

李容容,孙鑫,黄恺,等. C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙肝病毒转基因小鼠的转录组学分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1519-1529.

Li RR, Sun X, Huang K, et al. Transcriptomic analysis of C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst hepatitis B virus transgenic mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1519-1529.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.001

C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙肝病毒转基因小鼠的转录组学分析

李容容^{1#}, 孙鑫^{1,2#}, 黄恺², 赵志敏², 彭渊^{1*}, 刘成海^{1,2,3*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 上海 201203; 2. 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203; 3. 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

【摘要】 目的 观察 C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 转基因 (HBV-Tg) 小鼠模型的特征, 并分析 HBV-Tg 小鼠模型的转录组学特点。**方法** 以 10 只雄性 HBV-Tg 小鼠为实验组, 10 只野生型小鼠为对照组。以血清 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 水平和肝组织 HBsAg、HBeAg 表达情况评价模型小鼠病毒学特征, 检测血清 ALT、AST, 肝组织 HE、天狼猩红染色及肝组织 Hyp 含量评估小鼠肝脏炎症及纤维化程度。两组各随机选择 3 例肝组织样本提取 RNA 进行高通量转录组测序。经 R 软件分析获得表达显著的差异基因, 经 GO 和 KEGG 分析获得差异基因功能富集情况, 再采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 对差异显著的基因进行验证。**结果** 与正常组相比, 模型组 ALT、AST 水平均有所升高, 以 ALT 更为显著 ($P < 0.05$); 模型组肝组织 HE 染色可见肝细胞核增大, 个别肝细胞出现肿胀。天狼猩红染色结果显示, HBV 转基因组汇管区及小叶间出现少量胶原沉积, 呈细线状。通过筛选条件 ($|\log FC| > 2$ 倍且 $P_{adj} < 0.05$) 获得差异基因共计 1352 个, 其中上调基因 703 个, 下调基因 649 个。KEGG 分析提示差异基因主要在 PPAR 信号通路、视黄醇代谢、脂肪酸降解等通路中富集 ($P_{adj} < 0.05$)。明显上调的差异基因主要有 Cyp4a10、Cyp4a14、Acot1、Acot3、Ehhadh 等, 明显下调基因包括 Scn5a、Apol10b、Igdde4、Cxcl1、9530077C05Rik 等, 经 RT-qPCR 验证趋势一致 ($P < 0.05$)。**结论** HBV-Tg 小鼠具有自发纤维化的趋势, 经转录组学分析, 慢性乙型病毒性肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 发生的潜在机制主要涉及 PPAR 信号通路、视黄醇代谢、脂肪酸降解、药物代谢等通路。

【关键词】 乙型病毒性肝炎; 转基因小鼠; 转录组学; 基因表达

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1519-11

Transcriptomic analysis of C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst hepatitis B virus transgenic mice

【基金项目】 国家自然科学基金 (82205052, 82174057, 82274305), 上海市科委启明星计划扬帆专项 (22YF1449300), 上海中医药大学预算内项目 (2021LK081), 上海市临床重点专科建设项目 (shslczdzk01201), 山西中医药大学科技创新团队项目 (2022TD2003)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82205052, 82174057, 82274305), Shanghai Science and Technology Commission Sailing Project (22YF1449300), Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Budget Project (2021LK081), Shanghai Key Clinical Specialty Construction Project (shslczdzk01201), Science and Technology Innovation Team Project of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine (2022TD2003).

【作者简介】 李容容 (1993—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合防治急慢性肝病的基础与临床研究。
Email: 529734514@qq.com;

孙鑫 (1990—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中西医结合防治急慢性肝病的基础与临床研究。Email: 913637769@qq.com。
#共同第一作者

【通信作者】 刘成海 (1965—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中西医结合防治急慢性肝病的基础与临床研究。
Email: chenghailiu@hotmail.com;

彭渊 (1983—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 中西医结合防治急慢性肝病的基础与临床研究。
Email: pengyuan1026@shutcm.edu.cn。

* 共同通信作者

LI Rongrong^{1#}, SUN Xin^{1,2#}, HUANG Kai², ZHAO Zhimin², PENG Yuan^{1*}, LIU Chenghai^{1,2,3*}

(1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. 2. Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai 201203. 3. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Ministry of Education, Shanghai 201203)

Corresponding author: LIU Chenghai. E-mail: chenghailiu@hotmail.com; PENG Yuan. E-mail: pengyuan1026@shutcm.edu.cn

[Abstract] Objective To observe the characteristics of C57BL/6N-Tg (1.28HBV)/Vst transgenic hepatitis B virus (HBV-Tg) model mice and analyze their transcriptomic characteristics. **Methods** Twenty male HBV-Tg mice were divided into an experimental group and a wild-type (control) group ($n = 10$ mice per group). The virological characteristics of the model mice were evaluated according to serum levels of HBV DNA, HBsAg, and HBeAg, and expression levels of HBsAg and HBeAg in liver tissue. Serum levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), hematoxylin and eosin (HE) and Sirius red staining, and hydroxyproline (Hyp) in liver tissue were detected to evaluate the degree of liver inflammation and fibrosis. Liver tissue samples were randomly selected from three mice in each group for RNA extraction for high-throughput transcriptome sequencing. Significantly differentially expressed genes were identified using R software. Functional enrichment of differential genes was determined by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses, and genes with significant differences were verified by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** ALT and AST levels were increased in the model group compared with the normal group, with the result for ALT being more significant ($P < 0.05$). HE staining of liver tissue showed enlargement of the liver nucleus and swelling of some hepatocytes in the model group, while Sirius red staining showed a small amount of collagen deposition in the sink area and interlobule in the HBV transgenic group, in the shape of thin lines. A total of 1352 differential genes were obtained by screening ($|\log FC| > 2$ and $P_{adj} < 0.05$), including 703 up-regulated and 649 down-regulated genes. KEGG analysis suggested that differential genes were mainly enriched in the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling pathway, retinol metabolism, fatty acid degradation, and other pathways ($P_{adj} < 0.05$). The main significantly up-regulated genes included Cyp4a10, Cyp4a14, Acot1, Acot3, and Ehhadh, and the significantly down-regulated genes included Scn5a, Apol10b, Igddc4, Cxcl1, 9530077C05Rik. The trend was consistent after RT-qPCR detection ($P < 0.05$). **Conclusions** HBV-Tg mice have a tendency to develop spontaneous fibrosis. Transcriptomic analysis showed that chronic hepatitis B mainly involves PPAR signaling, retinol metabolism, fatty acid degradation, drug metabolism, and other pathways.

[Keywords] chronic hepatitis B; transgenic mice; transcriptomics; gene expression

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

慢性乙型病毒性肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 是临床常见传染性疾病^[1], 临床以乏力、食欲减退、转氨酶增高、肝肿大为主要表现; 以肝细胞炎症浸润、坏死和肝组织胶原沉积为病理特点^[2], 最终发展为肝纤维化/肝硬化, 甚至肝癌^[3]。由于 CHB 与患者乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染、宿主免疫、遗传、共存肝病等因素密切相关^[4], 发病机制较为复杂, 因此研究 CHB 发病的机制既是重点也是难点, 而选择适宜的 CHB 动物模型是 CHB 机制研究的必要条件。

C57BL/6N-Tg (1.28HBV)/Vs 乙型肝炎病毒转基因 (HBV-transgenic, HBV-Tg) 小鼠 (C57BL/6N 背景) 是将 HBV 的基因或基因组片段植入小鼠胚胎, 使小鼠肝细胞高表达 HBV 相关的蛋白或产生完整的

HBV 病毒颗粒。既往研究表明, HBV-Tg 小鼠可较好地模拟乙型肝炎病毒在人类体内的感染和病理过程, 是常见的用于 CHB 研究的小鼠模型^[5-6]。全转录组高通量测序 (full transcriptome high-throughput sequencing, RNA-Seq) 是一种先进的分子生物学技术, 可用于研究细胞或组织中的所有 RNA 分子的表达情况^[7], 已广泛应用于肝相关疾病的发病机制以及分子标志物的筛选等研究^[8]。鉴于小鼠全基因组已被证实有 90% 左右的基因与人类高度相似且近似于人类的病理解剖结构^[9-10], 本研究应用 RNA-Seq 分析 HBV 转基因小鼠的基因表达变化, 解析 CHB 研究的理想动物——HBV-Tg 小鼠的基因网络变化特点, 可为临床 CHB 早期诊断、药物筛查及生物标记物的发现提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

野生型 (wide type, WT) C57BL/6N 小鼠和 HBV-Tg 小鼠, 雄性, SPF 级, 数量各 10 只, 24 周龄, 体重 30 ± 2 g, 购自北京维通达生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0002】。在恒定温度 25℃、湿度 $55\% \pm 5\%$ 和光暗循环(昼夜明暗交替 12 h/12 h)条件下自由饮食和饮水, 饲养于北京维通达生物技术有限公司 SPF 级别实验室【SYXK(京)2019-0025】。所有操作符合实验动物福利伦理要求, 研究方案实施前经上海中医药大学动物实验伦理委员会审查批准(SZY201711007)。

1.1.2 主要试剂与仪器

乙型肝炎病毒表面抗原 (hepatitis B virus s antigen, HBsAg) 诊断试剂盒 (酶联免疫法, 批号: 202008071)、乙型肝炎病毒 e 抗原 (hepatitis B virus e antigen, HBeAg) 检测试剂盒 (酶联免疫法, 批号: 202001011)、乙型肝炎病毒核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法, 批号: 20050111), 均购自上海科华生物工程股份有限公司; 三氯甲烷 (Trichloromethane, 氯仿, 分析纯, Cat No.10006818)、无水乙醇 (Ethanol absolute, 分析纯, Cat No.100092680), 均购自国药集团化学试剂有限公司; DEPC 处理水 (Water-DEPC Treated Water, Cat No. B501005)、UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒 (Cat No. B511321), 均购自上海生工生物工程股份有限公司; 谷丙转氨酶 (ALT/GPT) 测试盒 (Cat No. C009-1)、谷草转氨酶 (AST/GOT) 测试盒 (Cat No. C010-1), 均购自南京建成生物工程研究所; 羟脯氨酸标准品 (trans-4-Hydroxy-L-proline, Cat No. H54409), 购自 Sigma 公司; HBsAg 预稀释小鼠单克隆抗体 (Cat No. ab859)、HBcAg 小鼠单克隆抗体 (Cat No. ab140243), 均购自 Abcam 中国艾博抗 (上海) 贸易有限公司; SABC 免疫组化染色试剂盒 (Cat No. SA1022-兔 IgG)、SABC 免疫组化染色试剂盒 (Cat No. SA1021-小鼠 IgG)、DAB 显色试剂盒 (Cat No. AR1022), 均购自武汉博士德生物工程有限公司; 逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Cat No. RR047A)、扩增试剂盒 TBGreen™ Premix EX Taq™ (Cat No. RR420A), 均购自 TaKaRa 公司; MyCycler™ Thermal Cycler 逆转录仪, 购自美国 Bio-Rad 公司;

TECAN F200 PRO 多功能酶标仪, 购自 TECAN 公司; LEICA ASP300 自动脱水机、LEICA EG1160 石蜡包埋机、转轮切片机 RM2035、HI1220 烤片机及 SCN400 数字扫描系统, 均购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 HBV-Tg 小鼠的构建与繁育

由北京维通达生物技术有限公司采用全基因显微注射法将 1.28 倍长度的 HBV (A 型, GenBank: AF305422.1) 线性化片段导入 C57BL/6Ncrl 小鼠胚胎原核, 获得转基因阳性小鼠。通过外周血 HBV 拷贝数分析, 保留了拷贝数达到 $10^7 \sim 10^8$ IU/mL 的首建鼠^[11-12]。按照半合子配野生 C57BL/6Ncrl 小鼠的方式建立了 HBV 转基因小鼠品系。

1.2.2 样本采集

所有小鼠采用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉, 打开腹腔, 下腔静脉取血, 室温静置 2 h, 以 4℃、3000 r/min, 离心 15 min, 收集血清, 4℃ 保存。采血后剪断下腔静脉, 摘取小鼠肝、脾并称重记录。留取约 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$ 肝组织, 10% 甲醛溶液固定, 其余肝组织 -70℃ 保存。

1.2.3 血清肝功能检测

按照试剂盒说明检测血清 ALT、AST 水平, 每个样本重复 3 次检测。

1.2.4 血清乙肝病毒学检测

参照试剂盒说明书使用酶联免疫法 (ELISA) 检测血清 HBsAg、HBeAg 水平; PCR-荧光探针法检测血清 HBV-DNA 含量, 每个样本重复 3 次检测。

1.2.5 病理染色

HE 染色观察肝组织炎症浸润, 天狼猩红染色观察肝组织胶原沉积情况, 并参照文献进行肝组织炎症分级和纤维化分期^[13-14]。

1.2.6 免疫组织化学染色

将石蜡切片脱蜡至水后置入柠檬酸缓冲液 (pH = 6.0) 进行热修复; 0.6% 过氧化物-甲醇溶液孵育灭活内源性酶、5% BSA 封闭; 滴加 HBsAg 小鼠单克隆预稀释抗体及 HBcAg 小鼠单克隆抗体 (1:100 稀释), 一抗 4℃ 过夜孵育, 滴加二抗孵育, 37℃ 孵育 40 min, DAB 显色, 苏木素衬染, 中性树胶封片后观察。

1.2.7 肝组织羟脯氨酸检测

参照 Jamall's 盐酸水解法^[15], 称取 100 mg 肝组织放入 50% 盐酸中 105℃ 水解过夜。后取 3 层滤纸过滤水解液并吸取 100 μL 烘干处理。取 Hyp 标准品 0.2 ~ 1.6 μg 设为标准曲线, 经氯胺 T 溶液

0.2 mL、含 25%对二甲基氨基苯甲醛和 27.3%高氯酸的异丙醇溶液反应,50℃水浴 1 h,558 nm 测定吸收值,每个样本重复 3 次检测。

1.2.8 RNA 提取、文库构建和测序

采用 TRIzol 试剂提取 WT、HBV-Tg 小鼠的总 RNA,检测 RNA 纯度、定量,并评估 RNA 完整性。质检合格后,构建转录组文库。库检合格后,使用 Illumina Novaseq 6000 测序平台进行全转录组测序分析,获得待测片段的序列信息。利用 Fastp 软件对原始数据进行质控并过滤,分别去除含接头的序列、含 N 比例大于 10%的序列、全部是 A 碱基的序列和低质量序列。

1.2.9 差异表达基因筛选

通过 R4.2.1 软件的“DESeq2 包”对原始 Counts 矩阵进行标准化处理(Normalize),并进行差异分析,将筛选条件设为 $|\text{LogFC}| > 2$ 和 $P.\text{adj} < 0.05$,获取上调和下调的差异基因。利用“ggplot2 [3.3.6]包”和“VennDiagram[1.7.3]包”对差异分析结果进行可视化,绘制火山图、韦恩图和 UpSet 图^[16-17]。

1.2.10 蛋白质与蛋白质互作 (protein-protein Interaction, PPI) 分析

采用 STRING 在线数据库 (<https://string-db.org/>, 更新至 2023 年 7 月 1 日),检索类型为 Multiple Proteins by Names/Identifiers,基因类型为小鼠 (mus musculus);对网络呈现交互分数选择高等可信值 0.7;同时隐藏孤立的蛋白,在线获得差异表达基因的 PPI 网络图。

1.2.11 基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析

利用 R4.2.1 软件的“org.Mm.eg.db 包”将差异基因转换成 EntrezID,再用“clusterProfiler [4.4.4] 包”进行 GO 和 KEGG 富集分析,显著性 cut-off 值设置为 $P.\text{adj} < 0.05$ 。通过超几何分析获得生物学过程 (biologicalprocess, BP)、细胞组分 (cellularcomponent, CC) 和分子功能 (molecularfunction, MF) 上的基因富集数,并绘制 GO 和 KEGG 气泡图^[18]。

1.2.12 关键基因的 RT-qPCR 验证

将转录组测序提取的总 RNA 剩余样品逆转录为 cDNA 模板,并按照说明书进行 PCR 扩增。根据各组的 Ct 值,选用 GAPDH 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组样本 mRNA 的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列详见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列(5'→3')
Table 1 RT-qPCR primer sequence(5'→3')

基因名称 Gene name	上游 Forward	下游 Reverse
Acot1	CGTCATGGCTCTGGCTTATTACAAC	CAGGTAGTTCACGGCTTCTTCAAAG
Cyp4a14	GGCACCATCTGAAGGACAAGGAG	AGAGACACTGTAAGCAGGCACATT
Acot3	GGAAGAGCGAGTTCTATGCCAGAG	GGGAAGCCTTACACAGTGGGAAG
Dmbt1	AACCACAGCAGAGCAGACAACC	TCTCTCCATTCTCCAGCCTCAC
Cyp4a10	TGCTCCTGCTGCTGGTGAAG	AGGTGATGGAACTGCTGGAAG
Ehhadh	GGTCATTCTAGCCGATACTTTCC	GCAGTTACCAACAACGACTCCAATC
Muc3	GAAGTGGTGAGAGCGTAGAGATAG	ACTGGTTACTGTCACACTCACTTCC
Acot2	ATGGTCTCTTGGATGTCGTGGAAG	GAGGAACAGGAAGGTCGTGTGAG
Ctrb1	TCCGATGAAGAGAATGTCCAGGTC	CATTACGCACGGTGAAGGAGTTG
S100g	TCAGAGTTCCCCAGCCTCTG	CTTCTCCATCGCCATTCTTATCCAG
Scn5a	CTCCTCGTCTGCTCATCTTCTG	CTCACACTCGCTCTTGTTGTTTAC
S100a9	AGCACAGTTGGCAACCTTTATGAAG	GTGTCCAGGTCCTCCATGATGTC
S100a8	ATGCCGTCTGAACTGGAGAAGG	TCTTGTAGAGGGCATGGTGATTTT
Apol10b	GAGGAAGCAGCAGAATTGTCAAGTG	ACTCAGGAACTCTCGCAGAAACC
Ngp	ATCCTGCTACCAATATCCCCTCC	GTTGACTGCCGCTTCTGAAAG
Igdec4	GCCATAAAGAGCAACGGGAGAAAG	AGGTCTTGGAGGTGGAGGTCAG
Mpo	CCACACCCTCATCCAACCTTTC	ATGCCACCTTCCAACACGACTC
9530077C05Rik	TGTAGTTCATCTCACCGAAGACCTG	GTGTGCCTATCTCGTGCCCTCAG
Cxcl1	TGGCTGGGATTACCTCAAGAAC	GTGTGGCTATGACTTCGGTTTGG
Derl3	TCGGTGCTGTTCTTATGACTCTGC	CTGCCAGCGCTCCATACATAGAC
GAPDH	GACTCCACTCACGGCAAATTC AAC	GACTCCACTCACGGCAAATTC AAC

1.3 统计学分析

各组数据使用 SPSS Statistics 25.0 软件进行统计分析,采用 Graphpad Prism (V 8.0.2) 软件做图。计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对两个独立组进行方差齐性检验和正态检验,符合正态分布采用独立样本 *T* 检验,不符合正态分布,则采用 Wilcoxon 秩和检验。两组间采用单因素方差分析检验 (LSD 进行两两比较)。单项有序分类资料采用 Ridit 分析, *P* < 0.05 表示有统计学意义。

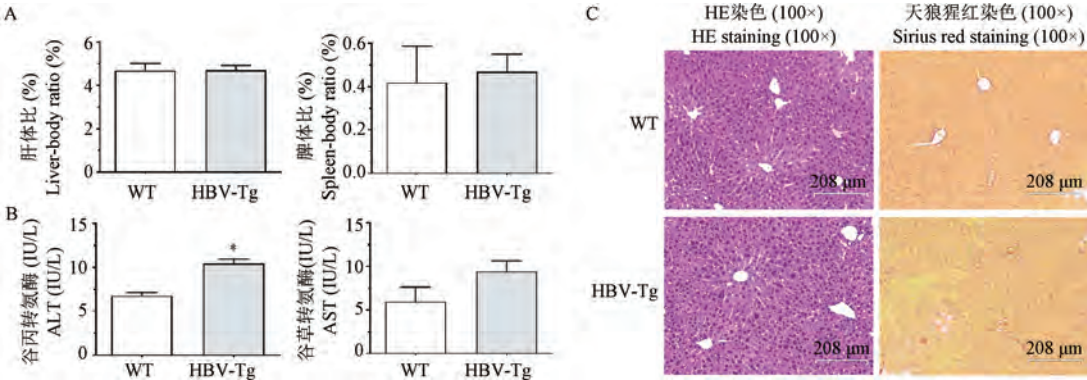
2 结果

2.1 一般生物学特征观察

两组小鼠均反应敏捷,活跃度良好,毛发有光泽,无掉毛、皮损等症状。每日的饮水饮食量、体重、肝体比、脾体比均无统计学差异 (图 1A)。

2.2 血清肝功能、肝组织炎症及纤维化比较

与 WT 组相比,HBV-Tg 组小鼠血清 ALT 水平升高 (*P* < 0.05);血清 AST 水平有升高趋势,但无统计学意义 (图 1B)。肝组织 HE 染色结果显示:两组小鼠肝小叶均结构完整、清晰,肝细胞呈条索状排列整齐,在中央静脉周围呈放射状分布;HBV-Tg 组小鼠另可见肝细胞核增大及核边缘化,个别肝细胞出现肿胀。肝组织天狼猩红染色结果显示,WT 组未见明显胶原沉积,HBV-Tg 组汇管区及小叶间出现少量胶原沉积,呈细线状,未见明显的桥接和假小叶形成。肝组织 Hyp 含量检测显示,两组小鼠肝组织 Hyp 含量的差异无统计学意义 (*P* > 0.05) (图 2B)。经 Ridit 分析,两组在炎症分级上无统计学差异,而纤维化分级具有显著性差异 (图 1C,表 2,表 3)。



注:A:肝体比与脾体比;B:血清生化 ALT、AST 水平;C:肝组织 HE、天狼猩红染色;与 WT 组相比, * *P* < 0.05。(下图同)

图 1 脏器指数、血清肝功能及肝组织病理染色 (*n* = 10)

Note. A. Liver-body ratio and spleen-body ratio. B. Serum ALT and AST levels of mice. C. HE and Sirius red staining of liver tissue. Compared with WT group, * *P* < 0.05. (The same in the following figures)

Figure 1 Organ index, serum liver function and pathological staining of liver tissue(*n* = 10)

表 2 肝组织炎症分级 (*n* = 10)

Table 2	Liver tissue inflammation classification(<i>n</i> = 10)				
	肝组织炎症分级				
组别	Liver tissue inflammation grades				
Groups	G0	G1	G2	G3	G4
WT	10	0	0	0	0
HBV-Tg	7	3	0	0	0
					0.425

表 3 肝组织纤维化分期 (*n* = 10)

Table 3	Liver fibrosis stages(<i>n</i> = 10)				
	肝组织纤维化分期				
组别	Hepatic fibrosis stages				
Groups	S0	S1	S2	S3	S4
WT	10	0	0	0	0
HBV-Tg	2	7	1	0	0
					0.7**

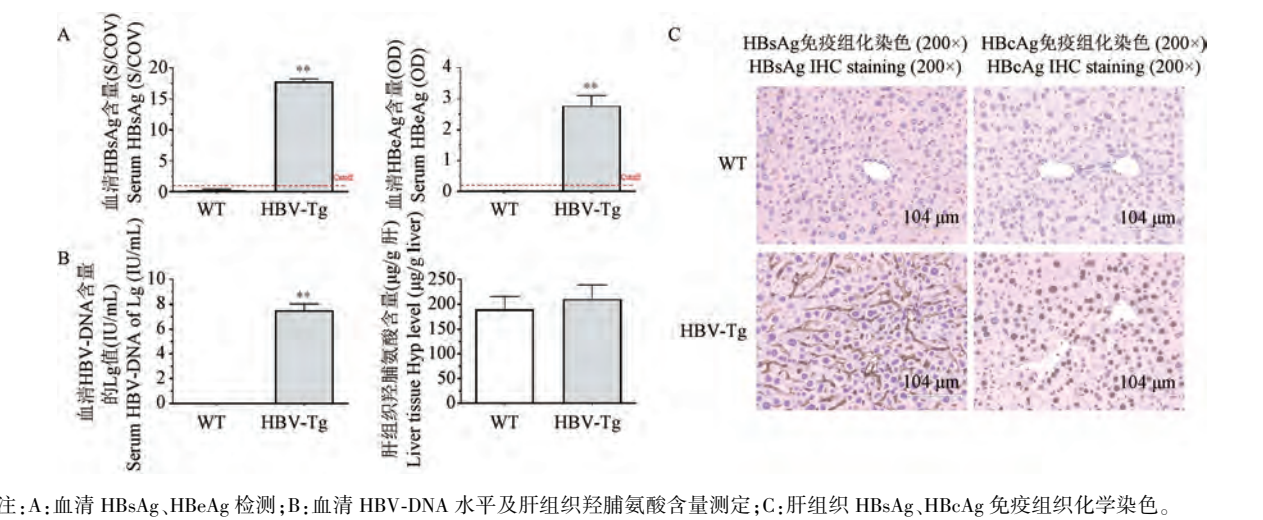
注:与 WT 组相比, ** *P* < 0.01。(下图同)
Note. Compared with WT group, ** *P* < 0.01. (The same in the following figures)

2.3 血清及肝组织 HBV 病毒指标比较

WT 组小鼠血清 HBsAg、HBeAg (低于 Cutoff 值) 和 HBV-DNA(未测及) 均为阴性,而 HBV-Tg 组小鼠血清 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 水平均呈阳性 (*P* < 0.01) (图 2A, 2B)。肝组织石蜡切片免疫组化结果显示,HBV-Tg 组小鼠肝组织 HBsAg 和 HBeAg 均可见明显的阳性表达,其中 HBsAg 主要围绕肝窦表达在细胞膜周围,HBeAg 主要表达于细胞核内 (图 2C)。

2.4 两组小鼠肝组织的差异表达基因

差异表达基因热图和火山图显示了两组小鼠肝组织差异基因的分布情况,WT 组和 HBV-Tg 组小鼠共有 1352 个差异基因 (| LogFC | > 2, *P*.adj < 0.05),其中 703 个上调基因、649 个下调基因。与



注: A: 血清 HBsAg、HBeAg 检测; B: 血清 HBV-DNA 水平及肝组织羟脯氨酸含量测定; C: 肝组织 HBsAg、HBeAg 免疫组织化学染色。

图 2 血清及肝组织 HBV 病毒学评价 (n = 10)

Note. A. Serum HBsAg and HBeAg level. B. Serum HBV-DNA level and Hyp content of liver tissue. C. Expression of HBsAg and HBeAg in liver tissue.

Figure 2 Evaluation of HBV virology in serum and liver tissue (n = 10)

WT 组小鼠相比, HBV-Tg 组小鼠肝 *Muc3*、*Ctrb1*、*Slc9a3*、*Reg1*、*Scn4b* 等基因表达显著上调; *Mpo*、*Fcnb*、*Clec2i*、*Gpr141*、*Derl3* 等基因表达显著下调 (图 3)。

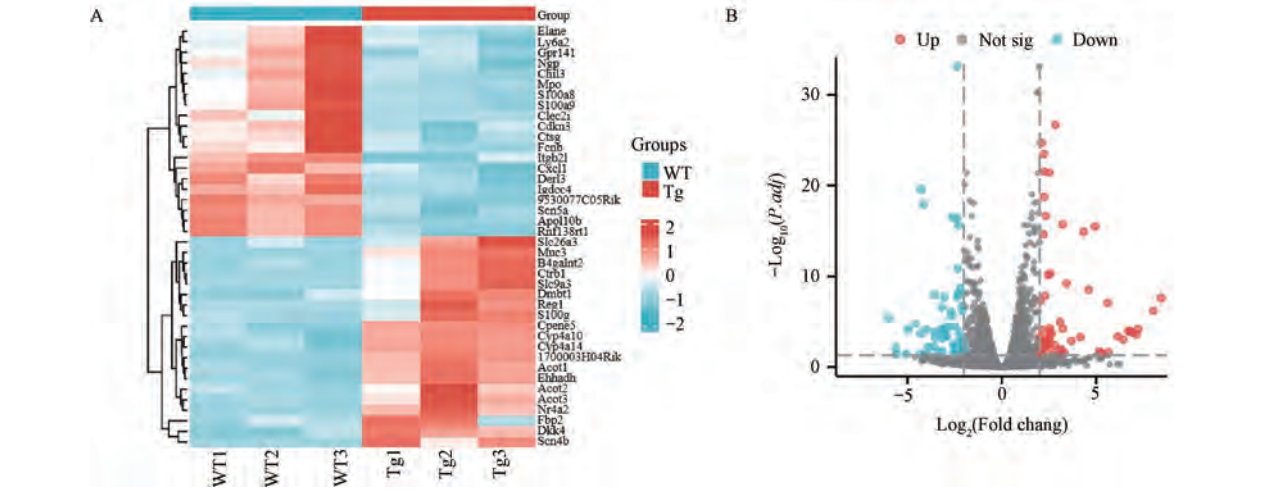
2.5 差异表达蛋白-蛋白互作 (Protein-Protein interaction networks, PPI) 分析

通过 String 数据库构建差异表达基因的蛋白网络互作图, 组成互作网络的基因主要与 *Cyp51*、*Cyp2c40*、*Fdft1*、*Calr*、*Fdps*、*Hmgcs1*、*Creld2*、*Cyp26a1*、*Hsp90b1*、*Adh4* 等蛋白相关, 占据了 PPI 网络的中心

位置 (图 4, 表 4)。

2.6 差异表达基因的 GO 分析

两组小鼠肝组织差异表达基因涉及 926 个生物过程 (biological process, BP)、58 个细胞组分 (cell component, CC) 和 150 个分子功能 (molecular function, MF)。BP 包括脂肪酸代谢、羧酸生物合成、有机酸生物合成等过程; CC 包括内质网膜伴侣复合物、顶端质膜、过氧化物酶体等组分; MF 包括氧化还原酶活性、羧酸跨膜转运蛋白活性、有机酸跨膜转运蛋白活性等功能 (图 5)。

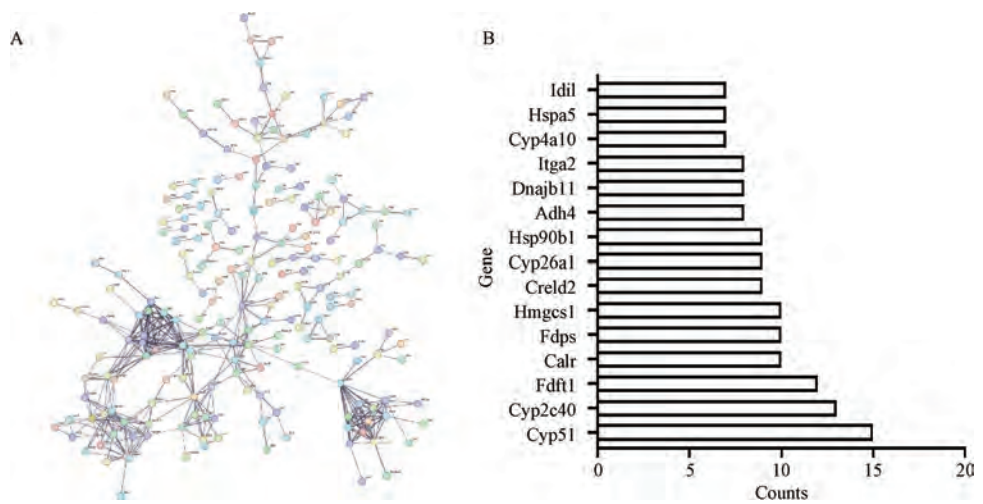


注: A: WT 组和 HBV-Tg 组小鼠差异基因热图; B: WT 组和 HBV-Tg 组小鼠差异基因火山图; 红色: 上调基因; 蓝色: 下调基因; 灰色: 无显著差异基因。

图 3 肝组织的差异表达基因

Note. A. Heat map of differentially expressed genes in WT and HBV-Tg mice. B. Differential gene volcano map of WT and HBV-Tg mice. Red. Up-regulated gene. Blue. Down-regulated gene. Grey. No significant differenced genes.

Figure 3 Differentially expressed genes in the liver



注：A:蛋白与蛋白相互作用图;B:差异基因表达量分布图。

图 4 肝组织差异基因的 PPI 网络图

Note. A. PPI network diagram. B. Differential gene expression distribution map.

Figure 4 PPI network of differentially expressed genes in the liver

表 4 调控 PPI 网络排名前 10 名关键基因

Table 4 Top 10 key genes in regulating PPI network

关键基因 Key gene	调控基因数 Regulatory gene number	调控基因 Regulatory gene
Cyp51	15	Hmgcs2、Hsd3b2、Insig1、Hsd3b3、Mvk、Por、Mvd、Fdps、Nsdhl、Idi、Hmgcs1、Fdft1、Sqle、Lss、Msmo1
Cyp2c40	13	Gstm3、Cyp4a14、Ugt2b1、Gsta2、Hsd3b5、Gstt2、Cyp4a10、Ugt2b38、Ugt1a9、Cyp4a32、Cyp4a12a、Cyp4a12b、Hsd3b3
Fdft1	12	Mvd、Sqle、Nsdhl、Msmo1、Mvk、Lss、Hmgcs2、Hsd3b2、Hsd3b3、Hmgcs1、Idi1、Fdps
Calr	10	Fcnb、Dnajb11、Manf、Sdf2l1、Hyou1、Pdia6、Pdia4、Hsp90b1、Pdia3、Hspa5
Fdps	10	Mvd、Rsad2、Sqle、Nsdhl、Msmo1、Mvk、Lss、Hmgcs2、Idi1、Hmgcs1
Hmgcs1	10	Mvd、Sreb1、Sqle、Nsdhl、Msmo1、Mvk、Lss、Insig1、Hmgcs2、Idi1
Creld2	9	Derl3、Hsp90b1、Sdf2l1、Gmppb、Hyou1、Pdia4、Hspa5、Dnajb11、Manf
Cyp26a1	9	Ugt2b1、Cyp4a32、Cyp4a12b、Cyp4a12a、Cyp2c40、Cyp4a10、Cyp4a14、Rarg、Retsat
Hsp90b1	9	Pcsk9、Manf、Sdf2l1、Thr2、Pdia3、Pdia6、Pdia4、Hyou1、Hspa5
Adh4	8	Gstm3、Ugt1a9、Gsta2、Ugt2b38、Aldh3a2、Ugt2b1、Retsat、Cyp26a1

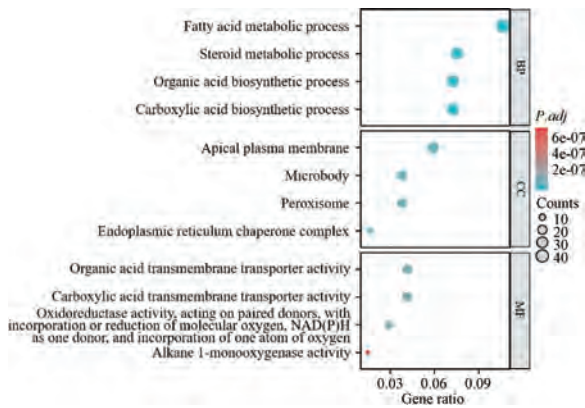


图 5 差异表达基因 GO 富集分析

Figure 5 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

2.7 差异表达基因的 KEGG 分析

与 WT 小鼠相比,HBV-Tg 小鼠的差异表达基因 KEGG 结果显示,共激活 21 条信号通路。排名前 10 位的包括:PPAR 信号通路、视黄醇代谢、脂肪酸降解、化学致癌-受体活化、药物代谢-其他酶、过氧化物酶体、胆汁分泌、TGF-β 信号通路、类固醇激素生物合成、药物代谢-细胞色素 P450 等通路(图 6)。

2.8 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

为进一步验证转录组测序差异基因的表达水平,将两组小鼠肝差异表达基因关键基因进行 RT-qPCR 验证。其中上调最显著的 10 个基因分别是 S100g、Ctrb1、Acot2、Muc3、Ehhadh、Cyp4a10、Dmbt1、Acot3、Cyp4a14、Acot1;下调最显著的 10 个

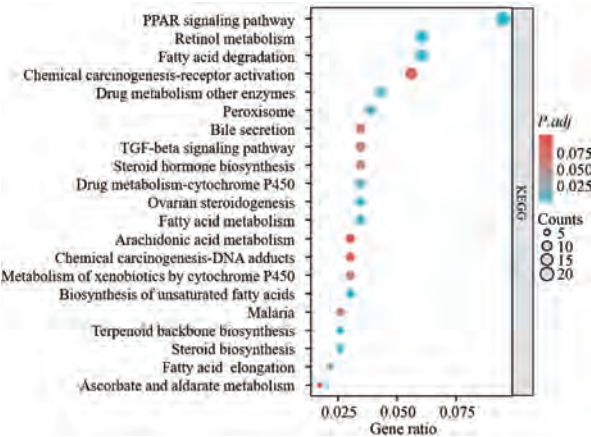


图 6 差异表达基因的 KEGG 分析

Figure 6 KEGG enrichment bubble map of differentially expressed genes

基因分别是 *Derl3*、*Cxcl1*、*9530077C05Rik*、*Mpo*、*Igdcc4*、*Ngp*、*Apol10b*、*S100a8*、*S100a9*、*Scn5a* (图 7)。

与 WT 小鼠相比,HBV-Tg 小鼠的 *Acot3*、*Muc3*、

Ehhadh、*Cyp4a10*、*Cyp4a14*、*Acot1* 基因 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$) ; *Cxcl1*、*9530077C05Rik*、*Igdcc4*、*Apol10b*、*Scn5a* 基因 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$) ,与转录组测序趋势一致(图 8)。

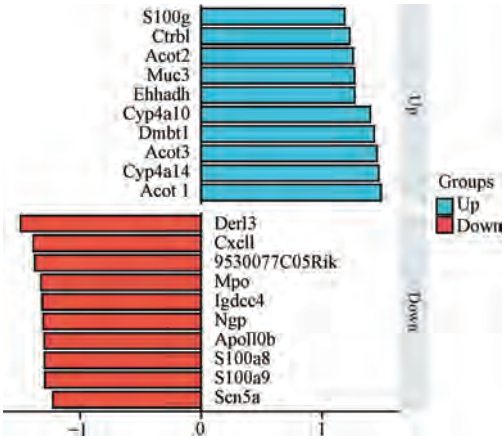


图 7 两组小鼠肝组织差异基因的表达水平

Figure 7 Expression levels of different genes in liver tissues of two groups of mice

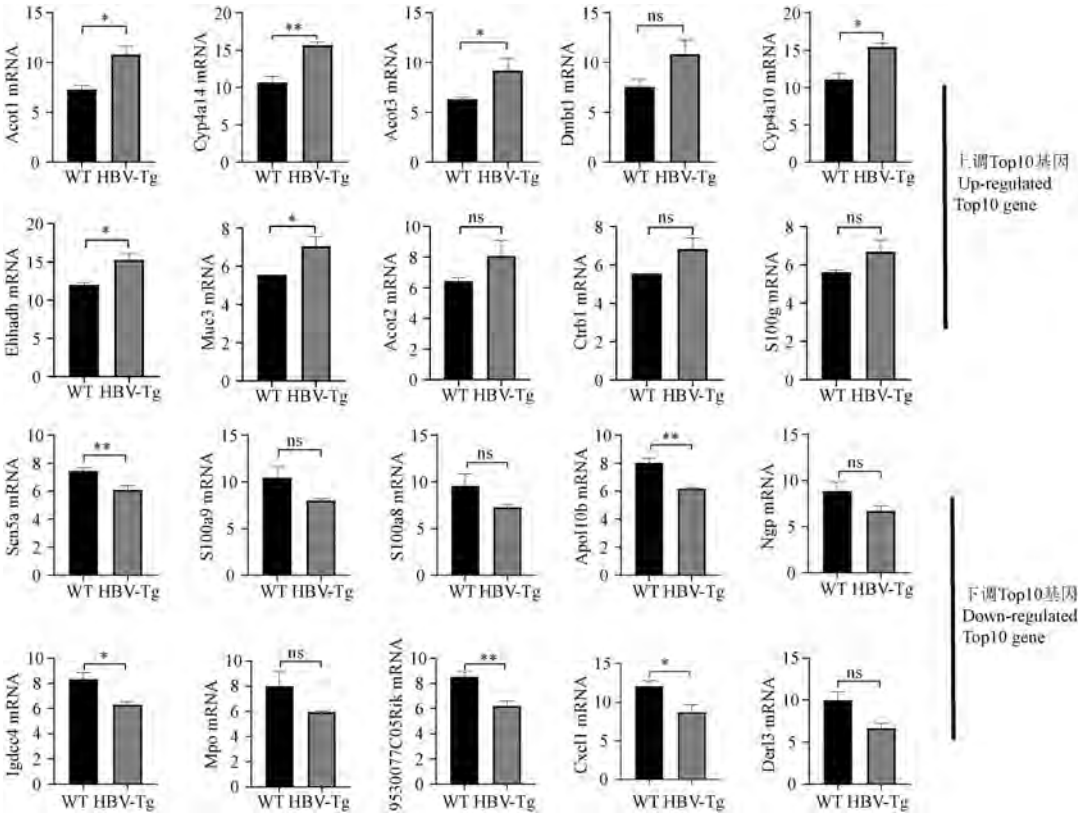


图 8 两组小鼠差异表达基因 RT-qPCR 分析

Figure 8 RT-qPCR analysis of differentially expressed genes in two groups of mice

3 讨论

目前常见的 CHB 动物模型有 HBV 转基因小

鼠^[19]、人源化嵌合肝小鼠模型^[20]、重组腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体介导的 HBV 感染小鼠模型^[21] 等。其中 HBV-Tg 小鼠可以持续高表

达 HBV 相关蛋白,产生病毒颗粒,价格低廉,随周龄的增加还可出现自发的肝组织损伤及纤维化^[6],在乙肝病毒相关机制研究及抗病毒治疗药物的疗效评价方面得到了广泛应用。本研究观察到 HBV-Tg 小鼠血清 HBV-DNA、HBsAg、HBeAg 水平及肝组织 HBsAg 及 HBcAg 的表达均呈阳性;肝组织 HE 染色显示均未见明显炎性细胞浸润;天狼猩红染色结果显示 HBV-Tg 小鼠有自发纤维化的趋势,与先前报道一致^[6,22]。

RNA-Seq 作为新一代的高通量测序技术,凭借测序成本低、精度高、覆盖范围广等优点^[23],已成为生物信息学分析前沿的研究方法。本研究采用 RNA-Seq 转录组测序筛选 HBV-Tg 小鼠与 WT 小鼠肝差异基因,共筛选出 1352 个特异性表达基因,其中表达上调基因数 703 个、下调基因数 649 个。差异基因中上调最明显前 6 位分别为 Cyp4a14、Cyp4a10、Acot1、Acot3、Ehhadh、Muc3,下调最明显前 5 位分别为 Scn5a、Apol10b、Igddc4、Cxcl1、9530077C05Rik。对排名靠前的差异基因采用 RT-qPCR 验证,各差异基因的改变与转录组测序结果一致。GO 和 KEGG 分析显示这些差异基因参与脂肪酸代谢、羧酸生物合成、有机酸生物合成等多个生物学过程,与内质网膜伴侣复合物、顶端质膜、过氧化物酶体等细胞组分相关;分子功能涉及氧化还原酶活性、羧酸跨膜转运蛋白活性、有机酸跨膜转运蛋白活性等;在 PPAR 信号通路、视黄醇代谢、脂肪酸降解、药物代谢等通路显著富集。

CHB 患者的感染与乙型肝炎病毒量密切相关,而乙型肝炎病毒中以亚病毒颗粒为主,其形成需要消耗大量宿主来源的肝细胞脂质,从而导致肝的脂质代谢紊乱^[24]。本研究中 KEGG 分析提示 HBV-Tg 小鼠肝差异基因在 PPAR 信号通路富集最为显著。PPAR α 作为核受体家族中的配体激活受体,与配体结合并激活后,可通过调节脂肪酸合成酶、脂蛋白等的表达来改善脂质代谢。有研究发现,HBsAg 阳性的 CHB 患者发生非酒精性脂肪肝病风险更低^[25-26];而增强脂质代谢能够显著降低 HBsAg 水平^[27-28]。细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450 enzymes, CYP) 4A10 与 4A14 的表达与脂肪酸的肝内氧化应激和脂质过氧化作用等密切相关^[29]。基辅酶 A 硫酯酶 1 (Acyl-CoA thioesterase 1, Acot1) 与 Acot3, 可以将脂肪酸酰基辅酶 A (fatty acid acyls-coAs) 水解成为游离脂肪酸 (free fatty acids) 和相应

的辅酶 A (coenzyme A, CoASH), 在脂肪酸的代谢中扮演者重要角色^[30]。此外, PPAR α 激活后还能抑制 NF- κ B 的活性从而降低炎症因子的水平,减轻肝的炎症反应^[31]。叶军等^[32]发现 miRNA-18a 可以激活 PPAR α / γ 信号通路,上调免疫功能相关细胞表面因子和细胞因子水平,改善 CHB 患者的免疫功能。视黄醇结合蛋白 (RBP) 分子主要由肝细胞的粗面内质网合成,可与视黄醇特异性结合后入血,在疾病早期反映肝的合成功能与分解代谢的变化^[33]。研究表明:CHB 同时伴发肝脂肪变性会加剧患者的肝纤维化^[34]。而天冬氨酰 β -羟化酶 (aspartate β -hydroxylase, ASPH) 可以通过 Cyp4a14/视黄醇代谢通路促进 HSC 活化从而促进肝纤维化的发生与发展^[35]。这些均提示脂质代谢在 CHB 的发生机制中占据重要地位,其可对乙型肝炎抗原的表达产生调控作用,为后续进一步研究 HBV 感染中脂类代谢的作用提供了重要的组学依据。

综上,本研究通过高通量测序技术发现的差异基因以及 KEGG 的通路,符合 CHB 的临床病理生理及转录基因水平的变化差异,尤其是涉及 CHB 的 PPAR 信号通路、视黄醇代谢、脂肪酸降解等通路。因此,该模型具有一定的 CHB 相关研究借鉴价值和意义。

然而,本研究仍存在一定的局限性。首先,HBV-Tg 复合腹腔注射 CCl₄ 的乙肝背景肝纤维化小鼠模型可加速肝纤维化形成,提高模型的稳定性,更好地模拟疾病内在的生理病理状态,因此后续可开展该复合模型的转录组学进一步研究。其次,该研究局限在转录组学水平,蛋白组学、代谢组学、多因子检测等其他技术方法有待进一步补充和完善,可为该模型的分子机制提供多维度的验证。最后,这些差异表达基因的确切功能和临床 HBV 相关疾病中的作用也有待进一步深入研究,以期 CHB 治疗提供依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] 张力公, 史珂, 许庆宝. 恩替卡韦治疗肺结核伴乙型肝炎病毒感染的临床疗效 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2022, 32 (19): 95-97.
Zhang LG, Shi K, Xu QB. Clinical efficacy of entecavir in the treatment of pulmonary tuberculosis with hepatitis B virus infection [J]. Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med, 2022, 32 (19): 95-97.
- [2] 尤红, 王福生, 李太生, 等. 慢性乙型肝炎防治指南 (2022 年版) [J]. 实用肝脏病杂志, 2023, 26 (3): 457-478.
You H, Wang FS, Li TS, et al. Guidelines for the prevention

- and treatment of chronic hepatitis B (version 2022) [J]. J Pract Hepatol, 2023, 26(3): 457-478.
- [3] Wang JH, Lee SB, Lee DS, et al. Total antioxidant capacity in HBV carriers, a promising biomarker for evaluating hepatic fibrosis: a pilot study [J]. Antioxidants, 2021, 10(1): 77.
- [4] 邢卉春. 影响慢性乙型肝炎病毒感染临床结局的宿主因素 [J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(7): 495-499.
- Xing HC. Host factors influencing the clinical outcome of chronic hepatitis B virus infection [J]. Chin J Hepatol, 2017, 25(7): 495-499.
- [5] Huang LR, Gäbel YA, Graf S, et al. Transfer of HBV genomes using low doses of adenovirus vectors leads to persistent infection in immune competent mice [J]. Gastroenterology, 2012, 142(7): 1447-1450.
- [6] 孙鑫, 黄恺, 赵志敏, 等. C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙型肝炎病毒转基因小鼠肝脏炎症与纤维化的病理特点 [J]. 肝脏, 2018, 23(1): 26-30.
- Sun X, Huang K, Zhao ZM, et al. Pathological features of liver inflammation and fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst [J]. Chin Hepatol, 2018, 23(1): 26-30.
- [7] Breschi A, Gingeras TR, Guigó R. Comparative transcriptomics in human and mouse [J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(7): 425-440.
- [8] Scheel J, von Brevern MC, Hörlein A, et al. Yellow pages to the transcriptome [J]. Pharmacogenomics, 2002, 3(6): 791-807.
- [9] Moore P. Mining the mouse [J]. Genome Biol, 2001, 2(1): spotlight-20010518-02.
- [10] 林兆宇, 高翔. 小鼠的遗传学研究 [J]. 生命科学, 2006, 18(5): 437-441.
- Lin ZY, Gao X. Genetic research of mouse [J]. Chin Bull Life Sci, 2006, 18(5): 437-441.
- [11] 立春雨. 利用腺相关病毒介导 CRISPR-Cas9 抑制 HBV 转基因小鼠体内乙型肝炎病毒复制的研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院; 2018.
- Sheng CY. Inhibition of HBV replication using AAV-delivered CRISPR-Cas9 *in vivo* [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences; 2018.
- [12] 杨炜峰, 苗振川, 宋希军, 等. HBV 感染的动物模型研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(5): 999-1005.
- Yang WF, Miao ZC, Song XJ, et al. Research advances in animal models of hepatitis B virus infection [J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(5): 999-1005.
- [13] Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging [J]. Hepatology, 1994, 19(6): 1513-1520.
- [14] Chen M, Sällberg M, Hughes J, et al. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins [J]. J Virol, 2005, 79(5): 3016-3027.
- [15] Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues [J]. Anal Biochem, 1981, 112(1): 70-75.
- [16] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550.
- [17] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139-140.
- [18] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284-287.
- [19] Araki K, Miyazaki J, Hino O, et al. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(1): 207-211.
- [20] Du Y, Broering R, Li X, et al. *In vivo* mouse models for hepatitis B virus infection and their application [J]. Front Immunol, 2021, 12: 766534.
- [21] Yang D, Liu L, Zhu D, et al. A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy [J]. Cell Mol Immunol, 2014, 11(1): 71-78.
- [22] Jin Z, Sun R, Wei H, et al. Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: involvement of natural killer T cells [J]. Hepatology, 2011, 53(1): 219-229.
- [23] Jiang Z, Zhou X, Li R, et al. Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(18): 3425-3439.
- [24] Satoh O, Umeda M, Imai H, et al. Lipid composition of hepatitis B virus surface antigen particles and the particle-producing human hepatoma cell lines [J]. J Lipid Res, 1990, 31(7): 1293-1300.
- [25] Joo E, Chang Y, Yeom J, et al. Hepatitis B virus infection and decreased risk of nonalcoholic fatty liver disease: a cohort study [J]. Hepatology, 2017, 65(3): 828-835.
- [26] Chung TH, Kim M, Kim CS. Association between hepatitis B surface antigen seropositivity and metabolic syndrome [J]. Korean J Fam Med, 2014, 35(2): 81-89.
- [27] 荆沙, 马泽林, 赵超. 乙型肝炎病毒表面抗原对细胞脂质合成作用的研究 [J]. 微生物与感染, 2020, 15(6): 360-369.
- Jing S, Ma ZL, Zhao C. Transcriptomics analysis reveals the up regulation of lipid synthesis by HBsAg [J]. J Microbes Infect, 2020, 15(6): 360-369.
- [28] 刘钦. 脂肪酸代谢影响 HBV 清除的初步研究 [D]. 武汉: 华中科技大学; 2016.
- Liu Q. A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of medicine [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology; 2016.
- [29] 黎宏章. SREBP-1c、CYP4A10、CYP4A14 和 CYP2E1 mRNA 在非酒精性脂肪性肝病大鼠中的表达 [D]. 杭州: 浙江大学; 2005.
- Li HZ. The mRNA expression of SREBP-1c、CYP4A10、CYP4A14 and CYP2E1 in rat with nonalcoholic fatty liver disease [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 2005.
- [30] Hunt MC, Alexson SE. The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism [J]. Prog Lipid Res,

2002, 41(2): 99–130.

[31] Li Q, Sun J, Mohammadtursun N, et al. Curcumin inhibits cigarette smoke-induced inflammation via modulating the PPAR γ -NF- κ B signaling pathway [J]. Food Funct, 2019, 10(12): 7983–7994.

[32] 叶军, 韩山山, 卢昕奕, 等. microRNA-18a 通过 PPAR α γ 信号通路上调慢性乙型肝炎患者调节性免疫功能 [J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(5): 1024–1028.
Ye J, Han SS, Lu XY, et al. microRNA-18a upregulates the regulatory immune function in patients with chronic hepatitis B through the PPAR α signaling pathway [J]. J Clin Hepatol, 2020, 36(5): 1024–1028.

[33] 殷艳天, 王立蓉, 黄菁, 等. 慢性乙型肝炎重叠急性戊型肝炎患者视黄醇结合蛋白检测 [J]. 江苏医药, 2013, 39(11): 1282–1283.

Yin YT, Wang LR, Huang J, et al. Detection and clinical significance of retinol binding protein in patients with chronic hepatitis B combined with acute hepatitis E [J]. Jiangsu Med J, 2013, 39(11): 1282–1283.

[34] Yang M, Wei L. Impact of NAFLD on the outcome of patients with chronic hepatitis B in Asia [J]. Liver Int, 2022, 42(9): 1981–1990.

[35] 张汉. ASPH 促进肝纤维化发生发展的作用与机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学; 2018.
Zhang H. The role of aspartate B-hydroxylase on the development and progression of liver fibrosis [D]. Shanghai: Second Military Medical University; 2018.

[收稿日期] 2023-08-08

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)动物学/人类学类的核心期刊!

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

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

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



康静,杨丽丽,王紫艳,等. 冠状动脉微血管疾病气虚血瘀证大鼠模型的建立及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1530–1538.

Kang J, Yang LL, Wang ZY, et al. Establishment and evaluation of a rat model of coronary microvascular disease with qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1530–1538.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.002

冠状动脉微血管疾病气虚血瘀证大鼠模型的建立及评价

康静^{1,2}, 杨丽丽¹, 王紫艳¹, 尤越¹, 史跃¹, 马彦雷¹, 孟红旭^{1*}, 李磊^{1,2*}

(1. 中国中医科学院西苑医院 中药药理北京市重点实验室, 国家中医心血管病临床医学研究中心, 北京 100091; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

【摘要】 目的 冠状动脉微血管疾病 (coronary microvascular disease, CMVD) 发病率逐年增高, 中医认为 CMVD 属中医学“络脉”的范畴, 气虚血瘀证是 CMVD 主要证型, 然而目前尚无气虚血瘀证 CMVD 动物模型的报道, 因此本研究探索建立冠状动脉微血管疾病气虚血瘀证大鼠模型并进行评价。**方法** 雄性 SD 大鼠 45 只, 随机分为假手术组、冠脉微血管疾病组和冠脉微血管疾病气虚血瘀证组, 每组 15 只。冠脉微血管疾病气虚血瘀证组动物每天随机 14 ~ 16 h 睡眠剥夺, 持续 6 周, 复制气虚证大鼠模型; 假手术组及冠脉微血管疾病组动物正常饲养 6 周。实验 6 周后, 冠脉微血管疾病组和冠脉微血管疾病气虚血瘀证组大鼠麻醉后开胸, 向左心室内注射栓塞微球 (40 ~ 120 μm), 假手术组动物行开胸手术但不注射栓塞微球。术后 7 d, 各组测定相关检测指标。**结果** 冠脉微血管疾病组与假手术组相比, 左室射血分数、左室缩短率明显降低, 肌酸激酶 MB 同工酶 (CK-MB) 以及乳酸脱氢酶 (LDH) 活性明显增加。冠脉微血管疾病气虚血瘀证组与假手术组相比, 心功能下降、心肌损伤标志物活性显著升高、血浆及全血粘度明显升高。**结论** 睡眠剥夺复合心室内注射栓塞微球可成功建立冠脉微血管疾病气虚血瘀证大鼠模型, 比较符合临床发病特征适合于发病与中药作用机制研究。

【关键词】 冠状动脉微血管疾病; 气虚血瘀证; 病证结合; 睡眠剥夺; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1530-09

Establishment and evaluation of a rat model of coronary microvascular disease with qi deficiency and blood stasis syndrome

KANG Jing^{1,2}, YANG Lili¹, WANG Ziyang¹, YOU Yue¹, SHI Yue¹, MA Yanlei¹, MENG Hongxu^{1*}, LI Lei^{1,2*}

(1. Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, National Clinical Research Center of Traditional Chinese Medicine for Cardiovascular Diseases, Beijing 100091, China. 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

Corresponding author: LI Lei. E-mail: lilei0502@126.com; MENG Hongxu. E-mail: amfd003@163.com

【基金项目】 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04609), 国家自然科学基金面上项目 (82174015), 国家中医心血管病临床医学研究中心专项科研基金项目 (CMC2022006), 安徽省高校协同创新项目 (GXXT-2020-024)。

Funded by Science and Technology Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (CI2021A04609), General Program of National Natural Science Foundation of China (82174015), Special Research Fund Project of National Center for Clinical Medical Research of Cardiovascular Diseases of Traditional Chinese Medicine (CMC2022006), University Collaborative Innovation Project of Anhui (GXXT-2020-024).

【作者简介】 康静 (1994—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 心血管中药药理研究。Email: kj17693569660@163.com

【通信作者】 孟红旭 (1972—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 心血管中药药理研究。Email: amfd003@163.com;

李磊 (1982—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药理学研究。Email: lilei0502@126.com。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective The incidence of coronary microvascular disease (CMVD) is increasing annually. According to traditional Chinese medicine (TCM), CMVD belongs to the category of “collaterals”, and qi deficiency and blood stasis are the main syndrome type of CMVD. Notably however, no studies have reported on the use of animal models of CMVD with qi deficiency and blood stasis. The current study therefore aimed to establish and evaluate a rat model of CMVD with qi deficiency and blood stasis syndrome. **Methods** Forty-five male SD rats were divided randomly into sham group, CMVD group, and CMVD + QXXY group ($n = 15$ rats per group). Rats in the CMVD + QXXY group were randomly deprived of sleep for 14 ~ 16 h/day for 6 weeks, and the model of qi deficiency syndrome was established. Animals in the sham group and the CMVD group were fed normally for 6 weeks. After 6 weeks, rats in the CMVD and CMVD + QXXY groups were anesthetized, their chests were opened, and embolic microspheres (40 ~ 120 μm) were injected into the left ventricle. Rats in the sham group underwent thoracotomy without injection of embolic microspheres. On day 7 after operation, relevant detection indicators were measured in each group. **Results** Compared with the sham group, the CMVD group showed a significant decrease in left ventricular ejection fraction and left ventricular shortening rate, while the activities of creatine kinase MB isoenzyme (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) were significantly increased. Heart function, hemorheology, myocardial enzyme index, and the degree of myocardial cell damage differed significantly between the CMVD + QXXY group compared with the sham group. **Conclusions** A rat model of CMVD + qi deficiency + blood stasis syndrome can be successfully established by sleep deprivation combined with intraventricular injection of embolic microspheres. This model will be suitable for the study of the pathogenesis of CMVD and the mechanisms of TCM.

[Keywords] coronary microvascular disease; qi deficiency and blood stasis syndrome; combination of disease and syndrome; sleep deprivation; animal model

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

冠状动脉微血管疾病 (coronary microvascular disease, CMVD) 是指在多种致病因素的影响下, 冠状动脉的小动脉 (直径 $< 100 \mu\text{m}$) 及前小动脉 (直径 $100 \sim 500 \mu\text{m}$) 的结构和功能受损, 从而导致心肌缺血或心绞痛的临床综合征^[1]。目前, CMVD 的发病机制仍然在探索之中, 研究显示冠状动脉微血管内皮功能障碍、血管平滑肌损伤、机械性压迫以及冠脉微栓塞等是 CMVD 发生的主要原因^[2-3]。现代中医学认为, CMVD 属“胸痹”“真心痛”“络病”等病的范畴, 证候多见血瘀、气虚、气滞等^[4]。气虚血瘀证为 CMVD 最常见的复合证型, 其主要病机为气虚行血无力, 瘀血内阻, 可用益气活血、通络止痛等治则中药治疗^[5-6]。目前, 尚无研究 CMVD 气虚血瘀证动物模型, 本课题组前期建立了 CMVD 大鼠、气虚血瘀证大鼠等动物模型^[7-8], 在此基础上, 本实验探索建立冠脉微血管疾病气虚血瘀证大鼠模型, 并对其模型进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

45 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 (250 ± 20) g, 购于斯贝福生物技术有限公司【SCXK (京)

2019-0010】。SPF 级屏障环境中 (温度 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $50\% \sim 60\%$, 大鼠自由饮食进水, 明/暗周期为 12 h; 饲料为⁶⁰Co 辐照实验鼠维持饲料), 饲养于中国中医科学院西苑医院实验动物中心【SYXK (京) 2018-0018】。实验动物处置严格遵循 3R 原则, 给予人道主义关怀。本研究方案经中国中医科学院西苑医院实验动物伦理委员会审批通过后开展实验 (2021XLC037)。

1.1.2 主要试剂与仪器

栓塞微粒球 (40 ~ 120 μm , 美国 Merit Medical 公司, 批号 X2321032); 肌酸激酶 (CK) 测定试剂盒 (上海光纯耀化学有限公司产品, 批号 110622); 肌酸激酶 MB 同工酶 (CK-MB) 测定试剂盒 (上海光纯耀化学有限公司产品, 批号 211230); 乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒 (上海光纯耀化学有限公司产品, 批号 103424)。

小动物呼吸机 (DW-3000S 型, 安徽正华生物仪器设备有限公司, 中国); 小动物超声仪 (Visual-Sonics Vevo 2100, Fujifilm, 日本); 血液流变测定仪 (LBV-N6C 型, 北京普利生仪器有限公司, 中国); 台式脉搏血氧仪 (Starr Life Science, 美国); 大小鼠抓力测定仪 (YLS-13A 型, 北京众实迪创科技发展有限公司, 中国); 生化分析仪 (LABOSPECT003 型,

Hitachi, 日本); 数码单镜反光相机 (D90, Nikon, 日本); 高速低温离心机 (ICE-CL31R 型, 赛默飞, 美国); 计算机彩色病理图像分析系统 (MPIAS-500 型, 北京正恒博诚科技发展有限公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备

将大鼠随机分为 3 组, 每组各 15 只, 具体分组如下: (1) 假手术组: 不进行睡眠剥夺, 不注射栓塞微球; (2) 冠脉微血管疾病组: 不进行睡眠剥夺, 心室内注射栓塞微球; (3) 冠脉微血管疾病气虚血瘀证组: 根据本课题组前期睡眠剥夺法建立的气虚血瘀证大鼠方法^[9], 先将大鼠每日随机睡眠剥夺 14 ~ 16 h, 连续睡眠剥夺 6 周后, 成功复制气虚血瘀证模型, 然后采用心室内注射栓塞微球法建立冠状动脉微血管疾病模型^[10]。将大鼠用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 行气管插管术, 然后连接小动物呼吸机机械通气, 于大鼠胸骨左侧缘第 4 肋纵向剪断, 轻柔分离心包膜, 完全暴露心脏, 将主动脉弓起始部分离出来, 并在下面穿手术线, 大鼠心脏稳定后, 轻柔将手术线的两端提起, 夹闭主动脉弓, 从心尖向左心室内注射 0.2 mL 栓塞微球 (直径 40 ~ 120 μm), 动脉夹阻断主动脉弓血流 20 s 后, 恢复主动脉血流, 大鼠稳定 2 ~ 3 min 后, 逐层缝合, 拔除气管插管。冠脉微血管疾病组正常饲养 6 周后, 采用心室内注射栓塞微球法建立冠状动脉微血管疾病模型。假手术组亦在实验 6 周后进行手术操作, 区别仅在于大鼠注射的为 0.2 mL 生理盐水。心室内注射栓塞微球术后 1 周 (实验 7 周), 各组测定相关检测指标并处死取材。

1.2.2 一般状态观察

在造模前后观察各组大鼠的体重、毛发、进食量、活动情况、精神状态等。

1.2.3 脉搏幅度检测

使用台式小动物无创脉冲血氧仪对大鼠脉搏幅度进行检测, 将带有红外感受器的探头夹住大鼠右侧后足, 待出现连续 30 个有效的数据后, 记录数据并计算均值。

1.2.4 舌象采集

大鼠麻醉后, 采用尼康 D90 数码单镜反光相机配合 60 mm 微距镜头进行舌象图像采集。5500 K 色温光源进行布光, 舌体处照度 2500 ~ 3000 lx。舌象照片以 JPG 格式输出, 选取 3 点舌体区域, 记录 R、G、B 分量值, 按照前期实验方法将 RGB 转化为

HIS 色度空间^[11], HIS 分别表示色调 (H)、亮度 (I) 和饱和度 (S), 是从人眼中认识颜色的 3 个特征。

1.2.5 抓力测定

将大鼠轻轻地放在抓力板上, 抓住鼠尾轻轻向后牵拉, 待大鼠抓牢抓力板后, 给大鼠施加最大力量向后拉, 致使大鼠松爪, 记录抓力机上的最大抓力, 每只大鼠测量 3 次, 获取大鼠的平均抓力值, 将不同实验组的抓力值进行对比分析。

1.2.6 超声心动图评价心功能

大鼠麻醉后, 剃净心脏投影部位的胸部体毛, 躯体左倾 30° 并涂抹超声耦合剂, 使用日本 Fujifilm 公司的小动物超声诊断仪, 频率为 9 ~ 18 MHz 的 MS210 型探头, 采用 M 型超声左室长轴切面二尖瓣腱索水平, 测量左室收缩期后壁厚度 (LVPWs)、左室收缩期前壁厚度 (LVAWs)、左心室收缩末期容积 (LVESV)、左室舒张期后壁厚度 (LVPWd)、左室舒张期前壁厚度 (LVAWd)、左心室舒张末期容积 (LVEDV) 等指标, 工作站软件计算左室射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (LVFS)、每搏输出量 (SV)、心输出量 (CO) 等指标。

1.2.7 血液、血浆黏稠度检测

在大鼠腹主动脉穿刺取血 (肝素抗凝) 3 mL, 将 1 mL 抗凝血放于血液流变仪样本位上, 在低切 5 s^{-1} , 中切 60 s^{-1} , 高切 150 s^{-1} 切变率下进行全血粘度测定, 2 mL 余血于 2000 r/min 离心 10 min 后, 取上清 0.8 mL 用于血浆粘度测定 (切变率 100 s^{-1})。

1.2.8 血清 CK、CK-MB 及 LDH 活性检测

大鼠腹主动脉取血后, 首先在室温环境下静置 1 h, 然后在 3000 r/min, 4℃ 条件下离心 10 min, 分离血清备用, 应用日本 LABOSPECT003 型自动生化分析仪及试剂盒, 测定血清 CK、CK-MB、LDH 值, 并将各组大鼠进行比较分析。

1.2.9 TTC 染色法测定心肌缺血、梗死面积

实验结束后, 取出心脏, 用生理盐水冲洗, 用吸水滤纸吸干多余水分, 从心脏冠状沟以下平行切取心肌, 心尖部一点弃之, 其余部分横切 4 片, 每片厚度 2 ~ 3 mm, 在 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 中避光染色 15 min 左右, 染色完成后, 使用高清单反相机拍照, 所得图像经 Image-Pro Plus 6.0 软件计算梗死面积心脏切片总面积。经 TTC 染色后, 心肌组织呈现红色的为正常组织, 呈现白色的为梗死区, 以梗死面积/心脏面积百分比代表梗死范围。

1.2.10 HE 染色观察心肌组织病理形态

实验结束后,取动物心室心肌组织,投入预先配好的 4%多聚甲醛溶液中固定,24 h 后修整,放入包埋盒中,流水冲洗 30 min,乙醇梯度脱水、于二甲苯中透明、石蜡包埋,后置于切片机上切成薄片(5 ~ 8 μm)。使用二甲苯脱蜡,脱蜡完成后,置于不同浓度乙醇中各浸泡 5 min 以达到充分水化,使用 PBS 溶液浸泡清洗,行苏木素-伊红染色 1 ~ 3 min,反复流水冲洗,随后入二甲苯中脱水透明,将切片从二甲苯中拿出来稍晾干,中性树胶封片,显微镜镜检,数码相机采集图像分析。

1.3 统计学分析

计量资料均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,多组之间比较采用单因素方差分析,方差齐性应用 SNK 检验,不足方差齐性的多组比较选择 Tamhane's T2 检验。以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态观察

假手术组大鼠可见体型正常,精神状态、摄食、活动均良好,毛发光顺,舌面呈粉嫩色;与假手术组相比,冠脉微血管疾病组大鼠体重显著下降($P < 0.01$),活动量少,毛发枯黄欠光泽,舌面暗红,冠脉

微血管疾病气虚血瘀证组大鼠体重显著下降($P < 0.01$)(见表 1),精神略显萎靡,活动较前减少,毛发枯黄无光泽,舌面暗淡。与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组体重下降,但未见显著性差异。

2.2 对大鼠脉搏幅度及抓力的影响

与假手术组相比,冠脉微血管疾病组大鼠脉搏幅度为 $61.51 \pm 10.75 \mu\text{m}$,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组脉搏幅度为 $28.12 \pm 8.00 \mu\text{m}$ 脉搏幅度明显减慢($P < 0.01$),与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组脉搏幅度显著下降($P < 0.01$)。与假手术组相比,各模型组抓力均显著下降($P < 0.01$);与冠脉微血管疾病模型组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组抓力下降明显($P < 0.01$)。见表 1,图 1。

2.3 对大鼠舌象的影响

与假手术组相比,冠脉微血管疾病组 S 值降低($P < 0.05$),冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 R/G 及 R/B 均降低($P < 0.01$),同时 R 值($P < 0.01$)分量值降低,S 值也出现降低($P < 0.01$)。提示冠脉微血管疾病气虚血瘀证组随着造模时间的变长,舌象图像 R 分量值降低,舌色饱和度下降。与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 R 值($P < 0.05$)分量值降低,提示舌象饱和度下降。见

表 1 各组大鼠体重、脉象和抓力变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes in body weight, pulse intensity and grasping strength in each group($\bar{x} \pm s$)				
分组 Groups	<i>n</i>	体重(g) Body weight(g)	脉搏幅度(μm) Pulse intensity(μm)	抓力(g) Grasping strength(g)
假手术组 Sham group	15	420.07 ± 15.49	76.66 ± 19.65	582.48 ± 22.68
冠脉微血管疾病组 CMVD group	11	392.91 ± 30.86**	61.51 ± 10.75**	350.09 ± 68.52**
冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 CMVD + QXXY group	10	386.30 ± 36.33**	28.12 ± 8.00**##	320.60 ± 28.66**##

注:与假手术组相比,** $P < 0.01$;与冠脉微血管疾病组相比,## $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Note. Compared with the sham group, ** $P < 0.01$. Compared with CMVD group, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

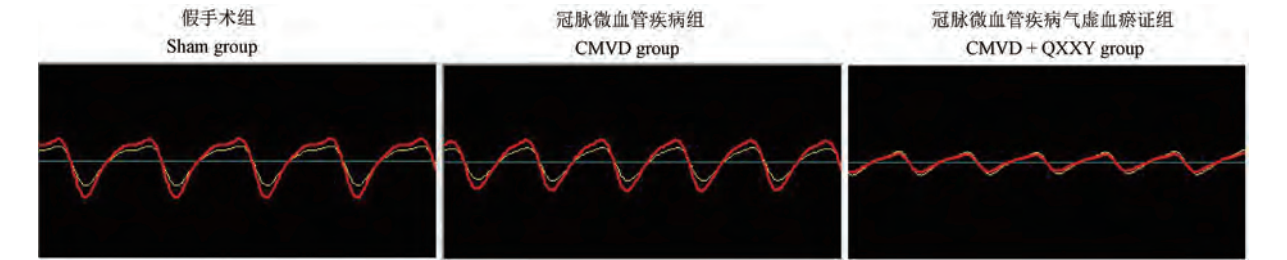


图 1 各组大鼠脉象
Figure 1 Pulse status of rats in each group

图 2,表 2。

2.4 对大鼠超声心动图的影响

与假手术组相比,冠脉微血管疾病组 LVIDs 明显增大 ($P < 0.01$), EF、FS 值均显著降低 ($P < 0.01$),表明左心室内注射栓塞微球构建疾病模型,对大鼠心功能具有较大的影响。冠脉微血管疾病气虚血瘀证组, LVIDs 显著增大 ($P < 0.01$), SV、CO

显著降低 ($P < 0.01$), EF、FS 亦显著降低 ($P < 0.01$),提示睡眠剥夺 6 周 + 左心室内注射栓塞微球,能够显著降低大鼠的心功能。与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组,左室舒张末期容积明显增加 ($P < 0.05$), SV、CO 显著降低 ($P < 0.01$),提示病证结合造模比单纯疾病造模心功能损伤更为严重。见图 3,表 3。



图 2 各组大鼠舌象

Figure 2 Tongue picture of rats in each group

表 2 各组大鼠舌像变化($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 15$)

Table 2 Changes in tongue images of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 15$)

分组 Groups	R	G	B	R/G	R/B	I	S	H
假手术组 Sham group	153.89 ± 6.64	93.69 ± 7.08	100.61 ± 8.91	1.65 ± 0.07	1.45 ± 0.35	124.29 ± 29.22	0.22 ± 0.06	89.84 ± 0.20
冠脉微血管 疾病组 CMVD group	150.40 ± 7.23	100.30 ± 11.80	107.00 ± 6.78	1.51 ± 0.11**	1.41 ± 0.05**	114.91 ± 13.43	0.16 ± 0.04*	86.88 ± 9.44
冠脉微血管疾 病气虚 血瘀证组 CMVD + QXXY group	142.73 ± 5.71***	99.90 ± 8.46	105.77 ± 6.20	1.44 ± 0.10**	1.35 ± 0.08**	116.13 ± 5.99	0.14 ± 0.03**	89.87 ± 0.10

注:像素区域 R(红色)、G(绿色)、B(蓝色); HIS 色度空间(色调 H、饱和度 S 及亮度 I);与假手术组相比, * $P < 0.05$;与冠脉微血管疾病组相比, # $P < 0.05$ 。(下图/表同)

Note. Pixel regions R (red), G (green), B (blue). HIS chromaticity space (hue H, saturation S, and brightness I). Compared with the sham group, * $P < 0.05$. Compared with CMVD group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

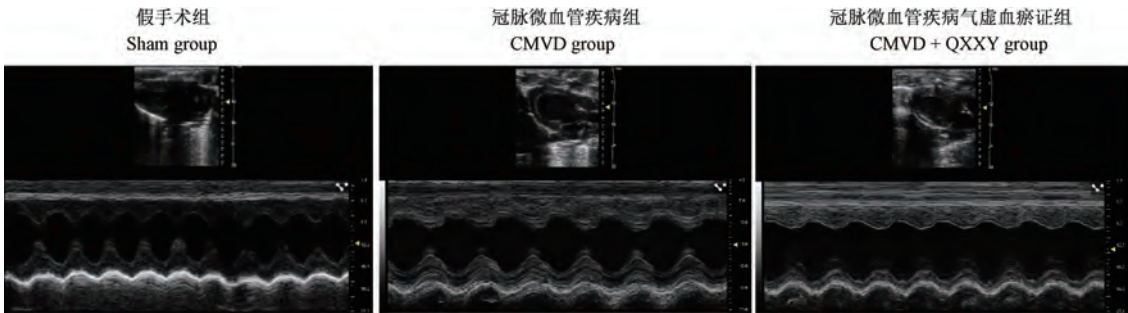


图 3 各组大鼠超声心动图

Figure 3 Echocardiogram of rats in each group

表 3 各组大鼠超声心动图参数测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 15$)

Table 3 Measurement results of echocardiography parameters in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 15$)

类型 Types	假手术组 Sham group	冠脉微血管疾病组 CMVD group	冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 CMVD + QXXY group
LVAWs (mm)	3.37 ± 0.23	2.95 ± 0.70 [*]	2.85 ± 0.54 ^{**}
LVAWd (mm)	1.59 ± 0.22	1.67 ± 0.32	1.76 ± 0.33
LVPWs (mm)	3.66 ± 0.32	3.35 ± 0.64	2.57 ± 0.50 ^{**##}
LVPWd (mm)	1.99 ± 0.43	1.88 ± 0.28	1.77 ± 0.26
LVIDs (mm)	3.24 ± 0.41	4.79 ± 0.81 ^{**}	4.53 ± 0.77 ^{**}
LVIDd (mm)	7.80 ± 0.50	8.08 ± 0.67	7.64 ± 0.85
LVV _s (μL)	43.57 ± 13.45	111.59 ± 43.14 ^{**}	98.10 ± 37.88 ^{**}
LVV _d (μL)	327.37 ± 47.47	383.79 ± 77.60 [*]	298.25 ± 74.67 [#]
SV (μL/beat)	283.80 ± 42.37	272.20 ± 39.25	200.15 ± 74.67 ^{**##}
CO (mL/min)	99.33 ± 14.83	95.27 ± 13.74	70.05 ± 19.86 ^{**##}
EF (%)	86.71 ± 3.54	71.79 ± 6.01 ^{**}	66.94 ± 10.92 ^{**}
FS (%)	58.39 ± 4.60	43.05 ± 5.16 ^{**}	39.05 ± 8.39 ^{**}

注:LVAWs:左室收缩期前壁厚度;LVAWd:左室舒张期前壁厚度;LVPWs:左室收缩期后壁厚度;LVPWd:左室舒张期后壁厚度;LVIDs:左室收缩末期前内径;LVIDd:左室舒张末期前内径;LVVs:左室收缩末期容积;LVVd:左室舒张末期容积;SV:每搏输出量;CO:心输出量;EF:射血分数;FS:短轴缩短率。

Note. LVAWs. Left ventricular systolic anterior wall thickness. LVAWd. Left ventricular diastole anterior wall thickness. LVPWs. Left ventricular systolic posterior wall thickness. LVPWd. Left ventricular diastole posterior wall thickness. LVIDs. Left ventricular end systolic inner diameter. LVIDd. Left ventricular end diastolic diameter. LVVs. Left ventricular end systolic volume. LVVd. Left ventricular end diastolic volume. SV. Stroke volume. CO. Cardiac output. EF. Ejection fraction. FS. Short axis shortening rate.

2.5 对大鼠血液流变学的影响

与假手术组相比,冠脉微血管疾病组血流动力学指标未见明显差异($P > 0.05$);冠脉微血管疾病气虚血瘀证组大鼠低、中、高切变率下全血黏度及

血浆黏度升高($P < 0.05, P < 0.01$)。与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组大鼠低、中、高切变率下全血黏度明显升高($P < 0.01$),血浆粘度没有统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 大鼠血液流变学指标测定结果($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Measurement results of hemorheology indexes in rats ($\bar{x} \pm s$)

分组 Groups	<i>n</i>	全血黏度(mPa/s) Whole blood viscosity (mPa/s)			血浆黏度(mPa/s) Plasma viscosity (mPa/s)
		低切(5 s ⁻¹) Low shear(5 s ⁻¹)	中切(60 s ⁻¹) Medium shear(60 s ⁻¹)	高切(150 s ⁻¹) High shear(150 s ⁻¹)	
假手术组 Sham group	15	9.31 ± 1.11	4.44 ± 0.38	3.87 ± 0.30	1.19 ± 0.03
冠脉微血管疾病组 CMVD group	11	9.79 ± 1.05	4.57 ± 0.40	3.96 ± 0.34	1.21 ± 0.05
冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 CMVD + QXXY group	10	12.08 ± 1.33 ^{**##}	5.54 ± 0.46 ^{**##}	4.86 ± 0.60 ^{**##}	1.24 ± 0.05 [*]

2.6 对大鼠心脏生化标志物的影响

与假手术相比,冠脉微血管疾病组大鼠血清CK、CK-MB及LDH活性明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),冠脉微血管疾病气虚血瘀证组大鼠血清

CK、CK-MB及LDH活性显著升高($P < 0.01$)。与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组大鼠血清CK活性具有显著性差异($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 各组大鼠血清CK、CK-MB及LDH变化($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Changes in serum CK, CK-MB, and LDH of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

分组 Groups	<i>n</i>	CK(U/L)	CK-MB(U/L)	LDH(U/L)
假手术组 Sham group	15	570.67 ± 156.48	566.87 ± 154.56	904.87 ± 195.93
冠脉微血管疾病组 CMVD group	11	710.09 ± 145.21 [*]	725.18 ± 110.51 ^{**}	1382.82 ± 572.81 ^{**}
冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 CMVD + QXXY group	10	1210.60 ± 531.57 ^{**##}	1039.70 ± 488.64 ^{**}	1557.20 ± 595.67 ^{**}

2.7 对大鼠心肌梗死范围的影响

经 TTC 染色以后,正常心肌组织染红色,梗死区不被染色,呈现白色,表明假手术组未出现梗死区。冠脉微血管疾病组,可见心肌组织有散在白色梗死区域;冠脉微血管疾病气虚血瘀证组,心肌周

围及心肌组织内部均出现白色梗死区(见图 4A)。由图 4B 中可见,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组梗死区相比明显,其梗死面积/心脏面积比例显著高于模型组($P < 0.05$),表明造模成功,具有统计学意义。

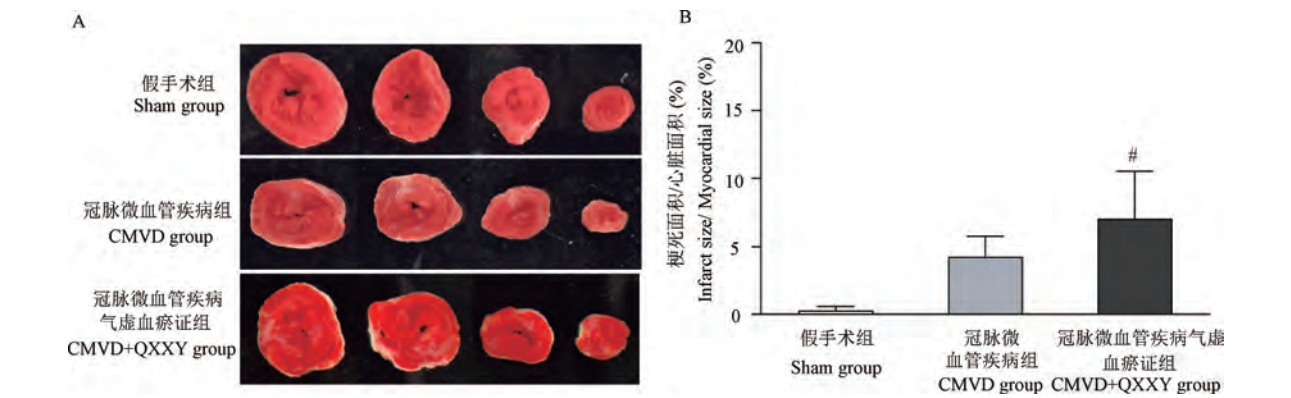


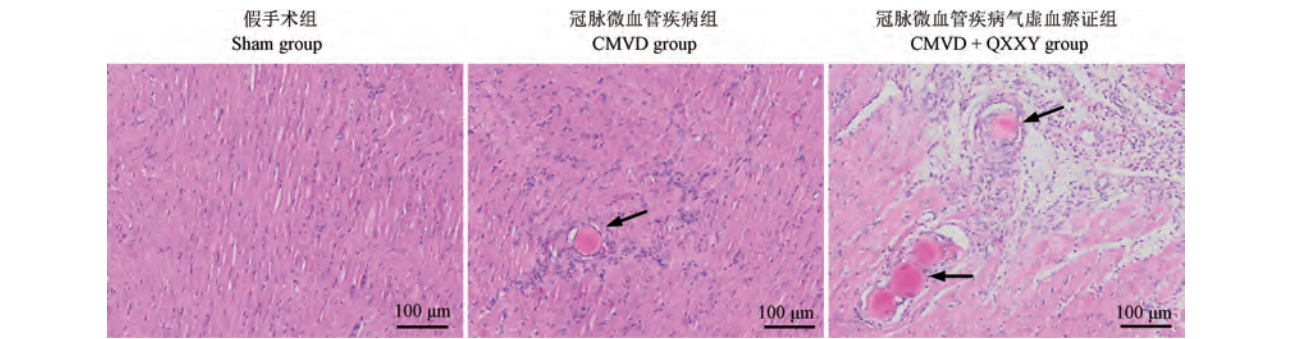
图 4 各组动物心肌 TTC 染色和心肌梗死面积

Figure 4 TTC staining diagram of myocardium and myocardial infarction area of animals in each group

2.8 对大鼠心肌病理形态影响

大鼠心肌组织经 HE 染色处理,在显微镜下观察可见,假手术组大鼠心肌细胞完整,形态规则,纤维排列规律整齐。冠脉微血管疾病组心肌组织可见栓塞微球,栓塞微球周围可见心肌组织出现较小

的溶解、断裂,心肌细胞破坏,心肌纤维排列错位明显;冠脉微血管疾病气虚血瘀证组可见栓塞微球周围心肌组织炎性扩散,纤维组织增生,出现严重的心肌溶解、断裂,心肌细胞彻底破坏,心肌纤维消失。见图 5。



注:箭头指示的为栓塞微球。

图 5 各组动物心肌组织形态(HE 染色)

Note. The arrow indicates microsphere embolism.

Figure 5 Myocardial tissue morphology of animals in each group (HE staining)

3 讨论

冠脉微血管疾病是指由于冠状动脉微血管功能(或)结构异常造成的心肌供血不足,从而引起一系列心肌缺血主观症状(或)客观依据的一类疾病^[12],是影响冠状动脉微循环结构和功能的疾病亚组,普遍存在于心血管危险因素中^[13]。动物疾病模型是认识疾病发病过程与药物干预机理研究的常

用方法,小型猪、大鼠等动物的冠脉微血管疾病模型已较为成熟^[14]。冠脉微血管疾病动物模型造模常见方法有栓塞微球法、自体血栓栓塞法、缺血再灌注损伤法等^[15]。栓塞微球法造模具有不开胸、微创的特点,动物死亡率较低,其优势在于可以稳定建立冠脉微血管疾病模型,相对于小型猪、犬等大动物,大鼠冠脉微血管动物模型有着更广泛的应用。本课题组前期通过心室内注射栓塞微球法建

立了大鼠冠脉微血管疾病模型并进行了中药作用机制研究^[16],本研究成功复制了前期建立的模型,动物模型表现出血清心肌酶活性升高、心肌损伤、心功能降低等,说明该造模方法比较稳定可靠。然而冠脉微血管病病证结合动物模型尚无报道。本研究在前期研究的基础上,采用睡眠剥夺(气虚血瘀)复合心室内注射栓塞微球(冠脉微血管疾病)的方法探索建立了冠脉微血管疾病气虚血瘀证动物模型。

现代中医学认为冠脉微血管疾病的病机属心络受损,血瘀阻络之证,乃属本虚标实之为病,属于中医学中的络脉病范畴,气虚血瘀证是其最常见的证型^[17]。有研究认为,长期睡眠失常易产生精神恍惚、不欲饮食、神疲乏力等临床类似气虚证的症状表现。另外,通过心室内注射栓塞微球法构建疾病模型,使冠状动脉微血管疾病在病理条件下由于气血推动无力,不能充实于心络,心络失养而受损,血瘀内结阻于心络而形成血瘀证的病机变化,充分体现出病症结合动物模型具有与中医临床相符合的特点^[18]。

疾病动物模型有助于发病机制的认识、药物作用及机理的研究,然而目前冠脉微血管疾病气虚血瘀证动物模型尚无报道。气虚血瘀证动物模型常见的造模方法有睡眠剥夺法,评价的方法(或指标)有大鼠舌象、脉象、凝血功能、血浆 ACTH、超声心动图、血管组织 HE 染色等^[19]。本研究结果显示,气虚血瘀证冠脉微血管疾病大鼠即使停止睡眠剥夺因素 1 周后仍出现了明显的血瘀证表现,如血液流变学、舌象改变,同时也出现了气虚证的表现,如活动量少、毛发枯黄欠光泽、抓力降低等,说明该证候因素造模具有好的稳定性和持续性。与单纯疾病因素造模的冠脉微血管疾病大鼠相比,病证结合造模方法建立的动物模型除了反应血瘀证的血流变有明显差异之外,心功能、抓力、心肌酶、梗死面积等指标也显示病证结合动物模型的损伤更为严重。

本研究在前期研究的基础上,以中医理论为指导,通过睡眠剥夺复合心室内注射栓塞微球方法成功建立了气虚血瘀证冠脉微血管疾病大鼠模型。一般指标、血液流变学、血清心肌酶、心功能等体现出了临床气虚血瘀证及冠脉微血管疾病特征疾病一致的客观指标,充分证实了病证结合的动物模型可行性和可靠性,为中医药基础和临床研究提供有价值的实验数据。本研究也将应用系统生物学、微

血管功能与形态及气-脉-血等各种观察指标,从基础到临床等各方面对证候模型以及相应方药药效及作用机制进行深入探索。

参 考 文 献(References)

- [1] 张运,陈韵岱,傅向华,等. 冠状动脉微血管疾病诊断和治疗的中国专家共识 [J]. 中国循环杂志, 2017, 32(5): 421-430.
Zhang Y, Chen YD, Fu XH, et al. China expert consensus on diagnosis and treatment of coronary microvascular disease [J]. Chin Circ J, 2017, 32(5): 421-430.
- [2] Vancheri F, Longo G, Vancheri S, et al. Coronary microvascular dysfunction [J]. J Clin Med, 2020, 9(9): 2880.
- [3] Deng J. Research progress on the molecular mechanism of coronary microvascular endothelial cell dysfunction [J]. Int J Cardiol Heart Vasc, 2021, 34: 100777.
- [4] 黄爱玲,姚方方,张泉,等. 冠脉慢血流导致胸痹心痛的临床证候观察及分析 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14(9): 152-153.
Huang AL, Yao FF, Zhang Q, et al. Observation and analysis of clinical syndromes of chest pain and heartache caused by slow coronary flow [J]. Asia-Pacific Tradit Med, 2018, 14(9): 152-153.
- [5] Yang Z, Lin S, Liu Y, et al. Traditional Chinese medicine in coronary microvascular disease [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 929159.
- [6] Taqueti VR, di Carli MF. Coronary microvascular disease pathogenic mechanisms and therapeutic options: JACC state-of-the-art review [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(21): 2625-2641.
- [7] Sun YH, Su Q, Li L, et al. Expression of p53 in myocardium following coronary microembolization in rats and its significance [J]. J Geriatr Cardiol, 2017, 14(5): 292-300.
- [8] 黄烁,刘建勋,李磊,等. 4 种冠心病气虚血瘀证大鼠模型建立方法的比较 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4216-4225.
Huang S, Liu JX, Li L, et al. Comparison of 4 types of coronary heart disease model of Qi deficiency and bloodstasis syndrome in rats [J]. Chin J Chin Mater Med, 2016, 41(22): 4216-4225.
- [9] 任建勋,尹春园,史雅红,等. 睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎建立心力衰竭气虚血瘀证大鼠模型的评价 [J]. 中医杂志, 2020, 61(5): 428-434.
Ren JX, Yin CY, Shi YH, et al. Evaluation on sleep deprivation combined with left anterior descending coronary artery ligation to establish rat model of heart failure with qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 61(5): 428-434.
- [10] 李磊,孟红旭,付建华,等. 两种造模方法建立大鼠冠脉微循环障碍模型比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 20-26.
Li L, Meng HX, Fu JH, et al. Comparative study of the establishment of rat coronary microvascular dysfunction models

- [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 20-26.
- [11] 李磊, 林成仁, 任建勋, 等. 小型猪痰瘀互结证冠心病证候诊断研究 [J]. 世界中医药, 2013, 8(10): 1132-1136.
- Li L, Lin CR, Ren JX, et al. Research on symptoms for coronary heart disease model of mini swine with phlegm-stasis syndrome type [J]. World Chin Med, 2013, 8(10): 1132-1136.
- [12] Task Force Members, Montalescot G, Sechtem U, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease; the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology [J]. Eur Heart J, 2013, 34(38): 2949-3003.
- [13] Thakker RA, Rodriguez Lozano J, Rodriguez Lozano P, et al. Coronary microvascular disease [J]. Cardiol Ther, 2022, 11(1): 23-31.
- [14] 李磊, 刘建勋, 任建勋, 等. 冠状动脉微循环功能障碍动物模型及中医药防治研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 254-258.
- Li L, Liu JX, Ren JX, et al. Advances in animal model and traditional Chinese medicine prevention in coronary microvascular dysfunction [J]. Chin J Chin Mater Med, 2017, 42(2): 254-258.
- [15] Berry C, Duncker DJ. Coronary microvascular disease: the next frontier for cardiovascular research [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(4): 737-740.
- [16] 李磊, 孟红旭, 辛高杰, 等. 双参宁心胶囊对冠状动脉微循环障碍大鼠心脏功能及血流动力学的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(22): 41-50.
- Li L, Meng HX, Xin GJ, et al. Effects of Shuangshen ningxin capsule on cardiac function and hemodynamics in rats with coronary microcirculatory disorder [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(22): 41-50.
- [17] 苏斌杰, 程劲松, 魏毅东, 等. 冠状动脉微血管疾病诊治进展 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2018, 20(3): 334-336.
- Su BJ, Cheng JS, Wei YD, et al. Progress in diagnosis and treatment of coronary microvascular diseases [J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2018, 20(3): 334-336.
- [18] 史雅红, 任建勋, 刘建勋, 等. 睡眠剥夺诱导的大鼠血瘀证对血小板活化影响的研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3341-3345.
- Shi YH, Ren JX, Liu JX, et al. Effect of blood stasis syndrome induced by sleep deprivation on platelet activation in rats [J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 43(16): 3341-3345.
- [19] 陈进成, 刘建勋, 马博, 等. 气虚血瘀证大鼠模型的建立与评价 [J]. 中医杂志, 2020, 61(3): 229-234.
- Chen JC, Liu JX, Ma B, et al. Establishment and evaluation of rat model of qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 61(3): 229-234.

[收稿日期] 2023-04-06

王淑敏,郝淑兰,冯玛莉,等. 长春瑞滨诱导化疗性静脉炎大鼠模型的构建和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1539–1544.

Wang SM, Hao SL, Feng ML, et al. Construction and evaluation of a chemotherapeutic phlebitis rat model induced by vinorelbine via the dorsalis pedis vein [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1539–1544.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.003

长春瑞滨诱导化疗性静脉炎大鼠模型的构建和评价

王淑敏¹, 郝淑兰¹, 冯玛莉¹, 姜萌¹, 王永辉², 高振飞², 王晞星^{1*}, 吉海杰^{1*}

(1. 山西省中医药研究院, 山西省中医院, 太原 030012; 2. 山西中医药大学, 太原 030619)

【摘要】 目的 构建一种经大鼠足背静脉注射长春瑞滨注射液诱导的化疗性静脉炎动物模型及评价体系。**方法** 大鼠随机分为空白组和 4 个不同浓度长春瑞滨模型组, 经后肢足背静脉注射 0.1 mL 生理盐水设为空白组, 其余大鼠则分别注射等体积的 2、3、4 和 5 mg/mL 长春瑞滨溶液, 每日测量患肢体积并计算肿胀率, 连续 7 d, 末次处死动物取病灶足背静脉组织, 采用苏木精-伊红 (HE) 染色法观察组织学改变, 同时扫描电镜观察内膜表面微观结构变化。**结果** 经足背静脉注射 2、3、4、5 mg/mL 长春瑞滨溶液可明显诱发大鼠后肢肿胀, 且肿胀率随浓度递增而加剧, 同时各浓度组均在第 3 天达峰值; 第 7 天静脉炎分级显示 2 mg/mL 组 50% 大鼠成模, 3 mg/mL 组为 83.3%, 而 4 mg/mL 组和 5 mg/mL 组大鼠 100% 造模成功, 其中 4 mg/mL 组Ⅲ级为 66.6%, 5 mg/mL 组Ⅳ级占 83.3%; HE 染色可见静脉周围组织随长春瑞滨溶液浓度增加呈现炎性细胞浸润、管壁增厚、管腔狭窄及血栓, 扫描电镜也显示静脉内皮细胞紧密连接破坏, 内膜表面粗糙且粘附血细胞。**结论** 经大鼠足背静脉注射 0.1 mL 的 3 ~ 5 mg/mL 长春瑞滨溶液可见局部红、肿及条索状静脉, 甚至皮肤溃烂, 静脉周围组织炎性细胞浸润, 静脉壁增厚、管腔狭窄及血栓形成, 静脉内膜表面粗糙且粘附血细胞, 基本符合临床化疗性静脉炎特征。

【关键词】 化疗性静脉炎; 大鼠; 足背静脉; 长春瑞滨

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1539-06

Construction and evaluation of a chemotherapeutic phlebitis rat model induced by vinorelbine via the dorsalis pedis vein

WANG Shumin¹, HAO Shulan¹, FENG Mali¹, JIANG Meng¹, WANG Yonghui²,
GAO Zhenfei², WANG Xixing^{1*}, JI Haijie^{1*}

(1. Shanxi Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Shanxi Traditional Chinese Medical Hospital, Taiyuan 030012, China. 2. Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619)

Corresponding author: WANG Xixing. E-mail: wangxx315@163.com; JI Haijie. E-mail: jihaijie82@hotmail.com

【Abstract】 Objective To establish and evaluate chemotherapeutic phlebitis model rats induced by vinorelbine via the dorsalis pedis vein. **Methods** Rats were divided randomly into control and 4 different concentration of vinorelbine-

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (81973672), 山西省科技创新人才团队专项资助 (202204051001032), 山西省基础研究计划 (202203021221291), 山西中医药大学科技创新团队 (2022TD2005)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81973672), the Special Fund for Science and Technology Innovation Team of Shanxi Province (202204051001032), Fundamental Research Program of Shanxi Province (202203021221291), Scientific and Technological Innovation Team of Shanxi University of Chinese Medicine (2022TD2005)。

【作者简介】 王淑敏 (1995—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药有效性安全性评价。Email: 2983027580@qq.com

【通信作者】 王晞星 (1959—), 男, 主任医师, 研究方向: 中医药防治肿瘤病临床与基础研究。Email: wangxx315@163.com;

吉海杰 (1982—), 男, 博士, 主任药师, 研究方向: 中药药效物质基础及机制研究。Email: jihaijie82@hotmail.com。

* 共同通信作者

induced model groups. Control rats were injected with 0.1 mL normal saline via the dorsalis pedis vein of the hind limb, while other rats were injected with different concentrations of vinorelbine (2, 3, 4, 5 mg/mL), as above. General observations were performed and the hind limb volume was measured daily for 7 consecutive days to calculate the swelling rate. The rats were then killed and histological changes in the dorsalis pedis vein were observed by hematoxylin and eosin staining. Microstructural changes on the surface of the vascular endometrium were observed by scanning electron microscopy. **Results** Injection of 2, 3, 4, 5 mg/mL vinorelbine via the dorsalis pedis vein significantly induced hind limb swelling in a concentration-dependent manner, peaking on day 3 in each group. The phlebitis rates on day 7 were 50% in the 2 mg/mL group and 83.3% in the 3 mg/mL group. Phlebitis was also induced in the 4 mg/mL and 5 mg/mL groups, including grade III in 66.6% and grade IV in 83.3%. Histopathology showed inflammatory cell infiltration, wall thickening, lumen stenosis, and thrombosis in the tissues surrounding the veins. Scanning electron microscopy showed destruction of tight junctions of venous endothelial cells, and a rough surface of the vascular lining, resulting in blood cell adhesion. **Conclusions** Injection of 0.1 mL of 3 ~ 5 mg/mL vinorelbine via the dorsalis pedis vein could induce red, swollen, and cord-like veins, as well as infiltration of inflammatory cells around the vein, thickened vein walls, lumen stenosis, and thrombosis. In addition, the surface of the venous intima was rough and adhered to numerous blood cells. All these features are consistent with those of clinical chemotherapeutic phlebitis in terms of the symptoms and pathological structure.

【Keywords】 chemotherapeutic phlebitis; rats; dorsalis pedis vein; vinorelbine

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

化疗性静脉炎是经静脉滴注发疱剂或强刺激性药物后出现的局部并发症,临床表现为疼痛、红肿、硬化,甚至静脉条索状,严重者可见静脉栓塞、组织坏死^[1]。抗肿瘤药物多属于发疱剂或具有强刺激性,如长春瑞滨、长春新碱及 5-氟脲嘧啶等^[2-4],肿瘤患者发生化疗性静脉炎不仅增加其心理负担与身体痛苦,而且严重的可影响到化疗方案的有序进行。因此,开展化疗性静脉炎的病理生理机制研究十分迫切,其中动物模型是不可或缺的重要研究工具。

目前化疗性静脉炎动物模型多经兔耳缘静脉^[5-7]和小鼠尾静脉^[8-9]注射刺激药物诱导,兔耳缘静脉表浅清晰,覆毛少,利于操作和观察,但实验兔获得不易及成本昂贵,而小鼠尾静脉细且走行较深,表面覆盖环状角质鳞片不易穿刺。此外,经大鼠皮下^[10]或猪真皮皮下^[11]注射阿霉素类药物亦可复制。总体来看,目前化疗性静脉炎动物模型与临床表现特征仍存在差距^[12],因此,建立一种复制方法简便、症状稳定且更接近临床特征的化疗性静脉炎实验动物模型具有重要意义。

大鼠足背静脉相较于兔耳缘静脉和小鼠尾静脉具有表浅清晰的特点,易于操作,同时易于获得且成本低廉。基于此,本研究经大鼠足背静脉注射长春瑞滨溶液,以静脉炎分级、患肢肿胀率、静脉组织病理学及内膜微观结构为评价指标,以期构建符合临床特征且方法简便的化疗性静脉炎动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,9 ~ 10 周龄,体重 300 ~ 320 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度控制在 40% ~ 50%,温度控制在 22 ~ 25℃,自由进食饮水,饲养于山西中医药大学屏障动物实验室【SYXK(晋)2020-0006】。所有动物实验操作经山西省中医药研究院实验动物伦理委员会审查(SZYLY2022KY-0302)。

1.1.2 主要试剂与仪器

酒石酸长春瑞滨注射液(江苏连云港豪森制药有限公司,批号 600210701);0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司,批号 A22061401);异氟烷(上海迈瑞尔化学技术有限公司,批号 45612875);多聚甲醛(上海麦克林生化科技有限公司,批号 C10397666);戊二醛固定液(南京森贝伽生物科技有限公司,批号 20211221)。

异氟烷小动物麻醉系统(Harvard,美国);足趾容积测量仪(成都泰盟科技有限公司,中国);石蜡切片机(Thermo Scientific,美国);组织包埋仪(湖北泰康医疗设备有限公司,中国);正置显微镜(Olympus 公司,日本);扫描电镜(HITACHI 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 模型制作

将 30 只大鼠随机分为空白组,长春瑞滨溶液 2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL 和 5 mg/mL 组,每组 6 只,脱毛膏脱去后肢一侧毛发,备好皮。次日,将大鼠置入小动物吸入麻醉机给予 2% 异氟烷麻醉,橡皮筋结扎大鼠后肢根部,75% 乙醇擦拭足背,使静脉充分暴露。在足背部距大鼠第四掌指关节 1 cm 处用甲紫溶液标记,0.45 mm × 15 mm 输液针行静脉穿刺术。除空白组注射 0.1 mL 生理盐水外,其余 4 组则分别注射相应浓度长春瑞滨溶液。药物注射成功后,按压进针口保留 5 min 后松开橡皮筋,继续按压直至无血液及药物外渗。每日测量患肢容积计算肿胀率,持续 7 d,末次观察结束后处死动物取足背静脉进行组织病理学观察,同时扫描电镜观察静脉内膜表面微观结构。

1.2.2 静脉炎分级

记录动物大体情况、注射静脉颜色改变、局部组织肿胀及消退情况,参考美国护理学会 2021 年版《输液治疗护理实践标准》静脉炎分级标准,0 级:没有症状;Ⅰ级:穿刺点局部发红;Ⅱ级:局部红斑或水肿;Ⅲ级:红斑、水肿,条索状静脉形成;Ⅳ级:红斑、水肿显著,条索状静脉形成、局部有溃烂或有脓液流出。

1.2.3 患肢肿胀率

每日测量处理侧后足-踝关节上 2 cm 体积,并计算肿胀率,计算公式:肿胀率(%) = (造模后容

积-造模前初始容积)/造模前初始容积 × 100%。

1.2.4 苏木精-伊红(HE)染色

取后肢组织浸入 4% 多聚甲醛溶液固定,常规脱水、透明、石蜡包埋、切片,HE 染色,正置显微镜拍照,观察切片内皮细胞脱落、炎性细胞浸润及血栓情况。

1.2.5 血管内膜微观结构观察

处死动物后立即取足背静脉,置于 2% 戊二醛磷酸缓冲液中固定,制备电镜超薄标本,扫描电镜下观察血管内膜超微结构。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件处理数据,肿胀率用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,静脉炎分级采用 Kruskal-Wallis 单因素方差分析,以 *P* < 0.05 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 不同浓度长春瑞滨溶液诱导肿胀率比较

实验期间空白组大鼠经后肢足背静脉注射生理盐水无肿胀发生,而不同浓度长春瑞滨溶液组大鼠后肢则出现不同程度肿胀。如表 1 所示,注射后第 1 天各浓度组肿胀率与空白组比较均明显升高,且随浓度递增而肿胀加剧,同时均在第 3 天达到峰值,其中长春瑞滨溶液 3 mg/mL 组、4 mg/mL 组和 5 mg/mL 组肿胀率分别为 61.76% ± 7.98%、83.75% ± 12.60% 和 132.80% ± 18.92%,第 5 天肿胀率则略有降低,至第 7 天肿胀率仍均大于 50%。

表 1 不同浓度长春瑞滨溶液诱导肿胀率比较(*n* = 6,%)

Table 1 Comparison of swelling rates induced by different concentration of vinorelbine(<i>n</i> = 6,%)				
组别 Groups	第 1 天 Day 1	第 3 天 Day 3	第 5 天 Day 5	第 7 天 Day 7
空白组 Control group	2.76 ± 0.53	2.12 ± 0.47	2.98 ± 0.65	2.82 ± 0.46
2 mg/mL 组 2 mg/mL group	15.39 ± 2.46**	33.01 ± 4.85***	19.39 ± 7.69**	21.25 ± 5.52**
3 mg/mL 组 3 mg/mL group	39.44 ± 6.38***	61.76 ± 7.98***	54.17 ± 7.16***	50.57 ± 12.07***
4 mg/mL 组 4 mg/mL group	58.95 ± 10.95***	83.75 ± 12.60***	75.35 ± 16.23***	73.20 ± 11.69***
5 mg/mL 组 5 mg/mL group	95.82 ± 14.67***	132.80 ± 18.92***	117.96 ± 22.89***	99.60 ± 15.01***

注:与空白组相比,***P* < 0.01,****P* < 0.001。(下表同)
Note. Compared with the control group,***P* < 0.01,****P* < 0.001. (The same in the following tables)

2.2 不同浓度长春瑞滨溶液诱导静脉炎分级比较

第 7 天大鼠患肢如图 1 所示,空白组大鼠后肢皮肤完整且无红肿,长春瑞滨溶液 2 mg/mL 组后肢

发红且有轻微肿胀,3 mg/mL 组后肢发红、有轻微肿胀和沿静脉走向的条索状改变,4 mg/mL 组后肢发红、肿胀,皮肤结痂及蜕皮,5 mg/mL 组后肢肿胀较

严重且皮肤出现蜕皮、溃烂及脓液流出。

静脉炎分级结果如表 2 所示,空白组大鼠均为 0 级;2 mg/mL 组 50% 大鼠为 I 级静脉炎,其余基本恢复正常;3 mg/mL 组大鼠 I 级、II 级和 III 级静脉炎分别占 33.3%、33.3% 和 16.7%;4 mg/mL 组 II 级、III 级和 IV 级静脉炎分别占 16.6%、66.6% 和 16.7%;5 mg/mL 组以 IV 级静脉炎为主,占 83.3%。与空白组相比,4 mg/mL 组和 5 mg/mL 组均具有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

2.3 组织病理学观察

第 7 天实验结束时处死动物取足背静脉行 HE

染色,结果如图 2 所示,正常大鼠足背静脉血管内膜完整,内皮细胞排列整齐;2 mg/mL 组血管周围组织轻微水肿,管壁略增厚,血管内膜较完整,少量炎性细胞浸润;3 mg/mL 组血管周围组织水肿,管壁增厚,管腔狭窄,内膜不规则破溃,大量炎细胞浸润;4 mg/mL 组血管周围组织水肿,大量炎细胞浸润,内膜纤维性增生向管腔内凸起,管腔未完全闭塞但聚集大量血细胞;5 mg/mL 组管腔内可见血栓形成,管腔几乎闭塞,内膜不规则破溃,内皮细胞脱落,管壁增厚,并伴有大量炎性细胞浸润,血管周围组织水肿严重。

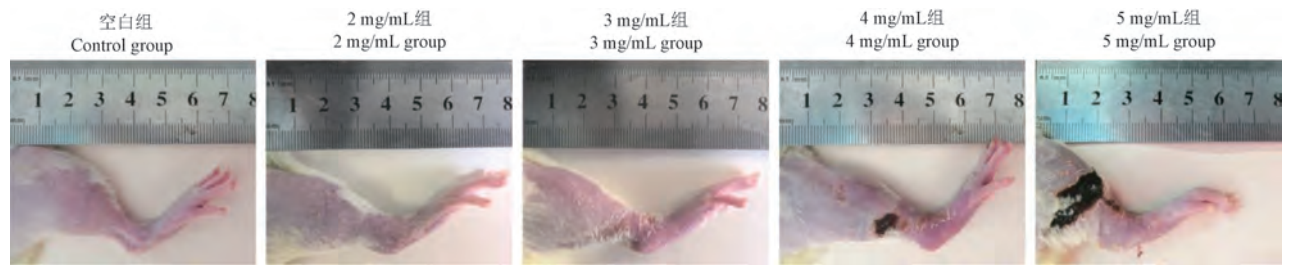
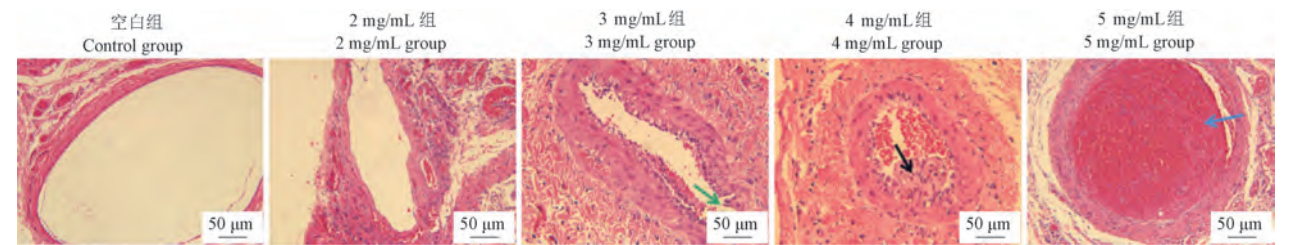


图 1 不同浓度长春瑞滨溶液诱导静脉炎典型特征(第 7 天)
Figure 1 Typical features of phlebitis induced by different concentration of vinorelbine (Day 7)

表 2 不同浓度长春瑞滨溶液诱导大鼠静脉炎分级比较($n = 6$,第 7 天)

Table 2 Grade of ascending concentration of vinorelbine-induced phlebitis in rats($n = 6$, Day 7)

组别 Groups	0 级 Grade 0	I 级 Grade I	II 级 Grade II	III 级 Grade III	IV 级 Grade IV	<i>H</i>	<i>P</i>
空白组 Control group	6(100.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)		
2 mg/mL 组 2 mg/mL group	3(50.0%)	3(50.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)		1.000
3 mg/mL 组 3 mg/mL group	1(16.7%)	2(33.3%)	2(33.3%)	1(16.7%)	0(0.0%)	24.538	0.743
4 mg/mL 组 4 mg/mL group	0(0.0%)	0(0.0%)	1(16.7%)	4(66.6%)	1(16.7%)		0.002**
5 mg/mL 组 5 mg/mL group	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	1(16.7%)	5(83.3%)		0.000***



注:绿色箭头;内膜不规则破溃;黑色箭头;内膜纤维性增生向管腔内凸起;蓝色箭头;血栓。

Note. Green arrow. Irregular rupture of the inner membrane. Black arrow. Intimal fibrous hyperplasia bulges into the lumen. Blue arrow. Thrombosis.

图 2 足背静脉组织病理学比较
Figure 2 Histopathological comparison of dorsalis pedis vein

2.4 模型大鼠足背静脉微观结构观察

扫描电镜结果如图 3 所示,正常血管内膜可见纵行内皮细胞长轴,表面完整光滑,2 mg/mL 组可见内皮细胞紧密连接轻微破坏,内膜表面出现破损以

及剥脱,3 mg/mL 组血管内膜表面受损,有少量细胞聚集,4 mg/mL 组血管内膜局部粘附红细胞等血细胞;5 mg/mL 组血管内膜大面积受损,表面粗糙且粘附有血细胞。

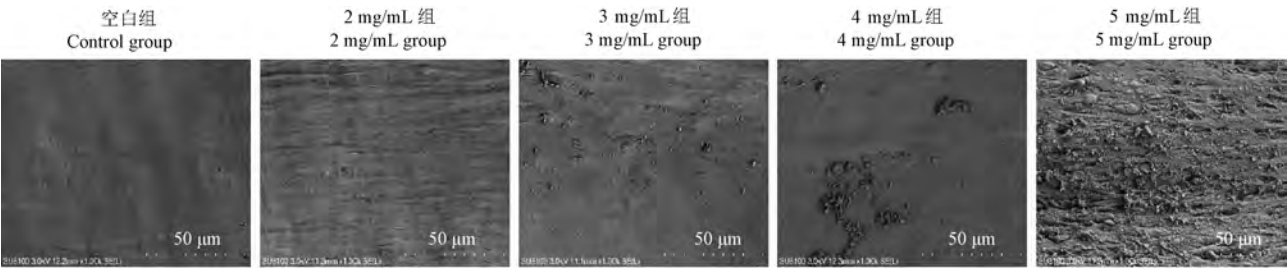


图 3 足背静脉内膜微观结构改变(× 1000)
Figure 3 Changes in the microstructure of the dorsalis pedis vein lining (× 1000)

3 讨论

长春瑞滨作为发泡性化疗药物的代表,主要用于非小细胞肺癌、乳腺癌及卵巢癌等肿瘤,而化疗性静脉炎和血液学毒性是其临床治疗中最常见的不良反应^[13]。长春瑞滨临床推荐使用剂量为 25 ~ 30 mg/m²^[14],急性毒性研究表明小鼠和大鼠静脉给药半数致死剂量(LD₅₀)分别为 38 mg/kg 和 11.2 mg/kg^[15],可见不同种属动物对长春瑞滨耐受差异较大。本研究前期考察了不同剂量长春瑞滨对大鼠造血系统的影响,发现单次静脉注射 6 mg/kg 长春瑞滨溶液 1 d 后大鼠外周血白细胞计数已明显减少并持续降低,直至 7 d 仍未能恢复至正常生理水平,同时大鼠体重明显减轻,而 3 mg/kg 长春瑞滨溶液未见明显血液毒性且体重变化不明显。本研究在此基础上比较注射 0.1 mL 不同浓度长春瑞滨溶液诱导的静脉炎症状,其中最大浓度 5 mg/mL 长春瑞滨溶液经换算后的剂量为 1.5 mg/kg,以确保在安全剂量下构建大鼠局部静脉炎模型。

目前多采用兔耳缘静脉和小鼠尾静脉构建化疗性静脉炎动物模型,兔耳富含胶原蛋白和软骨组织,而小鼠尾表面覆盖环状角质鳞片且胶原蛋白丰富,同时兔耳和鼠尾缺乏肌肉软组织,不能较好地模拟临床化疗性静脉炎症状。大鼠足背静脉表浅清晰且其肢体含有丰富肌肉软组织,为此本研究探索经大鼠足背静脉注射长春瑞滨溶液构建静脉炎模型,结果表明注射后第 1 天大鼠患肢即明显肿胀,且随长春瑞滨溶液浓度递增而愈发严重,第 3 天肿胀率达峰,至第 7 天 3 ~ 5 mg/mL 组大鼠患肢肿胀率仍大于 50%,肉眼可观察到 3 mg/mL 组大鼠后

肢有轻微肿胀和静脉条索状改变,以 I 级、II 级静脉炎为主,4 mg/mL 组后肢肿胀、皮肤结痂及蜕皮,以 III 级静脉炎为主,而 5 mg/mL 组后肢肿胀严重且皮肤蜕皮、溃烂及脓液流出,以 IV 级静脉炎为主。上述结果表明经大鼠后肢足背静脉注射 0.1 mL 的 3 ~ 5 mg/mL 长春瑞滨溶液可成功诱导化疗性静脉炎模型。

血管内皮细胞是覆盖于血管内膜表面的单层扁平或多角形的细胞,其可合成、分泌和活化多种血管生物活性物质,在调节血管张力与血流、维持纤溶凝血系统平衡、防止血小板聚集等方面具有重要作用^[16]。化疗性静脉炎的病理学表现为受损静脉淤血,白细胞聚集并大量附着于血管内表面,血管周围组织水肿等^[17]。本研究表明长春瑞滨溶液诱导化疗性静脉炎组织病理学改变随药物浓度增加改变趋于严重,静脉内皮细胞脱落,管壁增厚甚至内膜向管腔凸起增生,造成管腔狭窄,同时可见大量血细胞甚至血栓形成。扫描电镜可见静脉内皮细胞紧密连接破坏,内膜出现破损甚至大面积剥脱,表面粗糙且粘附有大量血细胞团块。

综上,本研究经大鼠后肢足背静脉注射 0.1 mL 的 3 ~ 5 mg/mL 长春瑞滨溶液局部可见红、肿及条索状静脉等症状,组织病理学可见静脉周围炎性细胞浸润,静脉壁增厚、管腔狭窄及血栓形成,同时微观可见静脉内膜表面缺损且粗糙、粘附大量血细胞等,在症状及组织病理学等方面可模拟临床化疗性静脉炎特征,具有复制方法简单、稳定性良好且成本低廉的优点,是一种可推广应用的化疗性静脉炎动物模型,为今后其发病机制及药物开发提供了良好的研究工具。

参 考 文 献(References)

- [1] Gorski LA, Hadaway L, Hagle ME, et al. Infusion therapy standards of practice [J]. J Infus Nurs, 2021, 44: S1-S224.
- [2] 魏秋红, 刘晓月, 王盼, 等. 抗肿瘤药物的分类和药效学研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(18): 3707-3711, 3716.
- Wei QH, Liu XY, Wang P, et al. Research progress on classification and pharmacodynamics of anti-tumor drugs [J]. Med Recapitul, 2020, 26(18): 3707-3711, 3716.
- [3] 于玲, 姜桂春, 苏兰若, 等. 三种外用药物预防 5-氟尿嘧啶持续泵入所致外周化疗性静脉炎的临床效果 [J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(7): 610-613.
- Yu L, Jiang GC, Su LR, et al. Clinical efficacy of three kinds of topical drug on preventing peripheral chemotherapeutic phlebitis caused by continuous infusion of 5-fluorouracil [J]. J Chin Med Univ, 2015, 44(7): 610-613.
- [4] 邱腾颖, 蔡金宝, 史和秀, 等. 长春新碱致兔耳缘化疗性静脉炎模型的建立 [J]. 药学服务与研究, 2015, 15(1): 56-59.
- Qiu TY, Cai JB, Shi HX, et al. Development of a rabbit model of chemotherapeutic phlebitis induced by vincristine [J]. Pharm Care Res, 2015, 15(1): 56-59.
- [5] 王红, 吴婷婷, 卢慧芳, 等. 长春瑞滨化疗性静脉炎动物模型的建立 [J]. 护理学杂志, 2014, 29(17): 19-21.
- Wang H, Wu TT, Lu HF, et al. An animal model of vinorelbine induced phlebitis [J]. J Nurs Sci, 2014, 29(17): 19-21.
- [6] Huang L, Chen G, Hu Q, et al. Construction of a rabbit model with vinorelbine administration via peripherally inserted central catheter and dynamic monitoring of changes in phlebitis and thrombosis [J]. Exp Ther Med, 2022, 23(3): 212.
- [7] Ge GF, Shi WW, Yu CH, et al. Baicalein attenuates vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury and chemotherapeutic phlebitis in rabbits [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 318: 23-32.
- [8] Yu N, Zhang SK, Chen J, et al. Mitigation of Qingluotongmai pills on chemotherapy-induced phlebitis: a network pharmacology study and experimental validation [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2022, 2022: 1.
- [9] Liu P, Ye L, Ren Y, et al. Chemotherapy-induced phlebitis via the GBP5/NLRP3 inflammasome axis and the therapeutic effect of aescin [J]. Br J Pharmacol, 2023, 180(8): 1132-1147.
- [10] 郭艳华, 郑晓春, 陈彦青. 低浓度阿霉素皮内注射对大鼠皮肤影响的实验观察 [J]. 福建医药杂志, 2014, 36(6): 78-79.
- Guo YH, Zheng XC, Chen YQ. Experimental observation on the effect of low concentration adriamycin intradermal injection on rat skin [J]. Fujian Med J, 2014, 36(6): 78-79.
- [11] Hajarizadeh H, Lebreto L, Barrie R, et al. Protective effect of doxorubicin in vitamin C or dimethyl sulfoxide against skin ulceration in the pig [J]. Ann Surg Oncol, 1994, 1(5): 411-414.
- [12] 周映伽, 沈红梅, 赵丽, 等. 化疗性静脉炎动物实验模型研究概况 [J]. 医学综述, 2019, 25(19): 3813-3817.
- Zhou YJ, Shen HM, Zhao L, et al. Survey of experimental models of chemotherapeutic phlebitis [J]. Med Recapitul, 2019, 25(19): 3813-3817.
- [13] Mondal A, Gandhi A, Fimognari C, et al. Alkaloids for cancer prevention and therapy: current progress and future perspectives [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 858: 172472.
- [14] 刘花, 陈延绅, 尤慧柠, 等. 长春瑞滨药动学及毒副作用研究进展 [J]. 中国药房, 2022, 33(11): 1403-1408.
- Liu H, Chen YS, You HN, et al. Research progress on pharmacokinetics and toxicity of vinorelbine [J]. Chin Pharm, 2022, 33(11): 1403-1408.
- [15] 张洪瑶, 贾飞, 钱璟, 等. 以斑马鱼为模型评价酒石酸长春瑞滨注射用乳剂与水针剂的毒性 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(24): 2773-2779.
- Zhang HY, Jia F, Qian J, et al. Evaluation of the toxicity of vinorelbine bitartrate injectable emulsion and VRL aqueous injection in zebrafish [J]. Chin J New Drugs, 2016, 25(24): 2773-2779.
- [16] Aird WC. Endothelium as an organ system [J]. Crit Care Med, 2004, 32(5): S271-S279.
- [17] Wang Z, Ma L, Wang X, et al. Cimetidine attenuates vinorelbine-induced phlebitis in mice by militating E-selectin expression [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2014, 74(2): 239-247.

[收稿日期] 2023-05-13

谢海纳,潘志强,曹琳娜. 双侧卵巢切除术和他莫昔芬给药诱发的潮热模型大鼠证候评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1545-1554.

Xie HN, Pan ZQ, Cao LN. Evaluation of hot-flash model rats induced by bilateral oophorectomy and tamoxifen administration [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1545-1554.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.004

双侧卵巢切除术和他莫昔芬给药诱发的潮热模型大鼠证候评价

谢海纳,潘志强*,曹琳娜

(上海中医药大学中医学院,上海 201203)

【摘要】 目的 探索用于妇女潮热现象研究的证候动物模型。**方法** 24 只雌性 SD 大鼠随机分为假手术组、双侧卵巢切除组和他莫昔芬组,每组 8 只,分别采用双侧卵巢切除术和灌胃 10 mg/(kg·d)他莫昔芬模拟两种潮热动物模型。在造模第 14 和 28 天,检测大鼠旷场活动、肛温、体表红外热像图等表征信息。第 29 天处死大鼠,取子宫称重并制作病理切片;ELISA 检测血液雌二醇与儿茶酚胺类物质含量;RT-qPCR 检测肾上腺性激素合成酶(Star、Cyp11a1、Cyp17a1、Cyp19a1、Por、Hsd3b2、Hsd17b1)基因表达,肾上腺髓质儿茶酚胺物质合成酶(Th、Ddc、Dbh、Pnmt)基因表达。**结果** 与假手术组相比,双侧卵巢切除组大鼠体重增长显著($P < 0.01$),而他莫昔芬组大鼠体重增长缓慢。双侧卵巢切除组大鼠体表最高温度在第 28 天显著下降($P < 0.01$),类似于阳虚表现,而其腹部最高温度与最低温度之差在第 14 天显著升高($P < 0.05$)、背部最高温度与最低温度之差在第 28 天显著升高($P < 0.01$),类似于内热表象,且大鼠旷场活动度下降($P < 0.01$),类似于精气不足表现;他莫昔芬组大鼠给药 14 d 其体表最高温度显著下降($P < 0.01$),但大鼠旷场活动度上升($P < 0.01$)。两种造模方式均导致大鼠子宫指数呈明显下降($P < 0.01$)。与假手术组相比,双侧卵巢切除组和他莫昔芬组 E2 均显著下降($P < 0.01$),NE、Epi 均呈降低趋势($P < 0.05$),双侧卵巢切除组 β -EP 也明显下降($P < 0.05$);与假手术组相比,双侧卵巢切除大鼠肾上腺 Cyp11a1 基因表达显著上升($P < 0.05$),而 Cyp17a1 与 Hsd17b1 基因表达显著下降($P < 0.05$);他莫昔芬组 Star 与 Por 基因表达显著上升($P < 0.01$),而 Cyp17a1 基因表达量明显下降($P < 0.01$);双侧卵巢切除组 Pnmt 基因表达显著下调($P < 0.01$)。**结论** 双侧卵巢切除 SD 大鼠可以用于围绝经期潮热的研究,其证候特征类似于中医的肾阳不足兼阴虚内热。

【关键词】 潮热;双侧卵巢切除;他莫昔芬;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1545-10

Evaluation of hot-flash model rats induced by bilateral oophorectomy and tamoxifen administration

XIE Haina, PAN Zhiqiang*, CAO Linna

(School of Traditional Chinese Medical, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: PAN Zhiqiang. E-mail: pzq527@163.com

【Abstract】 Objective To explore the animal model of syndrome used in the study of hot flash phenomenon in women. **Methods** Twenty-four female SD rats were divided randomly into three groups: Con group, Ovx group, and

【基金项目】上海市科委项目(19140905000)。

Funded by Shanghai Science and Technology Commission Project (19140905000).

【作者简介】谢海纳(1994—),女,在读博士研究生,研究方向:中医基础实验研究。Email:xhn2021@163.com

【通信作者】潘志强(1977—),男,教授,博士,博士生导师,研究方向:实验中医教学与中医基础实验研究。Email:pzq527@163.com

tamoxifen group ($n = 8$ rats per group). Hot flashes were induced by bilateral oophorectomy and intragastric tamoxifen $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, respectively. Open-field activity, anal temperature, and body surface infrared thermograms were detected on model days 14 and 28. The rats were then killed on day 29 and their uteruses were removed, weighed, and sectioned. Blood estradiol and catecholamine levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Gene expression levels of adrenal sex hormone synthetases (Star, Cyp11a1, Cyp17a1, Cyp19a1, Por, Hsd3b2, Hsd17b1) and catecholamine synthetases (Th, Ddc, Dbh, Pnmt) in the adrenal medulla were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Results** Rat body weight was significantly higher in the Ovx group compared with Con group ($P < 0.01$), while body weight increased slowly in the tamoxifen group. The maximum body surface temperature was significantly decreased on day 28 in the Ovx group ($P < 0.01$), the difference between the maximum and minimum abdominal temperatures was significantly increased on day 14 ($P < 0.05$), the difference between the maximum and minimum temperatures on the back was significantly increased on day 28 ($P < 0.01$), and the open-field activity was decreased ($P < 0.01$). Compared with the sham operation group, the maximum body surface temperature in the tamoxifen group was significantly decreased ($P < 0.01$) but the open-field activity was increased ($P < 0.01$). The uterine index was significantly decreased in both models ($P < 0.01$). Estradiol levels were significantly decreased ($P < 0.01$) and NE and epinephrine were also significantly decreased in the Ovx group compared with Con group ($P < 0.05$), and β -EP was also significantly decreased in Ovx group ($P < 0.05$). Adrenal Cyp11a1 gene expression was significantly increased ($P < 0.05$) while Cyp17a1 and Hsd17b1 gene expression levels were significantly decreased ($P < 0.05$) in bilateral ovariectomized rats compared with Con group. Compared with Con group, gene expression levels of Star and Por were significantly increased ($P < 0.01$) while Cyp17a1 gene expression was significantly decreased ($P < 0.01$) in the tamoxifen group, and Pnmt gene expression was significantly down-regulated in Ovx group ($P < 0.01$). **Conclusions** Bilateral ovariectomized rats can be used for the study of perimenopausal hot flashes, which resemble kidney Yang and Yin deficiency in traditional Chinese medicine.

【Keywords】 hot flash; bilateral ovariectomy; tamoxifen; animal model

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

潮热是临床较常见的症状,主要发生于妇女围绝经期及乳腺癌内分泌治疗过程中^[1-2]。现代医学认为潮热发生与雌激素水平下降关系密切,激素补充治疗被公认为是治疗潮热的金标准,然而使用激素对乳腺、子宫内膜、心血管均存在潜在的风险^[3-4],患者普遍存在对激素制剂的恐惧和误解,降低了激素治疗的依从性。祖国传统中医学认为潮热与肝肾藏象有关,是阴虚证的表现^[5-6],中医药对改善潮热现象具有一定的优势,然而中药作用机制的阐明有赖于合适的动物模型。基于此,本研究以SD大鼠为受试对象,观察卵巢切除与灌胃他莫昔芬两种模型大鼠是否出现潮热现象及其可能的中医证候类型,为中药复方药效研究提供合适的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24只12周龄SPF级雌性SD大鼠,体重230~250g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2022-0004】。室温22~25℃,湿度

40%~70%,12h明暗交替,予以常规普通饲料喂养以及自由饮水,饲养于上海中医药大学实验动物中心SPF级饲养室【SYXK(沪)2020-0009】。本实验方案遵守上海中医药大学实验动物伦理委员会要求(PZSHUTCM220124016)。

1.1.2 主要试剂与仪器

他莫昔芬购自上海国药集团化学试剂有限公司(批号20220831);苏木素-伊红染色液购自上海碧云天生物技术有限公司(货号C0105M-1);RNAiso Plus、PrimeScript[®] RT reagent Kit、SYBR[®] Premix Ex Taq[™](TliRNaseH Plus)Ⅱ购自宝生物工程(大连)有限公司(B21703);大鼠ELISA试剂盒(E2、NE、Epi、 β -EP、DA、5-HT)购自BioSwamp(货号RA20666、RA20557、RA20337、RA20683、RA20050、RA20031);大鼠Star、Cyp11a1、Cyp17a1、Cyp19a1、Por、Hsd3b2、Hsd17b1、Th、Ddc、Dbh、Pnmt、Gapdh基因引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

旷场笼底部铺设透明塑料板(课题组自制),ThermaCAM P30红外热像仪(FLIR公司,美国),WMY-01数字温度计(上海),酶标仪(BioTek,美国),7500 Fast型实时荧光定量PCR仪(ABI,美国)。

1.2 方法

1.2.1 分组

雌性大鼠适应性饲养 1 周后,随机设置 3 组,分别为假手术组 8 只、双侧卵巢切除组 8 只、他莫昔芬组 8 只。

1.2.2 造模

将大鼠麻醉固定后,剃去腹部毛发,纵向切开后腹部皮肤约 1 cm,拨开皮肤和脂肪,在腹腔深处先找到大鼠子宫,形态呈“Y”形,再用组织镊沿着 Y 字子宫分叉处向上提出粉红色的团块,形状呈桑葚样,表面有不规则的结节,被周围的白色脂肪包裹。用手术线结扎输卵管后,剪去完整卵巢组织,随后将其余部分送入腹腔(假手术组仅剪去少量脂肪)。最后进行 2 层缝合,再用红霉素软膏涂抹伤口处消炎。术后第 2 天开始每天相同时间进行连续阴道涂片 5 d,光镜下观察涂片中细胞的形态、数量及分布,拍照,当镜下连续出现大量白细胞、且有核上皮细胞和无核上皮细胞数量较少时,类似于动情间期的表现,提示大鼠去势造模成功。确认去势成功之后,他莫昔芬组每日 9:00 采用他莫昔芬(10 mg/(kg·d))灌胃,假手术组灌胃等体积的灭菌水,持

续 28 d。
1.2.3 四诊指标检测

在造模前后分别称量大鼠体重,在他莫昔芬灌胃后 14、28 d 后,运用课题组创建的大鼠辨证论治实验方法学,检测大鼠体重、旷场实验、肛温、体表红外热像图等表征信息,具体参见本课题组以往文献^[7-8]。

1.2.4 组织切片及 HE 染色

将大鼠子宫称重并用 10% 甲醛溶液固定 24 h 后,按照组织切片常规的流程,进行组织脱水、透明、包埋、切片,苏木素-伊红染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察组织结构和细胞形态并采集图像。

1.2.5 RT-qPCR 检测肾上腺基因表达

取大鼠肾上腺,加入 RNAiso Plus 试剂抽提总 RNA。采用 Primer3(v.0.4.0)在线软件设计引物并委托 Life Technologies 公司合成(见表 1)。采用 PrimeScript RT 试剂盒进行逆转录反应生成 cDNA,反应体系为 20 μL,反应条件为 37℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃ 终止;PCR 扩增反应体系为 20 μL,反应程序为 95℃ 变性 3 min,95℃ 退火 30 s,60℃ 延伸 30 s,40 个循环。每组 3 个复孔,采用 2^{-ΔΔCt}法计算各目的基因的相对表达量。

表 1 大鼠上、下游引物序列

Table 1 Sequence of forward and reverse primer in rat			
基因 Genes	mRNA 序列号 Serial number	引物序列 Primer sequence	产物 (bp) Product size (bp)
Cyp11a1	NM_017286	F:5'-GCTGGAAGGTGTAGCTCAGG-3' R:5'-CACTGGTGTGGAACATCTGG-3'	224
Cyp17a1	NM_012753	F:5'-ACTGAGGGTATCGTGGATGC-3' R:5'-TCGAACCTTCTCCCTGCACTT-3'	161
Star	NM_031558	F:5'-CATCCAGCAAGGAGAGGAAG-3' R:5'-CACCTGGCACCACTTACTT-3'	122
Cyp19a1	NM_017085	F:5'-CAGAGTATCCGGAGGTGGAA-3' R:5'-ACTCGAGCCTGTGCATTCTT-3'	249
Por	NM_031576	F:5'-ACAGGGAACACCTGTGGAAG-3' R:5'-CTAGTGAGTAGCGGCCCTTG-3'	189
Hsd3b2	NM_017265	F:5'-ATCTGTTGGAGGCCTGTGTC-3' R:5'-AAGTATGCAATGTGCCACCA-3'	228
Hsd17b1	NM_012851	F:5'-GTTATGAGCAAGCCCTGAGC-3' R:5'-TCTGGATCCCCTGAAACTTG-3'	247
Th	NM_012740	F:5'-CAGGGCTGCTGTCTTCTAC-3' R:5'-GGGCTGTCCAGTACGTCAAT-3'	247
Ddc	NM_001270852	F:5'-CAGCTCCTACCCAGCTATGC-3' R:5'-TTTTAGTCCGAGCAGCCACT-3'	239
Dbh	NM_013158	F:5'-TCTGTGCCCTGGAACCTCTTT-3' R:5'-CTGCGGAAGTGATCTTAGGC-3'	145
Pnmt	NM_031526	F:5'-ATCATATCACGACGCTGCTG-3' R:5'-TACCCTTGACGTCATCCACA-3'	219
Gapdh	NM_017008	F:5'-TGCCACTCAGAAGACTGTGG-3' R:5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'	129

1.2.6 ELISA 检测血液雌二醇与儿茶酚胺类物质含量

取大鼠血液,离心机 3000 r/min 分离血清,按照 ELISA 试剂盒说明书方法,检测大鼠血液中 E2、NE、Epi、β-EP、DA、5-HT 含量。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析和作图。采用非配对 *t* 检验或 Mann-Whitney test 分析, *P* < 0.05 表示有统计学意义。

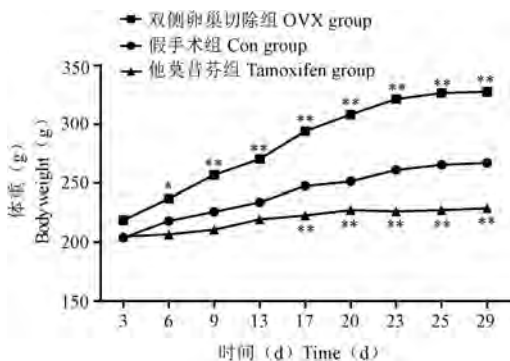
2 结果

2.1 大鼠体重的变化

假手术组大鼠体重平稳增长,与假手术组同期比较,术后第 6 天起双侧卵巢切除组大鼠体重增长显著(*P* < 0.05),而他莫昔芬组大鼠体重增长缓慢(*P* < 0.01),见图 1。提示卵巢切除后,大鼠雌激素快速匮乏,影响机体代谢过程导致肥胖现象;而给予抗雌激素药物他莫昔芬后,可能影响大鼠摄食量或促进蛋白质分解代谢,从而导致体重下降。

2.2 大鼠体温的变化

与假手术组相比,两种模型组大鼠肛温均无明显变化,提示采用肛温检测难以发现大鼠核心体温的敏感性变化。然而,就大鼠体表的红外温度而言,与假手术组相比,双侧卵巢切除组大鼠术后第 14 天其腹部最高温度与最低温度之差显著升高(*P* < 0.05);术后第 28 天背部最高温度与最低温度之



注:与假手术组相比, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01。(下同)
图 1 不同时间各组大鼠体重(*n* = 8)
Note. Compared with Con group, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01.
(The same in the following figures)

Figure 1 Body weight of rats in different time groups (*n* = 8)

差显著升高(*P* < 0.01),且体表最高温度(眼部温度)显著下降(*P* < 0.01)。他莫昔芬组大鼠给药 14 d 其体表最高温度显著下降(*P* < 0.01)。而体表最低温度(尾根部温度)未见明显变化(见图 2,图 3)。提示双侧卵巢切除后大鼠阳气减弱,表现为体表最高温度下降;而背腹部温差增大可能是潮热阵发性表现;他莫昔芬可能影响大鼠阳气,但是潮热现象不典型。

2.3 大鼠自主活动度的变化

与假手术组相比,双侧卵巢切除组大鼠术后第 28 天旷场水平活动下降(*P* < 0.01);他莫昔芬组大

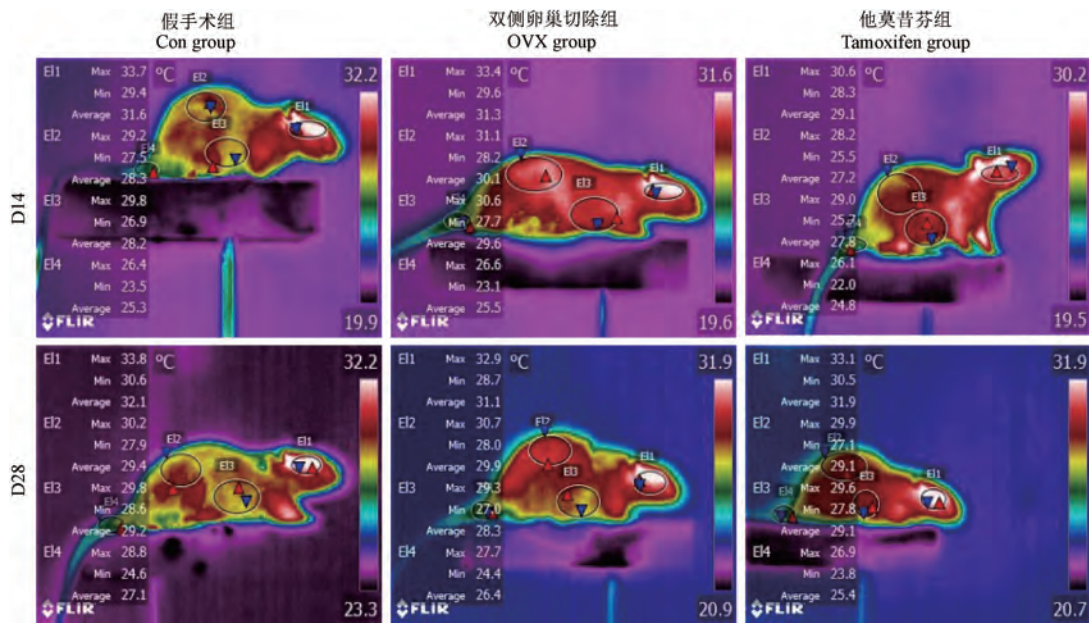


图 2 各组大鼠体表红外热图

Figure 2 Infrared heat map of body surface of rats in each group

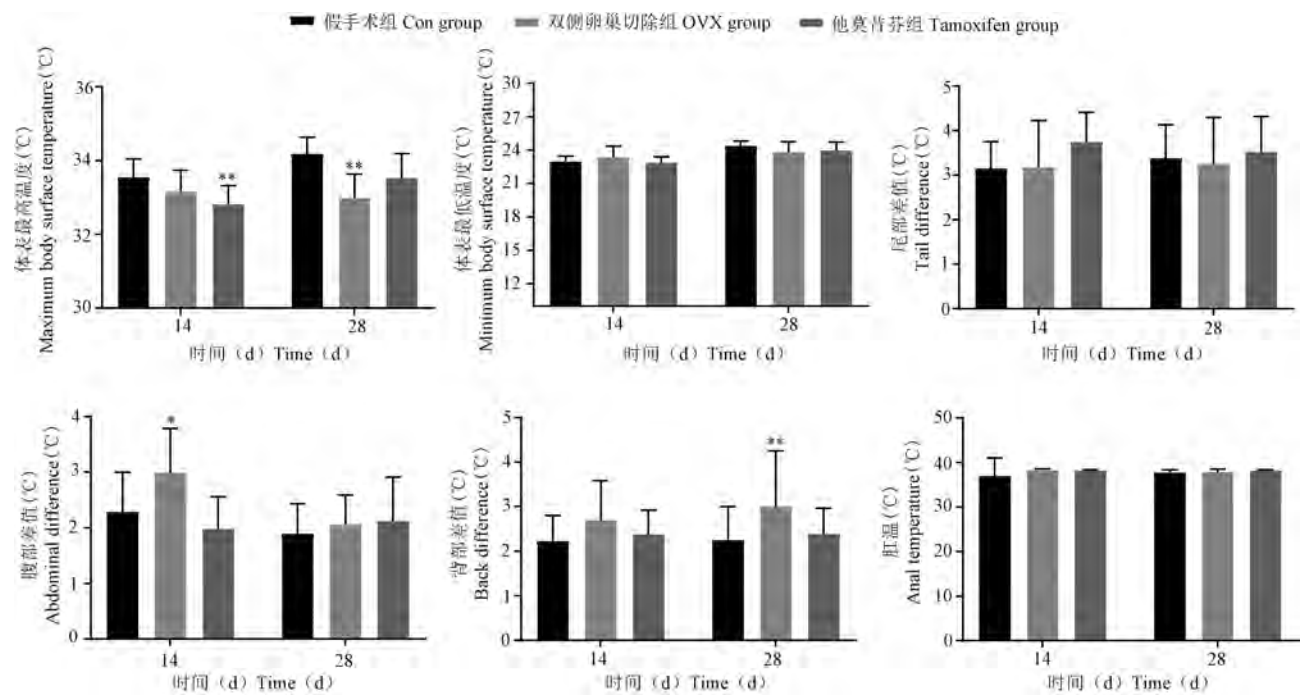


图3 各组大鼠肛温与体表红外温度变化(n = 8)

Figure 3 Changes of anal temperature and body surface infrared temperature in each group (n = 8)

鼠第 14 天旷场水平活动增加 ($P < 0.01$), 见图 4。提示双侧卵巢切除后大鼠精力不济, 表现为疲乏少动状态; 他莫昔芬组则呈现虚性亢奋状态。

2.4 大鼠子宫及内分泌组织形态的变化

2.4.1 对大鼠子宫重量的影响

与假手术组相比, 双侧卵巢切除组和他莫昔芬组子宫指数均明显下降 ($P < 0.01$), 其中双侧卵巢切除后子宫萎缩更明显, 见图 5。

2.4.2 对大鼠子宫病理形态的影响

假手术组大鼠子宫壁厚度、子宫肌层厚度和内膜厚度均正常, 与假手术组相比, 双侧卵巢切除组大鼠子宫各层厚度均显著变薄; 他莫昔芬组大鼠子

宫各层厚度也变薄, 见图 6。

2.5 大鼠血液雌二醇与儿茶酚胺类物质变化

与假手术组相比, 双侧卵巢切除组和他莫昔芬组 E2 均显著下降 ($P < 0.01$), NE、Epi 也下降 ($P < 0.05$), 双侧卵巢切除组 β -EP 也明显下降 ($P < 0.05$), 见图 7。雌二醇的降低提示大鼠围绝经期造模成功, NE、Epi 和 β -EP 等的变化提示大鼠卵巢功能丧失后, 出现体内儿茶酚胺类物质的代谢异常。

2.6 大鼠雌激素替代合成途径肾上腺类固醇激素合成酶基因表达变化

2.6.1 肾上腺性激素合成途径基因表达变化

与假手术组相比, 双侧卵巢切除大鼠肾上腺

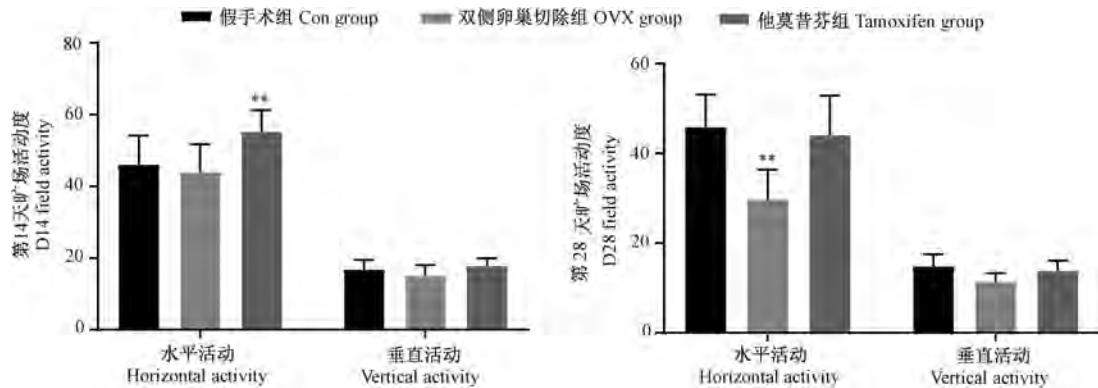


图4 各组大鼠旷场活动度(n = 8)

Figure 4 Open field activity of rats in each group (n = 8)

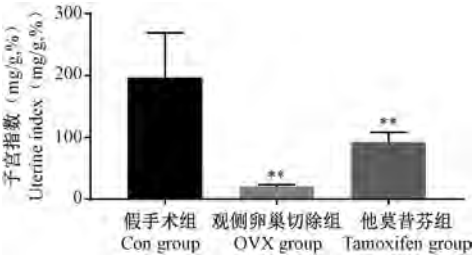


图 5 各组大鼠子宫指数 ($n = 8$)

Figure 5 Uterine index of rats in each group ($n = 8$)

Cyp11a1 基因表达量上升 ($P < 0.05$), 而 Cyp17a1 与 Hsd17b1 基因表达量下降 ($P < 0.05$), 见图 8。提示卵巢切除后, 来源于卵巢的雌激素丧失, 而肾上腺网状带细胞合成的性激素代偿需求, 导致 Cyp11a1 基因表达增强; Cyp17a1 与 Hsd17b1 基因表达量下降, 推测与雌激素实际水平下降有关。他莫昔芬组 Star 与 Por 基因表达量上升 ($P < 0.01$), 而 Cyp17a1 基因表达量明显下降 ($P < 0.01$), 见图

8。推测他莫昔芬竞争性结合雌激素受体后, 引起体内雌激素下降, 肾上腺网状带细胞代偿性合成雌激素, 导致 Star 与 Por 基因表达上调。

2.6.2 肾上腺髓质儿茶酚胺类物质基因表达变化
与假手术组相比, 双侧卵巢切除组 Pnmt 基因显著下调 ($P < 0.01$), Th 表达也减弱, 而使用他莫昔芬对儿茶酚胺类物质无影响, 见图 9。提示双侧卵巢切除后大鼠肾上腺髓质儿茶酚胺物质合成的限速酶合成能下降。

2.7 大鼠下丘脑 ER 及温度感受器 TRPV3、TRPV4 免疫组化变化

与假手术组相比, 在 $\times 200$ 镜下, 双侧卵巢切除组下丘脑 ER 和 TRPV4 阳性细胞数有显著减少, 他莫昔芬组 TRPV3 阳性细胞数显著减少, 见图 10。提示双侧卵巢切除后, 雌激素水平降低, 下丘脑中枢体温调定点正常生理机制发生改变, 从而产生潮热。

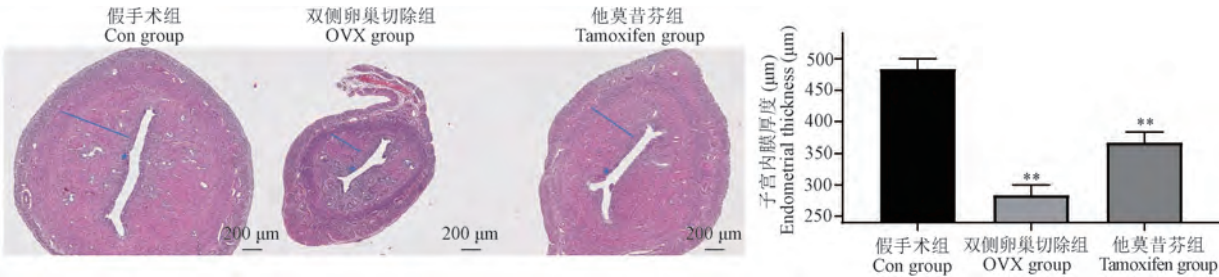


图 6 各组大鼠子宫病理切片及内膜厚度

Figure 6 Pathological section and endometrial thickness of rats in each group

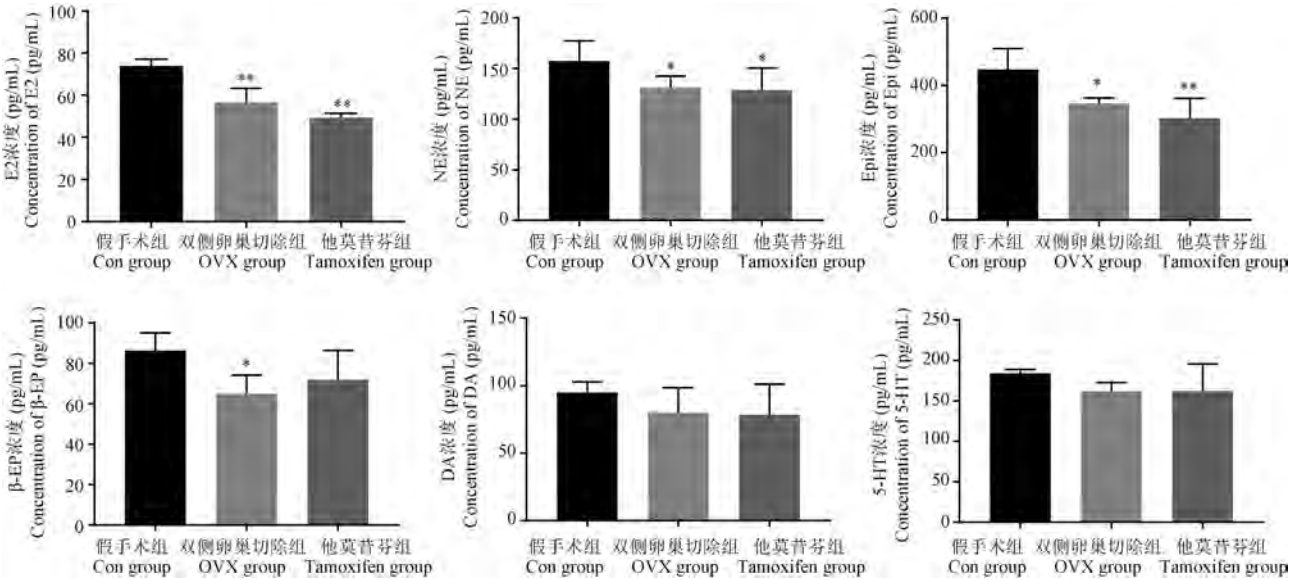


图 7 各组大鼠血液雌二醇与儿茶酚胺类物质变化

Figure 7 Changes of estradiol and catecholamines in blood of rats in each group

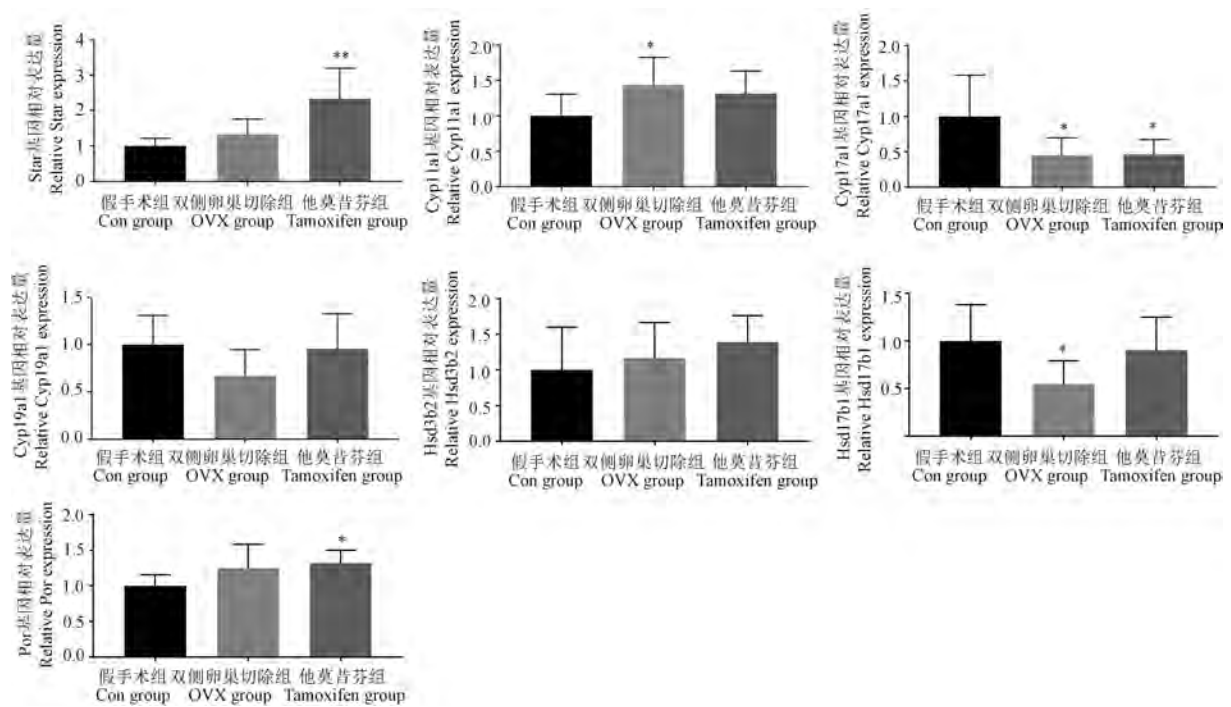


图 8 各组大鼠肾上腺性激素合成酶基因表达
Figure 8 Expression of adrenal sex hormone synthetase gene in each group

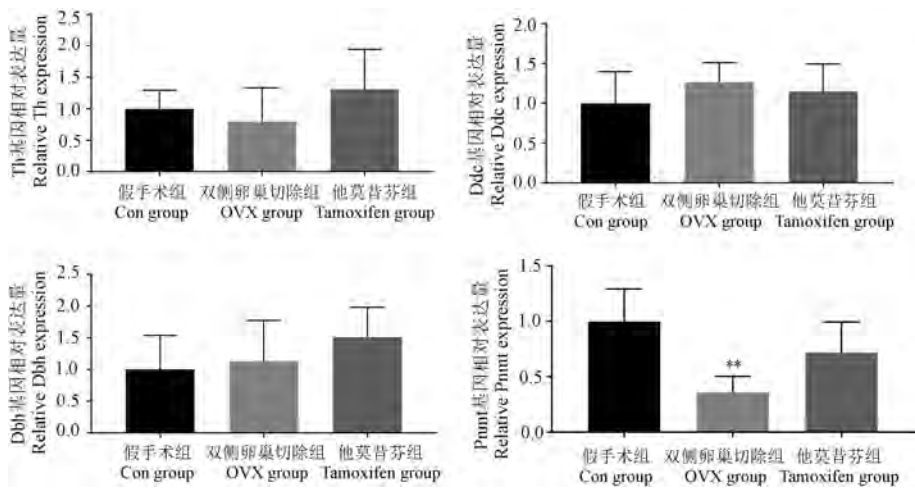


图 9 各组大鼠肾上腺儿茶酚胺类物质合成酶基因表达
Figure 9 Expression of adrenal catecholamine synthetase gene in each group

3 讨论

围绝经期是女性生理功能最重要的转折点,此阶段卵巢功能减弱,雌激素分泌自然逐渐减少,常伴随出现潮热、汗出、睡眠障碍、情绪变化、性功能障碍以及关节和肌肉疼痛等躯体或情志异常现象。据报道,40 ~ 64 岁女性约半数以上人群有潮热和汗出症状^[9],部分人群的潮热可持续数年甚至 10 年以上^[10],严重影响女性日常生活和工作效率。近年来,为了探索潮热发生的分子机制,有关围绝经期

潮热动物模型陆续被报道^[11-12],然而评价潮热模型的客观指标及中医证候属性仍待明确。

为了建立稳定的潮热动物模型及评价指标,本研究同步比较了双侧卵巢切除术和他莫昔芬给药两种造模方式。结果表明,卵巢切除后,大鼠体重增长明显,呈现肥胖现象,类似中医“肥人多痰”的特点,子宫明显萎缩,自主活动能力减弱,红外检测体表温度下降,但背腹部温度差更大,类似于中医的阴阳失调,以阳气不足兼阴虚内热为主的证候特征,提示双侧卵巢切除模型可以模拟临床围绝经期

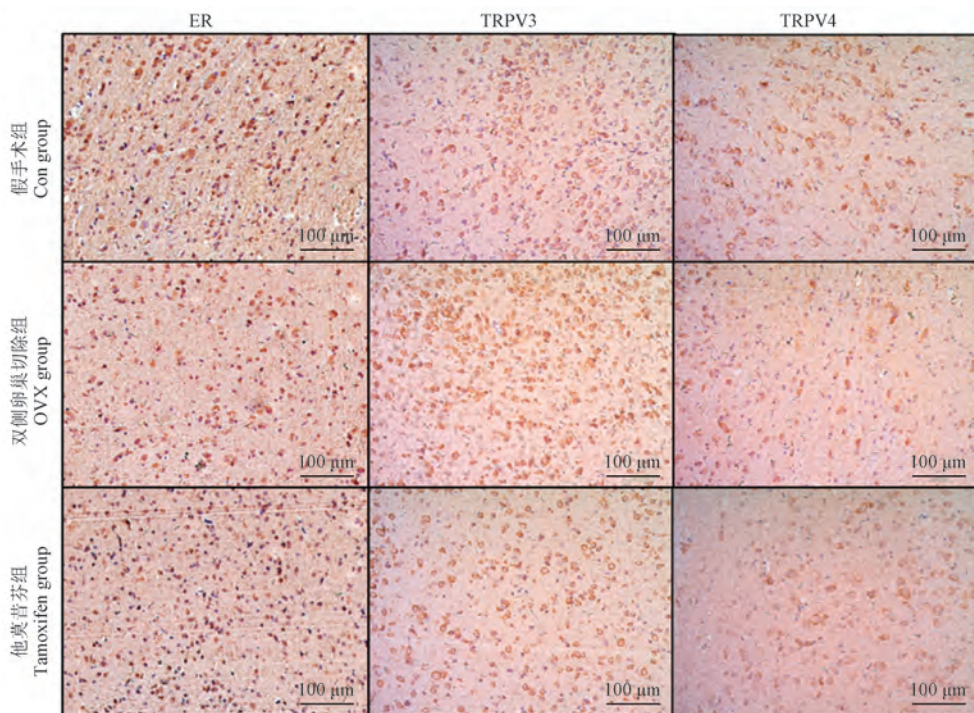


图 10 各组大鼠下丘脑 ER、TRPV3、TRPV4 免疫组化

Figure 10 Immunohistochemistry of ER, TRPV3 and TRPV4 in rat hypothalamus

综合征的潮热表现,与文献报道一致^[12-13]。此外,卵巢切除动物模型除应用于围绝经期综合征的研究外,还用于骨质疏松症、糖脂代谢紊乱等^[14-16]。

然而,给予他莫昔芬后,大鼠体重增长缓慢,但未呈现下降趋势,同样,大鼠子宫也有所萎缩,体表最高温度下降,自主活动能力却增加,类似于中医的虚性亢奋状态,提示他莫昔芬造模可能影响大鼠阳气的生发,而潮热现象不典型,该造模方法不宜潮热发生的机制研究。由于他莫昔芬是乳腺癌患者雌激素受体阳性人群的内分泌治疗药物^[17],临床观察发现服用他莫昔芬后多数患者潮热的发生率明显增加^[18-19],因此,有报道认为他莫昔芬可以构建围绝经期潮热动物模型^[20-21]。本研究结果提示他莫昔芬导致大鼠 E2 下降显著,但是潮热现象不典型,可能与物种的差异性有关。

进一步检测了两种造模方式后大鼠雌激素替代合成途径的变化,结果发现卵巢切除后,大鼠血液雌二醇水平下降,由于卵巢缺失,雌激素合成主要由肾上腺皮质网状带细胞替代合成,检测肾上腺性激素合成酶,发现 Cyp11a1 基因表达量上升,而 Cyp17a1 与 Hsd17b1 基因表达下降,推测雌激素下降后的代偿需求,导致肾上腺 Cyp11a1 基因表达增强,促使胆固醇裂解合成孕烯醇酮的过程活跃,而 Cyp17a1 与 Hsd17b1 基因表达下降,使得肾上腺雌

激素合成进一步减弱。此外,血液肾上腺素水平下降,并发现肾上腺髓质 Pnmt 基因表达下降,Th 表达也减弱,说明肾上腺髓质儿茶酚胺物质合成能力下降。综合肾上腺皮质与髓质相关激素合成酶的变化,提示卵巢切除后大鼠肾上腺类固醇激素合成能力代偿性增强,但是转化成雌激素与肾上腺素和去甲肾上腺素的能力仍减弱。

然而,他莫昔芬造模后,大鼠血液雌二醇水平下降,肾上腺 Star 与 Por 基因表达增强,而 Cyp17a1 基因表达量明显下降,肾上腺髓质功能无明显变化。提示他莫昔芬通过竞争雌激素受体的结合,降低雌激素水平后,也会导致大鼠肾上腺类固醇激素合成能力代偿性增强,但是转化成雌激素的能力也减弱。

临床一般使用激素替代疗法,通过调节卵巢功能,刺激其分泌雌二醇,抑制促卵泡生成素分泌,并调节 5-羟色胺含量,改善内分泌功能,进而达到缓解潮热症状的目的^[22]。而雌二醇又可以通过肾上腺皮质网状带转化而来,本研究检测了雌激素替代合成途径的肾上腺皮质性激素合成酶变化,发现双侧卵巢切除大鼠肾上腺 Cyp11a1 基因表达量上升,而 Cyp17a1 与 Hsd17b1 基因表达量下降,提示卵巢切除后大鼠类固醇合成代偿性增强,但是向性激素转化的合成酶减弱,可能减少性激素合成量。他莫

昔芬组 Star 与 Por 基因表达量上升,而 Cyp17a1 基因表达量明显下降,提示他莫昔芬给药后大鼠类固醇合成代偿性增强更明显,向性激素转化的能力也减弱。

临床研究发现^[23-24],围绝经期血浆儿茶酚胺水平升高,儿茶酚胺紊乱可引发一些症状,尤其是潮热,发现酪氨酸在 Th 催化下合成二羟苯丙氨酸,此步骤为限速过程,再依次合成多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素^[25-26]。本研究实验发现双侧卵巢切除组 Pnmt 基因显著下调,Th 表达也减弱,由于 Pnmt 是去甲肾上腺素代谢为肾上腺素的关键酶,Th 是肾上腺髓质儿茶酚胺物质合成的限速酶,提示卵巢切除后肾上腺髓质儿茶酚胺类物质合成减少;而使用他莫昔芬对儿茶酚胺类物质无影响。

综上所述,本研究认为大鼠双侧卵巢切除术可以较好地模拟围绝经期潮热现象,类似于中医的肾阳不足兼阴虚内热为主的证候特征,其中大鼠体重、背腹部最高温度与最低温度的温差、自主活动能力是较好的宏观评价指标,而血液雌二醇、子宫大小及各层形态学变化是理想的客观化指标,综合各指标变化,可用于围绝经期潮热的中药复方药效机制研究。

参 考 文 献(References)

[1] Kronenberg F. Hot flashes: epidemiology and physiology [J]. Ann N Y Acad Sci, 1990, 592: 52-86.

[2] Mitchell ES, Woods NF. Menstrual cycle phase, menopausal transition stage, self-reports of premenstrual syndrome and symptom severity: observations from the seattle midlife women's health study [J]. Menopause, 2022, 29(11): 1269-1278.

[3] Mehroosh H, Ryan R, Arreguin Joseph M, et al. The effects of estrogen and hormone replacement therapy on cardiovascular systems [J]. Future Cardiol, 2021, 17(2): 347-353.

[4] Poggio F, del Mastro L, Bruzzone M, et al. Safety of systemic hormone replacement therapy in breast cancer survivors: a systematic review and meta-analysis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2022, 191(2): 269-275.

[5] 国际中医临床实践指南 更年期综合征(2020-10-11) [J]. 世界中医药, 2021, 16(2): 190-192.

International guide to clinical practice of traditional Chinese medicine; climacteric syndrome (october-november, 2020) [J]. World Chin Med, 2021, 16(2): 190-192.

[6] 国家药品监督管理局. 中药新药临床研究指导原则: 试行 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2002.

National Medical Products Administration (NMPA). Guiding Principles for Clinical Research of New Chinese Medicine [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2002.

[7] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 大鼠、小鼠常见证候计量化辨

证方法的建立及其评价 [J]. 中医基础医学杂志, 2007, 13(7): 502-505.

Fang ZQ, Pan ZQ, Lu WL, et al. Establishment and evaluation of quantitative syndrome differentiation method for common syndromes in rats and mice [J]. J Basic Chin Med, 2007, 13(7): 502-505.

[8] 方肇勤. 大鼠、小鼠辨证论治实验方法学 [M]. 北京: 科学出版社; 2009.

Fang ZQ. Dashu/Xiaoshu Bianzhenglunzhi Shiyen Fangfaxue [M]. Beijing: Science Press; 2009.

[9] Voedisch AJ, Dunsmoor-Su R, Kasirsky J. Menopause: a global perspective and clinical guide for practice [J]. Clin Obstet Gynecol, 2021, 64(3): 528-554.

[10] Santoro N, Epperson CN, Mathews SB. Menopausal symptoms and their management [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2015, 44(3): 497-515.

[11] 张晓鹏, 刘兆平, 向钱, 等. 两种更年期妇女潮热动物模型的对比研究 [J]. 卫生研究, 2010, 39(1): 110-111.

Zhang XP, Liu ZP, Xiang Q, et al. Comparative study on two animal models of hot flashes in menopausal women [J]. J Hyg Res, 2010, 39(1): 110-111.

[12] 苗明三, 田硕, 辛卫云, 等. 围绝经期综合征动物模型制备规范(草案) [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 996-1000.

Miao MS, Tian S, Xin WY, et al. Standard (draft) for preparation of perimenopausal syndrome model [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(3): 996-1000.

[13] 赵梓妍, 张艳丽, 常文慧, 等. 双侧卵巢切除术建立雌激素缺乏大鼠模型的研究 [J]. 山西医科大学学报, 2020, 51(3): 269-274.

Zhao ZY, Zhang YL, Chang WH, et al. Experimental study on the establishment of estrogen deficiency rat model by bilateral ovariectomy [J]. J Shanxi Med Univ, 2020, 51(3): 269-274.

[14] 杰永生, 郭安忆, 綦惠, 等. 分散式冲击波治疗双侧卵巢切除大鼠晚期骨质疏松症的实验研究 [J]. 北京生物医学工程, 2022, 41(3): 275-279, 306.

Jie YS, Guo AY, Qi H, et al. Effect of radial extracorporeal shock wave therapy on ovariectomy-induced advanced osteoporosis in rats [J]. Beijing Biomed Eng, 2022, 41(3): 275-279, 306.

[15] 曹国龙, 田发明, 刘家寅. 洛伐他汀联合胰岛素干预双侧卵巢切除 2 型糖尿病 SD 模型大鼠骨折的愈合 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(5): 673-681.

Cao GL, Tian FM, Liu JY. Lovastatin combined with insulin effects on fracture healing in rat models of bilateral ovariectomized type 2 diabetic mellitus [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2020, 24(5): 673-681.

[16] Chapman JS, Powell CB, McLennan J, et al. Surveillance of survivors: follow-up after risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA 1/2 mutation carriers [J]. Gynecol Oncol, 2011, 122(2): 339-343.

[17] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2017 年版) [J]. 中国癌症杂志, 2017, 27(9):

695-759.
Breast Cancer Professional Committee of Chinese Anti-Cancer Association. Guidelines and specifications for diagnosis and treatment of breast cancer of China Anti-Cancer Association (2017 edition) [J]. Chin Oncol, 2017, 27(9): 695-759.

[18] 鲁泽春. 围绝经期潮热的神经内分泌机制研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(2): 97-100.
Lu ZC. Progress in the neuroendocrine origin of perimenopausal hot flushes [J]. J Int Obstet Gynecol, 2011, 38(2): 97-100.

[19] Fenlon DR, Corner JL, Haviland J. Menopausal hot flushes after breast cancer [J]. Eur J Cancer Care (Engl), 2009, 18(2): 140-148.

[20] 唐佳, 徐川, 唐勇, 等. 他莫昔芬引发潮热大鼠模型建立与评价 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(11): 2717-2719.
Tang J, Xu C, Tang Y, et al. Establishment and evaluation of a rat model of hot flashes induced by tamoxifen [J]. Chin J Gerontol, 2019, 39(11): 2717-2719.

[21] 胡兰, 何娜娜. CYP2D610 等位基因与口服他莫昔芬的乳腺癌患者发生潮热的相关性 [J]. 肿瘤药学, 2019, 9(6): 915-918.
Hu L, He NN. Association between CYP2D610 allele and hot flashes in breast cancer patients treated with oral tamoxifen [J]. Anti Tumor Pharm, 2019, 9(6): 915-918.

[22] Polo-Kantola P, Erkkola R, Irjala K, et al. Effect of short-term transdermal estrogen replacement therapy on sleep: a randomized, double-blind crossover trial in postmenopausal women [J]. Fertil Steril, 1999, 71(5): 873-880.

[23] Kronenberg F, Cote LJ, Linkie DM, et al. Menopausal hot flashes; thermoregulatory, cardiovascular, and circulating catecholamine and LH changes [J]. Maturitas, 1984, 6(1): 31-43.

[24] Rebar RW, Spitzer IB. The physiology and measurement of hot flushes [J]. Am J Obstet Gynecol, 1987, 156(5): 1284-1288.

[25] Flatmark T, Stevens RC. Structural insight into the aromatic amino acid hydroxylases and their disease-related mutant forms [J]. Chem Rev, 1999, 99(8): 2137-2160.

[26] Kobayashi K, Nagatsu T. Molecular genetics of tyrosine 3-monooxygenase and inherited diseases [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(1): 267-270.

[收稿日期] 2023-06-16

《中国比较医学杂志》稿约

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

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

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

期待您的来稿!

何佳慧,何杰滢,张百荣,等. 肝郁证便秘型肠易激综合征模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1555–1563.
He JH, He JY, Zhang BR, et al. Establishment and evaluation of constipated irritable bowel syndrome model with liver depression syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1555–1563.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.005

肝郁证便秘型肠易激综合征模型的建立与评价

何佳慧,何杰滢,张百荣,张水娣,魏苑君,杨超燕,陈艳芬*

(广东药科大学中药学院,广州 510006)

【摘要】 目的 采用单因素造模法和多因素联合造模法分别制备肝郁证便秘型肠易激综合征 (IBS-C) 大鼠模型,通过比较不同指标,提供理想的 IBS-C 实验动物模型。**方法** 42 只 SD 大鼠随机分为空白组 (Normal 组)、冰水灌胃组 (Cold 组)、束缚组 (Restrain 组)、夹尾组 (Tail 组)、冰水灌胃 + 束缚组 (C + R 组) 和冰水灌胃 + 夹尾组 (C + T 组)。造模期间观测各组体重、进食量、饮水量和存活情况,进行旷场行为学、粪便 Bristol 评分、内脏敏感性、小肠推进等指标观测,HE 染色观察大鼠结肠病理改变,ELISA 法检测血清、结肠中 5-HT、VIP 含量。**结果** 造模后,各模型组大鼠体重下降 ($P < 0.05, P < 0.01$),进食量、饮水量减少,各模型组血清中的 5-HT 含量均有上升。其中 Cold 组排便粒数及 Bristol 得分减少,结肠 5-HT 含量增加 ($P < 0.05, P < 0.01$);Restrain 组旷场总路程及平均速度减少 ($P < 0.01$);Tail 组糖水偏好降低 ($P < 0.01$);C + T 组糖水偏好率、旷场总路程、小肠推进率、排便粒数及 Bristol 得分减少,结肠中 5-HT 含量增加, VIP 含量减少 ($P < 0.05, P < 0.01$);C + R 组旷场总路程、平均速度、结肠中 VIP 含量减少 ($P < 0.05$);除 Tail 组,其余模型组与空白组相比,在造模 7、14 d,各压力值下均出现内脏高敏感性 ($P < 0.05, P < 0.01$);病理形态学观察显示,各模型组未见明显的炎性细胞浸润或病理学改变。**结论** 采用冰水灌胃结合夹尾法可以成功建立肝郁证 IBS-C 大鼠模型,是 5 种方法中的首选,为系统深入研究中医药防治 IBS-C 机制奠定了基础。

【关键词】 肝郁证便秘型肠易激综合征;大鼠;冰水;束缚;夹尾

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1555-09

Establishment and evaluation of constipated irritable bowel syndrome model with liver depression syndrome

HE Jiahui, HE Jieying, ZHANG Bairong, ZHANG Shuidi, WEI Yuanjun, YANG Chaoyan, CHEN Yanfen*

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Corresponding author: CHEN Yanfen. E-mail: xwnai@163.com

【Abstract】 Objective To prepare rat models of liver stagnation syndrome constipation-type irritable bowel syndrome (IBS-C) using single and multi-factor modeling method with different indicators, to provide ideal experimental animal models of IBS-C. **Methods** Forty-two SD rats were divided randomly into blank (Normal), cold-water gavage (Cold), restraint (Restrain), tail-clamping (Tail), cold-water gavage + restraint (C + R), and cold-water gavage + tail-clamping groups (C + T). Body weight, food intake, water intake, and survival status, as well as open-field behavior, fecal Bristol score, visceral sensitivity, and small intestine propulsion were observed in each group during the modeling period. Pathological changes in the rat colon were observed by hematoxylin and eosin staining, and the serum and colon contents of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and vasoactive intestinal peptide (VIP) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The body weight in each group decreased after modeling ($P < 0.05, P < 0.01$), the food and water intakes decreased, and serum 5-HT levels increased. The number of fecal particles and Bristol score decreased

[基金项目] 广东省自然科学基金面上项目 (2023A1515011128)。
Funded by Guangdong Provincial Natural Science Foundation General Project (2023A1515011128).
[作者简介] 何佳慧 (2000—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药效评价与应用研究。Email: jiahuihe1100@163.com
[通信作者] 陈艳芬 (1977—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药药效评价与作用机制研究。Email: xwnai@163.com

while the colon 5-HT content increased in the Cold group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the total distance and average speed of the restraint group in the open field decreased ($P < 0.01$); the preference for sugar water in the Tail group decreased ($P < 0.01$); the preference for sugar water, total open-field distance, small intestine propulsion rate, defecation particles, and Bristol score all decreased, while the colon 5-HT content increased and the VIP content decreased in the C + T group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); and the total distance, average speed, and VIP content in the colon decreased in the C + R group ($P < 0.05$). Except for the Tail group, all the model groups showed visceral hypersensitivity ($P < 0.05$, $P < 0.01$) compared to the blank group at various pressure values on days 7 and 14 of modeling. Pathological observations showed no significant inflammatory cell infiltration or pathological changes in any of the model groups. **Conclusions** The combination of ice-water gastric lavage and tail clamping can be used to establish a rat model of liver depression syndrome in IBS-C. This may be the best of the five tested method, and the resulting model may lay the foundation for further systematic and in-depth research into the mechanism of traditional Chinese medicine in preventing and treating IBS-C.

[Keywords] constipation-type irritable bowel syndrome with liver depression syndrome; rat; cold water; restraint; tail clamping

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

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种反复腹痛或腹部不适,并伴排便异常或排便习惯改变为主要临床症状的功能性肠病,其中便秘型肠易激综合征(constipation type of irritable bowel syndrome, IBS-C)属其常见亚型之一,主要表现为排便困难或排便时间延长,患病率呈逐年升高趋势^[1]。但目前关于 IBS-C 的模型研究极少,不利于该病病机研究及药物研发。IBS-C 属中医学“便秘”“腹痛”等范畴,中医认为肝气郁结,情志不调,失于疏泄,肝气横逆乘脾,脾失健运,则运化之力不足,以致肠腑传导失司,糟粕内停而发为便秘,总结其病机为肝郁气滞,脾运失健所致^[2]。中医药治疗 IBS-C 疗效显著,建立与之相关的肝郁证 IBS-C 动物模型是重要的基础。因此,本研究结合 IBS-C 经典造模因素,从中医病因病机理论出发,采用 5 种造模方法进行比较研究,分别为:冰水灌胃法、束缚法、夹尾法、冰水灌胃结合束缚法、冰水灌胃结合夹尾法,探索建立肝郁证 IBS-C 大鼠模型,为日后的病理研究和药物治疗机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

42 只 7 周龄 SPF 级 SD 健康大鼠,雌雄各半,体重 180 ~ 200 g,购自广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2018-0002】。期间自由饮水,饲喂普通维持饲料。饲养环境:昼夜各半循环照明,相对湿度 40% ~ 60%,温度 24 ~ 26℃,适应性饲养于广东药科大学实验动物中心 SPF 级动物房【SYXK(粤)2022-0125】。本实验方案及过程通过广东药科大

学实验动物中心伦理委员会批准(gdpulac 2017637)。

1.1.2 主要试剂与仪器

蔗糖(012070,天津市致远化学试剂有限公司);氯化钠(20211201,天津市致远化学试剂有限公司);异氟烷(22043001,瑞沃德生命科技有限公司);4%多聚甲醛(21348860, Biosharp);中性树胶(10004160,国药集团化学试剂有限公司);大鼠 5-HT ELISA 试剂盒(202203,江苏酶免实业有限公司);大鼠 VIP ELISA 试剂盒(Apr2022,泉州市睿信生物科技有限公司)。

旷场实验箱(广州必特生物科技有限公司,中国);超声波清洗器(SK8200 H,上海科导超声仪器有限公司,中国);高速冷冻离心机(H1850R,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,中国);万分之一分析天平(AUY120,SHIMADZU,日本);智能程控生物组织自动脱水机(TC-120H,湖北泰维科技实业有限公司,中国);生物组织自动包埋机(TB-718,湖北泰维科技实业有限公司,中国);组织切片机(RM2235,徕卡显微系统(上海)有限公司,中国);恒温摊片烤片机(TK-218,湖北泰维科技实业有限公司,中国);生物组织自动染色机(TR-108I,湖北泰维科技实业有限公司,中国);载玻片(G6004,武汉赛维尔生物科技有限公司,中国);倒置显微镜(CKX41, Olympus Corporation, 日本);多功能酶标仪(X5 型, Bio Tek Instruments, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模方法

42 只 SD 大鼠随机分为空白组(Normal 组)、冰水灌胃组(Cold 组)、束缚组(Restrain 组)、夹尾组

(Tail 组)、冰水灌胃 + 束缚组(C + R 组)、冰水灌胃 + 夹尾组(C + T 组), 每组 7 只。

造模持续 14 d, 期间正常饮食饮水。Normal 组生理盐水灌胃, 每只 2 mL; Cold 组 0 ~ 4℃ 冰生理盐水灌胃, 每只 2 mL; Restrain 组用松紧带将大鼠捆绑束缚在饲养笼铁盖上 1 h; Tail 组用医用纱布包裹金属钳夹住大鼠尾巴远端, 每天 2 次, 每次 30 min; C + R 组 0 ~ 4℃ 冰生理盐水灌胃, 每只 2 mL, 30 min 后将大鼠捆绑束缚在饲养笼铁盖上 1 h; C + T 组 0 ~ 4℃ 冰生理盐水灌胃, 每只 2 mL, 30 min 后用医用纱布包裹的金属钳夹住大鼠尾巴远端, 每天 2 次, 每次 30 min。

1.2.2 体征指标检测

每天观察记录各组大鼠的体重、毛发色泽、精神状态、进食量、饮水量等。每周固定时间监测大鼠进食量, 计算各组日平均食量。进食量 = (初始饲料量 - 24 h 后剩余饲料量) / 每笼鼠数。饮水量计算同进食量。

1.2.3 糖水偏好实验

造模 0、14 d, 禁食禁水 24 h 后进行糖水偏好实验, 大鼠单笼饲养, 给予每只大鼠 1% 蔗糖水和纯水各 1 瓶, 测 1 h 的糖水偏好率。糖水偏好率 = (糖水消耗量 / 总液体消耗量) × 100%。

1.2.4 旷场实验(open field test, OFT)

造模 0、14 d, 将大鼠放入旷场实验箱中适应环境 3 min, 摄像头记录动物行为以及路径, 每只大鼠在旷场中自由运动 5 min。实验结束后, 用 75% 乙醇清理旷场上一只大鼠的排泄物, 避免影响下一只大鼠的运动。通过旷场实验仪器自带分析软件分析大鼠在整个实验中的运动总路程、平均速度等。

1.2.5 粪便粒数及 Bristol 评分

造模 0、14 d, 大鼠被放置在一个单独的代谢笼中, 记录 4 h 内粪便数量, 并根据 Bristol 标准进行评分: 1 分, 分散的类似于干球和坚果, 难以排泄; 2 分, 腊肠状, 但成块; 3 分, 腊肠状表面有裂纹; 4 分, 腊肠状或蛇形, 光滑柔软; 5 分, 软团具有清晰的边缘, 易于排泄; 6 分, 绒状物, 边缘不清或糊状; 7 分, 水样便或无固状物^[3-4]。

1.2.6 内脏敏感性

造模 0、7、14 d, 采用腹壁撤离反射实验(abdominal withdrawal reflex test, AWR)检测大鼠内脏敏感性^[5]。检测前 24 h 禁食不禁水, 将大鼠固定于不能随意翻转的固定盒中, 自制的气囊导管润滑

后, 插入大鼠肛门约 2 cm 处, 用胶带固定, 待大鼠适应后, 分别给予 20、40、60、80 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 4 个压力级别进行刺激, 每个压力级别刺激 3 次, 每次 20 s, 间隔 180 s 后进行下一次刺激, 数据取均值^[6-7]。AWR 评分标准: 0 分, 大鼠情绪基本稳定, 无行为学反应; 1 分, 大鼠头部短暂静止不动; 2 分, 大鼠有轻微腹部肌肉收缩, 但腹部未抬离桌面; 3 分, 大鼠有强烈腹部肌肉收缩, 腹部抬离桌面; 4 分, 大鼠腹部强直收缩, 身体呈弓形, 腹部、骨盆及会阴部抬离桌面^[8]。

1.2.7 小肠推进率

造模 14 d, 禁食不禁水 24 h, 含炭末的半固定糊进行灌胃, 每只 2 mL, 30 min 后, 麻醉大鼠, 取出肠道, 将肠平铺在白纸上, 测量幽门至炭末距离及幽门至直肠末端距离分别为 L 和 S, 计算小肠推进率, 小肠推进率(%) = $L/S \times 100\%$ ^[9]。

1.2.8 病理组织学观察

造模 14 d, 麻醉大鼠, 剪取每只大鼠结肠组织, 4% 多聚甲醛固定液固定 24 h, 随后流水冲洗 1 h, 进行不同浓度乙醇梯度脱水, 石蜡包埋切片, 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 中性树胶封片。常规光镜下观察(100×)结肠的病理变化。

1.2.9 ELISA 法检测大鼠血清及结肠组织 5-HT、VIP 水平

造模 14 d, 大鼠麻醉后取腹主动脉血 5 mL, 静置后离心分离血清; 剪取大鼠结肠组织, 预冷生理盐水漂洗后, 滤纸擦干, 称重, 加入 9 倍量 PBS 缓冲液, 冰上充分研磨, 离心后取上清液, 按试剂盒说明书进行检测。

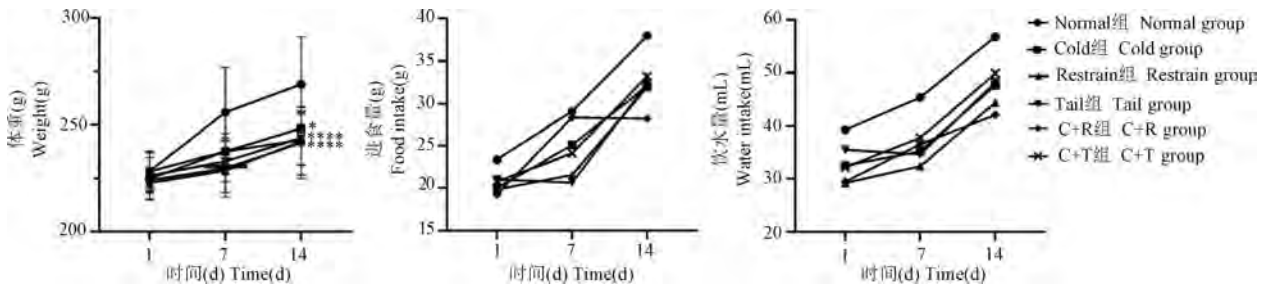
1.3 统计学分析

用 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 根据方差齐性检验, 方差齐用 LSD 分析, 方差不齐用 Tamhane's T2 分析。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 体征变化

大鼠初始体重无明显差异, 造模后, 各模型组较 Normal 组体重均显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), 进食量、饮水量减少, 但无显著性差异(图 1)。各模型组大鼠精神萎靡不振, 皮毛无光泽。造模期间无大鼠死亡。



注:与 Normal 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 1 大鼠体征变化($n = 7$)

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

Figure 1 Changes in physical signs of rats ($n = 7$)

2.2 糖水偏好实验

糖水偏好实验是一种根据动物对甜味特殊偏爱设计的评估动物模型抑郁行为的重要检测方式^[10]。从图 2 结果可知,与正常组相比,Tail 组及 C + T 组糖水偏好率显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。C + R 组糖水偏好率降低,但无显著性差异。

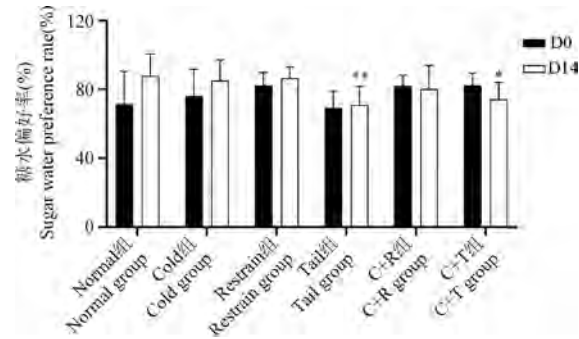


图 2 各组大鼠糖水偏好率变化情况($n = 7$)

Figure 2 Changes in sugar water preference rate of rats in each group ($n = 7$)

2.3 旷场实验

Restrain 组和 C + R 组总路程及平均速度减少

表 1 各组大鼠旷场实验结果($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 1 Open field experimental results of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别 Groups	D0		D14	
	总路程(mm) Total distance (mm)	平均速度(mm/s) Average speed (mm/s)	总路程(mm) Total distance (mm)	平均速度(mm/s) Average speed (mm/s)
Normal 组 Normal group	2966.48 ± 620.91	9.89 ± 2.07	3577.85 ± 632.17	11.67 ± 2.42
Cold 组 Cold group	3185.87 ± 510.88	10.62 ± 1.70	3033.23 ± 987.48	10.11 ± 3.30
Restrain 组 Restrain group	3108.20 ± 1382.06	10.50 ± 4.54	2355.60 ± 475.48**	7.85 ± 1.58**
Tail 组 Tail group	3411.92 ± 1175.13	11.38 ± 3.92	3016.90 ± 737.32	10.06 ± 2.46
C + R 组 C + R group	3438.98 ± 846.32	11.47 ± 2.82	2532.97 ± 1008.52*	8.44 ± 3.36*
C + T 组 C + T group	2883.50 ± 566.95	9.67 ± 1.88	2741.30 ± 557.98*	9.14 ± 1.86

($P < 0.01$, $P < 0.05$), C + T 组总路程明显减少 ($P < 0.05$) (表 1)。由图 3 可知,造模前各组大鼠自主运动无明显差异,且均往中央区域活动;造模 14 d 后,除 Normal 组及 Cold 组,其余 4 组活动区域主要集中在边角部位,说明可能夹尾及束缚都会造成大鼠的抑郁、焦虑倾向。

2.4 内脏敏感性

造模 7、14 d,除 Tail 组外,各组大鼠在 4 个压力值下均出现内脏高敏感性,存在显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示除 Tail 外的 4 种造模方法均可导致大鼠内脏高敏感性(图 4)。

2.5 排便情况

Cold 组、C + T 组的排便粒数及 Bristol 得分均明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),两组大鼠可能已出现较严重的便秘症状;而 Restrain 组粪便粒数及 Bristol 得分较 Normal 组有所增加,但无显著性差异,可能与本研究采用束缚刺激 1 h 有一定关系(见表 2)。有研究表明,束缚应激刺激量不充分时不能稳定地诱导 IBS-D 模型^[11]。

2.6 小肠推进率

造模后 Cold 组、C + T 组小肠推进率均下降,说

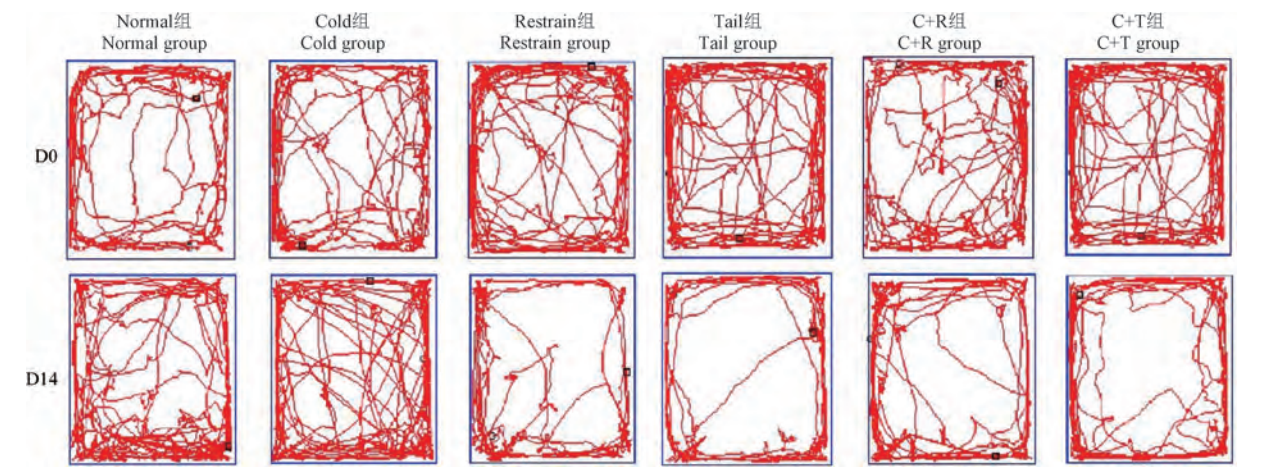


图 3 旷场实验轨迹变化
Figure 3 Changes in the trajectory of open field experiments

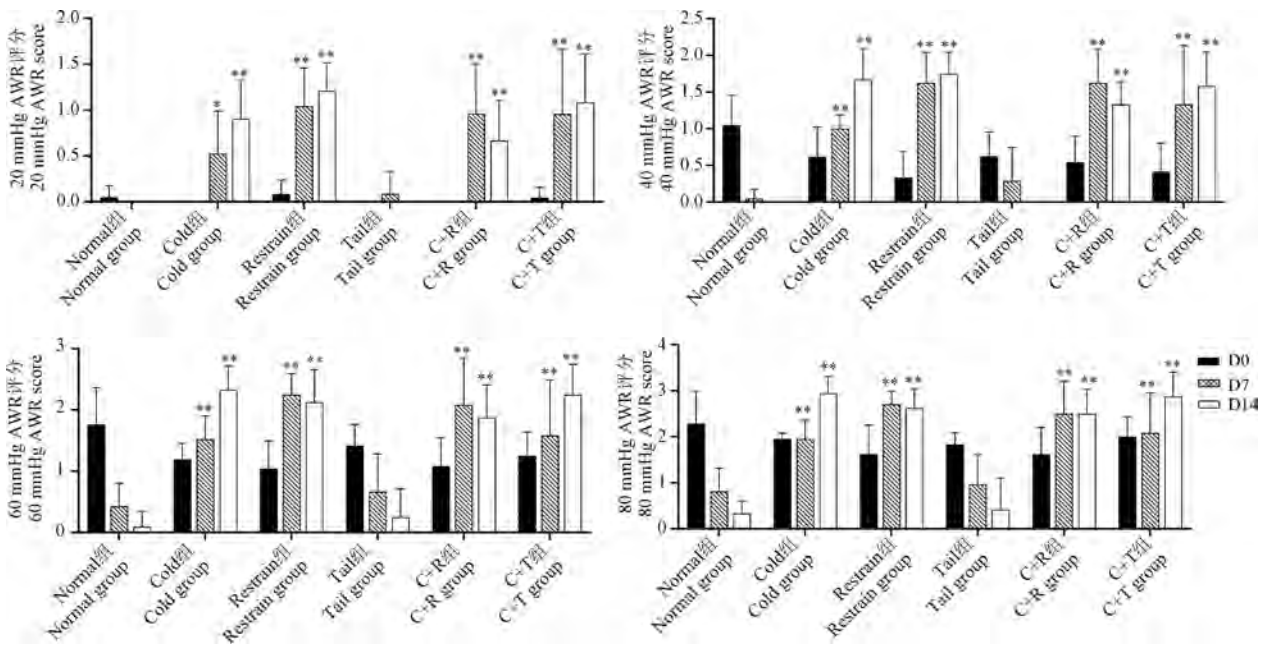


图 4 不同压力值下 AWR 得分变化情况($n = 7$)
Figure 4 Changes in AWR scores under different pressure values($n = 7$)

表 2 排便情况变化($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别 Groups	粪便粒数(粒/只) Fecal particles (particles/piece)		Bristol 得分 Bristol score	
	D0	D14	D0	D14
Normal 组 Normal group	6.76 ± 2.82	5.57 ± 2.82	3.46 ± 0.44	3.21 ± 0.22
Cold 组 Cold group	6.90 ± 5.56	2.17 ± 1.64 *	3.28 ± 1.52	1.38 ± 0.96 **
Restrain 组 Restrain group	6.22 ± 6.06	7.00 ± 2.65	3.14 ± 0.75	3.56 ± 0.22
Tail 组 Tail group	6.18 ± 2.49	5.41 ± 1.81	3.32 ± 0.59	3.31 ± 0.41
C + R 组 C + R group	6.30 ± 2.61	4.29 ± 3.55	3.03 ± 0.61	3.08 ± 0.55
C + T 组 C + T group	6.57 ± 6.29	2.14 ± 2.85 *	3.07 ± 0.73	1.26 ± 1.28 **

明这两种方法造模后均能导致小肠推进率速度减慢,其中 C + T 组更为显著($P < 0.01$),Restrain 组及 C + R 组大鼠小肠推进率有升高的趋势,但与 Normal 组比较无显著性差异(图 5)。

2.7 血清、结肠中 5-HT、VIP 含量结果

ELISA 检测结果显示,各模型组血清 5-HT 含量均有上升。Cold 组与 C + T 组结肠 5-HT 含量显著增加($P < 0.05$);C + R 组与 C + T 组结肠中 VIP 含量明显减少($P < 0.05$)(表 3)。

2.8 病理形态学观察

各组大鼠结肠组织 HE 染色结果如图 6 所示,各模型组腺体排列较为整齐,未见明显的炎性细胞浸润或明显病理学改变,提示这些造模因素不会造成大鼠出现器质性病理改变。

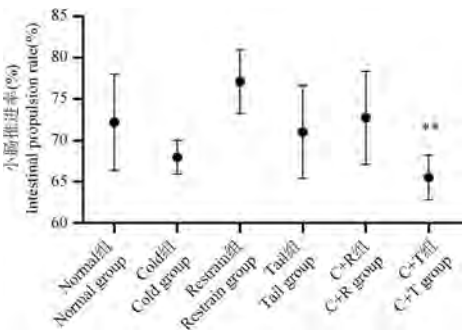


图 5 小肠推进率变化($n = 7$)
Figure 5 Changes in small intestine propulsion rate($n = 7$)

表 3 血清、结肠中 5-HT、VIP 含量($\bar{x} \pm s, n = 7$)
Table 3 5-HT and VIP content in serum and colon($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别 Groups	血清 5-HT(ng/L) Serum 5-HT (ng/L)	结肠 5-HT(ng/L) Colon 5-HT (ng/L)	结肠 VIP(pg/mL) Colon VIP (pg/mL)
Normal 组 Normal group	299.36 ± 28.21	337.27 ± 46.28	56.85 ± 6.97
Cold 组 Cold group	325.01 ± 28.66	409.44 ± 89.03 *	51.80 ± 4.39
Restrain 组 Restrain group	321.49 ± 14.89	364.96 ± 18.34	55.02 ± 4.14
Tail 组 Tail group	313.44 ± 18.67	387.59 ± 72.44	51.27 ± 4.38
C + R 组 C + R group	306.25 ± 29.29	326.84 ± 17.47	39.50 ± 4.84 **
C + T 组 C + T group	323.24 ± 47.03	405.73 ± 18.62 *	45.42 ± 7.61 **

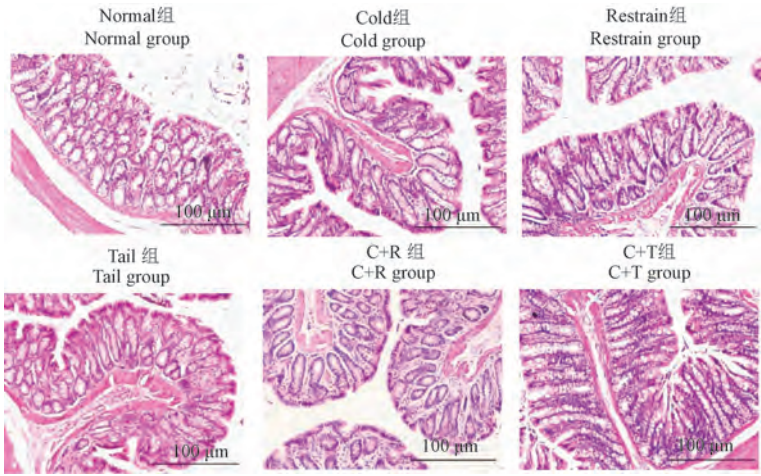


图 6 结肠 HE 染色
Figure 6 HE staining of colon

3 讨论

通过文献调研比较分析国内外 IBS-C 模型构建方法后可以发现,冰水灌胃是比较公认的 IBS-C 造模方法,冷饮危险因素中的温度被认为是引起肠道运动异常的关键因子,能够诱发大鼠的大便粒数减少和含水量减少^[12-20]。根据“多食生冷寒凉,损伤脾胃阳气”的中医理论,通过冰水灌胃给予连续的寒凉刺激,能够模拟实寒证的中医证候。但仅冰水灌胃单一因素刺激无法造成焦虑、抑郁等肝郁表

现,不符合 IBS 的发病特点。国家标准《中国临床诊疗术语》明确 IBS 病名为“肠郁”,大量研究表明本病症状出现或加重往往与精神因素有关,即与“郁证”密切相关^[20]。然而目前肝郁型 IBS-C 研究比较空缺,虽然也有个别文献报道母婴分离结合冰水灌胃法能够建立中医肝郁脾虚证 IBS-C 大鼠模型,但造模因素较复杂,因此亟需探索简便易行的肝郁证 IBS-C 造模方法^[21]。肝气郁多因郁怒所致,根据“怒伤肝,久则郁”,首先考虑通过经典的夹尾刺激、束缚应激因素分别建立肝郁模型。束缚应激和夹

尾刺激均是现代医学根据 IBS 发病的精神、神经因素用来诱发 IBS 动物模型的刺激因素,尤以前者在腹泻型肠易激综合征 (IBS-D) 模型中较为常用,一般采用番泻叶灌胃结合束缚应激刺激法,也有单独采用慢性束缚应激法^[22]。夹尾刺激极少单用做 IBS 模型的造模因素,可和疲劳、昼夜颠倒、断食水等因素一起诱发慢性应激致 IBS 大鼠模型^[22]。因此本研究结合目前关于 IBS-C 和肝郁模型的造模方法,采用冰水灌胃法、慢性束缚法、夹尾法、冰水灌胃结合慢性束缚、冰水灌胃结合夹尾法分别构建模型并采用多指标进行综合评价,为系统深入研究治疗中医药防治 IBS-C 机制奠定基础^[20]。

在研究过程中发现,虽然 5 种方法均能成功复制一定证候特征的大鼠模型,但在症状表现、出现时间及稳定性上有一定差异。现有研究表明 IBS-C 没有结肠器质性和结构改变,肠道转运缓慢和内脏超敏反应被认为是便秘肠易激综合征 (IBS-C) 的主要病理生理机制^[23-24]。本研究通过小肠推进来评价肠道运转快慢,造模后 Cold 组、C + T 组小肠推进率均下降,说明这两种方法造模后均能导致胃肠道运转减慢,其中 C + T 组更为显著。目前公认的内脏敏感性评价指标是 AWR 评分,当 AWR 评分升高,表明大鼠内脏敏感性增加,本研究中 Cold 组、Restrain 组、C + R 组、C + T 组均能显著提高大鼠的内脏敏感性;而 Tail 组的内脏敏感性没有显著增加,提示可能单独采用夹尾刺激大鼠这种刺激程度尚不够达到影响肠道敏感性。此外,单独束缚应激的 Restrain 组的排便量虽有增加,但与空白组比无显著性差异,可能和本实验采用的刺激量不够有关。根据文献报道,束缚应激刺激量不充分时不能稳定地诱导 IBS-D 模型,研究表明束缚模型 1 h 组和束缚模型 2 h 组所诱导 IBS-D 模型的内脏高敏感性程度相当($P > 0.05$),但 2 h 造模的动物在排便、结肠 5-HT_{3A}R 表达程度方面均有差别($P < 0.05$)^[11]。

糖水偏好实验及旷场实验都是评价抑郁动物模型的重要检测指标。本研究结果表明造模 14 d 后,与 Normal 组相比,仅 Tail 组和 C + T 组有显著性差异,C + R 组糖水偏好率虽有降低,但无显著性差异。根据文献报道,大鼠对于 1% 蔗糖溶液的消耗本身存在个体差异,最高和最低水平的大鼠可以相差 2 倍以上^[25];其次,由于糖水偏好测试前 1 d,对动物进行了饥饿处理,研究表明在食物(和/或水)匮乏的情况下,以饥饿为动机对甜味溶液的消

耗有很大的影响。饱养动物主要因其愉悦或有益的特性而消耗甜味溶液,而食物匮乏的动物主要是由于代谢/能量需求。食物匮乏增强了动物获取食物的动机,故大鼠在食物剥夺 24 h 后可能会消耗更多的蔗糖^[25]。因此,推测本实验中糖水偏好率结果可能受这些因素影响存在一定误差,提示将来可以对此进行深入的比较研究。应用精神应激方法复制内脏高敏感动物模型过程中大鼠可能出现心理行为学渐变变化^[26]。所以旷场实验的单一参数不能充分反映动物的认知、情绪及探索能力方面的变化,将不同参数进行组合分析能更全面地反映实验动物的行为特征变化。本研究表明,造模 14 d 后,Restrain 组和 C + R 总路程及平均速度减少,C + T 组总路程明显减少;除 Normal 组及 Cold 组,其余 4 组活动区域主要集中在边角部位。因此,综合旷场实验的总路程、平均速度、轨迹图,夹尾及束缚可能都会造成大鼠的焦虑、抑郁倾向。

神经递质作为胃肠道神经和胃肠道平滑肌的中间介质,在调节肠动力中发挥重要作用,如 5-HT、VIP 等。5-HT 具有调节消化道功能的作用,有研究认为 5-HT 的增加导致了内脏高敏感,激活多种神经活性物质,使参与脑肠调节的化学信号异常表达;并且 5-HT 作用于其各种受体,引起患者的肠道运动、分泌的改变,导致产生各种临床症状^[27-28]。血管活性肠肽(VIP)是抑制胃肠运动的主要神经递质之一,具有松弛胃肠平滑肌和促进分泌和吸收功能,可促进肠道水和电解质的分泌^[29]。本实验对大鼠血清、结肠 5-HT 和结肠 VIP 含量测定发现,C + T 组 5-HT 及 VIP 含量增加,提示 5-HT 及 VIP 含量升高可能与 IBS-C 发生密切相关。

综上所述,对 5 种因素大鼠造模方式进行对比研究,多因素联合造模的动物相比单因素造模(冰水灌胃)更符合人类 IBS 的表现,其中冰水灌胃结合夹尾法建立的 IBS-C 大鼠模型的 Bristol 得分、排便粒数均降低,对糖水兴趣降低以及自主活动行为减少,肠道敏感性显著升高,小肠推进率降低,从各方面比较符合中医肝气郁滞证 IBS-C 动物特征,具有肝郁证候稳定,肠道动力障碍显著的优点,可作为比较理想的肝郁证 IBS-C 发病机制及相关中药药效评价的模型。但由于时间和条件的限制,研究也存在诸多不足,今后可以进一步扩大实验样本量,增加观察时间及检测指标,对造模过程中的复杂因素进行更全面的比较研究。

参 考 文 献(References)

- [1] 李军祥, 陈詒, 唐旭东, 等. 肠易激综合征中西医结合诊疗共识意见(2017 年) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(3): 227-232.
Li JX, Chen J, Tang XD, et al. Consensus on diagnosis and treatment of irritable bowel syndrome with integrated traditional Chinese and western medicine (2017) [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2018, 26(3): 227-232.
- [2] 刘建乔, 刘仍海, 吴承东, 等. 健脾疏肝丸治疗便秘型肠易激综合征肝郁气滞证临床疗效观察 [J]. 北京中医药, 2023, 42(4): 394-397.
Liu JQ, Liu RH, Wu CD, et al. Clinical observation on treatment of constipation irritable bowel syndrome of stagnation of liver Qisynndrome with Jianpi Shugan Pill [J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2023, 42(4): 394-397.
- [3] Ju M, Kim N, Shin CM, et al. A randomized, double-blind, active-controlled exploratory clinical trial for the evaluation of the efficacy and safety of goodmorning S granule® on constipation [J]. Korean J Gastroenterol, 2022, 80(1): 17-27.
- [4] Li L, Cui H, Li T, et al. Synergistic effect of berberine-based Chinese medicine assembled nanostructures on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome *in vivo* [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 1210.
- [5] 陈颖, 赵妍, 罗丹妮, 等. 腹壁撤退反射实验测量方法概述 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 89-93.
Chen Y, Zhao Y, Luo DN, et al. asurement methods for abdminal withdrawal reflex test [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(8): 89-93.
- [6] 张立霞, 闫波, 潘颖, 等. 酸敏感离子通道 3 对肠易激综合征大鼠内脏高敏感性的影响及其机制 [J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(10): 1162-1166.
Zhang LX, Yan B, Pan Y, et al. Effect and mechanism of acid-sensing ion channel 3 on visceral hypersensitivity in rats with irritable bowel syndrome [J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2023, 48(10): 1162-1166.
- [7] 潘晓鸥, 赵燕, 赵远桥, 等. 石斛碱对肝郁脾虚型肠易激综合征小鼠 GFAP、NGF、BDNF 表达及内脏敏感性的影响 [J]. 中成药, 2021, 43(5): 1186-1190.
Pan XO, Zhao Y, Zhao YQ, et al. Effects of dendrobine on visceral sensitivity associated GFAP, NGF, BDNF ex-pressions in mice with irritable bowel syndrome of liver Qi-Stagnation & Spleen-Deficiency pattern [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(5): 1186-1190.
- [8] 高鸿智, 杨勇军, 刘仕鸿, 等. 中药治疗便秘型肠易激综合征 SD 大鼠的实验研究 [J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(4): 161-165.
Gao HZ, Yang YJ, Liu SH, et al. Experimental study on treatment of constipation irritable bowel syndrome sd rats with traditional Chinese medicine [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2021, 37(4): 161-165.
- [9] 何杰滢, 桂蓓, 李梦秋, 等. 胃寒型功能性消化不良大鼠模型的构建 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(2): 212-217.
He JY, Gui B, Li MQ, et al. Construction of functional dyspepsia models of Weiham syndrome in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(2): 212-217.
- [10] Monleon S, D'Aquila P, Parra A, et al. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine [J]. Psychopharmacology (Berl), 1995, 117(4): 453-457.
- [11] 周天然, 张瑶, 逯晓旭, 等. 慢性束缚应激腹泻型肠易激综合征大鼠模型的改良与评价 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(1): 163-168.
Zhou TR, Zhang Y, Lu XX, et al. Improvement and evaluation of rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome induced by chronic restrain stress [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2018, 35(1): 163-168.
- [12] 刘芳, 张芮苑, 刘畅, 等. 发汗前后厚朴对 IBS-C 大鼠肠道菌群分布及 5-HT、SP 水平的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(14): 141-149.
Liu F, Zhang RY, Liu C, et al. Effect of *Magnolia officinalis* cortex before and after sweating on distribution of intestinal flora and levels of 5-HT and SP in IBS-C rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(14): 141-149.
- [13] 祁赛. 摩腹法对 IBS-C 模型大鼠肠活动效应及 EGCs、GDNF、AKt 的研究 [D]. 天津: 天津中医药大学; 2020.
Qi S. Study on the effect of abdominal massage on intestinal activity and EGCs, GDNF, AKt in IBS-C model rats [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine; 2020.
- [14] Filippone A, Ardizzone A, Bova V, et al. A combination of xyloglucan, pea protein and *Chia* seed ameliorates intestinal barrier integrity and mucosa functionality in a rat model of constipation-predominant irritable bowel syndrome [J]. J Clin Med, 2022, 11(23): 7073.
- [15] Chen Y, Li Z, Yang Y, et al. Role of glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of experimental irritable bowel syndrome rat models [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(3): 607-613.
- [16] 杨倩, 杜妤, 郭子敬, 等. 麻枳降浊方对便秘型肠易激综合征大鼠肠道间质细胞的影响 [J]. 中医杂志, 2015, 56(12): 1058-1060.
Yang Q, Du Y, Guo ZJ, et al. Effect of *Mazhi Jiangzhuo Fang* on intestinal interstitial cell of rats with constipation type of irritable bowel syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2015, 56(12): 1058-1060.
- [17] 刘永, 谷诺诺, 王凯星, 等. 通腑降浊方对便秘型肠易激综合征大鼠粪便菌群结构的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(6): 1127-1133.
Liu Y, Gu NN, Wang KX, et al. Effect of bowels-unblocking and turbidity-purging recipe on microbial communities in faeces of rats with constipation-predominant irritable bowel syndrome [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2020, 37(6): 1127-1133.
- [18] 刘梦茹, 邱仁静, 田耀洲, 等. 运脾柔肝方对便秘型肠易激综合征大鼠胃动素、生长抑素影响的实验研究 [J]. 中国医

- 药导报, 2020, 17(8): 4-8, 16, 198.
- Liu MR, Qiu RJ, Tian YZ, et al. Experimental study on effect of Yunpi Rougan Recipe on motilin and somatostatin in rats with constipation type irritable bowel syndrome [J]. Chin Med Her, 2020, 17(8): 4-8, 16, 198.
- [19] Mnatsakanyan MG, Dyukova GM, Pogromov AP, et al. Emotional and personality features of patients with irritable bowel syndrome and bowel inflammatory diseases [J]. Klin Med, 2016, 94(10): 764-769.
- [20] 黄烨, 殷惠军, 陈可冀. 病证结合的基础研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 299-303.
- Huang Y, Yin HJ, Chen KJ. Basic research on the combination of disease and syndrome [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2012, 32(3): 299-303.
- [21] 涂星, 柴玉娜, 唐洪梅, 等. 肝郁脾虚型肠易激综合征便秘大鼠模型的建立和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 30-34.
- Tu X, Chai YN, Tang HM, et al. Establishment and evaluation of a rat model of constipation-predominant irritable bowel syndrome with liver-stagnation and spleen-deficiency [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(1): 30-34.
- [22] 陈奇, 张伯礼. 中药药效研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2016.
- Chen Qi, Zhang BL. Methodology for the study of traditional chinese medicine pharmacodynamics [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2016.
- [23] Huang Z, Lin Z, Lin C, et al. Transcutaneous electrical acustimulation improves irritable bowel syndrome with constipation by accelerating colon transit and reducing rectal sensation using autonomic mechanisms [J]. Am J Gastroenterol, 2022, 117(9): 1491-1501.
- [24] Kanazawa M, Palsson OS, Thiwan SIM, et al. Contributions of pain sensitivity and colonic motility to IBS symptom severity and predominant bowel habits [J]. Am J Gastroenterol, 2008, 103(10): 2550-2561.
- [25] Markov DD. Sucrose preference test as a measure of anhedonic behavior in a chronic unpredictable mild stress model of depression: outstanding issues [J]. Brain Sci, 2022, 12(10): 1287.
- [26] 易丽莎, 陈莹, 孙会会, 等. 精神应激致内脏高敏感大鼠的心理行为学变化 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(35): 1-6.
- Yi LS, Chen Y, Sun HH, et al. Psychological behavior changes in visceral hypersensitivity rat model induced by mental stress [J]. Chin J Modern Med, 2013, 23(35): 1-6.
- [27] 杨倩, 邱贝, 马赞, 等. 便秘型肠易激综合征大鼠肠组织中 5-HT 的实验研究 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(30): 35-37.
- Yang Q, Qiu B, Ma B, et al. Experimental study of 5-HT in intestinal tissues of rats with constipation predominant irritable bowel syndrome [J]. Clin J Chin Med, 2014, 6(30): 35-37.
- [28] 郑超伟, 李桂贤, 李敏, 等. 加味柴芍六君颗粒对便秘型肠易激综合征模型大鼠结肠组织 5-HT 的影响 [J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(4): 386-388.
- Zheng CW, Li GX, Li M, et al. Effect of Jiawei Chaishao Liujun Granule on 5-HT in the intestine tissue of constipation-predominant irritable bowel syndrome model rats [J]. J Pract Tradit Chin Med, 2019, 35(4): 386-388.
- [29] 黄重发, 金韩. 结肠水疗对便秘型 IBS 患者胃肠激素影响的相关性研究 [J]. 重庆医学, 2008, 37(5): 516-518.
- Huang CF, Jin H. Correlation study on the effect of colon hydrotherapy on gastrointestinal hormones in patients with constipation IBS [J]. Chongqing Med, 2008, 37(5): 516-518.

[收稿日期] 2023-07-29

张树玲,王军威,左鲁玉,等. 基于 16S rRNA 测序技术研究口服益生菌对结肠癌皮下瘤小鼠肠道菌群结构的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1564–1572.

Zhang SL, Wang JW, Zuo LY, et al. Effects of oral probiotics on gut microbiota structure in subcutaneous tumors in mice with colon cancer based on 16S rRNA sequencing technology [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1564–1572.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.006

基于 16S rRNA 测序技术研究口服益生菌对
结肠癌皮下瘤小鼠肠道菌群结构的影响

张树玲,王军威,左鲁玉,胡世亮,孙君志,王纯*

(成都体育学院,成都 610041)

【摘要】 目的 基于 16S rRNA 测序技术探讨口服益生菌对结肠癌皮下瘤小鼠肠道菌群多样性、群落结构及组间差异的影响。**方法** 24 只 6 周龄 BALB/c 雄性小鼠,适应性喂养 1 周后,随机分为对照组(NC 组, $n = 8$),模型组(M 组, $n = 8$),益生菌 + 模型组(PM 组, $n = 8$)。PM 组采用灌胃 200 μL 益生菌混合溶液(长双歧杆菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种混合冻干粉, 2×10^8 CFU),NC 组、M 组则给予 200 μL 生理盐水,每周 3 次,连续 7 周。于 10 周龄末,M 组和 PM 组左后肢侧背部皮下接种 0.2 mL CT26.WT 细胞悬液(浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$),NC 组相同部位接种 0.2 mL 生理盐水。观察小鼠一般状态、监测皮下肿瘤生长情况,利用 16S rRNA 测序法检测肠道菌群结构的变化。**结果** M 组小鼠皮下瘤凸显,PM 组小鼠皮下瘤体积与重量显著减少($P < 0.05$)。与 NC 组相比,M 组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数降低,组间 Beta 多样性存在显著性差异($P < 0.01$),补充益生菌对 M 组小鼠肠道菌群结构多样性具有一定的回调作用。与 M 组相比,PM 组拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、*Muribaculaceae*、拟杆菌属(*Bacteroides*)等相对丰度升高,厚壁菌门(*Firmicutes*)、脱硫菌门(*Desulfobacterota*)、毛螺菌属 NK4AB6(*Lachnospiraceae_NK4A136_group*)、另枝菌属(*Alistipes*)等相对丰度降低。LEfSe 分析表明,PM 组 *Muribaculaceae*、拟杆菌属(*Bacteroides*)为丰度较高的差异物种(LDA 值 > 4)。**结论** 口服益生菌可能通过增加结肠癌皮下瘤小鼠肠道菌群中有益菌 *Muribaculaceae* 和拟杆菌属(*Bacteroides*)的相对丰度,进而改善肠道菌群失调状态。

【关键词】 益生菌;结肠癌;皮下瘤;肠道菌群

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1564-09

Effects of oral probiotics on gut microbiota structure in
subcutaneous tumors in mice with colon cancer based
on 16S rRNA sequencing technology

ZHANG Shuling, WANG Junwei, ZUO Luyu, HU Shiliang, SUN Junzhi, WANG Chun*

(Chengdu Sport University, Chengdu 610041, China)

Corresponding author: WANG Chun. E-mail: 993279039@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of oral probiotics on gut microbiota diversity, colony structure, and intergroup differences in mice with subcutaneous colon cancer tumors, based on 16S rRNA sequencing technology.

Methods Twenty-four 6-week-old male BALB/c mice were divided randomly into normal control group (NC group, $n = 8$), model group (M group, $n = 8$), and probiotic + model group (PM group, $n = 8$) after adaptive feeding for 1 week. Mice in the PM group were given 200 μL probiotic mixed solution (*Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus delbrueckii*

[基金项目] 四川省科技计划项目资助(2022JDRC0137),运动医学四川省重点实验室 2023 年创新课题(2023-A014)。
Funded by Science & Technology Plan Projects of Sichuan Province(2022JDRC0137), 2023 Innovation Projects of Sports Medicine Key Laboratory of Sichuan Province(2023-A014).

[作者简介] 张树玲(1989—),女,在读博士研究生,研究方向:运动干预与健康促进。Email:1173054559@qq.com

[通信作者] 王纯(1961—),女,教授,研究方向:运动干预与健康促进。Email:993279039@qq.com

subsp. bulgaricus mixed lyophilized powder, 2×10^8 colony-forming units) by gavage three times/week for 7 weeks, while the M group and PM group received 200 μ L normal saline. At 10 weeks old, 0.2 mL CT26.WT cell suspension (1×10^7 /mL) was inoculated subcutaneously into the left hind limbs of M group and PM group, while NC group were inoculated with 0.2 mL normal saline. The general state of mice was observed, the growth of subcutaneous tumor was monitored, and the changes of intestinal flora structure were detected by 16S rRNA sequencing. **Results** The subcutaneous tumors of the M group were prominent, and the subcutaneous tumor volume and weight of the PM group were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with NC group, Alpha diversity index was lower in the M group, and a significant difference of Beta diversity inter groups ($P < 0.01$). And supplementation of probiotics had a certain effect on gut microbiota diversity in the M group. Compared with M group, the relative abundance of *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Muribaculaceae*, *Bacteroides* were higher in the PM group, while the relative abundance of *Firmicutes*, *Desulfobacterota*, *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *Alistipes* were lower in the PM group. LEfSe analysis showed that *Muribaculaceae* and *Bacteroides* in the PM group were different species with high abundance (LDA values > 4). **Conclusions** Oral probiotics may improve the gut microbiota by increasing the relative abundance of beneficial *Muribaculaceae* and *Bacteroides* in subcutaneous tumors in mice with colon cancer.

【Keywords】 probiotic; subcutaneous tumor; colon cancer; gut microbiota

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

2020 年全球癌症统计报告指出,全球新发癌症共 1930 万例,死亡近 1000 万例^[1]。我国占全球新发病例的 24% 和死亡病例的 30%,其中,胃肠道癌症死亡病例占我国全部恶性肿瘤死亡病例的 45%^[2]。结直肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,与既往数据相比,其发病率迅速上升,是癌症相关死亡主要原因之一^[2],但其发病原因及机制仍未明确。

Avuthu 等^[3]荟萃分析发现,肠道菌群失调与结直肠癌之间存在关联。有研究表明,肠道微生物组数据应纳入结直肠癌的预防、诊断和治疗^[4],特定致病细菌与结直肠癌的发病与进展有关,如具核梭杆菌 (*F. nucleatum*)^[3-5]、脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*)^[3-6]、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[3-6]、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)^[5] 等,而双歧杆菌 (*Bifidobacteria*)、乳酸杆菌 (*Lactobacillus*)、拟杆菌 (*Bacteroides*) 等肠道益生菌类群减少^[6]。

益生菌是一类当以足够的量使用时,对宿主健康有益的活性微生物^[7],抗肿瘤作用是益生菌的一个重要方面,可能与有效改善肠道菌群失衡^[8-10]、改变肠道环境 pH^[11]、缓解结肠炎症^[9]、增强机体免疫能力^[10]、直接抑制肿瘤相关分子^[10] 等机制有关。常见的益生菌包括乳酸杆菌 (*Lactobacillus*)、双歧杆菌 (*Bifidobacteria*)、链球菌 (*Streptococcus*) 以及少部分大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等^[12]。

16S 微生物多样性测序(又称扩增子测序)技术可对微生物中具有高度保守性及特异性的 16S rRNA 基因序列的 PCR 产物序列进行高通量测序,并检测微生物类群,获得微生物群落的组成及其相

对丰度,对分析肿瘤患者肠道菌群多样性、群落结构及其相对丰度、组间差异的变化发挥着不可忽视的作用,同时,在肿瘤患者肠道菌群中发现新致病菌方面也具有重要意义。

本实验采用皮下接种结肠癌 CT26.WT 细胞株建立结肠癌皮下荷瘤小鼠模型,以口服益生菌为干预手段,利用 16S rRNA 测序技术检测结肠癌皮下荷瘤小鼠肠道菌群多样性、群落结构及其相对丰度、组间差异等变化,探讨口服益生菌对结肠癌皮下荷瘤小鼠肠道菌群的影响,为口服益生菌改善肿瘤患者肠道菌群生态失调提供实验数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 6 周龄 SPF 级 BALB/c 雄性健康小鼠,体重 (21.37 ± 1.13)g,购于成都达硕实验动物有限公司【SCKX(川)2020-030】。分笼饲养,自由饮食饮水,室温 $20 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度 45% ~ 55%,光照 12 h/熄灯 12 h 模拟昼夜,交替环境,饲养于成都体育学院 SPF 级动物房【SYXK(川)2018-211】。本动物实验经成都体育学院伦理委员会批准(成体伦理[2021]64号)。

1.1.2 菌种

长双歧杆菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种混合冻干粉(长双歧杆菌 $> 1.0 \times 10^{10}$ CFU/g,德氏乳杆菌保加利亚亚种 $> 1.0 \times 10^{10}$ CFU/g,湖北省工业微生物菌种保藏与研究中心,20211119)。

1.1.3 主要试剂与仪器

CT26.WT 细胞株(武汉普诺赛生命科技有限公司,CL-0071),CT26.WT 细胞专用培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,CM-0071),MagPure Soil DNA LQ Kit(上海伯易生物科技有限公司,D6356-02), $1 \times$ dsDNA HS Assay Kit for Qubit(上海翌圣生物科技股份有限公司,12642ES76),TaKaRa Ex Taq(北京安诺伦生物科技有限公司,RR001Q)。CO₂ 培养箱(Thermo,美国),光学显微镜(Olympus,日本),数显游标卡尺(DELIXI,中国),台式高速离心机(Eppendorf),PCR 仪(Bio-Rad,美国),QIAextractor(QIAGEN,德国),电泳仪(Tanon,中国)凝胶成像仪(Tanon,中国),Bioanalyzer(Agilent,美国),Illumina Miseq 测序仪(Illumina Miseq,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

适应性喂养 1 周后,随机分为对照组(NC 组, $n = 8$)、模型组(M 组, $n = 8$)、益生菌 + 模型组(PM 组, $n = 8$)。

1.2.2 结肠癌皮下瘤小鼠模型

结肠癌皮下瘤小鼠模型参考文献^[13-15],取结肠癌 CT26.WT 细胞株,加入 CT26.WT 细胞专用培养基,于 5% CO₂ 培养箱中进行培养,隔天进行传代培养,当细胞活力达到 95% 时,使用 0.25% 胰酶-EDTA 消化细胞 3 min,加 10% FBS 完全培养液终止消化,将细胞悬液调整为 1×10^7 /mL。于 10 周龄末,取 0.2 mL 细胞悬液接种在 M 组和 PM 组每只小鼠左后肢侧背部皮下,NC 组每只小鼠相同部位接种 0.2 mL 生理盐水,所有操作均在无菌条件下进行。

1.2.3 口服益生菌方法

生理盐水溶解益生菌混合冻干粉达到 1×10^9 CFU/mL,PM 组给予 200 μ L (2×10^8 CFU) 混合菌粉溶液^[16],NC 组、M 组则给予 200 μ L 生理盐水。采用灌胃方式给药,每周 3 次,连续 7 周。

1.2.4 皮下荷瘤监测

从肿瘤大小可用数显游标卡尺测量其长度和宽度时,开始监测肿瘤体积。从可以触及皮下肿瘤开始监测肿瘤体积,肿瘤体积估计采用公式: $V = a \times b^2 / 2$ (a 、 b 分别为肿瘤长度与宽度),肿瘤质量通过公式: $M = V \times F$ (F 为取材时肿瘤实际质量与其体积比值)^[17]。

1.2.5 样本采集与处理

称重后以 2% 戊巴比妥钠溶液 4 mL/kg 腹腔内

注射麻醉。打开腹腔迅速取出整个肠道,冷生理盐水清洗肠道外表面后,切取所需盲肠段,用无菌镊子挤盲肠内容物至无菌冻存管,液氮速冻后转移入 -80℃ 冰箱储存,用于肠道菌群分析。

1.2.6 16S rRNA 检测肠道菌群

取出冻存的肠道内容物样本,深埋入干冰中邮寄至上海欧易生物医学科技有限公司进行 16S rRNA 测序。主要步骤包括样本总 DNA 抽提与质检、PCR 扩增、产物纯化、文库构建、Illumina 上机测序、生物信息学分析、物种注释使用 Silva 数据库。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理,以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示结果。多组间比较采用单因素方差(One-way ANOVA)进行分析,若满足正态分布,且方差齐则采用 LSD 检验,若方差不齐则采用 Tamhane's T2 检验;若不满足正态分布,则采用 Kruskal Wallis 检验或 Adonis 多元方差分析。两组间比较采用独立样本 T 检验。以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态观察

C 组小鼠精神状态良好、饮食正常、行动敏捷、体型健壮、体毛滋润而有光泽,M 组小鼠精神萎靡、动作迟缓、食欲下降、体毛无光泽、立毛、体形瘦弱,PM 组小鼠精神状态、食欲、去瘤体重、体毛光泽度等一般状态强于 M 组(见图 1)。

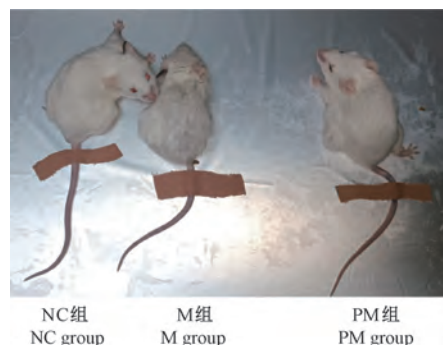
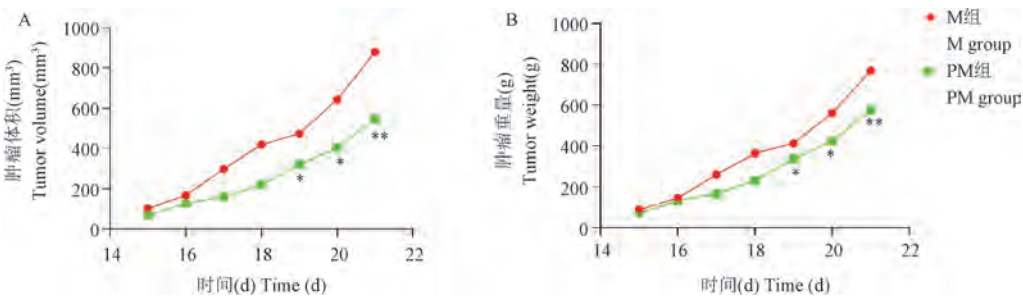


图 1 小鼠一般状态

Figure 1 General state

2.2 皮下荷瘤生长变化结果

接种 CT26.WT 细胞株后,约第 9 天可徒手触及皮下米粒般大小肿瘤,约第 15 天可用数显游标卡尺监测肿瘤体积,肿瘤体积及重量随时间逐渐增加,约第 19 天后 M 组显著性高于 PM 组,见图 2。



注:与 M 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 皮下肿瘤生长趋势

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

Figure 2 Trend of subcutaneous tumor growth

2.3 肠道菌群测序结果

2.3.1 肠道样本测序数据分析结果

从 3 组 17 例肠道样本中共获得 1354 601 条序列,经质量过滤、降噪、拼接及去嵌合体等质控分析,共得到 844 724 条序列,最终形成 ASV 6993 个。如图 3 所示,NC 组、M 组和 PM 组共有 ASV 28 个,NC 组特有 ASV 2920 个,M 组特有 ASV 2002 个,PM 组特有 ASV 1595 个。

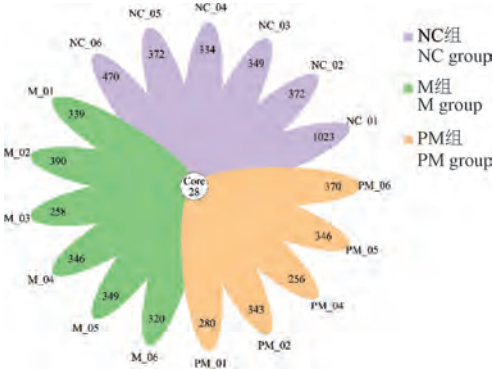


图 3 花瓣图

Figure 3 Flower plot

2.3.2 肠道菌群 Alpha 多样性分析结果

Alpha 多样性又称样本内多样性,通常反映一个样本内部的均匀度和丰富度信息。Alpha 多样性指数包括 Shannon、Simpson、ACE、Chao1、Observed species 等 5 个指数。Simpson、Shannon 指数反映群落丰富度,其稀释曲线随测序量的增加而逐渐平坦,表明当前测序量趋于饱和,即测序深度足够,已基本覆盖样本中所有物种(图 4)。ACE、Chao1、Observed species 指数放映群落多样性,数值越大表示群落含物种越高。如图 5 所示,与 NC 组相比,M 组小鼠 ACE 指数、Chao1 指数、Observed species 指数均下降,补充益生菌后其趋于正常,但均无显著性差异。

2.3.3 肠道菌群 Beta 多样性分析结果

Beta 多样性通常反映不同环境下群落之间的物种差异,即样本间距离。若样品间距离越接近,其微生物组成结构越相似,差异性越小,故群落结构相似度高的样品更聚集,群落结构差异性大更分散。主坐标分析 (Principal Coordinates Analysis, PCoA) 图(图 6) 和多元方差分析 (Adonis) 显示,各

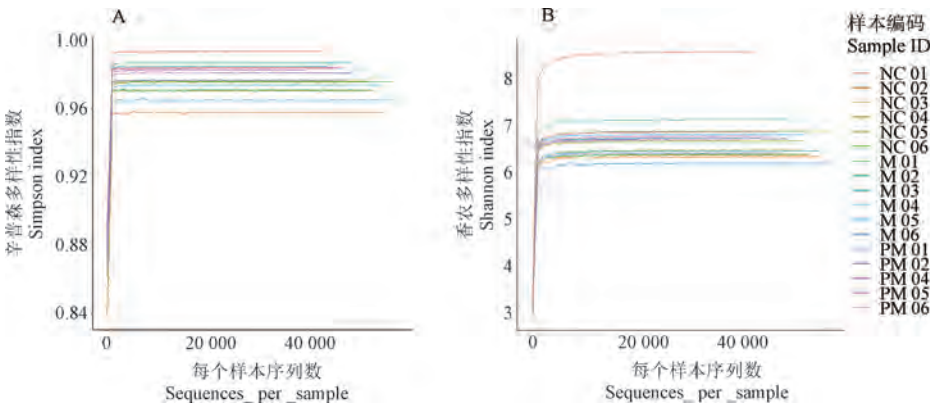


图 4 稀释曲线

Figure 4 Dilution curve

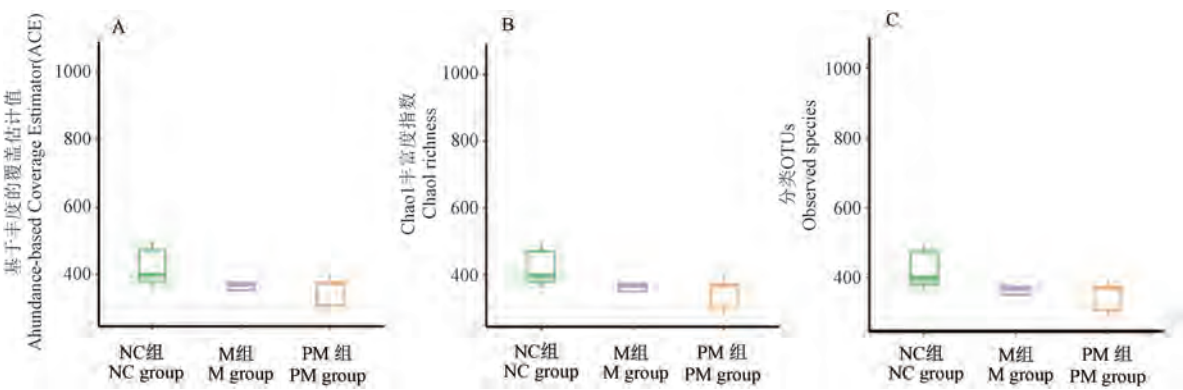
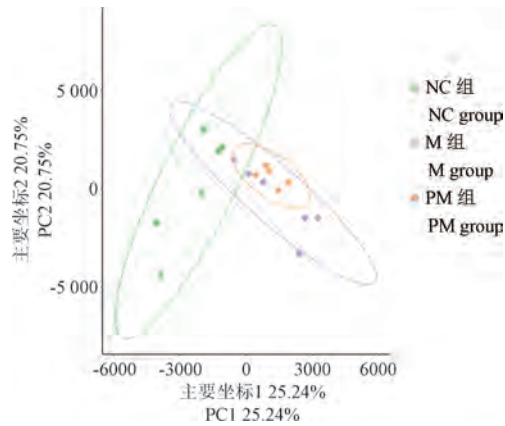


图 5 箱线图

Figure 5 Boxplot diagram

组组内样本倾向聚集,组间肠道菌群组成结构存在显著性差异($IR^2 = 0.26, P = 0.001 < 0.05$)。提示结肠癌小鼠肠道菌群结构发生了改变,补充益生菌后对肠道菌群结构多样性具有一定的回调作用。



注:横坐标(PC1)和纵坐标(PC2)为样本间差异解释度最大的两个主要坐标。

图 6 PCoA 图

Note. The abscissa (PC1) and ordinate (PC2) are the two main coordinates with the largest explanation of the differences between samples.

Figure 6 PCoA diagram

2. 3. 4 肠道菌群落结构分析结果

群落结构又称“生物群落”通常指生态学中,一个群落生物环境内相互之间具有直接或间接关系的所有生物。本实验统计分析各组小鼠各个细菌分类水平(门、纲、目、科、属、种)上的微生物群落的构成,选取门和属两种水平进行分析比较,清晰地展示了各组小鼠肠道内容物菌群的优势菌群及其差异,重点研究相对丰度占比较高的菌种。

如图 7A 所示,在门水平包括拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门

(*Proteobacteria*)和脱硫菌门(*Desulfobacterota*)4 种优势菌门,与 NC 组相比, M 组拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、脱硫菌门(*Desulfobacterota*)等相对丰度升高,厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)等相对丰度降低,提示厚壁菌门(*Firmicutes*)/拟杆菌门(*Bacteroidetes*)即 F/B 比值降低。经补充益生菌后,与 M 组相比,PM 组拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)等相对丰度升高,厚壁菌门(*Firmicutes*)、脱硫菌门(*Desulfobacterota*)等相对丰度降低,提示 F/B 比值降低。如图 7B 所示,在属水平上包括 *Muribaculaceae*、毛螺菌属 *NK4A136* (*Lachnospiraceae* _ *NK4A136_group*)、另枝菌属 (*Alistipes*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)等菌属是主要优势菌属。经补充益生菌后,与 M 组相比,PM 组 *Muribaculaceae*、拟杆菌属 (*Bacteroides*)等相对丰度升高,毛螺菌属 *NK4A136* (*Lachnospiraceae* _ *NK4A136_group*)、另枝菌属 (*Alistipes*)等相对丰度降低。

2. 3. 5 肠道菌群组间差异分析结果

采用 LEfSe 分析法即线性判别分析 (Linear Discriminant Analysis, LDA) 与效应量测量相结合,进一步探讨各组间的分类区别,结果发现共 44 条差异显著的种群 (LDA 值均大于 2),其中,20 条富集于 NC 组和 PM 组,4 条富集于 M 组。在属水平上, M 组缠结优杆菌属 (*Eubacterium_nodatum_group*) 显著性增多; PM 组 *Muribaculaceae*、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、*Muribaculum*、梭菌属 (*Clostridioides*)、狭义梭菌属_1 (*Clostridium_sensu_stricto_1*)、普雷沃氏菌科_ *NK3B31* (*Prevotellaceae_NK3B31_group*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、*ASF356*、狄氏副拟杆菌属 (*Parabacteroides*)、*UCG_010* 显著增多(图 8)。

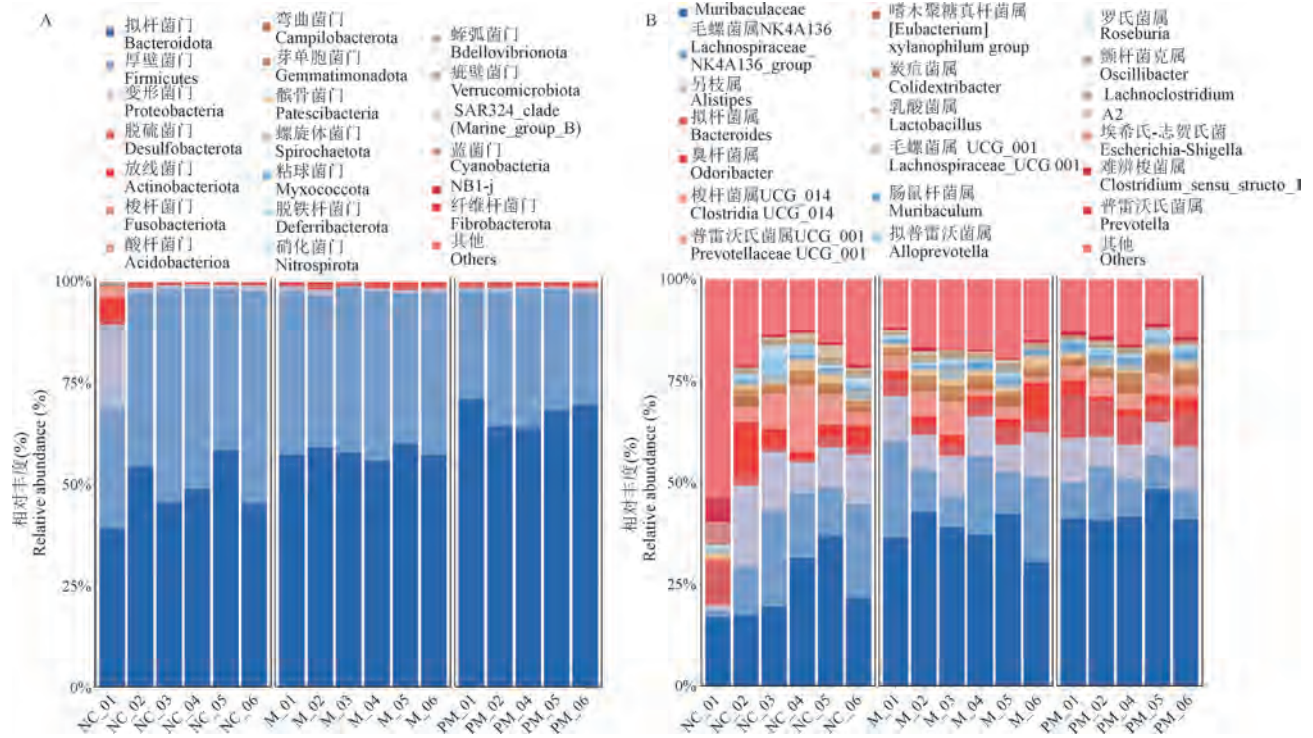


图 7 门和属水平的群落结构柱状图
Figure 7 Histogram of community structure at phylum level and genus level

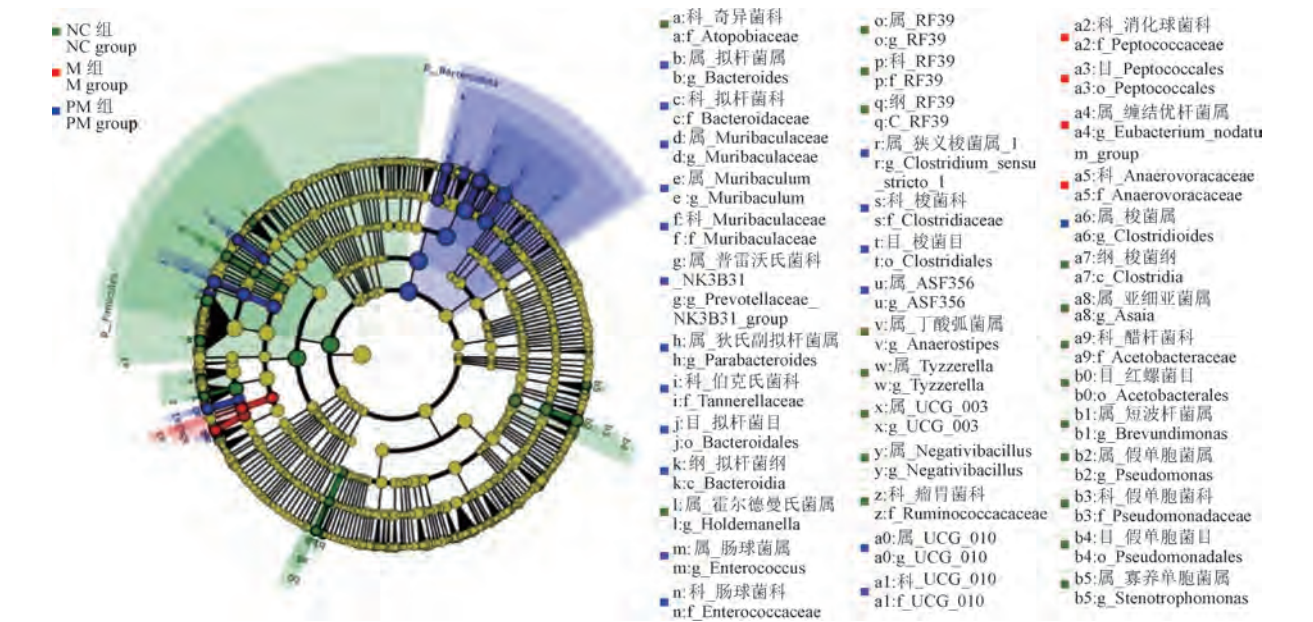


图 8 LEfSe 组间差异分析图
Figure 8 Analysis diagram of difference between LEfSe groups

3 讨论

结肠癌是一种与遗传、环境因素、生活方式等因素具有很强相关性的疾病,是全球最常见恶性肿瘤之一,国内发病率呈逐年增长趋势^[1]。如年龄、饮食、药物、代谢疾病等机体内环境的改变可能

造成肠道菌群稳态的失调,继而不同程度地引发多种疾病,其中,结肠癌的发生发展与其肠道菌群失调密切相关^[10,18]。改善肠道菌群失调状态,可降低结肠癌发生率,抑制结肠癌恶化,具体机制尚不明确^[19]。益生菌是一类对机体产生有益作用的微生物,可改善宿主肠道微生物平衡,对机体产生有利

的影响,用来预防和治疗疾病的历史已有一百多年了^[20]。其中,乳酸杆菌和双歧杆菌是益生菌中最重要的两位成员,人体生理性细菌,对宿主无致病性,摄入足够量对宿主肠道健康具有一定维持作用,可预防或抑制宿主肠道癌症的发生发展^[21]。本实验以结肠癌皮下瘤小鼠为研究对象,口服益生菌溶液为干预手段,益生菌选用长双歧杆菌和保加利亚亚种混合冻干粉(长双歧杆菌 $> 1.0 \times 10^{10}$ CFU/g,德氏乳杆菌保加利亚亚种 $> 1.0 \times 10^{10}$ CFU/g),利用 16S rRNA 测序技术研究结肠癌皮下瘤小鼠肠道菌群 Alpha 多样性、Beta 多样性、在门、属水平上肠道菌群菌落结构的变化及组间差异的影响。

实验采用皮下接种 CT26.WT 细胞株建立结肠癌皮下瘤小鼠模型,约第 9 天徒手触摸到 M 组及 PM 组小鼠皮下米粒般大小肿瘤块,肿瘤块随时间的延长开始逐渐变大,成功率 100%,由此,可见实验成功构建结肠癌皮下瘤小鼠模型。监测皮下肿瘤生长变化结果显示,结肠癌皮下瘤小鼠经口服益生菌 7 周后,后期其皮下瘤的体积与重量显著性下降,提示口服双歧杆菌和乳酸杆菌具有抑制肿瘤生长的作用,这与以往研究结果一致^[21-22]。

利用 16S rRNA 技术观察补充益生菌对肠道菌群结构的影响,结果显示各组间的有效序列及 ASVs 数量发生变化。Alpha 多样性分析显示,M 组与 NC 组相比有下降的趋势,这可能与肠内益生菌群大量减少、致病菌群大量增加有关,提示可能引发慢性炎症反应,促发结直肠癌的发生发展^[23-25];补充益生菌后其趋于正常,但均无显著性差异。进一步进行 Beta 多样性分析显示,各组间肠道菌群组成结构存在显著性差异($IR^2 = 0.26, P = 0.001 < 0.05$),提示结肠癌小鼠肠道菌群结构发生了改变,经补充益生菌对其肠道菌群结构具有一定的回调作用^[26-29]。有研究表明^[30-32],厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)作为人体两类主要肠道菌群,两者比值即 F/B 的增加或减少均被视为肠道菌群生态失调,其中,前者是肥胖患者,后者多数是炎症性肠病或结直肠癌患者^[30],这与本实验结肠癌皮下瘤小鼠肠道菌群菌落结构分析结果中 M 组 F/B 比值的变化一致。有研究表明,口服益生菌如双歧杆菌、乳酸杆菌,有助于恢复生态失调的微生物群,并可预防肥胖、炎症性肠病和结直肠癌等^[30,33]。Liu 等^[16]研究发现,口服丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*, CB)降低结肠炎相关结肠癌小鼠肠道

微生物群 F/B 比值,增加益生菌的相对丰度,与 PM 组经口服益生菌后 F/B 比值变化趋势一致。在门水平上,与 M 组相比,PM 组促炎菌变形菌门(*Proteobacteria*)相对丰度升高,但因增加幅度仅为 0.04%,而促炎菌脱硫菌门(*Desulfobacterota*)相对丰度降低。在属水平上,*Muribaculaceae* 参与抗炎机制^[34]、拟杆菌属(*Bacteroides*)可减轻炎症^[35],PM 组 *Muribaculaceae*、拟杆菌属(*Bacteroides*)等相对丰度高于 M 组,提示口服益生菌可显著提高肠道内有益菌群的相对丰度,改善肠道菌群稳态。PM 组有益菌毛螺菌属 NK4A136(*Lachnospiraceae_NK4A136_group*)、另枝菌属(*Alistipes*)等相对丰度低于 M 组,与以往研究不同^[36-37],可能与口服益生菌种类、小鼠种类及批次等其他因素有关。本研究进一步采用 LEfSe 分析表明,PM 组具有显著性差异菌群为 *Muribaculaceae*、拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Muribaculum*、梭菌属(*Clostridioides*)、狭义梭菌属_1(*Clostridium_sensu_stricto_1*)、普雷沃氏菌科_NK3B31(*Prevotellaceae_NK3B31_group*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、ASF356、狄氏副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、UCG_010,其中,*Muribaculaceae*、拟杆菌属(*Bacteroides*)(两者 LDA 值 > 4)与肠道菌群物种分析中两者相对丰度升高具有较好的一致性,提示口服益生菌可能增加结肠癌皮下瘤小鼠肠道菌群中益生菌的相对丰度。

4 小结

口服益生菌可能通过增加结肠癌皮下瘤小鼠肠道菌群中有益菌 *Muribaculaceae* 和拟杆菌属(*Bacteroides*)的相对丰度,进而改善肠道菌群失调状态。

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] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J, 2021, 134(7): 783-791.
- [3] Avuthu N, Guda C. Meta-analysis of altered gut microbiota reveals microbial and metabolic biomarkers for colorectal cancer [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(4): e0001322.
- [4] Garrett WS. The gut microbiota and colon cancer [J]. Science, 2019, 364(6446): 1133-1135.

- [5] Quaglio AEV, Grillo TG, de Oliveira ECS, et al. Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(30): 4053-4060.
- [6] Si H, Yang Q, Hu H, et al. Colorectal cancer occurrence and treatment based on changes in intestinal flora [J]. Semin Cancer Biol, 2021, 70: 3-10.
- [7] Hill C, Guarner F, Reid G, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014, 11(8): 506-514.
- [8] Pushpanathan P, Mathew GS, Selvarajan S, et al. Gut microbiota and its mysteries [J]. Indian J Med Microbiol, 2019, 37(2): 268-277.
- [9] Xu Q, Xu P, Cen Y, et al. Effects of preoperative oral administration of glucose solution combined with postoperative probiotics on inflammation and intestinal barrier function in patients after colorectal cancer surgery [J]. Oncol Lett, 2019, 18(1): 694-698.
- [10] 陈海彬, 周红光, 李文婷, 等. 基于肠道菌群的结肠癌防治及与癌毒病机理论的关系 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(12): 5796-5800.
- Chen HB, Zhou HG, Li WT, et al. Prevention and treatment of colon cancer based on intestinal flora and its relationship with cancerous toxin theory [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(12): 5796-5800.
- [11] 边佳昕, 闵涛玲, 陈昌发, 等. 益生菌用于疾病治疗的研究进展 [J]. 世界临床药物, 2017, 38(2): 134-137.
- Bian JX, Min TL, Chen CF, et al. Research progress of probiotics for disease treatment [J]. World Clin Drugs, 2017, 38(2): 134-137.
- [12] Ambalam P, Raman M, Purama RK, et al. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2016, 30(1): 119-131.
- [13] 吴宏磊, 陈进宝, 徐可, 等. 六神丸对结肠癌 CT26 荷瘤小鼠移植瘤生长的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(11): 1203-1206.
- Wu HL, Chen JB, Xu K, et al. Effect of Liushen pills on the growth of colon cancer CT26 tumor-bearing mice [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2022, 38(11): 1203-1206.
- [14] 刘文立, 莫海云. 白及多糖通过调节免疫作用抑制结肠癌 CT26 荷瘤小鼠肿瘤生长 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(8): 941-945.
- Liu WL, Mo HY. *Bletilla Striata* polysaccharide inhibits tumor growth in colon cancer CT26 tumor-bearing mice by regulating immunity [J]. Chin J Immunol, 2021, 37(8): 941-945.
- [15] 崔立坤, 张皓, 于伟, 等. 槐白皮提取物对 CT26 荷瘤小鼠的抑瘤减毒作用研究 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(5): 585-589.
- Cui LK, Zhang H, Yu W, et al. Study on the anti-tumor and toxicity reduction effects of the bark extract of *Sophora japonica* on the CT26 tumor-bearing mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2021, 38(5): 585-589.
- [16] Liu M, Xie W, Wan X, et al. *Clostridium butyricum* modulates gut microbiota and reduces colitis associated colon cancer in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 88: 106862.
- [17] 林行字. 钙蛋白酶抑制剂对癌性恶病质小鼠骨骼肌消耗的治疗作用及其机制研究 [D]. 福州: 福建医科大学; 2017.
- Lin HY. Effect and mechanism of calpain inhibitors on skeletal muscle wasting in cancer cachectic mice [D]. Fuzhou: Fujian Medical University; 2017.
- [18] Li J, Zhang AH, Wu FF, et al. Alterations in the gut microbiota and their metabolites in colorectal cancer: recent progress and future prospects [J]. Front Oncol, 2022, 12: 841552.
- [19] 王生, 黄晓星, 余鹏飞, 等. 肠道菌群失调与结肠癌发生发展之间关系的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8): 1045-1049.
- Wang S, Huang XX, Yu PF, et al. Intestinal microbiota dysbiosis associated with the development of colon cancer: progress and prospects [J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(8): 1045-1049.
- [20] Reid G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2016, 30(1): 17-25.
- [21] Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(10): 605-616.
- [22] 李庆祥. 口服短双歧杆菌抑制肿瘤生长的机制研究 [D]. 北京: 北京大学; 2021.
- Li QX. Study on the mechanism of oral *Bifidobacterium brevis* inhibiting tumor growth [D]. Beijing: Peking University; 2021.
- [23] Keku TO, Dulal S, Deveaux A, et al. The gastrointestinal microbiota and colorectal cancer [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 308(5): G351-G363.
- [24] 杨柳, 梁新军. 肠道菌群微生态与结直肠癌的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2018, 45(24): 1239-1242.
- Yang L, Liang XJ. Advances in the study of intestinal microecology and colorectal cancer [J]. Chin J Clin Oncol, 2018, 45(24): 1239-1242.
- [25] 罗绰, 黄明君, 王一琳, 等. 肠道菌群与结直肠癌研究进展 [J]. 肠外与肠内营养, 2019, 26(6): 377-381.
- Luo C, Huang MJ, Wang YL, et al. Advances in relation of intestinal flora and colorectal cancer [J]. Parenter Enter Nutr, 2019, 26(6): 377-381.
- [26] Tsai YL, Lin TL, Chang CJ, et al. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases [J]. J Biomed Sci, 2019, 26(1): 3.
- [27] Fong W, Li Q, Yu J. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer [J]. Oncogene, 2020, 39(26): 4925-4943.
- [28] Sugimura N, Li Q, Chu ESH, et al. *Lactobacillus gallinarum* modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumorigenesis [J]. Gut, 2021, 71(10): 2011-2021.
- [29] 杨小娟. 阿司匹林、益生菌制剂及两者的联合在结直肠癌进

- 展中的作用机制探究 [D]. 银川: 宁夏医科大学; 2021.
- Yang XJ. Study on the mechanism of aspirin, probiotics and their combination in the progress of colorectal cancer [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University; 2021.
- [30] Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease [J]. Microorganisms, 2020, 8 (11): 1715.
- [31] So WKW, Chan JYW, Law BMH, et al. Effects of a rice bran dietary intervention on the composition of the intestinal microbiota of adults with a high risk of colorectal cancer: a pilot randomised-controlled trial [J]. Nutrients, 2021, 13(2): 526.
- [32] 黄媛媛, 陈华国, 谢文, 等. 多糖与肠道菌群相互作用及其构效关系研究进展 [J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2325-2346.
- Huang YY, Chen HG, Xie W, et al. Interaction between polysaccharide and intestinal flora and its structure-effect relationship: a review [J]. Microbiol Chin, 2022, 49(6): 2325-2346.
- [33] 王爱云, 沈颖, 仲金秋, 等. 益生菌预防肿瘤作用研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(3): 312-315.
- Wang AY, Shen Y, Zhong JQ, et al. Progress of DJ-1 protein as target for liver fibrosis treatment [J]. Chin Pharmacol Bull, 2018, 34(3): 312-315.
- [34] Hao H, Zhang X, Tong L, et al. Effect of extracellular vesicles derived from *Lactobacillus plantarum* Q7 on gut microbiota and ulcerative colitis in mice [J]. Front Immunol, 2021, 12: 777147.
- [35] Tan H, Zhai Q, Chen W. Investigations of *Bacteroides* spp. towards next-generation probiotics [J]. Food Res Int, 2019, 116: 637-644.
- [36] Chen S, Wu X, Yu Z. Juglone suppresses inflammation and oxidative stress in colitis mice [J]. Front Immunol, 2021, 12: 674341.
- [37] Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, et al. The genus *Alistipes*: gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health [J]. Front Immunol, 2020, 11: 906.

[收稿日期] 2023-05-04

《中国实验动物学报》2024 年征订启事

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

开设栏目:研究论著和研究快报。

读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,140 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,合 600 元。邮发代号:2-748。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

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

叶志超,陈国玉,潘若浪,等. 人脐带间充质干细胞单次静脉注射 NOG 小鼠组织分布及其分析方法学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1573-1580.

Ye ZC, Chen GY, Pan RL, et al. Tissue distribution and analysis of human umbilical cord mesenchymal stem cells in NOG mice following single intravenous injection [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1573-1580.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.007

人脐带间充质干细胞单次静脉注射 NOG 小鼠组织分布及其分析方法学研究

叶志超^{1#}, 陈国玉^{1#}, 潘若浪², 史煜华¹, 顾利强¹, 夏丽娟¹,
林晓波¹, 张强², 徐莎莎², 邵金金^{1*}, 张立将^{1*}

(1. 杭州医学院安全性评价研究中心, 浙江省药物安全性评价技术研究
重点实验室, 杭州 310053; 2. 杭州易文赛生物技术有限公司, 杭州 311100)

【摘要】 目的 建立并验证小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA RT-qPCR 分析方法学, 研究人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSCs)单次静脉注射后在重度免疫缺陷 NOG 小鼠体内的组织分布情况。**方法** 建立小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA 的 RT-qPCR 分析方法, 进行标准曲线与线性范围、准确度与精密度、稳定性等方法学验证。取 NOG 小鼠 36 只, 雌雄各半, 单次静脉注射给予 HUCMSCs 3.5×10^7 cells/kg, 于 6、12、24、72 h、1 周、2 周各取 6 只小鼠麻醉, 采集血液(EDTA 抗凝)后解剖, 取肺、肾、心脏、肝、大脑、脊髓、胃、小肠、脂肪、皮肤、脾、睾丸(子宫、卵巢)提取 DNA, 用已验证的小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA RT-qPCR 分析方法测定各组织中 HUCMSCs 的分布情况。另选取 NOG 小鼠 18 只, 雌雄各半, 分为对照组 6 只、给药组 12 只, 分别静脉注射 0.9%氯化钠注射液、HUCMSCs 3.5×10^7 cells/kg, 给药期间观察小鼠急性毒性反应情况, 给药组于给药后 72 h、2、4 周各取 4 只动物剖检观察脏器组织大体观情况, 取肺组织石蜡切片采用免疫组化法检测线粒体蛋白表达, 分析 HUCMSCs 在肺组织中的定植情况。**结果** 建立的小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA 的 RT-qPCR 分析方法各考察指标均符合验证标准; NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后, 主要分布于肺和血液中(给药后 1 周内), 肺组织浓度高于血液, 肺组织、血液中 HUCMSCs 浓度分别在 6 ~ 24 h、6 ~ 72 h 之内维持相对平稳水平, 之后随时间推移下降, 其他组织各采样点均未测得 HUCMSCs 分布; 定植结果显示静脉注射 HUCMSCs 后 72 h 可在肺部检测到其存在, 2 周和 4 周时则未检测到; 单次静脉注射 HUCMSCs 后 NOG 小鼠未见明显急性毒性反应。**结论** 建立的 HUCMSCs 小鼠组织中分布分析方法可靠、可行; NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后主要于给药后 1 周内分布于肺和血液, 72 h 主要定植于肺组织; 单次静脉注射 HUCMSCs 具有良好的安全性。

【关键词】 人脐带间充质干细胞; NOG 小鼠; 定植分析; 组织分布

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1573-08

Tissue distribution and analysis of human umbilical cord mesenchymal stem cells in NOG mice following single intravenous injection

YE Zhichao^{1#}, CHEN Guoyu^{1#}, PAN Ruolang², SHI Yuhua¹, GU Liqiang¹, XIA Lijuan¹,
LIN Xiaobo¹, ZHANG Qiang², XU Shasha², SHAO Jinjin^{1*}, ZHANG Lijiang^{1*}

【基金项目】 浙江省重点研发计划项目(2021C03077), 杭州医学院青年科研基金项目(KYQN202106)。

Funded by Key R&D Program of Zhejiang Province (2021C03077), Hangzhou Medical College Youth Research Fund Project (KYQN202106).

【作者简介】 叶志超(1997—), 硕士, 研究方向: 药理学。Email: 1390725525@qq.com;

陈国玉(1997—), 硕士, 研究方向: 药理学。Email: chenguoyuuu@163.com。

#共同第一作者

【通信作者】 张立将(1981—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 药理毒理学研究。Email: 2020000087@hmc.edu.cn;

邵金金(1989—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 药理毒理学研究。Email: shaojinjin@hmc.edu.cn。

* 共同通信作者

(1. Key Laboratory of Drug Safety Evaluation and Research of Zhejiang Province, Center of Safety Evaluation and Research, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China. 2. S-Evans Biosciences Co., Ltd, Hangzhou 311100) Corresponding author: ZHANG Lijiang. E-mail: 2020000087@hmc.edu.cn; SHAO Jinjin. E-mail: shaojinjin@hmc.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a quantitative polymerase chain reaction (PCR) method for the analysis of human-derived SRY DNA in mouse tissues, and to study the tissue distribution of human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUCMSCs) in immunodeficient NOG mice after a single intravenous injection. **Methods** We established a quantitative PCR method for the analysis of human SRY DNA in mouse tissues, and validated the standard curve, linear range, accuracy, precision, and stability. Thirty-six NOG mice (18 male, 18 female) were administered 3.5×10^7 HUCMSCs/kg by single intravenous injection. Six mice were then anesthetized and dissected after blood collection (EDTA anticoagulation) at 6, 12, 24, and 72 h, and at 1 and 2 weeks, respectively. DNA was extracted from lung, kidney, heart, liver, brain, spinal cord, stomach, small intestine, fat, skin, spleen, testis, uterus, and ovary tissues, and the distribution of HUCMSCs in each tissue was determined by the validated quantitative PCR method for detecting the human-derived SRY gene in mouse tissues. In addition, 18 NOG mice (9 male, 9 female) were divided into control ($n = 6$) and treatment groups ($n = 12$) injected intravenously with 0.9% sodium chloride and 3.5×10^7 cells/kg, respectively. Acute toxic reactions were observed during the administration period, and four animals were dissected at 72 h and at 2 and 4 weeks after administration to observe the gross organs. Mitochondrial protein expression was detected in paraffin sections of lung tissues by immunohistochemistry to analyze the colonization of HUCMSCs in lung tissues. **Results** The established RT-qPCR method for human-derived SRY DNA in mouse tissues met the validation criteria for each index. After a single intravenous injection in NOG mice, HUCMSCs were mainly distributed in the lungs and blood within 1 week after administration, with higher concentrations in lung tissues than in blood. The concentrations of HUCMSCs in lung tissue and blood remained relatively stable within 6 ~ 24 h and 6 ~ 72 h, respectively, and then decreased over time. The distribution of HUCMSCs in other tissues was not measured at all sampling points. The colonization result showed that HUCMSCs were detected in lungs 72 h after intravenous injection, but not at 2 and 4 weeks. No obvious acute toxicity was observed in NOG mice after single intravenous administration of HUCMSCs. **Conclusions** The above method for analyzing the distribution of HUCMSCs in mouse tissue is reliable and feasible. HUCMSCs were mainly distributed in lung and blood in NOG mice within 1 week after a single intravenous injection, and mainly colonized lung tissue at 72 h. A single intravenous administration of HUCMSCs has a good safety profile.

【Keywords】 human umbilical cord mesenchymal stem cells; NOG mouse; colonization analysis; tissue distribution
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

近年来受新型冠状病毒影响,急性肺损伤发病率急剧增加^[1-2],严重感染时死亡率可高达 40%,目前主要治疗手段仅以支持治疗为主,急需寻找更为安全有效的治疗手段^[3-4]。已有研究表明,间充质干细胞具有非常可观地促进损伤组织再生修复和免疫调节作用,这使得间充质干细胞成为治疗急性肺损伤的“救命稻草”^[5]。间充质干细胞是一类具有多向分化和自我更新潜能的未分化细胞^[6-7],在组织修复及免疫调节等方面有巨大的应用潜力和价值。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSCs)是一类人脐带中胚层来源的成体干细胞^[8],具有可塑性强、免疫原性低和排异少等优点,同时还拥有易于分离培养、分泌多种细胞因子以及调节免疫等诸多优点^[9],目前临床主要拟用于造血支持,免疫系统疾病、心血

管系统疾病以及代谢疾病等多种疾病类型^[10-12]。虽然间充质干细胞已经被一些国家批准上市,但仍有很多人对其组织分布情况及安全性问题充满疑虑。

有研究表明间充质干细胞治疗(95%为脐带 MSC)后出现急性反应的占 11.9%^[13],包括发烧、头痛、心悸、脸部充血和失眠等症状。临床拟静脉注射 HUCMSCs 用于治疗急性肺损伤,应先考虑 HUCMSCs 输注后的急性毒性反应及体内分布情况。但目前受检测技术限制,缺乏标准化的人源 MSCs 体内检测方法,尚无法准确获得 HUCMSCs 在体内的组织分布状态及代谢情况。SRY 基因是雄性性别决定基因,指 Y 染色体上具体决定生物雄性性别的基因片段。SRY 在胚胎发育早期决定性别的分化和睾丸的形成。人的 SRY 基因位于 Yp11.3,编

码一个 204 氨基酸的蛋白质^[14-15]。为研究干细胞移植后的体内代谢情况,可选择将人源男性胚胎脐带间充质干细胞静脉注射移植到 NOG 小鼠中,通过检测小鼠组织样本中男性 SRY 基因的丰度和比例来对间充质干细胞的体内代谢情况进行动态检测。本研究建立了小鼠组织中 HUCMSCs(人源 SRY 基因 DNA)的 RT-qPCR 分析方法,考察重度免疫缺陷小鼠(NOG 小鼠)单次静脉注射 HUCMSCs 后的急性毒性反应、探索可能的毒性靶器官,以及体内组织分布、定植情况,为后续临床用药提供剂量参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

54 只 6 ~ 7 周龄 SPF 级健康 NOG 小鼠,雌雄各半,雌鼠体重 13.8 ~ 20.2 g,雄鼠体重 20.3 ~ 23.5 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。动物房温度 20 ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 70%,中央空调集中通风每小时不低于 15 次,光照 12 h 明、12 h 暗,IVC 换气次数为每小时 30 ~ 80 次,饲养于杭州医学院安全性评价研究中心屏障环境动物房内的独立送回风净化笼具(IVC)中【SYXK(浙)2022-0027】,经兽医检疫合格后使用。本研究过程中用到的实验动物饲养及使用均以科研为目的,可能涉及的与实验动物使用及福利相关的内容和程序都遵从实验动物使用和管理相关的法律法规和杭州医学院安全性评价研究中心实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC)的相关规定(NGLP-2020-019,NGLP-2021-004)。

1.1.2 细胞及细胞稀释液

人脐带间充质干细胞由杭州易文赛生物技术有限公司提供(符合质量检测标准),2 ~ 8℃短期保存于杭州易文赛生物技术有限公司提供的细胞稀释液中。

1.1.3 主要试剂与仪器

SRY-F 引物 5'-TGTCGCACTCTCCTTGTTT TT-3'和 SRY-R 引物 5'-TGGGTCGCTTCACTCTA TCCT-3'(生物工程(上海)股份有限公司);Power UpTM SYBRTM Green Master Mix (A25742, Thermo Fisher Scientific);SRY 质粒(浙江易思得生物科技有限公司);Nuclease-free H₂O (200019A,可帮基因);DNA 提取试剂盒(S8030/S8031,天根生化科技

(北京)有限公司)。RT-qPCR 仪(Step One Plus, Applied Biosystems);微量台式离心机(Heraeus Pico 17, Thermo Fisher);漩涡震荡仪(VORTEX-GENIE 1,Scientific Industries);超微量紫外分光光度计(ND-ONE-W,Thermo Fisher)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠组织中 HUCMSCs 人源 SRY 基因 DNA 的 RT-qPCR 分析方法学研究

建立小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA 的 RT-qPCR 分析方法,取贴壁培养的 HUCMSCs 和雌性小鼠各器官组织提取 DNA 并检测其浓度,在 RT-qPCR 仪上按表 1 配制反应液,引物序列见表 2,参数设置为 50℃ 2 min;95℃ 2 min;95℃ 15 s,64℃ 1 min,40 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。

表 1 反应液配制

Table 1 Preparation of reaction solution		
试剂名称	Reagents name	体积(μL) Volume(μL)
Nuclease-free H ₂ O		8.0
Power Up TM SYBR TM Green Master Mix		10.0
10 μmol/L SRY-F		0.5
10 μmol/L SRY-R		0.5
Sample		1.0
总体积 Total		20.0

选择性验证方法:取稀释液(Buffer TE)、预混液、空白基质、干细胞 DNA 样品、空白基质添加标准品,按照样品处理方法处理和测定,稀释液 TE、预混液和空白基质没有响应或对测定无干扰测得结果为 Undetermined 或出现的 Ct 值符合接受标准。

标准曲线和线性范围验证方法:制备零浓度样品及浓度分别为 1.00 × 10²、2.00 × 10²、2.00 × 10³、5.00 × 10⁴、2.00 × 10⁵、1.00 × 10⁶、8.00 × 10⁶、1.00 × 10⁷ copies/μL 校正标样。将校正标样浓度的 LOG 值与复孔 Ct 平均值作回归分析,计算标准曲线。然后将校正标样的 Ct 值代入相应标准曲线,计算回算浓度和回算准确度。接受标准:回算准确度应在 55% ~ 145%,定量下限处应在 50% ~ 150%。

准确度和精密度验证方法:制备 SRY 质粒浓度为 1.00 × 10²、3.00 × 10²、1.00 × 10⁴、7.50 × 10⁶、1.00 × 10⁷ copies/μL 的质控样品,各取 5 μL,加入 45 μL 空白基质,涡旋混匀,将 Ct 值代入当日标准曲线,计算实测浓度。接受标准:准确度实测浓度与标称浓度的比值均值应在 55% ~ 145%,定量下限准确度应在 50% ~ 150%;精密度实测浓度间的

相对标准偏差 (RSD) 不得超过 45%, 定量下限的精密密度不得超过 50%。

提取 DNA 组样品稳定性验证方法: 空白组织样品进行 DNA 提取后进行分装, 分别于处理测定 (0 h)、冻融 3 次、-80℃ 长期冻存 (18、41 和 84 d) 条件下放置后, 在 260 nm 测得浓度值, 计算每组样本浓度均值与零时样品的偏差。接受标准: 样本浓

度与 0 时测定结果相比偏差在 ± 15% 以内。

样品稳定性验证方法: 取质控液用空白基质稀释至低浓度 (3.00×10^2 copies/μL) 和高浓度 (7.50×10^6 copies/μL), 然后对这些样品进行分装, 冻融 3 次, -80℃ 长期保存 (7、15、30 和 68 d) 后, 获取分析物的浓度。接受标准: 每一浓度的均值与标示浓度相比偏差应在 ± 45% 范围内。

表 2 选择性结果
Table 2 Selective result

样品类型 Sample type	稀释液 Diluent TE	空白基质 Blank matrix	预混液 Premix	男性干细胞 DNA 样品 Stem cell DNA samples for men	LLOQ 选择性样本 LLOQ level of selective sample	ULOQ 选择性样本 ULOQ level of selective sample
Ct 值	未检测到 Undetermined	未检测到 Undetermined	未检测到 Undetermined	29.01	32.41	26.97

注: LLOQ: 最低定量限; ULOQ: 最高定量限。
Note. LLOQ. Low limit of quantification. ULOQ. Up limit of quantification.

1.2.2 NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后体内组织分布研究

选取重度免疫缺陷 NOG 小鼠 36 只, 雌雄各半, 单次静脉注射 3.5×10^7 cells/kg HUCMSCs, 分别于 6、12、24、72 h、1 周、2 周各取 6 只小鼠 (雌雄各半) 麻醉, 采集血液 (EDTA 抗凝) 后剖检, 取肺、肾、心脏、肝、大脑、脊髓、胃、小肠、脂肪、皮肤、脾、睾丸 (子宫、卵巢) 等组织后 -80℃ 冻存。提取各组织 DNA, 采用已验证的小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA RT-qPCR 分析方法测定各组织中人源 SRY 基因 DNA 的含量, 进一步研究 HUCMSCs 在各组织中的分布情况。

1.2.3 免疫缺陷小鼠静脉注射 HUCMSCs 急性毒性考察及定植分析研究

NOG 小鼠 18 只, 雌雄各半, 分为对照组和干细胞输注组, 其中干细胞输注组 12 只小鼠静脉注射 HUCMSCs 3.5×10^7 cells/kg (浓度 3.5×10^6 cells/mL); 对照组 6 只小鼠静脉注射相同体积的 0.9% 氯化钠注射液, 单次给药, 给药体积均为 10 mL/kg。给药过程中及给药后观察小鼠的反应情况, 连续观察 29 d, 记录所有出现的症状起始时间、严重程度、持续时间及死亡情况; 干细胞输注组于给药后 72 h、2、4 周分别取 4 只动物 (雌雄各半) 进行剖检, 肉眼观察各脏器是否有异常变化, 并采集肺制作石蜡切片, 利用免疫组化法检测人源线粒体蛋白表达, 以此判断 HUCMSCs 在肺组织中的定植情况。

1.3 统计学分析

从 Step One Plus 荧光定时定量 PCR 仪获得分

析物的拷贝数 Ct 值, 用 Excel 软件 (Microsoft Excel 2016) 对实验数据进行录入、计算、汇总整理, 计算平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 对校正样品建立标准曲线, 计算样品和校正标样、质控样品及实际样品的浓度等。P < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠组织中人源 SRY 基因 DNA RT-qPCR 分析方法学研究

2.1.1 选择性

稀释液 (TE)、预混液、空白基质或空白基质添加标准品浓度为 1.00×10^2 copies/μL (LLOQ) 和 1.00×10^7 copies/μL (ULOQ) 的样本, 测定结果为稀释液 (TE)、预混液和空白基质的样本 Ct 值均为 Undetermined; LLOQ 和 ULOQ 样本均有 Ct 值。结果显示本方法符合生物样本分析要求。见表 3。

表 3 标准曲线准确度和精密度结果

Table 3 Accuracy and precision of standard curve				
批次 Batch	理论浓度 (μL) Theoretical concentration copies (μL)	平均值 (μL) Average copies (μL)	RSD (%)	回算准确 度 (%) Correction accuracy (%)
SC-1	1.00×10^2	1.05×10^2	20.7	105.0
SC-2	2.00×10^2	1.87×10^2	11.6	93.3
SC-3	2.00×10^3	2.04×10^3	10.3	101.9
SC-4	5.00×10^4	5.18×10^4	9.2	103.6
SC-5	2.00×10^5	2.14×10^5	13.0	106.9
SC-6	1.00×10^6	9.70×10^5	8.1	97.0
SC-7	8.00×10^6	7.97×10^6	12.9	99.6
SC-8	1.00×10^7	9.84×10^6	10.0	98.4

2.1.2 标准曲线和线性范围

最低检测浓度为 1.00×10^2 copies/ μ L,检测范围为 $1.00 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^7$ copies/ μ L,标准品回

算浓度在理论值的 93.3% ~ 106.9%,平均浓度的 RSD(%) 为 8.1% ~ 20.7%。结果符合可接受标准。准确度和精密度均符合可接受标准。见表 4。

表 4 批间和批内准确度和精密度分析

Table 4 Analysis of accuracy and precision between and within batches							
指标 Index		ULOQ (1.00×10^7 copies/ μ L)	HQC (7.50×10^6 copies/ μ L)	MQC (1.00×10^4 copies/ μ L)	LQC (3.00×10^2 copies/ μ L)	LLOQ (1.00×10^1 copies/ μ L)	
批内 Within- batch	批次 1 Batch 1	平均值(μ L) Average copies (μ L)	8.95×10^6	7.08×10^6	1.18×10^4	3.13×10^2	87.1
		SD	12.1	24.3	4.40×10^2	6.90×10^5	4.20×10^5
		RSD (%)	13.9	7.8	3.7	9.8	4.7
		准确度 (%) Accuracy (%)	87.1	104.4	118.3	94.3	89.5
		平均值(μ L) Average copies (μ L)	7.91×10^6	5.68×10^6	1.15×10^4	3.33×10^2	1.47×10^2
	批次 2 Batch 2	SD	1.14×10^5	1.15×10^5	1.37×10^3	40.4	16.4
		RSD (%)	1.4	2.0	14.5	12.1	11.1
		准确度 (%) Accuracy (%)	79.1	75.8	114.7	111.1	147.4
		平均值(μ L) Average opies (μ L)	8.98×10^6	6.26×10^6	9.45×10^3	2.66×10^2	1.01×10^2
	批次 3 Batch 3	SD	3.11×10^5	4.20×10^5	2.08×10^2	32.4	16.2
		RSD (%)	3.5	6.7	2.2	12.2	16.1
		准确度 (%) Accuracy (%)	89.8	83.4	94.5	88.6	100.6
		平均值(μ L) Average copies (μ L)	8.61×10^6	6.34×10^6	1.09×10^4	3.04×10^2	1.12×10^2
	批间 Between-batch	SD	5.91×10^5	7.31×10^5	1.40×10^3	41.4	30.3
		RSD (%)	6.9	11.5	12.9	13.6	27.2
		准确度 (%) Accuracy (%)	86.1	84.5	109.2	101.4	111.7
		平均值(μ L) Average copies (μ L)	8.61×10^6	6.34×10^6	1.09×10^4	3.04×10^2	1.12×10^2

2.1.3 准确度和精密度

对最低定量限(LLOQ)、低质控样品(LQC)、中质控样品(MQC)、高浓度质控样品(HQC)和最高定量限(ULOQ)共 5 个水平的质控样品进行检测,共检测 3 个批次,每个批次不同的浓度有 3 个样本。批内 5 个水平的质控样品回算浓度均值在理论值的 75.8% ~ 147.4%,LQC、MQC、HQC 和 ULOQ 回算浓度的 RSD%为 1.4% ~ 12.2%,LLOQ 回算浓度的 RSD%为 11.1% ~ 16.1%。批间每个水平质控样品回算浓度均值在理论值的 84.5% ~ 111.7%,RSD%为 6.9% ~ 27.2%。结果符合可接受标准。见表 5。

2.1.4 稳定性

提取后 DNA 样品分别在 -80℃ 冻融 3 次、-80℃ 保存 18、41 和 84 d,每个样本浓度与 0 时测定结果偏差为-4.79% ~ 6.59%,RSD%为 0.60% ~ 8.12%,表明上述保存条件下稳定性良好。细胞、肝

表 5 NOG 小鼠静脉注射 HUCMSC 后人源 SRY 基因血液分布结果(copies/ μ L)

Table 5 Blood distribution of human SRY gene in NOG mice injected with HUCMSCs intravenously (copies/ μ L)							
批次 Batch		6 h	12 h	24 h	72 h	168 h	336 h
雄 Male	NO.1	236	240	174	86	B	B
	NO.2	1707	B	260	110	58	B
	NO.3	147	B	B	B	B	B
	Mean	697	240	217	98	58	/
	SD	876	/	61	17	/	/
	SD	876	/	61	17	/	/
雌 Female	NO.1	0	0	224	B	B	B
	NO.2	125	132	178	B	B	B
	NO.3	203	249	B	B	B	B
	Mean	110	127	201	/	/	/
	SD	103	125	32	/	/	/
	SD	103	125	32	/	/	/

注:B;低于定量下限;/:无相关数据。(下同)
Note. B. Below the lower limit of quantification. /. No relevant data available. (The same in the following tables)

组织样品分别在-80℃冻融 3 次、-80℃保存 7、15、30 和 68 d 后,LQC 和 HQC 的样品样本浓度均值与标示浓度偏差在-15.6% ~ 18.1%,表明上述保存条件下稳定性良好。

2.2 免疫缺陷小鼠单次静脉注射给予 HUCMSCs 后在体内的分布情况

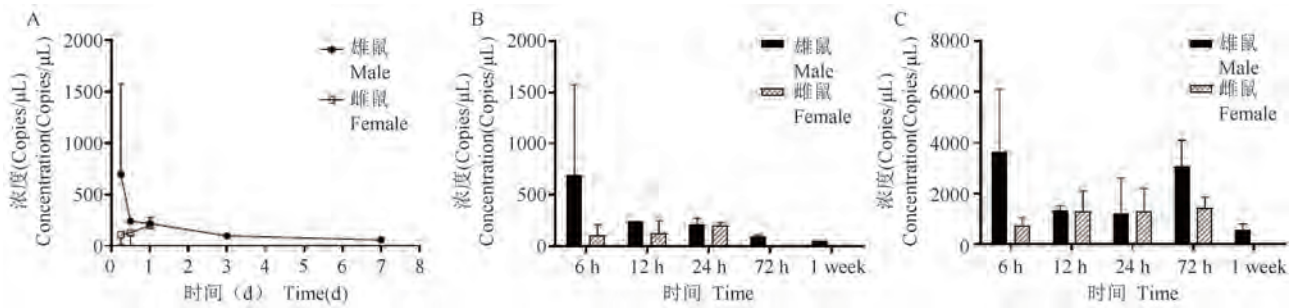
采用已建立的小鼠组织中 HUCMSCs 基因检测方法学,对所有组织分布样品提取 DNA 后进行 RT-qPCR 检测,结果显示:所有 NOG 小鼠的皮肤、睾丸、脾、肾、小肠、脊髓、脑、脂肪、卵巢、子宫、胃、肝、心脏 13 个组织在所有采样点均未测得人源 SRY 基因 DNA,而血液和肺样本中能测到人源 SRY 基因 DNA,提示静脉注射后 HUCMSCs 在 NOG 小鼠血液和肺中有分布。根据组织样品提取 DNA 模板中的浓度、模板体积以及样品质量或体积,可以算得组织样品中人源 SRY 基因 DNA 的浓度(见表 5,表 6)。

结合上述结果,HUCMSCs 在 NOG 小鼠血中的分布规律为:雄性小鼠 HUCMSCs 血中浓度基本呈现静脉注射的药时曲线特征,静脉注射 6 h 均值最高,为 697 copies/μL,然后随时间推移逐渐下降(6 h ~ 1 周有分布),2 周时低于定量下限;雌性小鼠 HUCMSCs 血中浓度均值在 6 ~ 24 h 相对平稳(164

~ 201 copies/μL,浓度缓慢升高),其后均低于定量下限。HUCMSCs 在 NOG 小鼠肺中的分布规律为:雄性小鼠肺组织 HUCMSCs 浓度均值在 6 h 最高(3636 copies/mg),然后随时间推移有所下降,但在 72 h 处有一反跳点(均值 3078 copies/mg),1 周时又有所下降,2 周时低于定量下限;雌性小鼠肺组织 HUCMSCs 浓度均值在 6 ~ 72 h 之内维持相对平稳(757 ~ 1439 copies/mg),其后均低于定量下限(见图 1)。

表 6 NOG 小鼠静脉注射 HUCMSCs 后人源 SRY 基因肺分布结果(copies/mg)

Table 6 Lung distribution of human SRY gene in NOG mice injected with HUCMSCs intravenously (copies/mg)							
批次 Batch		6 h	12 h	24 h	72 h	168 h	336 h
雄 Male	NO.1	4922	1343	499	2084	751	B
	NO.2	788	1199	2820	4105	419	B
	NO.3	5197	1517	345	3043	B	B
	Mean	3636	1353	1221	3078	585	/
	SD	2470	159	1387	1011	235	/
雌 Female	NO.1	1094	445	1273	1259	B	B
	NO.2	564	1995	2224	1134	B	B
	NO.3	614	1482	397	1925	B	B
	Mean	757	1307	1298	1439	/	/
	SD	292	790	913	425	/	/



注:A:药时曲线;B:血液分布变化;C:肺组织分布变化。
图 1 NOG 小鼠静脉注射 HUCMSCs 后人源 SRY 基因在小鼠血液中的药时曲线、血液分布变化和肺组织分布变化
Note. A. Intravenously. B. Blood distribution. C. Lung tissue distribution.
Figure 1 Drug time curve of SRY gene in NOG mice injected with HUCMSCs intravenously, blood distribution and lung tissue distribution of SRY gene in NOG mice

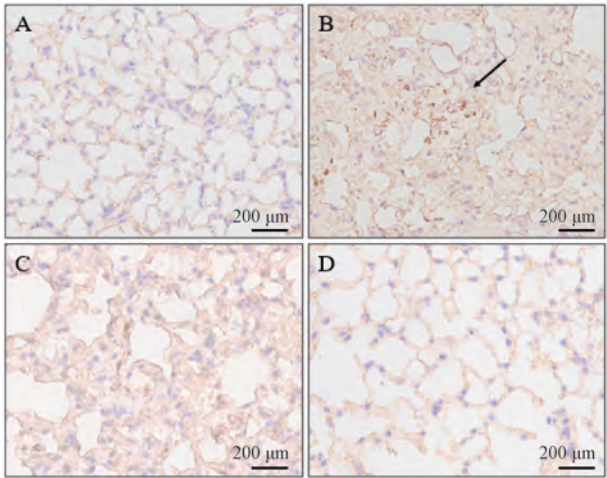
2.3 免疫缺陷小鼠静脉注射 HUCMSCs 急性毒性考察及定植分析

2.3.1 一般反应观察、大体观剖检结果

对照组小鼠整个实验期间均未见明显异常,未引起动物死亡;干细胞组给药后出现短暂可逆的弓背,其余未见明显反应异常,未引起动物死亡;于各检查阶段剖检两组小鼠,各脏器组织外观、色泽、形态和质地等均未发现肉眼可见的大体观异常变化。

2.3.2 定植检测结果

免疫组化结果显示,对照组动物肺组织未见显著棕色点或区域,未检测到 HUCMSCs 定植;干细胞组给药后 72 h,在小鼠肺组织中检测到 HUCMSCs 定植(4/4 只),肺组织可见显著棕色点或区域;而干细胞组给药后 2、4 周时均未检测到 HUCMSCs 定植,肺组织未见显著棕色点或区域。肺组织中定植分析结果与组织分布检测结果基本一致(见图 2)。



注:A:正常对照动物肺组织中人源线粒体蛋白表达结果;B~D:分别是 HUCMSCs 静脉注射后 72 h、2、4 周小鼠肺组织中人源线粒体蛋白表达结果。

图 2 静脉注射 HUCMSCs 在肺组织的定植情况
Note. A. Expression of human mitochondrial protein in lung tissues of control group. B ~ D. Expression of human mitochondrial protein in lung tissues of NOG mice injected with HUCMSCs intravenously after 72 h, 2 and 4 weeks.

Figure 2 Colonization of stem cells in lung tissue after injected with HUCMSCs intravenously

3 讨论

目前,研究间充质干细胞分布的主要方法有 2 种:(1)细胞示踪技术,比如用胸腺嘧啶核苷类似物 BrdU 标记,绿色荧光蛋白作为报告基因转入细胞后进行检测等。该方法能够观察细胞所处的位置,但只是定性检测,且检测过程中容易出现荧光信号弱、不稳定,不能区分移植细胞死活等各种弊端,导致组织分布结果不准确。(2)RT-qPCR 方法定量检测,比如利用间充质干细胞特征基因设计引物进行检测。本研究建立了 RT-qPCR 检测小鼠组织中人源 SRY 基因的方法(来表征人源干细胞在小鼠体内的分布),最低检测浓度为 1.00×10^2 copies/ μ L,检测范围为 $1.00 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^7$ copies/ μ L,能够在大量鼠组织中检测到微量的间充质干细胞基因并定量。方法学验证结果表明,各项验证指标均符合标准,方法可靠可行,能够为其他干细胞组织分布实验提供参考。

单次静脉注射体内组织分布结果表明,NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后,主要分布于肺和血液中(给药后 1 周内),其他组织未见明显分布。血液、肺组织中 HUCMSCs 浓度分别在 6 ~ 24 h、6 ~

72 h 之内 HUCMSCs 浓度维持相对平稳水平,后随时间推移下降。HUCMSCs 在雌雄小鼠肺部和血液中的分布不一致,表现为雄性小鼠肺部和血液中的分布均高于雌性小鼠,其中雄鼠肺组织中的 HUCMSCs 浓度均值最高(6 h)达到 3636 copies/mg,远大于雌性小鼠。免疫组化法定植验证分析结果显示,干细胞组给药后 72 h 在肺中检测到 HUCMSCs 定植(检出率 100%),而给药后 2、4 周时均未检测到,与组织分布检测结果基本一致,表明 NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后,于 72 h 内定植分布于肺,2 周之后基本代谢出机体。

参考 ICH 发布的 S6(R1)《生物技术药物的临床前安全性评价技术指南》^[16],结合单次给药后急性毒性观察结果:NOG 小鼠单次静脉注射 HUCMSCs 后除了出现短暂可逆的弓背,其余未见明显反应异常,不会引起免疫缺陷小鼠死亡,大体观剖检结果显示对小鼠各组织脏器以及毒性靶器官也均未见明显异常,提示单次静脉注射 HUCMSCs 具有较好的安全性。

通过将 HUCMSCs 人源 SRY 基因 DNA RT-qPCR 分析方法学作为技术支撑,结合实验室已有实验技术基础,后续对 HUCMSCs 开展了一系列全套的安全性研究,包括 NOG 小鼠单次给药毒性研究、重复给药毒性研究(NOg 小鼠、食蟹猴)、局部毒性研究(兔血管刺激、过敏、溶血)、软琼脂克隆形成实验、裸鼠成瘤性实验、NOG 小鼠 26 周体内致瘤实验等研究,在不同物种中进行全方位安全性评价,为后续 HUCMSCs 在临床中静脉注射途径应用提供了安全性资料参考。

参 考 文 献(References)

[1] 闵瑞,刘洁,代喆,等. 新型冠状病毒肺炎发病机制及临床研究进展 [J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(8): 1171-1176.
Min R, Liu J, Dai Z, et al. Advance in clinical study on pathogenesis on COVID-19 [J]. Chin J Nosocomiology, 2020, 30(8): 1171-1176.

[2] Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury [J]. Nat Med, 2005, 11(8): 875-879.

[3] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. N Engl J Med, 2020, 382(8): 727-733.

[4] Wang C, Horby PW, Hayden FG, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern [J]. Lancet, 2020, 395 (10223): 470-473.

[5] 鞠秀丽. 间充质干细胞治疗新型冠状病毒肺炎的潜在机制和

- 研究进展 [J]. 山东大学学报(医学版), 2020, 58(3): 32-37.
- Ju XL. Potential mechanism and research progress of mesenchymal stem cells in the treatment of 2019 novel coronavirus pneumonia [J]. J Shandong Univ Health Sci, 2020, 58(3): 32-37.
- [6] 何蕊, 陈舒, 江其生. 干细胞治疗前景的展望 [J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(6): 644-647.
- He R, Chen S, Jiang QS. Prospect of stem cell therapy [J]. J Radioimmunology, 2010, 23(6): 644-647.
- [7] Kim SJ, Choi YS, Ko ES, et al. Glucose-stimulated insulin secretion of various mesenchymal stem cells after insulin-producing cell differentiation [J]. J Biosci Bioeng, 2012, 113(6): 771-777.
- [8] 陈凤, 杨敏, 李彦洁, 等. 人脐带间充质干细胞的分离培养及多向分化潜能研究 [J]. 生物学杂志, 2021, 38(5): 82-85, 90.
- Chen F, Yang M, Li YJ, et al. Research on isolation, culture and multiple differentiation potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. J Biol, 2021, 38(5): 82-85, 90.
- [9] Ma S, Xie N, Li W, et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells [J]. Cell Death Differ, 2014, 21(2): 216-225.
- [10] 程洪艳, 昌晓红, 刘彩霞, 等. 干细胞临床研究及管理的现状与未来 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(2): 243-249.
- Cheng HY, Chang XH, Liu CX, et al. Current status and future of stem cell clinical research and management [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(2): 243-249.
- [11] 王晶, 黄云虹, 高晨燕. 我国间充质干细胞产品的注册申请情况及临床审评中的几点考虑 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31(15): 1468-1473.
- Wang J, Huang YH, Gao CY. Current application and registration status of mesenchymal stem cell products and considerations on its clinical review [J]. Chin J New Drugs, 2022, 31(15): 1468-1473.
- [12] 毛开云, 范月蕾, 王跃, 等. 间充质干细胞治疗产品开发现状与趋势 [J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(10): 126-134.
- Mao KY, Fan YL, Wang Y, et al. Development status and trend analysis of mesenchymal stem cells therapeutic products [J]. Chin Biotechnol, 2017, 37(10): 126-134.
- [13] Liang J, Zhang H, Kong W, et al. Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 312.
- [14] Alvarez-Nava F, Martínez MC, González S, et al. FISH and PCR analysis of the presence of Y-chromosome sequences in a patient with Xq-isochromosome and testicular tissue [J]. Clin Genet, 1999, 55(5): 356-361.
- [15] 陈勇, 周华蓉, 林晓容. 人类性别决定基因(SRY)的检测及其临床应用 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(3): 161-164.
- Chen Y, Zhou HR, Lin XR. The detection and clinical application of human sex determination gene on Y chromosome by PCR [J]. J Mol Diagn Ther, 2013, 5(3): 161-164.
- [16] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use(ICH). ICH S6 (R1): Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, 2011 [EB/OL]. <https://www.ich.org/>.

[收稿日期] 2023-04-14

刘玉倩,杨雯茜,王海涛. GSH/GPx4 介导的铁死亡通路在有氧运动预防自然衰老小鼠模型肝过氧化损伤中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1581-1587.

Liu YQ, Yang WQ, Wang HT. Role of the ferroptosis pathway mediated by GSH/GPx4 in preventing hepatocyte peroxidative injury following aerobic exercise in an elderly mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1581-1587.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.008

GSH/GPx4 介导的铁死亡通路在有氧运动 预防自然衰老小鼠模型肝过氧化 损伤中的作用

刘玉倩^{1,2}, 杨雯茜^{2,3}, 王海涛^{1,2*}

(1. 岭南师范学院运动与健康研究所, 广东 湛江 524048; 2. 岭南师范学院体育科学学院, 广东 湛江 524048; 3. 华南师范大学体育科学学院, 广州 510631)

【摘要】 目的 阐明谷胱甘肽 (glutathione, GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPx4) 介导的铁死亡 (ferroptosis) 通路在有氧运动预防小鼠增龄性肝细胞过氧化损伤中的作用机制, 为运动改善肝衰老和糖脂代谢紊乱提供新的作用靶点。**方法** 52 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 20 只, 随机分为老年对照组 (EC 组) 和老年运动组 (EE 组), 每组 10 只。16 周递增负荷中等强度运动 (1 ~ 2 周 14 m/min, 3 ~ 4 周 15 m/min, 5 ~ 10 周 16 m/min, 11 ~ 16 周 17 m/min, 每天 60 min, 坡度为 0°)。升主动脉灌注后, 取肝外侧叶制作 HE 切片和超薄透射电镜切片。ELISA 检测肝线粒体 8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2 deoxyguanosine, 8-OHdG)、白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、4-羟基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE)。比色法测定肝糖原、甘油三酯 (triglyceride, TG)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、肝非血红素铁 (non-heme iron)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)、GSH。Western Blot 检测肝 GPx4、醌氧化还原酶 1 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 2 (NADPH oxidase 2, NOX2)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier protein 7 family member 11, SLC7A11) 表达量。**结果** (1) 有氧运动可有效延缓老年小鼠随年龄增长的肝细胞过氧化损伤, 保持肝细胞线粒体正常结构和糖原储备量。(2) 与 EC 组相比, EE 组小鼠肝 GSH 和 NADPH 显著增加 ($P < 0.01$)。(3) 与 EC 组相比, EE 组小鼠肝线粒体 8-OHdG 和 4-HNE、MDA、铁含量和血清炎症因子 IL-6 含量显著下降 ($P < 0.01$)。(4) 运动增加肝 GPx4、NQO1、SLC7A11 表达量 ($P < 0.01$), 降低 NOX2 表达量 ($P < 0.01$)。**结论** 有氧运动通过 SLC7A11 增加 GSH 合成, 为 GPx4 提供充足的反应底物, 激活 GSH/GPx4 通路, 抑制铁死亡进程, 改善增龄引发的肝细胞过氧化损伤, 维持肝细胞正常结构与生理功能。

【关键词】 谷胱甘肽; 谷胱甘肽过氧化物酶 4; 有氧运动; 铁死亡; 衰老小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1581-07

Role of the ferroptosis pathway mediated by GSH/GPx4 in preventing hepatocyte peroxidative injury following aerobic exercise in an elderly mouse model

LIU Yuqian^{1,2}, YANG Wenqian^{2,3}, WANG Haitao^{1,2*}

【基金项目】 岭南师范学院人才专项 (ZL2008, ZL2009), 湛江市科技局项目 (2022B01077, 2023B01168)。

Funded by Talent Introduction Special Funds of Lingnan Normal University Presented (ZL2008, ZL2009), Zhanjiang City Science and Technology Research Program (2022B01077, 2023B01168)。

【作者简介】 刘玉倩 (1973—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 运动与铁代谢紊乱相关疾病防治。Email: yuqianht@126.com

【通信作者】 王海涛 (1973—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 运动与健康促进。Email: wanght@lingnan.edu.cn

(1. Institute of Exercise and Health Promotion, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China. 2. School of Physical Education and Sports Science, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048. 3. School of Physical Education and Sports Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Corresponding author: WANG Haitao. E-mail: wanght@lingnan.edu.cn

【Abstract】 Objective To elucidate the role of the glutathione (GSH)/glutathione peroxidase 4 (GPx4)-mediated ferroptosis pathway in preventing age-related hepatocyte peroxidation injury following aerobic exercise in mice, and to provide a new target for improving liver aging and metabolism disorders. **Methods** Twenty specific-pathogen-free C57BL/6 male mice aged 52 weeks were divided randomly into an elderly control group (EC group) and elderly exercise group (EE group) ($n = 10$ per group). The mice performed moderate-intensity exercise with incremental loads (1 ~ 2 weeks 14 m/min, 3 ~ 4 weeks 15 m/min, 5 ~ 10 weeks 16 m/min, 11 ~ 16 weeks 17 m/min, 60 min/day, slope 0°) for 16 weeks. After perfusion of the ascending aorta, the lateral liver lobes were harvested and sectioned for hematoxylin and eosin staining and ultrathin sections were used for transmission electron microscopy. Levels of 8-hydroxy-2 deoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) in the liver and serum interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Hepatic glycogen, triglycerides (TG), malondialdehyde (MDA), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and GSH were determined by colorimetry. Hepatic GPx4, glucose transporter (GLUT2), NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and solute carrier protein 7 family member 11 (SLC7A11) were detected by Western Blot. **Results** (1) Oxidative damage to hepatocytes was effectively delayed, normal mitochondrial structure and glycogen storage in hepatocytes were maintained. (2) Hepatic GSH and NADPH contents were significantly increased in EE mice compared with EC mice ($P < 0.01$). (3) In addition, liver levels of 8-OHdG, 4-HNE, MDA, and non-heme iron were significantly decreased in the EE group compared with the EC group ($P < 0.01$). (4) Expression levels of GPx4, NQO1, and SLC7A11 in the liver were increased ($P < 0.01$) while NOX2 expression was decreased ($P < 0.01$) in the EE group compared with the EC group. **Conclusions** GSH synthesis was increased in aged mice following aerobic exercise, providing reaction substrates for GPx4 and activating the GSH/GPx4 pathway. Ferroptosis was inhibited, thus improving hepatocyte peroxidation damage caused by aging, and maintaining the normal structure and physiological function of hepatocytes.

【Keywords】 glutathione; glutathione peroxidase 4; aerobic exercise; ferroptosis; elderly mice model

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

铁死亡 (ferroptosis) 特指一种铁依赖的非凋亡性细胞死亡, 主要以脂质过氧化为特征^[1]。自 2012 年首次提出铁死亡概念^[2], 近 10 年来, 关于铁死亡通路的调控在过氧化损伤所致相关疾病防治中的作用已成为新的研究热点^[3]。过量铁累积产生的 Fenton 反应是 ROS 的主要来源, 也是引发铁死亡的主要机制。肝细胞是铁在体内储存的主要场所 (13 ~ 15 mg/g), 肝也是机体糖、脂代谢的枢纽。因此, 肝细胞更易遭受过量铁引发的铁死亡, 出现过氧化损伤, 破坏物质代谢平衡, 加速衰老进程^[4]。谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 通过为谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPx4) 提供反应底物而在抑制铁死亡中起重要作用。GPx4 以 GSH 为辅因子将脂质氢过氧化物 (R-OOH) 转化为脂质醇 (R-OH) 而防止铁死亡^[5]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 是 GSH 的辅酶, 有助于维持细胞内 GSH 水平^[6]。溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier protein

7, family member 11, SLC7A11) 可为细胞提供半胱氨酸用于合成 GSH^[7]。肝既是机体最大的实质器官, 也是在衰老进程中最易受累的器官之一。以铁死亡通路为干预靶点, 可能是许多肝代谢类疾病防治的新思路^[8]。有氧运动在维持机体物质代谢平衡和防治器官衰老中的过氧化损伤发挥重要的作用^[9]。但运动是否会影响自然衰老进程中肝细胞因铁死亡而引发的过氧损伤还缺少充足的实验证据。因此, 本实验通过对自然衰老进程中的小鼠进行长期的有氧运动, 观察 GSH/GPx4 调控的铁死亡通路的变化, 为运动预防增龄引发的器官功能衰退提供实验依据, 也为相关疾病预防提供新的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只 52 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 健康小鼠, 体重 30.65 ± 3.27 g, 购于广东省医学实验动物中

心【SCXK(粤)2018-0002】，基础饲料(AIN-93G)购自广东省医学实验动物中心(粤饲证(2019)05073)。饲养环境:自然光照,自由饮水,饲养温度20~25℃,湿度50%~70%,饲养于华南师范大学体育科学学院。所有动物实验均经华南师范大学体育科学学院科研伦理小组委员会批准(SCNU-SPT-2019-002)。

1.1.2 主要试剂与仪器

ELISA 试剂盒:8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG)(上海生工);白介素6(interleukin-6, IL-6)、4-羟基壬烯醛(4-Hydroxynonenal, 4-HNE)(南京建成)。生化试剂盒:肝糖原试剂盒、甘油三酯(triglyceride, TG)、肝非血红素铁(non-heme iron)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)、GSH 试剂盒(南京建成),NADPH 试剂盒(Beyotime)。兔抗小鼠抗体:NOX2(Abcam ab131088),NQO1(Abcam, ab80588),GPx4(Abcam, ab125066),SLC7A11(Thermo, MA5-35360)。3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参(GAPDH 兔多克隆抗体),羊抗兔 IgG/HRP(二抗,YJ0189 艺佳生物)。线粒体分离试剂盒(Beyotime)。

超声细胞破碎仪(上海天呈科技有限公司), Synergy H4 多功能酶标仪(Thermo scientific),电泳和转膜系统(Bio-Rad),PVDF 膜(Bio-Rad, Immun-Blot),光学显微镜(Leica DM1000 徕卡显微系统(上海)有限公司),透射电子显微镜(JEM-1400HC 日本电子)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

小鼠随机分为对照组(EC组)和老年运动组(EE组),每组10只。实验室适应运动1周后,小鼠进行16周中等强度递增负荷运动(1~2周14 m/min, 3~4周15 m/min, 5~10周16 m/min, 11~16周17 m/min,每天60 min,坡度为0°,大约相当于70%~75%最大摄氧量)^[10]。所有动物运动干预前均无跑台运动史。小鼠取材时为69周龄,大约相当于人的65岁。

1.2.2 动物取材

用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠。小鼠麻醉后,取血,室温静置30 min后,4℃,3000 r/min 离心10 min,取血清并分装后置于-80℃冰箱备用。升主动脉冷0.9% NaCl 灌流后,于冰盘

上取肝左外侧叶,0.9% NaCl 清洗后滤纸吸去水分,投入液氮冷冻,分装后储存于-80℃冰箱备用。另取肝左外侧叶组织0.5 cm × 0.5 cm × 1 cm 投入4%多聚甲醛置于4℃冰箱备用。

1.2.3 肝细胞组织结构观察

取4%多聚甲醛固定的肝组织进行梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋后制作石蜡切片(6 μm),HE 染色后光学显微镜下10 × 40 倍镜下观察肝组织形态变化。取2 mm × 2 mm 小块于2.5%戊二醛+4%多聚甲醛溶液中4℃固定,1%锇酸过夜后,梯度乙醇脱水后环氧丙烷逐步置换乙醇,Spurr 树脂浸透后环氧树脂包埋固化,制作超薄电镜切片。透射电镜拍片,观察线粒体膜、细胞器膜变化。

1.2.4 生化指标检测

采用线粒体分离试剂盒差速离心获得肝组织线粒体^[11]。ELISA 法测定肝线粒体8-OHdG,4-HNE 波长450 nm 检测吸光值。比色法测定肝糖原,620 nm 测吸光值。TG 波长546 nm,测吸光值。比色法测定肝非血红素铁(non-heme iron),520 nm 测吸光值。NADPH 于450 nm 测吸光值。

1.2.5 Western Blot 检测肝铁死亡相关蛋白表达

取20 mg 肝组织加入200 μL 蛋白裂解液,超声破碎仪制备肝组织匀浆,用BCA法测定蛋白浓度,加样50 μg,恒压电泳(Bio-Rad),转膜后5%脱脂奶粉封闭,加入一抗4℃孵育过夜,抗体稀释度为1:500。洗膜后加入IgG/HRP(稀释度为1:2500),ECL 发光显影后用Image J 软件分析条带灰度值,并统计其与内参GAPDH 比值。

1.3 统计学分析

所有实验数据均表示为平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),采用SPSS 26.0 对数据进行独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

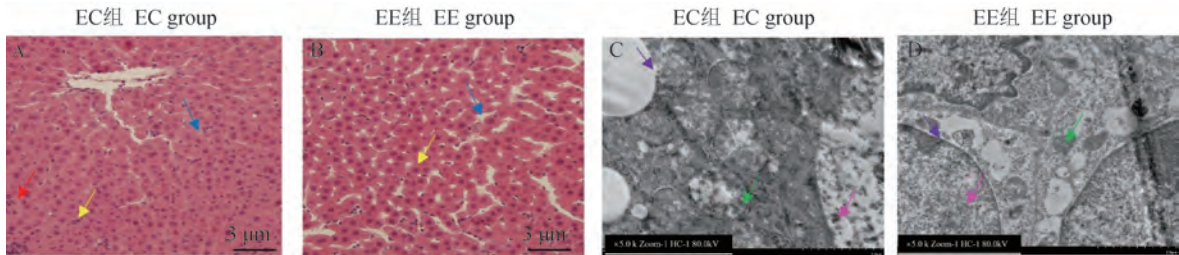
2 结果

2.1 有氧运动对自然衰老小鼠模型肝细胞超微结构的影响

光镜下可见EC组小鼠肝细胞有一定程度水肿,部分肝血窦受挤压变窄甚至消失(见图1A 蓝色箭头),肝细胞出现轻度脂肪样变性(见图1A 红色箭头),有少量肝细胞出现细胞核固缩深染(见图1A 黄色箭头),肝索排列紊乱。EE组小鼠肝组织HE 染色可见细胞膜完整,肝血窦清晰(见图1B 蓝色箭头),肝索排列较整齐,肝细胞脂肪样变较少,

细胞核形态完整(见图 1B 黄色箭头)。透射电镜显示的超微结构表明,EC 组小鼠肝细胞内线粒体皱缩、嵴断裂、膜破裂(见图 1C 绿色箭头),细胞内见脂滴沉积,细胞核膜破裂(见图 1C 紫色箭头),染色

质固缩、染色加深(见图 1C 粉色箭头)。EE 组小鼠肝细胞线粒体嵴排列较整齐、线粒体膜完整(见图 1D 绿色箭头),细胞核膜完整(见图 1D 紫色箭头),染色质均匀(见图 1D 粉色箭头)。



注:A,B:肝组织 HE 染色;C,D:透射电镜显示肝组织超微结构(× 5.0K)。

图 1 各组自然衰老小鼠模型肝细胞组织结构变化

Note. A, B. Histological structure of liver using HE. C, D. Ultrastructure of liver tissue using transmission electron microscopy sections(× 5.0K).

Figure 1 Changes of hepatocytes histology in each group

2.2 有氧运动对自然衰老小鼠模型肝重及肝铁含量的影响

与 EC 组相比,EE 组的肝重明显下降($P < 0.05$),肝 GSH 含量显著增加($P < 0.01$),肝糖原含量显著提高($P < 0.01$)。EE 组肝 TG 含量和非血红素铁含量均显著低于 EC 组小鼠($P < 0.01$),见表 1。

2.3 有氧运动对自然衰老小鼠模型肝细胞过氧化损伤的影响

与 EC 组相比,EE 组肝线粒体 8-OHdG 含量明显下降($P < 0.01$),肝细胞 4-HNE 含量和 MDA 显著降低($P < 0.01$)。EE 组肝 NADPH 含量显著高于 EC 组小鼠($P < 0.01$),见表 2。

2.4 有氧运动对自然衰老小鼠模型血清炎症和过氧化损伤的影响

与 EC 组相比,EE 组炎症相关因子,如血清 IL-6 含量明显下降($P < 0.01$)。EE 组血清脂质过氧化产物 4-HNE 和 MDA 含量显著低于 EC 组小鼠($P < 0.01$),线粒体过氧化损伤产物 8-OHdG 也显著低于 EC 组($P < 0.01$),见表 3。

2.5 有氧运动对自然衰老小鼠模型肝铁死亡相关蛋白表达的影响

与 EC 组相比,EE 组肝 NOX2 表达显著下降($P < 0.01$),NQO1、SCL7A11 和 GPx4 表达量显著增加($P < 0.01$),见图 2。

表 1 各组小鼠肝重、GSH、铁和糖原的变化($n = 10$)

Table 1 Changes in liver weight, GSH, iron and glycogen in each group($n = 10$)					
组别 Groups	肝重(g) Liver weight(g)	GSH($\mu\text{mol/g}$)	TG($\mu\text{mol/g}$)	铁($\mu\text{mol/g}$) Iron($\mu\text{mol/g}$)	糖原(mg/g) Glycogen(mg/g)
EC 组 EC group	1.52 ± 0.22	15.04 ± 3.23	23.17 ± 3.65	25.84 ± 2.79	11.83 ± 0.81
EE 组 EE group	1.27 ± 0.19*	39.42 ± 9.87**	11.49 ± 2.85**	18.10 ± 1.47**	15.60 ± 1.13**

注:与 EC 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

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

表 2 各组小鼠肝细胞过氧化损伤的变化($n = 10$)

Table 2 Changes in peroxidation damage of mouse hepatocytes in each group($n = 10$)				
组别 Groups	线粒体 8-OHdG (ng/mg) Mitochondrial 8-OHdG (ng/mg)	4-HNE (ng/g)	MDA (nmol/mg)	NADPH ($\mu\text{mol/g}$)
EC 组 EC group	6.74 ± 0.81	54.77 ± 8.49	29.74 ± 5.01	0.35 ± 0.04
EE 组 EE group	2.46 ± 0.69**	28.36 ± 4.86**	18.29 ± 4.72**	0.78 ± 0.09**

表 3 各组小鼠血清炎症和过氧化损伤的变化($n = 10$)

Table 3 Changes in serum inflammation and peroxidation damage in each group($n = 10$)				
组别 Groups	IL-6 (ng/L)	4-HNE (ng/L)	8-OHdG (ng/mL)	MDA (nmol/mL)
EC 组 EC group	152.36 ± 16.87	198.42 ± 22.07	16.59 ± 2.64	17.56 ± 1.37
EE 组 EE group	107.26 ± 11.42**	148.39 ± 12.94**	11.35 ± 1.82**	9.24 ± 1.61**

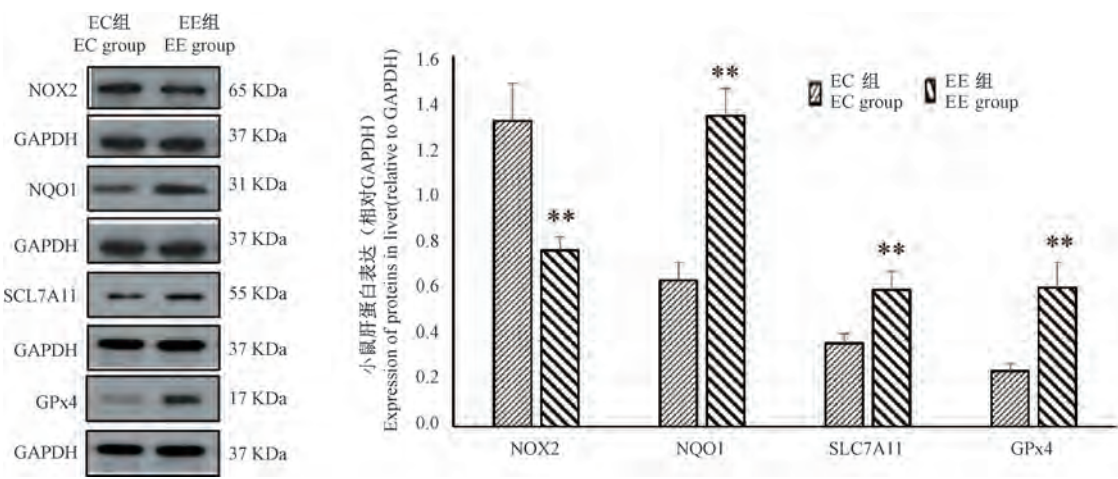


图 2 各组小鼠肝细胞铁死亡相关蛋白表达的变化

Figure 2 Changes in the expression of ferroptosis-related proteins in mouse hepatocytes in each group

3 讨论

铁广泛参与机体氧的运输及物质代谢等过程,维持铁的动态平衡才能保证机体正常生理功能。近年研究发现衰老与过量铁蓄积引发的铁死亡密切相关^[12]。过量铁通过 Haber-Weiss 和 Fenton 反应产生活性氧(ROS),触发细胞的过氧化损伤。随年龄增长,哺乳动物模型及人的脑、肝、肾、骨骼肌等组织易出现铁的累积,导致出现神经退行性病变、肝损伤、糖尿病、肾疾病、椎间盘退变和肌少症等^[13-16]。在本实验中 16 周有氧运动显著降低了肝组织中铁含量,降低 EE 组小鼠肝重量、肝组织中 TG 含量明显下降,肝糖原含量增加。透射电镜下观察到 EE 组小鼠的线粒体膜、细胞核膜完整、线粒体嵴排列整齐,光镜下可见肝索排列较为整齐,说明 EE 组小鼠的肝细胞保持了较好的组织形态结构和功能。而 EC 组则出现了细胞核膜破损,边界不清晰,线粒体嵴断裂等典型的铁死亡所致的形态结构改变,说明 EC 组小鼠肝细胞发生了铁死亡所致的过氧化损伤。过量铁累积产生的 ROS 与 EC 组小鼠肝细胞生物膜的脂质反应,导致形成醛类反应产物,如 4-HNE 和 MDA,这些物质会进一步攻击蛋白质或 DNA,放大细胞损伤。因此导致 EC 组小鼠肝线粒体 DNA 损伤严重(8-OHdG 为线粒体过氧化损伤的标志物)。脂质过氧化作用影响所有脂质双分子层和亚细胞结构,如线粒体、内质网和溶酶体的膜^[17]。过多的 MDA 与许多疾病有关,如阿尔茨海默病、帕金森病、癌症、心血管疾病、糖尿病和脂肪肝等^[18]。EE 组小鼠肝细胞中 4-HNE 和 MDA 显著

低于对照组,说明其遭受的过氧化损伤较轻,这与 EE 组小鼠肝组织中较少的铁含量是一致的。线粒体正常的结构与功能是维持肝细胞生理功能的基础。EE 组小鼠 8-OHdG 显著下降,说明其线粒体 DNA 的过氧化损伤较轻,因此运动组肝细胞线粒体具有较完整的组织形态结构,保持了正常生理功能,减少脂肪累积,增加肝糖原储备等。EE 组血清中的过氧化产物也明显低于对照组,这说明运动不仅降低了 EE 组肝细胞的过氧化损伤,对其他组织的过氧化损伤也起到了较好的缓解作用。

目前研究衰老相关疾病的动物模型,多采用注射 D-半乳糖,以期获得快速衰老模型^[19-20]。本次研究中采用了自然衰老小鼠,使其更接近真实衰老进程。自然衰老的小鼠肝也出现了明显的水肿及轻度脂肪变性,GSH 和 NADPH 降低。与其他研究中发现的衰老动物模型出现肝细胞水肿和肝血窦受到挤压变窄,并出现脂肪变性是一致的^[21-22]。

GSH 是机体重要的抗氧化底物,是一种由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸连接成的三肽,其在体内主要有还原型(GSH)和氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione disulfide,GSSG)两种形式。GSH 遍布全身各个器官系统,但其主要来源为肝细胞。GSH 是机体对抗 ROS 的重要防御系统^[6],在维持机体氧化还原平衡和正常生理功能中发挥重要作用。近年研究发现 GSH 与肝细胞过氧化损伤和衰老密切相关。许多天然食品或植物提取物(如天然二肽环^[23]、白藜芦醇^[24]、姜黄素^[25]、五味子精油^[26]等)可通过促进 GSH 表达减轻肝过氧化损伤及衰老进程。EE 组肝组织 GSH 含量显著增加,使肝组织中

线粒体 DNA 过氧化损伤降低及脂质过氧化产物减少。NOX2 是一种 NADPH 氧化酶,主要是以 NADPH 为底物产生 ROS,对细胞产生过氧化损伤。NOX2 表达增加会使肝细胞内 NADPH 耗竭,细胞内氧化自由基积累,增加细胞对铁死亡的敏感性。NOX2 表达和活性氧产生的增加密切相关^[27]。高淀粉饮食显著提升小鼠肝内 NOX2 表达,而敲低 NOX2 在动物及细胞水平均可特异性地抵抗高淀粉饮食介导的非酒精性脂肪肝^[1]。抑制 NOX2 活性可以降低过氧化损伤,改善胰岛移植的结局^[28]。EE 组小鼠肝细胞 NOX2 表达下降,因此对 NADPH 消耗减少,表现为肝 NADPH 含量增加。NADPH 是氧化型(GSSG)转化为还原型 GSH 的重要底物。SLC7A11(胱氨酸/谷氨酸反向转运体)可提供半胱氨酸,半胱氨酸是合成 GSH 三肽(Cys-Gly-Glu)所必需的^[29]。如果抑制 SLC7A11,会降低细胞内半胱氨酸和谷胱甘肽水平,导致纤维肉瘤细胞坏死^[30]。EE 组小鼠肝细胞中较多的 NADPH 和高表达的 SLC7A11 也促进了 GSH 含量的提高。NQO1 是机体重要的氧化还原酶,广泛存在于哺乳动物的肝、肺、肾、心脏和神经系统中,能催化醌还原成氢醌,阻止醌产生 ROS,避免对 DNA 造成氧化损伤^[31]。NQO1 通过维持泛醌还原形式,保护内源性抗氧化剂发挥生理作用^[6]。NQO1 参与 NADPH 的氧化还原反应。EE 组小鼠肝组织中 NQO1 含量显著增加,也有助于维持机体的抗氧化系统功能,减少增龄所致的过氧化损伤。

GPx4 是一种含有硒代半胱氨酸(selenocysteine)的酶,在修复磷脂过氧化损伤中起重要作用。近年 GPx4 被发现与铁死亡相关^[32]。自发现铁死亡以来,铁死亡已成为癌症和神经变性等不可治愈疾病的治疗靶点。因此,近年 GPx4 被认为是机体抑制铁死亡及其相关疾病的明星分子,其主要作用机制是以 GSH 为辅因子而发挥抗氧化作用,因此,GSH/GPx4 是机体内调控铁死亡的核心通路^[33]。抑制 SLC7A11/GSH/GPx4 轴导致血管平滑肌细胞发生铁死亡^[34]。GPR116 通过抑制 SLC7A11/GSH/GPx4 系统促进脓毒症肝损伤中的铁死亡^[35]。EE 组小鼠肝组织高表达的 GSH/GPx4 发挥了较好的抗氧化作用,减轻了铁死亡,因此,其循环系统和肝细胞过氧化损伤程度降低,有助于维持 EE 组小鼠肝组织正常生理功能。

铁死亡也是一把双刃剑,在正常细胞中,铁死

亡使细胞物质代谢紊乱和细胞死亡,然而诱导铁死亡近年来却被认为是抑制肝癌生长和进展的新途径^[36]。研究表明过量的铁蓄积和脂质过氧化是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)铁死亡的主要特征,铁死亡诱导剂联合免疫治疗成为 HCC 患者的新希望^[37]。

4 结论

适度的有氧运动一方面可促进衰老进程中的小鼠肝细胞铁含量下降,减少铁的累积;另一方面,运动通过促进 SLC7A11 表达,抑制 NOX2,为 GPx4 提供更多的 GSH,而发挥抗氧化功能,减轻过量铁诱发的铁死亡,减缓肝细胞的过氧化损伤,有助于维持肝细胞结构的完整性,发挥正常的生理功能。

参 考 文 献(References)

- [1] Feng G, Byrne CD, Targher G, et al. Ferroptosis and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: is there a link? [J]. *Liver Int*, 2022, 42(7): 1496–1502.
- [2] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060–1072.
- [3] Stockwell BR. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications [J]. *Cell*, 2022, 185(14): 2401–2421.
- [4] Fleming RE, Ponka P. Iron overload in human disease [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(4): 348–359.
- [5] Fang X, Wang H, Han D, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(7): 2672–2680.
- [6] 王福佛. 铁死亡 [M]. 北京: 科学出版社; 2022.
- [7] Maschalidi S, Mehrotra P, Keçeli BN, et al. Targeting SLC7A11 improves efferocytosis by dendritic cells and wound healing in diabetes [J]. *Nature*, 2022, 606(7915): 776–784.
- [8] 沈馨, 余盈盈, 陈峻逸, 等. 靶向铁死亡防治重大疾病的转化医学研究 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2022, 52(12): 1815–1826.
- [9] Shen X, Yu YY, Chen JY, et al. Targeting ferroptosis as a potential prevention and treatment strategy for human diseases [J]. *Sci Sin Vitae*, 2022, 52(12): 1815–1826.
- [10] 谢丹煜, 何艾舟, 李婷, 等. 有氧运动对肥胖大鼠内皮功能障碍和内脂素的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(4): 533–539.
- Xie ZY, He AZ, Li T, et al. Effect of aerobic exercise on endothelial dysfunction and visfatin in obese rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(4): 533–539.
- [10] Yang W, Liu Y, Yang G, et al. Moderate-intensity physical exercise affects the exercise performance and gut microbiota of

- mice [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 712381.
- [11] 王海涛, 杨雯茜, 刘玉倩. 有氧运动对高脂膳食小鼠心肌损伤中 Nrf2/GPX4/Ferroptosis 通路的作用 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2022, 38(2): 143-148.
- Wang HT, Yang WQ, Liu YQ. Effects of aerobic exercise on Nrf2/GPX4/Ferroptosis pathway in myocardial injury in high-fat diet mice [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2022, 38(2): 143-148.
- [12] Coradduzza D, Congiargiu A, Chen Z, et al. Ferroptosis and senescence; a systematic review [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3658.
- [13] Hsu CC, Senussi NH, Fertrin KY, et al. Iron overload disorders [J]. *Hepatol Commun*, 2022, 6(8): 1842-1854.
- [14] Wang W, Jing X, Du T, et al. Iron overload promotes intervertebral disc degeneration via inducing oxidative stress and ferroptosis in endplate chondrocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 190: 234-246.
- [15] Nemeth E, Ganz T. Hepcidin and iron in health and disease [J]. *Annu Rev Med*, 2023, 74(1): 261-277.
- [16] Harrison AV, Lorenzo FR, McClain DA. Iron and the pathophysiology of diabetes [J]. *Annu Rev Physiol*, 2023, 85: 339-362.
- [17] Capelletti MM, Manceau H, Puy H, et al. Ferroptosis in liver diseases: an overview [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 4908.
- [18] Boccatonda A, Andreetto L, D'Ardes D, et al. From NAFLD to MAFLD: definition, pathophysiological basis and cardiovascular implications [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(3): 883.
- [19] Ru M, Wang W, Zhai Z, et al. Nicotinamide mononucleotide supplementation protects the intestinal function in aging mice and D-galactose induced senescent cells [J]. *Food Funct*, 2022, 13(14): 7507-7519.
- [20] Samad N, Nasir A, Rehman MHU, et al. Adenosine protects D-galactose induced alterations in rat model of aging via attenuating neurochemical profile and redox status [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(7): 2483-2496.
- [21] Li Y, Adeniji NT, Fan W, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis during aging [J]. *Aging Dis*, 2022, 13(4): 1239-1251.
- [22] Chen J, Li X, Ge C, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(3): 467-480.
- [23] Zhang QY, Han SC, Huang RP, et al. Cyclo (-Phe-Phe) alleviates chick embryo liver injury via activating the Nrf2 pathway [J]. *Food Funct*, 2022, 13(13): 6962-6974.
- [24] 胡戈, 马欣雨, 秦菲, 等. 白藜芦醇对大鼠运动性肝损伤的保护作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(6): 763-769.
- Hu G, Ma XY, Qin F, et al. Protective effect of resveratrol on exercise-induced liver injury in rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(6): 763-769.
- [25] Chen J, Fan T, Li J, et al. Curcumin/cyclodextrin polymer inclusion complex attenuates ethanol-induced liver injury by inhibition of DNA damage in mice [J]. *Food Sci Nutr*, 2023, 11(5): 2418-2426.
- [26] Zhao J, Ding K, Hou M, et al. *Schisandra chinensis* essential oil attenuates acetaminophen-induced liver injury through alleviating oxidative stress and activating autophagy [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 958-967.
- [27] Paolillo R, Boulanger M, Gâtel P, et al. The NADPH oxidase NOX2 is a marker of adverse prognosis involved in chemoresistance of acute myeloid leukemias [J]. *Haematologica*, 2022, 107(11): 2562-2575.
- [28] Wrublewsky S, Glas J, Carlein C, et al. The loss of pancreatic islet NADPH oxidase (NOX)₂ improves islet transplantation [J]. *Redox Biol*, 2022, 55: 102419.
- [29] Li P, Yu J, Huang F, et al. SLC7A11-associated ferroptosis in acute injury diseases: mechanisms and strategies [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2023, 27(10): 4386-4398.
- [30] Toyokuni S, Yanatori I, Kong Y, et al. Ferroptosis at the crossroads of infection, aging and cancer [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(8): 2665-2671.
- [31] Alkhalifah EAR, Alobaid AA, Almajed MA, et al. Cardamom extract alleviates the oxidative stress, inflammation and apoptosis induced during acetaminophen-induced hepatic toxicity via modulating Nrf2/HO-1/NQO-1 pathway [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44(11): 5390-5404.
- [32] Nishida Xavier da Silva T, Friedmann Angeli JP, Ingold I. GPX4: old lessons, new features [J]. *Biochem Soc Trans*, 2022, 50(3): 1205-1213.
- [33] Zeng C, Lin J, Zhang K, et al. SHARPIN promotes cell proliferation of cholangiocarcinoma and inhibits ferroptosis via p53/SLC7A11/GPX4 signaling [J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(11): 3766-3775.
- [34] Ye Y, Chen A, Li L, et al. Repression of the antiporter SLC7A11/glutathione/glutathione peroxidase 4 axis drives ferroptosis of vascular smooth muscle cells to facilitate vascular calcification [J]. *Kidney Int*, 2022, 102(6): 1259-1275.
- [35] Wang Y, Wang T, Xiang Q, et al. GPR116 promotes ferroptosis in sepsis-induced liver injury by suppressing system Xc⁻/GSH/GPX4 [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2023, 2023: 1.
- [36] Ajoolabady A, Tang D, Kroemer G, et al. Ferroptosis in hepatocellular carcinoma: mechanisms and targeted therapy [J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(2): 190-205.
- [37] Long S, Chen Y, Wang Y, et al. Identification of Ferroptosis-related molecular model and immune subtypes of hepatocellular carcinoma for individual therapy [J]. *Cancer Med*, 2023, 12(2): 2134-2147.

郭亚茜, 刘瑞雪, 杜晓鹏, 等. 不同灭菌方法对猪专用配方奶粉营养成分的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31 (12): 1588-1597.

Guo YX, Liu RX, Du XP, et al. Effects of different sterilization methods on nutritional composition of pig-specific formula milk powder [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1588-1597.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.009

不同灭菌方法对猪专用配方奶粉营养成分的影响

郭亚茜, 刘瑞雪, 杜晓鹏, 朱华*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会
人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 使用不同灭菌方式对猪专用配方奶粉进行灭菌, 探讨对配方奶粉营养成分损失最小的灭菌方法及灭菌条件。**方法** 猪专用配方奶粉分为高压灭菌组和辐照灭菌组。高压灭菌组按照不同灭菌条件、辐照灭菌组按照不同⁶⁰Co- γ 射线剂量对配方奶粉进行灭菌。按国家标准对灭菌处理后的配方奶粉进行无菌状态检测和营养成分含量测定。**结果** 经不同灭菌方法处理后各组配方奶粉无菌状态检测结果均为阴性。常规营养成分在高压灭菌组 121℃ 30 min、辐照灭菌液体组 50 kGy 灭菌条件下粗蛋白含量降低有极显著性差异($P < 0.01$)、辐照灭菌粉末组 50 kGy 水分、粗蛋白和钙含量降低有极其显著性差异($P < 0.001$)。缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸在辐照灭菌粉末组 50 kGy 灭菌条件下含量变化无显著性差异, 高压灭菌组和辐照灭菌液体组所有氨基酸含量均降低($P < 0.001$)。微量元素在高压灭菌组 121℃ 30 min 灭菌条件下铁含量增加($P < 0.001$), 在辐照灭菌液体组 25 kGy 灭菌条件下铁和钾含量增加($P < 0.001$)、镁含量增加($P < 0.01$)。在辐照灭菌粉末组 50 kGy 灭菌条件下镁含量增加具有显著性差异($P < 0.05$), 钠含量增加($P < 0.01$)。维生素在高压灭菌组 121℃ 30 min 灭菌条件下 VE、VB₂ 含量增加($P < 0.001$)。在辐照灭菌液体组 50 kGy 灭菌条件下 VE 含量增加($P < 0.05$), VB₂ 含量减少($P < 0.001$)。在辐照灭菌粉末组 25 kGy 灭菌条件下 VE、VA 含量减少($P < 0.001$)。**结论** 高压灭菌组 121℃ 30 min 营养成分损失最小; 辐照灭菌组 50 kGy 辐照剂量营养成分损失最小。两种灭菌方法比较, 50 kGy 辐照灭菌粉末组营养成分含量损失最少。

【关键词】 高压灭菌; 辐照灭菌; 配方奶粉

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1588-10

Effects of different sterilization methods on nutritional composition of pig-specific formula milk powder

GUO Yaxi, LIU Ruixue, DU Xiaopeng, ZHU Hua*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, PUMC, NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China)

Corresponding author: ZHU Hua. E-mail: zhuh@cnilas.org

【Abstract】 Objective Using different sterilization method to sterilize pig specific formula milk powder, exploring the sterilization method and conditions that minimize the loss of nutritional components in formula milk powder. **Methods** Pig-specific formula milk powder was divided into high-pressure sterilization and irradiation sterilization groups. Formula milk powder in the high-pressure group was sterilized using different sterilization conditions and that in the irradiation group was sterilized using different ⁶⁰Co γ -radiation doses. The sterility and the nutritional contents of the sterilized formula milk

【基金项目】 国家重点研发计划项目(2022YFF071060001)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF071060001).

【作者简介】 郭亚茜(1989—), 女, 主管技师, 本科, 研究方向: 无菌动物技术。Email: GYX409@163.com

【通信作者】 朱华(1971—), 女, 主任技师, 硕士, 研究方向: 疾病与肠道微生态。Email: zhuh@cnilas.org

powders were determined according to national standards. **Results** The sterility tests for both groups of formula milk powder were negative. Compared to control group, the crude protein contents were significantly lower in formula in the high-pressure group sterilized at 121℃ for 30 min and in the irradiation liquid group sterilized at 50 kGy ($P < 0.01$). The water, crude protein, and calcium contents were significantly lower ($P < 0.001$) in the irradiation group sterilized at 50 kGy. There was no significant difference in the valine, isoleucine, or leucine content under 50 kGy sterilization conditions in the irradiation sterilized group, but all amino acid contents were decreased in the high-pressure sterilization and irradiation sterilized liquid groups ($P < 0.001$). Analysis of trace elements showed an increased iron content ($P < 0.001$) in formula sterilized at 121℃ for 30 min in the high-pressure sterilization group, increased iron and potassium contents ($P < 0.001$) under 25 kGy sterilization conditions in the irradiation sterilization liquid group, and increased magnesium content ($P < 0.01$). The magnesium ($P < 0.05$) and sodium contents ($P < 0.01$) differed significantly in formula treated under 50 kGy sterilization conditions in the irradiation sterilized powder group. VE and VB₂ contents were increased in formula sterilized at 121℃ for 30 min in the high-pressure sterilization group ($P < 0.001$), the VE content was increased ($P < 0.05$) and the VB₂ content was decreased ($P < 0.001$) in formula sterilized under 50 kGy conditions in the irradiation sterilization liquid group, and the VE and VA contents were decreased in formula sterilized at 25 kGy in the irradiation sterilized powder group ($P < 0.001$). **Conclusions** Sterilization at 121℃ for 30 min result ed in the least loss of nutritional components in the high-pressure sterilization group, while irradiation sterilization result ed in the least loss of nutrients at a dose of 50 kGy. Comparing the two sterilization method, irradiation of milk powder at 50 kGy result ed in the least loss of nutrient content.

【Keywords】 high-pressure sterilization; irradiation sterilization; formula powder
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

猪在生理、解剖、遗传特性、营养代谢等方面与人类近似,近年来在心血管疾病、组织/器官移植、肿瘤及糖尿病等医学研究中应用广泛^[1-2]。猪的肠道系统和杂食特性,与人高度相似,利用无菌猪制备人源化肠道菌群动物模型,重现度更高^[2-3]。将基因编辑技术、体细胞克隆技术与无菌猪净化技术结合,使无菌猪有望成为人类器官的潜在供体^[4-6]。人工哺乳净化是获得无菌猪的主要途径,在此过程中人工乳是无菌仔猪摄入营养的主要来源。人工乳的营养成分直接影响无菌猪的生长发育,是影响人工哺乳净化成功的主要因素之一。本实验使用不同灭菌条件对猪专用配方奶粉进行灭菌,在保证达到无菌标准前提下,探讨对配方奶粉营养成分损失最小的灭菌方法及灭菌条件,为生产、培育无菌猪提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 配方奶粉

仔猪专用配方奶粉(河南牧经海润农牧科技集团有限公司生产,批号:20221011)。

1.1.2 主要试剂与仪器

脑心浸液肉汤(OXOID, CM1135B), 硫乙醇酸钠(OXOID, CM0391B), 大豆蛋白胨(OXOID,

CM0129B), 三氯甲烷(Sigma, 235962), 丙酮(Sigma, 270725), 盐酸(Sigma, H1758), 甲醇(通广, TG10022)。

高压蒸汽灭菌器(TOMY-SX-700), ⁶⁰Co 源(北京鸿仪四方辐射技术有限公司), 抽真空机(鑫空 DZQ-500TE), 纯水机(TCHS-10R0/70F), 全自动氨基酸分析仪(A1-IE-2836)、高效液相色谱仪(IE-2796)、原子吸收分光光度计(A1-IE-2853)、分析天平(IE-2768), 玻璃瓶, 橡胶塞, 纱布, 打包绳, 真空袋。

1.2 方法

1.2.1 分组

将猪专用配方奶粉样品分为 15 个组(表 1), 采用高压蒸汽灭菌和⁶⁰Co 辐照灭菌两种方法,⁶⁰Co 辐照灭菌又分为液体组和粉末组。

1.2.2 处理

辐照灭菌液体组奶粉和纯净水按 1:6 稀释后分装到玻璃瓶内, 每瓶 200 mL; 辐照灭菌粉末组每袋 200 g, 按辐照要求真空包装后, 分装于 4 个 48.5 cm × 34.5 cm × 28 cm 纸箱内, 送辐照地点按不同⁶⁰Co-γ射线剂量(25、30、35、50 kGy)辐照灭菌。高压灭菌液体组奶粉和纯净水按 1:6 稀释后分装到玻璃瓶内, 每瓶 200 mL, 橡胶塞、纱布封口后分别按照 121℃ (30、40、50 min)、126℃ 10 min 和 134℃ 4 min

表 1 猪专用配方奶粉样品的分组

Table 1 Groups of pig specific formula milk

分组 Groups		灭菌条件/灭菌剂量 Sterilization conditions/dosage				
对照组(液体) Control group(liquid)		—				
高压灭菌组(液体) High-pressure group(liquid)		121℃ 30 min	121℃ 40 min	121℃ 50 min	126℃ 10 min	134℃ 4 min
辐照灭菌组(液体) Irradiation group(liquid)		25 kGy	30 kGy	35 kGy	50 kGy	—
辐照灭菌组(粉末) Irradiation group(powder)		25 kGy	30 kGy	35 kGy	50 kGy	—
对照组(粉末) Control group(powder)		—				

进行高压灭菌。液体对照组和粉末对照组不作任何处理。

所有灭菌处理后样品一式两份,一份送实验动物质量检测中心进行微生物检测,另一份加 2 个对照组样品送谱尼测试集团股份有限公司进行营养成分检测。

1.2.3 检测方法

采用全自动氨基酸分析仪检测氨基酸的含量(色谱柱:磺酸型阳离子树脂;流速:泵 1:0.40 mL/min,泵 2:0.35 mL/min;进样量:20 μL)。高效液相色谱仪检测维生素含量(色谱柱:C18 150 mm × 4.6 mm 5 μm;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL)。原子吸收分光光度计检测微量元素含量。常规方法检测粗蛋白、水分、粗灰分、粗脂肪、粗纤维、氯化钠、总磷、钙的含量。

1.3 统计学分析

实验结果用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

GraphPad Prism 7.0 软件进行显著性分析,采用方差分析比较组间差异, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 微生物检测

将经不同灭菌条件灭菌的配方奶粉,按照 GB/T14926.41、43—2001,GB14922.2—2011 进行无菌状态检测。检测结果均合格,见表 2。

2.2 常规营养成分

2.2.1 高压灭菌组

与对照组相比,高压灭菌组 121℃ 30 min 粗蛋白含量降低有极显著性差异($P < 0.01$),134℃ 4 min 粗蛋白含量降低有显著性差异($P < 0.05$),其他组粗蛋白含量均降低有极其显著性差异($P < 0.001$)。126℃ 20 min 粗脂肪含量增加($P < 0.01$),其他组粗脂肪含量均增加($P < 0.001$)。121℃ 40 min 粗灰分含量降低($P < 0.05$),121℃ 50

表 2 微生物检测结果

Table 2 Results of microbiological tests

高压灭菌组(液体) High pressure sterilization group (liquid)			辐照灭菌组(液体) Irradiation sterilization group (liquid)		辐照灭菌组(粉末) Irradiation sterilization group (powder)	
灭菌温度(℃) Sterilization temperature (℃)	灭菌时间(min) Sterilization time (min)	检测结果 Test results	辐照剂量(kGy) Radiation dose (kGy)	检测结果 Test results	辐照剂量(kGy) Radiation dose (kGy)	检测结果 Test results
121	30	阴性 Negative	25	阴性 Negative	25	阴性 Negative
	40	阴性 Negative	30	阴性 Negative	30	阴性 Negative
	50	阴性 Negative	35	阴性 Negative	35	阴性 Negative
126	20	阴性 Negative	50	阴性 Negative	50	阴性 Negative
134	4	阴性 Negative	/	/	/	/

min、126℃ 20 min 粗灰分含量降低 ($P < 0.001$)。121℃ 30 min、121℃ 40 min、121℃ 50 min 粗纤维含量增加 ($P < 0.001$)，126℃ 20 min 粗纤维含量降低 ($P < 0.01$)。121℃ 30 min、121℃ 50 min 总磷含量增加 ($P < 0.001$)，121℃ 40 min 钙含量降低 ($P <$

0.01)。高压灭菌组 134℃ 4 min 和 121℃ 30 min 只有粗蛋白含量降低，134℃ 4 min 灭菌条件下有 6 种常规营养成分含量变化无显著性差异，对常规营养成分含量影响最小。其次是 121℃ 30 min 组 (见表 3)。

表 3 高压灭菌组常规营养成分含量
Table 3 Conventional nutrient content in the high pressure sterilization group

组别 Groups		水分 (%) Water content (%)	粗灰分 (%) Crude ash (%)	粗蛋白 (%) Crude protein (%)	粗脂肪 (g/kg) Crude fat (g/kg)
对照组 (液体) Control group (liquid)		85.20 ± 0.46	4.36 ± 0.00	17.78 ± 0.10	107.3 ± 0.00
	121℃ 30 min	87.12 ± 1.04	4.30 ± 0.05	17.11 ± 0.19 **	133.33 ± 9.87 ***
	121℃ 40 min	85.40 ± 0.48	4.18 ± 0.00 *	16.78 ± 0.16 ***	134.93 ± 1.94 ***
高压灭菌组 High pressure sterilization group	121℃ 50 min	86.65 ± 0.60	3.99 ± 0.05 ***	16.71 ± 0.11 ***	141.79 ± 1.06 ***
	126℃ 20 min	86.14 ± 0.64	3.67 ± 0.00 ***	16.72 ± 0.16 ***	125.54 ± 0.51 **
	134℃ 4 min	85.69 ± 0.52	4.48 ± 0.05	17.23 ± 0.20 *	138.54 ± 3.44 ***

组别 Groups		粗纤维 (%) Crude fibre (%)	氯化钠 (%) Nacl (%)	总磷 (%) Total phosphorus (%)	钙 (g/kg) Calcium (g/kg)
对照组 (液体) Control group (liquid)		1.71 ± 0.05	0.80 ± 0.12	0.49 ± 0.01	6.08 ± 0.06
	121℃ 30 min	3.29 ± 0.16 ***	0.82 ± 0.00	0.59 ± 0.01 ***	5.99 ± 0.17
	121℃ 40 min	2.53 ± 0.10 ***	0.83 ± 0.14	0.46 ± 0.01	5.46 ± 0.07 **
高压灭菌组 High pressure sterilization group	121℃ 50 min	2.61 ± 0.11 ***	0.79 ± 0.00	0.68 ± 0.01 ***	6.13 ± 0.04
	126℃ 20 min	1.22 ± 0.10 **	0.75 ± 0.01	0.47 ± 0.00	5.99 ± 0.12
	134℃ 4 min	1.81 ± 0.10	0.84 ± 0.15	0.47 ± 0.01	6.10 ± 0.05

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。(下表同)
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following tables)

2.2.2 辐照灭菌组

与对照组相比,辐照灭菌液体组 25 kGy 和 35 kGy 组粗灰分含量降低具有极其显著性差异 ($P < 0.001$) ,30 kGy 组粗灰分含量降低具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。30 kGy 和 35 kGy 组粗蛋白含量降低 ($P < 0.001$) ,50 kGy 组粗蛋白含量降低 ($P < 0.01$)。25 kGy、30 kGy 和 50 kGy 组粗脂肪含量增加 ($P < 0.001$)。30 kGy 组粗纤维含量降低具有显著性差异 ($P < 0.05$)、35 kGy 组粗纤维含量增加 ($P < 0.01$)、50 kGy 组粗纤维含量增加 ($P < 0.001$)。总磷在 25 kGy 组含量增加 ($P < 0.001$)、30 kGy 组含量降低 ($P < 0.01$)、35 kGy 组含量降低 ($P < 0.05$)。30 kGy 和 35 kGy 组钙

含量降低 ($P < 0.001$)、50 kGy 组钙含量增加 ($P < 0.001$)。辐照灭菌粉末组水分、粗蛋白和钙含量均降低 ($P < 0.001$)。25 kGy 和 35 kGy 组粗灰分含量增加 ($P < 0.001$) ,30 kGy 和 50 kGy 组粗灰分含量增加 ($P < 0.01$)。辐照灭菌液体组 50 kGy 灭菌条件下只有粗蛋白含量降低,对常规营养成分含量影响最小。辐照灭菌粉末组 25 kGy 灭菌条件下水分、粗蛋白和钙含量降低最少,对营养成分含量的影响最小,其次是 50 kGy 组 (见表 4)。

2.3 氨基酸

高压蒸汽灭菌和⁶⁰Co 辐照灭菌对氨基酸含量损失率的影响(见表 5、表 6)。

表 4 辐照灭菌组常规营养成分含量

Table 4 Conventional nutrient content in the irradiated group

组别 Groups		水分 (%) Water content (%)	粗灰分 (%) Crude ash (%)	粗蛋白 (%) Crude protein (%)	粗脂肪 (g/kg) Crude fat (g/kg)
对照组 (液体) Control group (liquid)		85.20 ± 0.46	4.36 ± 0.00	17.78 ± 0.10	107.3 ± 0.00
辐照灭菌液体组 Irradiation sterilization liquid group	25 kGy	86.92 ± 0.75	3.78 ± 0.05 ***	17.54 ± 0.09	137.40 ± 3.24 ***
	30 kGy	86.63 ± 0.52	4.14 ± 0.05 **	16.94 ± 0.11 ***	141.79 ± 1.06 ***
	35 kGy	86.31 ± 0.99	3.91 ± 0.05 ***	16.76 ± 0.10 ***	114.96 ± 0.52
	50 kGy	86.98 ± 1.07	4.31 ± 0.05	17.13 ± 0.08 **	135.50 ± 0.54 ***
对照组 (粉末) Control group (powder)		4.09 ± 0.03	4.26 ± 0.01	20.32 ± 0.04	141.33 ± 2.88
辐照灭菌粉末组 Irradiation sterilization powder group	25 kGy	3.71 ± 0.01 ***	4.82 ± 0.08 ***	17.79 ± 0.01 ***	140.04 ± 0.59
	30 kGy	3.69 ± 0.05 ***	4.57 ± 0.02 **	17.36 ± 0.03 ***	141.02 ± 13.36
	35 kGy	3.68 ± 0.01 ***	4.81 ± 0.01 ***	17.10 ± 0.03 ***	146.27 ± 0.29
	50 kGy	3.70 ± 0.02 ***	4.53 ± 0.04 **	17.46 ± 0.02 ***	143.15 ± 0.29

组别 Groups		粗纤维 (%) Crude fibre (%)	氯化钠 (%) Nacl (%)	总磷 (%) Total phosphorus (%)	钙 (g/kg) Calcium (g/kg)
对照组 (液体) Control group (liquid)		1.71 ± 0.05	0.80 ± 0.12	0.49 ± 0.01	6.08 ± 0.06
辐照灭菌液体组 Irradiation sterilization liquid group	25 kGy	1.41 ± 0.06	0.81 ± 0.01	0.57 ± 0.02 ***	6.01 ± 0.20
	30 kGy	1.34 ± 0.09 *	0.80 ± 0.00	0.43 ± 0.01 **	5.13 ± 0.18 ***
	35 kGy	2.15 ± 0.05 **	0.75 ± 0.01	0.45 ± 0.01 *	4.95 ± 0.04 ***
	50 kGy	2.29 ± 0.11 ***	0.92 ± 0.16	0.50 ± 0.01	6.88 ± 0.18 ***
对照组 (粉末) Control group (powder)		1.70 ± 0.03	0.90 ± 0.00	0.48 ± 0.00	5.52 ± 0.01
辐照灭菌粉末组 Irradiation sterilization powder group	25 kGy	1.72 ± 0.07	0.87 ± 0.00	0.48 ± 0.00	4.69 ± 0.05 ***
	30 kGy	1.68 ± 0.02	0.93 ± 0.00	0.49 ± 0.00	4.33 ± 0.04 ***
	35 kGy	1.66 ± 0.03	0.90 ± 0.02	0.48 ± 0.01	4.29 ± 0.03 ***
	50 kGy	1.75 ± 0.04	0.90 ± 0.02	0.48 ± 0.00	4.68 ± 0.06 ***

2.3.1 高压灭菌组

与对照组比, 高压灭菌组在 121℃ 40 min、121℃ 50 min、126℃ 20 min 和 134℃ 4 min 条件下有 8 种氨基酸含量降低具有极其显著性差异 ($P < 0.001$)。121℃ 30 min 组有 3 种氨基酸含量降低 ($P < 0.001$)、3 种氨基酸含量增加 ($P < 0.001$)、2 种氨基酸含量降低有极显著性差异 ($P < 0.01$), 异亮氨酸含量降低具有显著性差异 ($P < 0.05$)。126℃ 20 min 组蛋氨酸含量增加 ($P < 0.001$), 121℃ 40 min 和 121℃ 50 min 组蛋氨酸含量增加 ($P < 0.01$)。121℃ 30 min 组有 5 种氨基酸含量比其他组损失小, 对氨基酸含量影响最小 (见表 5)。

2.3.2 辐照灭菌组

与对照组相比, 辐照灭菌液体组有 7 种氨基酸

表 5 高压灭菌组氨基酸损失率

Table 5 Loss rate of amino acids in high pressure sterilization group

组别 Groups	苏氨酸 Threonine	缬氨酸 Valine	蛋氨酸 Methionine	异亮氨酸 Isoleucine	亮氨酸 Leucine	苯丙氨酸 Phenylalanine	赖氨酸 Lysine	组氨酸 Histidine	精氨酸 Arginine
对照组 (液体) Control group (liquid)	0.71	0.73	0.17	0.65	1.23	0.69	1.09	0.33	0.51
高压灭菌组 High pressure sterilization group	121℃ 30 min	10.04 ***	6.58 **	-7.90 ***	4.75 *	3.34 **	-12.93 ***	30.07 ***	-13.68 ***
	121℃ 40 min	13.72 ***	16.68 ***	-4.69 **	14.98 ***	15.21 ***	24.50 ***	35.24 ***	17.93 ***
	121℃ 50 min	18.60 ***	25.34 ***	-4.39 **	20.90 ***	20.10 ***	26.53 ***	39.67 ***	21.88 ***
	126℃ 20 min	4.67 ***	10.11 ***	-9.36 ***	7.72 ***	5.74 ***	12.53 ***	22.53 ***	9.12 ***
	134℃ 4 min	12.94 ***	15.00 ***	-0.88	12.31 ***	15.08 ***	25.07 ***	36.65 ***	23.10 ***

含量均降低具有极其显著性差异($P < 0.001$)。异亮氨酸在 25 kGy 和 50 kGy 灭菌条件下含量降低具有极其显著性差异($P < 0.01$),在 30 kGy 和 35 kGy 灭菌条件下含量降低($P < 0.001$)。25 kGy、35 kGy 和 50 kGy 组蛋氨酸含量增加($P < 0.001$),30 kGy 组蛋氨酸含量增加($P < 0.01$)。辐照灭菌粉末组苏氨酸含量降低($P < 0.01$),赖氨酸含量降低($P < 0.001$)。25 kGy 组有 4 种氨基酸含量降低($P < 0.001$)、4 种氨基酸含量降低($P < 0.01$)。蛋氨酸在 30 kGy 和 50 kGy 灭菌条件下降低($P < 0.001$),在 35 kGy 灭菌条件下含量降低($P <$

0.01)。苯丙氨酸在 30 kGy 灭菌条件下增加($P < 0.01$),在 35 kGy 和 50 kGy 灭菌条件下含量增加($P < 0.001$)。30 kGy、35 kGy 和 50 kGy 灭菌条件下组氨酸含量增加($P < 0.01$)。精氨酸在 30 kGy 灭菌条件下含量降低($P < 0.01$),在 35 kGy 和 50 kGy 灭菌条件下含量降低具有显著性差异($P < 0.05$)。辐照灭菌液体 25 kGy 组有 4 种氨基酸损失小于其他辐照灭菌组,氨基酸含量影响最小,其次是 50 kGy 组。辐照灭菌粉末组 50 kGy 组有 5 种氨基酸损失小于其他辐照灭菌组,氨基酸含量影响最小(见表 6)。

表 6 辐照灭菌组氨基酸损失率

Table 6 Loss rate of amino acid in irradiated group					
组别 Groups	苏氨酸 Threonine	缬氨酸 Valine	蛋氨酸 Methionine	异亮氨酸 Isoleucine	亮氨酸 Leucine
对照组(液体) Control group (liquid)	0.71	0.73	0.17	0.65	1.23
辐照灭菌液体组 Irradiation sterilization liquid group	25 kGy6.86***	8.32***	-35.39***	6.95**	9.21***
	30 kGy21.29***	21.97***	-4.97**	20.21***	22.84***
	35 kGy18.39***	21.41***	-7.31***	19.52***	19.49***
	50 kGy7.78***	8.88***	-16.96***	7.02**	8.80***
对照组(粉末) Control group (powder)	0.85	0.87	0.27	0.82	1.52
辐照灭菌粉末组 Irradiation sterilization powder group	25 kGy7.10**	13.75***	5.87***	13.80***	9.61**
	30 kGy10.18**	2.70	18.90***	3.31	2.62
	35 kGy6.93**	3.04	3.67**	1.53	0.92
	50 kGy7.93**	0.62	6.24***	-1.67	-0.78

组别 Groups	苯丙氨酸 Phenylalanine	赖氨酸 Lysine	组氨酸 Histidine	精氨酸 Arginine
对照组(液体) Control group (liquid)	0.69	1.09	0.33	0.51
辐照灭菌液体组 Irradiation sterilization liquid group	25 kGy18.41***	8.50***	12.61***	16.26***
	30 kGy30.60***	24.50***	29.94***	29.80***
	35 kGy29.66***	22.35***	28.57***	21.42***
	50 kGy18.35***	13.57***	21.12***	9.44***
对照组(粉末) Control group (powder)	0.87	1.31	0.41	0.70
辐照灭菌粉末组 Irradiation sterilization powder group	25 kGy11.44**	7.39***	7.49**	5.12**
	30 kGy-13.39**	8.72***	-5.78**	5.27**
	35 kGy-16.88***	8.65***	-8.35**	3.70*
	50 kGy-18.59***	7.27***	-6.52**	3.20*

2.4 维生素

维生素在不同灭菌条件下与对照组相比含量变化情况(见表 7,表 8)。

2.4.1 高压灭菌组

与对照组比,高压灭菌组在 121℃ 30 min、121℃ 50 min、126℃ 20 min 灭菌条件下 VE、VB₂ 含量增加具有极其显著性差异($P < 0.001$),134℃ 4 min 组 VE 含量增加($P < 0.001$)。VA 和 VD₃ 含量均未检出。

高压灭菌组 121℃ 30 min 组 VE、VB₂ 含量损失小于辐照灭菌组,对维生素含量影响最小(见表 7)。

2.4.2 辐照灭菌组

与对照组相比,辐照灭菌液体组 VB₂ 含量降低有极其显著性差异($P < 0.001$)。VE 在 25 kGy 灭菌条件下含量增加($P < 0.001$),在 30 kGy 灭菌条件下含量增加具有显著性差异($P < 0.05$),在 50 kGy 灭菌条件下含量增加有极显著性差异($P <$

0.01)。辐照灭菌粉末组 25 kGy 组 VE、VA 含量降低($P < 0.001$), VD_3 含量降低 ($P < 0.01$)。30 kGy、35 kGy 和 50 kGy 组 VE、VA 和 VD_3 含量降低 ($P < 0.001$)。35 kGy 和 50 kGy 组 VB_2 含量均降低 ($P < 0.05$)。VA、 VD_3 均未检出。辐照灭菌组 25

kGy 组维生素含量损失小于其他辐照灭菌组,对维生素含量影响最小,其次是 50 kGy 组(见表 8)。

2.5 微量元素

微量元素经高压蒸汽灭菌和⁶⁰Co 辐照灭菌后含量变化(见表 9,表 10)。

表 7 高压灭菌组维生素含量

Table 7 Vitamin content of high pressure sterilization group

组别 Groups		VE (mg/kg)	VB ₂ (mg/kg)	VA (KIU/kg)	VD ₃ (KIU/kg)
对照组 (液体) Control group (liquid)		41.46 ± 0.40	16.20 ± 0.11	/	/
	121℃ 30 min	60.50 ± 1.53 ***	19.45 ± 0.58 ***	/	/
高压灭菌组 High pressure sterilization group	121℃ 40 min	39.77 ± 0.54	15.91 ± 0.11	/	/
	121℃ 50 min	51.34 ± 0.88 ***	19.21 ± 0.47 ***	/	/
	126℃ 20 min	49.77 ± 0.37 ***	20.44 ± 0.14 ***	/	/
	134℃ 4 min	53.93 ± 1.03 ***	15.53 ± 0.11	/	/

表 8 辐照灭菌组维生素含量

Table 8 Vitamin content of irradiation sterilization group

组别 Groups		VE (mg/kg)	VB ₂ (mg/kg)	VA (KIU/kg)	VD ₃ (KIU/kg)
对照组(液体) Control group (liquid)		41.46 ± 0.40	16.20 ± 0.11	/	/
辐照灭菌液体组 Irradiation sterilization liquid group	25 kGy	48.17 ± 0.36 ***	11.63 ± 0.14 ***	/	/
	30 kGy	44.75 ± 0.41 *	8.68 ± 0.12 ***	/	/
	35 kGy	40.70 ± 1.83	8.80 ± 0.08 ***	/	/
	50 kGy	46.65 ± 0.88 **	10.27 ± 0.05 ***	/	/
对照组(粉末) Control group (powder)		130.55 ± 3.61	19.75 ± 0.32	10.29 ± 0.58	1.94 ± 0.14
辐照灭菌粉末组 Irradiation sterilization powder group	25 kGy	48.61 ± 0.96 ***	18.98 ± 0.28	2.34 ± 0.07 ***	1.41 ± 0.08 **
	30 kGy	21.34 ± 0.34 ***	18.79 ± 0.46	1.40 ± 0.01 ***	1.09 ± 0.05 ***
	35 kGy	47.87 ± 2.31 ***	18.49 ± 0.12 *	1.59 ± 0.00 ***	1.17 ± 0.04 ***
	50 kGy	51.72 ± 0.95 ***	18.69 ± 0.12 *	1.15 ± 0.04 ***	1.13 ± 0.07 ***

表 9 高压灭菌组微量元素含量

Table 9 Micronutrient content of high pressure sterilization group

组别 Groups		锌(g/kg) Zinc (g/kg)	铁(mg/kg) Iron (mg/kg)	镁(mg/kg) Magnesium (mg/kg)	钾(g/kg) Potassium (g/kg)	钠(g/kg) Sodium (g/kg)
对照组(液体) Control group (liquid)		1.86 ± 0.05	34.75 ± 0.07	486.00 ± 1.41	6.72 ± 0.17	/
	121℃ 30 min	1.84 ± 0.06	43.15 ± 1.48 ***	508.00 ± 12.73	6.44 ± 0.17	/
高压灭菌组 High pressure sterilization group	121℃ 40 min	1.65 ± 0.04 **	29.62 ± 0.34 **	468.00 ± 9.90	5.72 ± 0.05 **	/
	121℃ 50 min	1.46 ± 0.04 ***	26.74 ± 0.03 ***	523.50 ± 7.78 *	6.05 ± 0.19 *	/
	126℃ 20 min	1.56 ± 0.04 ***	24.35 ± 1.88 ***	476.50 ± 16.26	6.61 ± 0.18	/
	134℃ 4 min	1.72 ± 0.04 *	39.90 ± 1.41 **	460.00 ± 4.24	6.20 ± 0.21	/

2.5.1 高压灭菌组

与对照组相比,高压灭菌组 121℃ 30 min 组铁含量增加有极其显著性差异($P < 0.001$),121℃ 40 min 组锌、铁和钾含量降低具有极显著性差异($P < 0.01$)。121℃ 50 min 组镁含量增加具有显著性差异($P < 0.05$)、钾含量降低($P < 0.05$)。121℃ 50

min、126℃ 20 min 组锌和铁含量降低($P < 0.001$),134℃ 4 min 组锌含量降低($P < 0.05$)、铁含量增加($P < 0.01$)。钠含量均未检出。高压灭菌组 121℃ 30 min 组有 3 种微量元素含量变化无显著性差异,1 种微量元素含量增加,对微量元素含量影响最小(见表 9)。

表 10 辐照灭菌组微量元素含量

Table 10 Contents of trace elements in irradiation sterilization group

组别 Groups	锌 (g/kg) Zinc (g/kg)	铁 (mg/kg) Iron (mg/kg)	镁 (mg/kg) Magnesium (mg/kg)	钾 (g/kg) Potassium (g/kg)	钠 (g/kg) Sodium (g/kg)	
对照组 (液体) Control group (liquid)	1. 86 ± 0. 05	34. 75 ± 0. 07	486. 00 ± 1. 41	6. 72 ± 0. 17	/	
辐照灭菌液体组 Irradiation sterilization liquid group	25 kGy	1. 81 ± 0. 01	48. 35 ± 1. 63 ***	542. 00 ± 16. 97 **	8. 59 ± 0. 29 ***	/
	30 kGy	1. 53 ± 0. 01 ***	39. 75 ± 0. 92 **	488. 50 ± 6. 36	7. 46 ± 0. 19 *	/
	35 kGy	1. 43 ± 0. 04 ***	36. 90 ± 0. 14	489. 00 ± 2. 83	6. 16 ± 0. 08	/
	50 kGy	1. 68 ± 0. 01 **	34. 43 ± 0. 60	553. 50 ± 10. 61 ***	7. 84 ± 0. 24 ***	/
对照组 (粉末) Control group (powder)	1. 56 ± 0. 01	29. 15 ± 0. 49	513. 00 ± 18. 38	7. 55 ± 0. 26	2. 80 ± 0. 05	
辐照灭菌粉末组 Irradiation sterilization powder group	25 kGy	1. 39 ± 0. 02 **	32. 55 ± 0. 21 **	540. 00 ± 7. 07	6. 45 ± 0. 16 **	3. 23 ± 0. 06 **
	30 kGy	1. 48 ± 0. 03	32. 75 ± 1. 06 **	486. 50 ± 6. 36	6. 84 ± 0. 05 *	3. 36 ± 0. 10 **
	35 kGy	1. 23 ± 0. 04 ***	24. 90 ± 0. 00 **	384. 50 ± 9. 19 ***	7. 07 ± 0. 02	2. 56 ± 0. 06
	50 kGy	1. 49 ± 0. 03	30. 60 ± 0. 28	564. 00 ± 8. 49 *	7. 18 ± 0. 25	3. 26 ± 0. 11 **

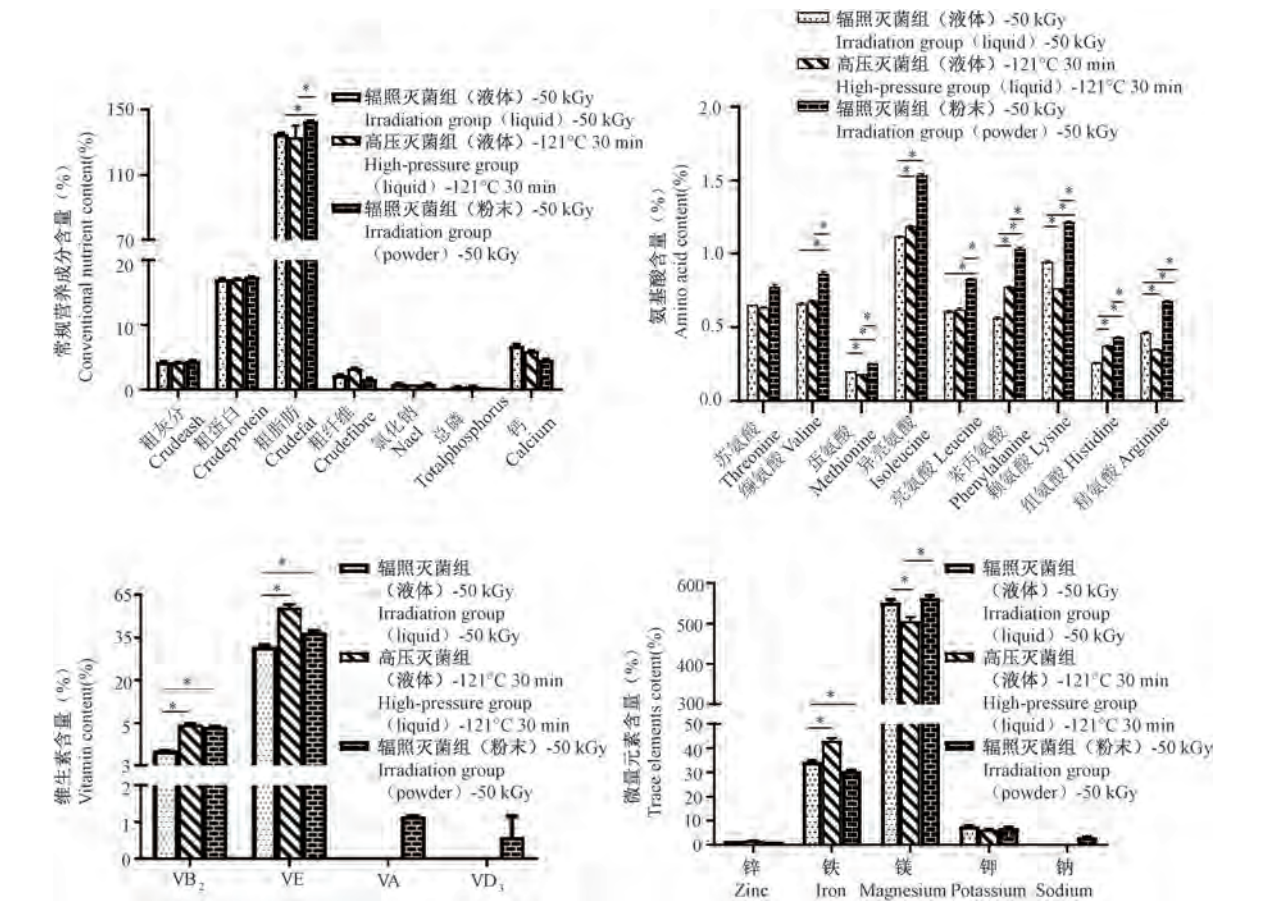


图 1 不同灭菌方式对营养成分含量影响的比较

Figure 1 Comparison of the effects of different sterilization methods on nutrient content

2.5.2 辐照灭菌组

与对照组相比,辐照灭菌液体组 25 kGy 组铁和钾含量增加具有极其显著性差异($P < 0.001$),镁含量增加具有极显著性差异($P < 0.01$)。30 kGy 组锌含量降低($P < 0.001$)、铁含量增加($P < 0.01$)、钾含量增加具有显著性差异($P < 0.05$)。35 kGy 组锌含量降低($P < 0.001$)。50 kGy 组锌含量降低($P < 0.01$)、镁和钾含量增加($P < 0.001$)。辐照灭菌粉末组 25 kGy 组锌和钾含量降低($P < 0.01$),25 kGy 和 30 kGy 组铁和钠含量增加($P < 0.01$),30 kGy 组钾含量降低($P < 0.05$)。35 kGy 组锌含量降低、镁含量增加($P < 0.001$),铁含量降低($P < 0.01$)。50 kGy 组镁含量增加($P < 0.05$),钠含量增加($P < 0.01$)。钠含量均未检出。辐照灭菌液体组 25 kGy 组有 1 种微量元素含量变化无显著性差异,3 种微量元素含量增加,对微量元素含量影响最小,其次是 50 kGy 组。辐照灭菌粉末组 50 kGy 组有 3 种微量元素含量变化无显著性差异,2 种微量元素含量增加,对微量元素含量影响最小(见表 10)。

2.6 不同灭菌方式对营养成分的影响比较

将 3 种灭菌方式中对营养成分影响最小的三组进行组间比较,如图 1A,1B 所示,辐照灭菌粉末组常规营养成分和氨基酸含量明显高于高压灭菌组和辐照灭菌液体组。如图 1C,1D 所示,高压灭菌组和辐照灭菌液体组维生素、微量元素含量小于辐照灭菌粉末组。

3 讨论

实验动物——配合饲料卫生标准(GB 14924.2—2001)中规定:清洁级实验动物配合饲料应进行高压灭菌或辐照灭菌,SPF 级和无菌动物更应如此。常用的灭菌方法为高压蒸汽灭菌和 ^{60}Co 辐照灭菌。高压蒸汽灭菌是目前最成熟、应用最广泛的灭菌方法。其灭菌原理是通过热作用破坏微生物蛋白、核酸和细胞膜,杀灭微生物。 ^{60}Co 辐照灭菌属于冷灭菌方法, ^{60}Co 能释放出一种波长短、能量高、穿透力极强的 γ 射线,直接作用于水,该过程产生的氢氧自由基($\text{OH}\cdot$)引起 DNA 损伤,破坏其结构与代谢,从而杀灭微生物。 ^{60}Co 辐照灭菌过程很少产热,同时具穿透力强、操作简单、可连续作业的特点,因此能较好地保存配方奶粉中营养成分^[7]。但因其设备的特殊性,需送至特定地点进行灭菌,配制好的人工乳需要经过运输、贮藏后才能进行灭

菌,操作时间不可控,在此期间人工乳可能发生腐败、变质等导致营养成分损失。与之相反,高压蒸汽灭菌法因其设备普及率高、操作简单,配制后可立即进行灭菌,避免了因运输、贮藏而可能造成的影响。但其最大的缺点是,由于蒸汽比热大,穿透力强,对人工乳的物理性质、营养成分影响极大。

很多报道显示,辐照灭菌对固体饲料的营养成分影响小^[8],高压蒸汽灭菌对固体饲料的营养成分损失大^[9-10],未见有其对配方奶粉或者液体人工乳灭菌后营养成分对比的相关报道。本文主要对比了不同灭菌方法对猪专用配方奶粉营养成分的影响。实验结果显示,辐照灭菌粉末组常规营养、氨基酸和微量元素的变化明显小于两个液体灭菌组。VA、VD₃ 和钠含量在液态配方奶中均未检出,固态配方奶粉有检出值,其原因可能与配方奶粉的形态有关,水分的存在可增加辐照时营养成分的损失,原因是辐照时水产生自由基,能引起强烈的氧化作用^[11]。高压灭菌组和辐照灭菌液体组维生素的损失明显大于辐照灭菌粉末组,原因可能是与配方奶粉不同形态含水量及维生素存在状态有关,含水量高的辐照后损失大,游离态维生素辐照后损失较多,结合态则反之^[12]。

研究结果显示,高压灭菌和辐照灭菌均对配方奶粉营养成分产生不同程度破坏。辐照灭菌液体组氨基酸、维生素和辐照灭菌粉末组常规营养、维生素 25 kGy 辐照灭菌效果比 50 kGy 影响小。但根据国外经验表明,用 25 kGy 剂量辐照灭菌可获得无病原的动物饲料,而用 30 ~ 50 kGy 剂量辐照灭菌可获得无菌的饲料^[11]。所以在培育 SPF 级动物时可选择使用 25 kGy^[13],培育无菌动物时推荐使用 50 kGy 辐照剂量^[14]。综上所述,高压灭菌组 121℃ 30 min 营养成分损失最小,辐照灭菌组 50 kGy 灭菌条件下营养成分损失最小。辐照灭菌粉末组 50 kGy 灭菌条件下营养成分含量影响小于高压灭菌组和辐照灭菌液体组。

结合以上不同灭菌方式的优点和缺点以及本次实验结果,可以选择配方奶粉使用 ^{60}Co 辐照灭菌,纯净水使用高压蒸汽灭菌的搭配方式。这样可以在保证达到无菌化标准同时,营养成分损失最小。还可因为辐照物品体积的减少,大大降低运输、辐照的经济成本。因 ^{60}Co 辐照灭菌设备特殊性,如果没有辐照灭菌条件可以选择使用 121℃ 30 min 进行高压蒸汽灭菌。

参 考 文 献(References)

[1] Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, et al. The pig: a model for human infectious diseases [J]. Trends Microbiol, 2012, 20(1): 50-57.

[2] Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, et al. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? [J]. Nutr Res Rev, 2010, 23(1): 4-22.

[3] Wang M, Donovan SM. Human microbiota-associated swine; current progress and future opportunities [J]. Ilar J, 2015, 56(1): 63-73.

[4] Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, et al. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas *in vivo* in apancreatic cloned pigs [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(12): 4557-4562.

[5] Tanihara F, Hirata M, Otoi T. Current status of the application of gene editing in pigs [J]. J Reprod Dev, 2021, 67(3): 177-187.

[6] Rashid T, Takebe T, Nakauchi H. Novel strategies for liver therapy using stem cells [J]. Gut, 2015, 64(1): 1-4.

[7] 韦瑀龙, 蓝晓庆. 中药钴 60 辐照灭菌的应用研究进展 [J]. 海峡药学, 2019, 31(8): 4-7.
Wei YL, Lan XQ. Progress in application research of ⁶⁰Co irradiation sterilization on traditional Chinese medicine [J]. Strait Pharm J, 2019, 31(8): 4-7.

[8] 任春磊, 杨国山, 闫傲霜. ⁶⁰Co-γ 射线辐照技术在实验动物饲料灭菌中的应用 [J]. 实验动物科学, 2008, 25(4): 51-54.
Ren CL, Yang GS, Yan AS. The application of ⁶⁰Co-γ ray irradiation technology in the sterilization of experimental animal feed [J]. Lab Anim Sci, 2008, 25(4): 51-54.

[9] 张大维, 邴国强, 甘振威, 等. 不同灭菌方法对实验动物配合颗粒饲料营养成分的影响 [J]. 饲料工业, 2012, 33(2): 40-43.

[10] Zhang DW, Bing GQ, Gan ZW, et al. Effects of different sterilization methods on the nutrients of granular experimental animal feedstuff [J]. Feed Ind, 2012, 33(2): 40-43.

[10] 丁力, 刘建高, 刘建琪, 等. 辐照和高压蒸汽灭菌方法对兔繁殖饲料营养成分的影响 [J]. 实用预防医学, 2019, 26(7): 795-800.

[11] Ding L, Liu JG, Liu JQ, et al. Effects of irradiation and high-pressure steam sterilization on nutrients of rabbit breeding feeds [J]. Pract Prev Med, 2019, 26(7): 795-800.

[11] Coates ME. 生物医学研究中动物日粮的选择与配合指南 [M]. 北京: 原子能出版社; 1995.
Coates ME. Guidelines for the selection and coordination of animal diets in biomedical research [M]. Beijing: Atomic Energy Press; 1995.

[12] 张采, 周正宇, 王禹斌, 等. ⁶⁰Co 辐照饲料的试验研究 [J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(4): 236-239.

[12] Zhang C, Zhou ZY, Wang YB, et al. Experimental study on ⁶⁰Co irradiated feed [J]. Lab Anim Comp Med, 2004, 24(4): 236-239.

[13] 周正宇, 薛智谋. 实验动物饲料⁶⁰Co 辐照灭菌剂量的研究 [J]. 上海实验动物科学, 2001, 21(2): 100-102.

[13] Zhou ZY, Xue ZM. Study on radiation sterilization dose of ⁶⁰Co for experimental animal feed [J]. Lab Anim Comp Med, 2001, 21(2): 100-102.

[14] Qv L, Yang Z, Yao M, et al. Methods for establishment and maintenance of germ-free rat models [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1148.

[收稿日期] 2023-05-22

陈函沐,李惠,赵菊梅,等. 单胺氧化酶 A(MAOA)在前列腺癌进展中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1598-1604.
Chen HM, Li H, Zhao JM, et al. Role of monoamine oxidase A in prostate cancer progression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1598-1604.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.010

单胺氧化酶 A(MAOA)在前列腺癌进展中的作用

陈函沐^{1,2},李惠²,赵菊梅^{1*},师长宏^{2*}

(1. 延安大学基础医学院,陕西 延安 716000;2. 空军军医大学实验动物中心,西安 710032)

【摘要】 单胺氧化酶 A(monoamine oxidase A,MAOA)是一种催化单胺类神经递质和膳食胺氧化脱氨反应的线粒体酶,在神经精神疾病的发病、进展和治疗中发挥着重要作用。最近有研究发现前列腺癌(prostate cancer,PCa)中的 MAOA 表达升高与肿瘤的进展密切相关,是驱动 PCa 异质性转化的重要因素。本文主要综述了 MAOA 在前列腺癌不同病程发展中的作用,包括前列腺癌的发生、发展、侵袭、转移以及耐药。讨论了 MAOA 在肿瘤微环境中的作用及其抑制剂的潜在用途,进一步提出了在临床前模型中开展基于靶向 MAOA 的治疗研究,推动相关临床试验,以期 PCa 的治疗提供新的潜在治疗靶点。

【关键词】 单胺氧化酶 A;前列腺癌;异质性;进展;抑制剂

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1598-07

Role of monoamine oxidase A in prostate cancer progression

CHEN Hanmu^{1,2}, LI Hui², ZHAO Jumei^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China. 2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn; ZHAO Jumei. E-mail: jmj2003.stu@163.com

【Abstract】 Monoamine oxidase A (MAOA) is a mitochondrial enzyme that catalyzes the oxidative deamination of monoamine neurotransmitters and dietary amines. It plays a crucial role in the pathogenesis, progress, and treatment of neuropsychiatric disorders. Recent studies have revealed that elevated expression of MAOA in prostate cancer (PCa) is closely associated with tumor progression and drives the heterogeneity of PCa. In this review, we summarize the role of MAOA in the development of PCa in different disease stages, including oncogenesis, development, invasion, metastasis, and drug resistance. We also discuss the involvement of MAOA in the tumor microenvironment and explore the potential utility of MAOA inhibitors. We further propose therapeutic strategies based on targeting MAOA in preclinical models to promote relevant clinical trials. This review aims to provide new potential therapeutic targets for the treatment of PCa.

【Keywords】 monoamine oxidase A; prostate cancer; heterogeneous; progression; inhibitor

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

前列腺癌(prostate cancer,PCa)是西方国家男性癌症第二大死亡原因^[1-2]。由于其发生发展中存在潜在的基因组异常以及其他分子变化从而表现出显著的异质性^[3]。已证实 PCa 源于高级别前列腺上皮内瘤变(high grade prostatic intraepithelial neoplasia,HGPIN)的癌前病变,其前列腺腺体或导

【基金项目】 国家自然科学基金(32270566,32070532)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(32270566, 32070532).

【作者简介】陈函沐(2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。Email:chm20001111@163.com

【通信作者】师长宏(1973—),男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。Email:changhong@fmmu.edu.cn;

赵菊梅(1970—),女,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。Email:jmj2003.stu@163.com。

* 共同通信作者

管内存在异常的细胞学特征^[4],这被认为是良性前列腺上皮和浸润性癌之间的过渡期。尽管目前针对 HGPIN 的治疗有手术、放射治疗,以及较少使用的雄激素剥夺疗法 (androgen deprivation therapy, ADT)。但高达 35% HGPIN 仍会进展为 PCa,并发生转移,扩散到骨骼、淋巴结和膀胱。这一阶段的 PCa 对 ADT 治疗仍然敏感,因此被称为转移性激素敏感性前列腺癌 (metastatic hormone-sensitive prostate cancer, mHSPC)^[5]。此外,雄激素受体 (androgen receptor, AR) 在驱动 PCa 进展中发挥重要作用,因此靶向 AR 的 ADT 治疗是该阶段的主要治疗方案。但大多数患者在 ADT 治疗后 2 ~ 3 年形成复发性肿瘤,AR 被重新激活,随后出现致命的去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC)^[6]。由于 CRPC 的发展仍依赖于 AR 信号,进一步使用新型 AR 通路抑制剂如恩杂鲁胺 (enzalutamide, Enz) 可阻止 AR 激活,并降低 AR 靶基因前列腺特异抗原 (prostate specific antigen, PSA) 的表达,有效延长患者生存期。但在 Enz 的强大选择性压力下,可迅速产生耐药 (EnzR),进而诱导这些“非 AR 驱动”的 PCa 进展转化为神经内分泌性前列腺癌 (neuroendocrine prostate cancer, NEPC) 表型,其恶性程度更高,临床很难治愈^[7]。因此,迫切需要一个特异性的靶点来指征 PCa 的进展,抑制其异质性转化^[8]。

单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 是一种线粒体膜结合酶,具有 MAOA 和 MAOB 两个亚型,可催化膳食胺、单胺神经递质和激素的氧化脱氨反应^[9]。MAOA 在神经精神疾病中有着广泛的研究,其代谢血清素、多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素等神经递质。这些神经递质在哺乳动物数百万年的进化压力和进程中协同免疫共同进化,以在人体内外 (血压、pH 或温度) 环境发生变化的背景下共同维持细胞和生理的动态平衡。神经系统和免疫系统通过进化适应了不断变化的外界条件,以其各自不同的接口 (端口) 感知、整合和回应来自环境外部或躯体内部的伤害,这其中包括组织创伤、感染和恶性肿瘤等^[10]。越来越多的证据表明,MAOA 在 PCa 的发生发展中起着重要作用,其表达水平与 PCa 细胞分化状态密切相关,较高的 MAOA 水平与较高的 Gleason 分级相关^[11]。已有研究证实 MAOA 促进 PCa 的生长、转移、干性和治疗抵抗,主要通过促进氧化应激、增加缺氧、诱导上皮-间质转化

(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和激活下游转录因子 Twist1 等多种相关信号级联来实现^[12]。靶向 MAOA 可能是治疗 PCa 的一个目标。因此,本文综述了 MAOA 在 PCa 进展中作用,并分析了相关机制,基于动物模型实验结果进一步提出了针对 MAOA 靶点的治疗策略,以期为 PCa 的治疗提供新的思路^[13]。

1 MAOA 的表达与 PCa 的发生密切相关

1.1 影响多种肿瘤相关基因的功能

PCa 是由多种基因改变引起的恶性肿瘤,例如 FOXO1 和 PTEN 基因是诱导 PCa 发生的重要基因,上述两基因的变化均与 MAOA 表达密切相关,从而驱动 PCa 的发生^[14]。FOXO1 是转录因子叉头家族 O 亚类的成员,在 PCa 中直接或间接地抑制全长 AR 或 AR 的活性剪接变体的转录活性,可以通过 AKT 的磷酸化来调节 PI3K/AKT 信号的激活,从而促进 PCa 的发生。Kim 等^[15]建立了 PCa 异种移植小鼠模型,发现 MAOA 调节 AKT/FOXO1 信号通路激活 Twist1 的转录,从而抑制 E-钙粘蛋白的转录,促进 PCa 细胞的 EMT。研究表明在高达 70% PCa 患者中观察到 PTEN 缺失,并与总体预后不良相关,甚至 PTEN 的细微变化也被证明与癌症易感性呈正相关。机制研究发现 PTEN 主要通过 PI3K-AKT-p27 途径调节肿瘤细胞增殖^[16]。还有研究发现在 PTEN^{-/-} 的小鼠模型和人 PCa 细胞系中,MAOA 的表达受 PTEN/AKT 通路调节并受生存素的影响,而沉默 MAOA 则降低生存素的表达。因此,MAOA 通过影响多种肿瘤相关基因的功能调控 PCa 的发生。

1.2 调节干细胞特性

癌细胞可分为终末分化 (terminal-differentiated, TD) 细胞、瞬时放大 (transient-amplifying, TA) 细胞和肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs)^[17]。在这些类型中,来自基底细胞区或管腔细胞区的 CSCs 是唯一具有无限增殖潜力和可塑性的细胞。肿瘤细胞的成球实验 (成球大小及数目) 是衡量肿瘤细胞干性的金标准, Liao 等^[18]研究发现在前列腺癌 LNCaP 细胞中,沉默 MAOA 或用 MAOA 抑制剂氯吉灵 (clorgyline, CLG) 处理,可显著减少肿瘤细胞成球的大小和数量,这提示 MAOA 在 CSCs 调控中发挥一定的作用。进一步体内实验数据显示与对照组 PTEN KO 小鼠相比,在 PTEN/MAOA KO 小鼠中,前

列腺管腔细胞区干细胞标志物 OCT4 和 NANOG 明显减少,同时 AKT 磷酸化水平和 Ki67 表达显著下降,上皮细胞的增殖也明显降低,说明 MAOA 可以与 PTEN 相互作用,调节 PCa 的干性,影响 AKT 的磷酸化,进而促进 PCa 细胞的增殖与迁移^[19]。因此,MAOA 可以通过影响干细胞特性来调控前列腺癌的发生。

2 靶向 MAOA 调节 PCa 细胞的异质性进展

通过已有的临床数据发现 MAOA 与 PCa 的进展相关,且其表达程度随着 PCa 恶性进展而变化,包括前列腺癌的增殖、侵袭、转移与耐药的发生均与 MAOA 的表达密切相关。

2.1 MAOA 通过与 AR 相互作用促进 PCa 的增殖

已有研究证实,MAOA 的表达升高与 PCa 的恶性发展程度相关,如在高的 Gleason 分级肿瘤标本中观察到 E-钙粘蛋白(上皮标记物)表达降低、波形蛋白(间充质标记物)和 MAOA 表达增加^[12]。在前列腺癌细胞 PC-3 中过表达 MAOA 可加速癌细胞的增殖;而在高表达 MAOA 的前列腺癌细胞系 LNCaP、C4-2 中沉默 MAOA 可导致癌细胞增殖速度减慢,其主要机制是前列腺癌中 MAOA 与 AR 相互作用,AR 通过直接结合 MAOA 中内含子的 ARE 来促进 MAOA 的表达,而反过来 MAOA 是通过 Twist1 依赖的 Shh/Gli 信号,激活 YAP1 的表达,进而增强 YAP1-AR 与核的相互作用,从而上调 AR 在前列腺癌细胞中的转录活性,最终调控 AR 依赖性前列腺癌的生长。敲除 MAOA 则抑制了小鼠前列腺癌的发展和生长^[20]。此外,对前列腺癌细胞的研究表明,MAOA 底物 5-羟色胺、5-羟色胺受体的活性均与促进前列腺癌细胞增殖有关。

2.2 MAOA 通过 EMT 和 cMET 依赖方式促进 PCa 的侵袭

肿瘤侵袭是一个复杂的多阶段、多步骤的过程。在这个过程中,癌细胞从原发位置扩散,侵袭周围正常组织和器官。EMT 是癌细胞扩散中最重要的步骤之一,上皮细胞通过表观遗传转录程序获得间充质特征,导致细胞间接触减少和运动性增加,从而发生侵袭^[21]。而缺氧是多种实体肿瘤中的常见情况,常与预后不良和 EMT 促进的侵袭性表型的表达有关。HIF1 α 是缺氧的主要介质,通过激活与肿瘤进展有关的下游靶基因来调节缺氧效应。

研究表明,MAOA 通过产生 ROS 和破坏 PHD3 来稳定 HIF1 α 的转录活性,其转录活性的增加反过来激活 VEGF-A/NRP1 信号通路,上调 AKT/FOXO1,进而导致转录抑制因子 FOXO1 向核转移,最终导致 EMT 的发生^[22]。这些由 MAOA 诱导的氧化应激、缺氧、EMT 之间的相互作用协同促进前列腺癌的侵袭性^[23-24]。

除上述方式之外,PCa 还可通过神经周围侵袭(perineural invasion, PNI)促进肿瘤生长与进展,PNI 是指肿瘤细胞侵犯神经内部、周围和穿过神经的一种病理过程,也是 PCa 预后和生存率较差的指标之一^[25]。PNI 涉及多种分子、细胞因子和代谢机制,其特点是肿瘤细胞和神经细胞之间存在密切的相互作用。神经细胞分泌的物质可以诱导肿瘤细胞的侵袭,肿瘤细胞可以促进神经细胞的轴突生长。Yin 等^[26]探讨了 MAOA 在 PCa 中调节 PNI 的作用。在 PCa 细胞和原位异种移植模型中发现 MAOA 能促进 PCa 细胞的增殖和神经生长因子等细胞因子的表达,进而增强神经与癌细胞的相互作用,导致 PNI 的发生。其机制是 MAOA 通过激活 SEMA3C,以自分泌或旁分泌的方式刺激 cMET 与神经生长因子 PlexinA2、NRP1 之间的相互作用,最终促进 PNI 的形成。以上研究说明,MAOA 在介导 PCa 的侵袭中发挥了重要作用。

2.3 MAOA 通过旁分泌方式驱动 PCa 发生骨转移

临床超过四分之三的晚期 PCa 患者会出现骨转移,约有 50% 患者在初诊时发现骨转移,从而影响患者生存率,缩短患者生存周期^[27]。主要原因是肿瘤细胞分泌的细胞因子破坏骨代谢的动态平衡,产生溶骨或成骨表型。Wu 等^[28]发现在前列腺癌细胞高转移亚系 C4-2B、ARCaPM 和 PC-3M 中 MAOA mRNA 的水平均高于其相对应的亲本细胞系。随后将标记荧光的肿瘤细胞注射到小鼠左心室内,构建前列腺癌骨转移模型,结果发现与对照组相比,过表达 MAOA 的 PC-3 细胞注射后迅速在小鼠体内发生广泛的骨转移。机制研究表明 MAOA 通过作用于成骨细胞中 Twist1 依赖的旁分泌 shh 信号通路,促进转录因子 Gli1 和 Gli2 的表达从而激活 IL-6 和 RANKL 的产生和释放,进一步诱导破骨细胞生成来打破骨代谢平衡,最终使得肿瘤细胞在骨组织中播散和定植。不仅如此,这种骨代谢失衡可导致破骨细胞释放有助于肿瘤细胞生存的生长因子,如

TGF β s 和 BMPs, 继而增强肿瘤细胞与破骨细胞结合, 加速播散和定植, 以此形成恶性循环。综上, 在肿瘤细胞中高表达的 MAOA 可以促进 PCa 发生骨转移。

2.4 MAOA 通过改变 HIF-1 α 信号的传导增加 PCa 的耐药性

耐药是 PCa 患者晚期治疗的主要挑战之一。二代抗雄药阿比特龙和恩杂鲁胺的耐药机制主要是由于 AR 基因发生了变异, 包括 AR 扩增、AR 突变、AR 剪切变异体 (AR variants, AR-Vs) 等。AR-Vs 是 AR 截短的变异体, 目前已报道的 20 余种 AR-Vs 中 AR-V7 在 CRPC 中检出频率最高, 是被广泛研究的剪切变异体之一^[29-30]。在恩杂鲁胺耐药发展过程中, ARv7 的增加可促进 MAOA 的表达, 从而改变下游 HIF-1 α 信号的传导来增加恩杂鲁胺抗性, 靶向 PCa 中的 MAOA 可以恢复耐药细胞对恩杂鲁胺的敏感性。与单独使用恩杂鲁胺相比, MAOA 抑制剂 CLG 联合恩杂鲁胺可显著抑制耐药 PCa 细胞的生长^[31]。除此之外, 多个临床实验表明, 在使用化疗药物发生复发的 PCa 患者的肿瘤细胞上可检测到高水平的 MAOA, 这可能是 PCa 患者对化疗药物不敏感的重要原因之一。相应的体外实验发现, 与正常的 PC-3 细胞相比, 过表达 MAOA 的 PC-3 细胞在多西他赛处理下, 其细胞存活率显著升高, 预示着 MAOA 的过表达影响着 PCa 患者对化疗药物的敏感性。

3 MAOA 抑制剂用于前列腺癌的治疗

目前有关 MAOA 的研究主要集中在神经精神疾病, 其相应的抑制剂 (monoamine oxidase inhibitors, MAOIs) 应用于临床治疗抑郁症已有几十年的历史。鉴于 MAOA 促进 PCa 的进展, 可以基于临床上应用的 MAOA 抑制剂, 探讨“老药新用”的策略, 并研究联合 MAOIs 用于 PCa 治疗的可能性^[32-33]。

3.1 单药治疗策略

单胺氧化酶抑制剂可分为非选择性单胺氧化酶抑制药物 (MAO inhibitor drugs, MAOID)、MAOA 抑制药物和 MAOB 抑制药物。目前, 临床上使用最广泛的 MAOA 抑制剂是苯乙肼, 属于非选择性药物, 主要用于治疗非典型或难治性重度抑郁症^[34]。一项研究苯乙肼在激素敏感性前列腺癌患者中治

疗效果的 II 期临床试验 (Clinical Trials.gov Identifier: NCT02217709) 结果显示, 苯乙肼可显著降低该类患者血清 PSA 水平, 体现出良好的治疗效果^[35]。Wu 等^[28]使用临床前小鼠模型发现 MAOA 可以促进肿瘤细胞、成骨细胞和破骨细胞之间复杂的旁分泌相互作用进而促进骨转移, 使用选择性的 MAOA 抑制剂 CLG 后可有效阻断 PCa 细胞造成的骨溶解和骨转移。除此之外, MAOA 已被证实神经内分泌 (neuroendocrine, NE) 分化的 PCa 细胞中表达上调, 其产生的活性氧类在抑制凋亡和激活 NE 分化 PCa 细胞的吞噬中起重要作用, 而 MAOA 抑制剂 CLG 和苯乙肼均可显著减少 PCa 细胞的神经内分泌分化和自我吞噬, 从而成为神经内分泌肿瘤的潜在治疗策略。鉴于 MAOA 促进 PCa 进展, 且其抑制剂已在临床使用, MAOA 可能成为 PCa 治疗的潜在靶点。

3.2 联合治疗策略

与单一使用 MAOA 抑制剂相比, 联合用药具有规避肿瘤耐药性和产生协同作用的潜能。已有的动物实验研究证实, 与目前临床使用的治疗策略相结合的联合疗法可以有效地抑制 PCa 生长并延长荷瘤鼠的生存期。目前对于转移性前列腺癌和 CRPC 尚无有效的治疗药物, 而联合疗法可能是一种有效策略, 特别是基于 ADT 的联合治疗可能产生更好的效果^[36]。

22Rv1 和 C4-2B 均为雄激素非依赖型 PCa 细胞, 对 AR 抑制剂具有一定的抗性。Wang 等^[32]研究发现, 恩杂鲁胺对上述两种 PCa 细胞的抑制效果不明显, 但当联合 MAOA 抑制剂 CLG 可显著抑制上述细胞的生长, 且 CLG 体现出增强恩杂鲁胺治疗效果的能力。提示 MAOA 抑制剂与抗雄药的联合使用可能是治疗耐药性前列腺癌的有效手段。除此以外, MAOA 抑制剂与其他药物联合也体现出较好的治疗效果。Khatri 等^[37]研究发现在 PCa 中 Survivin 与 MAOA 表达之间存在相关性, 当 Survivin 抑制剂 (YM155 和 SC144) 与 MAOA 抑制剂联合使用时表现出显著的协同效果。考虑到上述两种抑制剂均已进入临床试验, 上述研究结果支持将这种联合治疗策略迅速转化为临床治疗 PCa。在另外的实验中发现, 使用化疗药物产生的细胞毒性可诱导 MAOA 的表达, 进而增强了多西紫杉醇的耐药性^[38]。针对上述问题, MAOA 抑制剂 CLG 与多西紫杉醇或卡巴紫杉醇联合使用可显著抑制 PCa 细胞 LNCaP 和耐药细胞 VCaP 的生长。由于部分

MAOA 抑制剂已被批准用于临床,上述结果提示,可以将 MAOA 抑制剂与多西紫杉醇相结合的方案尽快推进临床转化^[39]。

3.3 诊疗一体化策略

近年来个性化肿瘤学在很大程度上依赖于多功能药物的开发,从而整合肿瘤靶向、成像和细胞毒性活性来实现肿瘤诊断和治疗一体化。除了重新利用以往临床上可用的 MAOA 抑制剂外,还出现了一种新型的肿瘤靶向 MAOA 抑制剂-NMI。NMI 是一种将用于肿瘤靶向的近红外染料与 MAOA 抑制剂 CLG 衍生物结合在一起的偶联化合物^[40]。该偶联物靶向于 PCa 细胞,定位于线粒体,并在低微摩尔 IC₅₀ 范围内抑制 MAOA 活性。在 3 种 MAOA 高表达的 PCa 细胞系中 (LNCaP、C4-2B 和过表达 MAOA 的 PC-3 细胞),NMI 的治疗效果超过了 CLG^[41]。其肿瘤靶向性作用在高表达 MAOA 的 PCa 中随肿瘤缺氧的增加而增强,其机制可能是由于肿瘤缺氧激活了 HIF1 α /OATPs 信号轴^[42]。此外,这种结合物还具有诊断潜力,可以区分前列腺癌的 MAOA 活性、缺氧程度以及恶性潜能。因此,NMI 可能成为治疗和诊断 PCa 的一种新型药物,通过适当的临床前开发,可能成为下一代抗癌治疗的重要方案^[43]。

总之,目前对于 CRPC 患者缺乏有效的治疗策略。现有大量研究支持 MAOIs 联合其他现有疗法作为 PCa 潜在的治疗策略,特别是针对 CRPC 患者,需要进一步开发、验证和优化,以期推进临床应用。

4 展望

MAOA 促进 PCa 的增殖、转移和治疗耐药的发生,其高表达与 PCa 预后相关,这为靶向 MAOA 治疗 PCa 提供了相关理论基础。未来基于 MAOA 靶点应用于 PCa 的研究,还应注意以下两个方面。

4.1 调控肿瘤微环境中 MAOA 的表达可能是治疗 PCa 的新策略

最新研究发现肿瘤基质中的 MAOA 也在 PCa 进展中发挥重要作用^[44]。实验证实靶向抑制基质成纤维细胞上的 MAOA 后,PCa 增殖、迁移能力明显减慢。机制研究发现 MAOA 可通过 Twist1 转录因子调节 IL-6 的表达,进而激活下游的 STAT3 通路促进 PCa 细胞的生长、迁移。此外,Du 等^[25]还发现癌症相关的成纤维细胞还可以通过激活肿瘤细胞

MAOA-mTOR-HIF-1 α 信号通路诱导 PCa 细胞发生 EMT,从而促进转移。正是因为 MAOA 在肿瘤和间质中双靶点的潜力,使其作为治疗的 PCa 靶点更具有独特的优势。

4.2 靶向 MAOA 的联合用药可能是治疗 PCa 的有效策略

目前临床推荐 mCRPC 患者一线使用恩杂鲁胺、阿比特龙等新型内分泌药物进行治疗,当疾病进展后可换用另一种药物序贯治疗。而中国临床肿瘤学会 (Chinese Society of Clinical Oncology, CSCO) 发布的第三版前列腺癌诊疗指南强调联合治疗增效,组合治疗优于序贯。基于 MAOA 靶点用于 PCa 治疗表现的良好潜力,未来可以将 MAOA 抑制剂与抗雄药或化疗药联合治疗策略进行深入探索,以期发挥更好的抑癌作用,提高 PCa 的临床治疗效果。

综上所述,虽然 MAOA 最初被确定为一个神经递质调节器,但近年来的研究发现其在 PCa 的发生、发展的每个阶段都发挥重要作用,同时,肿瘤微环境中 MAOA 的表达也影响 PCa 的进展。因此,靶向 MAOA 和应用 MAOA 抑制剂进行 PCa 的治疗可能是一个很有前景的策略。

参 考 文 献 (References)

- [1] Haffner MC, Zwart W, Roudier MP, et al. Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer [J]. Nat Rev Urol, 2021, 18(2): 79-92.
- [2] 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.
- [3] Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Berndt SI, et al. A meta-analysis of 87, 040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer [J]. Nat Genet, 2014, 46(10): 1103-1109.
- [4] Damber JE, Aus G. Prostate cancer [J]. Lancet, 2008, 371(9625): 1710-1721.
- [5] Schweizer MT, Yu EY. Persistent androgen receptor addiction in castration-resistant prostate cancer [J]. J Hematol Oncol, 2015, 8(1): 128.
- [6] Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, et al. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC) [J]. Transl Androl Urol, 2015, 4(3): 365-380.
- [7] Aggarwal R, Huang J, Alumkal JJ, et al. Clinical and genomic characterization of treatment-emergent small-cell neuroendocrine prostate cancer: a multi-institutional prospective study [J]. J Clin Oncol, 2018, 36(24): 2492-2503.
- [8] 师长宏. 前列腺癌异质性转化 PDX 模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 242-247.

- Shi CH. Research progress in patient-derived tumor xenograft models of heterogeneous transformation of prostate cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 242–247.
- [9] Bortolato M, Chen K, Shih JC. Monoamine oxidase inactivation; from pathophysiology to therapeutics [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(13–14): 1527–1533.
- [10] Bortolato M, Floris G, Shih JC. From aggression to autism; new perspectives on the behavioral sequelae of monoamine oxidase deficiency [J]. J Neural Transm, 2018, 125(11): 1589–1599.
- [11] Jung K. Re: A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma [J]. Eur Urol, 2007, 51(3): 851–852.
- [12] Wu JB, Shao C, Li X, et al. Monoamine oxidase A mediates prostate tumorigenesis and cancer metastasis [J]. J Clin Invest, 2014, 124(7): 2891–2908.
- [13] Jacobs MR, Olivero JE, Choi HO, et al. Synthesis and anti-cancer potential of potent peripheral MAOA inhibitors designed to limit blood; brain penetration [J]. Bioorg Med Chem, 2023, 92: 117425.
- [14] Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer [J]. Nat Genet, 2012, 44(6): 685–689.
- [15] Kim J, Jin H, Zhao JC, et al. FOXA1 inhibits prostate cancer neuroendocrine differentiation [J]. Oncogene, 2017, 36(28): 4072–4080.
- [16] Chen CH, Wu B. Monoamine oxidase A: an emerging therapeutic target in prostate cancer [J]. Front Oncol, 2023, 13(17): 51–59.
- [17] Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? [J]. Cell Stem Cell, 2015, 16(3): 225–238.
- [18] Liao CP, Lin TP, Li PC, et al. Loss of MAOA in epithelia inhibits adenocarcinoma development, cell proliferation and cancer stem cells in prostate [J]. Oncogene, 2018, 37(38): 5175–5190.
- [19] Chen L, Xiong W, Qi L, et al. High monoamine oxidase a expression predicts poor prognosis for prostate cancer patients [J]. BMC Urol, 2023, 23(1): 112.
- [20] Wei J, Yin L, Li J, et al. Bidirectional cross-talk between MAOA and AR promotes hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer [J]. Cancer Res, 2021, 81(16): 4275–4289.
- [21] Rice MA, Malhotra SV, Stoyanova T. Second-generation antiandrogens: from discovery to standard of care in castration resistant prostate cancer [J]. Front Oncol, 2019, 9: 801.
- [22] Virtanen V, Paunu K, Kukkula A, et al. Glucocorticoid receptor-induced non-muscle caldesmon regulates metastasis in castration-resistant prostate cancer [J]. Oncogenesis, 2023, 12(1): 35–42.
- [23] Dhiman P, Malik N, Sobarzo-Sánchez E, et al. Quercetin and related chromenone derivatives as monoamine oxidase inhibitors; targeting neurological and mental disorders [J]. Molecules, 2019, 24(3): 418–436.
- [24] White TA, Kwon EM, Fu R, et al. The monoamine oxidase A gene promoter repeat and prostate cancer risk [J]. Prostate, 2012, 72(15): 1622–1627.
- [25] Du Y, Long Q, Zhang L, et al. Curcumin inhibits cancer-associated fibroblast-driven prostate cancer invasion through MAOA/mTOR/HIF-1 α signaling [J]. Int J Oncol, 2015, 47(6): 2064–2072.
- [26] Yin L, Li J, Wang J, et al. MAOA promotes prostate cancer cell perineural invasion through SEMA3C/PlexinA2/NRP1-cMET signaling [J]. Oncogene, 2021, 40(7): 1362–1374.
- [27] Flamand V, Zhao H, Peehl DM. Targeting monoamine oxidase A in advanced prostate cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(11): 1761–1771.
- [28] Wu JB, Yin L, Shi C, et al. MAOA-dependent activation of shh-IL6-RANKL signaling network promotes prostate cancer metastasis by engaging tumor-stromal cell interactions [J]. Cancer Cell, 2017, 31(3): 368–382.
- [29] Amakye D, Jagani Z, Dorsch M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer [J]. Nat Med, 2013, 19(11): 1410–1422.
- [30] Zhang Q, Han Y, Zhang Y, et al. Treatment-emergent neuroendocrine prostate cancer: a clinicopathological and immunohistochemical analysis of 94 cases [J]. Front Oncol, 2020, 10: 571308.
- [31] Davies AH, Beltran H, Zoubeidi A. Cellular plasticity and the neuroendocrine phenotype in prostate cancer [J]. Nat Rev Urol, 2018, 15(5): 271–286.
- [32] Wang K, Luo J, Yeh S, et al. The MAO inhibitors phenelzine and clorgyline revert enzalutamide resistance in castration resistant prostate cancer [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2689.
- [33] Meenu M, Verma VK, Seth A, et al. Association of monoamine oxidase A with tumor burden and castration resistance in prostate cancer [J]. Curr Ther Res Clin Exp, 2020, 93: 100610.
- [34] Gross ME, Agus DB, Dorff TB, et al. Phase 2 trial of monoamine oxidase inhibitor phenelzine in biochemical recurrent prostate cancer [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2021, 24(1): 61–68.
- [35] Mo Y, Chen M, Qin H, et al. *Pueraria lobata* potentially treating prostate cancer on single-cell level by network pharmacology and AutoDock: clinical findings and drug targets [J]. Comput Math Methods Med, 2022, 2022: 3758219.
- [36] Larkin SET, Townsend P. Association of common variations of 8q24 with the risk of prostate cancer in koreans and a review of the Asian population [J]. BJU International, 2012, 110: 1–10.
- [37] Khatri DK, Juvekar AR. Kinetics of inhibition of monoamine oxidase using curcumin and ellagic acid [J]. Pharmacogn Mag, 2016, 12(2): S116–S120.
- [38] Xu S, Adisetiyo H, Tamura S, et al. Dual inhibition of survivin and MAOA synergistically impairs growth of PTEN-negative prostate cancer [J]. Br J Cancer, 2015, 113(2): 242–251.

- [39] Yin L, Ye Y, Zou L, et al. AR antagonists develop drug resistance through TOMM20 autophagic degradation-promoted transformation to neuroendocrine prostate cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 204.
- [40] Gordon RR, Wu M, Huang CY, et al. Chemotherapy-induced monoamine oxidase expression in prostate carcinoma functions as a cytoprotective resistance enzyme and associates with clinical outcomes [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e104271.
- [41] Wu JB, Lin TP, Gallagher JD, et al. Monoamine oxidase A inhibitor-near-infrared dye conjugate reduces prostate tumor growth [J]. J Am Chem Soc, 2015, 137(6): 2366-2374.
- [42] Lv Q, Yang X, Wang M, et al. Mitochondria-targeted prostate cancer therapy using a near-infrared fluorescence dye-monoamine oxidase A inhibitor conjugate [J]. J Control Release, 2018, 279: 234-242.
- [43] Kim WY, Won M, Salimi A, et al. Monoamine oxidase-a targeting probe for prostate cancer imaging and inhibition of metastasis [J]. Chem Commun, 2019, 55(88): 13267-13270.
- [44] 师长宏. 基于近红外荧光制剂的多模态多功能分子影像技术在肿瘤模型中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2): 234-238.
- Shi CH. Application of multi-modal and multi-functional molecular imaging based on near-infrared fluorescence dye in tumor models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(2): 234-238.

[收稿日期] 2023-08-11

《中国实验动物学报》稿约

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

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!

李雪婵,韩乐,王雪文,等. 啮齿类动物衰老模型研究新进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1605-1609.

Li XC, Han L, Wang XW, et al. Research progress in aging rodent models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1605-1609.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.011

啮齿类动物衰老模型研究新进展

李雪婵^{1#}, 韩乐^{1#}, 王雪文¹, 柳立军², 吴建军¹, 王晶^{1*}

(1. 甘肃中医药大学公共卫生学院, 兰州 730000;
2. 兰州大学第一医院生殖医学中心, 兰州 730000)

【摘要】 衰老是一种随着时间积累而发生的退行性变化的过程, 年龄相关疾病与衰老密切相关。目前, 探索衰老发生发展的原因和机制, 寻找能有效延缓衰老、预防或治疗衰老疾病的药物, 是人类面临的巨大挑战。衰老动物模型的构建是衰老研究必须涉及的重要手段。各种衰老动物模型都有不同的衰老机制, 不同的衰老动物模型各有优缺点, 适合不同的研究目的。本文以啮齿类动物所构建的衰老模型进行综述, 为衰老研究提供资料。

【关键词】 衰老模型; 啮齿类动物; 机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1605-05

Research progress in aging rodent models

LI Xuechan^{1#}, HAN Le^{1#}, WANG Xuewen¹, LIU Lijun², WU Jianjun¹, WANG Jing^{1*}

(1. School of Public Health, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China.
2. Reproductive Medicine Center, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000)
Corresponding author: WANG Jing. E-mail: jwang_2017@hotmail.com

【Abstract】 Aging is a process of degenerative change that occurs as a result of time-related accumulation, associated with age-related diseases. Understanding the causes and mechanisms of aging and finding drugs that can effectively delay aging and prevent and cure age-related diseases currently present a great challenge for humans. Aging animal models thus represent an important tool in aging research, and various aging animal models have been created using different aging mechanisms. These different models having specific advantages and disadvantages, making them suitable for different research purposes. This review considers aging rodent models to provide information for aging research.

【Keywords】 aging model; rodents; mechanism

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

衰老是指机体随着年龄的增长而发生的组织结构、生理功能和心理行为上的退行性变化^[1-2]。糖尿病、癌症、心脑血管疾病、神经退行性疾病都与衰老密切相关, 是当前影响老年人生命健康的重要疾病^[3]。阐明衰老的机制, 开发延缓或逆转衰老的药物是一项关系国计民生的任务。

在此过程中, 开发构建衰老动物模型, 是探索衰老机理、筛选抗衰老药物、预防老年性疾病的关键手段之一。目前, 以啮齿类动物(大鼠或小鼠)构建的衰老模型种类较多, 每种模型都有不同的机理

【基金项目】 国家自然科学基金(82060829, 81760835), 甘肃省陇东生物资源保护利用与生态修复重点实验室开放基金(LDSWZY2002-3)。Funded by National Natural Science Foundation of China (82060829, 81760835), Foundation of Gansu Key Laboratory of Protection and Utilization for Biological Resources and Ecological Restoration (LDSWZY2002-3).

【作者简介】 李雪婵(1998—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 临床检验诊断学。Email: 1390699161@qq.com;
韩乐(1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 临床检验诊断学。Email: 2744002508@qq.com。
#共同第一作者

【通信作者】 王晶(1982—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 利用组学技术进行疾病诊断和机制研究。
Email: jwang_2017@hotmail.com

和特点,选择合适的衰老模型,对研究衰老机制和开发抗衰老药物至关重要。因此,本文综述了近年来在临床科研中常用的啮齿类动物衰老模型,以及其在衰老和抗衰老研究中的应用进展,希望以此为切入点拓展此类研究更多的思路和视角。

1 各种啮齿类动物衰老模型

1.1 自然动物模型

1.1.1 自然衰老模型

自然衰老模型的主要表现是,几乎所有器官结构和功能的退化,学习记忆能力以及免疫功能的下降,最符合人类衰老的特征,也可作为衡量其他衰老模型的尺度^[4-7]。目前,大鼠和小鼠是此类模型中最常用的实验动物,因为与其他动物相比,大鼠和小鼠寿命周期较短、价格便宜、容易繁殖^[8]。而且,啮齿类动物大约 99% 基因与人类相同,许多系统(如免疫、内分泌和消化系统)在结构和功能上也与人类相似^[7]。建模时,1 ~ 2 月龄的小鼠或 3 ~ 5 月龄的大鼠被安置在屏障环境实验室中,按常规饮食喂养。12 ~ 24 月龄小鼠视为老龄;21 ~ 26 月龄视为大鼠衰老早期,30 ~ 32 月龄为衰老晚期^[9]。张敏等^[10]选择雌性 SD 大鼠喂养 22 月后,发现老年雌性大鼠中骨钙含量、骨密度、雌激素及雌激素受体发生显著性改变,提示该模型可用于老年骨质疏松症的研究。

1.1.2 SAM 模型

快速老化小鼠(senescence accelerated mouse, SAM)是一种选择性近交系小鼠,于 1970 年在京都大学被开发^[11]。经过 20 多年的发展,该模型已非常成熟,其特点是随着年龄的增长而快速、不可逆地老化。目前已有 12 个亚系,各亚系表现出不同的病理表型^[4],包括神经退行性改变、学习记忆功能障碍、免疫系统功能障碍等^[12]。快速老化的 P 系(SAMP)表现出的病理表型与老年人相似,如 SAMP1、P2、P7、P9、P10、P11 亚系出现的大脑存在老年淀粉样变性,SAMP6 出现老年骨质疏松症,SAMP8 表现出典型的学习和记忆障碍^[13],也是一种自发性痴呆模型。SAMP10 是唯一出现与衰老相关脑萎缩的啮齿类模型,是研究与衰老相关的神经元减少及脑萎缩的最佳模型^[14]。SAMP6 是研究老化骨与骨质疏松的有益模型^[15]。SAM 模型在衰老及与衰老相关疾病的遗传研究中具有很大的优势,但价格较高、货源不充足,这在实验设计前需要考虑。

1.2 化学干预模型

D-半乳糖在 1985 年被徐黻本用于构建衰老模型,有研究者发现给小鼠注射 D-半乳糖后会导致与自然衰老相似的衰老特征,缩短寿命^[1,16]。关于其中的机制,有学者认为过量注射的 D-半乳糖,在醛糖还原酶的催化下,会使机体细胞中的半乳糖被还原为半乳糖醇,因不能被细胞进一步代谢而逐渐积累在细胞内,破坏机体正常的渗透压,导致细胞肿胀,最终引起机体生化变化、免疫功能障碍、细胞变性等类似自然衰老的表现。还有一种观点认为,D-半乳糖在半乳糖氧化酶的作用下,被催化生成过氧化氢,导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的形成,进而加速机体老化^[17-18]。该模型操作方法简单、成本低、实验结果明显、稳定,已成为国内公认的衰老动物模型,被广泛应用于抗衰老研究。但值得注意的是,该模型在不同实验室的造模剂量、造模时间、给药途径等方面的报道存在较大差异,文献报道中评估衰老的各项指标也有所不同^[19]。例如,Sun 等^[20]使用体重和器官指数作为该模型图成功的标志;Qian 等^[21]通过测定大鼠血清中过氧化氢酶活性和脂质过氧化物(lipid peroxidation, LPO)、晚期糖基化终末产物(advanced glycosylation end products, AGEs)、MDA 含量来判断该模型是否成功建立;Pan 等^[22]在研究又以 D-半乳糖组 P53 和 P21 蛋白的表达增加,来反映该模型的建立。因此,将 D-半乳糖诱导衰老模型应用于衰老研究时,应综合考虑以上影响造模的条件,并根据具体情况选择相应的衰老指标进行检测,从而确定模型的建立。

1.3 物理干预模型

1.3.1 胸腺切除术老化模型

胸腺作为 T 淋巴细胞产生的主要部位和免疫系统的关键器官,其退化直接影响机体的免疫功能^[23]。切除小鼠胸腺不仅会降低免疫反应,还会使学习能力下降^[24-25]。切除胸腺会导致小鼠肝中脂质过氧化代谢物丙二醛增加,葡萄糖代谢受损,从而产生与人类衰老相似的病理变化^[26]。因此,切除胸腺也可作为一种模拟衰老的方法。与 D-半乳糖诱导衰老模型和 SAM 模型相比,切除胸腺的动物模型在免疫衰老研究方面具有更大的优势,而且不需要大量的人力和物力^[4,27-28]。但由于动物胸腺被切除,无法定性或定量测量衰老的一些免疫指标,可能会影响实验的可靠性^[4]。此外,实验动物摘除胸腺后容易导致死亡,不同人员取组织器官的手法不

同,影响器官的完全程度,从而造成实验结果的误差^[4,27]。

1.3.2 全身辐射(TBI)早衰模型

利用 X 射线和 γ 射线的全身放射治疗(total body irradiation, TBI)可通过直接电离效应和辐射过程间接产生自由基,引起细胞和组织损伤^[29]。研究发现,亚致死性全身放射会导致小鼠进行性早衰,与对照组相比,TBI 小鼠逐渐出现老化的时间大约提前了 2 倍。而且,TBI 小鼠的老化表型与未受照射的老龄小鼠表型相似,TBI 小鼠是一个有效的早衰模型^[30]。Velegzhaninov 等^[31]进行 γ 射线照射观察,用剂量为 0、10、30、50、90、120、150、200 和 500 mGy 以及 1、2 Gy 的射线进行实验,结果发现,低剂量(30 mGy) γ 辐射可提高正常人成纤维细胞的整体增殖潜力,若要用于衰老建模时,照射剂量要高得多。此模型实验操作简便,效果迅速,但 TBI 早衰小鼠模型仅表现早衰的某些方面特征,模型评估都是在短时间内进行的^[30-33],而且放射线对人体有危害,操作风险较大,对实验条件和实验人员都有较高要求。

1.3.3 臭氧致衰老动物模型

臭氧是一种强氧化剂,常温下在机体内促进氧自由基的产生,造成细胞变性死亡,进而引发机体内多器官的功能衰退^[19,34]。根据这一机制,建立了臭氧大鼠衰老模型,作为一种急性衰老模型,该模型操作简便、时间短、成功率高,可用于研究衰老相关疾病的形态学和行为学方面,是国际公认的衰老模型^[34]。该模型估算的参数包括血清 SOD 活性、MDA、葡萄糖、胆固醇、器官指数和耐寒能力^[9]。研究表明,臭氧会导致胸腺和脾萎缩、免疫反应下降、学习能力受损,严重者还会出现阿尔茨海默病症状^[19,34]。李军等^[35]发现,臭氧诱导衰老可诱导心脏、肾、肺和皮肤等多种组织衰老,并导致类似自然衰老的表型。然而,臭氧建模会永久性损伤包括干细胞在内的所有受体细胞,对受体造成致命损伤,使宿主难以维持正常的生理衰老,对相关研究和药物筛选造成了局限。

1.4 基因敲除/敲入致衰老模型

1.4.1 基因敲除模型

在啮齿类动物机体内敲除 *Erccl* 基因、或者 *SIRT6* 基因可缩短动物寿命,同时也表现出多个器官生理性衰老的表型^[19]。*Erccl*^{-/-}小鼠出现与自然衰老小鼠相似的细胞负荷度,以及早衰体征,如体

重减轻、神经元减少、骨髓萎缩,以及主要器官(如肝、肾、骨骼肌和血管)的病理性老化^[36]。这类小鼠模型的衰老速度大约是野生型小鼠的 6 倍,是研究快速老化的适宜模型^[19]。Lombard 等^[37]将小鼠体内 *SIRT1* ~ *SIRT7* 家族的 7 个基因依次敲除,敲除 *SIRT6* 的小鼠与其他小鼠相比,多个器官出现生理性退化,并伴有骨密度降低、皮下脂肪减少、淋巴细胞减少等早衰症状。*SIRT6* 缺失小鼠的寿命只有大约 4 周,生存期相对较短,因此,不利于较长时间的干预实验研究^[19]。

1.4.2 基因敲入-线粒体 DNA 聚合酶突变模型

PolgA 是细胞核中编码线粒体 DNA (mitochondrial, mtDNA) 聚合酶的催化亚基^[38]。mtDNA 突变在机体发育过程中的不断累积,是导致衰老的重要因素之一^[39]。利用 *PolgA* 对小鼠进行基因改造,发现 mtDNA 突变累积比野生型小鼠更快。mtDNA 突变会引起不可逆的细胞凋亡,导致组织功能障碍,出现大量与年龄相关的体征变化,例如,体重减轻、渐进性听力丧失、骨质疏松、皮下脂肪减少、脱发、生育率降低、自发活动减少等^[40-41]。该模型最初是为了验证线粒体衰老理论而创建的^[42]。尽管该模型会表现出许多和其他模型一样的早衰特征,但这类模型不伴随活性氧(ROS)或氧化应激水平的显著增加^[43]。

2 总结及展望

综上所述,目前已有多种啮齿类动物衰老模型成为人类研究衰老机制的有效工具。然而各类模型表现出的病理改变各不相同,都有其各自的长处与不足。在众多动物衰老模型中,自然动物模型较为常用,这种衰老模型最为符合人类衰老的特征,但是鼠类货源难以获得。D-半乳糖诱导衰老模型其实验结果明显、稳定,应用较为广泛,但在不同实验室造模剂量、时间等方面差异较大。物理损伤模型其操作简单且成功率较高,但对受体损伤较大。基因敲除/敲入致衰老模型其衰老速度快,可以缩短观察周期,但操作较为复杂。建议根据不同的实验经费、实验设备、实验周期和研究目的选择更符合需求的衰老模型。

关于衰老的研究一直是人们关注的热点,只有真正地了解衰老及相关机制,才能探索出延缓衰老的有效方法。虽然各种衰老动物模型被建立,并应用于衰老机理和抗衰老研究,但由于衰老所涉及影

响的范围广泛,如神经系统退化、生殖能力减退等多方面,目前并没有一种模型能够应用于所有方面的衰老研究。因此,根据研究目的,并依据不同衰老模型的自身特点和优势,选择适合的模型进行机制研究和药物筛选至关重要。此外,随着细胞、分子生物学等实验技术的不断进步,基因工程、人工智能、机器学习等新型技术的不断发展,未来将有更多更新的、更合适的衰老动物模型被建立,从而助力于人类抗衰老研究,实现全民健康的发展需要。

参 考 文 献(References)

- [1] Azman KF, Zakaria R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview [J]. Biogerontology, 2019, 20(6): 763–782.
- [2] Tabula Muris Consortium. A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse [J]. Nature, 2020, 583(7817): 590–595.
- [3] Saul D, Kosinsky RL. Epigenetics of aging and aging-associated diseases [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(1): 401.
- [4] 陈强威, 江涛, 唐春萍. 动物衰老模型建立与机制的研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(1): 119–123.
Chen QW, Jiang T, Tang CP. Progress on the establishment and mechanism of animal aging model [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2018, 34(1): 119–123.
- [5] Hurley MJ, Urrea C, Garduno BM, et al. Genome sequencing variations in the *Octodon degus*, an unconventional natural model of aging and Alzheimer's disease [J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 894994.
- [6] Schumacher B, Pothof J, Vijg J, et al. The central role of DNA damage in the ageing process [J]. Nature, 2021, 592(7856): 695–703.
- [7] 卢延华, 管博文, 孟爱民. 衰老动物模型及其研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 109–113.
Lu YH, Guan BW, Meng AM. Research progress in aging animal models [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(9): 109–113.
- [8] 李少创, 韩诚, 秦亚莉, 等. 阿尔茨海默病实验动物模型评述 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 131–145.
Li SC, Han C, Qin YL, et al. A review of experimental animal models of Alzheimer's disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 131–145.
- [9] 孙凯, 蒋伟文. 鼠衰老模型的建模方法概述 [J]. 中华老年口腔医学杂志, 2017, 15(3): 181–184.
Sun K, Jiang WW. A review of methods for ageing mouse models [J]. Chin J Geriatr Dent, 2017, 15(3): 181–184.
- [10] 张敏, 郭雄, 章晓风, 等. 老龄雌性大鼠骨代谢的实验模型研究 [J]. 现代预防医学, 2010, 37(16): 3118–3119, 3121.
Zhang M, Guo X, Zhang XF, et al. Study on the bone metabolism of aged female rats [J]. Mod Prev Med, 2010, 37(16): 3118–3119, 3121.
- [11] Ueda Y, Inui A, Mifune Y, et al. Molecular changes to tendons after collagenase-induced acute tendon injury in a senescence-accelerated mouse model [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2019, 20(1): 120.
- [12] 谢颖, 杨玉媚, 和蕊, 等. 保健灸益寿延年研究中衰老动物模型的筛选 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(2): 784–788.
Xie Y, Yang YM, He R, et al. Screening of senile animal models in the study of health-care moxibustion for life extension [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(2): 784–788.
- [13] 尹丹阳, 胡怡, 史仍飞. 动物衰老模型的研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 156–162.
Yin DY, Hu Y, Shi RF. Advances in animal aging models [J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(2): 156–162.
- [14] 张慧叶, 种文强, 李昂, 等. 阿尔茨海默症动物模型研究概述及其非实验死亡原因的分析 [J]. 中国医药导报, 2020, 17(12): 36–40.
Zhang HY, Zhong WQ, Li A, et al. Overview of animal model study of Alzheimer's disease and analysis of non-experimental causes of death [J]. Chin Med Herald, 2020, 17(12): 36–40.
- [15] Huang YM, Xu BE, Kuai Z, et al. Glucagon-like peptide-2 ameliorates age-associated bone loss and gut barrier dysfunction in senescence-accelerated mouse prone 6 mice [J]. Gerontology, 2023, 69(4): 428–449.
- [16] hwe T, Bo-Htay C, Leech T, et al. D-galactose-induced aging does not cause further deterioration in brain pathologies and cognitive decline in the obese condition [J]. Exp Gerontol, 2020, 138: 111001.
- [17] 叶睿, 周浩, 陈婷, 等. pVAX-GHRH 表达质粒对 D-半乳糖诱导老年动物骨质疏松的影响 [J]. 中国兽医学报, 2021, 41(11): 2182–2189, 2195.
Ye R, Zhou H, Chen T, et al. Effect of pVAX-GHRH expression plasmid on D-galactose-induced osteoporosis in elderly animals [J]. Chin J Vet Sci, 2021, 41(11): 2182–2189, 2195.
- [18] Kumar H, Bhardwaj K, Valko M, et al. Antioxidative potential of *Lactobacillus* sp. in ameliorating D-galactose-induced aging [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, 106(13-16): 4831–4843.
- [19] He X, Wan F, Su W, et al. Research progress on skin aging and active ingredients [J]. Molecules, 2023, 28(14): 5556.
- [20] Sun K, Yang P, Zhao R, et al. Matrine attenuates D-galactose-induced aging-related behavior in mice via inhibition of cellular senescence and oxidative stress [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7108604.
- [21] Qian J, Wang X, Cao J, et al. Dihydromyricetin attenuates D-galactose-induced brain aging of mice via inhibiting oxidative stress and neuroinflammation [J]. Neurosci Lett, 2021, 756: 135963.
- [22] Pan H, Feng W, Chen M, et al. Alginate oligosaccharide ameliorates D-Galactose-induced kidney aging in mice through activation of the Nrf2 signaling pathway [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 6623328.
- [23] Tian W, He J, Yu H, et al. Clinical characteristics of myasthenia gravis (MG) patients developing other autoimmune

- diseases after thymectomy from one single center cohort [J]. Thorac Cancer, 2023, 14(2): 135-142.
- [24] Nishiyama N. Thymectomy-induced deterioration of learning and memory [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2001, 47(1): 161-165.
- [25] Zhang Y, Saito H, Nishiyama N. Thymectomy-induced deterioration of learning and memory in mice [J]. Brain Res, 1994, 658(1-2): 127-134.
- [26] 高会丽, 王丹巧, 汪晓燕, 等. 不同衰老大鼠模型大脑皮层细胞凋亡状况的比较 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(15): 2144-2146.
- Gao HL, Wang DQ, Wang XY, et al. The study of apoptosis and mitochondria membrane potential of cerebral cortex cells in aging rats model induced by different methods [J]. Chin J Gerontol, 2010, 30(15): 2144-2146.
- [27] 龙金烈, 杨明. 一种新型致小鼠拟衰老模型的初步建立 [J]. 海南医学, 2012, 23(5): 20-24.
- Long JL, Yang M. Contruction of glucous-induced aging model in KM mice [J]. Hainan Med J, 2012, 23(5): 20-24.
- [28] Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence [J]. Exp Gerontol, 1997, 32(1-2): 105-109.
- [29] Käsmann L, Dietrich A, Staab-Weijnitz CA, et al. Radiation-induced lung toxicity-cellular and molecular mechanisms of pathogenesis, management, and literature review [J]. Radiat Oncol, 2020, 15(1): 214.
- [30] Fielder E, Weigand M, Agneessens J, et al. Sublethal whole-body irradiation causes progressive premature frailty in micers [J]. Mech Ageing Dev, 2019, 180: 63-69.
- [31] Velegzhaninov IO, Ermakova AV, Klovov DY. Low dose ionizing irradiation suppresses cellular senescence in normal human fibroblasts [J]. Int J Radiat Biol, 2018, 94(9): 825-828.
- [32] Demaria M, O' Leary MN, Chang J, et al. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse [J]. Cancer Discov, 2017, 7(2): 165-176.
- [33] Dougherty JP, Springer DA, Cullen MJ, et al. Evaluation of the effects of chemotherapy-induced fatigue and pharmacological interventions in multiple mouse behavioral assays [J]. Behav Brain Res, 2019, 360: 255-261.
- [34] 颜少帅, 张小可, 杨现霞, 等. 迷迭香醇提物对臭氧模型小鼠抗氧化能力的影响 [J]. 泰山医学院学报, 2020, 41(11): 822-825.
- Yan SS, Zhang XK, Yang XX, et al. Effect of antioxidant capacity of ethanol extract of rosemary on ozone aging mice model [J]. J Shandong First Med Univ, 2020, 41(11): 822-825.
- [35] 李军, 张洹, 王彦平, 等. 小鼠胎盘源干细胞移植对臭氧致衰老模型的影响 [J]. 广东医学, 2010, 31(4): 404-406.
- Li J, Zhang H, Wang YP, et al. The effect of mice placenta stem cell transplantation on mice ozone-induced aging model [J]. Guangdong Med J, 2010, 31(4): 404-406.
- [36] Kim DE, Dollé MET, Vermeij WP, et al. Deficiency in the DNA repair protein ERCC1 triggers a link between senescence and apoptosis in human fibroblasts and mouse skin [J]. Aging Cell, 2020, 19(3): e13072.
- [37] Lombard DB, Schwer B, Alt FW, et al. SIRT6 in DNA repair, metabolism and ageing [J]. J Intern Med, 2008, 263(2): 128-141.
- [38] Hipps D, Dobson PF, Warren C, et al. Detecting respiratory chain defects in osteoblasts from osteoarthritic patients using imaging mass cytometry [J]. Bone, 2022, 158: 116371.
- [39] Lazo S, Noren Hooten N, Green J, et al. Mitochondrial DNA in extracellular vesicles declines with age [J]. Aging Cell, 2021, 20(1): e13283.
- [40] Cai N, Wu Y, Huang Y. Induction of accelerated aging in a mouse model [J]. Cells, 2022, 11(9): 1418.
- [41] Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging [J]. Science, 2005, 309(5733): 481-484.
- [42] Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase [J]. Nature, 2004, 429(6990): 417-423.
- [43] MacLaine KD, Stebbings KA, Llano DA, Havird JC. The mtDNA mutation spectrum in the PolG mutator mouse reveals germline and somatic selection [J]. BMC Genom Data, 2021, 22(1): 52.

[收稿日期] 2023-09-05

李梦瑶,高枫,郑帆帆,等. 应用基因修饰动物模型研究抑郁症进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1610-1616.

Li MY, Gao F, Zheng FF, et al. Progress in depression research using genetically modified animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1610-1616.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.012

应用基因修饰动物模型研究抑郁症进展

李梦瑶,高枫,郑帆帆,何盟泽,何昭,李优磊*

(延安大学医学院,陕西 延安 716000)

【摘要】 抑郁症是一种多基因遗传的复杂性精神疾病,其发病率高,严重者伴有轻生行为。近年来,人们对抑郁症临床表征及发病机制的认识不断提高。随着基因编辑技术的不断进步,基因敲除动物构建效率大幅提高且成本随之降低,因此越来越多的基因敲除动物被应用于抑郁症基础研究和药物研发领域,为揭示抑郁症发病机制提供有力工具。本文综述了近年来应用基因敲除鼠模型研究抑郁症候选致病基因作用及机制方面的研究进展。

【关键词】 抑郁症;基因敲除;单胺能系统;脑源性神经营养因子;谷氨酸;下丘脑-垂体-肾上腺轴

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1610-07

Progress in depression research using genetically modified animal models

LI Mengyao, GAO Feng, ZHENG Fanfan, HE Mengze, HE Zhao, LI Youlei*

(Medical School of Yan'an University, Yan'an 716000, China)

Corresponding author: LI Youlei. E-mail: liyoulei@yau.edu.cn

【Abstract】 Depression is a complex mental disease with polygenic inheritance and a high incidence. Our understanding of the clinical manifestations and pathogenesis of depression has recently improved. Continuous progress in gene-editing technologies has increased the construction efficiency and reduced the cost of gene-knockout animals, leading to their increasing use in the fields of basic research and drug development for depression and providing a powerful tool for revealing the pathogenesis of depression. In this review, we summarize recent progress in understanding the roles and mechanisms of candidate genes in depression using knockout model mice.

【Keywords】 depression; gene knockout; monoamine system; brain-derived neurotrophic factor(BDNF); glutamic acid; HPA axis

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

随着社会的发展,人们的生活节奏越来越快,随之而来的压力潜移默化地影响着人们,致使抑郁症患病率逐年提高,已成为目前社会中常见的情绪障碍^[1]。抑郁症是一种多基因遗传的复杂性精神疾病,表现为社交能力障碍、情绪低落、食欲不振等特点,严重时可有自杀行为^[2-3]。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)报道,2021 年约有 3.8% 人口患抑郁症,其中 5% 为成年人^[4-5]。

中国精神卫生调查显示,我国抑郁症患病率为 3.4%,患病人数高达 9500 万^[6-7],且发病群体逐渐呈年轻化。但目前还存在治疗效果不明显、治疗周期长、低收入和中等收入国家超过 75% 患者得不到治疗等问题^[8]。目前抑郁症发病机制尚不明确,关于其分子、生理和病理机制的假说,包括有单胺假说、神经营养假说、谷氨酸假说、皮质类固醇假说等。证明这些假说有效性的方法是调控这些病理

【基金项目】 陕西省教育厅科学研究计划项目(22JK0613),延安大学博士科研启动项目(YDBK2021-07)。

Funded by the Scientific Research Program of Shaanxi Provincial Education Department (22JK0613), Doctoral Research Program of Yan'an University (YDBK2021-07).

【作者简介】 李梦瑶(2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:中枢神经损伤与修复研究。Email:limengyao0312@163.com

【通信作者】 李优磊(1993—),男,讲师,博士,研究方向:代谢性疾病发生的分子机制研究。Email:liyoulei@yau.edu.cn

生理过程中相关基因的表达,并研究在抑郁症病理生理学中的作用。基因敲除鼠模型是研究基因功能和动物表型的有力工具,随着基因工程的不断进步,Cre-LoxP 技术以及 CRISPR-Cas9 技术的相继出现且逐渐成熟,基因敲除小鼠可在较短时间内构建成功^[9],这为研究人员提供了很大的便利条件。在本综述中,总结了近年来抑郁症常用的基因敲除鼠模型,以及基因敲除诱发抑郁症致病机制的研究进展。

1 抑郁症假说及相关基因敲除鼠模型

1.1 基因敲除使单胺能系统失衡

情绪在日常生活中起着至关重要的作用,影响着社交活动、精神状态以及睡眠质量,但抑郁症患者的信息处理和情绪调节会出现改变。单胺神经递质调节情绪、睡眠、社交行为,这些神经递质在单胺能系统中合成^[10-12]。单胺假说是抑郁症最广泛的病因学理论,一直被认为与单胺能神经传递受损有关,尤其是 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、多巴胺(dopamine, DA)的缺乏^[10-12]。

首先,抑郁症发生涉及 5-HT 系统的长期失调,其中,轴突蛋白(neurexin, Nrnx)基因编码突触前细胞粘附分子,这些分子对调节突触神经递质释放尤为重要,当 5-HT 神经元 Nrnx 缺失,会导致小鼠出生后早期 5-HT 神经元数量减少,转运体表达降低等情况的发生,且小鼠社交能力降低,抑郁样行为增加,说明 Nrnx 在 5-HT 神经传递、5-HT 神经元存活和复杂行为执行中发挥重要作用^[13]。此外,5-HT_{1A} 受体基因是调节 5-HT 活性的关键节点,主要功能为通过其体细胞树突状自身受体抑制 5-HT 神经元的放电,Cc2d1a 基因敲除导致了 5-HT_{1A} 自身受体的过表达,抑制神经元放电,与 5-HT_{1A} 自身受体依赖性焦虑/抑郁表型以及 5-HT_{1A} 自身受体依赖性抗抑郁表型有关,提示 Cc2d1a 基因是 5-HT 功能和行为的关键转录因子,影响着抑郁症的发生发展^[14]。另外,5-羟色胺 2A 受体在整个中枢神经系统中广泛表达,由 Htr2a 基因编码的 5-羟色胺 2A 受体与重度抑郁症之间也存在关联,敲除 Htr2a 基因小鼠出现了较低的神经传递,在不同行为学实验(悬尾实验、强迫游泳实验、蔗糖偏好实验、高架十字迷宫实验)中表现出焦虑、抑郁样表型^[15]。5-HT 神经传递关键调节因子是血清素再摄取转运蛋白

(serotonin re-uptake transporter, SERT),胚胎发育期间在许多大脑区域短暂表达,在 SERT 敲除小鼠和大鼠中进行的研究一致显示其焦虑样症状^[16]。前额叶皮层(prefrontal cortex, PFC)中单胺能系统失衡可导致多种神经与精神疾病,研究显示,SERT 缺乏会导致腹侧海马和前额叶皮层中 BDNF 表达总体降低,在背侧海马和背侧 PFC 中,实施慢性母体分离(chronic maternal separation, CMS)后神经营养蛋白基因表达显著增加,特别是在杂合 SERT 敲除大鼠中,这些发现可能为调节神经营养因子功能提供新的线索,其失调可能导致多种精神疾病的发生^[17]。其次,去甲肾上腺素的水平也影响着抑郁症的发生发展。EP4 受体相关蛋白(EP4 receptor-related proteins, EPRAP)是一种新发现的调节巨噬细胞活化的分子,研究显示,Eprap 基因敲除小鼠在强迫游泳测试中抑郁样行为显著增加,并发现 Eprap 基因敲除鼠大脑中的去甲肾上腺素水平降低,表明 Eprap 基因敲除后可能通过影响 NE 水平导致单胺能系统失衡而引起抑郁症的发生^[18]。去甲肾上腺素转运蛋白(norepinephrine transporter, NET)也称为溶质载体家族 6 成员 2(solute vector family 6 members 2, SLC6A2),可以重吸收突触去甲肾上腺素维持体内去甲肾上腺素水平,因此,大脑 NET 水平变化导致的去甲肾上腺素失衡可能与抑郁症的发生有关^[19]。去甲肾上腺素转运蛋白调节大脑和交感神经系统中去甲肾上腺素能信号传导的突触 NE 可用性。研究表明,Net 基因敲除杂合子雄性小鼠显示 Net 蛋白水平降低 50%,且表现出抗抑郁表型,Net-KO 小鼠还观察到血清素系统和多巴胺相关基因的表达也发生变化,Htr2c 受体基因在 Net-KO 小鼠额叶皮质中表达升高,但在海马齿状回中表达降低^[20]。最后,多巴胺也可通过影响前额叶皮层和皮质丘脑功能调节抑郁症。多巴胺转运蛋白(dopamine transporter, DAT)参与突触前末端的多巴胺再摄取,DAT 缺失导致高多巴胺能表型^[21]。DAT 缺失的基因工程雌性大鼠在 PFC 中存在神经退行性表型,伴有青春期早期谷氨酸能神经传递和神经胶质激活的改变,且谷氨酸与神经胶质细胞都与抑郁症密切相关,提示该基因缺乏可能影响抑郁症的发生^[22]。另外,DAT 基因敲除小鼠多巴胺水平升高,DAT 的表达增强可能损坏皮质丘脑回路,从而导致异常的回避行为以及抑郁样行为^[23]。

综上,单胺能系统主要调节情绪,与人体情绪

相关的脑区以前额叶皮层和海马为主,当 5-HT、NE、DA 发生变化,神经递质传递受损,小鼠出现了抑郁样行为,通过检测基因敲除鼠相关脑区上述标志物的变化,从分子水平和行为学水平验证其是否患有抑郁症。此外,基因敲除鼠的构建也为抑郁症发病机制的研究提供了良好的生物工具,并为以后药物研发提供了有效靶点和线索。

1.2 基因敲除使 BDNF 失调

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 对大脑中神经元成熟,突触形成和突触可塑性等过程发挥关键作用^[24]。“神经营养假说”认为中枢神经系统中的 BDNF 表达水平改变后,神经元失去营养从而萎缩,突触可塑性降低,脑功能失调,从而引起抑郁症^[25]。抑郁症患者在 BDNF 水平和功能方面表现出区域特异性改变,BDNF 上调发生在患者伏隔核,下调发生在海马体和内侧前额叶皮层^[26]。BDNF 是抑郁症病理生理学和抗抑郁药治疗机制不可或缺的一部分,在抑郁症死后脑样本中发现海马体和 PFC 中 BDNF 蛋白水平降低,抑郁症大鼠 PFC 中的 BDNF 水平以及海马体的 CA3 和 DG 显著降低^[27]。研究显示,在 BDNF 杂合子敲除 (*BDNF*^{+/-}) 动物中,BDNF 水平长期处于野生型水平的 50% 低水平状态,强烈影响丘脑回路中的谷氨酸能和 GABA 能突触传递^[28],但没有显示出抑郁样行为的改变,表明 BDNF 水平降低本身不会直接影响抑郁症相关行为发生,在遭受慢性社会挫败应激 (chronic social defeat stress, CSDS) 之后,BDNF 杂合子敲除小鼠出现了抑郁样行为,证明了 BDNF 相关机制可能参与压力的作用,共同作用导致抑郁样行为^[25]。最近 *Morc1* 基因被 DNA 甲基化和全基因组关联研究确定为与啮齿动物、灵长类动物和人类早期生活压力相关的抑郁症候选基因,*Morc1*^{-/-}小鼠在强迫游泳实验 (forced swimming test, FST) 中表现出更多的不动,结合习得的无助实验 (learned helplessness experiment, LH) 的结果,*Morc1*^{-/-}小鼠的抑郁样行为明显增加,且在前额叶皮层和杏仁核中 BDNF 有减少的趋势,再次证明 BDNF 变化对抑郁症的发生发展至关重要^[29]。*Morc1*^{-/-}小鼠可能是一种有前途的表现遗传学验证的小鼠模型,可用于与早期生活压力相关的抑郁症研究。此外,BICD2 是一种运动激活衔接蛋白,为神经元迁移所必需,*Bicd2* 调节脑源性神经营养因子的亚细胞分布和 mRNA 局部翻译,与对照组小鼠相

比,表达 *Bicd2* shRNA 的小鼠海马 BDNF 蛋白水平显著上调。TrkB 是 BDNF 的主要高亲和力受体,*Bicd2* 敲低海马体中的磷酸化程度高于对照海马体,表明 BDNF 信号通路被激活。这些结果表明,BDNF 信号通路很可能是 *Bicd2* 敲低在抑郁样行为小鼠海马中发挥抗抑郁作用的基础^[30]。脂联素 (adiponectin, APN) 是一种脂肪细胞分泌的循环激素,具有抗糖尿病和葡萄糖/脂质调节能力,在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 存在的条件下, κ B 抑制因子激酶 (inhibitor of κ B kinase, IKK) 抑制剂 Bay11-7082 处理恢复了 APN-KO 小鼠大脑皮层中 p-NF- κ B 的表达,APN-KO 小鼠显示细胞因子增加 (抗炎),伴有脂联素受体表达受损 (mRNA/蛋白质水平) 和 LPS 处理的 APN-KO 小鼠大脑皮层和初级小胶质细胞中的 IBA-1 水平降低,且 APN-KO 小鼠的抗抑郁作用被原肌球蛋白相关激酶 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 拮抗剂 K252a 和 IKK 抑制剂 Bay11-7082 所消除,提示 TrkB/BDNF 信号通路与 NF- κ B 在抑郁症中存在交互作用^[31]。上述研究显示 NF- κ B 诱发的 BDNF 变化可能是 LPS 诱导的抑郁症发病机制的原因,其中 APN 可能是重度抑郁症的替代治疗靶点。另外,虽然 BDNF 对于抗抑郁药物发挥作用是必要的,但 BDNF 不容易穿过血脑屏障,由于 BDNF 与 TrkB 受体具有高亲和力,因此,对 TrkB 信号传导的小分子的开发产生了兴趣^[32]。对抑郁症患者研究发现,患者脑组织 BDNF mRNA 和蛋白质水平均降低。此外,这些个体 TrkB mRNA 和蛋白水平也出现降低,说明可通过调节 TrkB 来影响 BDNF^[33]。纤溶酶原激活物抑制剂-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 在重度抑郁症发病机制中的作用可能也来自神经营养假说,BDNF 起源于前体 BDNF,被组织型纤溶酶原激活剂 (tPA)-纤溶酶原系统蛋白水解,产生成熟蛋白 BDNF。*PAI-1*^{-/-}小鼠导致明显的抑郁样表型与 tPA-BDNF 轴无关,但 5-HT 和 DA 的浓度降低,且 *PAI-1*^{-/-}小鼠为重度抑郁症的耐药 SSRI 遗传模型^[34],这表明 PAI-1 也有可能是开发重度抑郁症新药的靶点。

综上,BDNF 主要通过神经元损伤调控抑郁症,抑郁症患者 BDNF 在不同脑区的变化不同,主要表现在前额叶皮层、杏仁核、海马以及伏隔核,且抑郁样行为可能是 BDNF 变化和压力共同作用导致脑功能失调的结果,也与 TrkB 信号转导密切相关,且还可能调控单胺能系统相关因子从而诱发抑郁症。

1.3 基因敲除使谷氨酸堆积

目前主要研究方向为神经胶质细胞假说,即在抑郁症早期由于应激刺激和基因的相互作用使神经胶质细胞受损,从而使突触间隙中的谷氨酸清除障碍,导致过多谷氨酸堆积加速了神经元细胞死亡,最终引起了抑郁症。谷氨酸受体 1 (glutamate receptor 1, GluR1) 在啮齿动物多个大脑区域均表达,包括大脑皮层、海马体、杏仁核、纹状体、伏隔核、外侧僵核、背侧中缝核等^[35-36], *GluR1-KO* 小鼠在 FST 行为学实验中表现出抑郁样行为, 药物研究发现与抑郁症相关大脑区域中的 5-羟色胺浓度增加可能是 *GluR1-KO* 小鼠异常行为的原因^[37]。I 型 mGluR 激活 TRPC1 通道会暂时去极化培养物中的海马神经元并改变其兴奋性, 在体内, 缺乏 *Trpc1* 会损害这些过程, 海马体中 *Trpc1* 基因缺失会损害 I 型 mGluR 诱导的信号通路, 从而降低 mGluR-长期抑郁, I 型 mGluR-长期抑郁发生在许多大脑区域, 包括中脑、纹状体和小脑, 这些大脑区域功能异常均可能诱发长期抑郁症^[38-39]。*Bax* 基因被称为细胞死亡的有效调节因子, 是 Bcl-2 基因家族的成员, 其促凋亡 Bcl 相关 X 蛋白 (Bax) 被认为在调节神经元发育过程中以及损伤后的细胞凋亡中发挥着至关重要的作用, *Bax* 敲除 (*Bax-KO*) 小鼠被用来研究神经元死亡。*Bax-KO* 小鼠破坏了细胞的程序性死亡, 且在 FST 行为学实验中表现出更长时间的不动, 为抑郁样表型^[40]。此研究说明了发育早期细胞的存活和死亡之间的良好平衡对于以后正常大脑功能至关重要。此外, 神经胶质细胞是一组神经系统细胞, 在中枢神经系统中通常分为大胶质细胞 (主要包括星形胶质细胞和少突胶质细胞) 和小胶质细胞^[41]。 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体 ($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7$ nAChR) 是一种主要在中枢神经系统小胶质细胞中表达的离子受体, 在调节炎症中小胶质细胞功能的中枢抗炎过程中起重要作用。 $\alpha 7$ nAChR-KO 大鼠小胶质细胞形态多为阿米巴样活化, 当 $\alpha 7$ nAChR 的表达上调, 产生抗炎从而产生抗抑郁作用^[42]。神经连接素在谷氨酸能突触中定位于突触后, 神经连接素 3 (neuroconnectin 3, NLGN3) 是一种 X 连锁神经配素基因, 可以改变网络结构且同步影响神经元网络中的信息处理^[43]。研究显示, 对 *Nlgn3-KO* 小鼠实施慢性温和和不可预测性应激 (chronic mild and unpredictable stress, CUMS) 后 GFAP 和 Iba-1 表达升高, GFAP 和 IBA-1

是星形胶质细胞和小胶质细胞的重要标志, 敲除 *Nlgn3* 可以减少胶质细胞的活化, 从而改善 CUMS 诱导的抑郁样行为, 证明 *Nlgn3* 可以被视为开发针对抑郁症发展的有效治疗策略的潜在靶标^[44]。甾醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c) 是精神分裂症患者的易感基因, 该基因敲除小鼠表现出抑郁样行为, 发现其海马体和内侧前额叶皮层中 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 受体亚型和谷氨酸脱羧酶的 mRNA 水平降低^[45], γ -氨基丁酸是主要的抑制性神经递质, 海马体或 PFC 中 GABA 能中间神经元的缺失可以诱导神经元的去抑制, 使大脑区域活动增加, 谷氨酸脱羧酶的表达减少会引起小鼠的情绪异常包括抑郁样行为^[46]。细胞周期蛋白依赖性激酶样 5 (cyclin-dependent kinase-like 5, Cdkl5) 基因突变会导致严重的神经发育障碍, 研究发现该基因敲除小鼠的焦虑样行为显著增加, 抑郁样行为被改变, Cdkl5 还控制海马体中含 GluN2B 的 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体的突触后定位, 当 NMDA 受体被破坏会导致谷氨酸堆积引起抑郁样行为^[47]。

综上, 该假说认为抑郁症主要与神经元细胞死亡相关, 其原因主要包括基因和应激刺激的共同作用使神经胶质细胞受损以及受体的破坏导致了谷氨酸的堆积。基因敲除后影响了神经胶质细胞的活化, 致使相关大脑区域异常, 最终导致了焦虑和抑郁样行为的出现。提示神经元细胞功能的完整性可能参与抑郁症发生发展。

1.4 基因敲除使 HPA 轴紊乱

关于皮质类固醇假说认为, 抑郁症主要由下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) 功能异常引起, 应激使 HPA 轴紊乱, 糖皮质激素水平升高, 海马神经元功能障碍和结构改变^[48]。研究显示, 海马齿状回神经再生能力下降参与应激诱导的抑郁样行为, NOD 样受体家族热蛋白结构域 6 (NOD-like receptor family heat protein domain 6, NLRP6) 在海马齿状回的神经干细胞中大量表达, 是神经干细胞增殖所必需的, 以维持海马神经发生和增长过程中的应激恢复能力。当 *Nlrp6* 基因敲除后发现小鼠皮质酮 (应激因子) 水平显著升高, 易受应激的影响, 更易出现抑郁样行为, 但 *Nlrp6* 基因过表达时可阻断该现象, 同时与抑郁症相关的海马神经再生能力提高^[49]。应激反应的关键步骤是激活

神经肽促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotropin releasing hormone, CRH) 或因子, CRH 通过与 G 蛋白偶联受体家族成员 CRH 受体-1 和 CRH 受体-2 结合起作用^[50]。*Crh*^{-/-}小鼠 HPA 轴活性显著降低,且在重复应激 *Crh* 基因敲除鼠的 CRH-R1 mRNA 显著降低^[51]。*Crh*-KO 小鼠的基础糖皮质激素水平在应激期间非常低,表现出焦虑相关行为(焦虑是抑郁症患病率最高的主要症状)以及正常的应激诱导的行为改变,*Crhr1* 和 *Crhr2* 基因在海马体中的表达水平与杏仁核相似,而杏仁核是 CRH 作用的主要区域之一^[52]。*Crhr1* 基因敲除小鼠在杏仁核中环境诱导的情况下有抗焦虑的作用,缺乏 CRH 受体 1 的小鼠在应激下表现出 HPA 轴活动改变,导致焦虑减少^[53]。有研究表明,类固醇受体共激活剂 (steroid receptor coactivators, SRC-1) 作为 HPA 轴上突触核受体 (nuclear receptor, NR) 中的糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptors, GR) 的主要共同调节因子,不仅在海马体、大脑皮层和下丘脑中广泛表达,还调节促肾上腺皮质激素释放激素的转录^[54]。*Src-1* 基因敲除小鼠抑制了 CUMS 诱导的 GR 的表达,更容易受到 CUMS 的影响,糖皮质激素受体表达改变,在 FST 和 TST 行为学实验中表现出抑郁样行为^[55]。另外,下丘脑-垂体-肾上腺应力轴与昼夜节律密切相关,HPA 轴异常导致昼夜节律失调,与抑郁症密切相关^[56]。下丘脑 (hypothalamus, HPA) 通过调节肾上腺皮质对糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 的敏感性与 HPA 轴相连,HPA 轴活动由生物钟调节,哺乳动物生物钟的主要控制器在下丘脑的视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN)^[57],由 SCN 中的一组基因调节如 *Per2* 基因,这些基因在转录-翻译反馈环中工作,以稳定和协调日常生理节律,包括昼夜皮质酮周期。*Per2*^{-/-}小鼠昼夜节律周期缩短,昼夜皮质酮紊乱,破坏了昼夜节律系统,HPA 应力轴失调,且在 FST 行为学实验中表现出抑郁样行为增加^[58]。昼夜节律异常引起的睡眠障碍是抑郁症的主要症状和危险因素之一,褪黑素 (melatonin, MT) 也是一种调节昼夜节律的激素,ASMT 是 MT 合成的关键限速酶,*Asmt*-KO 小鼠出生时具有较低的 ASMT 活性和 MT 缺乏,*Asmt* 敲除增加了与运动相关的神经元的兴奋性,可能是由于相关基因表达水平的改变^[59]。

综上,HPA 轴的紊乱主要影响了糖皮质激素的水平,常与应激刺激共同作用。另外,昼夜节律在

抑郁症中也发挥着至关重要的作用,HPA 轴受生物钟调节,人类的诸多生理功能都存在生物节律现象,因基因缺失导致抑郁症动物模型中也可观察到昼夜节律的改变,提示当发生抑郁症时,HPA 轴的紊乱也可能是昼夜节律失调引起的,要双重考虑其致病机制。

2 总结与展望

抑郁症是一种病因复杂的精神疾病,本文总结了抑郁症相关候选基因的研究进展,这些假说认为抑郁症发病机制主要包括单胺能系统失衡、BDNF 失调、谷氨酸堆积和 HPA 轴紊乱等因素。其中所涉及的基因敲除鼠为之后药物的研发提供了动物模型,而这些候选基因也为临床早期抑郁症的筛查提供了参考。目前抑郁症靶向药物的研发主要针对的是单基因引起的抑郁症,而在现实情况中抑郁症是多基因遗传的复杂性精神疾病,未来可以在明确多重病因的前提下考虑联合用药,这将会使抑郁症治疗效果得到改善。

参 考 文 献 (References)

- [1] Ibrahim AK, Kelly SJ, Adams CE, et al. A systematic review of studies of depression prevalence in university students [J]. J Psychiatr Res, 2013, 47(3): 391-400.
- [2] Rogers ML, Ringer FB, Joiner TE. The association between suicidal ideation and lifetime suicide attempts is strongest at low levels of depression [J]. Psychiatry Res, 2018, 270: 324-328.
- [3] Ordaz SJ, Goyer MS, Ho TC, et al. Network basis of suicidal ideation in depressed adolescents [J]. J Affect Disord, 2018, 226: 92-99.
- [4] Castaldelli-Maia JM, Bhugra D. Analysis of global prevalence of mental and substance use disorders within countries: focus on sociodemographic characteristics and income levels [J]. Int Rev Psychiatry, 2022, 34(1): 6-15.
- [5] World Health Organization. Depressive disorder (depression) [R]. Geneva: World Health Organization; 2023.
- [6] 傅小兰, 张侃, 陈雪峰, 等. 心理健康蓝皮书: 中国国民心理健康发展报告(2021-2022) [M]. 北京: 社会科学文献出版社; 2023.
- [7] Fu XL, Zhang K, Chen XF, et al. Mental Health Blue Book: Report on the development of national mental health in China (2021 - 2022) [M]. Beijing: Social Sciences Literature Press; 2023.
- [8] Lu J, Xu X, Huang Y, et al. Prevalence of depressive disorders and treatment in China: a cross-sectional epidemiological study [J]. Lancet Psychiatry, 2021, 8(11): 981-990.
- [9] Evans-Lacko S, Aguilar-Gaxiola S, Al-Hamzawi A, et al. Socio-economic variations in the mental health treatment gap for people with anxiety, mood, and substance use disorders: results from

- the WHO World Mental Health (WMH) surveys [J]. *Psychol Med*, 2018, 48(9): 1560–1571.
- [9] Klimke A, Güttler S, Kuballa P, et al. Use of CRISPR/Cas9 for the modification of the mouse genome [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1953: 213–230.
- [10] Shao X, Zhu G. Associations among monoamine neurotransmitter pathways, personality traits, and major depressive disorder [J]. *Front Psychiatry*, 2020, 11: 381.
- [11] Perez-Caballero L, Torres-Sánchez S, Romero-López-Alberca C, et al. Monoaminergic system and depression [J]. *Cell Tissue Res*, 2019, 377(1): 107–113.
- [12] Tritschler L, Gaillard R, Gardier AM, et al. Consequences of the monoaminergic systems cross-talk in the antidepressant activity [J]. *Encephale*, 2018, 44(3): 264–273.
- [13] Cheung A, Konno K, Imamura Y, et al. Neurexins in serotonergic neurons regulate neuronal survival, serotonin transmission, and complex mouse behaviors [J]. *Elife*, 2023, 12: e85058.
- [14] Smith ALW, Harmer CJ, Cowen PJ, et al. The serotonin 1A (5-HT_{1A}) receptor as a pharmacological target in depression [J]. *CNS Drugs*, 2023, 37(7): 571–585.
- [15] Petit AC, Quesseveur G, Gressier F, et al. Converging translational evidence for the involvement of the serotonin 2A receptor gene in major depressive disorder [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, 54: 76–82.
- [16] Mohammad F, Ho J, Woo JH, et al. Concordance and incongruence in preclinical anxiety models: systematic review and meta-analyses [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016, 68: 504–529.
- [17] Calabrese F, van der Doelen RH, Guidotti G, et al. Exposure to early life stress regulates *Bdnf* expression in SERT mutant rats in an anatomically selective fashion [J]. *J Neurochem*, 2015, 132(1): 146–154.
- [18] Fujikawa R, Higuchi S, Ikeda T, et al. Behavioral abnormalities and reduced norepinephrine in EP4 receptor-associated protein (EPRAP)-deficient mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(2): 584–588.
- [19] Pan Y, Cheng Q, Shan MS, et al. Association between polymorphism of the norepinephrine transporter gene rs2242446 and rs5669 loci and depression disorders [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 18837–18842.
- [20] Solich J, Kolasa M, Kusmider M, et al. Norepinephrine transporter knock-out alters expression of the genes connected with antidepressant drugs action [J]. *Brain Res*, 2015, 1594: 284–292.
- [21] Manoni G, Puzzo C, Gigantesco A, et al. Behavioral phenotype in heterozygous DAT rats: transgenerational transmission of maternal impact and the role of genetic asset [J]. *Brain Sci*, 2022, 12(4): 469.
- [22] Illiano P, Leo D, Gainetdinov RR, et al. Early adolescence prefrontal cortex alterations in female rats lacking dopamine transporter [J]. *Biomedicine*, 2021, 9(2): 157.
- [23] Sekiguchi H, Pavey G, Dean B. Altered levels of dopamine transporter in the frontal pole and the striatum in mood disorders: a postmortem study [J]. *J Affect Disord*, 2023, 320: 313–318.
- [24] Brigadski T, Lessmann V. The physiology of regulated BDNF release [J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 382: 15–45.
- [25] Chou D, Huang CC, Hsu KS. Brain-derived neurotrophic factor in the amygdala mediates susceptibility to fear conditioning [J]. *Exp Neurol*, 2014, 255: 19–29.
- [26] Chan SW, Harmer CJ, Norbury R, et al. Hippocampal volume in vulnerability and resilience to depression [J]. *J Affect Disord*, 2016, 189: 199–202.
- [27] Chauhan VS, Khan SA, Kulhari K. Correlation of brain-derived neurotrophic factor with severity of depression and treatment response [J]. *Med J Armed Forces India*, 2023, 79(4): 451–457.
- [28] Laudes T, Meis S, Munsch T, et al. Impaired transmission at corticothalamic excitatory inputs and intrathalamic GABAergic synapses in the ventrobasal thalamus of heterozygous BDNF knockout mice [J]. *Neuroscience*, 2012, 222: 215–227.
- [29] Schmidt M, Brandwein C, Luoni A, et al. *Morc1* knockout evokes a depression-like phenotype in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 296: 7–14.
- [30] Xiu J, Li J, Liu Z, et al. Elevated *BICD2* DNA methylation in blood of major depressive disorder patients and reduction of depressive-like behaviors in hippocampal *Bicd2*-knockdown mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(30): e2201967119.
- [31] Li W, Ali T, Zheng C, et al. Anti-depressive-like behaviors of APN KO mice involve *Trkb*/BDNF signaling related neuroinflammatory changes [J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(2): 1047–1058.
- [32] Casarotto PC, Giryh M, Fred SM, et al. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors [J]. *Cell*, 2021, 184(5): 1299–1313.
- [33] Kouba BR, Torrá ACN, Camargo A, et al. The antidepressant-like effect elicited by vitamin D₃ is associated with BDNF/TrkB-related synaptic protein synthesis [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 38(2): 601–611.
- [34] Party H, Dujarrier C, Hébert M, et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) deficiency predisposes to depression and resistance to treatments [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2019, 7(1): 153.
- [35] Wang T, Bai Y, Zheng X, et al. *Sapap4* deficiency leads to postsynaptic defects and abnormal behaviors relevant to hyperkinetic neuropsychiatric disorder in mice [J]. *Cereb Cortex*, 2023, 33(4): 1104–1118.
- [36] Hepp R, Hay YA, Aguado C, et al. Glutamate receptors of the delta family are widely expressed in the adult brain [J]. *Brain Struct Funct*, 2015, 220(5): 2797–2815.
- [37] Nakamoto C, Kawamura M, Nakatsukasa E, et al. *GluD1* knockout mice with a pure C57BL/6N background show impaired fear memory, social interaction, and enhanced depressive-like behavior [J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0229288.

- [38] Shin S, Gombiedza FC, Awuah Boadi E, et al. Reduction of TRPC1/TRPC3 mediated Ca^{2+} -signaling protects oxidative stress-induced COPD [J]. Cell Signal, 2023, 107: 110681.
- [39] Yerna X, Schakman O, Rathbi I, et al. Role of the TRPC1 channel in hippocampal long-term depression and in spatial memory extinction [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1712.
- [40] Krahe TE, Medina AE, Lantz CL, et al. Hyperactivity and depression-like traits in Bax KO mice [J]. Brain Res, 2015, 1625: 246–254.
- [41] He X, Song J, Gao H, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and glial cell-derived neurotrophic factor in patients with first-episode depression at different ages [J]. Int J Psychiatry Clin Pract, 2023, 27(2): 118–126.
- [42] Chen Y, Zhang Y, Wang J, et al. Anti-neuroinflammation effects of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation against depression-like behaviors via hypothalamic $\alpha 7\text{nAChR}/\text{JAK2}/\text{STAT3}/\text{NF-}\kappa\text{B}$ pathway in rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(9): 2634–2644.
- [43] Muellerleile J, Vnencak M, Ippolito A, et al. Neuroligin-3 regulates excitatory synaptic transmission and EPSP-spike coupling in the dentate gyrus *in vivo* [J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(2): 1098–1111.
- [44] Li ZQ, Yan ZY, Lan FJ, et al. Suppression of NLRP3 inflammasome attenuates stress-induced depression-like behavior in NLGN3-deficient mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(4): 933–940.
- [45] Lee S, Kang S, Ang MJ, et al. Deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c induces schizophrenia-like behavior in mice [J]. Genes Brain Behav, 2019, 18(4): e12540.
- [46] Miyata S, Kakizaki T, Fujihara K, et al. Global knockdown of glutamate decarboxylase 67 elicits emotional abnormality in mice [J]. Mol Brain, 2021, 14(1): 5.
- [47] Kosuke O, Keizo T, Aya W, et al. Comprehensive behavioral analysis of the Cdk15 knockout mice revealed significant enhancement in anxiety- and fear-related behaviors and impairment in both acquisition and long-term retention of spatial reference memory [J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0196587.
- [48] Jacobson L. Forebrain glucocorticoid receptor gene deletion attenuates behavioral changes and antidepressant responsiveness during chronic stress [J]. Brain Res, 2014, 1583: 109–121.
- [49] Tang C, Wang Q, Shen J, et al. Neuron stem cell NLRP6 sustains hippocampal neurogenesis to resist stress-induced depression [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(5): 2017–2038.
- [50] Stanton LM, Price AJ, Manning EE. Hypothalamic corticotrophin releasing hormone neurons in stress-induced psychopathology: Revaluation of synaptic contributions [J]. J Neuroendocrinol, 2023, 35(4): e13268.
- [51] Klenerova V, Kvetnansky R, Hynie S. The effect of acute and repeated stress on CRH-R1 and CRH-R2 mRNA expression in pituitaries of wild type and CRH knock-out mice [J]. Cell Mol Neurobiol, 2018, 38(1): 163–169.
- [52] Koutmani Y, Gampierakis IA, Polissidis A, et al. CRH promotes the neurogenic activity of neural stem cells in the adult hippocampus [J]. Cell Rep, 2019, 29(4): 932–945.
- [53] Gray JM, Vecchiarelli HA, Morena M, et al. Corticotropin-releasing hormone drives anandamide hydrolysis in the amygdala to promote anxiety [J]. J Neurosci, 2015, 35(9): 3879–3892.
- [54] Bian C, Huang Y, Zhu H, et al. Steroid receptor coactivator-1 knockdown decreases synaptic plasticity and impairs spatial memory in the hippocampus of mice [J]. Neuroscience, 2018, 377: 114–125.
- [55] Wu Q, Wang B, Ntim M, et al. SRC-1 deficiency increases susceptibility of mice to depressive-like behavior after exposure to CUMS [J]. Neurochem Res, 2021, 46(7): 1830–1843.
- [56] Rao RT, Androulakis I. The physiological significance of the circadian dynamics of the HPA axis: Interplay between circadian rhythms, allostasis and stress resilience [J]. Horm Behav, 2019, 110: 77–89.
- [57] Kinlein SA, Karatsoreos IN. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a substrate for stress resilience: interactions with the circadian clock [J]. Front Neuroendocrinol, 2020, 56: 100819.
- [58] Russell AL, Miller L, Yi H, et al. Knockout of the circadian gene, Per2, disrupts corticosterone secretion and results in depressive-like behaviors and deficits in startle responses [J]. BMC Neurosci, 2021, 22(1): 5.
- [59] Liu W, Huang Z, Xia J, et al. Gene expression profile associated with Asmt knockout-induced depression-like behaviors and exercise effects in mouse hypothalamus [J]. Biosci Rep, 2022, 42(7): BSR20220800.

[收稿日期] 2023-07-03

王搏,宋庆华,唐会猛,等. 博来霉素诱导的肺纤维化动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1617-1628.
Wang B, Song QH, Tang HM, et al. Progress in animal models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1617-1628.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.013

博来霉素诱导的肺纤维化动物模型研究进展

王搏¹, 宋庆华¹, 唐会猛¹, 刘杨¹, 谢洋^{1,2}, 田燕歌^{1*}

(1. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治部共建协同创新中心, 河南省中医药防治呼吸病重点实验室, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450046)

【摘要】 肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是一种进行性、间质纤维化性肺疾病,其特征是肺实质的持续瘢痕形成,患者生存质量降低、预后不良。PF 发病机制不明,缺乏有效治疗药物,动物模型是探讨疾病发病机制、寻求有效治疗药物的主要工具。多种因素可诱导纤维化形成,根据已知病因(如粉尘、辐射、细菌或病毒等)可不同程度诱导 PF 模型,其中,博来霉素(bleomycin, BLM)诱导的模型具有重复性强、纤维化病理与临床类似等优势而被广泛应用,其诱导方式主要有气管内滴注、气管内雾化、尾静脉注射、腹腔注射和经鼻吸入,根据诱导频次分为单次和多次诱导。本文基于相关文献,总结了 BLM 不同诱导频次、诱导方式建立的 PF 模型的特点,为其应用提供依据。

【关键词】 肺纤维化;动物模型;博来霉素;造模方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1617-12

Progress in animal models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis

WANG Bo¹, SONG Qinghua¹, TANG Huimeng¹, LIU Yang¹, XIE Yang^{1,2}, TIAN Yange^{1*}

(1. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-Constructed by Henan Province and Education Ministry of People's Republic of China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. the First Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

Corresponding author: TIAN Yange. E-mail: yange0910@126.com

【Abstract】 Pulmonary fibrosis (PF) is a progressive, interstitial fibrotic lung disease characterized by persistent scar formation in the lung parenchyma, and a reduced quality of life and poor prognosis for patients. The pathogenesis of PF is unknown and there is a lack of effective therapeutic agents; however, animal models are currently the main tool used to explore the pathogenesis of the disease and to find effective therapeutic agents. PF can be induced by various factors and to different degrees according to known etiologies. Among these, bleomycin-induced models are widely used because of their reproducibility and the similarity between the fibrosis pathology and clinical conditions. The main induction method include intratracheal drip, intratracheal nebulization, tail vein injection, intraperitoneal injection, and transnasal inhalation, and these can be classified into single and multiple doses, according to the frequency of induction. Based on the relevant literature, the current review summarizes the characteristics of the bleomycin-induced PF model using different induction frequencies and method, to provide a basis for the application of this model.

【Keywords】 pulmonary fibrosis; animal model; bleomycin; modeling method

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

【基金项目】 河南省科技研发计划联合基金项目(232301420020), 河南省自然科学基金资助项目(212300410056)。
Funded by Scientific and Technological Research and Development Plan of Henan Province (232301420020), National Natural Science Foundation of Henan (212300410056).
【作者简介】 王搏(1994—),男,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。Email:wb791857114@163.com
【通信作者】 田燕歌(1984—),女,博士,副教授,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。Email:yange0910@126.com

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是一种慢性、进行性、不可逆的间质性肺疾病,是多种类型弥漫性肺间质疾病 (diffuse interstitial lung disease, DILD) 的共同结局^[1-2]。PF 病因复杂,发病机制尚不明确,研究认为其与环境暴露、吸烟、感染、遗传易感性、衰老等因素有关^[3]。PF 目前缺乏有效的治疗药物,经美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的吡非尼酮、尼达尼布虽然能在一定程度上改善临床症状,减缓肺功能下降,但存在一定副作用及药物耐受性问题^[4-5],肺移植是 PF 唯一治愈方法,仅可作为少数患者的治疗选择^[6]。因此,加强对 PF 的机制研究和新药物研发是目前医学界迫切需要解决的问题。

动物模型是进行疾病基础研究的一个主要工具,稳定可靠、可重复、符合人类病理特征,动物模型是研究疾病发病机制及有效治疗的重要基础,虽然目前没有一种动物模型能概括人类 PF 的全部特征,但仍能部分再现 PF 的病理表现^[7],这对于评价药物疗效、探究药物作用机制具有重要意义。用于诱导 PF 的动物模型包括鼠、猫^[8]、狗^[9]、马^[10]、兔^[11]、羊^[12]等,其中,鼠类具有造模周期短、实验效率高、个体差异小、价格便宜、可重复性强等优点,是最常用的造模动物^[13],多种诱导因素均可引起肺纤维化的发生,如博来霉素 (bleomycin, BLM)、石棉^[14]、二氧化硅^[15]、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)^[16]、辐射^[17]、百草枯^[18]等,不同诱导方式各有优缺点,见表 1。其中,BLM 诱导的肺纤维化模型操作简单、可重复性强、与人类疾病的典型特征相似,是目前应用最广泛的 PF 模型^[19]。本文总结了常用的 BLM 诱导 PF 模型,并分析这些动物模型的应用及特点,为肺纤维化动物模型的应用提供参考。

1 博来霉素诱导肺纤维化的历史渊源

BLM 是一种氨基糖肽类抗生素,1966 年,日本学者首先从轮枝链霉菌的培养液中分离得到, FDA 于 1973 年批准了 BLM 的临床使用,具有良好的抗肿瘤活性,是一线抗肿瘤药物^[20-22]。然而,随着 BLM 使用的增加,不久后便发现由于肺部产生的博来霉素水解酶 (BLM 的主要灭活剂) 水平较低,易发生破坏性的毒副作用,造成肺纤维化或严重的间质性肺病^[23-24]。有赖于这种毒副作用,1974 年 Adamson 等^[25]首次采用腹腔多次注射 BLM (每只

0.5 mg),每周 2 次,连续 4 周,发现 BLM 可引起小鼠肺间质和肺泡持续性损伤,这种改变与人肺纤维化相似,从而为研究 PF 提供了一种合适的动物模型。1978 年 Snider 等^[26]通过一次性气管内滴注 BLM (0.5 U/100 g) 成功建立了仓鼠 PF 动物模型。自此,BLM 诱导的 PF 模型被广泛应用于肺纤维化的实验研究。

2 博来霉素诱导肺纤维化模型的现状

大量实验证实 BLM 单次或多次给药均可诱导 PF 模型,诱导方式有气管内滴注、气管内雾化、尾静脉注射、腹腔注射和经鼻吸入等多种途径。

2.1 BLM 单次给药

BLM 单次给药诱导 PF 模型在研究肺纤维化发病机制及筛选潜在抗 PF 有效药物方面具有重要作用^[27-28]。但有研究发现,在单剂量 BLM 诱导小鼠 PF 模型中,21 d 后在没有任何干预的情况下,肺纤维化会自发消退^[29-30]。

2.1.1 博来霉素单次气管内滴注法

一次性气管内滴注 BLM 是目前国内外最常用的 PF 造模方式,但这种方式也存在药物分布不均匀,进入各肺叶的 BLM 的剂量不同,形成的肺纤维化主要分布在肺门和支气管周围等特点^[31-32],常见的气管内滴注法包括气管暴露法和非气管暴露法。

气管暴露法是将动物麻醉后,仰卧位固定于实验台上,无菌条件下进行颈部正中切口,逐层分离软组织,使气管暴露,经气管软骨环间隙进针穿刺向气管内滴注 BLM 溶液,随后缝合切口、消毒。门翔等^[33]将 ICR 小鼠麻醉后暴露气管,将 BLM (2.5 mg/kg) 溶液经气管滴注入肺部制备 PF 模型,造模干预 28 d 后,小鼠肺功能显著降低,肺泡内出血,肺泡间隔出现大量成纤维细胞,炎症细胞浸润,肺泡壁明显增宽,肺泡间有大量胶原纤维沉积。周飘等^[34]通过气管暴露法向 SD 大鼠气管内一次性缓慢注入博来霉素 (5 mg/kg) 构建 PF 大鼠模型,造模 28 d 后,肺功能降低,肺泡间隔增厚,且在气管和支气管周围的肺组织有大量胶原沉积。气管暴露法可以保证 BLM 完全进入气管,提高了诱导 PF 的准确性,但因其使用外科手术操作导致造模 1 周内动物难以抬头进食,并且增大了动物感染死亡的风险。

非气管暴露法是在动物麻醉后,运用插管装置直接从口腔内经过声门进入气道,然后灌注博来霉素溶液。燕苗苗等^[35]采用一次性无创气管内滴注

表 1 各种肺纤维化模型的优点和局限性

Table 1 Advantages and limitations of various pulmonary fibrosis models

造模方式 Moulding methods	优点 Advantages	局限性 Limitations
博来霉素 Bleomycin	造模方式多样、费用低、易于操作,可重复性强,在阐明细胞和分子机制上具有重要作用,能复制出 IPF 典型的肺组织病变 Model has various methods, low cost, easy operation and strong repeatability, which plays an important role in elucidating the cellular and molecular mechanism, and can replicate the typical lung tissue lesions of IPF	缺乏一些 UIP 特征(进行性、不可逆性)、小鼠肺纤维化气管内给药模型中,28 d 后纤维化有一定自限性 Lacking some features of UIP (progressive and irreversible), Some self-limitation of fibrosis after 28 days in an endotracheal administration model of pulmonary fibrosis in mice
石棉 Asbestos	石棉特异性沉积可以诱导出氧化应激和肺泡上皮细胞损伤、能形成持续性的刺激 Asbestos specific deposition can induce oxidative stress and alveolar epithelial cell damage, which can form a persistent stimulation	纤维化常出现在肺中央而不是在胸膜下,纤维化在两肺叶间分布不均匀,且石棉可引起人罕见的间皮瘤 Areas of fibrosis are often central rather than subpleural, fibrosis is unevenly distributed between the lobes, and asbestos can cause mesothelioma, a rare disease in humans
二氧化硅 Silica	产生的纤维化结节类似于职业暴露于粉尘和微粒的肺纤维化患者。二氧化硅难以清除,可形成持久性刺激 Fibrotic nodules resemble pulmonary fibrosis patients with occupational exposure to dust and particulates. Silica is difficult to remove and forms a persistent irritation	缺乏许多间质性肺炎的特征,需要专门的设备来雾化二氧化硅颗粒,且有种属依赖性 Lacking many of the features of interstitial pneumonia. Specialized equipment is required to atomize silica particles and is species dependent
异硫氰酸荧光素 Fluorescein isothiocyanate	免疫荧光确定周围纤维化的沉积区域及肺损伤区域,不依赖于小鼠品系、纤维化持续时间长 Fluorescence identified areas of deposition of surrounding fibrosis and areas of lung injury, independent of mouse strain, and long duration of fibrosis	必须使用新鲜溶液,并在每次使用前进行超声处理,使纤维化的重复性和标准化难以统一、缺乏 UIP 的一些典型特征 Fresh solutions must be used and sonicated prior to each use, making the reproducibility and standardization of fibrosis difficult to unify and lacking some of the typical features of UIP
辐射 Radiation	作为放射性肺炎和纤维化模型的临床意义 Clinical significance as a model of radiation pneumonitis and fibrosis	模型建模周期长、辐射量难以把握、费用较昂贵、并且存在个体抗差异性 Modeling period is long, the amount of radiation is difficult to grasp, the cost is expensive, and there are individual differences in resistance
百草枯 Paraquat	可以诱导出肺泡损伤、氧化应激、内质网应激及细胞因子变化、比较符合百草枯致人肺纤维化病理特点 This model induced alveolar damage, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and changes in cytokines. It was consistent with the pathological characteristics of paraquat-induced pulmonary fibrosis	造模死亡率高,会引起肺、肝、肾、心脏和中枢神经系统等脏器损伤影响动物状态、缺乏一些 UIP 的典型病理改变 Mortality of UIP model is high, which can cause lung, liver, kidney, heart and central nervous system damage and affect the state of the animal, and lack some typical pathological changes of UIP
病毒载体或转基因动物 Viral vector or transgenic animal	允许有针对性地研究特定的纤维化相关基因、能模拟人类疾病的上皮细胞凋亡和介质变化的特点 Allows targeted studies of specific fibrosis-related genes. Characteristics of epithelial cell apoptosis and mediator changes that mimic human disease	免疫系统会识别并攻击这些载体,使模型转化不理想、具有种属依赖性、费用昂贵 Immune system recognizes and attacks these vectors, making model translation undesirable, species dependent, and expensive

BLM 法对 C57BL/6J 小鼠和 SD 大鼠进行诱导,通过肺功能、肺组织病理、肺组织中 HYP 含量等指标观察,证明一次性气管内滴注 BLM 21 d 均可诱导大、小鼠 PF 模型。Du 等^[36]采用一次性无创气管插管滴注 BLM(3 U/kg)建立 SD 大鼠 PF 模型,造模 28 d 后发现,肺组织有较强的实变、肺容量明显降低、肺泡结构紊乱肺间隔增厚、肺组织中胶原沉积及纤维化灶明显增加、肺组织内转化生长因子 $\beta 1$ (transform growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA) 等含量明显增加。非气管暴露法所需设备简单、可重复强,避免了外科手术带来的风险,但由于不能直接观察到 BLM 进入气管,难以保证 100%模型成功率。

2.1.2 博来霉素单次气管内雾化吸入法

气管内雾化吸入法是先将动物麻醉,然后在可视化喉镜操作下将雾化装置经口插入动物气管腔内,使药物在恒定速率下通过气管内雾化形式进入肺脏。王鹤等^[37]将 SD 大鼠采用单次气管内雾化 BLM(60 g/L,30 min)方式诱导 PF 模型,28 d 后,肺组织病理可见巨噬细胞、淋巴细胞等浸润,肺泡壁增厚及肺泡间隔增宽,在肺间质区域可见成纤维细胞聚集和胶原基质沉积增加,肺实质结构紊乱,肺组织中羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)含量显著升高,且与单次气管内滴注组相比动物死亡率更低,肺组织纤维化分布更加均匀弥散。陈广

瑞等^[38]将 SD 大鼠进行一次性气管内雾化吸入 BLM (5 mg/kg) 诱导 PF 模型,造模后第 21 天,可见肺泡扩张,肺泡壁增厚;肺泡结构紊乱、肺组织实质化、并伴有大量粒细胞浸润;肺泡腔内可见巨噬细胞浸润、胶原增殖显著,成纤维细胞灶分布均匀。Abidi 等^[39]首先将 Wistar 大鼠麻醉,然后将 1 个微型喷雾器连接到高压注射器在可视纤维喉镜下经口插入气管腔,使 BLM 溶液以大约 15 $\mu\text{L/s}$ 的速度雾化(颗粒大小:16 ~ 22 μm ;操作压力:3000 psi),结果显示在 BLM 诱导第 21 天后,可引起肺间质弥漫性纤维化,表现为肺组织内炎症指数增高、肺纤维化评分升高、肺泡壁明显增厚、肺泡结构紊乱、大量炎性细胞浸润和间质内胶原过度沉积。总之,气管内雾化吸入 BLM 诱导 PF 方式可以使药物在肺内均匀分布,使整个肺组织纤维化病灶更加均匀,有助于更好地表现肺纤维化过程,但其需要专业的气管内雾化设备,造模耗时过长,对于样本量大的实验具有较大挑战性,且雾化过程中药物损耗较大,难以保证真正进入体内的量,造成动物间差异较大,可重复性差。

2.1.3 博来霉素单次尾静脉注射法

BLM 尾静脉给药诱导 PF 动物模型是模拟人体应用药物的方式,其病灶主要位于胸膜下和血管周围,与人 PF 的病理学改变相似。杨聪颖等^[40]将 ICR 小鼠经尾静脉一次性注射 200、150、100 mg/kg BLM 建立小鼠 PF 模型,在造模第 14 天后,各剂量组均可见胸膜下及肺血管周围不同程度的炎性改变,肺泡腔及肺间质内可见炎症细胞浸润,部分肺泡腔破坏或消失,肺泡间隔明显增厚,肺组织结构紊乱;在造模后第 14 ~ 21 天各组肺炎及肺纤维化程度均显著升高,肺间质内大量炎性细胞浸润,肺实质呈大片融合实变,并最终形成广泛稳定的纤维化,免疫组化结果显示肺组织Ⅲ型胶原面积明显升高,其中以尾静脉一次性注射 BLM 200 mg/kg 后第 21 天诱导建立的 PF 模型成模最好,与人类肺纤维化的病理分布较为接近。涂常力等^[41]将 BLM (200 mg/kg) 经尾静脉一次性注入 C57BL/6 小鼠体内,在造模后第 4 周,肺 CT 可见周围肺野及肺底网格状阴影,不均匀的斑片状阴影,粗网状不透光影,6 周时肺内病变范围有所减少;肺组织病理显示胸膜下、血管周围、肺泡内和肺泡间隔内不同程度炎性细胞浸润,部分肺泡腔被破坏或结构消失;肺泡间隔不同程度的胶原蛋白沉积,病变区域与正常肺

组织的混杂分布(空间异质性);肺组织中 I 型胶原蛋白(collagen-I, COL-I)、TGF- β 1、 α -SMA 及 HYP 蛋白水平平均上调。综上所述,单次尾静脉注射 BLM 诱导 PF 模型方式具备操作简便、有效安全方便、与人类肺纤维化的病理接近等优势,但易造成尾部肿胀坏死和胃肠道反应。

2.1.4 博来霉素单次经鼻吸入法

单次经鼻吸入 BLM 诱导 PF 模型是目前国内常用的造模方式^[42-44],经鼻吸入法是先将动物麻醉,然后用微量移液器吸取适量 BLM 溶液,将药物经鼻腔缓慢滴入动物气管内,滴入后悬垂旋转。徐钰等^[45]将雄性 ICR 小鼠经鼻滴入 BLM (4 mg/kg) 诱导 PF 模型,肺病理组织切片显示,在 BLM 刺激后第 7 天,肺泡内大量炎性细胞浸润,无明显的肺纤维化表现;在 BLM 刺激后第 14 天,肺组织可见局灶性纤维组织形成;在 BLM 刺激后第 28 天,肺组织可见广泛纤维化,小鼠肺系数、羟脯氨酸含量、肺炎及肺间质纤维化评分均显著升高。杨兴娜等^[46]研究发现,SD 大鼠经鼻滴入博来霉素(7 mg/kg)可成功建立 PF 模型,在经鼻滴入 BLM 刺激后第 28 天,肺组织病理显示,肺泡间隔及肺泡内明显炎性反应,局部可见陈旧性出血灶,肺泡腔有大量巨噬细胞浸润,大量胶原纤维沉积,纤维细胞增生明显,肺纤维化及肺炎分级明显升高,血清中 MDA 水平明显升高。张秀等^[47]将 Wistar 大鼠经鼻一次性滴入 BLM (7 mg/kg) 成功制备肺纤维化动物模型,造模后第 28 天,肺组织病理显示肺组织结构严重破坏,细支气管壁上皮细胞水肿、坏死、脱落,管壁纤维化,肺泡腔内见大量炎性细胞浸润,局部Ⅱ型肺泡上皮细胞增生,肺间质纤维组织广泛增生,纤维化区可见大量增生的纤维细胞和胶原纤维沉积,甚至蜂窝样改变;肺组织中 α -SMA、HYP 及转化生长因子 β Ⅱ型受体含量均显著升高。经鼻吸入诱导 PF 模型具备操作简便、快速、对动物伤害小等优点,但可重复性及造模准确性不高,易造成动物窒息。上述单次诱导模型制作方法和主要指标变化见表 2。

2.2 BLM 多次给药

PF 主要是反复肺泡结构破坏,细胞外基质大量沉积、炎症细胞的浸润以及肺组织异常重构伴蜂窝肺的形成^[48-49],为模拟肺泡结构反复破坏的过程,建立更加稳定可靠、病症相似性高的肺纤维化模型,部分研究采用 BLM 多次给药造模方式。

表 2 单次博来霉素诱导的肺部病理和重要指标变化

Table 2 Single bleomycin-induced changes in pulmonary pathology and important indicators

方法 Methods	物种 Species	博来霉素 浓度(剂量) Concentration of bleomycin (dose)	肺病理表现 Lung histopathology	主要指标变化 Changes in main indicators	文献 Literatures
气管内滴注 Tracheal perfusion	ICR 小鼠 ICR mice	2.5 mg/kg (0.1 mL)	造模后第 28 天肺泡内出血,肺泡间隔出现大量纤维细胞,炎症细胞浸润;肺泡壁明显增宽,肺泡间有大量胶原纤维沉积 On the 28th day after modeling, alveolar hemorrhage, a large number of fibrocytes and inflammatory cell infiltration appeared in the alveolar septum. The alveolar wall was significantly widened and there was a large amount of collagen fiber deposition between the alveoli	FVC ↓、 FEV0.1 ↓、 TNF-α ↑、 IL-6 ↑、 IL-8 ↑、 HYP ↑、 TGF-β1 ↑	[33]
	SD 大鼠 SD rat	5 mg/kg	造模后第 28 天肺泡间隔增厚,且在气管和支气管周围的肺组织有大量胶原沉积 On the 28th day after modeling, the alveolar septum was thickened, and a large amount of collagen was deposited in the lung tissue around the trachea and bronchus	Cydn ↓、 COL1A1 mRNA ↑、 RL ↑、Re ↑	[34]
	C57BL/6J 小鼠 C57BL/6J mice	5 mg/kg	造模后第 21 天肺组织结构破坏、肺泡壁明显增厚,全肺产生炎症浸润;肺组织明显纤维条索形成及胶原沉积 On the 21st day after modeling, the lung tissue structure was destroyed, the alveolar wall was significantly thickened, and the whole lung was inflammatory infiltration. The lung tissue showed obvious fibrous cord formation and collagen deposition	HYP ↑;TV ↓、 MV ↓	[35]
	SD 大鼠 SD rat	3 U/kg	造模后第 28 天,模型组大肺组织均有较强的实变、肺容量明显降低、肺泡结构紊乱肺间隔增厚、肺组织中胶原沉积及纤维化灶明显增加 On the 28th day after modeling, the large lung tissue of the model group had strong consolidation, significantly reduced lung volume, disordered alveolar structure, thickened lung septum, and significantly increased collagen deposition and fibrosis foci in lung tissue	TGF-β1 ↑、 α-SMA ↑、 TNF-α ↑、 IL-1β ↑、 IL-6 ↑	[36]
	SD 大鼠 SD rat	60 g/L (30 min)	造模后第 28 天,肺组织病理可见巨噬细胞、淋巴细胞等浸润,肺泡壁增厚及肺泡间隔增宽,在肺间质区域可见成纤维细胞聚集和胶原基质沉积增加,肺实质结构紊乱 After 28 days of modeling, the lung tissue displayed pathological changes characterized by infiltration of macrophages and lymphocytes, thickening of the alveolar walls and widening of the alveolar septa, aggregation of fibroblasts, increased deposition of collagen matrix in the interstitial area of the lung, and structural disorder in the interstitial area of the lung parenchyma	HYP ↑、 PAI-1 ↑	[37]
气管内雾化 Aerosol inhalation	SD 大鼠 SD rat	5 mg/kg (15 s)	造模后第 21 天,肺泡结构改变,肺组织实质化,并伴有多量粒细胞浸润、肺泡腔内可见巨噬细胞浸润、肺组织损伤明显,胶原增殖显著 On the 21st day after modeling, alveolar structure changed, lung tissue was parenchymal, accompanied by a large number of granulocyte infiltration, macrophage infiltration in alveolar space, obvious lung tissue injury, and significantly increased collagen	HYP ↑、 TGF-β1 ↑	[38]
	Wistar 大鼠 Wister rat	2 mg/kg	造模后第 21 天肺组织内炎症指数增高、肺纤维化评分升高,肺泡壁明显增厚、肺泡结构紊乱、大量炎性细胞浸润和间质内胶原过度沉积 On the 21st day after modeling, the inflammatory index and pulmonary fibrosis score in lung tissue were increased, the alveolar wall was significantly thickened, the alveolar structure was disordered, a large number of inflammatory cell infiltration and excessive deposition of collagen in the interstitium were found	TGF-β ↑、 MDA ↑、 Catalase ↓、 SOD ↓	[39]

续表 2

方法 Methods	物种 Species	博来霉素 浓度(剂量) Concentration of bleomycin (dose)	肺病理表现 Lung histopathology	主要指标变化 Changes in main indicators	文献 Literatures
尾静脉注射 Tail vein injection	ICR 小鼠 ICR mice	200、150、 100 mg/kg	造模后第 21 天,肺实质呈大片融合实变,其间有大量的炎症细胞浸润,并最终形成广泛稳定的纤维化 After 21 days of modeling, the lung parenchyma exhibited a significant area of fusion and consolidation, accompanied by a substantial infiltration of inflammatory cells, ultimately resulting in extensive and stable fibrosis	COL-Ⅲ ↑	[40]
	C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	200 mg/kg	造模后 2 周,肺组织出现大量炎症细胞浸润;4 周可见广泛纤维化病变,部分可见小灶分布的成纤维细胞灶;6 周时肺纤维化病变较前减轻 At 2 weeks after modeling, a large number of inflammatory cells infiltrated in the lung tissue. At 4 weeks, extensive fibrosis and small foci of fibroblasts were observed. At 6 weeks, pulmonary fibrosis was alleviated	COL-Ⅰ ↑、 TGF-β1 ↑、 α-SMA ↑	[41]
	ICR 小鼠 ICR mice	4 mg/kg	造模第 7 天后,肺泡内大量炎性细胞浸润,无明显的肺纤维化表现;造模 14 天后,肺组织可见局灶性纤维组织形成;造模 28 天后,肺组织可见广泛纤维化,肺泡炎及肺间质纤维化评分均显著升高 After 7 days of modeling, a large number of inflammatory cells infiltrated in the alveoli, and there was no obvious pulmonary fibrosis. After 14 days of modeling, focal fibrous tissue formation was observed in lung tissue. After 28 days of modeling, extensive fibrosis was observed in lung tissue, and the scores of alveolitis and pulmonary interstitial fibrosis were significantly increased	HYP ↑	[45]
经鼻吸入 Intranasal drip	SD 大鼠 SD rat	7 mg/kg	造模后第 28 天,肺泡间隔及肺泡内明显炎性反应,局部可见陈旧性出血灶,肺泡腔大量巨噬细胞浸润,大量胶原纤维沉积,纤维细胞增生明显,肺纤维化及肺泡炎分级明显升高 On the 28th day after modeling, there were obvious inflammatory reactions in alveolar septum and alveoli, local old hemorrhage foci, a large number of macrophages infiltration in alveolar cavity, a large number of collagen fibers deposition, and obvious fibroblast proliferation, and the grade of pulmonary fibrosis and alveolitis was significantly increased	MDA ↑	[46]
	Wistar 大鼠 Wister rat	7 mg/kg	造模第 28 天后,肺组织结构严重破坏,细支气管壁上皮细胞水肿、坏死、脱落,管壁纤维化,肺泡腔内见大量炎性细胞浸润,局部Ⅱ型肺泡上皮细胞增生,肺间质纤维组织广泛增生,纤维化区可见大量增生的纤维细胞和胶原纤维沉积,甚至蜂窝样改变 After 28 days of modeling, the structure of lung tissue was severely damaged, with edema, necrosis, and shedding of bronchiolar epithelial cells, fibrosis of the wall, a large number of inflammatory cells infiltration in the alveolar cavity, local proliferation of type Ⅱ alveolar epithelial cells, extensive proliferation of pulmonary interstitial fibrous tissue, and a large number of proliferative fibroblasts and collagen fibers deposition in the fibrotic area, even honeycomb-like changes	α-SMA ↑、 HYP ↑、 Smad4 ↑、 TGF-βRⅡ ↑、 Smad2 ↑、 p-Smad2 ↑、 Smad7 ↓	[47]

2. 2. 1 博来霉素多次气管内滴注法

陈孟毅等^[50]将 C57BL/6J 小鼠无创气管内滴注 BLM(0.4 mg/mL,每只 100 μL),2 周诱导 1 次,共 8 次,给药后 0.5、1、2、4 个月时肺组织肺泡腔胞浆渗出逐渐减少,血管周围炎细胞浸润,肺泡间隔增宽,其中以 BLM 诱导 0.5 个月时程度最明显。同

时,胶原纤维在 0.5 个月时出现,且在继续给药 1、2、4 个月时胶原纤维持续存在;在给药 4 个月时肺组织胶原纤维和衰老细胞 β-半乳糖苷酶明显增加。Redente 等^[51]将 C57BL/6J 小鼠通过无创气管内重复滴注 BLM 制备 PF 模型,经过 3 次双周 BLM (1 U/kg) 诱导后,在 6 ~ 24 周表现出持续性和进

行性肺纤维化,肺组织病理显示胶原沉积增加、成纤维细胞积聚、纤维化区域内 I 型和 II 型肺泡上皮细胞丢失、club 细胞分泌蛋白 (club cell secretory protein, CCSP) 使细支气管肺实质化、肺组织蜂窝样改变,以及增生性 KRT8 上皮细胞的过度积累,显微计算机断层扫描成像显示明显的牵引性支气管扩张和胸膜下纤维化。上述研究表明,多次气管内滴注 BLM 诱导 PF 方式能更充分再现 PF 患者的肺上皮重塑,模拟持续性和进行性肺纤维化,但存在动物死亡率高、造模时间耗时过长、经济代价高等缺点。

2.2.2 博来霉素多次气管内雾化吸入法

多次气管内雾化吸入 BLM 是近年来探究 PF 发病机制及筛选有效防治药物开展的一种造模方式。王鹤等^[37]将 SD 大鼠以多次雾化吸入 BLM (60 g/L) 30 min,连续雾化 3 d,诱导 PF 模型,造模 28 d 后,肺组织病理显示肺间隔中、重度增厚、肺间质慢性活动性炎症、间质可见成团的纤维组织增生、甚至肺泡结构消失,形成连续的纤维化;大鼠肺组织中 HYP 及 PAI-1 含量均显著升高。多次雾化吸入 BLM 制备的 PF 模型,其肺病理损伤和生理指标相对稳定,符合肺纤维化的演变过程,是一种有效的 PF 模型制备手段,但由于这种造模方式运用较少,需进一步扩大样本量以明确具体的造模效果。

2.2.3 博来霉素多次腹腔内注射法

腹腔注射 BLM 诱导 PF 模型方式通常需要多次注射,其纤维化病灶主要位于胸膜下和血管周围,与人 PF 病理改变相似^[52-53],是近年来比较常用的造模方式。苏敏红等^[54]将 C57BL/6 小鼠分别通过每周 1 次和 2 次腹腔注射 BLM (35 mg/kg),共 8 次,诱导 PF 模型,两组在第 8 次腹腔注射后 2、4、6、8、10 周均出现不同程度的肺泡炎、肺纤维化;免疫组织化学显示 COL- I 主要沉积在胸膜下、血管周围肺间质和肺泡间隔;造模 2 周后肺组织中 COL- I、 α -SMA、TGF- β 1 及 HYP 含量均显著增高,并持续至第 10 周,其中每周 2 次腹腔注射 BLM 诱导 PF 模型稳定性更好。Liu 等^[55]将 C57BL/6 小鼠分别于第 1、5、8、11、15 天腹腔注射 BLM (5 mg/mL,每只 100 μ L) 建立 PF 模型,在造模后第 28 天,肺病理组织显示弥漫性肺泡损伤、肺泡间隔水肿、明显纤维化伴有肺组织结构破坏和广泛胶原沉积,肺组织中 TGF- β 1、COL- I 及 α -SMA 含量均显著升

高。程雪等^[56]将 C57BL/6 小鼠腹腔注射 BLM (7.5 mg/(kg·d)),连续 10 d,制备 PF 模型,造模后第 28 天,肺组织病理显示肺泡间隔明显增厚,肺泡间隔和肺泡腔有大量炎症细胞浸润及大量胶原纤维渗出,肺泡炎及肺纤维化评分显著升高;血清中 TGF- β 1、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 及肺组织中 α -SMA、COL- I、III 型胶原蛋白 (collagen-III, COL-III) 的含量均明显升高。结合以上结果,多次腹腔内注射 BLM 方式诱导 PF 模型具备操作简单、病灶分布较均匀,与临床 PF 患者病理分布相似等优点,但由于腹腔注射 BLM 给药剂量和频率多样,模型稳定性各异,且所需药量较大,易导致腹腔内其他器官损伤和胃肠道反应,影响广泛应用。

2.2.4 博来霉素多次尾静脉注射法

近年来小剂量多次尾静脉注射 BLM 诱导 PF 模型被用来探索纤维化发病机制的研究屡见报道^[41,57]。孟婕等^[58]通过小剂量多次尾静脉注射 BLM 方式诱导 PF 模型,实验中将 ICR 小鼠放入固定器内固定,露出尾巴,用 75% 乙醇消毒,显露尾静脉,1 mL 注射器按 10 mg/kg 给予 BLM 注射,持续 14 d,造模第 28 天后,肺组织病理显示肺组织大片融合实变,肺泡及肺间隔内可见巨噬细胞和淋巴细胞渗出,成纤维细胞增生,肺泡结构紊乱;肺泡间隔及肺间质大量胶原纤维沉积,纤维化病灶主要聚集在胸膜下并均匀分布于肺间质;肺组织中 HYP 含量及肺间质损伤指数均显著升高。Gul 等^[59]将 C57BL/6 小鼠分为低剂量、高剂量组,分别以 10 mg/kg 和 20 mg/kg 尾静脉注射 BLM,连续 7 d,制备 PF 模型。造模第 28 天后,小鼠肺功能明显下降;PET/CT 显像及分析显示肺纤维化实变、非通气肺面积及高密度肺面积均明显增加;肺泡灌洗液和血清中 TGF- β 1、TNF- α 、IL-6、GM-CSF 及肺组织中 HYP、PAI-1 含量均显著性升高;肺病理显示肺泡结构破坏、纤维化面积及胶原沉积明显增加,肺纤维化的发生集中于胸膜下,均匀分布于肺间质;透射电镜超微结构图象可见 I 型肺泡上皮细胞变性、崩解、脱落,内皮细胞肿胀,II 型肺泡上皮细胞增生,粗面内质网扩张,胶原纤维在间质内大量堆积。综上所述,小剂量多次尾静脉注射 BLM 诱导 PF 模型接近人类 PF 疾病特征,但易造成动物尾部肿胀、溃烂坏死和胃肠道反应。上述多次诱导模型制作方法和主要指标变化见表 3。

表 3 多次博来霉素诱导的肺部病理和重要指标变化

Table 3 Multiple bleomycin-induced changes in pulmonary pathology and important indicators

方法 Methods	物种 Species	博来霉素浓度 (剂量) Concentration of bleomycin (dose)	肺病理表现 Lung histopathology	主要指标变化 Changes in main indicators	文献 Literatures
气管内滴注 Tracheal perfusion	C57BL/6J 小鼠	0.4 mg/mL (每 只 100 μ L), 2 周给药 1 次, 共 8 次	造模后 0.5、1、2、4 个月时肺组织肺泡腔胞浆渗出逐渐减少, 血管周围炎细胞浸润, 肺泡间隔增宽, 其中以 BLM 诱导 0.5 个月时程度最明显。肺组织中胶原纤维增加	SA- β -Gal $\uparrow$	[50]
	C57BL/6J mice	0.4 mg/mL (100 μ L per mouse), once every 2 weeks, a total of 8 times	At 0.5, 1, 2 and 4 months after modeling, the alveolar cytoplasmic exudation gradually decreased, perivascular inflammatory cells infiltrated, and alveolar septum widened, which was the most obvious at 0.5 months after BLM induction. Collagen fibers were increased in lung tissue		
气管内雾化 Aerosol inhalation	C57BL/6J 小鼠	1 U/kg, 2 周给 药 1 次, 共 3 次	造模后 6 ~ 24 周之间表现出持续性和进行性肺纤维化, 肺组织病理显示胶原沉积增加、成纤维细胞积聚、纤维化区域内 I 型和 II 型肺泡上皮细胞丢失、肺实质内 CCSP 细胞的细支气管化、肺组织蜂窝样改变	α -SMA $\uparrow$ 、 HYP $\uparrow$ 、 TGF- β $\uparrow$ 、 Fibroblasts $\uparrow$	[51]
	C57BL/6J mice	1 U/kg, once every 2 weeks, a total of 3 times	Persistent and progressive pulmonary fibrosis was observed between 6 and 24 weeks after modeling. Lung histopathology showed increased collagen deposition, accumulation of fibroblasts, loss of type I and type II alveolar epithelial cells in the fibrotic area, bronchiolization of CCSP cells in lung parenchyma and honeycomb-like changes in lung tissue.		
气管内雾化 Aerosol inhalation	SD 大鼠	60 g/L, 30 min, 雾化 3 d	造模第 28 天后, 肺组织病理显示肺间隔中、重度增厚、肺间质慢性活动性炎症、间质可见成团的纤维组织增生、甚至肺泡结构消失, 形成连续的纤维化	HYP $\uparrow$ 、 PAI-1 $\uparrow$	[37]
	SD rat	60 g/L, 30 min, continuous aerosol inhalation for 3 d	On the 28th day after modeling, lung tissue pathology showed moderate to severe thickening of the pulmonary septum, chronic active inflammation in the pulmonary interstitium, mass fibrous tissue proliferation in the interstitium, and even disappearance of alveolar structure, forming continuous fibrosis		
腹腔内注射 Intraperitoneal injection	C75BL/6 小鼠	35 mg/kg, 2 次/ 周, 共注射 8 次	在造模后 2 ~ 10 周, 肺组织血管周围、肺泡腔内、肺泡间隔、胸膜下均有不同程度的炎性细胞浸润, 以淋巴细胞为主, 肺泡间隔增厚, 肺泡腔内有大量胶原纤维渗出, 肺泡腔扩大, 肺泡壁变薄, 肺泡结构被破坏消失; 肺泡间隔大量胶原蛋白沉积	COL- I $\uparrow$ 、 α -SMA $\uparrow$ 、 HYP $\uparrow$ 、 TGF- β 1 $\uparrow$	[54]
	C57BL/6 mice	35 mg/kg, twice a week, with a total of 8 injections	From 2 to 10 weeks after modeling, there were varying degrees of inflammatory cell infiltration around blood vessels, alveolar cavity, alveolar septum and subpleura in lung tissue, mainly lymphocytes, thickened alveolar septum, a large number of collagen fibers exudate in alveolar cavity, alveolar cavity expanded, alveolar wall became thinner, alveolar structure was destroyed and disappeared. A large amount of collagen was deposited in the alveolar septum		
腹腔内注射 Intraperitoneal injection	C75BL/6 小鼠	5 mg/mL (100 μ L), 第 1、5、8、 11、15 天腹腔 注射	在 BLM 给药后第 28 天, 肺组织弥漫性肺泡损伤、肺泡间隔水肿、明显纤维化伴有肺组织结构破坏和广泛胶原沉积	COL- I $\uparrow$ 、 α -SMA $\uparrow$ 、 TGF- β 1 $\uparrow$ 、 p-Smad2 $\uparrow$ 、 p-Smad3 $\uparrow$ 、 E-cadherin $\downarrow$	[55]
	C57BL/6 mice	5 mg/mL (100 μ L), intraperitoneal injection on the 1st, 5th, 8th, 11th and 15th day	On the 28th day after BLM administration, diffuse alveolar injury, edema of alveolar septa, obvious fibrosis accompanied by structural destruction of lung tissue and extensive collagen deposition occurred in lung tissue		
	C75BL/6 小鼠	7.5 mg/(kg $\cdot$ d), 连续 10 d	造模后第 28 天, 模型组肺泡间隔明显增厚, 肺泡间隔和肺泡腔有大量炎症细胞浸润及大量胶原纤维渗出, 肺炎炎及肺纤维化评分显著升高	COL- I $\uparrow$ 、 α -SMA $\uparrow$ 、 COL- III $\uparrow$ 、 TGF- β 1 $\uparrow$ 、 TNF- α $\uparrow$	[56]
	C57BL/6 mice	7.5mg/(kg $\cdot$ d) for 10 days	On the 28th day after modeling, the alveolar septum of the model group was significantly thickened, with a large number of inflammatory cells infiltration and collagen fiber exudation in the alveolar septum and alveolar cavity, and the scores of alveolitis and pulmonary fibrosis were significantly increased		

续表 3

方法 Methods	物种 Species	博来霉素浓度 (剂量) Concentration of bleomycin (dose)	肺病理表现 Lung histopathology	主要指标变化 Changes in main indicators	文献 Literatures
尾静脉注射 Tail vein Injection	ICR 小鼠 ICR mice	10 mg/kg, 每天 1 次,持续 14 d 10 mg/kg once a day for 14 days	在 BLM 给药后第 28 天后,肺组织病理显示肺组织大片融合实变,肺泡及肺间隔内可见巨噬细胞和淋巴细胞渗出,成纤维细胞增生,肺泡结构紊乱,Masson 染色可见肺泡间隔及肺间质大量胶原纤维沉积 After 28th days of BLM administration, pathological examination of lung tissue revealed extensive fusion and consolidation, exudation of macrophages and lymphocytes, hyperplasia of fibroblasts, as well as disorder in alveolar septum and interstitial lung structure. Masson staining demonstrated significant deposition of collagen fibers in the alveolar septum and interstitial lung.	HYP ↑	[58]
	C75BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	10 mg/kg 20 mg/kg, 每天 1 次连续 7 d 10 mg/kg 20 mg/kg, once a day for 7 days	造模第 28 天后,肺病理显示肺泡结构破坏、纤维化面积及胶原沉积明显增加,肺纤维化的发生集中于胸膜下,均匀分布于肺间质 After 28th days of modeling, the pathological film of lung tissue showed that the destruction of alveolar structure, fibrosis area and collagen deposition increased significantly. The occurrence of pulmonary fibrosis was concentrated in the subpleura and evenly distributed in the lung interstitium	TGF-β1 ↑、 TNF-α ↑、 IL-6 ↑、 HYP ↑、 PAI-1 ↑	[59]

表 4 博来霉素不同给药方式的优点和局限性
Table 4 Advantages and limitations of different delivery methods of bleomycin

给药方式 Drug-delivery way	优点 Advantages	局限性 Limitations
气管内滴注 Tracheal perfusion	造模时间短、费用较低、可重复性高、成模周期短、仪器工具简单易得,能复制出 IPF 典型的肺组织病变 Short modeling time, low cost, high repeatability, short modeling cycle, and easy access to instruments and tools. It can replicate the typical lung tissue lesions of IPF	对操作者技术要求较高,肺纤维化集中在肺门和支气管周围,并且病变在不同肺叶分布不均匀,单次给药存在肺纤维化的自限性 High technical requirements for operators. Pulmonary fibrosis is concentrated around the hilum and bronchus, and the lesions are unevenly distributed in different lung lobes. There was self-limitation of pulmonary fibrosis with a single dose
气管内雾化 Aerosol inhalation	药物在体内均匀分布,使整个肺组织均匀肺纤维化 Drug is evenly distributed in the body and the whole lung tissue is evenly fibrosed	需要专业的动物用气管内雾化设备,造价昂贵,造模耗时过长,不适用于需要样本量大的实验 Professional equipment for animal endotracheal atomization is required. Expensive, long time, not suitable for experiments requiring large sample sizes
尾静脉注射 Tail vein injection	实验条件易于控制,重复性好,病理及相关细胞因子改变与临床 IPF 相似 Experimental conditions were easy to control and reproducible. The pathological changes and related cytokines were similar to those in clinical IPF	操作难度较大,易造成尾部肿胀坏死和胃肠道反应,影响动物生存状态,且成模效果存在较大差异 This method is difficult to operate, easy to cause tail swelling and necrosis and gastrointestinal reaction, affecting the survival state of animals, and there are great differences in the modeling effect
经鼻吸入 Inhaled by nose	操作简便、快速,动物损伤小 Easy and fast operation, little animal damage	可操作性、可重复性及造模准确性不高,易造成动物窒息 Low operability, reproducibility and accuracy of mold making, easily causing animal suffocation
腹腔注射 Intraperitoneal injection	可减轻因手术操作差异而引起的纤维化程度,操作简单、病灶分布较匀,纤维化区主要集中在胸膜下,与临床 IPF 病理分布相似 Can reduce the degree of fibrosis caused by differences in surgical procedures. Operation is simple, the distribution of lesions is uniform, and the fibrotic area is mainly concentrated in the subpleura, which is similar to the pathological distribution of clinical IPF	需多次给药,所需药量较大,易导致腹腔内其他器官损伤和胃肠道反应 Multiple administrations are required, requiring larger amounts of drugs, causes damage to other organs in the abdominal cavity and gastrointestinal reactions

3 结语与展望

PF 是一种病因不明的致命性疾病,可靠的肺纤维化动物模型在探索其发病机制、探寻有效治疗药物中具有重要作用。通过总结近 20 年相关文献发现:(1)BLM 为 PF 模型建立的常用诱导剂。(2)在动物选择方面,以鼠尤为广泛,包括 Wistar 大鼠、SD 大鼠、BALA/C 小鼠、C57BL/6 小鼠、KM 小鼠和 ICR 小鼠等。其中,C57BL/6 小鼠和 Wistar 大鼠更容易复制出 PF 模型^[60-61]。(3)在诱导方式上有气管内滴注、气管内雾化、尾静脉注射、腹腔注射和经鼻吸入,以气管内滴注尤为常见。不同诱导方式各有特点(见表 4)。(4)在诱导频次上,有单次和多次,多次诱导有连续给药、每周 2 次给药及其他间断给药等。BLM 单次给药诱导 PF 模型应用较为广泛,因其操作简便、成模较快,病理表现典型,在阐明 PF 机制研究上具有重要作用^[62],但并不能模拟出人 PF 进行性、不可逆性等重要特征^[53]。BLM 多次给药方式能复制出人 PF 进程中慢性、进行性的肺损伤和明显的肺泡上皮细胞增生,且产生的炎性反应较弱,可造成更持久的纤维化^[63],这对于研究上皮间质转化、肺重塑与修复具有重要意义,但该方式经济成本高、造模时间久、对动物创伤较大。

目前的模型研究仍具有一些局限性,如:BLM 来源不一、实验条件不同、观察时间不统一、缺乏高质量的模型依据、部分研究存在盲目仿制等。因此,未来研究中应注意:(1)在模型的建立上,明确 BLM 的来源、动物的种属以及模型稳定性的探索,建立稳定、可重复性强、更为符合人类疾病进程及病理特征的肺纤维化动物模型。(2)在研究中应合理选择模型:对于疾病机制研究可不局限于某种特定模型,对于药效评价及作用机制研究需根据药物的疗程,疗程短的可以选取单次诱导模型,对于治疗周期长或需要评价远后效应的研究需选取模型持续时间长的诱导方式。

参 考 文 献(References)

[1] Kolahian S, Fernandez IE, Eickelberg O, et al. Immune mechanisms in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(3): 309-322.

[2] Yu Q, Tang X. Irreversibility of pulmonary fibrosis [J]. *Aging Dis*, 2022, 13: 73-86.

[3] Renzoni Elisabetta A, Venerino P, Mackintosh John A. Disease pathology in fibrotic interstitial lung disease: is it all about usual interstitial pneumonia? [J]. *Lancet Lond Engl*, 2021, 398(10309): 1437-1449.

[4] Bando M, Yamauchi H, Ogura T, et al. Clinical experience of the long-term use of pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Intern Med*, 2016, 55(5): 443-448.

[5] Galli JA, Pandya A, Vega-Olivo M, et al. Pirfenidone and nintedanib for pulmonary fibrosis in clinical practice: Tolerability and adverse drug reactions [J]. *Respirology*, 2017, 22(6): 1171-1178.

[6] Kapnadak SG, Raghu G. Lung transplantation for interstitial lung disease [J]. *Eur Respir Rev*, 2021, 30(161): 210017.

[7] Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(2): L152-L160.

[8] Cohn LA, Norris CR, Hawkins EC, et al. Identification and characterization of an idiopathic pulmonary fibrosis-like condition in cats [J]. *J Vet Intern Med*, 2004, 18(5): 632-641.

[9] 王健. 平阳霉素致犬肺纤维化的影像学基础研究 [D]. 西安: 第四军医大学; 1998.

Wang J. Basic imaging study on pulmonary fibrosis induced by Pingyangmycin in dogs [D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University; 1998.

[10] Williams KJ, Maes R, Del Piero F, et al. Equine multinodular pulmonary fibrosis: a newly recognized herpesvirus-associated fibrotic lung disease [J]. *Vet Pathol*, 2007, 44(6): 849-862.

[11] 郑向鹏, 滑炎卿, 张国桢, 等. III 型胶原纤维在实验性特发性肺纤维化早期的动态研究 [J]. *上海医学*, 2002, 25(4): 205-209.

Zheng XP, Hua YQ, Zhang GZ, et al. Expression of type III collagen in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Shanghai Med J*, 2002, 25(4): 205-209.

[12] 尉传社, 张俊祥, 张阳, 等. 博来霉素性羊肺纤维化的实验研究(II): 糖皮质激素和丹参治疗的 CT 与病理 [J]. *临床放射学杂志*, 2005, 24(2): 166-169.

Wei CS, Zhang JX, Zhang Y, et al. Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Experimental Goats(part II): computed tomography and pathology of the effect of adrenal cortical hormones and salvia miltiorrhiza [J]. *J Clin Radiol*, 2005, 24(2): 166-169.

[13] Liu T, De Los Santos FG, Phan SH. The bleomycin model of pulmonary fibrosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1627: 27-42.

[14] Moore B, Lawson WE, Oury TD, et al. Animal models of fibrotic lung disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(2): 167-179.

[15] Cheng D, Xu Q, Wang Y, et al. Metformin attenuates silica-induced pulmonary fibrosis via AMPK signaling [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 349.

[16] Wang J, Xu L, Xiang Z, et al. Microcystin-LR ameliorates pulmonary fibrosis via modulating CD206⁺ M2-like macrophage polarization [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 136.

[17] Park SH, Kim JY, Kim JM, et al. PM014 attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis via regulating NF- κ B and TGF- β 1/NOX4 pathways [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 16112.

[18] Cui Y, Xin H, Tao Y, et al. *Arenaria kansuensis* attenuates pulmonary fibrosis in mice via the activation of Nrf2 pathway and the inhibition of NF- κ B/TGF- β 1/Smad2/3 pathway [J].

- Phytother Res, 2021, 35(2): 974–986.
- [19] Mouratis MA, Aidinis V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin [J]. Curr Opin Pulm Med, 2011, 17(5): 355–361.
- [20] Engelhardt JF, Litzky L, Wilson JM. Prolonged transgene expression in cotton rat lung with recombinant adenoviruses defective in E2a [J]. Hum Gene Ther, 1994, 5(10): 1217–1229.
- [21] 王燕, 王真, 何琪杨. 博来霉素类抗生素作用机制的研究进展 [J]. 国外医药(抗生素分册), 2009, 30(1): 5–8, 18.
Wang Y, Wang Z, He QY. Research progress on the mechanism of bleomycin antibiotics [J]. World Notes Antibiot, 2009, 30(1): 5–8, 18.
- [22] 王淑月. 博来霉素类抗生素的构效关系 [J]. 河北医学院学报, 1995, 16(1): 50–51.
Wang SY. Structure-activity relationship of bleomycin antibiotics [J]. J Hebei Med Univ, 1995, 16(1): 50–51.
- [23] Rudders RA, Hensley GT. Bleomycin pulmonary toxicity [J]. Chest, 1973, 63(4): 627–628.
- [24] Bedrossian CW, Luna MA, MacKay B, et al. Ultrastructure of pulmonary bleomycin toxicity [J]. Cancer, 1973, 32(1): 44–51.
- [25] Adamson IY, Bowden DH. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Am J Pathol, 1974, 77(2): 185–197.
- [26] Snider GL, Celli BR, Goldstein RH, et al. Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin. Lung volumes, volume-pressure relations, carbon monoxide uptake, and arterial blood gas studied [J]. Am Rev Respir Dis, 1978, 117(2): 289–297.
- [27] Williamson JD, Sadofsky LR, Hart SP. The pathogenesis of bleomycin-induced lung injury in animals and its applicability to human idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Exp Lung Res, 2015, 41(2): 57–73.
- [28] Nie Y, Zhang D, Qian F, et al. Baccatin III ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via suppression of TGF- β 1 production and TGF- β 1-induced fibroblast differentiation [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 74: 105696.
- [29] Chung MP, Monick MM, Hamzeh NY, et al. Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 29(3): 375–380.
- [30] Izicki G, Segel MJ, Christensen TG, et al. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis [J]. Int J Exp Pathol, 2002, 83(3): 111–119.
- [31] Peng R, Sridhar S, Tyagi G, et al. Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for “active” disease [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e59348.
- [32] Decologne N, Wettstein G, Kolb M, et al. Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles [J]. Eur Respir J, 2010, 35(1): 176–185.
- [33] 门翔, 党强, 周小果, 等. 槲皮素对基于 TGF- β 1/P38 MAPK/NF- κ B 信号通路抗博来霉素致小鼠肺纤维化的作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(2): 43–47.
Men X, Dang Q, Zhou XG, et al. Effect and mechanism of quercetin on bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice based on TGF- β 1/p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2023, 39(2): 43–47.
- [34] 周颀, 杜婧, 吴程, 等. 黄芪注射液通过 miR-29a-3p/COL1A1 信号轴干预肺纤维化的机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(3): 107–110.
Zhou P, Du J, Wu C, et al. Huangqi injection ameliorates pulmonary fibrosis through miR-29a-3p/COL1A1 pathway [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(3): 107–110.
- [35] 燕苗苗, 赵亚昆, 王搏, 等. 博来霉素诱导大鼠与小鼠肺纤维化模型的评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(2): 179–186.
Yan MM, Zhao YK, Wang B, et al. Comparison and evaluation of different doses of bleomycin-induced pulmonary fibrosis models in mice and rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(2): 179–186.
- [36] Du W, Tang Z, Yang F, et al. Icaritin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by targeting Hippo/YAP pathway [J]. Biomedicine Pharmacother, 2021, 143: 112152.
- [37] 王鹤, 张广平, 侯红平, 等. 博来霉素不同给药方式致大鼠肺纤维化模型探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 73–79.
Wang H, Zhang GP, Hou HP, et al. Effect of different administration methods with bleomycin on pulmonary fibrosis in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(11): 73–79.
- [38] 陈广瑞, 李俭, 梁笛, 等. 肺纤维化大鼠模型造模方法的优化 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(2): 201–207.
Chen GR, Li J, Liang D, et al. Optimization of modeling method for pulmonary fibrosis rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(2): 201–207.
- [39] Abidi A, Bahri S, Ben Khamsa S, et al. A comparative study of intratracheal and aerosolization instillations of bleomycin inducing experimental lung fibrosis in rat [J]. Toxicol Mech Methods, 2019, 29(2): 75–85.
- [40] 杨聪颖, 彭雄群, 阳惠湘, 等. 不同剂量博来霉素诱导小鼠肺纤维化的差异及动态变化 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(2): 45–51, 94.
Yang CY, Peng XQ, Yang HX, et al. Dynamic evolution and comparison of different dose-bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2013, 21(2): 45–51, 94.
- [41] 涂常力, 刘香, 郑晓滨, 等. 静脉注射博来霉素诱导肺纤维化模型小鼠的稳定性评价 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(40): 6436–6443.
Tu CL, Liu X, Zheng XB, et al. Intravenous injection of bleomycin induces pulmonary fibrosis in mice: a stability evaluation [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2015, 19(40): 6436–6443.
- [42] 张小欢. EI24 调控 AMPK/mTOR 通路促进细胞自噬减轻小鼠肺纤维化的作用及机制研究 [D]. 贵阳: 贵州医科大学; 2021.
Zhang XH. Effect and mechanism of EI24 regulating AMPK/mTOR pathway, promoting autophagy and reducing pulmonary

- fibrosis in mice [D]. Guiyang: Guizhou Medical University; 2021.
- [43] 胡静, 刘旭凌. 经鼻滴入博来霉素致小鼠肺纤维化模型的建立及其病理演变 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(5): 351–353, 406.
- Hu J, Liu XL. Establishment and pathological evolution of a mouse model of pulmonary fibrosis by nasal bleomycin instillation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2009, 17(5): 351–353, 406.
- [44] 胡萍, 高占成. mIFN- γ 转基因表达对小鼠肺纤维化治疗的作用机制 [J]. 山东医药, 2009, 49(28): 14–17.
- Hu P, Gao ZC. The mechanism of treat effect by the transgenic expression of murine interferon- γ in pulmonary fibrosis mouse [J]. Shandong Med J, 2009, 49(28): 14–17.
- [45] 徐钰, 高占成, 陈彬, 等. γ -干扰素转基因表达对不同时期博来霉素致小鼠肺间质纤维化的作用 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2005, 4(2): 130–134.
- Xu Y, Gao ZC, Chen B, et al. Effects of murine interferon- γ transgene expression on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice at different stages [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2005, 4(2): 130–134.
- [46] 杨兴娜, 舒艳梅, 王金梁. 合并酸误吸的特发性肺纤维化大鼠抑酸治疗研究 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(4): 330–332.
- Yang XN, Shu YM, Wang JL. Effect of acid suppression therapy on idiopathic pulmonary fibrosis in rats with acid aspiration [J]. J Chin Pract Diagn Ther, 2019, 33(4): 330–332.
- [47] 张秀, 胡静, 覃惠, 等. 宣肺化痰方对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β 1/Smad 表达的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3326–3333.
- Zhang X, Hu J, Qin H, et al. Effects of Xuanfei Huayu Formula on expression of TGF- β 1/Smad in lung tissue of pulmonary fibrosis rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(14): 3326–3333.
- [48] Sakai N, Tager AM. Fibrosis of two: Epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(7): 911–921.
- [49] Pardo A, Selman M. Role of matrix metalloproteases in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012, 5: S9.
- [50] 陈孟毅, 林帅, 杜朋, 等. 博来霉素气管多次给药诱导小鼠肺纤维化模型 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(2): 8–11, 182.
- Chen MY, Lin S, Du P, et al. Establishment of murine pulmonary fibrosis model induced by repetitive intratracheal administration of Bleomycin [J]. Chin Med Her, 2017, 14(2): 8–11, 182.
- [51] Redente EF, Black BP, Backos DS, et al. Persistent, progressive pulmonary fibrosis and epithelial remodeling in mice [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2021, 64(6): 669–676.
- [52] Lynch DA, Sverzellati N, Travis WD, et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper [J]. Lancet Respir Med, 2018, 6(2): 138–153.
- [53] Felix C, Jack G, Laurent Geoffrey J. Pulmonary fibrosis: searching for model answers [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33(1): 9–13.
- [54] 苏敏红, 江宁, 李洪涛, 等. 腹腔注射博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型的长期稳定性 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(4): 512–519.
- Su MH, Jiang N, Li HT, et al. Intraperitoneal injection of bleomycin induces pulmonary fibrosis in mice: a long-term stability evaluation [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2017, 21(4): 512–519.
- [55] Liu Y, Liu B, Zhang GQ, et al. Calpain inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via switching the development of epithelial-mesenchymal transition [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2018, 391(7): 695–704.
- [56] 程雪, 方泓, 张运克, 等. 肺痹方干预肺纤维化模型小鼠细胞外基质转化的机制 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(31): 5038–5043.
- Cheng X, Fang H, Zhang YK, et al. Interventional mechanism of Feibi prescription on extracellular matrix transformation in a mouse model of pulmonary fibrosis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2020, 24(31): 5038–5043.
- [57] Kakugawa T, Mukae H, Hishikawa Y, et al. Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Virchows Arch, 2010, 456(3): 309–315.
- [58] 孟婕, 彭张哲, 陶立坚. 小剂量多次尾静脉注射与气管内滴注博来霉素致小鼠肺纤维化模型的比较研究 [J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(12): 1228–1232.
- Meng J, Peng ZZ, Tao LJ. Murine pulmonary fibrosis model induced by repeated low-dose intravenous injection and intratracheal instillation of bleomycin [J]. J Central South Univ Med Sci, 2013, 38(12): 1228–1232.
- [59] Gul A, Yang F, Xie C, et al. Pulmonary fibrosis model of mice induced by different administration methods of bleomycin [J]. BMC Pulm Med, 2023, 23(1): 91.
- [60] 刘蓉, 赵瑾, 李洪涛, 等. 两个品系小鼠肺纤维化模型的比较观察 [J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(5): 376–380.
- Liu R, Zhao J, Li HT, et al. Comparative observation on pulmonary fibrosis models between two strains of mice [J]. Lab Anim Comp Med, 2011, 31(5): 376–380.
- [61] 袁仝, 庞立健, 郑玮东, 等. IPF 动物造模及造模方法研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(7): 89–91.
- Yuan Q, Pang LJ, Zheng WD, et al. Study of induction of pulmonary fibrosis and methods of induced pulmonary fibrosis [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2014, 16(7): 89–91.
- [62] Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: from biological mechanisms to counteractions [J]. Pharmacol Res, 2015, 97: 122–130.
- [63] Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, et al. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 299(4): L442–L452.

张敏,张晶晶,宁国柱. 模式动物斑马鱼在人乳腺癌疾病研究中的应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1629-1635.
Zhang M, Zhang JJ, Ning GZ. Research progress on the application of a zebrafish model in breast cancer research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1629-1635.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.014

模式动物斑马鱼在人乳腺癌疾病研究中的应用进展

张敏,张晶晶*,宁国柱*

(广东医科大学附属湛江市斑马鱼发育与疾病动物模型重点实验室,广东 湛江 524001)

【摘要】 斑马鱼异种移植模型在乳腺癌的研究中具有重要的价值,能够密切观察肿瘤细胞生长、转移以及与免疫系统的相互作用,为乳腺癌治疗提供新的思路和实验依据。此外,斑马鱼模型还可以用于高通量药物的筛选。本篇综述归纳和总结了斑马鱼异种移植模型在乳腺癌发生发展中的机制研究进展,以及抗肿瘤药物在乳腺癌斑马鱼异种移植模型中的相关筛选和治疗研究进展。

【关键词】 斑马鱼;异种移植模型;乳腺癌

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1629-07

Research progress on the application of a zebrafish model in breast cancer research

ZHANG Min, ZHANG Jingjing*, NING Guozhu*

(Affiliated Hospital of Guangdong Medical University & Zhanjiang Key Laboratory of Zebrafish Model for Development and Disease, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Corresponding author: ZHANG Jingjing. E-mail: jingjing.zhang@live.com; NING Guozhu. E-mail: zhuzilaoning@163.com

【Abstract】 The zebrafish xenograft model plays an important role in cancer modelling, especially breast cancer xenografts. This model facilitates the real-time observation of tumor cell growth, metastasis, and interactions with the immune system, thus providing novel insights and experimental foundations for breast cancer treatment. Furthermore, the zebrafish xenograft model offers a valuable tool for high-throughput drug screening. This review provides an overview of the contributions of the zebrafish xenograft model to elucidating the mechanisms underlying breast cancer development, and its use in screening anti-tumor drugs and conducting therapeutic research.

【Keywords】 zebrafish; xenotransplantation mode; breast cancer

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

1 斑马鱼异种移植模型在肿瘤研究中的优势

异种移植模型是指人源性的细胞或组织移植

入实验动物体内^[1]。常用的实验动物有免疫缺陷小鼠及斑马鱼等。利用免疫缺陷小鼠进行异种移植模型构建所提供的微环境与人体更相似、可接纳的肿瘤细胞多、成瘤率高可实现对肿瘤细胞的长时程追踪。但实验周期长、体内细胞成像困难、免疫

【基金项目】 湛江市科技发展专项资金 (2022A01231)。

Funded by the Science and Technology Planning Project of Zhanjiang (2022A01231).

【作者简介】 张敏 (1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 脑血管发育。Email: zmin@gdmu.edu.cn

【通信作者】 张晶晶 (1984—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 脑血管发育。Email: jingjing.zhang@live.com;

宁国柱 (1982—), 男, 博士, 助理研究员, 硕士生导师, 研究方向: 疾病动物模型。Email: zhuzilaoning@163.com。

* 共同通信作者

缺陷小鼠很难实现大规模和高通量的细胞移植实验,并且小鼠的维护、生物安全等方面的处理花费巨大^[2]。相比之下,新兴起的斑马鱼模型,与人类基因组相似高达 85%、饲养成本低廉、胚胎透明易于成像观察、操作简便,研究人员每天可以对上千条斑马鱼进行显微注射,用以进行实验研究,对于实验进展和药物筛选效率有较大的提升^[3]。

Lee 等^[4]在 2005 年首次成功将黑色素瘤细胞移植到斑马鱼体内,随后有大量研究报道了各种癌细胞在斑马鱼体内的移植和应用。这些研究不仅有助于更好地理解癌症的发病机制,也为癌症的治疗提供了新的思路和方法。斑马鱼是研究肿瘤生物学的有力工具,具有多种优点^[5],如培养周期短、体外受精、体外发育、胚胎呈透明等特点,使得观察者可以轻松观察到斑马鱼个体的发育情况,可以深入研究肿瘤细胞引起的一系列变化,包括宿主的血管重塑、肿瘤细胞播散以及侵入周围组织的过程,甚至能够清晰地观察单个肿瘤细胞在宿主体内的行为以及命运^[6]。斑马鱼早期仅有非特异性免疫,不具备完善的特异性免疫,因此可以直接接种人肿瘤细胞来筛选广谱抗肿瘤药物,而不需要使用免疫抑制剂处理^[4]。虽然斑马鱼胚胎自身没有乳腺组织,无法精准模拟人类自发性乳腺癌发生发展的过程,但乳腺癌细胞在斑马鱼胚胎里的存活和增殖、迁移和侵袭、促血管新生等特征都与人类乳腺癌的进展具有较高相似度;另外,斑马鱼的肿瘤标志物相关因子与人类有较高的保守性,对抗肿瘤药物的

反应与人类高度一致,加上其发育快、繁殖力强、胚胎透明易观察等独特优势,故该移植模型是研究肿瘤血管生成的理想模型,并能应用于靶点药物的筛选、药效评估和安全性评估^[6-8]。

2 人乳腺癌斑马鱼异种移植部位的分类

斑马鱼作为一种细胞异种移植的新型模型,可研究微肿瘤形成、细胞侵袭和转移、肿瘤诱导的血管生成等动态行为。斑马鱼早期免疫功能缺失的优势,给研究工作带来了极大的便利。研究者可根据需求,在建立人类肿瘤细胞移植模型时,每次可通过显微注射 50 ~ 300 个细胞。并在胚胎受精后 48 h 选择不同的注射部位,如卵黄周围间隙或总回流静脉导管注射细胞。这些模型可相互补充,充分反映肿瘤细胞多步骤转移级联事件的早期和后期阶段,整个实验期不超过 8 d。此外,肿瘤细胞还可注射到斑马鱼的尾静脉、后脑室、卵黄等组织内,这些模型结合了细胞标记、微移植和荧光成像技术,可快速评估癌症转移对遗传和药理学操作的反应,可用于研究肿瘤生长和转移,是经典的动物模型之一。因此,根据肿瘤细胞的移植部位的不同,可将斑马鱼异种模型分类为五大类,分别为总回流静脉移植、尾静脉移植、卵黄周围间隙移植、后脑移植和卵黄囊移植。移植部位的不同,具有其特有的研究优势(见图 1 和表 1)。

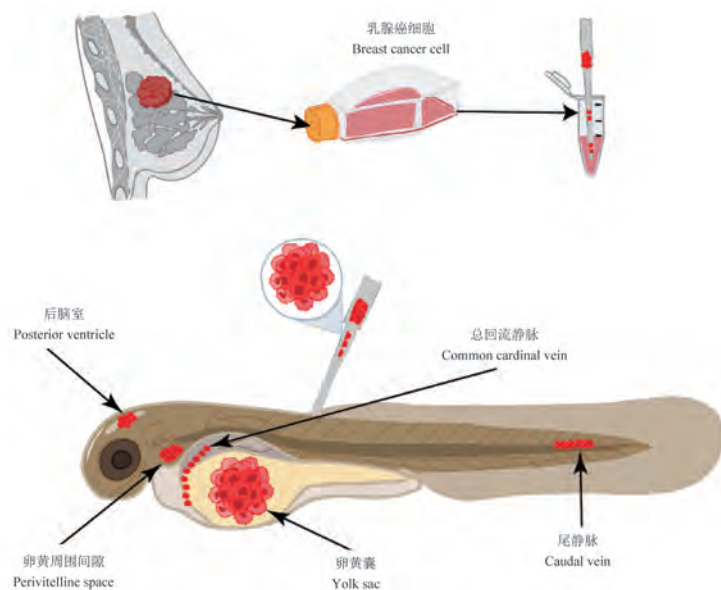


图 1 斑马鱼异种移植常见部位模式图

Figure 1 Schematic diagrams describing xenotransplantation models in zebrafish

表 1 根据移植部位不同,斑马鱼异种移植模型的分类

Table 1 Classification of zebrafish xenotransplantation models based on different transplantation sites

移植部位 Xenotransplantation site	优势 Advantages	乳腺癌细胞株 Human breast cancer cell lines
总回流静脉、尾静脉 Common cardinal vein、caudal vein	可直接模拟肿瘤的血道转移 Directly simulate the hematogenous tumor metastasis	MDA-MB-231 ^[8-18] 、MCF7 ^[8,14,19]
卵黄周围间隙 Perivitelline space	更有利于肿瘤生存的微环境,模拟原位肿瘤发生 Provides a conducive tumor microenvironment and establishes an orthotopic transplantation model	MDA-MB-231 ^[10,20-25] 、MCF7 ^[26]
后脑室 Posterior ventricle	用于筛选可透过血脑屏障的药物 For screening drugs that can pass through the blood-brain barrier	MDA-MB-231 ^[8,27] 、MDA-MB-361 ^[28]
卵黄囊 Yolk sac	可容纳更多的肿瘤细胞,因其营养丰富更适合肿瘤细胞生存 Accommodate more tumor cells and its more nutritious is suitable for tumor cell survival	MDA-MB-231 ^[7,29-34] 、MCF7 ^[19,32,35-36] 、MDA-MB-468 ^[29] 、HCC1954 ^[37]

3 利用斑马鱼异种移植研究乳腺癌发生发展的机制

3.1 CXCR4、VEGFA 和 TGF-β 等分子在乳腺癌侵袭和转移中起重要作用

肿瘤的发生发展与其周围的微环境密切相关,趋化因子受体 4(C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4)是趋化因子基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1, CXCL12)的特异受体,其信号在中性粒细胞中高度表达,靶向 CXCR4 是限制肿瘤进展的有效方法。斑马鱼模型揭示了 CXCR4-CXCL12 轴在三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 早期转移中发挥的作用。斑马鱼与人类配体和受体之间有交叉通信,人类肿瘤细胞表达 CXCR4 通过感应斑马鱼转移部位的同源配体启动了早期转移事件。这一发现为进一步研究斑马鱼与人类细胞间的交叉通信提供了新的思路,也为乳腺癌治疗提供了新的策略^[8,15]。

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在血管形成中起着不可缺少的作用^[20],当抑制血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 信号时,可以抑制局部肿瘤增殖,但也会加速肿瘤侵袭和微转移。近期研究表明,在透明斑马鱼胚胎血液循环中注射肿瘤细胞,通过抑制 VEGFR 信号可以促进中性粒细胞迁移,从而加速肿瘤的侵袭和转移,为抑制 VEGF 促进肿瘤侵袭性的临床研究提供了新的理论基础^[16]。

转化生长因子 β (TGF-β) 是一种促进乳腺癌细胞转移的因子, RNF12 是泛素连接酶 E3, RNF12 通过与抑制性 SMAD7 结合并诱导其蛋白酶体降解来

刺激 TGF-β 信号传导。研究发现, RNF12 水平与磷酸化的 AKT 水平呈正相关, AKT 的活化可促进 RNF12 的核定位,从而通过调控 TGF-β 信号传导促进乳腺癌细胞在斑马鱼异种移植模型中的侵袭和转移。因此,在未来侵袭性乳腺癌的治疗中,联合靶向 AKT、RNF12 和 TGF-β 可能成为一种新的治疗手段^[11,38]。

此外,利用斑马鱼异种移植模型在研究乳腺癌迁移和侵袭中的作用机制还涉及多种重要分子,包括 NF-κB^[39]、srGAP1^[12,14] 和 BCL-2^[21] 等,这些研究有助于深入了解乳腺癌迁移和侵袭的发生机制,并为乳腺癌的治疗提供新的思路和方法。

3.2 EVI1、HMGB3 基因与乳腺癌的增殖和凋亡相关

亲嗜性病毒整合位点 1 (ecotropic viral integration site 1, EVI1) 是一种致癌转录因子,其与乳腺癌的预后密切相关。当乳腺癌细胞中 EVI1 基因被沉默后,通过建立斑马鱼异种移植模型,发现癌细胞的增殖、凋亡抗性和体内肿瘤形成都被抑制。此外,补充雌激素可以重新促进雌激素受体阳性 (ER+) 乳腺癌体内肿瘤重新生成,但对雌激素受体阴性 (ER-) 乳腺癌无此作用。因此, EVI1 基因的沉默,对 (ER-) 乳腺癌患者更加关键。研究确定 G 蛋白偶联受体 54 (GPR54) 配体 KISS1 是 EVI1 的新型转录靶标,基因 EVI1 可通过调控 KISS1 的转录直接影响 GPRP 信号传导,未来可以通过 GPR54 靶向抑制剂来治疗 (ER-) 患者^[40]。

miR-3-142p 是乳腺癌中已知的肿瘤抑制性 miRNA,已被证明可以靶向 HMG 家族。斑马鱼异种移植模型及体外实验的结果显示高迁移率族蛋白 B3 (high mobility group box 1, HMGB3) 是乳腺癌

中 miR-142-3p 的直接靶标,miR-3-142p 诱导的细胞凋亡需要 HMGB3 的下调。这项新研究揭示了 HMGB3 在乳腺癌发生中的重要作用,并表明 miR-3-142p 可以作为乳腺癌治疗的新靶点^[30]。

3.3 SORLA、NRF1 分子在乳腺癌脑转移中发挥作用

脑转移 (brain metastasis, BMS) 恶性程度高,有效治疗有限,是目前人类尚在研究的难题。据统计

在发生转移的乳腺癌患者中,约有 7% ~ 16% 转移性乳腺癌患者的乳腺癌细胞会首先转移到大脑^[41]。有研究报道 Sortilin 相关受体 1 (sorting protein-related receptor containing LDLR class-A repeats, SORLA) 沉默对乳腺癌耐药性脑转移治疗具有重要影响。在 MDA-MB-361 乳腺癌细胞株建立的斑马鱼异种移植模型中,将 SorLA 沉默细胞移植到斑马鱼胚胎的大脑中,使用奈拉替尼治疗 SorLA 沉默细

表 2 在人乳腺癌斑马鱼异种移植模型中进行抗癌研究的药物分子

药物名称 Medicines	研究内容/参与机制 Research content/participation mechanism
来那替尼 Nerlynx/neratinib	泛 HER 激酶抑制剂,能够有效抑制 HER2 过表达的乳腺癌细胞系增殖。斑马鱼异种移植技术可以筛选出抗耐药的分子和基因,为其耐药性提供新的解决方案 ^[28] The pan-HER kinase inhibitor can effectively inhibit the proliferation of HER2-overexpressing breast cancer cell lines. Zebrafish xenotransplantation technology can screen out anti-drug resistance molecules and genes, providing new solutions for drug resistance ^[28]
阿霉素 Adriamycin	嵌入 DNA 而抑制核酸的合成,利用斑马鱼模型探究其造成的毒性作用和耐药性 ^[48] Inhibiting the synthesis of nucleic acids by intercalation into DNA, zebrafish model was used to explore its toxic effects and drug resistance ^[48]
顺铂 Cisplatin	破坏 DNA 的功能,抑制细胞有丝分裂,利用斑马鱼药物筛选模型筛选出一种减少其毒性的新型化合物 ^[49] Cisplatin-induced DNA damage, cell cycle arrest, a new compound to reduce its toxicity was screened by zebrafish drug screening model ^[49]
拉帕替尼 Lapatinib	斑马鱼异种移植实验发现,在乳腺癌细胞中过表达 GSDMB 可以激活 Rab7,促进自噬,减少拉帕替尼的耐药性 ^[37] Zebrafish xenograft experiments found that overexpression of GSDMB in breast cancer cells can activate Rab7, promote autophagy, and reduce lapatinib resistance ^[37]
组蛋白去乙酰化酶 Histone deacetylase	组蛋白去乙酰化具有抑制转录的作用,通过斑马鱼模型进行体内毒性评估和抗癌效果的研究,证实其作为一种新型的抗癌药物分子的潜力 ^[31] Histone deacetylation has the effect of inhibiting transcription. The <i>in vivo</i> toxicity evaluation and anti-cancer effect study through the zebrafish model confirmed its potential as a new type of anti-cancer drug molecule ^[31]
CEL-吡嗪衍生物 11a-11i CEL-pyrazine derivatives 11a-11i	化合物 11i 能抑制 G1/M 期的 MCF-7 细胞,可作为乳腺癌治疗的候选药物。在斑马鱼异种移植模型中,化合物 11i 也能有效抑制 MCF-7 细胞的增殖 ^[19] Compound 11i can inhibit MCF-7 cells in G1/M phase and can be used as a candidate drug for breast cancer treatment. In the zebrafish xenograft model, compound 11i also effectively inhibited the proliferation of MCF-7 cells ^[19]
姜黄素 Curcumin	激活线粒体凋亡途径诱导细胞凋亡,姜黄素对斑马鱼胚胎有致畸作用,而纳米姜黄素的影响较弱,可用于抗癌药物开发 ^[45] Activation of mitochondrial apoptosis pathway to induce cell apoptosis, curcumin has teratogenic effects on zebrafish embryos, while nano-curcumin has a weaker effect and can be used for the development of anticancer drugs ^[45]
加味阳和汤 JWYHD	JWYHD 可通过 JAK2/STAT3 信号通路诱导细胞凋亡,并在斑马鱼模型中抑制肿瘤细胞炎症反应,进而抑制肿瘤发展 ^[46] JWYHD can induce apoptosis through the JAK2/STAT3 signaling pathway and inhibit the inflammatory response of tumor cells in the zebrafish model, thereby inhibiting tumor development ^[46]
白桦素纳米悬浮液 Betulin nanosuspensions	白桦素纳米悬浮液可以通过多种途径发挥药理作用,包括阻止细胞周期、诱导细胞凋亡和抑制血管生成。其纳米化形式表现出高效的抗血管生成作用,这在斑马鱼血管再生模型中得到了证实 ^[47] Betulin nanosuspensions can exert pharmacological effects through a variety of ways, including preventing cell cycle, inducing apoptosis and inhibiting angiogenesis. Its nano-form shows an efficient anti-angiogenesis effect, which has been confirmed in the zebrafish angiogenesis model ^[47]
Osthole, 7-甲氧基-8-(3-甲 基-2-丁烯基)香豆素 Osthole, 7-methoxy-8-(3- methyl-2-butenyl) coumarin	建立斑马鱼异种移植模型,评估 Osthole 在体内的抗转移活性,并证明其通过调整合素触发的 FAK/Src 信号通路抑制肿瘤迁移 ^[21] A zebrafish xenograft model was established to evaluate the anti-metastatic activity of Osthole <i>in vivo</i> and to prove that it inhibits tumor migration by regulating the integrin-triggered FAK/Src signaling pathway ^[21]

胞组可导致肿瘤生长消退,而对照组则表现为耐奈拉替尼,肿瘤生长未受影响。这表明 SorLA 沉默是人表皮生长因子-2(HER2)靶向治疗的一种敏感方法,未来靶向 SorLA 作为新型联合治疗可能为提高乳腺癌脑转移患者的治疗提供了重要参考^[28]。

研究发现,与正常乳腺组织相比,核呼吸因子 1(nuclear respiratory factor-1, NRF1)和 DNA 结合抑制因子 3(inhibitor of DNA binding 3 gene, ID3)在乳腺癌样本中高表达,其中 NRF1 可促进乳腺癌干细胞的形成和扩散, ID3 已被证明是一种分泌的血管生成转录因子。斑马鱼异种移植实验表明 ID3 可诱导内皮干细胞(endothelial stem cells, ESCs)加速血管新生,并可进一步促进 NRF1 诱导的乳腺癌干细胞穿过血脑屏障并引导它们在脑内进行定植,形成脑转移肿瘤。这些发现对于开发 NRF1-ID3 信号传导通路的新的抗乳腺癌药物以防止乳腺癌扩散到大脑具有重要意义^[22]。

4 参与人乳腺癌斑马鱼异种移植模型的药物治疗研究

斑马鱼异种移植模型的研究价值十分广泛,不仅可以用于肿瘤生长和转移机制研究,还可以作为抗肿瘤药物筛选和新药评估的首选动物模型。以下是抗肿瘤药物的主要研究报道,具体见表 2。

来那替尼(nerlynx, neratinib)是一种激酶抑制剂,可以干扰蛋白质活化。其中的活性成分 neratinib 能够靶向干扰乳腺癌细胞上的 HER2 蛋白,进而阻止癌细胞生长。除了单独使用,还可以与其他药物联合使用,以应对 HER2 阳性乳腺癌细胞的耐药性。通过利用斑马鱼异种移植技术,成功筛选出了能够抗耐药的分子和基因,如 SorLA^[28]、HMGB3^[30]等,由于在肿瘤细胞中亦有表达这些分子和基因,这一发现为抗耐药性治疗提供了新的药物候选和新的抗癌治疗策略^[42-43]。

阿霉素(adriamycin, ADR)是一种抗癌药物,可以抑制乳腺癌细胞的生长。但由于其组织毒性给药物的使用带来了极大的阻碍,研究人员可使用斑马鱼异种移植模型研究阿霉素的毒性。在 MCF-7 异种移植模型中,DOX 联合木兰花碱(magnoflorine)显示出显著的抗肿瘤作用,并对肝、心脏、肾和脾等器官的毒性较单独使用 DOX 小。这一发现使得斑马鱼异种移植模型的应用更加广泛,其可以帮助开发更有效且低毒性的抗癌药物,为治疗癌症提供新

的思路和途径^[44]。另外,斑马鱼异种移植模型也可用于一些新型抗肿瘤药物的评估,如中成药试剂^[45-46]、纳米粒子^[33,47]等。

5 总结与展望

目前,人乳腺癌斑马鱼异种移植模型是一种可靠的动物模型,可以模拟患者肿瘤的分子生物学、组织学和病理学特点,并保留肿瘤的异质性,从而为研究乳腺癌的发病机制提供了重要的工具。虽然该模型的应用仍受到限制,但斑马鱼的独特优势使得该模型建立的意义非常重大。该模型能够模拟肿瘤远隔转移灶、斑马鱼产量多能更好地利用高通量筛选药物,为寻找新的治疗方法提供了重要的参考。但研究人员仍需要进一步探索乳腺癌的发生发展机制,以便更好地利用该模型的优势,为临床治疗提供更准确、有效的指导。

参 考 文 献(References)

- [1] Goyama S, Wunderlich M, Mulloy JC. Xenograft models for normal and malignant stem cells [J]. *Blood*, 2015, 125(17): 2630-2640.
- [2] Ellenbroek SI, van Rheenen J. Imaging hallmarks of cancer in living mice [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(6): 406-418.
- [3] Moore JC, Langenau DM. Allograft cancer cell transplantation in zebrafish [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 916: 265-287.
- [4] Lee LM, Seftor EA, Bonde G, et al. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation [J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(4): 1560-1570.
- [5] Berghmans S, Jette C, Langenau D, et al. Making waves in cancer research: new models in the zebrafish [J]. *Biotechniques*, 2005, 39(2): 227-237.
- [6] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [7] Yadav P, Sharma P, Sundaram S, et al. SLC7A11/xCT is a target of miR-5096 and its restoration partially rescues miR-5096-mediated ferroptosis and anti-tumor effects in human breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2021, 522: 211-224.
- [8] Tulotta C, Stefanescu C, Beletkaia E, et al. Inhibition of signaling between human CXCR4 and zebrafish ligands by the small molecule IT1t impairs the formation of triple-negative breast cancer early metastases in a zebrafish xenograft model [J]. *Dis Model Mech*, 2016, 9(2): 141-153.
- [9] Mercatali L, La Manna F, Groenewoud A, et al. Development of a patient-derived xenograft (PDX) of breast cancer bone metastasis in a zebrafish model [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8): 1375.
- [10] Ren J, Liu S, Cui C, et al. Invasive behavior of human breast

- cancer cells in embryonic zebrafish [J]. *J Vis Exp*, 2017 (122): 55459.
- [11] Huang Y, Liu S, Shan M, et al. RNF12 is regulated by AKT phosphorylation and promotes TGF- β driven breast cancer metastasis [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(1): 44.
 - [12] Mondal C, Gacha-Garay MJ, Larkin KA, et al. A proliferative to invasive switch is mediated by srGAP1 downregulation through the activation of TGF- β 2 signaling [J]. *Cell Rep*, 2022, 40(12): 111358.
 - [13] Yuan C, Wang Z, Wang Z, et al. Novel chiral Ru(II) complexes as potential c-myc G-quadruplex DNA stabilizers inducing DNA damage to suppress triple-negative breast cancer progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 203.
 - [14] Ghoroghi S, Mary B, Larnicol A, et al. Ral GTPases promote breast cancer metastasis by controlling biogenesis and organ targeting of exosomes [J]. *Elife*, 2021, 10: e61539.
 - [15] Tulotta C, Stefanescu C, Chen Q, et al. CXCR4 signaling regulates metastatic onset by controlling neutrophil motility and response to malignant cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 2399.
 - [16] He S, Lamers GE, Beenakker JW, et al. Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model [J]. *J Pathol*, 2012, 227(4): 431–445.
 - [17] Kong L, Chen Q, Campbell F, et al. Light-triggered cancer cell specific targeting and liposomal drug delivery in a zebrafish xenograft model [J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9(6): e1901489.
 - [18] Paul CD, Bishop K, Devine A, et al. Tissue architectural cues drive organ targeting of tumor cells in zebrafish [J]. *Cell Syst*, 2019, 9(2): 187–206.
 - [19] Feng Y, Zhang B, Lv J, et al. Scaffold hopping of celastrol provides derivatives containing pepper ring, pyrazine and oxazole substructures as potent autophagy inducers against breast cancer cell line MCF-7 [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 234: 114254.
 - [20] Britto DD, Wyroba B, Chen W, et al. Macrophages enhance Vegfa-driven angiogenesis in an embryonic zebrafish tumour xenograft model [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(12): dmm035998.
 - [21] Chen YQ, Song HY, Zhou ZY, et al. Osthole inhibits the migration and invasion of highly metastatic breast cancer cells by suppressing ITG α 3/ITG β 5 signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(6): 1544–1555.
 - [22] Das JK, Deoraj A, Roy D, et al. Brain infiltration of breast cancer stem cells is facilitated by paracrine signaling by inhibitor of differentiation 3 to nuclear respiratory factor 1 [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148(10): 2881–2891.
 - [23] Zhang Y, Gong Y, Hu D, et al. Nuclear SIPA1 activates integrin β 1 promoter and promotes invasion of breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2015, 34(11): 1451–1462.
 - [24] Yang B, Peng F, Zhang Y, et al. Aiduqing formula suppresses breast cancer metastasis via inhibiting CXCL1-mediated autophagy [J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: 153628.
 - [25] Hanna SJ, McCoy-Simandle K, Leung E, et al. Tunneling nanotubes, a novel mode of tumor cell-macrophage communication in tumor cell invasion [J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(3): jcs223321.
 - [26] Ambrosio MR, Mosca G, Migliaccio T, et al. Glucose enhances pro-tumorigenic functions of mammary adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells on breast cancer cell lines [J]. *Cancers*, 2022, 14(21): 5421.
 - [27] Gopal U, Monroe JD, Marudamuthu AS, et al. Development of a triple-negative breast cancer leptomeningeal disease model in zebrafish [J]. *Cells*, 2023, 12(7): 995.
 - [28] Al-Akhrass H, Conway JRW, Poulsen ASA, et al. A feed-forward loop between SorLA and HER3 determines heregulin response and neratinib resistance [J]. *Oncogene*, 2021, 40(7): 1300–1317.
 - [29] Sokary S, Zakaria Z, Bawadi H, et al. Testing the anticancer effect of matcha using zebrafish as an animal model [J]. *Nutrients*, 2023, 15(10): 2369.
 - [30] Sharma P, Yadav P, Sundaram S, et al. HMGB3 inhibition by miR-142-3p/sh-RNA modulates autophagy and induces apoptosis via ROS accumulation and mitochondrial dysfunction and reduces the tumorigenic potential of human breast cancer cells [J]. *Life Sci*, 2022, 304: 120727.
 - [31] Ružić D, Ellinger B, Djoković N, et al. Discovery of 1-benzhydryl-piperazine-based HDAC inhibitors with anti-breast cancer activity: synthesis, molecular modeling, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(12): 2600.
 - [32] Hsieh TH, Hsu CY, Yang PJ, et al. DEHP mediates drug resistance by directly targeting AhR in human breast cancer [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2022, 145: 112400.
 - [33] Lores S, Gámez-Chiachio M, Cascallar M, et al. Effectiveness of a novel gene nanotherapy based on putrescine for cancer treatment [J]. *Biomater Sci*, 2023, 11(12): 4210–4225.
 - [34] Harfouche R, Basu S, Soni S, et al. Nanoparticle-mediated targeting of phosphatidylinositol-3-kinase signaling inhibits angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2009, 12(4): 325–338.
 - [35] Lenis-Rojas OA, Roma-Rodriguez C, Fernandes AR, et al. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* efficacy of ruthenium polypyridyl compounds against breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8916.
 - [36] Tan C, Sun W, Xu Z, et al. Small extracellular vesicles deliver TGF- β 1 and promote adriamycin resistance in breast cancer cells [J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(5): 1528–1542.
 - [37] Gámez-Chiachio M, Molina-Crespo Á, Ramos-Nebot C, et al. Gasdermin B over-expression modulates HER2-targeted therapy resistance by inducing protective autophagy through Rab7 activation [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 285.
 - [38] Drabsch Y, He S, Zhang L, et al. Transforming growth factor- β signalling controls human breast cancer metastasis in a zebrafish xenograft model [J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(6): R106.
 - [39] Fu CW, Tsai HE, Chen WS, et al. Sialyltransferase inhibitors

suppress breast cancer metastasis [J]. J Med Chem, 2021, 64 (1): 527-542.

[40] Wang H, Schaefer T, Konantz M, et al. Prominent oncogenic roles of EVI1 in breast carcinoma [J]. Cancer Res, 2017, 77 (8): 2148-2160.

[41] Barnholtz-Sloan JS, Sloan AE, Davis FG, et al. Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the metropolitan detroit cancer surveillance system [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(14): 2865-2872.

[42] Vaught DB, Stanford JC, Young C, et al. HER3 is required for HER2-induced preneoplastic changes to the breast epithelium and tumor formation [J]. Cancer Res, 2012, 72(10): 2672-2682.

[43] Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(8): 553-563.

[44] Tian W, Xie X, Cao P. Magnoflorine improves sensitivity to doxorubicin (DOX) of breast cancer cells via inducing apoptosis and autophagy through AKT/mTOR and p38 signaling pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109139.

[45] Do XH, Hoang MHT, Vu AT, et al. Differential cytotoxicity of curcumin-loaded micelles on human tumor and stromal cells [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(20): 12362.

[46] You Y, Chen X, Chen X, et al. Jiawei Yanghe Decoction suppresses breast cancer by regulating immune responses via JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 316: 116358.

[47] John R, Dalal B, Shankarkumar A, et al. Innovative Betulin Nanosuspension exhibits enhanced anticancer activity in a triple negative breast cancer cell line and zebrafish angiogenesis model [J]. Int J Pharm, 2021, 600: 120511.

[48] Liu HN, Guo NN, Guo WW, et al. Delivery of mitochondriotropic doxorubicin derivatives using self-assembling hyaluronic acid nanocarriers in doxorubicin-resistant breast cancer [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(10): 1681-1692.

[49] Ma L, Lin X, Li C, et al. A Cancer Cell-selective and low-toxic bifunctional heterodinuclear Pt(IV)-Ru(II) anticancer prodrug [J]. Inorg Chem, 2018, 57(5): 2917-2924.

[收稿日期] 2023-09-04

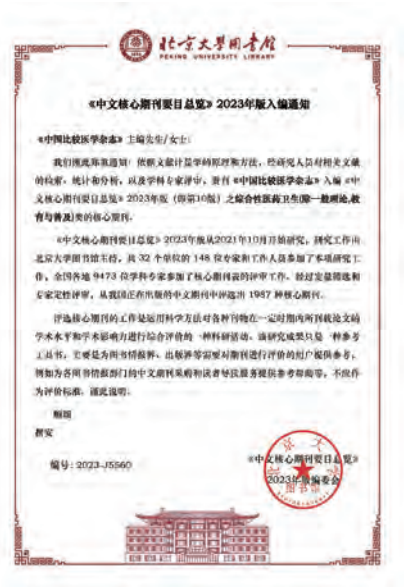
《中国比较医学杂志》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国比较医学杂志》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)综合性医药卫生类的核心期刊!

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

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

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



王妍,曹永春,邢凯. 猪作为模式动物的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1636–1645.

Wang Y, Cao YC, Xing K. Progress in use of pigs as model animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1636–1645.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.015

猪作为模式动物的研究进展

王妍¹, 曹永春^{1*}, 邢凯^{1,2*}

(1. 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206; 2. 中国农业大学动物科学技术学院, 北京 100193)

【摘要】 人类疾病动物模型是指生物医学研究过程中所建立起来的具有人类疾病模拟表现的动物实验对象及相关实验材料,在医学研究中有着至关重要的作用。猪与人类在解剖结构、生理学、免疫学和基因组学等方面具有相似性,作为模式动物非常适合于生物医学方面的研究,并且对比其他模式动物有较大优势。近年来,基因工程等生物技术的进步促进了用于人类疾病研究的猪模型的快速兴起。目前,猪除了作为异种移植器官供体与药物设计的工具外,还可以作为模式动物研究人类发育过程、先天性疾病和疾病反应机制,为改善人类健康作出巨大的贡献。本文将阐述猪作为人类研究模型心血管疾病、癌症、眼科学、颅面研究、肌肉骨骼研究、皮肤研究、生殖和胎儿发育、营养和微生物组研究、大脑和神经退行性疾病、糖尿病、感染性疾病和疫苗设计、以及异种移植的发展现状并对其未来应用进行展望。

【关键词】 猪;模式动物;疾病模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1636-10

Progress in use of pigs as model animals

WANG Yan¹, CAO Yongchun^{1*}, XING Kai^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China.

2. School of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193)

Corresponding author: CAO Yongchun. E-mail: caoyongchun001@sina.com; XING Kai. E-mail: xk@cau.edu.cn

【Abstract】 Animal models of human diseases include experimental animals and related materials established during biomedical research, which in turn play a vital role in medical research. Pigs and humans are similar in terms of their anatomy, physiology, immunology, and genetics. Pigs are thus suitable model animals for biomedical research and have various advantages compared with other model animals. Recent advances in biotechnology, such as genetic engineering, have contributed to a rapid increase in the use of pig models for human disease research. In addition to serving as xenotransplant organ donors and as tools in drug-design studies, pigs can also be used as model animals to study human developmental processes, congenital diseases, and disease-response mechanisms, thus making important contributions to improving human health. This review considers the current status and future applications of pigs as research models for studies of human cardiovascular diseases, cancer, ophthalmology, craniofacial, musculoskeletal, and skin research, reproductive and fetal development, nutrition, microbiome research, brain and neurodegenerative diseases, diabetes, infectious diseases, and vaccine design, as well as for xenotransplantation.

【Keywords】 pig; model animal; disease models

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

【作者简介】 王妍(2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:动物遗传育种。Email:1420047800@qq.com

【通信作者】 曹永春(1972—),女,硕士,副教授,研究方向:动物营养与饲料。Email:caoyongchun001@sina.com;

邢凯(1986—),男,博士,副教授,研究方向:动物遗传育种。Email:xk@cau.edu.cn。

* 共同通信作者

模式动物是实验动物的一种,可以在科学研究、教学、生产等实验中探索动物发育的普遍规律和机制,揭示普遍规律的生命现象^[1]。与人类临床试验相反,疾病动物模型的主要目标是将其临床药理学和治疗功效用于人类,以便药物开发研究或改善临床试验模型^[2]。模式动物主要有六大类:啮齿类(小鼠、大鼠)、非灵长人类、犬类、兔类、猪类、斑马鱼。其中,猪的心脏结构、皮肤结构、呼吸道等系统与人类相似^[3],作为模式动物可用于生物化学、酶学、内分泌学、繁殖学、营养学和肥胖及其相关疾病的研究,从而为改善人类健康作出巨大的贡献,已经得到包括美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)在内的全世界医药管理机构的认可^[4]。

1 猪的生物学特性与作为模式动物的优势

1.1 猪的生理特点

猪是最早被驯化的家畜,是杂食性单胃动物,其体型大小与人类相近,具有基因多样、世代间隔短、生产力高、繁殖性能好等特点,在解剖结构和免疫系统方面与人有较高的相似性,可根据人类所需要的各种模型进行选育^[5]。为了进行生物学研究,研究者们将猪进行繁殖育种,以获得体型较小的品种。例如,尤卡坦、汉福德、米尼雷威和广泛使用的哥廷根小型猪等,这些猪的成年体重 34 ~ 68 kg,与人类体重相似^[6],是良好的实验动物模型。

1.2 猪作为模式动物的生理优势

啮齿类动物是现在应用最为广泛的模式动物,具有体型小、繁殖速度快、生命周期相对较短、遗传背景清晰、饲养成本小等优点,但由于缺乏精细的大脑结构、免疫系统和新陈代谢与人类差异较大、在生理解剖上难度较高,所以存在局限性^[7]。在基础和转化生物医学研究中非人灵长类动物是重要的医学模型,其优势在于生理解剖、认知能力、社会复杂性等方面与人类具有高度相似性,且遗传物质高度同源,但由于非人灵长类动物是国家保护动物,资源比较稀缺,所以需进一步发展并扩大其种质资源^[8]。

随着生命科学领域的不断发展,猪模型逐渐走入人们视野。作为模式动物,猪的性格温顺较易驯服,可供人们重复采样并进行外科手术,在屠宰后可以收集复杂的组织样本以供实验^[9]。猪具有类

似于人的心血管、呼吸、代谢和胃肠系统,可用于研究代谢性疾病和传染性疾病以及相关疫苗开发^[10-11]。猪的基因组序列和染色体结构与人类高度同源,目前猪的克隆和基因技术较为成熟,有许多基本特性明确的细胞系可供利用,转化和基因编辑猪模型,将成为转化医学研究的重要工具^[12],此外可通过基因工程技术推进基因组学和蛋白质组学的发展^[13]。

2 猪作为模式动物在医学中的应用

猪作为动物模型,在心血管疾病、癌症、眼科研究、颅面研究、肌肉骨骼研究、皮肤研究、生殖和胎儿发育、营养和微生物组研究、大脑和神经退行性疾病、糖尿病、感染性疾病和疫苗设计、以及异种移植的研究上对生物医学研究做出了巨大贡献,也促进了医学与兽医学之间的合作研究。

2.1 心血管疾病研究

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)是全球最常见的死亡原因,为了探究疾病的发生过程,需要能够充分模拟人类 CVD 的动物模型。啮齿类动物的血管大小、脂蛋白谱和代谢方面与人类不同,很少出现斑块破裂和血栓形成等重要的人类动脉粥样硬化特征^[14],作为模式动物具有局限性。猪在生理学、病理学、免疫学和心血管系统方面与人类相似,且在伦理上比其他非人类灵长动物更易被人们接受,经济价格适中,故成为人类心血管疾病的模式动物。

CVD 的主要危险因素是动脉粥样硬化导致的心肌梗死和血浆中的非高密度脂蛋白胆固醇(non-HDL-C)水平升高^[15]。正常猪很难发展出晚期动脉粥样硬化病变,即使使用高脂肪和高胆固醇饮食诱导也是如此,所以 Chen 等^[16]研究出了转基因巴马小型猪, Fang 等^[17]在此基础上利用 CRISPR/Cas9 系统破坏载脂蛋白 E(ApoE)基因,采用体细胞核转移技术建立了 ApoE 敲除(KO)巴马小型猪模型,发现饲喂高脂肪和高胆固醇饮食的 ApoE-KO 猪患有高胆固醇血症,且主动脉和冠状动脉出现动脉粥样硬化病变,说明其为人类动脉粥样硬化的理想模型。血浆中 non-HDL-C 水平受到环境和遗传因素影响, Xie 等^[18]研究出去唾液酸糖蛋白受体(ASGR1)缺陷猪,研究其变体对人类心脏保护作用的机制,实验结果表明抑制 ASGR1 会降低血浆中 non-HDL-C 水平并抑制动脉粥样硬化性 CVD 的发

展。代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 是 CVD 的主要风险来源,为研究 MS 对心脏反应 (MR) 的机制, Karimi 等^[19]利用大白猪模型比较代谢组、转录组、功能分析和无监督机器学习,发现了 MS 相关 CVD 的潜在治疗靶点。

此外,在冠状动脉生理学、冠状动脉侧支循环和运动生理学的研究中,由于尤卡坦小型猪血管容量、侧支循环与人相似,红细胞比容更高,心脏更大,是研究人类冠状动脉侧支循环生长和发育的良好模型^[20]。猪作为模式动物开发了便携式心肺转流系统、体外膜氧合系统、完善了心室颤动技术和心肺复苏^[21],使用经皮途径诱导二尖瓣返流的方案完善了治疗心衰的疗法^[22]。越南猪为组织工程心脏瓣膜的临床前研究提供了完整而详尽的生理参数和方法学信息^[23],长白猪可用于研究心房颤动诱导的基本电生理评估程序,并建立了心肌梗死模型^[24],是评估血管内相关机制的一种好的方法^[25]。

猪心血管疾病模型在高胆固醇血症、高甘油三酯血症和动脉粥样硬化病变等方面做出了突出贡献,为研究早期家族性高胆固醇血症和动脉粥样硬化以及开发新疗法提供了有价值的研究成果。

2.2 肥胖症与糖尿病研究

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是以慢性高血糖表型、高胰岛素抵抗以及低胰岛素敏感性为特征的一种代谢性疾病,长期的高血糖状态可引发一系列严重的并发症,如心脏病发作、失明、神经和血管损伤等^[26]。世界上超过三分之一的人口超重或肥胖,肥胖诱导的胰岛素抵抗加速了胰岛衰竭,是 2 型糖尿病的重要诱因。2021 年,全球 20 ~ 79 岁人群中,糖尿病粗患病率为 10.5%,预计 2030 年和 2045 年将增长到 11.3% 和 12.2%。肥胖症和糖尿病在世界范围内的患病率迅速增加,目前针对不同类型的糖尿病存在多种治疗方案,但该疾病是一种复杂的代谢性疾病,与多个组织和器官的严重改变有关^[27],为了缓解这一流行病,迫切需要更安全、更有效的治疗方法,所以需要通过动物模型深入了解糖尿病的疾病机制,发现、验证和优化新的治疗方法,以确保其在人类中的安全使用^[28]。猪胰腺的大小、形状、血液循环和发育、胰岛结构、内分泌细胞类型比例和 β 细胞质量与人类相似,胰腺分泌的胰岛素只有一个氨基酸与人类有差别^[29],在被重组人胰岛素取代之前,猪胰岛素被用于人类治疗,所以猪是

研究糖尿病的合适模型。

美国糖尿病协会的分类标准将其分为 4 种: 1 型、2 型、妊娠期和特发性糖尿病。前两种类型约占糖尿病患者总数的 95%。猪由于其自身的生理特点,不会自发患有糖尿病,须通过以下 4 种方式诱发其患病: (1) 手术部分或全部胰腺切除术; (2) 化学上采用选择性 β 细胞毒性物质如链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 和四氧嘧啶 (alloxan, ALX) 处理; (3) 通过高能量、高脂肪、高糖饮食干预; (4) 基因改造^[30]。

Marshall 等^[31]采用 2 次低剂量的给药方案获得了 STZ 诱发的汉福德小型猪糖尿病模型,以及在另一项研究中通过增加剂量的给药方案得到患有严重糖尿病的尤卡坦小型猪模型^[32]。在 STZ 性糖尿病研究中,已有汉福德小型猪、约克夏猪、哥廷根小型猪、尤卡坦小型猪的动物模型,此外五指山小型猪是最敏感的 STZ 性糖尿病模型^[33]。Boullion 等^[34]通过静脉注射 ALX,建立了尤卡坦小型猪、哥廷根小型猪、辛克莱小型猪糖尿病模型。ALX 作用机制与 STZ 类似,但毒副作用比 STZ 大,会引起 β 细胞损伤,现在较少采用。

赵玉琼等^[35]用高糖高脂饲料同时诱导广西巴马小型猪、五指山小型猪和农大小型猪 (源自贵州小型猪),结果表明单纯食物能够诱导猪发生 2 型糖尿病,缺点是发病率低、高血糖症状不显著、饲喂时间需 1 年以上,其中五指山小型猪相对比较易感,农大小型猪不易感。

2000 年,Reed 等^[36]率先创立了高脂饮食诱导动物发生胰岛素抵抗,再以小剂量 STZ 破坏胰岛 β 细胞建立大鼠 2 型糖尿病模型的方法, Srinivasan 等^[37]完善了这一模型。2012 年,肖国华等^[38]应用这种方法诱导了雄性版纳微型猪 2 型糖尿病,在此基础上孙若飞等^[39]持续高糖高脂饲料喂养雄性滇南小耳猪 8 周,在第 4 周静脉注射 40 mg/kg 的 STZ,研究猪对 STZ 毒性反应的差异。于健等^[40]、滕东剑等^[41]和 Wu 等^[42]分别应用巴马小型猪对 STZ 毒性反应进行了研究,虽注射 STZ 的剂量和时间不同,但动物却有类似的反应,因此,该方法建立小型猪 2 型糖尿病模型的条件需进一步研究。

1988 年, Vize 等^[43]通过显微注射将携带有人类金属硫蛋白启动子的外源生长激素基因转入受精卵获得了转基因猪,开启了猪遗传修饰技术的研究,但由于其成本较高且成功率低,所以进展缓慢。

2001 年,第一头体细胞核移植的转基因克隆猪的诞生,标志着基因工程技术迅速发展。2013 年,CRISPR/cas9 基因编辑技术的出现,加速了基因敲除猪的研发进程。现在糖尿病猪模型主要为单基因变异模型,有 RIP II 转基因猪^[44]、Porcine Ins^{C94Y}转基因猪^[45]和 Human HNF-1 α ^{P291fsins C}转基因猪^[46]。胰岛素在依赖型糖尿病、永久性新生儿糖尿病、青少年成熟型糖尿病和高胰岛素血症中起核心作用^[47]。通过使用基因编辑技术将调控胰岛素的基因进行突变或删除,为研究糖尿病的发病机制和胰岛素补充治疗提供了宝贵的模型。

由于猪具有大容量的胰岛 β 细胞群,不易患有糖尿病,但美国的奥斯萨巴猪 (Ossabaw island hog) 和西班牙的伊比利亚猪 (Iberian pig) 却是 2 型糖尿病易感性的品种^[48]。1979 年,Phillips 等^[49]利用静脉糖耐量测试筛选了两个尤卡坦小型猪品系。1987 年,Hand 等^[50]应用了该品系第 7 代猪进行糖尿病诱导实验,发现其不再具有高糖尿病易感性,因此选育遗传易感性的猪仍是待解决的关键问题。

2.3 眼科学研究

眼睛是复杂的光学元件系统,全球有 2.85 亿人患有视力障碍^[51],近年来矫正近视和散光的激光手术显著增加,因此提高光与眼睛相互作用的相关知识对提高手术效率非常重要。猪的眼睛与人类有许多相似之处,包括眼角膜、晶状体、玻璃体、全血管性视网膜脉管系统、视网膜外侧的视锥细胞光感受器、无脉络膜、相同的巩膜厚度和角膜胶原纤维的排列^[52],因此在比较研究中很有价值^[53],而且作为屠宰场的副产品,猪眼较易获得,所以猪被认为是提供外源器官的合适动物。

1999 年,Sugiura 等^[54]在猪眼中创建一个均匀的硬化晶状体核以接近人眼中的前囊,用于白内障手术训练。2005 年,Ruiz-Ederra 等^[55]通过灼烧猪眼的外膜静脉,对照眼的视网膜神经节细胞发现猪视网膜和人类的相似性,并得出结论猪视网膜是人类青光眼相关研究的合适模型。2011 年,Sanchez 等^[56]测量并汇编了猪和人眼的解剖参数,以帮助研究人员根据研究目标选择动物模型。2019 年,Regal 等^[57]通过光谱测量确定猪眼的完整光学特征,通过椭圆偏振法测量折射率,获得了可见光区和红外区角膜、晶状体、玻璃体、巩膜、虹膜、脉络膜和眼睑的不同参数,通过添加虹膜、巩膜或睫状体等光学部件创建了猪眼模型,为激光手术研究提供折射率、

透射率、反射率、吸收系数和散射系数等参数,成为隐形眼镜研究的生物医学模型。

猪眼模型被用来评估眼内晶状体植入期间的手术疗效,已在色素性视网膜炎、青光眼、干眼症、视网膜脱离和分析视网膜和脉络膜的组织学变化中的比较研究价值得到了验证,目前哥廷根小型猪是眼科研究中流行的非啮齿类动物模型^[58]。

2.4 皮肤研究

皮肤病和皮肤损伤较为常见,动物模型广泛应用于研究皮肤生理病理学和测试潜在的治疗方法。猪皮肤的表皮、厚度、毛囊密度和细菌群与人类皮肤相似,因此,FDA 建议将猪纳入临床前生物学研究和治疗性检测^[59]。

因烧伤导致的液体流失、pH 失衡、器官衰竭和感染等因素可导致死亡,冷冻保存的猪皮肤通过异种移植可以完整的覆盖在伤口部位,在严重烧伤的患者身上采用猪皮移植可获得较好的治疗效果,故猪的皮肤模型有助于烧伤组织工程皮肤的发展。2009 年,Barbero 等^[60]比较了人类和家猪皮肤之间的渗透性和滞后时间测量值,评估种内和种间变异性,结果发现猪皮肤通透性种内平均变异系数为 21%,人皮肤渗透性平均变异系数为 35%,化合物组的种间平均变异系数为 37%,证明猪是人类皮肤渗透性的良好模型,并且比人类皮肤模型具有更少的变异性。

单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 技术可以同时定量分析数千个单个细胞的转录组,为细胞类型、组成、状态、信号传导、受体-配体相互作用及其在发育、疾病和治疗过程中的动力学提供了新的见解,Han 等^[61]研究了一种用于分离和冷冻保存猪皮肤单细胞以获得 scRNA-seq 的方法。使用 Miltenyi 试剂盒和 MiltenyigentleMACS 解离器可以将猪皮肤解离成具有高细胞活力的单细胞,在 90% FBS + 10% DMSO 冷冻保存,不会引起额外的细胞死亡,细胞聚集或基因表达谱的变化,为皮肤研究提供了很大价值。

猪模型在皮肤愈合研究中被广泛使用,Hamilton 等^[62]研究了猪伤口的解剖位置、大小、深度以及愈合的微环境,得出猪是人类肌成纤维细胞愈合的有用类似物。Tapking 等^[63]测试烧伤中的不同皮肤组织类型,为伤口愈合提供研究方法。目前猪模型已被用于药物毒性、改善烧伤的治疗方式、整形外科技术、人工皮肤移植等研究。

2.5 营养和微生物组研究

猪是研究儿科营养和胃肠病学的重要动物,人类和猪作为杂食性哺乳动物,结肠是纤维性膳食成分的主要发酵部位,而且猪最低营养需求量与人类的日常营养需求量相当,与人类具有相似的营养吸收过程。猪已被用于研究与人类营养科学的相关领域,包括代谢综合征、肥胖症、食物过敏、酒精摄入等。Roura 等^[64]发现猪可以像人类一样品尝酸(酸味)、碳水化合物(甜味)、谷氨酸(鲜味)和脂肪酸,这种营养品尝系统的相似性使其可以用于与饮食味道测试和食欲调节的研究。

新生猪与早产儿在体型、器官发育和许多临床特征方面非常相似,这种比较优势使其成为早产儿胃肠道和肝重要疾病的新的转化和临床相关模型^[65]。2014 年,Odle 等^[66]阐述了仔猪模型的各种常量营养素,包括脂质、碳水化合物、蛋白质、氨基酸和钙磷,证明仔猪是儿科营养和代谢研究的适应性和稳定的模型。猪的研究已经确定了早产、微生物定植和肠内营养在坏死性小肠结肠炎发病机制中的重要作用。Burrin 等^[67]对新生猪的研究表明,无胃肠激素胰高血糖素样肽 2 (GLP-2) 对肠道的营养作用及其在肠道适应过程中的作用,对阐明肠外营养相关肝病也发挥了重要作用。早产猪可成为研究肠道微生物群调节剂、药物和新型诊断工具近红外光谱的宝贵模型,以预防和治疗儿科疾病。

2.6 异种移植研究

全世界有很多人由于疾病等原因等待器官或者细胞移植,目前尚未有足够的供体用于患者治疗,Carrel^[68]提出移植治疗器官衰竭的未来是“异种移植”,将非人类物种的细胞、组织或器官移植到人类中,提供无限的可移植器官作为永久性器官替代物或人源器官的“桥梁”。猪器官异种移植为人体器官移植短缺提供了解决方案。对移植时,应考虑抗体、补体、凝血、炎症和细胞反应,Cooper 等^[69]发现器官来源猪的遗传操作要删除已知碳水化合物特异性抗原的表达并转基因表达人类保护蛋白,例如补体和凝血调节蛋白。

转基因猪的异种移植最大的挑战是超急性排斥反应,为了避免这种情况,采用敲除 α -1,3-半乳糖基转移酶基因和包膜下自体胸腺组织培育。2022 年,Montgomery 等^[70]完成了世界首例猪肾移植手术,将转基因猪的肾移植到两个脑死亡的人类接受者身上,发现异种移植后每小时尿量是天然肾尿量

的 2 倍多,保持活力和功能 54 h,没有超急性排斥反应的迹象。2022 年,Porrett 等^[71]对脑死亡患者进行双侧天然肾切除术,随后从基因工程改造后的猪身上移植了两个肾,实验中没有观察到超急性排斥反应,肾保持活力 74 h。2022 年,Reardon 等^[72]首次将基因修饰猪的心脏移植给晚期心脏病患者,术后没有出现严重的排斥反应,猪心也开始发挥正常功能,但在术后 2 个月去世,这是人类首次成功将转基因猪心脏移植到患者体内。

这些异种移植的尝试为研究提供了诸多有价值的科学数据,是器官移植发展道路上的里程碑,但目前仍面临着“免疫排斥”“跨物种生物安全”“伦理风险”等重大隐患^[73]。

2.7 口腔医学研究

人类等大型哺乳动物具有乳牙和恒牙两副牙列,恒牙发育和乳恒牙替换长达 6 ~ 12 年^[74]。目前应用于口腔医学研究的模式动物多为小鼠等啮齿类动物,由于其为单牙列,无法进行乳恒牙替换的研究。爬行动物虽为多牙列动物,但牙齿的形态结构及功能与人类具有较大差别。

1976 年,Bivin 等^[75]发现小型猪的牙列形态、替换模式与人类更相似,可作为研究乳恒牙发育的模式动物。1995 年,Lang 等^[76]发现小型猪牙周组织体外培养后再植入有再生能力。2006 年,Sonoyama 等^[77]通过小型猪自体根尖牙干细胞(stem cells from the apical papilla, SCAPs)和牙周膜干细胞(periodontal stem cells, PDLSCs)与生物支架复合,实现了生物牙根再生,并用异体牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)实现了冠修复。2014 年,Iwasaki 等^[78]利用牙周部分牙槽骨去除联合丝线结扎的方法,建立了小型猪的牙周炎模型。后来经过不断探索,创建了小型猪牙齿发育研究平台,建立了小型猪牙胚发育不同阶段的 cDNA 文库、基因表达谱、非编码 RNA 表达谱、DNA 甲基化谱及蛋白质调控网络,证明了小型猪是研究牙齿发育和替换的理想模式动物^[79]。在 Li 等^[80]、Xu 等^[81]的研究中,小型猪已成为探讨放射性骨坏死(osteoradionecrosis, ORN)及双膦酸盐相关性颌骨骨坏死(bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, BRONJ)等颌骨疾病发病机制和诊治方法的重要模式动物。

2.8 胃肠疾病研究

胃肠道与营养物质的供应、消化和吸收方面有

着重要关联,猪的胃肠在结构和营养吸收方面与人类具有相似性,而且对人类的肠道病原体具有易感性,是合适的胃肠疾病模型^[82]。目前已被用来评估肠道微生物组成对饮食引起的肥胖和非酒精性脂肪性肝炎的影响,以及研究营养干预后人类微生物群的变化。

猪可作为许多胃肠道疾病的模型,2005 年, Rosow 等^[83]在猪模型中捕捉肠系膜缺血的最早阶段使用计算机断层扫描进行成像分析,2011 年, Pereira-Fantini 等^[84]使用短肠综合征仔猪模型研究小肠切除术的短期和长期影响。2013 年, Sangild 等^[65]研究早产猪作为小儿坏死性小肠结肠炎的模型,还有艾滋病相关隐孢子虫感染^[85]、应激诱导的肠道功能障碍模型^[86]、囊性纤维化模型^[87]和家族性腺瘤性息肉病模型等^[88]。2021 年,孔令建等^[89]使用离体猪胃建立了适用于内镜黏膜下剥离术操作训练的人工血液灌注离体猪胃模型。2023 年, Papenkort 等^[90]通过计算机建立了猪胃 3D 模型,在未来可用于人类胃功能研究。

2.9 其他疾病模型研究

猪作为模式动物除了在以上疾病中应用外,也在癌症、骨骼、生殖、胎儿发育、肺部疾病、感染性疾病和疫苗设计、大脑和神经性疾病中有所应用。

与小鼠相比,猪具有较长的寿命,可以更准确地研究癌症进展,且猪的平均体型与人类相似(人类, 65 kg; 小型猪, 80 kg; 小鼠, 0.02 kg),作为模式动物更容易进行手术、诊断成像和治疗测试,目前已有乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、骨肉瘤和黑色素瘤等癌症模型^[91]。在肿瘤学方面, Noah 等^[92]用病毒致癌 cDNAs 转化的原代猪细胞的自体移植证明猪的肿瘤发生与人类相似,为肿瘤的治疗提供良好的模型。

猪是临床转化应用的重要模式动物,在口腔生物医学研究中可研究牙周炎治疗、颌骨骨坏死及牙髓牙本质再生等^[79]。此外,基因工程猪模型可推进神经退行性疾病的研究,如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈症以及肌萎缩侧索硬化症等^[93]。

猪是人畜共患病的来源,从细菌(沙门氏菌病)到病毒(流感)再到寄生虫(弓形虫病)疾病^[94],感染人类和猪的流感病毒具有相同的亚型(H1N1、H1N2 和 H3N2),对猪的生物医学模型进行优化,可以更好地揭示人类流感病毒的感染机制,探索感染引起炎症反应的治疗方法以及开发流感疫苗。

3 展望

猪作为模式动物代表了基础生物学、农业和兽医科学交叉融合,目前已有多种人类疾病的猪模型,为人类疾病的分析和治疗提供了支持,在疾病机制、药物测试、疫苗设计和异种移植等方面的研究中发挥了重要作用。猪的基因工程的最新进展进一步丰富了可用的猪模型的种类,随着对猪基因组和免疫系统研究的深入,也将提升猪作为模式动物的潜力。

美国国家猪资源研究中心(National Swine Resource and Research Center, NSRRC)是世界上第一个专门从事遗传工程猪制备、模式猪遗传物质保存的官方机构,截至目前,保存了 60 余种基因工程猪品系,是最大的人类疾病模型猪种质资源及信息资源库(<https://nsrrc.missouri.edu/StrainAvail/>)^[95],我国在“十二五”期间优先规划安排模式动物表型与遗传研究国家重大科技基础设施建设,其中猪的设施“天蓬工程”已于 2022 年 10 月试运行,这将推动猪作为模式动物的开发与应用,为动物育种、人类医疗、异种器官移植方面提供平台支撑。

与小动物模型相比,猪需要更多的空间、饲料,需要特殊饲养和实验设施,喂养成本高以及检测样本量少等,目前已实验动物化的小型猪品种包括西藏小型猪、版纳微型猪、贵州小型猪、中国农大小型猪、五指山小型猪、广西巴马小型猪和滇南小耳猪等^[96]。如果可以改善猪的营养、物理环境、健康、行为互动和精神状态,会促进猪模型的发展。猪和人类依旧存在许多差异,在临床试验前要确定药物和治疗的安全性,在实验中要小心交叉感染和疾病的传播。此外,目前一些模型未形成稳定表型、未能广泛应用于基础理论研究,还需要进一步完善的技术体系,将发病机制与临床有机结合。

近年来对猪多能干细胞和基因编辑技术的研究为克隆猪的生产提供了技术指导,加快了猪模型在研究遗传背景和测试药物、治疗方法和给药方法方面的研究,但在猪基因编辑、体外胚胎培养和辅助生殖方面还有很多需要改进的地方。随着基础科学和应用技术的持续发展,需要对猪的疾病模型进行有针对性的深入研究,以提供合适的动物模型。

参 考 文 献(References)

[1] Stricker-Krongrad A, Shoemaker CR, Bouchard GF. The

- miniature swine as a model in experimental and translational medicine [J]. *Toxicol Pathol*, 2016, 44(4): 612–623.
- [2] Bassols A, Costa C, Eckersall PD, et al. The pig as an animal model for human pathologies: a proteomics perspective [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2014, 8(9-10): 715–731.
- [3] 丁生财. 猪内源性逆转录病毒异种移植生物安全性的初步研究 [D]. 重庆: 第三军医大学; 2002.
- Ding SC. A preliminary study on biologic safety with porcine endogenous retrovirus in xenotransplantation [D]. Chongqing: Third Military Medical University; 2002.
- [4] 杨公社, 张浩卫, 白亮, 等. 猪—研究肥胖和糖尿病的理想模式动物 [J]. *自然科学进展*, 2008, 18(5): 481–487.
- Yang GS, Zhang HW, Bai L, et al. Pigs—an ideal model animal for studying obesity and diabetes [J]. *Prog Nat Sci*, 2008, 18(5): 481–487.
- [5] 蔡新宇, 毛晓伟, 赵毅强. 家养动物驯化起源的研究方法与进展 [J]. *生物多样性*, 2022, 30(4): 179–196.
- Cai XY, Mao XW, Zhao YQ. Methods and research progress on the origin of animal domestication [J]. *Biodivers Sci*, 2022, 30(4): 179–196.
- [6] 冯书堂. 我国小型猪资源实验化培育及开发利用 [J]. *实验动物科学*, 2007, 24(6): 111–118.
- Feng ST. Experimental cultivation, development and utilization of miniature pig resources in China [J]. *Lab Anim Sci*, 2007, 24(6): 111–118.
- [7] McGonigle P, Ruggeri B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(1): 162–171.
- [8] 黄涛, 张海涛, 李志雄, 等. 非人灵长类动物在病毒感染模型中的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(2): 248–255.
- Huang T, Zhang HT, Li ZX, et al. Research progress in non-human primate virus infection models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(2): 248–255.
- [9] Pabst R. The pig as a model for immunology research [J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 380(2): 287–304.
- [10] 王芳, 牛冬, 余旭平, 等. 猪生物医学模型研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2009, 30(4): 99–102.
- Wang F, Niu D, Yu XP, et al. Progress on swine biomedical model [J]. *Prog Vet Med*, 2009, 30(4): 99–102.
- [11] 周姐. 猪圆环病毒 2 型-猪瘟病毒共感染细胞的蛋白质组研究 [D]. 杭州: 浙江大学; 2016.
- Zhou N. Proteome analysis of the coinfection of porcine circovirus type 2 and classical swine fever virus *in vitro* [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 2016.
- [12] Lunney JK, van Goor A, Walker KE, et al. Importance of the pig as a human biomedical model [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(621): eabd5758.
- [13] Itoh M, Mukae Y, Kitsuka T, et al. Development of an immunodeficient pig model allowing long-term accommodation of artificial human vascular tubes [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2244.
- [14] Al-Mashhadi RH, Sørensen CB, Kragh PM, et al. Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(166): 166ra1.
- [15] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095–2128.
- [16] Chen F, Wang Y, Yuan Y, et al. Generation of B cell-deficient pigs by highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene targeting [J]. *J Genet Genomics*, 2015, 42(8): 437–444.
- [17] Fang B, Ren X, Wang Y, et al. Apolipoprotein E deficiency accelerates atherosclerosis development in miniature pigs [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(10): dmm036632.
- [18] Xie B, Shi X, Li Y, et al. Deficiency of ASGR1 in pigs recapitulates reduced risk factor for cardiovascular disease in humans [J]. *PLoS Genet*, 2021, 17(11): e1009891.
- [19] Karimi M, Petkova V, Asara JM, et al. Metabolomics and the pig model reveal aberrant cardiac energy metabolism in metabolic syndrome [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3483.
- [20] White FC, Roth DM, Bloor CM. The pig as a model for myocardial ischemia and exercise [J]. *Lab Anim Sci*, 1986, 36(4): 351–356.
- [21] Judge EP, Lynne Hughes JM, Egan JJ, et al. Anatomy and bronchoscopy of the porcine lung. A model for translational respiratory medicine [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 51(3): 334–343.
- [22] Gyöngyösi M, Strehblow C, Sperker W, et al. Platelet activation and high tissue factor level predict acute stent thrombosis in pig coronary arteries: prothrombotic response of drug-eluting or bare stent implantation within the first 24 hours [J]. *Thromb Haemost*, 2006, 96(2): 202–209.
- [23] Bertho N, Meurens F. The pig as a medical model for acquired respiratory diseases and dysfunctions: an immunological perspective [J]. *Mol Immunol*, 2021, 135: 254–267.
- [24] Schüttler D, Tomsits P, Bleyer C, et al. A practical guide to setting up pig models for cardiovascular catheterization, electrophysiological assessment and heart disease research [J]. *Lab Anim*, 2022, 51(2): 46–67.
- [25] Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, et al. Animal models of cardiovascular diseases [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 497841.
- [26] Baena-Díez JM, Peñafiel J, Subirana I, et al. Risk of cause-specific death in individuals with diabetes: a competing risks analysis [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(11): 1987–1995.
- [27] Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(3): 140–162.
- [28] Piatkowski T, Brandenberger C, Rahmanian P, et al. Localization of exogenous mesenchymal stem cells in a pig model of lung transplantation [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2018, 66(1): 63–70.

- [29] 周莹, 刘军彤, 杨宇峰, 等. 中西医结合治疗糖尿病研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(9): 134–138.
Zhou Y, Liu JT, Yang YF, et al. Research progress on the treatment of diabetes by integrative medicine [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2023, 25(9): 134–138.
- [30] Renner S, Blutke A, Clauss S, et al. Porcine models for studying complications and organ crosstalk in diabetes mellitus [J]. Cell Tissue Res, 2020, 380(2): 341–378.
- [31] Marshall M, Oberhofer H, Staubesand J. Early micro- and macro-angiopathy in the streptozotocin diabetic minipig [J]. Res Exp Med, 1980, 177(2): 145–158.
- [32] Marshall M. Induction of chronic diabetes by streptozotocin in the miniature pig [J]. Res Exp Med, 1979, 175(2): 187–196.
- [33] Ferrer J, Scott WE, Weegman BP, et al. Pig pancreas anatomy: implications for pancreas procurement, preservation, and islet isolation [J]. Transplantation, 2008, 86(11): 1503–1510.
- [34] Boullion RD, Mokelke EA, Wamhoff BR, et al. Porcine model of diabetic dyslipidemia: insulin and feed algorithms for mimicking diabetes mellitus in humans [J]. Comp Med, 2003, 53(1): 42–52.
- [35] 赵玉琼, 陈华. 小型猪糖尿病模型研究进展 [J]. 实验动物科学, 2020, 37(4): 78–84.
Zhao YQ, Chen H. Swine models of diabetes mellitus [J]. Lab Anim Sci, 2020, 37(4): 78–84.
- [36] Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [J]. Metabolism, 2000, 49(11): 1390–1394.
- [37] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. Pharmacol Res, 2005, 52(4): 313–320.
- [38] 肖国华, 张素君, 余坚, 等. 高糖高脂联合低剂量 STZ 诱导版纳微型猪 2 型糖尿病动物模型的建立 [J]. 中南医学科学杂志, 2012, 40(4): 351–356.
Xiao GH, Zhang SJ, Yu J, et al. Establishment of model of type 2 diabetes in Chinese Banna miniature pigs induced by high sucrose/high fat diet and STZ [J]. J Med Sci Central South Chin, 2012, 40(4): 351–356.
- [39] 孙若飞, 王昆华, 赵泉, 等. 2 型糖尿病滇南小耳猪动物模型的建立 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(5): 37–40.
Sun RF, Wang KH, Zhao Q, et al. Establishment of animal model of type 2 diabetic in diannan small-ear pigs [J]. Lab Anim Sci, 2012, 29(5): 37–40.
- [40] 于健, 叶瑶, 黄漓莉, 等. 高脂高糖饮食联合链脲佐菌素构建巴马小型猪 2 型糖尿病模型稳定性研究 [J]. 山西医药杂志, 2014, 43(21): 2499–2501.
Yu J, Ye Y, Huang LL, et al. The research on stability of type 2 diabetes model in Chinese Bama miniature pigs induced by high fat/ high sucrose diet and STZ [J]. Shanxi Med J, 2014, 43(21): 2499–2501.
- [41] 滕东剑, 高碧云, 农晓琳, 等. 广西巴马小型猪 2 型糖尿病模型的建立及其牙龈组织病理学观察 [J]. 广西医科大学学报, 2017, 34(10): 1411–1414.
Teng DJ, Gao BY, Nong XL, et al. The establishment of Bama minipig model of type 2 diabetes and the observation of its gingival histopathology [J]. J Guangxi Med Univ, 2017, 34(10): 1411–1414.
- [42] Wu Y, Zhang L, Liang J, et al. Comparative analysis on liver transcriptome profiles of different methods to establish type 2 diabetes mellitus models in Guangxi Bama mini-pig [J]. Gene, 2018, 673: 194–200.
- [43] Vize PD, Michalska AE, Ashman R, et al. Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth [J]. J Cell Sci, 1988, 90: 295–300.
- [44] Renner S, Fehlings C, Herbach N, et al. Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function [J]. Diabetes, 2010, 59(5): 1228–1238.
- [45] Renner S, Braun-Reichhart C, Blutke A, et al. Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs [J]. Diabetes, 2013, 62(5): 1505–1511.
- [46] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus [J]. Diabetes Care, 2012, 35(1): S64–S71.
- [47] Eksi YE, Balci MK, Sanlioglu S. Generation of insulin deficient pancreatic beta cells for insulin gene replacement therapy [J]. Hum Gene Therapy, 2018, 29(12): A114–A115.
- [48] McKenney-Drake ML, Rodenbeck SD, Owen MK, et al. Repeat cross-sectional data on the progression of the metabolic syndrome in Ossabaw miniature swine [J]. Data Brief, 2016, 7: 1393–1395.
- [49] Phillips RW, Panepinto LM, Will DH. Genetic selection for diabetogenic traits in Yucatan miniature swine [J]. Diabetes, 1979, 28(12): 1102–1107.
- [50] Hand MS, Surwit RS, Rodin J, et al. Failure of genetically selected miniature swine to model NIDDM [J]. Diabetes, 1987, 36(3): 284–287.
- [51] 盛志康. 猪眼角膜微结构、内皮细胞活性及基因表达研究 [D]. 天津: 天津农学院; 2020.
Sheng ZK. Study eye cornea on the microstructure, endothelial cell activity and gene expression in pigs [D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University; 2020.
- [52] Middleton S. Porcine ophthalmology [J]. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2010, 26(3): 557–572.
- [53] Vrolyk V, Desmarais MJ, Lambert D, et al. Neonatal and juvenile ocular development in göttingen minipigs and domestic pigs: a histomorphological and immunohistochemical study [J]. Vet Pathol, 2020, 57(6): 889–914.
- [54] Sugiura T, Kurosaka D, Uezuki Y, et al. Creating cataract in a pig eye [J]. J Cataract Refract Surg, 1999, 25(5): 615–621.
- [55] Ruiz-Ederra J, García M, Hernández M, et al. The pig eye as a novel model of glaucoma [J]. Exp Eye Res, 2005, 81(5): 561–569.
- [56] Sanchez I, Martin R, Ussa F, et al. The parameters of the porcine eyeball [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2011,

- 249(4): 475–482.
- [57] Regal S, O'Connor D, Brige P, et al. Determination of optical parameters of the porcine eye and development of a simulated model [J]. *J Biophotonics*, 2019, 12(11): e201800398.
 - [58] Shrader S, Mowry RN. Histomorphometric evaluation of the Göttingen minipig eye [J]. *Vet Ophthalmol*, 2019, 22(6): 872–878.
 - [59] FDA Wound Healing Clinical Focus Group. Guidance for industry: chronic cutaneous ulcer and burn wounds-developing products for treatment [J]. *Wound Repair Regen*, 2001, 9(4): 258–268.
 - [60] Barbero AM, Frasch HF. Pig and Guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: a quantitative review [J]. *Toxicol Vitro*, 2009, 23(1): 1–13.
 - [61] Han L, Jara CP, Wang O, et al. Isolating and cryopreserving pig skin cells for single-cell RNA sequencing study [J]. *PLoS One*, 2022, 17(2): e0263869.
 - [62] Hamilton DW, Walker JT, Tinney D, et al. The pig as a model system for investigating the recruitment and contribution of myofibroblasts in skin healing [J]. *Wound Repair Regen*, 2022, 30(1): 45–63.
 - [63] Tapking C, Popp D, Branski L. Pig model to test tissue-engineered skin [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1993: 239–249.
 - [64] Roura E, Koopmans SJ, Lallès JP, et al. Critical review evaluating the pig as a model for human nutritional physiology [J]. *Nutr Res Rev*, 2016, 29(1): 60–90.
 - [65] Sangild PT, Thymann T, Schmidt M, et al. Invited review: the preterm pig as a model in pediatric gastroenterology [J]. *J Anim Sci*, 2013, 91(10): 4713–4729.
 - [66] Odle J, Lin X, Jacobi S, et al. The suckling piglet as an agrimedical model for the study of pediatric nutrition and metabolism [J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2014, 2: 419–444.
 - [67] Burrin D, Sangild PT, Stoll B, et al. Translational advances in pediatric nutrition and gastroenterology: new insights from pig models [J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2020, 8: 321–354.
 - [68] Carrel A. Results of the transplantation of blood vessels, organs and limbs [J]. *JAMA*, 1983, 250(7): 944–953.
 - [69] Cooper DKC, Hara H, Iwase H, et al. Pig kidney xenotransplantation: progress toward clinical trials [J]. *Clin Transplant*, 2021, 35(1): e14139.
 - [70] Montgomery RA, Stern JM, Lonze BE, et al. Results of two cases of pig-to-human kidney xenotransplantation [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(20): 1889–1898.
 - [71] Porrett PM, Orandi BJ, Kumar V, et al. First clinical-grade porcine kidney xenotransplant using a human decedent model [J]. *Am J Transplant*, 2022, 22(4): 1037–1053.
 - [72] Reardon S. First pig-to-human heart transplant: what can scientists learn? [J]. *Nature*, 2022, 601(7893): 305–306.
 - [73] 杨兆华, 王春生. “转基因猪心”可期? 异种心脏移植研究进展 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2023, 50(4): 600–605, 612.
 - Yang ZH, Wang CS. Research progress in cardiac xenotransplantation: can “genetically modified pig heart” be expected? [J]. *Fudan Univ J Med Sci*, 2023, 50(4): 600–605, 612.
 - [74] 刘怡, 房殿吉, 王松灵. 小型猪在口腔医学研究中的应用 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2007, 42(7): 444–446.
 - Liu Y, Fang DJ, Wang SL. Application of miniature pig in stomatology research [J]. *Chin J Stomatol*, 2007, 42(7): 444–446.
 - [75] Bivin WS, McClure RC. Deciduous tooth chronology in the mandible of the domestic pig [J]. *J Dent Res*, 1976, 55(4): 591–597.
 - [76] Lang H, Schüler N, Arnhold S, et al. Formation of differentiated tissues *in vivo* by periodontal cell populations cultured *in vitro* [J]. *J Dent Res*, 1995, 74(5): 1219–1225.
 - [77] Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine [J]. *PLoS One*, 2006, 1(1): e79.
 - [78] Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, et al. Periodontal regeneration using periodontal ligament stem cell-transferred amnion [J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(3-4): 693–704.
 - [79] 周建, 杨子, 王松灵. 小型猪模式动物在口腔颌面生物医学研究中的应用 [J]. *生物医学转化*, 2021, 2(3): 1–5, 36.
 - Zhou J, Yang Z, Wang SL. Application of miniature pig model animal in oral and maxillofacial biomedical research [J]. *Biomed Transform*, 2021, 2(3): 1–5, 36.
 - [80] Li Y, Xu J, Mao L, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell therapy for bisphosphonate-related jaw osteonecrosis in Swine [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(14): 2047–2056.
 - [81] Xu J, Yan X, Gao R, et al. Effect of irradiation on microvascular endothelial cells of parotid glands in the miniature pig [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 78(3): 897–903.
 - [82] Zhang Q, Widmer G, Tzipori S. A pig model of the human gastrointestinal tract [J]. *Gut Microbes*, 2013, 4(3): 193–200.
 - [83] Rosow DE, Sahani D, Strobel O, et al. Imaging of acute mesenteric ischemia using multidetector CT and CT angiography in a porcine model [J]. *J Gastrointest Surg*, 2005, 9(9): 1262–1274.
 - [84] Pereira-Fantini PM, Thomas SL, Wilson G, et al. Short- and long-term effects of small bowel resection: a unique histological study in a piglet model of short bowel syndrome [J]. *Histochem Cell Biol*, 2011, 135(2): 195–202.
 - [85] Gookin JL, Chiang S, Allen J, et al. NF- κ B-mediated expression of iNOS promotes epithelial defense against infection by *Cryptosporidium parvum* in neonatal piglets [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(1): G164–G174.
 - [86] Moeser AJ, Klok CV, Ryan KA, et al. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(1): G173–G181.
 - [87] Welsh MJ, Rogers CS, Stoltz DA, et al. Development of a porcine model of cystic fibrosis [J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2009, 120: 149–162.
 - [88] Flisikowska T, Merkl C, Landmann M, et al. A porcine model of

familial adenomatous polyposis [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(5): 1173–1175.

[89] 孔令建, 殷积彬, 周洋洋, 等. 适用于内镜黏膜下剥离术操作训练的人工血液灌注离体猪胃模型的制备 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2021, 56(4): 451–455.

Kong LJ, Yin JB, Zhou YY, et al. Preparation of isolated pig gastric model with blood circulation for operation training of endoscopic submucosal dissection [J]. *J Zhengzhou Univ Med Sci*, 2021, 56(4): 451–455.

[90] Papenkort S, Borsdorf M, Bül M, et al. A geometry model of the porcine stomach featuring mucosa and muscle layer thicknesses [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2023, 142: 105801.

[91] Horák V, Fortýn K, Hruban V, et al. Hereditary melanoblastoma in miniature pigs and its successful therapy by devitalization technique [J]. *Cell Mol Biol*, 1999, 45(7): 1119–1129.

[92] Noah R, Schook Lawrence B, Schachtschneider Kyle M. Porcine cancer models: potential tools to enhance cancer drug trials [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2020, 15(8): 893–902.

[93] Ryan MC, Sherman P, Rowland LM, et al. Miniature pig model of human adolescent brain white matter development [J]. *J Neurosci Methods*, 2018, 296: 99–108.

[94] Ludwig B, Wolf E, Schönmann U, et al. Large animal models of diabetes [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2128: 115–134.

[95] 高菲, 王煜, 杜嘉祥, 等. 遗传修饰猪模型在生物医学及农业领域研究进展及应用 [J]. *遗传*, 2023, 45(1): 6–28.

Gao F, Wang Y, Du JX, et al. Advances and applications of genetically modified pig models in biomedical and agricultural field [J]. *Hereditas*, 2023, 45(1): 6–28.

[96] 商海涛, 魏泓. 我国小型猪品系资源状况初浅分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(1): 70–75.

Shang HT, Wei H. Preliminary analysis of chinese miniature pig strains and resources [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2007, 15(1): 70–75.

[收稿日期] 2023-03-07

构建临床癌症研究相关的人源肿瘤异种移植模型的进展

人源肿瘤异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)模型是从癌症患者手术切除肿瘤组织,随后移植到免疫缺陷小鼠体内,从而更好地保留了肿瘤的异质性。这是一种重要的转化医学研究方法,特别是在推动精准医学方面,这种方法已经崭露头角。本文从时间维度阐述了 PDX 模型在各个阶段的发展。作为 PDX 模型发展的第一阶段,人源肿瘤原位异种移植(patient-derived orthotopic xenograft, PDOX)模型将人源肿瘤组织植入小鼠体内,位置与患者的解剖位置相对应。PDOX 模型具有多个优势,包括高度保真地还原原始肿瘤、增强药物敏感性以及提高移植成功率。然而, PDOX 模型也存在严峻的挑战,它需要先进的手术技术和精密的成像技术,这限制了其应用。随后,人源化小鼠模型以及斑马鱼模型相继被开发应用。人源化小鼠模型具有类似肿瘤和免疫系统相互作用的人类免疫环境,是 PDX 模型研究的热点话题。斑马鱼异种移植模型(zebrafish patient-derived tumor xenograft, zPDX)和患者源性类器官(patient-derived organoids, PDO)模型作为研究癌症和药物开发的新模型, zPDX 模型用于将肿瘤移植到斑马鱼体内,成为新型个性化动物疾病模型,具有缩短患者等待时间的优势。PDO 模型提供了一种新的药物测试方法,该方法可复制体内环境并保存重要的与患者相关的肿瘤信息。本综述突出了 PDX 模型每个新阶段的功能特征,并阐述了这一快速发展领域所面临的挑战以及未来的发展。

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): 381–398. <https://doi.org/10.1002/ame2.12349>)。

《中国实验动物学报》2023 年总目次

2023 年 第 31 卷 1~12 期

第 1 期

小鼠骨髓间充质干细胞分离方法的比较与探讨	廖新爱,蔡丹妮,游若兰,黄慧芳(1)
基于 TGF- β 1/Smad 信号通路初步探讨虎杖醇提物对腺嘌呤诱导小鼠肾间质纤维化的改善作用	段艳华,陈云祥,郑高利,温磊,陈浩,张丽丽,秦荔,王佳虹,刘芳,夏道宗,张立将(10)
肺孢子菌肺炎小鼠模型建立及免疫学评价	邓书伟,杜春静,张玥,周妍希,张亮,秦秋实,朱缪雯(20)
骨髓间充质干细胞对类风湿关节炎小鼠干预效果研究	吴玉娥,曾业文,罗挺,凌雪莹,梁十,李航,贾欢欢(27)
大鼠真菌性中耳炎模型建立	彭冬冬,陈相池,唐梓宁,肖洒,彭西湘,刘学武(35)
青春期丙烯酰胺暴露对小鼠肺组织氧化损伤的影响	卜文婕,林爱琴,高继光,潘涛,任悦鸣,孙敏(43)
痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型的构建及代谢组学分析	刘思美,强喆,吴思澜,涂如霞,李恒华,黄崇刚(51)
不同造模周期对羟基脲致肾阳虚动物模型的影响	马小娟,马文礼,王丽新(64)
MEC-1 移植法构建慢性淋巴细胞白血病小鼠模型	赵子璇,南苗苗,贺喜白乙,梁浩,郭旭东,刘东军(75)
基于 Sirt1/FoxO1 通路探讨瑞马唑仑减轻脓毒症小鼠脑损伤的机制研究	郭小丽,杨昌明,王婵,王先圆,刘荣莉(82)
神经根型颈椎病动物模型研究进展	成海燕,杨琛,何燕,段利冬,徐霞(91)
基于病证结合探讨动脉粥样硬化瘀毒证的模型构建与评价	张晓因,吴敏,孙长鑫,陈纪烨,李晓雅,刘龙涛(98)
模拟失重实验动物模型的建立与评价	纪依澜,赵德明,王菲,阚广捍,吴斌,杨利峰(106)
高尿酸血症动物模型研究进展	王琳,沈嘉艳,谢招虎,秦冬冬,李兆福,马晓惠,吕小满(112)
改良的多平台水环境法在睡眠剥夺动物模型中的应用与评价	刁华琼,张婧,王敏,陈雨菲,朱庆生,李小黎(120)
美国农业部主导的实验动物管理政策演变和启示	徐国恒(129)
美国卫生署与国立卫生研究院 NIH 主导的实验动物管理体系的演变和启示	徐国恒(134)

第 2 期

冠状动脉左前降支结扎对巨噬细胞消除模型构建的影响	向晨莹,钟嘉俊,郝琰琰,布威麦热姆·热杰普,聂宇,廉虹(141)
去甲基化酶 JARID1D 在前列腺癌侵袭和转移中的作用与机制	谢清华,胡耀华,张彰勤,徐艺菲,张永斌,师长宏(151)
三种双心疾病动物模型的建立和评价	王元博,李夏,荆瑞,杨文山,王一晨,王超臣,姚磊,胡国(158)
基于文献及实验探讨急性心肌缺血模型大鼠海马神经元凋亡的研究	王堃,童思佳,吴生兵,周美启(167)
博来霉素诱导大鼠与小鼠肺纤维化模型的评价*	燕苗苗,赵亚昆,王搏,邱志广,田燕歌(179)
HBV 相关肝纤维化小鼠模型的建立及关键表型深度分析研究	何苗,向霞,徐如青,伍悦,吕小琴,刘阳,何明忠,赖国旗(187)
链脲佐菌素诱导糖尿病肺纤维化小鼠模型的建立与评价*	付庭吕,李宁,刘博昊,熊锐,何如愿,卢子龙,李国瑞,耿庆(194)
肺纤维化大鼠模型造模方法的优化*	陈广瑞,李俭,梁笛,秦宜德,付汉江(201)

基于细胞焦亡 PCR 芯片分析负重跑训练对增龄大鼠骨骼肌丢失的影响	付鹏宇, 杨璐瑶, 唐舒宁, 苏浩, 龚丽景 (208)
理中丸对脾虚型腹泻大鼠结肠黏膜屏障 IL-22/MUC2/claudin-2 信号通路的影响	杜青, 李心亮, 曾宏亮, 徐琳本, 谢芳一 (217)
基于 TL1A/DR3 探究肠道菌群对 TNBS 诱导大鼠肠纤维化的作用研究	赵慧巧, 张玉玲, 张永鹏, 靳国印, 贺伟, 罗飞, 卢年华 (225)
香砂六君子汤对脾胃虚弱型功能性消化不良大鼠的干预机制研究	刘梦雅, 成映霞, 白敏, 赵琳娜, 李润法, 张延英, 安耀荣, 段永强 (232)
啮齿类动物视觉电生理检测方法	姚泰康, 程天, 徐博轩, 索玲格, 张頔, 张纯 (240)
PDX 模型在肿瘤医学中的应用进展	马双平, 马静, 张洁, 张俊河 (245)
高尿酸血症和痛风动物模型及其建立方法的研究进展	程雅欣, 李佳 (251)
干燥综合征样动物模型的研究现状与思考	刘瑞林, 李纪高, 周全, 张剑勇, 贾二涛 (257)
性早熟动物造模研究进展	于身存, 吴静芬, 张桂菊 (265)
* 肺纤维化动物模型及评价专题	

第 3 期

胸腺上皮细胞特异性敲除 <i>GSK-3β</i> 基因小鼠模型的鉴定及免疫学特征观察	李喜, 曾艳, 陈昌蓉, 李论, 余祥, 周永芹, 王德成, 邓亚光, 宋银宏 (279)
西藏小型猪颈动脉粥样硬化模型的建立及评价研究	徐雁云, 潘永明, 黄俊杰, 屠海烨, 郁晨, 陈民利, 徐孝平 (287)
斑马鱼肝癌细胞与肿瘤相关成纤维细胞可视化转移模型的构建	张硕, 姜晓燕, 沈水杰, 吴育, 蔡艳, 葛炜炜, 李高盼 (296)
干眼肝经郁热证小鼠模型的建立与评价	刘培, 蒋鹏飞, 彭俊, 彭清华 (302)
非诺贝特和辛伐他汀对非酒精性脂肪肝小鼠线粒体功能的作用研究	王雪梅, 车悦, 王怡婷, 汪洁英, 门可 (310)
有氧和抗阻运动对 SAMP8 小鼠免疫机能的影响	张燕, 曲波, 丁海丽 (319)
基于数据挖掘的慢性支气管炎动物模型应用分析	邓亚胜, 黄慧, 梁天薇, 林江 (327)
树鼩脑微血管内皮永生化细胞系的建立及最适 D-半乳糖浓度诱导 BMECs 衰老细胞模型的探讨	陈柳, 邱敏, 丁相荣, 霍妹洵, 王文广, 陆彩霞, 代解杰 (337)
可实时监测的小鼠原发性肝癌模型建立及应用	方权, 郑晓光, 孙越, 陈倪静, 骆境怡, 王琦轩, 康蓉, 吴佳琪, 何小柏, 陈林洁 (346)
雷公藤建立卵巢早衰大鼠模型的实验研究	范雅祺, 郑燕鹏, 周子婷, 崔慕瑶, 李司琪, 单雪燕, 李鑫, 李莉, 王尚龙, 刘自民, 邹圣灿, 孙紫薇, 李玲璐 (355)
秋水仙碱对新西兰兔不稳定斑块形成的影响研究	张涛, 蒋知新, 杜大勇, 柳杨, 李巍, 李运田 (365)
人源肿瘤异种移植小鼠模型研究进展	刘张驰, 王娟, 陈旭 (374)
酒精使用障碍动物模型构建的研究进展	吕振, 龚志刚 (382)
基于登革病毒免疫逃逸机制的小鼠感染模型研究进展	李怡然, 师长宏, 赵勇, 吕玉红, 张彩勤 (390)
医学功能学科实验融入动物伦理教育的思考与探究	饶玉良, 张亚东, 严钰锋 (397)
化疗药物诱导的神经病理性疼痛动物模型研究进展	张俊, 黄琴, 肖彩芝, 夏冬琴, 曹杰, 田丽娅, 刘绍永, 王维 (402)
移植性肺癌动物模型研究进展	薛艳芳, 王莉翠, 周依舒, 黄劲柏 (410)

第 4 期

肠道湿热泄泻和寒湿泄泻“同病异治”的物质基础研究	陈宝霞, 任建明, 周轲, 李宏雅, 牛淳, 纪鹏, 华永丽, 魏彦明 (417)
巨噬细胞条件性 <i>Cd226</i> 基因敲除小鼠的构建及功能分析	秦琪, 李娟, 杨柳, 方亮, 陈丽华 (428)
豚草花粉-屋尘螨混合抗原诱导比格犬哮喘的探索性研究	罗钰龙, 陈迪非, 陈焕杰, 龙海斌, 刘经纬, 李时悦, 苏柱泉 (437)

PM2.5 暴露对大鼠心脏功能及 NLRP3 炎性小体表达的影响	张行行,赵麓,孙欠欠,赵安东,周甜雨,王川,刘继平,王斌(445)
基于实时体温监测技术探讨酵母菌、脂多糖、2,4-二硝基酚对小鼠致热作用及呼吸功能的影响	晋一帆,李胜群,孙竹筠,刘孝云,叶冬雪,赵涛,肖敏,容蓉,杨勇(454)
流感病毒-金黄色葡萄球菌共感染小鼠模型建立及达菲的干预作用研究	韩雨秀,赵良鑫,杜宝香,孙启慧,杨勇,容蓉(463)
树鼩视网膜血管内皮细胞永生化细胞株的建立及鉴定	霍姝洵,邱敏,王文广,陆彩霞,罕园园,代解杰(471)
基于数据挖掘的功能性消化不良动物模型的评价	刘昊,李文静,王馨媛,肖洪玲(478)
水浸束缚应激模型在小鼠结肠损伤研究中的探索与实践	徐小英,胡慧美,尹秋雄,曾海舟,江禹鹏,李博艺,钱国强(492)
Pkd1 ^{fl} : Cre 小鼠在自然状态下的发病情况研究	周卫民,刘庆生,吕东颖,陈方明,朱科燕,王德军(501)
妊娠母体免疫激活动物模型研究进展	邬建飞,蔡端芳,谭友果,蒲建林,向波,王丙龙(507)
新水缸潜水模型在斑马鱼焦虑及应激行为研究中的进展*	林艾诺,李亚茜,闫志,李可(514)
斑马鱼脊柱区的发育*	张静,迟彦艳,杨珩,宋雪,张健飞,隋锦鸿(524)
斑马鱼肝纤维化动物模型研究进展*	王洁,冯驰,董武,杨景峰(531)
斑马鱼模型在化妆品功效评价研究中的应用进展*	郑丹阳,徐梦漪,李淑敏,朱永闯,龔盛昭,蔡丽华,胡翠萍(541)
斑马鱼在放射生物学领域的研究进展*	冯青靛,曹少飞,龙泽宇,韩宝华,李蕴慧,李建国(549)
* 模式动物斑马鱼的基础与应用研究专题	

第 5 期

两种 C57BL/6J 小鼠酒精性脂肪肝模型建立方法及比较	杜冯,梁李铖,邹坤,马明华,黄文峰(557)
肾衰方干预 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬治疗 CKD 心肌损伤的作用机制研究*	张格第,刘庚鑫,郭敏,罗富里,晏子友(567)
人源化更年期抑郁小鼠模型构建及评价	曹晓静,武国富,侯佳睿,宋雷,王小云(576)
异丙肾上腺素诱导慢性心衰模型的方法优化*	杜冰玉,尹燕燕,岳昭娣,常万鹏,阚梦凡,于少泓(583)
基于“虚、瘀、毒”病机理论的膝痹病证结合模型的建立及评价	欧梁,卢敏,张永辉,邝高艳,谭旭仪,匡建军(590)
铁过载致心肌纤维化小型猪模型的建立*	关开明,钟德琳,王朝天,彭飞,方培荣,韦力琪,彭鹏(598)
不同病理因素诱导的大鼠心肌肥大模型心肌表型特征及表达谱*	丁月,周荧,刘景艳,周江峰,吕东颖,蔡兆伟,王德军(605)
3 种方法建立阳虚型慢传输型便秘大鼠模型的比较研究	张远哲,赵罗娜,简胜男,李中正,黎豫川(618)
塞来昔布和己酮可可碱对小鼠 Lewis 肺癌的抑瘤作用研究	郭默然,贾晓琼,杜娟,张劲然,宫家玉(629)
联合磷酸肌酸钠和曲美他嗪对酒精性心脏病大鼠的超声心动图及心脏血清学相关指标的影响*	李晓栋,李金国,游素君(635)
碘乙酸单钠诱导 SD 大鼠膝关节炎后 HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 蛋白表达及意义	熊翔,魏小雨,许建中,罗飞(643)
HIV 动物模型在毒品滥用研究中的应用	王婵,杨根梦,刘柳,王浩伟,苗霖,李怡,李娟,曾晓锋(653)
结直肠癌基因工程小鼠模型研究进展	安庆玲,谭邓旭,师长宏(660)
线粒体 DNA 编辑技术及其在生物医学中的应用	廖媛,陈方兵(668)
金黄地鼠生物净化及其应用	郭亚茜,杜晓鹏,朱华(676)
关于我国实验动物福利伦理的思考及建议	王贵平,周正宇(683)
脑类器官在创伤性脑损伤研究中的应用	刘可,郭文文,王颖花,张廷英,汪永锋,赵亚,师长宏(690)
* 心肌损害与心肌病	

第 6 期

miR-328-3p-Akt/mTOR 轴在雷公藤甲素抑制脑胶质瘤细胞生长中的作用及机制研究	刘喜红,杜晓丹,范孟杨,徐柳清,赵培源 (697)
多种认知障碍的危险因素对高血压大鼠脑组织病理形态和铁含量的影响	畅苏瑞,刘剑刚,文嘉钰,李浩,董国菊,刘春秋,石玉娇 (706)
姜黄素联合单胺氧化酶 A 抑制剂氯吉灵对肺癌细胞增殖的影响	王荟荟,郭晨博,谭邓旭,张延英,汪永锋,师长宏 (715)
2 型糖尿病气阴两虚证大鼠尿液代谢组学研究	邱华明,李子祥,金源卿,吴曙光 (722)
绝经后脂质代谢紊乱诱导小鼠抑郁症状的形成*	沈皓天,姜俊杰,晁滢,洪敏,郑劼,卞慧敏 (733)
大鼠肥胖抑郁模型建立及肠道菌群多样性的性别差异研究*	徐磊,罗小泉,瞿萍,钟毅,张鸿,曾宪保,杨玉艳,刘志勇,洪滔 (743)
妊娠期高血压疾病对早产大鼠甲状腺形态及功能的影响	何月,孙毛毛,吴聪榕,于永慧 (756)
白藜芦醇对大鼠运动性肝损伤的保护作用	胡戈,马欣雨,秦菲,曹建民,董丽,周海涛,华冰 (763)
阿片 μ 受体阻滞剂对习得性无助小鼠运动能力及抑郁、焦虑样行为的影响*	刘国军,刘阳春,刘志强 (770)
基于动物模型的药物筛选数据库的建立	吴玥,王珏,冯婷婷,李依桐,薛婧,郭建国,向志光,何君,王凯,张阳,李璐,高虹,魏强,孔琪 (778)
动脉粥样硬化小鼠模型应用进展	李浩,张琪 (787)
啮齿类动物情绪传染的研究进展	刘昊,李文静,王馨媛,王晨琪,吴亚轩,肖洪玲 (795)
奖励性操作条件反射实验在学习记忆研究中的应用	张亦文,姚彩虹,孙欣然,陈善广,刘新民,姜宁 (802)
慢性应激诱导动物抑郁样行为机制研究进展*	陈亚婷,雷梦珠,张波,李传玉 (811)
犬咬合力测试方法研究进展	方伟,陈方园,郑吉龙,叶柳彤,牛承义 (820)
皮瓣缺血再灌注损伤大鼠模型的构建及其运用进展	黄亚伟,徐偉伟,张浩 (827)
* 抑郁与行为的机制研究	

第 7 期

博来霉素联合脂多糖诱导大鼠特发性肺纤维化急性加重动物模型的建立	于睿智,王天娇,臧凝子,吕晓东,庞立健 (833)
咪喹莫特联合慢性温和性不可预知应激建立斑秃样小鼠模型	吕书影,曲保全,林文君,杨顶权 (846)
基于 NLRP3/ASC/Caspase-1 通路探讨真武汤改善脾肾阳虚型糖尿病肾病炎症损伤的机制	赵哲,陈光顺,白敏,靳玉秋,田萌媛,张延英,刘臻华,宋冰 (853)
果蝇 Neuroligin 4 以非依赖于 Neurexin 方式调控突触的发育	张新旺,耿俊华,李莉,张娟,彭泽旭 (864)
黄芪多糖对肺肿瘤转移前微环境中 HIF-1 和 S100A8/A9 蛋白表达及肺转移的影响	刘兆华,王彦君,申明,陈彦文,李杨,杨玲玲,梁乾坤,明海霞 (871)
诱导多能干细胞分化的平滑肌细胞促进糖尿病鼠创面愈合的研究	高喜翔,高明杰,谷涌泉,郭连瑞 (880)
调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病稳定期大鼠肺与肠道炎症指标的影响	轩银霜,李亚,卞晴晴,毛静,李晓俊,李素云 (888)
溃疡性结肠炎动物模型的特点及应用分析	周欣欣,刘茜茜,任珍,蒋鑫,白莉,苗明三 (896)
高温高湿环境对大鼠血尿酸水平的影响及其作用机制研究	程雅欣,李佳,刘明玉,谭文彬 (905)
鼠后肢缺血模型研究进展	张永康,殷康力,宗媛,刘家睿,王御震,曹烨民 (913)
间充质干细胞衰老的表观遗传学研究进展	孟博,杨盛,彭晴,赵文杰,张钰,胡满,刘鑫,张亮 (922)
骨质疏松动物模型构建进展与应用特点分析	李彦丹,闫盼盼,苗艳艳,苗明三 (928)
常用药物性肝损伤动物模型的制备方法	赵善民,汪芸,刘畅,崔淑芳 (935)

无菌动物在肠道微生物组研究中的应用与发展	胡雅谦,王珊珊,张童,袁嘉丽,牛海涛(946)
酒精性肝病动物模型的研究现状及展望	刘梦佳,连奕琪,吕翼(955)
丰富环境对母婴分离认知功能障碍影响的研究进展	李玲玉,李金玲,廖小雨,罗雯,孙鸿燕(963)

第 8 期

基于 APP/PS1 双转基因小鼠与野生型小鼠比较综述学习记忆相关行为学实验优缺点和注意事项	尚培骏,姬乃春,杨锦雯,赵沅杰,拓振杰,张晓华(969)
可评价注射式再生支架修复效果的小鼠骨缺损模型的构建研究	王飞燕,李志凌,尹博丰,李佩霖,郝瑞聪,韩梦月,李晓彤,田家仪,丁丽,武文卿,朱恒(985)
基于生物正交点击化学修饰吡啶菁绿用于脂肪间充质干细胞活体示踪的实验研究	何宏星,廖乃顺(993)
基于“心痛治肝”理论探讨从肝治心方调控心肌缺血再灌注损伤中铁死亡的机制	陈亚,曾阳,何飘,谢丽华,张程程,王瑾茜,袁华,刘莹莹,朴美虹,汪辛强(999)
树鼩心电图和超声心动图评价分析	孙效容,苏丹,杨棣远,张敏,罗峰,徐钰惟,贵文娟,陈玥(1007)
吡啶-3-丙酸对大鼠急性脊髓损伤的神经保护作用及机制研究	徐纪伟,孙丹华,陈旭东,王宁,孙壕烨(1012)
Agtr1a 调节 LPS 诱导的 <i>Lbp</i> ^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症	米传靓,付彬,李思迪,陈志达,郭中坤,张振宇,王可洲(1021)
早期运动干预对 PD 大鼠模型感觉运动功能的影响	王帅,赵刚(1028)
基于数据挖掘的乙型肝炎病毒感染动物模型研究	李晓斌,刘博文,李峰,苏晚晴,胡世平(1035)
基于数据挖掘的骨质疏松症动物模型建立与分析	周浩伟,王秉谦,张宇辰,潘亚磊(1042)
结缔组织病相关肺间质病变动物模型研究进展	武上雯,李桓,龚晓红,陆超群,陈一鸣,邢清桦,李松伟(1051)
斑马鱼肝细胞癌模型研究的最新进展	屈芷馨,李完美,张峰华(1061)
Langendorff 心脏灌流技术(针对心肌缺血再灌注)的应用和发展	李楠,张晨,孙艳君,高晟玮,李多静,王心蕊,王保和(1070)
鹅膏毒肽中毒动物模型建立的研究进展	张慧洁,杨根梦,王浩伟,曾晓锋,李楨(1078)
二乙酰吗啡成瘾及神经毒性作用机制研究进展	谢明仁,袁霞,俞蕾,何天晓,张璟,俞发荣(1085)
辐射损伤动物模型	管博文,张俊伶,孟爱民(1091)

第 9 期

类风湿关节炎伴发抑郁症模型大鼠制备与评价探讨	李媛媛,张碧涛,范培健,崔子龙,王少贤(1105)
定量口鼻吸入法建立大鼠慢性阻塞性肺病模型	彭冬冬,江芝,陈相池,唐梓宁,杜艳华,姜德建,刘学武(1114)
miR-185-5p 影响小鼠乳腺癌 PY8119 细胞增殖、侵袭迁移的研究	刘璐,赵燕乔,王晓娜,王坤,尹崇高,刘清华,李洪利(1126)
围绝经期抑郁症大鼠海马 <i>Notch1</i> 信号通路基因的表达与甲基化水平研究	沈建英,梁文娜,陈惠芳,张凌媛,庄琬荧,陈晓阳,陈雅茹,肖琼琼,杨敏,闵莉,龚琳(1133)
轻中度闭合型创伤性脑损伤小鼠模型建立及评价	卜苑静,付文亮,邢微微,徐东刚(1140)
熊胆粉对 DEN+PBO 诱发大鼠肝癌早期阶段的影响研究	董锐,张梅,洪泽宣,唐倩,邹昕羽,贾贵阳,倪元萍,涉谷淳,金美兰(1148)
阿尔兹海默症动物实验的研究热点与趋势:基于 WOS 数据库的 CiteSpace 文献计量分析	杨加辉,林萌,罗涛,张先艳,陈来,罗小泉(1156)
基于数据挖掘的扩张型心肌病动物模型研究	葛君玺,秦格,谢逸轩,苗明三,白明(1167)
复合刺激诱导多种呼吸系统疾病急性加重期动物模型的研究进展	邱志广,邵雪洁,卢瑞龙,田燕歌,任周新(1177)
小型猪在中医动物模型中的应用研究进展	李子祥,邱华明,吴延军,赵海,吴曙光(1186)

糖尿病大血管病变小鼠模型研究进展	杨燕,陈正涛,肖华胜,高泓,谢春光(1194)
鱼类雄性性别分化与精巢发育调控基因研究进展	杨超超,屈蓉,杜妙柔,王琪,雷忻(1206)
动物元认知的研究进展	王婉宁,贾宁(1217)
全身型幼年特发性关节炎与巨噬细胞活化综合征的动物模型研究进展	黎峰铭,唐雪梅(1225)
肿瘤研究中的实验动物福利问题探讨	敬文宪,张伶俐(1234)

第 10 期

脾虚湿蕴证溃疡性结肠炎模型构建及 T 淋巴细胞变化的研究	肖秋萍,钟友宝,喻松仁,李姗姗,罗小泉,刘璇,陈丽玲(1241)
基于 OPG/RANK/RANKL 信号通路探讨铁筷子对 CIA 大鼠骨破坏的防护作用	单文婷,王潇,杨晓龙,艾飞,刘杨,魏鑫,刘霞(1250)
TMAO 对脾虚高脂血症大鼠脂代谢的影响及香砂六君子汤的干预作用	冷雪,李阳(1261)
慢性阻塞性肺疾病合并慢性肾病大鼠模型建立与评价	范正媛,李亚,李素云,李高峰,李景梅(1271)
基于血清代谢组学研究黄连解毒汤对 SD 大鼠胆汁酸代谢的影响	杨光勇,杜海洋,张庚鑫,苏钢,涂小华,何光志(1278)
强直性脊柱炎食蟹猴膝关节及肠道组织病理变化分析	黄玉叶,蔡艳贞,蔡春梅,祝合朋,丁煌冠,贾欢欢,肖文德,陈珺,李文德,卢丽(1287)
胶原蛋白肽联合海藻酸钠通过下调 NLRP3 炎症小体表达改善小鼠宫腔粘连	程怡怡,赵伟伟,宋振峰,童福雯,刘刚,张花,施磊磊,郭志坤,王现伟,潘莹,孙永琨(1296)
小鼠血浆中黄卡瓦胡椒素 B 的 HPLC-MS/MS 定量分析方法建立与药代动力学特征研究	吴启鑫,赵小亮,焦玥,罗明珠,王怡婷,李晶哲,王靖怡,马琰岩,李涛,刘长振(1304)
基于肠道菌群和短链脂肪酸代谢探讨不同饮食条件下高脂血症大鼠发病机制	杨宗统,孙铁锋,李晓晶,徐东川,袁敏,靳光乾,王雯慧(1314)
卵巢癌动物模型的特点及应用分析	易楚,詹莎,马昕怡,伍洋杰,布筠艺,马民,颜显欣(1324)
不同干预因素建立小鼠动脉粥样硬化模型的研究进展	白旭峰,王姝雯,曹清雨,刘亚丽,胡慧明(1334)
病证结合的功能性消化不良动物模型的研究进展	刘昊,王馨媛,李文静,吴亚轩,王晨琪,肖洪玲(1342)
胃溃疡病中医证候动物模型研究进展	王雯,侯雨君,王路,鄢香芸,李艳秋,孙路强,陈帅,石云舟,郑倩华,李瑛(1351)
斑马鱼模型在神经退行性疾病研究中的应用进展	刘延英(1361)
小鼠支气管肺炎灌洗术研究进展	吴志豪,杨露银,任维,周雅楠,王红,雷云,于红,杨思进(1368)
评价白蛋白相关药物动物模型的研究进展	资崧,宁丽,周小青,唐成程(1374)

第 11 期

II 型心肾综合征大鼠模型制备方法的改良	刘茜,王新婷,程培培,戎靖枫,杨天舒,周华(1381)
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,张靓,黄鑫,余磊,陈鹏飞,谢学文,陈治非,方开晗,费书珂(1389)
新型大鼠腰部慢性骨骼肌复合损伤模型的建立	卢晶晶,张弛,张驰名,许钊瀚,林煜翔,谢炜星(1399)
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,粟胜勇,王甜,苏虹(1408)
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(1415)
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(1423)
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(1431)
基于数据挖掘的青光眼动物模型的应用特点分析	袁晞钊,付琮怡,苗明三(1439)

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,李明珠,朴浩哲,崔颖,张立德,金圣博,王建波(1447)
聚焦基因治疗的扩张型心肌病模型构建及进展	陈玉林,蒋虎刚,安涛,李雯,严春艳,黄倩,刘凯,李应东,赵信科(1462)
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(1470)
NK 细胞及其免疫疗法在肿瘤免疫治疗中的应用	王赛飞,荀敬,武雪亮,张晖,张琦,张大鹏(1479)
活体脑部神经递质检测技术的研究进展	朱铭钰,崔利利,陈欢,侯宏卫,胡清源(1485)
用于新型冠状病毒研究的小鼠和猴子动物模型	张博,陈庭伟,李孝琢,李天晴,董娥(1498)
皮质醇用于评估犬应激压力的研究进展	孙宁,付家琳,徐澍,俞曦,水映懿,朱启文(1504)
浅谈国外实验大鼠资源的开发与利用	张乐颖,徐威,左琴(1512)

第 12 期

C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙肝病毒转基因小鼠的转录组学分析	李容容,孙鑫,黄恺,赵志敏,彭渊,刘成海(1519)
冠状动脉微血管疾病气虚血瘀证大鼠模型的建立及评价	康静,杨丽丽,王紫艳,尤越,史跃,马彦雷,孟红旭,李磊(1530)
长春瑞滨诱导化疗性静脉炎大鼠模型的构建和评价	王淑敏,郝淑兰,冯玛莉,姜萌,王永辉,高振飞,王晞星,吉海杰(1539)
双侧卵巢切除术和他莫昔芬给药诱发的潮热模型大鼠证候评价	谢海纳,潘志强,曹琳娜(1545)
肝郁证便秘型肠易激综合征模型的建立与评价	何佳慧,何杰滢,张百荣,张水娣,魏苑君,杨超燕,陈艳芬(1555)
基于 16S rRNA 测序技术研究口服益生菌对结肠癌皮下瘤小鼠肠道菌群结构的影响	张树玲,王军威,左鲁玉,胡世亮,孙君志,王纯(1564)
人脐带间充质干细胞单次静脉注射 NOG 小鼠组织分布及其分析方法学研究	叶志超,陈国玉,潘若浪,史煜华,顾利强,夏丽娟,林晓波,张强,徐莎莎,邵金金,张立将(1573)
GSH/GPx4 介导的铁死亡通路在有氧运动预防自然衰老小鼠模型肝过氧化损伤中的作用	刘玉倩,杨雯茜,王海涛(1581)
不同灭菌方法对猪专用配方奶粉营养成分的影响	郭亚茜,刘瑞雪,杜晓鹏,朱华(1588)
单胺氧化酶 A(MAOA)在前列腺癌进展中的作用	陈函沐,李惠,赵菊梅,师长宏(1598)
啮齿类动物衰老模型研究新进展	李雪婵,韩乐,王雪文,柳立军,吴建军,王晶(1605)
应用基因修饰动物模型研究抑郁症进展	李梦瑶,高枫,郑帆帆,何盟泽,何昭,李优磊(1610)
博来霉素诱导的肺纤维化动物模型研究进展	王搏,宋庆华,唐会猛,刘杨,谢洋,田燕歌(1617)
模式动物斑马鱼在人乳腺癌疾病研究中的应用进展	张敏,张晶晶,宁国柱(1629)
猪作为模式动物的研究进展	王妍,曹永春,邢凯(1636)
《中国实验动物学报》2023 年总目次	(1646)

《ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA》
CUMMULATIVE TABLE OF CONTENTS

Vol.31 Issues 1–12 2023

Issue 1

Comparison and discussion of methods for isolating mouse bone marrow mesenchymal stem cells	1
..... LIAO Xinai, CAI Danni, YOU Ruolan, HUANG Huifang(1)	
Ethanolic extract of <i>Polygonum cuspidatum</i> attenuates renal fibrosis in a mouse model of adenine-induced renal injury through inhibiting TGF-β1/Smad signaling	10
..... DUAN Yanhua, CHEN Yunxiang, ZHENG Gaoli, WEN Lei, CHEN Hao, ZHANG Lili, QIN Li, WANG Jiahong, LIU Fang, XIA Daozong, ZHANG Lijiang(10)	
Establishment and immunological evaluation of <i>Pneumocystis murina</i> pneumonia mouse model	20
..... DENG Shuwei, DU Chunjing, ZHANG Yue, ZHOU Yanxi, ZHANG Liang, QIN Qiushi, ZHU Liuluan(20)	
Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice	27
..... WU Yue, ZENG Yewen, LUO Ting, LING Xueying, LIANG Shi, LI Hang, JIA Huanhuan(27)	
Establishment of fungal otitis media model in rats	35
..... PENG Dongdong, CHEN Xiangchi, TANG Zining, XIAO Sa, PENG Xixiang, LIU Xuewu(35)	
Effects of adolescent exposure to acrylamide on oxidative injury of lung tissue in mice	43
..... BU Wenjie, LIN Aiqin, GAO Jiguang, PAN Tao, REN Yueming, SUN Min(43)	
Establishment and metabolomics analysis of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease with phlegm-dampness syndrome	51
..... LIU Simei, QIANG Zhe, WU Silan, TU Ruxia, LI Henghua, HUANG Chonggang(51)	
Effect of different modeling periods on hydroxyurea-induced kidney-yang deficiency animal model	64
..... MA Xiaojuan, MA Wenli, WANG Lixin(64)	
Preparation of mouse models of chronic lymphocytic leukemia by MEC-1 cells transplantation	75
..... ZHAO Zixuan, NAN Miaomiao, HEXIG Bayar, LIANG Hao, GUO Xudong, LIU Dongjun(75)	
Mechanism of remazolam in reducing brain injury in sepsis mice based on Sirt1/FoxO1 pathway	82
..... GUO Xiaoli, YANG Changming, WANG Chan, WANG Xianyuan, LIU Rongli(82)	
Advances in animal models of cervical spondylotic radiculopathy	91
..... CHENG Haiyan, YANG Chen, HE Yan, DUAN Lidong, XU Xia(91)	
Construction and evaluation of a model of atherosclerotic blood-stasis and toxic syndrome based on a combination of disease and syndrome	98
..... ZHANG Xiaonan, WU Min, SUN Changxin, CHEN Jiye, LI Xiaoya, LIU Longtao(98)	
Establishment and evaluation of experimental animal models simulating weightlessness	106
..... JI Yilan, ZHAO Deming, WANG Fei, KAN Guanghan, WU Bin, YANG Lifeng(106)	
Progress of hyperuricemia animal model research	112
..... WANG Lin, SHEN Jiayan, XIE Zhaohu, QIN Dongdong, LI Zhaofu, MA Xiaohui, LYU Xiaoman(112)	
Application and evaluation of the modified multi-platform method in animal model of sleep deprivation	120
..... DIAO Huaqiong, ZHANG Jing, WANG Min, CHEN Yufei, ZHU Qingsheng, LI Xiaoli(120)	
U.S. federal law: animal welfare act and animal welfare regulations and enlightenment	129
..... XU Guoheng(129)	
PHS/NIH policy on laboratory animal care and use in the United States	134
..... XU Guoheng(134)	

Issue 2

Effect of ligation of left anterior descending coronary artery on establishment of macrophage elimination model	141
..... XIANG Chenying, ZHONG Jiajun, HAO Yanyan, RAJAP Bvmaram, NIE Yu, LIAN Hong(141)	
Role and mechanism of demethylase JARID1D in invasion and metastasis of prostate cancer	151
..... XIE Qinghua, HU Yaohua, ZHANG Caiqin, XU Yifei, ZHANG Yongbin, SHI Changhong(151)	
Establishment and evaluation of three rat models of psycho-cardiac disease	158
..... WANG Yuanbo, LI Xia, JING Rui, YANG Wenshan, WANG Yichen, WANG Chaochen, YAO Lei, HU Yuan(158)	

Study of apoptosis of hippocampal neurons in acute myocardial ischemia model rats based on literature and experiments	WANG Kun, TONG Sijia, WU Shengbing, ZHOU Meiqi(167)
Comparison and evaluation of different doses of bleomycin-induced pulmonary fibrosis models in mice and rats	YAN Miaomiao, ZHAO Yakun, WANG Bo, QIU Zhiguang, TIAN Yange(179)
A mouse model of liver fibrosis with HBV and key phenotypic analysis	HE Miao, XIANG Xia, XU Ruqing, WU Yue, LYU Xiaolin, LIU Yang, HE Mingzhong, LAI Guoqi(187)
Establishment and evaluation of streptozotocin-induced diabetic pulmonary fibrosis mouse model	FU Tinglyu, LI Ning, LIU Bohao, XIONG Rui, HE Ruyuan, LU Zilong, LI Guorui, GENG Qing(194)
Optimization of modeling method for pulmonary fibrosis rat model	CHEN Guangrui, LI Jian, LIANG Di, QIN Yide, FU Hanjiang(201)
Effect of weight-bearing running on skeletal muscle loss in aging rats based on pyroptosis PCR array	FU Pengyu, YANG Luyao, TANG Shuning, SU Hao, GONG Lijing(208)
Effects of Lizhong pill on IL-22-MUC2/claudin-2 signaling pathway in colonic mucosal barrier in spleen-deficiency diarrhea rats ...	DU Qing, LI Xinliang, ZENG Hongliang, XU Linben, XIE Fangyi(217)
Exploring the effect of intestinal flora on TNBS-induced intestinal fibrosis in rats based on TL1A/DR3	ZHAO Huiqiao, ZHANG Yuling, ZHANG Yongpeng, JIN Guoyin, HE Wei, LUO Fei, LU Nianhua(225)
Mechanism of Xiangsha Liujunzi Tang intervention for functional dyspepsia rats with spleen and stomach weakness through the CaM/MLCK/MLC ₂₀ pathway	LIU Mengya, CHENG Yingxia, BAI Min, ZHAO Linna, LI Runfa, ZHANG Yanying, AN Yaorong, DUAN Yongqiang(232)
Electrophysiological detection methods for rodent vision	YAO Taikang, CHENG Tian, XU Boxuan, SUO Lingge, ZHANG Di, ZHANG Chun(240)
Progress of PDX model application in oncology medicine	MA Shuangping, MA Jing, ZHANG Jie, ZHANG Junhe(245)
Animal models of hyperuricemia and gout; established methods and research progress	CHENG Yaxin, LI Jia(251)
Research status and perspectives on animal model of Sjögren's syndrome-like disease	LIU Ruilin, LI Jigao, ZHOU Quan, ZHANG Jianyong, JIA Ertao(257)
Advances in animal modeling of precocious puberty	YU Shencun, WU Jingfen, ZHANG Guiju(265)

Issue 3

Characterization and immunological characteristics of GSK-3 β gene knockout thymic epithelial cells in mice	LI Xi, ZENG Yan, CHEN Changrong, LI Lun, YU Xiang, ZHOU Yongqin, WANG Decheng, DENG Yaguang, SONG Yinhong(279)
Establishment and disease characteristics of a carotid atherosclerosis model in Tibet mini-pigs	XU Yanyun, PAN Yongming, HUANG Junjie, TU Haiye, YU Chen, CHEN Minli, XU Xiaoping(287)
Establishment of a visual metastasis model of hepatoma cells and cancer-associated fibroblasts in zebrafish	ZHANG Shuo, JIANG Xiaoyan, SHEN Shuijie, WU Yu, CAI Yan, GE Weiwei, LI Gaopan(296)
Establishment and evaluation of mouse model of dry eye with liver meridian stagnation heat syndrome	LIU Pei, JIANG Pengfei, PENG Jun, PENG Qinghua(302)
Effects of fenofibrate and simvastatin on mitochondrial functions in mice with non-alcoholic fatty liver disease	WANG Xuemei, CHE Yue, WANG Yiting, WANG Jieying, MEN Ke(310)
Effects of aerobic and resistance exercise on immune functions in SAMP8 mice	ZHANG Yan, QU Bo, DING Haili(319)
Analysis of the application of animal models of chronic bronchitis by data mining	DENG Yasheng, HUANG Hui, LIANG Tianwei, LIN Jiang(327)
Establishment of an immortalized tree shrew brain microvascular endothelial cell line and study of a senescence cell model of BMECs induced by the D-galactose concentration	CHEN Liu, QIU Min, DING Xiangrong, HUO Shurui, WANG Wenguang, LU Caixia, DAI Jiejie(337)
Establishment and application of a mouse model of HCC in real-time	FANG Quan, ZHENG Xiaoguang, SUN Yue, CHEN Nijing, LUO Jingyi, WANG Qixuan, KANG Rong, WU Jiaqi, HE Xiaobai, CHEN Linjie(346)
Establishment of a rat model of premature ovarian failure induced by <i>Tripterygium wilfordii</i>	FAN Yaqi, ZHENG Yanpeng, ZHOU Ziting, CUI Muyao, LI Siqi, SHAN Xueyan, LI Xin, LI Li, WANG Shanglong, LIU Zimin, ZOU Shengcan, SUN Ziwei, LI Lingru(355)
Effect of colchicine on unstable plaque formation in New Zealand rabbits	ZHANG Tao, JIANG Zhixin, DU Dayong, LIU Yang, LI Wei, LI Yuntian(365)
Establishment and application of human tumor xenograft models in cancer research	LIU Zhangchi, WANG Juan, CHEN Xu(374)
Advances in establishment of alcohol use disorder models	LYU Zhen, GONG Zhigang(382)

Research progress in mouse infection models based on the immune escape mechanism of dengue virus	
.....	LI Yiran, SHI Changhong, ZHAO Yong, LYU Yuhong, ZHANG Caiqin(390)
Exploration of animal ethics education for medical functional experiments	RAO Yuliang, ZHANG Yadong, YAN Yufeng(397)
Advances in animal models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy pain	
.....	ZHANG Jun, HUANG Qin, XIAO Caizhi, XIA Dongqin, CAO Jie, TIAN Liya, LIU Shaoyong, WANG Wei(402)
Research progress of transplanted lung cancer animal model	XUE Yanfang, WANG Licui, ZHOU Yishu, HUANG Jinbai(410)

Issue 4

Material basis of the same disease and different treatment of intestinal damp heat diarrhea and cold damp diarrhea	
.....	CHEN Baoxia, REN Jianming, ZHOU Ke, LI Hongya, NIU Chun, JI Peng, HUA Yongli, WEI Yanming(417)
Construction and functional analysis of macrophage-conditional Cd226 gene knockout mice	
.....	QIN Qi, LI Juan, YANG Liu, FANG Liang, CHEN Lihua(428)
Exploratory study of asthma in beagle dogs induced by mixed antigens of ragweed pollen and house dust mite	
.....	LUO Yulong, CHEN Difei, CHEN Huanjie, LONG Haibin, LIU Jingwei, LI Shiyue, SU Zhuquan(437)
Effects of PM2.5 exposure on cardiac functions and the NLRP3 inflammasome in rats and its mechanism	
.....	ZHANG Hanghang, ZHAO Lu, SUN Qianqian, ZHAO Andong, ZHOU Tianyu, WANG Chuan, LIU Jiping, WANG Bin(445)
Effect of yeast, lipopolysaccharide, and 2,4-dinitrophenol on thermogenesis and respiratory functions in mice based on real-time temperature monitoring technology	
.....	JIN Yifan, LI Shengqun, SUN Zhuyun, LIU Xiaoyun, YE Dongxue, ZHAO Tao, XIAO Min, RONG Rong, YANG Yong(454)
Establishment of a mouse model by influenza virus-Staphylococcus aureus co-infection and intervention effect of Tamiflu	
.....	HAN Yuxiu, ZHAO Liangxin, DU Baoxiang, SUN Qihui, YANG Yong, RONG Rong(463)
Establishment and characterization of immortalized cell lines of retinal microvascular endothelial cells from tree shrew	
.....	HUO Shurui, QIU Min, WANG Wenguang, LU Caixia, HAN Yuanyuan, DAI Jiejie(471)
Analysis of the application characteristics of functional dyspepsia animal models based on data mining	
.....	LIU Hao, LI Wenjing, WANG Xinai, XIAO Hongling(478)
Exploration and application of water immersion restraint stress model in the study of colonic injury in mice	
.....	XU Xiaoying, HU Huimei, YIN Qiuxiong, ZENG Haizhou, JIANG Yupeng, LI Boyi, QIAN Guoqiang(492)
Pathogenesis of Pkd1 ^{fl} : Cre mice in their natural state	
.....	ZHOU Weimin, LIU Qingsheng, LYU Dongying, CHEN Fangming, ZHU Keyan, WANG Dejun(501)
Research advances in animal models of maternal immune activation during pregnancy	
.....	WU Jianfei, CAI Duanfang, TAN Youguo, PU Jianlin, XIANG Bo, WANG Binglong(507)
Advances in novel tank diving test for the study of anxiety and stress behaviour in zebrafish	
.....	LIN Ainuo, LI Yaxi, YAN Zhi, LI Ke(514)
Development of the spinal region in zebrafish	
.....	ZHANG Jing, CHI Yanyan, YANG Heng, SONG Xue, ZHANG Jianfei, SUI Hongjin(524)
Application and progress of zebrafish in the study of liver fibrosis	WANG Jie, FENG Chi, DONG Wu, YANG Jingfeng(531)
Progress of the application of zebrafish models in the study of the efficacy of functional cosmetics	
.....	ZHENG Danyang, XU Mengyi, LI Shumin, ZHU Yongchuang, GONG Shengzhao, CAI Lihua, HU Cuiping(541)
Research progress of zebrafish in the field of radiobiology	
.....	FENG Qingliang, CAO Shaofei, LONG Zeyu, HAN Baohua, LI Yunhui, LI Jianguo(549)

Issue 5

Establishment and comparison of two alcoholic fatty liver models in C57BL/6J mice	
.....	DU Feng, LIANG Licheng, ZOU Kun, MA Minghua, HUANG Wenfeng(557)
Mechanism of Shenshuai recipe in PINK1/Parkin-mediated mitochondrial autophagy for treatment of CKD myocardial injury	
.....	ZHANG Gedi, LIU Gengxin, GUO Min, LUO Fuli, YAN Ziyou(567)
Establishment and evaluation of a humanized depression mouse model	
.....	CAO Xiaojing, WU Guofu, HOU Jiarui, SONG Lei, WANG Xiaoyun(576)
Method optimization of an isoproterenol-induced chronic heart failure model	
.....	DU Bingyu, YIN Yanyan, YUE Zhaodi, CHANG Wanpeng, KAN Mengfan, YU Shaohong(583)
Establishment and evaluation of a combination of disease and syndrome model of knee osteoarthritis based on the pathogenesis theory of “Deficiency, Stasis, and Toxicity”	
.....	OU Liang, LU Min, ZHANG Yonghui, KUANG Gaoyan, Tan Xuqi, KUANG Jianjun(590)

Establishment of a miniature pig model of myocardial fibrosis induced by iron overload	
..... GUAN Kaiming, ZHONG Delin, LUO Chaotian, PENG Fei, FANG Peirong, WEI Liqi, PENG Peng(598)	
Phenotypic characteristics and gene expression profiles of myocardial cells in rat cardiac hypertrophy models induced by various pathological factors	
..... DING Yue, ZHOU Ying, LIU Jingyan, ZHOU Jiangfeng, LYU Dongying, CAI Zhaowei, WANG Dejun(605)	
Establishment of a yang-deficiency slow transit constipation rat model by three methods: a comparative study	
..... ZHANG Yuanzhe, ZHAO Luona, JIAN Shengnan, LI Zhongzheng, LI Yuchuan(618)	
Anti-tumor effects of celecoxib and pentoxifylline on Lewis lung carcinoma in mice	
..... GUO Moran, JIA Xiaoqiong, DU Juan, ZHANG Shaoran, GONG Jiayu(629)	
Effects of combined creatine phosphate sodium and trimetazidine on echocardiography and cardiac serology-related indexes in rats with alcoholic cardiomyopathy	
..... LI Xiaodong, LI Jinguo, YOU Sujun(635)	
Expression and significance of HIF-1 α , OPN, IL-1 β , TNF- α , MMP-13 and NGF proteins after MIA-induced KOA in SD rats	
..... XIONG Ao, WEI Xiaoyu, XU Jianzhong, LUO Fei(643)	
Application of a HIV animal model in drug abuse research	
..... WANG Chan, YANG Genmeng, LIU Liu, WANG Haowei, MIAO Lin, LI Yi, LI Juan, ZENG Xiaofeng(653)	
Genetically engineered mouse models of colorectal cancer	
..... AN Qingling, TAN Dengxu, SHI Changhong(660)	
Mitochondrial DNA editing technologies and their applications in biomedicine	
..... LIAO Yuan, CHEN Fangbing(668)	
Biological purification and application of golden hamster	
..... GUO Yaxi, DU Xiaopeng, ZHU Hua(676)	
Reflections and suggestions on the ethics and welfare of laboratory animals in China	
..... WANG Guiping, ZHOU Zhengyu(683)	
Application of brain organoids in the study of traumatic brain injury	
..... LIU Ke, GUO Wenwen, WANG Yinghua, ZHANG Yanying, WANG Yongfeng, ZHAO Ya, SHI Changhong(690)	

Issue 6

Role and mechanism of miR-328-3p-Akt/mTOR axis in the inhibition of glioma cell growth by triptolide	
..... LIU Xihong, DU Xiaodan, FAN Mengyang, XU Liuqing, ZHAO Peiyuan(697)	
Risk factors of cognitive impairment influence histopathological morphology and iron content in hypertensive rats	
..... CHANG Surui, LIU Jiangang, WEN Jiayu, LI Hao, DONG Guoju, LIU Chunqiu, SHI Yujiao(706)	
Effect of curcumin combined with monoamine oxidase inhibitor clorgyline on lung cancer cell proliferation	
..... WANG Huihui, GUO Chenbo, TAN Dengxu, ZHANG Yanying, WANG Yongfeng, SHI Changhong(715)	
Urine metabolomics in type 2 diabetes rats with qi yin deficiency syndrome	
..... QIU Huaming, LI Zixiang, JIN Yuanqing, WU Shuguang(722)	
Postmenopausal lipid metabolism disorder induces depressive symptoms in mice	
..... SHEN Haotian, JIANG Junjie, CHAO Ying, HONG Min, ZHENG Jie, BIAN Huimin(733)	
Establishment of an obesity depression model in rats and study of sex differences in gut flora diversity	
..... XU Lei, LUO Xiaoquan, QU Ping, ZHONG Yi, ZHANG Hong, ZENG Xianbao, YANG Yuyan, LIU Zhiyong, HONG Tao(743)	
Effect of hypertensive disorder complicating pregnancy on thyroid morphology and function in preterm rats	
..... HE Yue, SUN Maomao, WU Congrong, YU Yonghui(756)	
Protective effect of resveratrol on exercise-induced liver injury in rats	
..... HU Ge, MA Xinyu, QIN Fei, CAO Jianmin, DONG Li, ZHOU Haitao, HUA Bing(763)	
Effects of μ opioid receptor blockers on motor ability and depressive and anxiety-like behavior in learned helplessness mice	
..... LIU Guojun, LIU Yangchun, LIU Zhiqiang(770)	
Construction of a drug screening database based on animal models	
..... WU Yue, WANG Jue, FENG Tingting, LI Yitong, XUE Jing, GUO Jianguo, XIANG Zhiguang, HE Jun, WANG Kai, ZHANG Yang, LI Lu, GAO Hong, WEI Qiang, KONG Qi(778)	
Progress in the application of arteriosclerosis mouse models	
..... LI Hao, ZHANG Qi(787)	
Research progress on rodent emotional contagion	
..... LIU Hao, LI Wenjing, WANG Xinai, WANG Chenqi, WU Yaxuan, XIAO Hongling(795)	
Overview on the application of reward-directed operant conditioning method in the study of learning and memory	
..... ZHANG Yuwen, YAO Caihong, SUN Xinran, CHEN Shanguang, LIU Xinmin, JIANG Ning(802)	
Research progress on mechanisms underlying chronic-stress-induced depressive-like behavior in animals	
..... CHEN Yating, LEI Mengzhu, ZHANG Bo, LI Chuanyu(811)	
Research progress on methods of bite force testing in canine	
..... FANG Wei, CHEN Fangyuan, ZHENG Jilong, YE Liutong, NIU Chengyi(820)	
Research progress on skin flap models of ischemia-reperfusion injury in rats	
..... HUANG Yawei, XU Tingwei, ZHANG Hao(827)	

Issue 7

Establishment of model of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis in rats induced by bleomycin and lipopolysaccharide ...	YU Ruizhi, WANG Tianjiao, ZANG Ningzi, LYU Xiaodong, PANG Lijian(833)
Imiquimod combined with chronic unpredictable mild stress to establish a mouse model of alopecia areata ...	LYU Shuying, QU Baoquan, LIN Wenjun, YANG Dingquan(846)
Mechanism of Zhenwu Decoction in improving renal inflammatory injury in diabetes with spleen-kidney yang deficiency based on NLRP3/ASC/Caspase-1 pathway ...	ZHAO Zhe, CHEN Guangshun, BAI Min, JIN Yuqiu, TIAN Mengyuan, ZHANG Yanying, LIU Zhenhua, SONG Bing(853)
Neuroigin 4 is independent of neurexin in regulating synaptic development in <i>Drosophila</i> ...	ZHANG Xinwang, GENG Junhua, LI Li, ZHANG Juan, PENG Zexu(864)
Effect of <i>Astragalus</i> polysaccharides on HIF-1 and S100A8/A9 protein expression in the pre-metastatic niche of lung tumors and lung metastasis ...	LIU Zhaohua, WANG Yanjun, SHEN Ming, CHEN Yanwen, LI Yang, YANG Lingling, LIANG Qiankun, MING Haixia(871)
Induced pluripotent stem cell-derived smooth muscle cells improve wound healing in diabetic mice ...	GAO Xixiang, GAO Mingjie, GU Yongquan, GUO Lianrui(880)
Effects of three Tiao-Bu Fei-Shen therapies on lung and intestinal inflammation indexes in rats with stable chronic obstructive pulmonary disease ...	XUAN Yinshuang, LI Ya, BIAN Qingqing, MAO Jing, LI Xiaojun, LI Suyun(888)
Characteristics and application analysis of animal models of ulcerative colitis ...	ZHOU Xinxin, LIU Xixi, REN Zhen, JIANG Xin, BAI Li, MIAO Mingsan(896)
Influence and mechanism of elevated serum uric acid levels in rats in a high temperature-humidity environment ...	CHENG Yaxin, LI Jia, LIU Mingyu, TAN Wenbin(905)
Development of a mouse model for hind limb ischemia ...	ZHANG Yongkang, YIN Kangli, ZONG Yuan, LIU Jiarui, WANG Yuzhen, CAO Yemin(913)
Research progress in epigenetics of senescence of mesenchymal stem cells ...	MENG Bo, YANG Sheng, PENG Qing, ZHAO Wenjie, ZHANG Yu, HU Man, LIU Xin, ZHANG Liang(922)
Establishment and application of osteoporosis animal models ...	LI Yanran, YAN Panpan, MIAO Yanyan, MIAO Mingsan(928)
Preparation of animal models of drug-induced liver injury ...	ZHAO Shanmin, WANG Yun, LIU Chang, CUI Shufang(935)
Application and development of germ-free animals for gut microbiome research ...	HU Yaqian, WANG Shanshan, ZHANG Tong, YUAN Jiali, NIU Haitao(946)
Research status and prospect of animal models of alcoholic liver disease ...	LIU Mengjia, LIAN Yiqi, LYU Yi(955)
Research progress on the effects of enriched environment on maternal separation cognitive dysfunction ...	LI Lingyu, LI Jinling, LIAO Xiaoyu, LUO Wen, SUN Hongyan(963)

Issue 8

Comparison of APP/PS1 double transgenic and wild-type mice to review the advantages, disadvantages, and cautions of behavioral tests related to learning and memory ...	SHANG Peijun, JI Naichun, YANG Jinwen, ZHAO Yuanjie, TA Zhenjie, ZHANG Xiaohua(969)
Establishment of a mouse bone defect model to evaluate the repair effect of injectable regenerative scaffolds ...	WANG Feiyan, LI Zhiling, YIN Bofeng, LI Peilin, HAO Ruicong, HAN Mengyue, LI Xiaotong, TIAN Jiayi, DING Li, WU Wenqing, ZHU Heng(985)
<i>In vivo</i> tracking of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells labeled with indocyanine green using bio-orthogonal click chemistry ...	HE Hongxing, LIAO Naishun(993)
Protective mechanism of regulating ferroptosis by Conggan Zhixin recipe in myocardial ischemia-reperfusion injury based on the theory of heartache governing liver ...	CHEN Ya, ZENG Yang, HE Piao, XIE Lihua, ZHANG Chengcheng, WANG Jinxi, YUAN Hua, LIU Yingying, PIAO Meihong, WANG Xinqiang(999)
Evaluation of electrocardiogram and echocardiography of tree shrews ...	SUN Xiaorong, SU Dan, YANG Diyuan, ZHANG Min, LUO Feng, XU Yuwei, GUI Wenjuan, CHEN Yue(1007)
Neuroprotective effect and mechanism of indole-3-propionic acid in acute rat spinal cord injury ...	XU Jiwei, SUN Danhua, CHEN Xudong, WANG Ning, SUN Haoye(1012)
Agtr1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of <i>Lbp</i> ^{-/-} mice ...	MI Chuanliang, FU Bin, LI Sidi, CHEN Zhida, GUO Zhongkun, ZHANG Zhenyu, WANG Kezhou(1021)
Effect of early exercise intervention on sensorimotor functions in PD rats ...	WANG Shuai, ZHAO Gang(1028)

Analysis of animal models for the study of hepatitis B virus infection based on data mining	LI Xiaobin, LIU Bowen, LI Feng, SU Xiaopeng, HU Shiping(1035)
Establishment and analysis of animal models of osteoporosis based on data mining	ZHOU Haowei, WANG Bingqian, ZHANG Yuchen, PAN Yalei(1042)
Research progress on animal model of connective tissue disease-interstitial lung disease	WU Shangwen, Li Huan, GONG Xiaohong, LU Chaoqun, Chen Yiming, Xing Qinghua, LI Songwei(1051)
Recent advances of research in hepatocellular carcinoma models using zebrafish	QU Zhixin, LI Xianmei, ZHANG Fenghua(1061)
Langendorff cardiac perfusion technique for myocardial ischemia reperfusion applications and developments	LI Nan, ZHANG Chen, SUN Yanjun, GAO Shengwei, LI Duoqing, WANG Xinrui, WANG Baohe(1070)
Research progress on the establishment of animal models of amanitin poisoning	ZHANG Huijie, YANG Genmeng, WANG Haowei, ZENG Xiaofeng, LI Zhen(1078)
Research progress of diacetylmorphine in addiction and neurotoxic mechanisms	XIE Mingren, YUAN Xia, YU Lei, HE Tianxiao, ZHANG Jing, YU Farong(1085)
Animal models for radiation injury research	GUAN Bowen, ZHANG Junling, MENG Aimin(1091)

Issue 9

Establishment and evaluation of a rat model of rheumatoid arthritis with depression	LI Yuanyuan, ZHANG Bitao, FAN Peijian, CUI Zilong, WANG Shaoxian(1105)
Quantitative inhalation method to establish a model of chronic obstructive pulmonary disease in rats	PENG Dongdong, JIANG Zhi, CHEN Xiangchi, TANG Zining, DU Yanhua, JIANG Dejian, LIU Xuewu(1114)
Effect of miR-185-5p on proliferation, invasion, and migration of mouse breast cancer PY8119 cells	LIU Lu, ZHAO Yanqiao, WANG Xiaona, WANG Kun, YIN Chonggao, LIU Qinghua, LI Hongli(1126)
Expression and methylation level of hippocampal <i>Notch1</i> signaling pathway genes in perimenopausal depression rats	SHEN Jianying, LIANG Wenna, CHEN Huifang, ZHANG Lingyuan, ZHUANG Yuanying, CHEN Xiaoyang, CHEN Yaru, XIAO Qiongqiong, YANG Min, MIN Li, GONG Lin(1133)
Establishment and evaluation of a mild-to-moderate closed traumatic brain injury mouse model	BU Yuanjing, FU Wenliang, XING Weiwei, XU Donggang(1140)
Effects of bear bile powder on the early stage of hepatocarcinogenesis induced by DEN+PBO in SD rats	DONG Rui, ZHANG Mei, HONG Zexuan, TANG Qian, ZOU Xinyu, JIA Guiyang, NI Yuanping, MAKOTO Shibutani, JIN Meilan(1148)
Research hot topics and trends of Alzheimer's disease animal experiments: CiteSpace bibliometric analysis based on the WOS database	YANG Jiahui, LIN Meng, LUO Tao, ZHANG Xianyan, CHEN Lai, LUO Xiaoquan(1156)
Data mining-based animal model for dilated cardiomyopathy	GE Junxi, QIN Ge, XIE Yixuan, MIAO Mingsan, BAI Ming(1167)
Research progress on animal models of acute exacerbation of various respiratory diseases induced by compound factors	QIU Zhiguang, SHAO Xuejie, LU Ruilong, TIAN Yange, REN Zhouxin(1177)
Progress in the application of minipigs as animal models of Chinese medicine	LI Zixiang, QIU Huaming, WU Yanjun, ZHAO Hai, WU Shuguang(1186)
Research progress on mouse models of diabetes macroangiopathy	YANG Yan, CHEN Zhengtao, XIAO Huasheng, GAO Hong, XIE Chunguang(1194)
Research progress on genes regulating male sex differentiation and sperm development in fish	YANG Chaochao, QU Rong, DU Miaorou, WANG Qi, LEI Xin(1206)
Research progress of animal metacognition	WANG Wanning, JIA Ning(1217)
Progress on animal models of systemic juvenile idiopathic arthritis and macrophage activation syndrome	LI Fengming, TANG Xuemei(1225)
Discussing the welfare of laboratory animals in tumor research	JING Wenxian, ZHANG Lingli(1234)

Issue 10

Model of ulcerative colitis with spleen deficiency and dampness syndrome, and changes in T lymphocytes	XIAO Qiuping, ZHONG Yubao, YU Songren, LI Shanshan, LUO Xiaoquan, LIU Xuan, CHEN Liling(1241)
Exploring the protective effect of <i>helleborus thibetanus</i> franch alcohol extract on bone destruction in CIA rats based on the OPG/RANK/RANKL signaling pathway	SHAN Wenting, WANG Xiao, YANG Xiaolong, AI Fei, LIU Yang, WEI Xin, LIU Xia(1250)

Effect of TMAO on lipid metabolism in spleen-deficiency hyperlipemia rats and the therapeutic effect of Xiangsha Liujunzi Decoction	LENG Xue, LI Yang(1261)
Model establishment and evaluation of chronic obstructive pulmonary disease complicated with chronic kidney disease in rats	FAN Zhengyuan, LI Ya, LI Suyun, LI Gaofeng, LI Jingmei(1271)
Study on the effect of Huanglian Jiedu Decoction on bile acid metabolism in SD rats based on serum metabolomics	YANG Guangyong, DU Haiyang, ZHANG Gengxin, SU Gang, TU Xiaohua, HE Guangzhi(1278)
Pathological changes in the knee joint and intestinal tissue in ankylosing spondylitis monkeys	HUANG Yuye, CAI Yanzhen, CAI Chunmei, ZHU Hepeng, DING Huangguan, JIA Huanhuan, XIAO Wende, CHEN Jun, LI Wende, LU Li(1287)
Collagen peptide combined with sodium alginate improve intrauterine adhesions in mice by downregulating expression of NLRP3 inflammasome	CHENG Yiyi, ZHAO Weiwei, SONG Zhenfeng, TONG Fuwen, LIU Gang, ZHANG Hua, SHI Leilei, GUO Zhikun, WANG Xianwei, PAN Ying, SUN Yongkun(1296)
Establishment of HPLC-MS/MS quantitative analysis method and pharmacokinetic characteristics of Flavokawain B of plasma in mice	WU Qixin, ZHAO Xiaoliang, JIAO Yue, LUO Mingzhu, WANG Yiting, LI Jingzhe, WANG Jingyi, MA Yanyan, LI Tao, LIU Changzhen(1304)
Pathogenesis of hyperlipidemia in rats under various dietary conditions based on intestinal flora and short-chain fatty acid metabolism	YANG Zongtong, SUN Tiefeng, LI Xiaojing, XU Dongchuan, YUAN Min, JIN Guangqian, WANG Wenhui(1314)
Characteristics and application analysis of animal models of ovarian cancer	YI Chu, ZHAN Sha, MA Xinyi, WU Yangjie, BU Junyi, MA Min, YAN Xianxin(1324)
Research progress on establishment of a mouse atherosclerosis model by various intervention factors	BAI Xufeng, WANG Shuwen, CAO Qingyu, LIU Yali, HU Huiming(1334)
Research progress of functional dyspepsia animal models based on the combination of disease and syndrome	LIU Hao, WANG Xinai, LI Wenjing, WU Yaxuan, WANG Chenqi, XIAO Hongling(1342)
Research progress on animal model establishment and evaluation of TCM syndromes of gastric ulcer	WANG Wen, HOU Yujun, WANG Lu, YAN Xiangyun, LI Yanqiu, SUN Luqiang, CHEN Shuai, SHI Yunzhou, ZHENG Qianhua, LI Ying(1351)
Progress in the application of the zebrafish models in the study of neurodegenerative diseases	LIU Yanying(1361)
Research progress of bronchoalveolar lavage in mice	WU Zhihao, YANG Luyin, REN Wei, ZHOU Yanan, WANG Hong, LEI Yun, YU Hong, YANG Sijin(1368)
Advances in animal models for albumin-related drug studies	ZI Yin, NING Li, ZHOU Xiaoqing, TANG Chengcheng(1374)

Issue 11

Improvement in the establishment method for the type II cardio-renal syndrome rat model	LIU Qian, WANG Xinting, CHENG Peipei, RONG Jingfeng, YANG Tianshu, ZHOU Hua(1381)
N-acetyl-D-glucosamine inhibits oxidative stress and promotes M2 macrophage polarization to alleviate acute pancreatitis in rats	XU Zuzhi, ZHANG Liang, HUANG Xin, YU Lei, CHEN Pengfei, XIE Xuewen, CHEN Zhifei, FANG Kaihan, FEI Shuke(1389)
Establishment of a novel composite rat model of chronic skeletal muscle injury	LU Jingjing, ZHANG Chi, ZHANG Chiming, XU Danghan, LIN Yuxiang, XIE Weixing(1399)
Plantar injection of complete Freund's adjuvant induces behavioral and monoamine neurotransmitter changes in comorbid pain and depression model rats	YANG Pu, SU Shengyong, WANG Tian, SU Hong(1408)
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(1415)
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(1423)
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(1431)
Application and characteristics of a glaucoma animal model based on data mining	YUAN Xifan, FU Qingyi, MIAO Mingsan(1439)
Animal models of paclitaxel-induced neuropathic pain in rats and mice and their application in traditional Chinese medicine	YU Jun, LI Mingzhu, PIAO Haozhe, CUI Ying, ZHANG Lide, JIN Shengbo, WANG Jianbo(1447)
Model establishment and progress of focused gene therapy for dilated cardiomyopathy	CHEN Yulin, JIANG Hugang, AN Tao, LI Wen, YAN Chunyan, HUANG Qian, LIU Kai, LI Yingdong, ZHAO Xinke(1462)
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(1470)

Application of NK cells and their immunotherapy in tumor immunotherapy WANG Saifei, XUN Jing, WU Xueliang, ZHANG Hui, ZHANG Qi, ZHANG Dapeng(1479)

Research progress of neurotransmitter detection technology in live brains ZHU Mingyu, CUI Lili, CHEN Huan, HOU Hongwei, HU Qingyuan(1485)

Animal models of SARS-CoV-2 infection and pathology in mice and monkeys ZHANG Bo, CHEN Tingwei, LI Xiaozhuo, LI Tianqing, DONG E(1498)

Research progress on cortisol measurement to evaluate stress in dogs SUN Ning, FU Jialin, XU Shu, YU Xi, SHUI Yingyi, ZHU Qiwen(1504)

Brief review of the cultivation and utilization of rat resources ZHANG Leying, XU Wei, ZUO Qin(1512)

Issue 12

Transcriptomic analysis of C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst hepatitis B virus transgenic mice LI Rongrong, SUN Xin, HUANG Kai, ZHAO Zhimin, PENG Yuan, LIU Chenghai(1519)

Establishment and evaluation of a rat model of coronary microvascular disease with qi deficiency and blood stasis syndrome KANG Jing, YANG Lili, WANG Ziyang, YOU Yue, SHI Yue, MA Yanlei, MENG Hongxu, LI Lei(1530)

Construction and evaluation of a chemotherapeutic phlebitis rat model induced by vinorelbine via the dorsalis pedis vein WANG Shumin, HAO Shulan, FENG Mali, JIANG Meng, WANG Yonghui, GAO Zhenfei, WANG Xixing, JI Haijie(1539)

Evaluation of hot-flash model rats induced by bilateral oophorectomy and tamoxifen administration XIE Haina, PAN Zhiqiang, CAO Linna(1545)

Establishment and evaluation of constipated irritable bowel syndrome model with liver depression syndrome HE Jiahui, HE Jieying, ZHANG Bairong, ZHANG Shuidi, WEI Yuanjun, YANG Chaoyan, CHEN Yanfen(1555)

Effects of oral probiotics on gut microbiota structure in subcutaneous tumors in mice with colon cancer based on 16S rRNA sequencing technology ZHANG Shuling, WANG Junwei, ZUO Luyu, HU Shiliang, SUN Junzhi, WANG Chun(1564)

Tissue distribution and analysis of human umbilical cord mesenchymal stem cells in NOG mice following single intravenous injection YE Zhichao, CHEN Guoyu, PAN Ruolang, SHI Yuhua, GU Liqiang, XIA Lijuan, LIN Xiaobo, ZHANG Qiang, XU Shasha, SHAO Jinjin, ZHANG Lijiang(1573)

Role of the ferroptosis pathway mediated by GSH/GPx4 in preventing hepatocyte peroxidative injury following aerobic exercise in an elderly mouse model LIU Yuqian, YANG Wenqian, WANG Haitao(1581)

Effects of different sterilization methods on nutritional composition of pig-specific formula milk powder GUO Yaxi, LIU Ruixue, DU Xiaopeng, ZHU Hua(1588)

Role of monoamine oxidase A in prostate cancer progression CHEN Hanmu, LI Hui, ZHAO Jumei, SHI Changhong(1598)

Research progress in aging rodent models LI Xuechan, HAN Le, WANG Xuewen, LIU Lijun, WU Jianjun, WANG Jing(1605)

Progress in depression research using genetically modified animal models LI Mengyao, GAO Feng, ZHENG Fanfan, HE Mengze, HE Zhao, LI Youlei(1610)

Progress in animal models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis WANG Bo, SONG Qinghua, TANG Huimeng, LIU Yang, XIE Yang, TIAN Yange(1617)

Research progress on the application of a zebrafish model in breast cancer research ZHANG Min, ZHANG Jingjing, NING Guozhu(1629)

Progress in use of pigs as model animals WANG Yan, CAO Yongchun, XING Kai(1636)