痛风性关节炎动物模型的选择和制备提供了重要的参考依据。Ma 等^[14]发现了一种环境内分泌干扰物双 A 酚能够激活肝中黄嘌呤氧化酶的活性使尿酸生成增加,对尿酸的排泄功能无影响,实验选择 C57BL/6J 小鼠给予含有不同浓度的双 A 酚饮食,取肝原代肝细胞和血清分别观察尿酸浓度和黄嘌呤氧化酶活性,运用分子对接分析 XOD 与双 A 酚的亲合力来证明双 A 酚在促进高尿酸血症发生中的作用。

2.1.2 补充尿酸

补充外源性尿酸是诱导高尿酸血症的最直接方式,最常用的方法为腹腔注射。陈光亮等^[15]给小鼠腹腔注射 125、250、500、1000 mg/kg 剂量的尿酸,1 h 后测定血清尿酸水平明显升高,补充尿酸可形

成高尿酸血症动物模型,以 250 mg/kg 效果最好。

2.2 抑制尿酸酶活性

由于人类尿酸酶基因失活无法将嘌呤代谢物及时排出体外,这是人类易患高尿酸血症的重要原因,而啮齿类动物可以通过尿酸酶的途径将尿酸排出,抑制尿酸酶使尿酸排泄减少是建立高尿酸血症的重要策略。氧嗪酸钾是抑制尿酸氧化酶的代表药物,该药物属于三氮杂苯类化合物,可以竞争性的抑制尿酸酶的活性,它的特点是成模时间快,维持时间长,给药途径多样。吴林菁等^[16]给予小鼠腹腔注射氧嗪酸钾 250 mg/kg 连续 7 d,可观察到血清尿酸水平、肌酐升高,肾有不同程度的变性坏死,炎症细胞浸润发生病理改变。黄元河等^[17]通过给小鼠灌胃氧嗪酸钾 250 mg/kg 致尿酸生成增多。王陈芸等^[18]给小鼠注射不同剂量的氧嗪酸钾诱导尿酸升高,对小鼠尾静脉采血测定尿酸,研究认为在给药 600 mg/kg 1~2 h 内形成比较稳定的急性高尿酸血症模型。

2.3 抑制尿酸排泄

这类造模药物包括乙胺丁醇、烟酸、腺嘌呤、吡嗪酰胺等,在特定的剂量下会对肾组织造成损伤,削减肾对尿酸的排泄能力,维持体内高尿酸的环境。其中,腺嘌呤通过在黄嘌呤氧化酶的作用下在动物肝中被转化成难溶于水的二羟基腺嘌呤堆积在肾小管中,抑制肾正常代谢尿酸的能力从而使血清尿酸升高^[19]。长时间给予高浓度的腺嘌呤时观察到大鼠逐渐消瘦,蜷缩拱背,嗜睡,耳廓和口唇色淡,先有血清肌酐、尿素氮水平升高,再者尿酸水平升高,腺嘌呤结晶在肾中沉积,炎性细胞浸润,组织增生,表明腺嘌呤制备的高尿酸血症先有肾功能损伤进而有尿酸水平升高,肾功能损伤不可逆^[20]。小剂量持续给药时肾损害轻,有益于药物的筛选,但造模时间较长。张大艳等^[21]选用小鼠以 75 mg/kg 的剂量连续灌胃 4 周后,结果表明腺嘌呤能显著升高小鼠血清尿酸、肌酐水平、肝 XOD 及腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)活性。单独用乙胺丁醇和烟酸作为造模剂来制备高尿酸血症模型很少,常与其他造模药物联合进行造模。

2.4 多种方式诱导

常用方法是增加尿酸来源、抑制尿酸酶活性及抑制尿酸排泄联合造模,此类方法可以缩短造模时间,从多个诱导途径出发,为探索更理想的造模方法提供了条件。氧嗪酸钾+腺嘌呤:Wen 等^[22]选用

灌胃氧嗪酸钾和腺嘌呤来评估这种造模方法对尿酸排泄和肾功能与时间的关系,发现小鼠的尿酸水平在给药 3 d 后明显高于正常组,7 d 后保持稳定,在第 10 天肾功能出现轻微病变,在 21 d 时出现严重病变,此外,小鼠肾促进尿酸重吸收的葡萄糖转运蛋白 9 (glucose transporter 9, GLUT9) 和尿酸盐转运蛋白 1 (urate transporter 1, URAT1) 基因表达在 3~21 d 显著增加,促进尿酸分泌的三磷酸腺苷结合转运蛋白 G2 (ATP-binding cassette super family gmemb er 2, ABCG2)、有机阴离子转运蛋白 1 (organic anion transporter 1, OAT1) 表达在 2~21 d 显著下降,此类方法适用于建立稳定、持续的高尿酸血症模型。氧嗪酸钾+次黄嘌呤:Li 等^[23]使用氧嗪酸钾+次黄嘌呤的方法连续造模 10 d 后检测血清尿酸、尿素氮、肌酐水平变化明显,肾小球萎缩、肾小管扩张出现结晶引起了明显的肾损伤,该模型可以建立类似于人类的急性肾病高尿酸血症模型。有学者指出核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族含 pyrin 结构域蛋白 3 (NLRP3) 是炎症的危险信号,在肾的炎症的致病机制中起着关键的作用,尿酸和尿酸钠晶体可以激活 NLRP3 炎性小体介导白细胞介素-1 β 炎性因子分泌引起肾炎性反应^[24]。因此在建立高尿酸血症伴有肾病时激活 NLRP3 炎性小体是个可行的策略。氧嗪酸钾+尿酸+沙丁鱼:Dhouibi 等^[25]选用 Wistar 大鼠腹腔注射 300 mg/(kg·d) 的氧嗪酸钾和 100 mg/(kg·d) 的尿酸诱导急性高尿酸血症模型,在停药后尿酸水平下降。持续性给予氧嗪酸钾 300 mg/(kg·d) 持续灌胃并在大鼠饮食中加入高嘌呤饮食沙丁鱼,尿酸水平在 15 d 时保持稳定,本模型适合复制慢性高尿酸血症,具有持久稳定的特点。酵母+腺嘌呤:Li 等^[26]用 SD 大鼠灌胃酵母抽提物 10 g/kg 加腺嘌呤联合造模,血清和尿液中尿酸、尿素氮、肌酐指数上升,肾结构与对照组相比肾小管上皮细胞空泡变性、肾小球萎缩、肾皮质管腔扩张,同时,研究者在大鼠右踝关节内注射尿酸钠混悬液诱导急性痛风性关节炎模型,2 h 后出现明显肿胀,12 h 后达到高峰,肿胀度随时间延长逐渐下降。在高尿酸血症的发生过程中,有尿酸钠的参与会引起急性痛风。由于肠道也参与尿酸的代谢和排泄,有学者为了更好地了解肠道菌群与高尿酸血症之间的联系,将 Wistar 大鼠饲喂酵母饲料和灌胃腺嘌呤 100 mg/(kg·d),5 周后尿酸水平明显升高,粪便中的微生物多样性发生改变^[27],该

模型简便易操作,动物死亡率小,但是造模时间较长。Liu 等^[28]用 Wistar 大鼠建立高尿酸血症致动脉粥样硬化模型,在动物饲料中分别加入高脂饮食(猪肉、胆固醇、胆盐、丙基硫氧嘧啶)和高嘌呤饮食(10%酵母)+皮下注射腺嘌呤(50 mg/kg, i. g)和硫酸氢钾(100 mg/kg),4 周后高脂饮食组总胆固醇、脂蛋白升高、尿酸水平没有变化,高嘌呤饮食组总胆固醇和尿酸水平均升高,8 周后主动脉出现钙沉积、平滑肌细胞损伤伴随纤维化。腺嘌呤+乙胺丁醇:林宇星等^[29]选用腺嘌呤 50 mg/kg、乙胺丁醇 100 mg/kg 联合给药建立小鼠高尿酸血症模型,实验结果表明小鼠 UA 升高明显,且肾功能的损害较小,模型可靠稳定。氧嗪酸钾+NaCl:Mazzali 等^[30]用氧嗪酸钾并在大鼠饮水中加入 2% 的盐(NaCl)连续 7 周可以复制轻度高尿酸血症合并高血压模型,结果显示对肾损害并不明显同时有血压升高和轻度肾小管间质损伤,肾的肾素表达增加,停用氧嗪酸钾后尿酸和血压恢复正常。可能是因为高尿酸血症通过激活肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)系统造成小动脉的微血管损伤引起的高血压。现将动物模型的种类及其诱导方法整理见表 1。

2.5 其他方式造模法

2.5.1 敲除基因

除了传统药物诱导造模方法外,人类也在寻找与人类发病更为相似的自发性高尿酸血症模型,潘明子等^[32]使用尿酸氧化酶基因敲除 C57BL/6J 小鼠建立自发性高尿酸血症,6 周时已出现明显的肾功能受损,该模型是研究尿酸性肾病相关的理想模型。Jie 等^[33]在纯 C57BL/6J 背景下使用转录激活物样效应器核酸酶技术生成了尿酸氧化酶(urate oxidase, UOX)基因敲除小鼠模型,小鼠可以观察到肾功能不全,肾小球与肾小管发生病变,这类模型存活率高,模拟了与人类相似的尿酸代谢过程。

2.5.2 破坏肠道菌群

肠道是人体消化和排毒的重要场所,也是最大的免疫器官,肠道菌群的平衡对维持人体健康有着重要作用,参与嘌呤的分解代谢,影响着人体营养物质的新陈代谢。在正常情况下,肠道的屏障功能可以有效的防止机体受到微生物和内毒素的侵害^[34],但当饮食不规律的情况下如摄入过量的高嘌呤、高脂、高果糖食物和嗜酒等不良的习惯后,能够快速改变人体的肠道菌群,菌群失调对黏膜免疫有

表 1 动物模型的种类及其诱导方法

Table 1 Types of animal models and their induction methods

模型方法 Molding method	动物种类 Animal species	造模药物 Modeling drug	造模周期 Modeling cycle	用法用量 Usage and dosage	表现 Performance
增加尿酸来源 Increase uric acid source	海兰蛋雏鸡 Hailan egg chick	酵母+高蛋白食物 Yeast and high protein food	30 d	400+200 mg/kg, p. o	UA、XOD 升高, 肾损害 ^[11] UA, XOD increase, renal damage ^[11]
	雄性迪法克鹌鹑 Male difac quail	酵母+牛肉+蛤蜊+大豆 Yeast, beef, clam and aoybean	60 d	20% + 20% + 10% + 10%, p. o	UA 升高 ^[12] UA increase ^[12]
	雄性白色亨来鸡 Male white Henley chicken	高蛋白食物 High protein food	70 d	19. 11%, p. o	UA 升高, 关节变形, 肾损伤 ^[13] Increased UA, joint deformation and kidney injury ^[13]
抑发抑制尿酸排泄 Inhibitio inhibition of uric acid excretionuri	小鼠 Mice	双 A 酚饮食 Bisphenol a diet	56 d	500 mg/kg, p. o	UA 升高 ^[14] UA increase ^[14]
	小鼠 Mice	尿酸 Uric acid	7 d	250 mg/kg, i. p	UA、Cr、XOD、ADA 升高 ^[15] UA, Cr, XOD, ADA increased ^[15]
	小鼠 Mice	腺嘌呤 Adenine	28 d	75 mg/kg, p. o	UA 升高, 肾损伤, 炎性细胞浸润 ^[21] Elevated UA, renal injury, inflammatory cell infiltration ^[21]
抑制尿酸酶活性 Inhibition uricase a of activity	小鼠 Mice	氧嗪酸钾 Potassium oxazinate	7 d	250 mg/kg, i. p	UA 升高 ^[16] UA increase ^[16]
	小鼠 Mice	氧嗪酸钾 Potassium oxazinate	1 ~ 2 h	250 mg/kg, p. o	GLUT9、ORAT1 升高, ABCG2、OAT1、NPT1 mRNA 下降 ^[17] GLUT9 and ORAT1 increase, ABCG2 OAT1 and NPT1 mRNA decrease ^[17]
	小鼠 Mice	氧嗪酸钾+腺嘌呤 Potassium oxazinate and adenine	21 d	200+5 mg/kg, p. o	UA、BUN、Cr 升高, 肾损伤 ^[22] UA BUN and Cr increased, renal injury ^[22]
多种方法诱导 Induction by multiple methods	小鼠 Mice	氧嗪酸钾+次黄嘌呤 Potassium oxazinate and hypoxanthine	10 d	300+300 mg/kg, i. p	UA 升高 ^[23] UA increase ^[23]
	大鼠 Rat	氧嗪酸钾+尿酸+沙丁鱼 Potassium oxazinate and uric acid and sardine	15 d	300+100 mg/kg, i. p+ 8. 3 g/kg, p. o	UA 升高, 肾损伤 ^[25] UA increased and renal injury ^[25]
	大鼠 Rat	腺嘌呤+酵母 Adenine and yeast	35 d	100 mg/kg, p. o	UA 升高, 肾损伤 ^[26] UA increased and renal injury ^[26]
	大鼠 Rat	腺嘌呤+酵母+尿酸钠 Adenine, yeast and sodium urate	8 d	100 mg/kg + 10 g/kg, p. o+25 mg/mL, i. m	UA、BUN、Cr 升高 ^[27] UA, BUN, Cr increased ^[27]
	大鼠 Rat	高脂饮食+腺嘌呤+硫酸氢钾 High fat diet, adenine and potassium bisulfate	32 d	10%, p. o+50 mg/kg, i. g+100 mg/kg, i. p	肾损伤, 足趾肿胀, TC、UA 升高, 钙沉积 ^[28] Kidney injury, toe swel Ling, elevated TC and UA, calcium deposition ^[28]
	小鼠 Mice	腺嘌呤+乙胺丁醇 Adenine and ethambutol	15 d	50+100 mg/kg, p. o	UA 升高、肾损害小 ^[29] UA increased with little renal damage ^[29]
	大鼠 Rat	氧嗪酸钾+NaCl Potassium oxazinate and NaCl	42 d	2%+0. 125%, p. o	血压升高+肾间质损伤 ^[30] Elevated blood pressure and renal interstitial injury ^[30]
	大鼠 Rat	次黄嘌呤+烟酸 Hypoxanthine plus and nicotinic acid	30 min	100 mg/kg, p. o + 80 mg/kg, i. p	UA 升高 ^[31] UA increase ^[31]

重大影响,使肠道通透性增加,肠粘膜免疫防御屏障下降,肠上皮细胞会出现异常增殖和凋亡,这些炎症细胞因子渗漏到体循环中,导致炎症恶化。有研究指出,肠道功能障碍引起的细菌移位可激活免疫系统并引起低度炎症,这与代谢性疾病密切相关^[35],脂多糖的增加会导致炎症通路激活^[36]。因此,肠道屏障受损导致的肠道菌群的紊乱可能是高尿酸血症发病的因素。近年来肠道微生物群已被证实与高尿酸血症及其代谢疾病有着密切的联系,Wang 等^[37] 15%的高果糖溶液喂养 BALB/c 雄性小鼠以复制高尿酸血症模型,在实验中可以发现血清 UA、XO 活性升高和肝中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)水平上升,高果糖的摄入会引起肠道菌群失调是高尿酸血症的危险因素。Morimoto 等^[38]在给大鼠饲喂含有氧酸的食物,8 周后发现 ABCG2 的表达在回肠中上调、尿酸升高,表明了回肠在尿酸排泄中的作用,蔡萌^[12]用含有高嘌呤、高脂非同源性食饵来诱导鹌鹑高尿酸血症,鹌鹑的肠道中革兰氏阴性菌致病菌数量增加,有害代谢产物内毒素入血含量增加,尿酸升高。因此破坏动物体内的肠道菌群可以作为诱导高尿酸血症模型的方法。

3 体外细胞模型

由于动物和人存在种属差异,且在用动物模型筛选治疗高尿酸血症药物具有周期性长、重复性低等的局限性,如果既能实现药物的高通量筛选工作及药效学的研究,同时又能避免动物模型所带来的局限性,则可为科学研究带来巨大便利,例如,体外细胞模型环境可控,无需伦理审批,具有可靠的可重复性优势,还可以更真实的模拟临床变化过程,目前,关于高尿酸血症体外细胞的文献记载并不多,体外细胞模型比基于动物的方法更适合在活细胞中筛选降尿酸药物,也为以后模型的建立提供新的方向。刘丹等^[39]以人的肝细胞为基础,用尿酸生成的前体物质腺苷为诱导物来建立高尿酸血症体外细胞模型,模型组给予一定的腺苷溶液,正常组给予基础培养基,36 h 后加黄嘌呤氧化酶孵育 12 h 后,抽取细胞上清液测尿酸浓度,结果显示模型组的尿酸浓度明显高于正常组,选用的腺苷浓度和时间在 2.5 mmol/L、36 h 可以显著的诱导人肝细胞产生尿酸。李全亮^[40]采用人脐静脉血管内皮细胞作为研究对象,用不同浓度的尿酸对人脐静脉血管内

皮细胞进行处理,来探究不同浓度的尿酸对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的内皮细胞炎症反应的影响,当尿酸浓度在 200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 时,人脐静脉内皮细胞的活力显著下降。Hou 等^[41]使用培养的正常成人肾的近端小管上皮细胞系(HK-2)以腺苷来诱导 HK-2 细胞产生嘌呤代谢的肌苷和次黄嘌呤,在腺苷为 2.5 mmol/L、密度为 1×10^5 ,诱导时间为 30 h 时建立高尿酸血症细胞模型。

4 讨论

根据上文所述,禽类和啮齿类仍被作为构建高尿酸血症模型的主要对象,它们因有着各自的优势而被研究者们所选择,禽类在尿酸代谢方面与人类有着相似之处而被应用,啮齿类在生理生化方面的相似性成为了首要的选择,且饲养简单、给药容易、繁殖性强宜于做新药的研究与开发,造模方法主要从增加尿酸来源、抑制尿酸酶活性、抑制尿酸排泄、敲除基因以及破坏肠道菌群等方面进行构造。研究者可根据不同的疾病需要选择相应的造模方法,在这个过程中要考虑到动物的健康状况,给药的剂量不宜过大,给药后尿酸水平应保持稳定避免出现可逆的情况。此外,随着细胞培养技术的广泛应用,高尿酸血症体外细胞模型具有可重复性的优势逐渐成为重要的选择对象。

虽然禽类和啮齿类拥有独特的优势,但禽类与人类的种系差异大在另一方面也受到了限制,啮齿类在尿酸生成与代谢方面与人类不同,体外细胞模型虽然可以提高药物的筛选效率,但仅能提供可能的化合物而缺乏精准性,药物的有效性和机制还需要在动物模型中来进一步验证。近年来研究者们也在逐渐尝试用其他动物来建立高尿酸血症模型,如斑马鱼和树鼩,斑马鱼的繁殖时间短,与人类基因具有同质性,现已用于一些遗传变异和尿酸调节之间分子机制的研究^[4],树鼩对高尿酸血症模型药有高敏感性成为潜在的动物模型,此外,非人灵长类动物最接近人类的基因编码被看作是最理想的模型,然而,目前这些方面的造模应用研究并不多,在未来的研究中可将其纳入并在已有的方法基础上进行深化,从而为建模提供新的策略。

参 考 文 献(References)

- [1] 姜泉,韩曼,唐晓颇,等. 痛风和高尿酸血症病证结合诊疗指南[J]. 中医杂志, 2021, 62(14): 1276-1288.
Jiang Q, Han M, Tang XP, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of gout combined with hyperuricemia [J]. J Tradit

- Chin Med, 2021, 62(14): 1276-1288.
- [2] 段姮妃, 段荔, 谢招虎, 等. 中西医结合治疗高尿酸血症研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(3): 210-213.
- Duan HF, Duan L, Xie ZH, et al. Research progress of hyperuricemia treated with integrated traditional Chinese and western medicine [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2020, 47(3): 210-213.
- [3] Johnson RJ, Bakris GL, Borghi C, et al. Hyperuricemia, acute and chronic kidney disease, hypertension, and cardiovascular disease: report of a scientific workshop organized by the national kidney foundation [J]. Am J Kidney Dis, 2018, 71(6): 851-865.
- [4] 简桂林, 青玉凤, 张全波, 等. 痛风动物模型的研究现状及进展 [J]. 医学综述, 2021, 27(12): 2397-2401.
- Jian GL, Qing YF, Zhang QB, et al. Research status and progress of gout animal models [J]. Med Recapitulate, 2021, 27(12): 2397-2401.
- [5] 吴芑, 王亮, 李海涛, 等. 高尿酸血症模型的建立及降尿酸药物的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(7): 1283-1294.
- Wu F, Wang L, Li HT, et al. Establishment of hyperuricemia model and research progress of uric acid lowering drugs [J]. Chin J Pathophysiol, 2021, 37(7): 1283-1294.
- [6] 刘晓燕, 朱学江, 郭军, 等. 不同品系小鼠对代谢性高尿酸血症造模的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(24): 4824-4237.
- Liu XY, Zhu XJ, Guo J, et al. Effects of different strains of mice on the modeling of metabolic hyperuricemia [J]. Pro Mod Biomedicine, 2011, 11(24): 4824-4237.
- [7] 曹克光, 臧力学, 唐丽, 等. 高尿酸血症动物模型的建立及应用 [J]. 实验动物科学与管理, 2000, 2(2): 6-9.
- Cao KG, Zang LX, Tang L, et al. Establishment and application of hyperuricemia animal model [J]. Lab Anim Sci Adm, 2000, 2(2): 6-9.
- [8] 林志健, 李凡, 张冰, 等. 禽类动物高尿酸血症的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(5): 572-576.
- Lin ZJ, Li F, Zhang B, et al. Research progress of hyperuricemia in poultry [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(5): 572-576.
- [9] 沈桂芹. 降尿酸方对高尿酸血症大鼠作用机制的研究 [D]. 辽宁: 辽宁中医药大学; 2018.
- Shen GQ. Study on the mechanism of Jiangsuan recipe on hyperuricemia rats [D]. Liaoning: Liaoning University of Chinese Medicine; 2018.
- [10] 陈光亮, 张清林, 马晓芹, 等. 酵母致小鼠高尿酸血症模型 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(4): 467-469.
- Chen GL, Zhang QL, Ma XQ, et al. Yeast induced hyperuricemia model in mice [J]. Chin Pharmacol Bull, 2003, 19(4): 467-469.
- [11] 赵振升, 孔涛, 周变华. 鸡高尿酸血症模型的建立及别嘌呤对其的抑制作用 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34(8): 1345-1348.
- Zhao ZS, Kong T, Zhao BH. Establishment of chicken hyperuricemia model and its inhibition by allopurine [J]. Chin J Vet Sci, 2014, 34(8): 1345-1348.
- [12] 蔡萌. 菊苣对非同源食饵诱导的鹌鹑高尿酸血症及肠道屏障损伤的影响研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2018.
- Cai M. Effects of chicory on hyperuricemia and intestinal barrier damage in quails induced by non-homologous bait [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2018.
- [13] Hong F, Zheng A, Xu P, et al. High-Protein diet induces hyperuricemia in a new animal model for studying human gout [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 1-23.
- [14] Ma L, Hu J, Li J, et al. Bisphenol A promotes hyperuricemia via activating xanthine oxidase [J]. FASEB J, 2018, 32(2): 1007-1016.
- [15] 陈光亮, 孙秀霞, 王钦茂, 等. 小鼠高尿酸血症模型的研究 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(3): 350-352.
- Chen GL, Sun XX, Wang QM, et al. Study on mouse model of hyperuricemia [J]. Chin Pharmacol Bull, 2001, 17(3): 350-352.
- [16] 吴林菁, 张幸幸, 蔡正伦, 等. 艳山姜挥发油对小鼠高尿酸血症的保护作用 [J]. 贵州医科大学学报, 2021, 46(12): 1404-1408.
- Wu LQ, Zhang XX, Cai ZL, et al. Protective effect of volatile oil from alpinia officinalis on hyperuricemia in mice [J]. Guiyang Med Coll, 2021, 46(12): 1404-1408.
- [17] 黄元河, 黎星星, 潘乔丹, 等. 赤苍藤醇提物的急性毒性及对小鼠高尿酸血症的影响 [J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(5): 52-54.
- Huang YH, Li XX, Pan QD, et al. Acute toxicity of alcohol extract of celastrus angustifolia and its effect on hyperuricemia in mice [J]. Chin J Etho Med Ethnopharm, 2017, 26(5): 52-54.
- [18] 王陈芸, 李哲丽, 叶尤松, 等. 氧嗪酸钾致小鼠急性高尿酸血症动物模型的研究及评价 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(1): 176-180.
- Wang CY, Li ZL, Ye YS, et al. Study and evaluation of acute hyperuricemia animal model induced by potassium oxazinate in mice [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2019, 35(1): 176-180.
- [19] 王心怡. 针刺俞、原、募穴对高尿酸血症大鼠 SUA、XOD、ALP 的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2017.
- Wang XY. Effects of acupuncture at Shu, Yuan and Mu points on SUA, XOD and ALP in hyperuricemia rats [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2017.
- [20] 杨桂梅, 黄胜华, 李江, 等. 腺嘌呤和氧嗪酸钾制作高尿酸血症大鼠模型比较 [J]. 实验动物科学, 2011, 28(2): 23-26.
- Yang GM, Huang SH, Li J, et al. Comparison of adenine and oxazinic acid in hyperuricemia rat model [J]. J Exp Anim Sci, 2011, 28(2): 23-26.
- [21] 张大艳, 肖为, 陶叶杏, 等. 海带褐藻多糖硫酸酯对腺嘌呤诱导的小鼠高尿酸血症的拮抗作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(3): 433-437.

- Zhang DY, Xiao W, Tao YX, et al. Antagonism of Laminaria fucoidan on adenine induced hyperuricemia in mice [J]. Nat Prod Res Dev, 2016, 28(3): 433-437.
- [22] Wen S, Wang D, Yu H, et al. The time-feature of uric acid excretion in hyperuricemia mice induced by potassium oxonate and adenine [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 51-78.
- [23] Li Q, Huang Z, Liu D, et al. Effect of berberine on hyperuricemia and kidney injury: a network pharmacology analysis and experimental validation in a mouse model [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15(32): 41-54.
- [24] Chen Y, Li C, Yuan X, et al. Curcumin attenuates potassium oxonate-induced hyperuricemia and kidney inflammation in mice [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118(10): 91-95.
- [25] Dhoubi R, Affes H, Salem MB, et al. Creation of an adequate animal model of hyperuricemia (acute and chronic hyperuricemia) study of its reversibility and its maintenance [J]. Life Sci, 2021, 268(11): 89-98.
- [26] Li H, Zhang X, Gu L, et al. Anti-Gout effects of the medicinal fungus *Phellinus igniarius* in hyperuricaemia and acute gouty arthritis rat models [J]. Front Pharmacol, 2021, 12(8): 801-910.
- [27] Liu X, Lv Q, Ren H, et al. The altered gut microbiota of high-purine-induced hyperuricemia rats and its correlation with hyperuricemia [J]. Peer J, 2020, 8(1): 86-64.
- [28] Liu Z, Chen T, Niu H, et al. The establishment and characteristics of rat model of atherosclerosis induced by hyperuricemia [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016(136): 52-57.
- [29] 林宇星, 阮君山, 傅慧玲, 等. 小鼠高尿酸血症模型的建立及小春花的干预作用 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(18): 48-49.
- Lin YX, Ruan JS, Fu HL, et al. Establishment of hyperuricemia model in mice and the intervention effect of Xiaochunhua [J]. Chin J Ethn Med Ethnopharm, 2011, 20(18): 48-49.
- [30] Mazzali M, Hughes J, Kim YG, et al. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-novel crystal-independent mechanism [J]. Hypertension, 2001, 38(5): 1101-1106.
- [31] 陈心智, 黄晓巍, 欧喜燕, 等. 痛风安胶囊对高尿酸血症大鼠血尿酸水平影响的实验研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2007, 23(2): 8-9.
- Chen XZ, Huang XW, Ou XY, et al. Experimental study on the effect of tongfeng'an capsule on serum uric acid level in hyperuricemia rats [J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med, 2007, 23(2): 8-9.
- [32] 潘明子, 贺玉伟, 李海龙, 等. Uox 基因敲除自发高尿酸血症对小鼠体重、血压及血液生理生化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 71-77.
- Pan MZ, He YW, Li HL, et al. Effects of Uox gene knockout spontaneous hyperuricemia on body weight, blood pressure and blood physiology and biochemistry in mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 71-77.
- [33] Jie L, Xu H, Xuan Y, et al. Knockout of the urate oxidase gene provides a stable mouse model of hyperuricemia associated with metabolic disorders [J]. Kidney International, 2018, 93(1): 69-80.
- [34] 朱学鑫, 孙益. 基于肠道菌群防治高尿酸血症的研究进展 [J]. 蛇志, 2021, 33(2): 214-217.
- Zhu XX, Sun Y. Research Progress on prevention and treatment of hyperuricemia based on intestinal flora [J]. J Snake, 2021, 33(2): 214-217.
- [35] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1761-1772.
- [36] Xu D, Lv Q, Wang X, et al. Hyperuricemia is associated with impaired intestinal permeability in mice [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019, 317(4): 484-492.
- [37] Wang H, Mei L, Deng Y, et al. Lactobacillus brevis DM9218 ameliorates fructose-induced hyperuricemia through inosine degradation and manipulation of intestinal dysbiosis [J]. Nutrition, 2019, 62(11): 63-73.
- [38] Morimoto C, Tamura Y, Asakawa S, et al. ABCG2 expression and uric acid metabolism of the intestine in hyperuricemia model rat [J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2020, 39(5): 744-759.
- [39] 刘丹, 任娇艳, 梁明, 等. 高尿酸血症细胞模型的构建及其在降尿酸肽筛选中的应用 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(8): 72-79.
- Liu D, Ren JY, Liang M, et al. Construction of hyperuricemia cell model and its application in the screening of uric acid lowering peptides [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(8): 72-79.
- [40] 李全亮. 高尿酸对 TNF- α 诱导的内皮细胞炎症反应的影响及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学; 2017.
- Li QL. Effect of high uric acid on TNF- α Effect and mechanism of induced inflammatory response of endothelial Cells [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2017.
- [41] Hou C, Liu D, Wang M, et al. Novel xanthine oxidase-based cell model using HK-2 cell for screening antihyperuricemic functional compounds [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 136(20): 135-145.

[收稿日期] 2022-05-30

刁华琼,张婧,王敏,等. 改良的多平台水环境法在睡眠剥夺动物模型中的应用与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 120-128.

Diao HQ, Zhang J, Wang M, et al. Application and evaluation of the modified multi-platform method in animal model of sleep deprivation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 120-128.

Doi:10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2023. 01. 015

改良的多平台水环境法在睡眠剥夺动物模型中的应用与评价

刁华琼¹, 张婧¹, 王敏¹, 陈雨菲¹, 朱庆生^{2*}, 李小黎^{1*}

(1. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029; 2. 北京市朝阳区第三医院, 北京 100121)

【摘要】 改良的多平台水环境法(modified multi-platform method, MMPM)由单平台及多平台水环境法发展而来,目前多用于制备睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)动物模型。与单平台和早期的多平台水环境相比, MMPM 可扩大动物的活动范围,减少群体分离和社会孤立带来的应激,具有易行性和适用性高及造模死亡率低的优点,是国内外较常用的一种 SD 造模方法。不过,影响 SD 模型制备的实验因素较多, MMPM 在不同研究中的造模效果参差不齐。为提高模型的稳定性和实验的可重复性,本文梳理了 MMPM 在 SD 动物模型中的具体应用和评价方法,以供后期相关研究参考。

【关键词】 改良的多平台水环境法;睡眠剥夺;动物模型;综述

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0120-09

Application and evaluation of the modified multi-platform method in animal model of sleep deprivation

DIAO Huaqiong¹, ZHANG Jing¹, WANG Min¹, CHEN Yufei¹, ZHU Qingsheng^{2*}, LI Xiaoli^{1*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China. 2. Third Hospital of Beijing Chaoyang District, Beijing 100121)

Corresponding author: LI Xiaoli. E-mail: tigerxl2002@163.com; ZHU Qingsheng. E-mail: zhuqingsheng32@sina.com

【Abstract】 The modified multi-platform method (MMPM) is developed from single-platform and multi-platform method and is mostly used to prepare sleep deprivation (SD) animal models. Compared with single-platform and early multi-platform method, MMPM expands the range of activities that animals partake in and decreases the stress caused by group separation and social isolation. Thus, MMPM can increase the social stability of SD animals. The advantages of MMPM, high simplicity and applicability and low mortality, contribute to the popularity in preparing the animal model of SD in China and other countries. However, many experimental factors affect the modeling effects of MMPM, resulting in uneven modeling effects in different SD studies. In this article, to improve the stability and reproductivity of the experimental SD and provide a reference for further, the specific application and evaluation method of MMPM in SD animal models are reviewed.

【Keywords】 modified multi-platform method, MMPM; sleep deprivation; animal models; review

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

[基金项目] 北京市朝阳区科技计划项目(CYSF2205)。
Funded by Chaoyang District Science and Technology Program of Beijing(CYSF2205)。
[作者简介] 刁华琼(1994—),女,博士研究生,研究方向:中医药防治脑病的研究。Email:m18989120996@163.com
[通信作者] 李小黎,男,博士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治脑病和神志病的临床和基础研究。
Email:tigerxl2002@163.com;
朱庆生,男,主任医师,研究方向:精神疾病的防治研究。Email:zhuqingsheng32@sina.com
* 共同通信作者

睡眠是维护机体健康及中枢神经系统正常功能必不可少的生理过程,睡眠剥夺对机体的精力、注意力、认知功能等均有消极影响,是多种神经系统疾病的常见危险因素,亟需建立与人类睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)相似的动物模型来探索其发病机制及防治途径。依据睡眠时脑电图表现、眼球运动和睡眠深度等情况,人类正常睡眠可分为非快速眼动(non-rapid eye movement sleep, NREM)和快速眼动(rapid eye movement, REM)两种时相^[1],其中 REM 睡眠又称异相睡眠,与人和动物的学习记忆、智力发育、情感等有密切联系,是动物实验中常被剥夺的睡眠时相。改良的多平台水环境法(modified multiple water method, MMPM)便是剥夺 REM 睡眠的一种常用方法,与温和刺激、强迫运动、药物干预等造模方法相比, MMPM 不仅简便易行,而且动物的死亡率低,具有较高的可控性和适用性。不过,不同研究在动物品系、睡眠剥夺时间、平台直径、对照组及模型评价等方面的选择存在差异, MMPM 的造模效果参差不齐。为提高 MMPM 制备 SD 模型的可靠性和可重复性,本文将从以上角度,梳理 MMPM 在国内外睡眠剥夺研究中的应用现状,为后期相关实验提供参考。

1 平台水环境法在睡眠剥夺动物模型中的应用历程

单平台水环境法, 又称倒置花盆法(inverted flowerpot method), 是 SD 动物模型中最早使用的平台水环境。1965 年, Dement 等^[2]初次将成年猫放置在圆形水箱中的石块上, 发现该方法确能剥夺猫的睡眠; 同年 Cohen 等^[3]将水箱中的石块更换为倒置花盆, 当盆底上的动物进入 REM 睡眠时, 会因全身肌张力下降, 鼻尖触水甚至落水而觉醒, 动物因畏水又重新上台进入睡眠, 如此循环往复, 可达到剥夺 REM 睡眠的效果。不过, 水环境中的单平台不仅限制了动物的活动范围, 而且增加了群体分离带来的应激, 不易判断指标变化与 SD 间的关系, 降低了实验对科学问题的说明性。1981 年, van Hulzen 等^[4]围绕水箱中心平台增加了 4 个平台, 在保证睡眠剥夺效果的前提下, 扩大了动物的活动范围。但动物此时仍为孤立状态, 同组大鼠被置于不同水箱或不同时段进行睡眠剥夺, 均可增加组内的造模效果差异, 因此研究者对平台水环境法进行再次改进, 即本文探讨的改良的多平台水环境法(MMPM)。MMPM 是指在增添水箱中平台的同时,

增加动物的数量, 使同组动物有机会被放入同一水箱剥夺睡眠, 不仅能减小组内的造模效果差异, 而且能降低群体分离带来的应激, 为睡眠剥夺研究提供相对稳定的动物模型。

2 MMPM 在睡眠剥夺动物模型中的具体应用

2.1 实验动物的选择

选择合适的实验动物是睡眠剥夺实验中的重要环节, 应尽量选用与人类有相似睡眠结构的动物为研究对象。SD 动物模型可用的品系较多, 如猫、鼠、犬、猴、果蝇、斑马鱼等, 但在 MMPM 建立的 SD 模型中, 大鼠和小鼠更为常用, 其中 Sprague-Dawley 大鼠^[5-7]、Wistar 大鼠^[8-10]、ICR 小鼠^[11-13]和 C57BL/6J 小鼠^[14-16]的供应充足, 且与人类有着相近的睡眠结构, 其使用频率更高^[17](见表 1)。动物的年龄和性别是 MMPM 中需要考虑的另外两个重要因素^[18]。有研究同时纳入雄性和雌性鼠进行睡眠剥夺, 发现雌性鼠对 SD 的反应性更高^[19], 这与女性失眠患者居多的特点相符, 但目前国内外的 SD 相关实验多以雄性鼠为研究对象, 其目的是减少激素波动对睡眠和实验结果的影响。事实上, 雄性鼠也存在激素波动, 其个体差异甚至比雌性个体更明显^[20], 缺乏对雌性个体的睡眠剥夺研究, 可能会降低女性服用治失眠药物的疗效或增加药物的不良反应发生率, 应平衡雌性与雄性个体在睡眠剥夺研究中的占比^[21]。此外, MMPM 中多以成年鼠为研究对象, 其中大鼠的周龄多为 8 ~ 12 周, 小鼠多为 6 ~ 8 周, 计划慢性睡眠剥夺或实验周期较长者, 可适当减小动物的基线周龄。另有研究选用孕鼠^[22]、青年鼠^[23]、退役种鼠^[24]分别构建妊娠期失眠、青少年失眠及老年失眠动物模型, 进而观察母代失眠对子代的影响^[25]以及青少年和老年群体中失眠的病理变化, 对研究特殊人群失眠的产生机制及治疗途径有重要价值。

2.2 睡眠剥夺环境的设置

睡眠与觉醒具有明显的昼夜节律, 光照周期是睡眠研究中需要关注的重要因素。多数实验在选用 MMPM 制备 SD 模型时, 会依据实验室原本的光照周期, 选择 12 h 光照 12 h 黑暗或 14 h 光照 10 h 黑暗^[13, 26], 也有研究为排除光暗节律对动物睡眠的影响, 将进行睡眠剥夺的动物暴露在 24 h 的荧光灯下^[27]。结果表明, 在不同光照周期中进行的 MMPM 均可减少动物的总睡眠时间, 但尚不清楚哪一光照

周期下的睡眠剥夺效果更好。其次,温度亦可影响动物的睡眠,在 MMPM 实验中,需着重关注睡眠剥夺水箱中的水温,而早期发表的相关文献多未提及对水温的控制,可能是水温这一因素未引起重视。随着睡眠研究的广泛开展及实验方法的完善,有关 MMPM 中水温控制的阐述越发详细,研究报道其一般设置在 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$,总体而言,与所处实验室的温度差异较小。再者,动物有随时采食水的习惯,无论正常饲养期还是睡眠剥夺期,都应保证动物有充足的饲料和饮水^[26]。MMPM 中的食水一般悬挂于睡眠剥夺水箱的顶部,动物站上平台则可自由进食饮水,也为连续观察动物的进食量提供了条件。此外,MPPM 常持续数小时甚至数天,应定时更换睡眠剥夺箱中的水,为动物提供相对清洁的实验环境。

2.3 平台相关参数的确定

MPPM 需用到的实验设备包括睡眠剥夺水箱、圆形窄平台、恒温仪、水箱网格盖、饲料挂篮及水瓶。首先,窄平台是 MMPM 剥夺动物睡眠的主要工具,平台数与动物数的比例、平台的直径、平台间的纵横间距以及平台与水面的距离均可影响造模效果。考虑到动物的社会群居性,越来越多的研究将来自同组的大鼠放入同一水箱进行睡眠剥夺,水箱中的平台数通常为动物数的 2 倍^[28],该比例既能为动物提供足够的活动范围,也不会占用过多的实验空间。其次,平台的直径由大鼠重量与平台面积的比值决定,大鼠体重与平台面积的比值越大,REM 睡眠减少越明显。当比值为 1:1 时,仅部分慢波睡眠受到影响;当比值为 10:1 时(如大鼠体重约 330 g,平台直径为 6.5 cm,平台表面积为 33 cm²),可完全剥夺 REM 睡眠^[29]。再者睡眠剥夺实验中大鼠常用的平台直径为 5.0 ~ 6.5 cm^[10,23],小鼠常用的平台直径为 3.0 ~ 3.5 cm^[30,11];平台间距以动物能在平台间自由跳越,但不能倚靠两个平台或水箱边缘入睡为宜,大鼠所在睡眠剥夺箱中的平台纵横间距一般设置为 7.0 ~ 10 cm^[19,31],小鼠则多设置为 5.0 cm^[12]。另一需要注意的是,平台通常高出水面 1 ~ 2 cm^[29]。若平台超出水面过多,动物在进入 REM 睡眠时不能第一时间触水而觉醒,且不利于动物入水后再次上台;若平台高出水面不足,则会增加动物与水环境的接触时间,造成更大的应激。

2.4 正常对照的实施

采用 MMPM 制备睡眠剥夺动物模型时,常用 3 种方法作为正常对照。第一种是宽平台对照,是指

将对照组动物放置在与模型组相似水环境中的宽平台上(大鼠:直径约 15 cm^[28],小鼠:直径约 12 cm^[16]),该平台可供动物蜷缩入睡而不触水,保证动物的睡眠,而且每个宽平台仅能容下 1 只动物,与窄平台制备的睡眠剥夺模型形成了严格的对照。第二种是密集铁丝网对照,是指将对照组动物放置在与模型组相似水环境中的密集铁丝网上(高出水面 2 cm),该方法允许同一水箱中动物蜷缩在一起入睡,与宽平台对照相比,更符合动物的社会群体性。第三种是家笼对照,是指将对照组动物置于平日饲养的笼中,由于对照组动物不用接触新异的水环境,且有充足的睡眠条件,故能与模型组形成更大程度的对照。3 种对照方法各有优势,可依据研究目的及实验条件选择其中 1 种或 2 种方法作为对照。从目前文献来看,家笼对照最为常用,其次是宽平台对照;当设置 2 个对照组时,多为家笼对照与宽平台对照组合。不过,在最初剥夺睡眠的 24 h 内,12.5 cm 的宽平台仍可以剥夺动物 50% 的 REM^[32];在剥夺睡眠的第 4 个 24 h,宽平台组与家笼对照组大鼠有同样长的 REM 睡眠时间,而窄平台组大鼠的 REM 急剧下降,提示造模时间过短不利于观察宽平台组与模型组动物间的睡眠差异,宽平台对照可能更适用于 24 h 以上的睡眠剥夺方案。此外,观察动物从平台取下后 24 h 内的睡眠情况,发现窄平台组大鼠的 REM 睡眠时间增加 280%,而宽平台组大鼠的 REM 时间没有显著增加^[33],提示宽平台对大鼠 REM 睡眠的影响较小,可用作 SD 模型的正常对照。

2.5 睡眠剥夺时长的选择

大鼠与小鼠均为夜行性动物,其睡眠多发生在白天,故国内外的睡眠剥夺实验多在白天进行。但动物的睡眠并非全在白天,有研究在夜间采用 MMPM 制备模型(14 h/d, 21 d),发现动物的自主活动距离增加,且出现明显的焦虑样行为^[8],这与人类长期失眠易引起不良情绪的特点相符。但目前尚无研究比较白天与夜间制备睡眠剥夺模型的效果差异,不清楚是否必要将 MMPM 集中在白天或夜间进行。此外,MPPM 有较高的可操作性,不仅适合制备急性 SD 模型,在慢性 SD 模型的制备中也有明显优势。如前所述,造模时间过短不易观察到模型组与对照组动物间的睡眠差异^[34],持续时间过长又会增加动物死亡的风险,因此急性 SD 模型中的动物通常暴露于 24 h 的 MMPM,持续时间多为 2 ~

4 d (见表 1)。慢性 SD 模型中,动物常接受 8 ~ 18 h/d 的睡眠剥夺,剥夺时长短于 12 h/d 者,常于上午开始,当日白天结束;剥夺长于 12 h/d 者,多从下午开始,次日白天结束,这在扰乱动物的睡眠节律的同时,也减小了造模实验对研究者睡眠的影响。更重要的是慢性 SD 模型的制备至少需要持续 21 d,如此可形成生物周期,这是 MMPM 在制备 SD 动物模型中的优势。

3 MMPM 在睡眠剥夺动物模型中的评价方法

3.1 一般体征

动物的一般体征包括体重、饮食饮水量、二便、精神状态、背毛色泽等。由于 SD 可显著增加动物的活动时间,增强能量代谢^[60],体重成为了睡眠剥夺研究常观察的体征之一。Youngblood 等^[29] 比较

表 1 MMPM 在 SD 动物模型中的应用
Table 1 Application of MMPM in the animal models of SD

类型 Type	常用的睡眠剥夺参数 Frequently-used parameters of MMPM		较少用的睡眠剥夺参数 Less-used parameters of MMPM	
	大鼠 Rats	小鼠 Mice	大鼠 Rats	小鼠 Mice
品系 Strains	Sprague-Dawley ^[5-7] 、 Wistar ^[8-10]	ICR ^[11-13] 、 C57BL/6J ^[14-16]	Swiss Albino ^[35] 、 Wistar Albino ^[36]	BALB/c ^[37] 、 Swiss EPM-M1 ^[38]
周龄 Age	8 ~ 12 周 ^[7,19,39] 8 ~ 12 weeks ^[7,19,39]	6 ~ 8 周 ^[12-13,40] 6 ~ 8 weeks ^[12,13,40]	3 ~ 4 周 ^[23,41] 、 退役种鼠 ^[24] 3 ~ 4 weeks ^[23,41] 、 retired breeders ^[24]	4 周 ^[11] 、12 周 ^[38] 4 weeks ^[11] 、12 weeks ^[38]
性别 Gender		雄性 Male	雌性 ^[10,28] 、雌雄并用 ^[19] Female ^[10,28] 、Male and female ^[19]	
光照周期(光:暗) Photoperiod (light:dark)		12:12	14:10 ^[13,26] 、24:0 ^[27]	
水温(℃) Water temperature(℃)	22 ~ 24 ^[27,41-42]	23 ~ 25 ^[11-12]	19 ^[33]	26 ~ 28 ^[14]
平台直径(cm) Diameter of platform (cm)	5.0 ^[10,31,43] 、5.5 ^[5] 、 6.0 ^[41] 、6.5 ^[23,27,44]	3.0 ^[14,16,30,38,45-46] 、 3.5 ^[11,12,37]	7.0 ^[19] 、 8.0 ^[47]	1.5 ^[40] 、 2.5 ^[15]
平台间距(cm) Distance between platforms (cm)	10 ^[19,23,28] 、 7.0 ^[27,31,48]	5.0 ^[12,15]	4.5 ^[39] 、 15.0 ^[49]	7.0 ^[46]
平台与动物数量之比 Ratio of platform to animals	10:4 ^[23,28] 、11:7 ^[41] 、 20:8 ^[24] 、12:5 ^[40] 、 12:8 ^[44] 、20:12 ^[9]	12:6 ^[38,45]	5:2 ^[10] 、6:5 ^[49]	24:5 ^[14]
正常对照的方法 Method of normal control	宽平台 ^[9,43] 、家笼 ^[50] 、 密集铁丝网 ^[27,47,49] Large platform ^[9,43] 、Cage ^[50] 、 Dense wire mesh ^[27,47,49]		无水环境的多平台 ^[39] MMPM was not filled with water ^[39]	
急性睡眠剥夺时长 Duration of acute SD	24 h/d(2 d ^[35,41,45] 、3 d ^[19,28,36,38] 、 4 d ^[28,44])		24 h/d(1 d ^[24] 、5 d ^[11] 、7 d ^[27,51])、 20 h/d(5 d ^[46] 、7 d ^[52])、 18 h/d(3 d ^[12])	
慢性睡眠剥夺时长 Duration of chronic SD	8 h/d(28 d ^[53] 、42 d ^[9,43])、 12 h/d(21 d ^[54] 、30 d ^[55])、 18 h/d(21 d ^[5,56] 、28 d ^[57-58])		20 h/d(14 d ^[49] 、28 d ^[47] 、56 d ^[14])、 24 h/d(42 d ^[59])	
REM 睡眠剥夺时间 Time of REM SD	8 h/d(8:30 ~ 16:30 ^[53])、 12 h/d(8:00 ~ 20:00 ^[54] 、9:00 ~ 21:00 ^[55])、 18 h/d(14:00 ~ 次日 8:00 ^[5] 、16:00 ~ 次日 10:00 ^[58] 、18:00 ~ 次日 12:00 ^[7,12]) 18 h/d(from 14:00 to the next day 8:00 ^[5] 、 from 16:00 to the next day 10:00 ^[58] 、 from 18:00 to the next day 12:00 ^[7,12])		19 h/d(20:00 ~ 次日 15:00 ^[6])、 20 h/d(0:00 ~ 20:00 ^[26] 、12:00 ~ 次日 8:00 ^[14,47]) 19 h/d(from 20:00 to the next day 15:00 ^[6])、 20 h/d(from 0:00 to 20:00 ^[26] 、from 12:00 to the next day 8:00 ^[14,47])	

窄平台与宽平台组大鼠的体重变化,发现窄平台能更明显地减轻动物的体重,提示平台水环境法对动物体质量的消极影响。闫德祺等^[59]运用 MMPM 制备慢性 SD 模型(24 h/d,每周 6 d,连续 7 周),从第 3 周开始,便观察到模型组大鼠的体重明显低于家笼对照组;Turan 等^[36]运用 MMPM 建立急性 SD 模型后(24 h/d,3 d),发现模型组动物的体重明显低于对照组和宽平台组。无论是在急性或慢性 SD 动物模型中,MMPM 均可减小动物的体重增长率,这与过度觉醒相关失眠人群体重下降的特点相符^[61]。此外,魏丹丹等^[54]通过 MMPM 建立睡眠剥夺模型(12 h/d,21 d)后,发现模型组小鼠毛发干枯、形体消瘦、对外界刺激反应减弱及严重的疲劳状态;谭云霞等^[49]通过 MMPM 制备 SD 模型(20 h/d,14 d),观察到大鼠进食和饮水量显著增多,本该睡眠的白天也活动不停,提示大鼠的睡眠节律紊乱;唐淑洁等^[57]建立慢性 SD(18 h/d,28 d),发现模型组大鼠精神亢奋,易激惹,毛硬粗糙无光泽,饮食减少、饮水增多等。由此可见,MMPM 模型对动物的一般体征影响较广,而且动物的进食量在不同睡眠剥夺期的变化趋势不完全一致,可能的原因是睡眠剥夺初期的能量代谢较高,促使动物进食,随着睡眠剥夺时长的累积,动物身体逐渐虚弱,进食日渐减少。总之,动态观察动物的一般体征,可丰富对 SD 模型的评价依据。

3.2 自主活动

老鼠有昼伏夜出的习性,睡眠剥夺会增加动物总的自主活动距离,可通过观测动物的自主活动情况,初步评估 MMPM 剥夺睡眠的效果。谢光璟等^[47]利用 MMPM 制备慢性睡眠剥夺模型(20 h/d,28 d),发现模型组大鼠的中心点移动距离增长,平均活动速度增加,活动频率更高,且活动面积更大,提示大鼠的兴奋性增加。刘鑫等^[56]通过 MMPM 进行慢性睡眠剥夺(18 h/d,21 d),于造模结束后第 7 天记录大鼠的自主活动情况,发现模型组大鼠的光照和黑暗环境活动路程以及总活动路程均显著增加,动物的白昼睡眠节律出现紊乱;谭云霞等^[49]进行的睡眠剥夺研究也发现类似结果。以上研究均提示 MMPM 可通过剥夺睡眠来增加动物的自主活动,该结果可作为成功建立 SD 模型的间接依据。

3.3 戊巴比妥钠睡眠协同实验

戊巴比妥钠对中枢神经系统有抑制作用,实验一般通过腹腔注射戊巴比妥钠,并结合动物的翻正

反射来评价 SD 模型的制备效果^[62]。翻正反射消失提示动物入睡,翻正反射恢复则提示动物从睡眠中觉醒,通常将腹腔注射至翻正反射消失的时长记为睡眠潜伏期,翻正反射消失到反射恢复的时长记为睡眠持续时间。课题组前期采用 MMPM 剥夺大鼠睡眠(12 h/d,21 d),通过戊巴比妥钠睡眠协同实验发现睡眠剥夺大鼠的睡眠潜伏时间较对照组长,睡眠持续时间较对照组短^[63]。Bergmann 等^[60]间断运用 MMPM 建立慢性 SD 模型,通过戊巴比妥钠睡眠协同实验发现模型组大鼠的睡眠潜伏期显著长于正常组,而睡眠时间显著短于正常组,这与失眠人群入睡困难,总睡眠时间不足的特点相符,提示 MMPM 制备 SD 模型的相似性。

3.4 脑电监测

脑电图是脑生物电活动的检查技术,通过手术在动物脑部安装电极,可持续监测动物的总睡眠时间及睡眠结构,是评估睡眠剥夺动物模型制备效果的重要工具。根据眼球运动,睡眠脑电图可分为 NREM 和 REM 波相,脑电观察的睡眠结构主要包括觉醒(WAKE)、慢波睡眠 I 期(SWS1)、慢波睡眠 II 期(SWS2)、快速眼动睡眠(REM)及其占总睡眠时间的比例。有研究通过 MMPM 制备 24 h 的急性 SD 模型,脑电监测发现模型组动物的睡眠潜伏期延长,并伴随皮层快速的低波幅脑电波,睡眠恢复期则观察到 REM 睡眠的反弹^[48],提示 REM 是 MMPM 剥夺的主要睡眠时相。课题组前期运用 MMPM(12 h/d,21 d)制备慢性睡眠剥夺大鼠,脑电监测发现模型组大鼠的 Wake 期时间显著增加,NREM 期、REM 期和总睡眠时间均明显短于正常对照组^[64]。闫德祺等^[59]间断使用 MMPM 42 d 建立慢性 SD,脑电结果提示模型组大鼠的总睡眠时间不短于家笼对照组,但 SWS2、REM 及其所占比例显著低于家笼对照组。张曼等^[51]利用 MMPM(24 h/d,7 d)制备 SD 模型,发现大鼠的总睡眠时间和 NREM 占比均低于正常组,睡眠潜伏期和觉醒比例均高于正常组;王琦^[34]与唐淑洁等^[57]的研究也得出类似结论,为 MMPM 成功制备 SD 动物模型提供了有力证据。

4 结语

动物品系、睡眠剥夺环境、平台相关参数、睡眠剥夺时长和正常对照方法是 MMPM 模型制备和评价的重要影响因素,虽然不同研究在以上方面存在差异,但也有规律可循。模型制备方面,睡眠剥夺

动物实验多以成年的雄性大鼠或小鼠为研究对象,以水环境中的宽平台或笼饲养为正常对照,实验常依据动物的体重估算合适的窄平台和宽平台直径。此外,MMPM 中的睡眠剥夺多在白天进行,其中急性 SD 的剥夺时长通常为 24 h/d,连续 2 ~ 4 d,慢性 SD 的剥夺时长多为 8 ~ 18 h/d,至少持续 3 周,具体剥夺时长需依据研究目的而定。模型评价方面,MMPM 制备的 SD 模型可表现出动物毛发粗糙、易激惹、体质量下降、自主活动增加等体征,以及睡眠潜伏期延长、总睡眠时间缩短、REM 睡眠及其占比降低等睡眠变化,符合人类失眠的临床特征,提示 MMPM 制备 SD 模型的相似性。

虽然 MMPM 是一种可靠的睡眠剥夺方法,但其在模型的制备和评价方面仍有不足。首先,水环境是 MMPM 剥夺动物睡眠的一个重要因素,但动物对水环境的适应程度存在差异,不同程度的应激可增加除 SD 以外其他因素对实验指标的影响,因此,有必要将动物提前放入睡眠剥夺箱适应环境。其次,温度过低是动物失眠的一个重要因素,若不能合理且均衡地控制每个睡眠剥夺箱的水温,将会增加实验误差,故需加用恒温设备来控制各睡眠剥夺箱中的水温。再者,睡眠剥夺动物模型中的客观评价方法较少,其中脑电监测需经手术安装电极,而 MMPM 中的水环境会增加切口感染的风险,且大鼠头部电极易在睡眠剥夺期脱落,对 24 h/d 的睡眠剥夺实验而言,不易监测动物在模型制备期的睡眠变化情况。随着实验设备的日益完善及睡眠研究的逐步深入,MMPM 在睡眠剥夺动物模型中的应用和评价方法有望得到改进。

参 考 文 献(References)

- [1] 王洛萱,李劲草,张有志. 常用失眠动物模型及其睡眠结构特征研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34 (5): 389-394.
Wang LX, Li JC, Zhang YZ. Research progress in sleep structure characteristics of commonly used animal insomnia models [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2020, 34 (5): 389-394.
- [2] Dement WC. Recent studies on the biological role of rapid eye movement sleep [J]. Am J Psychiatry, 1965, 122 (4): 404-408.
- [3] Cohen HB, Dement WC. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of paradoxical phase [J]. Science, 1965, 150(3701): 1318-1319.
- [4] van Hulzen ZJ, Coenen AM. Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats [J]. Physiol Behav, 1981, 27 (4): 741-744.
- [5] Konakanchi S, Raavi V, MI HK, et al. Effect of chronic sleep deprivation and sleep recovery on hippocampal CA3 neurons, spatial memory and anxiety-like behavior in rats [J]. Neurobiol Learn Mem, 2022, 187: 107559.
- [6] Wang T, Niu K, Fan A, et al. Dietary intake of polyunsaturated fatty acids alleviates cognition deficits and depression-like behaviour via cannabinoid system in sleep deprivation rats [J]. Behav Brain Res, 2020, 384: 112545.
- [7] Noorafshan A, Karimi F, Kamali AM, et al. Restorative effects of curcumin on sleep-deprivation induced memory impairments and structural changes of the hippocampus in a rat model [J]. Life Sci, 2017, 189: 63-70.
- [8] Han C, Li F, Tian S, et al. Beneficial effect of compound essential oil inhalation on central fatigue [J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1): 309.
- [9] Massadeh AM, Alzoubi KH, Milhem AM, et al. Evaluating the effect of selenium on spatial memory impairment induced by sleep deprivation [J]. Physiol Behav, 2022, 244: 113669.
- [10] de Oliveira RA, Cunha GMA, Borges KDM, et al. The effect of venlafaxine on behaviour, body weight and striatal monoamine levels on sleep-deprived female rats [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2004, 79(3): 499-506.
- [11] Zhou HR, Wu JR, Bei L, et al. Hydroalcoholic extract from *Abelmoschus manihot* (Linn.) Medicus flower reverses sleep deprivation-evoked learning and memory deficit [J]. Food Funct, 2020, 11(10): 8978-8986.
- [12] Li H, Yu F, Sun X, et al. Dihydropyridine ameliorates memory impairment induced by acute sleep deprivation [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 853: 220-228.
- [13] Wang X, Wang Z, Cao J, et al. Melatonin alleviates acute sleep deprivation-induced memory loss in mice by suppressing hippocampal ferroptosis [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 708645.
- [14] Tai F, Wang C, Deng X, et al. Treadmill exercise ameliorates chronic REM sleep deprivation-induced anxiety-like behavior and cognitive impairment in C57BL/6J mice [J]. Brain Res Bull, 2020, 164: 198-207.
- [15] Wang W, Yang L, Liu T, et al. Corilagin ameliorates sleep deprivation-induced memory impairments by inhibiting NOX2 and activating Nrf2 [J]. Brain Res Bull, 2020, 160: 141-149.
- [16] Jiao Q, Dong X, Guo C, et al. Effects of sleep deprivation of various durations on novelty-related object recognition memory and object location memory in mice [J]. Behav Brain Res, 2022, 418: 113621.
- [17] 谢晨,杨文佳,于心同,等. 睡眠研究中相关动物选择的进展 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 87-92.
Xie C, Yang WJ, Yu XT, et al. Progress in the animal selection for sleep research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2012, 20(2): 87-92.
- [18] 齐凤琴. 具有改善睡眠作用药物的药效评价方法的建立 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2005.
Qi FQ. The establishment of pharmacological evaluating methods

- on improving sleep effect [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2005.
- [19] Hajali V, Sheibani V, Esmaili-Mahani S, et al. Female rats are more susceptible to the deleterious effects of paradoxical sleep deprivation on cognitive performance [J]. Behav Brain Res, 2012, 228(2): 311–318.
- [20] Dayton A, Exner EC, Bukowy JD, et al. Breaking the cycle; estrous variation does not require increased sample size in the study of female rats [J]. Hypertension, 2016, 68(5): 1139–1144.
- [21] Clayton JA, Collins FS. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies [J]. Nature, 2014, 509(7500): 282–283.
- [22] Khodaverdilo A, Farhadi M, Jameie M, et al. Neurogenesis in the rat neonate's hippocampus with maternal short-term REM sleep deprivation restores by royal jelly treatment [J]. Brain Behav, 2021, 11(12): e2423.
- [23] Ghaheri S, Panahpour H, Abdollahzadeh M, et al. Adolescent enriched environment exposure alleviates cognitive impairments in sleep-deprived male rats; role of hippocampal brain-derived neurotrophic factor [J]. Int J Dev Neurosci, 2022, 82(2): 133–145.
- [24] Solanki N, Atrooz F, Asghar S, et al. Tempol protects sleep-deprivation induced behavioral deficits in aggressive male Long-Evans rats [J]. Neurosci Lett, 2016, 612: 245–250.
- [25] Han Y, Wang J, Zhao Q, et al. Pioglitazone alleviates maternal sleep deprivation-induced cognitive deficits in male rat offspring by enhancing microglia-mediated neurogenesis [J]. Brain Behav Immun, 2020, 87: 568–578.
- [26] Xie G, Huang X, Li H, et al. Caffeine-related effects on cognitive performance; roles of apoptosis in rat hippocampus following sleep deprivation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 534: 632–638.
- [27] Zhao FY, Guo SN, Xu Y, et al. Investigation of acupuncture in improving sleep, cognitive and emotion based on attenuation of oxidative stress in prefrontal cortex in sleep-deprived rats [J]. J Acupunct Tuina Sci, 2021, 19(3): 157–166.
- [28] Rajizadeh MA, Esmailpour K, Masoumi-Ardakani Y, et al. Voluntary exercise impact on cognitive impairments in sleep-deprived intact female rats [J]. Physiol Behav, 2018, 188: 58–66.
- [29] Youngblood BD, Zhou J, Smagin GN, et al. Sleep deprivation by the “flower pot” technique and spatial reference memory [J]. Physiol Behav, 1997, 61(2): 249–256.
- [30] Zhang Q, Su G, Yang Q, et al. Round scad-derived octapeptide WCPFSRSF confers neuroprotection by regulating Akt/Nrf2/NFkB signaling [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(36): 10606–10616.
- [31] Alhaider IA, Aleisa AM, Tran TT, et al. Sleep deprivation prevents stimulation-induced increases of levels of P-CREB and BDNF; protection by caffeine [J]. Mol Cell Neurosci, 2011, 46(4): 742–751.
- [32] Pujol JF, Mouret J, Jouvét M, et al. Increased turnover of cerebral norepinephrine during rebound of paradoxical sleep in the rat [J]. Science, 1968, 159(3810): 112–114.
- [33] Mendelson WB, Guthrie RD, Frederick G, et al. The flower pot technique of rapid eye movement (REM) sleep deprivation [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1974, 2(4): 553–556.
- [34] 王琦. 刺五加总苷对水平所致大鼠睡眠剥夺的睡眠周期的影响 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2014.
- Wang Q. *Acanthopanax* aggregation glycosides on levels of rats caused by sleep deprivation sleep cycle [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2014.
- [35] Lima AMA, de Bruin VMS, Rios ERV, et al. Differential effects of paradoxical sleep deprivation on memory and oxidative stress [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2014, 387(5): 399–406.
- [36] Turan I, Sayan Ozacmak H, Ozacmak VH, et al. The effects of glucagon-like peptide 1 receptor agonist (exenatide) on memory impairment, and anxiety- and depression-like behavior induced by REM sleep deprivation [J]. Brain Res Bull, 2021, 174: 194–202.
- [37] Xu X, Zheng P, Zhao H, et al. Effect of electroacupuncture at GV20 on sleep deprivation-induced depression-like behavior in mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 7481813.
- [38] Silva RH, Chehin AB, Kameda SR, et al. Effects of pre- or post-training paradoxical sleep deprivation on two animal models of learning and memory in mice [J]. Neurobiol Learn Mem, 2004, 82(2): 90–98.
- [39] Pei W, Meng F, Deng Q, et al. Electroacupuncture promotes the survival and synaptic plasticity of hippocampal neurons and improvement of sleep deprivation-induced spatial memory impairment [J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27(12): 1472–1482.
- [40] Farajdokht F, Vatandoust SM, Hosseini L, et al. Sericin protects against acute sleep deprivation-induced memory impairment via enhancement of hippocampal synaptic protein levels and inhibition of oxidative stress and neuroinflammation in mice [J]. Brain Res Bull, 2021, 174: 203–211.
- [41] Sahin L, Cevik OS, Cevik K, et al. Mild regular treadmill exercise ameliorated the detrimental effects of acute sleep deprivation on spatial memory [J]. Brain Res, 2021, 1759: 147367.
- [42] 孟玲欣, 范贵民, 王景涛. 改良多平台水环境法制作大鼠 REM 睡眠剥夺模型的研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2013, 36(2): 99–100.
- Meng LX, Fan GM, Wang JT. Study on REM sleep deprivation model of rats made by improved multi-platform water environment law [J]. Heilongjiang Med Pharm, 2013, 36(2): 99–100.
- [43] Alzoubi KH, Khabour OF, Rashid BA, et al. The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment; the role of oxidative stress [J]. Behav Brain Res, 2012, 226(1): 205–210.
- [44] Rossi VC, Tiba PA, Moreira KDM, et al. Effects of sleep

- deprivation on different phases of memory in the rat: dissociation between contextual and tone fear conditioning tasks [J]. *Front Behav Neurosci*, 2014, 8: 389.
- [45] Cao Y, Li Q, Liu L, et al. Modafinil protects hippocampal neurons by suppressing excessive autophagy and apoptosis in mice with sleep deprivation [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(9): 1282–1297.
- [46] Wan Y, Gao W, Zhou K, et al. Role of IGF-1 in neuroinflammation and cognition deficits induced by sleep deprivation [J]. *Neurosci Lett*, 2022, 776: 136575.
- [47] 谢光璟, 徐波, 夏婧, 等. 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马 CA1 区细胞结构及神经元损伤的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7): 26–32.
- Xie GJ, Xu B, Xia J, et al. Protective effects of anmeidan on cell structure against neuronal damage in hippocampal CA1 region of sleep-deprived rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(7): 26–32.
- [48] Xie JF, Shao YF, Wang HL, et al. Neuropeptide S counteracts paradoxical sleep deprivation-induced anxiety-like behavior and sleep disturbances [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 64.
- [49] 谭云霞, 纪可, 刘福贵, 等. 安寐丹通过调控星形胶质细胞活性改善睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆能力 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7): 18–25.
- Tan YX, Ji K, Liu FG, et al. Anmeidan improves learning and memory ability of sleep-deprived rats by regulating astrocyte activity [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(7): 18–25.
- [50] Karabulut S, Korkmaz Bayramov K, Bayramov R, et al. Effects of post-learning REM sleep deprivation on hippocampal plasticity-related genes and microRNA in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 361: 7–13.
- [51] 张曼, 戴建业, 唐乾利. 白背桐黄钻方调控失眠剥夺大鼠脑电活动、神经递质、炎症因子和氧化应激的促眠机制研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(11): 2432–2435.
- Zhang M, Dai JY, Tang QL. Hypnogenetic mechanism underlying regulation of electrical activity, neurotransmitter, inflammatory factors and oxidative stress of brain in insomnia model rats by baibeitong Huangzhuang formula [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2019, 46(11): 2432–2435.
- [52] 黄晓宇, 谢光璟, 黄攀攀. 天王补心丹加减干预睡眠剥夺大鼠能量代谢机制的生物信息学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(22): 172–180.
- Huang XY, Xie GJ, Huang PP. Bioinformatics analysis on mechanism of modified Tianwang buxinan intervention on energy metabolism in sleep deprived rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2020, 26(22): 172–180.
- [53] Alzoubi KH, Mayyas FA, Khabour OF, et al. Chronic melatonin treatment prevents memory impairment induced by chronic sleep deprivation [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 3439–3447.
- [54] 魏丹丹, 李玉洁, 王永杰, 等. 圣愈汤通过调节海马区单胺类神经递质水平改善睡眠剥夺小鼠学习、记忆能力 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(7): 1–8.
- Wei DD, Li YJ, Wang YJ, et al. Shengyutang improves learning and memory ability of sleep deprived mice by regulating levels of monoamine neurotransmitters in *Hippocampus* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2021, 27(7): 1–8.
- [55] 郭帆, 吴东南, 刘玲, 等. 酸枣仁汤防治睡眠剥夺性大鼠学习记忆功能变化及其对 NLRP3 通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(2): 22–27.
- Guo F, Wu DN, Liu L, et al. Effect of Suanzaoren Tang on learning-memory function and NLRP3 pathway in sleep-deprived rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2021, 27(2): 22–27.
- [56] 刘鑫, 王平, 丁莉, 等. 酸枣仁汤对老年慢性睡眠剥夺大鼠节律基因与钟控基因表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(4): 1890–1894.
- Liu X, Wang P, Ding L, et al. Effects of Suanzaoren Decoction on the expression of rhythm gene and clock control gene in elderly chronic sleep deprivation rats [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(4): 1890–1894.
- [57] 唐淑洁, 赵旭伟, 王梓丞, 等. 佐匹克隆对慢性睡眠剥夺老年大鼠神经递质及脑电的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(15): 1472–1474.
- Tang SJ, Zhao XW, Wang ZC, et al. Effects of zopiclone on neurotransmitter and electroencephalogram in aged rats with chronic sleep deprivation [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2017, 37(15): 1472–1474.
- [58] Lai WD, Tung TH, Teng CY, et al. Fish oil ameliorates neuropsychiatric behaviors and gut dysbiosis by elevating selected microbiota-derived metabolites and tissue tight junctions in rats under chronic sleep deprivation [J]. *Food Funct*, 2022, 13(5): 2662–2680.
- [59] 闫德祺, 张星平, 邓宁, 等. 魄不安于肺不寐大鼠褪黑素及其相关受体的变化 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(5): 2924–2928.
- Yan DQ, Zhang XP, Deng N, et al. Changes of melatonin and G-protein-coupled receptor 50 in insomnia rats with corporeal soul unrest in the lung [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(5): 2924–2928.
- [60] Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, et al. Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and mediation [J]. *Sleep*, 1989, 12(1): 31–41.
- [61] Ren R, Zhang Y, Yang L, et al. Insomnia with physiological hyperarousal is associated with lower weight: a novel finding and its clinical implications [J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11(1): 604.
- [62] 夏天吉, 闫明珠, 王智, 等. 大小鼠失眠模型和评价方法研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(3): 428–435.
- Xia TJ, Yan MZ, Wang Z, et al. Research progress on animal models of insomnia and evaluation methods [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(3): 428–435.
- [63] 陈弘婧. 柴胡加龙骨牡蛎汤加减对 REM 睡眠剥夺大鼠肠道菌群的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- Chen HJ. Effect of Chaihu plus Longgu Muli decoction on

intestinal flora of REM sleep deprivation rats [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2020.

- [64] 张乃文, 李梦媛, 李小黎, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对睡眠剥夺大鼠行为学、脑电活动和炎性因子的影响 [J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2022, 19(2): 36-41.

Zhang NW, Li MY, Li XL, et al. Effects of Caihujialonggumuli

Decoction on behavior, brain electrical activity mapping and inflammatory response of rats in sleep deprivation [J]. J Hunan Normal Univ (Med Sci), 2022, 19(2): 36-41.

[收稿日期] 2022-09-21

《中国实验动物学报》2023 年征订启事

《中国实验动物学报》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。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。

开设栏目:研究论著和研究快报。

读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,140 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,合计 600 元。邮发代号:2-748。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

请注明订刊数量,并写明刊物寄往地址及收件人。收到汇款后,我们会及时将发票寄给您。

徐国恒. 美国农业部主导的实验动物管理政策演变和启示 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 129-133.

Xu GH. U. S. federal law; animal welfare act and animal welfare regulations and enlightenment[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 129-133.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.016

美国农业部主导的实验动物管理政策演变和启示

徐国恒^{1,2*}

(1. 北京大学医学部实验动物科学部,北京 100191;2. 北京大学医学部基础医学院生理学与病理生理学系,北京 100191)

【摘要】 美国农业部《动物福利法》监管大中型动物如猴犬猫兔、海洋哺乳动物等的生产运输交易和使用等诸多商贸过程及其用于医学实验或非医学测试。该法规不管辖常用的实验室大鼠和小鼠,因而从动物类型上或从条例细则上不能全覆盖也不适合生物医学研究机构的实验动物管理。美国卫生署和 NIH 的动物政策管辖全美生物医学研究机构的脊椎类动物实验使用,被国际生物医学研究机构普遍借鉴采纳。美国的这两套动物法规管理体系,目的职能明显不同,既平行,又交叉和相互补充。本文介绍其主要沿革,侧重生物医学研究机构的实验动物使用与管理委员会组成和职能演变,期望对我国实验动物的使用和管理有所启示。

【关键词】 实验动物;动物设施;动物使用管理;动物福利

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 01-0129-05

U. S. federal law: animal welfare act and animal welfare regulations and enlightenment

XU Guoheng^{1,2*}

(1. Department of Laboratory Animal Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China.
2. Department of Physiology and Pathophysiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191)
Corresponding author: XU Guoheng. E-mail: xug@bjmu.edu.cn

【Abstract】 The United States Department of Agriculture is charged with drawing up the Animal Welfare Act and Animal Welfare Regulations, the only federal laws that regulate the treatment of animals in research, teaching, testing, and exhibition and include animal facilities, vehicles, equipment, or other sites used or intended for use in business. These federal laws govern large and medium-sized animals, such as monkeys, dogs, cats, and rabbits, and include marine mammals, but do not regulate the use of rats and mice, which are commonly used in biomedical laboratories in universities and institutes in the United States. Therefore, the laws do not fully govern the management of laboratory animals in biomedical research institutions. By contrast, the policy on laboratory animal care and use supervised by the United States National Institutes of Health (NIH) and Public Health Service (PHS) fully governs the use of all vertebrate animal species — including laboratory rats and mice — used in biomedical research. This paper gives a brief overview of historical events and information related to United States Animal Welfare Act and Animal Welfare Regulations. It is expected that this research could offer some enlightenment might offer guide the use and management of laboratory animals in China.

【Keywords】 laboratory animal; animal facility; animal care and use; animal welfare

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

美国联邦《动物福利法,Animal Welfare Act》由农业部下属的动物植物卫生检疫局(Animal and Plant Health Inspection Service, APHIS)主导负责^[1-2],管辖大中型动物的生产、饲养、运输、交易和

[作者简介] 徐国恒(1964—),博士,教授,常务副主任,研究方向:生理学、脂肪生成与脂肪分解调节。Email: xug@bjmu.edu.cn

使用等商贸过程,管辖范围主要是大中型哺乳类动物,但不包括常用的实验大鼠和小鼠,因而不适合生物医学研究机构的大小鼠实验动物管理。尽管以《动物福利法》冠名,但除了法规条例的标题词条外,蓝皮书全文 256 页内容中从未出现过一处“伦理”词汇,只出了 4 次“福利”字词^[1-3]。

美国卫生署及国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)主导全美生物医学研究机构的脊椎类实验动物管理政策,其鲜明特征是覆盖了实验室大鼠和小鼠,对大小鼠之外的其他大中型实验动物完全与美国农业部《动物福利法》同步,但在实施管理方面更加严格^[1-3]。这样,美国农业部、卫生署和 NIH 分别主导的两套联邦法规政策体系,职能不同、却平行交叉,实现了对广义的“动物”和狭义的“实验动物”包括“实验用动物”管理的全覆盖^[1-4]。

本文介绍美国农业部《动物福利法》实验动物政策的主要演变过程。

1 早期演变-因盗窃贩卖动物立法

在 1966 年以前,美国没有全国性的动物管理法规,也没有形成标准化的实验动物繁殖、饲养、使用和管理体系,主要体现在对实验动物的来源、质量、动物饲养设施环境没有规范性要求^[4-5]。从事生物医学研究的大学或研究院所等机构(institution),也包括非医学机构如机动车辆安全碰撞试验等,研究人员自行购买动物用于实验^[5]。那时美国的实验动物概念,主要是“实验用动物”概念。随着机构对“实验用动物”需求的快速增加,动物供应商应运而生,四处捕捉流浪犬猫,甚至偷窃家养犬猫,装进笼子麻袋,运输贩售到各类医学或非医学机构进行试验。这些动物进入研究机构之后、到达实验终点之前的实验期间,机构没有标准化的动物设施和饲养条件,往往因陋就简,导致实验用动物异常。但这一时期,主要是动物商贩的盗窃犬猫行为、运输贩卖过程中的虐待动物行为^[5],时有新闻报道,日渐引发公众关注。

1966 年,美国出台了第一部由农业部主导的《实验动物福利法》,首次以联邦法律形式禁止偷窃家养或宠物犬猫,作为实验用动物。1970 年改名为《动物福利法-Animal Welfare Act》,删除了“实验”两字,表明该法律监管重点是广义的动物,如畜禽动物、家养动物和野生动物,而不再只是限于实验

动物及其福利。以笔者认识,这不只是字面上的简单改动,意味着该法律对管辖动物范畴、机构和业务活动管理任务的重大变动,实验动物只是其涵盖的一小部分。1971 年,农业部颁布了《动物福利法》的 F 子部《Subpart F, Stolen Animals 盗窃动物》,禁止买卖、运输、展览和使用盗窃偷猎来的动物,强调禁止盗窃贩卖动物用于商业性展览,例如比赛耍猴之类。1979 年颁布《动物福利法》的 E 子部《Subpart E, Identification of Animals 动物标识》,加强动物标识和追踪溯源管理。

2 中期演变-因动物保护激进主义运动大幅修法

上世纪八十年代以后,欧洲和美国社会的动物保护组织、人道协会活动频繁,有的逐渐升级到暴力恐怖级别。最著名的标志性事件,是美国的两家著名大学和研究机构的实验室打砸事件^[6-8]。其一,与美国首都毗邻的马里兰州的行为学研究所(Institute for Behavioral Research, Silver Spring)的 Edward Taub 博士,研究猴的传入神经阻滞与肢体感觉运动功能重建。1981 年 5 月,该实验室接收相距约十英里外、位于美国首都的著名 Georgetown 大学政治专业的学生 Alex Pacheco 为志愿者。后者声称对医学研究感兴趣,其实是当时尚不知名的动物极端组织 PETA(People for the Ethical Treatment of Animals)的发起人之一,由该组织策划派遣渗入实验室内部。Taub 博士去外地休假一周,分配 Pacheco 负责照料猴。在此期间 Pacheco 精心拍摄了大量让普通民众看来具有强烈视觉冲击力的实验猴的照片,并且据此控告 Taub 博士一百多项虐待动物罪名。这在美国历史上、国际医学研究史上,都是第一次。1981 年 9 月警察突袭实验室, Taub 博士被逮捕,成为全世界第一个因实验动物被逮捕的科学家,被 NIH 撤销所有科研基金资助项目。经过漫长的诉讼,美国最著名的三家神经科学和精神科学会科学家的作证, Taub 博士最终无罪释放,但实验室被关闭。该研究所也被改组改名,即便可能有特殊背景,但现在业已不复存在。Taub 博士失业 5 年后,在另一州立大学教书,终身未再做猴实验研究,而是将之前的猴研究成果进行临床转化,发明了一种治疗方法试图帮助脑中风患者部分恢复瘫痪的肢体功能^[6-7]。

凭借此次极其轰动的著名事件的推动, PETA 一跃成为美国最大、世界知名的动物极端主义组

织,并由 Alex Pacheco 长期担任主席^[6-8]。PETA 公布的 2017 年财务报告收入 4846 万美元,绝大部分来自募捐。PETA 现在在很多国家设有分部,但已不屑关注实验动物,而致力抗议动物源食品包括鸡蛋牛奶,抗议电脑网络手机游戏捕捉囚禁动物甚至钓鱼等,拓展进入虚拟世界动物福利行业。

同时期,美国宾州大学一个使用狒狒研究脑水肿的著名实验室^[6-8],也被动物激进者闯入打砸,并提起诉讼。基于其社会政治文化特点,以那些轰动案件和新闻为契机,美国各地不断滋生更多的实验动物相关的重大事件,引发影响美国公众对动物和实验动物的强烈关注和辩论,影响民意转化为选票压力,影响政治界、科学界联手对动物法规进行快速修订和阐释。

1985 年 12 月 23 日美国紧急颁布联邦公共法案 99-198,即《食品安全法案-1985》的 F 分标题《Public Law 99-198, Food Security Act of 1985, Subtitle F - Animal Welfare 动物福利》,后来也被称作《The Improved Standards for Laboratory Animals Act 实验动物法 改良标准》。这个 F 分标题法规内容被转移至农业部《动物福利法》。史称其为 1985 年版重大修订,首次提出机构应建立 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC),阐述了人道关怀动物的理念,包括提供设施环境、健康饲养、减轻动物疼痛等。然而,1985 版最重大的修订是农业部设立了动物植物卫生检疫局 APHIS,其职能可能与国内的动物植物卫生监测检疫部门相似。美国动植物卫生检疫局职能重多,如农产品食品安全和全球贸易,动物植物病原检疫和相关生物技术、生物安全和恐怖活动,外来物种入侵和疫病传入、野生动物及家畜疾病监控等等。它附带监管研究机构 IACUC 的履职^[1-2,4]。同时,美国卫生署则依据 1985 年 11 月 20 日颁布的公共法案 99-158《健康研究扩展法案》(Public Law 99-158, Health Research Extension Act),于 1986 年修订《人道管理和使用实验动物》条款 (Humane Care and Use of Laboratory Animals) 形成了美国卫生署主导的实验动物法规政策,是第 3 版。

按 1985 年版紧急修订的规定,约定未尽事项在 1989 年颁布的《动物福利法实施条例-Animal Welfare Regulations, AWRs》中进行了细则规定。重要改动包括:(1) 动物机构需要获得注册许可,(2) 机构要成立至少 3 名成员组成的 IACUC、且其不能

来自本机构下属的同一个分支单位。这是美国农业部《动物福利法》政策下的 IACUC 构架的最显著特征,与美国卫生署和 NIH 至少 5 名委员且可来源同一下属分支单位的 IACUC 构架明显不同。

仔细审视中国国家和各省市不同版本的实验动物管理条例、国标涉及的实验动物管理委员会、或实验动物福利伦理委员会的人员来源和组成,有的参考采用的是美国农业部的 3 人 IACUC 框架^[1-2,4],有的则是美国卫生署和 NIH 的至少 5 人 IACUC 框架^[1-2,4],因此导致混乱,体现在实验动物管理相关的专业书籍和授课培训中,也体现在实际管理应用中。迄今有人仍不清楚应该按照机构的行业特点组建适宜的 IACUC 构架。例如有人认为医科大学的 IACUC 委员要平均分散分配到不同的下属分支单位,如 A 学院 B 学院、C 处 D 处,或者业务毫不相关的 E 单位。这种认识和做法已经施行了很多年,可能在通常大单位下的二级行政管理而言有些便利,但就实验动物专业而言,实践上因循守旧比较教条,效果是可以说是比较失败的。因为这类机构的 IACUC 委员会,他如果不执行什么具体功能,就是无效的,但这种机构 IACUC 很常见。这是值得讨论的问题,期望将来能按照机构属性、涉及的业务范围,进行梳理和规范。

话说回来,即便有了 1985 年紧急修法,此后美国各地仍然频繁爆发针对大学研究机构实验动物研究进行的暴力活动,动物激进组织入侵大学、破坏实验室和动物设施、盗窃或放走实验动物、炸弹威胁实验动物从业人员和科研人员、跟踪破坏实验动物从业者和使用者的汽车和房屋并威胁其家人,以至于英国伦敦警察厅、美国联邦调查局曾宣布这类激进动物组织的活动为暴力恐怖活动,其中最活跃的三个组织之一即上述通过制造银泉镇 (Silver Spring) 猴事件发展起来的 PETA^[6-8]。

3 后期演变-对动物和机构的法规定义、修法覆盖“研究机构”

1990 年前,美国农业部《动物福利法》主要覆盖动物“生产商、销售商、中间商、承运商、展览商”等商业贸易机构,通俗讲主要监管动物进入“研究机构”之前的过程,但并不包括“研究机构”。直到 1989 年颁布的条例细则,农业部《动物福利法》政策体系所监管的机构,仍然不包括“研究机构”^[2]。

1990 年进行的大幅修订颁布了 B、C 两个子部,首次定义增补了《Subpart C, Research Facilities 研

究机构》,才覆盖了“研究机构”内的动物使用和管理。1991 年又进行较大幅度修订,明确了对“动物”和“机构”范畴的法律定义,形成了最终标准章程。2002、2007 和 2008 年又进行数次小幅补充修订,构成了目前美国农业部《动物福利法》、《动物福利法实施条例》合二为一的体系。本文主要参考其 2020 年 7 月版蓝皮书^[2]。

值得思考的是该法以“动物福利”冠名,但长达 256 页的 PDF 文本除了法规标题外,正文中没有出现任何一处“伦理 Ethic, Ethics”词汇,仅出现了 4 处“动物福利 welfare of animal”词汇^[1-2]。可鉴其借动物福利之名,行管理之实。

目前,该法对“研究机构”的定义指使用活体动物进行研究 research、测试 tests、实验 experiments、教学(但中小学除外)、展览活动的机构组织或个人,但不包括宠物零售店。其“研究、测试、实验”的法律涵义广泛,包括但不限于医学生物学研究活动。其经销商(dealers)的定义,指将狗、猫进行商业销售用于研究、展览或大宗贩卖给宠物店等,但进行零售销售的宠物店却不属于“经销商”范畴。展览商(exhibitors)指公共或私人展览如嘉年华会、马戏团、动物园、海洋馆等涉及任何商业购买的恒温动物的机构活动,但零售宠物店、赛马赛狗、牛仔竞技表演、纯种狗猫展览不属于“展览商”范畴^[2]。

该法对所管辖的“动物-Animal”的法律定义是:活的或死的非人灵长类动物、犬、猫、兔、豚鼠、仓鼠、或任何其他温血动物,这些动物正在或打算用于研究、教学、实验、测试(如道路安全机动车碰撞测试)、动物展览目的(如动物园、海洋馆、马戏团、动物搏斗、斗鸡逗鸟等),或用作宠物目的,或用于商业使用目的^[1-2]。

但是该法同时也进行了细致的特别规定:(1)为了研究目的而饲养的鸟类、大鼠、小鼠、马,不是该法案管辖的“动物”范畴,意谓该法不覆盖实验室大小鼠和鸟禽和马;(2)其他农场动物包括但不限于,用作肉食品或皮毛纤维的牲畜和家禽、或用于改善动物营养、繁殖、用于或打算用于改善肉品质量或皮毛纤维质量、改善动物生产效率和管理效率目的的牲畜和家禽,不属于该法案管辖的“动物”范畴,意谓该法不覆盖大部分的农场动物及相关事项;(3)对于犬而言,所有的犬,包括用于狩猎、看家护院、或繁殖繁育、销售目的的狗及其杂交品种,均属于该法管辖的“动物”范畴,该法对犬及其相关事

项的覆盖是全方位的,体现了该法因禁止盗窃犬猫而来的源头、也体现了在欧美社会犬类享有的“高地位”;(4)该法对猫没有专门的定义,但在该法规条文中猫总是与犬一同出现(dogs and cats),二者的地位是相当的^[1-2]。

4 美国农业部政策对动物保护组织收容所的宽松规定与动物伦理悖论

农业部《动物福利法》规定,美国私立或公立的动物保护组织设立的收容所、人道协会等机构收容的猫、犬属于农业部法定管辖“动物”范畴,但只要不卖给展览商或研究机构,就无须获得注册许可证、也不需成立 IACUC。事实上赋予了动物保护组织设立的收容所法律豁免,对其收容的犬猫动物设施环境和饲养福利没有标准,不受法规监管。又规定其收容犬猫不能超过 1~2 周滞留期限,其后安乐死是收容犬猫能得到的最大福利、合法的命运归宿。几十年来这在美国或世界各地动物宠物收容所都在定期进行着,收容所将安乐死的日子称为宠物安乐日,那些景象若暴露于公众,不知对这样的动物福利作何感想。该法还规定,美国公立的动物收容所和人道协会机构不属于法人,因而无需获得注册许可也无需成立 IACUC,但可将收容的犬猫等动物提供给研究机构使用^[1-2,4]。

5 该法对我国实验动物管理参照系的借鉴意义

国标和地标建议的 IACUC 或伦理委员会框架,有至少 3 名委员的(GB/T 27416-2014)、有 5 名委员的人数差异(DB11/T 1734-2020),有委员可以来源于该机构下属的同一单位、或不能来源于不同下属单位的,其解释莫衷一是,实乃参照不同所致。

美国农业部动物植物卫生检疫局监管的机构 IACUC 至少由 3 名成员组成、且其不能来自本机构下属的同一个分支单位。这是美国农业部《动物福利法》IACUC 构架的最显著特征^[1-2,4]。可概要理解其主要管辖动物养殖场、经销商、运输商、海洋馆动物园等商业贸易机构,这些机构的下属分支机构均密切涉及动物的生产运输贸易等商贸过程,IACUC 委员的分散有利于规避同一机构下属部门的利益冲突。相类似的,我国实验动物养殖场、生产供应商等商贸机构,可参照美国农业部的动物法规体系及其 IACUC 构架。

但美国农业部动物法规体系及其 IACUC 构架,

不适合美国的也不适合我国的医学生物学研究机构。我国医学生物高校院所或医药生物制品研发机构,可遵循国际惯例、借鉴美国卫生署和 NIH 至少 5 名委员的 IACUC 构架^[1-2,4-5]、无须限定委员供职的下属分支单位^[1-2,4-5],由动物部与该机构的专业院系协商遴选,而不是由机构首脑和官僚指派^[5]。关于卫生署和 NIH 实验动物政策和管理体系沿革,另文撰述。

参 考 文 献(References)

[1] USDA. Animal and Plant Health Inspection Service [EB/OL]. [2022 - 04 - 25]. <https://www.nal.usda.gov/awic/animal-welfare-act>.
[2] USDA. Animal welfare act and animal welfare regulations [EB/OL]. [2022 - 07]. https://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/downloads/AC_BlueBook_AWA_508_comp_version.pdf.
[3] Gluck JP and Orlans FB. Institutional Animal Care and Use

Committees: A flawed paradigm or work in progress? [J]. Ethics Behav, 1997, 7(4): 329-336.
[4] ARENA, OLAW. ARENA/OLAW IACUC Guidebook [EB/OL]. [2018 - 5 - 10]. <https://olaw.nih.gov/guidance/ARENA-OLAW-IACUC-guidebook.htm>.
[5] Steneck NH. Role of the institutional animal care and use committee in monitoring research, A flawed paradigm or work in progress? [J]. Ethics Behav, 1997, 7(2): 173-184.
[6] Matfield M. Animal experimentation: the continuing debate [J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(2): 149-152.
[7] Traystman RJ. The goal of animal welfare, animal “rights”, and antivivisectionist groups in the United States [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 1990, 2(3): 153-158.
[8] Loeb JM, Hendee WR, Smith SJ, et al. Human vs animal rights. In defense of animal research [J]. JAMA, 1989, 262(19): 2716-2720.

[收稿日期] 2022-04-26

《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://zgswdw.cnjournals.com/zgbjyxzz/ch/index.aspx>
期待您的来稿!

徐国恒. 美国卫生署与国立卫生研究院 NIH 主导的实验动物管理体系的演变和启示 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 134-140.

Xu GH. PHS/NIH policy on laboratory animal care and use in the United States [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 134-140.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.017

美国卫生署与国立卫生研究院 NIH 主导的
实验动物管理体系的演变和启示

徐国恒^{1,2*}

(1. 北京大学医学部实验动物科学部, 北京 100191; 2. 北京大学医学部基础医学院生理学与病理生理学系, 北京 100191)

【摘要】 美国卫生署是负责联邦实验动物法规的行政部门,国立卫生研究院(NIH)是实施该法规的专业部门并监管全美生物医学机构脊椎类实验动物使用和管理。1961 年 NIH 最早建立了美国的实验动物管理框架,在实践中改进。1990 年代后发布著名的《IACUC 工作手册》和《实验动物管理与使用指南》,形成了较为完善的现代生物医学实验动物管理体系,被国际生物医学领域普遍采纳借鉴。本文介绍 NIH 实验动物政策演变、管理体系、实验动物使用与管理委员会 IACUC 的组成职责和工作运行机制,以期对我国实验动物行业有所启示。

【关键词】 实验动物;动物设施;实验动物使用与管理;美国卫生署;美国国立卫生研究院

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 01-0134-07

PHS/NIH policy on laboratory animal care and use in the United States

XU Guoheng^{1,2*}

(1. Peking University Health Science Center, Department of Laboratory Animal Science, Beijing 100191, China.
2. Department of Physiology and Pathophysiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191)
Corresponding author: XU Guoheng. E-mail: xug@bjmu.edu.cn

【Abstract】 Federal law and policy on laboratory animal care and use governed by the Public Health Service (PHS) and by the National Institutes of Health (NIH), Department of Health and Human Services in the United States is different from the Federal Laws and Regulations of the Animal Welfare Act supervised by the Animal and Plant Health Inspection Service of the United States Department of Agriculture. Early in 1961, the NIH released the first version of the Guide for Laboratory Animal Facilities and Care. With a series of important revisions implemented from 1960 s to 1990 s, the PHS/NIH have established two comprehensible systems: the IACUC and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The NIH office of Laboratory Animal Welfare is responsible for the general administration and coordination of the PHS-governed federal law and policy system and revises and releases the IACUC handbook, and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in the United States. Both publications are also widely adopted as administration references in the field of international biomedical research. This review describes the historic evolution of PHS/NIH Law and Policy on the use of laboratory animals.

【Keywords】 laboratory animal; animal facility; animal care and use; U. S. Public Health Service; National Institutes of Health

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

美国卫生部下辖公共卫生署 (Public Health Service, PHS)、国立卫生研究院(National Institute of Health, NIH)、食品药品监督管理局和疾控中心等部门。卫生署是主管生物医药、疾病健康基础和临

[作者简介] 徐国恒(1964—), 医学博士, 教授, 常务副主任, 研究方向: 医学生理学, 脂肪生成与脂肪分解调节。
Email: xug@bjmu.edu.cn

床研究相关联邦法规的行政部门。NIH 拥有 27 个独立的大型研究所和中心,是美国也是世界上规模最大的生物医学研究机构。2023 财年 NIH 预算约 625 亿美元,其中 NIH 管理支配的医学研发预算 490.4 亿、用于疾病大流行预防预算 120.5 亿。NIH 管理支配的 490.4 亿预算部分约 10% 用于 NIH 所属实验室,82% 以 NIH 基金项目形式资助全美高校和研发机构,约 8% 为 NIH 与院外和国外机构联合基金项目(以上资料摘译自 NIH 网站)。基于 NIH 独特的科研基金经费管理体制和地位,NIH 有能力将联邦实验动物法规落实为具体的实施细则。NIH 是美国生物医学实验动物管理体系的构建者和执行者。

前文^[1]介绍美国农业部《动物福利法》的“动物”定义不包括实验室大鼠和小鼠,因而不适合生物医学研究机构^[1-3]。美国卫生署和 NIH 的实验动物政策覆盖了实验室大小鼠及所有脊椎类动物,并完全兼容农业部主导的联邦动物法规,因而适合生物医学研究机构^[4-6]。本文介绍美国卫生署和 NIH 实验动物管理体系演变,侧重介绍 NIH 实验动物指南、实验动物使用与管理委员会(IACUC)组成、职能和工作机制;期望有益于探索适合国情的实验动物使用与管理体系。

1 NIH 实验动物管理体系的演变

1961 年美国芝加哥地区医学研究机构联合成立了一个动物饲养评议组(Animal Care Panel),旨在推动改善实验动物设施和饲养条件。1963 年评议组撰写《实验动物设施和饲养指南》(Guide for laboratory animal facilities and care),该项目受 NIH 资助,因而被认为是 NIH 实验动物指南第一版(1965 年和 1968 年修订第二、第三版)^[4-7]。同年,评议组成立独立的动物设施认证委员会,于 1965 年更名成为美国实验动物评估与认证协会(American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC),随后迁往毗邻华盛顿特区的 NIH 总部。1967 年后,评议组演变成为美国实验动物科学协会(American Association for Laboratory Animal Science, AALAS)、美国实验动物从业者协会或美国实验动物兽医培训机构(American Society of Laboratory Animal Practitioners, ASLAP)。这三大协会的总部均设在 NIH,是 NIH 主导全美生物医学机构实验动物管理政策体系的参谋部,率先提出“实

验动物科学、比较医学”概念,并以此为名主办实验动物专业期刊 Comparative Medicine、Journal of the American Association for Laboratory Animal Science (JAALAS)。

1971 年 NIH 颁布了完全由自己制订的实验动物政策(Care and Treatment of Laboratory Animals),同时发布《实验动物使用准则》(Principles for the Use of Laboratory Animals),被称为 NIH 指南第四版,于 1972 年修订为第五版^[4-7]。NIH 的实验动物管理政策是务实的,获得 NIH 资助的机构既可以申请 AAALAC 动物设施认证(代价昂贵),或者成立一个动物养护委员会(Animal Care Committee)加强管理,改善动物饲养条件。此时的动物养护委员会名称上尚不是 IACUC,只要求至少有 1 名兽医,每年检查 1 次动物设施并提出改进建议^[4-7]。

这期间欧美动物保护主义激进活动兴起。1966 年美农业部实施联邦《实验动物福利法》,旨在禁止盗窃犬猫贩卖用于实验;1970 年改名《动物福利法-Animal Welfare Act》,删除“实验”二字表明管辖重点不再是实验动物,而是温血动物,但该法的动物定义不包括实验室小鼠和实验室大鼠^[1-3]。

1973 年美国卫生署出台第一部实验动物法规《人道养护和使用实验动物 Humane Care and Use of Laboratory Animals》^[4-7],以联邦法规形式取代了 NIH 管理政策,强制要求机构进行动物设施 AAALAC 认证,必须建立至少 3 人的 IACUC。AAALAC 设施营造和认证标准很高,据估算全美机构需要为动物设施改造升级付出万亿美元的昂贵代价,在经济上并不可行^[4-8]。因为很多机构都无法达标,卫生署只得鼓励机构和科研人员“自觉遵守”。卫生署的首部法规没有明确 IACUC 职能,没有明确由谁实施和督察、如何评审动物实验计划(animal protocol)、如何向上级监管部门提交审查和监督报告,导致机构、IACUC、科研人员、动物设施部门看似都有责任但却没有具体责任,缺乏可执行和监督机制,脱离了现实,引起广大机构和科研人员不满^[8]。1979 年卫生署修订颁布第二版法规,不再强制要求动物设施 AAALAC 认证,只要求机构成立 IACUC 审查基金资助项目,但并不强制审查动物使用计划(Animal Protocol)而是鼓励机构和科研人员自觉审查,实际上与 1971 年 NIH 政策一样。但 1979 年卫生署修订的第二版法规有一个重大变化,即明确授权 NIH 的实验室安全与防护办公室

(Office for Protection from Research Risks) 下属的动物福利科 (Division of Animal Welfare) 具体负责 IACUC 事务^[4-9], 后来该科演化为 NIH 实验动物福利办公室 (Office of Laboratory Animal Welfare, OLAW) 负责 IACUC 事务至今^[4-7]。

1979 年卫生署修订版法规要求成立 IACUC, 但仍未建立审查督查动物使用计划 (Animal Protocol) 的有效机制。正如 Whitney 等^[8]调查研究认为在 1979~1984 年的 5 年间 IACUC 职责不明、缺乏独立性和专业性、在履职方面底气不足, 未能有效提升实验动物管理^[8-9]。1987 年 Whitney^[8] 建议卫生署修法明确机构的监管整改责任, 赋予 IACUC 独立督查职能和权利。建议 IACUC 委员应具有丰富的专业知识和实验动物经验, 切实有效审核动物使用计划, 认为 IACUC 的非专业委员难以提供有价值的建议, 质疑机构 IACUC 委员会组建的随意性, 不能有效履行职责^[8-11]。注意 1987 年后正当我国实验动物事业初起, 海外取经, 而当时美国体系并不完善, 自然取不来真经, 至今在我国机构主体责任和 IACUC 职能不明的情形仍相当常见。

上世纪七十年代以后欧美动物保护组织的激进活动愈演愈烈。银泉镇猴事件 (Silver Spring Monkey)、宾州大学研究人员进行狒狒手术时吸烟嬉笑事件 (影像被动物激进组织公布于众), 是美国实验动物发展史上的重大事件^[12-17]。从那时起到现在, “动物福利伦理” 在欧美社会成为极其敏感的话题。1981 年 9 月动物保护激进组织 (People for the Ethical Treatment of Animals, PETA) 做局以志愿者身份进入在 NIH 附近银泉镇的行为学研究所 (Institute for Behavioral Research) 的 Edward Taub 博士实验室^[7]。Taub 博士外出休假时嘱咐该志愿者照看尚在进行神经电活动和行为学实验的猴子, 但 PETA 成员精心拍摄具有强烈视觉冲击力的录像和照片, 在多家报刊和电视报道, 继而控告 Taub 博士 119 项虐待动物罪名^[12-17]。警察紧急搜查实验室并逮捕了 Taub 博士^[12]。Taub 博士成为美国也是世界上首位因实验动物被捕的科学家^[12], 经过数年诉讼被判无罪, 但所承担的 NIH 基金项目被撤销, 实验室被关闭, 失业多年, 后来该研究所也不复存在^[12]。

PETA 动物激进组织因此名声大噪, 并由该志愿者长期担任主席^[12]。1985 年 12 月 23 日美国紧急颁布联邦《食品安全法案》F 分标题《动物福利,

Public Law 99-198, Food Security Act of 1985, Subtitle F-Animal Welfare》, 后来也被称作《实验动物法案 改良标准 The Improved Standards for Laboratory Animals Act》。后来这个 F 分标题的法规内容被转移至农业部《动物福利法》。同时 1985 年 11 月 20 日联邦紧急颁布《健康研究扩展法案 实验用动物-Public Law 99-158. Animals in Research》, 卫生署据此修订颁布《人道管理和使用实验动物-Humane Care and Use of Laboratory Animals》, 将联邦法案《美国政府关于脊椎动物实验使用管理准则》作为规范性附录整合进入 1986 版卫生署法规, 全面覆盖了用于实验研究的所有脊椎类动物, 从此卫生署的实验动物法规政策有了质的飞跃^[4-11]。重要的是, 卫生署新法规授权 NIH 成立实验动物福利办公室 (Office of Laboratory Animal Welfare, OLAW)^[4-6,9], 它作为 NIH 直属单位对 NIH 主任或主任办公室负责, 同时拥有直接向卫生署提交监管报告的法定权利和职责, 一直主导 IACUC 体系和全美实验动物管理事务至今^[4-6,9]。

2 NIH 实验动物管理机构与管理政策主要内容

在推进实验动物管理的工作层面上, OLAW 致力推进和完善 IACUC 工作机制、修订发布 NIH 实验动物政策和使用管理指南, 这两方面的经验值得我国借鉴参考。一是, 推动全美机构建立切实有效的 IACUC 检查督查机制。按照 NIH 指南和 IACUC 工作手册的描述, 进入 1990 年代以后才真正确立了 IACUC 独立性和权威性, 明确了 IACUC 运行工作机制, 以 NIH 指南和 IACUC 体系为核心的管理制度才真正步入良性运行轨道^[4-6,9]。1992 年 NIH 发布第一版《IACUC handbook 工作手册》, 2002 年修订的第二版沿用至今; 同时还发布 IACUC 工作 101 问答, 细致描述了 IACUC 的组成职能、运行工作机制、委员职责及履职、动物使用与管理、人员培训、发生问题的处理建议等^[9]。二是, 修订发布 NIH《实验动物管理与使用指南 Guide for the care and use of laboratory animals 及相关政策细则^[4-6,9]》, 着重对动物设施和专业实验研究设施的设计营造、动物环境与饲养管理、动物使用计划 (Animal Protocol) 实施监督措施、对兽医照护、人员培训等进行规范。明确指出哪些措施和指标是必须执行的 (must, 具有法规强制性)、应当实施的 (should, 强烈建议)、可以实施或尽可能实施的 (may, 以鼓励追求更高的水准)^[4]。NIH 指南建立了必须遵守的最低标准和鼓

励追求的较高标准,分界明确清晰,措施内容可实施性强,但也保持了相当的变通灵活性。例如,允许在动物中心屏障设施之外建立非 SPF 级别的仪器检测区、手术区、实验操作区,允许在科研人员自己的实验室内进行不超过 24 h 的大小鼠实验操作、不超过 12 h 的豚鼠、仓鼠、犬、猫、兔临时实验操作,而且没有强制要求必须使用 SPF 级别大小鼠。

目前最新版 NIH《实验动物管理与使用指南》

是 2011 年第 8 版,与 1996 年第 7 版差别不大,可从 NIH 网站下载英文版^[4]。《IACUC handbook 工作手册及 101 问答》,目前是 2002 年修订的第二版^[9];两书均有中文翻译版可供参考^[18-19],是全面了解当代实验动物管理体系和工作规范的有效途径。

表 1 和表 2 对比列出了卫生署/NIH 和农业部法规政策下 IACUC 组成框架和工作职责的主要内容。

表 1 美国 NIH 和农业部政策下 IACUC 的组成框架

Table 1 Comparison of IACUC membership requirements

PHS/NIH 政策至少 5 名委员 Minimum of 5 members on PHS/NIH Policy	农业部政策至少 3 名委员 Minimum of 3 members by USDA Regulations
1 名兽医,督察动物健康福利,检查实验动物使用计划 Animal Protocol。可有多名兽医。 One veterinarian who has responsibility for activities involving animals at the institution.	1 名兽医,督察动物健康福利,检查实验动物使用计划 Animal Protocol。可有多名兽医。 One veterinarian who has responsibility for activities involving animals at the institution.
1 名富有动物研究经验的科研人员,可有多名。 One scientist experienced in research involving animals.	/
1 名非科学领域人士,可以是机构内的,也可以是机构外的。 One member whose primary concerns are in a nonscientific area.	1 名非实验动物使用者,可以是机构内的。 One person who is not a laboratory animal user.
1 名与该机构无关联的委员,能代表公众对动物养护和使用的关切。 One member not affiliated in any way with the institution, who represents the general community interests in the proper care and use of animals.	1 名与该机构无关联的委员,能代表公众对动物养护和使用的关切。 One member not affiliated in any way with the institution, who represents the general community interests in the proper care and use of animals.
不要求所有委员出席 IACUC 会议,有争议时超过半数委员开会投票表决。 Quorum votes require more than 50% of the IACUC members in favor.	其他要求:来自该机构的同一个下属单位的委员不超过 3 人。 Not more than three members from the same administrative unit of the institution

3 IACUC 的组建模式和运行管理以及对我们和启示

按照 NIH 指南和 IACUC 工作手册描述,机构首脑对该机构进行动物实验管理负责,但首脑及其副手不宜担任 IACUC 主席或委员;兽医师承担较大的责任并有独立上报的权利,可以是 IACUC 委员但不宜担任主席。因为就制度设计层面而言,IACUC 主席和兽医师都拥有独立的向上级行政主管部门报告重大事项的法定权利和职责,机构首脑和兽医师担任 IACUC 主席可能会有潜在的利益冲突^[4,9,18-19]。NIH 认为 IACUC 主席应由资深科学家担任,既能沟通机构首脑和科研人员,也有利于解决问题。如果一个机构的下属单位众多且实验动物用量大,NIH 建议可额外设置一名共同主席协同处理繁杂事务。NIH 问卷调查表明,美国半数以上的机构由 IACUC 主席来指派委员,因为他更了解合适的委员人选及其具备的专业知识、参与热情度和参与时间包括个人秉性,甚至会倾向选择那些较为抵触动物管理规则的教授做委员,实践表明那些平

时抵触管理的科研人员一旦了解问题症结所在和复杂性很可能会转变态度积极支持 IACUC 管理^[4,9,18-19]。IACUC 中非专业委员的作用长期以来备受质疑,主要是难以提供有价值的建议^[4,9,18-19],但笔者思考设置非专业委员可能有助于平衡和缓解社会公众对动物科研伦理的关切和焦虑。

在我国,机构首脑或副手担任 IACUC 主席的情形很常见。假如他有精力时间和意愿琢磨实验动物的具体管理事务,自然具备强大的资源调动能力来解决问题。我国几十年实践表明这不是有效模式,或许反映了 1990 年代之前尚未成熟的 NIH 体系对我国的遗留影响,应与时俱进改进。

2014 年国标 GB/T 27416《实验动物机构 质量和能力的通用要求》描述的 IACUC 组成与职责是迄今国内最详细的,其框架接近 NIH 管理体系。国内其他法规和标准,似应进一步明确“机构”的法律定义、动管会和伦理委员会的组成方式、职能区别及工作机制,其职责不只是保证动物“福利伦理”,而是管理督查保证动物质量和提升动物实验服务品质。

表 2 美国 NIH 和农业部 IACUC 委员会的职能

Table 2 Federally mandated functions of the IACUC

卫生署/NIH 授权的 IACUC 职责	农业部政策授权的 IACUC 职责
IACUC functions on PHS/NIH policy	IACUC functions on USDA regulations
至少每半年审查 1 次机构的动物福利、动物使用计划 Animal Protocol 落实情况。	至少每半年审查 1 次机构的动物福利、动物使用计划 Animal Protocol 落实情况。
Review, at least once every 6 months, the research facility's program for the humane care and use of animals, using the <i>Guide</i> as a basis for evaluation.	Review, at least once every 6 months, the research facility's program for humane care and use of animals, using Animal Welfare as a basis for evaluation.
审批 NIH 项目的动物实验计划 Animal Protocol、审批动物计划的重大变更。每 3 年重新审批 1 次(所有脊椎动物包括实验室大小鼠)。	审批动物使用计划 Animal Protocol、审批动物计划的重大变更。至少每 1 年重新审批 1 次(不包括实验室大小鼠)。
Review and approve, or withhold approval of animal care and use activities. Continuing review is required at least once every 3 years.	Review and approve, or withhold approval of animal care and use activities. Continuing review of activities required not less than annually.
至少每半年检查 1 次机构的所有动物设施,包括中心设施、外围实验设施、检测和手术操作区域、临时实验存留 24 h 区域,犬猫存留超过 12 h 的设施需遵守农业部法规处理。	至少每半年检查 1 次机构的所有动物设施,包括动物饲养和研究区、动物存留超过 12 h 的任何区域。
Inspect, at least once every 6 months, all of the institution's animal facilities, including satellite holding facilities (in which animals are housed for more than 24 hours) outside of the core facility and areas where surgical manipulations are performed, using the <i>Guide</i> as a basis for evaluation.	Inspect, at least once every 6 months, all of the institution's animal facilities, including areas where animals are housed for more than 12 hours.
调查处理涉及动物饲养和使用的投诉。	调查处理涉及动物饲养和使用的投诉。
Review and investigate concerns involving the care and use of animals at the institution.	Review and investigate concerns involving the care and use of animals resulting from public complaints and from reports of noncompliance received from laboratory or research facility personnel or employees.
就动物使用计划、动物设施环境、兽医照护、人员培训向机构首脑提出建议。	就动物使用计划、动物设施环境、兽医照护、人员培训向机构首脑提出建议。
Make recommendations to the institution regarding any aspect of the animal program, facilities or personnel training.	Make recommendations to the institution regarding any aspect of the animal program, facilities or personnel training.
向机构提交 IACUC 评估报告,包括是否遵守 NIH 指南,要明确指出偏离指南的情况及原因,指出重大、主要、次要缺陷及纠正措施和时间表,IACUC 可邀请临时顾问专家协助评估。	向机构提交 IACUC 评估报告,指出严重的、主要的、和次要的缺陷及纠正措施和时间表。发现对动物健康安全构成威胁的严重缺陷,IACUC 应在 15 个工作日内通过机构首脑向 APHIS 和资助该活动的联邦机构书面报告。
The evaluation and report that must distinguish significant deficiencies from minor deficiencies and contain a reasonable and specific plan and schedule for correcting each deficiency.	Prepare reports of its evaluations that must distinguish significant deficiencies from minor deficiencies and must contain a reasonable and specific plan and schedule with dates for correcting each deficiency.
违背 NIH 指南,视情况采取适当纠正措施;IACUC 会议超过半数表决可暂停动物实验并向 OLAW(NIH 实验动物福利办公室)书面报告并给出解释。	违背已批准的动物计划,视情况采取适当纠正措施,可暂停使用,直至向 APHIS(美农业部动物植物检疫局动物福利处)书面报告。
Be authorized to suspend an activity involving animals only after review of the IACUC with the vote. Review the reasons for suspension, take appropriate corrective action, and report that action with a full explanation to OLAW.	Be authorized to suspend an activity involving animals only after review of the IACUC with the vote. Review the reasons for suspension, take appropriate corrective action, and report to APHIS and any federal agency funding that activity.

据观察国内机构动管会或伦理委员会(IACUC)的几种组建方式,一是公文通知各单位推荐委员;二是主管领导和处室指派。这两类方式组建的委员会有很多非专业的行政后勤管理部门人员和各专业院系领导或知名教授,但撇开了责任攸关的动物部,成立后不能有效履职无疾而终的情形

较为常见。三是由动物部主导牵头与高频使用动物的院系协商,遴选有积极参与意识和熟悉动物实验的科学家作为委员;这种方式符合国际惯例,不悖我国管理法规。我国生物医学机构体量庞大,不宜由行政部门分派委员,不宜限定来自同一院系有经验的委员人数。建议由动物部主导与院系协商遴选并对委员进行履职培训,这决定动管会运行和履职的专业有效性,决定该机构的实验动物管理和服务水平。

美国农业部《动物福利法》定义的动物不包括实验室大小鼠,其 IACUC 组织框架用于生物医学机构容易引起混乱^[1-3]。农业部《动物福利法》要求设置 IACUC 的机构包括:公园、动物园、马戏团、水族馆等动物展览商、实验动物养殖场、运输商和经销商;不需要设置 IACUC 的机构包括:中小学和科学展览、生活用途的畜禽农场、零售宠物店、牛仔竞技赛马等;公立动物收容所或协会因不是“法人机构”而无须设立 IACUC,收容的犬猫可供研究机构使用;私立动物收容所也无须设立 IACUC,只要不把收容的犬猫卖给展览商或研究机构、且在两周内对收容动物实施安乐死^[1-3]。可见美国农业部《动物福利法》IACUC 体系主要覆盖动物商贸机构,通常不包括医学研究机构。它规定 3 名委员不能来自机构的同一下属单位,有利于规避下属部门之间利益冲突。我国大中型实验动物养殖场和单位供应商等商贸机构,可参考美国农业部《动物福利法》动物政策和 IACUC 体系。

4 思考与评论

美国卫生署负责实验动物联邦法规,NIH 具体负责实验动物使用与管理。总体来看国内很多机构的 IACUC 运行模式与美国 NIH 框架较为相似,近年来越来越重视对实验动物使用计划(Animal Protocol)的审批督查,这符合生物医学研究领域国际惯例。督查动物福利伦理只是 NIH 体系 IACUC 的一部分职责,主要职责是规范实验动物使用与管理。类比思考,国内条例要求机构成立实验动物管理委员会和福利伦理委员会,这两个委员会的框架组成和职能区分不甚明确,有很多重叠交叉,也没有明确如何履行各自的管理职责。作者认为应该合二为一,建立单一的职责明确的实验动物使用与管理委员会,进行一体化管理。另外,NIH 指南对于设施环境、动物饲养和使用管理明确界定了需要遵

守的最低标准、一般标准、鼓励追求的较高标准(体现在指南的用语 must, should, may),较好兼顾了设施营造和运行代价、可实施性、便利性灵活性之间的平衡。NIH 指南不强制要求必须在 SPF 屏障环境饲养和实验;允许在动物中心设施(Central/Core animal facility)的外围设立散在的卫星型设施(decentralized or satellite animal facilities)诸如影像仪器检查、手术操作、行为学实验、或感染操作区,而且这些区域不强制达到 SPF 环境;允许将大小鼠拿回实验室进行不超过 24 h 的终点实验操作;屏障内的动物实验区通常安装市政自来水管路、洗涤水池、排水地漏,方便使用。从很多医学研究特点和实验性质来看,复杂的影像检查、复杂的仪器测量、手术操作、行为学实验等临时或中短期动物实验,没有必要甚至也不可能在 SPF 环境进行,在适当管控的非 SPF 环境下进行不会影响实验结果。对比 NIH 实施多半个世纪的设施分区分级管理策略,国内近十几年来对大小鼠屏障设施的营造运行维持的硬性要求越来越高,而且标准趋向唯一,即动物设施环境、大小鼠级别及其饲养和实验环境都在趋向单一的 SPF 级别,运行代价高昂,值得思考。

参 考 文 献(References)

- [1] 徐国恒. 美国农业部主导的实验动物管理政策演变和启示[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 129-133.
Xu GH. U. S. federal law; animal welfare act and animal welfare regulations and enlightenment [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 129-133.
- [2] USDA. Animal welfare act and animal welfare regulations [EB/OL]. [2022-07]. https://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/downloads/AC_BlueBook_AWA_508_comp_version.pdf.
- [3] USDA. Animal and plant health inspection service [EB/OL]. [2022-04-25]. <https://www.nal.usda.gov/awic/animal-welfare-act>.
- [4] NIH. Guide for the care and use of laboratory animals; eighth edition [EB/OL]. [2011-01-01]. <https://olaw.nih.gov/sites/default/files/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals.pdf>.
- [5] PHS policy on humane care and use of laboratory animals. Office of laboratory animal welfare, National Institutes of Health [EB/OL]. [2021-6-9]. <https://olaw.nih.gov/policies-laws/phs-policy.htm>.
- [6] Office of Laboratory Animal Welfare. National institutes of health [EB/OL]. [2021-5-7]. <https://olaw.nih.gov.pdf>.
- [7] Rozmiarek H. Current and future policies regarding laboratory animal welfare [J]. Invest Radiol, 1987, 22(2): 175-179.
- [8] Whitney RA. Animal care and use committees: history and

- current national policies in the United States [J]. Lab Anim Sci, 1987, 37: 18-21.
- [9] ARENA/OLAW IACUC Guidebook. Second Edition [EB/OL]. [2018-5-10]. <https://olaw.nih.gov/guidance/ARENA-OLAW-IACUC-guidebook.htm>.
- [10] Steneck NH. Role of the institutional animal care and use committee in monitoring research, a flawed paradigm or work in progress? [J]. Ethics Behav, 1997, 7(2): 173-184.
- [11] Gluck JP, Orlans FB. Institutional animal care and use committees: a flawed paradigm or work in progress? [J]. Ethics Behav, 1997, 7(4): 329-336.
- [12] Matfield M. Animal experimentation: the continuing debate [J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(2): 149-152.
- [13] Traystman RJ. The goal of animal welfare, animal "rights", and antivivisectionist groups in the United States [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 1990, 2(3): 153-158.
- [14] Loeb JM, Hendee WR, Smith SJ, et al. Human vs animal rights. In defense of animal research [J]. JAMA, 1989, 262(19): 2716-2720.
- [15] Groves JM. Are smelly animals happy animals? competing definitions of laboratory animal cruelty and public policy [J]. Soc Anim, 1994, 2(2): 125-144.
- [16] Suran M, Wolinsky H. The end of monkey research? New legislation and public pressure could jeopardize research with primates in both Europe and the USA [J]. EMBO Rep, 2009, 10(10): 1080-1082.
- [17] Gluck JP. Moving beyond the welfare standard of psychological well-being for nonhuman primates: the case of chimpanzees [J]. Theor Med Bioeth, 2014, 35(2): 105-116.
- [18] 王建飞, 周艳, 刘吉宏, 等译. NIH 实验动物使用和管理指南 [M]. 上海: 上海科学技术出版社; 2012.
- Wang JF, Zhou Y, Liu JH, et al. Chinese version of NIH Guide for the care and use of laboratory animals: 8th edition [M]. Shanghai: Shanghai science and technology press; 2012.
- [19] 贺争鸣, 李根平, 等. 实验动物管理与使用委员会工作手册 [M]. 北京: 科学出版社; 2013.
- He ZM, Li GP. Chinese version of the IACUC Guidebook, 2nd Edition [M]. Beijing: The science publishing company; 2013.
- [收稿日期] 2022-04-26

《中国实验动物学报》稿约

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

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!