

刘茜,王新婷,程培培,等. II型心肾综合征大鼠模型制备方法的改良[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1381-1388.
Liu Q, Wang XT, Cheng PP, et al. Improvement in the establishment method for the type II cardio-renal syndrome rat model [J].
Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1381-1388.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.001

II型心肾综合征大鼠模型制备方法的改良

刘茜¹,王新婷¹,程培培¹,戎靖枫¹,杨天舒²,周华^{1*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院中西医结合心血管研究室,上海 201203;
2. 上海中医药大学附属市中医医院心内科,上海 200071)

【摘要】 目的 建立一种改良的II型心肾综合征大鼠模型并进行评估。**方法** 将20只雄性SD大鼠随机分为假手术组(7只)与模型组(13只)。采用在小动物麻醉机下挤心脏法进行永久性结扎冠状动脉左前降支造成心肌梗死,1周后行单侧肾(右肾)切除术,第6周行心脏超声、病理学染色及血液、尿液等检测来验证模型的建立。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠心超检测的心功能、内生肌酐清除率明显下降($P < 0.01$),脑钠肽、血肌酐、尿素氮、24 h尿蛋白明显升高($P < 0.01$);HE染色发现模型组大鼠心肌排列紊乱,肾小球萎缩伴炎症细胞浸润。苦味酸-天狼猩红染色发现模型组大鼠心肌胶原纤维明显增多,肾小管排列不规则,大量胶原沉积,阳性染色面积比明显升高($P < 0.01$)。**结论** 本改良造模方法能够制备一种操作简便、手术创伤小、死亡率低的II型心肾综合征大鼠模型,模拟了早期心脏、肾功能损伤和病理改变,为系统深入研究II型心肾综合征的发病机制及药效作用机理奠定了基础。

【关键词】 动物模型; II型心肾综合征;SD大鼠;纤维化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1381-08

Improvement in the establishment method for the type II cardio-renal syndrome rat model

LIU Qian¹, WANG Xinting¹, CHENG Peipei¹, RONG Jingfeng¹, YANG Tianshu², ZHOU Hua^{1*}

(1. Institute of Cardiovascular Disease of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. 2. Cardiology Department, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071)
Corresponding author: ZHOU Hua. E-mail: zhouhua@shutcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish an improved type II cardio-renal syndrome rat model and evaluate it.
Methods Twenty male SD rats were randomly divided into sham and model groups with 7 rats in the sham group and 13 rats in the model group. The model group received the method of squeezing the heart under a small animal anesthesia machine to permanently ligate the left anterior descending branch of the coronary artery to cause myocardial infarction. One week later, unilateral nephrectomy (right nephrectomy) was performed. The rats underwent cardiac echocardiography, pathological staining, and blood and urine tests at 6 weeks to verify model establishment. **Results** Compared with the sham group, the cardiac function assessed by echocardiography and the endogenous creatinine clearance rate in the model group rats were significantly decreased ($P < 0.01$), and the levels of brain natriuretic peptide, blood creatinine, urea nitrogen, and 24 h urine protein in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). HE staining revealed a

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(82274306),国家自然科学基金青年项目(82204859),上海申康医院发展中心重大临床研究项目(SHDC2020CR1053B)。

Funded by the National Natural Science Foundation General Fund(82274306), National Natural Science Foundation Youth Fund(82204859), Major Clinical Research Projects of Shanghai Shenkang Hospital Development Center(SHDC2020CR1053B)。

【作者简介】刘茜(1987—),女,助理研究员,硕士,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。Email:715810815@qq.com

【通信作者】周华(1962—),男,教授,硕士,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。Email:zhouhua@shutcm.edu.cn

disordered myocardial arrangement, glomerular atrophy, and inflammatory cell infiltration in model group rats. Picric acid-Sirius red staining showed a significant increase in myocardial collagen fibers, an irregular arrangement of renal tubules, and a large amount of collagen deposition in model group rats. The positive staining area ratio was also significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusions** This improved modeling method provided a type II cardio-renal syndrome rat model with a simple operation, minimal surgical trauma, and low mortality rate. This model simulates the early onset of cardiac and renal function damage and pathological changes in type II CRS, laying the foundation for systematic and in-depth research on the pathogenesis and pathological mechanism of type II cardio-renal syndrome.

【Keywords】 animal models; Type II cardio-renal syndrome; SD rats; fibrosis

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

心肾综合征(cardio-renal syndrome, CRS)是指心脏和肾任意一个器官急性或慢性功能不全导致的另一器官急性或慢性损伤而引起的临床综合征,根据其病理生理特点和病程长短,可分为5个亚型:I型为急性心肾综合征,即急性心功能障碍(如急性失代偿性心力衰竭、急性冠脉综合征)导致的急性肾损伤;II型为慢性心肾综合征,即慢性心功能障碍(如慢性心力衰竭、先天性心脏病)导致的慢性肾损伤;III型为急性肾心综合征,即急性肾损伤(如急性肾小管坏死、急性肾小球疾病)导致的急性心功能障碍;IV型为慢性肾心综合征,即慢性肾病(如慢性肾小球或间质病变)导致的心功能障碍;V型为继发性心肾综合征,即全身性疾病(如脓毒血症、糖尿病)导致的心脏、肾功能同时发生障碍^[1-2]。在心血管领域,2021年流行病学数据显示,全球心力衰竭患者人数已达6430万^[3],约63%的慢性心力衰竭患者存在II型CRS,明确II型CRS的发病机制并研发安全有效的药物迫在眉睫,急需通过高度模拟临床II型CRS的动物模型为发病机制研究及药物开发提供依据。目前很多心肾综合征的动物模型构建相对笼统,并未区分以上5个亚型,而现有的II型CRS动物模型构建术式繁多,手术创伤大,有些并不能很好地模拟发病和病情进展过程^[4-5]。本研究参考国内外学者的研究方法并进行改良,通过结扎冠状动脉+单侧肾切除术成功建立II型CRS大鼠动物模型,为进一步的发病机制及药物开发研究奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20只SPF级健康的6~7周龄SD雄性大鼠,体重180~200g,购于上海市计划生育科学研究所实验动物经营部【SCXK(沪)2018-0006】。饲养环

境:室温(23 ± 2)℃,湿度(50 ± 5)%,12h光照/12h黑暗,普通饲料喂养,自由获取纯净水,饲养于上海中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)2020-0009】。本实验开展获得了上海中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(IACUC:PZSHUTCM2303220006)。

1.1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(220405,深圳市瑞沃德生命科技有限公司),庆大霉素(2207202222,辰欣药业股份有限公司),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(C0105S,上海碧云天生物技术有限公司),改良天狼星红染色试剂盒(G1472,北京索莱宝科技有限公司),大鼠脑钠肽(BNP)酶联免疫检测试剂盒(H166-1-2,南京建成生物工程研究所有限公司),肌酐(Cr)测定试剂盒(肌氨酸氧化酶法)(C011-2-1,南京建成生物工程研究所有限公司),尿素氮(BUN)测试盒(二乙酰肼比色法)(C013-1-1,南京建成生物工程研究所有限公司),尿蛋白定量测试盒(CBB法)(C035-2-1,南京建成生物工程研究所有限公司)。

小动物麻醉机(R540,瑞沃德),动物心电图机(VECG-2302B,广州市三锐电子科技有限公司),心脏超声仪器(Vivid,GE),石蜡包埋机(HistoCore Arcadia H, LEICA),组织包埋冷台(HistoCore Arcadia C, LEICA),手动轮转式切片机(HistoCore BIOCUT, LEICA),石蜡切片水浴摊片机(HI1210, LEICA),组织病理学用烘片仪(HI1220, LEICA),显微数码CCD(DP71, Olympus),全功能酶标仪(Synergy H1, BioTek),离心机(Avanti J-15R, Beckman Coulter)。

1.2 方法

1.2.1 分组和造模

20只SD大鼠经适应性喂养1周后被随机分为假手术组($n = 7$)和模型组($n = 13$)。II型CRS造模:心肌梗死造模1周后行单侧肾切除术,第6周II

型 CRS 成模(图 1)。

心肌梗死后慢性心衰模型的建立:在 Johns 法建立心梗模型的基础上,参考文献^[6-8]略作修改,采取结扎大鼠冠状动脉前降支制备慢性心衰大鼠模型。取雄性 SD 大鼠术前禁食禁水 12 h,将大鼠放入诱导盒中 3% 异氟烷诱导麻醉,待大鼠麻醉后仰卧位固定在手术台上,使用面罩将大鼠脸部罩住,予 2% 异氟烷维持麻醉。常规胸部消毒、备皮,于心尖搏动最强处稍上(第 4、5 肋间)与胸骨平行处作一长约 2 ~ 3 cm 的横向切口,钝性分离胸大肌,右手持钝头剪紧靠胸骨左缘插入肋间肌,沿肋骨走向扩大胸腔,暴露心脏,剪开心包膜,双手挤压胸部使心脏自行跳出胸腔外,迅速于左冠状动脉前降支起始处下方约 2 mm 处用 6-0 带线缝针进行永久性结扎(深度约 2 mm,宽度约 3 mm),结扎后确认心肌明显发白,回纳心脏至胸腔,逐层缝合胸部肌肉和皮

肤,乙醇消毒术口。以上操作均严格在无菌条件下进行。术后立即行心电图检查,以标准导联 II(纸速 25 mm/s,电压 10 mm/mV)中 ST 段弓背抬高为心肌梗死形成的标准。假手术组除不结扎冠状动脉,其余操作同前。术后腹腔注射庆大霉素预防感染。

单侧肾切除造模:心梗术后 1 周,术前禁食禁水 12 h。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠,使大鼠俯卧位固定于手术台上,右侧肋下脊直肌外侧常规消毒、备皮,在右侧肋弓下 1 cm 处,脊柱向右旁开 1 cm 处切开一平行于脊柱长约 1.5 cm 切口,逐层切开肌肉进入腹腔,暴露右肾,分离肾包膜,暴露肾门,永久性结扎右侧肾蒂,切除右肾,注意不要伤及肾上腺。逐层缝合背部肌肉、皮肤,乙醇消毒伤口。假手术组除了不结扎肾蒂、不切除右肾,余操作同前。术后腹腔注射庆大霉素预防感染。

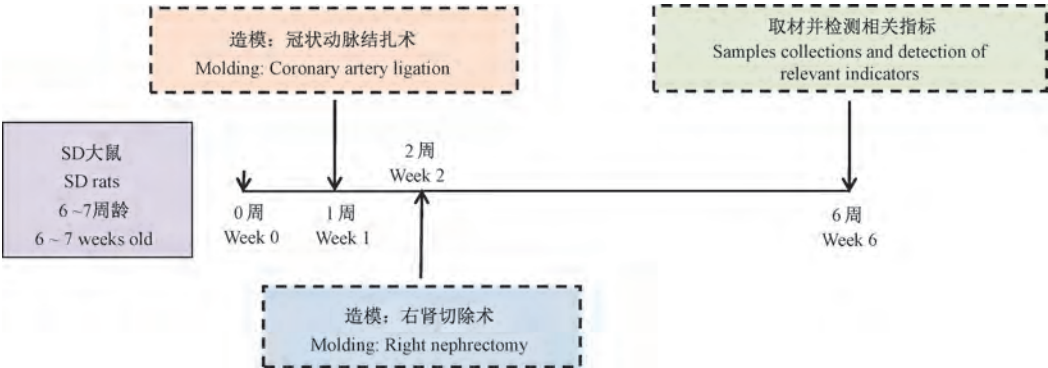


图 1 II 型心肾综合征造模路线图
Figure 1 Model road map for type II cardio-renal syndrome

1. 2. 2 超声心动图检测

两组大鼠于 II 型 CRS 建模完成后进行超声心动图检测,注射戊巴比妥钠麻醉大鼠,应用 GE Vivid 心脏超声仪器,M 型超声心动图测量大鼠左心室射血分数(left ventricular ejection fractions, LVEF)和左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)。

1. 2. 3 样本采集及心脏、左肾重量指数测定

在大鼠取血前 1 d,将大鼠放入代谢笼收集 24 h 尿液,并记录 24 h 尿液总量。将留取的尿液离心(常温,1500 r/min,5 min),取上清液放入-80℃保存。留取完大鼠尿液后,称取大鼠体重,注射戊巴比妥钠麻醉大鼠,采用腹主动脉取血法收集大鼠血液标本,静置 2 h 后离心(4℃,3000 r/min,15 min),

取上清液放入-80℃保存。取完血后开胸、开腹依次取出心脏、左肾,用生理盐水泡洗,滤纸吸干心脏、左肾表面水分,分别称量心脏、左肾重量。心脏重量指数 = (心脏重量/体重) × 100%。左肾重量指数 = (左肾重量/体重) × 100%。

1. 2. 4 心脏、肾生化指标检测

采用竞争法检测血脑钠肽(BNP),并用酶标仪分析计算吸光度。以肌氨酸氧化酶法检测大鼠血肌酐(Scr)、尿肌酐(Ucr)。以二乙酰肟比色法检测血尿素氮(BUN)。以 CBB 法检测 24 h 尿蛋白。计算内生肌酐清除率(creatinine clearance rate, Ccr):Ccr (mL/min) = 尿肌酐 × 24 h 尿量(mL)/血肌酐 × 1440。

1. 2. 5 组织病理学检查

取大鼠心脏、左肾组织,置于 4% 多聚甲醛固

定、不同浓度乙醇脱水、二甲苯透明,石蜡包埋、切片。常规脱蜡后按说明书进行 HE、苦味酸-天狼星红染色,封片后采用 OlympusDP71 显微数码 CCD 采集图片,用 Image-Pro Plus 6.1 软件进行心脏、左肾组织天狼星红阳性染色面积比(%)分析。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料若符合正态分布、方差齐性,组间分析采用两独立样本 *t* 检验,并采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行统计描述。若不符合正态分布、方差齐性,组间分析采用两独立样本非参数检验方法 Mann-Whitney U 检验,并采用中位数、四分位数间距 *M*(*P*₂₅, *P*₇₅) 进行统计描述。统计检验均采用双侧检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

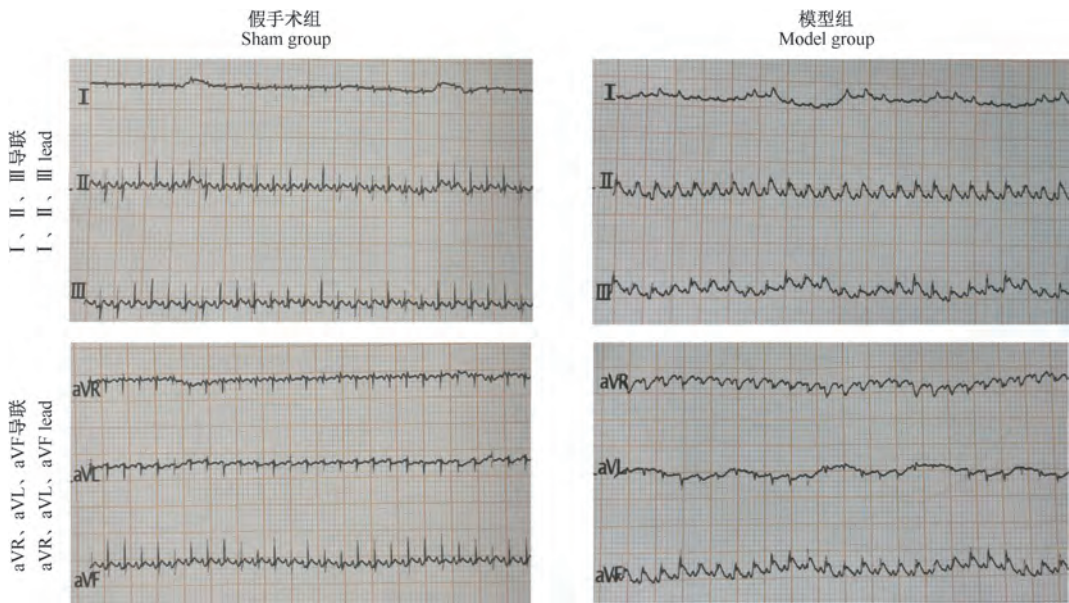


图2 假手术组和模型组大鼠心肌梗死造模后心电图

Figure 2 Electrocardiograms of rats in the sham group and model group after myocardial infarction modeling

2.3 超声心动图检查结果

采用两独立样本 *t* 检验分析显示,与假手术组相比,模型组大鼠 LVEF 明显降低 (*P* < 0.01)。采用 Mann-Whitney U 检验分析显示,与假手术组相比,模型组大鼠 LVFS 明显降低 (*P* < 0.01)。提示模型组大鼠心功能受损明显,心衰模型造模成功(图3)。

2.4 心脏、左肾重量指数比较

采用两独立样本 *t* 检验分析显示,模型组大鼠的心脏重量指数较假手术组明显升高 (*P* < 0.01)。采用 Mann-Whitney U 检验分析显示,模型组大鼠的左肾重量指数较假手术组明显升高 (*P* < 0.01)。提

2 结果

2.1 造模死亡率及心衰成功率

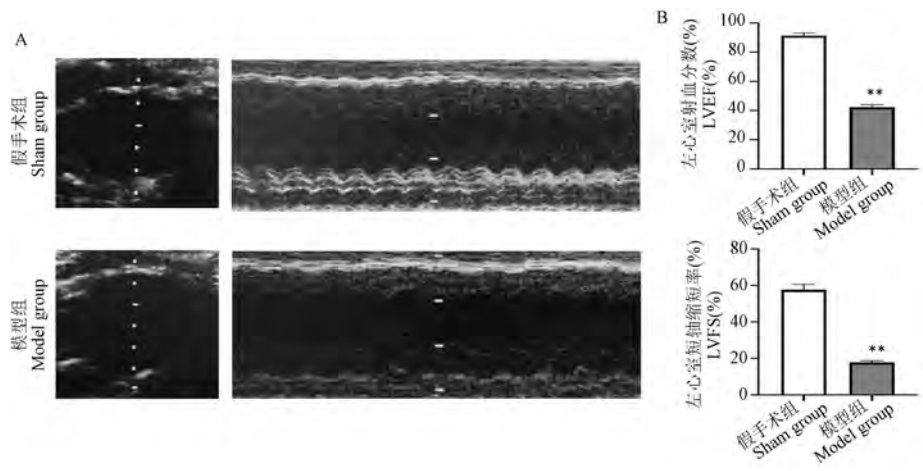
实验结束后,假手术组无大鼠死亡;模型组大鼠死亡 3 只,剩余 10 只,死亡率为 23.1% (3/13),心梗造模术后 24 h 内死亡 2 只,考虑死亡原因为心源性休克;心梗 + 单侧肾切除术后 2 周死亡 1 只,考虑死亡原因为心、肾功能衰竭。心梗术后 4 周行心脏超声检测,EF > 50% 则心衰造模失败,故剔除大鼠 2 只,大鼠心衰成功率为 80% (8/10)。

2.2 心电图检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠心梗造模后心电图显示 I、II、III、aVF 导联 ST 段呈弓背向上型抬高,提示心肌梗死造模成功(图2)。

示模型组大鼠的心脏、左肾体积存在代偿性增大(表1)。

表1 心脏、左肾重量指数比较($\bar{x} \pm s, M(P_{25}, P_{75})$)			
Table 1 Comparison of heart weight/body weight and left kidney weight/body weight($\bar{x} \pm s, M(P_{25}, P_{75})$)			
组别 Groups	<i>n</i>	全心重量 指数(%) Heart weight/body weight(%)	左肾重量指数(%) Left kidney weight/ body weight(%)
假手术组 Sham group	7	0.31 ± 0.01	0.36(0.34, 0.36)
模型组 Model group	8	0.41 ± 0.02**	0.49(0.48, 0.49)**



注:A:大鼠心脏超声心动图代表图像;B:大鼠 LVEF、LVFS 结果;与假手术组相比, ** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 3 大鼠超声心动图检查结果

Note. A. Representative echocardiographic images of rats. B. Results of LVEF and LVFS in rats. Compared with the sham group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 3 Results of rat echocardiography examination

2.5 心脏、肾生化指标检测结果

2.5.1 心脏生化指标检测结果

采用两独立样本 t 检验分析显示,与假手术组相比,模型组大鼠 BNP 水平明显升高 ($P < 0.01$),提示模型组大鼠心功能降低明显(表 2)。

2.5.2 肾生化指标检测结果

采用 Mann-Whitney U 检验分析显示,与假手术组相比,模型组大鼠 Scr、BUN 水平升高 ($P < 0.01$)。采用两独立样本 t 检验分析显示,与假手术

组相比,模型组大鼠 24 h 尿蛋白水平升高 ($P < 0.01$),Ccr 降低 ($P < 0.01$)。提示模型组大鼠肾功能降低(表 2)。

2.6 组织病理学改变

2.6.1 体表形态

假手术组大鼠心脏表面血管分布清晰,色泽红润,肾表面光滑有色泽。模型组大鼠心脏呈暗红色,左心室壁梗死区明显发白,肾表面凹凸不平,可见瘀斑(图 4)。

表 2 心脏、肾生化指标比较($\bar{x} \pm s, M(P_{25}, P_{75})$)

Table 2 Comparison of biochemical indicators of heart and kidney($\bar{x} \pm s, M(P_{25}, P_{75})$)

组别 Groups	<i>n</i>	脑钠肽 (ng/L) BNP (ng/L)	血肌酐 (μmol/L) Scr (μmol/L)	尿素氮 (mmol/L) BUN (mmol/L)	内生肌酐清除率 (mL/min) Ccr (mL/min)	24 h 尿蛋白 (mg) 24 h urinary protein (mg)
假手术组 Sham group	7	57.38 ± 7.90	15.28 (14.44, 16.15)	4.46 (4.40, 4.47)	2.43 ± 0.10	4.79 ± 0.58
模型组 Model group	8	152.19 ± 15.09**	50.13 (49.40, 56.90)**	6.98 (6.37, 7.27)**	0.94 ± 0.06**	14.69 ± 1.83**

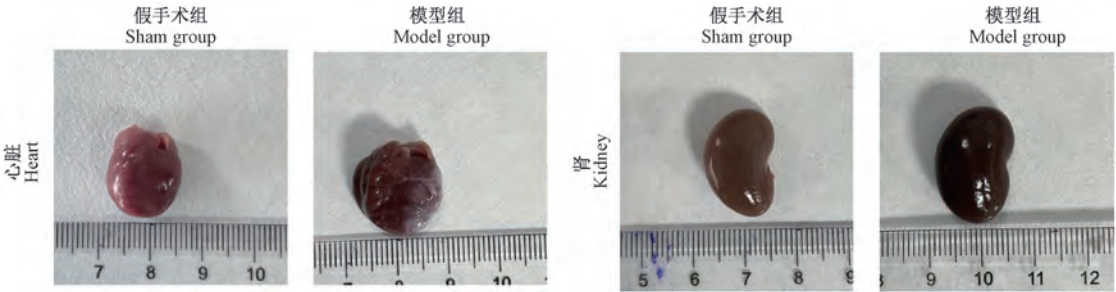


图 4 大鼠心脏和肾体表形态

Figure 4 Surface morphology of rats' heart and kidney

2.6.2 HE 染色结果

假手术组的心肌细胞大小正常,心肌纤维排列整齐、分界轮廓清晰,间质内无明显炎症细胞浸润。模型组的心肌细胞排列紊乱,心肌细胞明显水肿甚至坏死,管壁外及间质中有炎症细胞浸润,结缔组

织增生。假手术组的肾小管和肾小球形态正常,无萎缩肿胀,肾小管间质无明显炎症细胞浸润。模型组的肾小管萎缩,肾小管壁增厚伴管腔扩张,排列不规则,间质内可见炎症细胞浸润及粘液物质(图 5)。

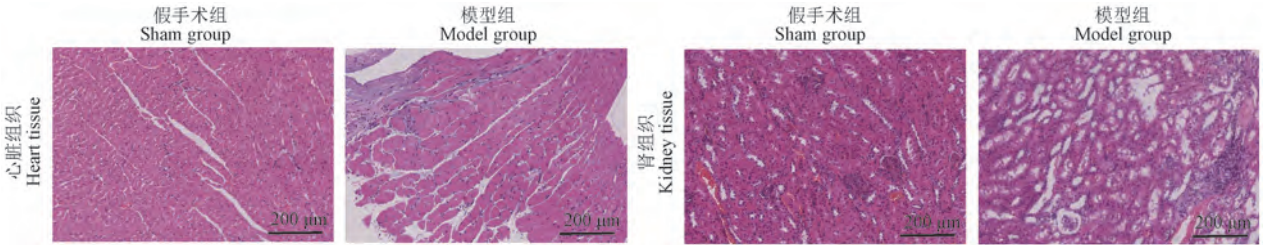
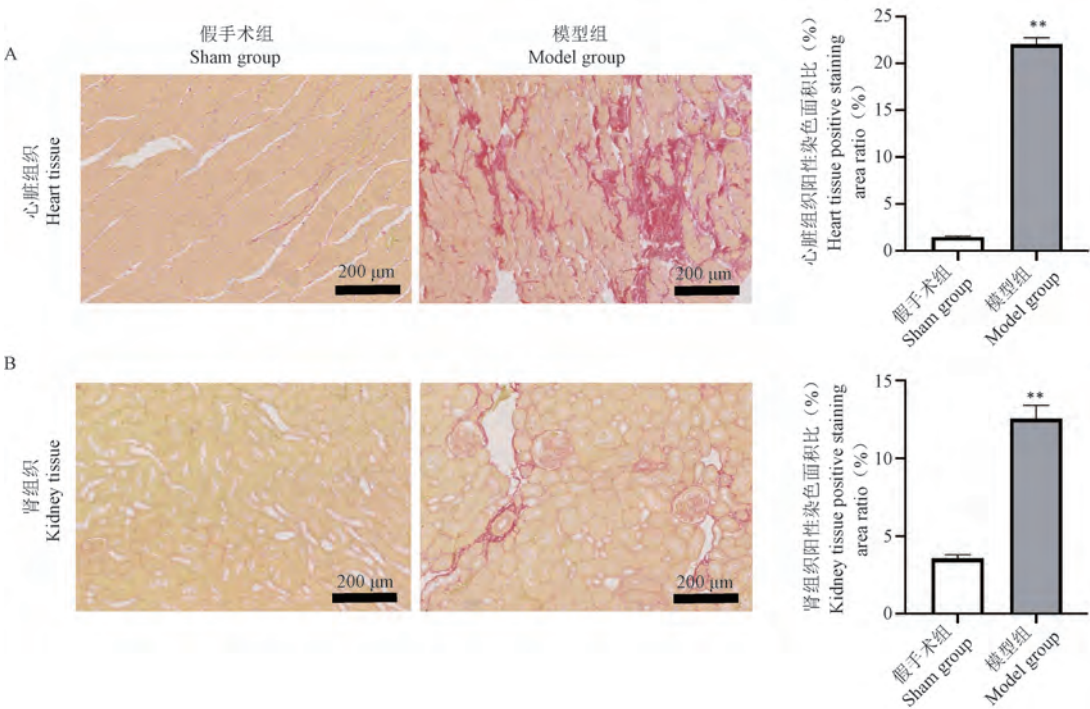


图 5 大鼠心脏组织和肾组织 HE 染色
Figure 5 HE staining of rats' heart tissue and kidney tissue

2.6.3 苦味酸-天狼星红染色结果

假手术组心肌胶原纤维分布均匀、排列整齐、集成束。模型组心肌胶原纤维明显增多,分布不均,排列紊乱,粗大的胶原纤维互相交错成网状。假手术组肾小管和肾小球结构正常,无萎缩肿胀,

无纤维组织增生。模型组可见肾间质中大量胶原纤维沉积,肾小球结构紊乱伴周围纤维化,肾小管排列不规则。采用 Mann-Whitney U 检验分析显示,模型组心脏、肾的天狼星红阳性染色面积比均较假手术组明显增加($P < 0.01$)(图 6)。



注:A:大鼠心脏组织苦味酸-天狼星红染色和阳性染色面积比;B:大鼠肾组织苦味酸-天狼星红染色和阳性染色面积比。

图 6 大鼠心脏组织、肾组织苦味酸-天狼星红染色及阳性染色面积比

Note. A. Picric acid Sirius red staining of rats' heart tissue and positive staining area ratio in rats. B. Picric acid Sirius red staining of rats' kidney tissue and positive staining area ratio in rats.

Figure 6 Picric acid Sirius red staining and positive staining area ratio in rats' heart tissue and kidney tissue

3 讨论

Ⅱ型 CRS 是近年来全球关注的热点和难点问题,构建规范的、高度模拟临床Ⅱ型 CRS 的动物模型可以为Ⅱ型 CRS 的发病机制研究和药物开发提供依据。Ⅱ型 CRS 的造模可分为单一模型和复合模型。单一模型造模时间长,其中给药动物模型与人体 CRS 发生过程存在差异,目前最常用的是冠脉结扎联合 5/6 肾切除的复合模型^[9-10]。根据文献报道,冠脉结扎多采用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后先行气管插管,再开胸结扎冠状动脉,结扎完后关闭胸腔,待大鼠恢复自主呼吸后拔除气管插管完成造模^[11]。此心梗造模方法耗时长,气管插管不当可引起喉头水肿、气道损伤,增加了感染率,气管穿孔、出血、分泌物过多则易阻塞气道,引起窒息等并发症,增加造模的死亡率。5/6 部分肾切除采用腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,切除一侧肾皮质的 2/3 或结扎肾动脉的 2/3 分支,1 周后再行第 2 次手术,同样方法麻醉,切除另一侧肾^[12-13]。5/6 肾切除需要二次开腹,残留肾少,手术创伤大,死亡率高。尽管上述复合模型使大鼠在短时间出现严重的心、肾功能损伤,但对于后期进行药效学研究,尤其治疗周期长的研究,心、肾功能衰竭导致的死亡率会增加,需扩大模型样本量。

根据文献报道,大鼠冠脉结扎 2 周后即可出现心衰^[14],4 周后心衰模型明确建立^[7]。大鼠单侧肾切除术常用于制备早期肾功能不全模型,肾切除第 2 周时另一侧肾进入代偿期^[15],第 4 周出现肾功能损伤^[16]。冠脉结扎联合单侧肾切除术的复合模型制备Ⅱ型 CRS 的研究发现,2 周内分别行冠脉结扎+单侧肾切除术,第 6 周Ⅱ型 CRS 即可成模^[17-18]。因此,在确保心脏、肾功能出现障碍的前提下应选择最短成模时间,节约造模成本,缩短实验周期。

本研究参考了上述成模时间并对术式进行改良,通过小动物麻醉机下挤心脏法进行永久性结扎冠状动脉左前降支造成心肌梗死,1 周后行单侧肾(右肾)切除术,第 6 周建立Ⅱ型心肾综合征大鼠动物模型。麻醉机下挤心脏法所需麻醉时间短,无需气管插管,不存在气道损伤,减少了感染风险,降低了死亡率。单侧肾切除减轻了造模对肾的损伤,避免了二次开腹,减少了麻药使用及感染风险。尽管单侧肾切除不能在短时间内引起严重的肾损伤,但更符合Ⅱ型 CRS 的发病特点,即慢性心功能障碍导

致的慢性肾损伤^[15]。

本研究改良的大鼠模型,降低了死亡率,同时,造模成功率也得验证。心超中 EF、FS 主要反映左心室的收缩功能,EF、FS 越低提示心肌收缩力越弱,心衰越严重。BNP 主要储存于心室内,心衰时大量分泌,是评价心功能紊乱最敏感和特异性最高的指标之一,常用于心衰的诊断和治疗。本研究中模型组大鼠 EF、FS 较假手术组明显降低,BNP 明显升高,提示大鼠心功能损伤明显,心衰造模成功。Scr、BUN、Ccr 和 24 h 尿蛋白都是常用的反映肾功能的经典指标,当出现肾功能受损时,肾小球滤过功能下降,使得血液中 Scr、BUN 排泄受到影响,造成 Scr、BUN 在血液中积累。Ccr 反映肾小球的滤过功能,判断肾小球损伤程度,滤过率越低则肾损伤越大。肾小球损伤使滤过膜通透性增加,尿液中蛋白质含量升高,24 h 尿蛋白是反映早期肾损伤的主要指标^[19]。与假手术组相比,模型组大鼠 Scr、BUN、24 h 尿蛋白水平明显升高,Ccr 明显降低,提示模型组大鼠肾功能降低。CRS 发病机制复杂,目前较为公认的机制包括交感神经系统过度兴奋、RAAS 过度激活、炎症反应、氧化应激等,最终表现为心肌重构和肾纤维化^[20-22]。本研究通过组织学检查发现,模型组大鼠心肌细胞排列紊乱,管壁外及间质中炎症细胞浸润,结缔组织增生,心肌胶原纤维明显增多且排列紊乱。肾小球结构紊乱伴周围纤维化,肾小管排列不规则,间质内可见炎症细胞浸润、粘液物质及胶原纤维沉积。模型组心脏、肾的天狼星红阳性染色面积比较假手术组明显增加,提示模型组大鼠出现了心肌重构及肾纤维化。上述实验结果证实了本模型制备方法的改良能较好地模拟Ⅱ型 CRS 发病早期的心脏、肾功能损伤和病理改变。

综上所述,本研究采用在小动物麻醉机下挤心脏法进行永久性结扎冠状动脉左前降支造成心肌梗死,1 周后行单侧肾(右肾)切除术,成功建立Ⅱ型心肾综合征大鼠动物模型。此改良模操作简便、手术创伤小、死亡率低,能很好地模拟了Ⅱ型心肾综合征早期的心脏、肾功能损伤和病理改变,为系统深入研究Ⅱ型心肾综合征的发病机制及药效作用机理奠定基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Ronco C, McCullough P, Anker SD, et al. Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative [J]. Eur Heart J, 2010, 31(6): 703-711.

- [2] Ajibowo AO, Okobi OE, Emore E, et al. Cardiorenal syndrome: a literature review [J]. *Cureus*, 2023, 15(7): e41252.
- [3] Bragazzi NL, Zhong W, Shu J, et al. Burden of heart failure and underlying causes in 195 countries and territories from 1990 to 2017 [J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2021, 28(15): 1682-1690.
- [4] 王蕾, 郝迪, 李旭, 等. 心肾综合征动物模型研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(11): 1496-1498.
- Wang L, Hao D, Li X, et al. Research progress in animal models of cardiorenal syndrome [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2013, 29(11): 1496-1498.
- [5] 查玉玲, 孔森, 周育平, 等. II 型心肾综合征动物模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(4): 535-541.
- Zha YL, Kong M, Zhou YP, et al. Advances in the study of animal models of type II cardiorenal syndrome [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(4): 535-541.
- [6] Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals [J]. *Ann Surg*, 1954, 140(5): 675-682.
- [7] 田颖, 王江, 李振魁, 等. 大鼠心肌梗死后心力衰竭模型的建立和评估 [J]. *心脏杂志*, 2006, 18(4): 404-405, 410.
- Tian Y, Wang J, Li ZK, et al. Establishment and assessment of rat model of heart failure after myocardial infarction [J]. *Chin Heart J*, 2006, 18(4): 404-405, 410.
- [8] Li H, Huang J, Liu C, et al. A new model of heart failure post-myocardial infarction in the rat [J]. *J Vis Exp*, 2021(172): e5497.
- [9] Szymanski MK, de Boer RA, Navis GJ, et al. Animal models of cardiorenal syndrome: a review [J]. *Heart Fail Rev*, 2012, 17(3): 411-420.
- [10] Bongartz LG, Braam B, Gaillard CA, et al. Target organ cross talk in cardiorenal syndrome: animal models [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(9): F1253-F1263.
- [11] 李军, 吕双红, 薛剑, 等. 大鼠心肌梗死后心力衰竭模型的建立及评价 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2015, 22(10): 1037-1041.
- Li J, Lv SH, Xue J, et al. Establishment and evaluation of heart failure model after myocardial infarction in rats [J]. *Labeled Immunoass Clin Med*, 2015, 22(10): 1037-1041.
- [12] 李宁, 王国泰. 扶正泄浊保肾汤对 5/6 肾切除 CRF 大鼠 PTH 的影响研究 [J]. *中外医学研究*, 2019, 17(30): 1-3.
- Li N, Wang GT. The effects of fuzheng Xiezhuo Baoshen Decoction on PTH in CRF rats with 5/6 nephrectomy [J]. *Chin Foreign Med Res*, 2019, 17(30): 1-3.
- [13] 王蒙, 杨柳易, 杨婧, 等. 肾衰 II 号方对 5/6 肾切除大鼠残余肾组织凋亡相关蛋白表达的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(5): 64-68.
- Wang M, Yang LY, Yang J, et al. Effects of Shenshuai II prescription on apoptosis-related protein expression in renal tissue of chronic renal failure rats induced by 5/6 nephrectomy [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2019, 26(5): 64-68.
- [14] Li M, Zheng C, Sato T, et al. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats [J]. *Circulation*, 2004, 109(1): 120-124.
- [15] 刘晓雪, 王静璇, 刘松玲, 等. 1/2 及 5/6 肾切除大鼠肾脏病变规律研究 [J]. *中国奶牛*, 2018, 342(5): 1-6.
- Liu XX, Wang JX, Liu SL, et al. Study on kidney lesions in 1/2 and 5/6 nephrectomies rats [J]. *Chin Dairy Cattle*, 2018, 342(5): 1-6.
- [16] Mori K, Katsumata SI, Miyajima K, et al. Effects of dietary phosphorus concentration and phosphate salt form on renal tubule function in unilateral nephrectomized rats [J]. *Nutr Health*, 2022; 2601060221122223.
- [17] 盛晓生, 林丽, 俞章平, 等. 和肽素检测在心肾综合征大鼠模型中的诊断价值 [J]. *中国现代医生*, 2017, 55(34): 24-27, 31.
- Sheng XS, Lin L, Yu ZP, et al. The diagnostic value of copeptin detection in rat models of cardiorenal syndrome [J]. *Chin Modern Dr*, 2017, 55(34): 24-27, 31.
- [18] 安成, 侯雪筠, 周育平. 复方交泰汤对心肾综合征模型大鼠心功能的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(18): 2748-2750.
- An C, Hou XY, Zhou YP. Influences of Fufang Jiaotai Decoction on the cardiac function in the rats with cardiorenal syndrome [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2019, 17(18): 2748-2750.
- [19] Chebotareva N, Vinogradov A, McDonnell V, et al. Urinary protein and peptide markers in chronic kidney disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12123.
- [20] 刘茜, 周华, 瞿惠燕, 等. 心肾综合征发病机制和治疗的研究进展 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2018, 26(2): 1-5.
- Liu Q, Zhou H, Qu HY, et al. Progress on pathogenesis and treatment of cardio-renal syndrome [J]. *Pract J Cardiac Cereb Pneumal Vasc Dis*, 2018, 26(2): 1-5.
- [21] Xu X, Zhang B, Wang Y, et al. Renal fibrosis in type 2 cardiorenal syndrome: an update on mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2023, 164: 114901.
- [22] Zucker I, Xia Z, Wang HJ. Potential neuromodulation of the cardio-renal syndrome [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(3): 803.

[收稿日期] 2023-08-11

许祖知,张靓,黄鑫,等. N-乙酰-D-氨基葡萄糖抑制氧化应激和促进巨噬细胞 M2 极化减轻大鼠急性胰腺炎 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1389-1398.

Xu ZZ, Zhang L, Huang X, et al. N-acetyl-D-glucosamine inhibits oxidative stress and promotes M2 macrophage polarization to alleviate acute pancreatitis in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1389-1398.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.002

N-乙酰-D-氨基葡萄糖抑制氧化应激和促进巨噬细胞 M2 极化减轻大鼠急性胰腺炎

许祖知^{1#}, 张靓^{2#}, 黄鑫¹, 余磊¹, 陈鹏飞¹, 谢学文¹, 陈治非¹,
方开晗¹, 费书珂^{1*}

(1. 南华大学衡阳医学院附属第二医院肝胆胰脾外科, 湖南 衡阳 421000;

2. 南华大学衡阳医学院附属第二医院风湿免疫科, 湖南 衡阳 421000)

【摘要】 目的 本文研究 N-乙酰-D-氨基葡萄糖 (N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc) 对大鼠急性胰腺炎的影响。**方法** 将 20 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为对照组、AP 组、低剂量 GlcNAc + AP 组、高剂量 GlcNAc + AP 组, 每组 5 只。AP 组、低剂量 GlcNAc + AP 组、高剂量 GlcNAc + AP 组分别予以腹腔注射 2.5 g/kg 的 L-精氨酸致大鼠急性胰腺炎 2 次, 每次间隔 1 h, 其中低剂量 GlcNAc + AP 组和高剂量 GlcNAc + AP 组第 1 次腹腔注射 L-精氨酸前 24 h 分别予以 50 mg/kg 和 200 mg/kg GlcNAc 腹腔注射, 对照组、AP 组腹腔注射同等体积生理盐水。24 h 后处死大鼠, 采集血清和胰腺组织。HE 染色观察胰腺组织形态, 酶联免疫吸附实验检测大鼠血清中淀粉酶 (AMY)、脂肪酶 (LPS)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA); Western Blot 检测胰腺组织核因子 E2 相关因子 2 (NRF2)、血红素氧合酶-1 (HO-1)、过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ) 的表达; 免疫荧光检测胰腺组织白细胞分化抗原 86 (CD86)、白细胞分化抗原 (CD206)、巨噬细胞标志物 (F4/80)。免疫组化检测胰腺 CD86、CD206 的表达。**结果** (1) 与对照组大鼠相比, AP 组大鼠血清 AMY、LPS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 水平、胰腺 CD86 免疫荧光定量明显升高 ($P < 0.05$); 而 SOD 活性、NRF2、HO-1、PPAR- γ 蛋白表达水平、胰腺 CD206 免疫荧光定量明显下降 ($P < 0.05$); (2) 与 AP 组大鼠相比, 低剂量 GlcNAc + AP 组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA、LPS、胰腺 CD86 免疫荧光定量水平明显降低 ($P < 0.05$); 胰腺 PPAR- γ 蛋白水平明显升高 ($P < 0.05$); (3) 与 AP 组大鼠相比, 高剂量 GlcNAc + AP 组大鼠血清 AMY、LPS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA、胰腺 CD86 免疫荧光定量水平明显降低 ($P < 0.05$), 而血清 SOD 水平、NRF2、HO-1、PPAR- γ 蛋白表达水平、胰腺 CD206 免疫荧光定量水平明显升高 ($P < 0.05$); (4) 与低剂量 GlcNAc + AP 组相比, 高剂量 GlcNAc + AP 组大鼠血清 LPS、IL-1 β 、IL-6 明显降低 ($P < 0.05$); 胰腺 HO-1、PPAR- γ 蛋白的表达水平、胰腺 CD206 免疫荧光定量明显升高 ($P < 0.05$)。**结论** GlcNAc 干预可以减轻 AP 大鼠急性胰腺炎损伤, 可能是激活 NRF2/HO-1 信号通路抑制氧化应激和促进巨噬细胞 M2 极化来减轻 AP 大鼠胰腺损伤。

【关键词】 急性胰腺炎; 巨噬细胞 M2 极化; N-乙酰-D-氨基葡萄糖; 氧化应激; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1389-10

【基金项目】 湖南省自然科学基金-部门联合基金项目 (2023JJ60354), 湖南省临床医疗技术创新引导项目 (2021SK51701)。

Funded by the Natural Science Foundation of Hunan Province-Department Joint Fund Project (2023JJ60354), Clinical Medical Technology Innovation Guide Project of Hunan Province (2021SK51701)。

【作者简介】 许祖知, 男, 硕士, 研究方向: 急性胰腺炎; 胆汁淤积性肝病。Email: 465509981@qq.com;

张靓, 女, 本科, 副主任医师, 研究方向: 风湿免疫疾病防治机制研究。Email: 985140469@qq.com。

#共同第一作者

【通信作者】 费书珂, 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 急性胰腺炎, 胆汁淤积性肝病, 胆囊结石。Email: pretender8129@hotmail.com

N-acetyl-D-glucosamine inhibits oxidative stress and promotes M2 macrophage polarization to alleviate acute pancreatitis in rats

XU Zuzhi^{1#}, ZHANG Liang^{2#}, HUANG Xin¹, YU Lei¹, CHEN Pengfei¹, XIE Xuewen¹,
CHEN Zhifei¹, FANG Kaihan¹, FEI Shuke^{1*}

(1. the Second Affiliated Hospital, Department of Hepatobiliary, Pancreatic and Splenic Surgery, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421000, China. 2. the Second Affiliated Hospital, Department of Rheumatology and Immunology, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421000)

Corresponding author: FEI Shuke. E-mail: pretender8129@hotmail.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) on acute pancreatitis in rats. **Methods** Twenty male SD rats were randomly divided into a control group, AP group, low GlcNAc + AP group and high GlcNAc + AP group, with five rats in each group. Acute pancreatitis was induced in AP group, low GlcNAc + AP group and high GlcNAc + AP group by two intraperitoneal injections of 2.5 g/kg L-arginine with a 1 hour interval. Among them, low GlcNAc + AP group and high GlcNAc + AP group were administered 50 and 200 mg/kg GlcNAc, respectively, by intraperitoneal injection at 24 hours before the first intraperitoneal injection of L-arginine. Group control and AP were intraperitoneally injected with the same volume of normal saline. After 24 h, the rats were sacrificed, and serum and pancreatic tissues were collected. Pancreatic tissue morphology was observed by HE staining, and serum levels of amylase (AMY), lipase (LPS), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Protein expression of nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2), heme oxygenase-1 (HO-1), and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) in pancreatic tissue was detected by Western Blot. Cluster of differentiation (CD)86, CD206 and macrophage markers (F4/80) were detected by immunofluorescence. Expression of CD86 and CD206 in pancreatic tissue was detected by immunohistochemistry. **Results** (1) Compared with control group, AMY, LPS, IL-1 β , IL-6, TNF- α , and MDA levels and pancreatic CD86 expression in AP group were significantly increased ($P < 0.05$), while SOD activity, protein expression levels of NRF2, HO-1, and PPAR- γ , and pancreatic CD206 expression were significantly decreased ($P < 0.05$). (2) Compared with AP group, serum IL-1 β , IL-6, TNF- α , MDA, and LPS and the pancreatic CD86 expression in low GlcNAc + AP group were significantly decreased ($P < 0.05$). The PPAR- γ protein level in the pancreas was significantly increased ($P < 0.05$). (3) Compared with AP group, serum AMY, LPS, IL-1 β , IL-6, TNF- α , and MDA and pancreatic CD86 expression in high GlcNAc + AP group were significantly decreased ($P < 0.05$), while serum SOD, and NRF2, HO-1, PPAR- γ , and pancreatic CD206 expression were significantly increased ($P < 0.05$). (4) Compared with low GlcNAc + AP group, serum LPS, IL-1 β and IL-6 in high GlcNAc + AP group were significantly decreased ($P < 0.05$). Pancreatic expression of HO-1, PPAR- γ , and pancreatic CD206 were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** GlcNAc treatment attenuates acute pancreatitis injury in AP rats, possibly by activating the NRF2/HO-1 signaling pathway to inhibit oxidative stress and promoting M2 macrophage polarization to attenuate pancreatic injury in AP rats.

[Keywords] acute pancreatitis; M2 macrophage polarization; N-acetyl-D-glucosamine; oxidative stress; rats

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

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床中常见的消化系统疾病之一,因多种因素导致胰蛋白酶激活,同时引起病理性细胞通路和细胞器功能障碍,最终导致胰腺腺泡细胞死亡,引发局部乃至全身的炎症反应^[1-3]。严重的炎症和激活的炎症细胞会产生高水平的活性氧(reactive oxygen species, ROS),耗尽内源性抗氧化剂,导致机体氧化和抗氧

化失衡,引起氧化应激,从而破坏腺泡细胞并加剧多器官功能障碍^[4-5]。丙二醛(malondialdehyde, MDA)即是常见的脂质过氧化产物之一,其含量反映的是机体脂质过氧化程度。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)作为机体内最重要的自由基清除剂维持机体代谢平衡,其含量可反映机体抗氧化的程度^[6]。过氧化物酶体增生物激活受体- γ

(peroxisome proliferator activated receptor- γ , PPAR- γ) 是一种核受体,最初被确定为脂肪生成的关键核转录因子,而后研究证明其在炎症、癌症和细胞分化中发挥重要的调节作用。此外,PPAR- γ 也被认为是调节巨噬细胞分化和细胞极化的关键抗炎调节剂^[7]。在 AP 早期,胰腺组织浸润的巨噬细胞通常为 M1 型巨噬细胞,可持续产生高水平的促炎细胞因子、活性氮和活性氧等中间体参与引发和维持炎症,进一步扩大炎症范围,而在 AP 晚期,激活的 M2 型巨噬细胞则缓解炎症并限制炎症范围^[8]。因此,将巨噬细胞极化从促炎 M1 型调整为抗炎 M2 型是 AP 的有效治疗选择^[9]。氨基葡萄糖 (glucosamine, GlcN) 是一种天然的氨基单糖,为人体关节软骨基质中合成蛋白聚糖所必需的物质, N-乙酰-D-氨基葡萄糖 (N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc) 是 9 种主要糖核苷酸之一,其在细胞质中合成,并主要以尿苷二磷酸 (uridine 5'-diphosphate, UDP) 结合的形式被激活^[10],是 GlcN 类药物的常用临床形式之一,目前广泛应用于临床上骨关节炎的治疗,对于关节软骨起到保护作用^[11]。GlcNAc 除了对关节的保护作用外,同时还在其他多种炎症疾病具有缓解作用。GlcN 还可以通过抑制 ROS 相关的炎症信号来减轻香烟烟雾引起的肺部炎症^[12]。GlcN 可抑制炎症细胞中髓过氧化物酶的激活,以及 NF- κ B、COX-2 和 iNOS 的激活,从而抑制结肠粘膜的炎症,证实了在炎症性肠病中的抗炎作用^[13]。Chiu 等^[14]在实验中发现 GlcN 通过抑制 NLRP3 炎症小体及 NF- κ B 的激活减轻细胞的毒性与炎症反应。然而,对于 GlcN 在正常组织和炎症组织中氧化应激的影响,似乎也存在相反的观点。Moore 等^[15]研究表明, GlcN 增强了正常饮食小鼠的胰岛素抵抗,但改善了高脂饮食小鼠的肥胖和胰岛素抵抗。同时, GlcN 促进视网膜 Müller 细胞的内质网应激,并导致胰岛素抵抗作用,这表明 GlcN 可能加剧糖尿病诱导的高血糖。这与之前大多研究对于 GlcN 抑制氧化应激这一结论相悖。因此,有必要针对 GlcN 在不同器官组织疾病中作用机制进行进一步研究。关于 GlcNAc 在胰腺相关疾病中的研究较少。Kim 等^[16]研究表明,由 GlcNAc 和葡萄糖醛酸糖组成的透明质酸 (hyaluronic acid, HA), 可以作为一种营养剂来促进胰腺导管腺癌的代谢。然而,目前尚未有 GlcNAc 在胰腺炎之间的直接研究。本研究通过 L-精氨酸诱导的 AP 大鼠模型,探讨 GlcNAc 对胰腺

组织形态、炎症因子、氧化应激水平、M1、M2 型巨噬细胞标志物的影响,为 AP 的治疗提供新的切入点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只,体重 200 ~ 250 g,购自斯贝福生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。所有大鼠饲养于南华大学 SPF 级动物实验中心【SYXK(湘)2022-0008】,饲养期间自由饮水、饮食,饲喂普通饲料由南华大学实验动物中心提供。饲养环境:遵守日照/黑暗环境各 12 h,在湿度 40%~60%,温度 20 ~ 26℃ 下饲养。本实验所有操作已通过南华大学伦理审查会审批(USC2022 10DS18)。

1.1.2 主要试剂与仪器

N-乙酰-D-氨基葡萄糖(上海源叶生物科技有限公司,货号:S11029), IL-1 β 、IL-6、TNF- α 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,货号分别为:CSB-E08055r、CSB-E04640r、CSB-E11987r), HO-1 抗体和 β -actin 抗体 (proteintech、货号:27282-1-AP、66009-1-Ig)、NRF2 抗体和 PPAR- γ 抗体 (Abcam, 货号:ab62352、16643-1-AP), CD206 抗体 (PTG、货号:18704-1-AP、26903-1-AP), CD86 抗体 (PTG、货号:26903-1-AP 或 13395-1-AP), F4/80 (Santa, 货号:sc-377009)。电泳槽和转膜系统(北京六一,中国), 光学显微镜 (Motic, BA210T, 中国), 多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司, MB-530, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 AP 模型制备、给药方法、取材

20 只 SPF 级雄性 SD 大鼠经 1 周适应性喂养后,根据随机对照原则,分为对照组(腹腔注射生理盐水)、AP 组(腹腔注射 20% L-精氨酸溶液)、低剂量 GlcNAc + AP 组(腹腔注射 50 mg/kg GlcNAc)、高剂量 GlcNAc + AP 组(腹腔注射 200 mg/kg GlcNAc)。所有大鼠 AP 造模给药前禁食 24 h,禁饮 8 h。AP 造模采用方法:按 2.5 g/kg 剂量腹腔注射 20% L-精氨酸 2 次,间隔 60 min。低、高剂量 GlcNAc + AP 组造模采用方法:AP 造模前 24 h 分别按照 50 mg/kg 或 200 mg/kg 剂量予以腹腔注射 GlcNAc。24 h 后按 2.5 g/kg 剂量腹腔注射 20% L-精氨酸 2 次,间隔 60 min。48 h 后进行大鼠取材,将大鼠麻醉后固定手术台开腹,取腹主动脉血,于

离心机中 4℃ 下, 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 分装于两个 1.5 mL 离心管中, -80℃ 冰箱保存, 一份用于检测血清 AMY、LPS、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6; 另一份用于检测 MDA、SOD 含量。取血后再取胰腺组织。将取好的胰腺组织分为两部分, 一部分用 4% 多聚甲醛溶液固定, 制备石蜡切片用于 HE 染色和免疫组化; 另一部分存放在 -80℃ 冰箱中备用, 之后用 Western Blot 检测和免疫荧光。

1.2.2 胰腺组织 HE 染色

取出用 4% 多聚甲醛固定的 SD 大鼠胰腺组织, 将其切成 4 μ m 的薄片, 用不同浓度的乙醇和二甲苯逐级脱水, 石蜡包埋, 然后在 100 倍光镜下检查组织病理学变化。

1.2.3 ELISA 法检测 AMY、LPS、SOD、MDA 水平

将保存在 -80℃ 的大鼠血清置于室温解冻, 离心, 参照各试剂盒说明书进行测定, 用酶标仪 (MB-530, 深圳市汇松科技发展有限公司) 分别在 450 nm (IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD)、532 nm (MDA)、580 nm (LPS) 和 660 nm (AMY) 处检测吸光度。根据各自的标准曲线计算相应指标的浓度。

1.2.4 Western Blot 检测 NRF2、HO-1、PPAR- γ 的表达水平

将存于 -80℃ 的胰腺组织, 解冻后加入溶解剂, 离心分离上层清液。采用 BCA 法进行蛋白定量。取 200 μ L 蛋白上清液, 进行凝胶电泳后转膜, 用 1 $\times$ PBST 封闭 90 min 后, 加入相应抗体 (HO-1、NRF2、PPAR- γ 、 β -actin 抗体, 稀释比例分别以 1:2000; 1:1000; 1:3000; 1:5000), 4℃ 孵育过夜。然后加入 HRP 标记的二抗 (稀释比例 1:5000), 室温下孵育 90 min。ECL 显色后, 采用凝胶成像系统进行图像分析。

1.2.5 M1、M2 极化、PPAR- γ 的免疫荧光

将胰腺组织切片 60℃ 下烘焙 12 h 后放入二甲苯酚溶液 1 h, 然后分别用 100%、95%、85%、75% 的乙醇脱水。将该切片分别在 EDTA 缓冲剂 (pH = 9.0)、0.01 mol/L PBS (pH = 7.2 ~ 7.6)、硼氢化钠溶液、苏丹黑染色溶液、10% 的正常人血清/5% 的牛血清白处理后, 将一抗体 (PPAR- γ 、CD86 + F4/80, CD206 + F4/80) 滴入培养基中置于冰箱中 12 h。用 50 ~ 100 μ L 的抗-兔子免疫球蛋白-IgG 标记的荧光抗体, 在 37℃ 下培养 60 ~ 90 min, 然后甘油封存避光保存, 置于荧光显微镜下观察。采用凝胶成像系统进行图像分析。

1.2.6 免疫组化

将胰腺组织切片 60℃ 下烘焙 12 h 后依次脱水, 热修复抗原后, 加 1% 高碘酸灭活内源性酶, 将一抗体 (CD86, CD206) 孵育过夜。用 50 ~ 100 μ L 抗-兔、兔-IgG 抗体-HRP 多聚体 37℃ 孵育 30 min, 冲洗后滴加预制好的显色液 DAB 工作液 50 ~ 100 μ L, 苏木素复染 5 ~ 10 min, 蒸馏水冲洗, PBS 返蓝; 再次脱水后置于二甲苯 10 min, 2 次, 中性树胶封片、显微镜观察。用 Image-Pro Plus 进行图像分析。

1.3 统计学分析

实验数据和统计过程用 GraphPad Prism 9.0 处理, 计量资料用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组之间比较采用单因素方差分析, 非配对 t 检验用两组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

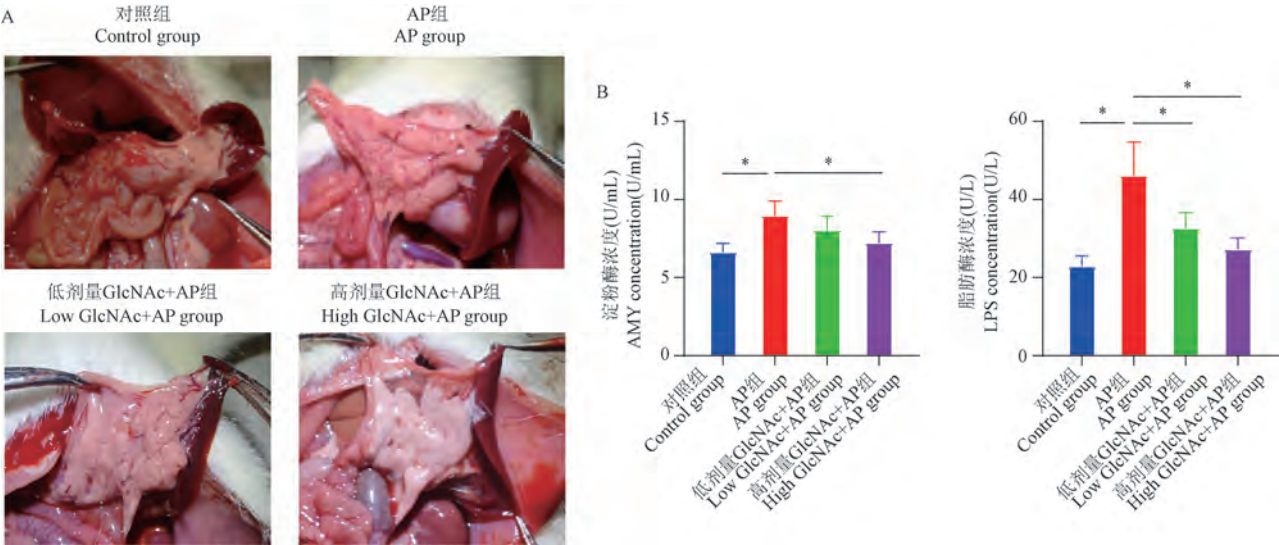
2 结果

2.1 GlcNAc 下调 L-精氨酸诱导的 AP 大鼠血清 AMY、LPS 水平

L-精氨酸造模后, 肉眼观 AP 组胰腺较对照组明显水肿, 渗出, 同时 AP 组大鼠血清 AMY (8.97 ± 0.42 U/mL)、LPS 水平 (46.12 ± 3.84 U/L) 较对照组 (6.63 ± 0.25 U/mL), (22.92 ± 1.19 U/L) 明显升高 ($P < 0.05$), 表明 AP 大鼠造模成功; 高剂量 GlcNAc + AP 组大鼠血清 AMY (7.22 ± 0.32 U/mL)、LPS (27.28 ± 1.26 U/L) 与 AP 组大鼠相比均明显下降 ($P < 0.05$), 同时低剂量 GlcNAc + AP 组血清 AMY (8.04 ± 0.40 U/mL) 无显著性差异, 而 LPS (32.66 ± 1.77 U/L) 明显低于 AP 组 ($P < 0.05$)。在大鼠腹腔肉眼观中, 低剂量 GlcNAc + AP 组和高剂量 GlcNAc + AP 组胰腺组织的水肿程度较 AP 组明显减轻; 而在低剂量 GlcNAc + AP 组 AMY、LPS 水平和高剂量 GlcNAc + AP 组无显著性差异 (图 1)。综上所述, GlcNAc 可以降低 L-精氨酸诱导的 AP 大鼠血清 AMY、LPS 水平。

2.2 GlcNAc 减轻 L-精氨酸诱导的 AP 大鼠胰腺损伤

对照组大鼠在显微镜下可观察到胰腺小叶间清晰, 胰腺组织无水肿、坏死、出血等, 其周围无明显炎症细胞浸润。AP 组有明显的胰腺间质水肿、大量炎症细胞浸润聚集、胰腺小叶间模糊、大量胰腺腺泡细胞坏死, 未见明显出血。低剂量 GlcNAc + AP 组大鼠可观察到有胰腺间质水肿、中量炎症细胞浸润聚集、胰腺小叶间模糊、腺泡细胞坏死, 未见明显出血。高剂量 GlcNAc + AP 组大鼠可观察到有



注:A:腹腔胰腺肉眼观;B:血清淀粉酶和脂肪酶浓度;与 AP 组相比, * $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 大鼠腹腔肉眼观和血清 AMY、LPS

Note. A. Abdominal pancreas macroscopic view. B. Serum amylase and lipase concentrations of rats. Compared with AP group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Abdominal cavity images of rats and concentration of AMY and LPS

胰腺间质轻度水肿、少量炎症细胞浸润聚集、胰腺小叶间稍模糊、腺泡细胞少量坏死,未见明显出血(图 2)。综上所述,GlcNAc 可以减轻 L-精氨酸诱导的 AP 大鼠胰腺的损伤。

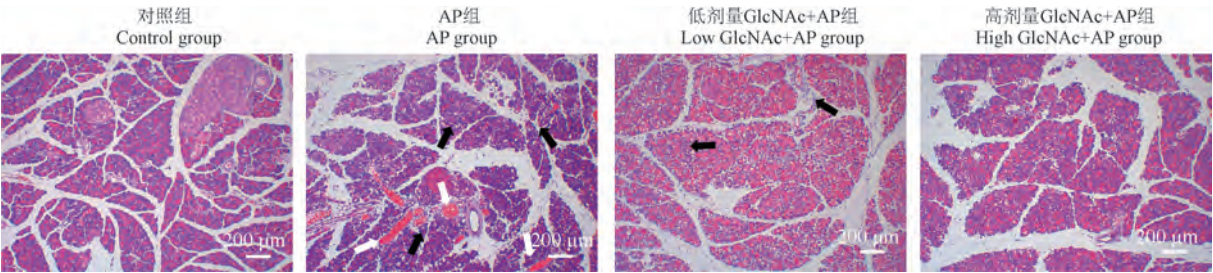
2.3 GlcNAc 对 AP 大鼠血清炎症因子水平的影响

与对照组炎症因子 IL-1 β (0.18 $\pm$ 0.01 ng/mL)、IL-6 (45.81 $\pm$ 1.16 pg/mL)、TNF- α (36.13 $\pm$ 1.73 pg/mL) 水平相比,AP 组血清炎症因子 IL-1 β (0.44 $\pm$ 0.01 ng/mL)、IL-6 (96.53 $\pm$ 2.71 pg/mL)、TNF- α (63.56 $\pm$ 1.74 pg/mL) 水平明显升高 ($P < 0.05$);低剂量 GlcNAc + AP 组和高剂量 GlcNAc + AP 组与 AP 组相比,其血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平明显下降 ($P < 0.05$);而低剂量 GlcNAc + AP 组和高剂量 GlcNAc + AP 组之间,可以发现高

剂量 GlcNAc + AP 组血清炎症因子 IL-1 β (0.29 $\pm$ 0.01 ng/mL)、IL-6 (65.70 $\pm$ 2.57 pg/mL) 水平较低剂量 GlcNAc + AP 组 (0.37 $\pm$ 0.01 ng/mL, 79.18 $\pm$ 1.86 pg/mL) 明显下降 ($P < 0.05$),而高剂量 GlcNAc + AP 组 TNF- α (45.31 $\pm$ 3.48 pg/mL) 仅略低于低剂量 GlcNAc + AP 组 (53.73 $\pm$ 2.13 pg/mL),且无显著性差异(图 3)。总的来说,GlcNAc 可明显降低 AP 大鼠血清炎症因子水平。

2.4 GlcNAc 抑制 AP 大鼠 MDA、SOD 的表达

与对照组 MDA (3.99 $\pm$ 0.49 nmol/L), SOD (31.89 $\pm$ 0.84 nmol/L) 相比,AP 组大鼠血清 MDA (8.38 $\pm$ 0.48 nmol/L) 水平明显升高 ($P < 0.05$),而 SOD 水平 (12.71 $\pm$ 1.30 nmol/L) 明显下降 ($P < 0.05$),表明 AP 大鼠机体氧化应激水平明显升高

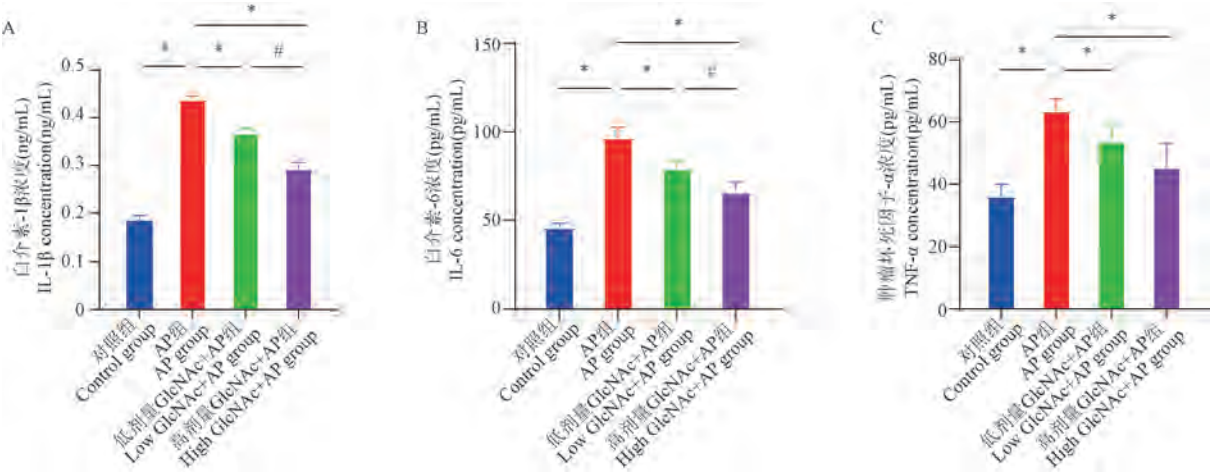


注:白色箭头:胰腺组织出血;黑色箭头:胰腺组织炎症细胞浸润。

图 2 GlcNAc 对大鼠胰腺组织形态的影响(HE 染色)

Note. White arrow. Pancreas hemorrhage. Black arrow. Inflammatory cells infiltrate pancreatic tissue.

Figure 2 Effect of GlcNAc on pancreatic histomorphology of rats (HE staining)



注:与低剂量 GlcNAc + AP 组相比, # $P < 0.05$ 。(下图同)

图 3 大鼠血清 IL-1β、IL-6、和 TNF-α 的表达

Note. Compared with low GlcNAc + AP group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 3 Expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α in serum of rats

(图 4)。高剂量 GlcNAc + AP 组 (6.03 ± 0.38 nmol/L) 相比于 AP 组 MDA 水平明显下降 ($P < 0.05$), SOD 水平 (24.67 ± 1.74 nmol/L) 明显升高 ($P < 0.05$), 提示 GlcNAc 可以显著降低 AP 大鼠氧化应激水平。低剂量 GlcNAc + AP 组相比于 AP 组, MDA 水平 (6.59 ± 0.42 nmol/L) 明显下降 ($P < 0.05$), SOD 水平 (18.33 ± 2.29 nmol/L) 略高, 但都无显著性差异。同时, 高剂量的 GlcNAc 似乎比低剂量 GlcNAc 更能降低 AP 大鼠 MDA、升高 SOD, 但两者并无显著性差异(图 4)。总而言之, GlcNAc 可以明显降低 AP 大鼠氧化应激水平。

2.5 GlcNAc 促进 AP 大鼠 NRF2、HO-1 的表达

相比于对照组, AP 组大鼠 NRF2、HO-1 的蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$)。而高剂量 GlcNAc + AP

组 NRF2、HO-1 蛋白表达较 AP 组明显升高 ($P < 0.05$); 同时, 在低剂量 GlcNAc + AP 组和高剂量 GlcNAc + AP 组之间, 高剂量 GlcNAc + AP 组 HO-1 蛋白表达略高, 但无显著性差异 ($P > 0.05$); 综上所述, 推断 GlcNAc 促进 AP 大鼠 NRF2/HO-1 轴的激活, 抑制氧化应激, 减轻 AP 大鼠胰腺损伤(图 5)。

2.6 GlcNAc 促进 AP 大鼠 M2 巨噬细胞极化

PPAR-γ 的表达与巨噬细胞极化密切相关^[7]。在本实验中, 与对照组相比, Western Blot 检测提示 AP 组 PPAR-γ 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 同时, 高剂量 GlcNAc + AP 组 PPAR-γ 较 AP 组明显升高 ($P < 0.05$) (图 5)。为求进一步验证 GlcNAc 与巨噬细胞极化的关系, 进行免疫荧光和免疫组化验证。各组大鼠 CD86 (M1 型巨噬细胞标志物) 和

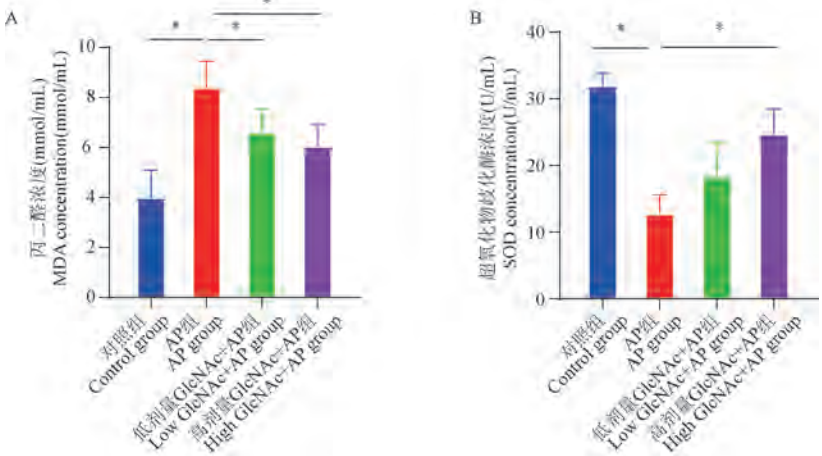
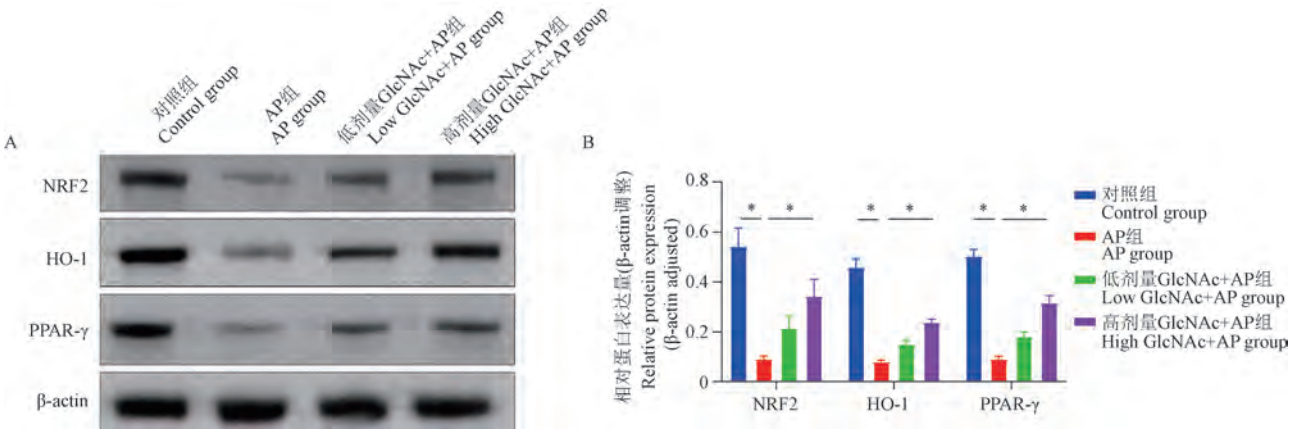


图 4 大鼠血清 MDA、SOD 浓度

Figure 4 Concentration of MDA and SOD in serum of rats



注:A:胰腺组织 NRF2、HO-1、PPAR-γ 的 Western Blot; B:胰腺组织中 NRF2、HO-1、PPAR-γ 的蛋白定量分析的结果。

图 5 GlcNAc 对大鼠胰腺 NRF2、HO-1、PPAR-γ 蛋白质表达水平的影响

Note. A. Western Blot of NRF2, HO-1 and PPAR-γ in pancreatic tissue. B. Quantitative and analysis of NRF2, HO-1 and PPAR-γ in pancreatic tissue.

Figure 5 Effect of GlcNAc on the proteins expression levels of NRF2, HO-1 and PPAR-γ in pancreas of rats

CD206(M2 型巨噬细胞标志物)免疫组化显示 AP 组与对照组相比,CD86 增高,CD206 降低,而无论低剂量 GlcNAc + AP 组还是高剂量 GlcNAc + AP 组都可明显抑制这一现象(图 6)。同时,免疫荧光提示 F4/80(巨噬细胞标志物)与 CD86、CD206 等存在共定位的现象,表示 CD86、CD206 分别代表胰腺组织中的 M1 型极化巨噬细胞和 M2 型极化巨噬细胞。AP 组免疫荧光提示 CD86 明显升高、CD206 明显下降,提示巨噬细胞向 M1 促炎型转化。而在高

剂量 GlcNAc + AP 组中,免疫荧光及定量分析提示 CD206 明显升高、CD86 明显下降($P < 0.05$)。这结果表明 GlcNAc 干预可以促进巨噬细胞向 M2 抗炎型转化。低剂量 GlcNAc + AP 组免疫荧光定量提示 CD86 明显降低($P < 0.05$),但对于 CD206 的影响不明显。同时,高剂量 GlcNAc + AP 组相比于低剂量 GlcNAc + AP 组,其 CD206 定量分析明显升高(图 7,图 8)($P < 0.05$)。综上所述,GlcNAc 促进 AP 大鼠巨噬细胞向 M2 型抗炎型转化。

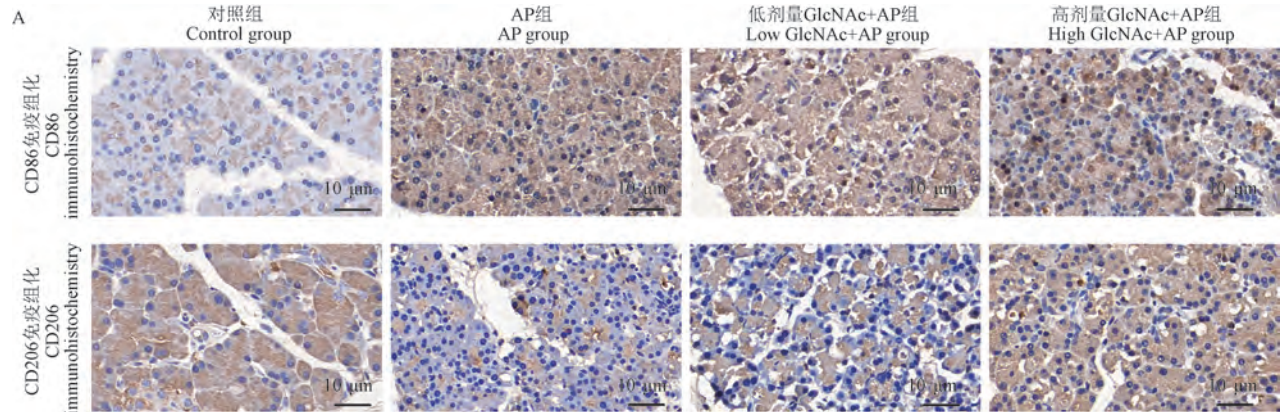


图 6 大鼠胰腺 CD86、CD206 免疫组化

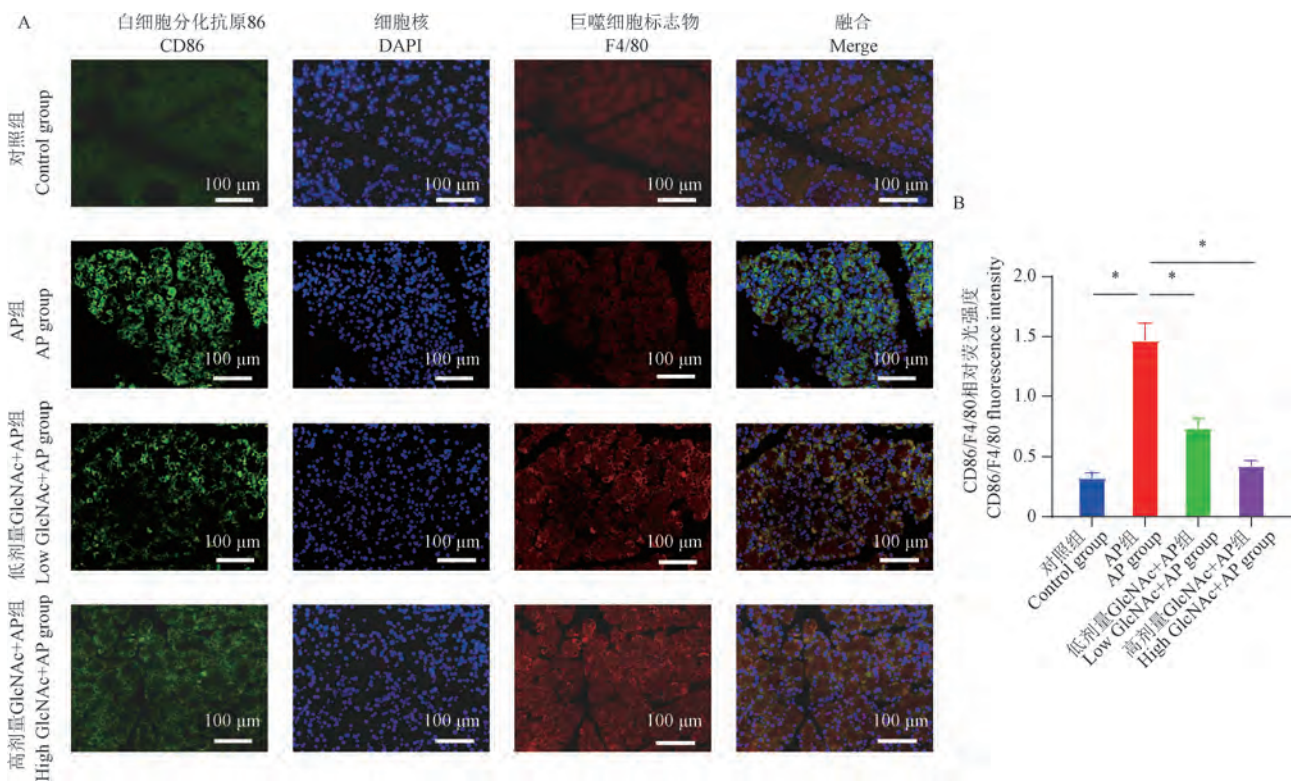
Figure 6 Immunohistochemistry of CD86 and CD206 in rats pancreatic tissue

3 讨论

急性胰腺炎的治疗,临床上多以抑制胰酶、抗炎、止痛、胃肠道减压、静脉营养对症治疗,但仍有部分患者得不到有效的治疗。因此,寻找治疗 AP 的手段,仍为重中之重。通过胰腺炎的病理生理机

制研究,减少 Ca^{2+} 超载、抑制 ROS、恢复腺泡细胞自噬、减轻线粒体功能障碍、抑制腺泡细胞和巨噬细胞内胰蛋白酶原过早激活、抑制巨噬细胞 M1 型极化和促进巨噬细胞 M2 型极化可能是胰腺炎治疗研究的重要着手点。

在本实验中,发现 GlcNAc 可明显减轻 AP 大鼠



注:A:四组大鼠胰腺 CD86 的免疫荧光;绿色:CD86;蓝色:细胞核;红色:F4/80;B:四组大鼠 CD86 免疫荧光定量分析(CD86 相对荧光强度与 F4/80 相对荧光强度的比值)。

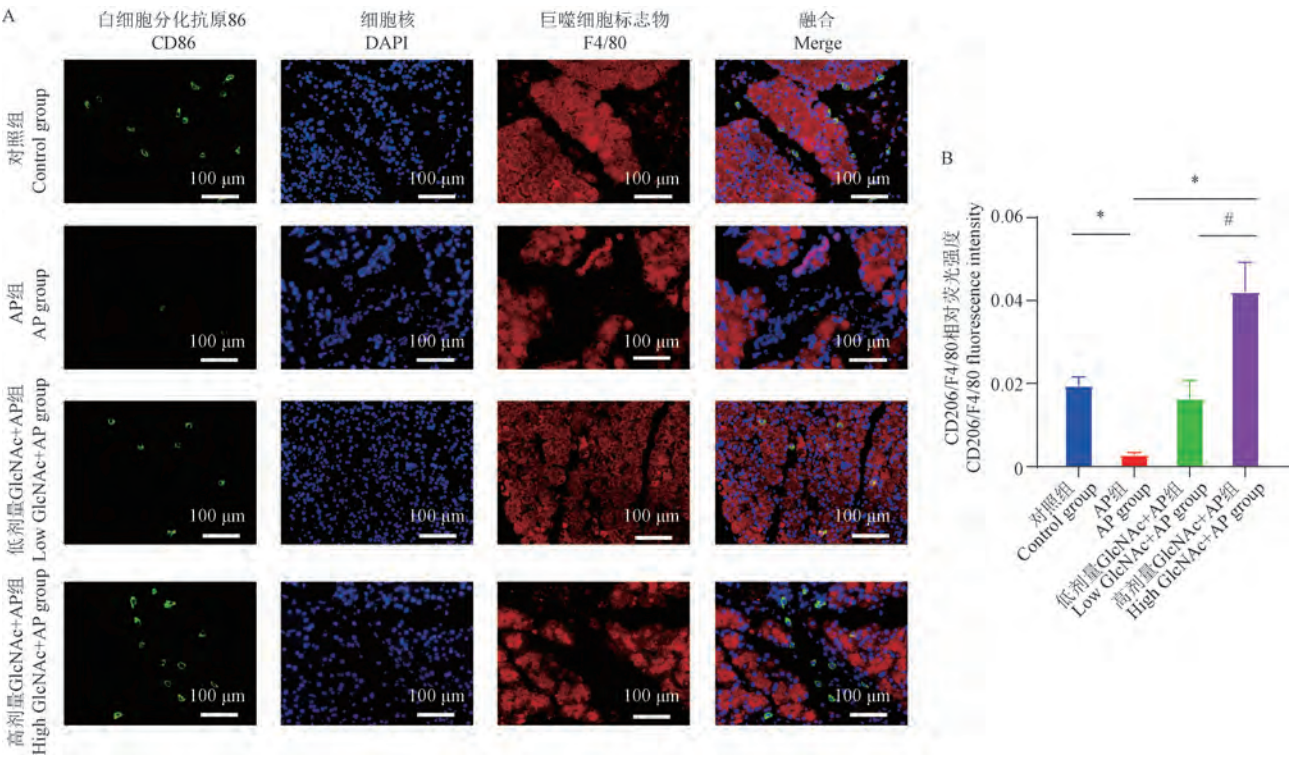
图 7 大鼠胰腺 CD86 免疫荧光及定量分析

Note. A. Immunofluorescence of pancreatic CD86 in four groups of rats. Green. CD86. Blue. Nucleus. Red. F4/80. B. Quantitative analysis of CD86 immunofluorescence in four groups of rats (ratio of CD86 relative fluorescence intensity to F4/80 relative fluorescence intensity).

Figure 7 Immunofluorescence and quantitative analysis of CD86 in rats pancreatic tissue

氧化应激和胰腺损伤。对比 AP 组,可以发现高剂量 GlcNAc + AP 组血清 AMY、LPS 水平明显降低,而低剂量 GlcNAc + AP 组虽然 LPS 水平明显降低,但血清 AMY 水平仅略低于 AP 组(无显著性差异)。考虑到 AMY、LPS 与胰腺炎严重程度并不完全平行,进一步检测了炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)的水平。无论是低剂量 GlcNAc + AP 组,还是高剂量 GlcNAc + AP 组,其炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)都明显下降,这表示 GlcNAc 治疗可以减轻 AP 大鼠的炎症程度。在氧化应激相关标志物的 Western Blot 检测中发现,相比于 AP 组,高剂量 GlcNAc + AP 组 MDA 水平明显降低,SOD 水平明显升高($P < 0.05$),而低剂量 GlcNAc + AP 组中,MDA 水平仅稍降低,SOD 含量仅稍高于 AP 组,且没有显著性差异,这提示低剂量 GlcNAc 可能对于 L-精氨酸造模的中重度 AP 来说,其抑制氧化应激能力较弱。低剂量 GlcNAc 对于 AP 的影响,可能需要更为轻型的 AP 模型(例如雨蛙肽诱导 AP 模型)去进一步探讨其抑制氧化应激能力。

既往的研究中,NRF2/HO-1 通路在众多研究中被证实参与了 AP 病情的发生发展,且与氧化应激相关^[17-18]。Shi 等^[19]研究表明,LipoxinA4 受体激动剂 BML-111 通过 NRF2 调节的抗氧化途径改善急性胰腺炎后的肠道紊乱。Mei 等^[20]研究表明由 GlcNAc 以 β -1,4 糖苷键结合而成的多糖-壳寡糖(COS)可改善胰腺损伤的严重程度,防止肠屏障破坏并减少 SAP 中的炎症和氧化损伤。其主要的保护机制归因于肠道微生物群的重塑以及 Nrf2/HO-1 通路的调节。本实验研究了 GlcNAc 与 NRF2/HO-1 通路和氧化应激之间的关系,高剂量 GlcNAc + AP 组大鼠血清中 NRF2、HO-1 的表达明显升高,然而,低剂量 GlcNAc + AP 组大鼠血清 HO-1、NRF2 表达升高不明显,这可能的原因是低剂量 GlcNAc 对于 NRF2-HO-1 信号通路的激活能力较弱。同时,NRF2 除了作用于 HO-1 这一下游之外,还作用于下游其他基团,如还原型辅酶/醌氧化还原酶(NADPH)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)等。进一步了解 GlcNAc 对 NRF2/HO-1 通路的影响,可以通过增加多个



注:A:四组大鼠胰腺 CD206 的免疫荧光;绿色:CD206;蓝色:细胞核;红色:F4/80; B:四组大鼠 CD206 免疫荧光定量分析(CD206 相对荧光强度与 F4/80 相对荧光强度的比值)。

图 8 大鼠胰腺 CD206 免疫荧光及定量分析

Note. A. Immunofluorescence of pancreatic CD206 in four groups of rats. Green. CD206. Blue. Nucleus. Red. F4/80. B. Quantitative analysis of CD206 immunofluorescence in four groups of rats (ratio of CD206 relative fluorescence intensity to F4/80 relative fluorescence intensity).

Figure 8 Immunofluorescence and quantitative analysis of CD206 in rats pancreatic tissue

GlcNAc 剂量干预组,同时纳入 NADPH、GPX4 等 NRF2 其他下游基团进行验证。

对于巨噬细胞 M2 型极化和 AP 之间的研究,促进巨噬细胞 M2 型极化可能是减轻 AP 胰腺损伤甚至其他脏器损伤的有效方法。Taguchi 等^[21]研究发现静脉注射一种针对巨噬细胞的新型纳米一氧化碳结合血红蛋白囊泡 (CO-bound hemoglobin vesicles,CO-HBVE),可诱导巨噬细胞分化为 M2 样表型,从而抑制胰腺中性粒细胞的浸润,减轻胰腺炎所致的肺损伤。与药物治疗相比,一些特殊的外科技术也可能调节巨噬细胞的极化来治疗 AP。研究表明,在重症 AP 大鼠中,腹部穿刺术和引流术可以诱导巨噬细胞极化到 M2 型,这可能是由于胰腺炎相关的腹水清除和腹腔炎性环境改善所致^[22]。针对 M1 极化的实验中,在用表达 miRNA-16 的慢病毒转染从 AP 大鼠分离的腹腔巨噬细胞后,巨噬细胞的极化从 M2 型转变为 M1 型,并在功能上激活了 CD4⁺ T 细胞,加剧炎症的程度^[23]。此外,最近的报道表明,在小鼠胰腺中,巨噬细胞可能参与诱导腺

泡-导管化生 (acinar-to-ductal metaplasia, ADM),以及促进胰腺 β-细胞再生^[24]。

本实验中,首先对胰腺组织进行免疫荧光检测,采用 F4/80 标记大鼠胰腺巨噬细胞,然后进行巨噬细胞表型的荧光检测,发现在 AP 组可见 M1 型极化明显升高,表现为 CD206 明显下降,CD86 明显上升 ($P < 0.05$)。而在高剂量 GlcNAc + AP 组中,可以看到 M1 型极化明显抑制,M2 型极化明显上升,表现为 CD206 明显上升,CD86 明显下降 ($P < 0.05$)。同时,在低剂量 GlcNAc + AP 组和高剂量 GlcNAc + AP 组的比较中,高剂量 GlcNAc + AP 组 M2 极化上升更加明显 ($P < 0.05$)。接着,用 Western Blot 对胰腺组织 PPAR-γ 的蛋白进行分析,发现 AP 组 PPAR-γ 蛋白表达明显降低,而应用 GlcNAc 干预的低剂量 GlcNAc + AP 组和高剂量 GlcNAc + AP 组,其 PPAR-γ 蛋白表达明显上升 ($P < 0.05$),这也进一步验证了本实验结果。同时,在对各组大鼠 CD86、CD206 免疫组化的检测中,也可以发现 GlcNAc 治疗后,大鼠 CD206 含量明显升高,

CD86 含量明显下降。这充分证明 GlcNAc 治疗促进巨噬细胞 M2 极化,减轻 AP 大鼠胰腺损伤。

综上所述,在 L-精氨酸诱导的 AP 大鼠模型中, NRF2/HO-1 信号通路被激活,巨噬细胞表型向促炎型 M1 转化,而 GlcNAc 治疗可通过抑制 NRF2/HO-1 信号通路的激活,促进巨噬细胞表型向抑炎型 M2 转化,从而减轻 AP。

参 考 文 献(References)

- [1] Lugea A, Waldron R, Mareninova O, et al. Human pancreatic acinar cells: proteomic characterization, physiologic responses, and organellar disorders in *ex vivo* pancreatitis [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(12): 2726–2743.
- [2] Mederos MA, Reber HA, Girgis MD. Acute pancreatitis: a review [J]. *JAMA*, 2021, 325(4): 382–390.
- [3] Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, et al. Classification of acute pancreatitis-2012: revision of the *Atlanta* classification and definitions by international consensus [J]. *Gut*, 2013, 62(1): 102–111.
- [4] Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 8416763.
- [5] Robles L, Vaziri ND, Ichii H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of pancreatitis: effect of antioxidant therapy [J]. *Pancreat Disord Ther*, 2013, 3(1): 112.
- [6] Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus [J]. *World J Diabetes*, 2015, 6(3): 456–480.
- [7] Mileti E, Kwok K, Andersson D, et al. Human white adipose tissue displays selective insulin resistance in the obese state [J]. *Diabetes*, 2021, 70: 1486–1497.
- [8] Habtezion A, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Acute pancreatitis: a multifaceted set of organelle and cellular interactions [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(7): 1941–1950.
- [9] Wu J, Zhang L, Shi J, et al. Macrophage phenotypic switch orchestrates the inflammation and repair/regeneration following acute pancreatitis injury [J]. *EBioMedicine*, 2020, 58, 102920.
- [10] Zhou X, Yang G, Guan F. Biological functions and analytical strategies of sialic acids in tumor [J]. *Cells*, 2020, 9(2): 273.
- [11] Yang W, Sun C, He S, et al. The efficacy and safety of disease-modifying osteoarthritis drugs for knee and hip osteoarthritis-a systematic review and network meta-analysis [J]. *J Gen Intern Med*, 2021, 36: 2085–2093.
- [12] Wu YL, Lin AH, Chen CH, et al. Glucosamine attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting ROS-sensitive inflammatory signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 69: 208–218.
- [13] Azuma K, Osaki T, Kurozumi S, et al. Anti-inflammatory effects of orally administered glucosamine oligomer in an experimental model of inflammatory bowel disease [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 115: 448–456.
- [14] Chiu HW, Li LH, Hsieh CY, et al. Glucosamine inhibits IL-1 β expression by preserving mitochondrial integrity and disrupting assembly of the NLRP3 inflammasome [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 5603.
- [15] Moore JA, Miller WP, Dennis MD. Glucosamine induces REDD1 to suppress insulin action in retinal Müller cells [J]. *Cell Signal*, 2016, 28(5): 384–390.
- [16] Kim PK, Halbrook CJ, Kerk SA, et al. Hyaluronic acid fuels pancreatic cancer cell growth [J]. *Elife*, 2021, 10: e62645.
- [17] Alruhaimi RS, Hassanein EHM, Abd El-Aziz MK, et al. The melatonin receptor agonist agomelatine protects against acute pancreatitis induced by cadmium by attenuating inflammation and oxidative stress and modulating Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124: 110833.
- [18] Yuan C, Dong X, Xu S, et al. AKBA alleviates experimental pancreatitis by inhibiting oxidative stress in macrophages through the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 121: 110501.
- [19] Shi Z, Wang Y, Ye W, et al. The LipoxinA4 receptor agonist BML-111 ameliorates intestinal disruption following acute pancreatitis through the Nrf2-regulated antioxidant pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 163: 379–391.
- [20] Mei QX, Hu JH, Huang ZH, et al. Pretreatment with chitosan oligosaccharides attenuate experimental severe acute pancreatitis via inhibiting oxidative stress and modulating intestinal homeostasis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(6): 942–953.
- [21] Taguchi K, Nagao S, Maeda H, et al. Biomimetic carbon monoxide delivery based on hemoglobin vesicles ameliorates acute pancreatitis in mice via the regulation of macrophage and neutrophil activity [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 1266–1274.
- [22] Liu RH, Wen Y, Sun H, et al. Abdominal paracentesis drainage ameliorates severe acute pancreatitis in rats by regulating the polarization of peritoneal macrophages [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24: 5131–5143.
- [23] Jia X, Li X, Shen Y, et al. MiR-16 regulates mouse peritoneal macrophage polarization and affects T-cell activation [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20: 1898–1907.
- [24] Brissova M, Aamodt K, Brahmachary P, et al. Islet microenvironment, modulated by vascular endothelial growth factor- α signaling, promotes β cell regeneration [J]. *Cell Metab*, 2014, 19(3): 498–511.

卢晶晶,张弛,张驰名,等. 新型大鼠腰部慢性骨骼肌复合损伤模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1399-1407.
Lu JJ, Zhang C, Zhang CM, et al. Establishment of a novel composite rat model of chronic skeletal muscle injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1399-1407.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.003

新型大鼠腰部慢性骨骼肌复合损伤模型的建立

卢晶晶¹, 张弛², 张驰名³, 许钊瀚¹, 林煜翔³, 谢炜星^{4*}

(1. 广州中医药大学第一附属医院针推康复中心, 广州 510000; 2. 北京中医药大学
第二临床医学院, 北京 100105; 3. 广州中医药大学, 广州 510000;
4. 广州中医药大学第一附属医院骨伤中心, 广州 510000)

【摘要】 目的 本研究旨在建立一种新型大鼠腰部慢性骨骼肌复合损伤模型,以深入探索其机制和治疗方法。**方法** 将 28 只 SD 大鼠随机分为对照组(10 只)、单纯打击伤模型组(打击组,垂直打击)9 只、复合损伤模型组(复合组,垂直打击结合强迫长时坐位)9 只,造模 3 d 后行旷场实验、HE 染色和 PCR 测序。**结果** 打击组大鼠旷场路程明显低于复合组,两组均低于对照组。HE 染色提示打击组多处肌纤维断裂,肌间隙明显增宽,肌核分布不均,可见充血;复合组肌纤维断裂,肌间隙稍增宽,肌间可见炎症细胞浸润,特别是肌纤维断裂周围有肌纤维核聚集。测序结果中火山图提示 *Pf4* 基因具有显著差异性。复合组大鼠肌肉组织 GO 分析中氧气结合和氧载体活性通路上调。**结论** 本研究尝试建立了一种复合骨骼肌损伤模型,该模型可用于研究腰部慢性骨骼肌损伤的病理机制,并可用于评估治疗方法的疗效,在慢性非特异性腰痛的动物实验中具有实际应用价值。

【关键词】 大鼠模型;腰部慢性骨骼肌损伤;转录组测序;复合损伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1399-09

Establishment of a novel composite rat model of chronic skeletal muscle injury

LU Jingjing¹, ZHANG Chi², ZHANG Chiming³, XU Danghan¹, LIN Yuxiang³, XIE Weixing^{4*}

(1. Department of Acupuncture and Rehabilitation, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China. 2. the Second Clinical School of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100105. 3. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510000. 4. Bone Injury Center of the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510000)

Corresponding author: XIE Weixing. E-mail: xwx841211@163.com

【Abstract】 Objective To establish a novel rat model of chronic skeletal muscle composite injury in the lumbar region, to explore its mechanism and treatment method in depth. **Methods** Twenty-eight SD rats were randomly divided into control group ($n = 10$), Hitting injury model(HIM) group ($n = 9$), Composite damage model(CDM) group ($n = 9$) (vertical blow combined with forced prolonged sitting). Open field test, HE staining and PCR sequencing were performed 3 days after modeling. **Results** The open field distance of rats in HIM group was significantly shorter than that

【基金项目】 国家中医药传承创新中心科研专项(2022QN26), 广东省中医针灸重点实验室开放基金科研项目(浮针专项:01), 广东省中医药管理局科研平台专项(20244007)。

Funded by the National Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation Center Research Special Project (2022QN26), Key Laboratory of Guangdong Provincial for Acupuncture and Chinese Medicine (Special Project for Floating Acupuncture: 01), Guangdong Provincial Bureau of Traditional Chinese Medicine Research Project(20244007)。

【作者简介】 卢晶晶(1990—),女,主治医师,在读博士研究生,研究方向:针灸学。Email:18520215013@163.com

【通信作者】 谢炜星(1984—),男,副主任医师,博士,研究方向:骨质疏松。Email:xwx841211@163.com

in the CDM group, and both groups had shorter distances than the control group. HE staining showed multiple muscle fiber breaks, significant widening of muscle gaps, uneven distribution of muscle nuclei, and visible congestion in the model group of simple blow injury; In the CDM group, muscle fibers were ruptured, the muscle gaps were slightly widened, and inflammatory cell infiltration was observed between the muscles, especially around the muscle fiber breakage, with muscle fiber nuclei gathering. A volcano plot of the sequencing result suggested significant differences in the *Pf4* gene. GO analysis of muscle tissue in model group rats showed upregulation of oxygen binding and carrier activity pathways. **Conclusions** This study attempted to establish a composite skeletal muscle injury model to study the pathological changes of chronic skeletal muscle injury in the low back pain and evaluate the efficacy of treatment method. It has practical application value in animal experiments for chronic non-specific low back pain.

[Keywords] rat model; chronic skeletal muscle injury; transcriptome sequencing; composite injury

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

在各种类型创伤中,肌肉组织损伤所占的比例相对最高^[1]。损伤后肌肉组织血肿机化、瘢痕组织产生,对活动能力、生活质量构成现实的威胁^[2];因此研究骨骼肌损伤的发病机制,了解其病理特点和临床转归,探讨相关的预防、治疗和康复措施等,一直是医学研究的一项重要课题^[3]。慢性骨骼肌损伤是一种常见的运动损伤,它可以导致肌肉疼痛、功能障碍和活动受限^[4]。需要注意的是慢性骨骼肌损伤往往是急性骨骼肌损伤后康复不彻底,同时局部再次遭受反复打击而成。长时间不活动^[5]、固定骨骼肌或太空飞行也会导致肌肉骨骼质量、大小和力量的显著损失,最终导致肌肉萎缩^[6]。

检索文献发现在骨骼肌损伤的模型制备方面主要是急性期的模型比较成熟:如垂直打击造模^[7-8]、布比卡因注射造模^[9]等。而在慢性骨骼肌损伤方面传统的模型一般采用手术切除或切割肌肉组织的方式,例如切除肌腱或者神经^[10]、阻断血流^[11]等方法,以达到慢性损伤的效果。有研究者选择经典的大鼠下坡跑离心收缩模型诱导动物的慢性骨骼肌损伤模型^[12-13],该模型由 Schwane 等^[14]设计建立,然而需要注意的是该文发表时间是 1983 年,距今已 40 年。其只能模拟部分慢性肌肉损伤情况:尽管该方法可以模拟骨骼肌的长期负荷和运动过程,但并不能完全模拟所有慢性肌肉损伤情况,因此需要结合其他模型和方法进行综合研究。传统的慢性骨骼肌损伤模型局限性在于无法模拟真实的骨骼肌疾病,因为病理机制简单,与具有持久的肌肉疼痛、功能障碍的原发病有较大区别。此外,传统的方法还可能导致非特异性的细胞死亡和炎症反应,从而难以评估慢性肌肉损伤的分子机制。

另外,骨骼肌损伤模型在动物实验中往往采用的是针对腓肠肌、股四头肌进行定位打击,本实验

更换损伤肌群同时结合人体工程力学提出构建腰部慢性骨骼肌复合损伤模型新思路:急性损伤后的大鼠腰部肌肉在长期过度负重的条件下不断缺血、痉挛、机化等达到慢性非特异性腰痛的损伤时间则可以构建完整的复合模型。2022 年,研究显示非特异性腰痛是全球最普遍和最致残的疾病,在慢性患者人群中,较少患者能自行缓解(约 30%)^[15]。而其病因常常是因肌肉和韧带等软组织在急性损伤的基础上进一步慢性劳损(如久坐、久立)而导致病情迁延不愈^[15]。慢性骨骼肌损伤对肌肉组织的修复和再生能力有严重影响,而建立新型大鼠腰部慢性骨骼肌复合损伤模型可以为肌肉组织再生提供更真实的模型,促进肌肉组织的再生和修复研究;可以更真实地模拟肌肉长期受损状态,有助于深入探究慢性骨骼肌损伤的病理机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级健康 8 周龄雄性 SD 大鼠 28 只,体重 250 ~ 300 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(粤)2022-0063】,动物饲养于广州中医药大学实验动物中心【SYXK(粤)2018-0001】,大鼠自由进食及饮水,温度为 20 ~ 22℃,湿度 50% ~ 60%,模拟自然光照周期(每日 8:30 开灯,每日 20:30 关灯),大鼠按组分笼,定期消毒清理饲养盒,更换垫料。本实验由广州中医药大学实验动物伦理委员会审核通过(20220331007)。

1.1.2 主要试剂与仪器

3%戊巴比妥钠(上海化学试剂采供供应站分装厂,120505);4%多聚甲醛溶液(BL539A)购自北京沃格东方科技有限公司,品牌:biosharp。单钩砝码

打击器(500 g):购自沧州辰龙精密机械有限公司。自制固定圆桶杯:定制圆桶 PVC(底部直径 12 cm,高度 30 cm),购自温州钱森包装有限共公司;网格卡扣:购自河北稳固丝网制品有限公司(丝径 0.4 mm 丝网宽 90 cm);Slide-Viewer 图像采集系统:应用程序,版本:2.5.0.143918。NovaSeq 6000 测序平台:仪器名称,DNBseq-T7RS,武汉华大智造科技有限公司生产的仪器,仪器编号 R1100600210010。

1.2 方法

1.2.1 实验改进思路

为解决上述问题,本文综合文献对方法进行了优化。复合损伤模型组参考垂直打击模型^[7-8],经过预实验选择对大鼠打击合理范围内的打击次数(连续 2 次),然后采用自制坐位模具,将大鼠固定在各个鼠格中强迫坐姿制造静力压,通过体位及力学的改变,加重肌肉负担减少肌肉修复,并使用转录组测序进行验证^[16]。参考文献^[17]记载人类 1 h 约等同于大鼠生命周期的 30 h 以上(不同年龄段有差异),结合预实验观察动物耐受程度,将强迫坐姿时间安排在打击后持续 1 h。人类慢性非特异性腰痛的发病时间,为腰痛急性(6 周内)、亚急性(6 ~ 12 周)和慢性(12 周以上)^[18],大鼠的发病时间则相应缩短^[17]。人类的 1 h 约等同于成年期大鼠生命周期的 34.8 h^[16](即大鼠一个月相当于人类的 3 年,相较人类更快地衰老)。在 60 h 的造模方案中,间歇(打击 + 强迫坐姿)训练时间,符合慢性腰肌劳损的要求。单纯打击伤模型组则符合急性损伤要求;造模时间约 28 h。静力压会影响足部、尾部等组织的血流及细胞代谢,要定期检查相应部位,谨慎控制坐位姿势时长,减轻脚部和爪子的压力,并尽可能减少伤害。

1.2.2 分组造模

在实验前进行 1 周的适应性饲养。采用随机数字表法将 28 只 SD 大鼠随机分为 3 组,分别为对照组(Control group),单纯打击伤模型组,简称打击组(HIM group),复合损伤模型组,简称复合组(CDM group)。其中,对照组 10 只,打击组 9 只(行垂直打击),复合组 9 只(垂直打击结合强迫长时坐位),标记编号。用 3%戊巴比妥钠按 0.5 mL/100 g 的计量,腹腔注射麻醉。本实验中打击组参考侯懿烜等^[19]垂直下落打击的造模方法构建,而复合组在打击后使 SD 大鼠强迫持续坐姿,以模拟人类疾病腰肌劳损。

进行分笼适应性喂养 7 d 后,剪除大鼠打击处被毛,打击组大鼠俯卧位并在打击点做标记同时打击器激光锚定打击部位(见图 1),打击部位在俯卧位大鼠第五腰椎水平双侧竖脊肌^[10],触碰局部时有躲避反射。每次击打左右腰部各 1 次,垂直打击标记部位(2 d 内共打击 3 组),打击器与损伤处接触面积约为 1 cm × 1 cm,动能为 2.352 J(打击器总重量为 500 g,由 48 cm 处自由落体)。观察打击部位无骨折,表皮无破损,有散在红色斑点,皮下暗红,不作任何处理,形成背部肌群急性钝挫伤动物模型。复合组 2 d 内共打击 2 组(左右腰肌各 1 次为 1 组),随后使用自制固定圆桶杯及网格卡扣固定大鼠,使其模仿人体坐位姿势强迫坐位 1 h 造模(见图 2)。造模成功后将实验大鼠放回笼中继续进行常规饲养,按实验时间表和流程图进行(见图 3)。

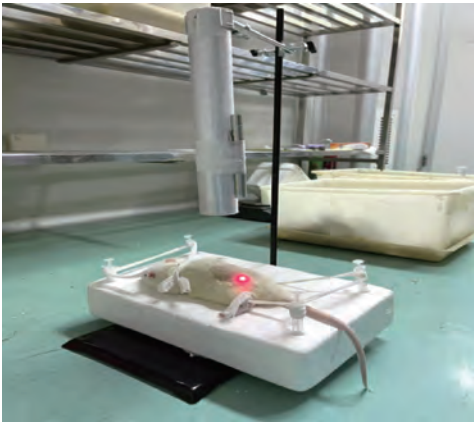


图 1 垂直打击图
Figure 1 Vertical strike diagram

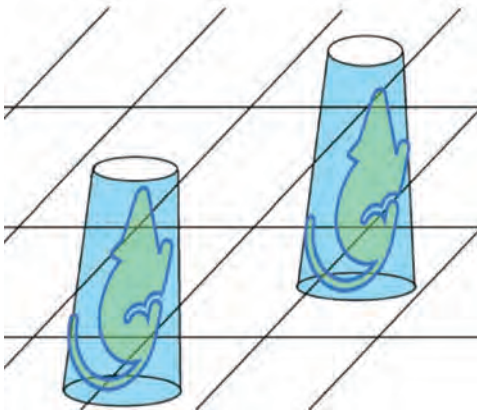
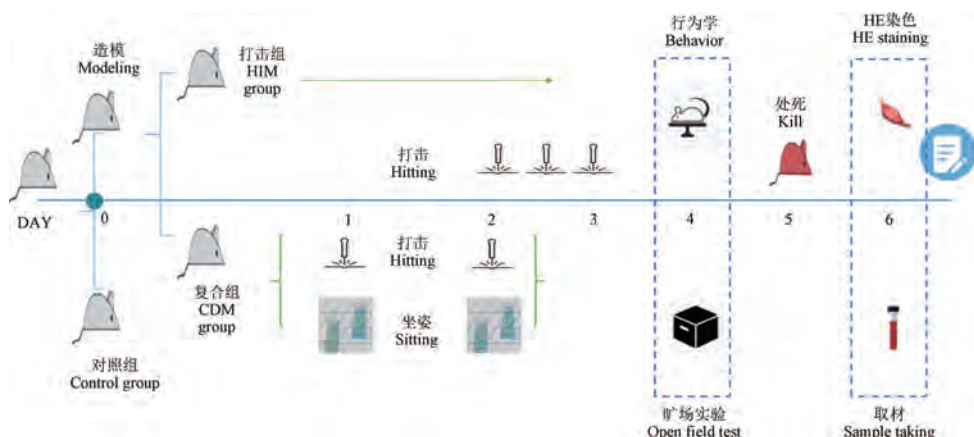


图 2 强迫坐姿模型示意图
Figure 2 Diagram of a forced sitting posture model

1.2.3 行为学——旷场实验

(1)实验开始之前,先确保实验箱干净无味,需



注:打击组在 2 d 内打击 3 次。

图 3 实验流程图

Note. HIM group was hit 3 times in two days.

Figure 3 Experimental flowchart

要注意清理上一次测试遗留下来的粪便、尿液等。(2)实验人员在软件中设置好相应的参数,记录好动物的编号、日期、状态等信息。(3)将实验动物迅速放置于实验箱的中央区域,并立即离开。(4)打开动物行为学分析软件,自动记录动物在箱体内的活动,实验时间通常为 15 min。旷场实验完成后处死大鼠。

1.2.4 标本准备

每次取材前,大鼠禁食禁水 12 h,分别称重,大鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉,固定后除毛备皮,暴露竖脊肌,锐性切取 L4/L5 节段肌组织,右侧部分置于 4%多聚甲醛溶液中固定,部分切成小块放入 1.5 mL RNase-free 螺纹冻存管中再置于 -80°C 液氮中冷冻保存用于测序,左侧置于液氮冷冻后保存于 -80°C 冰箱,用于后续实验。

1.2.5 组织病理染色

取材固定、修块、染色、水化、包埋、烤片等处理。病理观察:使用 Slide-Viewer 图像采集系统对腰部的肌肉形态进行观察与描述。

1.2.6 测序

从对照组和复合组各选取 3 只进行测序,按体重分层,随后按随机数字选择三层中的任意 1 只大鼠进行标本测序。其中根据体重差值每 25 g 为一层,随机数字表法在第一层选择的大鼠作为对照组 1/复合组 1;第二层作为对照组 2/复合组 2;第三层作为对照组 3/复合组 3。取新鲜竖脊肌,按照 ABclonal mRNA-seq Lib Prep Kit(爱博泰克生物科技有限公司,中国)说明书制备 PE 文库。纯化 PCR 产物,并使用 Agilent Bioanalyzer 4150 评估文库质

量。最后,使用 NovaSeq 6000 测序平台 PE150 读长进行测序。

1.2.7 数据分析

高通量测序得到的原始图像数据文件经 CASAVA 碱基识别(base calling)分析转化为原始测序序列(sequenced reads),并经测序错误率分布检查评估样本数据质量,利用 FeatureCounts 软件计算出每个基因在各个样本中的表达量每千碱基的片段映射读取数(fragments per kilobase per million mapped reads,FPKM)。运用中科新生命云平台(网址 <https://bio-cloud.apptbiotech.com/tool>)绘制主成分分析图(principal component analysis,PCA)、差异基因分布火山图、差异基因热图、功能富集(gene ontology,GO)分析上下调通路。

1.3 统计学分析

所有数据均用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用多功能数据图像分析软件 Graphpad Prism 8.0.2 进行统计分析,结果主要采用 t 检验法检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

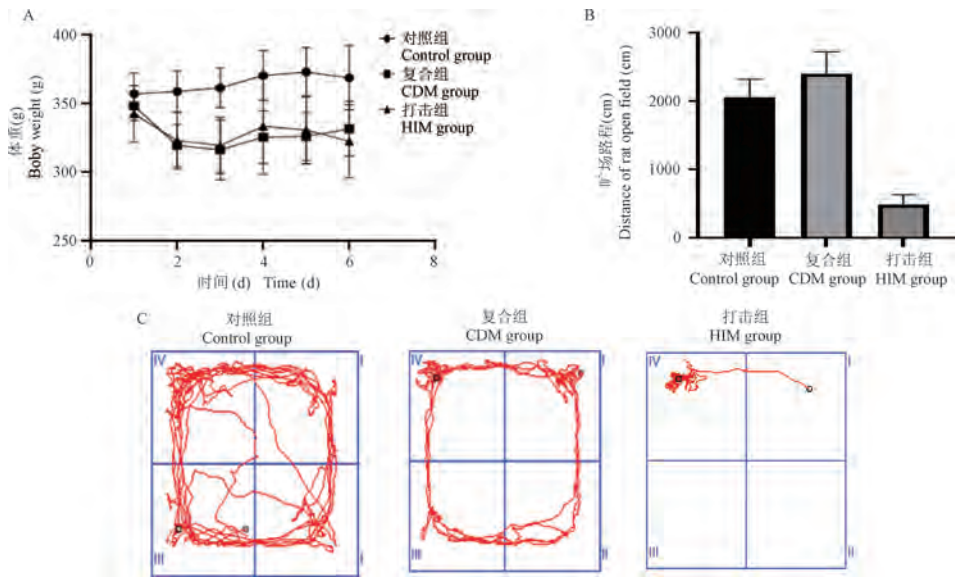
2 结果

2.1 一般观察结果

对大鼠实验前观察发现,各组大鼠均表现为容易受到惊吓,对抓取刺激反应强烈,放置笼子 30 min 后各大鼠均活动自由,正常饮水进食。随着造模次数的增多,模型组大鼠表现为活动量、体重、饮食、饮水的减少;造模和干预过程中有 2 只模型组大鼠死亡。解剖取材时发现对照组的大鼠肌肉筋膜是

十分平整且呈鲜红颜色,表明其血液供应较充足,筋膜无粘连,触摸无结节。造模前各组大鼠皮毛光泽度好,正常进食饮水和排便,活动自如,对大鼠进行体重的称量($P < 0.05$),见图 4A;结果显示组间

不存在显著性差异。随着造模实验不断进行,除对照组体重基本未见明显变化外,打击组及复合组大鼠体重均有不同程度下降,但是两组之间下降趋势一致。行为学旷场实验结果见图 4B,图 4C。



注:A:造模前3组大鼠体重趋势图;B:旷场路程;C:旷场轨迹图。
Note. A. Body weight trend of 3 groups of rats before modeling. B. Distance of rat open field. C. Open field trajectory map.

图4 造模前体重与旷场实验

Figure 4 Weight and open field test

2.2 HE 染色

各组大鼠骨骼肌组织 HE 染色结果如图 5 所示,对照组:骨骼肌组织排列整齐,肌膜结构清晰,肌间隙正常,肌纤维改变未见明显异常,纤维着色均匀,细胞分界清楚,走行一致,无炎症细胞浸润。打击组:大鼠骨骼肌结构不清,纤维紊乱,可见多处肌纤维断裂(黑色箭头),肌纤维着色均匀,细胞分界清楚,肌间隙明显增宽,肌核分布不均,可见充血。复合组:骨骼肌组织细胞分界清楚,与对照组相比,结构紊乱(蓝色箭头),纤维着色不均,可见肌

纤维断裂,肌间隙稍增宽,肌间可见炎症细胞浸润。与打击组对比,复合组在肌纤维断裂周围,有肌纤维核聚集(绿色箭头)。

2.3 复合组与对照组测序数据分析

6 个样本数据质量较高,错误率低(见表 1)。设定每千碱基的片段映射读取数 FPKM 大于 10 为高表达,筛选 FPKM 大于 10 的基因绘制主成分分析图(Principal Component Analysis, PCA)评估组间差异对照组组间差异小,与复合组有明显差异,可进一步分析差异基因(见图 6)。

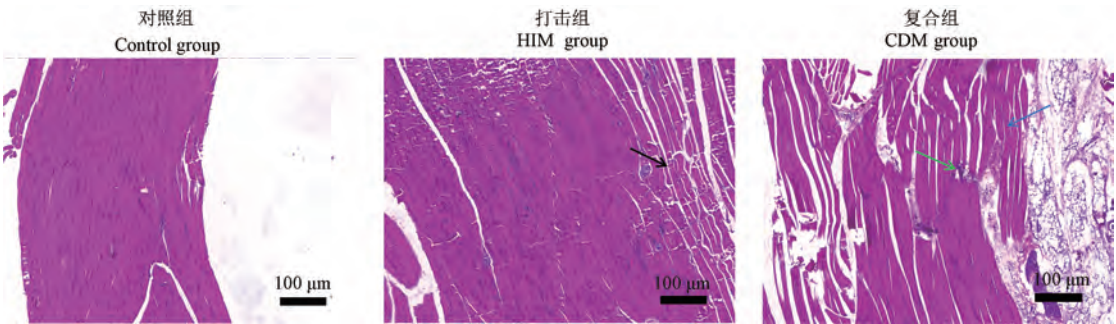


图5 造模后三组 HE 染色

Figure 5 Three groups of HE staining after molding

表 1 各样本数据质量一览表

Table 1 Overview of data quality for each sample

样本 Sample	原始测序 序列 Raw reads	过滤后的 序列 Clean reads	过滤后碱基 数目(G) Clean bases (G)	错误率(%) Error(%)	质量值≥ 20(%) Q≥20(%)	质量值≥ 30(%) Q≥30(%)	配对碱 基(%) GC(%)
对照组 1 Control group 1	55 706 818	55 706 742	8.34	0.03	97.79	92.88	50.76
对照组 2 Control group 2	57 894 882	57 894 792	8.65	0.03	97.65	92.52	51.26
对照组 3 Control group 3	54 152 142	54 152 056	8.10	0.02	98.12	93.69	50.49
复合组 1 CDM group 1	47 197 130	47 197 082	7.05	0.03	97.57	92.67	51.76
复合组 2 CDM group 2	54 919 386	54 919 296	8.21	0.02	98.55	94.93	51.31
复合组 3 CDM group 3	64 320 828	64 320 730	9.62	0.02	98.20	93.99	51.49

注:过滤后碱基数目;过滤后的序列的个数乘以测序序列的长度(约 150 bp),并转化为以 G 为单位;质量值≥20%、质量值≥30%;碱基质量分数大于 20、30 的碱基占总体碱基的百分比;配对碱基:碱基 G 和 C 的数量总和占总的碱基数量的百分比。
Note. Clean bases. The product of the number of clean reads and the length of the sequencing sequence (about 150 bp), converted to units of G. Q≥20%, Q≥30%. The percentage of bases with a base quality score greater than 20 and 30, respectively, out of the total number of bases. GC. The percentage of the total number of G and C bases out of the total number of bases.

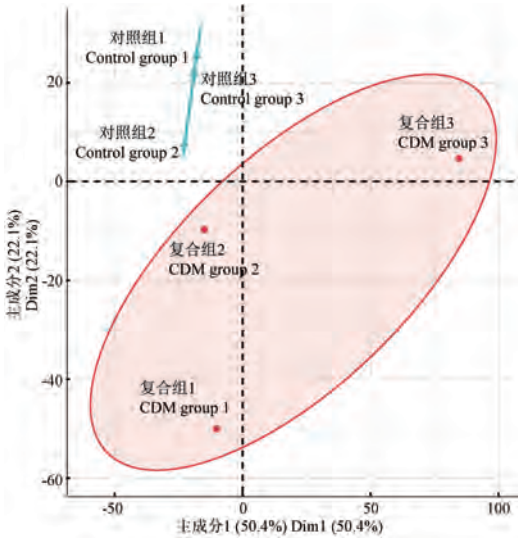


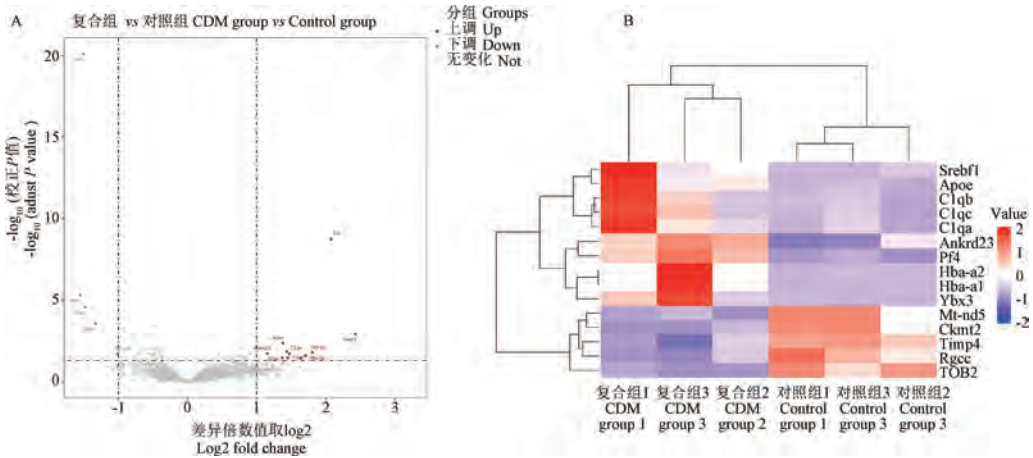
图 6 主成分分析(PCA)

Figure 6 Principal component analysis (PCA)

结合火山图(见图 7A)与热图(见图 7B)筛选差异基因,可得出下调的差异基因包括:*Tob2*、*Rgcc*、*Timp4*、*Ckmt2*。而上调的差异基因包括:*Pf4*、*Ankrd23*。下调的 *Tob2* 基因差异最为显著:其属于抑制蛋白家族(BTG/TOB 蛋白家族),涉及细胞周期、细胞分化等多个生物学过程。*BTG/TOB* 基因家族对早期肌纤维增殖有显著影响,BTG1 有刺激成肌细胞中多种转录因子的活性的能力^[20]。

Ckmt2 的下调影响细胞能量代谢和线粒体功能。*Pf4* 是上调基因中差异最为显著的基因,是一种由血小板释放的细胞因子,参与凝血反应和血小板功能,*Pf4* 可能与损伤的严重程度有关^[21]。

在 GO 分析中(见图 8)下调通路的前 20 包括细胞外基质成分分泌的调节、磷酸肌酸合成及代谢过程等($P < 0.05$)。细胞外基质(extracellular



注:A:复合组与对照组差异基因火山图;B:复合组与对照组差异基因热图。

图 7 差异基因火山图与热图

Note. A. Volcano plot of differentially expressed genes between CDM group and control group. B. Heat map of differentially expressed genes between CDM group and control group.

Figure 7 Volcano map and heat map of differentially expressed genes

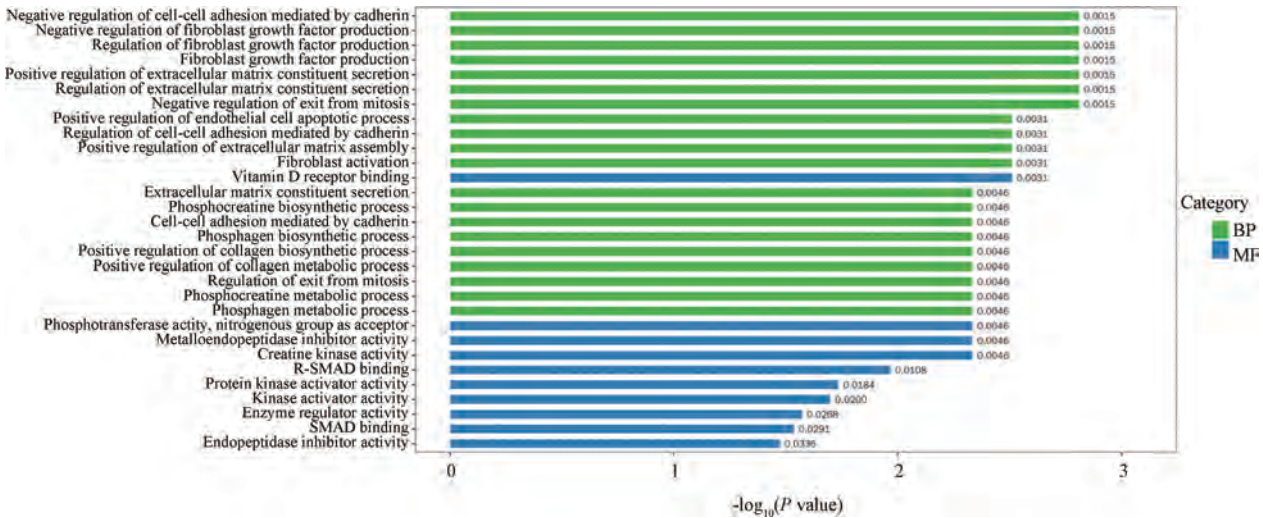


图 8 复合组下调基因 GO 分析
Figure 8 Analysis of down-regulated gene GO in CDM group

matrix, ECM)是由多种蛋白质和多糖组成的复杂结构,为细胞提供支持和定向,同时也在信号传递和细胞运动中发挥重要作用^[22]。ECM 成分的分泌和降解是由多种分子调节的,包括生长因子、基质金属蛋白酶^[23]、组织因子等。这些分子在细胞外环境中形成一个复杂的调节网络,可以通过多种信号通路调控 ECM 成分的合成和降解,从而影响细胞的行为和功能。磷酸肌酸(phosphocreatine, PCr)是肌肉细胞中的一个重要能量储备物质,可以在高强度运动时迅速转化为 ATP,为肌肉提供能量。磷酸肌酸代谢过程包括磷酸肌酸的合成和降解,这些过程是由多个酶催化和调控的,包括肌酸激酶、磷酸肌酸

酶等。同时,磷酸肌酸的合成和降解也受多种因素的影响,如锻炼强度、营养状况等。胶原是 ECM 中的主要成分之一,在细胞外环境中形成纤维状结构,为组织提供强度和支持。胶原生物合成过程包括多种酶的催化和调控,如蛋白多肽前体的加工、胶原纤维的组装等。这些过程受多种因素的影响,如生长因子、细胞外基质分子等,可以通过多种信号通路调节胶原的生物合成和分解。

前 10 位的 GO 分析上调通路包括突触修剪、氧结合、氧气输送、氧载体活性、分子载体活性等($P < 0.05$)(见图 9)。突触修剪是指神经元之间的突触连接在发育和学习过程中会被调整和重塑的过程。

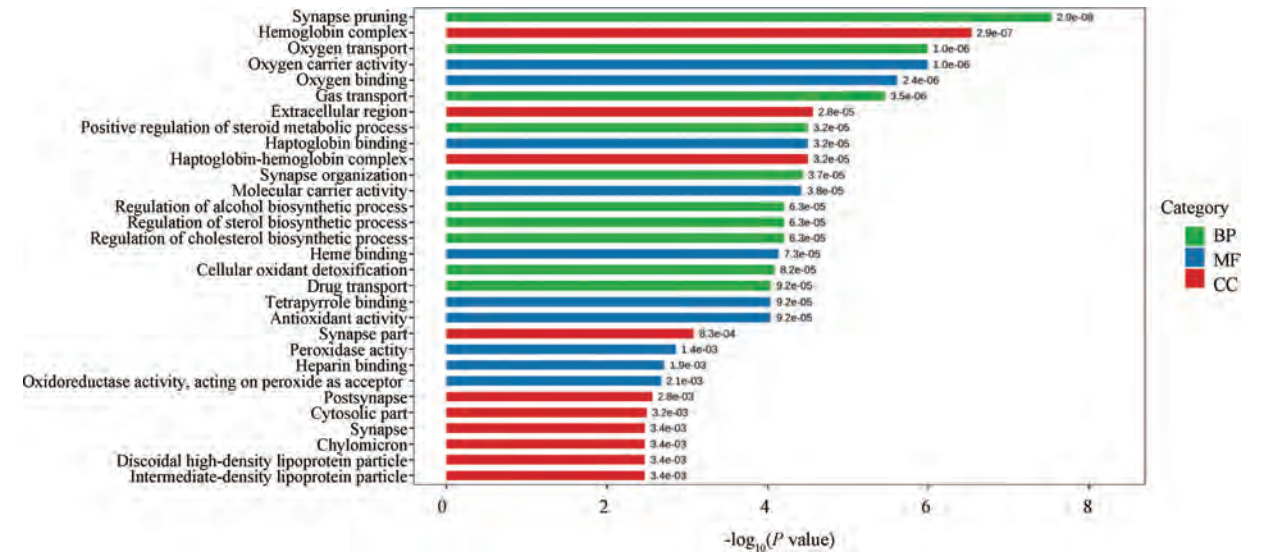


图 9 复合组上调基因 GO 分析
Figure 9 Analysis of up-regulated gene GO in CDM group

突触修剪的异常可能导致神经元和肌肉之间的不恰当连接,从而导致肌肉的收缩和骨骼肌的受损。而氧气结合和氧载体活性的异常侧面反映了本模型中所出现肌肉缺氧和细胞死亡,这些都是与骨骼肌损伤相关的生物学过程。分子载体活性是指分子(如蛋白质和其他生物分子)在细胞和组织内转运和传递物质的能力。在骨骼肌损伤过程中,分子载体的异常可能导致物质的不适当运输和转运,从而导致细胞和组织的功能受损。

3 讨论

选择合适的实验动物模型对实验研究尤为重要。本研究建立了一种新型大鼠慢性骨骼肌复合损伤模型;该动物模型选择了 SD 大鼠作为实验对象,通过打击损伤的方式模拟了复合型腰部骨骼肌损伤的病理过程,从转录组测序、运动学评估等多角度综合评估损伤质量、模型契合度。本模型的行为学改变为活动能力下降,病理生理学变化包括炎症改变、肌腱断裂、肌肉萎缩等。这些变化与人类腰部骨骼肌损伤,如腰肌劳损具有相似性。本实验动物模型采用测序技术进行评价,而 *Timp4* 基因在大鼠肌肉再生过程中的表达水平下调;*Ckmi2* 参与肌肉细胞的能量代谢过程,其变化可能会影响肌肉损伤后的修复;*Pf4* 在炎症反应和肌肉修复过程的启动会被释放到血液中,进入损伤区域,并与其他细胞因子相互作用。因此本模型测序结果中以上基因的变化侧面提示本模型造模成功。

另外本研究也为今后探究骨骼肌损伤和修复过程中的分子机制和生物学过程提供了参考方向:GO 分析提示 BP 突触剪切、氧输送、蛋白质激活级联;MF 氧载活性、氧集合、触珠蛋白结合;细胞定位 (cellular component, CC) 触珠蛋白血红蛋白复合物、细胞外区等在总差异通路排序的前 15 位。以上通路有助于理解骨骼肌物理模型基因调控的生物学机制,推断肌肉修复和再生过程中的分子细节。

本模型具有以下 3 个方面的优势:(1)创新性:采用的损伤方式包括重物外力打击造成肌膜撕裂和长时静力压导致肌肉萎缩等多种方式,尽可能地模拟复杂的腰部骨骼肌损伤情况。(2)简便性:模型相对简单,通过查阅文献^[16-17]获得较为精密的计算模型操作时间,有序的建立慢性模型,一方面人为外力影响因素较少,具有可复制性和实用性。另一方面,下坡跑离心收缩模型方案需要长达 5 ~

28 d^[12,14] 的造模时间,对比而言本模型方案只需要 3 d,节省人力物力。(3)影响因素少:与注射布比卡因^[9]等药物方式造模相比,本复合模型基于物理造模方式,如该模型用于评价新药治疗骨骼肌损伤等疾病,不涉及药物相互作用及药物代谢等,干扰因素少,应用潜力广。当然本模型也存在局限性:大鼠强迫坐位固定器的机械标准化仍需精细,减少误差因素。

本研究为未来的骨骼肌损伤相关研究提供了一种新的模型创新方向,期望新的实验模型能提高人类腰部骨骼肌损伤的治疗效果,大鼠模型骨骼肌肌肉测序结果可以为骨骼肌损伤和修复的分子机制和生物学过程研究提供重要信息,并为研究和治疗肌肉疾病提供潜在的靶点。

参 考 文 献 (References)

- [1] Turner NJ, Badylak SF. Regeneration of skeletal muscle [J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(3): 759-774.
- [2] Liu J, Saul D, Böker KO, et al. Current methods for skeletal muscle tissue repair and regeneration [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 1984879.
- [3] 刘秀娟, 盛蕾, 张念云, 等. 不同运动方式对大鼠骨骼肌 MSTN 和 IGF1 的影响比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 41-48.
- [4] Liu XJ, Sheng L, Zhang NY, et al. Comparison of the effects of different exercise modes on MSTN and IGF1 of rat skeletal muscle [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 41-48.
- [5] Chen Z, Lan H, Liao Z, et al. Regulatory T cells-centered regulatory networks of skeletal muscle inflammation and regeneration [J]. Cell Biosci, 2022, 12(1): 112.
- [6] Sirago G, Pellegrino MA, Bottinelli R, et al. Loss of neuromuscular junction integrity and muscle atrophy in skeletal muscle disuse [J]. Ageing Res Rev, 2023, 83: 101810.
- [7] Britto FA, Begue G, Rossano B, et al. REDD1 deletion prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014, 307(11): E983-E993.
- [8] Sakuma Y, Miyagi M, Inoue G, et al. Muscle injury in rats induces upregulation of inflammatory cytokines in injured muscle and calcitonin gene-related peptide in dorsal root Ganglia innervating the injured muscle [J]. Muscle Nerve, 2016, 54(4): 776-782.
- [9] Rodrigues G, Moraes T, Elisei L, et al. Resistance exercise and whey protein supplementation reduce mechanical allodynia and spinal microglia activation after acute muscle trauma in rats [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 726423.
- [10] 吕巧巧, 张莉, 李霞, 等. 电针“委中”对腰多裂肌损伤大鼠铁代谢紊乱的保护作用 [J]. 针刺研究, 2022, 47(12): 1073-1079.
- [11] Lv QQ, Zhang L, Li X, et al. Effect of electroacupuncture of

- “Weizhong” on iron metabolism disorder in rats with lumbar multifidus muscle injury [J]. *Acupunct Res*, 2022, 47(12): 1073–1079.
- [10] 谢慧, 唐成林, 赵丹丹, 等. 电针干预经 TGF- β 1/Smad3 信号通路对失神经肌萎缩大鼠肌卫星细胞分化的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 2019, 38(3): 211–216.
- Xie H, Tang CL, Zhao DD, et al. Effects of electroacupuncture on differentiation of muscle satellite cells through controlling TGF- β 1/Smad3 signal pathway in denervated rats [J]. *Chin J Sports Med*, 2019, 38(3): 211–216.
- [11] 刘宗义, 朱付平, 李武平. 桃红四物汤对大鼠肢体缺血-再灌注损伤骨骼肌长链非编码 RNA H19、核因子 κ B-p65 表达的影响 [J]. *陕西中医*, 2022, 43(9): 1163–1169.
- Liu ZY, Zhu FP, Li WP. Effects of Taohong Siwu Decoction on expression of lncRNA H19 and NF- κ B-p65 in skeletal muscle of rats with limb ischemia-reperfusion injury [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2022, 43(9): 1163–1169.
- [12] 张晓陶, 杨彦红, 杨桦, 等. 针刺对慢性骨骼肌损伤模型大鼠血清肌酸激酶的影响 [J]. *甘肃中医药大学学报*, 2020, 37(6): 5–8.
- Zhang XT, Yang YH, Yang H, et al. Effect of acupuncture on serum creatine kinase of the model rats with chronic skeletal muscle injury [J]. *J Gansu Univ Chin Med*, 2020, 37(6): 5–8.
- [13] 孟祥利, 吕晓虹. 离心运动模式对运动性肌肉损伤的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(32): 5132–5136.
- Meng XL, Lv XH. Effect of eccentric exercise patterns on exercise-induced muscle damage [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2023, 27(32): 5132–5136.
- [14] Schwane JA, Armstrong RB. Effect of training on skeletal muscle injury from downhill running in rats [J]. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1983, 55(3): 969–975.
- [15] Chiarotto A, Koes BW. Nonspecific low back pain [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(18): 1732–1740.
- [16] Niu M, Zhao Y, Xiang L, et al. 16S rRNA gene sequencing analysis of gut microbiome in a mini-pig diabetes model [J]. *Anim Model Exp Med*, 2022, 5(1): 81–88.
- [17] Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's [J]. *Int J Prev Med*, 2013, 4(6): 624–630.
- [18] Han CS, Hancock MJ, Maher CG. Reconsidering non-specific low back pain: where to from here? [J]. *Spine J*, 2022, 22(12): 1927–1930.
- [19] 侯懿烜, 郑元义, 张萍, 等. 按摩增强琥珀酸脱氢酶和钾-钠 ATP 酶活性促进兔股四头肌的损伤修复 [J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(19): 2012–2015.
- Hou YX, Zheng YY, Zhang P, et al. Massage promotes repairing of injured quadriceps femoris muscle of rabbit through enhancing activity of SDH and K⁺-Na⁺-ATPase [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*, 2011, 33(19): 2012–2015.
- [20] Winkler GS. The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 222(1): 66–72.
- [21] Shi G, Field DJ, Long X, et al. Platelet factor 4 mediates vascular smooth muscle cell injury responses [J]. *Blood*, 2013, 121(21): 4417–4427.
- [22] Zanotti S, Magri F, Salani S, et al. Extracellular matrix disorganization and sarcolemmal alterations in COL6-related myopathy patients with new variants of COL6 genes [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5551.
- [23] 吴玉冰, 尹莉芳, 秦超. 基质金属蛋白酶在疾病诊断中的应用及其检测方法 [J]. *中国药科大学学报*, 2020, 51(5): 614–621.
- Wu YB, Yin LF, Qin C. Clinical application and detection of matrix metalloproteinases in diagnosis [J]. *J Chin Pharm Univ*, 2020, 51(5): 614–621.

[收稿日期] 2023-04-10

羊璞,栗胜勇,王甜,等. 足底注射完全弗氏佐剂致疼痛抑郁共病模型大鼠行为学及单胺类神经递质改变 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1408-1414.

Yang P, Su SY, Wang T, et al. Plantar injection of complete Freund's adjuvant induces behavioral and monoamine neurotransmitter changes in comorbid pain and depression model rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1408-1414.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.004

足底注射完全弗氏佐剂致疼痛抑郁 共病模型大鼠行为学及单胺类 神经递质改变

羊璞^{1,3}, 栗胜勇^{2*}, 王甜¹, 苏虹¹

(1. 广西中医药大学第一临床医学院, 南宁 530023; 2. 广西中医药大学第一附属医院针灸科, 南宁 530023;
3. 广西中医药防治医学分子生物重点实验室, 南宁 530023)

【摘要】 目的 观察足底注射完全弗氏佐剂对大鼠疼痛抑郁行为的影响及海马单胺类神经递质的变化,旨在建立慢性炎性疼痛抑郁共病动物模型。**方法** 将 16 只 8 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠随机分为模型组与对照组, 每组 8 只。模型组大鼠麻醉后通过左后足底注射完全弗氏佐剂 100 μ L, 建立慢性炎性疼痛抑郁共病模型大鼠, 对照组注射同体积生理盐水。采用 Von Frey 纤维丝和热辐射刺激仪测量大鼠的疼痛阈值, 采用旷场实验、悬尾实验、强迫游泳实验评价大鼠的抑郁行为, 采用酶联免疫吸附实验检测大鼠海马组织的 5-羟色胺、多巴胺、去甲肾上腺素的含量, 采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察大鼠海马区病理改变。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠机械缩足阈值及热缩足反射潜伏期在 3、7、14 d 明显降低 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 模型组大鼠旷场实验运动总距离在 7、14 d 明显减少 ($P < 0.01$), 中央区停留时长在 14 d 明显降低 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 模型组大鼠悬尾实验不动时间在 14 d 明显增加 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 模型组大鼠强迫游泳实验不动时间在 7、14 d 明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与对照组相比, 模型组大鼠海马中 5-羟色胺、多巴胺、去甲肾上腺素含量明显减少 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 模型组大鼠海马组织病理发生改变, 神经元形态不规则, 排列松散、紊乱, 细胞间隙增大, 部分细胞核模糊, 出现部分神经元固缩、凋亡。**结论** 100 μ L 完全弗氏佐剂足底注射可引起大鼠痛觉过敏、抑郁样行为改变及海马单胺类神经递质明显降低, 造成海马病理形态变化, 可有效模拟疼痛抑郁共病的表现, 是一种可用于慢性炎性疼痛抑郁共病病理机制研究的实验模型。

【关键词】 疼痛; 抑郁; 共病; 完全弗氏佐剂; 单胺类神经递质; 大鼠; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1408-07

Plantar injection of complete Freund's adjuvant induces behavioral and monoamine neurotransmitter changes in comorbid pain and depression model rats

YANG Pu^{1,3}, SU Shengyong^{2*}, WANG Tian¹, SU Hong¹

【基金项目】 国家自然科学基金 (81960895, 82160934), 广西壮族自治区一流学科建设项目 (2018XK075), 广西中医药大学研究生教育创新计划项目 (YCBXJ2023023)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81960895, 82160934), First-Class Discipline Construction Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2018XK075), the Innovation Project of Guangxi Graduate Education (YCBXJ2023023)。

【作者简介】 羊璞 (1994—), 男, 在读博士研究生, 研究方向: 针灸治疗痛症及脑病的研究。Email: 804806730@qq.com

【通信作者】 栗胜勇 (1976—), 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 针灸治疗痛症及脑病的研究。Email: 1037097555@qq.com

(1. the First School of Clinical Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China.
2. Department of Acupuncture and Moxibustion, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of
Chinese Medicine, Nanning 530023. 3. Guangxi Key Laboratory of Molecular Biology of Preventive
Medicine of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023)
Corresponding author: SU Shengyong. E-mail:1037097555@qq.com

[Abstract] Objective To observe the effects of plantar injection of complete Freund’s adjuvant (CFA) on pain-depressive behavior and changes in hippocampal monoamine neurotransmitters in rats to establish an animal model of related comorbidity. **Methods** Sixteen male, 8-week-old, SPF-grade healthy SD rats were randomly divided into model and control groups with eight rats in each group. In the model group, rats were anesthetized and injected with 100 μL CFA in the left hind paw to induce the comorbid chronic inflammatory pain and depression model. In the control group, rats were injected with the same volume of saline. Pain thresholds were measured using the Von Frey hair and thermal radiation instrument, and depression-like behaviors were assessed using the open field test (OFT), tail suspension test (TST), and forced swim test (FST). Enzyme-linked immunosorbent assays were used to measure 5-hydroxytryptamine (5-HT), dopamine (DA), and norepinephrine (NE) in rat hippocampal tissue. Histological changes in the hippocampal area were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** Compared with the control group, the mechanical withdrawal threshold and thermal withdrawal latency in the model group were significantly decreased at 3, 7, and 14 days ($P < 0.01$). The total distance in the OFT was significantly reduced at 7 and 14 days ($P < 0.01$), and the time spent in the center zone was significantly decreased at 14 days ($P < 0.01$). Immobility time in the TST was significantly increased at 14 days ($P < 0.01$), and the immobility time in the FST was significantly increased at 7 and 14 days ($P < 0.05$, $P < 0.01$). 5-HT, DA, and NE contents in hippocampal tissue of the model group rats were significantly reduced compared with those in the control group ($P < 0.01$), and hippocampal tissue in the model group showed pathological changes, including irregular neuronal shapes, loose and disordered arrangement, increased intercellular space, some unclear cell nuclei, and some neuronal contraction and apoptosis. **Conclusions** Injection of 100 μL CFA into the footpad causes pain hypersensitivity, depression-like behavior, significant reductions in monoaminergic neurotransmitters in the hippocampus, and histological changes in the hippocampus, effectively simulating the manifestations of comorbid pain and depression, and is an experimental model to study the pathological mechanisms of comorbid chronic inflammatory pain and depression.

[Keywords] pain; depression; comorbidity; complete Freund’s adjuvant; monoamine neurotransmitters; rat; animal model

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

慢性疼痛是指疼痛持续或间歇性超过 12 周,在此过程中,慢性疼痛作为一种长期的应激源常导致患者出现抑郁状态^[1]。慢性疼痛和抑郁可相互叠加,造成患者功能下降,并影响预后,增加治疗费用^[2]。疼痛和抑郁的共病可导致临床诊断产生误差,可能会造成治疗时机的延误,从而进一步增加患者负担。临床上慢性炎性疼痛常与抑郁共存^[3],但目前慢性炎性疼痛和抑郁发生的因果关系及内在机制尚不清楚,因此,建立合理、可靠、易得的动物模型是进一步研究二者关系的基础^[4]。基于单胺类神经递质假说研发的临床药物,如选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂、5-羟色胺去甲肾上腺素再摄取抑制剂,已被证实对疼痛抑郁共病具有疗效,显示出单胺类神经递质在慢性疼痛和抑郁共病中的关键作用^[5]。单胺类神经递质作用分别在疼痛和抑

郁中的较多,但涉及慢性炎性疼痛抑郁共病的研究还较为少见,因此本实验拟通过完全弗氏佐剂 (complete Freund’s adjuvant, CFA) 建立慢性炎性疼痛抑郁共病模型大鼠,观察模型大鼠疼痛、抑郁样行为学及海马单胺类神经递质的变化,为慢性炎性疼痛抑郁共病的基础研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级健康 SD 雄性大鼠 16 只,体重为 180 ~ 220 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司【SCXK(湘)2019-0014】,饲养于广西中医药大学第一附属医院医学分子生物学实验室动物房【SYXK(桂)2019-0001】,饲养温度 23 ~ 25℃,相对湿度

50% ~ 60%, 12 h/12 h 昼夜节律, 自由饮水摄食。本实验所有操作符合动物福利伦理原则, 并通过广西中医药大学实验动物福利伦理委员会的批准 (DW20220523-106)。

1.1.2 主要试剂与仪器

苏木素染色液、伊红染色液 (批号: BA-4041, BA-4024, 珠海贝索生物技术有限公司); 分化液 (批号: C0163M, 上海碧云天生物技术有限公司); 5-HT、DA、NE (批号: E-EL-0033c, E-EL-0046c, E-EL-0047c, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA), (批号: 7009, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 异氟醚 (批号: R510-22, 深圳瑞沃德生命科技有限公司)。40 cm × 23 cm × 15 cm 聚丙烯透明树脂材料敞箱、48 cm × 34 cm × 39 cm 足底测试平台、Von Frey 纤维丝 (型号: NC12775-79, 购自上海玉研科学仪器有限公司); 小动物专用麻醉机 (型号: CDS9000, 美国 Harvard); 热板痛觉测试仪 (型号: II TC39, 美国 Life Science); 自动多功能酶标仪 (型号: BioTek-Elx800, 美国 Thermo Fisher)。

1.2 方法

1.2.1 分组和造模

适应性喂养 1 周后, 采用 Open-Field 法进行行为学测定后, 16 只 SD 大鼠行为表现得分及体重相近, 使用随机数字表法分为对照组和模型组, 每组 8 只。

慢性炎性疼痛抑郁共病大鼠模型造模方法: 参考文献^[6-9]的方法, 大鼠用 2% 异氟醚吸入麻醉后, 俯卧位固定, 使用微量注射器给予大鼠左后爪足底表面注射 CFA 100 μ L, 造模 48 h 后, 大鼠造模足出现明显红肿现象且痛阈值明显下降, 代表造模成功。对照组注射等量 0.9% 氯化钠溶液。

1.2.2 机械缩足阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)

根据改良 Up-down 法计算 MWT^[10], 将大鼠放置于金属筛网上的聚丙烯树脂材料敞箱内, 安静 15 min 后, 以一系列标准化 Von Frey 纤维丝垂直刺其左后肢足底中部皮肤, 缓慢增加压力使纤维丝呈现“C”或“S”型, 并保持 6 ~ 8 s, 大鼠出现抬足、舔足、躲避等反应时被视为阳性反应。使用公式 $MWT = (10^{[Xf + k\delta]}) / 10000$ 计算具体数值, 其中 Xf 为最后一支 Von Frey 丝的压力值; k 为阳性反应组合相对应的查表值, δ 为所用刺激间的平均差值 (0.224)。

1.2.3 热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL)

将大鼠置入有机玻璃箱中盖上挡板使其适应 15 min, 后用热板痛觉刺激仪照射大鼠足底, 照射开始至大鼠出现抬腿回避时间为热缩足反射潜伏期。同一刺激部位刺激的间隔时间为 10 min, 记录时间, 每只大鼠连续测定 3 次取平均值。

1.2.4 旷场实验 (open-field test, OFT)

将大鼠放置于黑色敞箱 (50 cm × 50 cm × 40 cm) 底部中心方格内适应 15 min, 设中心点附近 20 cm × 20 cm 方形区域为中央区, 进行摄像和计时, 记录每只大鼠 5 min 的运动总距离和中央区停留时间, 两只大鼠实验之间用 75% 乙醇清洁旷场箱底部及四壁。

1.2.5 悬尾实验 (tail suspension test, TST)

使用医用胶布将大鼠尾部距末端约 1/3 处缠绕固定于悬尾仪上, 使大鼠呈倒挂状态, 采用摄像头观察并记录大鼠在 5 min 内的不动时间。

1.2.6 强迫游泳实验 (forced swim test, FST)

将大鼠放入无盖、透明的有机玻璃圆桶中, 水深约 30 cm, 水温 (20 ± 2) °C, 记录 5 min 内大鼠累计不动时间 (以四肢偶尔微小滑动保持头部浮在水面露出鼻孔保持呼吸为“不动”标准), 每只大鼠实验后即换水并将大鼠擦干。

以上行为学实验分别于造模前 1 d, 造模后 3、7、14 d 进行。

1.2.7 单胺类神经递质测定

所有行为学实验完成 24 h 后, 大鼠麻醉后开胸, 暴露心脏, 使用 0.9% 氯化钠溶液灌注, 待血液流尽后离断头部剥离出大脑组织。4°C 蒸馏水冲洗干净后置于培养皿中, 于冰上分离大脑, 参照 Paxinos-Watson 大鼠脑立体定位图谱取海马, 钝性分离出两侧大脑海马组织, 放入液氮中速冻后于 -80°C 冰箱保存备用。具体参照文献^[11-12]的方法, 取两组大鼠海马组织于 4°C 下 2000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 检测 5-HT、DA、NE 的含量, 按 ELISA 试剂盒说明书的操作步骤进行。

1.2.8 海马组织病理变化

海马取材方法同上, 海马组织常规石蜡包埋后切片, 厚度 5 μ m, 脱蜡水洗后, HE 染色, 光学显微镜观察海马组织形态变化。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。所有数据

采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据符合正态分布且方差齐,多个时间点测量的结局比较采用重复测量方差分析,其余资料采用 t 检验比较组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

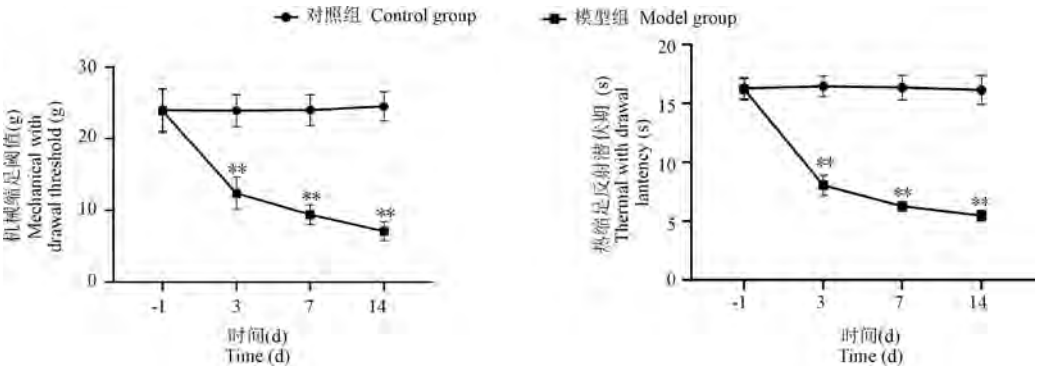
2.1 大鼠疼痛行为学比较

造模前 1 d,两组大鼠的 MWT 与 TWL 对比,无统计学意义($P > 0.05$)。造模后,模型组大鼠造模

3、7、14 d 的 MWT 与 TWL 均明显降低,有统计学意义($P < 0.01$),表明 CFA 足底注射造模可快速造成大鼠对机械痛敏和热痛敏的敏感性增加。见图 1。

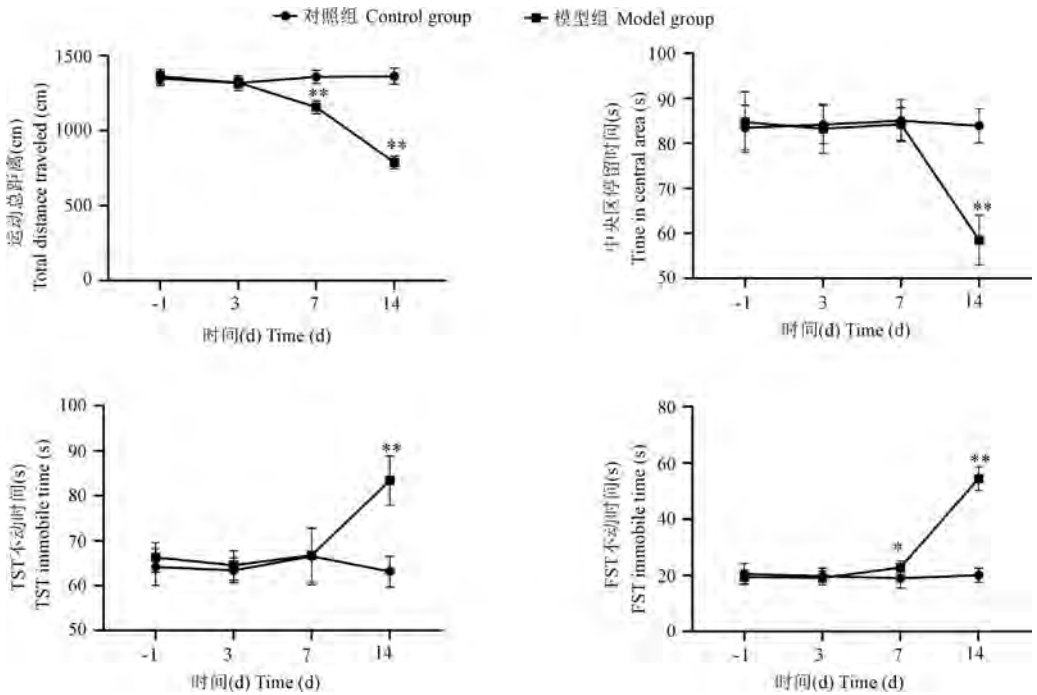
2.2 大鼠抑郁样行为学比较

造模前 1 d 及造模 3 d,两组大鼠 OFT 运动总距离、中央区停留时间对比无统计学意义($P > 0.05$)。造模后,模型组大鼠在造模 7、14 d 的 OFT 运动总距离低于对照组,有统计学意义($P < 0.01$);模型组大鼠在造模 7 d 的 OFT 中央区停留时间与对照组对比



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。(下图同)
图 1 两组大鼠 MWT 及 TWL 比较
Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Comparison of MWT and TWL of rats in two group



注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。
图 2 两组大鼠 OFT、TST、FST 指标比较
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$.
Figure 2 Comparison of OFT, TST and FST of rats between the two groups

无统计学意义($P > 0.05$),但在 14 d 的 OFT 中央区停留时间低于对照组($P < 0.01$);造模前 1 d 及造模 3 d,两组大鼠的 TST、FST 不动时间无统计学意义($P > 0.05$),模型组大鼠在造模 14 d 的 TST 不动时间高于对照组,有统计学意义($P < 0.01$),造模 7 d 时,TST 不动时间无统计学意义($P > 0.05$);模型组大鼠在造模 7、14 d 的 FST 不动时间增加,有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),说明 CFA 造模 7 d 后即可出现部分绝望行为,在 14 d 时症状更明显。见图 2。

2.3 大鼠海马单胺类神经递质含量比较

与对照组相比,模型组大鼠海马 5-HT、DA、NE 含量均显著降低,具有统计学意义($P < 0.01$),可以认为 CFA 足底注射 14 d 后可导致大鼠海马单胺类神经递质表达下降。见图 3。

2.4 大鼠海马组织病理形态变化

对照组神经元排列整齐,结构完整,形态规则,染色清晰,细胞间隙均匀;模型组神经元形态不规则,排列松散、紊乱,细胞间隙增大,部分细胞核模糊,出现部分神经元固缩、凋亡。见图 4。

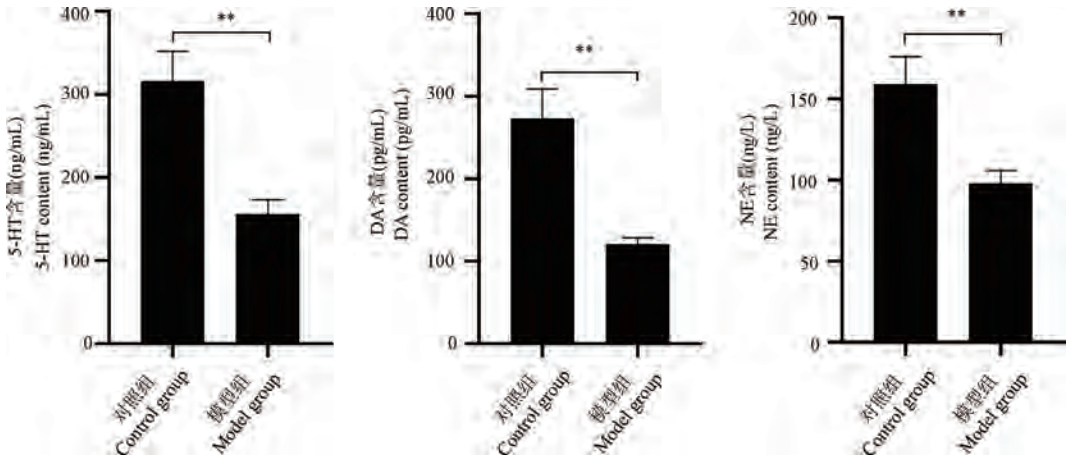
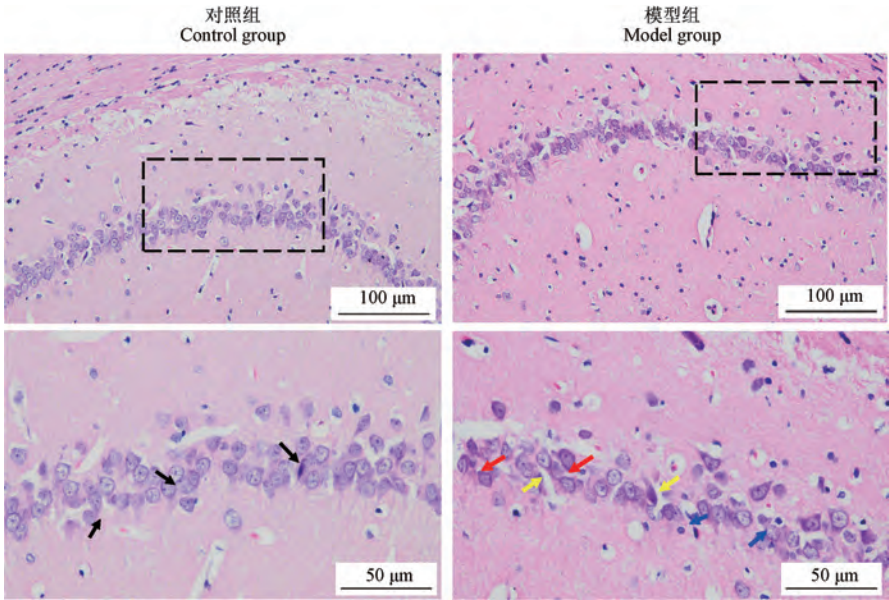


图 3 两组大鼠海马单胺类神经递质含量比较

Figure 3 Comparison of monoamine neurotransmitters in hippocampus of rats between the two groups



注:黑色箭头:正常细胞;红色箭头:细胞核模糊;黄色箭头:细胞间隙增大;蓝色箭头:神经元固缩凋亡。

Figure 4 大鼠海马区病理形态改变

Note. Black arrows. Normal cells. Red arrow. Unclear cell nuclei. Yellow arrow. Intercellular space. Blue arrow. Neuronal contraction and apoptosis.

Figure 4 Pathological changes in the hippocampus of rats

3 讨论

临床中众多炎性疼痛疾病与抑郁具有高度共患性,如膝关节炎、类风湿关节炎、慢性盆腔炎^[3,13-14],早期证据表明,神经突触间隙单胺递质的浓度的高低影响了慢性疼痛与抑郁障碍的发生发展^[1],研究显示脑内单胺类神经递质失衡是疼痛抑郁共病的重要机制之一,针对海马单胺类神经递质探讨慢性疼痛抑郁共病的发病机制具有显著意义^[15]。近年疼痛抑郁共病研究数量急剧增加,显示出研究人员对这两种疾病共病状态的高度关注,建立相关共病的动物模型有助于进一步探索二者之间关系,并有助于新治疗方式的开发。近年慢性疼痛抑郁共病造模方法众多,可通过神经病理性疼痛及炎症性疼痛诱导^[16],也有研究通过腹腔注射利血平快速诱导,各种造模方法产生的疼痛及其诱导的抑郁具有差异,且各有优劣,选用适合的造模方法是研究方案制定的前提和基础^[15,17]。

CFA 是一种含有灭活的结核分枝杆菌的油包水乳剂,能够提供刺激性强且持久的免疫反应所需的抗原释放,在足底或胫骨关节内注射可制作外周慢性炎性疼痛模型^[18],导致动物产生机械性痛觉异常及热痛觉过敏,单次注射后其效果至少可维持以 21 d。也有研究为确保疼痛症状的持续,在首次注射 10 d 后再次注射 CFA^[19]。另有实验研究选用 C57/B6 小鼠,分别在第 1、7、14 天于后足底表面 3 次注射 20 μL CFA,此方法适用于较长周期的动物行为学观察实验^[20]。在以往研究中,发现 CFA 的用量有 10 ~ 100 μL 不等,大小鼠品系不同也会影响用量的多少^[21]。本研究探索性的采用足底注射 CFA 100 μL 诱导大鼠慢性炎性疼痛症状,结果发现造模 3 d 后大鼠的 MWT 和 TWL 即大幅降低,且疼痛效果持续时间可超过 14 d,提示 CFA 100 μL 足底注射可快速诱导大鼠的机械性痛觉异常及热痛觉过敏,这与前期研究^[22]结果一致。疼痛感觉是相关情绪和认知功能活动的基础,慢性疼痛可导致大鼠奖赏机制缺陷和快感缺失,OFT、FST、TST 是用于评估动物行为绝望的检测方法,本研究结果显示,造模 7 d 后,模型组大鼠出现 OFT 运动总距离降低和 FST 不动时间增多,造模 14 d 后出现了 OFT 运动总距离和中央区停留时长减少、FST、TST 不动时间增加,提示 CFA 100 μL 注射在第 7 天即可诱导出动物的部分抑郁行为,这与 Wang 等^[6]的研究结果基

本类似。

5-HT、DA、NE 是参与情绪活动、疼痛传递的重要生化物质,浓度降低及其受体功能低下可间接导致(下丘脑-垂体-肾上腺)HPA 轴功能亢进,形成慢性疼痛或者情志改变^[23],另有研究也显示在慢性疼痛和抑郁患者体内均可发现 5-HT、DA、NE 水平和功能的减退。以往研究证实 CFA 导致的慢性炎性疼痛抑郁共病与炎症因子有关,但针对单胺类神经递质的研究却少有提及^[24]。因此本研究以单胺类神经递质为切入点进一步研究二者关系,结果发现,CFA 注射后可导致海马内单胺类神经递质含量降低,证实了 CFA 诱导的慢性炎性疼痛及共患抑郁样行为,其机制可能与单胺类神经递质减少密切相关。

海马体作为大脑边缘系统的重要组成部分,是炎性疼痛和抑郁联系的一个关键部位^[22]。海马神经元的凋亡是介导疼痛抑郁出现的关键病理变化^[25]。本研究发现,与对照组相比,模型组大鼠海马细胞形态改变,神经元形态不规则,排列松散、紊乱,细胞间隙增大,部分细胞核模糊,出现部分神经元固缩、凋亡。提示海马神经元损伤情况与行为学实验结果相一致。

本研究存在部分局限性:目前 CFA 致疼痛抑郁的药物使用剂量不统一,未对不同梯度剂量 CFA 足底注射对大鼠行为学的影响进行研究,以探索建立慢性炎性疼痛抑郁共病模型所需的合适剂量;另外本研究只进行了为期 14 d 的行为学观测,研究周期相对较短,在未来研究中会继续延长观察周期,为后续干预措施选择合理的介入时机提供参考。

参 考 文 献(References)

- [1] Sheng J, Liu S, Wang Y, et al. The link between depression and chronic pain: neural mechanisms in the brain [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 9724371.
- [2] Holmes A, Christelis N, Arnold C. Depression and chronic pain [J]. *Med J Aust*, 2013, 199(S6): S17-S20.
- [3] Nerurkar L, Siebert S, McInnes IB, et al. Rheumatoid arthritis and depression: an inflammatory perspective [J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6(2): 164-173.
- [4] Krupina NA, Khlebnikova NN, Orlova IN, et al. Experimental model of combined pain and depression status in rats [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2010, 149(4): 479-484.
- [5] Zhao J, Shi W, Lu Y, et al. Alterations of monoamine neurotransmitters, HPA-axis hormones, and inflammation cytokines in reserpine-induced hyperalgesia and depression comorbidity rat model [J]. *BMC Psychiatry*, 2022, 22(1): 419.

- [6] Wang J, Zhao Q, Zhou Y, et al. Subanesthetic dose of ketamine improved CFA-induced inflammatory pain and depression-like behaviors via caveolin-1 in mice [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2020, 32(4): 359–366.
- [7] Liao HY, Lin YW. Electroacupuncture attenuates chronic inflammatory pain and depression comorbidity through transient receptor potential V1 in the brain [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(6): 1417–1435.
- [8] Zhang GF, Wang J, Han JF, et al. Acute single dose of ketamine relieves mechanical allodynia and consequent depression-like behaviors in a rat model [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 631: 7–12.
- [9] Coral-Pérez S, Martínez-Martel I, Martínez-Serrat M, et al. Treatment with hydrogen-rich water improves the nociceptive and anxiodepressive-like behaviors associated with chronic inflammatory pain in mice [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(11): 2153.
- [10] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55–63.
- [11] Liang S, Huang R, Lin X, et al. Effects of Yulangsan polysaccharide on monoamine neurotransmitters, adenylyate cyclase activity and brain-derived neurotrophic factor expression in a mouse model of depression induced by unpredictable chronic mild stress [J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(3): 191–196.
- [12] 王奕丹, 张磊, 王建楠, 等. FTY720 对卒中后抑郁大鼠单胺类神经递质影响的实验研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 38–43.
Wang YD, Zhang L, Wang JN, et al. Effects of FTY720 on monoamine neurotransmitters in rats with post-stroke depression [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(4): 38–43.
- [13] Harth M, Nielson WR. Pain and affective distress in arthritis: relationship to immunity and inflammation [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2019, 15(5): 541–552.
- [14] Karshikoff B, Martucci KT, MacKey S. Relationship between blood cytokine levels, psychological comorbidity, and widespreadness of pain in chronic pelvic pain [J]. *Front Psychiatry*, 2021, 12: 651083.
- [15] 王安娜, 赵静洁, 高雪松, 等. 急性利血平致疼痛抑郁共病模型大鼠行为学及血清炎症因子的改变 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2019, 28(3): 230–234.
Wang AN, Zhao JJ, Gao XS, et al. Changes of behavioral and serum inflammatory factors in rats with acute reserpine-induced comorbidity of pain and depression [J]. *Chin J Behav Med Brain Sci*, 2019, 28(3): 230–234.
- [16] 国笑, 王瑜, 李少源, 等. 抑郁与慢性疼痛共病动物模型的研究进展 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21(4): 689–695.
Guo X, Wang Y, Li SY, et al. Research progress of animal models of depression-chronic pain comorbidity [J]. *Modern Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2019, 21(4): 689–695.
- [17] Singh L, Kaur A, Garg S, et al. Skimmetin/osthole mitigates pain-depression dyad via inhibiting inflammatory and oxidative stress-mediated neurotransmitter dysregulation [J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(1): 111–121.
- [18] 贾可欣, 刘春芳, 王金霞, 等. 盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠的镇痛作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(15): 61–68.
Jia KX, Liu CF, Wang JX, et al. Analgesic effect of Panlongqi Tablet on rats with chronic inflammatory pain [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2020, 26(15): 61–68.
- [19] Zhou W, Jin Y, Meng Q, et al. A neural circuit for comorbid depressive symptoms in chronic pain [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(10): 1649–1658.
- [20] Huang HY, Liao HY, Lin YW. Effects and mechanisms of electroacupuncture on chronic inflammatory pain and depression comorbidity in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4951591.
- [21] Kremer M, Becker LJ, Barrot M, et al. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 236–270.
- [22] 王倩, 张娟, 周一, 等. CFA 注射致炎性疼痛过程中海马内 BDNF 的表达及作用研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(36): 7001–7006.
Wang Q, Zhang J, Zhou Y, et al. The expression and role of BDNF in the hippocampus during inflammatory pain after CFA administration [J]. *Prog Mod Biomed*, 2014, 14(36): 7001–7006.
- [23] 肖靛宜. 隔药灸灸对 FD 肝郁脾虚模型大鼠胃排空率及下丘脑单胺类神经递质的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学; 2016.
Xiao JY. Effects of moxibustion with medicine-separated cake on gastric emptying rate and monoamine neurotransmitters in hypothalamus of FD model rats with liver depression and spleen deficiency [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine; 2016.
- [24] 徐芳, 杨婧, 孟波, 等. 盐酸小檗碱改善慢性炎症痛和抑郁的作用研究 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(14): 1103–1108.
Xu F, Yang J, Meng B, et al. The effect of berberine on ameliorating chronic inflammatory pain and depression [J]. *Natl Med J Chin*, 2018, 98(14): 1103–1108.
- [25] 柳丽, 徐海玲, 季凯琳, 等. 神经病理性疼痛致抑郁小鼠脑内 BDNF/TrkB/CREB 信号的动态变化 [J]. *医学研究生学报*, 2022, 35(11): 1132–1137.
Liu L, Xu HL, Ji KL, et al. Dynamic changes of BDNF/TrkB/CREB signal in the brain of depressed mice caused by neuropathic pain [J]. *J Med Postgrad*, 2022, 35(11): 1132–1137.

龙红,霍春茂,李康,等. 自发矮小症雌性 SD 大鼠不孕的机制初探 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1415-1422.
Long H, Huo CM, Li K, et al. Preliminary study on the mechanism of infertility in female SD rats with spontaneous dwarfism [J].
Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1415-1422.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.005

自发矮小症雌性 SD 大鼠不孕的机制初探

龙红,霍春茂,李康,包峰云,秦廷洋,赵玉佳,张仕斌*

(贵州遵义医科大学实验动物中心,贵州 遵义 563000)

【摘要】 目的 探讨自发矮小症雌性 SD 大鼠(short stature rat, SSR)不孕的原因及其致病机理研究。**方法** 以成年野生型 SD 雌性大鼠和 SSR 雌性大鼠为研究对象,采用阴道涂片法观察动情周期变化;采用同期发情超数排卵方法比较促排卵效果;测定卵巢、子宫重量及体重、卵巢、子宫指数;测定血清中 AMH、E2、FSH、LH、FSH/LH 含量;对卵巢组织进行转录组学测序以分析基因表达差异。**结果** SSR 雌性大鼠动情周期无异常,SSR 雌性大鼠体重显著低于野生型,其卵巢指数和子宫指数显著高于野生型。排卵结果显示,野生型 SD 大鼠平均排卵数量显著高于 SSR 雌性不孕大鼠($P < 0.001$);野生型 SD 大鼠血清 AMH($P < 0.01$)、E2($P < 0.05$)水平显著高于 SSR 雌性不孕大鼠,血清 FSH($P < 0.01$)、LH($P < 0.01$)及 FSH/LH($P < 0.05$)水平显著低于 SSR 雌性不孕大鼠,PROG 则不显著;转录组测序获得 250 个差异表达基因,其中有 190 个上调基因、60 个下调基因。GO 和 KEGG 分析结果显示,差异表达基因主要富集在 IL-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、p53 信号通路(p53 signaling pathway)和细胞因子-细胞因子受体相互作用(cytokine-cytokine receptor interaction)等。利用 CytoHubba 插件的 MCC、MNC、EPC 和 Degree 算法分别筛选前 10 的重要节点,取交集最后得到 9 个 Hub 基因,分别为 Cxcl1、Cxcl2、IL1a、IL1b、Cd80、Mmp13、Mmp8、Fgf3、Ptgs2。**结论** SSR 雌性大鼠不孕可能与卵巢储备功能下降和卵巢低反应有关,同时筛选出 Cxcl1、Cxcl2、IL1a、IL1b、Cd80、Mmp13、Mmp8、Fgf3 和 Ptgs2 与不孕相关,为进一步探究不孕机制奠定理论基础。

【关键词】 自发矮小症雌性 SD 大鼠;不孕;转录组测序;Hub 基因

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1415-08

Preliminary study on the mechanism of infertility in female SD rats with spontaneous dwarfism

LONG Hong, HUO Chunmao, LI Kang, BAO Fengyun, QIN Tingyang, ZHAO Yujia, ZHANG Shibin*

(Laboratory Animal Center of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

Corresponding author: ZHANG Shibin. E-mail: 574610922@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the causes of infertility and its pathological mechanism in female SD rats with spontaneous dwarfism (short stature rat, SSR). **Methods** Adult wildtype and SSR female SD rats were used in this study. A vaginal smear was used to observe changes in the motile cycle. Ovulation promotion was compared using the simultaneous estrus supernumerary ovulation method. Ovarian and uterine weight and body weight, and ovarian and uterine indices were measured. AMH, E2, FSH, LH, and FSH/LH levels in serum were measured. Transcriptome sequencing of ovarian tissues was performed to analyze gene expression differences. **Results** No abnormalities were observed in the estrous cycle of SSR female rats. The body weight of SSR female rats was significantly lower than that of wildtype rats, and their ovarian and uterine indices were significantly higher than that of wildtype rats. The mean number of ovulations was significantly higher in wildtype rats than in SSR female infertile rats ($P < 0.001$). Serum AMH ($P < 0.01$) and E2 ($P < 0.05$) levels were

【基金项目】2023 年度贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzkwj2023-192)。

Funded by 2023 Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project(gzkwj2023-192).

【作者简介】龙红(1992—),女,实验师,研究方向:人类疾病动物模型。Email:895763698@qq.com

【通信作者】张仕斌(1981—),男,副教授,研究方向:人类疾病动物模型。Email:574610922@qq.com

significantly higher in wildtype rats than in SSR female infertile rats, and serum levels of FSH, LH, and FSH/LH ($P < 0.05$) were significantly lower in SSR infertile females than in SSR infertile rats, while PROG showed no significant difference. Transcriptome sequencing yielded 250 differentially expressed genes, including 190 upregulated and 60 downregulated genes. p53 signaling pathway and cytokine-cytokine receptor interaction. The MCC, MNC, EPC, and degree calculations of the CytoHubba plug-in were used to screen the top 10 significant nodes. The intersection was used to finally obtain nine hub genes, namely Cxcl1, Cxcl2, IL1a, IL1b, Cd80, Mmp13, Mmp8, Fgf3, and Ptgs2. **Conclusions** Infertility in SSR female rats may be related to a decreased ovarian reserve function and poor ovarian response. Cxcl1, Cxcl2, IL1a, IL1b, Cd80, Mmp13, Mmp8, Fgf3, and Ptgs2 were associated with infertility, laying a theoretical foundation to further explore infertility mechanisms.

【Keywords】 female short stature rat; infertility; transcriptome sequencing; Hub gene

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

本课题组偶然发现在封闭群 SD 大鼠的繁育过程中出现具有自发矮小特征的大鼠,在前期的表型特征及遗传模式鉴定过程中发现矮小雌性大鼠不孕^[1]。不孕不育已成为一个全球性的生殖健康问题,全世界约有 15% 的夫妻受到影响^[2],而结婚年龄、妇科手术史、甜食和卵巢储备减少等都是造成不孕的因素^[3]。笔者推测 SSR 雌性不孕可能与卵巢储备功能下降及卵巢低反应有关系。本研究通过探索 SSR 雌性大鼠不孕的机制,期望为人类不孕不育的研究和治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7 只 SPF 级雌性 SSR 大鼠和 3 只 SPF 级野生型雌性 SD 大鼠,体重分别为 188 ~ 220 g 和 240 ~ 245 g,均为 9 周龄,由遵义医科大学实验动物中心提供【SCXK(黔)-2021-0002】,饲养于遵义医科大学实验动物中心屏障系统实验室【SYXK(黔)-2021-0004】。大鼠在饲养期间均自由采食和饮水,湿度控制在 40% ~ 60%,温度控制在 20 ~ 26℃,昼夜各半明暗交替。本动物实验经过遵义医科大学实验动物福利伦理委员会审批(ZMU21-2203-575)。

1.1.2 主要试剂与仪器

革兰氏染色液(快速法)(贝索生物技术有限公司);人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)和孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG)(宁波第二激素厂);大鼠雌二醇(E2)ELISA 试剂盒、大鼠促卵泡素(FSH)ELISA 试剂盒、大鼠黄体生成素(LH)ELISA 试剂盒、大鼠缪勒管抑制物质(AMH)ELISA 试剂盒、大鼠孕酮(PROG)ELISA 试剂盒(上海纪宁

实业有限公司)。普通光学显微镜(SDPTOP US510CA)、体视镜(OLYMPUS SZ61)、倒置显微镜(SDPTOP HAL)。

1.2 方法

1.2.1 动情周期的观察

将野生型 SD 大鼠作为对照组(WT),SSR 雌性不孕大鼠作为实验组(Mut),进行动情周期的观察。将每只大鼠进行编号标记,采用阴道拭子法^[4],每天 9:00 采样制作阴道涂片,直至出现 2 个完整动情周期。阴道涂片及快速染色方法^[5]:用生理盐水将消毒棉签浸湿,插入大鼠阴道口 1 ~ 2 cm,轻轻旋转 3 圈,快速均匀地涂在载玻片上,待自然风干。滴加 1 ~ 2 滴龙胆紫溶液染色 10 s,水洗后甩干;滴加适量碘溶液染色 10 s,水洗后甩干;加 2 滴脱色液 20 s,水洗后甩干;最后加 1 ~ 2 滴沙黄溶液复染 10 s,水冲洗,自然风干,镜检。

1.2.2 血清 AMH、E2、FSH、LH 和 PROG 水平检测

将大鼠麻醉后,颈静脉采血 1 mL,放置 30 min,离心机设置 3000 r/min,时间 10 min,得到大鼠血清。随后利用酶联免疫吸附试验法检测血清中 AMH、E2、FSH、LH 和 PROG 五项指标水平。

1.2.3 促排卵观察

10 只大鼠腹腔注射 PMSG 15 IU/100 g,48 h 后腹腔注射 hCG 7.5 IU/100 g,注射 24 h 后,麻醉大鼠,处死。打开腹腔,剪断输卵管,移至倒置显微镜下定位输卵管膨大部位置,快速用针头划破膨大部,卵母细胞成团自动涌出。用透明质酸酶处理卵母细胞团,除掉包裹在外的卵丘颗粒细胞,镜下计数。

1.2.4 转录组学分析

取野生型 SD 雌性大鼠和 SSR 雌性不孕大鼠各 3 只,分别编号为 WT01、WT02、WT03 和 Mut01、Mut02、Mut03。将其卵巢组织送中科新生命公司进

行转录组学测序。用 DESeq2 进行基因的差异表达分析,将 $\text{padj} < 0.05$, $|\log_2\text{foldchange}| > 2$ 作为差异显著性标准筛选差异表达基因。STRING 设置连接度 > 0.4 绘制蛋白互作网络图 (protein-protein interaction network, PPI); MCODE 插件中设置 Degree cut-off = 2、Node Score cut-off = 0.2 及 K-Core = 2 获取模块。

1.3 统计学分析

采用基迪奥生信云平台对相关数据进行统计学分析。计量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,

多样本计量资料选择 T 检验分析, $P < 0.05$ 则表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动情周期的比较

10 只雌性大鼠阴道涂片未见异常,动情周期均为 4 ~ 5 d。10 只雌性大鼠阴道涂片观察完整动情周期变化如图 1。实验组体重显著低于对照组,卵巢指数和子宫指数显著高于对照组,卵巢和子宫则无显著变化(图 2)。

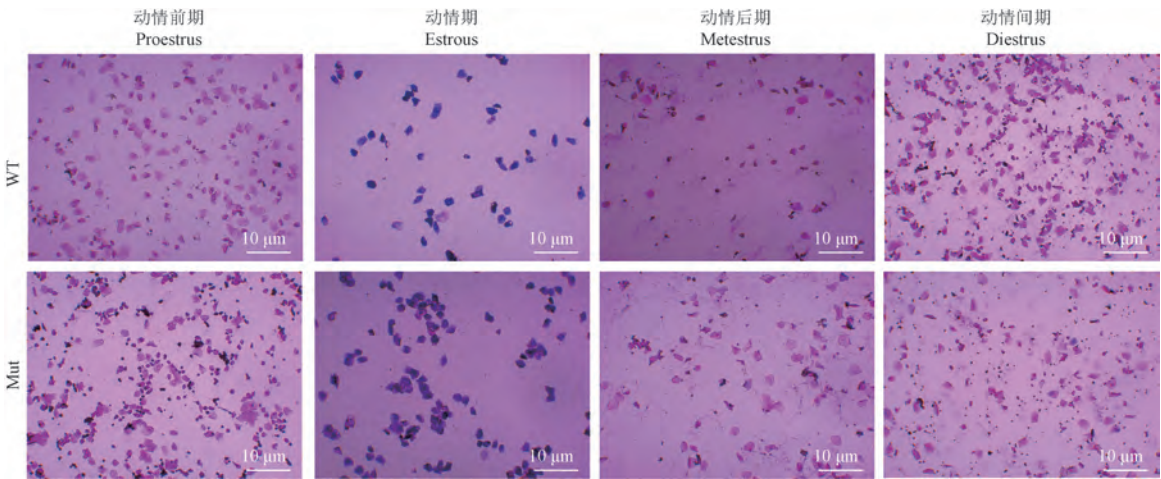
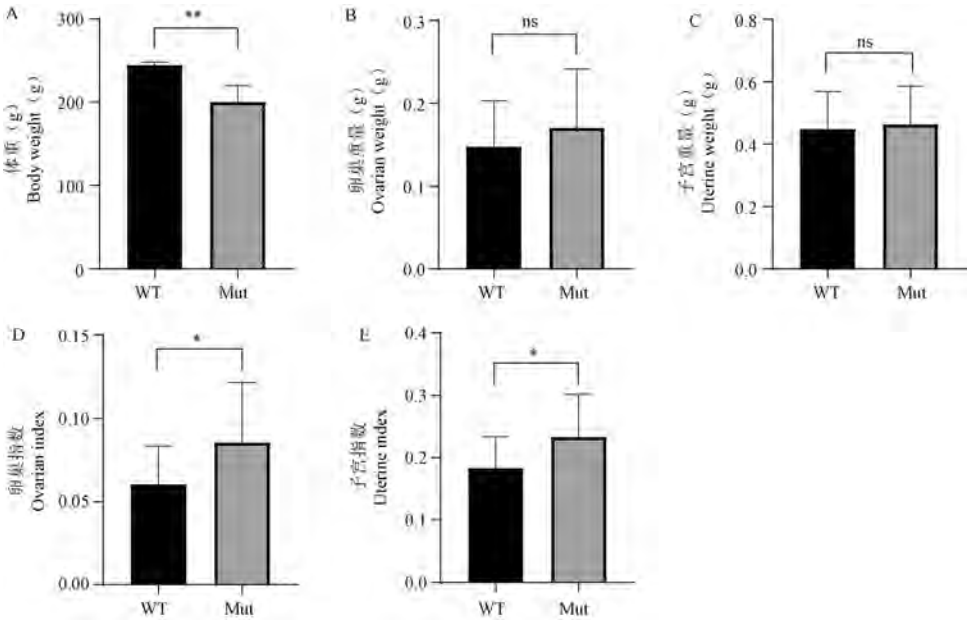


图 1 动情周期比较
Figure 1 Comparison of estrous cycle



注:与野生型相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图同)
图 2 两组之间体重、卵巢、子宫、卵巢指数及子宫指数的变化
Note. Compared with WT, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes in body weight, ovaries, uterus, ovarian index and uterine index between the two groups

2.2 超排效果比较

在 PMSG 15 IU/100 g + hCG 7.5 IU/100 g 剂量组合下,性成熟大鼠可以获得最佳排卵效果^[6-7]。排卵结果显示,对照组平均排卵数量 38 个,显著高于实验组(平均排卵数量 3 个)。

2.3 10 只大鼠血清 AMH、E2、FSH、LH 和 PROG 水平比较

对照组大鼠血清 AMH ($P < 0.01$)、E2 ($P < 0.05$)水平显著高于实验组,对照组大鼠血清 FSH ($P < 0.01$)、LH ($P < 0.01$)及 FSH/LH ($P < 0.05$)水平显著低于实验组,对照组大鼠血清 PROG 与实验组比较不显著,见图 3。

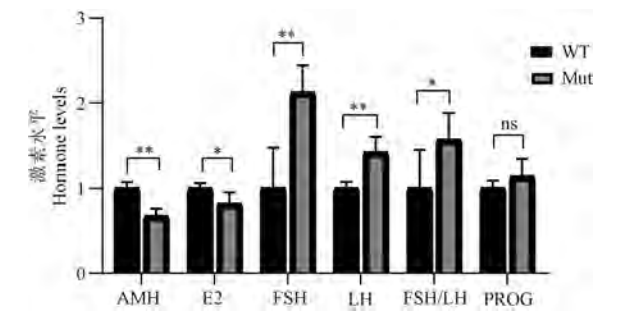


图 3 两组之间 AMH、E2、FSH、LH、FSH/LH、PROG 激素的比较

Figure 3 Comparison of AMH, E2, FSH, LH, FSH/LH, PROG hormones between two groups

2.4 转录组数据分析

2.4.1 样品间相关性评估

样品间基因表达水平相关性是检验实验可靠性和样本选择是否合理的重要指标。样品之间表达模式的相似度越高,则相关性系数越接近 1。本次测序样本之间的相关性系数大于 0.89(图 4),符合重复样本的选择。

2.4.2 差异基因的筛选

用 DESeq2 进行基因的差异表达分析,将 $\text{padj} < 0.05$, $|\log_2\text{foldchange}| > 2$ 作为差异显著性标准。差异基因分析显示,与正常组相比,不孕组共有 250 个差异表达基因,其中有 190 个上调基因,60 个下调基因(图 5)。

2.4.3 差异基因的分析

对获得的 250 个差异表达基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。挑选 GO 三大分类中最显著的 20 个功能条目作图(图 6),在生物学过程分类中,差异表达基因主要富集在磷酸化的正向调节(positive regulation of phosphorylation)、磷脂酶活性的调节(regulation of phospholipase activity)、磷代谢过程的正调控(positive regulation of phosphorus metabolic process)等;在细胞组成分类中,主要富集在细胞外区(extracellular region)、细胞外间隙(extracellular space)等;在分子生物学分类中,主要

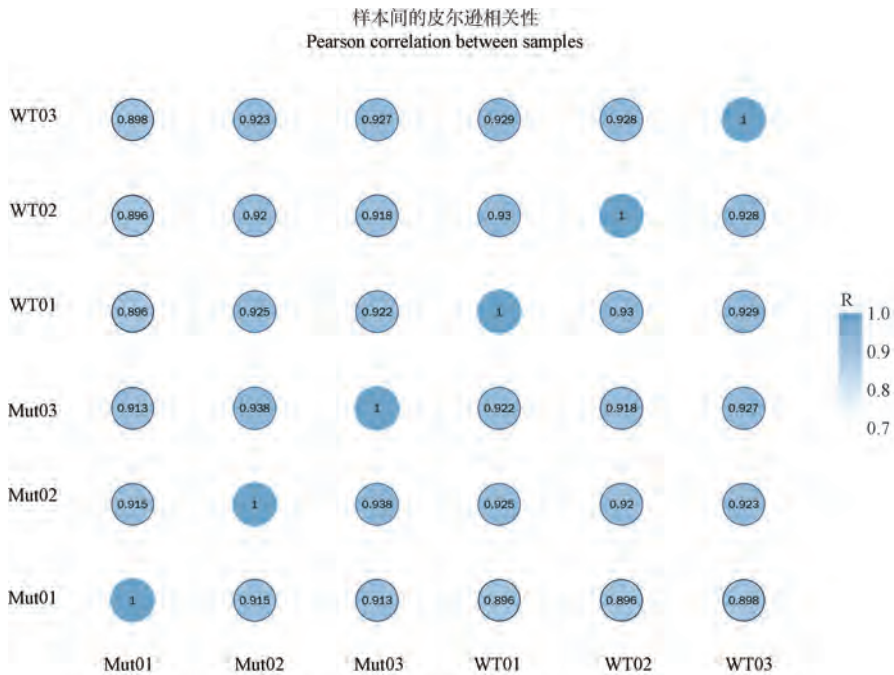


图 4 样品间相关系数热图

Figure 4 Heat map of correlation coefficients between samples

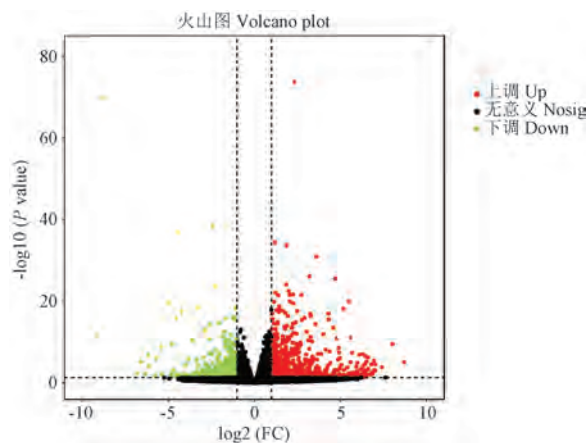


图 5 差异基因表达分布火山图

Figure 5 Volcano map of differential gene expression distribution

富集在白细胞介素-1 受体结合 (interleukin-1 receptor binding)、细胞因子活性 (cytokine activity) 等。

挑选 KEGG 富集中最显著的 20 条 pathway 条目作图分析,发现这些差异表达基因主要富集在

IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、p53 信号通路 (p53 signaling pathway) 和细胞因子-细胞因子受体相互作用 (cytokine-cytokine receptor interaction) 等。

2. 4. 4 蛋白互作网络分析及 Hub 基因筛选

为更好地理解这些差异基因间的相互关系,应用 TRING 蛋白互作数据库绘制 PPI 图(图 7)。

使用 Cytoscape 软件中的 MCODE 插件创建分子模块,设置分数大于 4,获得 2 个功能模块。在图 8 中,基因 Cxcl1、Cxcl2、IL1a、IL1b、Cd80、Mmp13、Mmp8、Fgf3、Ptgs2 聚集在模块 1 中。再使用 CytoHubba 插件的 MCC、MNC、EPC 和 Degree4 种拓扑算法分别筛选前 10 的重要节点,作 VEEN 图取交集(图 9),最后获得 9 个 Hub 基因,分别为 Cxcl1、Cxcl2、IL1a、IL1b、Cd80、Mmp13、Mmp8、Fgf3、Ptgs2 基因。模块 1 中的基因与筛选的 9 个 Hub 基因完全重叠,推测该模块的 9 个基因是 SSR 雌性大鼠不孕的关键基因。

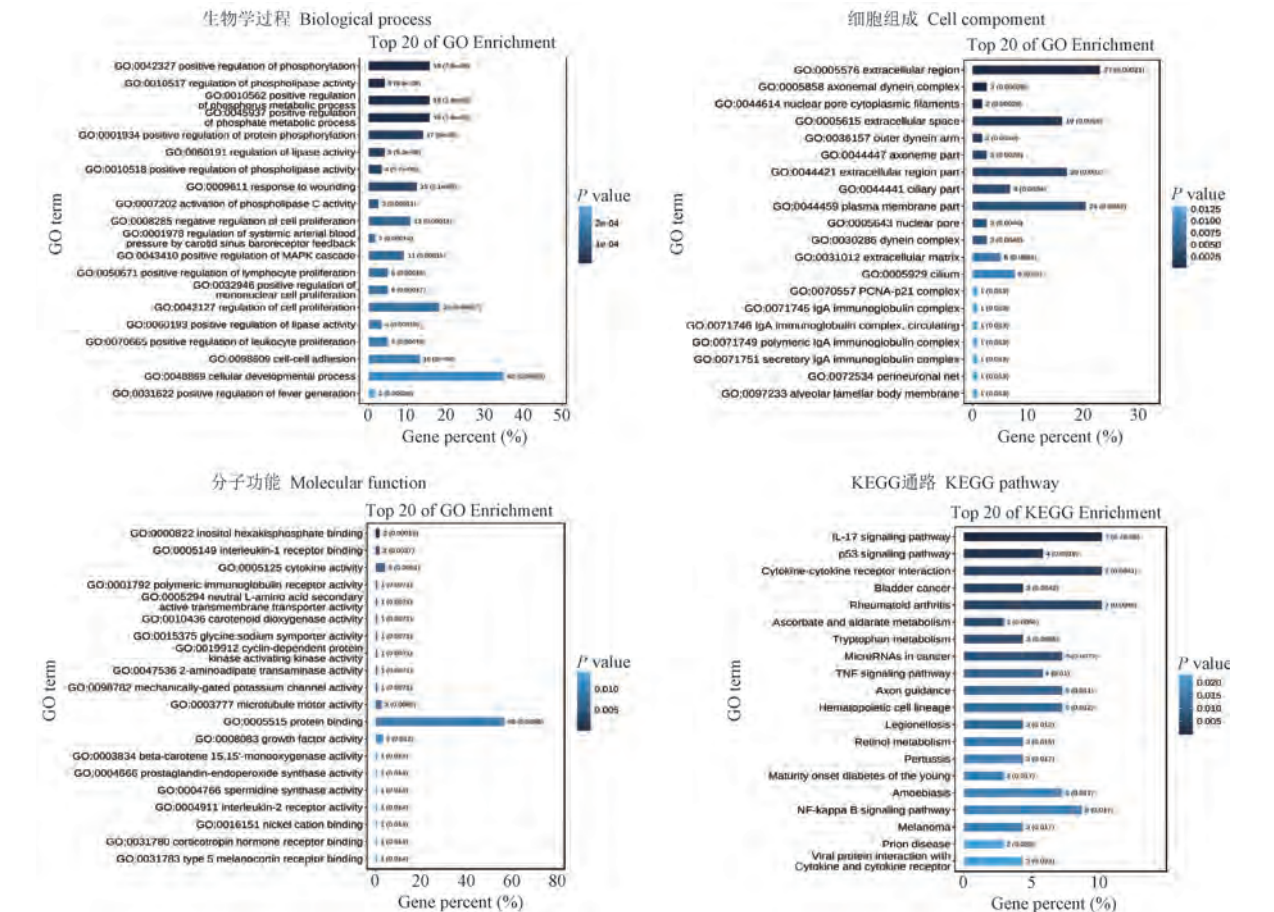


图 6 差异基因 KEGG 富集柱状图(TOP 20)

Figure 6 KEGG enrichment histogram of differential genes (TOP 20)

卵母细胞数量呈正相关^[8-9]。本研究中 SSR 雌性不孕大鼠血清 AMH 水平显著低于正常组,对应排卵数也显著低于正常组。有研究表明,与空白对照组相比,卵巢储备功能减退大鼠的血清 AMH 和 E2 水平显著降低,FSH 和 LH 水平显著增加^[6-10],与本研究结果相符。有研究表明 FSH/LH 能够预测卵巢的反应性,并评估不孕患者卵巢储备功能^[11]。王紫微等^[12]研究表明,随着 FSH/LH 的升高,卵巢低反应的发生率也随之增加。周洪梅等^[13]的研究发现,FSH/LH 在卵巢高反应、卵巢正常反应和卵巢低反应中呈逐渐升高的趋势。

为探究 SSR 雌性不孕大鼠的病理机制,本课题组采用转录组测序方法来分析其不孕机理。结果显示,与对照组相比,不孕组获得 250 个差异表达基因,其中有 190 个上调基因,60 个下调基因。将差异基因作富集分析,发现这些差异表达基因主要富集在 IL-17 信号通路、p53 信号通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用等。有研究报道,在美洲长春花小肽 (small peptides from periplaneta americana, SPPA) 改善过氧化氢诱导的人类颗粒细胞凋亡的机制研究中发现, S100A7、S100A9、RELA 和 IL17RE 参与 IL-17 信号通路,在抵抗细胞凋亡过程中发挥了重要作用^[14]。

本研究筛选的 Hub 基因中, IL1a、IL1b 主要由受刺激的单核细胞产生,是炎症过程的关键诱导因子,被推测在慢性炎症疾病中发挥作用^[15]。衰老的 Nlrp3^{-/-}小鼠和同龄的野生型小鼠相比,卵巢中主要的促炎症基因 IL1a、IL1b 表达水平降低,巨噬细胞浸润减少,卵泡储备量增加^[16]。本研究中, IL1a、IL1b 表达上调,可能导致卵泡储备减少。

Cxcl1 和 Cxcl2 属于 CXC 类趋化因子家族中的成员之一,能与单核细胞、中性粒细胞和 T 细胞等表面受体结合,参加细胞毒效应。子宫内膜中的 Cxcl1 可使 B 淋巴细胞选择性外渗到子宫内膜间质,从而引起子宫内膜和输卵管的炎症^[17]。李兆萍等^[18]在输卵管阻塞性不孕的临床治疗研究中发现,经治疗后,不孕患者的血清 Cxcl1 水平降低了。

Mmp8 和 Mmp13 基因是编码单核细胞来源的基质金属蛋白酶 (MMPs) 的基因, MMPs 参与卵泡发生、卵泡闭锁和细胞外基质 (ECM) 的重塑过程^[19],是人类排卵的关键因素^[20]。研究报道, MMP、基质金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 和转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 等相互协调作用紊乱会破坏 ECM 的合成

与降解的稳态,形成卵巢纤维化^[21],导致不孕。本研究中, SSR 雌性不孕大鼠中 MMP 均上调,推测 ECM 稳态失衡,引起卵巢纤维化发展。

Ptgs2 是前列腺素合成过程中的限速酶,在炎症和有丝分裂过程中被诱导,其表达影响卵丘细胞的扩张、成熟、分化等,并在 DOR 患者中表达上调^[22]。黄龙^[23]的研究发现, Ptgs2 在闭锁卵泡中高表达,并且促进了猪卵巢颗粒细胞凋亡。

综上所述, SSR 雌性大鼠不孕可能是由卵巢储备功能减退和卵巢低反应引起的。250 个表达差异基因主要富集在 IL-17 信号通路、p53 信号通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用等通路。蛋白质互作分析结果显示, Cxcl1、Cxcl2、IL1a、IL1b、Cd80、Mmp13、Mmp8、Fgf3、Ptgs2 可能是 SSR 雌性大鼠不孕的关键蛋白。本研究结果提示 SSR 雌性大鼠不孕可能与卵巢颗粒细胞纤维化或凋亡有关,进一步的具体机制研究需深入探索。

参 考 文 献 (References)

- [1] 包峰云, 龙红, 秦廷洋, 等. 自发矮小症突变大鼠家系的建立及其主要生物学特性测定 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 792-799.
Bao FY, Long H, Qin TY, et al. Establishment of a rat model family with spontaneous short stature and identification of its main biological characteristics [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 792-799.
- [2] Jiao SY, Yang YH, Chen SR. Molecular genetics of infertility: loss-of-function mutations in humans and corresponding knockout/mutated mice [J]. Hum Reprod Update, 2021, 27(1): 154-189.
- [3] Liang S, Chen Y, Wang Q, et al. Prevalence and associated factors of infertility among 20-49 year old women in Henan Province, China [J]. Reprod health, 2021, 18(1): 254.
- [4] Sano K, Matsuda S, Tohyama S, et al. Deep learning-based classification of the mouse estrous cycle stages [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 11714.
- [5] 张蕾, 张若乾, 秦秀云, 等. 快速革兰氏染色法对大、小鼠动情周期的鉴别 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 45-50, 74.
Zhang L, Zhang RQ, Qin XY, et al. Identification of estrous cycles in rats and mice by rapid Gram staining [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 45-50, 74.
- [6] 时玲, 卢鸽, 李红晓, 等. 电针对卵巢储备功能减退大鼠卵巢谷胱甘肽相关调控酶的影响 [J]. 针刺研究, 2023, 48(4): 378-384, 410.
Shi L, Lu G, Li HX, et al. Electroacupuncture promotes expression of glutathione related regulatory enzymes in ovary tissue of rats with diminished ovarian reserve [J]. Acupunct Res, 2023, 48(4): 378-384, 410.

- [7] Sotomaru Y, Kamisako T, Hioki K. Estrous stage- and animal age-independent superovulation in the BrHan: WIST @ Jcl (GALAS) rat [J]. Exp Anim, 2005, 54(2): 137-141.
- [8] Cedars MI. Evaluation of female fertility-AMH and ovarian reserve testing [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2022, 107(6): 1510-1519.
- [9] Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide [J]. Am J Obstet Gynecol, 2017, 217(2): 129-140.
- [10] 何丽, 景荣华, 顾仁艳. 温针灸调节 Nrf2/ARE 通路对卵巢功能减退大鼠氧化应激损伤的保护作用 [J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(2): 188-193, 231.
- He L, Jing RH, Gu RY. Protective effect of warm acupuncture on oxidative stress injury in rats with ovarian hypofunction by regulating Nrf2/ARE pathway [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2023, 32(2): 188-193, 231.
- [11] 王丹瑾, 马成斌, 糜茵, 等. 基础 FSH/LH 在预测年轻不孕女性卵巢储备功能及自然周期排卵率中的价值 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13(1): 124-126.
- Wang DJ, Ma CB, Mi Y, et al. The value of basal FSH/LH in predicting ovarian reserve function and natural cycle ovulation rate of young infertile women [J]. Lab Med Clin, 2016, 13(1): 124-126.
- [12] 王紫微, 范艳丽, 辛欣, 等. FSH/LH 在 AMH 正常人群中评估卵巢低反应的价值 [J]. 河北医科大学学报, 2021, 42(9): 1057-1062.
- Wang ZW, Fan YL, Xin X, et al. The value of FSH/LH in assessing poor ovarian response in normal AMH population [J]. J Hebei Med Univ, 2021, 42(9): 1057-1062.
- [13] 周洪梅, 董金菊, 马梦玲. AMH 联合 E₂/FSH/LH 检测对不孕症患者卵巢储备功能及反应性的评估作用 [J]. 中国性科学, 2020, 29(8): 71-75.
- Zhou HM, Dong JJ, Ma ML. Assessment of ovarian reserve function and responsiveness in infertility patients by AMH combined with E₂ and FSH/LH [J]. Chin J Hum Sex, 2020, 29(8): 71-75.
- [14] Wang Q, Fu R, Cheng H, et al. Analysis of the resistance of small peptides from *Periplaneta americana* to hydrogen peroxide-induced apoptosis in human ovarian granular cells based on RNA-seq [J]. Gene, 2022, 813: 146120.
- [15] Rashid N, Nigam A, Saxena P, et al. Association of IL-1 β , IL-1Ra and FABP1 gene polymorphisms with the metabolic features of polycystic ovary syndrome [J]. Inflamm Res, 2017, 66(7): 621-636.
- [16] Lliberos C, Liew SH, Mansell A, et al. The inflammasome contributes to depletion of the ovarian reserve during aging in mice [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 628473.
- [17] 尚芸婕, 徐望明, 肖卓妮. 慢性子宫内膜炎在辅助生殖领域相关研究进展 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2022, 14(2): 22-24.
- Shang YJ, Xu WM, Xiao ZN. Research progress of chronic endometritis in the field of assisted reproduction [J]. Chin J Fam Plan Gynecotokol, 2022, 14(2): 22-24.
- [18] 李兆萍, 王韞琪, 方茂霖. 红藤合剂灌肠联合输卵管通液术治疗输卵管阻塞性不孕的临床疗效及对盆腔局部微环境的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(19): 66-72.
- Li ZP, Wang YQ, Fang ML. Influence of Hongteng mixture combined with tubal ablation on local microenvironment of pelvic cavity with tubal obstructive infertility [J]. Chin J Mod Med, 2022, 32(19): 66-72.
- [19] Hrabia A. Matrix metalloproteinases (MMPs) and inhibitors of MMPs in the avian reproductive system: an overview [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8056.
- [20] Rosewell KL, Al-Alem L, Zakerkish F, et al. Induction of proteinases in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle by human chorionic gonadotropin [J]. Fertil Steril, 2015, 103(3): 826-833.
- [21] Zhou F, Shi L, Zhang SY. Ovarian fibrosis: a phenomenon of concern [J]. Chin Med J, 2017, 130: 365-371.
- [22] Pashaiasl M, Ebrahimi M, Ebrahimi E. Identification of the key regulating genes of diminished ovarian reserve (DOR) by network and gene ontology analysis [J]. Mol Biol Rep, 2016, 43(9): 923-937.
- [23] 黄龙. 猪卵泡闭锁过程中 piR-23 通过 PTGS2 调控颗粒细胞凋亡 [D]. 南京: 南京农业大学; 2020.
- Huang L. piR-23 Regulates Granulocyte Apoptosis by PTGS2 during Porcine Follicular Atresia [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University; 2020.

[收稿日期] 2023-06-02

陈婕,唐鑫,陈盼,等. 基于改良大鼠双侧颈总动脉结扎法建立血管性痴呆模型探讨脑血流量变化规律及对血管新生相关蛋白的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1423-1430.

Chen J, Tang X, Chen P, et al. Modified bilateral carotid artery ligation to establish a vascular dementia rat model and investigate changes in cerebral blood flow and effects on angiogenesis-related proteins [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1423-1430.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.006

基于改良大鼠双侧颈总动脉结扎法建立血管性痴呆模型探讨脑血流量变化规律及对血管新生相关蛋白的影响

陈婕,唐鑫,陈盼,谢紫薇,谢海花,张泓,邹莹洁*,谭洁*

(湖南中医药大学针灸推拿与康复学院,长沙 410208)

【摘要】 目的 通过改良大鼠双侧颈总动脉结扎法建立血管性痴呆(cascular dementia, VD)大鼠模型观察其脑血流量变化规律及血管新生蛋白表达等变化。**方法** 将 36 只 SD 雄性大鼠随机分为假手术组($n = 18$)和模型组($n = 18$),假手术组只分离双侧颈总动脉不作结扎,模型组行双侧颈总动脉结扎法制备 VD 模型,于造模前、造模后 14 d 采用 Morris 水迷宫进行行为学测试,激光散斑对比成像检测脑血流量变化,Western Blot 法检测 HIF-1 α 、VEGF 及 HO-1 蛋白表达,ELISA 法检测 IL-4、IL-10 含量。**结果** 造模后 14 d,与假手术组比较,模型组逃避潜伏期延长、穿越平台次数减少($P < 0.05$);造模后 2 h、3、7 d,模型组较假手术组脑血流量显著降低($P < 0.05$),造模后 14、21 d,假手术组和模型组的脑血流量变化无显著差异($P > 0.05$);模型组在造模后 2 h 脑血流量降至最低($P < 0.05$),此后脑血流量开始恢复,恢复高峰期发生在造模后 3 ~ 7 d,并于造模后 14 d 恢复至造模前水平;造模后 21 d,模型组海马区 HIF-1 α 、VEGF 及 HO-1 蛋白表达含量较假手术组明显升高($P < 0.05$),模型组血清中 IL-4、IL-10 的含量较假手术组明显升高($P < 0.05$)。**结论** 改良大鼠双侧颈总动脉结扎法建立 VD 模型的脑血流量变化呈现一定时间规律,造模后 21 d 该模型海马区 HIF-1 α 、VEGF 及 HO-1 的表达显著增加,并伴随 IL-4 和 IL-10 含量的升高。

【关键词】 血管性痴呆;模型;脑血流量;血管新生;炎症;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1423-08

Modified bilateral carotid artery ligation to establish a vascular dementia rat model and investigate changes in cerebral blood flow and effects on angiogenesis-related proteins

CHEN Jie, TANG Xin, CHEN Pan, XIE Ziwei, XIE Haihua, ZHANG Hong, ZOU Yingjie*, TAN Jie*

(College of Acupuncture & Tuina and Rehabilitation, Hunan University
of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Corresponding author: TAN Jie. E-mail:86869454@qq.com; ZOU Yingjie. E-mail:yingjiezou@foxmail.com

【基金项目】湖南省教育厅科学研究重点项目(22A0253),湖南省中医药科研计划项目(2021233)。

Funded by Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department(22A0253), Hunan Province Traditional Chinese Medicine Research Project(2021233).

【作者简介】陈婕(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:神经系统疾病的中西医结合康复机理与临床研究。

Email:1299066871@qq.com

【通信作者】谭洁(1980—),女,教授,博士,研究方向:神经系统疾病的中西医结合康复机理与临床研究。Email:86869454@qq.com;

邹莹洁(1991—),女,讲师,硕士,研究方向:神经康复。Email:yingjiezou@foxmail.com。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective Apply modified bilateral carotid artery ligation to establish a VD rat model to observe changes in cerebral blood flow and expression of angiogenic proteins. **Methods** Thirty-six SD male rats were randomly divided into a sham group ($n = 18$) and model group ($n = 18$). In the sham group, only the bilateral carotid artery was isolated without ligation, whereas in the model group, the bilateral carotid artery was ligated to establish the VD model. The Morris water maze behavior test was applied before and 14 days after modeling. Variation in cerebral blood flow was detected by laser speckle contrast imaging. Protein expression of HIF-1 α , VEGF, and HO-1 was detected by Western Blot. IL-4 and IL-10 contents were measured by ELISA. **Results** At 14 days after modeling, escape latency was significantly prolonged and the frequency of crossing the platform had significantly decreased in the model group compared with the sham group ($P < 0.05$). At 2 hours, 3 days, and 7 days after modeling, cerebral blood flow in the model group was significantly lower than that in the sham group ($P < 0.05$). At 14 and 21 days after modeling, no significant difference was found in cerebral blood flow between sham and model groups ($P > 0.05$). In the model group, cerebral blood flow was decreased to a minimum at 2 hours after modeling ($P < 0.05$) and then began to recover. The peak of recovery occurred at 3 ~ 7 days after modeling and returned to the level before modeling on day 14 after modeling. At postoperative day 21, expression of HIF-1 α , VEGF, and HO-1 proteins in the hippocampus of the model group was increased remarkably ($P < 0.05$) and the serum contents of IL-4 and IL-10 in the model group were significantly increased compared with those in the sham group ($P < 0.05$). **Conclusions** The variation in cerebral blood flow in the VD rat model established by the modified bilateral carotid artery ligation was dependent on time. At postoperative day 21, HIF-1 α , VEGF, and HO-1 in the hippocampus were increased significantly, which was accompanied by increased levels of IL-4 and IL-10.

[Keywords] vascular dementia; model; cerebral blood flow; angiogenesis; inflammation; rats

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

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是由于各种心脑血管疾病引起的脑组织病理改变进而导致的一种慢性神经退行性疾病,其特征为脑血流量减少所致的明显认知障碍^[1-2],患者可能会出现思维迟钝、健忘、抑郁、焦虑、定向障碍以及执行功能的丧失等,实验中建立合适的动物模型以模拟慢性脑血流量减少的病理状态,为 VD 的病理生理学机制研究提供了基础^[3-6]。

慢性脑灌注不足 (chronic cerebral hypoperfusion, CCH) 是导致 VD 的主要原因之一,可使其脑血流量 (cerebral blood flow, CBF) 持续下降,造成神经血管单元失衡,产生氧化应激、神经炎症、脱髓鞘、兴奋性毒性、血脑屏障破坏等一系列损害,最终引发突触损伤、白质病变和脑萎缩等^[1,7-8]。动物实验中可通过慢性脑灌注不足的方法使脑血流量持续下降来建立 VD 模型^[9],改良大鼠双侧颈总动脉结扎法是建立该模型方法之一,能较稳定地表达其生理病理指标,使大鼠出现较明显的学习记忆障碍,且操作简单、死亡率低,是较理想的 VD 模型建立方法^[10]。因此,探索 VD 动物模型脑血流量时间变化规律及对血管新生相关蛋白的影响,对评估该病预防、用药及康复的疗效很重要。

长期慢性的脑缺血能导致缺氧,暴露于此种环境会使大鼠脑结构和功能产生适应性变化,即通过

血管新生增加血管密度来缓解缺血缺氧,也许是大脑的一种血管重塑机制^[11-12]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor α , HIF-1 α) 是参与大脑血管新生和神经发生的重要调节剂,能通过调节血管新生相关因子增强血管新生,其下游血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 也是促进脑缺血后血管新生的重要蛋白,可以高效促进血管内皮细胞的有丝分裂与增殖^[13-15],增加血管新生,而血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 则能在脑缺血损伤中发挥抗炎以及促血管新生的功能^[16-17],三者均可在脑缺血后促进血管生成,帮助大脑重建微血管网络,缓解 VD 的慢性脑缺血损伤。本研究以改良的双侧颈总动脉结扎法建立 VD 大鼠模型,通过激光散斑衬比成像技术观察其造模后 2 h、3、7、14、21 d 的脑血流量变化,并检测造模后 21 d 海马中血管新生相关蛋白 HIF-1 α 、VEGF、HO-1 以及血清中抑炎因子 IL-4、IL-10 的含量,为防治 VD 持续脑血流下降进而引发的一系列病理损害提供客观依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只,6 ~ 8 周龄,体

重 180 ~ 200 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】, 饲养于湖南中医药大学实验动物中心【SYXK(湘)2019-0009】, 温度 24 ~ 26℃, 湿度 50% ~ 70%, 12 h 明暗交替环境, 给予充足的食物和水。所有操作均符合湖南中医药大学实验伦理学要求并经批准(LL-2022101204)。

1.1.2 主要试剂与仪器

2%戊巴比妥钠(Merck, P3761), IL-4 ELISA 试剂盒(Elabscience, E-EL-R0014c), IL-10 ELISA 试剂盒(Elabscience, E-EL-R0016c), HIF-1 α 抗体(Abcam, ab179483), VEGF-A 抗体(ZEN-BIOSCIENCE, R26073), HO-1 抗体(Proteintech, 10701-1-AP), β -tubulin 抗体(Proteintech, 10094-1-AP), 羊抗兔二抗(Abiowell, AWS0002a)。

激光散斑成像系统(Moor Instruments 公司, 型号:Moor FIPI-2, 英国), Morris 水迷宫系统(泰盟公司, 型号:MT-200, 中国), 双臂脑立体定位仪(众实公司, 型号:ZS-FDC, 北京), 化学发光凝胶成像仪(Bio-Rad 公司, 型号:ChemiDoc™ XRS +, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模

将 36 只 SD 大鼠随机分成 2 组, 即假手术组($n = 18$)和模型组($n = 18$), 具体操作方法如下:

模型组:术前禁食 12 h, 采用改良双侧颈总动脉结扎法建立 VD 模型^[10]。2%戊巴比妥 0.3 mL/100 g 腹腔注射麻醉, 大鼠仰卧位, 先后于颈正中线左右旁开 0.5 cm 切口, 逐层分离出双侧颈总动脉, 用 4-0 号缝合线分别在两侧颈总动脉近心和远心端结扎, 共 2 次, 每次打 4 次结以防止线脱落, 留出一段动脉以便从两端线结中间剪断颈总动脉, 然后逐层缝合切口, 注意无菌操作。

假手术组:仅分离颈总动脉但不结扎, 其他操作与模型组一致。

成模标准:计算假手术组大鼠逃避潜伏期平均值(A)、模型组大鼠逃避潜伏期平均值(B), 算出 B 与 A 的差并与 B 比较得出比值(C), 即 $C = (B - A)/B$, 若 $C \geq 20\%$, 则判断造模成功^[18]。

1.2.2 成模率、死亡率及存活率统计

造模后第 21 天统计模型组和假手术组的死亡率、存活率及成模率。

1.2.3 Morris 水迷宫行为学检测

采用 Morris 水迷宫行为学检测在造模前和造模后第 14 天^[19]分别进行大鼠学习记忆能力测试。水

迷宫是一个平分为 4 个象限的圆形水池, 目标象限中放一个无色透明平台, 加水高度为没过平台一手手指厚度。测试前在水中加入二氧化钛粉末, 使平台不易被大鼠发现。实验分为两部分:(1)定位航行实验(共 5 d):每天固定时间入水, 打乱每天 4 个象限入水顺序, 4 个象限分别入水 1 次, 共 4 次(如第 1 天:1 $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$ 3 $\rightarrow$ 4;第 2 天:2 $\rightarrow$ 3 $\rightarrow$ 4 $\rightarrow$ 1), 每次设置 120 s, 以大鼠爬上平台并停留超过 3 s 耗时记作逃避潜伏期, 如 120 s 内未爬上平台, 则引导其上平台并停留 10 s, 记其逃避潜伏期为 120 s, 计算第 3、4、5 天的 4 个象限的平均耗时, 并算出这 3 d 平均耗时的平均值, 即为最终逃避潜伏期。(2)空间探索实验(第 6 天):撤去目标象限的平台, 计时 120 s 得出大鼠穿越目标象限平台区域的次数, 记为穿越平台次数。

1.2.4 激光散斑衬比成像仪检测

2%异氟醚呼吸麻醉, 使用脑立体定位仪将大鼠头部固定, 于头顶正中靠近耳前位置将大鼠头部被毛除净, 碘酒消毒并使用眼科剪将头顶被皮剪开约 1.5 ~ 2.0 cm, 以头颅前囟点和人字点为长度, 两点连线左右旁开约 0.5 cm 宽度作为观察范围, 使用颅钻将其颅骨磨薄, 以肉眼能透过颅骨看到血管为最佳观察厚度, 用棉球蘸取 0.9%生理盐水轻轻涂抹于暴露的颅骨, 进行激光散斑衬比成像, 记录其脑血流量变化图像。使用 moorFLPIReviewV50 软件对图像进行分析, 在一侧大脑选择感兴趣的区域(ROI)计算出该侧大脑脑血流量变化值, 左右脑各取一个面积相同的区域, 计算出两个区域的平均值作为最终的脑血流量变化值。

1.2.5 Western Blot 检测

麻醉方法同 1.2.1, 大鼠麻醉后, 每组随机取 6 只大鼠, 取双侧海马组织, 将海马充分剪碎, 加入裂解液, 冰上静置后使用组织破碎仪破碎;离心后取上清, -80℃冰箱保存。使用 BCA 试剂盒测定浓度并配置上样缓冲液, 蛋白变性、电泳、转膜, 5%脱脂牛奶封闭, 一抗 4℃孵育过夜、二抗孵育, 显影得到目的条带, 使用 Image J 软件分析目标条带灰度值, 用目的蛋白与内参蛋白 β -tubulin 比值作为其相对表达含量变化。

1.2.6 ELISA 检测

造模后 21 d, 麻醉大鼠, 进行腹主动脉采血, 每只大鼠取 5 ~ 10 mL 全血, 静置 1 h, 离心机预冷 4℃, 2307 r/min 离心 15 min, 取出上清保存, 最后采

用 ELISA 法检测大鼠血清中 IL-4、IL-10 含量,根据试剂盒说明书进行具体操作。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计量资料用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用配对 t 检验,若满足正态齐性和方差齐性则采用独立样本的 t 检验,若方差不齐则采用配对 t' 检验,若不满正态齐性则采用 Wilcoxon 秩和检验;指标随时间变化比较采用重复测量单变量方差分析。以

$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成模率、死亡率和存活率统计

造模后 21 d,假手术组共计死亡 4 只,存活 14 只,死亡率为 22.2%,存活率为 77.8%;模型组共计死亡 5 只,存活 13 只,死亡率为 27.8%,存活率为 72.2%;模型组造模 18 只,成模 10 只,成模率为 55.6%,见表 1。

表 1 各组造模后 21 d 死亡、成活和成模数统计

Table 1 Death, survival and vascular dementia numbers of each group were counted on 21 days after modeling							
组别 Groups	死亡 Death	存活 Survive	造模 Modeling	成模 Vascular dementia	死亡率(%) Mortality rate (%)	存活率(%) Survival rate (%)	成模率(%) Model success rate (%)
假手术组 Sham group	4	14	—	—	22.2%	77.8%	—
模型组 Model group	5	13	18	10	27.8%	72.2%	55.6%

2.2 造模前后大鼠学习记忆能力比较

造模前,与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期、穿越平台次数均无显著性差异($P > 0.05$)。

造模后 14 d,与假手术组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期延长、穿越平台次数减少,差异具有显著性($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组造模前后逃避潜伏期及穿越平台次数比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of escape latency and platform crossing frequency before and after modeling in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)				
组别 Groups	造模前 Before modeling		造模后 After modeling	
	逃避潜伏期(s) Escape latency(s)	穿越平台次数(次) Platform crossing frequency(times)	逃避潜伏期(s) Escape latency(s)	穿越平台次数(次) Platform crossing frequency(times)
假手术组 Sham group	14.32 ± 3.71	4.15 ± 1.18	5.82 ± 0.76	6.65 ± 1.27
模型组 Model group	15.60 ± 6.28	3.95 ± 2.17	14.10 ± 6.39 *	4.95 ± 1.54 *

注:与假手术组相比, * $P < 0.05$ 。(下同)
Note. Compared with the sham group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

2.3 造模前后大鼠脑血流量变化比较

组间比较发现,造模前,假手术组和模型组间大鼠脑血流量变化差异无显著性($P > 0.05$);造模后 2 h、3、7 d,与假手术组相比,模型组大鼠脑血流量均降低,差异具有显著性($P < 0.05$);造模后 14、21 d,假手术组和模型组间大鼠脑血流量变化差异无显著性($P > 0.05$),见图 1。

组内比较发现,假手术组脑血流量在术后 2 h 开始上升,于造模后 3 d 升至最高,此后开始下降,在造模后 14 d 降至基线(术前)水平,造模后 21 d 上升至超过基线水平。模型组脑血流量在造模后 2 h 降至最低($P < 0.05$),下降了约为基线(造模前)

的 17.56%,此后开始恢复,恢复高峰期发生在造模后 3 ~ 7 d 之间,并在造模后 14 d 恢复至基线水平,在造模后 21 d 持续上升至超过基线水平,见图 1。

2.4 造模后 21 d 大鼠海马区 HIF-1α、VEGF 及 HO-1 蛋白表达比较

造模后 21 d,与假手术组比较,模型组大鼠海马区 HIF-1α、VEGF 及 HO-1 蛋白表达含量显著升高,差异具有显著性($P < 0.05$),见图 2。

2.5 造模后 21 d 大鼠血清中 IL-4、IL-10 含量比较

造模后 21 d,与假手术组比较,模型组大鼠血清中 IL-4、IL-10 含量升高,差异具有显著性($P < 0.05$),见图 3。

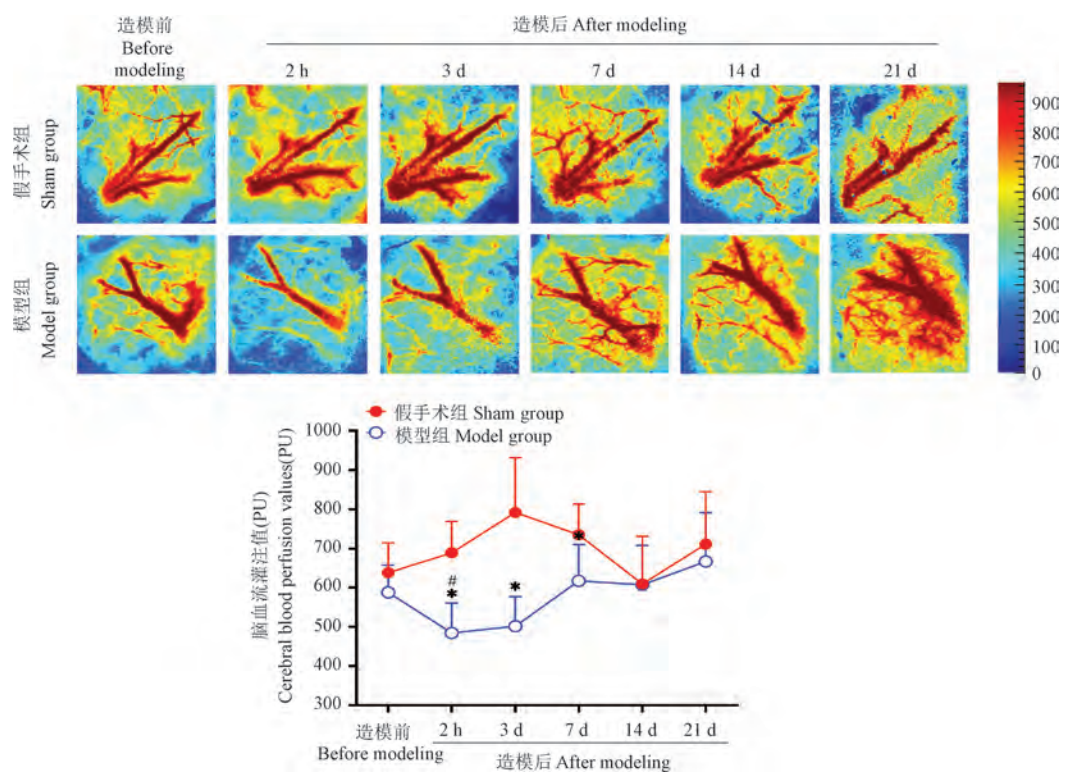


图1 各组造模前后脑血流量变化($n = 10$)

Note. Compared with before modeling, $^{\#}P < 0.05$.

Figure 1 Changes of cerebral blood flow before and after modeling in each group($n = 10$)

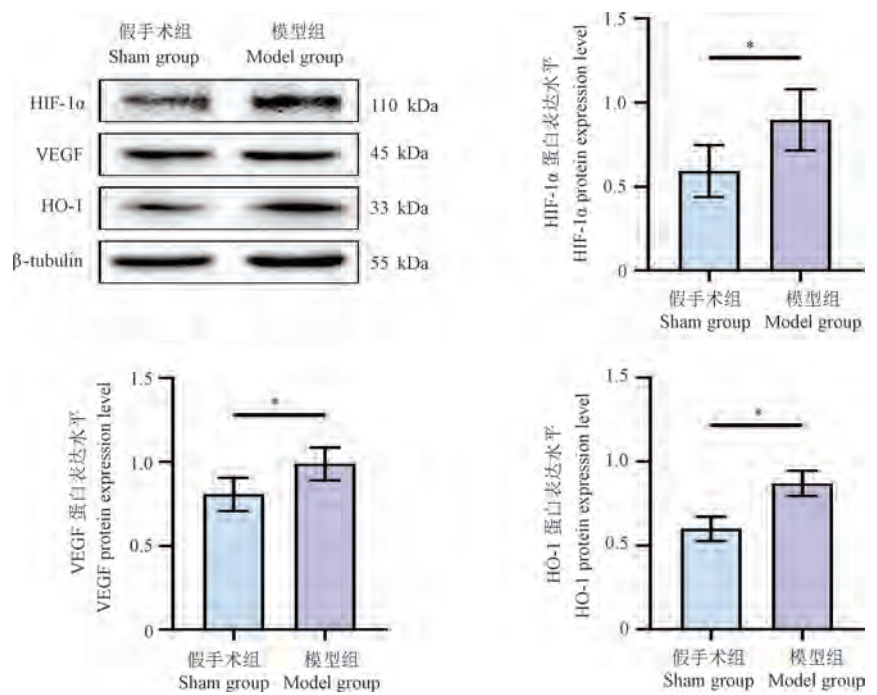


图2 各组 HIF-1 α 、VEGF 及 HO-1 蛋白表达水平($n = 6$)

Figure 2 Protein expression level of HIF-1 α , VEGF and HO-1 in each group($n = 6$)

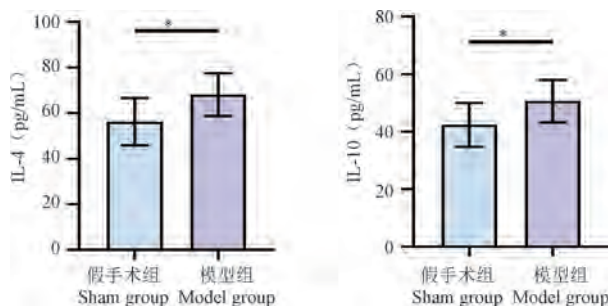


图3 各组 IL-4、IL-10 含量变化比较($n = 10$)

Figure 3 Comparison of IL-4 and IL-10 contents in each group($n = 10$)

3 讨论

目前研究表明,脑血流量持续降低引起的慢性脑低灌注是导致血管性痴呆认知能力下降的主要驱动因素,涉及缺血、缺氧、氧化应激和神经炎症等病理动态过程^[20-21],与该病的开始和进展有关,最终会损害海马体、脑白质和基底神经节等脑组织,造成认知功能障碍^[22]。持续且调节良好的血液供应是脑维持正常生理代谢的关键,其耗氧量且只能依赖于血液供氧,即使是慢性的脑血流量下降也可能对脑功能产生无法弥补的影响,因此,检测 VD 脑血流量变化非常重要^[22],而探究 VD 在脑缺血后脑血流量时间变化规律也将有助于找到其预防和治疗介入关键时期。

脑缺血损伤发生后的 3 ~ 7 d 可能是有效治疗介入的关键时期^[23-25],在此期间脑组织为了应对缺血带来的伤害,会通过增加血管新生相关蛋白的表达来促进血管生成,增加脑血流量;以往的研究也发现,VD 大鼠的脑血流量在造模后 2 ~ 3 h 内会降至最低,而在造模后 1 d 内开始恢复,并于造模后 7 ~ 14 d 内得到显著恢复^[26-28],但造模后 28 d 的脑血流量仍可能低于假手术组^[29]。因此,本研究采用改良大鼠双侧颈总动脉结扎法建立 VD 模型,以造模前和造模后 2 h、3、7、14、21 d 为观察时间点,通过激光散斑对比成像系统检测其脑血流量时间变化规律,发现与假手术组比较,模型组大鼠的脑血流量变化在术后 2 h、3、7 d 的显著降低,而术后第 14、21 天的变化无显著差异,与之前的研究一致^[30];组内比较发现,假手术组大鼠脑血流量在术后 2 h 后开始上升,于造模后 3 d 升至最高,此后开始下降,在术后 14 d 降至基线(术前)水平,此后沿基线波动,这种变化可能是呼吸麻醉吸入异氟烷造成的,因其对大脑血管具有舒张作用,可使脑血流量显著

增加^[31-32];模型组大鼠脑血流量在造模后 2 h 下降最为明显,下降值约为基线(造模前)的 17.56%,此后开始恢复,恢复高峰期发生在造模后的 3 ~ 7 d,但仍低于假手术组,于造模后第 14 天恢复至基线水平,与先前的研究一致^[26-28]。

研究发现,血管新生相关蛋白能在脑缺血后 24 h 内开始表达,在脑缺血后 3 ~ 7 d 便能达到峰值,其新生的血管也能在脑缺血后 3 d 观察到^[25-33],这与本研究的脑血流量恢复高峰期时间一致;VD 造模后 2 h 脑血流量下降至最低值,为了维持正常的脑血流量,血管生成蛋白被激活以产生新的微血管,因此血管重塑能力和血管生成在此过程中被启动^[29-34],脑组织通过上调 VEGF 来激活脑血管生成,同时,作为缺氧基因表达的开关 HIF-1 α ^[35-36],能进一步促进 VEGF 强大的血管新生作用^[37],刺激内皮细胞增殖和迁移,促进新生血管发生、分化和稳定;脑缺血损伤发生时,红细胞大量破裂释放游离的血红素介导炎症反应,损伤血管内皮,HO-1 则通过分解游离血红素来降低血红素的生物利用度,产生抗氧化、抗炎以及促血管新生的效果^[16-17],HIF-1 α 也能介导 HO-1 基因的转录激活以响应缺血缺氧,发挥其抗炎和促血管新生作用^[38];因此,HIF-1 α 、VEGF 以及 HO-1 三者同时参与血管新生过程,能促进脑血流量的恢复。本研究发现,造模后 21 d,模型组大鼠海马中 HIF-1 α 、VEGF 以及 HO-1 蛋白的表达均高于假手术组,同时,其血清中 IL-4 和 IL-10 的含量也出现升高,提示 VD 大鼠可能通过自我修复提高 HIF-1 α 、VEGF、HO-1 的表达来促进血管新生,并抑制神经炎症反应,进一步证实,脑缺血后,大脑可以通过血管新生蛋白的激活促进新的微血管生成^[11-12],帮助脑血流量的恢复。

综上,本研究表明,改良的双侧颈总动脉结扎法建立的 VD 大鼠模型脑血流量变化呈现一定时间

规律,能在造模后随时间自行恢复;造模后 21 d 海马中 HIF-1 α 、VEGF、HO-1 及血清中 IL-4、IL-10 的含量增加,提示 VD 发病后,大脑可能通过强大的血管新生能力,促进脑血流量恢复,抑制神经炎症,减轻其认知功能损害。VD 造模后血管新生蛋白的表达是否和脑血流量时间变化规律一致本文尚不清楚,因此,本课题组将进一步展开实验探索 VD 大鼠血管新生与脑血流量变化规律的关系。

参 考 文 献(References)

- [1] Yu W, Li Y, Hu J, et al. A study on the pathogenesis of vascular cognitive impairment and dementia: the chronic cerebral hypoperfusion hypothesis [J]. J Clin Med, 2022, 11 (16): 4742.
- [2] Li C, Wang Y, Yan XL, et al. Pathological changes in neurovascular units: lessons from cases of vascular dementia [J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27 (1): 17–25.
- [3] Tiwari N, Upadhyay J, Ansari MN, et al. Experimental rodent models of vascular dementia: a systematic review [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2021, 20 (7): 657–672.
- [4] 刘伟, 胡鹏, 冯波. 血管性痴呆大鼠模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27 (6): 805–809.
Liu W, Hu P, Feng B. Research progress of rat models of vascular dementia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27 (6): 805–809.
- [5] 牛雨晴, 秦合伟, 姬令山, 等. 血管性认知障碍和卒中后认知障碍动物模型初步评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (5): 121–127.
Niu YQ, Qin HW, Ji LS, et al. Preliminary evaluation of animal models of vascular and post-stroke cognitive impairments [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32 (5): 121–127.
- [6] Yang Y, Kimura-Ohba S, Thompson J, et al. Rodent models of vascular cognitive impairment [J]. Transl Stroke Res, 2016, 7 (5): 407–414.
- [7] Zhu HY, Hong FF, Yang SL. The roles of nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in the pathology of vascular dementia and related therapeutic approaches [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (9): 4540.
- [8] 闫峰, 田悦, 汉语悠, 等. 稀莶通栓胶囊减轻慢性脑缺血大鼠认知功能损伤的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (5): 47–52, 76.
Yan F, Tian Y, Huang YY, et al. Use of Xi-Xian-Tong-Shuan capsules for alleviating vascular cognitive impairment in rats with chronic cerebral hypoperfusion [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32 (5): 47–52, 76.
- [9] Du SQ, Wang XR, Xiao LY, et al. Molecular mechanisms of vascular dementia: what can be learned from animal models of chronic cerebral hypoperfusion? [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54 (5): 3670–3682.
- [10] 谭洁, 韩国栋, 张泓, 等. 改良大鼠双侧颈总动脉结扎方式建立血管性痴呆模型的评价研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32 (3): 264–268.
- [11] Tan J, Han GD, Zhang H, et al. Evaluation of vascular dementia rat model established by modified bilateral carotid artery ligation way [J]. Chin J Rehabil Med, 2017, 32 (3): 264–268.
- [12] Tregub PP, Averchuk AS, Baranich TI, et al. Physiological and pathological remodeling of cerebral microvessels [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (20): 12683.
- [13] Guan Y, Liu J, Gu Y, et al. Effects of hypoxia on cerebral microvascular angiogenesis: benefits or damages? [J]. Aging Dis, 2023, 14: 370–385.
- [14] Ni H, Li J, Zheng J, et al. Cardamonin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by activating the HIF-1 α /VEGFA pathway [J]. Phytother Res, 2022, 36 (4): 1736–1747.
- [15] Wang H, Xu X, Yin Y, et al. Catalpol protects vascular structure and promotes angiogenesis in cerebral ischemic rats by targeting HIF-1 α /VEGF [J]. Phytomedicine, 2020, 78: 153300.
- [16] Mitroshina EV, Savyuk MO, Ponimaskin E, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) in ischemic stroke and neurodegenerative disease [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 703084.
- [17] Mariapaola N, Lisa FA, Mann Giovanni E. Heme oxygenase dependent bilirubin generation in vascular cells: a role in preventing endothelial dysfunction in local tissue microenvironment? [J]. Front Physiol, 2020, 11: 23.
- [18] Ryter SW. Heme oxygenase-1: an anti-inflammatory effector in cardiovascular, lung, and related metabolic disorders [J]. Antioxidants, 2022, 11 (3): 555.
- [19] 邓畅, 邹莹洁, 张泓, 等. 电针对血管性痴呆大鼠血脑屏障及海马促炎细胞因子的影响 [J]. 针刺研究, 2022, 47 (10): 885–890.
Deng C, Zou YJ, Zhang H, et al. Effects of electroacupuncture on the blood-brain-barrier and proinflammatory cytokine IL-1 β and IL-18 in the hippocampus of rats with vascular dementia [J]. Acupunct Res, 2022, 47 (10): 885–890.
- [20] 高音来, 田浩梅, 陈楚淘, 等. “调心通督”针刺法对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马组织 VEGF、Ang-1 蛋白表达的影响 [J]. 中国针灸, 2020, 40 (10): 1108–1112.
Gao YL, Tian HM, Chen CT, et al. Effect of acupuncture technique of Tiaoxin Tongdu on learning-memory ability and expressions of hippocampal VEGF and Ang-1 in rats with vascular dementia [J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2020, 40 (10): 1108–1112.
- [21] Wei B, Wu S, Wang Z, et al. Comparison of cognitive performance and cardiac function between three different rat models of vascular dementia [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2022, 18: 19–28.
- [22] Rajeev V, Chai YL, Poh L, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: a critical feature in unravelling the etiology of vascular cognitive impairment [J]. Acta Neuropathol Commun, 2023, 11 (1): 93.
- [23] Fang YC, Hsieh YC, Hu CJ, et al. Endothelial dysfunction in neurodegenerative diseases [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24

- (3): 2909.
- [23] 李保龙, 梁润玉, 裴飞, 等. 基于缝隙连接蛋白-43 调控的运动预处理促进大鼠脑缺血再灌注后神经血管单元重构的机制研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2023, 38(3): 299-304.
Li BL, Liang RY, Pei F, et al. Mechanism of exercise preconditioning based on Cx43 promoting neurovascular unit remodeling after cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. Chin J Rehabil Med, 2023, 38(3): 299-304.
- [24] 贾蓝羽, 杜元灏, 李晶, 等. 电针“水沟”穴对脑缺血大鼠缺血血脑组织血管新生相关因子表达的影响 [J]. 针刺研究, 2019, 44(10): 715-721.
Jia LY, Du YH, Li J, et al. Effects of electroacupuncture on morphology of neovascularization and expression of angiogenesis-related factors in ischemic brain tissue of cerebral ischemia rats [J]. Acupunct Res, 2019, 44(10): 715-721.
- [25] 姚文超, 李梦醒, 刘箐, 等. 电针联合康复训练调控 PI3K/Akt 信号通路介导脑缺血后血管新生相关因子的表达 [J]. 康复学报, 2020, 30(5): 377-386.
Yao WC, Li MX, Liu Q, et al. Angiogenesis regulated by electroacupuncture combined with rehabilitation training in cerebral ischemia involved in PI3K/Akt signaling pathway [J]. Rehabil Med, 2020, 30(5): 377-386.
- [26] Wang J, Yang C, Wang H, et al. A new rat model of chronic cerebral hypoperfusion resulting in early-stage vascular cognitive impairment [J]. Front Aging Neurosci, 2020, 12: 86.
- [27] Kitamura A, Saito S, Maki T, et al. Gradual cerebral hypoperfusion in spontaneously hypertensive rats induces slowly evolving white matter abnormalities and impairs working memory [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2016, 36(9): 1592-1602.
- [28] Washida K, Hattori Y, Ihara M. Animal models of chronic cerebral hypoperfusion: from mouse to primate [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): 6176.
- [29] Fang C, Liu J, Feng M, et al. Shengyu Decoction treating vascular cognitive impairment by promoting AKT/HIF-1 α /VEGF related cerebrovascular generation and ameliorating MAPK/NF- κ B mediated neuroinflammation [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 296: 115441.
- [30] Kato H, Kanai Y, Watabe T, et al. Quantitative measurement of regional cerebral blood flow and oxygen metabolism in a rat model of cerebral hypoperfusion [J]. Brain Res, 2019, 1719: 208-216.
- [31] Sullender CT, Richards LM, He F, et al. Dynamics of isoflurane-induced vasodilation and blood flow of cerebral vasculature revealed by multi-exposure speckle imaging [J]. J Neurosci Methods, 2022, 366: 109434.
- [32] Wei Z, Li Y, Bibic A, et al. Toward accurate cerebral blood flow estimation in mice after accounting for anesthesia [J]. Front Physiol, 2023, 14: 1169622.
- [33] Yang L, Yang BC, Zhang CX, et al. Protective effects of acupuncture and LGNHFD on expressions of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and cluster of differentiation 34 in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 41(3): 463-470.
- [34] Halder Sebok K, Richard M. The impact of chronic mild hypoxia on cerebrovascular remodelling; uncoupling of angiogenesis and vascular breakdown [J]. Fluids Barriers CNS, 2021, 18(1): 50.
- [35] 王璐. 黄芪甲苷调控 VEGF/PI₃K/AKT 信号通路干预肺微血管内皮细胞血管新生的影响及临床研究 [D]. 济南: 山东中医药大学; 2020.
Wang L. Study on the effect of Astragaloside on the regulation of Angiogenesis on PMVECs by VEGF/PI₃K/AKT signaling pathway and clinical research [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 2020.
- [36] Samakova A, Gazova A, Sabova N, et al. The PI₃k/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiologic condition in ischemia [J]. Physiol Res, 2019, 68(2): S131-S138.
- [37] 刘志强, 李亚坤, 白玫, 等. 基于 VEGF 途径探究丹参素对大鼠视网膜静脉阻塞及对视网膜功能的改善作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(5): 52-60.
Liu ZQ, Li YK, Bai M, et al. Mechanism of Danshensu in retinal vein occlusion and retinal functions in rats via the VEGF pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(5): 52-60.
- [38] Dunn LL, Kong SMY, Tumanov S, et al. Hmox1 (heme oxygenase-1) protects against ischemia-mediated injury via stabilization of HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(1): 317-330.

[收稿日期] 2023-06-16

代浩然,王跃,王旭,等. 2 型糖尿病及其微血管并发症动物模型生化指标特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1431-1438.

Dai HR, Wang Y, Wang X, et al. Biochemical characteristics of type 2 diabetes mellitus and its microvascular complications in animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1431-1438.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2023. 11. 007

2 型糖尿病及其微血管并发症动物模型生化指标特征分析

代浩然,王跃,王旭,朴成玉,刘静,吴修红*

(黑龙江中医药大学药学院,哈尔滨 150040)

【摘要】 目的 通过总结以大鼠和小鼠作为动物模型的 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)及其微血管并发症的实验数据,对其生化指标进行分析,以期为今后进行相关实验提供理论参考。**方法** 以“2 型糖尿病”“糖尿病肾病”“糖尿病足”“糖尿病视网膜病变”等为主题词在中国知网、PubMed 数据库进行检索,筛选出从 2019 年 10 月 31 日 ~ 2022 年 10 月 31 日发表的临床与动物实验中有关 T2DM 及微血管并发症的期刊文献,对文献记载的受试对象、疾病种类、检测指标等内容进行整理归纳,建立数据库进行统计分析。**结果** 共筛选纳入文献 510 篇,其中 T2DM 实验中高频应用的生化指标为空腹血糖,糖尿病肾病实验中高频应用的生化指标为尿蛋白水平相关指标,糖尿病足与糖尿病视网膜病变实验中采用的生化指标多为血清炎症因子。**结论** 本研究通过对 T2DM 及其微血管并发症实验中生化指标应用频率进行探析,可为疾病的临床诊疗及动物实验的开展提供重要参考依据。

【关键词】 2 型糖尿病;微血管并发症;动物模型;生化指标

【中图分类号】 Q95-33

【文献标志码】 A

【文章编号】 1005-4847 (2023) 11-1431-08

Biochemical characteristics of type 2 diabetes mellitus and its microvascular complications in animal models

DAI Haoran, WANG Yue, WANG Xu, PIAO Chengyu, LIU Jing, WU Xiuhong*

(School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Corresponding author: WU Xiuhong. E-mail: wxh8088@163.com

【Abstract】 Objective By summarizing experimental data of animal models of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its microvascular complications in rats and mice as animal models, the biochemical indexes were analyzed in order to provide theoretical reference for future experiments. **Methods** The main topics of “type 2 diabetes” “diabetic nephropathy” “diabetic foot” and “diabetic retinopathy” were searched on China National Knowledge Infrastructure and PubMed databases to screen out the journal literatures related to T2DM and microvascular complications in clinical and animal experiments published from October 31, 2019 to October 31, 2022. The subjects, disease types, detection indicators and other contents recorded in the literature were sorted out and summarized, and a database was established for statistical analysis. **Results** A total of 510 literatures were selected, among which fasting blood glucose was the most frequently used biochemical index in T2DM experiment, urine protein level was the most frequently used biochemical index in diabetic nephropathy experiment, and serum inflammatory factors were the most frequently used biochemical index in

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82174274),黑龙江省中医药管理局(zyw2022-076)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(82174274), Heilongjiang Province Traditional Chinese Medicine Classic Popularization Research Project(zyw2022-076).

【作者简介】 代浩然(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:中药药效物质基础及其代谢组学。Email: 2116318971@qq.com

【通信作者】 吴修红(1978—),女,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药药效物质基础及其代谢组学。Email: wxh8088@163.com

diabetic foot and diabetic retinopathy experiment. **Conclusions** By analyzing the application frequency of biochemical indicators in T2DM and its microvascular complications, this study can provide an important reference for clinical diagnosis and treatment of the disease and the development of animal experiments.

【Keywords】 type 2 diabetes mellitus; microvascular complications; animal model; biochemical index

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

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种代谢性疾病, 患病率逐年攀升, 已达到流行病的程度, 预计到 2045 年全球糖尿病患者将达到约 7.83 亿^[1-3]。长期高血糖状态通过中断许多生理代谢途径而影响微血管系统, 最终导致糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN)、糖尿病足 (diabetic foot, DF)、糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR)^[4]。由于 T2DM 及其微血管并发症的发病人群呈现年轻化趋势, 使得防治该疾病已然成为亟需攻破的重要难题。

生化指标能客观反映动物机体生理病理变化与代谢状况, 一定程度上能反映疾病的严重程度^[5-6]。因此通过检测生化指标确定患病趋势, 可达到及时用药干预治疗的目的。近年来, 研究者对 T2DM 及其微血管并发症开展了大量研究工作, 除临床研究外, 动物实验多选用大鼠或小鼠作为模型, 本研究收集了大量已发表的与 T2DM 及其微血管并发症相关文献, 对其所选用的生化指标进行综述, 以期应用该类模型开展研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 检索策略

在中国知网、PubMed 数据库检索从 2019 年 10 月 31 日 ~ 2022 年 10 月 31 日发表的临床与动物实

验中有关 T2DM 及微血管并发症的期刊文献, 中文检索词包括“2 型糖尿病”“糖尿病肾病”“糖尿病足”“糖尿病视网膜病变”等; 英文检索词包括“type 2 diabetes mellitus”“diabetic nephropathy”“diabetic foot”“diabetic retinopathy”等, 采用主题词和自由词结合的检索方式。

1.2 文献筛选标准

选择已公开发表的使用临床患者以及使用大鼠和小鼠作为动物模型进行 T2DM 及微血管并发症研究的实验性期刊文献, 剔除动物模型不明及合并其他大血管及心血管并发症的文献, 仅选用模型条件完备且可获得全文的期刊文献。

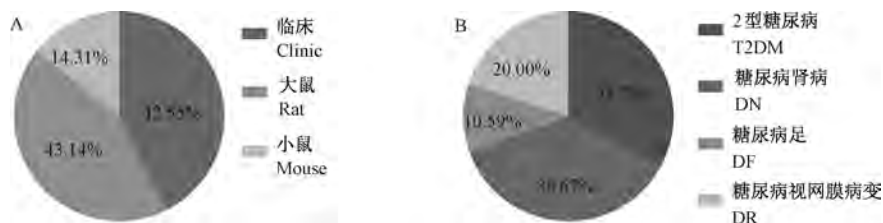
1.3 统计学分析

应用 Excel 2019 软件, 将纳入的文献中的受试对象、疾病种类、检测指标等信息汇总整理成 T2DM 及其微血管并发症生化指标数据库, 使用 Excel 进一步进行频次分析及表格的制作, 并使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计图的绘制。

2 结果

2.1 检索结果

本研究共检索到相关文献 1886 篇, 依据纳入和排除标准, 最终纳入 510 篇 (T2DM 共 167 篇, DN 共 187 篇, DF 共 54 篇, DR 共 102 篇), 见图 1。



注: A: 不同实验群体; B: 不同疾病类型。

图 1 T2DM 及其微血管并发症相关文献分布情况

Note. A. Different experimental groups. B. Different disease types.

Figure 1 Distribution of literature on T2DM and its microvascular complications

2.2 生化指标统计分析

2.2.1 2 型糖尿病

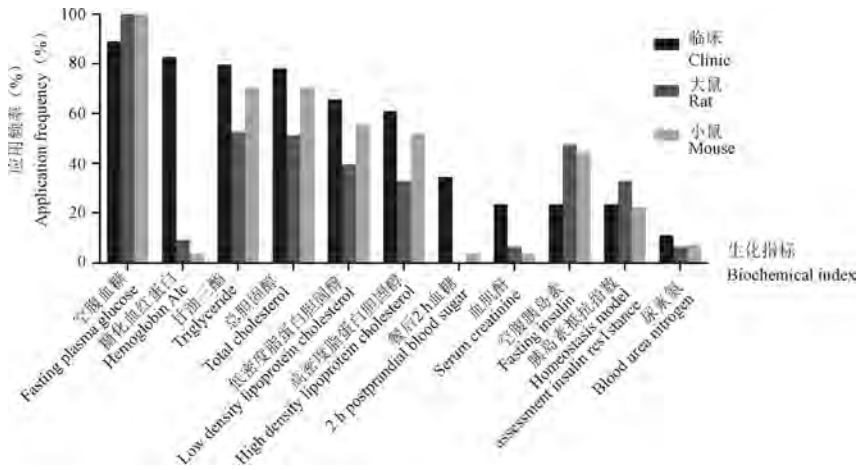
T2DM 是一种由于胰岛细胞分泌胰岛素减少或者因胰岛素抵抗而引起的复杂的代谢紊乱的疾病。

临床和动物实验中通过检测生化指标而对健康状况进行评估, 经统计分析发现应用较多的生化指标有空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)

等,而对于餐后 2 h 血糖(2 h postprandial blood sugar,2 h PG)及糖化血红蛋白(hemoglobin A1c,HbA1c)的检测,动物实验明显少于临床实验。FPG 能反映胰岛 β 细胞的功能,一般用来表示基础胰岛素的分泌功能,是 T2DM 最常用的检测指标。研究发现 FPG 在临床检查中漏诊率较高且 2 h PG 容易受饮食、运动等因素的干扰,影响诊断效能,因此必须联合 HbA1c 进行诊断^[7]。对于动物实验而言已知应用某种方式对其动物胰岛 β 细胞进行破坏,因此 FPG 值能较准确的反映机体的情况,与 2 h PG 及 HbA1c 联合检测较少。付平等^[8]研究表明血脂异常可引发胰岛素抵抗,而胰岛素抵抗又反过来加

重了脂代谢紊乱,进而促使 T2DM 的发生,同时研究发现血脂参数(TC、TG 等)具有反映 T2DM 患病风险的能力。相比于临床实验,动物实验生化指标的选用略显匮乏,除以往实验中都采用的生化指标外,动物实验多选择体重、摄食量和饮水量作为考察指标。T2DM 实验中各生化指标选用频率,见图 2。

实验中不论是临床患者还是动物模型,T2DM 组 FPG 值均大于正常对照组。在动物实验中,为保证模型的稳定性,会把成模标准拉高,汪峰等^[9]研究发现,当 FPG ≥ 16.70 mmol/L 时,模型较为稳定,可以良好的开展实验,因此动物实验中模型组 FPG 普遍高于临床患者,见表 1。



注:临床:64 篇;大鼠:76 篇;小鼠:27 篇。

图 2 T2DM 实验生化指标应用情况

Note. Clinic. 64 articles. Rat. 76 articles. Mouse. 27 articles.

Figure 2 Application of experimental biochemical indicators of T2DM

表 1 T2DM 高频应用生化指标变化范围

生化指标 Biochemical index	Table 1 Variation range of biochemical indices of T2DM high-frequency application					
	临床 ^[10] Clinic ^[10]		大鼠 ^[11-15] Rat ^[11-15]		小鼠 ^[16-20] Mouse ^[16-20]	
	正常值 Normal value	患病值 Disease value	正常值 Normal value	患病值 Disease value	正常值 Normal value	患病值 Disease value
空腹血糖 (mmol/L) Fasting plasma glucose (mmol/L)	3.60 ~ 6.10	≥ 7.00	4.52 $\pm$ 0.32	20.46 $\pm$ 4.32 **	6.58 $\pm$ 0.98	21.38 $\pm$ 4.91 **
甘油三酯 (mmol/L) Triglyceride (mmol/L)	0.56 ~ 1.70	> 1.70	0.93 $\pm$ 0.22	1.74 $\pm$ 0.56 *	1.05 $\pm$ 0.40	2.15 $\pm$ 0.85 *
总胆固醇 (mmol/L) Total cholesterol (mmol/L)	2.84 ~ 5.68	—	2.45 $\pm$ 0.86	4.68 $\pm$ 1.36 *	2.52 $\pm$ 1.17	5.80 $\pm$ 1.22 **
低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) Low density lipoprotein cholesterol (mmol/L)	2.10 ~ 3.10	—	0.60 $\pm$ 0.39	3.24 $\pm$ 2.25 *	1.65 $\pm$ 1.06	3.03 $\pm$ 1.35
高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) High density lipoprotein cholesterol (mmol/L)	1.14 ~ 1.76	< 1.04	2.09 $\pm$ 0.80	1.17 $\pm$ 0.58 *	1.86 $\pm$ 0.49	0.95 $\pm$ 0.46 *

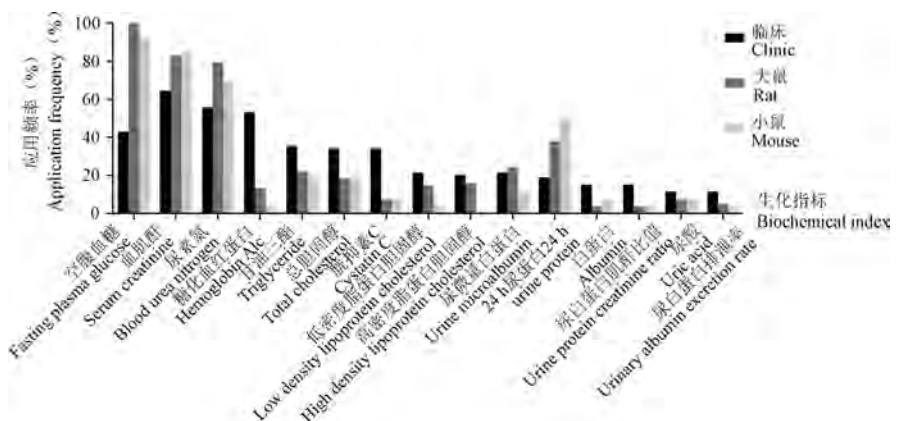
注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2.2 糖尿病肾病(DN)

DN 是一种危害性极大的 DM 慢性微血管并发症,且 DN 患者的全因死亡率比无肾病的 DM 患者高约 30 倍,且在中国的流行率逐渐上升^[21-23]。DM 患者肾在长期的 DM 状态下发生病理结构的改变,包括肾小球细胞外基质增生、系膜扩张、基底膜增厚等,进而发展为肾小球硬化和肾小管间质纤维化,最终发展为终末期肾病^[24]。

在 DN 患者发病的早期阶段,缺乏特异性的临床表现,在影像学中往往无法显示出,容易被忽视,而实验室指标是对 DN 开展早期诊断的重要手段,

其中尿蛋白是评定 DN 的重要指标^[25]。随着 DN 病程的进展,肾小球滤过率明显下降,同时尿蛋白排泄量从正常(30 mg/24 h)逐渐到微量尿蛋白(30 ~ 300 mg/24 h)最终到大量尿蛋白(300 mg/24 h)。多项研究表明尿蛋白与 DN 的发生发展密切相关,是 DN 的危险标记物^[26]。经过统计分析发现临床实验和动物实验中的生化指标中尿蛋白最为常用,如尿微量白蛋白(urine microalbumin, UmAlb)、24 h 尿蛋白(24 h urine protein, 24 hUP)、尿白蛋白肌酐比值(urine protein creatinine ratio, UACR)等,见图 3。



注:临床:79 篇;大鼠:82 篇;小鼠:26 篇。

图 3 DN 实验生化指标应用情况

Note. Clinic. 79 articles. Rat. 82 articles. Mouse. 26 articles.

Figure 3 Application of experimental biochemical indicators of DN

人体尿蛋白水平不论是正常值还是患病值均高于动物模型,这可能与足细胞蛋白在机体内分布数量有关。肾小球滤过膜从内到外分别为肾小球内皮细胞、基底膜、足细胞,其中足细胞是肾小球滤过的最后屏障和最主要屏障。肾小球足细胞的裂隙隔膜损伤可导致蛋白等大分子物质透过滤过膜,促进蛋白尿的形成,而足细胞蛋白足突蛋白(podocin)和肾病蛋白(nephrin)是裂隙隔膜的重要组成部分。足突蛋白的降低和肾病蛋白表达的减少都会引起足细胞功能失衡,并在实验中得出人体足细胞蛋白的分子量远高于动物模型,因此推测足细胞蛋白数量可影响蛋白尿的水平^[27-29]。

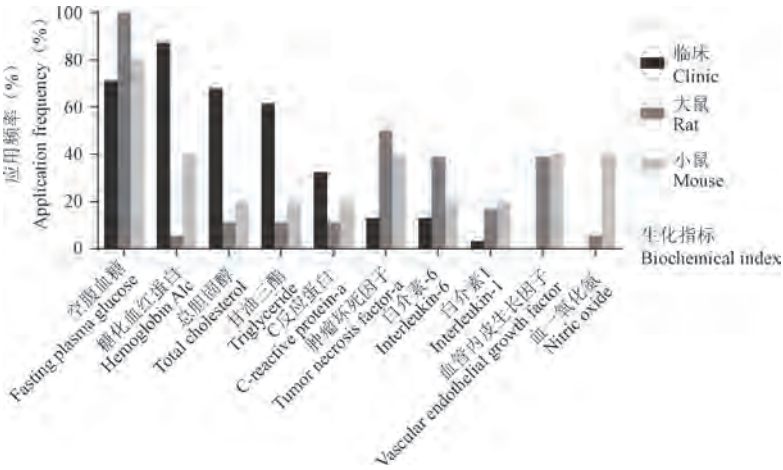
2.2.3 糖尿病足(DF)

DF 是糖尿病常见且严重的慢性并发症,治疗预后不佳,严重的 DF 患者需通过截肢手术,来防止疾病的扩散^[30]。随着对 DF 的不断深入研究,通过生化指标变化,可以用来评估 DF 患者病情情况。

经统计分析发现在临床和动物实验应用的生化指标有 FPG、TC、TG、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)等。因 DF 通常并发有不同程度的感染,导致炎症反应的发生,CRP 含量也随之升高。有研究表明通过检测 CRP 水平,将会对 DF 未来的风险预测及疗效评价起到积极的作用^[31]。肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)是由体内单核巨噬细胞分泌的炎症因子,当足细胞感染时,单核细胞被激活, TNF-α 的含量有所增加,从而导致血管内皮细胞的破坏,使足细胞病情加重。Dominguez 等^[32]研究发现,通过使用 TNF-α 抑制剂治疗 T2DM 患者,可使其血管并发症和胰岛素抵抗得到逆转。白介素-6(interleukin-6, IL-6)不仅有免疫调节的作用,还可以促炎,影响组织修复,使炎症损伤加重,进而促进 DF 的进展^[33]。白介素-1(interleukin-1, IL-1)是典型的炎症因子,在 DF 中恶性循环。高血糖环境下可产生大量 IL-1,进而诱导胰岛 β 细胞凋亡导致高血糖,从而使 DF 伤口难以

愈合^[34]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 能导致血管内皮细胞的增殖, 以及新生血管的形成。VEGF 含量与血一氧化氮

(nitric oxide, NO) 含量相关联: VEGF 可刺激内皮细胞产生 NO, 使其浓度程剂量依赖性增加, 起到血管维持作用, 见图 4。



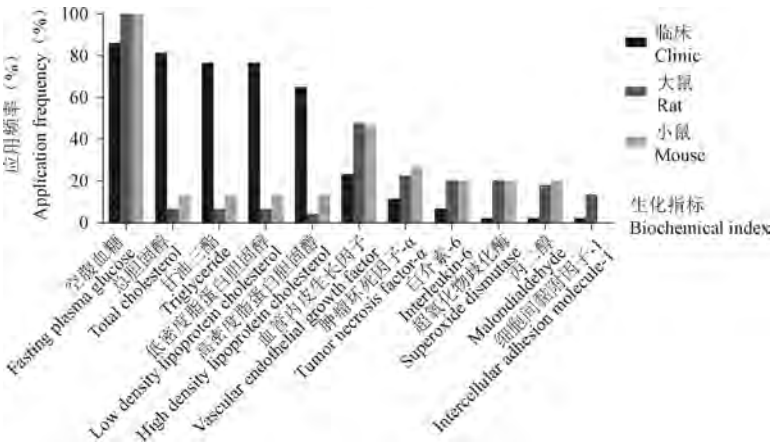
注: 临床: 31 篇; 大鼠: 18 篇; 小鼠: 5 篇。
Note. Clinic. 31 articles. Rat. 18 articles. Mouse. 5 articles.
Figure 4 Application of experimental biochemical indicators of DF

2. 2. 4 糖尿病视网膜病变 (DR)

DR 是一种常见的糖尿病微血管并发症, 是导致患者视网膜出现慢性损伤, 最终导致患者出现视力模糊, 甚至失明。临床实验常用最佳矫正视力为考察标准, 视力至少提高 2 行, 即为显效^[35]。除了基本的血糖和一些炎症因子外, 动物实验与临床实验应用的生化指标相差较大, 因此对实验中应用的高频率生化指标进行详细统计, 见图 5。

VEGF 是最有效的促血管生长因子, 在高血糖状态下可改变视网膜微环境, 导致缺氧引起内皮细

胞功能异常, 从而使 VEGF 的表达增加。据报道 VEGF 的增加可诱导视网膜内皮通透性和增殖, 进而导致视网膜血管生成^[36]。Zhang 等^[37] 研究发现通过抑制 VEGF 的表达, 可阻止血管的生成, 改善 DR。IL-6 可促进内皮细胞通透性增加, 与 VEGF 等产生协同作用, 或导致新生血管形成及微导管闭塞, 使 DR 进展加快^[38]。TNF-α 可引起 VEGF 水平的提高, 使视网膜通透性有所增加, 同时诱发新生血管。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 是维护内皮细胞和血管功能的关键酶, 也是主要的



注: 临床: 43 篇; 大鼠: 44 篇; 小鼠: 15 篇。
Note. Clinic. 43 articles. Rat. 44 articles. Mouse. 15 articles.
Figure 5 Application of experimental biochemical indicators of DR

自由基清除剂,在胰岛的细胞内高度集中,维持 β 细胞在体内的平衡^[39]。丙二醛(malondialdehyde, MDA)是膜脂过氧化的一种重要产物,可以使视网膜细胞通透性和流通性改变,最终导致其结构的改变。有研究发现经中药治疗后糖尿病大鼠静脉血清中 SOD、MDA 值均有显著性改变^[40]。细胞间粘附因子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)可参与炎症,促进黏连,从而破坏血管壁^[41]。

3 总结与展望

通过总结发现, T2DM 及其微血管并发症实验中血糖指标应用率最高。各并发症也有其特有的高频应用生化指标:在 DN 实验中高频应用的生化指标为尿蛋白水平相关指标;DF 实验中高频应用的生化指标为 CRP、TNF- α 、IL-6 等;DR 实验中高频应用的生化指标为 VEGF、ICAM-1 等;DF 与 DR 实验采用的生化指标多为血清炎症因子。这些生化指标在不同并发症中变化趋势基本保持一致。

在 T2DM 及其微血管并发症的动物模型中, FPG 的成模标准明显高于糖尿病动物模型,因此提高成模标准,可以保证糖尿病并发症模型的稳定性和成功率;糖尿病不同的病变方向虽然具有相同的血脂异常趋势,但各并发症的血脂水平指标在成模前后变化范围却不尽相同,这是由于不同模型个体中各激素变化不同,从而导致的轻微差异。值得一提的是,有些相同的生化指标在不同的治疗方向中,变化趋势可能不同,因此在实验中需注意所选指标变化趋势与治疗方向是否匹配,例如在 DR 与 DF 实验中 VEGF 都为高频生化指标,但 VEGF 在 DR 实验中经治疗后血清中含量呈下降趋势,在 DF 实验中呈上升趋势,这是因为 DF 患者 VEGF 值下降,会导致血管生成受阻导致溃疡难以愈合^[42],所以在 DF 实验血清中 VEGF 表达增加,而 DR 患者视网膜黄斑水肿、视网膜、脉络膜新生血管生成都与 VEGF 表达增加相关,故 DR 治疗实验中,需降低 VEGF 的表达。

本研究选取 T2DM 及其微血管并发症的相关文献,并选择应用频率较高的生化指标与临床应用相结合进行总结,希望能给广大研究者们提供有价值的参考。

参 考 文 献(References)

[1] 谢秀英,雷涛,沙雯君,等.桑叶代茶饮联合二甲双胍对肺热津伤证 2 型糖尿病患者的临床疗效[J].中成药,2020,42(10):2627-2631.

Xie XY, Lei T, Sha WJ, et al. Clinical effects of Mori Folium drink as tea combined with metformin on patients with type 2 diabetes mellitus due to lung heat and fluid-humor injury [J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(10): 2627-2631.

[2] Faselis C, Katsimardou A, Imprialos K, et al. Microvascular complications of type 2 diabetes mellitus [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2020, 18(2): 117-124.

[3] Kim HJ, Kim KI. Blood pressure target in type 2 diabetes mellitus [J]. Diabetes Metab J, 2022, 46(5): 667-674.

[4] Chen C, Liu D. Establishment of zebrafish models for diabetes mellitus and its microvascular complications [J]. J Vasc Res, 2022, 59(4): 251-260.

[5] 高鹤轩,刘汇涛,王洪亮,等.不同海拔地区马鹿血液生理生化指标分析[J].黑龙江畜牧兽医,2022,654(18):136-140.

Gao HX, Liu HT, Wang HL, et al. Analysis of blood physiological and biochemical indexes of red deer at different altitudes [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2022, 654(18): 136-140.

[6] Deng X, Liu B, Li J, et al. Blood biochemical characteristics of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systemic review and meta-analysis [J]. Clin Chem Lab Med, 2020, 58(8): 1172-1181.

[7] 苏婉雯,徐剑容,宋新.空腹血糖、餐后 2 h 血糖结合糖化血红蛋白对于糖尿病视网膜病变风险价值评估[J].中国处方药,2022,20(6):104-106.

Su WW, Xu JR, Song X. Risk evaluation of fasting blood glucose, 2 h postprandial blood glucose combined with glycosylated hemoglobin for diabetic retinopathy [J]. J Chin Prescr Drug, 2022, 20(6): 104-106.

[8] 付平,冯春红,杨超.血脂异常对 2 型糖尿病发生发展的影响[J].西南医科大学学报,2018,41(3):287-290.

Fu P, Feng CH, Yang C. Association of dyslipidemia with the development and progression of type 2 diabetes [J]. J Southwest Med Univ, 2018, 41(3): 287-290.

[9] 汪峰,杨国珍,刘必,等.链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型稳定性观察[J].贵阳医学院学报,2012,37(1):40-42.

Wang F, Yang GZ, Liu M, et al. The stability of type 1 diabetes rat model induced by STZ and discussion on standards of successful modeling [J]. J Guiyang Med Coll, 2012, 37(1): 40-42.

[10] 中华医学会糖尿病学分会.中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J].中国实用内科杂志,2018,38(4):292-344.

Chinese Diabetes Society. Guidelines for prevention and control of type 2 diabetes in China (2017 Edition) [J]. Chin J Pract Intern Med, 2018, 38(4): 292-344.

[11] 夏荣平,马张庆,朱恩泽,等.格列喹酮联用瑞舒伐他汀钙对 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂的影响[J].通化师范学院学报,2022,43(10):57-62.

Xia RP, Ma ZQ, Zhu EZ, et al. Effects of gliquidone combined with rosuvastatin calcium on blood glucose and blood lipid in type 2 diabetic rats [J]. J Tonghua Norm Univ, 2022, 43(10): 57

- 62.
- [12] 许梦君, 郭翌, 陆芝兰. 消渴方基于 CN/NFAT 信号通路对 2 型糖尿病大鼠的干预效果研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(14): 1497-1502.
- Xu MJ, Guo Z, Lu ZL. Study on the intervention effect of Xiaoke Decoction on type 2 diabetic rats based on CN/NFAT signaling pathway [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2021, 30(14): 1497-1502.
- [13] 韩雪莹, 单国顺, 杨宇峰, 等. 益糖康对 2 型糖尿病模型大鼠糖脂代谢和肠道菌群的影响 [J]. 中医杂志, 2022, 63(1): 64-71.
- Han XY, Shan GS, Yang YF, et al. Effects of yitangkang on regulating glucose-lipid metabolism and intestinal microflora in type 2 diabetes model rats [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(1): 64-71.
- [14] 苗潇磊, 罗萍, 胡适可, 等. PSP 及 PSP1 对 2 型糖尿病大鼠血糖血脂水平的影响 [J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2022, 36(2): 101-104, 117.
- Miao XL, Luo P, Hu SK, et al. Effects of PSP and PSP1 on blood glucose and blood lipid levels in type 2 diabetes mellitus rats [J]. J Hubei Univ Sci Technol (Med Sci), 2022, 36(2): 101-104, 117.
- [15] 曾小艳, 李永平, 赵钰, 等. 覆盆子原花青素对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及抗氧化作用影响的研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2022, 36(1): 18-21.
- Zeng XY, Li YP, Zhao Y, et al. Study on the effect of raspberry proanthocyanidins on glucose and lipid metabolism and anti-oxidation in type 2 diabetic rats [J]. Res Pract Chin Med, 2022, 36(1): 18-21.
- [16] 周小莉, 路晰煊, 梁海艳, 等. 达格列净通过改善线粒体功能减轻 2 型糖尿病小鼠及高糖诱导的血管内皮细胞损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(3): 425-433.
- Zhou XL, Lu XX, Liang HY, et al. Dapagliflozin attenuates vascular endothelial cell injury in type 2 diabetic mice or induced by high glucose via improving mitochondrial function [J]. Chin J Pathophysiol, 2023, 39(3): 425-433.
- [17] 蔡志敏, 马宇鹏, 肖姗. 五苓散对 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢及心肌损伤保护作用研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(4): 474-479.
- Cai ZM, Ma YP, Xiao S. Study on the protecting effect of Wulingsan Decoction on glucose and lipid metabolism and myocardial injury in type 2 diabetic mice [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2022, 31(4): 474-479.
- [18] 李玉明, 廖程娟, 朱沅如, 等. 白藜中性多糖对 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢的作用 [J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(20): 12-17.
- Li YM, Liao CJ, Zhu YR, et al. Effect of neutral polysaccharide from *Acanthopanax trifoliatum* on glycolipid metabolism in type 2 diabetic mice [J]. Chin J Ethnomedic Ethnopharm, 2022, 31(20): 12-17.
- [19] 代昕玥, 葛炳钢, 张旭雯, 等. 茯砖茶改善 2 型糖尿病小鼠代谢紊乱的效果研究 [J]. 茶叶科学, 2022, 42(1): 63-75.
- Dai XY, Ge BG, Zhang XW, et al. Effect of fu brick tea on improving metabolic disorders in type 2 diabetes mice [J]. J Tea Sci, 2022, 42(1): 63-75.
- [20] 张葵之, 陈艳梅, 张燕, 等. 鞣花酸改善 2 型糖尿病小鼠脂肪组织胰岛素抵抗的实验研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(5): 544-547.
- Zhang YZ, Chen YM, Zhang Y, et al. Experimental study of ellagic acid on the improving insulin resistance in adipose tissue of type 2 diabetic mice [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(5): 544-547.
- [21] 白宇, 杨丽霞, 贺云, 等. 当归多糖通过 TLR4/NF- κ B 信号通路对糖尿病肾病大鼠的影响 [J]. 中成药, 2021, 43(3): 755-760.
- Bai Y, Yang LX, He Y, et al. Effect of angelica polysaccharide on diabetic nephropathy rats through TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(3): 755-760.
- [22] Sagoo MK, Gnudi L. Diabetic nephropathy: an overview [J]. Methods Mol Biol, 2020, 2067: 3-7.
- [23] Xiong Y, Zhou L. The signaling of cellular senescence in diabetic nephropathy [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 7495629.
- [24] 林婷婷. 利拉鲁肽调控 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制糖尿病肾病肾小球细胞外基质增生的研究 [D]. 福州: 福建医科大学; 2021.
- Lin TT. Liraglutide inhibition the proliferation of glomerular extracellular matrix in diabetic nephropathy through regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway [D]. Fuzhou: Fujian Medical University; 2021.
- [25] 黄海海. 尿蛋白与尿微量白蛋白联用对糖尿病肾病患者的临床检验价值及阳性率分析 [J]. 糖尿病新世界, 2022, 25(22): 59-62.
- Huang DH. Clinical test value and positive rate analysis of urinary protein combined with urinary microalbumin in patients with diabetic nephropathy [J]. Diabetes New World, 2022, 25(22): 59-62.
- [26] 李丽萍, 王君. 尿蛋白与糖尿病微血管病变关系的研究进展 [J]. 微循环学杂志, 2021, 31(2): 74-78.
- Li LP, Wang J. Research progress on the relationship between urinary protein and diabetic microangiopathy [J]. Chin J Microcirc, 2021, 31(2): 74-78.
- [27] 柴蔚霞. 足细胞及信号转导系统对蛋白尿形成的机制探析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(40): 108-109.
- Chai WX. Mechanism of podocyte and signal transduction system on proteinuria [J]. World Latest Med Inf, 2019, 19(40): 108-109.
- [28] 邢丽娜, 姚卫国, 王浩, 等. 血清 Klotho 水平与早期糖尿病肾病足细胞损伤的相关研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(4): 310-312.
- Xing LN, Yao WG, Wang H, et al. The relationships of Klotho and podocyte injury in the patients with early diabetic nephropathy [J]. Chin J Integr Tradit West Med Nephrol, 2019, 20(4): 310-312.

- [29] 徐静琳, 孔祥静, 韩颖敏, 等. 舒洛地特调控 miR-27a 介导自噬调控糖尿病肾病足细胞损伤机制研究 [J]. 中国现代医生, 2021, 59(14): 39–44, 193.
Xu JL, Kong XJ, Han YM, et al. Mechanism research of sulodexide in regulating miR-27a-mediated autophagy in regulation of podocyte injury in diabetic nephropathy [J]. Chin Mod Dr, 2021, 59(14): 39–44, 193.
- [30] 鄞莹. 糖尿病足与血清肿瘤坏死因子关系研究 [J]. 中国现代医生, 2018, 56(34): 26–28.
Yin Y. Study on the relationship between diabetic foot and serum tumor necrosis factor [J]. Chin J Modern Med, 2018, 56(34): 26–28.
- [31] 王钧, 匡霞, 林立平. C 反应蛋白与糖尿病足 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(36): 146–147.
Wang J, Kuang X, Lin LP. C-reactive protein and diabetic foot [J]. Guide Chin Med, 2012, 10(36): 146–147.
- [32] Dominguez H, Storgaard H, Rask-Madsen C, et al. Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor- α blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes [J]. J Vasc Res, 2005, 42(6): 517–525.
- [33] 姚建波. 血清 VCAM-1、IL-6 水平与糖尿病足患者临床分级的关系 [J]. 哈尔滨医药, 2022, 42(6): 66–67.
Yao JB. Relationship between serum VCAM-1 and IL-6 levels and clinical classification of diabetic foot patients [J]. Harbin Med J, 2022, 42(6): 66–67.
- [34] 段旭东, 赵辉, 高璇, 等. 清利活血汤配合三黄生肌纱条对糖尿病足溃疡大鼠血浆及肉芽组织中白介素-1、内皮素-1 及一氧化氮含量的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(4): 1041–1043.
Duan XD, Zhao H, Gao X, et al. Effects of Qingli Huoxue Decoction combined with Sanhuang Shengji gauze on the contents of interleukin-1, endothelin-1 and nitric oxide in plasma and granulation tissue of diabetic foot ulcer rats [J]. Chin J Gerontol, 2015, 35(4): 1041–1043.
- [35] 陈锦晖, 林曦. 康柏西普注射液联合复方血栓通胶囊对增殖性糖尿病视网膜病变患者最佳矫正视力及氧化应激反应的影响 [J]. 糖尿病新世界, 2022, 25(23): 27–30.
Chen JH, Lin X. Effect of Compazepine injection combined with compound thromboxane capsule on best corrected visual acuity and oxidative stress response in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. Diabet New World, 2022, 25(23): 27–30.
- [36] Yang Y, Liu Y, Li Y, et al. microRNA-15b targets VEGF and inhibits angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2020, 105(11): 3404–3415.
- [37] Zhang D, Lv FL, Wang GH. Effects of HIF-1 α on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(16): 5071–5076.
- [38] 鹿秋玉, 李才锐, 孙曙光. IL-6 与糖尿病性视网膜膜变的相关研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2015, 15(1): 52–54.
Lu QY, Li CR, Sun SG. Research progress of IL-6 and diabetic retinopathy [J]. Int Eye Sci, 2015, 15(1): 52–54.
- [39] 王伟, 李孝才. 糖尿病视网膜病变与超氧化物歧化酶活性值的关系 [J]. 武警医学, 2018, 29(8): 784–785, 789.
Wang W, Li XC. Relationships between superoxide dismutase activity and diabetic retinopathy [J]. Med J Chin PAP, 2018, 29(8): 784–785, 789.
- [40] 董文, 颀瑞萍, 刘勤, 等. 益气养阴方对糖尿病视网膜病变患者中 SOD 和 MDA 表达的影响 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(20): 145–147.
Dong W, Jie RP, Liu Q, et al. Effect of Yiqi Yangyin Recipe on the expression of MDA and SOD in patients with diabetic retinopathy [J]. Asia Pac Tradit Med, 2017, 13(20): 145–147.
- [41] 赵云, 张珍丽, 吕娜. 通阳开窍法针刺对非增生性糖尿病视网膜病变患者 VEGF、sICAM-1、TNF- α 因子的影响 [J]. 国医论坛, 2022, 37(6): 21–23.
Zhao Y, Zhang ZL, Lv N. Influence of the method of Tongyang Kaiqiao acupuncture on VEGF, sICAM-1 and TNF- α factors of patients with non-proliferative diabetes retinopathy [J]. Forum Tradit Chin Med, 2022, 37(6): 21–23.
- [42] Deshpande MS, Kuchroo PV. A novel dermal tissue construct: development and in vitro characterization [J]. Biotechnol Prog, 2010, 26(5): 1424–1430.

[收稿日期] 2023-03-20

袁晞钒,付琼怡,苗明三. 基于数据挖掘的青光眼动物模型的应用特点分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1439-1446.
Yuan XF, Fu QY, Miao MS. Application and characteristics of a glaucoma animal model based on data mining [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1439-1446.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.008

基于数据挖掘的青光眼动物模型的应用特点分析

袁晞钒¹,付琼怡¹,苗明三^{1,2*}

(1. 河南中医药大学中医药科学院,郑州 450046;2. 河南中医药大学,郑州 450046)

【摘要】 目的 研究青光眼动物模型应用情况,为其动物实验方法和模型完善提供参考。**方法** 以“青光眼”和“动物模型”为主题词,在中国知网、PubMed 中收集 2012 年 11 月 1 日 ~ 2022 年 11 月 2 日青光眼动物模型的相关文献,总结实验动物种类、性别、造模方法、检测指标等,建立数据库进行统计分析。**结果** 共筛选得到符合标准的 400 篇文献,其中实验动物多为 C57BL/6J 小鼠,动物性别以雄性居多;造模方法多采用前房注射物质诱导型、转基因型和激光光凝诱导型;高频检测指标主要包括眼压测量、组织病理、蛋白免疫印迹和免疫组化。**结论** 目前青光眼动物模型造模方法种类较多,但是相关中医因素干预较少,建议增加病证结合的青光眼动物模型。本研究通过对青光眼动物模型实验进行挖掘分析,对不同动物模型进行评估,通过挖掘内容为构建建模成功率高、重现性好、与临床吻合度高的动物模型提供参考,为模型完善提供思路。

【关键词】 青光眼动物模型;数据挖掘;造模要素;应用分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1439-08

Application and characteristics of a glaucoma animal model based on data mining

YUAN Xifan¹, FU Qiongyi¹, MIAO Mingsan^{1,2*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

Corresponding author: MIAO Mingsan. E-mail:miaomingsan@163.com

【Abstract】 Objective To study the application of an animal model of glaucoma and provide a reference for improved animal experimental method and models. **Methods** We searched the CNI and PubMed databases using the terms “glaucoma” and “animal models” to identify studies related to animal models of glaucoma from 2012 to 2022. The study species, sex, modeling method, and detection indexes were summarized, and a database was established for statistical analysis. **Results** In total, 400 articles conforming to the criteria were selected. Most of the experimental animals were C57BL/6J mice and most of them were male. The most common modeling method were anterior chamber injection-induced, transgenic, and laser photocoagulation-induced models. The most frequent detection indicators included intraocular pressure measurement, histopathology, Western Blot analysis, and immunohistochemistry. **Conclusions** Numerous method have been used to construct glaucoma animal models, but the intervention of related traditional Chinese medicine factors is less. It is suggested to increase the glaucoma animal model combined with disease and syndrome. This study evaluated different animal models of glaucoma by data mining to provide references for the construction of animal models with high modelling-success rates, good reproducibility, and high clinical coincidence, as well as providing ideas for model improvement.

【Keywords】 animal model of glaucoma; data mining; moulding element; application analysis

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

【基金项目】 国家自然科学基金(80274038),岐黄学者(国中医药人教函 2022-6),河南省重大公益专项(201300310100)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (80274038), Scholar Qihuang (Chinese Medicine Education Letter 2022-6), Major Public Welfare Project of Henan Province (201300310100).
【作者简介】 袁晞钒,女,在读硕士研究生,研究方向:药理学。Email: yuanxifan2021@163.com
【通信作者】 苗明三(1965—),男,教授,博士,研究方向:中药药理学。Email: miaomingsan@163.com

青光眼是一种视神经头改变、视网膜神经节细胞(retinal ganglion fine the cell, RGC)逐渐死亡、视野丧失的进行性神经病变。眼压升高是主要的危险因素^[1]。青光眼是一种发病原因复杂的高致盲性眼病。全球 40 ~ 80 岁人群中青光眼患病率为 3.5%,随着老年人在人口中的数量和比例不断增加,预计到 2040 年将有 1.118 亿人患有青光眼^[2]。目前,青光眼尚无根治方法,所有的治疗方法都以降低眼压(intraocular pressure, IOP)为目标^[3]。降低眼压是该病目前唯一可行的治疗方法^[4]。西医对青光眼的发病机制尚未明确,中医将其归属为“五风内障”的范畴,认为该病发病与情志等多因素相关^[5]。青光眼致盲给患者带来了巨大的疾病负担和经济负担。因此研究有效的治疗方法和药物至关重要,而理想的动物模型是进一步研究青光眼的重要工具。本文通过对青光眼动物模型进行归纳总结分析,为青光眼动物模型的完善提供思路,以便能更好地应用于后续的研究中。

1 资料与方法

1.1 数据来源

在中国知网、PubMed 中以“青光眼”“动物模型”为主题词进行检索,锁定检索年限 2012 年 11 月 1 日~2022 年 11 月 2 日的期刊文献建立数据库,共检索出 1088 篇文献。

1.2 纳入标准

选择“青光眼”动物模型应用研究相关的实验性文献,筛选造模方法完整及实验过程清晰的文章,最终筛选得到符合标准的 400 篇文献。

1.3 排除标准

排除造模方法不全;会议、报纸、硕博学位论文、综述等文献及青光眼相关体外实验。

1.4 数据规范

实验动物名称、种类等均参照《实验动物和动物实验技术》^[6]进行规范总结。

1.5 数据处理及分析

将纳入标准的 400 篇文献的实验动物种类、性别、造模方法、检测指标等数据录入 Excel 表,建立青光眼动物模型数据库。使用 Excel 2019 进行统计学处理与分析。

2 结果

2.1 青光眼模型动物种系应用情况

将涉及青光眼动物模型的 400 篇文献中的实验动物进行分类,总频次为 400。总共 24 类动物,最多的为 C57BL/6J 小鼠(86 次;21.50%)、SD 大鼠(58 次;14.50%)、DBA/2J 小鼠(49 次;12.25%),具体见图 1。

本研究中,通过统计得到青光眼造模动物主要为鼠类。主要原因是:啮齿类动物的眼睛和人类的眼睛有许多重要的生物学相似性^[7]。其中小鼠占比较高。研究表明 C57BL/6J 小鼠的视网膜更易损伤,视网膜厚度减少,血管损伤更严重^[8]。DBA/2J 小鼠青光眼模型是一种近交系,随着年龄的增长逐渐发展为青光眼样异常。在前房,小鼠出现一种色素分散综合征,其主要作用是炎症反应,导致眼压升高。DBA/2J 小鼠有两种不同的表型:虹膜色素分散(可能与 DBA/2J 眼睛的免疫功能障碍有关)和虹膜色素转移(可能与虹膜色素转移有关)^[9]。

2.2 青光眼模型动物性别分布情况

将 400 篇文献中所涉及的实验动物性别进行分类规范,统计得出模型动物性别分布,有 38 例未对动物性别做出标记,明确标明性别的雄性动物 150 例、占 37.50%;雌雄各半动物 90 例、占 22.50%;雌性动物 67 例、占 16.75%;雌雄不限动物 55 例、占 13.75%。上述结果显示,动物性别以雄性居多,Ha 等^[10]研究发现雄激素睾酮可能与青光眼的发病机制有关。

2.3 青光眼模型造模方法

统计 400 篇文献中使用的青光眼模型造模方法,共有 12 种造模方法。前房注射物质诱导型(127 次;31.75%),转基因型(104 次;26.00%)、激光光凝诱导型(56 次;14.00%)最多。前房注射物质诱导型以微球注射前房(90 次;22.50%)、水凝胶注射(25 次;6.25%)较多;激光光凝诱导型以氩激光光凝小梁网(30 次;7.50%)、二极管激光光凝角巩膜缘和上巩膜静脉(18 次;4.50%)较多。详细造模情况见表 1。

从造模方法选择方面,前房注射物质诱导型为使用最多的方法,其中以微球注射前房最多,其次为转基因型、激光光凝诱导型。眼压升高是青光眼的主要危险因素,因此开发和使用眼压升高的动物模型进行青光眼研究是有意义的。在前房注入聚苯乙烯微珠(微球),是导致眼压升高、房水流出的主要物理阻塞^[28]。DBA/2J 小鼠和其他转基因模型与人类青光眼有许多相似之处,不同个体眼压升高、视网膜和视神经损伤的反应较为一致,个体差

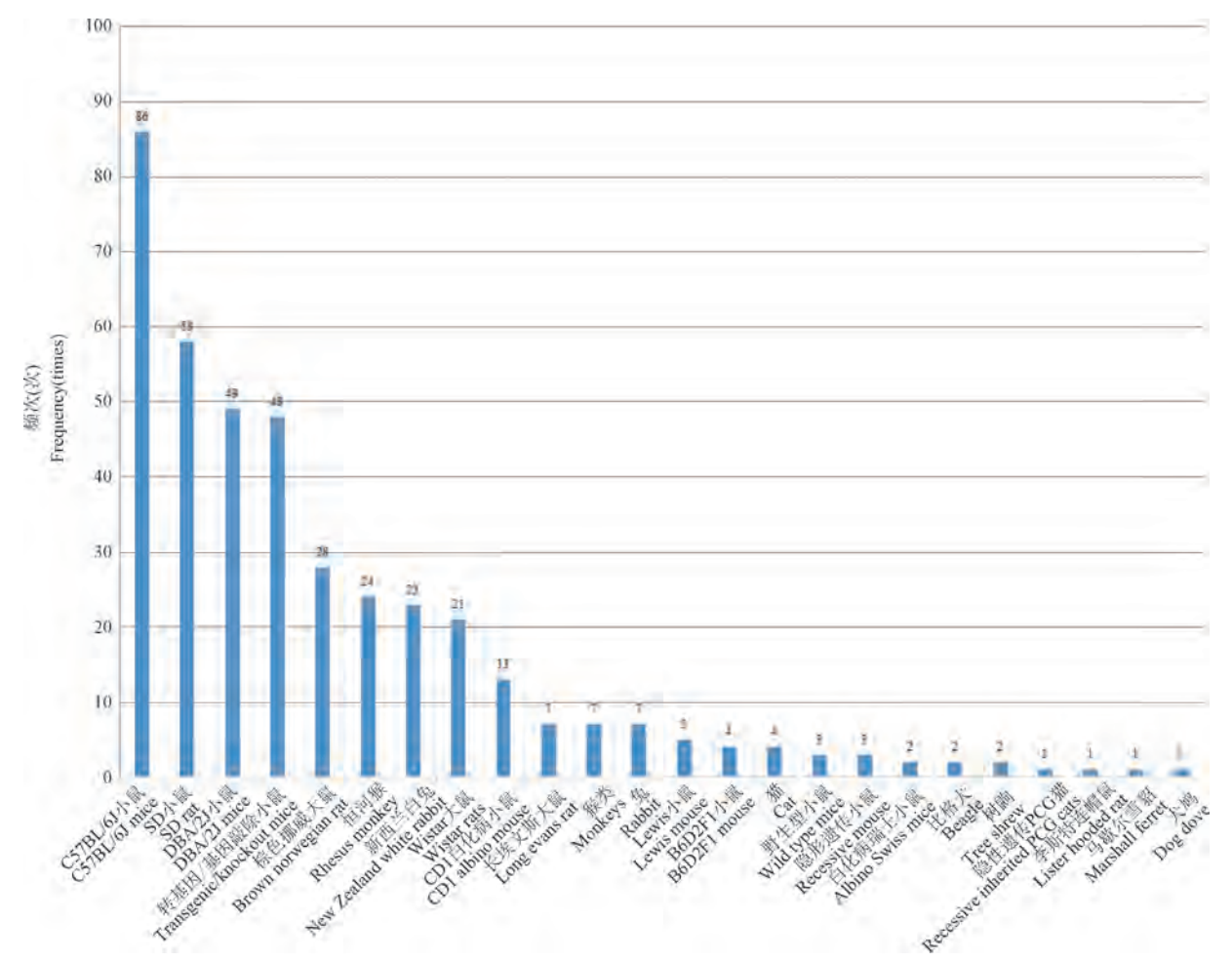


图 1 青光眼动物模型实验动物种类及频次
Figure 1 Species and frequency of experimental animals in animal model of glauco

表 1 青光眼动物模型造模方法及频次
Table 1 Method and frequency of animal model of glaucoma

造模类型 Mold type	造模方法 Molding method	造模周 期(周) Molding cycle (weeks)	频数(次) Frequency (times)	文献占 比(%) Literature ratio (%)
前房注射物质诱导型 Anterior chamber injection induced type	前房注射 2 μ L 粒径为 6 μ m 聚苯乙烯微球和 1 μ L 透明质酸钠 ^[11] 2 μ L 6 μ m polystyrene microspheres and 1 μ L sodium hyaluronate were injected into the anterior chamber ^[11]	8	90	22. 50
	将由 HyStem 和 Extralink 以 4 : 1 的比例组成的 7 μ L 水凝胶注入前房 ^[12] A 7 μ L hydrogel composed of HyStem and Extralink in a 4 : 1 ratio was injected into the anterior chamber ^[12]	4	25	6. 25
	每眼先用微量进样器抽取房水,随后注射复方卡波姆溶液缓慢进入前房 ^[13] Aqueous humor was extracted from each eye with a microsampler, followed by injection of compound carbomer solution into the anterior chamber slowly ^[13]	4	10	2. 50
	无菌盐水中制备的新鲜 α -胰凝乳蛋白酶溶液,通过套管灌入后房 ^[14] Fresh α -chymotrypsin solution prepared from sterile saline solution was injected into the posterior chamber through a cannula ^[14]	2	2	0. 50

续表 1

造模类型 Mold type	造模方法 Molding method	造模周 期(周) Molding cycle (weeks)	频数(次) Frequency (times)	文献占 比(%) Literature ratio (%)
转基因型 Transgene type	DBA/2J 小鼠在 8 ~ 9 月龄开始出现视网膜神经节细胞凋亡和视神经的变性。18 月龄时,90% 以上的视神经严重变性及视功能丧失 ^[15] The apoptosis of retinal ganglion cells and degeneration of optic nerve began in DBA/2J mice at 8 ~ 9 months of age. At 18 months of age, more than 90% of the optic nerve had severe degeneration and loss of visual function ^[15]	36	104	26.00
激光光凝诱导型 Laser photocoagulation induction type	氩激光光凝小梁网中段 60 ~ 150 处,首次光凝 2 周后,对眼压低于 30 mmHg 剩余的小梁网部分再次进行激光光凝 ^[16] Argon laser photocoagulation was performed at 60 ~ 150 points in the middle part of the trabecular network. After 2 weeks of initial photocoagulation, laser photocoagulation was performed again on the remaining trabecular network with intraocular pressure below 30 mmHg ^[16]	24	30	7.50
	接受二极管激光光凝角巩膜缘和上巩膜静脉 ^[17] Receiving diode laser photocoagulation of corneoscleral margin and superior scleral vein ^[17]	4	18	4.50
	诱导角膜缘和 3 个巩膜外静脉光凝 ^[18] Photocoagulation of limbus cornea and three external scleral veins was induced ^[18]	4	8	2.00
巩膜上静脉高渗盐水注射诱导型 Supraceral vein hypertonic saline injection induced type	选择较大、分支少的上巩膜静脉,将其与巩膜分离后,插入一个连接注射器的玻璃微针,缓慢注射高渗盐水 50 μL 到巩膜上静脉以硬化小梁网 ^[19] The superior scleral vein with large size and few branches was separated from the sclera, and a glass microneedle connected to a syringe was inserted to slowly inject hypertonic saline 50 μL into the superior scleral vein to harden the trabecular network ^[19]	4	28	7.00
巩膜上静脉烙闭诱导型 Supraceral vein cautery induction type	充分暴露巩膜上静脉,烧灼静脉主干使静脉封闭 ^[20] The supraceral vein is fully exposed and the main vein is cauterized to seal the vein ^[20]	4	19	4.75
滤过手术模型 Filter operation model	小梁切除术、全层巩膜咬切术、植管手术 ^[21] Trabeculectomy, scleral bite and tube grafting ^[21]	4	17	4.25
视网膜缺血/再灌注损伤诱导型 Retinal ischemia/ reperfusion injury induced type	注射内皮素-1 2.5 nmol/L 或选择性结扎大鼠眼血管 ^[22] The eye vessels of rats were injected with endothelin-1 at 2.5 nmol/L or ligation selectively ^[22]	48 h	15	3.75
遗传型 Genotype	常染色体隐性遗传病,多在 9 ~ 18 个月大时发病 ^[23] Autosomal recessive genetic disease, most in 9 ~ 18 months of age when the onset ^[23]	36	8	2.00
环角巩膜缘缝合诱导型 Annular horn scleral suture induction type	用尼龙缝合线在眼球赤道部周围的结膜上进行环形缝合,不穿透巩膜,打一个活结将缝合线系紧,通过调节活结的松紧度调整眼压 ^[24] A circular suture is made on the conjunctiva around the equator of the eyeball with nylon sutures, without penetrating the sclera. A slipknot is tied to tighten the sutures, and the pressure is adjusted by adjusting the tightness of the slipknot ^[24]	2	7	1.75
视神经机械损伤诱导型 Optic neuromechanical injury induction type	视神经横断或挤压模型 ^[25] Optic nerve transection or compression model ^[25]	4	7	1.75
类固醇药物诱导型 Steroid-induced	局部或全身使用类固醇药物 ^[26] Topical or systemic use of steroid medications ^[26]	4	6	1.50
玻璃体内注射兴奋性毒 性物质 Vitreous injection of excitatory toxic substances	注射谷氨酸、N-甲基天冬氨酸、内皮素-1 等 ^[27] Glutamic acid, N-methyl aspartic acid, endothelin-1 and so on were injected ^[27]	4	6	1.50

异较小。而且转基因动物有助于识别各基因之间的相互作用^[29]。激光光凝诱导型以与氩激光光凝小梁网、二极管激光光凝角巩膜缘和上巩膜静脉较多。相比氩激光,二极管激光产生更深更大的斑尺寸病变,导致小梁网损伤更大,眼压升高明显^[30]。巩膜上静脉高渗盐水是以硬化小梁网,增加房水流出阻力,从而达到升高眼压的作用,但是此方法操作难度大,眼压升高不稳定,需要重复注射^[31]。巩膜上静脉烙闭诱导型比激光光凝法侵入性更小,且不会引起前房并发症。由于具有的其有效性和可及性,实验性青光眼的大多数结构和功能研究都使用了这种方法。该模型中的眼压升高被认为涉及到流出阻力增加^[32]。环角巩膜缘缝合是一种简单、微创、经济有效的造模方法,可诱导大鼠和小鼠的眼压升高,损伤神经节细胞^[33]。前房穿刺法与植管法均能成功建立大鼠青光眼滤过手术动物模型,且植管法更有利于观察滤过泡形态及瘢痕形成情况,也可用于青光眼术后抗瘢痕相关研究^[34]。视神经损伤模型是引起 RGCs 凋亡的青光眼研究常用的动物模型。它可以在模拟视神经损伤的病理变化的同时,不影响视网膜动脉、静脉功能和血液供应^[35]。类固醇诱导的高眼压青光眼动物模型价格低廉且无创,但是与人类解剖学有差异^[36]。各种自发性青光眼模型前后已经在不同的动物物种中被描述过。

这些动物物种包括兔子、狗、猴子、小鼠、大鼠和猫。被研究的这些模型为青光眼的病理生理学提供了有价值的信息^[37]。

2.4 青光眼动物模型检测指标

统计纳入标准的 400 篇文献中青光眼动物模型的检测指标,若检测指标为同一个组织的多个同类型指标,则归为一类,不再分开统计,如血清中同时检测 CRP、PCT、IL-1 和 IL-6 水平等,则把这些指标统称为血清指标,同一实验只计入一次。统计结果表明,400 篇实验文献涵盖种不同的指标类型,累计频数 818 次。其中检测较多的指标为眼压测量、组织病理(视网膜、视神经、眼球、房角)、蛋白质印迹分析(视网膜、眼睛、视网膜神经节、β-肌动蛋白、免疫球蛋白 G、RhoA、ROCK、Caspase-3)、免疫组化(视网膜、视网膜视神经节、视神经、眼睛、脑、纤连蛋白、α 平滑肌肌动蛋白)、RGCs 计数、实时荧光定量、视网膜电图、光学相干断层扫描 CT(眼睛、视网膜)等。检测指标分类使用频率(每种频率通过四舍五入,保留小数点后两位),见表 2。

高频的青光眼动物模型检测指标为眼压测量占 22.49%,组织病理检查占 12.59%,蛋白免疫印迹法检查占 12.22%,免疫组化检查占 11.98%,RGCs 计数占 9.41%、实时荧光定量占 7.70%、视网膜电图占 4.77%,是评价青光眼动物模型成功的重

表 2 模型检测指标及使用频率

Table 2 Model detection indicators and usage frequency

检测指标 Detection index	频数(次) Frequency (times)	频率(%) Frequency (%)
眼压测量 Tonometry	184	22.49
组织病理(视网膜、视神经、眼球、房角) Histopathology (retina, optic nerve, eyeball, atrial angle)	103	12.59
蛋白免疫印迹(视网膜、眼睛、视网膜神经节、β-肌动蛋白、免疫球蛋白 G、RhoA、ROCK、Caspase-3) Western Blot (retina, eye, retinal ganglion, β-actin, immunoglobulin G, RhoA, ROCK, Caspase-3)	100	12.22
免疫组化(视网膜、视网膜视神经节、视神经、眼睛、脑、纤连蛋白、α 平滑肌肌动蛋白) Immunohistochemistry (retina, retinal optic ganglion, optic nerve, eye, brain, fibronectin, α smooth muscle actin)	98	11.98
RGCs 计数 RGCs count	77	9.41
实时荧光定量 Real-time fluorescence quantification	63	7.70
视网膜电图 Electroretinogram	39	4.77
光学相干断层扫描 CT(眼睛、视网膜) Optical coherence tomography CT (eye, retina)	34	4.16
电子显微镜(视网膜、视神经) Electron microscope (retina, optic nerve)	23	2.81
凋亡细胞检测 Apoptotic cell detection	22	2.69

续表 2

检测指标 Detection index	频数(次) Frequency(times)	频率(%) Frequency(%)
视神经轴突计数 Axon count of optic nerve	20	2.44
酶联免疫测(胶原蛋白 1、纤连蛋白、 α -SMA、NO 水平、TGF- β 的浓度、血清 NLRP3、IL-6、IL-8、TNF- α 、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、TNF、IL-1 β 、MCP-1、血清 IgG、半胱天冬酶-3、硝基酪氨酸含量、TNF- α) Enzyme-linked immunoassay(collagen 1, fibronectin, α -SMA, NO level, TGF- β concentration, serum NLRP3, IL-6, IL-8, TNF- α , malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase(SOD), TNF, IL-1 β , MCP-1, serum IgG, caspase-3, nitrotyrosine content, TNF- α)	19	2.32
裂隙灯检查(眼睑、前房、眼球) Slit-lamp examination(eyelid, anterior chamber, eyeball)	15	1.83
线粒体 DNA 含量的测量、密度和大小定量、功能测定 Mitochondrial DNA content measurement, density and size quantitative, functional determination	8	0.98
房水流出检测 Aqueous humor outflow detection	8	0.98
定量逆转录聚合酶链反应乳酸脱氢酶测定 Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction lactate dehydrogenase assay	5	0.61

要指标。在临床治疗中,眼压测量和视网膜形态是患者疾病发展和转归的重要参考依据,因此在未来的动物模型应用中,建议将眼压测量和视网膜形态改变作为重要指标考察,并参照临床检测标准制定符合青光眼动物模型的检测指标。

3 模型成功标准

目前,西医对于青光眼动物模型评价指标以病理指标、表观指标为主,经过对近 10 年青光眼动物实验统计分析拟定青光眼动物模型制备成功判断标准。具体见表 3。

表 3 青光眼动物模型成功判断标准

Table 3 Criteria for successful judgment of animal models of glaucoma

分类 Cassification	模型成功后趋势 Trend after model success
表观指标 Apparent index	眼压升高;房角形态改变(堵塞小梁网结构,正常虹膜形态消失);眼前节检查(裂隙灯下可见角膜钙化斑、虹膜色素脱失、瞳孔移位、眼前房内的房水混浊) Increased intraocular pressure; Changes in angular shape (blockage of trabecular mesh structure, disappearance of normal iris shape); Anterior segmental examination(corneal calcification spot, iris pigment loss, pupil displacement, and cloudy aqueous humor in anterior chamber can be seen under slit lamp)
病理指标 Pathological index	视网膜厚度及形态(视网膜各层组织均变薄、内丛状层厚度减少,内外核层融合为一层,细胞排列紊乱,神经节细胞明显减少) Retinal thickness and morphology (all retinal layers were thinner, the inner plexus layer was less thick, the inner and outer nuclear layers were fused into one layer, the cell arrangement was disordered, and the ganglion cells were significantly reduced)

4 讨论

青光眼是一种视神经病变,包括一系列神经退行性疾病,最终由于 RGC 功能障碍和退行性病变导致不可逆失明。青光眼属于中医“五风内障”的范畴,其代表不同的青光类型,绿风内障相当于原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma, PACG),而青风内障类似于原发性开角型青光眼 (primary open-angle glaucoma, POAG)^[38]。本病的发生与脏腑、气、血、津液紊乱密切相关^[39]。目前青光眼的临床护理标准是通过药物或手术方法降低 IOP 治疗;然而,即使 IOP 得到充分控制,眼压降低也不足以阻止患者的进行性视野丧失^[40]。因此,迫切需要开发更安全有效的青光眼治疗方法^[41]。青光眼的新治疗策略需要开发功能性的、可重复的、易于使用的、低成本的动物模型用于临床前研究。此外,这些模型应该模拟人类青光眼过程中出现的情况^[42]。因此需要进一步的实验动物研究,为治疗药物筛选奠定基础。

综上所述,根据统计结果显示,目前研究者们较多选择的实验动物为 C57BL/6J 小鼠,性别多为雄性,造模方法以前房注射物质诱导型、转基因型、激光光凝诱导型最多。相关模型指标:检测眼压测量、组织病理、蛋白免疫印迹、免疫组化最多。青光眼动物模型发病机制复杂,目前研究结果表明青光眼发病过程中涉及 3 个功能类:线粒体、应激和核蛋白,表明在视网膜神经退行性过程中能量代谢、应激反应和基因表达改变的损伤^[43]。因此可以考虑

从以上方面进行青光眼动物模型研究。理想的青光眼动物模型应能模拟人类青光眼的形态学、病理生理学及生化指标,具有类似的生物学机制,对其治疗药物有类似的药效反应,而以上模型尚不能达到此要求。但从解剖结构、生理功能及病理特点考虑,与西医青光眼定义与诊断存在较好的吻合度。目前中医病证结合的青光眼动物模型尚无统一标准,建议未来增加相关方面研究,更加有利于建立符合青光眼临床研究特点的实验动物模型与评估标准,将会有力推进中西医结合治疗青光眼的发展趋势^[44]。

参 考 文 献 (References)

- [1] Reinehr S, Reinhard J, Wiemann S, et al. Transfer of the experimental autoimmune glaucoma model from rats to mice-new options to study glaucoma disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (10): 2563.
- [2] Chong RS, Crowston JG, Wong TT. Experimental models of glaucoma filtration surgery [J]. *Acta Ophthalmol*, 2021, 99 (1): 9-15.
- [3] Jassim AH, Cavanaugh M, Shah JS, et al. Transcorneal electrical stimulation reduces neurodegenerative process in a mouse model of glaucoma [J]. *Ann Biomed Eng*, 2021, 49(2): 858-870.
- [4] Donahue RJ, Fehrman RL, Gustafson JR, et al. BCLX_L gene therapy moderates neuropathology in the DBA/2J mouse model of inherited glaucoma [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(8): 781.
- [5] 彭清华. 中医眼科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2012. Peng QH, *Ophthalmology of traditional Chinese medicine* [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press; 2012.
- [6] 苗明三. 常用医药研究动物模型 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2007. Miao MS. *Commonly used medical research animal models* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2007.
- [7] Pang IH, Clark AF. Inducible rodent models of glaucoma [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2020, 75: 100799.
- [8] Shi H, Ebrahim AS, Berger EA. A Contrast in Pathogenic Responses between C57BL/6J and BALB/cJ mice using a model of retinal injury [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188 (12): 2717-2728.
- [9] Wirtz MK, Keller KE. The role of the IL-20 subfamily in glaucoma [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 4083735.
- [10] Ha JS, Lee HS, Park JY, et al. Relationship between androgen deprivation therapy and normal-tension glaucoma in patients with prostate cancer: a nationwide cohort study [J]. *Yonsei Med J*, 2022, 63(10): 908-914.
- [11] Wareham LK, Dordea AC, Schleifer G, et al. Increased bioavailability of cyclic guanylate monophosphate prevents retinal ganglion cell degeneration [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 121: 65-75.
- [12] Yang X, Hondur G, Tezel G. Antioxidant treatment limits neuroinflammation in experimental glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(4): 2344-2354.
- [13] Liu H, Xiu Y, Zhang Q, et al. Silencing microRNA-29b-3p expression protects human trabecular meshwork cells against oxidative injury via upregulation of RNF138 to activate the ERK pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(6): 101.
- [14] Adelli GR, Bhagav P, Taskar P, et al. Development of a $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol amino acid-dicarboxylate prodrug with improved ocular bioavailability [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(4): 2167-2179.
- [15] 李银鑫, 蒋鹏飞, 曾志成, 等. 青光安 II 号方有效组分对青光眼模型 DBA/2J 小鼠视网膜中 RhoA、ROCK 及 Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(6): 673-678. Li YX, Jiang PF, Zeng ZC, et al. Effects of the effective component of qingguang' an II on the expression of RhoA, ROCK and caspase-3 protein in the retina of DBA/2J mice with glaucoma [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2020, 40(6): 673-678.
- [16] Gu L, Kwong JM, Caprioli J, et al. DNA and RNA oxidative damage in the retina is associated with ganglion cell mitochondria [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 8705.
- [17] de Gracia P, Gallego BI, Rojas B, et al. Automatic counting of microglial cells in healthy and glaucomatous mouse retinas [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143278.
- [18] Léger-Charnay E, Gambert S, Martine L, et al. Retinal cholesterol metabolism is perturbed in response to experimental glaucoma in the rat [J]. *PLoS One*, 2022, 17(3): e0264787.
- [19] McGrady NR, Minton AZ, Stankowska DL, et al. Upregulation of the endothelin A (ETA) receptor and its association with neurodegeneration in a rodent model of glaucoma [J]. *BMC Neurosci*, 2017, 18(1): 27.
- [20] Zhao N, Shi J, Xu H, et al. Baicalin suppresses glaucoma pathogenesis by regulating the PI3K/AKT signaling *in vitro* and *in vivo* [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 10187-10198.
- [21] Chong RS, Crowston JG, Wong TT. Experimental models of glaucoma filtration surgery [J]. *Acta Ophthalmol*, 2021, 99 (1): 9-15.
- [22] Xu Y, Yang B, Hu Y, et al. Wogonin prevents TLR4-NF- κ B-mediated neuro-inflammation and improves retinal ganglion cells survival in retina after optic nerve crush [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(45): 72503-72517.
- [23] Oikawa K, Ver Hoeve JN, Teixeira LBC, et al. Sub-region-specific optic nerve head glial activation in glaucoma [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(6): 2620-2638.
- [24] Fernando O, Tagalakakis AD, Awad S, et al. Development of targeted siRNA nanocomplexes to prevent fibrosis in experimental glaucoma filtration surgery [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(12): 2812-2822.
- [25] Jia Y, Jiang S, Chen C, et al. Caffeic acid phenethyl ester attenuates nuclear factor- κ B-mediated inflammatory responses in

- Müller cells and protects against retinal ganglion cell death [J]. Mol Med Rep, 19(6): 4863–4871.
- [26] Overby DR, Clark AF. Animal models of glucocorticoid-induced glaucoma [J]. Exp Eye Res, 2015, 141: 15–22.
- [27] Shiozawa AL, Igarashi T, Kobayashi M, et al. Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in an inner retinal injury model induced by intravitreal injection of N-methyl-D-aspartate (NMDA) [J]. Mol Vis, 2020, 26: 409–422.
- [28] Pang IH, Clark AF. Inducible rodent models of glaucoma [J]. Prog Retin Eye Res, 2020, 75: 100799.
- [29] Harada C, Kimura A, Guo X, et al. Recent advances in genetically modified animal models of glaucoma and their roles in drug repositioning [J]. Br J Ophthalmol, 2019, 103(2): 161–166.
- [30] Biswas S, Wan KH. Review of rodent hypertensive glaucoma models [J]. Acta Ophthalmol, 2019, 97(3): e331–e340.
- [31] 熊亚妮, 孟永, 钱仪敏, 等. 青光眼动物模型与人体发病机制的相关性研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31(3): 231–236.
- Xiong YN, Meng Y, Qian YM, et al. Research progress on relationship between animal model of glaucoma and human pathogenesis [J]. Chin J New Drugs, 2022, 31(3): 231–236.
- [32] Evangelho K, Mastronardi CA, de-la-Torre A. Experimental models of glaucoma: a powerful translational tool for the future development of new therapies for glaucoma in humans—a review of the literature [J]. Medicina (Kaunas), 2019, 55(6): 280.
- [33] 宋硕, 孟永, 李华. 青光眼动物模型在青光眼研究中的应用 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2021, 41(12): 1850–1855.
- Song S, Meng Y, Li H. Application of glaucoma animal model in glaucoma study [J]. J Nanjing Med Univ(Nat Sci), 2021, 41(12): 1850–1855.
- [34] Chong RS, Crowston JG, Wong TT. Experimental models of glaucoma filtration surgery [J]. Acta Ophthalmol, 2021, 99(1): 9–15.
- [35] 吴维霖, 刘锦荣, 王辉. 青光眼动物模型的研究进展 [J]. 赣南医学院学报, 2017, 37(6): 988–991.
- Wu WL, Liu JR, Wang H. Research progress in animal models of glaucoma [J]. J Gannan Med College, 2017, 37(6): 988–991.
- [36] Shah M, Cabrera-Ghayouri S, Christie LA, et al. Translational preclinical pharmacologic disease models for ophthalmic drug development [J]. Pharm Res, 2019, 36(4): 58.
- [37] Bouhenni RA, Dunmire J, Sewell A, et al. Animal models of glaucoma [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 692609.
- [38] 孙河. 眼科疾病辨治思路与方法 [M]. 北京: 科学出版社; 2018.
- Sun H. Ideas and methods of ophthalmic disease discrimination and treatment [M]. Beijing: Science Press; 2018.
- [39] 李翔, 彭俊, 蒋鹏飞, 等. 原发性开角型青光眼中证型、证候、证素文献分析研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(11): 1354–1357.
- Li X, Peng J, Jiang PF, et al. Study on traditional Chinese medicine syndrome types, syndrome complex and syndrome elements of primary open angle glaucoma [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2019, 39(11): 1354–1357.
- [40] Guo C, Qu X, Rangaswamy N, et al. A murine glaucoma model induced by rapid *in vivo* photopolymerization of hyaluronic acid glycidyl methacrylate [J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0196529.
- [41] Ishida K, Nakano Y, Ojino K, et al. Evaluation of Bleb characteristics after trabeculectomy and glaucoma implant surgery in the rabbit [J]. Ophthalmic Res, 2021, 64(1): 68–76.
- [42] Smedowski A, Pietrucha-Dutczak M, Kaamiranta K, et al. A rat experimental model of glaucoma incorporating rapid-onset elevation of intraocular pressure [J]. Sci Rep, 2014, 4: 5910.
- [43] Von Thun Und Hohenstein-Blaul N, Kunst S, Pfeiffer N, et al. Biomarkers for glaucoma: from the lab to the clinic [J]. Eye (Lond), 2017, 31(2): 225–231.
- [44] 李晓宇, 梁丽娜, 高云, 等. 基于中西医临床病证特点的青光眼动物模型分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(24): 213–219.
- Li XY, Liang LN, Gao Y, et al. Analysis of animal models of glaucoma based on characteristics of clinical symptoms of traditional Chinese and western medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(24): 213–219.

[收稿日期] 2023-03-07

于俊,李明珠,朴浩哲,等. 紫杉醇诱导的神经病理性疼痛大鼠和小鼠动物模型研究及其在中医药方面应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1447-1461.

Yu J, Li MZ, Piao HZ, et al. Animal models of paclitaxel-induced neuropathic pain in rats and mice and their application in traditional Chinese medicine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1447-1461.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.009

紫杉醇诱导的神经病理性疼痛大鼠和小鼠动物模型研究及其在中医药方面应用进展

于俊¹, 李明珠^{2*}, 朴浩哲², 崔颖², 张立德³, 金圣博³, 王建波³

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032; 2. 中国医科大学肿瘤医院 辽宁省肿瘤医院, 沈阳 110042; 3. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

【摘要】 中医药在防治化疗后所诱导的周围神经病理性疼痛(chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain, CIPNP)方面有明确的临床疗效优势,但其具体临床应用和作用机制等仍待更深入研究和探索,因此需要探究出更精准、更符合临床疾病发生发展规律的动物模型来作为研究的媒介。此文对近几年现有紫杉醇所致的 CIPNP 大鼠和小鼠动物模型的建立和检测标准进行深入的梳理和探讨,及其模型在中医药防治 CIPNP 方面的应用价值做相关评价及阐述,以期能为今后中医药防治 CIPNP 的实验研究提供理论依据和参考,更加利于临床实践和推广。

【关键词】 紫杉醇; 化疗; 周围神经病理性疼痛; 动物模型; 中医药防治

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1447-15

Animal models of paclitaxel-induced neuropathic pain in rats and mice and their application in traditional Chinese medicine

YU Jun¹, LI Mingzhu^{2*}, PIAO Haozhe², CUI Ying², ZHANG Lide³, JIN Shengbo³, WANG Jianbo³

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China. 2. Cancer Hospital of China Medical University, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang 110042. 3. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032)

Corresponding author: LI Mingzhu. E-mail: limingzhu198600@126.com

【Abstract】 Traditional Chinese medicines have demonstrated clinical efficacy in preventing and treating chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain (CIPNP). However, their specific clinical application and mechanism of action require further in-depth study and exploration. There is thus a need to develop more accurate and clinically relevant animal models that reflect the occurrence and development of human diseases as a tool for research. This review provides an in-depth analysis and discussion of the recent establishment and detection criteria of existing rat and mouse animal models of paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain. We also evaluate and explain the application of these models for the prevention and treatment of CIPNP in traditional Chinese medicine, thus providing a theoretical basis and reference for future experimental and mechanistic research on the subject. This research will benefit clinical practice and promotion, offering valuable insights into preventing and treating CIPNP using traditional Chinese medicines.

【基金项目】 国家自然科学基金(82104838), 辽宁省自然科学基金(2022-BS-059)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(82104838), Provincial Natural Science Foundation of Liaoning(2020-BS-059).

【作者简介】 于俊(1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治恶性肿瘤及其并发症。Email: 770245723@qq.com

【通信作者】 李明珠(1986—), 女, 副主任医师, 研究生导师, 研究方向: 中西医结合防治恶性肿瘤及其并发症。

Email: limingzhu198600@126.com

[Keywords] paclitaxel; chemotherapy; peripheral neuropathic pain; animal model; traditional Chinese medicine prevention and treatment

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

恶性肿瘤是导致世界上每个国家人口死亡的主要原因,也是延长预期寿命的重要障碍,根据 2019 年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的估计,在全球的 183 个国家中,有 112 个国家在 70 岁之前的第一或第二大死亡原因是恶性肿瘤,在另外 23 个国家中排名第三或第四^[1]。可见,恶性肿瘤作为全球人口主要死亡原因的地位日益突出^[2]。紫杉醇是一种广谱抗恶性肿瘤的化合物,主要来源于一种药用植物,特别是紫杉树、红豆杉的树皮,是目前最常见的化疗药物,并作为多种癌症如乳腺癌、肺癌和卵巢癌等恶性肿瘤的一线化疗药物,临床上被广泛应用^[3]。然而,紫杉醇的使用会产生不良反应,限制了其治疗的连续性,该不良反应就是所谓化疗诱导的神经病理性疼痛,其患病率高达 87%,主要是一种感觉症状,导致手和/或脚麻木、刺痛和疼痛,甚至影响运动功能,症状持续数月乃至数年,严重影响治疗的连续性及患者的生活质量^[4]。近几年,现代医学一直致力于解决化疗后所诱导的周围神经病理性疼痛(chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain, CIPNP)的防治这一难题,所以 CIPNP 的防治已成为各大医家研究的热点,而中医药因其独特的辨证论治体系、安全有效且不良反应发生率低的优势而得到认可,在《2021 年化疗所致周围 CIPNP 中西医诊治专家共识》中指出越来越多的临床研究报道中使用中医药配合神经营养剂、抗氧化剂和钙镁合剂可以进一步降低周围 CIPNP 发生率,改善生存质量,提高患者对化疗耐受性和依从性,并将黄芪桂枝五物汤和通络蠲痹汤作为治疗 CIPNP 的 A+级推荐药物,但中医药的防治机制有待进一步明确和探究^[5]。因此,在研究时选择理想的 CIPNP 动物模型及准确的行为检测方法,已成为 CIPNP 病因病机及中医药防治 CIPNP 作用机制等热点研究极为关键的一步;而目前国内外的机理研究中经常使用大鼠或小鼠的 CIPNP 模型,但由于缺乏明确的分类和评价指标,使得现有的 CIPNP 动物模型不能得到充分合理的利用,影响了研究结果的可靠性与真实性^[6]。因此,本文介绍了紫杉醇化疗后所致的大鼠 CIPNP 和小鼠 CIPNP 模型的建立方法、具体成模检测方法以及大鼠和小鼠 CIPNP 模型在中医药临床科研中的

应用,以期后续实验中选择出更符合实验要求的 CIPNP 模型提供理论依据和参考,建立更适合于临床使用的动物模型,为国内外学者研究中西医结合治疗肿瘤疼痛提供理想的实验平台。

1 紫杉醇所致大鼠和小鼠 CIPNP 模型建立的主要方法

无论是大鼠还是小鼠 CIPNP 模型,常用注射方式都为腹腔注射或者静脉注射,且这两种注射方式相对来说都是安全性高且可操作性强的,但目前国内外对于 CIPNP 模型的造模还是以腹腔注射为主,腹腔注射主要的不良反应为腹膜肿胀^[7]。在对恶性肿瘤患者使用紫杉醇化疗时,单次治疗的起始剂量为 135 mg/m² 或 175 mg/m² (分别为 3.6 mg/kg 和 4.7 mg/kg)时,在治疗后的“24 ~ 72 h”可能出现神经损伤急性症状,但尚未报告关节或肌肉骨骼系统的客观变化,这种急性疼痛在输注后约 1 周缓解;而当紫杉醇的注射时间达到每 3 周静脉注射 3 ~ 24 h,累积注射剂量达到 1400 ~ 1500 mg/m² (37.8 ~ 40.5 mg/kg)的时候,这时患者会伴有“感觉丧失或感觉异常”或“可能干扰日常生活活动”的慢性疼痛的症状,所以紫杉醇所致的 CIPNP 大鼠和小鼠模型建立目前只有慢性模型,没有急性模型^[8-10]。

目前报道中,对于紫杉醇所致的 CIPNP 大鼠模型的建立,大多数学者选择 1 mg/kg 或 2 mg/kg,第 0、2、4、6 天注射,模拟临床多次化疗的方式造 CIPNP 慢性模型^[11-14];并且在一些学者的研究中发现,当紫杉醇单次注射剂量为 1.0 ~ 32.0 mg/kg,总剂量为 8.0 ~ 82.0 mg/kg 时,按照动物种属与用药转换公式,换算成人体的注射总剂量为 1.3 ~ 12.9 mg/kg,此时大鼠在接受该剂量范围的紫杉醇溶液注射后会出现一些行为学变化,如会出现肢体末端皮肤略显苍白,舔趾和抬足的次数增加等行为变化,进一步会出现机械性痛阈、机械痛觉过敏、冷痛阈等的疼痛行为改变^[7,15]。

对于紫杉醇所致的 CIPNP 小鼠模型的建立,大多数学者选择 2 mg/kg,每天注射 1 次,共 5 次的注射方式进行造模^[16-23];并且在一些学者的研究中发现,当紫杉醇单次注射剂量为 4.0 ~ 18.0 mg/kg,累

计总剂量为 4.0 ~ 8.0 mg/kg 时,按照动物种属与用药转换公式,换算成人体的注射总剂量 0.33 ~ 3.1 mg/kg,此时小鼠在接受紫杉醇注射后会出现机械性痛觉过敏、冷热痛觉过敏等疼痛行为学改变^[15]。

在实验研究中,上述疼痛的行为表现的变化可以用来确定建模是否成功。表 1~3 从造模方法、药物注射方式、药物总剂量、大鼠或小鼠种类、行为表现、安全性以及适用的研究范围方面详细叙述国内外常用的紫杉醇所致的 CIPNP 大鼠和小鼠的模型。大鼠均选取 SD 或 Wistar 大鼠,小鼠种类的选取较多,但还是以 C57BL/6J 或 CD1 小鼠为多数,大鼠雄性或者雌性无明显差别,但小鼠在相同的注射方式和种类下,不同性别会出现不同的行为表现。

2 成模检测方法

紫杉醇化疗所引起的 CIPNP 的临床表现,如手和/或脚的麻木、刺痛、疼痛和感觉障碍等症状,这些症状在大鼠或小鼠的 CIPNP 模型中也会有对应的行为表现,而建立模型和评估疗效的成功,通常是通过机械痛阈值、机械性痛觉过敏、冷热痛阈值以及冷热痛觉过敏的变化来评估的。下文详细介绍了近几年国内外常用的成模检测方法。

2.1 机械痛阈检测

2.1.1 Von Frey 法

机械异常性疼痛是指大鼠或小鼠对机械刺激的过度疼痛反应,最常见的测试是使用 Von Frey 纤维丝的单丝进行评估。这项测试一共需要选择其中 8 根不同压力值的单丝,分别触压大鼠或小鼠的后脚掌中部,逐渐增加硬度,用垂直于表面的力施加到 Von Frey 纤维丝上,力会使单丝弓起大约 6 ~ 8 s,这对健康的大鼠或小鼠来说,会导致爪子急剧缩回,这样可以通过测量阈值来评估机械性异常痛^[58]。

2.1.2 足底动态实验

使用动态足底感觉计(意大利)测量大鼠或小鼠的机械痛觉,让大鼠或小鼠在穿孔平台顶部的塑料外壳内栖息 30 ~ 60 min,然后启动微处理器,该微处理器会自动抬起一根金属丝,大鼠或小鼠落定时,该金属丝在后爪上施加线性增加的力(0.25 g/s,切断时间为 20 s),当大鼠或小鼠移除爪子或金属丝施加在后爪的重量达到 5 g 而产生切断力时,处理器会自动获得停止信号,此时大鼠或小鼠对机械刺激的退出阈值自动记录为 g,需要对大

鼠或小鼠后爪进行至少 3 次测试^[56,59]。

2.2 机械痛觉过敏检测

2.2.1 Von Frey 纤维丝法(4.0 g、15.0 g、0.6 g)

使用 Von Frey 纤维丝评估机械敏感性(英国林顿仪器公司),将大鼠放置在带金属丝的透明有机玻璃盒(15 cm × 16 cm × 21 cm)中,并使其适应环境;当 4 只爪子都与地板接触时,将 Von Frey 纤维丝(4 g、15 g)按力的升序施加到后爪上,且将每根 Von Frey 纤维丝施加到每个后爪足底中部区域的五个离散点上,并保持 5 s,记录退出次数,以 2 min 的时间间隔进行 5 次实验,结果记录为大鼠对每根纤维丝的戒断发生率^[13,39]。将小鼠单独放置在透明有机玻璃盒(9 cm × 7 cm × 11 cm)中,行为测试开始前,使其适应玻璃盒 1 h,然后当小鼠后爪的腹面接近高架钢丝网平台(意大利)时,将 0.6 g Von Frey 纤维丝(芝加哥,美国)从下方输送至右后爪的足底表面,并对后爪施加力,需要用 0.6 g Von Frey 纤维丝测试 10 次(每次持续时间为 3 s,每次间隔时间为 10 s,然后测量脱丝反应频率),其中在紫杉醇处理的大鼠或小鼠中,机械超敏反应的发生率为 90%^[18]。

2.2.2 兰德尔足压(Randall-Selitto)实验

Randall-Selitto 实验是机械痛觉过敏的一种测量方法,这项测试有助于评估大鼠而不是小鼠的伤害性阈值,因为需要动物用爪子进行沉重的物理约束测试,而小鼠很少能容忍这种处理;测试时需要把大鼠被限制在一个可以接触到后爪的背包、毛巾或圆柱体中;为了获得可靠的数据,大鼠需要习惯于实验设备一段时间,然后用 Ugo Basile 镇痛仪将压力施加于大鼠足底表面,然后使压力以恒定的速率增加,直至观察到大鼠出现伤害性行为反应(如发出痛苦叫声),测试结果是得到两个相似的连续压力值^[60]。

2.3 冷痛觉过敏检测

2.3.1 丙酮实验

通过丙酮实验评估冷痛觉过敏,将每只大鼠或小鼠放置在由铁丝网制成的盒子(20.0 cm × 13.5 cm × 27.0 cm)中,并在实验前让其栖息 30 min。用针头和注射器将 1 L 丙酮(日本大阪市和谷纯化学有限公司)喷洒在每个后爪的足底皮肤上 3 次,并在丙酮喷洒开始后 40 s 内记录退出反应的次数。还有 1 种方式是将大鼠或小鼠置于封闭的矩形金属丝网室中,在右后爪的足底表面喷洒约 100 μL 丙

表 1 大鼠 CIPNP 模型
Table 1 CIPNP acute model of rat

造模方法 Modeling methods	注射药物方式 Injecting drugs	药物总剂量 Total drug dose	疼痛行为表现 Pain behavior	大鼠种类 Rat species	安全性 Safety	适用研究场景 Applicable research areas
1 mg/kg,第 0、2、4、6 天注射 ^[11] 1 mg/kg, injected on days 0,2,4 and 6 ^[11]	腹腔注射 <i>i.p</i>	4 mg/kg	机械痛阈、冷痛觉、机械性痛觉过敏 + MA, + CA, + MH	Wistar 雄性大鼠 Wistar male rats	明确记载无大鼠死亡记录 Clearly document that no rat deaths are recorded	机制研究 Mechanism research
2 mg/kg,第 0、2、4、6 天注射 ^[12] 2 mg/kg, injected on days 0,2, 4 and 6 ^[12]	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	机械痛阈、机械性痛觉过敏 + MA, + MH	SD 雄性大鼠 SD male rats	无死亡描述 Deathless description	机制研究 Mechanism research
2 mg/kg,第 0、2、4、6 天注射 ^[13] 2 mg/kg, injected on days 0, 2, 4 and 6 ^[13]	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	冷痛觉过敏、机械性痛觉过敏 + CH, + MH	SD 雄性大鼠 SD male rats	明确记载无大鼠死亡记录 Clearly document that no rat deaths are recorded	机制研究 Mechanism research
2,4 mg/kg,第 0、2、4、6 天注射 ^[14] 2,4 mg/kg, injected on days 0, 2, 4 and 6 ^[14]	腹腔注射 <i>i.p</i>	8,16 mg/kg	热痛觉过敏、机械痛阈、机械性痛觉过敏 + HH, + MA, + MH	Wistar 雄性大鼠 Wistar male rats	无死亡描述 Deathless description	机制研究 Mechanism research
0.1,0.5,1.0 mg/kg, 每天注射 1 次,连续 5 d,持续 2 周 ^[24] 0.1,0.5,1.0 mg/kg, injected once per day for 5 days for 2 weeks ^[24]	腹腔注射 <i>i.p</i>	1,5,10 mg/kg	机械性痛觉过敏、机械痛阈、热痛觉 + MH, + MA, + HA	SD 雄性大鼠 SD male rats	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
0.5,1.0,2.0 mg/kg, 每 2 d 注射 1 次,共 4 次 ^[25-26] 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg, injectnce every 2 days,4 times in total ^[25-26]	腹腔注射 <i>i.p</i>	2,4,8 mg/kg	机械痛阈、机械性痛觉过敏、热痛觉、冷痛觉、未出现运动缺陷 + MA, + MH, + HA, + CA, - motor deficit	SD 雄性大鼠 SD male rats	无死亡描述 Deathless description	疗效研究 Curative effect research
1 mg/kg,每 2 d 注射 1 次,共 4 次 ^[27] 1 mg/kg, injected once every 2 days, 4 times in total ^[27]	腹腔注射 <i>i.p</i>	4 mg/kg	机械性痛觉过敏 + MH	SD 雄性和雌性大鼠 SD male and female rats	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
2 mg/kg,第 1、3、5、7 天注射 ^[28] 2 mg/kg, injected on days 1, 3, 5 and 7 ^[28]	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	机械痛阈、热痛觉过敏 + MA, + HH	SD 雄性大鼠 SD male rats	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
2 mg/kg,每 2 d 注射 1 次,共 4 次 ^[29] 2 mg/kg, injected once every 2 days, 4 times in total ^[29]	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	机械痛阈、冷痛觉 + MA, + CA	SD 雄性大鼠 SD male rats	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
2 mg/kg,每 2 d 注射 1 次,共 16 次 ^[30] 2 mg/kg, injected once every 2 days,16 times in total ^[30]	腹腔注射 <i>i.p</i>	32 mg/kg	热痛觉过敏 + HH	SD 雄性大鼠 SD male rats	明确记载无大鼠死亡记录 Clearly document that no rat deaths are recorded	机制研究 Mechanism research
2 mg/kg,每 4 d 注射 1 次,持续 4 次 ^[31] 2 mg/kg, injected once every 4 days, 4 times ^[31]	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	机械痛阈 + MA	SD 雄性大鼠 SD male rats	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research

续表 1

造模方法 Modeling methods	注射药物方式 Injecting drugs	药物总剂量 Total drug dose	疼痛行为表现 Pain behavior	大鼠种类 Rat species	安全性 Safety	适用研究场景 Applicable research areas
2 mg/kg, 每 2 d 注射 4 次, 共 4 次 ^[32] 2 mg/kg, injected 4 times every 2 days, 4 times in total ^[32]	腹腔注射 <i>i.p</i>	32 mg/kg	机械痛阈、冷痛觉过敏 + MA, + CH	SD 雄性大鼠 SD male rats	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
2 mg/kg, 每天注射 1 次, 共 5 次 ^[33] 2 mg/kg, injected once per day, 5 times in total ^[33]	腹腔注射 <i>i.p</i>	10 mg/kg	热痛觉过敏 + HH	SD 雄性大鼠 SD male rats	明确记载无大鼠死亡记录 Clearly document that no rat deaths are recorded	机制研究 Mechanism research
3, 6 mg/kg, 第 1、2、8、9、15、16、22、23 天注射 ^[34] 3, 6 mg/kg, injected on days 1, 2, 8, 9, 15, 16, 22 and 23 ^[34]	腹腔注射 <i>i.p</i>	24, 48 mg/kg	机械痛阈、未出现冷痛觉过敏 + MA, -CH	SD 雄性大鼠 SD male rats	明确记载无大鼠死亡记录 Clearly document that no rat deaths are recorded	发展性研究 Developmental research
4 mg/kg, 第 1、4、8、11 天注射 ^[35] 4 mg/kg, injected on days 1, 4, 8 and 11 ^[35]	腹腔注射 <i>i.p</i>	16 mg/kg	机械痛阈、冷痛觉过敏 + MA, + CH	SD 雄性大鼠 SD male rats	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
5 mg/kg, 第 0、7、14、21 天注射 ^[36] 5 mg/kg, injected on days 0, 7, 14 and 21 ^[36]	腹腔注射 <i>i.p</i>	20 mg/kg	机械痛阈、机械性痛觉过敏 + MA, + MH	SD 雄性大鼠 SD male rats	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
5 mg/kg, 每 2 d 注射 1 次, 持续 5 次 ^[37] 5 mg/kg, injected once every 2 days 5 times ^[37]	静脉注射 <i>i.v</i>	25 mg/kg	热痛觉减退、运动缺陷 + HHO, + motor deficit	SD 雄性大鼠 SD male rats	第 11 天治疗组有大鼠死亡 On the 11th day, rats died in the treatment group	都不适用 Neither applies
6 mg/kg, 每周注射 1 次, 共 4 次 ^[38] 6 mg/kg, injected once a week for 4 times ^[38]	腹腔注射 <i>i.p</i>	24 mg/kg	机械痛阈 + MA	SD 雄性大鼠 SD male rats	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
9 mg/kg, 第 0、2、4、6 天注射 ^[39] 9 mg/kg, injected on days 0, 2, 4 and 6 ^[39]	腹腔注射 <i>i.p</i>	36 mg/kg	冷痛觉、机械痛阈、机械性痛觉过敏、热痛觉 + CA, + MA, + MH, + HA	Wistar 雄性大鼠 Wistar male rats	明确记载无大鼠死亡记录 Clearly document that no rat deaths are recorded	疗效研究 Curative effect research
16 mg/kg, 每周注射 1 次, 持续 5 周 ^[40] 16 mg/kg, injected once a week for 5 weeks ^[40]	腹腔注射 <i>i.p</i>	80 mg/kg	热痛觉减退、机械性痛觉过敏 + HHO, + MH	SD 雄性大鼠 SD male rats	明确记载有 2 只大鼠死亡, 1 只 在第 1 次注射时死亡, 另 1 只 在第 4 次注射时死亡 Two rats were clearly documented to have died, one at the first injection and the other at the fourth injection	都不适用 Neither applies
15 ~ 18 mg/kg, 第 0、3 天注射 ^[41] 15 ~ 18 mg/kg, injected on day 0, 3 ^[41]	静脉注射 <i>i.v</i>	30 ~ 36 mg/kg	冷痛觉过敏、机械痛阈、未出现热痛觉减退 + CH, + MA, -HHO	SD 雌性大鼠 SD female rats	明确记载无大鼠死亡记录 Clearly document that no rat deaths are recorded	发展性研究 Developmental research
16 mg/kg, 每 2 d 注射 1 次, 共 2 次 ^[17] 16 mg/kg, injected once every 2 days, 2 times in total ^[17]	腹腔注射 <i>i.p</i>	32 mg/kg	机械痛阈 + MA	SD 雄性大鼠 SD male rats	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental studies

注: *i.p*: 腹腔注射; *i.v*: 静脉注射; CA: 冷痛觉; CH: 冷痛觉过敏; HA: 热痛觉; HH: 热痛觉过敏; HHO: 热痛觉减退; MA: 机械痛阈; MH: 机械痛觉过敏; + : 这种行为是在紫杉醇给药后经过评估有类似疼痛的行为; - : 这种行为在紫杉醇给药后经过评估不明显。(下表同)
Note. *i.p*. Intraperitoneal injection. *i.v*. Intravenous injection. CA. Cold allodynia. CH. Cold hyperalgesia. HA. Heat allodynia. HH. Heat hyperalgesia. HHO. Heat hypoalgesia. MA. Mechanical allodynia. MH. Mechanical hyperalgesia. +. This behaviour was assessed as pain-like following paclitaxel administration. -. This behaviour was assessed as insignificant following paclitaxel administration. (The same in the following tables)

表 2 小鼠 CIPNP 模型
Table 2 CIPNP acute model of mice

造模方法 Modeling methods	注射药物方式 Injecting drugs	药物总剂量 Total drug dose	疼痛性为表现 Pain behavior	小鼠种类 Mice species	安全性 Safety	适用研究范围 Applicable research areas
1 ~ 2 mg/kg, 每天注射 1 次, 共 5 次 ^[16] 1 ~ 2 mg/kg, injected once per day, 5 times in total ^[16]	腹腔注射 <i>i.p</i>	5 ~ 10 mg/kg	机械痛阈 + MA	ddY 系雄性小鼠 ddY male strain mice	无死亡描述 Deathless description	机制研究 Mechanism research
2 mg/kg, 每天注射 1 次, 共 5 次 ^[17] 2 mg/kg, injected once per day, 5 times in total ^[17]	腹腔注射 <i>i.p</i>	10 mg/kg	机械痛阈、热痛觉过敏 + MA, + HH	BALB/c 雌性小鼠 BALB/c female mice	无死亡描述 Deathless description	机制研究 Mechanism research
2 mg/kg, 每天注射 1 次, 共 5 次 ^[18] 2 mg/kg, injected once per day, 5 times in total ^[18]	腹腔注射 <i>i.p</i>	10 mg/kg	机械性痛觉过敏 + MH	瑞士雄性小鼠 Swiss male mice	无死亡描述 Deathless description	机制研究 Mechanism research
2 mg/kg, 每天注射 1 次, 共 5 次 ^[19] 2 mg/kg, injected once per day, 5 times in total ^[19]	腹腔注射 <i>i.p</i>	10 mg/kg	机械痛阈、机械性痛觉过敏、热痛觉过敏、热痛觉 + MA, + MH, + HH, + HA	瑞士白化雄性小鼠 Swiss albino male mice	无死亡描述 Deathless description	疗效研究 Curative effect research
2 mg/kg, 每天注射 1 次, 共 5 次 ^[20] 2 mg/kg, injected once per day, 5 times in total ^[20]	腹腔注射 <i>i.p</i>	10 mg/kg	热痛觉过敏 + HH	BALB/c 雄性和雌性小鼠 BALB/c male and female mice	无死亡描述 Deathless description	机制研究 Mechanism research
2 mg/kg, 每天注射 1 次, 共 5 次 ^[21] 2 mg/kg, injected once per day, 5 times in total ^[21]	腹腔注射 <i>i.p</i>	10 mg/kg	机械痛阈 + MA	BALB/c 雌性小鼠 BALB/c female mice	无死亡描述 Deathless description	机制研究 Mechanism research
2 mg/kg, 每天注射 1 次, 共 5 次 ^[22] 2 mg/kg, injected once per day, 5 times in total ^[22]	腹腔注射 <i>i.p</i>	10 mg/kg	热痛觉过敏 + HH	BALB/c 雌性小鼠 BALB/c female mice	无死亡描述 Deathless description	机制研究 Mechanism research
2 mg/kg, 每天注射 1 次, 共 5 次 ^[23] 2 mg/kg, injected once per day, 5 times in total ^[23]	腹腔注射 <i>i.p</i>	10 mg/kg	机械痛阈、热痛觉过敏 + MA, + HH	CD1 雄性小鼠 CD1 male mice	无死亡描述 Deathless description	机制研究 Mechanism research
2 mg/kg, 每 3 d 注射 1 次, 共 4 次 ^[42] 2 mg/kg, injected once every 3 days, 4 times in total ^[42]	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	机械痛阈 + MA	C57BL/6J 雄性和雌性小鼠 C57BL/6J male and female mice	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
2 mg/kg, 每隔 1 d 注射 1 次, 共 4 次 ^[43] 2 mg/kg, injected once every 1 day, 4 times in total ^[43]	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	机械痛阈、冷痛觉 + MA, + CA	C57BL/6J 雄性小鼠 C57BL/6J male mice	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
2 mg/kg, 第 1、3、5、8 天注射 ^[44] 2 mg/kg, injected on days 1, 3, 5 and 8 ^[44]	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	热痛觉 + HA	CD1 小鼠 CD1 mice	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
4 mg/kg, 第 1、3、5、7 天注射 ^[45] 4 mg/kg, injected on days 1, 3, 5 and 7 ^[45]	腹腔注射 <i>i.p</i>	16 mg/kg	机械性痛觉过敏 + MH	CrIj: CD1 (ICR) 雄性小鼠 CrIj: CD1 (ICR) male mice	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research

续表 2

造模方法 Modeling methods	注射药物方式 Injecting drugs	药物总剂量 Total drug dose	疼痛性为表现 Pain behavior	小鼠种类 Mice species	安全性 Safety	适用研究范围 Applicable research areas
4 mg/kg, 第 1、3、5、7 天注射 ^[46] 4 mg/kg, injected on days 1, 3, 5 and 7 ^[46]	腹腔注射 <i>i.p</i>	16 mg/kg	机械痛阈、热痛觉过敏 + MA, + HH	C57BL/6J 雄性和雌性小鼠 C57BL/6J male and female mice	无死亡描述 Deathless description	机制研究 Mechanism research
4 mg/kg, 每隔 1 d 注射 1 次, 共 4 次 ^[47] 4 mg/kg, injected once every 1 day, 4 times in total ^[47]	腹腔注射 <i>i.p</i>	16 mg/kg	机械性痛觉过敏 + MH	ICR 雌性小鼠 ICR female mice	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
4 mg/kg, 每隔 1 d 注射 1 次, 共 4 次 ^[48] 4 mg/kg, injected once every 1 day, 4 times in total ^[48]	腹腔注射 <i>i.p</i>	16 mg/kg	机械痛阈 + MA	C57BL/6J 雄性小鼠 C57BL/6 male mice	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
4 mg/kg, 第 0、2、4、6 天注射 ^[49] 4 mg/kg, injected on days 0, 2, 4 and 6 ^[49]	腹腔注射 <i>i.p</i>	16 mg/kg	机械痛阈、冷痛觉 + MA, + CA	C57BL/6J 雄性小鼠 C57BL/6 male mice	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
6 mg/kg, 注射 1 次 ^[50] 6 mg/kg, injected once ^[50]	腹腔注射 <i>i.p</i>	6 mg/kg	机械痛阈 (WT 雄性小鼠在第 4 周时机械痛阈消失)、冷痛觉 + MA (MA disappeared in WT male mice at week 4), + CA	WT 雄性和雌性小鼠 WT male and female mice	无死亡描述 Deathless description	都不适用 Neither applies
8 mg/kg, 每 2 d 注射 1 次, 共 4 次 ^[51] 8 mg/kg, injected once every 2 days, 4 times in total ^[51]	腹腔注射 <i>i.p</i>	32 mg/kg	机械性痛觉过敏、冷痛觉过敏 + MH, + CH	C57BL/6J 雄性和雌性小鼠 C57BL/6J male and female mice	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research
20 mg/kg, 第 15、17、19、21 天注射 ^[52] 20 mg/kg, injected on days 15, 17, 19 and 21 ^[52]	腹腔注射 <i>i.p</i>	80 mg/kg	机械性痛觉过敏、冷痛觉过敏 + MH, + HH	C57BL/6J 雄性小鼠 C57BL/6J male mice	无死亡描述 Deathless description	发展性研究 Developmental research

表 3 大、小鼠 CIPNP 造模注射方式
Table 3 CIPNP model injection method of rat and mice

注射方式 Injection methods	注射部位 Injection site	配置浓度 Configuration concentration	每次注射量 Injection volume	溶媒 Solvent
腹腔注射 [17, 20, 22, 28–30, 35, 43, 45, 53–57] <i>i.p</i> ^[17, 20, 22, 28–30, 35, 43, 45, 53–57]	腹腔 Abdominal cavity	1.0 mg/mL	1.0 mL	生理盐水 Normal saline
		1.0 mg/mL	0.5 mL	5% 葡萄糖溶液 5% glucose solution
		0.2 mg/mL	< 0.3 mL	乙醇溶液, 聚氧乙基化蓖麻油, 生理盐水 Ethanol solution, polyoxyethylated castor oil, normal saline
		0.2 mg/mL	小鼠 < 0.3 mL mice < 0.3 mL	
		1.0 mg/mL	大鼠 < 0.8 mL rats < 0.8 mL	
静脉注射 ^[39, 41] <i>i.v</i> ^[39, 41]	鼠尾静脉 Caudal vein of the rat	–	1.0 mL	乙醇溶液, 聚氧乙基化蓖麻油, 生理盐水 Ethanol solution, polyoxyethylated castor oil, normal saline
	颈静脉 Jugular vein	6.0 mg/mL	1.0 mL	乙醇溶液, 聚氧乙基化蓖麻油, 生理盐水 Ethanol solution, polyoxyethylated castor oil, normal saline

酮,用 1 min 的持续时间观察冷感觉,根据反应用 5 分制评分:1 分 = 舔爪反应;2 分 = 抖动反应;3 分 = 右后爪抬起持续时间在 4 s 内;4 分 = 右后爪抬起的持续时间为 5 ~ 8 s;5 分 = 右后爪抬起的持续时间超过 8 s;需要检测 3 次,得到累积分数,最低得 0 分,最高得 15 分,得 15 分时被认为是严重的神经元损伤^[19,34]。

2.3.2 冷水浸泡实验

为了测试冷痛觉过敏反应,可以进行冷水浸泡实验。将大鼠或小鼠为 1 只后爪浸泡在充满冷水($4 \pm 1^\circ\text{C}$)的水浴中,在整个实验过程中,用温度计(克利夫顿,新泽西州)监测并保持水浴的温度。每只后爪每隔 10 min 测试 2 次,以便在测试之间恢复,截止时间设置为 20 s,以防止组织损伤,计算从冷水浴中垂直或水平抽出后爪的潜伏期的平均值,此平均值用作测试数据^[39]。

2.3.3 冷水浴鼠尾撤尾法

在使用尾部浸入实验测试冷痛觉异常时,将大鼠或小鼠的尾部末端(5 cm 远端)浸入装满 10°C 冷水的容器中。在整个实验过程中保持恒定温度(10°C),记录大鼠或小鼠尾尖拔出的潜伏期,浸入时间不能超过 20 s,避免任何组织损伤。对每只大鼠或小鼠重复该程序 3 次,并计算平均值^[61-62]。

2.3.4 冷足底实验

冷足底实验可以客观、廉价地评估大鼠或小鼠的冷痛觉反应,并可以量化镇痛和超敏反应。使用装满湿冰或干冰的铝盒(或铝箔盒)将玻璃板冷却至所需的起始温度,使用 T 型灯丝的热电偶探头测试中心测量板的温度,一旦平板达到所需的起始温度,使房间的温度保持稳定,将大鼠或小鼠放在观察箱中 15 min,使其安静,再将大鼠或小鼠后爪放在有压缩干冰的玻璃表面上,记录大鼠或小鼠开始到出现缩爪、舔脚或抓挠的时间,截止时间为 90 s,以避免皮肤冻伤,此期间被称为潜伏期,用作冷痛觉反应的衡量标准,每只大鼠或小鼠在正式实验前 1 周接受适应性测试^[63-64]。

2.4 热痛觉过敏检测

2.4.1 热辐法

(1)热辐鼠尾法

用甩尾测试评估热痛觉时,需要使用甩尾镇痛仪(型号:35100;意大利)提供主要刺激,该装置拥有一个红外(I.R.)源(50 W 灯泡),热辐射能量从该红外源发出,并将光束集中到大鼠或小鼠的尾巴

上。热源的刺激强度设置为 50 W,因为该水平在未处理的对照大鼠或小鼠中能产生 6 ~ 8 s 的基线甩尾反射潜伏期。将大鼠或小鼠放在测试板上,并用无菌毛巾覆盖。光束聚焦在距离尾巴尖端 5 cm 的位置。为了防止组织损伤,第 2 次和第 3 次刺激在距离第一个部位 1 cm 的两个方向上进行,将大鼠或小鼠的最大反应延迟 15 s 后的时间设置为截止时间,以避免任何潜在的组织损伤,传感器会自动记录甩尾反射的潜伏期,每只大鼠或小鼠每隔 15 s 测量 3 次基线和退出潜伏期,其平均值用作测试数据^[39]。

(2)热辐射鼠后足法

将大鼠或小鼠置于玻璃表面的再生障碍箱中,并允许其适应环境 20 min,在开始时调整光的强度,使平均基线时间为 9 s,截止潜伏期为 20 s;使用辐射热刺激器将焦点精确地对准每只大鼠或小鼠后爪的足底表面中部,并记录其回缩的潜伏期,每只大鼠或小鼠双足需要分别连续测量 5 次,每次需要间隔 5 s,在这 5 个数值中去掉最大和最小值后计算平均值,该平均值即为大鼠或者小鼠的热痛阈^[14]。

2.4.2 热板实验法

将大鼠或小鼠单独放置在热板上,然后将温度调节至($55 \pm 1^\circ\text{C}$),记录大鼠或小鼠第 1 次为避免热量而出现疼痛感、舔爪或跳跃反应的时间,然后立即将大鼠或小鼠从热板中取出,要求截止时间是 20 s,以避免损坏爪子^[65]。

2.4.3 热水浴鼠尾浸泡实验

在大鼠或小鼠接受紫杉醇给药 30 min 后,进行热水浴鼠尾浸泡实验。在正式实验前 1 周,对每只大鼠或小鼠进行适应性测试。在大鼠或小鼠不再挣扎后,将尾巴浸入水浴中,记录了从浸入到甩尾反应的时间,温度设定为 47°C ,大多数大鼠或小鼠的甩尾时间为 10 s。为了防止高温伤害,选择 20 s 作为截止时间。每只大鼠或小鼠测试 3 次,间隔至少 5 min,3 次测试的平均值用于测试数据^[66]。

3 大鼠 CIPNP 模型在中医药临床科研中的应用

大鼠 CIPNP 模型也是中医学者们研究中医药防治紫杉醇诱导的神经病理性疼痛机制和疗效的一个重要媒介,而且在目前国内所能查阅到的文献中发现,中医药临床科研中实验者选择的大多都是大鼠 CIPNP 模型,这与大鼠的行为表现较小鼠更易

于观察有关。如吴非泽^[67]的研究中使用 8 mg/kg, 每 3 d 注射 1 次, 连续 3 次的造模方式, 并在第 0、2、4、6、8、10 天进行疼痛行为测试, 其在后续实验中其发现复方温络通散方外用可有效防治紫杉醇所致周围神经毒性, 明显缓解大鼠机械性痛觉过敏, 其机制是温络通散通过调节亚油酸代谢通路、甘油磷脂代谢通路发挥防治紫杉醇所致 CIPNP 的作用。邹晓玲^[68]在实验研究中对 Wistar 雄性大鼠用 8 mg/kg, 第 1、4、7 天注射的造模方式进行造模, 并根据给药前后疼痛行为数据的变化发现参附注射液具有减轻紫杉醇化疗所致 CIPNP 的作用, 且高剂量时效果明显, 其作用机制可能是与紫杉醇能够维持外周神经结构的完整性有关, 血清中 NGF 的高表达可能与该作用机制有一定相关性。钟敏钰^[69]在进行实验研究前为了成功建立紫杉醇所致的大鼠 CIPNP 模型, 其选择对 SD 雄性大鼠重复腹腔注射紫杉醇 1.0 或 2.0 mg/(kg·d), 经过在造模前 1 d 和造模后的第 3、5、7、12、16、20 天对大鼠进行机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足潜伏 (thermal withdrawal latency, TWL) 测试, 结果表明重复腹腔注射紫杉醇 2.0 mg/(kg·d) 可以成功建立化学治疗导致的 CIPNP 的动物模型; 通过对 20 d 内大鼠机械痛觉过敏和热痛觉过敏的数据改变的观察, 其发现川芎嗪注射液能有效防治紫杉醇所致的大鼠 CIPNP, 降低机械刺激性痛觉过敏和热痛觉过敏, 并且其效果不亚于通常用于治疗神经性疼痛的抗癫痫药物; 这可能与川芎嗪注射液减少了 NGF 在中枢和外周神经系统中的表达, 从而减少神经损伤有关。多位学者在对大鼠进行 2 mg/kg, 第 1、3、5、7 天注射或 2 mg/kg, 第 0、2、4、6 天注射方式下, 成功得到了紫杉醇诱导的大鼠 CIPNP 模型, 在此基础上通过观察 3 周内大鼠第 0、7、14、21 天的行为测试数据指标发现黄芪桂枝五物汤水煎液可抑制紫杉醇所致周围神经病变, 且不影响紫杉醇的抗肿瘤效果, 黄芪桂枝五物汤能够改善紫杉醇所致周围神经病变的药理作用可能是通过下调 TLR4/NF- κ B 和激活 PI3K/Akt-Nrf2 通路发挥抗炎、抗氧化作用所介导的, 也有可能是黄芪桂枝五味汤提高了血清和脊髓中的 SOD 活性, 降低了血清和脊髓中的 MDA 含量, 发挥了保护神经细胞的直接抗氧化作用^[70-71]。饶志璟^[72]在明确了温经化瘀通络方在临床试验中能显著降低 CIPNP 发生率, 且能更有效地降低患者神经症状评分 (total

neuropathy score, TNS) 的基础上, 为了进一步探求其中的作用机理, 其进行了实验研究, 采用了对 SD 雌性大鼠进行 8 mg/kg, 第 1、4、7 天注射的造模方式得到 CIPNP 模型, 并在对比了 10 d 内大鼠的机械痛阈变化后, 得出了化瘀通络方可显著缓解紫杉醇诱导化疗后周围神经病变大鼠的行为学改变, 其机制可能与下调脊髓组织中 CCL2 表达, 干扰 TLR4 蛋白信号通路, 减轻炎症免疫级联反应有关的结论, 这也间接证明了目前临床虽然对于中医治疗紫杉醇诱导的 CIPNP 有疗效肯定, 但对于机制的研究还是处于不明朗的阶段, 还有很多的机制可能性, 所以动物模型作为机制研究的媒介, 还是具有重要的研究意义。韩滨等^[73]在研究中对大鼠在第 0、7、14、21 天进行行为测试, 发现了桃红四物汤可缓解每隔 2 d 注射 8 mg/kg 紫杉醇, 共注射 4 次造成的外周神经损伤的 SD 雌性大鼠疼痛症状, 其机制可能与降低炎症反应、诱导自噬清除损伤碎片而促进神经损伤恢复有关。对于 CIPNP 的治疗, 中医的一些经典方也有很好疗效, 比如在最新的研究中发现芍药甘草汤的治疗减轻了用 2 mg/kg, 第 1、3、5、7 天注射紫杉醇的大鼠模型中诱导的慢性疼痛; 其中实验数据进一步表明, 芍药甘草汤逆转了紫杉醇大鼠中 TRPV1、TLR4-MyD88 信号的表达^[74]。当然, 除了上述的成方, 在最新的报道中也提到一些中药成分的提取物对该病的治疗有一定疗效, 并从实验数据方面对其可能的机制与作用进行了证实, 其中槲皮素在中药侧柏叶、高良姜、款冬花、桑寄生中均含有此成分; 严进红等^[75]通过对大鼠每隔 2 d 腹腔注射 2 mg/kg 紫杉醇, 共注射 4 次建立紫杉醇诱导的神经痛模型, 并通过第 0、2、4、6、8 天大鼠的行为测试数据变化分析来明确槲皮素是通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路来影响脊髓中的炎症因子水平, 进而减少炎症细胞迁移。综合以上国内学者对于中医药防治 CIPNP 机制实验研究的造模方式以及结合内容来看, 选择雄性 SD 大鼠 2 mg/kg, 第 0、2、4、6 天注射的造模方式无论从安全性还是疼痛行为表现的时间节点方面, 对于中医药防治 CIPNP 作用机制的实验研究和疗效实验研究都是最佳的造模方式, 这种方式既保证了实验过程中动物的安全性也为实验提供了足够的观察指标和可靠的实验数据。另外, 表 1 ~ 2 中的大鼠和小鼠 CIPNP 模型绝大多数都是非中医药实验研究中所选择的 CIPNP 模型, 所以和中医药实验研究中的 CIPNP 模型选择还是

有一定区别的,虽然疾病的发生发展规律是相同的,但中医药对于疾病的治疗还是更趋向于慢性治疗,所以即使在相同的造模方式下 Wistar 雄性大鼠可以表现出更多的疼痛行为表现或者相同的疼痛行为表现^[67-70];但还是选择 SD 雄性大鼠作为中医药实验研究中 CIPNP 模型最适合的大鼠种类选择,是因为 SD 雄性大鼠疼痛行为表现持续时间更长^[67-75],更符合中医药治疗的基本规律,见表 4。

表 4 大、小鼠 CIPNP 模型在中医中的应用

Table 4 Rat and mice CIPNP model applied in traditional Chinese medicine						
使用药物 Drugs use	大鼠/小鼠 种类 Rat/mice species	紫杉醇注 射方式 Paclitaxel injection	药物总 剂量 Total drug dose	造模方法 Modeling methods	行为表现 Behavior	检测方法 Detection methods
复方温络通散 ^[67] Compound Wenluotong powder ^[67]	SD 雌性大鼠 SD female rats	腹腔注射 <i>i.p</i>	24 mg/kg	8 mg/kg, 每 3 d 注射 1 次, 连续 3 次 (第 1、4、7 天注射) 8 mg/kg, once every 3 days, three times in a row (injected on days 1, 4 and 7)	机械性痛觉过敏 + MH	Von Frey 纤维丝 Von Frey filament
参附注射液 ^[68] Shenfu injection ^[68]	Wistar 雄性大鼠 Wistar male rats	腹腔注射 <i>i.p</i>	24 mg/kg	8 mg/kg, 第 1、4、7 天注射 8 mg/kg, injected on days 1, 4 and 7	机械性痛觉过敏、热 痛觉过敏 + MH, + HH	机械缩足反射阈值、热 缩足潜伏期 Mechanical foot retraction reflex threshold, thermal foot retraction latency
川芎嗪注射液 ^[69] Ligustrazine injection ^[69]	SD 雄性大鼠 SD male rats	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	2 mg/kg, 第 1、3、5、7 天注射 2 mg/kg, injected on days 1, 3, 5 and 7	机械性痛觉过敏、热 痛觉过敏 + MH, + HH	机械缩足反射阈值、热 缩足潜伏期 Mechanical foot retraction reflex threshold, thermal foot retraction latency
黄芪桂枝五物汤 ^[70] Huangqiguizhiwuwu decoction ^[70]	Wistar 雄性大鼠 Wistar male rats	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	2 mg/kg, 第 1、3、5、7 天注射 2 mg/kg, injected on days 1, 3, 5 and 7	机械性痛觉过敏、热 痛觉过敏 + MH, + HH	Von Frey 纤维丝、热辐 射鼠后足法 Von Frey filament, thermal radiation rat rear foot method
黄芪桂枝五物汤 ^[71] Huangqiguizhiwuwu decoction ^[71]	SD 雄性大鼠 SD male rats	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	2 mg/kg, 第 0、2、4、6 天注射 2 mg/kg, injected on days 0, 2, 4 and 6	机械性痛觉过敏、冷 痛觉过敏 + MH, + CH	Von Frey 纤维丝、丙酮 实验 Von Frey filament, acetone experiment
温经化瘀通络方 颗粒 ^[72] Wenjinghuayutongluo formula granules ^[72]	SD 雌性大鼠 SD female rats	腹腔注射 <i>i.p</i>	24 mg/kg	8 mg/kg, 第 1、4、7 天注射 8 mg/kg, injected on days 1, 4 and 7	机械性痛觉过敏、冷 痛觉过敏 + MH, + CH	Von Frey 纤维丝、冷板 实验测定 Von Frey filament, cold plate test determination
桃红四物汤 ^[73] Taohongsiwu decoction ^[73]	SD 雌性大鼠 SD female rats	腹腔注射 <i>i.p</i>	32 mg/kg	8 mg/kg, 第 1、3、5、7 天注射 8 mg/kg, injected on days 1, 3, 5 and 7	机械性痛觉过敏、冷 痛觉过敏、热痛觉 过敏 + MH, + CH, + HH	Von Frey 纤维丝、机械 缩足反射阈值、冷热板 实验测定 Von Frey filament, mechanical foot retraction reflex threshold, hot and cold plate test determination
芍药甘草汤 ^[74] Peony and licorice decoction ^[74]	SD 雌性大鼠 SD female rats	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	2 mg/kg, 第 1、3、5、7 天注射 2 mg/kg, injected on days 1, 3, 5 and 7	机械痛阈、热痛觉 过敏 + MA, + HH	Von Frey 纤维丝、热辐 射鼠后足法 Von Frey filament, thermal radiation rat rear foot method
槲皮素 ^[75] Quercetin ^[75]	SD 雌性大鼠 SD female rats	腹腔注射 <i>i.p</i>	8 mg/kg	2 mg/kg, 第 1、3、5、7 天注射 2 mg/kg, injected on days 1, 3, 5 and 7	机械痛阈 + MA	Von Frey 纤维丝 Von Frey filament

4 结语

根据国际癌症研究机构 (international agency for research on cancer, IARC) 发布的全球癌症 2020 年统计数据中,女性乳腺癌位于 2020 年全球恶性肿瘤发病率的榜首,约有 230 万例新发病例,占全部新发病例的 11.7%,其次是肺癌,约有 180 万例新发病例,占全部新发病例的 11.4%^[2];而这些恶性肿瘤

患者大部分要接受紫杉醇治疗,在治疗过程中或治疗后,患者可能出现感觉障碍或在执行特定的手动任务(如按钮)时出现问题,且这些症状随着剂量的累积,症状的程度可能会更严重,并可能导致多达 25% 使用紫杉醇治疗的患者改变、减少或停止给药,甚至有 41% 的患者在结束治疗 3 年后仍会出现症状,有 14% 的患者在停止治疗 13 年后,症状持续存在,上述情况不仅会导致患者生活质量的下降,还会增加医疗支出^[4];而 CIPNP 是一种复杂的疾病,依赖于不同化疗药物作用机制的多样性,根据化合物的不同,化疗药物可导致各种神经病变类型,包括感觉和/或运动、脱髓鞘和轴突、颅骨和自体神经病变,所以其发病机制也尚未完全了解^[76]。为了解决上述疑难问题,选择理想的动物模型是解决问题的关键,而大鼠和小鼠 CIPNP 模型具有造模和行为检测简单方便、利用率高等优点,成为了国内外研究人类疾病发病机制和探索疾病防治原则的优秀工具,具有十分广阔的应用前景,为国内外肿瘤学家研究化疗后癌痛搭建了一座桥梁;在实验研究中,可以根据研究课题的方向和实际情况所需要的模型特点来选择符合临床的动物模型,这对实验数据结果的可靠性具有重要意义。西医方面尚无明确的治疗方案可用于 CIPNP,因为其确切的病理生理学尚不清楚,CIPNP 最常被认认为是由于轴突病变导致的神经性疼痛,其原因可能是轴突退化,然而,大多数治疗神经性疼痛的药物,包括三环类抗抑郁药和抗惊厥药,都只能是减轻症状,且在 CIPNP 中的疗效最低,还具有不可逆的副作用,而现有的指南在美国临床肿瘤学会(American Society of Clinical Oncology, ASCO)的指导下仅推荐度洛西汀作为治疗 CIPNP 的一线药物治疗^[4,77]。中医药因其独特的辨证论治体系、安全有效且不良反应发生率低的优势,在紫杉醇化疗后诱导的 CIPNP 的治疗方面得到了认可且被指南推荐,这可能与中医药能够下调 TLR4/NF- κ B 和激活 PI3K/Akt-Nrf2 通路或调控 Wnt/ β -catenin 信号通路以及下调脊髓组织中 CCL2 表达,来减轻炎症反应有关^[70,72,75],为此需要更精准、更符合临床的动物模型来深入研究和探索具体的发病机制及治疗作用机理。

目前国内外对紫杉醇诱导的大或小鼠 CIPNP 模型的研究中,大多数实验者选择的观察周期都不超过 3 周(21 d),疼痛行为测试的时间节点选择也是以每隔 2 d 测试 1 次或每周测试 1 次为主^[67-75],

但在新的研究中发现动物严重的痛觉过敏在第 3 周才开始,而热痛觉过敏将持续 8 周以上,机械性异位痛将持续 12 周^[78],所以在今后的实验中建议实验人员延长疼痛指标的观察周期以及对行为测试时间间隔进行调整,以增加实验结果的准确性。目前动物模型在生物医学上常应用于基础研究、应用研究、发展性研究 3 个实验研究场景,其中大鼠和小鼠的基因组与人类基因组高度同源,可以模拟人类疾病的发展、诊断以及类似于人类的治疗,所以常用于基础研究中的机制研究、应用研究中的疗效研究以及发展性研究;就本文来讲机制研究是指 CIPNP 的发病机制和中医药对于大鼠或小鼠 CIPNP 模型的作用机制也就是中医药与 CIPNP 模型机体结构组成部分的相互关系,以及其间发生的某种生理、病理变化;疗效研究是指评估中医药作为潜在治疗药物的有效性,发展性研究是指用应用创新的中医药研究成果和现有的医学知识与技术,以发展创新技术为内容而进行的研究实验^[79-81]。在中医药治疗紫杉醇诱导的 CIPNP 机制研究及紫杉醇诱导的 CIPNP 发病机制研究模型中,要在保证动物安全的基础上,根据所研究的通路需要的观察指标选择合适的造模方式而且机制研究不需要很多的疼痛评估和疗效的评价,1 ~ 2 种疼痛行为检测方式就可以进行深入探讨,所以 SD 大鼠 1 ~ 2 mg/kg,第 0、2、4、6 天注射或者 BALB/c 小鼠 2 mg/kg,每天注射 1 次,共 5 次的造模方式最适用于机制研究^[11-14,17,20-22,33,71]。中医药治疗紫杉醇诱导的 CIPNP 疗效研究要模拟临床多次化疗、多次注射形成的 CIPNP 临床情况且需要 2 种以上的疼痛阈值评估手段,多种方式的评估更有利于全方面评估中医药疗效,这样就需要选择能够使动物出现多种疼痛行为变化而作为观察指标的造模方式,所以大鼠 2、9 mg/kg,第 0、2、4、6 天注射或者瑞士白化小鼠 2 mg/kg,每天注射 1 次,共 5 次的造模方式最适用于中医药治疗紫杉醇诱导的 CIPNP 疗效研究^[19,39,71]。在中医药治疗紫杉醇诱导的 CIPNP 发展性研究模型中,其在于发展创新中医药可行性的评估,更加侧重于研究疗效结合机制,所以可以选择单种或多种疼痛行为检测,且造模时的注射剂量有多种选择,可选择小剂量的雄性 SD 大鼠 2 mg/kg,第 1、3、5、7 天的造模方式^[28,75],也可以选择大剂量的雄性 SD 大鼠 15 ~ 18 mg/kg,第 0、3 天的造模方式^[41]。而就目前中医药实验所涉及的紫

杉醇诱导的 CIPNP 动物模型的应用来看,大多数实验没有根据实验的研究范围选择适合的 CIPNP 模型,这不仅会影响实验结果的准确性,还会因不合理使用而浪费动物资源,建议在今后的实验中,研究者要根据实验研究的类型选择符合实验目的的 CIPNP 模型。对于现有的作用机制研究,总结起来就是可能与降低了炎症反应有关,说明中医药治疗紫杉醇诱导 CIPNP 作用机制的研究还尚未明确,这与国内目前缺乏中医相关的大、小鼠 CIPNP 模型的造模体系和如何将大、小鼠模型与紫杉醇所致 CIPNP 中医辨证相关的气虚、血虚、寒凝、血瘀等分型相结合有直接关系,所以建议在今后的实验中要建立与中医相关的动物模型,将造模与中医辨证理论相结合,这对于国内外学者探索中医药防治 CIPNP 的作用机理及 CIPNP 的发病机理更具有指导意义。并要利用中医的独特优势发扬中医药治疗 CIPNP,这还需要学者们进一步完善和建立中医大、小鼠 CIPNP 模型标准,不断探索、发掘与研究,逐步形成疗效更加确切的诊疗体系,从而使其获得更广泛的临床应用。

参 考 文 献(References)

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] 王悠清. 2020 年全球癌症统计报告 [J]. *中华预防医学杂志*, 2021, 55(3): 398-398.
Wang YQ. Global cancer statistics report 2020 [J]. *Chin J Prev Med*, 2021, 55(3): 398-398.
- [3] Sharifi-Rad J, Quispe C, Patra JK, et al. Paclitaxel: application in modern oncology and nanomedicine-based cancer therapy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 3687700.
- [4] Velasco-González R, Coffeen U. Neuropathophysiological aspects of paclitaxel-induced peripheral neuropathy [J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(6): 1673-1689.
- [5] 樊碧发. 化疗所致周围 CIPNP 中西医诊治专家共识 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2021, 28(23): 1761-1767, 1779.
Fan BF. Expert consensus on the treatment of chemotherapy induced peripheral neuropathic pain in Chinese and Western medicine [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2021, 28(23): 1761-1767, 1779.
- [6] 李明珠, 王文萍, 金圣博. 奥沙利铂诱导的神经病理性疼痛大鼠模型研究及其在中医方面应用进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(2): 278-285.
Li MZ, Wang WP, Jin SB. Rat model of neuropathic pain induced by oxaliplatin and its application in traditional Chinese medicine [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(2): 278-285.
- [7] Al Moundhri MS, Al-Salam S, Al Mahrouqee A, et al. The effect of curcumin on oxaliplatin and cisplatin neurotoxicity in rats: some behavioral, biochemical, and histopathological studies [J]. *J Med Toxicol*, 2013, 9(1): 25-33.
- [8] Wolf S, Barton D, Kottschade L, et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies [J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44(11): 1507-1515.
- [9] Miltenburg NC, Boogerd W. Chemotherapy-induced neuropathy: a comprehensive survey [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(7): 872-882.
- [10] Food and Drug Administration. Guidance for industry: Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers [R]. Rockville MD: Food and Drug Administration; 2005.
- [11] Paniagua N, Sánchez-Robles EM, Bagues A, et al. Behavior and electrophysiology studies of the peripheral neuropathy induced by individual and co-administration of paclitaxel and oxaliplatin in rat [J]. *Life Sci*, 2021, 277: 119397.
- [12] Xia Z, Xiao Y, Wu Y, et al. Sodium channel Nav1.7 expression is upregulated in the dorsal root ganglia in a rat model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 1738.
- [13] Griffiths LA, Duggett NA, Pitcher AL, et al. Evoked and ongoing pain-like behaviours in a rat model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy [J]. *Pain Res Manag*, 2018, 2018: 8217613.
- [14] Chiba T, Oka Y, Kambe T, et al. Paclitaxel-induced peripheral neuropathy increases substance P release in rat spinal cord [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 770: 46-51.
- [15] Hama A, Takamatsu H. Chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain and rodent models [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2016, 15(1): 7-19.
- [16] Katsuyama S, Sato K, Yagi T, et al. Effects of repeated milnacipran and fluvoxamine treatment on mechanical allodynia in a mouse paclitaxel-induced neuropathic pain model [J]. *Biomed Res*, 2013, 34(2): 105-111.
- [17] Thangamani D, Edafiohio IO, Masocha W. The anticonvulsant enaminone E139 attenuates paclitaxel-induced neuropathic pain in rodents [J]. *Sci World J*, 2013, 2013: 240508.
- [18] Manjavachi MN, Passos GF, Trevisan G, et al. Spinal blockage of CXCL1 and its receptor CXCR2 inhibits paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 151: 136-143.
- [19] Kaur S, Muthuraman A. Ameliorative effect of Gallic acid in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice [J]. *Toxicol Rep*, 2019, 6: 505-513.
- [20] Parvathy SS, Masocha W. Co-administration of indomethacin and minocycline attenuates established paclitaxel-induced neuropathic thermal hyperalgesia: involvement of cannabinoid CB1 receptors [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10541.
- [21] Thomas A, Okine BN, Finn DP, et al. Peripheral deficiency and antiallodynic effects of 2-arachidonoyl glycerol in a mouse model

- of paclitaxel-induced neuropathic pain [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110456.
- [22] Masocha W. Gene expression profile of sodium channel subunits in the anterior cingulate cortex during experimental paclitaxel-induced neuropathic pain in mice [J]. Peer J, 2016, 4: e2702.
- [23] Ruiz-Medina J, Baulies A, Bura SA, et al. Paclitaxel-induced neuropathic pain is age dependent and devolves on glial response [J]. Eur J Pain, 2013, 17(1): 75–85.
- [24] Dina OA, Chen X, Reichling D, et al. Role of protein kinase Cepsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat [J]. Neuroscience, 2001, 108(3): 507–515.
- [25] Polomano RC, Mannes AJ, Clark US, et al. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel [J]. Pain, 2001, 94(3): 293–304.
- [26] Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy [J]. Pain, 2004, 109(1–2): 150–161.
- [27] Staurengo-Ferrari L, Bonet IJM, Araldi D, et al. Neuroendocrine stress axis-dependence of duloxetine analgesia (anti-hyperalgesia) in chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. J Neurosci, 2022, 42(3): 405–415.
- [28] Li Y, Yin C, Liu B, et al. Transcriptome profiling of long noncoding RNAs and mRNAs in spinal cord of a rat model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy identifies potential mechanisms mediating neuroinflammation and pain [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 48.
- [29] Huynh PN, Giuvelis D, Christensen S, et al. RgIA4 accelerates recovery from paclitaxel-induced neuropathic pain in rats [J]. Mar Drugs, 2019, 18(1): 12.
- [30] Pourmohammadi N, Alimoradi H, Mehr SE, et al. Lithium attenuates peripheral neuropathy induced by paclitaxel in rats [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012, 110(3): 231–237.
- [31] Ganugula R, Deng M, Arora M, et al. Polyester nanoparticle encapsulation mitigates paclitaxel-induced peripheral neuropathy [J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10(3): 1801–1812.
- [32] Deng L, Guindon J, Vemuri VK, et al. The maintenance of cisplatin- and paclitaxel-induced mechanical and cold allodynia is suppressed by cannabinoid CB₂ receptor activation and independent of CXCR4 signaling in models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. Mol Pain, 2012, 8: 71.
- [33] Amoateng P, Adjei S, Osei-Safo D, et al. Analgesic effects of a hydro-ethanolic whole plant extract of *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn in paclitaxel-induced neuropathic pain in rats [J]. BMC Res Notes, 2017, 10(1): 226.
- [34] Yamashita Y, Irie K, Kochi A, et al. Involvement of Charcot-Marie-Tooth disease gene mitofusin 2 expression in paclitaxel-induced mechanical allodynia in rats [J]. Neurosci Lett, 2017, 653: 337–340.
- [35] Nakamura H, Kawashiri T, Kobayashi D, et al. Analgesic effects of sokeikakketsuto on chemotherapy-induced mechanical allodynia and cold hyperalgesia in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2021, 44(2): 271–274.
- [36] Xu F, Xu S, Wang L, et al. Antinociceptive efficacy of verticinone in murine models of inflammatory pain and paclitaxel-induced neuropathic pain [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(9): 1377–1382.
- [37] Cavaletti G, Cavalletti E, Montaguti P, et al. Effect on the peripheral nervous system of the short-term intravenous administration of paclitaxel in the rat [J]. Neurotoxicology, 1997, 18: 137–145.
- [38] Mori K, Kawashiri T, Mine K, et al. Inhibitory effect of $\alpha 1$ receptor antagonists on paclitaxel-induced peripheral neuropathy in a rodent model and clinical database [J]. Toxics, 2022, 10(11): 669.
- [39] Beh ST, Kuo YM, Chang WW, et al. Preventive hypothermia as a neuroprotective strategy for paclitaxel-induced peripheral neuropathy [J]. Pain, 2019, 160(7): 1505–1521.
- [40] Authier N, Gillet JP, Fialip J, et al. Description of a short-term Taxol[®]-induced nociceptive neuropathy in rats [J]. Brain Res, 2000, 887(2): 239–249.
- [41] Cliffer KD, Siuciak JA, Carson SR, et al. Physiological characterization of taxol-induced large-fiber sensory neuropathy in the rat [J]. Ann Neurol, 1998, 43(1): 46–55.
- [42] Son DB, Choi W, Kim M, et al. Decursin alleviates mechanical allodynia in a paclitaxel-induced neuropathic pain mouse model [J]. Cells, 2021, 10(3): 547.
- [43] Martínez-Martel I, Bai X, Batallé G, et al. New treatment for the cognitive and emotional deficits linked with paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice [J]. Antioxidants, 2022, 11(12): 2387.
- [44] Micheli L, Testai L, Angeli A, et al. Inhibitors of mitochondrial human carbonic anhydrases VA and VB as a therapeutic strategy against paclitaxel-induced neuropathic pain in mice [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11): 6229.
- [45] Ami N, Okamoto K, Oshima H. Analgesic effect of magnetic stimulation on paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain in mice [J]. Brain Res, 2012, 1461: 24–29.
- [46] Li Y, Kang J, Xu Y, et al. Artesunate alleviates paclitaxel-induced neuropathic pain in mice by decreasing metabotropic glutamate receptor 5 activity and neuroinflammation in primary sensory neurons [J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 902572.
- [47] Sankaranarayanan I, Tavares-Ferreira D, Mwirigi JM, et al. Inducible co-stimulatory molecule (ICOS) alleviates paclitaxel-induced neuropathic pain via an IL-10-mediated mechanism in female mice [J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 32.
- [48] Uchida H, Jun N, Ueda H. Lysophosphatidic acid and its receptors LPA1 and LPA3 mediate paclitaxel-induced neuropathic pain in mice [J]. Mol Pain, 2014, 10: 71.
- [49] Slivicki RA, Mali SS, Hohmann AG. Voluntary exercise reduces both chemotherapy-induced neuropathic nociception and deficits in hippocampal cellular proliferation in a mouse model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy [J]. Neurobiol Pain,

- 2019, 6:100035.
- [50] Luo X, Huh Y, Bang S, et al. Macrophage toll-like receptor 9 contributes to chemotherapy-induced neuropathic pain in male mice [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(35): 6848–6864.
- [51] Caillaud M, Patel NH, Toma W, et al. A fenofibrate diet prevents paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice [J]. *Cancers*, 2020, 13(1): 69.
- [52] Suo J, Wang M, Zhang P, et al. Siwei Jianbu Decoction improves painful paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mouse model by modulating the NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Regen Med Res*, 2020, 8: 2.
- [53] Li Y, Yin C, Li X, et al. Electroacupuncture alleviates paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain in rats via suppressing TLR4 signaling and TRPV1 upregulation in sensory neurons [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 5917.
- [54] Lee JH, Kim B, Ko SG, et al. Analgesic effect of SH003 and *Trichosanthes kirilowii* maximowicz in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44(2): 718–730.
- [55] Masocha W, Parvathy SS. Preventative and therapeutic effects of a GABA transporter 1 inhibitor administered systemically in a mouse model of paclitaxel-induced neuropathic pain [J]. *Peer J*, 2016, 4: e2798.
- [56] Qabazard B, Masocha W, Khajah M, et al. H₂S donor GYY4137 ameliorates paclitaxel-induced neuropathic pain in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110210.
- [57] Chen X, Green PG, Levine JD. Abnormal muscle afferent function in a model of Taxol chemotherapy-induced painful neuropathy [J]. *J Neurophysiol*, 2011, 106(1): 274–279.
- [58] Höke A, Ray M. Rodent models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. *ILAR J*, 2014, 54(3): 273–281.
- [59] Al-Romaiyan A, Masocha W. Pristimerin, a triterpene that inhibits monoacylglycerol lipase activity, prevents the development of paclitaxel-induced allodynia in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 944502.
- [60] Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 284.
- [61] Singh J, Saha L, Singh N, et al. Study of nuclear factor-2 erythroid related factor-2 activator, berberine, in paclitaxel induced peripheral neuropathy pain model in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(5): 797–805.
- [62] Mangaiarkkarasi A, Rameshkannan S, Ali RM. Effect of gabapentin and pregabalin in rat model of taxol induced neuropathic pain [J]. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9(5): FF11–FF14.
- [63] Brenner DS, Golden JP, Vogt SK, et al. A simple and inexpensive method for determining cold sensitivity and adaptation in mice [J]. *J Vis Exp*, 2015, 97: 52640.
- [64] Hu PP, Huang F. Yunnan Baiyao ameliorates MIA-induced knee osteoarthritis pain in rats through anti-inflammatory effect [J]. *Chin J Clin Pharm Therap*, 2019, 3: 254–259.
- [65] Parvathy SS, Masocha W. Matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 prevents the development of paclitaxel-induced hyperalgesia in mice [J]. *Med Princ Pract*, 2013, 22(1): 35–41.
- [66] Xue C, Liu SX, Hu J, et al. *Corydalis saxicola* Bunting total alkaloids attenuate paclitaxel-induced peripheral neuropathy through PKC ϵ /p38 MAPK/TRPV1 signaling pathway [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 58.
- [67] 吴非泽. 中药复方温络通散外用防治紫杉醇致周围神经毒性的作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2018.
- Wu FZ. Study on the mechanism of external application of WenLuoTong powder against peripheral neurotoxicity induced by paclitaxel [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2018.
- [68] 邹晓玲. 参附注射液减轻紫杉醇外周神经毒性的临床及实验研究 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2018.
- Zou XL. Clinical and experimental study on Shenfu injection to alleviate the peripheral neurotoxicity of paclitaxel [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; 2018.
- [69] 钟敏钰. 川芎嗪注射液干预紫杉醇致大鼠外周神经病理性疼痛的实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学; 2016.
- Zhong MY. Experimental study of ligustrazine injection on peripheral neuropathic pain induced by paclitaxel in rats [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine; 2016.
- [70] 吕章明. 黄芪桂枝五物汤防治紫杉醇致周围神经病变的物质基础及机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学; 2020.
- Lv ZM. Study on material basis and mechanism of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction for alleviating paclitaxel-induced peripheral neuropathy [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine; 2020.
- [71] 李荣荣. 黄芪桂枝五物汤对紫杉醇致外周神经毒性氧化应激的影响 [D]. 南京: 南京中医药大学; 2014.
- Li RR. The anti-oxidant effect of huangqiguizhiwuwu decoction on paclitaxel induced peripheral neuropathy [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine; 2014.
- [72] 饶志璟. 温经化瘀通络方改善化疗后周围神经病变随机对照临床观察及机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学; 2020.
- Rao ZJ. Randomized controlled clinical observation and mechanism study of Wenjing Huayu Tongluo recipe in improving peripheral neuropathy after chemotherapy [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; 2020.
- [73] 韩滨, 郝晨伟, 董敏, 等. 桃红四物汤对紫杉醇所致大鼠外周神经损伤的保护作用及其机制 [J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(5): 570–576.
- Han B, Hao CW, Dong M, et al. Protective effect and potential mechanism of Taohong Siwu Decoction on peripheral nerve injury of paclitaxel [J]. *Med J Chin People's Liberation Army*, 2023, 48(5): 570–576.
- [74] Chen Y, Lu R, Wang Y, et al. Shaoyao Gancan Decoction ameliorates paclitaxel-induced peripheral neuropathy via suppressing TRPV1 and TLR4 signaling expression in rats [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 2067–2081.
- [75] 严进红, 韩克跃, 夏杰, 等. 槲皮素减轻紫杉醇致神经病理

性大鼠疼痛的作用与机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(12): 2065–2070, 2181.

Yan JH, Han KY, Xia J, et al. Effect and mechanism of quercetin on pain relief induced by paclitaxel in neuropathic rats [J]. Nat Prod Res Dev, 2019, 31(12): 2065–2070, 2181.

[76] Cioroiu C, Weimer LH. Update on chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2017, 17(6): 47.

[77] Hou S, Huh B, Kim HK, et al. Treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: systematic review and recommendations [J]. Pain Physician, 2018, 21(6): 571–592.

[78] Casals-Díaz L, Casas C, Navarro X. Changes of voltage-gated sodium channels in sensory nerve regeneration and neuropathic pain models [J]. Restor Neurol Neurosci, 2015, 33(3): 321–334.

[79] Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, et al. Role of animal models in biomedical research: a review [J]. Lab Anim Res, 2022, 38(1): 18.

[80] Fujiwara S. Humanized mice: a brief overview on their diverse applications in biomedical research [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(4): 2889–2901.

[81] da Silva Morais A, Oliveira J, Reis R. Small animal models [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1059: 423–439.

[收稿日期] 2023-01-20

SHARPIN 基因敲除叙利亚仓鼠的建立和特征分析

线性泛素链相关蛋白 SHARPIN 是一种高度保守的蛋白,表达于多种类型的细胞和组织。SHARPIN 主要由氨基端卷曲螺旋结构域、泛素样结构域和 NPL4 锌指结构域组成。这 3 种结构域使得 SHAPIN 能与靶蛋白结合并促进泛素介导的蛋白降解。SHARPIN 基因突变可能与 Alzheimer 症的发生有关,其功能缺失可诱导多器官嗜酸性粒细胞炎症,皮炎以及次级淋巴器官发育异常。叙利亚仓鼠是一种常用于生殖学、肿瘤学、心血管疾病以及感染性疾病研究的实验动物,具有繁殖能力强、易于操作等优点。

苗晋鑫团队利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和胚胎移植技术建立 SHARPIN 基因敲除的叙利亚仓鼠。该仓鼠的 SHARPIN 基因第 1 外显子因缺失 155 nt 造成移码突变并提前终止,最终使 SHARPIN 基因完全丧失功能。通过 PCR 扩增和 Sanger 测序排除潜在脱靶位点。SHARPIN^{-/-} 仓鼠淋巴器官发育异常,组织病理学检查结果显示包括脾、肝、肺、小肠和食管等在内的多种器官和组织内嗜酸性粒细胞的浸润。然而,SHARPIN 缺失不影响脾 T 细胞、巨噬细胞、部分 B 细胞和 NK 细胞特异性基因表达。SHARPIN^{-/-} 仓鼠食管趋化因子受体 CCR3 及其配体 CCL11 表达上调,同时 IL-4 和 IL-13 表达升高,而脑组织内 NF-κB 信号通路活性降低。SHARPIN 基因敲除叙利亚仓鼠是温和型的嗜酸性粒细胞增多食管炎模型,补充了嗜酸性粒细胞小鼠模型的应用。

总之,本研究成功构建了 SHARPIN 基因敲除的叙利亚仓鼠,为研究 SHARPIN 在调节炎症反应及其它感染性疾病中的作用提供可靠模型。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(5): 489–498. doi: 10.1002/ame2.12265)

陈玉林,蒋虎刚,安涛,等. 聚焦基因治疗的扩张型心肌病模型构建及进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1462-1469.
Chen YL, Jiang HG, An T, et al. Model establishment and progress of focused gene therapy for dilated cardiomyopathy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1462-1469.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.010

聚焦基因治疗的扩张型心肌病模型构建及进展

陈玉林¹,蒋虎刚¹,安涛⁴,李雯¹,严春艳¹,黄倩¹,刘凯^{1,2},
李应东^{1,2,3},赵信科^{1,2,3*}

(1. 甘肃中医药大学 中西医结合学院,兰州 730000;2. 甘肃中医药大学 第三附属医院,
甘肃 白银 730900;3. 甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室,兰州 730000;
4. 中国医学科学院北京协和医学院国家心血管病中心阜外医院心力衰竭中心,北京 100037)

【摘要】 扩张型心肌病是引起心力衰竭的主要疾病之一,存在病因学异质性。近 1/4 扩张型心肌病患者与遗传相关,心室扩大和心肌收缩功能障碍是该病的主要特征。核纤层蛋白 A(Lamin A,LMNA)基因突变是遗传性扩张型心肌病的重要病因,心律失常是 LMNA 突变遗传性扩张型心肌病的重要临床表征。近年来基于 C57/B6 遗传背景小鼠聚焦基因治疗的啮齿类动物扩张型心肌病模型构建及其干预是研究的热点,对犬和猪等大动物模型构建也有一定的研究。大动物尤其是非人灵长类动物是更贴近人的理想模型,但目前对于非人灵长类动物的心脏疾病模型并未涉及扩张型心肌病,故本文综述了基因层面的扩张型心肌病啮齿类动物及大动物模型的研究,提出可进行基于当前研究基础上的非人灵长类扩张型心肌病模型的理念,为今后有针对性地研究致病机制以及临床治疗提供新思路。

【关键词】 扩张型心肌病;LMNA 突变;基因治疗;动物模型
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1462-08

Model establishment and progress of focused gene therapy for dilated cardiomyopathy

CHEN Yulin¹, JIANG Hugang¹, AN Tao⁴, LI Wen¹, YAN Chunyan¹, HUANG Qian¹,
LIU Kai^{1,2}, LI Yingdong^{1,2,3}, ZHAO Xinke^{1,2,3*}

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82260869,82360926),中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)青年岐黄学者基金资助项目,国家中医药管理局“李应东全国名中医传承工作室”建设项目(国中医药办人教函[2022]5号),甘肃省科技重大专项计划(20ZD7FA002),2021年度“双一流”科研重点项目(GSSYXXM-05-ZXYJH-5),甘肃省中医药防治重大疾病科研课题项目(GZKZD-2018-02),甘肃省教育科技创新项目(2021jyjbgs-03),白银市科技计划项目(2022-2-50Y),甘肃中医药大学第三附属医院院内课题(2022YK-11),甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目(2021KCYB-5),甘肃中医药大学附属医院科研及技术创新基金项目(gzfy-2022-10),甘肃省中医药科研课题项目(GKZP-2023-59)。

Funded by the National Natural Science Fund Project(82260869,82360926), Inheritance and Innovation of TCM of the “Millions and Millions” Talent Project (Qihuang Project) Young Qihuang Scholars Project, State Administration of Traditional Chinese Medicine “Li Yingdong National Famous Traditional Chinese Medicine Inheritance Studio” Construction Project (National Traditional Chinese Medicine [2022] No. 5), Gansu Province Science and Technology Major Special Plan (20ZD7FA002), the Double “First-Class” Key Scientific Research Project in 2021 (GSSYXXM-05-ZXYJH-5), Gansu Province Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Major Diseases(GZKZD-2018-02), Gansu Province Education Science and Technology Innovation Project (2021jyjbgs-03), Baiyin Science and Technology Plan Project (2022-2-50Y), Hospital Project of the Third Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine (2022YK-11), Scientific Research and Innovation Project of Gansu University of Traditional Chinese Medicine(2021KCYB-5), Scientific Research and Technology Innovation Project of the Affiliated Hospital of Gansu University Traditional Chinese Medicine (gzfy-2022-10), Gansu Provincial Traditional Chinese Medicine Research Project(GKZP-2023-59).

【作者简介】陈玉林(1995—),男,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。Email:2386546944@qq.com
【通信作者】赵信科(1984—),男,博士,博士后,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。
Email:zxkd412@163.com

(1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. the Third Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Baiyin 730900. 3. Gansu Key Laboratory of TCM Prevention and Treatment of Chronic Diseases, Lanzhou 730000. 4. State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovasculariseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College Key, Beijing 100037)
Corresponding author: ZHAO Xinke. E-mail: zxkd412@ 163.com

[Abstract] Dilated cardiomyopathy is a main disease that causes heart failure and exhibits etiological heterogeneity. Nearly a quarter of dilated cardiomyopathy in patients is related to genetics, and ventricular dilation and myocardial systolic dysfunction are the main characteristics of the disease. LMNA mutation is a major cause of hereditary dilated cardiomyopathy, and arrhythmia is a major clinical manifestation of hereditary dilated cardiomyopathy with LMNA mutation. In recent years, establishment of a dilated cardiomyopathy model in C57/B6 mice and its treatment by focused gene therapy has been a research focus, and some important conclusion have been drawn from the establishment of large animal models in dogs and pigs. However, large animals, especially non-human primates, are closer to humans. At present, dilated cardiomyopathy is not involved in the heart disease model of non-human primates. Therefore, this article reviews studies on rodent and large animal models of dilated cardiomyopathy at the genetic level and proposes the idea of developing a dilated cardiomyopathy model in a non-human primate. It also provides new ideas to study the pathogenesis and clinical treatment.

[Keywords] dilated cardiomyopathy; LMNA mutation; gene therapy; animal model

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

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是在没有异常负荷条件或冠状动脉疾病能够引起左心室收缩功能障碍的情况下存在左心室(left ventricle, LV)扩张和收缩功能障碍^[1]。DCM 存在病因学异质性,非遗传性占 75%。DCM 的患病率约为 1/250 ~ 1/2500,在成人中发病率每年可达 7/100 000,在儿童中发病率每年可达 0.57/100 000,男性高于女性,且 66%的儿童患有特发性疾病^[2]。人 DCM 遗传背景特定致病突变仍未明确,其研究也是当前热点。心肌病的遗传复杂性挑战了传统“单基因疾病”理念,目前研究集中于“力传导缺陷”假说,未来研究希望发现遗传突变组合,理解心肌病的分子亚型^[3]。基因突变是 DCM 的重要病因,核纤层蛋白 A(Lamin A, LMNA)突变是导致 DCM 的常见突变之一。

1 LMNA 突变是遗传性 DCM 的重要病因

LMNA 突变是遗传性 DCM 的重要病因。在包含 2032 名 DCM 患者的研究中,导致家族及散发性 DCM 病例的合并频率为 5%;152 名患者中有 105 名(69%)为男性;LMNA 突变携带者 DCM 诊断的平均年龄为 40 岁。LMNA 突变 DCM 患者的平均 LVEF 为 35%,受损程度稍低;心脏移植(heart transplantation, HTx)的平均年龄为 41 岁;26%的

LMNA 突变 DCM 患者中进行了植入式心律转复除颤器(Implantable cardioverter-defibrillator, ICD)的植入来干预临床心律失常问题^[4-7]。LMNA 突变导致心脏损伤机制有结构假说:LMNA 突变相关层粘连蛋白结构缺陷导致细胞核结构软化和形态异常;机械转导假说:A 型层粘连蛋白突变导致收缩组织的结构调节失常,机械应力抵抗力降低;基因转录假说:Lamin A/C 能够直接结合染色质,调节其空间组织,影响转录和基因定位;线粒体功能破坏:LMNA 突变导致异染色质结构和表观遗传标志物(H3K9me2/3)增加,并破坏线粒体超微结构^[4,7]。LMNA 突变通过影响细胞核机械结构和基因转录导致心肌病的发生。

2 心律失常是 LMNA-DCM 的重要临床表征

心律失常是 LMNA-DCM 的重要临床表征。其中包括房室传导阻滞、束支传导阻滞、窦房结功能异常的传导系统疾病占 73%;心房颤动、心房扑动、室上性心动过速占 61%;室性心律失常占 50%;另外还有心源性猝死^[8]。

3 LMNA-DCM 的突变发生率及突变类型

在一项关于 LMNA 突变的临床研究中发现 66

名心脏移植受者或转诊心脏移植患者中有 5 个突变 (7.6%), 另外一项研究中 44 名扩张型心肌病患者中有 4 个突变 (9.1%) (LMNA 突变的类型及表型如表 1)。所有 LMNA-DCM 都伴有不同程度的心律失常。LMNA 突变的类型有 *p. Arg541Cys*、*p. Arg541Gly*、*p. Arg89Leu*、*p. Val256Gly*、

*p. Gly400Argfs** 11、*p. Thr510Tyrfs** 42、*p. Gln246**、*p. Ser431**、*p. Tyr481**，其中 *p. Arg89Leu*、*p. Val256Gly*、*p. Gly400Argfs** 11、*p. Thr510Tyrfs** 42、*p. Gln246**、*p. Ser431**、*p. Tyr481** 突变伴有房室传导阻滞，*p. Gly400Argfs** 11 突变伴有病态窦房结综合征^[9]。

表 1 LMNA 突变的类型及表型

Table 1 Types and phenotypes of LMNA mutations									
突变类型 Mutation type	N(外显) N(exon)	DCM	AVB	SSS	CD + SWMA	HF	CPK	ICD	OHT
<i>p. Arg541Cys</i>	1(1)	+	-	-	+(LBBB)	+	0	1	1
<i>p. Arg541Gly</i>	3(2)	+	-	-	+(NBBB)	-	0	0	-
<i>p. Arg89Leu</i>	1(1)	+	+	-	-	-	0	0	1
<i>p. Val256Gly</i>	1(1)	+	+	-	-	-	0	0	-
<i>p. Gly400Argfs</i> * 11	3(2)	+	+	+	-	+	2	0	0
<i>p. Thr510Tyrfs</i> * 42	5(4)	+	+	-	-	-	3	2	1
<i>p. Gln246</i> *	2(1)	+	+	-	-	+	0	0	-
<i>p. Ser431</i> *	5(4)	+	+	-	-	-	0	1	1
<i>p. Tyr481</i> *	4(4)	+	+	-	-	+	2	0	2

注: DCM: 扩张型心肌病; AVB: 房室传导阻滞; HF: 心力衰竭; SWMA: 节段性壁运动异常; SSS: 病态窦房结综合征; CD: 传导性疾病; CPK: 磷酸肌酸激酶; ICD: 植入型心律转复除颤器; OHT: 心脏移植; LBBB: 左束支传导阻滞; NBBB: 非特异性束支传导阻滞; +: 患有; -: 不患有。
Note. DCM. Dilated cardiomyopathy. AVB. AV block. HF. Heart failure. SWMA. Segmental wall motion abnormalities. SSS. Morbid sinus syndrome. CD. Conductive disease. CPK. Phosphocreatine kinase. ICD. Implantable cardioverter defibrillator. OHT. Heart transplant. LBBB. Left bundle branch block. NBBB. Non-specific bundle branch block. +. With. -. No.

4 聚焦基因治疗的啮齿类动物 DCM 模型

近年来基于 C57/B6 遗传背景小鼠聚焦基因治

疗的啮齿类动物 DCM 模型构建及其干预也是研究的热点(总结如表 2)。

对含 *p. H222P* LMNA 突变的小鼠模型中 *Lmna*^{H222P/H222P} 突变导致小鼠胚胎体内心脏缺陷, 赖

表 2 聚焦基因治疗啮齿类动物 DCM 模型

Table 2 A rodent DCM model that is focused on gene therapy				
基因靶点及 突变类型 Gene targets and the type of mutations	是否基于临 床样本 Is it based on a clinical sample	研究内容 Research contents	干预措施 Intervention study	文献来源 Literature reference
<i>SDHAF4</i> -CM-KO	是 Yes	揭示了线粒体复合体 II 在扩张型心肌病发生发展中的重要作用 Evealed the important role of mitochondrial complex II in the development and progression of dilated cardiomyopathy	补充富马酸靶向线粒体或抑制线粒体分裂改善线粒体动力学, 部分恢复心功能并延长突变小鼠的寿命 Fumarate supplementation for targeting to mitochondria or inhibition of mitochondrial fission improves mitochondrial dynamics, partially restores cardiac function and extends the lifespan of mutant mice	[10]
<i>Atat1</i> -KO	是 Yes	证明了由 cofilin-1 和 MRTF-A/SRF 介导的肌动蛋白-微管细胞骨架相互作用, 促进了 LMNA 突变引起的扩张型心肌病 Demonstrated that the actin-microtubule cytoskeleton interactions mediated by cofilin-1 and MRTF-A/SRF promoted a dilated cardiomyopathy caused by LMNA mutations	调节 α -微管蛋白乙酰化水平 Regulation of α -tubulin ETC levels	[11]
<i>BAG3</i> -CM-KO	是 Yes	抑制 HDAC6 保护心脏功能 HDAC6 inhibition protected the cardiac function	iPSC-CMs 与表型筛选和深度学相结合具有加速药物发现的能力 iPSC-CMs combined with phenotypic screening and depth science have the ability to accelerate drug discovery	[12]

续表 2

基因靶点及 突变类型 Gene targets and the type of mutations	是否基于临 床样本 Is it based on a clinical sample	研究内容 Research contents	干预措施 Intervention study	文献来源 Literature reference
<i>PLN-R14-KO</i>	是 Yes	PLN-R14del 相关心肌病的首表现中蛋 白质稳态和 PLN 蛋白聚集的改变 Altered protein homeostasis and PLN protein aggregation in the first manifestation of PLN- R14del-associated cardiomyopathy	对 PLN 蛋白聚集的干预可能作为新的靶点 Prognosis for PLN protein aggregation may serve as new targets	[13]
<i>BRD4-CM-KO</i>	是 Yes	BRD4 调节心肌细胞线粒体稳态有重要 作用 BRD4 has an important role in regulating mitochondrial homeostasis in cardiomyocytes	临床前模型中小分子 BET 蛋白抑制剂(如 JQ1)已显示出逆转心肌肥厚和心力衰竭的 疗效 Small-molecule BET protein inhibitors such as (such as JQ1) in preclinical models have shown efficacy to reverse cardiac hypertrophy and heart failure	[11]
<i>TAB2-CM-KO</i>	是 Yes	TAB2 是心肌稳态和重构的关键调节因 子,通过抑制 ripk1 依赖的细胞凋亡和坏 死性凋亡 TAB2 is a key regulator of cardiac homeostasis and remodeling by inhibiting ripk1 dependent and necrotising apoptosis	靶向 ripk1 为可能的治疗靶点 Targeting ripk1 as a possible therapeutic target	[14]
<i>LEMD2-CM-KI</i>	是 Yes	LEMD2 对基因组稳定性和心脏功能的重 要性 Importance of LEMD2 for genome stability and cardiac function	心肌细胞特异性 LEMD2 基因治疗 Cardiomyocyte-specific LEMD2 gene therapy	[15]
<i>Tnnt2-KI</i>	是 Yes	心脏驻留与噬细胞通过 TRPV4 依赖的机 制感知机械刺激,协调适应性重塑和衰竭 心脏的存活 Heart residence and phages sense mechanical stimulation through a TRPV4 dependent mechanism, coordinating adaptive remodeling and survival of the failing heart	TRPV4 通道活性调节 DCM 的适应性重构和 冠状动脉血管生成,机械感知是心脏巨噬 细胞活化的机制 TRPV4 channel activity regulates adaptive remodeling of the DCM and coronary angiogenesis, and mechanoeption is the mechanism of cardiac macrophage activation	[16]
<i>OGT/OGA-CM-KI</i>	是 Yes	过度的 o-glcnae 化可导致心肌病,部分由 于能量缺陷 Excessive o-glcnae comorylation can cause cardiomyopathy, partly due to energetics defects	减少过度的 o-glcnae 糖基化 To reduce the excessive o-glcnae idiorylation	[17]
<i>Bag5-KI</i>	是 Yes	BAG5 的失活突变可导致 DCM, BAG5 可 能是 DCM 病例的基因检测靶点 Inactivating mutations in BAG5 can cause DCM, and BAG5 may be a target for genetic testing in DCM cases	基因治疗 Gene therapy	[18]
<i>RLC/MYL2-KI</i>	是 Yes	突变诱导的肌球蛋白能量状态的重新分 布是导致人类 DCM-D94A 突变相关机制 之一,影响 SRX-DRX 平衡 Mutation-induced redistribution of myosin energy states is one of the associated mechanisms leading to DCM-D94A mutations in humans, affecting the SRX-DRX balance	DCM-d94a 突变降低了肌球蛋白运动功能, 导致小鼠发生收缩功能低下和 DCM,未来 可从此机制开展工作 DCM-d94a mutation reduced the automotor function of myoidal eggs, leading to the contractile hypofunctional phenotype and DCM in mice, which can be developed in this mechanism in the future	[19]
<i>NR4A2-CM-KI</i>	否 No	NR4A2 过表达导致细胞周期再进入和 DNA 复制增加,但不导致心肌细胞分裂 导致 DCM NR4A2 overexpression leads to cell cycle re- entry and increased DNA replication, but does not cause cardiomyocyte division leading to DCM	核受体作为一个新的重要的调节因子调节 心肌细胞自我更新和心脏重生 Nuclear receptors as a new important regulator regulating cardiomyocyte self-renewal and cardiac rebirth	[20]

续表 2

基因靶点及 突变类型 Gene targets and the type of mutations	是否基于临 床样本 Is it based on a clinical sample	研究内容 Research contents	干预措施 Intervention study	文献来源 Literature reference
<i>ADAR1</i> -CM-KO	否 No	具有酶活性的 ADAR1 可预防由内源性非编辑 RNA 触发的 irf7 导致的心脏自身炎症反应引起的 DCM Enzymatically active ADAR1 prevents DCM resulting from the cardiac autoinflammatory response of the irf7 guides triggered by the endogenous non-edited RNA	ADAR1 在心肌细胞中具有不依赖 RNA 编辑的功能,预防心衰发生 ADAR1 has the function of nonisis RNA editing in cardiomyocytes to prevent the occurrence of heart failure	[21]
<i>LMNA</i> -CM-KO	否 No	SUN1 微蛋白的心肌细胞特异性表达可预防心脏病进展 Cardiomyocyte-specific expression of the SUN1 microprotein prevents cardiomyopathy progression	可能避免了开发针对每种不同 LMNA 心脏病诱发突变(有超过 450 种突变)的特异性疗法 Development of specific therapies for each different LMNA cardiomyopathy-induced mutations(with more than 450 mutations) may be avoided	[22]
<i>HDAC6</i> -KO	否 No	去乙酰化酶在控制肌原纤维功能和心肌被动僵硬中的作用,提示可逆的乙酰化改变了肌联蛋白的顺应性 Role of deacetinase in controlling myofibrillar function and passive stiffness of myocarmuscle suggests that reversible acetinchanges the compliance of myxin	靶向 HDAC6 来操纵心脏弹性特性 To the HDAC6 to manipulate the cardiac elastic properties	[23]
<i>Rev-erbα/β</i> -CM-KO	否 No	生物钟介导的预测和营养诱导的反应在心肌代谢中的时间协调,心脏分子睡眠类型可能参与了人类 DCM 的发生 Temporetemporal coordination of clock-mediated predictions and nutrient-induced responses in myocardial metabolism, cardiac molecular sleep types may be involved in the development of DCM in humans	Rev-erb 下游的心肌生物学为治疗靶点 Cardiac muscle biology downstream of Rev-erb is a therapeutic target	[24]
<i>CUL1/2</i> -KO	否 No	ULK1 和 ULK2 在发育中的心脏中功能冗余,而 ULK1 在成人心脏中具有更独特、更突出的作用 ULK1 and ULK2 have several functions in the developing heart, while ULK1 has a more distinct and prominent role in the adult heart	提高 ULK1 活性可能代表了部分心肌疾病的潜在治疗方法 Improving ULK1 activity may represent a potential therapeutic approach for several myocardial disorders	[25]
<i>Tmem65</i> -KD	否 No	Imem65 功能异常导致闰盘(ICD)结构受损,心脏电生理异常,最终导致心脏病 Imem65 abnormal function leads to boudoir disc (ICD) structure damage, cardiac electrophysiological abnormalities, and eventually leads to cardiomyopathy	未来需了解 Tmem65 水平降低时发生死亡的原因 Future future needed to understand the causes of Tmem65 reduction	[26]
<i>MTFP1</i> -CM-KO	否 No	揭示了 MTFP1 在控制生物能量效率和细胞死亡敏感性方面的新功能,并确定了其在预防致病性心脏重构中的重要性 Recovers a novel function of MTFP1 in controlling bioenergetic efficiency and cell-death plant sensitivity and identifies its importance in preventing pathogenic cardiac remodeling	MTFP1 有望成为减轻心脏病理事件和心脏疾病代谢重构的靶点 MTFP1 is expected to be a target for attenuated cardiac pathology events and metabolic remodeling in cardiac diseases	[27]
<i>Mst1</i> -CM-KI	否 No	Hippo 信号激活通过抑制线粒体基因介导线粒体损伤,从而促进 DCM 的发生发展 Hippo signaling activation mediates mitochondrial damage by inhibiting mitochondrial genes, thus contributing to the development of DCM	Hippo 通路是治疗心脏病线粒体功能障碍的重要靶点 Hippo pathway is a target for the treatment of mitochondrial dysfunction in cardiomyopathy	[28]

注:CM:心肌细胞;KO:基因敲除;KI:基因敲入;KD:基因过表达。
Note. CM. Cardiomyocyte. KO. Gene knockout. KI. Gene knock-in. KD. Gene overexpression.

氨酸特异性去甲基化酶 1 抑制剂 (lysine-specific demethylase 1, LSD1) GSK-LSD1 挽救了 $Lmna^{H222P/H222P}$ 胚胎的心脏发育,且可预防小鼠的纤维化和心力衰竭,靶向组蛋白去甲基化酶 LSD1 可在核纤层蛋白病小鼠模型中预防心肌病^[29];对相同遗传背景的两个独立的大鼠品系,建立近端和远端 TTNtv 模型 (TTNtvA: A 带变异; TTNtvZ: Z 盘变异; 纯合突变的大鼠无法存活,杂合突变的大鼠以正常的孟德尔比率出生) 实验发现核糖体分析确定了 titin 的截短变异体的翻译足迹,TTN 的近端和远端 TTNtv 改变亚型加工并触发 NMD,大鼠和人类的 TTNtv 对心脏几何形状和功能产生不利影响,未来的研究聚焦于确定在 TTNtv 和遗传或环境的二次触发相互作用中风险最大^[30];对 Rbm20R636Q-KO 小鼠模型,纯合子突变小鼠的短轴缩短分数显著降低表现出与 DCM 一致的形态学特征^[31-32]。实验发现心脏基因的异常剪接 (如 TTN 突变) 是 RBM20 相关心肌病的主要原因,通过 AAV9 对这些小鼠进行包含 ABEmax-VRQR-SpCas9 和单向导 RNA 的 ABE 成分的全身递送,心功能恢复且寿命延长^[33]。RNA-seq 显示,ABE 校正挽救了 R636Q/R636Q 小鼠的心脏转录谱,全身校正 ABE 减少了 CMs 中存在的毒性 RNP 颗粒,并挽救了小鼠的心功能障碍^[34]。

5 扩张型心肌病大动物模型研究

大动物构建模型有着绝对优势,包括生理、认知能力、神经解剖学、社会复杂性、繁殖和发育等方面非人灵长类与人类具有高度相似性。神经系统相似性:研究脑脊髓接口的可植入组件,为脊髓损伤患者的概念验证研究提供了一条实用的转化途径^[35];器官解剖学相似性:基于基因编辑技术,NHPs 被用于开发模拟人类疾病 (如癌症) 的高效转化医学平台^[36];生殖系统相似性:自体鞘膜干细胞移植可以改善 NHPs 激素水平以及早发性卵巢功能不全的症状^[37]。非人灵长类动物 (non-human primates, NHPs) 的大型的单细胞转录组图谱已构建,包含了来自成年 NHPs 食蟹猴 45 个组织、113 个细胞群的超过 100 万个细胞,提供了一个巨大的注释资源^[38-39]。基于超灵敏序贯荧光原位杂交 (USeqFISH) 的空间转录组学已开发,可用于非人灵长类动物中原位 AAV 分析和多模态单细胞分析^[40-41]。在蛋白层面,反义寡核苷酸 (anti-sense oligonucleotides, ASO) 在 NHPs 肌肉中的效力的探

究:调节与血浆蛋白的结合可以以物种依赖性的方式影响 ASO 活性和在肝外组织的分布,为确定增强 ASO 在肌肉组织中的效力的其他策略奠定了基础^[42];分泌蛋白 PCSK9 (LDL 受体的拮抗剂) 失活对治疗高胆固醇血症的探究^[43-44];在 6 只非人灵长类动物中单次输入表达靶向 PCSK9 的工程巨核酸酶的 AAV 载体可导致肝中 PCSK9 的剂量依赖性破坏,以及循环 PCSK9 和血清胆固醇的稳定减少,证明了在非人灵长类动物中具有生理学意义的高效体内编辑^[45]。

大动物犬模型目前存在犬类天然 DCM 模型及突变基因,易患天然 DCM 的犬类有纽芬兰犬、圣伯纳犬、杜宾猎犬、大丹犬、爱尔兰猎狼犬、拳师犬、英国可卡犬,其中与人 DCM 相关的基因有 ACTC1、ACTN2、CSRP3^[46]。犬类模型构建方式为小剂量 (0.7 mg/kg) 阿霉素经 5F Judkins 导管注入左冠状动脉主干,每周重复输注,持续 5 周。模型实验结果显示肌纤维萎缩和细胞质空泡化,并伴有间质纤维化,主要见于左心室;证明反复冠状动脉内灌注阿霉素是一种简单可靠的制备犬扩张型心肌病模型的方法^[47]。

在关于基因突变相关的模型上,2019 年,家系研究揭示位于 1 号染色体长臂的 RBM20 基因第九个外显子错义突变可导致 DCM^[48]。正常 RBM20 存在于细胞核,突变 RBM20 在胞质异常聚集,突变 RBM20 导致 TTN、CAMK2D 等重要功能基因转录的 pre-mRNA 异常剪切^[49-51]。RBM20 存在多种突变,其中位于 RS 区域的最常见^[50],人 R636S 突变被用于 DCM 猪模型,通过具有高度精确性和可控性的 TALEN 基因编辑里的同源定向修复技术 (HDR) 引入错义突变序列 (R636S) 及一个防再次被切割的 Bgl II 序列^[51],超声显示纯合突变猪 EF 值明显下降,杂合子无明显改变,MRI 也显示纯合突变猪心脏扩大,EF 下降。新生纯合突变猪出生时心脏即明显改变:心脏体积增大,心室扩张,室壁更薄,更柔软和脆弱,心脏重量明显增加;杂合突变胞质少量聚集 RBM20,纯合突变大量聚集;电镜显示肌节缩短且结构受损,心肌细胞排列紊乱。另外参照文献^[52],在 iPCS 中验证了碱基编辑和先导编辑在 RBM20 基因突变的效果,并进一步在其 DCM 小鼠模型中得到证实,由此提出在大动物模型中是否可以有此效果,需进一步验证。纯合突变猪生存率明显降低;猪血浆 ANP 和 BNP 明显增加;RBM20 纯合

突变猪心肌纤维化、心肌肥大、心肌受损等相关基因上调,细胞周期、DNA 合成相关基因下调。

6 总结与展望

非人灵长类依然是更贴近人类的模型,猴在免疫相关基因表达模式和细胞通讯方面与人类的相似程度显著高于小鼠^[52],目前对于非人类灵长类动物的心脏疾病模型并未涉及 DCM,而猴模型是很大的动物心脏疾病模型,但目前并未从基因层面创建 DCM 模型。目前对于 DCM 的治疗集中于心衰层面,暂未发现可治疗因基因突变导致 DCM 的药物,有研究利用 iPSCs 表明洛伐他汀改善 LMNA 心肌病的内皮功能障碍,他汀类药物可能为新的药物选择。最新研究利用碱基编辑和先导编辑等方式修正基因突变,在小动物模型中已取得了成果,不仅在 iPSC 中验证了碱基编辑和先导编辑在修正 RBM20 突变的效果,还在其 DCM 小鼠模型中证实了 ABE 可有效修正基因突变,恢复其心脏功能并延长寿命^[53]。在今后的研究中基于基因治疗的大动物及非人灵长类模型的发展,借助高层次平台和科研团队可以从基因层面治疗 DCM 实现更大的突破。

参 考 文 献(References)

- [1] Merlo M, Daneluzzi C, Mestroni L, et al. Historical terminology, classifications, and present definition of DCM [M]. Springer: Dilated Cardiomyopathy: From Genetics to Clinical Management; 2019.
- [2] Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases [J]. Eur Heart J, 2008, 29(2): 270–276.
- [3] McNally EM, Barefield DY, Puckelwartz MJ. The genetic landscape of cardiomyopathy and its role in heart failure [J]. Cell Metab, 2015, 21(2): 174–182.
- [4] Kayvanpour E, Sedaghat-Hamedani F, Amr A, et al. Genotype-phenotype associations in dilated cardiomyopathy: meta-analysis on more than 8000 individuals [J]. Clin Res Cardiol, 2017, 106(2): 127–139.
- [5] Mehrabi M, Morris TA, Cang Z, et al. A study of gene expression, structure, and contractility of iPSC-derived cardiac myocytes from a family with heart disease due to LMNA mutation [J]. Ann Biomed Eng, 2021, 49(12): 3524–3539.
- [6] Shelly S, Lopez-Jimenez F, Chacin-Suarez A, et al. Accelerated aging in LMNA mutations detected by artificial intelligence ECG-derived age [J]. Mayo Clin Proc, 2023, 98(4): 522–532.
- [7] Yamada T, Nomura S, Amiya E, et al. LMNA mutations and right heart failure in patients with cardiomyopathy and with left ventricular assist devices [J]. J Card Fail, 2023, 29(5): 855–857.
- [8] Saj M, Bilinska ZT, Tarnowska A, et al. LMNA mutations in Polish patients with dilated cardiomyopathy: prevalence, clinical characteristics, and *in vitro* studies [J]. BMC Med Genet, 2013, 14: 65.
- [9] Sidhu K, Castrini AI, Parikh V, et al. The response to cardiac resynchronization therapy in LMNA cardiomyopathy [J]. Eur J Heart Fail, 2022, 24(4): 685–693.
- [10] Wang X, Zhang X, Cao K, et al. Cardiac disruption of SDHAF4-mediated mitochondrial complex II assembly promotes dilated cardiomyopathy [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 3947.
- [11] Kim SY, Zhang X, Schiattarella GG, et al. Epigenetic reader BRD4 (bromodomain-Containing protein 4) governs nucleus-encoded mitochondrial transcriptome to regulate cardiac function [J]. Circulation, 2020, 142(24): 2356–2370.
- [12] Wang M, Pan W, Xu Y, et al. Microglia-mediated neuroinflammation: a potential target for the treatment of cardiovascular diseases [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 3083–3094.
- [13] Eijgenraam TR, Boogerd CJ, Stege NM, et al. Protein aggregation is an early manifestation of phospholamban p. (Arg14del)-related cardiomyopathy: development of PLN-R14del-related cardiomyopathy [J]. Circ Heart Fail, 2021, 14(11): e008532.
- [14] Miwa S, Kashyap S, Chini E, et al. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging [J]. J Clin Invest, 2022, 132(13): e158447.
- [15] Dabke K, Hendrick G, Devkota S. The gut microbiome and metabolic syndrome [J]. J Clin Invest, 2019, 129(10): 4050–4057.
- [16] Wong NR, Mohan J, Kopecky BJ, et al. Resident cardiac macrophages mediate adaptive myocardial remodeling [J]. Immunity, 2021, 54(9): 2072–2088.
- [17] Sahu M, Reddy VRM, Park C, et al. Review article on the lattice defect and interface loss mechanisms in kesterite materials and their impact on solar cell performance [J]. Solar Energy, 2021, 230: 13–58.
- [18] Claassen JAHR, Thijssen DHJ, Panerai RB, et al. Regulation of cerebral blood flow in humans: physiology and clinical implications of autoregulation [J]. Physiol Rev, 2021, 101(4): 1487–1559.
- [19] Kanai Y. Overview on poly(ADP-ribose) immuno-biomedicine and future prospects [J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2016, 92(7): 222–236.
- [20] Ashraf S, Taegtmeier H, Harmancey R. Prolonged cardiac NR4A2 activation causes dilated cardiomyopathy in mice [J]. Basic Res Cardiol, 2022, 117(1): 33.
- [21] Garcia-Gonzalez C, Dieterich C, Maroli G, et al. ADAR1 prevents autoinflammatory processes in the heart mediated by IRF7 [J]. Circ Res, 2022, 131(7): 580–597.
- [22] Roager HM, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3294.
- [23] Ramirez-Campillo R, García-Hermoso A, Moran J, et al. The effects of plyometric jump training on physical fitness attributes in basketball players: a meta-analysis [J]. J Sport Health Sci,

- 2022, 11(6): 656–670.
- [24] Dai J, Su Y, Zhong S, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 145.
 - [25] Martinez FJ, Rabe KF, Ferguson GT, et al. Reduced all-cause mortality in the ETHOS trial of budesonide/glycopyrrolate/formoterol for chronic obstructive pulmonary disease. A randomized, double-blind, multicenter, parallel-group study [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(5): 553–564.
 - [26] Teng ACT, Gu L, di Paola M, et al. Tmem65 is critical for the structure and function of the intercalated discs in mouse hearts [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6166.
 - [27] Donnarumma E, Kohlhaas M, Vimont E, et al. Mitochondrial Fission process 1 controls inner membrane integrity and protects against heart failure [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6634.
 - [28] Yamashita S. Recent progress in oculopharyngeal muscular dystrophy [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(7): 1375.
 - [29] Guénantin AC, Jebeniani I, Leschik J, et al. Targeting the histone demethylase LSD1 prevents cardiomyopathy in a mouse model of laminopathy [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(1): e136488.
 - [30] Schafer S, de Marvao A, Adami E, et al. Titin-truncating variants affect heart function in disease cohorts and the general population [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(1): 46–53.
 - [31] Dai J, Li Z, Huang W, et al. RBM20 is a candidate gene for hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Can J Cardiol*, 2021, 37(11): 1751–1759.
 - [32] Yamamoto T, Sano R, Miura A, et al. I536T variant of RBM20 affects splicing of cardiac structural proteins that are causative for developing dilated cardiomyopathy [J]. *J Mol Med*, 2022, 100(12): 1741–1754.
 - [33] de Frutos F, Ochoa JP, Fernández AI, et al. Late gadolinium enhancement distribution patterns in non-ischemic dilated cardiomyopathy: Genotype-phenotype correlation [J]. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2022, 9(2): 37–49.
 - [34] Nishiyama T, Zhang Y, Cui M, et al. Precise genomic editing of pathogenic mutations in *RBM20* rescues dilated cardiomyopathy [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(672): eade1633.
 - [35] Capogrosso M, Milekovic T, Borton D, et al. A brain-spine interface alleviating gait deficits after spinal cord injury in Primates [J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 284–288.
 - [36] Zhong L, Huang Y, He J, et al. Generation of *in situ* CRISPR-mediated primary and metastatic cancer from monkey liver [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 411.
 - [37] Chen H, Xia K, Huang W, et al. Autologous transplantation of thecal stem cells restores ovarian function in nonhuman Primates [J]. *Cell Discov*, 2021, 7(1): 75.
 - [38] Han L, Wei X, Liu C, et al. Cell transcriptomic atlas of the non-human primate *Macaca fascicularis* [J]. *Nature*, 2022, 604(7907): 723–731.
 - [39] Chang L, Anna KA, Wang HJ, et al. Stable expression of an HIV decoy receptor after *in vivo* HSC transduction in mice and NHPs: Safety and efficacy in protection from SHIV [J]. *Molecular Therapy*, 2023, 31(4): 1059–1073.
 - [40] Zhong Z, Luo XY, Xiang P, et al. MRTF- α alleviates myocardial ischemia reperfusion injury by inhibiting the inflammatory response and inducing autophagy [J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(2): 343–359.
 - [41] Liu Z, Zhou J, Xu W, et al. A novel STING agonist-adjuvanted pan-sarbecovirus vaccine elicits potent and durable neutralizing antibody and T cell responses in mice, rabbits and NHPs [J]. *Cell Res*, 2022, 32(3): 269–287.
 - [42] Østergaard ME, Jackson M, Low A, et al. Conjugation of hydrophobic moieties enhances potency of antisense oligonucleotides in the muscle of rodents and non-human Primates [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(12): 6045–6058.
 - [43] D’Onofrio N, Prattichizzo F, Marfella R, et al. SIRT3 mediates the effects of PCSK9 inhibitors on inflammation, autophagy, and oxidative stress in endothelial cells [J]. *Theranostics*, 2023, 13(2): 531–542.
 - [44] Goonewardena SN, Rosenson RS. PCSK9: the nexus of lipoprotein metabolism and inflammation in COVID-19 [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2023, 81(3): 235–236.
 - [45] Wang L, Smith J, Breton C, et al. Meganuclease targeting of PCSK9 in macaque liver leads to stable reduction in serum cholesterol [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(8): 717–725.
 - [46] Simpson S, Edwards J, Ferguson-Mignan TF, et al. Genetics of human and canine dilated cardiomyopathy [J]. *Int J Genomics*, 2015, 2015: 204823.
 - [47] Toyoda Y, Okada M, Kashem MA. A canine model of dilated cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, 115(6): 1367–1373.
 - [48] Schultheiss HP, Fairweather D, Caforio ALP, et al. Dilated cardiomyopathy [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 32.
 - [49] Brauch KM, Karst ML, Herron KJ, et al. Mutations in ribonucleic acid binding protein gene cause familial dilated cardiomyopathy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(10): 930–941.
 - [50] Koelemen J, Gotthardt M, Steinmetz LM, et al. RBM20-related cardiomyopathy: current understanding and future options [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(18): 4101.
 - [51] Schneider JW, Oommen S, Qureshi MY, et al. Dysregulated ribonucleoprotein granules promote cardiomyopathy in *RBM20* gene-edited pigs [J]. *Nat Med*, 2020, 26(11): 1788–1800.
 - [52] Qu J, Yang F, Zhu T, et al. A reference single-cell regulomic and transcriptomic map of cynomolgus monkeys [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4069.
 - [53] Sayed N, Liu C, Ameen M, et al. Clinical trial in a dish using iPSCs shows lovastatin improves endothelial dysfunction and cellular cross-talk in LMNA cardiomyopathy [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(554): eaax9276.

李婷婷,张慧,张铭宸,等. 生酮饮食影响运动表现与疲劳恢复的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1470-1478.
Li TT, Zhang H, Zhang MC, et al. Research progress on the influence of a ketogenic diet on athletic performance and fatigue recovery [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1470-1478.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.011

生酮饮食影响运动表现与疲劳恢复的研究进展

李婷婷,张慧,张铭宸,王宏英,张萍萍,王孝文*,孙忠广*

(潍坊医学院康复医学院,山东 潍坊 261053)

【摘要】 生酮饮食可补充血酮,为骨骼肌供能,影响动物和人类的运动表现和疲劳恢复。本文发现生酮饮食通过轴突发芽和神经再支配使肌纤维由 II b 向 II a 转变,改善快肌线粒体的质量与功能,增加组蛋白乙酰转移酶以增强骨骼肌力量;并利用酮体供能,在慢肌中降低糖酵解、提升脂肪酸氧化的能力以提高运动耐力;减轻骨骼肌的内质网应激、氧化应激与炎症反应,保护机体免受损伤,可减少肌糖原的消耗与乳酸的积累,减轻运动后疲劳并促进恢复。本研究认为生酮饮食对机体产生的负面影响较低,能提升运动表现与加快疲劳恢复,可作为竞技运动与康复训练中的饮食方案。

【关键词】 生酮饮食;运动表现;疲劳恢复;骨骼肌力量;运动耐力

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1470-09

Research progress on the influence of a ketogenic diet on athletic performance and fatigue recovery

LI Tingting, ZHANG Hui, ZHANG Mingchen, WANG Hongying, ZHANG Pingping,
WANG Xiaowen*, SUN Zhongguang*

(School of Rehabilitation Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

Corresponding author: SUN Zhongguang. E-mail: sunzhongguang@outlook.com;

WANG Xiaowen. E-mail: wangxiaowen2003@126.com

【Abstract】 Ketogenic diet can supplement blood ketone, provide energy for skeletal muscle, and affect the athletic performance and recovery of animals and humans after fatigue. In this paper, it was found that ketogenic diet transformed muscle fibers from II b to II a through axonal germination and nerve reinnervation, improved the quality and function of mitochondria of fast muscle and increased histone acetyltransferase to enhance skeletal muscle strength. Using ketone body to provide energy, it can reduce glycolysis and improve the ability of fatty acid oxidation in slow muscle to improve exercise

【基金项目】 国家食品安全风险评估中心科研联合攻关计划项目 (LH2022GG11), 山东省自然科学基金青年项目 (ZR2022QH094), 2023 年山东省大学生创新创业训练计划项目 (S202310438041S), 2023 年潍坊医学院大学生创新创业训练计划项目 (X2023041)。

Funded by the National Food Safety Risk Assessment Center Scientific Research Joint Research Project (LH2022GG11), the National Natural Science Foundation of Shandong (ZR2022QH094), the Student Innovation and Entrepreneurship Training Program Project of Shandong Province in 2023 (S202310438041S), the Student Innovation and Entrepreneurship Training Program Project of Weifang Medical University in 2023 (X2023041)。

【作者简介】 李婷婷 (1998—), 女, 硕士, 初级康复治疗师, 研究方向: 营养与运动防治骨骼肌与心脏疾病机制的研究。

Email: tingtinglovestudy@163.com

【通信作者】 孙忠广 (1991—), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 营养与运动防治心脏疾病机制的研究; Email: sunzhongguang@outlook.com;

王孝文 (1968—), 男, 博士, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 营养防治骨骼肌疾病机制的研究。

Email: wangxiaowen2003@126.com。

* 共同通信作者

endurance; It can reduce endoplasmic reticulum stress, oxidative stress and inflammatory reaction of skeletal muscle, protect the body from injury, reduce the consumption of muscle glycogen and the accumulation of lactic acid, reduce fatigue after exercise and promote recovery. It is considered that ketogenic diet has low negative effects on the body, can improve sports performance and accelerate fatigue recovery, and can be used as a diet scheme in competitive sports and rehabilitation training.

【Keywords】 ketogenic diet; athletic performance; fatigue recovery; muscle strength; exercise tolerance

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

生酮饮食(ketogenic diet, KD)是一种高脂肪、极低碳水化合物和适量蛋白质的饮食方案,常作为补充血酮的重要策略,为大脑、骨骼肌和心脏等高能量需求组织提供能量底物^[1]。在碳水化合物摄入减少时,机体葡萄糖的分解代谢受到抑制,不能提供充足的底物和酶,不足以进行三羧酸循环并产生能量。同时胰岛素分泌减少、肝脂肪动员加快,使脂肪酸氧化产生酮体,在线粒体内释放更多能量,进而降低运动时的糖酵解,保存肌糖原,此时饮食中的高脂肪可得到充分利用,造成营养酮症^[2]。骨骼肌对酮体有高亲和力,但一般状态下能量供应贡献率低于 5%,习惯性高脂肪的消耗可提升酮体对能量供应贡献度,在营养酮症状态最高可升至 72%^[2-3]。运动时酮体的利用率增加了 5 倍,肝生成酮体也随之增加造成运动酮症, KD 干预能为运动状态提供更充足的酮体,满足运动对酮体的需求^[3]。

KD 最早用来控制难治性癫痫,在治疗神经系统、内分泌系统和心血管系统的疾病中也卓有成效。近年来逐渐被健身塑形、竞技能力调节等领域关注,并在运动表现与运动疲劳恢复中也发挥一定调节作用^[4-6]。本文通过综述当前 KD 在运动表现与运动疲劳恢复中的动物与人类研究,分析 KD 的应用和作用机制,探讨其使用的安全性及现状,旨在为竞技运动与康复训练提供思路与方案。

1 运动表现

1.1 增强骨骼肌表现的动物实验及机制

KD 在机体中通过肌纤维类型的改变影响骨骼肌质量与力量,腓肠肌主要由 II b 型纤维组成,与常规饮食相比,长期 KD 使骨骼肌质量显著下降,由 II a 纤维组成的足底肌与比目鱼肌的质量却得到增加^[7-8]。骨骼肌的肌性部分主要由 I 型慢缩纤维(慢肌)和 II 型快缩纤维(快肌)两种肌纤维构成, II 型快缩纤维主要分为 II a 氧化型与 II b 酵解型两种^[9]。随着年龄的增长,骨骼肌纤维数量和纤维横

截面积的减小,导致骨骼肌质量下降,肌力降低^[7,10]。老年小鼠在 14 个月的长期喂养期间,常规饮食未引起纤维类型的转变,而 KD 可使 II b 型肌纤维下降, I 型、II a 型肌纤维显著增加,且长期 KD 的 I 型、II a 型平均纤维横截面积更高于短期,可见长期干预对骨骼肌质量与力量提高优于短期^[11]。KD 增加轴突发芽和神经再支配,使氧化型纤维保留,通过分析 $< 750 \mu\text{m}^2$ 的小纤维中的去神经支配分子标志物与乙酰胆碱受体亚基,发现年龄会增加去神经支配分子标志物和乙酰胆碱受体亚基的表达,也随 KD 的干预而增加,且长期 KD 明显优于短期。这表明神经元重塑会随增龄而增加,也因 KD 增加, II a 型肌纤维的神经再支配与骨骼肌质量的增加有关^[11]。Sonjak 等^[12]认为轴突发芽可以改善骨骼肌减少症的骨骼肌质量与功能,且增龄所致的骨骼肌功能的差异与神经再支配反应的稳健性有关^[13]。

短期 KD 改善快肌线粒体质量与功能,4 个月相对短期 KD 诱导腓肠肌中线粒体生物发生标志物线粒体转录因子 A 的表达及线粒体合成蛋白沉默信息调节蛋白 1(sirtuin 1, Sirt1)、Sirt3、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活剂 1 α (peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 alpha, PGC-1 α) 增加。PGC-1 α 是 KD 干预下提升骨骼肌质量与力量的关键基因, PGC-1 α 基因敲除小鼠出现明显的骨骼肌萎缩与运动受损^[11,14]。柠檬酸合酶(citrate synthase, CS)与骨骼肌力量相关,催化三羧酸循环第一步限速反应,是营养物质彻底氧化供能的关键酶,其活性通常代表线粒体功能^[15]。长期 KD 降低线粒体的基因表达与蛋白质合成速率,但并未影响 CS 的活性^[11]。不同时期 KD 均可上调 CS 的活性,电子传递链中氧化磷酸化相关蛋白质辅酶 Q1 β 复合体 8、泛素-细胞色素 C 还原酶核心蛋白 II、细胞色素 C 氧化酶 I 和腺嘌呤核苷三磷酸 5A (分别来自复合物 I、III、IV 和 V) 的水平升高,氧化代谢能力增强, KD 也提高了雄性大鼠腓肠肌中 CS

的活性和线粒体的功能^[11,16-17]。Zhou 等^[18]研究认为 KD 能上调老年小鼠后肢骨骼肌中标记线粒体酶 CS、复合物 I 和复合物 IV 的活性,防止了增龄相关的线粒体功能下降。Hyatt 等^[19]发现复合物 II 底物的腓肠肌线粒体耦合,对保持阻力训练的 KD 大鼠的呼吸控制更显著。

通过测量腓肠肌的蛋白质合成和水解标志物,发现即使短期 KD 中线粒体生物发生标志物水平增加,老年小鼠肌原纤维,线粒体和细胞质部分的蛋白质合成率也会降低,且总蛋白含量的增加并不显著^[11,20]。KD 增加胰岛素受体底物 1 水平,激活作为细胞生长调节因子的雷帕霉素靶蛋白 C1 信号通路,减弱蛋白质合成代谢。蛋白酶体的 3 个蛋白水解亚基($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 5$)的腺嘌呤核苷三磷酸依赖性(20S 和 26S)活性随增龄而增加,长期 KD 使蛋白酶体降解略有减弱。自噬相关标志物微管相关蛋白 1 轻链 3B-II (microtubule-associated protein 1 light chain 3B-II, LC3B-II)、LC3B-II/LC3B-I 值随增龄降低,萎缩相关蛋白叉头转录因子 O1 (forkhead box O1, FOXO1) 和 FOXO3A 随增龄升高,因短期 KD 影响微弱,难以使骨骼肌质量增加。Li 等^[21]发现生酮氨基酸通过自噬信号通路,恢复高脂肪损害的线粒体功能,增强运动表现。

研究发现 14 个月 KD 干预的老年小鼠前肢抓力高于常规组,有更强的骨骼肌力量,而 1 个月的短期干预却未能引起骨骼肌力量的增强,结果表明长期 KD 干预使蛋白乙酰转移酶 p300 的乙酰化升高,因此长期 KD 通过增加组蛋白乙酰转移酶以增强骨骼肌力量^[22]。小鼠骨骼肌特异性敲除 p300 对平均纤维横截面积影响较小,却降低骨骼肌收缩能力,导致握力迅速下降,甚至死亡^[23-24]。2 个月 KD 使中年雌性小鼠腓肠肌中 PGC-1 α 总蛋白与核蛋白升高,但未引起表达的差异,表明翻译后的乙酰化修饰起重要作用,分析显示乙酰化赖氨酸、 β -羟基丁酸赖氨酸和乙酰转移酶 p300 显著增加^[25]。

酮体是 KD 在耐力运动中提供的主要能源物质,在运动中被利用后显著降低。3 周 KD 喂养的小鼠每天经 60 min 运动后,血清 β -羟基丁酸(β -hydroxybutyrate, β -OHB)显著降低,但经负重游泳时间和在体腓肠肌收缩实验结果分析发现,短期 KD 仅起到保留运动耐力的作用^[26]。常规饮食组的血酮在负重游泳后升高,而 KD 小鼠游泳前后血酮变化不大,可认为 KD 干预下的耐力运动主要以酮体

供能^[20]。对小鼠实施 8 周 KD 干预,使血清 β -OHB 上升,但力竭运动后显著下降,且达到力竭的时间长于常规组,证实 KD 造成小鼠酮症适应,利于耐力性运动中利用酮体供能^[27]。小鼠经 12 周 KD 结合运动干预后的血清 β -OHB 仅高于 KD 组,表明长期 KD 干预时的日常耐力训练也消耗酮体供能^[28]。

KD 使糖酵解关键酶转录表达下降,主要通过提升慢肌中脂肪酸氧化相关基因转录表达能力,造成酮症适应,有更强的脂肪运输、代谢与利用能力,进而促进运动耐力的增强^[29]。短期 KD 摄入碳水化合物比例低,率先引起糖酵解的下降,4 周 KD 仅使小鼠骨骼肌中糖酵解关键酶己糖激酶 2 (hexokinase 2, Hk2)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, Pk) 与琥珀酰辅酶 A 转移酶 (succinyl-CoA, Scot) 表达降低,未引起脂肪酸摄取与氧化的相关酶改变^[28]。随着干预时间延长,逐步增强了脂肪酸氧化,并在慢肌中表现显著,8 周 KD 组游离脂肪酸与甘油三酯水平高于常规饮食组,经耐力运动后浓度降低,运动增加了脂肪利用,延长小鼠达到力竭时间,9 周 KD 增加了比目鱼肌中脂肪酸氧化基因肉碱棕榈酰转移酶 1A、羟基酰基辅酶 A 脱氢酶 (hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, HADH) 表达,但腓肠肌中变化不显著^[27,30]。长期 KD 使脂肪酸氧化升高更显著,有更强的运动耐力,12 周干预使 Pk 与 Scot 表达下降,脂肪酸摄取的分化簇 36 (cluster of differentiation 36, Cd36) 和 Hadh 升高,14 个月 KD 干预使老年小鼠游离脂肪酸水平较常规饮食高,悬挂实验总时间延长,运动耐力增强^[22,28]。

比目鱼肌属于慢肌, I 型肌纤维占 60% 以上,以其显著抗疲劳特性在耐力性运动中发挥作用^[31]。在 KD 的干预下,比目鱼肌中促进酮体分解的限速酶羟基丁酸脱氢酶的转录升高,而在腓肠肌中降低,慢肌中的羟基丁酸脱氢酶表达增强,有助于促进酮体的分解和运动耐力的提升。KD 使脂肪酸氧化的关键酶甘油三酯脂肪酶在腓肠肌与比目鱼肌中表达上调,比目鱼肌中激素敏感脂肪酶的表达上调,表明增强慢肌内脂肪的动员是提高运动耐力的主要因素^[32]。Huang 等^[26]增加 KD 中蛋白质的比例后,测试股四头肌中的脂肪酸氧化基因的转录与表达发现,脂肪酸利用关键酶丙酮酸脱氢酶激酶 (pyruvate dehydrogenase kinases, PDKs) 与肉碱棕榈酰转移酶 1b (carnitine palmitoyl transterase-1b, CPT-1b) 表达升高,脂质贮存乙酰辅酶 A 羧化酶 1 转录

能力降低,脂肪酸氧化增强。

1.2 不影响或降低运动表现的动物实验及机制

短期 KD 可能与不同性别的激素水平控制相关,对雌性动物运动表现的增强无效,睾酮对骨骼肌合成与分解代谢的作用最强,而雌激素相关受体在骨骼肌中仅可维持骨骼肌质量^[33-35]。7 d KD 干预使编码骨骼肌萎缩相关泛素连接酶的基因表达、自噬基因 LC3B 表达均上调数倍,血浆胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 含量减少,骨骼肌合成代谢下降,骨骼肌合成代谢相关基因 IGF-1 和 I 型胶原 $\alpha 2$ 基因 (collagen type I $\alpha 2$, COL1A2) 的转录减少。真核翻译起始因子 4E 的转录下降,抑制了骨骼肌中的蛋白质合成,造成雌性小鼠腓肠肌、胫骨前肌和比目鱼肌的质量分别降低了 23%、11% 和 16%,肌纤维大小分别减小了 20%、28% 和 16%,骨骼肌力量下降了 22%,且 2 周 KD 也降低了雌性小鼠有氧能力^[36]。基于短期 KD 对雌性小鼠的实验结果,Nakao 等^[37]提出可以依据此建立骨骼肌减少症动物模型,但此观点尚存在争议,需重复验证。

随着 KD 作用时间的增长,改善了雌性小鼠在干预初期的骨骼肌萎缩,维持了骨骼肌质量与力量,但尚无研究对更长期的干预进行讨论。5 周 KD 升高了雌性小鼠血清酮体,并未增强运动耐力^[38]。2 个月 KD 在腓肠肌中增强了乙酰化,增加了 Sirt3、PGC-1 α 蛋白,真核翻译起始因子 2A 的磷酸化升高了 2 倍,使中年雌性小鼠股四头肌、腓肠肌与比目鱼肌的骨骼肌质量保留,胫骨前肌质量升高,骨骼肌力量和运动耐力维持^[25]。根据长期 KD 使老年雄性小鼠骨骼肌力量增强^[22],Pathak 等^[25]推断在老年雌性小鼠也会有相同表现,但当前缺乏证据证实。

KD 不利于慢性缺血灌注损伤的恢复,存在肢体缺血的患者也应避免 KD。Shalamu 等^[39]对雄性小鼠进行 2 周 KD 喂养后进行后肢缺血灌注损伤手术,再持续 2 周喂养观察,第 4 周时发现缺血后肢骨骼肌中的糖酵解相关基因葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter type 1, GLUT1)、GLUT4 和 Hk2 转录与表达进一步降低,脂肪酸利用基因 Cd36 和 CPT1 转录与表达由术前的升高转而降低,纤维化基因 α -平滑肌肌动蛋白的转录与表达增加,骨骼肌萎缩基因 FOXO3 和 LC3 转录增加,进一步降低了糖酵解,逆转了脂肪酸利用率,引起了骨骼肌的萎缩与纤维化,骨骼肌的恢复与再生情况差。

KD 降低过低体重小鼠的运动耐力,分析发现 KD 干预下小鼠体重低于常规饲料组,体重与运动耐力呈线性正相关,过低体重小鼠表现低脂肪适应能力,运动耐力差,但并未观察到与酮体的利用存在相关性^[27]。不能排除因 KD 食物外形与口感区别于常规饲料,引起小鼠食欲下降造成的体重降低,进而影响运动耐力^[33]。

1.3 维持与增强运动表现的人类实验

KD 更好地改善了运动员的身体成分,但对提升骨骼肌力量的效用有限,甚至可能损害经过训练增强的骨骼肌力量,最终呈现为骨骼肌力量的维持^[40-41]。KD 可以造成运动员体重显著降低,但是 30 d KD 未改变足球运动员的股四头肌面积与最大骨骼肌力量,8 周 KD 对职业运动员的上下肢骨骼肌力量的提升与西方饮食组的差异也不显著^[42-44]。在保持日常运动训练的基础上,常规饮食比 KD 更体现出增强骨骼肌力量的优越性,8 周 KD 只保留了运动员背肌与下肢肌的骨骼肌力量,9 周 KD 也未引起运动员骨骼肌力量的增加^[45-46]。

KD 在运动员中维持与增强运动耐力的需求多于骨骼肌力量。短期 KD 只改善了运动员的身体成分,仅有提升运动耐力的趋势,2 周 KD 提升了男性运动员体内的游离脂肪酸、血酮与血糖水平,25 d KD 只提升了竞走运动员的脂肪酸氧化,10 000 m 性能测试增加不显著^[47-48]。1 个月的 KD 目前认为是适宜时长,稳定提升运动员的运动能力与成绩,但缺乏循证依据,30 d KD 使足球运动员的呼吸交换比降低、高强度有氧运动的能力升高,认为对 KD 有较好的适应并增强了运动耐力,31 d KD 增加 8 名耐力运动员血酮与尿酮水平,降低总体最大摄氧量,未引起 Banister 训练脉冲、总运动距离和次最大运动能力 (包括力竭时间与距离) 的改变,但在速度为 12 km/h 与 13.5 km/h 时运动效率高,最大摄氧量显著增加^[42,49]。超过 1 个月的饮食干预对运动员的运动表现产生了负面影响,男性运动员 6 周 KD 相对于高碳水饮食,会延长 5 km 跑步实验时间,降低成绩,而 8 周常规饮食限制引起了运动最大摄氧量的增加,KD 仅能维持运动耐力^[45,50]。长期 KD 使人体产生了适应,在供能方式上以脂肪酸氧化为主,不影响运动表现,12 周 KD 提高了男性运动员血酮水平,增加了 6 s 冲刺测试和临界功率测试的峰值功率,增强了 100 km 计时赛测试中的脂肪酸氧化,但不能显著提升成绩^[51]。6 个月的长期只 KD

造成了葡萄糖代谢的下降,并未影响运动表现^[52]。

目前常对运动员采用“低训高赛”的方式,即训练时的中高强度运动摄入高脂低碳水饮食进行生酮,减低体重并维持或增强运动表现,在高强度的比赛中摄入高碳水快速提供能量,提高成绩^[53]。Burke 等^[54]发现,通过对男性竞走运动员进行 5 d KD 干预适应和 1 d 高碳水饮食,比 6 d 高碳水饮食组 200 km 测试的脂肪酸氧化升高了 25%,增加了最大摄氧量,8 km 与 5 km 速度测试也分别提升了 50% 和 20%。通过综合的 Meta 分析显示,KD 只对改善呼吸交换率有效,难以通过影响耐力运动员最大摄氧量、最大心率、力竭时间和自感劳累等级,达到增强运动耐力的目的,但并未对时间进行区分,后续可考虑将时间亚组分析以证实不同时长 KD 对运动员运动表现的影响^[55]。

KD 对不同性别人类的影响也存在差异,在女性的运动表现中提升效果差,还加重年轻女性的运动后的骨骼肌疲劳^[56-58]。8 周 KD 让女性运动员深蹲与卧推力量低于常规饮食组,3 个月 KD 只降低了体重,呈现维持了女性举重运动员的竞赛成绩^[46,59]。

KD 在非职业运动员群体中稳定提升了运动表现,单独 KD 作用的运动表现提升高于配合日常运动训练,主要增强中低强度运动表现,难以改变高强度运动,KD 对运动表现的改变在高强度运动员群体中尚未发挥最佳效果^[30]。50 ~ 70 岁人群中骨骼肌减少性肥胖患者经 6 周干预后,显著增加了骨骼肌力量,肥胖女性经 45 d KD 干预后握力增加,与脂肪量呈负相关、无脂肪量呈正相关,同体重的减轻无关^[60-61]。52 周 KD 使男性健康成人最大摄氧量增加 3.14%,保持了骨骼肌力量与运动耐力^[62]。

2 运动保护与疲劳恢复

2.1 运动保护与疲劳恢复的动物实验及机制

近年研究显示,KD 可以通过减轻骨骼肌的内质网应激、氧化应激与炎症反应,营造运动状态下健康的细胞环境,保护机体免受损伤^[63]。KD 使内质网应激反应的关键蛋白水平下降,短期下调 C/EBP 同源蛋白水平,长期下调免疫球蛋白重链结合蛋白、肌醇依赖酶 1 α 和蛋白质二硫键异构酶水平^[11]。机体活性氧随增龄与机体的病理变化增加,抗氧化蛋白超氧化物歧化酶 2 和过氧化氢酶的水平逐渐降低,可随长期 KD 显著增加,减少氧化应激,

维持氧化-还原平衡^[11]。KD 也降低因剧烈运动产生的过量白介素-6(interleukin-6, IL-6),减轻炎症反应对机体造成的损害,增强脂肪酸氧化^[32]。肌酸激酶与乳酸脱氢酶是骨骼肌损伤的标志物,剧烈运动后升高而诱发急性骨骼肌损伤,经 KD 干预降低,保护机体在耐力运动中免受损伤^[27]。血浆成纤维细胞生长因子 21 存在抗炎作用,9 周 KD 使其表达增加,也有助于能量稳态的调节^[30,64]。

Huang 等^[65]认为 KD 增强“代谢灵活性”,减少糖酵解并增强脂肪酸氧化,加快耐力运动后的恢复。开放场测试将小鼠放于固定空间,经测试运动轨迹发现力竭运动经 24 h 休息后 KD 组活动轨迹更频繁。运动中代谢产生的乳酸和血氨诱发运动后疲劳,而 KD 小鼠足底肌中乳酸积累少,血氨水平低,证实 KD 加快了小鼠运动后功能恢复。当前 KD 对骨骼肌中运动保护与疲劳恢复机制的动物实验仍有所欠缺,后续可通过测定不同类型骨骼肌中代谢相关基因的转录表达水平,进一步解释影响机制。

2.2 运动保护与疲劳恢复的人类实验

酮体在骨骼肌中发挥抗氧化与抗炎作用,减轻剧烈运动对机体的损害^[66]。KD 降低了运动员体内炎症反应,8 周 KD 干预使职业健美运动 IL-6 降低 13.35%,西方饮食增加 6.52%,且血清肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor- α , TNF- α)也低于西方饮食,IL-6 和 TNF- α 与胰岛素水平有关,在胰岛素抵抗的发病机制中起作用,降低葡萄糖分解促进酮体生成^[43]。但 Shaw 等^[67]认为 31 d KD 未改变男性耐力运动员唾液与血液粘膜的免疫标记物,需要更多严谨的实验设计证实 KD 在运动中的保护状况。

肌糖原消耗与乳酸积累是运动产生疲劳的主要原因,KD 造成的脂肪适应增加了肌糖原的储备,进而减轻了运动后疲劳的产生^[63,68]。竞走运动员经 3 周 KD 干预,降低了运动时 4 min 和 6 min 的血清乳酸浓度,增加机体高强度运动的缓冲能力^[69]。31 d KD 使耐力运动员血乳酸呈现降低趋势,在最大耗氧量时沉积最多^[49]。运动前 KD 摄入使男性运动员血清乳酸平均浓度显著低于低碳饮食,在运动期间 KD 摄入发现上肢骨骼肌的过碘酸雪夫染色强度下降,比低碳饮食的肌糖原沉积更多,利于肌糖原的保留^[70]。

3 生酮饮食的安全性与应用现状

根据食物中脂质的占比不同,可将 KD 分为经

典 KD、中链甘油三酯 KD、改良阿特金斯饮食和低血糖指数治疗^[71]。其中中链甘油脂肪酸能更快穿过线粒体膜进行 β -氧化,生酮效率最高,酮体快速提供能量,改善运动耐力,但人体摄入超过 30 g 中链甘油脂肪酸时,造成了胃肠道的不良反应,损害运动表现^[72-74]。目前认为减轻 KD 负面影响的饮食策略是联合补充肌酸,可进一步降低体重,改善身体成分,增强骨骼肌力量与运动耐力,促进运动后骨骼肌的疲劳恢复^[75]。

不同于 KD 引起的内源性酮体的生成,急性酮症优先考虑外源性酮体的直接补充,包括酮盐、酮酯或 1,3-丁二醇以及酮酸,但对运动表现贡献小,主要引起血清酮体的快速升高,存在消化系统与心血管系统副作用^[76-78]。KD 通过生成酮体发挥作用,比外源性酮体反应稳定,Kephart 等^[79]发现 1 周的短期 KD 比酮盐补充引起雄性大鼠的生理性酮症更强。外源性酮症造成急性酮症,并抑制机体内源性生酮,不利于长期作用^[72]。

4 结论和未来研究方向

本文对 KD 改变运动表现与疲劳恢复的动物研究与人类研究进行概述,发现 KD 对骨骼肌的作用效果与干预时长有关,在动物研究中的改善效果更明显。认为在动物研究中,KD 可以通过轴突发芽和神经再支配引起肌纤维类型由 II b 向 II a 转变,使 PGC-1 α 和 CS 表达增加,改善快肌的线粒体质量与功能,影响骨骼肌蛋白质合成与水解标志物,增加组蛋白乙酰转移酶 p300 以增强骨骼肌力量,而短期 KD 主要引起标志物表达的改变,提升骨骼肌力量的效果最好,长期干预才能转变肌纤维的类型;在耐力运动中 KD 提供酮体为机体供能,降低慢肌中的糖酵解关键酶 Hk2、Pk 和 Scot 的表达,提升脂肪酸氧化相关酶 PDKs 和 CPT-1b 的表达,起到增强运动耐力的效果,且随 KD 干预时间的延长效果更好;KD 也降低了运动时骨骼肌的内质网应激、氧化应激与炎症反应的标志物表达水平,营造运动状态下健康的细胞环境,保护机体免受损伤,并减少肌糖原的消耗与乳酸的积累,减轻运动后疲劳促进疲劳恢复。在 KD 对人类的作用上,主要以改善竞技运动员身体成分为主,未引起骨骼肌力量的变化,可因不同周期的 KD 干预对运动耐力产生不同影响,1 个月的连续 KD 能显著增加最大摄氧量,增强运动耐力,是用于提升耐力型竞技运动成绩的最佳

周期。

KD 对不同性别的动物与人类产生了不同的影响,目前研究主要以雄性动物与男性为主,在雌性动物中出现提升运动表现的情况略晚于雄性,后续需更长时间的 KD 干预与性别对比研究。在运动保护与疲劳恢复方面,当前的研究内容有限,难以观察到不同时间的 KD 干预下的不同表现,后续应加强在该领域的进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Masood W, Annamaraju P, Uppaluri KR. Ketogenic diet [M]. Treasure Island: StatPearls Publishing LLC; 2022.
- [2] Evans M, Cogan KE, Egan B. Metabolism of ketone bodies during exercise and training: physiological basis for exogenous supplementation [J]. J Physiol, 2017, 595(9): 2857-2871.
- [3] Harvey KL, Holcomb LE, Kolwicz SC Jr. Ketogenic diets and exercise performance [J]. Nutrients, 2019, 11(10): 2296.
- [4] Imdad K, Abualait T, Kanwal A, et al. The metabolic role of ketogenic diets in treating epilepsy [J]. Nutrients, 2022, 14(23): 5074.
- [5] Nasser S, Vialichka V, Biesiekierska M, et al. Effects of ketogenic diet and ketone bodies on the cardiovascular system: concentration matters [J]. World J Diabetes, 2020, 11(12): 584-595.
- [6] Dyńska D, Kowalcze K, Paziewska A. The role of ketogenic diet in the treatment of neurological diseases [J]. Nutrients, 2022, 14(23): 5003.
- [7] Nilwik R, Snijders T, Leenders M, et al. The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size [J]. Exp Gerontol, 2013, 48(5): 492-498.
- [8] Yakupova EI, Bocharnikov AD, Plotnikov EY. Effects of ketogenic diet on muscle metabolism in health and disease [J]. Nutrients, 2022, 14(18): 3842.
- [9] Lee RC, Wang Z, Heo M, et al. Total-body skeletal muscle mass: development and cross-validation of anthropometric prediction models [J]. Am J Clin Nutr, 2000, 72(3): 796-803.
- [10] Larsson L, Degens H, Li M, et al. Sarcopenia: aging-related loss of muscle mass and function [J]. Physiol Rev, 2019, 99(1): 427-511.
- [11] Wallace MA, Aguirre NW, Marcotte GR, et al. The ketogenic diet preserves skeletal muscle with aging in mice [J]. Aging Cell, 2021, 20(4): e13322.
- [12] Sonjak V, Jacob K, Morais JA, et al. Fidelity of muscle fibre reinnervation modulates ageing muscle impact in elderly women [J]. J Physiol, 2019, 597(19): 5009-5023.
- [13] Rudolf R, Khan MM, Labeit S, et al. Degeneration of neuromuscular junction in age and dystrophy [J]. Front Aging Neurosci, 2014, 6: 99.
- [14] Schnyder S, Svensson K, Cardel B, et al. Muscle PGC-1 α is

- required for long-term systemic and local adaptations to a ketogenic diet in mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2017, 312(5): E437-E446.
- [15] van Diemen MPJ, Ziagkos D, Kruizinga MD, et al. Mitochondrial function, grip strength, and activity are related to recovery of mobility after a total knee arthroplasty [J]. *Clin Transl Sci*, 2023, 16(2): 224–235.
- [16] Parry HA, Kephart WC, Mumford PW, et al. Ketogenic diet increases mitochondria volume in the liver and skeletal muscle without altering oxidative stress markers in rats [J]. *Heliyon*, 2018, 4(11): e00975.
- [17] Ogura Y, Kakehashi C, Yoshihara T, et al. Ketogenic diet feeding improves aerobic metabolism property in extensor digitorum longus muscle of sedentary male rats [J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0241382.
- [18] Zhou Z, Hagopian K, López-Domínguez JA, et al. A ketogenic diet impacts markers of mitochondrial mass in a tissue specific manner in aged mice [J]. *Aging*, 2021, 13(6): 7914–7930.
- [19] Hyatt HW, Kephart WC, Holland AM, et al. A ketogenic diet in rodents elicits improved mitochondrial adaptations in response to resistance exercise training compared to an isocaloric western diet [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 533.
- [20] 袁瑞, 李帆, 胡桂霖, 等. 生酮饮食对小鼠骨骼肌力量及运动耐力的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 2021, 40(4): 294–297.
- Yuan R, Li F, Hu GL, et al. Effects of ketogenic diet on skeletal muscle strength and athletic endurance of mice [J]. *Chin J Sports Med*, 2021, 40(4): 294–297.
- [21] Li J, Kanasaki M, Xu L, et al. A ketogenic amino acid rich diet benefits mitochondrial homeostasis by altering the AKT/4EBP1 and autophagy signaling pathways in the gastrocnemius and soleus [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862(7): 1547–1555.
- [22] Roberts MN, Wallace MA, Tomilov AA, et al. A ketogenic diet extends longevity and healthspan in adult mice [J]. *Cell Metab*, 2017, 26(3): 539–546.
- [23] Karukurichi KR, Wang L, Uzasci L, et al. Analysis of p300/CBP histone acetyltransferase regulation using circular permutation and semisynthesis [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(4): 1222–1223.
- [24] Svensson K, LaBarge SA, Sathe A, et al. p300 and cAMP response element-binding protein-binding protein in skeletal muscle homeostasis, contractile function, and survival [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2020, 11(2): 464–477.
- [25] Pathak SJ, Zhou Z, Steffen D, et al. 2-month ketogenic diet preferentially alters skeletal muscle and augments cognitive function in middle aged female mice [J]. *Aging Cell*, 2022, 21(10): e13706.
- [26] Huang TY, Linden MA, Fuller SE, et al. Combined effects of a ketogenic diet and exercise training alter mitochondrial and peroxisomal substrate oxidative capacity in skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2021, 320(6): E1053-E1067.
- [27] Ma S, Huang Q, Yada K, et al. An 8-week ketogenic low carbohydrate, high fat diet enhanced exhaustive exercise capacity in mice [J]. *Nutrients*, 2018, 10(6): 673.
- [28] Shimizu K, Saito H, Sumi K, et al. Short-term and long-term ketogenic diet therapy and the addition of exercise have differential impacts on metabolic gene expression in the mouse energy-consuming organs heart and skeletal muscle [J]. *Nutr Res*, 2018, 60: 77–86.
- [29] Ashtary-Larky D, Bagheri R, Bavi H, et al. Ketogenic diets, physical activity and body composition: a review [J]. *Br J Nutr*, 2022, 127(12): 1898–1920.
- [30] Ma S, Yang J, Tominaga T, et al. A low-carbohydrate ketogenic diet and treadmill training enhanced fatty acid oxidation capacity but did not enhance maximal exercise capacity in mice [J]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 611.
- [31] Hargreaves M, Spriet LL. Skeletal muscle energy metabolism during exercise [J]. *Nat Metab*, 2020, 2(9): 817–828.
- [32] Ma S, Huang Q, Tominaga T, et al. An 8-week ketogenic diet alternated interleukin-6, ketolytic and lipolytic gene expression, and enhanced exercise capacity in mice [J]. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1696.
- [33] Pathak SJ, Baar K. Ketogenic diets and mitochondrial function: benefits for aging but not for athletes [J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2023, 51(1): 27–33.
- [34] Paoli A, Cancellara P, Pompei P, et al. Ketogenic diet and skeletal muscle hypertrophy: a frenemy relationship? [J]. *J Hum Kinet*, 2019, 68: 233–247.
- [35] Yoh K, Ikeda K, Horie K, et al. Roles of estrogen, estrogen receptors, and estrogen-related receptors in skeletal muscle: regulation of mitochondrial function [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 1853.
- [36] Nilsson J, Ericsson M, Joibari MM, et al. A low-carbohydrate high-fat diet decreases lean mass and impairs cardiac function in pair-fed female C57BL/6J mice [J]. *Nutr Metab*, 2016, 13: 79.
- [37] Nakao R, Abe T, Yamamoto S, et al. Ketogenic diet induces skeletal muscle atrophy via reducing muscle protein synthesis and possibly activating proteolysis in mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19652.
- [38] Holcomb LE, O'Neill CC, DeWitt EA, et al. The effects of fasting or ketogenic diet on endurance exercise performance and metabolism in female mice [J]. *Metabolites*, 2021, 11(6): 397.
- [39] Shalamu A, Dong Z, Liu B, et al. Effects of the ketogenic diet in mice with hind limb ischemia [J]. *Nutr Metab*, 2022, 19(1): 59.
- [40] Burke LM. Nutritional approaches to counter performance constraints in high-level sports competition [J]. *Exp Physiol*, 2021, 106(12): 2304–2323.
- [41] Valenzuela PL, Castillo-García A, Lucia A, et al. Effects of combining a ketogenic diet with resistance training on body composition, strength, and mechanical power in trained individuals: a narrative review [J]. *Nutrients*, 2021, 13

- (9): 3083.
- [42] Antonio Paoli A, Mancin L, Caprio M, et al. Effects of 30 days of ketogenic diet on body composition, muscle strength, muscle area, metabolism, and performance in semi-professional soccer players [J]. J Int Soc Sports Nutr, 2021, 18(1): 62.
 - [43] Paoli A, Cenci L, Pompei P, et al. Effects of two months of very low carbohydrate ketogenic diet on body composition, muscle strength, muscle area, and blood parameters in competitive natural body builders [J]. Nutrients, 2021, 13(2): 374.
 - [44] Vidić V, Ilić V, Toskić L, et al. Effects of calorie restricted low carbohydrate high fat ketogenic *vs.* non-ketogenic diet on strength, body-composition, hormonal and lipid profile in trained middle-aged men [J]. Clin Nutr, 2021, 40(4): 1495–1502.
 - [45] Kysel P, Haluzíková D, Doležalová RP, et al. The influence of cyclical ketogenic reduction diet *vs.* nutritionally balanced reduction diet on body composition, strength, and endurance performance in healthy young males; a randomized controlled trial [J]. Nutrients, 2020, 12(9): 2832.
 - [46] Vargas S, Romance R, Petro JL, et al. Efficacy of ketogenic diet on body composition during resistance training in trained men; a randomized controlled trial [J]. J Int Soc Sports Nutr, 2018, 15(1): 31.
 - [47] Terink R, Witkamp RF, Hopman MTE, et al. A 2 week cross-over intervention with a low carbohydrate, high fat diet compared to a high carbohydrate diet attenuates exercise-induced cortisol response, but not the reduction of exercise capacity, in recreational athletes [J]. Nutrients, 2021, 13(1): 157.
 - [48] Burke LM, Sharma AP, Heikura IA, et al. Crisis of confidence averted; impairment of exercise economy and performance in elite race walkers by ketogenic low carbohydrate, high fat (LCHF) diet is reproducible [J]. PLoS One, 2020, 15(6): e0234027.
 - [49] Shaw DM, Merien F, Braakhuis A, et al. Effect of a ketogenic diet on submaximal exercise capacity and efficiency in runners [J]. Med Sci Sports Exerc, 2019, 51(10): 2135–2146.
 - [50] Prins Philip J, Noakes Timothy D, Welton Gary L, et al. High rates of fat oxidation induced by a low-carbohydrate, high-fat diet, do not impair 5-km running performance in competitive recreational athletes [J]. J Sports Sci Med, 2019, 18(4): 738–750.
 - [51] McSwiney FT, Wardrop B, Hyde PN, et al. Keto-adaptation enhances exercise performance and body composition responses to training in endurance athletes [J]. Metabolism, 2018, 81: 25–34.
 - [52] Webster CC, van Boom KM, Armino N, et al. Reduced glucose tolerance and skeletal muscle GLUT4 and IRS1 content in cyclists habituated to a long-term low-carbohydrate, high-fat diet [J]. Int J Sport Nutr Exerc Metab, 2020, 30(3): 210–217.
 - [53] Burke LM. Ketogenic low-CHO, high-fat diet: the future of elite endurance sport? [J]. J Physiol, 2021, 599(3): 819–843.
 - [54] Burke LM, Whitfield J, Heikura IA, et al. Adaptation to a low carbohydrate high fat diet is rapid but impairs endurance exercise metabolism and performance despite enhanced glycogen availability [J]. J Physiol, 2021, 599(3): 771–790.
 - [55] Cao J, Lei S, Wang X, et al. The effect of a ketogenic low-carbohydrate, high-fat diet on aerobic capacity and exercise performance in endurance athletes: a systematic review and meta-analysis [J]. Nutrients, 2021, 13(8): 2896.
 - [56] Koerich ACC, Borszcz FK, Thives Mello A, et al. Effects of the ketogenic diet on performance and body composition in athletes and trained adults: a systematic review and Bayesian multivariate multilevel meta-analysis and meta-regression [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022; 1–26.
 - [57] Durkalec-Michalski K, Nowaczyk PM, Siedzik K. Effect of a four-week ketogenic diet on exercise metabolism in CrossFit-trained athletes [J]. J Int Soc Sports Nutr, 2019, 16(1): 16.
 - [58] Sjödin A, Hellström F, Sehlstedt E, et al. Effects of a ketogenic diet on muscle fatigue in healthy, young, normal-weight women: a randomized controlled feeding trial [J]. Nutrients, 2020, 12(4): 955.
 - [59] Greene DA, Varley BJ, Hartwig TB, et al. A low-carbohydrate ketogenic diet reduces body mass without compromising performance in powerlifting and olympic weightlifting athletes [J]. J Strength Cond Res, 2018, 32(12): 3373–3382.
 - [60] Camajani E, Feraco A, Proietti S, et al. Very low calorie ketogenic diet combined with physical interval training for preserving muscle mass during weight loss in sarcopenic obesity: a pilot study [J]. Front Nutr, 2022, 9: 955024.
 - [61] Barrea L, de Alteriis G, Muscogiuri G, et al. Impact of a very low-calorie ketogenic diet (VLCKD) on changes in handgrip strength in women with obesity [J]. Nutrients, 2022, 14(19): 4213.
 - [62] Wycherley TP, Buckley JD, Noakes M, et al. Long-term effects of a very low-carbohydrate weight loss diet on exercise capacity and tolerance in overweight and obese adults [J]. J Am Coll Nutr, 2014, 33(4): 267–273.
 - [63] Ma S, Suzuki K. Keto-adaptation and endurance exercise capacity, fatigue recovery, and exercise-induced muscle and organ damage prevention: a narrative review [J]. Sports, 2019, 7(2): 40.
 - [64] Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF₂₁ [J]. Annu Rev Physiol, 2016, 78: 223–241.
 - [65] Huang Q, Ma S, Tominaga T, et al. An 8-week, low carbohydrate, high fat, ketogenic diet enhanced exhaustive exercise capacity in mice part 2: effect on fatigue recovery, post-exercise biomarkers and anti-oxidation capacity [J]. Nutrients, 2018, 10(10): 1339.
 - [66] Koutnik AP, D'Agostino DP, Egan B. Anticatabolic effects of ketone bodies in skeletal muscle [J]. Trends Endocrinol Metab, 2019, 30(4): 227–229.
 - [67] Shaw DM, Merien F, Braakhuis A, et al. Adaptation to a ketogenic diet modulates adaptive and mucosal immune markers in trained male endurance athletes [J]. Scand J Med Sci Sports, 2021, 31(1): 140–152.
 - [68] 车开萱, 邱俊强. 脂肪适应有助于提升运动表现吗? [J]. 体

- 育科学, 2022, 42(3): 85–90, 97.
- Che KX, Qiu JQ. Fat adaptation: can it help to improve exercise performance? [J]. Chin Sport Sci, 2022, 42(3): 85–90, 97.
- [69] Carr AJ, Sharma AP, Ross ML, et al. Chronic ketogenic low carbohydrate high fat diet has minimal effects on acid-base status in elite athletes [J]. Nutrients, 2018, 10(2): 236.
- [70] Cox PJ, Kirk T, Ashmore T, et al. Nutritional ketosis alters fuel preference and thereby endurance performance in athletes [J]. Cell Metab, 2016, 24(2): 256–268.
- [71] Leone A, de Amicis R, Lessa C, et al. Food and food products on the Italian market for ketogenic dietary treatment of neurological diseases [J]. Nutrients, 2019, 11(5): 1104.
- [72] Harvey CJDC, Schofield GM, Williden M. The use of nutritional supplements to induce ketosis and reduce symptoms associated with keto-induction: a narrative review [J]. PeerJ, 2018, 6: e4488.
- [73] Fukazawa A, Koike A, Karasawa T, et al. Effects of a ketogenic diet containing medium-chain triglycerides and endurance training on metabolic enzyme adaptations in rat skeletal muscle [J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1269.
- [74] Chapman-Lopez TJ, Koh Y. The effects of medium-chain triglyceride oil supplementation on endurance performance and substrate utilization in healthy populations: a systematic review [J]. J Obes Metab Syndr, 2022, 31(3): 217–229.
- [75] Kaviani M, Izadi A, Heshmati J. Would creatine supplementation augment exercise performance during a low carbohydrate high fat diet? [J]. Med Hypotheses, 2021, 146: 110369.
- [76] Dearlove DJ, Harrison OK, Hodson L, et al. The effect of blood ketone concentration and exercise intensity on exogenous ketone oxidation rates in athletes [J]. Med Sci Sports Exerc, 2021, 53(3): 505–516.
- [77] 阿丽娅, 李子华, 吕金艳, 等. 小分子,大作为:酮体 D- β 羟基丁酸在医疗领域的应用与展望 [J]. 生物工程学报, 2022, 38(3): 976–989.
- A LY, Li ZH, Lv JY, et al. Applications and perspectives of ketone body D- β -hydroxybutyrate in the medical fields [J]. Chin J Biotechnol, 2022, 38(3): 976–989.
- [78] 高镒, 王馨塘, 许春艳, 等. 补充酮体对竞技运动表现的影响及其机制研究进展 [J]. 中国运动医学杂志, 2022, 41(5): 405–412.
- Gao D, Wang XT, Xu CY, et al. Research progress on the effect of ketone body supplementation on competitive sports performance and its mechanism [J]. Chin J Sports Med, 2022, 41(5): 405–412.
- [79] Kephart WC, Mumford PW, Mao X, et al. The 1-week and 8-month effects of a ketogenic diet or ketone salt supplementation on multi-organ markers of oxidative stress and mitochondrial function in rats [J]. Nutrients, 2017, 9(9): 1019.

[收稿日期] 2023-06-01

王赛飞, 荀敬, 武雪亮, 等. NK 细胞及其免疫疗法在肿瘤免疫治疗中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1479-1484.
Wang SF, Xun J, Wu XL, et al. Application of NK cells and their immunotherapy in tumor immunotherapy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1479-1484.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.012

NK 细胞及其免疫疗法在肿瘤免疫治疗中的应用

王赛飞¹, 荀敬², 武雪亮³, 张晖², 张琦², 张大鹏^{2*}

(1. 天津大学医学工程与转化医学研究院, 天津 300072; 2. 天津大学中西结合医院, 天津 300100; 3. 河北北方学院附属第一医院, 河北 张家口 075000)

【摘要】 自然杀伤(natural killer,NK)细胞作为机体固有免疫细胞的组成部分,不需要肿瘤抗原的预先刺激,就可以杀伤肿瘤细胞。因此,基于 NK 细胞的免疫疗法独具优势,并在肿瘤免疫治疗领域取得了重要进展。本文对 NK 细胞的发育、分类、作用机制,以及基于 NK 细胞的免疫疗法包括免疫检查点抑制剂、过继细胞疗法、NK 细胞接合器在肿瘤免疫中的应用进行综述,阐明基于 NK 细胞的抗肿瘤免疫疗法的原理、现状及发展趋势,为其在肿瘤免疫治疗领域的发展和应用提供思路。

【关键词】 自然杀伤细胞;免疫疗法;肿瘤免疫;临床治疗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1479-06

Application of NK cells and their immunotherapy in tumor immunotherapy

WANG Saifei¹, XUN Jing², WU Xueliang³, ZHANG Hui², ZHANG Qi², ZHANG Dapeng^{2*}

(1. Academy of Medical Engineering and Translational Medicine, Tianjin University, Tianjin 300072, China.
2. Integrated Chinese and Western Medicine Hospital, Tianjin University, Tianjin 300100.
3. the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)
Corresponding author: ZHANG Dapeng. E-mail: dapeng721115@126.com

【Abstract】 Natural killer (NK) cells as intrinsic immune cells kill tumor cells without the need for pre-stimulation by tumor antigens. Therefore, NK cell based immunotherapy has unique advantages and has made significant progress in tumor treatment. In this article, we review the development, classification, and mechanism of NK cells as well as the applications of NK cell based immunotherapies, including immune checkpoint inhibitors, adoptive cell therapy, and NK cell adapters in tumor immunity. Thus, we elucidate the principle, current status, and developmental trend of NK cell-based anti-tumor immunotherapies to provide ideas for their development and application in the field of tumor immunotherapy.

【Keywords】 natural killer cells; immunotherapy; tumor immunity; clinical treatment

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

【基金项目】 天津市自然科学基金重点项目(20JCZDJC00780),天津市自然科学基金重点项目(21JCZDJC00450),天津市中医药重点领域科研项目(2023008),天津市中医药管理局中医中西医结合项目(2021008,2021043)。

Funded by Key Program of Natural Science Foundation of Tianjin (20JCZDJC00780), Key Program of Natural Science Foundation of Tianjin (21JCZDJC00450), Tianjin Key Research Project of Traditional Chinese Medicine (2023008), Traditional Chinese Medicine and Combined Traditional Chinese Medicine and Western Medicine Program of the Tianjin Municipal Administration of Traditional Chinese Medicine (2021008, 2021043).

【作者简介】 王赛飞(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤免疫。Email:wangsf0416@163.com

【通信作者】 张大鹏(1972—),男,博士,主任医师,研究方向:肝胆胰外科疾病的中西医结合治疗。Email:dapeng721115@126.com

肿瘤的发生、发展与免疫系统机能相关。肿瘤细胞的增殖会对免疫微环境的稳态平衡造成一定程度的破坏^[1];免疫系统内的免疫细胞和炎症细胞及其分泌的趋化因子、细胞因子,可以在肿瘤的产生和发展进程中发挥一定的调控作用^[2-3]。肿瘤免疫治疗作为新式的肿瘤医治手段,弥补了手术、放疗、化疗“不完全、易转移、副作用大”的弊端。NK 细胞作为机体先天免疫系统高度专业化的淋巴细胞,无需抗原刺激即可杀伤肿瘤细胞,因此在肿瘤免疫反应中具有独特优势。随着医疗技术的发展和基础医学研究的深入,基于 NK 细胞的免疫疗法在肿瘤免疫治疗领域取得重要突破。本文简要总结了 NK 细胞的发育、分类、作用机制,以及包括免疫检查点抑制剂、过继 NK 细胞疗法、NK 细胞接合器在内的基于 NK 细胞免疫疗法在肿瘤免疫中的应用,进一步分析了基于 NK 细胞免疫治疗在肿瘤免疫中的应用发展趋势。

1 NK 细胞的发育和分类

NK 细胞属于先天淋巴细胞^[4-5],占总淋巴细胞循环数的 5% ~ 15%^[6]。NK 细胞在机体内由 CD34⁺造血祖细胞发育,通过共同淋巴细胞祖细胞逐渐上调 CD56、下调 CD34,得以分化并在骨髓和淋巴器官中成熟。人体的 NK 细胞在血液中的周转时长大约为 2 周^[7],在体内增殖时间约 13.5 d^[8]。NK 细胞被定义为 CD3⁻CD16⁺CD56⁺的细胞,依据 CD56 的表达水平可分为 CD56^{dim}和 CD56^{bright}^[9]两个不同功能和表型的亚群。CD56^{dim}细胞表达杀伤细胞免疫球蛋白样受体和 CD16,主要存在于血液中,发挥细胞毒作用。而 CD56^{bright}细胞毒性较弱,主要存在于淋巴结中,可产生细胞因子发挥免疫调节作用。

2 NK 细胞的作用机制

2.1 抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用

抗体依赖的细胞介导的细胞毒性 (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 是一种主要由 NK 细胞介导的强有力的细胞毒性机制,是 NK 细胞杀伤肿瘤细胞的关键机制。在人 IgG 的 FcR 受体中,CD16a 主要负责触发 NK 细胞介导的 ADCC。CD16a 识别 IgG 调理的靶点后,NK 细胞通过释放细胞毒性分子来诱导靶细胞的死亡。McMichael 等^[10]的临床研究表明:将西妥昔单抗与 IL-12 联用治疗复发或转移性头颈部鳞状细胞癌患者,无进展生存

期大于 100 d 患者的 NK 细胞在体外的 ADCC 效应强于无进展生存期小于 100 d 患者的 NK 细胞。此外,通过抑制肿瘤坏死因子- α 转换酶表达、工程化抗体、NK 细胞接合器、调节 NK 细胞代谢途径等方式也可以增强 NK 细胞 ADCC 效应^[11]。靶向 CD16a 有助于解决当前肿瘤免疫治疗的一些局限性,最大限度地增强 ADCC。因此,深入了解 CD16a 的作用机制,有利于寻找有效增强 ADCC 的策略,进而提升 NK 细胞的抗肿瘤活性。

2.2 直接杀伤

NK 细胞可以通过分泌穿孔素直接对靶细胞造成杀伤。NK 细胞与靶细胞接触激发颗粒胞吐,释放的穿孔素通过聚合作用在靶细胞的表面形成小孔来介导杀伤。值得关注的一点是:靶细胞被穿孔素成功杀伤,而 NK 细胞本身却可以幸存。Li 等^[12]研究表明在穿孔素被释放到 NK 细胞与靶细胞之间后,穿孔素致密的脂质膜与 NK 细胞膜融合,进而增强了 NK 细胞膜,这使 NK 细胞得以存活。此外,还发现一种侵袭性乳腺癌的癌细胞也可以通过强化细胞膜来逃避 NK 细胞的杀伤。目前还不能确定这种强化细胞膜逃避杀伤的机制是否具有普遍性,在具有普遍性的情况下,通过破坏肿瘤细胞的细胞膜来提高免疫系统的免疫能力不失为一种有前景的免疫治疗方法。此外,Zheng 等^[13]研究从全新的细胞膜拓扑学角度诠释了肿瘤来源 NK 细胞功能紊乱和免疫逃逸的新机制,也为提高 NK 细胞的免疫治疗提供新策略。NK 细胞这一特性使其在免疫治疗中脱颖而出。

2.3 诱导细胞凋亡

NK 细胞通过表达肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 和 Fas (Fas cell surface death receptor) 配体来诱导表达 TRAIL 受体的靶细胞和 CD95⁺靶细胞发生内源酶级联反应,进而诱导靶细胞凋亡^[14]。Pan 等^[15]研究发现线粒体凋亡在 NK 细胞介导的杀伤中发挥着重要作用,激活线粒体凋亡途径使癌细胞对 NK 细胞的敏感度增强。此外该研究测试 NK 细胞与 BH3 mimetics 组合的方法可能也适用于基于 T 细胞的免疫疗法,为后续相关的临床试验奠定了基础。

NK 细胞能够穿越血脑屏障,进入脑部肿瘤组织中。Fares 等^[16]指出 NK 细胞疗法相较于传统治疗是一种新颖、具有前景的治疗脑肿瘤的方式。此

外, NK 细胞还能够通过分泌多种趋化因子、生长因子和细胞因子, 与其他免疫细胞(如 DC、T、巨噬细胞等)相互作用, 激活机体适应性免疫应答进而抑制肿瘤进展^[17]。

3 基于 NK 细胞的免疫疗法在肿瘤免疫中的应用

3.1 免疫检查点抑制剂

随着免疫治疗成为治疗肿瘤的一种重要方式, 靶向免疫检查点的抑制也成为了免疫治疗的一种新方法。过去, 免疫检查点抑制剂主要针对 T 细胞, 如今以 NK 细胞为靶点的免疫检查点抑制剂成为了新的研究方向。

3.1.1 靶向 PD-1/PD-L1 抑制剂

程序性死亡受体 1 (programmed cell death-1, PD-1) 作为一种重要的免疫抑制分子, 在 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、B 细胞和其他先天淋巴细胞中均有表达。研究表明 PD-1 在近四分之一的健康个体外周血淋巴细胞上高表达^[18]。在胃癌、食管癌、肝癌和结直肠癌等癌症中, PD-1 在外周血及肿瘤浸润 NK 细胞上的表达上调^[19]。PD-1⁺ NK 细胞较 PD-1⁻ NK 细胞细胞毒性小、产生细胞因子和能力也较低^[20]。近年来靶向 PD-1/PD-L1 抑制剂有效应用于血液肿瘤和实体瘤的治疗^[21-22]。帕博利珠单抗、德瓦鲁单抗通过阻断 PD-1/PD-L1 进而激活人非小细胞肺癌中的 PD1⁺ NK 细胞, 发挥了高效的抗肿瘤免疫作用^[23-24]。目前对 PD-1 在 NK 细胞上的表达机制及其是否能够直接抑制 NK 细胞功能尚不明确, 还有待进一步的探索研究。

3.1.2 靶向 TIGIT 抑制剂

具有 Ig 和免疫受体酪氨酸抑制基序结构域的 T 细胞免疫受体 (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains, TIGIT) 是一种表达于 NK 细胞和 T 细胞表面的 Ig 超家族受体, 在限制适应性和固有免疫中发挥着举足轻重的作用^[25]。TIGIT 在肿瘤浸润的 NK 细胞中高表达^[26], 能够直接抑制 NK 细胞的功能。在小鼠和人体内, TIGIT 可以抑制 NK 细胞因子和脱颗粒的产生及 NK 细胞介导的 CD155⁺ 肿瘤细胞的细胞毒性^[27-28]。Chauvin 等^[29] 研究指出 TIGIT 抑制剂与 IL-15 联用可使 NK 细胞对黑色素瘤的细胞毒性得到增强, 并减少小鼠黑色素瘤模型中的肿瘤转移。此外, 联合 PD-1/TIGIT 抑制剂与单独 TIGIT 抑制剂相比能够显著增强 CD8⁺ T 细胞免疫

能力^[30], 同时引起移植实体瘤小鼠的肿瘤排斥反应^[31]。目前, 全球已研发出多款靶向 TIGIT 药物, 其中近 20 款进入 1 期临床, 近 10 款进入 2 期临床, 至少 5 款进入 3 期临床。TIGIT 抑制剂相关的联合疗法在不久的将来会更具应用前景。

3.1.3 靶向 NKG2A 抑制剂

NKG2A (NK Group 2 family of receptor A) 是属于 NK 细胞受体家族 2 中抑制性的受体^[32], 也称为 CD94。在 CD8⁺ T 细胞在内的部分 T 细胞和 NK 细胞表面均有表达^[33]。外周血中近 50% 的 NK 细胞表达 CD94/NKG2A。HLA-E 作为 NKG2A 的唯一配体, 在正常组织细胞中表达水平较低, 而在肿瘤浸润的 NK 细胞、CD8⁺ T 细胞和肿瘤细胞中高表达^[34]。André 等^[35] 研究指出阻断 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞上的 NKG2A 与癌细胞上的 HLA-E 的相互作用, 可以刺激抗肿瘤免疫。Cohen 等^[36] 研究表明将 NKG2A 抑制剂与西妥昔单抗联用治疗复发或转移的头颈部鳞状细胞癌可以得到更好的治疗效果。总的来说, 阻断 NKG2A 是一种十分有效的免疫治疗方法, 尤其是与免疫肿瘤治疗药物的联用更是有着不错的开发和应用前景。

3.2 过继 NK 细胞疗法

3.2.1 NK 细胞输注

NK 细胞输注治疗方法是将体外诱导培养的 NK 细胞输注到肿瘤患者体内, 具体包括自体 NK 细胞输注和同种异体 NK 细胞输注。Marofi 等^[37] 研究表明, 自体供体 NK 细胞表面杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs) 与肿瘤细胞表面的人类白细胞抗原并不匹配, 这将阻止 KIR 向下游传递抑制性信号; 相比之下, 异体来源的活化 NK 细胞能够有效发挥抗肿瘤免疫活性。Lin 等^[38] 发现, 将帕米珠单抗与同种异体的 NK 细胞一起注射到进展期非小细胞肺癌患者体内, 能有效延长患者生存时间至 18.5 个月。随着 NK 细胞纯化技术以及扩增技术的不断改进, NK 细胞输注有望成为过继性免疫治疗的重要组成部分。

3.2.2 CAR-NK 细胞疗法

嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 是由基因工程技术制造的人工受体分子, 能够提高免疫细胞特异性识别抗原的能力并增强其活化的功能^[39]。目前 CAR-T 疗法已经被广泛应用于各种肿瘤的细胞免疫治疗中, 但 CAR-T 治疗中存在细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS)、

移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 和免疫效应细胞相关神经毒性综合征 (immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome, ICANS) 的问题^[40]。CAR-NK 治疗中 NK 细胞来源主要包括从外周血、脐带血或体外培养的 NK 细胞系,与 CAR-T 相比,CAR-NK 来源更加稳定,且副作用更少^[41-42]。Frey 等^[43]研究指出可能是由于激活的 NK 细胞不释放诱导 CRS 的关键细胞因子 IL-6,从而避免了 CRS。NK 细胞可以在没有抗原刺激或人类白细胞抗原匹配的情况下靶向肿瘤细胞,也避免了 GVHD 反应^[44]。此外 CAR-NK 还可以通过表达激活型受体 DNAM-1(CD226)、天然细胞毒性受体和 NKG2D 来识别癌细胞,与 CAR-T 细胞相比具有更高的靶向功效^[39-43]。Teng 等^[46]指出以前列腺干细胞抗原为靶点的 CAR-NK 疗法能够显著抑制胰腺癌进程。虽然与 CAR-T 细胞相比,CAR-NK 细胞具有其独特的优势,但仍存在一些挑战,其中包括 NK 细胞对基因工程的抗性、NK 细胞的增殖潜力和对输注的持久性有限。

3.3 NK 细胞接合器(NK cell engagers,NKCEs)

3.3.1 CD16A-NKCEs

CD16A 含两个胞外 Ig 样结构,同时是 IgG 抗体 Fc 片段的受体^[47]。抗原结合的 IgG 与 CD16A 之间相互作用,可以诱导细胞内免疫受体酪氨酸的磷酸化^[48]。AFM24 是 Affimed 公司利用重定向优化细胞杀伤(ROCK[®]) 抗体平台开发的一种针对先天免疫 NK 细胞上的 CD16A 和肿瘤细胞上的 EGFR (epidermal growth factor receptor) 的双特异性 IgG1-scFv 融合抗体。有研究表明,AFM24 可有效靶向表达同水平人表皮生长因子受体的肿瘤^[49]。Oberge 等^[50]和 Habif 等^[51]研究表明在癌症中存在 CD16A 在肿瘤浸润淋巴细胞上的表达被下调,肿瘤浸润 NK 细胞中 CD16A 表达的缺失可能会降低治疗性单克隆抗体的疗效。尽管如此,CD16A-NKCEs 在血液系统恶性肿瘤的临床研究中仍发挥了显著作用。

3.3.2 NKG2D-NKCEs

NKG2-D 型整合膜蛋白(NKG2D)是一种激活性受体,一般表达于 NK、NKT、 $\gamma\delta$ T 亚群和 CD8⁺ T 细胞亚群。包含 Fab 片段的 NKG2D-NKCEs 同时结合肿瘤细胞上的乳腺癌预后判断因子(HER2)和 NK 细胞上的 NKG2D,可通过未受刺激的 NK 细胞触发体外细胞毒性^[52]。将含有抗肿瘤抗原抗体片段的免疫偶联物与天然 NKG2D 配体串联,进而诱

导 NKG2D 激活引起抗肿瘤免疫。Wang 等^[53]研究表明此方式可有效激活 NK 细胞介导的抗肿瘤抗原表达细胞的细胞毒性,并且在临床前模型的体内发挥活性作用。NKG2D-NKCEs 为多发性骨髓瘤提供了新的治疗方式,且极具临床应用潜力。

对 NK 细胞的免疫疗法在肿瘤免疫中的应用进行简单的总结(见表 1),为进一步深入研究 NK 细胞在免疫系统中的作用和激活 NK 细胞的机理,基于 NK 细胞的肿瘤免疫疗法将拥有更为广泛的应用前景。

表 1 基于 NK 细胞的免疫疗法在肿瘤免疫中的应用

Table 1 Applications of NK cell-based immunotherapy in tumor immunology	
应用 Application	原理 Principle
激活剂介导的 NK 细胞治疗 Activator mediated NK cell therapy	利用抗体、小分子化合物等物质来激活 NK 细胞,增强其杀伤肿瘤细胞的能力 Using substances such as antibodies and small molecule compounds to activate NK cells and enhance their ability to kill tumor cells
CAR-NK 细胞治疗 CAR-NK cell therapy	将人工合成的 CARs 引入 NK 细胞中,使其能够特异性地识别和攻击肿瘤细胞 Introduction of synthetic CARs into NK cells to enable them to specifically identify and attack tumor cells
细胞因子介导的 NK 细胞治疗 Cytokine-mediated NK cell therapy	利用细胞因子如 IL-2、IL-12、IL-15 等来激活 NK 细胞,增强其杀伤肿瘤细胞的能力 Use cytokines such as IL-2, IL-12, IL-15 to activate NK cells and enhance their ability to kill tumor cells
NK 细胞过继治疗 NK cell adoptive therapy	将经过扩增和激活的 NK 细胞移植到患者体内,增强免疫系统攻击肿瘤细胞的能力 Transplantation of amplified and activated NK cells into patients to enhance the immune system's ability to attack tumour cells
NK 细胞联合免疫治疗 NK cell combined immunotherapy	与其他免疫疗法如抗 PD-1、抗 PD-L1 等联合使用,以增强治疗效果 Use in combination with other immunotherapies such as anti-PD-1 and anti-PD-L1 to enhance the therapeutic effect
NK 联合化疗治疗 NK combined with chemotherapy treatment	与化疗药物联合使用,提高治疗效果,减少肿瘤细胞对化疗药物的抗性,同时减轻化疗药物的副作用 Combined with chemotherapy drugs to improve the therapeutic effect and reduce the resistance of tumour cells to chemotherapy drugs, while reducing the side effects of chemotherapy drugs
选择性靶向介导的 NK 细胞治疗 Selective targeting-mediated NK cell therapy	利用某些物质(如抗体)将 NK 细胞引导到肿瘤细胞附近,提高其靶向性和杀伤效率 Use of certain substances (e.g. antibodies) to direct NK cells near tumour cells to improve their targeting and killing efficiency

4 展望

NK 细胞是先天免疫的重要组成部分,在抗肿瘤形成中发挥着关键作用。此外 NK 细胞能直接通过 ADCC 溶解肿瘤细胞;清除初级免疫反应中因主要组织相容性复合体受损的细胞;联合 PD-1 治疗可提高 PD-1 抗体的反应率;招募 DC、T、巨噬细胞协同发挥作用,在肿瘤免疫治疗中占有很大优势。因此,在基础研究和临床试验中继续深入研究 NK 细胞的抗肿瘤机制对于开发新型免疫疗法是十分必要的。此外,未来的免疫治疗可尝试将先天免疫和适应性免疫有效结合以获得更好的治疗效果。

参 考 文 献(References)

- [1] Budisan L, Zanoaga O, Braicu C, et al. Links between infections, lung cancer, and the immune system [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9394.
- [2] 刘鑫男, 李丹, 李斌. 免疫微环境介导的肿瘤耐受机制及其靶向治疗 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(1): 2281–2290.
Liu XN, Li D, Li B. Immune microenvironment-mediated tumor tolerance mechanisms and their targeted therapies [J]. *Chin J Cell Biol*, 2018, 40(1): 2281–2290.
- [3] Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1423–1437.
- [4] Chiossone L, Dumas PY, Vienne M, et al. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(11): 671–688.
- [5] Vivier E, Artis D, Colonna M, et al. Innate lymphoid cells: 10 years on [J]. *Cell*, 2018, 174(5): 1054–1066.
- [6] Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(9): 1025–1036.
- [7] Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, et al. *In vivo* kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection [J]. *Immunology*, 2007, 121(2): 258–265.
- [8] Lutz CT, Karapetyan A, Al-Attar A, et al. Human NK cells proliferate and die *in vivo* more rapidly than T cells in healthy young and elderly adults [J]. *J Immunol*, 2011, 186(8): 4590–4598.
- [9] Cong J, Wei H. Natural killer cells in the lungs [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1416.
- [10] McMichael EL, Benner B, Atwal LS, et al. A phase I/II trial of cetuximab in combination with interleukin-12 administered to patients with unresectable primary or recurrent head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(16): 4955–4965.
- [11] Coënon L, Villalba M. From CD16a biology to antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity improvement [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 913215.
- [12] Li Y, Orange JS. Degranulation enhances presynaptic membrane packing, which protects NK cells from perforin-mediated autolysis [J]. *PLoS Biol*, 2021, 19(8): e3001328.
- [13] Zheng X, Hou Z, Qian Y, et al. Tumors evade immune cytotoxicity by altering the surface topology of NK cells [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(5): 802–813.
- [14] Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity [J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 105(6): 1319–1329.
- [15] Pan R, Ryan J, Pan D, et al. Augmenting NK cell-based immunotherapy by targeting mitochondrial apoptosis [J]. *Cell*, 2022, 185(9): 1521–1538.
- [16] Fares J, Davis ZB, Rechberger JS, et al. Advances in NK cell therapy for brain tumors [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2023, 7(1): 17.
- [17] Zeng Y, Lv X, Du J. Natural killer cell-based immunotherapy for lung cancer: challenges and perspectives (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2021, 46(5): 232.
- [18] Pesce S, Greppi M, Tabellini G, et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: Aphenotypic and functional characterization [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(1): 335–346.
- [19] Mariotti FR, Petrini S, Ingegnere T, et al. PD-1 in human NK cells: evidence of cytoplasmic mRNA and protein expression [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(3): 1557030.
- [20] Liu Y, Cheng Y, Xu Y, et al. Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers [J]. *Oncogene*, 2017, 36(44): 6143–6153.
- [21] Tang J, Yu JX, Hubbard-Lucey VM, et al. Trial watch: the clinical trial landscape for PD1/PDL1 immune checkpoint inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(12): 854–855.
- [22] Wilson RAM, Evans TRJ, Fraser AR, et al. Immune checkpoint inhibitors: new strategies to checkmate cancer [J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 191(2): 133–148.
- [23] Trefny MP, Kaiser M, Stanczak MA, et al. PD-1⁺ natural killer cells in human non-small cell lung cancer can be activated by PD-1/PD-L1 blockade [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69(8): 1505–1517.
- [24] Jain P, Jain C, Velcheti V. Role of immune-checkpoint inhibitors in lung cancer [J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2018, 12(1): 1–13.
- [25] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Five-year survival and correlates among patients with advanced melanoma, renal cell carcinoma, or non-small cell lung cancer treated with nivolumab [J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(10): 1411–1420.
- [26] Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(7): 723–732.

- [27] Stanietsky N, Rovis TL, Glasner A, et al. Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(8): 2138–2150.
- [28] Li M, Xia P, Du Y, et al. T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) receptor/poliiovirus receptor (PVR) ligand engagement suppresses interferon- γ production of natural killer cells via β -arrestin 2-mediated negative signaling [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(25): 17647–17657.
- [29] Chauvin JM, Ka M, Pagliano O, et al. IL15 stimulation with TIGIT blockade reverses CD155-mediated NK-cell dysfunction in melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(20): 5520–5533.
- [30] Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J, et al. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8⁺T cells in melanoma patients [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(5): 2046–2058.
- [31] Dixon KO, Schorer M, Nevin J, et al. Functional anti-TIGIT antibodies regulate development of autoimmunity and antitumor immunity [J]. *J Immunol*, 2018, 200(8): 3000–3007.
- [32] Yabe T, McSherry C, Bach FH, et al. A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins [J]. *Immunogenetics*, 1993, 37(6): 455–460.
- [33] Gunturi A, Berg RE, Forman J. The role of CD94/NKG2 in innate and adaptive immunity [J]. *Immunol Res*, 2004, 30(1): 29–34.
- [34] van Montfoort N, Borst L, Korner MJ, et al. NKG2A blockade potentiates CD8 T cell immunity induced by cancer vaccines [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1744–1755.
- [35] André P, Denis C, Soulas C, et al. Anti-NKG2A MAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1731–1743.
- [36] Cohen R, Fayette J, Posner M, et al. Abstract CT158: Phase II study of monalizumab, a first-in-class NKG2A monoclonal antibody, in combination with cetuximab in previously treated recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (R/M SCCHN): preliminary assessment of safety and efficacy [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13): CT158.
- [37] Marofi F, Al-Awad AS, Sulaiman Rahman H, et al. CAR-NK cell: a new paradigm in tumor immunotherapy [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 673276.
- [38] Lin M, Luo H, Liang S, et al. Pembrolizumab plus allogeneic NK cells in advanced non-small cell lung cancer patients [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(5): 2560–2569.
- [39] Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors [J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(2): 215–223.
- [40] Pang Z, Wang Z, Li F, et al. Current progress of CAR-NK therapy in cancer treatment [J]. *Cancers*, 2022, 14(17): 4318.
- [41] Xie G, Dong H, Liang Y, et al. CAR-NK cells: a promising cellular immunotherapy for cancer [J]. *EBioMedicine*, 2020, 59: 102975.
- [42] Elahi R, Heidary AH, Hadiloo K, et al. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer (CAR NK) cells in cancer treatment; recent advances and future prospects [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(6): 2081–2106.
- [43] Frey N, Porter D. Cytokine release syndrome with chimeric antigen receptor T cell therapy [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019, 25(4): e123–e127.
- [44] Siegler EL, Zhu Y, Wang P, et al. Off-the-shelf CAR-NK cells for cancer immunotherapy [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2): 160–161.
- [45] Wrona E, Borowiec M, Potemski P. CAR-NK cells in the treatment of solid tumors [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5899.
- [46] Teng KY, Mansour AG, Zhu Z, et al. Off-the-shelf prostate stem cell antigen-directed chimeric antigen receptor natural killer cell therapy to treat pancreatic cancer [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(4): 1319–1333.
- [47] Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions [J]. *Immunol Rev*, 2015, 268(1): 25–51.
- [48] Miller JS, Lanier L. Natural killer cells in cancer immunotherapy [J]. *Cancer Biol*, 2019, 3: 77–103.
- [49] Wingert S, Reusch U, Knackmuss S, et al. Preclinical evaluation of AFM24, a novel CD16A-specific innate immune cell engager targeting EGFR-positive tumors [J]. *MAbs*, 2021, 13(1): 1950264.
- [50] Oberg HH, Kellner C, Gonnermann D, et al. Tribody [(HER2)₂xCD16] is more effective than trastuzumab in enhancing $\gamma\delta$ T cell and natural killer cell cytotoxicity against HER2-expressing cancer cells [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 814.
- [51] Habif G, Crinier A, André P, et al. Targeting natural killer cells in solid tumors [J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(5): 415–422.
- [52] Raynaud A, Desrumeaux K, Vidard L, et al. Anti-NKG2D single domain-based antibodies for the modulation of anti-tumor immune response [J]. *Oncoimmunology*, 2020, 10(1): 1854529.
- [53] Wang Y, Li H, Xu W, et al. BCMA-targeting bispecific antibody that simultaneously stimulates NKG2D-enhanced efficacy against multiple myeloma [J]. *J Immunother*, 2020, 43(6): 175–188.

[收稿日期] 2023-04-27

朱铭钰,崔利利,陈欢,等. 活体脑部神经递质检测技术的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1485–1497.
Zhu MY, Cui LL, Chen H, et al. Research progress of neurotransmitter detection technology in live brains [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1485–1497.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.011.013

活体脑部神经递质检测技术的研究进展

朱铭钰^{1,2}, 崔利利¹, 陈欢¹, 侯宏卫^{1*}, 胡清源^{1*}

(1. 国家烟草质量监督检验中心,烟草生物学效应重点实验室,郑州 450000;
2. 青岛大学,山东 青岛 266071)

【摘要】神经递质作为一种内源性化学物质,在维持人正常生命活动等方面发挥着至关重要的作用。神经递质水平异常会导致人身体、精神不佳以及一些神经退行性疾病的发生。然而,神经递质超低的浓度、复杂的化学性质以及释放模式,使准确检测其体内浓度面临巨大挑战。为了精确监测大脑神经递质,准确了解神经递质释放动力学,对近五年来常用的活体检测神经递质的方法及其研究进展进行综述。详细介绍微透析法、电化学传感器以及荧光传感器的基本原理及其适用性。

【关键词】神经递质;疾病;检测;活体

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847 (2023) 11-1485-13

Research progress of neurotransmitter detection technology in live brains

ZHU Mingyu^{1,2}, CUI Lili¹, CHEN Huan¹, HOU Hongwei^{1*}, HU Qingyuan^{1*}

(1. China National Tobacco Quality Supervision and Test Center, Key Laboratory of Tobacco Biological Effects, Zhengzhou 450000, China. 2. Qingdao University, Qingdao 266071)

Corresponding author: HOU Hongwei. E-mail: qsfctc@163.com; HU Qingyuan. E-mail: huqy1965@163.com

【Abstract】As endogenous chemical substances, neurotransmitters play a vital role in maintaining normal life activities. Abnormal levels of neurotransmitters can lead to physical, mental, and some neurodegenerative diseases. However, the ultralow concentration, complex chemical properties, and release modes of neurotransmitters make their accurate detection *in vivo* a great challenge. To accurately monitor neurotransmitters in the brain and accurately understand the release kinetics of neurotransmitters, we reviewed several method commonly used in the past five years to detect neurotransmitters *in vivo* and their research progress. The basic principle and applicability of microdialysis, electrochemical sensors, and fluorescence sensors are introduced in detail.

【Keywords】neurotransmitter; disease; detection; live body

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

神经递质主要是指实现神经化学传递信号转导,促使机体完成特定生物反应的化学物质^[1]。神经递质的新陈代谢和信号传递与维持大脑的结构和功能有关,例如在大脑神经元之间传递神经信

【基金项目】中国烟草总公司科技重大专项(110202101018(XX-04)),中国烟草总公司重点研发项目(110202102014)。
Funded by China National Tobacco Corporation Science and Technology Major Project (110202101018 (XX-04)), China National Tobacco Corporation Key Research and Development Project(110202102014).
【作者简介】朱铭钰(1998—),男,在读硕士研究生,研究方向:神经递质和烟碱代谢物检测。Email: zmy06052021@163.com
【通信作者】胡清源(1965—),博士,博士生导师,研究方向:烟草化学及分析化学的科研与烟草质量监督。
Email: huqy1965@163.com;
侯宏卫(1975—),博士,研究员,研究方向:烟草化学、吸烟与健康及生物标志物。Email: qsfctc@163.com。
* 共同通信作者

号,维持神经系统功能以及促进神经细胞的生长和修复等。神经递质的失调会引起人体内一系列疾病的发生,如精神分裂症、帕金森氏症、阿尔茨海默症、癫痫和注意力缺陷多动障碍等^[2]。自 1921 年诺贝尔生理学和医学奖获得者奥托·洛伊发现了第一个神经递质——乙酰胆碱后,截至目前,已经确定了 100 多种神经递质^[3-4]。根据其化学性质,可将脑内神经递质分为四大类:第一类为胆碱类,例如乙酰胆碱(ACh)等;第二类为单胺类,例如多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)和 5-羟色胺(5-HT)等;第三类为氨基酸类,例如谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)等;第四类为神经肽类,例如谷胱甘肽、阿片肽等。其中,多巴胺作为最受关注的神经递质,在人体的生命活动中发挥着重要的作用,与帕金森症和阿尔茨海默症密切相关。乙酰胆碱和 5-羟色胺等神经递质也在学习、记忆和情绪中起到重要

作用。

神经递质之间存在着复杂的相互作用,协同调控人类神经性疾病。然而,由于内源性成分的干扰以及神经递质含量不断更新变化和代谢,导致一些传统的微透析法、电化学和荧光成像等检测方法很难实现神经递质释放的精准检测,神经递质高时空分辨率的可视化检测也成为神经递质检测分析的难点^[5]。近年来,研究者们为了精确检测神经递质的释放,不断地对微透析、电化学和荧光成像等方法进行改进,开发出了一系列快速、灵敏、高效、同时检测多种神经递质的检测方法,以期了解神经递质在上述疾病中的作用机理,为新药物的开发提供技术支撑^[6]。如图 1 所示,本文对微透析法、电化学法以及荧光成像这三类常用的神经递质检测技术进行详细的介绍,方便研究者根据需求选择合适的研究方法。

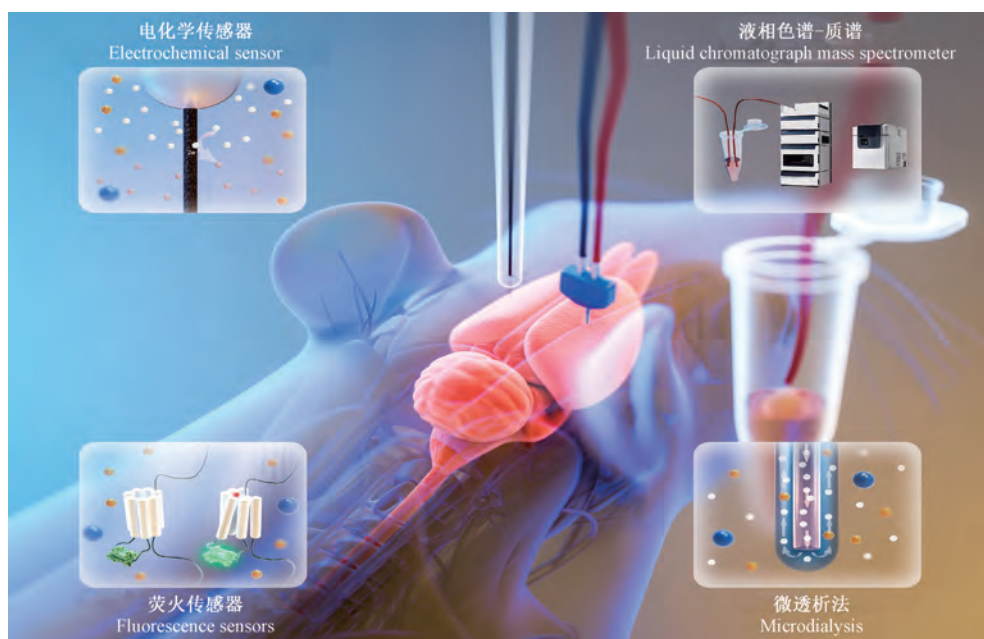


图 1 三种神经递质检测技术的汇总图

Figure 1 Summary diagram of three neurotransmitter detection techniques

1 微透析法

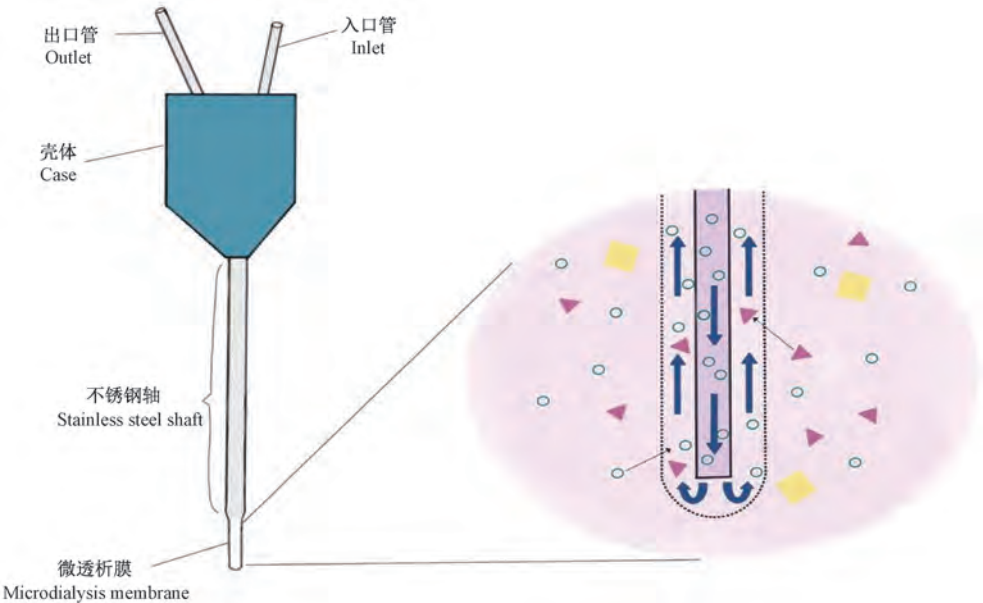
微透析法(Microdialysis)是目前应用最广泛的采集体内神经化学物质的方法之一,常与高效液相色谱-质谱仪等设备联用^[7]。微透析法作为一种侵入性的采样技术,其对测试组织的损伤相对较小,可以在不过度干扰研究环境的情况下对脑脊液样品进行收集。早在 1966 年,Bito 等^[8]就首次提出了通过透析从大脑间质液体中收集分析物的概念。目

前,微透析法已经应用于大脑疾病的研究中,对于诊断脑类疾病的潜在原因以及治疗具有很大的意义。

微透析针被设计为穿过组织的“毛细血管”,由轴、壳体、入口管和出口管四部分组成。入口管与灌注系统相连,通过探头输送灌注液(通常是人工脑脊液或林格氏溶液),以匹配脑间质液的电解质浓度^[9]。微透析过程中一般采用较低的流速收集透析液,以减少溶质的非特异性消耗,并维持较高的相对回收率^[10]。但这也使得微透析时间分辨率

降低,不利于将神经递质浓度的改变与动物特定行为联系起来^[11]。细胞外流体中的溶液和小分子通过半透膜扩散到内部透析液中,然后被收集,如图 2

所示。微透析膜可以将组织结构和灌流相关的流体动力隔离开来,因此微透析探针植入后对组织损伤或流体动力学破坏相对较少^[12]。



注:当微透析针放置到待测组织后,通过注射泵以一定的流速将人工脑脊液通过入口管泵入内部管道,在存在浓度差的条件下,组织中的待测物通过微透析前端的半透膜进入探针内,并被连续流动的人工脑脊液不断带出,实现人工脑脊液与大脑中的脑脊液交换;绿色透明圆形代表 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 以及 Mg^{2+} 等;粉色三角形代表氨基酸、单胺类神经递质等;黄色圆形代表蛋白质、多肽等。

图 2 微透析针结构及微透析膜工作原理

Note. After the microdialysis needle is placed in the tissue to be tested, the artificial cerebrospinal fluid is pumped into the internal pipeline through the inlet tube at a certain flow rate through the syringe pump. The semi-permeable membrane enters the probe and is continuously brought out by the continuous flow of artificial cerebrospinal fluid to realize the exchange of artificial cerebrospinal fluid and cerebrospinal fluid in the brain. Green transparent circles represent Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} , etc.. Pink triangles represent amino acids, monoamine neurotransmitters, etc. Yellow circles represent proteins, polypeptides, etc.

Figure 2 Microdialysis needle structure and microdialysis membrane working principle

透析针的大小、膜的表面积、分析物扩散系数以及透析液收集的速度都会使得微透析技术受到时间和空间分辨低的限制^[13]。为了提高微透析采样技术在时间和空间上的分辨率,Ngernsutivorakul 等^[14]将微制造的推拉式采样针和微流控芯片相结合,通过直接进样到质谱分析所得液滴,同时测定了谷氨酰胺、谷氨酸、 γ -氨基丁酸和乙酰胆碱,在 100 nL/min 灌注速率下产生 6 s 时间分辨率。这种推拉式采样针提供的空间分辨率约是普通微透析探针的 1000 倍。

1.1 微透析法与检测器联用

现如今有多种分析技术可定量微透析样本中的神经递质含量。如前所述,在监测脑介质中神经递质的浓度时,时间分辨率至关重要。微透析收集完样本后可以通过液体旋转器和注射阀与高效液相色谱仪进行在线连接将不同的神经递质分离出

来,然后通过质谱仪、荧光检测器或电化学检测器等对脑脊液中神经递质的含量进行分析。透析样品也可以冷冻存储,然后在不同的时间点通过高效液相色谱仪或气相色谱仪等进行“离线”分析^[15]。在线微透析虽然能最大限度地降低离线微透析过程中发生的样本丢失或降解的可能性,但是在线微透析的时间分辨率不仅受样品采集所需时间的限制,还受化学分析所需时间的限制^[16]。

1.1.1 微透析法与液相色谱-质谱法联用

液相色谱-质谱法是现在应用较为广泛的定量分析方法,液相色谱-质谱联用技术不仅克服了液相色谱本身定性能力差的问题,也克服了质谱法分离效率差的问题,极大地提高了分析的灵敏度。液相色谱-质谱法与其他检测方法相比检测物质种类的范围更广,该技术以其优异的灵敏度、选择性和准确性在神经递质的检测中占据着重要地位。但是

一些神经递质对质谱的响应信号较弱,且生物透析液中基质复杂,这就需要对样品进行复杂的前处理(如衍生化等)。Wong 等^[17]将微透析法与高效液相色谱-串联质谱法相结合,利用苯甲酰氯对包括儿茶酚胺、吲哚胺以及氨基酸等在内的 70 种神经相关化合物进行标记,在 33 min 内完成了对 70 种化合物的分离。大多数分析化合物的检测极限低于 10 nmol/L,检出限在 0.02 ~ 8.00 nmol/L 的范围内,相对标准偏差小于 10%。该方法在分析大鼠脑脊液、人脑脊液和血清等微透析液时能稳定地进行监测,证明了该方法在多种生理环境和模型系统中具有广泛的实用性。Meng 等^[18]将液相色谱-串联质谱法和化学衍生化法相结合,对大鼠血清中包括神经递质、氨基酸以及生物胺等在内的 42 种极性神经化学物质进行了检测,在 15 min 内完成了对 42 种神经化学物质的分离。该方法的检测限在 0.05 ~ 11.63 nmol/L,定量下限为 0.09 ~ 46.50 nmol/L。

随着近几年色谱柱的不断发展,使人们在一定程度上避免了繁琐的样品前处理过程。Fu 等^[19]将体内微透析和液相色谱-串联质谱法相结合,同时测定干细胞因子中木脂素和内源性神经递质等 19 种物质,定量限为 0.5 ~ 20.0 ng/mL。该方法观察和比较木脂素在正常大鼠和阿尔茨海默氏症大鼠体内的药代动力学差异以及对神经递质的影响。Becker 等^[20]通过液相色谱-串联质谱法灵敏地同时定量小鼠微透析液中多巴胺、乙酰胆碱以及 5-羟色胺在内的 16 种神经递质,该方法检出限为 0.005 ~ 17.100 ng/mL,定量限为 0.015 ~ 50.000 ng/mL。潘凌云等^[21]利用超高效液相色谱-串联质谱法同时测定大鼠脑微透析样品中 11 种神经递质(如乙酰胆碱、谷氨酸、甘氨酸和去甲肾上腺素等),该方法在 5 min 内对 11 种神经递质进行测量,检出限为 0.05 ~ 2.50 nmol/L,定量限为 0.125 ~ 12.500 nmol/L。为研究健康和疾病动物模型中神经递质的变化提供了高效的检测方法。Helmschrodt 等^[22]利用液相色谱-串联质谱法对小鼠脑透析液中 5 种神经递质(多巴胺、5-羟色胺、去甲肾上腺素、乙酰胆碱和 γ -氨基丁酸)及其代谢物共 11 种物质进行定量,该方法的检出限在 0.005 ~ 0.750 ng/mL,定量限在 0.025 ~ 2.000 ng/mL,该方法首次能够在一个样品中同时定量胆碱、乙酰胆碱和 γ -氨基丁酸,以及多巴胺和 5-羟色胺代谢的代谢物。

1.1.2 微透析法与液相色谱-荧光检测器联用

液相色谱-荧光检测法在一定程度上解决了液相色谱-电化学检测法的一些缺点,因其具有更高的稳定性、更高的可靠性和易操作性。但对于一些单胺类的神经递质,不具有吸收强荧光的官能团。因此,通常需要在柱前或柱后进行额外的衍生化步骤,来提高检测的灵敏度。Şanlı 等^[23]将微透析和液相色谱-荧光检测法相结合,通过利用 3-(4-羧基苯甲酰基)-2-喹啉甲醛对大小鼠脊髓组织中的 4 种神经递质(谷氨酸、甘氨酸、牛磺酸以及 γ -氨基丁酸)进行衍生化,开发出了一种快速、灵敏的神经递质检测方法。该方法样品制备步骤简单,在最佳条件下,4 种分析物在 0.50 ~ 50.00 μ mol/L 的浓度范围内呈线性,检测限和定量限的范围分别为 0.03 ~ 0.06 μ mol/L 和 0.095 ~ 0.179 μ mol/L。邓祖跃等^[24]开发了一种分离度高且稳定性好的液相色谱-荧光检测法,对大鼠不同的 6 个脑区中的去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺及其代谢物共 7 种物质进行定量。该方法在 0.9 ~ 400.0 μ g/L 的浓度范围内线性范围良好,检测限的范围为 0.3 ~ 8.0 μ g/L,证实了脑内单胺类神经递质在不同脑区分布的差异。咎富文等^[25]通过高效液相色谱-荧光检测法研究小鼠随百草枯中毒时间变化脑组织中 8 种神经递质(多巴胺、左旋多巴、高香草酸、肾上腺素、去甲肾上腺素、二羟基苯乙酸、5-羟色胺和 5-羟吲哚乙酸)的含量变化。该方法的灵敏度高、选择性好、操作简便,检出限的范围为 0.34 ~ 5.26 μ g/L。

1.1.3 微透析法与液相色谱-电化学检测器联用

液相色谱-电化学检测法与液相色谱-质谱法相比,具有较高的灵敏度和选择性,操作相对比较简单。且大多数神经递质是电活性化合物,液相色谱-电化学检测法在检测具有电活性的神经递质时不需要进行衍生化处理,这也避免了液相色谱-质谱法和液相色谱-荧光检测法在样品检测前复杂的前处理过程。液相色谱-电化学检测法虽然具有较高的灵敏度和选择性,但与液相色谱-质谱法和液相色谱-荧光检测法相比神经递质的检测种类相对较少,加上电极变质等局限性,导致液相色谱-电化学检测法在重现性上相对较差。van Schoors 等^[26]开发了一种快速灵敏的微孔超高效液相色谱法,通过与电化学检测相结合同时测定大鼠脑微透析样品中的多巴胺、去甲肾上腺素和 5-羟色胺。该方法测得去甲肾上腺素的定量下限为 100 pmol/L,多巴胺和

5-羟色胺的定量下限为 150 pmol/L。徐妍等^[27]将微透析技术与高效液相色谱-电化学检测技术相结合对大鼠纹状体部位脑脊液中所含的多巴胺、3,4-二羟基苯乙酸、高香草酸、5-羟色胺以及 5-羟吲哚乙酸的含量进行测量。该方法的线性范围为 0.2 ~ 500.0 ng/mL,日内和日间精密度(1 d)均不大于 9.7%,检出限为 0.1 ~ 0.2 ng/mL。该方法具有较高的灵敏度和良好的选择性,对于在线、动态监测药物作用下活体动物脑脊液中神经递质变化具有重要意义。刘斌等^[28]采用微透析和高效液相色谱-电化学检测器联用的方法,测定了大鼠右侧下丘脑腹外侧视前区中 5-羟色胺,多巴胺以及去甲肾上腺素在 1 d 内的变化趋势,实时评价朱砂安神丸引起的单胺神经递质的变化效应以及对睡眠的影响。该方法线性范围为 3.125 ~ 50.000 pg/mL,日内和日间精密度均小于 3.6%。结果表明,朱砂安神丸抑制下丘脑腹外侧视前区接受 5-羟色胺和去甲肾

上腺素,从而起到安神助眠的作用。

1.1.4 微透析法与气相色谱-质谱法联用

另一种和微透析相结合用于测定神经递质的技术是气相色谱-质谱联用法(GC-MS)。尽管在对神经递质的检测方面,通常首选微透析与液相色谱-质谱法相结合,但是气相色谱-质谱法在对一些神经递质的检测方面具有出色的特异性和选择性。Farthing 等^[29]建立了一种快速、选择性的气相色谱-串联质谱法同时测定小鼠脑组织中 γ -氨基丁酸和谷氨酸。由于 GC 需要挥发性化合物,因此在加热的 GC 进样口在线对 γ -氨基丁酸和谷氨酸进行衍生化,以获得挥发性更强、反应活性更低的化合物^[30]。该方法在 0.5 ~ 100.0 μ g/mL 的范围内呈线性, γ -氨基丁酸和谷氨酸的检出限分别为 250 ng/mL 和 100 ng/mL。因此,根据所使用的神经递质分离技术和检测器的不同,微透析具有不同的灵敏度和选择性,如表 1 所示。

表 1 与微透析联用的不同检测器之间的比较
Table 1 Comparison between different detectors for use with microdialysis

方法 Method	分析物种类 Analyte type	检出限 (ng/mL) LOD (ng/mL)	文献 Reference
液相色谱-质谱法 Liquid chromatography-mass spectrometry	衍生化 Derivatization 包括儿茶酚胺、吲哚胺、氨基酸、多胺、痕量胺、抗氧化剂、能量化合物及其代谢产物等 70 种化学物质 Including 70 chemical substances such as catecholamines, indoleamines, amino acids, polyamines, trace amines, antioxidants, energy compounds and their metabolites	0.009 ~ 28.830	[17]
	未衍生化 Underderivatization 5-羟色胺、5-羟吲哚乙酸、褪黑素、多巴胺、3-甲氧基酪胺、高香草酸、乙酰胆碱、脱氧肉碱、胆碱、 γ -氨基丁酸、腺苷、谷氨酰胺以及谷氨酸 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindoleacetic acid, melatonin, dopamine, 3-methoxytyramine, homovanillic acid, acetylcholine, deoxycarnitine, choline, GABA, adenosine, glutamine and glutamate	0.005 ~ 17.100	[20]
液相色谱-荧光检测器法 Liquid chromatography-fluorescence detector	多巴胺、左旋多巴、高香草酸、肾上腺素、去甲肾上腺素、二羟基苯乙酸、5-羟色胺、5-羟吲哚乙酸 Dopamine, levodopa, homovanillic acid, epinephrine, norepinephrine, dihydroxyphenylacetic acid, 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindoleacetic acid	0.340 ~ 5.260	[25]
液相色谱-电化学检测器法 Liquid chromatography-electrochemical detector	多巴胺、3,4-二羟基苯乙酸、高香草酸、5-羟色胺、5-羟吲哚乙酸 Dopamine, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindoleacetic acid	0.100 ~ 0.200	[27]
气相色谱-质谱法 Gas chromatography-mass spectrometry	γ -氨基丁酸和谷氨酸 GABA and glutamic acid	250.000, 100.000	[29]

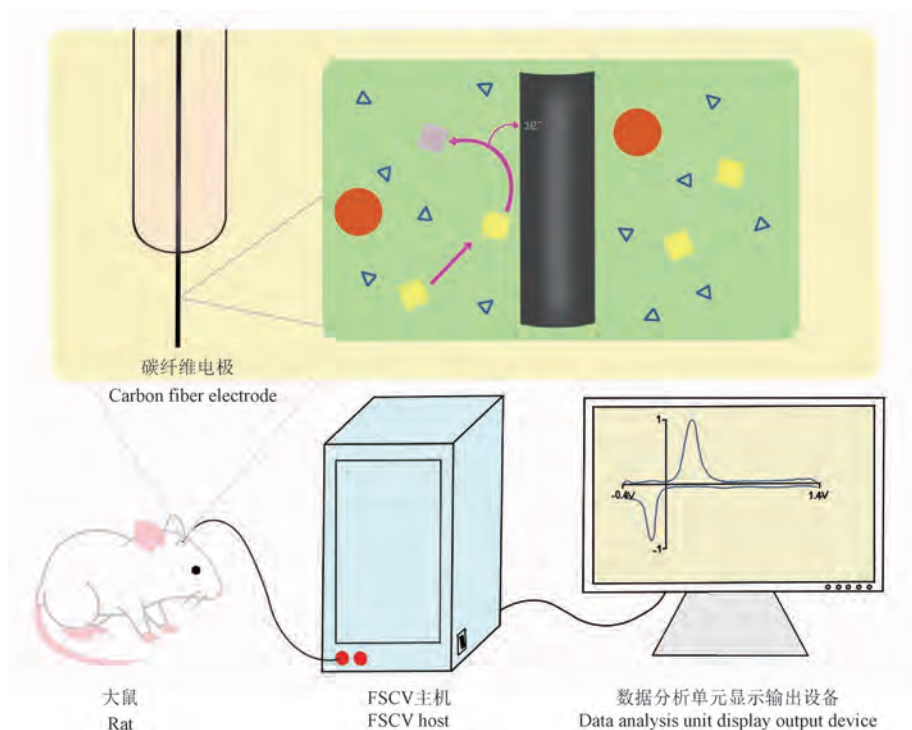
2 电化学传感器法

除了微透析法外,基于氧化还原反应原理的电化学检测方法近年也逐步发展起来,如图 3 所示。自 1973 年 Kissinger 等^[31]首次使用伏安法后,伏安法已经发展成为以亚秒精度进行体内神经化学监

测的唯一可行技术。目前,包括循环伏安法(CV)、差示脉冲伏安法(DPV)和快速扫描循环伏安法(FSCV)在内的许多伏安技术已被应用到神经化学物质的测量中^[32-33]。然而 CV 仅限于体外应用和检测高浓度的神经递质,且时间分辨率较低。DPV 虽然可以用单个探针同时检测多个分析物,但仍不足

以捕捉神经递质的亚秒变化。而 FSCV 能够以高时间分辨率在体内外快速检测神经递质^[34]。接下来,

本文详细综述了 FSCV 的基本原理、发展以及该方法在神经传递研究中的应用进展。



注:上下扫描一定范围的电位会导致吸附在电极表面的分析物的氧化和还原产生电流。神经递质的浓度可以用峰电流值来定量,随着神经递质浓度的升高,氧化峰的幅度也随之增大。所以既可以通过电流峰的电位位置得到定性信息,又可以通过峰的电流强度得出定量信息。

图 3 快速扫描循环伏安电化学传感器的一般设置及工作原理

Note. Sweeping up and down a range of potentials results in the oxidation and reduction of analytes adsorbed on the electrode surface to generate currents. The concentration of neurotransmitter can be quantified by peak current value, and the amplitude of the oxidation peak increases with the increase of neurotransmitter concentration. Therefore, qualitative information can be obtained through the potential position of the current peak, and quantitative information can be obtained through the current intensity of the peak.

Figure 3 General setup and working principle of a fast-scan cyclic voltammetry electrochemical sensor

FSCV 常被用来测量清醒和有行为的动物大脑中的多巴胺,解决生物医学中神经递质局部浓度低、测量难的问题^[35]。FSCV 以高扫描速度将三角形波形应用于微电极,进而快速氧化和还原电极表面的电活性物质,微电极的小尺寸(直径 5 ~ 20 μm)使其比微透析探针更能接近要检测的释放部位^[36]。近几年随着人们对电极的不断开发,FSCV 可以与多电极阵列联用实现各种神经递质的检测。Castagnola 等^[37]利用玻碳微电极阵列对大鼠纹状体中多巴胺和 5-羟色胺进行定量。该方法具有良好的稳定性和可重复性,多巴胺和 5-羟色胺的检测范围为 10 ~ 200 nmol/L。然而 FSCV 所使用的传统的三角形波形在检测 DA 和 NE 时会产生类似的伏安图,难以区分这两种分析物的变化,分子特异性较差^[38]。

FSCV 主要通过对电极进行修饰或改变电流波

形来提高其化学选择性。在电极方面,电极涂层可以防止具有相似氧化还原曲线的分析物吸附到电极表面,避免电极对非特异性分子的吸附,从而提高化学选择性^[39]。例如,NaFion 涂层电极已成功用于 5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)的检测且防止碳纤维电极结垢,解决了 5-羟色胺干扰降低记录特异性和保真度等问题^[40]。Taylor 等^[41]在 3,4-乙烯二氧噻吩的基础上开发出一种纳米复合涂层,使得碳纤维电极检测多巴胺的灵敏度提高了大约 422 倍,检测范围为 191 ~ 223 nmol/L。Puthongkham 等^[42]将纳米金刚石悬浮液滴铸到碳纤维微电极上,发现纳米金刚石能够显著提高 FSCV 对神经递质检测的灵敏度,同时还能够降低碳纤维电极在电化学和生物上的污损程度。该方法在检测多巴胺时表现尤为明显,灵敏度提高了 1.9 ~ 2.3 倍,检出限提高至 2 ~ 4 nmol/L。而 Bennet 等^[43]首次将钻石电极记录应

用于人类,开发出了掺硼钻石电极。该电极的灵敏度与碳纤维电极相当,但物理强度要比碳纤维电极高出 200 倍左右,在体外的使用寿命更长。在电流波形方面,通过改变波形的电势极限、扫描速率和应用频率来提高 FSCV 对神经递质检测的灵敏度、选择性和时间分辨率等各种性能,该方法性价比高、操作简单^[44]。FSCV 的标准波形是类似 CV 的三角形,若使用其他形状的定制波形,可以实现特定化合物的检测^[45]。Jo 等^[46]将三角形波形和矩形波形相结合,利用 0.1、0.2 和 0.3 V 正常脉冲伏安法和 FSCV 交替进行对大鼠纹状体中的多巴胺和去甲肾上腺素进行区分,在 0.1 V 时去甲肾上腺素和多巴胺这种区分最为明显。Ross 等^[47]开发了一种类似梯形的波形,能够选择性地检测腺苷、过氧化氢和 ATP。该波形与传统波形相比有着更低的检测限,并且能够提高在高扫描速率下电极的稳定性。Park 等^[48]将循环方波伏安法和背景减除相结合开发出快速循环方波伏安法(FCSWV),该方法极大地提高了对 DA 检测的灵敏度。当 DA 浓度为 0.5 ~ 2 $\mu\text{mol/L}$ 时,FCSWV 的检测极限为 5 ~ 9 nmol/L,而相同情况下 FSCV 检测极限为 11 ~ 37 nmol/L。除灵敏度增加外,与常规 FSCV 比,FCSWV 能更好地区分大鼠纹状体中多巴胺与其他神经递质。随着交替波形开发(传统三角形波形之外)以及专用探针的不断进步,FSCV 可实现同时、多重检测不同的神经化学物质^[49]。随着对 FSCV 不断地了解和开发,相信定能解决现代神经递质研究中所面临的一系列问题。

3 荧光传感器法

荧光检测是一种高特异性、高时空分辨率和良好的生物相容性的蛋白质动力学实时检测技术。该技术需引入荧光素基团对神经递质进行标记,通过检测和分析荧光信号的强度,完成对神经递质浓度的监测。根据此原理,本文详细综述两类较为成熟的实时可视化监测神经递质的荧光传感器^[50]。

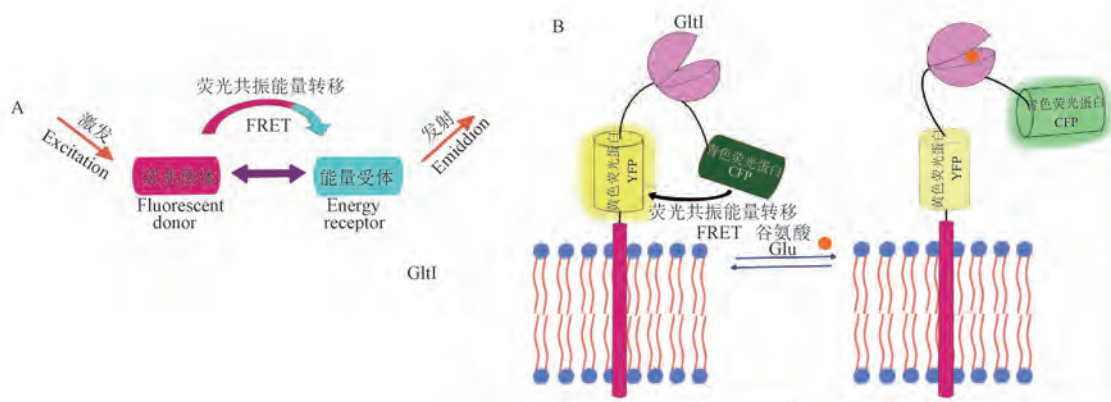
3.1 基于 FRET 的蛋白质传感器

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)是激发态的供体荧光团通过偶极间的相互作用将其激发能以非辐射方式传递给受体荧光团,从而导致受体荧光团发光的技术,如图 4A^[51]。自 1948 年发现以来,FRET 已经发展成为检测分子之间,尤其是蛋白质之间相互作用的

强大工具,为生物医学研究的广泛领域开辟了新的可能性^[52]。Okumoto 等^[53]利用能够与神经递质结合的细菌周质结合蛋白(PBPs)作为传感器支架,将来自大肠杆菌的谷氨酸/天冬氨酸结合蛋白 ybeJ(也称 GltI)与绿色荧光蛋白的两个变体融合,研发出初代 Glu 荧光指示蛋白(FLIPE),对谷氨酸的亲合力约为 600 nmol/L,时间分辨率约为 1 ms,如图 4B。Masharina 等^[54]基于 FRET 技术,将 SNAP-tag、CLIP-tag 和目标分析物的受体蛋白(RP)组成融合蛋白,研发出半合成荧光传感器蛋白(Snifit)。该传感器以高特异性和高时间分辨率在哺乳动物活细胞表面检测 γ -氨基丁酸, γ -氨基丁酸的检测浓度在微摩尔至毫摩尔的范围内,时间分辨率在 1 ~ 10 s 的范围内,在研究生物系统中 γ -氨基丁酸的作用发挥着重要的价值。

由于多巴胺和去甲肾上腺素结构上的相似性,在电化学传感器等检测方法中这两种神经递质的检测信号也较为相近。而之后开发的一系列基于细胞的神经递质荧光工程报告程序(CNiFERs),不仅能分别通过 D2 受体、 $\alpha 1A$ 受体和 M1 受体,完成对多巴胺、去甲肾上腺素以及乙酰胆碱的选择性检测,而且能精确定位所检测的位置和时间,时间分辨率在 1 ~ 10 s 的范围内^[55-56]。与 FLIPE 和 Snifit 系统相比,CNiFER 系统已经在体内得到了广泛的表征。Muller 等^[57]将 CNiFERs 注射到小鼠的前额叶皮质,使用双光子显微镜测量条件反射过程中神经递质的释放。在该方法中,D2 CNiFER 对多巴胺表现出纳摩尔级别的灵敏度,而去甲肾上腺素的灵敏度比多巴胺低了 30 倍左右,多巴胺的检测浓度为 2.4 ~ 2.6 nmol/L,而去甲肾上腺素的检测浓度为 73 ~ 89 nmol/L。同样, $\alpha 1A$ CNiFER 对去甲肾上腺素表现出纳摩尔级别的灵敏度,去甲肾上腺素的检测浓度为 18 ~ 20 nmol/L,而多巴胺的检测浓度为 1.3 ~ 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 。虽然 CNiFER 不能分辨单个突触的神经传递,但仍然是体内监测神经递质最有特色的方法之一。

Marvin 等^[58]将循环重排绿色荧光蛋白(circularly permuted enhanced green fluorescent protein, cpEGFP)插入到 GltI 中开发出了 iGluSnFR,增强了与 Glu 结合时的荧光信号,并在神经元、视网膜、蠕虫、斑马鱼以及小鼠中都能长期稳定的成像。与 CNiFERs 相比,iGluSnFR 可以快速直接进入突触间隙,有着更适合于体内成像的信噪比和动力学,其



注:A:FRET 基本原理:激发态的供体荧光团通过偶极间的相互作用将其激发能以非辐射方式传递给受体荧光团,从而导致受体荧光团发光;B:基于 FRET 原理的谷氨酸传感器示意图:通过将来自大肠杆菌的 GltI 与青色荧光蛋白(CFP)和黄色荧光蛋白(YFP)组成的 FRET 对融合,设计出了第一个谷氨酸传感器;GltI 为传感器的分子识别结构域,当它在与谷氨酸结合时构象发生变化,导致 YFP 和 CFP 相互远离,FRET 效率降低。

图 4 FRET 基本原理与基于 FRET 原理的谷氨酸传感器

Note. A. The basic principle of FRET. Donor fluorophore in the excited state transfers its excitation energy to the acceptor fluorophore in a non-radiative manner through the interaction between dipoles, thereby causing the acceptor fluorophore to emit light. B. Based on the principle of FRET Schematic diagram of the glutamate sensor. First glutamate sensor was designed by fusing GltI from *Escherichia coli* with a FRET pair consisting of cyan fluorescent protein (CFP) and yellow fluorescent protein (YFP). GltI is the molecular recognition domain of the sensor. When it binds to glutamate, its conformation changes, causing YFP and CFP to move away from each other, and the FRET efficiency decreases.

Figure 4 Basic principle of FRET and glutamate sensor based on FRET principle

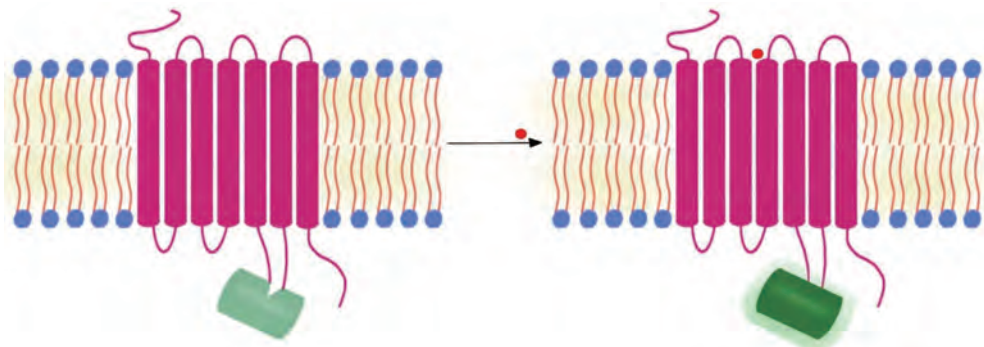
对谷氨酸的亲合力在 98 ~ 116 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内,时间分辨率在约为 5 ms 的范围内,检测范围为 1 ~ 10 mmol/L。Marvin 等^[59]用环重排超折叠绿色荧光蛋白(circularly permuted superfolder green fluorescent protein, cpSFGFP)取代了原来的 cpEGFP,开发出了 SF-iGluSnFR。虽然 SF-iGluSnFR 的动力学与最初的 iGluSnFR 相比要慢,但 SF-iGluSnFR 具有更高的亲和力和灵敏度,比 iGluSnFR 更适用于监测突触中谷氨酸的快速释放^[60]。Helassa 等^[61]在最初的 iGluSnFR 的基础上,设计出了 iGlu_r 和 iGlu_u 两种新的变体,其中 iGlu_u 能够在 100 Hz 的频率下直接报告大鼠海马神经元细胞中单个谷氨酸的释放,检测范围为 0.01 ~ 10 mmol/L。虽然与 iGluSnFR 相比,iGlu_r 和 iGlu_u 的亲合力有所降低,但这两种变体在体外的构象变化速度和在突触中的动力学速度分别提高了 6 倍和 5 倍^[62]。

3.2 基于 G 蛋白偶联受体的蛋白质传感器

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是最大的膜受体家族,近年来,已开发了一系列基于 GPCR 的传感器来测量神经递质,比如 ACh 传感器(GACh)、DA 传感器(GRAB_{DA})和 NE 传感器(GRAB_{NE}),如图 5 所示,以及通过人类 DAD1 和 D4 受体进行检测的 dLight 系列探针^[63]。

与 PBP 作为传感器支架相比,基于 GPCR 传感器在原理上可达到相似的灵敏度和响应动力学,但在检测相应的神经递质时具有更好的亲和力和选择性。

Patriarchi 等^[64]开发了一种基于遗传编码的多巴胺传感器——dLight1,该传感器能够以高时空分辨率监测小鼠纹状体中多巴胺毫秒级的变化情况,该传感器对多巴胺亲合力在 300 ~ 360 nmol/L 的范围内。研究表明 dLight1 在研究药理操作、电生理或光遗传学刺激等情况下多巴胺的动态变化时具有很强的实用性。Patriarchi 等^[65]还设计除了干扰性小和光稳定性强的 RdLight1,RdLight1 对多巴胺的亲合力为 229 nmol/L,检测范围为 0.01 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$,为扩展基于 GPCR 的传感器的颜色光谱提供了一个范例。Sun 等^[66]用 cpGFP 取代了多巴胺 D2 受体 GPCR 的第三细胞内环,经过广泛的优化制备出了对多巴胺具有高度特异性的 GRAB_{DA},该传感器具有亚细胞分辨率、亚秒动力学、较大的表观亲合力以及出色的分子特异性,能够实时检测活蝇、斑马鱼和小鼠等多个模型系统中内源性多巴胺的动态变化。GRAB_{DA} 对多巴胺的亲合力为 130 nmol/L,时间分辨率不大于 100 ms。dLight 和 GRAB_{DA} 在 HEK293 T 细胞中都具有很好的表达和



注:GPCRs 由 7 个 α 螺旋跨膜结构域 (TMs) 组成,当配体与 GPCR 结合时 TM6 的胞质末端构象变化最大。通过插入到 GPCRs 第三细胞内环结构域中的 epGFP,完成对 TM5 和 TM6 的连接,以检测 GPCRs 与配体结合时发生的构象变化。配体结合诱导 GPCR 的构象变化,从而导致荧光增强。

图 5 基于 G 蛋白偶联受体的荧光传感器

Note. GPCRs consist of seven α -helical transmembrane domains (TMs), and the conformation of the cytoplasmic end of TM6 changes the most when a ligand binds to the GPCR. Ligation of TM5 and TM6 is accomplished by epGFP inserted into the third intracellular loop domain of GPCRs to detect conformational changes that occur upon GPCR binding to ligands. Ligand binding induces a conformational change in the GPCR resulting in increased fluorescence.

Figure 5 Fluorescent sensor based on G protein-coupled receptors

良好的性能。

Jing 等^[67]开发了一系列基于 GPCR 的 GACH,能够选择性地响应外源性和内源性乙酰胆碱,并通过双光子显微镜捕捉到强烈的荧光信号,具有良好的灵敏度、配体特异性、动力学和光稳定性。该传感器在对乙酰胆碱的亲合力为 100 $\mu\text{mol/L}$,时间分辨率在毫秒级别的范围内。Feng 等^[68]利用配体结合时第五和第六跨膜域之间的构象变化来调节结

合的荧光蛋白的亮度,开发了一系列基于 GPCR 激活的 GRAB_{NE}。研究发现,GRAB_{NE}具有很高的灵敏度、特异性和光稳定性,对去甲肾上腺素的亲合力在纳摩尔至微摩尔的范围内,时间分辨率在亚秒级别的范围内,检测范围为 0.1 ~ 100.0 $\mu\text{mol/L}$ 。GRAB_{NE}能快速、特异地监测小鼠生理和病理过程中体内去甲肾上腺素的动态变化,对于了解去甲肾上腺素在复杂行为中的调节和影响具有重要的作用。

表 2 不同种类的荧光传感器在神经递质检测方面的比较

Table 2 Comparison of different kinds of fluorescence sensors for neurotransmitter detection						
传感器类型 Sensor type	类型 Type	目标分析物 Target analyte	亲和力 Affinity	时间分辨率 Temporal resolution	检测范围 Detection range	文献 Reference
FLIPE	细菌周质结合蛋白 PBP	谷氨酸 Glu	约为 600 nmol/L Approximately 600 nmol/L	约为 1 ms Approximately 1 ms	10 ~ 10 000 $\mu\text{mol/L}$	[53]
Snifit	细菌周质结合蛋白 PBP	γ -氨基丁酸 GABA	约为 400 $\mu\text{mol/L}$ Approximately 400 $\mu\text{mol/L}$	1 ~ 10 s	1 ~ 10 000 $\mu\text{mol/L}$	[54]
CNiFERs	细菌周质结合蛋白 PBP	多巴胺,去甲肾 上腺素,乙酰胆碱 DA, NE, ACh	2.4 ~ 2.6 nmol/L	1 ~ 10 s	纳摩尔级别 Nanomolar level	[57]
iGluSnFR	细菌周质结合蛋白 PBP	谷氨酸 Glu	约为 9 $\mu\text{mol/L}$ Approximately 9 $\mu\text{mol/L}$	约为 5 ms Approximately 5 ms	1 ~ 10 000 $\mu\text{mol/L}$	[58]
dLight1	G 蛋白偶联受体 GPCR	多巴胺 DA	300 ~ 360 nmol/L	10 ~ 100 ms	0.01 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$	[64]
RdLight1	G 蛋白偶联受体 GPCR	多巴胺 DA	229 nmol/L	126 ~ 320 ms	0.01 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$	[65]
GRAB _{DA}	G 蛋白偶联受体 GPCR	多巴胺 DA	130 nmol/L	$\leq$ 100 ms	0.01 ~ 1 $\mu\text{mol/L}$	[66]
GACH	G 蛋白偶联受体 GPCR	乙酰胆碱 ACh	100 $\mu\text{mol/L}$	248 ~ 312 ms, 687 ~ 837 ms	1 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$	[67]
GRAB _{NE}	G 蛋白偶联受体 GPCR	去甲肾上腺素 NE	1 $\mu\text{mol/L}$	72 ~ 680 ms, 36 ~ 1 890 ms	0.1 ~ 100.0 $\mu\text{mol/L}$	[68]

表 2 为不同种类的荧光传感器在神经递质检测方面的比较。

4 总结与展望

神经递质是神经系统中重要的化学信使,在维持人体正常的生命活动中扮演着十分重要的角色。虽然已有关于神经递质检测技术的文章,但大部分文章只着重讨论某一类神经递质检测技术。本文对目前常用的能够实时监测体内神经递质的技术进行了全面的回顾。详细阐述了各个检测方法的原理及其应用,比较了这些方法的优缺点,如表 3 所示。当面临不同的情况时,可以为选择合适的技术

提供了良好的参考。

在自由活动的动物模型甚至人类中,对神经化学动力学的微侵入性监测仍然是具有挑战性的。除了上面讨论的技术外,研究者们还开发了其他基于化学和细胞的方法来监测神经化学动力学^[69]。随着材料学、生物和化学等领域中各种新技术的不断发展,大脑神经递质检测技术的研发将会被推向一个新的水平。神经科学的研究者们提出的新问题和在创造各种技术中吸取的经验教训将成为开发新的检测神经递质方法的纽带^[11]。神经递质的检测研究已经具备较好的基础,许多技术正在经历广泛的创新并显示出巨大的未来前景,未来神经递

表 3 神经递质检测工具之间的比较

Table 3 Comparison between neurotransmitter detection tools							
方法 Methods	原理 Principle	空间分辨率 Spatial resolution	时间分辨率 Temporal resolution	灵敏度 Sensitivity	实用性 Practicality	局限性 Limitations	模式生物 Model organisms
微透析法 Microdialysis	通过植入大脑的透析探头完成对神经递质的收集 Collection of neurotransmitters through dialysis probes implanted in the brain	低,受探头尺寸限制(≥ 1 mm 长,~ 200 μm 直径) Low, limited by probe size (≥ 1 mm long, ~ 200 μm diameter)	亚分钟到分钟 Sub-minutes to minutes	低 Low	检测范围广,允许多模式研究和神经化学物质的多路检测,可用于行为正常的动物 Broad detection range allows multimodal studies and multiplexed detection of neurochemicals in normally behaving animals	时空分辨率差,造成组织损伤 Poor spatial and temporal resolution, causing tissue damage	大小鼠、狗、兔子、猪、恒河猴 Rat, mouse, dogs, rabbits, pigs, rhesus monkeys
快速扫描循环伏安法 Fast scan cyclic voltammetry	通过微电极,利用一定的电压对具有电活性的神经递质进行监测 Using microelectrodes to monitor electrically active neurotransmitters using a certain voltage	中高,受探头尺寸限制(≥ 50 μm 长,5 ~ 10 μm 直径) Medium height, limited by probe size (≥ 50 μm long, 5 ~ 10 μm diameter)	亚秒级分辨率 Sub-second resolution	高 High	允许多模式研究,可用于急性脑切片或行为正常的动物,微电极可减少组织损伤 Allows for multimodal studies, can be used in acute brain slices or in normal behaving animals, microelectrodes reduce tissue damage	空间分辨率差,造成组织损伤 Poor spatial resolution, causing tissue damage	大小鼠、斑马鱼、猪、恒河猴、人 Rat and mouse, zebrafish, pigs, rhesus monkeys, humans
荧光传感器法 Fluorescence sensors	通过小分子或蛋白质的传感器对神经递质进行间接监测或测量 Indirect monitoring or measurement of neurotransmitters via small molecule or protein sensors	高 High	亚秒级分辨率 Sub-second resolution	中高 Medium height	特异性好,具有多种荧光指示剂和蛋白质传感器 Good specificity, with a variety of fluorescent indicators and protein sensors	荧光强度随时间推移而衰减,无法对同一个样品进行连续观察,在体内的使用有限 Fluorescence intensity decays over time, prevents continuous observation of the same sample, limited use <i>in vivo</i>	大肠杆菌、黑腹果蝇、秀丽隐杆线虫、大小鼠、斑马鱼、恒河猴 Escherichia coli, Drosophila melanogaster, caenorhabditis elegans, rat and mouse, zebrafish, rhesus monkey

质检测技术将继续向着无创、实时可视化以及信号放大等方向发展。

参 考 文 献(References)

- [1] Chiu SY, Kriegler S. Neurotransmitter-mediated signaling between axons and glial cells [J]. *Glia*, 1994, 11(2): 191–200.
- [2] Baranwal A, Chandra P. Clinical implications and electrochemical biosensing of monoamine neurotransmitters in body fluids, *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo* models [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 121: 137–152.
- [3] Banerjee S, McCracken S, Hossain MF, et al. Electrochemical detection of neurotransmitters [J]. *Biosensors*, 2020, 10(8): 101.
- [4] Tavakolian-Ardakani Z, Hosu O, Cristea C, et al. Latest trends in electrochemical sensors for neurotransmitters: a review [J]. *Sensors*, 2019, 19(9): 2037.
- [5] Li Y, Zhong W, Wang D, et al. Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10503.
- [6] 万金霞, 李毓龙. 神经递质检测方法的研究进展 [J]. *分析化学*, 2020, 48(3): 307–315.
- Wan JX, Li YL. Recent advances in detection methods for neurotransmitters [J]. *Chin J Anal Chem*, 2020, 48(3): 307–315.
- [7] Zhu M, Liu G, Chen H, et al. Analytical strategies in neurotransmitter measurements: a mini literature review [J]. *Biomed Chromatogr*, 2023, 37(7): e5521.
- [8] Bito L, Davson H, Levin E, et al. The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, *in vivo* dialysate of brain, and blood plasma of the dog [J]. *J Neurochem*, 1966, 13(11): 1057–1067.
- [9] Zapata A, Chefer VI, Shippenberg TS. Microdialysis in rodents [J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2009, 7: 72.
- [10] Lada MW, Kennedy RT. Quantitative *in vivo* monitoring of primary amines in rat caudate nucleus using microdialysis coupled by a flow-gated interface to capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. *Anal Chem*, 1996, 68(17): 2790–2797.
- [11] Tjahjono N, Jin Y, Hsu A, et al. Letting the little light of mind shine: advances and future directions in neurochemical detection [J]. *Neurosci Res*, 2022, 179: 65–78.
- [12] Cepeda DE, Hains L, Li D, et al. Experimental evaluation and computational modeling of tissue damage from low-flow push-pull perfusion sampling *in vivo* [J]. *J Neurosci Methods*, 2015, 242: 97–105.
- [13] Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, et al. Overview of brain microdialysis [J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2009, 7: 71.
- [14] Ngernsutorakul T, Steyer DJ, Valenta AC, et al. *In vivo* chemical monitoring at high spatiotemporal resolution using microfabricated sampling probes and droplet-based microfluidics coupled to mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(18): 10943–10950.
- [15] Li Q, Pei J, Song P, et al. Fraction collection from capillary liquid chromatography and off-line electrospray ionization mass spectrometry using oil segmented flow [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(12): 5260–5267.
- [16] Nandi P, Lunte SM. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 651(1): 1–14.
- [17] Wong JM, Malec PA, Mabrouk OS, et al. Benzoyl chloride derivatization with liquid chromatography-mass spectrometry for targeted metabolomics of neurochemicals in biological samples [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1446: 78–90.
- [18] Meng X, Bai H, Ma Q, et al. Broad targeted analysis of neurochemicals in rat serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatization [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(21): 4006–4017.
- [19] Fu J, Zhang H, Liu S, et al. An integrated strategy using LC-MS/MS combined with *in vivo* microdialysis for the simultaneous determination of lignans of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. Fructus and endogenous neurotransmitters: application in pharmacokinetic and pharmacodynamic studies [J]. *Food Funct*, 2021, 12(19): 8932–8945.
- [20] Becker S, Schulz A, Kreyer S, et al. Sensitive and simultaneous quantification of 16 neurotransmitters and metabolites in murine microdialysate by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2023, 253: 123965.
- [21] 潘凌云, 王雨, 刘新华, 等. UPLC-MS/MS 同时测定大鼠脑微透析样品中 11 个神经递质含量 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(12): 3242–3250.
- Pan LY, Wang Y, Liu XH, et al. Simultaneous determination of 11 neurotransmitters in brain microdialysis samples from rats by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2022, 47(12): 3242–3250.
- [22] Helmschrodt C, Becker S, Perl S, et al. Development of a fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of neurotransmitters in murine microdialysate [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(28): 7777–7787.
- [23] Şanlı N, Tague SE, Lunte C. Analysis of amino acid neurotransmitters from rat and mouse spinal cords by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 107: 217–222.
- [24] 邓祖跃, 许国峰, 袁钰萍, 等. HPLC-FLD 测定不同脑区 3 种单胺神经递质及其代谢产物含量 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(5): 522–525.
- Deng ZY, Xu GF, Yuan YP, et al. Content determination of three kinds of monoamine neurotransmitters and their metabolites in rat different brain tissue by HPLC with fluorescence detection [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2019, 36(5): 522–525.
- [25] 咎富文, 解裴育, 贾昊然, 等. 高效液相色谱法测定百草枯染毒后小鼠脑组织中 8 种单胺类神经递质的含量变化 [J].

- 理化检验(化学分册), 2019, 55(10): 1126–1131.
- Zan FW, Xie PY, Jia HR, et al. HPLC determination of 8 monoamine neurotransmitters in brain tissues of mice contaminated with paraquat and their changes after contamination [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2019, 55(10): 1126–1131.
- [26] van Schoors J, Viaene J, van Wanseele Y, et al. An improved microbore UHPLC method with electrochemical detection for the simultaneous determination of low monoamine levels in *in vivo* brain microdialysis samples [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 127: 136–146.
- [27] 徐妍, 毛健, 庆宏. 微透析-HPLC-ECD 联用在线测定烟碱暴露大鼠脑内单胺神经递质的动态变化 [J]. 烟草科技, 2017, 50(1): 50–57.
- Xu Y, Mao J, Qing H. *In vivo* determination of monoamine neurotransmitters in brain striatum of rat using online microdialysis coupled with high performance liquid chromatography-electrochemical detector [J]. Tobacco Sci Technol, 2017, 50(1): 50–57.
- [28] 刘斌, 李廷利. 朱砂安神丸对大鼠 VLPO 脑区内单胺类递质的影响 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2018, 27(6): 425–430.
- Liu B, Li TL. The effect of Zhusha Anshen Pill on monoamine neurotransmitters in rat VLPO brain region [J]. Chin J Drug Depend, 2018, 27(6): 425–430.
- [29] Farthing CA, Farthing DE, Gress RE, et al. Determination of l-glutamic acid and γ -aminobutyric acid in mouse brain tissue utilizing GC-MS/MS [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, 1068/1069: 64–70.
- [30] Foguet-Romero E, Samarra I, Guirro M, et al. Optimization of a GC-MS injection-port derivatization methodology to enhance metabolomics analysis throughput in biological samples [J]. J Proteome Res, 2022, 21(11): 2555–2565.
- [31] Kissinger PT, Hart JB, Adams RN. Voltammetry in brain tissue—a new neurophysiological measurement [J]. Brain Res, 1973, 55(1): 209–213.
- [32] Demuru S, Nela L, Marchack N, et al. Scalable nanostructured carbon electrode arrays for enhanced dopamine detection [J]. ACS Sens, 2018, 3(4): 799–805.
- [33] Venton BJ. Fundamentals of fast-scan cyclic voltammetry for dopamine detection [J]. Analyst, 2020, 145(4): 1158–1168.
- [34] Zhu M, Zeng C, Ye J, et al. Simultaneous *in vivo* voltammetric determination of dopamine and 5-Hydroxytryptamine in the mouse brain [J]. Appl Surf Sci, 2018, 455: 646–652.
- [35] Ganesana M, Lee ST, Wang Y, et al. Analytical techniques in neuroscience: recent advances in imaging, separation, and electrochemical methods [J]. Anal Chem, 2017, 89(1): 314–341.
- [36] Puthongkham P, Venton BJ. Recent advances in fast-scan cyclic voltammetry [J]. Analyst, 2020, 145(4): 1087–1102.
- [37] Castagnola E, Thongpang S, Hirabayashi M, et al. Glassy carbon microelectrode arrays enable voltage-peak separated simultaneous detection of dopamine and serotonin using fast scan cyclic voltammetry [J]. Analyst, 2021, 146(12): 3955–3970.
- [38] Heien ML, Phillips PE, Stuber GD, et al. Overoxidation of carbon-fiber microelectrodes enhances dopamine adsorption and increases sensitivity [J]. Analyst, 2003, 128(12): 1413–1419.
- [39] Feng T, Ji W, Tang Q, et al. Low-fouling nanoporous conductive polymer-coated microelectrode for *in vivo* monitoring of dopamine in the rat brain [J]. Anal Chem, 2019, 91(16): 10786–10791.
- [40] Hashemi P, Dankoski EC, Petrovic J, et al. Voltammetric detection of 5-hydroxytryptamine release in the rat brain [J]. Anal Chem, 2009, 81(22): 9462–9471.
- [41] Taylor IM, Patel NA, Freedman NC, et al. Direct *in vivo* electrochemical detection of resting dopamine using poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/carbon nanotube functionalized microelectrodes [J]. Anal Chem, 2019, 91(20): 12917–12927.
- [42] Puthongkham P, Venton BJ. Nanodiamond coating improves the sensitivity and antifouling properties of carbon fiber microelectrodes [J]. ACS Sens, 2019, 4(9): 2403–2411.
- [43] Bennet KE, Tomshine JR, Min HK, et al. A diamond-based electrode for detection of neurochemicals in the human brain [J]. Front Hum Neurosci, 2016, 10: 102.
- [44] Rafi H, Zestos AG. Review-recent advances in FSCV detection of neurochemicals via waveform and carbon microelectrode modification [J]. J Electrochem Soc, 2021, 168(5): 057520.
- [45] Corva DM, Adams SD, Bennet KE, et al. Miniature FSCV devices: a review [J]. IEEE Sens J, 2021, 21(12): 13006–13018.
- [46] Jo T, Yoshimi K, Takahashi T, et al. Dual use of rectangular and triangular waveforms in voltammetry using a carbon fiber microelectrode to differentiate norepinephrine from dopamine [J]. J Electroanal Chem, 2017, 802: 1–7.
- [47] Ross AE, Venton BJ. Sawhorse waveform voltammetry for selective detection of adenosine, ATP, and hydrogen peroxide [J]. Anal Chem, 2014, 86(15): 7486–7493.
- [48] Park C, Oh Y, Shin H, et al. Fast cyclic square-wave voltammetry to enhance neurotransmitter selectivity and sensitivity [J]. Anal Chem, 2018, 90(22): 13348–13355.
- [49] Hersey M, Samaranayake S, Berger SN, et al. Inflammation-induced histamine impairs the capacity of escitalopram to increase hippocampal extracellular serotonin [J]. J Neurosci, 2021, 41(30): 6564–6577.
- [50] Wang W, Kim CK, Ting AY. Molecular tools for imaging and recording neuronal activity [J]. Nat Chem Biol, 2019, 15(2): 101–110.
- [51] Lim J, Petersen M, Bunz M, et al. Flow cytometry based-FRET: basics, novel developments and future perspectives [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(4): 217.
- [52] Deal J, Pleshinger DJ, Johnson SC, et al. Milestones in the development and implementation of FRET-based sensors of intracellular signals: a biological perspective of the history of FRET [J]. Cell Signal, 2020, 75: 109769.
- [53] Okumoto S, Looger LL, Micheva KD, et al. Detection of

- glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(24): 8740–8745.
- [54] Masharina A, Reymond L, Maurel D, et al. A fluorescent sensor for GABA and synthetic GABA(B) receptor ligands [J]. J Am Chem Soc, 2012, 134(46): 19026–19034.
- [55] Beyene AG, Yang SJ, Landry MP. Review Article: tools and trends for probing brain neurochemistry [J]. J Vac Sci Technol A, 2019, 37(4): 040802.
- [56] Lacin E, Muller A, Fernando M, et al. Construction of cell-based neurotransmitter fluorescent engineered reporters (CNiFERs) for optical detection of neurotransmitters *in vivo* [J]. J Vis Exp, 2016(111): 53290.
- [57] Muller A, Joseph V, Slesinger PA, et al. Cell-based reporters reveal *in vivo* dynamics of dopamine and norepinephrine release in murine cortex [J]. Nat Methods, 2014, 11(12): 1245–1252.
- [58] Marvin JS, Borghuis BG, Tian L, et al. An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission [J]. Nat Methods, 2013, 10(2): 162–170.
- [59] Marvin JS, Scholl B, Wilson DE, et al. Stability, affinity, and chromatic variants of the glutamate sensor iGluSnFR [J]. Nat Methods, 2018, 15(11): 936–939.
- [60] Shen Y, Nasu Y, Shkolnikov I, et al. Engineering genetically encoded fluorescent indicators for imaging of neuronal activity: progress and prospects [J]. Neurosci Res, 2020, 152: 3–14.
- [61] Helassa N, Dürst CD, Coates C, et al. Ultrafast glutamate sensors resolve high-frequency release at Schaffer collateral synapses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(21): 5594–5599.
- [62] 胡巧, 史雨馨, 杨晓玲, 等. 神经递质的可视化荧光检测技术研究进展 [J]. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1051–1059. Hu Q, Shi YX, Yang XL, et al. Progress in fluorescent visualization techniques for neurotransmitter detection [J]. Chin J Biotechnol, 2020, 36(6): 1051–1059.
- [63] Jing M, Zhang Y, Wang H, et al. G-protein-coupled receptor-based sensors for imaging neurochemicals with high sensitivity and specificity [J]. J Neurochem, 2019, 151(3): 279–288.
- [64] Patriarchi T, Cho JR, Merten K, et al. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors [J]. Science, 2018, 360(6396): eaat4422.
- [65] Patriarchi T, Mohebi A, Sun J, et al. An expanded palette of dopamine sensors for multiplex imaging *in vivo* [J]. Nat Methods, 2020, 17(11): 1147–1155.
- [66] Sun F, Zeng J, Jing M, et al. A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice [J]. Cell, 2018, 174(2): 481–496.
- [67] Jing M, Zhang P, Wang G, et al. A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for *in vitro* and *in vivo* studies [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(8): 726–737.
- [68] Feng J, Zhang C, Lischinsky JE, et al. A genetically encoded fluorescent sensor for rapid and specific *InVivo* detection of norepinephrine [J]. Neuron, 2019, 102(4): 745–761.
- [69] Zhang Y, Jiang N, Yetisen AK. Brain neurochemical monitoring [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 189: 113351.

[收稿日期] 2023-05-24

张博,陈庭伟,李孝琢,等. 用于新型冠状病毒研究的小鼠和猴子动物模型 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1498-1503.

Zhang B, Chen TW, Li XZ, et al. Animal models of SARS-CoV-2 infection and pathology in mice and monkeys [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1498-1503.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.014

用于新型冠状病毒研究的小鼠和猴子动物模型

张博^{1,2}, 陈庭伟^{1,2}, 李孝琢^{1,2}, 李天晴^{1,2}, 董娥^{1,2*}

(1. 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500; 2. 昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室, 昆明 650500)

【摘要】 随着严重急性呼吸系统综合症冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 在世界范围内的传播, 其基因组在不断突变进化, 出现了 α 、 β 、 γ 、 δ 等不同的毒株, 因而持续研发针对不同毒株的药物和疫苗是应对该病毒传播的核心。而构建 SARS-CoV-2 动物模型不仅用于研究新冠病毒的致病机制, 也是评价 SARS-CoV-2 相关药物与疫苗治疗效果的关键。然而, 常用的模式动物小鼠对野生型的 SARS-CoV-2 不易感, 因此迫切需要能够感染新冠且更好地模拟人体病理生理状态的动物模型。本综述回顾了用于新冠病毒感染和传播的动物模型, 以及这些模型在表征病毒免疫病理学方面的进展。

【关键词】 新型冠状病毒; SARS-CoV-2; 动物模型; 病理学; 免疫学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1498-06

Animal models of SARS-CoV-2 infection and pathology in mice and monkeys

ZHANG Bo^{1,2}, CHEN Tingwei^{1,2}, LI Xiaozhuo^{1,2}, LI Tianqing^{1,2}, DONG E^{1,2*}

(1. Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500, China. 2. State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500)
Corresponding author: DONG E. E-mail: dong@lpbr.cn

【Abstract】 As the severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) pandemic continues to spread globally, its genome is undergoing mutations and evolution, giving rise to various strains such as α , β , γ , and δ . Therefore, the continuous development of drugs and vaccines targeting the various strains has become pivotal to addressing the COVID-19 pandemic. Establishing animal models of SARS-CoV-2 enables study of the pathogenesis of the virus and is crucial for evaluating the efficacy of drugs and vaccines against SARS-CoV-2. However, commonly used animal models such as mice exhibit limited susceptibility to wildtype SARS-CoV-2 infection, underscoring the urgent need for animal models that can be infected with the novel coronavirus and better simulate the human pathological and physiological conditions. This review summarizes the animal models used to study SARS-CoV-2 infection and transmission, and their progress in characterizing the viral immunopathology.

【Keywords】 novel coronavirus; SARS-CoV-2; animal model; pathology; immunology

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

【基金项目】 云南省教育厅科学研究基金项目 (2022J0060), 国家自然科学基金 (32130034)。

Funded by Scientific Research Fund Project of Yunnan Provincial Department of Education (2022J0060), National Natural Science Foundation of China (32130034).

【作者简介】 张博, 女, 硕士, 研究方向: 子宫内类器官相关研究。Email: 2516519803@qq.com

【通信作者】 董娥, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 子宫内类器官相关疾病研究。Email: dong@lpbr.cn

冠状病毒是单股正链的 RNA 病毒,具有多种毒株,其中包括 SARS-CoV-1 (SARS-CoV) 和 SARS-CoV-2,这两种病毒均可导致严重的急性呼吸系统综合症。SARS-CoV-2 感染宿主细胞涉及病毒的刺突蛋白(spike protein)与宿主细胞的血管紧张素转换酶 2(ACE2)受体特异性结合,因此宿主细胞表达 ACE2 是病毒感染的关键。合适的动物模型对于研究 SARS-CoV-2 的感染机制至关重要,也是药物和疫苗有效性评估的关键。生物信息学分析发现,与人 ACE2 受体同源性相近的动物包括恒河猴、食蟹猴、非洲绿猴、仓鼠、水貂和猫等^[1]。近交小鼠由于在遗传背景上具有均一性,实验结果上有一致性等优点,因此被广泛用于研究基因功能或疾病机制。但是由于小鼠和人类 ACE2 存在差异,传统的小鼠模型无法有效模拟 SARS-CoV-2 病毒感染以及临床患者的症状和相关免疫反应。因此,研究人员通过转基因、基因敲入、病毒递送等技术,构建能够感染 SARS-CoV-2 病毒的关键动物模型,最终用于研究 SARS-CoV-2 病毒的感染机制、评估疫苗和抗病毒药物的有效性,以及深入探究其致病机理。本文综述了目前用于模拟 SARS-CoV-2 感染的临床前动物模型以及构建这些动物模型的方法和策略。

1 小鼠模型

在许多病毒学研究中,小鼠模型被广泛采用。然而,由于 SARS-CoV-2 感染宿主细胞主要通过人血管紧张素转化酶 2(human angiotensin converting enzyme 2, hACE2)受体而非小鼠 ACE2 受体,这导致野生型 SARS-CoV-2 无法感染传统的标准实验小鼠。鉴于此,针对缺乏新冠病毒易感染小鼠模型现状,研究人员采取了多种策略来建立易感小鼠模型。首先,从病毒角度出发,在小鼠体内通过连续传代新冠病毒的方式,筛选出能够有效感染标准实验小鼠的适应株,利用适应株建立易感模型。其次,从小鼠角度来说,可构建 ACE2 基因人源化的小鼠来实现这一目标。由于转基因小鼠培育和繁殖周期较长,亦可通过气管接种腺病毒(adenovirus, AdV)或腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV),使小鼠肺组织迅速表达人源 ACE2(hACE2),从而促进 SARS-CoV-2 对小鼠肺部的感染。此外,为了更准确地研究新冠病毒攻击宿主后产生的免疫学反应,在小鼠肺组织人源化的基础上,还需将小鼠的免疫系统人源化,这将有助于更深入地了解

SARS-CoV-2 感染人体后引发的免疫病理反应。下面将详细介绍目前用于 SARS-CoV-2 研究的小鼠模型,并讨论这些模型的致病特征。

1.1 稳定遗传的转基因小鼠模型

构建 SARS-CoV-2 感染小鼠模型,表达人源的 ACE2 基因是关键。在早期,由于技术限制,通过将异源基因启动子驱动的 hACE2 表达载体直接注射到胚胎中就可构建转基因小鼠。涉及的启动子包括 mACE2、hK18、hHFH4/FOXJ1、CAG^[2-5]。mACE2 启动子驱动的 hACE2 基因表达更接近于小鼠体内天然 ACE2 的分布情况,但 hACE2 基因表达较弱。而由 hK18、hHFH4/FOXJ1 人源启动子驱动的 hACE2 基因的表达则更强,但改变了 ACE2 在小鼠组织中的分布,从而改变病毒的组织嗜性。总之,该方法的缺点在于外源性导入的 hACE2 基因随机插入小鼠基因组中,可能干扰其他基因表达,同时无法兼顾 hACE2 在体内的高表达以及表达分布接近体内的真实情况。随着 CRISPR/Cas9 技术不断成熟,这一技术也被用来构建转基因小鼠模型,并成功解决上述两个问题。研究人员利用 CRISPR/Cas9 系统将 hACE2 基因定点敲入至小鼠内源性 ACE2 位点的 2 号外显子中,这种方式不仅破坏了小鼠内源性 mACE2 基因的表达,也保证了外源 hACE2 基因表达分布与内源性 ACE2 的表达具有一致^[6]。此外,将四倍体补偿技术和 CRISPR/Cas9 胚胎干细胞基因编辑技术相结合,可以在 35 d 内成功建立 ACE2 人源化的近交系小鼠^[7]。

SRAS-CoV-2 主要通过呼吸道传播,转基因小鼠经鼻途径感染病毒后,除了出现相关的上呼吸道症状外,体重减轻是小鼠感染模型中最主要的临床症状^[3-4]。不同的毒株、感染途径、病毒感染剂量以及 ACE2 在不同组织的分布差异,都可能会引起不同的临床表现和病理变化。hACE2 小鼠经 SARS-CoV-2 感染后会引发与人类患者高度相似的肺部疾病,包括弥散性肺泡损伤、间质性肺炎、炎症或淋巴细胞浸润以及肺血管损伤^[2]。人们发现,由于老年小鼠体内干扰素和抗体的产生明显受损,在感染病毒后,与年轻小鼠相比,病毒在其体内复制更加旺盛,从而导致症状加重^[8-9]。同时也发现,性别对于新冠患病严重程度也有影响,雄性小鼠比雌性小鼠的症状更加严重^[10]。目前 K18-hACE2 小鼠被大多数研究人员作为 SARS-CoV-2 免疫研究的对象,人们发现其感染病毒后,高表达与发病进程相关的趋化

因子(如 CCL2、CCL3、CCL4、CXCL1 和 CXCL10)以及炎症细胞因子(TNF α 、IL-6 和 G-CSF)^[11]。这与人感染 SARS-CoV-2 后具有高度一致性,因此 K18-hACE2 小鼠是目前研究新冠感染后机体免疫变化很理想的易感模型。

1.2 Ad5-hACE2 或 AAV-hACE2 转导的小鼠模型

除了通过基因修饰的转基因小鼠过表达 hACE2 基因之外,还可以通过病毒介导的基因递送方式在小鼠体内实现 ACE2 的异位表达。常用的病毒载体包括 Adv 或 AAV。例如,通过鼻内或者气管接种的方式,使过表达 hACE2 的腺病毒 Ad5-hACE2 感染大部分肺上皮细胞,促使 SARS-CoV-2 在小鼠呼吸道内繁殖和复制,这一过程可以持续数天,导致小鼠体重下降约 20%,在感染过程中,可以观察到肺部出现炎症浸润、出血以及肺泡水肿等病理变化,说明肺功能受到损害。TNF- α 和 IL-6 等炎症因子也显著上调^[12]。相较于腺病毒,腺相关病毒的免疫原性较低,通过 AAV 介导 hACE2 在小鼠肺部表达,再经 SARS-CoV-2 感染,病毒同样可以在小鼠肺组织中复制,进而引发肺单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的浸润增加,同时还诱导 I 型干扰素和体液免疫反应^[13]。目前靶向小鼠肺组织常用的 AAV 血清型是 AAV-6 和 AAV-9,通过腹腔注射和气管接种 AAV-ACE2 病毒,能够实现在小鼠肺部持续表达 ACE2,时间可达 28 周^[14-16]。感染 AAV-ACE2 的野生型小鼠在 SARS-CoV-2 病毒攻击后,病毒在 hACE2 小鼠肺部的复制过程持续 7 d 左右,出现了中度的间质性肺炎症状。这些症状包括支气管周炎症、肺泡上皮弥散性感染、单核细胞以及衍生的巨噬细胞的浸润,不同品系小鼠免疫反应方面表现不一^[17]。免疫力强的小鼠能在 1 周左右迅速清除病毒,而免疫缺陷小鼠,如 IFNAR^{-/-} 和 STAT1^{-/-} 小鼠,病毒清除的时间则较长^[12-13]。这种个体免疫差异能够很好地模拟临床上的重症症状。值得注意的是,免疫缺陷小鼠被感染后,肺组织不再募集巨噬细胞,且 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞以及 NK 细胞的激活受到抑制,淋巴细胞数量减少,而中性粒细胞数量却显著增加,这一现象在 SARS-CoV-2 患者的病理过程中相当常见^[18-19],因此正向免疫反应对于抗病毒至关重要。尽管 AAV 或 Adv 可快速获得新冠易感的动物模型,但与 K18-hACE2 转基因小鼠相比,病毒在体内的复制能力降低,对应的临床症状也较轻,也就是说在模拟 SARS-CoV-2 感染的病理

特征方面存在一定限制,这可能主要归因于 hACE2 的异位表达影响了病毒对细胞或者组织的亲嗜性。

1.3 新冠病毒鼠适应株筛选及其感染模型

为了应对缺乏适用于新冠病毒研究的小鼠模型,从病毒角度着手,采用 SARS-CoV-2 在小鼠体内进行强制连续传代的方法,筛选能有效感染小鼠的新冠病毒适应株,即 MASCP6。经过对该毒株深度测序分析,发现与原始毒株相比,第一代(P0)的肺组织研磨液中,新冠病毒 S 蛋白基因的受体结合域(receptor-binding domain, RBD)已经出现了 A23063T(N501Y)突变,该位点突变可有效增强病毒与小鼠 ACE2 受体的亲和力。随着传代至 P36,获得了一株毒性更强的小鼠适应菌株 MASCP36,其中涉及突变位点包括 K417N、Q493H,该突变株感染小鼠后引起典型的呼吸道症状^[20]。同样,将 SARS-CoV-2-Hu-1 毒株在 1 岁龄 BALB/c 老年鼠中传代,病毒滴度达到峰值时处死老年小鼠,将收获的 P1 代病毒经鼻接种到幼鼠中连续传代,产生小鼠适应毒株 WBP-1。病毒序列分析显示,第一代出现了 Q498H 突变,而 Q493K 突变则发生在第五代,这些突变均发生在 RBD 区域,增强了病毒与 mACE2 的亲和力^[21-22]。使用 TLR7/8 激动剂雷西莫德可以保护小鼠免受 WBP-1 攻击,这种小鼠适应性毒株是研究 SARS-CoV-2 和开发新疗法的有力工具^[23]。除了通过连续传代积累有利于病毒复制的突变外,还可采用反向遗传技术重塑 S 蛋白抗原和 mAce2 的结合部位,从而快速构建小鼠适应性毒株 SARS-CoV-2 MA 重组病毒。该病毒借助 mAce2 受体感染宿主,产生的临床相关表型较 hACE2 小鼠更为丰富,包括体重下降、肺功能受损、致死率和死亡率增加等^[24]。并用 SARS-CoV-2 MA 毒株在小鼠身上证明了新冠感染严重程度高度依赖于年龄大小的疾病特征,同时证实聚乙二醇化 IFN- λ 1a 在临床上可用于治疗 SARS-CoV-2 引起的感染^[25]。

1.4 植入人体组织或细胞的人源化小鼠模型

尽管可以通过基因人源化或筛选小鼠易感的 SARS-CoV-2 毒株的方法建立新冠感染的小鼠模型,但是肺组织作为 SARS-CoV-2 感染的主要靶组织,难以通过小鼠模型揭示人肺感染 SARS-CoV-2 时的病理变化。因此,拥有人肺成熟结构的组织对于模拟 SARS-CoV-2 感染人体的过程至关重要。通过手术将人胎儿肺组织移植到重症联合免疫缺陷小鼠(severe combined immunodeficiency, SCID)的背部皮

肤内,经过 8 周的生长,建立了 SCID-人肺小鼠模型,随后对该模型进行 SARS-CoV-2 感染实验,结果显示病毒在肺组织中快速复制,引发了严重的肺损伤和强烈的炎症反应^[26]。但也有研究表明,将人胎儿肺移植到肾包膜下,更有利于人胎儿肺组织微血管的重塑。无论是肾包膜移植还是皮下移植均支持病毒在移植肺组织中的感染和复制,借助该模型发现 SARS-CoV-2 主要感染人 II 型肺泡上皮细胞(human type II alveolar epithelial cells, hAEC2s)以及气管中的纤毛细胞,并验证了口服 EIDD-2801 这种广谱抗病毒药物能显著抑制 SARS-CoV-2 在肺移植中的复制^[27]。

为了使人源化肺组织具备气体交换功能,从而更好地研究病毒传播,研究人员首先通过博来霉素破坏鼠源的肺细胞,随后通过静脉注射或者气管滴注的方式在原位嵌合人肺干细胞、人胎肺细胞、胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)以及诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSCs)定向分化来的肺样细胞,最终构建人肺嵌合小鼠模型^[28]。然而,迄今为止,尚未有使用此模型来研究呼吸道病原体感染的报道。其中一个重要的原因是该模型中的人肺嵌合比例较低。

尽管人肺异种移植小鼠模型可以作为研究 SARS-CoV-2 感染人肺部过程的有利工具,但要充分模拟 SARS-CoV-2 病毒感染人类肺部引起的人类免疫反应过程仍然存在困难,主要原因是人肺小鼠模型缺乏人的免疫反应系统,因此在人肺小鼠模型基础上,通过移植人的骨髓将小鼠免疫系统人源化是探索临床中 SARS-CoV-2 感染人体肺组织免疫反应的关键。当 SARS-CoV-2 感染该模型小鼠后,小鼠出现严重的炎症和 SARS-CoV-2 相关的免疫病理学表型,这可能与巨噬细胞浸润和分化以及 I 型干扰素上调有关^[29]。因此肺/免疫系统双入源化的小鼠不仅可以用于评估 SARS-CoV-2 病毒感染早期引发的免疫反应^[30],还可以作为评估抗体和类固醇疗法对新冠病毒早期感染影响的重要模型^[31]。

2 非人灵长类动物模型

与小鼠相比,非人灵长类动物(non-human primate, NHP),包括恒河猴、食蟹猴、非洲绿猴、狒狒和普通狨猴等,在生理特征和免疫调节等方面与人类具有显著的相似性,因此可以用于 SARS-CoV-2 感染的大动物模型。ACE2 基因在多物种中的序列

比对分析显示:恒河猴的 ACE2 基因与人 ACE2 基因的同源性为 91%,且 ACE2 与 S 蛋白关键结合区域 RBD 的氨基酸序列在人、食蟹猴和恒河猴中是保守的。尽管如此,不同品种的猴子对 SARS-CoV-2 的易感性不一样,最敏感的是非洲绿猴、其次是恒河猴,最后是食蟹猴,这一现象表明有无 ACE2 受体表达并不是评估新冠病毒感染与否的唯一指标,可能还与其他辅助受体的参与有关。NHP 单细胞测序分析显示,II 型肺泡细胞、鼻杯状分泌细胞和吸收性肠细胞均同时表达 ACE2 和 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶 2(transmembrane protease, erine 2, TMPRSS2),而这两种蛋白是 SARS-CoV-2 感染宿主细胞的关键受体,这一结果表明这些类型的细胞很可能是 SARS-CoV-2 感染的主要靶细胞^[32]。

非洲绿猴在受到病毒攻击后,出现的临床症状包括短暂发烧、食欲下降、高碳酸血症、淋巴细胞和血小板减少症、肝转氨酶升高,单核细胞增加以及急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[33-35]。值得注意的是 ARDS 在老年非洲绿猴身上可以持续观察到,这个症状在其他 NHP 中很难模拟,因此老年非洲绿猴可能是模拟新冠重症非常重要的模型^[35]。感染病毒的猴观察到病毒性肺炎、胃肠道异常和广泛的肺部病变,包括:肺变色、浑浊、细支气管炎、充血和胸膜粘连^[34]。

恒河猴则在感染病毒后出现轻度发烧、体重减轻、食欲下降和缺氧,偶有乏力、血小板减少、短暂中性粒细胞减少和淋巴细胞减少^[36-37]。尽管恒河猴表现出典型的人类患者的临床症状:肺部变色、充血、玻璃样浑浊、浸润、出血、坏死和间质性肺炎,但是无法重现临床上重症患者的症状,例如 ARDS^[36]。

当通过鼻内或气管内的方式感染 SARS-CoV-2 时,食蟹猴的肺出现实质病变,轻度发烧以及体重减轻,同时还观察到 SARS-CoV-2 感染猴表现出另一种病理变化,即弥散性肺泡损伤(diffuse alveolar injury, DAI)^[35]。

总的来说,三种 NHP 均对 SARS-CoV-2 易感,但症状不如临床上的严重。序列分析显示:猴子 ACE2 与 RBD 的亲和力低于人,一定程度上也解释了为什么 NHP 能够感染 SARS-CoV-2,但不会发展为重症。因此通过 AAV 病毒在猴子肺部实现异位表达 hACE2,可能是模拟人类 SARS-CoV-2 引起的重症临床症状的最佳手段。此外,不同种类的 NHP

在病毒复制和清除方面存在差异。而病毒的复制和清除了与猴子品种有关,还与病毒感染宿主的途径有关。单独鼻腔和鼻腔气管联合接种病毒,这两种方式都可以使病毒大量复制,并在感染后 1 ~ 3 d 达到峰值,持续 5 ~ 7 d 后下降^[38-40]。有研究报道,SARS-CoV-2 感染后 5 d 会引起病毒在鼻腔组织中的第二波复制,病毒脱落期延长,可持续 4 周^[4]。另一项研究显示,下呼吸道和肺组织中的病毒复制在感染 3 d 后增加,并在感染 9 d 时达到峰值^[41]。而气管内接种 SARS-CoV-2 则不会引起病毒在鼻组织中复制,且病毒在肺组织中载量要低得多,表明上呼吸道病毒聚集是加剧下呼吸道的病毒传播和感染的重要前提,上呼吸道病毒聚集会出现更严重的新冠症状^[42]。

SARS-CoV-2 感染后,先天免疫反应的激活发生在感染后 1 ~ 3 d 内,感染早期诱导 I 型 IFN 反应,中晚期则诱导 Th1/Th2 反应和获得性免疫反应^[43-45]。中和抗体最早在 NHP 感染病毒后 5 d 产生,并在感染后 15 ~ 21 d 时达到峰值^[41,46]。当 NHP 再次暴露于 SARS-CoV-2 时,中和抗体和记忆免疫反应可有效防止病毒再次感染机体^[47]。当病毒诱导 T 辅助细胞的 Th0 亚型向 Th1 亚型转变后,Th1 细胞协同巨噬细胞激活 B 淋巴细胞,从而促进机体内病毒的清除。此外,TNF- α 和 IFN- γ 可直接作用于肺上皮表面的受体,诱导抗病毒反应。Th2 分泌的细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 和 IL-10 则抑制抗病毒反应并延迟清除病毒^[45],总之,清除 SARS-CoV-2 是一个受机体免疫调节的过程,针对病毒产生的中和抗体和适应性免疫反应会促进病毒的清除。

3 结语

小鼠模型可以很好地模拟在 SARS-CoV-2 患者上观察到的临床症状和特征。K18-hACE2 和 CAG-hACE2 转基因小鼠能很好地模拟重症 ARDS 患者的特征。由于小鼠遗传背景比较清楚,因此在操作性和重复性上具有很大优势。AAV 或 Adv 异位表达则会改变病毒对组织或细胞的嗜性,且仅短暂表达。而 NHPs 与人类亲缘关系较近,在疫苗和抗体效果评估方面有很强的优势,但价格昂贵。因此要想充分研究 SARS-CoV-2 的致病机制以及感染后引起的免疫反应,需要综合评估不同动物模型的优势和劣势,更好地为新冠病毒疫苗开发和抗病毒方法的研究服务。

参 考 文 献 (References)

- [1] Damas J, Hughes GM, Keough KC, et al. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117 (36): 22311-22322.
- [2] Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice [J]. *Nature*, 2020, 583 (7818): 830-833.
- [3] Winkler ES, Bailey AL, Kafai NM, et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(11): 1327-1335.
- [4] Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, et al. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *Cell*, 2020, 182(1): 50-58.
- [5] Asaka MN, Utsumi D, Kamada H, et al. Highly susceptible SARS-CoV-2 model in CAG promoter-driven hACE2-transgenic mice [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(19): e152529.
- [6] Sun SH, Chen Q, Gu HJ, et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28 (1): 124-133.
- [7] Liu FL, Wu K, Sun J, et al. Rapid generation of ACE2 humanized inbred mouse model for COVID-19 with tetraploid complementation [J]. *Natl Sci Rev*, 2021, 8(2): nwa285.
- [8] Chen Y, Li C, Liu F, et al. Age-associated SARS-CoV-2 breakthrough infection and changes in immune response in a mouse model [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11(1): 368-383.
- [9] Zhang Y, Huang K, Wang T, et al. SARS-CoV-2 rapidly adapts in aged BALB/c mice and induces typical pneumonia [J]. *J Virol*, 2021, 95(11): e02477.
- [10] Roberto A, Hiroshi D, Fernández Jose F, et al. Sex-specific differences in the pathogenesis, endothelial dysfunction, and hypercoagulability of sars-cov-2 infection in K18-hACE2 mice [J]. *Blood*, 2022, 140(1): 1674-1675.
- [11] Oladunni FS, Park JG, Pino PA, et al. Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6122.
- [12] Sun J, Zhuang Z, Zheng J, et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment [J]. *Cell*, 2020, 182(3): 734-743.
- [13] Israelow B, Song E, Mao T, et al. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(12): e20201241.
- [14] Gary EN, Warner BM, Parzych EM, et al. A novel mouse AAV6 hACE2 transduction model of wild-type SARS-CoV-2 infection studied using synDNA immunogens [J]. *iScience*, 2021, 24 (7): 102699.
- [15] Sun CP, Jan JT, Wang IH, et al. Rapid generation of mouse model for emerging infectious disease with the case of severe COVID-19 [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(8): e1009758.
- [16] Glazkova DV, Bogoslovskaya EV, Urusov FA, et al. Generation of SARS-CoV-2 mouse model by transient expression of the human ACE2 gene mediated by intranasal administration of AAV-

- hACE2 [J]. Mol Biol, 2022, 56(5): 774–782.
- [17] Nikesh T, Warner Bryce M, Griffin Bryan D, et al. Generation and characterization of a SARS-CoV-2-susceptible mouse model using adeno-associated virus (AAV_{6.2}FF)-mediated respiratory delivery of the human ACE2 gene [J]. Viruses, 2022, 15(1): 85.
 - [18] Liu R, Wang Y, Li J, et al. Decreased T cell populations contribute to the increased severity of COVID-19 [J]. Clin Chim Acta, 2020, 508: 110–114.
 - [19] Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19 [J]. Nat Med, 2020, 26(7): 1070–1076.
 - [20] Gu H, Chen Q, Yang G, et al. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy [J]. Science, 2020, 369(6511): 1603–1607.
 - [21] Huang K, Zhang Y, Hui X, et al. Q493K and Q498H substitutions in Spike promote adaptation of SARS-CoV-2 in mice [J]. EBioMedicine, 2021, 67: 103381.
 - [22] Sun S, Gu H, Cao L, et al. Characterization and structural basis of a lethal mouse-adapted SARS-CoV-2 [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5654.
 - [23] Huang K, Zhang Y, Hui X, et al. Q493K and Q498H substitutions in Spike promote adaptation of SARS-CoV-2 in mice [J]. EBioMedicine, 2021, 67: 103381.
 - [24] Leist SR, Dinno KH 3rd, Schäfer A, et al. A mouse-adapted SARS-CoV-2 induces acute lung injury and mortality in standard laboratory mice [J]. Cell, 2020, 183(4): 1070–1085.
 - [25] Dinno KH 3rd, Leist SR, Schäfer A, et al. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures [J]. Nature, 2020, 586(7830): 560–566.
 - [26] Fu W, Wang W, Yuan L, et al. A SCID mouse-human lung xenograft model of SARS-CoV-2 infection [J]. Theranostics, 2021, 11(13): 6607–6615.
 - [27] Wahl A, Gralinski LE, Johnson CE, et al. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801 [J]. Nature, 2021, 591(7850): 451–457.
 - [28] Kathiriyi JJ, Wang C, Zhou M, et al. Human alveolar type 2 epithelium transdifferentiates into metaplastic KRT5⁺ basal cells [J]. Nat Cell Biol, 2022, 24(1): 10–23.
 - [29] Kenney DJ, O’Connell AK, Turcinovic J, et al. Humanized mice reveal a macrophage-enriched gene signature defining human lung tissue protection during SARS-CoV-2 infection [J]. Cell Rep, 2022, 39(3): 110714.
 - [30] Sun R, Zhao Z, Fu C, et al. Humanized mice for investigating SARS-CoV-2 lung infection and associated human immune responses [J]. Eur J Immunol, 2022, 52(10): 1640–1647.
 - [31] Zhang C, Wei B, Liu Z, et al. Bafilomycin A1 inhibits SARS-CoV-2 infection in a human lung xenograft mouse model [J]. Virol J, 2023, 20(1): 18.
 - [32] Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues [J]. Cell, 2020, 181(5): 1016–1035.
 - [33] Johnston SC, Ricks KM, Jay A, et al. Development of a coronavirus disease 2019 nonhuman primate model using airborne exposure [J]. PLoS One, 2021, 16(2): e0246366.
 - [34] Woolsey C, Borisevich V, Prasad AN, et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection [J]. Nat Immunol, 2021, 22(1): 86–98.
 - [35] Blair RV, Vaccari M, Doyle-Meyers LA, et al. Acute respiratory distress in aged, SARS-CoV-2-infected African green monkeys but not Rhesus macaques [J]. Am J Pathol, 2021, 191(2): 274–282.
 - [36] Rockx B, Kuiken T, Herfst S, et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model [J]. Science, 2020, 368(6494): 1012–1015.
 - [37] Munster VJ, Flagg M, Singh M, et al. Subtle differences in the pathogenicity of SARS-CoV-2 variants of concern B.1. 1. 7 and B. 1. 351 in rhesus macaques [J]. bioRxiv, 2021, 7(43): eabj3627.
 - [38] Böszörményi KP, Stammes MA, Fagrouch ZC, et al. The post-acute phase of SARS-CoV-2 infection in two macaque species is associated with signs of ongoing virus replication and pathology in pulmonary and extrapulmonary tissues [J]. Viruses, 2021, 13(8): 1673.
 - [39] Salguero FJ, White AD, Slack GS, et al. Comparison of rhesus and cynomolgus macaques as an infection model for COVID-19 [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1260.
 - [40] Lu S, Zhao Y, Yu W, et al. Comparison of nonhuman Primates identified the suitable model for COVID-19 [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 157.
 - [41] Zheng H, Li H, Guo L, et al. Virulence and pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques: a nonhuman primate model of COVID-19 progression [J]. PLoS Pathog, 2020, 16(11): e1008949.
 - [42] Shan C, Yao YF, Yang XL, et al. Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in Rhesus macaques [J]. Cell Res, 2020, 30(8): 670–677.
 - [43] Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, et al. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19 [J]. Nat Immunol, 2020, 21(11): 1336–1345.
 - [44] Zhou Y, Fu B, Zheng X, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients [J]. Natl Sci Rev, 2020, 7(6): 998–1002.
 - [45] Aleebrahim-Dehkordi E, Molavi B, Mokhtari M, et al. T helper type (Th1/Th2) responses to SARS-CoV-2 and influenza A (H1N1) virus: from cytokines produced to immune responses [J]. Transpl Immunol, 2022, 70: 101495.
 - [46] Baek SH, Oh H, Koo BS, et al. Cynomolgus macaque model for COVID-19 delta variant [J]. Immune Netw, 2022, 22(6): e48.
 - [47] Deng W, Bao L, Liu J, et al. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques [J]. Science, 2020, 369(6505): 818–823.

孙宁,付家琳,徐澍,等. 皮质醇用于评估犬应激压力的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1504–1511.
Sun N, Fu JL, Xu S, et al. Research progress on cortisol measurement to evaluate stress in dogs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1504–1511.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.015

皮质醇用于评估犬应激压力的研究进展

孙宁¹, 付家琳¹, 徐澍¹, 俞曦², 水映懿³, 朱启文^{4*}

(1. 中国刑事警察学院, 沈阳 110034; 2. 安徽省铜陵市公安局, 安徽 铜陵 244000;
3. 中国人民公安大学, 北京 100038; 4. 沈阳医学院辽宁省行为认知重点实验室, 沈阳 110034)

【摘要】近年来,人们将皮质醇(cortisol)作为评估犬(*Canis familiaris*)压力的生物标志物。为了评估犬的福利状况,本文综述了犬在各种应激压力下皮质醇水平及其变化情况,并根据犬皮质醇的变化规律,探究缓解犬压力的影响因素,进一步完善缓解犬压力的措施。建议使用皮质醇测定结合行为观察等多项生理指标,以更准确地评估犬的抗应激压力水平。

【关键词】皮质醇;犬;应激压力;动物福利

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847(2023)11-1504-08

Research progress on cortisol measurement to evaluate stress in dogs

SUN Ning¹, FU Jialin¹, XU Shu¹, YU Xi², SHUI Yingyi³, ZHU Qiwen^{4*}

(1. Criminal Investigation Police University of China, Shenyang 110034, China. 2. Tongling Public Security Bureau, Anhui Province, Tongling 244000. 3. People's Public Security University of China, Beijing 100038.
4. Liaoning Provincial Key Laboratory of Behavioral Cognition, Shenyang Medical College, Shenyang 110034)

Corresponding author: ZHU Qiwen. E-mail: syxyzqw@163.com

【Abstract】In recent years, cortisol has been used as a biomarker to assess stress in dogs. To evaluate the welfare of dogs, we reviewed cortisol levels and changes in dogs under various stresses. We explored the influential factors that relieve stress in accordance with variations in cortisol levels, to improve the measures which reduce stress in dogs. It is recommended to apply cortisol measurement and behavioral observation comprehensively to evaluate stress in dogs more accurately.

【Keywords】cortisol; dog; stress; animal welfare

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

皮质醇作为动物福利研究的基石,已被用于测量各物种的压力应激反应^[1]。皮质醇(cortisol)是一种糖皮质激素,参与许多生理过程,也是衡量动物压力的良好指标。皮质醇的释放受下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴调控。皮质醇分泌增加被认为是一种对应激反应的适应。皮质醇可以加速动物体内碳水化合物代谢,

增加血液中葡萄糖的可利用性,这样有助于应对短期应激中的压力,同时皮质醇也是反映动物个体面临压力强度的重要生理指标^[2]。

犬(*Canis familiaris*)是人类最早驯化的动物,量化犬的压力水平一直是研究人员感兴趣的研究。近年来,人们将皮质醇作为评估犬压力的生物标志物^[3-5]。大量研究证明了皮质醇衡量犬肾上腺皮质

【基金项目】中央高校基本科研业务费项目(3242021016),辽宁省教育厅科学研究经费项目(LJKZ0073)。

Funded by the Fundamental Research Funds for the Central Universities(3242021016), Scientific Research Fund Project of Liaoning Education Department(LJKZ0073)。

【作者简介】孙宁(1973—),女,硕士,教授,硕士生导师,研究方向:警犬技术及动物行为研究。Email:1336794661@qq.com

【通信作者】朱启文(1963—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:动物行为与认知研究。Email:syxyzqw@163.com

活动的实用性和有效性,目前已经在多种基质中测定犬的皮质醇水平,血液、唾液、尿液、乳汁、头发和粪便中的皮质醇都可作为犬的压力标志物^[6-10],每种方法都有自身特点和相对可行性。血液和唾液中的皮质醇测定具有瞬时性,可以“即时”还原采集样本时的肾上腺皮质活动,尿液、乳汁、粪便、毛发中的皮质醇是显示肾上腺皮质活动的时间累积值,时间范围从 < 1 h(尿液、牛奶)到 1 d(粪便)到几天或几周(毛发)。对于发生在数个小时内的急性应激反应,最好采用唾液、尿液以及粪便来测定^[11];而毛发以及指甲能够测定数周内的皮质醇,可以用来反映一段时间内的肾上腺皮质的慢性变化。通过皮质醇水平的变化来识别犬在压力下的生理反应,对于评估犬的福利状态非常重要。本文归纳总结了犬外界环境中的各种压力源,综述了犬在各种应激压力下皮质醇水平及其变化情况,同时根据犬皮质醇的变化规律,探究缓解犬压力的影响因素,进一步完善减轻犬压力的措施,改善犬的福利状况。

1 皮质醇评估各种压力源对犬的压力

犬经常会暴露在各种压力源下,例如噪音、新环境、运输、恶劣条件等,犬会表现出恐惧、刻板行为(stereotyped)等,各种压力源对犬的压力可以通过测定皮质醇进行量化评估。

1.1 评估噪音对犬的压力

犬对噪音经常会表现为恐惧行为,发生率在 23% ~ 49%^[12]。声源的性质(强度、频率、可预测性等)对犬有不同的影响。

噪音通常声音响亮、发生突然,例如:雷暴^[13]、烟花^[14]和枪声^[15]等。犬面对这种响亮的噪音,行为表现为降低姿势(身体蹲伏、尾巴低垂)、喘息、颤抖、吠叫、躲藏、踱步以及找寻熟人等^[16]。雷暴发生后,犬的唾液皮质醇显著增加 207%,持续 40 min 以上才恢复^[13];听到枪声后,犬血浆皮质醇和孕酮急剧增加^[15]。

常见的家庭噪音,如吸尘器、微波炉、烟雾报警器等,也会导致犬恐惧和焦虑。表现为向主人靠近、嚎叫、舔嘴唇以及气喘吁吁等。吸尘器的噪音会使犬基础血浆皮质醇浓度持续高于 55 nmol/L^[17]。声源的频率不同,犬的行为有所不同,但皮质醇水平的差异未见报道。对于低频声源(如真空吸尘器),犬更常见激动和兴奋(吠叫、攻击)行为,也有少量表现为舔嘴唇、耳朵后耷;烟雾报警器的哔哔声为高

频声音,犬会表现为更强烈的恐惧,例如颤抖,因为犬对 1000 ~ 8000 Hz 范围内的声音具有高灵敏度^[18]。犬对高频声音的敏感性高于人类,犬对较低频声音与人类的敏感性差别不大^[19]。例如,人类婴儿的哭声,人听起来仅仅是响亮的声音,犬听起来是痛苦并响亮的^[20]。

刺激能否预测,犬的压力程度有所不同,犬会表现出不同的急性应激行为及皮质醇反应。对于犬无法预期的刺激,如爆炸声、电击和突然掉落的袋子,犬行为表现为降低姿势(身体蹲伏、尾巴低垂),诱发唾液皮质醇升高,峰值为 20.4 ± 4.5 nmol/L(唾液皮质醇基础值为 6.0 nmol/L),皮质醇的水平与犬暴露在响亮噪音下相似^[13]。峰值出现在声音刺激后 16.9 ± 2.3 min,持续约 60 min 恢复正常。其他的刺激,比如人打开雨伞、按压犬趴在地上,这些刺激都是可以预期的,并没有改变犬的皮质醇水平,唾液皮质醇值与基础水平相比保持不变^[21],但犬在行为上表现为身体颤抖和舔嘴行为频率增加,以及轻微的舔嘴、打哈欠等。Weiss^[22]在经典的应激大鼠实验中,认为刺激的可预见性是调节唾液皮质醇水平的主要因素。但 Dess 等^[23]观点相反,他认为是可控制性而不是可预测性显著地调节了电击后犬血浆皮质醇的反应,但也提出,不可预测的休克后的皮质醇均值比可预测休克后的更高。可见两种观点并不矛盾,因此,刺激的可预测性能判断刺激压力是否引发皮质醇反应。

1.2 评估新环境对犬的压力

犬进入新环境后,不熟悉的环境、人、动物,之前社会关系的破坏以及不可预测的事件等情况都会给犬带来压力^[24]。犬去宠物医院就医,会引发犬血浆皮质醇水平增加^[25],可能是因为犬与主人隔离^[26]。收容所对犬来说是一个新环境,刚到收容所的犬,表现出过度舔毛、重复转圈等刻板行为。刻板行为越多,皮质醇水平越高^[10]。在入住前 3 d 压力水平最高,之后逐渐减弱^[27],第 1 周就习惯了收容所的新环境;Hennessy^[28]研究表明,入住第 3 ~ 5 天尿和血浆皮质醇水平会急剧升高,然后随着时间的推移趋于平稳^[29],直到 10 d 后才下降到基础水平^[30];Stephen 等^[31]发现犬到收容所第 17 天左右尿皮质醇达到峰值,之后水平稳步下降,到第 31 天时,与在家中的基础水平没有显著性差异(作者也注意到犬存在很大的个体差异);小猎犬在从户外围栏转移到犬笼后,发现第 1 天的皮质醇水平最高,并在

接下来的 77 d 内逐渐下降并趋于稳定^[32];新入收容所的犬血浆皮质醇水平是在家时的 3 倍^[33],然而,仅仅 5 d 后水平相当^[27]。以上研究显示,随着时间的推移,收容所犬的皮质醇水平下降,表明压力减轻了,犬已经适应了新环境^[33-34]。相比之下,老年犬适应新的环境较慢,入住收容所第 7 天,老年犬粪便皮质醇水平(12178.4 ± 2524.4 ng/g),是同一收容所与人类经常接触的犬的 10 倍(与人类经常接触的犬: 1035.9 ± 179.9 ng/g)^[35],之后略有下降。随着时间的推移,刻板行为从第 1 天的 35.7% 下降到第 6 天的 2.6%,结果表明,老年犬似乎在行为上适应了新环境,但需要超过 1 周的时间才能充分适应收容所中的新环境。然而,有作者指出,皮质醇的减少并不一定代表压力减少,他们认为长时间的压力使肾上腺变得“疲劳”而无法继续产生皮质醇,很有可能是 HPA 轴出现不正确反应才导致皮质醇水平下降^[9,29]。

接触人类可以减少犬对新环境的压力。Willen 等^[36]发现,30 min 的人类陪伴降低了新入收容所的犬血浆皮质醇浓度。Coppola 等^[4]研究表明,新入收容所的犬经过 30 ~ 90 min 的玩耍、梳毛、训练和散步,第 2 天的唾液皮质醇降低。van der laan 等^[37]发现新来收容所的犬会频繁地接近不熟悉的人并迅速形成依恋关系,犬增加了与人类的社会接触。接触人类对犬适应新环境的有益影响也已得到证实^[4,24,38],接触人类缓解了犬的 HPA 应激系统对新情况的敏感性。从这个意义上说,人类的陪伴能够抑制对新环境的压力反应^[39]。在压力期间,同种动物的存在可以使某些动物平静下来,这种现象被称为社会缓冲^[40]。但有人发现犬接触人类比接触犬同类更有利于犬的健康^[41]。在新环境中,犬皮质醇水平升高,有同伴犬陪伴发现皮质醇仍然升高,但如果在新环境中有人类陪伴,则皮质醇水平不会升高,而且经常观察到犬有接近人类的社会行为。关于人犬互动的文献有很多,但探索收容所环境中人犬互动作用的研究有限。对犬而言,玩具起着重要作用,可以作为新的刺激物打破犬舍的单调^[42]。对于猫来说,提供专门用于抓挠、攀爬的空间特别有用^[43]。收容所可根据物种的特性需求来丰富环境,以帮助它们应对新环境的压力源,并减少因压力导致的异常行为和刻板行为^[44]。

1.3 评估运输对犬的压力

运输对犬来说是一种新奇事物,综合了不同的

压力源,例如在运输过程中被关在狭窄的笼子里、车辆振动、交通噪音、未知环境、高温和装卸货等。公路和飞机运输都会对给犬带来压力^[45]。Horwitz^[46]的研究显示,犬在运输过程中的压力反应是恐惧或焦虑的结果。Beerda 等^[3]发现唾液皮质醇的水平从运输前的 3.6 ± 0.4 nmol/L 增加到到达后的 37.4 ± 8.2 nmol/L。Frank 等^[47]观察到皮质醇浓度在运输前和运输后均有所增加,飞机运输之前 (16.2 nmol/L) 和运输后 (14.8 nmol/L) 的平均唾液皮质醇浓度显著高于基线水平 12.6 nmol/L (最初采样时犬可能已经很兴奋)。结果表明,运输前和运输过程造成了高强度的压力。皮质醇在粪便中的代谢有滞后性,即应激的发生与粪便中出现皮质醇之间存在延迟时间。运输时的应激与粪便皮质醇峰值的延迟时间发生在动物装载后 47 h^[48]。

鉴于运输会引起生理应激反应,可采取适当措施,例如减少运输时间、改善运输条件(空间、通风、温度等)。重复运输过程也可减少犬压力反应,在一项研究中表明,直升机运输犬去搜救,犬被装载到直升机上飞行了 30 min,皮质醇仅适度增加(10% ~ 20%),唾液皮质醇从基础水平 5.4 μ g/L 增加到 6.4 μ g/L^[49],而且犬恢复良好,未影响搜索性能,皮质醇的变化程度比之前的研究要小,之前研究中,环境压力会导致犬血浆皮质醇增加高达 2 ~ 4 倍,45 min 后才能恢复到基础水平^[21],搜救犬的日常运输训练使犬对环境挑战产生较小的反应(即较小的皮质醇变化)。对人类的研究表明,训练有素且技术娴熟的运动员对压力源的反应明显低于未受过训练的运动员^[50]。马运输引起的应激反应也会随着反复运输而降低^[51]。

1.4 评估恶劣犬舍对犬的压力

大多数犬生活在犬舍里,犬舍的空间和条件对犬福利的影响非常大^[24]。Beerda 等^[52]认为居住条件恶劣的犬尿皮质醇水平升高并持续多年。由于犬舍环境的压力,犬表现出异常行为。犬在狭窄的犬舍空间中,表现最明显的异常行为就是刻板行为^[53]。重复的、无功能的行为被称为刻板行为。刻板行为与不佳环境之间存在高度相关性^[54]。将刻板行为视为福利受损和慢性压力已被广泛认可。犬刻板行为的具体表现是盘旋、反复在犬舍行走、踱步、从墙壁上弹起、食粪、大声吠叫等^[55]。与家庭环境相比,犬舍环境中的刻板行为发生率相对较高^[29]。Stephen 等^[56]发现,犬在犬舍中时间越长,

刻板行为发生率越高,而恐惧行为越少。工作犬,如警犬、军犬等,通常饲养在犬舍中,Denham 等^[57]发现工作犬中有 93% 表现出刻板行为。马利诺阿犬是中国工作犬品种之一,在密闭空间内通常会表现出盘旋的行为,据报道,马利诺阿犬的刻板行为率比其他工作犬品种更高,达 29.78% ~ 33.86%^[5],但比不盘旋的个体具有更强的工作欲望和主动性,工作性能更好^[58]。在评估刻板行为与皮质醇水平之间的关系中发现,无论是犬盘旋、踱步、吠叫等任何刻板行为和粪便皮质醇水平之间无相关性^[59],这个结果倾向于皮质醇水平和行为无关的结论^[8,33]。

一些研究表明,环境丰富可以有效地减少犬舍带来的压力,比如丰富犬舍内的玩具、训练和基础设施被证明是提高犬福利的有效方法,犬可以减少刻板行为、降低血浆皮质醇水平^[55]。工作犬的犬舍基础设施通常不丰富,一项改善研究是在犬舍周围铺设草坪(350 m²)、在犬舍的天花板上悬挂玩具(30 cm 黄麻抹布卷),犬刻板行为表现出降低趋势^[60],刻板行为的减少可以作为犬适应环境的良好指示。同时训导员将犬带到草坪区域互动,发现犬的粪便皮质醇水平显著降低,说明犬定期进行户外活动以及丰富的犬舍设施都可以成为减轻犬压力行为和生理的有效方法。

还有一种缓解措施,就是群养犬。Hetts 等^[61]指出,社会隔离可能比空间限制更有害。单独圈养的犬与成群圈养的犬的行为差异很大,单养犬的刻板行为时间为 4% ~ 5%;群养犬刻板行为时间为 0.9% ~ 2%,更多的行为表现是休息、游戏和社交互动^[55]。从福利的角度来看,群养是一种合适的选择,提供了与其他犬积极互动的机会,包括玩耍、陪伴、身体联系和社交。

2 皮质醇评估人压力与犬压力的相关性

2.1 人犬压力的同步性

犬是人类的驯化动物,犬和人类至少有 15 000 年的密切联系,有着独特的种间关系。犬和人类间会发生压力传染^[62]。Sundman 等^[63]评估犬与主人毛发中的皮质醇浓度,发现犬与人之间存在长期的种间应激激素同步,证实犬在很大程度上反映了主人的压力,主人体内皮质醇水平的增加伴随着犬体内皮质醇水平的增加。Ouellette 等^[64]明确报告说,

人类对犬皮质醇水平的变异性有很大的影响。人类母亲和孩子之间也存在皮质醇水平的同步性。主人的性格、责任心和开放性与犬的皮质醇水平存在相关性。Kotrschal 等^[65]发现,神经质主人的犬毛发皮质醇水平低,因为神经质主人与他们的犬形成了强烈的依恋联系。更有趣的是,人犬的压力同步与犬性别有关,公犬和母犬的毛发皮质醇水平均与主人的毛发皮质醇水平同步,母犬相关性更强,这与其他物种人类^[66]、大鼠^[67]的研究结果一致。Nagasawa 等^[68]发现母犬会表现出更高的情绪反应。主人的性别也会影响犬的行为反应,例如犬在被女性主人抚摸时比男性主人更放松^[69]。此外,男性主人的公犬比女性主人的公犬更善于交际和活跃^[65],并且在犬的依恋实验评估中,男性主人的公犬的皮质醇浓度最低^[70],这可能与人类与犬的互动态度有关^[71]。

2.2 人犬压力同步受犬工作性能的影响

工作犬是特殊用犬,人犬压力同步在工作犬中体现得尤为明显。工作犬在工作期间与它们的主人一样暴露于相同的压力源中。已经证实,人和犬以相似的方式对同压力刺激作出反应^[20]。在搜救犬考试期间,主人的压力会影响犬的压力水平。犬和主人的皮质醇水平存在强烈的显著正相关。Lit 等^[72]观察到犬考试失败后,皮质醇水平升高。Sümegi 等^[62]描述了类似的结论,当主人有压力时,犬在解决问题方面更差,认知能力也更差。犬可通过人类肢体语言和面部表情精准识别人类的情绪^[73]。搜救犬和主人每周都要进行数小时的训练,在共同完成任务的接触中,人与犬的相互理解进一步增强,这可能会导致更强的皮质醇相关性^[74]。在犬的敏捷性比赛中,证实了主人与犬之间皮质醇水平是同步的^[73]。之前的研究表明,训练和竞争会影响犬的社会行为^[75]和毛发皮质醇水平^[76]。赛犬与主人的皮质醇同步性比宠物犬与主人的关联性更强,如 Meyer 等^[74]的建议,许多犬主人应积极训练他们的犬参加敏捷性和服从性比赛,训练可能会增加情感上的亲密度,从而产生更强的同步性。

3 皮质醇可作为评估工作犬压力的标志物

3.1 评估工作犬的压力

工作犬在一些工作领域发挥着不可替代的作用,人类社会对专业工作犬的需求日益增加,如导

盲犬、搜毒犬、搜爆犬、搜救犬等。与家养犬相比,工作犬会暴露在许多具有挑战性的环境中,例如交通、噪音等干扰,与陌生环境、陌生人等压力源接触。它们更容易感受到压力和紧张,会出现异常行为,比如跑向或远离主人、反复转身、重复舔舐行为、过度警觉^[77]。压力导致的一系列消极表现会影响工作性能的发挥,也会有损其福利水平。

工作犬通常在压力大的情况下工作。例如 Wojtas 等^[78]表明救援搜索对工作犬来说是压力事件,这可以通过唾液皮质醇的升高来证明。还有一项专门对工作犬福利的研究,对德国牧羊犬、马利诺阿犬、杜宾犬和罗威纳犬 4 种工作犬进行皮质醇测定^[79],休息条件下的唾液皮质醇浓度平均在 $0.361 \sim 0.438 \mu\text{g}/\text{dL}$ 之间,而工作条件下的唾液皮质醇浓度平均在 $0.312 \sim 0.592 \mu\text{g}/\text{dL}$ 之间。犬的基础唾液皮质醇水平范围为 $0.02 \sim 0.3 \mu\text{g}/\text{dL}$ ^[80]。结果表明,即使在休息条件下,工作犬的皮质醇水平也很高,这意味着它们长时间承受压力。

在工作期间,各品种的工作犬之间的皮质醇水平没有显著性差异,这可能是因为犬处于相同的刺激下,训练程序和环境对于所有品种来说都是相同的,皮质醇水平基本没有差异^[5]。罗威纳犬($0.614 \mu\text{g}/\text{dL}$)和德国牧羊犬($0.567 \mu\text{g}/\text{dL}$)的唾液皮质醇水平略高于其他犬($P > 0.05$)。虽然德国牧羊犬皮质醇水平较高,但并没有表现与压力有关的行为,可能与体力工作相关^[63]。罗威纳犬的唾液皮质醇水平最高,在日常训练、休息或工作中,与其他受到相同刺激的工作犬相比,罗威纳犬会表现出更多的刻板行为,罗威纳犬可能更容易感受到压力。

3.2 评估犬在压力源中的恢复能力

在极度紧张的环境中完成任务后,合格的工作犬经过一段时间会表现出行为复原力。Elizabeth 等^[81]对 2001 年 9 月 11 日恐怖袭击事件参与救援工作的搜救犬进行了终生跟踪,以评估事件对其健康和行为的影响,研究表明,事件并未对搜救犬的行为产生不利影响,搜救犬在一定时间内能从强大的压力中恢复。Beerda 等^[21]也证明犬能从急性压力源中恢复,他发现,大多数犬在应激后 30 min 后,唾液皮质醇的峰值下降了一半,并在应激后 45 ~ 60 min 后恢复到基础水平。这表明,犬有能力从遭遇的压力源中恢复过来,这种从压力源中恢复的能力对于工作犬来说尤其重要,因为它们注定会定期暴露于潜在的压力源中。因此,Beerda 等^[21]认为

可通过皮质醇测试犬在压力源中的恢复能力来筛选工作犬。目前,筛选工作犬的常用方法是评估幼犬的警用素质。依据 6 月龄幼犬培训考核标准,考核包括发育状况、体能、服从性、胆量、衔取等,其中与应对压力相关的项目是胆量的考核。国内考核方法是:犬在牵引状态下能自由穿梭 6 人以上陌生人群,并能适应陌生人牵引、抚摸和 50 m 处声响刺激,对车辆行人不惊慌。国外的考核方法是考核犬应对各种突发刺激、新情况、触觉/音频刺激的表现,然后根据考核结果挑选警用性能良好的幼犬。在现有的工作犬筛选标准中,尚未评估犬在压力源中的恢复能力。可根据皮质醇的变化来评估工作犬能否应对将来的工作任务,例如犬在训练后,显示出唾液皮质醇升高但能恢复到基线值,可以认定该犬能够应对训练期间遇到的压力源,以此来衡量工作犬的应对压力能力,可以尽早发现具有潜力的工作犬,从而提高整体训练效果,有助于降低培训成本。

4 皮质醇测定与行为观察的相关性

犬暴露于以上的压力源时,除了皮质醇水平变化,往往在行为上也有所表现,比如,恐惧行为和刻板行为。恐惧行为中,犬降低姿势(包括身体蹲伏、尾巴低垂、耳朵后耷)是犬极度恐惧时最明显的行为表现,细微的行为表现是身体颤抖、吠叫、呜呜声、舔嘴唇、打哈欠、摇尾巴和抬起爪子等,各种表述不一致^[82];刻板行为中,多表现为盘旋、反复在犬舍行走、踱步、从墙壁上弹起、食粪、大声吠叫等^[55]。因此,很多人认为行为观察和皮质醇测定方法密切相关,行为特征与压力下的生理和神经内分泌反应有关^[83]。Hiby 等^[9]先前的研究表明,犬表现出恐惧行为和刻板行为越多,皮质醇水平越高。但 Beerda 等^[21]发现,压力行为与唾液、尿液皮质醇水平几乎没有显著的关联。目前,毛发样本是唯一发现皮质醇水平与压力行为(如躲藏、喘气、降低身体姿势)之间存在密切相关的测定方法,其他研究也报告犬的皮质醇水平与行为之间没有关系^[8,33]。尽管犬的行为观察和皮质醇测量之间是否存在相关性仍存在争议^[8],但这两项方法都在单独评估动物福利状况。例如,行为观察已被确立为评估犬应激的工具^[13],行为观察通常被认为是一个可靠的指标^[84]。因此,可坚持建议综合使用行为观察和皮质醇测定方法来共同研究犬的压力。

5 总结与展望

综上所述,国外皮质醇用于评估犬应激压力的研究蓬勃发展,且取得了一系列有意义的研究成果。通过测定皮质醇的水平可以评估犬在压力源下的福利状况,也可监测缓解犬压力的影响因素,进而指导完善减轻犬压力的措施。虽然皮质醇测定是评估 HPA 系统功能活动的最实用和最常见的测量方法,但皮质醇在压力评估中的可靠性仍受到质疑,因为皮质醇浓度变化受复杂机制的影响,许多因素会影响皮质醇水平,比如环境、个体、测定方法和时间变量^[85]。针对某个动物、某一个时间点上,确定影响皮质醇水平的因素不一定与压力事件相关^[86]。使用皮质醇作为压力指标,特别是从长远来看,仍然存在争议。为了更准确地评估犬的整体应激压力水平,建议参考多项参数,包括行为观察和其他的生理指标,如心率变异性(heart-rate variability, HRV)、催产素(oxytocin, OT)、分泌型免疫球蛋白 A(salivary immunoglobulin A, sIgA)、唾液 α -淀粉酶(salivary alpha-amylase)等^[87-88],以更可靠、更客观地评估犬的福利状况。

参 考 文 献(References)

- [1] Mormède P, Andanson S, Aupérin B, et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare [J]. *Physiol Behav*, 2007, 92(3): 317-339.
- [2] 胡越, 熊威威, 谭毅, 等. 不同急性应激反应大鼠模型的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(12): 51-54.
Hu Y, Xiong WW, Tan Y, et al. Comparison of different rat models of acute stress response [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(12): 51-54.
- [3] Beerda B, Schilder MB, Bernadina W, et al. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses [J]. *Physiol Behav*, 1999, 66(2): 243-254.
- [4] Coppola CL, Grandin T, Enns RM. Human interaction and cortisol: can human contact reduce stress for shelter dogs? [J]. *Physiol Behav*, 2006, 87(3): 537-541.
- [5] Haverbeke A, Diederich C, Depiereux E, et al. Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges [J]. *Physiol Behav*, 2008, 93(1-2): 59-67.
- [6] Korchia J, Freeman K. Validation study of canine urine cortisol measurement with the Immulite 2000 Xpi cortisol immunoassay [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2021, 33: 1052-1068.
- [7] Megahed AA, Jones KL, Bisinotto RS, et al. Validation of a fully automated chemiluminescent immunoassay for cattle serum and plasma progesterone measurement [J]. *Front Vet Sci*, 2023, 9: 1064201.
- [8] Hennessy MB, Voith VL, Mazzei SJ, et al. Behavior and cortisol levels of dogs in a public animal shelter, and an exploration of the ability of these measures to predict problem behavior after adoption [J]. *Appl Anim Behav Sci*, 2001, 73(3): 217-233.
- [9] Hiby EF, Rooney NJ, Bradshaw JWS. Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels [J]. *Physiol Behav*, 2006, 89(3): 385-391.
- [10] Meunier S, Groessl M, Reusch C, et al. Salivary cortisol in healthy dogs: a randomized cross-over study to evaluate different saliva stimulation methods and their effects on saliva volume and cortisol concentration [J]. *BMC Vet Res*, 2021, 17(1): 194.
- [11] Touma C, Palme R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1046: 54-74.
- [12] Storengen LM, Lingaas F. Noise sensitivity in 17 dog breeds: prevalence, breed risk and correlation with fear in other situations [J]. *Appl Anim Behav Sci*, 2015, 171: 152-160.
- [13] Dreschel NA, Granger DA. Physiological and behavioral reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers [J]. *Appl Anim Behav Sci*, 2005, 95(3-4): 153-168.
- [14] Dale AR, Walker JK, Farnworth MJ, et al. A survey of owners' perceptions of fear of fireworks in a sample of dogs and cats in New Zealand [J]. *N Z Vet J*, 2010, 58(6): 286-291.
- [15] Hydbring-Sandberg E, von Walter LW, Höglund K, et al. Physiological reactions to fear provocation in dogs [J]. *J Endocrinol*, 2004, 180(3): 439-448.
- [16] Blackwell EJ, Bradshaw JWS, Casey RA. Fear responses to noises in domestic dogs: prevalence, risk factors and co-occurrence with other fear related behaviour [J]. *Appl Anim Behav Sci*, 2013, 145(1-2): 15-25.
- [17] Gin TE, Puchot ML, Cook AK. Impact of an auditory stimulus on baseline cortisol concentrations in clinically normal dogs [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2018, 64: 66-69.
- [18] Heffner H. Hearing in large and small dogs: absolute thresholds and size of the tympanic membrane [J]. *Behav Neurosci*, 1983, 97: 310-318.
- [19] Barber A, Wilkinson A, Montealegre ZF, et al. A comparison of hearing and auditory functioning between dogs and humans [J]. *Comp Cogn Behav Rev*, 2020, 15: 45-94.
- [20] Yong MH, Ruffman T. Emotional contagion: dogs and humans show a similar physiological response to human infant crying [J]. *Behav Process*, 2014, 108: 155-165.
- [21] Beerda B, Schilder MBH, van Hooff JARAM, et al. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs [J]. *Appl Anim Behav Sci*, 1998, 58(3-4): 365-381.
- [22] Weiss JM. Psychological factors in stress and disease [J]. *Sci Am*, 1972, 226(6): 104-113.
- [23] Dess NK, Linwick D, Patterson J, et al. Immediate and proactive effects of controllability and predictability on plasma cortisol responses to shocks in dogs [J]. *Behav Neurosci*, 1983, 97(6): 1005-1016.
- [24] Vieira de Castro AC, Fuchs D, Morello GM, et al. Does training method matter? Evidence for the negative impact of aversive-

- based methods on companion dog welfare [J]. PLoS One, 2020, 15(12): e0225023.
- [25] Mariti C, Pierantoni L, Sighieri C, et al. Guardians' perceptions of dogs' welfare and behaviors related to visiting the veterinary clinic [J]. J Appl Anim Welf Sci, 2017, 20(1): 24–33.
 - [26] Buttner AP. Neurobiological underpinnings of dogs' human-like social competence: how interactions between stress response systems and oxytocin mediate dogs' social skills [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2016, 71: 198–214.
 - [27] Hennessy MB, Davis HN, Williams MT, et al. Plasma cortisol levels of dogs at a County animal shelter [J]. Physiol Behav, 1997, 62(3): 485–490.
 - [28] Hennessy MB. Using hypothalamic-pituitary-adrenal measures for assessing and reducing the stress of dogs in shelters: a review [J]. Appl Anim Behav Sci, 2013, 149(1–4): 1–12.
 - [29] Protopopova A. Effects of sheltering on physiology, immune function, behavior, and the welfare of dogs [J]. Physiol Behav, 2016, 159: 95–103.
 - [30] Dudley ES. White blood cell counts, parasite prevalence, and plasma cortisol levels of dogs in a county animal shelter: changes over days and impact of a program of repeated human Interaction [D]. Dayton: Wright State University; 2014.
 - [31] Stephen JM, Ledger RA. A longitudinal evaluation of urinary cortisol in kennelled dogs, *Canis familiaris* [J]. Physiol Behav, 2006, 87(5): 911–916.
 - [32] Clark JD, Rager DR, Crowell-Davis S, et al. Housing and exercise of dogs: effects on behavior, immune function, and cortisol concentration [J]. Lab Anim Sci, 1997, 47(5): 500–510.
 - [33] Rooney NJ, Gaines SA, Bradshaw JWS. Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: investigating mitigation of stress by prior habituation [J]. Physiol Behav, 2007, 92(5): 847–854.
 - [34] Part CE, Kiddie JL, Hayes WA, et al. Physiological, physical and behavioural changes in dogs (*Canis familiaris*) when kennelled: testing the validity of stress parameters [J]. Physiol Behav, 2014, 133: 260–271.
 - [35] Uetake K, Uchida H, Ishihara J, et al. Faecal corticosterone levels of dogs relinquished to a shelter in Japan [J]. Vet Rec Open, 2015, 2(2): e000139.
 - [36] Willen RM, Mutwill A, MacDonald LJ, et al. Factors determining the effects of human interaction on the cortisol levels of shelter dogs [J]. Appl Anim Behav Sci, 2017, 186: 41–48.
 - [37] van der Laan JE, Vinke CM, Arndt SS. Evaluation of hair cortisol as an indicator of long-term stress responses in dogs in an animal shelter and after subsequent adoption [J]. Sci Rep, 2022, 12: 5117.
 - [38] Hennessy MB, Morris A, Linden F. Evaluation of the effects of a socialization program in a prison on behavior and pituitary-adrenal hormone levels of shelter dogs [J]. Appl Anim Behav Sci, 2006, 99(1–2): 157–171.
 - [39] Pedretti G, Canori C, Marshall-Pescini S, et al. Audience effect on domestic dogs' behavioural displays and facial expressions [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 9747.
 - [40] Denommé MR, Mason G. Social buffering as a tool for improving rodent welfare [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2022, 61(1): 5–14.
 - [41] Valsecchi P, Pattacini O, Beretta V, et al. 13: effects of a human social enrichment program on behavior and welfare of sheltered dogs [J]. J Vet Behav Clin Appl Res, 2007, 2: 88–89.
 - [42] Wells DL. The influence of toys on the behaviour and welfare of kennelled dogs [J]. Animal Welf, 2004, 13(3): 367–373.
 - [43] Stella J, Croney C, Buffington T. Environmental factors that affect the behavior and welfare of domestic cats (*Felis silvestris catus*) housed in cages [J]. Appl Anim Behav Sci, 2014, 160: 94–105.
 - [44] Wells DL. Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: a review [J]. Appl Anim Behav Sci, 2009, 118(1–2): 1–11.
 - [45] Liang W, Zeng L, Yu C, et al. Effect of flight transport stress on blood parameters in beagles and the anti-stress effect of Dangshen [J]. Anim Model Exp Med, 2018, 1(2): 162–168.
 - [46] Horwitz D. BSAVA manual of canine and feline behavioural medicine [M]. Philadelphia: British Small Animal Veterinary Association; 2009.
 - [47] Frank D, Gauthier A, Bergeron R. Placebo-controlled double-blind clomipramine trial for the treatment of anxiety or fear in beagles during ground transport [J]. La Revue Veterinaire Can, 2006, 47(11): 1102–1108.
 - [48] Shepherdson D, Lewis KD, Carlstead K, et al. Individual and environmental factors associated with stereotypic behavior and fecal glucocorticoid metabolite levels in zoo housed polar bears [J]. Appl Anim Behav Sci, 2013, 147(3–4): 268–277.
 - [49] Perry E, Gulson N, Liu Cross TW, et al. Physiological effects of stress related to helicopter travel in federal emergency management agency search-and-rescue canines [J]. J Nutr Sci, 2017, 6: e28.
 - [50] Rimmel U, Zellweger BC, Marti B, et al. Trained men show lower cortisol, heart rate and psychological responses to psychosocial stress compared with untrained men [J]. Psychoneuroendocrinology, 2007, 32(6): 627–635.
 - [51] Schmidt A, Hödl S, Möstl E, et al. Cortisol release, heart rate, and heart rate variability in transport-naïve horses during repeated road transport [J]. Domest Anim Endocrinol, 2010, 39(3): 205–213.
 - [52] Beerda B, Schilder MBH, van Hooff J. Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs [J]. Anim Welf, 2000, 9(1): 49–62.
 - [53] Beerda B, Schilder MB, van Hooff JA, et al. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses [J]. Physiol Behav, 1999, 66(2): 233–242.
 - [54] Mason GJ. Stereotypies: a critical review [J]. Anim Behav, 1991, 41(6): 1015–1037.
 - [55] Hubrecht RC, Serpell JA, Poole TB. Correlates of pen size and housing conditions on the behaviour of kennelled dogs [J]. Appl Anim Behav Sci, 1992, 34(4): 365–383.
 - [56] Stephen J, Ledger R. An audit of behavioral indicators of poor

- welfare in kenneled dogs in the United Kingdom [J]. J Appl Anim Welf Sci, 2005, 8: 79–95.
- [57] Denham HDC, Bradshaw JWS, Rooney NJ. Repetitive behaviour in kennelled domestic dog: Stereotypical or not? [J]. Physiol Behav, 2014, 128: 288–294.
- [58] Cao X, Irwin DM, Liu YH, et al. Balancing selection on CDH2 may be related to the behavioral features of the Belgian Malinois [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110075.
- [59] Nogueira LB, Palme R, Mendonça-Furtado O. Give them a toy or increase time out of kennel at lawn areas: what is the influence of these interventions on police dogs' welfare? [J]. Animals, 2021, 11(8): 2264.
- [60] Lefebvre D, Giffroy JM, Diederich C. Cortisol and behavioral responses to enrichment in military working dogs [J]. J Ethol, 2009, 27(2): 255–265.
- [61] Hettis S, Derrell Clark J, Calpin JP, et al. Influence of housing conditions on beagle behaviour [J]. Appl Anim Behav Sci, 1992, 34(1–2): 137–155.
- [62] Sümegi Z, Oláh K, Topál J. Emotional contagion in dogs as measured by change in cognitive task performance [J]. Appl Anim Behav Sci, 2014, 160: 106–115.
- [63] Sundman AS, van Poucke E, Svensson Holm AC, et al. Long-term stress levels are synchronized in dogs and their owners [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 7391.
- [64] Ouellette SJ, Russell E, Kryski KR, et al. Hair cortisol concentrations in higher- and lower-stress mother-daughter dyads: a pilot study of associations and moderators [J]. Dev Psychobiol, 2015, 57(5): 519–534.
- [65] Kotschal K, Schöberl I, Bauer B, et al. Dyadic relationships and operational performance of male and female owners and their male dogs [J]. Behav Processes, 2009, 81(3): 383–391.
- [66] Höglin A, van Poucke E, Katajamaa R, et al. Long-term stress in dogs is related to the human-dog relationship and personality traits [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 8612.
- [67] Ben-Ami Bartal I, Decety J, Mason P. Empathy and pro-social behavior in rats [J]. Science, 2011, 334(6061): 1427–1430.
- [68] Nagasawa M, Mitsui S, En S, et al. Social evolution. Oxytocin-gaze positive loop and the coevolution of human-dog bonds [J]. Science, 2015, 348(6232): 333–336.
- [69] Hennessy MB, Williams MT, Miller DD, et al. Influence of male and female petters on plasma cortisol and behaviour: can human interaction reduce the stress of dogs in a public animal shelter? [J]. Appl Anim Behav Sci, 1998, 61(1): 63–77.
- [70] Schöberl I, Beetz A, Solomon J, et al. Social factors influencing cortisol modulation in dogs during a strange situation procedure [J]. J Vet Behav, 2016, 11: 77–85.
- [71] Schöberl I, Wedl M, Beetz A, et al. Psychobiological factors affecting cortisol variability in human-dog dyads [J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0170707.
- [72] Lit L, Boehm D, Marzke S, et al. Certification testing as an acute naturalistic stressor for disaster dog handlers [J]. Stress, 2010, 13(5): 392–401.
- [73] Jones AC, Josephs RA. Interspecies hormonal interactions between man and the domestic dog (*Canis familiaris*) [J]. Horm Behav, 2006, 50(3): 393–400.
- [74] Meyer I, Forkman B. Dog and owner characteristics affecting the dog-owner relationship [J]. J Vet Behav, 2014, 9(4): 143–150.
- [75] Marshall-Pescini S, Frazzi C, Valsecchi P. The effect of training and breed group on problem-solving behaviours in dogs [J]. Anim Cogn, 2016, 19(3): 571–579.
- [76] Roth LS, Faresjö Å, Theodorsson E, et al. Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs [J]. Sci Rep, 2016, 6: 19631.
- [77] Mills D, Karagiannis C, Zulch H. Stress—its effects on health and behavior: a guide for practitioners [J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2014, 44(3): 525–541.
- [78] Wojtaś J, Karpiński M, Czyżowski P. Salivary cortisol interactions in search and rescue dogs and their handlers [J]. Animals, 2020, 10(4): 595.
- [79] Arcuri GB, Pantoja MHA, Titto CG, et al. Preliminary analysis of reproductive, behavioral and physiological characteristics of military working dogs [J]. Anim Reprod, 2022, 19(1): e20210092.
- [80] Hekman JP, Karas AZ, Dreschel NA. Salivary cortisol concentrations and behavior in a population of healthy dogs hospitalized for elective procedures [J]. Appl Anim Behav Sci, 2012, 141(3): 149–157.
- [81] Elizabeth H, Kelsey Kathleen M, Niedermeyer Greta M, et al. Long-term behavioral resilience in search-and-rescue dogs responding to the September 11, 2001 terrorist attacks [J]. Appl Anim Behav Sci, 2021, 234: 105173.
- [82] Stellato AC, Flint HE, Widowski TM, et al. Assessment of fear-related behaviours displayed by companion dogs (*Canis familiaris*) in response to social and non-social stimuli [J]. Appl Anim Behav Sci, 2017, 188: 84–90.
- [83] Doerfler RL, Lehermeier C, Kliem H, et al. Physiological and behavioral responses of dairy cattle to the introduction of robot scrapers [J]. Front Vet Sci, 2016, 3: 106.
- [84] Mariti C, Gazzano A, Moore JL, et al. Perception of dogs' stress by their owners [J]. J Veter Behav, 2012, 7(4): 213–219.
- [85] Lensen RCMM, Moons CPH, Diederich C. Physiological stress reactivity and recovery related to behavioral traits in dogs (*Canis familiaris*) [J]. PLoS One, 2019, 14(9): e0222581.
- [86] Ralph CR, Tilbrook AJ. INVITED REVIEW: the usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare [J]. J Anim Sci, 2016, 94(2): 457–470.
- [87] Clark JM, Sun D. Guidelines for the ethical review of laboratory animal welfare People's Republic of China National Standard GB/T 35892-2018 [J]. Anim Model Exp Med, 2020, 3: 103–113.
- [88] Kang EH, Park SH, Oh YI, et al. Assessment of salivary alpha-amylase and cortisol as a pain related stress biomarker in dogs pre-and post-operation [J]. BMC Vet Res, 2022, 18(1): 31.

张乐颖,徐威,左琴. 浅谈国外实验大鼠资源的开发与利用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1512-1518.

Zhang LY, Xu W, Zuo Q. Brief review of the cultivation and utilization of rat resources [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1512-1518.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.016

浅谈国外实验大鼠资源的开发与利用

张乐颖¹, 徐威², 左琴^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 中国农业大学, 北京 100193)

【摘要】 实验大鼠是最常用的实验动物之一, 因其遗传及环境较易控制, 且体型约为小鼠 10 倍, 容易操作, 被广泛应用于生理学、神经行为学、病理学及毒理学等生物医药领域研究。本文回顾了百余年来国外实验大鼠资源培育、保存和开发历程, 为我国更好地收集、分享和利用实验大鼠资源提供借鉴。

【关键词】 大鼠; 资源; 开发与利用; 资源库

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 11-1512-07

Brief review of the cultivation and utilization of rat resources

ZHANG Leying¹, XU Wei², ZUO Qin^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China.

2. China Agriculture University, Beijing 100193)

Corresponding author: ZUO Qin. E-mail: zuoqin2001@163.com

【Abstract】 Rat is one of representative laboratory animals since the genetic and the environment is comparatively easy to control. Laboratory rats are widely used in the area of physiology, neuroethology, pathology and toxicology due to the approximately ten times larger body size compared to mouse, offering several unique advantages in surgical procedures and clinical sampling of blood, tissues, etc. This paper reviews the cultivation and utilization history of the laboratory rat resources abroad such as strain breeding, preservation and database establishment to provide references for collecting, sharing and utilizing laboratory rat resources in our country.

【Keywords】 rat; resources; cultivation and utilization; repository

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

大鼠属于哺乳纲、啮齿目、鼠科、家鼠属, 由褐家鼠变种而来。相对小鼠而言, 大鼠不仅体型较大, 在外科手术、组织或血液样品采集上较有优势^[1], 而且在生理代谢水平和行为认知能力等方面更接近人类, 遗传学较为一致, 常用于生理代谢相关哺乳基因的研究, 在揭示人类疾病病因及治疗方面发挥了巨大作用, 是研究人类疾病的良好模型。国外实验大鼠资源经过百余年的开发和利用, 已形成了规模化、标准化研发供应体系, 有利的支撑了生命科学发展。

1 大鼠的早期应用

大鼠通常被认为是第一种被人类专门驯化用于科学实验的动物^[2]。19 世纪早期就有大鼠应用于科学研究的记录: 如 1856 年法国利用大鼠进行肾上腺切除术的效果研究, 而当时大鼠还未形成品系和标准化生产^[3]。

1.1 早期营养学研究

大鼠对维生素、氨基酸等营养元素缺乏较为敏感, 可发生典型的缺乏症状。20 世纪初, McCollum

[作者简介] 张乐颖(1986—), 女, 硕士, 研究方向: 实验动物资源保存。Email: zhangleying126@126.com

[通信作者] 左琴(1975—), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物遗传与资源保存。Email: zuoqin2001@163.com

等^[4]发现使用简化饲料饲养白化大鼠会导致动物衰亡,并于 1913 年发现卵黄提取物(即维生素 A)可促进健康生长及繁育。1912 年 Hopkins^[5]通过给处于快速生产期的幼龄大鼠饲喂牛奶,发现牛奶中可能含有微量促进生长的“辅助因子”(维生素),并于 1929 年获得了诺贝尔奖。Osborne 等^[6]利用大鼠测定了哪些是必需氨基酸和非必需氨基酸,并在大鼠身上首次利用“代谢笼”精确监测动物的摄入及排泄。Steenbock 等^[7]发现用紫外线照射饲料可缓解大鼠佝偻病症状,从而揭示了紫外线照射可增加食物中维生素 D 含量。此外,大鼠也被作为实验动物用于寻找维生素缺乏的治疗方法。

1.2 神经行为学研究

大鼠和人类的神经系统发育遵循相同的方式,发育速度是人类的 30 倍,即 3 岁的大鼠相当于人类的 90 岁,这种换算适用于生命各个阶段^[8]。同时大鼠的神经系统与人类相似,具有行为情绪的变化特征,行为表现多样,情绪敏感,广泛用于高级神经活动研究,是痴呆症、帕金森病、上瘾性药物、脑科学与认知科学等研究的重要模型。“迷宫”的开发者 Small^[9]利用大鼠的自然挖洞行为探索迷宫来推测啮齿类动物的学习记忆情况。20 世纪 80 年代初,英国心理学家 Morris 等^[10]利用大鼠在盛有水和牛奶混合物的不透明水池中搜索目标物的方法,研究大鼠海马体等脑区受到损害后的学习、记忆和空间定向以及认知能力。此外在社会行为学方面,由于在自然界,小鼠所住的洞穴为一只雄性与多只雌性,天然领地意识更强,而大鼠是多只雄性与雌性共同居住,领地意识较低,因领地意识导致的社会性压力对结果造成影响较小。

1.3 药理学和毒理学研究

大鼠因体型较大,可以连续抽血,与小鼠相比,大鼠更容易进行复杂的外科操作和生理学测量。同时大鼠与人类具有相似的毒素代谢途径,一直是药理学和毒理学的研究工具^[11]。

2 实验大鼠资源的培育历程

大鼠最初的人工饲养是用作观赏宠物。18 世纪时,大鼠在欧洲作为观赏动物驯养,1775 年日本出版的《Yoso-tama-no-kakehashi》一书中也有如何繁育并保持各种毛色大鼠的描述^[12],从这个方面讲大鼠资源的培育早于大鼠的相关生物学研究。20 世纪初,Castle 等^[13]进行了毛色遗传的早期研究,并

通过育种实验培育出白色、黑色、棕色等不同毛色的大鼠。

2.1 标准化实验大鼠的建立

1915 年,Donaldson^[14]意识到神经学研究需要标准化,并提出“考虑到大鼠的体型、饮食习惯、对特定感染的抵抗力以及较快的繁殖和生命周期,无法在人类身上进行的实验,可以在大鼠上进行。”并在控制饲养条件下系统地繁育白化鼠,得到了 Wistar 及来源于 Wistar 的种群及大鼠神经系统发育的相关数据。他还在《人类解剖学问题》一书中提出实验室材料应该可供研究员之间使用,包括标准化的动物:即需要建立一个标准的种群以最小化个体间差异。当然,当时的标准化仅指在表型上相对统一的实验大鼠。

2.2 品系培育

King^[15]在 1908 ~ 1927 年间对鼠群进行近亲繁殖研究,监测近交对性别比例、生产、繁育等影响,有关体型和生产性能的遗传规律以及研究不同品系的孟德尔遗传情况,培育出 PA、WKA、WF、WKY 和 LEW 等大鼠近交品系。

据美国大鼠基因组数据库统计,截至 2017 年已有大鼠远交系 60 种^[16],其代表品系有 Wistar、SD 以及 LE^[17]。近交系大鼠 700 余种^[16],用于生命医学研究的各个领域:

2.2.1 心血管研究方面

1958 年,奥塔哥大学医学院的 Smirk 等^[18]在 Wistar 种群培育出自发性高血压大鼠;1962 年,Dahl 等^[19]培育了盐敏感型(SS)和耐盐型(SR)大鼠;俄亥俄医学院的 Rapp^[20]利用该核心群得到 Dahl 盐敏感/抗性大鼠;在饲喂高盐食物时,耐盐大鼠没有产生如盐敏感大鼠的高血压,而在正常饲喂时,盐敏感大鼠仍然表现为高血压,后证明与血管紧张素转换酶和心房利钠肽受体基因相关。1963 年日本 Okamoto 等^[21]从 Wistar 大鼠中筛选培育自发性高血压(SHR)大鼠,表现为血压持续升高及心脏肥厚、心力衰竭、和肾功能损害等高血压终末器官损害的许多特征,雄性 SHR 还伴有广泛结节性动脉周围炎,被用作结节性动脉周围炎动物模型。SHR 成为目前应用最广泛的高血压大鼠模型。SHR-SP(SHR 的亚系之一)在 SHR 的表型特征基础上,血压更高,卒中可能性也更高^[22-23]。2018 年,Redina 等^[24]在 Wistar 种群中筛选并通过近交得到了应激性动脉高血压的原始模型 ISIAH,与其他高血压大

鼠基因相比有许多特异性单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), 表现为稳定遗传的神经内分泌和肾调节的血压升高。相关的心衰代表品系还有自发性高血压及心衰模型 SHHF, 表现为先天性心肌病及高血压发展为代偿性心衰, 其肾素、血管紧张素、醛固酮系统激活、利钠肽升高、肿瘤坏死因子升高生理生化反应也与心衰患者表型相似^[25]。

2.2.2 代谢研究方面

在糖尿病的研究中, 1975 年日本 Goto 等^[26]在 Wistar 大鼠中筛选高血糖个体培育出 Goto-Kakizaki (GK) 大鼠, 是 II 型糖尿病 (diabetes mellitus type 2, T2DM) 的非肥胖实验模型, 使研究人员能够监测糖尿病引起的变化而不涉及肥胖的影响。该大鼠品系表现出明显的 T2DM 相关胃肠道特征, 如肠道形态明显改变, 肠蠕动减少, 转运缓慢, 且与 Wistar 大鼠相比, 肠道微生物群有所改变, 被广泛应用于非胰岛素依赖型糖尿病 (noninsulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) 研究。1992 年 Kawano 等^[27]在远交系 Long-Evans 中发现自发性糖尿病大鼠, 通过选择育种培育出与人类 II 型糖尿病极为相似的糖不耐受 OLETF 大鼠。OLETF 大鼠表现有高血糖、慢性病程、轻度肥胖、胰岛增生性病灶和肾并发症, 伴有多尿、多饮和轻度肥胖, 被认为是人类 NIDDM 伴轻度肥胖的最佳模型之一。BB 大鼠由加拿大渥太华实验室在 Wistar 中选育而成, 具有 I 型糖尿病的典型特征: 体重减轻、多饮、多尿、糖尿、酮症酸中毒、高血糖、低胰岛素、胰岛炎、胰岛 β 细胞减少, 需依赖于胰岛素治疗才能生存。BB 大鼠另一个特点是其血液中淋巴细胞减少, 易于感染^[28-29]。ZSDS 大鼠由 Crl; CD 大鼠和 ZDF (Zucker Diabetic Fatty) 大鼠杂交并选择性近交繁育 30 代以上培育而成, 因此 ZSDS 大鼠无瘦素受体, 表现为潜在糖尿病发展, 并在高脂肪饮食时, 可发展为糖尿病, ZSDS 糖尿病大鼠具有血管内皮功能障碍, 伤口愈合困难, 心脏收缩和舒张减弱功能, 神经病变和肾病, 骨骼组成改变和骨折风险增加等糖尿病并发症表型, 是临床治疗高血糖所导致的并发症的良好模型^[30]。

在肥胖研究中, 1961 年 Zucker^[31]发现了自发突变 Zucker Fatty 大鼠 (ZFR), 后期证明为单碱基基因突变导致的瘦素受体亲和性降低, 在 3 周龄即表现为原发性肥胖且在前 16 周快速发展, 并伴有继发性高胰岛素血症、血脂异常和高血压等代谢综合征,

但血糖正常或轻度异常, 并不会导致显性糖尿病的发生。80 年代早期, Wistar Kyoto 大鼠和 Zucker Fatty 大鼠杂合培育了 Wistar fatty 大鼠 (WFR), 表现为由饮食诱导的肥胖、高胰岛素血症、高血压和血脂异常等代谢综合征的同时, 在老年时期表现为糖尿病性神经病、老年肾病, 可用于 II 型糖尿病研究模型^[32]。糖尿病自发高血压大鼠 (SHROB) 由自发高血压雌鼠 SHR 和 SD 雄鼠杂交形成, 筛选的瘦素受体基因隐形突变, 体重增加延迟到 6 周龄以后, 可达到 750 ~ 1000 g, 且表现为胰岛素耐受和葡萄糖不耐受, 无 II 型糖尿病征。与 ZFR 大鼠相比, SHROB 大鼠的高血压更为离散, 且有严重的高血脂。DS 肥胖大鼠 (DahlS.ZLepr^{fa}/Lepr^{fa}) 由盐敏感的 Dahl 大鼠与 ZFR 大鼠杂交得到, 除了体重增加和内脏皮下脂肪囤积、高血压等代谢异常表现, DS 肥胖大鼠还表现为肾功能异常^[33-34]。

2.2.3 行为学研究方面

用于抑郁症研究的大鼠有失神癫痫模型 WAG/Rij 大鼠、WKY 大鼠、FSL 大鼠及 FHH 大鼠, 其中 WKY 大鼠表现为多巴胺和去肾上腺素异常, 亦表现出焦虑特征; FHH 大鼠在表现出抑郁征的同时表现出对酒精的异常喜好, 也用于酗酒的相关研究^[35]。

2.3 转基因实验大鼠模型的建立

常见的大鼠模型主要包括诱导模型和遗传模型两类, 诱导模型如静脉注射一定剂量的戊四唑 (Pentetetrazole, PTZ) 或直接电刺激大脑, 可诱发癫痫发作的表征, 与自然产生的疾病相比存在差异; 而遗传模型有助于了解基因相关的病理生理学信息。早期大鼠 ES 细胞培养限制了基于大鼠 ES 细胞的经典基因打靶技术的广泛应用, 随着基因组编辑技术如锌指核酸酶技术 (Zinc finger nuclease, ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 技术以及 CRISPR/Cas9 技术的问世, 拓展了大鼠做为实验模式动物在基础研究及药物筛选、临床前药物评价的应用范围。自 CRISPR 技术在大鼠上的应用以来, 通过转基因已建立了 240 余种大鼠疾病模型包括: 高血压、糖尿病、癌症和神经系统疾病等, 并有超过 350 个大鼠基因已被确定为在疾病中发挥潜在或关键作用, 从而提供了丰富的疾病模型资源^[17,36]。

2.3.1 免疫缺陷大鼠模型

2012 年日本京都大学的 Mashimo 等^[37]通过 ZFNs 技术分别获得基于 F344 品系的 *Prkdc* 单基因

敲除的 *SCID* 大鼠和 *Prkdc* 与 *Il2rg* 双基敲除的 FSG 大鼠,且经实验证明,以上两种大鼠未出现 SCID 小鼠中出现的 B 细胞“泄露”现象,都展示了很好的接受外源诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)和卵巢瘤的能力。2019 年,同济大学何笛^[38]采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 SD 大鼠中敲除 *Rag1*、*Rag2* 和 *Il2rg* 基因,建立了 SD-RG 大鼠。皮下注射不同来源的肿瘤细胞系后,SD-RG 大鼠上的移植肿瘤生长明显快于 NSG 小鼠,且并未表现出 FSG 大鼠生长受阻的缺陷。同时,该研究利用 SD-RG 大鼠成功建立了首例肺鳞癌的人源肿瘤异种移植(patient-derived xenograft model, PDX)大鼠模型,移植肿瘤生长迅速并具有原发肿瘤的病理学特征,有力地支持了肿瘤免疫治疗、干细胞治疗和抗病毒药物研发等临床前研究。

2.3.2 精神疾病大鼠遗传模型

BDNF^{+/-}大鼠是常用的焦虑和抑郁模型,较 BDNF^{+/-}小鼠的稳定性较好,用于精神分裂症、自闭症和物质滥用研究^[39];MECP2^{+/-}大鼠作为自闭症和雷特障碍(Rett's disorder)模型,用于研究自闭症患者体感功能障碍和触觉障碍及雷特障碍综合征与肥胖的关系^[40-42];tgDISC-1 大鼠在生理结构上表现为背侧纹状体突触严重失调,其行为学表型包括在新物体识别测试和新位置识别测试中表现出超探索行为及对新物体和新位置的明显偏好,在转棒实验中旋转缺陷明显,常用作精神分裂症模型^[43-44]。

2.3.3 帕金森病大鼠遗传模型

在帕金森病因揭示方面,转基因大鼠如 LRRK2 KO 大鼠、 α -synuclein KO 大鼠、Parkin KO 大鼠、PINK1 KO 大鼠和 DJ-1KO 大鼠也越来越多地用于帕金森病相关基因的转基因和病毒介导的过表达^[45]。虽然没有一种大鼠模型可完全再现像帕金森病这样复杂的人类疾病的每一个特征,然而,与具有相同突变的小鼠相比,许多帕金森病遗传大鼠动物模型更好地重现了帕金森病的关键方面,包括黑质多巴胺能神经元的进行性损失、运动行为缺陷以及异常 α -突触核蛋白聚集体的年龄依赖性形成^[46-47]。2022 年,鲁白团队开发出全球首个全面模拟人类 AD 的大鼠模型 App^{NL-G-F},App^{NL-G-F}携带了 Swedish、Iberian 和 Arctic 三个人类家族突变,并且不改变 APP 蛋白及其片段在脑内的时间和空间的表达水平^[48]。与其他模型相比,该模型显示出与人

类更相似的病理和疾病进展,也是目前唯一仅通过突变的人源化 APP 敲入就能同时产生 A β 聚集和 Tau 相关病理表型的啮齿类模型。

2.3.4 线粒体基因突变大鼠模型

2021 年中国医学科学院医学实验动物研究所马元武和南京医科大学沈彬教授团队针对人体中与癫痫、心肌病及 Leigh 综合征相关的 mtDNA TRNK 基因中的 G8363A 突变以及与线粒体肌病相关的 mtDNA TRNE 基因中的 G14710A 突变,建立了 G7755A 和 G14098A 点突变大鼠模型,该模型不仅可以模拟人线粒体基因 G14710A 突变的临床表型,也为创建更多 mtDNA 突变相关疾病大鼠模型奠定了基础^[49]。

2.3.5 神经系统疾病大鼠模型

亚历山大病(Alexander disease, AxD)是一种进行性和罕见的神经系统疾病,威斯康星大学 Hagemann 等^[50]建立了 AxD 大鼠模型,模型具有出以罗森塔尔纤维形式的胶质酸性纤维蛋白聚集、广泛的星形胶质细胞增生和白质缺陷等典型病理特征,而 AxD 小鼠模型无法表现出上述特征,同时在使用反义寡核苷酸治疗 AxD 大鼠模型后,可有效抑制并逆转以上病理发展。不仅为亚历山大病的临床治疗提供了可能,同时有机会研究胶质酸性纤维蛋白突变与脑白质缺陷的关系等病理机制。

3 实验大鼠资源保存中心

随着不断增加的大鼠品系及各种疾病模型的培育,为有效利用大鼠资源,资源保存中心应运而生。美国、日本等国家先后建立了大鼠资源和研究中心(Rat Resource and Research Center, RRRC)、国家大鼠生物资源项目(National Biological Resource Project-Rat, NBRP-Rat)等非商业大鼠资源保存中心。此外,一些商业公司也保存有一定的大鼠资源。这些资源保存中心有效地促进了实验大鼠供应向专业化和社会化的方向发展。

3.1 美国大鼠资源和研究中心(RRRC)

RRRC 于 2001 年在密苏里大学建立,旨在为全球研究者和生物医学中大鼠模型的研究提供服务,包括引入、冷冻保存、培养和提供高质量的实验室大鼠。该中心目前保存有转基因大鼠、自发突变大鼠及复杂性状模型 550 余种以及 8 个大鼠干细胞系,包括活体及大量的冷冻保存种质^[51]。RRRC 还与大鼠基因组数据库(Rat Genome Database, RGD)

合作,以保证品系的正确命名。

3.2 日本国家大鼠生物资源项目(NBRP-Rat)

NBRP-Rat 是日本大型国家生物资源项目(National Biological Resource Project, NBRP)的一个分支,主要任务是收集各品系大鼠表型和基因型,冷冻保存胚胎、精子,并共享所收集的大鼠品系和相关数据。NBRP-Rat 保存大鼠共 814 个品系包括近交系、远交系和重组系,以及自发突变、转基因和诱变大鼠,并在其网站按照模型所应用的研究领域进行分类,便于研究者搜寻所需要的模型。此外, NBRP-Rat 开展了表型分析项目:在所有常规品系和许多突变品系中选取 6 只 5 ~ 10 周龄的雄性和雌性大鼠进行表型分析,包括血液生理、生化、运动和神经行为测试,并在网上提供数据用于检索查询。其建立的数据库包括各大鼠品系的表型和基本遗传信息^[52]。

3.3 MCW 基因编辑大鼠资源中心

随着转基因大鼠疾病模型的需求增加,MCW 基因编辑大鼠资源中心于 2013 年在美国威斯康辛医学院成立,旨在利用现有的技术和基因编辑基础设施支持大鼠研究^[53]。同其他保存中心相似,提供大鼠资源的同时,也提供基因型鉴定及资源冻存服务。近十年,该中心累计制作保存了 250 个基因大鼠模型,特别是心血管相关的疾病模型。

3.4 商业资源

美国 Sprague Dawley 公司 1925 年创立,保存并出售 SD、F344、Lewis 和 Wistar 等 14 种大鼠品系。美国 Charles River 公司 1947 年成立,目前保存有 40 种大鼠品系,包括 22 种近交系^[53]。

4 实验大鼠资源数据库

为了更好的应用实验大鼠资源和动物模型研发数据,美国、日本等国家在建立资源保存中心的同时,也建立了实验大鼠资源数据库,对实验大鼠遗传和基因组研究工作产生的数据进行收集、整合、存储和共享。主要有大鼠基因组数据库、美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)、欧洲生物信息学研究所 Ensembl 基因组数据库项目和加州大鼠圣鲁克兹分校基因组资源等。

大鼠基因组数据库(rat genome database, RGD)是目前大鼠数据最多、来源最广泛的数据库,其目标是“收集、整合正在进行的大鼠遗传和基因组研

究工作产生的数据,并尽可能广泛的供给科学研究”。RGD 提供大鼠基因、标记、数量性状位点以及用于比较的小鼠和人类同源基因,以帮助进行比较基因组分析^[54-56]。除了基因组相关数据, RGD 还提供大鼠品系的全面信息,包括品系来源及特征、文献(如有)记载的疾病或关联表型、饲养信息、药物或化学反应等。RGD 网站还可以按照心血管、神经、呼吸、免疫或炎症、乳腺癌、糖尿病等不同疾病检索到不同的品系和模型^[32]。

全球各国的资源保存中心及数据库提供各类大鼠模型的同时,还为众多的研究者提供了设施设备如核磁共振成像技术、行为测量站等用于初步实验和筛选,帮助研究人员尽快获得准确的研究结果。

5 关于我国实验大鼠资源发展的思考

回顾国际上实验大鼠资源百余年的发展历程,可以清晰的看到,美国、日本等发达国家制定了长期发展规划,对资源保存中心、资源数据库等方面进行了长期投入和持续建设,实验大鼠资源保存、研发、共享体系已基本构建完成,并在全球实现了产业化和商业化。这对我国实验大鼠资源的发展起到了良好的示范和借鉴作用。

我国目前实验大鼠资源主要依托国家啮齿类实验动物资源库和国家人类疾病动物模型资源库等开展保存工作。国家啮齿类实验动物资源库是集包括大鼠在内的啮齿类实验动物资源研发分析、保种生产、质量检测、动物实验于一体的综合资源保存共享平台。国家人类疾病动物模型资源库主要以“新发突发传染病”、“四大慢病”为主要集成资源,进行人类疾病动物模型资源的研制、引进、收集、保存和开放共享,建立了我国疾病基因工程大鼠资源库,国家人类疾病动物模型资源库现已收录基因编辑大鼠模型 237 种,主要集中在神经相关疾病、代谢相关疾病、心血管相关疾病、免疫相关疾病、荧光和 Cre 工具大鼠等方面。为我国生命科学和医药创新研究进程提供了有力的支撑。

经过 40 余年的发展,我国实验大鼠资源和共享体系取得了一些进展,培养了我国特有的 TR1 大鼠、白内障大鼠等品系。但仍存在资源开发和引进丰富度不够、净化和繁育等标准化技术匮乏、标准及评价体系不健全、高品质实验动物数量不足、资源和数据共享滞后等问题。我国需要以国家实验动物资源库建设为核心,不断提升软件能力,尤其

在以下 5 个方面持续发力:(1)提升动物模型研发能力,扩大资源丰富度;(2)整理汇交新资源,补充更新资源完整度;(3)建立完善资源数据库,提高资源利用效率;(4)加强认证体系建设,完善健全标准化技术和评价体系;(5)修订相关管理规定,规范资源合理配置。

同时,基因工程大鼠资源的研制成为各国竞相占领的科技制高点之一。由于各国都在起步阶段,差距不大,且我国在利用基因编辑技术开展基因修饰动物模型研发领域已达到国际领先水平,是可以同发达国家竞争的主要领域之一,也是我国建立世界领先资源的突破点。这将有效带动我国心脑血管疾病、认知科学、分子影像学、器官移植、中医药学等领域的创新研究。

笔者相信在国家实验动物资源库的引领下,各行业齐发力,必将有效支撑大鼠资源保存、开发、挖掘和可持续利用,提升我国大鼠资源国际竞争力,在攻关新发突发传染病和生物安全风险防控、医药和医疗设备等领域关键核心技术发挥重要支撑作用,对推进健康中国和科技强国建设贡献力量。

参 考 文 献(References)

- [1] Farag A, Mandour AS, Hendawy H, et al. A review on experimental surgical models and anesthetic protocols of heart failure in rats [J]. *Front Vet Sci*, 2023, 10: 1103229.
- [2] Modlinska K, Pisula W. The Norway rat, from an obnoxious pest to a laboratory pet [J]. *Elife*, 2020, 9: e50651.
- [3] Philipeaux JM. Note sur l'extirpation des capsules servenales chez les rats albi (Mus Rattus) [J]. *Compt Rend Hebdomad Des Sean Del Acade Des Sci*, 1856, 43: 904-906.
- [4] McCollum EV, Davis M. The necessity of certain lipins in the diet during growth [J]. *Biol Chem*, 1913, 15(1): 167-175.
- [5] Hopkins FG. Feeding experiments illustrating the importance of accessory factors in normal dietaries [J]. *J Physiol*, 1912, 44(5-6): 425-460.
- [6] Osborne TB, Mendel LB. The amino-acid minimum for maintenance and growth, as exemplified by further experiments with lysine and tryptophane [J]. *Biol Chem*, 1916, 25: 1-12.
- [7] Steenbock H. The introduction of growth promoting and califying properties in a ration by exposure to light [J]. *Science*, 1924, 60(1549): 224-225.
- [8] Lazar JW. Henry Herbert Donaldson's (1857-1938) contribution to an organized approach to the experimental study of the mammalian central nervous system [J]. *J Hist Neurosci*, 2018, 27(4): 311-332.
- [9] Small WS. An experimental study of the mental processes of the rat [J]. *Am J Psychol*, 1900, 11(2): 133-165.
- [10] Morris GM. Spatial localization does not require the presence of local cues [J]. *Learn Motiv*, 1981, 12: 239-260.
- [11] Karp NA, Coleman L, Cotton P, et al. Impact of repeated micro and macro blood sampling on clinical chemistry and haematology in rats for toxicokinetic studies [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2023, 141: 105386.
- [12] Shunpo DO. Yoso-tama-no-kakehashi [M]. Osaka: Shunpo DO; 1775.
- [13] Castle WE. Variation in the hooded pattern of rats, and a new allele of hooded [J]. *Genetics*, 1951, 36(3): 254-266.
- [14] Donaldson HH. The rat: reference tables and data for the albino rat and the Norway rat [R]. Philadelphia, 1915.
- [15] King HD. Seasonal variations in fertility and in the sex ratio of mammals, with special reference to the rat [J]. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org*, 1927, 112(1): 61-111.
- [16] Shimoyama M, Smith JR, Bryda E, et al. Rat genome and model resources [J]. *ILAR J*, 2017, 58(1): 42-58.
- [17] 孙靖. 实验动物学基础 [M]. 北京: 北京科学技术出版社; 2005.
- [18] Smirk FH, Hall WH. Inherited hypertension in rats [J]. *Nature*, 1958, 182(4637): 727-728.
- [19] Dahl LK, Heine M, Tassinari L. Effects of chronic excess salt ingestion. Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension [J]. *J Exp Med*, 1962, 115(6): 1173-1190.
- [20] Rapp JP. Dahl salt susceptible and salt resistant rats [J]. *Hypertension*, 1982, 4: 753-763.
- [21] Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats [J]. *Jpn Circ J*, 1963, 282-293.
- [22] 陈慧, 郑乐民, 郭延松, 等. 常见大、小鼠实验性心血管病模型专家共识 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 8(42): 922-932.
- [23] Chen H, Zheng LM, Guo YS, et al. Expert consensus on common experimental cardiovascular disease model of rats and mouse [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2022, 8(42): 922-932.
- [24] Pinto Y. Lessons from rat models of hypertension from Goldblatt to genetic engineering [J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 39(1): 77-88.
- [25] Redina OE, Markel AL. Stress, genes, and hypertension. contribution of the ISIAH rat strain study [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2018, 20(8): 66.
- [26] Heyen JR, Blasi ER, Nikula K, et al. Structural, functional, and molecular characterization of the SHHF model of heart failure [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(5): H1775-H1784.
- [27] Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats [J]. *Proc Jpn Acad*, 1975, 51: 80-85.
- [28] Kawano K, Hirashima T, Mori S, et al. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications [J]. *Diabetes*,

- 1992, 41(11): 1422–1428.
- [28] Yamada T, Kose H, Ohta T, et al. Genetic dissection of complex genetic factor involved in NIDDM of OLETF rat [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 582546.
- [29] Dalco LJ, Dave KR. Diabetic rodent models for chronic stroke studies [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2616: 429–439.
- [30] Wang AN, Carlos J, Fraser GM, et al. Zucker Diabetic-Sprague Dawley (ZSDS) rat; type 2 diabetes translational research model [J]. *Exp Physiol*, 2022, 107(4): 265–282.
- [31] Zucker LM, Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat [J]. *Hered*, 1961, 52: 275–278.
- [32] Ikeda H, Shino A, Matsuo T, et al. A new genetically obese-hyperglycemic rat (Wistar fatty) [J]. *Diabetes*, 1981, 30(12): 1045–1050.
- [33] Doulberis M, Papaefthymiou A, Polyzos SA, et al. Rodent models of obesity [J]. *Minerva Endocrinol*, 2020, 45(3): 243–263.
- [34] McPherson KC, Shields CA, Poudel B, et al. Impact of obesity as an independent risk factor for the development of renal injury: implications from rat models of obesity [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 316(2): F316–F327.
- [35] 罗卓慧, 庞硕, 张连峰. 常见精神疾病的大、小鼠遗传模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(11): 119–126.
- Luo ZH, Pang S, Zhang LF. Research progress of genetic models of common mental diseases in rats and mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(11): 119–126.
- [36] Szpirer C. Rat models of human diseases and related phenotypes: a systematic inventory of the causative genes [J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1): 84.
- [37] Mashimo T, Takizawa A, Kobayashi J, et al. Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 685–694.
- [38] He D, Zhang J, Wu W, et al. A novel immunodeficient rat model supports human lung cancer xenografts [J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 140–150.
- [39] Jaehne EJ, Kent JN, Antolasic EJ, et al. Behavioral phenotyping of a rat model of the BDNF Val66Met polymorphism reveals selective impairment of fear memory [J]. *Transl Psychiatry*, 2022, 12(1): 93.
- [40] Zhai W, Hu HX, Le L, et al. Generation and analysis of the Rett syndrome-associated MeCP2-null rat model [J]. *Hereditas*, 2016, 38(11): 1004–1011.
- [41] Choi M, Ko SY, Seo JY, et al. Autistic-like social deficits in hippocampal MeCP2 knockdown rat models are rescued by ketamine [J]. *BMB Rep*, 2022, 55(5): 238–243.
- [42] Deng JV, Orsini CA, Shimp KG, et al. MeCP2 expression in a rat model of risky decision making [J]. *Neuroscience*, 2018, 369: 212–221.
- [43] Seidisarouei M, Schäble S, van Wingerden M, et al. Social anhedonia as a disrupted-in-schizophrenia 1-dependent phenotype [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 10182.
- [44] Sialana FJ, Wang AL, Fazari B, et al. Quantitative proteomics of synaptosomal fractions in a rat overexpressing human *DISC1* gene indicates profound synaptic dysregulation in the dorsal *Striatum* [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 26.
- [45] Creed RB, Goldberg MS. New developments in genetic rat models of Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2018, 33(5): 717–729.
- [46] Hoffmeister JD, Kelm-Nelson CA, Ciucci MR. Manipulation of vocal communication and anxiety through pharmacologic modulation of norepinephrine in the Pink1^{-/-} rat model of Parkinson disease [J]. *Behav Brain Res*, 2022, 418: 113642.
- [47] 陈子方, 吴海妹, 沈凡艺, 等. 帕金森病大鼠模型制作方法研究进展 [J]. *山东医药*, 2021, 61(8): 93–96.
- Chen ZF, Wu HM, Shen FY, et al. Research progress on methods of making rat models of Parkinson's disease [J]. *Shandong Medical Journal*, 2021, 61(8): 93–96.
- [48] Pang K, Jiang R, Zhang W, et al. An App knock-in rat model for Alzheimer's disease exhibiting A β and tau pathologies, neuronal death and cognitive impairments [J]. *Cell Res*, 2022, 32(2): 157–175.
- [49] Qi X, Chen X, Guo J, et al. Precision modeling of mitochondrial disease in rats via DdCBE-mediated mtDNA editing [J]. *Cell Discov*, 2021, 7(1): 95.
- [50] Hagemann TL, Powers B, Lin NH, et al. Antisense therapy in a rat model of Alexander disease reverses GFAP pathology, white matter deficits, and motor impairment [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(620): eabg4711.
- [51] Neff EP. Rats on the rise [J]. *Lab Anim (NY)*, 2021, 50(8): 205–208.
- [52] Smith JR, Bolton ER, Dwinell MR. The rat: a model used in biomedical research [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2018: 1–41.
- [53] Laulederkind SJF, Hayman GT, Wang SJ, et al. Rat genome databases, repositories, and tools [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2018: 71–96.
- [54] Laulederkind SJF, Hayman GT, Wang SJ, et al. A primer for the rat genome database (RGD) [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1757: 163–209.
- [55] Shimoyama M, Laulederkind SJ, De Pons J, et al. Exploring human disease using the rat genome database [J]. *Dis Model Mech*, 2016, 9(10): 1089–1095.
- [56] de la Cruz N, Bromberg S, Pasko D, et al. The Rat Genome Database (RGD): developments towards a phenome database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: D485–D491.