

丛超, 顾祖曦, 吴盼晴, 等. 卵巢切除对 APP/PS1 小鼠认知功能和海马雌激素受体表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 1-9.

Cong C, Gu ZX, Wu PQ, et al. Effect of ovariectomy on cognitive function and hippocampal estrogen receptor expression in APP/PS1 mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.001

卵巢切除对 APP/PS1 小鼠认知功能和海马雌激素受体表达的影响

丛超, 顾祖曦, 吴盼晴, 陈思儒, 林光耀, 徐莲薇*

(上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

【摘要】 **目的** 本研究旨在观察阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 动物模型 APP/PS1 雌性小鼠卵巢切除 (ovariectomized, ovx) 术后海马组织中 A β 沉积和雌激素受体水平在不同月龄的变化规律。**方法** 将3月龄 APP/PS1 雌性小鼠分3组, 每组20只, 10只采用经腹手术切除双侧卵巢作为模型 (ovx) 组, 10只摘除相应部位的等体积脂肪作为对照 (sham) 组。分别饲养3个月、4个月、5个月作为6月龄组、7月龄组、8月龄组, 通过 Morris 水迷宫评价不同月龄 APP/PS1 小鼠认知功能, 透射电镜观察两组小鼠海马 CA1 区细胞内细胞器形态变化, 免疫荧光染色检测两组小鼠海马 CA1 区 A β 沉积, ELISA 检测两组小鼠血清雌激素、ROS、SOD、MDA 水平和含量, Western blot 测定 ER α 和 ER β 表达水平。**结果** 随着月龄的不断增加, 水迷宫测试中 ovx 组小鼠逃避潜伏期逐渐延长, 海马 CA1 区 A β 沉积增加、海马神经元线粒体肿胀增加, 胞浆内见大量脂褐素及淀粉样沉积; 血清雌二醇水平、SOD 活力下降, ROS 水平、MDA 含量增加, 海马组织 ER α 和 ER β 表达降低。**结论** 小鼠卵巢切除术后可能会加剧海马 A β 沉积, 其认知功能降低呈现年龄依赖性。

【关键词】 雌激素受体; 认知障碍; APP/PS1 小鼠; 海马; 阿尔茨海默病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0001-09

Effect of ovariectomy on cognitive function and hippocampal estrogen receptor expression in APP/PS1 mice

CONG Chao, GU Zuxi, WU Panqing, CHEN Siru, LIN Guangyao, XU Lianwei*

(Longhua Hospital Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** The present study aimed to observe the changes in A β deposition and estrogen receptor levels in the hippocampal tissue of female APP/PS1 mice with Alzheimer's disease (AD) after receiving an ovariectomy at different ages. **Methods** 3-month-old APP/PS1 female mice were divided into three groups, with 20 mice in each group. Ten mice were treated with bilateral ovarian resection via abdominal surgery as the model (ovx) group. The 10 mice in the control (sham) group underwent surgery in which an equivalent volume fat was removed from the corresponding area. After 3, 4, and 5 months, APP/PS1 mice were assigned to 6-, 7-, and 8-month age groups. The cognitive function of the APP/PS1 mice of different ages was evaluated using the Morris water maze. Morphological changes to intracellular organelles in

【基金项目】 国家自然科学基金 (82174427)。

【作者简介】 丛超 (1992—), 女, 博士, 医师, 研究方向: 中医药诊治女性生殖内分泌疾病研究工作。E-mail: congchaosunny@163.com

【通信作者】 徐莲薇 (1969—), 女, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中医药诊治女性生殖内分泌及不孕病。

E-mail: doctorsherryxlw@163.com

the CA1 area of the hippocampus of the two groups of mice were observed using transmission electron microscopy. Immunofluorescence staining was used to detect the deposition of A β in the CA1 area of the hippocampus of the two groups of mice. ELISA was used to detect the levels and contents of serum estrogen, ROS, SOD, and MDA, and Western blot was used to determine the expression levels of ER α and ER β . **Results** As the ovx group mice increased in age, their escape latency in the water maze test gradually lengthened, the deposition of A β in the hippocampal CA1 area increased, the mitochondrial swelling of hippocampal neurons increased, and larger amounts of lipofuscin and amyloid deposition were observed in the cytoplasm. Their serum E₂ levels and SOD activity decreased, while their ROS levels and MDA contents increased, and the expression of ER α and ER β in the hippocampal tissue decreased. **Conclusions** Ovariectomy in mice with low estrogen status may exacerbate hippocampal A β deposition and age-dependent cognitive decline.

[Keywords] estrogen receptor; cognitive impairment; APP/PS1 mice; hippocampus; Alzheimer's disease

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

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种老龄人口的神经退行性疾病,在女性绝经后发病率较高^[1]。有研究显示,女性约占 AD 患者的 70%,她们一生中患 AD 的风险比男性大,疾病进展率约为男性的 3 倍,认知障碍的范围也更广泛^[2-3]。这种性别差异的原因尚不清楚。有研究认为绝经后雌激素治疗,能改善认知功能^[4]。AD 主要病理特征为脑内神经细胞之间由 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 沉积形成的老年斑及神经细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化,造成神经元纤维缠结^[5-6],其中由 A β 蛋白异常聚集引起的构象变化及神经毒性在 AD 发生发展过程中起核心作用^[7-8]。为了探究卵巢切除 (ovariectomized, ovx) 后雌激素降低是否会对认知功能产生影响并促进 A β 的沉积,我们选择 APP/PS1 双转基因小鼠作为 AD 的动物模型,该模型可以较好地模拟细胞外 A β 沉积等 AD 的神经病理学特征^[9],是一种较理想的 AD 动物模型,与普通小鼠相比,这种小鼠脑内 6~8 月龄就出现学习记忆能力减退,12 月龄更加明显^[10]。

女性 AD 的发生与雌激素信号转导减少相关,雌激素与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 结合并激活下游转录机制^[11]。雌激素受体表达水平与行为学功能的关系,以及随着模型动物月龄的增加呈现出的变化规律,目前还未定论。本研究通过对 3 月龄 APP/PS1 雌性小鼠切除卵巢来模拟绝经后雌激素减退状态,通过比较不同时间节点的行为学差异,海马 CA1 区 A β 沉积及雌激素受体表达的水平,探究卵巢切除术对 APP/PS1 小鼠认知功能的影响,阐明 ER 在 AD 中的潜在作用,一方面为绝经后认知障碍的动物模型月龄选择提供依据,另一方面有助于更好地理解 AD 中观察到的性别差异,并为性别差异提供治疗策略参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 月龄 SPF 级 APP/PS1 雌性小鼠 60 只,体重 (20 \pm 2)g,购买于北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK(京)2019-0008], APP/PS1 小鼠均饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障设施 [SYXK(沪)2020-0009],洁净度为 5 级,环境温度 (23 \pm 3) $^{\circ}$ C,相对湿度 (50 \pm 10)%,换气次数每小时不低于 20 次,12 h/12 h 光暗循环。每笼动物 4 只,动物自由摄食饮水,每天定时清理鼠笼。本实验方案按照“3R”原则并获得上海中医药大学实验伦理委员会批准 (PZSHUTCM2302280003)。

1.2 主要试剂与仪器

一抗 ER α (Abcam, ab32063); 一抗 ER β (Invitrogen, PA1-311); GAPDH (美国 Cell Signaling Technology 公司); 过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (上海羿圣生物技术有限公司, 33101ES60); 小鼠雌二醇 ELISA 试剂盒 (HY03302E)、SOD ELISA 试剂盒 (HY03125E)、MDA ELISA 试剂盒 (HY03124E) 均购自上海恒远生物; ROS ELISA 试剂盒 (南京森贝伽生物科技有限公司, SBJ-R0799); 3% 硫黄素染液 (GDP1027)、山羊抗兔荧光二抗 (GB25303) 均购自武汉赛维尔生物技术有限公司; 多聚甲醛 (中国 Biosharp 生物技术有限公司, BL539A)。

荧光倒置显微镜 (Nikon, Ts2-FL); 透射电镜 (Thermo Scientific, Talos L120C); Western blot 电泳仪 (Mini Protein V3, Bio-Rad); Western blot 转膜仪 (Mini Trans Blot, Bio-Rad); 凝胶成像系统 (Chemscope 6300, 中国上海); Morris 水迷宫 (中国上海市欣软信息科技有限公司, XR-XM101)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠分组

60 只 APP/PS1 雌性小鼠分 3 组, 每组 20 只, 适应饲养 1 周后, 每组中 10 只采用经腹手术切除双侧卵巢作为模型组 (ovx 组), 另 10 只仅摘除相应部位的等体积脂肪作为对照组 (sham 组), 分别饲养 3 个月、4 个月、5 个月作为 6 月龄组、7 月龄组、8 月龄组。模型制备的时间流程图见图 1。

1.3.2 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫分别通过前 5 d 的定位航行实验和第 6 天的空间探索实验检测 2 组小鼠以空间为参考的学习记忆功能^[12]。第 1 天将小鼠从水迷宫第 1 象限内侧壁放入水中, 测试 60 s, 其找到逃生平台的时间即为此次逃避潜伏期, 若 60 s 内仍未找到, 则逃避潜伏期记为 60 s, 并引导其找到逃生平台, 休息、适应学习平台所在位置 15 s, 然后从第 3 象限放入, 步骤同前。第 2~5 天步骤同第 1 天, 共进行 5 d。第 6 天进行空间探索实验测试, 实验开始前, 去掉第 3 象限的逃生平台。每只小鼠均从第 1 象限放入, 测试 60 s, 通过记录比较其穿越平台的次数、平台象限运动路程百分比、平台象限运动时间百分比, 检测其空间学习记忆的提取能力。

1.3.3 免疫荧光检测 ovx 对 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区 A β 沉积的影响

将小鼠海马组织切片浸泡于多聚甲醛 10 min, 然后置于磷酸盐缓冲液中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。用 50% 乙醇配制 0.3% 硫磺素 T 溶液, 用滤纸过滤, 室温孵育 8 min。将玻片置于磷酸盐缓冲液中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片甩干后滴加 DAPI 染液, 室温避光孵育 10 min。最后, 用抗荧光淬灭封片剂封片。将制备好的

硫磺素 T 染色切片置于荧光显微镜下用 200 倍视野观察并采集图像^[13]。应用 Image J 软件分析每个视野中 A β 沉积量和沉积面积占比 (阳性总面积/统计总场总面积)。

1.3.4 海马组织 E₂ 水平、ROS 水平、MDA 含量、SOD 活力检测

取小鼠海马组织匀浆, 采用双抗体夹心 ELISA 法检测小鼠血清 E₂ 水平^[14]、采用硫代巴比妥酸法检测海马组织 MDA 含量, 黄嘌呤氧化法检测海马组织 SOD 活力^[15]。制备海马组织单细胞悬液, 使用二氯荧光素双乙酸盐 (DCFH-DA) 探针法检测细胞内活性氧水平^[16]。按照试剂盒说明书分别进行操作, 结束反应后, 酶标仪检测。

1.3.5 透射电镜观察海马神经元细胞形态

分离海马组织后, 立即将海马组织置于冰冷的 2.5% 戊二醛溶液中 2 h。将海马组织在 0.2 mol/L 二甲酰二甲酸缓冲液中洗涤 4 次, 并在 1% OsO₄ 中固定 2 h, 然后在分级丙酮步骤中脱水, 并嵌入树脂中。超薄切片用 2% 乙酸铀酰和柠檬酸铅双重染色, 并通过透射电镜进行观察拍照。

1.3.6 Western blot 检测海马组织 ER α 、ER β 表达

从海马组织中提取的蛋白质, 经电泳转膜后, 用 5% BSA 在室温下封闭 1 h, 与 ER α (1 : 1000) 和 ER β (1 : 1000) 在 4 °C 的温度下孵育过夜, 与辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的二抗 (山羊抗兔 IgG (1 : 10 000)) 孵育 1 h。用凝胶成像系统显影, 用 Image J 检测条带灰度值。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 21.0 统计软件分析。计量资料采用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。水迷宫各组小鼠的逃



图 1 APP/PS1 小鼠模型制备的时间流程图

Figure 1 Time flow chart for the preparation of APP/PS1 mouse model

避潜伏期符合正态分布且方差齐采用重复测量方差分析;各组小鼠穿越平台次数、平台运动路程百分比、平台运动时间百分比、A β 沉积面积组间对比采用双因素方差分析;雌激素水平、氧化应激指标、Western blot 数据符合正态性分布且方差齐采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

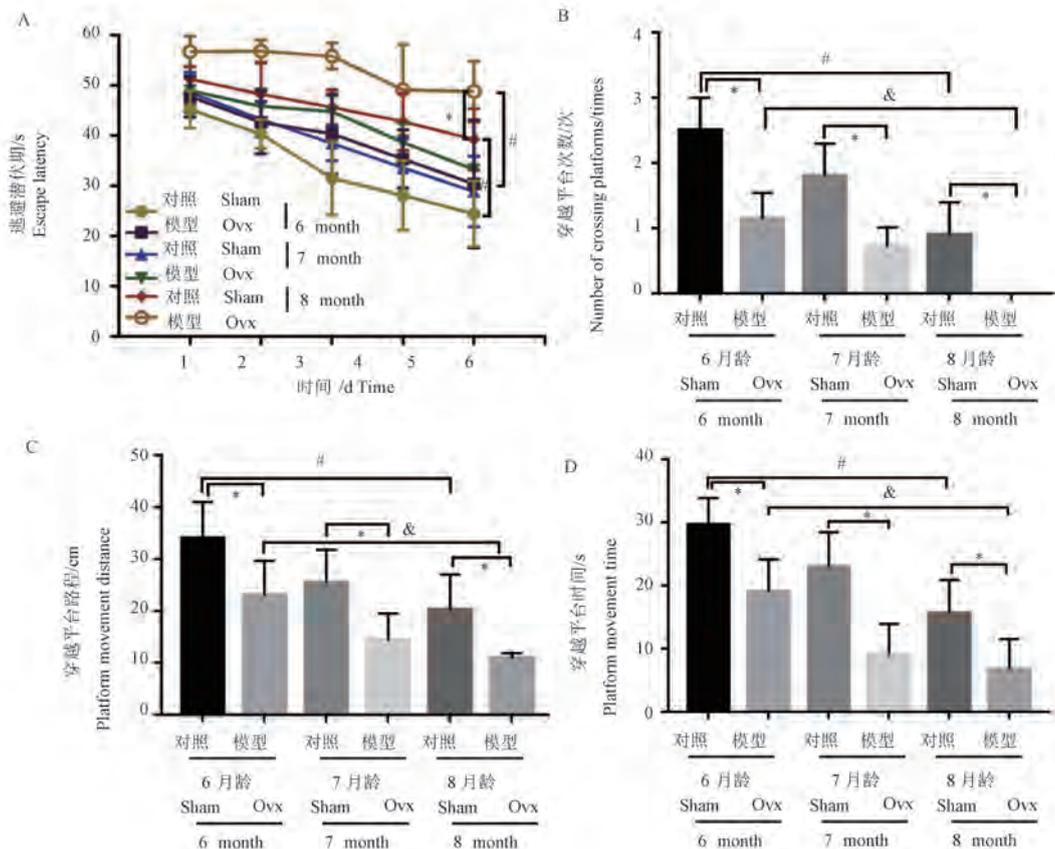
2.1 水迷宫实验

水迷宫测试用于评估学习和记忆功能,如图 2A 所示,随着月龄的增加,小鼠逃避潜伏期不断延长,同一月龄小鼠,与 sham 组比较,ovx 组逃避潜伏期仅有延长趋势,无统计学意义($P > 0.05$)。sham 组或 ovx 组中,与 6 月龄小鼠对比,8 月龄小鼠逃避潜伏期显著延长,差异有统计学意义($P < 0.05$);同一

月龄小鼠中,与 sham 组比较,6、7 月龄 ovx 组逃避潜伏期虽延长但无显著性差异($P > 0.05$),在 8 月龄时,与 sham 组相比,ovx 组逃避潜伏期延长,差异有统计学意义($P < 0.05$);在空间探索试验中(图 2B~2D),小鼠穿越平台次数、平台象限运动路程、平台象限运动时间比较上,同一月龄小鼠中,与 sham 组比较,ovx 组穿越平台次数、时间、路程均显著减少($P < 0.05$);sham 组和 ovx 组中,与 6 月龄小鼠对比,8 月龄小鼠穿越平台次数、平台象限运动路程、平台象限运动时间显著降低($P < 0.05$)。水迷宫实验证实,ovx 可加重小鼠空间记忆和记忆提取能力,小鼠认知功能在 6 月龄时已出现,随着月龄的增加,ovx 对小鼠空间记忆和提取能力的影响愈发显著。

2.2 免疫荧光法检测 ovx 对 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区 A β 沉积的影响

如图 3 所示,通过硫磺素免疫荧光染色我们观



注:与 sham 组相比,* $P < 0.05$;8 月龄与 sham 组 6 月龄相比,# $P < 0.05$;8 月龄与 ovx 组 6 月龄相比,& $P < 0.05$ 。

图 2 卵巢切除对不同月龄 APP/PS1 小鼠空间学习及空间记忆能力的影响

Note. Compared with the sham group, * $P < 0.05$. 8 months of age compared with the sham group at 6 months, # $P < 0.05$. 8 months of age compared with ovx group at 6 months, & $P < 0.05$.

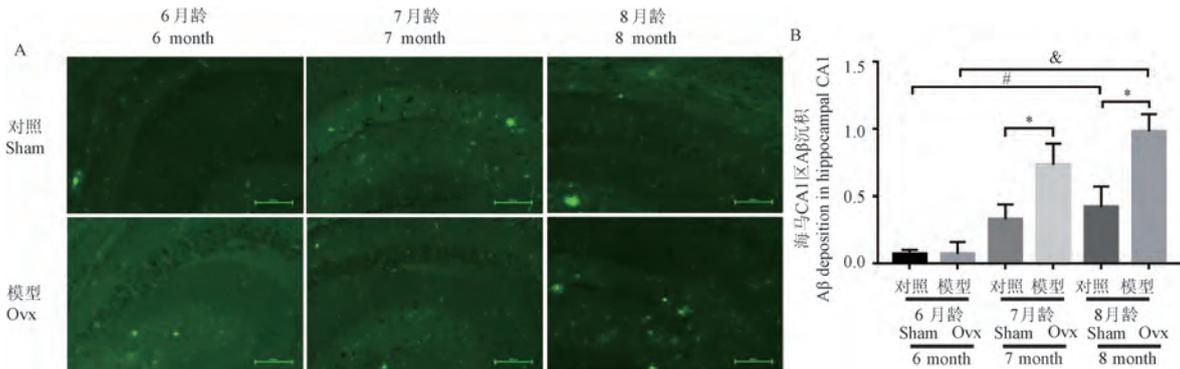
Figure 2 Effects of ovariectomy on spatial learning and memory in different months of APP/PS1 mice

察 ovx 手术对 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区 Aβ 斑块沉积的影响,随着月龄的增大,无论 sham 组还是 ovx 组,APP/PS1 小鼠海马 CA1 区 Aβ 斑块沉积数量均呈现增加趋势;sham 组中,与 6 月龄相比,7、8 月龄小鼠海马 CA1 区 Aβ 斑块沉积数量差异无统计学意义($P>0.05$);ovx 组中,与 6 月龄相比,7 月龄

小鼠海马 CA1 区 Aβ 斑块沉积数量差异无统计学意义($P>0.05$),8 月龄小鼠海马 CA1 区 Aβ 斑块沉积数量增加($P<0.05$)。

2.3 透射电镜观察 ovx 对 APP/PS1 小鼠海马神经元细胞内细胞器形态

如图 4 所示,在 6 月龄 sham 组小鼠海马神经元

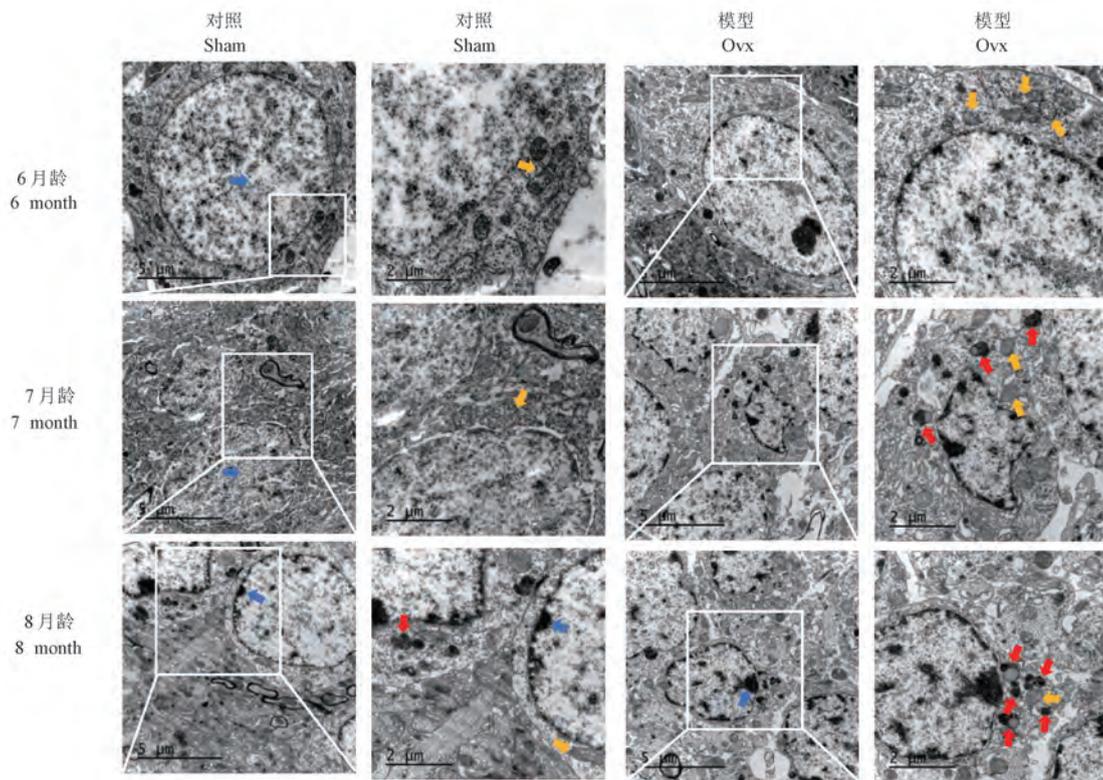


注:绿色荧光代表 Aβ 斑块沉积。同一月龄的 Aβ 沉积数量,与 sham 组相比, * $P<0.05$;8 月龄与 6 月龄 ovx 组相比, # $P<0.05$ 。

图 3 切除卵巢对不同月龄 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区 Aβ 表达的影响

Note. Green fluorescence represents Aβ deposition. The number of Aβ deposition at the same month of age, compared with the sham group, * $P<0.05$. 8 months of age compared with the ovx group at 6 months, # $P<0.05$.

Figure 3 Effect of ovariectomy on the expression of Aβ in different ages APP/PS1 mice hippocampal CA1 region



注:蓝色箭头:染色质;黄色箭头:线粒体;红色箭头:斑块。

图 4 透射电镜观察 ovx 对不同月龄 APP/PS1 小鼠海马神经元细胞形态的影响

Note. Blue arrow, Chromatin. Yellow arrow, Mitochondria. Red arrow, Plaque.

Figure 4 Transmission electron microscopy observation of the effect of different month old ovx on the morphology of hippocampal neurons in APP/PS1 mice

细胞染色质分布均匀,线粒体膜、嵴完整,未见异常斑块沉积;在 6 月龄 ovx 组小鼠发现染色质分布尚均匀,线粒体膜、嵴完整,胞浆内见少量脂褐素颗粒;在 7 月龄 sham 组小鼠海马神经元细胞见染色质分布均匀,线粒体轻微肿胀;在 7 月龄 ovx 小鼠组,染色质分布欠均匀,线粒体略微肿胀变形,胞浆内见脂褐素及淀粉样斑块沉积;在 8 月龄 sham 组小鼠海马神经元细胞中,染色质分布呈边集化,线粒体嵴模糊不清,胞浆内见少量淀粉样斑块沉积;在 8 月龄 ovx 小鼠中,染色质边集较多,线粒体肿胀,嵴消失,胞浆内见大量脂褐素及淀粉样沉积。

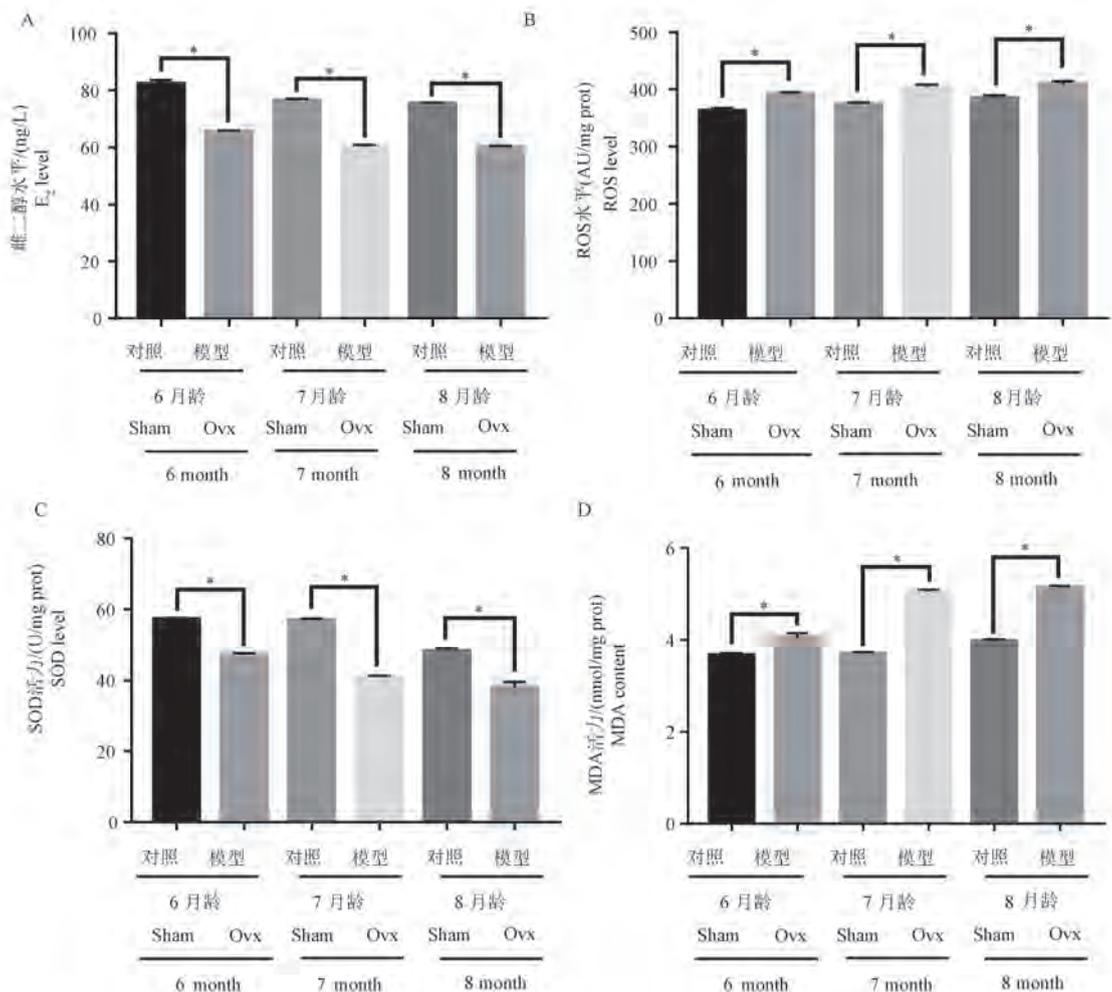
2.4 ovx 对不同月龄 APP/PS1 小鼠血清中 E₂ 水平、ROS 水平、SOD 活力、MDA 含量的影响

如图 5 所示,ELISA 法检测不同月龄血清中 E₂ (动情期)含量。统计结果显示 6、7、8 月龄 ovx 后与

sham 组比较 E₂ 水平显著降低($P < 0.05$),月龄与小鼠血清中 E₂ 水平成反比。海马组织 ROS 水平、MDA 含量是反应机体氧化应激状态的指标,SOD 活力是反应抗氧化能力的指标,对不同月龄小鼠的 sham 组与 ovx 组进行 MDA、ROS、SOD 对比分析,发现与 sham 组相比,ovx 组的 MDA 含量、ROS 水平显著增加($P < 0.05$),SOD 活力较 sham 组显著下降($P < 0.05$),表明 ovx 后 APP/PS1 小鼠血清雌激素减退,抗氧化能力降低。

2.5 Western blot 检测 ovx 对不同月龄 APP/PS1 小鼠海马组织 ER α 、ER β 表达水平的影响

如图 6 所示通过 Western blot 检测了 APP/PS1 小鼠海马组织中 ER α 、ER β 水平,从图中可以看出,6、7、8 月龄小鼠 ovx 后,海马组织中 ER α 、ER β 水平均有不同程度的下降,在 7、8 月龄 APP、PS1 小鼠海

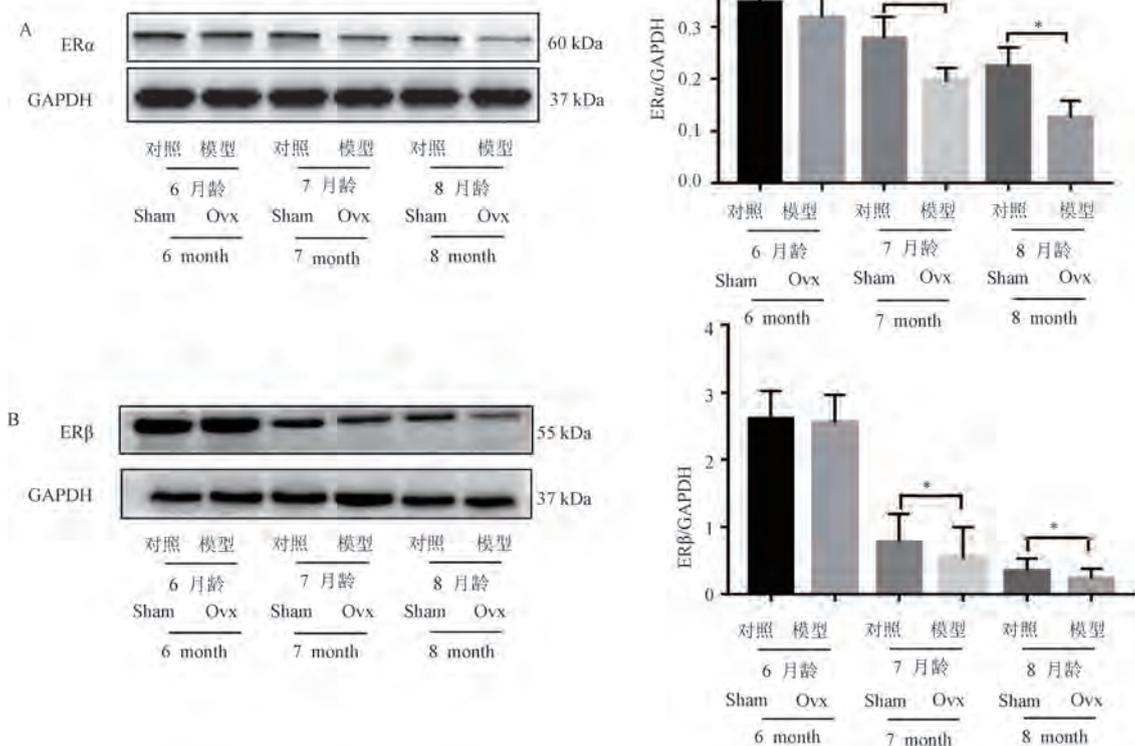


注:与 sham 组相比,* $P < 0.05$ 。

图 5 ovx 对不同月龄 APP/PS1 小鼠雌二醇水平、ROS 水平、SOD 活力、MDA 含量的影响

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

Figure 5 Effects of ovx on E₂ levels, ROS levels, SOD activity, and MDA content in different age of APP/PS1 mice



注:与 sham 组对比, * $P < 0.05$ 。

图 6 ovx 对不同月龄 APP/PS1 小鼠海马组织 ER α 和 ER β 水平的影响

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

Figure 6 Effect of ovx on ER α and ER β in hippocampal tissue of different ages APP/PS1 mice

马组织中, ER α 、ER β 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

绝经状态一直被认为是影响认知功能的重要因素,围绝经期前后女性发生认知功能障碍的病因尚不清楚,雌激素水平生理性降低通常与 AD 风险增加有关,大样本研究指出,在围绝经期使用激素替代治疗的女性可能会降低 AD 风险^[17]。在男性中,雌激素水平与 AD 风险无关^[18],因此,女性绝经过渡期与 AD 高风险密切相关^[19],这种性别差异除与女性平均寿命较长外,还与女性围绝经期雌激素水平降低有关,绝经后女性雌激素迅速降低增加了 AD 的易感性^[20]。事实上,对 40~60 岁女性人群的脑成像研究表明,与绝经前女性或年龄匹配的男性相比,围绝经期和绝经后女性的 AD 病理表现,特别是脑淀粉样蛋白 A β 沉积显著增加^[21]。

A β 的异常沉积是 AD 发病机制的关键环节^[22-24]。A β 级联假说首次提出,以 A β 为主要成

分的老年斑块细胞外沉积可能是 AD 发病机制的主要启动因素^[25]。研究表明,海马组织作为中枢神经系统最重要的组成部分之一,参与大脑信息存储和记忆等重要功能,在学习、记忆和情绪应激过程中发挥着不可替代的作用^[26]。在本研究中,为了证实卵巢切除对认知功能的影响,以及探索后续实验研究药物干预的时间,节约实验动物成本,故选择 3 月龄开始开始饲养,以期在 6~8 月龄中选取出现 A β 沉积和认知功能减退的最佳月龄和开始药物干预的时间。本研究水迷宫实验、硫磺素染色和透射电镜结果证实,随着小鼠年龄的增加,APP/PS1 小鼠的认知功能逐渐下降,A β 沉积增加。

有研究表明,雌激素可以改善认知功能和记忆力,降低 AD 的发病程度,并降低患 AD 的风险^[27-29]。有研究显示,雌激素可能通过降解 A β 、下调神经源性炎症来改善记忆力^[30]。雌激素受体与雌激素结合后,调节基因转录,从而在动物繁殖、生长发育、脑神经保护中发挥重要作用^[31-32]。ERs 有

ER α 和 ER β 两种亚型, ER α 主要在脑中胆碱样神经元中表达, 少量在海马组织中表达, 而 ER β 主要在大脑皮层和海马区表达^[33]。先前的研究发现, APP/PS1 小鼠的 ER α mRNA 和蛋白质以年龄依赖性的方式减少, HEK/APP 细胞中 ER α 过表达可减少 A β 的产生^[34]。然而, 在海马中发现了高水平的 ER β mRNA 表达, 这表明 ER β 可能是学习记忆的功能性受体^[35]。这与本研究结果一致。在本研究中, APP/PS1 小鼠通过切除卵巢模拟绝经后女性低雌激素环境状态, 随着月龄的增加, 海马中 ER α 和 ER β 逐渐减少。与 sham 组相比, ovx 加速了这些变化。本研究结果表明, 雌激素受体的表达与学习记忆密切相关, 并可能对 A β 的沉积产生影响。

随着海马区 A β 的不断沉积, 能够刺激神经细胞产生大量的 ROS^[36], 过量的 ROS 不能被及时清除, 进一步攻击生物膜脂质双分子层结构, 破坏细胞膜的结构和功能, 生成有害的 MDA^[37], MDA 是脂质氧化损伤的生物标志物, 而 SOD 是抗氧化物, 可清除过量的 ROS, 一旦活性降低, 抗氧化能力减弱, 不利于机体清除血液及脑组织中氧自由基, 加重血脑屏障损伤和神经退化, 最终导致神经元凋亡和坏死, 促进 AD 病情加重^[38]。本研究结果显示, APP/PS1 小鼠的 ROS 水平和 MDA 含量随着月龄的增加而增加, SOD 活力降低, 抗氧化损伤能力减弱, ovx 加重了这种变化。

本研究发现 APP/PS1 小鼠在 6 月龄时出现认知功能障碍, 8 月龄认知功能障碍和 A β 沉积更为明显, 卵巢切除加重了认知障碍的发生, 在 8 月龄时尤为显著, 因此, 本研究可指导在绝经后认知功能障碍研究中 APP/PS1 小鼠月龄的选择; 同时, 小鼠卵巢切除后的低雌激素状态可能会加剧海马 A β 沉积并导致 AD 的快速发展, APP/PS1 小鼠海马组织中雌激素受体表达降低与抗氧化能力水平降低、A β 水平升高, 其认知功能降低均呈现月龄依赖性。但是, 在 APP/PS1 转基因小鼠模型海马中, 雌激素受体水平的下调是否通过信号通路转导调控 AD 的发生发展, 仍需进一步的研究。

参考文献:

[1] MCCARTHY M, RAVAL A P. The peri-menopause in a woman's life: a systemic inflammatory phase that enables later neurodegenerative disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17 (1): 317.

[2] XIONG J, KANG S S, WANG Z, et al. FSH blockade improves

cognition in mice with Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2022, 603(7901): 470-476.

- [3] MARONGIU R. Accelerated ovarian failure as a unique model to study peri-menopause influence on Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 242.
- [4] SATO K, TAKAYAMA K I, INOUE S. Expression and function of estrogen receptors and estrogen-related receptors in the brain and their association with Alzheimer's disease [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1220150.
- [5] OSSENKOPPELE R, VAN DER KANT R, HANSSON O. Tau biomarkers in Alzheimer's disease: towards implementation in clinical practice and trials [J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(8): 726-734.
- [6] LIN T, TJERNBERG L O, SCHEDIN-WEISS S. Neuronal trafficking of the amyloid precursor protein-what do we really know? [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(7): 801.
- [7] JUCKER M, WALKER L C. Alzheimer's disease: From immunotherapy to immunoprevention [J]. *Cell*, 2023, 186 (20): 4260-4270.
- [8] SÖDERBERG L, JOHANNESSON M, NYGREN P, et al. Lecanemab, aducanumab, and gantenerumab—binding profiles to different forms of amyloid-beta might explain efficacy and side effects in clinical trials for Alzheimer's disease [J]. *Neurotherapeutics*, 2023, 20(1): 195-206.
- [9] SHEPHERD A, LIM J K H, WONG V H Y, et al. Progressive impairments in executive function in the APP/PS1 model of Alzheimer's disease as measured by translatable touchscreen testing [J]. *Neurobiol Aging*, 2021, 108: 58-71.
- [10] WEBSTER S J, BACHSTETTER A D, NELSON P T, et al. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models [J]. *Front Genet*, 2014, 5: 88.
- [11] UDDIN M S, RAHMAN M M, JAKARIA M, et al. Estrogen signaling in Alzheimer's disease: molecular insights and therapeutic targets for Alzheimer's dementia [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(6): 2654-2670.
- [12] MIFFLIN M A, WINSLOW W, SURENDRA L, et al. Sex differences in the IntelliCage and the Morris water maze in the APP/PS1 mouse model of amyloidosis [J]. *Neurobiol Aging*, 2021, 101: 130-140.
- [13] TAO R, WANG N, SHEN T, et al. High-fidelity imaging of amyloid-beta deposits with an ultrasensitive fluorescent probe facilitates the early diagnosis and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Theranostics*, 2022, 12(6): 2549-2559.
- [14] WALL E G, DESAI R, KHANT AUNG Z, et al. Unexpected plasma gonadal steroid and prolactin levels across the mouse estrous cycle [J]. *Endocrinology*, 2023, 164(6): bqad070.
- [15] CHEN J, CHEN Y H, LV H Y, et al. Effect of hyperbaric oxygen on lipid peroxidation and visual development in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain damage [J]. *Biomed Rep*, 2016, 5(1): 136-140.
- [16] LAL R, DHARAVATH R N, CHOPRA K. Alpha-lipoic acid

- ameliorates doxorubicin-induced cognitive impairments by modulating neuroinflammation and oxidative stress via NRF-2/HO-1 signaling pathway in the rat hippocampus [J]. *Neurochem Res*, 2023, 48(8): 2476–2489.
- [17] MISHRA P, DAVIES D A, ALBENSI B C. The interaction between NF- κ B and estrogen in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(3): 1515–1526.
- [18] PIKE C J. Sex and the development of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(1/2): 671–680.
- [19] MISHRA A, WANG Y, YIN F, et al. A tale of two systems: Lessons learned from female mid-life aging with implications for Alzheimer's prevention & treatment [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 74: 101542.
- [20] SOCHOCKA M, KARSKA J, PSZCZOŁOWSKA M, et al. Cognitive decline in early and premature menopause [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6566.
- [21] SCHEYER O, RAHMAN A, HRISTOV H, et al. Female sex and Alzheimer's risk; the menopause connection [J]. *J Prev Alzheimers Dis*, 2018, 5(4): 225–230.
- [22] ASHRAFIAN H, ZADEH E H, KHAN R H. Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 167: 382–394.
- [23] ZHANG Y, CHEN H, LI R, et al. Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 248.
- [24] SALLOWAY S, CHALKIAS S, BARKHOF F, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in 2 phase 3 studies evaluating aducanumab in patients with early alzheimer disease [J]. *JAMA Neurol*, 2022, 79(1): 13–21.
- [25] HUANG S Y, ZHANG Y R, GUO Y, et al. Glymphatic system dysfunction predicts amyloid deposition, neurodegeneration, and clinical progression in Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2024, 20(5): 3251–3269.
- [26] KIM T A, SYTY M D, WU K, et al. Adult hippocampal neurogenesis and its impairment in Alzheimer's disease [J]. *Zool Res*, 2022, 43(3): 481–496.
- [27] ZHAO W, HOU Y, SONG X, et al. Estrogen deficiency induces mitochondrial damage prior to emergence of cognitive deficits in a postmenopausal mouse model [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 713819.
- [28] TECALCO-CRUZ A C, LÓPEZ-CANOVAS L, AZUARA-LICEAGA E. Estrogen signaling via estrogen receptor alpha and its implications for neurodegeneration associated with Alzheimer's disease in aging women [J]. *Metab Brain Dis*, 2023, 38(3): 783–793.
- [29] MARBOUTI L, ZAHMATKESH M, RIAHI E, et al. GnRH protective effects against amyloid β -induced cognitive decline; a potential role of the 17 β -estradiol [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 518: 110985.
- [30] LAI Y J, ZHU B L, SUN F, et al. Estrogen receptor α promotes Cav1.2 ubiquitination and degradation in neuronal cells and in APP/PS1 mice [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(4): e12961.
- [31] MOORS T E, LI S, MCCAFFERY T D, et al. Increased palmitoylation improves estrogen receptor alpha-dependent hippocampal synaptic deficits in a mouse model of synucleinopathy [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(46): ead1454.
- [32] MAIOLI S, LEANDER K, NILSSON P, et al. Estrogen receptors and the aging brain [J]. *Essays Biochem*, 2021, 65(6): 913–925.
- [33] BORA S H, LIU Z, KECOJEVIC A, et al. Direct, complex effects of estrogens on basal forebrain cholinergic neurons [J]. *Exp Neurol*, 2005, 194(2): 506–522.
- [34] TANG Y, MIN Z, XIANG X J, et al. Estrogen-related receptor alpha is involved in Alzheimer's disease-like pathology [J]. *Exp Neurol*, 2018, 305: 89–96.
- [35] GU Y, ZHANG N, ZHU S, et al. Estradiol reduced 5-HT reuptake by downregulating the gene expression of Plasma Membrane Monoamine Transporter (PMAT, Slc29a4) through estrogen receptor β and the MAPK/ERK signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 924: 174939.
- [36] ZHANG H, SU Y, SUN Z, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates A β deposition by inhibiting NADPH oxidase 2 activation in APP/PS1 mice [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(6): 665–675.
- [37] JOMOVA K, VALKO M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease [J]. *Toxicology*, 2011, 283(2/3): 65–87.
- [38] BALENDRA V, SINGH S K. Therapeutic potential of astaxanthin and superoxide dismutase in Alzheimer's disease [J]. *Open Biol*, 2021, 11(6): 210013.

[收稿日期]2024-04-16

王寅峰,刘泽宇,殷晓阳,等. 基于嘌呤能受体 P2X7R 的痛风性关节炎病理研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 10-17.

Wang YF, Liu ZY, Yin XY, et al. Pathology of gouty arthritis based on purinergic receptor P2X7R [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 10-17.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.002

基于嘌呤能受体 P2X7R 的痛风性关节炎病理研究

王寅峰,刘泽宇,殷晓阳,鲁程锦,林志健*,张冰

(北京中医药大学中药学院,北京 102488)

【摘要】 **目的** 观察冰水泳浴对痛风大鼠模型病理变化的影响并探究其中 P2X7R 的调控机制。**方法** 雄性 SD 大鼠分为正常(NORM)组和实验组,实验组包括痛风对照(GC)组、冰水泳浴(IWS)组和亮蓝 G(BBG, P2X7R 拮抗剂)组。实验组大鼠通过尿酸酶抑制法联合 Coderre 法塑造高尿酸血症合并痛风性关节炎模型。冰水泳浴组大鼠在 Coderre 法造模后的 0 h 和 12 h,分别于深约 0.5 m 的冰水混合物中进行 5 min 的耐力游泳,BBG 组则在造模后立即腹腔注射 BBG 溶液 1 次。公式计算踝关节肿胀指数;尿酸酶法检测大鼠血清尿酸水平;ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量;HE 染色观察踝关节和滑膜组织的病理变化;Western blot 和免疫组化分别检测滑膜组织中 P2X7R 和 NLRP3 蛋白表达。**结果** 与正常组相比,实验组大鼠血清尿酸水平及踝关节肿胀指数均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且滑膜组织均存在不同程度的炎性浸润。与痛风对照组相比,冰水泳浴组踝关节肿胀指数在 12 h 显著升高($P<0.05$),血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量($P<0.01$)及滑膜组织中 P2X7R、NLRP3 蛋白量均有显著表达($P<0.05$);病理结果显示软骨表面破损,滑膜组织出现严重增生与糜烂,并伴有大量炎性细胞聚集。BBG 组大鼠滑膜组织的 P2X7R、NLRP3 蛋白表达与病理损伤较痛风对照组无显著变化($P>0.05$),而血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达均有显著改善($P<0.01$)。**结论** 冰水泳浴模拟的寒冷刺激和剧烈运动可加重痛风性关节炎的病理损伤,其机制可能与关节局部 P2X7R 的高表达有关。

【关键词】 尿酸;痛风性关节炎;嘌呤能受体 P2X7R;冰水泳浴;痛风模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0010-08

Pathology of gouty arthritis based on purinergic receptor P2X7R

WANG Yinfeng, LIU Zeyu, YIN Xiaoyang, LU Chengjin, LIN Zhijian*, ZHANG Bing

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of ice-water swimming on pathological changes in model gouty rats, and investigate the relevant regulatory mechanism of the purinergic P2X7R receptor. **Methods** Male Sprague Dawley rats were divided into normal(NORM) and experimental groups including gouty control(GC), ice-water swimming(IWS), and Brilliant Blue G (BBG, a P2X7R inhibitor) groups. Rats in the experimental groups were modeled to simulate hyperuricemia and gouty arthritis by inhibiting uric acid metabolism combined with the Coderre method. Rats in the ice-water swimming group were treated with 5 min of endurance swimming in an ice-water mixture at a depth of about 0.5 m for 0 h and 12 h after modeling by the Coderre method, while rats in the BBG group were injected intraperitoneally with BBG solution once after modeling. Ankle swelling index was calculated using a formula. Serum uric acid levels were detected by uricase assay, and serum levels of the inflammatory factors interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α

【基金项目】 国家自然科学基金(U20A200573);北京市自然科学基金(7212178)。

【作者简介】 王寅峰(1998—),男,硕士研究生,研究方向:中药防治代谢性疾病。E-mail:wangyinfeng24@163.com

【通信作者】 林志健(1983—),男,教授,博士,研究方向:中药防治代谢性疾病、中药药物警戒与安全合理用药。

E-mail:linzhijian@bucm.edu.cn

were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The pathological status of the ankle joints was examined by hematoxylin and eosin staining. P2X7R and NLRP3 protein expression levels in synovial tissue were detected by Western blot and immunohistochemistry, respectively. **Results** Serum uric acid levels and the ankle joint swelling index were significantly higher in the experimental groups compared with the normal group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the synovial tissues showed different degrees of inflammatory infiltration. The ankle swelling index was significantly higher in the ice-water swimming group compared with the gouty control group at 12 h ($P < 0.05$). Serum IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels ($P < 0.01$) and P2X7R and NLRP3 protein levels in synovial tissues were all significantly elevated ($P < 0.05$). Histopathology showed that the cartilage surface was broken and the synovial tissue showed severe hyperplasia and erosion, accompanied by numerous inflammatory cell aggregates. There were no significant changes in P2X7R or NLRP3 protein expression or pathology in synovial tissues in the BBG group compared with the gouty control group ($P > 0.05$), but serum IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels were all significantly suppressed ($P < 0.01$). **Conclusions** Cold stimulation and strenuous exercise simulated by ice-water swimming may exacerbate pathological damage in gouty arthritis via a mechanism related to high P2X7R expression in the joints.

[Keywords] uric acid; gouty arthritis; purinergic receptor P2X7R; ice-water swimming; gouty model

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

痛风性关节炎(gouty arthritis, GA)是由于机体尿酸水平升高,导致过饱和的尿酸盐晶体(monosodium urate, MSU)沉积于关节,并造成炎症反应的一类代谢性疾病,具有反复性、高发性和致残性的特点,严重降低患者生活质量^[1]。然而临床报道称,部分痛风性关节炎患者中并未发现高尿酸或 MSU 沉积的情况,亦有高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)或 MSU 沉积的患者从未发生痛风^[2-5]。由此可见,GA 发作可能存在独立于尿酸水平或 MSU 的调控因子。嘌呤能 2X7 受体(purinergic 2X7 receptor, P2X7R)是嘌呤能受体家族中由 ATP 激活的非选择性门控离子通道蛋白,在调控炎症和疼痛方面具有关键作用^[6-7]。在 GA 中,当大量 ATP 作用于 P2X7R 后会导致胞内 K⁺外流,引起细胞膜电位改变,该过程可活化 NLRP3 炎性小体,进而诱导并释放与 GA 相关的成熟 IL-1 β ^[8-10]。研究表明,寒冷状态下的适应性生热反应和剧烈运动期间的机械刺激均可造成机体 ATP 水平的波动,而释放到胞外的 ATP 会充当损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs)激活 P2X7R 参与自身免疫反应^[11],并且 P2X7R 的单核苷酸多态性被发现与痛风易感性之间存在密切关联^[12]。由此提示,机体 ATP 水平波动引起关节局部 P2X7R 的上调表达可能是诱导 GA 发作的重要环节。

本研究将从 GA 发作与尿酸水平或 MSU 沉积之间存在非直接相关的临床现象出发,通过冰水泳浴模拟寒冷刺激和剧烈运动对机体 ATP 水平的影响,探究嘌呤能受体 P2X7R 在痛风性关节炎病理变

化中的调控作用,为阐释 P2X7R 可能作为 GA 发作中的独立因子提供一定的科学依据,从而为防治该疾病提供可借鉴的干预靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠,SPF 级,6~8 周龄,体重(180 \pm 10)g,28 只,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010],实验动物质量合格证号:110324241100117713,饲养于北京中医药大学实验动物屏障系统[SYXK(京)2023-0011]。本实验由北京中医药大学动物伦理委员会批准(BCUM-2023120702-4244),同时按照 3R 原则给予实验动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

羧甲基纤维素钠(批号:M06IS206920)、氧嗪酸钾(批号:N03HS200134)购自上海源叶生物科技有限公司;酵母浸膏粉(批号:4414328-02)购自赛默飞世尔科技公司;亮蓝 G(Brilliant Blue G, BBG,批号:SHBM1064)、尿酸单钠盐(批号:BCBH7155V)购自美国 SIGMA 公司;大鼠 IL-1 β (货号:KT2923-A)、IL-6(货号:KT3066-A)、TNF- α (货号:KT3056-A)酶联免疫分析试剂盒购自江苏酶免实业有限公司;尿酸测定试剂盒(批号:221431)购自中生北控生物科技股份有限公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号:240003004)购自北京索莱宝科技有限公司;P2X7R 兔多克隆抗体(批号:5500014214)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;NLRP3 鼠单克隆抗体(批号:10040218)、 β -actin 鼠单克隆抗体(批号:

10027682)、Anti-Mouse IgG (H + L) (批号: 20000838)、Anti-Rabbit IgG (H + L) (批号: 20000768) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 封闭用羊血清 (批号: 242260328)、抗体稀释液 (批号: 23112302)、通用小鼠/兔二步法检测试剂盒 (批号: 2409A0128)、DAB 显色试剂盒 (批号: 240010323) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。DH5-3 型低速台式离心机, 北京时代北利离心机有限公司; H3-16KR 台式高速冷冻离心机, 湖南可成仪器设备有限公司; Reichert Histostat 石蜡组织切片机, 美国 AO 公司; Olympus BX53 显微镜, 日本奥林巴斯公司; Sunrise 酶标仪, 瑞士 TECAN 公司; DYY6D 型多用电泳仪、WD-9405C 脱色摇床, 北京六一仪器厂; MiniChemi500 全自动化学发光图像分析仪, 北京赛智创业科技有限公司; DHG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱, 北京鸿达天矩试验设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与造模

雄性 SD 大鼠随机分为正常 (NORM) 组和实验组, 其中实验组包括痛风对照 (GC) 组、冰水泳浴 (IWS) 组和亮蓝 G (BBG) 组, 每组各 7 只。实验组各组大鼠首先用氧嗪酸钾 1 g / (kg · d) 联合酵母浸膏 10 g / (kg · d) 连续灌胃 11 d 塑造 HUA 模型, 再于第 12 天采用 Coderre 法在两侧踝关节处注射 MSU 混悬液 (25 mg/mL, 每侧 0.15 mL) 以塑造痛风性关节炎模型。IWS 组大鼠在注射 MSU 后的 0 h 和 12 h 分别于深约 0.5 m 的冰水混合物中游泳 5 min; BBG 组大鼠则腹腔注射 BBG 溶液 (P2X7R 拮抗剂, 50 mg/kg, 6 mg/mL) 1 次, 不进行冰水游泳干预。NORM 组大鼠在造模期间正常饮食、水。Coderre 法造模 24 h 后麻醉各组大鼠并腹主动脉取血、取材。

1.3.2 尿酸酶法检测血清尿酸水平

经腹主动脉采血获得的血液在室温下静置 2 h, 3000 r/min 离心 10 min, 取上层血清分装后, 严格按照尿酸试剂盒说明书进行测定。

1.3.3 大鼠踝关节肿胀指数测量

使用 0.5 cm 宽度的纸条环绕踝关节部位 1 圈并测量其长度, 每只大鼠测量 3 次后取平均值作为踝关节周径。分别在造模前和造模后的 4 h、8 h、12 h、24 h 进行测量, 利用公式计算踝关节肿胀指数。

踝关节肿胀指数 =

$$\frac{\text{各时间点测量的踝关节周径} - \text{初始踝关节周径}}{\text{初始踝关节周径}} \times 100\%$$

1.3.4 ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达水平

严格按照 ELISA 试剂盒中的说明书对血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达水平进行检测。

1.3.5 苏木素-伊红 (HE) 染色观察大鼠踝关节组织病理形态

踝关节组织在 EDTA 溶液中脱钙至可被针尖无较大阻力穿刺, 随后进行脱水和石蜡包埋, 并切成 3 μ m 的组织切片。将切片脱蜡后进行 HE 染色并封片, 分别在 100 \times 和 400 \times 视野下观察踝关节腔和滑膜组织的病理形态。

1.3.6 Western blot 检测大鼠踝关节滑膜组织 P2X7R 蛋白表达

滑膜组织匀浆后在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 的条件下离心 10 min 后取蛋白上清, BCA 法测定蛋白浓度。各样品取一定体积的蛋白上清加入 5 \times 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸变性 10 min, 分装后于 -80 $^{\circ}$ C 储存备用。蛋白电泳条件为 80 V 电泳 30 min, 120 V 电泳 60 min; 电转条件为恒流 300 mA, 1.5 h。5% 脱脂奶封闭 1 h, 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗溶液过夜。洗膜后室温孵育二抗 1 h, 均匀淋洒 ECL 化学发光液并于成像系统中显影, 使用 Image J 1.53 t 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.3.7 免疫组织化学法检测大鼠踝关节滑膜组织的 NLRP3 蛋白表达

踝关节组织的石蜡切片进行脱蜡复水, 继以 0.125% 胰酶混合液修复, 阻断; 加 NLRP3 一抗 (1 : 200) 孵育过夜, 二抗孵育; DAB 染色, 苏木素复染, 最终脱水封片。每组选取 4 张切片, 各切片在 400 \times 视野下观察滑膜组织, 并取 4 个互不重叠的区域拍照, 使用 Image J 1.53 t 软件测定图像的阳性表达面积占比。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 23.0 软件分析数据, 数据结果均以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 若符合正态分布, 则多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时采用 LSD 法比较, 方差不齐时采用 Tamhane's T_2 法; 若不符合正态分布则采用非参数检验进行分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

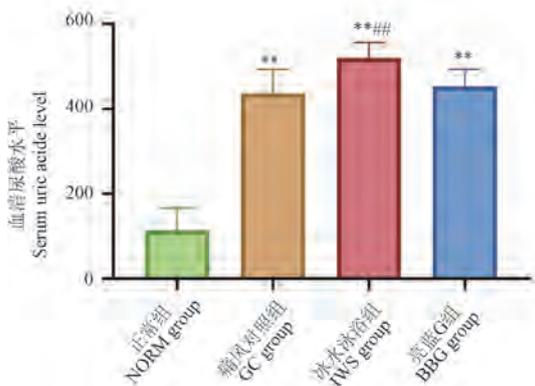
2.1 各组大鼠的血清尿酸水平比较

与 NORM 组相比, 实验组中各组大鼠的血清尿

酸水平均显著升高(均 $P < 0.01$),提示高尿酸血症模型塑造成功。与 GC 组相比,IWS 组大鼠的血清尿酸水平显著升高($P < 0.01$);BBG 组大鼠则无明显变化,如图 1。

2.2 各组大鼠的踝关节肿胀指数比较

与 NORM 组相比,实验组中各组大鼠的踝关节在 4 h 均出现明显肿胀($P < 0.05, P < 0.01$),提示 GA 模型塑造成功,并且在 12 h 达到肿胀高峰(均 $P <$



注:与正常组相比, ** $P < 0.01$;与痛风对照组相比,## $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠的血清尿酸水平

Note. Compared with NORM group, ** $P < 0.01$. Compared with GC group, ## $P < 0.01$.

Figure 1 Serum uric acid levels of rats in each group

0.01)。与 GC 组相比,IWS 组在各时间点的踝关节肿胀指数均有升高,并在 12 h 出现显著差异($P < 0.05$);BBG 组在各时间点均有下降,其差异不具有统计学意义($P > 0.05$),如图 2。

2.3 各组大鼠血清炎症因子表达水平检测

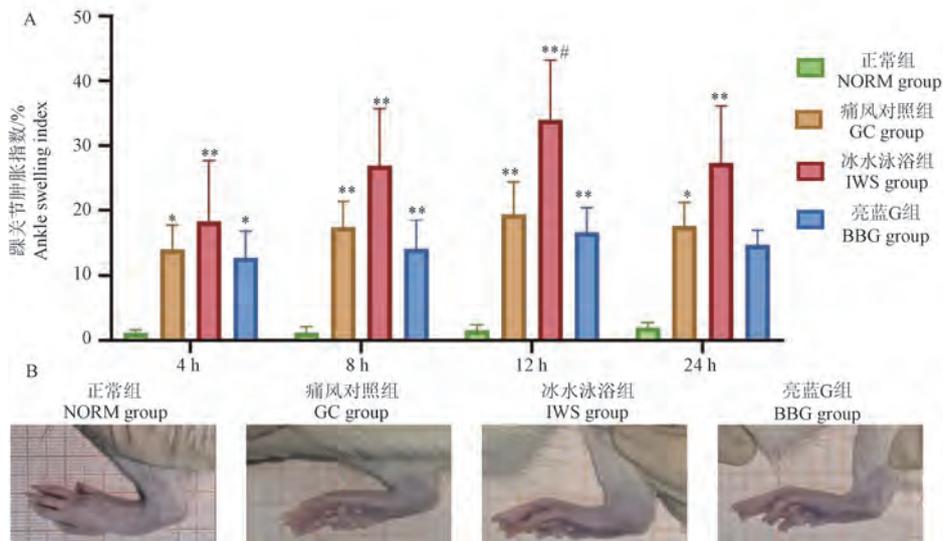
与 NORM 组相比,GC 组和 IWS 组的血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达水平均显著升高(均 $P < 0.01$),BBG 组则无明显变化($P > 0.05$);与 GC 组相比,IWS 组的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达水平仍有显著升高(均 $P < 0.01$),BBG 组则显著下降(均 $P < 0.01$),如图 3。

2.4 各组大鼠踝关节组织病理学观察

NORM 组大鼠踝关节腔未见滑膜增生,软骨表面形态完整,滑膜组织无炎性细胞浸润。GC 组踝关节腔可见滑膜增生,且滑膜组织出现炎性细胞浸润和少量纤维化。IWS 组踝关节腔间隙增大,出现严重的滑膜增生与糜烂,并可见大量炎性细胞浸润,同时软骨表面出现破损。BBG 组踝关节腔存在少量滑膜增生和炎性细胞浸润,软骨表面未见明显病变,如图 4。

2.5 各组大鼠滑膜组织中 P2X7R 与 NLRP3 蛋白表达水平比较

如图 5A、5B 中 P2X7R 的蛋白条带结果显示,与 NORM 组相比,实验组中各组大鼠滑膜组织的

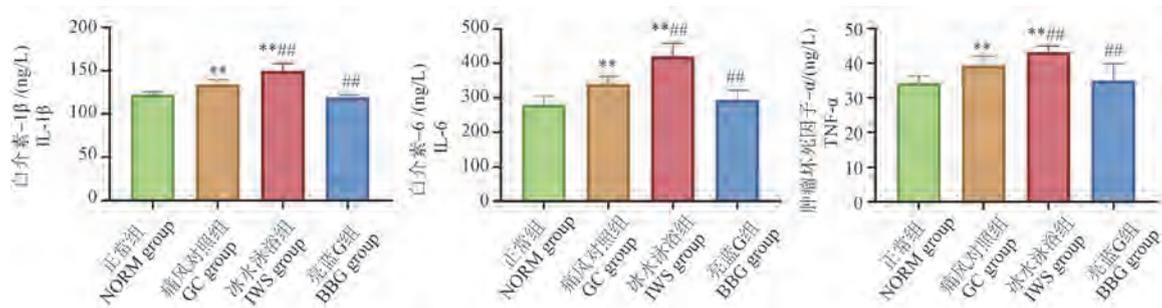


注:A:踝关节肿胀指数;B:12 h 踝关节肿胀情况观察。与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与痛风对照组相比,# $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠的踝关节肿胀指数

Note. A, Ankle swelling index. B, 12 h ankle swelling observation. Compared with NORM group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with GC group, # $P < 0.05$.

Figure 2 Ankle swelling index of rats in each group

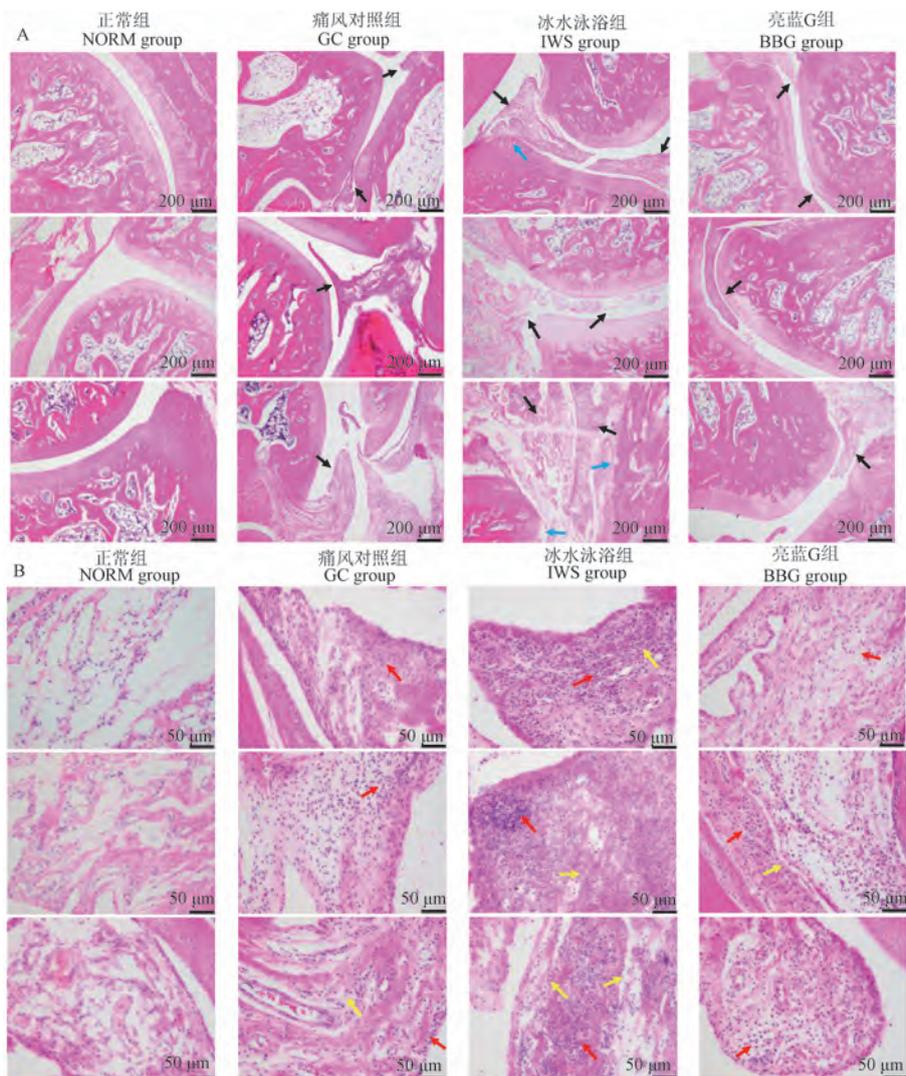


注:与正常组相比, ** $P < 0.01$;与痛风对照组相比,### $P < 0.01$ 。

图 3 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达水平比较

Note. Compared with NORM group, ** $P < 0.01$. Compared with GC group, ### $P < 0.01$.

Figure 3 Comparison of serum IL-1 β , IL-6 and TNF- α expression levels of rats in each group

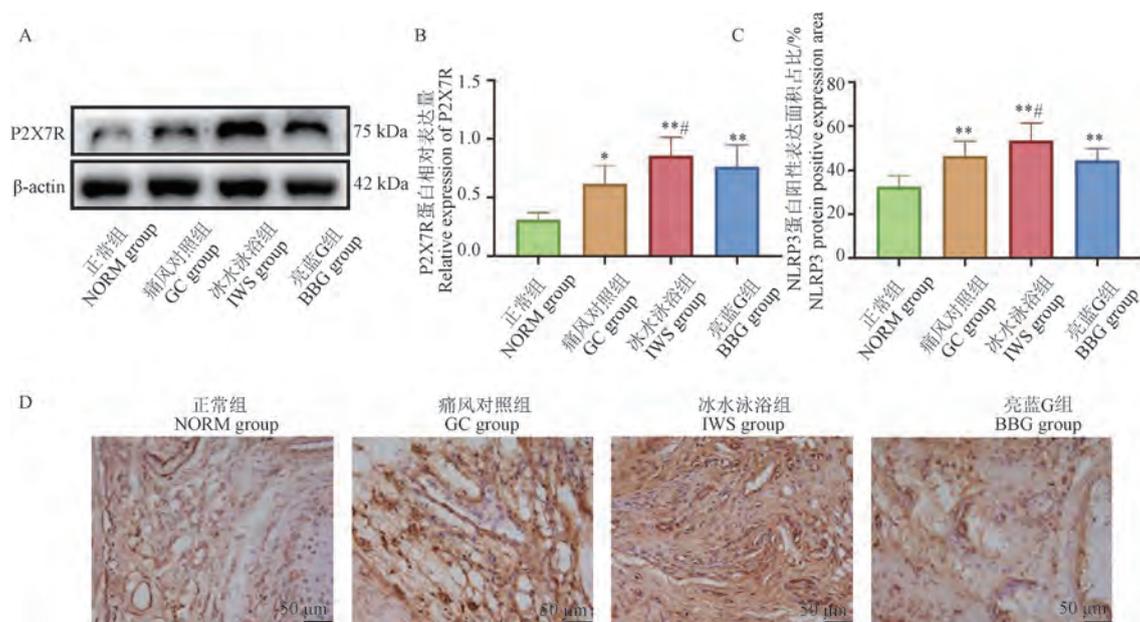


注:A:踝关节组织病理形态,黑色箭头为滑膜增生,蓝色箭头为软骨表面破损;B:滑膜组织病理形态,红色箭头为炎性细胞浸润,黄色箭头为滑膜组织纤维化。

图 4 各组大鼠踝关节的病理形态观察(HE, $n = 3$)

Note. A, Histopathological pattern of ankle joint. Black arrows are synovial hyperplasia, and blue arrows are cartilage surface breaks. B, Histopathological pattern of synovium. Red arrows are inflammatory cell infiltration, and yellow arrows are synovial tissue fibrosis.

Figure 4 Pathomorphological observations on the ankle joints of rats in each group (HE, $n = 3$)



注:A:Western blot 检测 P2X7R;B:P2X7R 蛋白相对表达量统计($n=4$);C:NLRP3 蛋白阳性表达面积占比统计($n=4$);D:免疫组化检测 NLRP3。与正常组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与痛风对照组相比,# $P<0.05$ 。

图5 大鼠踝关节滑膜组织中 P2X7R 和 NLRP3 蛋白表达情况

Note. A, Western blot for P2X7R. B, Relative expression of P2X7R protein ($n=4$). C, Percentage of NLRP3 protein positive expression area ($n=4$). D, IHC for NLRP3. Compared with NORM group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with GC group, # $P<0.05$.

Figure 5 P2X7R and NLRP3 protein expression of rat ankle synovial tissue

P2X7R 表达均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与 GC 组相比,IWS 组的 P2X7R 表达显著升高($P<0.05$);BBG 组大鼠的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

NLRP3 蛋白的阳性表达面积占比结果显示,与 NORM 组相比,实验组中各组大鼠的 NLRP3 表达均显著升高(均 $P<0.01$)。与 GC 组相比,IWS 组大鼠的 NLRP3 表达显著升高($P<0.05$);BBG 组大鼠无明显变化($P>0.05$),如图 5C、5D。

3 讨论

机体尿酸水平升高是引起 GA 发作的重要生化基础^[13],然而《中国高尿酸血症与痛风诊疗指南(2019)》表明 HUA 患者中只有约 10%~15% 会进展为痛风^[14]。有报道称,一名运动员完成长距离马拉松后,在血清尿酸正常的情况下出现第一跖趾关节的急性痛风炎症^[15];且冷诱导型 RNA 结合蛋白可在寒冷应激状态下被激活,进而增强尿酸诱导的痛风炎症^[16]。因此探究除尿酸水平或 MSU 沉积之外的 GA 诱发因素,对于防治该疾病具有一定的临床意义。研究发现,局部 ATP 水平波动可以激活免疫细胞中的 P2X7R/NLRP3 信号通路,从而释放 IL-1 β 引起痛风中的炎症级联反应^[8]。但目前关于

P2X7R 介导痛风炎症的相关研究主要以工具药激动或抑制其表达的方式开展,而较少从临床诱因切入探究^[17]。因此本实验基于前期工作和现有研究^[18-19],通过对模型大鼠施加冰水耐力游泳,进而观察 GA 病理变化并阐释其中 P2X7R 的调控作用。

研究结果显示,与 GC 组相比,冰水泳浴可明显加重模型大鼠的踝关节肿胀和炎症损伤,并且滑膜组织中 P2X7R 和 NLRP3 的蛋白表达均出现显著上调,这可能和关节处 ATP 大量产生后作用于 P2X7R,并与 MSU 发挥协同作用促进 NLRP3 高表达有关^[20];然而 BBG 组大鼠滑膜组织的病理损伤和蛋白表达并无明显改善,但外周血中的 IL-1 β 等促炎细胞因子水平得到显著抑制。推测该情况可能与血药浓度较低有关,即 24 h 内给药 1 次导致 BBG 无法充分分布于滑膜组织发挥抑制作用^[19,21]。因此在使用该抑制剂时,应考虑预防性给药的方式,以保证其充分的组织分布。

高尿酸产生的原因主要分为内源性的嘌呤代谢紊乱和外源性的嘌呤过量摄入^[22],而长期从事大强度训练的运动员由于代谢水平旺盛,被认为是 HUA 的高发人群,进而为 GA 发作埋下隐患^[23]。同时,有研究表明高强度间歇运动会使大鼠骨骼肌中

的 ATP 迅速水解,其分解产物次黄嘌呤核苷酸经系列催化后会生成尿酸释放入血,造成机体尿酸水平升高^[24]。为此,本实验在大鼠 GA 模型上合并 HUA 开展研究。血清尿酸水平结果显示,IWS 组大鼠较 GC 组显著升高,而 BBG 组与 GC 组相比无明显变化,提示剧烈运动可能会打破大鼠机体 ATP 的合成与水解平衡,进而引发嘌呤代谢紊乱增加血清尿酸含量。结合冰水泳浴引起模型大鼠痛风炎症损伤加剧的现象,推测关节局部 P2X7R 的高表达可能是诱导高尿酸直接进展为 GA 的重要调控因子。

本研究基于现有技术开展仍存在一定的局限性。由于大鼠具有尿酸代谢酶,可分解尿酸为尿囊素排出体外,因此基于抑制尿酸代谢法联合 Coderre 法塑造的痛风模型大鼠,难以体现该疾病临床发生发展的全程病理特点^[25-26]。同时,造模期间由于处理因素较多,所以实验中选择以 HUA 合并 GA 模型本身作为对照排除干扰,但对于深入且多层次的比较尚需更多的对照设计。目前该研究处于初期探索阶段,未来将设计并采用更加科学系统的造模方式和分组方法开展大样本实验进行验证。

综上所述,本研究发现冰水泳浴可促进痛风模型大鼠滑膜组织中 P2X7R 的表达,进而加重 GA 的病理损伤。此外,该过程模拟的寒冷刺激和剧烈运动可引起血清尿酸水平升高和促炎因子的分泌,因此局部 P2X7R 的激活可能是诱导高尿酸直接进展为 GA 的重要环节,未来需要进一步研究加以验证。

参考文献:

[1] 王雨,林志健,李文静,等. 从“整合论治”策略探析痛风病防治中药研发新路径 [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(2): 576-580.

WANG Y, LIN Z J, LI W J, et al. Exploration on the new path for developing anti-gout disease Chinese medicine from the perspective of ‘integrated therapy’ strategy [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2024, 39(2): 576-580.

[2] ZHANG W Z. Why does hyperuricemia not necessarily induce gout? [J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 280.

[3] 刘维. 痛风及高尿酸血症中西医结合诊疗指南 [J]. 中医杂志, 2023, 64(1): 98-106.

LIU W. Guideline for diagnosis and treatment of gout and hyperuricemia with integrated traditional Chinese and western medicine [J]. J Tradit Chin Med, 2023, 64(1): 98-106.

[4] ROUAULT T, CALDWELL D S, HOLMES E W. Aspiration of the asymptomatic metatarsophalangeal joint in gout patients and hyperuricemic controls [J]. Arthritis Rheum, 1982, 25(2):

209-212.

[5] PASCUAL E, JOVANÍ V. A quantitative study of the phagocytosis of urate crystals in the synovial fluid of asymptomatic joints of patients with gout [J]. Br J Rheumatol, 1995, 34(8): 724-726.

[6] 周游,汪雯,蔡杨乾,等. 电针对炎性痛大鼠背根神经节卫星胶质细胞活化和 P2X7 受体表达的干预 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 494-502.

ZHOU Y, WANG W, CAI Y Q, et al. Effect of electroacupuncture on activation of satellite glial cells and P2X7 receptor in the DRG of rats with chronic inflammatory pain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 494-502.

[7] HU S Q, HU J L, ZOU F L, et al. P2X7 receptor in inflammation and pain [J]. Brain Res Bull, 2022, 187: 199-209.

[8] 邵子晨,李华南,黄鑫,等. 免疫细胞在痛风性关节炎中的作用及中医药干预研究进展 [J]. 中国医药导刊, 2023, 25(11): 1117-1124.

SHAO Z C, LI H N, HUANG X, et al. Role of immune cells in gouty arthritis and research progress on traditional Chinese medicine intervention [J]. Chin J Med Guide, 2023, 25(11): 1117-1124.

[9] 程永芳,林珍梅,张玲,等. NLRP3 炎症小体在代谢性疾病中的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(2): 445-448.

CHENG Y F, LIN Z M, ZHANG L, et al. Research progress of NLRP3 inflammasome in metabolic diseases [J]. Chin J Immunol, 2024, 40(2): 445-448.

[10] LIU Y R, WANG J Q, LI J. Role of NLRP3 in the pathogenesis and treatment of gout arthritis [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1137822.

[11] TAO J H, ZHANG Y, LI X P. P2X7R: a potential key regulator of acute gouty arthritis [J]. Semin Arthritis Rheum, 2013, 43(3): 376-380.

[12] 陶金辉,唐江平,程苗,等. P2X7R 基因 rs1621388 多态性与痛风易感性的关联研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2017, 21(7): 698-701, 736.

TAO J H, TANG J P, CHENG M, et al. Study on the association between P2X7R gene rs1621388 polymorphism and gout susceptibility [J]. Chin J Dis Contr Prev, 2017, 21(7): 698-701, 736.

[13] 黄晶,杨婷,王雨,等. 痛风的国内外认识及治疗进展与思考 [J]. 世界中医药, 2021, 16(1): 1-7.

HUANG J, YANG T, WANG Y, et al. Progress and thinking on the treatment of gout disease at home and abroad [J]. World Chin Med, 2021, 16(1): 1-7.

[14] LI Y, LIN Z, WANG Y, et al. Are hyperuricemia and gout different diseases? Comment on the guidelines for the diagnosis and management of hyperuricemia and gout with the healthcare professional perspectives in China [J]. Int J Rheum Dis, 2023, 26(9): 1866-1868.

[15] GUNAWARDENA H, CHURN P, BLAKE D R. Running for

- gout research [J]. *Rheumatology*, 2005, 44(8): 1073-1074.
- [16] FUJITA Y, YAGO T, MATSUMOTO H, et al. Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) potentiates uric acid-induced IL-1 β production [J]. *Arthritis Res Ther*, 2021, 23(1): 128.
- [17] LI X, LIU Y, LUO C, et al. Z1456467176 alleviates gouty arthritis by allosterically modulating P2X7R to inhibit NLRP3 inflammasome activation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 979939.
- [18] 时乐, 徐立, 尹莲, 等. 冷水冰浴对高尿酸血症模型大鼠诱发痛风性关节炎的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(1): 25-29.
- SHI L, XU L, YIN L, et al. Effect of swimming in cold water on gouty arthritis of rats with hyperuricemia [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2012, 26(1): 25-29.
- [19] 代晓娟. P2X7R 在调控大鼠急性痛风性关节炎发病中的作用机制及 Treg/Th17 比值的变化趋势 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- DAI X J. The mechanism of P2X7R in regulating the pathogenesis of acute gouty arthritis in rats and the changing trend of Treg/Th17 ratio [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2019.
- [20] LI X, WAN A, LIU Y, et al. P2X7R mediates the synergistic effect of ATP and MSU crystals to induce acute gouty arthritis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023: 3317307.
- [21] XIE Y, HAN R, LI Y, et al. P2X7 receptor antagonists modulate experimental autoimmune neuritis *via* regulation of NLRP3 inflammasome activation and Th17 and Th1 cell differentiation [J]. *J Neuroinflammation*, 2024, 21(1): 73.
- [22] 王琳, 沈嘉艳, 谢招虎, 等. 高尿酸血症动物模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(1): 112-119.
- WANG L, SHEN J Y, XIE Z H, et al. Progress of hyperuricemia animal model research [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(1): 112-119.
- [23] 孟博达. 专业运动员、教练员运动性损伤与痛风 [J]. *中国临床康复*, 2004, 8(6): 1112.
- MENG B D. Sports Injuries and Gout in Professional Athletes and Coaches [J]. *Chin J Clin Rehab*, 2004, 8(6): 1112.
- [24] 严政, 于文兵, 马继政. 大强度运动对大鼠嘌呤核苷酸代谢的影响及运动模型研究 [J]. *体育与科学*, 2003, 24(5): 66-68.
- YAN Z, YU W B, MA J Z. Effects of high intensity exercise on purine nucleotide metabolism of rats and study of motor model [J]. *Phys Sci*, 2003, 24(5): 66-68.
- [25] 张冰, 胥亦, 林志健, 等. 痛风病中医认识源流考 [J]. *世界中医药*, 2024, 19(13): 1875-1880, 1888.
- ZHANG B, XU Y, LIN Z J, et al. Origin and development of traditional Chinese medicine understanding of gout disease [J]. *World Chin Med*, 2024, 19(13): 1875-1880, 1888.
- [26] 程雅欣, 李佳. 高尿酸血症和痛风动物模型及其建立方法的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(2): 251-256.
- CHENG Y X, LI J. Animal models of hyperuricemia and gout: established methods and research progress [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(2): 251-256.

[收稿日期]2024-06-08

陈舒,张静蕾,荣康,等. 基于 Rab27a 研究厚朴三物汤对结直肠癌模型小鼠外泌体的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (10): 18-27.

Chen S, Zhang JL, Rong K, et al. Effect of Houpu Sanwu decoction on exosomes in colorectal cancer model mice based on Rab27a [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 18-27.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.003

基于 Rab27a 研究厚朴三物汤对结直肠癌模型小鼠外泌体的影响

陈舒¹,张静蕾²,荣康³,张楠^{4*},孙维义⁴

(1.河南中医药大学,郑州 450003;2.中山大学附属第一医院,广州 510080;3.郑州大学第五附属医院
消化内科,郑州 450052;4.河南中医药大学第一附属医院 普外科,郑州 450003)

【摘要】 目的 探讨厚朴三物汤对 C57BL/6J 小鼠皮下瘤的影响和机制。方法 将小鼠结直肠癌 MC-38 细胞通过皮下注射入 C57BL/6J 小鼠体内建立结直肠癌皮下瘤模型,将造模成功的小鼠随机分组为模型对照组、厚朴三物汤低剂量组、厚朴三物汤中剂量组、厚朴三物汤高剂量组、5-氟尿嘧啶组(5-FU 组)、联合组(5-氟尿嘧啶+厚朴三物汤中剂量组),每组小鼠各 6 只。分别给予生理盐水和厚朴三物汤灌胃或生理盐水和 5-FU 腹腔注射,每天 1 次,连续 24 d。干预期间定期检测小鼠精神状态、饮食等一般情况,定期检测小鼠肿瘤体积的变化。取材后,对各组皮下瘤进行称重并采用 HE 染色观察小鼠皮下瘤病理组织变化;采用透射电子显微镜、Western blot、NTA 对结直肠癌组织来源的外泌体进行鉴定;采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测肿瘤组织中 Rab27a 和外泌体标志物 CD63、TSG101、ALIX 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 厚朴三物汤可以抑制小鼠肿瘤的生长,厚朴三物汤各剂量组、联合组的肿瘤生长缓慢,均受到不同程度的抑制,其中中药各剂量组以中剂量灌胃抗癌效果最佳,且与 5-FU 联用(联合组)呈协同作用;厚朴三物汤可以促使肿瘤发生坏死,表现出与 5-FU 组相同的抗癌作用,剂量越高,坏死程度越严重,并且厚朴三物汤与 5-FU 联用(联合组)呈协同作用;厚朴三物汤可以抑制小鼠 Rab27a 和外泌体中特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的蛋白表达量和 mRNA 的相对表达量。**结论** 厚朴三物汤的抗结直肠癌机制可能与 Rab27a 调控的外泌体分泌减少有关。

【关键词】 厚朴三物汤;结直肠癌;Rab27a;外泌体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0018-10

Effect of Houpu Sanwu decoction on exosomes in colorectal cancer model mice based on Rab27a

CHEN Shu¹, ZHANG Jinglei², RONG Kang³, ZHANG Nan^{4*}, SUN Weiyi⁴

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China.

2. the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080.

3. Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052.

4. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003)

【基金项目】 河南省自然科学基金项目(222300420489);国家中医优势专科(外科)(cz0338-03)。

【作者简介】 陈舒(1997—),女,硕士,住院医师,研究方向:消化系统肿瘤临床与实验研究。E-mail:18238792138@sina.cn

【通信作者】 张楠(1969—),男,主任医师,博士生导师,研究方向:消化系统肿瘤临床与基础研究。E-mail:jinglei.1999@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of Houpu Sanwu decoction on subcutaneous tumors in C57BL/6J mice. **Methods** Mouse colorectal cancer MC-38 cells were injected subcutaneously into C57BL/6J mice to establish a subcutaneous tumor model of colorectal cancer. The model mice were then divided randomly into model control, Houpu Sanwu decoction (HPSWD) low dose, HPSWD medium dose, HPSWD high dose, 5-fluorouracil (5-FU), and combination groups (5-FU+HPSWD medium dose) ($n=6$ mice per group). The mice were treated with normal saline and Houpu Sanwu decoction by gavage, or normal saline and 5-FU by intraperitoneal injection once a day for 24 consecutive days. During the intervention period, the mental state, diet, and other general conditions of the mice, as well as changes in tumor volume, were monitored regularly. At the end of the experiment, the subcutaneous tumors in each group were removed and weighed, and pathological features were examined by hematoxylin and eosin staining. Transmission electron microscopy, Western blot, and nanoparticle tracking analysis were used to identify exosomes derived from colorectal cancer tissues. Tumor mRNA and protein expression levels of Rab27a and the exosome markers CD63, TSG101, and ALIX were detected by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction and Western blot, respectively. **Results** Houpu Sanwu decoction inhibited tumor growth in mice. Tumor growth was inhibited to varying degrees in all the HPSWD dose groups and in the combination group. The HPSWD medium dose group showed the greatest anticancer effect, and the combination group showed a synergistic effect with 5-FU. Houpu Sanwu decoction induced tumor necrosis in a dose-dependent manner, with a similar anticancer effect to 5-FU. Houpu Sanwu decoction also inhibited the protein and mRNA expression levels of Rab27a and the exosome-specific markers CD63, ALIX, and TSG101 in mice. **Conclusions** Houpu Sanwu decoction inhibits tumor growth and the secretion of exosomes, possibly by regulating Rab27a.

【Keywords】 Houpu Sanwu decoction; colorectal cancer; Rab27a; exosome

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

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是全球普遍存在的恶性疾病之一,也是癌症相关死亡和健康负担的原因^[1]。由于经济发展、生活方式和饮食的改变, CRC 的发病率和死亡率在我国仍处于上升趋势^[2]。结直肠癌的发病是一个复杂的发育过程,涉及多个阶段和多个基因的参与,具有非典型的早期症状^[3]。虽然系统根治性切除术和辅助化疗可以达到最大的治疗效果,但许多患者出现局部复发和远处转移,生存率尚不理想,且化疗药物长期使用后存在毒性高、不良反应多等问题^[4-6]。大量研究证实了中药及其成分可以提高治疗效果,最大限度地减少不良反应,在结直肠癌防治中的作用得到了认可^[7-9]。

近年来,外泌体作为新兴的纳米级生物载体,在肿瘤治疗领域越来越受到关注。外泌体是细胞释放的脂质双层膜囊泡,直径范围为 30~150 nm,通过将核酸、蛋白质、脂质和代谢物等生物活性货物转移到靶细胞中发挥作用,突出了外泌体在癌症诊断、治疗和药物递送方面的潜力^[10]。Rab27a 属于 Ras GTP 酶超家族的 Rab (Ras 相关蛋白),参与外泌体的生物发生和分泌过程^[11]。目前, Rab27a 被确定为介导 CRC 发展的癌蛋白,可能是 CRC 潜在的治疗靶点^[12]。

结直肠癌患者多有脾胃功能失调,其治疗需要调整脾胃气机升降,重建脏腑阴阳、气血、邪正的平衡,以通为补。出自中医学著作《金匱要略》的厚朴三物汤 (Houpu Sanwu decoction, HPSWD) 重在行气泄满,是调理升降泄下的经典方剂。现代药理学发现,厚朴三物汤里厚朴中的厚朴酚、大黄中的大黄素和枳实均具有抗癌功效^[13-15],且有研究证明大黄中的大黄素具有抑制外泌体的作用^[16]。因此,厚朴三物汤符合 CRC 治疗原则。本研究以 C57BL/6J 小鼠为研究对象,基于 Rab27a 探讨厚朴三物汤对 CRC 模型小鼠的抗癌效果以及对外泌体分泌的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

小鼠结直肠癌 MC38 细胞购自北京北纳创联生物技术研究所,货号 BNCC337716。

1.1.2 实验动物

36 只雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (6~8 周龄), 体重 (20±2) g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2019-0008], 于河南中医药大学第一附属医院动物实验中心 [SYXK (豫) 2022-0004]

适应性饲养 1 周后开始实验,本研究已得到河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理审查委员会批准(YFYDW2022015)。饲养条件为室温 24~26 ℃,相对湿度 45%~55%,光照周期 12 h/12 h 明/暗交替。实验过程符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

厚朴三物汤(厚朴 24 g、大黄 12 g、枳实 9 g)由河南中医药大学第一附属医院制剂中心提供。5-氟尿嘧啶(5-FU)(天津金耀药业有限公司, H12020959,规格:25 mg);RPMI Medium 1640 培养基(索莱宝, 31800);1×PBS 缓冲液(索莱宝, P1020);胎牛血清(索莱宝, S9020);胰蛋白酶(索莱宝, T1300);HE 染色试剂盒(索莱宝, G1120);BCA 蛋白浓度检测试剂盒(索莱宝, PC0020);一抗抗体 Rab27a、CD63、TSG101、ALIX 抗体(赛维尔, GB111106、GB12620、GB111106、GB124080);二抗抗体 Rab27a、CD63、TSG101、ALIX 抗体(赛维尔, GB23303、GB23301、GB23301、GB23303);RNA 提取试剂盒(索莱宝, R1200-50T);荧光定量逆转录试剂盒(宝日医, RR047A);荧光定量检测试剂盒(宝日医, RR820A);2%磷钨酸(索莱宝, G1871)。酶标仪(Bio-Rad, Model 550);显微镜(Leica, DM3000);掌上离心机(赛维尔, MS6000);全景切片扫描仪(3D-histech, Panoramic DESK);垂直电泳仪(赛维尔, SVE-2);转印电泳仪(赛维尔, SVT-2);化学发光仪(CLINX, 6100);超微量分光光度计(Thermo, NanoDrop2000);荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, CFX);透射电镜(日本 jeol 公司, JEM1230);纳米颗粒追踪分析仪(Particle Metrix, ZetaView PMX 110)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

将 CRC 细胞株 MC38 置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养,置于含 5% CO₂ 的 37 ℃ 培养箱中培养。所有用于细胞培养的胎牛血清均在 4 ℃ 下通过离心(1234.7 r/min)过夜产生,以确保去除任何胎牛血清来源的外泌体。

1.3.2 异种移植瘤模型建立

模型建立参照文献^[17]。MC38 细胞皮下注射($n=6, 2 \times 10^6$ /只),5 d 后观察肿瘤成瘤情况。

1.3.3 动物分组及处理方法

36 只小鼠均造模成功,随机将其分为 6 组,分别为模型对照组、厚朴三物汤低剂量组、厚朴三物汤中剂量组、厚朴三物汤高剂量组、5-氟尿嘧啶(5-

FU)组、联合组(5-氟尿嘧啶+厚朴三物汤中剂量组),每组 6 只。其中模型对照组每天给予小鼠生理盐水灌胃,厚朴三物汤低、中、高剂量组、联合组每天给予小鼠的灌胃剂量分别为 11 g/(kg·d)、22 g/(kg·d)、44 g/(kg·d)、22 g/(kg·d),5-FU 组、联合组腹腔注射 5-FU 溶液,剂量分别为 0.25×10^{-3} g/(kg·d)。连续给药 24 d。

1.3.4 小鼠皮下瘤体积测定

首次测量标记为第 0 天,每 5 d 测量小鼠皮下瘤的长径与短径,并用游标卡尺测量肿瘤的长径(a)与其垂直方向的短径(b),计算体积= $0.5 \times a \times b^2$ 。

1.3.5 肿瘤组织样本的 HE 染色

肿瘤组织从固定液中取出,进行石蜡包埋。蜡块切片后放入载玻片。将组织切片放置于二甲苯中浸泡,使石蜡溶解。接着进行样本切片水化。水化后的切片进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。最后风干并用中性树胶封片。用全景切片扫描仪采集并保存图片。

1.3.6 RNA 提取和定量逆转录 PCR (reverse transcription coupled to the quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

采用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。采用超微量分光光度计检测 RNA 纯度,并记录 A_{260}/A_{280} 比值。荧光定量逆转录试剂盒将总 RNA 进行逆转录,采用荧光定量检测试剂盒进行 PCR 扩增。以 GAPDH 作为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

1.3.7 蛋白免疫印迹(Western blot)试验

用 PBS 冲洗肿瘤组织后,使用无菌组织剪将组织剪成极小块并置于匀浆管中,加入裂解液、蛋白

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name		引物(5'-3') Primer(5'-3')
Rab27a	F	CGCTATGGGTTTCCTGCTTCT
	R	TCCTCTTTCACTGCCCTCTGGT
CD63	F	AACATAACTGTGGGCTGTGGGA
	R	GATAATTCCCAAGACCTCCACAAA
ALIX	F	GTATTGGCTTCCCTTAACCTTCC
	R	TCCAACAATCTTAGCGACTCCTC
GAPDH	F	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG
	R	TGAGGTCATGAAGGGGCTCGT
TSG101	F	GTCAAAGTCAATGTCATCGCT
	R	CTCGATAACGCACTGGGATTG

酶抑制剂。离心 15 min (4 °C, 800 r/min), 收集上清液使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度, 在蛋白加载缓冲液中煮沸, 样品经 15% SDS-PAGE 处理后转移到 PVDF 膜上。将膜密封于 5% 脱脂乳中, 在室温下在摇壶上密封 1 h。用 5% BSA 的 TBST 缓冲液将一抗稀释至合适浓度, 放入相应的膜中, 使膜与一抗充分接触, 在摇床上摇匀, 4 °C 摇过夜, 用 1 × TBST 洗涤 3 次。将二抗稀释, 与 5% 牛血清白蛋白结合, 引入适当的孵育箱, 在室温下振荡 1 h, 然后用 1 × TBST 洗涤 3 次。最后对样品进行曝光并拍照分析。

1.3.8 外泌体的提取

取新鲜的肿瘤组织轻轻切成小薄片 (1 ~ 2 mm), 在 RPMI-1640 培养基中 37 °C 孵育 30 min, 经过胶原蛋白水解酶 D 和 DNase 解离组织后, 进行一个过滤步骤 (70 μm), 进一步以 212.4 r/min 离心 10 min 和 385 r/min 离心 20 min 用于去除细胞和组织碎片。取上清液以 725 r/min 离心 20 min 和 258.7 r/min 离心 2.5 h, 取出管底的澄清沉淀物, 重悬于 PBS 中, 获得外泌体^[18]。所有离心均在 4 °C 且无菌条件下实施。

1.3.9 外泌体的鉴定

(1) Western blot 检测

具体步骤参考 1.3.7。

(2) 透射电子显微镜观察

用吸管将一小滴样品放在蜡盘上。取铜网, 使有支撑膜的表面与样品液表面接触, 静置 5 min, 取

出铜网, 用滤纸条吸附多余的液滴, 稍干。取 2% 磷钨酸溶液滴于蜡盘上。将吸附样品的铜网置于染液表面 (使样品与染液接触), 静置 5 min。去除铜网后, 用滤纸条将多余的液滴吸出, 然后在白炽灯下晾干。使用透射电镜进行拍摄。

(3) 纳米粒子跟踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA)

分离的外泌体样品用 1 × PBS 缓冲液稀释, 测量粒径和浓度。在 11 个位置记录并分析了 NTA 测量结果。ZetaView 系统用 110 nm 的聚苯乙烯颗粒进行校准。温度维持在 23 °C 和 37 °C。

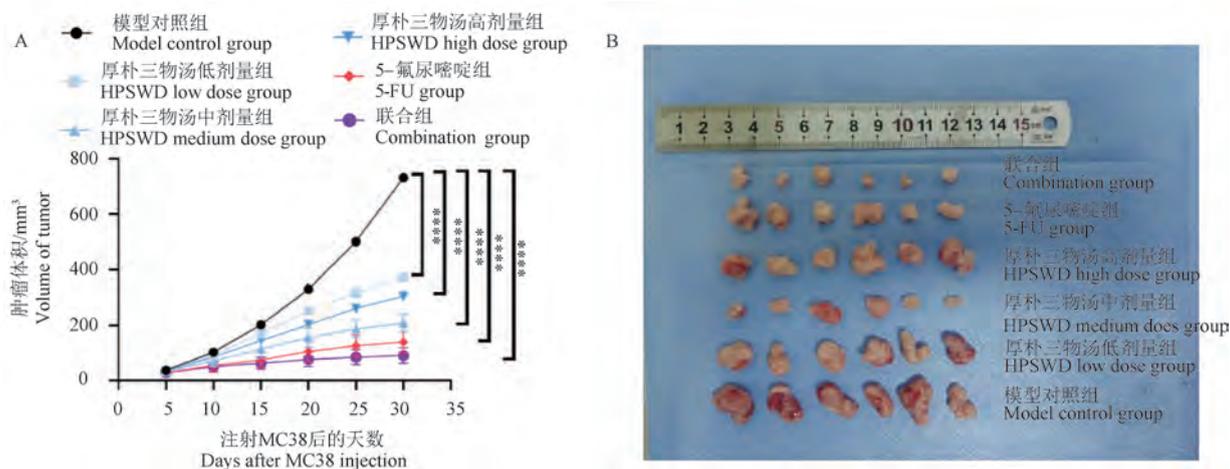
1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.5.1 和 Adobe Photoshop 2020 软件对实验数据进行处理及图绘制。定量资料组间比较采用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较先行方差分析, 方差齐则采用单因素方差分析 (ANOVA); 方差不齐, 则行秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPSWD 对小鼠皮下瘤体积的影响

如图 1 所示, 与模型对照组相比, 厚朴三物汤低、中、高剂量组和联合组的肿瘤生长缓慢, 均受到不同程度的抑制 ($P < 0.05$), 表现出与 5-FU 组相同的抑制作用, 其中以联合组抑制肿瘤生长最显著 ($P < 0.05$)。在厚朴三物汤各剂量组中, 以中剂量组抑制肿瘤生长程度最显著 ($P < 0.05$)。结果表明, 厚



注: A: 厚朴三物汤干预后, 小鼠肿瘤组织体积的变化; B: 厚朴三物汤干预后, 取材时小鼠肿瘤组织图片。与模型对照组相比, **** $P < 0.0001$ 。

图 1 肿瘤体积生长曲线和小鼠肿瘤组织图片

Note. A, Changes in tumor tissue volume in mice after intervention with Houpu Sanwu decoction. B, Pictures of tumor tissue of mice after intervention with Houpu Sanwu decoction when the samples were taken. Compared with the model control group, **** $P < 0.0001$.

Figure 1 Tumor volume growth curve and pictures of mouse tumor tissue

朴三物汤可以抑制肿瘤生长,其中以中剂量灌胃抗癌效果最佳,且与 5-FU 联用(联合组)呈协同作用。

2.2 HPSWD 对小鼠肿瘤组织重量的影响

与模型对照组相比,厚朴三物汤中剂量组、5-FU 组和联合组的肿瘤重量明显减轻($P<0.01$),差异具有统计学意义;与厚朴三物汤中剂量组比较,厚朴三物汤低剂量组和厚朴三物汤高剂量组的肿瘤重量明显增高($P<0.05$),差异具有统计学意义(表 2)。

表 2 厚朴三物汤对小鼠肿瘤组织重量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Houpu Sanwu decoction on the weight of tumor tissue in mice

组别 Groups	小鼠肿瘤组织重量/g Weight of tumor tissue in mice
模型对照组 Model control group	0.77±0.27
厚朴三物汤低剂量组 HPSWD low dose group	0.55±0.1 ^b
厚朴三物汤中剂量组 HPSWD medium dose group	0.18±0.12 ^a
厚朴三物汤高剂量组 HPSWD high dose group	0.52±0.23 ^b
5-氟尿嘧啶组 5-FU group	0.30±0.14 ^a
联合组 Combination group	0.09±0.05 ^a

注:与模型对照组比较,^a $P<0.01$;与厚朴三物汤中剂量组比较,^b $P<0.05$ 。

Note. Compared with the model control group, ^a $P<0.01$. Compared with HPSWD medium dose group, ^b $P<0.05$.

2.3 HPSWD 对小鼠肿瘤组织病理变化的影响

模型对照组中肿瘤细胞胞核异型、核质比高,核仁不明显,可见核分裂象;偶见肿瘤细胞坏死,胞核固缩深染、碎裂或溶解消失。厚朴三物汤各剂量组、联合组的肿瘤均出现不同程度的坏死,表现出与 5-FU 组相同的抗癌作用。上述肿瘤组织 HE 结果说明厚朴三物汤可以促使肿瘤发生坏死,剂量越高肿瘤坏死程度越严重,厚朴三物汤与 5-FU 联用(联合组)呈协同作用(图 2)。

2.4 小鼠肿瘤组织来源的外泌体鉴定

经过一系列的操作从肿瘤组织中提取外泌体,通过透射电镜发现外泌体的形状为双层膜的圆形颗粒,符合典型的外泌体特征(图 3)。采用 Western blot 方法鉴定 CRC 产生的外泌体,并揭示了外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的表达。采用纳米颗粒跟踪分析技术(NTA)分析了细胞的外泌体的大小、分布和数量(图 4)。

2.5 厚朴三物汤对 Rab27a 和外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 蛋白的影响

为了明确厚朴三物汤如何影响 Rab27a 和外泌体分泌的,笔者分析了小鼠肿瘤组织中 Rab27a 和外泌体中特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的蛋白表达量(图 5、图 6)。结果发现,相较于模型对照组,厚朴三物汤中剂量组和联合组均能够很好的抑

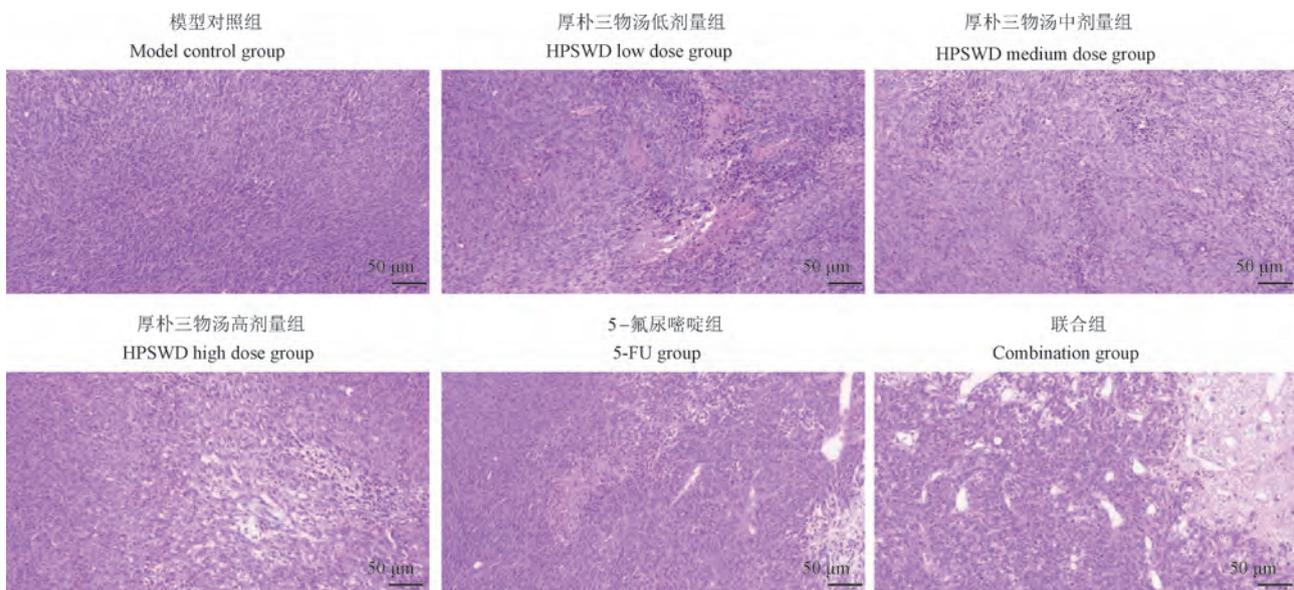


图 2 小鼠肿瘤组织病理学图片

Figure 2 Histopathological picture of mouse tumors

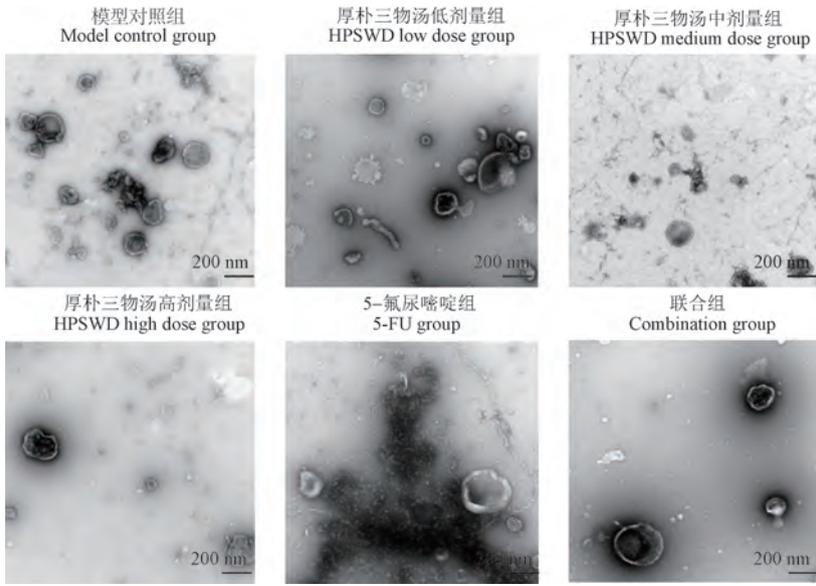


图 3 外泌体的电镜鉴定图片

Figure 3 Electron microscopic identification picture of exosomes

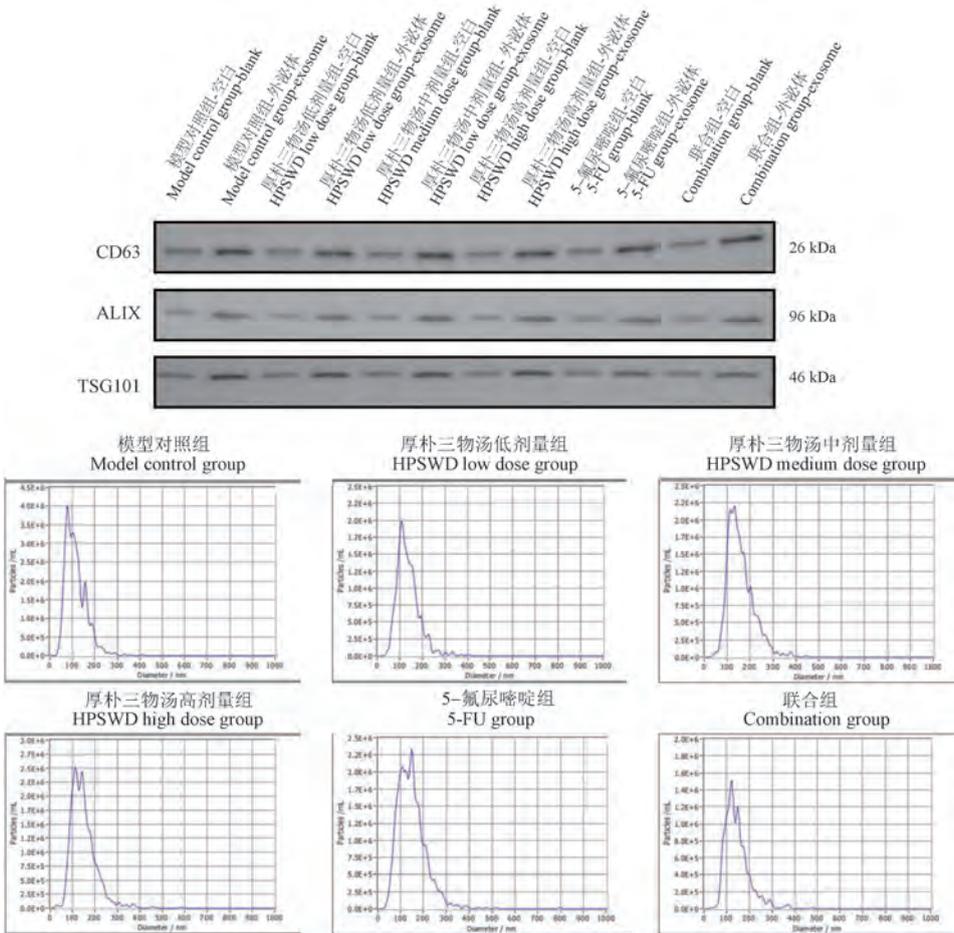


图 4 外泌体的 Western blot 和 NTA 鉴定图片

Figure 4 Western blot and NTA identification pictures of exosomes

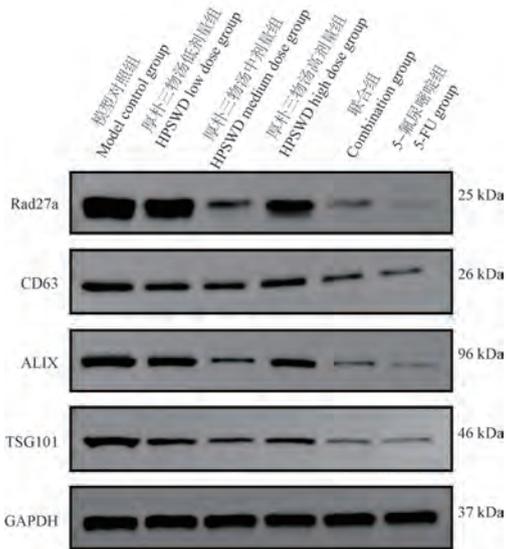


图 5 Rab27a 和外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 蛋白条带

Figure 5 Protein bands of Rab27a and exosome-specific markers CD63, ALIX, and TSG101

制 Rab27a 和外泌体中特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的表达 ($P < 0.05$)。Rab27a 与厚朴三物汤的剂量呈一定的剂量关系,但在厚朴三物汤各浓度剂量组中,以中剂量组抑制效果更好 ($P < 0.05$),可能是高剂量的药物灌胃进入体内吸收后,对小鼠的肝肾产生了毒副作用,亦或是影响了小鼠的肿瘤免疫微环境,导致了剂量高疗效反而下降的情况出现,后续会做进一步的研究。

2.6 厚朴三物汤对 Rab27a 和外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 mRNA 的影响

相较于模型对照组,厚朴三物汤中剂量组和联合组均能够很好地抑制 Rab27a 和外泌体中特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的表达 ($P < 0.05$)。结果发现,Rab27a 与厚朴三物汤的剂量呈一定的剂量关系,但在厚朴三物汤各浓度剂量组中,以中剂量组抑制效果更好 ($P < 0.05$,图 7)。

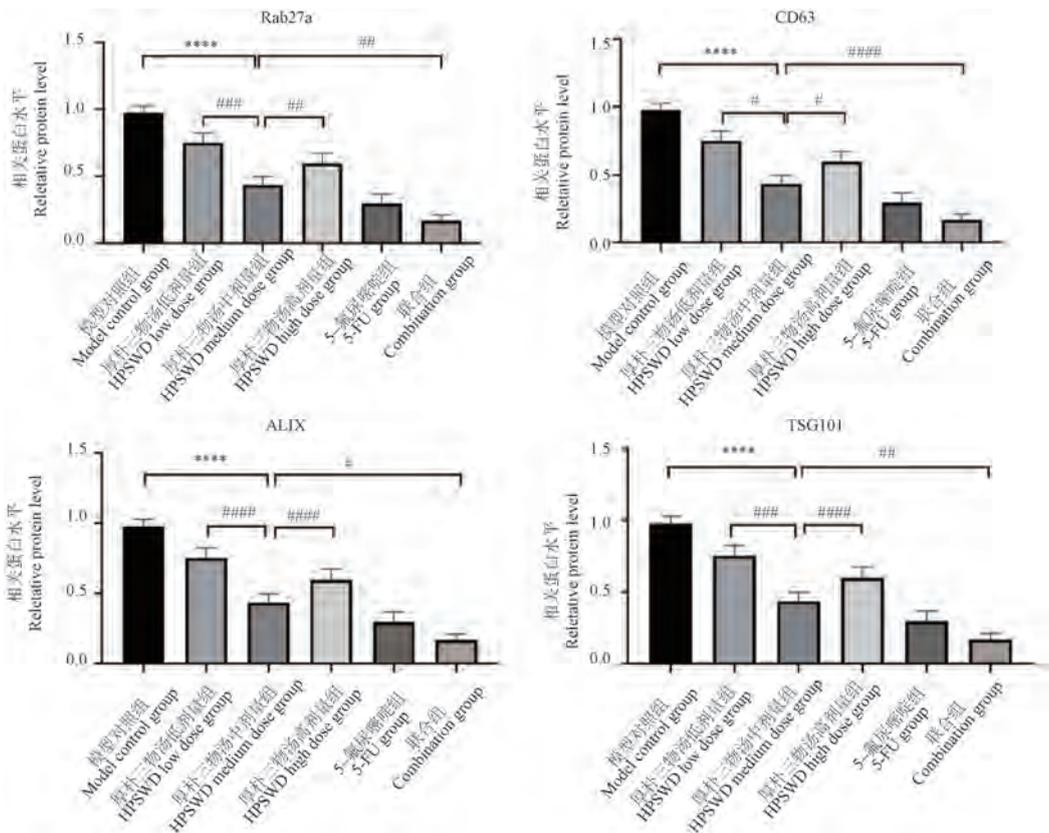
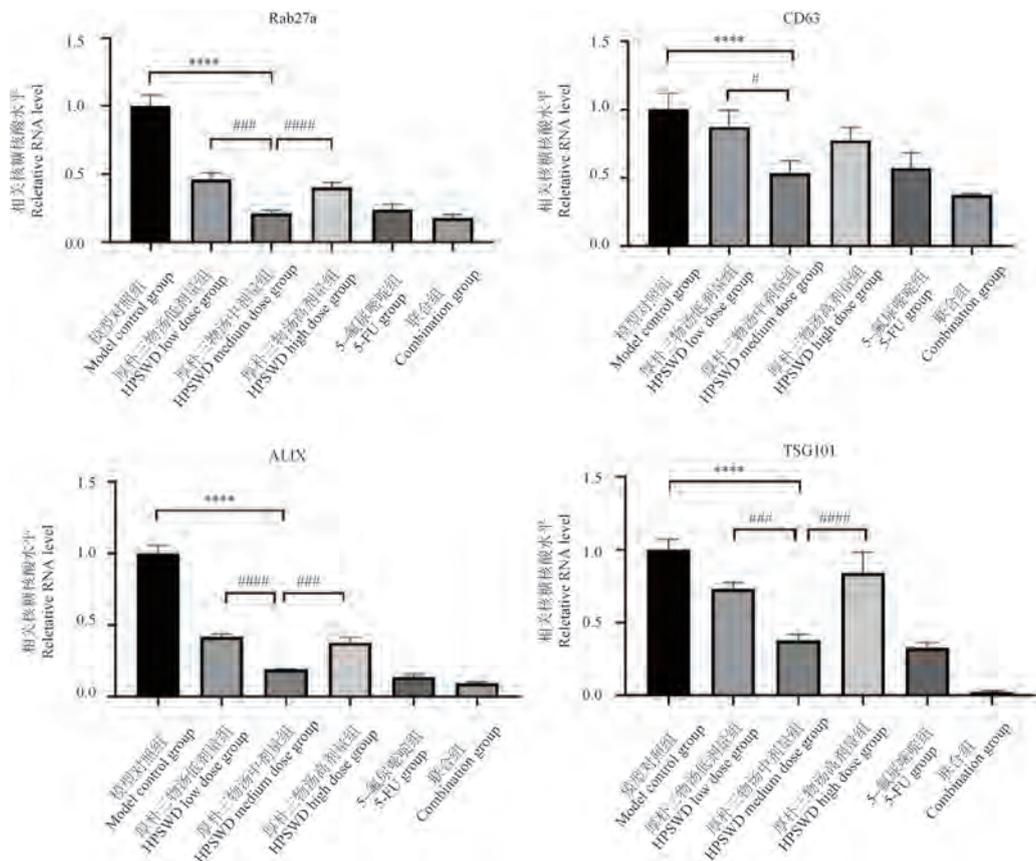


图 6 Rab27a 和外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 蛋白表达

注:与模型对照组相比,**** $P < 0.0001$;与厚朴三物汤中剂量组比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$,#### $P < 0.001$,##### $P < 0.0001$ 。

Note. Compared with the model control group, **** $P < 0.0001$. Compared with the HPSWD medium dose group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$.

Figure 6 Protein expression of Rab27a and exosome-specific markers CD63, ALIX, and TSG101



注:与模型对照组相比,**** $P < 0.0001$;与厚朴三物汤中剂量组比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.001$,#### $P < 0.0001$ 。

图 7 Rab27a 和外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 mRNA 表达

Note. Compared with the model control group, **** $P < 0.0001$. Compared with the HPSWD medium dose group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$.

Figure 7 mRNA expression of Rab27a and exosome-specific markers CD63, ALIX, and TSG101

3 讨论

被称为外泌体的囊泡由多种哺乳动物细胞释放,外泌体作为一种新型的递送载体,可以包裹如非编码 RNA、运输蛋白质和核酸等物质,从而能够传递生物细胞间信息^[19]。由于其双层膜结构导致内容物不容易被降解,以及外泌体的物理和病理功能及其在诊断和治疗应用中的潜力日益得到认可,其在肿瘤中的作用近年来受到研究领域和生物医学行业的广泛关注^[20-21]。研究表明,外泌体可以成为改变肿瘤微环境和导致肿瘤转移的细胞间通讯的极好介质,影响细胞的生长、凋亡、迁移、侵袭和治疗抵抗,参与多种恶性肿瘤的发生发展^[22-24]。

在调节囊泡运输的 Rab 蛋白家族成员中, Rab27 及其效应子被认为在它们从细胞内部到质膜附近的运输中起着多功能和关键作用^[25]。两种 Rab27 亚型 Rab27a、Rab27b 在所有组织中都有表达,但 Rab27a 是在体内表达的主要亚型,尤其富含

整个胃肠道、前列腺等^[11]。越来越多的研究表明, Rab27a 已成为许多其他癌症肿瘤进展的促进剂, Rab27a 在 CRC 中表达上调,被确定为介导 CRC 发展的癌蛋白^[12]; Rab27a 能够促进口腔鳞状细胞癌的迁移侵袭,与预后较差有关^[26]; Rab27a 通过调节促侵袭性外泌体促进黑色素瘤细胞侵袭和转移^[27]; Rab27a 的下调可以抑制膀胱癌细胞增殖、迁移侵袭和上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 并抑制异种移植肿瘤生长^[28]。最近的研究表明, Rab27a 可以调节多种细胞的外泌体分泌, 包括树突状细胞、结直肠癌、宫颈癌细胞、乳腺癌细胞、黑色素瘤细胞等^[29]。此外, Rab27a 已被揭示通过控制外泌体分泌在癌细胞的增殖和侵袭中发挥关键作用,外泌体分泌调节肿瘤微环境和癌细胞的功能,从而促进癌症进展,增强肿瘤支持微环境的形成^[30-32]。然而,它们在 CRC 中的作用和调控机制尚未被广泛分析。因此,必须研究 CRC 发生和发展的生物学原因,以便找到新的治疗靶点将有助于

确定可能的治疗干预措施以改善癌症治疗。

结直肠癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一。在许多发展中国家, CRC 的发病率和死亡率正在迅速上升^[33-34]。结直肠癌在中医属于“肠覃”“伏梁”“积聚”“脏毒”“锁肛痔”等范畴。结直肠癌的主要病机为正虚、气机升降失调,“正虚”是肿瘤发病的根本原因,结直肠癌是在脾虚的基础上产生。《灵枢·水胀》云:“肠覃何如?岐伯曰:寒气客于肠外与卫气相搏,气不得荣,因有所系,僻而内着,恶气乃起,瘕肉乃生。始生也,大如鸡卵……”。指出结直肠癌虚实夹杂的病理特征。“气机升降失调”是结直肠癌形成的基本病理过程,《素问·五脏别论》云:“六腑者传化物而不藏,故实而不能满也”。说明六腑功能“以通为用”。六腑之气宜通不宜滞,滞则胀满,气机痞塞不通,升降失调使精、血、津液不能正常运转,聚湿为痰、血停为瘀,从而产生痰、瘀、毒等病理产物蓄积,聚积停于虚弱之大肠,进一步加重气机运行的失衡,最终导致结直肠癌的发生。

目前,中医药已被证实对结直肠癌具有重要的抑制作用,并可与放化疗联合治疗肿瘤^[35]。厚朴三物汤出自于医圣张仲景所著的《金匮要略》,由厚朴、大黄、枳实组成,其中厚朴理气导滞,枳实破气消积,大黄通腑泄热,三味合用共奏行气消积祛瘀之功效^[36]。厚朴三物汤以行气为主,其主要功效为行气除满、去积通便,主治气滞不行、大便不通、实热内积、腹胀腹痛,其功效符合结直肠癌顺应六腑“通降”治则,且临床上治疗气滞便秘疗效确切。现代药理学发现,厚朴三物汤里厚朴中的厚朴酚、大黄中的大黄素和枳实均具有抗癌功效,能够通过抑制肿瘤细胞的自噬和凋亡,肿瘤外的血管生成和 EMT,抑制癌症的侵袭和迁移,从而达到抑制肿瘤生长发展的目的^[13-15]。因此,不管是从中医理论辨证方面还是相关国内外实验理论方面,笔者认为厚朴三物汤有可能会抑制结直肠癌生长和发展。

进一步研究发现与模型对照组对比,厚朴三物汤可以缓解肿瘤小鼠的不良状态。通过对肿瘤生长方面发现,厚朴三物汤各剂量组、联合组的肿瘤生长缓慢,均受到不同程度的抑制,其中中药各剂量组以中剂量灌胃抗癌效果最佳,且与 5-FU 联用(联合组)呈协同作用。对肿瘤组织切片进行 HE 染色,结果显示厚朴三物汤可以促使肿瘤发生坏死,表现出与 5-FU 组相同的抗癌作用,剂量越高坏死程度越严重,并且厚朴三物汤与 5-FU 联用(联合组)

呈协同作用。从动物肿瘤组织中提取到外泌体,经透射电镜、Western blot 和 NTA 鉴定揭示了外泌体特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的表达。随后采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测厚朴三物汤在小鼠肿瘤中对 Rab27a 和外泌体分泌是否具有抑制作用。结果显示厚朴三物汤可以抑制小鼠 Rab27a 和外泌体中特异性标志物 CD63、ALIX 和 TSG101 的蛋白表达量和 mRNA 的相对表达量。以上结果均证明了厚朴三物汤对于结直肠癌的抗肿瘤作用可能是通过下调 Rab27a 从而抑制外泌体分泌实现的。

综上,本研究表明了厚朴三物汤对结直肠癌模型小鼠的皮下瘤的生长具有一定的抑制作用,其抗癌作用可能是通过下调 Rab27a 的表达从而抑制结直肠癌中外泌体的分泌导致的。此外,实验过程中还发现厚朴三物汤和 5-FU 组联合用药呈协同作用。这些结果为结直肠癌提供了新的肿瘤微环境相关调控机制,可能有助于制定结直肠癌治疗的新策略。

参考文献:

- [1] CHEN Y, LIU F, CHEN X, et al. MicroRNA-622 upregulates cell cycle process by targeting FOLR2 to promote CRC proliferation [J]. BMC Cancer, 2024, 24(1): 26.
- [2] WANG Z, DAN W, ZHANG N, et al. Colorectal cancer and gut microbiota studies in China [J]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2236364.
- [3] GAO X, LONG R, QIN M, et al. Gab2 promotes the growth of colorectal cancer by regulating the M2 polarization of tumor-associated macrophages [J]. Int J Mol Med, 2024, 53(1): 3.
- [4] LV Y, ZHENG P, MAO Y, et al. Intratumor APOL3 delineates a distinctive immunogenic ferroptosis subset with prognosis prediction in colorectal cancer [J]. Cancer Sci, 2024, 115(1): 257-269.
- [5] DING M, WANG C, HU J, et al. PLOD3 facilitated T cell activation in the colorectal tumor microenvironment and liver metastasis by the TNF- α /NF- κ B pathway [J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 30.
- [6] LIU P, YING J, GUO X, et al. An exploration of the effect of Chinese herbal compound on the occurrence and development of large intestine cancer and intestinal flora [J]. Heliyon, 2024, 10(1): e23533.
- [7] MA X, LI Y, LIANG D, et al. Solanine induces ferroptosis in colorectal cancer cells through ALOX12B/ADCY4 molecular axis [J]. J Pharm Pharmacol, 2024, 76(3): 224-235.
- [8] WEI J, ZHENG Z, HOU X, et al. Echinacoside inhibits colorectal cancer metastasis via modulating the gut microbiota and suppressing the PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(Pt A): 116866.
- [9] KONG P, TANG X, LIU F, et al. Astragaloside IV regulates circ_0001615 and miR-873-5p/LASP1 axis to suppress colorectal cancer cell progression [J]. Chem Biol Drug Des, 2024, 103

- (1); e14423.
- [10] YANG Q, LI S, OU H, et al. Exosome-based delivery strategies for tumor therapy: an update on modification, loading, and clinical application [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 41.
- [11] MENACEUR C, DUSAÏLLY O, GOSSELET F, et al. Vesicular trafficking, a mechanism controlled by cascade activation of rab proteins: focus on Rab27 [J]. *Biology*, 2023, 12(12): 1530.
- [12] LI Q, ZHAO H, DONG W, et al. RAB27A promotes the proliferation and invasion of colorectal cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 19359.
- [13] DAI G, WANG D, MA S, et al. ACSL4 promotes colorectal cancer and is a potential therapeutic target of emodin [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154149.
- [14] JANG Y, KIM E K, SHIM W S. Phytotherapeutic effects of the fruits of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. on cancer, inflammation, and digestive dysfunction [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(4): 616–624.
- [15] LIU R X, REN W Y, MA Y, et al. BMP7 mediates the anticancer effect of honokiol by upregulating p53 in HCT116 cells [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(3): 907–917.
- [16] 蔡青云, 许丽君. 大黄素对急性胰腺炎胰腺腺泡细胞外泌体水平和氧化应激的调控作用 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2020, 55(3): 373–376.
- CAI Q Y, XU L J. Regulation of emodin on exosome level and oxidative stress of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis [J]. *J Zhengzhou Univ Med Sci*, 2020, 55(3): 373–376.
- [17] ZHANG Q, DENG T, ZHANG H, et al. Adipocyte-derived exosomal MTPP suppresses ferroptosis and promotes chemoresistance in colorectal cancer [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(28): e2203357.
- [18] CRESCITELLI R, LÄSSER C, JANG S C, et al. Subpopulations of extracellular vesicles from human metastatic melanoma tissue identified by quantitative proteomics after optimized isolation [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1722433.
- [19] CHEN C, LIU Y, LIU L, et al. Exosomal circTUBGCP4 promotes vascular endothelial cell tipping and colorectal cancer metastasis by activating Akt signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 46.
- [20] BARUAH H, SARMA A, BASAK D, et al. Exosome: From biology to drug delivery [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2024, 14(6): 1480–1516.
- [21] GUO W, CAI Y, LIU X, et al. Single-exosome profiling identifies ITGB3+ and ITGAM+ exosome subpopulations as promising early diagnostic biomarkers and therapeutic targets for colorectal cancer [J]. *Research*, 2023, 6: 0041.
- [22] QIU S, XIE L, LU C, et al. Gastric cancer-derived exosomal miR-519a-3p promotes liver metastasis by inducing intrahepatic M2-like macrophage-mediated angiogenesis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 296.
- [23] SONG Q, YU H, CHENG Y, et al. Bladder cancer-derived exosomal KRT6B promotes invasion and metastasis by inducing EMT and regulating the immune microenvironment [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 308.
- [24] XIE H, YAO J, WANG Y, et al. Exosome-transmitted circVMP1 facilitates the progression and cisplatin resistance of non-small cell lung cancer by targeting miR-524-5p-METTL3/SOX2 axis [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 1257–1271.
- [25] IZUMI T. *In vivo* roles of Rab27 and its effectors in exocytosis [J]. *Cell Struct Funct*, 2021, 46(2): 79–94.
- [26] HUANG J, YANG J G, REN J G, et al. Overexpression of RAB27A in oral squamous cell carcinoma promotes tumor migration and invasion *via* modulation of EGFR membrane stability [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17): 13103.
- [27] GUO D, LUI G Y L, LAI S L, et al. RAB27A promotes melanoma cell invasion and metastasis *via* regulation of pro-invasive exosomes [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(12): 3070–3085.
- [28] ZHANG Q, HAO L, SHEN Z, et al. MiR-186-5p suppresses cell migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition in bladder cancer by targeting RAB27A/B [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(11): 2174–2185.
- [29] LI Z, FANG R, FANG J, et al. Functional implications of Rab27 GTPases in cancer [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 44.
- [30] CHEN L, GUO P, HE Y, et al. HCC-derived exosomes elicit HCC progression and recurrence by epithelial-mesenchymal transition through MAPK/ERK signalling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 513.
- [31] MOHAMED GAMAL EL-DIN G, IBRAHIM F K, SHEHATA H H, et al. Exosomal expression of RAB27A and its related lncRNA Lnc-RNA-RP11-510M2 in lung cancer [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2022, 128(6): 1479–1485.
- [32] KOH H M, JANG B G, KIM D C. Prognostic significance of Rab27 expression in solid cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14136.
- [33] ZHENG Z, LUAN N, TU K, et al. The roles of protocadherin-7 in colorectal cancer cells on cell proliferation and its chemoresistance [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1072033.
- [34] 安庆玲, 谭邓旭, 师长宏. 结直肠癌基因工程小鼠模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(5): 660–667.
- AN Q L, TAN D X, SHI C H. Genetically engineered mouse models of colorectal cancer [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(5): 660–667.
- [35] RANJAN A, RAMACHANDRAN S, GUPTA N, et al. Role of phytochemicals in cancer prevention [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 4981.
- [36] 毛宇东, 吴发洪, 王满才, 等. 基于自主神经系统研究厚朴三物汤调控胃肠动力的作用机制 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2023, 32(12): 1607–1616.
- MAO Y D, WU F H, WANG M C, et al. Mechanism of Houpu Sanwu decoction in regulating gastrointestinal motility based on the autonomic nervous system [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2023, 32(12): 1607–1616.

宋庆华,唐会猛,孙鑫,等.不同剂量博来霉素诱导的肺纤维化大鼠模型比较[J].中国比较医学杂志,2024,34(10):28-37.
Song QH, Tang HM, Sun X, et al. Comparison of pulmonary fibrosis rat models induced by different dosed of bleomycin [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 28-37.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.004

不同剂量博来霉素诱导的肺纤维化大鼠模型比较

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

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

【摘要】 目的 比较不同剂量博来霉素(bleomycin, BLM)气管内滴注诱导的大鼠肺纤维化(pulmonary disease, PF)模型的成功率及稳定性。方法 150只SD大鼠随机分为空白组、BLM低剂量组(BL-L组,3 mg/kg)和BLM高剂量组(BL-H组,5 mg/kg),造模后观察大鼠一般状态、死亡情况、体重变化,第28、42、56、84天检测大鼠深吸气量(inspiratory capacity, IC)、肺活量(vital capacity, VC)、肺准静态顺应性(chord compliance, Cchord)和肺动态顺应性(dynamic compliance, Cdyn),记录肺系数,HE、MASSON染色观察肺组织病理变化,检测肺组织羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量,免疫组化检测肺组织胶原蛋白III(collagen type III, COL III)表达。结果 BL-L组与BL-H组的死亡率分别为20%和28%。BL-L组体重在第0~56天低于空白组($P<0.01$),第56天以后体重恢复。第0~56天BL-H组体重显著低于空白组和BL-L组($P<0.01$)。与空白组比较,第28天,BL-L组肺功能IC、VC、Cchord、Cdyn显著降低($P<0.01$, $P<0.05$),BL-H组IC和Cdyn显著下降($P<0.05$),第42天,BL-L组IC、VC、Cchord显著下降($P<0.01$, $P<0.05$),BL-H组IC、VC、Cchord、Cdyn显著下降($P<0.01$, $P<0.05$),且IC、VC、Cchord与BL-L组相比显著降低($P<0.01$),第56天,BL-H组Cchord显著低于空白组和BL-L组($P<0.01$)。第28天,BL-L组和BL-H组肺系数显著高于空白组($P<0.01$),第42~56天,BL-H组肺系数显著高于BL-L组和空白组($P<0.01$)。BL-L组在第28~56天可观察到炎症浸润、纤维化条索和COL III表达,第84天纤维化病变几乎消失,BL-H组在28~84天均可观察到显著纤维化病变,COL III表达程度显著高于空白组($P<0.01$)。第28~42天,BL-L组HYP含量显著高于空白组($P<0.05$, $P<0.01$),后逐渐下降,第28~84天,BL-H组HYP含量显著高于空白组($P<0.01$)。结论 3 mg/kg与5 mg/kg的BLM均可成功制备PF大鼠模型,BL-L组在第28天形成肺纤维化,持续至第42天;BL-H组在第28天形成更严重的肺纤维化,持续至第56天,第84天仍有半数存在中重度纤维化。

【关键词】 肺纤维化;博来霉素;模型比较

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)10-0028-10

Comparison of pulmonary fibrosis rat models induced by different dosed of bleomycin

SONG Qinghua¹, TANG Huimeng^{1,3}, SUN Xin^{1,3}, LIU Yang¹, XIE Yunyun^{1,3}, TIAN Yange^{1,2*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Co-Construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of PR, Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Zhengzhou 450046, China. 2. Henan University of Chinese Medicine, Academy of Chinese Medical Sciences, Zhengzhou 450046. 3. the First Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【基金项目】河南省科技研发计划联合基金(优势学科培育类)(232301420020)。

【作者简介】宋庆华(1996—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。E-mail:monaek@163.com

【通信作者】田燕歌(1984—),女,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治呼吸系统机制与配伍规律。E-mail:yange0910@126.com

【Abstract】 Objective To compare the success rate and stability of rat pulmonary fibrosis (PF) models induced by intratracheal instillation of different doses of bleomycin (BLM). **Methods** One hundred and fifty Sprague Dawley rats were divided randomly into control, low-dose BLM 3 mg/kg (BL-L), and high-dose BLM 5 mg/kg (BL-H) groups. General status, mortality, and weight changes were observed, and the lung inspiratory capacity (IC), vital capacity (VC), chord compliance (Cchord), and dynamic compliance (Cdyn) were detected on days 28, 42, 56, and 84. Lung coefficients were recorded and pathological changes in lung tissue were observed by hematoxylin and eosin and Masson staining. The lung hydroxyproline (HYP) content was detected and collagen type III (COL III) was detected by immunohistochemistry. **Results** The mortality rates in the BL-L and BL-H groups were 20% and 28%, respectively. Body weight was significantly lower in the BL-L group compared with the control group on days 0~56, and weight recovery after day 56. Body weight was significantly lower in the BL-H group compared with the control and BL-L groups from days 0~56 ($P < 0.01$). Regarding lung function, IC, VC, Cchord, and Cdyn were significantly lower in the BL-L group compared with the control group on day 28 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and IC and Cdyn were significantly lower in the BL-H group ($P < 0.01$). IC, VC, and Cchord were significantly decreased in the BL-L group on day 42 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while IC, VC, Cchord, and Cdyn were significantly decreased in the BL-H group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and IC, VC, and Cchord were significantly lower compared with in the BL-L group ($P < 0.01$). Cchord was significantly lower in the BL-H group compared with the control and BL-L groups on day 56 ($P < 0.01$). The lung coefficients on day 28 were significantly higher in the BL-L and BL-H groups compared with the control group ($P < 0.01$), and were significantly higher in the BL-H group from days 42~56 compared with the BL-L and control groups ($P < 0.01$). Regarding lung histopathology and immunohistochemistry, inflammatory infiltration, fibrotic streaks, and COL III expression were observed in the BL-L group from days 28~56, and almost complete disappearance of the fibrotic lesions on day 84. In contrast, fibrotic lesions could be observed from days 28~84 in the BL-H group, with significantly elevated COL III expression compared with the control group ($P < 0.01$). The HYP content was significantly higher in the BL-L group compared with the control group from days 28~42 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and then gradually decreased, and the HYP content was significantly higher in the BL-H group than in the control group from days 28~84 ($P < 0.01$). **Conclusions** Both 3 and 5 mg/kg BLM can successfully induce PF rat models. Rats treated with 3 mg/kg BLM developed fibrosis on day 28, which lasted until day 42 and then gradually recovered. Rats treated with 5 mg/kg BLM developed fibrosis on day 28, and the degree of fibrosis was more severe with the higher compared with the lower dose, with stable fibrotic lesions up to day 56 and moderate-to-severe fibrosis still present in half of the rats until day 84.

【Keywords】 pulmonary fibrosis; bleomycin; model comparison

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

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary disease, IPF) 是一种慢性弥漫性肺间质性疾病, 临床表现为进展性的呼吸困难, 病理特征为大量成纤维细胞增殖活化, 细胞外胶原广泛沉积, 并伴随大量炎症细胞浸润, 导致正常肺组织结构被破坏, 出现异常瘢痕增生^[1-2]。在亚太地区, IPF 的患病率估计在 57~451/百万人/年^[3], 并且发病率和死亡率正在逐渐上升^[4-6], IPF 患者的中位生存期约为 2.5~3.5 年^[7-8], 疾病进展导致的呼吸衰竭是 IPF 最常见的死亡原因^[9-10]。IPF 不仅威胁患者生命健康, 降低患者生存质量, 而且极大地加重了社会经济负担。目前临床常用药物为吡非尼酮和尼达尼布, 两者虽然能在一定程度上改善患者肺功能, 降低急性加重率, 但不能阻止病情进展或逆转肺部受损的纤维化区域^[11-12], 且存在诸多不良反应^[13-14]。如今 IPF 的

具体发病机制尚未完全明确, 患者对 IPF 新药的开发需求日益迫切, 探究出一种稳定、有效的动物造模方法对 IPF 的发病机制研究和药效评价研究有着重大意义。

现行的 IPF 动物造模方式众多, 常用的造模方法为使用一定剂量的博来霉素 (bleomycin, BLM) 对实验动物进行不同方式的干预^[15], 但大多数相关研究的实验周期较短, 这是由于 BLM 气管滴注所致的肺纤维化 (pulmonary disease, PF) 动物模型存在自限性, 即在造模完成后的一定时间内, 在不对造模动物进行任何干预的情况下, 其肺纤维化病理学改变会逐渐减轻, 肺功能也会逐渐恢复^[16]。目前尚未有研究对 PF 大鼠进行长期观察, 明确其病变消退的规律。目前实验大鼠常用剂量为 3 mg/kg^[17]、5 mg/kg^[18], 观察周期为第 14、21、28、

56 天^[19-21]。虽然有 BLM 诱导的肺纤维化模型存在自限性的报道^[22],但鲜有研究观察其恢复规律,无法为疗程较长的治疗方案(中药、康复等)提供模型参考。

基于此,本研究选用常用的 SD 大鼠为研究对象,采用 3 mg/kg 和 5 mg/kg BLM 气管内滴注诱导肺纤维化大鼠模型,进行为期 84 d 的追踪观察,对比两者成模情况及模型持续时间,为寻求有效疗法并探讨机制提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 实验动物

150 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体重 180~220 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]。实验大鼠均饲养于河南中医药大学动物实验室[SYXK(豫)2021-0015],保持室温 21~25 ℃,湿度 50%,每天昼夜对半循环照明,自由饮水进食,每 3 d 更换 1 次垫料。本研究通过河南中医药大学实验动物福利伦理审查委员会审查批准(DWLL202203014),遵守实验动物 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

注射用盐酸博来霉素(规格:每瓶 15 mg,批号 620780),购自日本化药株式会社;苏木素染液(北京索莱宝生物科技有限公司,G1120);伊红染色液染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,G1110);Masson 三色染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,G1340);羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)试剂盒(南京建成生物工程研究所,20240321)。非束缚小动物肺功能测量仪(Buxco, 美国);Leica-DM6000B 光学显微镜及 LAS V4.7 照相系统(Leica, 德国);Image-Pro Plus(IPP)6.0 专业图像分析系统(Media Cybernetics, 美国);Milli Synthesis 超净纯水机(Millipore, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 肺纤维化模型建立及分组

采用随机数表法将 150 大鼠分为空白组、BLM 低剂量组(BL-L 组,3 mg/kg)和 BLM 高剂量组(BL-H 组,5 mg/kg),每组各 50 只。第 1 天,BLM 低剂量组和 BLM 高剂量组大鼠接受一次性气管滴注博来霉素法建立肺纤维化模型,空白组给予生理盐水气管滴注。正常饲养,分别于第 28、42、56、84 天分批次取材。

1.3.2 大鼠一般情况

观察并记录各组大鼠造模前后的精神状态、饮水进食情况、外观变化和行为学变化。

1.3.3 死亡情况

造模后将各组大鼠归笼,自由饮水进食,正常环境饲养,统计各组大鼠死亡数量并分析。

1.3.4 体重变化

从造模第 1 天开始,每 14 d 称量 1 次大鼠体重并统计分析。

1.3.5 肺功能

分别于造模前、第 28、42、56、84 天采用动物肺功能检测系统检测大鼠深吸气量(inspiratory capacity, IC)、肺活量(vital capacity, VC)、肺准静态顺应性(chord compliance, Cchord)和肺动态顺应性(dynamic compliance, Cdyn)指标。

1.3.6 肺系数

取材前称量大鼠体重,取出肺组织后称量肺湿重,按以下公式计算肺系数=肺湿重/g/体重/kg×100%。

1.3.7 肺组织病理

使用 4% 的甲醛溶液固定左肺,脱水后进行包埋,切片进行 HE 和 MASSON 染色,显微镜下观察肺组织胶原沉积和肺组织炎症等病理变化。使用 Szapiel 评分^[23]评价肺泡炎症,Ashcroft 评分^[24]评价纤维化程度。

1.3.8 肺组织 HYP 含量

按照 HYP 试剂盒说明书取适量肺组织进行 HYP 含量测定。

1.3.9 肺组织免疫组化

采用免疫组织化学法检测肺组织中 COL III 的表达,每张切片显微镜下采集 10 个视野,使用 IPP 6.0 软件对采集到的图像进行定量分析,结果用积分光密度值(integral optical density, IOD)表示。

1.3.10 各组纤维化程度分析

使用 Ashcroft 评分量表反映大鼠的纤维化病变情况,拟定评分在 0~2 分范围的病变为轻度肺纤维化病变,3~6 分范围为中度肺纤维化病变,7~8 分范围为重度肺纤维化病变,统计各组各时间点的纤维化程度。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。实验数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),符合方差齐性的采用最小显著

差异法 (least-significant difference, LSD), 不符合方差齐性的采用 Dunnett T_3 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空白组大鼠活动自如, 精神状态良好, 饮水进食正常, 毛发洁白光亮; 造模第 0~20 天, BLM 低剂量组大鼠懒动, 精神状态稍差, 饮水进食量减少, 毛发枯黄无光泽, 呼吸稍显急促, 口唇及四肢颜色浅白; BLM 高剂量组大鼠活动受限, 精神萎靡, 毛发干枯, 部分大鼠体型明显瘦弱, 呼吸急促, 鼻翼煽动, 胸廓可见明显呼吸起伏, 唇舌及四肢颜色浅淡, 四肢抓力小。第 21 天以后, 大鼠整体状态较前平稳, 少部分大鼠出现四肢纤弱、腹部异常胀大的情况, 追踪观察发现此类大鼠陆续死亡。

2.2 死亡情况

造模后密切观察并统计各组大鼠死亡情况, 实验期间空白组大鼠无死亡; BLM 低剂量组在造模第 2 天死亡 3 只, 第 3~8 天未出现死亡, 第 9~20 天间断出现死亡, 共计死亡 10 只, 死亡率为 20%, 死亡大鼠鼻头有粘液渗出, 解剖可见肺部大量淤血, 胸膜粘连, 少数大鼠肺部可观察到灰白色瘢痕。 BLM 高剂量组在造模第 2~12 天连续出现大鼠死亡, 共计死亡 14 只, 死亡率为 28%, 死亡大鼠鼻头、眼角有少量血液渗出, 气管内可见大量黄色黏性分泌物, 肺部均可见大量淤血。 BLM 低剂量组和 BLM 高剂量组死亡率均显著高于空白组 ($P < 0.01$)。见图 1。

2.3 体重变化

实验期间各组大鼠体重整体呈上升趋势, 在第 14 天, BLM 低剂量组体重显著低于空白组 ($P < 0.01$), BLM 高剂量组体重显著低于空白组和 BLM 低剂量组 ($P < 0.01$); 第 28 天至第 56 天, BLM 低剂量组和 BLM 高剂量组体重增长缓慢, 且 BLM 高剂量组体重显著低于空白组 ($P < 0.01$); 第 70 天开始, 3 组大鼠体重差异均无统计学意义, 见图 2。

2.4 肺功能

实验期间空白组和 BLM 低剂量组肺功能随日龄增加稳步提升, 但 BLM 低剂量组肺功能较空白组增长缓慢, 第 28~42 天, BLM 低剂量组大鼠 IC、VC、Cchord、Cdyn 显著低于空白组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 第 56~84 天, BLM 低剂量组肺功能仍低于空白组, 但无统计学意义。 BLM 高剂量组大鼠第 28 天 IC

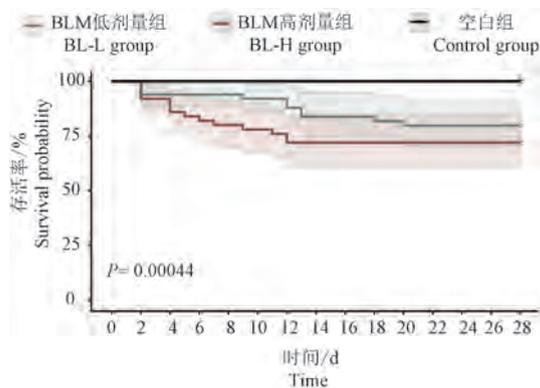
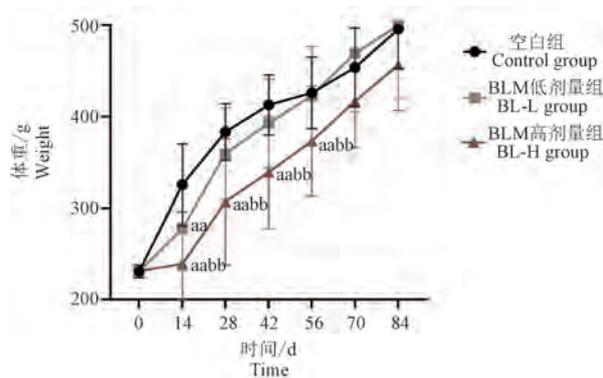


图 1 各组大鼠 28 d 生存曲线

Figure 1 28-day survival curve of each group



注: 与空白组比较, ^{aa} $P < 0.01$; 与 BLM 低剂量组比较, ^{bb} $P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠体重变化 ($n \geq 8$)

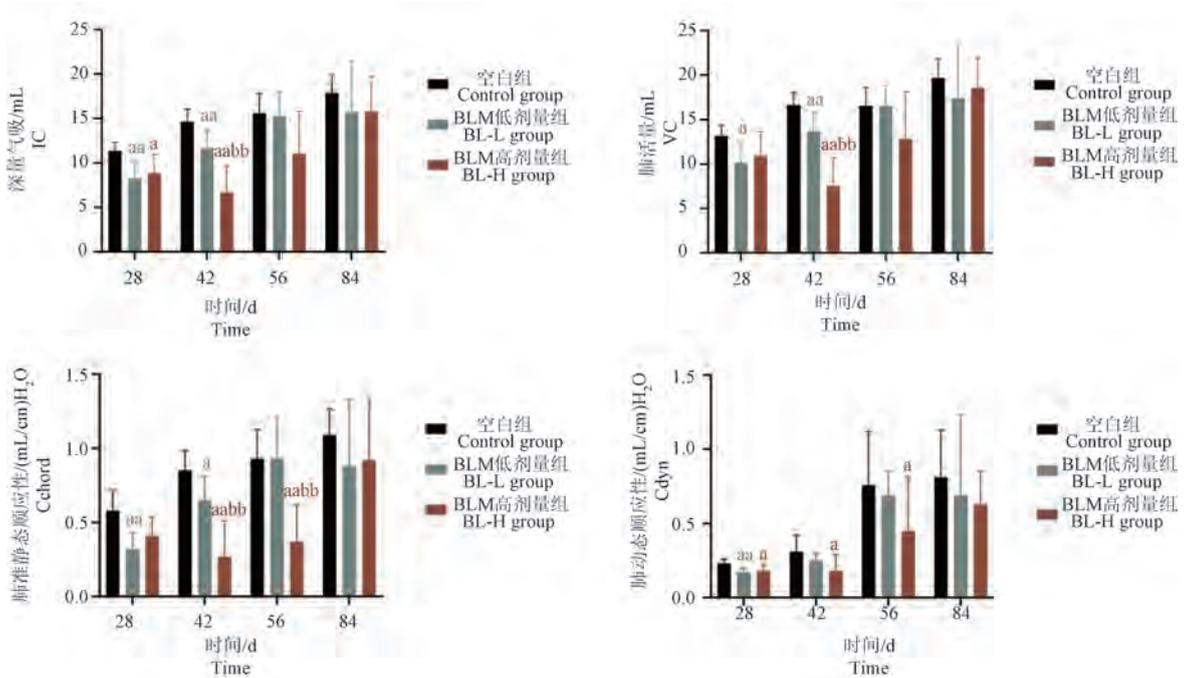
Note. Compared with control group, ^{aa} $P < 0.01$. Compared with BL-L group, ^{bb} $P < 0.01$.

Figure 2 Changes in body weight of rats

和 Cdyn 显著低于空白组 ($P < 0.01$); 第 42 天, IC、VC、Cchord、Cdyn 均显著低于空白组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 且 IC、VC、Cchord 显著低于 BLM 低剂量组 ($P < 0.01$); 第 56 天, Cchord、Cdyn 显著低于空白组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 第 84 天, 肺功能仍低于空白组, 但无统计学意义。两组肺功能均随时间缓慢增长, 增长速度低于空白组, 考虑与动物体重增加有关。见图 3。

2.5 肺系数

观察期间空白组大鼠的肺系数无明显变化。第 28 天, BLM 低剂量组和 BLM 高剂量组肺系数显著高于空白组 ($P < 0.01$)。第 42~56 天, BLM 高剂量组肺系数显著高于空白组和 BLM 低剂量组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), BLM 低剂量组肺系数略高于空白组, 但无统计学意义。第 84 天, 各组肺系数无明显差异, 见图 4。

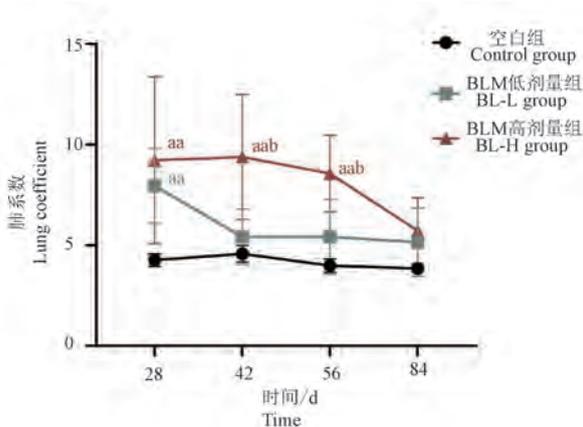


注:与空白组比较,^a $P < 0.05$,^{aa} $P < 0.01$;与BLM低剂量组比较,^{bb} $P < 0.01$ 。

图3 各组大鼠肺功能IC、VC、Cchord和Cdyn变化($n = 6 \sim 10$)

Note. Compared with control group, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$. Compared with BL-L group, ^{bb} $P < 0.01$.

Figure 3 Changes in IC, VC, Cchord and Cdyn of rat lung function



注:与空白组比较,^{aa} $P < 0.01$;与BLM低剂量组比较,^b $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠肺系数变化($n = 8 \sim 12$)

Note. Compared with control group, ^{aa} $P < 0.01$. Compared with BL-L group, ^b $P < 0.05$.

Figure 4 Changes in rat lung coefficient

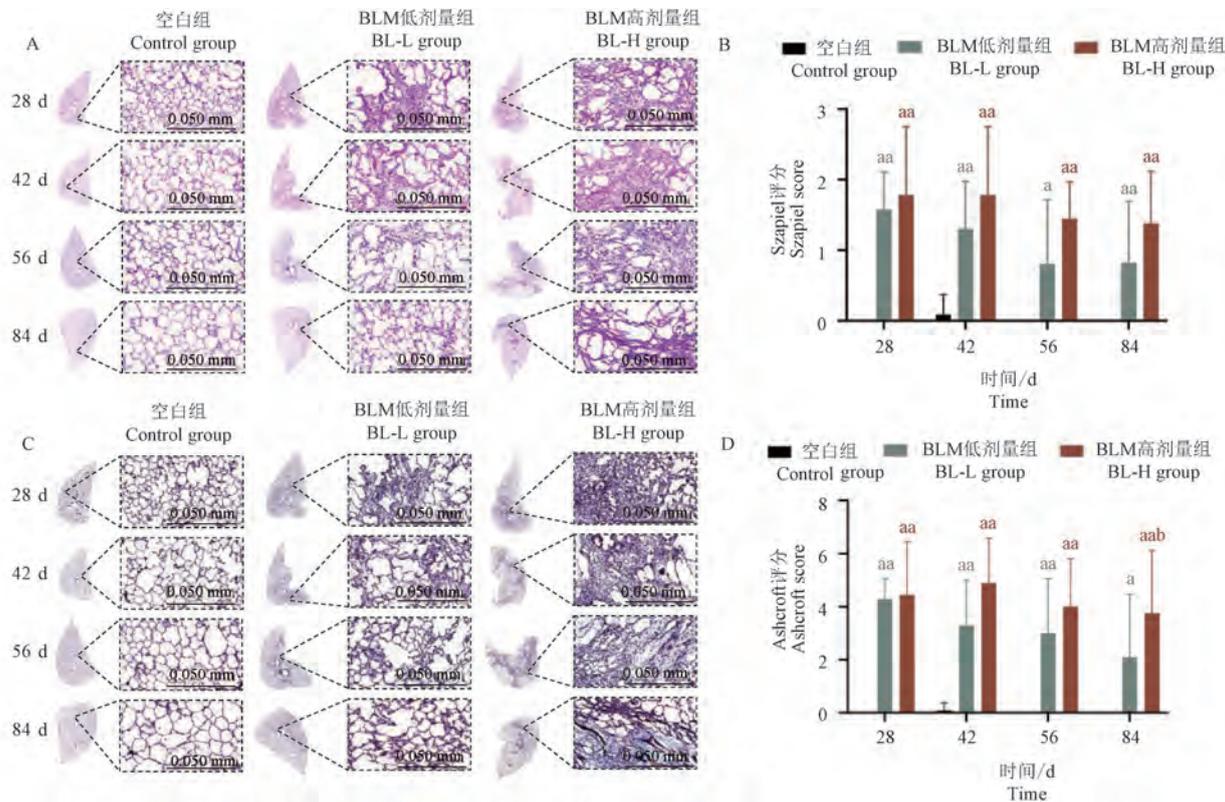
2.6 肺组织病理

肺组织病理结果显示,各时间点的空白组大鼠肺组织结构正常,肺泡壁清晰完整,无损伤。造模第28天,BLM低剂量组和BLM高剂量组大鼠肺组织HE染色可见肺泡腔内有炎性细胞浸润,肺泡壁破裂,肺组织结构紊乱,MASSON染色可见广泛蓝染

的纤维条索和明显胶原沉积。造模第42天,BLM低剂量组大鼠的炎症情况较第28天减轻,多数大鼠纤维化病变依旧严重,但有少数大鼠肺组织纤维化病变出现一定程度的消退,BLM高剂量组大鼠肺组织广泛形成纤维化病变,Ashcroft评分较第28天升高。造模第56天,BLM低剂量组大鼠的肺泡炎症和肺纤维化程度明显减轻,BLM组肺泡炎症改善,多数大鼠肺组织纤维化病变较第42天无明显变化,部分大鼠纤维化病变有所消退。造模第84天,BLM低剂量组大鼠的纤维化病变持续消退,部分大鼠肺组织已无明显纤维化病变,BLM高剂量组大鼠纤维化病变较之前明显改善,但仍有部分大鼠存在严重的纤维化病变。见图5。

2.7 肺组织HYP含量

如图6 HYP含量测定结果显示,空白组大鼠肺组织HYP含量在各时间点无明显变化。随着造模时间的推移,BLM低剂量组HYP含量呈现下降趋势,在第28~42天,HYP含量显著高于空白组($P < 0.05$, $P < 0.01$),第56~84天HYP含量仍高于空白组,但无统计学意义。而BLM高剂量组HYP含量先呈上升趋势,在第42天达到峰值,后逐渐下降,但都显著高于空白组($P < 0.01$)。

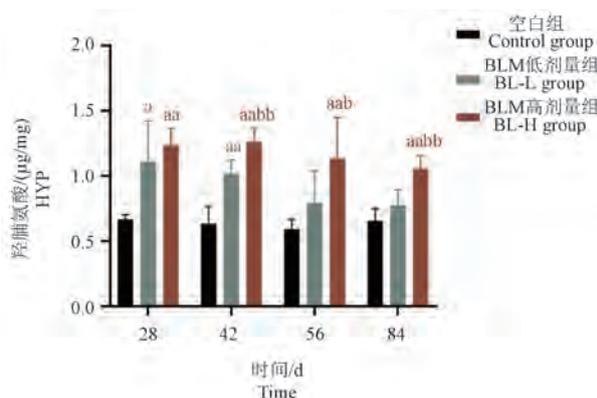


注:A:大鼠肺组织 HE 染色;B:大鼠肺组织 Szapiel 评分;C:大鼠肺组织 MASSON 染色;D:大鼠肺组织的 Ashcroft 评分。与空白组比较, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$,与 BLM 低剂量组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图 5 各组大鼠肺组织病理变化及评分

Note. A, HE staining of rat lung tissue. B, Szapiel score of rat lung tissue. C, MASSON staining of rat lung tissue. D, Ashcroft score of rat lung tissue. Compared with control group, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$. Compared with BL-L group, ^b $P < 0.05$.

Figure 5 Histopathologic changes and scores of rat lungs



注:与空白组比较, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$,与 BLM 低剂量组比较, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ 。

图 6 各组大鼠肺组织 HYP 含量($n = 6$)

Note. Compared with control group, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$. Compared with BL-L group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$.

Figure 6 HYP content in lung tissue of rats

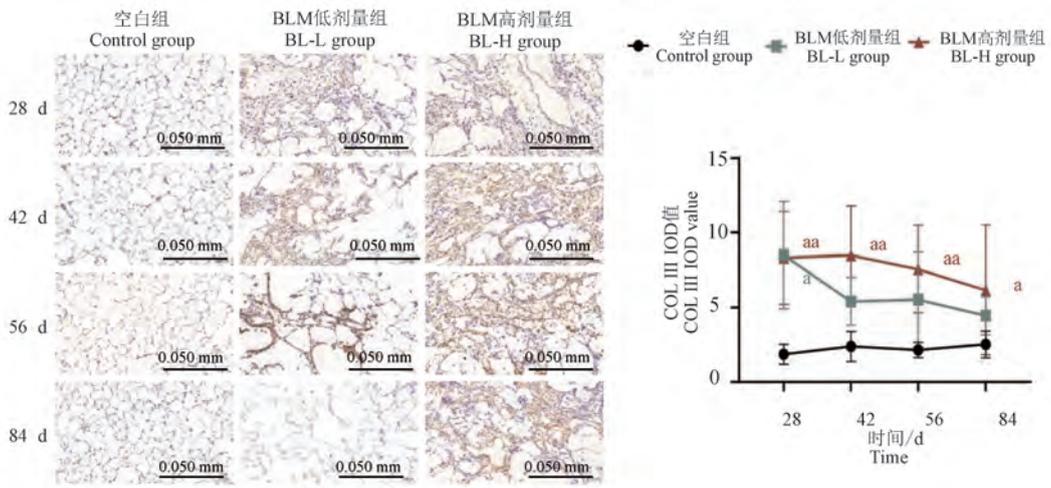
2.8 肺组织 COL III 表达

肺组织免疫组化结果显示,与空白组相比,BLM

低剂量组在造模第 28 天可观察到大鼠肺间质 COL III 高表达($P < 0.05$);在第 42、56 天 COL III 表达降低,第 84 天仅可观察到肺泡结构破坏;BLM 高剂量组大鼠在 4 个时间点均可观察到 COL III 高表达($P < 0.01, P < 0.05$)。见图 7。

2.9 各组纤维化程度分析

如图 8 所示,根据各组各时间点 Ashcroft 评分情况评价大鼠的纤维化程度,第 28 天,BLM 低剂量组大鼠均出现中度 PF 病变,BLM 高剂量组则有 11.11% 的大鼠轻度 PF 病变,66.67% 中度病变,22.22% 的大鼠重度病变。第 42 天,BLM 低剂量组有 30.00% 大鼠轻度病变,60% 的大鼠中度病变,10% 重度病变,有明显的纤维化改变,而 BLM 高剂量组大鼠的整体病变情况和第 28 天一致。第 56 天,BLM 低剂量组有 40.00% 的大鼠轻度 PF 病变,50% 中度病变,10% 重度病变,BLM 高剂量组则有 22.22% 的大鼠轻度病变,66.67% 中度病变,11.11% 重度病变,两组肺纤维化病变出现一定程度



注:与空白组比较,^a $P < 0.05$,^{aa} $P < 0.01$ 。

图 7 肺组织 COL III 蛋白表达 ($n = 8 \sim 12$)

Note. Compared with control group, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$.

Figure 7 COL III protein expression in lung tissue

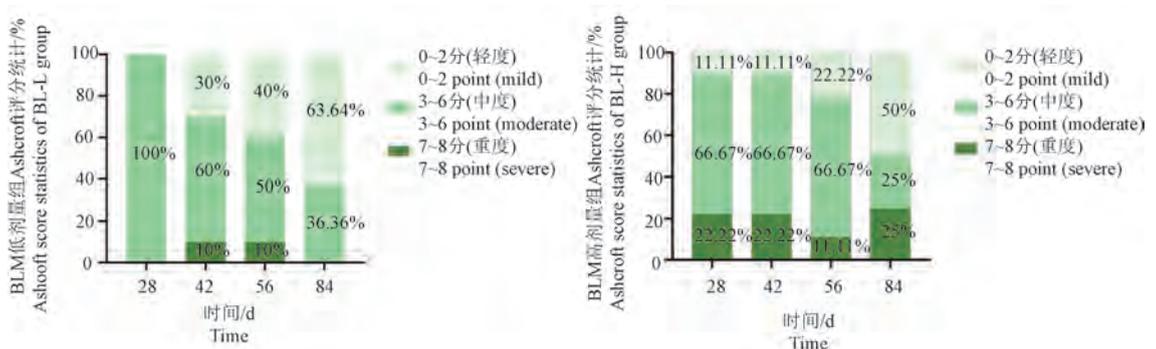


图 8 各组大鼠各时间点 Ashcroft 评分统计

Figure 8 Ashcroft score statistics of different groups of rats at different times

的消退。第 84 天, BLM 低剂量组有 63.64% 的大鼠轻度病变, 多数大鼠的纤维化病变明显减轻, 而 BLM 高剂量组有 50.00% 的大鼠轻度病变, 50% 中重度病变。

3 讨论

稳定的动物模型是研究疾病发病机制、探寻有效防治方法及机制的关键。多种因素可诱导肺纤维化动物模型, 如 BLM、石棉、二氧化硅、百草枯等, 其中 BLM 诱导的肺纤维化模型因其易操作、可复现、成模速度快、与人类疾病典型特征相似等优点而应用广泛, 造模动物包括鼠、猫、狗、马、兔、羊、猪等, 鼠类为最常用的造模动物; 诱导方式有气管内滴注、气管内雾化、尾静脉注射、腹腔注射和经鼻吸入, 以气管内滴注尤为常见^[25], BLM 造模剂量则根

据实验动物品种不同存在差异, 使用剂量大多在 3~5 mg/kg 范围内^[26-30]。BLM 诱导的肺纤维化病变会在一定时间内自行消退, 但其消退时间、消退程度及消退速度与 BLM 剂量的关系尚不清楚, 导致 IPF 的病理机制研究和药物作用评价均受限制。本研究旨在对比 3 mg/kg 和 5 mg/kg 两种 BLM 造模剂量制备的 PF 模型在不同时间节点的肺纤维化整体情况, 明确其病理阶段, 评价其成模特点。

肺功能为判断 PF 模型是否成功制备的重要指标, 由于肺纤维化大鼠肺组织弹性降低, 肺容积下降, 影响了肺通气功能和换气功能, 吸气时肺组织难以充分扩张, 呼气时也难以完全排出气体, 表现为深吸气量 IC 和肺活量 VC 的下降^[31]。纤维化的发生影响肺顺应性变化, 使准静态顺应性 C_{chord} 和动态顺应性 C_{dyn} 均降低^[32]。本研究发现, 两种剂

量 BLM 诱导的 PF 大鼠肺容积和肺顺应性第 28 天均显著降低, 3 mg/kg BLM 干预 PF 模型肺功能持续到第 42 天, 5 mg/kg BLM 干预的 PF 大鼠的肺功能下降持续到第 56 天。

有研究指出, 肺纤维化从炎症期到纤维化形成期间的病理阶段可大致分为 3 期: 急性炎症期、急性炎症-纤维化交界期、纤维化稳定期^[33-35]。炎症是肺纤维化的启动因素, 肺部受到有害物质的刺激时会激活巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞, 释放 TGF- β 、TNF- α 、IL-6 等细胞因子, 加剧肺部炎症^[36], 导致肺组织结构破坏和炎症细胞聚集。若刺激强度过大或者刺激因素持续存在, 会刺激成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 分泌过多的胶原蛋白和其他的细胞外基质对受损肺组织进行异常修复, 表现为肺泡壁增厚, 肺组织出现纤维条索或纤维团块, 最终导致肺纤维化的发生^[37]。本研究发现, 第 28 天, 两组大鼠肺泡腔内出现炎症细胞的大量聚集和广泛蓝染的纤维条索, BLM 低剂量组大鼠均处于急性炎症-纤维化交界期, 且纤维化病变已基本形成。而 BLM 高剂量组大鼠受到更加强烈持久的炎症刺激, 纤维化阶段在时间轴上的变化要滞后于 BLM 高剂量组, 处于急性炎症-纤维化交界期, 但肺功能尚未完全恶化, 纤维化病变正在形成。停止 BLM 刺激一段后, 大鼠炎症状态会逐渐消退, 进入稳定的肺纤维化病理阶段^[38]。细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 增加是肺纤维化的主要病理特征^[39], 胶原蛋白是 ECM 的主要成分, 尤其是 I 型和 III 型胶原蛋白^[40], 而 HYP 是胶原蛋白特有的氨基酸^[41], 其含量变化可以反映肺纤维化的严重程度, 肺系数也会随着肺纤维化的发生而上升。第 42 天, BLM 低剂量组多数大鼠已度过炎症期, COL III 大量表达, HYP 含量显著增加, 处于肺纤维化稳定期, 而 BLM 高剂量组肺组织的纤维化病灶进一步扩大, HYP 含量显著高于空白组和 BLM 低剂量组, 进入纤维化稳定期, 纤维化病变全面形成。随着观察时间增加, 大鼠的 PF 病变逐渐消退, 第 56 天, BLM 低剂量组有接近半数的大鼠纤维化病变有显著消退, BLM 高剂量组多数大鼠处于纤维化稳定期, 纤维化病变依旧明显。第 84 天, BLM 低剂量组大鼠的肺纤维化病变已出现大范围的消退, BLM 高剂量组有半数大鼠纤维化病变减轻, 但仍有部分大鼠纤维化持续存在, 少数进行性加重。

本研究结果表明, 3 mg/kg 和 5 mg/kg 的 BLM

均可成功制备 PF 模型, 但 5 mg/kg 的 BLM 对大鼠造成的刺激更大, 会导致更多数量的大鼠死亡, 对大鼠的生长抑制也更加明显。同时发现, 两种剂量 BLM 诱导的 PF 模型皆存在较大组内差异, 即同一剂量 BLM 干预的 PF 大鼠在同一时间点会出现部分大鼠纤维化病变消退, 部分大鼠病变进行性加重的情况, 提示造模过程应尽可能统一操作者水平, 实验过程应充分考虑动物死亡率及个体差异, 以免出现较大误差。

同时本研究也对实验设计有一些启示。进行肺纤维化相关实验时可根据实验目的选择不同剂量的博来霉素制备动物模型, 选择恰当的时间点进行观察。在进行损伤机制相关研究时, 两个剂量均可选用, 观察的时间点在第 28 天前; 如进行损伤后修复机制探讨, 3 mg/kg 的模型研究点可选取第 28~42 天, 5 mg/kg 的模型可选取第 42~84 天; 在进行疗程相对较长的疗法疗效及机制研究时, 可选用 5 mg/kg BLM 诱导的模型。但需注意的是, 不同品系动物、不同来源 BLM、不同造模方式等对模型的特点和稳定性均有影响, 研究中需注意观察。

参考文献:

- [1] RICHELDI L, COLLARD H R, JONES M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10082): 1941-1952.
- [2] CHENG H, FENG D, LI X, et al. Iron deposition-induced ferroptosis in alveolar type II cells promotes the development of pulmonary fibrosis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(12): 166204.
- [3] MAHER T M, BENDSTRUP E, DRON L, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 197.
- [4] HUTCHINSON J, FOGARTY A, HUBBARD R, et al. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review [J]. *Eur Respir J*, 2015, 46(3): 795-806.
- [5] HARARI S, MADOTTO F, CAMINATI A, et al. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis in northern Italy [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0147072.
- [6] DUCHEMANN B, ANNESI-MAESANO I, JACOB DE NAUROIS C, et al. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris [J]. *Eur Respir J*, 2017, 50(2): 1602419.
- [7] American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(2 Pt 1): 646-664.
- [8] American Thoracic Society, European Respiratory Society.

- American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001 [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(2): 277-304.
- [9] LEY B, COLLARD H R, KING T E Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(4): 431-440.
- [10] CAI M, ZHU M, BAN C, et al. Clinical features and outcomes of 210 patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Chin Med J*, 2014, 127(10): 1868-1873.
- [11] PETNAK T, LERTJITBANJONG P, THONGPRAYOON C, et al. Impact of antifibrotic therapy on mortality and acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Chest*, 2021, 160(5): 1751-1763.
- [12] DEMPSEY T M, SANGARALINGHAM L R, YAO X, et al. Clinical effectiveness of antifibrotic medications for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(2): 168-174.
- [13] 中华医学会呼吸病学分会间质性肺病学组, 中国医师协会呼吸医师分会间质性肺疾病工作委员会. 特发性肺纤维化急性加重诊断和治疗中国专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(26): 2014-2023.
- Interstitial Lung Disease Group of the Respiratory Disease Branch of the Chinese Medical Association, Interstitial Pulmonary Disease Working Committee of the Respiratory Physician Branch of the Chinese Medical Association. China expert consensus on diagnosis and treatment of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Natl Med J China*, 2019, 99(26): 2014-2023.
- [14] 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.
- [15] MOURATIS M A, AIDINIS V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2011, 17(5): 355-361.
- [16] IZBICKI G, SEGEL M J, CHRISTENSEN T G, et al. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis [J]. *Int J Exp Pathol*, 2002, 83(3): 111-119.
- [17] 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 bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2023, 39(12): 2296-2304.
- [18] 燕苗苗, 赵亚昆, 王搏, 等. 博来霉素诱导大鼠与小鼠肺纤维化模型的评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(2): 179-186.
- YAN M M, ZHAO Y K, WANG B, et al. Comparison and evaluation of different doses of bleomycin-induced pulmonary fibrosis models in mice and rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(2): 179-186.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 杨兴娜, 舒艳梅, 王金梁. 合并酸误吸的特发性肺纤维化大鼠抑酸治疗研究 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33(4): 330-332.
- YANG X N, SHU Y M, WANG J L. Effect of acid suppression therapy on idiopathic pulmonary fibrosis in rats with acid aspiration [J]. *J Chin Pract Diagn Ther*, 2019, 33(4): 330-332.
- [22] JENKINS R G, MOORE B B, CHAMBERS R C, et al. An official American thoracic society workshop report: use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(5): 667-679.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] ABIDI A, BAHRI S, BEN KHAMSA S, et al. A comparative study of intratracheal and aerosolization instillations of bleomycin inducing experimental lung fibrosis in rat [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2019, 29(2): 75-85.
- [27] PAN T, ZHOU Q, MIAO K, et al. Suppressing Sart1 to modulate macrophage polarization by siRNA-loaded liposomes: a promising therapeutic strategy for pulmonary fibrosis [J]. *Theranostics*, 2021, 11(3): 1192-1206.
- [28] LEE T H, YEH C F, LEE Y T, et al. Fibroblast-enriched endoplasmic reticulum protein TXNDC5 promotes pulmonary fibrosis by augmenting TGF β signaling through TGFBR1

- stabilization [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4254.
- [29] 陈孟毅, 孟爱民. 肺纤维化动物模型及研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(6): 88-93.
CHEN M Y, MENG A M. Introduction and research progress of animal models of pulmonary fibrosis [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(6): 88-93.
- [30] LV Q, WANG J, XU C, et al. Pirfenidone alleviates pulmonary fibrosis *in vitro* and *in vivo* through regulating Wnt/GSK-3 β / β -catenin and TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathways [J]. Mol Med, 2020, 26(1): 49.
- [31] 王岚, 柴桦, 梁斌苗, 等. 结缔组织疾病合并肺纤维化-肺气肿综合征 20 例临床分析并文献复习 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2017, 16(5): 484-489.
WANG L, CHAI H, LIANG B M, et al. Analysis of clinical characteristics of combined pulmonary fibrosis emphysema syndrome in 20 patients with connective tissue disease [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2017, 16(5): 484-489.
- [32] 朱蕾, 刘又宁, 钮善福. 临床呼吸生理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
ZHU L, LIU Y N, NIU S F. Clinical respiratory physiology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008.
- [33] NOBLE P W, BARKAUSKAS C E, JIANG D. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators [J]. J Clin Invest, 2012, 122(8): 2756-2762.
- [34] WICK G, GRUNDTMAN C, MAYERL C, et al. The immunology of fibrosis [J]. Annu Rev Immunol, 2013, 31: 107-135.
- [35] 彭玉华. 特发性肺间质纤维化中医药治疗思路与方法 [J]. 中医药学刊, 2003, 21(10): 1774-1775.
PENG Y H. Thoughts and methods of treating idiopathic pulmonary interstitial fibrosis with traditional Chinese medicine [J]. Study J Tradit Chin Med, 2003, 21(10): 1774-1775.
- [36] 孙健, 沈巨信. 炎症及细胞自噬与急性肺损伤关系的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(17): 2163-2168.
SUN J, SHEN J X. Research progress on relationship between inflammation and autophagy with acute lung injury [J]. Chin J Immunol, 2019, 35(17): 2163-2168.
- [37] HERRERA J, FORSTER C, PENG T, et al. Registration of the extracellular matrix components constituting the fibroblastic focus in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. JCI Insight, 2019, 4(1): e125185.
- [38] 吕晓东, 庞立健. 博来霉素致大鼠肺纤维化模型肺组织不同时间点的动态演变 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(3): 508-511.
LYU X D, PANG L J. Bleomycin induced rat model of pulmonary fibrosis lung tissue at different time points dynamic evolution process [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2010, 28(3): 508-511.
- [39] 陈金燃, 郭凯宁, 谢灵枫, 等. 细胞外基质的异常黏滞力经 talin1-vinculin 结合促进放射性肺纤维化进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(z1): 31.
CHEN J R, GUO K N, XIE L F, et al. The aberrant viscosity of the extracellular matrix is promoted by the binding of talin1-vinculin to promote the progression of radiopulmonary fibrosis [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2023, 37(z1): 31.
- [40] 李茜, 李小静, 李心怡. 富含半胱氨酸酸性糖蛋白在皮肤纤维化疾病中的研究进展 [J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(6): 137-140.
LI Q, LI X J, LI X Y. Research progress on secreted protein acidic and rich in cysteine in skin fibrosis disease [J]. J Clin Med Pract, 2023, 27(6): 137-140.
- [41] 梁杏梅, 刘喜华, 黄建春, 等. 玉朗伞查尔酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 35-41.
LIANG X M, LIU X H, HUANG J C, et al. Effect of Yulangsan Chalcone on the nuclear factor- κ B signaling pathway in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 35-41.

[收稿日期]2024-06-11

彭超杰,南淞华,吴林柯,等. 茯苓杏仁甘草汤调控巨噬细胞极化抑制动脉粥样硬化病变的进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 38-46.

Peng CJ, Nan SH, Wu LK, et al. Fuling Xingren Gancan granules regulate macrophage polarization and inhibit the progression of atherosclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 38-46.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.005

茯苓杏仁甘草汤调控巨噬细胞极化抑制动脉粥样硬化病变的进展

彭超杰¹,南淞华¹,吴林柯¹,孟雪¹,吴鸿^{1,2*}

(1.河南中医药大学第二附属医院,郑州 450002;2.河南中医药大学心血管病研究所,郑州 450002)

【摘要】 目的 探讨茯苓杏仁甘草汤 (Fuling Xingren Gancan granule, FXG) 对小鼠动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 巨噬细胞极化的调控作用。方法 ApoE^{-/-}小鼠构建 AS 模型, RAW264.7 巨噬细胞构建极化模型。油红 O 和苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 观察主动脉斑块总面积和主动脉管腔狭窄程度。荧光定量 PCR 和 Western blot 体内外检测 M1 型极化因子诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, CCL2) 和 M2 型极化因子精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1)、类几丁质酶样蛋白 (chitinase-like protein 3, YMI)、甘露糖受体 (CD206) 的表达水平及信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription, STAT3) 磷酸化水平。结果 FXG 明显减少 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块总面积、降低 M1 型巨噬细胞极化因子 iNOS、CCL2 表达水平, 升高 M2 型巨噬细胞极化因子 Arg-1、YMI 表达水平 ($P < 0.05$)。模型组小鼠和 M1 型巨噬细胞 STAT3 磷酸化水平降低, 在 FXG 干预后其磷酸化水平上调 ($P < 0.05$)。P-STAT3 抑制剂 Stattic 部分消除了 FXG 对 iNOS 和 Arg-1 的调控作用 ($P < 0.05$)。结论 FXG 具有抑制 AS 进展的作用, 其作用与靶向 STAT3 调控巨噬细胞极化有关。

【关键词】 茯苓杏仁甘草汤; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞极化; 信号转导和转录激活因子 3

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0038-09

Fuling Xingren Gancan granules regulate macrophage polarization and inhibit the progression of atherosclerosis

PENG Chaojie¹, NAN Songhua¹, WU Linke¹, MENG Xue¹, WU Hong^{1,2*}

(1. the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China.

2. Institute of Cardiovascular Disease, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002)

【Abstract】 **Objective** To investigate the regulatory effect of Fuling Xingren Gancan granules (FXG) on macrophage polarization in atherosclerosis (AS) model mice. **Methods** ApoE^{-/-} mice were used to construct an AS model and RAW264.7 macrophages were used to construct a polarized cell model. The total area of aortic plaques and the degree of aortic stenosis were detected by Oil red O and hematoxylin and eosin staining, respectively. Expression levels of the M1 polarization factors inducible nitric oxide synthase (iNOS) and chemokine ligand 2 (CCL2), as well as the M2 macrophage

【基金项目】 河南省自然科学基金面上项目 (232300420054); 河南省科技研发计划联合基金 (222301420088); 河南省高校重点科研项目 (23A360013)。

【作者简介】 彭超杰 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治心血管疾病。E-mail: pengcj6699@163.com

【通信作者】 吴鸿 (1974—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治心血管疾病。E-mail: kevin5me@126.com

factors Arg-1, YM1, and CD206, and the phosphorylation levels of signal transducer and activator of transcription (STAT3) *in vitro* and *in vivo* were detected by polymerase chain reaction and Western blot. **Results** FXG significantly reduced the total area of aortic plaques in ApoE^{-/-} mice, decreased the expression levels of the M1 macrophage polarization factors iNOS and CCL2, and increased the expression levels of the M2 macrophage polarization factors Arg-1 and YM1 ($P < 0.05$). STAT phosphorylation levels were decreased in the model mice and M1 macrophages, but were upregulated after FXG intervention ($P < 0.05$). The STAT3 inhibitor Stattic partially eliminated the regulatory effect of FXG on iNOS and Arg-1 ($P < 0.05$). **Conclusions** FXG has an inhibitory effect on the progression of AS, via targeting STAT3 to regulate macrophage polarization.

[Keywords] Fuling Xingren Gancao granule; atherosclerosis; macrophage polarization; STAT3

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

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是导致多种心血管疾病发生发展的病理基础^[1]。巨噬细胞在 AS 病变过程中极化为不同表型参与全部病理阶段^[2]。巨噬细胞可以极化为促炎性经典激活表型 (M1 型), 或者抗炎性交替激活表型 (M2 型)^[3], 其表型比例失衡是 AS 发生发展的重要因素^[4]。研究表明, 巨噬细胞极化受信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription, STAT3) 调控^[5]。茯苓杏仁甘草汤 (Fuling Xingren Gancao granule, FXG) 是临床用于治疗心血管疾病 (胸痹) 的经典方。有研究报道, FXG 具有抑制大鼠心肌细胞凋亡、改善心肌缺血等作用^[6-7]。前期研究表明, FXG 能抑制 AS 小鼠炎症反应和脂质沉积^[8-9], 但机制尚不明确。本研究基于前期研究基础, 观察 FXG 对 AS 病变中 M1 型巨噬细胞极化因子诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, CCL2) 和 M2 型巨噬细胞极化因子精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1)、类几丁质酶样蛋白 (chitinase-like protein 3, YM1) 以及 M2 型巨噬细胞标志蛋白甘露糖受体 (CD206) 表达水平和 STAT3 磷酸化水平的影响, 探讨其干预 AS 进展的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7) 购自中国科学院昆明细胞库 (KCB), 编号: KCB200603YJ。

1.1.2 实验动物

45 只 SPF 级 8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠, 15 只同品系 SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠, 体重 (20±

2)g, 由江苏省赛业模式生物研究中心 (太仓) 有限公司提供 [SCXK (苏) 2020-0006]。动物实验在河南省中医院中心实验室 SPF 级动物中心进行 [SYXK (豫) 2021-0018]。实验室环境 12 h/12 h 明/暗交替, 温度恒定为 22~24 °C, 以每笼 4 只, 自由进食进水饲养。动物实验获得河南中医药大学第二附属医院动物伦理委员会批准 (HNSZYY-20200529)。在实验中, 动物饲养和实验过程中按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

茯苓杏仁甘草汤: 茯苓 45 g、杏仁 15 g、甘草 15 g, 由四川新绿药科技发展有限公司生产的配方颗粒剂提供 (批号: 茯苓 21060127、杏仁 21060027、甘草 21060124)。Arg-1 抗体、iNOS 抗体 (Gene Tex, GTX109242、GTX13024); STAT3 抗体、磷酸信号转导和转录激活因子 3 (phosphorylation STAT3, P-STAT3) 抗体 (Cell Signaling Technology, #4904、#9145S); CD206 抗体、Cy3 标记山羊抗兔二抗、FITC 标记山羊抗兔二抗、 β -actin (武汉三鹰生物技术公司, 18704-1-AP、SA00009-2、SA00003-2、81115-1-RR); 总 RNA 抽提纯化试剂盒 (上海生工, B518621); 逆转录聚合酶链反应试剂盒、荧光定量试剂盒 (TaKaRa, RR047A、RR820A); BCA 蛋白定量试剂盒; 苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色试剂盒 (京索莱宝, G1120); 干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) (PeproTech, 315-05); 白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) 重组蛋白 (PeproTech, AF-214-14); 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、油红 O 粉末 (Sigma, L2880、1002391130); STAT3 抑制剂 Stattic CAS (Santa Cruz, 19983-44-9); 高脂饲料 (南京麦瑞斯生物科技有限公司, D12108C)。

蛋白垂直电泳仪、转印仪、凝胶图像系统、荧光

定量 PCR 定量仪 (Bio-Rad, 164-5070、170-4070、170-8265、CFX Connect); 荧光显微镜 (Nikon, Ti-E); 荧光定量 PCR 扩增仪 (Thermo Fisher Scientific, 7500Fast); 超微量核酸蛋白测定仪 (南京五义科技有限公司, Onedrop 2000); 超速低温离心机 (Sigma-Aldrich, SIGMA 3-18K)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠分组及造模方法

45 只 ApoE^{-/-} 小鼠分为模型组、茯苓杏仁甘草汤 (茯苓甘, FXG) 组、瑞舒伐 (Rosuvastatin, RST) 组, 每组 15 只。空白组饲喂普通饲料, 其余各组给予高脂饲料 (成分: 蛋白质 23%、碳水化合物 45%、脂肪 20%、其他 12%) 喂养。灌胃给药与高脂饮食同步进行, 均采用临床等效量给药, 每天灌胃给药 1 次。空白组、模型组给予等量 0.9% 氯化钠溶液灌胃。持续 16 周^[10-11]。

1.3.2 干预药物配备

茯苓杏仁甘草汤: 将 1 剂中药溶于 40 mL 去离子水中, 煮沸并超声溶解, 给药量按照小鼠与人体表面积换算等效剂量, 最终小鼠给药浓度为 0.006 mL/g。

瑞舒伐他汀钙: 同上, 将 1 片瑞舒伐他汀钙溶于 40 mL 去离子水, 超声充分溶解, 置于冰箱保存。

1.3.3 RAW264.7 巨噬细胞造模及干预方法

LPS (100 ng/mL) 和 IFN- γ (20 ng/mL) 刺激 RAW264.7 巨噬细胞 12 h 建立 M1 型巨噬细胞极化模型, IL-4 (20 ng/mL) 刺激 12 h 建立 M2 型巨噬细胞极化模型^[12], 造模前 24 h 加入 FXG 和 Stattic 干预。细胞分为空白组、M1 模型组 (LPS+IFN- γ)、FXG 组 (LPS+IFN- γ +FXG)、M2 阳性对照组 (LPS+IFN- γ +IL-4)、STAT3 抑制剂组 (LPS+IFN- γ +FXG+Stattic), 干预后收集各组细胞及细胞上清。

1.3.4 存取组织标本

小鼠取材前 12 h 禁食禁水, 4% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 留取血液标本, 冰生理盐水进行心脏灌注, 分离肝、脾等脏器, 迅速剥离小鼠完整胸腹主动脉, 并尽量保留主动脉弓、头臂干、左侧颈总动脉、左锁骨下动脉, 部分用 4% 多聚甲醛固定, 剩余保存于 -80 °C 冰箱中, 用于进行后续实验。

1.3.5 油红 O 染色

将分离后的主动脉在体式显微镜下剔除主动脉管腔外的脂肪组织及外膜, 室温固定漂洗后, 将主动脉沿管腔剪开, 60% 异丙醇中浸洗 3 s 后将主动脉浸没于 0.3% 油红 O 工作液中密闭孵育 10 min, 将主动脉平铺于显微镜下拍照。

1.3.6 HE 染色

组织切片脱蜡后滴加苏木素染色液染色 10 min, 流动水冲洗后, 滴加分化液分化 30 s, 自来水浸洗 3 次, 伊红染色液染色 30 s, 镜检观察染色情况。中性树胶封片。在显微镜下进来暴露完整主动脉根部组织, 观察各组小鼠主动脉根部斑块病理情况。

1.3.7 荧光定量 PCR 检测各组小鼠巨噬细胞极化因子 mRNA 的表达水平

剪取主动脉组织或收集各组细胞后, 提取并检测各组总 RNA 纯度及浓度, 逆转录为 cDNA。分别加入上下游引物、TB GREEN 等进行检测, 空白组做参照, β -actin 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。引物序列由上海生工提供, 见表 1。

1.3.8 Western blot 检测各组小鼠 iNOS、Arg-1、P-STAT3/STAT3 蛋白表达水平

剪取适量主动脉组织置于离心管, 或细胞培养板内每孔加入 80 μ L 裂解液 (RIPA 裂解液: PMSF = 100 : 1) 和磷酸酶抑制剂, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 以 120 V 恒压垂直电泳 20 min, 240

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Fluorescence quantitative PCR primer sequence

基因名称 Gene name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	引物长度/bp Primer length
一氧化氮合酶 iNOS	F: GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA R: GTGGACGGTCGATGTCAC	23 19
单核细胞趋化蛋白 1 CCL2	F: GAGATGCCTCAGCAGAGTGAAGA R: AGGCTTGCCAACCCAGGTAAC	24 21
精氨酸酶-1 Arg-1	F: CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG R: AGGAGCTGTCAATTAGGGACATC	22 22
类几丁质酶样蛋白 YM1	F: AGAAGGAGTTTCAAACCTGGT R: GTCTTGCTCATGTGTAAAGTGA	22 23
内参 β -actin	F: AGAAGCTGTGCTATGTTGCTCTA R: AAGGCTGAAAAGGCCTCAG	23 21

V 恒压电泳 30 min 电泳跑胶, 恒定电流 0.24 A 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 转膜 1 h。5% 脱脂奶粉溶液中室温摇床封闭 1 h 后孵育抗体并显影。一抗比例如下: iNOS (1 : 2000)、Arg-1 (1 : 2000)、P-STAT3 (1 : 1500)、STAT3 (1 : 2000)、 β -actin (1 : 4000)、二抗 (1 : 4000)。

1.4 统计学方法

GraphPad Prism 8.1 软件对所有实验数据进行统计分析和作图, 实验结果以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 方式呈现。数据分析多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FXG 对小鼠主动脉斑块面积的影响

油红 O 染色结果如图 1A 所示, 与模型组比较, FXG 干预后明显减少了主动脉中斑块总面积, 减轻病变程度 ($P < 0.05$)。图 1B 中 HE 染色显示, 与模型组比较, FXG 组管腔狭窄程度降低。

2.2 FXG 对小鼠主动脉组织极化因子 mRNA 表达量的影响

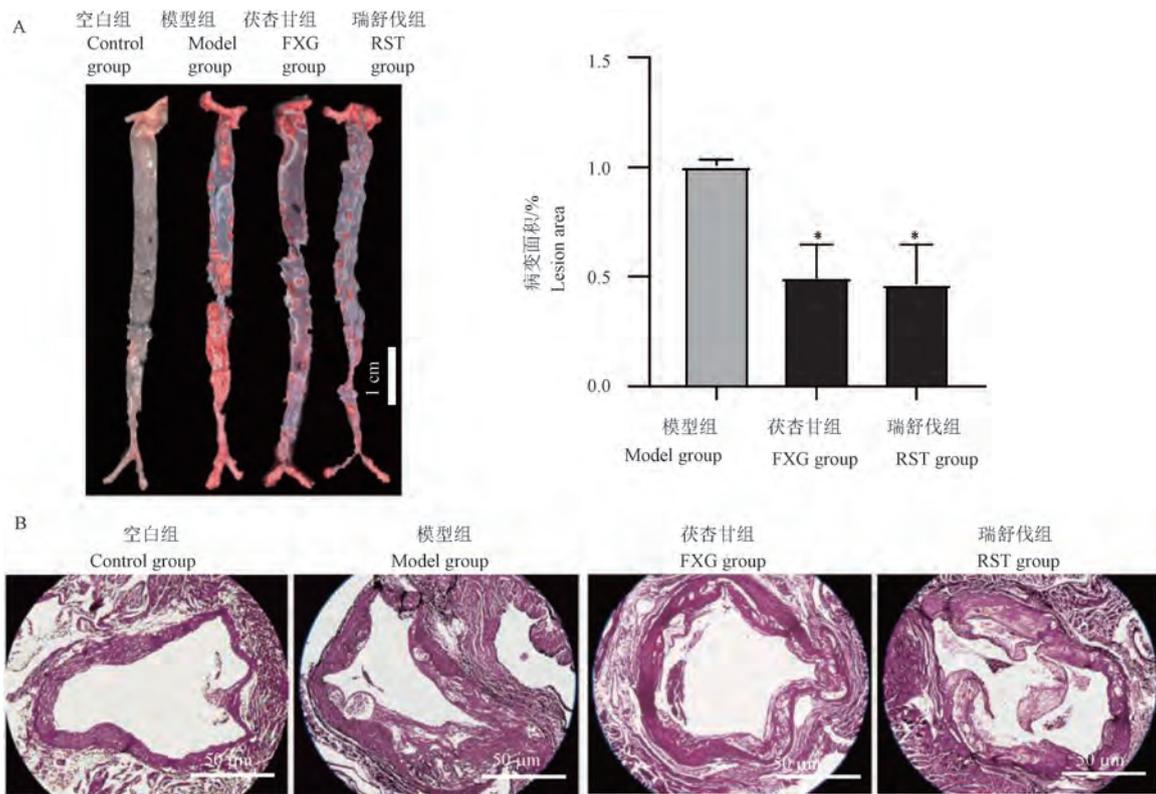
如图 2 所示, 极化因子表达水平可以反映 FXG 对巨噬细胞极化的调控作用, 与模型组比较, FXG 组 M1 型巨噬细胞极化因子 iNOS、CCL2 mRNA 表达水平降低, M2 型极化因子 Arg-1、YM1 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$)。

2.3 FXG 对小鼠主动脉组织极化因子蛋白表达量的影响

如图 3 所示, 与模型组比较, FXG 干预后小鼠主动脉斑块内 iNOS 蛋白表达水平明显降低, M2 型巨噬细胞标志蛋白 CD206 和极化因子 Arg-1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。

2.4 FXG 对 STAT3 磷酸化水平的影响

多项研究表明 STAT3 为驱动 M2 型巨噬细胞极化和抑制炎症反应的关键途径^[13-14]。因此, 为探索 FXG 调节巨噬细胞极化因子的作用是否与 STAT3 激活有关, 分别在体内外检测了 STAT3 及其磷酸化蛋白表达水平。如图 4A、4B 所示, 与空白组比较,



注: A: 小鼠主动脉油红 O 染色及斑块面积统计; B: 小鼠主动脉根部斑块 HE 染色。与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠主动脉组织病理变化 (HE, $n = 3$)

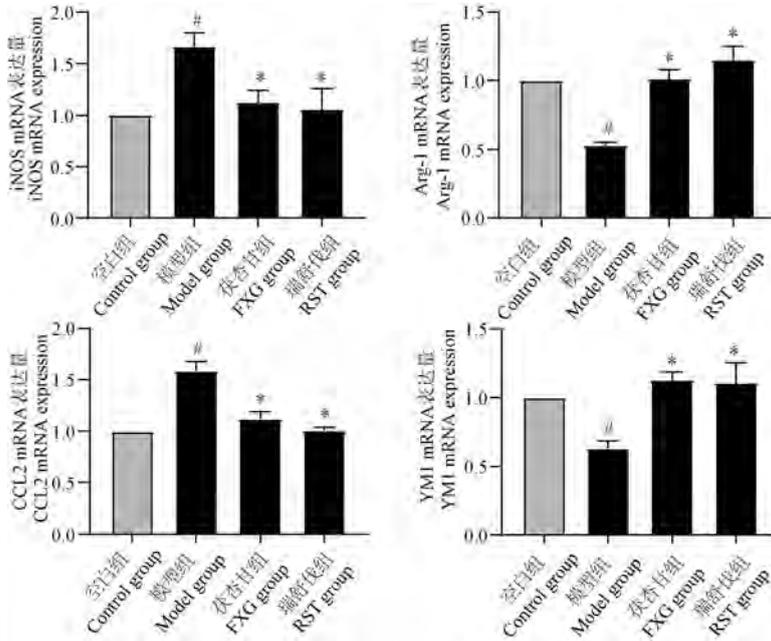
Note. A, Mouse aortic Oil red O staining and plaque area statistics. B, HE staining of mouse aortic root plaques. Compared with the Model group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Pathological changes in aortic tissue of mice in each group (HE, $n = 3$)

AS 小鼠和 M1 型巨噬细胞模型组的 STAT3 磷酸化水平均明显降低 ($P < 0.05$), 而经 FXG 干预后 STAT3 磷酸化水平在体内外均有所回升 ($P < 0.05$)。

2.5 FXG 对 STAT3 磷酸化水平和极化因子 iNOS、Arg-1 的表达量的影响

如图 5 所示, 进一步利用 STAT3 抑制剂 Stattic

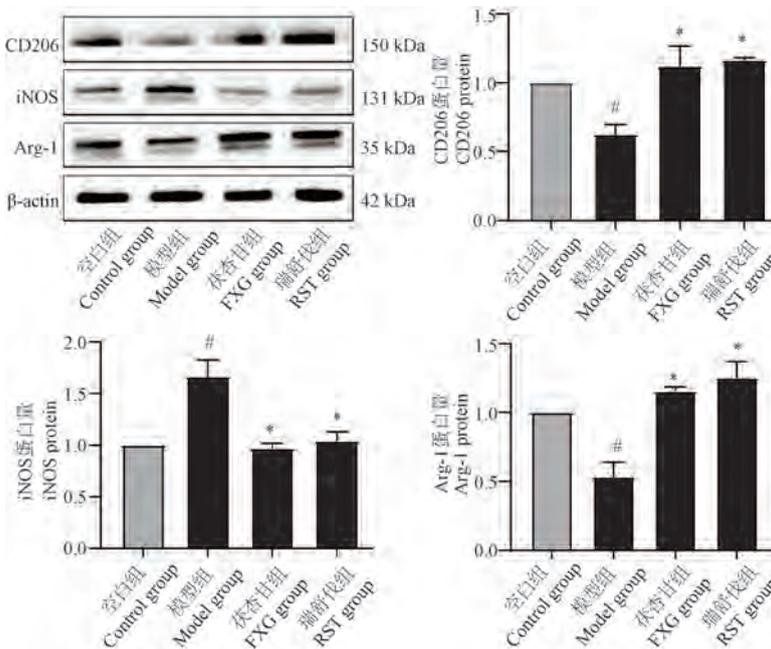


注: 与空白组比较, $\#P < 0.05$; 与模型组比较, $*P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠主动脉组织内巨噬细胞极化因子的 mRNA 表达水平 ($n = 3$)

Note. Compared with the Control group, $\#P < 0.05$. Compared with the Model group, $*P < 0.05$.

Figure 2 mRNA expression levels of macrophage polarization factor in the aortic tissues of mice in each group

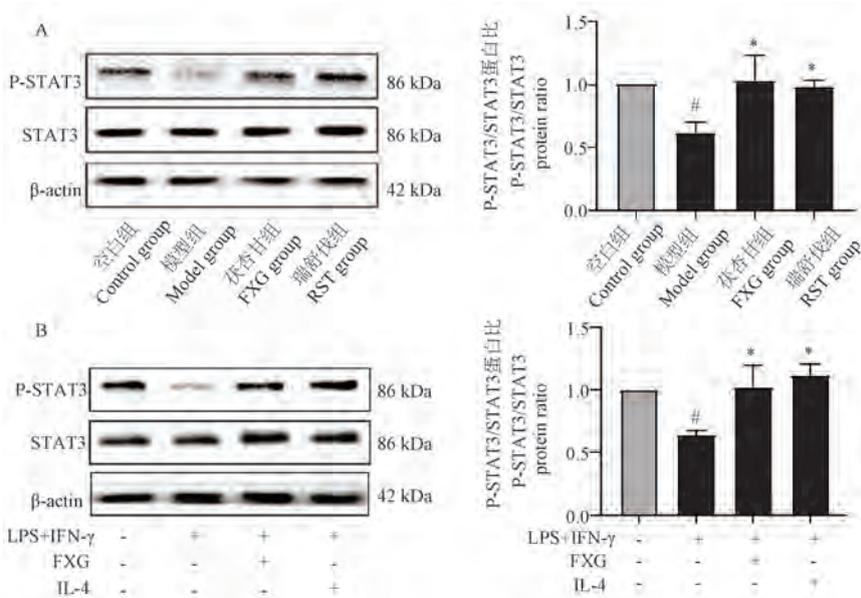


注: 与空白组比较, $\#P < 0.05$; 与模型组比较, $*P < 0.05$ 。

图 3 各组小鼠主动脉组织内巨噬细胞极化因子的蛋白表达水平 ($n = 3$)

Note. Compared with the Control group, $\#P < 0.05$; Compared with the Model group, $*P < 0.05$.

Figure 3 Protein expression levels of macrophage polarization factor in the aortic tissue of mice in each group

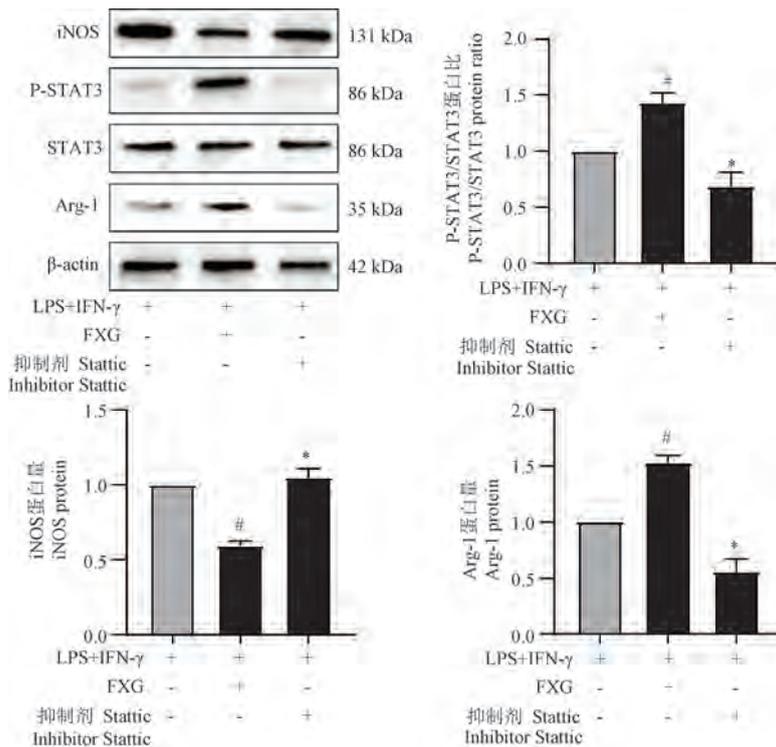


注:A;Western blot 检测小鼠主动脉组织内 P-STAT3/STAT3 蛋白表达水平;B;Western blot 检测 RAW264.7 巨噬细胞内 P-STAT3/STAT3 蛋白表达水平。与空白组比较, # $P<0.05$;与模型组比较, * $P<0.05$ 。

图 4 各组小鼠主动脉斑块和 RAW264.7 巨噬细胞内 iNOS、Arg-1 和 P-STAT3/STAT3 蛋白表达水平($n=3$)

Note. A, Western blot detection of P-STAT3/STAT3 protein expression levels in mouse aortic tissue. B, Western blot detection of P-STAT3/STAT3 protein expression levels in RAW264.7 macrophages. Compared with the Control group, # $P<0.05$. Compared with the Model group, * $P<0.05$.

Figure 4 Expression levels of iNOS, Arg-1, and P-STAT3/STAT3 proteins in aortic plaques and RAW264.7 macrophages of mice in each group



注:与 LPS+IFN-γ 组比较, # $P<0.05$;与 FXG 组比较, * $P<0.05$ 。

图 5 各组 RAW264.7 巨噬细胞内 iNOS、Arg-1 和 P-STAT3/STAT3 蛋白表达水平($n=3$)

Note. Compared with the LPS+IFN-γ group, # $P<0.05$. Compared with the FXG group, * $P<0.05$.

Figure 5 Expression levels of iNOS, Arg-1, and P-STAT3/STAT3 proteins in RAW264.7 macrophages of each group

对茯苓杏仁甘草汤治疗后的 RAW264.7 巨噬细胞进行处理,发现与 FXG 组比较,Stattic 组抑制 P-STAT3 表达($P<0.05$),同时升高 iNOS 表达水平,降低了 Arg-1 表达水平($P<0.05$),提示 FXG 抑制 iNOS 和促进 Arg-1 表达水平的作用随着 P-STAT3 表达被抑制而消除。

3 讨论

巨噬细胞在 AS 病变过程中主要极化为 M1 表型 M2 表型^[15],其中 M1 型巨噬细胞介导炎症反应,促进 iNOS、CCL2 等促炎因子产生,加剧 AS 慢性炎症状态^[16]。而 M2 型巨噬细胞释放 Arg-1、YM1 等因子,促进受损血管修复^[17],降低胆固醇积累,发挥抗 AS 和稳定斑块的作用^[18]。AS 斑块的进展和稳定性取决于浸润巨噬细胞的数量、极化状态以及不同表型巨噬细胞的比例^[19],通过靶向调控巨噬细胞极化状态成为防治 AS 的重要途径。

AS 归属于中医学“胸痹”范畴,M1 型和 M2 型巨噬细胞在 AS 中的作用与阴阳的对立制约、相互转化关系相似^[20],调节巨噬细胞极化,维持其表型比例平衡是 AS 防治的重要思路。许多应用于炎症性疾病的中药被证明具有调控巨噬细胞极化的作用^[21]。茯苓杏仁甘草汤由茯苓、杏仁、甘草三味药组成,现代研究表明,茯苓三萜提取物制造的透明质酸水凝胶能够调控 M2 型巨噬细胞极化,从而抑制炎症反应^[22]。羧甲基茯苓多糖可以增强巨噬细胞吞噬功能,降低其 CCL2 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 分泌水平,刺激巨噬细胞向 M2 型极化^[23]。苦杏仁苷抑制巨噬细胞白细胞介素(interleukin, IL)-6、TNF- α 的表达水平,增加 IL-10 表达水平,抑制 AS 病变进展^[24]。从甘草中提取的类黄酮异甘草素^[25]和 GLA^[26]被证明具有抗炎、抗氧化活性的作用,降低 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平,增加 M2 细胞因子 IL-10 和 TGF- β 表达水平,减少化疗药物引起的心脏毒性。总之,茯苓、杏仁、甘草的单体及其有效成分均被证明具有抑制 AS 和调控巨噬细胞极化的作用。团队前期研究也表明,FXG 能够减少 AS 小鼠主动脉斑块面积,降低其体重并改善血脂水平,抑制 AS 小鼠血清炎症因子水平^[8-9]。本研究结果提示,FXG 通过降低 iNOS、CCL2 表达水平,升高 Arg-1、YM1、CD296 表达水平,抑制 M1 型巨噬细胞极化,促进 M2 型巨噬细胞极化,从而减少斑块面积,抑制 AS 进展。

AS 的主要病理因素是血管壁内持续的慢性炎症反应。STAT3 在炎症反应和免疫控制中起着关键作用,过度激活或失活都会导致人类疾病^[27]。IL-10 和 IL-4 可以通过酪氨酸磷酸化 STAT3,提高其活性,抑制促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-12 和 IFN- γ 的水平,促进巨噬细胞向 M2 型极化,释放抗炎性和修复性细胞因子 IL-10、TGF- β 、Arg-1、血管内皮生长因子等,加速炎症消退、参与修复和重塑受损组织,发挥保护血管和抗 AS 作用^[28-29]。有研究报道,Wnt3a 通过激活 STAT3,响应 IL-4 诱导 M2 型巨噬细胞极化,从而促进小鼠 AS 斑块消退^[30]。白藜芦醇激活 STAT3 通路,抑制 NF- κ B 活性,从而抑制 M1 型巨噬细胞,增加 M2 型巨噬细胞,抑制 LPS 诱导的小鼠疾病发展^[31]。与这些研究一致,本研究结果表明 FXG 促进巨噬细胞向 M2 表型极化,并能升高 STAT3 磷酸化水平。随后探索了 FXG 调控巨噬细胞极化与调控 STAT3 磷酸化水平是否存在作用关系。结果表明,在使用 STAT3 抑制剂后,FXG 降低 iNOS、升高 Arg-1 的作用伴随 P-STAT3 水平降低而消除,提示 FXG 是通过调节 STAT3 活性来发挥调控巨噬细胞极化作用的。

综上所述,FXG 可减少 AS 斑块形成,其作用机制与促进 P-STAT3 表达水平从而调控巨噬细胞向 M2 表型转换有关。本研究结果揭示了中药复方在治疗 AS 这类复杂疾病时的优势,为临床应用 FXG 及研发 AS 等慢性炎症疾病的治疗性药物提供了实验依据,但其具体调控机制还有待进一步阐明。

参考文献:

- [1] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2022 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2022, 145(8): e153-e639.
- [2] TABAS I, BORNFELDT K E. Intracellular and intercellular aspects of macrophage immunometabolism in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2020, 126(9): 1209-1227.
- [3] MURRAY P J. Macrophage polarization [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 541-566.
- [4] LEE S G, OH J, BONG S K, et al. Macrophage polarization and acceleration of atherosclerotic plaques in a swine model [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193005.
- [5] WANG G, LIU X, LI X, et al. Suppression of PAPP-a mitigates atherosclerosis by mediating macrophage polarization via STAT3 signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 543: 29-37.
- [6] 陈新宇,文凯,蔡虎志,等. 茯苓杏仁甘草汤合橘枳姜汤对

- 急性心肌缺血大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(3): 165-168.
- CHEN X Y, WEN K, CAI H Z, et al. Effect of decoction of *Poria Cocos*, *Semen Armeniacae Amarum*, and *Radix Glycyrrhizae* combined with decoction of tangerine peel, immature bitter orange, and fresh ginger on cardiomyocyte apoptosis in rats with acute myocardial ischemia [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2016, 32(3): 165-168.
- [7] 陈新宇, 姜玲, 张世鹰, 等. 茯苓杏仁甘草汤合橘枳姜汤对异丙肾上腺素致急性心肌梗死大鼠的保护作用研究 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(5): 753-755, 851.
- CHEN X Y, JIANG L, ZHANG S Y, et al. The antioxidant protection research on combined Fuling Xingren Gancao Tang and juzhijiang Tang on rats with isoprenaline leading acute myocardial ischemia [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2016, 25(5): 753-755, 851.
- [8] 曹盼夏. 基于 PPAR γ 探讨茯苓杏仁甘草汤调控动脉粥样硬化脂质代谢的作用机制 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2022.
- CAO P X. Based on PPAR γ , the mechanism of Fuling almond licorice decoction in regulating lipid metabolism of atherosclerosis was discussed [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2022.
- [9] 葛鸾蝶. 茯苓杏仁甘草汤通过调控 SIRT1/NF- κ B 信号通路干预动脉粥样硬化炎症反应的作用 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2022.
- GE L D. Effect of Fuling almond licorice decoction on the inflammatory reaction of atherosclerosis by regulating SIRT1/NF- κ B signaling pathway [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2022.
- [10] LI Y, ZHANG C G, WANG X H, et al. Progression of atherosclerosis in ApoE-knockout mice fed on a high-fat diet [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(18): 3863-3867.
- [11] 陈慧, 郑乐民, 郭延松, 等. 常见大、小鼠实验性心血管病模型专家共识 [J]. 中华高血压杂志, 2022, 30(8): 710-719.
- CHEN H, ZHENG L M, GUO Y S, et al. Expert consensus on common large and mouse experimental cardiovascular disease models [J]. Chin J Hypertens, 2022, 30(8): 710-719.
- [12] LI X, ZHANG Y, PEI W, et al. LncRNA Dnmt3as regulates Dnmt3a expression leading to aberrant DNA methylation in macrophage polarization [J]. FASEB J, 2020, 34(4): 5077-5091.
- [13] EL KASMI K C, SMITH A M, WILLIAMS L, et al. Cutting edge: a transcriptional repressor and corepressor induced by the STAT3-regulated anti-inflammatory signaling pathway [J]. J Immunol, 2007, 179(11): 7215-7219.
- [14] 邓凌志. 冠心病患者外周血 M₂ 巨噬细胞水平变化及其极化的相关信号通路 [D]. 衡阳: 南华大学, 2016.
- DENG L Z. Changes of M₂ macrophages in peripheral blood of patients with coronary heart disease and related signal pathways of polarization [D]. Hengyang: University of South China, 2016.
- [15] BARRETT T J. Macrophages in atherosclerosis regression [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(1): 20-33.
- [16] COLIN S, CHINETTI-GBAGUIDI G, STAEELS B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis [J]. Immunol Rev, 2014, 262(1): 153-166.
- [17] BI Y, CHEN J, HU F, et al. M2 macrophages as a potential target for antiatherosclerosis treatment [J]. Neural Plast, 2019, 2019: 6724903.
- [18] RAHMAN K, VENGRENYUK Y, RAMSEY S A, et al. Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression [J]. J Clin Invest, 2017, 127(8): 2904-2915.
- [19] ESHGHJOO S, KIM D M, JAYARAMAN A, et al. Macrophage polarization in atherosclerosis [J]. Genes, 2022, 13(5): 756.
- [20] 刁雅静, 洗绍祥. 从中医阴阳学说论巨噬细胞极化在动脉粥样硬化中的作用 [J]. 世界中医药, 2023, 18(6): 823-827.
- DIAO Y J, XIAN S X. Role of macrophage polarization in atherosclerosis based on the Yin and Yang theory of traditional Chinese medicine [J]. World Chin Med, 2023, 18(6): 823-827.
- [21] 曹云祥, 刘健, 陶艳红, 等. 新风胶囊通过调控巨噬细胞极化改善活动期类风湿关节炎患者炎症反应及生活质量的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(9): 1466-1470, 1473.
- CAO Y X, LIU J, TAO Y H, et al. Study on Xinfeng Capsule improving inflammatory response and life quality in patients with active rheumatoid arthritis by regulating macrophage polarization [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2022, 28(9): 1466-1470, 1473.
- [22] DING X, LI S, TIAN M, et al. Facile preparation of a novel nanoemulsion based hyaluronic acid hydrogel loading with *Poria cocos* triterpenoids extract for wound dressing [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 226: 1490-1499.
- [23] 廖海锋, 邓向亮, 罗霞, 等. 羧甲基茯苓多糖对巨噬细胞极化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13): 122-126.
- LIAO H F, DENG X L, LUO X, et al. Effects of carboxymethylpachyman on polarization of macrophages [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(13): 122-126.
- [24] WANG Y, JIA Q, ZHANG Y, et al. Amygdalin attenuates atherosclerosis and plays an anti-inflammatory role in ApoE knock-out mice and bone marrow-derived macrophages [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 590929.
- [25] SUN J, ZHANG Q, YANG G, et al. The licorice flavonoid isoliquiritigenin attenuates *Mycobacterium tuberculosis*-induced inflammation through Notch1/NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 294: 115368.
- [26] HUANG K, LIU Y, TANG H, et al. Glabridin prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through gut microbiota modulation and colonic macrophage polarization in mice [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 107.
- [27] HILLMER E J, ZHANG H, LI H S, et al. STAT3 signaling in

- immunity [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2016, 31: 1-15.
- [28] AZEMI A K, MOKHTAR S S, SHARIF S E T, et al. *Clinacanthus nutans* attenuates atherosclerosis progression in rats with type 2 diabetes by reducing vascular oxidative stress and inflammation [J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 1432-1440.
- [29] QIAN Z, YANG H, LI H, et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway attenuates the development of atherosclerosis in *Apoe*^{-/-} mice through modulating macrophage functions [J]. Biomedicines, 2021, 9(9): 1150.
- [30] WEINSTOCK A, RAHMAN K, YAACOV O, et al. Wnt signaling enhances macrophage responses to IL-4 and promotes resolution of atherosclerosis [J]. eLife, 2021, 10: e67932.
- [31] ZHANG J, HUANG F, CHEN L, et al. Sodium lactate accelerates M2 macrophage polarization and improves cardiac function after myocardial infarction in mice [J]. Cardiovasc Ther, 2021, 2021: 5530541.

[收稿日期]2024-06-20



一种动物联合模型测定生长猪在不同粗纤维水平下大肠挥发性脂肪酸的净吸收量

厌氧微生物在动物胃肠道中发酵一系列碳水化合物从而生成有机酸和气体等产物,而单胃动物主要在大肠(盲肠、结肠)中进行微生物厌氧发酵产生挥发性脂肪酸(VFAs)和乳酸等。有研究发现:猪大肠利用发酵产生的 VFAs 能满足自身约 5%~20%的能量维持需求,除此之外,这部分 VFAs 还为动物肠道和动物健康提供营养。然而,大肠内微生物发酵生成 VFAs 的产量和模式会受到多种因素的影响,如何监控大肠内产生的内源性 VFAs 情况是一大难点问题,这也是难以对动物进行精准营养调控的原因。

基于上述背景,武汉轻工大学-湖北省动物营养与饲料科学重点实验室赵胜军团队研究构建“血管瘘-肠瘘”结合“同位素标记法”的动物联合模型,测定生长猪在不同粗纤维水平下大肠 VFAs 的净吸收量情况。其中为动态检测 VFAs 吸收情况采用手术造肠系膜、门静脉和股左动脉血管瘘,来测定单位时间门静脉对 VFAs 的吸收量。为消除前肠道以及外源性 VFAs 的干扰,手术构建回肠瘘管并在测定期间灌注碳 13 标记的 VFAs (¹³C-VFAs),通过检测门静脉血液和大肠组织中¹³C-VFAs 含量来计算大肠对 VFAs 的动态净吸收量。

总的来说,本研究构建了一种新方法探索动物大肠对 VFAs 的净吸收量,对精准监控大肠的营养吸收提供了新的思路并为进一步的研究奠定了基础。

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(4):375-380. <http://doi:10.1002/ame2.12329>)。

于利凯,田地,苏子珊,等.机械应力经 Piezo1/ERK1/2 轴介导 KOA 滑膜纤维化的机制研究 [J].中国比较医学杂志,2024,34(10):47-56.

Yu LK, Tian D, Su ZS, et al. Mechanism of mechanical stress in knee osteoarthritis synovial fibrosis mediated via the Piezo1/ERK1/2 axis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 47-56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.006

机械应力经 Piezo1/ERK1/2 轴介导 KOA 滑膜纤维化的机制研究

于利凯^{1,2}, 田地^{1,2}, 苏子珊^{1,2}, 揭立士^{1,2}, 郭少博^{1,2}, 王培民¹, 张农山^{1*}

(1.南京中医药大学附属医院/江苏省中医院,南京 210029;2.南京中医药大学第一临床医学院,南京 210023)

【摘要】 目的 探讨机械应力激活 Piezo1,经 ERK1/2 信号通路对 KOA 滑膜纤维化的影响。方法 将 25 只 SD 大鼠分为空白组、运动组、运动+GsMTx4 组、运动+PD98059 组、运动+GsMTx4+PD98059 组,共 5 组,每组各 5 只。造模完成后提取大鼠血清及滑膜组织进行天狼猩红染色、Masson 染色评估胶原沉积,Western blot、RT-qPCR 检测 Piezo1、ERK1/2、p-ERK1/2、 α -SMA、TGF- β 、Collagen I 及 TIMP-1 等相关蛋白及 mRNA 的表达,ELISA 检测 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量。细胞实验中将滑膜细胞分为空白组、拉力组、拉力+GsMTx4 组、拉力+PD98059 组、拉力+GsMTx4+PD98059 组,共 5 组。对造模完成后的细胞使用 Western blot、RT-qPCR 等技术进行上述指标的检测。结果 机械应力会增加大鼠滑膜组织胶原沉积,并提高通路相关指标及纤维化特异性指标 Piezo1、p-ERK/ERK、 α -SMA、TGF- β 、Collagen I、TIMP-1 的蛋白及 mRNA 表达 ($P < 0.05$),使用抑制剂均可见明显下调 ($P < 0.05$),但 ERK 抑制剂 (PD98059)对 Piezo1 表达无显著影响。运动组大鼠较空白组血清炎症因子含量显著提高 ($P < 0.05$),使用抑制剂后改善明显 ($P < 0.05$)。细胞实验中 Western blot 及 RT-qPCR 结果趋势同动物实验。结论 Piezo1 离子通道可以感受机械应力,激活 ERK1/2 通路介导膝关节滑膜纤维化。

【关键词】 Piezo1;ERK1/2;机械应力;KOA 滑膜纤维化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0047-10

Mechanism of mechanical stress in knee osteoarthritis synovial fibrosis mediated via the Piezo1/ERK1/2 axis

YU Likai^{1,2}, TIAN Di^{1,2}, SU Zishan^{1,2}, JIE Lishi^{1,2}, GUO Shaobo^{1,2}, WANG Peimin¹, ZHANG Nongshan^{1*}

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China. 2. the First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of Piezo1 activated by mechanical stress on knee osteoarthritis synovial fibrosis via the extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 signaling pathway. **Methods** Twenty-five Sprague Dawley rats were divided into blank, exercise, exercise+GsMTx4, exercise+PD98059, and exercise+GsMTx4+PD98059 groups ($n=5$ per group). After modeling, serum and synovial tissue were extracted and collagen deposition was evaluated by Sirius red and Masson staining. Expression levels of Piezo1, ERK1/2, phospho (p)-ERK1/2, α -smooth muscle actin (SMA), transforming growth factor (TGF)- β , Collagen I, and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 were

【基金项目】江苏省中医院科主任学术提升专项(Y2022ZR26);国家自然科学基金面上项目(82274545)。

【作者简介】于利凯(1999—),男,博士研究生,研究方向:骨关节病。E-mail:ylik_012022@163.com

【通信作者】张农山(1982—),男,副研究员,研究方向:骨关节病。E-mail:zns0032@163.com

detected by Western blot and reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and the interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α contents were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. For cell experiments, synovial cells were divided into blank, pull, pull + GsMTx4, pull + PD98059, and pull + GsMTx4 + PD98059 groups and the above indices were detected in the model cells by Western blot, RT-qPCR, and other techniques.

Results Mechanical stress increased collagen deposition in synovial tissues in the rats, and increased the protein and mRNA expression levels of the pathway-related and fibrosis-specific indicators Piezo1, p-ERK/ERK, α -SMA, TGF- β , Collagen I, and TIMP-1 ($P < 0.05$). Piezo1 expression was significantly down-regulated by both inhibitors ($P < 0.05$), but the ERK inhibitor (PD98059) had no significant effect on Piezo1 gene expression. Levels of serum inflammatory factors were significantly higher in the exercise group compared with the blank group ($P < 0.05$), and levels were significantly reduced by the inhibitors ($P < 0.05$). The *in vitro* experiments showed the same trends as the animal experiments.

Conclusions The Piezo1 ion channel can sense mechanical stress and activate the ERK1/2 pathway to mediate knee synovial fibrosis.

[Keywords] Piezo1; ERK1/2; mechanical stress; KOA synovial fibrosis

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

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的骨关节退行性病变,涉及关节软骨、滑膜、软骨下骨等多个组织,表现为疼痛、肿胀、关节僵硬甚至残疾^[1-2]。其中,滑膜纤维化是 KOA 的特征性病理表现之一,参与到 KOA 的发生与进展期^[3]。滑膜是关节内的一层结缔组织,可以产生滑液,进而润滑关节并清除代谢产物^[4],在 KOA 疾病中,滑膜纤维化被认为是患者膝关节僵硬的根本原因^[5]。同时,大量研究发现,以滑膜纤维化为主的非软骨结构病变是造成 KOA 疼痛的主要原因^[6-8]。开放手术是治疗滑膜纤维化最直接及有效的方法,但侵入性手术本身通常切口较大,且需要对全关节进行广泛探查,故存在诱发滑膜纤维化的可能性,并导致关节僵硬随时间推移而复发^[9]。因此,研究滑膜纤维化的发生机制,探寻早期治疗靶点,可以为临床 KOA 诊疗提供新的思路与理论基础。

纤维化是组织修复反应失调的结果,涉及多种信号传导通路,有报道指出机械敏感离子通道 Piezo1 可以感受应力刺激,在心肌纤维化、肾纤维化以及肺纤维化等疾病进展中发挥着重要的生物学作用^[10-12]。Zhao 等^[13]研究发现, Piezo1 的激活可以上调 TGF- β 、 α -SMA 等促纤维化特异性指标,提高纤维连接蛋白表达,进而促进 ECM 过度沉积,以此证明了 Piezo1 通过调节 ECM 重塑相关基因的表达诱导各类型细胞中的促纤维化表型变化。ERK1/2 属于丝裂原活化蛋白激酶家族,可以响应机械应力,将细胞外刺激转化为细胞增殖、分化及基因表达的信号,并广泛参与到各类型纤维化疾病进程^[14]。但目前针对机械应力及 Piezo1/ERK1/2 通路对 KOA 的影响机制研究较为匮乏,因此本文以

KOA 滑膜纤维化为研究对象,探讨 Piezo1/ERK1/2 通路关系及机械应力对膝关节滑膜组织的作用机制,以期为 KOA 治疗提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

25 只雄性 4 月龄 SD 大鼠, SPF 级, 体重 350 ~ 450 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2021-0011]; 5 只 4 周龄雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 120 ~ 150 g, 购自杭州医学院 [SCXK(浙)2019-0002]。均饲养于南京中医药大学实验动物中心 [SYXK(苏)2023-0077], 已获得南京中医药大学实验动物管理委员会与南京中医药大学实验动物伦理委员会批准 (IACUC-202307A057)。饲养条件:维持饲料,自由饮水摄食,自然昼夜,恒温 20 ~ 22 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%, 遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

GsMTx4 (HY-P1410)、PD98059 (HY-12028) 购自 MCE; 逆转录试剂盒 (R222-01)、PCR 试剂盒 (Q331-02) 购自南京诺唯赞; 免疫染色封闭液 (P0260)、免疫染色强力通透液 (P0097)、抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI) (P0131) 购自上海碧云天。Piezo1 (ab128245) 购自 Abcam; ERK1/2 (4695S)、p-ERK1/2 (4370S)、 α -SMA (19245S) 购自 CST; β -actin (AF7018)、TGF- β (AF1027)、Collagen I (AF7001)、TIMP-1 (AF7007) 购自 Affinity Biosciences。XR-PT-10B 型小动物跑步机 (上海欣软信息科技有限公司); FX-5000T 型细胞牵张拉伸应力加载系统 (美国 Flex cell 公司)。RT-qPCR 实验所需基因引物购自上海捷瑞生物公司, 见表 1。

表 1 基因引物设计序列及长度
Table 1 Primer sequences and lengths for gene amplification

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	长度/bp Length
β -actin	F: CTATCGGCAATGAGCGGTTCC R: GCACTGTGTTGGCATAGAGGTC	150
Piezo1	F: CAGCCGAGAGACAGAGAAGAAATAC R: GCAATGAGGAAGAGGATGATGAGAC	102
ERK1/2	F: GATTGCCTGCTGCTGTTCTTC R: CATCGTAGCCACTGACTTCTTCC	139
α -SMA	F: CCACTGCTGCTTCCTCTTCTTC R: TGCCCGCCGACTCCATTC	138
TGF- β	F: TAGCAACAATTCCTGGCGTTACC R: CCTGTATTCCGTCCTCTGGGTTTC	125
Collagen I	F: GTGCGATGGCGTCTATGC R: CTATGACTTCTGCGTCTGGTGATAC	116
TIMP-1	F: TCCTGGTCCCTGGCATAATCTG R: CACAAGCAATGACTGTCACTCTCC	139

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

将 25 只 SD 大鼠随机分为 5 组:空白组、运动组、运动 + GsMTx4 组、运动 + PD98059 组、运动 + GsMTx4 + PD98059 组,每组各 5 只。适应性喂养 1 周。

1.3.2 动物造模

空白组正常饲养至实验结束。运动组使用动物跑台构建运动模型大鼠,适应性喂养结束后,进行为期 3 d 的适应性训练,跑台参数设定为速度 10 m/min,每天 2 次,每次 15 min。适应性训练完成后,进行正式训练,跑台参数设定为速度 25 m/min、坡度 10°,每次 1 h,每天 1 次,每周 5 d,持续 8 周^[15]。运动+GsMTx4 组同运动组一致,进行造模处理,在正式训练结束前两周,每天对其进行腹腔注射 Piezo1 抑制剂 GsMTx4,每只注射量 1 mg/kg^[16]。运动+PD98059 组同运动组一致,进行造模处理,在正式训练结束前两周,每天对其进行尾静脉注射 ERK 抑制剂 PD98059,每只注射量 0.3 mg/kg^[17]。运动+GsMTx4+PD98059 组同运动组一致,进行造模处理,在正式训练结束前两周,每天对其进行腹腔注射 1 mg/kg GsMTx4,同时进行尾静脉注射 0.3 mg/kg PD98059。

1.3.3 动物血清及滑膜组织提取

动物造模完成后,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,沿腹中线剪开皮肤,暴露腹主动脉,刺入采血针,使血液吸入真空采血管,静置凝固后,离心分离,取上清于-80 °C 冰箱保存。采血完成后,膝关节备皮,手

术刀切开膝关节周围皮肤,钝性分离皮下组织沿髌骨上缘打开关节腔,分离周围肌腱及韧带,仔细分离滑膜组织,将其置于 4% 多聚甲醛室温保存或冻存管-80 °C 冰箱保存。

1.3.4 大鼠原代滑膜细胞提取

处死大鼠,在无菌环境下提取膝关节滑膜组织置于 PBS 中,洗涤 3 次,随后将组织剪碎放置于含有 0.15% I 型胶原酶的 DMEM 高糖培养基中,在 37 °C 环境下消化 4 h。消化完成后使用 70 μ m 筛网过筛,离心,并弃去上清后,将细胞重悬种于细胞培养皿,24 h 后换液,待细胞长至 80% 进行传代,3 代后进行细胞实验。

1.3.5 细胞造模

将滑膜细胞接种于膜性 6 孔板中,分为 5 组:空白组、拉力组、拉力+GsMTx4 组、拉力+PD98059 组和拉力+GsMTx4+PD98059 组。

空白组正常培养,不进行干预。拉力组置于应力加载系统,参数设置为周期每秒 6 次,幅度 20%,强度 50 Hz,时间梯度 24 h。拉力+GsMTx4 组应力加载同拉力组一致,培养使用含有 5 μ mol GsMTx4 的完全培养基。拉力+PD98059 组应力加载同拉力组一致,培养使用含有 50 μ mol PD98059 的完全培养基。拉力+GsMTx4+PD98059 组应力加载同拉力组一致,培养使用含有 5 μ mol GsMTx4 及 50 μ mol PD98059 的完全培养基。

1.3.6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)

解冻大鼠血清,稀释建立标准曲线,按照 ELISA 试剂盒说明书指示加入各工作液,依次检测各组样

本中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的含量。

1.3.7 天狼猩红染色

滑膜组织固定、脱水石蜡包埋、石蜡切片脱蜡至蒸馏水、滴加铁苏木素染色液染色 5~10 min、洗片、天狼猩红染色液滴染 1 h、流水冲洗、脱水透明、中性树胶封固。光镜观察。

1.3.8 Masson 染色

石蜡切片脱蜡至水、Weigert 苏木精液染核 5~10 min、水洗、Masson 丽春红酸性复红液 5~10 min、2%冰醋酸水溶液浸洗、1%磷钼酸水溶液分化 3~5 min、苯胺蓝复染 5 min、0.2%冰醋酸水溶液浸洗、95%乙醇、无水乙醇、二甲苯透明、中性树胶封固。光镜观察。

1.3.9 蛋白免疫印迹(Western blot)

将上述的滑膜组织或细胞使用裂解液提取蛋白,测蛋白浓度,加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混匀煮沸,-80℃冰箱保存。配胶、上样、电泳、转膜、封闭、洗膜、4℃孵育 β -actin、Piezo1、ERK1/2、p-ERK1/2、 α -SMA、TGF- β 、Collagen I、TIMP-1 一抗过夜、洗膜、孵育对应二抗、洗膜、曝光。

1.3.10 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

将上述的滑膜组织或细胞使用 TRIzol 法提取 RNA,使用分光光度计测得各样本 RNA 浓度。依据逆转录试剂盒将获得的 RNA 逆转录为 cDNA。再依据 RT-qPCR 试剂盒将获得的 cDNA 进行扩增。获得相应结果以 β -actin 为内参进行相应半定量处理。

1.4 统计学方法

实验数据使用 SPSS 26.0 进行数据分析,

Graphpad Prism 8、Adobe Illustrator 2022 等软件进行图片绘制。结果用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),事后多重比较使用 LSD 检验方法,数据以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 天狼猩红染色观察大鼠滑膜纤维化

天狼猩红染色显示运动组大鼠滑膜组织胶原沉积较空白组显著增加,各抑制剂组均能减少运动所导致的滑膜组织胶原沉积,见图 1。

2.2 Masson 染色观察大鼠滑膜纤维化

Masson 染色显示运动组大鼠滑膜组织蓝色胶原纤维较空白组显著增加,各抑制剂组均能减少运动所产生的滑膜组织蓝色胶原纤维,见图 2。

2.3 GsMTx4 和 PD98059 干预对 Piezo1/ERK1/2 通路蛋白表达的影响

大鼠滑膜组织 Western blot 结果显示,运动组与空白组相比,其 Piezo1、p-ERK/ERK 的蛋白表达均显著提高($P<0.05$)。运动+GsMTx4 组与运动+GsMTx4+PD98059 组的 Piezo1、p-ERK/ERK 的表达较运动组有所下降($P<0.05$)。而运动+PD98059 组与运动组相比,其 Piezo1 的蛋白表达无显著性差异($P>0.05$),但 p-ERK/ERK 的表达有所下降($P<0.05$),见图 3A。大鼠滑膜细胞 Western blot 结果显示,各组细胞间通路相关指标 Piezo1、p-ERK/ERK 的蛋白表达趋势与大鼠滑膜组织 Western blot 结果一致,见图 3B。

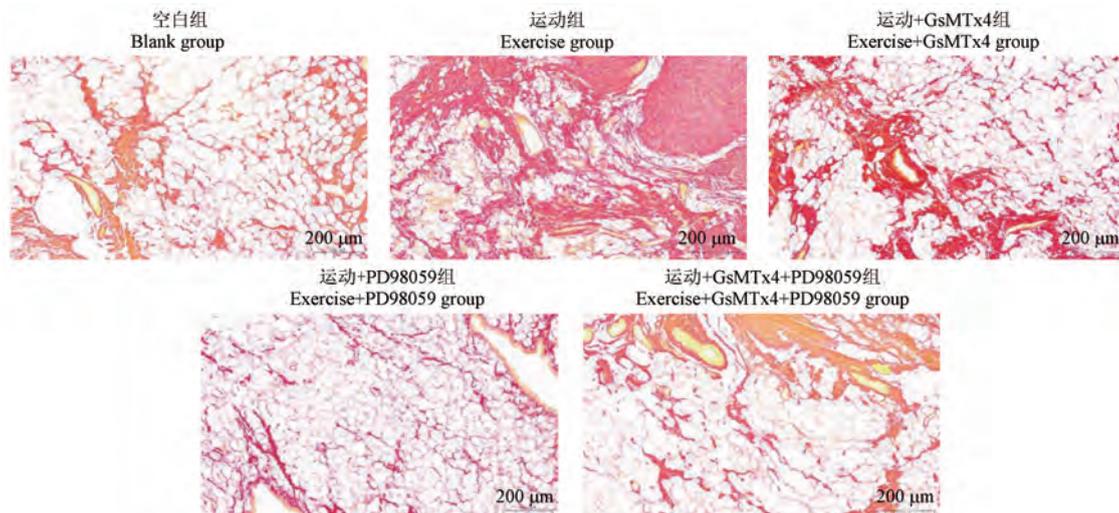


图 1 各组大鼠滑膜组织天狼猩红染色切片

Figure 1 Sirius red stained sections of synovial tissue from different rat groups

2.4 GsMTx4 和 PD98059 干预对 Piezo1/ERK1/2 通路基因表达的影响

大鼠滑膜组织 RT-qPCR 结果显示,运动组与空白组相比,其 Piezo1、ERK1/2 的 mRNA 表达均显著

提高($P < 0.05$)。运动+GsMTx4 组与运动+GsMTx4+PD98059 组的 Piezo1、ERK1/2 的 mRNA 表达较运动组有所下降($P < 0.05$)。而运动+PD98059 组与运动组相比,其 Piezo1 的 mRNA 表达无显著性差异(P

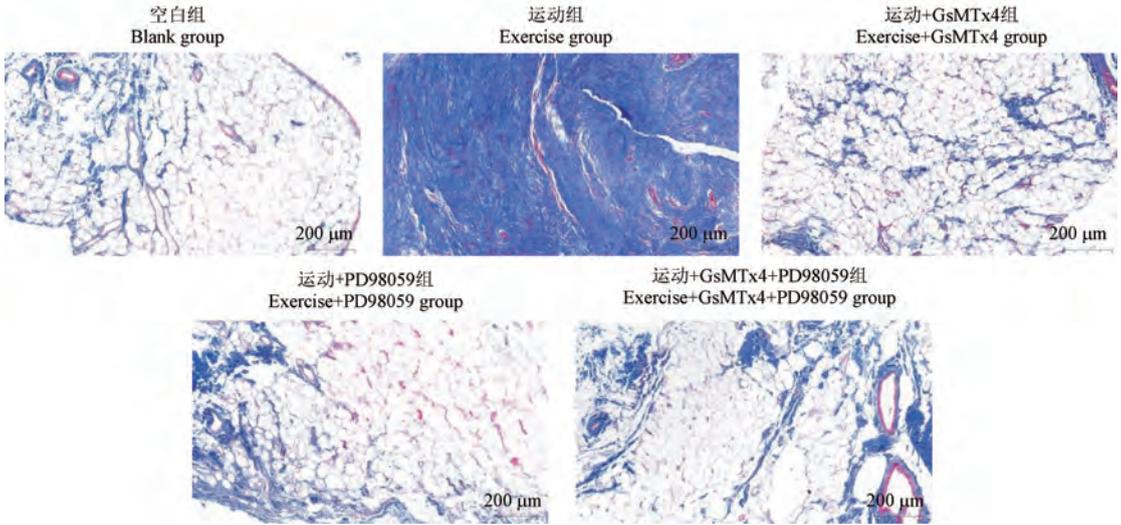
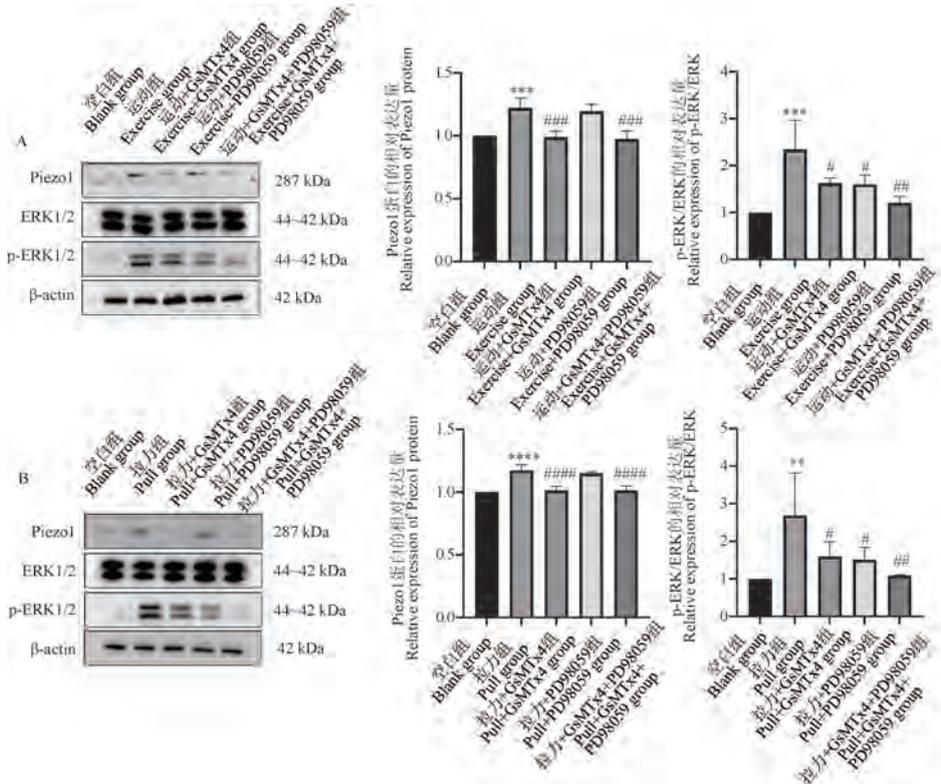


图 2 各组大鼠滑膜组织 Masson 染色切片

Figure 2 Masson's trichrome stained sections of synovial tissue from different groups of rats



注:A:滑膜组织蛋白表达;B:滑膜细胞蛋白表达。与空白组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$;与运动组(拉力组)比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$,#### $P < 0.0001$ 。

图 3 各组滑膜组织及细胞中通路相关蛋白表达量

Note. A, Synovial tissue protein expression. B, Synovial cell protein expression. Compared with blank group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with exercise group (pull group), # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$.

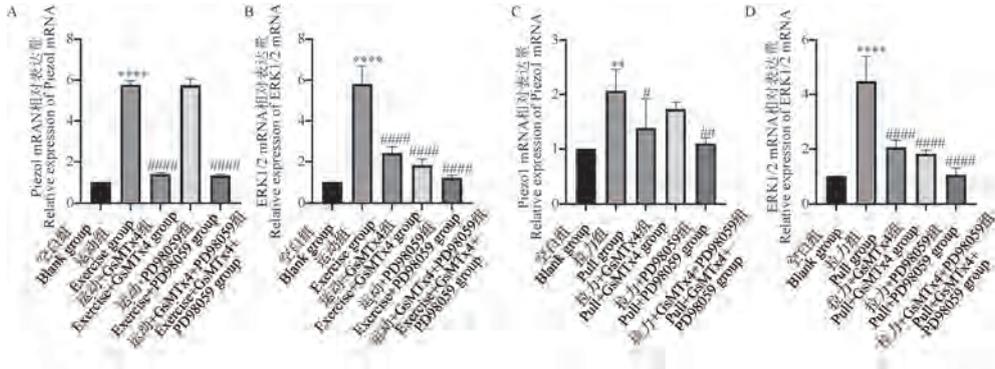
Figure 3 Changes in expression of pathway related proteins in synovial tissues and cells of each

>0.05), 但 ERK1/2 的 mRNA 表达有所下降 ($P < 0.05$), 见图 4A。大鼠滑膜细胞 RT-qPCR 结果显示, 各组细胞间 Piezo1、ERK1/2 的 mRNA 表达趋势同大鼠滑膜组织 RT-qPCR 结果, 见图 4B。

2.5 GsMTx4 和 PD98059 干预对纤维化相关蛋白表达的影响

大鼠滑膜组织 Western blot 结果显示, 运动组与

空白组相比, 其纤维化相关指标如 α -SMA、TGF- β 、Collagen I、TIMP-1 的蛋白表达均显著提高 ($P < 0.05$)。运动+GsMTx4 组、运动+PD98059 组以及运动+GsMTx4+PD98059 组纤维化相关指标的蛋白表达较拉力组均有所下降 ($P < 0.05$), 见图 5A。大鼠滑膜细胞 Western blot 结果显示, 各组细胞间纤维化相关指标的蛋白表达趋势同大鼠滑膜组织 Western

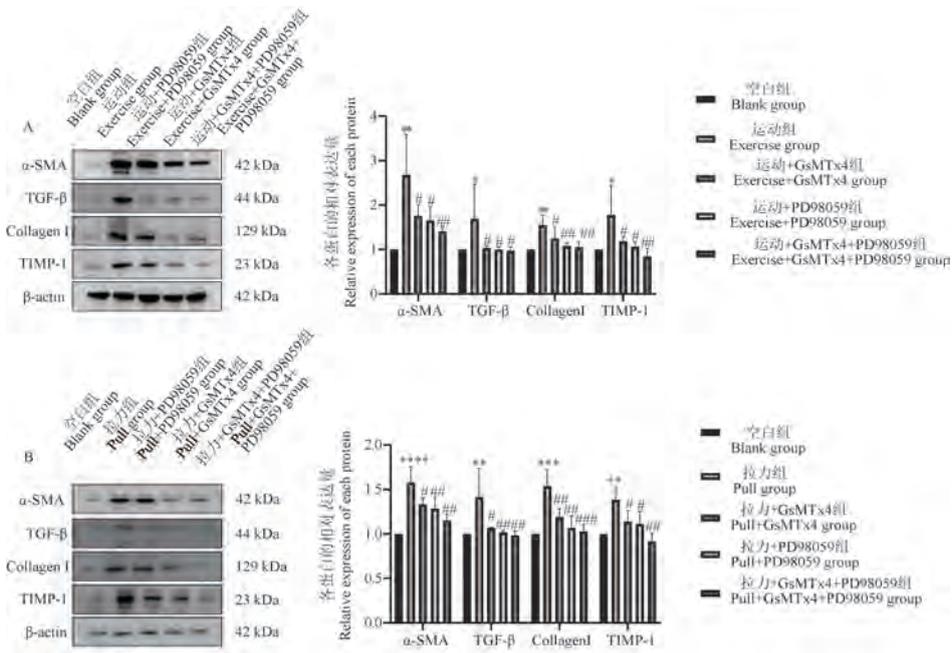


注: A: 滑膜组织 mRNA 表达; B: 滑膜细胞 mRNA 表达。与空白组比较, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; 与运动组 (拉力组) 比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ 。

图 4 各组滑膜组织及细胞中的通路相关 mRNA 表达变化

Note. A, Synovial tissue protein expression. B, Synovial cell protein expression. Compared with blank group, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$. Compared with exercise group (pull group), # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$.

Figure 4 Changes in mRNA expression related to pathways in synovial tissues and cells of each group



注: A: 滑膜组织蛋白表达; B: 滑膜细胞蛋白表达。与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与运动组 (拉力组) 比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

图 5 各组滑膜组织及细胞中的纤维化相关蛋白表达变化

Note. A, Synovial tissue protein expression. B, Synovial cell protein expression. Compared with blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with exercise group (pull group), # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 5 Changes in fibrosis related protein expression in synovial tissues and cells of each group

blot 结果一致,见图 5B。

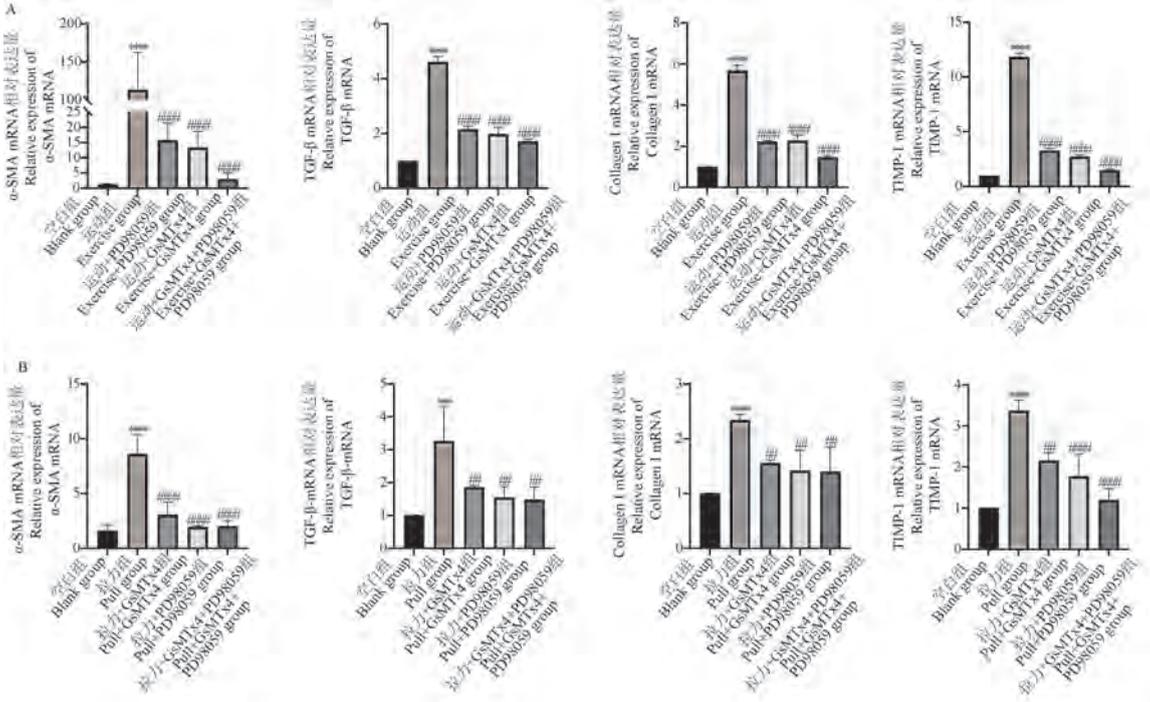
2.6 GsMTx4 和 PD98059 干预对纤维化相关基因表达的影响

大鼠滑膜组织 RT-qPCR 结果显示,运动组与空白组相比,其纤维化相关指标如 α -SMA、TGF- β 、Collagen I、TIMP-1 的 mRNA 表达均显著提高 ($P < 0.05$)。运动+GsMTx4 组、运动+PD98059 组以及运

动+GsMTx4+PD98059 组纤维化相关指标的 mRNA 表达较拉力组均有所下降 ($P < 0.05$),见图 6A。大鼠滑膜细胞 RT-qPCR 结果显示,各组细胞间纤维化相关基因的 mRNA 表达趋势同大鼠滑膜组织 RT-qPCR 结果,见图 6B。

2.7 ELISA 检测大鼠血清炎症因子表达

大鼠血清 ELISA 结果如图 7 显示,运动较空白

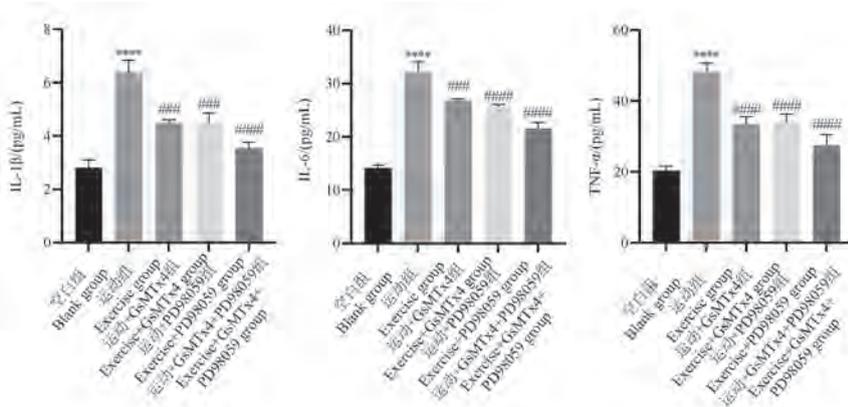


注:A:滑膜组织 mRNA 表达;B:滑膜细胞 mRNA 表达。与空白组比较,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$;与运动组(拉力组)比较,## $P < 0.01$,#### $P < 0.0001$ 。

图 6 各组滑膜组织及细胞中的纤维化相关指标 mRNA 表达变化

Note. A, Synovial tissue protein expression. B, Synovial cell protein expression. Compared with blank group, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with exercise group (pull group), ## $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$.

Figure 6 Changes in mRNA expression of fibrosis related indicators in synovial tissues and cells of each group



注:与空白组比较,**** $P < 0.0001$;与运动组比较,### $P < 0.001$,#### $P < 0.0001$ 。

图 7 各组血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量的比较

Note. Compared with blank group, **** $P < 0.0001$. Compared with exercise group, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$.

Figure 7 Comparison of serum TNF- α , IL-1 β , IL-6 density among different groups

组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度显著增高 ($P < 0.05$); 使用抑制剂后, 各炎症因子水平明显降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

KOA 是临床上最常见的慢性关节疾病之一, 其发病机制复杂, 主要与机体免疫、关节应力失衡、关节腔炎症、激素等因素相关^[18]。滑膜纤维化与 KOA 病情进展高度相关, 引起患者的关节僵硬与疼痛症状, 使下肢活动受限并最终导致膝关节功能丧失, 滑膜纤维化特征是滑膜内壁细胞增厚、基质血管化增加、炎症细胞浸润及亚内膜滑膜细胞纤维化, 主要原因在于成纤维细胞过度增殖以及胶原成分分解代谢之间的不平衡^[19-20]。在纤维化疾病中, TGF- β 、 α -SMA、Collagen I、TIMP-1 是重要的特异性指标, TGF- β 通过诱导胶原蛋白合成来促进 ECM 积累, 有研究通过阻断 TGF- β 减少了骨关节炎的骨赘形成及滑膜增厚^[21]。TIMP-1 表达升高在多种纤维化疾病中得到证实, 高表达的 TGF- β 诱导 TIMP-1, 并通过下调 MMP 促进滑膜增厚^[22]。本研究通过高强度跑台运动构建 KOA 大鼠模型, 病理学形态观察显示, 与空白组比较, 运动组大鼠滑膜胶原沉积显著增加, 并在使用抑制剂后明显减少; 同时, 运动组大鼠较空白组的 TGF- β 、 α -SMA、Collagen I、TIMP-1 等纤维化特异性标志物蛋白及 mRNA 表达显著上升, 使用抑制剂后明显下降, 说明高强度机械应力负荷使大鼠膝关节滑膜发生纤维化改变, 而抑制 Piezo1 或 ERK 可以缓解纤维化症状, 并改善滑膜病理状态。

大量研究表明 Piezo1 蛋白在组织纤维化进展中发挥着重要的作用, ERK1/2 蛋白能够促进 MAPK 信号通路关键蛋白丝氨酸、苏氨酸双位点的磷酸化水平, 从而实现如细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学功能^[23-25]。有研究发现, Piezo1 蛋白的激活可以促进骨肉瘤细胞的侵袭, 使用抑制剂 GsMTx4 降低 Piezo1 表达后可以减少骨肉瘤细胞增殖、阻止侵袭^[26]。因此, 本研究基于机械应力, 探讨 Piezo1 及 ERK1/2 在 KOA 病程中介导滑膜纤维化的作用机制, 并挖掘它们二者之间的联系。本研究发现, 机械应力可以激活 Piezo1/ERK1/2 信号轴, 促进胶原沉积, 且使用 GsMTx4 抑制 Piezo1 的表达、PD98059 抑制 ERK 的表达以及两者联合使用均可抑制滑膜纤维化进展。其中 GsMTx4 的使用可以抑制 Piezo1 及 p-EKR/ERK 蛋白及相关 mRNA 表达,

但 PD98059 的使用仅可以抑制 p-EKR/ERK 表达, 对 Piezo1 无显著影响, 结果提示 ERK1/2 可能位于 Piezo1 的下游, 借此可以传递力学信号, 实现 Piezo1 的生物学功能。

KOA 患者膝关节病变与炎症因子表达同样具有密切联系, 虽然早期炎症反应有利于组织修复, 但持续炎症会激活 TGF- β 、血小板生长因子、成纤维细胞生长因子等信号, 使 ECM 在病变组织过量积累, 导致无功能性纤维组织形成^[27]。本研究通过动物实验发现, 运动组大鼠较空白组, 血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量明显升高, 使用抑制剂后炎症因子含量显著降低, 提示高强度机械应力负荷会提高大鼠体内炎症因子含量, 而利用 GsMTx4 抑制 Piezo1 以及利用 PD98059 抑制 ERK1/2 后, 大鼠体内炎症环境得到明显改善。这与相关研究发现的 Piezo1 激活 MAPK/ERK1/2 信号通路, 介导过量机械应力刺激下的软骨细胞凋亡, 改变关节内环境进而产生大量氧自由基和炎症介质的结论是一致的^[28]。

本文尚存在一定的局限性, 首先我们仅探讨了机械应力对膝关节滑膜的直接影响。既往研究通过构建机械应力失稳模型, 发现膝关节组织出现纤维化反应, TGF- β 和血管内皮生长因子在其中起到核心作用^[29]。本文也得到了相似的结论, 但是并未深入研究机械应力通过影响大鼠其他生理功能对膝关节滑膜产生的间接作用。Warburton 等^[30]研究发现长期剧烈运动对人体内钾、钠、镁等离子代谢, 以及尿素、肌酐浓度影响较大。Gerche 等^[31]研究通过对专业运动员的调查发现, 长期剧烈运动导致心脏发生永久性结构变化, 心脏纤维化概率及心律失常风险增加。但国内外学者尚未对上述生理变化与膝关节滑膜纤维化的关系展开广泛探讨。此外, 本研究虽验证了 Piezo1 与 ERK1/2 信号传导的作用关系, 但二者之间或存在其他调控机制或通路参与。例如, Piezo1 感受应力刺激后, 介导钙离子进入细胞内, 使钙稳态失衡, 继而刺激活性氧过量逸出, 并以剂量依赖性的方式激活 ERK 信号通路^[32-33]。最后, 本文采用高强度跑台训练构建膝关节损伤模型, 目的是强调异常机械应力刺激对大鼠关节组织的影响, 虽然其他经典 KOA 造模方法, 如前交叉韧带横断手术等, 同样会对膝关节组织产生异常应力刺激, 或可与跑台造模产生相似影响, 但本研究结果是否能在 KOA 模型中转化, 以及其他运动训练强度是否会对大鼠滑膜造成相似影响, 仍需后续深入

挖掘^[34]。本文目前的研究只是对高强度机械应力诱导膝关节滑膜纤维化这一现象的初步观察, 希望在未来可以深入探索相关机制, 进一步推进研究结果在临床应用中的落实。

综上所述, 本文发现机械应力负荷可能通过激活 Piezo1 蛋白并介导 ERK1/2 通路导致膝关节滑膜纤维化及炎性因子释放。但是否存在其他通路在这一机制中发挥作用, 尚未完全探索, 希望在今后实验中深入研究。

参考文献:

[1] 吴鹏, 单进军, 黄正泉, 等. 丁公藤对大鼠膝关节滑膜炎及痛阈的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(6): 837-841.

WU P, SHAN J J, HUANG Z Q, et al. The effect of *Erycibe obtusifolia* Benth on the synovial inflammation and threshold of pain in KOA rats [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2020, 36(6): 837-841.

[2] 张力, 黄正泉, 李晓辰, 等. 膝痹宁对膝关节炎模型大鼠滑膜纤维化的影响 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 29-32.

ZHANG L, HUANG Z Q, LI X C, et al. Effect of xibining on synovial fibrosis in rats with knee osteoarthritis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(1): 29-32.

[3] RIM Y A, JU J H. The role of fibrosis in osteoarthritis progression [J]. Life (Basel), 2020, 11(1): 3.

[4] TAVALLAEE G, LIVELY S, ROCKEL J S, et al. Contribution of microRNA-27b-3p to synovial fibrotic responses in knee osteoarthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2022, 74(12): 1928-1942.

[5] WANG M, LESSARD S G, SINGH P, et al. Knee fibrosis is associated with the development of osteoarthritis in a murine model of tibial compression [J]. J Orthop Res, 2021, 39(5): 1030-1040.

[6] SRIWATANANUKULKIT O, DESCLAUX S, TAWONSAWATRUK T, et al. Effectiveness of losartan on infrapatellar fat pad/synovial fibrosis and pain behavior in the monoiodoacetate-induced rat model of osteoarthritis pain [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 158: 114121.

[7] NANUS D E, BADOUME A, WIJESINGHE S N, et al. Synovial tissue from sites of joint pain in knee osteoarthritis patients exhibits a differential phenotype with distinct fibroblast subsets [J]. EBioMedicine, 2021, 72: 103618.

[8] REMST D F, BLANEY E N, et al. Unravelling osteoarthritis-related synovial fibrosis: a step closer to solving joint stiffness [J]. Rheumatology (Oxford), 2015, 54(11): 1954-1963.

[9] ZHANG L, XING R, HUANG Z, et al. Synovial fibrosis involvement in osteoarthritis [J]. Front Med, 2021, 8: 684389.

[10] HE Y, DENG B, LIU S, et al. Myeloid *Piezo1* deletion protects renal fibrosis by restraining macrophage infiltration and activation [J]. Hypertension, 2022, 79(5): 918-931.

[11] BARTOLI F, EVANS E L, BLYTHE N M, et al. Global *PIEZO1* gain-of-function mutation causes cardiac hypertrophy and fibrosis in mice [J]. Cells, 2022, 11(7): 1199.

[12] FANG X Z, LI M, WANG Y X, et al. Mechanosensitive ion channel *Piezo1* mediates mechanical ventilation-exacerbated ARDS-associated pulmonary fibrosis [J]. J Adv Res, 2023, 53: 175-186.

[13] ZHAO X, KONG Y, LIANG B, et al. Mechanosensitive *Piezo1* channels mediate renal fibrosis [J]. JCI Insight, 2022, 7(7): e152330.

[14] BASTOW E R, LAMB K J, LEWTHWAITE J C, et al. Selective activation of the MEK-ERK pathway is regulated by mechanical stimuli in forming joints and promotes pericellular matrix formation [J]. J Biol Chem, 2005, 280(12): 11749-11758.

[15] LI Z, LIU S Y, XU L, et al. Effects of treadmill running with different intensity on rat subchondral bone [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1977.

[16] WANG Z, CHEN J, BABICHEVA A, et al. Endothelial upregulation of mechanosensitive channel *Piezo1* in pulmonary hypertension [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2021, 321(6): C1010-C1027.

[17] 王红霞, 曾翔俊, 江瑛, 等. 11, 12-EET 的延迟性心脏保护作用与磷酸化 ERK1/2 的关系 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(12): 2328-2331.

WANG H X, ZENG X J, JIANG Y, et al. Relationship between delayed cardioprotection effect of 11, 12-EET and phosphorylated ERK during ischemia and reperfusion in the rat myocardium [J]. Chin J Pathophysiol, 2006, 22(12): 2328-2331.

[18] 申延清, 刘凤霞, 曹红, 等. 膝关节炎患者的临床表现及相关影响因素 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(9): 1643-1646.

SHEN Y Q, LIU F X, CAO H, et al. Clinical manifestation and influence factors in patients with knee osteoarthritis [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2011, 15(9): 1643-1646.

[19] MATHIESSEN A, CONAGHAN P G. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications [J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 18.

[20] KUROWSKA-STOLARSKA M, ALIVERNINI S. Synovial tissue macrophages: friend or foe? [J]. RMD Open, 2017, 3(2): e000527.

[21] SCHARSTUHL A, VITTERS E L, VAN DER KRAAN P M, et al. Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(12): 3442-3451.

[22] ZHANG L, ZHANG L, HUANG Z, et al. Increased HIF-1 α in knee osteoarthritis aggravate synovial fibrosis *via* fibroblast-like

- synoviocyte pyroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 6326517.
- [23] 何珊, 王颖芳, 杜红卫, 等. siRNA-Piezo1 通过 ERK1/2 信号通路抑制滑膜细胞增殖和炎性因子表达的相关机制 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2020, 41(5): 434-443. HE S, WANG Y F, DU H W, et al. Mechanism research on siRNA-Piezo1 inhibiting cell proliferation of synoviocytes and expression of inflammatory factors through ERK1/2 signaling pathway [J]. *J Jinan Univ Nat Sci Med Ed*, 2020, 41(5): 434-443.
- [24] LAVOIE H, GAGNON J, THERRIEN M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(10): 607-632.
- [25] SUN Y, LIU WZ, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
- [26] JIANG L, ZHAO Y D, CHEN W X. The function of the novel mechanical activated ion channel Piezo1 in the human osteosarcoma cells [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 5070-5082.
- [27] DISTLER J H W, GYÖRFI A H, RAMANUJAM M, et al. Shared and distinct mechanisms of fibrosis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(12): 705-730.
- [28] 李晓飞, 张钊, 李晓东, 等. 新型机械激活离子通道蛋白 Piezo1 通过 MAPK/ERK1/2 信号通路介导软骨细胞凋亡的机制 [J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(31): 2472-2477. LI X F, ZHANG Z, LI X D, et al. Mechanism of the Piezo1 protein-induced apoptosis of the chondrocytes through the MAPK/ERK1/2 signal pathway [J]. *Chin Med J*, 2016, 96(31): 2472-2477.
- [29] ZHANG L, LI M, LI X, et al. Characteristics of sensory innervation in synovium of rats within different knee osteoarthritis models and the correlation between synovial fibrosis and hyperalgesia [J]. *J Adv Res*, 2022, 35: 141-151.
- [30] WARBURTON D E, WELSH R C, HAYKOWSKY M J, et al. Biochemical changes as a result of prolonged strenuous exercise [J]. *Br J Sports Med*, 2002, 36(4): 301-303.
- [31] GERCHE A L, PRIOR D L, HEIDBÜCHEL H. Strenuous endurance exercise: is more better for everyone? Our genes won't tell us [J]. *Br J Sports Med*, 2011, 45(3): 162-164.
- [32] SZCZOT M, NICKOLLS A R, LAM R M, et al. The form and function of PIEZO2 [J]. *Annu Rev Biochem*, 2021, 90: 507-534.
- [33] ZHANG Y, MA Y, LIANG N, et al. Blockage of ROS-ERK-DLP1 signaling and mitochondrial fission alleviates Cr(VI)-induced mitochondrial dysfunction in L02 hepatocytes [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 186: 109749.
- [34] SHA Y, ZHANG B, CHEN L, et al. Mechano growth factor accelerates ACL repair and improves cell mobility of mechanically injured human ACL fibroblasts by targeting Rac1-PAK1/2 and RhoA-ROCK1 pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4331.

[收稿日期]2024-04-26

刘金星, 苏旭, 程平, 等. 和厚朴酚保护 LPS 所致急性肺损伤中肺微血管内皮屏障的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 57-63.

Liu JX, Su X, Cheng P, et al. Study of the mechanism of Honokiol in protecting pulmonary microvascular endothelial barrier in lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 57-63.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.007

和厚朴酚保护 LPS 所致急性肺损伤中肺微血管内皮屏障的机制研究

刘金星¹, 苏旭¹, 程平², 黄安亮¹, 杨帆^{1*}

(1.成都市第五人民医院病理科, 成都 611130; 2.四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

【摘要】 目的 研究和厚朴酚 (HKL) 对脂多糖 (LPS) 引发的急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 中肺微血管内皮细胞的作用及其潜在机制。方法 小鼠肺微血管内皮细胞 (PMVECs), 于六孔板中以 DMEM+10% FBS 培养, 分为对照 (Con) 组 1、和厚朴酚 (HKL) 组 1、脂多糖处理 (LPS) 组 1、脂多糖+和厚朴酚治疗 (LPS+HKL) 组 1, 分别采用 Lipid Peroxidation 检测试剂盒与 H2DCF-DA 测定细胞裂解物中丙二醛 (MDA) 水平与活性氧水平; 采用 TUNEL/DAPI 双染检测细胞凋亡; 采用 VE-cadherin/DAPI、Claudin-5/DAPI 双染检测细胞连接; 采用 Western blot 检测细胞中 caspase-3、cleaved caspase-3、Sirt3、SOD2、乙酰化 SOD2 (Ac-SOD2); 32 只小鼠随机分为对照 (Con) 组 2、和厚朴酚 (HKL) 组 2、脂多糖处理 (LPS) 组 2、脂多糖+和厚朴酚治疗 (LPS+HKL) 组 2, 采用 HE 染色观察肺组织病理改变。结果 HKL 预处理能明显减轻 LPS 诱导的 ROS 与 MDA 水平升高 ($P < 0.05$), 同时降低 LPS 引起的 SOD2 乙酰化升高与 Sirt3 下调 ($P < 0.05$); TUNEL 与 caspase 分析显示 HKL 能够保护 LPS 诱导的 PMVECs 细胞凋亡; VE-cadherin 荧光染色显示 HKL 的预处理能够阻止 LPS 对细胞粘附连接的破坏; Claudin-5 荧光染色显示 HKL 的预处理能够阻止 LPS 对细胞紧密连接的破坏; 动物实验中, HE 染色显示 HKL 显著抑制 LPS 组小鼠肺组织中典型的 ARDS 病理改变。结论 HKL 能够显著抑制 LPS 所致的肺微血管内皮细胞氧化应激与细胞凋亡以及细胞间隙破坏, 从而减轻 ARDS 症状。

【关键词】 急性呼吸窘迫综合征; 脂多糖; 和厚朴酚; 细胞连接

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0057-07

Study of the mechanism of Honokiol in protecting pulmonary microvascular endothelial barrier in lipopolysaccharide-induced acute lung injury

LIU Jinxing¹, SU Xu¹, CHENG Ping², HUANG Anliang¹, YANG Fan^{1*}

(1. Department of Pathology, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, China.

2. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041)

【Abstract】 Objective To study the effect of Honokiol (HKL) on pulmonary microvascular endothelial cells in lipopolysaccharide (LPS)-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) and its potential mechanism. **Methods** Mouse lung microvascular endothelial cells (PMVECs) were cultured with DMEM+10% FBS in a six-well plate and divided into control (Con) group 1, Honokiol (HKL) group 1, LPS treated (LPS) group 1, and LPS+HKL treatment (HKL+

【基金项目】 四川省科技厅科技支撑项目 (2013SZ0044); 成都市科技局重点研发支撑计划技术创新研发项目 (2022-YF05-01725-SN)。

【作者简介】 刘金星 (1985—), 男, 本科, 主管技师, 研究方向: 分子病理学技术。E-mail: ljx85425@163.com

【通信作者】 杨帆 (1975—), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 病理诊断、分子病理。E-mail: yangfan5th@163.com

LPS) group 1. The levels of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in cell lysates were determined by lipid peroxidation assay kit and H2DCF-DA, respectively. TUNEL/DAPI double staining was used to detect apoptosis. Cell junctions were visualized via VE-cadherin/DAPI and Claudin-5/DAPI double staining. Western blot was used to detect caspase-3, cleaved caspase-3, Sirt3, SOD2, and acetylated SOD2 (Ac-SOD2) expression. Thirty-two mice were randomly divided into control (Con) group 2, Honokiol (HKL) group 2, LPS treated (LPS) group 2, and LPS+HKL treatment (HKL+LPS) group 2. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe pathological changes to the lung tissue. **Results** HKL pretreatment significantly reversed the LPS-induced increase in ROS and MDA levels ($P < 0.05$), SOD2 acetylation and Sirt3 down-regulation ($P < 0.05$). TUNEL and caspase analysis showed that HKL protected against the apoptosis of PMVECs induced by LPS. VE-cadherin fluorescence staining demonstrated that HKL pretreatment prevented LPS from disrupting cell adhesion junctions. Claudin-5 fluorescence staining showed that HKL pretreatment prevented LPS from disrupting the tight junctions between cells. In the animal experiments, HE staining showed that HKL significantly inhibited the typical pathological changes of ARDS in the lung tissue of mice in the LPS group. **Conclusions** HKL can significantly inhibit the LPS-induced oxidative stress, apoptosis, and cell-connection breakdown of PMVECs, thereby alleviating ARDS symptoms.

【Keywords】 acute respiratory distress syndrome; lipopolysaccharide; Honokiol; cell junction

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

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS), 也称为急性肺损伤 (acute lung injury, ALI), 是危重病医学中最具挑战性的临床条件之一。它是一种严重并有生命威胁的疾病, 其特点是肺内急性和广泛的炎症, 导致富含蛋白质的非静压肺水肿和难治性低氧血症^[1]。它增加肺“僵硬”, 并损害肺去除 CO₂ 的能力。ARDS 可由直接创伤引起, 如接触有毒物质或呼吸道感染, 也可由败血症等间接伤害引起。ARDS 伴有严重的炎症、肺血管功能障碍及弥漫性微血管损伤。在病程早期发生的病理改变, 如肺血管收缩、水肿、低氧血症、栓塞性血管闭塞和毛细血管损伤, 可增加肺阻力并引起肺动脉高压。

肺微血管内皮屏障是指排列在肺血管上的一层特殊细胞, 即内皮细胞。这种屏障在维持肺组织的完整性和功能方面起着至关重要的作用。它调节血液和周围肺组织之间的分子、离子和细胞的运动。脂多糖诱导的 ALI 是指由于暴露于脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 而导致肺组织发炎和受损的一种情况, 脂多糖是一种存在于某些细菌外膜中的成分^[2]。众所周知, 脂多糖可以激活免疫系统并引发炎症反应。在 LPS 诱导的 ALI 中, 肺微血管内皮屏障受损。LPS 与内皮细胞的相互作用引发一系列分子和细胞事件, 导致内皮功能障碍和屏障破坏。在 LPS 诱导的 ALI 中, 肺微血管内皮屏障的破坏在该疾病的发病机制中起关键作用。它导致血管通透性增加、炎症细胞浸润和肺水肿的发展^[3]。了解这些机制对于制定旨在保护或恢复 ALI 中内皮

屏障完整性的治疗策略非常重要。

和厚朴酚 (Honokiol, HKL) 是一种小分子天然产物, 从厚朴树皮中提取。在许多研究中被证明具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤和抗血管生成作用^[4-6]。另有研究证实 HKL 可作为线粒体蛋白 Sirt3 的直接激动剂, 逆转小鼠心肌肥厚^[7]。先前的研究发现 HKL 在 LPS 诱导的急性肺损伤中对上皮细胞及内皮细胞具有保护作用, 但其作用机制并未进一步阐明^[8-9]。本研究拟从原代培养小鼠肺微血管内皮细胞 (mouse pulmonary microvascular endothelial cells, PMVECs) 氧化应激、细胞凋亡以及细胞连接方向探讨 HKL 对 LPS 所致 ARDS 的肺微血管作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

32 只健康 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 8~10 周龄, 体重为 20~25 g, 购于四川大学动物中心 [SCXK (川) 2024-0026], 饲养于四川大学生物治疗国家重点实验室独立通气的笼内 [SYXK (川) 2024-0185], 提供标准饮食和水。所有实验方案均经四川大学华西医院伦理委员会批准 (20230302090), 实验动物饲养和实验过程中严格遵守实验动物使用的 3R 原则, 给予动物人道关怀。

1.1.2 细胞

PMVECs 购自美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC), 采用含

10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的高糖 DMEM 培养基,在 5% CO₂, 37 °C 恒温培养箱中培养。

1.2 主要试剂与仪器

和厚朴酚 (Sigma-Aldrich 公司, H4914-10MG); 二甲基亚砜 (DMSO) (Sigma-Aldrich 公司, 41640-100ML); 苏木精染液 (武汉塞维尔生物科技有限公司, CR22002071); 伊红染液 (合肥博美生物科技有限责任公司, YE2080); Anti-cleaved caspase-3 抗体 (Abcam 公司, Ab32042); Anti-Sirt3 抗体 (Abcam 公司, ab260049); Anti-SOD2/MnSOD 抗体 (Abcam 公司, ab13533); Acetyl-SOD2 (Lys122) 多抗 (ThermoFisher 公司, PA5-105107); Anti-GAPDH 抗体 (Abcam 公司, ab9485); Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody (ThermoFisher 公司, A-11045); Anti-VE Cadherin 抗体 (Abcam 公司, ab313632); Anti-Claudin5 抗体 (Abcam 公司, ab131259); Lipid Peroxidation (MDA) Assay 试剂盒 (Abcam 公司, ab118970); 2', 7' -二氯二氢荧光素二乙酸酯 (H2DCFDA) (ThermoFisher 公司, D399); TUNEL Assay 试剂盒 (Abcam 公司, ab66110)。多功能酶标仪 (Biotek, 型号 SynergyH1); 电泳仪 (Bio Rad, 型号 1658033); 化学发光凝胶成像系统 (Invitrogen, 型号 iBrightCL750); 荧光显微镜 (Nikon, 型号 TS100)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞实验

PMVECs 于六孔板中以 DMEM+10%小鼠肺微血管内皮细胞 FBS 培养,生长特性为贴壁生长,当细胞密度达 90%以上时,对照 (Con) 组 1 加入 50 μL 0.1% DMSO, 和厚朴酚 (HKL) 组 1 加入 50 μL 5 μmol/L HKL, 脂多糖处理 (LPS) 组 1 加入 50 μL 100 ng/mL LPS, 脂多糖+和厚朴酚治疗 (LPS+HKL) 组 1 加入 5 μmol/L HKL 预处理 2 h 后加入 100 ng/mL LPS, 24 h 后分别进行 HE 染色与 TUNEL 检测, VE-cadherin, Claudin-5 的荧光染色以及 Western blot 分析 caspase-3, cleaved caspase-3, Sirt3, SOD2、乙酰化 SOD2 (Ac-SOD2)。

1.3.2 ROS 与 MDA 测量

处理各组 PMVECs 24 h 后,各组细胞裂解液在含有终浓度为 1 μmol H2DCF-DA 的反应缓冲液中于 37 °C 黑暗环境孵育 30 min,用 PBS 洗涤 2 次,酶标仪获取荧光密度 (Ex/Em = 488/525 nm)。细胞裂解物中丙二醛水平用 Lipid Peroxidation (MDA) Assay 试剂

盒测定。数据取 3 个独立细胞培养的平均值。

1.3.3 小鼠 ARDS 模型的构建

将 32 只小鼠随机分为 4 组:对照 (Con) 组 2、和厚朴酚 (HKL) 组 2、脂多糖处理 (LPS) 组 2 和脂多糖+和厚朴酚治疗 (HKL+LPS) 组 2, 每组 8 只。小鼠麻醉后,将 50 μL 无菌 LPS 溶液 (5 mg/kg) 滴注于 LPS 组和 HKL+LPS 组 2 小鼠气管, Con 组 2 注入 50 μL 无菌 PBS 溶液。LPS 滴注前 2 h, HKL 组 2 腹腔注射 HKL 溶液 (5 mg/kg) (0.1% DMSO 溶剂), Con 组 2 和 LPS 组 2 腹腔注射等量含 0.1% DMSO 的 PBS 溶液, HKL 组 2 给予 HKL+LPS 组 2 等量的 HKL 溶液 (5 mg/kg)。24 h 后处死小鼠,取肺并固定于 10%福尔马林中。

1.3.4 小鼠肺组织 HE 染色及病理评分

将小鼠肺组织固定在 10%中性缓冲福尔马林中 48 h,随后用梯度浓度的酒精脱水。石蜡包埋组织,切片至 4 μm。组织切片采用 HE 染色检测病理变化。根据以下肺损伤评分标准^[8]评分:肺泡间隙中性粒细胞;间质间隙中性粒细胞;肺泡腔渗入蛋白碎片;透明膜形成;肺泡间隔增厚。

1.4 统计学方法

本实验采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 5 进行数据统计分析。计量资料以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,经 Shapiro-Wilk 检验发现均呈正态分布,重复测量数据进行重复测量方差分析,两组比较使用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HKL 逆转 LPS 诱导 PMVECs 产生的氧化应激

本研究使用 H2DCF-DA 测定 LPS (500 ng/mL, 6 h) 处理 PMVECs 后的 ROS 水平,如图 1A 所示,与 Con 组 1 相比, LPS 组中 ROS 水平明显增强,而经 HKL 预处理后明显消失。同时,评估 MDA 水平 (图 1C), LPS 组 1 中 MDA 水平与 Con 组 1 比较明显升高, HKL+LPS 组 1 则显著逆转了 LPS 引起的 MDA 升高。为了确定 HKL 降低氧化应激的机制,本研究检测了 Ac-SOD2 与 SOD2 (一种催化超氧化物转化为过氧化氢的酶) 的比例以及 Sirt3 水平。与 Con 组 1 比较, LPS 组 1 Sirt3 表达显著降低 ($P < 0.05$), SOD2 乙酰化水平显著升高 ($P < 0.05$)。与 LPS 组 1 相比, HKL 显著上调 Sirt3 表达 ($P < 0.05$), 降低 SOD2 乙酰化水平 ($P < 0.05$, 图 1B)。

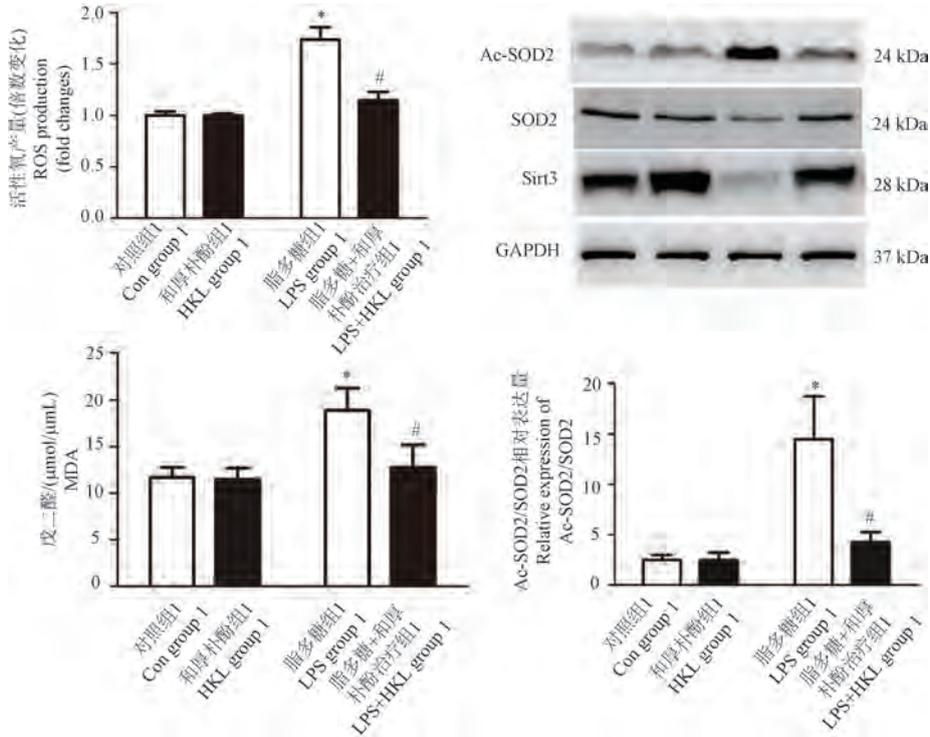
2.2 HKL 保护 LPS 诱导的 PMVECs 细胞凋亡

各组 PMVECs 经处理后, TUNEL 的结果表明, 与 Con 组 1 比较, LPS 组 1 PMVECs 存活率显著降低 ($P < 0.05$, 图 2A), 同时, Western blot 分析显示, caspase-3 被激活 (图 2B)。与 LPS 组 1 比较, HKL

组 1 细胞存活率显著升高 ($P < 0.05$), 且 caspase-3 被阻止激活。

2.3 HKL 对 PMVECs 中 VE-cadherin 的影响

如图 3 所示, Con 组 1 用 PBS 处理的 PMVECs 进行 VE-cadherin 与 DAPI 双染, 显示细胞间粘附连

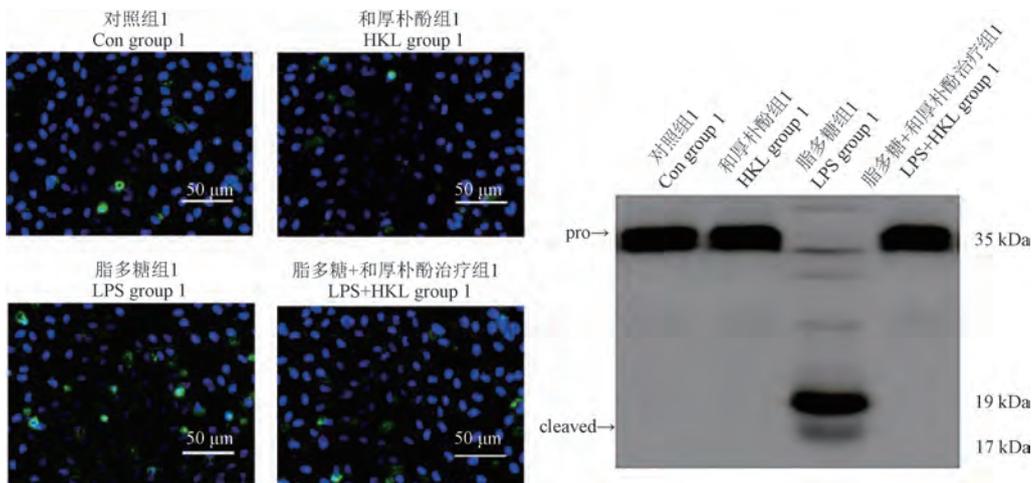


注: A: ROS 产量的变化; B: SOD2 乙酰化水平变化; C: MDA 的变化。与 Con 组 1 相比, * $P < 0.05$; 与 LPS 组 1 相比, # $P < 0.05$ 。

图 1 HKL 对小鼠肺微血管内皮细胞中 MDA 改变及 ROS 生成的影响

Note. A, Changes in ROS production. B, Changes in SOD2 acetylation level. C, Changes in MDA. Compared with the Con group 1, * $P < 0.05$. Compared with the LPS group 1, # $P < 0.05$.

Figure 1 Effects of Honokiol on MDA changes and ROS production in mouse lung microvascular endothelial cells



注: A: 各组 TUNEL 与 DAPI 双染结果比较, B: 各组 caspase-3 Western blot 结果分析。

图 2 HKL 保护 LPS 诱导的 PMVECs 细胞凋亡

Note. A, Comparison of TUNEL and DAPI double staining results among groups. B, Analysis of Western blot results of caspase-3 in each group.

Figure 2 HKL protects PMVECs cells from LPS-induced apoptosis

接的完整性,几乎不可见间隙。与 PBS 相比,LPS 处理的 PMVEC 表面 VE-cadherin 染色变为不连续性,出现大量间隙,提示 LPS 破坏了细胞的粘附连接。而 HKL 的预处理则阻止了 LPS 对细胞粘附连接的破坏。

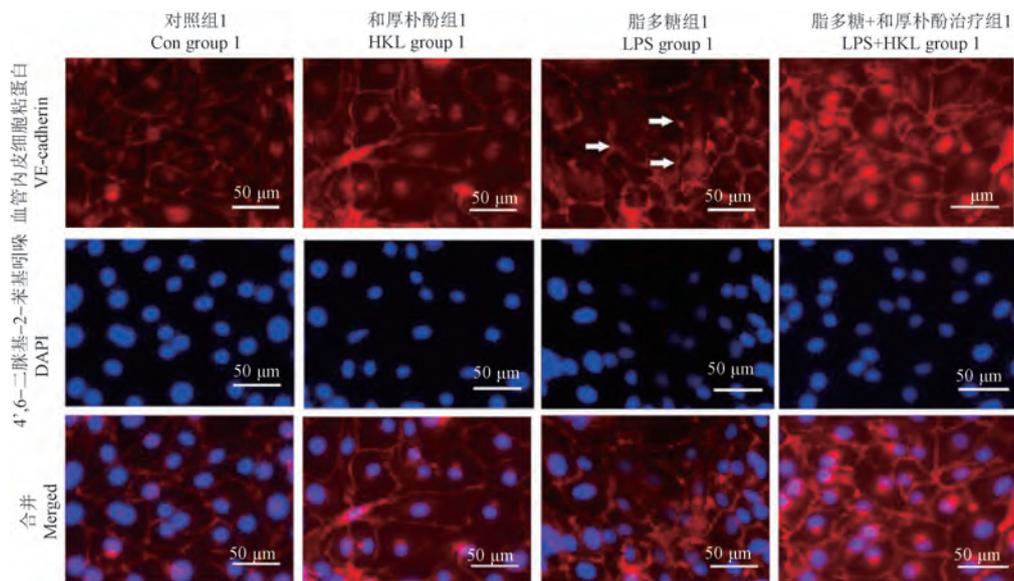
2.4 LPS 对 PMVECs 中 Claudin-5 的影响

利用免疫荧光法双染 Claudin-5 与 DAPI 检测紧密连接蛋白 Claudin-5 的定位。如图 4 所示,Con

组 1 中 Claudin-5 沿内皮细胞膜呈线性分布,表明 Claudin-5 定位于内皮细胞边缘。而 LPS 处理肺 PMVECs 后,内皮细胞膜上的 Claudin-5 荧光信号出现大量间隙,提示 LPS 破坏了细胞的紧密连接。而 HKL 的预处理则阻止了 LPS 对细胞紧密连接的破坏。

2.5 HKL 减轻 LPS 导致的肺损伤

如图 5 HE 染色显示,Con 组 2 与 HKL 组 2 中,

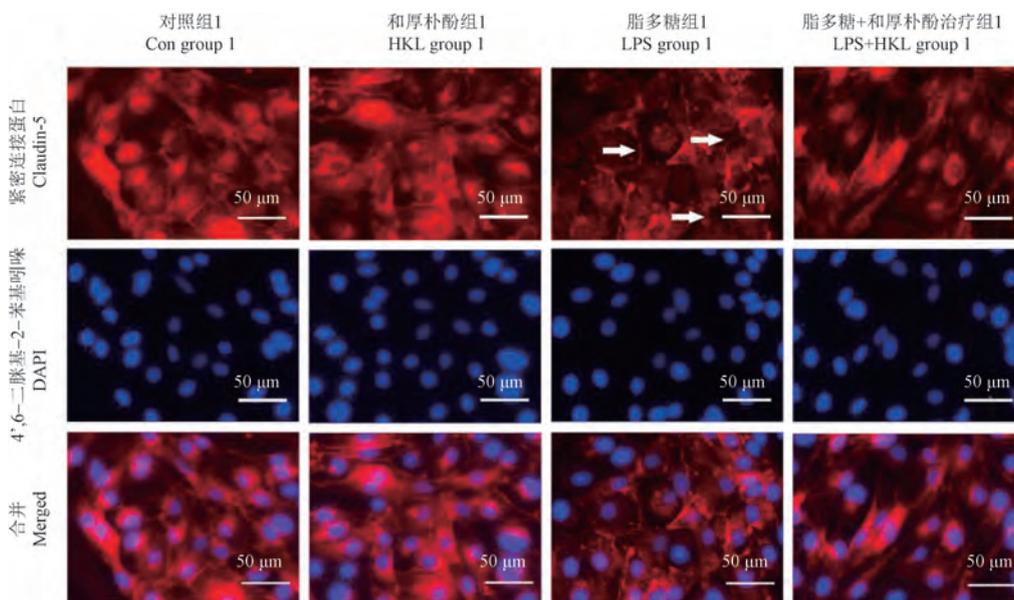


注:白色箭头所指为细胞连接断裂处。

图 3 HKL 减轻 LPS 对 PMVECs VE-cadherin 的影响

Note. White arrow points to the site where cell connections are broken.

Figure 3 HKL alleviates the effects of LPS on PMVECs VE-cadherin



注:白色箭头所指为细胞连接断裂处。

图 4 HKL 减轻 LPS 对 PMVECs 中 Claudin-5 的影响

Note. White arrow points to the site where cell connections are broken.

Figure 4 HKL alleviates the effects of LPS on PMVECs Claudin-5

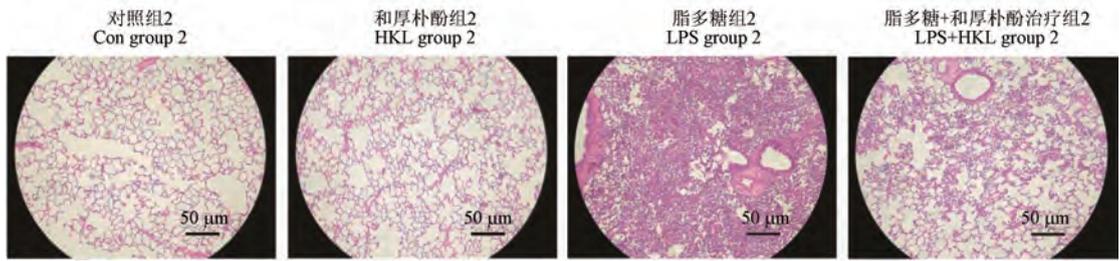


图 5 HKL 减轻 LPS 导致的肺损伤

Figure 5 Honokiol alleviates LPS-induced lung injury

肺泡结构完整,无明显病理改变;LPS 组 2 中则有明显的病理改变,包括炎症细胞浸润、肺泡和肺泡液中中性粒细胞聚集、肺泡壁增厚、肺淤血和透明膜形成。这些病理特征均符合急性肺损伤的病理学特征;HKL+LPS 组 2 显著减少了 LPS 诱导的肺组织损伤,肺泡间隔仅有轻度增厚,伴少许水肿以及炎症细胞浸润。

3 讨论

脂多糖可以破坏内皮细胞之间的细胞连接,而这些细胞连接对于维持屏障的完整性至关重要。这种破坏允许分子和免疫细胞穿过内皮层进入肺组织,引起炎症和组织损伤^[10]。LPS 同时激活内皮细胞,导致炎症介质如细胞因子、趋化因子和粘附分子的释放。这些分子促进免疫细胞的招募和激活,如中性粒细胞有助于炎症反应。脂多糖诱导的炎症反应导致内皮通透性增加,使液体和蛋白质渗出血管并积聚在肺组织中,导致肺水肿的形成,进一步损害肺功能^[11]。本实验采用 18 G 留置针行气管插管建立人工气道,8 h 后成功诱导了小鼠的 ALI。LPS 刺激引起明显的病理改变,包括炎症细胞浸润、肺泡和肺泡液里中性粒细胞聚集、肺泡壁增厚和肺间质充血。HKL 预处理明显减轻了 LPS 诱导的肺组织损伤。

LPS 诱导的炎症可破坏内皮细胞的线粒体功能。线粒体功能障碍导致促凋亡因子如细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质中。这触发了半胱天冬酶的激活及后续的细胞凋亡^[12]。LPS 还可以激活内皮细胞内多种促凋亡通路。这些通路包括 p53 通路以及 c-Jun N-末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路^[13]。内皮细胞的凋亡破坏其正常功能,导致血管完整性受损和通透性增加。这有助于肺水肿的发展,并损害肺部的气体交换。凋亡细胞死亡可破坏肺微血管内皮屏障的完整性^[14]。它会在

内皮层造成间隙和不连续性,使液体、蛋白质和免疫细胞渗漏到肺组织中。内皮细胞的凋亡同样阻碍了血管生成的进程,而血管生成对于组织修复和再生至关重要。它延缓了内皮屏障的恢复和正常肺功能的重建^[15]。在本研究中,通过体外培养 PMVECs,我们发现 LPS 处理可显著提高 PMVECs 的细胞凋亡,并引起 caspase-3 激活,提示 LPS 引起内皮细胞死亡是对血管的破坏机制之一。

caspase 是一种多功能蛋白酶,虽然大部分研究集中在细胞凋亡的功能上,但有明确的文献证明其在细胞凋亡以外的几个基本细胞过程中的作用^[16]。与本研究相关的是,包括 caspase-3、6 和 8 在内的多个 caspase 与衔接蛋白 β -catenin 的断裂及随后的降解有关,此外, caspase-3 还能切割 γ -catenin^[13]。因此, caspase 可能通过切割和加工关键衔接蛋白(如 β -catenin)来调控细胞连接的形成和稳定性,从而调节 PMVECs 的屏障功能。PMVECs 屏障功能障碍的几种潜在机制已经被提出,但最重要的似乎是关键的细胞间连接的破坏,主要包括了粘着连接和紧密连接,通过这些连接,相邻的微血管内皮细胞(microvascular endothelial cell, MVEC)在稳态条件下形成了选择性的半透性屏障^[16]。粘着连接是由相邻 MVEC 膜中血管内皮细胞钙黏蛋白(VE-cadherin)分子的胞间隙同质二聚体相互作用而形成的。VE-cadherin 在正常肺 MVEC 通透性屏障的维持中扮演了极其关键的角色,它通过细胞间的相互作用与细胞质衔接蛋白如 β -catenin、 γ -catenin 在细胞内相互作用,因此 VE-cadherin 能与肌动蛋白细胞骨架连接从而加强屏障功能^[17]。鉴于 caspase-3 在体外培养的 PMVECs 中的激活以及 VE-cadherin 在内皮细胞间粘附的重要作用,本研究通过荧光染色分析了 VE-cadherin 在 LPS 处理后的变化,结果显示 LPS 处理的 MVEC 表面 VE-cadherin 染色变为不连续性,出现大量间隙,表明内皮细胞间的粘着连

接被破坏。此外,紧密连接破坏也是导致肺泡毛细血管通透性增加的重要病理因素。紧密连接是位于细胞顶端的一种类似网络的封闭结构,主要由 Claudin 蛋白家族和相关蛋白 ZO-1 组成^[18]。连接和关闭细胞间隙的能力决定了细胞间隙的渗透性。研究发现 Claudin-5 在感染所致肺微血管内皮屏障功能损伤中的表达明显降低^[19]。此外,还有研究发现低氧可降低 ZO-1 和 Claudin-5 的表达,进而导致血管内皮屏障功能的破坏,引起血管内皮细胞的通透性增加^[20]。在本研究中,LPS 处理肺 MVEC 后,内皮细胞膜上的 Claudin-5 消失,仅保留了细胞内的结构,提示 LPS 破坏了细胞间的紧密连接结构。而和厚朴酚通过稳定血管内皮细胞的 VE-cadherin 与 Claudin-5 改善 LPS 诱导的急性肺损伤,提示维持内皮细胞连接的完整性也是和厚朴酚对抗急性呼吸窘迫综合征的药理之一。

参考文献:

[1] DENIEL G, DHELFT F, LANCELOT S, et al. Pulmonary inflammation decreases with ultra-protective ventilation in experimental ARDS under VV-ECMO: a positron emission tomography study [J]. *Front Med*, 2024, 11: 1338602.

[2] ZHOU M, MENG L, HE Q, et al. Valsartan attenuates LPS-induced ALI by modulating NF- κ B and MAPK pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1321095.

[3] VASSILIOUA G, KOTANIDOU A, DIMOPOULOU I, et al. Endothelial damage in acute respiratory distress syndrome [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8793.

[4] SZALAŃSKA-RAPAŁA K, ZYCH M, BORYMSKA W, et al. Beneficial effect of honokiol and magnolol on polyol pathway and oxidative stress parameters in the testes of diabetic rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 172: 116265.

[5] JAYAKUMARIN R, RAJENDRAN R, SIVASAILAM A, et al. Honokiol regulates mitochondrial substrate utilization and cellular fatty acid metabolism in diabetic mice heart [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 896: 173918.

[6] PAN X, HUA Z, FAN G, et al. Inflammatory suppression and immunity regulation benefits of honokiol in a rat model of acute peritonitis via the regulation of NLRP3 inflammasome and Sirt1/autophagy axis [J]. *Histol Histopathol*, 2024, 39(7): 921-934.

[7] PILLAI V B, SAMANT S, SUNDARESAN N R, et al. Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6656.

[8] 陈兰, 李雯, 王导新. 和厚朴酚通过激活线粒体依赖的 Sirt3/AMPK 途径减轻脂多糖所致的急性呼吸窘迫综合征 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2018, 43(10): 1075-1082.

CHEN L, LI W, WANG D X. Honokiol attenuates lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome via activation of mitochondrion-dependent Sirt3/AMPK pathway [J]. *J Cent South Univ Med Sci*, 2018, 43(10): 1075-1082.

[9] LIU Y, ZHOU J, LUO Y, et al. Honokiol alleviates LPS-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via Nrf2 activation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 127.

[10] WANG T, ZHUANG Y, YU C, et al. D-beta-hydroxybutyrate up-regulates Claudin-1 and alleviates the intestinal hyperpermeability in lipopolysaccharide-treated mice [J]. *Tissue Cell*, 2024, 87: 102343.

[11] PIERRAKOS C, KARANIKOLASM, SCOLLETTA S, et al. Acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and therapeutic options [J]. *J Clin Med Res*, 2012, 4(1): 7-16.

[12] LIANG J, ZHANG J, FAN J, et al. ANXA3 interference inactivates ERK/ELK1 pathway to mitigate inflammation and apoptosis in sepsis-associated acute lung injury [J]. *Mol Immunol*, 2024, 167: 25-33.

[13] ZHANGZ K, ZHOU Y, CAO J, et al. Rosmarinic acid ameliorates septic-associated mortality and lung injury in mice via GRP78/IRE1 α /JNK pathway [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73(7): 916-921.

[14] TAN W, LI Y, MA L, et al. Exosomes of endothelial progenitor cells repair injured vascular endothelial cells through the Bcl2/Bax/Caspase-3 pathway [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 4465.

[15] XU L, CHEN Y, FENG S, et al. PEDF inhibits LPS-induced acute lung injury in rats and promotes lung epithelial cell survival by upregulating PPAR- γ [J]. *BMC Pulm Med*, 2023, 23(1): 359.

[16] LAN R, YU Y, SONG J, et al. SFRP2 suppresses trophoblast cell migration by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2024, 29(4): 66.

[17] NAN W, HE Y, WANG S, et al. Molecular mechanism of VE-cadherin in regulating endothelial cell behaviour during angiogenesis [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1234104.

[18] COLAMONICIM A, EPSHTEIN Y, CHEN W, et al. Haloperidol attenuates lung endothelial cell permeability *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2186.

[19] WANG R, SONG W, XIE C, et al. Urinary trypsin inhibitor protects tight junctions of septic pulmonary capillary endothelial cells by regulating the functions of macrophages [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 1973-1989.

[20] MA X, ZHANGH, PAN Q, et al. Hypoxia/Aglycemia-induced endothelial barrier dysfunction and tight junction protein downregulation can be ameliorated by citicoline [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82604.

张洁云, 芦星宇, 刘晋芳, 等. 骨骼肌组织冰冻切片制备方法优化研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 64-71.
Zhang JY, Lu XY, Liu JF, et al. Optimal method for preparing frozen skeletal muscle tissue sections [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 64-71.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.008

骨骼肌组织冰冻切片制备方法优化研究

张洁云, 芦星宇, 刘晋芳, 曹锡梅, 李娜, 孙俊红*, 梁新华*

(山西医科大学法医学院, 山西 晋中 030600)

【摘要】 目的 探索新鲜和固定骨骼肌组织的最优冰冻切片方法, 为骨骼肌疾病的快速诊断及骨骼肌疾病发病机制的研究奠定实验基础。方法 提取 C57BL/6J 小鼠胫骨前肌, 新鲜组织经液氮直接速冻、包埋剂联合液氮速冻、异戊烷联合液氮速冻前处理; 固定组织经直接包埋、包埋剂联合液氮速冻进行前处理, 制作冰冻切片后 HE 染色, 并计算冰晶和肌纤维横截面积以评估不同前处理方式的切片效果。结果 新鲜组织经液氮直接速冻和异戊烷联合液氮速冻处理后可见肌纤维束形态消失, 大量的冰晶空泡; 包埋剂联合液氮漂浮速冻, 可见肌纤维束完整致密、无冰晶, 为适合新鲜组织的前处理方法。固定组织包埋剂联合液氮速冻处理后肌纤维束完整、无冰晶。结论 新鲜和固定组织经包埋剂联合液氮速冻处理后肌纤维束完整、无冰晶, 便于免疫组化、免疫荧光等实验的进一步进行, 有利于准确快速地诊断骨骼肌疾病及探索骨骼肌疾病的发病机制。

【关键词】 冰冻切片; 骨骼肌; OCT 包埋剂联合液氮速冻; C57BL/6J 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0064-08

Optimal method for preparing frozen skeletal muscle tissue sections

ZHANG Jieyun, LU Xingyu, LIU Jinfang, CAO Ximei, LI Na, SUN Junhong*, LIANG Xinhua*

(Department of Forensic Medicine, Shanxi Medical University, Jinzhong 030600, China)

【Abstract】 Objective To explore the optimal method for preparing fresh and fixed skeletal muscle tissues, and to lay an experimental foundation for the rapid diagnosis of and research into the pathogenesis of skeletal muscle diseases. **Methods** The tibialis anterior muscle was extracted from C57BL/6J mice. Fresh tissue was treated by direct rapid freezing in liquid nitrogen, embedding combined with liquid nitrogen freezing, and foreign body alkane treatment combined with liquid nitrogen freezing. Fixed tissues were pre-treated by direct embedding with embedding agent combined with rapid liquid nitrogen freezing. The frozen sections were stained with hematoxylin and eosin. The cross-sectional areas of ice crystals and muscle fibers were calculated to evaluate the effects of the different pre-treatment method. **Results** The morphology of the muscle fiber bundles was disrupted and numerous ice crystal vacuoles were observed in fresh tissues after direct liquid nitrogen freezing and foreign body alkane treatment combined with liquid nitrogen freezing. In contrast, the muscle fiber bundles were intact and dense and there were no ice crystals in tissues treated with embedding agent combined with rapid liquid nitrogen freezing, indicating that this pre-treatment method was suitable for preparing fresh skeletal muscle tissue. Fixed tissue treated with embedding agent and liquid nitrogen freezing also showed complete muscle fiber bundles and no ice crystals. **Conclusions** Treatment of fresh and fixed skeletal muscle tissues with embedding agent combined

【基金项目】 山西省科学技术厅青年科学研究项目(202303021212123); 山西省科技创新人才团队专项资助(202204051001025)。

【作者简介】 张洁云(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 骨骼肌损伤再生修复机制研究。E-mail: zhangjieyun12@163.com

【通信作者】 梁新华(1978—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 法医损伤病理学。E-mail: liangxh163@163.com

孙俊红(1975—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 法医病理学、法医临床损伤研究。E-mail: sunjunhong146@163.com

* 共同通信作者

with rapid liquid nitrogen freezing preserves muscle fiber bundles, with no ice crystals. Tissues prepared by this method are thus suitable for further examinations, such as immunohistochemistry and immunofluorescence. This method will therefore aid the accurate and rapid diagnosis of and research into the pathogenesis of skeletal muscle diseases.

【Keywords】 frozen section; skeletal muscle; OCT combined with liquid nitrogen quick freezing; C57BL/6J mice

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

骨骼肌活检病理分析是临床医生诊断与鉴别骨骼肌疾病的重要手段。先天性肌病、代谢性肌病及炎性肌病等具有特异病理表现的骨骼肌疾病,通过病理分析可以明确诊断,病理图像是提示骨骼肌不良病理改变的主要手段之一。常见的病理图像切片技术包括石蜡切片和冰冻切片^[1]。与传统的石蜡切片技术相比,冰冻切片技术不仅省时省力,其显著优势在于无需经过透明、过蜡等步骤,组织蛋白质不易发生变性,可更好地保存组织细胞的抗原活性以及酶活性^[2-4],更适用于免疫荧光、免疫组化以及需抗原染色定位的实验^[5]。

骨骼肌组织含水量较高,约占 75%~80%^[6],因而在常规冷冻处理制作冰冻切片的过程中极易产生冰晶从而影响肌纤维的完整性,不利于后续抗原定位^[7]。本实验室前期实验中采用-80℃冷冻处理骨骼肌组织时产生了许多体积较大、形状不规则的冰晶。这可能是-80℃冷冻过程比较缓慢,组织跨越最大冰晶带时间过久所致。速冻法可快速跨越冰晶带从而降低冰晶对组织结构的损伤^[8],但是掌握好速冻方法的选择以及时间的长短仍较为困难。因此,亟需探索简单且稳定性好的方法来最大程度保持骨骼肌组织形态的完整,尽可能精确还原不同肌病及损伤后的病理变化。液氮速冻和液氮联合异戊烷速冻由于经济易实现是科学研究中常见的速冻方法^[9]。胫骨前肌是小腿下肌群的重要骨骼肌之一,由于其混合纤维类型的特征,是各类损伤模型中研究最广泛的部位;此外,作为一种高度异质的骨骼肌,胫骨前肌只有一个腹部,因而其损伤保持均匀性^[10]。因此,本研究以 C57BL/6J 小鼠的胫骨前肌为研究对象,探索骨骼肌组织最适的冰冻切片条件。

1 材料和方法

1.1 实验动物

无特定病原体级 (specific pathogen free, SPF) C57BL/6J 雄性小鼠 24 只,6~8 周龄,体重 20~25 g。来源于北京斯贝福生物科技有限公司 [SCXK (京)2019-0010],饲养于在山西医科大学实验动物

中心 [SYXK (晋)2019-0007]。小鼠饲养环境采用 12 h/12 h 光/暗循环,室温 (23±2)℃,湿度 (55±4)%,并自由获取食物和水。实验操作经山西医科大学动物伦理委员会批准 (2021LL244)。遵循中华人民共和国卫生部发布的《实验动物护理与使用指南协定书》原则,实验过程遵循 3R 原则给予动物福利保护。

1.2 主要试剂与仪器

无水乙醇 (天津市致远化学试剂有限公司, 20230315);二甲苯 (天津市致远化学试剂有限公司, 20230411);分化液 (南昌雨露实验器材有限公司, 200901);返蓝液 (南昌雨露实验器材有限公司, 200901);伊红染色液 (珠海贝索生物技术有限公司, C230401);苏木素染色液 (珠海贝索生物技术有限公司, C230403);中性树胶 (上海懿洋仪器有限公司, 20220615)。冷冻切片机 (徕卡显微系统 (上海) 贸易有限公司, Leica CM1950);全景组织细胞定量分析系统 (缇基北京科技有限公司, TissueFaxs200 Plus);刀片 (徕卡显微系统 (上海) 贸易有限公司, Leica22512783);OCT 冷冻包埋剂 (日本樱花, 4127-00);异戊烷 (安徽泽升科技有限公司, 1813377);环保型 GD 肌肉固定液 (武汉塞维尔生物科技有限公司, CR2210072);黏附载玻片 (江苏世态实验器材有限公司, 80312-3161);包埋模具盒 (江苏世态实验器材有限公司, 80203-009);盖玻片 (江苏世态实验器材有限公司, 80340-3610)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠胫骨前肌提取

C57BL/6J 小鼠颈部脱臼处理后,将腿部毛发剃除以避免取材时混入样本,消毒后环形切开脚踝以下皮肤,向上提拉皮肤暴露小腿肌群,使用镊子沿小腿内缘分离胫骨前肌,剪去踝侧胫骨前肌肌腱后,轻轻地将胫骨前肌从胫骨上分离,并切开髌骨侧胫骨前肌上端,完整分离出胫骨前肌,进行后续处理。

1.3.2 胫骨前肌预处理

按图 1 将 24 只小鼠的 48 块胫骨前肌分为 8 个不同亚处理组,每个亚处理组 $n=6$ 。具体操作如下。

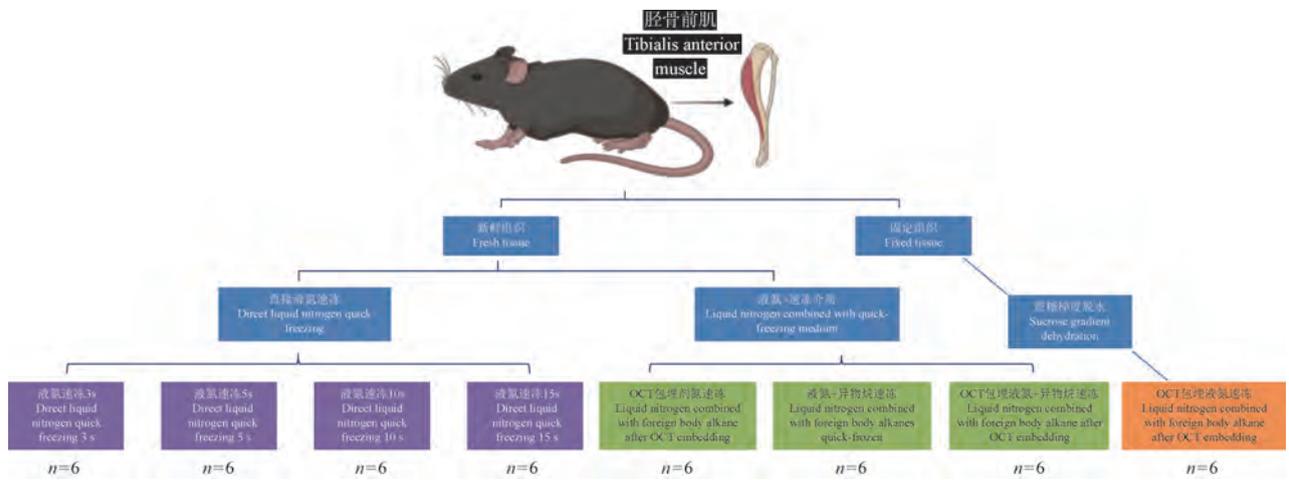


图 1 实验动物分组与组织预处理

Figure 1 Experimental animal grouping and tissue pre-processing

(1) 新鲜组织

直接液氮速冻组:取下骨骼肌后立即将其放入液氮,设置 3 s、5 s、10 s、15 s 不同速冻时间点,组织均匀变白并不会由于冷冻过度而冻裂,即视为速冻完全。**液氮联合 OCT 包埋剂组** ($n=6$):将 OCT 包埋剂挤满模具盒,避免产生气泡;将组织垂直放入包埋剂中后,3 块组织直接将包埋盒沉入液氮中速冻至包埋剂恰好完全凝固;余 3 块组织将包埋盒漂浮于液氮上方速冻至包埋剂恰好完全凝固(本研究使用 25 mm×25 mm×5 mm 包埋模具盒,包埋剂完全凝固需 25~30 s)。**液氮联合异戊烷速冻组:**将盛有异戊烷的铝制小杯漂浮于液氮罐上方,待异戊烷预冷至半凝固状态后,再将组织浸入异戊烷中速冻 10 s 至组织均匀变白。**液氮联合异戊烷+OCT 包埋剂组:**将 OCT 包埋好的组织浮于用液氮预冷的异戊烷上方速冻至包埋剂恰好完全凝固。

(2) 固定组织 ($n=6$)

骨骼肌组织使用环保型 GD 肌肉专用固定液固定 15~18 h 后,15%~30%蔗糖梯度脱水。梯度脱水完成后,用滤纸吸掉多余的水分后在包埋模具盒内用 OCT 包埋组织后浮于液氮上方速冻至包埋剂恰好完全凝固,此过程需注意保持组织垂直。

1.3.3 制作冰冻切片

使用 Leica 冷冻切片机。冰冻切片机 24 h 处于恒温待机状态,切片前 1 h 设置好所需的冷冻切片温度(骨骼肌组织冷冻箱温度 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为宜,样品头温度 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为宜)。调整防卷板的位置,将刀片、毛笔、镊子等放入冷冻箱预冷,预处理好的组织放入冷冻箱中复温至组织温度与冷冻箱温度

一致时,更换锋利的新刀片,使用 $6\text{ }\mu\text{m}$ 进行组织切片,利用温差将组织粘在黏附载玻片上。

1.3.4 HE 染色

将组织切片置于 4%多聚甲醛中固定 5 min,苏木素染色 5 min,水洗 1 min,1%盐酸酒精分化 10 s,水洗 1 min,氨水返蓝 1 min,水洗 1 min,伊红染色 3 min,水洗 1 min,95%乙醇 I 1 min,95%乙醇 II 1 min,无水乙醇 I 1 min,无水乙醇 II 1 min,二甲苯 I 1 min,二甲苯 II 1 min。中性树胶封片,于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤箱烘干。

1.3.5 图像采集与绘图

使用全景组织细胞定量分析系统对组织切片进行扫描。每个亚处理组的 6 张切片中随机选取 2 张 $200\times$ 视野,每组共计 12 个视野,用于比较分析冰晶、肌纤维横截面积。使用 Image pro plus 6.0 计算冰晶及肌纤维横截面积。并使用 GraphPad Prism 9.0 绘图。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行分析,以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示所有数据,组间差异分析采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多重比较采用方差齐性 LSD- t 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 直接液氮速冻不同时间骨骼肌结构改变的比较

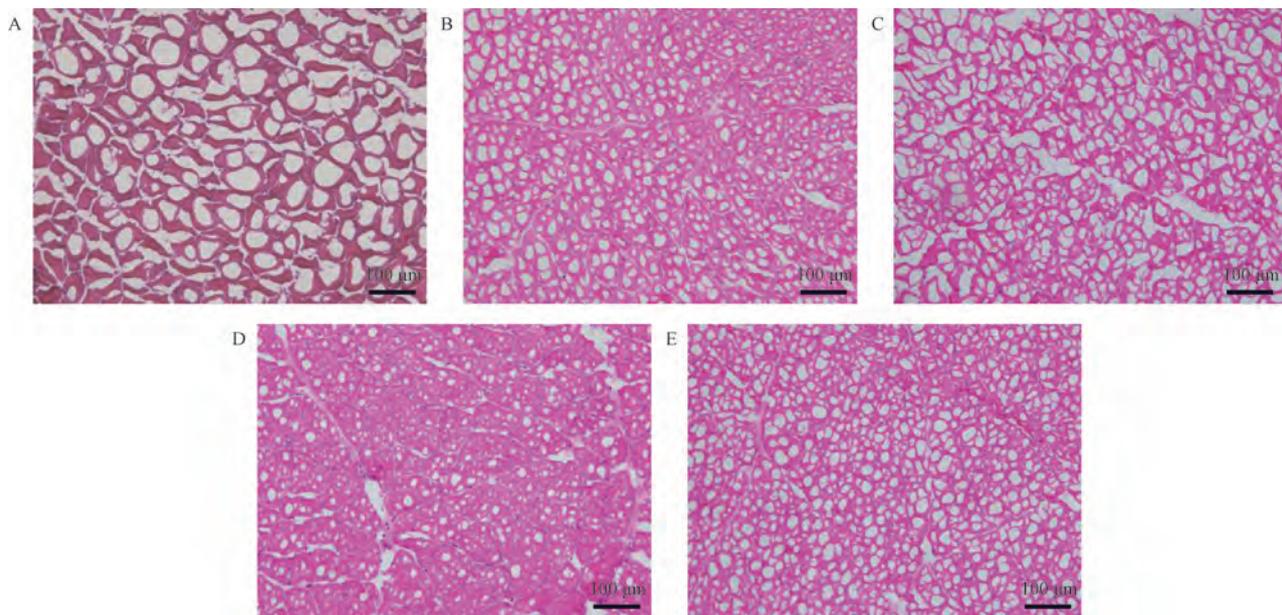
直接 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻处理组织的 HE 结果如图 2A 所示,骨骼肌组织肌束形态完全消失,肌纤维内可

见大量不规则的冰晶空泡,肌原纤维结构完全消失。直接液氮速冻处理骨骼肌组织时,结果显示,相较于直接-80℃冷冻,液氮速冻不同时间后均可明显缓解冰晶(表1, $P < 0.001$),但不同时间点的HE染色切片肌纤维内仍可见许多不规则的细小冰晶(图2B~2E),表明直接液氮速冻法仍不能达到病理诊断要求。此外,骨骼肌冰晶的缓解程度随液氮速冻时间的延长并不成规律性变化,经统计在所设置的4个时间点中,速冻10s后冰晶横截面积最

小、缓解效果最优。

2.2 液氮联合介质速冻对骨骼肌结构改变的比较

本研究使用了两种介质缓解液氮速冻造成的冰晶:OCT包埋剂和异戊烷。结果显示,使用OCT包埋后再经液氮速冻,当包埋盒浸入液氮时,肌纤维内仍可见大量不规则的细小冰晶(图3A);而当包埋剂漂浮于液氮上方,即包埋剂不与液氮直接接触时,肌纤维完整致密且规则,肌筋膜边界清晰,无冰晶产生(图3B),冰晶得到最大程度的缓解。此



注:A:直接-80℃冷冻;B:直接液氮速冻3s;C:直接液氮速冻5s;D:直接液氮速冻10s;E:直接液氮速冻15s。

图2 直接液氮速冻不同时间骨骼肌结构改变的比较

Note. A, Directly freezing at -80℃. B, Direct liquid nitrogen quick freezing 3 s. C, Direct liquid nitrogen quick freezing 5 s. D, Direct liquid nitrogen quick freezing 10 s. E, Direct liquid nitrogen quick freezing 15 s.

Figure 2 Comparison of skeletal muscle structure changes at different time of direct liquid nitrogen quick freezing

表1 直接液速冻不同时间骨骼肌组织冰晶面积比较($n = 100, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of ice crystal area of skeletal muscle tissue at different time of direct liquid quick freezing

液氮速冻不同时间 Liquid nitrogen quick-freezing at different time	冰晶横截面积/ μm^2 Ice crystal cross-sectional area
直接-80℃冷冻 Directly freezing at -80℃	136.84±50.73
直接液氮速冻3s Direct liquid nitrogen quick freezing 3 s	23.92±7.80***
直接液氮速冻5s Direct liquid nitrogen quick freezing 5 s	49.65±18.89**** $\Delta\Delta$
直接液氮速冻10s Direct liquid nitrogen quick freezing 10 s	12.39±5.59****###
直接液氮速冻15s Direct liquid nitrogen quick freezing 15 s	31.44±12.14****# Δ

注:与直接-80℃冷冻组相比,*** $P < 0.001$;与直接液氮速冻3s组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$;与直接液氮速冻5s组相比,# $P < 0.05$,### $P < 0.001$;与直接液氮速冻10s组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

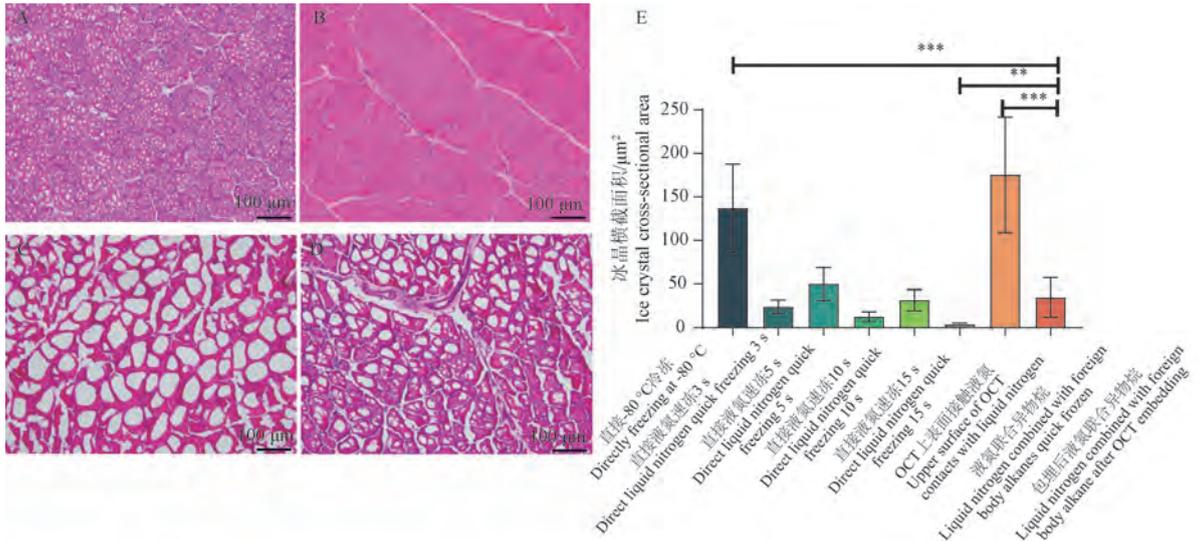
Note. Compared with directly freezing at -80℃ group, *** $P < 0.001$. Compared with direct liquid nitrogen quick freezing 3 s group, $\Delta\Delta P < 0.01$. Compared with direct liquid nitrogen quick freezing 5 s group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$. Compared with direct liquid nitrogen quick freezing 10 s group, $\Delta P < 0.05$.

外,如图 3C 所示,当使用液氮联合异戊烷速冻时,产生的冰晶面积大于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻($(175.15\pm 66.53)\mu\text{m}^2$ vs $(136.84\pm 50.73)\mu\text{m}^2$, $P<0.05$) (表 1、表 2),而 OCT 包埋后液氮联合异戊烷速冻,产生的冰晶面积与直接液氮速冻各时间点均无差异(图 3E)。

2.3 组织固定对切片效果的影响

固定组织包埋后经液氮速冻,切片完整,HE 染

色可见肌纤维呈圆形、多边形,细胞核位于周边,肌原纤维呈点状,结构规则且完整,肌纤维聚集成束,周围被结缔组织所包绕(图 4A)。与新鲜骨骼肌组织相比(图 4B),固定脱水后骨骼肌组织肌束膜及肌外膜间结缔组织间隙虽略增宽,比较骨骼肌组织的肌纤维横截面积,发现两组之间无统计学意义,并未对骨骼肌的定量产生影响(图 4C)。



注:A;OCT 包埋后浸入液氮速冻(包埋剂上表面接触到液氮);B;OCT 包埋后漂浮于液氮上方速冻(包埋剂上表面不接触到液氮);C;液氮联合异戊烷直接速冻;D;OCT 包埋后液氮联合异戊烷速冻;E:不同方法产生的冰晶横截面积综合比较。与 OCT 包埋后液氮联合异戊烷组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 3 不同介质下骨骼肌结构改变的比较

Note. A, Liquid nitrogen rapid freezing after OCT embedding (the surface of the embedding agent comes into contact with liquid nitrogen). B, Liquid nitrogen rapid freezing after OCT embedding (the surface of the embedding agent does not come into contact with liquid nitrogen). C, Liquid nitrogen combined with foreign body alkanes direct quick freezing. D, Liquid nitrogen combined with foreign body alkane quick freezing after OCT embedding. E, Comprehensive comparison of ice crystal areas generated by different methods. Compared with liquid nitrogen combined with foreign body alkane after OCT embedding group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 3 Comparison of changes in skeletal muscle structure under different media

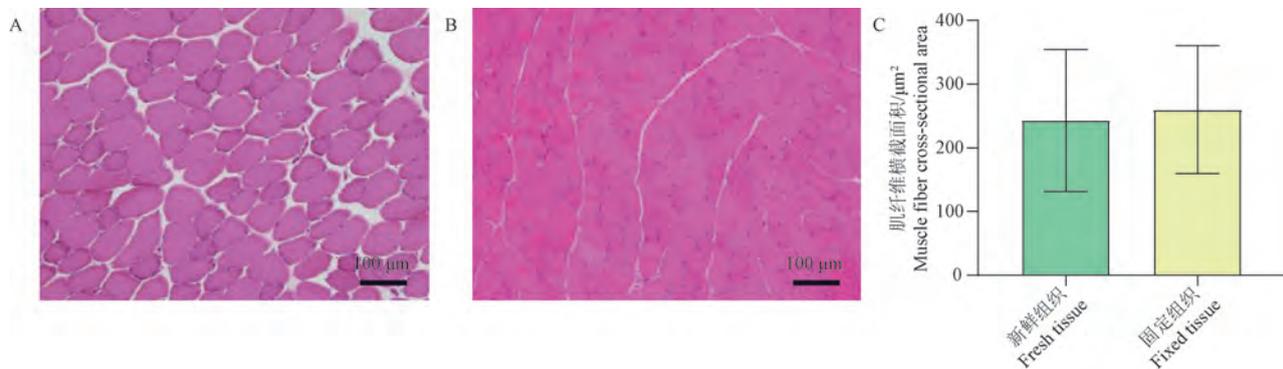
表 2 不同介质下骨骼肌组织冰晶横截面积($n=100, \bar{x}\pm s$)

Table 2 Cross sectional area of ice crystals in skeletal muscle tissue under different media

不同处理方式 Different treatments	冰晶横截面积/ μm^2 Ice crystal cross-sectional area
OCT 上表面接触液氮 Upper surface of OCT contacts with liquid nitrogen	4.040 ± 1.37
OCT 上表面不接触液氮 Upper surface of OCT does not contact with liquid nitrogen	0
液氮联合异戊烷 Liquid nitrogen combined with foreign body alkanes quick-frozen	175.15 ± 66.53 ****##
包埋后液氮联合异戊烷 Liquid nitrogen combined with foreign body alkane after OCT embedding	34.61 ± 22.60 *** ## $\Delta\Delta\Delta$

注:与 OCT 上表面接触液氮组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 OCT 上表面不接触液氮组相比, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$;与液氮联合异戊烷组相比, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$ 。

Note. Compared with upper surface of OCT contacts with liquid nitrogen group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with upper surface of OCT does not contact with liquid nitrogen group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with liquid nitrogen combined with foreign body alkanes quick-frozen group, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$.



注:A:固定组织包埋后液氮速冻;B:新鲜组织包埋后液氮速冻;C:新鲜和固定组织肌纤维横截面积的定量比较。

图4 新鲜组织和固定组织骨骼肌结构改变的比较

Note. A, Liquid nitrogen rapid freezing after fixed tissue embedding. B, Liquid nitrogen rapid freezing after embedding fresh tissue. C, Quantitative comparison of cross-sectional area of fresh and fixed tissue muscle fibers.

Figure 4 Comparison of changes in skeletal muscle structure between fresh and fixed tissues

3 讨论

高质量的切片技术是临床病理科的一项常规技术^[11],无论是对骨骼肌疾病的术中诊断还是常规诊断都至关重要,而骨骼肌组织在冷冻过程中极易形成冰晶,因此,标本的冷冻过程是确保肌肉活检质量的关键环节^[12]。获得高质量的切片应对各个环节均进行细致的处理,这就要求病理技术人员不断对每个过程进行优化。既往对不同组织冰冻切片条件优化的研究表明,不同组织达到最佳切片效果所需的冰冻条件各不相同,因此本研究对高骨骼肌组织冰冻切片条件进行了探索。

直接 -80°C 冷冻几乎可以引起所有的组织内部产生过大的冰晶、使组织结构受损^[13],而速冻法可以快速跨越冰晶形成区从而降低对组织结构的损伤。目前科学研究中常用的速冻方法有:液氮速冻、液氮/异戊烷法速冻、干冰/无水乙醇速冻等。液氮速冻法由于其结构简单、操作方便、成本低廉等优点被广泛用于食品行业中肉类质量的维持^[14-15]。因此本研究探索了液氮速冻对肌组织冰晶缓解的效果,结果显示尽管相较于直接 -80°C 冷冻,液氮速冻 10 s 后冰晶横截面积最小、缓解效果最优,但仍无法达到病理诊断要求。这可能与液氮速冻过程过快相关,液氮快速速冻时,组织内的水分会快速形成大量的晶核,进而形成小而细微的冰晶^[16]。这一结果与孙红星等^[17]发现的液氮速冻法更适合骨骼肌组织结果不同,这种差异的产生可能源于不同肌组织大小不同,肌纤维直径不同对液氮速冻的反应性不同^[18-19]。此外,在实验过程中发现

液氮速冻时间过短,组织速冻不完全不易切片,而过久易造成组织发脆甚至冻裂,对速冻时间的把握有一定的难度,且未能达到完全缓解冰晶效果。因此不推荐直接液氮速冻法制备骨骼肌组织冰冻切片。

王园园等^[8]的研究表明,包埋方法、速冻方法以及切片温度都会影响切片效果,因而本研究探究了两种常用且易获得的方法来缓解液氮速冻造成的细微冰晶:液氮/异戊烷速冻法、OCT 包埋剂。结果显示液氮异戊烷法无法达到缓解冰晶的效果,而且发现液氮异戊烷法所致的冰晶横截面积大于液氮速冻法,这是由于缓慢冷冻过程中,组织内水分形成晶核速率较慢,而通过最大冰晶形成带的时间长,晶核生长的时间充分,导致得到的晶体较大,对细胞和组织造成较大的破坏。而肌组织经 OCT 包埋后漂浮液氮速冻法,能够有效缓解冰晶的产生,HE 染色可见肌纤维完整致密且规则,肌筋膜边界清晰。该方法不仅快速,且可将组织连同包埋模具盒一起保存,可适用于多次切片的情况,是适合新鲜肌组织的冰冻切片方法。

新鲜组织直接进行冷冻切片可在 30 min 内快速完成从包埋切片到染色的所有步骤,方便快捷,但存在组织易碎裂、脱片、不能长期保存等问题^[20-21]。因此对固定组织切片条件的探究也尤为重要。在对固定骨骼肌组织最优冰冻切片条件探索时,发现经固定脱水后,冰晶得到了有效缓解,但存在包埋的组织过软、切片易碎的问题。而固定骨骼肌组织经液氮处理后,冰晶得到有效控制,HE 染色可见肌纤维聚集成束,结构完整且排列整齐,周

围被结缔组织所包绕。此外,该方法在小鼠肝、脾、肠组织切片中亦取得了较好的结果。组织固定后避免了细胞的自溶和腐败,能更好地保存蛋白质、脂肪、糖等各种成分^[22]。因而固定组织液氮速冻冰冻切片法是适于广泛推广且稳定性强的一种方法。

综上所述,冰冻切片的制作需依据组织自身特点严格控制各个环节,更需依据实际应用选择合适且方便的方法。本研究针对骨骼肌冰冻切片冰晶问题,优化了适合新鲜组织和固定组织的冰冻切片制作方法,为手术标本进行更精准诊断及各类骨骼肌疾病机制研究提供技术支持与参考。但该方法仍存在一定局限性,在后续研究中仍需要对骨骼肌组织冰冻切片条件进行更深一步的探索,以寻找更适合骨骼肌组织的高效且操作简单的前处理方法。

参考文献:

- [1] TOMITA T. Immunohistochemical staining for lymphatic and blood vessels in normal tissues: comparison between routinely paraffin-embedded tissues and frozen sections [J]. *Acta Med Acad*, 2021, 50(1): 13-28.
- [2] ROELOFS A J, DE BARI C. Immunostaining of skeletal tissues [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1914: 437-450.
- [3] WANG Y N, TIAN Y, HE M, et al. Cryostat sectioning of the mouse brain [J]. *Bio-Protocol*, 2021, 11: e1010819.
- [4] GE X. Immunofluorescence staining on mouse embryonic brain sections [J]. *Bio-Protocol*, 2012, 2(11): e192.
- [5] 张燕, 韩志慧, 钟延丰, 等. 骨骼肌活组织检查病理诊断技术的改进及应用 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2009, 41(4): 459-462.
ZHANG Y, HAN Z H, ZHONG Y F, et al. Improvement and application of diagnostic techniques of the skeletal muscle biopsy [J]. *J Peking Univ Health Sci*, 2009, 41(4): 459-462.
- [6] BIRBRAIR A, ZHANG T, WANG Z M, et al. Pericytes: multitasking cells in the regeneration of injured, diseased, and aged skeletal muscle [J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6: 245.
- [7] BITTL A, NAP M, JÄGER W, et al. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein on frozen and paraffin-embedded tissue sections of normal and malignant tissues [J]. *Anticancer Res*, 1995, 15(3): 1007-1014.
- [8] 王园园, 王涛, 李新, 等. 小鼠不同组织冰冻切片技术探讨 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(9): 59-63.
WANG Y Y, WANG T, LI X, et al. Discussion of frozen section techniques with different tissues in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(9): 59-63.
- [9] 黄钊, 张丽琴, 钟杰. 快速冰冻切片技术在病理诊断中的应用效果 [J]. *中国卫生标准管理*, 2024, 15(12): 129-132.
HUANG Z, ZHANG L Q, ZHONG J. Application effect of rapid frozen section technology in pathological diagnosis [J]. *China Health Stand Manag*, 2024, 15(12): 129-132.
- [10] HARDY D, BESNARD A, LATIL M, et al. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147198.
- [11] SANTORO A, PIERMATTEI A, INZANI F, et al. Frozen section accurately allows pathological characterization of endometrial cancer in patients with a preoperative ambiguous or inconclusive diagnoses: our experience [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 1096.
- [12] HANKE C W, LEONARD A L, REED A J. Rapid preparation of high-quality frozen sections using a membrane and vacuum system embedding machine [J]. *Dermatol Surg*, 2008, 34(1): 20-25.
- [13] GAO W, HUANG Y, ZENG X A, et al. Effect of soluble soybean polysaccharides on freeze-denaturation and structure of myofibrillar protein of bighead carp surimi with liquid nitrogen freezing [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 135: 839-844.
- [14] 鲁珺, 余海霞, 杨水兵, 等. 液氮深冷速冻对三疣梭子蟹品质和微观组织结构的影响 [J]. *中国食品学报*, 2016, 16(9): 87-94.
LU J, YU H X, YANG S B, et al. Effect of cryogenic freezing by liquid nitrogen on the quality and microstructure of *Portunus trituberculatus* [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2016, 16(9): 87-94.
- [15] 罗江美, 赵茜, 赵健如, 等. 冰晶生长对冷冻水产品品质影响及新型冷冻方式研究进展 [J]. *现代食品科技*, 2024, 40(2): 336-373.
LUO M J, ZHAO Q, ZHAO J R, et al. Research progress on the effect of ice crystal growth on the quality of frozen aquatic products and development of innovative freezing methods [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2024, 40(2): 336-373.
- [16] 李苑, 王丽平, 李钰金, 等. 水产品冻结贮藏中冰晶的形成及控制研究进展 [J]. *食品科学*, 2016, 37(19): 277-282.
LI Y, WANG L P, LI Y J, et al. A review of the formation and control of ice crystals in aquatic products during freezing storage [J]. *Food Sci*, 2016, 37(19): 277-282.
- [17] 孙红星, 窦永青, 韩梅. 不同冰冻条件对肌性组织标本冻存效果的影响 [J]. *河北医科大学学报*, 2021, 42(9): 998-1002.
SUN H X, DOU Y Q, HAN M. Effect of different freezing conditions on the freezing preservation of muscle tissue specimens [J]. *J Hebei Med Univ*, 2021, 42(9): 998-1002.
- [18] 王媛, 宋肖, 胡晓悦, 等. 大鼠小腿骨骼肌冰冻切片样本冻存优化的实验教学探析 [J]. *科教导刊(下旬刊)*, 2020, 12(30): 116-117, 164.
WANG Y, SONG X, HU X Y, et al. Optimization of cryopreserving methods of frozen sections of rat calf muscle [J]. *Guide Sci Educ*, 2020, 12(30): 116-117, 164.
- [19] 朱道立, 张艳红, 程量. 家兔胫骨前肌肌纤维型的分布研究 [J]. *中国实验动物学报*, 1995, 3(2): 70-76.
ZHU D L, ZHANG Y H, CHENG L. Study on the distribution of tibialis anterior muscle fiber type in rabbits [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 1995, 3(2): 70-76.

- [20] 徐天怡, 张慧玲, 王海东. 9 种固定方式对脂肪组织冷冻切片质量的影响 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023, 69(14): 73-76, 136-137.
XU T Y, ZHANG H L, WANG D H. Effects of nine fixation methods on the quality of cryosection of adipose tissue [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2023, 69(14): 73-76, 136-137.
- [21] STEVEN R T, NIEHAUS M, TAYLOR A J, et al. Atmospheric-pressure infrared laser-ablation plasma-postionization mass spectrometry imaging of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and fresh-frozen tissue sections with no sample preparation [J]. Anal Chem, 2022, 94(28): 9970-9974.
- [22] 黄小雨, 仲欢欢, 付琳琳, 等. 固定组织的冰冻切片技术探讨 [J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(8): 988-990.
HUANG X Y, ZHONG H H, FU L L, et al. Discussion on frozen section technology of fixed tissue [J]. J Shanxi Med Univ, 2018, 49(8): 988-990.

[收稿日期]2024-04-10

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》2024 年征订启事

《中国比较医学杂志》由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。开设栏目:研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等。读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,180 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,共计 600 元。邮发代号:82-917。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

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

赖娅娜, 曾文滔. 真孕受体用于金黄仓鼠胚胎移植的方法建立与优化 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 72-77.

Lai YN, Zeng WT. Establishment and optimization of a method for transferring golden hamster embryos using true pregnancy recipients [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 72-77.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.009

真孕受体用于金黄仓鼠胚胎移植的方法建立与优化

赖娅娜, 曾文滔*

(南京医科大学医药实验动物中心, 南京 211166)

【摘要】目的 优化金黄仓鼠胚胎移植技术, 探索金黄仓鼠真孕受体最佳移植胚胎数目及发育时期。**方法** 建立真孕白化金黄仓鼠种群作为胚胎移植受体, 比较胚胎发育期、受体减胚及二次移植受体对产仔率、供胚得仔率及后代存活率的影响, 确定真孕受体最佳胚胎移植枚数及移植方法。**结果** 相对于野生型金黄仓鼠作为移植受体, 真孕白化受体可快速判定子代来源, 并适用于多种以胚胎移植为基础的生殖类实验方案, 采用受精卵或二细胞胚胎对移植效果无显著影响 ($P>0.05$); 减胚组能显著提高供胚得仔率 (22%, $P<0.05$), 二次移植受体的未孕率显著提高 (42%, $P<0.01$); 移植 6~10 枚胚胎的供胚得仔率最高 (27%, $P<0.01$), 存活率正常 (89%)。**结论** 6~10 枚供体胚胎有助于提高供胚得仔率和存活率, 基于白化真孕受体的胚胎移植方法, 为金黄仓鼠的应用与开发提供了技术支撑。

【关键词】 金黄仓鼠; 受精卵; 二细胞胚胎; 胚胎移植

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0072-06

Establishment and optimization of a method for transferring golden hamster embryos using true pregnancy recipients

LAI Yana, ZENG Wentao*

(Animal Core Facility of Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

【Abstract】Objective To optimize the technical parameters used for embryo transfer in golden hamsters, and explore the optimal number and developmental period of transplanted embryos for golden hamster pregnancy recipients. **Methods** We established a population of true pregnant albino golden hamster embryo transfer recipients and compared the effects of different embryonic developmental stages, recipient embryo reduction, and secondary transfer recipients on litter yield, donor embryo yield, and offspring survival rate. **Results** Compared with wild-type golden hamster transplant recipients, true pregnancy albino recipients allowed the origin of the offspring to be determined quickly, and were suitable for various reproductive experimental programs based on embryo transfer. The use of fertilized eggs or two-cell embryos had no significant impact on the transfer effect ($P>0.05$); however, the rate of donor embryos was significantly increased in the recipient embryo-reduction group (22%, $P<0.05$). The second transfer recipient's non-pregnancy rate was significantly increased (42%, $P<0.01$). The highest embryo yield rate (27%, $P<0.01$) and normal survival rate (89%) occurred with the transfer of 6~10 embryos. **Conclusions** The transfer of 6~10 donor embryos may improve the yield and survival rate of donor embryos. Here, we successfully established an embryo transfer method using pregnant albino golden

【基金项目】 江苏省实验动物协会科研项目 (DWXH202303); 江苏省卫健委医学科科研项目 (Z2023003); 国家重点研发计划 (2021YFF0702500)。

【作者简介】 赖娅娜 (1979—), 女, 实验师, 硕士, 研究方向: 基因编辑动物模型构建。E-mail: lai yana@njmu.edu.cn

【通信作者】 曾文滔 (1987—) 男, 高级实验师, 研究方向: 生殖医学与遗传。E-mail: wentaozeng@njmu.edu.cn

hamsters as recipients, thus providing technical support for the application and development of gene modification models in golden hamsters.

【Keywords】 golden hamster; fertilized egg; two-cell embryos; embryo transfer

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

金黄仓鼠 (golden hamster) 又称叙利亚仓鼠 (Syrian hamster), 属于啮齿目仓鼠科, 因其具有繁殖周期短、易于饲养等特点, 成为早期研究配子发生及受精机制的主要模式动物之一^[1-2]。与哺乳类动物中应用最广泛的小鼠相比, 仓鼠在肿瘤学、遗传学、生殖研究领域、营养学和传染病学等医学生物学研究领域具有更为明显的优势^[3-6]。金黄仓鼠生殖技术虽然起步早, 但其卵子和早期胚胎对外环境异常敏感, 极易形成胚胎发育阻滞, 其卵子或早期胚胎体外操作至今仍是一件极具挑战的工作; 此外, 雄性金黄仓鼠无凝固腺, 利用结扎雄鼠制作的假孕受体鼠无法通过阴栓判定是否交配, 移植效率极低。由此不仅导致金黄仓鼠胚胎移植相关基础数据的缺乏, 更是制约了金黄仓鼠在生殖生物学和基因工程领域的研究应用^[7-10]。

实验动物的标准化是保障实验数据和结果准确性的必要前提和基础。以胚胎移植为基础的生物净化可高效、快捷地提高实验动物病原微生物等级^[11], 配合种资源冷冻保存技术可快速应对感染区动物净化处理工作, 是现今使用最广泛的生物净化和生物安全防控方法^[12]。目前, 国内金黄仓鼠仍采用剖腹产净化的方法^[3], 建立简便的胚胎移植方法对基因修饰金黄仓鼠建立与应用具有重要意义。本文通过真孕白化金黄仓鼠提高移植胚胎附植率, 探索并优化金黄仓鼠真孕受体胚胎移植关键性技术参数, 以为金黄仓鼠模型应用与种资源传递提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8~20 周 SPF 级金黄仓鼠雄鼠 20 只、雌鼠 40 只, 体重 (120±20)g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [SCXK (京) 2021-0011]。SPF 级白化金黄仓鼠 (8~20 周雄鼠 40 只、雌鼠 200 只, 体重 (120±20)g) 及净化供胚品系 (8~20 周雄鼠 50 只、雌鼠 150 只, 体重 (120±20)g) 为本单位利用 CRISPR-Cas9 技术构建。使用大鼠 IVC 笼架饲养于南京医科大学医药实验动物中心屏障环境 [SYXK (苏) 2020-0022], 14 h/10 h 明/暗循环 (明 6:00~

20:00), 自由采食。实验动物病原微生物检验由南京医科大学医药实验动物中心质量保障部完成 (BSL-2, NJ2022210)。所有实验均经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准 (IACUC-2210035、IACUC-2402038), 实验设计及饲养使用过程均遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

HECM-11 胚胎培养液^[4] (配制, 所有试剂均购于美国 Sigma 公司); 石蜡油 (美国 Sigma 公司, 货号 M8410); 三溴乙醇 (美国 Sigma 公司, 货号 T48402); 叔戊醇 (美国 Sigma 公司, 货号 721123); 透明质酸酶 (美国 Sigma 公司, 货号 H3506); 孕母马血清促性腺激素 (宁波第二激素厂, 批号 B2301111)。大鼠 IVC 笼架 (苏州猴皇公司, 型号 MK-D-1); 三气培养箱 (德国 Eppendorf 公司, 型号 Galaxy 48R); 体式显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号 SZX10); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司, 型号 100 μL、1 mL); 培养皿 (美国 Corning 公司, 货号 430165); 手术镊 (瑞士 Dumont 公司, 型号 15916-G); 眼科镊 (瑞士 Dumont 公司, 型号 500338); 手术剪 (张家港大都医疗器械, 型号 YYJ-PT); 反力式止血夹 (上海金钟手术器械, 型号 XEC230); 持针器 (上海金钟手术器械, 型号 J32010); 缝合针 (上海医用缝合针厂, 型号角⊙弧 6×10); 缝合线 (上海医用缝合针厂, 型号 5-0); 洗卵针 (北京吉田生物, 货号 BJ-40)。

1.3 实验方法

1.3.1 受体种群建立及实验分组

真孕移植受体鼠为本单位自主构建的酪氨酸酶敲除白化金黄仓鼠 ($Tyr^{-/-}$)^[4]。购买的 SPF 级金黄仓鼠经隔离检疫后作为受体鼠接受 $Tyr^{-/-}$ 胚胎移植, $Tyr^{-/-}$ 移植后代以自然配繁的方式建立白化系受体种群。实验一, 移植受体根据胚胎发育时期分为受精卵移植组和二细胞期移植组, 研究金黄仓鼠最佳的胚胎移植时期; 实验二, 以二细胞期移植组为对照组, 比较受体减胚组及受体二次移植组对移植胚胎的产仔率和活仔率的影响; 实验三, 根据二细胞期胚胎移植数目分为 6~10 枚、11~15 枚、16~20 枚、21~25 枚及 26~30 枚 5 组, 研究金黄仓鼠最佳胚胎移植数目。以上各组移植受体数不少于 5 只。

1.3.2 供体鼠与受体鼠制备

所有雌鼠需要经过 2 个情期记录,按发情时间分组使用。供体鼠(6~8 周龄)在发情周期的第 1 天根据体重腹腔注射孕母马血清促性腺激素(PMSG, 15 IU/120 g)诱导超排卵,发情第 4 天与雄性仓鼠 1:1 合笼配繁(雄鼠合笼频次间隔 1 周以上),次日 9:00 镜检雌性阴道分泌物(图 1A、1B),有精子判定为交配供体。受体鼠在自然发情第 4 天与雄鼠 1:1 配繁,检精当天记为 0.5 d,受精卵及二细胞胚胎均移植 0.5 d 自然交配受体。

1.3.3 供体受精卵及二细胞胚胎的获取

提前 1 d 制备 HECM-11a 或 HECM-11b 培养微滴,在 37.5 °C 三气培养箱平衡过夜(10% CO₂、5% O₂、85% N₂)。受精卵在检精当天 13:00 左右取卵,操作液为 HECM-11a,二细胞胚胎在检精次日 13:00 左右取卵,操作液为 HECM-11b。腹腔注射 1.25% 阿佛丁(1.8 mL/100 g)麻醉后断颈处死供体雌鼠,暴露腹腔剪取输卵管,置于培养微滴内,在体式显微镜下,用眼科镊撕开输卵管壶腹部,释放出细胞团,加入 30 μL 透明质酸酶消化处理 3~5 min。将受精卵在 HECM-11a 微滴内洗涤 3 次,去除多核受精卵及未受精卵。二细胞胚胎无需透明质酸酶处理,撕开输卵管释放胚胎后用口吸管洗涤 3 次,挑

选卵裂球大小均匀的二细胞胚胎备用,收集胚胎及胚胎移植均在暗室红色光源下进行。

1.3.4 金黄仓鼠胚胎移植

1.25%阿佛丁麻醉受体雌鼠,背部皮肤正中开口后,在腹部肋骨与髂骨之间打开腹壁肌肉层,镊取脂肪垫拉出一侧卵巢及输卵管(图 1C),吸取一定数目胚胎备用,在体式显微镜下用眼科镊纵向撕裂输卵管壶腹部与伞端之间,移植管向输卵管壶腹部吹入胚胎。受体减胚组完成胚胎移植后取出另一侧生殖附件,将输卵管与子宫链接处截断,减少受体鼠自身的胚胎数量,提高供胚生存空间。提前用保温桶(含 37.5 °C 温袋)避光转运胚胎至屏障内生殖实验室,需在 2 h 内完成取胚及移植实验。

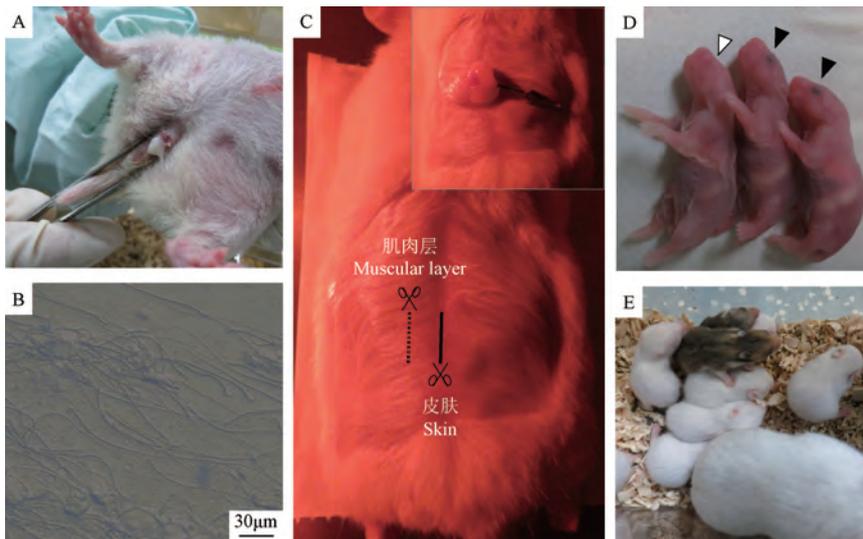
1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,组间采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 白化金黄仓鼠种群构建

利用真孕金黄仓鼠受体移植 *Tyr*^{-/-} 仓鼠胚胎,成功获得了 SPF 级 *Tyr*^{-/-} 仓鼠繁育种群。后续金黄仓鼠胚胎移植数据统计过程中,产仔当天通过眼睛色素判定供胚产仔情况,黑色为供胚子代,1 周后可



注:A:发情第 1 天及交配后取阴道分泌物;B:阴道分泌物涂片镜检精子;C:胚胎移植时受体皮肤及肌肉层开口位置;D:产仔首日通过眼睛色素判定供胚发育幼鼠;E:1 周后可通过毛色辨别幼鼠来源。

图 1 胚胎移植方法及后代幼鼠辨别

Note. A, Vaginal secretions were taken on day 1 of estrus and after mating. B, Smear of vaginal secretions for microscopic examination of sperm. C, Location of the opening of the skin and muscle layer of the recipient at the time of embryo transfer. D, Donor embryo developmental litter was determined by eye pigment on the first day of delivery. E, Offspring developed from donor embryos were identified by hair color after one week.

Figure 1 Embryo transfer method and offspring identification

通过毛色区分(图 1D、1E)。净化过程中产生的 $Tyr^{-/-}$ 后代可转为备用受体鼠,用于受体种群贮备和更新。

2.2 不同发育时期胚胎移植

将移植胚分为受精卵移植组和二细胞移植组,明确胚胎移植最佳发育时期。移植数据显示受精卵期供胚产仔率为 11%、幼鼠存活率为 92%;二细胞期供胚产仔率为 14%、存活率为 83%,两组数据无显著性差异($P>0.05$),未孕受体数和受体产仔数相近;采用受精卵与二细胞胚胎移植后供胚平均数没有显著性差异,低比例的供胚得仔率证明受体胚胎比移植胚胎更具竞争优势。实验结果表明,金黄仓鼠受精卵与二细胞胚胎期均可用于真孕受体胚胎移植,供胚得仔率偏低(见表 1)。

2.3 真孕受体单侧输卵管结扎减胚移植结果

以二细胞移植组为对照组,比较受体减胚组

(对侧输卵管结扎)组及受体二次移植组(首次移植造成的输卵管断裂)对于移植效果的影响。结果显示,受体减胚组的供胚得仔率为 22%,显著高于其它两组($P<0.05$),平均供胚得仔率 73%(3 只),高于对照组的 27%(2 只),证明受体减胚可以增加供胚的生长空间,提高供胚得仔率。减胚组供胚离乳存活数仅为 56%,与其它两组差异极为显著($P<0.01$)。受体二次移植组与对照组在供胚产仔率和供胚离乳存活率均无显著差异($P>0.05$),二次移植的受体未孕率(42%)高于对照组(11%)及减胚组(20%),结果表明受体鼠不宜二次利用(见表 2)。

2.4 金黄仓鼠真孕受体最佳胚胎移植数目

在二细胞移植操作中,按 6~10 枚、11~15 枚、16~20 枚、21~25 枚、26~30 枚对移植供胚数进行分组(见表 3)。在得仔率方面,受体移植 6~10 枚

表 1 胚胎不同发育时期对移植产仔情况的影响

Table 1 Effect of different developmental periods of embryos on the litter size of the transfer

分组 Groups	移植受体 总数 Total number of transplant recipients	未孕受体 Unpregnant recipient	A 移植胚胎 总数 Total number of transferred embryos	供胚得仔情况 Delivery of embryos and offspring			受体产仔情况 Receptor farrowing status	
				B		C	产仔总数 Total litter size	均只产仔数 Average litter size
				得仔总数(B/A) Total number of offspring obtained(B/A)	均只产仔数 Average litter size	存活只数 (C/A) Survival number(C/A)		
受精卵移植组 Zygotic embryo transfer group	29	4	456	51(11%)	2	47(92%)	176	6
二细胞移植组 Two-cell embryo transfer group	120	13	1926	263(14%)	2	219(83%)	715	6

表 2 不同受体鼠输卵管状态对胚胎移植产仔数的影响

Table 2 Effect of different status of the oviducts of recipient on embryo transfer litter size

分组 Groups	A 移植受体总数 Total number of transplant recipients	B 未孕受体 (B/A) Unpregnant recipient (B/A)	C 移植胚胎总数 Total number of transferred embryos	供胚得仔情况 Delivery of embryos and offspring			受体产仔情况 Receptor farrowing status	
				D		E	产仔总数 Total litter size	均只产仔数 Average litter size
				得仔总数(D/C) Total number of offspring obtained(D/C)	存活只数 (E/D) Survival number(E/D)	均只产仔数 Average litter size		
对照组 Control group	120	13(11%)	1926	263(14%)	219(83%)	2	715	6
受体减胚组 Receptor embryo reduction group	5	1(20%)	74	16(22%)*	9(56%)**	3	6	1
受体二次移植组 Recipient second transplantation group	12	5(42%)**	174	17(10%)	16(94%)	1	21	2

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

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

表 3 供胚数对二细胞期胚胎移植产仔的影响

Table 3 Effect of number of donor embryo segments on the litter size of two-cell stage embryos transferred

分组 Groups	移植受体总数 Total number of transplant recipients	A 移植胚胎总数 Total number of transferred embryos	供胚得仔情况 Delivery of embryos and offspring			受体产仔情况 Receptor farrowing status	
			B 得仔总数(B/A) Total number of offspring obtained(B/A)	均只产仔数 Average litter size	C 存活只数 (C/B) Survival number(C/B)	产仔总数 Total litter size	均只产仔数 Average litter size
6~10 枚 6~10 pcs	8	67	18(27%) ^{###}	2	16(89%)	52	7
11~15 枚 11~15 pcs	60	816	116(14%)	2	101(87%)	358	6
16~20 枚 16~20 pcs	31	528	56(11%)	2	51(91%)	197	6
21~25 枚 21~25 pcs	12	261	36(14%)	3	33(92%)	34	3
26~30 枚 26~30 pcs	8	219	35(16%)	4	16(46%) ^{###}	62	8

注:各组之间相互比较,^{##} $P<0.01$ 。

Note. Compared between different groups, ^{##} $P<0.01$.

组供胚得仔率最高(27%),显著优于其它各组($P<0.01$);在供胚存活率方面,26~30枚胚胎移植组供胚离乳存活数最低(仅为46%),显著低于其它几组($P<0.01$),此组的单只受体产仔只数达到了12只(4+8),过高的产仔数严重影响了代乳存活率,其他各组间供胚存活率没有统计学差异。因此,单只自然交配受体鼠移植6~10胚胎可获得最大的胚胎利用率。

3 讨论

近几年,金黄仓鼠在以新冠病毒为代表的病毒及传染病学研究中应用广泛^[9],金黄仓鼠可直接感染SARS-CoV-2并表现出与人类COVID-19相似的统计学意义^[10],SARS-CoV-2感染的基因修饰疾病模型金黄仓鼠可能会发展为重症感染甚至死亡。因此,建立方便快捷的生物净化技术以及提高繁育鼠饲养等级尤为重要。标准的小鼠生物净化技术操作过程中需要用到假孕受体鼠,真孕受体在小鼠生物净化及辅助生殖中偶有使用,获得胚胎较少的品系可以通过真孕受体胚胎移植增加供胚得仔率,构建致死率较高的基因编辑小鼠时也会通过真孕受体来解决妊娠率低、死胎、巨胎等问题^[13]。雄性金黄仓鼠无凝固腺,利用结扎雄鼠制作的假孕受体鼠无法通过阴栓判定是否交配,移植效率极低,因此利用真孕受体鼠胚胎移植具有一定的可行性。以 $Tyr^{-/-}$ 白化金黄仓鼠品系自然交配作为胚胎移植的受体鼠的优势在于,净化过程中不仅可以通过阴

道分泌物镜检精子判定交配情况,利用新生幼鼠眼睛色素判定子代来源极大地减少了净化后代的筛选和鉴定工作;而产生的 $Tyr^{-/-}$ 后代(受体胚胎)可用于受体种群的补充和更新,形成良性循环后无需额外开展制备受体鼠的扩群工作。

金黄仓鼠胚胎体外培养与基因编辑依然面临诸多困难,其胚胎对光照、pH值、温度等体外培养环境非常敏感,易发生胚胎发育阻滞进而影响产仔率^[4-6]。此前已发现显微注射胚胎二细胞移植要优于受精卵期^[4],二细胞胚胎不需透明质酸酶消化颗粒细胞,可快速分辨并去除未受精和发育异常胚胎,减少胚胎体外操作时间,在胚胎移植实验操作中更具优势。但本项研究对比发现未经显微注射的早期胚胎的供胚得仔率与活仔率没有统计学差异,受精卵及二细胞胚胎均可用于胚胎移植。实验还发现受体胚胎比移植胚胎更具竞争优势(受精卵移植后代占比22%、二细胞移植后代占比27%),真孕受体胚胎移植存在很大的局限性。通过减少受体胚胎数能明显减少受体后代的产生(27%),增加供胚的得仔率(73%),但相对较低的活仔率(减胚组56%)和妊娠率(受体二次移植组42%)提示受体减胚方法还需进一步研究。

明确真孕受体最佳的胚胎移植数目能有效减少供体鼠的使用量,也是“3R原则”中减少(Reduction)原则的重要体现,在金黄仓鼠辅助生殖中具有重要的应用意义。杭州师范大学以小鼠作为移植胚胎研究对象时发现,胚胎移植并不会随着

移植胚胎数的增加而提高产仔数^[14-15], 本文对二细胞移植组划分的 5 个数目区间也得出了相似的结果, 6~10 枚组供胚产仔率与各组相比较差异极为显著 ($P < 0.01$); 而供胚活仔率除了显著高于 26~30 枚组 ($P < 0.01$), 与其它组没有统计学意义 ($P > 0.05$)。因此, 金黄仓鼠真孕受体单侧移植 6~10 枚胚胎可获得最佳的供胚得仔率。

综上所述, 通过优化移植受体及胚胎移植方法, 研究对比多因素金黄仓鼠胚胎移植技术条件, 本文为金黄仓鼠胚胎移植技术提供了参考依据和数据支持, 对金黄仓鼠基因修饰模型开发、应用以及种资源库的建立与分享有着重要意义。

参考文献:

- [1] HIROSE M, OGIURA A. The golden (Syrian) *Hamster* as a model for the study of reproductive biology: Past, present, and future [J]. *Reprod Med Biol*, 2018, 18(1): 34-39.
- [2] 朱九明, 顾亚平. 金黄仓鼠发情规律和排卵数的观察 [J]. *实验动物与比较医学*, 1990, 10(1): 8-9, 14.
ZHU J M, GU Y P. Observation on estrus regularity and ovulation number of golden *Hamster* [J]. *Lab Anim Comp Med*, 1990, 10(1): 8-9, 14.
- [3] 郭亚茜, 杜晓鹏, 朱华. 金黄地鼠生物净化及其应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(5): 676-682.
GUO Y X, DU X P, ZHU H. Biological purification and application of golden *Hamster* [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(5): 676-682.
- [4] ZHANG H, ZHANG F, CHEN Q, et al. The piRNA pathway is essential for generating functional oocytes in golden hamsters [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(9): 1013-1022.
- [5] HASUWA H, IWASAKI Y W, AU YEUNG W K, et al. Production of functional oocytes requires maternally expressed PIWI genes and piRNAs in golden hamsters [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(9): 1002-1012.
- [6] LOUBALOVA Z, FULKA H, HORVAT F, et al. Formation of spermatogonia and fertile oocytes in golden hamsters requires piRNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(9): 992-1001.
- [7] WU M, DONG B, CAO A, et al. Delineation of molecular pathways that regulate hepatic PCSK9 and LDL receptor expression during fasting in normolipidemic hamsters [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 224(2): 401-410.
- [8] JIA Y, WANG Y, DUNMALL L S C, et al. Syrian *Hamster* as an ideal animal model for evaluation of cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1126969.
- [9] 周小青, 唐成程, 邹庆剑. SARS-CoV-2 易感实验动物研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 128-134.
ZHOU X Q, TANG C C, ZOU Q J. Research progress of SARS-CoV-2-susceptible laboratory animals [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(2): 128-134.
- [10] OSTERRIEDER N, BERTZBACH L D, DIETERT K, et al. Age-dependent progression of SARS-CoV-2 infection in Syrian hamsters [J]. *Viruses*, 2020, 12(7): 779.
- [11] 刘伟, 陶芳标, 黄德武, 等. 应用胚胎移植技术培育 SPF 级小鼠的研究进展 [J]. *河北联合大学学报(医学版)*, 2013, 15(1): 30-32.
LIU W, TAO F B, HUANG D W, et al. Research progress in cultivating SPF mice by embryo transfer technology [J]. *J Hebei U Univ Health Sci*, 2013, 15(1): 30-32.
- [12] KIM H, BANG J, BAEK S H, et al. Eliminating murine norovirus, *Helicobacter hepaticus*, and intestinal *Protozoa* by embryo transfer for an entire mouse barrier facility [J]. *Exp Anim*, 2022, 71(1): 28-35.
- [13] ZHOU G, WEI H, WANG X, et al. Serial culture is critical for *in vitro* development of parthenogenetic embryos in the golden Syrian *Hamster* [J]. *Cell Reprogram*, 2018, 20(3): 187-195.
- [14] 何志颖. 规范化基因剔除小鼠技术体系的研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2006.
HE Z Y. Study on the technical system of standardized gene knockout mice [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2006.
- [15] 桂飞, 杨伟伟, 孙筱品, 等. 小鼠胚胎移植影响因素的初步探索 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(6): 483-488.
GUI F, YANG W W, SUN X P, et al. Preliminary study on the influencing factors of mouse embryo transfer [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2020, 40(6): 483-488.

[收稿日期] 2024-04-11

李会萍, 杨锦淳, 温金银, 等. 国内实验动物福利伦理研究的现状与建议 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 78-87.
Li HP, Yang JC, Wen JY, et al. Current situation and suggestions for research on laboratory animal welfare and ethics in China [J].
Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 78-87.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.010

国内实验动物福利伦理研究的现状与建议

李会萍, 杨锦淳, 温金银, 赵维波*

(广东省实验动物监测所, 广州 510663)

【摘要】 **目的** 探究国内实验动物福利伦理的研究现状、研究脉络、演进历程和未来研究方向。**方法** 以2001年~2023年间CNKI数据库中期刊收录的实验动物福利与伦理相关的文献为数据源,运用文献研读的定性描述和CiteSpace可视化文献计量分析相结合的方法,梳理和归纳实验动物福利伦理领域已查询到文章的概况、热点主题和研究方向。**结果** 研究表明国内实验动物福利伦理研究热度总体呈上升趋势。研究热点主题包括实验动物福利伦理的基本理论、实验动物福利伦理立法、实验动物福利伦理技术标准、实验动物福利伦理审查、实验动物福利伦理教学研究等方面,并且针对新兴交叉学科引发的伦理问题,在研究内容上不断创新。**结论** 从实验动物福利伦理法律制度、伦理审查机制、教育与培训、创新研究等层面提出了相关建议,以为实验动物福利伦理工作提供参考借鉴。

【关键词】 实验动物;动物福利;伦理审查;CiteSpace

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0078-10

Current situation and suggestions for research on laboratory animal welfare and ethics in China

LI Huiping, YANG Jinchun, WEN Jinyin, ZHAO Weibo*

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

【Abstract】 **Objective** Exploring the current research status, research context, evolution, and future research directions of laboratory animal welfare and ethics in China. **Methods** Literature related to laboratory animal welfare and ethics was collected from journals in the China National Knowledge Infrastructure (CNKI) database from 2001 to 2023. A combination of a qualitative description based on a literature review and CiteSpace visual bibliometric analysis was used to summarize the achievements, hot topics, and directions of laboratory animal welfare and ethics research. **Results** The literature shows that the overall popularity of research into laboratory animal welfare and ethics is on the rise in China. The hot research topics in this field include basic theories of laboratory animal welfare and ethics, the legislation of laboratory animal welfare and ethics, technologies for improving laboratory animal welfare and ethics, reviews of laboratory animal welfare and ethics, and laboratory animal welfare and ethics education. In response to the ethical issues arising from emerging interdisciplinary fields, continuous innovation is being made via research into this topic. **Conclusions** Suggestions are put forward regarding changes to the legal system, review mechanisms, education and training, and innovative research using laboratory animals welfare and ethics to provide a reference and guidance on the welfare and ethics of laboratory animals.

【基金项目】广东省科技计划项目(2023A1414020031, 2019A141403002)。

【作者简介】李会萍(1980—),女,硕士,研究员,研究方向:实验动物信息化与科技情报。E-mail:lihp_666@gdiami.cn

【通信作者】赵维波(1976—),男,硕士,研究员,研究方向:实验动物学与科技管理。E-mail:183775444@qq.com

【Keywords】 laboratory animal; animal welfare; ethical review; CiteSpace

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

实验动物作为生命科学研究的重要支撑条件,用其生命推动着科技的进步,其存在的动物福利与伦理问题也越来越受到人们的关注。中国现行的多部法规、规定对涉及实验动物福利与伦理的问题提出了要求,如 1988 年出台的《实验动物管理条例》第二十七条规定:“从事实验动物工作的人员对实验动物必须爱护,不得戏弄或虐待”,条例新修订稿中,实验动物福利与伦理管理单独成章;2006 年科技部出台《关于善待实验动物的指导性意见》,指出“应善待动物,避免伤害和痛苦……”;2022 年 3 月,中共中央办公厅、国务院办公厅印发《关于加强科技伦理治理的意见》,提出“涉及人、实验动物的科技活动,应当按规定由本单位科技伦理(审查)委员会审查批准……”^[1]。另外,《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892-2018)、《实验动物安乐死指南》(GB/T 39760-2021)、《实验动物福利伦理工作规范》(DB32/T 2911-2016)、《实验动物福利伦理审查技术规范》(DB11/T 1734-2020)等国家标准和地方标准先后发布实施,这些标准对实验动物福利与伦理审查管理的各环节也作出了规定。可见,国内关于实验动物福利伦理的法规制度以及标准体系逐步完善。随着我国基因编辑技术、脑机接口技术、合成生物学等新兴交叉科技的快速发展,以及我国实验动物使用量的持续增加,关于实验动物福利伦理问题仍然是值得深入研究的议题。在此背景下,学者们从不同角度研究了实验动物福利伦理领域的热点问题。因此,为了归纳和梳理当前我国实验动物福利伦理领域研究的现状、存在问题及研究热点,本文运用研读文献的定性描述和 CiteSpace 文献计量学相结合的方法,以 2001 年~2023 年实验动物福利与伦理相关文章为数据源,对我国实验动物福利与伦理领域相关文献的总体概况、热点主题、研究脉络以及演进趋势进行分析,以期为实验动物的相关科学研究提供参考与借鉴。

1 数据来源与研究方法

1.1 数据来源

研究的数据来自中国知网(CNKI)数据库相关文献,以检索公式为(SU% = ‘实验动物’ OR SU % = ‘动物实验’) AND (SU % = ‘动物’ OR SU % = ‘福利’ OR SU % = ‘动物’ OR SU % = ‘伦理’ OR

SU % = ‘伦理学’) 为主题进行专业检索,检索起始时间不限定,截止时间至 2023 年 12 月 31 日,并将文献来源设置为中文期刊类别。经检索后获得 316 篇关于实验动物福利伦理的相关文献,文献的时间跨度为 2001 年~2023 年。为了使文献分析更精准、有效,对检索结果进行筛选,剔除学位论文、会议、论坛、报纸以及重复性非文献类数据,最终得到 215 篇有效样本数据。

1.2 研究方法

本文运用定性和定量方法进行数据分析,其中定性方法采用阅读文献的形式,定量方法采用 CiteSpace 文献计量软件,将中国知网(CNKI)获得的样本导出为 Rework 格式数据,再将该数据导入到 CiteSpace 进行数据转换为可识别的格式,然后对实验动物福利伦理研究的机构、关键词共现、聚类、时间线等知识图谱进行可视化分析,梳理和归纳实验动物福利伦理领域的研究热点和趋势。

2 实验动物福利伦理研究概况

2.1 发文量分析

某领域文献的发文量在一定程度上能较直观地反映其研究的热度及发展速度。从实验动物福利伦理研究的文献发文量趋势图(图 1)来看,其发文量与其它学科相比,在数量上还很有限,但整体上其发文量呈逐年上升趋势,2016 年之后发文量增幅较为显著,2019 年呈波动下降,此后处于较稳定增长态势。将实验动物福利伦理相关文章大致划分 3 个阶段:第一阶段(2001 年~2008 年),这时期的发文量很少,每年的发文量仅 1~3 篇。第二阶段(2009 年~2020 年),这期间的发文量有所增加,除 2016 年发文量增加格外突出以及 2019 年下降明显之外,其它年份的发文量保持平稳增长,年均发文量在 13 篇左右。第三阶段(2021 年~2023 年),这时期的年均发文量达到 25 篇,增长明显。可见,近年来关于实验动物福利伦理的研究主题受到学者们越来越多的关注和重视,逐渐成为科技伦理领域内的研究热点。

2.2 期刊来源分析

2001 年~2023 年间实验动物福利伦理研究的文献期刊分布情况见表 1。从表 1 可见,刊发实验动物福利伦理文献最多的是《中国比较医学杂志》,

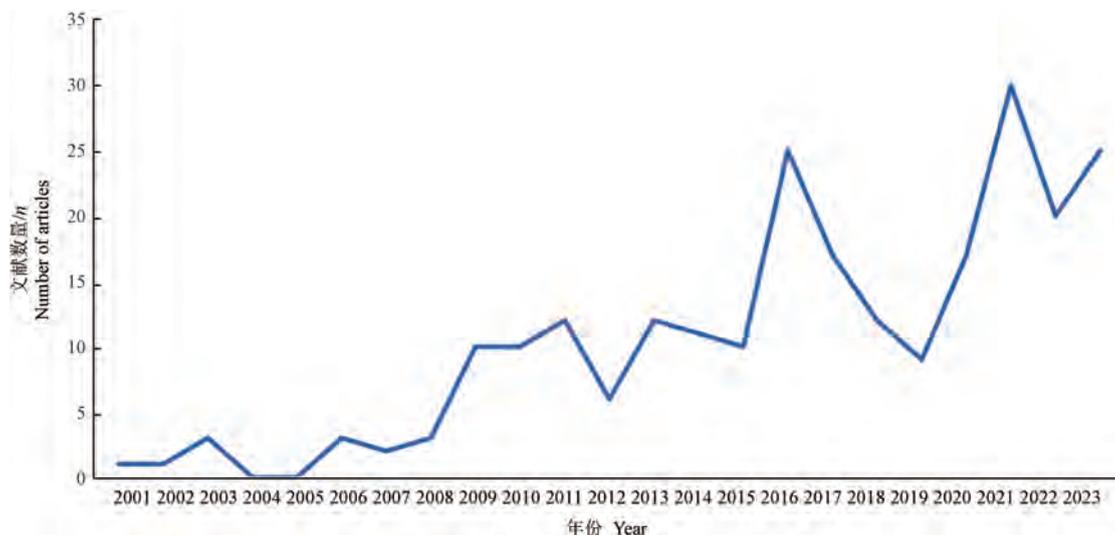


图 1 2001 年~2023 年国内实验动物福利伦理研究历年发文量

Figure 1 Annual publication volume of research on the welfare and ethics of laboratory animals in China from 2001 to 2023

表 1 2001 年~2023 年实验动物福利伦理研究的期刊来源分布

Table 1 Distribution of journal sources for research on laboratory animal welfare and ethics from 2001 to 2023

序号 Number	期刊名称 Journal name	发文量/n Number of articles
1	中国比较医学杂志 Chinese Journal of Comparative Medicine	32
2	实验动物与比较医学 Laboratory Animal and Comparative Medicine	28
3	实验动物科学 Laboratory Animal Science	25
4	中国医学伦理学 Chinese Medical Ethics	10
5	医学与哲学 Medicine & Philosophy	10
6	南京农业大学 Journal of Nanjing Agricultural University	6
7	实验室研究与探索 Research and Exploration in Laboratory	4
8	中国实验动物学报 Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica	4
9	中国组织工程研究 Chinese Journal of Tissue Engineering Research	4
10	教育教学论坛 Education and Teaching Forum	4
11	基础医学教育 Basic Medical Education	3
12	湖南师范大学学报 Journal of Hunan Normal University	3
13	海峡预防医学杂志 Strait Journal of Preventive Medicine	3
14	东北林业大学 Journal of Northeast Forestry University	3
15	中国兽医杂志 Chinese Journal of Veterinary Medicine	3
16	科技管理研究 Science and Technology Management Research	3

其次是《实验动物与比较医学》和《实验动物科学》，实验动物本领域期刊的载文量占了总发文量的

39.5%，说明实验动物福利伦理研究在行业内得到了高度关注和重视。其次，《中国医学伦理学》、《医

学与哲学》期刊分别发表文献 10 篇,表明实验动物福利伦理研究在医学、伦理学等学科领域也有较高的关注度,载文量也相对较多。从发文期刊的特点来看,实验动物福利伦理研究主要涉及实验动物学、医学、伦理学、教育学、管理学等学科领域,学科交叉分布较广。

2.3 研究机构分析

通过对研究机构的发文量的分析大致可以反映实验动物福利伦理研究的核心力量分布情况。根据 CiteSpace 软件识别出研究机构发文量情况以及机构合作共现图谱见表 2。从研究机构的发文量统计结果来看发文量在 3 篇及以上的研究机构仅 10 个。从研究机构合作共现来看,研究机构共有 247 个,合作机构之间有 135 条连接线,网络密度为 0.0044,说明国内实验动物福利伦理研究的机构之间有一定的合作,但合作紧密度有待加强。主要以中国食品药品检定研究院、中国疾病预防控制中心、上海实验动物研究中心、中国合格评审国家认可中心、国家卫生健康委科学技术研究所等单位为主导,与其他单位形成联合研究团队,开展合作交流。从研究机构性质来看,主要以科研院所、高校的医学类学院发文为主,表明这两类机构对实验动物福利伦理的关注度更高,高产的研究机构较集中。

2.4 高被引文献分析

高被引文献在一定程度上反映了作者发表的文章在某领域受关注的程度和传播力。根据普赖斯的高被引论文计算公式 $M = 0.749 * \sqrt{N_{max}}$, $\sqrt{N_{max}}$ 代表被引频次最高论文的被引频次,当计算公式的数值 $\geq M$ 的论文,则表明该文章为高被引论文^[2]。根据上述公式,通过 CNKI 数据库中的被引频次排序,计算得出本次被引次数 ≥ 6.4 (本文取整数 6) 的论文为高被引论文。经笔者统计,被引频次 ≥ 6 的高被引论文共有 87 篇,占实验动物福利伦理研究总发文量的 40.5%,表明该领域的研究成果得到了学者们的广泛关注,具有较高的学术影响力。从被引频次看,排名前 30 的论文被引频次均在 15 次以上,来自杨国斌的《生物医学研究中实验动物伦理学问题的思考》一文被引次数最高,被引达 72 次。从研究内容看,高被引文献主要涉及实验动物福利伦理的理论研究、立法研究、伦理审查机制、动物实验“3R”、福利技术研究等主题内容。从发表的期刊来看,高被引文献主要来源《中国比较医学杂志》、《实验动物与比较医学》、《实验动物科学》、《中国医学伦理学》、《医学与哲学》等专业期刊,这与文献所属主要期刊及学科分布是相吻合的。

表 2 2001 年~2023 年实验动物福利伦理研究机构发文量统计

Table 2 Statistics on the number of publications by research institutions on laboratory animal welfare and ethics from 2001 to 2023

序号 Number	机构名称 Institution name	发文量/n Number of articles
1	中国医学科学院医学实验动物研究所/协和医学院 Institute of Laboratory Animal Science, CAMS & PUMC	10
2	南京军区南京总医院 Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command	8
3	中国食品药品检定研究院 National Institutes for Food and Drug Control	7
4	广东医科大学 Guangdong Medical University	7
5	中国疾病预防控制中心 Chinese Center for Disease Control and Prevention	6
6	国家卫生计生委科学技术研究所 National Research Institute for Health and Family Planning	6
7	中国农业大学动物医学院 College of Veterinary Medicine China Agricultural University	4
8	南方医科大学 Southern Medical University	4
9	福建省实验动物管理委员会 Fujian Laboratory Animal Management Committee	3
10	上海实验动物研究中心 Shanghai Laboratory Animal Research Center	3

3 实验动物福利伦理研究主题、脉络

3.1 关键词共现图谱分析

通过对某领域关键词的分析在一定程度上可以反映该领域的研究热点。在 CiteSpace 中运用寻径网络算法 (pathfinder), 将节点类型设置为关键词, 时间跨度设置为“2001~2023”得到实验动物福利伦理研究关键词共现图谱, 如图 2 所示。图中共有 185 个节点, 439 条连线, 网络密度为 0.0258, 表明实验动物福利伦理研究中节点之间有一定的联系性, 但紧密程度有待加强。关键词涉及实验动物、动物福利、动物实验、动物伦理、伦理审查、伦理、福利、实验教学、安乐死等方面。对关键词的词频和中心度进一步统计分析, 得出实验动物福利伦理高频关键词表, 见表 3。关键词的重要性和影响力越大说明其中心度就越高。在表 3 中, 关键词词频最高的是“实验动物”, 其次是“动物福利”“动物实验”“动物伦理”“伦理”的词频均在 20 次以上, 说明这几项关键词在多个研究角度受关注度较高。从中心性来看, “实验动物”“动物福利”“动物实验”“伦理审查”的中心性均在 0.1 以上, 表明它们在该领域网络结构中的核心地位和基础性作用。总体上看, 关键词的词频与中心性基本成正比, 这些关键词也是图谱中的关键节点。

表 3 2001 年~2023 年实验动物福利伦理高频关键词
Table 3 High frequency keywords of laboratory animals welfare and ethics from 2001 to 2023

序号 Number	关键词 Keyword	词频 Word frequency	中心性 Centrality
1	实验动物 Laboratory animal	88	0.93
2	动物福利 Animal welfare	58	0.47
3	动物实验 Animal experiments	35	0.33
4	动物伦理 Animal ethics	29	0.22
5	伦理 Ethics	20	0.06
6	福利 Welfare	18	0.03
7	伦理审查 Ethical review	16	0.11
8	实验教学 Experimental teaching	8	0.05
9	3R 原则 3R principle	7	0.03
10	生物医学 Biomedicine	7	0.04
11	生物安全 Biological safety	5	0.00
12	医学伦理 Medical ethics	5	0.04
13	安乐死 Euthanasia	4	0.04

Timespan: 2001-2023 (Slice Length=1)
Selection Criteria: g-index (k=25), LRF=3.0, L/N=10, LBY=5, e=1.0
Network: N=185, E=439 (Density=0.0258)
Largest 1 CCs: 170 (91%)
Nodes Labeled: 1.0%
Pruning: None
Excluded:

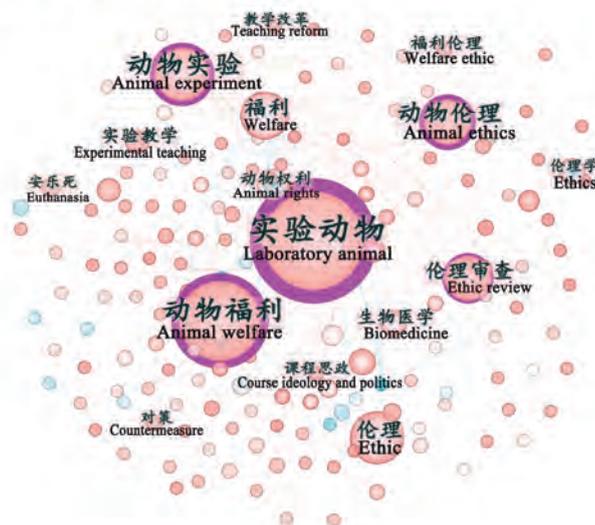


图 2 2001 年~2023 年国内实验动物福利伦理研究关键词共现图谱

Figure 2 Co-occurrence map of keywords in domestic laboratory animal welfare and ethics research from 2001 to 2023

3.2 关键词聚类分析

在 CiteSpace 软件中采用 LLR(对数似然算法)对关键词进行聚类,得出 2001 年~2023 年实验动物福利伦理研究的关键词聚类图谱,见图 3。在图 3 中共获得 8 个聚类标签,其中 Q 值为 0.5398(≥ 0.3 的临界值),S 值为 0.8395(≥ 0.5 的临界值),表明关键词聚类结构显著、聚类效果令人信服,这也有助于对实验动物福利伦理研究的总体特征和发展

趋势进行概括和分析。通过对聚类信息的分解,国内实验动物福利伦理领域的研究热点主要聚焦基本理论、福利伦理立法、伦理审查、福利伦理技术、动物福利伦理教学等领域。

3.3 关键词时趋分析

在关键词共现与聚类基础上,绘制关键词时间线图谱可以更直观地展示出实验动物福利伦理研究的演进历程。如图 4 所示,研究成果大多以实验

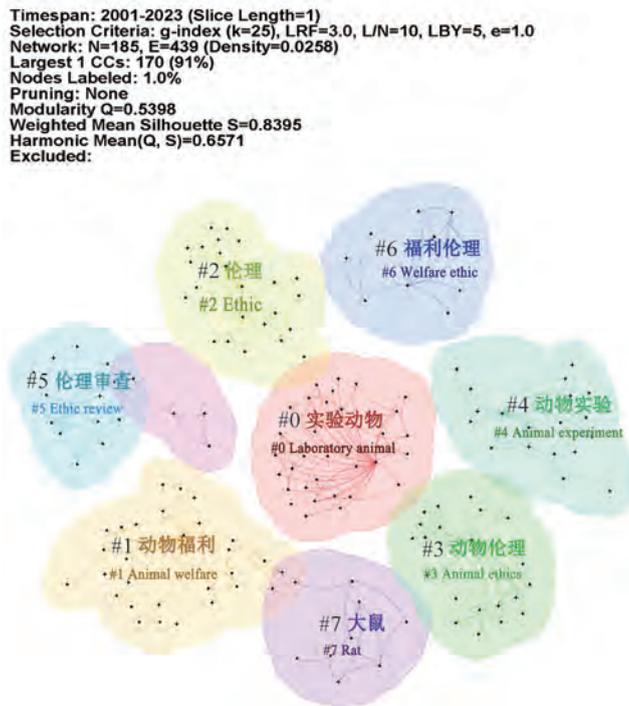


图 3 2001 年~2023 年国内实验动物福利伦理研究关键词聚类图谱

Figure 3 Keyword clustering map of domestic laboratory animal welfare and ethics research from 2001 to 2023

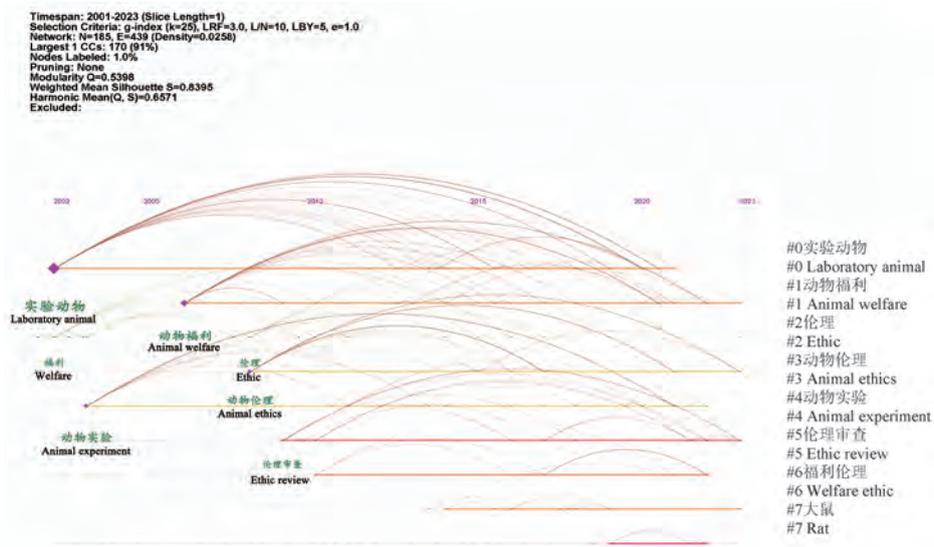


图 4 2001 年~2023 年国内实验动物福利伦理研究关键词时间线图谱

Figure 4 Timeline map of keywords in research on laboratory animal welfare and ethics in China from 2001 to 2023

动物、动物实验、动物福利、动物伦理展开,这些关键词也是图谱中最突出的关键节点。在研究早期主要围绕实验动物福利伦理的概念、涵义、理论原则展开,出现的关键词主要是“伦理学”“福利”等。随着我国实验动物科技发展与动物福利伦理研究的不断深入,实验动物法律保护制度、动物福利立法等问题受到关切,随后较多学者开始对国外“3R原则”“5F福利原则”等探索研究用于指导我国实验动物福利伦理工作。2012年后,实验动物福利伦理的教育与培训被提上日程,各高校针对教师、医学生掌握的福利伦理情况展开调查,进行了实验动物福利伦理在教学改革、实验教学、课程思政方面的研究。2016年始,我国实验动物福利伦理的研究快速发展,出现了许多动物伦理审查标准化、规范化以及审查评价指标体系的相关研究。2020年《科学技术活动违规行为处理暂行规定》、2021年《中华人民共和国生物安全法》、2022年《关于加强科技伦理治理的意见》等法规、政策先后出台,实验动物福利伦理作为科技伦理的一个重要分支,扩展了学者们的研究视角,进一步加强了相关研究,在实验动物福利伦理基本理论、福利伦理审查机制与法律制度、福利技术等方面取得了很大进展,针对当前基因编辑、脑机接口技术、合成生物学、异种移植等新兴科技引发的问题也逐渐出现在动物福利伦理研究的视野中,如动物基因编辑、生物安全、动物模型研究过程中涉及的福利伦理问题开始成为新的研究前沿。

4 实验动物福利伦理研究热点与趋势

(1) 实验动物福利伦理的基本理论

该主题包含的聚类关键词有伦理、伦理学、动物伦理、伦理认知等。国内学者从不同角度提出了众多实验动物福利伦理基本理论观点,为实验动物福利伦理工作的开展以及解决实践中的问题提供了理论依据和指导。

(2) 实验动物福利伦理的立法研究

该主题包含的聚类关键词有动物伦理立法、福利保护制度、法律制度等。目前我国已出台相关的实验动物福利伦理法规、规定在法律层次、法律效力及法律权威性方面都还不高,与国际社会接轨还存在差距,因此,我国还需要加强实验动物福利伦理立法工作,建立完善的实验动物福利伦理法律体系。

(3) 实验动物福利伦理的技术研究

该主题包含的聚类关键词有福利技术、“3R”、替代方法、安乐死、仁慈终点等。福利技术是支撑实验动物福利伦理工作的基础条件。近年来,我国特别是在推进动物实验替代方法与验证体系建设、化妆品测试、毒性试验等福利技术方面取得了良好的效果,但基于更多的提升实验动物福利水平以及福利伦理评价指标技术体系方面的研究仍不足^[1]。

(4) 实验动物福利伦理的审查研究

该主题包含的聚类关键词有伦理审查、审查监管、审查机制、评价指标、审查制度等。实验动物福利伦理审查是保证实验动物福利,规范从业人员遵守法规和职业道德行为的重要措施。需要根据实验动物福利伦理的原则和相关标准,对使用实验动物的合理性、必要性和规范性进行专门的检查和审定。从查阅文献来看,涉及实验动物福利伦理审查相关的文献有91篇,占总发文量的32.5%,成为该领域的研究热点主题。众多学者提出的关于实验动物福利伦理审查相关的建议为实现与国际接轨,推进我国实验动物伦理审查工作发挥了积极的作用。

(5) 实验动物福利伦理在教学中的研究

该主题包含的聚类关键词有动物实验、实验教学、教学改革、实验伦理、伦理教育、福利意识等。从学者们的调查研究来看,绝大部分文章认为应该重视和关注动物福利及伦理,对动物福利伦理基本知识的知晓度还很薄弱,如动物实验的“3R”原则、“5F”福利认知度低,对动物福利伦理的相关法规、规定等知之甚少,对动物实验的技术操作规程掌握不足等^[3-9]。还有学者则对高校实验动物伦理学教育存在的问题进行了分析,并提出相关对策,如建议医学院校增设“动物福利与伦理”课程、教学中融入实验动物伦理案例、实验教学中强化规范操作等^[10]。总体来看,实验动物伦理学教育问题已引起了广泛关注,但目前我国高校对动物福利伦理方面的教学内容还存在严重不足,迫切需要加强高校师生对动物福利伦理的认知和宣贯^[11-14]。

(6) 实验动物福利伦理的创新研究

实验动物福利伦理的研究较早时期主要是围绕其基本理论、法律制度、福利伦理审查、动物福利与伦理教学、福利技术等展开。近年来,随着实验动物科技发展以及新兴交叉学科的融合,一些学者

对动物基因编辑中的伦理^[15]、生物安全中福利伦理^[16]、疾病动物模型建模过程中的福利伦理^[17]等问题进行了探索研究。在实验动物福利伦理内涵、理论研究方面,提出了以人为核心视角,端正人类态度来理解和认识实验动物福利伦理的观点^[18],探究了动物实验伦理判定与人格特质呈显著相关性,提出了建立实验动物从业人员的学术能力与人文道德、哲学素养并重的综合培养机制^[19],还有学者论述在实验动物福利伦理实践中的主体责任,这对于指导各级责任主体从事实验动物福利伦理的活动具有重要的指导作用^[20]。

5 总结与展望

5.1 研究总结

本文以 CNKI 数据库中 2001 年~2023 年期刊刊发的实验动物福利伦理文献为研究样本,采用定性(研读文献)和定量(CiteSpace 可视化计量工具)的描述方法,对国内实验动物福利伦理研究现状、热点主题进行了分析,归纳如下:

从发文量的总体趋势看,呈波动式上升,2021 年以来相关文献量进入了快速增长期。这与我国《中华人民共和国生物安全法》、《关于加强科技伦理治理的意见》等相关法规、政策出台和实验动物使用量逐年增加,以及基因编辑、脑机接口技术、合成生物学、人工智能等引发的新兴交叉科技的发展历程密切相关,推动了新形势下我国实验动物福利伦理研究的快速发展,成为科技伦理领域内的研究热点。

从研究机构合作网络看,发文量最多的机构是中国医学科学院系统单位,其次是南京军区南京总医院、中国食品药品检定研究院、广东医科大学、中国疾病预防控制中心、国家卫生健康委科学技术研究所等,发文量均在 6 篇以上。国内实验动物福利伦理研究机构有一定的合作群体,但研究机构之间的网络密度较低,合作程度还有待加强。

从高被引文献与期刊载文量看,实验动物福利伦理研究的高被引论文 87 篇,占总发文量的 40.5%,表明该领域的研究成果受到了广泛关注,学术影响力得到认可。载文量最多的期刊是《中国比较医学杂志》,其次是《实验动物与比较医学》、《实验动物科学》、《中国医学伦理学》、《医学与哲学》等。

从关键词共现、聚类与时间线图看,词频较

高的关键词包括“实验动物”“动物福利”“动物实验”“动物伦理”“伦理审查”“伦理”等。基于关键词聚类图谱总结出国内实验动物福利伦理研究的主要研究热点内容,具体包括:实验动物福利伦理基本理论研究、实验动物福利伦理立法研究、实验动物福利伦理技术研究、动物伦理审查机制研究、动物福利伦理的教学研究等。从关键词时间线图看,实验动物福利伦理研究的演进趋势大致是从基本理论、法律制度与管理、福利伦理审查、福利伦理教育、福利技术、新兴交叉学科福利伦理等展开,为更好地指导我国实验动物福利伦理的研究与应用实践提供了积极的作用。

5.2 展望与建议

(1) 在法律制度层面,需持续推进我国实验动物福利立法工作,提升和完善实验动物福利伦理的法律地位、立法原则、法律条款等,从而建立完善的实验动物福利法律体系,制定可操作性强、能促进我国实验动物发展实际需要和科技进步并且与国际接轨的实验动物福利法规,为突破国际贸易中的技术壁垒提供重要支撑,也有利于在国际科技竞争中掌握科技伦理话语权。

(2) 在福利伦理审查和监督机制层面,缺少实验动物福利伦理审查国家标准的落实。目前我国由实验动物使用或生产机构原效法美国的做法各自成立实验动物使用与管理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC),与我国相关法规、标准和规定的应成立实验动物福利伦理审查委员会的规范性要求有明显的差距,各伦理委员会人员能力水平参差不齐,缺少伦理审查法规、标准的岗前培训,造成在科研项目申报、文章发表、成果发布等环节的伦理审查流于形式的现象普遍存在,对实验过程的福利伦理现场跟踪监督审查缺失,对存在伦理风险的科技活动监管不足,对违反实验动物福利伦理国家标准的情况没有相应的惩罚等。为此,建议由国家和省级地方实验动物主管部门成立实验动物福利伦理专家委员会,指导各地方以及各机构实验动物福利伦理工作,层层落实主体责任,加强福利伦理的审查和监管力度;建立健全实验动物福利伦理(审查)委员会的培训考核评估机制,引入第三方评估认定机制,加强实验动物福利伦理委员会的责任意识,提高福利伦理审查专业化能力。

(3) 在福利伦理技术研究层面,学者们基于“3R

原则”指导实验动物福利伦理的技术研究不断推进,如在化妆品、毒性试验等领域的动物实验替代方法研究产出了系列成果,但更广泛地有助于促进实验动物福利水平和提高动物伦理审查、实验操作以及评价技术指标等研究不足。建议国家将实验动物福利伦理相关技术研究纳入科技项目持续给予支持,从而加快推动我国实验动物福利伦理工作。

(4)在福利伦理教育和培训层面,有待全面加强实验动物从业人员的福利伦理和标准化意识。高校特别是医学院校、农科院校建议设立“动物福利与伦理”课程,培养师生的伦理学专业知识和伦理观念。对于科研人员、实验人员等,除掌握实验动物福利伦理基本知识外,还要增强实验动物福利技术学习,特别是实验操作技术如动物麻醉、动物手术、安乐死、人道终点等技能的培训,遵守动物实验“3R”“五大自由福利”原则,充分尊重实验动物的权利和福利。

(5)在福利伦理专业人才层面,目前主要是由从事实验动物科学研究的科技工作者多为兼任,缺少从事实验动物福利伦理管理的专门人员或专职的实验动物福利伦理的管理队伍,缺乏具备实验动物学、医学、伦理学、法律学、管理学等多学科知识的复合型人才。建议国家和地方相关部门遴选一批高水平的科技伦理研究队伍组建专家智库,以定期或不定期方式加快培养各类实验动物福利伦理管理、审查以及治理人才,或通过高校、学会/协会等机构开展定点教育培训试点计划,有针对性的培养一批能满足实验动物福利伦理各岗位要求的专门人才。

(6)在福利伦理创新研究层面,随着生命科学、医学等新兴技术(如脑机接口技术、基因编辑、合成生物学、异种移植、人工智能)等发展,由此带来的新的伦理问题和风险,应加大引起学者们的关注和研判,探索适合我国科技发展相适应的标准化、规范化的伦理审查和监管制度,以避免更多的“贺建奎基因编辑婴儿”事件,从而有效防范新兴技术所带来的伦理风险。

参考文献:

[1] 国家科技基础条件平台中心. 中国实验动物资源发展研究报告-2022 [M]. 北京: 科学出版社, 2023.
National Science and Technology Infrastructure Platform Center. Research report on the development of laboratory animal resources in China-2022 [M]. Beijing: Science Press, 2023.

[2] 马少珍. 基于文献计量学的《华中农业大学学报(社会科学版)》2008-2017 年发展研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
MA S Z. Research on the Development of Journal of Huazhong Agricultural University (Social Science Edition) 2008 - 2017 Based on Bibliometrics [D]. WuHuan: Huazhong Agricultural University, 2019.

[3] 李琼, 张冰. 动物医学专业动物福利与伦理教育现状的调查分析 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2022, 67(5): 54-57, 61.
LI Q, ZHANG B. Investigation and analysis on the current situation of animal welfare and ethics education in animal medicine specialty [J]. Shanghai J Anim Husb Vet Med, 2022, 67(5): 54-57, 61.

[4] 李闪闪, 郑小兰, 张新庆. 我国医学科研人员对实验动物伦理认知和态度分析 [J]. 科学与社会, 2021, 11(2): 110-122.
LI S S, ZHENG X L, ZHANG X Q. Analysis of the current situation of medical researchers' knowledge and attitude towards laboratory animal ethics in China [J]. Sci Soc, 2021, 11(2): 110-122.

[5] 程美玲, 张莹, 白华毅, 等. 农科院校动物类专业大学生实验动物福利意识调查分析 [J]. 云南农业大学学报(社会科学版), 2021, 15(1): 150-153.
CHENG M L, ZHANG Y, BAI H Y, et al. Analysis on the consciousness of experimental animal welfare of the students majoring in animals in agricultural colleges [J]. J Yunnan Agric Univ Soc Sci, 2021, 15(1): 150-153.

[6] 李莲军, 卿玉波, 贾宝瑜, 等. 兽医学教师动物伦理及福利意识调查 [J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(11): 129-131.
LI L J, QING Y B, JIA B Y, et al. Investigation on animal ethics and welfare consciousness of veterinary teachers [J]. Chin J Vet Med, 2019, 55(11): 129-131.

[7] 林玮, 刘德强, 王训立. 福建省部分高校师生实验动物伦理福利意识的调查和分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(1): 69-71.
LIN W, LIU D Q, WANG X L. Investigation and analysis of the ethical and welfare awareness of experimental animals among teachers and students in some universities in Fujian Province [J]. Lab Anim Comp Med, 2018, 38(1): 69-71.

[8] 郑亚楠, 常欣峰, 李奕慧. 医学生对实验动物伦理知晓情况的调查 [J]. 医学与哲学, 2016, 37(15): 31-33.
ZHENG Y N, CHANG X F, LI Y H. Investigation on medical students' cognitions of experimental animals' ethics [J]. Med Philos, 2016, 37(15): 31-33.

[9] 张臣福, 唐凯琳, 田冬霞. 医学生进行动物实验的现状调查及动物实验伦理教育探析——以广东省医学类院校为例 [J]. 中国卫生事业管理, 2013, 30(11): 852-855.
ZHANG C F, TANG K L, TIAN D X. Surveying the status of animal experiments for medical students and ethics education on animal experiments sampled with medical colleges in Guangdong [J]. Chin Health Serv Manag, 2013, 30(11): 852-855.

[10] 谭冬梅, 谭毅, 韩志刚. 医药院校实验教学中存在的动物福

- 利问题及对策 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(12): 91-94.
- TAN D M, TAN Y, HAN Z G. Problems and measures of animal welfare in experimental teaching at medical colleges [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(12): 91-94.
- [11] 孙泉, 卢静. 医学实验技术专业实验动物伦理学教学改革初探 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(5): 67-69.
- SUN Q, LU J. A teaching practice on laboratory animal ethnics in medical laboratory science [J]. Lab Anim Sci, 2017, 34(5): 67-69.
- [12] 张慧楠, 刘丹, 李明凯, 等. 动物伦理教育在基础医学综合实验教学中的应用 [J]. 中国医学伦理学, 2017, 30(11): 1387-1390.
- ZHANG H N, LIU D, LI M K, et al. Application of animal ethical education in comprehensive experimental teaching of preclinical medicine [J]. Chin Med Ethics, 2017, 30(11): 1387-1390.
- [13] 刘慧聪, 张冰. 高校动物医学专业“动物福利与伦理”课程教学的思考 [J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(7): 121-124.
- LIU H C, ZHANG B. Reflections on the teaching of “animal welfare and ethics” for animal medicine majors in colleges and universities [J]. Chin J Vet Med, 2020, 56(7): 121-124.
- [14] 饶玉良, 张亚东, 严钰锋. 医学功能学科实验融入动物伦理教育的思考与探究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 397-401.
- RAO Y L, ZHANG Y D, YAN Y F. Exploration of animal ethics education for medical functional experiments [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 397-401.
- [15] 程新宇. 动物基因编辑的若干伦理问题及其治理 [J]. 华中科技大学学报(社会科学版), 2022, 36(5): 9-16.
- CHENG X Y. Ethical issues and its governance in animal gene editing [J]. J Huazhong Univ Sci Technol Soc Sci Ed, 2022, 36(5): 9-16.
- [16] 肖玉伟, 陆娜, 孙倩, 等. 生物医学研究中动物生物安全、福利与伦理 [J]. 临床军医杂志, 2022, 50(11): 1208-1210.
- XIAO Y W, LU N, SUN Q, et al. Animal biosafety, welfare, and ethics in biomedical research [J]. Clin J Med Off, 2022, 50(11): 1208-1210.
- [17] 肖楚兰, 陈娇娇, 郭冰洁, 等. 关于实验动物运动模型建立的伦理思考 [J]. 医学与哲学, 2022, 43(2): 38-42.
- XIAO C L, CHEN J J, GUO B J, et al. Ethical reflection on the establishment of exercise models of experimental animals [J]. Med Philos, 2022, 43(2): 38-42.
- [18] 刘云波. 以人为核心认识实验动物福利与伦理 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 125-126.
- LIU Y B. Human-centered understanding of laboratory animal welfare and ethics [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 125-126.
- [19] 赵勇. 动物实验伦理判定与人格特质相关性研究 [J]. 中国科学基金, 2023, 37(3): 393-402.
- ZHAO Y. Study on the correlation between ethical determination of animal experiment and personality traits [J]. Bull Natl Nat Sci Found China, 2023, 37(3): 393-402.
- [20] 杜小燕. 关于实验动物福利伦理实践中主体责任的思考 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 127-129.
- DU X Y. Consideration about subject responsibility in practice of laboratory animal ethics and welfare [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 127-129.

[收稿日期]2024-04-23

徐骁,熊文静,马西祥,等. 面向实验动物设施的能耗监测系统设计与应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 88-96.
Xu X, Xiong WJ, Ma XX, et al. Design and application of energy monitoring system for laboratory animal facilities [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 88-96.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.011

面向实验动物设施的能耗监测系统设计与应用

徐 骁,熊文静,马西祥,母丹丹,周顺长*

(华中科技大学实验动物中心,武汉 430030)

【摘要】 目的 实验动物设施的能源消耗在科研机构能耗中占据相当大的比例,且其能耗特点与普通建筑物存在显著不同,因而需要专门的监测与管理。方法 面向实验动物设施设计了一套能耗监测系统,选取华中科技大学 SPF 级实验动物设施进行了部署。结果 该系统上线运行后,实现了设施用电量数据的实时采集和记录,并提出了3种应用场景下的管理节能措施。结论 面向实验动物设施的能耗监测系统具备可靠、高效、易用的特点,对实验动物设施能源管理工作具有指导意义与推广价值。

【关键词】 能耗监测系统;实验动物设施;节能管理

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0088-09

Design and application of energy monitoring system for laboratory animal facilities

XU Xiao, XIONG Wenjing, MA Xixiang, MU Dandan, ZHOU Shunchang*

(Laboratory Animal Center, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

【Abstract】 **Objective** Experimental animal facilities account for a significant proportion of the energy consumption by scientific research institutions; however, the energy consumption characteristics of these facilities differ from those of ordinary buildings, and thus require specialized monitoring and management. **Methods** A set of energy consumption monitoring systems was designed for experimental animal facilities and deployed in the specific pathogen-free-level experimental animal facility of Huazhong University of Science and Technology. **Results** The system achieved real-time collection and recording of the facility's electricity consumption data, and proposed energy-saving measures for three application scenarios. **Conclusions** This energy consumption monitoring system designed for experimental animal facilities is reliable, efficient, and user-friendly, and has the potential to guide and promote energy management programs at experimental animal facilities.

【Keywords】 energy consumption monitoring system; laboratory animal facilities; energy saving management

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

实验动物设施的节能管理不仅关乎机构的经济效益,更直接影响到环境保护和动物福利。有效的监测能够更加科学地了解能源的使用情况,识别

能耗高峰期和节能潜力,从而制定更合理的能源管理策略,降低能源成本,提高能源利用效率。

因此,设计并实施面向实验动物设施的能耗监

【基金项目】 华中科技大学实验技术研究项目(HZKJSYJSXM2024M096)。

【作者简介】 徐骁(1990—),男,硕士,研究方向:实验动物设施管理。E-mail: xuxiaolac@hust.edu.cn

【通信作者】 周顺长(1968—),男,高级工程师,研究方向:兽医学。E-mail: 1989020590@hust.edu.cn

测系统具有重要的理论和实践意义。本文旨在针对实验动物设施的高能耗问题,设计一套可靠、高效、易用的监测系统,并探讨其在实际应用中的效果,以为实验动物设施的节能管理提供有效的技术支持和决策依据。

1 能耗监测系统的实施背景

1.1 实验动物设施节能研究现状

实验动物设施的节能手段主要包括技术节能与管理节能,技术节能是指采用新设备、新技术,提高能源利用率。目前,新设备的主要关注点在降低除湿能耗、热回收等方面。Guan 等^[1]研究对比了溶液除湿空气处理系统(liquid desiccant air conditioning, LDAC)与常规空气处理系统在实验动物设施应用中的能耗差异,结论显示 LDAC 可实现 37.3% 的节电率。Li 等^[2]针对 LDAC 在实验动物设施应用中氨吸收性能不佳的特点,提出使用溴化锂溶液的方法,可以在实现节能运行的同时,显著地降低 LDAC 送风中氨浓度。余俊祥等^[3]以杭州市 3 个实验动物设施为例,对比分析了 LDAC、四管制多功能热泵以及冷水机组的能耗情况,结果显示 LDAC 能耗约为冷水机组的 55%,四管制多功能热泵能耗为冷水机组的 71%。Liu 等^[4]比较了热管、液体循环和溶液吸收 3 种余热回收技术的能效比,并进行了 4 个不同气候区的比较:严寒、寒夏、寒冬、夏暖冬。任尔媛^[5]分析了新排风热管显热回收及 U 型除湿热回收两种措施的节能效果,结论表明投资回收期小于 1 年。吴强等^[6]介绍了三维热管在除湿中的应用效果,全年可实现节能率为 20%。闫辰等^[7]统计分析乙二醇热回收装置在实验动物设施全年运行中的节能效果,并结合其特点提出了运行建议。

新技术的主要关注点是空气处理系统的优化控制策略以及计算机辅助气流组织设计。Zhuang 等^[8]提出了一种自适应的温湿度解耦控制方法,对现有的空气处理系统(air handling unit, AHU)进行改造后,结合室内外温湿度差调整进风量与进风方式,尽量避免在除湿阶段的降温与再加热过程,改造后空调系统的年能耗可降低 6.8%~40.8%。Liu 等^[9]提出了一种基于多风扇变频的改进系统,用于满足非工作模式下的压力控制要求,可节省 39.8% 的能耗,同时保证洁净度。钟加晨等^[10]、王文涛等^[11]、龚光彩等^[12]利用计算机流体力学模拟方法,

对实验动物设施内的气流组织进行了仿真计算,并得出相应改进建议。上述研究均取得了非常显著的节能效果。

管理节能是指在不改变现有技术、设备、工艺等硬件措施的前提下,通过管理手段优化运行方式、降低能源漏损率。目前,管理节能的主要关注点在与合理调整换气次数。Shan 等^[13]针对一处制药洁净车间进行了空气处理系统的控制策略优化,无需任何形式的设备更新投入,每年最高可节省 42% 的能源使用。Loomans 等^[14]讨论了基于需求控制过滤(demand controlled filtration, DCF)方法,根据洁净车间的实际被使用情况来动态地调整换气次数,在典型条件下,最高可实现 93.6% 的节能率。Zhuang 等^[15]提出了一种协调需求控制通风策略,通过协调空气处理系统和冷热源系统之间的运行来动态调整换气次数,实现多区洁净室空调系统运行节能率分别达到 63.3%。Cheng 等^[16]研究了 GMP 条件下洁净实验室中的生产模式与待机模式的双向切换,实现了节能控制,并对造成的压差梯度影响进行了讨论。

从以上国内外研究不难看出,无论是新技术新设备应用还是管理手段优化运行当中,节能潜力的分析、节能方案的制订、节能效果的衡量都非常依赖准确的能耗分析,以支撑实验动物设施的节能管理向着精细化、精准化的方向发展。

1.2 实验动物设施能耗分析方法

实验动物设施相比于其他公共建筑的能耗特征存在明显差异。丁贤明等^[17]对浙江大学实验动物中心的整体能耗进行了计量与测算,核算后监测期内实验动物设施的单位面积能耗是普通公共建筑的 8.52~21.88 倍。唐利军等^[18]对实验动物设施的基本能耗结构进行了分析,结论表明冷热源及新风系统的能耗占设施总能耗的 50% 以上,应重点予以关注。

实验动物设施能耗分析包括如下步骤(图 1):

(1) 能耗数据收集。通过收集实验动物设施的能源消耗数据,如电力、热力、水等,对能源消耗的趋势、周期性变化等进行统计和分析。

(2) 能耗模型建立。结合已收集的能耗数据,建立实验动物设施的能耗模型,对设施的能源消耗进行仿真和进一步预测。可以借助建模软件,根据设施的结构、设备特点等,通过模拟实验和参数优化,预测设施的能源使用最佳效率,建立能耗基线

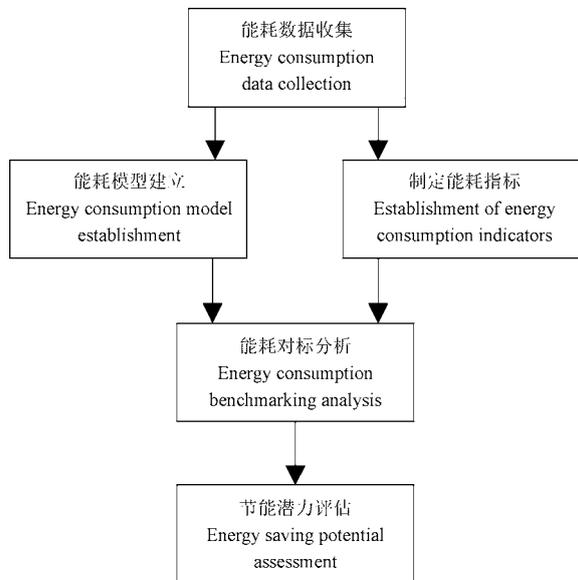


图 1 实验动物设施能耗分析步骤

Figure 1 Steps for energy consumption analysis of a laboratory animal facility

用于对比。

(3)制定能耗指标。借鉴能耗评估标准和指南,制定适用于特定实验动物设施的能耗评估指标,评估设施的能源利用效率和节能潜力,为能源管理和决策提供科学依据。

(4)能耗对标分析。使用已经建立的能耗指标或能耗模型,对实验动物设施的能耗状况进行评判。也可以利用能流图等工具,进一步对能源的流向、转化和损耗进行分析。

(5)节能潜力评估。结合对标结果,对影响实验动物设施能耗的各种因素进行分析,包括环境参数、设备运行、人为活动等,确定各种因素对能耗的影响程度,评估出潜在的节能潜力与措施。

在传统的能耗分析中,数据收集一般采用人工手抄方式,难以保证数据的准确性与实时性,严重影响后续的数据分析与评估。能耗监测系统的出现,解决了传统抄表中的诸多问题,具有重要的实用意义。

1.3 能耗监测系统及其在其他行业中的应用

能耗监测系统是通过安装能耗计量装置,采用实时传输等手段,及时采集并记录能耗数据的软硬件系统。作为一种能够实时监测和管理能源消耗的技术,可以实现能源消耗过程的数字化、信息化,因而在医院、制药洁净车间、高校实验室当中已经得到了广泛的应用^[19-21]。上述设施与实验动物设施具有显著的相似性,运用能耗监测系统实现实验

动物设施精细化节能管理,有望成为未来实验动物设施能源管理的主要发展方向。

2 能耗监测系统的设计

2.1 系统设计的基本原则与需求分析

在设计面向实验动物设施的能耗监测系统时,需要遵循以下基本原则:

(1)实时性。应具备实时监测能耗数据的功能,能够实时采集实验动物设施各项能源的消耗数据,包括电、气、水,以保证数据的准确性和及时性。

(2)灵活性。系统设计应考虑到不同实验动物设施的特点和需求差异,具有灵活的配置功能,能够根据具体情况调整监测参数和监测频率,以满足不同设施的监测要求。

(3)完整性。系统应具备完善的数据存储和管理功能,能够对采集到的能耗数据进行存储、备份和管理,以确保数据的安全性和可追溯性。

(4)易用性。系统应提供数据可视化和报表分析功能,能够将监测到的能耗数据以图表、报表等形式直观展示,满足不同用户的使用需求,包括科研人员、管理人员、设施运维人员等,降低用户的学习成本和使用难度。

(5)可扩展性。系统设计应考虑到未来的发展需求,具有良好的可扩展性,能够随着实验动物设施规模的扩大或技术的更新而进行相应的升级和扩展,保持系统的持续性和适应性。

2.2 系统整体架构设计

能耗监测系统架构整体可以分为采集层、传输层、平台层(图 2)。

(1)采集层。采集层是系统的基础,负责采集实验动物设施各项能源的消耗数据和环境参数。包括电力仪表、水表、气体流量计以及温湿度采集器等。采集器的选择应考虑到精度、稳定性、适应性等因素。

(2)传输层。负责将采集器采集到的数据传输至上层处理单元。采用有线或无线通信技术,如以太网、Wi-Fi、LoRa 等,确保数据的及时、稳定地传输。

(3)平台层。平台层又细分为数据处理层与应用服务层。在数据处理层,接收传输层的数据,并进行处理、分析和存储。该层的功能包括数据清洗、数据分析、异常检测、数据存储等,以确保数据的准确性和完整性。在应用服务层,提供系统的各

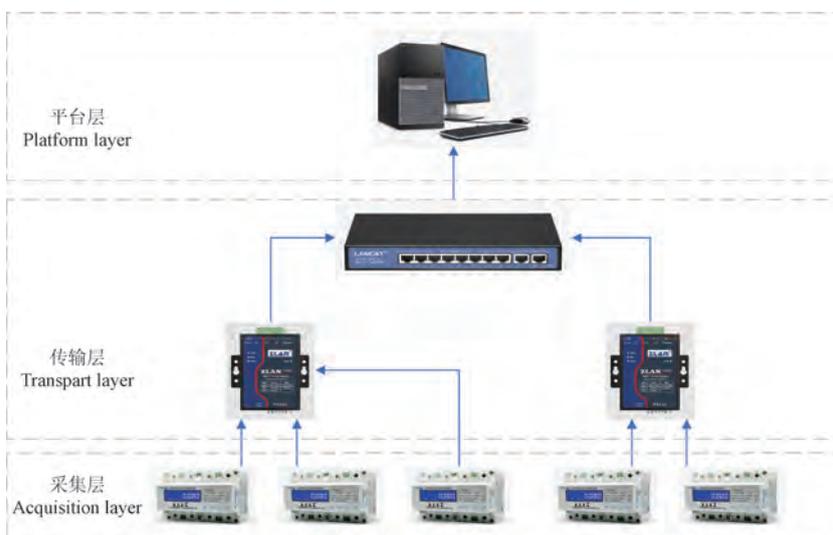


图 2 系统架构图

Figure 2 Architecture of system

项功能和服务,包括数据可视化、报警与预警、能耗分析、报表生成等。用户可以通过 Web 界面访问系统,查看实时数据和历史数据,并进行相应的操作和管理。

2.3 系统硬件与软件设计

能耗监测系统主要包括硬件系统和软件系统。

(1) 硬件系统。硬件系统主要由智能计量仪表、数据传输网关和服务器 3 部分组成。智能电表计量精度不低于 1.0 级,配备 RS485 通讯接口,采用 Modbus-RTU 标准协议,性能指标符合国标 GB/T 17215、GB/T 17883 和 DL/T 614 对电能表的各项技术要求,配套使用的电流互感器精度等级不低于 0.5 级。考虑转化楼实际布线经济性,数据传输网关使用有线/无线两种方式进行通讯。考虑实验动物屏障设施对信号屏蔽性强,无线传输选用 Lora 方式,可以实现-140 dBm 的接收灵敏度和+20 dBm 的输出功率,最远通讯距离达到 8 km。

(2) 软件系统。软件系统采用 B/S 架构设计,是一种以分布式思想结合模块化运行的设计架构,用户无需安装客户端,使用主流浏览器即可以访问系统。软件系统主要包括应用平台与数据库两部分。本系统应用平台选取 100% 开源的物联网开发引擎 Thingsboard,支持 MQTT、CoAP、SNMP、LWM2M、Modbus、OPC UA 和 HTTP 等行业标准物联网协议。数据库选用 PostgreSQL+ Cassandra 组合。PostgreSQL 数据库用于储存关系型数据及属性数据,Cassandra 数据库用于储存时间序列数据,如电能实时采集数据。数据库对外提供统一的数据

服务接口,Thingsboard 平台使用数据服务,提供各类应用,包括后台管理工具、数据可视化、数据分析应用及其他功能。

3 能耗监测系统的实现与验证

3.1 系统实施概况

华中科技大学转化医学大楼 15、16 楼实验动物设施(后文简称“转化楼”)为 SPF 级洁净实验动物设施,总建筑面积 6800 m²,其中屏障内面积 1600 m²。在转化楼设计部署一套能耗监测系统,主要包括各低压配电室及馈线回路增设智能电表、电流互感器、数据采集网关,通信网络构建与软件平台部署等。

转化楼总进线由大楼地下二层配电房引出,共含有一二级负荷 652.90 kW,三级负荷 2116.85 kW,主要包括空气处理系统、冷热源系统、蒸汽发生系统、净化水及辅助生产系统、照明及动力系统、安防弱电系统等用电负荷。结合转化楼低压配电室实际物理分布位置,能耗监测系统所接入的计量点位共计 27 个。

3.2 系统效果及验证

能耗监测系统由华中科技大学实验动物中心自行实施开发与部署,2023 年 12 月正式投入使用,截至 2024 年 4 月,系统接收能耗数据包 15 837 768 条,丢包率 2.87%,整体运行稳定(图 3)。

为验证数据采集与计量准确性,选取 2023 年 12 月 12 日~2023 年 12 月 24 日期间,由本系统采集电量数据与高压配电房进线总电表数据进行比



图3 系统实际运行界面

Figure 3 Actual operating interface of the system

对,如表 1 所示。

受数据采集周期、智能电表采集精度误差等因素影响,能耗监测系统数据与总表数据误差率为 0.5%,证明系统采集计量准确,满足实际应用标准。

以 2024 年度第一季度(2024 年 1 月~2024 年 3 月)为例,如图 4 显示,2024 年度第一季度转化楼总耗电量为 244 558.58 kWh。子系统方面,冷热源系统耗电量占比 58.94%,空气处理系统耗电量占比 35.13%,两者合计占总用电量的 94.07%。

设备方面,如图 5 所示,用电量排名前三的依次为 2 号风冷热泵、进排风机组、4 号冷热水循环水泵,与

表 1 能耗监测系统采集电量数据准确性验证比对

Table 1 Verification and comparison of the accuracy of electricity data collection in energy monitoring systems

日期 Date	总电表数据/kWh Total meter data	能耗监测系统数据/kWh System data
2023/12/12	3950	3819.33
2023/12/13	3380	3091.34
2023/12/14	2206	2924.98
2023/12/15	4999	3996.44
2023/12/16	3624	4280.02
2023/12/17	5073	4299.23
2023/12/18	1205	3986.94
2023/12/19	5948	3757.35
2023/12/20	4279	3788.93
2023/12/21	3992	4847.33
2023/12/22	5168	5028.99
2023/12/23	4511	4421.72
2023/12/24	4154	3983.17
合计 Total	52 489	52 225.77
总误差 Total error		263.23
误差率/% Error rate		0.50%

子系统耗电量整体情况相吻合。由此看出,转化楼管理节能应重点关注冷热源系统与空气处理系统。

3.3 系统节能应用

(1) 换气次数动态调整分析。合理设置换气次数在实验动物设施节能中至关重要。转化楼的设计风量为 45 000 m³,设计平均换气次数为 18.75/h,高于国标要求的最小换气次数。考虑工作时间段(6:00~20:00)人员流动,需要留有一定风量冗余以维持压力差稳定。在非工作时间段(20:00~次日 6:00)降低风量为 40 000 m³,平均换气次数为 16.67/h,以实现节能。

使用能耗监测系统计量节能效果,如图 6 所示,以典型日 2024 年 4 月 17 日为例,工作时间段(6:00~20:00)风机机组功率为 38.85 kW,在非工作时间段(20:00~次日 6:00)风机机组功率为 21.02 kW。降低风量运行后节能率为 45.89%,推算得全年节电量约为 52 063.6 kWh。

(2) 过渡季节运行辅助决策。在制热工况过渡季节(新风温度低于目标控制温度 5℃左右),所需的制热负荷较低,为实现节能目标,此时进行温湿度控制一般有两种运行方式:仅使用冷热源系统或仅使用电再热系统。两种方式需手动切换,依赖人工经验与判断,且缺乏数据分析支撑以确定最优策略。

使用能耗监测系统,以转化楼制热工况在过渡季节(2024 年 3 月~4 月)的运行数据为例,对其运行方式的选择进行了辅助决策分析,其结果如表 2 所示。



图 4 系统实际运行界面-分项统计电量(2024 年 1 月~2024 年 3 月)

Figure 4 Actual operating interface of the system-itemized electricity counting (January 2024~March 2024)

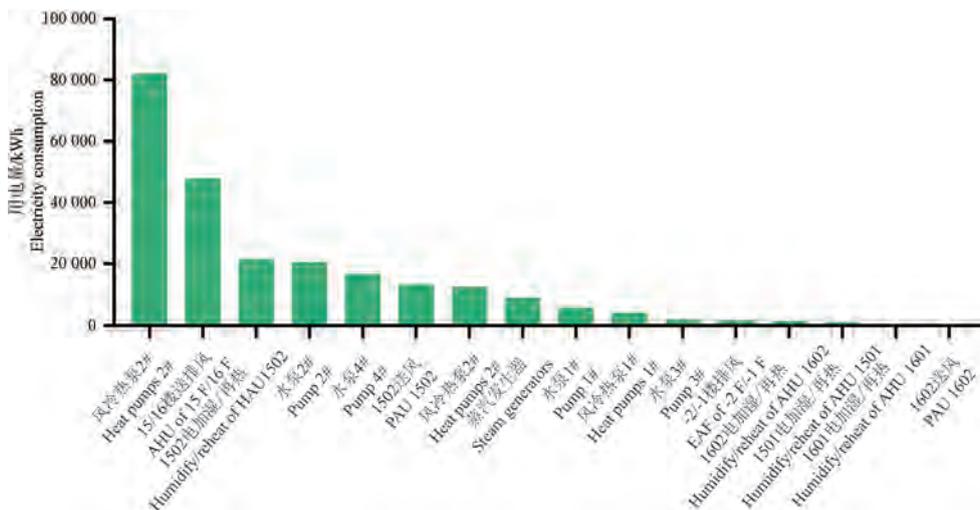


图 5 设备用电量排名(2024 年 1 月~2024 年 3 月)

Figure 5 Equipment electricity consumption ranking (January 2024~March 2024)

以上分析可以得出:在过渡季节同等温度条件下,新风湿度与目标湿度控制值(回风平均湿度)的湿度差值是决定选择运行方式的关键参数。以转化楼为例,湿度差的临界值为 24%~26%左右,湿度差低于临界值选择电再热系统更加节能,高于临界值选择冷热源系统更加节能。

(3)加湿方式切换辅助决策。冬季新风湿度较低,转化楼采用电热加湿方式保证屏障内湿度,配合空气处理系统覆盖全部饲养区域,且无法分区域

进行调整。在设施启用初期,笼位使用率不足 20%,造成了严重的能源浪费。

使用能耗监测系统,快速识别并发现了这一问题,采用分布式加湿器实现了 IVC 笼具内湿度的独立控制,加湿系统耗电量占日用电量比例由 28.08%~33.03%下降至 4.95%~6.27%。其加湿效果及用电量情况如表 3 所示。

以电热加湿系统加湿方式切换前典型日(12月26日)及切换后典型日(12月28日)为例(图7),

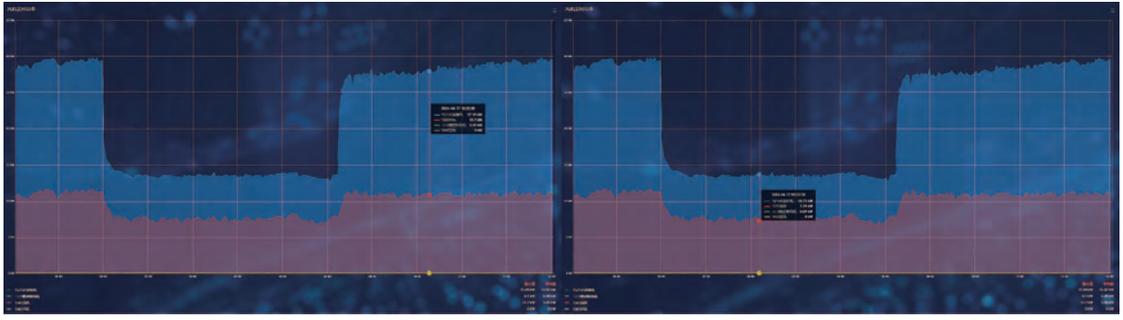


图 6 换气次数动态调整

Figure 6 Ventilation rate dynamic adjustment

表 2 过渡季节不同气候条件下不同运行方式的用电量比较

Table 2 Comparison of electricity consumption under different operating modes in various climate conditions during transitional seasons

运行方式 Operating mode	日期 Date	新风平均 温度/°C Average temperature of fresh air	回风平均 温度/°C Average temperature of return air	新风平均 湿度/% Average humidity of fresh air	回风平均 湿度/% Average humidity of return air	湿度差/% Humidity difference	用电量/kWh Electricity consumption
冷热源 Cooling and heating source	3月13日 March 13 th	16.4	20.3	47.4	36.9	10.5	605.83
电再热 Electric reheating	3月20日 March 20 th	17.0	20.4	41.5	31.5	10.0	540.79
冷热源 Cooling and heating source	3月27日 March 27 th	14.3	20.1	80.0	53.3	26.7	748.26
电再热 Electric reheating	4月4日 April 4 th	14.3	20.2	77.2	52.7	24.5	780.8
冷热源 Cooling and heating source	3月24日 March 24 th	16.6	20.1	88.9	59.3	29.6	647.71
电再热 Electric reheating	3月17日 March 17 th	16.7	20.1	89.3	61.8	27.5	723.19

表 3 不同加湿方式的加湿效果及用电量比较

Table 3 Comparison of effect and electricity consumption of different humidification methods

加湿方式 Humidification method	日期 Date	回风平均 湿度/% Average humidity of return air	IVC 笼具内平均 湿度/% Average humidity of IVC	加湿系统耗电量/kWh Electricity consumption of humidification system	日总用电量/kWh Total electricity consumption	加湿系统用电量占比/% Proportion of electricity consumed by humidification system
集中式加湿 Centralized humidification	12月22日 Dec 22 nd	29.8	35.4	1631.99	5031.31	32.44
	12月23日 Dec 23 rd	29.3	35.5	1454.41	4421.81	32.89
	12月24日 Dec 24 th	30.9	37.4	1315.19	3981.56	33.03
	12月25日 Dec 25 th	29.4	36.4	1043.20	3643.63	28.63
	12月26日 Dec 26 th	29.4	36.7	969.61	3453.01	28.08
	切换过渡期 Transition period	12月27日 Dec 27 th	27.7	34.6	408.00	3049.55
分布式加湿 Distributed humidification	12月28日 Dec 28 th	26.3	38.4	147.20	2631.20	5.59
	12月29日 Dec 29 th	30.5	42.6	147.19	2658.51	5.54
	12月30日 Dec 30 th	39.8	53.4	147.19	2474.02	5.95
	12月31日 Dec 31 st	27.3	39.7	147.19	2348.80	6.27
	1月1日 Jan 1 st	25.2	36.5	145.60	2627.47	5.54
	1月2日 Jan 2 nd	30.9	45.4	145.61	2943.46	4.95

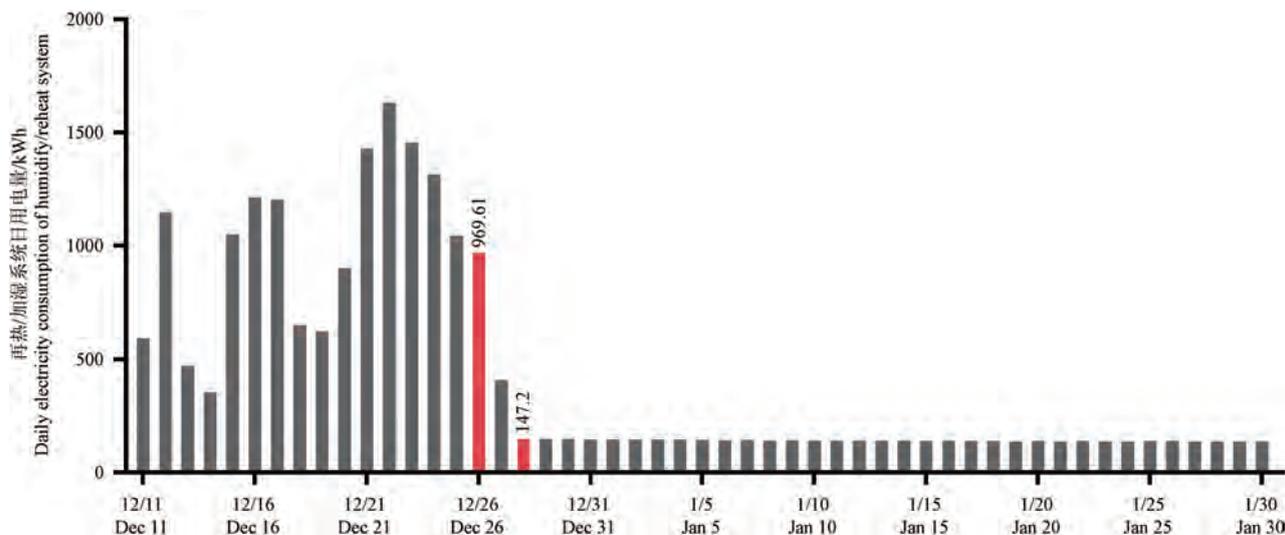


图7 加湿方式切换节能效果

Figure 7 Energy saving effects of humidification mode switching

切换前典型日用电量为 969.61 kWh, 切换后典型日用电量为 147.2 kWh, 理论对比节能率为 84.8%。

4 结论

实验动物设施的节能降耗研究, 非常依赖能耗数据的收集与分析。传统的数据清洗、过滤、整合等工作需要消耗大量的人力和时间, 能耗监测系统能够简洁高效地进行复杂的数据收集、处理和分析工作。本文设计了面向实验动物设施的能耗监测系统, 并结合华中科技大学转化医学大楼 15、16 楼实验动物设施进行了应用, 探索并评估了实验动物设施管理节能的手段和效果。本研究表明, 能耗监测系统在实验动物设施中具有显著的实用价值和推广价值。

参考文献:

[1] GUAN B, ZHANG T, LIU X. On-site performance investigation of liquid-desiccant air-conditioning system applied in laboratory rodent room; a comparative study [J]. *Energy Build*, 2021, 232: 110664.

[2] LI S, LIU X, ZHANG T. Ammonia absorption performance of a liquid desiccant dehumidification system applied in laboratory rodent room [J]. *Appl Therm Eng*, 2021, 199: 117523.

[3] 余俊祥, 林金成, 高克文, 等. 实验动物用房暖通空调系统节能策略研究 [J]. *暖通空调*, 2023, 53(12): 24-29.

YU J X, LIN J C, GAO K W, et al. Research on energy saving strategies of HVAC system for laboratory animal facilities [J]. *Heat Vent Air Cond*, 2023, 53(12): 24-29.

[4] LIU C, MA H, LIU S, et al. Heat recovery technology and energy-saving effect analysis apply to cleanroom exhaust waste

heat characteristics [J]. *Energy Build*, 2024, 306: 113935.

- [5] 任尔媛. 某 SPF 级动物房空调系统节能措施效果分析 [J]. *暖通空调*, 2021, 51(6): 71-74.
- REN E Y. Effect analysis on energy saving measures of air conditioning system in a SPF animal house [J]. *Heat Vent Air Cond*, 2021, 51(6): 71-74.
- [6] 吴强, 尤军, 吴成, 等. 三维热管在实验动物设施除湿中的节能应用 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(5): 437-439.
- WU Q, YOU J, WU C, et al. Energy-saving application of three-dimensional heat pipes in dehumidification of laboratory animal facilities [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2020, 40(5): 437-439.
- [7] 闫辰, 高晓松, 孙波, 等. 乙二醇热回收装置在实验动物设施运行中的节能效果 [J]. *实验动物科学*, 2022, 39(3): 45-50.
- YAN C, SHANG X S, SUN B, et al. Energy Saving effect of ethylene glycol heat recovery device in laboratory animal facility operation [J]. *Lab Anim Sci*, 2020, 40(5): 437-439.
- [8] ZHUANG C, WANG S. An adaptive full-range decoupled ventilation strategy for buildings with spaces requiring strict humidity control and its applications in different climatic conditions [J]. *Sustain Cities Soc*, 2020, 52: 101838.
- [9] LIU J, ZHANG L, YANG J, et al. Study on pressure control and energy saving of cleanroom in purification air conditioning system [J]. *Energy Build*, 2021, 253: 111502.
- [10] 钟加晨, 王志毅, 吴强. 基于节能的实验动物人工环境气流组织数值模拟 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(3): 104-110.
- ZHONG J C, WANG Z Y, WU Q. Numerical simulation of air distribution in an artificial laboratory animal environment designed to minimize energy costs [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(3): 104-110.

- [11] 王文涛, 郑功杭, 李先庭, 等. 利用室内空气循环净化降低实验动物房新风量的节能效果 [J]. 制冷学报, 2021, 42(6): 1-7.
WANG W T, ZHENG G H, LI X T, et al. Energy-saving effect of air-conditioning system in laboratory animal room with less fresh air volume and purification of indoor circulating air [J]. J Refrig, 2021, 42(6): 1-7.
- [12] 龚光彩, 陈湘, 刘激扬, 等. 空气载能辐射空调系统在实验动物房中的应用分析 [J]. 湖南大学学报(自然科学版), 2022, 49(3): 211-219.
GONG G C, CHEN X, LIU J Y, et al. Analysis of the application of air carrying energy radiant air-conditioning system in laboratory animal rooms [J]. J Hunan Univ Nat Sci, 2022, 49(3): 211-219.
- [13] SHAN K, WANG S. Energy efficient design and control of cleanroom environment control systems in subtropical regions-A comparative analysis and on-site validation [J]. Appl Energy, 2017, 204: 582-595.
- [14] LOOMANS M G L C, MOLENAAR P C A, KORT H S M, et al. Energy demand reduction in pharmaceutical cleanrooms through optimization of ventilation [J]. Energy Build, 2019, 202: 109346.
- [15] ZHUANG C, SHAN K, WANG S. Coordinated demand-controlled ventilation strategy for energy-efficient operation in multi-zone cleanroom air-conditioning systems [J]. Build Environ, 2021, 191: 107588.
- [16] CHENG X, LI C, MA X, et al. Pressure gradient control in bidirectional switching between standby mode and production mode in biopharmaceutical cleanroom [J]. J Build Eng, 2023, 65: 105816.
- [17] 丁贤明, 周荣贵, 丁阳, 等. 能耗监管体系在实验动物设施应用和节能措施评价 [J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(6): 453-458.
DING X M, ZHOU R G, DING Y, et al. Application and energy conservation methods assessing in laboratory animal facility by energy monitoring system [J]. Lab Anim Comp Med, 2011, 31(6): 453-458.
- [18] 唐利军, 徐国景, 张金明, 等. 实验动物建筑设施节能技术探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(1): 73-78.
TANG L J, XU G J, ZHANG J M, et al. Research for energy-saving technologies of laboratory animals building facilities [J]. Chin J Comp Med, 2010, 20(1): 73-78.
- [19] 胡铖, 胡晓妍. 医院能耗监测平台的优化与思考 [J]. 中国卫生产业, 2020, 17(5): 80-82.
HU C, HU X Y. Optimization and thinking of hospital energy consumption monitoring platform [J]. China Health Ind, 2020, 17(5): 80-82.
- [20] 代丹, 林绿渊, 肖武, 等. 制药厂房洁净空调系统能耗监测及分析方法 [J]. 暖通空调, 2021, 51(10): 33-38, 32.
DAI D, LIN L Y, XIAO W, et al. Energy consumption monitoring and analysis method of clean air conditioning systems in pharmaceutical factories [J]. Heat Vent Air Cond, 2021, 51(10): 33-38, 32.
- [21] 支琴, 熊顺子, 彭华松. 基于能耗监测的高校实验室安全管理策略 [J]. 实验室研究与探索, 2020, 39(7): 300-304.
ZHI Q, XIONG S Z, PENG H S. Laboratory safety management strategy based on energy consumption monitoring [J]. Res Explor Lab, 2020, 39(7): 300-304.

[收稿日期]2024-04-23

刘聪林, 乔楚华, 黎炎梅, 等. 湖北省实验动物许可证管理工作现状与对策 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 97-103.
Liu CL, Qiao CH, Li YM, et al. Current status and countermeasures in laboratory animal license management in Hubei Province [J].
Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 97-103.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.012

湖北省实验动物许可证管理工作现状与对策

刘聪林^{1*}, 乔楚华², 黎炎梅^{3,4}, 陈晓莉¹, 张金明^{3,4}, 陈瑞¹, 柳丹¹

(1.湖北省科技信息研究院, 武汉 430071; 2.湖北省科技厅, 武汉 430071;
3.湖北省实验动物学会, 武汉 430074; 4.湖北省疾病预防控制中心, 武汉 430079)

【摘要】 本文介绍了湖北省实验动物许可证日常管理服务以及事中、事后监管事项等内容。阐述了湖北省实验动物许可证管理现状、取得成效、遇到问题及对策建议。重点分析了湖北省实验动物立法情况、许可证发放及分布情况、设施规模、从业人员组成等。近年来, 湖北省实验动物许可证发放数量逐年增加, 持证单位的动物生产及使用数量持续上升。相关行业产业在蓬勃发展的同时, 也存在一些监管上的不足之处, 本文从生物安全角度出发, 结合我省许可证管理服务工作中遇到的问题, 提出相关安全监管对策建议, 从而更好地推动湖北省实验动物行业发展。

【关键词】 实验动物; 许可证; 管理; 对策

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0097-07

Current status and countermeasures in laboratory animal license management in Hubei Province

LIU Conglin^{1*}, QIAO Chuhua², LI Yanmei^{3,4}, CHEN Xiaoli¹, ZHANG Jinming^{3,4}, CHEN Rui¹, LIU Dan¹
(1. Hubei Academy of Science and Technological Information, Wuhan 430071, China. 2. Department of Science and Technology of Hubei Province, Wuhan 430071. 3. Hubei Association for Laboratory Animal, Wuhan 430074. 4. Hubei Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079)

【Abstract】 This review introduces the daily management practices related to laboratory animal licensing in Hubei Province and the supervision processes during and after licensing. We consider the current status of laboratory animal license management, achievements, problems, and countermeasures in Hubei Province, with a focus on analyzing the legislative situation for laboratory animals, the issuance and distribution of permits, the scale of facilities, and the composition of employees. The number of laboratory animal licenses issued in Hubei Province has recently been increasing year by year, and the numbers of animals produced and used by licensed units have also continued to rise. Although the related industries are flourishing however, there are some regulatory deficiencies. This paper considers the perspective of biosafety, combined with the problems encountered in license management, and proposes relevant safety supervision countermeasures and suggestions to promote the development of the laboratory animal industry in Hubei Province.

【Keywords】 laboratory animal; license; management; countermeasures

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

实验动物是生命科学研究和生物技术不断发展的基础材料和支撑条件,是国家科技创新的重要生物来源^[1]。湖北是科教大省,是全国饲养、应用实验动物比较多的省份之一,涉及医药、卫生、科技、教育、生物、环保、农业等各方面^[2]。其中生物医药产业的健康发展离不开实验动物的基础支撑。近年来,我省的实验动物行业发展迅速,进一步走向规范化、标准化,呈现十分良好的势头。

1 湖北省实验动物科技管理现状

1.1 制度建设情况

许可证制度是实验动物管理的市场准入制度,是保障实验动物和动物实验质量的重要措施^[3]。上世纪九十年代初开始,我省从宏观上加强了实验动物规范化管理,2005 年 7 月 29 日,湖北省人大第十届第十六次常委会通过了《湖北省实验动物管理条例》并于 2017 年、2022 年予以两次修订,2006 年 5 月,湖北省科技厅发布《湖北省实验动物许可证管理办法》并于 2023 年 7 月予以修订。随着两部政策法规的制定出台及完善,我省实验动物工作更加有法可依,实验动物科技管理工作进入了一个新的发展阶段。2022 年初,湖北省厅研究制定了《湖北省实验动物许可“证照分离”改革工作实施方案》、《湖北省实验动物生物安全风险管控指导性意见》两个规范性文件,在优化营商环境的同时强化底线思维,切实加强实验动物生物安全风险管控。一直以来湖北省科技厅高度重视实验动物科技工作,经过近三十年的探索和发展,湖北省已建立起较为完善的实验动物科技创新体系。

1.2 事前咨询及事中、事后监管服务情况

近年来,国家“放管服”改革不断深入。《湖北省实验动物许可“证照分离”改革工作实施方案》的发布,优化了证照审批流程,缩短了审批时限,办事效率得到了提高。证照分离改革在激发市场主体活力的同时,湖北省也越加重视事前咨询及事中、事后监管工作。

在事前咨询方面,通过线上线下公开实验动物许可事项全部流程环节和要素材料;对有需要的企事业单位提供图纸论证等方面的事前咨询服务。搭建企业与专家之间沟通平台。在服务中规范管理,为服务对象提供专业的论证意见,保证了设施建设初期的科学性,有效节约了企业建设改造成本。在事中、事后监管方面,我省严格实施实验动

物许可证年检工作,主动落实国务院和省委、省政府监管要求,开展实验动物“双随机、一公开”检查。年检过程中,我省严格按照《湖北省实验动物管理条例》及《湖北省实验动物许可证管理办法》的要求,对许可证单位提供的资料进行审核和现场抽查,并委托质量检测机构对生产单位的实验动物质量和使用单位的设施环境进行检测。检查结束后,将检查情况及处理结果向社会公开。我省每年开展对全省实验动物生产使用单位的“双随机、一公开”检查,科技厅负责成立检查组,检查组由执法人员、检测机构人员和行业专家组成。

信息化服务方面,我省于 2009 年在全国首创“湖北省实验动物公共服务平台”信息管理系统,该系统从国家科技部向全国推广,形成了全国性的实验动物管理体系。平台利用信息手段,实现了实验动物行政许可审批过程的线上跟踪管理,同时对已发放许可证设施的实验动物生产和使用情况进行留痕管理,对全国各省市实验动物质量控制、设施运行等方面进行监督指导,促进国家实验动物管理、服务创新及实验动物市场的规范发展。

近年来,湖北省设立专项资金,每年投入两百余万元,支持实验动物领域新技术、新标准的制定及出台,目前已有三项地方标准项目立项,取得了良好的效果。为提升我省实验动物从业人员的技能,湖北省每年设立专项资金,委托实验动物从业人员培训基地开展专项技术培训班及行业教育讲座。2022 年参与学员达 4500 余人,比疫情期间的 2021 年增加了近两倍。通过技术培训及能力评价活动,提高了实验动物从业人员业务素质,为我省实验动物科技及相关产业的发展提供了人才储备,对我省实验动物的发展起到很好的推动作用。

2 湖北省实验动物许可证发放情况

2.1 许可证发放情况

湖北省实验动物行业规模不断扩大,许可证发放数量逐年增加,持证单位的动物生产及使用数量持续上升,较好地支撑了湖北省生物医药产业的发展。2020 年~2022 年,实验动物行政许可办结数量分别为 16 件、33 件、34 件(包含新申请、延续及变更)。因持证单位业务规划调整停用 15 家。2020 年~2022 年实验动物有效期内许可证情况见图 1。根据湖北省资源调查统计数据显示,截至 2022 年底,湖北省现有有效的生产许可证共 20 张,有效的

使用许可证 84 张,较前两年均有稳步增长。

中南六省(广东省、河南省、湖北省、湖南省、广西省、海南省)许可证发放数量存在较大差异,见图 2。广东省有效许可证数量 241 张,居首位;湖北省有效许可证数量 104 张,位列第二;湖南省、河南省有效许可证数量分别为 65 张、72 张,均处于居中水平;广西、海南两省发放数量较少,分别为 40 张、10 张。

2.2 许可证分布情况

截止 2022 年底,以实验动物许可证持证单位性质划分,湖北省实验动物许可证分布在国有及民营企业 50 家、大专院校 29 家、科研院所 14 家、医疗卫生机构 9 家及其他企业 2 家(图 3)。国有及民营企业的使用许可证资源拥有机构占许可证总数量

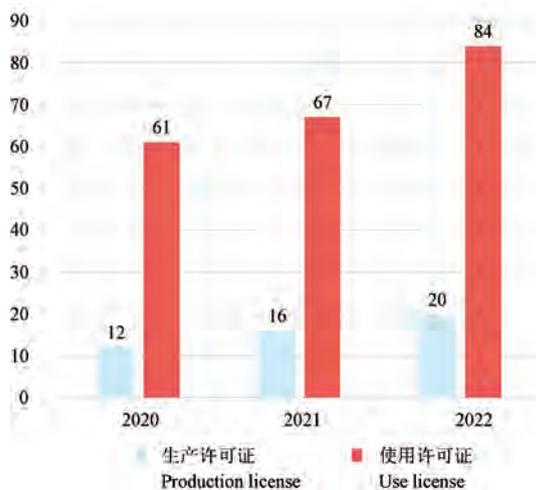


图 1 湖北省 2020 年~2022 年实验动物许可证数量

Figure 1 Number of laboratory animal licenses in Hubei Province from 2020 to 2022

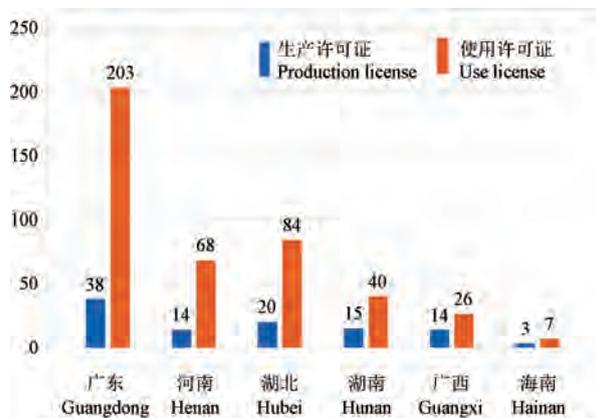


图 2 中南六省许可证数量

Figure 2 Number of permits in six provinces in Central South of China

48%,逐渐成为我省生物医药产业发展的主力军和生力军。从许可证持有单位的地理分布来看,截至 2022 年底,湖北省 17 个市州中有 12 个市州均有实验动物设施许可。数量排名前三的地市分别为武汉、宜昌、十堰。其中武汉市实验动物许可证数量 76 张,占全省许可证数量的 74%(图 3)。可以看出实验动物许可证数量的地域分布与当地的生命科学与生物医药产业发展的状况相匹配。

从近年来实验动物行政监督检查中发现,省内个别地区对实验动物的重要作用认识不足。有些企业职工、在校学生动物实验中生物安全意识不强。这需要进一步加大对实验动物及生物安全方面的法规宣贯、持续强化对实验动物学科地位重要性的认识广泛凝聚不同地区对实验动物重要性的社会共识,才能构建健康、稳定和谐的实验动物创新发展体系。

2.3 实验动物设施规模及生产使用情况

据不完全统计,截至 2022 年底,湖北省实验动物生产设施约 6 万平方米,使用设施约 14 万平方米,总设施面积超过 20 万平方米。一些新材料和新装备陆续出现在实验动物设施建设中,使设施质量和功能有了显著的改善和提升,并逐步向着机械化、节能化、自动化、智能化和网络化方向发展。

湖北省目前有 14 张 ABSL-2、3 张 ABSL-3 及 1 张 ABSL-4 使用许可证,主要分布在病毒学国家级重点实验室及高致病性病原体防控的预防性疫苗生产领域,包括重点科研院所、大专院校、人兽用疫苗生产企业。是全国生物安全实验室分布最全面、应用领域最广泛的地区之一。这些 ABSL-3 和 ABSL-4 生物安全实验室在 COVID-19 疾病相关疫苗、试剂、药物的研发工作中发挥了重大作用,为湖北省科技抗疫胜利作出了重要贡献。

据不完全统计,我省 2022 年实验动物生产总量约 70 万只,近三年,地鼠产量下降较为明显,这与疫情后乙脑疫苗生产量下降有关(见表 1)。2022 年我省 84 份使用许可证的 81 家机构使用了省内来源的实验动物 688 721 只。比 2021 年增加了 8%,其中使用量靠前的动物品种见表 2。

2.4 实验动物从业人员

实验动物行业是集知识密集型和劳动密集型于一体的特殊行业。既需要从事实验动物科研的专业人员,也需要动物饲养、设施设备维护等从业人员^[4]。近年来,湖北省实验动物从业人员数量持续



注:A:实验动物生产设施人员岗位分布;B:实验动物使用设施人员岗位分布;C:实验动物从业人员职称分布;D:实验动物从业人员学历分布。

图4 实验动物行业从业人员状况

Note. A, Composition of personnel for production facilities. B, Composition of personnel for use facilities. C, Distribution of professional titles of laboratory animal practitioners. D, Educational background distribution of laboratory animal practitioners.

Figure 4 Composition of personnel for production facilities

环节的缺失,不能达成闭环监管。主要体现在实验动物的年检工作、“双随机、一公开”等监管服务工作在原平台不能形成电子化记录,实验动物资源调查工作依然依靠纸质表格填写、人工统计的方式进行。大量数据汇集后的整理、查询、数据分析工作量巨大。历年形成的数据资源缺乏电子化存储与规划,为管理部门提供决策依据能力较弱。

3.2 技术人才从业意愿不强,专家型人才队伍面临断层

实验动物行业技术从业者一般经过多年的系统教育和科研培养,对本领域具有较深的研究兴趣和见解,大多数选择持续在行业内深耕细作。然而,在我国现有单位或企业组织结构架构中,实验动物设施机构一般属于支撑部门,设施的运行维护

需要较大数额经费支持,但直接经济效益不明显。青年从业者受限于“唯论文、唯帽子、唯职称、唯学历、唯奖项”的“五唯”标准,其职称评定渠道不畅,福利待遇不高,导致整个行业缺乏对人才的吸引力。由于对实验动物人才培养力度、培养渠道、培养方式、经费投入等较为局限,优秀人才培养已出现“青黄不接”的危机。未来数年,可能在专家增选遴选方面存在困境。

3.3 地方标准的研究与制定尚处于起步阶段,覆盖面不全等问题较为突出

实验动物相关标准中对实验动物及其设施各项指标均有明确规定,是检测机构出具报告的重要依据,也是专家现场验收及检查的技术支撑^[5]。目前,我国实验动物行业国家标准数量较少,而且覆

覆盖面窄。针对实验动物资源具有地域性、多样性特征,研究制定符合地域特色并与地方生物医药产业相匹配的地方标准显得尤为重要。

截至目前,中国实验动物信息网显示全国已有百余项实验动物地方标准发布实施。其中北京 52 项、江苏 22 项、云南 15 项、湖南 12 项、黑龙江 11 项、四川 10 项。而我省尚未有实验动物地方标准、团体标准出台,地方标准制定覆盖面不全,跟不上行业发展要求等问题较为突出。

4 实验动物生物安全管理的思考与建议

通过以上数据的分析可以看出,湖北省实验动物在制度法规构建、规模创新驱动、产业支撑服务等方面取得了明显成效。实验动物作为新质生产力,是生命科学研究的基础,也是医药健康产业的基石。支撑了多个相关行业的快速发展。同时,在实验动物许可证管理工作中,仍存在一些不足。针对湖北省实验动物发展实际,提出以下建议。

4.1 以公共服务平台为抓手,加强实验动物生产与使用的溯源管理

近年来,随着政务智慧化水平的不断提升,一方面实验动物行业相关数据信息越来越多,政务公开要求越来越深化、透明。另一方面,我省实验动物产业发展迅速,在生物安全监督管理中也出现了诸多新问题。原有平台在信息化方面应进行相应调整以适应新形势的要求。

建议升级平台的相关技术性能,完善实验动物质量合格证及设施使用证的开具范围。以平台为抓手,以用户需求为导向,应用大数据、物联网等先进的技术工具,构建包括实验动物设施管理、实验动物生产监管、实验动物使用监管、实验动物福利保障、技术交流与合作等全链条、多方位的实验动物行业管理服务体系。收集、整合、保存全省范围内实验动物资源数据,推动实验动物资源共享。构建集生产使用监管、动物福利保障、资源共享服务等一体化的大平台监管服务体系。逐步实现实验动物信息的全流程溯源管理。为科技计划决策提供支撑,为实验动物生产使用单位提供溯源查询路径,营造我省实验动物产业安全、创新、发展、稳定、和谐的新局面。

4.2 健全人才赋能机制,培养打造行业内高水平的专家队伍

习近平总书记在中央人才工作会议上强调,要

造就规模宏大的青年科技人才队伍,把培养国家战略人才的重心放在青年科技人才上,支持青年科技人才挑大梁、当主角^[6]。青年科技人才是实验动物行业人才梯队中最富有活力和创造力的队伍,是推动实验动物行业发展的生力军。

在我国,实验动物相关专业的课程学习大多在学校阶段,国家层面目前尚没有专门针对青年科技人才的战略发展规划和培养方案。为提升我省实验动物从业人员的技能,湖北省科技厅每年提供专项资金,委托实验动物从业人员培训基地开展专题培训及技能评价活动。与此同时,随着对人才培养需求的增加,也需要用人单位发挥主体作用,建立符合行业青年人才成长规律的培养体系。鼓励青年人才多参加科研工作交流学习,交流学习是科技人才成长的加速器,通过交流学习,可以开阔科研视野。通过制定相关政策举措,激发青年学者的科研参与热情。同时,还应注重在岗位实践中锻炼培育“专家型”人才。通过日常监督检查锻炼青年专家的多方面技能及能力。凝聚行业发展的原动力,形成我省实验动物行业人才的蓄水池,形成由上带下,自下而上顺畅发展的人才梯队,促进我省实验动物行业和人才个人的共同发展。

4.3 以“用”为导向,加强与我省特色资源相适应的地方标准的研究与制定进程

在科技主管部门的指导和支持下,我省已开始了实验动物标准研究工作。湖北省尚处于研究中地方标准有 3 项,科技主管部门每项给予 30 万的研究经费支持,切实解决了部分实验动物许可证发放过程中急需地方标准问题。但其他需求较多的实验鸭、实验羊、实验雪貂、实验鱼等实验动物标准建立尚为空白。

目前,实验鱼类在遗传学、药理学、毒理学、环境科学等领域具有广泛应用。由于湖北省水生实验动物尚未纳入行政许可管理范畴,暂未有相关数据的统计。据中国实验动物信息网数据统计,我国已有近十个省市发放了实验鱼的生产许可或使用许可。湖北省是较早开展水生实验动物研究的地区之一,有着丰富的特色资源,如中国科学院水生所拥有国际学界公认的全球三大斑马鱼资源库之一,资源库保藏的斑马鱼品系量为亚洲最大;活体保藏品系为全球最多,科技支撑能力连续两年位居全球首位,并且参与编制了 GB/T 39649-2020《实验动物 实验鱼质量控制》等多项标准的制定^[7]。建议

参照国家标准,尽快制定地方标准,进一步规范对我省水生实验动物的规范管理,以促进我省水生实验动物特色资源的高标准开发与利用。

参考文献:

- [1] 吴孝槐. CNAS 实验动物机构认可进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5): 384-391.
WU X H. Progress on the accreditation for laboratory animal institutions of CNAS [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(5): 384-391.
- [2] 刘聪林, 陈瑞, 姜鲲. 湖北省实验动物管理现状、问题及对策 [J]. 科技创业月刊, 2021, 34(1): 97-99.
LIU C L, CHEN R, JIANG K. Current situation, problems and countermeasures of laboratory animal management in Hubei Province [J]. J Entrepreneurship Sci and Technol, 2021, 34(1): 97-99.
- [3] 贺争鸣, 李根平, 徐平, 等. 写在《实验动物管理条例》发布实施三十周年 [J]. 实验动物科学, 2018, 35(4): 1-13.
HE Z M, LI G P, XU P, et al. Written on the 30th anniversary of the promulgation and implementation of the regulations for the administration of laboratory animals [J]. Lab Anim Sci, 2018, 35(4): 1-13.
- [4] 王锡乐, 巩薇, 贺争鸣, 等. 中国大陆地区实验动物机构、人员和设施现状分析 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(3): 66

-70.

WANG X L, GONG W, HE Z M, et al. Analysis on the current situation of laboratory animal institutions, personnel and facilities in chinese mainland [J]. Lab Anim Sci, 2017, 34(3): 66-70.

- [5] 李宝龙, 王玉娥, 司昌德, 等. 黑龙江省实验动物管理现状与发展对策 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(3): 181-189.
LI B L, WANG Y E, SI C D, et al. Current situation and development countermeasures of laboratory animal management in Heilongjiang Province [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(3): 181-189.
- [6] 芮绍炜, 刘倩铃. 青年科技人才成长环境的国别比较与启示 [J]. 中国科技人才, 2022, 9(3): 40-49.
RUI S W, LIU Q L. National comparison and enlightenment of the growth environment for young scientific and technological talents [J]. Sci Technol Talents China, 2022, 9(3): 40-49.
- [7] 冯丽萍, 朱琦, 林金杏. 实验用鱼的福利研究现状及思考 [J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(5): 524-530.
FENG L P, ZHU Q, LIN J X. Current status and reflections on welfare research of experimental fish [J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(5): 524-530.

[收稿日期]2024-05-04

朱紫悦,金美玲,许翔月,等. D-半乳糖诱导脑老化模型机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 104-110, 117.

Zhu ZY, Jin ML, Xu XY, et al. Research progress on the mechanism of D-galactose-induced brain aging model: a review [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 104-110, 117.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.013

D-半乳糖诱导脑老化模型机制的研究进展

朱紫悦¹,金美玲¹,许翔月²,刘 晴²,朱嘉雪¹,付明军¹,雷 霞^{2*},张 宁^{3*}

(1.黑龙江中医药大学基础医学院,哈尔滨 150040;2.南京中医药大学无锡附属医院,江苏 无锡 214071;
3.黑龙江中医药大学,哈尔滨 150040)

【摘要】 D-半乳糖(D-galactose, D-gal)作为正常的生理物质,过量摄入能在体内外引发类似自然脑衰老的过程,故在国内外被广泛用来诱导脑老化模型。D-半乳糖诱发的脑衰模型耗时短、成本低、效果明显,但其诱导机制复杂多样,各机制间的关系尚不明确,导致目前该模型的实际运用存在局限性。本文就D-半乳糖的体内代谢和诱导脑老化的各种机制,以及机制间的联系作一综述,旨在为该模型的运用发展和脑衰老的深入研究提供参考。

【关键词】 脑老化;D-半乳糖;模型机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0104-07

Research progress on the mechanism of D-galactose-induced brain aging model

ZHU Ziyue¹, JIN Meiling¹, XU Xiangyue², LIU Qing², ZHU Jiaxue¹, FU Mingjun¹, LEI Xia^{2*}, ZHANG Ning^{3*}

(1. College of Basical Medical Science, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China.

2. Wuxi Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Wuxi 214071.

3. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

【Abstract】 As a normal physiological substance, D-galactose can induce a process similar to natural brain aging *in vivo* and *in vitro* when administered excessively, and thus it is widely used to induce brain aging models in China and abroad. The model of brain failure induced by D-galactose has the advantages of a short modeling time, low cost, and significant effect. However, the induction mechanisms are complex and diverse, and the relationships between the mechanisms are unclear, which limit the practical applications of the model. This article reviews the *in vivo* metabolism of D-galactose and the various mechanisms involved in the induction of brain aging, as well as the links between the mechanisms, to provide a reference for the application and development of this model and the in-depth study of brain aging.

【Keywords】 brain aging; D-galactose; model mechanism

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

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(82174007);无锡市卫生健康委中青年拔尖人才资助计划(BJ2023072);无锡市卫生健康委科研项目(M202206)。

【作者简介】朱紫悦(1998—),女,硕士研究生,研究方向:滋肾阴、清虚热中药抗神经炎症机制研究。E-mail:1597508758@qq.com

【通信作者】雷霞(1982—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:滋阴清热中药性味理论研究。E-mail:leixia2006@163.com

张宁(1974—),男,教授,博士生导师,研究方向:中药抗阿尔茨海默病的药效物质及机制研究。

E-mail:zhangning0454@163.com * 共同通信作者

世界人口正在日益老龄化,全球生育率的下降和预期寿命的显著增加,使与年龄相关的退行性疾病已成为社会关注的前沿^[1-2]。脑老化是指从亚细胞到组织器官水平的一系列形态、结构的退行性变化,包括大脑体积减少、皮质变薄、白质退化等形态学特征和神经元细胞萎缩、树突变性、脱髓鞘等病理生理特征,最终伴随记忆丧失等认知缺陷和精神行为异常,成为推动神经退行性疾病的重要因素,也是社会老龄化负担的主要原因,因此,对脑老化的深入研究十分迫切^[3]。

动物模型是探索疾病的重要手段,其中脑老化相关的人工加速衰老模型因耗时短、易重复等优点在研究中更为常用^[4]。快速老化 SAMP8 系小鼠表现为记忆减退、淀粉样 β 前体蛋白 (amyloid beta precursor protein, APP) 代谢异常、神经元退化等,其饲养周期短,但价格昂贵,繁殖力弱来源较少;单侧/双侧海马区注射 β 淀粉样蛋白 (amyloid beta protein, A β) 片段模型表现为学习困难、A β 斑块周围星形胶质细胞增生、神经炎症等,造模周期短且成功率高,但诱发因素单一,对脑组织具有穿透性损伤;APP/PS1 双转基因模型表现为认知障碍、早期淀粉样斑块和突触损失等,但基因表达不稳定,造价高,未能完全观察到 Tau 蛋白过度磷酸化^[5-7]。D-半乳糖诱导模型是国内外应用较广泛的模型之一,能观察到认知记忆缺陷的行为学表现和胆碱能神经元减少、A β 免疫反应物聚集等病理特征,肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-1 β (interleukin, IL-1 β) 等炎症因子、自由基和 8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxyguanosine) 等衰老标志物水平的增高,是行之有效的脑老化模型^[8-10]。D-半乳糖诱导脑衰模型具有广泛性和多样性,且构建简便易行,价格低廉,性价比高,具有极大研究开发的潜能^[11]。

过量 D-半乳糖能降低脑组织的氧化酶活性,形成更多损害神经细胞的活性氧 (reactive oxygen species, ROS),其氧化应激效应已成为公认的主要机制,此外线粒体功能障碍、自噬、神经炎症和凋亡等也被证实与 D-半乳糖的作用相关^[2]。D-半乳糖诱发脑老化的机制是构建和研究模型的基础,目前已有大量关于其造模机制的研究,但结果繁杂,各机制之间的关系不甚明确,散乱且不成体系的机制理论也给模型使用者带来混淆和困扰。本文梳理了以往对 D-半乳糖致脑老化模型的研究,对 D-半

乳糖在体内的正常和异常代谢及其脑老化模型的构建机制进行总结,并讨论机制间的连接关系,以期为该模型今后的发展运用和脑老化相关疾病的研究奠定基础。

1 D-半乳糖的代谢和损害

D-半乳糖是一种还原的小分子醛己糖,和 D-葡萄糖互为同分异构体,存在于许多食物中,主要来源是哺乳动物乳汁中的乳糖^[4,7]。半乳糖推荐的正常最大日摄入量为 50 g,其中大部分在摄入后约 8 h 内从体内代谢排出,血液中 D-半乳糖的正常浓度低于 10 mg/dL^[2]。

摄入的 D-半乳糖被钠依赖性葡萄糖共转运蛋白 1 型 (sodium-glucose cotransporter-1, SGLT-1) 运输到细胞中,再通过葡萄糖转运蛋白 2 型 (glucose transporters-2, GLUT-2) 进入血液,被半乳糖激酶和 1-磷酸半乳糖尿苷转移酶代谢成葡萄糖,并进入糖酵解途径或作为糖原储存在肝、肌肉和脂肪组织中,也可通过葡萄糖转运蛋白 1 型 (glucose transporters-1, GLUT-1) 穿过血脑屏障摄取到大脑中^[2]。

D-半乳糖过量时,会被醛糖还原酶催化成不易被细胞分解的半乳糖醇,影响正常渗透压,引起如细胞肿胀、代谢紊乱,消耗并破坏机体抗氧化防御系统^[12]。另外,大量堆积的半乳糖也可被半乳糖氧化酶 (galactose, GOA) 氧化成乙醛糖和过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂),生成多种活性氧自由基,导致细胞的线粒体功能障碍、氧化应激、炎症和凋亡^[2,7]。鉴于半乳糖的代谢特点,可通过注射大量 D-半乳糖造成动物糖代谢异常,从而建立具有特殊研究目的的动物模型。

2 D-半乳糖诱导脑老化模型的机制

2.1 氧化应激损伤

D-半乳糖浓度升高时,GOA 为将其氧化成 H₂O₂,使超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 减少;增加的 H₂O₂ 与还原形式的 Fe 反应形成 OH⁻,H₂O₂ 和 OH⁻ 与其他 ROS 共同导致细胞膜脂质过氧化,损害氧化还原稳态。胺与 D-半乳糖反应形成不稳定的席夫碱 (Schiff's base) 产物,几天内生成更稳定的 Amadori 产物,并在数月或数年内不可逆地转化为晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs)。AGEs 与其受体

(receptor for advanced end glycation products, RAGE) 结合, 增加烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (triphosphopyridine nucleotide, NADPH) 氧化酶和 ROS, 导致神经元损伤和认知功能障碍。同时, 累积的半乳糖醇形成渗透应激, 使线粒体的电子传递链 (electron transfer chain, ETC) 活性降低, ROS 增加^[2,13]。还有研究发现, 苯二氮卓受体可能是控制线粒体呼吸以防 ROS 损伤的一部分机制, D-半乳糖可以通过降低苯二氮卓受体影响大脑皮层线粒体抗氧化能力^[2]。激活核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 作为维持氧化稳态的主要调节因子, 介导了 II 期酶 HO-1 的表达, 该酶提高了抗氧化和受保护细胞免受氧化损伤的能力, D-半乳糖可通过下调 Nrf2 和 HO-1 的表达水平来抑制其抗氧化功能^[14]。实验研究中常用氧化应激相关酶的活性作为测定指标, 如 SOD、GSH-Px、CAT、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、氧化型谷胱甘肽 (glutathione oxidized, GSSG) 和过氧化脂质 (lipid peroxidation, LPO) 以及谷胱甘肽巯基转移酶等^[2,15]。

2.2 线粒体功能障碍

D-半乳糖能诱发线粒体结构损伤, 使海马神经元线粒体肿胀、破碎及嵴断裂和缩小, 线粒体长度和面积减少^[16-17]。D-半乳糖产生的 ROS 导致线粒体 Ca^{2+} 超载, 线粒体膜电位下降, 膜中基质的电子密度也大面积降低, 部分膜溶解。D-半乳糖可降低线粒体 ATP 表达, 使细胞能量代谢不足。D-半乳糖能降低三羧酸循环酶水平, 脑线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 突变积累也可被 D-半乳糖诱发, 可能是 D-半乳糖通过减少 DNA 修复酶以及通过 NOC 依赖性途径进行的; D-半乳糖产生的 ROS 也可诱导 mtDNA 的突变, 从而抑制 mtDNA 的转录和翻译^[2,18-19]。

新的线粒体产生依赖于线粒体的生物发生, 其中 PGC-1 α -NRF1-TFAM 信号通路是调节线粒体生物发生的关键, 而 D-半乳糖能降低海马组织中的过氧化物酶体增殖受体 γ 共激活因子 α (peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator- α , PGC-1 α), 进而阻碍线粒体的新生和稳态^[20]。D-半乳糖也可以影响线粒体动力学的两种代表性蛋白, 提高促分裂的动力蛋白相关蛋白 1 (dynammin-related protein 1, DRP1) 和促融合的线粒体融合蛋白 2

(mitochondrial fusion protein, MFN2) 在海马组织中的表达水平, 使线粒体分裂融合增加^[21]。D-半乳糖诱导的线粒体生物发生和动力学异常, 导致线粒体损伤和功能障碍。

2.3 细胞自噬抑制

D-半乳糖在海马组织中能诱导自噬抑制, 使自噬体的形成减少, 自噬标志物水平异常, 其中自噬起始物微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3 (light chain 3, LC3) 及其衍生物 LC3 II/I、自噬相关蛋白 ATG3、ATG5、ATG7、BECN1 含量降低, 自噬降解底物 p62 增加^[1,21-22]。沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 能调控自噬降解, 哺乳动物雷帕霉素靶标 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 则能抑制自噬信号通路, D-半乳糖可以诱导 SIRT1 蛋白表达降低和 mTOR 表达水平升高; D-半乳糖还能使在自噬调节中充当自噬主要抑制因子的 p53 水平升高, 从而抑制自噬功能^[23]。当自噬发生时, LC3a 被酯化成 LC3b, p62 可以与 LC3b 结合并被泛素化的蛋白质降解。D-半乳糖诱导后 LC3b/a 和 p62 的表达随着溶酶体功能蛋白的降低而提高, 表明大量错误折叠蛋白质和衰老线粒体启动自噬过的同时, 由于溶酶体功能损害, p62 不能及时被消化, 次生溶酶体不能被分解而积累。D-半乳糖除了改变自噬指标, 还能降低溶酶体功能蛋白转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 和溶酶体相关膜蛋白 2 (lysosome-associated membrane protein-2, LAMP2) 的表达, 通过影响溶酶体功能进而阻滞自噬通量^[16]。

2.4 脑细胞衰老和凋亡

p53、p21 和 p16ink4 α 蛋白是影响细胞周期的关键因素, 激活 p53 基因, 可促进下游 p21 基因的表达, 降低细胞周期蛋白依赖性激酶复合物的活性, 阻断细胞周期; p16ink4 α 负调节细胞周期蛋白 (cyclin-dependent kinases 4, CDK4) 的活性, 阻断 DNA 复制, 导致细胞周期停滞。D-半乳糖的持续积累可以提高 p53、p21 和 p16ink4 α 水平, 降低 CDK4, 进而诱导细胞衰老^[1,24]。D-半乳糖可诱导海马神经元的凋亡, 并能导致细胞凋亡标志性蛋白的表达异常, 如抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平下降及促凋亡蛋白 Bax 和半胱天冬酶-3 (caspase-3) 的水平升高^[25-26]。D-半乳糖可通过内外两种途径致细胞凋亡: 外在死亡受体途径通过 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 直接激活效应半胱天冬

酶,并与线粒体的内在凋亡途径汇合;内在激活 p-JNK 并增强细胞色素 c (cytochrome c, Cyt c) 的水平,刺激 caspase-3、caspase-9 和裂解的聚 ADP 核糖聚合酶 (poly(ADP-ribose) polymerase, PARP-1) 的活化,诱导细胞凋亡^[2]。miR-34a mRNA 在调节细胞衰老中至关重要,并在衰老大脑中表达激活,D-半乳糖也可以升高 miR-34a 水平,通过其介导的衰老负调节因子 SIRT1 的下调诱导脑衰,也可以通过 miR-34a 的重要靶标 Bcl-2 的降低诱导细胞凋亡^[23]。

2.5 炎症信号激活

D-半乳糖可以通过 Ras 和氧化还原敏感信号通路激活转录因子 NF- κ B; Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 可促进 NF- κ B 释放,TLR4/NF- κ B 通路被激活时,会促进炎症因子的大量释放,而核蛋白相关受体 1 (nuclear receptor related 1, Nurr1) 通过置换核因子活化 NF- κ B 从而抑制炎症因子的产生,D-半乳糖能降低脑部区 Nurr1 水平,激活 TLR4/NF- κ B 信号通路导致炎症产生^[27]。髓系分化原发性应答基因 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 是 Toll 样和白细胞介素受体募集的衔接蛋白,以 MyD88 依赖性途径的形式能被所有 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 激活,从而去活化 NF- κ B; 组蛋白去乙酰化酶 3 (histone deacetylase 3, HDAC3) 是长期记忆形成的关键负调节因子,HDAC3 能通过脱乙酰影响 NF- κ B p65 途径的激活^[28-29]。D-半乳糖能联合 AlCl₃, 显著提高 MyD88、TRAF6、HDAC3、NF- κ B 的表达及其诱导的神经炎症。

2.6 神经物质代谢异常

与年龄相关的神经退行性疾病的学习和记忆缺陷与胆碱能下降有关,D-半乳糖能使乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 活性显著增加,乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 水平降低;单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 可降解单胺类神经递质,减弱记忆能力,D-半乳糖可使被认为是脑老化标志的 MAO-B 水平升高^[30]。D-半乳糖能使去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 的代谢产物 3-甲氨基-4-羟基苯乙二醇 (3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, MHPG) 和 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 的代谢产物 5-羟基吲哚乙酸 (5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA) 的水平明显下降,提示 D-半乳糖可能影响单胺能系统功能。D-半乳糖可以使黑质内生

成多巴胺 (dopamine, DA) 的限速酶酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 阳性细胞数量下降,减少多巴胺能神经元^[31]。

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是认知功能以及神经元生长和存活的重要因素,在 D-半乳糖处理的小鼠中被发现减少^[31-32]。突触后密度蛋白 95 调控突触连接,在突触结构和信号传递以及突触可塑性中发挥重要作用,D-半乳糖能明显降低大鼠海马中突触后密度蛋白 95 的 mRNA 和蛋白表达^[33]。D-半乳糖干预可造成海马 CA1 区树突棘密度降低,突触数量减少,突触相关蛋白表达下降,Tau 蛋白过度磷酸化水平升高,A β 蛋白沉积^[8,34-35]。

2.7 机制间的联系

张熙等^[7]发现 D-半乳糖大鼠的组织器官中存在过量 ROS,最早提出自由基致衰老学说,认为 D-半乳糖活性氧应激效应态是拟衰老和脑老化的启动因子,这一学说机制得到普遍公认。D-半乳糖诱导亚细胞水平的氧化应激时,脑线粒体是最容易被损伤的部位,大量 ROS 导致蛋白质错误折叠,线粒体膜电位降低、呼吸链损伤、mtDNA 突变积累,这些变化诱导更多的 ROS 产生,从而形成 ROS 和线粒体损伤的恶性循环。ROS 诱导的线粒体功能障碍被认为是加速大脑衰老的主要机制^[1-2,36]。自噬能及时清理损伤的线粒体以维持其动态平衡^[37],D-半乳糖本身可作为自噬的抑制因子,也可通过降低溶酶体功能来削弱自噬,从而阻断线粒体稳态的恢复,进一步恶化线粒体障碍^[22]。

D-半乳糖诱发的氧化应激和炎症之间存在许多信号分子和通路的连接,任一种机制的传播都可能导致另一种机制的恶化或激活,它们的自我强化循环会使脑细胞内外环境失衡,进一步加速衰老^[38]。氧化应激也可以激活细胞外死亡受体凋亡途径,或者让脂质过氧化产物进入线粒体介导的细胞凋亡途径,致线粒体损伤,释放 Cyt c 入胞质,形成凋亡体^[13]。D-半乳糖可以破坏脑组织细胞的结构,也可通过诱发的其他认知障碍机制,如影响神经递质和神经因子以及特异性病理产物的水平,从而产生协同破坏作用,共同推动 D-半乳糖致脑老化的结果^[39-41]。

3 D-半乳糖诱导脑老化模型的运用和局限性

3.1 模型的应用与优势

D-半乳糖模型最早在国外应用于白内障研究,

1985 年我国学者徐黻本^[42]首次在延缓衰老药物疗效实验中使用 D-半乳糖模型作为衰老模型。D-半乳糖可以诱导出记忆巩固与再现障碍、细胞退行病变、基因表达与调控功能异常、寿命缩短等全身衰老表现,而大脑因其高耗氧耗能导致的损伤敏感性,成为衰老的“重灾区”^[43-44]。D-半乳糖模型能在表观行为、脑组织病理和生化分子方面成功模拟出脑老化的状态,其致衰老的启动机制氧化应激易发生在能量代谢最活跃的脑部,累积的 ROS 损伤线粒体,进一步可抑制自噬清除,使脑细胞亚生理活动首当其冲受到 D-半乳糖的影响,持续的氧化应激加重神经炎症,诱发凋亡衰老,破坏脑部形态功能。D-半乳糖对各种衰老机制都能产生作用,各机制间也并非独立运行,而是相互联系、协同加速衰老的进程,这种机制联合体现出神经退行性疾病多因素致病的特点,且在神经退行性疾病尤其是阿尔茨海默病的模型构建中,得到特别青睐。

由于脑老化疾病的复杂性和多样性,近年来衍生出以 D-半乳糖诱导的脑老化模型为基础,配合具有目标疾病神经毒性的药物共同制备的复合式造模法,如 D-半乳糖联合 A β 类寡聚体、D-半乳糖联合 AlCl₃ 及 D-半乳糖联合 NaNO₂ 制备的 AD 模型^[8]。另外,除了体内的动物实验外,D-半乳糖还能用于体外细胞的加速衰老模型^[45]。重要的是,利用该模型探索的治疗方法或干预措施可以转化为临床应用。研究人员在 D-半乳糖模型中观察到低水平激光治疗的效果后,发现该疗法可能会恢复 ATP 以延缓衰老人类的认知能力下降;在 D-半乳糖模型中起抗衰老作用的花青素,也已被证实可以改善老年人的认知行为和大脑功能^[46-48]。此模型的大量研究和实践已充分说明其可行性,以及作为加速脑衰模型的优势和广阔前景。

3.2 模型的局限性

一些研究提出质疑,表示对 1 月龄的 Wistar 大鼠腹腔内注射 300 mg/kg 的 D-半乳糖 8 周没有发现影响焦虑水平、空间学习、记忆和神经发生^[49]。有的研究指出 D-半乳糖诱导的衰老与啮齿动物中天然发生的衰老并不完全一致,建议 D-半乳糖更适合诱导多囊卵巢综合征(PCOS)而不是衰老;D-半乳糖模型鼠虽然某些指标接近自然衰老,但免疫、行为等方面存在较大差异,用于氧化损伤研究尚可,不能完全反映真实衰老情况^[50-51]。

这与 D-半乳糖模型的研究自发于各个领域的

独立团队有关,各实验室在实验设置上存在差异,关于动物的品系、年龄以及注射剂量、方式和时间间隔尚未达成共识,造模过程缺乏标准化,研究结果质量也参差不齐,有些缺少降低偏移风险的报告^[52]。但 D-半乳糖致衰老的公认机制是通过氧化应激的扳机产生机体损伤,而加速衰老是指衰老表现的表现早于实际年龄,并且是由累积的适应不良和以氧化应激和慢性炎症为特征的病理引起的,因此 D-半乳糖用于模拟衰老早期反应是被认可且理想的^[38]。已有的大量结果证明,D-半乳糖是能够通过氧化损伤进一步导致后续老化病程的,各实验室造模得到的老化结果不一,并不能完全否认 D-半乳糖致衰老的最终效果,至于这种继发或原发(尚未了解的 D-半乳糖效应)于 D-半乳糖诱导形成的全方位多因素衰老模型,要如何准确稳定的制备出来,则需要进一步的探索和完善。

4 总结

综上,D-半乳糖的过量摄入可用作诱发脑老化的加速衰老模型,氧化应激作为 D-半乳糖启动衰老的机制,可进一步通过 ROS 加重线粒体障碍和抑制自噬,造成代谢紊乱,并继续协同脑细胞凋亡和炎症、神经功能障碍等模拟脑衰进展。D-半乳糖诱导早期脑老化的研究已得到广泛研究认可,其对后续衰老进程的影响则仍需深入探索。

参考文献:

- [1] ZHANG J J, HU R Y, CHEN K C, et al. 20 (S)-protopanaxatriol inhibited D-galactose-induced brain aging in mice via promoting mitochondrial autophagy flow [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(7): 2827-2840.
- [2] SHWE T, PRATCHAYASAKUL W, CHATTIPAKORN N, et al. Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions [J]. *Exp Gerontol*, 2018, 101: 13-36.
- [3] BLINKOUSKAYA Y, CAÇOILLO A, GOLLAMUDI T, et al. Brain aging mechanisms with mechanical manifestations [J]. *Mech Ageing Dev*, 2021, 200: 111575.
- [4] AZMAN K F, ZAKARIA R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(6): 763-782.
- [5] 孙孟艳, 秦合伟, 李彦杰, 等. 基于中西医临床病证特征的轻度认知障碍动物模型分析 [J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(2): 119-124.
SUN M Y, QIN H W, LI Y J, et al. Animal models of mild cognitive impairment based on the characteristics of clinical conditions in TCM and western medicine [J]. *Pharmacol Clin*

- Chin Mater Med, 2024, 40(2): 119-124.
- [6] CHINTAPALUDI S R, UYAR A, JACKSON H M, et al. Staging Alzheimer's disease in the brain and retina of B6. APP/PS1 mice by transcriptional profiling [J]. J Alzheimers Dis, 2020, 73(4): 1421-1434.
- [7] 张熙, 李文彬, 张炳烈. D-半乳糖急性中毒大鼠拟衰老生化改变 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1990, 4(4): 309-310.
- ZHANG X, LI W B, ZHANG B L. Biochemical changes of D-galactose subacute poisoning rats in mimetic senescence [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 1990, 4(4): 309-310.
- [8] 魏玉婷, 朱田田, 苏茉莉, 等. D-半乳糖法制备 AD 动物模型的综合总结与初步评价 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 846-856.
- WEI Y T, ZHU T T, SU M L, et al. Classification and research progress on animal models of Alzheimer's disease prepared by D-galactose [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 846-856.
- [9] 吴媛媛, 尹晓晨, 李梓民, 等. D-半乳糖衰老模型致衰特征及衰老标志物的研究 [J]. 中国热带医学, 2018, 18(7): 682-686.
- WU Y N, YIN X C, LI Z M, et al. Decay characteristics and aging markers of D-galactose induced aging model [J]. China Trop Med, 2018, 18(7): 682-686.
- [10] 刘建亚, 冯文静, 王仁萍, 等. D-半乳糖致衰老动物模型及其机制研究进展 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(3): 224-227.
- LIU J Y, FENG W J, WANG R P, et al. Research progress in D-galactose-induced aging animal model and its mechanisms [J]. Chin J Mult Organ Dis Elder, 2018, 17(3): 224-227.
- [11] 洪晶, 张娅俐, 闫莎莎, 等. D-半乳糖诱导衰老小鼠模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 136-142.
- HONG J, ZHANG Y L, YAN S S, et al. Research progress of the D-galactose-induced aging mouse model [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 136-142.
- [12] 陆盈盈, 高良才, 袁崇刚. D-半乳糖致老年性痴呆模型的评价和海马脑区甘丙肽表达研究 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2007, 14(4): 191-193, 200, II.
- LU Y Y, GAO L C, YUAN C G. Evaluation on alzheimer-like disease model induced by D-galactose and expression of galanin in the hippocampus [J]. Chin J Neuroimmunol Neurol, 2007, 14(4): 191-193, 200, II.
- [13] KUDRYAVTSEVA A V, KRASNOV G S, DMITRIEV A A, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 44879-44905.
- [14] 申屠路媚, 牟艳玲. 线粒体功能障碍机制及其相关疾病研究进展 [J]. 生命科学, 2018, 30(1): 87-93.
- SHENTU L M, MOU Y L. Research progress in mitochondrial dysfunction and its related diseases [J]. Chin Bull Life Sci, 2018, 30(1): 87-93.
- [15] 朱亚珍, 朱虹光. D-半乳糖致衰老动物模型的建立及其检测方法 [J]. 复旦学报(医学版), 2007, 34(4): 617-619.
- ZHU Y Z, ZHU H G. Establishment and measurement of D-galactose induced aging model [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2007, 34(4): 617-619.
- [16] ZHANG J J, CHEN K C, ZHOU Y, et al. Evaluating the effects of mitochondrial autophagy flux on ginsenoside Rg2 for delaying D-galactose induced brain aging in mice [J]. Phytomedicine, 2022, 104: 154341.
- [17] CHEN Y, YANG C, ZOU M, et al. Inhibiting mitochondrial inflammation through Drp1/HK1/NLRP3 pathway: a mechanism of alpinetin attenuated aging-associated cognitive impairment [J]. Phytother Res, 2023, 37(6): 2454-2471.
- [18] 杨梅桂, 郑凯, 宋质银. 线粒体-内质网相互作用机制、功能及其与相关疾病的关系研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2020, 37(10): 996-1001.
- YANG M G, ZHENG K, SONG Z Y. Research progress on the mechanism and function of mitochondrial-endoplasmic reticulum interaction and its relationship with related diseases [J]. J Xixiang Med Univ, 2020, 37(10): 996-1001.
- [19] MANCZAK M, JUNG Y, PARK B S, et al. Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging [J]. J Neurochem, 2005, 92(3): 494-504.
- [20] 何丽玲. 补肾养心化痰安神法防治健忘的理论探讨及强记汤对认知障碍模型小鼠线粒体功能的影响 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2023.
- HE L L. Theoretical discussion on the prevention and treatment of amnesia by tonifying kidney, nourishing heart, resolving phlegm and tranquilizing mind and the effect of Qiangji decoction on mitochondrial function in cognitive impairment model mice [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2023.
- [21] KOU X, LI J, LIU X, et al. Swimming attenuates d-galactose-induced brain aging via suppressing miR-34a-mediated autophagy impairment and abnormal mitochondrial dynamics [J]. J Appl Physiol, 2017, 122(6): 1462-1469.
- [22] WONG S Q, KUMAR A V, MILLS J, et al. Autophagy in aging and longevity [J]. Hum Genet, 2020, 139(3): 277-290.
- [23] CHEN P, CHEN F, LEI J, et al. Activation of the miR-34a-mediated SIRT1/mTOR signaling pathway by urolithin a attenuates D-Galactose-induced brain aging in mice [J]. Neurotherapeutics, 2019, 16(4): 1269-1282.
- [24] HOU Y, DAN X, BABBAR M, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease [J]. Nat Rev Neurol, 2019, 15(10): 565-581.
- [25] LOU Q, MENG X E, WEI C, et al. Jian-Yan-Ling capsules ameliorate cognitive impairment in mice with D-galactose-induced senescence and inhibit the oxidation-induced apoptosis of HT22 hippocampal cells by regulating the Nrf2-HO1 signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 310: 116356.
- [26] 董会萍. D-半乳糖衰老模型建立及模型小鼠认知功能障碍的研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2008.
- DONG H P. Establishment of aging model of D-galactose and study on cognitive dysfunction of model mice [D]. Dalian:

- Dalian University of Technology, 2008.
- [27] 代世嗣. Nurr1 调控 TLR4/NF- κ B 信号通路对衰老相关慢性炎症及多巴胺能神经元的作用及机制研究 [D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2023.
- DAI S S. The effect and mechanism of Nurr1 on aging-related chronic inflammation and dopaminergic neurons by regulating TLR4/NF- κ B signaling pathway [D]. Guiyang: Guizhou Medical University, 2023.
- [28] SONG X, ZHAO Z, ZHAO Y, et al. Protective effects of *Bacillus coagulans* JA845 against D-galactose/ AlCl_3 -induced cognitive decline, oxidative stress and neuroinflammation [J]. J Microbiol Biotechnol, 2022, 32(2): 212-219.
- [29] YU X, YU W, WU L, et al. Chitrosidase attenuates brain inflammation via HDAC3/NF- κ B pathway in D-galactose and aluminum-induced rat model with cognitive impairments [J]. Neurosci Res, 2021, 172: 73-79.
- [30] 金红. 山茱萸多糖对 D-半乳糖致衰老大鼠脑老化及 NGFmRNA 表达影响的实验研究 [D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2009.
- JIN H. Experimental study on the effect of *Cornus officinalis* polysaccharide on brain aging and NGFmRNA expression in D-galactose-induced aging rats [D]. Jiamusi: Jiamusi University, 2009.
- [31] 武燕, 张弘, 布仁, 等. 肉苁蓉多糖对 D-半乳糖所致急性衰老模型保护作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(7): 927-933.
- WU Y, ZHANG H, BU R, et al. *In vivo* and *in vitro* studies of protective effect of CDPS on acute aging mouse model induced by D-galactose [J]. Chin Pharmacol Bull, 2017, 33(7): 927-933.
- [32] 桑旭星. 远志寡糖酯改善实验性痴呆小鼠学习记忆能力及神经保护作用的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- SANG X X. Study on the improvement of learning and memory ability and neuroprotective effect of polygala tenuifolia oligosaccharide ester in experimental dementia mice [D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [33] 杨雅竹, 杜鹃, 屈海峰, 等. 人参皂苷 Rg1 对 D-半乳糖诱导脑老化小鼠学习记忆功能的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(28): 4487-4493.
- YANG Y Z, DU J, QU H F, et al. Effect of ginsenoside Rg1 on learning and memory ability of brain aging mice induced by D-galactose [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2023, 27(28): 4487-4493.
- [34] 陈宇园. 火麻仁提取液对 D-半乳糖致衰老大鼠空间学习和记忆的干预作用及其机制研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- CHEN N Y. Intervention effect of hemp seed extract on spatial learning and memory of aging rats induced by D-galactose and its mechanism [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2017.
- [35] 杨娟. 石菖蒲对 D-半乳糖诱导 AD 模型小鼠认知障碍的影响及机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2023.
- Yang J. Study on the effect and mechanism of *Acorus tatarinowii* Schott on cognitive impairment in AD model mice induced by D-galactose [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [36] WANG C H, WU S B, WU Y T, et al. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging [J]. Exp Biol Med, 2013, 238(5): 450-460.
- [37] TAN J X, FINKEL T. Lysosomes in senescence and aging [J]. EMBO Rep, 2023, 24(11): e57265.
- [38] ROSS K S, SMITH C. D-galactose: a model of accelerated ageing sufficiently sensitive to reflect preventative efficacy of an antioxidant treatment [J]. Biogerontology, 2020, 21(6): 745-761.
- [39] HOU J Y, XU H, CAO G Z, et al. Multi-omics reveals Dengzhan Shengmai formulation ameliorates cognitive impairments in D-galactose-induced aging mouse model by regulating CXCL12/CXCR4 and gut microbiota [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1175970.
- [40] 郑清, 孔立红, 余超超, 等. 电针对 D-半乳糖诱导的阿尔茨海默病大鼠认知功能及海马神经元自噬的影响 [J]. 针刺研究, 2020, 45(9): 689-695.
- ZHENG Q, KONG L H, YU C C, et al. Effects of electroacupuncture on cognitive function and neuronal autophagy in rats with D-galactose induced Alzheimer's disease [J]. Acupunct Res, 2020, 45(9): 689-695.
- [41] KRZYSZTOFORSKA K, PIECHAL A, BLECHARZ-KLIN K, et al. Administration of protocatechuic acid affects memory and restores hippocampal and cortical serotonin turnover in rat model of oral D-galactose-induced memory impairment [J]. Behav Brain Res, 2019, 368: 111896.
- [42] 徐馥本. D-半乳糖的亚急性毒性. 第二届国际衰老研究会议 [R]. 哈尔滨, 1985.
- XU F B. Subacute toxicity of D-galactose. The second international conference on aging research [R]. Harbin, 1985.
- [43] RAPPE A, MCWILLIAMS T G. Mitophagy in the aging nervous system [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 978142.
- [44] 赵凡凡, 周玉枝, 高丽, 等. D-半乳糖致衰老大鼠模型的研究进展 [J]. 药理学报, 2017, 52(3): 347-354.
- ZHAO F F, ZHOU Y Z, GAO L, et al. Advances in the study of the rat model of aging induced by D-galactose [J]. China Ind Econ, 2017, 52(3): 347-354.
- [45] XUE A, ZHAO D, ZHAO C, et al. Study on the neuroprotective effect of Zhimu-Huangbo extract on mitochondrial dysfunction in HT22 cells induced by D-galactose by promoting mitochondrial autophagy [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(Pt B): 117012.
- [46] ROSLI H, SHAHAR S, RAJAB N F, et al. The effects of polyphenols-rich tropical fruit juice on cognitive function and metabolomics profile-a randomized controlled trial in middle-aged women [J]. Nutr Neurosci, 2022, 25(8): 1577-1593.

李佳,余守洋,罗天元,等. 内侧前额叶皮质各层结构在全身麻醉作用机制中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (10): 111-117.

Li J, Yu SY, Luo TY, et al. Research progress in the role of the medial prefrontal cortex layered structure in general anesthesia [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34 (10): 111-117.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.014

内侧前额叶皮质各层结构在全身麻醉作用机制中的研究进展

李 佳^{1,2}, 余守洋², 罗天元^{1,2*}, 喻 田^{2*}

(1. 遵义医科大学附属医院麻醉科, 贵州 遵义 563000;
2. 贵州省麻醉与器官保护基础研究重点实验室, 贵州 遵义 563000)

【摘要】 内侧前额叶皮质参与了各种高级脑功能,包括注意力、意识转换和信息整合,被认为既是自下而上逐层传递信息模式的终点,又是从上至下整合信息传递的起点,可能是全身麻醉药发挥意识调控作用的核心区域。内侧前额叶皮质在垂直方向上可以分为6层,层与层之间在结构上具有丰富的环路连接,每一层都有着独特的功能。在本综述中,首先描述了内侧前额叶皮质的分层结构,其次,讨论了内侧前额叶皮质各层结构在全身麻醉中的作用。为此,本文回顾了啮齿类动物、灵长类动物和人类的内侧前额叶皮质分层与麻醉的相关研究,以期能为深入了解内侧前额叶皮质在全身麻醉中的作用机制提供一定的参考。

【关键词】 内侧前额叶皮质; 分层结构; 全身麻醉; 意识

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0111-07

Research progress in the role of the medial prefrontal cortex layered structure in general anesthesia

LI Jia^{1,2}, YU Shouyang², LUO Tianyuan^{1,2*}, YU Tian^{2*}

(1. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China.

2. Key Laboratory of Anesthesia and Organ Protection of Guizhou Province, Zunyi 563000)

【Abstract】 The medial prefrontal cortex engages in various higher brain functions, including attention, transition of consciousness, and information integration, and is the central structure for the action of general anesthetics. In addition, it is considered both the end point for the bottom-up model of the layer-by-layer transmission of information and the starting point for the top-down modulation and integration of information. Classically, the medial prefrontal cortex can be divided into six layers of different functions in the vertical direction, and there are rich neural connections among the layers. In this review, we describe the laminar flow structures found in the medial prefrontal cortex, then discuss how general anesthetics change consciousness via the cortical laminar flow structures. To this aim, the article reviews the available evidence from current studies using rodents, primates, and human subjects that highlight the role of the medial prefrontal cortex in anesthesia.

【基金项目】 国家自然科学基金(82060653); 遵义医科大学名医计划(20211022)。

【作者简介】 李佳(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 全身麻醉作用机制。E-mail: 969148750@qq.com

【通信作者】 罗天元(1987—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 全身麻醉作用机制。E-mail: 407542949@qq.com

喻田(1957—), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 全身麻醉作用机制。E-mail: zyyutian@126.com * 共同通信作者

【Keywords】 medial prefrontal cortex; laminar structure; general anesthesia; consciousness

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

全身麻醉药 (general anesthetics), 简称全麻药, 运用于临床已逾百年, 极大地促进了医学事业的发展, 其最大的特点是导致意识的可逆性消失。目前认为全麻药导致意识消失的具体作用机制主要源于两种作用模式: 一是 Bottom-up 模式, 该模式认为全麻药作用于皮质下 (subcortex) 睡眠-觉醒网络, 抑制信息的向上传导而导致意识水平下降; 二是 Top-down 模式, 该模式认为全麻药作用于丘脑 (thalamus, TH)-皮质 (cortex) 和皮质-皮质环路, 干扰信息的整合处理, 阻断意识内容的形成^[1]。而皮质既是自下而上逐层传递信息模式的终点, 又是自上至下整合信息模式的起点, 可能是全麻药作用的核心区域。

在所有皮质区域中, 前额叶皮质 (prefrontal cortex, PFC) 是尤为重要的意识相关结构。其结构最为复杂, 不仅与皮质以及皮质下区域具有广泛的纤维连接, 而且内部区域也存在着丰富的局部环路^[2-3], 这些错综复杂的神经纤维联系是整合处理来自皮质区域和皮质下区域众多信息的结构基础^[4]。内侧前额叶皮质 (medial prefrontal cortex, mPFC) 是前额叶皮质的主要亚区, 具有根据大脑目标统筹思想和行动的能力, 可以通俗理解为在面对众多选项干扰时, mPFC 具备支持单个活动持续进行的能力^[4], 这是意识形成的基础点。Pal 等^[5] 使用七氟烷持续麻醉大鼠 75 min 后, 通过在 mPFC 区域注射胆碱能激动剂, 激活该区域的胆碱能系统, 可以使大鼠直接从麻醉状态转变为清醒状态, 而在顶叶皮质区域注射胆碱能激动剂并不能够唤醒麻醉状态下的大鼠。2021 年的一项研究发现, 利用河豚毒素损害大鼠的 mPFC 后, 使用七氟烷麻醉大鼠, 所需的翻正反射消失时间显著缩短, 即加速了七氟烷的麻醉诱导, 同时增加了翻正反射恢复所需时间, 即延缓了七氟烷的麻醉苏醒^[6]。此外, 缺血缺氧性脑损伤患者的弥散张量纤维束成像结果表明, mPFC 受损程度越重, 患者的意识水平越低^[7]。而在小鼠缺血性脑卒中致 mPFC 损伤的模型中, 经鼻内外源性线粒体治疗减轻 mPFC 的损伤程度后, 小鼠的意识水平得到显著改善^[8]。由此可见, mPFC 的功能涵盖了意识形成, 参与了麻醉过程, 是目前神经科学研究意识过程的重点区域。

皮质具有特定的分层结构, 不同分层在解剖和

功能上都具有独特的特点。目前, 全麻机制领域的研究已经进展到解析特定分层结构以及不同层次之间相互联系阶段。

1 内侧前额叶皮质的分层

根据细胞形态、神经元类型以及神经元的密度, 在垂直方向上, 从皮质的最外表面到白质, mPFC 可以分为六层 (layer, L) (见图 1), 依次编号为第 I 层 (L1) 到第 VI 层 (L6), 除此之外, 每一层也分布有特定皮层神经元的树突, 位于浅层的 L1 到 L3 分布有胞体位于 L2、L3、L4、L5 和 L6 的神经元的顶端树突, 位于深层的 L5 和 L6 包含胞体位于 L3、L4、L5 和 L6 的神经元的基底树突^[9]。因此, 皮质神经元的输入取决于其树突和胞体的位置^[9]。这些说明每层都有着独特的神经元形态和纤维联系, 不同层之间的神经元连接模式并不完全相同^[10]。mPFC 中的绝大多数投射神经元都是跨越多层的锥体神经元, 这是一种分布在 L2~L6 五层中的谷氨酸能神经元, 约占神经元总数的 80%~90%^[11]。在锥体神经元中, 胞体处触发的动作电位能够反向传播到顶端树突, 并降低顶端树突动作电位的阈值, 表现为单独电流刺激顶端树突或胞体并不能使顶端树突产生动作电位, 但同时在两处进行电流刺激时, 爆发了动作电位, 而顶端树突处的动作电位又可传递到胞体处, 可以将到达其胞体的自下而上的前馈信息即感觉输入与到达其树突的自上而下的反馈信息即来自皮层的其他信息整合起来, 这就使皮质锥体神经元能够在细胞水平上进行前馈信息和反馈信息的整合^[12], 再经由层与层之间的局部连接传递到其他皮质区域或皮质下区域, 几乎所有的皮质微环路以及大多数的皮质下连接都是由锥体神经元所形成^[13]。

既往的研究表明, 大脑不同区域之间的反馈信息主要依靠皮质锥体神经元进行传导^[14]。这些说明大脑皮质层与层之间的连接多数是通过锥体神经元实现的。锥体神经元在形态上可以分为锥体形的胞质, 伸向皮质浅层的顶端树突以及向更深层漫延的基底树突^[15]。不同皮质层中, 锥体神经元形态上最大的区别体现在顶端树突的复杂程度以及投射终止的皮质层^[16]。锥体神经元的分类有多种方式, 根据锥体神经元的轴突投射靶点可以将其分

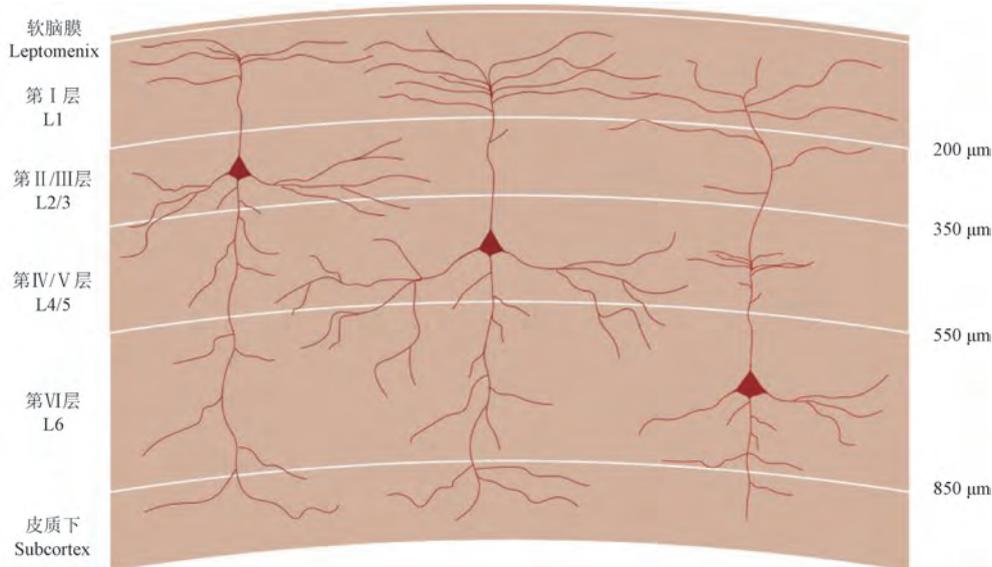


图 1 mPFC 分层结构

Figure 1 Layers of mPFC

为 3 个大类,每一个大类又包含多个亚型:第一类是端脑内神经元,主要位于 L2~L5,其轴突大多数投射至端脑,可以通过胼胝体和前连合连接左右大脑半球,是唯一一种能够投射至对侧皮质的神经元,包括新皮质、纹状体等,在 L5a 中有着细长薄簇状顶端树突;第二类是锥体束神经元,主要分布于 L5b 中,有着厚簇状顶端树突的大锥体神经元,调控皮质输出,主要投射至皮质下区域,包括脑干、脊髓和中脑,也可以投射至同侧的皮质和丘脑;第三大类是皮质丘脑神经元,主要投射至同侧丘脑^[17]。1993 年,Verceili 等^[18]将猫作为研究对象,发现位于不同皮质区域的锥体神经元,其树突结构具有特异性,这一发现支持了不同皮质区域的锥体神经元可以针对局部功能的需要,进化出特异的结构^[13],进而具备不同的纤维联系和功能,暗示了不同皮质层的锥体神经元在意识过程中所发挥的具体作用并不完全相同。

1.1 mPFC 中第 I 层

第 I 层(Layer I, L1)称为分子层,位于软脑膜(leptomeninx)的正下方 0~200 μm 处^[19],为皮质最浅层,分为浅层 L1a 和深层 L1b。令人惊讶的是,L1 没有锥体神经元的胞体,但其间分布有其余几层锥体神经元的顶端树突和轴突,来自皮质下区域的神经纤维,以及稀疏的抑制性神经元。L1 虽然不含锥体神经元,但是 L2~L5 中锥体神经元的顶端树突均投射至该层,因此,认为 L1 受到其余几层和皮质下区域的调控以及 L1 可以将接收到的信息通过顶端

树突传送到不同的分层区域^[20-21]。例如结合光遗传学技术,特异性激活 L1 中的胆碱能神经元轴突可以抑制 L2/3 中锥体神经元的输出活动^[16]。前期研究表明,L1 中稀疏的抑制性神经元主要是调节信息输入^[22],影响锥体神经元顶端树突并且能够自上而下调节信息输入的抑制性神经元主要有 4 种,分别是冠层细胞、血管活性肠肽细胞、神经源性神经营养因子细胞和 $\alpha 7$ 细胞^[22-23]。进一步利用膜片钳技术显示丙泊酚通过激活突触前中间神经元的抑制性输入,促进突触后多个大脑皮质锥体神经元的同步放电,阻碍了信息的传递^[24]。全身麻醉药氟烷增加了锥体神经元诱发的抑制性突触后电流的振幅,并且延长了抑制性突触后电流的持续时间和增加了发生频率^[25]。利用膜片钳技术研究 L1 中神经元的沟通方式发现 L1 中的神经元之间主要是通过直接突触和间隙连接两种方式进行交流,大多数突触连接同时由 γ -氨基丁酸 A 受体和 γ -氨基丁酸 B 受体介导,少数由单一 γ -氨基丁酸受体介导^[26]。除了皮层的输入外,来自于丘脑高阶核团的投射也可以输入到 L1,研究人员发现,丘脑腹侧核主要投射至 L1a,丘脑背内侧核主要投射至 L1b,两种传入神经均密集分布于边缘前皮质 L1 区,目前仍不清楚这些连接对 mPFC 的作用^[27]。来自丘脑的投射与 L1 中的兴奋性和抑制性神经元均形成了突触连接^[28],常常与意识、记忆和注意力有关^[29]。全麻药异氟烷的作用机制之一便是通过影响丘脑高阶核团输入到 L1,抑制突触中的谷氨酸释放,降低信息

在皮质网络中的传播速度,增加了皮质网络进行大量信息传递沟通的阈值,诱导产生了麻醉作用,从而认为异氟烷的作用机制主要是抑制皮质网络信息的传递,而不是影响单个细胞的整合处理信息过程^[30]。

1.2 mPFC 中第Ⅱ/Ⅲ层

第Ⅱ/Ⅲ层距离软脑膜 200~350 μm ^[19]。第Ⅳ层(L2)称为外部颗粒层,主要由小锥体神经元和数量众多的星形胶质细胞构成。其中的锥体神经元通过复杂的兴奋性连接,处理传入信息,并将处理过的信息传递到 L5/6 层中的锥体神经元^[31]。第Ⅲ层(L3)称为外部锥体细胞层,分布着中小型的锥体神经元,位于 L3 深层的锥体神经元体积通常大于位于 L3 更浅层的锥体神经元。L3 是主要的皮质输出层,主要功能是输出和接受其他皮质区域的锥体神经元的输入^[32-33],且其树突的大小显著影响了神经感受野的范围^[13]。L2 和 L3 中的锥体神经元轴突局部投射到同一皮质区域内的其他神经元及其他的皮质区域,从而介导了皮质内通信^[9]。L2/3 中的锥体神经元可以将处理后的信息输入到 L5/6,在 L5 中不仅可以诱发兴奋性突触后电位,还能诱发抑制性突触后电位,正是由于 L2/3 的这些特征,L2/3 被认为是接受输入,调节输出信号的主要靶标和信息发生重复传导的位置^[31,34-35]。

1.3 mPFC 中第Ⅳ/Ⅴ层

第Ⅳ/Ⅴ层距离软脑膜 350~550 μm ^[19]。第Ⅳ层(L4)称为内部颗粒层,绝大多数细胞为不同类型的星形胶质细胞和锥体神经元,是丘脑输入的主要皮质层,丘脑皮质神经元的输入主要由 L4 中的锥体神经元接受^[36-37],但是 L4 的主要输入皮层是低阶皮层,而且很少接收皮质区域的输入。由于 L4 可以大量投射到 L2/3,同时,也可以投射到 L5a/b,但是却很少接受兴奋性的输入,所以提出猜想 L4 中的神经元可能处于局部兴奋网络的上游位置^[14]。第Ⅴ层(L5)称为内部锥体细胞层,可以分为 L5a 和 L5b 两层,是主要的皮质输出层,分布着大型的锥体神经元,通常比 L3 的锥体神经元更大,L5 中的锥体神经元是皮质的主要输出通路,投射到其他皮质区域和皮质下结构^[9]。L5 中锥体神经元根据内在放电特性差异分为两类:一类是具有固定爆发性电位,接受去极化电流后可以爆发动作电位,多为锥体束神经元;另一类是具有规则电位发放尖峰,爆发单个动作电位,多为端脑内神经元^[38-39]。如前所

述,L5 中的锥体神经元除了可以接受 L2/3 的输入^[31],直接参与了丘脑皮质和皮质皮质微环路的组成之外,还具备决定皮质下区域输出的功能^[40],构成了 mPFC 到皮质下区域的主要皮质输出层,输出结构包括层内/中线丘脑核、杏仁核、基底神经节、脑干核和脊髓^[41],推测其在感觉和运动过程中发挥了作用^[42]。Bhariok 等^[43]的研究发现,全麻药可以引起 L5 中的锥体神经元出现一致性的钙活动变化,且该同步性钙活动的出现与消失和意识的消失与恢复保持一致,而且在全身麻醉期间,L5 中锥体神经元的顶端树突簇与其胞体之间的活动显示出较低的同步性,但 L5 锥体神经元的基底树突与其胞体间的活动显示了较高的同步性。另有研究表明,全麻药可通过抑制皮质 L5 中的锥体神经元的顶端树突,使清醒状态下皮质各层之间、树突与树突之间以及树突和细胞体之间的耦联解开,从而抑制皮质整体反馈信息的输送,降低皮质反馈信息传递的效率^[44]。因而,全身麻醉药致意识消失的作用机制之一是使新皮质锥体神经元内顶端树突功能发生改变,干扰皮质中锥体神经元顶端树突传递信号,影响树突电活动和树突的整合,所以全麻药能够抑制皮质自上而下的信号^[29,45]。

1.4 mPFC 中第Ⅵ层

第Ⅵ层(Layer VI, L6)中神经元形态多种多样,因此称为多形态层,距离软脑膜 650~850 μm ^[19],与形成皮层深层边界的白质相混合,分布着少量的大型锥体神经元,小纺锤形锥体神经元和多形态神经元。L6 中的锥体神经元也可以接受 L2/3 信息输入^[31],其顶端树突也参与了 L1 的组成。L6 的主要作用是将信息输出到丘脑,建立了皮质和丘脑之间精确而复杂的双向环路。比较清醒、睡眠和麻醉过程中的皮质神经元,发现在异氟烷和丙泊酚麻醉过程中,只有深皮质层神经元的爆发性抑制增加^[46]。意识不仅依赖于皮质-丘脑和皮质-皮质之间的活动,也依赖于深层神经元及时向浅层神经元提供前馈信息,不管是在麻醉状态还是自然睡眠状态下,深层神经元和丘脑神经元对意识的变化更为敏感^[46]。Redinbaugh 等^[46]研究发现异氟烷和丙泊酚诱导的全身麻醉减少了皮质深层区域的激活,也降低了同时投射到皮质深浅层的丘脑中央外侧核(central lateral thalamic, CL)的活动,减少了皮质层内部和皮质皮质之间的 α 和 γ 频率交流,然后用 γ 频率刺激 CL,重新激活了 CL-深皮质层通路,使猕

猴从麻醉状态转变为清醒状态,提高了意识水平,说明两种麻醉药共同作用于 CL-深皮质环,这可能是麻醉药物的共同靶点,特别是作用于 γ -氨基丁酸 A 受体的药物。

2 结语与展望

mPFC 作为信息处理的高级枢纽,是全麻药作用的关键部位,目前,外周信息处理的一种路径为外周信息输入到丘脑,丘脑再传递到皮质层 L4,在 L4 进行预处理后,L4 中的锥体神经元再输送到 L2/3,信息在 L2/3 中经过进一步处理后,输送到 L5,再往下进一步输出到皮质下区域^[47](见图 2)。类似通路的形成可能正是信息感知,意识形成的关键,而全麻药在这一通路的哪些靶点发挥作用,进而阻断信息的传递或整合正是麻醉机制研究所需要探讨的内容。

mPFC 中各层结构中,各类神经元形成的自上而下和自下而上的特异性投射通路都参与到了全麻药的作用机制当中,比较在睡眠和麻醉状态下大脑的改变,在睡眠中,大脑各区域的变化(例如信息整合减少)是均匀分布的,而在麻醉过程中,则以 PFC 的变化最为突出,这说明麻醉致意识消失的原因之一是 PFC 与其他大脑区域之间功能连接逐渐减少并出现脱节现象^[48-49],绘制并探索这些神经回路有助于理解全麻药的作用机制。尽管关于 mPFC

的神经回路研究取得了一定的进展,但是仍有以下几个重要问题没有得到解答:(1)位于 mPFC 的不同类型神经元在全麻过程中的作用有何不同?(2)mPFC 投出和投入通路在全麻过程中的作用机制;(3)mPFC 介导全身麻醉诱导和苏醒的神经机制是否不同。这些问题的解答,有助于精确调控麻醉过程,监控患者围手术期的意识状态,提高患者围手术期的安全性。在未来发展历程中,基于先进的研究技术,理解神经环路及神经网络在全身麻醉致意识消失中发挥的作用是研制理想全麻药的必经之路。相信对于 mPFC 皮质层结构的深入理解以及不同皮质分层结构功能的详细解析将有助于揭示全麻药的作用机制,也有利于揭示意识形成的神经生物学基础。

参考文献:

- [1] MASHOUR G A, HUDEZ A G. Bottom-up and top-down mechanisms of general anesthetics modulate different dimensions of consciousness [J]. *Front Neural Circuits*, 2017, 11: 44.
- [2] BARNES C L, PANDYA D N. Efferent cortical connections of multimodal cortex of the superior temporal sulcus in the rhesus monkey [J]. *J Comp Neurol*, 1992, 318(2): 222-244.
- [3] BARBAS H, HENION T H, DERMON C R. Diverse thalamic projections to the prefrontal cortex in the rhesus monkey [J]. *J Comp Neurol*, 1991, 313(1): 65-94.
- [4] MILLER E K, COHEN J D. An integrative theory of prefrontal cortex function [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 167-202.
- [5] PAL D, DEAN J G, LIU T, et al. Differential role of prefrontal and parietal cortices in controlling level of consciousness [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(13): 2145-2152.
- [6] HUELS E R, GROENHOUT T, FIELDS C W, et al. Inactivation of prefrontal cortex delays emergence from sevoflurane anesthesia [J]. *Front Syst Neurosci*, 2021, 15: 690717.
- [7] JANG S H, CHOI E B. Relationship between the consciousness level and the structural neural connectivity of the medial prefrontal cortex in hypoxic-ischemic brain injury: a pilot study [J]. *Neuroreport*, 2022, 33(17): 750-755.
- [8] HOSSEINI L, KARIMIPOUR M, SEYEDAGHAMIRI F, et al. Intranasal administration of mitochondria alleviated cognitive impairments and mitochondrial dysfunction in the photothrombotic model of mPFC stroke in mice [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2022, 31(12): 106801.
- [9] KANDEL E R, SCHWARTZ J H, JESSELL T M, et al. *Principles of Neural Science*(the 5th edition) [M]. the United States: McGraw-Hill Medical, 2012.
- [10] BASTOS A M, LOONIS R, KORNBLITH S, et al. Laminar recordings in frontal cortex suggest distinct layers for maintenance and control of working memory [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

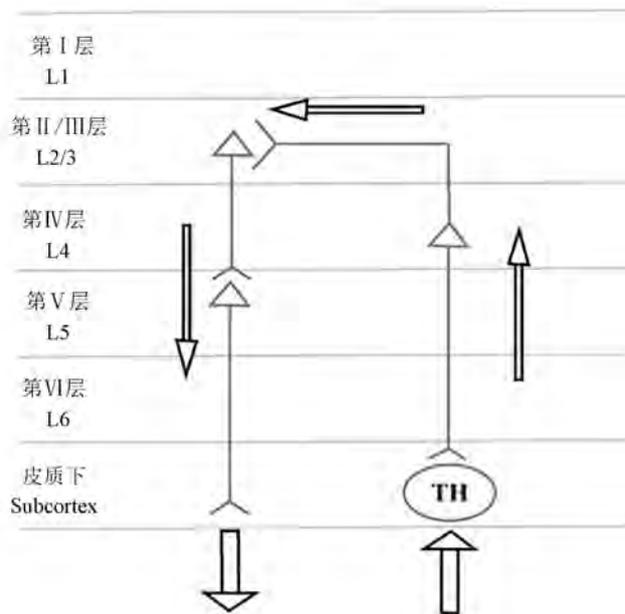


图 2 外周信息传递路径

Figure 2 Peripheral information transmission pathways

- 2018, 115(5): 1117–1122.
- [11] DEFELIPE J. The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity [J]. *Front Neuroanat*, 2011, 5: 29.
- [12] LARKUM M. A cellular mechanism for cortical associations: an organizing principle for the cerebral cortex [J]. *Trends Neurosci*, 2013, 36(3): 141–151.
- [13] ELSTON G N. Specialization of the neocortical pyramidal cell during primate evolution [M]. the United States: Academic Press, 2007.
- [14] HARRIS K D, SHEPHERD G M. The neocortical circuit: themes and variations [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(2): 170–181.
- [15] DEFELIPE J, ALONSO-NANCLARES L, ARELLANO J I. Microstructure of the neocortex: comparative aspects [J]. *J Neurocytol*, 2002, 31(3/4/5): 299–316.
- [16] MORADI CHAMEH H, RICH S, WANG L, et al. Diversity amongst human cortical pyramidal neurons revealed via their sag currents and frequency preferences [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2497.
- [17] BAKER A, KALMBACH B, MORISHIMA M, et al. Specialized subpopulations of deep-layer pyramidal neurons in the neocortex: bridging cellular properties to functional consequences [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(24): 5441–5455.
- [18] VERCELLI A, INNOCENTI G M. Morphology of visual callosal neurons with different locations, contralateral targets or patterns of development [J]. *Exp Brain Res*, 1993, 94(3): 393–404.
- [19] COLLINS D P, ANASTASIADIS P G, MARLIN J J, et al. Reciprocal circuits linking the prefrontal cortex with dorsal and ventral thalamic nuclei [J]. *Neuron*, 2018, 98(2): 366–379.
- [20] MURALIDHAR S, WANG Y, MARKRAM H. Synaptic and cellular organization of layer I of the developing rat somatosensory cortex [J]. *Front Neuroanat*, 2013, 7: 52.
- [21] MARIN-PADILLA M, MARIN-PADILLA T M. Origin, prenatal development and structural organization of layer I of the human cerebral (motor) cortex [J]. *Anat Embryol*, 1982, 164(2): 161–206.
- [22] GENESCU I, GAREL S. Being superficial: a developmental viewpoint on cortical layer I wiring [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2021, 66: 125–134.
- [23] SCHUMAN B, MACHOLD R P, HASHIKAWA Y, et al. Four unique interneuron populations reside in neocortical layer I [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(1): 125–139.
- [24] KOYANAGI Y, OI Y, KOBAYASHI M. Fast-spiking interneurons contribute to Propofol-induced facilitation of firing synchrony in pyramidal neurons of the rat insular cortex [J]. *Anesthesiology*, 2021, 134(2): 219–233.
- [25] NISHIKAWA K, MACIVER M B. Membrane and synaptic actions of halothane on rat hippocampal pyramidal neurons and inhibitory interneurons [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(16): 5915–5923.
- [26] HEIDBREDER C A, GROENEWEGEN H J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2003, 27(6): 555–579.
- [27] ANASTASIADIS P G, COLLINS D P, CARTER A G. Mediodorsal and ventromedial thalamus engage distinct L1 circuits in the prefrontal cortex [J]. *Neuron*, 2021, 109(2): 314–330.
- [28] CRUIKSHANK S J, AHMED O J, STEVENS T R, et al. Thalamic control of layer I circuits in prefrontal cortex [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(49): 17813–17823.
- [29] PHILLIPS W A, BACHMANN T, STORM J F. Apical function in neocortical pyramidal cells: a common pathway by which general anesthetics can affect mental state [J]. *Front Neural Circuits*, 2018, 12: 50.
- [30] HENTSCHKE H, RAZ A, KRAUSE B M, et al. Disruption of cortical network activity by the general anaesthetic isoflurane [J]. *Br J Anaesth*, 2017, 119(4): 685–696.
- [31] SHEPHERD G M. The microcircuit concept applied to cortical evolution: from three-layer to six-layer cortex [J]. *Front Neuroanat*, 2011, 5: 30.
- [32] SEMENDEFERI K, ARMSTRONG E, SCHLEICHER A, et al. Prefrontal cortex in humans and apes: a comparative study of area 10 [J]. *Am J Phys Anthropol*, 2001, 114(3): 224–241.
- [33] GOULAS A, ZILLES K, HILGETAG C C. Cortical gradients and laminar projections in mammals [J]. *Trends Neurosci*, 2018, 41(11): 775–788.
- [34] QUIQUEMPOIX M, FAYAD S L, BOUTOURLINSKY K, et al. Layer 2/3 pyramidal neurons control the gain of cortical output [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(11): 2799–2807.
- [35] CHERIYAN J, KAUSHIK M K, FERREIRA A N, et al. Specific targeting of the basolateral amygdala to projectionally defined pyramidal neurons in prelimbic and infralimbic cortex [J]. *eNeuro*, 2016, 3(2): ENEURO.0002–ENEURO.0016.
- [36] RAO M S, MIZUNO H. Elucidating mechanisms of neuronal circuit formation in layer 4 of the somatosensory cortex via intravital imaging [J]. *Neurosci Res*, 2021, 167: 47–53.
- [37] MILLER K D, PINTO D J, SIMONS D J. Processing in layer 4 of the neocortical circuit: new insights from visual and somatosensory cortex [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11(4): 488–497.
- [38] SELVERSTON A, ELSON R, RABINOVICH M, et al. Basic principles for generating motor output in the stomatogastric ganglion [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 860: 35–50.
- [39] MASLAND R H. Neuronal diversity in the retina [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11(4): 431–436.
- [40] TAKAHASHI N, EBNER C, SIGL-GLÖCKNER J, et al. Active dendritic currents gate descending cortical outputs in perception [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(10): 1277–1285.
- [41] MAREK G J, SCHOEPP D D. Cortical influences of serotonin and glutamate on layer V pyramidal neurons [J]. *Prog Brain*

- Res, 2021, 261: 341–378.
- [42] HATTOX A M, NELSON S B. Layer V neurons in mouse cortex projecting to different targets have distinct physiological properties [J]. *J Neurophysiol*, 2007, 98(6): 3330–3340.
- [43] BHARIOKE A, MUNZ M, BRIGNALL A, et al. General anesthesia globally synchronizes activity selectively in layer 5 cortical pyramidal neurons [J]. *Neuron*, 2022, 110(12): 2024–2040.
- [44] SUZUKI M, LARKUM M E. General anesthesia decouples cortical pyramidal neurons [J]. *Cell*, 2020, 180(4): 666–676.
- [45] MEYER K. The role of dendritic signaling in the anesthetic suppression of consciousness [J]. *Anesthesiology*, 2015, 122(6): 1415–1431.
- [46] REDINBAUGH M J, PHILLIPS J M, KAMBI N A, et al. Thalamus modulates consciousness via layer-specific control of cortex [J]. *Neuron*, 2020, 106(1): 66–75.
- [47] GILBERT C D, WIESEL T N. Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex [J]. *Nature*, 1979, 280(5718): 120–125.
- [48] ZELMANN R, PAULK A C, TIAN F, et al. Differential cortical network engagement during states of un/consciousness in humans [J]. *Neuron*, 2023, 111(21): 3479–3495.
- [49] HUANG Z, TARNAL V, VLISIDES P E, et al. Asymmetric neural dynamics characterize loss and recovery of consciousness [J]. *Neuroimage*, 2021, 236: 118042.

[收稿日期]2024-04-01

(上接第 110 页)

- [47] CHEN S, ZHOU H, ZHANG G, et al. Characterization, antioxidant, and neuroprotective effects of anthocyanins from *Nitraria tangutorum* Bobr. fruit [J]. *Food Chem*, 2021, 353: 129435.
- [48] DE TORRE J C. Treating cognitive impairment with transcranial low level laser therapy [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 168: 149–155.
- [49] CARDOSO A, MAGANO S, MARRANA F, et al. D-galactose high-dose administration failed to induce accelerated aging changes in neurogenesis, anxiety, and spatial memory on young male wistar rats [J]. *Rejuvenation Res*, 2015, 18(6): 497–507.
- [50] PARK J H, CHOI T S. Polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes in the d-galactose-induced aging mouse model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(4): 701–704.
- [51] 刘克明, 王春花, 李国星, 等. D-半乳糖模型鼠与自然衰老鼠的比较研究 [J]. *卫生研究*, 2007, 36(6): 685–688.
- LIU K M, WANG C H, LI G X, et al. A comparison study between D-galactose treated mice and natural aging mice [J]. *J Hyg Res*, 2007, 36(6): 685–688.
- [52] SADIGH-ETEGHAD S, MAJDI A, MCCANN S K, et al. D-galactose-induced brain ageing model: a systematic review and meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0184122.

[收稿日期]2024-03-05

杨慧捷, 兰瑞, 王漫漫, 等. 铜代谢异常在帕金森发病机制中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 118-124.
Yang HJ, Lan R, Wang MM, et al. Research advances in the pathogenesis of abnormal copper metabolism in Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 118-124.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.015

铜代谢异常在帕金森发病机制中的研究进展

杨慧捷¹, 兰瑞^{2*}, 王漫漫¹, 王玮玮¹, 李泓宇¹, 唐琛¹, 刘双¹,
杨杰丽¹, 沈晓明²

(1.河南中医药大学第一附属医院脑病中心, 郑州 450000;
2.河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450000)

【摘要】 帕金森病是一种与大脑铜代谢异常有关的神经退行性疾病, 铜代谢异常导致 α -突触核蛋白-铜络合物的错误折叠和聚集是帕金森病的重要病理标志。铜代谢是指有铜离子参与的细胞代谢过程, 与帕金森病中 α -突触核蛋白聚集、多巴胺代谢、线粒体功能障碍、氧化应激、铁死亡等发病机制密切相关。在本综述中, 我们通过研究铜代谢异常在帕金森病中发挥病理作用的机制, 描述铜发挥其毒性的分子代谢机制, 以期为进一步完善作用机制和药物的开发提供依据和帮助。

【关键词】 帕金森病; 铜代谢; 氧化应激; α -突触核蛋白; 铜蓝蛋白; 线粒体功能障碍

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0118-07

Research advances in the pathogenesis of abnormal copper metabolism in Parkinson's disease

YANG Huijie¹, LAN Rui^{2*}, WANG Manman¹, WANG Weiwei¹, LI Hongyu¹, TANG Chen¹, LIU Shuang¹,
YANG Jieli¹, SHEN Xiaoming²

(1. Encephalopathy Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.
2. the First Clinical College of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Parkinson's disease is a neurodegenerative disease associated with abnormal copper metabolism in the brain, which leads to misfolding and aggregation of α -synuclein-copper complexes, which is an important pathological sign of Parkinson's disease. Copper metabolism, i. e., cellular metabolic processes involving copper ions, is closely related to the pathogenesis of α -synuclein aggregation, dopamine metabolism, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and ferroptosis in Parkinson's disease. In this review, we summarize the molecular metabolic mechanism of copper toxicity by studying the pathological role of copper metabolism in Parkinson's disease, to support our further understanding of the mechanism of action and drug development.

【Keywords】 Parkinson's disease; copper metabolism; oxidative stress; α -synuclein; ceruloplasmin; mitochondrial dysfunction

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

【基金项目】 国家自然科学基金 (81973618, 81503422); 河南省中医药科学研究专项课题 (2022JDZX090); 河南省自然科学基金 (202300410399); 河南省中医药科学研究专项课题 (2019ZY1006)。

【作者简介】 杨慧捷 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治脑病。E-mail: yyy74852023@163.com

【通信作者】 兰瑞 (1984—), 女, 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合神经病学相关临床及实验研究。
E-mail: lanrui0312@163.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中老年人多见的神经退行性疾病,其病理特征是中脑黑质多巴胺神经元进行性变性丢失,残存的多巴胺神经元内富含 α -突触核蛋白和路易小体^[1]。临床以肌强直、静止性震颤及姿势障碍为主要症状,发病数年前可出现睡眠障碍、嗅觉减退及自主神经功能紊乱等非运动症状,严重降低中老年患者的生活质量^[2]。目前 PD 发病机制尚未明确,可能涉及氧化应激、免疫紊乱、遗传等^[3]。铜是一种对大脑发育和功能至关重要的生物金属,与神经退行性疾病的病理和生理有关。在 PD 中,游离铜与氧化应激增加、 α -突触核蛋白寡聚化和路易体形成有关^[4]。大量研究表明,在 PD 患者的黑质核和尾状核中发现铜、铜蓝蛋白浓度降低和游离铜浓度的增加,黑质中铁浓度增加和脑脊液中铁氧化酶活性降低^[5]。

1 铜主要代谢途径

铜是生命必需的金属营养素,通常依赖于 Cu^+ 和 Cu^{2+} 氧化态之间的氧化还原循环来发挥其生理作用,但细胞氧化还原状态的改变会导致铜稳态失衡,从而导致 PD 和其他具有金属依赖性疾病的金属增生^[6]。其中亚铜离子通过铜离子转运蛋白 1 (copper transporter 1, CTR1) 进入肠上皮细胞并通过铜离子转运 ATP 酶 α 肽 (Cu^{2+} transporting alpha polypeptide, ATP7A) 在门静脉循环中流出,其中绝大部分通过 CTR1 流入肝, Cu^+ 在肝主要代谢途径有 3 条,一部分通过 SCO1、SCO2 传递到线粒体,另一部分通过超氧化物歧化酶铜伴侣蛋白 (recombinant superoxide dismutase copper chaperone, CCS) 结合成铜锌依赖性超氧化物歧化酶 (Cu/Zn -SOD), 剩余一部分 Cu^+ 分别通过 ATP7B 蛋白排泄到胆汁和转运到反式高尔基体网上合成铜蓝蛋白 (ceruloplasmin, Cp), Cp 经血液循环进入机体的其他组织^[7]。大脑中铜离子浓度仅次于肝,其重要代谢途径是铜透过血脑屏障经由 CTR1 与 ATP7A 蛋白转运至不同脑区,从而进一步加重脑损伤^[8]。铜离子在细胞内价态的转换一定程度上反映和影响细胞的氧化还原状态,与氧化应激、胶原蛋白合成和皮肤色素沉着,维持血管的完整性,以及铁稳态、抗氧化防御和神经递质合成、线粒体功能、细胞程序性死亡密切相关^[9]。值得关注的是,尽管铜在 PD 的机制和其确切作用尚未被完全阐明,但近几年研究表明,铜及其代谢物在未来具有很大潜力成为临床诊断标记

物和疾病的新型治疗靶点。

2 PD 中的铜稳态失调

2.1 铜过量

铜是所有生物体必不可少的辅助因子,但如果浓度超过代谢机制所维持的阈值,它就会具有生物毒性^[10]。临床上,过量的铜在许多器官中表现出来,最常见的是 PD 和威尔逊病 (Wilson's disease, WD)。WD 是一种常染色体隐性遗传病,它是由 ATP7B 突变引起的,其特征是铜在身体各个部位过量沉积,主要在肝和大脑中^[11]。WD 的神经系统症状主要是肝外铜毒性导致神经组织损伤而引起的,其神经退行性变包括纹状体和苍白球,以及少数的大脑皮层、脑干和齿状核^[12]。脑组织和脑脊液中的铜水平弥漫性增加 10 倍,其毒性涉及线粒体毒性、氧化应激、细胞膜损伤、DNA 交联和酶抑制等多种机制^[13]。其中过量的铜最初被星形胶质细胞和少突胶质细胞吸收和缓冲,但最终会导致血脑屏障和脱髓鞘功能障碍,从而加速有毒寡聚形式的 α -Syn 的形成,极易引发 PD。此外,铜毒性还能影响基底神经节和额叶皮层,诱发 PD 样症状和认知缺陷。铜一旦进入体内并处于高浓度状态,它就会诱导 DNA 损伤和肿瘤磷酸化蛋白 53 (recombinant tumor protein p53, P53) 表达, P53 发生磷酸化并转位到细胞核中以诱导细胞凋亡调节因子 (bcl-2 associated x protein, BAX) 和 P53 上调凋亡调节因子 (recombinant p53 upregulated modulator of apoptosis, PUMA), 随后将细胞色素 c 释放到胞质溶胶中以启动细胞凋亡^[14]。Chakraborty 等^[15]通过运用不同剂量的 Cu 处理人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞,发现 Cu 损伤引起的细胞应激可能会启动信号蛋白 (如转录激活因子 6、蛋白激酶 R 样内质网激酶和内质网核信号转导蛋白 a1) 的释放,其中激活的内质网核信号转导蛋白 a1 催化 X 盒结合蛋白-1 的剪接,并在 Cu 存在的情况下进一步激活半胱天冬酶 12 的表达,导致半胱天冬酶级联反应的诱导。此外,在铜过量期间,神经元细胞会经历严重的压力,导致内质网中错误折叠的蛋白质积累,蛋白激酶 R 样内质网激酶因此寡聚化,从而在一端诱导人内质网应激蛋白的表达,在另一端抑制 Bcl-2 的表达。由此可见, Cu 触发了内质网应激,协调了一系列未折叠蛋白信号转导反应 (unfolded protein response, UPR)。UPR 的过度激活可导致 PD 样疾病,表明通过降低

铜浓度来抑制 UPR 的表达有望作为 PD 治疗的有效手段。另有研究发现,在格鲁伯奈瑟菌模型中,线粒体定位蛋白 NgDJ-1 的表达随着铜浓度的升高而增加,并且不受 ROS 积累的诱导,是铜代谢的潜在关键蛋白^[16]。NgDJ-1 属于 DJ-1/ThiJ/PfpI 超家族的同源性蛋白质。这个超家族的成员存在于从细菌到人类的许多生物体中,研究最多的是人类同源物 DJ-1,它在氧化应激下易位到线粒体和细胞核,并保护细胞免受氧化应激诱导的细胞死亡,并在常染色体隐性遗传早发性帕金森病中发挥关键作用^[17]。由此表明调控铜稳态可上调 DJ-1 同源物来抑制氧化应激,以减少 PD 患者脑细胞的损伤。

2.2 铜缺乏

虽然大多数研究将铜水平升高与 PD 风险增加联系起来,但事实上,最近的研究支持了铜含量降低也与患这种疾病有关。有临床研究表明,将 PD 患者与年龄相近的健康个体相比,PD 患者大脑中铜、铜蓝蛋白氧化酶活性以及每个铜蓝蛋白分子的铜浓度较低,并且黑质和蓝斑的铜含量降低了一半左右^[18]。铜缺乏症有遗传性和后天性,后者是最常见的。其临床表现是非特异性的,但累及所有器官和系统,会影响心血管、皮肤和免疫系统,尤其是贫血和帕金森病^[19]。Cendrowska-Pinkosz 等^[20]研究发现,用含有铜的金属纳米颗粒替换无机形式的铜或从饮食中完全剥夺铜后导致基因表达的变化,引起细胞色素 c 氧化酶的减少,锰超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的增加,表明大鼠大脑前额叶皮层对还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)的需求增加,影响了线粒体的 ROS 和 ATP 含量,从而对 PD 产生有害的影响。越来越多的证据表明,铜缺乏在铜代谢紊乱导致的神经退行性变中起着关键作用。此外,超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1) 活性位点的铜缺乏被认为是作用于 PD 的核心决定因素。SOD1 是主要的超氧化物歧化酶,负责催化超氧化物歧化为过氧化氢和分子氧,它是维持细胞氧化还原稳态的必需抗氧化酶^[21]。铜代谢紊乱和氧化应激是 PD 的潜在催化机制,在这种情况下,金属缺乏和氧化应激诱导的 SOD1 修饰可能与 PD 发病机制相关^[22]。有研究表明,在 PD 大脑中黑质和蓝斑的路易体和路易神经突中检测到 SOD1 的免疫反应性,提取出的可溶性 SOD1 的等电点发生了正向变化,证明了黑质和蓝斑中的铜缺乏与负载铜的

SOD1 减少有关,将 SOD1 无定形聚集体的形成与 PD 联系起来^[23]。此外,有研究表明,CuATSM 向 SOD1 蛋白提供铜,这种铜复合物有助于维持线粒体中的正常铜代谢,并且 CuATSM 在各种体内 PD 小鼠模型中表现出类似的保护作用^[24]。由此看来,SOD1 的异常金属化和聚集在 PD 中起到一定的作用,这些发现有助于人们研究铜代谢,可为 PD 的治疗提供了新思路。

3 铜参与帕金森病的相关机制

3.1 铜参与 α -突触核蛋白异常聚集

α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn)是一种小的外周膜蛋白,特异性定位于神经元的轴突末端,具有高度可溶性,在 PD 和其他突触核蛋白病的发病机制中起着核心作用^[25]。铜水平的改变和 α -Syn-铜络合物的增加可能在 PD 发病中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生起关键作用。Li 等^[26]发现 α -Syn 在残基 3-11、48-53 和 115-123 处对 Cu^{2+} 具有亲和力,其中残基 48-53 表现出最高的亲和力电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)和电化学证实了 Cu^{2+} 与 α -Syn 和 α -Syn 配合物的形成。还有研究发现,可溶性 α -突触核蛋白- Cu^{2+} 复合物具有多巴胺氧化酶活性,并在生物还原剂的存在下通过 $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ 氧化还原循环催化 ROS 的产生^[27]。此外, α -Syn-铜络合物的氧化还原活性可能会增加细胞氧化应激,这可能导致酪氨酸交联和神经递质多巴胺的氧化,而多巴胺神经元(主要存在于黑质中)在 PD 中对变性/死亡的易感性较高,由此表明铜代谢失调导致 α -Syn-铜络合物的沉积增加是 PD 的重要病理标志^[28]。Li 等^[29]进一步研究表明,重金属铜离子通过加速 α -突触核蛋白原纤维的朊病毒样繁殖,从而在 PD 的发病机制中发挥了新作用。此外,近期 Lothian 等^[30]提出了一种可能性,即铜可以诱导一小部分 α -Syn 分子触发成核过程,从而导致寡聚化,随后形成原纤维,并且只有在铜代谢紊乱的情况下才足以引发原纤维聚集,导致 PD 的发生发展。这些以铜为中心的氧化还原反应促进 α -Syn 的氧化和聚集,并在 PD 的发病中起不利作用。综上所述,铜离子对 α -Syn 蛋白聚集的浓度依赖性产生影响,强调了铜靶向 α -Syn 蛋白寡聚体进行治疗干预的重要性,Cu 极有可能成为临床检测的新型指标并对 PD 患者的治疗具有巨大的潜力。

3.2 铜参与多巴胺代谢

多巴胺(dopamine, DA)是最重要的儿茶胺神经递质之一,因为它参与了人类中枢神经系统的许多功能,包括调节躯体运动和参与精神情绪活动^[31]。多巴胺产生在黑质的腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA),特别是在下丘脑核和中脑。与其他单胺相比,多巴胺广泛分布于嗅球、中脑黑质、下丘脑、VTA、视网膜和导水管周围灰色区域^[32]。多巴胺代谢与线粒体自噬障碍、氧化应激等有关。多巴胺能神经元的失调或功能障碍与许多神经精神疾病有关,例如帕金森病、自闭症和精神分裂症^[33]。据报道,PD 的病理相关蛋白 α -Syn 的异常蛋白聚集通过与 toll 样受体(toll-like receptors, TLR)的相互作用激活小胶质细胞的 NLRP3 炎症小体,并最终通过核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的易位释放促炎细胞因子,并导致线粒体受损,从而损害多巴胺能神经元^[34]。多巴胺能神经的丧失和多巴胺缺乏会导致以强直、震颤和运动迟缓为特征的运动症状。有趣的是,过量接触有毒金属,如铜(Cu)、锌(Zn)、铁(Fe)会穿过血脑屏障进入大脑并导致多巴胺能神经元变性^[35]。有研究表明,铜暴露能够激活小胶质细胞分泌炎症产物,导致多巴胺能神经元焦亡,这与 C57BL/6J 小鼠小胶质细胞中 ROS/NF- κ B 通路的早期激活和随后的线粒体自噬障碍有关^[36]。有研究发现,当铜与 6-羟基多巴胺在纹状体内共同给药时,会增加多巴胺能变性,这一现象也伴随着氧化应激测定指数的增加,过氧化氢酶活性的降低,以及谷胱甘肽活性的增强^[37]。由此可见,铜可能通过多巴胺代谢增强氧化应激从而参与 PD 的发病机制。

3.3 铜参与线粒体功能障碍

线粒体是执行和协调细胞中各种代谢过程的必需细胞器,线粒体功能障碍严重影响细胞的健康并导致疾病,其中包括多种神经退行性疾病如阿尔茨海默病、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症等,尤其是 PD^[38]。有研究表明,PD 症状会因多种线粒体相关改变而加重,例如 ROS 产生、 Ca^{2+} 缓冲、线粒体动力学不平衡(包括裂变、融合、线粒体自噬)、生物遗传功能障碍、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)破坏、蛋白质聚集、神经毒素和基因突变,这些突变表现为不健康的线粒体参与神经退行性变中的中枢神经系统,导致黑质区域的 DA 神经元发育迟缓,从而导致 PD^[39]。有研究表明,高水

平的 Cu 参与炎症、氧化和亚硝化应激(nitrosation stress, NS)反应的信号通路的激活,包括 NF- κ B 和激活蛋白-1,这些铜离子的不平衡会损害不同酶、蛋白质、受体和转运蛋白的结构、调节和催化功能,铜通过与蛋白质结合及诱导聚集体形成发生神经退行性变,以及破坏线粒体功能,消耗三磷酸腺苷并诱导 ROS 的产生,形成恶性循环导致 PD、AD 和 MS 的神经退行性变^[40]。有试验研究表明,Cu 处理的 A53T 小鼠的线粒体功能、神经系统发育、突触功能和免疫反应发生改变,这些变化与线粒体分裂蛋白增加、线粒体融合蛋白减少、线粒体自噬蛋白异常、多巴胺神经元表达降低、 α -Syn 表达增加、炎症因子释放和小胶质细胞激活有关^[41]。由此可见,低剂量的铜治疗改变了参与线粒体、神经发育和炎症反应的关键蛋白质,并影响了线粒体的 ROS 和 ATP 含量,对于了解 PD 的病理生理学至关重要,并可能为预防和治疗受影响的患者提供可能的新靶点。

3.4 铜参与氧化应激

氧化应激(oxidative stress, OS)被定义为活性氧的产生与内源性抗氧化防御系统之间的不平衡^[42]。一些研究表明,PD 患者大脑中内源性抗氧化剂(谷胱甘肽和辅酶 Q_{10})的水平较低,氧化多巴胺和铁含量较高,表明氧化应激在 PD 的病理学中起着至关重要的作用^[43]。活性氧被认为是 PD 发展的关键调节剂,当细胞的抗氧化能力降低时,自由基会导致产生多巴胺的细胞严重受损和死亡,以对抗氧化应激,许多细胞内反应会产生 ROS,包括 NADPH 氧化酶的激活、线粒体功能障碍和过氧化氢(H_2O_2)分解^[44]。许多研究表明,铜会破坏氧化还原稳态,同时诱导自由基的产生并降低黑质中的抗氧化剂水平,铜还可以通过与氧化衍生物结合,导致一系列有害的氧化还原化学过程而引起氧化损伤^[45]。Maina 等^[46]研究表明,使用 Cu^{2+} 和 H_2O_2 的金属催化氧化导致两种错误折叠蛋白 $\text{A}\beta$ 和 α -Syn 形成交联,分别与阿尔茨海默病和 PD 相关。Behl 等^[47]研究发现,Cu 在过度暴露后,可以渗透到血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)并在大脑内移动,从而最终导致 OS 升级(通过活性氧依赖性途径)、路易体内的 α -Syn 聚集和脂质过氧化,从而导致 DA 神经细胞的破坏并促进 PD 的发作。此外,还有研究表明,长期铜暴露会改变运动功能,并以剂量依赖性方式诱导多巴胺能神经元丢失、星形胶质细胞增多症和小胶质细胞增生以及 α -Syn 的积累和聚集,铜

还能够以浓度依赖性方式诱导亚硝化应激^[48]。虽然铜代谢的具体调控机制仍需要进一步的研究,但不少学者认为在 PD 领域具有非常良好的应用前景。

3.5 铜与铁死亡

自 2012 年创造该术语以来,铁死亡的研究领域在过去几年中呈指数级增长^[49]。铁死亡是一种铁依赖性细胞死亡过程,是由脂质过氧化物的积累和铁的过度沉积引起的^[50]。铁死亡涉及多种生物学过程,如铁代谢、脂质代谢、氧化应激和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸、谷胱甘肽和辅酶 Q10 的生物合成^[51]。这一过程与 PD 患者黑质致密 (substantianigrapars compacta, SNc) 中多巴胺能神经元的死亡有关。血浆铜蓝蛋白是肝分泌的重要蛋白质,在人体的铜离子分布和运输中扮演关键角色,并在维持铜离子稳态方面起重要作用^[52]。此外,Cp 还是一种亚铁氧化酶,参与人体内铁离子的代谢。Yang 等^[53]发现,COMMD10 通过降低细胞中的 Cu 来抑制 Cp 的表达,从而促进铁死亡,并且还可以抑制 HIF1 α /Cp 环,破坏肝细胞性肝癌中的 Cu-Fe 稳态来加重铁死亡和放射敏感性。由此可见,Cp 的合成依赖于铜,是铁死亡的重要调节因子,Cp 通过影响铜代谢进而在 PD 患者多巴胺能神经元死亡中发挥必不可少的作用。

4 总结与展望

PD 是一种进行性加重的难治性神经退行性疾病,病理进程中存在多种形式的铜代谢紊乱,这也是造成 PD 多巴胺神经元细胞丢失、运动功能障碍的关键因素。随着研究的不断深入,部分 PD 的内在分子机制逐渐清晰。铜是脑细胞中必不可少的辅助因子和各种酶的结构成分,这些酶参与许多重要的生化途径,如多巴胺代谢、氧化应激、线粒体功能障碍、 α -Syn 聚集和铁代谢。然而,如前所述,细胞中铜代谢发生紊乱与 PD 等神经退行性疾病密切相关。因此,需要对细胞中的铜进行严格调节,以确保铜被必需酶充分利用。虽然铜与 PD 中呼吸链、抗氧化防御和铁代谢机制之间存在显著的串扰关系,但其作用机制尚未完全明确,在 PD 中探讨铜代谢的研究数量少,研究设计难度大,是科研人员未来需要努力的方向。未来可针对铜代谢及其靶向不同信号通路在 PD 中的机制,建立信号通路网络,去探索铜参与 PD 发病机制中的蛋白质、代谢物

和信号通路,从而为 PD 提供更多的治疗选择和治疗新思路。但由于目前对铜代谢在 PD 中的机制研究仍较缺乏,铜治疗仍面临许多挑战,希望在未来能够对铜代谢进行深入研究,并将其应用于临床,成为 PD 的新疗法。

参考文献:

- [1] FENG Y S, YANG S D, TAN Z X, et al. The benefits and mechanisms of exercise training for Parkinson's disease [J]. *Life Sci*, 2020, 245: 117345.
- [2] BLOEM B R, OKUN M S, KLEIN C. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10291): 2284–2303.
- [3] CABREIRA V, MASSANO J. Parkinson's disease: clinical review and update [J]. *Acta Med Port*, 2019, 32(10): 661–670.
- [4] MOLLENHAUER B, VON ARNIM C A F. Toward preventing Parkinson's disease [J]. *Science*, 2022, 377(6608): 818–819.
- [5] BISAGLIA M, BUBACCO L. Copper ions and Parkinson's disease: why is homeostasis so relevant? [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 195.
- [6] PEZACKI A T, MATIER C D, GU X, et al. Oxidation state-specific fluorescent copper sensors reveal oncogene-driven redox changes that regulate labile copper(II) pools [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(43): e2202736119.
- [7] LI Y. Copper homeostasis: Emerging target for cancer treatment [J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(9): 1900–1908.
- [8] AN Y, LI S, HUANG X, et al. The role of copper homeostasis in brain disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 13850.
- [9] GROMADZKA G, TARNACKA B, FLAGA A, et al. Copper dyshomeostasis in neurodegenerative diseases-therapeutic implications [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9259.
- [10] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254–1261.
- [11] SINGH N, KALLOLLIMATH P, SHAH M H, et al. Genetic analysis of ATP7B in 102 south Indian families with Wilson disease [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0215779.
- [12] HARTWIG C, ZLATIC S A, WALLIN M, et al. Trafficking mechanisms of P-type ATPase copper transporters [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 59: 24–33.
- [13] DUSEK P, LITWIN T, CZŁONKOWSKA A. Neurologic impairment in Wilson disease [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(Suppl 2): S64.
- [14] GONZALEZ-ALCOCER A, DUARTE-JURADO A P, SOTODOMINGUEZ A, et al. Unscrambling the role of redox-active biomaterials in dopaminergic neuronal death and promising metal chelation-based therapy for Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1256.
- [15] CHAKRABORTY J, PAKRASHI S, SARBAJNA A, et al.

- Quercetin attenuates copper-induced apoptotic cell death and endoplasmic reticulum stress in SH-SY5Y cells by autophagic modulation [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2022, 200(12): 5022–5041.
- [16] ŽENÍŠKOVÁ K, GRECHNIKOVA M, SUTAK R. Copper metabolism in *Naegleria gruberi* and its deadly relative *Naegleria fowleri* [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 853463.
- [17] SANZ F J, SOLANA-MANRIQUE C, PARICIO N. Disease-modifying effects of vincamine supplementation in *Drosophila* and human cell models of Parkinson's disease based on *DJ-1* deficiency [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2023, 14(12): 2294–2301.
- [18] KIM M J, OH S B, KIM J, et al. Association of metals with the risk and clinical characteristics of Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2018, 55: 117–121.
- [19] ALTARELLI M, BEN-HAMOUDA N, SCHNEIDER A, et al. Copper deficiency: causes, manifestations, and treatment [J]. *Nutr Clin Pract*, 2019, 34(4): 504–513.
- [20] CENDROWSKA-PINKOSZ M, OSTROWSKA-LESKO M, OGNIK K, et al. Dietary copper deficiency leads to changes in gene expression indicating an increased demand for NADH in the prefrontal cortex of the rat's brain [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6706.
- [21] XU J, SU X, BURLEY S K, et al. Nuclear SOD1 in growth control, oxidative stress response, amyotrophic lateral sclerosis, and cancer [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 427.
- [22] SHAFIQ K, SANGHAI N, GUO Y, et al. Implication of post-translationally modified SOD1 in pathological aging [J]. *Geroscience*, 2021, 43(2): 507–515.
- [23] TRIST B G, DAVIES K M, COTTAM V, et al. Amyotrophic lateral sclerosis-like superoxide dismutase 1 proteinopathy is associated with neuronal loss in Parkinson's disease brain [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 134(1): 113–127.
- [24] KUO M T H, BECKMAN J S, SHAW C A. Neuroprotective effect of CuATSM on neurotoxin-induced motor neuron loss in an ALS mouse model [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 130: 104495.
- [25] LIU C, ZHAO Y, XI H, et al. The membrane interaction of alpha-synuclein [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 633727.
- [26] LI S, KERMAN K. Electrochemical detection of interaction between copper (II) and peptides related to pathological α -synuclein mutants [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(6): 3818–3826.
- [27] CALVO J S, Mulpuri N V, DAO A, et al. Membrane insertion exacerbates the α -Synuclein-Cu (II) dopamine oxidase activity; Metallothionein-3 targets and silences all α -synuclein-Cu (II) complexes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 158: 149–161.
- [28] WITTUNG-STAFSHEDE P. Crossroads between copper ions and amyloid formation in Parkinson's disease [J]. *Essays Biochem*, 2022, 66(7): 977–986.
- [29] LI Y, YANG C, WANG S, et al. Copper and iron ions accelerate the prion-like propagation of α -synuclein; a vicious cycle in Parkinson's disease [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163: 562–573.
- [30] LOTHIAN A, LAGO L, MUKHERJEE S, et al. Characterization of the metal status of natively purified alpha-synuclein from human blood, brain tissue, or recombinant sources using size exclusion ICP-MS reveals no significant binding of Cu, Fe or Zn [J]. *Metallomics*, 2019, 11(1): 128–140.
- [31] LAKARD S, PAVEL I A, LAKARD B. Electrochemical biosensing of dopamine neurotransmitter: a review [J]. *Biosensors*, 2021, 11(6): 179.
- [32] LATIF S, JAHANGEER M, MAKNOONRAZIA D, et al. Dopamine in Parkinson's disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 522: 114–126.
- [33] POST M R, SULZER D. The chemical tools for imaging dopamine release [J]. *Cell Chem Biol*, 2021, 28(6): 748–764.
- [34] LI Y, XIA Y, YIN S, et al. Targeting microglial α -synuclein/TLRs/NF- κ B/NLRP3 inflammasome axis in Parkinson's disease [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 719807.
- [35] RAJ K, KAUR P, GUPTA G D, et al. Metals associated neurodegeneration in Parkinson's disease: Insight to physiological, pathological mechanisms and management [J]. *Neurosci Lett*, 2021, 753: 135873.
- [36] ZHOU Q, ZHANG Y, LU L, et al. Copper induces microglia-mediated neuroinflammation through ROS/NF- κ B pathway and mitophagy disorder [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 168: 113369.
- [37] CRUCES-SANDE A, RODRÍGUEZ-PÉREZ A I, HERBELLO-HERMELO P, et al. Copper increases brain oxidative stress and enhances the ability of 6-hydroxydopamine to cause dopaminergic degeneration in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(4): 2845–2854.
- [38] NG M Y W, WAI T, SIMONSEN A. Quality control of the mitochondrion [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(7): 881–905.
- [39] TRIST B G, HARE D J, DOUBLE K L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(6): e13031.
- [40] MEZZAROBÀ L, ALFIERI D F, COLADOSIMÃO A N, et al. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases [J]. *Neurotoxicology*, 2019, 74: 230–241.
- [41] CHEN J, GAO X, ZHENG C, et al. Low-dose Cu exposure enhanced α -synuclein accumulation associates with mitochondrial impairments in mice model of Parkinson's disease [J]. *Toxicol Lett*, 2023, 387: 14–27.
- [42] VANDER POL A, VAN GILST W H, VOORS A A, et al. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future [J]. *Eur J Heart Fail*, 2019, 21(4): 425–435.
- [43] PERCÁRIO S, DASILVABARBOSA A, VARELA E L P, et al. Oxidative stress in Parkinson's disease: potential benefits of antioxidant supplementation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 2360872.

- [44] HEMMATI-DINARVAND M, SAEDI S, VALILO M, et al. Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of oxidant-antioxidant systems [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 709: 134296.
- [45] PYATHA S, KIM H, LEE D, et al. Association between heavy metal exposure and Parkinson's disease: a review of the mechanisms related to oxidative stress [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(12): 2467.
- [46] MAINA M B, AL-HILALY Y K, BURRA G, et al. Oxidative stress conditions result in trapping of PHF-core tau (297-391) intermediates [J]. *Cells*, 2021, 10(3): 703.
- [47] BEHL T, MADAAN P, SEHGAL A, et al. Mechanistic insights expatiating the redox-active-metal-mediated neuronal degeneration in Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 678.
- [48] GONZALEZ-ALCOCER A, GOPAR-CUEVAS Y, SOTO-DOMINGUEZ A, et al. Combined chronic copper exposure and aging lead to neurotoxicity *in vivo* [J]. *Neurotoxicology*, 2023, 95: 181-192.
- [49] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [50] TANG D, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 107-125.
- [51] QIU Y, CAO Y, CAO W, et al. The application of ferroptosis in diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104919.
- [52] 江全鑫, 陈素贞, 刘军力. 铜蓝蛋白在脂质代谢稳态调控中作用的研究进展 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2024, 44(1): 124-130.
- JIANG Q X, CHEN S Z, LIU J L. Research progress in ceruloplasmin regulation of lipid metabolism homeostasis [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ Med Sci*, 2024, 44(1): 124-130.
- [53] YANG M, WU X, HU J, et al. COMM10 inhibits HIF1 α /CP loop to enhance ferroptosis and radiosensitivity by disrupting Cu-Fe balance in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2022, 76(5): 1138-1150.

[收稿日期] 2024-04-29



《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),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比较医学相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究进展、继续教育、设施设备、3R等。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》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://zgswydw.cnjournals.com>

期待您的来稿!

李亚青,王灿,苗明三. 肝性脑病造模方法与临床吻合度分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 125-137.

Li YQ, Wang C, Miao MS. Analysis of hepatic encephalopathy modeling methods and clinical match [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 125-137.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.016

肝性脑病造模方法与临床吻合度分析

李亚青¹,王 灿¹,苗明三^{1,2*}

(1.河南中医药大学药学院,郑州 450046;2.河南中医药大学豫药全产业链研发河南省协同创新中心,郑州 450046)

【摘要】 分析现有的肝性脑病动物模型方法与临床吻合度,以期为建立更符合中西医临床病症特点的动物模型提供思路。在中国知网、万方数据库,以“肝性脑病”“肝昏迷”“动物”“动物模型”为关键词,在 Pubmed 数据库,以“hepatic encephalopathy”“hepatic coma”“animal model”“animal”为关键词进行检索,整理有具体动物模型制备方法的有效文献,根据不同造模因素和方式进行整理、分类,概括造模方法、特点,依据肝性脑病中西医临床病症特点对动物模型的临床吻合情况进行赋值、分析。有效文献 128 篇,共 11 种动物模型,包含 15 种不同的造模方法,西医吻合度最高的是 CCl₄ 油溶液腹腔注射+灌胃+氯化铵腹腔注射模型(吻合度 92%),中医吻合度最高的是 CCl₄ 油溶液腹腔注射+乙醇水溶液自饮模型(吻合度 65%),但缺乏中西医吻合度均较高的肝性脑病动物模型。目前缺乏中西医病症特点结合的肝性脑病动物模型,结合中西医病症特点进行改进和完善,有望为肝性脑病的机制研究和临床诊治提供思路。

【关键词】 肝性脑病;肝昏迷;动物模型;病症特点;临床吻合度

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0125-13

Analysis of hepatic encephalopathy modeling methods and clinical match

LI Yaqing¹, WANG Can¹, MIAO Mingsan^{1,2*}

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

2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Henan Province, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 To analyze the existing method for obtaining animal models of hepatic encephalopathy and their clinical characteristics with a view to providing ideas for the establishment of animal models that are more in line with the clinical characteristics of Chinese and Western medicine. To search the Chinese Knowledge Network and Wanfang database, the keywords “hepatic encephalopathy”, “hepatic coma”, “animal”, and “animal model” were used. For the Pubmed database, “hepatic encephalopathy”, “hepatic coma”, “animal model”, and “animal” were used as search keywords. The literature on effective method of specific animal model preparation was collated and classified according to different modeling factors and method. The modeling method and characteristics were summarized, and the degree to which the animal models shared the clinical characteristics and symptoms of hepatic encephalopathy according to Chinese and Western medicine was assessed. The clinical match of the animal model was assigned and analyzed according to the clinical symptoms of hepatic encephalopathy in Chinese and Western medicine. There were 128 valid literature articles featuring 11 animal models obtained using 15 different modeling method. The highest degree of agreement with Western medicine was the CCl₄ oil solution intraperitoneal injection+gavage+ammonium chloride intraperitoneal injection model (92%), and the

【基金项目】河南省重大专项(221100310400);河南省国际合作重点项目(231111521200);岐黄学者(国中医药人教函2022-6)。

【作者简介】李亚青(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中药药理学。E-mail:aspringlee@163.com

【通信作者】苗明三(1965—),男,博士,教授,研究方向:中药药理教学与研究。E-mail:miaomingsan@163.com

highest degree of agreement with traditional Chinese medicine was the CCl₄ oil solution intraperitoneal injection + ethanol aqueous solution self-drinking model (65%), but both lacked a combination of Chinese and Western medicine clinical characteristics. At present, animal models of hepatic encephalopathy that combine the characteristics of Chinese and Western medicine are lacking. Improving and refining the models to encompass the characteristics of both Chinese and Western medicine are expected to provide ideas for mechanism research and advance the clinical diagnosis and treatment of hepatic encephalopathy.

【Keywords】 hepatic encephalopathy; hepatic coma; animal model; disease characteristics; clinical match

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

肝性脑病 (hepatic encephalopathy, HE) 是指由于严重肝功能障碍和/或门体分流,内源或外源性毒性代谢产物未经肝转化清除,在体内蓄积导致的以全身代谢紊乱为基础的中枢神经系统功能失调综合征^[1-2],病情多变、预后极差,是各种终末期肝病最常见的死亡原因^[3]。HE 的病理生理与发病机制较复杂,迄今未完全阐明,暂时没有哪种学说能够单独解释 HE 的各种神经精神症状^[4-5],亦尚无针对 HE 相关神经损伤的特效疗法^[6]。目前 HE 的机制和特效药物的研究还需要借助大量动物实验,而单纯的西医疾病动物模型已经不能覆盖复杂的发病机制,单纯的中医证候模型存在多个疾病证候相同的弊端,因此基于 HE 中西医临床病症特点分析现有的 HE 动物模型,为制备病证结合的 HE 动物模型提供完善和改进思路,对 HE 发病机制的探究和临床早期预防、及时有效的诊疗有重要意义。

1 HE 的病因病机

1.1 现代医学病因病机

HE 的概念中表示,其表现为广泛的神经或精神异常,从亚临床改变到昏迷^[7]。国际肝性脑病和氮代谢学会 (ISHEN) 引用了 AASLD/EASL 实践指南中 HE 的定义^[8]。现代医学对 HE 病因病机的研究和理解集中在氨中毒学说、炎症反应损伤、锰中毒学说、脑干网状系统功能紊乱、氨基酸失衡学说和假性神经递质学说等,认为 HE 最常见的诱因是感染,其中包括尿路和呼吸道、肠道、腹腔等感染,尤其以腹腔感染最为重要,其次是消化道出血、电解质和酸碱平衡紊乱。治疗集中在大量放腹水、利尿、高蛋白饮食以及使用苯二氮类药物和麻醉剂等^[2,9]。

1.2 中医学病因病机

中医学没有直接记载肝性脑病病名,但根据主要临床表现和体征,将本病归为“肝厥”“黄疸”“神昏”“闭证”等疾病范畴^[10]。《素问·热论篇》记载

“肝热病者,小便先黄,腹痛、多卧、身热;热争则狂言及惊,胁满痛,手足躁,不得安卧”,因此多数学者认为其病位主要在心、脑,与脾、胃、肝、大肠密切相关。中医认为本病因各种致病因素,毒、湿、热、痰、瘀、虚相互影响,致肝失疏泄、腑气不通、正虚邪胜扰乱心神、清窍不通,而见神昏谵语或呼之不应^[11]。各医家对 HE 的中医病因病机理解不同,临床中医证型也分为多种,但几种核心证型包括痰热蒙窍证、热毒炽盛证、肝肾阴虚证、脾肾阳虚证、阴阳俱脱证。

2 HE 诊断及临床特点分析

2.1 现代医学诊断

参考《肝硬化肝性脑病诊疗指南》(2018 年)^[2]和《2022 年欧洲肝病学会临床实践指南:肝性脑病的管理》^[12],HE 诊断主要依据患者基础疾病、神经学症状,包括谵妄、欣快等精神状态异常和肌紧张、腱反射亢进、扑翼样震颤等神经运动功能异常等来查找可能存在的诱因^[13]。现代医学主要从 HE 临床表现分级、实验室检查、辅助检查和并发症几方面进行 HE 诊断。其中以临床表现分级、神经精神异常表现和实验室检查作为 HE 诊断标准,因此,根据模型评价新方法^[14],将评价动物模型的诊断标准总结为核心指标(I)和相关指标(II),具体为: I: ①HE 临床表现(脑功能分级);②血氨升高;③神经精神症状;④神经运动障碍; II: ①肝功能检测阳性;②内窥镜检查阳性;③B 超检查;④脑 CT、MRI 检查结果阳性;⑤脑电图检查结果阳性。赋值方法为: I: 满足 I ①中任意一项分级积分 20%, I ②积分 20%, I ③④各 10%,共计 60%; II: II ①②③④⑤中每项赋值 8%,累计 40%。总分 100%。其中,参考动物脑功能评分法^[15]对动物模型进行 HE 临床表现分级(若出现表中 1~4 级行为表现的任一症状,即可诊断为 HE)。具体诊断类型及表现详见表 1。

表 1 HE 现代医学诊断
Table 1 HE modern medical diagnosis

诊断类型 Diagnosis type	表现 Performance	
	0 级:行为正常 Grade 0: Normal behavior	
	1 级:嗜睡,反应迟缓,行为活动减少,反射正常 Grade 1: Lethargy, delayed reaction, reduced behavioral activity, normal reflexes	
	①HE 临床认知表现(脑动能分级) ^[16] ① HE clinical cognitive manifestations (Brain kinetic rating) ^[16]	2 级:共济失调,但反射仍正常 Grade 2: Ataxia, but reflexes still normal
	3 级:反射逐渐消失 Grade 3: Gradual loss of reflexes	
	4 级:昏迷 Grade 4: Comatose	
I		
主要并发症 Main complications	②血氨升高 ②Elevation of blood ammonia	
	③神经精神症状:情绪不稳定、易怒、焦虑、抑郁 ③Neuropsychiatric symptoms: emotional instability, irritability, anxiety, depression	
	④神经运动障碍:肌阵挛、肌张力增高、动作不协调 ④Neuromotor disorders: myoclonus, increased muscle tone, uncoordinated movements	
	①肝功能检测:ALT、AST、血清总胆红素、直接胆红素、BUN、肌酐均升高,氨基酸酮体比例增加,低钠血症、低镁血症和低磷血症等电解质紊乱 ①Liver function tests: ALT, AST, serum total bilirubin, direct bilirubin, BUN, creatinine are elevated, the proportion of amino acid ketone bodies increased, hyponatremia, hypomagnesemia and hypophosphatemia and other electrolyte disorders	
	②内窥镜检查:食管黏膜充血、水肿、糜烂;食管和胃静脉曲张 ②Endoscopy: esophageal mucosal congestion, edema, erosion; esophageal and gastric varices	
II		
辅助检查 Auxiliary tests	③B 超检查:肝肿大、肝门静脉血管扩张、肝组织回声不均匀 ③B-ultrasound: enlarged liver, dilated blood vessels of hepatic portal vein, uneven echogenicity of liver tissues	
	④CT、MRI 检查:脑表面脑沟纹模糊不清,脑沟变浅;脑室特别是第三脑室和额角脑室系统扩大;颅内低密度区或高信号区 ④CT, MRI: blurring of cerebral sulcus patterns on the surface of the brain, shallow cerebral sulcus; enlarged ventricles, especially the third ventricle and the frontal horn ventricular system; intracranial low-density areas or high signal areas	
	⑤脑电图检查:显示慢波活动、棘波活动和间歇性高幅 delta 波活动等异常 ⑤Electroencephalography: abnormalities such as slow wave activity, spiking wave activity and intermittent high-amplitude delta wave activity	

2.2 中医辨证分型

HE 的中医分型众说纷纭,现参照中国中医药出版社出版的《实用中医消化病学》(2022 版)^[17]和人民卫生出版社出版的《肝性脑病》(2020 版)^[18],将 HE 辩证为肝风内动证、热毒炽盛证、阳明腑实证、痰热蒙窍证、阴阳俱脱证 5 个中医证型,具体证型及其临床表现详见表 2。

现根据临床表现将可用于 HE 动物模型的中医诊断标准总结为主证(I)和次证(II),如下, I:①眩晕、步态不稳;②四肢震颤或抽搐;③精神萎靡、嗜睡;④躁动不安;⑤腹胀;⑥昏睡或昏迷、气息微弱、四肢厥冷; II:①皮肤和黏膜发黄;②饮水增多;③发热;④小便短赤、大便色暗;⑤食欲减退、乏力;

⑥大便黏滞;⑦小便不利;⑧大便溏薄或自遗。判定动物模型临床吻合情况时,符合一项中医主证积分 10%,符合一项中医次证积分 5%,总分 100%^[19-21]。

3 现有的 HE 动物模型分析

现有的 HE 模型动物主要有 SD 大鼠、Wistar 大鼠、KM 小鼠、BALB/c 小鼠、C57BL/6 小鼠,其中,以雄性 SD 大鼠、雄性 Wistar 大鼠应用最多。此外,也有新西兰兔、雄性食蟹猴等,7 日龄的 SD 大鼠幼鼠(体重为 11~17 g)用来制备高胆红素血症脑病,模拟幼儿高胆红素血症引发的脑病模型。在分析动物模型时,往往根据能体现在动物身上的临床指标

进行评价。

3.1 HE 动物模型评价指标

现有的 HE 动物模型大多采用的检测评价指标包括动物一般状态、HE 临床分级评分(脑动能分级)、行为学检测、血氨测定、肝功能指标测定、脑组织相关检测及其他检测,此外,根据研究需要,个别文献还测定了动物肠道 pH 值、神经递质含量,前食欲素原 mRNA 检测等^[10-11,16],详见表 3。

3.2 现有的 HE 动物模型

在整理出的 128 篇有效文献中,按照诱导因素不同,整理出 11 种 HE 动物模型,包含 15 种不同的造模方法。现基于 2.1、2.2 诊断标准,结合 3.1 模型评价常用指标,将各模型具体造模方法、特点及临床吻合情况进行总结,吻合度高低的标准为:高吻合度 $\geq 70\%$, $50\% \leq$ 中吻合度 $< 70\%$,低吻合度 $< 50\%$ ^[22]。现有的 HE 动物模型详见表 4。

表 2 HE 中医辨证分型
Table 2 HE Chinese medicine diagnostic types

中医证型 TCM certificate	临床表现 Clinical manifestations	舌脉 Tongue and pulse
肝风内动证 Syndrome of the liver and wind	眩晕、头痛、肢麻震颤或手足抽搐 Dizziness, headache, numbness and tremor of limbs or convulsions of hands and feet	舌红苔薄,脉弦 Red tongue with thin moss and stringy pulse
热毒炽盛证 Syndrome of excessive heat and toxicity	身热、躁动不安、神昏谵语、皮肤斑疹或衄血 Heat, restlessness, delirium, skin rash or epistaxis	舌质红绛,苔黄或少,脉弦滑 Red tongue, yellow or scanty moss, slippery pulse
阳明腑实证 Syndrome of internal organs of the Yangming bowels	大便不畅或干燥、腹胀、烦渴引饮、潮热汗出、尿短赤 Unruly or dry stools, abdominal distension, thirst, hot flashes and sweating, short and reddish urine	舌质红,苔黄腻或黄燥,脉滑数 Red tongue, yellowish or dry moss, slippery pulse
痰热蒙窍证 Syndrome of which phlegm and heat obscure the orifices	躁动不安、谵语、口苦、大便黏滞不爽,尿短赤 Delirium, bitter taste in the mouth, sticky stools, short and reddish urine	舌红苔黄腻,脉滑数 Red tongue with yellowish greasy coating and smooth pulse
阴阳俱脱证 Syndrome of equilibrium between yin and yang	昏睡或昏迷、气息微弱、四肢厥冷、小便不利、大便自遗 Lethargy or coma, weak breath, cold extremities, dysuria, spontaneous stools	舌痿,脉细弱或脉微欲绝 Tongue impotence, weak pulse or weak pulse

表 3 HE 动物模型常用检测评价指标
Table 3 Commonly used evaluation indexes for HE animal models

检测类型 Types of test	指标 Indicators
一般状态 General status	饮食、精神、运动、毛色、体质量等 Diet, spirit, locomotion, coat color, body mass, etc.
实验动物脑动能分级 Grading of cerebral kinetic energy of experimental animals	0 级(11 分):行为正常 Grade 0 (11 points): normal behavior 1 级(>10 且<11 分):嗜睡,反应迟缓,行为活动减少,反射正常 Grade 1 (>10 and <11 points): lethargy, slow response, reduced behavioral activities, normal reflexes 2 级(≥ 9 且 ≤ 10 分):共济失调,但反射仍正常 Grade 2 (≥ 9 and ≤ 10 points): ataxia, but reflexes still normal 3 级(>0 且<9 分):反射逐渐消失 Grade 3 (>0 and <9 points): gradual loss of reflexes 4 级(0 分):角膜反射消失,动物昏迷 Grade 4 (0 points): corneal reflexes disappeared, animal comatose
行为学 Behavior	精神状态:高架十字实验 Mental status: elevated cross test 自发运动能力:旷场实验 Spontaneous locomotor activity: open field test 空间学习记忆能力:Morris 水迷宫实验 Spatial learning and memory ability: Morris water maze test 运动协调能力检测:运动疲劳或旋转实验 Motor coordination ability test: motor fatigue or rotation experiment 明暗箱实验、步态实验等 Light and dark box test, gait test, etc.

续表3

检测类型 Types of test	指标 Indicators
血氨测定 Blood ammonia measurement	全自动生化分析仪检测大鼠血氨水平、血浆内毒素 Fully automatic biochemical analyzer to measure blood ammonia level and plasma endotoxin in rats
肝功能指标 Liver function indicators	血清 ALT、AST、白蛋白和总胆红素、尿素氮等检测 Serum ALT, AST, albumin and total bilirubin, urea nitrogen and other tests
	肝组织活检、肝组织 HE 病理染色、NADPH-d 染色、尼式染色等 Liver tissue biopsy, HE pathology staining of liver tissue, NADPH-d staining, Ni-staining, etc.
	肝组织免疫组化:TLR4、NF-κB p65、NLRP3、Caspase1 蛋白含量等 Liver tissue immunohistochemistry: TLR4, NF-κB p65, NLRP3, Caspase1 protein content, etc.
脑组织相关检测 Brain tissue related tests	血脑屏障通透性以及脑内 EB 含量表示 Blood-brain barrier permeability and EB content in the brain
	脑含水量测算:脑组织含水量=(湿重-干重)/湿重×100% Brain water content: brain tissue water content = (wet weight - dry weight)/wet weight × 100%
	RT-qPCR 法检测脑组织中 TNF-α、IL-1 β、IL-6 mRNA 表达 Detection of TNF-α, IL-1 β, IL-6 mRNA expression in brain tissue by RT-qPCR
其他 Others	Western blot 法检测 NF-κB p65、PI3K、p-AKT 及其磷酸化等蛋白表达 Detection of NF-κB p65, PI3K, p-AKT and its phosphorylation and other protein expression by Western blot method
	ELISA 法检测脑氨含量、TNF-α、IL-1β、IL-6、LPS 等水平 ELISA for brain ammonia, TNF-α, IL-1β, IL-6, LPS, etc.
	脑电图测试、脑部磁共振检查、食管粘膜病理检测等 Electroencephalography, magnetic resonance imaging of the brain, esophageal mucosal pathology testing, etc.

表 4 现有的 HE 动物模型
Table 4 Existing animal models of HE

模型分类(11 种) Model categorization (11 types)	造模方法(15 种) Modeling methods (15 types)	模型动物 Model animals	模型特点 Model characteristics	临床吻合情况 Clinical match
TAA HE 模型 TAA HE model	硫代乙酰胺 (TAA) 腹腔注射 ^[23-25] :使动物体内 TAA 总量达 600 mg/kg (200 mg/kg, 每天 1 次, 连续 3 d; 或 300 mg/kg, 每天 1 次, 连续 2 d; 或 300 mg/kg, 每次 2 d, 连续 3 次); 或 TAA 灌胃 ^[15] : 20 mg/mL, 每天 1 次, 连续 4 d Thioacetamide (TAA) intraperitoneal injection ^[23-25] : to make the total amount of TAA in the animal reach 600 mg/kg (200 mg/kg, 1 time/d for 3 d; or 300 mg/kg, 1 time/d for 2 d; or 300 mg/kg, 2 d/time for 3 times); or TAA gavage ^[15] : 20 mg/mL, 1 time/d for 4 d	雄性 SD、Wistar 大鼠, C57BL/6、KM 小鼠 Male SD, Wistar rats, C57BL/6, KM mice	优点: 时间、剂量可控, 诱导率高, 致死率低; 缺点: 可引起腹水、脾肿大 Advantages: controllable time and dose, high induction rate, low lethality; Disadvantages: may cause ascites, spleen enlargement	西医: I ①②③④ II ②③④, 吻合度 84%; 中医: I ①②③⑤ II ⑤⑧, 吻合度 50%
	CCl ₄ 灌胃 + 结扎、切除 2/3 肝法 CCl ₄ gavage + ligation, resection of 2/3 of the liver method	灌胃 20% CCl ₄ 油溶液 5 mL/kg, 每天 1 次, 连续 2 d 后, 暴露肝, 依次结扎肝蒂部左前叶及中叶, 切除此两叶, 再结扎暴露的肝右叶, 不切除 ^[26] Gavage of 20% CCl ₄ oil solution 5 mL/kg, 1 time/d, 2 consecutive days, exposure of the liver, ligation of the left anterior lobe of the hepatic tip and the middle lobe, resection of these two lobes, and then ligation of the right lobe of the liver exposed without resection ^[26]	雄性 Wistar 大鼠 Male Wistar rats	优点: 可重复性、稳定性较高; 缺点: 操作复杂, 有肝缺血再灌注损伤的可能 Advantages: repeatable, high stability; Disadvantages: complexity of the operation, there are possibility of hepatic ischemia/reperfusion injury

续表4

模型分类(11种) Model categorization (11 types)	造模方法(15种) Modeling methods (15 types)	模型动物 Model animals	模型特点 Model characteristics	临床吻合情况 Clinical match
CCl ₄ +氯化铵 腹腔注射 + CCl ₄ 灌胃 CCl ₄ + ammonium chloride intraperitoneal injection + CCl ₄ gavage	0.4% CCl ₄ 油溶液 (10 mL/kg) 腹腔注射联合灌胃,再腹腔注射 0.5 mL/10 g 的氯化铵溶 ^[27] 0.4% CCl ₄ oil solution (10 mL/ kg) intraperitoneal injection combined with gavage, and then intraperitoneal injection of 0.5 mL/10 g of ammonium chloride soluble ^[27]	小鼠 Mice	优点:成模快、简单、 可重复;缺点:双重 CCl ₄ 易对动物造成 更大伤害 Advantages: fast, simple, repeatable modeling; Disadvantages: double CCl ₄ is easy to cause more damage to the animal	西医: I ①②③④ II ① ②③④, 吻合度 92%; 中医: I ①②⑤⑥ II ① ④⑤⑥, 吻合度 60% Western medicine: I ① ②③④ II ①②③④, 92% match; TCM: ① ②⑤⑥ II ①④⑤⑥, 60% match
CCl ₄ + TAA 注射 CCl ₄ + TAA injection	40% CCl ₄ 油溶液皮下注射,2次/ 周,持续9周/6周/12周 ^[28-31] ; 首周每次注射5 mL/kg,而后每 次注射3 mL/kg,随后TAA腹腔 注射,每次注射300 mg/kg,每天 1次,连续3 d Subcutaneous injection of 40% CCl ₄ oil solution 2 times/week for 9 weeks/6 weeks/12 weeks ^[28-31] ; 5 mL/kg per injection in the first week, 3 mL/kg per injection thereafter, followed by intraperitoneal injection of TAA, 300 mg/kg per injection, 1 time/d for 3 d	雄性Wistar大鼠; 雌、雄SD大鼠 Male Wistar rats; male and female SD rats	优点:剂量可控;缺 点:操作复杂、生物 局限性 Advantages: controllable dosage; Disadvantages: manipulation	西医: I ①②④ II ①② ③④, 吻合度 82%;中 医: I ②③⑤⑥ II ②③ ④, 吻合度 55% Western medicine: I ① ②④ II ①②③④, 82% match; TCM: I ②③ ⑤⑥ II ②③④, 55% match
CCl ₄ 油溶液 HE 模型 CCl ₄ oil solution HE model	腹部皮下注射40% CCl ₄ 油溶液, 5%乙醇自来水溶液自饮 ^[32-34] 。 首次给药每只鼠0.5 mL/100 g, 以后每只0.3 mL/100 g,每1周/ 2次,共注射9周/12周 Abdominal subcutaneous injection of 40% CCl ₄ oil solution, 5% ethanol tap water solution self- drinking ^[32-34] . First administration 0.5 mL/100 g per rat, then 0.3 mL/100 g per rat, every 1 week/2 times, total 9 weeks/12 weeks	SD、Wistar 大鼠 SD, Wistar rats	优点:简单,成本低; 缺点:自饮剂量、时 间不易控制 Advantages: simple, low cost; Disadvantages: self- drinking dosage and time are not easy to control	西医: I ①②③④ II ① ③⑤, 吻合度 84%;中 医: I ①②③④⑤ II ① ④⑤, 吻合度 65% Western medicine: I ① ②③④ II ①③⑤, 84% match; TCM: I ①② ③④⑤ II ①④⑤, 65% match
CCl ₄ 注射 + 乙醇水溶液 自饮 CCl ₄ injection + ethanol aqueous solution self-drinking	皮下注射50% CCl ₄ 油溶液,2 次/周,前2周剂量为0.3 mL/ kg,后8周为0.4 mL/kg,共注射 10周,第11周耳缘静脉注射10 μg/mL的内毒素生理盐水溶液 1次 ^[35] Subcutaneous injection of 50% CCl ₄ oil solution, 2 times/week, the dose of 0.3 mL/kg for the first 2 weeks, 0.4 mL/kg for the last 8 weeks, a total of 10 weeks injections, the 11th week ear margin intravenous injection of 10 μg/mL endotoxin saline solution 1 time ^[35]	新西兰兔 New Zealand rabbits	优点:较真实地反映 HE的发展过程;缺 点:时间长,可能会 导致动物早期死亡 Advantages: more realistically reflecting the process of the development of HE; Disadvantages: a long period of time, which may cause the early death of animals	西医: I ①②③ II ①② ③, 吻合度 74%;中医: I ①②③⑤⑥ II ⑥ 吻 合度 55% Western medicine: I ① ②③ II ①②③, 74% match; TCM: I ①② ③⑤⑥ II ⑥, 55% match

续表4

模型分类(11种) Model categorization (11 types)	造模方法(15种) Modeling methods (15 types)	模型动物 Model animals	模型特点 Model characteristics	临床吻合情况 Clinical match
D-Gal HE 模型 ^[36-37] D-Gal HE model ^[36-37]	D-氨基半乳糖 (D-Gal) 单次腹腔注射 2.5 g/kg 或前臂静脉注射 0.27 g/kg D-Galactosamine (D-Gal) is injected intraperitoneally at 2.5 g/kg or intravenously at 0.27 g/kg into the forearm	雄性 SD 大鼠、食蟹猴 Male SD rats and cynomolgus monkeys	优点:操作简单、快速;缺点:缺乏可控性,且只能模拟疾病发生的早期阶段 Advantages: simple and fast; Disadvantages: lack of controllability and can only simulate the early stages of disease development	西医: I ①② II ①②③④, 吻合度 72%; 中医: I ②⑥ II ③⑤⑥, 吻合度 35% Western medicine: I ①② II ①②③④, 72% match; TCM: I ②⑥ II ③⑤⑥, 35% match
APAP HE 模型 APAP HE model	对乙酰氨基酚 (APAP) 单次腹膜内注射, 1000 mg/kg ^[7] Single intraperitoneal injection of Acetaminophen (APAP), 1000 mg/kg ^[7]	BALB/c 小鼠 BALB/c mice	优点:简便,成模快;缺点:仅适用于小型动物 Advantages: simple, fast modeling; Disadvantages: only for small animals	西医: I ①③④ II ①②④, 吻合度 64%; 中医: I ①③⑥ II ⑦⑧, 吻合度 45% Western medicine: I ①③④ II ①②④, 64% match; TCM: I ①③⑥ II ⑦⑧, 45% match
肝叶切除+氯化铵 HE 模型 Hepatic lobectomy + ammonium chloride HE model	肝叶大部分切除,每隔 5 min 向十二指肠插管中注入 2.5% 复方氯化铵溶液 5 mL ^[38] Most of the hepatic lobes are resected, and 5 mL of 2.5% compound ammonium chloride is injected into the duodenal cannula every 5 min ^[38]	新西兰兔 New Zealand rabbits	优点:操作简单;缺点:对动物创伤较大 Advantages: simple operation; Disadvantages: more traumatic to the animal	西医: I ①②④ II ①②③④, 吻合度 82%; 中医: I ②⑤⑥ II ⑧, 吻合度 35% Western medicine: I ①②④ II ①②③④, 82% match; TCM: I ②⑤⑥ II ⑧, 35% match
门腔静脉侧-侧分流 HE 模型 Portal vein side-to-side shunt HE model	麻醉,剖腹暴露门静脉,用手术缝线将门静脉及其一个分支与体内其他部位连接,形成侧-侧分流通路 ^[30] Anesthesia, dissect the abdomen to expose the portal vein, and connect the portal vein and one of its branches to other parts of the body with surgical sutures to form a side-to-side shunt pathway ^[30]	雌雄 SD 大鼠 Male and female SD rats	优点:时间短,成模快;缺点:创伤较大,易引起出血、感染 Advantages: short time, fast modeling; Disadvantages: more traumatic, prone to bleeding and infection	西医: I ①④ II ①②④, 吻合度 54%; 中医: I ①②④⑥ II ⑦⑧, 吻合度 50% Western medicine: I ①④ II ①②④, 54% match; TCM: I ①②④⑥ II ⑦⑧, 50% match
胆管结扎 HE 模型 Bile duct ligation HE model	麻醉,开腹,找到胆管并进行结扎,以不要损伤其他组织为度 ^[39] Anesthesia, open the abdomen, locate the bile duct and ligate it to the extent that it does not damage other tissues ^[39]	雄性 Wistar 大鼠 Male Wistar rats	优点:操作简便;缺点:可重复性不高,病程较短 Advantages: easy to operate; Disadvantages: low reproducibility, shorter duration of the disease	西医: I ①②④ II ①②⑥, 吻合度 60%; 中医: I ②③⑤⑥ II ①④⑤⑥, 吻合度 60% Western medicine: I ①②④ II ①②⑥, 66% match; TCM: I ②③⑤⑥ II ①④⑤⑥, 60% match
醋酸铵 HE 模型 Ammonium acetate HE model	25% 醋酸铵饮食连续喂养 4 周 ^[40] 25% ammonium acetate diet continuously fed for 4 weeks ^[40]	雄性 Wistar 大鼠 Male Wistar rats	优点:简单,成功率高;缺点:易造成动物机能损害 Advantage: simple, high success rate; Disadvantage: easy to cause damage to animal functions	西医: I ①②④ II ①②③⑧, 吻合度 74%; 中医: I ①②⑤⑥ II ①④⑤⑧, 吻合度 60% Western medicine: I ①②④ II ①②③⑧, 74% match; TCM: I ①②⑤⑥ II ①④⑤⑧, 60% match

续表4

模型分类(11种) Model categorization (11 types)	造模方法(15种) Modeling methods (15 types)	模型动物 Model animals	模型特点 Model characteristics	临床吻合情况 Clinical match
胆红素 HE 模型 Bilirubin HE model	单次腹腔注射胆红素, 150 mg/kg ^[41] Single intraperitoneal injection of bilirubin, 150 mg/kg ^[41]	7日龄 SD 大鼠幼鼠(体重 11~17 g) 7-day-old SD rat pups (body weight 11~17 g)	优点: 操作简单; 缺点: 结果易受饮食、环境等影响 Advantage: easy to operate; Disadvantage: the results are easily affected by the diet, environment, etc.	西医: I ①② II ①③④, 吻合度 64%; 中医: I ②③⑤⑥ II ①④⑤⑥, 吻合度 60% Western medicine: I ①② II ①③④, 64% match; TCM: I ②③⑤⑥ II ①④⑤⑥, 60% match
基因敲除 HE 模型 Knockout HE model	敲除肝特异性 GS、Albumin 基因、Ugt1a1 基因等 ^[42] Knockout of liver-specific GS, Albumin gene, Ugt1a1 gene, etc. ^[42]	KO 小鼠 KO mice	优点: 高度模拟人类病理状态; 缺点: 结果难以转换、难以直接用于临床 Advantages: high simulation of human pathology; Disadvantages: difficult to convert the results, difficult to be used in the clinic	西医: I ①②③ II ①③④, 吻合度 74%; 中医: I ①②⑥ II ①⑤⑥, 吻合度 45% Western medicine: I ①②③ II ①③④, 74% match; TCM: I ①②⑥ II ①⑤⑥, 45% match

表 4 结果显示, 现有的建立 HE 动物模型的方式有药物、手术、基因 3 个方面, 各有优缺点, 相对而言, 西医临床吻合度普遍较高, 中医临床吻合度普遍不高, 其中, 西医吻合度最高的是 CCl₄ 油溶液腹腔注射+灌胃+氯化铵腹腔注射模型(吻合度 92%), 中医吻合度最高的是 CCl₄ 油溶液腹腔注射+乙醇水溶液自饮模型(吻合度 65%), 但缺乏中西医吻合度均同时较高的 HE 模型。

4 讨论

4.1 HE 动物模型特点

现有的 HE 动物模型中, CCl₄ 油溶液腹腔注射同时灌胃联合腹腔注射氯化铵模型西医吻合度最高, 其造模原理是 CCl₄ 可造成急性肝功能不全, 氯化铵溶液加重肝功能不全而引发 HE; CCl₄ 油溶液腹腔注射联合乙醇自来水溶液自饮模型中医吻合度最高, 其造模原理是 CCl₄ 引起肝细胞损伤和肝纤维化, 大量摄入乙醇模拟人类酗酒引起的肝损伤, 二者联合引起神经系统功能紊乱引发 HE。CCl₄ 是常见的工业有机溶剂, 进入体内后会被肝代谢为有毒的自由基, 对肝细胞产生直接毒性作用^[43]。腹腔注射 CCl₄ 油溶液, 可以使其迅速进入肝, 引起位置明确的肝损伤, 结合 CCl₄ 油溶液灌胃, 增加了肝对 CCl₄ 的摄取, 加重肝损伤, 氯化铵能在体内代谢释放出大量的氨气, 氯化铵腹腔注射进入体内, 增加血液中氨的浓度, 模拟 HE 患者高氨血症。该法复

制的 HE 动物模型, 动物表现出认知障碍、血氨升高、神经精神症状、神经运动障碍、肝功能阳性等 HE 疾病特点, 同时眩晕、步态不稳、四肢震颤、腹胀、昏睡、气息微弱等中医证候表现。CCl₄ 油溶液腹腔注射会引起肝的急性损伤, 肝功能衰竭导致肝不能有效解毒, 血液中的毒性物质无法被清除, 在脑部积聚形成氨、苯酚等脑内毒性物质, 干扰神经递质的正常传递和脑细胞的正常功能, 从而导致 HE 的发生, 表现出昏迷、抽搐、黄疸、腹水等肝功能衰竭的表现^[44], 其次, 乙醇水溶液自饮能够模拟酒精滥用导致的肝损伤^[45], 引起肝脂变性、纤维化以及肝细胞凋亡, 进一步加重了肝功能衰竭, 符合中医证型的痰热蒙窍证, 表现出眩晕、步态不稳、四肢震颤、嗜睡、腹胀、黏膜发黄、小便短赤、食欲减退等症状, CCl₄ 油溶液腹腔注射联合乙醇自来水溶液自饮法模拟肝损伤和毒性物质积聚的过程^[46]。因此, 这两种造模方法西医、中医临床吻合度分别较高。但当肝无法正常处理和清除体内的毒素时, 毒素就会积累在血液中, 进而对大脑产生影响, 导致神经精神异常的症状出现, 因此, 这两种造模若剂量和时间控制不当易对动物造成更大伤害, 且这两种造模方法并未达到中西医临床吻合度均同时较高, 因此还有待改进和完善, 力求复制既高度符合西医疾病特点又符合中医证候特点的 HE 动物模型。

其他的 HE 模型, 不论是药物还是手术诱导, 制备原理均明确且符合临床。临床 A 型 HE 与快速发

作的严重炎症和/或坏死性肝病导致的急性肝衰竭相关,B 型 HE 在没有实质肝病的情况下由门腔静脉分流引起,C 型 HE 伴有慢性肝衰竭。若按照 HE 临床分型,CCl₄ 油溶液腹腔注射+TAA 腹腔注射、CCl₄ 油溶液腹部皮下注射+乙醇自来水溶液自饮、CCl₄ 油溶液皮下注射+耳缘静脉注射内毒素、醋酸铵饮食、胆管结扎术均模拟 C 型 HE,门腔静脉侧-侧分流术制备 B 型 HE,其余大多为 A 型 HE,目前仍缺乏足够的由酒精、病毒和非酒精性脂肪性肝病(慢性肝病最常见的病因)诱导的 C 型 HE 动物模型^[40]。但各类模型均存在各自明确的优缺点:① TAA 诱导的 HE 模型,操作简单、重复性好,时间、剂量可控,诱导率较高,致死率较低,是目前国内外相对成熟和常用的动物 HE 模型,但高剂量、长期注射易导致全身性毒性反应和死亡,其副作用可能会引起腹水、脾肿大等病理改变;②肝叶切除、门腔静脉侧-侧分流、胆管结扎等手术法制备 HE 模型,手术操作复杂,需具备专业技术和经验,肝结扎和切除过程中会引起一定的肝缺血再灌注损伤,动物可能出现严重的肝功能衰竭和并发症^[30,37,39];③D-Gal 单次注射法操作简单、快速,但缺乏可控性,并且只能模拟疾病发生的早期阶段,限制了其在研究 HE 机制和治疗策略上的应用^[47];④注射胆红素法或造成胆汁淤积,模拟新生儿黄疸引起的肝损伤和 HE,但结果易受饮食、环境等影响等^[37,44]。

目前 HE 模型的共性缺点有以下 4 点:①常用的不同品类的大鼠、小鼠、兔子等动物生理特征和反应不同,这使得模型的可比性变得困难,且不同物种在肝结构和功能上存在一定的差异,这可能导致动物模型与人类疾病的特点不完全吻合,但肝结构和功能更接近人类的动物如猪、食蟹猴、基因敲除等实验成本高^[48];②手术法 HE 动物模型可重复性不高,且缺乏统一的操作标准和规范,导致不同实验室之间的实验结果差异较大;③每种造模方法的成模时间没有严格统一,不利于 HE 的药动力学研究;④大多模型未能模拟 HE 的整个疾病发展阶段等。最主要的是未能同时完全满足 HE 中西医临床病症特点。

4.2 HE 动物模型中西医临床吻合度差异较大的原因

目前的 HE 动物模型均能满足西医疾病特点,均是以满足 HE 疾病表现去复制动物模型,中医吻合度普遍较低,其主要原因是缺少中医证候因素的

诱因。可能原因是:①中医注重四诊合参,舌苔脉象是中医辨证分型的重要因素,而在动物身上不易获知,使得动物模型中医分型不够明确;②中医主要关注 HE 肝火上亢、气血不畅导致的精神障碍和肌肉症状,而西医则更加注重肝功能异常导致的认知和运动障碍;③中医强调肝气郁结导致的精神异常和消化系统症状,而西医则侧重于肝功能异常引起的神经精神异常和肝功能异常表现;④HE 通常发生在患有慢性肝病或急性肝衰竭的患者中,特征是脑功能受损,是一种神经精神综合征,虽然诱导肝功能衰竭和疾病的方法众多,但较少有神经和神经行为损害的特征,而且认知功能障碍,情绪性格改变等主要临床表现,在动物模型身上,往往通过行为学测试来评价,这存在外界干扰因素和主观因素,使得检测结果不能绝对准确,例如,动物行为学研究显示,TAA 长期喂养建立的 HE 模型在旷场实验中,中央活动时间与对照组无明显差异^[49];用门腔静脉分流术建立的 HE 动物模型在高架十字实验中,模型组动物的开臂、闭臂滞留时间与对照组无明显差异^[50-51];⑤中医辨证遵循整体观念,而现有的动物模型缺乏全面性,HE 被认为是氨基酸代谢紊乱、神经炎症反应以及神经递质异常等多种不同机制共同作用的结果,而目前的大多动物模型往往只模拟其中一种机制,难以全面地反映 HE 的复杂病理过程;⑥中医脏腑关系密切,脏腑辨证尤为重要,HE 患者常伴有肝功能受损,而动物模型往往只注重在脑部进行研究,忽略了全身脏腑的影响^[52];⑦HE 是一个逐渐加重的过程,目前的动物模型往往无法准确反映 HE 的发展过程,通常只能模拟其中某个阶段的疾病状态,无法完全呈现 HE 的整个疾病进程^[53];⑧目前的 HE 动物模型主要通过分析血液及脑组织的生化指标来评估 HE 的严重程度和病理变化,然而,在临床上评估 HE 的严重程度更多地依靠神经心理学测试和临床表现。

4.3 中西医病症特点结合的 HE 动物模型展望

基于 HE 中西医临床病症特点,复制 HE 动物模型时,可先满足西医疾病特点,再结合中医证候因素;或先还原中医证候诱因,再以药物或手术诱发 HE 疾病症状。总之既要有直接的疾病诱发因素,又需要明确的中医证候病因。具体可从以下几个方面对现有的 HE 模型进行完善:①可将常规饮水换为低浓度的乙醇水溶液自饮,模拟人类酒精肝的形成,弥补药物短期造模存在中医证型体现不足

的缺陷^[54];②C57BL/6 小鼠好斗,情绪易激,制备肝火亢盛模型可考虑 C57BL/6 小鼠,此外,中医认为,肝主怒,在药物造模的同时,增加夹尾、悬尾等应激方法,很好地来模拟人类情绪对疾病的影响,也有助于行为学结果呈现;③采用白天雌雄同笼饲养,夜间干扰失眠来模拟人类房劳致肾阳虚及睡眠不足导致肝阴虚的进程,来模拟阴阳俱虚证候^[55];④潮湿环境中用高脂饲料喂养,模拟外湿和脾胃湿热引起的湿热内盛证候^[56];⑤CCl₄ 或 TAA 注射联合温热类中药(干姜、肉桂等)灌胃法建立化学性肝损伤肝阴虚证;⑥为了提高 HE 动物模型的可重复性,有必要建立统一的动物中医证候评分标准和操作规范,并进行多中心的验证研究等。

总体而言,动物模型中西医临床吻合度不是绝对的,优缺点并存,但可以作为动物模型评价的直观方法,因此基于中西医临床病症特点,最大程度复制西医疾病特点和中医证候因素结合的 HE 中西医病症动物模型,有望为临床诊治 HE 提供实验依据,为中西医结合治疗 HE 指明方向。

参考文献:

[1] 李建锋, 王晓忠. 轻微型肝性脑病的中西医诊疗进展 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(9): 857-860.
LI J F, WANG X Z. Progress in diagnosis and treatment of mild hepatic encephalopathy with traditional Chinese and western medicine [J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2022, 32(9): 857-860.

[2] 徐小元, 丁惠国, 李文刚, 等. 肝硬化肝性脑病诊疗指南 [J]. 西南医科大学学报, 2018, 41(6): 477-490.
XU X Y, DING H G, LI W G, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of hepatic encephalopathy in liver cirrhosis [J]. J Southwest Med Univ, 2018, 41(6): 477-490.

[3] 朱荣火, 黄晶晶, 杜沁沁, 等. 中医治疗轻微型肝性脑病研究进展 [J]. 西部中医药, 2023, 36(5): 155-157.
ZHU R H, HUANG J J, DU Y Q, et al. Research progress of TCM therapy for minimal hepatic encephalopathy [J]. West J Tradit Chin Med, 2023, 36(5): 155-157.

[4] 张亮, 李浩, 汤善宏. 肝硬化血氨相关肝性脑病的诊治思考 [J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(12): 2942-2945.
ZHANG L, LI H, TANG S H. Reflections on the diagnosis and treatment of blood ammonia-related hepatic encephalopathy in liver cirrhosis [J]. J Clin Hepatol, 2023, 39(12): 2942-2945.

[5] 乐滢玉, 张荣臻, 肖伟松, 等. 肝性脑病发病机制的研究进展 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(5): 468-472.
LE Y Y, ZHANG R Z, XIAO W S, et al. Research progress on

pathogenesis of hepatic encephalopathy [J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2022, 32(5): 468-472.

[6] VILSTRUP H, AMODIO P, BAJAJ J, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease; 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver [J]. Hepatology, 2014, 60(2): 715-735.

[7] OMMATI M M, JAMSHIDZADEH A, SAEED M, et al. Dextromethorphan improves locomotor activity and decreases brain oxidative stress and inflammation in an animal model of acute liver failure [J]. Clin Exp Hepatol, 2022, 8(3): 178-187.

[8] 王宪波, 时克. 肝性脑病的中西医结合诊疗进展与展望 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(9): 1969-1973.
WANG X B, SHI K. Integrated traditional Chinese and Western medicine diagnosis and treatment of hepatic encephalopathy: Advances and perspectives [J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(9): 1969-1973.

[9] 孟书静, 张强, 苏醒, 等. 肝硬化患者发生肝性脑病危险因素的 Meta 分析 [J]. 承德医学院学报, 2022, 39(4): 302-307.
MENG S J, ZHANG Q, SU X, et al. Meta-analysis of risk factors for hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis [J]. J Chengde Med Univ, 2022, 39(4): 302-307.

[10] 林玉培, 王挺帅, 刘晓萍, 等. 中医药调控 NF-κB 信号通路改善神经炎症防治肝性脑病的研究进展 [J]. 中医学报, 2023, 38(8): 1606-1613.
LIN Y P, WANG T S, LIU X P, et al. Research progress of TCM improving neuroinflammation and prevent hepatic encephalopathy by regulating NF-κB signaling pathway [J]. Acta Chin Med, 2023, 38(8): 1606-1613.

[11] 石浩, 刘永刚, 李京涛, 等. 名中医常占杰从肝-肠-脑论治肝性脑病经验 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(7): 642-644.
SHI H, LIU Y G, LI J T, et al. Chang Zhanjie's experience in treating hepatic encephalopathy from liver-intestine-brain [J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2022, 32(7): 642-644.

[12] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines on the management of hepatic encephalopathy [J]. J Hepatol, 2022, 77(3): 807-824.

[13] 王天珩, 姜彩娥. 酒精性肝病伴酒精戒断综合征、高血氨症 1 例 [J]. 医学理论与实践, 2019, 32(3): 410, 426.
WANG T H, JIANG C E. Alcoholic liver disease with alcohol withdrawal syndrome and hyperammonemia; a case report [J]. J Med Theory Pract, 2019, 32(3): 410, 426.

[14] 田硕, 曹利华, 苗明三, 等. 基于临床中西医病症特点的中医药动物模型评价新方法 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(6): 165-169.
TIAN S, CAO L H, MIAO M S, et al. A new method for the

- evaluation of animal models used in traditional Chinese Medicine based on the clinical characteristics of Chinese and Western medicine [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2017, 33(6): 165-169.
- [15] 谭琳玲, 潘锦瑶, 郑德俊, 等. 硫代乙酰胺诱导大鼠急性肝性脑病模型建立的用药时间研究 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2013, 18(6): 344-348.
- TAN L L, PAN J Y, ZHENG D J, et al. The study on medication time of acute hepatic encephalopathy model of thioacetamide-induced rat [J]. *Mod Dig Interv*, 2013, 18(6): 344-348.
- [16] 吴锐, 丁珺, 程翘, 等. 星形胶质细胞参与肝性脑病发病机制的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(3): 110-115.
- WU R, DING J, CHENG C, et al. Astrocytes play a major role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(3): 110-115.
- [17] 唐旭东. *实用中医消化病学* [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2022.
- TANG X D. *Practical gastroenterology of Chinese medicine* [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2022.
- [18] 曹彬. *肝性脑病* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2020.
- CAO B. *Hepatic encephalopathy* [M]. Beijing: People's Health Press, 2020.
- [19] 李亚青, 汪小毅, 王灿, 等. 基于中西医临床病症特点的眩晕动物模型分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(1): 92-99.
- LI Y Q, WANG X Y, WANG C, et al. Analysis of animal models of vertigo based on the characteristics of clinical conditions in Chinese and Western medicines [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(1): 92-99.
- [20] 朱正望, 朱平生, 苗明三. 基于中西医临床病证特点的胆汁淤积性肝病动物模型评价 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(12): 2959-2964.
- ZHU Z W, ZHU P S, MIAO M S. Evaluation of cholestatic liver disease animal model based on clinical syndrome characteristics of integrated traditional Chinese and Western medicine [J]. *J Clin Hepatol*, 2023, 39(12): 2959-2964.
- [21] 苗明三, 马林纳, 彭孟凡, 等. 中医药物动物模型研究现状 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(1): 141-146.
- MIAO M S, MA L N, PENG M F, et al. Current status of research on animal models of traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(1): 141-146.
- [22] 祝红, 黄胜楠, 苗明三. 口腔溃疡动物模型造模方法及临床吻合度分析 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2023, 25(5): 1750-1756.
- ZHU H, HUANG S N, MIAO M S. Analysis of modeling methods and clinical match of animal models of oral ulcer [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2023, 25(5): 1750-1756.
- [23] 罗妙莎, 罗玉梅, 冯云, 等. 己酮可可碱灌胃对急性肝性脑病大鼠脑水肿的改善作用及其机制 [J]. *山东医药*, 2023, 63(21): 5-10.
- LUO M S, LUO Y M, FENG Y, et al. Effect and mechanism of intragastric administration of pentoxifylline on brain edema in rats with acute hepatic encephalopathy [J]. *Shandong Med J*, 2023, 63(21): 5-10.
- [24] 范柏爽, 吴梓君, 刘世豪, 等. 黄芩素衍生物对大鼠急性肝性脑病模型的干预 [J]. *天津中医药*, 2021, 38(11): 1456-1462.
- FAN B S, WU Z J, LIU S H, et al. Study on the intervention effect of baicalein derivative on acute hepatic encephalopathy in rats [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2021, 38(11): 1456-1462.
- [25] 郑塋. TAA 诱导的 A 型肝性脑病大鼠肠道通透性改变及机制研究 [J]. *辽宁医学杂志*, 2021, 35(5): 1-5.
- ZHENG J. Intestinal permeability in TAA-induced acute HE rats [J]. *Med J Liaoning*, 2021, 35(5): 1-5.
- [26] 徐礼通. 生大黄对大鼠肝性脑病治疗作用的实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2011, 20(8): 1263-1264.
- XU L T. Experimental of *Rheum officinale* on hepatic encephalopathy in rats [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2011, 20(8): 1263-1264.
- [27] 林丽萍, 张金添, 朱婷婷, 等. 急性肝功能不全小鼠对不同 pH 值氨的耐受性 [J]. *辽宁医学院学报*, 2013, 34(4): 18-20.
- LIN L P, ZHANG J T, ZHU T T, et al. Tolerance of ammonia at different pH values in mice with acute hepatic insufficiency [J]. *J Liaoning Med Univ*, 2013, 34(4): 18-20.
- [28] 钟瑞熙, 杜沁沁, 肖熹煜, 等. 三黄泻心汤对肝性脑病大鼠脑组织炎性损伤的改善作用及机制 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(9): 2128-2136.
- ZHONG R X, DU Y Q, XIAO X Y, et al. Role and mechanism of action of Sanhuang Xiexin Decoction in improving inflammatory injury of brain tissue in rats with hepatic encephalopathy [J]. *J Clin Hepatol*, 2023, 39(9): 2128-2136.
- [29] 周焯, 周振国, 刘昕艳, 等. 益木脑液灌肠对肝性脑病大鼠脑蛋白表达的影响 [J]. *中国中医急症*, 2022, 31(9): 1367-1371.
- ZHOU S, ZHOU Z G, LIU X Y, et al. Effect of yimunaoye enema on brain protein expression in rats with hepatic encephalopathy [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2022, 31(9): 1367-1371.
- [30] 陈宜林, 周杭, 路静, 等. 隐丹参酮制剂对肝性脑病大鼠的保护作用研究 [J]. *热带医学杂志*, 2021, 21(4): 408-412.
- CHEN Y L, ZHOU H, LU J, et al. The protective effect of cryptotanshinone preparations on rats with hepatic encephalopathy [J]. *J Trop Med*, 2021, 21(4): 408-412.

- [31] 高婵婵, 张海博, 魏海梁, 等. 基于肠-肝-脑轴探讨益木脑液灌肠对肝性脑病大鼠 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(6): 2599-2604.
GAO C C, ZHANG H B, WEI H L, et al. Discussion on the effects of Yimu Naoye enema on TLR4-NF- κ B-NLRP3 pathway in hepatic encephalopathy rats based on the enteric-hepato-brain axis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(6): 2599-2604.
- [32] 王晓宇, 刘冀, 孙杨, 等. 肝性脑病大鼠海马 CA1 区神经元形态变化和 NOS 表达的研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(27): 2983-2985.
WANG X Y, LIU J, SUN Y, et al. Study on morphological changes of neurons and NOS expression in CA1 Hippocampus of rats [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2014, 23(27): 2983-2985.
- [33] 蔡书景, 郭秀英. 肝性脑病大鼠中缝核群内 5-羟色胺表达的研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(22): 2421-2423.
CAI S J, GUO X Y. Study on the expression of 5-HT in raphe nuclei of rat with hepatic encephalopathy [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2013, 22(22): 2421-2423.
- [34] 刘冀, 朱建忠, 隋月林, 等. 肝性脑病大鼠海马齿状回神经元形态及一氧化氮合酶表达的变化 [J]. 神经解剖学杂志, 2012, 28(3): 294-300.
LIU J, ZHU J Z, SUI Y L, et al. The morphological changes and NOS expression of neurons in dentate gyms of hippocampus in the hepatic encephalopathy rats [J]. Chin J Neuroanat, 2012, 28(3): 294-300.
- [35] 张铁成, 付旷, 郭丽丽, 等. 兔实验性肝性脑病 1H 磁共振波谱初步研究 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(29): 5633-5636, 5670.
ZHANG T C, FU K, GUO L L, et al. Preliminary study of 1H-magnetic resonance spectroscopy in rabbit model of hepatic encephalopathy [J]. Prog Mod Biomed, 2014, 14(29): 5633-5636, 5670.
- [36] 黄一鸣, 王励, 李进军, 等. D-氨基半乳糖诱导的非人灵长类动物急性肝衰竭模型的建立 [J]. 器官移植, 2019, 10(1): 50-54, 87.
HUANG Y M, WANG L, LI J J, et al. Establishment of acute liver failure models induced by D-galactosamine in non-human Primates [J]. Organ Transplant, 2019, 10(1): 50-54, 87.
- [37] Di CERBO A, RONCATI L, MARINI C, et al. Possible association between DHEA and PKC ϵ in hepatic encephalopathy amelioration: a pilot study [J]. Front Vet Sci, 2021, 8: 695375.
- [38] 王垣芳, 袁文丹, 刘巍, 等. 东莨菪碱对兔肝性脑病模型的保护作用研究 [J]. 中国药房, 2010, 21(33): 3103-3105.
WANG Y F, YUAN W D, LIU W, et al. Protective effect of scopolamine on hepatic encephalopathy in rabbits [J]. China Pharm, 2010, 21(33): 3103-3105.
- [39] SIMICIC D, PIERZCHALA K, BRAISSANT O, et al. P36 Brain regional differences in the developing brain using an animal model of type C hepatic encephalopathy [J]. Am J Gastroenterol, 2023, 118(9S): S24-S25.
- [40] 方丽, 王静, 李雪佩, 等. 肝性脑病大鼠 OXA 神经元活性变化及其临床意义研究 [J]. 四川医学, 2021, 42(10): 990-993.
FANG L, WANG J, LI X P, et al. Changes of OXA neuronal activity and its clinical significance in rats with hepatic encephalopathy [J]. Sichuan Med J, 2021, 42(10): 990-993.
- [41] 贾晓君, 阴怀清, 曹芳芳, 等. 高胆红素血症及胆红素脑病新生大鼠模型的建立与评价 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(15): 2142-2145.
JIA X J, YIN H Q, CAO F F, et al. Establishment and evaluation of neonatal rat model with hyperbilirubinemia and bilirubin encephalopathy [J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2018, 16(15): 2142-2145.
- [42] QVARTSKHAVA N, LANG P A, GÖRG B, et al. Hyperammonemia in gene-targeted mice lacking functional hepatic glutamine synthetase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(17): 5521-5526.
- [43] 刘冀, 朱建忠, 隋月林, 等. 四氯化碳诱导大鼠肝性脑病模型的制备 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(2): 33-37.
LIU J, ZHU J Z, SUI Y L, et al. Establishment of a rat model of hepatic encephalopathy [J]. Chin J Comp Med, 2012, 22(2): 33-37.
- [44] 田单单, 王灿, 苗明三. 基于中西医临床病证特点的黄疸动物模型分析 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(1): 93-96, 128.
TIAN D D, WANG C, MIAO M S. Analysis of jaundice animal model: based on the clinical syndrome characteristics in traditional Chinese and Western medicine [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2024, 40(1): 93-96, 128.
- [45] 田单单, 王灿, 苗明三. 基于中西医临床病证特点的脂肪肝动物模型评价 [J]. 世界中医药, 2023, 18(12): 1784-1788.
TIAN D D, WANG C, MIAO M S. Evaluation of animal models of fatty liver based on clinical disease and syndrome characteristics of traditional Chinese and western medicine [J]. World Chin Med, 2023, 18(12): 1784-1788.
- [46] 程金来, 周子玉, 刘丽, 等. 小鼠急性酒精性肝损伤造模方法的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 26-33, 40.
CHENG J L, ZHOU Z Y, LIU L, et al. Comparison and optimization of acute alcoholic liver injury model in mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 26-33, 40.
- [47] 杜沅沁, 王萌, 黄国初, 等. 基于胆汁酸代谢组学探讨复方

- 大黄煎剂保留灌肠对轻微型肝性脑病大鼠模型的治疗作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(10): 2348-2357.
- DU Y Q, WANG M, HUANG G C, et al. Therapeutic effect of retention enema with compound rhubarb decoction on a rat model of minimal hepatic encephalopathy based on bile acid metabolomics [J]. J Clin Hepatol, 2023, 39(10): 2348-2357.
- [48] 廖锦元, 黄仲奎, 黎宁钦, 等. 小型猪肝硬化模型病理及生化指标的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(2): 8-11.
- LIAO J Y, HUANG Z K, LI N Q, et al. Pathological and biochemical changes of the liver in mini-pig models of hepatic cirrhosis [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(2): 8-11.
- [49] MAHMOUD M S, EL-KOTT A F, ALGWAIZ H I M, et al. Protective effect of *Moringa oleifera* Lam. leaf extract against oxidative stress, inflammation, depression, and apoptosis in a mouse model of hepatic encephalopathy [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2022, 29(55): 83783-83796.
- [50] MIQUEL M, BARTOLÍ R, ÒDNA G, et al. Rat CCl₄-induced cirrhosis plus total portal vein ligation; a new model for the study of hyperammonaemia and brain oedema [J]. Liver Int, 2010, 30(7): 979-987.
- [51] IKEUCHI K, TSUTSUMI T, ISHIZAKA A, et al. Modulation of duodenal and jejunal microbiota by rifaximin in mice with CCl₄-induced liver fibrosis [J]. Gut Pathog, 2023, 15(1): 14.
- [52] 李晓娟, 朱云, 王立福, 等. 桃核承气汤对大鼠肝性脑病模型干预治疗的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(10): 14-18.
- LI X J, ZHU Y, WANG L F, et al. Analysis of the preventive and therapeutic effects of Taohe Chengqi Decoction on a rat model of hepatic encephalopathy [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(10): 14-18.
- [53] 李明芳, 李曹飞, 左东泽, 等. 肝纤维化的发病机理及相关信号转导机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(8): 147-152.
- LI M F, LI C F, ZUO D Z, et al. Research progress on the pathogenesis and related signal transduction mechanisms of liver fibrosis [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 147-152.
- [54] 胡毅龙, 赵怡楠, 张双丽, 等. 基于数据挖掘的急性肝损伤动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 89-100.
- HU Y L, ZHAO Y N, ZHANG S L, et al. Analysis of the application characteristics of the acute liver injury animal model based on data mining [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 89-100.
- [55] 周晓玲, 王月明, 吴腾, 等. 基于 SDF-1/CXCR4 轴观察济生肾气汤对肝硬化大鼠 BMSCs 归巢的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 11-18.
- ZHOU X L, WANG Y M, WU T, et al. Effects of Jisheng Shenqi Decoction on homing of bone marrow mesenchymal stem cells based on the SDF-1/CXCR4 axis in rats with liver cirrhosis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 11-18.
- [56] 田时秋, 左泽平, 李依林, 等. 两种大鼠高脂血症模型的特点及性别差异研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 37-44.
- TIAN S Q, ZUO Z P, LI Y L, et al. Characteristics and sex differences of two kinds of hyperlipidemia models in rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 37-44.

[收稿日期] 2024-04-12

潘蕊,张铭,郑欣玥,等. Wnt/ β -catenin 信号通路在缺血性脑卒中后程序性细胞死亡中作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 138-145.

Pan R, Zhang M, Zheng XY, et al. Research progress on Wnt/ β -catenin signaling pathway in programmed cell death after ischemic stroke [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 138-145.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.017

Wnt/ β -catenin 信号通路在缺血性脑卒中后程序性细胞死亡中作用的研究进展

潘蕊¹,张铭^{2*},郑欣玥¹,王春晓¹,任琼迪¹

(1.河南中医药大学康复医学院,郑州 450046;2.河南中医药大学第一附属医院康复科,郑州 450000)

【摘要】 缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是一种由于脑血管阻塞或狭窄导致脑部供血不足,从而引起脑组织受损的神经系统疾病。近年来,越来越多的证据表明,Wnt/ β -catenin 信号通路在 IS 发生和发展的病理生理反应中发挥了重要作用。程序性细胞死亡包括细胞凋亡、坏死性凋亡、细胞焦亡、细胞自噬、泛凋亡和铁死亡等多种形式。在本综述中,我们将阐明这些不同细胞死亡方式的特征及其相互之间的串扰关系,并系统性地概述 Wnt/ β -catenin 信号通路干预不同细胞死亡方式在 IS 中的作用,旨在为今后的临床和基础研究提供参考。

【关键词】 缺血性脑卒中;Wnt/ β -catenin 信号通路;细胞凋亡;细胞焦亡;综述

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0138-08

Research progress on Wnt/ β -catenin signaling pathway in programmed cell death after ischemic stroke

PAN Rui¹, ZHANG Ming^{2*}, ZHENG Xinyue¹, WANG Chunxiao¹, REN Qiongdì¹

(1. Rehabilitation Medicine College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Department of Rehabilitation, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Ischemic stroke is a neurological disease that damages brain tissue as a result of an insufficient blood supply to the brain, due to blockage or stenosis of the brain vessels. Increasing evidence has indicated that the Wnt/ β -catenin signaling pathway plays an important role in the pathophysiological response to the occurrence and development of ischemic stroke. Programmed cell death includes many forms, such as apoptosis, necrotic apoptosis, pyroptosis, autophagy, PANoptosis, and ferroptosis. In this review, we elucidate the characteristics of these different modes of cell death and their cross-talk relationships with each other, and systematically outline the role of Wnt/ β -catenin signaling pathways in the intervention of different cell death modes in ischemic stroke, with the aim of providing references for future clinical and basic research studies.

【Keywords】 ischemic stroke; Wnt/ β -catenin signaling pathway; cell apoptosis; pyroptosis; review

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

【基金项目】 河南省中医药科学研究专项(20-21ZY1017);河南省中医药传承与创新人才工程(仲景工程)-拔尖人才(CZ0325-14);河南省中医学“双一流”创建科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-3-11)。

【作者简介】 潘蕊(2001—),女,硕士研究生,研究方向:脑卒中常见功能障碍的中西医结合研究。E-mail:1551132664@qq.com

【通信作者】 张铭(1979—),男,博士,副主任医师,研究方向:脑卒中常见功能障碍的中西医结合研究。E-mail:zhm7919@sina.com

脑卒中是人类疾病中致死、致残的首要病因,随着人口老龄化加剧和城市化进程的不断推进,我国脑卒中疾病的发生率呈爆发式增长的趋势。据统计,缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)患者约占全部脑卒中患者的 70%^[1]。疾病发生后,脑损伤会引起神经元死亡、炎症反应、血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)损伤、线粒体功能障碍及兴奋性毒性等一系列病理生理反应。由于脑卒中的治疗时间窗口较窄,许多患者无法在最佳时间内获得有效治疗,因此,亟需寻找安全、有效的治疗新策略。

细胞死亡根据是否具有可调控性常分为程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)及非 PCD。其中,PCD 主要包括细胞凋亡、自噬、坏死性凋亡、细胞焦亡、铁死亡和泛凋亡等,非 PCD 即为细胞坏死,是由于细胞受到化学或物理刺激而引起的细胞被动死亡。近年研究发现,PCD 通过介导神经元再生、减轻炎症和氧化应激反应等机制,在 IS 的发生发展中发挥着重要作用。Wnt/ β -catenin 信号通路是一条复杂的信号级联通路,在中枢神经系统相关疾病受损后的神经发育、突触发生、神经元生长、分化和存活中起着重要作用^[2]。据报道,Wnt/ β -catenin 信号通路可以调节 IS 引起的脑内许多变化,包括神经干细胞的增值和分化、脑梗死面积、受损组织的血脑屏障以及神经再生等^[3-4]。为此,本文就不同死亡方式的发生机制和串扰关系进行简要概述,并综述了 Wnt/ β -catenin 信号通路在 IS 后不同细胞死亡中的作用,旨在为治疗 IS 提供新的靶点和依据。

1 Wnt/ β -catenin 信号通路

1.1 通路组成

Wnt/ β -catenin 信号通路是 Wnt 信号通路中的经典通路,该通路主要组成包括分泌蛋白 Wnt 家族、Frizzled 受体家族、酪蛋白激酶 1(casein kinase 1, CK1)、LRP5/6 共受体、人散乱蛋白 1(dishevelled 1, Dvl)、丝氨酸/苏氨酸激酶(GSK-3 β)、轴蛋白(axis inhibition protein, Axin)、APC 蛋白、 β -catenin 以及 TCF/LEF 转录因子^[5]。Wnt 蛋白(如 Wnt1、Wnt3a、Wnt5a 等)是一类分泌性糖蛋白,通过结合细胞表面的受体启动信号通路。Frizzled 受体属于 G 蛋白偶联受体,与 Wnt 蛋白结合后能够启动信号传导。LRP5/6 共受体可与 Frizzled 受体共同组成复合物,增强 Wnt 信号。Dvl 蛋白是 Wnt 信号传递的枢纽,

负责将信号从受体传递到胞内。GSK-3 β 、CK1、Axin 和 APC 等蛋白质组成降解复合物,能够磷酸化 β -catenin,进而调控细胞内信号通路的活性和响应^[6]。 β -catenin 是一种结构复杂且重要的细胞结合蛋白,是 Wnt/ β -catenin 信号通路中的关键效应分子。

1.2 通路激活

Wnt/ β -catenin 信号通路被激活的标志是细胞核内 β -catenin 的水平升高。Wnt 蛋白与靶细胞表面的 Frizzled 受体以及 LRP5/6 共受体结合,形成受体复合物。受体复合物形成后会导致受体的聚集和构象变化,这种变化促使细胞内的 Dvl 蛋白被招募到受体复合物,导致 Dvl 蛋白进一步被磷酸化并激活。GSK-3 β 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键激酶,Dvl 蛋白能够抑制 GSK-3 β 对 β -catenin 的磷酸化,因此, β -catenin 不再被降解并稳定在细胞质中,最终转移到细胞核内并在核内积累。在细胞核中, β -catenin 与 TCF/LEF 转录因子结合,并激活 Wnt 相关的目的基因的表达。

2 Wnt/ β -catenin 信号通路在 IS 后程序性细胞死亡中的作用

2.1 细胞凋亡

细胞凋亡是受基因控制、细胞进行自主的有序性的死亡过程,发挥着清除机体内受损细胞的作用,对生命体的正常发育和维持至关重要。

2.1.1 细胞凋亡的机制

细胞凋亡通常是由内源性线粒体途径和外源性死亡受体途径所触发,两者最终均激活一系列效应蛋白酶(cysteiny l aspartate specific proteinases, caspases),导致细胞的系统性破坏和死亡。DNA 损伤、氧化应激、缺氧等病理生理反应均会引起凋亡信号的启动,线粒体外膜通透性增加是内源性凋亡途径的关键步骤,这一过程由 B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)家族蛋白调节^[7]。当促凋亡蛋白 Bcl-2 在细胞应激下被激活时,导致细胞色素 c(cytochrome c, Cyt c)从线粒体间质释放到细胞质中并与凋亡酶激活因子-1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)和脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP)结合,形成凋亡小体。凋亡小体会募集并活化半胱天冬酶 9(caspase-9),进一步激活下游效应酶半胱天冬酶 3(caspase-3)、半胱天冬酶 7(caspase-7),这些效应酶负责执行细胞凋亡,通过切割细胞内关键结构和裂

解功能蛋白,最终导致细胞凋亡。

外源性死亡受体途径通常是由死亡配体介导的,这些配体包括肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、Fas 配体、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(translating to responsible adult independent living, TRAIL)等^[8],以上配体可与相应的死亡受体结合形成复合物,这一复合物称为死亡诱导信号复合物(death-inducing signaling complex, DISC)。DISC 的形成后,导致半胱天冬酶 8(caspase-8)和下游 caspase-3、caspase-7 的激活,进而促使细胞凋亡。

2.1.2 Wnt/ β -catenin 信号通路与细胞凋亡

脑组织缺血后,会引起脑内 ATP 和能量供应的急剧下降,这会导致细胞内发生多种功能障碍,包括细胞膜的离子泵活性降低、胞浆内 Ca^{2+} 水平增加、线粒体功能受损等,最终导致细胞凋亡的发生。近年来,越来越多研究表明,通过下调 GSK-3 β 的表达,抑制 β -catenin 的磷酸化,能够激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,从而减少 Bcl-2 的表达以发挥抗凋亡作用。Zhang 等^[9] 建立大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)小鼠模型发现,通过增强 β -catenin 的表达以激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,能够促进神经干细胞的活力和迁移,抑制细胞凋亡。一项体外研究发现,通过抑制氧和葡萄糖剥夺/复氧复糖(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)模型中 GSK-3 β 的活化,激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,不仅能够上调 Bcl-2 的表达,同时减少 caspase-3 蛋白的水平,从而发挥抑制细胞凋亡,减轻缺血后细胞损伤的作用^[10]。由此可见,通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路调控细胞凋亡中相关因子表达,可有效改善 IS 发生后梗死面积,并减轻脑损伤。

2.2 细胞焦亡

细胞焦亡过程是一个促炎过程,该过程是由 NLRP3 炎症小体与 caspase-1 信号传导所介导的。在这一过程中,细胞膜破裂并伴有胞内物质的外流,同时释放大量促炎生物物质,最终加重脑组织的损伤。

2.2.1 细胞焦亡的机制

细胞焦亡分子机制的关键环节为 Caspase 家族对 Gasdermin 家族蛋白的选择性切割,可分为半胱天冬酶 1(caspase-1)介导的经典焦亡途径和由半胱天冬酶 4/5/11(caspase-4/5/11)介导的非经典焦亡途径。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-

like receptor protein 3, NLRP3) 炎性小体激活后,促使 caspase-1 前体转变为活化形式的 caspase-1,活化的 caspase-1 切割 GSDMD 的 N 端,释放出 N 端片段最后形成 N-GSDMD^[11]。N-GSDMD 片段插入细胞膜,形成孔洞,导致细胞膜通透性增加,最后释放细胞内容物从而导致细胞焦亡和炎症反应^[12]。非经典途径则是活化的 caspase-4/5/11 裂解 GSDMD 形成 N-GSDMD,最终导致细胞膜通透性增加,引起白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-18(IL-18)的释放触发炎症反应。

2.2.2 Wnt/ β -catenin 信号通路与细胞焦亡

IS 发生时,脑组织内缺血缺氧的环境可以激活 NLRP3 炎症小体, caspase-1 进一步被活化,并经过一系列过程导致细胞焦亡的发生。据报道,敲除 GSDMD 可有效阻断成熟 IL-1 β 和 IL-18 的释放,减少脑梗死面积,从而改善 IS 的发生发展及预后^[13]。Luo 等^[14] 在 MCAO/R 模型小鼠中发现,抑制 caspase-1、GSDMD 等蛋白的表达,能够减轻缺血区域的神经元焦亡。小胶质细胞是中枢神经系统中常驻的免疫细胞,可分为促炎 M1 型和抗炎 M2 型。研究发现, Wnt/ β -catenin 通路的激活剂能够调节 IS 后小胶质细胞由促炎到抗炎的极化,这种转换可以减少炎症因子的释放,进而有助于减轻细胞焦亡^[15]。据报道,下调 β -catenin 的过表达能够抑制 OGD/R 诱导的 NLRP3 炎症小体介导的焦亡,减少 caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的表达,进而减轻缺血后神经炎症反应和梗死面积^[16]。

2.3 坏死性凋亡

坏死性凋亡是通过死亡受体与配体结合或外来微生物核酸被激活的细胞自我破坏的过程。其形态特征为细胞体积增加、细胞塌陷、细胞器肿胀、质膜通透化和细胞内容物释放。

2.3.1 坏死性凋亡的机制

坏死性凋亡的执行依赖于几种关键分子,主要包括受体相互作用蛋白-1/3(receptor-interacting protein kinase 1/3, RIPK1/3)、底物混合谱系激酶样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)等^[17]。RIPK1 在坏死性凋亡中起着调控作用,当其被死亡受体激活后,活化的 RIPK1 在包含死亡结构域蛋白(Fas-associating protein with a novel death domain, FADD)、caspase-8 和半胱天冬酶 10(caspase-10)的寡聚复合物中被招募。在缺乏 caspase-8 的情况下, RIPK1 进一步招募并磷酸化

RIPK3, 活化后的 RIPK3 可以介导 MLKL 的活化^[18]。MLKL 作为执行分子导致胞膜裂解, 是坏死性凋亡的终末执行者, 激活的 MLKL 会在细胞膜上形成孔洞, 导致细胞内容物泄漏, 引发细胞坏死^[19]。

2.3.2 Wnt/ β -catenin 信号通路与坏死性凋亡

研究表明, 坏死性凋亡与 IS 的发生发展密切相关, RIPK1 抑制剂 NEC-1 能够减少 MCAO 小鼠的脑梗死体积, 从而减轻缺血缺氧后的脑损伤^[20]。另一项研究发现, RIPK1 抑制剂可降低坏死性凋亡相关蛋白的表达和 Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin 的磷酸化, 最终减轻脑损伤并改善神经功能缺损^[21]。Xuan 等^[22]进一步发现, RIPK 抑制剂不仅能够减少 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 蛋白的表达, 还可抑制 Wnt/ β -catenin/GSK-3 β 信号通路的传导, 从而减少细胞坏死性凋亡及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生。目前 IS 与坏死性凋亡相关的研究较少, 深入研究坏死性凋亡的机制, 可能为治疗 IS 提供更多的治疗靶点。

2.4 自噬

自噬是细胞在应对缺血、缺氧及氧化应激等不利环境时, 通过降解自身损伤或不需要的细胞器和蛋白质来维持细胞稳态和生存的一种重要机制。

2.4.1 自噬的机制

细胞自噬过程主要受哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、自噬相关蛋白 14 (polyclonal antibody, ATG14)、LC3 共轭系统、蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、AMP 活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 以及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 C1 (mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1) 激酶等调控, 自噬途径可以被 AMPK 信号激活^[23], 但通常被 mTOR 途径抑制^[24]。自噬是从由内质网、高尔基体或其他膜系统形成的隔离膜开始, 隔离膜逐渐扩展并包裹细胞内的部分细胞器或大分子, 最终形成自噬小体。在此过程中, 关键的自噬相关蛋白 (如 LC3-II) 参与了隔离膜的延伸和闭合。随后, 自噬小体与溶酶体融合, 形成自噬溶酶体, 它将自噬小体内的内容物降解为小分子。降解产物主要包括氨基酸、脂质等, 可以被细胞再利用, 用于合成新的蛋白质和其他细胞组分, 从而支持细胞的生长和存活^[25]。

2.4.2 自噬的作用

自噬作为细胞重要机制, 不仅与个体成长、发育、分化、衰老密切相关, 还参与肿瘤、神经系统疾

病及心脑血管病等多种疾病的发生和发展。研究发现, 通过基因鼠杂交方法能够阻断 mTORC1 相关蛋白, 小鼠脑内 M1 型小胶质细胞的基因表达下降, M2 型 mRNA 的表达显著增加^[26]。由此可见, 通过下调自噬相关蛋白表达可以促进抗炎因子的释放, 有可能减轻 IS 的炎症反应及脑损伤程度。

2.4.3 Wnt/ β -catenin 信号通路与自噬

在 IS 发生时, 由于血液供应中断, 脑细胞无法获取足够的能量和营养物质。因此, 细胞会启动自噬机制, 通过分解细胞内的蛋白质和细胞器来获取能量, 以应对短期的能量和营养缺乏。然而, 如果缺血状态持续存在, 细胞自噬可能会过度激活, 导致细胞损伤加剧甚至死亡。一项体外研究发现, 抑制 β -catenin 的表达后, LC3-II 的水平升高, 这说明 β -catenin 能够负向调节自噬小体的形成^[27]。活化 C 激酶 1 受体 (receptor for activated C kinase 1, RACK1) 作为 WD 重复序列家族的成员, 能够促进 Wnt/ β -catenin 信号通路的转导。研究发现, RACK1 还与 LC3 相互作用并增强 LC3 与 Dvl2 的结合, 从而通过自噬导致 Dvl 蛋白降解^[28]。

2.5 铁死亡

铁死亡是以铁超载、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 耗竭、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 失活、ROS 募集及线粒体结构改变为特征的细胞死亡形式。

2.5.1 铁死亡的机制

铁死亡主要由细胞内铁离子的积累和脂质过氧化引发。游离铁具有亚铁 (Fe^{2+}) 和铁 (Fe^{3+}) 两种形态, 过量的 Fe^{2+} 会通过 Fenton 反应产生自由基, 引发脂质过氧化和铁死亡。铁蛋白重链具有铁氧化酶活性, 可以转换 Fe^{2+} 至 Fe^{3+} , 以稳定形式储存, 从而防止 ROS 的形成。GPX4 通过还原脂质过氧化物防止铁死亡, 其功能依赖于 GSH。胱氨酸/谷氨酸反向转运体 (System Xc⁻) 通过转运半胱氨酸维持 GSH 水平, 抑制该系统会导致铁死亡。

2.5.2 Wnt/ β -catenin 信号通路与铁死亡

越来越多研究表明, 通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 也称 Akt) 等信号通路能够介导铁死亡, 进而改善 MCAO 大鼠模型的神经炎症、氧化应激及脑梗死面积等^[29-30]。同样, 铁死亡与 Wnt/ β -catenin 信号通路存在着密切的联系。最新研究发现^[31-32], 抑制 GSK-3 β 的表达会导致 β -

catenin 的核易位和积累,这将介导 GPX4 和紧密连接蛋白(ZO-1 和 Claudin-5)的表达,进而逆转缺血诱导的铁死亡和血脑屏障功能的破坏。当前情况来看,IS 的发生伴有铁离子的异常,但目前对于铁死亡与 Wnt/ β -catenin 的串扰在 IS 中的研究较少,其具体作用及作用机制仍尚未明确。

2.6 泛凋亡

泛凋亡(PANoptosis)是炎症细胞死亡的一种形式,具有细胞凋亡、焦亡和坏死性凋亡显著特征的新型死亡方式。PANoptosis 通常由传 ZZ-DNA 结合蛋白 1(Z-DNA binding protein 1, ZBP1)、NLRP3、ASC、FADD 和 RIPK1、RIPK3、caspase-1、caspase-8 等组成^[33]。研究发现,降低 MACO 海马中 caspase-1、caspase-3、caspase-8 等泛凋亡相关蛋白的表达,促进小胶质细胞向 M2 表型的转换,可以有效地缓解由脑 I/R 导致的神经元死亡^[34]。但泛凋亡在 IS 方面的研究较少,今后的研究可以进一步探讨这一新兴机制与 Wnt/ β -catenin 信号通路在 IS 的关系。

3 不同类型程序性死亡之间的串扰关系

3.1 凋亡与坏死性凋亡

凋亡和坏死性凋亡是细胞死亡的两种形式,它们在生物体中发挥不同的功能,但也有一定的联系。Caspase 家族活性是否被抑制以及 RIPK1 和 RIPK3 之间的相互作用是最终激活凋亡还是坏死性凋亡的重要原因^[35]。Naito 等^[36]在 MCAO 模型中发现,在短暂性脑缺血性损伤后,内皮细胞中的坏死性凋亡迅速激活以介导血管损伤,而神经元则表现出坏死性凋亡的早期激活,随后 TAK1 水平逐渐降低,引起细胞凋亡。最新研究发现,RIPK 作为坏死性凋亡的关键蛋白,其构向变化能够使 RIPK3 招募 RIPK1、FADD 和 caspase-8 激活复合物,从而促进细胞凋亡^[37]。

3.2 坏死性凋亡与焦亡

据了解,caspase-8 是外部细胞坏死性凋亡的起始半胱天冬酶,并抑制由 RIPK1 和 MLKL 介导的细胞焦亡。FADD 通过抑制 MLKL 诱导的坏死性凋亡和 caspase-8-GSDMD 依赖性上皮细胞焦亡来预防 ZBP1 和 TNFR1 下游的炎症反应^[38]。另一项研究发现,RIPK1 通过抑制由 ZBP1 介导的坏死性凋亡,进而减少小鼠的炎症反应^[39]。

3.3 焦亡与自噬

自噬通过降解炎症小体 NLRP3 或抑制其激活,

从而减少炎症反应和焦亡发生。一些信号分子和调控蛋白在自噬和焦亡中具有双重角色。例如,AMPK 可以通过调节 mTOR 信号通路影响自噬,同时也参与炎症反应的调控。研究发现,自噬抑制剂能够降低自噬蛋白水平并增加焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDM-N 和裂解的 caspase-1 的表达,从而加重了脑 I/R 损伤^[40]。

3.4 自噬与凋亡

Xing 等^[41]采用电针治疗 MCAO 大鼠发现,海马中的 LC3-II 表达水平增高,从而激活自噬逆转了电针的抗凋亡作用。另一项研究发现,脑损伤后海马神经元中 LC3 和 Beclin1 的水平降低,而这一结果会促进凋亡信号 caspase-3 的激活,导致神经细胞凋亡^[42]。

3.5 铁死亡与其他程序性死亡

铁死亡与其他死亡方式也存在一定联系,①与凋亡:erastin 作为一种铁死亡激活剂,同样能够诱导细胞凋亡^[43]。②与自噬:最近的研究表明,自噬和铁死亡之间的相互作用,这一过程可能是由 ROS 的积累驱动的^[44]。③与细胞焦亡:铁死亡诱导剂或过量铜处理后,GPX4 通过与不同的自噬受体相互作用而降解,从而触发铁死亡^[45]。

4 总结与展望

目前,如何减轻 IS 发病率及改善 IS 导致的功能障碍是全球关注并亟需解决的重难点问题。越来越多研究表明,Wnt/ β -catenin 信号通路可诱导神经损伤后的轴突再生,改善缺血后脑损伤,起到神经保护作用,不同的细胞死亡方式在 IS 中扮演着不同的角色,并发挥着重要的作用(表 1),但三者之间的串扰关系尚不明确,仍存在一定的局限性:①各类死亡方式在研究深度较不平衡,其中铁死亡和泛凋亡在 IS 的研究较为少,铜死亡和双硫死亡等新型细胞死亡也逐渐成为研究热点,未来仍须深入研究不同的细胞死亡方式,有助于发现治疗 IS 的新靶点。②目前,Wnt/ β -catenin 信号通路在 IS 的研究相对丰富,但探讨其在细胞程序性死亡的具体机制研究较少。③细胞研究多以基础实验为主,如何应用到临床是今后研究的重点与难点,此外,在基础实验中仍需深入探讨细胞死亡方式与其他信号通路的关系,挖掘更多治疗 IS 的潜力。

表 1 PCD 干预治疗 IS 的相关作用机制
Table 1 Mechanism of PCD intervention in the treatment of IS

细胞死亡方式 Cell death mode	干预 Intervention	结果 Outcome
	药物抑制剂 TWS119 ^[46] Drug inhibitor TWS119	缓解氧化应激,增加脑缺血大鼠的脑微血管密度、保护血脑屏障免受缺血/缺氧诱导的损伤。 Alleviates oxidative stress, increases cerebral microvascular density, and protects the blood-brain barrier from ischemia/hypoxia induced damage in cerebral ischemia rats.
细胞凋亡 Apoptosis	锂 ^[47] Li	增加了 BBB 的完整性、减少脑梗死面积以及减轻脑损伤。 Increased BBB integrity, reduced infarct size and reduced brain injury.
	miR-641 ^[48]	细胞凋亡和炎症增加,同时加剧了 OGD/R 触发的 SH-SY5Y 细胞损伤。 Apoptosis and inflammation were increased, while OGD/R-triggered SH-SY5Y cell damage was exacerbated.
细胞焦亡 Pyroptosis	光生物调节 ^[49] PBM	抑制细胞焦亡和小胶质细胞极化,减少脑梗死面积,提高空间学习和记忆能力。 Inhibit pyrodeath and microglia polarization, reduce infarct size, improve spatial learning and memory ability.
	巨噬细胞迁移抑制因子 ^[21] MIF	加剧了 BBB 破坏,MIF 抑制剂可以通过 RIPK1 激酶依赖性途径,减少脑损伤后的内皮细胞死亡和神经功能缺损。 By exacerbating BBB destruction, MIF inhibitors can reduce endothelial cell death and neural dysfunction after brain injury through RIPK1 kinase-dependent pathways.
坏死性凋亡 Necroptosis	Hsp70 相互作用蛋白 ^[50] CHIP	CHIP 过表达可降低 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 的表达,减轻 MCAO 小鼠诱导的坏死性凋亡。 CHIP overexpression can reduce the expression of RIPK1, RIPK3 and MLKL, and alleviate the necrotic apoptosis induced by MCAO mice.
细胞自噬 Autophagy	Bcl-2 关联永生基因 3 ^[51] BAG3	BAG3 过表达通过激活自噬,显著改善了 MCAO 小鼠的神经功能,减少了体内梗死体积,并提高了细胞存活率。 Overexpression of BAG3 significantly improved neural function, reduced infarct volume and increased cell survival in MCAO mice by activating autophagy.
铁死亡 Ferroptosis	β-石竹烯 ^[52] BCP	BCP 减少了 OGD/R 诱导的 ROS 生成和铁积累。 BCP reduces OGD/R-induced ROS production and iron accumulation.

参考文献:

[1] 周书娅, 杨昱. 脑卒中患者早期康复活动的研究进展 [J]. 预防医学, 2024, 36(2): 127-130.
ZHOU S Y, YANG Z. Research progress on early rehabilitation activities of stroke patients [J]. Prev Med, 2024, 36(2): 127-130.

[2] CHENG P, LIAO H Y, ZHANG H H. The role of Wnt/mTOR signaling in spinal cord injury [J]. J Clin Orthop Trauma, 2022, 25: 101760.

[3] ZHANG H, DU D, GAO X, et al. PFT-α protects the blood-brain barrier through the Wnt/β-catenin pathway after acute ischemic stroke [J]. Funct Integr Genomics, 2023, 23(4): 314.

[4] ZHOU F, WANG Z, XIONG K, et al. Olfactory three needle regulates the proliferation of olfactory bulb neural stem cells and ameliorates brain injury after subarachnoid hemorrhage by regulating Wnt/β-catenin signaling [J]. Heliyon, 2024, 10(7): e28551.

[5] JI Y B, WANG T X, GAO Q, et al. Normalization of non-canonical Wnt signalings does not compromise blood-brain barrier protection conferred by upregulating endothelial Wnt/β-catenin signaling following ischemic stroke [J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27(9): 1085-1096.

[6] YANG M H, BASAPPA B, DEVESHEGOWDA S N, et al. A novel drug prejudice scaffold-imidazopyridine-conjugate can promote cell death in a colorectal cancer model by binding to β-catenin and suppressing the Wnt signaling pathway [EB/OL]. [2024 - 07 - 22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39067696/>.

[7] BAI Y, YANG L, ZHANG C, et al. Studies on the mechanism of alloimperatorin on the proliferation and apoptosis of HeLa cells [J]. J Oncol, 2021, 2021: 6617312.

[8] HU H, TIAN M, DING C, et al. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection [J]. Front Immunol, 2018, 9: 3083.

[9] ZHANG S, JIAO H. Kaempferol regulates apoptosis and

- migration of neural stem cells to attenuate cerebral infarction by O-GlcNAcylation of β -catenin [J]. *Open Life Sci*, 2024, 19(1): 20220829.
- [10] FEI Y X, ZHU J P, ZHAO B, et al. XQ-1H regulates Wnt/GSK3 β / β -catenin pathway and ameliorates the integrity of blood brain barrier in mice with acute ischemic stroke [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 164: 269–288.
- [11] LI S, SUN Y, SONG M, et al. NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis exerts a crucial role in astrocyte pathological injury in mouse model of depression [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(23): e146852.
- [12] GU L, SUN M, LI R, et al. Activation of RKIP binding ASC attenuates neuronal pyroptosis and brain injury *via* caspase-1/GSDMD signaling pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Transl Stroke Res*, 2022, 13(6): 1037–1054.
- [13] WANG K, SUN Z, RU J, et al. Ablation of GSDMD improves outcome of ischemic stroke through blocking canonical and non-canonical inflammasomes dependent pyroptosis in microglia [J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 577927.
- [14] LUO L, LIU M, FAN Y, et al. Intermittent *Theta*-burst stimulation improves motor function by inhibiting neuronal pyroptosis and regulating microglial polarization *via* TLR4/NF κ B/NLRP3 signaling pathway in cerebral ischemic mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 141.
- [15] SONG D, ZHANG X, CHEN J, et al. Wnt canonical pathway activator TWS119 drives microglial anti-inflammatory activation and facilitates neurological recovery following experimental stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 256.
- [16] SUN F, AN C, LIU C, et al. FTO represses NLRP3-mediated pyroptosis and alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury *via* inhibiting CBL-mediated ubiquitination and degradation of β -catenin [J]. *FASEB J*, 2023, 37(6): e22964.
- [17] SUN J Y, ZHAO J, QIU Y, et al. Different concentrations of betaxolol switch cell fate between necroptosis, apoptosis, and senescence in human corneal stromal cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 391: 110898.
- [18] ZAAFAN M A, ABDELHAMID A M. The cardioprotective effect of microRNA-103 inhibitor against isoprenaline-induced myocardial infarction in mice through targeting FADD/RIPK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(2): 837–844.
- [19] JIANG G J, LI B B, FAN T J. Timolol induces necroptosis, apoptosis and senescence concentration-dependently in rabbit Limbal stem cells *in vitro* [J]. *Life Sci*, 2021, 277: 119453.
- [20] ZHOU X Y, LIN B, CHEN W, et al. The brain protection of MLKL inhibitor necrosulfonamide against focal ischemia/reperfusion injury associating with blocking the nucleus and nuclear envelope translocation of MLKL and RIP3K [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1157054.
- [21] LI Y, ZOU C, CHEN C, et al. Myeloid-derived MIF drives RIPK1-mediated cerebrovascular endothelial cell death to exacerbate ischemic brain injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(5): e2219091120.
- [22] XUAN M Y, PIAO S G, DING J, et al. Dapagliflozin alleviates renal fibrosis by inhibiting RIP1-RIP3-MLKL-mediated necroinflammation in unilateral ureteral obstruction [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 798381.
- [23] YANG S, LI F, LU S, et al. Ginseng root extract attenuates inflammation by inhibiting the MAPK/NF- κ B signaling pathway and activating autophagy and p62-Nrf2-Keap1 signaling *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114739.
- [24] TU H Y, YUAN B S, HOU X O, et al. α -synuclein suppresses microglial autophagy and promotes neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Aging Cell*, 2021, 20(12): e13522.
- [25] HU J, LIU J, CHEN S, et al. Thioredoxin-1 regulates the autophagy induced by oxidative stress through LC3-II in human lens epithelial cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2023, 50(6): 476–485.
- [26] VILLA-GONZÁLEZ M, RUBIO M, MARTÍN-LÓPEZ G, et al. Pharmacological inhibition of mTORC1 reduces neural death and damage volume after MCAO by modulating microglial reactivity [J]. *Biol Direct*, 2024, 19(1): 26.
- [27] PETHERICK K J, WILLIAMS A C, LANE J D, et al. Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk [J]. *EMBO J*, 2013, 32(13): 1903–1916.
- [28] CHENG M, XUE H, CAO W, et al. Receptor for activated C kinase 1 (RACK1) promotes dishevelled protein degradation *via* autophagy and antagonizes Wnt signaling [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(24): 12871–12879.
- [29] FU C, WU Y, LIU S, et al. Rehmannioside A improves cognitive impairment and alleviates ferroptosis *via* activating PI3K/AKT/Nrf2 and SLC7A11/GPX4 signaling pathway after ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 115021.
- [30] XIE J, ZHANG T, LI P, et al. Dihydropyridin attenuates cerebral ischemia reperfusion injury by inhibiting SPHK1/mTOR signaling and targeting ferroptosis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 3071–3085.
- [31] XU F, ZHANG J, JI L, et al. Inhibition of non-small cell lung cancer by ferroptosis and apoptosis induction through P53 and GSK-3 β /Nrf2 signal pathways using qingrehuoxue formula [J]. *J Cancer*, 2023, 14(3): 336–349.
- [32] FEI Y, LI T, WU R, et al. Se-(Methyl)-selenocysteine ameliorates blood-brain barrier disruption of focal cerebral ischemia mice *via* ferroptosis inhibition and tight junction upregulation in an Akt/GSK3 β -dependent manner [J]. *Psychopharmacology*, 2024, 241(2): 379–399.
- [33] PANDIAN N, KANNEGANTI T D. PANoptosis: a unique innate immune inflammatory cell death modality [J]. *J Immunol*, 2022, 209(9): 1625–1633.
- [34] CUI Y, HU Z, WANG L, et al. DL-3-n-butylphthalide ameliorates post-stroke emotional disorders by suppressing neuroinflammation and PANoptosis [J]. *Neurochem Res*, 2024, 49(8): 2215–2227.

- [35] 陈俞乐. 坏死性凋亡调节机制及其分子靶向药物相关研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(5): 453-455.
CHEN Y L. Research progress on the regulatory mechanism of necrotizing apoptosis and its molecular targeted drugs [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med, 2017, 27(5): 453-455.
- [36] NAITO M G, XU D, AMIN P, et al. Sequential activation of necroptosis and apoptosis cooperates to mediate vascular and neural pathology in stroke [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(9): 4959-4970.
- [37] RUHL D, DU T T, WAGNER E L, et al. Necroptosis and apoptosis contribute to cisplatin and aminoglycoside ototoxicity [J]. J Neurosci, 2019, 39(15): 2951-2964.
- [38] SCHWARZER R, JIAO H, WACHSMUTH L, et al. FADD and caspase-8 regulate gut homeostasis and inflammation by controlling MLKL- and GSDMD-mediated death of intestinal epithelial cells [J]. Immunity, 2020, 52(6): 978-993.
- [39] LIN J, KUMARI S, KIM C, et al. RIPK1 counteracts ZBP1-mediated necroptosis to inhibit inflammation [J]. Nature, 2016, 540(7631): 124-128.
- [40] TU Y, GUO C, SONG F, et al. Mild hypothermia alleviates diabetes aggravated cerebral ischemic injury *via* activating autophagy and inhibiting pyroptosis [J]. Brain Res Bull, 2019, 150: 1-12.
- [41] XING Y, ZHANG M, WANG M M, et al. The anti-apoptosis effect of single electroacupuncture treatment *via* suppressing neuronal autophagy in the acute stage of ischemic stroke without infarct alleviation [J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15: 633280.
- [42] YU X, LUO Y, YANG L, et al. Plasma metabolomic study on the effect of *Para*-hydroxybenzaldehyde intervention in a rat model of transient focal cerebral ischemia [J]. Mol Med Rep, 2023, 28(5): 224.
- [43] HUANG C, YANG M, DENG J, et al. Upregulation and activation of p53 by erastin-induced reactive oxygen species contribute to cytotoxic and cytostatic effects in A549 lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2018, 40(4): 2363-2370.
- [44] ZHANG X Y, HAN P P, ZHAO Y N, et al. Crosstalk between autophagy and ferroptosis mediate injury in ischemic stroke by generating reactive oxygen species [J]. Heliyon, 2024, 10(7): e28959.
- [45] XUE Q, YAN D, CHEN X, et al. Copper-dependent autophagic degradation of GPX4 drives ferroptosis [J]. Autophagy, 2023, 19(7): 1982-1996.
- [46] CHEN X, YAO N, MAO Y, et al. Activation of the Wnt/ β -catenin/CYP1B1 pathway alleviates oxidative stress and protects the blood-brain barrier under cerebral ischemia/reperfusion conditions [J]. Neural Regen Res, 2024, 19(7): 1541-1547.
- [47] JI Y B, GAO Q, TAN X X, et al. Lithium alleviates blood-brain barrier breakdown after cerebral ischemia and reperfusion by upregulating endothelial Wnt/ β -catenin signaling in mice [J]. Neuropharmacology, 2021, 186: 108474.
- [48] CHEN W, ZHANG Y, YIN M, et al. Circular RNA circPRDX3 mediates neuronal survival apoptosis in ischemic stroke by targeting miR-641 and NPR3 [J]. Brain Res, 2022, 1797: 148114.
- [49] KIM H, KIM M J, KWON Y W, et al. Benefits of a skull-interfaced flexible and implantable multilight emitting diode array for photobiomodulation in ischemic stroke [J]. Adv Sci, 2022, 9(11): e2104629.
- [50] YAO D, ZHANG S, HU Z, et al. CHIP ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating necroptosis and inflammation [J]. Aging, 2021, 13(23): 25564-25577.
- [51] LIU X, YE Q, HUANG Z, et al. BAG3 overexpression attenuates ischemic stroke injury by activating autophagy and inhibiting apoptosis [J]. Stroke, 2023, 54(8): 2114-2125.
- [52] HU Q, ZUO T, DENG L, et al. β -Caryophyllene suppresses ferroptosis induced by cerebral ischemia reperfusion *via* activation of the NRF2/HO-1 signaling pathway in MCAO/R rats [J]. Phytomedicine, 2022, 102: 154112.

[收稿日期]2024-06-20

赵子莹,王光义. 中医外治法调控类风湿关节炎相关通路研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 146-160.
Zhao ZY, Wang GY. Research progress into the regulation of rheumatoid arthritis-related pathways by external treatment with traditional Chinese medicines [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 146-160.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.018

中医外治法调控类风湿关节炎相关通路研究进展

赵子莹¹, 王光义^{1,2*}

(1. 贵州医科大学临床医学院, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院, 贵阳 550004)

【摘要】 类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种自身免疫性疾病, 常以对称性小关节疼痛为早期临床表现, 迁延难愈逐渐加重, 常常累及多个关节最终造成关节炎畸形, 使患者失去劳动能力。分子信号通路一直以来都是研究 RA 防治的关注焦点, 研究发现 RA 病程发生发展与 Janus 激酶-信号转导与转录激活因子 (JAK-STAT) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 信号通路、核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 信号通路、Toll 样受体 (TLRs) 信号通路、Wnt 信号通路、Notch 信号通路、缺氧诱导因子 1- α 与血管内皮生长因子 (HIF-1 α /VEGF) 信号通路、程序性死亡因子 1 与配体 1 (PD-1/PD-L1) 信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路均有密切联系。近些年来中医外治法基于以上信号通路治疗 RA 的研究逐渐增多, 逐步深入。本文通过查阅相关资料与报道, 阐述以上通路 with RA 发病、防治的关系, 并总结中医外治法调控以上信号通路防治类风湿性关节的研究成果, 以期临床选用中医外治法为治疗选择提供科学依据。

【关键词】 类风湿关节炎; 中医外治法; 分子信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0146-15

Research progress into the regulation of rheumatoid arthritis-related pathways by external treatment with traditional Chinese medicines

ZHAO Ziying¹, WANG Guangyi^{1,2*}

(1. Clinical Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China. 2. Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

【Abstract】 Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease with an early clinical manifestation of symmetric small joint pain, which gradually worsens and often involves multiple joints, ultimately result ing in arthritic deformities and loss of labor capacity. Molecular signaling pathways have been a focus of research regarding the prevention and treatment of RA, and the progression of RA has been shown to be closely related to various signaling pathways, including the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription, mitogen-activated protein kinase, NOD-like receptor protein 3, Toll-like receptor, Wnt, Notch, hypoxia-inducible factor 1- α and vascular endothelial growth factor, programmed death factor 1 and ligand 1, and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathways. Increasing recent studies have investigated the external treatment of RA using traditional Chinese medicines based on the above signaling pathways. In this paper, we review the relevant data and reports to explain the relationship between the above pathways and the pathogenesis and prevention of RA. We also summarize the research result regarding the modulation

【基金项目】 吕明庄全国名老中医药专家传承工作室织金工作站(黔中医药函[2023]2号)。

【作者简介】 赵子莹(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 针灸治疗类风湿关节炎。E-mail: 3299268385@qq.com

【通信作者】 王光义(1959—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 针灸治疗类风湿关节炎、脑血管疾病。E-mail: 573087568@qq.com

of these signaling pathways by external treatment with traditional Chinese medicines aimed at preventing and treating rheumatoid joints, with a view to providing a scientific basis for the clinical selection of these treatments.

【Keywords】 rheumatoid arthritis; external treatment of traditional Chinese medicines; molecular signaling pathway

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

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性自身免疫性疾病,以关节滑膜慢性炎症和骨破坏为主要病理表现。患者小关节出现对称性炎症,表现出现晨僵、红肿、疼痛的症状。持续反复的关节疼痛多首先表现在近端指间关节,腕、足、膝、髌等关节也可出现^[1]。在 RA 晚期,持续的骨破坏与滑膜炎的蔓延导致不同程度关节功能障碍、关节畸形,严重者累及心肺等脏器使患者完全丧失劳动能力。现如今,类风湿患者死亡率依然高于一般人群。RA 的全球患病率约为 0.5%~1.0%,中国现有患者约 500 万人,随着中国老年人口增多,这一数量仍在增加^[2]。西医治疗以非甾体抗炎药、糖皮质激素、抗风湿药为主,但存在消化道反应、过敏、感染等众多不良反应困扰患者^[3]。中医外治法是安全的补充与替代疗法,其种类多样,电针、火针、艾灸、药浴等多种方法对于治疗类风湿关节有着明确的疗效,又因安全性高、无明显副作用、内容丰富适配不同接受程度人群等优势,广泛受到患者的青睐。

RA 的疾病发生发展过程中,重要的病理变化如炎症细胞浸润滑膜、滑膜组织增生、血管翳的生成、软骨与骨的破坏等与各种细胞因子息息相关^[4]。诱导自身抗体产生、募集炎性细胞聚集的白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、降解组织造成软骨破坏的水解酶基质金属蛋白 (matrix metalloproteinases, MMPs)、诱导破骨细胞生成核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)、调控血管内皮细胞生长迁移的血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等的转录表达都依赖于多种分子信号通路的调控^[5]。虽然 RA 具体发病机制目前仍不明确,但已经逐渐认识到多种分子信号通路在 RA 发病过程中的重要作用。近些年来,有关各种中医外治法治疗 RA 的机制研究也逐渐增多。其中 Janus 激酶/信号转导和转录激活子 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 信号通路、核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎性小体

(NLRP3)、Notch 信号通路、经典的 Wnt/ β -连环蛋白 (Wnt/ β -catenin) 信号通路、程序性死亡因子 1 (programmed cell death-1, PD-1) 与其配体 1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B/Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路等在调控 RA 病程中扮演重要角色。本文综述了相关信号通路在 RA 病情发生发展中的作用与中医外治法调控相关分子信号通路防治 RA 的机制研究。

1 JAK-STAT 信号通路

JAK 家族,是非受体蛋白酪氨酸激酶,有 4 个家族成员 (JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2)。STAT 处于 JAK 下游,是保守的细胞质蛋白,JAK 使 STAT 磷酸化后,被激活从而形成二聚体,活化的 STAT 可进入细胞核结合靶基因,可促进多种促炎细胞因子表达参与 RA 的病程,如 IL-6、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)^[6]。实验证实 RA 患者炎性滑膜组织中 JAK、STAT1、STAT3 高表达^[7]。有趣的是 STAT1 在 RA 中促进炎症因子表达的同时,也可以促进增生的滑膜细胞凋亡,表现出一种双重调节作用^[8]。正常情况下,细胞因子信号抑制物 (suppressors of cytokine signaling, SOCS) 会在 STAT 激活的情况下表达增加,通过与 STAT 竞争性结合方式占用 JAK 酪氨酸磷酸化位点,抑制其下游信号分子的传递,形成负反馈调节。SOCS 家族有 8 位成员,SOCS1~7 和 CIS,而 JAK/STAT 信号通路最主要的抑制因子就是 SOCS1 和 SOCS3。然而在 RA 患者中,SOCS 负反馈调节能力严重不足,使得 JAK/STAT 信号通路持续激活^[9-10]。

早在 2007 年杨馨等^[11]通过基因芯片及生物信息分析技术检测发现,艾灸治疗对 RA 家兔滑膜中 JAK/STAT 通路异常激活有明显抑制作用。研究发现艾灸 RA 大鼠双侧“肾俞 (BL23)”穴,可以提高大鼠关节滑膜组织中 STAT1 和 SOCS mRNA 表达,降低炎症因子 IL-1 的表达,提示艾灸疗法治疗 RA 可

能与调控 JAK/STAT 通路负反馈调节有关^[12]。在相同实验条件下将艾灸治疗替换为针刺治疗可以达到相似的结果,但治疗后大鼠滑膜 STAT1 和 SOCS mRNA 表达虽然增多却明显低于艾灸组。文中虽未讨论,艾灸温经通脉的功效针对该实验风寒湿邪环境下“病证结合”的造模方法更符合辨证论治的基本原则,可能是艾灸组更具优势的原因。非受体 22 型蛋白酪氨酸磷酸酶基因 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22, PTPN22) 是负反馈调节 JAK/STAT 通路的重要基因,其表达的蛋白可以阻断 JAKs 的表达活性。研究发现,慢病毒转染干扰 PTPN22 的 RA 大耳白兔经过艾灸治疗,其滑膜组织中 JAK1、STAT4 mRNA 的表达较艾灸组增强^[13]。提示艾灸可能通过 PTPN22 基因良性调控 RA 大耳白兔滑膜组织中 JAK/STAT 信号通路的异常激活。张广辉等^[14]发现电针可以减少胶原诱导的类风湿大鼠软骨中 TNF- α 、STAT3、JAK3 表达,减少软骨细胞的凋亡,且电针联合甲氨蝶呤治疗效果优于甲氨蝶呤单独使用。基于“烧山火”手法与“进火法”简化而来的“热补针法”刺激 RA 大鼠“足三里 (ST36)”穴,可以显著降低大鼠足趾肿胀与疼痛程度,增加滑膜组织中 SOCS1、SOCS3 表达水平从而一定程度抑制 JAK/STAT 通路^[15]。

2 MAPK 信号通路

丝裂原激活蛋白激酶 MAPK 在 RA 的病理过程中起关键作用,参与炎症、滑膜细胞增生及骨破坏等环节。MAPK 信号转导通路是一组由三级激酶模式组成的通路,包括 MAPK 激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MKKK)、MAPK 激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, MKK) 和 MAPK^[16]。MAP3K 先受有丝分裂原刺激磷酸化而激活,然后 MAP3K 转而磷酸化激活 MAP2K,最后 MAP2K 磷酸化激活 MAPK,最终 MAPK 活化进而转入核内促进相应基因的表达。如其活化促进多种炎症因子如 TNF- α 、IL-1、IL-6 等、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2),加重 RA 的炎症反应。过度激活的 MAPKs 导致基质 MMPs 增多,MMPs 能够降解软骨基质中的胶原蛋白和蛋白多糖,从而造成软骨组织的破坏^[17]。MAPK 家族包括 ERK、JNK、p38 MAPK 和 ERK5 四个主要亚族。这些亚家族对应 4 种分支通路分别是 Ras/Raf/MEK/ERK 通路、JNK/SAP 通路、p38 通路和 ERK5 通路。

Ras 是 MAPK 通路上游分子,可以激活 Raf (MKKK 家族成员之一)进而激活 MAPK 通路。姚剑等^[18]发现艾灸“肾俞”“足三里”穴可以减少 RA 模型大鼠滑膜中 Ras、Raf、ERK1/2 和 p-ERK1/2 表达。沈甜等^[19]发现火针点刺佐剂诱导的 RA 模型大鼠腰部夹脊穴和阿是穴 (Ashi points),可以降低滑膜组织中 JNK、p38 蛋白以及血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达。药浴法结合药物的功效与温热的效应,广泛应用于关节疾病。研究发现,五味甘露药浴散加减方药浴可以较少佐剂诱导 RA 模型大鼠滑膜中 JNK1、ERK1/2、p38 蛋白以及血清中 TNF- α 和类风湿因子 (RF) 的表达,减轻关节肿胀程度,提示五味甘露药浴散加减方药浴可抑制 RA 模型大鼠 MAPK 通路^[20-21]。

3 NF- κ B 信号通路

NF- κ B 信号通路在 RA 的发生发展中扮演着重要角色,在 RA 患者滑膜 NF- κ B 表达明显高于正常人^[22]。NF- κ B 家族成员包括 RelA (p65)、NF- κ B1 (p50)、NF- κ B2 (p52)、RelB 及 c-Rel 五种。正常情况下,细胞中同源或异源 NF- κ B 二聚体与其抑制蛋白 I κ B 结合成三聚体而处于未活化状态。当细胞受到某些因素 (病毒、感染和细胞因子等) 刺激时,NF- κ B 抑制蛋白激酶 (IKK) 使 I κ B 磷酸化后降解,释放 NF- κ B 二聚体进入细胞核内调控相关蛋白表达。NF- κ B 信号通路可以活化大量炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β ,而 TNF- α 、IL-1 β 又可以正反馈调节 NF- κ B 信号通路,形成恶性循环^[23]。另外 NF- κ B 信号通路可以上调基质金属蛋白酶 MMP-3、MMP-9、促血管生成因子等促进 RA 中滑膜血管生成、软骨与骨破坏^[24]。

王丹^[25]发现 RA 模型家兔模型在艾灸双侧“肾俞”“足三里”后,免疫组化 SP 法染色测定的滑膜组织中 NF- κ B p65 表达减少,ELISA 法检测滑膜液中 IL-6、TNF- α 、VEGF 的含量降低。CXCL12 是一种趋化因子,而 CXCR4 是其特异性受体。CXCL12 过表达可显著增加 NF- κ B 结合活性,CXCR4 表达也受到 NF- κ B 调节。陈俊等^[26]的研究发现艾灸可下调 RA 家兔滑膜组织中 NF- κ B p65 mRNA、I κ B mRNA、CXCL12 mRNA、CXCR4 mRNA 的表达。同时唐玉芝等^[27]的临床研究发现艾灸“足三里”“肾俞”“阿是穴”联合常规西药进行治疗的患者血清中 NF- κ B、VEGF、IL-1 β 含量较常规西药对照组明显降低,

患者关节肿痛症状较常规西药对照组明显减轻。吴菲等^[28]分别用温和灸、直接灸和隔姜灸对 RA 家兔进行治疗,发现三种灸法均可以降低 RA 家兔滑膜中 NF- κ B p65、NF- κ B p50、IKK 的表达。

蔡国伟等^[29]发现温针灸可以提高胶原诱导的 RA 大鼠膝关节滑膜中 SIRT1 的表达,减少 NF- κ B 表达。SIRT1 是 NF- κ B 表达的抑制因子,而注射 SIRT1 抑制剂尼克酰胺的 RA 大鼠经温针灸治疗后,NF- κ B 表达明显高于 SIRT1 未被抑制的温针灸组,以此证明温针灸“足三里”“肾俞”和“悬钟(GB39)”穴能够调节 SIRT1/NF- κ B 信号通路抗类风湿。肿瘤坏死因子- α 转化酶(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是一种膜结合的金属蛋白酶,可以切割水解并将 TNF- α 以可溶性形式释放, TNF- α 进而诱导 NF- κ B 通路活化^[30]。李佳等^[31]发现电针刺激 RA 大鼠“足三里”“悬钟”和“肾俞”穴进行治疗,滑膜中 TACE 与 NF- κ B 表达较模型组下降,而非穴位的电针刺激干预与模型组比较则无明显差异,因而推测电针治疗 RA 可能与抑制 TACE/NF- κ B 信号通路过度激活有关。而在临床研究方面,刘婧等^[32]观察到类风湿关节患者经电针联合甲氨蝶呤治疗后,患者关节液中 NF- κ B p65、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达明显较治疗前下降,且相对表达量明显低于单纯口服甲氨蝶呤的患者。可见电针联合与辅助西药治疗时,可以调控 NF- κ B 信号通路达到更好的治疗效果。陈丽川等^[33]实验中穴位埋线“足三里”“肾俞”减少佐剂诱导关节炎大鼠膝关节滑膜中 NF- κ B p65 和 p-p65 以缓解关节炎。

4 NLRP3 信号通路

NLRP3 属于胞浆型模式识别受体,是 NOD 样受体家族成员,是一种由冷诱导自身炎症综合征基因 1 编码的蛋白质,其结构包含一个 N 端吡啶结构域(pyrimin domain, PYD)、介导寡聚的中央核苷酸结合寡聚结构域和一个 C 末端富含亮氨酸的重复序列。当 NLRP3 感应到刺激时会与凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)的 PYD 相互作用而结合,之后 ASC 通过募集 pro-caspase-1 进而聚集成 NLRP3 炎性小体^[34]。激活 NLRP3 形成炎性小体的过程包含两个步骤,在启动步骤中, Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)等 PRRs 识别结合损伤相

关分子模式(DAMPs)、病原微生物相关分子模式(PAMPs),激活 NF- κ B 信号通路,上调白介素前体 Pro-IL-1 β 、Pro-IL-18 和 NLRP3 的表达。在激活步骤中,NLRP3 响应多种刺激,如活性氧(ROS)、K⁺外流、ATP、溶酶体破裂和细菌或真菌,通过 PYD 结构域与接头蛋白 ASC 结合,并通过其 CARD 结构域招募前 Caspase-1,最终形成 NLRP3 炎性小体^[35]。NLRP3 炎性小体激活后,Caspase-1 将切割 Pro-IL-1 β 、Pro-IL-18 产生具有生物活性的 IL-1 β 、IL-18,并裂解 GSDMD 以诱导细胞焦亡加重 RA 炎症^[36]。有效调控 NLRP3 炎性小体的活化通路将有利于 RA 阻断早期病理性损伤。

王森等^[37]发现艾灸“肾俞”“足三里”佐剂诱导的关节炎大鼠,可以通过减少滑膜中 NLRP3、ASC、Caspase-1、TNF- α 、IL-1 β 的表达,减轻滑膜组织损伤程度,这表明艾灸对 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路有一定调节作用。江彬等^[38]使用麦粒灸干预 ROS 表达水平不同的佐剂诱导的关节炎大鼠,大鼠踝关节 ROS 相关蛋白活性氧调节因子 1(ROSMO1)、NLRP3 以及血清中 IL-1 β 表达量显著下降,认为麦粒灸可以抑制 ROS-NLRP3-IL-1 β 炎性通路从而发挥抗炎、镇痛作用。组织蛋白酶 B 是一种位于溶酶体内的蛋白酶,是 NLRP3 炎性小体激活剂诱导 Caspase-1 激活过程中必不可少的物质^[39]。陈俊等^[40]艾灸“肾俞”“足三里”治疗实验性关节炎家兔,发现艾灸可以有效控制炎症反应减轻膝关节肿胀,滑膜中 NLRP3 mRNA、组织蛋白酶 B mRNA 的表达和 ROS 荧光强度均明显降低,证明艾灸可通过对 NLRP3 炎性小体激活因素进行抑制,延缓 RA 的发展进程,以发挥治疗 RA 的作用。IL-1 β 、IL-18 作为 NLRP3 炎性小体直接调控的炎症因子的同时,可以激活 JAK2-STAT3 信号通路,席东来等^[41]发现艾灸可以减少 RA 大鼠滑膜中 NLRP3 mRNA、JAK2 mRNA、STAT3 mRNA 表达缓解炎症,而慢病毒介导的 NLRP3 过表达的大鼠身上上述作用明显减弱,提示艾灸可能通过抑制 NLRP3 炎性小体减少炎症因子的表达,从而抑制 JAK2-STAT3 异常激活,缓解 RA 炎症。基于时间针灸学理论,余明芳等^[42]推测 RA 大鼠 NLRP3 信号通路相关分子可能存在一定节律性,酉时艾灸治疗 RA 大鼠,NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA 表达水平的下调幅度更大,艾灸发挥抗炎作用可能通过抑制 NLRP3 信号通路有关。细胞自噬可以选择性降解 ASC、炎性小体传感器等抑

制炎症小体结构的形成^[43]。刘强等^[44]发现“热补法”可以上调 RA 寒证模型家兔滑膜自噬相关蛋白 Atg5、ULK1、LC3 II/LC3 I、Beclin-1 等表达,促进更多自噬的发生从而下调 IL-1、NLRP3,抑制炎症的发生。陈平等^[45]则发现“热补法”可以通过调控 P2X7Y/NLRP3/Caspase-1 信号通路减轻抑制下游炎症因子分泌改善滑膜损伤。

5 TLRs 信号通路

TLRs 在启动和维持 RA 病理过程中扮演着重要角色,TLRs 是一种跨膜模式识别受体,可识别 DAMPs 和病原微生物相关分子模式(PAMPs),如脂多糖、磷壁酸、肽聚糖、来源于死亡损伤细胞的热休克蛋白、高迁移率族蛋白和活性氧等^[46]。TLRs 是一个进化上保守的 I 型跨膜蛋白超家族,包括一个能与 PAMPs 或 DAMP 相互作用的亮氨酸重复序列胞外结构域,以及一个参与下游信号转导和引发炎症反应的细胞质 Toll/白细胞介素 1 受体结构域^[47]。当 TLR 与配体结合时,TLR 经历同二聚化或异二聚化,招募髓样分化因子 88 (myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88)、Toll 样受体/干扰素调节因子两种接头蛋白,MyD88 招募白介素-1 受体相关激酶 1 (interleukin 1 receptor associated kinase 1, IRAK-1) 与 IRAK-6,使 IRAK-1 磷酸化和激活。激活的 IRAK-1 泛素化 TNF 受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6),激活转化生长因子 β 活化激酶 1 和转化生长因子 β 活化激酶 1 结合蛋白复合物^[48]。该复合物激活 IKK 复合物,导致 $\text{I}\kappa\text{B}$ 的磷酸化和降解,从而活化 NF- κB 信号通路。被激活的转化生长因子 β 活化激酶 1 也是 MAP3K 家族重要成员,可激活 MAPK 信号通路,调控炎症因子^[49]。关节炎患者关节滑膜细胞、外周单核细胞中 TLR2、TLR3、TLR4、TLR7 均被发现大量增加。因此控制 RA 中 TLRs 的激活有助于明显缓解 RA。

袁娟等^[50]发现艾灸可以减少患病鼠滑膜 TLR4、MyD88、TRAF6 及 NF- κB p65 表达,张传英等^[51]在此基础上发现艾灸抑制 NF- κB 信号通路上游的抑制蛋白,通过抑制 TLR4/MyD88 信号通路抑制相关炎症因子表达,减轻关节炎症。朱艳等^[52]发现艾灸与 TLR4 拮抗剂均可以减少 RA 大鼠滑膜中 miR-155、TLR4 及其下游相关蛋白的表达,验证了 miR-155 在 RA 中的作用与 TLR4/NF- κB 通路密切

相关,艾灸可抑制 miR-155 表达从而抑制 TLR4/NF- κB 信号通路的激活,改善 RA 大鼠症状。苏俊贤等^[53]发现电针干预后,RA 模型大鼠滑膜组织中 TLR4、MyD88 和 TRAF6 的 mRNA 及蛋白的表达均显著降低,可促使细胞过度增殖的增殖细胞核抗原(PCNA)表达水平降低,电针治疗脂多糖诱导激活 TLR4 信号通路的 RA 大鼠,滑膜组织中 TLR4、MyD88 和 TRAF6、PCNA 表达均升高,通路激活剂明显抑制了电针的治疗作用,进一步证明了电针可以调控 TLR4 信号通路缓解 RA 大鼠病情。Dong 等^[54]使用电针刺刺激“足三里”“昆仑(BL60)”穴干预佐剂诱导的关节炎大鼠可以明显降低大鼠踝关节中 TLR4、MyD88、NF- κB 表达的影响。苏成红等^[55]发现与模型组比较,热补针法及 TAK-242 (TLR4 抑制剂)干预后,实验家兔滑膜组织 TLRs、MyD88、ERK1/2 蛋白表达水平及 mTOR、p70S6K mRNA 表达水平均降低,与之相反脂多糖联合热补针法处理的实验家兔上述指标水平虽低于模型组,但高于单纯热补针法组,进而证实热补针法可以通过抑制 TLRs/MyD88/ERK1/2 信号通路及其下游的 mTOR、p70S6K mRNA 表达,以抑制实验家兔滑膜细胞的增生。

6 Wnt 信号通路

Wnt/ β -catenin 信号通路在 RA 中被异常激活,在 RA 的滑膜炎症和骨代谢调节中发挥关键作用^[56]。信号通路由 Wnt 家族蛋白、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (LRP5/6)、蓬乱蛋白 Dsh、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、结直肠腺瘤性息肉蛋白 (APC)、 β -链环蛋白、轴蛋白 (Axin) 和 T 细胞因子/淋巴样增强因子 (TCF/LEF) 组成。当 Wnt 被激活后与膜受体 Dsh 相互作用,促进 Axin、APC、GSK-3 β 结合成复合物抑制 β -catenin 降解,造成 β -catenin 逐渐堆积进入细胞核,与 TCF/LEF 相互作用调控相关目的蛋白的表达^[57]。

DKK-1 是 Wnt 信号通路抑制蛋白,通过与 LRP5/6 竞争结合的方式抑制经典 Wnt 信号通路。张育瑛等^[58]向 DKK-1 组 RA 大鼠注射 DKK-1 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,观察组大鼠予以电针联合艾灸治疗,发现两组大鼠组 Wnt-3a 和 β -catenin 蛋白及 mRNA 表达较模型组大鼠降低,且关节炎肿胀、滑膜炎性细胞浸润和骨破坏情况均较模型组改善,提示电针联合艾灸治疗可通过下调 Wnt-3 和 β -

catenin 蛋白的表达,抑制 Wnt 信号通路减少骨损伤。在潘明柱等^[59]临床试验中发现,温经通络汤联合艾灸治疗疗效明显,患者血沉、C 反应蛋白以及类风湿因子水平均较治疗前下降,有效率 94.64%,患者血清中 Wnt-3 α 、 β -catenin 及下游参与成骨过程的骨形态发生蛋白-2 均下降,有效地缓解患者临床症状。陶偲钰等^[60]在常规西药基础上联合隔物灸、直接灸治疗 RA 患者,发现联合隔物灸、直接灸可减少 Wnt/ β -catenin 信号通路内源性负调节蛋白 SOST、调控 β -catenin 水平、抑制炎症因子 TNF- α 产生,缓解 RA 患者关节疼痛、降低疾病活动度。

7 Notch 信号通路

Notch 信号通路包括 Notch 受体 (Notch1-4)、Notch 配体 (DII1、DII3、DII4、Jagged1 和 Jagged2)、CSL (CBF-1、Suppressor of Hairless 和 Lag1 的合称)、DNA 结合蛋白、其他效应物和 Notch 调节分子^[61]。Notch 受体作为跨膜蛋白,可分为胞外段、跨膜段和胞内段 (Notch intra cellular domain, NICD)。通路激活时,成熟的 Notch 受体与 Notch 配体结合, NICD 作为 Notch 信号的主要效应形式被释放, NICD 与 CSL 结合从细胞质转移到细胞核,触发下游 Notch 靶基因的转录如 HES、HEY 和 HERP 等^[62]。Notch 主要表达于各种不同的免疫细胞中,在 RA 中可表达在增生的成纤维细胞、T 细胞、B 细胞、被募集于滑膜中的巨噬单核细胞中,调节 Th1、Th2、Th17 分化、增殖和炎症因子表达等^[63]。Notch 信号通路还可能通过 Foxp3 等与 NF- κ B、转化生长因子等信号通路协同表达。赵彩虹等^[64]发现傅山风湿外治方外敷患鼠踝关节,可以显著较少患鼠关节中 Notch1、Jagged1 和 Hes1 表达,同时也下调了具有促炎作用的 Th1 型细胞因子干扰素- γ 表达,上调具有抑炎作用的 Th2 型细胞因子和 IL-4 表达,提示傅山风湿外治方外敷可能通过抑制 Notch1/Jagged1 信号通路调节 Th1/Th2 平衡,达到治疗效果。高玉亭等^[65]沿用相同的治疗方法,发现可以降低患鼠踝关节和脾 Notch2、DLL1 和 NF- κ B p65 mRNA 和蛋白的表达水平,患鼠血清中炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-17 和干扰素- γ 水平均下降,肝肾组织均未见明显的病理损伤,血清 AST、ALT、BUN 和 Cr 水平正常,可见风湿外治方外敷可明显抑制 Notch2/DLL1 信号通路,且对肝肾功能无毒副作用。姜建振^[66]实验发现电针干预“足三里”“悬钟”穴治疗 RA 大鼠,大鼠滑膜

中 Notch1、Hes1、bFGF、转化生长因子表达明显降低, TUNEL 法检测异常增生的滑膜细胞的凋亡明显增多,电针有效地通过抑制 Notch1 通路,促进滑膜细胞凋亡。

8 HIF-1 α /VEGF 信号通路

RA 患者滑膜异常细胞增生导致氧与代谢需求增加,从而导致滑膜组织与周围环境缺氧,长期低氧环境刺激 HIF-1 α 表达增加。HIF-1 蛋白由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基组成^[67]。HIF-1 α 与位于血管内皮细胞表面的受体 VEGFR-2 相互作用,促进血管内皮细胞的增殖、迁移、血管重建,生成大量新生血管产生血管翳^[68]。血管翳增加有助于滑膜细胞侵蚀软骨,造成骨与软骨的破坏。同时 HIF-1 α 表达增加可以通过增加糖酵解,促进乳酸生成为炎症细胞提供能量,进一步诱导 IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 等炎症因子表达,加重关节炎症^[69]。

熊燕^[70]在传统西药治疗基础上增加艾灸治疗,与单纯西药治疗形成对比,发现联合治疗的患者病情改善更加明显,且联合治疗组患者血清中 HIF-1 α 、VEGF 含量明显低于单纯西药治疗组,提示艾灸可以协助西药降低患者血清中 HIF-1 α 、VEGF 表达、缓解关节炎与镇痛。张慧等^[71]在动物试验中发现,艾灸“足三里”“肾俞”“阿是穴”可以明显减少佐剂诱导的关节炎大鼠滑膜新生血管的产生,以及滑膜中 HIF-1 α 、VEGF 表达改善关节肿胀与炎症。李向军等^[72]发现 HIF-1 α 抑制剂 2-Methoxyestradiol 和热补针法治疗 RA 模型家兔,均可以降低 HIF-1 α 和糖酵解相关酶 (PKM2、LDHA、NADPH、HK2、PFKFB3) 以及乳酸的表达,从抑制 HIF-1 α 减少糖酵解的角度,阐释了热补法减少 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17 等炎症细胞因子表达、抑制关节炎的机制。

9 PD-1/PD-L1 信号通路

T 细胞的异常活化是 RA 发生发展的重要病理重要原因。PD-1 是一种共刺激分子,主要表达于活化的 T 细胞 B 细胞表面,其配体为程序性细胞死亡蛋白 1 配体 1 (PD-L1) 和 (PD-L2)。PD-1/PD-L1 可分为可溶型 (sPD-1/sPD-L1) 与细胞膜型 (mPD-1/mPD-L1),受体配体结合后可以抑制 T 细胞的活性^[73]。研究发现在 RA 患者的滑膜中 PD-1 表达增多,但也存在 PD-1 负调控 T 细胞能力受损、PD-1/PD-L1 信号通路抑制的现象,这可能与 sPD-1 与

mPD-L1 配体的竞争性结合有关^[74-75]。

吴菲^[76]研究发现与模型组相比,艾灸治疗的实验性 RA 家兔脾 mPD-1、mPD-L1 的蛋白表达明显升高,血清和滑膜液中 sPD-1 的含量降低,sPD-L1 的含量呈下降趋势但无统计学意义,推测可能因为 sPD-1 表达下降使其配体 sPD-L1 表达受到下调,但因其能与 mPD-1 结合起到协助增强抑制信号的作用而没有出现显著性的下降。艾灸治疗可能通过增加 RA 家兔脾 mPD-L1 蛋白表达,降低血清及滑膜液 sPD-1 含量来增强 PD-1/PD-L1 信号通路对 T 细胞活化的抑制作用。在此基础上,赖德利^[77]通过腺病毒载体介导干扰 PD-1 表达,观察其对艾灸治疗 RA 家兔的影响,发现治疗效果远不及艾灸对未经腺病毒载体介导干扰 PD-1 表达的家兔的治疗。实验中,艾灸可以降低 RA 家兔脾中可使 T 细胞的活化和增殖的激酶 Fyn 的表达,但在干扰 PD-1 表达后,艾灸降低 Fyn 表达的能力下降,对于在 T 细胞活化的早、中、晚期出现的标志性蛋白 CD69、CD71、CD25 的抑制作用也明显降低。钟玉梅等^[78]通过免疫组化等实验手段完善了艾灸上调 RA 家兔调脾 mPD-L1 表达的证据。综上所述,艾灸可以通过调控 PD-1/PD-L1 信号通路,抑制异常活化 T 细胞,达到治疗效果。肿瘤坏死因子受体超家族成员 OX40 是一种 I 型跨膜糖蛋白,主要表达在活化的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞,与 PD-1 相反。它可以活化 T 细胞,具有促进增殖、分化和促炎的作用,PD-1 和 OX40 失衡可能促进 RA 病情的进展,而 OX40 可以逆转因 PD-1 信号通路障碍引起的炎症因子表达增多^[79]。陈丽川等^[80]通过细胞流式技术发现 RA 大鼠血液中表达 OX40 的细胞含量低,而表达 PD-1 细胞含量较高,通过穴位埋线“足三里”“肾腧”进行治疗后,

表达 OX40 的细胞含量增加,而表达 PD-1 细胞含量降低,提示穴位埋线可以调控 PD-1/OX40 信号通路降低炎症程度。

10 PI3K/Akt/mTOR 信号通路

PI3K,是由一个 p110 催化亚单位和一个 p85 调节亚单位组成的异源二聚体。PI3K 的激活有两种方式,一种是其二聚体构象改变而被激活,另一种是通过 Ras 和 p110 直接结合导致 PI3K 的活化,PI3K 激活 PIP2 磷酸化产生 PIP3,AKT 是 PI3K 的下游分子,AKT 的 PH 结构域可以与 PIP3 结合而活化,活化的 AKT 磷酸化多种蛋白如 mTOR,进而调控细胞的生存与凋亡^[81]。PI3K/AKT 信号通路除了可以调控为人熟知的经典炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6,其对 IL-21、IL-22、IL-17 均有调节作用。郝锋等^[82]发现艾灸“足三里”可以明显降低 RA 大鼠滑膜中 PI3K、Akt、mTOR、血清中 IL-23、IL-17 蛋白的表达,且其抑制作用明显大于使用香烟模拟温热效应的香烟组。赵晨等^[83]的实验则发现针刺“三阴交(SP6)”“阴陵泉(SP9)”不仅可以降低 RA 大鼠滑膜中 PI3K、Akt、mTOR、p-Akt、p-mTOR 表达,还可以降低血清中炎症因子 IL-6、IL-17 含量,上调自噬相关蛋白 Beclin-1 和 LC3-II 表达。相应的大鼠增生的滑膜细胞表现出更多自噬行为,这表明针刺确可以通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路提高滑膜细胞自噬水平,从而减轻炎症与损伤。

单独中医外治法及其他治疗联合中医外治法调控 RA 相关通路的作用机制总结如表 1、表 2 所示,可以观察到中医外治法的基础实验研究相较于临床研究更多,针刺与艾灸的研究较为丰富,而临床研究中多以中医外治法与多种其他治疗方法相

表 1 单独中医外治疗法对 RA 相关通路调控

Table 1 Modulation of RA-related pathways by external therapeutic methods of Chinese medicine alone

外治方法 Types of external treatments	作用部位/穴位 Part/ acupuncture point of action	实验对象 Subject	信号通路 Signaling pathway	作用机制 Mechanism of action
针刺 ^[15] Acupuncture	足三里 ST36	CIA 大鼠 Collagen-Induced arthritis rats	JAK-STAT 信号通路 JAK-STAT signaling pathway	增加滑膜 SOCS1、SOCS3 表达 Increased the expression of SOCS1 and SOCS3 in synovium
针刺 ^[44] Acupuncture	足三里 ST36	寒证 AA 模型家兔 Cold syndrome AA model rabbits	NLRP3 信号通路 NLRP3 signaling pathway	下调 IL-1、NLRP3,下调自噬相关蛋白 Atg5、ULK1、LC3 II/LC3 I、Beclin-1 Reduced the expression of IL-1, NLRP3, ULK1, LC3 II/ LC3 I, Beclin-1

续表 1

外治方法 Types of external treatments	作用部位/穴位 Part/ acupuncture point of action	实验对象 Subject	信号通路 Signaling pathway	作用机制 Mechanism of action
针刺 ^[45] Acupuncture	足三里 ST36	寒证 AA 模型家兔 Cold syndrome AA model rabbits	NLRP3 信号通路 NLRP3 signaling pathway	下调滑膜 P2X7Y、NLRP3、Caspase-1 mRNA、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白 Reduced the expression of P2X7Y, NLRP3, IL-1 β , IL-6, TNF- α in synovium
针刺 ^[55] Acupuncture	足三里 ST36	寒证 AA 模型家兔 Cold syndrome AA model rabbits	TLR4 信号通路 TLR4 signaling pathway	抑制滑膜 TLRs、MyD88、ERK1/2 蛋白表达, 滑膜 mTOR、p70S6K mRNA 表达 Reduced the expression of TLRs, MyD88, ERK1/2, mTOR, p70S6K mRNA in synovium
针刺 ^[72] Acupuncture	足三里 ST36	寒证 AA 模型家兔 Cold syndrome AA model rabbits	HIF-1 α /VEGF 信号通路 HIF-1 α /VEGF signaling pathway	下调滑膜 HIF-1 α 、PKM2、LDHA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17、乳酸表达, 下调血清 NADPH、HK2、PFKFB3 表达 Reduced the expression of HIF-1 α , PKM2, LDHA, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 in synovium, and the expression of NADPH, HK2, PFKFB3 in serum
电针 ^[14] Electroacupuncture	合谷、太冲 LI4, LR3	CIA 大鼠 Collagen-Induced arthritis rats	JAK-STAT 信号通路 JAK-STAT signaling pathway	下调踝关节软骨 TNF- α 、STAT3、JAK3 表达 Reduced the expression of TNF- α , STAT3 and JAK3 expression in ankle cartilage
电针 ^[31] Electroacupuncture	足三里、悬钟、 肾俞 ST36, GB39, BL23	CIA 大鼠 Collagen-Induced arthritis rats	NF- κ B 信号通路 NF- κ B signaling pathway	下调滑膜中 TACE 与 NF- κ B 表达 Reduced the expression of TACE and NF- κ B expression in synovium
电针 ^[32] Electroacupuncture	大椎、曲池、足 三里、太冲、合 谷、肾俞、膈俞 GV14, LI11, ST36, LR3, LI4, BL23, BL17	RA 患者 Rheumatoid arthritis patient	NF- κ B 信号通路 NF- κ B signaling pathway	下调关节液中 NF- κ B p65、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 上调 TGF- β 、IL-10 表达 Reduced the expression of NF- κ B p65, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in synovial fluid, increased the expression of TGF- β , IL-10 expression
电针 ^[53] Electroacupuncture	合谷、太冲 LI4, LR3	CIA 大鼠 Collagen-Induced arthritis rats	TLR4 信号通路 TLR4 signaling pathway	下调滑膜组织中 TLR4、MyD88 和 TRAF6 mRNA 及蛋白, 下调关节液 TNF- α 、IL-1 β 及滑膜 PCNC 表达 Reduced the expression of TLR4, MyD88 and TRAF6 mRNA and protein in synovial tissue., Reduced the expression of TNF- α , IL-1 β , PCNC in synovial fluid
电针 ^[66] Electroacupuncture	足三里、悬钟 ST36, GB39	AA 大鼠 Adjuvant arthritis rats	Notch1 信号通路 Notch1 signaling pathway	下调滑膜中 Notch1、Hes1、bFGF、TGF- β 表达 Reduced the expression of Notch1, Hes1, bFGF, TGF- β in synovium
火针 ^[19] Fire-needle	L1-L5 夹脊穴 Jiaji (EX-B2)	AA 大鼠 Adjuvant arthritis rats	MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	下调滑膜组织中 JNK、p38 蛋白及血清中 TNF- α 、IL-1 β 的表达 Reduced expression of JNK, p38 protein in synovial tissue and TNF- α , IL-1 β in serum
温针灸 ^[29] Warm moxibustion	足三里、肾俞、 悬钟 ST36, GB39, BL23	CIA 大鼠 Collagen-Induced arthritis rats	NF- κ B 信号通路 NF- κ B signaling pathway	上调滑膜 SIRT1 蛋白、下调滑膜 NF- κ B p65 蛋白、血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-8 表达 Increased expression of SIRT1 and reduced NF- κ B p65 in synovium, and IL-1 β , IL-6, IL-8 in serum
艾灸 ^[25] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	AA 模型家兔 Adjuvant arthritis rabbits	NF- κ B 信号通路 NF- κ B signaling pathway	下调滑膜中 NF- κ B p65、TGF- β 1, 滑膜液中 IL-6、TNF- α 、VEG 的表达 Reduced NF- κ B p65 and TGF- β 1 in synovial and expression of IL-6, TNF- α and VEG in synovial fluid
艾灸 ^[26] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	AA 模型家兔 Adjuvant arthritis rabbits	NF- κ B 信号通路 NF- κ B signaling pathway	下调滑膜 NF- κ B p65 mRNA、I κ B mRNA、CXCL12 mRNA、CXCR4 mRNA 的表达 Reduced expression of NF- κ B p65 mRNA, I κ B mRNA, CXCL12 mRNA, CXCR4 mRNA in synovium

续表 1

外治方法 Types of external treatments	作用部位/穴位 Part/ acupuncture point of action	实验对象 Subject	信号通路 Signaling pathway	作用机制 Mechanism of action
艾灸 ^[11] Moxibustion	肾俞 BL23	AA 模型家兔 Adjuvant arthritis rabbits	JAK-STAT 信号通路 JAK-STAT signaling pathway	下调滑膜中 JAK2、JAK3、STAT3、STAT5 基因 Reduced expression of JAK2, JAK3, STAT3 and STAT5 genes in synovium
艾灸 ^[12] Moxibustion	肾俞 BL23	“病证结合”AA 大鼠 “Disease and evidence combined” AA rats	JAK-STAT 信号通路 JAK-STAT signaling pathway	上调滑膜中 STAT1 和 SOCS mRNA、血清 IL-2 表达, 下调血清 IL-1 表达 Increased STAT1 and SOCS mRNA in synovium, serum IL-2 expression, decreased serum IL-1 expression
艾灸 ^[13] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	RA 家兔 Adjuvant arthritis Rabbits	JAK-STAT 信号通路 JAK-STAT signaling pathway	下调 JAK1 mRNA 及 STAT4 mRNA 表达, 上调 PTPN22 mRNA 及蛋白的表达 Reduce the expression of JAK1 mRNA and STAT4 mRNA and increase the expression of PTPN22 mRNA and protein.
艾灸 ^[18] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	AA 大鼠 Adjuvant arthritis rats	MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	下调滑膜中 Ras、Raf、ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达 Reduced expression of Ras, Raf, ERK1/2 和 p-ERK1/2 in synovium
艾灸 ^[37] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	AA 大鼠 Adjuvant arthritis rats	NLRP3 信号通路 NLRP3 signaling pathway	下调滑膜 NLRP3、ASC、Caspase-1、TNF- α 、IL-1 β 的表达 Reduced expression of NLRP3, ASC, Caspase-1, TNF- α , IL-1 β in synovium
艾灸 ^[38] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	AA 大鼠 Adjuvant arthritis rats	NLRP3 信号通路 NLRP3 signaling pathway	踝关节 ROSMO1、NLRP3 蛋白、血清 IL-1 β 、血清 ROSMO1 mRNA 表达 Reduced expression of ROSMO1、NLRP3 in inflammatory tissue, and ROSMO1 mRNA in serum
艾灸 ^[40] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	RA 家兔 Adjuvant arthritis rabbits	NLRP3 信号通路 NLRP3 signaling pathway	下调滑膜 NLRP3 mRNA、Cathepsin-B mRNA、ROS 表达 Reduced synovial NLRP3 mRNA, Cathepsin-B mRNA, ROS expression
艾灸 ^[41] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	AA 家兔 Adjuvant arthritis rabbits	NLRP3 信号通路 NLRP3 signaling pathway	下调关节液 IL-1 β 、IL-18、滑膜中 NLRP3 mRNA、JAK2 mRNA、STAT3 mRNA Reduced IL-1 β , IL-18 in joint fluid, and NLRP3 mRNA, JAK2 mRNA, STAT3 mRNA in synovium
艾灸 ^[42] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	AA 大鼠 Adjuvant arthritis rats	NLRP3 信号通路 NLRP3 signaling pathway	上调 Clock、Bmal1 mRNA, 下调 NLRP3、Caspase-1、消皮素 D mRNA 表达 Increased Clock, Bmal1 mRNA expression, decreased NLRP3, Caspase-1, abasic dermatophyte D mRNA expression
艾灸 ^[50] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	“病证结合”AA 大鼠 “Disease and evidence combined” AA rats	TLR4/NF- κ B 信号通路 TLR4/NF- κ B signaling pathway	下调血清 TNF- α 、IL-1, 滑膜 TLR4 mRNA、MyD88 mRNA、TRAF-6 mRNA 及 NF- κ B p65 表达 Reduced TNF- α , IL-1 expression in serum and TLR4 mRNA, MyD88 mRNA, TRAF-6 mRNA, NF- κ B p65 expression in synovium
艾灸 ^[51] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	“病证结合”AA 大鼠 “Disease and evidence combined” AA rats	TLR4/NF- κ B 信号通路 TLR4/NF- κ B signaling pathway	下调滑膜 I κ K α 、I κ B β 、TLR4、MyD88、NF- κ B p65 的表达 Reduced expression of synovial I κ K α , I κ B β , TLR4, MyD88, NF- κ B p65
艾灸 ^[52] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	“病证结合”AA 大鼠 “Disease and evidence combined” AA rats	TLR4/NF- κ B 信号通路 TLR4/NF- κ B signaling pathway	下调滑膜 miR-155 及 TLR4、NF- κ B、MyD88、IRAK1、TRAF-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 和蛋白表达 Reduced mRNA and protein expression of synovial miR- 155 and TLR4, NF- κ B, MyD88, IRAK1, TRAF-6, IL- 1 β , TNF- α , IL-6

续表 1

外治方法 Types of external treatments	作用部位/穴位 Part/ acupuncture point of action	实验对象 Subject	信号通路 Signaling pathway	作用机制 Mechanism of action
艾灸 ^[28] Moxibustion	足三里、肾俞 ST36, BL23	AA 家兔 Adjuvant rabbits	arthriti NF-κB 信号通路 NF-κB signaling pathway	下调滑膜 NF-κB p65、NF-κB p50、IKK 表达 Reduced synovial NF-κB p65, NF-κB p50, and IKK expression
埋线 ^[33] Acupoint embedding Therapy	catgut 足三里、肾俞 ST36, BL23	AA 大鼠 Adjuvant arthritis rats	NF-κB 信号通路 NF-κB signaling pathway	下调血清 IL-6 和 IL-8、滑膜 NF-κB p65 和 p-p65 蛋白表达 Reduction of serum IL-6 and IL-8, synovial NF-κB p65 and p-p65 protein expression
埋线 ^[80] Acupoint embedding Therapy	catgut 足三里、肾俞 ST36, BL23	AA 大鼠 Adjuvant arthritis rats	PD-1 信号通路 PD-1 signaling pathway	上调表达 OX40 细胞数量, 下调表达 CD4、CD28、PD-1 细胞数量, 下调血清 IL-6、IL-8 含量 Increase in the number of cells expressing OX40, decrease in the number of cells expressing CD4, CD28, PD-1, down-regulation of serum IL-6, IL-8 levels
药浴 ^[20] Herbal bath therapy	未提及 Not mentioned	AA 大鼠 Adjuvant arthritis rats	MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	下调血清中 RF 水平、滑膜 JNK1 表达 Reduced RF levels in serum and synovial JNK1
药浴 ^[21] Herbal Bath Therapy	后下肢 Lower back limbs	AA 大鼠 Adjuvant arthritis rats	MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	下调血清中 TNF-α 的水平、滑膜 p38、ERK1/2 的表达, JNK1、p38、ERK1 基因表达 Reduced serum TNF-α levels, synovial p38, ERK1/2 expression, JNK1, p38 and ERK1 gene expression

表 2 其他治疗联合中医外治法对 RA 相关通路调控

Table 2 Modulation of RA-related pathways by other treatments in combination with external manipulations

外治方法 Types of external treatments	作用部位/穴位 Part/ acupuncture point of action	实验对象 Subject	信号通路 Signaling pathway	作用机制 Mechanism of action
艾灸联合西药 ^[27] Moxibustion combined with western medicine	阿是穴、足三里/肾俞 Ashi points, ST36/BL23	RA 患者 Rheumatoid arthritis patient	NF-κB 信号通路 NF-κB signaling pathway	下调血清 ESR、CRP、RF、NIK、NF-κB、VEGF、IL-1β 表达 Reduced serum ESR, CRP, RF, NIK, NF-κB, VEGF, IL-1β expression
针刺联合西药 ^[32] Acupuncture combined with western medicine	大椎、曲池、足三里、太冲、合谷、肾俞、膈俞 GV14, LI11, ST36, LR3, LI4, BL23, BL17	RA 患者 Rheumatoid arthritis patient	NF-κB 信号通路 NF-κB signaling pathway	下调关节液中 NF-κB p65、TNF-α、IL-1β、IL-6, 上调关节液 TGF-β、IL-10 水平 Decreased NF-κB p65, TNF-α, IL-1β, IL-6, and increased TGF-β, IL-10 levels in joint fluid
艾灸联合西药 ^[60] Moxibustion combined with western medicine	阿是穴、足三里/肾俞 Ashi points, ST36/BL23	RA 患者 Rheumatoid arthritis patient	Wnt 信号通路 Wnt signaling pathway	下调血清 SOST、β-catenin、TNF-α 水平 Reduced serum SOST, β-catenin, TNF-α expression
艾灸联合西药 ^[70] Moxibustion combined with western medicine	足三里、肾俞、阿是穴 ST36, BL23, Ashi points	RA 患者 Rheumatoid arthritis patient	HIF-1α/VEGF 信号通路 HIF-1α/VEGF signaling pathway	下调血清 TGF-β1、HIF-1α、VEGF 表达 Reduced serum TGF-β1, HIF-1α, VEGF expression
电针联合艾灸 ^[58] Electroacupuncture combined with moxibustion	昆仑、足三里、太溪、曲泉 BL60, ST36, KI3, LR8	CIA 大鼠 Collagen-induced arthritis rats	Wnt 信号通路 Wnt signaling pathway	下调血清 Wnt-3 和 β-catenin 蛋白及 mRNA Reduced protein expression of serum Wnt-3 and β-catenin and mRNA expression
温经通络汤联合温针灸 ^[59] Wenjing Tongluo decoction combined with acupuncture	阴陵泉、三阴交、足三里、气海、关元、曲池 SP9, SP6, ST36, RN6, RN4, LI11	RA 患者 Rheumatoid arthritis patient	Wnt 信号通路 Wnt signaling pathway	下调血清 Wnt-3α、β-catenin 及 BMP-2 水平 Reduced serum Wnt-3α, β-catenin and BMP-2 expression

结合的方式进行研究。

11 小结

综上所述,中医外治法可以通过调控 JAK-STAT 信号通路、MAPKs 信号通路、NF- κ B 信号通路、NLRP3 信号通路、TOLL 样受体、Wnt 信号通路、Notch 信号通路、HIF-1 α /VEGF 信号通路、PD-1/PD-L1 信号通路、PI3K/Akt/mTOR 信号通路,控制炎症、调节免疫细胞活性、细胞凋亡对 RA 治疗有着重要作用。基础研究中,中医外治法通常选取大鼠与家兔为实验动物以便外治操作。基于信号通路的临床研究中,中医外治法多作为常规西药治疗基础上的补充治疗手段,一定程度上反应中医外治法治疗类风湿性关节炎的临床现状。然而分子信号通路之间并非孤立,往往有着复杂的联系,互相影响形成网络。同样的治疗手段对 RA 发生发展的影响机制也是多样且复杂的。作为治疗 RA 有效手段与补充,中医外治法在临床效果方面研究成果颇多,但涉及分子通路的基础研究仍相对有限。中医外治法有着悠长的历史源流,时间积累下对骨关节疾病有着较为完善的认识和不可替代的治疗效果。对中医外治法治疗 RA 机制的探究,可以科学验证外治法治疗效果,为临床治疗提供更多思路,为患者提供更个性化更全面的治疗方案,推动中医药现代化研究。中医外治法方法多样,往往在探究具体治疗机制时,缺乏局部效应作用于整体的完整证据链。在未来的研究中不仅要更广泛、深入地探究分子机制,更要把握整体观念,将基础研究与临床研究相结合,探索中医外治法治疗 RA 的多途径、多靶点机制。

参考文献:

[1] GRAVALLESE E M, FIRESTEIN G S. Rheumatoid arthritis-common origins, divergent mechanisms [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(6): 529-542.

[2] 武占成, 赵晶, 朱秀惠, 等. 类风湿性关节炎的骨病变从络病论治 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(5): 760-765.

WU Z C, ZHAO J, ZHU X H, et al. Treatment of rheumatoid arthritis based on the collateral disease theory [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2020, 24(5): 760-765.

[3] FRAENKEL L, BATHON J M, ENGLAND B R, et al. 2021 American college of rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Care Res*, 2021, 73(7): 924-939.

[4] MCINNIS I B, SCHEFF G. Pathogenetic insights from the

treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10086): 2328-2337.

[5] NANKE Y. The pathogenesis of rheumatoid arthritis breakthroughs in molecular mechanisms 1 and 2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 11060.

[6] MALEMUD C J. The role of the JAK/STAT signal pathway in rheumatoid arthritis [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2018, 10(5/6): 117-127.

[7] MONARI C, BEVILACQUA S, PICCIONI M, et al. A microbial polysaccharide reduces the severity of rheumatoid arthritis by influencing Th17 differentiation and proinflammatory cytokines production [J]. *J Immunol*, 2009, 183(1): 191-200.

[8] 于子涵, 刘英. JAK-STAT1 信号通路及细胞因子信号转导抑制蛋白-1 在类风湿性关节炎中的研究进展 [J]. *风湿病与关节炎*, 2014, 3(4): 66-69.

YU Z H, LIU Y. Progress of JAK-STAT1 signalling pathway and cytokine signal transduction inhibitor protein-1 in rheumatoid arthritis [J]. *Rheum Arthritis*, 2014, 3(4): 66-69.

[9] 肖凡妮, 青玉凤, 张全波. JAK/STAT 信号通路在风湿免疫性疾病中作用的研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2022, 25(17): 2159-2164.

XIAO F N, QING Y F, ZHANG Q B. Latest advances in the role of JAK/STAT signaling pathway in autoimmune rheumatic diseases [J]. *Chin Gen Pract*, 2022, 25(17): 2159-2164.

[10] MOURA R A, FONSECA J E. JAK inhibitors and modulation of B cell immune responses in rheumatoid arthritis [J]. *Front Med*, 2021, 7: 607725.

[11] 杨馨, 李继书, 杨慎峭, 等. 艾灸对实验性类风湿性关节炎家兔滑膜细胞 JAK-STAT 信号通路影响的研究 [J]. *针刺研究*, 2007, 32(2): 75-82.

YANG X, LI J S, YANG S Q, et al. Influence of moxibustion on JAK-stat signal transduction pathways of synovial cells in rheumatoid arthritis rabbits [J]. *Acupunct Res*, 2007, 32(2): 75-82.

[12] 张传英, 邵芙蓉, 蔡荣林, 等. 艾灸对类风湿性关节炎大鼠关节滑膜组织转录信号转导因子 1、细胞因子信号负调控因子基因表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2015, 40(3): 205-209.

ZHANG C Y, SHAO F R, CAI R L, et al. Effects of moxibustion on expression of STAT 1, SOCS mRNA in synovium of rats with rheumatoid arthritis [J]. *Acupunct Res*, 2015, 40(3): 205-209.

[13] 杨馨, 陈俊, 路晓清, 等. 基于 PTPN22 干扰的艾灸对实验性类风湿性关节炎家兔滑膜细胞 JAK1-STAT4 信号通路的影响 [J]. *成都中医药大学学报*, 2023, 46(1): 25-31.

YANG X, CHEN J, LU X Q, et al. Effect of moxibustion based on lentivirus-mediated PTPN22 interference on JAK1-STAT4 signaling pathway of experimental RA rabbits' Synovial cells [J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med*, 2023, 46(1): 25-31.

[14] 张广辉, 张超, 郭占非, 等. 甲氨蝶呤联合电针治疗类风湿性关节炎模型大鼠 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(29): 4667-4672.

- ZHANG G H, ZHANG C, GUO Z F, et al. Therapeutic effect of methotrexate combined with electroacupuncture in rheumatoid arthritis rats [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2020, 24(29): 4667-4672.
- [15] 王芬, 赵彬元, 严兴科, 等. 热补针法对类风湿关节炎大鼠滑膜细胞 JAK-STAT 信号通路调节因子 SOCS1、SOCS3 表达的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(6): 56-60.
- WANG F, ZHAO B Y, YAN X K, et al. Effects of heat-reinforcing needling on expressions of cytokine signal suppressor SOCS1 and SOCS3 in JAK-STAT pathway of synovium cells in rheumatoid arthritis rats [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2020, 27(6): 56-60.
- [16] BEHL T, UPADHYAY T, SINGH S, et al. Polyphenols targeting MAPK mediated oxidative stress and inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *Molecules*, 2021, 26(21): 6570.
- [17] 李辉明, 薄双娟, 邢涛, 等. MAPK 信号通路在防治类风湿关节炎中的作用及中药干预研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(14): 288-298.
- LI H M, BO S J, XING T, et al. Role of MAPK signaling pathway in prevention and treatment of rheumatoid arthritis and Chinese medicine intervention; a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2024, 30(14): 288-298.
- [18] YAO J, HU L, SONG X G, et al. Influence of moxibustion at "Shēnshù" and "Zúsānlǐ" on Ras-MAPK signal pathways in synovial tissues of rats with experimental rheumatoid arthritis [J]. *World J Acupunct Moxibustion*, 2013, 23(2): 29-33.
- [19] 沈甜, 张彩荣, 伏荣红, 等. 火针对类风湿性关节炎大鼠踝关节 JNK、p38 丝裂原活化蛋白激酶的影响 [J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(6): 548-552.
- SHEN T, ZHANG C R, FU R H, et al. Effect of fire-needle intervention on JNK and p38 MAPK in ankle-joint of rheumatoid arthritis rats [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2016, 32(6): 548-552.
- [20] 韦婷, 刘宇, 王天虹, 等. 五味甘露药浴散加减方对佐剂型关节炎大鼠血清 RF 和滑膜组织 JNK1 的影响 [J]. *西南民族大学学报(自然科学版)*, 2015, 41(6): 708-712.
- WEI T, LIU Y, WANG T H, et al. Effect of Ganlu-Yaoyu-San on rats with adjuvant arthritis Serum RF level and JNK1 of synovial tissue [J]. *J Southwest Univ Natl Nat Sci Ed*, 2015, 41(6): 708-712.
- [21] 左芳, 韦婷, 董东, 等. 基于 MAPK 通路研究五味甘露药浴散加减方治疗类风湿性关节炎的药效机制 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(7): 1245-1250.
- ZUO F, WEI T, TONG D, et al. Pharmacodynamic mechanism of modified Ganlu Yaoyu San intreatment of rheumatoid arthritis based on MAPK signaling pathway [J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(7): 1245-1250.
- [22] LIU S, MA H, ZHANG H, et al. Recent advances on signaling pathways and their inhibitors in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Immunol*, 2021, 230: 108793.
- [23] 王晨, 程艳杰. NF- κ B 在类风湿性关节炎中的作用及调控机制 [J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(18): 2600-2603.
- WANG C, CHENG Y J. Role of NF- κ B in rheumatoid arthritis and its regulatory mechanism [J]. *Int J Lab Med*, 2016, 37(18): 2600-2603.
- [24] BARNABEI L, LAPLANTINE E, MBONGO W, et al. NF- κ B: at the borders of autoimmunity and inflammation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 716469.
- [25] 王丹. 艾灸对 RA 家兔 NF- κ B/TGF- β 1 信号通路和 VEGF 的影响 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- WANG D. Effect of moxibustion on NF- κ B/TGF- β 1 signaling pathway and VEGF in RA rabbits [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2017.
- [26] 陈俊, 路晓清, 席东来, 等. 艾灸对实验性 RA 家兔滑膜组织 CXCL12/CXCR4-NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(1): 248-253.
- CHEN J, LU X Q, XI D L, et al. Effect of moxibustion on CXCL12/CXCR4-NF- κ B signal pathway in synovial tissue of experimental RA rabbits [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2023, 34(1): 248-253.
- [27] 唐玉芝, 白玉, 王越月, 等. 艾灸影响 RA 患者的 NIK/NF- κ B/VEGF 通路及抗炎镇痛作用的机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(9): 2187-2189.
- TANG Y Z, BAI Y, WANG Y Y, et al. Effect of moxibustion on NIK/NF- κ B/VEGF pathway and mechanism of anti-inflammatory and analgesia in RA patients [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2019, 30(9): 2187-2189.
- [28] 吴菲, 杨涵棋, 张耀, 等. 不同灸法对实验类风湿性关节炎模型滑膜细胞 NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *吉林中医药*, 2014, 34(12): 1277-1279.
- WU F, YANG H Q, ZHANG Y, et al. Effect of different types of moxibustion intervention on NF- κ B signaling pathway of rabbits with rheumatoid arthritis [J]. *Jilin J Chin Med*, 2014, 34(12): 1277-1279.
- [29] 蔡国伟, 李佳, 李静. 温针灸对类风湿性关节炎大鼠关节滑膜组织沉默信息调节因子 2 相关酶 1 和核转录因子- κ B 蛋白的影响 [J]. *针刺研究*, 2017, 42(5): 397-401.
- CAI G W, LI J, LI J. Effect of warm needle moxibustion intervention on knee-joint swelling and expression of synovial SIRT 1 and NF- κ B in rats with rheumatoid arthritis [J]. *Acupunct Res*, 2017, 42(5): 397-401.
- [30] SONG Y, JO S, CHUNG J Y, et al. RNA interference-mediated suppression of TNF- α converting enzyme as an alternative anti-TNF- α therapy for rheumatoid arthritis [J]. *J Control Release*, 2021, 330: 1300-1312.
- [31] 李佳, 李静, 唐宏图, 等. 电针对类风湿性关节炎大鼠膝关节滑膜组织肿瘤坏死因子- α 转换酶/核转录因子- κ B 信号通路的影响 [J]. *针刺研究*, 2016, 41(3): 215-219, 246.
- LI J, LI J, TANG H T, et al. Effect of electroacupuncture intervention on inflammatory reactions and articular synovial TNF- α converting enzyme protein/NF- κ B signaling in rheumatoid arthritis rats [J]. *Acupunct Res*, 2016, 41(3): 215-219, 246.
- [32] 刘婧, 黄征, 张根红. 针刺调控 NF- κ B 信号通路改善类风

- 关节炎患者的症状及其机制研究 [J]. 针刺研究, 2020, 45(11): 914-919.
- LIU J, HUANG Z, ZHANG G H. Involvement of NF- κ B signal pathway in acupuncture treatment of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Acupunct Res*, 2020, 45(11): 914-919.
- [33] 陈丽川, 段波, 喻昭, 等. 足三里和肾腧穴位埋线对大鼠类风湿关节炎 NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(7): 1291-1296.
- CHEN L C, DUAN B, YU Z, et al. Acupoint catgut embedding attenuates rheumatoid arthritis in rats *via* NF- κ B signaling pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(7): 1291-1296.
- [34] YIN H, LIU N, SIGDEL K R, et al. Role of NLRP3 inflammasome in rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 931690.
- [35] CHEN P K, TANG K T, CHEN D Y. The NLRP3 inflammasome as a pathogenic player showing therapeutic potential in rheumatoid arthritis and its comorbidities: a narrative review [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(1): 626.
- [36] XIAO Y, ZHANG L. Mechanistic and therapeutic insights into the function of NLRP3 inflammasome in sterile arthritis [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1273174.
- [37] 王森, 朱艳, 赵会, 等. 基于 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路探讨艾灸改善佐剂性关节炎大鼠滑膜炎的机制 [J]. 针刺研究, 2023, 48(11): 1111-1116.
- WANG M, ZHU Y, ZHAO H, et al. Moxibustion intervention improves synovitis by down-regulating NLRP3/Caspase-1/IL-1 β signaling of synovial tissue in rats with adjuvant arthritis [J]. *Acupunct Res*, 2023, 48(11): 1111-1116.
- [38] 江彬, 高梓珊, 余芝, 等. 基于 ROS-NLRP3 通路探讨麦粒灸治疗佐剂性关节炎大鼠的作用及机制 [J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(6): 548-556.
- JIANG B, GAO Z S, YU Z, et al. Study on the effect and mechanism of wheat-grain moxibustion on adjuvant arthritis rats based on ROS-NLRP3 pathway [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2023, 39(6): 548-556.
- [39] CHEVRIAUX A, PILOT T, DERANGÈRE V, et al. Cathepsin B is required for NLRP3 inflammasome activation in macrophages, through NLRP3 interaction [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 167.
- [40] 陈俊, 刘华辉, 路晓清, 等. 艾灸对实验性类风湿性关节炎家兔滑膜组织 NLRP3 炎性小体激活因素 Cathepsin-B、ROS 水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(9): 152-157, 278-280.
- CHEN J, LIU H H, LU X Q, et al. Effect of Moxibustion on Cathepsin-B and NLRP3 levels of inflammatory corpuscles in synovial tissue of rabbits with experimental rheumatoid arthritis [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2022, 40(9): 152-157, 278-280.
- [41] 席东来, 杨慎峭, 王焱, 等. 艾灸在 NLRP3 炎性小体过表达下对佐剂性关节炎家兔膝关节滑膜组织 JAK2-STAT3 信号通路的影响 [J]. 针刺研究, 2022, 47(12): 1095-1100.
- XI D L, YANG S Q, WANG Y, et al. Effect of moxibustion on JAK2/STAT3 signal pathway in synovial tissues of rabbits with adjuvant arthritis under the overexpression of NLRP3 inflammatory bodies [J]. *Acupunct Res*, 2022, 47(12): 1095-1100.
- [42] 余明芳, 陈白露, 何欣玲, 等. 时辰艾灸干预类风湿性关节炎模型大鼠核心钟基因 Clock、Bmal1 表达与细胞焦亡的关系 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(35): 5700-5706.
- YU M F, CHEN B L, HE X L, et al. Effects of Chronomoxibustion on core clock genes Clock, Bmal1 and pyroptosis in rats with rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(35): 5700-5706.
- [43] YUN Y, BAEK A, KIM D E. Autophagy down-regulates NLRP3-dependent inflammatory response of intestinal epithelial cells under nutrient deprivation [J]. *BMB Rep*, 2021, 54(5): 260-265.
- [44] 刘强, 苏成红, 秦昕, 等. 基于自噬-NLRP3 炎症小体-IL-1 β 信号轴探究热补针法对类风湿性关节炎寒证模型家兔滑膜炎的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(12): 102-108.
- LIU Q, SU C H, QIN X, et al. Effect of heat-reinforcing acupuncture on synovial inflammatory in rheumatoid arthritis rabbits with cold syndrome based on autophagy-NLRP3 inflammasome-IL-1 β signaling axis [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2023, 30(12): 102-108.
- [45] 陈平, 何文洁, 杜小正, 等. 热补针法对类风湿性关节炎寒证家兔膝关节滑膜组织嘌呤能离子通道型受体 7、Nod 样受体蛋白 3 及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 表达的影响 [J]. 针刺研究, 2022, 47(11): 1012-1018.
- CHEN P, HE W J, DU X Z, et al. Effect of heat-reinforcing needling on expression of P2X7R, NLRP3 and Caspase-1 in synovial tissues of knee joint in rabbits with cold syndrome rheumatoid arthritis [J]. *Acupunct Res*, 2022, 47(11): 1012-1018.
- [46] 姚茹冰, 王圆圆, 蔡辉. Toll 样受体与类风湿性关节炎相关性研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(9): 1287-1289.
- YAO R B, WANG Y Y, CAI H. Research progress on the correlation between Toll-like receptor and rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Immunol*, 2015, 31(9): 1287-1289.
- [47] ARLEEVSKEYA M I, LARIONOVA R V, BROOKS W H, et al. Toll-like receptors, infections, and rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2020, 58(2): 172-181.
- [48] WANG J, WU X, JIANG M, et al. Mechanism by which TRAF6 participates in the immune regulation of autoimmune diseases and cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 4607197.
- [49] FITZGERALD K A, KAGAN J C. Toll-like receptors and the control of immunity [J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1044-1066.
- [50] 袁娟, 胡玲, 宋小鸽, 等. 艾灸对类风湿性关节炎大鼠关节滑膜组织 Toll 样受体 4-骨髓样分化因子 88-核转录因子- κ B 信号通路的影响 [J]. 针刺研究, 2015, 40(3): 199-204.
- YUAN J, HU L, SONG X G, et al. Influence of moxibustion on TLR 4-MyD 88-NF- κ B signal transduction pathway of synovial tissue in rheumatoid arthritis rats [J]. *Acupunct Res*, 2015, 40

- (3): 199-204.
- [51] 张传英, 胡玲, 蔡荣林, 等. 艾灸对类风湿性关节炎大鼠踝关节滑膜组织 Toll 样受体 4/核因子- κ B 信号通路的影响 [J]. 针刺研究, 2018, 43(11): 687-691.
ZHANG C Y, HU L, CAI R L, et al. Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling in synovial tissue is involved in the anti-inflammatory effect of moxibustion in rats with rheumatoid arthritis [J]. *Acupunct Res*, 2018, 43(11): 687-691.
- [52] 朱艳, 俞红五, 潘喻珍, 等. 艾灸“足三里”“肾俞”抑制 miR-155 介导的 TLR4/NF- κ B 信号通路改善大鼠佐剂性关节炎的研究 [J]. 针刺研究, 2021, 46(3): 194-200.
ZHU Y, YU H W, PAN Y Z, et al. Effect of moxibustion at “Zusanli” (ST36) and “Shenshu” (BL23) on miR-155-mediated TLR4/NF- κ B signaling involving amelioration of synovitis in rheumatoid arthritis rats [J]. *Acupunct Res*, 2021, 46(3): 194-200.
- [53] 苏俊贤, 张誉, 王志朝, 等. 基于 TLR4/MyD88/TRAF6 信号通路探究电针对类风湿性关节炎大鼠滑膜组织的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2023, 42(10): 1102-1108.
SU J X, ZHANG Y, WANG Z C, et al. Study of the effect of electroacupuncture on synovial tissues in rats with rheumatoid arthritis based on TLR4/MyD88/TRAF6 signaling pathway [J]. *Shanghai J Acupunct Moxibustion*, 2023, 42(10): 1102-1108.
- [54] DONG Z Q, ZHU J, LU D Z, et al. Effect of electroacupuncture in “Zusanli” and “Kunlun” acupoints on TLR4 signaling pathway of adjuvant arthritis rats [J]. *Am J Ther*, 2018, 25(3): e314-e319.
- [55] 苏成红, 杜小正, 方晓丽, 等. 热补针法对类风湿关节炎寒证家兔模型膝关节滑膜组织 TLR4-MyD88-ERK1/2 信号通路的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(7): 745-754.
SU C H, DU X Z, FANG X L, et al. Effect of heat-reinforcing needling on the TLR4-MyD88-ERK1/2 signaling pathway in the synovial tissue of the knee joint of rabbits with rheumatoid arthritis with cold syndrome [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2022, 45(7): 745-754.
- [56] 王香琳, 张杰. Wnt 信号通路在类风湿关节炎炎症及骨代谢方面的研究进展 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2023, 7(3): 127-130.
WANG X L, ZHANG J. Research progress of Wnt signaling pathway in inflammation and bone metabolism of rheumatoid arthritis [J]. *Mod Med Health Res Electron J*, 2023, 7(3): 127-130.
- [57] 高月, 唐芳, 马武开, 等. Wnt/OPG 信号通路轴在类风湿关节炎骨破坏中的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(22): 5604-5607.
GAO Y, TANG F, MA W K, et al. Research progress of Wnt/OPG signal pathway axis in bone destruction of rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Gerontol*, 2023, 43(22): 5604-5607.
- [58] 张育瑛, 何金森. 电针联合艾灸对胶原诱导性关节炎大鼠关节的保护作用 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(6): 2768-2774.
ZHANG Y Y, HE J S. Protection effect of electro acupuncture combined with moxibustion on joint of collagen-induced arthritis rats [J]. *Genom Appl Biol*, 2019, 38(6): 2768-2774.
- [59] 潘明柱, 荣兵, 贾峻, 等. 温经通络汤联合针灸治疗风寒湿痹型关节炎的疗效及对患者血清 Wnt-3 α , β -catenin 及 BMP-2 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 175-179.
PAN M Z, RONG B, JIA J, et al. Effect of Wenjing Tongluo Decoction combined with acupuncture on expression of serum Wnt-3 α , β -catenin and BMP-2 of patients with wind cold dampness arthritis [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2017, 23(24): 175-179.
- [60] 陶德钰, 唐洁, 汪雪, 等. 艾灸辅助治疗类风湿关节炎及对患者血清 SOST, β -catenin 含量的影响 [J]. 中国针灸, 2023, 43(12): 1384-1389.
TAO S Y, TANG J, WANG X, et al. Moxibustion as an adjunctive treatment for rheumatoid arthritis and its effects on the serum levels of SOST and β -catenin [J]. *Chin Acupunct Moxibustion*, 2023, 43(12): 1384-1389.
- [61] DING Q, HU W, WANG R, et al. Signaling pathways in rheumatoid arthritis: implications for targeted therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 68.
- [62] SPRINZAK D, BLACKLOW S C. Biophysics of Notch signaling [J]. *Annu Rev Biophys*, 2021, 50: 157-189.
- [63] 吴晶艺, 陆欣辰, 陈广洁. Notch 信号通路在类风湿关节炎发病机制中的研究进展 [J]. 现代免疫学, 2023, 43(2): 144-149.
WU J Y, LU X C, CHEN G J. Research progress on Notch signaling pathway in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Curr Immunol*, 2023, 43(2): 144-149.
- [64] 赵彩虹, 高玉亭, 郝慧琴, 等. 傅山风湿外治方对 CIA 大鼠 Notch1/Jagged1 通路表达的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(4): 431-436.
ZHAO C H, GAO Y T, HAO H Q, et al. Effect of Fushan rheumatism external prescription on expression of Notch1/Jagged1 pathway in CIA rats [J]. *Chin J Immunol*, 2021, 37(4): 431-436.
- [65] 高玉亭, 李振, 赵彩虹, 等. 局部应用傅山风湿外治方对胶原诱导性关节炎大鼠炎性细胞因子和 Notch2 通路的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(7): 2604-2611.
GAO Y T, LI Z, ZHAO C H, et al. Effect of topical application of Fushan rheumatism external prescription on inflammatory cytokines and Notch2 pathway in rats with collagen-induced arthritis [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2023, 25(7): 2604-2611.
- [66] 姜振振. 电针干预 RA 大鼠滑膜血管新生的 Notch1 信号通路调控机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
JIANG J Z. Study on the regulation mechanism of Notch1 signal pathway of electroacupuncture intervention on synovial angiogenesis in RA rats [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [67] LI H, WU Q Y, TENG X H, et al. The pathogenesis and

- regulatory role of HIF-1 in rheumatoid arthritis [J]. *Cent Eur J Immunol*, 2023, 48(4): 338-345.
- [68] UMAR S, PALASIEWICZ K, VOLIN M V, et al. Metabolic regulation of RA macrophages is distinct from RA fibroblasts and blockade of glycolysis alleviates inflammatory phenotype in both cell types [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(23): 7693-7707.
- [69] MCGETTRICK A F, O' NEILL L A J. The role of HIF in immunity and inflammation [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(4): 524-536.
- [70] 熊燕. 艾灸对 RA 患者 TGF- β 1、HIF-1 α 和 VEGF 含量的影响 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- XIONG Y. Effect of moxibustion on TGF- β 1, HIF-1 α and VEGF in RA patients [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [71] 张慧, 吴显, 吴生兵, 等. 艾灸对佐剂性关节炎大鼠踝关节滑膜组织低氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2023, 48(4): 347-352.
- ZHANG H, WU X, WU S B, et al. Effect of moxibustion on the expressions of hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in ankle synovial tissue of rats with adjuvant arthritis [J]. *Acupunct Res*, 2023, 48(4): 347-352.
- [72] 李向军, 李福欣, 井维尧, 等. 热补针法对类风湿关节炎证家兔膝关节滑膜组织缺氧诱导因子 1 α 和糖酵解活性的影响 [J]. *针刺研究*, 2024, 49(6): 585-593.
- LI X J, LI F X, JING W Y, et al. Effect of heat tonic acupuncture on synovial inflammation, HIF-1 α and glycolysis activity in rabbits with cold syndrome of rheumatoid arthritis [J]. *Acupunct Res*, 2024, 49(6): 585-593.
- [73] SAKURAGI T, YAMADA H, HARAGUCHI A, et al. Autoreactivity of peripheral helper T cells in the joints of rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol*, 2021, 206(9): 2045-2051.
- [74] BOMMARITO D, HALL C, TAAMS L S, et al. Inflammatory cytokines compromise programmed cell death-1 (PD-1)-mediated T cell suppression in inflammatory arthritis through up-regulation of soluble PD-1 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2017, 188(3): 455-466.
- [75] HELLBACHER E, SUNDSTRÖM C, MOLIN D, et al. Expression of PD-1, PD-L1 and PD-L2 in lymphomas in patients with pre-existing rheumatic diseases-a possible association with high rheumatoid arthritis disease activity [J]. *Cancers*, 2022, 14(6): 1509.
- [76] 吴菲. 艾灸调控实验性 RA 模型 T 细胞功能的 PD-1/PD-L1 机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- WU F. Study on PD-1/PD-L1 mechanism of moxibustion regulating T cell function in experimental RA model [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [77] 赖德利. PD-1 介导艾灸调控类风湿性关节炎 T 细胞过度活化的机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- LAI D L. Study on the mechanism of PD-1 mediated moxibustion regulating T cell overactivation in rheumatoid arthritis [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [78] 钟玉梅, 吴菲, 罗小超, 等. 基于 PD-1/PD-L1 信号通路艾灸治疗类风湿性关节炎的机制研究 [J]. *中国针灸*, 2020, 40(9): 976-982.
- ZHONG Y M, WU F, LUO X C, et al. Mechanism on moxibustion for rheumatoid arthritis based on PD-1/PD-L1 signaling pathway [J]. *Chin Acupunct Moxibustion*, 2020, 40(9): 976-982.
- [79] HUANG Y, PAN C, LIU Y, et al. Immune function and mechanism of costimulating molecules PD-1 and OX40 in rheumatoid arthritis [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2020, 40(11): 530-539.
- [80] 陈丽川, 段波, 喻昭, 等. 穴位埋线通过 PD-1/OX40 信号通路影响类风湿性关节炎的炎症水平 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(10): 8-14, 80.
- CHEN L C, DUAN B, YU Z, et al. Acupoint catgut embedding affects the level of inflammation in rheumatoid arthritis through the PD-1/OX40 signaling pathway [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(10): 8-14, 80.
- [81] 刘琼, 李永乐, 董平, 等. PI3K/Akt 信号通路类风湿性关节炎相关性探讨 [J]. *风湿病与关节炎*, 2021, 10(3): 62-66.
- LIU Q, LI Y L, DONG P, et al. Correlation between PI3K/Akt signaling pathway and rheumatoid arthritis [J]. *Rheum Arthritis*, 2021, 10(3): 62-66.
- [82] 郝锋, 吴立斌, 胡骏, 等. 艾灸对类风湿性关节炎模型大鼠足跖滑膜组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国针灸*, 2020, 40(11): 1211-1216.
- HAO F, WU L B, HU J, et al. Effect of moxibustion on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in foot-pad synovium in rats with rheumatoid arthritis [J]. *Chin Acupunct Moxibustion*, 2020, 40(11): 1211-1216.
- [83] 赵晨, 张敏, 朱艳, 等. 针刺调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路介导自噬保护佐剂性关节炎大鼠膝关节滑膜组织的研究 [J]. *针刺研究*, 2021, 46(12): 1016-1022.
- ZHAO C, ZHANG M, ZHU Y, et al. Acupuncture regulates PI3K/Akt/mTOR signaling and up-regulates cell autophagy to protect synovial tissue of adjuvant arthritis rats [J]. *Acupunct Res*, 2021, 46(12): 1016-1022.

[收稿日期]2024-04-11

马志红,张立红,曹源,等. 单细胞测序技术在多发性硬化研究中的应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 161-168.

Ma ZH, Zhang LH, Cao Y, et al. Research progress in the application of single-cell sequencing technology in multiple sclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 161-168.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.019

单细胞测序技术在多发性硬化研究中的应用进展

马志红¹,张立红¹,曹源¹,程明^{1,2*}

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院基础医学实验室, 济南 250031; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院神经内科, 济南 250031)

【摘要】 多发性硬化症是一种以神经炎症和神经变性为特征的慢性中枢神经系统自身免疫性疾病, 发病机制复杂, 由多种中枢神经系统和外周来源的细胞参与其中。最近, 单细胞测序技术逐渐应用于神经系统疾病中, 对于理解细胞间异质性、疾病发展机制和治疗策略有重要意义。本文对单细胞测序技术在多发性硬化疾病中应用进展进行综述。

【关键词】 多发性硬化; 单细胞测序技术; 中枢神经系统; 综述

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0161-08

Research progress in the application of single-cell sequencing technology in multiple sclerosis

MA Zhihong¹, ZHANG Lihong¹, CAO Yuan¹, CHENG Ming^{1,2*}

(1. Department of Basic Medical Sciences, the 960th Hospital of PLA, Jinan 250031, China.

2. Department of Neurology, the 960th Hospital of PLA, Jinan 250031)

【Abstract】 Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system characterized by neuroinflammation and neurodegeneration. The pathogenesis of the disease is complex, and involves various central nervous system and peripheral cells. Single-cell sequencing has recently been increasingly applied in the study of neurological disorders, leading to important advances in our understanding of intercellular heterogeneity, disease development mechanisms, and treatment strategies. This review summarizes research progress in single-cell sequencing and its applications in MS.

【Keywords】 multiple sclerosis; single-cell sequencing; central nervous system; review

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

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种免疫介导的中枢神经系统(central nervous system, CNS)慢性炎性脱髓鞘性疾病, 病变最常累及的部位为脑室周围白质、近皮质视神经脊髓、脑干和小脑^[1-2]。发病以青少年多见, 其病因复杂, 可能与遗传、环

境、生活方式等多种因素相关^[3]。MS病理特征为炎性脱髓鞘和神经胶质增生, 伴有神经轴索的损伤。目前临床分型包括临床孤立综合征(clinically isolated syndrome, CIS)、复发缓解型MS(relapsing remitting multiple sclerosis, RRMS)、继发进展型MS

【基金项目】 山东省自然科学基金(ZR2023MH370); 国家重点研发计划(2019YFC160630504)。

【作者简介】 马志红(1988—), 女, 硕士, 研究方向: 神经病理和分子基础研究。E-mail: mmh1017@126.com

【通信作者】 程明(1981—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 神经内科疑难与变性病临床工作。E-mail: chengming960@163.com

(secondary progressive multiple sclerosis, SPMS)、原发进展型 MS (primary progressive multiple sclerosis, PPMS)^[2]。MS 的发病机制主要为由自身反应性淋巴细胞、固有免疫细胞、神经胶质细胞和细胞因子,以及针对髓鞘抗原的自身抗体的协同作用,但触发因素、部位、以及如何维系自身反应性和驱动疾病进展的机制,至今仍不清楚^[4]。多数学者认为,MS 的免疫发病机制是由外周反应性 T 细胞被激活后通过内皮黏附分子渗透到 CNS,被树突状细胞、小胶质细胞和 CNS 中其他细胞重新激活并分化为致病性 Th 细胞亚群, Th1 和 Th17 等细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α 、IL-17、负责破坏血脑屏障的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 等细胞因子,同时招募更多的 CD8⁺T 细胞、B 细胞和单核细胞浸润,促进 CNS 损伤,并持续性激活巨噬细胞、树突状细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞进一步发挥作用,诱导髓鞘和少突胶质细胞损伤,促进神经变性^[5-7]。当前没有治愈 MS 症的疗法,随着对 MS 发病机制的深入认识,MS 的治疗策略和治疗目标也在不断改进和提高^[8-9]。在过去 20 年里, FDA 已经批准了十几种作用于某个与致病机制相关的靶细胞或分子而发挥治疗作用的药物,如 S1P1 受体调节剂、靶向 B 细胞 CD20 的单抗、CD52 抑制剂、减少炎症反应的干扰素等^[6,9-10]。获取 CNS 的组织样本非常困难,目前该疾病的诊断方法主要依赖于临床检查和神经影像学,使得采用新技术探索 MS 的发病机制十分必要^[11]。

单细胞组学 (single-cell omics) 已成为揭示单个细胞内 RNA 转录物异质性和复杂性,以及揭示组织/器官/生物体中不同细胞类型和功能组成的新兴研究方向^[12]。自 2009 年 Tang 等^[13]首次对单个卵裂球和卵母细胞的转录组进行了单细胞测序,近十几年来已被广泛应用于各项临床医学研究^[12,14]。单细胞测序技术种类繁多,可以测不同类型的遗传物质,包括基因组、转录组和蛋白组,以及检测组织中不同细胞类型的基因空间表达模式的空间转录组测序 (spatial transcriptomics sequencing) 等^[15]。单细胞测序研究不仅在单细胞水平上揭示了疾病组织及正常组织的细胞异质性,推动了疾病发病分子机制的解析,有利于疾病诊断和治疗,分子标志物的发现和通路的研究^[16]。近年来单细胞测序技术在神经系统疾病上的研究,主要集中在神经发育、神经肿瘤、神经感染性疾病和神经退行性疾病

等方向^[17-21],充分体现了其在疾病研究中的优势和临床价值。本文将对单细胞测序技术在 MS 中各类细胞类型的研究进行总结,探讨其在 MS 中的应用进展。

1 T 细胞和 B 细胞

T 细胞和 B 细胞作为适应性免疫的主要参与者,在体液免疫和细胞免疫中均发挥多重作用。传统观点认为, T 细胞在 MS 致病过程中发挥了核心的作用,这些 T 细胞穿过血脑屏障并靶向 CNS 的髓鞘^[7]。越来越多的证据表明 B 细胞及其不同亚群也可通过多种途径影响 MS 的发病^[22-23]。Beltrán 等^[24]对 6 名临床健康个体的脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 进行单细胞 RNA 测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq),这些个体是 MS 患者的同卵双胞胎,发现 CD8⁺T 细胞和 B 细胞克隆性扩增,表明早期适应性免疫激活,这些无症状但高危的个体是否会转变为临床 MS 仍有待确定,但研究结果表明 scRNA-seq 具有识别极早期病理改变的潜力。Ban 等^[25]利用 scRNA-seq 对 MS 和其他神经系统疾病 (other neurological diseases, ONDs) 患者 CSF 分析,发现 MS 患者中抑制受体上调的罕见 CD8⁺T 细胞群增加,并进一步鉴定出 ZC3HAV1 和 IFITM 两个控制病毒反应相关的基因。Ingelfinger 等^[26]利用质谱流式细胞术 (cytometry by time-of-flight, CyTOF)、单细胞转录组和表面蛋白测序 (cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing, CITE-seq) 等多组学技术,研究了 61 对 MS 症不一致的同卵双胞胎的外周免疫特征,以剖析遗传易感性和环境因素的影响。发现 MS 双胞胎的单核细胞群出现了炎症性转变,同时出现了 IL-2 高反应的过渡性幼稚辅助 T 细胞群,这些可作为 MS 相关的免疫改变,该研究揭示多发性硬化发病的潜在免疫学机制。Kendirli 等^[27]在 MS 大鼠模型中进行了一项体内全基因组 CRISPR 筛选,并确定了 T 细胞向 CNS 迁移的 5 个关键抑制因子和 18 个关键促进因子。并结合对 MS 患者 T 细胞进行的 scRNA-seq 分析,进一步证实调节因子黏附分子 $\alpha 4$ -整合素和趋化因子受体 CXCR3 的表达与 CD4⁺T 细胞向 CNS 迁移的倾向性相关。该研究揭示了诱导 MS 病变的关键调节因子。Ramesh 等^[28]对 RRMS 型患者、ONDs 患者和健康对照者的 CSF 和血液进行 scRNA-seq 分析,部分患者进行单细胞免

疫球蛋白测序 (chromatin immunoprecipitation single-cell sequencing, scIg-Seq) 分析。结果表明,胆固醇和核因子 κB (NF- κB) 生物合成途径被激活,CSF 记忆 B 细胞中特定的细胞因子和趋化因子受体被上调。此外,SMAD/TGF- β 1 信号在 CSF 浆细胞/浆细胞中下调。总之,CSF 中 B 细胞被驱动至炎症和克隆性扩展记忆和浆母细胞/浆细胞表型。Shi 等^[29]对 RRMS 患者和 SPMS 患者的血液样本进行 scRNA-seq 分析,结果显示 SPMS 患者除初始 CD8⁺T 细胞减少外,活化 CD8⁺T 细胞亚群升高。同时,这种异常扩增的外周 CD8⁺T 细胞不仅表现出表达 GzmB 的终末分化效应 (terminal differentiated effector, EMRA) 表型,而且具有明显的克隆扩增轨迹,并且 GzmB 在 CD8⁺T 细胞中的表达与 MS 的疾病进展呈正相关。因此,GzmB⁺ CD8⁺-TEMRA 细胞可以作为区分 SPMS 和 RRMS 的生物标志物。Teschner 等^[30]对克拉屈滨 (cladribine) 治疗前后的 MS 患者进行 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和 CD19⁺B 细胞进行 bulk-RNA-seq 以及外周血的 scRNA-seq 分析,结果显示,治疗后记忆 B 细胞亚群显著且持续减少,而 T 细胞亚群则以更均匀的模式略有减少。因此使用 cladribine 对选择性记忆 B 细胞簇的减少程度可以预测治疗反应。Schafflick 等^[31]利用 scRNA-seq 技术对 MS 和特发性颅内高压患者确定了 CSF 与血液的细胞图谱,发现 MS 患者 CSF 细胞组成多样性增加,并鉴定到 CSF 中未知的髓样树突状细胞 (myeloid dendritic cells, mDC) 富集。通过开发的细胞集富集分析 (cell set enrichment analysis, CSEA) 新方法,观察到 B 细胞、滤泡辅助 T 细胞 (follicular helper T cell, Tfh) 的扩增,在两种不同的 MS 动物模型中,证实该 Tfh 细胞可促进 CNS 自身免疫和局部 B 细胞浸润。综合以上研究,研究者利用单细胞测序技术进一步确定了 T 细胞和 B 细胞是导致 MS 发病的主角,并鉴定出免疫细胞亚群和炎症性信号转导通路表达谱的差异性。EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 感染一直与 MS 症相关,但这种感染是如何导致 MS 的尚不清楚^[32],利用单细胞测序技术对 T 细胞和 B 细胞进行进一步分析,发现病毒感染可能与 MS 的发病有关。Lanz 等^[33]通过对 MS 患者血液和配对的 CSF 中的 B 细胞库测序,然后基于蛋白质微阵列检测针对 MS 相关病毒的重组表达的 CSF 来源的抗体,初步鉴定出一种交叉反应性 CSF 来源的抗体,证明 EBV 转录因子 EBNA1 与

CNS 蛋白 GlialCAM 之间的高亲和力分子拟态,并为其相关性提供了晶体结构和体内功能证据,详细描述了这种拟态在 MS 病理生理学中的潜在意义,从而为 MS 和 EBV 之间的关联提供了一个新的机制联系,并可用于指导新型 MS 疗法的开发。Gottlieb 等^[34]分析了 RRMS 患者的 CSF 和血液中的 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 序列,以及对 EBV 感染的 B 细胞 (淋巴母细胞系或 LCL) 和其他抗原产生应答的 T 细胞。发现 MS 首发症状患者 CSF 中的 T 细胞对感染 EBV 的自体 B 淋巴细胞具有特异性,这些 LCL 特异性 T 细胞可能识别与 EBV 或人体蛋白质交叉反应的 CNS 抗原。这些重要的发现暗示 EBV 感染是 MS 发病机制的驱动因素,为针对 EBV 或其 CNS 交叉反应的表位提供了理论依据。

2 神经胶质细胞

CNS 中的神经胶质细胞主要有星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞等^[35]。小胶质细胞是作为一种特殊的免疫细胞,当神经炎症性刺激发生时,其通过调节血脑屏障、释放信号,迅速激活炎症反应,并在炎症后期清除炎症因子和修复受损的组织。近年来发现小胶质细胞,在 MS 神经炎中发挥重要作用^[36-37]。Masuda 等^[38]对 MS 患者和实验性变态反应性脑脊髓炎动物模型 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 的大脑组织分别进行 scRNA-seq 分析,发现了特异性状态的小胶质细胞簇。Schirmer 等^[39]对 12 名生前患有 MS 和 9 名无 MS 的大脑组织样本采用单细胞核转录组测序 (single nuclei RNA sequencing, snRNA-seq) 结合原位杂交等技术,发现多种应激及活化状态小胶质细胞位于 MS 斑块边缘,空间转录组提示选择性皮质神经元损伤和神经胶质激活相关的谱系和区域特异性转录组变化,可以预测 MS 进展。Esaulova 等^[40]对 2 名 RRMS 型患者和 1 名抗 MOG 障碍患者的 CSF 和血液样本进行 scRNA-seq 分析,发现正常对照者 CSF 均存在小胶质细胞,且与疾病类型无关。以上发现进一步证实小胶质细胞是 MS 免疫病理学的关键参与者,并通过空间转录组学对小胶质细胞进行定位。

星形胶质细胞在 CNS 中扮演关键角色,参与发育、维持平衡及疾病反应,这些细胞在 MS 中显示出功能异质性^[41-42]。Absinta 等^[43]通过使用 snRNA-seq 来研究活动性病变的核心、边缘和斑块周围以

及健康白质中的转录谱。研究发现了两个仅存在于病变活动边缘的细胞群, MS 中的小胶质细胞 (microglia inflamed in MS, MIMS) 和 MS 中的星形胶质细胞 (astrocytes inflamed in MS, AIMS)。病变活动边缘的特异性体现在补体因子 C1q 在 MIMS 表达上调。Wheeler 等^[44]通过对 EAE 小鼠进行 scRNA-seq 分析中枢神经细胞的基因表达, 发现星形胶质细胞的确存在多种不同的转录状态的亚群。CNS 中星形胶质细胞 NRF2 表达降低、MAFG 表达升高, 促进甲基化过程从而限制基因表达、抑制炎症因子的转录过程。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子驱动 MAFG、MAT2 α 以及促炎症因子的转录, 促进了中枢神经系统 EAE 的病理性发展, 该工作鉴定出了 MS 症在临床治疗方面可能的新靶点。Lee 等^[45]通过对细胞因子刺激和对照条件下的 B6 小鼠分选的星形胶质细胞进行了 scRNA-seq 和染色质转座酶可及性测序 (assay for transposase-accessible chromatin with high throughput sequencing, ATAC-Seq) 分析。鉴定出星形胶质细胞亚群, 这些细胞在神经系统疾病中记忆炎症刺激, 促进病理过程, 还发现这种记忆由 ATP-柠檬酸裂解酶 (ATP-citrate lyase, ACLY) 控制, 影响疾病模型中炎症反应。Clark 等^[46]通过核酸检测和测序对细胞进行聚焦探究 (focused interrogation of cells by nucleic acid detection and sequencing, FIND-seq) 和 scRNA-seq 对 EAE 小鼠和 MS 患者样本进行分析, 发现了一个以前未知的核受体 NR3C2 及其核心压迫因子 NCOR2 调控机制, 它控制着一个星形细胞亚群, 是潜在的 MS 中枢神经系统发病机制。以上研究利用单细胞测序技术对星形胶质细胞异质性和分子特征的认识有了极大的扩展, 加速了其作为治疗靶点奠定坚实的基础。

3 其他

骨髓作为成人主要的造血器官, 也是成人 T 细胞发育的中枢免疫器官, 对启动和维持机体免疫应答具有核心作用。Shi 等^[47]通过对 MS 患者骨髓细

胞进行 scRNA-seq 分析以及对 MS 小鼠模型骨谱系分析和流式细胞术, 发现 MS 患者骨髓造血系统上游的造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 发生活化, 进而向髓系偏倚, 造成下游单核细胞和中性粒细胞明显增加, 这种异常的骨髓生成涉及 CCL5-CCR5 轴并增加 CNS 炎症和脱髓鞘, 这些发现表明, 骨髓异常髓系增生驱动 MS 进展。中性粒细胞和单核细胞/巨噬细胞组成了 CNS 感染后早期动员的主要先天免疫细胞类型。Skinner 等^[48]在小鼠肝炎病毒感染的小鼠模型中, 利用 scRNA-seq 技术分析了小鼠脊髓的免疫细胞, 发现 CNS 浸润中性粒细胞有一个独特的 mRNA 表达谱, 这些表达与中性粒细胞外渗激活、趋化性和效应功能增加有关。这些发现揭示了中性粒细胞可能参与脑白质脱髓鞘的多种途径, 并为改善脱髓鞘提供了新的治疗靶点。Kang 等^[49]对患者和 MS 小鼠模型 CSF 和血液样本进行 scRNA-seq 分析, 结果显示, AXL⁺ Siglec6⁺ DCs (ASDCs)、ACY3⁺ DCs 和 LAMP3⁺ DCs 三种树突状细胞亚型在 CSF 中的表达高于血液。其中 ASDCs 表现出多黏附和刺激特征, 经常与 T 细胞密切接触。以上分析表明 ASDCs 可能参与了 CNS 自身免疫的发病机制。Müller-Miny 等^[50]利用 scRNA-seq 对 2 名使用过抗 CD52 抗体阿仑单抗 (alemtuzumab) 的 RRMS 患者 CSF 和外周血分析。结果显示在使用过 alemtuzumab 的患者 CSF 中维持了浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDCs), 但从血液中消失了。转录方面, alemtuzumab 治疗后, 与迁移相关的基因仅在 CSF 中升高。因此显示即使对血液产生深远影响的治疗, 也只能部分进入 CNS。

综上所述, 研究者均利用单细胞测序技术, 分析了 MS 患者各类细胞的特征及其对疾病的影响, 如表 1 所示。Masuda 等^[38]、Schirmer 等^[39] 和 Esaulova 等^[40] 研究突出了小胶质细胞的发现。Schirmer 等^[39]、Wheeler 等^[44]、Absinta 等^[43]、Lee 等^[45] 和 Clark 等^[46] 发现星形胶质细胞的不同亚群和表达模式。Beltrán 等^[24] 和 Ingelfinger 等^[26] 通过

表 1 多发性硬化单细胞组学研究

Table 1 Summary of researches on single-cell omics involving MS

文献 Literature	组织来源 Tissue source	单细胞测序技术 Single-cell sequencing technology	主要发现 Main findings
Masuda 等 ^[38] (2019 年) Masuda et al. ^[38] (2019)	MS 患者大脑组织、实验性自身免疫性 脑脊髓炎小鼠脑组织 Brain tissue from MS patients and mice with experimental autoimmune encephalomyelitis	单细胞转录组测序 scRNA-seq	发现了特异性状态的小胶质细胞簇。 Specific microglial clusters were identified.

续表

文献 Literature	组织来源 Tissue source	单细胞测序技术 Single-cell sequencing technology	主要发现 Main findings
Schirmer 等 ^[39] (2019 年) Schirmer et al. ^[39] (2019)	MS 患者和健康对照大脑组织 Brain tissue from MS patients and healthy controls	单细胞核转录组测序 snRNA-seq	发现多种应激及活化状态小胶质细胞位于 MS 斑块边缘。 Various stressed and activated microglial cells were found at the edges of MS plaques.
Beltrán 等 ^[24] (2019 年) Beltrán et al. ^[24] (2019)	MS 不协调双生子和对照组的 CSF 样本 CSF samples from MS-discordant twin pairs and controls	单细胞转录组测序 scRNA-seq	发现 CD8 ⁺ T 细胞和 B 细胞克隆性扩增,表明早期适应性免疫激活。 Clonal expansion of CD8 ⁺ T cells and B cells indicated early adaptive immune activation.
Esaulova 等 ^[40] (2020 年) Esaulova et al. ^[40] (2020)	RRMS 患者、抗 MOG 患者 CSF 和 PBMC 样本 CSF and PBMC samples from RRMS patients and anti-MOG patients	单细胞转录组测序 scRNA-seq	正常对照和 MS 患者 CSF 均存在小胶质细胞。 Microglial cells were present in the CSF of both normal controls and MS patients.
Ramesh 等 ^[28] (2020 年) Ramesh et al. ^[28] (2020)	正常对照、RRMS 型患者外周血和 CSF Peripheral blood and CSF from healthy controls and RRMS patients	单细胞转录组测序 、单细胞免疫球蛋白测序 scRNA-seq, scIg-Seq	CSF 中 B 细胞向炎性细胞、Bm 细胞和浆母/浆细胞表型分化。 B cells in the CSF differentiated into inflammatory cells, Bm cells, and plasma/plasmablast phenotypes.
Schafflick 等 ^[31] (2020 年) Schafflick et al. ^[31] (2020)	MS 患者 CSF 和外周血,实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型脑组织和脊髓 CSF and peripheral blood from MS patients, brain and spinal cord from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis	单细胞转录组测序 scRNA-seq	鉴定到 CSF 中未知的髓样树突状细胞 (mDC) 富集,观察到 B 细胞、滤泡辅助 T 细胞 (T _{fh}) 的扩增。 Unknown myeloid dendritic cells (mDC) were enriched in the CSF, along with expanded B cells and follicular helper T cells (T _{fh}).
Wheeler 等 ^[44] (2020 年) Wheeler et al. ^[44] (2020)	MS 患者脑组织,实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型脑组织 Brain tissue from MS patients and mice with experimental autoimmune encephalomyelitis	单细胞转录组测序 、染色质免疫共沉淀测序、染色质转座酶可及性测序 scRNA-seq, ChIP-seq, ATAC-seq	鉴定出星形胶质细胞的确存在多种不同的转录状态的亚群及关键转录调控因子 NRF2。 Various subpopulations of astrocytes with distinct transcriptional states and the key regulatory factor NRF2 were identified.
Absinta 等 ^[43] (2021 年) Absinta et al. ^[43] (2021)	MS 患者脑组织 Brain tissue from MS patients	单细胞核转录组测序 snRNA-seq	小胶质细胞亚型 MIMS 和星形胶质细胞 AIMS。 Microglial subtypes, MIMS; astrocyte subtypes, AIMS.
Skinner 等 ^[48] (2022 年) Skinner et al. ^[48] (2022)	JHMV 感染的实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型脊髓 Spinal cord from the experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model infected with JHMV	单细胞核转录组测序 scRNA-seq	CNS 浸润中性粒细胞有一个独特的 mRNA 表达谱。 CNS-infiltrating neutrophils displayed a unique mRNA expression profile.
Ingelfinger 等 ^[26] (2022 年) Ingelfinger et al. ^[26] (2022)	同卵双胞胎 MS 患者 PBMC PBMC from monozygotic twin MS patients	质谱流式技术、单细胞转录组和表面蛋白测序 CyTOF, CITE-seq	MS 双胞胎的单核细胞群出现了炎症性转变,同时出现了 IL-2 高反应的过渡性幼稚辅助 T 细胞群,这些可作为 MS 相关的免疫改变。 Monocyte populations from MS twins showed inflammatory changes, along with a transition to IL-2 high-reactive naive helper T cell populations, indicative of MS-related immune alterations.
Lanz 等 ^[33] (2022 年) Lanz et al. ^[33] (2022)	RRMS 患者外周血和 CSF Peripheral blood and CSF from RRMS patients	单细胞核转录组测序、B 细胞受体测序 scRNA-seq, BCR-seq	鉴定出交叉反应性 CSF 衍生抗体。 Cross-reactive antibodies derived from CSF were identified.
Shi 等 ^[47] (2022 年) Shi et al. ^[47] (2022)	MS 患者和健康对照的骨髓细胞 Bone marrow cells from MS patients and healthy controls	单细胞核转录组测序 scRNA-seq	MS 患者中,骨髓造血干细胞和祖细胞偏向骨髓谱系,T 细胞异常扩增。 In MS patients, bone marrow hematopoietic stem and progenitor cells skewed toward the myeloid lineage, with abnormal T cell expansion.

续表

文献 Literature	组织来源 Tissue source	单细胞测序技术 Single-cell sequencing technology	主要发现 Main findings
Ban 等 ^[25] (2024 年)	MS 患者和 ONDs 患者 CSF	单细胞核转录组测序	表达 HAVCR2 和 TIGIT 的罕见 CD8 ⁺ T 细胞群的上调。
Ban et al. ^[25] (2024)	CSF from MS patients and ONDs patients	scRNA-seq	Upregulation of a rare CD8 ⁺ T cell population expressing HAVCR2 and TIGIT.
Kendirli 等 ^[27] (2023 年)	MS 患者外周血、CSF	单细胞核转录组测序	在 MS 患者 CNS 迁移倾向的 T 细胞群中,调节因子黏附分子 α 4-整合素和趋化因子受体 CXCR3 显著表达。
Kendirli et al. ^[27] (2023)	Peripheral blood and CSF from MS patients	scRNA-seq	T cell populations with a tendency to migrate to the CNS in MS patients showed significant expression of regulatory factors; adhesion molecule α 4-integrin and chemokine receptor CXCR3.
Shi 等 ^[29] (2023 年)	RRMS 患者和 SPMS 患者的外周血	单细胞核转录组测序	SPMS 患者活化 CD8 ⁺ T 细胞亚群升高,并表达 Gzmb ⁺ EMRA 表型。
Shi et al. ^[29] (2023)	Peripheral blood from RRMS and SPMS patients	scRNA-seq	Activated CD8 ⁺ T cell subpopulations were elevated in SPMS patients, expressing the Gzmb ⁺ EMRA phenotype.
Teschner 等 ^[30] (2023 年)	克拉屈滨 (cladribine) 治疗前后的 MS 患者外周血	批量 RNA 测序、单细胞核转录组测序	治疗后记忆 B 细胞亚群显著且持续减少。
Teschner et al. ^[30] (2023)	Peripheral blood from MS patients before and after cladribine treatment	bulk-RNA-seq, scRNA-seq	Memory B cell subpopulations significantly and persistently decreased after treatment.
Clark 等 ^[46] (2023 年)	实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型和 MS 患者样本	通过核酸检测和测序对细胞进行聚焦探究、单细胞核转录组测序	核受体 NR3C2 及其核心压迫因子 NCOR2 在限制 XBP1 驱动的致病星形细胞反应中的新作用。
Clark et al. ^[46] (2023)	Samples from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis and MS patients	FIND-seq, scRNA-seq	A novel role of the nuclear receptor NR3C2 and its corepressor NCOR2 in restricting XBP1-driven pathogenic astrocyte responses was identified.
Kang 等 ^[49] (2023 年)	实验性自身免疫性脑脊髓炎模型和 IDD 患者外周血、CSF	单细胞核转录组测序	AXL ⁺ Siglec6 ⁺ 树突状细胞在 CSF 中表达量高于血液,可能参与了 CNS 自身免疫的发病机制。
Kang et al. ^[49] (2023)	Peripheral blood and CSF from experimental autoimmune encephalomyelitis model and patients with IDD	scRNA-seq	AXL ⁺ Siglec6 ⁺ dendritic cells are expressed at higher levels in the CSF than in the blood, and may be involved in the pathogenesis of CNS autoimmunity.
Müller-Miny 等 ^[50] (2023 年)	使用过抗 CD52 抗体阿仑单抗 (alemtuzumab)RRMS 患者 CSF 和血液	单细胞核转录组测序	浆细胞样树突状细胞 (pDCs) 仅在使用过阿仑单抗患者的 CSF 中维持,而在血液中消失。
Müller-Miny et al. ^[50] (2023)	CSF and blood from RRMS patients treated with the anti-CD52 antibody alemtuzumab	scRNA-seq	Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) were maintained only in the CSF of patients who had received alemtuzumab, while they disappeared from the blood.
Gottlieb 等 ^[34] (2024 年)	RRMS 患者外周血和 CSF	T 细胞受体测序	MS 患者早期阶段的 CSF 中存在大量 EBV 特异性的 T 细胞。
Gottlieb et al. ^[34] (2024)	Peripheral blood and CSF from RRMS patients	TCR-seq	A large number of EBV-specific T cells were found in the early stages of CSF from MS patients.
Lee 等 ^[45] (2024 年)	实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型脑组织	单细胞核转录组测序、染色质转座酶可及性测序	确定了 ACLY ⁺ p300 ⁺ 星形胶质细胞的一个独特亚群,这些亚群在 EAE 和 MS 病变中扩增。
Lee et al. ^[45] (2024)	Brain tissue from experimental autoimmune encephalomyelitis mice	scRNA-seq, ATAC-seq	A unique subpopulation of ACLY ⁺ p300 ⁺ astrocytes was identified, which was expanded in EAE and MS lesions.

双胞胎方法的配对分析使我们能够分辨出 MS 相关的免疫特征的遗传和环境决定的特征。Lanz 等^[33]、Shi 等^[47]和 Gottlieb 等^[34]发现 MS 发病机制的新驱动因素, Teschner 等^[30]和 Müller-Miny 等^[50]对免疫治疗过程中的患者 CSF 和血液中不同的细胞类型进行了评估。

4 小结与展望

单细胞测序技术在神经系统疾病中的应用,可以揭示与疾病发展密切相关的细胞类型、差异基因和信号通路,同时还有助于理解疾病免疫应答调控、免疫细胞亚型及其相互作用,挖掘早期诊断的新靶点和生物标志物。综上研究发现该技术在 MS 中的应用如表 1 所示,揭示了发病过程中 T 细胞、B 细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞等在发病过程中细胞亚群变化和细胞类型间的差异表达基因,解析了遗传及病毒感染等驱动因素的发病机制。随着空间转录组学、原位测序等更多测序技术的发展,以及和细胞病理学多平台的组合应用,使我们能更深入地确定 MS 疾病相关细胞的真实丰度、空间分布和在整个疾病过程中的细胞间相互作用,寻找可作为治疗的靶点。其次,随着临床研究数据的不断地积累,该技术可以有效地评估免疫治疗过程中患者 CSF 和血液中不同的细胞类型及其功能上的差异,有助于更好地了解免疫治疗的机制,制定更精准的免疫治疗方案,成为预后评估、疾病治疗和监测的有力工具之一。总之,随着单细胞多组学测序技术和应用的发展,越来越多的测序数据有望被生成并整合到一个可公开访问的数据库中,结合其他大规模基因筛选工具、数据分析和可视化平台将进一步扩大该技术的应用范围,为探索 MS 的发病机制、新治疗方法的研究提供新的思路。

参考文献:

[1] MARCUS R. What is multiple sclerosis? [J]. JAMA, 2022, 328(20): 2078.

[2] 中华医学会神经病学分会神经免疫学组, 中国免疫学会神经免疫分会. 中国多发性硬化诊断和治疗专家共识 [J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(7): 516-521.

Neuroimmunology Group, Chinese Society of Neurology, Chinese Society of Immunology. Expert consensus on diagnosis and treatment of multiple sclerosis in China [J]. Chin J Neurol, 2010, 43(7): 516-521.

[3] WARD M, GOLDMAN M D. Epidemiology and pathophysiology of multiple sclerosis [J]. Continuum, 2022, 28(4): 988

-1005.

[4] LASSMANN H. Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis [J]. Front Immunol, 2018, 9: 3116.

[5] RODRÍGUEZ MURÚA S, FAREZ M F, QUINTANA F J. The immune response in multiple sclerosis [J]. Annu Rev Pathol, 2022, 17: 121-139.

[6] LIU R, DU S, ZHAO L, et al. Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target [J]. Front Immunol, 2022, 13: 996469.

[7] SMOLDERS J, VAN LUIJN M M, HSIAO C C, et al. T-cell surveillance of the human brain in health and multiple sclerosis [J]. Semin Immunopathol, 2022, 44(6): 855-867.

[8] YONG H Y F, YONG V W. Mechanism-based criteria to improve therapeutic outcomes in progressive multiple sclerosis [J]. Nat Rev Neurol, 2022, 18(1): 40-55.

[9] CHARABATI M, WHEELER M A, WEINER H L, et al. Multiple sclerosis: Neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting [J]. Cell, 2023, 186(7): 1309-1327.

[10] BAECHER-ALLAN C, KASKOW B J, WEINER H L. Multiple sclerosis: mechanisms and immunotherapy [J]. Neuron, 2018, 97(4): 742-768.

[11] SHANKAR G M, BALAJ L, STOTT S L, et al. Liquid biopsy for brain tumors [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2017, 17(10): 943-947.

[12] JOVIC D, LIANG X, ZENG H, et al. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: a brief overview [J]. Clin Transl Med, 2022, 12(3): e694.

[13] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 377-382.

[14] PAOLILLO C, LONDIN E, FORTINA P. Single-cell genomics [J]. Clin Chem, 2019, 65(8): 972-985.

[15] RAO A, BARKLEY D, FRANÇA G S, et al. Exploring tissue architecture using spatial transcriptomics [J]. Nature, 2021, 596(7871): 211-220.

[16] PAPALEXI E, SATIJA R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(1): 35-45.

[17] HEMING M, BÖRSCH A L, WIENDL H, et al. High-dimensional investigation of the cerebrospinal fluid to explore and monitor CNS immune responses [J]. Genome Med, 2022, 14(1): 94.

[18] POZOJEVIC J, SPIELMANN M. Single-cell sequencing in neurodegenerative disorders [J]. Mol Diagn Ther, 2023, 27(5): 553-561.

[19] ZENG Z, MIAO N, SUN T. Revealing cellular and molecular complexity of the central nervous system using single cell sequencing [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 234.

[20] ARMAND E J, LI J, XIE F, et al. Single-cell sequencing of brain cell transcriptomes and epigenomes [J]. Neuron, 2021, 109(1): 11-26.

[21] PIEHL N, VAN OLST L, RAMAKRISHNAN A, et al.

- Cerebrospinal fluid immune dysregulation during healthy brain aging and cognitive impairment [J]. *Cell*, 2022, 185(26): 5028–5039.
- [22] ULUTEKIN C, GALLI E, SCHREINER B, et al. B cell depletion attenuates CD27 signaling of T helper cells in multiple sclerosis [J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(1): 101351.
- [23] BHARGAVA P, HARTUNG H P, CALABRESI P A. Contribution of B cells to cortical damage in multiple sclerosis [J]. *Brain*, 2022, 145(10): 3363–3373.
- [24] BELTRÁN E, GERDES L A, HANSEN, et al. Early adaptive immune activation detected in monozygotic twins with prodromal multiple sclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(11): 4758–4768.
- [25] BAN M, BREDIKHIN D, HUANG Y, et al. Expression profiling of cerebrospinal fluid identifies dysregulated antiviral mechanisms in multiple sclerosis [J]. *Brain*, 2024, 147(2): 554–565.
- [26] INGELFINGER F, GERDES L A, KAVAKA V, et al. Twin study reveals non-heritable immune perturbations in multiple sclerosis [J]. *Nature*, 2022, 603(7899): 152–158.
- [27] KENDIRLI A, DE LA ROSA C, LÄMMLE K F, et al. A genome-wide *in vivo* CRISPR screen identifies essential regulators of T cell migration to the CNS in a multiple sclerosis model [J]. *Nat Neurosci*, 2023, 26(10): 1713–1725.
- [28] RAMESH A, SCHUBERT R D, GREENFIELD A L, et al. A pathogenic and clonally expanded B cell transcriptome in active multiple sclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(37): 22932–22943.
- [29] SHI Z, WANG X, WANG J, et al. Granzyme B⁺ CD8⁺ T cells with terminal differentiated effector signature determine multiple sclerosis progression [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 138.
- [30] TESCHNER V E, FLECK A K, WALTER C, et al. Single-cell profiling reveals preferential reduction of memory B cell subsets in cladribine patients that correlates with treatment response [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2023, 16: 17562864231211077.
- [31] SCHAFFLICK D, XU C A, HARTLEHNERT M, et al. Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 247.
- [32] SOLDAN S S, LIEBERMAN P M. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(1): 51–64.
- [33] LANZ T V, BREWER R C, HO P P, et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM [J]. *Nature*, 2022, 603(7900): 321–327.
- [34] GOTTLIEB A, PHAM H P T, SALTARRELLI J G, et al. Expanded T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients are specific for Epstein-Barr-virus-infected B cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121(3): e2315857121.
- [35] JESSEN K R. Glial cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(10): 1861–1867.
- [36] CIGNARELLA F, FILIPELLO F, BOLLMAN B, et al. TREM2 activation on microglia promotes myelin debris clearance and remyelination in a model of multiple sclerosis [J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 140(4): 513–534.
- [37] VOET S, PRINZ M, VAN LOO G. Microglia in central nervous system inflammation and multiple sclerosis pathology [J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(2): 112–123.
- [38] MASUDA T, SANKOWSKI R, STASZEWSKI O, et al. Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution [J]. *Nature*, 2019, 566(7744): 388–392.
- [39] SCHIRMER L, VELMESHEV D, HOLMQVIST S, et al. Neuronal vulnerability and multilineage diversity in multiple sclerosis [J]. *Nature*, 2019, 573(7772): 75–82.
- [40] ESAULOVA E, CANTONI C, SHCHUKINA I, et al. Single-cell RNA-seq analysis of human CSF microglia and myeloid cells in neuroinflammation [J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2020, 7(4): e732.
- [41] LEE H G, WHEELER M A, QUINTANA F J. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(5): 339–358.
- [42] SCHIRMER L, SCHAFFER D P, BARTELS T, et al. Diversity and function of glial cell types in multiple sclerosis [J]. *Trends Immunol*, 2021, 42(3): 228–247.
- [43] ABSINTA M, MARIC D, GHARAGOZLOO M, et al. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis [J]. *Nature*, 2021, 597(7878): 709–714.
- [44] WHEELER M A, CLARK I C, TJON E C, et al. MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation [J]. *Nature*, 2020, 578(7796): 593–599.
- [45] LEE H G, RONE J M, LI Z, et al. Disease-associated astrocyte epigenetic memory promotes CNS pathology [J]. *Nature*, 2024, 627(8005): 865–872.
- [46] CLARK I C, WHEELER M A, LEE H G, et al. Identification of astrocyte regulators by nucleic acid cytometry [J]. *Nature*, 2023, 614(7947): 326–333.
- [47] SHI K, LI H, CHANG T, et al. Bone marrow hematopoiesis drives multiple sclerosis progression [J]. *Cell*, 2022, 185(13): 2234–2247.
- [48] SKINNER D D, SYAGE A R, OLIVARRIA G M, et al. Sustained infiltration of neutrophils into the CNS results in increased demyelination in a viral-induced model of multiple sclerosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 931388.
- [49] KANG J, KIM M, YOON D Y, et al. AXL⁺SIGLEC6⁺ dendritic cells in cerebrospinal fluid and brain tissues of patients with autoimmune inflammatory demyelinating disease of CNS [J]. *Clin Immunol*, 2023, 253: 109686.
- [50] MÜLLER-MINY L, HEMING M, LAUTWEIN T, et al. Alemtuzumab treatment exemplifies discordant immune effects of blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis [J]. *J Neuroimmunol*, 2023, 378: 578088.

孔明慧,鲁力铭,向蕾颖,等. 自闭症动物模型社会互动行为的评估及干预研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 169-178.

Kong MH, Lu LM, Xiang LY, et al. Research progress on the evaluation and intervention of social interaction behaviors in animal models of autism [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 169-178.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.020

自闭症动物模型社会互动行为的评估及干预研究进展

孔明慧¹, 鲁力铭¹, 向蕾颖¹, 陈小异^{1*}, 朱志茹^{2*}

(1.重庆师范大学教育科学学院,重庆 401331;2.陆军军医大学医学心理系军事认知心理学教研室,重庆 400038)

【摘要】 自闭症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是一种高度异质性的神经发育障碍,具有复杂的潜在遗传结构。然而,目前 ASD 正在研究的临床前试验主要通过啮齿类动物模型进行,以测试非药物干预及药物干预对 ASD 核心及相关症状的影响。本文从认知神经机制角度阐述影响社会互动行为的脑区;梳理社会互动的行为学测试实验;对 ASD 的核心和相关症状的有效非药物干预和药物干预进行综述,为下一步促进啮齿类动物模型临床前试验的发展提供参考方向。

【关键词】 自闭症谱系障碍;三箱社交实验;行为学实验;催产素

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0169-10

Research progress on the evaluation and intervention of social interaction behaviors in animal models of autism

KONG Minghui¹, LU Liming¹, XIANG Leiying¹, CHEN Xiaoyi^{1*}, ZHU Zhiru^{2*}

(1. School of Educational Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China.

2. Department of Military Cognitive Psychology, College of Medical Psychology, Army Medical University, Chongqing 400038)

【Abstract】 Autism spectrum disorder (ASD) is a highly heterogeneous neurodevelopmental disorder with a complex underlying genetic structure. Current preclinical trials, however, mainly rely on rodent models to test the effects of non-pharmacological and pharmacological interventions on the core and related symptoms of ASD. This paper considers the brain regions that affect social interaction behaviors from the perspective of cognitive neural mechanisms, and reviews behavioral testing experiments, such as the three-chamber social interaction test, visible burrow system, and eco-HAB system. We also summarize effective non-pharmacological and pharmacological interventions, such as baclofen, oxytocin, and metformin, in the core and related symptom areas of ASD. This review aims to provide reference directions to promote the development of preclinical trials using rodent models.

【Keywords】 autism spectrum disorder; three-compartment social interaction test; behavioral experiment; oxytocin

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

社会互动与生活质量密切相关,需要个体的身体功能与社会环境相适应^[1]。当个体出现社会互动障碍时,将影响其社会功能。事实上,社会功能

障碍不仅是抑郁症^[2]、精神分裂症和自闭症谱系障碍等神经精神疾病中一种显著且常见的症状表现,更是这些疾病发展进程中的关键危险因素。自闭

[作者简介]孔明慧(1997—),女,硕士研究生,研究方向:应用心理。E-mail:kongminghui2018@163.com

[通信作者]陈小异(1968—),男,博士,教授,研究方向:发展与教育心理学。E-mail:xyichen@163.com

朱志茹(1974—),女,博士,副教授,研究方向:认知心理学研究。E-mail:zhuzr2013@163.com *共同通信作者

症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD), 简称自闭症或孤独症, 是一种神经发育障碍疾病, 其临床症状集中于社会互动、社会沟通、重复刻板行为以及感觉反应缺陷等^[3]。据统计, 26 个国家的平均发病率约为 1%^[4], 在美国大约每 36 名的 8 岁儿童中就有 1 名患有 ASD^[5]。我国 ASD 发病率达 0.7%, ASD 患病人群超过 1000 万。其中, 0~14 岁儿童约有 300~500 万人^[6]。除了儿童以外, 成人 ASD 发病率也较为突出, 瑞典成人精神病门诊的新患者中, ASD 患者占比为 18.9%^[7]。ASD 个体的智力功能随着时间的发展无显著变化, 但社会互动行为能够随着个体进入青春期和成年期得到改善, 通过干预措施能改善其生活质量^[8]。由此研究者致力于对 ASD 个体进行系统干预研究, 使其社会互动缺陷得以恢复。

目前关于 ASD 的临床表现症状和病因具有多样性和复杂性。该疾病在同卵双胞胎中 ASD 诊断的一致性高达 90%, 然而, 只有 5%~30% 的 ASD 病例可以用单个基因的突变或基因组重排来解释^[9]。而表达单一突变的遗传模型也并不能完整模拟 ASD 的所有病理特征, 目前国际上通过行为学等手法构建了几种小鼠和大鼠品系, 它们能够较好地模拟 ASD 的核心症状。主要包括以下几种类型: (1) 基因模型。采用基因编辑技术, 对动物的单基因或多基因进行编辑构建的模型。如 Shank3 敲除模型^[10]。(2) 特发性 ASD 模型。通过行为学实验筛选繁育的小鼠或大鼠品系, 如 BTBR T+ Itpr3tf/J (BTBR) 小鼠模型。(3) 环境暴露模型。指暴露于生化刺激、病毒感染或紧张刺激等环境因素而诱发 ASD, 如丙戊酸 (valproic acid, VPA) 暴露模型。

BTBR 小鼠是目前公认的具有 ASD 核心症状的动物模型^[11]。其社交缺陷和刻板行为的症状表现具有稳健性和一致性, 也促进了 BTBR 小鼠在药物研发中的应用^[4]。在小鼠模型的研究中, 社会互动包括同一物种间多种类型的互动, 是小鼠维持适应性生命的基本行为^[12]。小鼠的社会互动行为可分为两个阶段: 食欲阶段和完成阶段。在食欲阶段中, 小鼠倾向于探索同类个体而不是无生命物体, 即社会偏好。小鼠也倾向于探索陌生个体而不是熟悉个体, 即社会识别或社会记忆, 是小鼠产生社会互动行为的基础^[13-14]。在临床试验中, 青少年的社会识别缺陷通常是 ASD 早期的重要标志^[12]。

本文以 BTBR 小鼠模型为主, 同时比较其他啮

齿类动物模型, 回顾其在行为实验中的表现及干预机制研究。阐述影响社会互动行为的认知神经机制及常用的小鼠社会互动行为范式, 重点梳理非药物干预与药物干预对改善小鼠社会互动行为的研究进展。

1 社会互动行为的认知神经机制

临床试验证据表明, 海马体参与社会记忆^[15], 社会记忆是产生适应性社会互动的一种重要能力。社会记忆功能障碍发现在部分神经精神疾病中呈现, 包括自闭症谱系障碍、精神分裂症和重度抑郁^[16]。目前在 BTBR 小鼠的海马体中已证实支持社会记忆的神经回路, 但研究者对其社会互动行为的认知神经机制认识仍存在争议, 当前研究主要集中于小鼠海马体、前额叶皮层以及伏隔核等探究小鼠的社会互动行为。本文总结了近年来, 影响 ASD 小鼠模型社会互动行为的相关脑区的一些最新研究进展 (见表 1)。

1.1 海马体对社会互动的影

关于海马体对社会互动的影已有较为明确的研究结论, 本文主要通过海马体的 CA1、CA2、CA3 及 DG 4 个亚区对社会互动行为的影响进行梳理。社会互动包含社会偏好和社会识别, 在海马体的不同神经回路中发挥着不同程度的作用。研究者还进一步深入细化海马体各亚区对社会互动行为的影响, 其中包括背侧和腹侧区域。

在 CA1 中, 研究者发现 Shank3 KO 小鼠的腹侧 CA1 (ventral CA1, vCA1) 社会记忆神经元减少, 海马锐波涟漪 (sharp-wave ripples, SPW-Rs) 中神经元集合尖峰序列受损, 导致社会互动行为障碍^[23]。另外, 通过抑制 Shank3 KO 小鼠的 CA2-vCA1 的神经投射, 结果显示损害了小鼠的社会识别, 在激活 CA2 区域的兴奋性神经元, 或激活 CA2-vCA1 神经回路后, 小鼠的社会识别障碍得到改善^[16]。在 CA3 锥体细胞中, N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体中的 NMDA 受体亚单位 1 基因 (NMDA receptor subunit 1 gene, NR1) 的缺失破坏了突触可塑性, 导致小鼠的社会识别缺陷^[24]。研究者发现, 增加颗粒下层 (subgranular zone, SGZ) 的神经发生和扩大 DG 中的新生颗粒神经元能够改善小鼠的社会识别障碍^[25]。综上所述, 海马体的各个亚区能够独立对社会识别产生影响, 也能够通过不同亚区之间的神经投射影响社会互动行为。从 vCA1

和 vCA3 到 LS 的谷氨酸能投射影响社会互动行为^[26]。研究认为 CA1 接受来自 CA3 投射的谢弗氏侧枝 (Schaffer collateral, SC) 也与社会记忆传递相关^[13]。

表 1 ASD 动物模型社会互动行为的相关脑区研究

Table 1 Brain regions associated with social interaction behavior in an animal model of ASD

动物模型 Model	菌株类型 Strain	神经回路 Neural circuits	社会互动缺陷 Social and circuit deficits	干预措施 Rescue
C57BL/6J 小鼠 ^[13] C57BL/6J mice	AAV	vCA1-LS	抑制 vCA1-LS 的神经投射, 不影响社会偏好, 但损害社会识别 Inhibition of vCA1-LS neural projections does not affect social preferences but impairs social recognition	/
Efr3b ^{fl/fl} 小鼠 ^[17] Efr3b ^{fl/fl} mice	Efr3b KO	dCA2	敲除 dCA2 PNs 中 Efr3b 的表达导致小鼠社会缺陷 Knockdown of Efr3b expression in dCA2 PNs results in social deficits	恢复 CA2 PNs 中 Efr3b 的表达, 或直接激活 CA2 PNs, 可以改善小鼠的社会识别障碍 Restoration of Efr3b expression in CA2 PNs, or direct activation of CA2 PNs, ameliorates social recognition deficits
C57BL/6 小鼠 ^[18] C57BL/6 mice	AAV	LEC-dCA2	抑制 LEC-dCA2 神经回路损害社会互动行为 Inhibition of LEC-dCA2 neural circuitry impairs social interaction behavior	激活该神经投射恢复社会识别行为 Activating its neural projections restores social recognition behaviors
C57BL/6J 小鼠 ^[12] C57BL/6J mice	AAV	dCA3 ^{CaMKIIα+} - dLS ^{CABA+} - PFN ^{Foxb1+} - IPAG	抑制 dCA3 ^{CaMKIIα+} 神经元导致小鼠出现社会识别障碍 Inhibition of dCA3 ^{CaMKIIα+} neurons leads to social recognition deficits in mice	激活 dCA3 ^{CaMKIIα+} 神经元改善小鼠的社会识别行为 Activation of dCA3 ^{CaMKIIα+} neurons improves social recognition behavior in mice
Auts2 ^{fl/fl} ; Emx1-Cre 小鼠 ^[19] Auts2 ^{fl/fl} ; Emx1-Cre mice	Auts2 KO	SuM-DG-CA3	在 DG 中特异性敲除 Auts2 导致小鼠社会识别障碍 Specific knockout of Auts2 in DG leads to impaired social recognition	激活 SuM-DG 回路纠正了 DG-CA3 突触传递, 恢复了小鼠的社会识别功能 Activation of this circuit corrects DG-CA3 synaptic transmission and restores social recognition
Wistar 大鼠 Wistar rat ^[20]	VPA	PP-DG	在 DG 区域, VPA 暴露的大鼠后代的社会互动明显受损 In the DG region, social interaction was significantly impaired in the offspring of rat exposed to VPA	/
Eef2 KO 小鼠 ^[21] Eef2 KO mice	Eef2 KO	mPFC	在 mPFC 的兴奋性神经元中特异性敲除 Eef2 导致社会互动障碍 Specific knockdown of Eef2 in excitatory neurons of the mPFC leads to impaired social interaction	激活 mPFC 中兴奋性神经元, 或 mPFC 局部输入 AMPAR 增强剂可以改善小鼠的社会识别缺陷 Amelioration of social recognition deficits in mice by chemogenetic activation of excitatory neurons in the mPFC or by local input of AMPAR enhancers to the mPFC
16p11.2 KO 小鼠 ^[22] 16p11.2 KO mice	16p11.2 KO	mPFC	16p11.2 缺失的雌性小鼠的社会识别能力受损, PFC 区域 LFP 功率变化显著高于 WT 小鼠 Social recognition is impaired in 16p11.2-deficient female mice, and LFP power changes in the PFC region are significantly higher than in WT mice	40 Hz 的闪光治疗, PFC 的 LFP 的功率得到有效降低, 也逆转了 PFC PNs 的过度兴奋性神经传递, 社会识别得到改善 Power of the LFP of the PFC was effectively reduced by 40 Hz flash treatment, which also reversed the hyperexcitability neurotransmission of the PFC PNs, and social recognition was improved

注: AAV: 腺相关病毒; LS: 外侧隔核; PP: 穿孔路径; PNs: 锥体神经元; LEC: 外侧内嗅皮层; SuM: 绒毛上核; AUTS2: 自闭症易感因子 2; CaMKIIα+: 钙调蛋白激酶 II; PFN: 小核; dLS: 背侧隔核; IPAG: 外侧中脑导水管周围灰质区; OXTR: 催产素受体; Eef2: 真核延伸因子 2; LFP: 局部场电位; WT: 野生型。

Note. AAV, Adeno-associated virus. LS, Lateral septal nucleus. PP, Perforant pathway. PNs, Pyramidal neurons. LEC, Lateral entorhinal cortical. SuM, Supramammillary nucleus. AUTS2, Autism susceptibility 2. CaMKIIα+, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α. PFN, Parvafox nucleus. dLS, Dorsal lateral septum. IPAG, Lateral periaqueductal gray. OXTR, Oxytocin receptor. Eef2, Eukaryotic elongation factor 2. LFP, Local field potential. WT: Wild type.

1.2 前额叶皮层对社会互动的影

小鼠的前额叶皮层 (prefrontal cortex, PFC) 在识别熟悉及陌生个体时均存在神经元激活^[13]。而内侧前额叶皮层 (medial prefrontal cortex, mPFC) 是控制社会互动行为的一个关键的大脑区域, 在社会行为中起着核心作用^[1]。

通过神经生物学分析, BTBR 小鼠的社会互动行为减少伴随着 PFC 和杏仁核 (Amygdala) 区域的 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 浓度降低, 谷氨酸浓度升高, 表明 BTBR 小鼠的社会互动行为与 PFC 相关^[27]。同时, mPFC 中的神经元与 NAc、杏仁核、腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA) 和中缝核 (dorsal raphe nucleus, DRN) 等不同的皮层下区域形成神经网络, 并调节社会互动行为。基于 PFC 每个亚区在社会和情绪行为中发挥着不同作用的影响^[28], 在社会互动过程中, 投射到基底外侧杏仁核 (basolateral amygdala, BLA) 的边缘下皮层 (infralimbic cortex, IL) 神经元的活动比投射到 BLA 的前边缘皮层 (prelimbic cortex, PL) 神经元更突出, 抑制 IL-BLA 通路或激活 PL-BLA 通路均导致社会互动行为障碍^[29]。ASD 小鼠模型同样表现出背侧内侧前额叶皮层 (dorsal medial prefrontal cortex, dmPFC) 神经元活动和局部场电位 (local field potential, LFP) 的振荡损伤。在 Shank3 KO 小鼠中, 在社会互动实验中表现社会回避时, dmPFC 的 4~7 Hz 频段的功率显著高于社会接近, 而 C57 小鼠没有表现这种显著变化^[30]。这表明不同脑区之间的连接受到社会互动行为不同方面的影响^[30], 如何维持 mPFC 兴奋性神经元的稳态平衡仍是未来研究的重点。

2 社会互动行为的评估方法

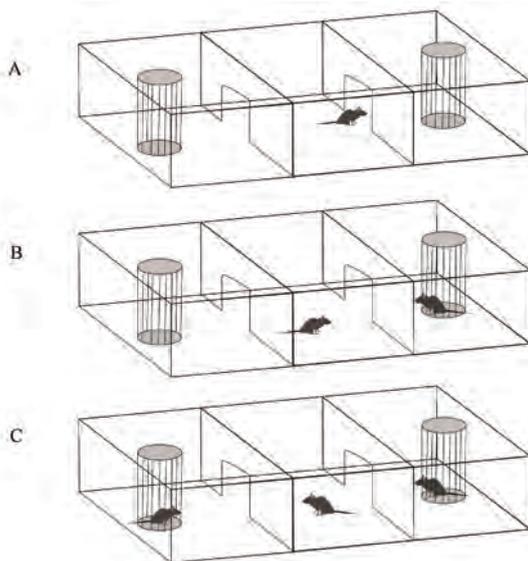
小鼠是群居动物, 具有高度的社会性, 能表现类似人类的社会交往、社交接近等社会互动行为。本文通过测试小鼠的社会互动行为, 从非自然、半自然、全自然 3 个方面介绍行为学实验方法, 主要包括三箱社交实验、可见洞穴系统、生态 HAB 系统。进而探究不同行为学实验的测试评估及实验效果。

2.1 三箱社交实验

三箱社交实验 (three-compartment social interaction test), 是用于测试小鼠社会性的常用实验室行为范式, 已被广泛运用于评估小鼠社会行为的几个方面, 包括社会互动、社会偏好和社会识别。

测试设备包括两个大小相等的腔室和一个中央腔室。在两端腔室放置两个倒置的金属笼, 实验共分 3 个阶段。适应阶段: 测试小鼠放置在中间腔室, 自由探索 5 min (见图 1A)。社会偏好阶段: 在一侧隔间放置一个空的金属笼, 在另一侧隔间放置一个带有小鼠 (1 号小鼠) 的金属笼, 将测试小鼠再次放入中间腔室, 自由探索 10 min (见图 1B)。社会识别阶段: 反转空金属笼和熟悉小鼠 (1 号小鼠) 金属笼的位置, 陌生老鼠 (2 号小鼠) 被放在空金属笼里, 将测试小鼠放入中间腔室, 自由探索 10 min (见图 1C)。这种范式在理论上利用了小鼠的先天社交驱动力, 对社会刺激表现出自发的探索行为^[31]。以停留时间和嗅探次数作为评价指标, 在偏好阶段, 测试小鼠倾向于与小鼠互动, 则社会互动偏好指数越高。在识别阶段, 测试小鼠倾向于与陌生小鼠互动, 则社会识别指数越高, 表明测试小鼠对熟悉小鼠形成识别记忆, 倾向于探索陌生小鼠。

除了三箱社交实验, 还有一种研究者常用的实验范式是社会互动实验。三箱社交实验是一种间接互动实验, 测试小鼠通过金属笼与刺激小鼠进行社会互动, 能够减少刺激小鼠对测试小鼠社交能力的影响。而社会互动实验是一种直接互动实验, 测



注: A: 适应阶段示意图; B: 社会偏好阶段示意图; C: 社会识别阶段示意图。

图 1 三箱社交实验示意图

Note. A, Schematic diagram of the adaptation trial. B, Schematic diagram of the social preference trial. C, Schematic diagram of the social recognition trial.

Figure 1 Schematic diagram of three-compartment social interaction test

试小鼠直接与刺激小鼠进行肢体接触的社会互动。综上所述,三箱社交实验是目前研究社交行为中最为广泛应用的范式,具有适用范围广、经济性高、时效性强的特点。但它是在一种非自然状态下新环境中,短暂的、受限的互动,受到测试环境的光照程度、实验处理以及饲养条件的影响^[32]。

2.2 可见洞穴系统

为了减少三箱社交实验对实验结果造成的影响,研究者引入一种新的社会互动行为研究范式——可见洞穴系统(the visible burrow system, VBS)。VBS 实验是复杂的、半自然生态系统社会行为学范式(见图 2)。VBS 实验可以对小鼠进行纵向监测,提供社会行为动态趋势的解读,包括社会等级形成和社会接触变化。VBS 实验根据小鼠习性模拟隧道和洞穴系统,旨在对小鼠的社会互动行为进行自动评分和技术跟踪,从而获得完整昼夜节律的活动轨迹。实验开始前一周,在小鼠背侧注射芯片,在巢箱中连接几根短隧道以供小鼠可以自由活动,食物和水放在小鼠可以随意进入的开放场地上。在箱体的顶部有两组 LED 灯和红外线用于照明,使用特定的检测装置对社会接近、社会嗅探、社会追随和社会回避进行追踪分析^[14,33]。研究者将 BTBR 小鼠与 C57 小鼠作为研究对象,进行可见洞穴实验和三箱社交实验,结果显示,可见洞穴实验的实验结果与三箱社交实验高度相似,能够测量出 BTBR 小鼠的社交缺陷和刻板行为^[34]。另有研究者为了测试 BTBR 小鼠的社会接近行为和社会回避行为进行 VBS 实验,发现 C57 和 BTBR 小鼠的实验

结果存在显著差异,与 C57 小鼠相比,BTBR 小鼠的社会互动行为表现较少,且更倾向于社会回避^[21]。

综上所述,BTBR 小鼠在 VBS 实验中表现出 24 h 昼夜节律周期的社会缺陷。与三箱社交实验研究不同的是,VBS 实验使用了一种自动行为评分系统,能够连续 7 d 在完整的昼夜节周期中监测 BTBR 和 C57 小鼠的活动,而不是选择一个特定的时间节点^[33]。鉴于目前 VBS 实验的纵向监测方法相对新颖,样本量估计相对困难,还需要进一步拓展研究来建立可靠的分析估计。

2.3 生态 HAB 系统

为减少小鼠所在环境的压力因素对测试结果的影响,研究者也会使用另一种实验范式——生态 HAB 系统(Eco-HAB system, Eco-HAB)——用于测试小鼠的社会互动行为^[32]。Eco-HAB 实验是一个自然环境的、全自动的、基于射频识别系统(radio frequency identification system, RFID)的行为范式(见图 3),旨在长时间记录群居小鼠活动的系统,测试小鼠群体的自发社会互动行为。它由 4 个笼子组成,其中两个装有食物和水,剩下两个为空笼子,通过隧道将各个笼子相连。研究者以 VPA 暴露的 C57 和 BALB 小鼠为研究对象,对 Eco-HAB 实验和三箱社交实验进行比较,VPA 暴露的小鼠表现出社会互动缺陷^[35],通过三箱社交实验能够证实这一点;但也有研究报告显示 VPA 干预能够增加小鼠的社会互动行为^[36],通过 Eco-HAB 实验能证实这一结论^[37]。这提示 Eco-HAB 实验不仅能够作为行为实验,也能成为环境干预的研究方向的工具。而

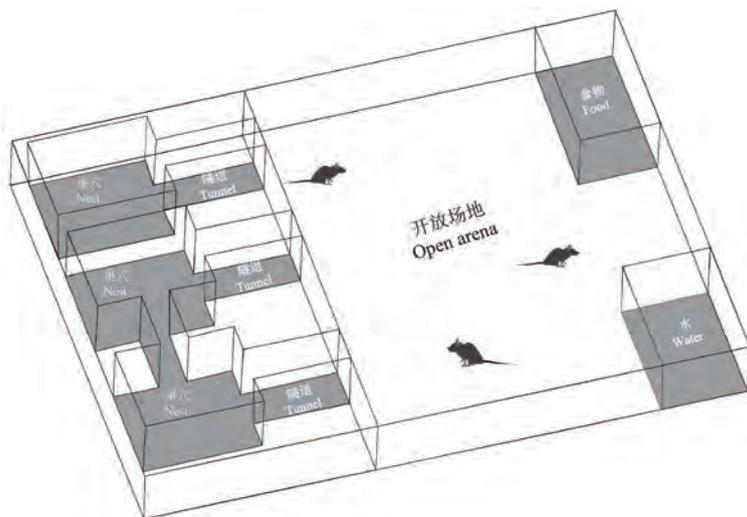


图 2 可见洞穴实验示意图

Figure 2 Schematic diagram of Visible Burrow System(VBS)

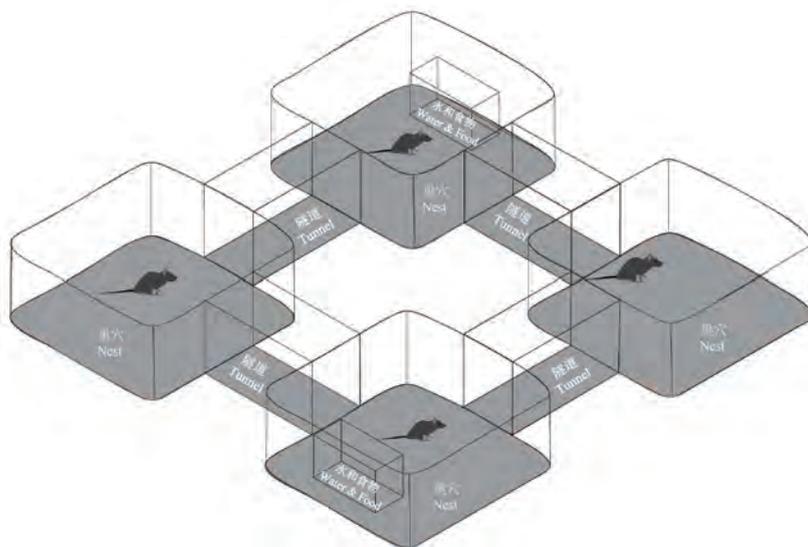


图 3 生态 HAB 实验示意图

Figure 3 Schematic diagram of the Eco-HAB

且,通过 Eco-HAB 实验对小鼠进行为期 10 d 的观察,结果报告 B6 小鼠能形成稳定的社会结构等级,而 BTBR 小鼠却不能形成优势地位^[32]。

综上所述,通过采取 Eco-HAB 实验能在探索中观察到小鼠形成的等级结构和优势地位。在生态系统中加入丰富的环境因素有助于提高 BTBR 的社交能力^[32]。

3 治疗 ASD 社会互动障碍的研究现状

在对 ASD 小鼠模型研究中,社会互动行为干预主要可以分为非药物干预和药物干预。非药物干预主要是通过一些环境、饮食及运动等方式对小鼠进行物理干预,是一种慢性干预。而药物干预是指通过给药的方式,如外部注射、服用抑制性或激活性的药物等,探索药理学手段对小鼠社会互动行为的影响。

3.1 非药物干预

(1) 环境干预。通过富集环境 (environmental enrichment, EE) 的方式对 BTBR 小鼠进行了住房条件干预。婴儿期 BTBR 小鼠被随机分配到标准环境 (standard environment, SE) 或 EE 住房条件,并接受为期 17 周的行为评估。通过三箱社交实验结果表明 BTBR 小鼠在 EE 中,增加了社会互动行为^[38]。值得注意的是,EE 能够改善小鼠的社会偏好,但不影响小鼠的社会识别。另外,Shank3^{ΔC/ΔC} 小鼠在 EE 中也观察到类似的社会互动行为的改善^[33]。

(2) 饮食干预。研究者通过饮食改变或营养补

充的方式干预 ASD 症状,通过生酮饮食 (ketogenic diets, KD),在三箱社交实验中改善了 BTBR 小鼠的社会识别^[39]。并且在临床试验中也观察到社会功能的改善,一份病例报告显示,当一名儿童接受 KD 治疗并发癫痫时,ASD 症状有显著改善^[40]。同样,高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 干预在三箱社交实验中增加了 BTBR 的社会互动行为^[41]。这很可能是通过调节肠道微生物群条件,从而维持中枢神经系统内的稳态来实现^[42-44]。

(3) 运动干预。研究报告了游泳能改善 Shank3 KO 小鼠的学习和社会记忆、海马神经发育等方面的异常^[45],但通过跑轮运动的方式对 BTBR 小鼠进行干预,结果表明运动并没有显著减弱 BTBR 小鼠的社会互动缺陷^[46]。这提示对运动模式的选择也会影响社会互动行为的干预效果。而在一些临床试验研究中,除了运动干预对 ASD 有积极影响外,目前还没有关于运动干预的具体建议^[47]。

3.2 药物干预

兴奋性/抑制性 (E/I) 神经传递失衡是自闭症样行为的一个焦点机制^[48]。E-I 平衡是由以谷氨酸能为代表的兴奋性递质系统和以 γ -氨基丁酸能为代表的抑制性递质系统的协同作用,在神经回路的构建中发挥关键作用^[49]。研究者用脑电图 (electroencephalogram, EEG) 检测到 ASD 患者脑内广泛的兴奋性改变,存在 E-I 失衡;而动物实验表明,局部兴奋或抑制性因素改变引起的 E-I 失衡也会导致 ASD 小鼠社会互动障碍^[50]。药物干预主要

通过调节神经传递的 E-I 平衡来干预 ASD 的社会互动缺陷。

(1) 阿巴氯芬 (Arbaclofen), 也称 STX209。研究者对 BTBR 小鼠分别进行急性 1.0、3.0 和 5.0 mg/kg 的阿巴氯芬干预, 通过三箱社交实验结果显示阿巴氯芬干预增加了 BTBR 小鼠的社会互动行为^[51], 另一项研究报告显示, 急性 1.5 mg/kg 阿巴氯芬干预未能改善 BTBR 小鼠的社会互动缺陷^[52], 这可能受到干预剂量和干预周期的影响。目前, 阿巴氯芬正在进行 II 期临床试验^[53], 150 名 5~21 岁的 ASD 参与者接受阿巴氯芬干预, 在文兰适应行为量表 II (vineland adaptive behavior scales II, VASB-II) 的结果中社会互动行为得到很好的改善^[54]。

(2) 催产素 (oxytocin, OXT)。OXT 与催产素受体 (oxytocin receptor, OXTR) 之间的相互作用, 能够促进社会互动行为^[55]。研究者对 Shank3^{-/-} 小鼠进行短期急性 OXT 鼻内给药, 能够改善小鼠的社会互动行为, 但其长期稳定的 OXT 干预及在其他 ASD 小鼠模型的适用性仍需进一步探讨^[56]。尽管临床试验存在争议, 但有研究强调了 OXT 干预婴儿 ASD 的治疗价值^[57]。在短期急性的治疗中, 成人 ASD 患者的症状得以改善^[58], 但在长期稳定的治疗中, 其社会功能没有得到改善^[59]; 最近对 ASD 儿童的 OXT 干预研究显示, 社会和认知功能亦没有改善^[55]。OXT 单一治疗的不理想结果, 以后可能考虑联合治疗的有效性^[60]。尽管 OXT 有很大的前景, 但它在 ASD 患者中的应用目前还不是主要治疗方式^[61]。

(3) 大麻二酚 (cannabidiol, CBD)。CBD 急性治疗改善了 BTBR 小鼠的社会互动行为, 在三箱社交实验中增加了对陌生小鼠的探索时间^[62]。CBD 干预在临床试验中也取得积极效果, 一项随机对照试验 (randomized controlled trials, RCT) 研究了儿童和年轻人的 ASD 患者口服 CBD 制剂, 结果显示 CBD 干预在行为和社会交流方面有积极改善^[63]。

(4) 二甲双胍 (Metformin)。急性二甲双胍干预增强了 BTBR 小鼠对陌生小鼠的社会偏好, 而通过慢性给药饮水 28 d, 三箱社交实验结果显示, 其对 BTBR 小鼠社会偏好没有影响, 但较 C57 小鼠而言, 社会优势有所变化^[64]。VPA 暴露的小鼠和大鼠通过二甲双胍治疗也能观察到社会互动行为的改善^[65]。ASD 儿童比同龄非自闭症儿童的雄激素水平较高, 二甲双胍能够抑制这类雄激素, 在对 6~17

岁的儿童和青少年 ASD 参与者的临床试验研究中, 使用二甲双胍干预的青少年与非典型抗精神病药物使用相关的体重得到有效降低, 且耐受性良好^[66]。

此外, 亚硒酸钠 (sodium selenite, Se) 口服灌胃 28 d 后, 进行三箱社交实验结果显示, BTBR+Se 组社会互动行为要高于 BTBR 组, 这给慢性干预 ASD 提供研究方向^[67]。

4 总结及展望

在动物模型中, 影响社会互动行为的药物已有从 ASD 的临床前试验转移到临床试验。药理探究与药物研发在临床前研究取得积极成果有助于推进临床试验的应用发展^[68]。因此, 进一步优化和构建预测动物模型对药物发现更为重要。(1) 提升模型建构有效性。主要包括两个方面, 一是动物模型与 ASD 的有效接近程度。一般而言, 动物模型呈现的有效性越多, 对 ASD 的预测效果越好, 核心症状的稳定性越高, 那么其用药评估的作用也越好。二是动物模型与 ASD 的有效应用程度。即模型的药理学反应及非药理学反应与临床治疗表现相近程度, 能够为慢性干预提供预测性^[11]。(2) 扩大啮齿类动物模型范围。目前对动物模型的选择主要集中于成年雄性小鼠, 可将小鼠性别、周龄、品系等因素综合考虑; 另外, 研究表明大鼠能提供更复杂的社会互动行为进行临床前试验^[68], 这为扩大研究适用性提供可靠参考。(3) 横向研究与纵向研究相结合。三箱社交实验对小鼠社会互动行为进行横向时间取样, 可考虑与纵向研究相结合, 已有部分研究者使用 VBS 或 Eco-HAB 与三箱社交实验相结合的方式^[34], 能够获得不同时间节点的行为变化和发展趋势。同时, 也可以利用现代科技手段, 如实时小鼠跟踪器 (live mouse tracker, LMT), 一种基于人工智能、机器学习和行为测量方法的评估程序, 能够捕捉口鼻接触、鼻肛嗅探及后肢站立等精细动作^[69], 减少实验测量误差。(4) 急性干预与慢性干预相结合。研究表明, 一次药物干预进行三箱社交实验, 其实验效果是急性、短促的, 如需考虑药物干预的持久性、耐受性和安全性, 还需与慢性药物干预相结合的方式, 从而了解干预的稳定性。目前对药物干预的研究主要以急性、短促为主, 可考虑增加慢性干预, 并对药物的耐受性、安全性有更深入的了解。

参考文献:

- [1] LIU L, XU H, WANG J, et al. Cell type-differential modulation of prefrontal cortical GABAergic interneurons on low gamma rhythm and social interaction [J]. *Sci Adv*, 2020, 6 (30): eaay4073.
- [2] ACHTERBERGH L, PITMAN A, BIRKEN M, et al. The experience of loneliness among young people with depression: a qualitative meta-synthesis of the literature [J]. *BMC Psychiatry*, 2020, 20(1): 415.
- [3] BATTLE D E. Diagnostic and statistical manual of mental disorders [J]. *Codas*, 2013, 25(2):191-192.
- [4] CRAWLEY J N. Twenty years of discoveries emerging from mouse models of autism [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2023, 146: 105053.
- [5] MAENNER M J, WARREN Z, WILLIAMS A R, et al. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years-autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2020 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 2023, 72(2): 1-14.
- [6] 五彩鹿自闭症研究院. 中国自闭症教育康复行业发展状况报告 V [M]. 北京: 光明日报出版社, 2024. Colorful Deer Autism Research Institute. China autism education and rehabilitation industry development report V [M]. Beijing: Guangming Ribbon Publishing House, 2024.
- [7] NYRENIUS J, EBERHARD J, GHAZIUDDIN M, et al. Prevalence of autism spectrum disorders in adult outpatient psychiatry [J]. *J Autism Dev Disord*, 2022, 52 (9): 3769 -3779.
- [8] GRABRUCKER A M. Autism spectrum disorders [M]. Brisbane (AU): Exon Publications, 2021.
- [9] VAN DER HEIJDEN M E, GILL J S, SILLITOE R V. Abnormal cerebellar development in autism spectrum disorders [J]. *Dev Neurosci*, 2021, 43(3/4): 181-190.
- [10] 罗卓慧, 庞硕, 张连峰. 常见精神疾病的大、小鼠遗传模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31 (11): 119 -126. LUO Z H, PANG S, ZHANG L F. Research progress of genetic models of common mental diseases in rats and mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(11): 119-126.
- [11] 周荣易, 党伟利, 周正, 等. 孤独症谱系障碍动物模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(3): 380-386. ZHOU R Y, DANG W L, ZHOU Z, et al. Advances in research of animal models of autism spectrum disorders [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(3): 380-386.
- [12] LIU Y, DENG S L, LI L X, et al. A circuit from dorsal hippocampal CA3 to paravox nucleus mediates chronic social defeat stress-induced deficits in preference for social novelty [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(8): eabe8828.
- [13] 游晶晶, 王丹, 孙琳杉, 等. 腹侧 CA1 到外侧隔核的神经元投射参与调控小鼠的社交记忆 [J]. *神经解剖学杂志*, 2020, 36(4): 353-361. YOU J J, WANG D, SUN L S, et al. Projections from the ventral CA1 to the lateral septal nucleus are involved in regulating social memory in mice [J]. *Chin J Neuroanat*, 2020, 36(4): 353-361.
- [14] SATO M, NAKAI N, FUJIMA S, et al. Social circuits and their dysfunction in autism spectrum disorder [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28(8): 3194-3206.
- [15] QUIAN Q R. How are memories stored in the human hippocampus? [J]. *Trends Cogn Sci*, 2021, 25(6): 425-426.
- [16] COPE E C, WANG S H, WATERS R C, et al. Activation of the CA2-ventral CA1 pathway reverses social discrimination dysfunction in Shank3B knockout mice [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1750.
- [17] WEI X, WANG J, YANG E, et al. Efr3b is essential for social recognition by modulating the excitability of CA2 pyramidal neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121 (3): e2314557121.
- [18] DANG R, ZHOU Y, ZHANG Y, et al. Regulation of social memory by lateral entorhinal cortical projection to dorsal hippocampal CA2 [J]. *Neurosci Bull*, 2022, 38 (3): 318 -322.
- [19] LI J, SUN X, YOU Y, et al. *Auts2* deletion involves in DG hypoplasia and social recognition deficit: The developmental and neural circuit mechanisms [J]. *Sci Adv*, 2022, 8 (9): eabk1238.
- [20] MOHAMMADKHANI R, GHAREMANI R, SALEHI I, et al. Impairment in social interaction and hippocampal long-term potentiation at perforant pathway-dentate gyrus synapses in a prenatal valproic acid-induced rat model of autism [J]. *Brain Commun*, 2022, 4(5): feac221.
- [21] MA X, LI L, LI Z, et al. eEF2 in the prefrontal cortex promotes excitatory synaptic transmission and social novelty behavior [J]. *EMBO Rep*, 2022, 23(10): e54543.
- [22] JU J, LI X, PAN Y, et al. Adenosine mediates the amelioration of social novelty deficits during rhythmic light treatment of 16p11.2 deletion female mice [J]. *Mol Psychiatry*, 2024, 5: s41380-024-02596-4.
- [23] TAO K, CHUNG M, WATARAI A, et al. Disrupted social memory ensembles in the ventral hippocampus underlie social *Amnesia* in autism-associated Shank3 mutant mice [J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(4): 2095-2105.
- [24] CHIANG M C, HUANG A J Y, WINTZER M E, et al. A role for CA3 in social recognition memory [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 354: 22-30.
- [25] MENG H, LI Q, WANG J, et al. The expansion of newborn neurons in hippocampus improves social recognition deficit in a mouse model of autism [J]. *Front Psychiatry*, 2023, 14: 1162179.
- [26] YEATES D C M, LEAVITT D, SUJANTHAN S, et al. Parallel ventral hippocampus-lateral septum pathways differentially regulate approach-avoidance conflict [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3349.
- [27] BOVE M, IKE K, ELDERING A, et al. The Visible Burrow System; a behavioral paradigm to assess sociability and social withdrawal in BTBR and C57BL/6J mice strains [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 344: 9-19.

- [28] YASHIMA J, UEKITA T, SAKAMOTO T. The prelimbic cortex but not the anterior cingulate cortex plays an important role in social recognition and social investigation in mice [J]. *PLoS One*, 2023, 18(4): e0284666.
- [29] HUANG W C, ZUCCA A, LEVY J, et al. Social behavior is modulated by valence-encoding mPFC-amygdala sub-circuitry [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(2): 107899.
- [30] KUGA N, ABE R, TAKANO K, et al. Prefrontal-amygdalar oscillations related to social behavior in mice [J]. *eLife*, 2022, 11: e78428.
- [31] ARAKAWA H. Revisiting sociability: Factors facilitating approach and avoidance during the three-chamber test [J]. *Physiol Behav*, 2023, 272: 114373.
- [32] WINIARSKI M, KONDRAKIEWICZ L, KONDRAKIEWICZ K, et al. Social deficits in BTBR T+ Itrp3tf/J mice vary with ecological validity of the test [J]. *Genes Brain Behav*, 2022, 21(5): e12814.
- [33] PELEH T, IKE K G O, FRENTZ I, et al. Cross-site reproducibility of social deficits in group-housed BTBR mice using automated longitudinal behavioural monitoring [J]. *Neuroscience*, 2020, 445: 95–108.
- [34] POBBE R L, PEARSON B L, DEFENSOR E B, et al. Expression of social behaviors of C57BL/6J versus BTBR inbred mouse strains in the visible burrow system [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 214(2): 443–449.
- [35] ROULLET F I, LAI J K Y, FOSTER J A. *In utero* exposure to valproic acid and autism—a current review of clinical and animal studies [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2013, 36: 47–56.
- [36] ŠTEFÁNIK P, OLEXOVÁ L, KRŠKOVÁ L. Increased sociability and gene expression of oxytocin and its receptor in the brains of rats affected prenatally by valproic acid [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, 131: 42–50.
- [37] PUŚCIAN A, ŁĘSKI S, KASPROWICZ G, et al. Eco-HAB as a fully automated and ecologically relevant assessment of social impairments in mouse models of autism [J]. *eLife*, 2016, 5: e19532.
- [38] QUEEN N J, BOARDMAN A A, PATEL R S, et al. Environmental enrichment improves metabolic and behavioral health in the BTBR mouse model of autism [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 111: 104476.
- [39] OLIVITO I, AVOLIO E, MINERVINI D, et al. Ketogenic diet ameliorates autism spectrum disorders-like behaviors *via* reduced inflammatory factors and microbiota remodeling in BTBR T⁺ Itrp3^{tf}/J mice [J]. *Exp Neurol*, 2023, 366: 114432.
- [40] HERBERT M R, BUCKLEY J A. Autism and dietary therapy: case report and review of the literature [J]. *J Child Neurol*, 2013, 28(8): 975–982.
- [41] DENG W, LI F, KE H, et al. Effect of metformin in autistic BTBR T+Itrp3tf/J mice administered a high-fat diet [J]. *Brain Res Bull*, 2022, 183: 172–183.
- [42] PIETRZAK D, KASPEREK K, RĘKAWEK P, et al. The therapeutic role of ketogenic diet in neurological disorders [J]. *Nutrients*, 2022, 14(9): 1952.
- [43] JIANG Z, YIN X, WANG M, et al. Effects of ketogenic diet on neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Aging Dis*, 2022, 13(4): 1146–1165.
- [44] 董丽仙, 尹爱武, 李灿委, 等. 肠道菌群失调与自闭症谱系障碍的相关性研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(6): 95–101.
- DONG L X, YIN A W, LI C W, et al. Research progress on the correlation between gut microbiota and autism spectrum disorders [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(6): 95–101.
- [45] XU D, MENG Y, AN S, et al. Swimming exercise is a promising early intervention for autism - like behavior in Shank3 deletion rats [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(1): 78–90.
- [46] FAIRBURN D J, BAIAMONTE B A, GRAY B E, et al. Voluntary exercise attenuates nociceptive abnormalities with no significant alterations of social interaction deficits in the BTBR mouse model of autism [J]. *Behav Brain Res*, 2022, 420: 113727.
- [47] TOSCANO C V A, BARROS L, LIMA A B, et al. Neuroinflammation in autism spectrum disorders: Exercise as a “pharmacological” tool [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, 129: 63–74.
- [48] MEYZA K Z, BLANCHARD D C. The BTBR mouse model of idiopathic autism – Current view on mechanisms [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 76(Pt A): 99–110.
- [49] 石岳, 朱波, 黄宇光. 兴奋-抑制失衡与孤独症谱系障碍: 作用机制及治疗进展 [J]. *协和医学杂志*, 2023, 14(4): 844–849.
- SHI Y, ZHU B, HUANG Y G. Excitatory-inhibitory imbalance and autism spectrum disorder mechanism and treatment progress [J]. *Med J Peking Union Med Coll Hosp*, 2023, 14(4): 844–849.
- [50] PARK G, JEON S J, KO I O, et al. Decreased *in vivo* glutamate/GABA ratio correlates with the social behavior deficit in a mouse model of autism spectrum disorder [J]. *Mol Brain*, 2022, 15(1): 19.
- [51] SILVERMAN J L, PRIDE M C, HAYES J E, et al. GABA_B receptor agonist R-baclofen reverses social deficits and reduces repetitive behavior in two mouse models of autism [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2015, 40(9): 2228–2239.
- [52] SHARGHI S, FLUNKERT S, DAURER M, et al. Evaluating the effect of R-Baclofen and LP-211 on autistic behavior of the BTBR and *Fmr1*-KO mouse models [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1087788.
- [53] ERICKSON C A, VEENSTRA-VANDERWEELE J M, MELMED R D, et al. STX209 (arbaclofen) for autism spectrum disorders: an 8-week open-label study [J]. *J Autism Dev Disord*, 2014, 44(4): 958–964.
- [54] VEENSTRA-VANDERWEELE J, COOK E H, KING B H, et al. Arbaclofen in children and adolescents with autism spectrum disorder: a randomized, controlled, phase 2 trial [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(7): 1390–1398.
- [55] JANZ P, KNOFLACH F, BLEICHER K, et al. Selective oxytocin receptor activation prevents prefrontal circuit dysfunction and social behavioral alterations in response to chronic prefrontal cortex activation in male rats [J]. *Front Cell Neurosci*, 2023,

- 17: 1286552.
- [56] SZABÓ J, MLYNÁR M, FEJEŠ A, et al. Intranasal oxytocin in a genetic animal model of autism [J]. *Mol Psychiatry*, 2024, 29 (2): 342-347.
- [57] BERTONI A, SCHALLER F, TYZIO R, et al. Oxytocin administration in neonates shapes hippocampal circuitry and restores social behavior in a mouse model of autism [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(12): 7582-7595.
- [58] YAMASUE H, OKADA T, MUNESUE T, et al. Effect of intranasal oxytocin on the core social symptoms of autism spectrum disorder: a randomized clinical trial [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(8): 1849-1858.
- [59] MAYER A V, WERMTER A K, STROTH S, et al. Randomized clinical trial shows no substantial modulation of empathy-related neural activation by intranasal oxytocin in autism [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 15056.
- [60] KONG X J, LIU J, LIU K, et al. Probiotic and oxytocin combination therapy in patients with autism spectrum disorder: a randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot trial [J]. *Nutrients*, 2021, 13(5): 1552.
- [61] AISHWORIYA R, VALICA T, HAGERMAN R, et al. An update on psychopharmacological treatment of autism spectrum disorder [J]. *Neurotherapeutics*, 2022, 19(1): 248-262.
- [62] FERREIRA L F, PATHAPATI N, SCHULTZ S T, et al. Acute cannabidiol treatment enhances social interaction in adult male mice [J]. *Adv Drug Alcohol Res*, 2023, 3: 11163.
- [63] Palumbo J M, Heussler H, Duhig M J, et al. Longer-term tolerability and efficacy of ZYN002 cannabidiol transdermal gel in children and adolescents with autism spectrum disorder: an open-label phase 2 study (BRIGHT [ZYN2-CL-030]) [J]. *Pediatrics*, 2022, 60(10): S258.
- [64] GREENE S, BORDAS B, JIMENEZ P, et al. Therapeutic potential of metformin to ameliorate behavioral symptoms of autism [J]. *FASEB J*, 2021, 35(S1): fasebj.2021.35.S1.02837.
- [65] ATIA A A, ASHOUR R H, ZAKI M M, et al. The comparative effectiveness of metformin and risperidone in a rat model of valproic acid-induced autism, Potential role for enhanced autophagy [J]. *Psychopharmacology*, 2023, 240 (6): 1313-1332.
- [66] ANAGNOSTOU E, AMAN M G, HANDEN B L, et al. Metformin for treatment of overweight induced by atypical antipsychotic medication in young people with autism spectrum disorder: a randomized clinical trial [J]. *JAMA Psychiatry*, 2016, 73(9): 928-937.
- [67] WU H, LUAN Y, WANG H, et al. Selenium inhibits ferroptosis and ameliorates autistic-like behaviors of BTBR mice by regulating the Nrf2/GPx4 pathway [J]. *Brain Res Bull*, 2022, 183: 38-48.
- [68] CHADMAN K K, FERNANDES S, DILIBERTO E, et al. Do animal models hold value in Autism spectrum disorder (ASD) drug discovery? [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2019, 14(8): 727-734.
- [69] MAISTERRENA A, DE CHAUMONT F, LONGUEVILLE J E, et al. Female mice prenatally exposed to valproic acid exhibit complex and prolonged social behavior deficits [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2024, 131: 110948.

[收稿日期]2024-06-10