

陈秋燕,曹克刚,刘珍洪,等. 三种方式构建脑低灌注大鼠模型的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1093-1104.

CHEN Q Y, CAO K G, LIU Z H, et al. Comparative study of three methods for constructing rat models of cerebral hypoperfusion [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1093-1104.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.001

三种方式构建脑低灌注大鼠模型的比较研究

陈秋燕¹, 曹克刚², 刘珍洪², 高颖², 罗云^{1*}, 孙晓波^{1*}

(1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

【摘要】 目的 通过比较 3 种大鼠脑灌注不足模型的脑血流量、脑组织中神经细胞形态改变及血清氧化与炎症因子水平的变化, 为脑血管疾病及神经退行性疾病机制及治疗药物研究提供实验动物模型。**方法** 将 88 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组 ($n = 16$)、经典双侧颈总动脉结扎组 (经典 2-VO 组, $n = 24$)、改良 2-VO 组 ($n = 24$) 和线栓法组 ($n = 24$)。经典 2-VO 组行双侧颈总动脉结扎术, 改良 2-VO 组在结扎之前先从颈总动脉抽血 ($1 \text{ mL}/100 \text{ g}$), 线栓法组行大脑中动脉闭塞术。前 2 种模型的假手术组仅分离颈总动脉但不结扎, 线栓法模型的假手术组仅结扎颈总动脉近心端和颈外动脉, 但不插入栓线。术后 1、3 和 7 d 时检测 3 组大鼠的脑血流量、脑梗死体积、血清炎症因子水平、海马组织苏木素-伊红 (HE) 染色和超微结构。**结果** 激光散斑的结果显示: 改良 2-VO 组大鼠脑血流下降幅度较其他 2 组更明显。第 7 天时, 仅有改良 2-VO 组大鼠脑血流量相较于假手术组仍有显著性差异, 且仍处于低灌注状态 (与术前相比脑血流量下降 30%)。TTC 染色的结果显示: 随着造模时间延长, 3 组大鼠纹状体区域的白色梗死灶逐渐变大, 其中改良 2-VO 组大鼠有 4 只 (约 26.7%) 在皮层和纹状体都出现了白色梗死灶, 线栓法组有 10 只 (约 66.7%) 在患侧皮层和纹状体出现了白色梗死灶。ELISA 结果显示: 3 组模型大鼠造模后炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、hs-CRP 水平升高, 氧化因子 ROS 的水平升高, 抗氧化因子 SOD 水平下降。在术后第 7 天时, 经典 2-VO 组与线栓法组大鼠的 hs-CRP 与假手术组相比无显著性差异, 但改良 2-VO 组与假手术组相比上述所有指标仍有显著性差异。HE 染色的结果显示, 改良 2-VO 组相较于另 2 组能造成更严重的海马 CA1 和 CA3 区损伤。透射电镜的结果显示, 改良 2-VO 组相较于另 2 组能造成海马区细胞更严重的线粒体和内质网损伤。**结论** 成功构建脑低灌注大鼠模型, 相较于经典 2-VO 法和线栓法, 改良 2-VO 法能在相同的时间内造成更完全的脑低灌注和更严重的神经损伤, 更接近人类脑低灌注病理状态。

【关键词】 脑低灌注; 双侧颈总动脉结扎法; 线栓法; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1093-12

Comparative study of three methods for constructing rat models of cerebral hypoperfusion

CHEN Qiuyan¹, CAO Kegang², LIU Zhenhong², GAO Ying², LUO Yun^{1*}, SUN Xiaobo^{1*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; 2. Dongzhimen Hospital Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Corresponding author: LUO Yun. E-mail: ly20040423@126.com; SUN Xiaobo. E-mail: sun_xiaobo163@163.com

【Abstract】 Objective By comparing the changes in cerebral blood flow, neuronal morphology in brain tissue, and the levels of serum oxidation and inflammatory factors in models of cerebral hypoperfusion, three experimental rat models

【基金项目】 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项 (2022YFC3501105)。

Funded by National Key R&D Program of China (2022YFC3501105).

【作者简介】 陈秋燕, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。Email: 1581451013@qq.com

【通信作者】 罗云, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药理学。Email: ly20040423@126.com;

孙晓波, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药药理学。Email: sun_xiaobo163@163.com。

* 共同通信作者

were assessed for their suitability as subjects of studies on the mechanisms and therapeutic drugs of cerebrovascular diseases and neurodegenerative diseases. **Methods** A total of 88 male SD rats were randomly divided into a sham operation group ($n = 16$), classic bilateral common carotid artery occlusion group (classic 2-VO group, $n = 24$), modified 2-VO group ($n = 24$), and intraluminal thread technique group ($n = 24$). Bilateral common carotid artery ligation was performed on the classic 2-VO group, while blood was drawn from the common carotid artery before ligation in the modified 2-VO group (1 mL/100 g). Middle cerebral artery occlusion was performed on the intraluminal thread technique group. In the sham operation groups of the first two models, the common carotid artery was separated but not ligated, while the proximal end of the common carotid artery and the external carotid artery were ligated; in addition, the bolt thread was not inserted in the sham group of the intraluminal thread technique group. Cerebral blood flow, infarct volume, serum inflammatory factor levels, hematoxylin and eosin-stained morphology, and ultrastructure of the hippocampal tissue were assessed at 1, 3, and 7 days after the operations. **Results** Laser speckle interferometry showed a decrease in cerebral blood flow of the modified 2-VO group that was more obvious than that of the other two groups. On day 7, only the modified 2-VO group still had significant differences in cerebral blood flow compared with the sham group, and it remained in a state of hypoperfusion (cerebral blood flow decreased by 30% compared with that before the operation). TTC staining showed that infarcts in the striata of the three groups gradually increased with time after the operation; 4 rats (about 26.7%) in the modified 2-VO group and 10 rats (about 66.7%) in the intraluminal thread technique group had infarcts in both the cortex and striatum. ELISA showed that the levels of inflammatory factors, such as TNF- α , IL-1 β , and hs-CRP, in the three groups were increased after the operations, and levels of the pro-oxidation factor ROS were also increased. In contrast, levels of the antioxidant factor SOD decreased. On postoperative day 7, there was no significant difference in the hs-CRP of the classic 2-VO and intraluminal thread technique groups compared with that of the sham group. However, the modified 2-VO group still exhibited significant differences in all the above indicators compared with the sham group. Hematoxylin and eosin staining showed that the modified 2-VO group had more severe damage to the hippocampal CA1 and CA3 regions compared with the other groups. Transmission electron microscopy demonstrated that the modified 2-VO group showed more severe damage to the mitochondrial and endoplasmic reticulum in the hippocampal region compared with the other groups. **Conclusions** A cerebral hypoperfusion model was successfully established. Compared with the classic 2-VO and intraluminal thread techniques, the modified 2-VO method can induce more complete cerebral hypoperfusion and more severe neural damage within the same time frame, resembling the pathological state of human cerebral hypoperfusion more closely.

[Keywords] cerebral hypoperfusion; 2-vessel occlusion; intraluminal thread technique; animal models

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

缺血性卒中是严重危害国民健康的重大慢性非传染性疾病,具有高死亡率、高致残率、高发病率的特点^[1]。血管再通术可显著降低死亡率并改善患者的预后,但受限于严格的治疗时间窗,能够接受血管内治疗的患者人数极低(静脉溶栓率 5.64%,血管内治疗率 1.45%),超过 92%的缺血性卒中患者无法接受溶栓治疗^[2]。这类非溶栓患者在大血管急性闭塞后,供血区血流灌注量迅速下降,形成梗死核心,周围组织血流灌注量不满足神经细胞维持正常功能所需达到的生理阈值而处于休眠状态,称为缺血半暗带,也常被认为是卒中后处于低灌注状态的脑组织。若血流灌注不能及时恢复,这些处于低灌注的脑组织将逐渐发生不可逆的死亡,导致梗死面积进一步扩大,造成永久的神经功能缺损^[3]。脑低灌注引起的血流动力学障碍

使得附壁血栓选择性地进入分水岭区终末血管引起梗死,即低灌注性脑梗死^[4]。这是一种由于血流灌注不良引起的特殊类型的缺血性脑卒中。因此,改善低灌注区域的血流灌注及时挽救濒临死亡的脑组织是目前血管内治疗领域研究的热点之一。

动物模型一直是临床与基础研究工作紧密结合的重要工具,不同课题组需综合考虑建模周期、成模效率和实验成本等多方面因素,制备出最接近人类卒中后低灌注发病机制和经济且简单可行的动物模型。目前,国内外文献报道的脑低灌注动物模型以大鼠的双侧颈总动脉闭塞(bilateral common carotid artery occlusion, B CAO)、大脑中动脉部分闭塞(intraluminal thread technique, ITT)也称线栓法,和小鼠的双侧颈总动脉狭窄(bilateral common carotid artery stenosis, BCAS)模型为主^[5-6]。ITT 栓线进入

部位与留置时间对实验结果影响较大,稳定性较差^[7]。BCAS 会对血管内皮产生不利影响,且用到的弹簧微线圈大大增加了实验成本。大鼠 BCAA 模型仍是目前应用最广泛的脑低灌注模型,不仅是因为其相对更简便的操作和低成本,与小鼠和沙鼠相比,大鼠脑血管解剖结构与人类最为接近,具有完整的大脑动脉环(Willis 环),可以通过侧支循环提供不间断的血流。但这同时也是它的一个缺陷,BCAO 仅造成不完全性的脑缺血,与临床卒中后低灌注患者的病理特征不符。线栓法虽然相比 BCAA 更贴近临床患者局灶性低灌注的状态,但目前其应用仅停留在超急性期(24 h)^[6]。基于以上 2 种模型,本研究团队通过比较它们各自的优缺点,建立了一种新的脑低灌注模型(后称改良 2-VO 法),旨在建立一种制备方法简便、症状稳定且更接近临床特征的脑低灌注模型。

为此,研究人员比较了 3 种方法,并通过检测大鼠的脑血流量、血清炎症与氧化因子水平、脑梗死体积大小、苏木素-伊红(HE)染色结果和透射电镜下各细胞器的形态等指标对比了在双侧结扎的条件下降低大鼠血容量(即改良型 2-VO 法)和单纯仅结扎双侧颈总动脉(后称经典 2-VO 法)以及线栓法 3 种处理手段建立的脑低灌注实验动物模型,为今后脑低灌注的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

88 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 220 ~ 240 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。饲养在中国医学科学院药用植物研究所动物中心【SYXK(京)2023-0008】,动物实验设施持续保持屏障环境标准。主要环境指标的控制范围:室温 20 ~ 26 ℃,日温差 ≤ 4 ℃。相对湿度 40% ~ 70%。最小换气次数每小时 15 次,光照明:暗 = 12 h:12 h。饲养于标准盒内,每盒 5 只,其饲养空间符合中华人民共和国国家标准 GB14925-2010 中关于实验动物所需最小空间的规定。所有动物均由培训合格的人员进行饲养管理,整个饲养过程中保持动物饮食活动自由。本研究方案经中国医学科学院药用植物研究所实验动物伦理委员会审批通过后开展实验(SLXD-20230505012)。

1.1.2 主要试剂与仪器

肝素钠(上海源叶生物科技有限公司,货号:S12004-100 g);1%戊巴比妥钠(50 mg/kg);组织固定液(北京九州岛柏林生物科技有限公司,BLC-01);HE 染液套装(Servicebio,G1003);Gluta 固定液(北京索莱宝科技有限公司,#P1126);TTC 染液(Sigma,T8877-10G);肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 酶联免疫吸附测定试剂盒(北京华英生物技术研究所以, HY-H0019);白介素 1 β (IL-1 β) 酶联免疫吸附测定试剂盒(北京华英生物技术研究所以,H-H0001);C 反应蛋白(CRP)酶联免疫吸附测定试剂盒(北京华英生物技术研究所以, HY-I0024);超氧化物歧化酶(SOD)酶联免疫吸附测定试剂盒(北京华英生物技术研究所以, HY-M0001);活性氧(ROS)酶联免疫吸附测定试剂盒(北京华英生物技术研究所以, HYI-0087)。非吸收性外科缝合线(扬州源康医疗器械有限公司,型号:4-0);2 mL 注射器;尼龙栓线(北京西浓科技有限公司,1720-A2JC);体重秤(上海菁华科技仪器有限公司,YP2002N);激光散斑成像仪(英国 Moor Instruments, MoorFLPI-2);恒温培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司,ZXDP-A2080);脱水机(意大利 DIAPATH, Donatello);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,JB-P5);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,RM2016)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模

根据大鼠体重,随机将 88 只 SD 大鼠分为 4 组,即假手术组($n = 16$),经典 2-VO 组($n = 24$),改良 2-VO 组($n = 24$)和线栓法组($n = 24$)。具体操作如下:经典 2-VO 组:用戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠,逐层分离出双侧颈总动脉,使用 4-0 外科缝合线结扎颈总动脉后离断,消毒缝合。改良 2-VO 组:麻醉大鼠后首先静脉推注肝素钠溶液使大鼠全身肝素化。逐层分离出双侧颈总动脉,结扎颈总动脉近心端,再在距结扎处 2.5 cm 处用 1 根缝合线绕过远心端,打 1 活结。取 2 mL 注射器,从两结中间位置扎破血管,在血管内后抽血(100 g/mL)。止血,扎紧之前系好活结,为了防止缝合线脱落每次打 4 次结,然后用手术剪在两结之间剪断颈总动脉,另一侧颈总动脉操作同上,消毒缝合。线栓法组:分离大鼠右侧颈总动脉和颈外动脉,用微动脉夹夹闭颈总动脉,用双极电凝笔电凝颈外动脉的分支。游离颈外动脉主干,在距颈总动脉分叉 3 ~ 4 mm 处结

扎。微动脉夹暂时夹闭颈内动脉,眼科剪将颈外动脉剪 1 小口,插入直径 0.175 mm 的栓线,在颈外动脉剪口处打 1 松结以阻断颈内动脉的血液返流,去除颈内动脉的微动脉夹,轻推尼龙线进入颈内动脉,部分阻断大脑中动脉 (middle cerebral artery, MCA) 的开口,插入深度 18 ~ 22 mm。去除颈总动脉的微动脉夹,消毒后逐层缝合皮下组织和皮肤。另外,各造模方法的假手术组具体操作:经典 2-VO 组和改良 2-VO 组:仅分离颈总动脉但不结扎;线栓法组:除了不插入栓线外其他操作与模型组一致。

1.2.2 动物处理

为了全面探究 3 种造模方法对大鼠产生的影响,增加其应用价值,实验人员设置了 3 个时间点,

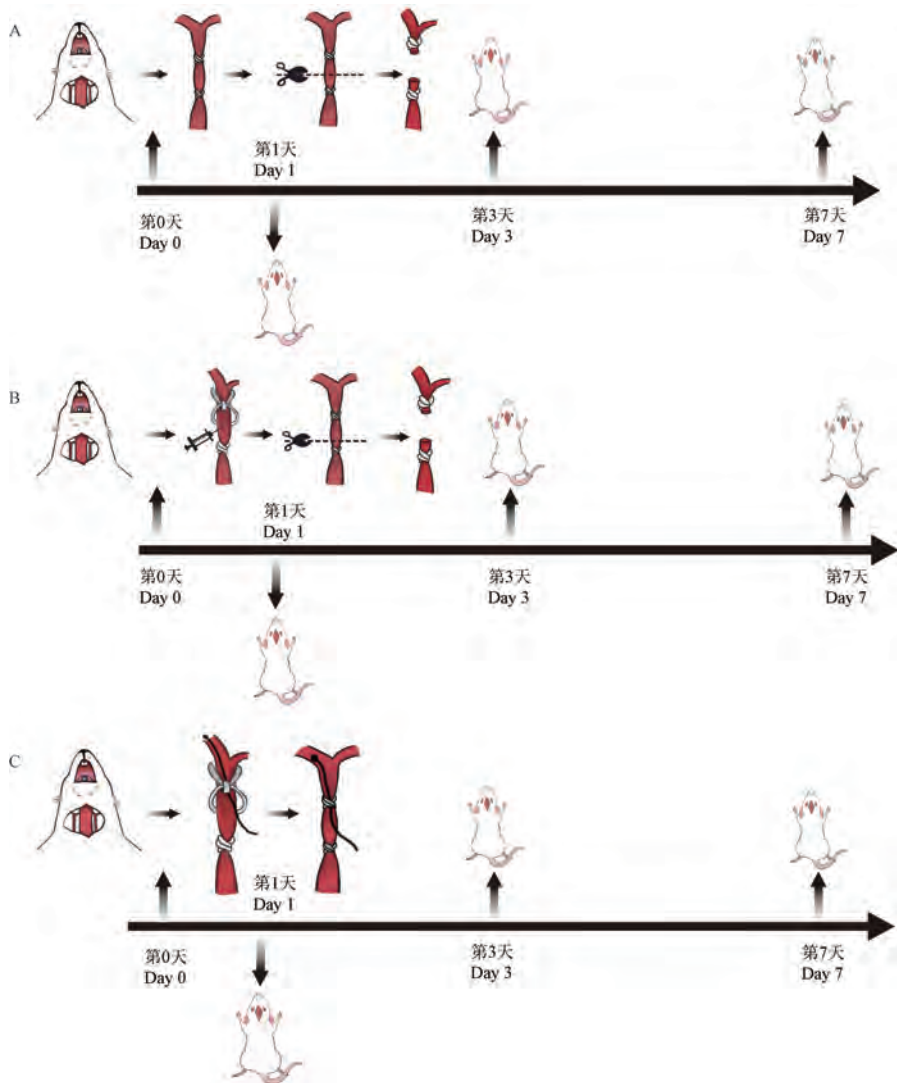
即术后 1、3、7 d,每个时间点取 9 只大鼠作为研究对象。实验模型构建示意图如图 1 所示。

1.2.3 激光散斑血流仪检测大鼠脑血流量

实验人员检测了 60 只大鼠的脑血流量。麻醉大鼠后,剪开顶部皮肤,清理干净残留毛发。再用扩胸器撑开大鼠头皮,将大鼠头部正对激光散斑血流仪摄像头下连续检测 3 min,大鼠脑血流量下降至缺血前 40% ~ 30% 以下视为缺血成功。

1.2.4 TTC 染色

大鼠测完脑血流后,腹主动脉取血后立即断头,将脑组织剥离后放冷冻至稍微硬化,除去小脑和脑干,再用刀片连续切 6 片 (每片约 2 mm),将脑片放入提前预热的 37 ℃ 2% TTC 溶液中避光孵育



注:A:经典 2-VO 组;B:改良 2-VO 组;C:线栓法组。

图 1 步态模型构建示意图

Note. A. Classic 2-VO group. B. Modified 2-VO group. C. Intraluminal thread technique (ITT) group.

Figure 1 Schematic diagram of gait model construction

15 min。孵育完成后将脑片在 4%多聚甲醛中固定过夜后,将脑片取出依次排列在白色滤纸上,拍照。

1.2.5 ELISA 法检测大鼠血清中 TNF-α、IL-1β、hs-CRP、SOD 和 ROS 的表达

取得的血液样本($n = 88$)经 4 ℃ 3000 r/min 离心 15 min 后取上清液得到大鼠血清样品,按照 ELISA 试剂盒说明书对大鼠血清进行检测。

1.2.6 大鼠脑组织 HE 染色

每种模型取 12 只大鼠,腹主动脉取血后立即断头,取出脑组织经生理盐水灌注后在 4%组织固定液中固定过夜。随后依次进行 HE 染色,光学显微镜观察病理变化。

1.2.7 透射电镜检测大鼠海马组织超微结构

每种模型取 12 只大鼠,腹主动脉取血后立即处

死,将脑组织置于冰袋上,用镊子小心分离出海马组织,放置于 Gluta 电镜固定液中固定 2 h。然后迅速行透射电镜观察。

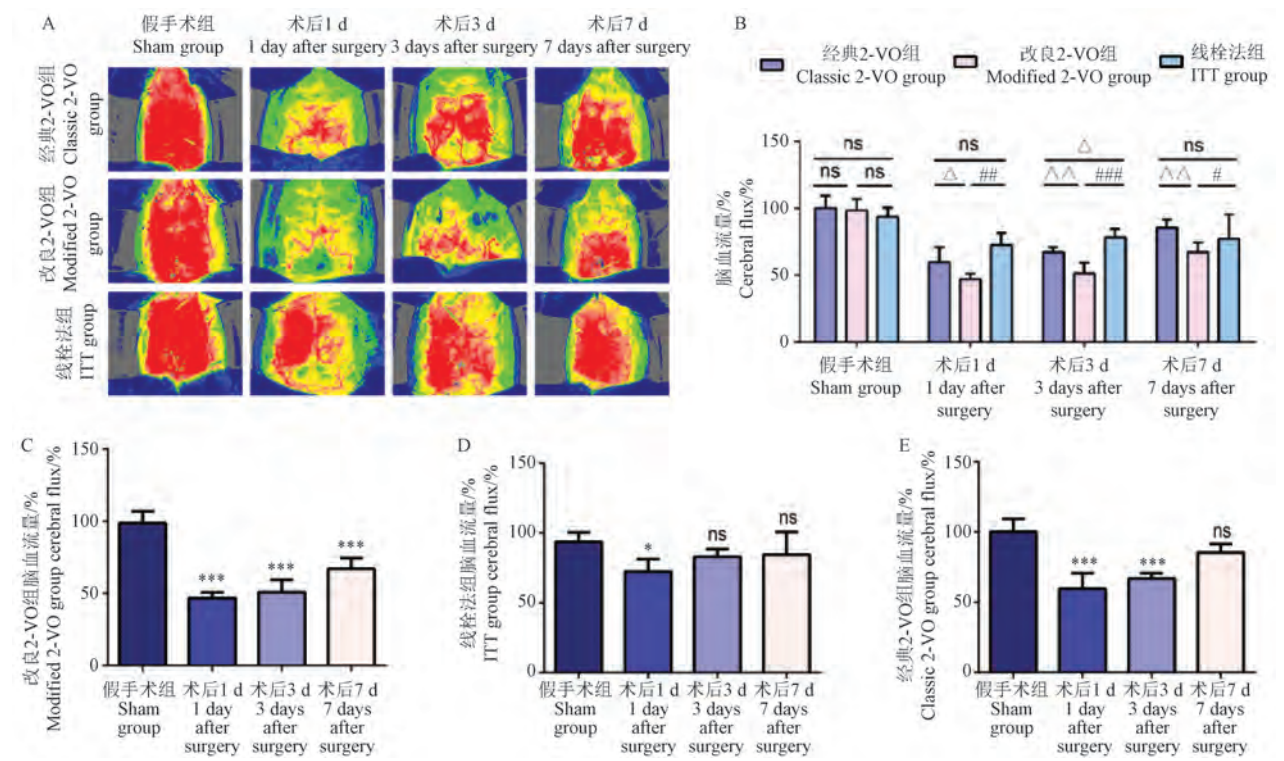
1.3 统计学分析

本实验数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,用 GraphPad Prism 6.02 软件进行统计学分析。确保数据呈正态分布的条件下,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脑血流变化情况

结果如图 2,研究团队采用激光散斑血流仪监测术后不同时间段大鼠脑血流量的变化,脑血流量



注:A:激光散斑检测术后不同时间点3种模型大鼠的脑血流量变化;B:3组大鼠在不同时间点的脑血流量变化对比;C:改良2-VO组大鼠术后不同时间点脑血流量变化;D:线栓法组大鼠术后不同时间点脑血流量变化;E:经典2-VO组大鼠术后不同时间点脑血流量变化。与假手术组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;与改良2-VO组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;与经典2-VO组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。(下同)

图2 大鼠经三种造模方法造模后脑血流变化情况($n = 5$)

Note. A. Laser speckle was used to detect the changes of cerebral blood flow at different time points after operation. B. Changes of cerebral blood flow at different time points in the three groups. C. Changes of cerebral blood flow at different time points after operation in modified 2-VO group. D. Changes of cerebral blood flow at different time points after operation in the intraluminal thread technique group. E. Changes in cerebral blood flow at different time points after operation in rats of the classic 2-VO group. Compared with sham group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with modified 2-VO group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. Compared with classic 2-VO group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes of cerebral blood flow in rats after three methods of modeling($n = 5$)

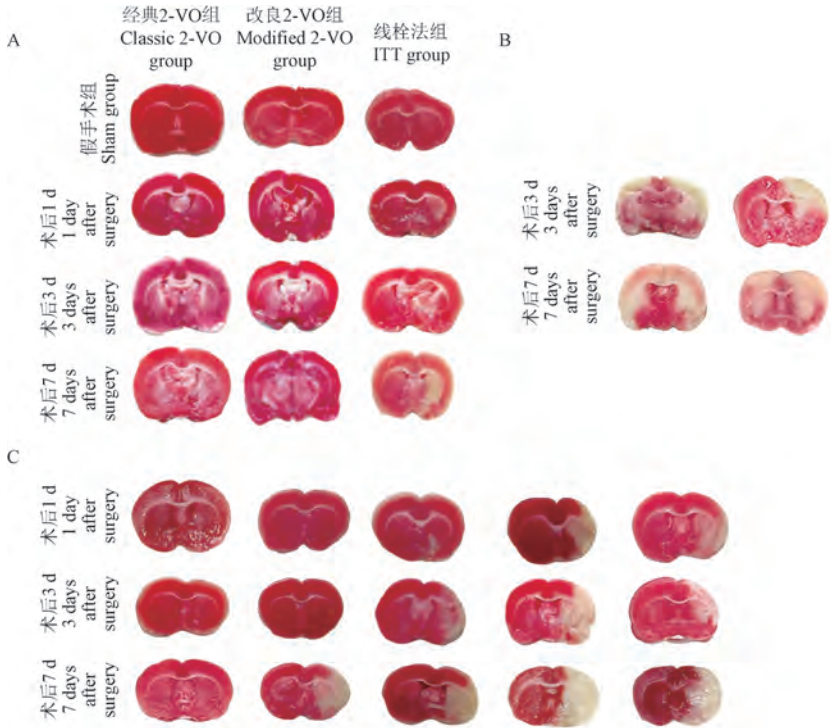
下降至缺血前 40% ~ 30%以下视为造模成功。

3 种模型的 Sham 组大鼠脑血流灌注充沛,未出现缺血情况。造模后,大鼠脑血流明显下降,其中改良 2-VO 组降幅最大。术后 1 d,该组脑血流仅为假手术组的 46.66%,明显低于其他 2 组。术后 3 d,经典 2-VO 组和改良 2-VO 组的脑血流分别上升至假手术组的 $66.98\% \pm 3.74\%$ 和 $50.75\% \pm 8.61\%$,线栓法组患侧脑血流量上升至健侧的 $78.12\% \pm 6.26\%$,此时前 2 组的脑血流量仍显著低于假手术组 ($P < 0.001$),线栓法组患侧与健侧之间的差值与假手术组相比无显著性差异。除此之外,改良 2-VO 组大鼠脑血流量显著低于另 2 组,经典 2-VO 组大鼠脑血流量虽然显著高于改良 2-VO 组,但相较于线栓法组来说仍具备一定优势。术后 7 d,经典 2-VO 组以及线栓法组与各自对照组相比脑血流均已无显著性差异,而改良 2-VO 组的脑血流量不仅仍显著低于假手术组 ($P < 0.001$),还低于另外 2 种模型大鼠的脑血流量,并且仍处于低灌注所定义的脑血流量范围 $67.10\% \pm 7.36\%$ 。

总之,术后 7 d 时,仅有改良 2-VO 组大鼠的脑血流量符合本研究对低灌注的定义,说明改良 2-VO 法可延长模型处于低灌注的时间,可用于较长给药周期的脑低灌注基础实验研究。

2.2 大鼠脑梗死体积情况

有研究指出一般情况下,不同于有栓子型的 ITT 模型,无栓子型的经典 2-VO 引起的不完全性脑缺血不易引起大脑皮层大面积梗死^[8]。在本研究中,经典 2-VO 组的大鼠在术后 3 d 和 7 d 时显示纹状体出现大小不等的白色梗死灶,这与文献结果相符,假手术组和经典 2-VO 组术后 1 d 时未显示明显染色异常(图 3A)。改良 2-VO 组和线栓法组均在术后 1 d 就出现纹状体梗死灶,并且梗死体积随着时间延长而增加。也就是说,与经典 2-VO 组相比,改良 2-VO 组与线栓法组能在更短的时间内形成梗死灶。除此之外,改良 2-VO 组还大约有 26.7% 的大鼠(4/15)分别在术后 3 d 和术后 7 d 在皮层和纹状体区域都出现了大面积的白色梗死灶(图 3B),而这一现象没有在经典 2-VO 组中观察到。



注:A:3 种造模方法不同时间点的脑组织 TTC 染色结果;B:改良 2-VO 组 4 只染色异常大鼠的 TTC 染色结果;C:线栓法组 15 只大鼠 TTC 染色情况,其中有 10 只大鼠在皮层和纹状体出现了大小不等的梗死灶。

图 3 TTC 染色检测 3 种方法不同时间点大鼠脑缺血情况

Note. A. TTC staining results of brain tissue at different time points of the three methods. B. TTC staining results of four rats with abnormal staining in the modified 2-VO group. C. TTC staining was performed in 15 rats in ITT group, and 10 of them showed infarcts of different sizes in cortex and striatum.

Figure 3 TTC staining was used to detect cerebral ischemia at different time points of the three methods

相较于前 2 个模型,线栓法组大鼠更易发生患侧皮层和纹状体区域都出现大面积白色梗死灶的现象(10/15),且梗死体积大小与造模时间呈正相关,见图 3C。研究人员推测这可能与 2 种因素有关:(1)栓线反复进出的过程会损伤血管内皮细胞,影响血管内膜完整性,诱发血栓形成完全堵塞血管;(2)与阻断的供血血管有关:大脑中动脉是颈内动脉的最大分支,承担大脑半球 80%的血供,阻塞大脑中动脉会导致包括纹状体和皮质在内的大量梗死^[9]。

TTC 染色结果表明:相较于经典 2-VO 组引起的相对温和的脑血流量下降,改良 2-VO 组引起的脑血流量下降幅度更大。线栓组不同于前面 2 组,线栓插入的深浅以及大鼠的血管内径对实验结果影响较大,且线栓的插入过深可导致脑血流急剧下降,这个结果往往是无法通过大鼠自身代偿来抵抗的,因此该模型相较于前 2 个模型来说稳定性较差。

2.3 3 组大鼠血清炎症及氧化因子的表达

如表 1 所示,线栓法组 TNF-α、IL-1β、hs-CRP

及 ROS 水平均随着造模时间延长先升后降,SOD 则是先降后升,术后 3 d 为转折点。术后 7 d 时,hs-CRP 下降至 3.06 ± 0.67 mg/L,与假手术组的差异无显著性。

改良 2-VO 组与经典 2-VO 组的变化规律较为相似,均表现为随着造模时间延长,促炎因子 TNF-α、IL-1β、hs-CRP 和氧化因子 ROS 水平逐渐下降,抗氧化因子 SOD 含量逐渐上升。但是,经典 2-VO 组 hs-CRP 水平在第 3 天时与对照组相比差异无显著性,术后 7 d 时含量进一步下降。而改良 2-VO 组各项指标在术后 7 d 时与对照组的差异仍具有显著性。

3 种造模方法均可引起大鼠的炎症和氧化应激反应,其中改良 2-VO 法能稳定地、持久地使大鼠的血清细胞因子保持在一个病理状态。

2.4 大鼠海马组织病理变化

通过 HE 染色评价 2 种造模方法在不同时间点对大鼠海马组织 CA1 区和 CA3 区的神经细胞形态的改变。如图 4 所示,3 种方法的假手术组海马神

表 1 不同时间点 3 组大鼠血清 TNF-α、IL-1β、hs-CRP、SOD 和 ROS 含量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of serum levels of TNF-α, IL-1β, hs-CRP, SOD and ROS among three groups at different time points($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	TNF-α/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	hs-CRP/(mg/L)	SOD/(U/mL)	ROS(MFI/mL)
经典 2-VO 假手术组 Classic 2-VO Sham group	28.57 ± 3.21	15.68 ± 1.70	2.90 ± 0.58	78.24 ± 10.67	147.38 ± 6.77
改良 2-VO 假手术组 Modified 2-VO Sham group	25.02 ± 4.01	14.10 ± 0.85	2.49 ± 0.12	85.37 ± 3.91	133.49 ± 5.45
线栓法假手术组 ITT Sham group	24.30 ± 3.48	13.72 ± 0.43	2.34 ± 0.20	89.26 ± 1.82	87.24 ± 17.84
经典 2-VO 组术后 1 d Classic 2-VO group 1 day after surgery	52.20 ± 4.04 **	31.45 ± 1.41 ***	4.59 ± 0.76 *	67.62 ± 7.00 *	282.45 ± 20.86 ***
经典 2-VO 组术后 3 d Classic 2-VO group 3 days after surgery	48.31 ± 0.29 ***	30.75 ± 0.87 ***	3.88 ± 0.48	72.11 ± 4.87 *	277.89 ± 22.43 ***
经典 2-VO 组术后 7 d Classic 2-VO group 7 days after surgery	45.03 ± 4.02 **	30.08 ± 2.63 **	3.45 ± 0.88	78.78 ± 0.74 **	270.12 ± 11.09 ***
改良 2-VO 组术后 1 d Modified 2-VO group 1 day after surgery	36.65 ± 2.46 **	25.67 ± 2.69 ***	4.00 ± 0.84 *	60.68 ± 0.64 ***	234.29 ± 6.79 ***
改良 2-VO 组术后 3 d Modified 2-VO group 3 days after surgery	35.28 ± 3.58 **	24.38 ± 8.69 *	3.80 ± 0.87 *	64.86 ± 4.62 ***	206.09 ± 4.62 ***
改良 2-VO 组术后 7 d Modified 2-VO group 7 days after surgery	34.73 ± 8.82 *	22.58 ± 4.67 *	3.58 ± 0.48 **	71.21 ± 7.24 *	198.98 ± 33.10 *
线栓法组术后 1 d ITT group 1 day after surgery	36.57 ± 10.98 *	23.33 ± 6.41 *	2.87 ± 0.49 *	81.28 ± 4.87 *	248.54 ± 33.34 **
线栓法组术后 3 d ITT group 3 days after surgery	53.60 ± 9.47 **	27.64 ± 1.51 ***	4.27 ± 0.20 ***	66.76 ± 6.27 **	275.54 ± 45.01 **
线栓法组术后 7 d ITT group 7 days after surgery	43.28 ± 12.28 *	22.08 ± 6.29 *	3.06 ± 0.67	69.09 ± 8.69 **	224.80 ± 60.87 **

注:与假手术组相比, ** P < 0.01。
Note. Compared with sham group, ** P < 0.01.

神经元数量丰富、形态规则、排列整齐密集、胞核大而圆、呈均匀淡蓝色或蓝色、核仁清楚。

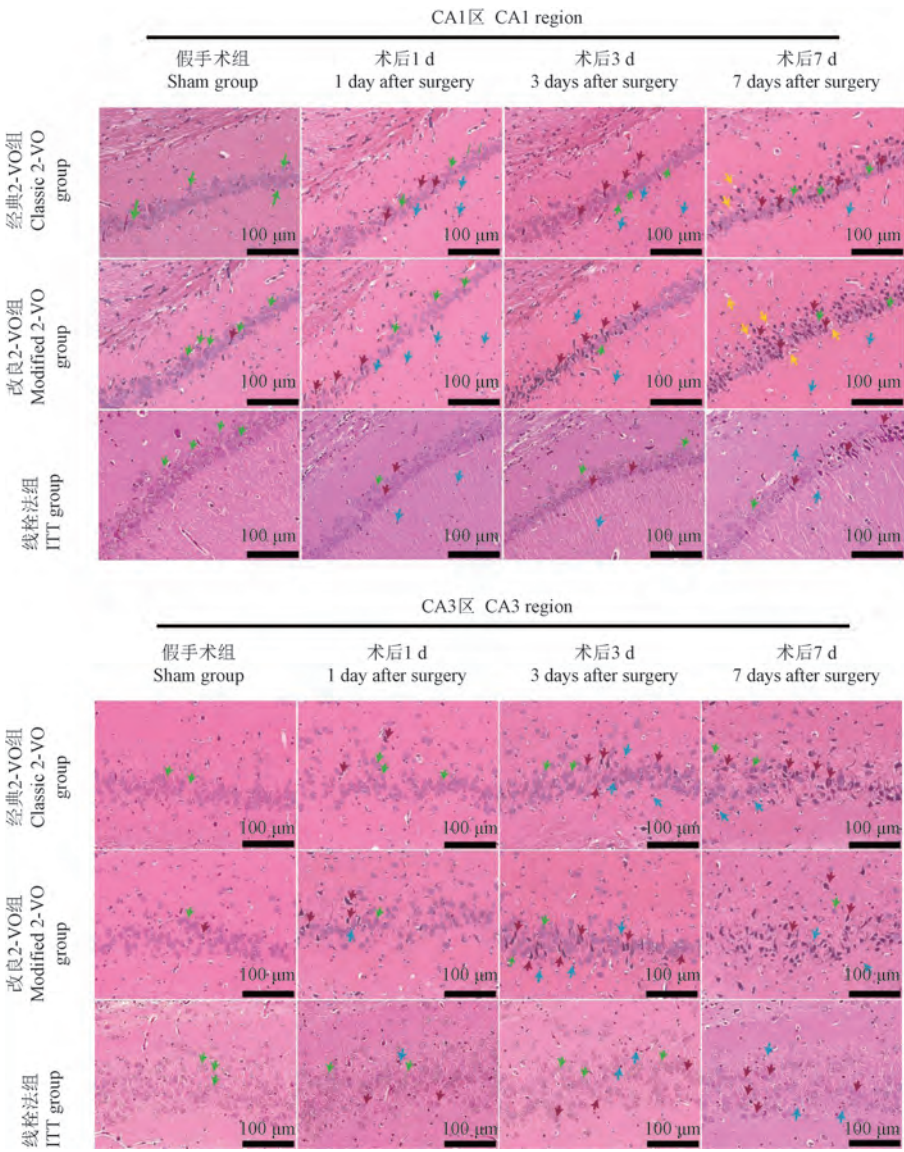
术后 1 d,各组海马区域的变化如下:经典 2-VO 组:极少数神经元体变形、皱缩深染(红色箭头),少数炎症细胞增生(蓝色箭头)。线栓法组:少量细胞核淡染,细胞间距增大。改良 2-VO 组:相较于前 2 组,皱缩神经元核炎症细胞数量增加。

术后 3 d,经典 2-VO 组 CA1 和 CA3 区少量神经元胞体变形皱缩深染,较多炎症细胞增生(蓝色箭头)。线栓法组 CA1 区多数细胞胞核消失,细胞数量减少,CA3 区结构层次紊乱。改良 2-VO 组较

其他 2 组损伤进一步增加,主要表现在:海马 CA1 和 CA3 区更多的神经元胞体变形皱缩深染成三角形或不规则的形状,神经元数量减少,炎症细胞浸润增加。

术后 7 d,经典 2-VO 组 CA1 和 CA3 区大量神经元皱缩深染,周围少见不规则空泡(黄色箭头),改良 2-VO 组皱缩神经元数量进一步增加,偶见少量正常细胞(绿色箭头),神经元排列更加紊乱。线栓法组相较其他两组损伤较轻,主要表现为 CA1 和 CA3 区神经元皱缩和排列紊乱,无空泡化现象。

总的来说,3 种方法均可导致大鼠海马 CA1、



注:红色箭头:异常神经元;绿色箭头:正常神经元;蓝色箭头:炎症细胞;黄色箭头:不规则空泡。

图 4 3 种造模方法术后 1、3、7 d 时大鼠海马组织 CA1 和 CA3 区 HE 染色

Note. Red arrow. Abnormal neurons. Green arrow. Normal neurons. Blue arrow. Inflammatory cells. Yellow arrow. Irregular physalides.

Figure 4 Hippocampal CA1 and CA3 regions of rats were stained with HE at 1, 3 and 7 days after operation

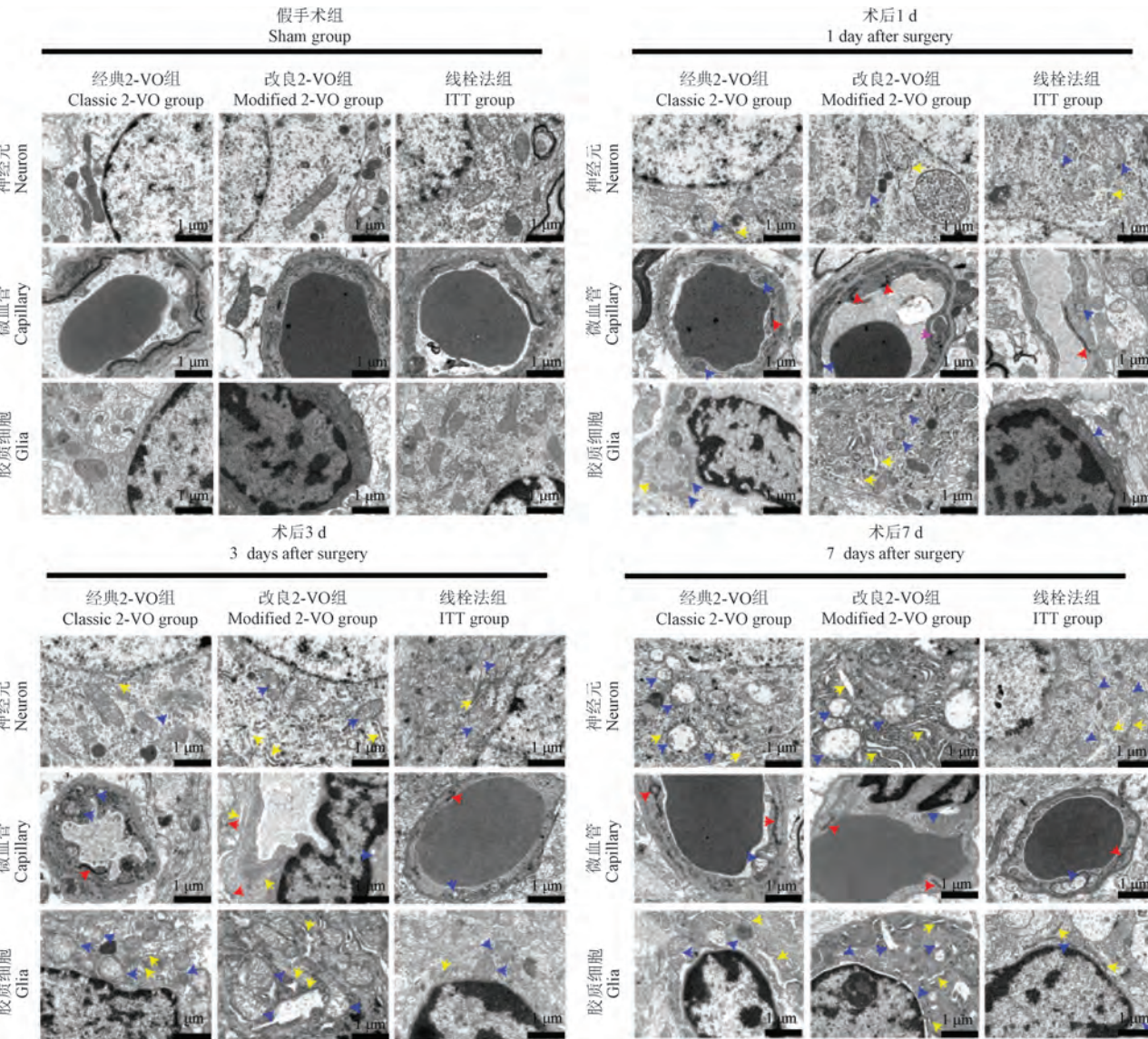
CA3 区受损, 损伤程度与造模时间呈正相关。其中, 改良 2-VO 组对比另外 2 组在相同造模时间内能造成海马组织更明显的病理损伤, 主要表现为术后第 3 天即出现大量皱缩深染坏死的神经元, 以及更多的炎性细胞浸润。

2.5 大鼠海马组织超微结构改变

如图 5 所示, 3 种造模方法的假手术组未显示明显病理性改变。术后 1 d, 3 种方法均可引起线粒体轻度损伤。改良 2-VO 法额外引起内质网腔扩张。具体体现为: (1) 神经元: 经典 2-VO 组与改良

2-VO 组线粒体均呈现轻度肿胀, 后者的内质网腔略有扩张。线栓法组线粒体嵴轻微肿胀, 部分内质网断裂。(2) 微血管: 3 种模型的微血管基底膜和内皮细胞结构正常, 线粒体嵴结构正常, 双层膜结构清晰, 紧密连接未被破坏。(3) 胶质细胞: 经典与改良 2-VO 组均表现线粒体嵴轻微肿胀, 排列紊乱。但后者内质网腔扩张更明显。线栓法组胶质细胞未见明显病理性改变。

术后 3 d, 3 种方法均可引起线粒体中度肿胀。但除此之外, 改良 2-VO 法还能造成内质网腔中度



注: 蓝色箭头: 线粒体超微结构改变; 黄色箭头: 内质网超微结构改变; 红色箭头: 紧密连接完整性; 紫色箭头: 自噬小体。

图 5 3 种造模方法术后 1、3、7 d 对大鼠海马组织不同细胞超微结构影响的代表性图像 (n = 3)

Note. Blue arrow. Ultrastructural changes of mitochondria. Yellow arrow. Ultrastructural changes of endoplasmic reticulum. Red arrow. Integrity of tight junctions. Purple arrow. Cytolysosome.

Figure 5 Representative images of the effects of three methods on the ultrastructure of different cells in the rat hippocampus at 1, 3 and 7 days after operation (n = 3)

扩张以及紧密连接受损。具体体现为:(1)神经元:3 组线粒体均表现为嵴部分溶解,双层膜结构模糊,中等程度肿胀。且改良 2-VO 组内质网腔扩张程度更严重。(2)微血管:经典 2-VO 组微血管基底膜结构部分溶解,紧密连接完整。改良 2-VO 组微血管基底膜溶解,紧密连接模糊,线粒体基质重度肿胀甚至出现空泡化;线栓法组与经典 2-VO 组病理改变类似。(3)胶质细胞:与前面的结果相似,除了线粒体表现出的肿胀外,改良 2-VO 组相较于另外 2 组内质网腔扩张更严重。

术后 7 d,改良 2-VO 组线粒体、内质网以及紧密连接的损伤程度均大于经典 2-VO 组和线栓法组。具体体现为:(1)神经元:经典 2-VO 组和改良 2-VO 组线粒体基质空泡化加剧,经典 2-VO 组内质网腔轻微扩张,有部分断裂;改良 2-VO 组在此基础上表现出更严重的内质网腔扩张。(2)微血管:经典 2-VO 组微血管内皮细胞基底膜中度溶解,紧密连接轻度受损。改良 2-VO 组微血管内皮细胞基底膜和紧密连接均被严重破坏,线粒体嵴几乎完全溶解。(3)胶质细胞:经典 2-VO 组线粒体破裂,部分基质空泡化,核膜扩张,内质网腔重度扩张;改良 2-VO 组相较于经典 2-VO 组线粒体碎片增多,空泡化更严重。线栓法组的超微结构改变虽然相较于 1 d 和 3 d 时有所加重,但损伤程度不如另外 2 种模型。

总的来说,在相同的造模时间内,改良 2-VO 组造成的海马区细胞损伤更严重,主要体现在:更明显的线粒体肿胀、空泡化现象;术后 1 d 即出现内质网应激;术后 3 d 即表现出紧密连接破坏。

3 讨论

经典 2-VO 法是目前使用最广泛,建立最成熟的低灌注模型之一,具有操作简单、成本低、动物存活率高等优点^[10]。但它造成的是一种不完全性脑缺血,主要归因于 SD 大鼠具有完整的 Willis 环,可在双侧颈总动脉结扎后持续为大脑提供不间断但逐渐减少的血液供应^[11],难以达到理想的脑缺血效果。沙鼠和大多数品系的小鼠会因为 Willis 环缺失导致 2-VO 术后出现严重的脑缺血甚至死亡^[12-13],说明了 Willis 环对 2-VO 模型的影响非常大。这将直接导致造模大鼠的组织学脑损伤程度差异较大,因为每个个体的 Willis 环发育情况和侧支代偿能力不同。对于一些具有良好的 Willis 环和血液储备能力的个体来说,仅仅 2-VO 不足以造成脑低灌注,从

而影响实验结果。因此,PULSINELLI 等^[14]在 1979 年提出了 1 种 4-VO 模型(双侧颈总动脉夹闭+椎动脉闭塞),大鼠术后前脑半球严重缺血缺氧,血流量降低至 3% 甚至更少,在短时间内与智能相关脑区严重受损且伴有感觉运动障碍,该模型为全脑缺血的研究作出了巨大的贡献。但这种 4-VO 模型具有如下缺点:操作困难,对手术操作者熟练度要求很高,且术后易感染,动物死亡率高,因此并没有被广泛接受用于研究^[9]。考虑到以上模型的特点,本研究团队构建了 1 种改良 2-VO 模型,即在 2-VO 的基础上给予低血压的条件,从而进一步降低脑灌注压,可使 2-VO 这种相对温和的不完全性脑缺血转为更严重的脑缺血,但又不同于 4-VO 模型的近乎全脑无血流供应,更符合临床低灌注性脑卒中患者低压的发病特征。已有研究报道,在夹闭双侧颈总动脉的基础上通过腹腔注射硝普钠来降低血压^[15-16],但硝普钠扩血管的作用在 30 min 后消失,模型大鼠无法维持较长时间的低压状态,并且外周血管的收缩舒张受环境温度因素影响较大,模型稳定性较差。在本研究中,研究人员通过从 SD 大鼠颈总动脉抽血直接降低大鼠总血容量来达到降低脑灌注压的目的,这种方法制备的低灌注模型相较于 2-VO + 硝普钠模型具有稳定性高、可重复性强的优点;相较于 4-VO 模型具有操作简便、动物存活率高的优点;并且能造成比 2-VO 模型更完全的脑缺血,一定程度上规避了因个体脑血流储备能力差异带来的影响。除了全脑低灌注模型以外,莫大鹏等^[6]在 2005 年建立的局部脑低灌注模型(即本文的线栓法)造成的病理学改变类似于传统意义上脑低灌注期的 I ~ II 期之间,即急性期,所以他们仅研究了 24 h 内局部低灌注对大鼠的影响。为了更充分研究脑低灌注各分期不同的病理生理学特点,本研究团队在莫大鹏等^[6]的基础上延长了造模时间,并且将其与全脑低灌注模型比较。

大脑血液循环系统由前循环系统和后循环系统两大系统组成,其中颈内动脉系统构成的脑血管网络常被称为前循环,经典 2-VO 造模后能有效降低大脑前循环脑血流量^[17]。有研究表明在经典 2-VO 术后 2 ~ 6 周在皮层和纹状体的神经元数量急剧减少,说明这两个区域受慢性缺血的影响较大^[8,18],在本研究中,经典 2-VO 组仅在纹状体观察到轻微梗死,未在皮层观察到梗死灶,这可能是因为大脑皮层拥有更为复杂的血管网络,这样的结构

特点可能使得皮层相对于纹状体更具有抗缺血性损伤的能力,由经典 2-VO 法引导的较温和且短时间的缺血(0 ~ 7 d)可能不足以引起皮层的梗死。而改良 2-VO 法中大约有 26.7% 的大鼠在皮层和纹状体都出现了梗死,这可能是因为改良 2-VO 法引起了更严重的前循环血流量下降,造成了相较于经典 2-VO 法更严重的神经功能损伤。线栓法相较于前面所述的 2 种模型更易形成皮层和纹状体大面积梗死,这可能与不同模型阻断的供血血管不同有关,栓线直接插入大脑中动脉根部能有效降低相应脑区的血供量,这与结扎双侧颈总动脉不同。需要注意的是,SD 大鼠大脑前动脉近端的内径一般为 0.2 mm,在保证插入相应深度的前提下,不损伤血管内膜,也不完全阻塞血管是本研究的目的,因此需要考虑栓线的直径和插入深度。本研究采取直径 0.175 mm 的栓线,在插入深度为 18 ~ 22 mm 的情况下完成造模,但由于大鼠个体间解剖学差异较大,插入相同深度和直径的栓线对中动脉的阻塞程度是不同的,这也解释了线栓法制备低灌注模型不稳定的原因。研究团队曾尝试利用 MoorFLPI-2 激光散斑成像仪实时监测大鼠的脑血流量以调整栓线深度,但受限于成像仪较低的时空分辨率,并且无法显示出细微的脑血流量变化而无法达到理想效果。需要在今后的实验中进一步改进和完善。

慢性脑灌注不足引起的葡萄糖和氧气中断会导致 Ca^{2+} 稳态被破坏,引起活性氧急性和慢性产生^[19],过多的活性氧攻击线粒体引起线粒体结构损伤和功能障碍,因此脑低灌注被认为是导致细胞能量代谢紊乱的重要原因。经典 2-VO 组的透射电镜结果显示,造模后随着时间的延长,海马区细胞的线粒体损伤逐渐加重。在改良 2-VO 组中,研究人员不仅观察到了逐渐加重的线粒体损伤,还发现了较经典 2-VO 组更严重的内质网肿胀现象。内质网在蛋白质和脂质合成中起着重要作用,也是细胞内最大的 Ca^{2+} 库,在细胞内 Ca^{2+} 稳态的维持中具有重要作用。线粒体相关膜 (mitochondrial associated membrane, MAM) 是内质网和线粒体 Ca^{2+} 信号传递中的专用微结构域,在生理条件下 MAM 控制着线粒体和内质网之间的 Ca^{2+} 稳态;在病理条件下,胞质内的 Ca^{2+} 可转运到应激的内质网并富集在 MAM 处,促进内质网-线粒体 Ca^{2+} 大量转移,然后线粒体通透性转换孔打开,过量的 Ca^{2+} 积累会激活促凋亡因子释放到胞质引起细胞凋亡^[20-21]。在缺血缺氧

的条件下,内质网应激可进一步加重线粒体结构和功能损伤,从而诱导一个更坏的结局^[22]。本实验的结果显示,改良 2-VO 法在另外 2 种方法尚未引起内质网异常的时间内(术后 1 d)即诱导出内质网应激现象,并且造成更严重的线粒体损伤。从超微结构改变的角度说明了在相同的造模时间内,改良 2-VO 法相较于经典 2-VO 法和线栓法能更快速诱导出符合临床低灌注特点的动物模型。

综上所述,本研究建立的改良 2-VO 模型具有以下优点:(1)更稳定,易重复。(2)能模拟出更完全的脑灌注不足状态。(3)能更快速诱导出神经功能损伤。该模型也存在一定的不足,例如:(1)放血时需要严格把控放血量,放血过多可能会使动物死亡率升高。(2)注射器针尖需要不断在血管内调整位置以便血液流出,这增加了手术难度,延长了手术时间,抽血过程还可能会对血管内皮产生影响。

本研究通过比较 3 种脑灌注不足动物模型制备的方法,明确了 3 类模型的适用范围及各自的优缺点,为后续脑灌注不足的病理机制及治疗药物研发提供参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] 《中国脑卒中防治报告》编写组.《中国脑卒中防治报告 2019》概要 [J]. 中国脑血管病杂志, 2020, 17(5): 272-281.
Report on Stroke Prevention and Treatment in China Writing Group. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2019 [J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2020, 17(5): 272-281.
- [2] YE Q, ZHAI F, CHAO B, et al. Rates of intravenous thrombolysis and endovascular therapy for acute ischaemic stroke in China between 2019 and 2020 [J]. Lancet Reg Health West Pac, 2022, 21: 100406.
- [3] HEISS W D. The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? [J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1268: 26-34.
- [4] MOMJIAN-MAYOR I, BARON J C. The pathophysiology of watershed infarction in internal carotid artery disease: review of cerebral perfusion studies [J]. Stroke, 2005, 36(3): 567-577.
- [5] WASHIDA K, HATTORI Y, IHARA M. Animal models of chronic cerebral hypoperfusion: from mouse to primate [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): E6176.
- [6] 莫大鹏, 凌锋, 李萌, 等. 大鼠脑局灶性低灌注模型的建立 [J]. 中国脑血管病杂志, 2005, 2(7): 316-320.
MO D P, LING F, LI M, et al. Study of establishing a model of regional cerebral hypoperfusion in rats [J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2005, 2(7): 316-320.
- [7] 刘伟, 胡鹏, 冯波. 血管性痴呆大鼠模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 805-809.

- LIU W, HU P, FENG B. Research progress of rat models of vascular dementia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 805–809.
- [8] LAPI D, MASTANTUONO T, SAPIO D, et al. Pial microvascular responses induced by transient bilateral common carotid artery occlusion in Zucker rats [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2013, 54(4): 415–429.
- [9] GARCIA J H, LIU K F, HO K L. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex [J]. Stroke, 1995, 26(4): 636–642.
- [10] 宋元毓, 陈英华, 李俊峰, 等. 血管性痴呆动物模型的研究概述 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 75–85.
SONG Y Y, CHEN Y H, LI J F, et al. A review of animal models of vascular dementia [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 75–85.
- [11] 孙伟, 耿悦, 陈叶婷, 等. Sprague-Dawley 与 Wistar 大鼠双侧颈总动脉结扎后大脑病理变化和认知功能的差异 [J]. 生理学报, 2019, 71(5): 705–716.
SUN W, GENG Y, CHEN Y T, et al. Differences of brain pathological changes and cognitive function after bilateral common carotid artery occlusion between Sprague-Dawley and Wistar rats [J]. Acta Physiol Sin, 2019, 71(5): 705–716.
- [12] TAMAKI M, KIDOGUCHI K, MIZOBE T, et al. Carotid artery occlusion and collateral circulation in C57Black/6J mice detected by synchrotron radiation microangiography [J]. Kobe J Med Sci, 2006, 52(5): 111–118.
- [13] 李长龙, 杜小燕, 王冬平, 等. 长爪沙鼠脑缺血模型近交系的培育及其发病机制研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 512–517.
LI C L, DU X Y, WANG D P, et al. Advances in research of the establishment of an inbred Mongolian gerbil model of cerebral ischemia and its mechanism of pathogenesis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 512–517.
- [14] PULSINELLI W A, BRIERLEY J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. Stroke, 1979, 10(3): 267–272.
- [15] WU S, HUANG R, ZHANG R, et al. Gastrodin and gastrodigenin improve energy metabolism disorders and mitochondrial dysfunction to antagonize vascular dementia [J]. Molecules, 2023, 28(6): 2598.
- [16] 王蕊, 杨秦飞, 唐一鹏, 等. 大鼠拟“血管性痴呆”模型的改进 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10): 914–916.
WANG R, YANG Q F, TANG Y P, et al. Improvement of a rat vascular dementia model [J]. Chin J Pathophysiol, 2000, 16(10): 914–916.
- [17] KATO H, KANAI Y, WATABE T, et al. Quantitative measurement of regional cerebral blood flow and oxygen metabolism in a rat model of cerebral hypoperfusion [J]. Brain Res, 2019, 1719: 208–216.
- [18] JING Z, SHI C, ZHU L, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces vascular plasticity and hemodynamics but also neuronal degeneration and cognitive impairment [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015, 35(8): 1249–1259.
- [19] RAJEEV V, CHAI Y L, POH L, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: a critical feature in unravelling the etiology of vascular cognitive impairment [J]. Acta Neuropathol Commun, 2023, 11(1): 93.
- [20] SZYMAŃSKI J, JANIKIEWICZ J, MICHALSKA B, et al. Interaction of mitochondria with the endoplasmic reticulum and plasma membrane in calcium homeostasis, lipid trafficking and mitochondrial structure [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): 1576.
- [21] ZHENG S, WANG X, ZHAO D, et al. Calcium homeostasis and cancer: insights from endoplasmic reticulum-centered organelle communications [J]. Trends Cell Biol, 2023, 33(4): 312–323.
- [22] WANG D P, KANG K, HAI J, et al. Alleviating CB2-dependent ER stress and mitochondrial dysfunction improves chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive impairment [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2024, 19(1): 1.

[收稿日期] 2024-04-30

金婷, 李沛奕, 聂慧敏, 等. 槲皮素缓解紫杉醇诱发外周神经病变小鼠模型的疼痛效应及其机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1105-1113.

JIN T, LI P Y, NIE H M, et al. Therapeutic effects and mechanisms of quercetin on pain responses in a mouse model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1105-1113.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.002

槲皮素缓解紫杉醇诱发外周神经病变小鼠模型的疼痛效应及其机制研究

金婷^{1#}, 李沛奕^{2#}, 聂慧敏², 尹诚语², 潘宇霜², 朱智慧³,
刘伯一^{2*}, 刘伯宇^{2*}

(1. 浙江中医药大学附属第三医院, 杭州 310013; 2. 浙江中医药大学第三临床医学院针灸神经生物学实验室, 杭州 310053; 3. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 观察槲皮素对紫杉醇诱发外周神经病变小鼠模型疼痛症状、脊髓星形胶质细胞活化以及背根神经节中痛敏感瞬时感受器电位香草酸亚型1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)、嘌呤能配体门控离子通道3(purinergic ligand-gated ion channel 3, P2X3)的干预作用。**方法** 选取C57BL/6小鼠24只, 随机分为空白组、模型组、模型+槲皮素组, 每组8只。模型组与模型+槲皮素组分别注射累计剂量为8 mg/kg的紫杉醇进行造模, 空白组在相应时间点注射对应溶剂。模型+槲皮素组在造模第8天开始, 每天灌胃60 mg/kg的槲皮素溶液, 其余两组分别给予相应体积溶剂。纤毛机械刺激针(von Frey)检测各组小鼠的机械痛阈, 免疫荧光检测各组小鼠脊髓中星形胶质细胞的活化, 免疫荧光和免疫印迹检测背根神经节中痛敏感TRPV1、P2X3的表达。**结果** (1)与模型组相比, 模型+槲皮素组小鼠的机械痛阈显著升高, 疼痛症状得到明显缓解。(2)与模型组相比, 模型+槲皮素组小鼠脊髓星形胶质细胞的活化明显降低, 背根神经节中TRPV1、P2X3的表达显著减少($P < 0.05$)。**结论** 槲皮素能够有效缓解紫杉醇诱发外周神经病变小鼠的疼痛症状, 其作用机制很可能与缓解脊髓星形胶质细胞活化以及减少背根神经节中TRPV1、P2X3表达有关。

【关键词】 槲皮素; 紫杉醇; 疼痛; 星形胶质细胞; TRPV1; P2X3

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)09-1105-09

Therapeutic effects and mechanisms of quercetin on pain responses in a mouse model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy

JIN Ting^{1#}, LI Piyi^{2#}, NIE Huimin², YIN Chengyu², PAN Yushuang²,
ZHU Zhihui³, LIU Boyi^{2*}, LIU Boyu^{2*}

(1. the Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310013, China; 2. Department of Neurobiology and Acupuncture Research, the Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: LIU Boyu. E-mail: lby_0731@163.com; LIU Boyi. E-mail: boyi.liu@foxmail.com

【基金项目】 国家自然科学基金(82305369), 浙江省自然科学基金(LQ21H270004)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(82305369), Zhejiang Provincial Natural Science Funds (LQ21H270004)。

【作者简介】 金婷, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 神经病理痛的机制。Email: 949156467@qq.com;

李沛奕, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 针刺镇痛的神经免疫机制。Email: 1499471104@qq.com。

#共同第一作者

【通信作者】 刘伯宇, 男, 实验师, 硕士, 研究方向: 针刺镇痛的机制。Email: lby_0731@163.com;

刘伯一, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 针刺镇痛的神经免疫学机制。Email: boyi.liu@foxmail.com。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To observe the effect of quercetin on mechanical allodynia, astrocyte activation, and upregulation of pain-related transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and P2X purinoceptor 3 (P2X3) in mice with paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Methods** Twenty-four C57BL/6 mice were divided randomly into control, model, and model + quercetin groups ($n = 8$ mice per group). Paclitaxel (total dose 8 mg/kg) was injected intraperitoneally into mice in the model and model + quercetin groups to establish the model. Mice in the control group were injected intraperitoneally with the same volume of vehicle. On day 8 after the first injection, mice in the model + quercetin group were injected with 60 mg/kg quercetin solution orally and mice in the other groups were injected with the same volume of vehicle. Mechanical pain was measured by the von Frey test. Activation of astrocytes in the spinal dorsal horn was detected by immunofluorescence. Expression levels of TRPV1 and P2X3 in dorsal root ganglia were detected by immunofluorescence and Western Blot. **Results** (1) Compared with model group, the mechanical pain of mice in model + quercetin group were relieved. (2) Compared with model group, the activation of astrocytes and the expressions of TRPV1 and P2X3 in mice of model + quercetin group were alleviated ($P < 0.05$). **Conclusions** Quercetin can significantly reduce mechanical pain in mice with paclitaxel-induced peripheral neuropathy. This mechanism maybe related to alleviating the activation of astrocytes in the spinal dorsal horn and reducing expression of TRPV1 and P2X3 in the dorsal root ganglia.

[Keywords] quercetin; paclitaxel; pain; astrocyte; TRPV1; P2X3

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

紫杉醇 (paclitaxel) 作为一种临床常见的一线抗肿瘤药物, 广泛应用于治疗乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌等多种恶性肿瘤的化疗中^[1-4]。而化疗药物诱发周围神经病变是紫杉醇临床治疗过程中最常见的副作用, 且呈现一定的剂量依赖性^[5-6]。紫杉醇诱发周围神经病变 (paclitaxel-induced peripheral neuropathy, PIPN) 主要表现为患者手足部位的灼热、麻木以及疼痛异常, 通常呈现手套长袜分布, 且一部分患者会发展成为永久的、不可逆的神经病变^[7]。PIPN 的迁延难愈也严重干扰了紫杉醇的临床疗效、降低了患者的生存质量, 大大限制了紫杉醇在临床中的应用。因此, 探究 PIPN 的发病机制, 寻找有效地治疗手段具有重大的临床意义。

槲皮素 (quercetin, Que) 是一种广泛存在于植物中的黄酮类物质, 具有抗炎、抗氧化、抗菌等多种生物学功能^[8]。除此之外, 槲皮素还能对 PIPN、糖尿病神经痛、带状疱疹后遗痛等多种慢性疼痛具有良好的镇痛作用^[9-13]。有研究表明, 脊髓星形胶质细胞的活化是导致 PIPN 疼痛的重要因素^[14-15], 利用药理学手段抑制星形胶质细胞的激活能够有效缓解 PIPN 的疼痛症状^[16]。胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是一种Ⅲ型中间丝结构蛋白, 主要存在于星形胶质细胞中, 当星形胶质细胞活化时, GFAP 的表达会显著增加^[17-19]。槲皮素可以通过调节胶质细胞的活化, 发挥神经保护作用, 治疗多种神经系统疾病^[20-23]。但槲皮素缓解 PIPN 疼痛的机制是否与抑制脊髓星形胶质细胞的活化还未可知。有研究表明, 背根神经节 (dorsal

root ganglia, DRG) 中瞬时感受器电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)、嘌呤能配体门控离子通道 3 (purinergic ligand-gated ion channel 3, P2X3) 等痛相关离子通道在脊髓胶质细胞的激活中发挥着关键作用, 对 TRPV1 和 P2X3 进行药理学干预均能缓解脊髓胶质细胞的活化^[24-25]。然而, 槲皮素能否通过抑制 TRPV1 和 P2X3 的表达来缓解星形胶质细胞的活化还有待研究。

本研究拟腹腔注射紫杉醇建立 PIPN 小鼠模型, 通过行为学检测观察槲皮素对 PIPN 模型的镇痛作用。通过免疫荧光技术, 利用 GFAP 检测星形胶质细胞的活化情况, 进而探讨槲皮素缓解 PIPN 疼痛的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选取 6 ~ 8 周龄、体重 22 ~ 26 g 的雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 24 只。小鼠购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司【SCXK (苏) 2023-009】, 并饲养于浙江中医药大学动物实验中心【SYXK (浙) 2021-0048】。饲养环境温度维持在 20 ~ 24 °C, 湿度为 40% ~ 70%, 12 h 循环照明, 小鼠自由饮水饮食。本实验所有操作已通过浙江中医药大学伦理委员会批准 (IACUC-202403-12)。

1.1.2 主要试剂与仪器

槲皮素 (HY-18085, MCE); 药用级紫杉醇 (安素泰, 澳大利亚); 小鼠抗 GFAP 抗体 (c9205, Sigma);

兔抗 TRPV1 抗体 (ACC-030, Alomone labs); 兔抗 P2X3 抗体 (APR-016, Alomone labs); 驴抗兔 IgG 594 (ab150080, abcam); 封闭用驴血清 (SL050, Solarbio); 磷酸盐缓冲液 (BL601A, biosharp); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0010S, Beyotime); RIPA 裂解液 (P0013E, Beyotime); 蛋白上样缓冲液 (P0015, Beyotime); 其余试剂均为分析纯。激光共聚焦显微镜 (Nikon); 冰冻切片 (Thermo); 纤毛机械刺激针 (von Frey) (Stoelting); 高速冷冻离心机 (Thermo); 凝胶成像系统 (Protein Simple)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与造模

将 C57BL/6 小鼠按体重随机分为 3 组, 分别为空白组、模型组、模型 + 槲皮素组, 每组 8 只。将用 0.9% 生理盐水稀释后的紫杉醇注射液分别于第 1、3、5、7 天腹腔注射到模型组和模型 + 槲皮素组小鼠的体内, 每次注射剂量为 2 mg/kg, 共 4 次, 以达到累计剂量 8 mg/kg, 建立 PIPN 模型。空白组注射同等剂量的溶剂。模型 + 槲皮素组于第 8 ~ 14 天每日灌胃给药 60 mg/kg 槲皮素溶液, 其余两组分别灌胃给药同等剂量的溶剂。

1.2.2 观察指标及检测方法

(1) 行为学检测: 机械痛阈检测: 各组小鼠分别于第 0、2、4、6、8、10、12、14 天检测机械痛阈, 检测方法参照 1994 年 CHAPLAN 等^[26]发表的文献, 选取经典的 Up and Down 法。检测前, 先将小鼠放置于测痛架上的透明塑料盒内, 合上盖板, 让小鼠安静 30 min。当小鼠停止整理毛发和探索走动时, 提示安静完成。检测时, 用 von Frey 纤维丝刺激小鼠右后肢足底中部, 刺激时避开足垫, 直到 von Frey 纤维丝弯成 S 形, 接着持续进行刺激 5 s, 观察小鼠是否出现缩足反应。随后根据文献中的方法, 计算小鼠的 50% 机械缩足阈 (50% paw withdrawal threshold, 50% PWT)。

(2) 取材及样本处理: 实验动物麻醉: 造模后第 14 天, 腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠溶液, 麻醉小鼠, 剂量为 50 mg/kg。

免疫印迹样本: 动物麻醉后打开胸腔, 经升主动脉快速灌注 4 °C 预冷后的 PBS 溶液, 快速取出小鼠第 3 ~ 5 腰椎处 (L3 ~ L5) 的 DRG, 置于 -80 °C 冰箱保存。

免疫荧光样本: 动物麻醉后打开胸腔, 经升主动脉快速灌注 4 °C 预冷后的 PBS 溶液, 随后灌注新

鲜的 4% 多聚甲醛, 等待小鼠肢体僵硬后, 快速取出小鼠腰膨大处脊髓以及 L3 ~ L5 的 DRG, 并置于含有 4% 多聚甲醛的 EP 管中, 静置过夜。随后依次使用 15%、30% 的蔗糖溶液脱水, 液氮速冻, 于 -80 °C 保存。

(3) 免疫荧光染色: 将组织从 -80 °C 冰箱中取出, OCT 包埋后使用冰冻切片器进行冰冻切片。采用小鼠抗 GFAP 抗体标记脊髓中的星形胶质细胞; 采用兔抗 TRPV1 抗体、兔抗 P2X3 抗体标记 DRG 中的 TRPV1、P2X3 蛋白。实验步骤如下: 使用 PBS 清洗 OCT 胶后, 使用 5% 驴血清 37 °C 封闭 1 h, 随后加入一抗, 4 °C 孵育过夜。随后使用 PBS 清洗 6 次, 每次 10 min, 并加入相应二抗, 37 °C 避光孵育 1 h, PBS 清洗 6 次, 每次 10 min。使用含抗荧光淬灭剂的 4', 6-二脒基-2 苯基吡啶 (DAPI) 进行封片。使用激光共聚焦显微镜拍摄, 随后用 Image J v1.8.0 进行统计分析。

(4) 免疫印迹检测: 将组织从 -80 °C 冰箱中取出后置于 1.5 mL EP 管中, 加入 RIPA 裂解液, 随后加入 2 mm 直径钢珠, 组织破碎仪匀浆后, 于 4 °C、11 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 并用 BCA 法检测蛋白浓度。根据 20 μg 蛋白上样量计算蛋白样本体积, 并加入 5 × loading buffer, 剩余体积用裂解液补齐以达到 10 μL 的上样体积, 98 °C 加热 5 min。将变性后蛋白于 5% ~ 10% SDS-PAGE 胶上进行电泳, 然后转印至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 分别用兔抗小鼠 TRPV1、P2X3、β-actin 的一抗抗体 4 °C 摇床孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记的驴抗兔二抗室温孵育 2 h, 加入 ECL 显色剂后进行拍照, 使用 Image J v1.8.0 进行灰度分析, β-actin 作为内参。

1.3 统计学分析

实验数据采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 采用 GraphPad prism 7.0 进行统计分析。两组间比较采用独立样本 Student's *t* 检验, 多组件比较采用单因素或双因素重复测量方差分析, 组件比较采用 Tukey 检验。以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

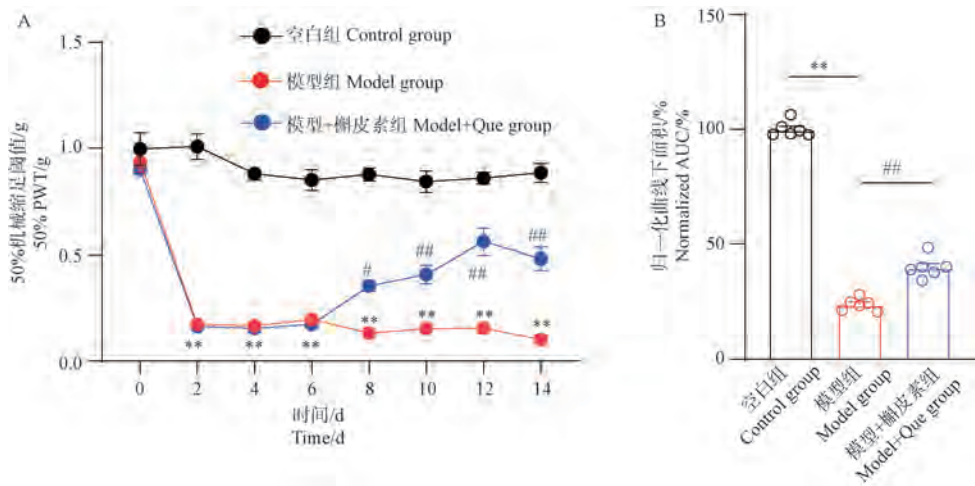
2 结果

2.1 槲皮素对 PIPN 模型的镇痛作用

图 1A 显示, 3 组小鼠造模前痛阈无统计学意义 ($P > 0.05$)。造模后, 与空白组相比, 模型组和模型 + 槲皮素组小鼠的机械痛阈显著降低 ($P <$

0.01),且能持续到第 14 天。这一结果与先前报道一致,提示 PIPN 模型造模成功^[14]。而与模型组相比,模型 + 槲皮素组小鼠的机械痛阈显著提

高($P < 0.05$)。图 1B 为图 1A 的各组曲线下面积。提示槲皮素对 PIPN 小鼠模型具有明确的镇痛作用。



注:A:空白组、模型组、模型 + 槲皮素组小鼠的 50%机械缩足阈值。B:A 图各组曲线下面积,以空白组为标准进行归一化统计;与空白组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 槲皮素对 PIPN 小鼠模型机械痛阈的治疗作用($n = 6$)

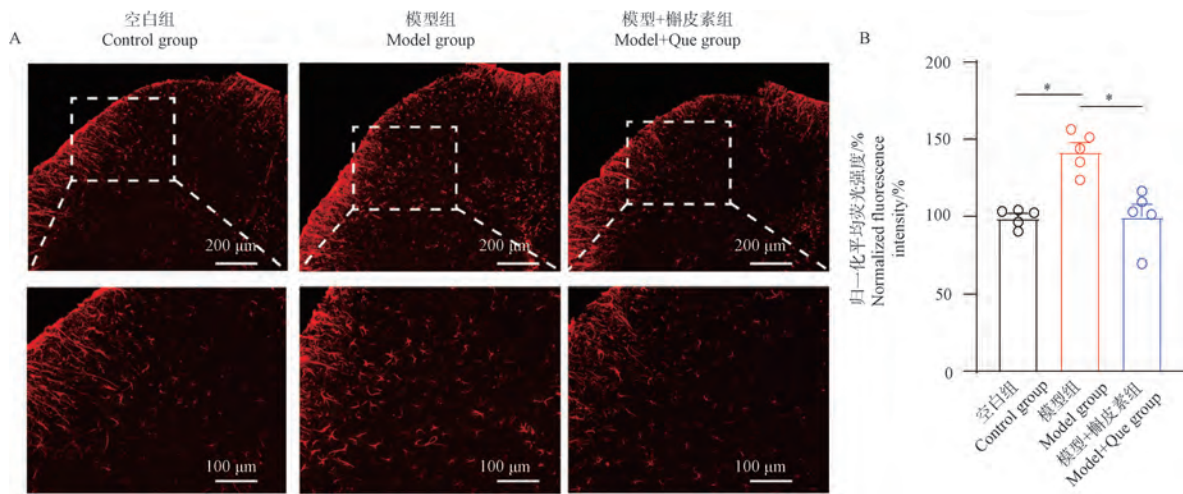
Note. A. 50% PWT of control group, model group and model + Que group. B. Normalized area under the curve (AUC) of panel A and all three group were normalized with control group. Compared with control group, ** $P < 0.01$. Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Therapeutic effects of quercetin on mechanical pain threshold of PIPN model mice ($n = 6$)

2.2 槲皮素对 PIPN 小鼠中枢敏化的干预作用

有研究表明,PIPn 小鼠脊髓星形胶质细胞的活化,是导致 PIPN 模型疼痛的重要原因。如图 2 所

示,模型组小鼠脊髓背角中的星形胶质细胞活化显著增加,而槲皮素能有显著降低脊髓星形胶质细胞的活化,缓解 PIPN 模型小鼠的中枢敏化。



注:A:空白组、模型组、模型 + 槲皮素组小鼠脊髓 GFAP 免疫荧光染色图;B:空白组、模型组、模型 + 槲皮素组小鼠脊髓 GFAP 平均荧光强度的归一化统计。与空白组相比, * $P < 0.05$ 。(下同)

图 2 槲皮素对 PIPN 小鼠脊髓星形胶质细胞活化的干预作用($n = 5$)

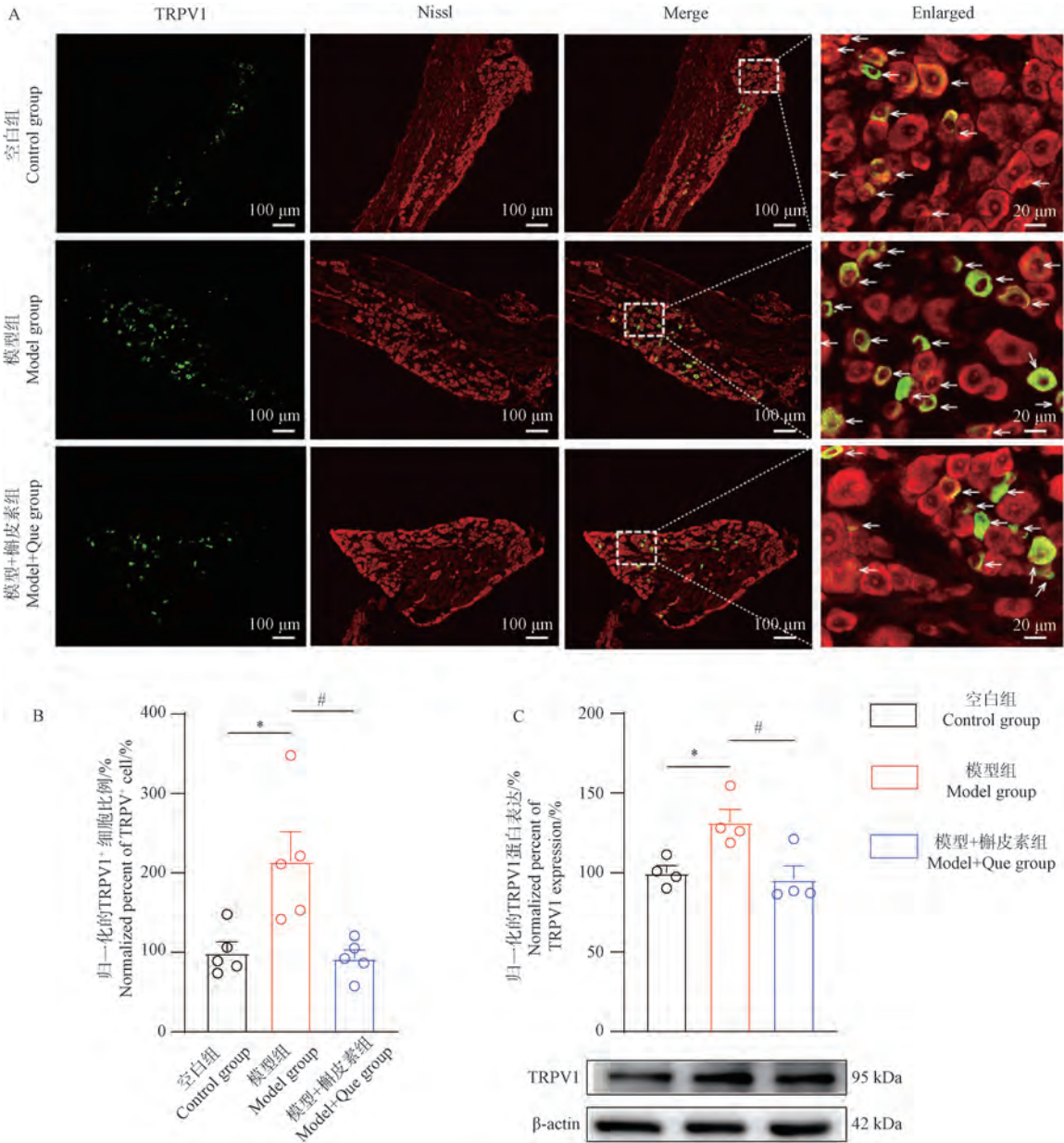
Noto. A. Representative immunofluorescence images of spinal GFAP from control group, model group and model + Que group mice. B. Summary of the normalized fluorescence intensity of spinal GFAP staining from mice in control group, model group and model + Que group mice. Compared with control group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 Effect of quercetin on activation of astrocyte in spinal cord of PIPN model mice ($n = 5$)

2.3 槲皮素对 PIPN 小鼠 DRG 神经元 TRPV1 过表达的干预作用

TRPV1 是一种与疼痛密切相关的离子通道,有研究表明,DRG 中 TRPV1 的过表达与紫杉醇诱发的疼痛密切相关。如图 3 所示,紫杉醇能够显著提

高小鼠 L3 ~ L5 DRG 神经元中 TRPV1 阳性细胞比例($P < 0.05$),而模型 + 槲皮素组中 TRPV1 阳性细胞的比例较模型组相比显著降低($P < 0.05$)。而免疫印迹结果也显示,模型组 DRG 中 TRPV1 的蛋白表达显著升高($P < 0.05$),而与模型组相比,模型



注:A:空白组、模型组、模型 + 槲皮素组小鼠 DRG 中 TRPV1 荧光代表图;绿色荧光标记 TRPV1,红色荧光标记尼氏小体;B:空白组、模型组、模型 + 槲皮素组小鼠 DRG 中 TRPV1 阳性神经元的归一化统计($n = 5$);C:空白组、模型组、模型 + 槲皮素组小鼠 DRG 中 TRPV1 的蛋白表达($n = 4$)。

图3 槲皮素对 PIPN 小鼠 DRG 神经元 TRPV1 过表达的干预作用

Note. A. Representative immunofluorescence images of TRPV1 in DRGs from control group、model group and model + Que group mice. Staining positive for TRPV1 are shown in green. Nissl staining (red) was used to illustrate DRG neurons. B. Summary of the normalizedpercent of TRPV1 positive cells from mice in control group、model group and model + Que group mice ($n = 5$). C. Expression of TRPV1 from mice in control group、model group and model + Que group mice ($n = 4$).

Figure 3 Effect of quercetin on overexpression of TRPV1 in DRG of PIPN model mice

+ 槲皮素组中 TRPV1 的表达显著降低($P < 0.05$)。

2.4 槲皮素对 PIPN 小鼠 DRG 神经元 P2X3 过表达的干预作用

P2X3 作为一种痛敏感的离子通道型受体,广泛参与了多种急慢性疼痛的发生与发展^[25-27],但

P2X3 是否是导致 PIPN 疼痛的关键因素尚未见报道。在本研究中发现,如图 4 所示,在 PIPN 小鼠模型中,L3 ~ L5 DRG 中 P2X3 的表达显著升高($P < 0.05$),而与模型组相比,模型 + 槲皮素组能够显著降低 P2X3 的表达($P < 0.05$)。

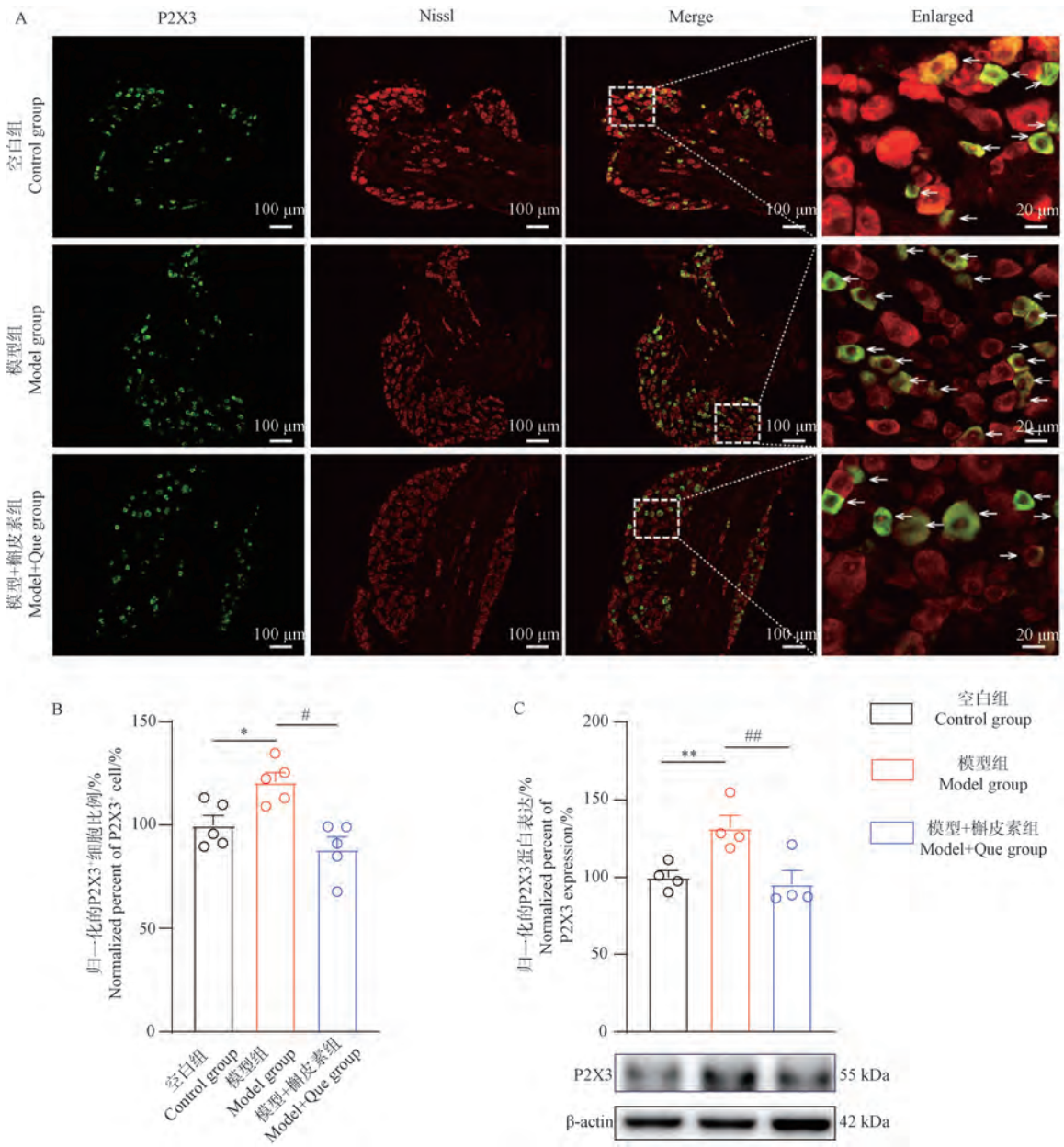


图 4 槲皮素对 PIPN 小鼠 DRG 神经元 P2X3 过表达的干预作用

Note. A. Representative immunofluorescence images of P2X3 in DRGs from control group, model group and model + Que group mice. Staining positive for P2X3 are shown in green. Nissl staining (red) was used to illustrate DRG neurons. B. Summary of the normalized percent of P2X3 positive cells from mice in control group, model group and model + Que group mice ($n = 5$). C. Expression of P2X3 from mice in control group, model group and model + Que group mice ($n = 4$).

Figure 4 Effect of quercetin on overexpression of P2X3 in DRGs of PIPN model mice

3 讨论

本研究成功建立了紫杉醇诱发的神经病理痛模型。小鼠在累计注射 8 mg/kg 紫杉醇溶液后出现明显的疼痛症状,具体表现为机械痛痛阈、热痛阈的显著降低。与空白组相比,模型组小鼠右后足的 50% PWT 显著降低,并稳定维持至第 14 天。该结果提示 PIPN 小鼠模型造模成功。

中枢敏化是导致众多慢性疼痛的关键机制^[18,28-29]。中枢系统的胶质细胞通过释放致炎因子提高神经元的兴奋性,进而导致中枢敏化^[16,30]。有研究表明,在 PIPN 模型中,紫杉醇对星形胶质细胞的激活,是诱发其疼痛的关键因素^[31-32]。紫杉醇被星形胶质细胞激活后,大量释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、基质细胞衍生因子-1 (Stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 等促炎因子。利用 L- α -氨基己二酸 (L- α -aminoadipic acid, L- α -AA) 抑制星形胶质细胞的活化能够显著改善 PIPN 小鼠的疼痛症状,而 TNF- α 、SDF-1 的中和抗体也能够达到相同的治疗效果^[16]。本研究发现,槲皮素能够显著降低脊髓中星形胶质细胞活化,说明槲皮素很可能是通过降低中枢敏化来发挥的镇痛作用。

为进一步探究槲皮素降低脊髓星形胶质细胞活化的具体机制,本研究将研究焦点聚焦在了外周 DRG 痛敏感 TRPV1 和 P2X3 蛋白上。TRPV1 作为瞬时受体电位家族中的一员^[33],在多种急性慢性疼痛中发挥着重要作用^[24,34-35]。本课题组前期研究发现,TRPV1 在 PIPN 诱发神经痛中发挥着关键作用,使用 TRPV1 的拮抗剂 AMG9810 能够显著缓解 PIPN 模型疼痛^[14]。而 P2X3 作为另一种在疼痛中广泛研究的痛相关蛋白^[36],在 PIPN 模型中却鲜见报道。有研究表明,敲除外周 P2X3 受体能够抑制糖尿病神经痛小鼠模型脊髓胶质细胞的活化,降低中枢敏化^[25]。本次实验结果显示,与空白组相比,PIPn 小鼠 L3 ~ L5 DRG 中 TRPV1、P2X3 阳性神经元比例均显著升高,而槲皮素能够显著降低 L3 ~ L5 DRG 神经元中 TRPV1、P2X3 的表达。与此同时,槲皮素还能够有效缓解脊髓中星形胶质细胞的活化,降低 PIPN 小鼠的中枢敏化。由此可以推测,槲皮素很可能是通过降低外周感觉神经元中 TRPV1、P2X3 的表达,减少脊髓星形胶质细胞的活化,进而缓解紫杉醇诱发的神经病理痛。

槲皮素是广泛存在于植物中一种黄酮类物质,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种生物学功能^[8]。有研究显示,槲皮素具有良好的抗肿瘤作用^[37-38],对多种头面部肿瘤以及耐药细胞株具有很好的抑制作用^[39],并且槲皮素与紫杉醇联用,能够明显提升紫杉醇的抑瘤作用^[40]。以上证据说明,使用槲皮素治疗 PIPN 的同时,不会影响紫杉醇的抗肿瘤作用。本研究显示,槲皮素能够显著降低 DRG 神经元中痛敏感 TRPV1 的表达。而在紫杉醇诱发的周围神经病变模型中,神经元上 TLR4 的过表达被认为是导致 TRPV1 表达升高的关键因素^[41-42]。既往研究显示,槲皮素可以通过抑制 TLR4 信号通路来达到抗炎作用^[43]。因此在 PIPN 模型中,槲皮素可能是通过抑制 TLR4 的过表达来降低 TRPV1 的表达。

综上所述,本研究发现槲皮素能够有效缓解 PIPN 小鼠的疼痛症状。其机制可能是通过降低外周 DRG 神经元中痛敏感 TRPV1、P2X3 的表达进而降低中枢敏化而实现的。而本研究对槲皮素与 PIPN 模型镇痛作用的揭示也将更有利于槲皮素与紫杉醇联用在临床上的应用,提升肿瘤化疗患者的生活质量。

参 考 文 献 (References)

- [1] GRECO F A, HAINSWORTH J D. Paclitaxel-based therapy in non-small-cell lung cancer: improved third generation chemotherapy [J]. *Ann Oncol*, 1999, 10(5): S63-S67.
- [2] MODY M D, GILL H S, SABA N F. The evolving and future role of taxanes in squamous cell carcinomas of the head and neck: a review [J]. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2016, 142(9): 898-905.
- [3] UNTCH M, JACKISCH C, SCHNEEWEISS A, et al. Nab-paclitaxel versus solvent-based paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer (GeparSepto-GBG 69): a randomised, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(3): 345-356.
- [4] FUJIWARA K, HASEGAWA K, NAGAO S. Landscape of systemic therapy for ovarian cancer in 2019: primary therapy [J]. *Cancer*, 2019, 125(24): 4582-4586.
- [5] POSTMA T J, VERMORKEN J B, LIEFTING A J M, et al. Paclitaxel-induced neuropathy [J]. *Ann Oncol*, 1995, 6(5): 489-494.
- [6] SISIGNANO M, BARON R, SCHOLICH K, et al. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain [J]. *Nat Rev Neurol*, 2014, 10(12): 694-707.
- [7] SERETNY M, CURRIE G L, SENA E S, et al. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Pain*,

- 2014, 155(12): 2461–2470.
- [8] CARRILLO-MARTINEZ E J, FLORES-HERNÁNDEZ F Y, SALAZAR-MONTES A M, et al. Quercetin, a flavonoid with great pharmacological capacity [J]. *Molecules*, 2024, 29(5): 1000.
- [9] 严进红, 韩克跃, 夏杰, 等. 槲皮素减轻紫杉醇致神经病理性大鼠疼痛的作用与机制 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(12): 2065–2070, 2181.
YAN J H, HAN K Y, XIA J, et al. Effect and mechanism of quercetin on pain relief induced by paclitaxel in neuropathic rats [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2019, 31(12): 2065–2070, 2181.
- [10] YE G, LIN C, ZHANG Y, et al. Quercetin alleviates neuropathic pain in the rat CCI model by mediating AMPK/MAPK pathway [J]. *J Pain Res*, 2021, 14: 1289–1301.
- [11] 王士珍, 张萌, 陈培, 等. 槲皮素对糖尿病大鼠神经病理性疼痛的改善作用及对 PI3K/AKT 信号通路的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(2): 69–74.
WANG S Z, ZHANG M, CHEN P, et al. Effect of quercetin on neuropathic pain of diabetic rats and the influence on PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2022, 38(2): 69–74.
- [12] 田佳玉, 冯丹, 胡焱, 等. 槲皮素通过抑制 MIP-1 α /CCR1/CCR5 信号通路减轻大鼠带状疱疹后神经痛 [J]. *天津医药*, 2024, 52(3): 256–260.
TIAN J Y, FENG D, HU H, et al. Mechanism of quercetin alleviating postherpetic neuralgia in rats by inhibiting MIP-1 α /CCR1/CCR5 signaling pathway [J]. *Tianjin Med J*, 2024, 25(3): 256–260.
- [13] 张书力, 冯丹. 槲皮素通过下调缓激肽受体 B1 表达减轻糖尿病大鼠神经病理性疼痛 [J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(2): 337–342.
ZHANG S L, FENG D. Quercetin reduces neuropathic pain in diabetic rats by down-regulating the expression of bradykinin receptor B1 [J]. *Chin J Immunol*, 2024, 40(2): 337–342.
- [14] LI Y, YIN C, LI X, et al. Electroacupuncture alleviates paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain in rats via suppressing TLR4 signaling and TRPV1 upregulation in sensory neurons [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 5917.
- [15] LI Y, YIN C, LIU B, et al. Transcriptome profiling of long noncoding RNAs and mRNAs in spinal cord of a rat model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy identifies potential mechanisms mediating neuroinflammation and pain [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 48.
- [16] LIU X, TONELLO R, LING Y, et al. Paclitaxel-activated astrocytes produce mechanical allodynia in mice by releasing tumor necrosis factor- α and stromal-derived cell factor 1 [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 209.
- [17] GANNE A, BALASUBRAMANIAM M, GRIFFIN W S T, et al. Glial fibrillary acidic protein: a biomarker and drug target for Alzheimer's disease [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(7): 1354.
- [18] JI R R, DONNELLY C R, NEDERGAARD M. Astrocytes in chronic pain and itch [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(11): 667–685.
- [19] YANG Z, WANG K K W. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker [J]. *Trends Neurosci*, 2015, 38(6): 364–374.
- [20] LI L, JIANG W, YU B, et al. Quercetin improves cerebral ischemia/reperfusion injury by promoting microglia/macrophages M2 polarization via regulating PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115653.
- [21] TANG Q, TAKASHIMA K, ZENG W, et al. Amelioration of lipopolysaccharides-induced impairment of fear memory acquisition by alpha-glycosyl isoquercitrin through suppression of neuroinflammation in rats [J]. *J Toxicol Sci*, 2023, 48(3): 121–137.
- [22] DU L, FAN X, YANG Y, et al. Quercetin ameliorates cognitive impairment in depression by targeting HSP90 to inhibit NLRP3 inflammasome activation [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(9): 6628–6641.
- [23] ZOU Y, JIANG J, LI Y, et al. Quercetin regulates microglia M1/M2 polarization and alleviates retinal inflammation via ERK/STAT3 pathway [J]. *Inflammation*, 2024, 27: 1–18.
- [24] HU Q, WANG Q, WANG C, et al. TRPV1 channel contributes to the behavioral hypersensitivity in a rat model of complex regional pain syndrome type 1 [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 453.
- [25] XIA L P, LUO H, MA Q, et al. GPR151 in nociceptors modulates neuropathic pain via regulating P2X3 function and microglial activation [J]. *Brain*, 2021, 144(11): 3405–3420.
- [26] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55–63.
- [27] TIAN S X, XU T, SHI R Y, et al. Analgesic effect of electroacupuncture on bone cancer pain in rat model: the role of peripheral P2X3 receptor [J]. *Purinergic Signal*, 2023, 19(1): 13–27.
- [28] CHEN G, ZHANG Y Q, QADRI Y J, et al. Microglia in pain: detrimental and protective roles in pathogenesis and resolution of pain [J]. *Neuron*, 2018, 100(6): 1292–1311.
- [29] CHEN R, YIN C, HU Q, et al. Expression profiling of spinal cord dorsal horn in a rat model of complex regional pain syndrome type-I uncovers potential mechanisms mediating pain and neuroinflammation responses [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 162.
- [30] LUO H, LIU H Z, ZHANG W W, et al. Interleukin-17 regulates neuron-glia communications, synaptic transmission, and neuropathic pain after chemotherapy [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(8): 2384–2397.
- [31] LI D Y, GAO S J, SUN J, et al. Notch signaling activation contributes to paclitaxel-induced neuropathic pain via activation

of A1 astrocytes [J]. Eur J Pharmacol, 2022, 928: 175130.

[32] SHI H, CHEN M, ZHENG C, et al. Fecal microbiota transplantation alleviated paclitaxel-induced peripheral neuropathy by interfering with astrocytes and TLR4/p38MAPK pathway in rats [J]. J Pain Res, 2023, 16: 2419–2432.

[33] CATERINA M J, JULIUS D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway [J]. Annu Rev Neurosci, 2001, 24: 487–517.

[34] CATERINA M J, SCHUMACHER M A, TOMINAGA M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway [J]. Nature, 1997, 389(6653): 816–824.

[35] YIN C, LIU B, WANG P, et al. Eucalyptol alleviates inflammation and pain responses in a mouse model of gout arthritis [J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(9): 2042–2057.

[36] HUANG Z, XIE N, ILLES P, et al. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 162.

[37] LI S, ZHAO Q, WANG B, et al. Quercetin reversed MDR in breast cancer cells through down-regulating P-gp expression and eliminating cancer stem cells mediated by YB-1 nuclear translocation [J]. Phytother Res, 2018, 32(8): 1530–1536.

[38] 池周, 张豪, 蔡玉节, 等. 槲皮素通过 PI3K/AKT 信号通路抑制奥沙利铂耐药胃癌细胞迁移 [J]. 实用药物与临床, 2024, 27(2): 81–85.

CHI Z, ZHANG H, CAI Y J, et al. Quercetin inhibits the migration of oxaliplatin-resistant gastric cancer cells through the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Pract Pharm Clin Remedies, 2024, 27(2): 81–85.

[39] 邹子川, 周霖, 陈寅瑜, 等. 槲皮素抗头颈部癌作用的研究新进展 [J]. 口腔生物医学, 2023, 14(3): 206–210.

ZOU Z C, ZHOU L, CHEN Y Y, et al. Research progress on the role of quercetin in head and neck cancer management [J]. Oral Biomed, 2023, 14(3): 206–210.

[40] WANG Y, YU H, WANG S, et al. Targeted delivery of quercetin by nanoparticles based on chitosan sensitizing paclitaxel-resistant lung cancer cells to paclitaxel [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021, 119: 111442.

[41] LI Y, ADAMEK P, ZHANG H, et al. The cancer chemotherapeutic paclitaxel increases human and rodent sensory neuron responses to TRPV1 by activation of TLR4 [J]. J Neurosci, 2015, 35(39): 13487–13500.

[42] WU Y, WANG Y, WANG J, et al. TLR4 mediates upregulation and sensitization of TRPV1 in primary afferent neurons in 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis [J]. Mol Pain, 2019, 15: 1744806919830018.

[43] JIANG M, WANG K, HUANG Y, et al. Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced cell oxidative stress and inflammatory responses via regulation of the TLR4-NF-κB signaling pathway in bovine rumen epithelial cells [J]. Toxins, 2023, 15(8): 512.

[收稿日期] 2024-04-10

朱星昊,仁青加,卓嘎,等. 麝香安诃痔疮膏皮肤刺激及痔相近模型动物实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1114-1221.

ZHU X H, REN Q J, ZHUO G, et al. Experimental animal studies on skin irritation with Shexiang Anhe hemorrhoid ointment and hemorrhoidal proximity models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1114-1221.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.003

麝香安诃痔疮膏皮肤刺激及痔相近模型 动物实验研究

朱星昊¹,仁青加²,卓嘎²,李闪闪³,吴宗耀²,苗明三³,齐冬梅^{4*}

(1. 山东中医药大学 中医药创新研究院,济南 250355;2. 西藏藏医药大学 藏医药与高原生物重点实验室,拉萨 850000;3. 河南中医药大学 研究生院,郑州 450046;4. 山东中医药大学 实验中心,济南 250355)

【摘要】 目的 探讨麝香安诃痔疮膏的急性毒性、刺激性及通过 TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路对痔相近模型大鼠的影响。**方法** 将 16 只新西兰家兔随机分为正常皮肤痔疮膏组、正常皮肤对照组、破损皮肤痔疮膏组和破损皮肤对照组,每组 4 只。两组痔疮膏给药组家兔脱毛区均匀涂抹麝香安诃痔疮膏(1 g/mL)20 g,两组对照组家兔背部脱毛区均匀涂抹等体积溶媒(甘油、羊毛脂与水的混合物),每天 1 次,连续 14 d。另取 40 只大鼠随机分为正常组、模型组、马应龙组、痔疮膏组,每组 10 只。每天涂抹 1 次,连续 14 d。用药后通过苏木素-伊红(HE)染色法等观察家兔局部皮肤急性毒性和刺激性安全状况。对痔相近大鼠肛周组织原位拍照,观察麝香安诃痔疮膏的疗效,并用游标卡尺测量溃疡长、宽,计算溃疡面积,使用 qRT-PCR 检测大鼠肛周组织中 TLR4、p38 MAPK 和 NF- κ B mRNA 的表达情况。**结果** 对家兔皮肤急性毒性及刺激性作用,与正常皮肤对照组及破损皮肤对照组比较,正常皮肤痔疮膏组家兔体重无明显变化;与破损皮肤对照组比较,麝香安诃痔疮膏对破损皮肤家兔用药 1、24、48、72 h 刺激性评价积分均值分别为 1.5、1.0、0.5 和 0.25,无明显皮肤刺激性。对痔相近大鼠的影响,与模型组比较,痔疮膏组大鼠在经 14 d 给药后症状明显减轻;大鼠溃疡面积均明显减少,具有统计学意义($P < 0.05$);TLR4、p38 MAPK、NF- κ B mRNA 水平显著降低,具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 麝香安诃痔疮膏对家兔皮肤的急性毒性、刺激性较小,是一种安全的外用药膏,在对痔相近大鼠的治疗中取得了较好的疗效,其作用机制可能与抑制 TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路相关。

【关键词】 麝香安诃痔疮膏;皮肤刺激;痔相近模型;TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1114-08

Experimental animal studies on skin irritation with Shexiang Anhe hemorrhoid ointment and hemorrhoidal proximity models

ZHU Xinghao¹, REN Qingjia², ZHUO Ga², LI Shanshan³, WU Zongyao², MIAO Mingsan³, QI Dongmei^{4*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Jinan 250355, China; 2. University of Xizang Medicine Key Laboratory of Tibetan Medicine and Plateau Biology, Lasa 850000, China; 3. Henan University of Chinese Medicine Graduate School, Zhengzhou 450046, China; 4. Shandong University of Traditional Chinese Medicine Experimental Center, Jinan 250355, China)

Corresponding author: QI Dongmei. E-mail: qidm119@163.com

【基金项目】“十四五”规划内涵建设项目(2022ZYYGH03),2022 年中医学(藏医)博士点建设科研支撑计划项目(BSDJS-22-09),中央引导地方科技发展专项资金项目(YDZX2022140)。

Funded by the Construction Projects within “the Fourteenth Five-Year” Plan(2022ZYYGH03), 2022 Scientific Research Support Program Project for the Construction of Doctoral Programs in Chinese Medicine (Tibetan Medicine) (BSDJS-22-09), Special Funds for the Central Government to Guide Local Scientific and Technological Development(YDZX2022140).

【作者简介】朱星昊,男,在读博士研究生,研究方向:方剂的组分配伍与作用机制。Email: 782707735@qq.com

【通信作者】齐冬梅,女,教授,博士,博士生导师,研究方向:方剂的组分配伍与作用机制。Email: qidm119@163.com

[Abstract] Objective To investigate the acute toxicity, irritation, and other effects of Shexiang Anhe hemorrhoid ointment on hemorrhoid-phased model rats by examining the TLR4/p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway. **Methods** Sixteen New Zealand rabbits were randomly divided into an intact skin Shexiang Anhe hemorrhoid ointment group, intact skin control group, broken skin Shexiang Anhe hemorrhoid ointment group, and broken skin control group, with four rabbits in each group. In the experimental group, 20 g of Shexiang Anhe hemorrhoid ointment (1 g/mL) was evenly applied to an area on the rabbits depleted of hair, and an equal volume of solvent (mixture of glycerol, lanolin, and water) was evenly applied to the area on the backs of the rabbits in the control group once a day for 14 days. Another 40 rats were taken and randomly divided into a normal group, model group, Maillard group, and hemorrhoid cream group, with 10 animals in each group. The cream was applied once a day for 14 days. The acute toxicity of the cream in the intact and broken skin of rabbits was observed by hematoxylin and eosin staining and other method after treatment. In situ photographs were taken of the perianal tissues of rats with hemorrhoids to observe the efficacy of Shexiang Anhe hemorrhoid ointment, and the length and width of the ulcers were measured with vernier calipers to calculate the area. Quantitative real time polymerase chain reaction was used to detect the expression of TLR4, p38 MAPK, and NF- κ B mRNA in the perianal tissues of the rats. **Results** Compared with rabbits in the control groups with intact or broken skin, rabbits in the administered group showed no significant difference in body mass. The mean values for the irritation evaluation points for Shexiang Anhe hemorrhoid ointment on rabbits with broken skin for 1 h, 24 h, 48 h, and 72 h were 1.5, 1, 0.5, and 0.25, respectively, showing there was no obvious skin irritation. In the hemorrhoidal rats, Shexiang Anhe hemorrhoid ointment treatment significantly reduced hemorrhoid symptoms after 14 days administration; the ulcer area was significantly smaller ($P < 0.05$) and TLR4, p38 MAPK, and NF- κ B mRNA levels were significantly lower compared with the findings in the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Shexiang Anhe hemorrhoid ointment is a safe topical treatment with minimal acute toxicity and irritation to the skin and achieved good efficacy in the treatment of hemorrhoidal rats. Its mechanism of action may be related to the inhibition of the TLR4/p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway.

[Keywords] Shexiang Anhe hemorrhoid ointment; dermal irritation; hemorrhoid model; TLR4/p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway

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

痔疮(haemorrhoidal disease,HD)是常见的肛门疾病,也是临床上最常见的结直肠疾病之一^[1]。常表现为出血、脱垂、疼痛、血栓形成、粘液分泌物和瘙痒等症状,给患者带来极大的痛苦^[2]。HD 的发病率较高,达到 87%^[3]。目前临床治疗方法较多,以手术治疗和药物治疗为主。手术治疗多采用红外线凝血/光凝术、注射硬化疗法、开放切除痔切除术和射频消融术等;药物治疗包括现代药物和传统药物,有药丸、栓剂、乳膏和湿巾等。这些疗法虽然能控制 HD 的急性症状,但无法达到治愈的目的,导致反复发作迁延难愈^[4]。因此,寻找安全、有效、便捷的治疗方法显得尤为重要。

藏医藏药是我国传统疗法的瑰宝,在 HD 的治疗上有其独特的方法。藏传医药经典《医学四续》第 3 部秘诀续第 64 章痔疮治法,将 HD 分为隆型、赤巴型、培根型、血型、干型、湿型 6 种类型,隆、赤巴、培根 3 型紊乱失调,致使隆滞聚,腹泻或大便干燥,大便带血腐臭,呈现寒象^[5]。藏药麝香安诃痔疮膏具有解毒消肿、破瘀止血、收敛止痛的作用^[6],尤其适用于培根型 HD 引起的腹胀、胃阳下降,疮面

白色、发痒欲搔等症状。目前越来越多的研究证实,HD 组织中含有大量的炎症细胞和炎症因子^[7]。Toll 样受体 4(toll-like receptor 4,TLR4)是机体免疫和炎症识别系统中的重要跨膜蛋白,在炎症调节中起关键作用。TLR4 能介导 MAPK 信号通路,触发 p38 MAPK 和 NF- κ B,促进炎症基因的表达,导致大量炎症的产生。TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路是一条促炎通路,可加快炎症反应进程。可见,通过药物干预减轻炎症反应可能是治疗 HD 的重要策略。因此,本研究拟明确藏药麝香安诃痔疮膏安全、无刺激的前提下,探讨其通过 TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路抑制炎症反应对痔相近大鼠的干预作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 周龄清洁级新西兰家兔 16 只,雌雄各 8 只,体重 2.0 ~ 2.5 kg,适应性喂养 1 周后开始实验。饲养条件:温度(26 ± 2)℃,相对湿度(49 ± 5)%,

标准的 12 h/12 h (光/暗) 循环, 自由进食饮水。8 周龄清洁级 SD 大鼠 (雄性) 共 40 只, 体重 190 ~ 210 g, 分笼饲养, 每笼 5 只, 温度 23 °C, 相对湿度 55%, 标准的 12 h/12 h (光/暗) 循环的饲养环境下, 正常饮食饮水。以上动物均购于郑州市惠济区华兴实验动物养殖场【SCXK(豫)2019-0002】, 动物饲养于河南中医药大学【SYXK(豫)2020-0004】。本实验经过河南中医药大学实验动物伦理委员会审查(DWLL202304100)。

1.1.2 主要试剂与仪器

麝香安诃痔疮膏制备: 精确称取处方量鸭嘴花、藏木香、毛诃子各 15 g, 诃子、西藏猫乳木各 13 g, 加 80% 乙醇 325 mL, 45 °C, 超声提取 60 min, 滤过, 收集滤液, 挥去乙醇, 残渣备用。另外精确称取处方量决明子、余甘子、安息香各 9 g, 粉碎, 过 100 目筛, 细粉备用。取适量水、甘油将挥去乙醇后的残渣和药材细粉混合, 用羊毛脂吸收后, 再加入冰片、人工麝香各 1 g, 混匀, 制得的麝香安诃痔疮膏每克相当于 2.5 g 生药量, 产品批号: 20220715。

甘油 (编号: 56-81-5, 美国宝洁公司); 羊毛脂 (编号: 8006-54-0, 山东东弘化工有限公司); 兔抗大鼠 TLR4、p38 MAPK、NF- κ B 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司/GB15186、GB153380、GBGB113882); 总 RNA 提取试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司/R1200); 通用逆转录试剂盒、Real-time PCR 荧光定量试剂盒 (上海翊圣生物科技有限公司/11141ES60、11201ES08)。

JK-EAB-2140N 电子分析天平; BX43SYSTEM MICROSCOPE (日本; OLYMPUS); JK-PAUG-250DE 超声波清洗器 (上海精学科学仪器有限公司); RM2245 石蜡切片机 (德国; 莱卡); TGL-18.5M 台式冷冻离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); YD-6D 型组织包埋机 (金华科迪); StepOne™ 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物系统公司 (ABI)); 数字测微计、电推剪、兔固定架、烧杯及滤纸若干等。

1.2 方法

1.2.1 模型制备、分组和给药

取 16 只新西兰家兔, 随机数字表法将其分为 4 组, 正常皮肤痔疮膏组 (NSZCG 组)、正常皮肤对照组 (NSDZ 组)、破损皮肤痔疮膏组 (BSZCG 组) 和破损皮肤对照组 (BSDZ 组), 每组 4 只。用药前 24 h, 家兔背部脊柱两侧脱毛, 左右各 2 cm × 2 cm。

破损皮肤造模: BSZCG 组和 BSDZ 组背部脱毛区消毒后, 参照文献^[8]造模, 渗血即可。待 24 h 后, BSZCG 组均匀涂抹麝香安诃痔疮膏 (1 g/mL) 20 g, BSDZ 组涂抹等体积溶媒 (甘油、羊毛脂与水的混合物)。双层纱布和聚乙烯薄膜覆盖破损处, 无刺激性胶布固定^[9-11]。

取 40 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组 (ZC 组)、模型组 (MX 组)、马应龙组 (MYL 组)、痔疮膏组 (ZCG 组), 每组 10 只。除 ZC 组外, 其余各组在肛周皮肤同一位置每只注射 0.1 mL 的 75% 冰醋酸致肛周溃疡复制大鼠痔疮模型, 造模后 24 h 后相机拍照, 见肛周肿胀、炎性渗出即造模成功^[12]。

给药前按压大鼠背部使其排便, 并用生理盐水清理肛周组织, MYL 组大鼠给予肛周组织涂抹马应龙麝香痔疮膏, 厚度 2 mm; ZCG 组大鼠给予肛周组织涂抹麝香安诃痔疮膏, 厚度 2 mm, 每天 1 次, 连续 14 d。

1.2.2 样本采集

给药前与第 7、14 天称重。实验结束, 处死家兔, 取用药局部皮肤, 福尔马林固定。

用 20% 乌拉坦 5 mL/kg 麻醉大鼠, 对肛周组织原位拍照, 观察比较, 并用游标卡尺测量溃疡长、宽, 计算溃疡面积, 然后取大鼠肛周组织, 液氮速冻后于 -80 °C 冰箱中冻存。

1.2.3 指标检测

(1) 观察家兔基本情况并称重: 于实验前 7 和 14 d 分别称重, 并记录其变化。观察家兔饮食、二便、精神状态、死亡情况, 局部皮肤的变化。

(2) 药物急性毒性和刺激性评价: 敷药 6 h 后, 用温水洗净药物。立即观察记录, 并在去除药物后 1、24、48 和 72 h, 记录涂敷部位有无红斑和水肿。然后取各组家兔皮肤做病理切片, 用《皮肤刺激反应评分标准》^[13] (表 1) 进行评分, 并计算刺激平均分, 0 ~ 0.5, 无刺激性; 0.5 ~ 2.0, 轻度刺激性; 2.0 ~ 6.0, 中度刺激性; 6.0 ~ 8.0, 强刺激性。依此方法确定药物皮肤刺激性。

(3) 痔相近模型大鼠局部症状变化: 治疗后观察痔相近模型大鼠肛周的局部症状。

(4) 痔相近大鼠溃疡面积的比较: 计算各组大鼠溃疡面积, 评价疗效。

(5) 苏木素-伊红 (HE) 染色法观察家兔局部皮肤的病理形态学变化: 取“1.2.2”项下固定的家兔局部皮肤, 制作病理切片, HE 染色, OLYMPUS 显

表 1 皮肤刺激反应评分表

Table 1 Skin irritation response scale

项目 Items	具体症状 Symptoms	分值 Score
红斑形成强度 Erythema formation intensity	未出现红斑 No erythema	0
	轻度红斑 Mild erythema	1
	中度红斑 Moderate erythema	2
	重度红斑 Severe erythema	3
	紫红色红斑到轻度焦痂形成 Bruise and mildly crusty	4
	未出现水肿 No oedema	0
水肿 Oedema	轻度水肿 Mild oedema	1
	中度水肿 Moderate oedema	2
	重度水肿 Severe oedema	3
	严重水肿 Extreme oedema	4
红斑及水肿 Erythema and oedema	红斑 + 水肿最高总分值 Erythema + oedema highest score	8

显微镜下观察家兔局部皮肤病理形态变化。

(6)qRT-PCR 检测肛周组织 TLR4、p38 MAPK、NF-κB 的 mRNA 表达定量:在 100 mg 肛周组织中加入提取试剂,进行组织匀浆,提取总 RNA,并检测其浓度及纯度。然后,加入靶基因上下游引物,进行 PCR 扩增^[14-15]。按照扩增程序三步法进行操作,绘制曲线,计算目的基因的相对表达水平,并统计分析^[16]。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 进行统计分析,计量资料均采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法

(LSD)检验,方差不齐者采用 Dennett’s 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 麝香安诃痔疮膏对家兔一般情况和体重的影响

各组家兔一般状况未见异常。在观察的 14 d 内,动物正常,无死亡。治疗 14 d 后,与 NSDZ 组比较,NSZCG 组体重无明显变化;与 BSDZ 组比较,BSZCG 组体重亦无明显变化。见表 2。

表 2 麝香安诃痔疮膏对家兔体重的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment

on the weight of rabbits($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	时间 Time	体重/kg Weight/kg
NSDZ 组 NSDZ group	给药前 Pre-medication	2.26 ± 0.10
	第 7 天 Day 7	2.61 ± 0.10
	第 14 天 Day 14	3.16 ± 0.19
NSZCG 组 NSZCG group	给药前 Pre-medication	2.25 ± 0.14
	第 7 天 Day 7	2.58 ± 0.13
	第 14 天 Day 14	3.10 ± 0.18
BSDZ 组 BSDZ group	给药前 Pre-medication	2.25 ± 0.11
	第 7 天 Day 7	2.70 ± 0.18
	第 14 天 Day 14	3.13 ± 0.10
BSZCG 组 BSZCG group	给药前 Pre-medication	2.27 ± 0.18
	第 7 天 Day 7	2.67 ± 0.12
	第 14 天 Day 14	3.08 ± 0.22

2.2 麝香安诃痔疮膏对家兔正常皮肤及破损皮肤急性毒性的影响

局部组织病理观测可见,完整皮肤无明显变化。破损皮肤用药后棘层细胞有好转现象。见图 1。

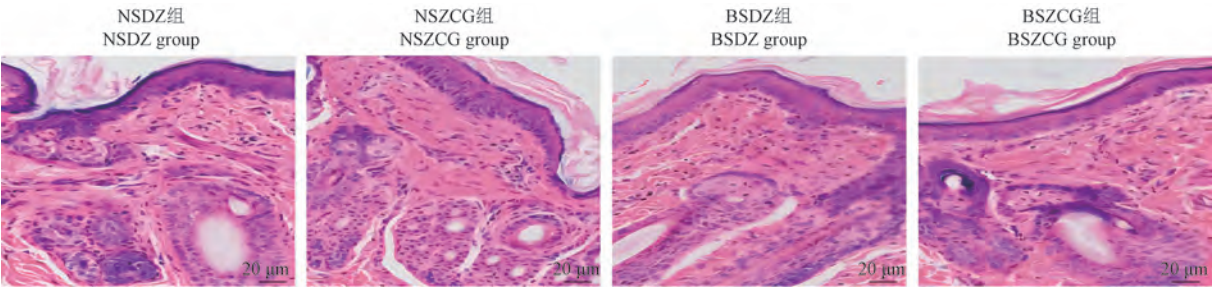


图 1 麝香安诃痔疮膏对家兔正常皮肤、破损皮肤急性毒性组织形态的影响

Figure 1 Effect of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment on the acute toxic histomorphology of normal and broken skin in rabbits

2.3 单次使用麝香安诃痔疮膏对破损皮肤家兔局部刺激性的影响

采用《皮肤刺激反应评分表》和刺激平均分评价单次使用麝香安诃痔疮膏对破损皮肤家兔局部刺激性情况,结果发现正常皮肤家兔,给药后 1 ~ 72 h,皮肤仅在给药 1 h 有轻度刺激,24 ~ 72 h,对家兔皮肤无刺激。破损皮肤组家兔,给药后 1 ~ 72 h,在 1 ~ 24 h 有轻度刺激,24 ~ 48 h 无刺激,48 ~ 72 h 无刺激。见表 3。

表 3 麝香安诃痔疮膏单次应用对家兔局部皮肤刺激性评价积分均值($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Mean value of integral evaluation of local skin irritation in rabbits by a single application of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment($\bar{x} \pm s$)						
组别 Groups	时间/h Time/h	评分/分 Score/point				均值/分 Average value/point
		1	2	3	4	
NSDZ 组 NSDZ group	1	0	1	1	0	0.50 ± 0.58
	24	0	0	1	0	0.25 ± 0.50
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
NSZCG 组 NSZCG group	1	1	1	1	1	1.00 ± 0.00
	24	1	0	1	0	0.50 ± 0.58
	48	1	0	1	0	0.50 ± 0.58
	72	0	0	1	0	0.25 ± 0.50
BSDZ 组 BSDZ group	1	1	1	1	1	1.00 ± 0.00
	24	1	1	0	1	0.75 ± 0.50
	48	0	1	0	1	0.50 ± 0.58
	72	0	0	0	0	0
BSZCG 组 BSZCG group	1	2	1	2	1	1.50 ± 0.58
	24	1	1	1	1	1.00 ± 0.00
	48	1	0	1	0	0.50 ± 0.58
	72	1	0	0	0	0.25 ± 0.50

2.4 麝香安诃痔疮膏对家兔局部皮肤组织刺激性形态学的影响

局部皮肤组织刺激性实验显示,家兔破损皮肤用药组及对照组基底细胞与棘层细胞无肉眼可见病变,稍微可见角化不良现象。麝香安诃痔疮膏单次应用对破损皮肤家兔刺激不明显。见图 2。

2.5 麝香安诃痔疮膏对痔相近大鼠局部症状的影响

ZC 组大鼠肛周组织形态完整, MX 组大鼠肛周组织出现肿胀,存在炎性渗出物,且在 14 d 后仍保持炎性渗出; MYL 组和 ZCG 组大鼠在造模后出现肛周组织肿胀,炎性渗出增多,经 14 d 给药后上述症状明显减轻。见图 3。

2.6 麝香安诃痔疮膏对痔相近大鼠溃疡面积的影响

4 组比较, MX 组大鼠肛周组织溃疡面积显著增加($P < 0.05$); 用药两组, MYL 组和 ZCG 组大鼠肛周组织溃疡面积比 MX 组大鼠溃疡面积显著减小($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 麝香安诃痔疮膏对痔相近大鼠溃疡面积的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment on the area of ulcers in rats with similar hemorrhoids ($\bar{x} \pm s, n = 10$)		
组别 Groups	溃疡面积/mm ² Ulcerated area/mm ²	
ZC 组 ZC group	0.00 ± 0.00	
MX 组 MX group	60.17 ± 3.43 ^a	
MYL 组 MYL group	17.67 ± 1.75 ^b	
ZCG 组 ZCG group	24.00 ± 1.79 ^b	

注:与 ZC 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 MX 组相比, ^b $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the ZC group, ^a $P < 0.05$. Compared with the MX group, ^b $P < 0.05$.

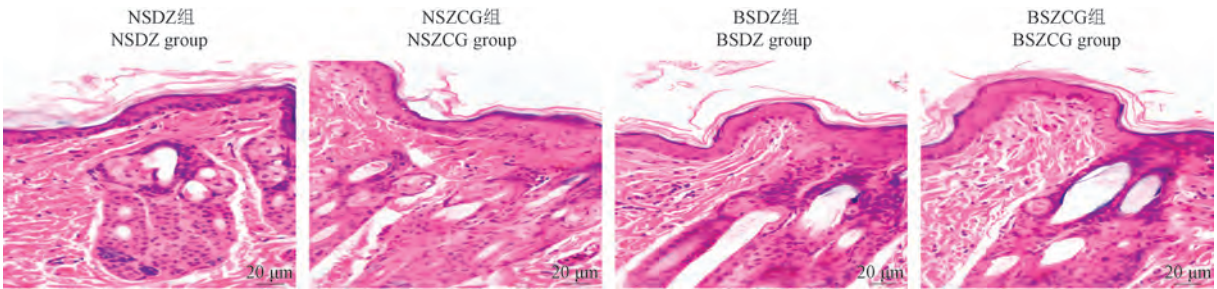


图 2 麝香安诃痔疮膏对家兔皮肤组织刺激性形态影响
Figure 2 Morphological effects of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment on skin tissue irritation in rabbits

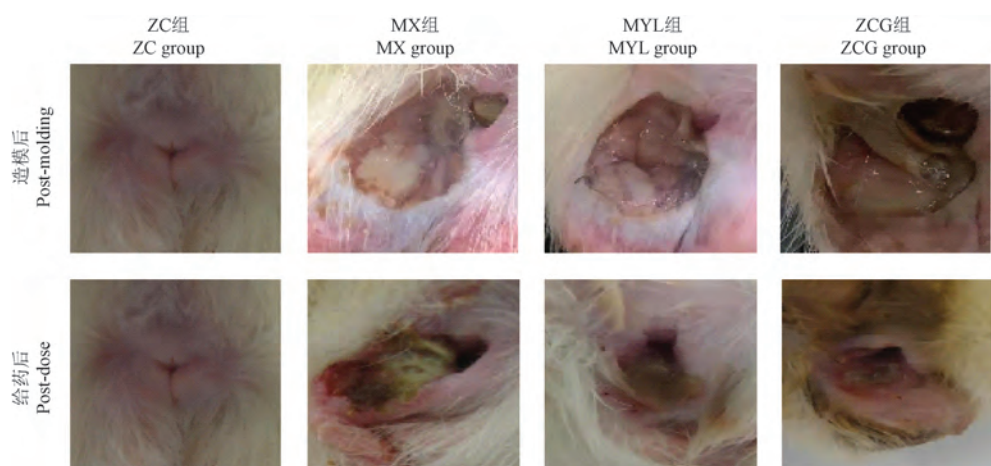


图3 麝香安诃痔疮膏对大鼠肛周组织形态影响

Figure 3 Morphologic effects of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment on perianal tissues of rats

2.7 麝香安诃痔疮膏对痔相近大鼠肛周组织TLR4、p38 MAPK、NF-κB mRNA 的影响

MX 组大鼠肛周组织 TLR4、p38 MAPK、NF-κB mRNA 水平比 ZC 组大鼠显著升高 ($P < 0.05$), 与 MX 组比较, MYL 组和 ZCG 组大鼠肛周组织 TLR4、p38 MAPK、NF-κB mRNA 水平降低, 较 MX 组大鼠有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 麝香安诃痔疮膏对痔相近大鼠肛周组织 TLR4、p38 MAPK 和 NF-κB mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of Shexiang Anhe Hemorrhoids ointment on the expression of TLR4, p38 MAPK and NF-κB mRNA in perianal tissues of hemorrhoid-adjacent

rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
组别 Groups	p38 MAPK/ $2^{-\Delta\Delta Ct}$	TLR4/ $2^{-\Delta\Delta Ct}$	NF-κB/ $2^{-\Delta\Delta Ct}$
ZC 组 ZC group	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
MX 组 MX group	3.94 ± 0.79 ^a	2.63 ± 0.28 ^a	4.05 ± 0.82 ^a
MYL 组 MYL group	0.58 ± 0.19 ^b	0.52 ± 0.22 ^b	0.60 ± 0.19 ^b
ZCG 组 ZCG group	0.61 ± 0.21 ^b	0.37 ± 0.11 ^b	0.62 ± 0.21 ^b

3 讨论

HD 是临床常见病、多发病, 临床多采用手术治疗, 虽能缓解症状, 但很快复发, 导致疾病迁延难愈, 给患者带来极大的痛苦, 严重影响患者的生活质量。藏医药作为中国民族医药的重要组成部分, 在 HD 的治疗中独具特色。根据课题组临床经验, 麝香安诃痔疮膏治疗 HD 疗效显著。麝香安诃痔疮

膏是一种具有消炎、消肿、止痛作用的软膏, 由安息香、诃子、毛诃子以及鸭嘴花等多种藏药组成, 方中安息香具有开窍清神、行气活血、止痛的功效^[17]; 藏医用使君子科诃子的干燥果实入药, 滋补养身, 升胃火, 助消化, 主治隆、赤巴、培根诱发的疾病; 毛诃子来源于毗黎勒的果实, 清热解毒、收敛养血、调和诸药, 尤善治恶性黄水病; 鸭嘴花味苦、涩, 性凉, 苦入五脏治病^[18], 能清热凉血、消炎止痛、主治血热、肝胆热、多血症等; 决明子清肝明目、润肠通便; 余甘子有清热凉血、消食健胃、生津止咳的功效; 藏木香具有健脾和胃、调气解郁、止痛、安胎的功效, 还用于清血热, 祛风, 治风热症、血热症, 西藏猫乳木抗炎、凉血、消肿, 治黄水。人工麝香具有开窍醒神、活血通经、消肿止痛的功效; 冰片粉具有开窍醒神、清热散毒、明目退翳的功效, 崔利利等^[19]对余甘子软膏中冰片促渗作用进行考察, 认为 5% 的冰片对余甘子软膏中没食子酸和柯里拉京的促渗效果最佳。目前, 该药用于临床 20 余年均取得了较好的治疗作用, 但其药物的急性毒性、刺激性以及治疗痔疮的作用机制均不明确, 严重影响药物的应用推广。基于此, 本研究分别选用家兔和大鼠为研究对象, 探讨麝香安诃痔疮膏的急性毒性和刺激性。结果发现, 该药是一种安全无毒副作用和刺激性的外用软膏; 而后在明确药物安全性的基础上, 制备痔相近大鼠模型验证其疗效并探讨作用机制。

本研究使用冰醋酸肛周注射后大鼠溃疡面积增大、局部组织炎性分泌物不断渗出, 表示痔相近大鼠模型的成功制备。形态学观察也发现, 模型组柱状上皮和鳞状上皮中存在组织间隙疏松和水肿

的情况,局部毛细血管出现增生、出血和瘀血,还可见大量中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等浸润。经麝香安诃痔疮膏干预后,柱状上皮和鳞状上皮中存在组织间隙疏松和水肿情况明显改善,局部毛细血管增生、出血也得到改善。有研究还发现,HD 会导致局部组织损伤,损伤周围的结缔组织和血管壁常会发生严重的炎症反应,表现为 T 淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞浸润,促进肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 等炎症细胞因子的分泌^[20]。TNF- α 是巨噬细胞/单核细胞在急性炎症过程中产生的一种炎症细胞因子,可促进 HD 的进展。IL-1 β 、IL-6 作为炎症细胞因子,能促进 HD 的进展。本研究发现,痔相近模型组中肛周组织中存在大量的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎性因子的表达,经麝香安诃痔疮膏干预后,表达降低,提示该药有较好的抗炎作用。

TLR4 的激活被认为对多种炎症信号通路具有重大影响,会触发促炎介质的产生,激活 NF- κ B 和 p38 MAPK 信号通路增强黏附分子和促炎细胞因子的产生。由于 p38 在炎症和应激反应中发挥着重要作用,并且研究发现用特定抑制剂阻断 p38 会导致 NF- κ B 转录活性减弱^[21]。可见,TLR4/p38 MAPK/NF- κ B 是重要的炎症通路。本研究通过 qRT-PCR 对 DNA 扩增的方式检测 TLR4、p38 MAPK、NF- κ B mRNA 的表达情况,结果发现,模型组大鼠肛周组织 TLR4、p38 MAPK、NF- κ B mRNA 水平比正常组大鼠显著升高,经麝香安诃痔疮膏干预后,TLR4、p38 MAPK、NF- κ B mRNA 水平降低,为麝香安诃痔疮膏治疗痔疮的安全性、有效性及机制研究提供了一些可借鉴的经验和方法。

参 考 文 献 (References)

- [1] 孙科, 李新, 韩彦琪, 等. 消痔丸对巴豆油致肛周肿胀模型大鼠的药效及作用机制研究 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6734-6742.
SUN K, LI X, HAN Y Q, et al. Pharmacodynamic effect and mechanism of Xiaozhi Pills in *Croton oil* preparation induced hemorrhoidal model in rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(20): 6734-6742.
- [2] JIN J, XIA W, CONNOLLY A, et al. Symptom-based scoring for haemorrhoidal disease: a systematic review [J]. Colorectal Dis, 2020, 22(11): 1518-1527.
- [3] SHEIKH P, LOHSIRIWAT V, SHELIGIN Y. Micronized purified flavonoid fraction in hemorrhoid disease: a systematic review and meta-analysis [J]. Adv Ther, 2020, 37(6): 2792-2812.
- [4] YUAN X G, WU J, YIN H M, et al. Comparison of the efficacy and safety of different surgical procedures for patients with hemorrhoids: a network meta-analysis [J]. Tech Coloproctol, 2023, 27(10): 799-811.
- [5] 宇妥·元丹袁波.《医学四续》[M]. 上海:上海科技出版社; 2012.
NINGSUI·Y D G B. Medical fourth continuation [M]. Shanghai: Shanghai Scientific Technical Publishers; 2012.
- [6] 丹增次珍, 普布扎西, 朱星昊, 等. 藏药五味姜黄膏药效学及急性毒性分析 [J]. 医学研究与教育, 2022, 39(6): 1-8.
DANZENG C Z, DANBU Z X, ZHU X H, et al. Analysis and evaluation of pharmacodynamics and acute toxicity of Tibetan medicine Wuwei Jianghuang ointment [J]. Med Res Educ, 2022, 39(6): 1-8.
- [7] 李剑, 赵红波, 吴洪, 等. 槐花消痔汤联合马应龙痔疮膏外敷治疗痔疮的疗效及对血清炎症因子、5-HT 水平的影响 [J]. 四川中医, 2021, 39(2): 95-99.
LI J, ZHAO H B, WU H, et al. Clinical efficacy of using Huaihua Xiaozhi Decoction combined with external application of Mayinglong hemorrhoid ointment in the treatment of hemorrhoids and its effects on levels of serum inflammatory factors and 5-HT [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2021, 39(2): 95-99.
- [8] 吴玥, 薛婧, 魏强, 等. 国家动物模型资源共享信息平台的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1080-1086.
WU Y, XUE J, WEI Q, et al. Establishment of national infrastructure for an animal model resource platform [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1080-1086.
- [9] 蒋森, 王家葵, 吴纯洁. 芦竹碱对 2, 4-二硝基氯苯诱导的特应性皮炎小鼠模型的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4): 19-25.
JIANG M, WANG J K, WU C J. Ameliorative effect of gramine on 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(4): 19-25.
- [10] 江晓雯, 方勇飞, 冯晓枫, 等. 高原脐贴软膏对家兔皮肤急性毒性和刺激性的实验研究 [J]. 中国中医急症, 2015, 24(5): 769-770, 821.
JIANG X J, FANG Y F, FENG X F, et al. Study of transdermal drug delivery of alti plano navel balm on acute toxicity and irritation in experimental rabbits [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2015, 24(5): 769-770, 821.
- [11] 刘沿, 胡小垒, 许可洪, 等. 经皮给药系统皮肤模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 122-128.
LIU Y, HU X L, XU K H, et al. Overview of *in vitro* skin models of transdermal drug delivery systems [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 122-128.
- [12] 周蒙恩, 李鹏, 金文琪, 等. 芩藴凉血合剂对痔病相近动物模型的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(1): 33-39.
ZHOU M E, LI P, JIN W Q, et al. Effect of Qinji Liangxue mixture on animal models of hemorrhoids [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 33-39.
- [13] 马珍珍, 刘艳, 谢国旗, 等. 骨刺散对家兔皮肤急性毒性和刺激性的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2019, 26(1): 39

-41.

MA Z Z, LIU Y, XIE G Q, et al. Experimental study on acute toxicity and irritation of Guci Powder to rabbit skin [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2019, 26(1): 39-41.

[14] 张明昊, 郭申, 杜婧雯, 等. 灯盏花素通过调控 LKB1/AMPK 和 Notch1/Jagged1 通路改善高脂血症大鼠血脂水平及肝肾功能的作用机制研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(6): 2341-2353.

ZHANG M H, GUO S, DU J W, et al. Restoring the blood lipid levels and liver and renal functions of breviscapine on hyperlipidemia rats by regulating LKB1/AMPK and Notch1/Jagged1 signal pathway [J]. Mod Tradit Chin Med Mat Med-World Sci Techn, 2022, 24(6): 2341-2353.

[15] 姜雯雯, 刘欢, 陈晓燕, 等. 京尼平苷通过 PI3K/Akt 通路促进糖尿病大鼠皮肤溃疡创面愈合 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 14-20.

JIANG W W, LIU H, CHEN X Y, et al. Geniposide promotes skin ulcer wound healing in diabetic rats through the PI3K/Akt pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 14-20.

[16] 刘亚敏, 董文霞, 薛鹏坤, 等. 金匮肾气丸通过调控 PI3K-AKT-mTOR 及 PI3K-AKT-GLUT4 通路干预多囊卵巢综合征大鼠的作用机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(1): 1-7.

LIU Y M, DONG W X, XUE P K, et al. Intervention effect of Jinkui Shenqi Wan on polycystic ovary syndrome in rats by regulating PI3K-AKT-mTOR and PI3K-AKT-GLUT4 pathways [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2023, 39(1): 1-7.

[17] 侯锡鸿, 张佩林, 王斯娴, 等. 芳香开窍中药对中枢神经系统疾病的治疗作用研究进展 [J]. 药学进展, 2021, 45(5): 372-381.

HOU X H, ZHANG P L, WANG S X, et al. Progress in the research on therapeutic effects of resuscitation-inducing aromatic herbs of traditional Chinese medicine on central nervous system diseases [J]. Prog Pharm Sci, 2021, 45(5): 372-381.

[18] 韩学超, 孙坤坤, 徐琬梨. 苦味中药的归经及临床应用 [J]. 山东中医药大学学报, 2022, 46(4): 463-466.

HAN X C, SUN K K, XU W L. Meridian tropism and clinical application of bitter Chinese materia medica [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2022, 46(4): 463-466.

[19] 崔利利, 郝佳旭, 查丽春, 等. 余甘子软膏的制备及冰片促渗作用考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(18): 1862-1867.

CUI L L, HAO J X, ZHA L C, et al. Preparation of *Phyllanthus emblica* ointment and investigation of the permeation-enhancing effect of borneol [J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(18): 1862-1867.

[20] 孙云峰, 王浩, 蒋宁, 等. 消痈溃得康对胃溃疡模型大鼠生长因子和凋亡相关因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 186-190.

SUN Y F, WANG H, JIANG N, et al. Effect of xiaoyong kuidekang on expressions of growth factors and apoptosis related factors in rat ulcer model [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2013, 19(5): 186-190.

[21] UNENKHUU B, KIM D B, KIM H S. MKP-3 suppresses LPS-induced inflammatory responses in HUVECs via inhibition of p38 MAPK/NF-κB pathway [J]. Anim Cells Syst, 2021, 25(4): 235-244.

[收稿日期] 2024-04-11

祁淑雯,仲烨伟,阿达来提·阿布都热西提,等. 基于靶向代谢组学技术研究毛菊苣对肥胖小鼠粪便胆汁酸谱的影响[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1122-1138.

QI S W, ZHONG Y W, ADALAITI A B D R X T, et al. Effect of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. on fecal bile acid profile in obese mice based on targeted metabolomics technique [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1122-1138.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.004

基于靶向代谢组学技术研究毛菊苣对肥胖小鼠 粪便胆汁酸谱的影响

祁淑雯,仲烨伟,阿达来提·阿布都热西提,张芮,侯文慧,张春子,
马晓燕,马晓丽*

(新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 探究毛菊苣乙醇提取物对高脂饮食诱导的肥胖小鼠粪便胆汁酸谱的影响。**方法** 选取6周龄C57BL/6雄性小鼠24只随机分为正常组、模型组、给药组和二甲双胍组。正常组给予常规饮食,其余3组给予高脂饲料,同时给药组每日灌胃10 mL/kg毛菊苣乙醇提取物溶液,二甲双胍组每日灌胃10 mL/kg二甲双胍溶液。10周后收集小鼠肝检测肝甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C);收集小鼠粪便通过超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测粪便胆汁酸含量。**结果** 与正常组相比,模型组小鼠体重($P < 0.0001$)、血清TG、TC、LDL-C水平($P < 0.0001$)和肝TG水平($P < 0.05$)显著升高,肝HDL-C水平显著降低($P < 0.001$),表现出增重和脂质代谢异常。毛菊苣乙醇提取物能显著降低小鼠体重($P < 0.0001$)、血清TG($P < 0.05$)、TC($P < 0.01$)、LDL-C($P < 0.01$)水平及肝TG($P < 0.0001$)、LDL-C($P < 0.05$)水平。方法学验证结果表明本研究建立的方法能准确定量粪便中的52种胆汁酸。分析各类胆汁酸浓度发现,毛菊苣乙醇提取物能显著增大次级胆汁酸/初级胆汁酸比例($P < 0.05$)。多元统计分析结果显示,各组的胆汁酸代谢模式发生明显改变。以第一主成分的变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP) > 1 , $P < 0.05$ 为条件筛选出给药组相对模型组的8种差异胆汁酸。通过检索京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库,发现差异胆汁酸主要参与次级胆汁酸生物合成途径。相关分析表明,粪便中脱氧胆酸($r_s = 0.6445$, $P < 0.001$)、异石胆酸($r_s = 0.5879$, $P < 0.01$)、 3β -脱氧胆酸($r_s = 0.6649$, $P < 0.001$)和 ω -鼠胆酸($r_s = 0.5387$, $P < 0.01$)4种差异胆汁酸与体重具有较强的正相关。**结论** 毛菊苣乙醇提取物可能通过调控次级胆汁酸生物合成,改变粪便胆汁酸代谢轮廓从而发挥减重和改善脂质异常的作用。

【关键词】 毛菊苣;肥胖;胆汁酸;代谢组学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1122-17

Effect of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. on fecal bile acid profile in obese mice based on targeted metabolomics technique

QI Shuwen, ZHONG Yewei, ADALAITI Abudurexiti, ZHANG Rui, HOU Wenhui,
ZHANG Chunzi, MA Xiaoyan, MA Xiaoli*

(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Corresponding author: MA Xiaoli. E-mail: xiaoli_Ma@xjmu.edu.cn

【基金项目】 新疆维吾尔自治区天山英才青年拔尖人才项目(2022TSYCCX0104)。

Funded by Tianshan Top Talents Youth Elites Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region(2022TSYCCX0104)。

【作者简介】 祁淑雯,女,硕士,研究方向:抗糖尿病新药研发。Email: qsw9999@163.com

【通信作者】 马晓丽,女,教授,博士,研究方向:抗糖尿病新药研发。Email: xiaoli_Ma@xjmu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the effect of ethanolic extract of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. on fecal bile acid profiles in high-fat-diet-induced obese mice. **Methods** Twenty-four 6-week-old C57 BL/6 male mice were divided randomly into normal, model, drug-administration, and metformin groups. Mice in the normal group were fed a regular diet and mice in the other three groups were given high-fat diets. The drug-administration group was gavaged with 10 mL/kg ethanol extract of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. daily, and the metformin group was gavaged with 10 mL/kg metformin daily. After 10 weeks, livers were collected to measure hepatic total triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein (HDL)-C. Feces were collected and analyzed. **Results** Body weight ($P < 0.0001$), liver TG ($P < 0.05$), and TC ($P > 0.05$) were all significantly higher in model mice compared with normal mice, while LDL-C ($P > 0.05$) and HDL-C ($P < 0.001$) were significantly lower, indicating abnormal weight gain and lipid metabolism. Alcoholic extract of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. significantly reduced body weight ($P < 0.0001$), liver TG ($P < 0.0001$), serum TG ($P < 0.05$), TC ($P < 0.01$), and LDL-C ($P < 0.05$) in mice. Methodsological validation showed that the current method could accurately quantify 52 bile acids in feces. Analysis of the concentration of each type of bile acid revealed that alcoholic extract of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. significantly increased the secondary/primary bile acid ratio ($P < 0.05$). Multivariate analysis showed that the bile acid metabolic pattern was significantly altered in all groups. Eight differential bile acids were screened in the drug-administration group relative to the model group using variable importance of projection > 1 and $P < 0.05$. A search of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database revealed that the differential bile acids were mainly involved in the secondary bile acid biosynthesis pathway. Correlation analysis showed that four differential bile acids, deoxycholic acid ($r_s = 0.6445$, $P < 0.001$), isolithocholic acid ($r_s = 0.5879$, $P < 0.01$), 3β -deoxycholic acid ($r_s = 0.6649$, $P < 0.001$), and ω -rhamnoglutaric acid ($r_s = 0.5387$, $P < 0.01$), in feces were strongly positively correlated with body weight. **Conclusions** *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. alcoholic extract may play a role in weight reduction and amelioration of dyslipidemia by modulating secondary bile acid biosynthesis and altering fecal bile acid metabolic profiles.

[Keywords] *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet.; obesity; bile acids; metabolomics

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

毛菊苣为菊科植物毛菊苣 (*Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet.) 的干燥地上部分或根, 是新疆地区特有的天然药物资源。毛菊苣作为菊苣来源之一收载于 2020 版中国药典第一部, 具有清肝利胆的功效^[1-2]。现代药理研究表明, 毛菊苣主要成分包括多糖类、酚酸类、黄酮类、萜类、苯丙素类等, 具有保肝、降糖降脂的功效^[3-4]。课题组前期研究显示, 毛菊苣乙醇提取物具有改善糖尿病 db/db 小鼠的脂质代谢紊乱的功能, 能显著降低血清熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)和 α -鼠胆酸(α -muricholic acid, α -MCA)水平, 并与血清甘油三酯(triglycerides, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC)水平呈正相关^[5], 因此推测毛菊苣可能通过调节胆汁酸(bile acids, BAs)代谢发挥减脂作用。目前尚无毛菊苣对肥胖动物模型胆汁酸代谢影响的报道。

胆汁酸是胆固醇经肝代谢生成的一种两亲性类固醇分子, 通过调节体内的胆汁酸受体从而影响机体能量代谢和糖脂稳态, 可作为识别肝疾病和代谢紊乱的一类潜在生物标志物^[6], 已有文献报道, 胆汁酸作为生物标志物在肥胖发病和进展过程中起到重要作用^[7-8]。目前, 靶向代谢组学广泛应用

于揭示肥胖状态下的体内代谢物变化, 发现药物的潜在分子靶标。如茯苓乙醇提取物通过调控尿液中的氨基酸水平改善大鼠脂质代谢紊乱^[9], JI 等^[10]确定了黄连汤剂治疗高脂诱导大鼠肥胖作用与血清和盲肠中的关键代谢标志物水平相关。但目前肥胖相关的粪便胆汁酸代谢研究较少, 因此进行粪便胆汁酸代谢组学研究对丰富当前肥胖机制研究具有重要意义。

基于此, 本研究建立高脂饮食诱导的 C57BL/6 小鼠肥胖模型, 给予毛菊苣乙醇提取物干预, 通过超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)靶向代谢组学技术, 对小鼠粪便中的 52 种胆汁酸进行定量分析。通过多元分析筛选出差异胆汁酸, 探究毛菊苣作用于脂质异常的胆汁酸调节通路, 为毛菊苣改善肥胖小鼠脂质代谢紊乱的可能机制提供线索, 拓展其药理应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 24 只, 体重

(20 ± 2) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】, 于新疆医科大学动物实验中心 SPF 级动物房【SYXK(新)2023-0004】饲养, 恒定室温(25 ± 1) °C, 相对湿度 55% ~ 65%, 每日光暗周期 12 h/12 h, 可自由活动、进食与饮水。本研究所有实验方案均得到新疆医科大学动物伦理委员会的批准(IACUC-20220720-08), 符合实验室动物与使用准则。

1.1.2 药物

毛菊苣购于新疆和田市墨玉县, 经新疆医科大学药学院徐海燕教授鉴定为菊科菊苣属植物毛菊苣的全草, 阴干后保存在新疆医科大学药学院。

1.1.3 主要试剂与仪器

甲醇、乙腈和乙酸铵为 LC-MS 级(德国 CNW Technologies); 二甲双胍(默克制药(江苏)有限公司, ACF2938); 戊巴比妥钠; TG 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, A110-1-1); TC 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, A111-1-1); 低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, A113-1-1); 高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, A112-1-1)。Vanquish 超高效液相色谱仪(Thermo Fisher Scientific)、Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱、Heraeus Fresco17 离心机均购自美国赛默飞世尔科技公司; Waters ACQUITY UPLC BEH C18 液相色谱柱(Waters, 150 × 2.1 mm, 1.7 μm); BSA124S-CW 天平(德国赛多利斯); YM-080S 超声仪(深圳方奥微电子有限公司); JXFSTPRP-24 研磨仪(上海净信科技有限公司); 明澈 D24 UV 纯水仪(德国默克密理博)。

1.2 方法

1.2.1 毛菊苣乙醇提取物的制备

取干燥的毛菊苣全草, 在 80 °C 下用乙醇回流 60 min, 料液比约为 1:10, 过滤, 浓缩, 干燥。

1.2.2 动物分组及样本采集

24 只 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 1 周, 随机分为正常组、模型组、给药组和二甲双胍组, 每组 6 只。正常组给予普通饲料和水, 以 1% 吐温 80 灌胃; 模型组、给药组和二甲双胍组给予高脂饲料和水, 其中给药组以 10 mL/kg 体积灌胃毛菊苣乙醇提取物溶液(以 200 mg 毛菊苣乙醇提取物加入 10 mL 1% 吐温 80 的比例, 超声溶解, 制备成浓度为

20 mg/mL 的毛菊苣乙醇提取物溶液), 二甲双胍组每日以 10 mL/kg 的体积灌胃二甲双胍溶液(以 100 mg 二甲双胍加入 10 mL 1% 吐温 80 的比例, 超声溶解, 制备成浓度为 20 mg/mL 的二甲双胍溶液)灌胃。小鼠喂养 10 周后, 处理前 1 d 收集粪便。禁食不禁水 12 h 后, 小鼠经 70 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后, 眼眶取血, 血液室温放置 1 h 后, 3500 r/min、4 °C 离心 10 min 得到血清。脱颈处死后, 收集肝组织, 将其迅速冷冻在液氮中, 并于 -80 °C 冰箱中储存。

1.2.3 血清及肝生化指标检测

按照试剂盒说明书检测血清及肝 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 含量。

1.2.4 肝组织病理学检测

通过苏木素-伊红(HE)染色法观察各组小鼠肝组织病理形态变化: 经 4% 多聚甲醛固定后的肝组织, 经清洗、透明、包埋、切片、染色、封片, 镜下观察肝组织病理形态。

1.2.5 粪便胆汁酸提取

称取 25 mg 粪便加入 1000 μL 提取液(甲醇: 乙腈: 水 = 2: 2: 1, 含内标, -40 °C 预冷), 涡旋混匀 30 s; 加入钢珠, 35 Hz 研磨处理 4 min, 超声 5 min(冰水浴); 重复 3 次上一步骤; -40 °C 静置 1 h; 样品 4 °C, 12 000 r/min, 半径 8.6 cm, 离心 15 min; 取上清液至 LC 进样瓶中, 用于 UPLC-MS/MS 分析。

1.2.6 标准溶液配制

准确称取相应量的标准品于容量瓶中, 分别配制成 1 mg/mL 的标准品储备液。取相应量的标准品储备液于容量瓶中, 配制成混合标准溶液。依次稀释该标准溶液得一系列校准溶液。

1.2.7 UPLC-MS/MS 法检测粪便胆汁酸含量

(1) 色谱条件: 采用 Vanquish 超高效液相色谱仪, 通过 Waters ACQUITY UPLC BEH C18(150 × 2.1 mm, 1.7 μm, Waters) 液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为 5 mmol/L 的乙酸铵水溶液, B 相为乙腈, 洗脱条件: 0 ~ 8.5 min 20% B; 8.5 ~ 15 min 20% → 26% B; 15 ~ 18.5 min 26% → 46% B; 18.5 ~ 20 min 46% → 99% B; 20 ~ 23 min 99% B; 23 ~ 23.4 min 99% → 20% B; 23.4 ~ 27 min 20% B。流速为 0.3 mL/min, 柱温为 45 °C, 进样体积为 1 μL。

(2) 质谱条件: 使用 Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱仪, 以平行反应监测(parallel reaction

monitoring, PRM) 模式进行质谱分析。离子源参数如下:喷雾电压 + 3500/-3200 V,鞘气(N_2)流量 40 arb,辅助气(N_2)流量 15 arb,辅助加热器温度 350 °C,毛细管温度 320 °C。

(3) 方法学考察

线性:对“1.2.6”得到的系列校准溶液进行 UPLC-MS/MS 分析。Y 表示目标胆汁酸与内标的峰面积比, X 表示目标胆汁酸的浓度,采用最小二乘法进行回归分析,权重设为 $1/X$ 。

检出限和定量限:将校准溶液稀释 2 倍后进行 UPLC-MS/MS 分析。将信噪比为 3 时所对应的胆汁酸浓度定义为检出限(limit of detection, LOD),将信噪比为 10 时所对应的胆汁酸浓度定义为定量限(limit of quantitation, LOQ)。

精密度:通过 QC 样品重复进样 7 次的峰面积标准相对偏差(relative standard deviation, RSD)评价。

准确度:通过加标回收率(recovery rate)即 QC 样品测得浓度与加标浓度的百分比值评价。

1.2.8 数据处理

利用 TraceFinder 4.10 软件对质谱数据进行采集和处理。对原始数据中的缺失值,以最小值与 0.1 至 0.5 范围内的随机数相乘进行填补。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 对药效学数据进行 ANOVA 方差分析,正态性检验;采用学生 t 检验(Student's t test)对代谢组学数据进行单变量统计分析, $P < 0.05$ 认为组间差异具有显著性。胆汁酸浓度数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 SIMCA 16.0.2 对数据进行多元统计分析,包括主成分分析(principal components analysis, PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal projections to latent structures discriminant analysis, OPLS-DA)。以第一主成分的变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP)大于 1, $P < 0.05$ 为标准筛选差异胆汁酸。使用 GraphPad Prism 8.3 进行相关性分析。利用 R 绘制层次聚类分析热图。

2 结果

2.1 毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠体重、血清及肝 TC、TG、LDL-C、HDL-C 的影响

第 10 周对小鼠进行称重,与正常组相比,模型组小鼠体重显著增加($P < 0.0001$),给予毛菊苣乙

醇提取物和二甲双胍能有效逆转高脂饮食诱导的体重上升($P < 0.0001$)。检测各组小鼠血清及肝 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平,结果显示与正常组相比,模型组血清 TG、TC、LDL-C 水平均显著升高($P < 0.0001$),HDL-C 水平无显著性差异,肝 TG 水平显著升高($P < 0.05$),TC 和 LDL-C 水平无显著性差异,HDL-C 水平显著降低($P < 0.001$);与模型组相比,给药组能显著降低血清 TG($P < 0.05$)、TC($P < 0.01$)、LDL-C($P < 0.01$)水平及肝 TG($P < 0.0001$)、LDL-C($P < 0.05$)水平,血清 HDL-C 及肝 TC 和 HDL-C 水平无显著性差异,二甲双胍能显著降低血清 TG($P < 0.05$)、TC($P < 0.01$)、LDL-C($P < 0.05$)和肝 TG($P < 0.0001$)、TC($P < 0.01$)、LDL-C($P < 0.05$)水平,不改变 HDL-C 水平,见图 1。

2.2 毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠肝组织病理形态的影响

正常组肝组织中肝细胞形态正常,排列紧密、肝索较清晰;模型组肝细胞变性肥大,胞浆疏松明显、不可见清晰肝索,并出现小脂肪空泡;与模型组相比,给药组和二甲双胍组肝组织病变减轻,肝细胞形态基本正常,见图 2。

2.3 UPLC-MS/MS 的胆汁酸识别与定量

对各组小鼠粪便样本进行分析,已有标准品的 52 种 BAs,根据标准品的保留时间及定量离子和特征离子的精确质量数 $m/z \pm 10$ ppm 进行识别和定量,见图 3、4。表明采用本分析方法可得到较好的色谱峰,很好地实现了各胆汁酸的色谱分离。

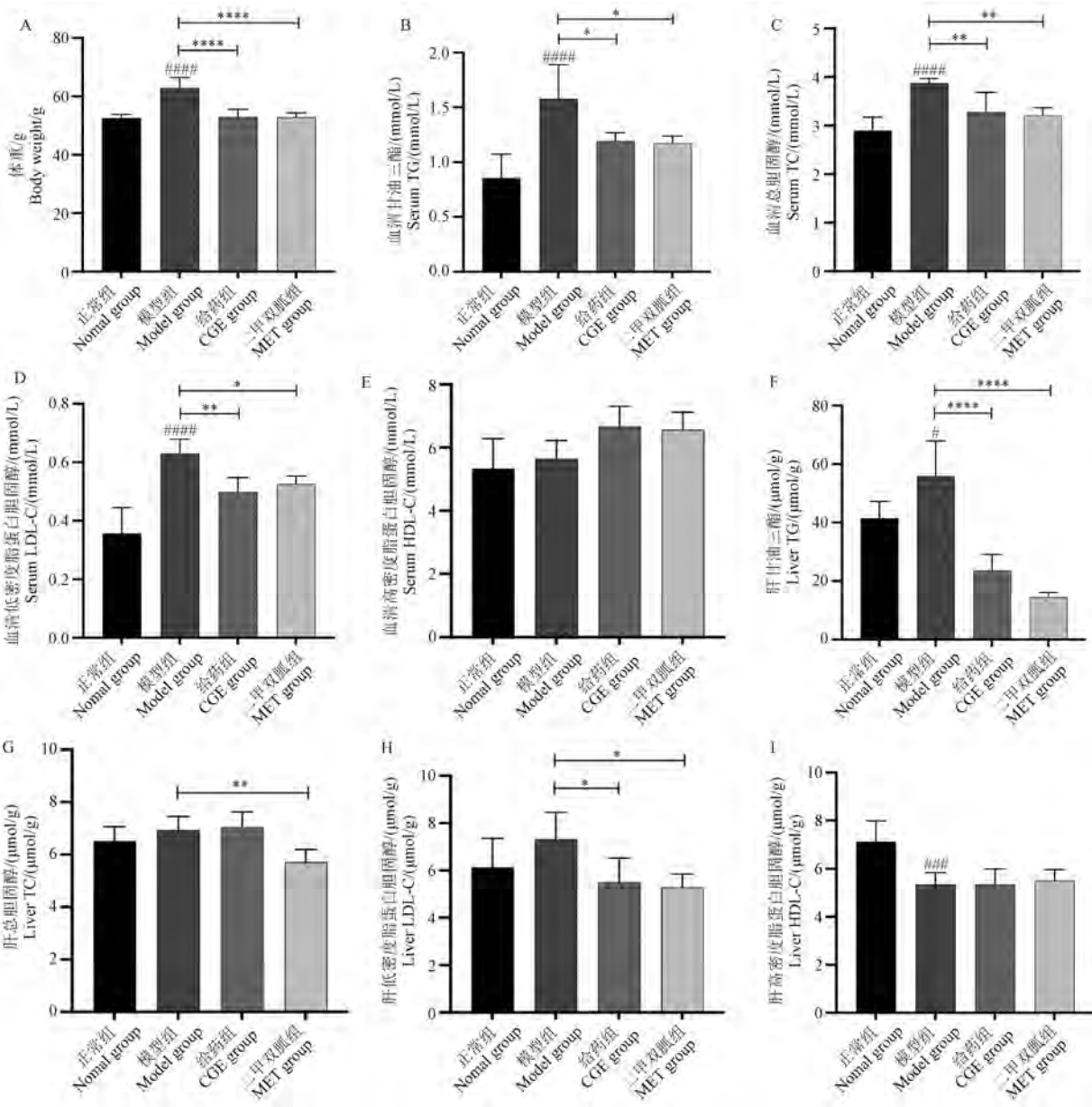
2.4 方法学考察

52 种胆汁酸标准品的 $R^2 > 0.9940$; LOD 在 0.43 ~ 7.14 nmol/L, LOQ 在 0.85 ~ 4.29 nmol/L; Recovery 在 81.3% ~ 100.0%, RSD $< 4.3\%$ 。表明本方法具有较好的线性,精密度和准确度较高,能够准确可靠的检出粪便样品中的胆汁酸。结果见表 1。

2.5 各组胆汁酸定量结果

本研究采用 UPLC-MS/MS 法,通过 BA 的标准曲线,对三组小鼠中粪便中的 52 种已知 BAs 进行了准确定量,结果采用浓度(nmol/g)表示,见表 2。

给予高脂饮食后,总粪便胆汁酸含量显著升高($P < 0.0001$),而毛菊苣乙醇提取物和二甲双胍能显著降低总粪便胆汁酸水平($P < 0.05$)。较于正常组,模型组 DHCA 和 UDCA-3S 水平降低($P <$



注:A:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠的体重影响($n = 10$);B:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠血清 TG 的影响($n = 6$);C:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠血清 TC 的影响($n = 6$);D:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠血清 LDL-C 的影响($n = 6$);E:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠血清 HDL-C 的影响($n = 6$);F:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠肝 TG 的影响($n = 6$);G:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠肝 TC 的影响($n = 6$);H:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠肝 LDL-C 的影响($n = 6$);I:毛菊苣乙醇提取物对肥胖小鼠肝 HDL-C 的影响($n = 6$)。与正常组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{###}P < 0.001$, $^{####}P < 0.0001$;与模型组相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$ 。(下图/表同)

图 1 毛菊苣乙醇提取物对各组小鼠体重、血清及肝 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 的影响

Note. A. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on the body weight of obese mice ($n = 10$). B. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on serum triglycerides (TG) in obese mice ($n = 6$). C. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on serum total cholesterol (TC) in obese mice ($n = 6$). D. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on serum low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in obese mice ($n = 6$). E. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in obese mice ($n = 6$). F. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on liver TG in obese mice ($n = 6$). G. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on liver TC in obese mice ($n = 6$). H. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on liver LDL-C in obese mice ($n = 6$). I. Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on liver HDL-C in obese mice ($n = 6$). Compared with normal group, $^{\#}P < 0.05$, $^{###}P < 0.001$, $^{####}P < 0.0001$. Compared with model group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Effects of *C. glandulosum* ethanol extract on body weight, serum and liver TC, TG, LDL-C and HDL-C in obese mice

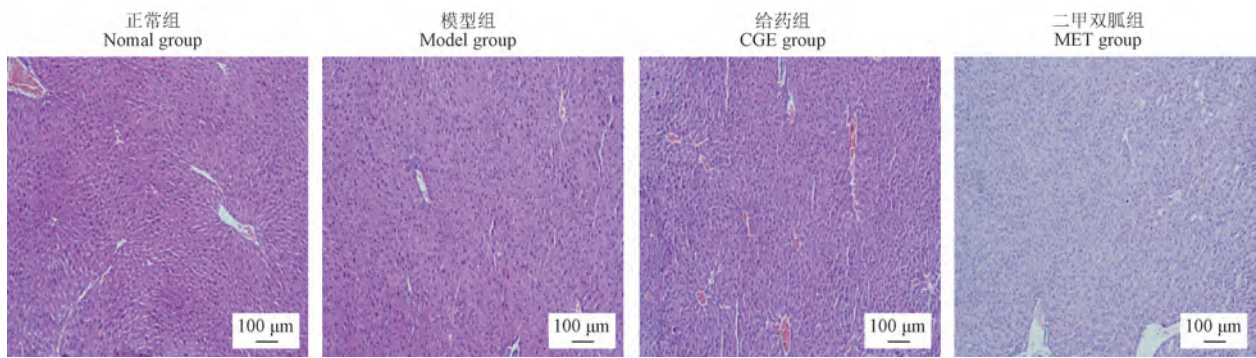


图 2 毛菊苣乙醇提取物对肝组织形态的影响(HE 染色)

Figure 2 Effect of *C. glandulosum* ethanol extract on the histomorphology of liver (HE staining)

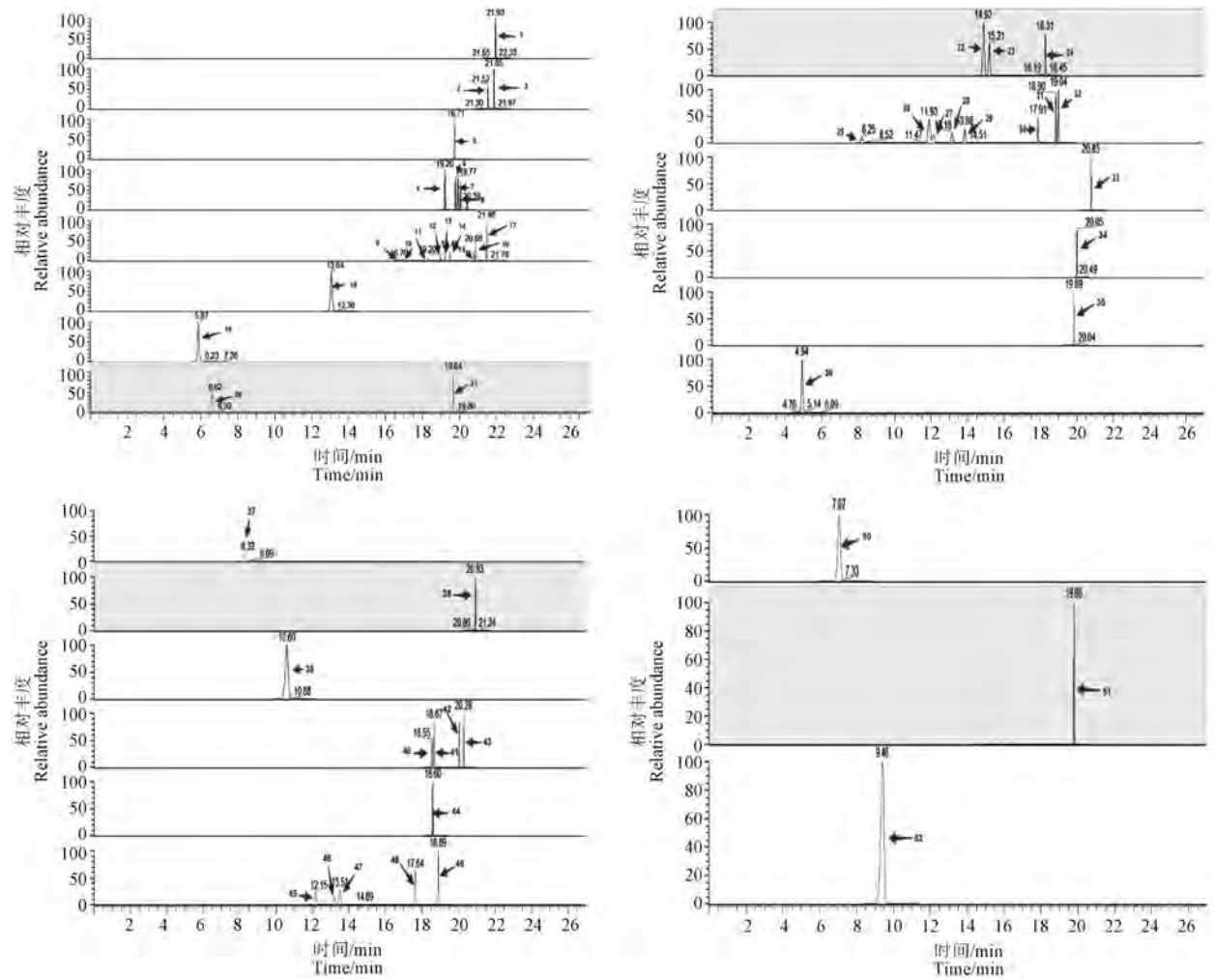


图 3 标准品溶液的提取离子色谱图

Figure 3 Ion chromatograms of standard solutions and sample extracts

0.05), isoLCA、 ω -MCA、isoHDCA、MDCA、THDCA、GLCA、T- ω -MCA、HDCA、3 β -DCA、DCA、DHCA、 α -MCA、HCA、isoUDCA、THCA、6-ketoLCA、GCDCA-3Gln、apoCA、UDCA-3S、TCA、TUDCA、CA-3S、T- α -MCA、CDCA-24Gln、T- β -MCA 和 12-ketoLCA 的水平升高($P < 0.05$);相较于模型组,给药组能逆转其中 isoLCA、3 β -DCA、DCA、 ω -MCA、CA-3S 和 GCDCA-3Gln 6 种胆汁酸的水平($P < 0.05$),同时升高 LCA 和 23-norDCA 水平($P < 0.05$)。二甲双胍组能逆转模型组 isoLCA、isoUDCA、MDCA、3 β -DCA、DCA 和

表 1 方法学考察结果

Table 1 Results of methodological study

胆汁酸 Bile acids	线性方程 Regression equation	决定系数 R^2	检出限/ (nmol/L) LOD/ (nmol/L)	定量限/ (nmol/L) LOQ/ (nmol/L)	标准相 对偏差 RSD	回收率/% Recovery/%
脱氢石胆酸 Dehydrolithocholic acid	$Y = 0.0061X + 0.0059$	0.9993	1.66	3.31	0.6	89.9
异石胆酸 Isolithocholic acid	$Y = 0.0073X + 0.0073$	0.9988	1.69	3.38	0.7	87.0
石胆酸 Lithocholic acid	$Y = 0.0038X + 0.0032$	0.9995	0.87	1.74	0.9	86.3
23-脱甲脱氧胆酸 23-nordeoxycholic acid	$Y = 0.0075X + 0.0002$	0.9998	1.65	3.29	3.5	82.7
6-酮石胆酸 6-ketolithocholic acid	$Y = 0.0049X + 0.0014$	0.9999	0.97	1.94	1.3	90.8
7-酮基石胆酸 7-ketolithocholic acid	$Y = 0.0039X - 0.0002$	0.9999	0.93	1.85	2.5	83.2
12-酮基石胆酸 12-ketolithocholic acid	$Y = 0.0057X + 0.0115$	0.9998	0.43	0.85	2.7	82.2
原胆酸 Apocholic acid	$Y = 0.0028X + 0.0019$	0.9981	1.96	3.92	0.9	84.0
异熊去氧胆酸 Isoursodeoxycholic acid	$Y = 0.0063X + 0.0092$	0.9992	3.34	6.68	1.1	82.3
鼠脱氧胆酸 Murideoxycholic acid	$Y = 0.0064X + 0.0078$	0.9996	1.62	3.24	1.5	85.4
异猪去氧胆酸 Isohyodeoxycholic acid	$Y = 0.0066X + 0.0037$	0.9996	1.92	3.83	1.7	81.3
熊脱氧胆酸 Ursodeoxycholic acid	$Y = 0.0044X + 0.0066$	0.9996	0.94	1.88	1.7	85.7
猪脱氧胆酸 Hyodeoxycholic acid	$Y = 0.0182X + 0.0180$	0.9990	1.77	3.53	1.8	86.0
3 β -脱氧胆酸 3 β -deoxycholic acid	$Y = 0.0043X + 0.0236$	0.9998	0.83	1.67	3.0	85.3
鹅脱氧胆酸 Chenodeoxycholic acid	$Y = 0.0071X + 0.0054$	0.9998	1.10	2.19	1.1	86.6
脱氧胆酸 Deoxycholic acid	$Y = 0.0020X + 0.0026$	0.9999	0.88	1.75	1.4	85.6
异脱氧胆酸 Isodeoxycholic acid	$Y = 0.0033X + 0.0005$	0.9995	1.13	2.27	0.8	82.4
去甲胆酸 Nor cholic acid	$Y = 0.0072X + 0.0240$	0.9993	0.85	1.70	1.3	82.2
脱氢胆酸 Dehydrocholic acid	$Y = 0.0081X - 0.0007$	0.9987	1.61	3.23	0.8	91.8
7,12-二酮石胆酸 7,12-diketolithocholic acid	$Y = 0.0122X + 0.0018$	0.9988	0.94	1.88	3.3	85.8
6,7-二酮石胆酸 6,7-diketolithocholic acid	$Y = 0.0048X + 0.0032$	0.9994	3.41	6.81	3.9	84.9
7-酮脱氧胆酸 7-ketodeoxycholic acid	$Y = 0.0054X + 0.0107$	0.9993	3.91	7.82	1.4	82.6
12-脱氢胆酸 12-dehydrocholic acid	$Y = 0.0042X + 0.0117$	0.9993	3.53	7.07	1.2	82.0
3-脱氢胆酸 3-dehydrocholic acid	$Y = 0.0024X + 0.0011$	0.9991	3.52	7.05	3.8	90.0
熊果胆酸 Ursocholic acid	$Y = 0.0060X + 0.0273$	0.9997	0.49	0.97	2.4	87.0

续表 1

胆汁酸 Bile acids	线性方程 Regression equation	决定系数 R^2	检出限/ (nmol/L) LOD/ (nmol/L)	定量限/ (nmol/L) LOQ/ (nmol/L)	标准相 对偏差 RSD	回收率/% Recovery/%
3β-胆酸 3β-cholic acid	Y = 0.0041X + 0.0039	0.9983	1.65	3.29	1.6	87.7
ω-鼠胆酸 ω-muricholic acid	Y = 0.0030X + 0.0076	0.9995	1.73	3.46	4.3	85.3
α-鼠胆酸 α-muricholic acid	Y = 0.0036X + 0.0144	0.9999	0.89	1.77	1.4	83.5
β-鼠胆酸 β-muricholic acid	Y = 0.0039X + 0.0012	0.9995	0.85	1.69	0.8	87.3
猪胆酸 Hyocholic acid	Y = 0.0061X + 0.0107	0.9995	7.14	14.29	1.0	85.3
别胆酸 Allochoic acid	Y = 0.0056X + 0.0009	0.9998	0.44	0.87	3.5	84.1
胆酸 Cholic acid	Y = 0.0025X + 0.0120	0.9998	3.55	7.11	1.5	81.5
甘氨石胆酸 Glycolithocholic acid	Y = 0.0028X + 0.0046	0.9999	0.45	0.91	1.0	89.5
石胆酸-3-硫酸 Lithocholic acid-3-sulfate	Y = 0.0042X - 0.0000	0.9999	0.49	0.99	3.6	84.2
甘氨脱氢胆酸 Glycodehydrocholic acid	Y = 0.0031X + 0.0032	0.9978	3.28	6.55	1.0	100.0
熊去氧胆酸-3-硫酸 Ursodeoxycholic acid 3-sulfate	Y = 0.0033X + 0.0035	0.9996	0.88	1.76	3.0	84.2
牛磺石胆酸 Taurolithocholic acid	Y = 0.0085X + 0.0053	0.9997	0.89	1.79	1.2	87.2
3-硫酸胆酸 Cholic acid-3-sulfate	Y = 0.0013X + 0.0013	0.9995	0.51	1.03	1.1	81.4
牛磺熊脱氧胆酸 Tauroursodeoxycholic acid	Y = 0.0063X - 0.0007	0.9999	2.07	4.15	1.4	87.5
牛磺猪脱氧胆酸 Taurohyodeoxycholic acid	Y = 0.0034X - 0.0009	0.9993	6.90	13.80	1.4	88.6
牛磺鹅脱氧胆酸 Taurochenodeoxycholic acid	Y = 0.0024X + 0.0250	0.9987	1.62	3.24	1.3	83.3
牛磺脱氧胆酸 Taurodeoxycholic acid	Y = 0.0061X + 0.0367	0.9989	6.65	13.31	1.6	85.4
甘氨石胆酸-3-硫酸 Glycolithocholic acid-3-sulfate	Y = 0.0080X + 0.0066	0.9997	1.69	3.38	1.0	87.5
牛磺-ω-鼠胆酸 Tauro-ω-muricholic acid	Y = 0.0061X + 0.0059	0.9997	0.43	0.86	1.3	88.9
牛磺-α-鼠胆酸 Tauro-α-muricholic acid	Y = 0.0073X + 0.0073	0.9988	0.84	1.68	3.3	92.8
牛磺-β-鼠胆酸 Tauro-β-muricholic acid	Y = 0.0038X + 0.0032	0.9993	0.90	1.80	0.7	89.7
牛磺猪胆酸 Taurohyocholic acid	Y = 0.0075X + 0.0002	0.9999	1.05	2.09	0.8	81.7
牛磺胆酸 Taurocholic acid	Y = 0.0049X + 0.0014	0.9999	0.86	1.71	1.5	81.5
甘氨胆酸-3-硫酸 Glycocholic acid-3-sulfate	Y = 0.0063X + 0.0092	0.9988	6.48	12.95	1.4	86.0
鹅去氧胆酸-24-酰基-β-葡糖苷酸 Chenodeoxycholic acid-24-acyl-β-D-glucuronide	Y = 0.0044X + 0.0066	0.9995	3.87	7.75	3.5	89.3
甘氨鹅脱氧胆酸-3-O-β-葡糖醛酸 Glycochenodeoxycholic acid-3-O-β-glucuronide	Y = 0.0072X + 0.0240	0.9989	1.59	3.18	2.1	84.8
甘氨脱氧胆酸 Glycdeoxycholic acid	Y = 0.0031X + 0.0067	0.9991	3.36	6.71	1.5	83.6

表 2 52 种胆汁酸定量结果(nmol/g, n = 6)
Table 2 Quantitative results of 52 bile acids(nmol/g, n = 6)

胆汁酸 Bile acids	缩写 Abbreviations	正常组 Normal group	模型组 Model group	给药组 CGE group	二甲双胍组 MET group
ω-鼠胆酸 ω-muricholic acid	ω-MCA	393. 10 ± 177. 43	2841. 94 ± 931. 18 [#]	1625. 99 ± 703. 76 [*]	22. 11 ± 10. 98
脱氧胆酸 Deoxycholic acid	DCA	228. 76 ± 128. 02	1518. 51 ± 185. 98 ^{####}	995. 97 ± 336. 80 [*]	56. 51 ± 26. 20 [*]
12-酮基石胆酸 12-ketolithocholic acid	12-ketoLCA	161. 98 ± 63. 64	283. 72 ± 91. 81 [#]	388. 19 ± 133. 40	0. 76 ± 0. 41
3-硫酸胆酸 Cholic acid-3-sulfate	CA-3S	149. 17 ± 202. 59	1656. 11 ± 669. 98 [#]	601. 80 ± 328. 22 [*]	0. 15 ± 0. 20 [*]
β-鼠胆酸 β-muricholic acid	β-MCA	146. 02 ± 44. 37	635. 37 ± 534. 38	351. 36 ± 60. 07	124. 63 ± 115. 31
α-鼠胆酸 α-muricholic acid	α-MCA	43. 67 ± 18. 96	174. 06 ± 70. 59 [#]	124. 15 ± 53. 09	1794. 61 ± 1420. 15
猪脱氧胆酸 Hyodeoxycholic acid	HDCA	22. 85 ± 12. 48	123. 46 ± 69. 91 [#]	134. 68 ± 61. 16	2. 36 ± 1. 29
牛磺胆酸 Taurocholic acid	TCA	22. 56 ± 7. 32	41. 42 ± 9. 61 [#]	38. 82 ± 7. 31	0. 16 ± 0. 06
胆酸 Cholic acid	CA	17. 21 ± 5. 81	30. 30 ± 20. 87	40. 18 ± 21. 35	3. 05 ± 1. 25
脱氢石胆酸 Dehydrolithocholic acid	DHLCA	15. 67 ± 9. 24	19. 19 ± 7. 37	28. 45 ± 15. 79	19. 62 ± 9. 29
牛磺-β-鼠胆酸 Tauro-β-muricholic acid	T-β-MCA	14. 65 ± 5. 52	36. 28 ± 17. 89 [#]	22. 08 ± 6. 89	3. 74 ± 0. 54
鹅脱氧胆酸 Chenodeoxycholic acid	CDCA	12. 58 ± 9. 93	74. 90 ± 58. 05	73. 27 ± 16. 71	39. 00 ± 35. 39
3β-胆酸 3β-cholic acid	3β-CA	10. 49 ± 3. 93	116. 69 ± 124. 24	36. 37 ± 11. 25	0. 11 ± 0. 27
12-脱氢胆酸 12-dehydrocholic acid	12-DHCA	9. 89 ± 3. 73	18. 01 ± 8. 24	22. 90 ± 8. 77	9. 26 ± 3. 06
3β-脱氧胆酸 3β-deoxycholic acid	3β-DCA	8. 32 ± 5. 35	77. 30 ± 10. 15 ^{####}	41. 25 ± 19. 59 [*]	96. 27 ± 53. 53 [*]
原胆酸 Apocholic acid	CA	6. 81 ± 5. 07	40. 76 ± 20. 05 [#]	29. 98 ± 9. 43	225. 03 ± 61. 76
别胆酸 Allocholic acid	ACA	6. 43 ± 3. 75	9. 21 ± 10. 38	17. 79 ± 19. 97	15. 91 ± 12. 29
7-酮脱氧胆酸 7-ketodeoxycholic acid	7-KDCA	5. 37 ± 1. 86	8. 93 ± 4. 17	12. 86 ± 2. 50	0. 71 ± 0. 21
6-酮石胆酸 6-ketolithocholic acid	6-ketoLCA	4. 38 ± 3. 31	18. 72 ± 7. 13 [#]	34. 11 ± 22. 67	0. 55 ± 0. 27
牛磺-ω-鼠胆酸 Tauro-ω-muricholic acid	T-ω-MCA	4. 36 ± 1. 32	19. 17 ± 9. 06 [#]	10. 91 ± 4. 07	0. 07 ± 0. 09
异石胆酸 Isolithocholic acid	isoLCA	3. 73 ± 1. 28	27. 21 ± 5. 92 ^{##}	16. 96 ± 5. 34 [*]	0. 08 ± 0. 04 [*]
异猪去氧胆酸 Isohyodeoxycholic acid	isoHDCA	3. 36 ± 1. 97	29. 29 ± 11. 26 [#]	19. 63 ± 8. 79	7. 03 ± 2. 58
猪胆酸 Hyocholic acid	HCA	3. 21 ± 1. 84	14. 95 ± 5. 04 [#]	11. 06 ± 4. 25	235. 25 ± 100. 42
牛磺-α-鼠胆酸 Tauro-α-muricholic acid	T-α-MCA	3. 10 ± 1. 20	6. 47 ± 2. 49 [#]	4. 13 ± 1. 16	10. 29 ± 4. 47
甘氨酸-3-硫酸 Glycocholic acid-3-sulfate	GCA-3S	2. 95 ± 2. 01	0. 79 ± 1. 14	1. 42 ± 1. 20	31. 27 ± 9. 26
鼠脱氧胆酸 Murideoxycholic acid	MDCA	2. 70 ± 0. 72	13. 63 ± 6. 16 [#]	10. 50 ± 3. 04	2. 45 ± 0. 99 [*]
牛磺鹅脱氧胆酸 Taurochenodeoxycholic acid	TCDCA	2. 45 ± 0. 89	2. 30 ± 0. 37	1. 75 ± 0. 43	1. 98 ± 0. 66 [*]
牛磺脱氧胆酸 Taurodeoxycholic acid	TDCA	2. 41 ± 0. 92	5. 76 ± 3. 22	3. 68 ± 1. 43	1. 51 ± 0. 43

续表 2

胆汁酸 Bile acids	缩写 Abbreviations	正常组 Normal group	模型组 Model group	给药组 CGE group	二甲双胍组 MET group
7-酮基石胆酸 7-ketolithocholic acid	7-ketoLCA	1.64 ± 1.08	1.25 ± 1.48	1.33 ± 0.47	16.30 ± 4.97
熊脱氧胆酸 Ursodeoxycholic acid	UDCA	1.51 ± 1.175	7.75 ± 7.60	6.07 ± 2.11	15.18 ± 11.23
牛磺熊脱氧胆酸 Tauroursodeoxycholic acid	TUDCA	1.47 ± 0.61	4.44 ± 1.85 [#]	4.00 ± 1.61	867.06 ± 400.22
3-脱氢胆酸 3-dehydrocholic acid	3-DHCA	1.35 ± 0.44	1.51 ± 0.93	1.97 ± 0.79	14.90 ± 4.79
鹅去氧胆酸-24-酰基-β-葡萄糖苷酸 Chenodeoxycholic acid-24-acyl-β-D-glucuronide	CDCA-24Gln	1.21 ± 0.26	1.56 ± 0.12 [#]	1.64 ± 0.15	0.48 ± 0.62
6,7-二酮石胆酸 6,7-diketolithocholic acid	6,7-diketoLCA	1.06 ± 0.49	1.05 ± 0.68	0.64 ± 0.15	0.54 ± 0.52
异熊去氧胆酸 Isoursodeoxycholic acid	isoUDCA	0.99 ± 0.64	7.15 ± 3.90 [#]	4.84 ± 1.88	20.72 ± 9.56 [*]
甘氨酸脱氢胆酸 Glycodehydrocholic acid	GDHCA	0.97 ± 0.56	0.57 ± 0.21	0.38 ± 0.18	0.03 ± 0.04
去甲胆酸 Nor cholic acid	NCA	0.96 ± 1.22	0.82 ± 0.48	0.63 ± 0.62	0.00 ± 0.00
熊果胆酸 Ursocholic acid	UCA	0.84 ± 0.40	2.68 ± 2.32	3.09 ± 2.07	1.28 ± 0.25
7,12-二酮石胆酸 7,12-diketolithocholic acid	7,12-diketoLCA	0.63 ± 0.37	0.23 ± 0.07	1.02 ± 0.79	0.11 ± 0.19
牛磺猪脱氧胆酸 Taurohyodeoxycholic acid	THDCA	0.59 ± 0.24	2.94 ± 1.20 [#]	2.70 ± 1.32	3.24 ± 0.77
熊去氧胆酸硫酸 Ursodeoxycholic acid 3-sulfate	UDCA-3S	0.36 ± 0.20	0.10 ± 0.04 [#]	0.09 ± 0.03	0.30 ± 0.12
23-脱甲脱氧胆酸 23-nordeoxycholic acid	23-norDCA	0.18 ± 0.17	0.28 ± 0.13	0.77 ± 0.36 [*]	106.10 ± 34.42
脱氢胆酸 Dehydrocholic acid	DHCA	0.12 ± 0.10	0.00 ± 0.00 [#]	0.10 ± 0.11	0.37 ± 0.44
石胆酸-3-硫酸 Lithocholic acid-3-sulfate	LCA-3S	0.10 ± 0.07	0.06 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.12 ± 0.05
牛磺石胆酸 Tauro lithocholic acid	TLCA	0.07 ± 0.08	0.16 ± 0.12	0.07 ± 0.04	0.08 ± 0.04
甘氨酸石胆酸-3-硫酸 Glycolithocholic acid-3-sulfate	GLCA-3S	0.06 ± 0.07	0.15 ± 0.06	0.12 ± 0.05	3.80 ± 2.76
甘氨酸胆酸 Glycolithocholic acid	GLCA	0.05 ± 0.01	0.18 ± 0.07 [#]	0.17 ± 0.08	14.69 ± 4.25
异脱氧胆酸 Isodeoxycholic acid	isoDCA	0.03 ± 0.03	0.05 ± 0.04	0.02 ± 0.03	780.36 ± 475.90 [*]
甘氨酸鹅脱氧胆酸-3-O-β-葡萄糖醛酸 Glycochenodeoxycholic acid-3-O-β-glucuronide	GCDCA-3Gln	0.02 ± 0.04	0.15 ± 0.05 [#]	0.06 ± 0.04 [*]	1.54 ± 0.18 [*]
石胆酸 Lithocholic acid	LCA	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	135.83 ± 33.22 ^{**}	12.36 ± 5.12 ^{**}
牛磺猪胆酸 Taurohyocholic acid	THCA	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.05 [#]	0.13 ± 0.15	20.59 ± 4.41 [*]
甘氨酸脱氧胆酸 Glycodeoxycholic acid	GDCA	0.00 ± 0.00	0.21 ± 0.04	0.22 ± 0.05	0.28 ± 0.07 [*]
总胆汁酸 Total bile acids	—	1322.41	7877.70 ^{####}	4816.44 [*]	4584.79 [*]

注:与正常组相比, ^{##}*P* < 0.01。(下图同)
Note. Compared with the normal group, ^{##}*P* < 0.01. (The same in the following figures)

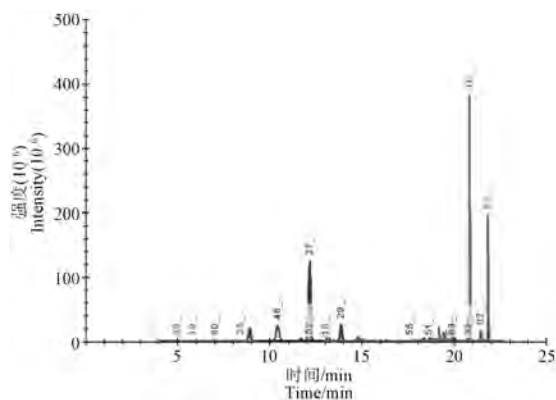


图 4 样品提取离子色谱图

Figure 4 Extracted ion chromatograms of the sample

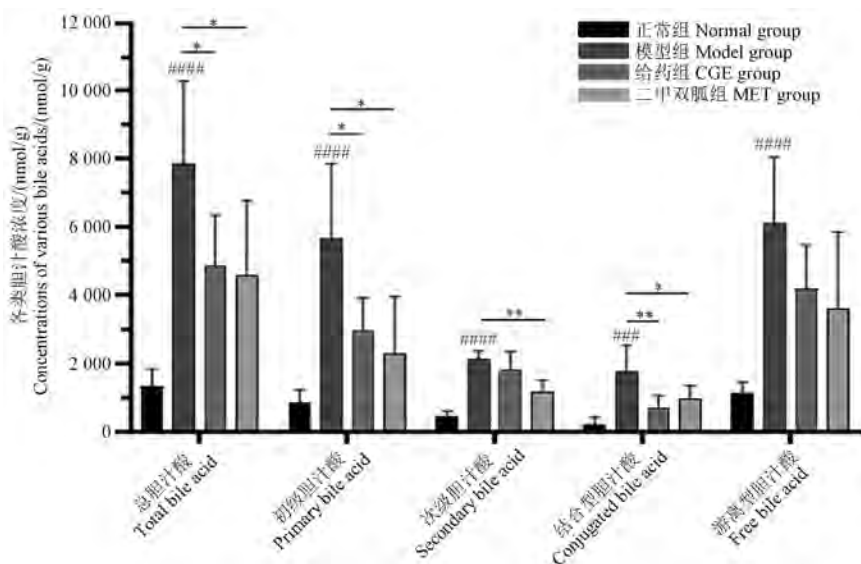


图 5 各组不同类型胆汁酸浓度(nmol/g, $n = 6$)

Figure 5 Different bile acid concentrations in each group(nmol/g, $n = 6$)

胆汁酸($P < 0.01$),游离型胆汁酸有下降趋势,但无统计学意义($P > 0.05$)。

各组次级胆汁酸/初级胆汁酸比值见图 6,与正常组相比,模型组该比值下降但无统计学意义($P > 0.05$),与模型组相比,给药组该比值显著升高($P < 0.05$),二甲双胍组该比值升高,但无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 多元统计分析-胆汁酸代谢轮廓分析

本研究采用 PCA 对正常组、模型组、给药组和二甲双胍组 4 组小鼠的粪便胆汁酸代谢轮廓进行分析,采用 OPLS-DA 对 4 组进行两两比较,并对 4 组胆汁酸浓度进行层次聚类分析。

2.6.1 PCA 分析

PCA 得分散点图中可以看出,样本全部处于 95%置信区间。如图 7 正常组和模型组的散点呈现

CA-3S 6 种胆汁酸水平($P < 0.05$),此外还降低 isoDCA、GDHCA、TCDCA 水平($P < 0.05$),升高 LCA 和 THCA 水平($P < 0.05$)。

各组不同类型胆汁酸浓度结果见图 5,与正常组相比,模型组初级胆汁酸($P < 0.0001$)、次级胆汁酸($P < 0.0001$)、结合型胆汁酸($P < 0.001$)和游离性胆汁酸($P < 0.0001$)浓度均升高;给予毛菊苣乙醇提取物能显著降低模型组升高的初级胆汁酸($P < 0.05$)和结合型胆汁酸($P < 0.01$),次级胆汁酸和游离性胆汁酸有下降的趋势,但无统计学意义($P > 0.05$)。给予二甲双胍能降低模型组升高的初级胆汁酸($P < 0.05$)、次级胆汁酸($P < 0.01$)和结合型

明显的分离,说明给予高脂饮食致使小鼠粪便胆汁酸组成发生变化;给药组与模型组散点呈分离的趋势,并同二甲双胍组散点聚集在一定区域内,说明给予毛菊苣乙醇提取物后,小鼠粪便胆汁酸组成相较模型组发生变化。

2.6.2 OPLS-DA 分析

如图 8 OPLS-DA 得分散点图中,正常组和模型组,给药组和模型组,二甲双胍组和模型组的散点均明显分离,同时每组内散点的聚集程度较好。表明正常组和模型组,给药组和模型组,二甲双胍组和模型组之间的粪便胆汁酸组成均存在差异。通过置换检验验证 OPLS-DA 模型拟合效果,Q2 的回归线在纵坐标上的截距小于 0,表明此模型无过度拟合现象,具有较好的可预测性和拟合度,可准确地描述数据。

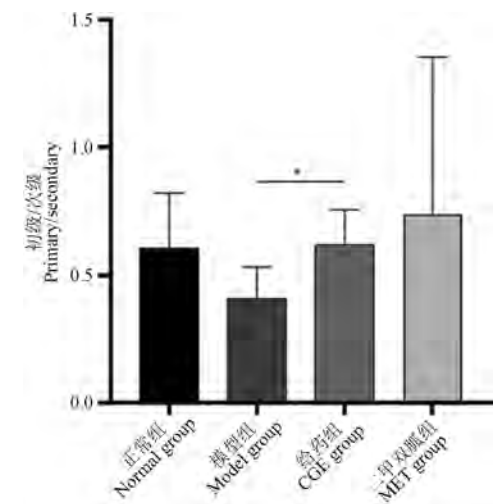


图 6 各组次级胆汁酸/初级胆汁酸的比值($n = 6$)
Figure 6 Ratio of secondary bile acids/primary bile acids in each group ($n = 6$)

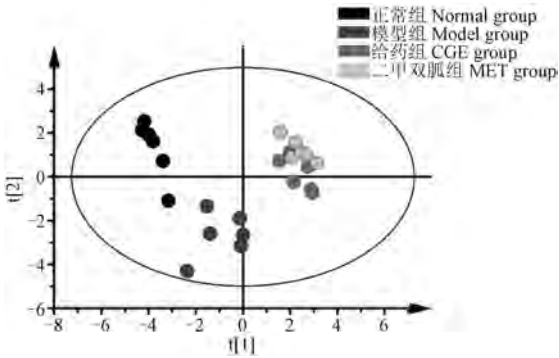


图 7 PCA 得分散点图
Figure 7 Score scatter plot of PCA model

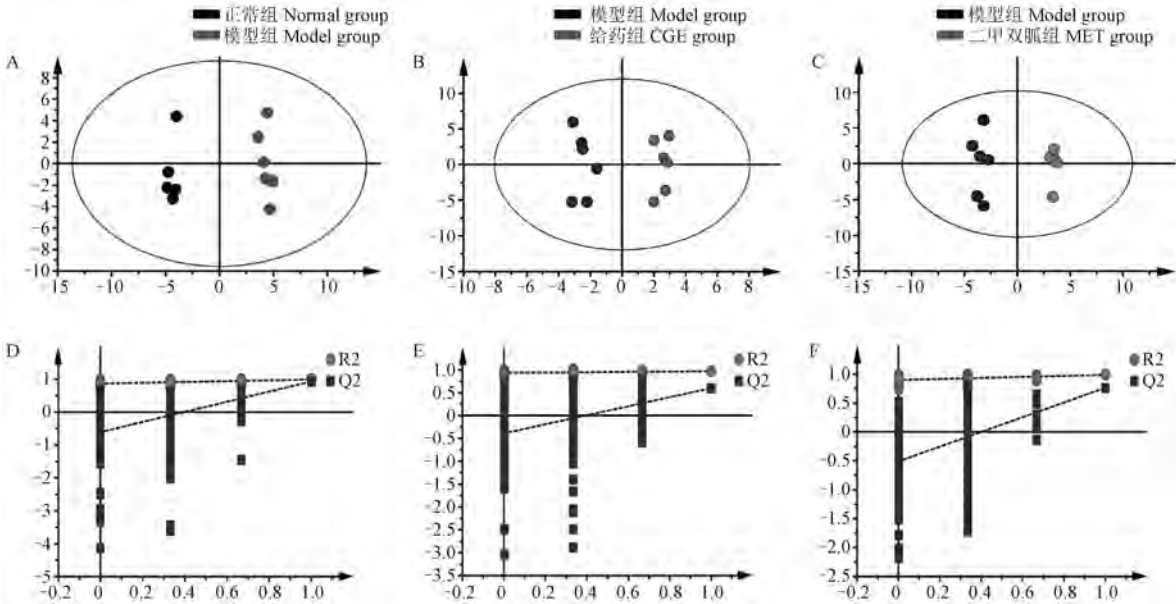
32 种胆汁酸,二甲双胍组上调了 9 种胆汁酸,下调了 43 种胆汁酸。

2.7 差异胆汁酸筛选

以 $VIP > 1, P < 0.05$ 为筛选条件,从 52 种胆汁酸中筛选出各组之间的差异胆汁酸,结果见表 3。相对于正常组,模型组有 22 种胆汁酸水平显著变化;相对于模型组,给药组显著升高 LCA ($P < 0.001$) 和 23-norDCA ($P < 0.05$) 水平,显著降低 DCA、 3β -DCA、isoLCA、CA-3S、 ω -MCA、GDCA-3Gln

2.6.3 层析聚类分析

对 4 组胆汁酸浓度数据进行层次聚类分析,并绘制热图,结果如图 9。相较于正常组,模型组上调了 42 种胆汁酸,下调 10 种胆汁酸;相较于模型组,毛菊苣乙醇提取物组上调了 20 种胆汁酸,下调了



注:A:正常组对模型组 OPLS-DA 得分散点图;B:给药组对模型组的 OPLS-DA 得分散点图;C:二甲双胍组对模型组的 OPLS-DA 得分散点图;D:正常组对模型组的置换检验结果;E:给药组对模型组的置换检验结果;F:二甲双胍组对模型组的置换检验结果。

图 8 OPLS-DA 得分散点图和置换检验结果

Note. A. Scatter plot of the OPLS-DA results comparing the normal group to the model group. B. Scatter plot of the OPLS-DA results comparing the treated group to the model group. C. Scatter plot of the OPLS-DA results comparing the metformin group to the model group. D. Permutation test results comparing the normal group to the model group. E. Permutation test results comparing the treated group to the model group. F. Permutation test results comparing the metformin group to the model group.

Figure 8 Score scatter plot of OPLS-DA model and permutation test

表 3 差异胆汁酸

Table 3 Differential bile acid profile

胆汁酸 Bile acid	模型组 VS 正常组 Model group VS Normal group		给药组 VS 模型组 CGE group VS Model group		二甲双胍组 VS 模型组 MET group VS Model group		KEGG 编号 KEGG ID	代谢通路 Metabolic pathways
	<i>P</i> 值	VIP 值	<i>P</i> 值	VIP 值	<i>P</i> 值	VIP 值		
	<i>P</i> value	VIP value	<i>P</i> value	VIP value	<i>P</i> value	VIP value		
isoLCA	0.000 ↑	1.489	1.705 ↓	0.017	1.527 ↓	0.001	—	—
ω-MCA	0.002 ↑	1.487	1.533 ↓	0.042	—	—	C17727	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
isoHDCA	0.003 ↑	1.480	—	—	—	—	—	—
MDCA	0.010 ↑	1.452	—	—	1.224 ↓	0.049	C15515	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
THDCA	0.007 ↑	1.441	—	—	—	—	—	—
TLCA	0.011 ↑	1.425	—	—	—	—	—	—
T-ω-MCA	0.014 ↑	1.385	—	—	—	—	—	—
α-MCA	0.008 ↑	1.381	—	—	—	—	—	—
HDCA	0.005 ↑	1.381	—	—	—	—	—	—
isoUDCA	0.016 ↑	1.362	—	—	1.409 ↓	0.043	C17662	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
THCA	0.024 ↑	1.359	—	—	1.139 ↑	0.032	C15516	—
6-ketoLCA	0.002 ↑	1.340	—	—	—	—	—	—
GDCA-3Gln	0.002 ↑	1.332	1.516 ↓	0.013	—	—	—	—
CA	0.012 ↑	1.313	—	—	—	—	—	—
UDCA-3S	0.028 ↓	1.270	—	—	—	—	—	—
TCA	0.006 ↑	1.248	—	—	—	—	—	—
TUDCA	0.014 ↑	1.220	—	—	—	—	—	—
CA-3S	0.003 ↑	1.213	1.583 ↓	0.010	1.086 ↓	0.043	—	—
T-α-MCA	0.021 ↑	1.073	—	—	—	—	—	—
CDCA-24Gln	0.022 ↑	1.044	—	—	—	—	—	—
T-β-MCA	0.042 ↑	1.044	—	—	—	—	—	—
12-ketoLCA	0.035 ↑	1.024	—	—	—	—	—	—
23-norDCA	—	—	1.391 ↑	0.027	—	—	—	—
LCA	—	—	2.187 ↑	0.000	1.890 ↑	0.001	C03990	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
DCA	—	—	1.780 ↓	0.013	1.338 ↓	0.006	C04483	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
3β-DCA	—	—	1.881 ↓	0.004	1.355 ↓	0.045	C20865	次级胆汁酸生物合成 Secondary bile acid biosynthesis
isoDCA	—	—	—	—	1.504 ↓	0.030	C17661	—
TCDCA	—	—	—	—	1.503 ↓	0.009	C05465	初级胆汁酸生物合成和 次级胆汁酸生物合成 Primary bile acid biosynthesis and secondary bile acid biosynthesis
GDHCA	—	—	—	—	1.255 ↓	0.030	—	—

注: ↑, 含量上升; ↓, 含量下降。
Note. ↑. Rise of content. ↓. Decline of content.

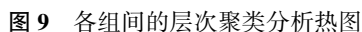
胆汁酸水平 ($P < 0.05$); 二甲双胍组显著升高 THCA 和 LCA 水平 ($P < 0.05$), 显著降低 isoLCA、MDCA、isoUDCA、CA-3S、DCA、3β-DCA、isoDCA、TCDCA 和 GDHCA 水平 ($P < 0.05$)。给药组和二甲双胍组与模型组之间的差异胆汁酸如图 10。

通过 KEGG 数据库检索给药组相对于模型组、二甲双胍组相对于模型组的差异胆汁酸参与的生物代谢途径, 结果见表 3, 发现给药组的差异胆汁酸主要参与次级胆汁酸生物合成代谢途径, 二甲双胍

表 4 小鼠体重和粪便差异胆汁酸的相关性分析 ($n = 24$)

Table 4 Correlation analysis of body weight and fecal differential bile acids in mice ($n = 24$)

差异胆汁酸 Differential bile acids	<i>Spearman</i> 相关系数 r_s	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
LCA	-0.2837	0.1792
DCA	0.6445	0.0007
isoLCA	0.5879	0.0025
23-norDCA	-0.0890	0.6792
3β-DCA	0.6649	0.0004
ω-MCA	0.5387	0.0066
CA-3S	-0.3153	0.1334
GCDCA-3Gln	0.5692	0.0037

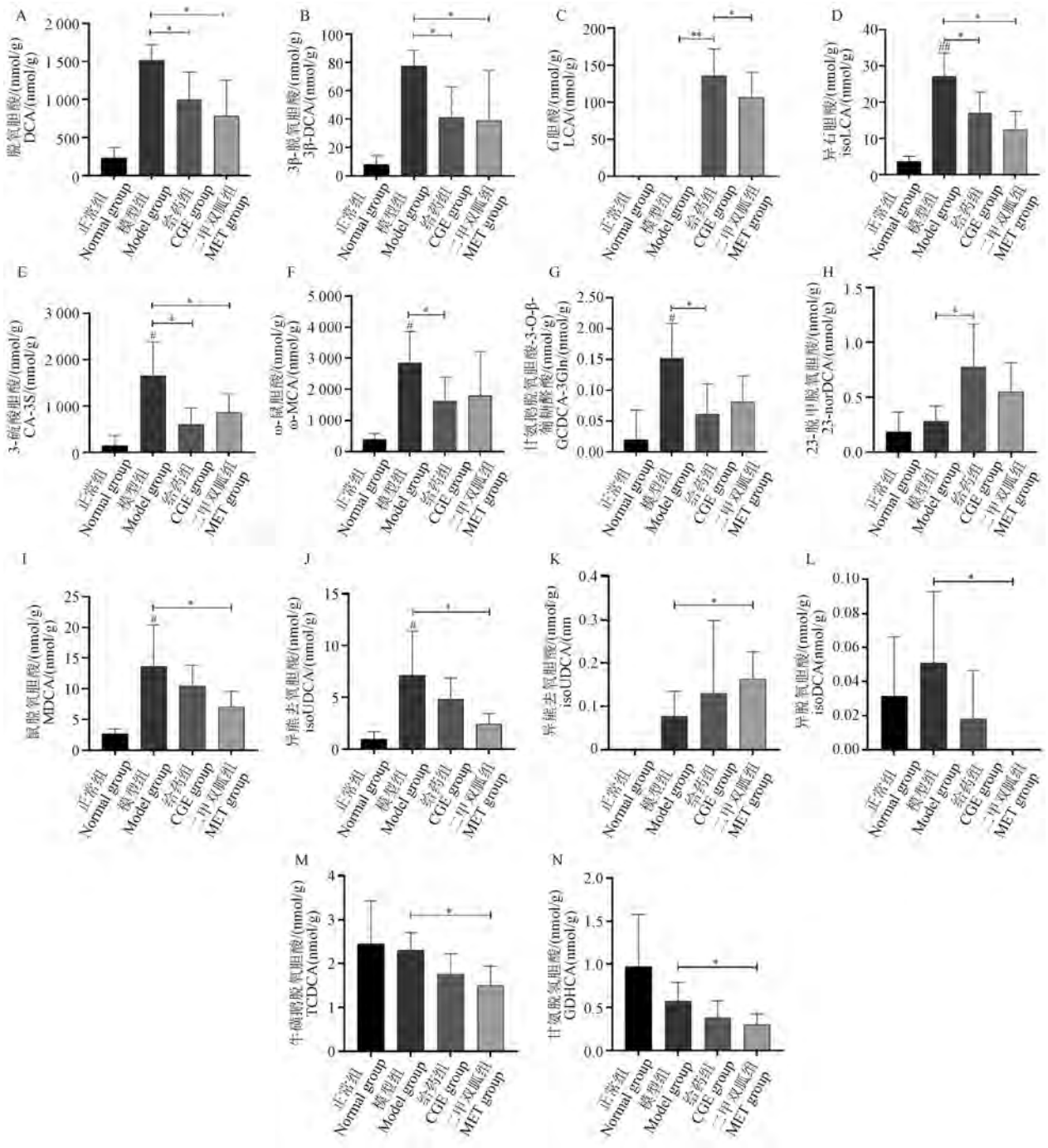


组的差异胆汁酸主要参与次级胆汁酸生物合成和初级胆汁酸生物合成途径。

通过 spearman 相关系数(spearman's correlation coefficient, r_s)相关性分析衡量小鼠($n = 24$)体重与各组差异胆汁酸浓度之间的相关性。结果如表 4 所示,粪便中 DCA($r_s = 0.6445, P < 0.001$)、isoLCA($r_s = 0.5879, P < 0.01$)、3 β -DCA($r_s = 0.6649, P < 0.01$)和 ω -MCA($r_s = 0.5387, P < 0.01$)4 种差异胆汁酸与体重具有较强的正相关。

本研究以高脂饮食诱导形成肥胖小鼠模型,并建立了一种稳定可靠的 UPLC-MS/MS 方法对小鼠粪便中 52 种胆汁酸进行定量分析,旨在探究毛菊苣乙醇提取物是否通过调节肥胖小鼠的胆汁酸稳态改善脂质代谢异常,并筛选出潜在生物标志物。HE 染色及药效结果显示毛菊苣乙醇提取物具有维持肥胖小鼠脂质稳态的作用。给予毛菊苣乙醇提取物后可改善肥胖小鼠的肝细胞变性,减少脂肪空泡,降低肥胖小鼠的体重、血清 TG、TC、LDL-C 和肝 TG、LDL-C 水平,但不改变肥胖小鼠肝 TC 和 HDL-C 水平。二甲双胍是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes

相对于正常组,模型组 52 种粪便胆汁酸的总含量显著增加,并显著改变了 22 种胆汁酸含量:除 UDCA-3S 外,DCA,isoLCA 等 21 种胆汁酸水平显著升高。这与先前的报道一致,高脂饮食会增加胆汁分泌从而增加肠道中的胆汁酸,更大的胆汁酸池充当信号分子刺激 G 蛋白偶联受体 5 (G protein-coupled receptor 5, TGR5) 的活性以增加机体的能量消耗^[14-15]。经毛茛菪乙醇提取物干预后,52 种粪



注:A:脱氧胆酸浓度;B:3β-脱氧胆酸浓度;C:胆酸浓度;D:异胆酸浓度;E:3-硫酸胆酸浓度;F:ω-鼠胆酸浓度;G:甘氨酸脱氧胆酸-3-O-β-葡萄糖醛酸浓度;H:23-脱氧胆酸浓度;I:鼠胆酸浓度;J:异熊去氧胆酸浓度;K:牛磺脱氧胆酸浓度;L:异脱氧胆酸浓度;M:牛磺鹅脱氧胆酸浓度;N:甘氨酸鹅脱氧胆酸浓度。

图 10 不同组之间的差异胆汁酸 (nmol/g, $n = 6$)

Note. A. Deoxycholic acid concentration. B. 3β-deoxycholic acid concentration. C. Lithocholic acid concentration. D. Isolithocholic acid concentration. E. 3-sulfate cholic acid concentration. F. ω-muricholic acid concentration. G. Glycoursodeoxycholic acid-3-O-β-glucuronide concentration. H. 23-Nor-deoxycholic acid concentration. I. Murideoxycholic acid concentration. J. Isooursodeoxycholic acid concentration. K. Taurohyodeoxycholic acid concentration. L. Isodeoxycholic acid concentration. M. Tauro-ursodeoxycholic acid concentration. N. Glycoursodeoxycholic acid concentration.

Figure 10 Differences between groups bile acids (nmol/g, $n = 6$)

便胆汁酸总含量显著回调,提示毛菊苣乙醇提取物 可改善胆汁酸代谢来调节脂质异常堆积。对初级、

次级、结合型和游离型胆汁酸水平进行分析发现,相较于正常组,模型组各类粪便胆汁酸水平均升高;相较于模型组毛菊苣乙醇提取物能显著降低粪便中初级胆汁酸和结合型胆汁酸水平,次级胆汁酸和游离性胆汁酸水平呈下降趋势。胆汁酸的主要生理作用是促进脂质的乳化和吸收,同时还作为信号分子激活体内两种主要的感受器:核受体 FXR 和细胞表面受体 G 蛋白偶联胆汁酸受体 1 (G protein-coupled bile acid receptor 1, GPBAR1)^[16]。因此胆汁酸是机体调节糖脂代谢相关复杂通路的关键因子,维持体内胆汁酸种类和水平的平衡对代谢性疾病至关重要。本研究中毛菊苣乙醇提取物还显著升高了粪便中次级/初级胆汁酸比值。相较于初级胆汁酸,次级胆汁酸因更低的溶解性而更难被重吸收,可导致机体更多的胆固醇排泄。研究表明,在高脂饮食喂养的小鼠肝脂肪变性中,伴随的次级胆汁酸及次级胆汁酸产生菌-乳酸杆菌科和钩端螺旋杆菌科的增加,有利于缓解代谢异常^[17]。柑橘总黄酮可通过增加小鼠拟杆菌科的相对丰度升高次级胆汁酸与初级胆汁酸的比例,显著减轻非酒精性脂肪肝小鼠的 FXR 和 TGR5 缺乏^[18]。本研究中粪便总胆汁酸和初级胆汁酸降低,而次级/初级胆汁酸比例增加,表明毛菊苣乙醇提取物可能通过增加次级胆汁酸产生菌丰度,促进了初级胆汁酸进入肠道后向次级胆汁酸转化的过程。

通过多元统计分析和差异胆汁酸筛选,鉴别出给药组相对于模型组的 8 种差异胆汁酸: LCA 和 23-norDCA 水平显著升高, DCA、3 β -DCA、isoLCA、CA-3S、 ω -MCA 和 GCDCA-3Gln 水平显著降低,其中多种胆汁酸被证明具有一系列的生物活性,可能在毛菊苣乙醇提取物调节脂质异常的过程中可能发挥着关键作用。如 DCA 和 LCA 都与肥胖相关疾病关系密切。DCA 水平与食欲调节和能量代谢相关酶,如胃肠激素、胰高血糖素样肽-1 等活性有关^[19]。先前研究表明高脂饮食喂养可增加大鼠血液,结肠和粪便中的 DCA 水平,高水平 DCA 会损伤肝星状细胞 DNA,并导致肥胖相关的肝细胞癌,而降低 DCA 水平可有效阻止肥胖小鼠的肝细胞癌进展^[20]。本研究结果中模型组粪便 DCA 水平显著增加,给予毛菊苣乙醇提取物会逆转这种现象。LCA 具有强疏水性而被认为具有肝毒性,但最近的研究表明,LCA 和 UDCA 混合物可通过激活 FXR 通路和修复肠道屏障完整性来降低高脂血症^[21-22]。本研

究中毛菊苣乙醇提取物升高了肥胖小鼠的粪便 LCA 含量,表明其可能促进肠道中 LCA 产生。鉴于这些差异胆汁酸的重要生物活性,本研究继续在 KEGG 数据库中检索了粪便差异胆汁酸参与的代谢通路,发现给药组相对于模型组的差异胆汁酸主要调节次级胆汁酸生物合成路径,进一步印证了毛菊苣乙醇提取物能促进肠道中初级胆汁酸向次级胆汁酸转化的推测。Spearman 相关性分析发现粪便中 DCA、isoDCA、3 β -DCA 和 ω -MCA 4 种胆汁酸与体重具有较强的正相关性,表明毛菊苣乙醇提取物发挥减重作用可能与降低差异胆汁酸水平作用密切相关。研究表明,DCA 在迟缓真杆菌和产气荚膜梭菌作用下,经 3 β 羟基差向异构化产生 isoDCA, DCA 转变为 isoDCA 有利于拟杆菌属生长,而拟杆菌属被证明在小鼠模型中能够起到预防肥胖的作用^[23-24]。 ω -MCA 由小鼠体内主要的初级胆汁酸 β -MCA 经 6 β -差向异构化形成。有文献表明给予西方饮食小鼠补充低聚果糖,可增加盲肠和门静脉中的次级胆汁酸水平(主要是 6 α -羟基胆汁酸,如 ω -MCA、HCA 和 HDCA),改善糖代谢、减少增重^[25]。3 β -DCA 则是 DCA 的 3 β 差向异构体。胆汁酸在肠道中的代谢与肠道菌群组成变化有关,因此推测毛菊苣乙醇提取物可能通过影响相关肠菌丰度来发挥减重作用。

综上所述,本研究通过代谢组学技术鉴别出 8 种差异粪便胆汁酸,主要涉及次级胆汁酸生物合成途径。毛菊苣可能通过调节次级胆汁酸生物合成,改变胆汁酸代谢轮廓,发挥减重和调控脂质代谢紊乱的作用,这为后续毛菊苣的药理机制研究提供可靠的理论基础。课题组未来将在本研究的基础上,结合血清样本的胆汁酸代谢组学研究,进一步探讨毛菊苣对肥胖小鼠肠道菌群的影响,阐明毛菊苣对次级胆汁酸生物合成的调控作用。

参 考 文 献 (References)

- [1] 新疆部队后勤部卫生部. 新疆中草药手册 [M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社; 1970.
Xinjiang Army Logistics Department Health Department. Xinjiang herbal medicine manual [M]. Urumqi: Xinjiang People's Publishing House; 1970.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
National Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia [M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press; 2020.
- [3] PEROVIĆ J, ŠAPONJAC V T, KOJIĆ J, et al. Chicory

- (*Cichorium intybus* L.) as a food ingredient-nutritional composition, bioactivity, safety, and health claims: a review [J]. Food Chem, 2021, 336: 127676.
- [4] YANG J, LEI Y, YAN J, et al. Research progress on the homologous effects of *Cichorium glandulosum* boiss. et huet on medicine and food: a review [J]. Nat Prod Commun, 2024, 19(4): 1–19.
- [5] YAN J, ZHANG R, KANG J, et al. Effect of *Cichorium glandulosum* on intestinal microbiota and bile acid metabolism in db/db mice [J]. Food Sci Nutr, 2023, 11(12): 7765–7778.
- [6] BATHENA S P, THAKARE R, GAUTAM N, et al. Urinary bile acids as biomarkers for liver diseases I. Stability of the baseline profile in healthy subjects [J]. Toxicol Sci, 2015, 143(2): 296–307.
- [7] LI R, ANDREU-SÁNCHEZ S, KUIPERS F, et al. Gut microbiome and bile acids in obesity-related diseases [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2021, 35(3): 101493.
- [8] MOLINARO A, WAHLSTRÖM A, MARSCHALL H U. Role of bile acids in metabolic control [J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29(1): 31–41.
- [9] 赵辉. 基于 UPLC-HDMS 的代谢组学研究茯苓和茯苓皮抗高脂血症大鼠的生物化学作用机制 [D]. 西安: 西北大学; 2020.
- ZHAO H. Metabonomics study based on UPLC-HDMS on the biochemical mechanism of *Poria cocos* and *Poria cocos* peel against hyperlipidemia in rats [D]. Xi'an: Northwest University; 2020.
- [10] JI Y, LUO K, ZHANG J M, et al. Obese rats intervened with *Rhizoma coptidis* revealed differential gene expression and microbiota by serum metabolomics [J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21(1): 208.
- [11] YEREVANIAN A, SOUKAS A A. Metformin: mechanisms in human obesity and weight loss [J]. Curr Obes Rep, 2019, 8(2): 156–164.
- [12] ZHANG Y, CHENG Y, LIU J, et al. Tauroursodeoxycholic acid functions as a critical effector mediating insulin sensitization of metformin in obese mice [J]. Redox Biol, 2022, 57: 102481.
- [13] SUN L, XIE C, WANG G, et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin [J]. Nat Med, 2018, 24(12): 1919–1929.
- [14] DI CIAULA A, GARRUTI G, LUNARDI BACCETTO R, et al. Bile acid physiology [J]. Ann Hepatol, 2017, 16(105): S4-S14.
- [15] WATANABE M, HORAI Y, HOUTEN S M, et al. Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure [J]. J Biol Chem, 2011, 286(30): 26913–26920.
- [16] RIDLON J M, HARRIS S C, BHOWMIK S, et al. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria [J]. Gut Microbes, 2016, 7(1): 22–39.
- [17] ZENG H, LARSON K J, CHENG W H, et al. Advanced liver steatosis accompanies an increase in hepatic inflammation, colonic, secondary bile acids and lactobacillaceae/lachnospiraceae bacteria in C57BL/6 mice fed a high-fat diet [J]. J Nutr Biochem, 2020, 78: 108336.
- [18] HE B, JIANG J, SHI Z, et al. Pure total flavonoids from *Citrus* attenuate non-alcoholic steatohepatitis via regulating the gut microbiota and bile acid metabolism in mice [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 135: 111183.
- [19] ROBERTS R E, GLICKSMAN C, ALAGHBAND-ZADEH J, et al. The relationship between postprandial bile acid concentration, GLP-1, PYY and ghrelin [J]. Clin Endocrinol, 2011, 74(1): 67–72.
- [20] LIN H, AN Y, TANG H, et al. Alterations of bile acids and gut microbiota in obesity induced by high fat diet in rat model [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(13): 3624–3632.
- [21] HAN Z, YAO L, ZHONG Y, et al. Gut microbiota mediates the effects of curcumin on enhancing Ucp1-dependent thermogenesis and improving high-fat diet-induced obesity [J]. Food Funct, 2021, 12(14): 6558–6575.
- [22] HUI S, HUANG L, WANG X, et al. Capsaicin improves glucose homeostasis by enhancing glucagon-like peptide-1 secretion through the regulation of bile acid metabolism via the remodeling of the gut microbiota in male mice [J]. FASEB J, 2020, 34(6): 8558–8573.
- [23] DEVLIN A S, FISCHBACH M A. A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids [J]. Nat Chem Biol, 2015, 11: 685–690.
- [24] WU L, PARK S H, KIM H. Direct and indirect evidence of effects of *Bacteroides* spp. on obesity and inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2023, 25(1): 438.
- [25] MAKKI K, BROLIN H, PETERSEN N, et al. 6 α -hydroxylated bile acids mediate TGR5 signalling to improve glucose metabolism upon dietary fiber supplementation in mice [J]. Gut, 2023, 72(2): 314–324.

[收稿日期] 2023-12-20

唐会猛,宋庆华,谢云云,等. 单双次气管内滴注博来霉素诱导肺纤维化大鼠模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1139-1148.

TANG H M, SONG Q H, XIE Y Y, et al. Comparison of rat models of pulmonary fibrosis induced by one or two intratracheal bleomycin instillation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1139-1148.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.005

单双次气管内滴注博来霉素诱导肺纤维化大鼠模型的比较

唐会猛^{1,2}, 宋庆华³, 谢云云^{1,2}, 孙鑫^{1,2}, 杨帆^{1,2}, 杨曙光¹, 田燕歌^{3*}

(1. 河南中医药大学第一附属医院呼吸科, 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450046; 3. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南省中医药防治呼吸病重点实验室, 郑州 450046)

【摘要】 目的 采用单次及两次气管内滴注博来霉素 (bleomycin, BLM) 构建肺纤维化大鼠模型, 比较 2 种造模方式的成模率及稳定性。**方法** 150 只 SPF 级 SD 大鼠随机分成空白对照组 (Control 组)、单次气管内滴注博来霉素组 (BLM-S 组)、两次气管内滴注博来霉素组 (BLM-M 组)。BLM-S 组第 1 天采用无创气管内滴注 BLM (3 mg/kg, 单次) 诱导; BLM-M 组第 1、14 天分别气管内滴注 BLM (3、2 mg/kg) 诱导, Control 组采用无创气管内滴注 0.9% 氯化钠注射液 (1 mL/kg); 于造模后第 28、42、56、84 天分批取材。检测大鼠深吸气量 (inspiratory capacity, IC)、肺活量 (vital capacity, VC)、静态肺顺应性 (static compliance of lung, Cchord) 及动态肺顺应性 (dynamic lung complication, Cdyn); 观察大鼠肺组织病理变化, 并对肺泡炎及纤维化程度进行评分; 采用免疫组化检测大鼠肺组织Ⅲ型胶原蛋白 (collagen-Ⅲ, COL-Ⅲ) 表达。**结果** (1) 一般状态及生存情况: Control 组、BLM-S 组和 BLM-M 组生存率分别为: 100%、80%、66%。第 14 ~ 42 天, BLM-S 组与 BLM-M 组大鼠体重显著低于 Control 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第 28 ~ 42 天, BLM-M 组体重显著低于 Control 组、BLM-S 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 (2) 肺功能: 与 Control 组比较, 第 28 天 BLM-S 组肺功能 IC、VC、Cchord、Cdyn 均显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), BLM-M 组 IC、VC、Cchord 显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 第 42 天 BLM-S 组大鼠 IC、VC、Cchord 显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 第 42 ~ 84 天 BLM-M 组大鼠 IC、VC、Cchord 明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 (3) 肺病理: 第 28 ~ 84 天, BLM-S 组大鼠出现炎性浸润及纤维条索后逐渐减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); BLM-M 组大鼠出现纤维化及肺泡炎后较为稳定 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 (4) 胶原沉积: 各时间点 BLM-S 组、BLM-M 组大鼠肺组织内 COL-Ⅲ 表达显著高于 Control 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 第 42 ~ 84 天 BLM-S 组 COL-Ⅲ 含量显著低于 28 d ($P < 0.05$)。**结论** 2 种造模方式均可成功建立肺纤维化模型, 其中单次法操作简便, 大鼠死亡率更低, 28 d 时纤维化程度明显, 但在 42 d 之后会逐渐恢复; 两次法造模成功率更高, 模型稳定性更好, 至 84 d 仍有超半数大鼠存在明显纤维化。

【关键词】 肺纤维化; 动物模型; 博来霉素; 单次及两次给药

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1139-10

Comparison of rat models of pulmonary fibrosis induced by one or two intratracheal bleomycin instillations

TANG Huimeng^{1,2}, SONG Qinghua³, XIE Yunyun^{1,2}, SUN Xin^{1,2}, YANG Fan^{1,2},
YANG Shuguang¹, TIAN Yange^{3*}

【基金项目】 河南省科技研发计划联合基金 (优势学科培育类) 项目 (232301420020), 国家自然科学基金项目 (82305138)。

Funded by the Scientific and Technological Research and Development Plan of Henan Province (Cultivation of Dominant Disciplines) (232301420020), National Natural Science Foundation of China (82305138).

【作者简介】 唐会猛, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治呼吸系统相关疾病。Email: 2252422689@qq.com

【通信作者】 田燕歌, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中医药防治呼吸病。Email: yange0910@126.com

- (1. Respiratory Department of the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;
2. the First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;
3. 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)
- Corresponding author: TIAN Yange. E-mail: yange0910@126.com

【Abstract】 Objective A rat model of pulmonary fibrosis was constructed using a single or two intratracheal drops of bleomycin (BLM) and the modeling rate and stability of the two modeling modalities were compared. **Methods** A total of 150 specific pathogen-free SD rats were divided randomly into blank control (control), single intratracheal drop of bleomycin (BLM-S), and two intratracheal drops of bleomycin (BLM-M) groups. Rats in the BLM-S group received a single dose of 3 mg/kg BLM by noninvasive intratracheal instillation, and rats in BLM-M group received 3 mg/kg BLM on day 1 and BLM 2 mg/kg on day 14. Rats in the control group were given intratracheal instillation of 0.9% sodium chloride (1 mL/kg). The rats were euthanized on days 28, 42, 56, and 84 after modelling, respectively. Deep inspiratory capacity (IC), vital capacity (VC), static lung compliance (Cchord), and dynamic lung complication (Cdyn) were measured in all rats. Pathological changes in lung tissue were observed, and the extent of alveolitis and fibrosis was graded. Collagen-III (COL-III) expression in rat lung tissue was detected by immunohistochemistry. **Results** (1) The survival rates in the control, BLM-S, and BLM-M groups were 100%, 80%, and 66%, respectively. Rats in the BLM-S and BLM-M groups had significantly lower body weights on days 14 ~ 42 compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and rats in the BLM-M group had significantly lower body weight on days 28 ~ 42 than rats in the control and BLM-S groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (2) Regarding lung function, IC, VC, Cchord, and Cdyn were all markedly decreased in the BLM-S group compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and IC, VC, and Cchord were significantly decreased in the BLM-M group ($P < 0.05$, $P < 0.01$) on day 28. IC, VC, and Cchord were significantly decreased in rats in the BLM-S group on day 42 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and were also significantly decreased in rats in the BLM-M group on days 42 ~ 84 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (3) In terms of lung pathology, inflammatory infiltration and fibrous cords appeared in the BLM-S group from days 28 ~ 84 and then gradually decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while fibrosis and alveolitis were relatively stable in the BLM-M group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (4) COL-III expression levels in lung tissue were significantly higher in rats in the BLM-S and BLM-M groups compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the COL-III content in the BLM-S group was significantly lower at 42 ~ 84 days than at 28 days ($P < 0.05$). **Conclusions** Both method are capable of effectively creating pulmonary fibrosis models. The single-dose approach is straightforward, has a lower death rate, and the degree of fibrosis is clearly visible by day 28, but progressively recovers after 42 days. In contrast, the two-dose instillation model has a greater success rate and better stability, with over half the rats still exhibiting visible fibrosis on day 84.

【Keywords】 pulmonary fibrosis; animal model; bleomycin; single administration, double administration

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

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性进行性的呼吸系统疾病,其特征是肺组织不可逆的瘢痕、纤维病灶形成^[1-2],临床上主要表现为不明原因的干咳、气喘、不断加重的呼吸困难,预后较差^[3-4]。IPF 严重危害公共身心健康,其发病率、病死率逐年升高^[5],中位生存期短至 3 ~ 5 年^[6],5 年生存率甚至不足 50%^[7]。近年来中西医结合抗纤维化治疗 IPF 取得了一些进展,然而 IPF 发病机制并未明确,截止目前,除肺移植外,仍无一种彻底根治 IPF 的方法^[8]。

IPF 机制不明,限制了有效防治的研究。稳定的、符合临床病理特征的动物模型是探索 IPF 发病机制、寻求有效治疗药物的关键。目前,反映 IPF 病

理特征的动物模型主要有细胞因子过表达法^[9]、药物法^[10]、毒物诱导法^[11]、环境诱导法^[12]等多种造模方法,各种造模方法各有利弊,造模效果不一,与临床上 IPF 患者的特征相比,仍有差异^[13-14]。其中,以气管内滴注博来霉素诱导的肺纤维化模型最为常见^[15]。但滴注方式、频次、剂量等方面尚未形成统一的标准,本研究以 SD 大鼠为研究对象,通过气管内滴注 BLM 造模,对比单次及两次给药诱导大鼠肺纤维化的成模率、稳定性和生存率等指标,为进一步研究提供模型依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

150 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重(200 ± 20)g,6 ~ 8 周龄,购自北京斯贝福生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。实验全程均在河南中医药大学动物实验室【SYXK(豫)2020-0004】饲养。饲养环境舒适,饲养温度控制在(22 ± 3)℃,相对湿度 40% ~ 60%,实验室环境保持安静,昼夜各半循环交替照明。大鼠自由进食标准饲料,饮用纯净水,所有实验操作均符合河南中医药大学实验动物伦理委员会审查标准(DWLL202203014)。

1.1.2 主要试剂与仪器

注射用盐酸博来霉素(BLM,每瓶 15 mg,产品批号:Y20801)购自日本株式会社;苏木素-伊红(HE)染色剂试剂盒(产品批号:C220901)、Masson 染色剂试剂盒(产品批号:C221201)购自珠海贝索生物技术有限公司;兔 IgG 免疫组化试剂盒 SABC 即用型(产品批号:SA1022-1KIT)购自博士德生物工程公司;COL-Ⅲ 抗体(货号:AF01336)购自 Affinity 公司。

Mill Q Synthesls 型超净纯水仪(Millipore, USA);PFT 动物肺功能检测系统(Buxco, USA);3DHISTECH 病理切片扫描仪(丹吉尔,中国);Histcore Autocut 全自动切片机(Leica, Germany);高速离心机(Eppendorf, Germany);DM6000B 光学显微镜(Leica, Germany)。

1.2 方法

1.2.1 分组及动物模型制备

150 只大鼠购回后适应性喂养 5 d。将所有大鼠随机分为空白对照组(Control 组)、单次气管内滴注博来霉素组(BLM-S 组)、两次气管内滴注博来霉素组(BLM-M 组),每组各 50 只。造模前采用腹腔注射 0.1% 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉大鼠,经气管内滴注博来霉素制备肺纤维化大鼠模型^[16]。具体操作方法:采用 1 mL 注射器抽取 BLM 备用,将大鼠麻醉后仰面固定于鼠板上。将白色冷光源垂直照射于大鼠咽喉部,一手提起大鼠舌头,另一手持气管插管。伴随大鼠呼吸,待咽喉部白色亮点出现时,迅速插入气管插管,拔出针芯。堵住大鼠口鼻,把棉球薄片放于针口,此时棉球薄片随大鼠呼吸前后摆动。再将 1 mL 注射器向上倾斜约 60°,推注 BLM 悬液,立即打入 0.5 mL 空气,随后直立旋转大鼠,使 BLM 均匀分布于大鼠肺部。Control 组分别于造模第 1、14 天气管内滴注 0.1 mL/100 g 0.9%生理

盐水。BLM-S 组分别于造模第 1 天气管内滴注 3 mg/kg 博来霉素,第 14 天气管内滴注 0.1 mL/100 g 0.9%生理盐水。BLM-M 组分别于实验第 1、14 天气管内滴注 3、2 mg/kg 博来霉素。

1.2.2 一般状态及死亡情况

大鼠进驻动物房后,详细观察记录各组大鼠精神状态、饮食和二便、毛发、体重增长变化等情况。实验期间监测大鼠的死亡情况,分析记录大鼠可能的死亡原因。

1.2.3 样本采集及处理

分别于造模第 28、42、56、84 天 4 个时间点取材,取材前 12 h 内禁水禁食。大鼠麻醉后,暴露胸腔,分离肺组织,拍照记录肺外观,称量肺湿重。切分肺组织,左肺用 4%多聚甲醛溶液灌注 20 min 后置于组织固定液中固定备用。

1.2.4 肺系数测定

计算各大鼠肺系数:大鼠肺系数 = 肺湿重(g)/处死前体重(kg) × 100%。

1.2.5 肺功能检测

造模 28、42、56、84 d,大鼠麻醉后,剪开颈部皮肤,钝性分离皮下肌肉组织,充分暴露大鼠气管,在气管上部剪一“T”字形切口,将气管插管带有金属的一端插入大鼠气管,结扎固定,另一端与 PFT 肺功能检测系统连接。待大鼠呼吸相对平稳后检测大鼠的深吸气量(inspiratory capacity, IC)、肺活量(vital capacity, VC)、静态肺顺应性(static compliance of lung, Cchord)、动态肺顺应性(dynamic lung complication, Cdyn)等指标。

1.2.6 肺组织病理观察

大鼠左肺固定 72 h 后,在近肺门处横切厚度约 3 mm 的组织,常规脱水,石蜡包埋,使用 Histcore Autocut 全自动切片机切片(厚度统一为 4 μm),脱蜡,水化后分别行 HE、Masson 染色,染色后,晾干封片。借助病理切片扫描仪,在镜下观察左肺组织病理形态变化和胶原纤维沉积情况。分别以 SZAPIEL 等^[17]和 ASHCROFT 等^[18]的评分方法为参考标准,2 人互盲评定肺泡炎和纤维化程度,当评分区别较大时借助第 3 人评分后讨论,确保无异议再确定最终分数。根据 Ashcroft 纤维化最终评分情况,将纤维化严重程度划分为轻度(0 ~ 2 分)、中度(3 ~ 6 分)、重度(7 ~ 8 分),比较各组不同时间点纤维化情况。

1.2.7 肺组织胶原蛋白表达检测

采用免疫组化法检测大鼠肺组织中 COL-Ⅲ 的表达。大鼠肺组织包埋脱蜡,经抗原修复、滴加抗体等步骤后显色、复染脱水、封片。利用 3DHISTECH 病理切片扫描仪扫描玻片,在软件 Slide Viewer2.6 中截片,每张切片截取 8 ~ 10 个视野,截取的每个视野不重叠。借助 Image-Pro Plus 6.0 软件计算每个视野下的 COL-Ⅲ 的积分光密度的平均值(integrated optical density, IOD)。

1.3 统计学分析

利用软件 SPSS 26.0 进行统计学分析,实验结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析评估组间差异,若方差齐选用最小显著差法(least significant difference, LSD),若不齐则采用 Dunnett's T3 法。并借助 Graph Pad Prism 8.0 将分析后的实验数据做可视化升级。以 $\alpha = 0.05$ 为显著性标准,且当 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状态及死亡情况比较

2.1.1 一般状态

造模前各组大鼠一般状态良好。造模后,Control 组大鼠较活跃,喜跑动、毛发白亮有光泽、饮食佳、呼吸平稳;BLM-S 组、BLM-M 组大鼠呼吸急促,喜静、喜卧、毛发一般、精神萎靡,饮食少。BLM-M 组第 2 次造模后精神较差,毛发晦暗枯槁、不思饮食、常卧、不喜跑动,与 Control 组相比、BLM-S 组生命状态差。如图 1A 所示,Control 组大鼠体重随时间逐渐增长,BLM-S 组第 14 天体重较 Control 组显

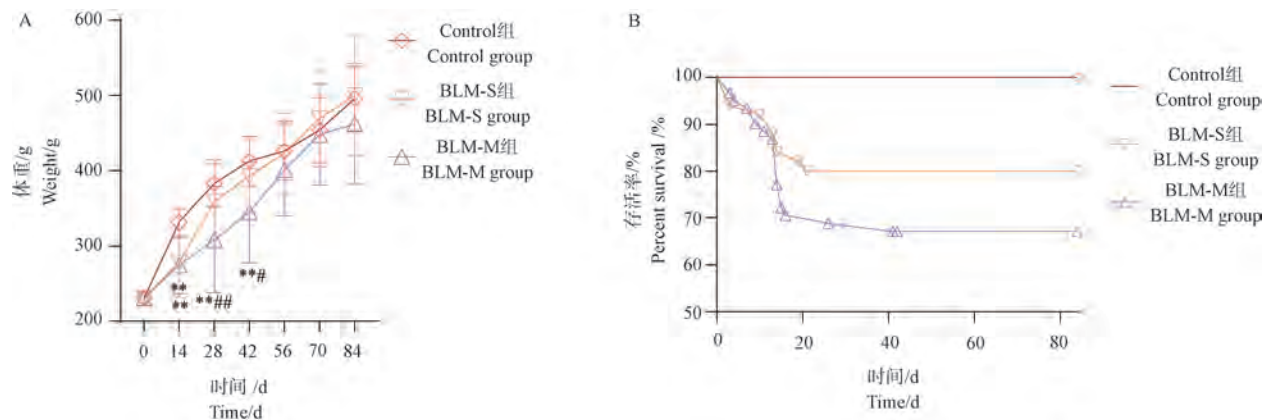
著降低($P < 0.01$),但 28 ~ 42 d 后虽然体重随时间也逐渐增长,但仍低于 Control 组($P < 0.05$),56 d 后体重基本与 Control 组一致。与 Control 组相比,BLM-M 组第 14 天体重显著下降($P < 0.01$),持续到第 42 天($P < 0.01$),56 d 后体重增长明显,但仍低于 Control 组($P > 0.05$),无统计学意义。与 BLM-S 组比较,BLM-M 组第 28、42 天显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.1.2 死亡情况

Control 组大鼠生命体征较平稳,未见死亡。造模后,模型组大鼠生命状态不平稳,死亡大鼠鼻部、眼部有明显黑色分泌物,腹部胀大,解剖后可见肺部有大量瘀血,部分大鼠胃肠胀气。大鼠死亡原因包括:气管插管滴注 BLM 后大鼠呼吸急促,鼻部、口部有药物及痰液溢出,考虑造模操作不当;麻醉大鼠苏醒后,大鼠死亡,解剖后可见肺部有大量淤血、瘀痕组织形成,考虑 BLM 细胞毒性较大,大鼠不耐受,感染后死亡。如图 1B 所示,最终 Control 组、BLM-S 组、BLM-M 组大鼠存活率分别为 100%、80%、66%。

2.2 肺外观及肺系数情况

肺外观如图 2A 所示:Control 组大鼠肺组织光滑柔软,颜色红润,结构正常;BLM-S 组、BLM-M 组大鼠肺结构紊乱,颜色晦暗,表面凹凸不平,可见大小不一的瘀点瘀斑,部分有灰黑色囊肿,质地较硬。与 BLM-S 组比较,BLM-M 组大鼠肺部纤维病灶面积更大,肺结构损伤更严重。随时间增加,BLM-S 组大鼠纤维病灶有所恢复,BLM-M 组大鼠肺纤维化程度未见明显消退。



注:与 Control 组相比, ** $P < 0.01$; 与 BLM-S 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下图/表同)

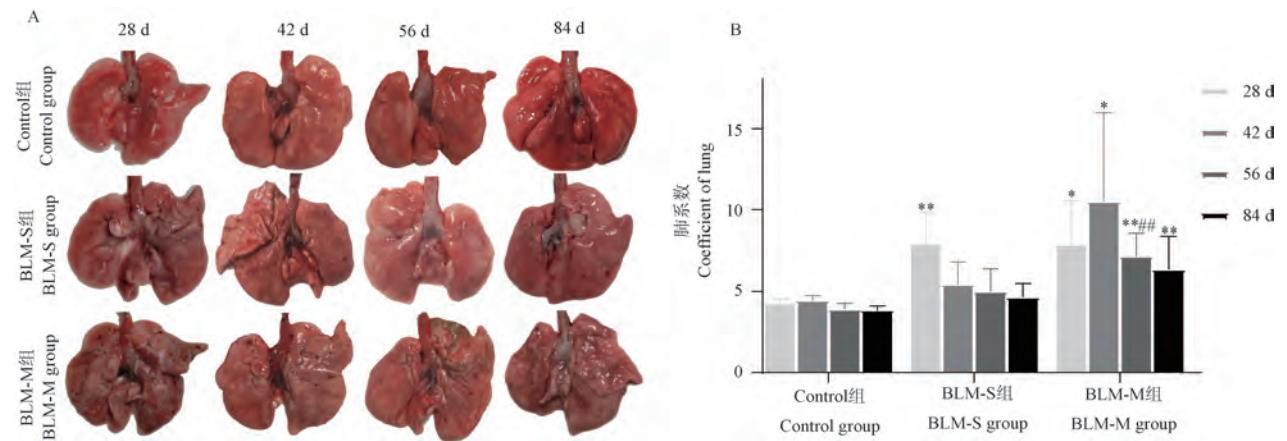
图 1 大鼠体重变化情况及存活率($n \geq 8$)

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with BLM-S group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Plot of changes in body weight and survival rate of rats($n \geq 8$)

肺系数结果如图 2B 所示,与 Control 组相比, BLM-S 组在不同时间点的肺系数均升高,其中在第 28 天时升高最为显著($P < 0.01$),随后随时间逐渐递减。与 BLM-M 组相比, BLM-S 组肺系数较低,但

无统计学意义。与 Control 组对比, BLM-M 组肺系数在第 28 ~ 84 天均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),且在第 42 天时达到高峰,此后随时间的增加,肺系数逐渐减低。



注:与 Control 组相比, * $P < 0.05$ 。(下图/表同)
图 2 不同时间点大鼠肺组织形态及肺系数情况($n = 8 \sim 10$)
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

Figure 2 Lung tissue morphology and Situation of rat lung coefficients of rats at different time points($n = 8 \sim 10$)

2.3 肺功能

造模 28 d,与 Control 组相比, BLM-S 组 IC、VC、Cchord、Cdyn 显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), BLM-M 组 IC、VC、Cchord 显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), Cdyn 明显下降,但无统计学意义。造模 42 d,与 Control 组相比, BLM-S 组、BLM-M 组 IC、VC、Cchord 显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$); BLM-M 组 IC、VC、Cchord 下降较 BLM-S 组显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。造模 56 d,与 Control 组相比, BLM-M 组

VC、Cchord 显著降低($P < 0.05$), BLM-S 组 IC、VC、Cchord、Cdyn 均降低,但无统计学意义。造模 84 d,与 Control 组相比, BLM-M 组 IC、VC、Cchord 显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), BLM-S 组 IC、VC、Cchord、Cdyn 均降低,但无统计学意义。随着时间的增加, Control 组、BLM-S 组 IC、VC、Cchord、Cdyn 逐渐增加,但无统计学意义。BLM-M 组第 28、42 天 IC、VC、Cchord、Cdyn 降低显著,后逐渐增长,但仍低于 Control 组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点肺功能比较($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 10$)

Table 1 Comparison of pulmonary function at different time points in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 10$)					
组别 Groups	时间/ d Time/d	IC/mL	VC/mL	Cchord/ (mL/cmH ₂ O)	Cdyn/(mL/cmH ₂ O)
Control 组 Control group	28	11.35 ± 0.96	13.86 ± 0.77	0.61 ± 0.10	0.25 ± 0.02
	42	14.67 ± 1.34	16.68 ± 1.38	0.86 ± 0.14	0.41 ± 0.31
	56	15.48 ± 1.28	17.27 ± 1.88	1.02 ± 0.15	0.64 ± 0.12
	84	19.18 ± 0.89	21.07 ± 1.16	1.25 ± 0.13	0.81 ± 0.29
BLM-S 组 BLM-S group	28	8.25 ± 2.02 *	10.72 ± 1.86 *	0.32 ± 0.11 **	0.18 ± 0.02 **
	42	11.99 ± 2.17 *	14.03 ± 2.32 *	0.69 ± 0.20 *	0.30 ± 0.14
	56	14.82 ± 2.38	16.03 ± 1.94	0.90 ± 0.30	0.63 ± 0.09
	84	17.3 ± 2.03	19.05 ± 2.19	0.99 ± 0.17	0.70 ± 0.55
BLM-M 组 BLM-M group	28	8.22 ± 2.21 **	10.28 ± 3.35 *	0.34 ± 0.19 **	0.19 ± 0.06
	42	8.40 ± 2.78 ***	10.16 ± 3.29 ***	0.35 ± 0.12 **	0.20 ± 0.07
	56	11.86 ± 2.24	13.64 ± 2.77 *	0.72 ± 0.20 *	0.50 ± 0.08
	84	14.79 ± 4.75 *	16.94 ± 5.06 *	0.71 ± 0.33 **	0.51 ± 0.17

2.4 大鼠肺组织病理变化情况

2.4.1 HE 染色及肺泡炎评分

HE 结果如图 3A 所示: Control 组大鼠肺组织完整,肺结构清晰,肺泡内未见炎性细胞浸润,无充血

无水肿。与 Control 组比较, BLM-M 组、BLM-S 组大鼠肺组织结构均有不同程度的紊乱, 肺泡壁明显增厚可见塌陷, 肺泡腔内有大量细胞聚集, 出现炎性浸润, BLM-M 组更为显著。随着时间的增加, BLM-S 组病理改变有所恢复。肺泡炎评分结果如图 3B 所示: 造模 28 d, 与 Control 组比较, BLM-S 组、BLM-M 组肺泡炎评分显著升高($P < 0.01$); 造模 42 d, 与

Control 组比较, BLM-S 组、BLM-M 组肺泡炎评分显著升高($P < 0.05$); 造模 56、84 d, 与 Control 组比较, BLM-S 组肺泡炎程度升高, 但无统计学意义, BLM-M 组肺泡炎评分显著升高($P < 0.01$)。42 d 后, BLM-S 组肺泡炎评分有所恢复, BLM-M 组第 42 天肺泡炎评分达到高峰, 至第 84 天仍处于较高水平。

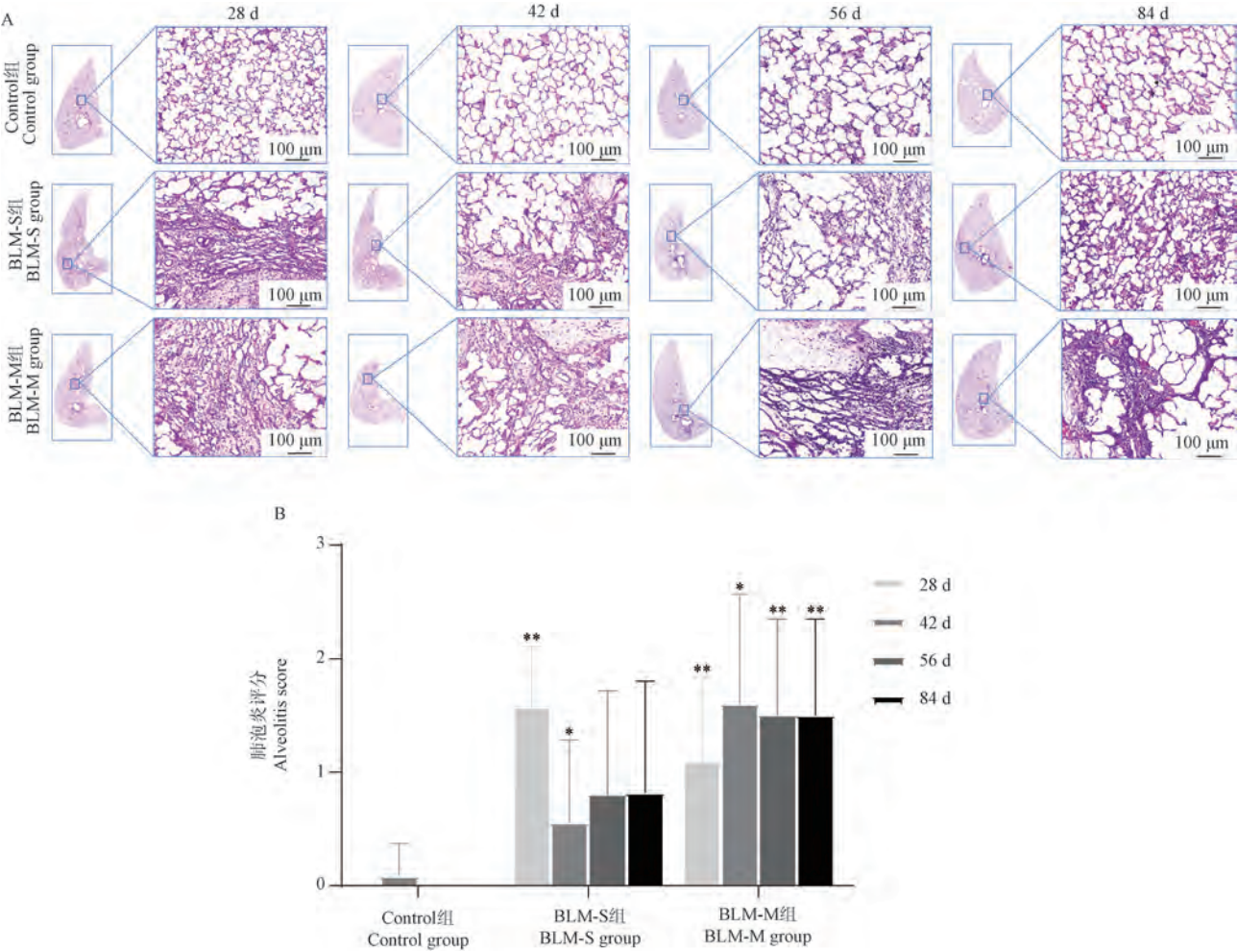


图 3 不同时间点大鼠 HE 染色及肺泡炎评分情况($n = 7 \sim 12$)

Figure 3 HE staining of rats and alveolitis scores at different time points($n = 7 \sim 12$)

2.4.2 Masson 染色及纤维化评分情况

Masson 染色结果如图 4A 所示: Control 组大鼠肺组织完整, 肺结构清晰, 肺泡壁无增厚、无塌陷, 肺间隔内仅存在少量纤维。与 Control 组比较, BLM-M 组、BLM-S 组大鼠肺组织结构损坏, 肺泡壁明显增厚, 气道周围和肺间隔可见交错分布的纤维条索和瘢痕组织, 胶原沉积明显。与 BLM-S 组比较, BLM-M 组纤维条索与瘢痕组织更为明显, 病变面积更大。纤维化评分结果如图 4B 所示: 与

Control 组比较, BLM-S 组第 28 ~ 56 天纤维化评分显著升高($P < 0.01$), BLM-M 组第 28 ~ 84 天纤维化评分显著升高($P < 0.01$)。BLM-M 组纤维化评分高于 BLM-S 组, 但组间无显著性差异。BLM-S 组纤维化评分第 28 天后随时间延长有所降低, BLM-M 组第 42 天的纤维化评分达到高峰, 56 d 后有所降低, 但仍高于 Control 组($P < 0.01$)。

纤维化评分不同分数段占比统计结果如图 4C, 4D 所示: 造模 28 d, BLM-S 组均集中在中度 3 ~ 6

分段, BLM-M 组轻、中、重度纤维化占比分别为 33%、56%、11%。造模 42 d, BLM-S 组中度纤维化占比降低至 60%, 轻、重度纤维化占比较低, 分别为 30%、10%; BLM-M 组纤维化中、重度占比较 28 d 有所升高, 分别占 60%、30%。造模 56 d, BLM-S 组纤维化轻、中、重度比例分别为 40%、50%、10%; BLM-

M 组纤维化轻、中度纤维化分别为 33%、67%。造模 84 d, BLM-S 组轻度纤维化比例最高为 64%, 中度为 36%, 未见重度纤维化; BLM-M 组轻、中、重度纤维化均有分布, 但以中度为主占 50%, 轻、重度纤维化分数段分别占 40%、10%。

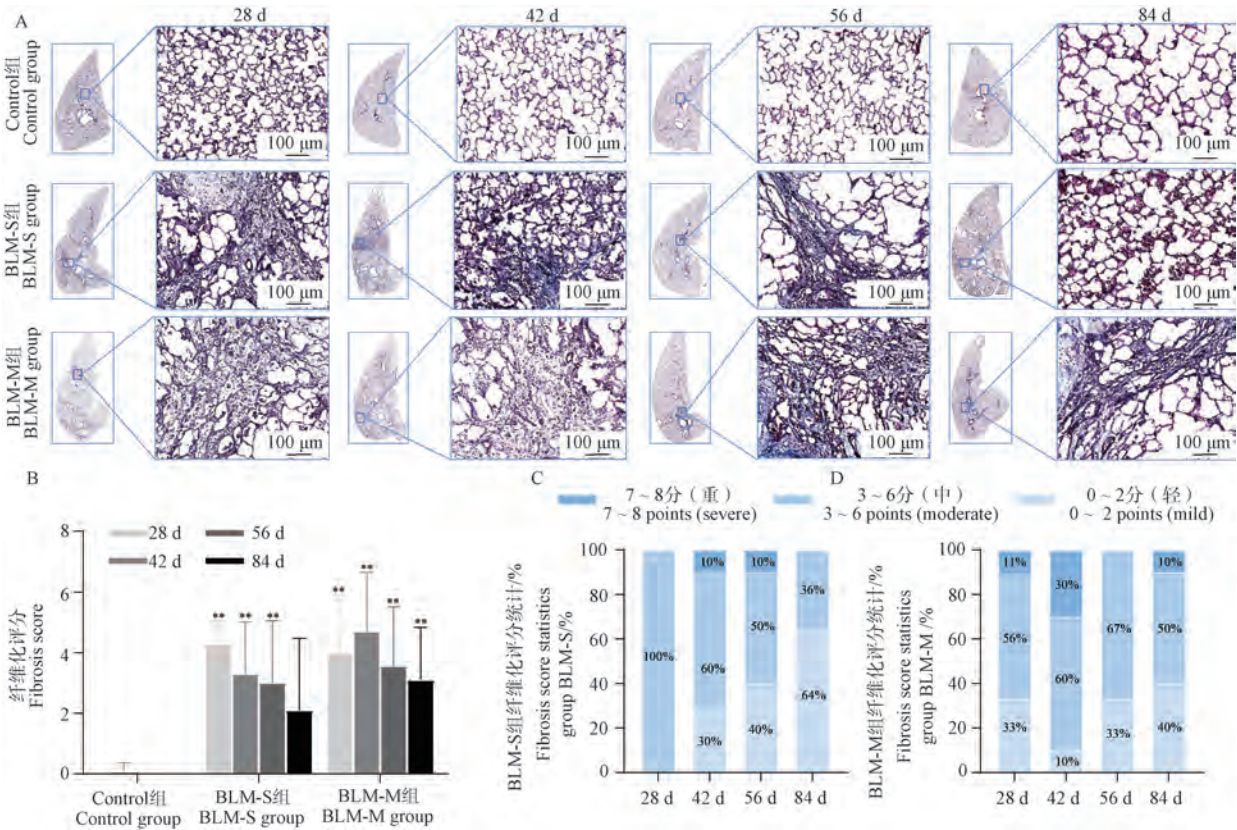


图 4 不同时间点 Masson 染色及纤维化评分情况($n = 7 \sim 12$)

Figure 4 Masson staining and fibrosis scores at different time points($n = 7 \sim 12$)

2.5 各组大鼠肺组织 COL-III 沉积情况

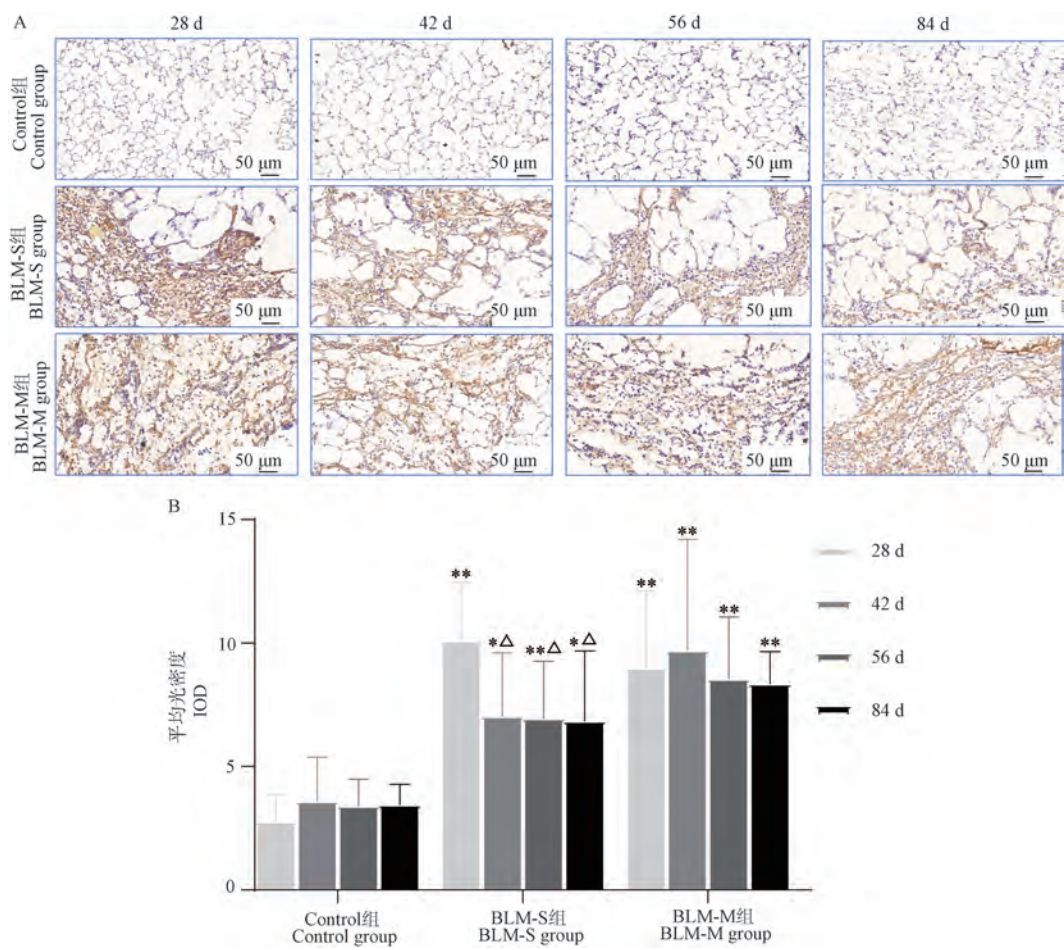
免疫组化结果显示(见图 5):COL-III 主要分布在肺间质、气管、支气管和大血管周围。Control 组 COL-III 的含量较低,仅在气管、支气管周围有少许分布。模型组 COL-III 分布较为广泛,在肺间质和大气管周围尤其突出。第 28 ~ 84 天,与 Control 组相比,BLM-S 组、BLM-M 组的 IOD 值更高,差异具有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。造模 28 d,与 BLM-S 组比较,BLM-M 组 IOD 值较小,但无统计学意义。造模 42 d,与 BLM-S 组比较,BLM-M 组 IOD 值升高,但无统计学意义。造模 28 d,BLM-S 组 COL-III 含量达到了高峰,随后随时间的延长,胶原含量呈逐渐递减的趋势($P < 0.01$)。造模 42 d,BLM-M 组 COL-III 含量达到了高峰,但并未随时间的延长,出

现递减的趋势,COL-III 的水平较为稳定,可持续至第 84 天。

3 讨论

IPF 是一种多发于 60 岁以上老年男性的间质性肺部疾病,其病理基础主要是胶原纤维过度堆积和细胞外基质弥漫性的异常分布^[19],患者常表现为进行性加重的呼吸困难,最终因呼吸衰竭而死亡^[20]。IPF 异质性较大,治疗措施有限,发病机制尚未明确,亟需开展新的机制研究。

动物模型是深入研究疾病机制,开发新药的前提,优化动物模型对攻克 IPF 具有重要意义。不同的动物类型诱导的肺纤维化模型不尽相同,目前使用较多的动物主要有:鼠^[21]、兔^[22]、狗^[23]等,其中



注:与 28 d 相比, $\Delta P < 0.05$

图 5 大鼠肺组织不同时间点 COL-III 表达情况

Note. Compared with 28 days, $\Delta P < 0.05$

Figure 5 Expression of COL-III in rat lung tissue at different time points

鼠类价格便宜、个体差异性较小是最为常用的物种。研究证实,包括 BLM、二氧化硅、辐射等多种因素均可诱导动物肺纤维化。BLM 诱导的动物模型与人类肺纤维化的典型特征较为相近,是目前应用最为广泛的一种诱导剂。BLM 致使动物肺纤维化的方式主要有:气管内滴注、雾化鼻吸入、腹腔注射、尾静脉注射等。大量研究表明,给予动物不同频次、不同剂量的 BLM 均可导致动物不同程度的肺纤维化。目前报道的 BLM 诱导大鼠肺纤维化造模方式有:一次性滴注 3.5 U/kg^[24]、3^[25]、5^[26] mg/kg BLM,2 次滴注 5 mg/kg BLM^[27] 等。其中一次性气管内滴注 BLM 方便操作、易于重复、价格便宜。但有研究报道一次性无创性气管内滴注 BLM 造模成功率较低,且模型不稳定,模型可持续时间仅为 21 d^[28]。两次造模法诱导动物肺纤维化,模型稳定,造模成功率较高,弥补了操作技术造成的 BLM 未进入

动物气管的缺陷,模型更加稳定,肺纤维化可持续时间长。但两次气管内滴注法较单次法操作复杂、价格昂贵,对动物造成了 2 次伤害。目前,虽然有部分研究对单多次气管内滴注 BLM 诱导大鼠肺纤维化这一造模方法进行了探索,但多数研究集中于比较模型的成功率和动物的死亡率,却未动态观察动物的自愈性^[29],忽视了模型的稳定性和可持续性,对于不同时间点适宜的造模方法研究较少。

基于此,本研究以 SD 大鼠为研究对象,采用气管内插管滴注 BLM 方法,对比单次及两次给药诱导大鼠肺纤维化的成模率、稳定性和生存率等,明确不同时间点适宜造模方式。将模型组分为单次气管内滴注博来霉素组(3 mg/kg BLM)、两次气管内滴注博来霉素组(首次 3 mg/kg BLM,14 d 时再给 2 mg/kg BLM),并选取 28、42、56、84 d 4 个不同的时间节点,动静态结合,多角度的评价成模情况。旨

在选取合适的造模方法,为构建理想的肺纤维化动物模型提供参考,为探索 IPF 的发生发展机制和有效治疗药物的开发奠定实验基础。

外科肺活检是评价 IPF 的重要指标。本研究表明,造模 28 d 模型组大鼠肺部出现弥漫性的肺损伤,显微镜下可见大量炎性浸润,肺部满布瘢痕组织,肺间隔增宽有纤维病灶形成。单次造模大鼠纤维化程度在造模 28 d 达到了高峰,以中度为主,至第 42 天,10%转为重度,30%转为轻度,后纤维化随时间开始减轻。多次造模大鼠第 28 天纤维化程度以中重度为主,部分处于轻度纤维化,但肺泡炎评分较高。该时间点为第 2 次气管内滴注 BLM 后 14 d,此时肺泡炎和纤维化均存在,与个体差异有关,部分大鼠肺泡炎表现明显;第 42 天纤维病灶面积显著增大并达到高峰,且中重度纤维化达到 90%,表明多次诱导加重了大鼠的肺部损伤,但 56 d 后也有部分大鼠纤维化程度减轻;至 84 d,仍有 60% 大鼠存在明显纤维化病灶,处于中重度纤维化状态。

肺功能是诊断呼吸系统疾病的重要辅助工具,IPF 患者肺组织弹性和扩张能力降低,可表现为限制性的通气功能障碍伴弥散功能降低^[20]。限制性通气功能障碍患者肺容量显著降低,其中 VC、IC 是反映肺容量的重要指标。造模 28,42 d 模型组大鼠 VC、IC 显著降低,提示 BLM 致使大鼠肺容量减低,该结果与 IPF 患者肺容量指标表征一致。造模 56 d BLM-S 组大鼠 VC、IC 有所恢复,但是 BLM-M 组在 84 d 时未见恢复。此外 IPF 患者肺泡结构损伤,纤维病灶形成,可严重影响气体交换供能,常出现肺顺应性降低^[19],Cchord 与 Cdyn 是反映肺部顺应性的常用评价指标。造模 28 d,模型组大鼠肺部动静态顺应性均出现明显降低,其中 BLM-S 组在造模 56 d 时顺应性明显回升,而 BLM-M 组大鼠肺顺应性降低持续至 84 d。

BLM 可诱导肌成纤维细胞大量增殖,肌成纤维细胞增多后产生大量的胶原蛋白,促进细胞外基质堆积,COL-Ⅲ 含量可反映胶原纤维的严重程度^[30]。BLM 刺激后 BLM-S、BLM-M 组大鼠肺组织 COL-Ⅲ 表达显著升高,提示单次及两次气管内滴注 BLM 均成功诱导大鼠胶原纤维增多。组内比较结果表明,BLM-S 组大鼠胶原含量在 42 d 后显著下降,而 BLM-M 组大鼠胶原表达较为稳定。

综上,本研究认为 2 种造模方式均可建立肺纤维化模型。其中造模第 1 天一次性气管内滴注 3

mg/kg BLM,在 28 d 内纤维化程度更高,方便操作、价格便宜、可重复性强,对大鼠气道的损伤较小,死亡率较低,但该种造模方法,在 42 d 后大鼠纤维化明显消退,适合损伤相关机制及疗程较短的疗法机制探索研究。两次滴注 BLM 诱导的大鼠模型,成模率更高,在造模第 42 天纤维化程度达高峰,模型持续时间较长,至 84 d 仍存在明显纤维化,是长周期实验更为理想的造模方法,但该模型操作较单次组复杂,对大鼠气道进行了 2 次损伤,死亡率更高,实验设计时应充分考虑大鼠个体差异及死亡率。但本研究的物种仅选用 SD 大鼠,且观察时间仅 84 d,对于模型的稳定性和持续性尚需进一步优化。

参 考 文 献 (References)

- [1] RICHELDI L, COLLARD H R, JONES M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10082): 1941-1952.
- [2] SPAGNOLO P, KROPSKI J A, JONES M G, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: disease mechanisms and drug development [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 222: 107798.
- [3] PODOLANCZUK A J, THOMSON C C, REMY-JARDIN M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: state of the art for 2023 [J]. *Eur Respir J*, 2023, 61(4): 2200957.
- [4] LYNCH D A, SVERZELLATI N, TRAVIS W D, et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a fleischner society white paper [J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(2): 138-153.
- [5] RYERSON C J, KOLB M. The increasing mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: fact or fallacy? [J]. *Eur Respir J*, 2018, 51(1): 1702420.
- [6] STRONGMAN H, KAUSAR I, MAHER T M. Incidence, prevalence, and survival of patients with idiopathic pulmonary fibrosis in the UK [J]. *Adv Ther*, 2018, 35(5): 724-736.
- [7] GAO J, KALAFATIS D, CARLSON L, et al. Baseline characteristics and survival of patients of idiopathic pulmonary fibrosis: a longitudinal analysis of the swedish IPF registry [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 40.
- [8] SOMOGYI V, CHAUDHURI N, TORRISI S E, et al. The therapy of idiopathic pulmonary fibrosis: what is next? [J]. *Eur Respir Rev*, 2019, 28(153): 190021.
- [9] TASHIRO J, RUBIO G A, LIMPER A H, et al. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Med*, 2017, 4: 118.
- [10] MOURATIS M A, AIDINIS V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2011, 17(5): 355-361.
- [11] RASOOLI R, POURGHOLAMHOSEIN F, KAMALI Y, et al. Combination therapy with pirfenidone plus prednisolone ameliorates paraquat-induced pulmonary fibrosis [J]. *Inflammation*, 2018, 41(1): 134-142.
- [12] QIU M, YANG Z, BIAN M, et al. Protective effects of

- isorhynchophylline against silicon-dioxide-induced lung injury in mice [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 1125–1134.
- [13] 郭琦琦, 李毅, 翁桓泽, 等. 生物及非生物因素诱导肺纤维化动物模型研究的特点 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(14): 2273–2278.
- GUO Q Q, LI Y, WENG H Z, et al. Advances in animal models of pulmonary fibrosis induced by biotic and abiotic factors [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(14): 2273–2278.
- [14] 李智慧, 余学庆, 杨曙光, 等. 特发性肺纤维化实验模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(1): 118–127.
- LI Z H, YU X Q, YANG S G, et al. Research progress on experimental models of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(1): 118–127.
- [15] 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 Q H, TANG H M, et al. Progress in animal models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(12): 1617–1628.
- [16] 李萌. 基于调控 IKK/I κ B/NF κ B 通路的扶正通络消积方治疗肺纤维化疗效及远后效应机制 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2017.
- LI M. Therapeutic effect and long-term effect mechanism of Fuzheng Tongluo Xiaoji recipe on pulmonary fibrosis based on regulating IKK/I κ B/NF κ B pathway [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2017.
- [17] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893–899.
- [18] ASHCROFT T, SIMPSON J M, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale [J]. *J Clin Pathol*, 1988, 41(4): 467–470.
- [19] BENEGAS URTEAGA M, RAMÍREZ RUZ J, SÁNCHEZ GONZÁLEZ M. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Radiologia (Engl Ed)*, 2022, 64: 227–239.
- [20] RAGHU G, REMY-JARDIN M, RICHELDI L, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults; an official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(9): e18–e47.
- [21] TASHIRO J, RUBIO G A, LIMPER A H, et al. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Med*, 2017, 4: 118.
- [22] 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 X P, HUA Y Q, ZHANG G Z, et al. Expression of type III collagen in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Shanghai Med J*, 2002, 25(4): 205–209.
- [23] 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.
- [24] MILARA J, HERNANDEZ G, BALLESTER B, et al. The JAK2 pathway is activated in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 24.
- [25] HAREL F, NGUYEN Q T, NSAIBIA M J, et al. SPECT imaging of pulmonary vascular disease in bleomycin-induced lung fibrosis using a vascular endothelium tracer [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 240.
- [26] 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 G R, 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.
- [27] 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 G P, HOU H P, 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.
- [28] CHUNG M P, MONICK M M, HAMZEH N Y, 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.
- [29] LI S, SHI J, TANG H. Animal models of drug-induced pulmonary fibrosis: an overview of molecular mechanisms and characteristics [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2022, 38(5): 699–723.
- [30] KARSDAL M A, NIELSEN S H, LEEMING D J, et al. The good and the bad collagens of fibrosis-Their role in signaling and organ function [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 43–56.

[收稿日期] 2024-04-13

王晓歌,鲍金宇,杨帅,等. 跑台运动上调 BDNF/TrkB-CREB 通路改善神经性疼痛模型大鼠焦虑样行为 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1149-1159.

WANG X G, BAO J Y, YANG S, et al. Treadmill exercise up-regulates BDNF/TrkB-CREB pathway to improve anxiety-like behavior in neuropathic pain rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1149-1159.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.006

跑台运动上调 BDNF/TrkB-CREB 通路改善神经性疼痛模型大鼠焦虑样行为

王晓歌¹, 鲍金宇², 杨帅³, 吕怡杭³, 臧卫东⁴, 李翠^{3,4*}

(1. 郑州工商学院体育学院, 郑州 451400; 2. 北京师范大学体育与运动学院, 北京 100875;

3. 郑州大学体育学院(校本部), 郑州 450001; 4. 郑州大学基础医学院, 郑州 450001)

【摘要】 目的 本研究拟探究中低强度跑台运动对慢性坐骨神经压迫损伤(chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI)模型大鼠的痛行为和焦虑样行为的影响,并研究 BDNF/TrkB-CREB 通路参与运动缓解 CCI 大鼠疼痛及焦虑行为的神经机制。**方法** 将 32 只 SD 雄性大鼠按照体重随机方法分为 4 组:假手术(Sham)组、模型(CCI)组、假手术 + 运动(Sham + Exe)组、模型 + 运动(CCI + Exe)组,其中 Sham + Exe 组、CCI + Exe 组大鼠进行 4 周的跑台训练。在术前及术后不同时间点检测各组大鼠机械缩足阈值(paw withdrawal threshold, PWT)和热缩足潜伏期(paw withdrawal latency, PWL),采用高架十字迷宫实验和旷场实验评估大鼠的焦虑样行为,采用实时荧光定量逆转录 PCR(real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)和免疫蛋白印迹实验检测海马组织中的脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、酪氨酸激酶受体(tyrosine kinase receptor B, TrkB)、环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)的 mRNA 及蛋白表达。**结果** (1) CCI 组大鼠术后 7、14、21、28、35 d 的术侧 PWT 和 PWL 显著低于 Sham 组($P < 0.001$),与 CCI 组相比,CCI + Exe 组术侧 PWT 在 21 d 后显著增加($P < 0.05$),术侧 PWL 在 14 d 后显著增加($P < 0.05$);(2)与 Sham 组相比,CCI 组大鼠停留在高架十字迷宫开放臂的时间百分比显著降低($P < 0.001$),在闭合臂的时间百分比显著升高($P < 0.01$),CCI + Exe 组开放臂时间百分比比较 CCI 组显著升高($P < 0.05$);(3) CCI 组大鼠在旷场中央区域停留的时间百分比,较 Sham 组显著降低($P < 0.001$),CCI + Exe 组与 CCI 组相比显著增加($P < 0.05$);(4)与 Sham 组相比,CCI 组大鼠海马中的 BDNF、TrkB、CREB mRNA 和蛋白表达均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),4 周的跑台运动使 BDNF、TrkB、CREB mRNA 以及蛋白的表达显著增加($P < 0.05$)。**结论** 四周跑台运动缓解了 CCI 模型大鼠的机械痛敏和热痛敏,并且缓解了慢性疼痛诱导的焦虑样行为;上调 BDNF/TrkB-CREB 通路可能是运动缓解慢性疼痛,改善焦虑情绪的机制之一。

【关键词】 跑台运动;神经病理性疼痛;焦虑;BDNF;TrkB;CREB

【中图分类号】 Q95-33

【文献标志码】 A

【文章编号】 1005-4847 (2024) 09-1149-11

Treadmill exercise up-regulates BDNF/TrkB-CREB pathway to improve anxiety-like behavior in neuropathic pain rats

WANG Xiaoge¹, BAO Jinyu², YANG Shuai³, LYU Yihang³, ZANG Weidong⁴, LI Cui^{3,4*}

(1. School of Physical Education, Zhengzhou Technology and Business University, Zhengzhou 451400, China;

2. College of Physical Education and Sports, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3. School of

Physical Education (Main Campus), Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 4. School of Basic

Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

【基金项目】 河南省自然科学基金(242300420378)。

Funded by the Natural Science Foundation of Henan Province (242300420378)。

【作者简介】 王晓歌,女,助教,硕士,研究方向:运动与人体生理学。Email:wxgxiaoge@163.com

【通信作者】 李翠,女,讲师,博士,研究方向:运动与神经可塑性。Email:lc@zzu.edu.cn

Corresponding author: LI Cui. E-mail: lc@zzu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the effects of low-to-moderate intensity treadmill exercise on pain and anxiety-like behaviors in rats with chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI), and to explore the neural mechanism of the exercise-related brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tropomyosin receptor kinase B (TrkB)-cAMP-response element binding protein (CREB) pathway in relieving pain and anxiety behaviors in CCI rats. **Methods** Thirty-two D rats were divided randomly into four groups: sham group, CCI group, sham + exercise (Sham + Exe) group, and CCI + exercise (CCI + Exe) group. Rats in the exercise groups underwent treadmill training for 4 weeks. The paw withdrawal threshold (PWT) and paw withdrawal latency (PWL) were measured before and at different time points after the operation. The elevated plus maze (EPM) and open field test (OFT) were used to evaluate anxiety-like behaviors in the rats. mRNA and protein expression levels of BDNF, TrkB, and CREB in the hippocampus were detected by real-time quantitative reverse transcription PCR and Western Blot, respectively. **Results** (1) The PWT and PWL on the operative side of the rats were significantly lower in the CCI compared with the sham group at 7, 14, 21, 28, and 35 days after the operation ($P < 0.001$). The PWT on the ipsilateral side was significantly increased in the CCI + Exe group after 21 days compared with the CCI group ($P < 0.05$), and the PWL on the ipsilateral side increased significantly after 14 days ($P < 0.05$). (2) The EPM result showed that rats in the CCI group spent a significantly lower proportion of time in the open arms ($P < 0.001$) and significantly more time in the closed arms compared with the sham group ($P < 0.01$). Rats in the CCI + Exe group spent significantly more time in the open arms than the CCI group ($P < 0.05$). (3) The OFT result showed that rats in the CCI group spent a significantly lower proportion of time in the central area of the open field compared with the sham group ($P < 0.001$), while the percentage of time was significantly increased in the CCI + Exe group compared with the CCI group ($P < 0.05$). (4) BDNF, TrkB, and CREB mRNA and protein levels in the hippocampus were significantly lower in the CCI group compared with the sham group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Four-week treadmill exercise increased the mRNA and protein expression levels of BDNF, TrkB, and CREB in the hippocampus of CCI rats ($P < 0.05$). **Conclusions** Four weeks of treadmill exercise alleviates mechanical and thermal hyperalgesia and anxiety induced by chronic pain in CCI rats. Up-regulation of the BDNF/TrkB-CREB pathway may be one of the mechanisms by which exercise relieves chronic pain and improves anxiety.

[Keywords] treadmill exercise; neuropathic pain; anxiety; BDNF; TrkB; CREB

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

慢性疼痛已成为世界公认的公共卫生问题,目前,全球慢性疼痛的平均患病率达 38%,而中国慢性疼痛患者超 3 亿人^[1]。神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)是由躯体感觉神经系统病变或疾病引起的慢性疼痛,痛感极强,迁延难治,严重影响人们的生活质量^[2]。NP 患者除了疼痛的持续性感受以及痛觉过敏反应外,常伴随焦虑、抑郁、兴趣缺失、动机行为下降等情感障碍^[3]。NP 引起的情绪变化可增强对疼痛的感知,从而形成恶性循环。疼痛与焦虑共病的发病机制复杂,病程持续时间长,长期服药引发的耐受性差及副作用成了临床治疗的难题,因此寻求一种更为可行的、有效的治疗方案仍是一项重大挑战。运动作为一种非药理学方法,其治疗疾病的有效性 & 益处已被广泛证明^[4-6],但运动发挥作用的机制尚未充分阐明。

NP 可以诱导中枢敏化,使疼痛 & 情绪相关脑区发生可塑性变化,近年来研究发现海马体在疼痛

和情绪调控中扮演着关键角色^[7]。海马灰质体积与焦虑抑郁评分呈负相关^[8],还有证据表明疼痛患者海马体积减小^[9],但体力活动可以增加海马和额叶皮层的灰质体积^[10]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是一种重要的神经调节因子,并且在海马和大脑皮层中高度表达^[11]。BDNF 主要与跨膜受体酪氨酸激酶受体(tyrosine kinase receptor B, TrkB)结合引发细胞内级联反应,并在外周和中枢神经系统的疼痛传递过程中发挥着重要作用^[12]。BDNF/TrkB 信号激活后可以触发环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)的磷酸化,同时活化的 CREB 又可以增强 BDNF 的转录,进而促进神经细胞生存,增加突触可塑性 & 神经发生^[13]。动物研究显示 BDNF^{Met/Met} 和 BDNF 敲除小鼠均表现出焦虑样行为^[14],外源性补充 BDNF 可以诱导神经发生并增加海马中的 BDNF 水平,从而在小鼠中产生抗抑

郁和抗焦虑的作用^[15]。研究表明,慢性坐骨神经压迫损伤 (chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI) 模型大鼠海马中 BDNF 表达下调,并观察到疼痛症状自发改善时 BDNF 表达的降低可以被逆转^[16],提示疼痛及焦虑的发病机制可能与海马中的 BDNF 有关。另有研究发现,电针治疗可以上调海马 BDNF/TrkB-CREB 信号通路促进突触可塑性,起到缓解慢性炎症性疼痛模型大鼠的疼痛及抑郁样行为的作用^[17],但是运动能否通过调控 BDNF 及下游通路发挥镇痛及抗焦虑作用尚未报道。

基于此,本研究选用 CCI 模型大鼠,通过行为和分子生物学的方法,观察跑台运动对 CCI 模型大鼠的疼痛及焦虑样行为的影响,并从 BDNF/TrkB-CREB 通路方面探究运动缓解疼痛及焦虑的机制,为运动缓解慢性疼痛及焦虑症状提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

32 只 6 ~ 8 周龄,体重 180 ~ 220 g 的雄性 SPF 级 SD 大鼠购于郑州大学动物实验管理中心【SCXK (豫)2022-0001】。饲养于郑州大学生命科学学院【SYXK (豫)2019-0002】。饲养环境为 SPF 级,温度 22 ~ 25 ℃,相对湿度为 40% ~ 60%,12 h 明暗交替,实验动物自由进食和饮水,定期更换鼠笼,保持垫料清洁干燥。实验过程及操作均符合郑州大学生命科学伦理审查要求,动物实验和动物护理获得郑州大学生命科学伦理审查委员会批准 (ZZUIRB 2022-68)。

1.1.2 主要试剂与仪器

BDNF (Abcam, ab108319); TrkB (Abcam, ab187041); CREB (Cell Signaling, #9197); GAPDH (Proteintech, 60004-1-Ig); RNA 样本保存液 (CWBIO, CW0592S); RNA 提取试剂盒 (Axygen, 23518KD1); 反转录试剂盒 (Thermo, K1622); PCR 扩增试剂盒 (Thermo, K0252); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (CWBIO, CW0022S); 增强型 RIPA 裂解液 (BOSTER, AR0102)。

非吸收性手术尼龙线 (环球, 4-0); von Frey 纤维丝 (Stoelin, 美国); 热辐射测痛仪 (UGOBASILES, R. L, 意大利); PCR 仪 (Biometra, 德国); 吸入式动物麻醉机 (瑞沃德, 深圳); 高架十字迷宫 (北京众实迪创科技发展有限公司, 北京); 旷场 (北京众

实迪创科技发展有限公司, 北京); 高灵敏化学发光成像系统 (Bio-Rad, 美国); QuantStudio 实时荧光定量 PCR 系统 (Thermo Fisher Scientific, 美国); 动物实验跑步机 (上海欣软信息科技有限公司 XR-PT-10B, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

按照体重随机分组方法将 32 只 SD 大鼠随机分为假手术 (Sham) 组、模型 (CCI) 组、假手术 + 运动 (Sham + Exe) 组、模型 + 运动 (CCI + Exe) 组, 每组 8 只。

1.2.2 CCI 模型制备

大鼠经 4% 异氟烷诱导麻醉 2 ~ 3 min, 2% 浓度维持麻醉。大鼠麻醉后将左腿手术部位周围毛发剔除, 用生理盐水及碘伏对皮肤进行消毒, 钝性分离大鼠左侧股二头肌, 暴露坐骨神经。将 CCI 组和 CCI + Exe 组大鼠使用非吸收性手术尼龙线 (4-0) 轻度结扎坐骨神经, 打 4 个结扎环, 每个结扎环之间间隔 1 ~ 2 mm, 结扎环以恰好可以在神经末梢滑动为宜, 最后缝合肌肉和皮肤并进行消毒。手术后将动物放在加热垫上, 直至苏醒。Sham 组和 Sham + Exe 组只需要暴露大鼠左坐骨神经而无需进行结扎, 并采用单纯间断缝合法缝合肌肉和皮肤并进行消毒。

1.2.3 运动干预

大鼠造模 7 d 后, 对 Sham + Exe 组和 CCI + Exe 组大鼠进行跑台运动干预, 本研究选择为期 4 周的中低强度跑台运动干预, 大鼠首先经过 3 d 的适应性训练, 训练方案为: 第 1 天 6 m/min 的速度运动 30 min, 第 2 天 7 m/min 的速度运动 30 min, 第 3 天 8 m/min 的速度运动 30 min。正式训练的训练方案为: 8 m/min 的速度运动 5 min, 然后以 10 m/min 的速度运动 25 min, 共训练 4 周, 每周 5 d, 跑台无坡度。此运动方案强度对应 42.8% ~ 57.58% × VO_{2max} 强度^[18]。

1.2.4 行为学测试

机械性缩足阈值 (paw withdrawal threshold, PWT): 采用经典的“Up-Down”法进行实验测定^[19], 选取 7 根呈对数递增强度的 von Frey 丝进行测试, 从 2.0 g 开始逐次增加至 26.0 g (2.0、6.0、8.0、10.0、15.0、26.0 g)。将 von Frey 丝通过金属网眼垂直刺向大鼠后足底中心皮肤, 每次刺激持续 8 ~ 10 s, 观察反应。若大鼠在刺扎时间内或在移开 von

Frey 丝时出现快速的缩足或舔足反应,则记为阳性;若无反应,则视为阴性。如果测试为阴性则选用下一级递增的 von Frey 丝刺激;若反应为阳性,则选相邻递减的 von Frey 丝进行刺激。当检测过程中第 1 次为阳性反应后再进行 4 次检测即可,同时,在测量已累计达到 9 次时,无论是否出现阳性,停止测试。测试结果通过“Up-Down”法特定计算将克度值转换为 PWT 值(g)。

热缩足潜伏期(paw withdrawal latency, PWL):采用 HARGREAVES 等^[20]的方法测量,在进行测量前,将每只大鼠分别放置于一个透明玻璃观察框内,让大鼠在安静的环境中适应 30 min,并提前打开热痛检测仪预热。热源的热刺激强度保持恒定,仪器设置为当大鼠抬起脚时,或者在 15 s 后,热刺激自动关闭。在大鼠处于安静且清醒的状态下,将红外光源对准大鼠后足底中央,按下计时开关并记录大鼠热缩足时间。此操作进行 3 次,每次之间至少间隔 20 min。通过取 3 次测量的平均值,得出大鼠的热痛缩足潜伏期。

高架十字迷宫实验(elevated plus maze test, EPM):高架十字迷宫实验装置包括一对开放臂(50 cm × 10 cm)、一对闭合臂(50 cm × 10 cm × 30 cm)和中央区域(10 cm × 10 cm)部分,装置上方装有一架红外摄像头记录动物活动情况。测试方法参考姜宁等^[21]的研究,测试前,先将大鼠放置于行为学测试室安静环境下适应 1 h。测试时,设置各组光照强度为 100 ~ 150 lx,将大鼠头部朝向开放臂置于高架中央区域,测试人员放下大鼠后迅速撤离监控区,开启录像,数据采集时间为 5 min。计算开放臂和闭合臂停留时间百分比。

旷场实验(open filed test, OFT):旷场实验装置包括隔音测试箱和数据采集分析系统,在箱子正上方安装摄像头,记录大鼠在箱内的活动情况。实验测试前,先将大鼠放置于行为学测试室安静环境下适应 1 h。实验开始时将大鼠放置于 100 cm × 100 cm × 40 cm 箱子底部的中央区域(60 cm × 60 cm),各组光照强度控制在 100 ~ 150 lx,记录大鼠 5 min 内行驶的总距离及停留在中央区域和外周区域的时间百分比。

1. 2. 5 取材

异氟烷麻醉大鼠,取出大鼠脑组织,浸泡在预冷的 PBS 缓冲液中,从脑中剥离海马体。Western Blot 检测的海马体组织进行低温研磨提取全细胞蛋

白进行实验测试;PCR 检测的海马体组织先放入 RNA 保护液,4℃ 过夜,随后抽出保护液进行实验测试。

1. 2. 6 实时荧光定量逆转录 PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)

大鼠海马体的总 RNA 通过 TRIzol 法提取,oligo dT 为通用引物,使用 ThermoScript 逆转录酶,三步法逆转录。每个样品 3 个复孔,目的基因设计特异性的正向和反向引物(见表 1)。反应在实时 PCR 仪器中进行,65 ~ 95 ℃ 溶解曲线,反应完成后,Bio-Rad Prime PCR 软件分析荧光信号数据,计算各反应管 Ct 值。所得数据以 GAPDH 为内参照,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算各目的基因的相对表达。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence(5' - 3')
GAPDH	F:GACATGCCGCTGGAGAAAC R:AGCCCAGGATGCCCTTAGT
BDNF	F:CCCAAGAGGTTAAAGTGATAGAAG R:TAGGCAGAATGAGCAATGTC
TrkB	F:TGCTCAAGTTGGCGAGACAT R:CAGGCACTTCTCTCGTTCAGT
CREB	F:TGTTGTTCAAGCTGCCTCTGGTG R:GCTTCTTCAGCAGGCTGTGTAGG

1. 2. 7 Western Blot

将海马体从大脑中分离出来,用含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,制备 2 μg/μL 上样蛋白。等量蛋白样品在 10% Tris-Tricine SDS-PAGE 凝胶电泳上分离,上样后电泳,转膜。蛋白转入 PVDF 膜后,在 5% BSA 封闭液中室温封闭 2 h。封闭结束后加入一抗 BDNF(1 : 1000)、CREB(1 : 800)、TrkB(1 : 500)、GAPDH(1 : 1000)4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入二抗室温孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次后用高灵敏化学发光成像系统进行成像,Image J version 2. 1. 0 软件对结果进行相对定量分析。

1. 3 统计学分析

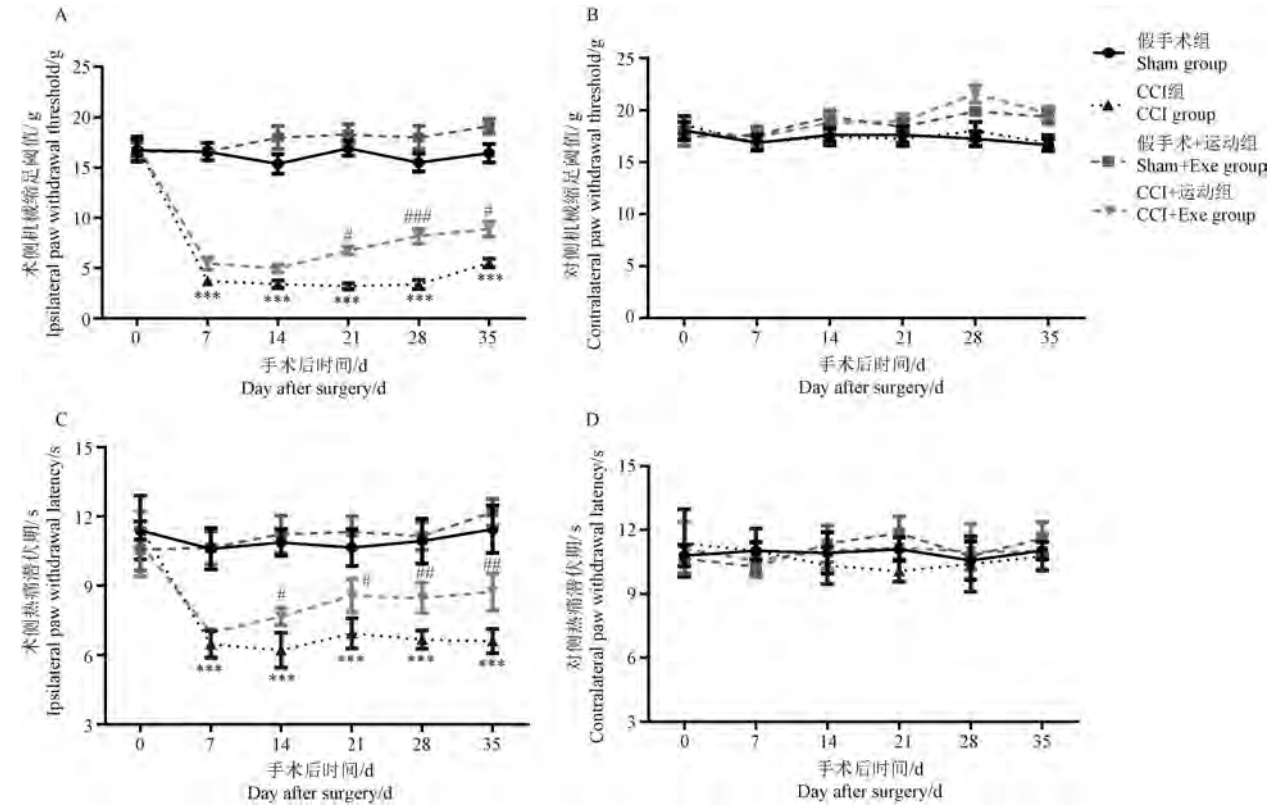
实验数据采用 GraphPad Prism 9. 0 进行作图和统计学分析,实验结果均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。不同时间点痛行为的比较采用重复测量方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,运动干预阶段 4 个组之间的比较采用双因素方差(Two-way ANOVA)分析。*P* < 0. 05 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 跑台运动对 CCI 模型大鼠痛行为的影响

痛行为学结果显示,与 Sham 组相比,CCI 组大鼠术后 7、14、21、28、35 d 的机械缩足阈值和热缩足潜伏期显著降低($P < 0.001$,图 1A; $P < 0.001$,图 1C),Sham 组和 Sham + Exe 组之间差异无显著性。

与 CCI 组相比,运动显著缓解了 21 d 后的机械痛敏反应($P < 0.05$,图 1A)和 14 d 后的热痛敏反应($P < 0.05$,图 1C)。同时观察大鼠对侧机械缩足阈值和热缩足潜伏期差异无显著性($P > 0.05$,图 1B,1D)。结果表明,慢性坐骨神经压迫损伤模型手术降低了大鼠的机械痛阈和热痛阈,而 4 周的跑台运动对机械痛阈值和热痛阈值有改善作用。



注:A:术侧PWT;B:对侧PWT;C:术侧PWL;D:对侧PWL;与Sham组相比,*** $P < 0.001$;与CCI组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。(下图同)

图1 各组大鼠机械痛和热痛测试结果($n = 8$)

Note. A. PWT of the ipsilateral side. B. PWT of the contralateral side. C. PWL of the ipsilateral side. D. PWL of the contralateral side. Compared with Sham group, *** $P < 0.001$. Compared with CCI group, # $P < 0.5$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. (The same in the following figures)

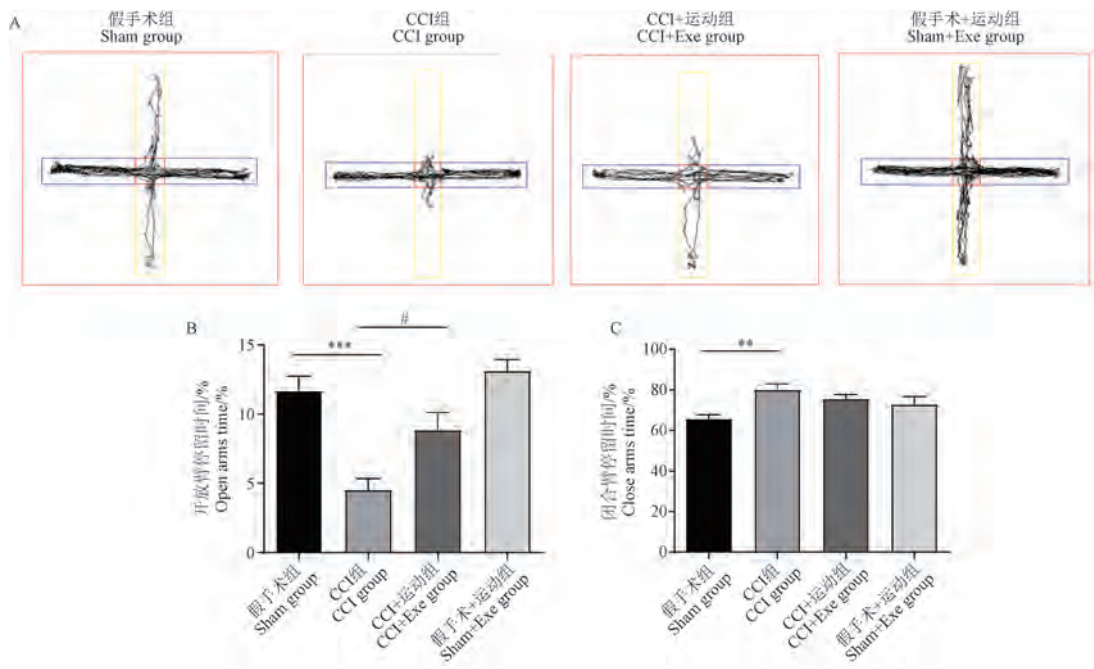
Figure 1 Results of the mechanical and thermal pain test in each group of rats($n = 8$)

2.2 跑台运动对 CCI 大鼠十字高架迷宫行为学的影响

EPM 行为学测试中大鼠活动轨迹如图 2A 所示。结果显示,与 Sham 组相比 CCI 组大鼠进入开放臂停留的时间百分比显著降低($P < 0.001$,图 2B),进入闭合臂的时间百分比显著升高($P < 0.01$,图 2C),提示 CCI 造模可诱导大鼠焦虑样行为的发生。与 CCI 组相比,CCI + Exe 组大鼠开放臂停留时间百分比显著升高($P < 0.05$,图 2B),但在闭合臂中停留的时间百分比差异无显著性,见图 2C。

2.3 跑台运动对 CCI 大鼠旷场行为的影响

OFT 行为学测试中大鼠活动轨迹如图 3A 所示,4 组大鼠在旷场中行驶的总路程无显著性差异(图 3B)。CCI 组大鼠在中央区域停留的时间百分比与 Sham 组相比显著降低($P < 0.001$,图 3C);与 CCI 组相比,CCI + Exe 组大鼠在中央区域停留的时间百分显著增加($P < 0.05$,图 3C),在外周区域活动的时间百分比无显著性差异(见图 3D)。结果提示,CCI 造模不影响大鼠的运动表现,且 4 周跑台运动可缓解 CCI 模型大鼠的焦虑样行为。

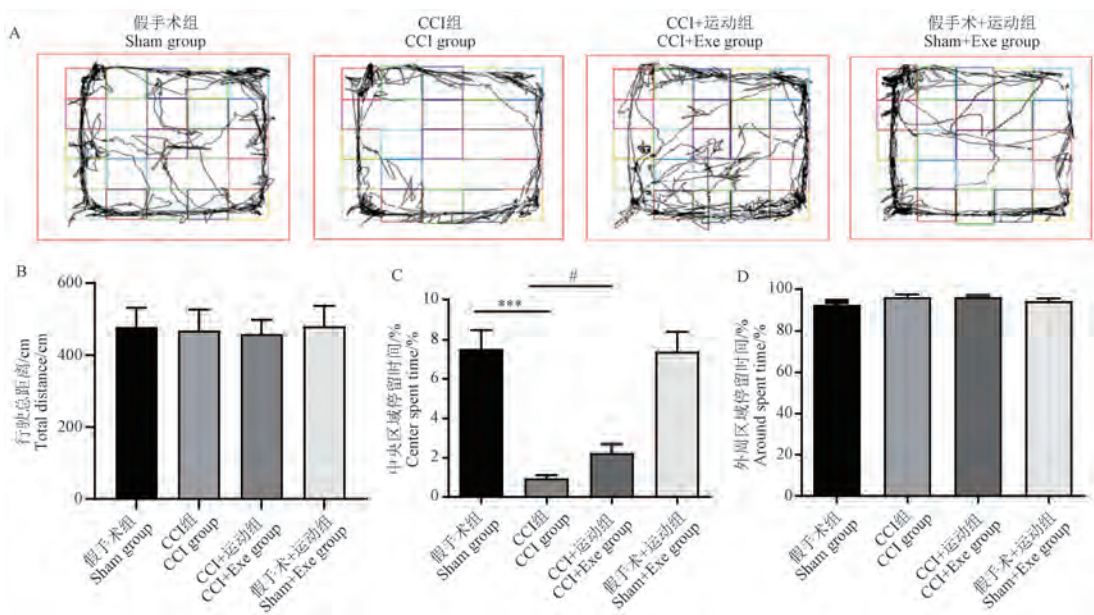


注:A:大鼠高架十字迷宫实验活动轨迹图;B:大鼠在高架十字迷宫开放臂停留的时间百分比;C:大鼠在高架十字迷宫闭合臂停留的时间百分比;与 Sham 组相比, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 各组大鼠高架十字迷宫实验测试结果($n = 8$)

Note. A. Activity trajectory map of the elevated plus maze test. B. Percentage of time spent in the open arms of the elevated plus maze. C. Percentage of time spent in the closed arms of the elevated plus maze test. Compared with Sham group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Results of the elevated plus maze test in each group of rats($n = 8$)



注:A:大鼠旷场实验活动轨迹图;B:大鼠在旷场中行驶的总距离;C:大鼠在旷场中央区域停留的时间百分比;D:大鼠在旷场外周区域停留的时间百分比。

图 3 各组大鼠旷场实验测试结果($n = 8$)

Note. A. Activity trajectory of rats in the open field test. B. Total distance travelled in the open field. C. Percentage of time spent in the central area of the open field. D. Percentage of time spent in the periphery area of the open field.

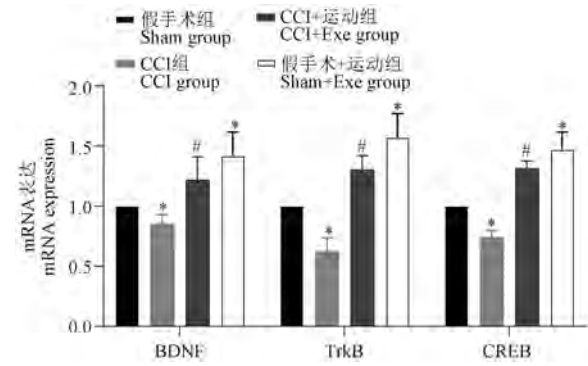
Figure 3 Results of open field test in rats of each group($n = 8$)

2.4 跑台运动对 CCI 大鼠 BDNF/TrkB/CREB 相关 mRNA 表达的影响

RT-qPCR 实验结果如图 4 所示,与 Sham 相比, CCI 大鼠海马中的 BDNF、TrkB、CREB mRNA 的表达显著降低($P < 0.05$),Sham + Exe 组的 BDNF、TrkB、CREB mRNA 的表达较 Sham 组显著增加($P < 0.05$)。CCI + Exe 组大鼠海马中的 BDNF、TrkB、CREB mRNA 的表达均高于 CCI 组,且差异具有显著性($P < 0.05$)。提示 CCI 诱导的疼痛和焦虑可以使 BDNF、TrkB、CREB mRNA 表达降低,而 4 周的跑台运动可以提高大鼠海马中 BDNF、TrkB、CREB mRNA 的表达。

2.5 跑台运动对大鼠 BDNF/TrkB/CREB 蛋白表达的影响

Western Blot 实验结果显示,与 Sham 组相比, CCI 组大鼠海马中的 BDNF、TrkB、CREB 蛋白表达均显著降低($P < 0.001$,图 5A; $P < 0.01$,图 5B, 5C),Sham + Exe 组蛋白表达均有升高,但差异无显著性。CCI + Exe 组大鼠海马中 BDNF、TrkB、CREB

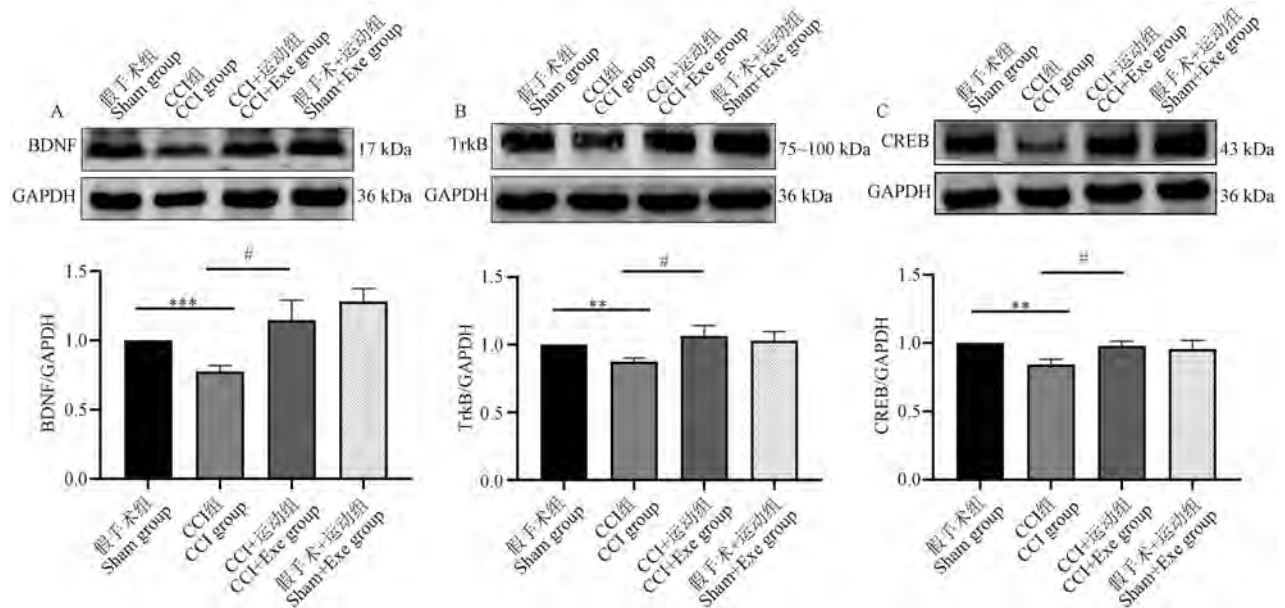


注:与 Sham 组相比, * $P < 0.05$ 。
图 4 各组大鼠海马中 BDNF、TrkB 和 CREB mRNA 的表达($n = 3$)

Note. Compared with Sham group, * $P < 0.05$.

Figure 4 Expression of BDNF, TrkB, and CREB mRNA in the hippocampus of rats in each group($n = 3$)

的蛋白表达高于 CCI 组大鼠($P < 0.05$),提示 CCI 诱导的焦虑可以使 BDNF、TrkB、CREB 蛋白表达降低,四周的跑台运动能够逆转 CCI 大鼠海马中 BDNF、TrkB、CREB 的蛋白表达。



注:A;BDNF 蛋白条带及蛋白表达统计图;B;TrkB 蛋白条带及蛋白表达统计图;C;CREB 蛋白条带及蛋白表达统计图。

图 5 各组大鼠海马中 BDNF、TrkB、CREB 蛋白的表达($n = 5$)

Note. A. Representative bands and quantification of BDNF protein. B. Representative bands and quantification of TrkB protein. C. Representative bands and quantification of CREB protein.

Figure 5 Expression of BDNF, TrkB and CREB proteins in the hippocampus of rats in each group($n = 5$)

3 讨论

NP 主要表现为异常性疼痛、痛觉过敏和自发性疼痛等特征^[22],它不仅引起疼痛感知,还常伴有

抑郁、焦虑等不良情绪反应^[23]。本研究发现 CCI 模型可以诱导大鼠的焦虑样行为,与海马中 BDNF、TrkB、CREB 的表达下降密切相关。4 周的中低强度跑台运动可以缓解 CCI 大鼠的疼痛及焦虑样行为,

并且可以上调 BDNF、TrkB、CREB 的表达。揭示了 BDNF/TrkB-CREB 通路参与运动缓解 CCI 诱导的疼痛及焦虑样行为中的作用机制,为运动改善疼痛及焦虑病症提供理论支撑。

NP 发病机制复杂,研究中常选取不同的动物模型探讨疼痛的发病机制,常见的 NP 模型有 CCI 模型、部分坐骨神经结扎模型 (partial sciatic nerve ligation, PSNL)、脊神经结扎模型 (spinal nerve ligation, SNL)、坐骨神经分支结扎模型 (spared nerve injury, SNI) 等^[24]。本研究采用 CCI 模型大鼠,在术后 7、14、21、28、35 d 检测痛行为学变化,结果表明 CCI 大鼠术侧肢体表现出显著的机械痛敏反应和热痛敏反应。慢性疼痛是负面情绪的重要诱因^[25],研究表明神经病理性疼痛、纤维肌痛、慢性内脏痛等动物模型都伴有焦虑样行为^[26]。有研究显示,PSNL 模型大鼠在造模后第 4 周至第 8 周表现出显著的焦虑样行为^[27],CCI 模型诱导的焦虑样行为多见于 CCI 术后 2 ~ 6 周^[28]。本研究在 CCI 术后的 5 周同样检测到大鼠的焦虑样行为,提示神经病理性疼痛可以诱导啮齿类动物的焦虑样行为。

目前临床上治疗疼痛及焦虑的药物种类繁多但副作用较大,长期服用会引起眩晕、嗜睡、耐受性差、药物成瘾等情况,严重影响患者的生活质量。因此疼痛及焦虑的非药物治疗方法引起了越来越多的重视,体育锻炼作为康复治疗的一种手段已被证明可以有效地缓解慢性疼痛或焦虑^[29-30]。运动对慢性疼痛动物模型的有益影响已得到广泛证明,Meta 分析显示,规律的有氧运动可以增加不同神经病理性疼痛模型动物的机械性缩足反射阈值和热缩足潜伏期^[31],不同形式的运动例如游泳、跑步机和转轮运动等,均可以减低 NP 相关的机械痛和热痛敏感性^[32]。有研究发现,2 h 的急性游泳运动可短暂减轻 SNL 模型大鼠的触觉痛敏感性,4 周的长期游泳运动可使 SNL 模型大鼠的痛阈值降低甚至完全恢复到正常值^[33]。CHO 等^[34]采用 8 m/min 的速度低强度跑台运动,每天运动 30 min 共 14 d,发现无论是造模前还是造模后开始运动,均可以缓解 SNI 模型大鼠的神经病理性疼痛。本研究采用的是 CCI 造模 1 周后进行跑台运动,为期 4 周,每周运动结束后检测痛行为学变化。运动强度对应 42.8% ~ 57.58% 最大摄氧量强度^[18],属于中低强度有氧运动。本研究结果显示 PWT 在运动后第 2 周显著增加,PWL 在运动后第 1 周表现出差异性,表明不

同的运动时间对机械痛和热痛敏感性的缓解程度不同。

临床研究发现每周 2 ~ 3 次的中低强度运动可以显著缓解焦虑患者的焦虑状态^[35],8 周的低强度体育锻炼可以显著改善纤维肌痛女性患者的疼痛感知、焦虑、抑郁及生活质量等^[36]。本研究在 4 周的运动干预结束后进行焦虑行为测试,结果显示 CCI 大鼠在 EPM 开放臂和 OFT 中央区域停留的时间百分比显著提高,提示 4 周的跑台运动可以缓解慢性疼痛诱导的焦虑样行为。这与 ZHOU 等^[37]的研究相似,证明连续 15 d,30 min/d 的自主转轮运动可以有效缓解完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱导的慢性炎性痛模型小鼠的疼痛和焦虑样行为。LOPES 等^[38]研究同样表明,从造模后第 15 天以 70% 最大摄氧量的强度连续运动 8 d,可以显著缓解 CCI 模型大鼠的疼痛及焦虑样行为。本研究结果支持先前的动物研究,并验证了临床观察的证据,即神经损伤疼痛伴焦虑患者受益于体育锻炼。

BDNF 主要在神经元和神经胶质细胞的胞体中合成,存在于整个大脑,并且在海马体和皮质中高表达^[11]。BDNF 与其特异性受体 TrkB 结合,可增强海马的突触传递能力^[17],并在疼痛传递及负面情绪调节过程中发挥重要作用^[39]。CREB 被称为转录增强因子,参与神经元生长发育、突触可塑性和长期记忆形成的调控^[40-41]。研究发现 BDNF 与受体 TrkB 结合后可以促进 CREB 的磷酸化,另一方面 CREB 作为转录因子,可以增强 BDNF 的转录^[42]。BDNF/TrkB-CREB 信号通路在维持神经增长,神经细胞分化和神经元的存活等方面发挥重要作用,由于其重要的生理功能使之成为各种疾病病理生理学研究的关键信号通路^[43]。BDNF/TrkB-CREB 通路与负面情绪及疼痛密切相关,研究发现 CCI 模型大鼠诱导的焦虑样行为与海马脑区 CREB 和 BDNF 表达减少有关^[38],壬基酚 (nonylphenol, NP) 诱导的焦虑模型大鼠中海马神经元损伤及 BDNF/TrkB-CREB 蛋白和 mRNA 表达下降^[44]。本研究结果同样显示 CCI 大鼠海马中 BDNF、TrkB、CREB mRNA 及蛋白表达下降,说明 CCI 模型大鼠的疼痛和焦虑样行为与海马 BDNF/TrkB-CREB 通路的受损有关。

多项研究表明,BDNF 可能是运动缓解疼痛^[45]和发挥脑保护作用^[46-47]的关键因子。运动可以通过调节 BDNF 水平抑制疼痛状态下伤害性神经元的

生长,促进健康神经元的再生^[5]。研究发现 CCI 模型大鼠同侧脊髓背角 BDNF 的表达增加与神经病理性疼痛的发展有关,而无论是每周 3 d 的低频运动还是每周 5 d 的高频运动(55%最大摄氧量强度)都可以通过抑制脊髓背角中的神经胶质细胞活化和 BDNF 表达来减轻神经性疼痛^[48]。疼痛状态下海马中 BDNF 的表达与脊髓背角 BDNF 的表达相反,研究发现 CFA 诱导的慢性炎性疼痛动物模型会降低海马中的 BDNF 表达,而这些影响与神经发生受损和焦虑有关,但富集环境与自主运动相结合的干预方法可以促进海马 BDNF 的表达以及神经发生缓解疼痛伴随的焦虑样行为^[49]。本研究通过 4 周的跑步机运动促进了 CCI 模型大鼠海马中 BDNF 的 mRNA 及蛋白表达,起到了缓解疼痛及焦虑的作用。运动同样可以促进 BDNF 的下游通路发挥神经保护作用,研究表明游泳训练可以通过增强 BDNF/TrkB 信号通路促进神经保护作用,进而抑制糖尿病模型小鼠大脑皮层的细胞凋亡^[50]。YANG 等^[17]研究发现电针通过上调海马 BDNF/TrkB-CREB 信号通路促进突触可塑性,起到缓解慢性炎症性疼痛模型大鼠的疼痛及抑郁样行为的作用。本研究采用 4 周跑台运动发现 CCI 大鼠经过运动之后海马脑区的 BDNF、TrkB、CREB 的 mRNA 和蛋白表达显著增加,表明运动可以促进 BDNF、TrkB、CREB 的高度表达,进而缓解 CCI 大鼠诱导的疼痛以及焦虑样行为,研究进一步证实了 BDNF 下游通路蛋白表达增加可能是运动缓解慢性疼痛诱导的焦虑样行为的机制之一。

综上,本研究证明了神经病理性疼痛可诱导大鼠出现焦虑样行为,且 4 周跑台运动通过上调海马 BDNF/TrkB-CREB 通路蛋白改善大鼠的疼痛和焦虑状态,为运动缓解慢性疼痛及焦虑症状提供理论基础。

参 考 文 献(References)

[1] 樊碧发. 中国疼痛医学发展报告 [M]. 北京: 清华大学出版社; 2020.
FAN B F. Report on development of pain medicine in China [M]. Beijing: Tsinghua University Press; 2020.

[2] FINNERUP N B, KUNER R, JENSEN T S. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101 (1): 259-301.

[3] YALCIN I, BARROT M. The anxiodepressive comorbidity in chronic pain [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2014, 27(5): 520-527.

[4] VANCAMPFORT D, HEISSEL A, WACLAWOVSKY A, et al.

Precision-based exercise in people with anxiety and stress related disorders: Are there interindividual differences in anxiolytic effects? An ancillary meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Psychiatry Res*, 2022, 317: 114803.

[5] LEITZELAR B N, KOLTYN K F. Exercise and neuropathic pain: a general overview of preclinical and clinical research [J]. *Sports Med Open*, 2021, 7(1): 21.

[6] BLUMENTHAL J A, ROZANSKI A. Exercise as a therapeutic modality for the prevention and treatment of depression [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2023, 77: 50-58.

[7] SHI H J, WANG S, WANG X P, et al. Hippocampus: molecular, cellular, and circuit features in anxiety [J]. *Neurosci Bull*, 2023, 39(6): 1009-1026.

[8] GOLD A L, STEUBER E R, WHITE L K, et al. Cortical thickness and subcortical gray matter volume in pediatric anxiety disorders [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(12): 2423-2433.

[9] LIU H Y, CHOU K H, CHEN W T. Migraine and the hippocampus [J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2018, 22 (2): 13.

[10] ERICKSON K I, LECKIE R L, WEINSTEIN A M. Physical activity, fitness, and gray matter volume [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(2): S20-S28.

[11] PEROVIC M, TESIC V, MLADENOVIC DJORDJEVIC A, et al. BDNF transcripts, proBDNF and proNGF, in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat [J]. *Age*, 2013, 35(6): 2057-2070.

[12] CAPPOLI N, TABOLACCI E, ACETO P, et al. The emerging role of the BDNF-TrkB signaling pathway in the modulation of pain perception [J]. *J Neuroimmunol*, 2020, 349: 577406.

[13] ESVALD E E, TUVIKENE J, SIRP A, et al. CREB family transcription factors are major mediators of BDNF transcriptional autoregulation in cortical neurons [J]. *J Neurosci*, 2020, 40 (7): 1405-1426.

[14] CHEN Z Y, JING D, BATH K G, et al. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior [J]. *Science*, 2006, 314(5796): 140-143.

[15] SCHMIDT H D, DUMAN R S. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(12): 2378-2391.

[16] SAFFARPOUR S, SHAABANI M, NAGHDI N, et al. *In vivo* evaluation of the hippocampal glutamate, GABA and the BDNF levels associated with spatial memory performance in a rodent model of neuropathic pain [J]. *Physiol Behav*, 2017, 175: 97-103.

[17] YANG P, CHEN H, WANG T, et al. Electroacupuncture promotes synaptic plasticity in rats with chronic inflammatory pain-related depression by upregulating BDNF/TrkB/CREB signaling pathway [J]. *Brain Behav*, 2023, 13(12): e3310.

[18] 董亚南. SD、Wistar 大鼠最大摄氧量的增龄特征与运动强度的量化研究 [D]. 曲阜: 曲阜师范大学; 2018.
DONG Y N. Quantitative study on aging characteristics and

- exercise intensity of SD and Wistar rats with maximum oxygen uptake [D]. Qufu: Qufu Normal University; 2018.
- [19] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55–63.
- [20] HARGREAVES K, DUBNER R, BROWN F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. *Pain*, 1988, 32(1): 77–88.
- [21] 姜宁, 姚彩虹, 叶帆, 等. 大小鼠焦虑行为实验方法概述 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(5): 698–704.
- JIANG N, YAO C H, YE F, et al. Overview of animal behavioral tests of anxiety [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(5): 698–704.
- [22] XU D, MA X, SUN C, et al. Emerging roles of circular RNAs in neuropathic pain [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(12): e13139.
- [23] WILLIAMS A C, CRAIG K D. Updating the definition of pain [J]. *Pain*, 2016, 157(11): 2420–2423.
- [24] ABOUD C, DUVEAU A, BOUALI-BENAZZOUE R, et al. Animal models of pain: diversity and benefits [J]. *J Neurosci Methods*, 2021, 348: 108997.
- [25] ABDUL M, YAN H Q, ZHAO W N, et al. VTA-NAc glutaminergic projection involves in the regulation of pain and pain-related anxiety [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 1083671.
- [26] KREMER M, BECKER L J, BARROT M, et al. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 236–270.
- [27] DANG T N, TIEN S N, OCHI R, et al. Enhanced anxiety-like behavior induced by chronic neuropathic pain and related parvalbumin-positive neurons in male rats [J]. *Behav Brain Res*, 2024, 459: 114786.
- [28] FONSECA-RODRIGUES D, AMORIM D, ALMEIDA A, et al. Emotional and cognitive impairments in the peripheral nerve chronic constriction injury model (CCI) of neuropathic pain: a systematic review [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 399: 113008.
- [29] STONEROCK G L, HOFFMAN B M, SMITH P J, et al. Exercise as treatment for anxiety: systematic review and analysis [J]. *Ann Behav Med*, 2015, 49(4): 542–556.
- [30] BELAVY D L, VAN OOSTERWIJCK J, CLARKSON M, et al. Pain sensitivity is reduced by exercise training: Evidence from a systematic review and meta-analysis [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, 120: 100–108.
- [31] GUO J B, CHEN B L, WANG Y, et al. Meta-analysis of the effect of exercise on neuropathic pain induced by peripheral nerve injury in rat models [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 636.
- [32] RUI MONTE-CRESPO J, PLAZA-MANZANO G, DÍAZ-ARRIBAS M J, et al. Aerobic exercise and neuropathic pain: insights from animal models and implications for human therapy [J]. *Biomedicine*, 2023, 11(12): 3174.
- [33] ECHEVERRÍA-RODRÍGUEZ O, GODÍNEZ-CHAPARRO B, GÓMEZ-GARCÍA M V, et al. Participation of angiotensin-(1-7) in exercise-induced analgesia in rats with neuropathic pain [J]. *Peptides*, 2021, 146: 170670.
- [34] CHO Y H, SEO T B. The timing point of exercise intervention regulates neuropathic pain-related molecules in the ipsilateral dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury [J]. *J Exerc Rehabil*, 2022, 18(5): 286–293.
- [35] STUBBS B, VANCAMPFORT D, ROSENBAUM S, et al. An examination of the anxiolytic effects of exercise for people with anxiety and stress-related disorders: a meta-analysis [J]. *Psychiatry Res*, 2017, 249: 102–108.
- [36] IZQUIERDO-ALVENTOSA R, INGLÉS M, CORTÉS-AMADOR S, et al. Low-intensity physical exercise improves pain catastrophizing and other psychological and physical aspects in women with fibromyalgia: a randomized controlled trial [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(10): 3634.
- [37] ZHOU Y S, MENG F C, CUI Y, et al. Regular aerobic exercise attenuates pain and anxiety in mice by restoring serotonin-modulated synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2022, 54(4): 566–581.
- [38] LOPES B C, MEDEIROS L F, STEIN D J, et al. tDCS and exercise improve anxiety-like behavior and locomotion in chronic pain rats via modulation of neurotrophins and inflammatory mediators [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 404: 113173.
- [39] SUN B, LV Y, XU H, et al. Effects of vortioxetine on depression model rats and expression of BDNF and Trk B in hippocampus [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2895–2902.
- [40] WANG C S, KAVALALI E T, MONTEGGIA L M. BDNF signaling in context: From synaptic regulation to psychiatric disorders [J]. *Cell*, 2022, 185(1): 62–76.
- [41] NOTARAS M, VAN DEN BUUSE M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(10): 2251–2274.
- [42] WANG H, XU J, LAZAROVICI P, et al. cAMP response element-binding protein (CREB): a possible signaling molecule link in the pathophysiology of schizophrenia [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 255.
- [43] YE Y L, ZHONG K, LIU D D, et al. Huanglian-Jie-du-Tang extract ameliorates depression-like behaviors through BDNF-TrkB-CREB pathway in rats with chronic unpredictable stress [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 7903918.
- [44] TANG L, LI S, YU J, et al. Nonylphenol induces anxiety-like behavior in rats by regulating BDNF/TrkB/CREB signal network [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 166: 113197.
- [45] BAI J, GENG B, WANG X, et al. Exercise facilitates the M1-to-M2 polarization of microglia by enhancing autophagy via the BDNF/AKT/mTOR pathway in neuropathic pain [J]. *Pain Physician*, 2022, 25(7): E1137-E1151.
- [46] WALSH J J, TSCHAKOVSKY M E. Exercise and circulating BDNF: Mechanisms of release and implications for the design of exercise interventions [J]. *Physiol Appl Nutr Metab*, 2018, 43(11): 1095–1104.
- [47] CEFIS M, CHANEY R, WIRTZ J, et al. Molecular mechanisms

underlying physical exercise-induced brain BDNF overproduction [J]. Front Mol Neurosci, 2023, 16: 1275924.

[48] SUMIZONO M, SAKAKIMA H, OTSUKA S, et al. The effect of exercise frequency on neuropathic pain and pain-related cellular reactions in the spinal cord and midbrain in a rat sciatic nerve injury model [J]. J Pain Res, 2018, 11: 281-291.

[49] ZHENG J, JIANG Y Y, XU L C, et al. Adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis contributes differentially

to environmental enrichment combined with voluntary exercise in alleviating chronic inflammatory pain in mice [J]. J Neurosci, 2017, 37(15): 4145-4157.

[50] CHENG S M, LEE S D. Exercise training enhances BDNF/TrkB signaling pathway and inhibits apoptosis in diabetic cerebral cortex [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(12): 6740.

[收稿日期] 2024-03-10

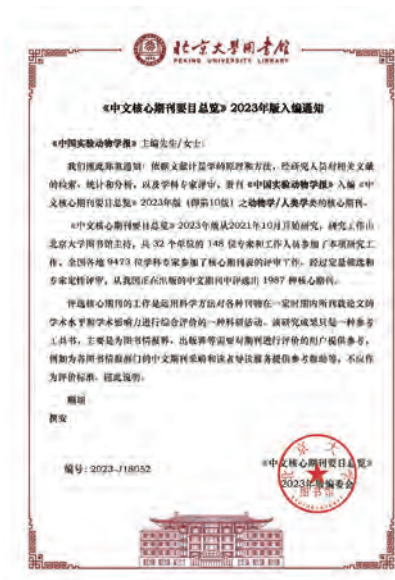
《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

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。



杨玉洁,朱中博,张艳美,等. 急性肺损伤对大鼠脾 T 细胞凋亡的影响及益肺健脾方的干预作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1160-1170.

YANG Y J, ZHU Z B, ZHANG Y M, et al. Effects of acute lung injury on apoptosis in rat splenic T cells and the interventional effect of Yifei Jianpi formula [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1160-1170.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.007

急性肺损伤对大鼠脾 T 细胞凋亡的影响 及益肺健脾方的干预作用研究

杨玉洁¹,朱中博¹,张艳美¹,刘喜平^{1*},张旭辉^{2*},张志明³

(1. 甘肃中医药大学,甘肃省中药新产品创制工程实验室,甘肃省中医方药挖掘与创新转化
重点实验室,兰州 730000;2. 甘肃中医药大学附属医院,肺病科 兰州 730000;
3. 甘肃省中医院,兰州 730000)

【摘要】 目的 观察急性肺损伤(acute lung injury,ALI)大鼠脾 T 细胞凋亡及 X-连锁凋亡抑制蛋白相关因子(XIAP-associated factor 1, XAF1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、死亡相关因子(factor associated suicide, FAS)蛋白表达情况,探讨益肺健脾方治疗 ALI 的机制是否与下调 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达,抑制 T 细胞凋亡有关。**方法** 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,随机分为空白组、模型组、阳性组、益肺健脾方高、中、低剂量组。阳性组给予地塞米松每天 0.5 g/kg 灌胃,益肺健脾方高、中、低剂量组分别给予每天 12、6、3 g/kg 的益肺健脾方灌胃,模型组与空白组均给予等量蒸馏水灌胃,每天给药 1 次,连续 14 d。动物肺功能检测系统检测各组大鼠肺功能情况;观察各组大鼠肺部影像学特征及脏器指数和肺组织湿重/干重(W/D)变化;苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠肺部组织的病理学变化;流式细胞术检测各组大鼠脾 T 细胞亚群(CD4⁺/CD8⁺)及脾 T 细胞的凋亡情况,Western Blot 检测脾中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达水平。**结果** 模型组大鼠肺功能降低,脾和胸腺脏器指数减少,肺组织湿重/干重(W/D)显著升高($P < 0.01$),肺部组织出现炎性渗出、肺泡破裂等现象,同时伴有肺纹理增粗以及大片磨玻璃影,T 细胞亚群(CD4⁺/CD8⁺)显著减少,XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达及 T 细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$);经益肺健脾方干预后,大鼠肺组织湿重/干重(W/D)明显降低,胸腺的脏器指数显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),T 细胞亚群(CD4⁺/CD8⁺)明显增加,XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达及 T 细胞凋亡率明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** ALI 可诱发大鼠脾 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达上调及 T 细胞凋亡,益肺健脾方可能通过下调 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达,抑制 ALI 诱发的脾 T 细胞凋亡。

【关键词】 急性肺损伤;益肺健脾方;T 细胞凋亡;XAF1;FAS;TNF- α

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1160-11

Effects of acute lung injury on apoptosis in rat splenic T cells and the interventional effect of Yifei Jianpi formula

YANG Yujie¹, ZHU Zhongbo¹, ZHANG Yanmei¹, LIU Xiping^{1*}, ZHANG Xuhui^{2*}, ZHANG Zhiming³

【基金项目】 甘肃省科技重大项目(22ZD1FA001),国家自然科学基金(82260889),第五批全国中医临床优秀人才研修项目(国中医药人教函[2022]239号),甘肃省自然科学基金项目(24JRRD002)。

Funded by Gansu Provincial Science and Technology Major Program (22ZD1FA001), National Natural Science Foundation of China (82260889), the Fifth Batch of National Traditional Chinese Medicine Clinical Outstanding Talents Training Program (Guozhong Medicine Ren Jiaohan [2022] No. 239), Natural Science Foundation of Gansu Province (24JRRD002).

【作者简介】 杨玉洁,在读硕士研究生,研究方向:方剂的临床应用及作用机理。Email:yyjwsry@163.com

【通信作者】 刘喜平,博士,教授,研究方向:方剂的临床应用及作用机理。Email:Lxpd-257@163.com;

张旭辉,硕士,主任医师,硕士生导师,研究方向:中西医结合呼吸病。Email:863303509@qq.com。

* 共同通信作者

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Laboratory for TCM New Products Development Engineering of Gansu Province, Key Laboratory of Traditional Chinese Herbs and Prescription Innovation and Transformation of Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 2. Department of Pulmonary Disease, Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Corresponding author: LIU Xiping. E-mail: Lxpd-257@163.com; ZHANG Xuhui. E-mail: 863303509@qq.com

[Abstract] **Objective** To observe splenic T cell apoptosis and XIAP-associated factor 1 (XAF1), FAS, and tumor necrosis factor (TNF)- α protein expression levels in rats with acute lung injury (ALI), and to determine their roles in the protective effect of Yifei Jianpi formula. **Methods** Sixty male specific pathogen-free SD rats were divided randomly into blank, model, positive control, and high-, medium-, and low-dose Yifei Jianpi formula groups. Rats in the positive control group were given 0.5 g/kg dexamethasone by gavage, and rats in the high-, medium-, and low-dose Yifei Jianpi formula groups were given 12, 6, and 3 g/kg Yifei Jianpi formula by gavage, respectively. Rats in the model and blank groups were given equal amounts of saline by gavage. All medications were administered once a day for 14 days. Lung function testing was carried out in all rats. We observed the imaging characteristics of the lungs and changes in the organ index and lung tissue wet/dry weight (W/D) in each group, and detected the pathological changes in lung tissues by hematoxylin-eosin staining. Splenic T-cell subpopulations ($CD4^+/CD8^+$) and apoptosis of splenic T-cells were detected by flow cytometry and XAF1, FAS, and TNF- α protein expression levels in the spleen were detected by Western Blot. **Results** Rats in the model group showed reduced lung function, decreased spleen and thymus organ indexes, and significantly higher W/D of lung tissue ($P < 0.01$). In addition, they had inflammatory exudation and alveolar rupture in the lung tissue, accompanied by thickening of the lung texture and large areas of ground-glass shadows, with a significant decrease in T-cell subsets ($CD4^+/CD8^+$) and significant increases in XAF1, FAS, and TNF- α proteins, and in the rate of T-cell apoptosis ($P < 0.01$). Yifei Jianpi formula significantly reduced the W/D spleen of rat lung tissues, significantly increased the thymus organ index ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and the T-cell subpopulation ($CD4^+/CD8^+$), and significantly decreased the protein expression levels of XAF1, FAS, and TNF- α , and the T-cell apoptosis rate ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** ALI induced up-regulation of XAF1, FAS, and TNF- α protein expression and T-cell apoptosis in the spleen of rats, and Yifei Jianpi formula may protect against ALI by down-regulating these factors.

[Keywords] acute lung injury; Yifei Jianpi formula; T-cell apoptosis; XAF1; FAS; TNF- α
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是由多种肺内(肺炎、感染等)或肺外致病因素导致的急性弥漫性炎性肺损伤,进而引起急性呼吸衰竭的临床综合征^[1]。ALI 以其显著的高发病率和死亡率对公共健康产生重大影响,研究统计 ALI 致死率已高达 30%~50%^[2]。机械通气、激素和抗炎药物是目前临床上常用的治疗方法,但均存在明显缺点,难以广泛推广,且激素和抗炎等药物副作用明显、预后差^[3]。故寻找安全有效的防治 ALI 的药物显得尤为紧迫。

益肺健脾方是治疗多种肺部炎性损伤的常用有效方剂,在促进肺部炎症吸收、保护肺组织损伤、改善患者临床症状方面疗效显著^[4]。同时有研究发现 T 细胞凋亡是机体正常免疫调节的一部分,它有助于维持免疫平衡和清除异常或受损的细胞。但 T 细胞凋亡也可导致免疫系统的失调和组织损伤^[5-6]。X-连锁凋亡抑制蛋白相关因子(XIAP-

associated factor 1,XAF1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-alpha,TNF- α)、死亡相关因子(factor associatedsuicide,FAS)是参与细胞凋亡的重要因子。XAF1 通过抑制 XIAP 的抗凋亡功能,从而促进细胞凋亡^[7];FAS 和凋亡相关因子配体(factor-related apoptosis ligand,FASL)的结合可以触发细胞凋亡信号通路^[8];TNF- α 则通过激活凋亡信号通路,诱导细胞凋亡的发生^[9]。这些因子相互作用,共同参与调控细胞凋亡的发生发展。但益肺健脾方是否通过干预 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达抑制 T 细胞凋亡,进而保护肺部急性损伤,仍需进一步验证。

本研究拟建立脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的大鼠 ALI 模型,观察益肺健脾方对 ALI 大鼠脾 T 细胞凋亡及 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达的影响,阐明益肺健脾方对 ALI 的治疗作用及作用机制,

为探讨中医药防治 ALI 提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

60 只 SPF 级 SD 雄性大鼠(8 周龄,体重 200 ~ 220 g),购买于斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。饲养于甘肃中医药大学科研中心 SPF 级实验室【SYXK(甘)2021-0004】,温度为(23 ± 2)℃、相对湿度 45% ~ 55%,12 h 明暗交替循环,饲养期间自由进食、进水,适应性饲养 5 d 后进行实验。所有程序均按照《甘肃省实验动物护理与使用指南》执行,且动物伦理获得甘肃中医药大学伦理委员会批准(2023-585)。

1.1.2 实验药物

益肺健脾方(黄芪 15 g,党参 6 g,陈皮 9 g,当归 9 g,柴胡 6 g,桔梗 3 g,麸炒白术 15 g,炒白芍 9 g,砂仁 13 g,生麦芽 15 g,炙甘草 6 g)药材饮片由甘肃中医药大学附属医院提供,经甘肃中医药大学药学院景明教授鉴定符合 2020 年版《中华人民共和国药典》规定。取上述益肺健脾方药材饮片,加入 10 倍量的蒸馏水浸泡药材,1 h 后煎煮 30 min,滤出药液后再次加入 8 倍量水煎煮 30 min,消毒纱布过滤,将 2 次滤液合并,浓缩至含生药质量浓度为 2.0 g/mL,4℃保存备用。

1.1.3 主要试剂与仪器

LPS 购自于 Solarbio 有限公司(批号:3230907001);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒购自于珠海贝索生物技术有限公司有限公司(批号:C220501);流式检测抗体均购自于购自于联科生物有限公司,Anti-Rat CD4 APC(批号:A311143)、Anti-Rat CD FITC(批号:A311142)、Anti-Rat CD25 FITC(A30534)、Anti-Rat CD4 PE(批号:A30534);凋亡试剂盒购自于 meilunbio 有限公司(批号:MA022-2);蛋白免疫印记(Western Blot)凝胶制备试剂盒购自 Solarbio 有限公司(批号:P1200-1/P1200-2);极敏型 ECL 化学发光试剂盒购自 NCM 有限公司(批号:P10060);单克隆抗体 β -Actin 购自于 Proteintech 有限公司(批号:20536-1-AP);单克隆兔源 TNF- α 抗体购自于 Immunoway 有限公司(批号:YT4689);单克隆兔源 FAS 抗体购自于 Affinity 有限公司(批号:AF5342);单克隆兔源 XAF1 抗体购自于 Abmart 有限公司(批号:TD13614);山羊抗兔 IgG 二抗购自

于 Proteintech 有限公司(批号:20000239);地塞米松购自于天津信谊津津药业有限公司(批号:1508156);BCA 蛋白定量试剂盒购自西安赫特生物技术有限公司(批号:WB003)。

动物 PET/SPECT/CT(Lnlview-3000B,美国),肺功能检测系统(WBP PLT-UNR-RT,美国),流式细胞仪(BD sciences,FACSV erse,美国),电泳仪(北京六一生物科技有限公司,DYCZ-24DH,中国),凝胶成像系统(广州柏鹭腾生物科技有限公司,GeLview 6000 plu,中国),台式高速离心机(可成仪器有限公司,3-18R,中国),YB-6LF 生物组织石蜡包埋机(亚光科技股份有限公司,YB-6LF,中国),智能感知石蜡切片机(上海珂淮仪器有限公司,KD-3390,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

60 只 SD 雄性大鼠,适应 1 周后,使用完全随机法选取 10 只大鼠作为空白组,剩余大鼠参考文献^[10]方法,采用气管内注射 LPS 建立 ALI 模型,造模结束后继续采用完全随机法将 ALI 模型大鼠随机分为模型组、阳性组、益肺健脾方高剂量组、益肺健脾方中剂量组、益肺健脾方低剂量组,每组 10 只。益肺健脾方高、中、低剂量组分别给予每天 12、6(相当于成人临床等效剂量)、3 g/kg 的益肺健脾方实验用药灌胃;阳性组给予每天 0.5 g/kg 的地塞米松溶液灌胃;正常组给予等体积的蒸馏水灌胃。各组大鼠连续灌胃 14 d,每天 1 次。

1.2.2 大鼠肺功能检测

参考文献^[11]方法,将各组 SD 大鼠用戊巴比妥钠(3 mg/kg)进行腹腔注射麻醉,待各组大鼠麻醉后无创进行肺功能测定。打开计算机 iox 2.6.0.3 采集系统软件,按照大鼠分组及编号设置数据储存路径,观察气道压力曲线、气道阻力曲线、肺容量曲线变化与动物呼吸机同步且平滑对称,待曲线稳定后收集呼吸数据。检测指标包括:最大吸气流速(peak inspiratory flow,PIF)、最大呼气流速(peak expiratory flow,PEF)、潮气量(tidal volume,TV)、呼气量(expiratory volume,EV)、50% 呼气流速(EF50)、被迫呼吸间隙(enhanced pause,Penh)。

1.2.3 大鼠肺部影像学特征观察

参考文献^[12]方法,SD 大鼠 3 mg/kg 的用戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉后,水平固定在 Micro CT 配套的动物支架上,保证肺部处在扫描范围内后进

行扫描。具体参数如下:扫描分辨率 78 μm ,曝光时间 2000 ms,电压 80 kV,电流 500 μA ,扫描角度 360°;图形分辨率 78 μm ,扫描时间 25 min,扫描后用 cobra 软件进行三维重构,将重构后的图像导入软件 amide 1.0.4 进行图像采集并观察肺组织炎性改变情况。

1.2.4 大鼠肺湿干质量比(W/D)和脏器指数的变化

各组 SD 大鼠用戊巴比妥钠(3 mg/kg)进行腹腔注射麻醉后处死,随后称取左肺为湿质量,将左肺放入恒温干燥箱(105 $^{\circ}\text{C}$)烘干 72 h,干燥至恒质量,并称取记录为干质量,按下列公式计算:肺干湿质量比 = 肺干质量/肺湿质量;脏器指数 = 脏器质量/大鼠体质量。

1.2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肺组织病理形态变化

各组大鼠按上述方法处死后,取左肺于 4%多聚甲醛固定过夜,随后经常规脱水包埋于石蜡中。切片后,采用 HE 染色检测大鼠肺组织形态学改变。最后于普通光镜下拍照,根据大鼠肺组织出血情况,肺泡是否有充血,肺泡腔内炎症细胞包括中性粒细胞、巨噬细胞浸润情况,肺泡间隔的厚度对肺组织损伤量化评分^[13]。0 分:正常肺组织;1 分:轻度肺损伤, $\leq 25\%$ 肺部受累;2 分:中度肺损伤, $> 25\% \sim 50\%$ 肺部受累;3 分:严重肺损伤, $> 50\% \sim < 75\%$ 肺部受累;4 分:非常严重,几乎整肺受累。

1.2.6 流式细胞术检测 T 细胞亚群比例及凋亡

各组大鼠按上述方法处死后取脾进行研磨,滤网过滤,按细胞沉淀体积的 5 倍容积加入红细胞裂解液,轻轻吹打混匀,裂解 5 min。于 1200 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$,离心 5 min,弃去红色上清液。加入 15 mL PBS,吹打混匀后于 1200 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$,离心 5 min),弃上清,加入 PBS 混匀后进行细胞计数,调整细胞浓度到 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。T 细胞计数:各组细胞混悬液中分别加入抗体 CD8 1.25 μL 、CD3 4.5 μL 、CD4 4.5 μL ,通过流式细胞仪对各组细胞混悬液中的 T 淋巴细胞进行计数。T 细胞凋亡检测:加入 CD3 4.5 μL 对 T 细胞进行标记;染色:加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色液,轻轻混匀;孵育:避光、室温孵育 15 min,随后置于冰上使用流式细胞仪检测。

1.2.7 Western Blot 检测脾 XAF1、FAS 和 TNF- α 蛋白表达

各组大鼠按上述方法处死后取脾组织,将脾组

织冷冻研磨,取部分研磨后的组织,加入蛋白酶抑制剂和裂解液,于组织研磨机中破碎研磨,离心,取上清。按照 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。根据目的蛋白分子量配置分离胶和浓缩胶。上样、电泳、并将其转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶完全浸没 PVDF 膜来封闭非特异性抗原(室温下静置 2 h),随后 $1 \times \text{TBST}$ 洗膜 3 次,每次 10 min。用相应的一抗(1:1000)完全浸没 PVDF 膜,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。次日洗膜后,将山羊抗兔 IgG 二抗(1:5000)在室温下孵育 1 h。洗膜 3 次后使用化学发光试剂显示,采用 Image J 1.8.0 软件分析计算凋亡标志蛋白 XAF1、FAS 和 TNF- α 的灰度值,并以 β -actin 作为参照蛋白。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件与 GraphPad Prism 9.5.1 进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两间比较采用独立 t 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺功能的变化

与空白组相比,模型组 PEF、PIF、TV、EV、EF50 均显著降低,而 Penh 显著增高($P < 0.01$)。与模型组相比,益肺健脾方高、中剂量组中的 PEF、PIF、TV、EV、EF50 显著升高($P < 0.05$),而 Penh 显著降低($P < 0.01$),且趋势呈现剂量-效应关系(见表 1)。

2.2 各组大鼠肺部影像学的变化

与空白组相比,模型组肺纹理增粗,可见大片磨玻璃阴影。与模型组相比,益肺健脾方高、中、低剂量组的磨玻璃阴影均有所改善,其中益肺健脾方高剂量组改善情况明显优于中低剂量组(见图 1)。

2.3 各组大鼠肺干湿质量比和脏器指数的变化

与空白组比较,模型组大鼠肺干湿质量比显著升高($P < 0.01$),肺水肿严重,大鼠胸腺和脾指数均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,益肺健脾方高剂量组大鼠胸腺指数明显升高($P < 0.05$)、益肺健脾方高、中剂量组脾指数显著升高($P < 0.01$)。益肺健脾方高、中剂量组大鼠肺干湿质量比显著降低($P < 0.01$)(见表 2)。

2.4 各组大鼠肺组织病理形态的变化

空白组大鼠肺组织未见明显异常,肺泡内无渗出物,肺泡大小均匀且排列整齐。与空白组相比,

表 1 各组大鼠肺功能的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Changes in lung function of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	剂量/ (g/kg) Dosages/ (g/kg)	PIF/(mL/s)	PEF/(mL/s)	TV/mL	EV/mL	EF50/mL	Penh
空白组 Blank group	—	50.13 ± 0.89	46.87 ± 1.92	3.00 ± 0.18	4.30 ± 0.32	47.34 ± 3.33	0.53 ± 0.17
模型组 Model group	—	17.21 ± 2.18**	16.86 ± 3.45**	0.75 ± 0.48**	1.02 ± 0.24**	14.71 ± 3.83**	3.18 ± 0.39**
阳性组 Positive group	0.5	46.87 ± 1.53 ^{##}	38.09 ± 1.16 ^{##}	2.70 ± 0.28 ^{##}	3.98 ± 0.47 ^{##}	37.79 ± 4.14 ^{##}	0.85 ± 0.25 ^{##}
益肺健脾方高剂量组 High dose group	12	35.62 ± 3.09 ^{##}	36.23 ± 0.85 ^{##}	2.34 ± 0.45 ^{##}	3.35 ± 0.71 ^{##}	34.57 ± 3.43 ^{##}	0.98 ± 0.18 ^{##}
益肺健脾方中剂量组 Medium dose group	6	30.41 ± 1.25 ^{##}	31.01 ± 0.85 ^{##}	1.43 ± 0.24 [#]	2.99 ± 1.05 [#]	28.57 ± 4.22 ^{##}	1.21 ± 0.22 ^{##}
益肺健脾方低剂量组 Low dose group	3	22.00 ± 2.08 [#]	25.51 ± 3.75 ^{##}	0.83 ± 0.13	1.55 ± 0.49	18.90 ± 1.63	1.81 ± 0.22 ^{##}

注:与空白组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。(下图/表同)

Note. Compared with the blank group, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

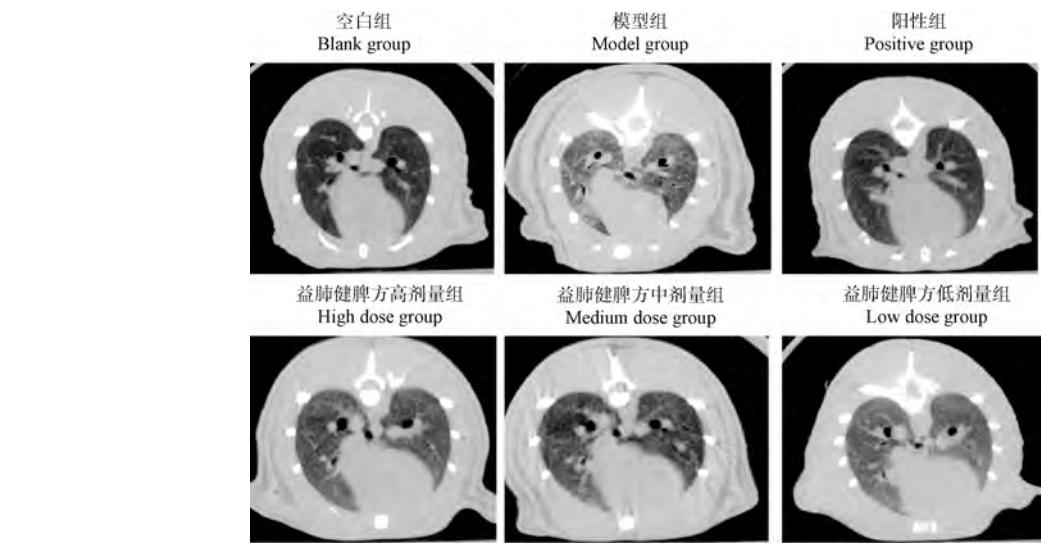


图 1 各组大鼠肺部影像学变化

Figure 1 Changes in lung imaging of rats in each group

模型组中大鼠肺组织严重受损,肺间质水肿、充血、肺泡壁增厚、肺泡间隙增宽、并见大量炎症细胞浸润,肺组织损伤评分显著升高($P < 0.01$)。益肺健脾方高、中、低剂量组的肺组织损伤情况均有不同程度地减轻,并伴有炎性细胞浸润减少,其中益肺健脾方高、中剂量组肺组织损伤评分显著降低($P < 0.01$)(见图 2)

2.5 各组大鼠脾组织中 T 细胞凋亡情况

与空白组比较,模型组大鼠脾组织中 $CD4^+ / CD8^+$ 显著降低($P < 0.01$),T 细胞总凋亡率显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,益肺健脾方高、中剂量组大鼠脾组织中 $CD4^+ / CD8^+$ 明显升高($P <$

0.05)、T 细胞凋亡率则显著降低($P < 0.01$),以益肺健脾方高剂量组最为显著($P < 0.01$)。(见图 3, 图 4)

2.6 各组大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达

与空白组比较,模型组大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的表达水平均呈现上调趋势($P < 0.05$)。与模型组比较,益肺健脾方高、中剂量组大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的表达水平均显著下调($P < 0.05$),而益肺健脾方低剂量组上述蛋白表达水平有降低,但无统计学意义($P > 0.05$)。(见图 5)。

表 2 各组大鼠脏器指数及肺湿干质量比($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Organ index and lung wet to dry mass ratio of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	剂量/(g/kg) Dosages/(g/kg)	胸腺指数 Thymus index	脾指数 Spleen index	肺干湿质量比/% Lung wet/dry mass ratio/%
空白组 Blank group	—	2.54 ± 0.40	2.96 ± 0.33	3.97 ± 0.25
模型组 Model group	—	1.35 ± 0.28**	1.70 ± 0.28**	5.50 ± 0.23**
阳性组 Positive group	0.5	2.12 ± 0.18 [#]	2.84 ± 0.56 ^{##}	4.37 ± 0.36 ^{##}
益肺健脾方高剂量组 High dose group	12	2.10 ± 0.30 [#]	2.77 ± 0.81 ^{##}	4.52 ± 0.31 ^{##}
益肺健脾方中剂量组 Medium dose group	6	1.88 ± 0.32	2.58 ± 0.29 ^{##}	4.64 ± 0.19 ^{##}
益肺健脾方低剂量组 Low dose group	3	1.45 ± 0.41	2.12 ± 0.78 [#]	5.10 ± 0.31 [#]

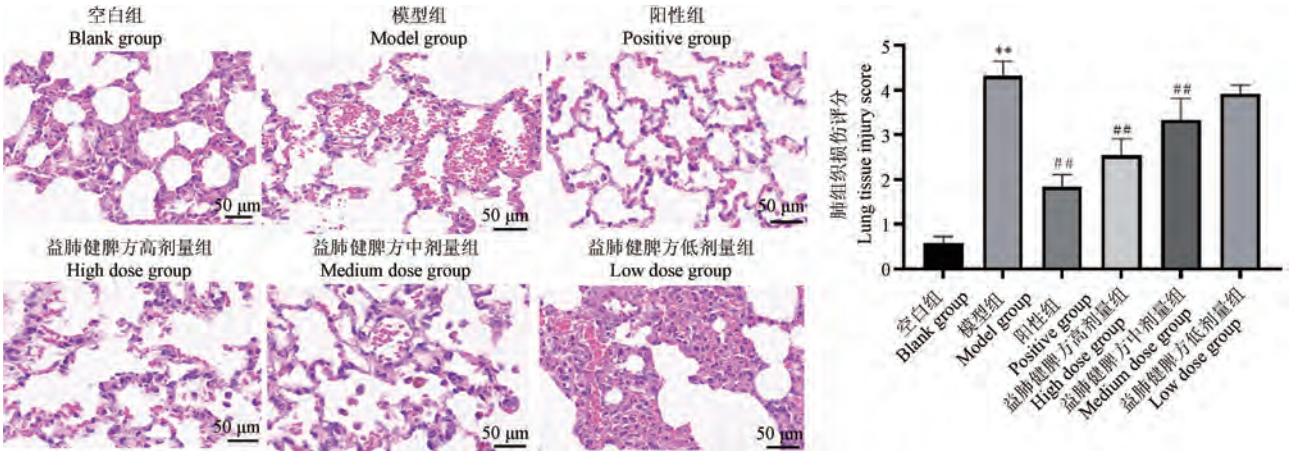


图 2 各组大鼠肺组织 HE 染色

Figure 2 HE staining of rat lung tissue in each group

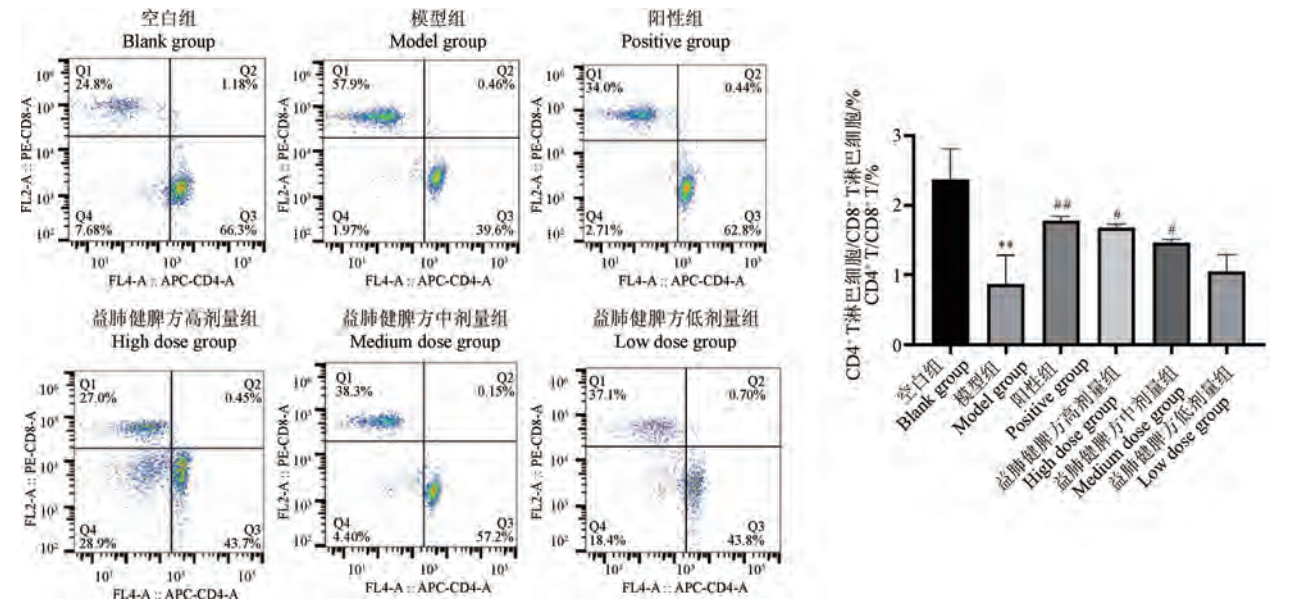


图 3 各组大鼠脾组织中 T 细胞亚群(CD4⁺/CD8⁺)的变化

Figure 3 Changes of T-cell subsets (CD4⁺/CD8⁺) in the spleen tissues of rats from various groups

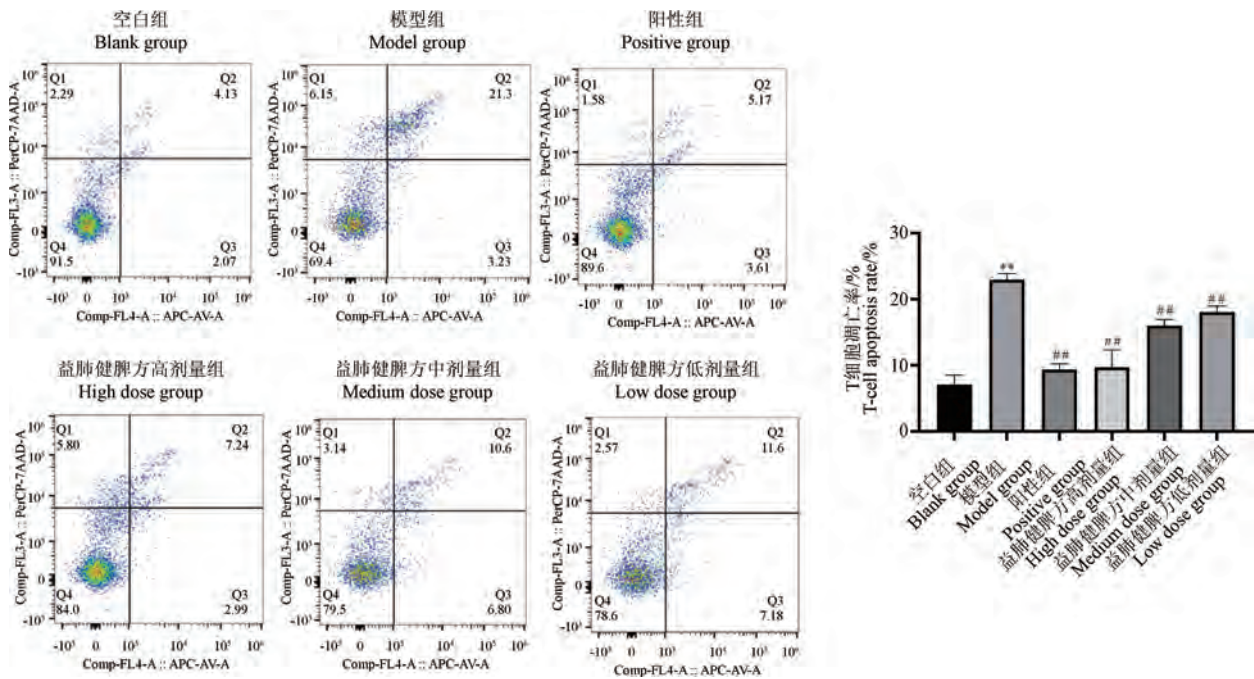
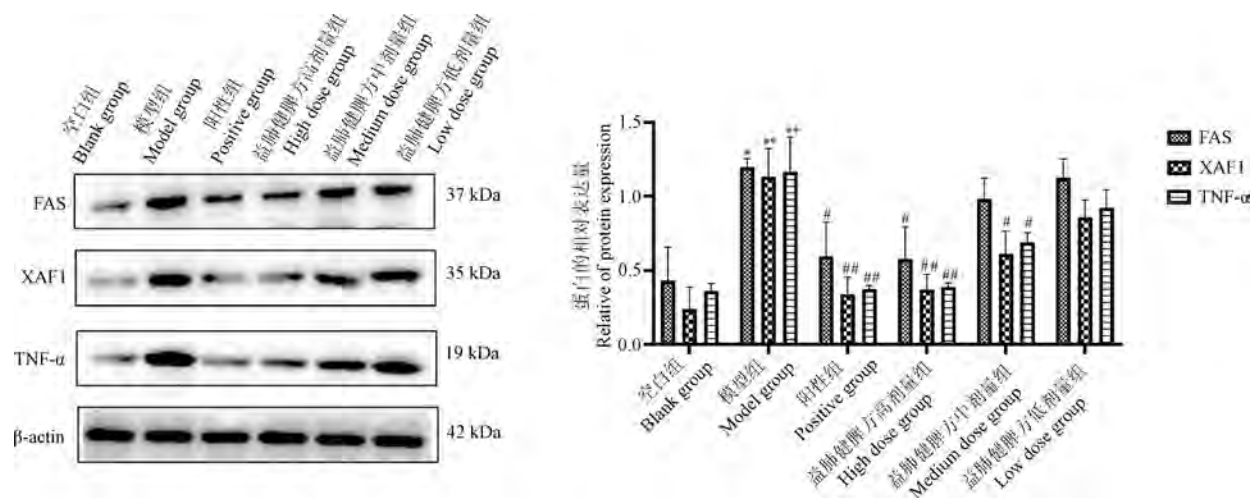


图 4 各组大鼠脾组织中 T 细胞凋亡的情况

Figure 4 T-cell apoptosis in the spleen tissue of rats in each group



注:与空白组相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 各组大鼠脾组织中 XAF1、FAS 和 TNF-α 蛋白表达变化

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

Figure 5 Changes in protein expression of XAF1、FAS and TNF-α in spleen tissues of rats in various groups

3 讨论

ALI 是一种先天性与适应性免疫反应相关的急性炎症性疾病^[14]。研究表明,T 细胞凋亡在急性肺损伤的发展中起着一定的作用,减少 T 细胞凋亡可能有助于减轻肺部组织损伤和炎症反应,从而改善急性肺损伤的预后^[15]。然而,目前对于如何调控 T 细胞凋亡以及其在急性肺损伤中的具体作用机制

还需要进一步研究,因此深入了解 T 细胞凋亡的调控机制与急性肺损伤发展的关系,有助于寻找潜在的治疗策略和改善患者的预后。

现代研究发现肺部损伤与炎症反应会累及全身多个组织和器官,尤其是对胃肠道和免疫系统^[16]。改善胃肠道症状,保护脾胃功能,能够促进肺部炎症的吸收,减少粘连,改善肺损伤,提高其免疫功能,及早截断病势,防止疾病的进一步发展^[17]。

中医学认为肺属金,脾胃属土,二者母子相生,在生理和病理上具有相关性。生理上肺气充足依赖脾气生化,脾运输水谷精微则依赖肺气的宣发肃降,两脏共同输布津液并维持人体全身气机的调畅^[18-19];病理上则易出现母病及子,子病及母,肺脾同病的特点^[20]。在治疗上《医宗必读·虚劳》指出:“脾有生肺之能…土旺而生金,勿拘于保肺”。因此,培土生金、益肺健脾在肺系疾病治疗中具有重要意义^[21]。课题组前期研究表明具有益气健脾、培土生金作用的参苓白术散能显著改善 LPS 诱导的肺部炎症反应,提高肺部免疫功能^[22]。许爱英^[23]和韩冰阁等^[24]也证实了“培土生金”有利于肺炎后炎症的吸收和呼吸功能的修复,从而增强机体免疫功能。另外作为培土生金代表方的补中益气汤也被证实具有消除炎症、调节免疫、缓解咳嗽、肺损伤等症状,保护肺组织的作用^[25]。基于以上理论背景,本研究所采用方剂益肺健脾方是由经典方补中益气汤化裁而来,由炙黄芪、党参、陈皮、当归、柴胡、桔梗、麸炒白术、炒白芍、砂仁、生麦芽、炙甘草组成。全方以“益肺健脾”立法,兼顾止咳、化痰、平喘,在促进肺部炎症吸收、缩短病程、改善患者症状方面具有良好的临床疗效。基于该方的临床反馈及文献回顾,本研究通过 LPS 来构建大鼠急性肺损伤模型。LPS 作为革兰氏阴性菌细胞壁的一种成分,可通过破坏肺泡上皮屏障并诱导细胞凋亡以及肺组织中氧化水平的不平衡直接引起 ALI^[26-27]。研究结果表明,益肺健脾方能够有效改善大鼠肺功能、肺组织损伤及肺部炎症。肺水肿是 ALI 最主要的病理特征之一^[28];胸腺和脾指数通常是评估宿主免疫能力的重要指标^[29],本研究结果发现益肺健脾方不但能够降低 W/D 比率,显著抑制肺水肿,同时还能提高脾与胸腺的脏器指数,增加大鼠免疫力^[30]。可见,益肺健脾方对于大鼠 ALI 模型的肺部组织损伤具有较好的改善作用。

T 细胞是对肺部炎症保护性免疫的核心成分^[31]。根据细胞表面标志物和特化功能,经典二分法将 T 细胞分为 CD4⁺ 和 CD8⁺。CD4⁺ T 细胞也称为 T 辅助细胞,根据他们的表型、特征细胞因子和指定转录因子的能力,CD4⁺ T 细胞分为 5 个经典亚群:TH1 细胞(TH1 cell, TH1)、辅助性 T 细胞 2(T helper 2 cell, Th2)、辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, TH17)、滤泡辅助性 T 细胞(follicular helper T cell, Tfh)和调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)

细胞^[32]。以上亚群的功能可协调宿主对病原体的防御。细胞毒性 CD8⁺ T(CTL)细胞是早期抗肿瘤、抗感染的细胞,可介导直接杀伤受感染的靶细胞,赋予肺部感染保护性免疫^[33];CD4⁺ T/CD8⁺ T 表示诱导性 T 淋巴细胞与抑制性 T 淋巴细胞之间的平衡状态,是机体免疫内环境稳定的最重要指标^[34];总之,T 细胞对肺部炎症反应保护起着重要作用,且不同的 T 细胞亚群可协调先天性和适应性免疫反应,促进病原体清除、组织修复以及对呼吸道细菌感染的持久记忆的建立^[35]。有研究表明,肺部炎症期间,T 细胞凋亡可能会影响 T 细胞亚群的比例^[36]。同时 T 细胞作为机体免疫防御中的关键角色,是免疫系统中重要的组成部分,其凋亡增加,可加剧急性肺损伤的发生^[37]。细胞凋亡在许多生理与病理过程中发挥重要作用,特别是在发育和免疫系统中^[38]。研究表明,FAS、TNF- α 、XAF1 是通过外在(死亡受体途径)和内在(线粒体途径)启动细胞凋亡的重要分子^[39],同时 FAS、TNF- α 和 XAF1 在维持免疫系统平衡中也扮演着重要角色。其中,FAS 通过参与调节 T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞等免疫细胞的活化、增殖和凋亡过程,从而维持免疫平衡^[40];TNF- α 则是一种多功能的细胞因子,诱导细胞凋亡的同时广泛参与炎症反应和免疫调节,在免疫系统中发挥重要作用^[41];XAF1 在免疫细胞中表达较高,可参与调节免疫细胞的凋亡过程,从而影响免疫功能的发挥^[42]。另有研究报道显示,TNF 和 XAF1 是参与 T 细胞凋亡的重要通路^[43];同时有临床性研究证实,在肺部炎症明显的患者外周血中发现 XAF1、TNF- α 、FAS 等凋亡通路相关基因特异性上调,且 T 细胞的数量也随之明显减少^[44]。与上述研究结果相似,本研究利用流式细胞术检测大鼠脾组织中 T 细胞亚群(CD4⁺/CD8⁺)与 T 细胞的凋亡情况,其结果显示,益肺健脾方高、中剂量组显著增加大鼠脾中 CD4⁺/CD8⁺ 比例的同时明显降低了大鼠脾中 T 细胞的凋亡率。随后利用蛋白免疫印迹法对大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白表达水平变化进行检测,结果显示与空白组相比,模型组大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的相对表达水平均显著性升高,而与模型组相比,益肺健脾方高、中剂量组明显降低了脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的相对表达水平。总之这些结果表明益肺健脾方可能也是通过降低大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的表达量来减少急性肺损伤

中的 T 细胞凋亡数量。综上,益肺健脾方对大鼠 ALI 模型的肺功能、肺纹理以及肺部损伤均有一定的改善作用,提高脾中的 $CD4^+/CD8^+$ 的同时还能减少了 T 细胞的凋亡数量,其机制可能与下调大鼠脾组织中 XAF1、FAS、TNF- α 蛋白的表达水平有关。本研究不仅为后续进一步探讨益肺健脾方改善 ALI 的相关分子机制提供了实验基础,也为益肺健脾方临床防治 ALI 提供了科学依据。

参 考 文 献(References)

- [1] HUANG W, FU G, WANG Y, et al. Immunometabolic reprogramming of macrophages with inhalable CRISPR/Cas9 nanotherapeutics for acute lung injury intervention [J]. Acta Biomater, 2024, 181: 308–316.
- [2] ZHANG J, GUO Y, MAK M, et al. Translational medicine for acute lung injury [J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 25.
- [3] SHAH D, DAS P, ACHARYA S, et al. Small immunomodulatory molecules as potential therapeutics in experimental murine models of acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS) [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2573.
- [4] 王鑫, 张志明, 王功臣, 等. “甘肃方剂”在新型冠状病毒肺炎防治中的应用策略分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 21–25.
WANG X, ZHANG Z M, WANG G C, et al. Analysis of “Gansu prescriptions” in prevention and treatment of coronavirus disease-2019 [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(16): 21–25.
- [5] BETSUYAKU T, ITO Y, PEAKE N, et al. Enhanced autophagy and phagocytosis of apoptotic lymphocytes in splenic macrophages of acute ethanol-treated rats: Light and electron microscopic studies [J]. Histol Histopathol, 2024, 39(7): 853–866.
- [6] YAO Y, DENG H, LI P, et al. α -lactose improves the survival of septic mice by blockade of TIM-3 signaling to prevent NKT cell apoptosis and attenuate cytokine storm [J]. Shock, 2017, 47(3): 337–345.
- [7] LIU J, LIU X, WEI B, et al. Effect of stable overexpression of XAF1 gene on biological characteristics of ovarian cancer A2780 cells [J]. J South Med Univ, 2021, 41(5): 760–766.
- [8] RANJAN K, PATHAK C. Cellular dynamics of fas-associated death domain in the regulation of cancer and inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(6): 3228.
- [9] ZHANG P, LI W, ZHENG X, et al. Endoplasmic reticulum stress and death receptor-mediated apoptosis in the neuronal differentiation of adult adipose-derived stromal cells [J]. Heliyon, 2024, 10(7): e28608.
- [10] 张亚平, 张广平, 苏萍, 等. 不同途径吸入脂多糖致大鼠急性肺炎模型的优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7): 82–88.
ZHANG Y P, ZHANG G P, SU P, et al. Selection of acute pneumonia rat models induced by lipopolysaccharide with different inhalation pathways [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(7): 82–88.
- [11] 王俊丽, 刘喜平, 崔树婷, 等. 湿生扁蕾不同提取部位对肺纤维化模型大鼠肺功能的影响 [J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(23): 21–26.
WANG J L, LIU X P, CUI S T, et al. Effects of different polar parts of *Gentianopsis paludosa* (Munro.) ma on pulmonary function in rats with pulmonary fibrosis [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacology, 2022, 31(23): 21–26.
- [12] 廖一羲, 王搏, 邱志广, 等. 博来霉素诱导的肺纤维化大鼠肺组织病理和超微结构变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(12): 2296–2304.
LIAO Y X, WANG B, QIU Z G, et al. Lung histopathological and ultrastructural changes in rats with bleomy-cin-induced pulmonary fibrosis [J]. Chin J Pathophysiol, 2023, 39(12): 2296–2304.
- [13] 张英华, 吕翰林, 周建文, 等. 黄连解毒汤调节 HIF-1 α /VEGF 信号通路改善 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(7): 59–65.
ZHANG Y H, LU H L, ZHOU J W, et al. Huanglian jiedutang regulates HIF-1 α /VEGF signaling pathway to improve learning and memory abilities of APP/PS1 transgenic mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(7): 59–65.
- [14] YANG J, DONG L, WANG Y, et al. Targeted degradation of hexokinase 2 for anti-inflammatory treatment in acute lung injury [J]. Mol Med Rep, 2024, 29(5): 83.
- [15] DOUGHTY L. Adaptive immune function in critical illness [J]. Curr Opin Pediatr, 2016, 28(3): 274–280.
- [16] XU Y, ZHU J, FENG B, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells on lung and gut $CD8^+$ T cells in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. Cell Prolif, 2021, 54(5): e13028.
- [17] 路迎冬, 尚唱, 辛来运, 等. 基于肠道微生态角度探讨从脾胃论治在新型冠状病毒肺炎中的应用 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(7): 1–6.
LU Y D, SHANG C, XIN L Y, et al. Application of treatment from spleen and stomach in tackling COVID-19 with intestinal microecology approach [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(7): 1–6.
- [18] 蔡梦圆, 吴澎泞, 杨仁旭, 等. “肺脾同治”法在新型冠状病毒肺炎中的应用 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(2): 63–66.
CAI M Y, WU P N, YANG R X, et al. The application of TCM theory “pifeitongzhi” in COVID-19 [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(2): 63–66.
- [19] 张召杨, 孙增涛, 刘南飞, 等. 肺脾相关理论及临床应用研究 [J]. 陕西中医, 2020, 41(11): 1623–1626, 1631.
ZHANG Z Y, SUN Z T, LIU N F, et al. Theory and clinical application of lung and spleen [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2020, 41(11): 1623–1626, 1631.
- [20] 严诏琦, 徐义峰, 李可可, 等. 国医大师洪广祥从“补虚泻

实,肺脾同治”论治支气管扩张症缓解期经验 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(8): 1997–1999.

YAN Z Q, XU Y F, LI K K, et al. Brief summary of academic thoughts of national master of TCM HONG Guang-xiang on diagnosis and treatment for pulmonary diseases [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(8): 1997–1999.

[21] 赵蓉, 邢峰丽, 张艳霞, 等. 基于“肺脾同治”中医治疗老年肺部感染研究进展 [J]. 河北中医, 2023, 45(12): 2102–2106.

ZHAO R, XING F L, ZHANG Y X, et al. Research progress of treating senile pulmonary infection with traditional Chinese medicine based on “treating both lung and spleen” [J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2023, 45(12): 2102–2106.

[22] 武妍琳, 刘喜平, 贾育新, 等. 参苓白术散对肠道菌群失调幼鼠肺部免疫炎症反应的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(11): 79–85.

WU Y L, LIU X P, JIA Y X, et al. Effect of Shenling Baizhu Powder on pulmonary immune inflammatory response in juvenile mice with intestinal dysbiosis [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2022, 29(11): 79–85.

[23] 许爱英. 间接补益的作用与临证应用意义 [J]. 中医学药刊, 2003, 21(6): 965.

XU A Y. The role of indirect tonic and its clinical significance [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2003, 21(6): 965.

[24] 韩冰阁, 张志明, 雍文兴, 等. 从肠道微生态探讨“培土生金法”在治疗新型冠状病毒肺炎中的运用 [J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(7): 105–108.

HAN B G, ZHANG Z M, YONG W X, et al. Study on the application of Peitu Shengjin method in the treatment of new coronavirus pneumonia [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2021, 35(7): 105–108.

[25] 尹燕燕, 岳昭娣, 丁懿, 等. 基于网络药理学探讨补中益气汤对新型冠状病毒肺炎恢复期的作用机制 [J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(5): 685–694.

YIN Y Y, YUE Z D, DING Y, et al. Study on the mechanism of Buzhong Yiqi Decoction on the recovery period of COVID-19 based on network pharmacology [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2021, 45(5): 685–694.

[26] LIU Z, GAO J, BAN Y, et al. Synergistic effect of paeoniflorin combined with luteolin in alleviating Lipopolysaccharides-induced acute lung injury [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 327: 118022.

[27] QING C, WU Y, LIU B, et al. Ameliorative effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides on LPS-induced acute lung injury [J]. Chem Biodivers, 2024, 21(5): e202400506.

[28] 戴全武, 刘毅, 曾格格, 等. 苓甘五味姜辛汤治疗急性肺损伤的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(24): 95–103.

DAI Q W, LIU Y, ZENG G G, et al. Study on mechanism of Linggan Wuwei Jiangxintang in treating acute lung injury [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(24): 95–103.

[29] 孔思琪, 李金田, 李娟, 等. 归芪益元膏联合顺铂通过内质网应激途径和线粒体凋亡途径对 Lewis 肺癌小鼠的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(20): 54–61.

KONG S Q, LI J T, LI J, et al. Effect of Guiqi Yiyuan ointment combined with cisplatin on mice with Lewis lung cancer through endoplasmic reticulum stress pathway and mitochondrial apoptosis pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(20): 54–61.

[30] 陆松侠, 黄茸茸, 胡健力, 等. 基于 IL-33/ST2 信号通路研究补肺汤对慢性支气管炎大鼠肺组织炎症因子表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(23): 5826–5830.

LU S X, HUANG R R, HU J L, et al. Based on IL-33/ST2 signaling pathway, the effect of Bufei Decoction on the expression of inflammatory factors in lung tissue of rats with chronic bronchitis was studied [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(23): 5826–5830.

[31] CHEN K, KOLLS J K. T cell-mediated host immune defenses in the lung [J]. Annu Rev Immunol, 2013, 31: 605–633.

[32] ANNUNZIATO F, ROMAGNANI S. Heterogeneity of human effector CD4⁺ T cells [J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(6): 257.

[33] KOH C H, LEE S, KWAK M, et al. CD8 T-cell subsets: heterogeneity, functions, and therapeutic potential [J]. Exp Mol Med, 2023, 55(11): 2287–2299.

[34] BYRNES D, MASTERSON C H, BRADY J, et al. Differential effects of cytokine versus hypoxic preconditioning of human mesenchymal stromal cells in pulmonary sepsis induced by antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Pharmaceuticals, 2023, 16(2): 149.

[35] WU J, HAYES B W, PHOENIX C, et al. A highly polarized Th₂ bladder response to infection promotes epithelial repair at the expense of preventing new infections [J]. Nat Immunol, 2020, 21(6): 671–683.

[36] ZHANG S, ZHANG N, HAN J, et al. Dynamic immune status analysis of peripheral blood mononuclear cells in patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection sepsis using single-cell RNA sequencing [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1380211.

[37] LIU J, SONG K, LIN B, et al. HMGB1 promotes neutrophil PD-L1 expression through TLR2 and mediates T cell apoptosis leading to immunosuppression in sepsis [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 133: 112130.

[38] BAUMANN S, KRUEGER A, KIRCHHOFF S, et al. Regulation of T cell apoptosis during the immune response [J]. Curr Mol Med, 2002, 2(3): 257–272.

[39] IGNEY F H, KRAMMER P H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(4): 277–288.

[40] YANG Z, KAO X, HUANG N, et al. Identification and analysis of PANoptosis-related genes in sepsis-induced lung injury by bioinformatics and experimental verification [J]. J Inflamm Res, 2024, 17: 1941–1956.

[41] SUKOCHEVA O A, NEGANOVA M E, ALEKSANDROVA Y, et al. Signaling controversy and future therapeutical perspectives of targeting sphingolipid network in cancer immune editing and

- resistance to tumor necrosis factor- α immunotherapy [J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 251.
- [42] HAN Y, BAI X, LIU S, et al. XAF1 protects host against emerging RNA viruses by stabilizing IRF1-dependent antiviral immunity [J]. J Virol, 2022, 96(17): e0077422.
- [43] YANG X, YAN J, XUE Y, et al. Single-cell profiling reveals distinct immune response landscapes in tuberculous pleural effusion and non-TPE [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1191357.
- [44] ZHU L, YANG P, ZHAO Y, et al. Single-cell sequencing of peripheral mononuclear cells reveals distinct immune response landscapes of COVID-19 and influenza patients [J]. Immunity, 2020, 53(3): 685-696.
- [收稿日期] 2024-05-28

《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!

陈娟娟,郑荣发,莫伟彬,等. 运动联合益生菌干预 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢、氧化应激及骨骼肌卫星细胞成肌分化水平的变化 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1171-1181.

CHEN J J, ZHENG R F, MO W B, et al. Changes in glycolipid metabolism, oxidative stress, and myogenic differentiation levels of skeletal muscle satellite cells in rats with type 2 diabetes mellitus treated with exercise combined with probiotics [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1171-1181.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.008

运动联合益生菌干预 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢、氧化应激及骨骼肌卫星细胞成肌分化水平的变化

陈娟娟¹, 郑荣发², 莫伟彬^{2,3*}, 李国峰², 李明亮²

(1. 凯里学院体育学院, 贵州 凯里 556000; 2. 广西师范大学体育与健康学院, 广西 桂林 541001;
3. 药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室, 广西 桂林 541001)

【摘要】 目的 观察运动联合益生菌干预 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢、氧化应激及骨骼肌卫星细胞表达的影响。**方法** 8 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只, 随机选择 10 只大鼠为正常对照组 (NC 组), 造模组大鼠腹腔注射链脲佐菌素, 建立 2 型糖尿病大鼠模型, 随机分为模型组 (TN 组)、运动 + 糖尿病组 (YTN 组)、益生菌 + 糖尿病组 (GTN 组)、运动 + 益生菌 + 糖尿病组 (YGTN 组), 6 周的递增负荷有氧跑台运动 (第 1 周跑台速度为 15 m/min, 持续 30 min; 第 2 周跑台速度为 15 m/min, 持续 60 min; 第 3 ~ 6 周跑台速度为 19.3 m/min, 运动时间持续 60 min, 持续训练到第 6 周, 每周 5 d); GTN 组和 YGTN 组在训练前 1 h 灌胃 10.0 mL/(kg·d) 的 Lactibiane Iki 益生菌溶液 (浓度为 10⁷ CFU/mL)。最后, 测定大鼠糖脂代谢指标、氧化应激指标及骨骼肌卫星细胞蛋白的表达。**结果** (1) TN 组、YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠空腹血糖 (fasting plasma glucose, FBG)、血清胰岛素 (fasting serum insulin, FINS)、糖化血红蛋白 (hemoglobin A1c, HBA1C) 和胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment-insulin resistance index, HOMA-IR) 水平均高于 NC 组 ($P < 0.01$), 其中, YGTN 组大鼠 FBG 水平均低于 TN 组、YTN 组、GTN 组 ($P < 0.05$); YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 FINS 水平均与 TN 组比较均有所下降 ($P < 0.01$); YGTN 组大鼠血清 HBA1C 水平均低于 TN 组、YTN 组和 GTN 组水平 ($P < 0.01$); YGTN 组大鼠 HOMA-IR 指数与 TN 组、YTN 组和 GTN 组比较下降较显著 ($P < 0.01$)。结果表明有氧运动联合益生菌干预组大鼠 FBG、FINS、HBA1C 和 HOMA-IR 含量下降较明显。(2) TN 组大鼠血清总胆固醇 (total cholesterol, T-CHO)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL) 和游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 水平均高于 NC 组 ($P < 0.05$), YGTN 组大鼠血清 T-CHO、TG、LDL 和 FFA 水平均低于 TN 组 ($P < 0.05$), 基本上恢复到 NC 组的水平。TN 组大鼠血清高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL) 水平低于 NC 组 ($P < 0.05$), YGTN 组大鼠血清 HDL 水平高于 TN 组 ($P < 0.05$), 基本上恢复到 NC 组水平。结果表明有氧运动联合益生菌干预糖尿病大鼠, 可降低糖尿病大鼠血清 T-CHO、TG、LDL、FFA 含量, 提高 HDL 水平较明显。(3) TN 组大鼠血清丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和游离 8-异前列腺素 F2 α (8-iso-prostaglandin F2 α , 8-iso-PGF2 α) 水平均高于 NC 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), YGTN 组大鼠血清 MDA 和 8-iso-PGF2 α 水平均低于 TN 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); TN 组大鼠血清过氧化氢酶 (catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 水平均低于 NC 组 ($P < 0.01$), YGTN 组大鼠血清 CAT、SOD、GSH-Px 和 T-AOC 水平均高于 NC 组 ($P < 0.01$), 但基本上恢复到 NC 组的水平。(4) TN 组大鼠骨骼肌卫星细胞配对盒基因 7 (paired box gene 7, Pax7)、成肌分化因子 (myogenic determination gene, MyoD)、肌细胞生成素 (myogenin, MyoG) 和生肌因子 5 (myogenic factor 5, Myf5) 蛋白表达均低于 NC 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), YGTN

【基金项目】 广西教育厅科研项目 (2021KY1596), 广西师范大学教育发展基金会“教师成长基金”项目 (EDF2016005)。
Funded by Scientific Research Project of Guangxi Education Department (2021KY1596), “Teachers’ Growth Fund” Project of Education Development Foundation of Guangxi Normal University (EDF2016005).

【作者简介】 陈娟娟, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 运动医学。Email: chenjuanjuan0701@163.com

【通信作者】 莫伟彬, 男, 博士, 教授, 研究方向: 运动与分子生物学。Email: mogaol@163.com

组大鼠骨骼肌 Pax7、MyoD、MyoG 和 Myf5 蛋白表达均高于 TN 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);基本上恢复到 NC 组水平。TN 组大鼠骨骼肌生成抑制素 (myostatin, MSTN) 蛋白表达高于 NC 组 ($P < 0.05$), YGTN 组大鼠骨骼肌 MSTN 蛋白表达低于 TN 组 ($P < 0.05$),基本上恢复到 NC 组水平。**结论** 益生菌和运动具有减轻胰岛素抵抗,改善血脂和氧化激的作用,在改善 2 型糖尿病大鼠血糖和胰岛素水平具有协同作用。此外,有氧运动联合益生菌干预促进了肌细胞的分化,可能对防止 T2DM 引起肌肉质量的流失和力量下降以及肌肉组织的并发症发挥一定的作用。

【关键词】 运动;益生菌;2 型糖尿病大鼠;糖脂代谢;氧化应激;骨骼肌卫星细胞

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2024) 09-1171-11

Changes in glycolipid metabolism, oxidative stress, and myogenic differentiation levels of skeletal muscle satellite cells in rats with type 2 diabetes mellitus treated with exercise combined with probiotics

CHEN Juanjuan¹, ZHENG Rongfa², MO Weibin^{2,3*}, LI Guofeng², LI Mingliang²

(1. School of Physical Education, Kaili College, Kaili 556000, China; 2. School of Physical Education and Health, Guangxi Normal University, Guilin 541001, China; 3. State Key Laboratory of Medicinal Resource Chemistry and Pharmaceutical Molecular Engineering, Guilin 541001, China)

Corresponding author: MO Weibin. E-mail: mogaol@163.com

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of exercise combined with probiotic intervention on glycolipid metabolism, oxidative stress, and skeletal muscle satellite cell expression in type 2 diabetic rats. **Methods** From 60 8-week-old SPF-grade SD male rats, 10 rats were randomly selected as the normal control group (NC), and the rest were injected intraperitoneally with streptozotocin, establishing a rat model of type 2 diabetes mellitus. The diabetic rats were randomly divided into model (TN), exercise + diabetes (YTN), probiotic + diabetes (GTN), and exercise + probiotics + diabetes (YGTN) groups. The exercise groups were subjected to 6 weeks of incremental load aerobic treadmill exercise (speed of 15 m/min for 30 min in week 1, 15 m/min for 60 min in week 2, and 19.3 m/min for 60 min in weeks 3 ~ 6, with continuous training until week 6, 5 days/week). The GTN and YGTN groups were administered 10.0 mL/(kg·d) of Lactibiane Iki probiotic solution (concentration of 10^7 CFU/mL) one hour before training. Glycolipid metabolism indexes, oxidative stress indexes, and expression of skeletal muscle satellite cell proteins were measured in rats. **Results** (1) The levels of fasting plasma glucose (FBG), fasting serum insulin (FINS), hemoglobin A1c (HBA1C) and (homeostasis model assessment-insulin resistance index (HOMA-IR)) were higher in the TN, YTN, GTN, and YGTN groups than in the NC group ($P < 0.01$). The levels of FBG in the YGTN group were lower than those in the TN, YTN, GTN, and YGTN groups ($P < 0.05$). Serum FINS levels in YTN, GTN and YGTN groups were all decreased compared with those in the TN group ($P < 0.01$). Serum HBA1C levels were lower in the YGTN group than the TN, YTN, and GTN groups ($P < 0.01$). The HOMA-IR indices of rats in the YGTN group decreased more significantly compared with those in the TN, YTN, and GTN groups ($P < 0.01$). The result showed that FBG, FINS, HBA1C, and HOMA-IR decreased more significantly in rats in the aerobic exercise combined with probiotic intervention group than the other intervention groups. (2) Serum total cholesterol (T-CHO), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL) and free fatty acid (FFA) levels in the TN group were higher than those in the NC group ($P < 0.05$), and those of the YGTN group were lower than those of the TN group ($P < 0.05$) and basically restored to the level of the NC group. Serum high density lipoprotein cholesterol (HDL) levels were lower in the TN group than the NC group ($P < 0.05$), Serum HDL levels of rats in TN group were lower than those of the NC group ($P < 0.05$), and those in the YGTN group were higher than those of TN group ($P < 0.05$), which were basically restored to the level of NC group. The result showed that aerobic exercise combined with probiotic intervention reduced serum T-CHO, TG, LDL, FFA levels and increased HDL levels more significantly than other interventions in diabetic rats. (3) Serum malondialdehyde (MDA) and 8-iso-prostaglandin F2 α (8-isoPGF2 α) levels of rats in the TN group were higher than those in the NC group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and those of

rats in the YGTN group were lower than those in the TN group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Serum catalase (CAT), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px) and total antioxidant capacity (T-AOC) in the TN group were lower than those in the NC group ($P < 0.01$), and those of rats in the YGTN group were higher than those of the NC group ($P < 0.01$) and were basically restored to the levels of NC group. (4)The protein expression levels of paired box gene 7(Pax7), myogenic determination gene(Myod), myogenin(Myog) and myogenic factor 5(Myf5) in the skeletal muscle of rats in the TN group were lower than those in the NC group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and these levels were higher in the YGTN group than the TN group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); basically, the levels were restored to those of the NC group. In the TN group, myostatin(MSTN) protein expression was higher in the TN group than the NC group ($P < 0.05$), and that in the YGTN group was lower than that in the TN group ($P < 0.05$) and basically restored to the level of the NC group. **Conclusions** The result showed that probiotics and aerobic exercise had a synergistic effect in improving blood glucose and insulin levels, attenuating insulin resistance, improving lipids and oxidative radicals, and preventing the phenomenon of disturbed glucose metabolism, thus achieving dynamic equilibrium regulation in type 2 diabetic rats. Aerobic exercise combined with probiotics also promoted myoblast differentiation, which played a role in preventing T2DM-induced loss of muscle mass and strength as well as muscle tissue complications.

[Keywords] exercise; probiotics; type 2 diabetic rats; glucolipid metabolism; oxidative stress; skeletal muscle satellite cells

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

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种慢性代谢疾病,是胰岛素抵抗、胰岛素相对缺乏所造成的高血糖,由环境和遗传共同作用的结果,常见症状是机体内糖脂代谢紊乱、疲倦或酸痛、 β 细胞功能障碍和慢性炎症等。骨骼肌作为机体内外代谢葡萄糖的主要器官,也是胰岛素作用最重要的靶器官之一,骨骼肌胰岛素抵抗是 T2DM 发病的主要因素。骨骼肌脂质代谢的紊乱、高血糖、氧化应激和胰岛素抵抗等因素均会导致糖尿病发生,进而诱导机体内慢病共病的发生^[1]。有研究证实, T2DM 发生时会出现骨骼肌卫星细胞成脂化、脂肪异位堆积、氧化应激和炎症因子聚集等肌卫星细胞功能改变^[2]。在治疗和预防糖尿病方面,科学合理的有氧运动能够改善 T2DM 患者机体内血液流变性、调节糖脂代谢和增强肌卫星细胞活动等功效^[3]。益生菌是宿主有益的活性微生物,能改善机体内宿主微生态平衡,合理的补充益生菌能够改善胰岛素的敏感性和调控胰岛素信号,在调节糖脂代谢紊乱和胃肠道功能、降低胆固醇、增强免疫力和提高肌肉抗疲劳能力等方面具有重要的作用^[4]。运动联合益生菌干预 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢、氧化应激及骨骼肌卫星细胞成肌分化水平的变化还鲜有报道。本研究通过 6 周的有氧运动和益生菌干预 T2DM 大鼠,分析糖脂代谢、氧化应激及骨骼肌卫星细胞配对盒基因 7(paired box gene 7, Pax7)、成肌分化因子(myogenic determination gene, MyoD)、肌细胞生成素(myogenin, MyoG)、生肌因子 5(myogenic

factor 5, Myf5) 和肌生成抑制素(myostatin, MSTN) 蛋白表达的变化,为预防和治疗 T2DM 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

60 只 8 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 170 ± 10 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。饲养室内温度为 $21 \sim 25$ °C,湿度 $50\% \pm 5\%$,采用 12 h/12 h 照明,常规分笼饲养,自由饮食,正常对照组以常规饲料饲养,造模组大鼠给予高脂饮食(60% 常规饲料、18.5% 猪油、20% 糖、1% 胆固醇、0.5% 胆盐),饲养于桂林医学院实验中心屏障环境中【SYXK(桂)2020-0005】。本实验通过广西师范大学实验动物伦理委员会伦理审查(GXNU-202401-004)。

1.1.2 主要试剂与仪器

链脲佐菌素(批号:MFCD00006607)、柠檬酸缓冲液(批号:202411208)均购于德国 Merck KGaA;益生菌固体配剂(法国 Laboratoire PiLeJe 公司,批号:G20230216);Accu-CheK 血糖试纸(罗氏血糖健康医护公司,批号:20241208);胰岛素(货号:H203-1-1)、糖化血红蛋白(货号:A056-1-1)、总胆固醇(货号:A111-1-1)、甘油三酯(货号:A110-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇(货号:A112-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇(货号:A113-1-1)、游离脂肪酸(货号:A042-2-1),以上试剂盒均购于南京建成生物研究所;丙二醛试

剂盒(货号: ml094963)、过氧化氢酶(货号: ml037079)、超氧化物歧化酶(货号: ml059387)、谷胱甘肽过氧化物酶(货号: ml059130)、总抗氧化能力(货号: ml092654)、游离 8-异前列腺素 F2 α (货号: ab133025),以上试剂盒均购于上海酶联生物科技有限公司。

大鼠动物跑台(正华, ZH-PT);酶标测定仪(型号: M1000, TeCAn, 瑞士);台式高速度冷冻离心机(型号: 3k15, 德国 SIGMA 公司);电泳仪(美国, BD 公司);Dolphin-Doc 凝胶成像系统和 Dolphin-ID 软件(美国 Wealtec 公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模与分组

60 只大鼠经饲养 1 周后,随机分为正常对照组(NC 组, 10 只)和造模组(50 只)。NC 组常规饲养,造模组高脂饮食。参照 REED 等^[5]的方案建立 2 型糖尿病大鼠模型,腹腔注射链脲佐菌素(用 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液溶解,剂量 35 mg/kg),NC 组注射等体积柠檬酸缓冲液。注射 7 d 后尾静脉采血检测血糖,血糖浓度 ≥ 16.7 mmol/L 且大鼠出现多饮、多食和多尿症状为造模成功。剔除造模未成功和死亡大鼠 6 只,造模成功率 88%,选取成模大鼠 40 只,分为模型组(TN 组)、运动 + 糖尿病组(YTN 组)、益生菌 + 糖尿病组(GTN 组)、运动 + 益生菌 + 糖尿病组(YGTN 组),每组 10 只。

1.2.2 益生菌灌服量

益生菌灌胃组按新配制好的益生菌溶液 10.0 mL/(kg·d)灌服^[6-7],浓度为 10^7 CFU/mL,其余各组灌胃等体积蒸馏水,每天训练前 1 h 灌胃 1 次,连续灌胃 6 周。

1.2.3 运动方案

训练模型按 BEDFORD 等^[8]的研究并做适当调整,训练前先进行 1 周的适应性跑台运动(8 m/min, 15 min, 每周 5 d, 0°)。第 1 周跑台速度为 15 m/min,持续 30 min;第 2 周跑台速度为 15 m/min,持续 60 min;第 3 ~ 6 周跑台速度为 19.3 m/min,运动时间持续 60 min,持续训练到第 6 周,每周 5 d,跑度坡度 0°。YTN 组、YGTN 组均按此方案进行为期 6 周的递增负荷有氧跑台运动。NC 组、TN 组和 GTN 组不运动。

1.2.4 动物取材

6 周有氧运动干预结束后,大鼠禁食 12 h,尾静脉取血,测试空腹血糖(fasting plasma glucose, FBG)

后腹腔注射 20% 乌拉坦溶液(3 mL/kg),开腹,经腹主动脉取血,放入管中,室温静置,4 °C 4000 r/min 离心 10 min,取血清,-4 °C 保存备用。迅速取出腓肠肌,用冰冻的生理盐水清洗,吸干,包裹,-80 °C 冰箱保存待测。

1.2.5 糖脂代谢、氧化应激指标测定

(1)糖代谢指标测定方法:FBG 的测定采用氧化酶测定法,血清胰岛素(fasting serum insulin, FINS)和糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HBA1C)采用 ELISA 测定法,具体操作严格按照试剂盒说明书检测。胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-insulin resistance index, HOMA-IR)的计算公式为 $FBG \times FINS / 22.5$ 。

(2)脂代谢指标测定方法:采用微板法检测血清血脂总胆固醇(total cholesterol, T-CHO)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL)、游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)具体操作严格按照试剂盒说明书检测。

(3)氧化应激指标测定方法:采用 ELISA 测定法检测血清氧化应激指标丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、游离 8-异前列腺素 F2 α (8-iso-prostaglandin F2 α , 8-isoPGF2 α),以上试剂盒均购于南京建成生物工程研究所,各指标具体操作严格按照试剂盒说明书检测。

1.2.6 Western Blot 法检测骨骼肌卫星细胞相关蛋白表达

取大鼠腓肠肌组织 150 mg,经液氮研磨、RIPA 裂解、离心(4 °C, 12 000 r/min, 20 min)、取上清液,采用 BCA 法检测蛋白浓度,上样缓冲液与蛋白样品混匀后,经 100 °C 水浴 10 min;在垂直电流仪上电泳,样品经 SDS-PAGE 分离后移至 PVDF 膜上,转膜,封闭,按试剂盒要求加入一抗 Pax7(1 : 1000)、MyoD(1 : 1000)、MyoG(1 : 1000)、Myf5(1 : 1000)、MSTN(1 : 1000)和 β -actin(1 : 1000)置于摇床 4 °C 过夜,洗膜,再加入羊抗鼠二抗(1 : 2000),ECL 显色;转移膜上曝光,显影、定影后置于凝胶图像成像分析系统和 Image J v1.8.0 软件对条带灰度进行分析和比较。

1.3 统计学分析

数据统计采用 SPSS 26.0 统计软件处理, 计量资料用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组之间统计方法采用 t 检验; 多组之间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 大鼠糖代谢指标比较

TN 组、YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠 FBG 水平平均高于 NC 组($P < 0.01$), 但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后, YGTN 组大鼠 FBG 水平低于 TN 组($P < 0.05$), 其中, YGTN 组 FBG 水平下降较明显, 与 TN 组、YTN 组和 GTN 组比较有极其显著性差异($P < 0.05$)。TN 组、YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 FINS 水平均高于 NC 组, 其中 TN 组大鼠 FINS 水平与 NC 组比较具有极其显著性差异($P < 0.01$), YTN 组和 GTN 组大鼠 FINS 水平与 NC 组比较具有显著性差异($P < 0.05$), 但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合

益生菌干预后, YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 FINS 水平与 TN 组比较均有所下降($P < 0.01$), 其中, YGTN 组 FINS 水平下降较明显, 基本上恢复到 NC 组水平。TN 组、YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 HBA1C 水平均高于 NC 组, 其中 TN 组、YTN 组和 GTN 组大鼠 HBA1C 水平与 NC 组比较具有极其显著性差异($P < 0.01$), YGTN 组大鼠血清 HBA1C 水平与 NC 组比较具有显著性差异($P < 0.05$), 但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后, YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 HBA1C 水平均有所下降, 其中 YGTN 组 HBA1C 水平下降较明显, 与 TN 组、YTN 组、GTN 组比较有极其显著性差异($P < 0.01$)。TN 组、YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠 HOMA-IR 指数均高于 NC 组($P < 0.01$), 但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后, YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠 HOMA-IR 指数均低于 TN 组($P < 0.01$), 其中, YGTN 组 HOMA-IR 指数下降较明显, 与 YTN 组、GTN 组比较有极其显著性差异($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 大鼠糖代谢指标检测情况比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	FBG / (mmol/L)	FINS / (mIU/L)	HBA1C / (mmol/L)	HOMA-IR
NC 组 NC group	5.73 $\pm$ 1.01	10.67 $\pm$ 0.81	4.89 $\pm$ 1.06	2.59 $\pm$ 0.96
TN 组 TN group	17.23 $\pm$ 0.25 ^{aa}	24.61 $\pm$ 0.31 ^{aa}	12.34 $\pm$ 0.95 ^{aa}	18.85 $\pm$ 0.94 ^{aa}
YTN 组 YTN group	14.34 $\pm$ 0.37 ^{aa}	17.33 $\pm$ 0.35 ^{acc}	11.32 $\pm$ 1.01 ^{aa}	11.05 $\pm$ 1.02 ^{acce}
GTN 组 GTN group	14.14 $\pm$ 0.67 ^{aa}	16.42 $\pm$ 0.88 ^{acc}	10.89 $\pm$ 1.06 ^{aa}	10.32 $\pm$ 0.88 ^{acce}
YGTN 组 YGTN group	9.35 $\pm$ 1.16 ^{aceegg}	13.02 $\pm$ 0.33 ^{cc}	6.53 $\pm$ 0.89 ^{acceegg}	5.45 $\pm$ 0.33 ^{acceegg}

注: 与 NC 组相比, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$; 与 TN 组相比, ^c $P < 0.05$, ^{cc} $P < 0.01$; 与 YTN 组相比, ^e $P < 0.05$, ^{ee} $P < 0.01$; 与 GTN 组相比, ^g $P < 0.05$, ^{gg} $P < 0.01$ 。(下图/表同)

Note. Compared with the NC group ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$. Compared with the TN group, ^c $P < 0.05$, ^{cc} $P < 0.01$. Compared with the YTN group, ^e $P < 0.05$, ^{ee} $P < 0.01$. Compared with the GTN group, ^g $P < 0.05$, ^{gg} $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

2.2 大鼠血脂代谢比较

与 NC 组相比, TN 组大鼠血清 T-CHO 水平明显升高, 具有显著性差异($P < 0.05$), 但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后, YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 T-CHO 水平均高于 NC 组($P < 0.05$)而低于 TN 组, 其中, YGTN 组下降较明显, 与 TN 组、YTN 组和 GTN 组比较有显著性差异($P < 0.05$)。与 NC 组相比, TN 组大鼠血清 TG 水平明显升高, 具有显著性差异($P < 0.05$), 但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后, YTN 组、GTN 组和 YGTN 组均高于 NC 组, 其中 YTN 组和 GTN 组与 NC 组比较有显著性差异($P < 0.05$), 而 YTN 组、GTN 组和 YGTN 组与 TN 组相比均有所下降, 其中 YGTN 组下降较明显, 与 TN 组、

YTN 组和 GTN 组比较有显著性差异($P < 0.05$)。与 NC 组相比, TN 组大鼠血清 HDL 水平下降较明显, 具有显著性差异($P < 0.05$), 但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后, YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 HDL 水平均有所升高, 其中 YGTN 组大鼠基本上恢复到 NC 组水平, 但 YTN 组和 GTN 组仍低于 NC 组($P < 0.05$), 而 YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 HDL 水平均高于 TN 组, 其中 YGTN 组上升较明显, 与 TN 组和 YTN 组比较有显著性差异($P < 0.05$)。与 NC 组相比, TN 组大鼠血清 LDL 水平明显升高, 具有显著性差异($P < 0.05$), 但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后, YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 LDL 水平均高于 NC 组, 其中 YTN 组和

GTN 组大鼠血清 LDL 水平与 NC 组比较有显著性差异($P < 0.05$),而 YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 LDL 水平与 TN 组相比均有所下降,其中 YGTN 组下降较明显,与 TN 组、YTN 组和 GTN 组比较有显著性差异($P < 0.05$)。与 NC 组相比,TN 组大鼠血清 FFA 水平明显升高,具有显著性差异($P < 0.05$),但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后,YTN 组和 GTN 组大鼠血清 FFA 水平均高于 NC 组($P < 0.05$),YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 FFA 水平与 TN 组比较均有所下降($P < 0.05$),见表 2。

2.3 大鼠氧化应激指标含量比较

TN 组大鼠血清 MDA 水平高于 NC 组($P < 0.05$),但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后,YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 MDA 水平均高于 NC 组而低于 TN 组,其中,YTN 组和 GTN 组 MDA 水平与 NC 组比较具有显著性差异($P < 0.05$),而 YGTN 组基本上恢复到 NC 组的水平,与 TN 组、YTN 组和 GTN 组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。TN 组大鼠血清 CAT 水平低于 NC 组($P < 0.01$),但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后,YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 CAT 水平均低于 NC 组而高于 TN 组,其中 YTN 组和 GTN 组大鼠血清 CAT 水平与 NC 组比较具有显著性差异($P < 0.05$),YGTN 组大鼠血清 CAT 水平与 TN 组、YTN 组和 GTN 组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。TN 组大鼠血清 SOD 水平低于 NC 组($P < 0.01$),但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后,YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 SOD 水平均低于 NC 组,其中 YTN 组、GTN 组与 NC 组比较有极其显著性差异($P < 0.01$),YGTN 组与 NC 组比较具有显著性差异(P

< 0.05),而 YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 SOD 水平均高于 TN 组($P < 0.05$),其中 YGTN 组大鼠血清 SOD 水平均高于 YTN 组和 GTN 组($P < 0.01$)。TN 组大鼠血清 GSH-Px 水平低于 NC 组($P < 0.01$),但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后,YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 GSH-Px 水平均低于 NC 组,其中 YTN 组和 GTN 组 GSH-Px 水平与 NC 组比较具有极其显著性差异($P < 0.01$),而 YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 GSH-Px 水平均高于 TN 组,其中 YTN 组和 GTN 组 GSH-Px 水平与 TN 组比较具有显著性差异($P < 0.05$),YGTN 组大鼠血清 GSH-Px 水平与 TN 组比较具有极其显著性差异($P < 0.01$),此外,YGTN 组大鼠血清 GSH-Px 水平升高较明显,与 YTN 组和 GTN 组比较有显著性差异($P < 0.05$)。TN 组大鼠血清 T-AOC 水平低于 NC 组($P < 0.01$),但 TN 组分别进行运动、益生菌及运动联合益生菌干预后,YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 T-AOC 水平均低于 NC 组而高于 TN 组,其中 YTN 组和 GTN 组 T-AOC 水平与 NC 组比较具有极其显著性差异($P < 0.01$),而 YGTN 组大鼠血清 T-AOC 水平均与 TN 组、YTN 组和 GTN 组比较有极其显著性差异($P < 0.01$)。TN 组大鼠血清 8-isoPGF2 α 水平高于 NC 组($P < 0.01$),但 TN 组经运动、益生菌及运动联合益生菌干预后,YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠血清 8-isoPGF2 α 水平均高于 NC 组而低于 TN 组,其中 YTN 组和 GTN 组 8-isoPGF2 α 水平与 NC 组比较具有极其显著性差异($P < 0.01$),而 YTN 组和 GTN 组大鼠血清 8-isoPGF2 α 水平与 TN 组比较有显著性差异($P < 0.05$),YGTN 组大鼠血清 8-isoPGF2 α 水平与 TN 组、YTN 组和 GTN 组比较有极其显著性差异($P < 0.01$),见表 3。

表 2 大鼠脂代谢指标检测情况($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mmol/L}$)

Table 2 Detection of lipid metabolism indexes in each group of rats($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mmol/L}$)					
组别 Groups	T-CHO	TG	HDL	LDL	FFA
NC 组 NC group	1.76 $\pm$ 0.28	0.92 $\pm$ 0.31	1.26 $\pm$ 0.03	0.61 $\pm$ 0.07	0.81 $\pm$ 0.07
TN 组 TN group	2.99 $\pm$ 0.81 ^a	1.78 $\pm$ 0.52 ^a	0.78 $\pm$ 0.07 ^a	1.63 $\pm$ 0.10 ^a	1.78 $\pm$ 0.38 ^a
YTN 组 YTN group	2.81 $\pm$ 0.15 ^a	1.52 $\pm$ 0.12 ^a	0.86 $\pm$ 0.12 ^a	1.41 $\pm$ 0.09 ^a	1.19 $\pm$ 0.33 ^{ac}
GTN 组 GTN group	2.71 $\pm$ 0.12 ^a	1.50 $\pm$ 0.15 ^a	0.91 $\pm$ 0.09 ^a	1.38 $\pm$ 0.05 ^a	1.10 $\pm$ 0.11 ^{ac}
YGTN 组 YGTN group	2.23 $\pm$ 0.11 ^{aceg}	1.21 $\pm$ 0.11 ^{ceg}	1.16 $\pm$ 0.05 ^{ce}	0.76 $\pm$ 0.07 ^{ceg}	0.93 $\pm$ 0.07 ^c

表 3 大鼠血清氧化应激指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Comparison of serum oxidative stress indexes in rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	MDA/(nmol/mg)	CAT/(U/mL)	SOD/(U/mL)	GSH-Px/(U/mg)	T-AOC /(U/mL)	8-isoPGF2α/(ng/L)
NC 组 NC group	6. 01 ± 0. 11	10. 31 ± 0. 19	170. 30 ± 1. 16	110. 21 ± 1. 11	9. 32 ± 1. 17	290. 33 ± 18. 11
TN 组 TN group	8. 35 ± 0. 09 ^a	5. 19 ± 0. 20 ^{aa}	90. 14 ± 3. 55 ^{aa}	52. 21 ± 1. 31 ^{aa}	4. 78 ± 1. 15 ^{aa}	398. 22 ± 11. 21 ^{aa}
YTN 组 YTN group	8. 12 ± 0. 11 ^a	6. 17 ± 1. 01 ^{aa}	109. 21 ± 1. 16 ^{aac}	78. 20 ± 1. 51 ^{aac}	5. 37 ± 1. 18 ^{aa}	360. 28 ± 11. 34 ^{aac}
GTN 组 GTN group	8. 02 ± 0. 08 ^a	7. 18 ± 1. 20 ^a	111. 23 ± 1. 21 ^{aac}	79. 34 ± 1. 10 ^{aac}	5. 57 ± 1. 20 ^{aa}	359. 28 ± 11. 39 ^{aac}
YGTN 组 YGTN group	6. 32 ± 0. 10 ^{ceg}	9. 21 ± 1. 21 ^{ceceg}	152. 31 ± 1. 22 ^{acceegg}	106. 27 ± 1. 08 ^{ceceg}	9. 20 ± 1. 08 ^{ceceegg}	301. 73 ± 11. 78 ^{ceceegg}

2.4 骨骼肌卫星细胞相关蛋白表达水平结果

由图 1 可知,TN 组、YTN 组和 GTN 组大鼠骨骼肌 Pax7 蛋白表达均低于 NC 组($P < 0.05$),YGTN 组大鼠骨骼肌 Pax7 蛋白表达高于 TN 组($P < 0.05$)。TN 组、YTN 组和 GTN 组大鼠骨骼肌 MyoD 蛋白表达均低于 NC 组($P < 0.05$),YTN 组、GTN 组和 YGTN 组大鼠骨骼肌 MyoD 蛋白表达均高于 TN 组($P < 0.05$)。TN 组、YTN 组和 GTN 组大鼠骨骼肌 MyoG 蛋白表达均低于 NC 组($P < 0.05$),GTN 组和 YGTN 组大鼠骨骼肌 MyoG 蛋白表达均高于 TN 组($P < 0.05$)。TN 组、YTN 组和 GTN 组大鼠骨骼肌 Myf5 蛋白表达均低于 NC 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),GTN 组和 YGTN 组大鼠骨骼肌 Myf5 蛋白表达均高于 TN 组和 YTN 组($P < 0.01$)。TN 组、YTN 组和 GTN 组大鼠骨骼肌 MSTN 蛋白表达均高于 NC 组($P < 0.05$),YGTN 组大鼠骨骼肌 MSTN 蛋白表达低于 TN 组($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 运动联合益生菌干预对 2 型糖尿病大鼠糖代谢水平的影响

2 型糖尿病是一种常见的全身代谢障碍疾病,其主要发病机制是机体内胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能受损,其最直接的检测指标是 FBG 和 FINS。多项研究表明,运动能够促进骨骼肌对血糖的吸收和利用,降低血糖和促进胰岛素的分泌^[9-13]。本研究发现,TN 组大鼠空腹血糖、血清胰岛素和胰岛素抵抗指数,都明显高于 NC 组,但通过有氧运动干预和灌服益生菌后,大鼠空腹血糖、血清胰岛素和胰岛素抵抗指数都有所下降,特别是有氧运动联合益生菌干预组大鼠空腹血糖、血清胰岛素和胰岛素抵抗指数下降较明显,表明益生菌和有氧运动协同减轻胰岛素抵抗,从而达到调节机体内的动态平衡。

HbA1C 是机体内红细胞中血红蛋白与血清中

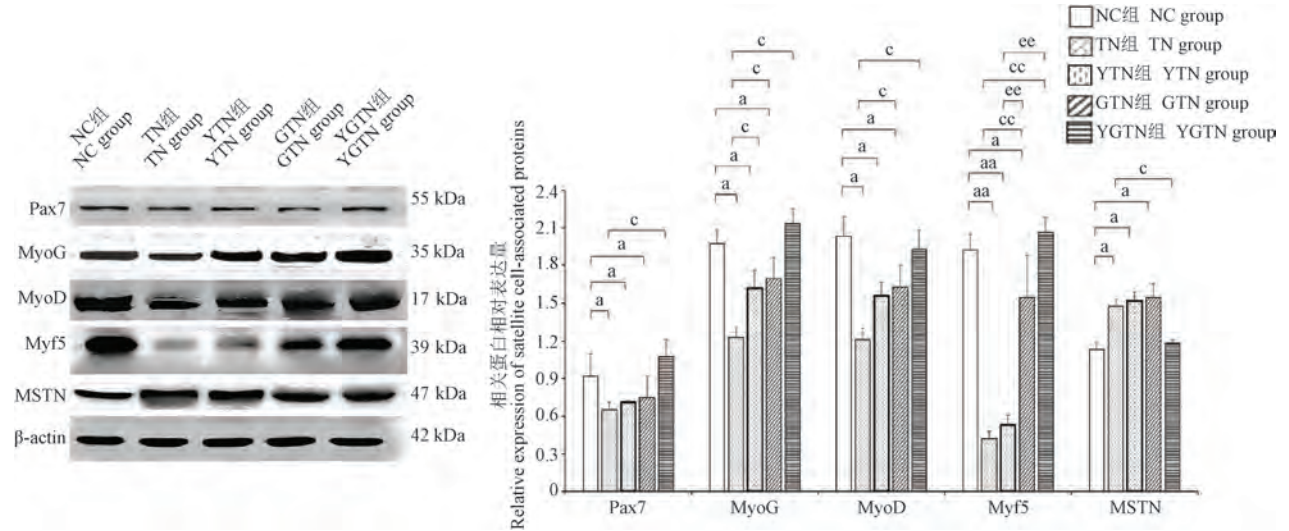


图 1 各组大鼠骨骼肌卫星细胞相关蛋白表达

Figure 1 Skeletal muscle satellite cell-associated protein expression in various groups of rats

糖类相结合的产物,是评价 2 型糖尿病患者控制血糖的重要指标^[14]。金玉琴等^[15]研究发现,在 2 型糖尿病患者中,高浓度的 HbA1C 患者合并血管并发症发生率高于正常浓度 HbA1C 患者。本研究显示,单纯的有氧运动干预或补充益生菌降低糖尿病大鼠 HbA1C 水平不明显,但有氧运动联合益生菌干预糖尿病大鼠,血清 HbA1C 水平明显低于 TN 组和单纯有氧运动及益生菌的补充,这与孟晴等^[12]和李源源等^[16]的研究结果相似。这可能是由于有氧运动能够增强胰岛素敏感性和增加肌肉组织对葡萄糖的摄取,而益生菌能够减少机体内肝糖原的积累和改善大鼠糖的耐量受损。

3.2 运动联合益生菌干预对 2 型糖尿病大鼠血脂代谢的影响

FFA 是脂肪代谢的产物,是机体的重要能量来源;血清 FFA 除了能够反映机体的代谢调节外,也能够反映机体内的生理功能或病理状态。李艳辉等^[17]研究发现,有氧运动能够促进 FFA 的摄取和利用,致使 TG 代谢加强,浓度下降,同时降低了 LDL-C 含量和提高 HDL-C 含量。王小梅等^[18]研究发现,单纯的有氧运动干预或补充谷氨酰胺均能缓解 T2DM 大鼠脂代谢,但两者联合更优于单一的作用。本研究结果显示,单纯的有氧运动干预或补充益生菌对降低糖尿病大鼠 T-CHO、TG、LDL、FFA 含量和提高 HDL 水平不明显,但二者联合可降低糖尿病大鼠血清 T-CHO、TG、LDL、FFA 含量,提高 HDL 水平较明显。提示有氧运动联合益生菌具有改善血脂代谢的作用,这可能是由于益生菌在有氧运动的作用下,增加机体内抗氧化能力和促进机体内血液循环,致使机体分解更多的能源代谢底物和增加抗氧化物质的合成,从而达到改善血脂的作用,但其机制还有待进一步研究。

3.3 运动联合益生菌干预对 2 型糖尿病大鼠氧化应激水平的影响

MDA、CAT、SOD、GSH-Px、T-AOC 和 8-isoPGF2 α 是细胞内抗氧化酶的重要组成部分,也是检测机体内氧化应激的重要指标。机体在受到外来刺激时,机体内细胞 SOD 和 CAT 对维持机体内细胞氧化与抗氧化物质的平衡至关重要^[19]。MDA 可反映机体内脂质过氧化损伤的氧化应激的严重程度^[20]。GSH-Px 是机体内重要的过氧化物分解酶,可联合 SOD 和 CAT 清除超氧阴离子,此外, GSH-Px 具有直接清除过氧化脂质和活性氧簇,从

而达到防止机体内的损伤^[21]。总抗氧化能力 (T-AOC) 是反映机体内不同组织总抗氧化物质与抗氧化酶的氧化能力,可间接反映机体组织的脂质过氧化损伤程度^[22]。8-isoPGF2 α 是评价机体内氧化应激的敏感指标和生物标志物^[23]。郭佳青等^[24]研究发现,抗阻联合有氧运动能够减轻妊娠期糖尿病患者血糖和氧化应激水平。吴琦等^[25]研究表明,维格列汀联合恩格列净可改善 T2DM 患者氧化应激失衡。本研究结果显示,单纯的有氧运动干预或补充益生菌对提高糖尿病大鼠 CAT、SOD、GSH-Px、T-AOC 含量和降低 MDA 与 8-isoPGF2 α 水平不明显。但有氧运动联合益生菌干预对提高糖尿病大鼠血清 CAT、SOD、GSH-Px、T-AOC 含量和降低 MDA 与 8-isoPGF2 α 水平较明显,基本上恢复到 NC 组水平。提示有氧运动联合益生菌具有改善 T2DM 氧化应激的作用,从而提高患者血糖控制效果。

3.4 运动联合益生菌干预对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌卫星细胞相关蛋白表达的影响

肌卫星细胞是存在于骨骼肌纤维基底膜与基膜之间的成体干细胞,具有参与骨骼肌纤维的增殖、分化以及骨骼肌形成、发育、修复和再生的作用。而糖尿病患者随着病情的发展,骨骼肌出现肌肉质量的流失和力量下降的症状,即骨骼肌组织的并发症^[26]。研究发现,糖尿病患者常发生骨骼肌的异位脂质堆积和肌卫星细胞的成脂化^[2]。Pax7 是 Pax7 基因家族第 III 组的成员之一,是卫星细胞的分子标记。张杰^[27]研究发现,跑台运动和抗阻运动后 Pax7 表达显著升高。李娜^[28]研究证实, Pax7 参与调控了力竭运动与钝挫引起骨骼肌劳损的卫星细胞的增殖和分化过程。本研究发现,单纯的有氧运动干预或补充益生菌对糖尿病大鼠骨骼肌 Pax7 蛋白表达增加不明显,但有氧运动联合益生菌干预糖尿病大鼠骨骼肌 Pax7 蛋白表达高于糖尿病模型组和 NC 组,提示有氧运动联合益生菌干预激活腓肠肌局部肌卫星细胞分化,对防止 T2DM 引起肌肉质量的流失和力量下降以及肌肉组织的并发症起到一定的作用,但其机制还有待进一步深入研究。

MyoD、MyoG 和 Myf5 是成肌调节因子家族 (MRF) 的重要成员。MyoD 是肌卫星细胞激活和增殖的标志^[29]。MyoG 基因是一种与机体内肌纤维数目有关的基因,与 MyoD 基因家族在骨骼肌细胞体系中均存在表达,在机体内骨骼肌组织的发育、生长、成熟和损伤后的修复及神经萎缩等方面起到极

为重要的作用^[30]。Myf5 是 Myod 家族中不同功能的分子,是肌祖细胞最早被诱导表达的因子,与 MyoD 具有互补的冗余功能作用^[31]。有学者研究发现,肌卫星细胞在机体内受到激活后 MyoD 优先被表达,然后与 Myf5 共激活 MyoG,最终致使肌卫星细胞的分化^[32]。SNIJDERS 等^[33]研究发现,一次性大强度力竭运动后 MyoD、MyoG 和 Myf5 激活调控了肌卫星细胞的增殖。程春芳等^[34]研究发现,MyoD 和 Myf5 是机体内骨骼肌损伤修复的源动力。蔡乐^[35]研究发现,12 周的有氧运动致使骨骼肌 MyoD、MyoG 和 Myf5 蛋白表达水平升高。本研究结果显示,单纯的有氧运动干预或补充益生菌对糖尿病大鼠骨骼肌 MyoD、MyoG 和 Myf5 蛋白表达增加不明显,但有氧运动联合益生菌干预糖尿病大鼠骨骼肌 MyoD、MyoG 和 Myf5 蛋白表达高于糖尿病模型组和 NC 组,提示有氧运动联合益生菌干预在一定程度上促进了肌细胞的分化。

MSTN 属转化生长分化因子-P(TGF- β)超家族成员,是参与抑制肌卫星细胞活化和成肌细胞增殖的肌肉因子,主要表达于骨骼肌中,在心肌中也有少量表达,具有调节肌肉发育、糖代谢、脂蛋白代谢过程和肌卫星细胞的活化及自我更新能力的作用^[36]。GARCÍA-FONTANA 等^[37]研究发现,MSTN 参与机体内糖代谢影响胰岛素抵抗,调控肌肉生长,与糖代谢受损存在明显的关系。谢玉亭等^[38]研究发现,耐力训练可降低糖尿病大鼠骨骼肌 MSTN 表达水平,促进了比目鱼肌横截面积增加。李灵杰等^[39]研究发现,运动致使大鼠腓肠肌 MSTN 表达下降,心衰诱导的骨骼肌萎缩得到改善和抑制骨骼肌凋亡。张靓等^[40]研究发现,跑台运动联合高脂饮食组大鼠腓肠肌 MSTN 蛋白表达水平显著下降,提示 8 周的跑台运动联合高脂饮食诱导了大鼠腓肠肌结构发生重塑。本研究结果显示,单纯的有氧运动干预或补充益生菌对糖尿病大鼠骨骼肌 MSTN 蛋白变化不大,但有氧运动联合益生菌干预糖尿病大鼠骨骼肌 MSTN 蛋白表达显著下降并低于糖尿病 TN 组,基本上恢复到 NC 组的水平,提示有氧运动联合益生菌干预糖尿病大鼠骨骼肌下降 MSTN 表达,可能是促进骨骼肌细胞葡萄糖摄取和利用。

综上所述,相较于单纯有氧运动或补充益生菌而言,有氧运动联合益生菌对 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂代谢的控制效果更佳,可明显减轻氧化应激程度,促进肌细胞的分化,对防止糖尿病大鼠糖脂代

谢紊乱和肌肉组织的并发症起到一定的作用。

参 考 文 献 (References)

- [1] 李欣,寇少杰,李粉萍,等. 肠道菌群与糖尿病微血管病变的研究进展 [J]. 中国糖尿病杂志, 2023, 31(4): 303–308.
LI X, KOU S J, LI F P, et al. Overview of the relationship between intestinal flora and diabetic microvascular diseases [J]. Chin J Diabetes, 2023, 31(4): 303–308.
- [2] 黄怡,周越. 2 型糖尿病下骨骼肌状态及影响肌卫星细胞增殖分化的因素 [J]. 生理科学进展, 2018, 49(4): 270–274.
HUANG Y, ZHOU Y. The status of skeletal muscle and factors affecting the proliferation and differentiation of muscle satellite cells in type 2 diabetes mellitus [J]. Prog Physiol Sci, 2018, 49(4): 270–274.
- [3] 黄怡. 离心运动对 2 型糖尿病大鼠肌卫星细胞及巨噬细胞的作用 [D]. 北京: 北京体育大学; 2018.
HUANG Y. Effects of eccentric exercise on satellite cells and macrophage state in type 2 diabetes mellitus [D]. Beijing: Beijing Sport University; 2018.
- [4] 刘佳,夏永军,熊智强,等. 益生菌对 2 型糖尿病缓解作用的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 466–471.
LIU J, XIA Y J, XIONG Z Q, et al. Research progress of probiotics in alleviating type 2 diabetes mellitus [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(1): 466–471.
- [5] REED M J, MESZAROS K, ENTES L J, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [J]. Metabolism, 2000, 49(11): 1390–1394.
- [6] 莫伟彬,杨衍滔,郭艳菊,等. 益生菌干预对运动大鼠胃肠激素与 AQP4 表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 411–417.
MO W B, YANG Y T, GUO Y J, et al. Effect of probiotics on gastrointestinal hormones and expression of AQP4 in rats during exercise [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 411–417.
- [7] CHEN Y M, WEI L, CHIU Y S, et al. *Lactobacillus plantarum* TWK10 supplementation improves exercise performance and increases muscle mass in mice [J]. Nutrients, 2016, 8(4): 205.
- [8] BEDFORD T G, TIPTON C M, WILSON N C, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1979, 47(6): 1278–1283.
- [9] HANSEN M, PALSSØE M K, HELGE J W, et al. The effect of metformin on glucose homeostasis during moderate exercise [J]. Diabetes Care, 2015, 38(2): 293–301.
- [10] 朱洪竹,朱梅菊. 有氧运动联合螺旋藻营养补充对 2 型糖尿病大鼠学习记忆的影响及其机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(11): 1845–1853.
ZHU H Z, ZHU M J. The effects of aerobic exercise and spirulina supplement on learning and memory function in hippocampus of type 2 diabetes rats and its mechanism [J]. Nat Prod Res Dev, 2021, 33(11): 1845–1853.
- [11] 胡晓蓉,李修英,许娟,等. 高强度间歇运动联合抗阻运动对 2 型糖尿病患者糖脂代谢的影响 [J]. 中国卫生检验杂志,

- 2023, 33(12): 1486–1489, 1494.
- HU X R, LI X Y, XU J, et al. Application of high intensity intermittent exercise combined with resistance exercise in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Chin J Health Lab Technol, 2023, 33(12): 1486–1489, 1494.
- [12] 孟晴, 陈伟, 张明, 等. 有氧联合抗阻运动对 2 型糖尿病患者效果的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2018, 24(12): 1465–1470.
- MENG Q, CHEN W, ZHANG M, et al. Effect of aerobic and resistance exercise for patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2018, 24(12): 1465–1470.
- [13] 袁新国, 谢梦洲, 杨英, 等. 二冬汤和有氧运动对 2 型糖尿病大鼠糖代谢和脂代谢的影响 [J]. 重庆医学, 2018, 47(28): 3610–3613.
- YUAN X G, XIE M Z, YANG Y, et al. Effect of ErDong Decoction and aerobic exercise on glucose metabolism and lipid metabolism in type 2 diabetes rats [J]. Chongqing Med, 2018, 47(28): 3610–3613.
- [14] 张灵灵, 刘劲柏, 刘玉倩, 等. 运动防治糖尿病的研究进展 [J]. 生物学通报, 2015, 50(8): 1–3.
- ZHANG L L, LIU J B, LIU Y Q, et al. Research progress on prevention and treatment of diabetes by exercise [J]. Bull Biol, 2015, 50(8): 1–3.
- [15] 金玉琴, 沈菁, 吴秀萍, 等. 胱抑素 C、糖化血红蛋白及尿微量白蛋白与 2 型糖尿病血管并发症关系的探讨 [J]. 徐州医科大学学报, 2020, 40(5): 370–372.
- JIN Y Q, SHEN J, WU X P, et al. Relationship between cystatin C, glycosylated hemoglobin and microalbuminuria and vascular complications of type 2 diabetes mellitus [J]. J Xuzhou Med Univ, 2020, 40(5): 370–372.
- [16] 李源源, 方奋, 贾占昀, 等. 不同强度有氧运动对 2 型糖尿病患者血糖及心肺耐力的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2017, 39(8): 617–619.
- LI Y Y, FANG F, JIA Z Y, et al. Effects of different intensity aerobic exercise on blood glucose and cardiopulmonary endurance in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Chin J Phys Med Rehabil, 2017, 39(8): 617–619.
- [17] 李艳辉, 衣雪洁. 有氧运动对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌 ERK1/2 活性的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2017, 33(1): 33–37.
- LI Y H, YI X J. The effects of aerobic exercise on ERK1/2 activity in skeletal muscle of type 2 diabetic rats [J]. Chin J Appl Physiol, 2017, 33(1): 33–37.
- [18] 王小梅, 景会锋. 有氧运动和谷氨酰胺对 2 型糖尿病大鼠氧化应激及相关因子表达的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(2): 150–154.
- WANG X M, JING H F. Effects of aerobic exercise and glutamine on oxidative stress and expression of related factors in type 2 diabetic rats [J]. Chin J Appl Physiol, 2019, 35(2): 150–154.
- [19] 刘子源, 谭泽明, 谭佳琪, 等. 有氧运动联合荔枝多酚对 2 型糖尿病大鼠血管炎症的影响及其机制探讨 [J]. 中南药学, 2021, 19(9): 1833–1840.
- LIU Z Y, TAN Z M, TAN J Q, et al. Effect of aerobic exercises and litchi polyphenols on the vascular inflammation and related mechanism in type 2 diabetic rats [J]. Cent South Pharm, 2021, 19(9): 1833–1840.
- [20] 郑欣, 戚艳艳, 毕丽娜, 等. 吡格列酮二甲双胍联合运动康复对超重或肥胖 2 型糖尿病患者糖脂代谢和胰岛功能的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(7): 1257–1260, 1238.
- ZHENG X, QI Y Y, BI L N, et al. Effects of pioglitazone metformin combined with exercise rehabilitation on glucose and lipid metabolism and islet function in overweight or obese patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Prog Mod Biomed, 2021, 21(7): 1257–1260, 1238.
- [21] 贾靖. 白灵菇多糖对运动小鼠氧化应激的影响 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(2): 895–901.
- JIA J. Effect of plesurotus nebroidensis polysaccharide on oxidative stress in exercised mice [J]. Genom Appl Biol, 2020, 39(2): 895–901.
- [22] 云冰, 褚雪菲, 王恩行, 等. 不同浓度化痰逐瘀汤在冠心病血瘀模型家兔干预中的应用效果及对 GSH、SOD、T-AOC 水平的影响 [J]. 四川中医, 2020, 38(5): 86–89.
- YUN B, CHU X F, WANG E X, et al. Application effect of different concentrations of Huatan Zhuyu Decoction on intervention of blood stasis model rabbits with coronary heart disease and its influence on the levels of GSH, SOD and T-AOC [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2020, 38(5): 86–89.
- [23] 刘柯伶, 王莉, 翁铭娜. 8-OHdG、8-isoPGF 2 α 在预测孕妇早产中的意义 [J]. 皖南医学院学报, 2017, 3(1): 41–43.
- LIU K L, WANG L, WENG M N. Significance of 8-OHdG and 8-isoPGF 2 α in predicting preterm delivery [J]. J Wannan Med Coll, 2017, 3(1): 41–43.
- [24] 郭佳青, 王佳洁, 秦梦路. 抗阻联合有氧运动对妊娠期糖尿病患者血糖、氧化应激及妊娠结局的影响 [J]. 中国计划生育学杂志, 2023, 31(6): 1296–1301.
- GUO J Q, WANG J J, QIN M L. Effects of the combined resistance-aerobic exercise of pregnant women with gestational diabetes mellitus on their blood glucose level, oxidative stress, and pregnancy outcomes [J]. Chin J Fam Plan, 2023, 31(6): 1296–1301.
- [25] 吴琦, 王慧娟, 谭昊, 等. 维格列汀联合恩格列净治疗对 2 型糖尿病患者机体炎症状态和氧化应激水平的影响 [J]. 中国处方药, 2023, 21(9): 114–116.
- WU Q, WANG H J, TAN H, et al. Effects of vigitazone combined with engelglinide on inflammation and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. J Chin Prescr Drug, 2023, 21(9): 114–116.
- [26] 郑密, 黄新一, 李莹, 等. 不同频率电刺激对 2 型糖尿病大鼠血糖水平及骨骼肌卫星细胞激活的影响 [J]. 哈尔滨体育学院学报, 2023, 41(2): 11–17.
- ZHENG M, HUANG X Y, LI Y, et al. Effects of different frequency of electrical stimulation on blood glucose level and muscle satellite cell activation in type 2 diabetics rats [J]. J Harbin Sport Univ, 2023, 41(2): 11–17.

- [27] 张杰. 跑台和抗阻运动对骨骼肌葡萄糖摄取和 mTOR 信号通路的影响 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(9): 4263-4269.
ZHANG J. Effects of treadmill exercise and resistance exercise on skeletal muscle glucose uptake and mTOR signaling pathway [J]. *Genom Appl Biol*, 2020, 39(9): 4263-4269.
- [28] 李娜. 力竭运动与钝挫伤对大鼠骨骼肌卫星细胞体外增殖及 Hes1/Jagged1/Pax7 含量的影响 [D]. 扬州: 扬州大学; 2016.
LI N. Effects of exhaustive exercise and blunt trauma on the proliferation of rat skeletal muscle satellite cells in vitro and the content of Hes1/Jagged1/Pax7 [D]. Yangzhou: Yangzhou University; 2016.
- [29] 孙文杰. 大强度训练对大鼠骨骼肌蛋白质分解代谢与生肌调节因子的影响 [D]. 扬州: 扬州大学; 2009.
SUN W J. The influence of overloading on the catabolism of protein and the gene expression of myogenic regulatory factors in the skeletal muscles of male rats [D]. Yangzhou: Yangzhou University; 2009.
- [30] 王今越, 王小虹, 冯维斗. 运动 + 热量限制对大鼠骨骼肌质量的影响及 Akt, mTOR 的作用 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(19): 4336-4340.
WANG J Y, WANG X H, FENG W D. Effects of exercise + calorie restriction on skeletal muscle quality in rats and the effects of Akt and mTOR [J]. *Chin J Gerontol*, 2021, 41(19): 4336-4340.
- [31] 王震, 蔺海旗, 何霏, 等. 运动激活骨骼肌卫星细胞; 增龄性肌衰减症及肌肉损伤修复的运动预防和治疗 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(23): 3752-3759.
WANG Z, LIN H Q, HE F, et al. Exercise activates skeletal muscle satellite cells; exercise prevention and treatment for age-related sarcopenia and muscle injury [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2021, 25(23): 3752-3759.
- [32] 廖锦雯, 房冬梅. 运动对肌少症肌卫星细胞通路的影响研究 [J]. 体育科技文献通报, 2022, 30(6): 257-260.
LIAO J W, FANG D M. Research on the effect of exercise on muscle satellite cell pathway in sarcopenia [J]. *Bull Sport Sci Technol*, 2022, 30(6): 257-260.
- [33] SNIJDERS T, VERDIJK L B, BEELEN M, et al. A single bout of exercise activates skeletal muscle satellite cells during subsequent overnight recovery [J]. *Exp Physiol*, 2012, 97(6): 762-773.
- [34] 程春芳, 万娟, 丁恺志, 等. 成肌细胞增殖与分化及其调控机制 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(14): 2200-2206.
CHENG C F, WAN J, DING K Z, et al. Regulatory mechanism of myoblast proliferation and differentiation [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2023, 27(14): 2200-2206.
- [35] 蔡乐乐. LncRNA MAR1 在有氧运动促进衰老性肌萎缩小鼠成肌分化中的机制研究 [D]. 太原: 山西大学; 2023.
CAI L L. Study on the mechanism of LncRNA MAR1 in aerobic exercise promoting myogenic differentiation in aging muscular atrophy mice [D]. Taiyuan: Shanxi University; 2023.
- [36] 耿红红, 王政. 肌肉生长抑制素的研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2012, 33(9): 110-112.
GENG H H, WANG Z. Research progress of MSTN [J]. *Anim Husb Feed Sci*, 2012, 33(9): 110-112.
- [37] GARCÍA-FONTANA B, REYES-GARCÍA R, MORALES-SANTANA S, et al. Relationship between myostatin and irisin in type 2 diabetes mellitus: a compensatory mechanism to an unfavourable metabolic state? [J]. *Endocrine*, 2016, 52(1): 54-62.
- [38] 谢玉亭, 王兆馨, 刘秀娟. 8 周有氧和日粮限制对肥胖大鼠减重及比目鱼肌 MSTN 的影响 [J]. 湖北体育科技, 2023, 42(7): 580-583, 653.
XIE Y T, WANG Z X, LIU X J. Effects of 8-week aerobic exercise and dietary restriction on weight loss and MSTN of soleus in obese rats [J]. *Hubei Phys Sci*, 2023, 42(7): 580-583, 653.
- [39] 李灵杰, 张靓, 陈雪飞, 等. 跑台运动对腹主动脉缩窄诱导的心衰大鼠骨骼肌凋亡和 VEGFB 及其受体表达的影响 [J]. 中国体育科技, 2022, 58(5): 84-93, 104.
LI L J, ZHANG J, CHEN X F, et al. Effects of treadmill running on skeletal muscle apoptosis and VEGFB/VEGFR1 expression of abdominal aortic constriction induced heart failure rats [J]. *Chin Sport Sci Technol*, 2022, 58(5): 84-93, 104.
- [40] 张靓, 杨洪涛, 曹玉仙, 等. 跑台运动对高脂饮食诱导的肥胖大鼠腓肠肌肌肉生长抑制素的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2014, 33(5): 446-452.
ZHANG J, YANG H T, CAO Y X, et al. Effects of treadmill running on myostatin in gastrocnemius of obese rats [J]. *Chin J Phys Med*, 2014, 33(5): 446-452.

[收稿日期] 2024-01-17

徐梦婷,朱钰晨,苏丹,等. 江香薷籽油对果蝇睡眠、嗅觉能力和抗氧化指标的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1182-1190.

XU M T, ZHU Y C, SU D, et al. Effects of *Mosla chinensis* seed oil on sleep, olfactory ability, and antioxidant indexes in *D. melanogaster* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1182-1190.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.009

江香薷籽油对果蝇睡眠、嗅觉能力和抗氧化指标的影响

徐梦婷¹,朱钰晨¹,苏丹¹,宋永贵¹,张文凯¹,徐磊¹,
马秋婷¹,刘志勇^{1*},郭绍勇²

(1. 江西中医药大学实验动物科技中心,南昌 330004;2. 江西金贝农业发展有限公司,江西 新余 338000)

【摘要】 目的 探究江香薷籽油(*Mosla chinensis* seed oil, MCSO)对果蝇的生理行为和抗氧化指标的影响。**方法** 将1日龄野生型 W¹¹¹⁸ 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*, *D. melanogaster*)分为对照组、0.25%、0.5%、1%、2%和4%剂量组,并设雌雄分组。对照组喂食基础培养基,各剂量组分别喂食添加了0.25%、0.5%、1%、2%和4%浓度的MCSO培养基,采用攀爬实验探究最佳给药浓度和给药时间。再将果蝇分为空白组、模型组和给药组,模型组果蝇通过夜间重复光照刺激法剥夺果蝇睡眠,建立失眠模型。采用食欲实验、攀爬实验、应激实验、嗅觉记忆实验和检测果蝇睡眠-觉醒节律探究MCSO对果蝇生理行为的影响;采用酶联免疫吸附实验检测果蝇体内超氧化物歧化酶(super oxidase dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。**结果** MCSO能够增强30日龄果蝇的运动能力($P < 0.01$);提高SOD、CAT活性($P < 0.01$)、降低体内MDA含量($P < 0.01$);改善衰老果蝇的嗅觉记忆能力。睡眠剥夺后雌性果蝇模型组夜晚睡眠时间减少($P < 0.05$),雄性果蝇模型组夜晚睡眠时间减少($P < 0.01$),喂食MCSO后,睡眠剥夺的雌性果蝇夜间睡眠时间延长($P < 0.05$),雄性果蝇夜间睡眠时间延长($P < 0.01$)。**结论** MCSO对果蝇具有一定的体内抗氧化能力,能延长睡眠剥夺果蝇的夜间睡眠时间以及提高果蝇的嗅觉记忆力。

【关键词】 果蝇;江香薷籽;抗氧化;睡眠

【中图分类号】 Q95-33

【文献标志码】 A

【文章编号】 1005-4847 (2024) 09-1182-09

Effects of *Mosla chinensis* seed oil on sleep, olfactory ability, and antioxidant indexes in *D. melanogaster*

XU Mengting¹, ZHU Yuchen¹, SU Dan¹, SONG Yonggui¹, ZHANG Wenkai¹, XU Lei¹,
MA Qiuting¹, LIU Zhiyong^{1*}, GUO Shaoyong²

(1. Laboratory Animal Science and Technology Center of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi Jinbei Agricultural Development Co., Ltd, Xinyu 338000, China)

Corresponding author: LIU Zhiyong. E-mail: liuzhiyong0791@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of MCSO on physiological behavior and antioxidant index in *D. melanogaster*. **Methods** One-day-old wild type *D. melanogaster* was divided into control group, 0.25%, 0.5%, 1%, 2% and 4% dose groups, as well as male and female groups. The control group was exposed to the base medium, and each

【基金项目】 江西中医药大学科技创新团队发展计划(CXTD-22004)。

Funded by the Jiangxi University of Chinese Medicine Science and Technology Innovation Team Development Program(CXTD-22004)。

【作者简介】 徐梦婷,女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理与毒理。Email: 1789956108@qq.com

【通信作者】 刘志勇,男,教授,博士,研究方向:中药药理与毒理。Email: liuzhiyong0791@163.com

dose group was exposed to the MCSO medium added with 0.25%, 0.5%, 1%, 2% and 4% concentrations, respectively. The optimal dosage concentration and time of administration were investigated by climbing experiment. Then the flies were divided into control group, model group and MCSO group. The model group was established by depriving the flies of sleep through repeated nocturnal light stimulation. Period of drug treatment, appetite test, negative geotaxis ability test, stress test, olfactory memory test, and sleep-wake rhythm detection were used to explore the effects of MCSO on their physiological behavior. The activities of super oxidase dismutase (SOD), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** MCSO enhanced the locomotory ability of 30-day-old *D. melanogaster* ($P < 0.01$), increased the activity of SOD and CAT ($P < 0.01$), and decreased the concentration of MDA ($P < 0.01$). Improve olfactory memory of senile fruit flies. After sleep deprivation, the night sleep time of female *Drosophila* model group was reduced ($P < 0.05$), and that of male *Drosophila* model group was reduced ($P < 0.01$). After feeding MCSO, the night sleep time of female *drosophila* model group was extended ($P < 0.05$), and that of male *drosophila* model group was extended ($P < 0.01$). **Conclusions** MCSO had a certain antioxidant effect, prolonging the sleep time and improving the olfactory memory of sleep-deprived *Drosophila*.

[Keywords] *Drosophila melanogaster*; *Mosla chinensis* seed; antioxidant activity; sleep

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

香薷为唇形科石荠苎属植物石香薷 (*Mosla chinensis* Maxim) 或江香薷 (*Moda chinensis*-*Jiangxiangru*), 前者习称“青香薷”, 为野生品; 后者习称“江香薷”, 为栽培品种^[1]。江香薷是江西的道地药材^[2]。江香薷籽油 (*Mosla chinensis* seed oil, MCSO) 系江香薷成熟后干燥的种子经一系列工艺精制而成的金黄色透明的油状液体。研究报道^[3], MCSO 中含有大量多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA), PUFA 参与了生物体生理调控的许多方面^[4], 其中 α -亚麻酸 (α -linolenic acid, ALA) 的含量为 50% ~ 60%, ALA 具有抗氧化^[5]、增强智力、提高记忆力^[6]、保护视力^[7]、改善睡眠^[8]、抗代谢综合征、抑制血栓性疾病、降低血脂、降血压、调节肠道菌群^[9]等功能, 以上研究提示 MCSO 可能具有很好的开发应用前景。

果蝇作为一种经典的模式生物, 发育周期短、繁殖能力强。果蝇与人类基因的同源性高达 80%, 且功能保守, 这些同源基因在人类和果蝇中执行着类似的生物学功能^[10], 使研究人员能够在短时间内通过果蝇模型进行人类相关疾病的研究。因此, 本实验利用果蝇这一模式生物, 研究 MCSO 对果蝇行为学以及抗氧化酶活性与 MDA 含量的影响, 探究其体内抗氧化、改善睡眠与学习记忆的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

1 日龄野生型 W¹¹¹⁸ 黑腹果蝇 (*Drosophila*

melnogaster, *D. melanogaster*), 培养在恒温箱内, 培养环境温度 25 ℃、湿度 65%, 光照周期 L/D = 12 h/12 h, 来自江西中医药大学实验动物科技中心。

1.1.2 主要试剂与仪器

MCSO (实验室自制); 考马斯亮蓝 G250 (上海麦克林生化科技有限公司, 批号 C14869772); 葡萄糖 (商丘亚翔生物科技有限公司, 批号 230302); 30% 过氧化氢 (西陇科学, 批号 2211082); 果蝇超氧化物歧化酶 (SOD) ELISA 试剂盒 (货号 HP-E22129)、果蝇过氧化氢酶 (CAT) ELISA 试剂盒 (货号 HP-E22186) 和果蝇丙二醛 (MDA) ELISA 试剂盒 (货号 HP-E22158) 均购自赫澎 (上海) 生物科技有限公司。

CP313 电子天平 (CP313, 奥豪斯仪器有限公司); Varioskan Flash 多功能读数仪 (Thermo Varioskan Flash, 美国赛默飞世尔公司); 电热恒温三用水箱 (HH-WB22-550-II, 上海跃进医疗器械有限公司); Beckman Allegra 冷冻离心机 (X-30R, 美国 beckman 公司); 果蝇活动监测系统 (DAM2, 南京伊科医疗器械有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养基制备

基础培养基: 取蔗糖 18.75 g、玉米粉 26.25 g、琼脂 1.875 g、酵母粉 10 g, 加蒸馏水 250 mL 放入锅中搅拌直至所有材料加热溶解, 至沸腾 (100 ℃) 后 10 min 加入丙酸 1.25 mL ($\geq 99\%$) 和尼铂金甲酯 3 mL (5%), 继续加热 3 min 至培养基浓稠状态, 立即分装在备用培养管中, 放凉至室温后, 放入 4 ℃ 冰箱保存。

MCSO 培养基:在配置基础培养基的过程中,加入按比例称取的 MCSO,在加热的过程中不断搅拌至均匀,其余步骤同基础培养基的制备,分别制得 0.25%、0.5%、1%、2%和 4%的 MCSO 培养基。

1.2.2 夜间重复光照刺激剥夺果蝇睡眠方法

参考许光辉等^[11]的方法,在果蝇培养箱中安置光照控制器,设定时间为 8:00 ~ 20:00 正常光照,晚 20:00 熄灯后,从 20:00 开始,每个整点恢复光照 10 min,其他时间为黑暗期,持续至次日上午 8:00,光照强度 650 Lx。

1.2.3 探究最佳给药浓度

参考宋明容等^[12]的方法稍作修改,选择 1 日龄 W^{1118} 型果蝇,分为对照组、MCSO 0.25%、0.5%、1%、2%和 4%剂量组,各 30 只。对照组以基础培养基连续喂养 7 d;MCSO 各剂量组 1 日龄果蝇以基础培养基喂养 2 d 后分别饲养在 0.25%、0.5%、1%、2%和 4%MCSO 培养基 5 d。

第 8 天将 6 组果蝇分别进行攀爬能力测试并计算果蝇攀附指数 (climb index, CI),并参考果蝇存活情况确定 MCSO 的最佳给药浓度。操作方法:将待测果蝇转移至测定管中,轻拍测定管使果蝇落在测定管底部,记录在 10 s 内爬升至 7.5 cm 的果蝇数,每组果蝇测 3 次,两次测量之间间隔 30 min,按公式计算果蝇攀附指数 (CI) ($CI = 10 \text{ s 内爬升至 } 7.5 \text{ cm 果蝇总数} / \text{果蝇总数} \times 100$;存活率 = 喂食 7 d 后存活果蝇数量 / 总样本量 $\times 100\%$,结果不计算实验中意外飞走的果蝇)。

1.2.4 MCSO 对果蝇摄食量的影响

参考文献^[13]方法,收集羽化后 1 d 的野生型 W^{1118} 果蝇共 360 只,随机分成 2 组,一组为空白组,另一组为给药组,每组 30 只,设 3 个平行管。空白组果蝇在基础培养基培养 20 d,给药组果蝇在基础培养基培养 10 d 后转入给药培养基培养 10 d。于 21 d 将果蝇转移至空管饥饿 1 h,通过毛细管喂食用 5%葡萄糖溶液配置的 0.5%亮蓝溶液,5 h 后 CO_2 麻醉,倒入研磨器中,移液枪移取 200 μL 超纯水,进行研磨,再加入 800 μL 超纯水,混匀后离心,取上清液,涡旋 30 s,取 200 μL 于 96 孔板,625 nm 处测定吸光度。

1.2.5 MCSO 对果蝇攀爬能力的影响

按“1.2.4”进行分组培育,选择 30 日龄的中年果蝇^[14]为实验对象。空白组果蝇在基础培养基培养 30 d,给药组果蝇在基础培养基培养 20 d 后转入

给药培养基培养 10 d,于第 31 天进行测试。

1.2.6 MCSO 对果蝇抗应激能力的影响

按“1.2.4”进行分组给药,每管 10 只,设置 3 个平行管。氧化应激损伤实验:于饲养 21 d 将果蝇转出空的培养管,饥饿 2 h,再向其中加入浸有双氧水的滤纸条,每隔 1 h 观察并记录果蝇存活情况。热应激实验:参考张婉迎等^[15]的方法并稍作修改,于饲养 21 d 将果蝇转入空管,并放置于 39 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅内,每隔 1 h 记录果蝇存活情况直至全部死亡并绘制生存曲线。

1.2.7 MCSO 对失眠果蝇睡眠的影响

收集羽化 12 h 内的果蝇,分为空白组、模型组和给药组,每组 32 只,并设雌雄分组,空白组与模型组果蝇于基础培养基喂养 7 d,给药组果蝇于给药培养基喂养 7 d,于第 8 天晚上移入果蝇活动监测管中进行睡眠监测(于监测前适应 12 h)。睡眠检测方法:将实验所需的果蝇分别转移至细小玻璃管内(内径 5 mm、长 65 mm,一端装入果蝇培养基或给药培养基用黑色小帽封住,另一端用小棉球封住)每根小管内 1 只果蝇,并将细小玻璃管放置在果蝇红外活动检测器上,通过 DAMSystem 3.0 软件每 5 min 记录 1 次果蝇活动次数。若 5 min 内活动次数为 0,表示果蝇处于睡眠状态,记录为果蝇的睡眠时间,连续记录 24 h。

1.2.8 MCSO 对果蝇嗅觉记忆的影响

参考文献^[16]方法进行,每组 50 只,分为空白组与给药组,并设雌雄分组,选择 30 日龄的果蝇为实验对象。空白组果蝇在基础培养基培养 30 d,给药组果蝇在基础培养基培养 20 d 后转入给药培养基培养 10 d。于第 31 天开始实验,将果蝇饥饿 2 h 后分别放进 1000 mL 的烧杯中,再分别放进带有孔洞并且装有香蕉的 50 mL 有孔离心管 2 支,1 支离心管装有香蕉,另 1 支离心管在香蕉的上端隔有纱布,果蝇只可以闻到香蕉的味道但是不能吃到香蕉。然后观察果蝇进入可食离心管的数目。每隔 1 h 观察记录 1 次进入离心管的果蝇只数。

1.2.9 MCSO 对果蝇抗氧化酶活性的影响

收集羽化后 1 d 的野生型 W^{1118} 果蝇,每组 150 只,按“1.2.4”进行分组给药。于培养第 21 天麻醉称重,加入预冷的生理盐水制备 2%的组织匀浆液。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,3000 r/min,离心 10 min,取上清液,按照 SOD、CAT、MDA 试剂盒说明书测定 SOD、CAT 的酶活性和 MDA 的含量。

1.3 统计学分析

数据用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 IBM SPSS 27.0 软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。使用 Graph Pad Prism 9.5.1 绘图。

2 结果

2.1 最佳给药浓度的筛选

利用果蝇的负趋地性进行攀爬实验,能够很好的反应其运动能力。不同剂量的 MCSO 对果蝇 CI 与存活率的影响见表 1,0.5% 剂量组能够提高雌性 CI,差异具有显著性,0.5% 和 2% 剂量组均有提高雄性果蝇 CI 的趋势,但在实验中发现,2% 剂量组雄性

果蝇与 0.5% 浓度组雄性果蝇相比死亡率较高,4% 剂量组的果蝇存活率仅为 83%。可能是由于高浓度组的培养基气味过浓,影响了果蝇进食导致死亡。因此,通过 5 d 的药物暴露选择 0.5% 剂量作为最佳给药浓度。

2.2 MCSO 对果蝇摄食量的影响

有研究报道表明,适当的饮食限制可延缓机体衰老,延长寿命,增强机体的抗氧化能力^[17]。由图 1 可知,雌、雄果蝇喂食 MCSO 后,与对照组相比,摄食量无显著性差异,因此排除了饮食限制对抗衰老作用的影响。

表 1 不同浓度的 MCSO 对果蝇攀附指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	n		CI		存活率/% Survivorship/%	
	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
0.25% 剂量组 0.25% dose group	27	25	77.77 ± 3.03	92.33 ± 1.89	90.00	83.33
0.5% 剂量组 0.5% dose group	28	29	94.05 ± 1.68 [#]	93.10 ± 0.00	96.55	96.67
1% 剂量组 1% dose group	27	25	71.60 ± 1.74	90.67 ± 1.89	90.00	83.30
2% 剂量组 2% dose group	29	25	82.76 ± 2.82	97.33 ± 1.89	96.67	86.20
4% 剂量组 4% dose group	20	25	65.00 ± 0.00	90.67 ± 1.89	66.67	83.33
对照组 Normal group	28	28	88.09 ± 4.45	90.47 ± 1.69	93.33	93.33

注:与对照组相比,[#] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$.

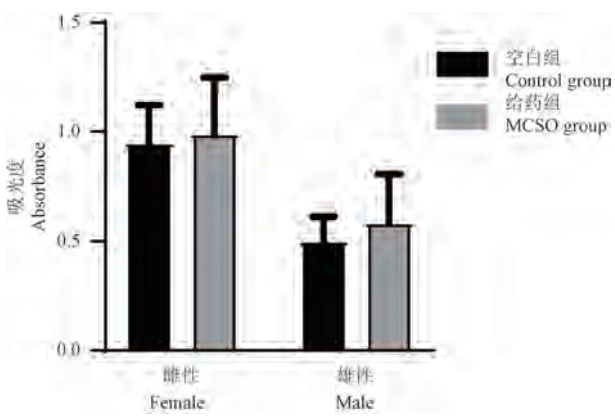


图 1 MCSO 对果蝇摄食量的影响
Figure 1 Effect of MCSO on food intake of D. melanogaster

2.3 MCSO 对果蝇攀爬能力的影响

随着果蝇年龄的增长,其运动、嗅觉、学习能力

和昼夜节律性也随着年龄衰退^[18]。由表 2 可知,在喂食 MCSO 后,果蝇的攀爬能力得到了显著提高,雌、雄果蝇的 CI 提高率分为 38.77% 和 46.08%。表明 MCSO 能够改善果蝇衰老导致的运动能力下降。

表 2 MCSO 对 30 d 果蝇攀爬能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)
Table 2 Effect of MCSO on the negative geotaxis ability of 30 d D. melanogaster($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别 Groups	雌性 CI Female CI	雄性 CI Male CI
空白组 Control group	44.44 ± 1.92	49.44 ± 2.25
给药组 MCSO group	61.67 ± 2.21 ^{**}	72.22 ± 2.03 ^{**}

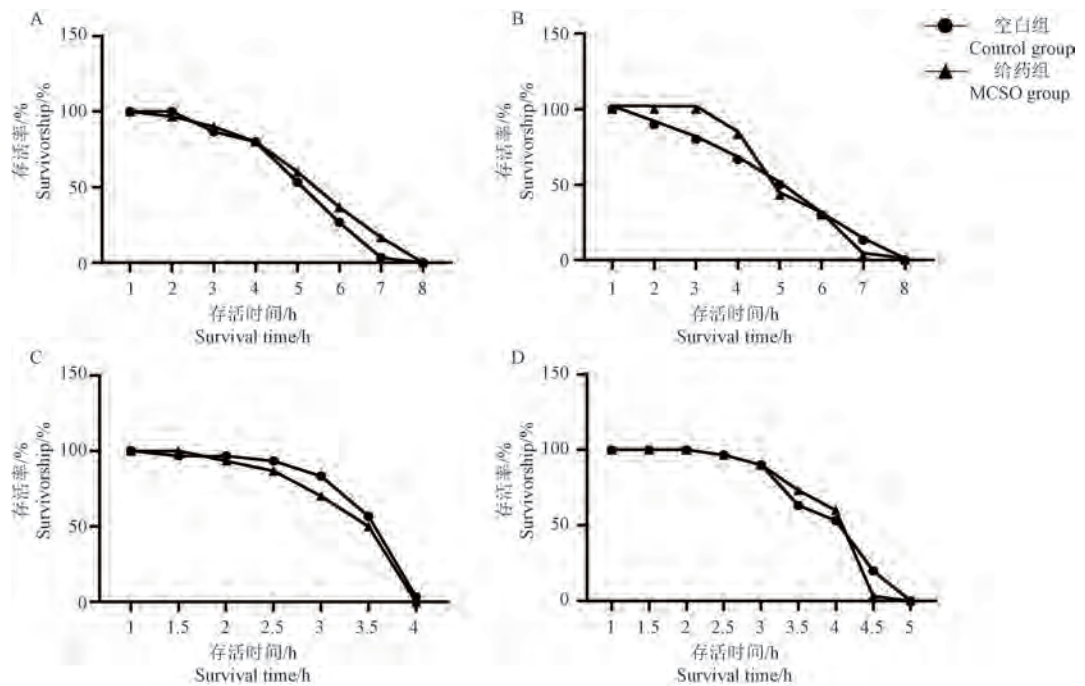
注:与空白组相比,^{**} $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Note. Compared with control group, ^{**} $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

2.4 MCSO 对果蝇氧化应激能力的影响

果蝇适应能力的丧失与年龄有关,适应性内稳

态衰老理论也是解释衰老过程的另一个重要理论^[19]。因此本实验探究 MCSO 对果蝇抗应激能力的影响,结果如图 2 所示。在氧化应激损伤实验中,

与空白组相比,给药组雄性果蝇最高生存时间无变化,但其平均寿命延长 4.2%;在热刺激环境中,雌、雄果蝇的寿命无明显变化。



注:A:MCSO 对氧化损伤雌性果蝇寿命的影响;B:MCSO 对氧化损伤雄性果蝇寿命的影响;C:MCSO 对热刺激下雌性果蝇寿命的影响;D:MCSO 对热刺激下雄性果蝇寿命的影响。

图 2 MCSO 对急性氧化损伤和热刺激果蝇寿命的影响 (n = 30)

Note. A. Effect of MCSO on the life span of female *D. melanogaster* after oxidative damage. B. Effect of MCSO on the life span of male *D. melanogaster* after oxidative damage. C. Effect of MCSO on the lifespan of female *D. melanogaster* under heat stimulation. D. Effect of MCSO on longevity of male *D. melanogaster* under heat stimulation.

Figure 2 Effects of MCSO on survival time of *D. melanogaster* after acute oxidative damage and heat stimulation (n = 30)

2.5 MCSO 对失眠果蝇睡眠的影响

由表 3 分析可知,雌雄果蝇模型组夜晚睡眠时间均低于空白组,其差异具有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$),而白天睡眠时间无显著性差异,表明失眠造模成功。对失眠模型果蝇喂食 MCSO 后,给药组与模型组比较,其夜晚睡眠时间延长,差异具有显著性($P < 0.05$),而与空白组睡眠时间无显著性差异,表明 MCSO 能够改善雌雄果蝇的失眠情况,具有正向干预作用。

图 3 中黑色线条表示果蝇活动,白色表示睡眠。黑色线条越高表明单位时间内的活动次数越多,线条越密集,表示单位时间内果蝇活动越频繁。通过图 3 可知,图中红框内模型组雌、雄果蝇的夜间活动量显著高于空白组,MCSO 给药后,果蝇睡眠情况又接近于空白组。结合表 3 睡眠时间可得,MCSO 可能是通过减少果蝇夜间活动次数,延长睡眠时长来

改善睡眠剥夺对生物节律的影响。

白天 12 h 给药组果蝇黑色线条相对空白组密集,说明喂养 MCSO 后果蝇的活动相较频繁,白天活动次数升高,结合表 3 白天睡眠时间中雄性给药组果蝇睡眠时间低于空白组,差异具有显著性($P < 0.01$)。可知 MCSO 能够增强雄性果蝇白天活动次数。

2.6 江香薷对果蝇嗅觉记忆的影响

结果显示,给药组雌、雄果蝇 1 ~ 9 h 进入无障碍离心管的数量均高于空白对照组,表明 MCSO 可改善果蝇的嗅觉记忆能力(图 4)。

2.7 MCSO 对果蝇抗氧化酶活性的影响

2.7.1 MCSO 对果蝇 SOD 活性的影响

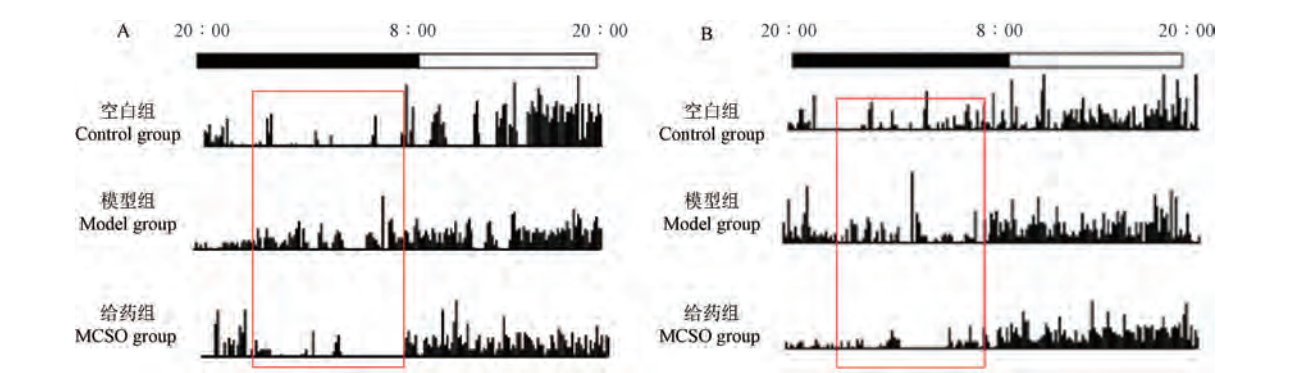
自由基致衰老学说被广泛认为是衰老的主要机制,环境和内部代谢产生的自由基和相关氧化剂会对细胞结构和机体功能产生影响,机体自身能够

表 3 MCSO 对 7 日龄果蝇睡眠时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 32$)

Table 3 Effect of MCSO on sleep time of 7-day-old D. melanogaster($\bar{x} \pm s, n = 32$)

组别 Groups		平均时间/min Average time/min		
		总睡眠时间 Total sleep time	白天睡眠时间 Daytime sleep time	夜晚睡眠时间 Night sleep time
空白组 Control group	雌 Female	790.16 ± 103.98	267.83 ± 80.52	522.33 ± 51.11
	雄 Male	1072.9 ± 215.53	448.38 ± 133.79	624.54 ± 103.03
模型组 Model group	雌 Female	609.33 ± 152.60	204.17 ± 75.17	405.16 ± 112.57 [*]
	雄 Male	946.67 ± 251.91	457.16 ± 122.47	488.86 ± 155.59 ^{**}
给药组 MCSO group	雌 Female	778.60 ± 185.91	205.10 ± 98.11	573.50 ± 111.61 ^{aa}
	雄 Male	898.78 ± 158.91	325.71 ± 107.97 ^{**aa}	573.05 ± 64.57 ^a

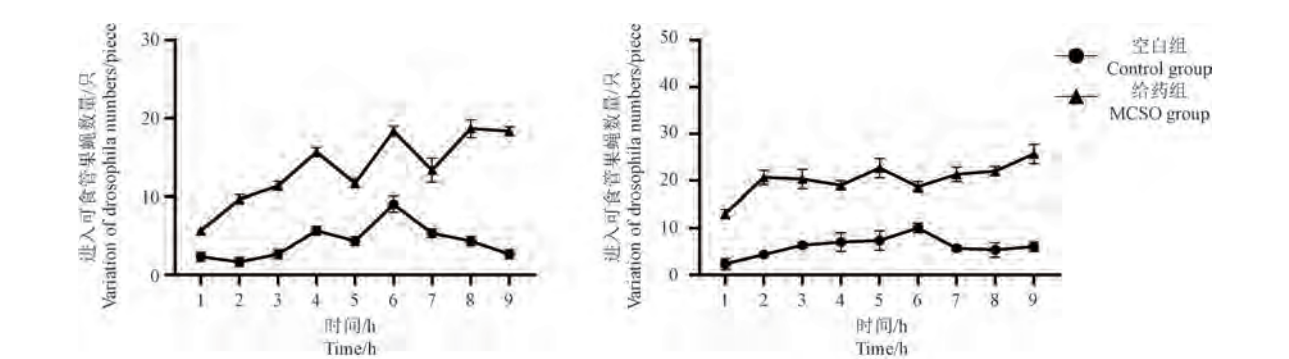
注:与空白组相比, ^{*}*P* < 0.05;与模型组相比, ^a*P* < 0.05, ^{aa}*P* < 0.01。
Note. Compared with control group, ^{*}*P* < 0.05. Compared with model group, ^a*P* < 0.05, ^{aa}*P* < 0.01.



注:A:雌性果蝇睡眠节律图;B:雄性果蝇睡眠节律图。
图 3 MCSO 对果蝇睡眠-觉醒节律的影响

Note. A. Sleep rhythm of female D. melanogaster. B. Seep rhythm of male D. melanogaster.

Figure 3 Effect of MCSO on sleep-wake activity of D. melanogaster



注:A:雌性果蝇进入无障碍离心管数量变化曲线图;B:雄性果蝇进入无障碍离心管数量变化曲线图。
图 4 果蝇进入无障碍离心管数量变化
Note. A. Variation curve of the number of female D. melanogaster entering the barrier-free centrifuge tube. B. Variation of the number of male D. melanogaster entering the barrier-free centrifuge tube.

Figure 4 D. melanogaster numbers entering the centrifuge tube and eating food

通过抗氧化防御系统平衡自由基的破坏作用。SOD 是现代研究中最广泛的用于清除体内自由基的抗氧化酶^[20]。由图 5 可知雌、雄给药组果蝇 SOD 活性均高于空白组,差异具有显著性($P < 0.01$),表明 MCSO 能够增强果蝇体内 SOD 活性。

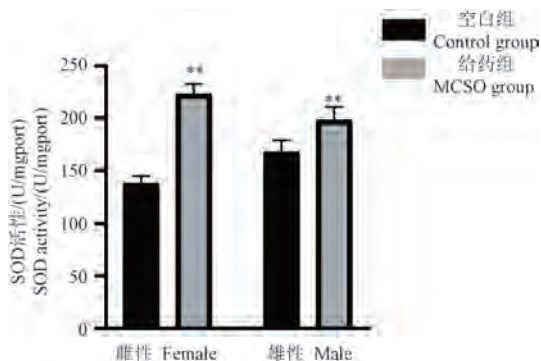


图 5 MCSO 对果蝇 SOD 活性的影响

Figure 5 Effect of MCSO on SOD activity in *D. melanogaster*

2.7.2 MCSO 对果蝇 CAT 活性的影响

CAT 是另一种抗氧化酶,由图 6 可知,给药组雌、雄果蝇 CAT 活性均高于空白组,具有显著性差异($P < 0.01$),说明 MCSO 能够增强果蝇体内 CAT 活性。

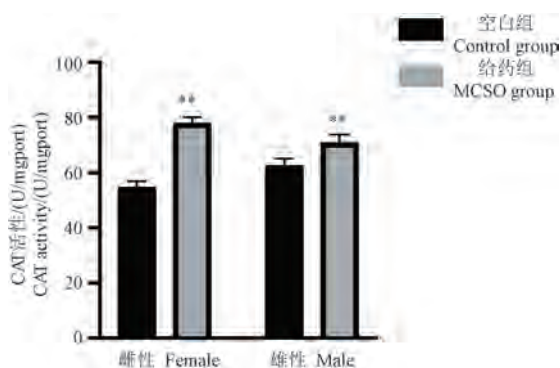


图 6 MCSO 对果蝇 CAT 活性的影响

Figure 6 Effect of MCSO on CAT activity in *D. melanogaster*

2.7.3 MCSO 对果蝇 MDA 含量的影响

MDA 是脂质过氧化的主要产物之一,其水平随着年龄的增加而升高,可反映自由基对机体的损伤程度^[21]。由图 7 可知,对果蝇喂食 MCSO 后,雌、雄果蝇体内 MDA 含量均下降,具有极显著性差异($P < 0.01$)。结合“2.7.1”与“2.7.2”结果,MCSO 对果蝇的抗氧化能力具有正向调控作用。

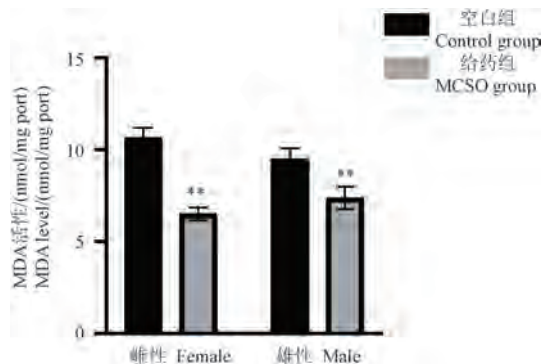


图 7 MCSO 对果蝇体内 MDA 含量的影响

Figure 7 Effect of MCSO on MDA in *D. melanogaster*

3 讨论

课题组前期对 MCSO 进行成分分析时发现,其脂肪酸中 α -亚麻酸含量高达 67.34%,同时 DPPH 自由基清除率达到 58.168%,总抗氧化能力为 0.5 mmol/g,证明 MCSO 具有一定的体外抗氧化能力^[3]。国外研究报道,亚麻酸对秀丽隐杆线虫具有氧化应激损伤保护作用并能延长其寿命^[22]。基于以上报道,本研究通过对果蝇进行食欲实验、攀爬实验、抗应激实验并测定体内抗氧化酶活性和 MDA 含量来评价 MCSO 的体内抗氧化作用,结果得到, MCSO 能够增强 30 日龄果蝇的运动能力,提高抗氧化酶活性、降低体内 MDA 含量,且不依赖饮食限制途径。

本实验通过检测果蝇 24 h 活动情况,以平均睡眠时间和睡眠-觉醒节律为观察指标,探究 MCSO 对失眠模型果蝇的睡眠改善作用。发现 MCSO 可以延长果蝇夜间睡眠时间,正向调控失眠果蝇睡眠-觉醒节律。有临床研究表明,膳食 n-3 多不饱和脂肪酸摄入量与睡眠量之间存在正相关, MCSO 可能是通过补充多不饱和脂肪酸这一途径来调节果蝇睡眠^[23]。另有研究表明,睡眠和氧化应激之间存在双向关系,推测 MCSO 可能通过改善果蝇的抗氧化能力来实现睡眠调节^[24]。

PUFA 能够提高认知障碍患者的学习记忆能力主要通过减轻炎症反应、增强脑组织抗氧化能力、增强神经元的突触活性这 3 个途径^[25]。研究表明含有 PUFA 的香薷籽油具有改善子代小鼠学习记忆的功能^[26]。果蝇寿命短暂,平均只有 40 d,具有与人类极为相似的学习记忆构造机理^[27],在这方面的缺陷可以通过嗅觉调节过程得到观察^[28]。研究表明衰老会导致果蝇中期记忆依赖的合成蛋白受损

从而导致记忆下降。在巴普洛夫嗅觉记忆测试中, 30 日龄果蝇中避开惩罚性气味的果蝇数量显著性低于 10 日龄果蝇^[29]。本实验利用这一特点通过对 30 日龄果蝇的嗅觉记忆实验, 初步考察了 MCSO 是否具有潜在的改善学习记忆的作用, 结果表明 MCSO 能够显著提高进入无障碍离心管的果蝇数量, 认为其具有一定的改善果蝇嗅觉记忆的作用。

以上研究结果为进一步开发利用江香薷籽的药用价值提供了基础, 但其作用机制还有待进一步探究。

参 考 文 献(References)

[1] 单锋, 张万祥, 张水寒, 等. 经典名方中香薷的本草考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(12): 1-12.
SHAN F, ZHANG W X, ZHANG S H, et al. Herbal textual research on moslae herba in famous classical formulas [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(12): 1-12.

[2] 梁小敏, 龚福保, 周万祥, 等. 不同播期和收获期对江香薷农艺性状及品质的影响 [J]. 农业科技通讯, 2022, 4: 83-87.
LIANG X M, GONG F B, ZHOU W X, et al. Effects of different sowing dates and harvest dates on agronomic traits and quality of *Elsholtzia bodinieri* [J]. Bull Agric Sci Technol, 2022, 4: 83-87.

[3] 罗琪, 邓泽元, 洪滔, 等. 江香薷籽挥发油成分和脂肪酸分析及其抗氧化活性研究 [J]. 江西科学, 2022, 40(4): 683-689.
LUO Q, DENG Z Y, HONG T, et al. Chemical composition analysis of volatile oils and fatty acids from *Mosla chinensis* seeds and antioxidant activity [J]. Jiangxi Sci, 2022, 40(4): 683-689.

[4] 吴洪号, 张慧, 贾佳, 等. 功能性多不饱和脂肪酸的生理功能及应用研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(8): 134-140.
WU H H, ZHANG H, JIA J, et al. Research progress of physiologic function and application of functional polyunsaturated fatty acids [J]. Chin Food Add, 2021, 32(8): 134-140.

[5] 李晓钰, 郑明明, 郭艳, 等. α -亚麻酸植物甾醇酯抑制氧化应激改善非酒精性脂肪性肝病 [J]. 营养学报, 2020, 42(6): 575-580.
LI X Y, ZHENG M M, GUO Y, et al. Protection of plant sterol ester of α -linolenic acid from non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting oxidative stress [J]. Acta Nutr Sin, 2020, 42(6): 575-580.

[6] 陈亮, 王丽梅, 郭艳芬, 等. 核桃油、紫苏油、 α -亚麻酸、亚油酸对大鼠学习记忆的影响 [J]. 中国油脂, 2011, 36(10): 33-37.
CHENG L, WANG L M, GUO Y F, et al. Effect of walnut oil, perilla oil, α -linolenic acid and linoleic acid supplementation on rats spatial learning and memory ability [J]. Chin Oils Fats,

2011, 36(10): 33-37.

[7] SINCLAIR A J, GUO X F, ABEDIN L. Dietary alpha-linolenic acid supports high retinal DHA levels [J]. Nutrients, 2022, 14(2): 301.

[8] LUO J, GE H, SUN J, et al. Associations of dietary ω -3, ω -6 fatty acids consumption with sleep disorders and sleep duration among adults [J]. Nutrients, 2021, 13(5): 1475.

[9] YUAN Q, XIE F, HUANG W, et al. The review of alpha-linolenic acid: Sources, metabolism, and pharmacology [J]. Phytother Res, 2022, 36(1): 164-188.

[10] 黄莉莉, 冯湘雯, 卞宏生, 等. 果蝇作为睡眠模型的研究进展 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2014, 23(3): 166-169.
HUANG L L, FENG X W, BIAN H S, et al. Research progress of *Drosophila* as a sleep model [J]. Chin J Drug Depend, 2014, 23(3): 166-169.

[11] 许光辉, 李廷利. 夜间重复光照刺激建立果蝇睡眠剥夺模型的研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 2044-2045.
XU G H, LI T L. Establishment of a model of sleep deprivation induced by repeated light stimulation at night in *Drosophila* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2012, 23(8): 2044-2045.

[12] 宋明容, 任佳慧, 刘莹, 等. 远志皂苷对转 Tau 基因果蝇 AD 模型行为学及 dTOR 基因表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(12): 2837-2839.
SONG M R, REN J H, LIU Y, et al. Effects of *Polygala tenuifolia* saponins on behavior and dTOR gene expression in AD model of Tau transgenic *Drosophila* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(12): 2837-2839.

[13] 朱想, 沈洁, 吕佳乐, 等. 夏枯草水提物对黑腹果蝇寿命的影响 [J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(6): 54-59.
ZHU X, SHEN J, LYU J L, et al. Effect of *Prunella vulgaris* extracts on the lifespan of *Drosophila melanogaster* [J]. Chin Food Addit, 2019, 30(6): 54-59.

[14] ZHOU Y Z, YAN M L, GAO L, et al. Metabonomics approach to assessing the metabolism variation and gender gap of *Drosophila melanogaster* in aging process [J]. Exp Gerontol, 2017, 98: 110-119.

[15] 张婉迎, 赵文学, 尹翌秋, 等. 人参水提物对果蝇抗衰老的作用机制 [J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(5): 557-562.
ZHANG W Y, ZHAO W X, YIN Y Q, et al. Mechanism of Anti-aging activity of water extract of ginseng in *Drosophila melanogaster* [J]. J Jilin Agric Univ, 2018, 40(5): 557-562.

[16] 雷莉, 范桂香, 宋士生, 等. 温度对果蝇学习记忆行为的影响 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2006, 27(4): 341-343.
LEI L, FAN G X, SONG T S, et al. Effects of temperature on behaviour of learning and memory of *Drosophila melanogaster* [J]. J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci), 2006, 27(4): 341-343.

[17] 张佳丽, 叶怡翔, 魏剑晖, 等. 饮食限制对 D-半乳糖诱导的雌性老龄大鼠皮肤的抗衰老作用的研究 [J]. 营养学报, 2018, 40(5): 509-511.
ZHANG J L, YE Y X, WEI J H, et al. Anti-aging effect of

- dietary restriction on skin of female aged rats induced by D-galactose [J]. Acta Nutr Sin, 2018, 40(5): 509–511.
- [18] GROTEWIEL M S, MARTIN I, BHANDARI P, et al. Functional senescence in *Drosophila melanogaster* [J]. Ageing Res Rev, 2005, 4(3): 372–397.
- [19] 杨善岚, 吴磊, 涂嘉欣, 等. 自由基致衰老的研究进展 [J]. 中华疾病控制杂志, 2022, 26(5): 589–594.
- YANG S L, WU L, TU J X, et al. Research progress of free radical induced aging [J]. Chin J Dis Contr Prev, 2022, 26(5): 589–594.
- [20] TANG R, CHEN X, DANG T, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides extend the mean lifespan of *Drosophila melanogaster* [J]. Food Funct, 2019, 10(7): 4231–4241.
- [21] 斯琴, 刘铜华. 蒙药手掌参-37 味丸对亚急性衰老模型小鼠血清 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响 [J]. 中医药导报, 2014, 20(4): 10–11, 15.
- SI Q, LIU T H. The influence of Shouzhangshen-37 pill of Mongolian medicine on serum SOD, CAT, GSH-px activity and MDA content in sub-acute aging model mice [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 20(4): 10–11, 15.
- [22] MORGESE M G, SCHIAVONE S, BOVE M, et al. N-3 PUFA prevent oxidative stress in a rat model of beta-amyloid-induced toxicity [J]. Pharmaceuticals, 2021, 14(4): 339.
- [23] DECOEUR F, BENMAMAR-BADEL A, LEYROLLE Q, et al. Dietary N-3 PUFA deficiency affects sleep-wake activity in basal condition and in response to an inflammatory challenge in mice [J]. Brain Behav Immun, 2020, 85: 162–169.
- [24] KO K, AHN Y, CHEON G Y, et al. Effects of *Dendropanax morbiferus* leaf extract on sleep parameters in invertebrate and vertebrate models [J]. Antioxidants, 2023, 12(10): 1890.
- [25] 刘佳欣, 付朝旭, 许妍姬. ω -3 和 ω -6 多不饱和脂肪酸改善轻度认知障碍机制的研究进展 [J]. 中国油脂, 2022, 47(4): 81–86.
- LIU J X, FU C X, XU Y J. Progress on the mechanism of ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids in improving mild cognitive impairment [J]. Chin Oils Fats, 2022, 47(4): 81–86.
- [26] 张丽娟, 尚建华, 殷建忠, 等. 云南野生香薷油对子代小鼠学习记忆功能的影响 [J]. 现代食品科技, 2012, 28(7): 733–736, 732.
- ZHANG L J, SHANG J H, YIN J Z, et al. Effect of Yunnan wild *Elsholtzia* oil on learning and memory in offspring mice [J]. Mod Food Sci Technol, 2012, 28(7): 733–736, 732.
- [27] 刘志勇. 果蝇作为学习记忆实验动物模型的研究回顾 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(2): 108–111.
- LIU Z Y. Review on learning and memory model of *Drosophila* [J]. Chin J Comp Med, 2005, 15(2): 108–111.
- [28] TAMURA T, CHIANG A S, ITO N, et al. Aging specifically impairs amnesiac-dependent memory in *Drosophila* [J]. Neuron, 2003, 40(5): 1003–1011.
- [29] TONOKI A, DAVIS R L. Aging impairs protein-synthesis-dependent long-term memory in *Drosophila* [J]. J Neurosci, 2015, 35(3): 1173–1180.

[收稿日期] 2023–11–03

张晨阳,胡耀华,张延英,等. 基于小鼠模型的前列腺癌骨转移机制研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1191-1197.

ZHANG C Y, HU Y H, ZHANG Y Y, et al. Progress in the study of bone metastasis in prostate cancer based on a mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1191-1197.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.010

基于小鼠模型的前列腺癌骨转移机制研究进展

张晨阳^{1,2}, 胡耀华², 张延英¹, 师长宏^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 前列腺癌是男性泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤,具有很高的骨转移倾向,约70%的患者死于骨转移。小鼠模型是研究前列腺癌骨转移的重要工具,对于前列腺癌骨转移病理生理学机制的阐释,治疗药物的筛选和评价均具有重要意义。基于此,本文综述了前列腺癌骨转移小鼠模型的研究进展,归纳构建动物模型方法以及评价策略,重点总结通过小鼠模型揭示的前列腺癌骨转移发生发展的机制,以期为前列腺癌的骨转移研究提供重要的实验工具。

【关键词】 前列腺癌; 小鼠模型; 肿瘤转移; 机制研究

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1191-07

Progress in the study of bone metastasis in prostate cancer based on a mouse model

ZHANG Chenyang^{1,2}, HU Yaohua², ZHANG Yanying¹, SHI Changhong^{1,2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Prostate cancer is a prevalent malignant tumor in the male genitourinary system, characterized by a high propensity for bone metastasis. It is a leading cause of mortality, with approximately 70% of deaths attributed to this form of metastasis. Mouse models provide a crucial tool in the investigation of prostate cancer bone metastasis, and play a pivotal role in elucidating the underlying pathophysiological mechanisms and in the development and assessment of therapeutic agents. In this review, we summarize research progress in the construction method and evaluation strategies used in establishing prostate cancer bone metastasis mouse models. Notably, this review focuses on the exploration of the mechanisms responsible for prostate cancer bone metastasis, using mouse models, with the aim of offering insights and serving as a valuable reference for prostate cancer bone metastasis.

【Keywords】 prostate cancer; mouse model; tumor metastasis; mechanism studies

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

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是全球男性中癌症致死的第二大原因,死亡率仅次于肺癌,其发生远处转移的概率高达70%,而骨骼是最常见的转移部位^[1]。前列腺癌骨转移的患者常伴有骨代谢

紊乱、骨痛、病理性骨折、脊髓压迫、高钙血症等并发症,其生活质量及生存率明显下降^[2]。为了改善骨转移患者预后不佳的状况,迫切需要深入了解前列腺癌的恶性生理学行为及其骨转移发生发展的

【基金项目】 国家自然科学基金(32070532,32270566)。

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

【作者简介】 张晨阳,女,在读硕士研究生,研究方向:前列腺癌骨转移动物模型的制备与应用。Email:3169976774@qq.com

【通信作者】 师长宏,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:疾病动物模型的制备与评价。Email:changhong@fmmu.edu.cn

机制。建立临床前小鼠模型,是认识前列腺癌骨转移病因、机制及筛选药物的重要手段。本文对现有的前列腺癌骨转移小鼠模型进行系统总结,分析模型的优缺点,重点介绍小鼠模型在骨转移分子机制研究方面的应用进展,以期建立更加贴近临床实际的骨转移模型,为转移性前列腺癌研究提供更有有效的实验工具。

1 前列腺癌骨转移的基本特征

前列腺癌骨转移是一个复杂且多阶段的过程,涉及肿瘤细胞和目标肿瘤微环境的相互作用^[3]。这一过程开始于原发肿瘤细胞对周围组织的侵袭,并进一步进入血液或淋巴系统^[4]。这些进入循环系统的肿瘤细胞随后可能在骨骼中定居,增殖或进入休眠状态,最终形成可见的转移性肿瘤^[5]。

肿瘤细胞在骨微环境中通过一系列复杂的机制引发恶性循环,导致骨重塑异常和肿瘤转移^[6]。这些机制包括肿瘤细胞分泌的可溶性因子,如核因子受体激活因子- κ B 配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)、甲状旁腺素相关肽 (parathyroid hormone-related protein, PTHrP)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等^[7-9],这些因子既可直接促进破骨细胞的分化和活性,也可激活成骨细胞,释放白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和 RANKL 等因子,间接增强破骨细胞的骨吸收能力。此外,骨的脱矿作用释放的转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor, IGF) 和钙离子等同样为肿瘤细胞的生长提供了支持^[7-9]。

此外,免疫系统在调节肿瘤进展中可能发挥作用,如 Th17 细胞释放的 RANKL 和 TNF 促进骨吸收,以及转移性前列腺癌患者血液中的抗肿瘤自然杀伤细胞受到抑制^[10]。免疫系统在转移中的确切作用尚未明确且缺乏相应的动物模型。因此需要有效的临床前模型来阐明潜在机制,并识别新的治疗靶点。

2 前列腺癌骨转移模型的建立

在前列腺癌骨转移模型的构建过程中,细胞系的种类和注射方式至关重要,是影响模型成功的重要因素^[11]。深入理解这些因素的利与弊对于揭示前列腺癌转移发生的机制、开发新的治疗策略以及药物评估具有重要的意义。

目前,前列腺癌骨转移小鼠模型的制作方法大体分为 3 类:左心室注射、胫骨注射和尾静脉注射。不同的注射方式具有不同器官的转移倾向,因此在选择器官荷瘤时,应尽可能准确地模拟转移过程。

2.1 左心室注射

左心室注射,即将具有高转移潜能的肿瘤细胞系注射至胸骨左侧第二、三肋间处。当观察到鲜红血液喷射涌出进入针管,并且回血液面随着小鼠心率搏动上下起伏时,即可定义为左心室注射成功。其是一种常用的技术手段,能模拟肿瘤细胞经血道转移后在骨和骨髓中锚定、增殖并导致骨质重构的过程。TANAKA 等^[12]将前列腺癌细胞通过左心室注射无胸腺裸鼠体内,利用了先进的生物发光成像 (bioluminescence imaging, BLI) 技术来监测肿瘤细胞的播散和进展,注射后通过 BLI 确认了心内接种模型构建成功,并观察到荧光素酶标记的细胞已分散到全身,基于该模型,重点探讨 Axl 通路在前列腺癌骨转移及其相关骨骼重塑中的潜在作用。此外,超声引导下的左心室内注射人肺癌细胞也能有效提高建模成功率,较真实地模拟临床肺癌患者骨转移的生物学特性^[13]。这表明,无论是前列腺癌还是肺癌,左心室注射技术都是建立骨转移模型的有效方法。该方法建立的骨转移模型在转移部位、生长状况、病理形态和影像学表现上与临床相似。基于该方法建立的模型,研究人员能够进行疾病机制研究、药物筛选评估、发现生物标志物、开发治疗策略等多种生物学和药理学研究。但此方法操作难度大,构建周期长,小鼠死亡风险高。

2.2 胫骨注射

胫骨注射直接将前列腺癌细胞悬液从胫骨头关节窝注射入骨髓腔。与左心室注射相比,该方法操作简单,构建周期短,能够很好地模拟癌症晚期的骨转移状态,但无法模拟肿瘤血道转移的过程,适用于研究肿瘤细胞与骨微环境之间的相互作用以及肿瘤细胞的骨转移潜能。LEE 等^[14]成功构建前列腺癌胫骨原位移植瘤模型,发现血管生成剂 rhLK8 能够有效抑制前列腺癌细胞在裸鼠体内的生长和转移。此外,其他研究也表明,不同部位的骨转移模型可以通过类似的方法构建,例如股骨和腰椎内注射,这些方法同样可以成功诱导肿瘤的形成和转移^[15]。这些模型能够较好的模拟前列腺癌在骨骼微环境中的生长与转归情况,为研究前列腺癌的骨转移提供了适宜的平台。然而,这种方法存在

一定的局限性,例如无法完全模拟肿瘤的全身性、多发性、成骨性等特点。

2.3 尾静脉注射

尾静脉注射,主要是肿瘤细胞经尾静脉注射后通过肺部的毛细血管网进入动脉血液循环系统,多形成肺转移,后期可能会造成远端器官的转移。该方法操作简单,但其得到的模型与人类前列腺癌的实际转移路径不完全一致,因为人类前列腺癌更倾向于骨转移。真核翻译起始因子 5A2 (eukaryotic translation initiation factor 5A2, eIF5A2) 是一种诱导 PCa 细胞中上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的延伸因子。ZHENG 等^[16]通过尾静脉注射成功构建前列腺癌肺转移模型,结果发现 eIF5A2 能够显著促进前列腺癌细胞体内转移。尽管尾静脉注射方式构建的前列腺癌肺转移模型在研究前列腺癌转移机制方面具有一定的价值,但由于人类前列腺癌更倾向于发生骨转移。未来的研究需要进一步探索前列腺癌细胞转移的具体机制,特别是骨转移的分子机制,以便为前列腺癌的诊断和治疗提供更多的信息和策略。

总之,以上 3 种方法建立的动物模型各有其独特的应用价值,需根据不同实验目的,选择合适的造模方法,为研究前列腺癌骨转移的机制提供有效的实验平台。

3 基于骨转移小鼠模型研究前列腺癌骨转移机制

前列腺癌骨转移是前列腺癌晚期常见的并发症,在前列腺癌骨转移过程中,恶性前列腺癌细胞扮演着关键角色^[17]。其通过改变自身表型,如减少与周围细胞的粘附力,提高细胞迁移性和侵袭力,从而推动骨转移的发生^[18]。同时,骨骼微环境释放的趋化因子可吸引前列腺癌细胞向骨组织转移,而癌细胞通过分泌特定的细胞因子来进一步调节其定植环境,使之更利于自身的存活与增殖^[19]。这种细胞与微环境之间的相互作用,进一步导致了骨骼结构与功能的转变。此外,促进前列腺癌恶性进展的细胞分子在骨转移中也发挥了重要作用。

3.1 RANKL 在前列腺癌骨转移中的作用

前列腺癌细胞通过血液循环进入骨髓,随后肿瘤细胞释放的因子促进成骨细胞高表达 RANKL^[20]。RANKL 与破骨细胞表面的核因子- κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK)

结合激活破骨细胞,导致骨基质的降解和溶骨性改变^[21]。破骨细胞表达的 RANKL 与 RANK 结合来调节骨重塑,促进破骨细胞的活化和未成熟破骨细胞分化^[22]。

在一项研究中,将前列腺癌细胞 PC-3 注射到雄性 CB17 重度联合免疫缺陷 (server combined immune-deficiency, SCID) 小鼠的胫骨内。研究发现,由于 PC-3 在骨骼内增殖,宿主基质中的 RANKL 在全身和局部均被诱导表达,并以 RANKL 依赖性方式促进癌细胞侵袭^[23]。局部分化的 RANKL 以转移性组织特异性方式在细胞迁移中发挥关键作用。这些发现揭示了 RANKL/RANK 在骨相关肿瘤中的直接作用,并证明了其作为新的治疗方式靶点的潜力。

3.2 EMT 在前列腺癌骨转移中的作用

EMT 是肿瘤转移的先决条件,在多种因素和转录因子的诱导下,肿瘤细胞获得间充质表型,这不仅降低了上皮细胞间的粘附力,也增强了它们对基底膜的侵袭能力,进而促进了肿瘤的播散和转移^[24]。与 EMT 相关的蛋白,例如 PTHrP、蜗牛蛋白 (snail)、波形蛋白 (vimentin)、E-钙粘蛋白 (E-cadherin) 等具有多种生理功能,主要通过促进骨吸来推动癌症的进展,尤其是在骨骼浸润方面。ONGKEKO 等^[25]在 DU145 细胞中过表达 PTHrP 的 1-141 或 1-173 亚型时,Snail 和 vimentin 表达上调, E-cadherin 下调。将这些过表达 PTHrP 的 DU145 细胞注射到裸鼠的胫骨中,会引起严重的骨破坏,而亲本 DU145 细胞几乎不会造成骨骼破坏。这些研究表明 PTHrP 可能通过 EMT 促进前列腺癌的骨转移。PUTZKE 等^[26]基于 E-cadherin 的表达从 DU145 细胞系中衍生出 3 种稳定的等基因细胞系 S-DU145 (间充质亚系)、R-DU145 (上皮亚系)、T-DU145,并将它们注射到 SCID 小鼠胫骨中,结果显示,上皮亚系的细胞生长最活跃,而间充质亚系则不生长。

这些结果表明 EMT 在前列腺癌骨转移中起着至关重要的作用,其与肿瘤的侵袭性和转移性密切相关,了解 EMT 在前列腺癌骨转移中的作用对于开发新的治疗策略和改善患者预后具有重要意义。

3.3 翼状蛋白 (wingless and Int-1, Wnt) 在前列腺癌骨转移中的作用

Wnt 是一类含有丰富半胱氨酸的糖蛋白,其活性常常受到内源性拮抗蛋白 (dickkopf-1, DKK-1) 的

调节。Wnts 蛋白在胚胎期骨骼的形成中发挥关键作用^[27]。此外, Wnts 已被证明具有自分泌肿瘤促进功能, 包括增强细胞增殖和抑制细胞凋亡^[28]。

DKK-1 是典型 Wnts 的特异性抑制剂, HALL 等^[29]通过使用空载体或含有 DKK-1 基因的载体, 成功的在 C4-2B 细胞中稳定转染并阻断 Wnt 信号活性。然后, 这些细胞被注射到雄性 CB17 严重联合免疫缺陷小鼠的胫骨中, 以评估前列腺癌衍生的 DKK-1 表达对骨转移过程的影响。研究发现 Wnt 有助于前列腺癌诱导成骨细胞活性的机制, 同时表明 DKK-1 和 Wnt 表达之间的平衡在前列腺癌骨转移病变发展中的意义, 决定了特定时间点上哪种类型的骨病变占主导地位。

受体酪氨酸激酶样孤儿受体 2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2, ROR2) 是一种非经典的 Wnt 受体, 在骨骼形态发生、成骨细胞分化和骨形成中起关键作用^[30]。TSENG 等^[31]将 PC-3 细胞直接注射到裸鼠的前列腺中。研究发现, ROR2 通过调节 PIAS3-PI3K-AKT2 信号轴有效抑制了前列腺癌的转移。这些发现为深入理解 Wnt 在前列腺癌骨转移中的作用机制提供了新的视角。

3.4 肿瘤细胞、成骨细胞、破骨细胞之间的相互作用

肿瘤和骨骼之间存在着一种恶性循环的相互作用。肿瘤细胞分泌的因子能够激活骨细胞, 而骨细胞则释放生长因子和细胞因子反过来作用于肿瘤细胞。它们依赖于这种粘性循环, 即癌细胞-微环境的相互作用, 从而在骨骼中形成明显的转移灶。

JIN 等^[32]将核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 激活的 LNCaP-EE 细胞通过胫骨内注射移植到雄性无胸腺裸鼠 (BALB/c 菌株) 骨骼中。与此同时, 使用空载体 (LNCaP-EV) 感染的 LNCaP 细胞作为对照组。结果发现, NF- κ B 激活的 PCa 细胞能够促进破骨细胞的分化, 进而为肿瘤细胞在骨转移性 PCa 中的生存、增殖和病理性骨重塑提供适宜的微环境。

MORRISSEY 等^[33]将 PC-3 细胞注射到 SCID 小鼠的胫骨中, 导致溶骨性病变, 研究团队探究了肿瘤细胞本身是否也表达这些破骨细胞分化的细胞因子。结果显示, 肿瘤细胞表达的 IL-6 能够促进前列腺癌骨转移瘤的破骨细胞反应。此外, 破骨细胞因子的局部表达以及成骨细胞与破骨细胞前体细胞之间的受体相互作用, 在前列腺癌肿瘤中破骨细

胞的形成过程中起着至关重要的作用。

3.5 骨环境分泌的细胞因子在前列腺癌骨转移中的作用

在骨骼微环境中, 骨基质和骨髓细胞可分泌大量细胞因子, 这些因子为前列腺癌细胞的生长提供导向。这些因子不仅能够介导细胞间的相互作用, 还能调节肿瘤的增殖、侵袭、转移、激活血管生成等多种生理功能。

TGF- β 和骨形态发生蛋白质 (bone morphogenetic protein, BMP) 通路可调节破坏性溶解性骨病变的骨生长和吸收^[34]。STRAIGN 等^[35]研究表明, 具有溶解性或母细胞性病变的人类前列腺癌骨转移的临床样本中显示了不同的 BMP 与 TGF- β 信号转导, 表明 BMPs 对骨稳态表现出明显的影响, 通过胫骨内注射 MYC-CaP 小鼠前列腺细胞系到 FVBN 同基因小鼠中, 继续在已建立的骨转移损伤模型中测试 BMP 抑制。BMP 受体小分子拮抗剂 DMH1 治疗的小鼠在不影响肿瘤生长的情况下, 小梁骨适度减少, 循环中的淋巴细胞减少, 证明了对骨转移性前列腺癌中 BMP 抑制的特殊反应。

IGF 是骨骼中最丰富的生长因子, 是正常骨骼发育和功能所必需的。IGF 通过激活胰岛素生长因子-1 受体 (insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R) 和变异胰岛素受体促进癌症进展、侵袭性和耐药性, IGF 与骨生物学特别相关, 有助于骨转移瘤的归巢、休眠、定植和扩增。KM1468 是一种抗 IGF-1/2 抗体, 可抑制前列腺癌细胞向植入的成人骨骼转移发展和进展^[36]。GOYA 等^[37]将人前列腺癌细胞 (MDA PCa 2b) 注射到人类成人骨骼中, 植入非肥胖糖尿病/严重联合免疫缺陷小鼠体内, KM1468 在注射前列腺癌细胞前或注射后 4 周给予, 结果发现 KM1468 显著抑制新发骨肿瘤的发展和已建立的肿瘤病灶的进展, 这表明骨转移可能反映了 IGF 依赖性。因此, IGF 轴的治疗靶向可能为治疗骨转移提供一种有效的方法。

基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 是一种由骨髓基质细胞分泌的趋化因子, 在前列腺癌的转移组织中高表达^[38]。SUN 等^[39]将转移性前列腺癌 PC-3 细胞注射到无胸腺雄性小鼠的左心室中构建骨转移模型。观察到 SDF-1 受体 CXCR4 的抗体阻断了 PC-3 诱导的转移, 以及先前观察到的 SDF-1 抗体在体外减少了 PC3 增殖。表明阻断 CXCR4 可抑制对骨骼中前列腺癌的生长。

因此,将 PC-3 细胞通过胫内注射到裸鼠体内,阻断 SDF-1 受体 CXCR4 可抑制 PC-3 衍生肿瘤的发展。此外,研究表明,骨转移瘤的发展依赖于 SDF-1 的生长。

4 总结与展望

前列腺癌的进展是一个复杂过程,受多种因素影响。建立一个能够准确反映人体前列腺癌发展、转移过程的临床前小鼠模型,对于深入理解其发生机制、转移机制、预防、诊断、药物开发和治疗具有重要意义。根据研究目标,选择合适的小鼠模型至关重要。然而,现有的前列腺癌骨转移小鼠模型尚存在不足,可以通过以下策略来提升模型的有效性。

4.1 创制新的模型展现肿瘤的异质性

异质性是肿瘤细胞的基本特征,通过改进模型来更好地模拟肿瘤内部不同细胞群体之间的相互作用,从而可以更准确的揭示骨转移的机制。比如,开发人源性肿瘤异种移植模型(patient-derived tumor xenograft model, PDX),该模型能够更好地保留原始肿瘤的特征,提供更接近临床情况的模型^[40]。在模型中考虑骨微环境因素,如成骨细胞、破骨细胞、骨髓基质细胞和细胞外基质等,因为它们与肿瘤细胞的相互作用对骨转移有重要影响。还有,采用肿瘤类器官(patient-derived organoids, PDO)也能够模拟原始肿瘤的微观结构和细胞异质性,可以用于研究肿瘤微环境中的细胞间相互作用。另外,由于不同肿瘤细胞系具有各自不同的特征,可以综合使用多个肿瘤细胞系,更好地模拟肿瘤内部的异质性。通过上述策略,研究人员可以更准确地模拟肿瘤的异质性,从而更好地理解前列腺癌骨转移的生物学特性,发展个性化治疗方法,并提高药物开发的成功率。

4.2 综合使用不同类型的模型模拟前列腺癌骨转移的复杂性

由于前列腺癌骨转移发生的复杂性,单一模型无法有效阐释其发生进展的机制,需要多种模型的综合应用。如体外细胞模型、3D 培养模型和共培养模型、体内肿瘤细胞移植模型和 PDX 模型的综合使用,可以更全面地模拟前列腺癌骨转移的复杂性。通过上述体外模型和动物模型的联合使用,可以有效展示肿瘤细胞与骨微环境之间的相互作用、骨重塑过程中的异常信号通路以及肿瘤细胞对药物的耐药性等,从而有助于从分子层面更好地理解肿瘤

转移的机制。

4.3 结合分子影像技术有效评估骨转移的发生

新型的分子影像技术,如活体成像, Micro-CT 和多模态核素成像均可有效评估前列腺癌骨转移的发生发展。这些技术能够非侵入性地观察肿瘤细胞在体内的动态变化,包括肿瘤的大小、位置以及是否有新的转移灶形成,能够帮助研究者及时调整干预方案。如¹⁸F-NaF PET-CT,可实时监测肿瘤的生长和转移,在骨转移的检测中表现出较高的敏感性,从而更精确地评估治疗效果^[41]。

理想的前列腺癌骨转移模型需要更加准确地模拟临床前列腺癌骨转移的过程,可以为疾病的理解 and 治疗提供新的视角和方法。相信随着模型创制技术的不断完善和应用,未来的小鼠模型会与人体的相似度越来越高,可以更加准确地阐释前列腺癌骨转移发生的机制,从而可能开发出更加有效的治疗策略,改善前列腺癌患者的生存率和生活质量。

参 考 文 献(References)

- [1] SIEGEL R, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024 [J]. CA A Cancer J Clin, 2024, 74: 12-49.
- [2] TAKEI D, TAGAMI K. Management of cancer pain due to bone metastasis [J]. J Bone Miner Metab, 2023, 41(3): 327-336.
- [3] ARAKIL N, AKHUND S A, ELAASSER B, et al. Intersecting paths: unraveling the complex journey of cancer to bone metastasis [J]. Biomedicines, 2024, 12(5): 1075.
- [4] SULEKHA SURESH D, GURUVAYOORAPPAN C. Molecular principles of tissue invasion and metastasis [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2023, 324(5): C971-C991.
- [5] BLASCO M T, ESPUNY I, GOMIS R R. Ecology and evolution of dormant metastasis [J]. Trends Cancer, 2022, 8(7): 570-582.
- [6] SATCHER R L, ZHANG X H. Evolving cancer-niche interactions and therapeutic targets during bone metastasis [J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(2): 85-101.
- [7] SONG X, WEI C, LI X. The signaling pathways associated with breast cancer bone metastasis [J]. Front Oncol, 2022, 12: 855609.
- [8] TUFAIL M, WU C. RANK pathway in cancer: underlying resistance and therapeutic approaches [J]. J Chemother, 2023, 35(5): 369-382.
- [9] SHARMA A, SHARMA L, GOYAL R. Molecular signaling pathways and essential metabolic elements in bone remodeling: an implication of therapeutic targets for bone diseases [J]. Curr Drug Targets, 2021, 22(1): 77-104.
- [10] LI B, WANG P, JIAO J, et al. Roles of the RANKL-RANK axis in immunity-implications for pathogenesis and treatment of bone metastasis [J]. Front Immunol, 2022, 13: 824117.
- [11] SINGH A S, FIGG W D. *In vivo* models of prostate cancer

- metastasis to bone [J]. 2005, 174(3): 820–826.
- [12] TANAKA M, DYKES S S, SIEMANN D W. Inhibition of the Axl pathway impairs breast and prostate cancer metastasis to the bones and bone remodeling [J]. Clin Exp Metastasis, 2021, 38(3): 321–335.
- [13] 柴文君, 孙磊, 刘晓丽, 等. 超声引导下左心室内注射人肺癌细胞建立骨转移小鼠模型 [J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(3): 183–189.
- CHAI W J, SUN L, LIU X L, et al. Establishment of bone metastasis mouse models through injecting human lung cancer cells into left ventricle under ultrasound guidance [J]. Lab Anim Comp Med, 2020, 40(3): 183–189.
- [14] LEE H J, YU H K, PAPADOPOULOS J N, et al. Targeted antivascular therapy with the apolipoprotein (a) Kringle V, rhLK8, inhibits the growth and metastasis of human prostate cancer in an orthotopic nude mouse model [J]. Neoplasia, 2012, 14(4): 335–343.
- [15] 毕永祥, 肖民辉, 张宁南, 等. 小鼠不同部位体内前列腺癌骨转移模型的建立及方法改进 [J]. 北京大学学报(医学版), 2017, 49(4): 590–596.
- BI Y X, XIAO M H, ZHANG N N, et al. Construction and improvement of animal models with different positional osseous metastasis of prostate cancer *in vivo* [J]. J Peking Univ Health Sci, 2017, 49(4): 590–596.
- [16] ZHENG Y, LI P, HUANG H, et al. Androgen receptor regulates eIF5A2 expression and promotes prostate cancer metastasis via EMT [J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 373–341.
- [17] WELLS K V, KRACKELER M L, JATHAL M K, et al. Prostate cancer and bone: clinical presentation and molecular mechanisms [J]. Endocr Relat Cancer, 2023, 30(9): 34–57.
- [18] LEBER M F, EFFERTH T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis [J]. Int J Oncol, 2009, 34(4): 881–895.
- [19] KATT M E, WONG A D, SEARSON P C. Dissemination from a solid tumor: examining the multiple parallel pathways [J]. Trends Cancer, 2018, 4(1): 20–37.
- [20] OKAMOTO K. Role of RANKL in cancer development and metastasis [J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(1): 71–81.
- [21] BERISH R B, ALI A N, TELMER P G, et al. Translational models of prostate cancer bone metastasis [J]. Nat Rev Urol, 2018, 15(7): 403–421.
- [22] DE LEON-OLIVA D, BARRENA-BLÁZQUEZ S, JIMÉNEZ-ÁLVAREZ L, et al. The RANK-RANKL-OPG system: a multifaceted regulator of homeostasis, immunity, and cancer [J]. Medicina, 2023, 59(10): 1752.
- [23] ARMSTRONG A P, MILLER R E, JONES J C, et al. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes [J]. 2008, 68(1): 92–104.
- [24] HUANG Y, HONG W, WEI X. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 129–137.
- [25] ONGKEKO W M, BURTON D, KIANG A, et al. Parathyroid hormone related-protein promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85803.
- [26] PUTZKE A P, VENTURA A P, BAILEY A M, et al. Metastatic progression of prostate cancer and e-cadherin regulation by zeb1 and SRC family kinases [J]. 2011, 179(1): 400–410.
- [27] NIEHRS C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators [J]. Oncogene, 2006, 25(57): 7469–7481.
- [28] WERNER J, BOONEKAMP K E, ZHAN T, et al. The roles of secreted wnt ligands in cancer [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6): 5349–5387.
- [29] HALL C L, BAFICO A, DAI J, et al. Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts [J]. Cancer Res, 2005, 65(17): 7554–7560.
- [30] AN F, SONG J, CHANG W, et al. Research progress on the mechanism of the SFRP-mediated Wnt signalling pathway involved in bone metabolism in osteoporosis [J]. Mol Biotechnol, 2024, 66(5): 975–990.
- [31] TSENG J C, HUANG S H, LIN C Y, et al. ROR2 suppresses metastasis of prostate cancer via regulation of miR-199a-5p-PIAS3-AKT2 signaling axis [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(5): 376.
- [32] JIN R, STERLING J A, EDWARDS J R, et al. Activation of NF-kappa B signaling promotes growth of prostate cancer cells in bone [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60983.
- [33] MORRISSEY C, LAI J S, BROWN L G, et al. The expression of osteoclastogenesis-associated factors and osteoblast response to osteolytic prostate cancer cells [J]. 2010, 70(4): 412–424.
- [34] JANN J, GASCON S, ROUX S, et al. Influence of the TGF- β superfamily on osteoclasts/osteoblasts balance in physiological and pathological bone conditions [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7597.
- [35] STRAIGN D M, IHLE C L, PROVERA M D, et al. Targeting the BMP pathway in prostate cancer induced bone disease [J]. Front Endocrinol, 2021, 12: 769316.
- [36] RIEUNIER G, WU X, MACAULAY V M, et al. Bad to the bone: the role of the insulin-like growth factor axis in osseous metastasis [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(12): 3479–3485.
- [37] GOYA M, MIYAMOTO S, NAGAI, et al. Growth inhibition of human prostate cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice by a ligand-specific antibody to human insulin-like growth factors [J]. Cancer Res, 2004, 64(17): 6252–6258.
- [38] LUO F, SU Y, ZHANG Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells promote the progression of prostate cancer through the SDF-1/CXCR4 axis *in vivo* and *in vitro* [J]. Clin Transl Oncol, 2022, 24(5): 892–901.
- [39] SUN Y X, SCHNEIDER A, JUNG Y, et al. Skeletal localization and neutralization of the SDF-1 (CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites *in vivo*

[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(2): 318-329.

[40] 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 C H. 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.

[41] ZHANG-YIN J, PANAGIOTIDIS E. Role of 18F-NaF PET/CT in bone metastases [J]. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2023, 67(4): 249-258.

[收稿日期] 2024-06-18

《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。



孙然,许关振,刘越,等. 病态窦房结综合征动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1198–1206.
SUN R, XU G Z, LIU Y, et al. Progress in animal models of sick sinus syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1198–1206.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.011

病态窦房结综合征动物模型的研究进展

孙然¹, 许关振¹, 刘越², 孙莹莹¹, 张淑涵¹, 薄慧赢¹, 武妍彤¹, 侯平^{3*}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110033; 2. 沈阳医学院, 沈阳 110032; 3. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110033)

【摘要】 病态窦房结综合征(sick sinus syndrome, SSS)是窦房结及其周边组织发生了损伤,使窦房结发生了兴奋、传导功能紊乱,从而引起了一系列的心律失常疾病。为更好地探索 SSS 发病机制,并为其治疗研究提供依据,建立出能够模拟人类窦房结功能紊乱的动物模型具有重要价值。本文从动物选择、造模原理及方法、模型评价方法及检测指标等方面进行综述,希望能够为更加深入研究 SSS 致病机制提供基础和依据。

【关键词】 病态窦房结综合征; 动物模型; 造模原理; 心率; 研究进展

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1198-09

Progress in animal models of sick sinus syndrome

SUN Ran¹, XU Guanzhen¹, LIU Yue², SUN Yingying¹, ZHANG Shuhan¹,
BO Huiying¹, WU Yantong¹, HOU Ping^{3*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110033, China; 2. Shenyang Medical College, Shenyang 110032, China; 3. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110033, China)

Corresponding author: HOU Ping. E-mail: houpings7@126.com

【Abstract】 Sick sinus syndrome (SSS) refers to damage to the sinoatrial node and its surrounding tissues, which leads to excitation and conduction dysfunction of the sinoatrial node, Resultsing in arrhythmia diseases. A better understanding of the pathogenesis of SSS is required to provide a basis for its treatment, including establishing an animal model that can simulate human sinus node dysfunction. In this paper, we review the animal selection, the principles and method of modeling, and the evaluation method and detection indicators of the models, to provide a basis for further studies of the pathogenesis of SSS.

【Keywords】 sick sinus syndrome; animal model; modeling principle; heart rate; research progress

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

病态窦房结综合征(sick sinus syndrome, SSS)又称窦房结功能障碍(sinus node dysfunction, SND),冲动形成障碍或者冲动传导障碍引起一系列异常节律。SSS 患者有心悸、乏力、头昏眼花、反应迟钝等症状,严重者可引起短暂黑蒙、晕厥甚至死亡^[1-2]。美国流行病学研究预测表明,窦房结功能紊乱病例数量将从 2012 年的 78 000 例可能增加到

2060 年的 172 000 例^[3]。目前常规的构建 SSS 动物模型的方法主要分为促衰老法、促纤维化法、促炎、氧化应激法、刺激自主神经法以及基因突变法。但是在构建 SSS 模型的过程中,动物种类的选择以及模型评价指标的确定也是尤为重要。下面就 SSS 模型动物的选择、造模原理以及方法、评价指标的选择进行综述,以期建立更符合临床病证特点的 SSS 动物模型,

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81874403),辽宁省“兴辽英才计划”项目(XLYC1802099)。

Funded by General Project of National Natural Science Foundation of China (81874403), Liaoning Province “Xingliao Talents” Program (XLYC1802099)。

【作者简介】 孙然,女,硕士,研究方向:缓慢性心律失常的中药干预。Email:293825213@qq.com

【通信作者】 侯平,女,硕士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:缓慢性心律失常的中药干预。Email:houpings7@126.com

旨在为科研及临床相关研究提供进一步的指导。

1 动物模型选择

小鼠^[3-4]、大鼠^[5]、斑马鱼^[6-7]、兔^[8-11]、犬^[12]等是常用于制作 SSS 模型的动物,小鼠的品系主要是选择 C57BL/6 小鼠,大鼠品系主要选择 Wistar 大鼠和 SD 大鼠。大小鼠等虽然在人类种属同源性和生理生化特性的接近程度上略差于大动物(如猴、猪等),但是由于心率较快,心电图图形较为稳定,变异性小,造模后心率变化也更加明显,日常饲养易管理,成为目前最常用的造模动物。但啮齿类动物体积较小,对于窦房结(sinus node, SAN)的观察存在一定的难度,而兔、犬心脏体积较大,对于 SAN 的观察也较为清晰明了,但饲养管理较小型啮齿类相对困难、价格高昂,实验应用较啮齿类少。斑马鱼模型是近期应用较为广泛的实验动物,并且斑马鱼有成功构建 SSS 模型的报告^[6],由于斑马鱼的胚胎和成人心率以及动作电位的形状、持续时间非常相似,使用吗啡寡核苷酸还可以实现快速有效的基因特异性敲除,适合大规模遗传研究,能够快速发现新的遗传致病因素^[6]。斑马鱼在心脏研究中另外一个主要优势是其胚胎是透明的,可以高效的评估心脏发育、心率分析和表型表征。但斑马鱼心脏形态为两腔,且为冷血动物,心率随着所处环境温度的变化而产生巨大差异,因此斑马鱼作为 SSS 模型有较大争议。综合饲养环境、经济成本、种属以及造模后特征等因素,目前相对最优的 SSS 模型候选仍为啮齿类动物。

2 造模原理及方法

SSS 的发生既有退行性特发性纤维化、心脏重构等内在因素,也有药物治疗、代谢异常等外在因素,因此明确 SSS 的病理生理特征有助于更好的构建 SSS 动物模型。

2.1 衰老

流行病学调查显示,人类 SSS 的平均发病年龄在 73 ~ 76 岁之间,且发病率会随着年龄的增长逐渐提高,衰老诱导的 SAN 退化是 SSS 产生的一个重要风险因素^[13]。研究使用衰弱指数(frailty index, FI)对年轻和老年小鼠进行量化,发现 FI 的变化与 SAN 恢复时间、传导速度、间质纤维化和基质金属蛋白酶的表达密切相关^[14-15]。衰老导致的起搏速度减慢是由多种机制组合引起的,包括起搏细胞、

通道蛋白(HCN4、Cav1.2 和 Nav1.5 等)的减少以及组织纤维化的增加等^[4]。随着年龄的增长,SAN 的功能会逐渐受损,从而影响心脏的正常搏动,心率下降^[16]。*Klotho* 具有抗衰老的特性,随着年龄的增长,其表达水平也随之下降,基因多态性会影响并预测心血管疾病的风险^[17],小鼠 *Klotho* 基因的表达缺陷类似人类的衰老,TAKESHITA 等^[18]研究发现 *Klotho* 基因敲除导致的 SAN 功能异常,并且该基因只在相应的 SAN 区域表达,*Klotho* 敲除基因小鼠在 3 周龄前发育正常,3 周龄后机体活跃度下降,并在 8、9 周过早死亡^[19],临床症状与人 SSS 一致,符合衰老导致的 SSS 模型。基于此可以初步判定与年龄相关的功能和形态变化会影响 SAN 功能^[14]。此外就是从自然衰老的动物中筛选心率显著降低的个体作为研究 SSS 的动物模型,但是由于该方法获得的合格动物数量较少,无法用于大规模实验。

2.2 纤维化

纤维组织在维持 SAN 的正常起搏以及传导功能方面发挥着至关重要的作用,纤维组织的存在保证了 SAN 功能的完整性^[20]。但当 SAN 组织过度纤维化时,会损害动作电位的产生和传导,导致 SND^[21]。纤维化的病理变化主要涉及成纤维细胞的激活和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度分泌,SSS 的发病机制可能与 SAN 纤维化过程中胶原纤维束破坏心肌细胞之间的连接有关,射频消融、化学损伤、促纤维化分子以及炎症的激活等许多因素都可以达到此类的损伤,从而导致功能和电生理异常^[21-22]。

射频消融法是通过向 SAN 区(上腔静脉与右心耳交界处)发放射频电流,提升 SAN 周边组织温度,局部的心肌细胞发生脱水、凝结、蛋白变性,形成一个边界清晰的坏死灶,从而建立 SSS 模型^[23]。化学损伤是利用甲醛^[5]、氢氧化钠^[24-25]等化学物质腐蚀 SAN,使 SAN 周围组织发生纤维化的改变,从而延长电传导时间。化学损伤法处理大鼠以及小鼠相对难度较大,因为大鼠和小鼠体积较小,且 SAN 的解剖位置处于肺叶和胸腺覆盖之下,用化学试剂处理过程中不可避免的会损伤到右肺叶和胸腺,导致造模完成撤下呼吸机后表现出较高的死亡率。ZHONG 等^[26]在应用化学损伤法的时候,优化了小动物在化学试剂损伤 SAN 时对右肺叶和胸腺的损伤,进行精确按压渗透法,通过心率、存活率以及病理染色证明 SAN 损伤后心率降低 31% ~ 40% 的大

鼠 SSS 模型是可持续和稳定的,具有指导意义。相较于大鼠和小鼠,化学损伤法在兔和犬的实验中,成功率则能大大提高,因此在选用化学损伤造模的时候,应该注意造模动物的选择。

促纤维化分子以及炎症的激活主要是通过应用血管紧张素(angiotensin II, Ang II)来实现。目前已有研究证明,注射 Ang II 可以通过激活 AKT/mTOR 信号通路的磷酸化来抑制自噬,从而激活成纤维细胞并诱导 ECM 过度分泌^[27],注射 Ang II 还可以激活 NADPH 氧化酶,活化的 NADPH 氧化酶催化产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)在许多生理学过程中都起着重要作用,ROS 参与细胞的氧化还原信号传导、细胞生长和死亡等生物过程的调控,从而导致 SAN 细胞氧化、凋亡,发生 SND^[28]。虽然这种方法可以成功诱导心率减慢,模拟 SAN 变性,但该方法已被发现会引起高血压及心力衰竭^[29]。皮下微量渗透泵注射 Ang II 较直接破坏 SAN 是一种更好的方法,但 ALZET 皮下微量渗透泵的高成本也限制了其应用,特别是对于一些资金不足的研究小组。

2.3 炎症和氧化应激

炎症和氧化应激会破坏 SAN 的稳定性,并导致不可逆转的功能损害^[30]。对于 SAN 细胞而言,炎症和氧化应激可以通过缺血、缺氧和细胞毒性刺激实现^[31]。CHANG 等^[32]研究发现氧化应激可能导致离子通道的变化,导致心律失常和 SND。ROS 在 SAN 细胞中积累也是 SSS 的一个重要机制^[3],高水平的 ROS 介导能显著降低细胞的离子通量和膜离子泵功能,从而严重影响 SAN 的功能^[33]。基于炎症以及氧化应激原理建立 SSS 模型方法主要是 SAN 动脉结扎法以及皮下注射 D-半乳糖法。

缺血再灌注损伤 SAN 区域符合临床病理改变,尤其是与心肌梗死或冠心病后心动过缓患者发生的病理改变一致^[34-35]。由于 SAN 的血液主要是右冠状动脉提供,结扎 SAN 动脉期间,能够激活大量中性粒细胞, SAN 动脉结扎解除后,炎症级联激活会加重梗死的损伤,最终导致 SAN 细胞凋亡^[5]。ZHANG 等^[5]研究发现用缺血再灌注方法的模型中发现 HCN4 和 SCN5A 表达下降,这表明 SAN 动脉结扎法可能通过损害离子通道蛋白表达以降低起搏速度。但是在复现模型时,彭杰等^[11]发现在解除 SAN 动脉结扎 1 周后,心率恢复至正常,病理可见 SAN 区域新生血管形成,未见间质增生^[11,36]。为解

决此类情况,ZHANG 等^[5]在缺血再灌注后给予动物连续服用了 2 周的普萘洛尔,从而避免模型动物自我修复。由此可知通过延长 SAN 动脉结扎时间以及给予药物维持低心率或许可以提高 SSS 模型的成功率。

氧化应激是 D-半乳糖(D-galactose, D-Gal)诱导 SAN 退化的重要机制,过量的 ROS 还会导致相关离子通道功能障碍,导致 SND。D-Gal 水平过高会改变氧化酶活性并产生氧化产物,导致细胞代谢紊乱。过量的 D-Gal 与蛋白质或肽的游离氨基酸基团形成晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs),从而导致机体衰老^[37]。张恒等^[4]研究发现 D-Gal 的应用不仅成功的导致人诱导多能干细胞来源的心肌细胞(human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs)搏动功能障碍,而且还诱导机体衰老从而导致 C57BL/6 小鼠 SAN 变性。ZHANG 等^[3]研究发现 D-Gal 能够降低心脏收缩能力和器官灌注量,提高 B 型钠尿肽(B-type natriuretic peptide, BNP)水平,且导致心率下降,这种现象类似于变时性功能障碍,表明可能已经发生了 SND。通过 Masson 染色发现 D-Gal 导致 SAN 和心肌的显著纤维化,这表明 D-Gal 诱导心脏退行性病变,导致 SAN 和心脏功能障碍。此外 D-Gal 能够显著下调 SAN 中环化核苷酸调控阳离子通道蛋白亚型 4(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated cation channels 4, HCN4)的表达,这种现象与超极化激活的阳离子通道(hyperpolarization-activated cation channel, I_h)通道的损害有关,这被认为是 SND 的主要原因。氧化应激指标和二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)染色结果表明,D-Gal 不仅诱导小鼠产生氧化应激,还会导致 ROS 在 SAN 中显著积累。综上,D-Gal 诱导的 SSS 模型与衰老导致的 SSS 机制相符,通过诱导窦房结衰老模拟退行性病变,符合人源化疾病模型标准,具有模型可靠、成功率高、费用低廉、易于获取、成模周期短的特点,是目前较为科学也是最新的造模方法,成功突破该领域动物模型复制的诸多门槛与限制。

2.4 自主神经功能障碍

自主神经系统通过神经纤维与 SAN 相连,与心率有密切的关系。心率变异性(heart rate variability, HRV)受到自主神经系统的影响,代表逐次心跳周期差异的变化情况,HRV 的降低反映自主神经功能紊乱^[15,38]。临床研究表明,不仅 SSS 患者

的 HRV 下降,通常与衰老相关的心房颤动和心力衰竭等疾病也会导致 HRV 的下降^[39]。HRV 指标随年龄增长而下降,对于评估心血管系统的健康很重要,反映了心脏活动自主调节功能的减弱^[40]。对于因迷走神经张力过大引起的严重症状性心动过缓的成年人,心脏神经消融术被认为是一种有前途的治疗选择^[41]。通过进行心脏神经节丛消融可以改善症状性窦性心动过缓患者的长期窦性窦率增加并改善生活质量^[42-43]。基于此原理建立的 SSS 动物模型为刺激迷走神经法。迷走神经受到刺激释放乙酰胆碱作用于心肌细胞膜的 M 型胆碱能受体,激活 SAN 细胞的钾通道,抑制四相的内向电流 I_t 以及钙通道,导致 SAN 功能异常,心率减慢,房室传导速度减慢^[12,14]。用迷走神经刺激法制作慢性心律失常的动物模型虽然比较困难,但费用低、易于控制、较适用于大型的动物。

2.5 其他

此外越来越多的研究表明 SSS 的发生与其所编码的离子通道发生的基因变异有关,又称为“离子通道病”^[6,19,44-49]。目前临床上发现由于基因突变导致的 SSS 的相关基因有 *SCN5A*、*HCN4*、*HCN1*、*KLOTHO*、*MFN2*、*AKAP10*、*CASDQ2*、*MYH6*、*GNB2* 等,通过基因突变等方法建立 SSS 模型也逐渐增加。*SCN5A* 突变斑马鱼具有 SSS 表型特征,如心动过缓、QRS/P 比值增加以及变时功能不全^[3,46-47]。FENSKE 等^[49]研究发现 *HCN1* 敲除后小鼠心率下降,窦房结恢复时间延长,心率变异性增加。ZHENG 等^[50]用他莫昔芬诱导心脏传导系统(*Hcn4*^{CreERT2})特异性敲除 *Lats1/2* (*Lats1/2* *CKO*),*Lats1/2* *CKO* 小鼠表现出心率降低的症状,出现严重的 SND;病理发现 SAN 成纤维细胞大量增殖,纤维化明显。还有研究将两种基因工程小鼠系 ROSA-eGFP-DTA 和 *HCN4*-*Ki*T-Cre 杂交,以实现心脏起搏和传导系统中细胞的可诱导性缺失。这种缺失导致 SAN 组织退行性纤维化,这种病理学特征正是 SSS 的病理表现^[51]。赵允梓^[44]通过构建 *AKAP10* 基因突变,在斑马鱼中成功模拟出窦性停搏样表型。ZHANG 等^[52]研究发现 *miR-1976* 转基因小鼠中 *Cav1.2* 和 *Cav1.3* 蛋白表达减弱,抑制了 L 型钙离子通道,从而导致窦房结功能障碍。SHI 等^[53]研究发现心肌特异性敲除 *Cfp1* 的杂合小鼠(*Cfp1*^{+/-})的 *HCN4* 启动子区激活基因转录因子 H3K4me3、H3K9ac 和 H3K27ac 修饰减少,*HCN4* 表达减少影响

I_t 电流,从而导致小鼠心率减慢,SAN 功能异常。然而,由于纯合类敲除小鼠的胚胎致死性和杂合子小鼠缺乏表型,导致小鼠敲除模型的实用性受到限制。当今医学时代,将基因测试纳入临床实践已成为常态,相信基因突变模型也会逐渐完善,成为以后的趋势。

3 模型评价方法

目前 SSS 模型检测指标众多,如表观指标、心电图检测、病理指标检测等,但检验模型是否建立成功,心电图的指标检测最为重要。但针对不同动物的特征,心电图判定 SSS 的标准也有所差异。大鼠 SSS 模型成功为造模 1、2 周后心率都明显减慢且心率低于造模前 30%^[36];小鼠 SSS 模型成功标准为静息心率显著下降,RR 间期延长,但是文中未提及心率下降的具体标准^[4]。常见的兔 SSS 模型成功标准为心率下降 30%以上或出现窦性停搏、窦房阻滞或交界性逸搏且在 2 h 内不发生反复,有时可见心动过缓心动过速综合症,逸搏心律与房性心动过速交替出现^[23,54];斑马鱼 SSS 造模成功标准为 PP 或 RR 间期超过 1.5 s,由于温度对于斑马鱼心率的变化影响巨大,因此在心电图时应将斑马鱼控制在相同的温度^[6]。

有研究认为 SSS 患者常出现乏力、头晕等症状,因此在评估 SSS 模型时应加上了表观指标,如精神、行动、皮毛色泽、食欲等,当模型出现精神萎靡、行动迟缓、皮毛干枯易脱落、食欲欠佳,合并心率下降的表现则为 SSS 模型成功^[3,55]。针对体重的问题,出现了争议,程佳新^[55]主张体重下降更加符合 SSS 模型的特征,而 ZHANG 等^[3]则主张肥胖更加符合衰老导致 SSS 的特征,但是由于两人造模方式有所差异,因此体重的差异也是一个值得讨论的问题。还有研究加入了窦房结功能测定^[54],使构建 SSS 模型更加严谨。

病理指标主要涉及苏木素-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色、天狼星红染色等,可以直接反应 SAN 形态变化、炎症浸润以及纤维化程度等。此外 SSS 发病与 ROS 蛋白水平及相关基因表达变化密切相关,检测这些指标有助于探索药物干预靶点。目前大多数研究的评价指标只观察心电图,较为单一,同时也没有明确的心率下降标准,多为造模前后对比或者模型组与空白对照组对比,当出现统计学差异变化后,便认为造模成功。现将动物模型的诱导方法及检测指标整理见表 1。

表 1 SSS 动物模型造模方法及评价标准

Table 1 SSS animal model establishment methods and evaluation indicators

造模对象 Modeling object	造模方法 Modeling method	表现 Performance
SD 大鼠 ^[11] SD rats ^[11]	自然衰老 Natural aging	1. 病理表现为 SAN 纤维化改变; 2. 纤维化蛋白:转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β)、含不育 α 基元域 3 (sterile alpha motif domain containing 3, Samd3)、α-平滑肌肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin, α-SMA) 表达水平升高; 3. 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平下降, 超氧化物歧化酶 (super oxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽 (glutathione, r-glutamyl cysteinyl + glycine, GSH) 水平升高 1. Pathological manifestations were SAN fibrosis; 2. Increased expression of fibrosis proteins TGF-β, Samd3 and α-SMA; 3. MDA levels decreased and SOD and GSH levels increased
斑马鱼 ^[6] Zebrafish ^[6]	自然衰老 Natural aging	1. PP 间隔超过 1.5 s, 较低的心率 (heart rate, HR), 相邻正常心动周期差值的均方根 (root mean square of successive differences, RMSSD) 增加, QRS/P 比增加, P 波振幅减少; 2. 阿托品给药未使衰老斑马鱼的 HR 增加到正常斑马鱼的水平; 3. 轻微心脏功能障碍 1. PP interval of more than 1.5 s, lower HR, increased RMSSD, increased QRS/P ratio, and decreased P-wave amplitude; 2. Atropine administration did not increase the HR of aged zebrafish to the level of normal zebrafish; 3. Mild cardiac dysfunction
实验兔 ^[54] Experimental rabbits ^[54]	40% 甲醛湿敷法 40% formaldehyde wet compress method	1. 心率逐渐降低, 下降 30%; 2. SAN 病理见纤维化改变; 3. 窦房结恢复时间 (sinus node recovery time, SNRT)、校正窦房结恢复时间 (correct sinus node recovery time, SNRTc) 和窦房传导时间 (sinoatrial conduction time, SACT) 上升; 4. HCN4 表达下降 1. HR gradually decreased by 30%; 2. SAN pathology showed fibrotic changes; 3. SNRT, SNRTc and SACT increased; 4. Decreased HCN4 expression
SD 大鼠 ^[36] SD rats ^[36]	10% 氢氧化钠静脉注射 10% sodium hydroxide was administered intravenously	1. HR 下降 30% 及以上; 2. SAN 病理见细胞减少, 结构模糊, 间质组织增生, 并有空泡形成, 胶原水平升高; 3. SAN 组织 HCN4 蛋白表达下降 1. HR decreased by 30% or more; 2. Pathology of SAN showed that the cells decreased, the structure was fuzzy, the interstitial tissue proliferated, and there was vacuolization, and the collagen level increased; 3. Decreased HCN4 protein expression in SAN tissue
C57BL/6 小鼠 ^[3] C57BL/6 mice ^[3]	D-半乳糖皮下注射 200 mg/(kg·d), 持续 8 周 D-galactose was administered subcutaneously at 200 mg/(kg·d) for 8 weeks	1. 行动迟缓, 精神萎靡, 背部毛发无光泽并伴随脱落, 体重增加; 2. HR 明显低于正常小鼠; 3. 左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室短轴缩短率 (left ventricular fraction shortening, LVFS)、血清 BNP 以及脑血容量下降; 4. SAN 和心肌组织病理可见胶原容积分数上升, 纤维化水平升高; 5. SAN 中 HCN4 表达水平下降, ROS 水平升高 1. Slow movement, listless spirit, dull back hair and loss, weight gain; 2. HR was significantly lower than that of normal mice; 3. LVEF, LVFS, serum BNP and cerebral blood volume decreased; 4. Increased collagen volume fraction and fibrosis were observed in sinoatrial node and myocardial tissue pathology; 5. HCN4 expression level in SAN, elevated ROS in SAN
C57BL/6 雄性小鼠 ^[55] C57BL/6 male mice ^[55]	皮下微量渗透泵注射血管紧张素 II 3 mg/(kg·d), 持续 28 d Angiotensin II 3 mg/(kg·d) was administered by subcutaneous microosmotic pump for 28 days	1. HR 逐渐降低, 28 d 后 HR 较术前小鼠 HR 减慢大于 30% 2. 小鼠精神渐渐萎靡、行动欠佳、皮毛干枯竖立易脱落, 体重逐渐下降、食欲欠佳, 极少部分小鼠还出现了呼吸低微的表现 1. HR gradually decreased, and after 28 days the heart rate decreased by more than 30% compared with the preoperative heart rate of the mice 2. Spirit of the mice gradually droop, poor action, dry and erect fur easy to fall off, weight loss, poor appetite, a small number of mice also showed low breathing performance

续表 1

造模对象 Modeling object	造模方法 Modeling method	表现 Performance
SD 大鼠 ^[36] SD rats ^[36]	缺血再灌注法 Ischemia-reperfusion	1. HR 下降 30% 及以上; 2. SAN 病理见细胞减少, 结构模糊, 间质组织增生, 并有空泡形成, 胶原水平升高; 3. SAN 组织 HCN4 蛋白表达下降 1. HR decreased by 30% or more; 2. Pathology of SAN showed that the cells decreased, the structure was fuzzy, the interstitial tissue proliferated, and there was vacuolization, and the collagen level increased; 3. Decreased HCN4 protein expression in SAN tissue
健康大耳白兔 ^[23] Healthy big-eared white rabbits ^[23]	射频消融法 Radiofrequency ablation method	1. HR 下降 50% ~ 60%; 2. SNRT 明显延长, 且时间大于 110 ms 1. HR decreased by 50% ~ 60%; 2. SNRT was significantly prolonged, and the time was more than 110 ms
成年犬 ^[12] Adult dogs ^[12]	刺激迷走神经干 Stimulating the vagus nerve	心率减慢, 发生窦性停搏 HR slowed, and sinus arrest occurred
斑马鱼 ^[6] Zebrafish ^[6]	SCN5A 突变 SCN5A mutation	1. PP 间隔超过 1.5 s, 较低的 HR, RMSSD 增加, P 波振幅减少; 2. 阿托品给药未使衰老斑马鱼的 HR 增加到正常斑马鱼的水平 1. PP interval of more than 1.5 seconds, lower HR, RMSSD increase, and P-wave amplitude decrease; 2. Atropine administration did not increase the HR of aged zebrafish to the level of normal zebrafish
斑马鱼 ^[7] Zebrafish ^[7]	ABCC9 敲除 Knockout of ABCC9	1. 斑马鱼 HR 显著降低; 2. 斑马鱼心输出量、舒张末期心室容积、收缩末期心室容积显著降低, 射血分数显著升高 1. Zebrafish HR was significantly reduced; 2. Cardiac output, end-diastolic ventricular volume and end-systolic ventricular volume of zebrafish were significantly decreased, and the ejection fraction was significantly increased
小鼠(未提及品系) ^[49-50] Mice(strain was not mentioned) ^[49-50]	HCN4 突变 HCN4 mutation HCN1 敲除 Knockout of HCN1	1. HR 降低、窦房结恢复时间延长, HR 变异性增加; 2. SAN 病理表现为纤维化明显 1. Decreased HR, prolonged sinus node recovery time, and increased HR variability; 2. SAN pathology showed obvious fibrosis
小鼠(未提及品系) ^[18] Mice(strain was not mentioned) ^[18]	KLOTHO 敲除 Knockout of KLOTHO	RR 间期延长, HR 下降 RR interval was prolonged and the heart HR

4 总结与讨论

综上,为充分模拟临床症状、贴合临床发病机制,近年来国内外研究者从病理生理入手,建立了各种各样、不同机理的 SSS 动物模型。主要方法包括:促衰老法、促纤维化法、促炎以及氧化应激法、刺激自主神经法以及基因突变法。现多种造模方法已经用于 SSS 机制研究、治疗以及药物开发中,推动 SSS 的研究进展。但 SSS 造模仍然存在以下问题:(1)缺乏统一的造模评价标准。目前 SSS 动物模型建立成功的标准主要依据统计学方法进行自主评价,且大部分研究评价指标单一,仅考察心率变化。(2)人 SSS 发病因素多样且复杂,多因素交互作用,采用联合造模方法,模拟导致 SSS 发生的危险因素以及治病条件的可行性也有待进一步研究。(3)不同造模方法在不同实验室、不同动物种属间、

不同操作细节、不同环境条件可能存在较大的差异,导致模型的稳定性和可重复性不足。

由于 SSS 发病机制复杂且多样,因此在造模的时候需根据研究的情况进行选择,如研究心衰后导致 SAN 功能紊乱,可以选择缺血再灌注加普萘洛尔维持低心率模型;若是研究离子通道相关蛋白的话,可以选择特定基因突变模型;若是研究衰老型 SSS,则可以选择 D-Gal 诱导或者从自然衰老的动物中筛选心率较低的。因此根据研究类型进行特定的模型选定尤为重要。科学稳定可靠的造模方法应该是基于疾病的发病机制,综合多因素考虑,在结合既往造模方法上,根据研究内容进行科学的造模方法选择,建立符合特殊人群的 SSS 动物模型。因此未来需要更加注重模拟 SSS 的发病机制和过程,协同多基因和其他因素的模型,更好的为 SSS 的防治研究提供基础。

参 考 文 献(References)

- [1] CHOI S, VIVAS O, BAUDOT M, et al. Aging alters the formation and functionality of signaling microdomains between L-type calcium channels and β_2 -adrenergic receptors in cardiac pacemaker cells [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 805909.
- [2] SATHNUR N, EBIN E, BENDITT D G. Sinus node dysfunction [J]. *Cardiol Clin*, 2023, 41(3): 349–367.
- [3] ZHANG H, CHEN C, LIU Y, et al. D-galactose causes sinoatrial node dysfunction: from phenotype to mechanism [J]. *Aging*, 2023, 15(21): 12551–12569.
- [4] 张恒. 益心复脉颗粒改善增龄性窦房结功能减退机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2023.
ZHANG H. Study on the mechanism of Yixin-Fumai granules in improving age-related sinoatrial node dysfunction [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2023.
- [5] ZHANG W, ZHU B, REN J, et al. Two methods for modeling of sick sinus syndrome in rats: Ischemia reperfusion and sodium hydroxide induced injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 778–784.
- [6] YAN J, LI H, BU H, et al. Aging-associated sinus arrest and sick sinus syndrome in adult zebrafish [J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232457.
- [7] 闫鲁仪. 病态窦房结综合征相关 ABCC9 基因突变在斑马鱼体内的功能验证 [D]. 济南: 山东大学; 2023.
YAN L Y. Functional verification of sick sinus syndrom-related ABCC9 gene mutation in zebrafish [D]. Jinan: Shandong University; 2023.
- [8] 张晓华, 赵宏宇, 钱锋, 等. 增率复脉颗粒对病态窦房结综合征兔模型心肌细胞钙离子通道蛋白及 mRNA 表达的影响 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2022, 17(12): 2345–2349, 2360.
ZHANG X H, ZHAO H Y, QIAN F, et al. Effect of Zenglv Fumai Granules on the expression of calcium channel protein and mRNA in myocardial cells of rabbits with sick sinus syndrome [J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2022, 17(12): 2345–2349, 2360.
- [9] 刘学武, 王小青, 赵丞, 等. 甲醛致兔窦房结损伤模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(11): 21–27.
LIU X W, WANG X Q, ZHAO C, et al. Establishment of rabbit sinoatrial node injury model induced by formaldehyde [J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 25(11): 21–27.
- [10] 刘如秀, 李汇博, 王妮娜, 等. 益阳活血方对兔病窦综合征心阳虚血瘀证模型中医证候及血液流变学的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(9): 2065–2068.
LIU R X, LI H B, WANG N N, et al. Effect of Yiyang Huoxue Recipe on TCM syndrome and hemorheology of rabbit model combined sick sinus syndrome with heart-yang deficiency and blood-stasis syndrome [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2011, 26(9): 2065–2068.
- [11] 彭杰, 刘如秀, 刘宇. 通阳活血方对兔缺血再灌注窦房结细胞骨架微管蛋白 β -tubulin 的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(11): 45–47.
- [12] PENG J, LIU R X, LIU Y. Effect of Tongyang Huoxue recipe on cytoskeleton protein β -tubulin of ischemia reperfusion injured sinoatrial node cell in rabbits [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2014, 21(11): 45–47.
- [13] 尹军祥, 郭继鸿. 迷走神经干刺激建立缓慢型心律失常动物模型的研究 [J]. *临床心电图杂志*, 2008, 17(2): 134–137.
- [14] YIN J X, GUO J H. Establishment of an animal model of bradyarrhythmia by vagus nerve trunk stimulation [J]. *J Clinical Electrophysiol*, 2008, 17(2): 134–137.
- [15] MONFREDI O, BOYETT M R. Sick sinus syndrome and atrial fibrillation in older persons-A view from the sinoatrial nodal myocyte [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 83: 88–100.
- [16] WEISER-BITOUN I, MORI H, NABESHIMA T, et al. Age-dependent contribution of intrinsic mechanisms to sinoatrial node function in humans [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 18875.
- [17] DOREY T W, JANSEN H J, MOGHTADAEI M, et al. Impacts of frailty on heart rate variability in aging mice: Roles of the autonomic nervous system and sinoatrial node [J]. *Heart Rhythm*, 2021, 18(11): 1999–2008.
- [18] PETERS C H, SHARPE E J, PROENZA C. Cardiac pacemaker activity and aging [J]. *Annu Rev Physiol*, 2020, 82: 21–43.
- [19] PRUD'HOMME G J, KURT M, WANG Q. Pathobiology of the klotho antiaging protein and therapeutic considerations [J]. *Front Aging*, 2022, 3: 931331.
- [20] TAKESHITA K, FUJIMORI T, KUROTAKI Y, et al. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression [J]. *Circulation*, 2004, 109(14): 1776–1782.
- [21] 房晨鹏, 蔡盈盈, 邓珏琳. Klotho 基因多态性与病态窦房结综合征的关系 [J]. *现代预防医学*, 2013, 40(2): 372–375.
- [22] FANG C L, CAI Y Y, DENG J L. Study on the association between Klotho gene polymorphism and sick sinus syndrome [J]. *Mod Prev Med*, 2013, 40(2): 372–375.
- [23] LURJE I, GAISA N T, WEISKIRCHEN R, et al. Mechanisms of organ fibrosis: Emerging concepts and implications for novel treatment strategies [J]. *Mol Aspects Med*, 2023, 92: 101191.
- [24] WANG H F, DU X J, ZHANG Y Y, et al. New perspective on the mechanisms of cardiac fibrosis [J]. *Sci Bull*, 2023, 68(22): 2704–2708.
- [25] CHEN M, WU Q. Roles and mechanisms of natural drugs on sinus node dysfunction [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164: 114777.
- [26] 骆峰. 窦房结功能障碍时心房电活动变化的实验研究 [D]. 汕头: 汕头大学; 2004.
- [27] LUO F. Electrophysiologic characteristic of the atrium in rabbits with sinus node dysfunction [D]. Shantou: Shantou University; 2004.
- [28] YANG K, LI X, ZHOU B, et al. Sodium hydroxide-induced esophageal stricture *via* an endoscopic injection needle: a novel rabbit model of corrosive injury [J]. *J Interv Med*, 2018, 1(1):

- 5–8.
- [25] RAO W, LIU J, ZHOU Y X, et al. Anti-tumor effect of sodium-induced thermochemical ablation therapy [J]. Int J Hyperthermia, 2008, 24(8): 675–681.
 - [26] ZHONG H B, WANG T J, LIAN G L, et al. Development of a rat model of sick sinus syndrome using pinpoint press permeation [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 7487324.
 - [27] CHEN C, ZHANG H, HOU S, et al. Shenxian-Shengmai oral liquid evoke autophagy of fibroblast to attenuate sinoatrial node fibrosis in sick sinus syndrome mice via the AKT/mTOR pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 5219277.
 - [28] VERMOT A, PETIT-HÄRTLEIN I, SMITH S M E, et al. NADPH oxidases (NOX): an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology [J]. Antioxidants, 2021, 10(6): 890.
 - [29] MURTADA S I, KAWAMURA Y, WEISS D, et al. Differential biomechanical responses of elastic and muscular arteries to angiotensin II-induced hypertension [J]. J Biomech, 2021, 119: 110297.
 - [30] KONDO H, KIRA S, ONIKI T, et al. Interleukin-10 treatment attenuates sinus node dysfunction caused by streptozotocin-induced hyperglycaemia in mice [J]. Cardiovasc Res, 2019, 115(1): 57–70.
 - [31] 姚辉. 参仙升脉口服液激活 Nrf2/HO-1 通路抑制内质网应激改善 SSS 小鼠窦房结纤维化 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2020.
 - YAO H. Shenxian Shengmai oral liquid activates Nrf2/HO-1 pathway, inhibits endoplasmic reticulum stress and improves sinoatrial node fibrosis in SSS mice [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2020.
 - [32] CHANG X, LIU J, WANG Y, et al. Mitochondrial disorder and treatment of ischemic cardiomyopathy: Potential and advantages of Chinese herbal medicine [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 159: 114171.
 - [33] ZHANG H, CHEN C, LIU Y, et al. NRF-2/HO-1 pathway-mediated SHOX2 activation is a key switch for heart rate acceleration by Yixin-Fumai Granules [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 8488269.
 - [34] WANG Y, WU Q, LIU J, et al. The effect of the Tongyang Huoxue recipe (TYHX) on the I_{to}/I_{Kur} in ischemia/reperfusion sinoatrial node cells [J]. Cardiovasc Ther, 2022, 2022: 4114817.
 - [35] LIU R, LI J, LIU Y, et al. The effect of astragaloside on pacemaker current and the cytoskeleton in rabbit sinoatrial node cells under the ischemia and reperfusion condition [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 551.
 - [36] 蒋礼祥. 大鼠病态窦房结综合征的模型对比研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学; 2021.
 - JIANG L X. Comparative study on models of sick sinus syndrome in rats [D]. Zunyi: Zunyi Medical University; 2021.
 - [37] CHU W, WANG P, MA Z, et al. Ultrasonic treatment of *Dendrobium officinale* polysaccharide enhances antioxidant and anti-inflammatory activity in a mouse D-galactose-induced aging model [J]. Food Sci Nutr, 2022, 10(8): 2620–2630.
 - [38] TIWARI R, KUMAR R, MALIK S, et al. Analysis of heart rate variability and implication of different factors on heart rate variability [J]. Curr Cardiol Rev, 2021, 17(5): e160721189770.
 - [39] SHAFFER F, GINSBERG J P. An overview of heart rate variability metrics and norms [J]. Front Public Health, 2017, 5: 258.
 - [40] MOGHTADAEI M, DOREY T W, ROSE R A. Evaluation of non-linear heart rate variability using multi-scale multi-fractal detrended fluctuation analysis in mice: Roles of the autonomic nervous system and sinoatrial node [J]. Front Physiol, 2022, 13: 970393.
 - [41] XU X, HE S, LIU Q, et al. Cardioneuroablation for successful treatment of symptomatic bradycardia in a 12-year-old child after a 6-month follow-up [J]. Front Cardiovasc Med, 2023, 10: 1290482.
 - [42] QIN M, CHEN X W, LIU X. Reply: atrial ganglionated plexus modification: a novel approach to treat symptomatic sinus bradycardia [J]. JACC Clin Electrophysiol, 2018, 4(2): 288–289.
 - [43] CHEN W, LIU Z, XIAO P, et al. Extracardiac vagal stimulation-assisted cardioneuroablation: dynamically evaluating the impact of sequential ganglionated plexus ablation on vagal control of SAN and AVN in patients with sinoatrial node dysfunction [J]. J Cardiovasc Dev Dis, 2022, 9(6): 188.
 - [44] 赵允梓. AKAP10 与汉族人群病窦综合征的关联研究及其新的突变型致病窦的机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2014.
 - ZHAO Y Z. Association study of AKAP10 with sinus node dysfunction in Han Chinese population and the mechanism of novel mutations of AKAP10 associated with sinus node dysfunction [D]. Beijing: Peking Union Medical College; 2014.
 - [45] 马芳芳, 李敏, 郑明奇, 等. SCN5A 基因突变与心律失常的研究进展 [J]. 中华全科医学, 2019, 17(11): 1902–1906, 1978.
 - MA F F, LI M, ZHENG M Q, et al. Advances in research on SCN5A gene mutation and arrhythmia [J]. Chin J Gen Pract, 2019, 17(11): 1902–1906, 1978.
 - [46] WILDE A A M, AMIN A S. Clinical spectrum of SCN5A mutations: long QT syndrome, brugada syndrome, and cardiomyopathy [J]. JACC Clin Electrophysiol, 2018, 4(5): 569–579.
 - [47] ALKORASHY M, AL-GHAMDI B, TULBAH S, et al. A novel homozygous SCN5A variant detected in sick sinus syndrome [J]. Pacing Clin Electrophysiol, 2021, 44(2): 380–384.
 - [48] VERKERK A O, REMME C A. Zebrafish: a novel research tool for cardiac (patho) electrophysiology and ion channel disorders [J]. Front Physiol, 2012, 3: 255.
 - [49] FENSKE S, KRAUSE S C, HASSAN S I, et al. Sick sinus

- syndrome in HCN1-deficient mice [J]. *Circulation*, 2013, 128 (24): 2585–2594.
- [50] ZHENG M, LI R G, SONG J, et al. Hippo-Yap signaling maintains sinoatrial node homeostasis [J]. *Circulation*, 2022, 146(22): 1694–1711.
- [51] CHO H C, MARBÁN E. Biological therapies for cardiac arrhythmias: can genes and cells replace drugs and devices? [J]. *Circ Res*, 2010, 106(4): 674–685.
- [52] ZHANG J, WEI F, DING L, et al. MicroRNA-1976 regulates degeneration of the sinoatrial node by targeting $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ ion channels [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 134: 74–85.
- [53] SHI L, SHEN J, JIN X, et al. Deficiency of CXXC finger protein 1 leads to small changes in heart rate but moderate epigenetic alterations and significant protein downregulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 4 (HCN4) ion channels in mice [J]. *Heart Rhythm*, 2021, 18(10): 1780–1789.
- [54] 毕路甲. 不同病态窦房结综合征造模方法对起搏相关离子通道功能的影响及强心复脉颗粒的治疗效果分析 [D]. 新乡: 新乡医学院; 2022.
- BI L J. Effect of different modeling methods on pacing-related ion channel function and therapeutic effect of Qiangxin-Fumai granules in sick sinus syndrome [D]. Xinxiang: Xinxiang Medical College; 2022.
- [55] 程佳新. 基于网络药理学研究益心复脉颗粒治疗病态窦房结综合征的作用机制 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2022.
- CHENG J X. Study on the mechanism of Yixin-Fumai granules in the treatment of sick sinus syndrome based on network pharmacology [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2022.

[收稿日期] 2024-03-04

《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!

刘一帆, 黄楠, 刘煜萱, 等. 侏儒症动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1207-1214.

LIU Y F, HUANG N, LIU Y X, et al. Progress in the study of animal models of dwarfism [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1207-1214.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.012

侏儒症动物模型研究进展

刘一帆^{1,2}, 黄楠¹, 刘煜萱², 甘玲², 陈虹宇^{1*}

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 西南大学动物医学院, 重庆 402460)

【摘要】 侏儒症 (Dwarfism) 是一种全球范围内罕见的生长发育障碍性疾病, 通常由遗传或疾病导致, 最突出表型是身材矮小。动物模型是研究其发病机制、预防、治疗方案及鉴定潜在治疗靶点及生物标志物的重要工具。随着基因工程技术的发展, 基因编辑动物模型越来越多地被用于侏儒症的相关研究。本文将从理论依据、模型特点以及研究应用等方面对现有侏儒症动物模型进行总结与讨论, 供科研和临床人员参考使用, 以便更好地开展对侏儒症的发病机制和防治方法的研究。

【关键词】 侏儒症; 基因编辑; 动物模型; 生长激素缺乏; 软骨发育不全

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1207-08

Progress in the study of animal models of dwarfism

LIU Yifan^{1,2}, HUANG Nan¹, LIU Yuxuan², GAN Ling², CHEN Hongyu^{1*}

(1. Chongqing Academy of Animal Husbandry, Chongqing 402460, China;

2. School of Animal Medicine, Southwest University, Chongqing 402460, China)

Corresponding author: CHEN Hongyu. E-mail: 1308864840@qq.com

【Abstract】 Dwarfism is a globally rare growth disorder, usually caused by genetics or disease, with the most prominent phenotype being short stature. Animal models are important tools for studying its pathogenesis, prevention, and treatment options, and identifying potential therapeutic targets and biomarkers. The development of genetic engineering technology has greatly promoted the application of gene-edited animal models in the study of dwarfism. In this review, we summarize and discuss the existing animal models of dwarfism in terms of their theoretical basis, model characteristics, and research applications. This offers a reference for researchers and clinicians aiming to better conduct research on the pathogenesis and prevention of dwarfism.

【Keywords】 dwarfism; gene editing; animal model; growth hormone deficiency; chondrodysplasia

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

侏儒症作为一种生长发育代谢疾病, 给患者的生活带来了极大困难, 其发病机制复杂多样。病因主要有家族性矮小、内分泌系统遗传病 (如生长激素缺乏症、先天性肾上腺皮质增生症等)^[1]、遗传代谢性疾病^[2]、骨骼系统疾病 (如成骨不全, 软骨发育不良等)、性染色体病 (如 Turner 综合征)^[3]、慢性疾

病以及社会心理因素等, 其中生长激素缺乏和软骨发育不全是侏儒症的常见类型。VERGARA 等^[4]对缺乏生长激素 (growth hormone, GH) 的 Snell 侏儒小鼠注射 GH 和甲状腺素, 经治疗后小鼠体重增加了约 45%, 证明激素治疗对 Snell 小鼠体型的改善作用。MATSUSHITA 等^[5]给软骨发育不全

【基金项目】 国家重点研发计划 (2021YFA0805901-2), 重庆市畜牧科学院财政专项资金 (22518C)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0805901-2), Financial Special Funds for Chongqing Academy of Animal Husbandry (22518C).

【作者简介】 刘一帆, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物神经与内分泌调控。Email: 2196059593@qq.com

【通信作者】 陈虹宇, 女, 硕士, 研究方向: 病原与宿主相互作用。Email: 1308864840@qq.com

(achondroplasia, ACH) 转基因 $Fgfr3^{Ach/+}$ 小鼠模型服用美克洛嗪,发现美克洛嗪可抑制软骨细胞中成纤维细胞生长因子受体 3 (fibroblast growth factor receptor 3, FGFR3) 信号的升高,促进小鼠骨骼生长,证明美克洛嗪对改善 ACH 身材矮小的临床可行性。动物模型的建立对阐明侏儒症的发病机制、研究侏儒症的治疗方案等尤为重要。

侏儒症模型的种类繁多,功能各有不同。啮齿类动物由于其经济方便等优点在动物模型中所占比例最大,应用最为广泛。目前国内外关于侏儒动物模型的研究在动物的选择上多为小鼠,随着生物技术的发展,猪这种大动物也逐渐被用作建立侏儒症模型,弥补了小鼠与人的身体系统和功能差异性大的一些缺陷。本文将对侏儒症常见动物模型进行归纳总结,以期对未来研究提供参考。

1 侏儒症动物模型文献分析

以“dwarfism”+“animal model”为关键词,在 PubMed 检索到 458 篇文献,包含小鼠、大鼠、猪、兔、鸡、斑马鱼模型等,其中最多的是小鼠模型。这些模型大多利用基因编辑的方法建立。随着基因工程技术的发展,通过基因手段能够越来越多地在动物上模拟人类疾病。近十年的文献(2013 ~ 2023 年,共 208 篇)发展趋势见图 1。可以看出,随着对侏儒症模型研究的深入,初期呈上升趋势,但在 2020 年后有所下降,可能是由于人们将更多的精力投入到了对新型冠状病毒的研究。

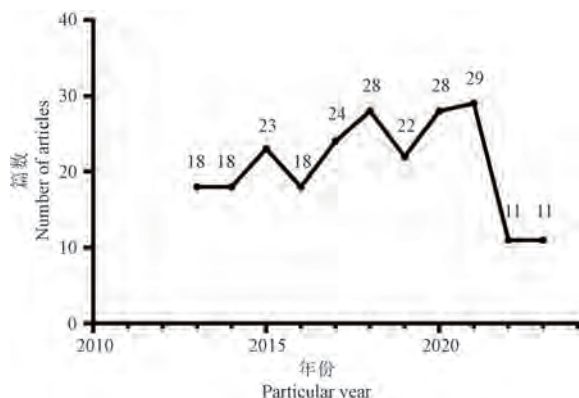


图 1 PubMed 中侏儒症动物模型文献发展趋势

Figure 1 Development trend of dwarfism animal model literature in PubMed

2 常见侏儒症动物模型

2.1 生长激素缺乏症模型

生长激素缺乏症 (growth hormone deficiency,

GHD) 是一种罕见的疾病,其特征是垂体前叶 GH 分泌不足^[6]。此外, GH 分化的关键基因(如 *Prop-1* 和 *Pou1f1*) 突变都会导致 GHD 的发生,并通常伴有垂体激素缺乏症。GH 抗性(即由于 GH 受体 GHR 突变)和胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1) 缺乏可能导致 GHD 样表型,因为也可能导致幼期生长不良和极端矮小^[7]。

2.1.1 Snell 侏儒小鼠模型

Snell 侏儒小鼠于 20 世纪 20 年代被 SNELL^[8] 发现,是第一个被发现的侏儒品系。Snell 侏儒小鼠 616 号染色体上的垂体特异性正转录因子 1 (*Pit-1*, 现称 *Pou1f1*) 基因的隐性常染色体发生点突变 (W261C),导致垂体前叶发育不良,引起出生后生长迟缓、衰老延缓、寿命延长^[9]。Snell 小鼠被广泛用于研究延缓衰老^[10]。

2.1.2 Ames 侏儒小鼠

Ames 侏儒小鼠于 1961 年被 SCHAIBLE 等^[11] 发现。表型是基于 *Prop1* 基因的纯合单基因突变,该突变显著延长了寿命。*Prop-1* 基因参与 *Pit-1* 的激活,并参与垂体前叶中生长激素细胞、促甲状腺激素细胞和催乳激素细胞的表型特化^[10]。Ames 侏儒小鼠在出生时具有正常体型;然而,成年后的体重仅为正常小鼠体重的三分之一^[12]。与正常小鼠相比体温显著降低,这一特征是多种激素缺乏导致产热减少的结果^[13]。自被发现以来,这些小鼠也同 Snell 小鼠一样被广泛应用于延缓衰老的研究。

2.1.3 GHR 敲除动物

由 GHR 疾病引起的个体侏儒症在人类、小型猪^[14-16]、牛和绵羊^[17] 中为 Laron 综合征和特发性身材矮小,在鸡中为性连锁侏儒症^[18-19]。比较常见的模型是 GHR 敲除 (knock out, KO) 小鼠和 GHR KO 猪。

GHR KO 小鼠也被称为 Laron 侏儒小鼠,由 ZHOU 等^[20] 在 1997 年开发作为人类 Laron 综合征的小鼠模型。Laron 综合征是一种具有 GH 抗性的遗传性疾病,其特征是 IGF1 水平降低, GHR 突变导致生长激素 GH 水平升高^[21]。其表型为严重的出生后生长衰竭、骨龄和青春期延迟、面部畸形、躯干肥胖和低血糖^[22]。GHR KO 小鼠的编码 GHR 的基因遭到靶向破坏,缺乏功能性 GHR 并显示生长激素抗性^[23]。GHR KO 小鼠为研究人类 Laron 综合征提供了有价值的模型,也用于研究 GH/IGF-1 轴的功能^[24-25]。

小鼠模型的不足之处是体型小、寿命短以及与人类相比生理差异较大,小鼠模型的研究结果难以推断到 Laron 综合征患者的临床情况,而转基因猪模型体型大,后代数量多,与人类生物学相似性高,寿命相对较长,有助于弥补啮齿动物模型的缺陷^[26]。GHR KO 猪生长速度缓慢,体型较小^[27]。

迄今为止,生长激素对免疫功能的影响主要在小鼠模型中研究,但小鼠和人类的免疫系统在许多特征上有所不同^[28]。其中一个差异是白细胞亚群的群体规模^[29]。由于 GHR 在白细胞类型中表达存在异质性,且白细胞亚群在物种之间也存在差异,因此 GHR 的破坏可能以物种特异性的方式影响免疫功能。虽然人类白细胞主要由中性粒细胞组成,但小鼠白细胞中淋巴细胞占大多数(75% ~ 90%)。相反,猪的白细胞组成更接近人类白细胞组成,淋巴细胞占 27% ~ 60%^[30],因此 GHR KO 猪可作为免疫学研究的良好模型^[21]。GHR KO 猪脂肪组织的脂肪细胞大小和基因表达谱与 Laron 综合征患者也有一些相似之处^[31]。

2.1.4 GHRH KO 小鼠

GHRH 是一种下丘脑神经肽,在 GH 分泌的调节中起关键作用^[32]。为了确定缺乏 GHRH 的后果,设计了 GHRH KO 小鼠模型^[33]。GHRH KO 小鼠出生时表现正常,未显示胚胎致死性。然而,从 3 周龄开始,GHRH KO 小鼠表现出显著的生长迟缓,这与垂体 GH mRNA 和蛋白质含量降低相关,血清 IGF 1 降低,肝 IGF 1 mRNA 降低。此外,GHRH KO 小鼠表现出垂体发育不全以及体重和身长减小^[33]。GHRH KO 小鼠还显示出免疫系统功能的改变,与对照小鼠相比不容易发生自身免疫性脑脊髓炎^[34]。GHRH KO 小鼠也可作为免疫疾病模型。

2.2 软骨发育不全小鼠模型

ACH 是侏儒症常见的形式,是一种常染色体显性遗传病,发病率为 1/16 000 ~ 1/20 000^[35]。之前对 ACH 模型的研究表明,软骨发育不全为其最突出特征,包括圆形头骨和肢体缩短^[9]。ACH 模型常被用来评估新的和有效的治疗软骨发育不全的方法。

2.2.1 *Fgfr3* 小鼠模型

Fgfr3 中的常染色体显性突变引起 ACH 和相关的软骨发育不良综合征,包括软骨发育不全、重度软骨发育不全伴发育延迟、黑质增生和致死性发育不良等。*Fgfr3* 在软骨细胞和成熟成骨细胞中表达,

其功能是调节骨生长。另外 *Fgfr1*、*Fgfr2*、*Twist1* 以及 *Spred-2* 等基因的突变也可导致 ACH^[36]。已经构建多种小鼠模型来研究 *Fgfr3* 相关的软骨发育不良^[37-38],如转基因小鼠 *Fgfr3*^{Ach/+} 模型,其中 II 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(collagen type II alpha 1, Col2 $\alpha 1$)启动子驱动软骨细胞中 ACH 突变的表达,Col2 $\alpha 1$ 是一种存在于软骨和眼睛玻璃体液中的纤维状胶原蛋白。随后产生了 *Fgfr3*^{380/+}、*Fgfr3*^{375/+}、*Fgfr3*^{367/+}、*Fgfr3*^{644/}和 *Fgfr3*^{644/+} 等基因敲入小鼠模型^[39]。*Fgfr3* 小鼠模型的产生有助于破译 *Fgfr3* 功能获得性突变对骨发育的影响。

2.2.2 *Rheb* KO 小鼠

哺乳动物雷帕霉素靶标蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,mTOR 信号通路在软骨代谢疾病中的作用已被大量证实,能调控软骨细胞的增殖和凋亡,对软骨肉瘤、骨关节炎、软骨发育不良等疾病有重要影响^[40]。mTOR 信号失活与多种疾病密切相关,包括癌症、代谢性疾病和发育障碍^[41]。目前发现 mTOR 通路有两个亚型:mTORC1 和 mTORC2。小 GTP 蛋白 RHEB 是 mTORC1 的重要组件^[42]。敲除小鼠软骨细胞上 *Rheb* 基因,小鼠会表现出短肢体型侏儒症,主要表型有软骨发育不全并伴有骨质疏松^[36]。*Rheb* KO 小鼠可作为研究软骨发育调控机制的动物模型。

2.2.3 *Nell-1* 小鼠

神经源性表皮生长因子样分子-1(neural epidermal growth factor-like 1, *Nell-1*)是一种骨诱导蛋白,已被证明可以调节骨骼成骨^[43]。*Nell-1* 的突变与软骨发育不全、早发性家族性骨关节炎、Langer-Saldino 软骨发育不全、Kniest 发育不良、I 型 Stickler 综合征和 Strudwick 型脊椎骨骺发育不良有关^[44]。Qi 等^[45]通过研究 *Nell-1* 在表达 Col2 $\alpha 1$ 的细胞系中的特异性失活来确定 *Nell-1* 在软骨内骨化中的作用。*Nell-1* 纯合突变导致新生儿死亡,因此产生了一种遗传修饰的 *Nell-1* 突变体模型,*Nell-1*^{Col2 $\alpha 1$} 小鼠模型。该模型在产后 1 个月和 3 个月,*Nell-1* 失活导致侏儒症和过早发育不良^[45]。*Nell-1* 小鼠也可为研究软骨发育的调控机制提供参考。

2.2.4 *Shox2* KO 小鼠

位于人类拟常染色体区的矮小同源盒基因(short stature homeobox gene, *Shox*)在肢体发育期间主要集中在肢体的中肢部分,在软骨形成第一步期

间的间充质细胞以及在整个软骨内骨化过程中的生长板发育中的软骨细胞中表达^[46]。*Shox* 基因还调控其他软骨发育相关基因的表达,其杂合突变会导致 Leri-Weill 软骨发育不良,纯合突变导致严重的侏儒症,也称为 Langer 间膜发育不良^[47]。SHOX2 是 SHOX 的人同源蛋白,具有与 SHOX 83% 的同源性和相同的同源结构域。鼠类在生物进化过程中丢失了 *Shox* 基因,但保留了 *Shox2* 基因。*Shox2* KO 小鼠在软骨细胞分化进程中肢骨形成严重迟缓,表现与 *Shox* 基因缺陷的临床表现相似^[48],所以 *Shox2* KO 小鼠可作为研究 *Shox* 基因功能的良好模型。

3 其他基因编辑动物模型

3.1 HMGA 缺乏动物

高迁移率族 A 蛋白 (high mobility group protein, HMGA) 是小的非组蛋白蛋白,与基因调控和细胞生物学过程的许多方面有关,包括 HMGA1 和 HMGA2,其可以结合 DNA 并改变染色质状态,通过诱导 DNA 的构象变化来调节转录,参与基因表达的调节^[49]。一般来说,在胚胎发生期间大量表达,但在成体分化组织中下调^[50]。*Hmga1/Hmga2*-KO 小鼠表现出“超级侏儒”表型^[51]。小鼠中 *Hmga2* 基因敲除导致侏儒表型,包括出生时体重减轻、头部缩短,成年小鼠体重约为正常体重的 40%^[52]。*Hmga2* KO 猪的体型相较正常体型减小 35% ~ 85%^[53]。CARNEIRO 等^[54]发现侏儒兔的 *Hmga2* 位点有 12.1 kb 缺失。*Hmga* 基因编辑动物可为能更好地阐明 HMGA 的功能提供参考。

3.2 Syndecan-4 KO 小鼠

多配体蛋白聚糖-4 (syndecan-4, SDC4) 已被报道是肌肉分化所必需,在成肌细胞和早期胚胎肌管周围高度表达,在发育和再生中起作用^[55]。Syndecan-4 KO 小鼠表现出侏儒表型,体重减轻,肌肉重量减少,肌肉受损后无法再生,肌肉生长缓慢,肌纤维横截面积减小,肌源性调节转录因子的表达减少^[56]。Syndecan-4 KO 小鼠可作为研究肌肉分化调控机制的模型。

3.3 SMC5^{K371} del 小鼠和 SMC5 KO 斑马鱼

染色体结构维持家族 (structural maintenance of chromosome, SMC) 中的 SMC5 突变已被证明可导致原始侏儒症和胰岛素抵抗型糖尿病。SMC5 KO 斑马鱼体型显著缩小。基因敲除小鼠具有胚胎致死性,SMC5 基因第 371 位氨基酸缺失导致侏儒症,

SMC5^{K371} del 小鼠显示较差的存活率、身材矮小和葡萄糖耐受不良^[57]。SMC5 小鼠模型有望成为胰岛素抵抗型糖尿病发病机制的研究模型。

3.4 *Spre*d^{-/-} 小鼠

具有 EVH1 结构域的杂蛋白相关蛋白 (sprouty related EVH1 domain, *Spre*d) 基因负向调节从酪氨酸激酶到 Ras-MAPK 通路的信号传导,鼠中 *Spre*d 基因缺失会导致行为问题、侏儒和多种其他表型,包括白血病风险增加^[58]。*Spre*d^{-/-} 小鼠有助于了解 SPRED 蛋白的调节功能,用于治疗由 Ras 信号过度活跃传导引起的 RAS 信号通路相关综合征和癌症。

3.5 *BubR1*^{H/L1002P} 小鼠

有丝分裂检查点丝氨酸/苏氨酸激酶 B (mitotic checkpoint serine/threonine kinase B, *BubR1*) 参与染色体分离,编码参与纺锤体检查点功能的激酶^[59]。*BubR1*^{H/L1002P} 小鼠表现出镶嵌型异倍体综合征特征,包括癌症易感性和各种早衰表型,例如寿命短、侏儒、脂肪营养不良、肌肉减少症和心脏应激耐受性低^[60]。*BubR1* 小鼠可为体内 *BubR1* 的变化如何驱动复杂的病理提供重要的机制见解。

3.6 *Runx2* KO 小鼠

矮小相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, *Runx2*) 是成骨细胞特异性转录因子,其 DNA 结构域与核心结合因子 β 形成异源二聚体,特异识别并结合其共有序列,可增加骨钙蛋白、骨唾液蛋白、I 型胶原等成骨基因的表达,是干细胞向成骨细胞定向分化及不成熟成骨细胞成骨分化过程中关键的转录因子^[61]。*Runx2* KO 小鼠表现侏儒表型^[62],可为研究 *Runx2* 在不同发育阶段的功能提供参考。

4 总结与展望

本文对侏儒症相关的一些动物模型做了概括总结,见表 1,侏儒症动物的侏儒表型常伴随生长激素缺乏症、成骨障碍疾病、肌肉发育障碍疾病等产生。研究者可根据研究方向选择不同的动物模型,常见的侏儒症模型动物例如鼠和猪各有优势。若探究生长激素缺乏症动物体内某因子的调控机制可以选择 Ames 小鼠、Snell 小鼠等,要进行临床研究则可选择 GHR KO 猪。使用基因工程动物,其中特定基因表达以及相关的代谢途径改变,可以研究致病基因在侏儒症发病过程中的作用机制。总之,建立有效且稳定的侏儒症动物模型可节省成本、缩短

表 1 侏儒症动物模型总结

Table 1 Summary of animal models of dwarfism

动物名称 Animals	突变基因 Mutant genes	基因功能 Gene function	表型 Phenotypes
Snell 侏儒小鼠 Snell dwarf mice	Pit-1 (现称 Pou1f1)	编码垂体特异性转录因子 Encodes a pituitary-specific transcription factor	侏儒; 寿命延长; 衰老延缓; 发病率低; 体温低; 生育能力降低 ^[8-10]
	Pit-1 (now known as Pou1f1)		Dwarf; increased life span; delayed aging; low morbidity; low body temperature; reduced fertility ^[8-10]
Ames 侏儒小鼠 Ames dwarf mice	Prop-1	编码 GHR Encodes the GHR	侏儒; 寿命延长; 延缓衰老; 低发病率; 低体温; 生育力下降 ^[11-13]
			Pygmies; increased longevity; delayed aging; low morbidity; low body temperature; decreased fertility ^[11-13]
GHR 敲除小鼠 GHR KO mice	GHR	编码 GHR Encodes the GHR	出生后生长迟缓; 寿命延长; 生育能力降低 ^[20-25]
			Postnatal growth retardation; increased life expectancy; reduced fertility ^[20-25]
GHR 敲除猪 GHR KO pig	GHR	调节 GH 分泌模式 Regulates GH secretion pattern	生长速度缓慢; 体型较小 ^[21,26-31]
			Slow growth rate ;small size ^[21,26-31]
GHRH 敲除小鼠 GHRH KO mice	GHRH	调节 GH 分泌模式 Regulates GH secretion pattern	侏儒; 生长迟缓 ^[32-34]
			Dwarf; growth retardation ^[32-34]
Fgfr3 小鼠模型 Fgfr3 mouse model	Fgfr3	调节骨生长 Regulates bone growth	软骨发育不全 ^[36-39]
			Chondrodysplasia ^[36-39]
Rheb 敲除小鼠 Rheb KO mice	Rheb	通过调控 mTORC1 从而参与调控细胞的增殖、分化、凋亡 Involved in the regulation of cell proliferation, differentiation, and apoptosis through the regulation of mTORC1	软骨发育不全并伴有骨质疏松 ^[36,40-42]
			Chondrodysplasia with osteoporosis ^[36,40-42]
Nell-1 ^{Col 2α1} 小鼠 Nell-1 ^{Col 2α1} mice	Nell-1	调节骨骼成骨 Regulates bone formation	侏儒; 发育不良 ^[43-45]
			Dwarf; stunted ^[43-45]
Shox2 敲除小鼠 Shox2 KO mice	Shox2	调节软骨形成 Regulates cartilage formation	侏儒; 软骨发育不良 ^[46-48]
			Dwarf; chondrodysplasia ^[46-48]
Hmga1/Hmga2 双敲除小鼠 Hmga1/Hmga2 double knock-out mice	Hmga1/Hmga2	Hmga1: 参与胚胎发育、肿瘤转化、分化、细胞凋亡、细胞代谢等基本的细胞过程; Hmga2: 致癌因子, 通过 PI3K/AKT/mTOR、NF-κB 等途径激活信号传导, 促进上皮向间充质转化 Hmga1: involved in basic cellular processes such as embryonic development, tumor transformation, differentiation, apoptosis, and cell metabolism; Hmga2: carcinogen, activates signaling and promotes epithelial-to-mesenchymal transition through pathways such as PI3K/AKT/mTOR, NF-κB, etc.	超级侏儒 ^[51]
			Superpygmy ^[51]
Hmga2 敲除小鼠 Hmga2 KO mice	Hmga2	Hmga2: 致癌因子, 通过 PI3K/AKT/mTOR、NF-κB 等途径激活信号传导, 促进上皮向间充质转化 Hmga1: involved in basic cellular processes such as embryonic development, tumor transformation, differentiation, apoptosis, and cell metabolism; Hmga2: carcinogen, activates signaling and promotes epithelial-to-mesenchymal transition through pathways such as PI3K/AKT/mTOR, NF-κB, etc.	体重减轻; 头部缩短 ^[52]
			Weight loss; head shortening ^[52]
Hmga2 敲除猪 Hmga2 KO pig	Hmga2	Hmga2: 致癌因子, 通过 PI3K/AKT/mTOR、NF-κB 等途径激活信号传导, 促进上皮向间充质转化 Hmga1: involved in basic cellular processes such as embryonic development, tumor transformation, differentiation, apoptosis, and cell metabolism; Hmga2: carcinogen, activates signaling and promotes epithelial-to-mesenchymal transition through pathways such as PI3K/AKT/mTOR, NF-κB, etc.	体型减小 ^[53]
			Attenuate ^[53]
Syndecan-4 敲除小鼠 Syndecan-4 KO mice	Syndecan-4	参与肌肉分化 Involved in muscle differentiation	侏儒; 体重减轻; 肌肉重量减少; 肌纤维横截面积较小; 肌源性调节转录因子的表达减少 ^[55-56]
			Dwarf; weight loss; reduced muscle weight; smaller muscle fiber cross-sectional area; and reduced expression of myogenic regulatory transcription factors ^[55-56]
SMC5 ^{K371 del} 小鼠 SMC5 ^{K371 del} mice	SMC5	在染色体结构和动力学中起重要作用 Plays an important role in chromosome structure and dynamics	存活率差; 身材矮小和葡萄糖耐受不良 ^[57]
			Poor survival; short stature and glucose intolerance ^[57]
Spred 敲除小鼠 Spred KO mice	Spred	调节从酪氨酸激酶到 Ras-MAPK 通路的信号传导 Regulation of signaling from tyrosine kinases to the Ras-MAPK pathway	行为问题; 侏儒 ^[58]
			Behavioral problems; dwarfism ^[58]

续表 1

动物名称 Animals	突变基因 Mutant genes	基因功能 Gene function	表型 Phenotypes
BubR1 ^{H/L1002P} 小鼠 BubR1 ^{H/L1002P} mice	BubR1	参与染色体分离,有丝分裂的检查点基因 Involved in chromosome segregation, mitotic checkpoint genes	寿命短;侏儒;脂肪营养不良;肌肉减少症和心脏应激耐受性低 ^[59-60] Short life span; dwarfism; lipodystrophy; sarcopenia and low cardiac stress tolerance ^[59-60]
Runx2 敲除小鼠 Runx2 KO mice	Runx2	干细胞向成骨细胞定向分化及不成熟成骨细胞成骨分化过程中关键的转录因子 Critical transcription factors in the directed differentiation of stem cells to osteoblasts and osteogenic differentiation of immature osteoblasts	侏儒 ^[61-62] Dwarfism ^[61-62]

周期,为日后开展相关基础研究提供更多可靠依据。

基因工程动物模型目前主要用于疾病发病机制研究,检测新的治疗方法并进行药效评价、药物筛选等。相对于传统的动物模型,基因工程动物能更精确地研究相关基因在疾病发生发展中的作用,越来越多的基因编辑动物被应用到人类疾病防治研究中。在动物模型的基础上,结合临床样本进行分析,有望进一步揭示侏儒症的发病机制。期待未来有更多更合适的侏儒症动物模型被建立,从而助力于人类侏儒症研究,实现全民健康的发展需要。

参 考 文 献(References)

[1] LIN S, LI C, LI C, et al. Growth hormone receptor mutations related to individual dwarfism [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5): 1433.

[2] SELLIER P. Genetically caused retarded growth in animals [J]. Domest Anim Endocrinol, 2000, 19(2): 105-119.

[3] ZINN A R, PAGE D C, FISHER E M. Turner syndrome; the case of the missing sex chromosome [J]. Trends Genet, 1993, 9(3): 90-93.

[4] VERGARA M, SMITH-WHEELOCK M, HARPER J M, et al. Hormone-treated snell dwarf mice regain fertility but remain long lived and disease resistant [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004, 59(12): 1244-1250.

[5] MATSUSHITA M, HASEGAWA S, KITO H, et al. Meclozine promotes longitudinal skeletal growth in transgenic mice with achondroplasia carrying a gain-of-function mutation in the *FGFR3* gene [J]. Endocrinology, 2015, 156(2): 548-554.

[6] HO K K Y, 2007 GH Deficiency Consensus Workshop Participants. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with GH deficiency II: a statement of the GH research society in association with the European society for pediatric endocrinology, lawson wilkins society, european society of endocrinology, japan endocrine society, and endocrine society of australia [J]. Eur J Endocrinol, 2007, 157(6): 695-700.

[7] GAHETE M D, LUQUE R M, CASTAÑO J P. Models of GH deficiency in animal studies [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2016, 30(6): 693-704.

[8] SNELL G D. Dwarf, a new Mendelian recessive character of the

house mouse [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1929, 15(9): 733-734.

[9] DIMATTIA G E, RHODES S J, KRONES A, et al. The Pit-1 gene is regulated by distinct early and late pituitary-specific enhancers [J]. Dev Biol, 1997, 182(1): 180-190.

[10] ANDERSEN B, PEARSE R V 2nd, JENNE K, et al. The Ames dwarf gene is required for Pit-1 gene activation [J]. Dev Biol, 1995, 172(2): 495-503.

[11] SCHAIBLE R, GOWEN J W. A new dwarf mouse [J]. Genetics, 1961, 46: 896.

[12] BROWN-BORG H M, BORG K E, MELISKA C J, et al. Dwarf mice and the ageing process [J]. Nature, 1996, 384(6604): 33.

[13] HUNTER W S, CROSON W B, BARTKE A, et al. Low body temperature in long-lived Ames dwarf mice at rest and during stress [J]. Physiol Behav, 1999, 67(3): 433-437.

[14] ARMAN A, YÜKSEL B, COKER A, et al. Novel growth hormone receptor gene mutation in a patient with Laron syndrome [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2010, 23(4): 407-414.

[15] GENNERO I, EDOUARD T, RASHAD M, et al. Identification of a novel mutation in the human growth hormone receptor gene (*GHR*) in a patient with Laron syndrome [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2007, 20(7): 825-831.

[16] HUI H N, METHERELL L A, NG K L, et al. Novel growth hormone receptor mutation in a Chinese patient with Laron syndrome [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2005, 18(2): 209-213.

[17] BOEGHEIM I J M, LEEGWATER P A J, VAN LITH H A, et al. Current insights into the molecular genetic basis of dwarfism in livestock [J]. Vet J, 2017, 224: 64-75.

[18] LIN S, LI H, MU H, et al. Let-7b regulates the expression of the growth hormone receptor gene in deletion-type dwarf chickens [J]. BMC Genomics, 2012, 13: 306.

[19] LUO W, LIN S, LI G, et al. Integrative analyses of miRNA-mRNA interactions reveal let-7b, miR-128 and MAPK pathway involvement in muscle mass loss in sex-linked dwarf chickens [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(3): 276.

[20] ZHOU Y, XU B C, MAHESHWARI H G, et al. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron

- mouse) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(24): 13215–13220.
- [21] SCHILLOKS M C, GIESE I M, HINRICHS A, et al. Effects of GHR deficiency and juvenile hypoglycemia on immune cells of a porcine model for laron syndrome [J]. *Biomolecules*, 2023, 13 (4): 597.
- [22] WERNER H, SARFSTEIN R, NAGARAJ K, et al. Laron syndrome research paves the way for new insights in oncological investigation [J]. *Cells*, 2020, 9(11): 2446.
- [23] YOUNG J, BELL S, QIAN Y, et al. Mouse models of growth hormone insensitivity [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2021, 22 (1): 17–29.
- [24] LIU Y, MASTERNAK M M, SCHNEIDER A, et al. Dwarf mice as models for reproductive ageing research [J]. *Reprod Biomed Online*, 2022, 44(1): 5–13.
- [25] 袁人飞, 邓伟民, 韩丽萍, 等. 成年生长激素缺乏动物模型与骨代谢相关研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24 (2): 208–212.
- YUAN R F, DENG W M, HAN L P, et al. Research progress of adult animal models of growth hormone deficiency and bone metabolism [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2016, 24(2): 208–212.
- [26] CUI D, LI F, LI Q, et al. Generation of a miniature pig disease model for human Laron syndrome [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15603.
- [27] YU H, LONG W, ZHANG X, et al. Generation of GHR-modified pigs as Laron syndrome models via a dual-sgRNAs/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 41.
- [28] PABST R. The pig as a model for immunology research [J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 380(2): 287–304.
- [29] MESTAS J, HUGHES C C W. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology [J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 2731–2738.
- [30] KARALYAN Z, ZAKARYAN H, ARZUMANYAN H, et al. Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus [J]. *BMC Vet Res*, 2012, 8: 18.
- [31] AGUIAR-OLIVEIRA M H, BARTKE A. Growth hormone deficiency: health and longevity [J]. *Endocr Rev*, 2019, 40 (2): 575–601.
- [32] GAHETE M D, DURÁN-PRADO M, LUQUE R M, et al. Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes: lessons from comparative endocrinology [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1163: 137–153.
- [33] ALBA M, SALVATORI R. A mouse with targeted ablation of the growth hormone-releasing hormone gene: a new model of isolated growth hormone deficiency [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(9): 4134–4143.
- [34] SHOHREH R, PARDO C A, GUARALDI F, et al. GH, but not GHRH, plays a role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Endocrinology*, 2011, 152 (10): 3803–3810.
- [35] KIMURA T, BOSAKOVA M, NONAKA Y, et al. An RNA aptamer restores defective bone growth in FGFR3-related skeletal dysplasia in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13 (592): eaba4226.
- [36] 李胜发. 软骨细胞特异性敲除 Rheb 基因对小鼠软骨发育的初步研究 [D]. 广州: 南方医科大学; 2015.
- LI S F. Rheb regulation of mTOR signaling controls the transition of chondrocyte proliferation and promotes skeletal development [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2015.
- [37] LEE Y C, SONG I W, PAI Y J, et al. Knock-in human FGFR3 achondroplasia mutation as a mouse model for human skeletal dysplasia [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43220.
- [38] PANNIER S, COULOIGNER V, MESSADDEQ N, et al. Activating Fgfr3 Y367C mutation causes hearing loss and inner ear defect in a mouse model of chondrodysplasia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(2): 140–147.
- [39] LEGEAI-MALLET L, SAVARIRAYAN R. Novel therapeutic approaches for the treatment of achondroplasia [J]. *Bone*, 2020, 141: 115579.
- [40] LV S, WANG X, JIN S, et al. Quercetin mediates TSC2-RHEB-mTOR pathway to regulate chondrocytes autophagy in knee osteoarthritis [J]. *Gene*, 2022, 820: 146209.
- [41] MARTIN T D, CHEN X W, KAPLAN R E, et al. Ral and Rheb GTPase activating proteins integrate mTOR and GTPase signaling in aging, autophagy, and tumor cell invasion [J]. *Mol Cell*, 2014, 53(2): 209–220.
- [42] DENG L, CHEN L, ZHAO L, et al. Ubiquitination of Rheb governs growth factor-induced mTORC1 activation [J]. *Cell Res*, 2019, 29(2): 136–150.
- [43] LI C, ZHANG X, ZHENG Z, et al. Nell-1 is a key functional modulator in osteochondrogenesis and beyond [J]. *J Dent Res*, 2019, 98(13): 1458–1468.
- [44] TANG R, WANG Q, DU J, et al. Expression and localization of Nell-1 during murine molar development [J]. *J Mol Histol*, 2013, 44(2): 175–181.
- [45] QI H, KIM J K, HA P, et al. Inactivation of nell-1 in chondrocytes significantly impedes appendicular skeletogenesis [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(3): 533–546.
- [46] BLASCHKE R J, RAPPOLD G A. SHOX: growth, Léri-Weill and Turner syndromes [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2000, 11 (6): 227–230.
- [47] HAN Y, LEFEBVRE V. L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28 (16): 4999–5013.
- [48] AZA-CARMONA M, BARCA-TIERNO V, HISADO-OLIVA A, et al. NPPB and ACAN, two novel SHOX2 transcription targets implicated in skeletal development [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (1): e83104.
- [49] MANSOORI B, MOHAMMADI A, DITZEL H J, et al. HMG2 as a critical regulator in cancer development [J]. *Genes*, 2021, 12(2): 269.

- [50] VIGNALI R, MARRACCI S. *HMGA* genes and proteins in development and evolution [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(2): 654.
- [51] FEDERICO A, FORZATI F, ESPOSITO F, et al. Hmga1/Hmga2 double knock-out mice display a “superpygmy” phenotype [J]. Biol Open, 2014, 3(5): 372–378.
- [52] SU L, DENG Z, LENG F. The mammalian high mobility group protein AT-hook 2 (HMGA2): biochemical and biophysical properties, and its association with adipogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(10): 3710.
- [53] CHUNG J, ZHANG X, COLLINS B, et al. High mobility group A2 (HMGA2) deficiency in pigs leads to dwarfism, abnormal fetal resource allocation, and cryptorchidism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(21): 5420–5425.
- [54] CARNEIRO M, HU D, ARCHER J, et al. Dwarfism and altered craniofacial development in rabbits is caused by a 12.1 kb deletion at the HMGA2 locus [J]. Genetics, 2017, 205(2): 955–965.
- [55] SZTRETNYE M, SINGLÁR Z, GANBAT N, et al. Unravelling the effects of syndecan-4 knockdown on skeletal muscle functions [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(8): 6933.
- [56] RØNNING S B, CARLSON C R, ARONSEN J M, et al. Syndecan-4^{-/-} mice have smaller muscle fibers, increased Akt/mTOR/S6K1 and notch/HES-1 pathways, and alterations in extracellular matrix components [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 730.
- [57] ZHU W, SHI Y, ZHANG C, et al. In-frame deletion of SMC5 related with the phenotype of primordial dwarfism, chromosomal instability and insulin resistance [J]. Clin Transl Med, 2023, 13(1): e1007.
- [58] LORENZO C, MCCORMICK F. SPRED proteins and their roles in signal transduction, development, and malignancy [J]. Genes Dev, 2020, 34(21/22): 1410–1421.
- [59] KYURAGI R, MATSUMOTO T, HARADA Y, et al. BubR1 insufficiency inhibits neointimal hyperplasia through impaired vascular smooth muscle cell proliferation in mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(2): 341–347.
- [60] SIEBEN C J, JEGANATHAN K B, NELSON G G, et al. BubR1 allelic effects drive phenotypic heterogeneity in mosaic-variegated aneuploidy progeria syndrome [J]. J Clin Invest, 2020, 130(1): 171–188.
- [61] ABOU-JAOUDE A, COURTES M, BADIQUE L, et al. ShcA promotes chondrocyte hypertrophic commitment and osteoarthritis in mice through RunX2 nuclear translocation and YAP1 inactivation [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2022, 30(10): 1365–1375.
- [62] TAKARADA T, HINOI E, NAKAZATO R, et al. An analysis of skeletal development in osteoblast-specific and chondrocyte-specific runt-related transcription factor-2 (Runx2) knockout mice [J]. J Bone Miner Res, 2013, 28(10): 2064–2069.

[收稿日期] 2024-01-30

李娜,余桂芳,王娅鑫,等. 母婴分离动物模型及其影响学习记忆相关机制的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1215-1221.

LI N, SHE G F, WANG Y X, et al. Research progress in animal models of maternal separation and related mechanisms that affect learning and memory [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1215-1221.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.013

母婴分离动物模型及其影响学习记忆 相关机制的研究进展

李娜¹,余桂芳¹,王娅鑫¹,雷青¹,孙鸿燕^{1,2*}

(1. 西南医科大学护理学院,四川 泸州 646000;2. 西南医科大学附属医院护理部,四川 泸州 646000)

【摘要】 母婴分离(maternal separation, MS)是一种生命早期的社会剥夺,会损伤啮齿类动物(主要为大鼠或小鼠)成年后学习记忆能力。MS动物模型是目前研究学习记忆能力障碍表现及其机制的常用动物模型之一。本文对MS动物模型以及MS影响子代学习记忆的相关机制进行综述,旨在为后续进行MS子代学习记忆的相关研究提供依据。

【关键词】 母婴分离;学习记忆;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1215-07

Research progress in animal models of maternal separation and related mechanisms that affect learning and memory

LI Na¹, SHE Guifang¹, WANG Yaxin¹, LEI Qing¹, SUN Hongyan^{1,2*}

(1. School of Nursing, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Nursing Department of Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Corresponding author: SUN Hongyan. E-mail: shy2002@swmu.edu.cn

【Abstract】 Maternal separation is a kind of social deprivation in early life that has been shown to impede the learning and memory abilities of rodents (mainly rats or mice) in adulthood. Animal models of mother-infant separation are commonly used to study the manifestations and mechanisms of learning and memory impairment. In this paper, an animal model of maternal-infant separation and related mechanisms of maternal-infant separation that affect offspring's learning and memory are reviewed to provide a basis for subsequent research on maternal-infant separation.

【Keywords】 maternal separation; learning and memory; animal model

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

随着三胎政策的全面放开,高龄孕产妇比例相对增加,妊娠合并症的高危孕产妇比例上升,也造成了高危新生儿的数量上升,高危新生儿出生后多需立即转入新生儿重症监护病房(neonatal intensive care center, NICU)进行病情观察及治疗,极易发生

母婴分离(maternal separation, MS)^[1-2]。MS是指将断乳前或出生后1~21 d(postnatal day 1~21, PND 1~21)的年幼个体与母亲分开^[3],是生命早期较为常见的负性刺激之一。研究发现,MS会导致大脑结构的改变,影响神经发育,以致子代学习

【基金项目】 四川省科技厅重大科技专项项目(2020YFSY0032)。

Funded by Major Science and Technology Special Project of Sichuan Provincial Science and Technology Department(2020YFSY0032).

【作者简介】 李娜,女,在读硕士研究生,研究方向:临床护理学基础与伦理。Email: 1009207560@qq.com

【通信作者】 孙鸿燕,女,硕士,主任护师,教授,硕士生导师,研究方向:临床护理学基础与伦理。Email: shy2002@swmu.edu.cn

记忆能力下降^[4]。近年来,MS 影响子代学习记忆能力的研究已成为焦点,但其具体影响机制仍未清楚。出于伦理学限制,MS 影响子代学习记忆的研究对象主要以动物为主。本文结合文献对 MS 动物模型以及 MS 影响子代学习记忆的相关机制研究进行综述,旨在为后续进行 MS 所致子代学习记忆损伤的相关研究提供依据。

1 母婴分离动物模型

1.1 母婴分离动物模型概述

MS 在鸟类、猪和豚鼠中都有所研究,但是 MS 动物模型的构建最常选用大鼠和小鼠^[5]。早期社会剥夺(early social deprivation, ESD)是指在生命发展早期由于居住卫生条件差、社会性刺激获得少、亲子互动沟通缺失等不良影响,基本的生理和心理需求难以满足,导致母婴依恋关系发展受阻的一种现象^[6]。早期干预(early handling, EH)和 MS 为早期社会剥夺的两种方式。EH 是指将 PND 1 ~ 21 的子鼠与母鼠分开 3 ~ 15 min;而 MS 是指让两者进行更长时间地分离,即为 1 ~ 24 h^[7]。EH 分离时间短,类似于母鼠自然状态下与子鼠分离的时间,从而不造成严重的社会剥夺;相反,MS 分离时间较长,可产生较为严重的剥夺^[8]。MS 模型为一种早期社会剥夺模型,是目前探究 MS 引起子代异常行为变化及机制的动物模型之一^[9]。

1.2 母婴分离动物模型构建

1.2.1 实验对象选择

MS 动物模型可选用 C57BL/6 小鼠、SD 大鼠、Wistar 大鼠等作为研究对象。为减少性别因素对实验结果的影响,研究者多选取雄性作为研究对象^[10]。

1.2.2 分离时机

小鼠出生当日记录为 PND 0,母鼠与子鼠的分离时机不同,产生的影响也有所差异,大多研究学者选择在 PND 2 ~ 14 或 PND 2 ~ 21 进行 MS^[11]。MS 时间与应激低反应期发生重叠,子鼠在自然环境状态下出生后的 2 周内表现出对压力刺激反应低甚至无反应^[12]。因此,子鼠对压力的这种自然防御能力可能会减弱 MS 的影响。

1.2.3 分离频率

MS 包括单次分离和连续重复分离。大多数研究采用连续重复分离,子代每天与母鼠进行 1 ~ 2 次分离^[13]。若采用单次分离,研究人员大多会在

PND 9 将子鼠与母鼠进行长时间的分离^[6]。

1.2.4 分离持续时间

大部分论文使用“MS xx”代码表示分离持续时间,xx 代表以分钟为单位的分离时间^[14]。在连续重复分离中,多数团队选择 MS 180、MS 360,少数团队选择 MS 60、MS 240、MS 480,1 次分离一般不超过 360 min^[15]。在单次分离实验中,研究者多选择分离 24 h (1440 min),但是该方式不常用,因为会改变幼鼠睡眠的结构,减少快速动眼睡眠^[14]。

1.2.5 对照组

多数研究者设立对照组会选择不进行 MS,部分团队会通过进行 EH 来作为对照,即进行 MS 3 ~ 15 min^[16],这种处理更贴近实际,因为即便在现实环境中,母鼠与幼鼠也不会一刻不离。

2 母婴分离动物模型的学习记忆行为评价

2.1 Morris 水迷宫

Morris 水迷宫是由英国神经科学家 Morris 于 20 世纪 80 年代开发的新型水迷宫,是评估学习记忆的经典实验^[17],主要是通过记录大鼠从入水到找到隐藏平台的时间与游泳轨迹来评估其学习记忆能力。研究显示,MS 子鼠在水迷宫中表现为逃避潜伏期增加以及穿越平台次数减少,提示空间记忆能力受损^[18]。但也有研究显示,早期 MS 应激可以增强子鼠的认知与空间记忆能力,这可能与分离的时间程序、水温、训练时间安排等有关^[19]。

2.2 Y 迷宫

Y 迷宫是一种基于动物自然探索好奇心的行为测试,该测试中的自发交替行为可用于评估动物的短期空间记忆能力^[20]。其主要利用受试动物对于新环境探索的天性,实验过程中受试动物每次转换探索新的方向时都要记住之前探寻过的方向,可以反映出动物的识别记忆能力。研究显示,子鼠经历 MS 后在 Y 迷宫中表现出交替次数降低,提示其学习记忆能力受损^[21]。而 ZHANG 等^[22]发现,虽然 MS(PND 1 ~ 21, 3 h/d)也明显降低了 SD 大鼠的自发交替次数,但 MS(PND 1 ~ 21, 15 min/d)对其并未产生影响,提示分离时间可能是影响大鼠空间记忆能力的关键因素之一。

2.3 新物体识别实验

新物体识别实验是一种非奖赏性的认知记忆实验模型,其主要利用大鼠、小鼠更倾向于寻找新

物体的偏好,通过记录对已熟悉物体与新陌生物体的探索时长来推断动物的记忆能力^[23]。FADAEI-KENARSARY 等^[24]研究发现,与对照组相比,MS 组大鼠的学习记忆能力在新物体识别测试中的认知指数无显著性差异,提示学习记忆未受影响。而一项系统评价显示,MS 子代大鼠、小鼠在新物体识别测试中表现出记忆受损^[25]。

2.4 巴恩斯迷宫实验

巴恩斯迷宫 (Barnes maze, BM) 是一种基于早地的啮齿类动物避光喜暗且爱探究的天性而设计,通过记录动物找到目标箱的时间及进入空洞的次数用于评估啮齿动物的空间学习记忆能力^[26]。CORDIER 等^[27]研究发现,在巴恩斯迷宫测试中,MS 组大鼠找到目标箱的时间比对照组长,提示 MS 大鼠在空间学习和记忆方面存在缺陷。

3 母婴分离影响学习记忆的可能机制

3.1 脑内化学物质

3.1.1 氨基酸类神经递质

谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 和 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 是中枢神经系统中主要的兴奋性和抑制性神经递质,对维持大脑兴奋-抑制平衡起着重要的调节作用,其共同调节作用失衡会对学习记忆功能产生重要影响^[28]。Glu 是大脑中含量最丰富的氨基酸,一定范围内 Glu 水平升高对正常的神经元发育、突触可塑性、学习记忆有促进作用。相反,过高的 Glu 水平会对学习记忆产生抑制作用,而 GABA 可以减弱 Glu 的作用,与 Glu 共同维持大脑的兴奋-抑制平衡状态^[29]。研究发现,在 PND 1 ~ 21 经历 MS 的成年雄性大鼠学习记忆能力下降,可能与海马中谷氨酸水平降低以及 GABA 水平升高有关^[30]。

3.1.2 单胺类神经递质

单胺类神经递质主要包括多巴胺 (dopamine, DA)、5-羟色胺 (5-hydroxy tryptamine, 5-HT) 等。DA 广泛分布于与学习记忆过程密切相关的大脑区域,包括前额叶大脑皮层、海马和纹状体。海马体中的多巴胺 D1 受体主要负责记忆的获取,激活这些受体可以增强空间学习和记忆^[31]。多巴胺转运蛋白 (dopamine transporter, DAT) 是一种膜结合的突触前蛋白,可快速清除已释放到细胞外的多巴胺,从而限制多巴胺信号传导的幅度和持续时间。多巴胺信号转导及其受体对学习记忆和突触可塑性会产

生重要影响^[32]。GROCHECKI 等^[33]研究发现,MS 诱导了青春期大鼠多巴胺传递功能减退,主要表现在 DAT 过表达和多巴胺 D1 受体上调,从而导致大鼠空间记忆障碍,而通过给予一种非典型 DAT 抑制剂 CE-123 后,多巴胺信号传导正常化,MS 大鼠的学习记忆得到改善。5-HT 是一种单胺型神经递质,又称血清素,主要参与调节学习记忆、认知和情绪等生理功能。NIWA 等^[34]研究表明,MS 大鼠学习记忆能力下降,可能与大脑中 5-HT 及其代谢物 5-羟基吲哚乙酸的水平降低有关。

3.1.3 胆碱能神经递质

乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 作为重要的神经递质之一,在学习记忆中起着重要作用,Ach 信号传导失调与学习记忆功能障碍密切相关^[35]。胆碱 (choline, Ch) 是人体的一种必需营养素,可以通过调节神经发育、改善突触发生或调节神经递质 Ach 的合成和释放来提高学习记忆能力^[36]。研究发现,对 MS 大鼠给予富含 Ch 的饮食会改善学习记忆功能障碍^[37]。

3.2 下丘脑-垂体-肾上腺轴

下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) 是神经内分泌系统的重要组成部分,长时间的 MS 会改变 HPA 轴的功能和反馈调节,导致成年后出现学习记忆功能障碍^[38]。受到应激时,下丘脑室旁核分泌促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotropin releasing hormone, CRH) 和精氨酸加压素 (arginine-vasopressin, AVP),而 CRH 和 AVP 可以激活垂体前叶以分泌促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH),其反过来刺激肾上腺皮质细胞释放 HPA 轴的最终产物—皮质类固醇 (人体皮质醇和啮齿动物皮质酮 (corticosterone, Cort))。WEI 等^[39]研究表明,MS 小鼠的记忆能力下降可能与海马区的 CRH 水平升高有关。研究发现,雄性 Wistar 大鼠 MS 成年后在水迷宫中表现为学习记忆障碍,其机制可能与血浆 ACTH 和 CORT 水平升高有关^[40]。而 ROQUE 等^[41]通过评估不同发育时间点 HPA 轴的激活水平发现,MS 180 长期增加了下丘脑和海马 CRH 的表达,而不影响 AVP 或 CORT 水平,并且对下丘脑 CRH 的表达影响一直持续到成年,可能与 MS 大鼠成年后学习记忆能力降低有关。

3.3 突触可塑性

突触是神经元之间进行信息传递的关键部位,

其可塑性调节普遍存在于中枢神经系统。突触可塑性是指神经元之间连接的数量和强度随突触和神经元活动的变化而发生改变,既包括传递效能的变化;也包括形态结构的变化,如突触后致密物增厚或变薄等,突触可塑性在学习和记忆方面发挥着重要作用^[42]。SHAHRAKI 等^[43]研究发现,MS 降低了雄性大鼠海马 CA1 区的 LTP 诱导,从而导致学习记忆障碍。而电针可通过恢复海马 Schaffer 侧枝-CA1 区突触处的 LTP 诱导来改善母体分离动物的学习记忆缺陷^[44]。此外,脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 对于突触的生长发育及其可塑性有着极其重要的作用^[45]。MARTISOVA 等^[46]认为 MS 大鼠学习记忆能力下降可能与 BDNF 和突触标记物突触素 (synaptophysin, SYN) 和突触后密度蛋白 95 (postsynaptic density protein-95, PSD-95) 的减少有关。BACHILLER 等^[47]研究也证实,MS 导致小鼠突触功能相关基因 SYN 表达降低。

3.4 神经炎症

神经炎症是由中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的小胶质细胞和星形胶质细胞等介导的一系列免疫应答^[48]。小胶质细胞是大脑中主要的免疫效应细胞,被认为是 CNS 中的第一道防线,其功能对 CNS 的发育至关重要,包括神经发生、突

触成熟和轴突生长等^[49]。正常的小胶质细胞可以释放促进神经元生长和迁移的神经营养因子。然而,过度激活的小胶质细胞可以产生白介素-1 β (interleukin1 β , IL-1 β) 和白介素-6 (interleukin6, IL-6) 等一系列细胞因子,从而诱导中枢炎症反应。此外,炎症细胞因子的过度释放会反过来激活小胶质细胞,形成恶性循环,进一步加重中枢神经系统的炎症损伤,损害学习记忆功能^[50]。研究表明,MS 诱导了学习记忆障碍,降低了海马多巴胺水平,并升高了子鼠的 IL-6、TNF- α 水平^[51]。HAO 等^[52]研究也发现,早期 MS 应激会损伤成年期 SD 大鼠学习记忆能力损伤,其原因可能与小胶质细胞数量显著增加并伴有 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 上调有关。

3.5 氧化应激

氧化应激是指自由基产生与抗氧化剂及其相关酶的清除能力失衡,导致氧化还原信号传导和控制被破坏,从而导致结构和功能出现损伤和紊乱^[53]。研究表明,MS 大鼠在基底外侧杏仁核和海马齿状回小清蛋白神经元中表现出氧化应激标志物 8-oxo-dG 的表达增加,学习记忆能力水平下降,提示氧化应激增加可能是导致 MS 大鼠学习记忆障碍的原因^[54]。ERSHADI 等^[55]研究发现,与对照组相比,MS 组小鼠学习记忆能力受损,海马中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平升高,谷胱甘肽

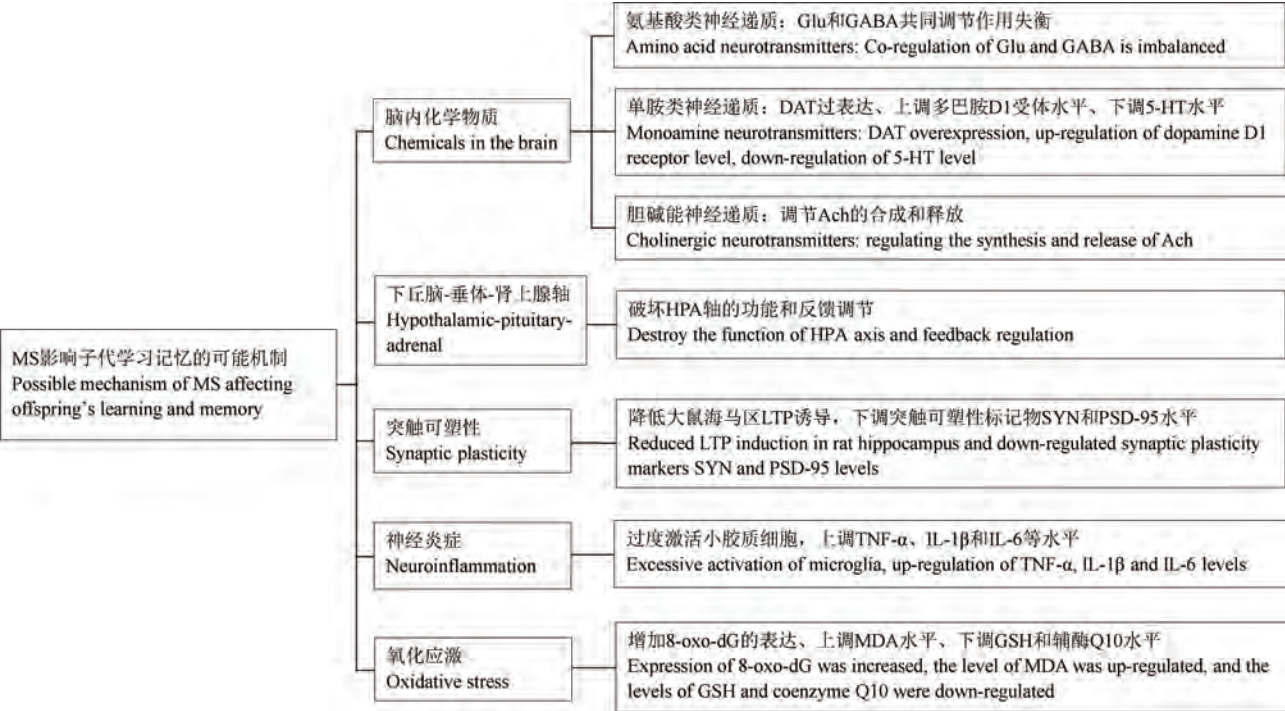


图 1 母婴分离影响子代学习记忆的可能机制

Figure 1 Possible mechanism of maternal separation affecting the learning and memory of offspring

(glutathione, GSH)、辅酶 q10 (coenzyme q10, CoQ) 水平下降,总抗氧化能力水平也降低。提示经历 MS 的幼鼠成年后学习记忆水平降低可能是通过氧化应激机制发生。见图 1。

4 小结

综上所述,MS 作为一种生命早期的社会剥夺,可以通过影响脑内化学物质、HPA 轴、突触可塑性、神经炎症以及氧化应激等,从而影响子代大鼠学习记忆能力,但是其诱导子代学习记忆障碍的机制需进一步深入研究,以期对 MS 新生儿进行干预提供理论依据,以减少 MS 诱导子代学习记忆障碍的风险,促进 MS 患儿的健康成长。目前,MS 建模方式中不同分离方式对实验结果的影响尚有争议,未来需要进一步深入探讨。

参 考 文 献 (References)

- [1] LAU C. Breastfeeding challenges and the preterm mother-infant dyad: a conceptual model [J]. *Breastfeed Med*, 2018, 13(1): 8-17.
- [2] 李姣姣, 于秀荣, 王云芳, 等. 母婴分离的早产产妇泌乳 II 期启动延迟的影响因素研究 [J]. *中华护理教育*, 2022, 19(4): 368-373.
LI J J, YU X R, WANG Y F, et al. The influencing factors of delayed onset of lactogenesis II in preterm parturient women separated from their infants [J]. *Chin J Nurs Educ*, 2022, 19(4): 368-373.
- [3] VILELA F C, VIEIRA J S, GIUSTI-PAIVA A, et al. Experiencing early life maternal separation increases pain sensitivity in adult offspring [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2017, 62: 8-14.
- [4] WANG X, JIANG L, MA W, et al. Maternal separation affects anxiety-like behavior beginning in adolescence and continuing through adulthood and related to Dnmt3a expression [J]. *J Neurophysiol*, 2022, 128(3): 611-618.
- [5] 张传领, 邸桐, 王文婧, 等. 母婴分离应激对 rd 新生小鼠行为的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(4): 89-93.
ZHANG C L, DI T, WANG W J, et al. Effect of maternal separation stress on behavior of neonatal rd mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(4): 89-93.
- [6] CARLSON M, EARLS F. Psychological and neuroendocrinological sequelae of early social deprivation in institutionalized children in Romania [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1997, 807: 419-428.
- [7] 薛晓芳, 李曼, 王玮文, 等. 母婴分离的动物模型及其神经生物学机制 [J]. *心理科学进展*, 2013, 21(6): 990-998.
XUE X F, LI M, WANG W W, et al. The animal model and neurobiological mechanisms of maternal separation [J]. *Adv Psychol Sci*, 2013, 21(6): 990-998.
- [8] VAN HEERDEN J H, RUSSELL V, KORFF A, et al. Evaluating the behavioural consequences of early maternal separation in adult C57BL/6 mice; the importance of time [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 207(2): 332-342.
- [9] 张宇翔, 刘建鹏, 陈佳欣, 等. 母婴分离动物研究及其进展 [J]. *海南医学*, 2017, 28(6): 943-946.
ZHANG Y X, LIU J P, CHEN J X, et al. Research progress on the animal model of maternal separation [J]. *Hainan Med J*, 2017, 28(6): 943-946.
- [10] WEISS I C, DOMENEY A M, MOREAU J L, et al. Dissociation between the effects of pre-weaning and/or post-weaning social isolation on prepulse inhibition and latent inhibition in adult Sprague-Dawley rats [J]. *Behav Brain Res*, 2001, 121(1/2): 207-218.
- [11] WANG D, LEVINE J L S, AVILA-QUINTERO V, et al. Systematic review and meta-analysis: effects of maternal separation on anxiety-like behavior in rodents [J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1): 174.
- [12] 刘守恒, 滕腾, 李泽钧, 等. 母婴分离模型的应用及其诱导抑郁的相关机制研究进展 [J]. *国际精神病学杂志*, 2019, 46(4): 597-600.
LIU S H, TENG T, LI Z J, et al. Research progress on the application of mother-infant separation model and its related mechanism of inducing depression [J]. *J Int Psychi*, 2019, 46(4): 597-600.
- [13] VETULANI J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition [J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(6): 1451-1461.
- [14] LUNDBERG S, ABELSON K S P, NYLANDER I, et al. Few long-term consequences after prolonged maternal separation in female Wistar rats [J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0190042.
- [15] 何静, 王高华, 王慧玲, 等. 早期母婴分离对大鼠海马 GFAP 表达的影响 [J]. *国际精神病学杂志*, 2018, 45(5): 827-829, 833.
HE J, WANG G H, WANG H L, et al. The effect of early maternal deprivation on the GFAP expression of rats in hippocampus [J]. *J Int Psychi*, 2018, 45(5): 827-829, 833.
- [16] BARACZ S J, EVERETT N A, ROBINSON K J, et al. Maternal separation changes maternal care, anxiety-like behaviour and expression of paraventricular oxytocin and corticotrophin-releasing factor immunoreactivity in lactating rats [J]. *J Neuroendocrinol*, 2020, 32(6): e12861.
- [17] BRANDEIS R, BRANDYS Y, YEHUDA S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning [J]. *Int J Neurosci*, 1989, 48(1/2): 29-69.
- [18] MCVEY NEUFELD K A, O' MAHONY S M, HOBAN A E, et al. Neurobehavioural effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG alone and in combination with prebiotics polydextrose and galactooligosaccharide in male rats exposed to early-life stress [J]. *Nutr Neurosci*, 2019, 22(6): 425-434.
- [19] CEVIK O S, CEVIK K, TEMEL G O, et al. Maternal separation increased memory function and anxiety without effects of

- environmental enrichment in male rats [J]. *Behav Brain Res*, 2023, 441: 114280.
- [20] KRAEUTER A K, GUEST P C, SARNYAI Z. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 105–111.
- [21] SHIN S, LEE S. The impact of environmental factors during maternal separation on the behaviors of adolescent C57BL/6 mice [J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1147951.
- [22] ZHANG X, LI H, SUN H, et al. Effects of BDNF signaling on anxiety-related behavior and spatial memory of adolescent rats in different length of maternal separation [J]. *Front Psychiatry*, 2020, 11: 709.
- [23] COHEN S J, JR STACKMAN R W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 285: 105–117.
- [24] FADAEI-KENARSARY M, ESMAEILPOUR K, SHABANI M, et al. Chronic morphine exposure and maternal separation induce impairments in cognition and locomotor activity of male adolescent rats [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2023, 83(3): 235–247.
- [25] ROCHA M, WANG D, AVILA-QUINTERO V, et al. Deficits in hippocampal-dependent memory across different rodent models of early life stress: systematic review and meta-analysis [J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11(1): 231.
- [26] RODRÍGUEZ PERIS L, SCHEUBER M I, SHAN H, et al. Barnes maze test for spatial memory: a new, sensitive scoring system for mouse search strategies [J]. *Behav Brain Res*, 2024, 458: 114730.
- [27] CORDIER J M, AGUGLIA J P, DANELON V, et al. Postweaning enriched environment enhances cognitive function and brain-derived neurotrophic factor signaling in the hippocampus in maternally separated rats [J]. *Neuroscience*, 2021, 453: 138–147.
- [28] SEARS S M, HEWETT S J. Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance [J]. *Exp Biol Med*, 2021, 246(9): 1069–1083.
- [29] 周洪莉, 张祚, 周吉银. GABA 能神经系统与学习记忆的研究进展 [J]. *国际精神病学杂志*, 2019, 46(6): 961–963, 970.
- ZHOU H L, ZHANG Z, ZHOU J Y. Research progress of GABAergic nervous system and learning and memory [J]. *J Int Psychi*, 2019, 46(6): 961–963, 970.
- [30] KOTLINSKA J H, GROCHECKI P, MICHALAK A, et al. Neonatal maternal separation induces sexual dimorphism in brain development; the influence on amino acid levels and cognitive disorders [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(10): 1449.
- [31] KOUROSH-ARAMI M, KOMAKI A, ZARRINDAST M R. Dopamine as a potential target for learning and memory: contributing to related neurological disorders [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2023, 22(4): 558–576.
- [32] KEMPADOO K A, MOSHAROV E V, CHOI S J, et al. Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(51): 14835–14840.
- [33] GROCHECKI P, SMAGA I, SUROWKA P, et al. Novel dopamine transporter inhibitor, CE-123, ameliorates spatial memory deficits induced by maternal separation in adolescent rats: impact of sex [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10718.
- [34] NIWA M, MATSUMOTO Y, MOURI A, et al. Vulnerability in early life to changes in the rearing environment plays a crucial role in the aetiopathology of psychiatric disorders [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2011, 14(4): 459–477.
- [35] MINEUR Y S, PICCIOTTO M R. The role of acetylcholine in negative encoding bias: Too much of a good thing? [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 114–125.
- [36] WURTMAN R J. Non-nutritional uses of nutrients [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 668: S10-S15.
- [37] MORENO GUDIÑO H, CARÍAS PICÓN D, DE BRUGADA SAURAS I. Dietary choline during periadolescence attenuates cognitive damage caused by neonatal maternal separation in male rats [J]. *Nutr Neurosci*, 2017, 20(6): 327–335.
- [38] BABICOLA L, VENTURA R, D'ADDARIO S L, et al. Long term effects of early life stress on HPA circuit in rodent models [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 521: 111125.
- [39] WEI F, DENG X, MA B, et al. Experiences shape hippocampal neuron morphology and the local levels of CRHR1 and OTR [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(5): 2129–2147.
- [40] AISA B, TORDERA R, LASHERAS B, et al. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2007, 32(3): 256–266.
- [41] ROQUE A, VALLES MÉNDEZ K M, RUIZ R, et al. Early life stress induces a transient increase in hippocampal corticotropin-releasing hormone in rat neonates that precedes the effects on hypothalamic neuropeptides [J]. *Eur J Neurosci*, 2022, 55(9/10): 2108–2121.
- [42] ZHANG K, LIAO P, WEN J, et al. Synaptic plasticity in schizophrenia pathophysiology [J]. *IBRO Neurosci Rep*, 2022, 13: 478–487.
- [43] SHAHRAKI S, ESMAEILPOUR K, SHABANI M, et al. Choline chloride modulates learning, memory, and synaptic plasticity impairments in maternally separated adolescent male rats [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2022, 82(1): 19–38.
- [44] GUO L, LIANG X, LIANG Z, et al. Electroacupuncture ameliorates cognitive deficit and improves hippocampal synaptic plasticity in adult rat with neonatal maternal separation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 2468105.
- [45] COLUCCI-D'AMATO L, SPERANZA L, VOLPICELLI F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7777.
- [46] MARTISOVA E, AISA B, GUEREÑU G, et al. Effects of early maternal separation on biobehavioral and neuropathological markers of Alzheimer's disease in adult male rats [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2013, 10(4): 420–432.

[47] BACHILLER S, PAULUS A, VÁZQUEZ-REYES S, et al. Maternal separation leads to regional hippocampal microglial activation and alters the behavior in the adolescence in a sex-specific manner [J]. Brain Behav Immun Health, 2020, 9: 100142.

[48] ZHAO J, BI W, XIAO S, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 5790.

[49] TAY T L, SAVAGE J C, HUI C W, et al. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition [J]. J Physiol, 2017, 595(6): 1929–1945.

[50] LI Z, ZHU Y, KANG Y, et al. Neuroinflammation as the underlying mechanism of postoperative cognitive dysfunction and therapeutic strategies [J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 843069.

[51] JOLODAR S K, BIGDELI M, MOGHADDAM A H. Hypericin ameliorates maternal separation-induced cognitive deficits and hippocampal inflammation in rats [J]. Mini Rev Med Chem, 2021, 21(9): 1144–1149.

[52] HAO K, WANG H, ZHANG Y, et al. Nicotinamide reverses deficits in puberty-born neurons and cognitive function after maternal separation [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 232.

[53] SIES H. Oxidative stress: concept and some practical aspects [J]. Antioxidants, 2020, 9(9): 852.

[54] SOARES A R, GILDAWIE K R, HONEYCUTT J A, et al. Region-specific effects of maternal separation on oxidative stress accumulation in parvalbumin neurons of male and female rats [J]. Behav Brain Res, 2020, 388: 112658.

[55] ERSHADI A S B, AMINI-KHOEI H, HOSSEINI M J, et al. SAHA improves depressive symptoms, cognitive impairment and oxidative stress: rise of a new antidepressant class [J]. Neurochem Res, 2021, 46(5): 1252–1263.

[收稿日期] 2023-12-08

自噬及自噬相关分子在神经退行性疾病中的研究进展

自噬是细胞内清除异常蛋白质或受损细胞器的重要途径之一,正常情况下,细胞自噬主要清除衰老的细胞器以及蛋白酶体系统难以清除的大分子蛋白,对维持细胞内能量和物质代谢的稳态起到重要作用。细胞内受损的细胞器主要通过选择性自噬降解,神经元中异常的线粒体主要经线粒体自噬清除,包括以下多种途径:PINK1-Parkin 通路以及心磷脂、BNIP3L、FUNDC1、FKBP8 等跨膜蛋白介导的非 PINK1-Parkin 通路。神经系统内异常的自噬过程可引起神经系统损伤,包括自噬体聚集、神经细胞萎缩、线粒体耗竭以及轴突和树突的萎缩等。在帕金森病(Parkinson’s disease, PD)、阿尔兹海默病(Alzheimer’s disease, AD)、亨廷顿舞蹈症(Huntington’s disease, HD)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)及路易氏体痴呆(dementia with Lewy body, DLB)等神经退行性疾病中观察到了异常的自噬过程。本文概述了自噬过程在神经退行性疾病中的重要作用,为理解自噬相关分子与神经退行性疾病的联系做出了必要阐释,为研究神经退行性疾病的病理机制和治疗方法提供了思路。

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(1):10–17. doi: 10.1002/ame2.12229)。

孙榕,毛忠南,支晓东,等. 非手术动物模型在血管性认知障碍中的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(9): 1222-1232.

SUN R, MAO Z N, ZHI X D, et al. Advances in non-surgical animal models of vascular cognitive impairment [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(9): 1222-1232.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.014

非手术动物模型在血管性认知障碍中的研究进展

孙榕¹, 毛忠南^{2*}, 支晓东², 宋雪霞², 李莎莎², 张世瑞²

(1. 甘肃中医药大学针灸推拿学院, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学附属医院, 兰州 730000)

【摘要】 血管性认知障碍 (vascular cognitive impairment, VCI) 包含从轻度认知障碍到全面痴呆的一系列疾病, 可由不同原因的血管病变及其危险因素引起。建立适宜的动物模型对于发病机制研究和药物研发具有重要意义, 然而到目前为止, 没有一种动物模型可以完美模拟 VCI 的发病机制。目前的 VCI 造模以颈动脉及椎动脉狭窄或闭塞为主流方法, 但近年来越来越多的非手术方法的涌现, 为研究这一疾病提供了新的思路和前景。本综述就 VCI 非手术动物模型的构建方法、模型机制、模型特点进行讨论, 为研究者选择更合适的动物模型提供参考。

【关键词】 血管性认知障碍; 非手术动物模型; 建模方法; 模型机制; 模型特点

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 09-1222-11

Advances in non-surgical animal models of vascular cognitive impairment

SUN Rong¹, MAO Zhongnan^{2*}, ZHI Xiaodong², SONG Xuexia², LI Shasha², ZHANG Shirui²

(1. College of Acupuncture and Massage, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

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

Corresponding author: MAO Zhongnan. E-mail: Kyg1b912@163.com

【Abstract】 Vascular cognitive impairment (VCI) includes a range of illnesses from mild cognitive impairment to dementia, attributable to cerebrovascular factors. Although appropriate animal models are needed to allow clinicopathological research and drug development, there are currently no animal models that can perfectly simulate the pathogenesis of VCI. At present, carotid artery and vertebral artery stenosis or occlusion are the main method for VCI modeling; however, increasing numbers of non-surgical method have recently emerged, providing new ideas and prospects for the study of this disease. In this paper, we consider the construction method, model mechanisms, and model characteristics of non-surgical animal models of VCI, to provide a reference to help researchers choose the most suitable animal model.

【Keywords】 vascular cognitive impairment; non-surgical animal model; modeling method; model mechanism; model characteristics

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

血管性认知功能障碍 (vascular cognitive impairment, VCI) 是由脑血管病危险因素 (如高血压病、糖尿病和高脂血症等)、显性脑血管病如脑梗死和脑出血 (cerebral hemorrhage, ICH)、非显性脑血管

【基金项目】 兰州市科技发展指导性计划项目 (2022-5-116), 中医药康复服务能力的提升项目 002081003 (2023KF-03), 甘肃省科技厅 2022 自然科学基金一般项目 (22JR5RA609)。

Funded by Guiding Plan Project of Scientific and Technological Development in Lanzhou City (2022-5-116), Chinese Medicine Rehabilitation Service Capacity Improvement Project 002081003 (2023KF-03), General Program of Natural Science Foundation of Gansu Provincial Science and Technology Department in 2022 (22JR5RA609).

【作者简介】 孙榕, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 针灸康复。Email: 2781053590@qq.com

【通信作者】 毛忠南, 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 针灸康复。Email: Kyg1b912@163.com

病(如白质损伤、灰质萎缩和慢性脑缺血)等引起的从轻度认知损害到痴呆的临床综合征,是从轻度认知障碍到血管性痴呆的任一阶段和类型,也是继阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)的第二大认知障碍疾病。近年来 VCI 的发病率逐年增高,在全球范围内,痴呆症患者人数从 1990 年的 2020 万增加到 2016 年的 4380 万,而这一数字预计在 2050 年将增加两倍多^[1]。在中国,2019 年 65 岁以上人群的痴呆患病率为 5.60%^[2]。目前,许多临床实验已展示出一些积极的效果。但这些实验中的认知功能改善程度往往是适度的,故亟需寻求更接近人类的动物模型,为疾病的预防和药物研发提供依据。但 VCI 的发病机理复杂,可同时合并综合性因素,因此对其病机和病理过程的模仿面临巨大挑战。

目前为止,临床研究的 VCI 啮齿类动物模型有手术模型和非手术动物模型两大类,手术模型以颈动脉狭窄或闭塞为主,包括大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)、双侧颈动脉闭塞(bilateral carotid artery stenosis and occlusion, BCAA)、双侧颈总动脉狭窄(bilateral common carotid artery stenosis, BCAS)、2 血管闭塞法(2-vessel occlusion, 2-VO)、4 血管闭塞法(transient 4-vessel occlusion, 4-VO),非手术模型主要包括自发性高血压/卒中易感性(spontaneous hypertensive stroke susceptibility, SHR/SP)、2 型糖尿病(type 2 diabetic mellitus, T2DM)模型、脑淀粉样血管病(cerebral amyloid angiopathy, CAA)、常染色体显性遗传性脑动脉病伴皮质下梗死和白质脑病(cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, CADASIL)、高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)。由于手术动物模型的操作难度高、致死率高,而建立非手术动物模型更加便捷、经济、耗时较少且对动物的伤害更小,多数 VCI 的发生并非由大动脉直接闭塞引起,血栓、基因突变、饮食习惯、遗传因素、小血管病变等均可能为发病因素,这使得非手术模型可能在应用中具有更好的前景。故本文主要探讨非手术动物模型在 VCI 中的应用,为研究者们选择更可行性的 VCI 动物模型提供参考价值。

1 发病机理

有研究发现 VCI 是由脑供血减少,导致受影响的脑区域神经元损伤和脑部结构功能受损,最终导

致认知障碍。其发病机理涉及血管壁异常、缺血梗死、小动脉硬化等多种因素。

1.1 缺血因素

血管阻塞,无论大小,都可能引发 VCI 和痴呆,且它的发病往往具有延后性。大血管阻塞如缺血性中风,小血管阻塞如动脉硬化,均可导致 VCI。在中风时,血管壁中的炎症物质和淀粉样蛋白的沉积,对 VCI 的发展有重要影响^[3-4]。中风后,认知能力的下降较快(相较于其他形式的 VCI,不到一年)^[5-6],而小血管阻塞则发展缓慢^[6]。长期的脑灌注不足,可能导致白色物质损伤和认知功能突然下降,最终导致多个认知领域受到损害^[7-9]。

1.2 出血因素

ICH 后也可能发生血管功能障碍和认知缺陷^[8-9]。尤其是老年人、女性、有既往 ICH 病史、初始神经功能缺损更严重及早期收缩压持续偏高的患者,更容易受到这种认知障碍的影响。CAA 引起的颅内出血可能会导致认知功能障碍,并导致脑水肿和继发性缺血。此外,蛛网膜下腔出血若累及海马体和额颞区,也可导致视觉空间记忆和语言缺陷综合征^[10]。在这种情况下,VCI 的发生可能与硬膜淋巴引流受影响有关^[11]。

1.3 其他因素

VCI 可与 AD 等疾病合并出现,这些疾病通常由血管和脑组织蛋白质结构变化引起^[12]。此外,高血压和糖尿病是 AD 的独立风险因素,可与 VCI 合并。吸烟、维生素 E 缺乏、体力活动不足和低教育水平等生活方式因素也可能与 VCI 有关。然而,这些因素对 VCI 认知缺陷的影响目前仍存在争议^[13]。

2 分子生物学机制

动物模型可用于研究脑血管损伤期间大脑中发生的分子变化,以及这些变化最终如何引起认知缺陷。脑循环保证了足够的血液输送到大脑。缺氧或慢性脑灌注不足可能导致神经血管单位中能量底物的递送和代谢废物的清除之间的平衡改变。就认知缺陷而言,病理机制可能涵盖从氧化应激到血管清除有毒废物如 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β),以及从神经炎症到小胶质细胞、星形胶质细胞和内皮细胞功能受损。下面将从这几个方面描述 VCI 的分子机制。

2.1 星形胶质细胞的作用

研究表明,星形胶质细胞是导致 VCI 的重要因

素。作为神经血管单元的重要组成部分,星形胶质细胞的主要作用是调节脑血流量,血脑屏障渗透性、神经免疫反应和神经血管重构^[14],同时也在血管向神经元提供能量方面发挥着至关重要的作用。其通过特有的突起(星形细胞端足)与脑血管周围的内皮细胞直接互动,从而调节脑部血流^[15]。星形细胞的端足作为一个特殊单位,主要起维持大脑离子和渗透稳态的作用。有研究发现,端足破坏会导致小胶质细胞活化和促炎细胞因子的释放。WEEKMAN 等^[16]证实,在炎症过程中,星形胶质细胞和端足可能因基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)的释放而发生变性, MMPs 将破坏端足和血管系统基底膜上的 α - β 肌营养不良聚糖复合物。端足变性导致神经血管耦合受损,进而影响钾稳态,使神经元兴奋性增加,最终导致认知障碍^[17]。此外,星形胶质细胞也可以通过星形胶质细胞 CN/活化 T 细胞核因子(activating t nuclear factor, NFAT)机制,促进炎症细胞因子的释放,进而影响认知功能。

2.2 小胶质细胞的作用

氧化应激可以引起神经血管炎症^[18]。因此, VCI 的病理生理过程也与炎症因子有关^[19]。对大鼠模型的研究发现,小胶质细胞可以在缺血缺氧条件下释放 MMPs,使血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)破坏,并且使髓纤维被破坏^[20]而产生认知障碍。此外,活化的小胶质细胞可以释放白细胞介素(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎性因子在 VCI 中发挥重要作用^[21]。在脑卒中动物模型和人类中,脑卒中发生后,血清和脑脊液中的 IL-6 水平会升高^[22-23]。此外,有研究显示,对于有血管危险因素的患者, IL-6 水平升高可能会增加他们患痴呆的风险。因此,在 VD 患者的血清中 IL-6 水平也较高^[24],提示 VCI 发展过程中有炎症成分存在。

2.3 神经元细胞的氧化应激作用

氧化应激可由脑微血管内皮中活性氧(reactive oxygen, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)的产生增加而引起^[25]。亦可由血管相关的病理状态引起,包括高血压、糖尿病和动脉硬化。此外,有研究证明,神经退行性疾病的一种常见现象,是蛋白质的过度氧化,这被认为与认知缺陷相关^[26-27]。而在 VCI 中,多项研究均证实氧化应激是认知障碍发病的主要因素。

已有研究探索了动物模型中氧化应激的分子机制。ROS 的产生增加是氧化应激的特征^[28],这也是心血管病理生理学和神经退行性病变的原因^[29]。神经元的突触活动和神经传递可能由于 ROS 和抗氧化防御的降低而受到直接影响,从而导致认知功能障碍。研究发现,在认知障碍中,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶可以引起 ROS 的过量产生^[30]。NADPH 氧化酶是一种存在于多种细胞中的多单位酶,包括中性粒细胞和血管细胞,特别是发现其在脑血管中存在,来源于 NADPH 氧化酶的 ROS 是脑血管失调的关键致病效应物,这种失调可能引发细胞功能障碍和细胞死亡,进而导致认知障碍。

2.4 周细胞

周细胞是包裹毛细血管和静脉中内皮细胞的多功能壁细胞^[31]。周细胞的主要作用是维持 BBB 完整性,清除中枢代谢废物,而在调节脑血流量(cerebral blood flow, CBF)收缩中也起着至关重要的作用。

有研究表明,周细胞可表达多种标志物,而最常用的细胞标志物包括: α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、神经元神经胶质抗原(neuronal glial antigen, NG2)和血小板衍生生长因子受体 β (platelet-derived growth factor receptor beta, PDGFR β)^[32],通过评估这些标志物在周细胞中的表达情况,可进一步研究周细胞的形态^[33]。然而,目前为止,这些标志物的使用仍存在一些挑战,因为这些标志物在其他类型细胞中也表达。周细胞和内皮细胞的相互作用通过微结构连接形成^[34],这种相互作用对两种细胞的生存和能否正常发挥其功能都至关重要,内皮细胞的分化和生存依赖于周细胞,同理,内皮细胞释放的血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF-B)对周细胞的增殖和迁徙具有关键的调控作用。PDGF-B 与位于周细胞膜的受体 PDGFR β 结合,激活包括转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)和 Notch 在内的信号转导途径,使周细胞增殖并将其迁移到新生血管上。因此,周细胞的缺失会对内皮细胞和血脑屏障的通透性产生不良影响。

在 VCI 的动物模型和死后组织学研究中, VCI 中周细胞丢失的机制尚未阐明。有数据显示,血管因素(高血压、高血糖),可导致周细胞损失^[35]。同

时,周细胞的丢失可引起内皮细胞死亡,并可加重血管功能障碍,导致微血管退化,进而导致慢性缺氧。

这些研究表明周细胞在诱发 VCI 的记忆缺陷中可能有显著作用,而周细胞具体如何诱导 VCI 还需进一步研究。

2.5 内皮细胞和一氧化氮(nitric oxide, NO)

内皮细胞形成全身所有血管的内壁^[36],是神经血管单元的一部分,覆盖在脑血管的内表面。许多研究表明,内皮细胞在 VCI 中起着重要作用。氧化应激损伤的内皮细胞可导致脑血管损伤和神经血管解耦^[37]。除此之外,这种与认知功能障碍的联系似乎是由于这些细胞对 NO 产生的影响^[38]。

NO 是一氧化氮合酶的内皮亚型在内皮细胞中分泌的一种反应性气体,它被强直释放以控制中枢神经系统的血管张力和神经元活动。在慢性 VCI 脑低灌注模型^[39]和高血压大鼠^[40]中,已观察到内皮源性 NO 生物利用度降低,这种降低可能是认知障碍的原因。这一假说的进一步支持来自 AD 动物模型的研究,其中,NO 的减少增加了 A β 对认知的负面影响,而 NO 对 A β 沉积有保护作用^[41]。

目前许多研究都集中在恢复 VCI 模型正常条件下 NO 水平的治疗上。NO 对认知过程的影响已经被研究过,发现它们是由多种机制介导的。一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)与 N-甲基-D-天冬氨酸(n-methyl-d-aspartate, NMDA)受体突触后共定位。Ca²⁺内流进入突触后神经元后,NO 作为一种逆行信使,提供一种正反馈机制来维持突触前谷氨酸释放,谷氨酸与各种突触后 NMDA 受体结合,加强海马记忆相关过程,如长期电位增强(long-term potentiometric enhancement, LTP)。NO 还通过参与突触传递和细胞内运输的蛋白质的翻译后修饰(S-亚硝基化和 3-硝基酪氨酸化)调控其他途径^[41]。

然而,同时需要注意的是,NO 的过度产生可能通过过度刺激 NMDA 受体(兴奋性毒性)产生负面影响,在正常情况下,相同的 NO 通过诱导环磷酸鸟苷(cyclic guanosine phosphate, cGMP)介导的信号通路来抵消这种影响^[42]。因此,内皮细胞 NO 释放的减少可能在解释血管病变和认知障碍之间的关系中发挥了非常重要的作用。然而,为了更好地定义 NO 在 VCI 中的神经保护作用 and 神经毒性作用,还需要其他研究。

3 非手术动物模型

PULSINELLI 等^[43]在 1979 年提出了 4-VO 后,各种改良手术方法相继出现。手术模型主要以脑组织缺血坏死、缺血再灌注损伤等机制诱发 VCI,但该方法会引起动物脑部血流量迅速降低,而使小鼠死亡率较高^[44],故本综述着重介绍非手术动物模型。在非手术动物模型中,研究者们通过对动物的饮食控制、基因修饰等手段,诱导出类似于人类 VCI 的病理生理变化^[45]。这些模型能够模拟 VCI 的多个方面,包括脑缺血、脑白质损伤、血管性痴呆等,且因其操作简便、可重复性强等特点,在 VCI 研究中具有广泛应用前景。

3.1 微栓塞模型

并非所有的 VCI 病因均为大血管病变,长期、反复的微栓塞也可能是重要病因之一。微栓塞存在于大小不等的皮质和皮质下区域。微栓塞动物模型可由血栓栓塞、胆固醇晶体、微珠或微球诱导,下面将从这几个方面进行详细描述,具体模型特点和优缺点总结及动物模型图分别见表 1、表 2、图 1。

3.1.1 造模方式与机制

(1)胆固醇晶体诱导的微栓塞模型

造模方式:WANG 等^[46]选择 8 ~ 10 周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠或者 CX3CRI-GFP 转基因小鼠(体重在 22 ~ 24 g)。通过 70 μ m 和 40 μ m 细胞过滤器过滤游离胆固醇晶体,然后收集并用血细胞计数器计数。随后,将小鼠随机分为中风组和假手术组,并用氯胺酮和甲苯噻嗪(50 mg/kg 和 10 mg/kg)进行麻醉。在解剖显微镜下,仔细分离右颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA)。用 7-0 线结扎 ICA 的颅外分支,并永久结扎 ECA 的远端部分。将微血管夹应用于 CCA 以及 ECA 和 ICA 的近端,并在 ECA 结扎部位与 ECA 夹之间切开。向 CCA 方向将聚乙烯(PE10)管插入 ECA,取出微血管夹以恢复血流。通过 PE10 管注入 100 μ L 生理盐水,共 3500 $\pm$ 500 个胆固醇晶体或单独的 100 μ L 生理盐水(假手术动物)。注射完成后,取出导管,永久结扎近端 ECA 并关闭伤口。

模型机制:可在大鼠中产生多发性梗死诱导的血管性认知障碍痴呆(vascular dementia, VaD)。受

表 1 研究血管认知障碍的主要非手术动物模型

Table 1 Primary nonsurgical animal model for the study of vascular cognitive impairment

模型 Models	物种 Species	建模方式 Modeling method	脑损伤部位 Brain injury site	分子病理损伤 Molecular pathological injury	参考文献 References
微栓塞模型 Microembolization model	雄性 C57BL/6J 小鼠或者 CX3CRI-GFP 转基因小鼠, Wistar 大鼠 Male C57BL/6J mice or CX3CRI-GFP transgenic mice, wister rat	1. 向颈内动脉注射胆固醇晶体; 2. 使用聚乙烯导管向颈内动脉注射微球; 3. 向颈内动脉注射不同尺寸的血栓 1. Inject cholesterol crystals into the ICA; 2. Microspheres were injected into the ICA using a polyethylene catheter; 3. Inject different sizes of blood clots into the ICA	皮质、纹状体、海马体和皮质下组织、丘脑 Cortex, striatum、hippocampal、subcortical tissue, thalamus	小胶质细胞、巨噬细胞和星形胶质细胞活化 Activation of microglia, macrophages and astrocytes	[46-49]
高同型半胱氨酸血症模型 HHcy model	WT 和 APP/PS1 小鼠 WT and APP/PS1 mice	饮食诱导 Dietary induction	额叶皮层和海马体 Frontal and hippocampal	淀粉样蛋白减少 Decreased amyloid protein	[52-53]
2 型糖尿病模型 T2DM model	db/AD 小鼠 db/AD mice	基因敲除后重编辑 Reedit after gene knockout	皮质 Cortex	β-淀粉样蛋白无变化 There was no change in Aβ	[55]
自发性高血压模型 SHR/SP model	SHR/SP 大鼠 SHR/SP rat	近交系操作 Inbred line operation	皮质 Cortex	白质损伤 White matter injury	[57-59]
常染色体显性遗传性脑动脉病伴皮质下梗死和白质脑病模型 CADASIL model	TgPAC-Notch3R169C 小鼠 TgPAC-Notch3R169C mice	基因操作 Gene manipulation	胼胝体、纹状体、内囊和海马体 Callosum, corpus striatum, endocystand hippocampal	白质损伤 White matter injury	[61]
脑淀粉样血管病模型 CAA model	APPDutch 小鼠和 Tg-SwDI 转基因小鼠 APPDutch mice and Tg-SwDI transgenic mice	基因操作 Gene manipulation	额颞叶皮层 Frontotemporal cortex	星形胶质细胞和活化小胶质细胞活化 Activation of astrocytes and activated microglia	[63]

表 2 非手术动物模型的优缺点比较

Table 2 Comparison of advantages and disadvantages of non-surgical animal models

模型 Models	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
微栓塞模型 Microembolization model	对小鼠的创伤性小,精准调控 VCI 的病程 It is less traumatic to mice and precisely regulates the course of VCI	无法准确控制脑缺血时间 Cerebral ischemia time cannot be accurately controlled
高同型半胱氨酸血症模型 HHcy model	造模方法可重复性高,可人为控制血液中同型半胱氨酸的水平 Modeling method is reproducible and can artificially control the level of homocysteine in the blood	模型耗时长,实验结果不一致 Model takes a long time and the experimental results are inconsistent
2 型糖尿病模型 T2DM model	模型操作步骤简便 Model is easy to operate	构模过程复杂,周期长,实验成本高 Molding process is complicated, period is long and the experiment cost is high
自发性高血压模型 SHR/SP model	可调控性强 Strong controllability	对肾和大脑产生损害 Damage to the kidneys and brain
常染色体显性遗传性脑动脉病伴皮质下梗死和白质脑病模型 CADASIL model	可人为控制基因表达人为研究常染色体显性遗传性脑动脉病伴皮质下梗死和白质脑病的发病机制提供理想的临床前模型 CADASIL can be artificially controlled gene expression and artificially studied and the pathogenesis provides an ideal preclinical model	基因表达量的控制可能出现偏差 Control of gene expression may be biased
脑淀粉样血管病模型 CAA model	忠实的模拟人类微血管 CAA 相关的认知障碍,为疾病的治疗提供新的潜在靶点 Faithful simulation of human microvascular CAA-related cognitive impairment provides new potential targets for the treatment of the disease	实验周期长,成本负担重 Experiment period is long, the cost burden is heavy

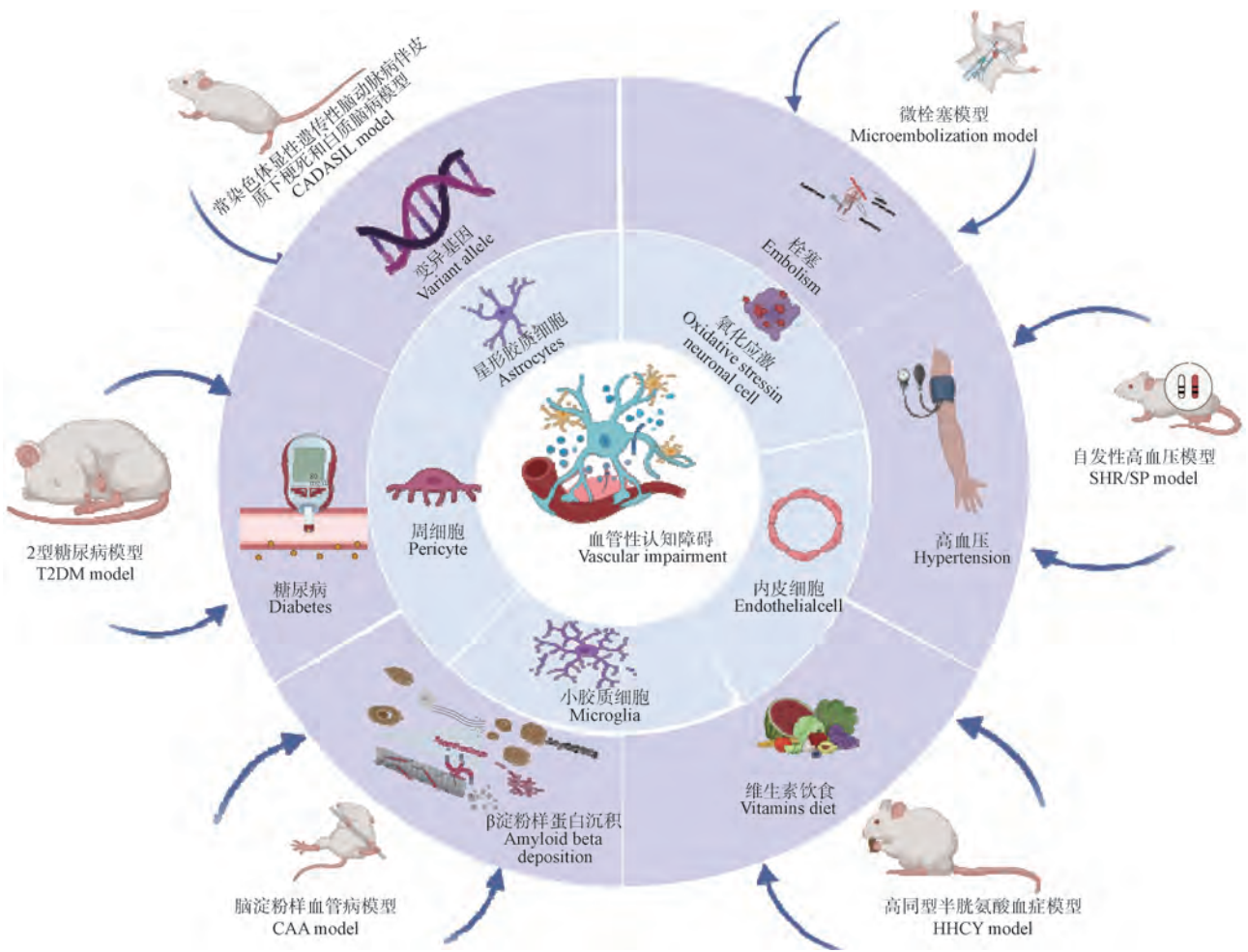


图 1 非手术动物模型图

Figure 1 Diagram of non-surgical animal model

影响的大脑区域是皮质、纹状体、海马和皮质下组织,导致小胶质细胞、巨噬细胞和星形胶质细胞活化。神经元损伤、死亡和胶质增生通常在卒中 28 d 后随时间持续增加^[47]。

(2)微球诱导的微栓塞模型

造模方式:MIYAKE 等^[48]通过使用聚乙烯导管(尺寸 3F,直径 1.0 mm)将悬浮在 20%葡聚糖溶液中的 700 ~ 900 个直径为 48 ~ 50 微球注射到右 ICA 中。

模型机制:可以在大鼠大脑的皮层、纹状体和海马体中诱导多发性梗死。在大脑缺血侧观察到 CBF 的持续降低,神经元损伤以及能量和神经递质代谢受损。这些缺血性损伤导致认知障碍。在血管内栓塞后约一周的水迷宫测试中观察到较长的逃逸潜伏期,表明空间学习障碍和主动、被动回避表现不佳。

(3)血栓诱导的微栓塞模型

造模方式:将不同尺寸的栓子(150 ~ 178 μm 、74 ~ 124 μm 和 48 ~ 74 μm)注射到小鼠 ICA 中以产生血栓栓塞性梗死。用生理盐水稀释 0.3 mL 3% 栓子(凝块)混悬液,然后注入 ICA。从 Wistar 大鼠的股动脉取规定量的血液,然后以 4000 r/min 离心 10 min,形成凝块。弃去血清,将剩余血液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中储存 72 h,形成凝块。在手术前 36 h 采血,以防止死亡^[47]。

模型机制:血栓诱导的梗死主要发生在大脑皮层、海马、丘脑和纹状体区域。有研究报告称,神经功能缺损的情况与栓子直径密切相关^[49],这为研究者提供了重要参考价值,可根据需要选择合适大小的栓子来构建皮质下缺血和血管性痴呆的动物模型。

3.1.2 模型特点

该模型的制作方式比较成熟,对小鼠的创伤性较小,可以确保小鼠的存活率。通过调节栓塞物质

的种类、大小、数量及注射方式等参数,以精准控制栓塞的程度和范围,从而对 VCI 的病程可以精准调控。动物模型的不同及栓塞物质的种类、大小等不同对该模型的疾病影响程度不同。该模型无法准确控制脑缺血时间,因此梗死体积不稳定,这使得病情程度无法预测。

3.2 HHcy 模型

HHcy 是公认的可独立导致心脑血管疾病的危险因素。同型半胱氨酸是一种非蛋白质形成氨基酸,参与蛋氨酸和半胱氨酸的产生^[50]。亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylene tetraphilic folate reductase, MTHFR) 或胱硫氨酸 β 合酶 (cystathione beta synthase, CBS) 基因的突变或维生素 B₆, B₉ 和 B₁₂ 水平低可导致血浆同型半胱氨酸水平升高,称为 HHcy。有研究发现,血清同型半胱氨酸水平与痴呆患者的认知功能呈负相关,并且血管性认知障碍和痴呆 (vascular cognitive impairment and dementia, VCID) 患者的水平升高比 AD 患者更常见。虽然研究表明同型半胱氨酸水平与海马萎缩、白质病变和腔隙性梗死之间存在关联,但同型半胱氨酸诱导的损伤机制仍然未知^[51]。

3.2.1 造模方式与机制

造模方式:SUDDUTH 等^[52]在实验中发现,通过给 6 ~ 12 月龄的 WT 和 APP/PS1 小鼠喂富含维生素 B₆, B₁₂ 和 B₉ 的饮食,并补充蛋氨酸 3 ~ 6 个月来诱导 HHcy。这种饮食通过 1-碳代谢途径产生 HHcy,而分解成半胱氨酸的程度极少。当喂食这种饮食时,6 ~ 12 个月大 WT 和 APP/PS1 小鼠中都表现出血浆同型半胱氨酸水平的显著升高。

模型机制:在 HHcy 小鼠模型中,星形胶质细胞在 72 h 内钾通道和水通道蛋白 4 的数量会逐渐减少,并在这个时间点达到最低。小胶质细胞在 48 h 会先出现促炎标志物的上升,但随后到 72 h 时,抗炎标志物的数量会增加。内皮细胞在 72 h 时紧密连接蛋白 5 抗体 (claudin-5, claudin-5) 的含量会上升,但在 48 h 时闭塞蛋白的数量会减少,且在该模型中发现,大脑神经元的两个钾通道糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3 β) 和蛋白磷酸酶 2 (protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme, PPP2CA) 增加,以及抗炎标志物增加^[53]。

3.2.2 模型特点

由于 HHcy 是心血管疾病、脑血管病和认知障

碍的独立危险因素,因此该模型构建更贴近人体病理生理过程,有助于研究 VCI 的发病机制。对于模型构建方面,可以通过调控该模型动物的饮食,来人为的控制血液中同型半胱氨酸的水平,从而研究不同程度的 HHcy 对认知功能的影响。此外,该模型的造模方法相对稳定,只要严格控制实验条件,就可以得到较为一致的实验结果,具有良好的可重复性。但由于需要长期调整模型动物的饮食,以达到稳定的 HHcy 状态,因此造模过程耗时较长。并且动物的体重、饮食量的不同对 HHcy 的敏感性和反应程度可能存在差异,这可能会导致实验结果的不一致性。

3.3 T2DM 小鼠模型

T2DM 主要表现为胰岛素抵抗和 β 细胞功能受损,这两种因素相互作用导致高血糖。此外,T2DM 还常伴有血脂异常和高血压病等并发症,这些因素对全身多个器官系统都具有不良影响。大量证据表明糖尿病容易引发并加速认知功能障碍^[54],而 T2DM 目前被认为是轻度认知功能障碍 (mild cognitive impairment, MCI) 和 AD 的独立危险因素。但其具体的致病原因尚不清楚,有研究显示,T2DM 与一系列可能导致认知功能受损的病理过程紧密相关,包括内皮功能下降、白质病变、CBF 减少、脑萎缩、脑梗死以及神经传导速度减慢等。研究还发现,高糖高脂饮食/糖尿病会导致海马体齿状回神经元密度减少,该区域对于成年后的神经再生至关重要。因此,该区域神经的减少可能是引发认知功能障碍的关键因素之一。

3.3.1 造模方式与机制

(1)造模方式:NIEDOWICZ 等^[55]创建了一个结合 T2DM 和 AD 特征的小鼠模型,这种模型是将糖尿病小鼠模型与 APPDNL/DNL9PS1P264L/P264L 基因敲除的痴呆模型进行杂交。这种 db/AD 小鼠既保留了亲本系的特性,例如严重的肥胖、糖尿病和 A β 的沉积,并出现了其他的病理学改变,如更严重的脑血管病变,包括动脉瘤和小中风。

(2)模型机制:尽管整体早老素 (presenilin, PS) 表达水平升高,但糖尿病小鼠的皮质 A β 沉积并没有显著增加,A β 也没有在脉管系统中沉积或被清除到血浆中。与同龄的 db/db 或 APP/PS1 小鼠相比,db/AD 小鼠在表现出更严重的认知障碍。这些结果提示,小鼠的糖尿病和(或)肥胖可能导致血管系统的不稳定,进而引发认知障碍,而这种障碍可

能与 A β 无关。

3.3.2 模型特点

该方法操作步骤简便,造模后小鼠未出现运动障碍。通过模拟糖尿病发病机制,导致小鼠出现血管样病变,但与临床 VCI 多因素发病不尽相同。该模型的构建过程复杂、周期较长、实验成本较高。

3.4 SHR/SP 模型

高血压是 VCI 的主要原因之一,可使 VCI 患者出现腔隙性脑卒中和白质高信号 (whitematter hyperintensities, WMH)。有研究表明,高血压会引起脑血流量减少、管腔狭窄,血管内皮细胞受损,进而导致小血管疾病 (small vessel disease, SVD), 导致白质、皮质和海马体进行性损伤^[56]。

3.4.1 造模方式与机制

(1)造模方式:YAMORI^[57] 及其团队在日本对 WKY 大鼠进行遗传改造后得到了自发性脑卒中大鼠模型 (SHR/SP) 品系。此种模型大鼠在 12 周龄后发展为重度高血压,即收缩压通常约 200 mmHg,在脑缺氧的情况下,发现 5 月龄大鼠的脑部血流量在额区减少,平均约 36 周龄即出现脑梗塞或 ICH。

(2)模型机制:大脑白质损伤情况在 SHR/SP 大鼠模型中与 VCI 患者在 MRI 上几乎一致^[58]。SHR/SP 大鼠的深部白质损伤和皮质下缺血性血管病 (SIVD) 型 VCI 患者相似。在不控制饮食的情况下,SHR/SP 大鼠将在 4 ~ 5 月龄开始显示白质变化,并在 9 月龄时发生梗死和出血。当这些大鼠年龄增长到 52 ~ 64 周时,它们会出现脑梗死并有出血倾向,导致死亡。通过高盐、低蛋白饮食,这些大鼠的寿命可能会进一步缩短至 4 个月。

3.4.2 模型特点

YAMORI 等^[59] 发现,SHR/SP 模型的血管易脆性较 WKY 大,根据研究目的的不同,可以对 SHR/SP 模型进行各种修饰,可调控性强,而且该模型通过饮食控制可以缩短实验时间。此外,为研究白质损伤情况,可以通过延迟异常饮食喂养,使高血压完全发展,从而研究白质改变,且降低中风的发生率。由于高血压会对肾引起损害,因此该模型中,改变后的饮食会造成肾和大脑的严重损害,这使得模型与人类的差异性越大,对高血压引起 VCI 的发病机理、机制的研究带来困难。

3.5 CADASIL 模型

CADASIL 是由一种位于 19 号染色体上的 Notch3 基因突变引起的遗传性小血管病,而 Notch3

蛋白是哺乳动物体内存在的 4 种 Notch 蛋白之一,在组织中调控细胞的各种活动^[60]。CADASIL 的特征是颗粒状亲渗物质 (granular osmophilic substance, GOM) 在中小动脉中积聚以及血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 的丢失。CADASIL 患者从成年早期开始出现皮质下腔隙性进行性的 WML,最终导致认知能力下降和皮层下梗死复发。因此,CADASIL 是卒中和血管性痴呆的最常见遗传原因。

3.5.1 造模方式与机制

(1)造模方式:WALLAYS 等^[61] 报道了一种新的敲入 R169C 小鼠模型,通过引入内源性 Notch3 突变,产生了约 20 个月大的 CADASIL 临床表型。研究发现,CADASIL 临床前小鼠模型 TgPAC-Notch3R169C 小鼠随着年龄的增长出现进行性和节段性白质病变。通过将引起 CADASIL 的 Notch3 突变引入大型 p1 衍生的人工染色体 (artificial chromosome, AC), 可以创建新的 CADASIL 小鼠模型。

(2)模型机制:突变体 Notch3 过表达 4 倍的转基因小鼠模型可以再现 CADASIL 的主要病理特征,如 Notch3 细胞外结构域聚集和 GOM 沉积在脑血管中(5 月龄),脑血流量减少(约 11 ~ 12 月龄),在 18 ~ 20 个月大的动物中,会在大脑的某些关键区域(如胼胝体、纹状体、内囊和海马体)显示出广泛的白质病变。

3.5.2 模型特点

CADASIL 转基因小鼠模型能够模拟人类 CADASIL 的有效病理征,包括白质病变、脑血流量、血管平滑肌细胞的变形、坏死以及 GOM 在中小动脉中积聚情况。此外,该模型可以通过人为的控制基因表达、培养环境等因素来研究 CADASIL 的发病机制,为研究 CADASIL 的发病机制提供理想的临床前模型。虽然 CADASIL 小鼠模型能够模拟人类 CADASIL 疾病的许多病理生理过程,但是在模型基因表达中,基因表达量的控制有时可能出现偏差,此外,由于小鼠和人类在生理、解剖和代谢等方面存在差异,因此不能够完全模拟人类疾病的所有方面。

3.6 CAA 模型

CAA 是一种常见的 SVD,是指 β -淀粉样原纤维沉积在脑动脉壁上^[62]。一般认为它是 ICH 的主要病因。近年来,CAA 也被认为是 VCI 和痴呆的重要

危险因素。除了出血性脑损伤外,CAA 还与广泛的缺血性组织损伤有关,包括白质高密度和微梗死。 $A\beta$ 在 CAA 中的沉积过程尚不完全清楚。早期的理论认为,CAA 中的 $A\beta$ 直接来源于血管壁的平滑肌细胞。最近的研究结果表明,CAA 中的 $A\beta$ 主要由神经元产生,然后由于 $A\beta$ 清除受损而沉积在血管壁上。

3.6.1 造模方式与机制

(1)造模方式:APPDutch 小鼠和 Tg-SwDI 转基因小鼠模型能够模拟这种特定疾病。研究报道^[63],APPDutch 小鼠是通过过表达 E693Q 突变的人类衰老淀粉样前体蛋白(aging of the amyloid precursor protein,APP)产生的,大约在 22 ~ 25 个月龄时,在小脑膜和皮质血管中开始形成血管淀粉样蛋白沉积,而雌性小鼠的病发病可能更早。与主要靶向脑实质的 APPwt 小鼠不同,APPDutch 小鼠的大脑中没有发现致密斑块,弥漫性脑实质斑块也很少发现。因此,E693Q 氨基酸取代使得 $A\beta$ 重新定向到脑血管壁上。而 Tg-SwDI 小鼠模型是另一种主要用于研究 CAA 的转基因小鼠模型。这些小鼠表达含有瑞典 K670N/M671L 和荷兰/爱荷华 E693Q/D694N 促血管突变的人类 APP。

(2)模型机制: $A\beta$ 的大脑微血管沉积主要在小鼠的丘脑和耻骨下被观察到。早在 3 月龄时,Tg-SwDI 小鼠的丘脑和丘脑下微血管中的淀粉样蛋白水平就高于前脑的其他部位。CAA 将在 3 月龄时进行首次观察,50% 的微血管在 12 月龄时受到影响,在 24 月龄时增加到 85% ~ 90%。与丘脑和耻骨下相比,Tg-SwDI 小鼠的额颞叶皮层血管只受到最小程度的影响。它们在 3 个月大时表现出空间学习和记忆能力受损,这与耻骨下微血管淀粉样蛋白的发育以及活性星形胶质细胞和活化小胶质细胞数量的显著增加是一致的。

3.6.2 模型特点

Tg-SwDI 小鼠主要在毛细血管中发生早发性 CAA,而大血管相对幸免。该模型表现出人类微血管 CAA 相关的认知障碍,并表现出强烈的神经炎症反应,并为与该病的发生和进展相关的神经炎症和血管周围应激的发病机制提供了新的实验见解,为该病症提供了新的潜在治疗靶点。APPDutch 小鼠模型的发病年龄相对较晚,会给带来了较长的实验周期和成本负担。而且小鼠性别不同对疾病的影响周期也不同,这对于疾病的研究带来较大负担。

此外,APPDutch 小鼠模型大脑中的致密、弥散性斑块观察甚少,这对 CAA 疾病的发病机制研究也带来一定困难。

简而言之,转基因小鼠模型如 APPDutch 和 Tg-SwDI 能够模拟特定模式,分别用于研究 $A\beta$ 和 CAA。然而,这些模型各有优缺点,需要根据研究目的选择合适的模型。此外,从神经元的淀粉样蛋白变化中剖析出 CAA 的作用,以解释神经退行性病变难度较大。因此,这些小鼠模型对没有淀粉样蛋白沉积的血管事件引发的 VCI 机制,仅提供了有限的见解。

4 总结与展望

目前,VCI 非手术动物模型主要通过药物干预、基因操作、或其他非侵入性手段来模拟 VCI 的病理过程,这些 VCI 的非手术动物模型各有优缺点,需针对实验需求选择合适的模型。非手术动物模型的建造有助于研究者对 VCI 的发病机理和分子机制进行更深入的认识,且这类模型通过调整动物的饮食、合并症等危险因素进行干预,有助于探索 VCI 的预防策略。虽然 VCI 非手术动物模型建造的研究有一定进展,但对 VCI 的确切病理机制、治疗用药等问题仍不十分明确,故仍需更多的相关研究和高质量、同质化的证据研究。

参 考 文 献(References)

- [1] GBD2016 Dementia Collaborators. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016 [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(1): 88–106.
- [2] JIA L, QUAN M, FU Y, et al. Dementia in China: epidemiology, clinical management, and research advances [J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(1): 81–92.
- [3] SCHAAPMEERDERS P, TULADHAR A M, ARNTZ R M, et al. Remote lower white matter integrity increases the risk of long-term cognitive impairment after ischemic stroke in young adults [J]. *Stroke*, 2016, 47(10): 2517–2525.
- [4] MIJALLOVIĆ M D, PAVLOVIĆ A, BRAININ M, et al. Post-stroke dementia-A comprehensive review [J]. *BMC Med*, 2017, 15(1): 11.
- [5] SKROBOT O A, O'BRIEN J, BLACK S, et al. The vascular impairment of cognition classification consensus study [J]. *Alzheimers Dement*, 2017, 13(6): 624–633.
- [6] MANDZIA J L, SMITH E E, HORTON M, et al. Imaging and baseline predictors of cognitive performance in minor ischemic stroke and patients with transient ischemic attack at 90 days [J]. *Stroke*, 2016, 47(3): 726–731.
- [7] CHOI B R, KIM D H, BACK D B, et al. Characterization of

- white matter injury in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Stroke*, 2016, 47(2): 542–547.
- [8] MOULIN S, LABREUCHE J, BOMBOIS S, et al. Dementia risk after spontaneous intracerebral haemorrhage: a prospective cohort study [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(8): 820–829.
- [9] YOU S, WANG X, LINDLEY R I, et al. Early cognitive impairment after intracerebral hemorrhage in the INTERACT1 study [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2017, 44(5/6): 320–324.
- [10] SU J, TONGZHOU T, GUO Q, et al. Memory deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a functional magnetic resonance imaging study [J]. *World Neurosurg*, 2018, 111: e500–e506.
- [11] SAHYOUNI R, GOSHTASBI K, MAHMOODI A, et al. Chronic subdural hematoma: a perspective on subdural membranes and dementia [J]. *World Neurosurg*, 2017, 108: 954–958.
- [12] O'BRIEN J T, ERKINJUNTTI T, REISBERG B, et al. Vascular cognitive impairment [J]. *Lancet Neurol*, 2003, 2(2): 89–98.
- [13] DICHGANS M, ZIETEMANN V. Prevention of vascular cognitive impairment [J]. *Stroke*, 2012, 43(11): 3137–3146.
- [14] PRICE B R, JOHNSON L A, NORRIS C M. Reactive astrocytes: the nexus of pathological and clinical hallmarks of Alzheimer's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 68: 101335.
- [15] PRICE B R, NORRIS C M, SOMPOL P, et al. An emerging role of astrocytes in vascular contributions to cognitive impairment and dementia [J]. *J Neurochem*, 2018, 144(5): 644–650.
- [16] WEEKMAN E M, WILCOCK D M. Matrix metalloproteinase in blood-brain barrier breakdown in dementia [J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 49(4): 893–903.
- [17] ARANTINI S, TRAN C H T, GORDON G R, et al. Impaired neurovascular coupling in aging and Alzheimer's disease: Contribution of astrocyte dysfunction and endothelial impairment to cognitive decline [J]. *Exp Gerontol*, 2017, 94: 52–58.
- [18] SHA S, TAN J, MIAO Y, et al. The role of autophagy in hypoxia-induced neuroinflammation [J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(6): 733–739.
- [19] SONG J, LI M, KANG N, et al. Baicalein ameliorates cognitive impairment of vascular dementia rats via suppressing neuroinflammation and regulating intestinal microbiota [J]. *Brain Res Bull*, 2024, 208: 110888.
- [20] YANG Y, ZHAO X, ZHU Z, et al. Vascular dementia: A microglia's perspective [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 81: 101734.
- [21] BLOCK M L, ZECCA L, HONG J S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(1): 57–69.
- [22] WEI J, SUN C, LIU C, et al. Effects of rat anti-mouse interleukin-6 receptor antibody on the recovery of cognitive function in stroke mice [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(2): 507–515.
- [23] WYTRYKOWSKA A, PROSBA-MACKIEWICZ M, NYKA W M. IL-1 β , TNF- α , and IL-6 levels in gingival fluid and serum of patients with ischemic stroke [J]. *J Oral Sci*, 2016, 58(4): 509–513.
- [24] DUKIC L, SIMUNDIC A M, MARTINIC-POPOVIC I, et al. The role of human kallikrein 6, clusterin and adiponectin as potential blood biomarkers of dementia [J]. *Clin Biochem*, 2016, 49(3): 213–218.
- [25] RAJEEV V, FANN D Y, DINH Q N, et al. Pathophysiology of blood brain barrier dysfunction during chronic cerebral hypoperfusion in vascular cognitive impairment [J]. *Theranostics*, 2022, 12(4): 1639–1658.
- [26] BENNETT S, GRANT M M, ALDRED S. Oxidative stress in vascular dementia and Alzheimer's disease: a common pathology [J]. *J Alzheimers Dis*, 2009, 17(2): 245–257.
- [27] GACKOWSKI D, ROZALSKI R, SIOMEK A, et al. Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia [J]. *J Neurol Sci*, 2008, 266(1/2): 57–62.
- [28] LIU D D, YUAN X, CHU S F, et al. CZ-7, a new derivative of Claulansine F, ameliorates 2VO-induced vascular dementia in rats through a Nrf2-mediated antioxidant responses [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(4): 425–440.
- [29] YAN Q, LIU S, SUN Y, et al. Targeting oxidative stress as a preventive and therapeutic approach for cardiovascular disease [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 519.
- [30] TÖNNIES E, TRUSHINA E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(4): 1105–1121.
- [31] YANG Y, ZHAO X, ZHU Z, et al. Vascular dementia: A microglia's perspective [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 81: 101734.
- [32] BOHANNON D G, LONG D, KIM W K. Understanding the heterogeneity of human pericyte subsets in blood-brain barrier homeostasis and neurological diseases [J]. *Cells*, 2021, 10(4): 890.
- [33] MÄE M A, HE L, NORDLING S, et al. Single-cell analysis of blood-brain barrier response to pericyte loss [J]. *Circ Res*, 2021, 128(4): e46–e62.
- [34] ORNELAS S, BERTHIAUME A A, BONNEY S K, et al. Three-dimensional ultrastructure of the brain pericyte-endothelial interface [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(9): 2185–2200.
- [35] BELTRAMO E, PORTA M. Pericyte loss in diabetic retinopathy: mechanisms and consequences [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(26): 3218–3225.
- [36] EDGERTON-FULTON M, ERGUL A. Vascular contributions to cognitive impairment/dementia in diabetes: role of endothelial cells and pericytes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 323(4): C1177–C1189.
- [37] WANG F, CAO Y, MA L, et al. Dysfunction of cerebrovascular endothelial cells: prelude to vascular dementia [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 376.
- [38] STEPHAN B C M, HARRISON S L, KEAGE H A D, et al.

- Cardiovascular disease, the nitric oxide pathway and risk of cognitive impairment and dementia [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2017, 19(9): 87.
- [39] REN C, LI N, LI S, et al. Limb ischemic conditioning improved cognitive deficits via ENOS-dependent augmentation of angiogenesis after chronic cerebral hypoperfusion in rats [J]. *Aging Dis*, 2018, 9(5): 869–879.
- [40] ZHANG L, ZHENG H, LUO J, et al. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase reverses the effect of exercise on improving cognitive function in hypertensive rats [J]. *Hypertens Res*, 2018, 41(6): 414–425.
- [41] MANUKHINA E B, PSHENNIKOVA M G, GORYACHEVA A V, et al. Role of nitric oxide in prevention of cognitive disorders in neurodegenerative brain injuries in rats [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2008, 146(4): 391–395.
- [42] BALEZ R, OOI L. Getting to NO Alzheimer's disease: neuroprotection versus neurotoxicity mediated by nitric oxide [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 3806157.
- [43] PULSINELLI W A, BRIERLEY J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3): 267–272.
- [44] 侯外方, 张茂森, 张琳, 等. 血管性认知障碍动物模型的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(4): 542–552.
- HOU W F, ZHANG M S, ZHANG L, et al. Research progress using animal models of vascular cognitive impairment [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(4): 542–552.
- [45] TUO Q Z, ZOU J J, LEI P. Rodent models of vascular cognitive impairment [J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(5): 1–12.
- [46] WANG M, ILIFF J J, LIAO Y, et al. Cognitive deficits and delayed neuronal loss in a mouse model of multiple microinfarcts [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(50): 17948–17960.
- [47] TIWARI N, UPADHYAY J, ANSARI M N, et al. Experimental rodent models of vascular dementia: a systematic review [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2021, 20(7): 657–672.
- [48] MIYAKE K, TAKAGI N, TAKEO S. Effects of naftidrofuryl oxalate on microsphere embolism-induced decrease in regional blood flow of rat brain [J]. *Br J Pharmacol*, 1994, 112(1): 226–230.
- [49] ZHANG H A, GAO M, CHEN B, et al. Evaluation of hippocampal injury and cognitive function induced by embolization in the rat brain [J]. *Anat Rec*, 2013, 296(8): 1207–1214.
- [50] KAUR B, SHARMA P K, CHATTERJEE B, et al. Defective quality control autophagy in hyperhomocysteinemia promotes ER stress and consequent neuronal apoptosis through proteotoxicity [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 258.
- [51] PRICE B R, WILCOCK D M, WEEKMAN E M. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for vascular contributions to cognitive impairment and dementia [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 350.
- [52] SUDDUTH T L, POWELL D K, SMITH C D, et al. Induction of hyperhomocysteinemia models vascular dementia by induction of cerebral microhemorrhages and neuroinflammation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(5): 708–715.
- [53] MAIUOLO J, GLIOZZI M, MUSOLINO V, et al. The “frail” brain blood barrier in neurodegenerative diseases: role of early disruption of endothelial cell-to-cell connections [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2693.
- [54] ZULOAGA K L, JOHNSON L A, ROESE N E, et al. High fat diet-induced diabetes in mice exacerbates cognitive deficit due to chronic hypoperfusion [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(7): 1257–1270.
- [55] NIEDOWICZ D M, REEVES V L, PLATT T L, et al. Obesity and diabetes cause cognitive dysfunction in the absence of accelerated β -amyloid deposition in a novel murine model of mixed or vascular dementia [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2014, 2: 64.
- [56] ZHANG Z, CHOPP M, ZHANG R L, et al. A mouse model of embolic focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(10): 1081–1088.
- [57] YAMORI Y. Overview: studies on spontaneous hypertension-development from animal models toward man [J]. *Clin Exp Hypertens A*, 1991, 13(5): 631–644.
- [58] YANG Y, KIMURA-OHBA S, THOMPSON J, et al. Rodent models of vascular cognitive impairment [J]. *Transl Stroke Res*, 2016, 7(5): 407–414.
- [59] YAMORI Y, HORIE R, HANDA H, et al. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans [J]. *Stroke*, 1976, 7(1): 46–53.
- [60] YUAN L, CHEN X, JANKOVIC J, et al. CADASIL: A NOTCH3-associated cerebral small vessel disease [J]. *J Adv Res*, 2024, 2: 1–8.
- [61] WALLAYS G, NUYENS D, SILASI-MANSAT R, et al. Notch3 Arg170Cys knock-in mice display pathologic and clinical features of the neurovascular disorder cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(12): 2881–2888.
- [62] SZIDONYA L, NICKERSON J P. Cerebral amyloid angiopathy [J]. *Radiol Clin North Am*, 2023, 61(3): 551–562.
- [63] HERZIG M C, WINKLER D T, BURGERMEISTER P, et al. Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis [J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7(9): 954–960.