

魏秀楠,孙大娟,梁峻尉,等. AOM/DSS 诱导建立结肠炎-癌转化大鼠模型的组织学评价及肠道菌群分析 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1369-1378.

WEI X N, SUN D J, LIANG J W, et al. Histological evaluation and analysis of intestinal flora in a rat model of colitis-cancer transformation induced by azoxymethane/dextran sulfate sodium [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1369-1378.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.001

AOM/DSS 诱导建立结肠炎-癌转化大鼠模型的组织学评价及肠道菌群分析

魏秀楠¹, 孙大娟^{1,2*}, 梁峻尉², 刘佳卉¹, 李公义¹, 迟莉丽²

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

【摘要】 目的 本研究旨在建立一种表征炎症性肠病炎-癌转化的大鼠模型,并探讨其肠道菌群特征。**方法** 将成年雄性 Wistar 大鼠随机分为空白组及葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 不同干预周期的模型组 (M1、M2、M3 组)。模型组大鼠均采用单次腹腔注射氧化偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM) 联合自由饮用 3 个周期 DSS 的方法诱导结肠炎-癌转化,期间记录疾病活动指数 (disease active index, DAI) 评分,于 DSS 第 1、2、3 周期结束时分别处死 M1、M2、M3 组大鼠,留取脾、结肠组织及结肠内容物。采用苏木素-伊红 (HE) 染色、透射电子显微镜观察等方法对各组大鼠结肠组织学损伤及癌变情况进行评估,并采用 16S rRNA 测序技术分析其肠道菌群的特征性改变。**结果** AOM/DSS 造模导致了显著的 DAI 评分上升、结肠缩短及脾指数升高。从 M1 组到 M3 组,肠黏膜屏障逐渐破坏,病理评分逐渐升高,依次出现了异常隐窝灶、息肉、低级别上皮内瘤变、高级别上皮内瘤变和黏膜内癌,同时,该病理演变过程表现出与人体炎症性肠病癌变相似的特征。在 16S rRNA 测序中,采用 Wilcoxon 和 ALDEx2 两种差异丰度检验工具筛选得到以拟杆菌门 (Bacteroidetes)、单球菌属 (*Monoglobus*) 为代表的菌群丰度变化可能参与了结肠炎-癌转化的进展,并观察到差异菌群的功能主要富集到了脂质代谢、碳水化合物代谢等代谢途径。**结论** AOM/DSS 诱导建立的大鼠模型能较贴切地动态模拟结肠炎-癌转化的病理特点,同时伴随着特定肠道菌群丰度的改变,可能与菌群介导的代谢途径密切相关。

【关键词】 结肠炎相关性结直肠癌;结肠炎-癌转化;组织病理学;16S rRNA 测序;肠道菌群

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1369-10

Histological evaluation and analysis of intestinal flora in a rat model of colitis-cancer transformation induced by azoxymethane/dextran sulfate sodium

WEI Xiunan¹, SUN Dajuan^{1,2*}, LIANG Junwei², LIU Jiahui¹, LI Gongyi¹, CHI Lili²

(1. First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

Corresponding author: SUN Dajuan. E-mail: sdj20122015@163.com

【Abstract】 Objective The aim of this study was to establish a rat model of inflammation-cancer transformation of inflammatory bowel disease (IBD) and to explore the associated characteristics of the intestinal flora. **Methods** Adult

【基金项目】 国家自然科学基金 (82205057, 81673969), 济南市科技计划 (202134024), 山东中医药大学青年科研创新团队项目。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82205057, 81673969), the Science and Technology Plan of Jinan (202134024), the Youth Scientific Research Innovation Team Project of Shandong University of Traditional Chinese Medicine.

【作者简介】 魏秀楠,女,在读博士研究生,研究方向:炎症性肠病的基础与临床。Email:1404073775@qq.com

【通信作者】 孙大娟,女,博士,副主任医师,研究员,硕士生导师,研究方向:中西医结合诊治消化系统疾病的基础与临床。

Email:sdj20122015@163.com

male Wistar rats were divided randomly into control and model groups (M1, M2, M3) with different dextran sulfate sodium (DSS) intervention cycles. Colitis-cancer transformation was induced in all rats in the model group by a single intraperitoneal injection of azoxymethane (AOM) combined with free drinking of DSS in different cycles, and disease activity index (DAI) scores were recorded. Rats in the M1, M2 and M3 groups were killed at the end of the first, second, and third cycles of DSS, respectively, and spleen and colon tissues and colon contents were collected. Histological damage and colon carcinogenesis were evaluated in each group using hematoxylin and eosin staining and transmission electron microscopy. Characteristic changes in the intestinal flora were analyzed by 16S rRNA sequencing. **Results** AOM/DSS administration significantly increased the DAI score, shortened the colon, and increased the spleen index. The intestinal mucosal barrier was progressively destroyed from groups M1 to M3, and the pathological score was gradually increased. Abnormal crypt foci, polyps, low- and high-grade intraepithelial neoplasia, and mucosal carcinoma appeared in turn, while the pathological process showed similar characteristics to carcinogenesis in human inflammatory bowel disease. Screening using 16S rRNA sequencing with two differential abundance testing tools, Wilcoxon and ALDEx2, indicated that changes in flora abundance represented by *Bacteroidetes* and *Monoglobus* may be involved in the progression of colitis-cancer transformation. The functions of the differential flora were mainly enriched in metabolic pathways, such as lipid and carbohydrate metabolism. **Conclusions** The current rat model induced by AOM/DSS can dynamically simulate the pathological characteristics of colitis-cancer transformation, accompanied by changes in the abundance of specific intestinal flora, which may be closely related to the metabolic pathways mediated by the flora.

【Keywords】 colitis associated colorectal cancer; colitis-cancer transformation; histopathology; 16S rRNA sequencing; intestinal flora

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

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 可通过“慢性炎症反应-低度异型增生-高度异型增生-癌”的序列演进过程发展为结肠炎相关性结直肠癌 (colitis-associated colorectal cancer, CAC), 癌变率高达 3.7%^[1]。CAC 约占 IBD 患者所有死亡的 15%, 同时也是导致 IBD 人群行结肠切除术的主要原因^[2]。目前 IBD 癌变的机制尚未阐明, 并缺乏有效的防治手段。当前的研究普遍认为持续的组织学炎症是导致 CAC 的主要原因, 但其内在机制尚未完全揭示^[3-5]。研究表明, 慢性结肠炎症诱导的微生物组改变可能是炎-癌转化的驱动因素, 但较少研究关注炎-癌转化过程中肠道微生物组的改变^[6-7]。

葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 是目前最常用的诱导结肠炎模型的化学试剂^[8]。氧化偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM) 是一种致癌剂, 可导致碱基错配, 用于诱导自发性结直肠癌。AOM 单独诱导癌症造模周期长 (30 周), 而腹腔注射 AOM 联合反复施加 DSS 不仅可以缩短造模周期, 还能模拟持续、复发的组织学炎症^[9]。目前, AOM/DSS 诱导 CAC 的方法在小鼠身上已经运用得颇为成熟, 能够短期 (2 ~ 3 个月) 复刻多枚结肠肿瘤, 成瘤率较高^[10]。但既往研究均着眼于 CAC 成瘤后的干预, 鲜少对炎-癌转化动态过程的研究。本研究采用 AOM/DSS 诱导炎-癌转化不同阶段的大鼠模型, 从

组织学角度评估肠道损伤及癌变情况, 并分析其肠道菌群的特征性改变, 为从不同时期干预结肠炎-癌转化的基础研究提供方法参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 16 只, 7 ~ 8 周龄, 体重 200 ~ 250 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。将所有大鼠饲养于山东中医药大学附属医院实验动物中心【SYXK(鲁)2023-0031】, 屏障环境: 温度 (21 ± 1) °C, 湿度 (50 ± 5) %, 12 h/12 h 光暗循环。整个实验过程中, 大鼠可自由进食和饮水。实验操作均符合实验动物护理和使用指南的 3R 原则, 本实验已通过山东中医药大学附属医院动物伦理委员会审核批准 (AWE-2022-025)。

1.1.2 主要试剂与仪器

AOM (Sigma, 美国), DSS (MP Biomedicals, 分子量: 36 ~ 50 kDa, 美国), 10% 福尔马林固定液 (索莱宝, 中国), 2.5% 戊二醛固定液 (兰杰柯, 中国), 醋酸铀 (中兴百瑞, 中国), 醋酸铅 (启光科贸, 中国), 苏木素染色试剂盒 (索莱宝, 中国), 伊红染色试剂盒 (索莱宝, 中国), DNA 提取试剂盒 (Omega Bio-

Tek, 美国), NEXTflex® DNA 快速建库试剂盒 (Bioo Scientific, 美国)。

Nanodrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, 美国), 智跃 WS-10 数字化全景扫描仪 (江苏智跃医疗科技有限公司, 中国), JEM-1200EX 透射电子显微镜 (JEOL, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 构建结肠炎-癌转化大鼠模型

适应性喂养后, 将大鼠随机分为空白组 ($n = 4$) 和模型组 ($n = 12$)。实验方案参考 DE ROBERTIS 等^[10]的研究制定, 在实验开始第 1 天, 模型组大鼠以 AOM 12.5 mg/kg 腹腔注射, 然后随机分为 M1、M2、M3 三组 ($n = 4$)。7 d 后, 模型组大鼠均自由饮用 3% DSS 溶液 5 d, 然后撤掉 DSS 换成无菌蒸馏水, 16 d 后留取 M1 组样本; M2、M3 组继续自由饮用 2% DSS 溶液 5 d, 然后撤掉 DSS 换成无菌蒸馏水, 16 d 后留取 M2 组样本; M3 组继续自由饮用 2% DSS 溶液 5 d, 然后撤掉 DSS 换成无菌蒸馏水, 9 d 后留取 M3 组样本。

1.2.2 样本采集

收集各组大鼠脾、结肠及结肠内容物。脾称重用于计算脾指数, 计算公式: 脾指数 = 脾重量 (mg)/体重 (g)。测量结肠长度, 然后纵向剖开, 用生理盐水清洗, 观察成瘤病灶。自肛门向上 5 ~ 7 cm 的位置切下 0.5 cm 的远端结肠置于戊二醛固定液中, 其余结肠组织放在福尔马林溶液中固定。新鲜结肠内容物立即冻存于 -80 °C 冰箱, 之后转移至液氮。

1.2.3 疾病活动指数

在整个实验周期中, 每天记录大鼠的结肠炎表现, 计算其疾病活动指数 (disease activity index, DAI): (1) 体重减轻 (0 分, 无; 1 分, < 5%; 2 分, 5% ~ 10%; 3 分, 10% ~ 20%; 4 分, > 20%); (2) 大便粘稠度 (0 分, 正常; 2 分, 大便松散; 4 分, 水样便); (3) 便血 (0 分, 无出血; 2 分, 便潜血阳性, 但无肉眼血便; 4 分, 肉眼血便); 以上 3 个指标的平均值为 DAI 最终得分^[11]。

1.2.4 组织病理学评分

制备结肠组织石蜡切片并进行苏木素-伊红 (HE) 染色。按照盲法原则, 由两位不了解实验方案的病理学专家判定各样本肿瘤相关病变的程度和数量, 并从炎症、溃疡、增生以及损伤程度 4 个维度进行评分, 由轻到重分别有 0、2、15、40、80、100 分

的评分级别, 得分累加值为组织病理学总得分^[12]。

1.2.5 透射电子显微镜观察

参照 WANG 等^[13]的研究, 对结肠组织进行预处理、染色及制备超薄切片, 用醋酸铀和醋酸铅进行双重染色, 并使用 JEM-1200EX 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 拍照观察肠黏膜微绒毛、细胞间紧密连接等超微结构。

1.2.6 16S rRNA 测序

根据试剂盒说明书, 使用 DNA 提取试剂盒提取结肠内容物总 DNA。使用 Nanodrop ND-2000 测定 DNA 浓度, 并通过琼脂糖凝胶电泳进行质检。对 16S rRNA V3 ~ V4 区进行扩增, 扩增引物序列为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。提取扩增子, 进行纯化和定量, 然后通过 NEXTflex® DNA 快速建库试剂盒建库, 采用 Illumina Miseq PE300 平台测序。使用 fastp 软件 (v 0.19.6) 对原始测序序列进行质控, 使用 FLASH 软件 (v 1.2.7) 进行拼接。基于默认参数, 使用 Qiime2 流程中的 DADA2 插件对质控拼接之后的优化序列进行降噪处理。将所有样本序列数按最小样本序列数进行抽平。基于 silva138 数据库, 使用 Qiime2 中的 Naive bayes classify-sklearn 对 ASV 进行物种分类学分析。采用 mothur 软件 (v 1.3.0) 计算 α 多样性指数, 包括 Ace、Shannon 和 Simpson 指数。使用 PICRUST2 (v 2.2.0) 软件进行功能预测。

1.3 统计学分析

一般情况及组织学数据: 采用 SPSS Statistics 26.0 进行统计学分析, 通过 GraphPad Prism 9.4.0 进行可视化, 多组间两两比较, 方差齐采用单因素方差分析, 方差不齐采用非参数检验。16S rRNA 测序数据: 采用 Wilcoxon 秩和检验进行组间 α 多样性指数差异分析; 使用基于 bray-curtis 距离算法的 PCoA 分析和 NMDS 分析检验样本间微生物群落结构的相似性及差异性; 通过 Wilcoxon 秩和检验及 ALDEx2 检验分别分析门和属水平上具有显著性差异的物种; 使用 Benjamini-Hochberg 方法对 ALDEx2 检验的 P 值进行校正^[14]。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

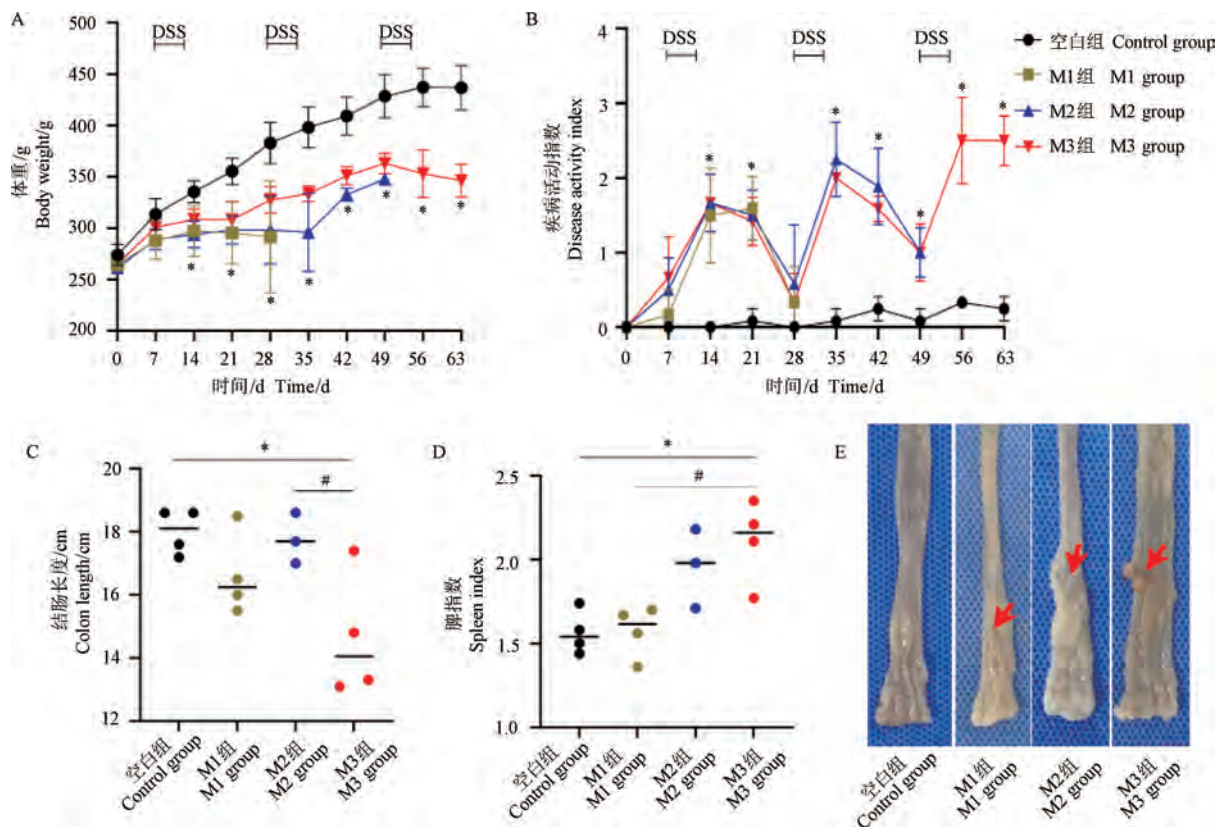
2 结果

2.1 结肠炎-癌转化一般情况比较

在整个实验周期中, M2 组 1 只大鼠在第 2 次

DSS 给药后因严重的体重下降、腹泻及便血死亡,其余大鼠被纳入后续实验分析。DSS 造成了明显的体重下降及 DAI 评分升高(图 1A,1B)。撤掉 DSS 后,模型组的 DAI 评分逐渐下降,其中,在第 1 个 DSS 循环结束时降到了与空白组相似的水平($P > 0.05$),而在后 2 个 DSS 循环结束时与空白组仍存在显著性差异($P < 0.05$),提示累积炎症负荷的增

加削弱了大鼠结肠炎的自愈能力。M3 组的结肠长度较空白组和 M2 组显著缩短($P < 0.05$,图 1C),脾指数均较空白组和 M1 组显著升高($P < 0.05$,图 1D),表明其结肠炎程度加重。此外,肉眼观察发现肿瘤相关性病灶的形态特征存在异质性,即有的表现为隆起性病变,有的则表现为平坦性病变,但病变均发生在远端结肠部分(图 1E)。



注:A:体重变化折线图;B:疾病活动指数评分变化折线图;C:结肠长度统计图;D:脾指数统计图;E:结肠病变代表性图片;与空白组相比,* $P < 0.05$;模型组之间相比,# $P < 0.05$ 。(下同)

图 1 AOM/DSS 诱导结肠炎-癌转化不同阶段的一般情况比较

Note. A. Line chart of body weight. B. Line chart of disease activity index score. C. Statistical diagram of colon length. D. Statistical diagram of spleen index. E. Representative pictures of colon lesions. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared between model groups, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Comparison of the general situation of different stages of colitis-cancer transformation induced by AOM/DSS

2.2 结肠炎-癌转化组织学评价

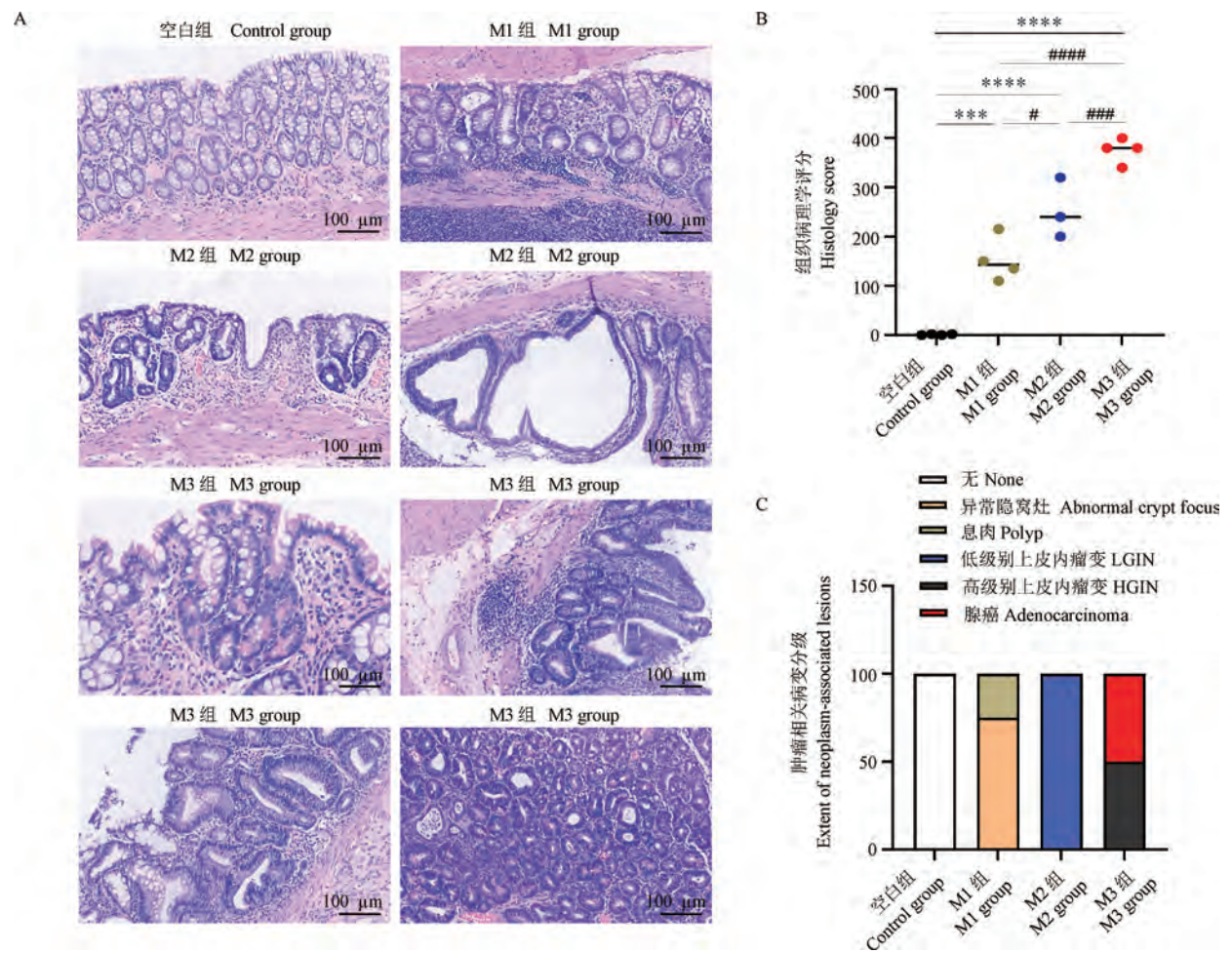
2.2.1 结肠组织病理学观察及评分

如图 2 所示,空白组可观察到正常的肠黏膜结构。各模型组可观察到炎性细胞浸润,以及隐窝极性消失、隐窝扩张、隐窝分支、隐窝脓肿、杯状细胞减少、潘氏细胞化生、绒毛状化生等与 IBD 相类似的特征性改变^[15]。此外,炎性及异型增生病灶以间断、多灶性分布为主,连续或弥漫性病灶较少见。在肿瘤相关病变分级方面,M1 组只能观察到异常隐窝灶(3/4)和息肉(1/4);M2 组大鼠均已形成低

级别上皮内瘤变(low-grade intraepithelial neoplasia, LGIN,4/4);M3 组各有 50%的大鼠形成了高级别上皮内瘤变(high-grade intraepithelial neoplasia, HGIN, 2/4)和黏膜内癌(2/4)。模型组大鼠的病理评分均较空白组显著升高,其中 M2 组较 M1 组显著升高($P < 0.05$),M3 组较 M2 组显著升高($P < 0.001$)。

2.2.2 肠黏膜屏障功能评价

TEM 观察肠黏膜纵切面的微观结构,结果显示空白组微绒毛排列密集整齐、细胞间连接致密、线粒体结构清晰散在分布。从 M1 组到 M3 组,肠黏膜



注:A: HE 染色代表性图;B:组织病理学评分统计图;C:肿瘤相关病变分级图;与空白组相比,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$;模型组之间相比,### $P < 0.001$,#### $P < 0.0001$ 。

图 2 AOM/DSS 诱导结肠炎-癌转化不同阶段的组织病理学观察及评分

Note. A. Representative picture of HE staining. B. Histology score chart. C. Map of extent of neoplasm-associated lesions. Compared with control group, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared between model groups, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$.

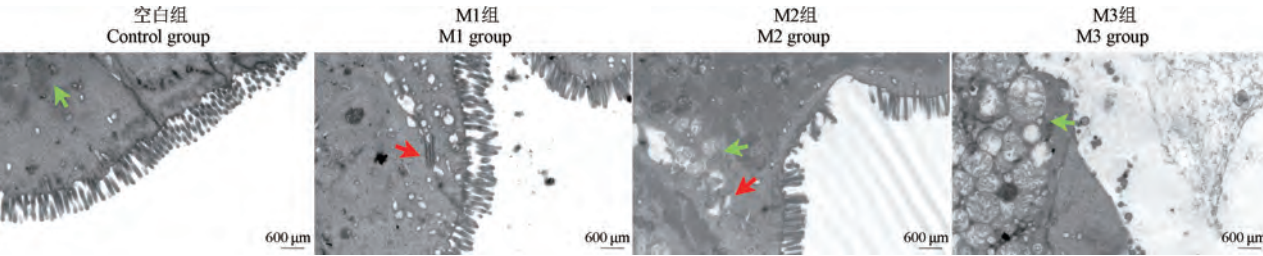
Figure 2 Histopathological observation and scoring of different stages of colitis-cancer transformation induced by AOM/DSS

微绒毛逐渐减少直至缺失,细胞间连接变得松散,线粒体结构肿胀乃至结构消失(见图 3),表明肠上皮细胞出现功能障碍,黏膜屏障逐渐被破坏。

2.3 16S rRNA 测序分析

2.3.1 测序数据筛选

将空白组与 M3 组的结肠内容物进行 16S rRNA



注:绿色箭头:线粒体;红色箭头:细胞间紧密连接。

图 3 AOM/DSS 诱导结肠炎-癌转化不同阶段的肠黏膜 TEM 图像

Note. Green arrow. Mitochondria. Red arrow. Tight connection between cells.

Figure 3 TEM images of intestinal mucosa at different stages of colitis-cancer transformation induced by AOM/DSS

基因测序。空白组与 M3 组 8 个样本共得到 430 293 个优化序列,178 560 040 个碱基,平均序列长度为 415 bp。对得到的测序数据进行物种筛选,按最小样本序列数 18 614 进行抽平。抽平后,每个样本的物种覆盖度仍可达 99.9% 以上。最终得到的有效序列用于生物信息学及统计学分析。

2.3.2 α 多样性分析

与空白组相比,用于表征物种多样性的 Shannon 指数在 M3 组显著降低 ($P < 0.05$)、Simpson 指数在 M3 组显著升高 ($P < 0.05$);用于表征物种丰富度的 Ace 指数在 M3 组显著降低 ($P < 0.05$) (图 4)。以上结果表明 AOM/DSS 造模导致

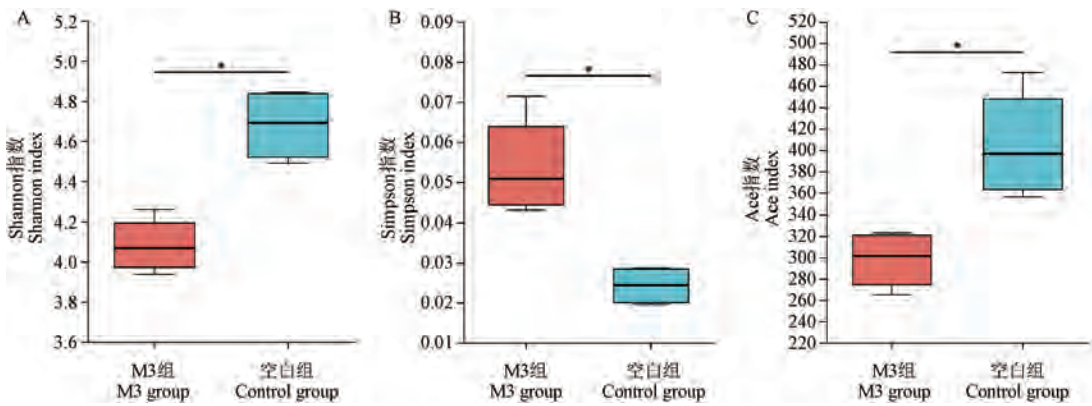
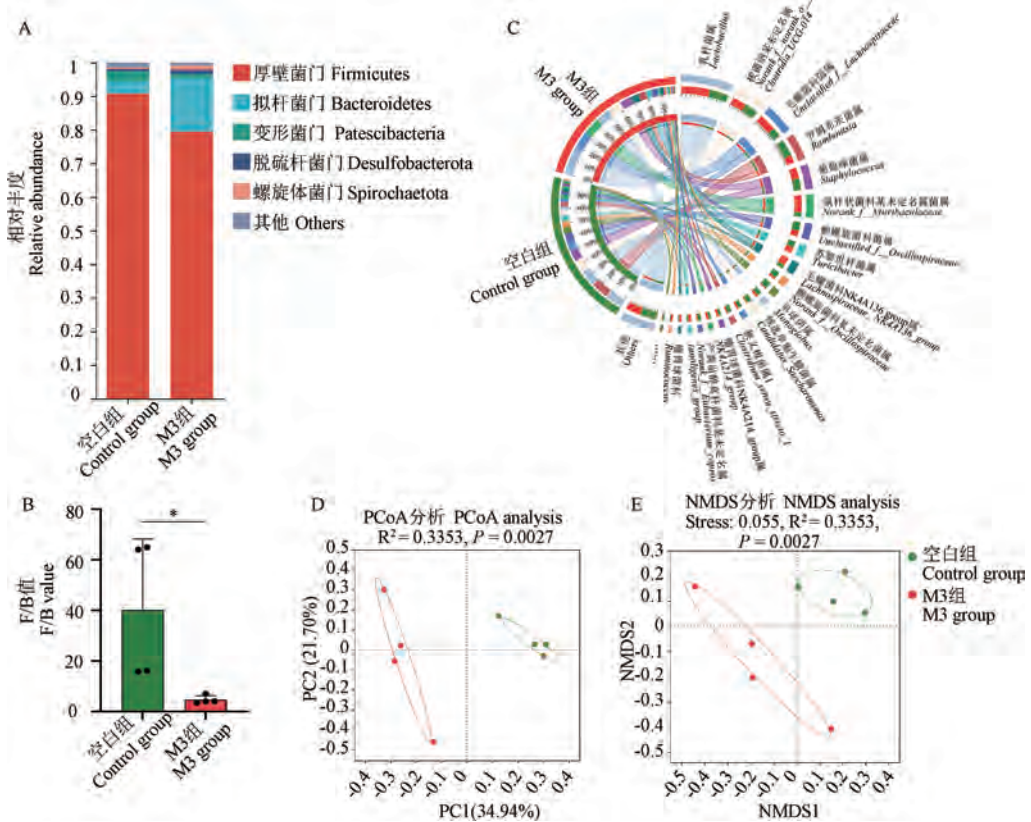


图 4 α 多样性比较

Figure 4 Comparison of α diversity



注:A:肠道菌群在门水平上的相对丰度柱状图;B:F/B 值统计图;C:肠道菌群在属水平上的相对丰度 circos 图;D:基于 bray_curtis 的 PCoA 聚类分析;E:基于 bray_curtis 的 NMDS 聚类分析。

图 5 物种组成及聚类分析

Note. A. Histogram of relative abundance of intestinal flora at phylum level. B. Statistical diagram of F/B value. C. Circos diagram of relative abundance of intestinal flora at genus level. D. PCoA analysis based on bray_curtis. E. NMDS analysis based on bray_curtis.

Figure 5 Species composition and cluster analysis

肠道菌群的多样性及丰富度下降。

2.3.3 物种组成及聚类分析

各样本的物种组成在门水平上丰度最高的前 5 位分别是厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Patescibacteria)、脱硫杆菌门 (Desulfobacterota)、螺旋体门 (Spirochaetota) (图 5A)。特别的是, M3 组 Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) 值显著低于空白组 ($P < 0.05$, 图 5B)。物种组成在属水平上丰度最高的前 5 位分别为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、梭菌纲某未定名属 (*Norank_f__norank_o__Clostridia_UCG-014*)、毛螺菌科菌属 (*Unclassified_f__Lachnospiraceae*)、罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) (图 5C)。对物种组成进行的 PCoA 分析 (图 5D) 及 NMDS 分析 (图 5E) 显示两组组内表现为良好的聚类、组间表现为良好的分离, 表明 AOM/DSS 显著改变了大鼠的菌群结构。

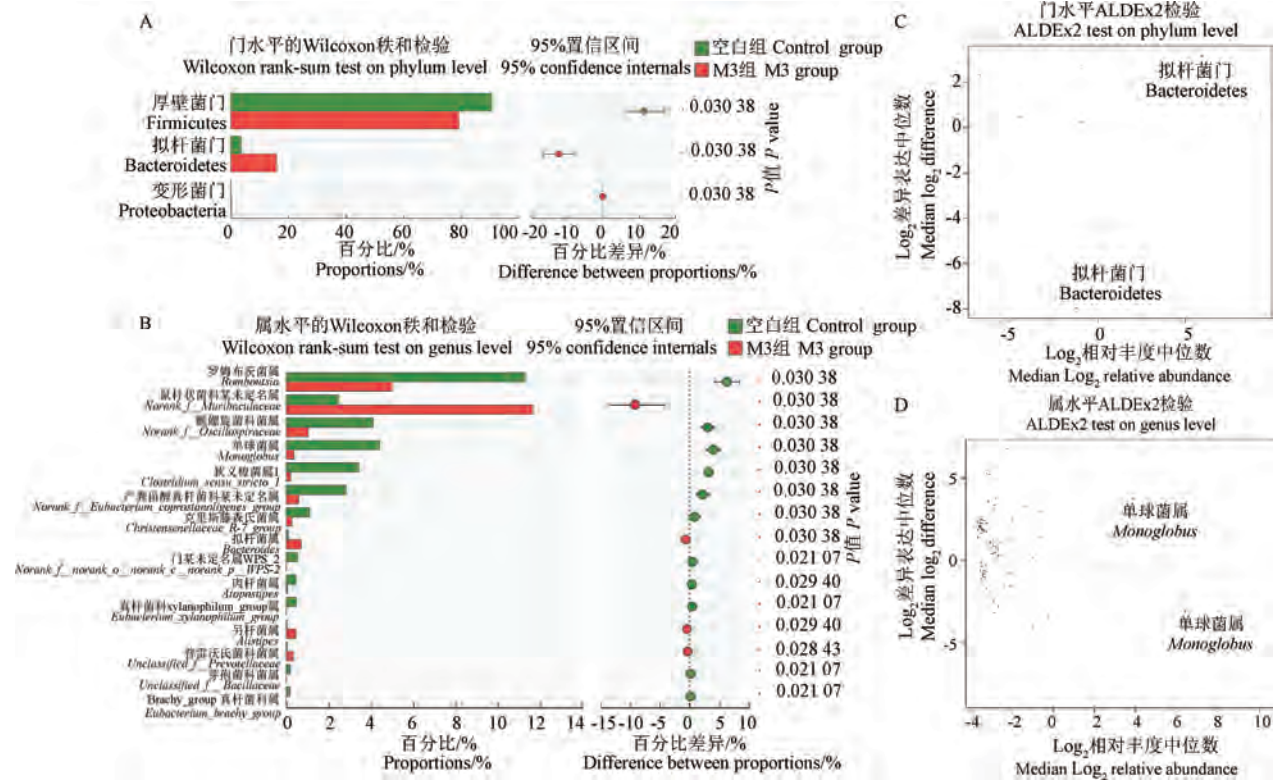
2.3.4 差异物种分析

采用 Wilcoxon 秩和检验及 ALDEx2 检验对门水

平和属水平的差异物种进行分析。Wilcoxon 检验结果显示, 在门水平上, 与空白组相比, M3 组 Firmicutes 丰度显著降低, Bacteroidetes、Proteobacteria 丰度显著增高 (图 6A); 在属水平上, M3 组鼠杆状菌科某未定名属 (*Norank_f__Muribaculaceae*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、另枝菌属 (*Alistipes*)、普雷沃氏菌科菌属 (*Unclassified_f__Prevotellaceae*) 丰度显著增高, 而 *Romboutsia*、颤螺旋菌科菌属 (*Norank_f__Oscillospiraceae*)、单球菌属 (*Monoglobus*)、克里斯滕森氏菌属 (*Christensenellaceae_R-7_group*)、肉杆菌属 (*Atopostipes*) 等丰度显著降低 (图 6B)。ALDEx2 检验结果显示, 与空白组相比, M3 组 Bacteroidetes 丰度显著增高 (图 6C), *Monoglobus* 丰度显著降低 (图 6D)。

2.3.5 差异菌群的 COG 富集分析

PICRUSt2 的 COG 功能预测结果见图 7, 差异菌群的功能富集到了转录、翻译、细胞周期控制、细胞骨架、翻译后修饰等多个生物学过程, 特别的是, 其



注: A: 基于 Wilcoxon 秩和检验门水平的差异菌群; B: 基于 Wilcoxon 秩和检验属水平的差异菌群; C: 基于 ALDEx2 检验门水平的差异菌群; D: 基于 ALDEx2 检验属水平的差异菌群。

图 6 基于 Wilcoxon 秩和检验和 ALDEx2 检验的差异物种分析

Note. A. Differential flora at phylum level based on Wilcoxon rank-sum test. B. Differential flora at genus level based on Wilcoxon rank-sum test. C. Differential flora at phylum level based on ALDEx2 test. D. Differential flora at genus level based on ALDEx2 test.

Figure 6 Differential species analysis based on Wilcoxon rank-sum test and ALDEx2 test

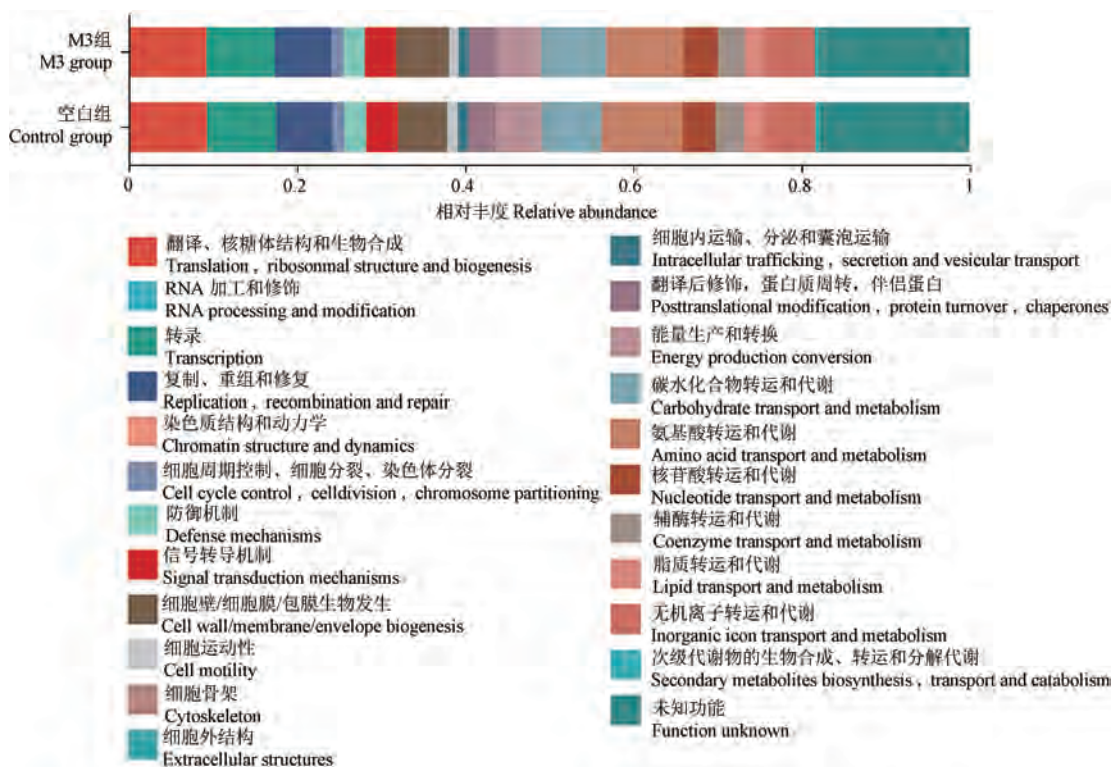


图 7 COG 功能预测图

Figure 7 Diagram of COG function prediction

中包含了诸多代谢相关途径,如脂质转运和代谢、碳水化合物转运和代谢、氨基酸转运和代谢、核苷酸转运和代谢等。

3 讨论

本研究采用 AOM/DSS 体内诱导建立了大鼠结肠炎-癌转化模型。AOM/DSS 造模导致了明显的结肠缩短和脾指数升高。结肠长度缩短被认为是 DSS 诱导的结肠炎模型的标志^[16]。脾指数反映大鼠的炎症与贫血程度^[17]。从 M1 组到 M3 组,结肠长度越来越短,脾指数越来越高,表征了越来越严重的炎症与失血,这与本研究中 DAI 评分及体重的变化趋势一致。从 M1 组到 M3 组,结肠组织病理评分逐渐升高,病理特征譬如隐窝脓肿、潘氏细胞化生、结肠黏膜绒毛化等改变均符合人体 IBD 的特征,表明 AOM/DSS 造模可以部分模拟人体 IBD 的病理过程^[18]。在肿瘤相关病变方面,从 M1 组到 M3 组,依次出现了异常隐窝灶、息肉、LGIN、HGIN、黏膜内癌,这与人体结肠炎-异型增生-癌的癌变序列是相似的。M3 组形成了 50% 的 HGIN 和 50% 的黏膜内癌,癌组织并未发生浸润性生长,表征了一种较早期阶段的肿瘤特征。无论是肉眼观察还是组织病

理学结果均显示,结肠病变的形态学特征存在异质性,即有的表现为隆起性病变,有的则表现为平坦性病变。COOPER 等^[19]研究表明,两种形态异型增生的遗传特征有所不同,扁平病变具有更高的癌变风险。

对 16S rRNA 测序得到的物种信息进行分析,发现与空白组相比,AOM/DSS 造模显著改变了大鼠的菌群结构,并且降低了肠道菌群多样性。在差异菌群分析方面,目前尚无差异丰度 (differential abundance, DA) 检验方法选择的金标准,LEfSe 及 Wilcoxon 检验是科学研究中最常用的。但近期 NEARING 等^[20]比较 14 种不同的 DA 检验方法发现其结果存在较大的异质性,其中,LEfSe 有较高的假阳性率,而 ALDEx2 和 ANCOM-II 的假阳性率最低,并建议使用多种 DA 检验方法以提高分析结果的可靠性。因此,本研究进行了两种检验模式下 (Wilcoxon 和 ALDEx2) 具有显著性差异的物种以互相印证。

Wilcoxon 检验在门水平鉴定出 3 种差异菌群,在属水平鉴定出 15 种差异菌群,而 ALDEx2 检验在门水平和属水平仅各鉴定出 1 种。但 ALDEx2 检验鉴定出的 2 种菌群均包含在 Wilcoxon 检验鉴定出

的菌群中,分别是 *Bacteroidetes* 和 *Monoglobus*。*Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 是人体肠道中两种最主要的细菌,占肠道菌群总数的 90% 以上^[21]。尽管目前研究表明,F/B 值的变化表征着肠道微生态的失衡,但其在 AOM/DSS 模型中的变化趋势尚无定论^[22-23]。WANG 等^[23]在 AOM/DSS 诱导的小鼠模型中发现 F/B 值降低,与本研究结果一致。在属水平上,ALDEx2 检验显示 *Monoglobus* 丰度显著降低。*Monoglobus* 可降解膳食纤维产生丁酸,丁酸是为肠上皮细胞提供能量的主要短链脂肪酸,并具有抗结肠炎的作用^[24]。LI 等^[25]的研究表明,*Monoglobus* 在健康人群肠道中显著富集。WU 等^[26]发现菊粉可通过调节 *Monoglobus* 的丰度来改善肠道免疫,并促进短链脂肪酸产生。白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 是一种重要的抗炎细胞因子,在预防炎症和维持免疫稳态方面发挥重要作用,IL-10^{-/-}小鼠已被广泛用作实验性结肠炎模型,WANG 等^[27]研究发现,*Monoglobus* 的相对丰度与 IL-10 呈正相关,表明该菌属具有直接或间接抑制炎症的生物活性。但 *Monoglobus* 在 IBD 及 CAC 中鲜有报道。本研究通过两种 DA 检验工具,证实了 *Monoglobus* 在 AOM/DSS 诱导的炎-癌转化大鼠模型中显著减少,这个新的发现将丰富对 IBD 癌变中肠道微生态改变的认识。

此外,Wilcoxon 检验表明,在属水平上,M3 组的 *Bacteroides*、*norank_f_Muribaculaceae*、*Alistipes* 等丰度显著增高,*Romboutsia*、*Christensenellaceae_R-7_group* 等丰度显著降低。KORDAHI 等^[28]近期研究发现,*Bacteroides* 在管状腺瘤性息肉附近的黏膜中显著富集,黏膜菌群中的脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 可通过激活核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 诱导炎症促进 CAC 早期阶段的进展。WANG 等^[29]研究表明,*Norank_f_Muribaculaceae*、*Alistipes* 在化疗诱导的 CAC 小鼠结肠炎中显著富集,并且与脂质代谢密切相关。既往研究显示,代谢途径可影响肠道稳态,在 IBD 和 CAC 的发病中扮演重要角色^[29-31]。本研究中,肠道菌群的功能预测包含了诸多代谢相关通路,例如碳水化合物转运和代谢、核苷酸转运和代谢、脂质转运和代谢等,表明肠道菌群可能通过影响其自身和宿主的代谢稳态介导了结肠的炎-癌转化,当然这需要进一步地深入研究。

综上,通过单次腹腔注射 AOM 联合自由饮用 3 个循环 DSS 的方案,在组织学上能较贴切地模拟

“慢性炎症反应-低度异型增生-高度异型增生-癌”的序列演进过程,可将其作为结肠炎-癌转化的动物模型运用。而在 AOM/DSS 诱导后丰度显著改变的几类菌群,特别是 *Bacteroidetes* 和 *Monoglobus*,很可能是影响结肠炎-癌转化的关键菌群。未来可扩大样本量,对诱导周期的更多节点进行比较,从而得到更加动态、全程的炎-癌转化过程,为干预性研究的用药时机选择提供参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] ROGLER G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 2014, 345(2): 235-241.
- [2] SHAH S C, ITZKOWITZ S H. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: mechanisms and management [J]. Gastroenterology, 2022, 162(3): 715-730.
- [3] YVELLEZ O V, RAI V, SOSSENHEIMER P H, et al. Cumulative histologic inflammation predicts colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a validation study [J]. Inflamm Bowel Dis, 2021, 27(2): 203-206.
- [4] CHOI C R, AL BAKIR I, DING N J, et al. Cumulative burden of inflammation predicts colorectal neoplasia risk in ulcerative colitis: a large single-centre study [J]. Gut, 2019, 68(3): 414-422.
- [5] CURTIUS K, KABIR M, AL BAKIR I, et al. Multicentre derivation and validation of a colitis-associated colorectal cancer risk prediction web tool [J]. Gut, 2022, 71(4): 705-715.
- [6] SAKAI K, DE VELASCO M A, KURA Y, et al. Transcriptome profiling and metagenomic analysis help to elucidate interactions in an inflammation-associated cancer mouse model [J]. Cancers, 2021, 13(15): 3683.
- [7] KANG M, MARTIN A. Microbiome and colorectal cancer: Unraveling host-microbiota interactions in colitis-associated colorectal cancer development [J]. Semin Immunol, 2017, 32: 3-13.
- [8] LÓPEZ-ESTÉVEZ S, LÓPEZ-TORRELLARDONA J M, PARERA M, et al. Long-lasting visceral hypersensitivity in a model of DSS-induced colitis in rats [J]. Neurogastroenterol Motil, 2022, 34(11): e14441.
- [9] NEUFERT C, BECKER C, NEURATH M F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression [J]. Nat Protoc, 2007, 2(8): 1998-2004.
- [10] DE ROBERTIS M, MASSI E, POETA M L, et al. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies [J]. J Carcinog, 2011, 10: 9.
- [11] ZHOU Y, FENG Y, CEN R, et al. San-Wu-Huang-Qin decoction attenuates tumorigenesis and mucosal barrier impairment in the AOM/DSS model by targeting gut microbiome [J]. Phytomedicine, 2022, 98: 153966.
- [12] KARKI R, MAN S M, SUBBARAO MALIREDDI R K S, et al.

- NLR3 is an inhibitory sensor of PI3K-mTOR pathways in cancer [J]. *Nature*, 2016, 540(7634): 583–587.
- [13] WANG Y H, YU H, LIU T G, et al. Yinlai decoction protects microstructure of colon and regulates serum level of D-lactic acid in pneumonia mice fed with high-calorie and high-protein diet [J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29(8): 714–720.
- [14] BREZINA S, BORKOVEC M, BAIERL A, et al. Using fecal immunochemical cartridges for gut microbiome analysis within a colorectal cancer screening program [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2176119.
- [15] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组病理分组, 叶子茵, 肖书渊, 等. 中国炎症性肠病病理诊断专家指导意见 [J]. *中华炎症肠病杂志*, 2021, 5(1): 5–20.
- Pathology Group, Inflammatory Bowel Disease Group, Chinese Society of Gastroenterology, Chinese Medical Association, YE Z Y, XIAO S Y, et al. Experts guideline on pathological assessment of inflammatory bowel disease in China [J]. *Chin J Inflamm Bowel Dis*, 2021, 5(1): 5–20.
- [16] AHN S I, CHO S, CHOI N J. Effect of dietary probiotics on colon length in an inflammatory bowel disease-induced murine model: a meta-analysis [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(2): 1807–1819.
- [17] YAN Y X, SHAO M J, QI Q, et al. Artemisinin analogue SM934 ameliorates DSS-induced mouse ulcerative colitis via suppressing neutrophils and macrophages [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(10): 1633–1644.
- [18] SCHOFIELD J B, HABOUBI N. Histopathological mimics of inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2020, 26(7): 994–1009.
- [19] COOPER H S, MURTHY S, KIDO K, et al. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(4): 757–768.
- [20] NEARING J T, DOUGLAS G M, HAYES M G, et al. Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 342.
- [21] BÄCKHED F, LEY R E, SONNENBURG J L, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine [J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1915–1920.
- [22] ZHU W, LI J, CHEN Y, et al. AC1Q3QWB inhibits colorectal cancer progression by modulating the immune response and balancing the structure of the intestinal microbiota [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 109768.
- [23] WANG K, WU W, WANG Q, et al. The negative effect of *Akkermansia muciniphila*-mediated post-antibiotic reconstitution of the gut microbiota on the development of colitis-associated colorectal cancer in mice [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 932047.
- [24] HANUS M, PARADA-VENEGAS D, LANDSKRON G, et al. Immune system, microbiota, and microbial metabolites: the unresolved triad in colorectal cancer microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 612826.
- [25] LI R, YI X, YANG J, et al. Gut microbiome signatures in the progression of hepatitis B virus-induced liver disease [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 916061.
- [26] WU X, HUANG X, MA W, et al. Bioactive polysaccharides promote gut immunity via different ways [J]. *Food Funct*, 2023, 14(3): 1387–1400.
- [27] WANG Q, ZHANG S X, CHANG M J, et al. Characteristics of the gut microbiome and its relationship with peripheral CD4⁺ T cell subpopulations and cytokines in rheumatoid arthritis [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 799602.
- [28] KORDAHI M C, STANAWAY I B, AVRIL M, et al. Genomic and functional characterization of a mucosal symbiont involved in early-stage colorectal cancer [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(10): 1589–1598.
- [29] WANG L, WANG R, WEI G Y, et al. Cryptotanshinone alleviates chemotherapy-induced colitis in mice with colon cancer via regulating fecal-bacteria-related lipid metabolism [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 163: 105232.
- [30] GERNER R R, KLEPSCH V, MACHEINER S, et al. NAD metabolism fuels human and mouse intestinal inflammation [J]. *Gut*, 2018, 67(10): 1813–1823.
- [31] WANG M, ZHOU B, CONG W, et al. Amelioration of AOM/DSS-induced murine colitis-associated cancer by evodiamine intervention is primarily associated with gut microbiota-metabolism-inflammatory signaling axis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 797605.

[收稿日期] 2024-04-23

唐秋梅,韩雪,杨光勇,等. 基于宏基因组学探究葛根芩连汤改善抗生素相关性腹泻 SD 大鼠模型菌群失调的作用机制 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1379-1389.

TANG Q M, HAN X, YANG G Y, et al. Macrogenomics-based study of the mechanism of GeGen QinLian Decoction in ameliorating dysbiosis in a rat model of antibiotic-associated diarrhea [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1379-1389.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.002

基于宏基因组学探究葛根芩连汤改善抗生素相关性腹泻 SD 大鼠模型菌群失调的作用机制

唐秋梅¹,韩雪^{1,2},杨光勇¹,陈瑞¹,王文佳¹,涂小华¹,田维毅¹,
蔡彦朋¹,陈驰¹,何光志^{1*}

(1. 贵州中医药大学 基础医学院,贵阳 550025;2. 德江县人民医院,德江 565200)

【摘要】 目的 探究葛根芩连汤 (GeGen QinLian Decoction, GQD) 治疗抗生素相关性腹泻 (antibiotic-associated diarrhoea, AAD) 后大鼠肠道菌群以及功能的变化。**方法** 将 60 只 SPF 级雌雄各半的 SD 大鼠喂养 7 d 后,按 1:5 随机分为空白 (Con) 组和造模组。造模组大鼠使用克林霉素 (250 mg/kg) 灌胃造模,每天 1 次,连续 7 d。造模成功后随机分为模型 (Mod) 组、葛根芩连汤高剂量 (GQD-H) 组、葛根芩连汤中剂量 (GQD-M) 组、葛根芩连汤低剂量 (GQD-L) 组、丽珠肠乐 (LBP) 组,每组 10 只。按给药剂量 GQD-H 组 (10.08 g/kg)、GQD-M 组 (5.04 g/kg)、GQD-L 组 (2.52 g/kg)、LBP 组 (0.15 g/kg) 灌胃干预,Con 组和 Mod 组给予等体积生理盐水灌胃,每天 1 次,连续给药 7 d 后采集粪便,进行宏基因组学测序分析。**结果** α 多样性和 β 多样性提示 Mod 组与 GQD-H 组、GQD-M 组、GQD-L 组之间肠道微生物多样性有差异;GQD 各剂量组在门水平上增加厚壁菌门 (Bacillota) 的丰度,降低变形菌门 (Pseudomonadota) 丰度。在属水平上增加肠道黏液真杆菌属 (*Blautia*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、*Thomasclavelia*、*Mediterraneibacter* 相对丰度,降低 *Adlercreutzia*、*Muribaculum*、*Escherichia* 相对丰度;GQD 上调氨基酸代谢途径、碳水化合物代谢途径、免疫疾病途径。**结论** GQD 干预 AAD 后能改善肠道有益菌和致病菌的丰度比例,进而减轻肠道炎症反应,修复肠道免疫系统。

【关键词】 葛根芩连汤;抗生素相关性腹泻;宏基因组学;肠道菌群

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1379-11

Macrogenomics-based study of the mechanism of GeGen QinLian Decoction in ameliorating dysbiosis in a rat model of antibiotic-associated diarrhea

TANG Qiumei¹, HAN Xue^{1,2}, YANG Guangyong¹, CHEN Rui¹, WANG Wenjia¹, TU Xiaohua¹,
TIAN Weiyi¹, CAI Yanpeng¹, CHEN Chi¹, HE Guangzhi^{1*}

(1. School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine,
Guiyang 550025, China; 2. Dejiang County People's Hospital, Dejiang 565200, China)
Corresponding author: HE Guangzhi. E-mail:392724549@qq.com

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (82060796), 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2020] 4Y187 号), 贵州省科技科学技术基金 (黔科合基础 [2020] 1Y392), 贵州省科技创新人才团队 (黔科合平台人才 [2020] 5010), 贵州省发改委工程研究中心建设项目 (黔发改高技 (2020) 896 号)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82060796), Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project (Qiankehe Support [2020] 4Y187), Guizhou Provincial Science and Technology Science and Technology Fund (Qiankehe Foundation [2020] 1Y392), Guizhou Provincial Science and Technology Innovation Talent Team (Qiankehe Platform Talent [2020] 5010), Guizhou Provincial Development and Reform Commission Engineering Research Centre Construction Project (Guizhou Development and Reform High Technology (2020) 896).

【作者简介】 唐秋梅,女,在读硕士研究生,研究方向:中医学基础。Email:982207182@qq.com

【通信作者】 何光志,男,博士,博士生导师,研究方向:中西医结合基础。Email:392724549@qq.com

[Abstract] Objective To investigate changes in the intestinal flora and function in rats with antibiotic-associated diarrhea (AAD) treated with GeGen QinLian Decoction (GQD). **Methods** Sixty male or female SPF-grade SD rats were fed for 7 days and then divided randomly into Control (Con) and modeling groups (1 : 5 ratio). Rats in the modeling group received clindamycin 250 mg/kg by gavage once a day for 7 consecutive days. After successful modeling, the rats were divided randomly into model (Mod), high-dose GQD (GQD-H, 10.08 g/kg), medium-dose GQD (GQD-M, 5.04 g/kg), low-dose GQD (GQD-L, 2.52 g/kg), and live Bifidobacterium power (LBP, 0.15 g/kg) groups ($n = 10$ rats per group). GQD and LBP were administered by gavage, and the Con and Mod groups were given an equal volume of saline by gavage once a day. Feces were collected after 7 consecutive days of administration for macrogenomics sequencing analysis. **Results** α diversity and β diversity suggested that intestinal microbial diversity differed between the Mod and GQD-treated groups. GQD increased the abundance of thick-walled bacteria and decreased the abundance of *Aspergillus* at the phylum level, and increased the relative abundances of the intestinal mucus bacteria *Blautia*, *Bacteroides*, *Thomasclavelia*, and *Mediterraneibacter*, and decreased the relative abundances of *Adlercreutzia*, *Muribaculum*, and *Escherichia* at the genus level. GQD also up-regulated the amino acid, carbohydrate, and immune disease pathways. **Conclusions** GQD improves the abundance ratio of beneficial and pathogenic intestinal bacteria in rats with antibiotic-associated diarrhea, which in turn reduces the intestinal inflammatory response and repairs the intestinal immune system.

[Keywords] GeGen QinLian Decoction; antibiotic-associated diarrhea; metagenomics; intestinal flora
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

抗生素相关性腹泻 (antibiotic-associated diarrhoea, AAD) 是指临床上长期不规范使用抗生素治疗疾病后出现的常见副作用, 由于抗生素破坏肠道内有益菌和致病菌的平衡, 引起特定病原体生长, 导致微生物群结构和功能改变^[1]。AAD 临床表现为排水样便以及痉挛性腹痛, 严重者甚至出现肠麻痹和休克^[2]。任何抗生素都可能引发 AAD, 尤其是克林霉素、阿莫西林-克拉维酸、头孢菌素类等广谱抗生素^[3]。世界卫生组织 (world health organization, WHO) 报告, 临床住院患者中使用抗生素治疗疾病高达 80%, 其中儿童接受抗生素治疗频率更高, 儿童 AAD 的发生率为 20% ~ 35%^[4]。因此, AAD 已然成为严重的公共卫生问题之一, 而现代医学对 AAD 的治疗集中在补充双歧杆菌、乳杆菌等益生菌来恢复被破坏的肠道菌群, 改善肠道屏障功能和免疫刺激, 提高机体免疫反应, 在临床上使用效果较好。但是过度或长期摄入益生菌, 会使肠道出现益生菌依赖, 逐渐丧失自身繁殖有益菌的能力, 需要长期购买益生菌维持肠道正常的菌群繁殖, 造成严重家庭经济负担。所以本研究旨在从中医药角度寻找能够从根源改善肠道功能的方法。

葛根芩连汤 (GeGen QinLian Decoction, GQD) 是张仲景所著《伤寒论》中的经典方剂, 方由葛根、黄芩、黄连、炙甘草组成。GQD 中重用君药葛根, 葛根能升阳止泻, 是治泻良药, GQD 善清热止利, 临床上常用其治疗急性肠炎、肠伤寒、结肠炎等肠道疾病。有证据表明, GQD 能显著升高 AAD 大鼠体内丁酸

含量, 并且对戊酸和己酸也有一定程度的回调, 通过参与短链脂肪酸 (short chain fatty acid, SCFAs) 代谢来提高肠道抗炎、抗氧化和免疫调节作用^[5]。SCFAs 代谢受到多种微生物共同调节, 而微生物作用涉及广泛, 不仅是通过 SCFAs 代谢改善肠道功能, 还涉及氨基酸代谢、维生素代谢等。据此, 发现 GQD 治疗 AAD 的作用机制可能与影响肠道内微生物, 从而改变肠道功能有关。肠道微生物种类繁多并且分布广泛, 传统的分离培养技术不能全面了解肠道所含微生物的种类和功能, 阻碍对 GQD 干预 AAD 相关机制的深度探讨。宏基因组学是一种直接研究微生物群体完整基因组信息的手段, 能规避对微生物个体进行分离培养, 更真实地反映样本中微生物种类、结构, 进一步研究微生物功能, 宏基因组学是研究微生物多样性和群落特征的重要手段。因此, 本研究通过宏基因组学技术进行相关生物信息学分析, 旨在探究 GQD 干预 AAD 后肠道微生物种类和功能的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

60 只 SD 大鼠, 雌雄各半, SPF 级, 6 ~ 8 周龄, 体重 200 g 左右, 购买于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK (京) 2019-0008】。饲养环境: 温度 22 ℃ 左右, 相对湿度 50% 左右, 12 h 循环照明。SD 大鼠饲养于贵州中医药大学动物研究所【SYXK

(黔)2021-0005】。在实验过程中严格遵循实验动物的替代、减少和优化原则。本实验过程均规范操作,符合动物伦理学要求,本动物实验由贵州中医药大学伦理委员会批准(IACUC 20210162)。

1.1.2 药物

葛根、黄芩、黄连、炙甘草均购于北京同仁堂贵阳分店,批号分别为 201201、200701、200301、201202。以上药物由药物鉴定研究室(贵州中医药大学)鉴定符合《中国药典》相关条件。丽珠肠乐胶囊购自丽珠集团丽珠制药厂,批号为 S10960040,克林霉素磷酸酯购自广州白云山天心制药股份有限公司,批号为 210202。

1.1.3 主要试剂与仪器

缓冲液、酶(New England Biolabs 公司,美国),批号分别为 M0531S、M0530S,20% agarose gels (biowest 公司,西班牙)批号为 111860。

核酸电泳仪(北京市六一仪器厂,中国),Covaris 超声波破碎仪(Covaris S2 System 公司,美国),Qubit Fluorometric Quantification (Life Technologies 公司,美国),安捷伦 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies 公司,美国),PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国),测序仪(Illumina 公司,美国),Agilent Fragment Analyzer 5400 全自动毛细管电泳系统(Agilent Technologies 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 葛根芩连汤的制备

取葛根、黄芩、黄连和炙甘草,分别称 24、9、9 和 6 g,将中药加入纯水中浸泡后,使用电磁炉先大火煮沸 15 min 后转小火持续煎熬 120 min,将药液过滤保存后,再次以同样方式煎煮一次,获得过滤后的药液,两次药液混合后进行加热浓缩,放置 4 ℃ 冰箱中保存。

1.2.2 动物分组、造模、给药

大鼠喂养 1 周后,随机分为空白(Con)组和造模组。造模组使用克林霉素(250 mg/kg)灌胃,持续 7 d。观察大鼠大便出现次数增多、不成型,颜色为褐色或淡褐色,代表造模成功。造模成功后,随机分为模型(Mod)组、葛根芩连汤高剂量(GQD-H)组、葛根芩连汤中剂量(GQD-M)组、葛根芩连汤低剂量(GQD-L)组、丽珠肠乐(LBP)组。按照 GQD-H 组(10.08 g/kg)、GQD-M 组(5.04 g/kg)、GQD-L 组(2.52 g/kg)、LBP 组(0.15 g/kg)对应剂量药物灌胃治疗 7 d,Con 组和 Mod 组使用等体积生理盐水灌

胃,造模期间和治疗期间均正常饮食饮水。药物治疗后处死各组大鼠,并在无菌条件下收集结肠内容物,-80 ℃ 冻存备用。

1.2.3 样本提取与检测

采用 CTAB 法提取粪便基因组 DNA:2.0 mL Ep 管内加 CTAB 裂解液 1000 μ L、溶菌酶、适量粪便样本,颠倒混匀多次,样本完全裂解后离心取上清,上清液中加入酚、氯仿,再次离心取上清,加入氯仿,颠倒混匀,12 000 r/min 离心 10 min,将上清液取至 1.5 mL 离心管内,加异丙醇,摇匀后-20 ℃ 沉淀。再次离心,留下沉淀。使用 1 mL 75%乙醇洗涤两次后晾干 DNA 样本,加入 ddH₂O 溶解 DNA 样品,最后加 RNaseA 1 μ L 消化 RNA,37 ℃ 放置 15 min。

1.2.4 文库构建与库检

通过十六烷基三甲基溴化铵试剂盒提取基因组 DNA,检查 DNA 浓度和完整性后用 NEBNext[®] Ultra[™] DNA Library Prep Kit 构建 DNA 文库。使用 Covaris 超声波破碎仪将合格的 DNA 样品破碎到 350 bp 大小,再进行末端修复、加 A 尾和测序接头,筛选 DNA 片段,PCR 扩增和纯化,构建完整的文库。再次 PCR 扩增,纯化 PCR 产物,除去非特异性产物,通过 Agilent 5400 system 评估文库质量后使用 qPCR 定量文库浓度。

1.2.5 生物信息分析

数据质控与去宿主序列:通过 Illumina 测序平台获得各组粪便样本原始数据,采用 Knead Data 0.7.4 软件对原始数据进行去除接头序列,扫描序列,切除平均质量分低于 20 的后续序列,去除最终长度小于 50 bp 的序列等预处理,通过 FastQC 来检测质控合理性和效果。物种注释:通过微生物核酸数据库以及 Kraken 2 数据库计算和比对粪便所含的全部物种序列数,之后通过 Bracken 2.0 软件计算粪便样本中微生物相对丰度。功能注释:进行质控和去宿主后的高质量样本使用 HUMAnN 3 3.6 软件对京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库进行 KEGG orthologous(KO)类群丰度的量化,获得功能数据库的注释信息和相对丰度表,对获得的丰度进行丰度聚类分析、PCoA 降维分析、样品聚类分析以及线性判别分析效应量(LEfSe)Biomarker 分析,挖掘各组之间的物种和功能差异。

1.3 统计学分析

针对组间微生物多样性,采用克鲁斯卡尔-沃利

斯(Kruskal-Wallis)方法计算 α 多样性,基于欧式距离 PCoA 分析方法对多维数据进行降维,计算 β 多样性。使用 LEfSe 分析方法寻找组间特征微生物。差异微生物和功能通过 SPSS 26.0 筛选,判断实验数据是否满足正态分布以及检验方差齐性,两者均满足采用单因素方差分析,不满足方差齐性使用 Kruskal-Wallis(H)分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 肠道微生物多样性分析

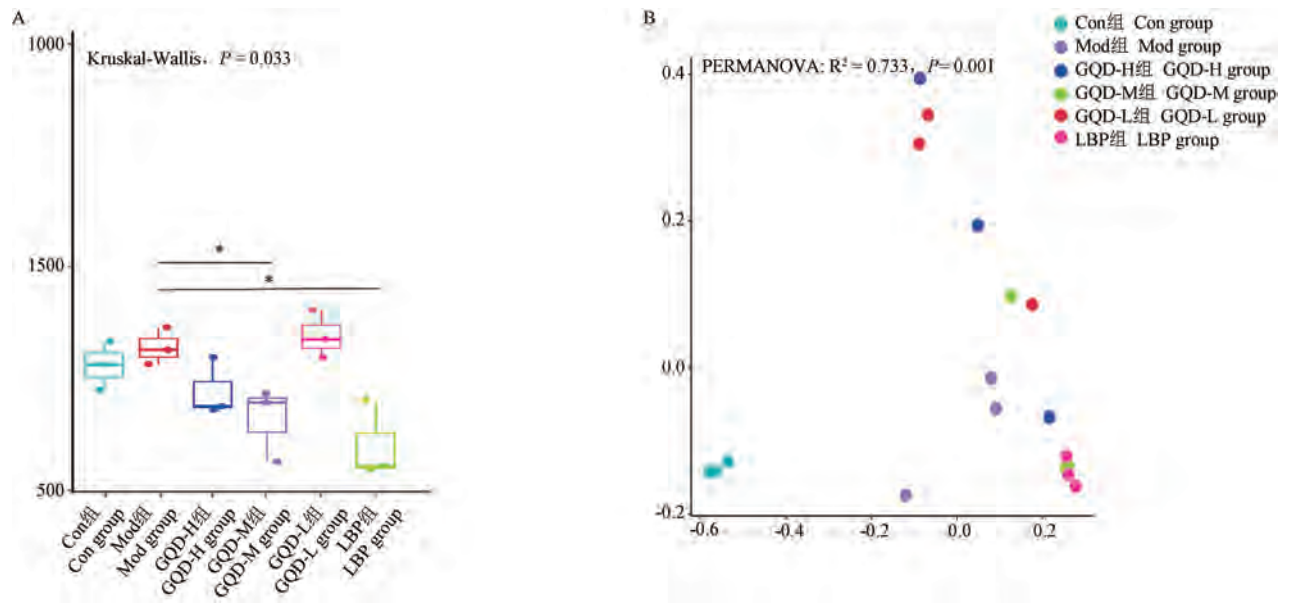
α 多样性与 β 多样性是反映各组组间微生物组成整体区别的方法, α 多样性反映 Mod 组与 GQD-M 组、LBP 组之间具有显著性差异($P < 0.05$)(图 1A)。通过 β 多样性分析对比各组样本之间的差异,样本距离越近则代表菌群相似度越高。结果发现 Mod 组与 GQD 各剂量组以及 LBP 组间未出现重叠现象,而 GQD-M 组与 LBP 组样本间出现重叠。组间差异分析结果为 $R^2 = 0.733, P = 0.001$,组间差异优于组内差异(图 1B)。据此,猜测 GQD 能改变 AAD 模型大鼠肠道微生物结构。

2.2 肠道微生物物种组成分析

为了研究治疗组干预 AAD 后肠道微生物的具体变化,比较各组间在门水平和属水平上的微生物相对丰度。在门水平上,注释到丰度较高的有疣微

菌门(Verrucomicrobiota)、拟杆菌门(Bacteroidota)、厚壁菌门(Bacillota)、放线菌门(Actinomycetota)、变形菌门(Pseudomonadota)。与 Con 组相比,Mod 组 Pseudomonadota 丰度上升,Actinomycetota、Verrucomicrobiota 丰度下降。与 Mod 组相比,GQD 各剂量组与 LBP 组中 Bacillota 丰度上升, Pseudomonadota、Bacteroidota 丰度下降。在本研究中,Con 组、Mod 组、GQD-H 组、GQD-M 组、GQD-L 组、LBP 组 Bacteroidota/Bacillota (B/F) 的值分别为 1.21、1.87、2.12、0.79、0.55 和 0.12。Mod 组 B/F 值高于 Con 组,证明克林霉素会破坏肠道微生物, GQD-M 组、GQD-L 组和 LBP 组 B/F 值低于 Mod 组,证明 GQD 和 LBP 可以促进 AAD 大鼠肠道微生物恢复(图 2A)。运用 Kruskal-Wallis 检验和单因素方差分析可知 Bacillota、Actinomycetota、Verrucomicrobiota 均具有显著性差异($P < 0.05$),其余无统计学意义(图 2B)。

如图 3 所示,在属水平上,与 Con 组相比,Mod 组肠道内 *Adlercreutzia*、肠鼠杆菌属(*Muribaculum*)、*Thomasclavelia*、埃希菌属(*Escherichia*)、*Duncaniella* 相对丰度比例升高。双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、黏液蛋白阿克曼菌属(*Akkermansia*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、粪杆菌属(*Faecalibaculum*) 相对丰度比例降低。与 Mod 组相比,GQD 各剂量组与 LBP 组肠道布劳特氏菌属

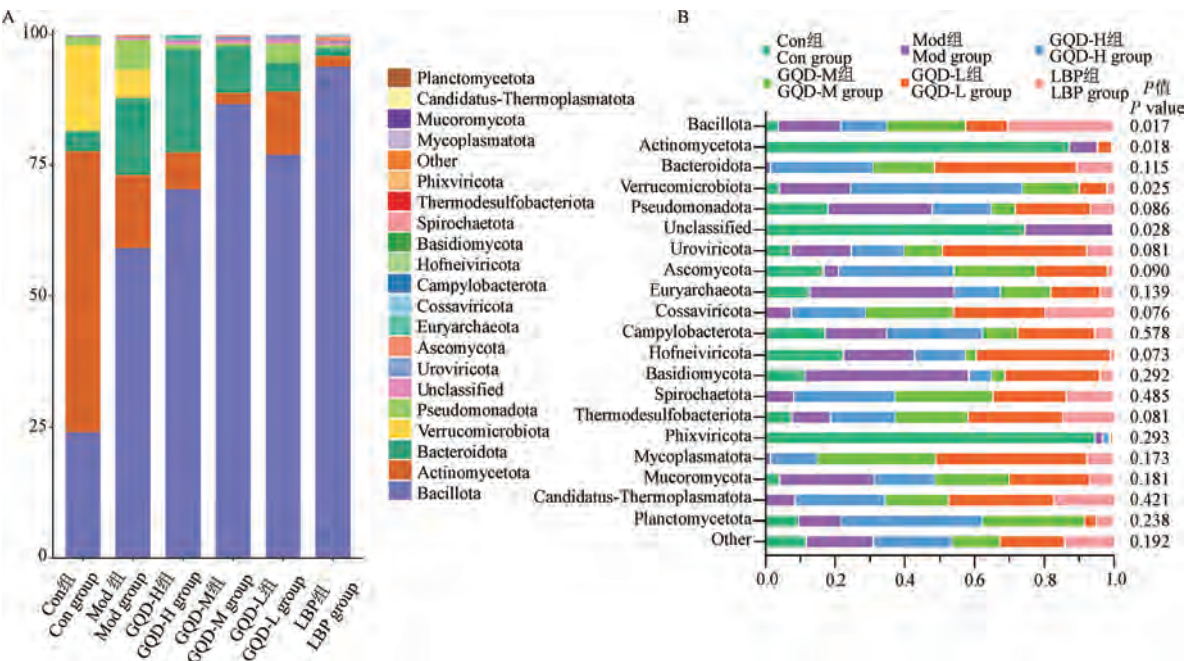


注:A: α 多样性;B: β 多样性。

图1 肠道微生物 α 多样性和 β 多样性

Note. A. α diversity. B. β diversity.

Figure 1 Gut microbial α diversity and β diversity



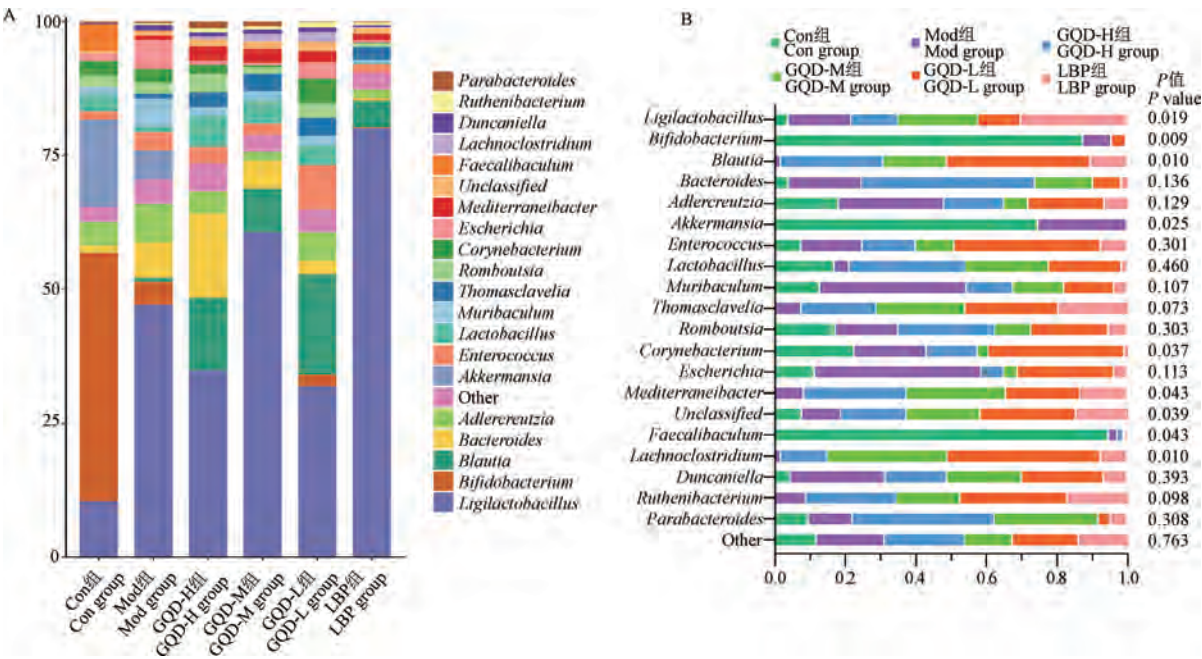
注:A:物种百分比堆积图;B:物种差异性分析。

图 2 GQD 治疗后肠道微生物门水平组成分析

Note. A. Species percentage stacking map. B. Species variability analysis.

Figure 2 Compositional analysis of gut microbiota phylum level after GQD treatment

(*Blautia*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Mediterraneibacter*、*Lachnoclostridium* 相对丰度升高,*Lactobacillus* 丰度在 GQD 组中升高。*Adlercreutzia*、*Muribaculum*、*Escherichia* 相对丰度比例降低(图 3A)。通过 Kruskal-Wallis 检验发现 *Blautia*、*Bifidobacterium*、*Lachnoclostridium* 有极显著性($P <$



注:A:物种百分比堆积图;B:物种差异性分析。

图 3 GQD 治疗后肠道微生物属水平组成分析

Note. A. Species percentage stacking map. B. Species variability analysis.

Figure 3 Compositional analysis of gut microbial genus level after GQD treatment

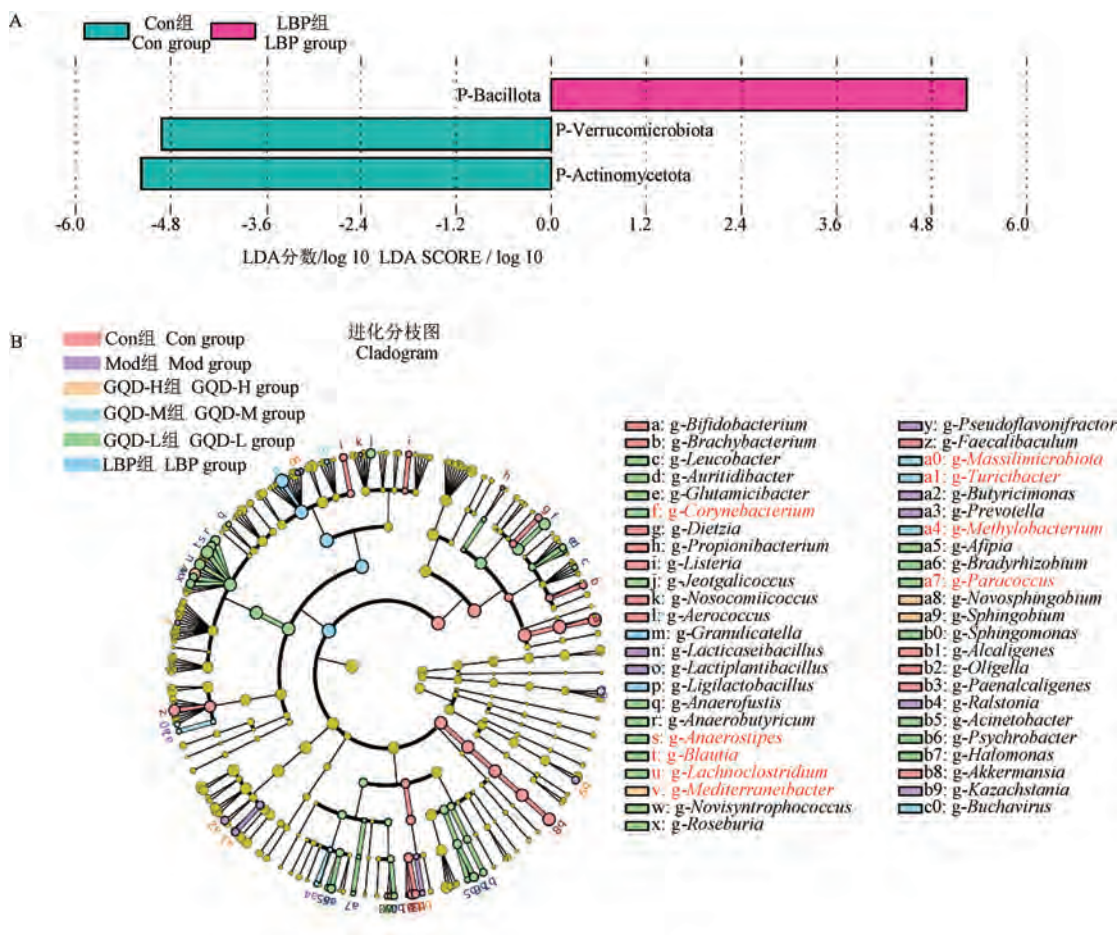
0.01), *Ligilactobacillus*、*Akkermansia*、*Corynebacterium*、*Mediterraneibacter* 有显著性差异 ($P < 0.05$), 其余无统计学意义 (图 3B)。

2.3 LEfSe 分析

为了寻找各组中的差异物种, 通过 LEfSe 分析筛选出组间差异生物标记物。组间肠道微生物组成均存在明显差异, 6 组共筛选出 91 个差异微生物 ($LDA > 2, P < 0.05$)。在门水平上, Con 组差异微生物谱系包括 Actinomycetota、Verrucomicrobiota, LBP 组包括 Bacillota, 其他组未筛出明显特征微生

物 (图 4A)。

属水平上, Mod 组特征微生物为假黄酮属 (*Pseudoflavonifractor*)、普雷沃氏菌属 (*Prevotella*)、丁霉单孢菌属 (*Butyricimonas*); QGD-H 组中特征微生物为地中海杆菌属 (*Mediterraneibacter*); QGD-M 组特征微生物为 *Turicibacter*、*Methylobacterium*、*Massilimicrobiota*; QGD-L 组中特征微生物为 *Blautia*、*Corynebacterium*、副球菌属 (*Paracoccus*)、*Lachnoclostridium*、*Anaerostipes*; LBP 组中特征微生物为 *Ligilactobacillus* (图 4B)。



注: A: 门水平 LEfSe 分析; B: 属水平 LEfSe 分析。

图 4 门、属水平肠道微生物 LEfSe 分析

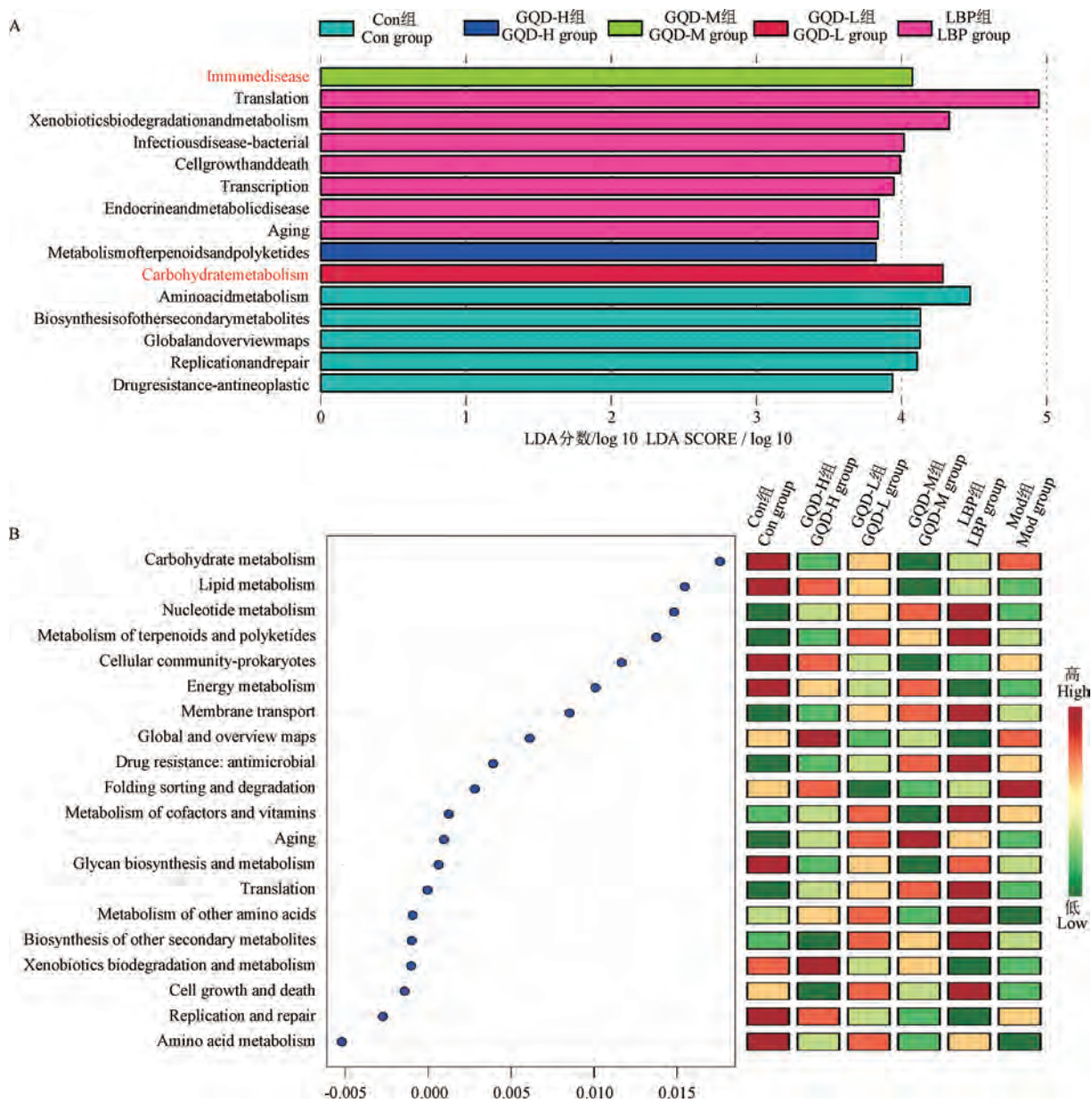
Note. A. Phylum level LEfSe analysis. B. Genus level LEfSe analysis.

Figure 4 LEfSe analysis of gut microorganisms at phylum and genus level

2.4 肠道微生物功能预测

菌群具备的潜在功能是探索药物治疗疾病机制的直接要素, 为了研究 GQD 干预后肠道微生物功能的变化, 通过宏基因组学基因序列数据的 KEGG 分析进行功能注释和预测。通过 LEfSe 富集到 GQD 各剂量组优势功能为碳水化合物代谢途径与免疫疾病途径 ($LDA > 3, P < 0.05$) (图 5A)。在 Level 2

水平上, 与 Con 组相比, Mod 组基础代谢降低, 例如: 氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢、脂质代谢、萜类化合物和多酮类化合物的代谢、核苷酸代谢等。Mod 组基础代谢现状, 提示肠道菌群紊乱。与 Mod 组相比, GQD 各剂量组以下功能提高, 包括: 碳水化合物代谢、其他氨基酸的代谢、复制和修复、能量代谢、异种生物降解和代谢、膜运输、抗药性:



注:A:Level 2 水平 LEfSe 分析;B:Level 2 水平随机森林分析。

图 5 KEGG 功能富集预测图

Note. A. Level 2 level LEfSe analysis. B. Level 2 level random forest analysis.

Figure 5 Predictive map of KEGG functional enrichment

抗微生物。通过随机森林分析后发现在各组中表现变化最明显的为氨基酸代谢途径(图 5B)。通过 KEGG 功能分析发现 GQD 干预后主要影响的功能集中在碳水化合物代谢途径、免疫疾病途径、氨基酸代谢途径。

2.5 功能相对丰度差异性分析

肠道菌群生物变化(代谢、生长、衰老)是改变肠道功能的重要影响因素,通过 MetaCyc 数据库预测菌群构建的潜在功能,结果如图 6。与 Con 组相比,Mod 组下调了以下 8 个途径,包括:L-精氨酸生

物合成 I (通过 L-鸟氨酸)(L-arginine biosynthesis I ,via L-ornithine),L-精氨酸生物合成 II (乙酰循环)(L-arginine biosynthesis II ,acetyl cycle),L-鸟氨酸生物合成 I (L-ornithine biosynthesis I),L-赖氨酸生物合成 III (L-lysine biosynthesis III),L-赖氨酸生物合成 VI (L-lysine biosynthesis VI),丙酮酸发酵生成醋酸和乳酸 II (pyruvate fermentation to acetate and lactate II),L-酪氨酸生物合成的超级途径(superpathway of L-tyrosine biosynthesis),L-赖氨酸、L-苏氨酸和 L-蛋氨酸生物合成超级途径 II

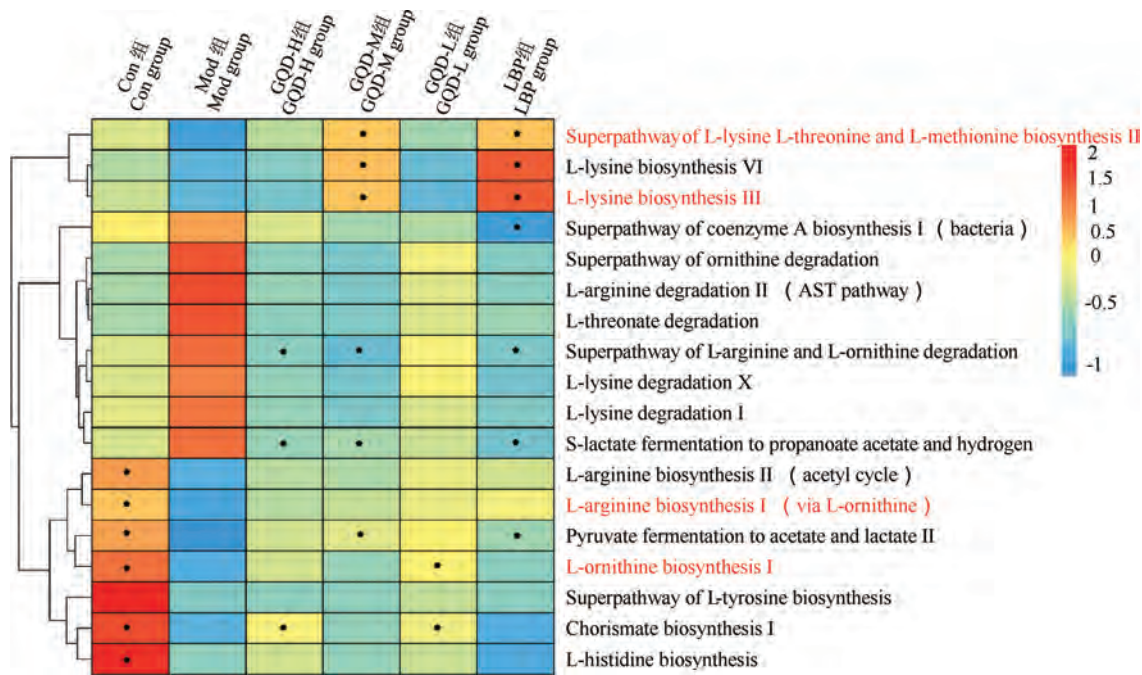


图 6 MetaCyc 功能差异性分析
Figure 6 Differential analysis of MetaCyc function

(superpathway of L-lysine, L-threonine and L-methionine biosynthesis II)。Mod 组中上升了以下途径: L-精氨酸降解 II (AST 途径) (L-arginine degradation II, AST pathway), 鸟氨酸降解的超级途径 (superpathway of ornithine degradation), L-赖氨酸降解 X (L-lysine degradation X), L-苏氨酸降解 (L-threonate degradation)。而 GQD 干预后以上 8 个下调功能均得到改善, 并且精氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、苏氨酸降解水平下降。以上途径主要为氨基酸合成与降解, 提示 GQD 能增强氨基酸合成水平, 抑制氨基酸降解。

3 讨论

抗生素过度或不规范使用引起肠道有益菌和致病菌比例失调是引发肠道炎症、破坏肠道免疫的关键因素。本课题组前期研究发现 GQD 能通过激活线粒体自噬, 清除组织内受损的线粒体, 减轻菌群失调性大鼠肠道损伤, GQD 还对头孢拉定和硫酸庆大霉素造成的菌群失调性腹泻大鼠门水平和属水平上的菌群丰度有回调作用^[6-7]。LBP 又名双歧杆菌, 被定义为活的微生物, 能有效改善腹痛、腹泻, 调节有害微生物和有益微生物丰度比例, 恢复肠道微生物稳态^[8]。因此, 本实验选用 GQD 和 LBP 作为对照来研究治疗 AAD 后肠道菌群丰度变化以及功能变化, 从肠道菌群方面研究其作用机制。研

究发现, α 多样性显示 GQD-M 组、LBP 组与 Mod 组整体微生物多样性上具有显著性差异。 β 多样性结果中各组均与 Mod 组分隔开, 而 GQD-M 组与 LBP 组出现重叠, 证明 GQD 和 LBP 均能改变 AAD 模型大鼠肠道微生物组成, 其中猜测葛根芩连汤中剂量调节微生物效应与 LBP 更接近。

已知 GQD 干预能改变肠道微生物组成后, 进一步在门水平和属水平上探究干预前后微生物组成变化。结果表明, 在门水平上, Mod 组主要富集到的是 Pseudomonadota, 而 Pseudomonadota 常作为肠道菌群平衡的观测指标, 此门改变可以证明克林霉素打破了肠道中原本的微生物平衡^[9]。GQD 各剂量组和 LBP 组中 Bacillota 丰度上升, Pseudomonadota 丰度下降, 表明 GQD 和 LBP 能改善被破坏的肠道微生物丰度比例。在属水平上, Mod 组中 *Bifidobacterium*、*Akkermansia*、*Lactobacillus* 丰度下降, *Pseudoflavonifractor*、*Prevotella*、*Butyricimonas*、*Escherichia* 丰度上升。双歧杆菌属、阿克曼菌属、乳酸杆菌属都是肠道内出名的有益菌, 能调节自身免疫、改善慢性炎症和修复肠道损伤^[10-12]。而与之相反, *Pseudoflavonifractor* 在免疫异常的湿滞综合征大鼠肠道内显著富集, 因此把它称为免疫异常状态下的细菌指标之一^[13]。 *Prevotella*、*Butyricimonas* 均与肠道炎症反应密切联系, *Prevotella* 丰度增加, 相应的 T 辅助性 17 型 (Th17) 与 Toll 样受体 2 被激活,

导致抗原呈递细胞产生白细胞介素-23 (interleukin-23, IL-23)、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 等促炎因子,引起代谢紊乱和全身炎症^[14]。*Escherichia* 被归于 Pseudomonadota, 是全球关于腹泻研究最广泛、最重要的菌属之一,部分 *Escherichia* 有较强毒力特征,能引起严重腹泻和肠道疾病^[15]。根据在 Mod 组中有益菌和致病菌的相应变化指向使用克林霉素后引起炎症、破坏肠道黏膜屏障、肠道免疫系统稳定性被打破。

在 GQD-M 组和 GQD-L 组肠道内富集到的微生物 *Turicibacter*、*Blautia* 能直接促进宿主初级胆汁酸代谢为次级胆汁酸 (石胆酸、脱氧胆酸)^[16-17]。*Bacteroides* 和 *Lactobacillus* 能通过产生胆盐水解酶间接促进次级胆汁酸产生^[18-19]。次级胆汁酸参与先天性免疫和适应性免疫细胞的分化和功能,如巨噬细胞、树突状细胞、T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞等^[20]。*Roseburia*、*Mediterraneibacter*、*Bacteroides* 均能产生丁酸盐,*Bacteroides* 还能分泌代谢产物乙酸盐和丙酸盐。丁酸盐、乙酸盐和丙酸盐都属于 SCFAs。丁酸盐能够与蛋白脱乙酰酶、紧密连接蛋白相互作用,从而加固肠道屏障、减轻炎症反应、降低肠道通透性^[21-23]。乙酸盐和丙酸盐能诱导产生免疫球蛋白 A,抑制中性粒细胞和巨噬细胞释放促炎细胞因子,有助于维持免疫系统的稳定性^[24-25]。*Lachnospirillum* 是白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 诱导水平最高的乳酸菌菌株,有高抗炎活性,能抑制慢性炎症,改善代谢紊乱^[26]。结果表明,GQD 干预后改善肠道有益菌的比例,激活胆汁酸代谢和 SCFAs 代谢,减轻肠道炎症,促进肠道免疫系统稳定。

GQD 不仅对肠道微生物紊乱有调节作用,而且对功能也有一定影响。通过功能预测后发现 GQD 组主要改善碳水化合物代谢途径、免疫疾病途径和氨基酸代谢途径。碳水化合物代谢已被认为是先天免疫细胞活化和功能的标志,整个途径包括消化吸收、糖酵解和三羧酸循环^[27]。免疫细胞的增殖、生长、发育离不开能量支持,能量通常来源于糖酵解和三羧酸循环两种方式,所以糖酵解和三羧酸 (tricarboxylic acid, TCA) 循环与免疫功能联系密切。糖酵解途径能促进已被激活的巨噬细胞和效应淋巴细胞的生长、分化和功能^[28-29]。TCA 循环被称为

免疫细胞功能的代谢“控制器”,是由于 TCA 循环的衍生代谢物能调节免疫反应的类型和程度。例如,TCA 循环代谢物琥珀酸盐是巨噬细胞反应的重要调节剂,参与炎症的起始、维持和消退^[30]。此外,通过 MetaCyc 数据库预测到 GQD 干预后提高了精氨酸合成、赖氨酸合成、鸟氨酸合成、苏氨酸合成途径。精氨酸作为控制免疫细胞功能的关键途径,参与巨噬细胞、树突状细胞、T 细胞、B 细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞生长、发育以及免疫功能^[31-33]。鸟氨酸是巨噬细胞精氨酸酶 1 的代谢物,是精氨酸的下游,鸟氨酸代谢与促分解巨噬细胞持续执行胞吞作用联系^[34]。赖氨酸和苏氨酸是机体必需氨基酸,是免疫球蛋白的组成成分,合成阻碍时,会出现免疫球蛋白分泌抑制现象,引起机体免疫力低下,所以,赖氨酸和苏氨酸的合成与产生抗体、增强机体体液免疫正相关^[35-36]。研究结果表明,GQD 能通过提高碳水化合物代谢途径和氨基酸代谢途径,进而提高 AAD 大鼠肠道免疫疾病途径,恢复肠道免疫损伤。

本研究通过宏基因组学,研究葛根芩连汤治疗抗生素相关性腹泻的作用机制,寻找药物干预后引起变化的特征微生物以及功能,并且对微生物和功能进行关联分析。根据结果发现主要功能均指向 GQD 能提高肠道免疫,但是并未深入探讨免疫相关因子与筛出的关键肠道菌群之间的关系,后续还需要通过菌群移植技术,对差异菌群培养,进一步验证菌群与免疫之间的关系,构建以肠道微生物介导的微生物-免疫-疾病之间的因果关系,进一步阐述其作用机制。

参 考 文 献 (References)

- [1] LUKASIK J, DIERIKX T, BESSELING-VAN DER VAART I, et al. Multispecies probiotic for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a randomized clinical trial [J]. JAMA Pediatr, 2022, 176(9): 860-866.
- [2] GUO Q, GOLDENBERG J Z, HUMPHREY C, et al. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2019, 4(4): CD004827.
- [3] MEKONNEN S A, MERENSTEIN D, FRASER C M, et al. Molecular mechanisms of probiotic prevention of antibiotic-associated diarrhea [J]. Curr Opin Biotechnol, 2020, 61: 226-234.
- [4] MCFARLAND L V, OZEN M, DINLEYICI E C, et al. Comparison of pediatric and adult antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(11): 3078-3104.
- [5] 苏钢, 杨光勇, 韩雪, 等. 基于靶向代谢组学探讨葛根芩连

- 汤对抗生素相关性腹泻大鼠粪便短链脂肪酸的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(7): 189–196.
- SU G, YANG G Y, HAN X, et al. Effect of Gegen Qinliantang on fecal short-chain fatty acids in rats with antibiotic-associated diarrhea based on targeted metabolomics [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(7): 189–196.
- [6] 张庚鑫, 杜海洋, 杨光勇, 等. 葛根芩连汤对菌群失调性腹泻大鼠模型结肠组织 PINK1/Parkin 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(4): 857–861.
- ZHANG G X, DU H Y, YANG G Y, et al. Effect of Gegen Qinlian Decoction on PINK1/Parkin expression in colon of rats with dysbacteriosis diarrhea [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(4): 857–861.
- [7] 张庚鑫, 杜海洋, 王平, 等. 基于 16S rRNA 测序研究葛根芩连汤对菌群失调性腹泻大鼠肠道菌群结构的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 19–26.
- ZHANG G X, DU H Y, WANG P, et al. Effect of Gegen Qinliantang on structure of intestinal flora in dysbacterial diarrhea rats based on 16S rRNA sequencing [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(11): 19–26.
- [8] SRIVASTAVA S, BASAK U, NAGHIBI M, et al. A randomized double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety and efficacy of live *Bifidobacterium longum* CECT 7347 (ES1) and heat-treated *Bifidobacterium longum* CECT 7347 (HT-ES1) in participants with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2338322.
- [9] LITVAK Y, BYNDLOSS M X, TSOLIS R M, et al. Dysbiotic Proteobacteria expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction [J]. Curr Opin Microbiol, 2017, 39: 1–6.
- [10] LAURSEN M F, SAKANAKA M, VON BURG N, et al. *Bifidobacterium* species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut [J]. Nat Microbiol, 2021, 6(11): 1367–1382.
- [11] RODRIGUES V F, ELIAS-OLIVEIRA J, PEREIRA Í S, et al. *Akkermansia muciniphila* and gut immune system: a good friendship that attenuates inflammatory bowel disease, obesity, and diabetes [J]. Front Immunol, 2022, 13: 934695.
- [12] SLATTERY C, COTTER P D, O' TOOLE P W. Analysis of health benefits conferred by *Lactobacillus* species from kefir [J]. Nutrients, 2019, 11(6): 1252.
- [13] ZHAO W, DUAN C, LIU Y, et al. Modulating effects of *Astragalus* polysaccharide on immune disorders via gut microbiota and the TLR4/NF- κ B pathway in rats with syndrome of dampness stagnancy due to spleen deficiency [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2023, 24(7): 650–662.
- [14] LARSEN J M. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease [J]. Immunology, 2017, 151(4): 363–374.
- [15] JESSER K J, LEVY K. Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes [J]. Curr Opin Infect Dis, 2020, 33(5): 372–380.
- [16] LYNCH J B, GONZALEZ E L, CHOY K, et al. Gut microbiota *Turicibacter* strains differentially modify bile acids and host lipids [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 3669.
- [17] LIU X, MAO B, GU J, et al. *Blautia*-a new functional genus with potential probiotic properties? [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1–21.
- [18] FOLEY M H, O' FLAHERTY S, ALLEN G, et al. *Lactobacillus* bile salt hydrolase substrate specificity governs bacterial fitness and host colonization [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(6): e2017709118.
- [19] ADHIKARI A A, SEEGAR T C M, FICARRO S B, et al. Development of a covalent inhibitor of gut bacterial bile salt hydrolases [J]. Nat Chem Biol, 2020, 16(3): 318–326.
- [20] SU X, GAO Y, YANG R. Gut microbiota derived bile acid metabolites maintain the homeostasis of gut and systemic immunity [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1127743.
- [21] KIM J S, LEE K C, SUH M K, et al. *Mediterraneibacter butyricigenes* sp. nov., a butyrate-producing bacterium isolated from human faeces [J]. J Microbiol, 2019, 57(1): 38–44.
- [22] ZHANG L, LIU C, JIANG Q, et al. Butyrate in energy metabolism: there is still more to learn [J]. Trends Endocrinol Metab, 2021, 32(3): 159–169.
- [23] NIE K, MA K, LUO W, et al. *Roseburia intestinalis*: a beneficial gut organism from the discoveries in genus and species [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 757718.
- [24] ZAFAR H, JR SAIER M H. Gut *Bacteroides* species in health and disease [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1–20.
- [25] SUN M, WU W, LIU Z, et al. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases [J]. J Gastroenterol, 2017, 52(1): 1–8.
- [26] SAKURAI K, TOSHIMITSU T, OKADA E, et al. Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* OLL2712 on memory function in older adults with declining memory: a randomized placebo-controlled trial [J]. Nutrients, 2022, 14(20): 4300.
- [27] ZHAO H, RAINES L N, HUANG S C C. Carbohydrate and amino acid metabolism as hallmarks for innate immune cell activation and function [J]. Cells, 2020, 9(3): 562.
- [28] KORNBERG M D, BHARGAVA P, KIM P M, et al. Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity [J]. Science, 2018, 360(6387): 449–453.
- [29] CHANG C H, CURTIS J D, MAGGI L B Jr, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis [J]. Cell, 2013, 153(6): 1239–1251.
- [30] SCAGLIOLA A, MAININI F, CARDACI S. The tricarboxylic acid cycle at the crossroad between cancer and immunity [J]. Antioxid Redox Signal, 2020, 32(12): 834–852.
- [31] GEIGER R, RIECKMANN J C, WOLF T, et al. L-arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity [J]. Cell, 2016, 167(3): 829–842.
- [32] LÍNDEZ A A M I, REITH W. Arginine-dependent immune responses [J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(13): 5303–5324.
- [33] CROWTHER R R, QUALLS J E. Metabolic regulation of immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*: a spotlight on L-

arginine and L-tryptophan metabolism [J]. Front Immunol, 2021, 11: 628432.

[34] YURDAGUL A Jr, SUBRAMANIAN M, WANG X, et al. Macrophage metabolism of apoptotic cell-derived arginine promotes continual efferocytosis and resolution of injury [J]. Cell Metab, 2020, 31(3): 518-533.

[35] ISERI V J, KLASING K C. Changes in the amount of lysine in protective proteins and immune cells after a systemic response to dead *Escherichia coli*: implications for the nutritional costs of

immunity [J]. Integr Comp Biol, 2014, 54(5): 922-930.

[36] 李仁德, 李光玉, 王凯英. 苏氨酸对动物的生物学作用研究进展 [J]. 饲料工业, 2017, 38(8): 36-39.

LI R D, LI G Y, WANG K Y. Research advances on biological function of threonine for animal [J]. Feed Ind, 2017, 38(8): 36-39.

[收稿日期] 2024-07-02

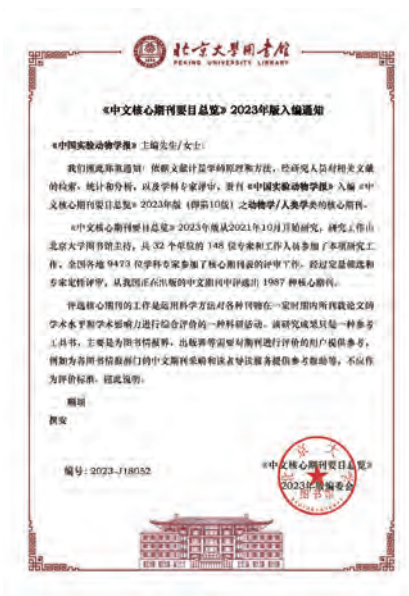
《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

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

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

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

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



柯璐, 曹愿, 谷文达, 等. 通过 CRISPR/Cas9 技术构建 *Apoe* 基因敲除小鼠模型及其表型研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1390–1398.

KE L, CAO Y, GU W D, et al. Use of CRISPR/Cas9 system for establishment and characterization of *Apoe* gene knockout mice model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1390–1398.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.003

通过 CRISPR/Cas9 技术构建 *Apoe* 基因敲除小鼠模型及其表型研究

柯璐, 曹愿, 谷文达, 刘甦苏, 孙晓炜, 赵皓阳, 翟世杰, 郭怀勇, 娄玥, 范昌发*

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 102629)

【摘要】 目的 本研究通过 CRISPR/Cas9 技术构建 *Apoe* 基因敲除小鼠模型, 以进一步探讨 *Apoe* 在血脂代谢和形成动脉粥样硬化病症中的功能。**方法** 针对 C57BL/6J 小鼠 *Apoe* 基因设计 2 个 sgRNA 靶位点, 并将 sgRNA 和 Cas9 mRNA 共同注入受精卵, 移植至 ICR 受体鼠, 获得 F₀ 代小鼠, 通过提取鼠尾 DNA 以及 PCR 筛选, 获得阳性小鼠。通过荧光定量逆转录 PCR 法检测小鼠各组织中 *Apoe* mRNA 表达水平。检测小鼠血清中的血脂指标, 并通过油红 O 染色主动脉血管, 以检测动脉内膜脂质的积聚。**结果** PCR 及测序结果确认成功构建了 *Apoe* 基因敲除小鼠 (C57BL/6-*Apoe*^{em1}/Nifdc, 简称 *Apoe* KO 小鼠); 实时荧光定量逆转录 PCR 实验结果显示, *Apoe* KO 纯合小鼠 (*Apoe*^{-/-}) 的肝、大脑、脾、肾和肺组织中的 *Apoe* mRNA 显著降低; 血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平显著升高, 且雄性小鼠的血清高密度脂蛋白胆固醇水平显著降低; 主动脉血管油红 O 染色显示, 在相同且食用正常饲料条件下, 野生型 (wild-type, WT) 小鼠无脂质堆积, *Apoe*^{-/-} 小鼠则呈现大量红色脂质斑块。**结论** 本研究成功构建 *Apoe* 基因敲除小鼠, 该纯合子小鼠在非高脂饲料下呈典型的异常血脂代谢及主动脉内膜脂质积聚特征, 为 *Apoe* KO 小鼠资源提供了背景数据, 为血脂代谢异常表型研究提供新模型。

【关键词】 *Apoe*; C57BL/6-*Apoe*^{em1}/Nifdc; CRISPR/Cas9; 血脂代谢; 主动脉

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1390-09

Use of CRISPR/Cas9 system for establishment and characterization of *Apoe* gene knockout mice model

KE Lu, CAO Yuan, GU Wenda, LIU Susu, SUN Xiaowei, ZHAO Haoyang, ZHAI Shijie,
GUO Huaiyong, LOU Yue, FAN Changfa*

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC), Beijing 102629, China)

Corresponding author: FAN Changfa. E-mail: fancf@nifdc.org.cn

【Abstract】 Objective The CRISPR/Cas9 system was utilized to generate an *Apoe* knockout mice model to support further investigations of the role of *Apoe* in lipid metabolism and atherosclerosis. **Methods** Two single guide RNAs designed for *Apoe* in C57BL/6J mice were co-injected with Cas9 mRNA into fertilized eggs, followed by transplantation into ICR recipient mice to obtain F₀ generation mice. KO mice were identified by polymerase chain reaction (PCR) screening of tail DNA. *Apoe* mRNA expression in various tissues was assessed by quantitative real-time PCR and lipid indexes were measured in serum samples. Lipid accumulation in the inner lining of aortic vessels was detected by oil red O staining. **Results** PCR and sequencing confirmed the successful construction of *Apoe* KO mice (C57BL/6-*Apoe*^{em1}/Nifdc). *Apoe* mRNA levels were significantly reduced in the liver, brain, spleen, kidney, and lung tissues of *Apoe* KO homozygous mice

【基金项目】 国家重点研发计划 (2023YFC3402000)。

Funded by National Key Research and Development Program (2023YFC3402000).

【作者简介】 柯璐, 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 疾病动物模型。Email: kksl00@163.com

【通信作者】 范昌发, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 疾病动物模型。Email: fancf@nifdc.org.cn

(*Apoe*^{-/-}), as shown by reverse transcription quantitative real-time PCR. Serum total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels were increased in *Apoe*^{-/-} mice, and high-density lipoprotein cholesterol levels were decreased in male *Apoe*^{-/-} mice. Extensive lipid plaques were observed in the inner lining of the arteries in *Apoe*^{-/-} mice compared with WT mice, under normal chow consumption conditions. **Conclusions** This study successfully established an *Apoe* KO mice model exhibiting a typical abnormal lipid metabolism phenotype with arterial lipid accumulation, even without a high-fat diet intervention. This work provides background data for the *Apoe* KO mice resource and a new model for the study of abnormal lipid metabolism.

【Keywords】 *Apoe*; C57BL/6-*Apoe*^{em1}/Nifdc; CRISPR/Cas9; lipid metabolism; aorta
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

维持正常的胆固醇水平对于哺乳动物细胞功能和活力至关重要^[1]。胆固醇水平的升高是造成多种疾病的重要危险因素。脂类不溶于水,需要与载脂蛋白结合,实现在血浆中正常运输。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, *Apoe*) 是一种多态性蛋白参与脂蛋白的转化与代谢过程,是极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 和高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的组成部分,在脂蛋白和胆固醇的代谢和再分布中起着重要作用^[2]。*Apoe* 主要在肝和大脑中合成^[3],当 *Apoe* 功能失调或缺失时,人类^[4]和动物模型^[5]会出现严重的高脂血症。在 *Apoe* 敲除小鼠中^[6],动脉粥样硬化会自行发展,是动脉粥样硬化的理想模型。自从 1992 年 PIEDRAHITA 等^[6]首次通过胚胎干细胞打靶技术失活 *Apoe* 基因之后,大量研究揭示了 *Apoe* 的基因功能^[7-12],其在心血管系统、神经系统、呼吸系统、免疫系统、骨细胞发育和代谢发育等多种生理功能中都起着重要作用。虽然 *Apoe* 基因敲除小鼠在国内使用较为广泛,但多从国外引进,在商业化应用或药物研发领域可能存在知识产权限制。因此,本文通过 CRISPR/Cas9 技术构建了 *Apoe* 基因敲除小鼠模型 (*Apoe* KO 小鼠),检测分析了 *Apoe* 对血脂代谢以及诱导动脉粥样硬化的功能作用,为 *Apoe* 体内功能及靶向机制研究提供模型资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只 15 ~ 20 g 的 4 ~ 6 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠,20 只 30 ~ 35 g 的 10 ~ 12 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠和 10 只 25 ~ 30 g 的 6 ~ 8 周龄 SPF 级雌性 ICR 小鼠由中检院实验动物资源所繁育并提供【SCXK (京)2022-0002】,饲养于本单位实验动物资源研究所屏障环境中【SYXK (京)

2022-0014】。饲养期间给予小鼠标准饲料 (武汉市万千佳兴生物科技有限公司) 及灭菌自来水。饲养环境:室温 20 ~ 26 ℃,相对湿度 40% ~ 70%,照明 12 h 明/12 h 暗。所有操作均符合本单位实验动物伦理学要求 (中检动 (福)第 2024 (B)011 号)。

1.1.2 主要试剂与仪器

mMESSAGE mMACHINE T7 转录试剂盒 (AM1344)、多聚腺苷酸加尾试剂盒 (AM1350)、MEGAscript T7 Transcription Kit (AM1354) 和 MEGAclear Transcription Clean-Up Kit (AM1908) 均购于 Thermo Fisher; RNeasy Mini kit (74104) 购于 QIAGEN; RNA 提取试剂 (AN30307A)、RT-PCR 试剂盒 (AM81680A) 和荧光定量 PCR 试剂盒 (AM81776A) 购于 TaKaRa; 油红 O 试剂盒 (0803A22) 购于 LEAGENE。

微量定量注射仪 (FemtoJet 4i, Eppendorf); 显微镜注射系统 (IX71, OLYMPUS); 荧光定量 PCR 仪 (LC480 II, Roche); 超微量分光光度计 (Nanodrop2000, Thermo); 体视显微镜 (SM2745, Nikon); 冷冻离心机 (3-18KS, Sigma); PCR 扩增仪 (K960, Heal Force); 全自动生化分析仪 (7180, HITACHI)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 *Apoe* 基因敲除策略

小鼠 *Apoe* 基因定位于小鼠 7 号染色体,含有 4 个外显子。如图 1 所示,根据小鼠 *Apoe* 基因结构,在 2 号和 3 号外显子分别设计 2 个 sgRNA 靶位点,通过 CRISPR/Cas9 编辑技术敲除 2 号和 3 号外显子部分序列后,使得 *Apoe* 蛋白无法正常翻译,构建基因缺失模型。

1.2.2 sgRNA 的体外合成及转录

小鼠 *Apoe* 基因 Gene ID (NCBI): 11 816 定位于小鼠 7 号染色体 (Chromosome7: 19, 430, 034-19, 433, 113, Ensembl: ENSMUSG00000002985), 全长

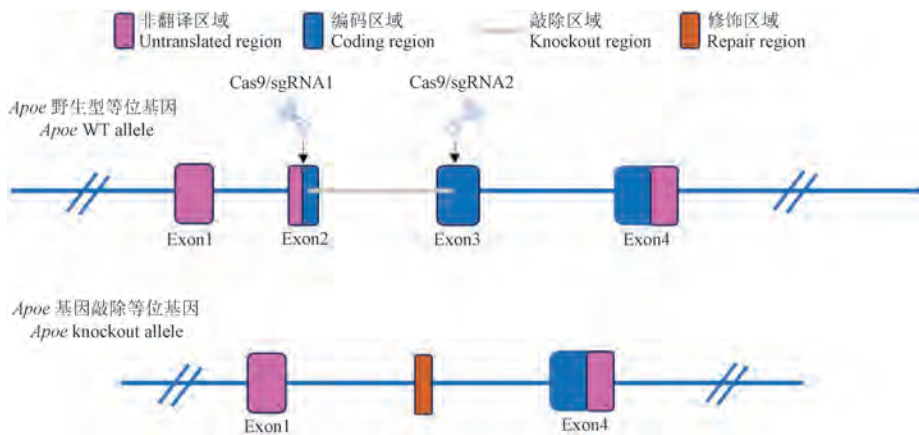


图 1 *Apoe* 基因敲除小鼠构建策略

Figure 1 Construction strategy of *Apoe* knockout mice

4518 bp, 包含 11 个转录本, *Apoe*-206 转录本长度为 1408 bp, 有 4 个外显子。根据敲除模型设计原则, 选择共有转录本的 2 号外显子和 3 号外显子作为敲除区域。在 2 号和 3 号外显子的上下游分别设计 2 个 sgRNA 靶位点, 通过在线网站 <https://cctop.cos.uni-heidelberg.de/> 设计获得 sgRNA 序列(如表 1 所示)。并在 sgRNA 设计后通过网站 <http://www.rgenome.net/> 检测其是否存在潜在脱靶位点, 确保该 sgRNA 仅有一个目标靶点。

表 1 sgRNA 序列信息

Table 1 sgRNA sequence information

sgRNA 靶序列 sgRNA target sequence	序列信息(5'-3') Sequence information(5'-3')
sgRNA1	F:TAGGTATGGAGCAAGGACTTGCTG R:AAACACGAAAGTCCTTGCTCCATA
sgRNA2	F:TAGGGCAGGCCTGAACCGCTTCT R:AAACAGAAGCGGTTTCAGGGCCTGC

引物合成后经退火连接后使用 Bbs I 酶切 pT7 质粒, 然后克隆转化, 次日挑取 4 个菌落进行质粒提取, 并进行测序验证。以测序正确的 sgRNA 质粒为模板进行 PCR 扩增。PCR 条件: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 15 s, 共 30 个循环, 反应程序结束后于 4 ℃ 保存。PCR 扩增产物加入 2 倍体积无水乙醇, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 加入 500 μL 70% 乙醇清洗 2 次, 然后将沉淀溶解于 30 μL RNase free 水中。使用 MEGAshonscript T7 Transcription Kit 进行体外转录, 于 37 ℃ 孵育 4 h, 然后加入 DNase 消化 20 min, 使用 MEGAclear Transcription Clean-Up Kit 纯化产物, 经进一步浓缩并分装存于 -80 ℃ 备用。

1.2.3 Cas9 mRNA 的体外转录

采用 px330 质粒为模板, 采用 Hind III 酶进行酶

切, 电泳跑胶回收后, 最终加入 30 μL RNase free 水溶解。以回收产物为模板, 利用 mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription kit 进行体外转录, 于 37 ℃ 孵育 2 h, 然后加入 DNase 消化 20 min, 再使用 Poly(A) Tailing kit 加尾 50 min, 最后使用 RNeasy Mini kit 对产物进行纯化, 再经浓度测定后分装存于 -80 ℃ 备用。

1.2.4 显微注射及胚胎移植

4 ~ 6 周龄 C57BL/6 雌性小鼠超数排卵后与雄鼠合笼, 挑选见栓雌鼠, 剖开腹腔, 在输卵管壶腹部收集受精卵细胞。将构建好的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 于冰上解冻, 混合浓度为 sgRNA 50 ng/μL, Cas9 mRNA 100 ng/μL, 12 000 r/min 离心 40 min, 吸取上清, 见图 2。用吸管吸取液体从注射针后端注入尖端, 进行显微注射。操作成功的囊胚放入胚胎培养液中, 37 ℃, 5% CO₂ 培养 30 ~ 60 min, 随后快速移植到假孕母鼠的子宫内, 缝合后将移植鼠饲养于 IVC 环境中。移植鼠产出 F₀ 代小鼠后通过剪尾进行基因型鉴定与筛选。

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

分别取 *Apoe* KO 纯合小鼠与同窝野生型小鼠组织用于 RT-qPCR 检测。使用 RNAiso Plus 提取组织 RNA, 并检测 RNA 浓度及纯度, 测定 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 及 OD_{260 nm}/OD_{230 nm} 的值在 1.8 ~ 2.2 的范围内, 反转录合成 cDNA 后, 以 *Gapdh* 为内参采用 RT-qPCR 技术对其进行表达量的测定。反应的条件设置: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s (40 个循环); 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 95 ℃ 15 s。反应结果使用 LC480 Software 1.5 软件收集、分析。所有的样品都在同一块板中做 3 次重复, RT-qPCR 引物如表 2 所示。

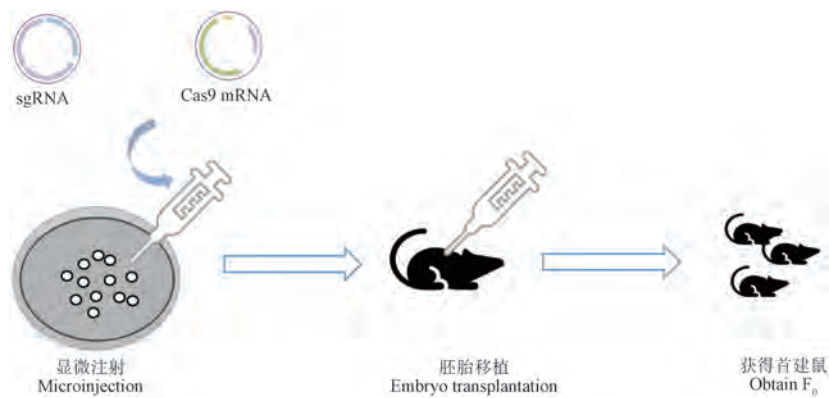


图 2 Apoe KO 小鼠构建流程

Figure 2 Construction process of Apoe KO mice

表 2 RT-qPCR 引物序列

Table 2 RT-qPCR primer sequences

引物 Primer	序列信息(5'-3') Sequence information(5'-3')	解链温度/℃ Tm/℃	GC 含量/% GC/%	产物长度/bp Product length/bp
Apoe	F:CCGTGCTGTTGCTCACATT	58.67	52.63	91
	R:CAGGGTTGGTTGCTTTGC	57.24	55.56	
Gapdh	F:GCTCGGTGTAACGGATTTC	59.48	55.00	97
	R:GAAGGGTGCTGTGATGCCAA	60.61	55.00	

1.2.6 血脂水平测定

注射 0.5 mg/mL 的舒泰,小鼠麻醉后采集血液,全血静置 1 ~ 2 h,待血液充分凝固后离心分离得到血清,使用全自动分析仪以及胆固醇(cholesterol, Chol)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂盒对血清进行血脂指标检测。

1.2.7 动脉粥样硬化特征检测

将小鼠仰卧位固定于解剖台,麻醉后剪开胸腔,充分暴露心脏。将连有生理盐水的输液器针头自心尖部插入左心室,在右心耳剪开一小口进行全身灌注。灌注完成后分离主动脉并置于 4% 的甲醛中固定,固定后将血管外部的多余脂肪分离干净。将 Vannas 弹簧剪自升主动脉断口处伸入血管腔内,沿主动脉弓大弯侧剖开整个主动脉。将剖开的主动脉内膜面朝上展开并进行固定。60% 异丙醇浸洗 20 ~ 30 s 后加入改良油红 O 染色液,密闭染色

10 ~ 15 min。再置入 60% 异丙醇稍洗去除染液,蒸馏水复洗。最后固定血管后拍照,分析阳性斑块的数量。

1.3 统计学分析

用 SPSS 23.0 和 Graphpad 8.0 软件进行统计学分析,数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验分析。以 *P* < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

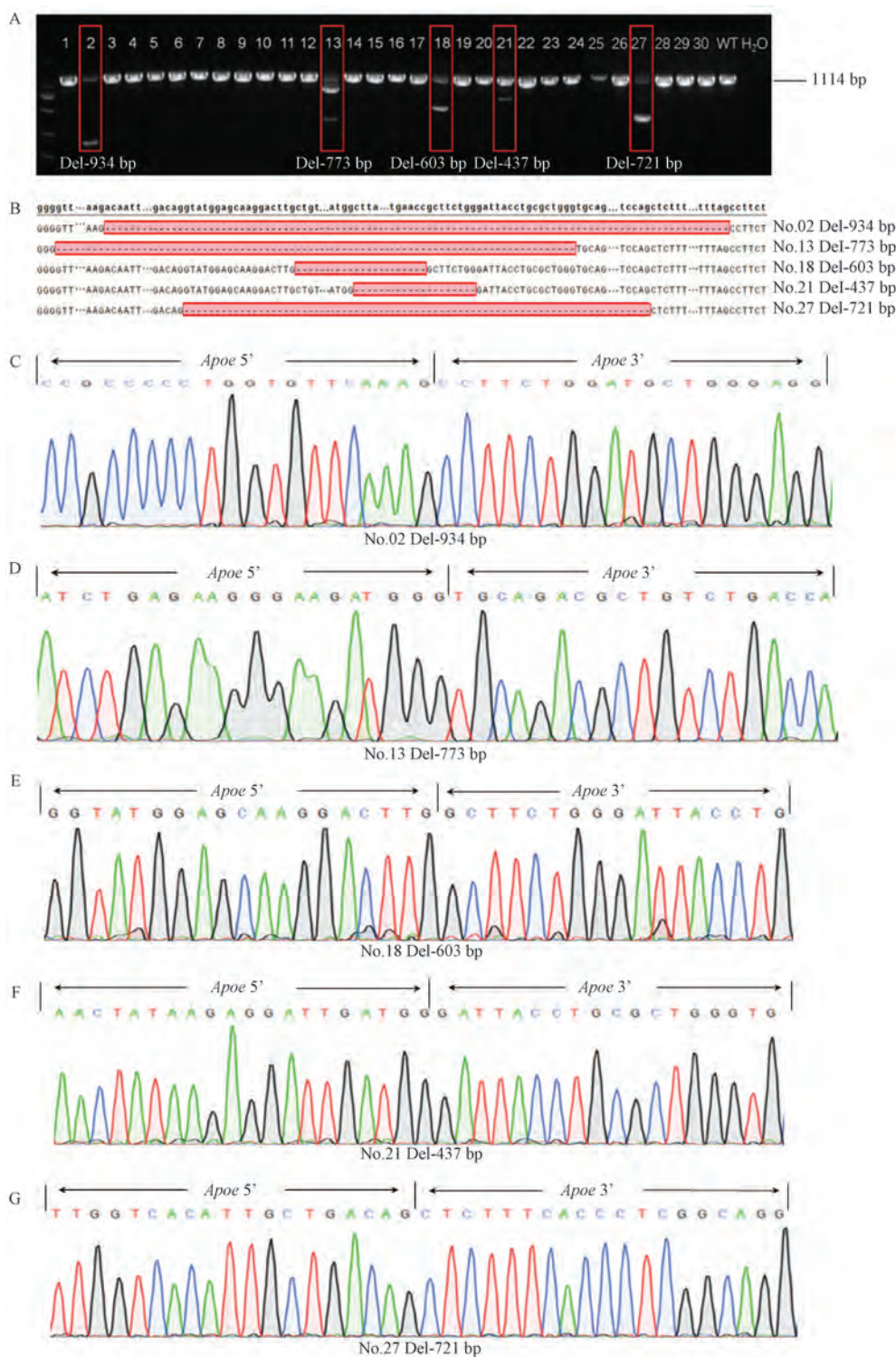
2.1 Apoe KO 小鼠的造模

如表 3 所示,将显微注射后的 80 枚受精卵移植到假孕母鼠的子宫内,产仔后获得 30 只 F₀ 代小鼠,通过 PCR 结果显示共有 5 只小鼠的靶位点发生非同源重组修复,导致碱基发生随机缺失(图 3A)。对 PCR 产物进行 Sanger 测序,5 只敲除小鼠分别为 2 号(雌性,敲除 934 bp),13 号(雄性,敲除 773 bp),18 号(雄性,敲除 603 bp),21 号(雄性,敲除 437 bp),27 号(雌性,敲除 721 bp)(图 3B ~ 3G)。根据 CRISPR/Cas9 的工作原理一般会在 PAM 序列

表 3 Apoe KO 小鼠的筛选流程

Table 3 Procedures for acquisition of Apoe KO mice

品系 Strain	胚胎移植数/个 Number of embryos transferred/numbers	新生小鼠数/只 Number of born mice/numbers	敲除阳性小鼠数/只 Number of knock-out positive mice/numbers	筛选阳性小鼠数/只 Number of positive mice was screened/numbers
C57BL/6J	80	30	5	2



注:A;PCR 鉴定 F₀ 代小鼠基因型,野生型条带大小:1147 bp,敲除片段大小分别为 934 bp,773 bp,603 bp,437 bp,721 bp;B:F₀ 代小鼠测序比对;C ~ G:5 只 F₀ 代 Apoe KO 小鼠的 Sanger 测序峰图。

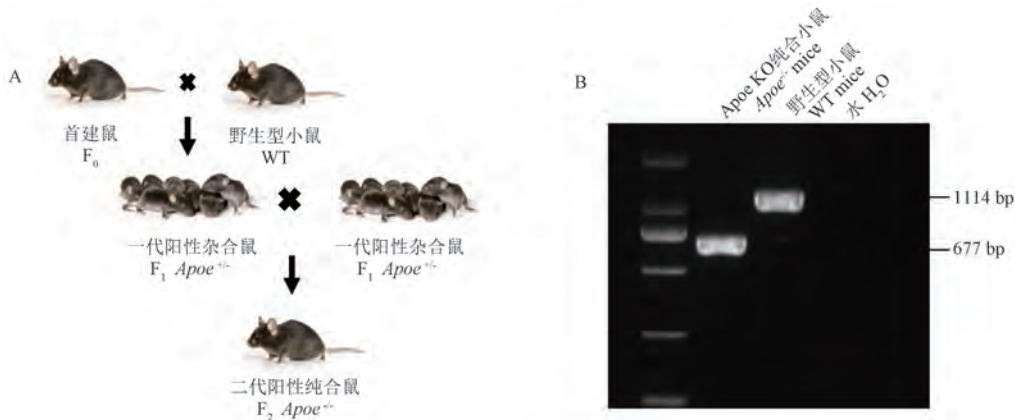
图 3 Apoe KO 小鼠筛选

Note. A. F₀ generation mice genotypes were identified by PCR. Size of wild-type band was 1147 bp, and the size of knockout band was 934 bp, 773 bp, 603 bp, 677 bp, 721 bp. B. Sequencing comparison of F₀ generation mice. C ~ G. Sanger sequencing peak result of F₀ positive Apoe KO mice.

Figure 3 Screening of Apoe KO mice

上游的第 3 个碱基进行断裂,因此根据两条 sgRNA 可以预测目标敲除条带是 605 bp,以上敲除小鼠大都在目标片段附近。之前的研究表明,在阳性小鼠的筛选中,通常优先选取雄性且非 3 的整倍数碱基敲除的小鼠^[13]。因此,选择了其中的 13 号和 21 号阳性小鼠进行扩繁,本研究中使用 21 号阳性小鼠进

行实验。将 21 号 F₀ 代小鼠与野生型小鼠交配,获得 F₁ 代小鼠,通过 PCR 筛选出 Apoe KO 杂合小鼠 (Apoe^{+/-}) (图 4A)。最后通过 F₁ 代杂合小鼠自交获得 F₂ 代 Apoe KO 纯合小鼠 (Apoe^{-/-}), PCR 结果如图 4B 所示。野生型条带大小为 1147 bp,敲除鼠条带大小为 677 bp。



注:A: Apoe KO 小鼠繁殖策略;B: F₂ 代小鼠 PCR 鉴定小鼠基因型。
图 4 Apoe KO 纯合小鼠的繁殖与鉴定

Note. A. Reproductive strategy of Apoe KO mice. B. Genotyping were identified by PCR of F₂ generation mice.

Figure 4 Reproduction and identification of Apoe^{-/-} mice

2.2 Apoe mRNA 相对表达量的变化

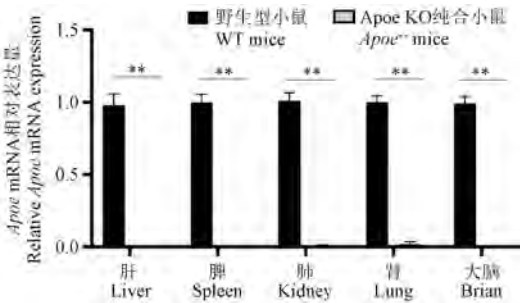
为了验证敲除效率,在 Apoe 基因的第 2 号外显子和第 3 号外显子设计上下游引物,利用 RT-qPCR 检测 3 ~ 4 月龄小鼠组织中的 Apoe mRNA 表达水平,如图 5 所示,与野生型小鼠相比,Apoe KO 纯合小鼠的肝、脾、肺、肾和大脑组织中的 Apoe mRNA 表达水平显著降低,几乎检测不到 Apoe mRNA 的表达,这表明 Apoe 基因被成功敲除,并获得了 Apoe KO 纯合小鼠。

2.3 小鼠血脂代谢的变化

通过检测 3 ~ 4 月龄小鼠血清中各项血脂代谢的指标,结果如图 6 所示,虽然 Apoe KO 纯合小鼠的甘油三酯水平与野生型小鼠无明显差异,但总胆固醇水平显著升高。同时测量了 LDL-C 与 HDL-C,发现 Apoe KO 纯合小鼠血清中的 LDL-C 显著升高,但 HDL-C 没有显著的变化,进一步分析发现,Apoe KO 纯合雄性小鼠的血清 HDL-C 显著降低,而雌性小鼠无显著性差异。这表明 Apoe 基因会影响血脂代谢,并且对雄性小鼠的影响更大。

2.4 小鼠主动脉血管的脂质积聚

解剖 3 ~ 4 月龄的小鼠,油红 O 染色其主动脉血管,如图 7A 所示,野生型小鼠的主动脉血管干净平滑,无任何油红 O 阳性脂质斑块,而同龄的 Apoe

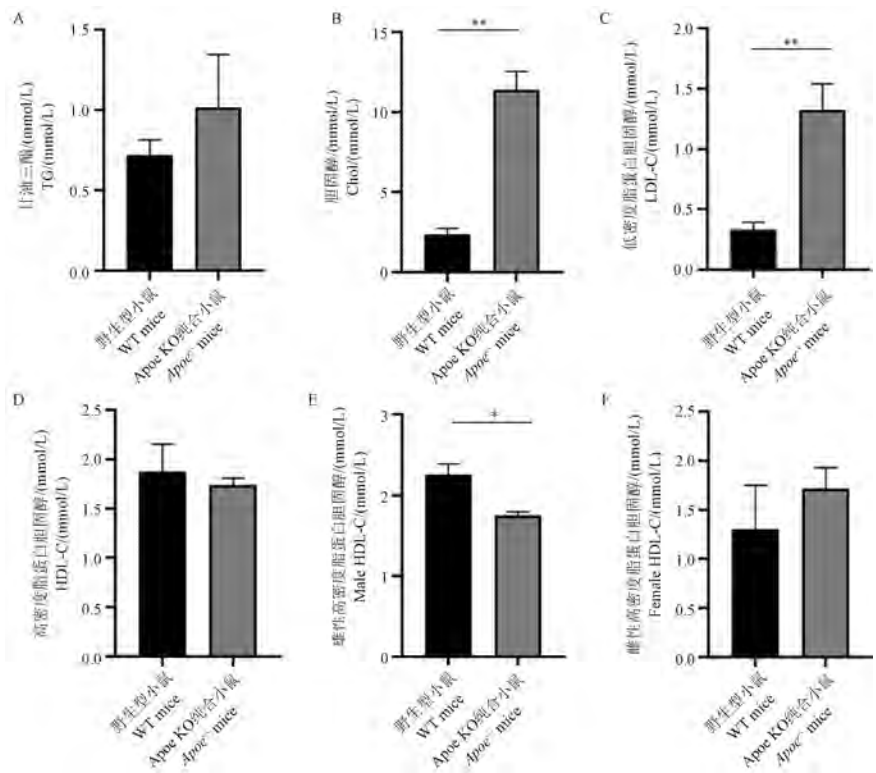


注:与野生型小鼠相比,** P < 0.01。(下同)
图 5 Apoe KO 纯合小鼠中 Apoe mRNA 的表达水平($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Note. Compared with WT mice, ** P < 0.01. (The same in the following figures)

Figure 5 Apoe mRNA expression levels in Apoe^{-/-} mice($\bar{x} \pm s, n = 4$)

KO 纯合小鼠的主动脉内壁附着有油红 O 染色阳性红色的脂质斑块,如图 7A 箭头所指,Apoe KO 纯合小鼠的主动脉弓、降主动脉和血管交界处都分布着红色脂质斑块。同时对野生型小鼠、Apoe 敲除组小鼠的油红 O 染色阳性斑块数量统计发现,二者存在显著性差异(图 7B)。这些结果表明即使在没有高脂饲料饲喂的情况下,Apoe KO 纯合小鼠在 3 ~ 4 月龄的时候就能够形成早期动脉粥样硬化的特征。

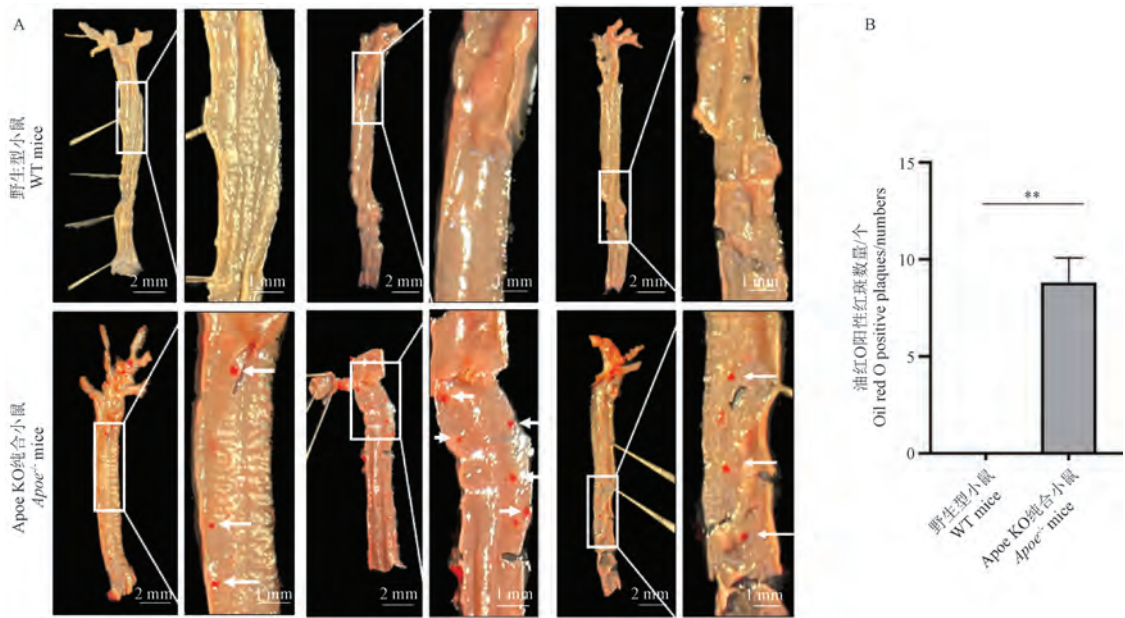


注:A;TG 水平比较;B:Chol 水平比较;C:LDL-C 水平比较;D:HDL-C 水平比较;E:雄性 HDL-C 水平比较;F:雌性 HDL-C 水平比较;与野生型小鼠相比,* $P < 0.05$ 。

图 6 3 ~ 4 月龄 Apoe KO 纯合小鼠与同龄野生型小鼠血脂比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Comparison of TG levels. B. Comparison of Chol level. C. Comparison of LDL-C levels. D. Comparison of HDL-C levels. E. Comparison of HDL-C levels in male mice. F. Comparison of HDL-C levels in female mice. Compared with WT mice, * $P < 0.05$.

Figure 6 Comparison of serum lipid levels between *Apoe*^{-/-} mice and WT mice at 3 ~ 4 months age($\bar{x} \pm s, n = 5$)



注:A;主动脉根部油红 O 染色;箭头:油红 O 阳性染色斑块;B:主动脉血管油红 O 阳性染色斑块数量统计。

图 7 Apoe KO 纯合小鼠与野生型小鼠血脂主动脉根部油红 O 染色($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Oil red O staining of aorta root. Arrow. Oil red O positive staining plaque. B. Statistical analysis of aorta oil red O positive staining plaque.

Figure 7 Oil red O staining of aorta root of *Apoe*^{-/-} mice and WT mice($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

人类疾病与基因功能密切相关,研究基因的功能是当今生命科学领域的重要内容。通过基因编辑技术构建特定基因的敲除模型,不仅仅为某种疾病提供模型工具,也是研究基因功能的首选方法。其中基因编辑的小鼠模型已被广泛应用于多种研究领域,由于小鼠与人有 90% 同源基因,因此这些基因功能可以类推至人类身上^[14]。Apoe 是一种多功能蛋白,作为血浆脂蛋白的组分在脂质运输中起着重要作用^[4]。有研究表明,通过胚胎干细胞同源重组构建了靶向缺失 Apoe 小鼠在动脉树的许多部位会自发动脉粥样硬化性病变^[5]。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术是通过 sgRNA 引导能够对目标基因内特定位点进行精确修饰,是一种简单、高效且经济实惠的基因组编辑技术^[15]。在本研究中通过设计两条 sgRNA 能够预测敲除位置以及片段大小,造成靶位点中间区域片段的缺失,相比于单一 sgRNA 能够实现更高的敲除效率以及可控性。在胚胎移植后通过 PCR 和测序筛选 F₀ 代的阳性敲除小鼠,一般选择符合所设计的 sgRNA 预期敲除片段大小的小鼠,排除敲除片段大小为 3 的倍数的小鼠,同时保留多个 F₀ 代小鼠传代繁殖,以保证能够扩繁稳定的敲除小鼠群体,由于雄性小鼠在扩繁中的相对优势,可以优先考虑雄性小鼠作为 F₀ 代小鼠。在本研究中,选择了 437 bp 片段敲除的 21 号 F₀ 代小鼠进行传代,在 F₂ 代获得纯合的 Apoe KO 小鼠。有研究表明,Apoe 在多个组织中都有所表达,其中肝细胞是 Apoe 蛋白的主要合成位点^[16]。通过 RT-qPCR 检测到 Apoe mRNA 在野生型小鼠的肝、脾、肺、肾和大脑表达,尤其在肝中的表达最高,与之前的研究结果一致,而敲除 Apoe 基因的纯合子小鼠的组织几乎检测不到 Apoe mRNA 的表达,这证明敲除小鼠模型的构建是成功的。

Apoe 作为血浆脂质水平的关键调节因子,能够参与血浆脂质含量的稳态控制。对小鼠血清胆固醇水平检测结果显示 Apoe KO 纯合小鼠胆固醇、LDL-C 水平显著升高,雄性 Apoe KO 纯合小鼠 HDL-C 水平显著降低,以及 Apoe KO 纯合小鼠主动脉内壁形成的脂质累积,这都是动脉粥样硬化的早期表征^[17]。小鼠的动脉粥样硬化以时间依赖性方式发展动脉病变,因此在血脂和血管的检测中小鼠年龄选择也尤为重要,本研究选取的 3 ~ 4 月龄小鼠处

于动脉粥样硬化的早期进程,有文献表明在 8 ~ 9 月龄小鼠中动脉能观察到更广泛病变分布^[18],在 1 岁时出现晚期动脉粥样硬化病变,能够获得更好的病理学表征^[19]。在动脉粥样硬化疾病的小鼠模型构建中,Apoe 基因缺失小鼠会自发形成动脉粥样硬化,但通常在研究中会通过高脂肪饮食加速 Apoe KO 小鼠动脉粥样硬化进程,更好地模拟人类饮食依赖性动脉粥样硬化的表征^[20]。而本研究中,在正常的、非高脂饲料情况下,即可观察到典型的脂质斑块表型,意味着本模型可以用于动脉粥样硬化研究。

综上,本研究通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功构建 Apoe KO 小鼠模型,并对其在血脂代谢以及血管病变中的功能进行了初步研究,发现 Apoe 在血液中维持胆固醇稳态和清除乳糜微粒的功能,可以模拟动脉粥样硬化的发展病程。另外,Apoe 在神经、血管等许多疾病中都有着重要的作用,本研究提供了新的 Apoe KO 小鼠模型,并且在传代 4 代之后依然能够正常繁殖以及保持稳定的表型,为更好地研究 Apoe 在疾病中的功能提供了基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] CHEN L, ZHAO Z W, ZENG P H, et al. Molecular mechanisms for ABCA1-mediated cholesterol efflux [J]. Cell Cycle, 2022, 21(11): 1121-1139.
- [2] REUE K L, QUON D H, O'DONNELL K A, et al. Cloning and regulation of messenger RNA for mouse apolipoprotein E [J]. J Biol Chem, 1984, 259(4): 2100-2107.
- [3] RABER J, AKANA S F, BHATNAGAR S, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal dysfunction in Apoe^{-/-} mice: possible role in behavioral and metabolic alterations [J]. J Neurosci, 2000, 20(5): 2064-2071.
- [4] MAHLEY R W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology [J]. Science, 1988, 240(4852): 622-630.
- [5] PLUMP A S, SMITH J D, HAYEK T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells [J]. Cell, 1992, 71(2): 343-353.
- [6] PIEDRAHITA J A, ZHANG S H, HAGAMAN J R, et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(10): 4471-4475.
- [7] FULLERTON S M, SHIRMAN G A, STRITTMATTER W J, et al. Impairment of the blood-nerve and blood-brain barriers in apolipoprotein E knockout mice [J]. Exp Neurol, 2001, 169(1): 13-22.
- [8] HARTLEY C J, REDDY A K, MADALA S, et al.

Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279 (5): H2326-H2334.

[9] MASSARO D, MASSARO G D. Apoetm1Unc mice have impaired alveologenesi s, low lung function, and rapid loss of lung function [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294 (5): L991-L997.

[10] ZHOU X, PAULSSON G, STEMME S, et al. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic Apo E-knockout mice [J]. J Clin Invest, 1998, 101(8) : 1717-1725.

[11] SCHILLING A F, SCHINKE T, MÜNCH C, et al. Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(2) : 274-282.

[12] MOGHADASIAN M H, MCMANUS B M, NGUYEN L B, et al. Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice; relevance to apo E-related disorders in humans [J]. FASEB J, 2001, 15 (14): 2623-2630.

[13] 吴曦, 霍桂桃, 刘甦苏, 等. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 FcγR 基因大片段敲除小鼠模型 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5) : 583-591.

WU X, HUO G T, LIU S S, et al. Establishment of a large fragment FcγR gene knockout mouse model using CRISPR/Cas9 genome editing technique [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(5) : 583-591.

[14] VANDAMME T F. Use of rodents as models of human diseases [J]. J Pharm Bioallied Sci, 2014, 6(1) : 2-9.

[15] MA Y, ZHANG L, HUANG X. Genome modification by CRISPR/Cas9 [J]. FEBS J, 2014, 281(23) : 5186-5193.

[16] HUANG Y, MAHLEY R W. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer ' s diseases [J]. Neurobiol Dis, 2014, 72: 3-12.

[17] JAWIEN J, NASTALEK P, KORBUT R. Mouse models of experimental atherosclerosis [J]. J Physiol Pharmacol, 2004, 55 (3): 503-517.

[18] REDDICK R L, ZHANG S H, MAEDA N. Atherosclerosis in mice lacking Apo E. Evaluation of lesion development and progression [J]. Arterioscler Thromb, 1994, 14(1) : 141-147.

[19] WANG Y X, HALKS-MILLER M, VERGONA R, et al. Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 278(2) : H428-H434.

[20] 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.

[收稿日期] 2024-04-17

《中国实验动物学报》稿约

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

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>
期待您的来稿!

邱华明,李子祥,唐杰,等. 贵州小型猪 2 型糖尿病气阴两虚证模型建立及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1399-1407.

QIU H M, LI Z X, TANG J, et al. Establishment and evaluation of a Qi Yin deficiency syndrome model of type 2 diabetes in Guizhou miniature pigs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1399-1407.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.004

贵州小型猪 2 型糖尿病气阴两虚证模型建立及评价

邱华明,李子祥,唐杰,吴延军,赵海,吴曙光*

(贵州中医药大学,贵阳 550025)

【摘要】 目的 本研究旨在探讨贵州小型猪 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 气阴两虚证模型的构建方法及评价体系和相关指标。**方法** 选取 6 月龄贵州小型猪 26 只,其中正常组 6 只采用基础饲料喂养 10 个月, T2DM 气阴两虚证模型组 20 只采用高糖高脂饲料饲喂 10 个月、青皮附子水煎剂喂养 3 个月,构建了贵州小型猪 T2DM 气阴两虚证模型。以小便情况、大便情况、行动、精神、对周围环境反应及皮毛鼻盘色泽 5 方面量表评价中医证型,血清 CD4⁺、CD8⁺ 及两者比值, cAMP、cGMP 及两者比值、舌象红色值(R)、绿色值(G)和蓝色值(B)评估气阴两虚证。采用空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS)、糖化血红蛋白 (glycated hemoglobin, HbA1c)、糖耐量实验 (glucose tolerance test, OGTT)、胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)、甘油三酯 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 等指标变化,苏木素-伊红 (HE) 染色观察胰腺组织形态学变化来评价 T2DM。**结果** 模型组小型猪的体征可概括为体型偏胖、神疲乏力、好卧、懒动、精神萎靡、无神、食少多饮、皮毛无光泽、皮毛灰暗;二便、行动及精神、对周围环境反应、皮毛鼻盘色泽等评分偏低 ($P < 0.05$);舌象呈舌红无苔或少苔;与正常组相比,模型组小型猪实验室指标出现了 FBG、HbA1c、HOMA-IR、TC、LDL-C、cAMP、cGMP、舌象 R、G、B 值显著降低, PT、APTT、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 值显著下降, TG 升高 ($P > 0.05$), HDL-C 升高 ($P > 0.05$), cGMP 升高 ($P > 0.05$);病理染色显示胰腺组织破坏。**结论** 采用高糖高脂饲料配合破气伤阴中药饲喂的方法可成功建立 T2DM 气阴两虚小型猪模型。该模型在中医证候上呈现神疲乏力、烦渴欲饮、气短懒言、舌红少津、少苔、脉虚无力的主症和小便色黄透明无味、大便干结、反应迟钝、蜷缩、皮毛无光泽、灰暗、鼻盘淡白无华等兼症,也呈现糖脂代谢异常和胰岛素抵抗的临床表现。

【关键词】 贵州小型猪; 2 型糖尿病; 气阴两虚证; 空腹血糖

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1399-09

Establishment and evaluation of a Qi Yin deficiency syndrome model of type 2 diabetes in Guizhou miniature pigs

QIU Huaming, LI Zixiang, TANG Jie, WU Yanjun, ZHAO Hai, WU Shuguang*

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Corresponding author: WU Shuguang. E-mail: 243099502@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the construction method, evaluation system, and related indicators of the Qi Yin deficiency syndrome model of type 2 diabetes (T2DM) in Guizhou miniature pigs. **Methods** Twenty-six 6-month-old Guizhou miniature pigs were divided into 2 groups: pigs fed a basic diet for 10 months (normal group, $n = 6$), and pigs

【基金项目】 国家自然科学基金 (82160957), 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2021] 一般 148), 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK [2024] 一般 360)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82160957), Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project (Supported by Qiankehe [2021] General 148), Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project (Qiankehe Fundamentals-ZK [2024] General 360).

【作者简介】 邱华明, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医基础。Email: 137415316@qq.com

【通信作者】 吴曙光, 硕士, 正高级实验师, 硕士生导师, 研究方向: 中医基础理论与实验动物学。Email: 243099502@qq.com

fed a high-sugar, high-fat diet for 10 months followed by Qingpi Fuzi decoction for 3 months (Qi Yin deficiency in T2DM model group, $n = 20$). Qi Yin deficiency in the T2DM model was created in Guizhou miniature pigs. Traditional Chinese medicine syndrome types were evaluated using five scales, including urination, defecation, movement and mental state, response to the surrounding environment, and color of the skin, hair, and nasal disc. Serum $CD4^+$ and $CD8^+$ and their ratios, cAMP and cGMP and their ratios, as well as tongue RGB color values were used to evaluate Qi Yin deficiency syndrome. Fasting blood glucose (FBG), glycosylated hemoglobin (HbA1c), glucose tolerance test (OGTT), homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and other indicators were used to evaluate T2DM. **Results** Physically, the model group pigs were overweight and showed fatigue, with a tendency to lie down, lethargy, overeating and drinking, and dull fur. The defecation, movement and mental state, response to the surrounding environment, and color of the skin, fur, and nasal disc scores were relatively low ($P < 0.05$). The tongue appeared red with no or little coating. Pigs in the model group showed significantly lower of FBG, HbA1c, HOMA-IR, TC, LDL-C, cAMP, and cGMP, compared with the normal group. The RGB values of the tongue images were significantly reduced. The PT, APTT, $CD4^+$, and $CD4^+/CD8^+$ values were also significantly reduced, and TG, HDL-C, and cGMP were all elevated (all $P > 0.05$). Pathological staining showed destruction of pancreatic tissue. **Conclusions** The method of using a high-sugar and high-fat diet combined with traditional Chinese medicine for breaking Qi and damaging Yin can be used to establish a small pig model of T2DM with Qi Yin deficiency. The established model shows the main symptoms of fatigue, thirst, shortness of breath and lethargy, redness and dryness of the tongue, lack of coating on the tongue, and a weak pulse in traditional Chinese medicine syndromes, as well as concurrent symptoms including yellow and transparent urine, dry stools, slow response, curling up, dull fur, and a gray and dull nasal disc, as well as clinical manifestations of abnormal glucose and lipid metabolism and insulin resistance.

[Keywords] Guizhou miniature pig; type 2 diabetes mellitus; Qi Yin deficiency syndrome; fasting blood glucose

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

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一组由遗传和环境等多种因素引起的,由胰岛素分泌和(或)作用缺陷所导致的以慢性高血糖为特征的代谢性疾病,常伴有糖、脂肪、蛋白质、水、电解质等代谢紊乱的临床综合征^[1]。其中 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)占 95%以上。DM 在中医学中属于“消渴”范畴,主要病机是阴虚内热。2022 年版《国家糖尿病基层中医防治管理指南》中指出 DM 中医主要证型分为热盛伤津证、肝郁脾虚证、痰浊中阻证、气阴两虚证、湿热蕴结证^[2]。其中气阴两虚证是 DM 前期及 DM 最常见和最主要的证型^[3-4]。

中医病证结合模型是一种将中医证候与现代医学疾病相结合,综合病因、病理变化、临床表现等因素,建立符合中医证候特点的动物模型^[5]。主要用于研究中医证候的病因、发病机制和治疗方法。2 型糖尿病的中医证候病证结合模型研究目前大多采用大鼠作为模型动物,使用疾病造模因素与证候造模因素相叠加的方法来建立模型,采用 T2DM 指标及证候指标来评判模型^[6]。上述造模方法和所采用的动物尚不能完全模拟符合中医基础理论的 T2DM 中医证候特点以及 T2DM 发生发展变化。贵

州小型猪是由贵州中医药大学甘世祥教授于 1982 年引种培育的实验小型猪,具有体型小、繁殖力高、基因纯合等特点,特别是在胰岛素分泌、糖耐量异常等生理过程与人类相似,能更好地模拟 DM 发病过程^[7]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 月龄清洁级贵州小型猪 26 只,雄性 14 只,雌性 12 只,体重(10.98 ± 2.42)kg,由贵州中医药大学实验动物研究所提供【SCXK(黔)2021-0003】,饲养于贵州中医药大学实验动物研究所清洁级实验室中【SYXK(黔)2021-0005】。饲养条件:正常室温 $20 \sim 26^\circ\text{C}$,湿度 $50\% \sim 70\%$;12 h/12 h 昼夜节律,动物可以自由进食饮水。本研究涉及的实验动物及实验操作均经过贵州中医药大学动物实验伦理学审批(20220116)。

1.1.2 主要试剂与仪器

附子(四川江油,220101),青皮(江西新余,20220201),4%多聚甲醛组织固定液(biosharp,

22315976), CD4⁺、CD8⁺ 试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司, RX501095P), 环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP), 环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司, RX501017P), GHb、INS 试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司, RX500940P), 10 mL 丙泊酚注射液(四川国瑞药业有限责任公司, H20040079)。

罗氏卓越型血糖仪(罗氏诊断有限公司, ACCU-CHEK Performa), HS11 型数码相机(富士公司, FinePix HSII), 台式高速冷冻离心机(大龙, D3024R), 酶标检测仪(BioTeK, Epoch), 全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技, Chemray 420), 脱水(DIAPATH, Donatello), 包埋机(武汉俊杰电子有限公司, JB-P5)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模

将 26 只 6 月龄小型猪随机分为 T2DM 气阴两虚证模型组(以下简称模型组)20 只和正常组 6 只, 其中模型组雌性 10 只, 雄性 10 只, 正常组雌性 2 只, 雄性 4 只。模型组喂养高脂高糖饲料, 第 7 个月开始每天在高脂高糖饲料中加入青皮附子水煎剂直到实验结束, 正常组喂养基础饲料, 直到实验结束。以上实验小型猪每天喂食两次(早上 8 点、下午 4 点), 提供自由饮用水, 实验周期为 10 个月。

1.2.2 青皮附子水煎剂的制备

在制作过程中, 严格遵循青皮与附子 3 : 2 比例。首先, 向青皮附子中加入 8 倍质量的纯水, 并静置 30 min。随后, 进行第一次煮沸处理, 持续 1 h, 并用纱布过滤掉药渣。回收药渣, 并加入相当于药材质量 4 倍的纯水进行第 2 次熬制。同样持续 1 h 后, 再次用纱布过滤。将两次得到的药液合并, 并使用旋转蒸发仪将其浓缩至 0.5 g/mL 生药的浓度^[3]。

1.2.3 小型猪 T2MD 气阴两虚证中医证型评价及量表

根据《国家糖尿病基层中医防治管理指南》^[2]《中药新药临床研究指导原则》^[8]《中医糖尿病临床诊疗指南》^[9]三者中 T2DM 气阴两虚证的共同表现: 神疲乏力、烦渴欲饮、气短懒言、舌淡红少津、少苔、脉虚无力等主症, 小便短少、大便干结等兼证, 制定了小便情况、大便情况、行动及精神、对环境反应情况、皮毛鼻盘色泽 5 个有关中医证候评定量表(具体如表 1 ~ 5), 采取相关体征指标作为模型中

医证候评价标准^[10-11], 其中评分越低越接近气阴两虚证的表现。

1.2.4 小型猪 T2MD 诊断标准

世界卫生组织对于人类糖尿病的诊断标准是空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) ≥ 7.0 mmol/L。根据国家实验动物专家委员会的相关规定, 小型猪的 MD 诊断标准: FBG ≥ 6.77 mmol/L 即为造模成功^[12]。

1.2.5 小型猪体重系数、饮水量、饮食量测定

每个月空腹状态下测量小型猪的体重、身长, 计算体重系数: 体重系数 = 体重/身长的平方。在第 10 个月每周记录小型猪的 24 h 饮水量、饮食量: 饮水量 = 单只猪的总加水量 - 24 h 后剩余水量; 饮食量 = (单只猪早上的总加饲料量 - 早上剩余量) + (单只猪下午的总加饲料量 - 下午剩余量)。测饮食量时, 采用小型猪自然条件下饮食, 直至小型猪吃饱后不再继续饮食时开始测量。为了确保对小型猪体征变化的判断标准一致, 排除个人主观判断和评判标准的误差, 一个人负责记录和评分, 另一个人负责审核评分结果。

1.2.6 小型猪舌象分析

于实验结束前最后一周采集小型猪舌象信息, 在小型猪麻醉状态下, 使用镊子拉动其舌头, 使其完全暴露。在数码相机的近距离拍摄模式下, 将小型猪的舌面与标准色卡进行比对拍照。使用 Photoshop2021 中的套圈工具选择舌尖至舌面中部的特定区域。通过“直方图”工具, 精确地计算出选定区域内的红色值(R)、绿色值(G)和蓝色值(B)。

1.2.7 FBG 测定、糖耐量测定、糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1c)测定、胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)

计算每个月在空腹 16 h 后用血糖仪及血糖试

表 1 小便情况评定表

Table 1 Evaluation of urinary conditions			
评分/分 Score/ points	颜色 Colour	气味 Smell	质地 Texture
0	-	无味道 Unsavory	-
1	深黄 Deep yellow	轻度臭 Mild odor	透明 Transparent
2	介于二者间 Between the two	臭秽尚能忍受 Stinky and filthy, still tolerable	介于二者间 Between the two
3	淡黄 Pale yellow	臭秽难以忍受 Stinky and unbearable	浑浊 Turbidity

表 2 大便情况评定表

Table 2 Evaluation of bowel movements			
评分/分 Score/point	颜色 Colour	性状 Character	质地 Texture
1	黑色 Black	球形 Spherical	硬 Hard
2	黄色 Yellow	成型 Molding	软硬适中 Moderate softness and hardness
3	淡黄 Pale yellow	水样便 Watery stool	软 Soft

表 3 行动及精神评定表

Table 3 Action and mental assessment form		
评分/分 Score/point	状态 State	精神 Spirit
0	无反应 No response	-
1	神疲乏力、好卧 Feeling tired and weak, prone to lying down	精神萎靡、无神 Mental lethargy, lifelessness
2	自然站立 Natural standing	精神尚可、有神 Spiritually decent, with spirit
3	好动、爬栏、拱笼 Be active, climb fences, arch cages	精神亢奋、甚至烦躁 Mental excitement, even irritability

表 4 对环境反应情况评定表

Table 4 Evaluation of environmental response		
评分/分 Score/point	平素观察 Regular observation	敲打笼子后观察 Observe after tapping the cage
0	无反应 No response	无反应 No response
1	反应迟钝、蜷缩、少动 Slow reaction, curling up, less movement	缓慢行动、无叫声 Slow movement, no sound
2	容易受到惊吓 Easy to be frightened	迅速行动、叫声较大 Act quickly, shout loudly
3	反应灵敏、尾巴自然摆动 Quick response, natural tail swing	剧烈对抗、躲闪及时 Intense confrontation, timely evasion

表 5 皮毛鼻盘色泽评定表

Table 5 Evaluation table for skin and hair nose disc color		
评分/分 Score/point	皮毛色泽 Fur color	鼻盘颜色 Nasal disc color
0	明显掉毛或结块 Obvious shedding or clumping	淡白无华伴重度青紫 Pale white and unadorned with severe cyan purple
1	灰暗 Gray and dark	淡白无华伴轻度青紫 Pale white with no bloom and mild cyan purple
2	毛色不顺、无光泽 Uneven, dull fur color	淡白无华 Light white and unadorned
3	毛色光滑 Smooth fur color	淡红色 Light red

纸,尾尖取血,测 3 次,取平均数,计算 FBG。

糖耐量测定:小型猪空腹 12 ~ 16 h,然后给予 50%葡萄糖溶液,剂量为 1.2 mL/kg,通过耳缘静脉注射,注射时间不超过 3 min。实验后在第 3、10、30、60、90 和 120 min 记录和观测血糖水平的变化。

ELISA 法检测空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS)和 HbA1c 的含量。

计算 HOMA-IR,其计算公式为: $HOMA-IR = FBG \times FINS / 22.5$ 。

1.2.8 血脂四项及凝血检测

在实验结束前,所有实验中的小型猪在进行前腔静脉采血时必须保持 16 h 的空腹状态。采集血液后,以 3000 r/min 在 4 ℃ 下离心 10 min,以分离血清。运用全自动生化分析仪检测多个血液指标,如甘油三酯 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)。

1.2.9 血清 CD4⁺、CD8⁺、cAMP、cGMP 含量测定及 CD4⁺/CD8⁺、cAMP/cGMP 计算

小型猪前腔静脉采血,分离血清,-80 ℃ 保存备用。ELISA 实验检测血清 CD4⁺、CD8⁺、cAMP、cGMP 的含量,计算 CD4⁺/CD8⁺、cAMP/cGMP 比值。

1.2.10 胰腺组织苏木素-伊红 (HE) 染色观察

实验最后 1 周,动物禁食 16 h 后,麻醉并处死,胰腺组织取出并保存在 4%多聚甲醛固定液中,HE 染色,光镜下观察胰腺组织形态学变化。

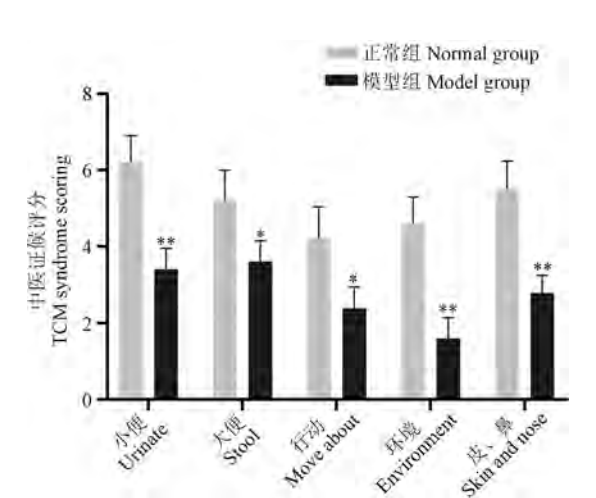
1.3 统计学分析

运用 SPSS 26.0 软件统计,数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据满足正态和方差齐则采用方差分析,以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 小型猪一般状态的观察

结果显示在第 10 个月的每周观察中,与正常组相比,模型组小型猪在小便、大便情况、运动及精神、对周围环境反应、皮毛鼻盘色泽的中医辨证评分偏低,其中小便色黄透明无味,大便颜色偏黑、呈球形,神疲乏力、好卧、懒动、精神萎靡、无神,自然情况反应迟钝、蜷缩、少动、敲打笼盒时无反应,皮毛无光泽、灰暗、明显掉毛,鼻盘淡白无华伴轻度青紫 (图 1)。



注:与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 小型猪中医证候评分观察

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

Figure 1 Observation on traditional Chinese medicine syndrome scoring of miniature pigs

2.2 小型猪体重系数、饮水量、饮食量测定

结果显示,与正常组相比,模型组体重系数显著增高($P < 0.05$),饮水量显著增加($P < 0.05$),饮食量显著降低($P < 0.01$)(图 2)。

2.3 小型猪舌象分析结果

结果显示,与正常组相比,模型组小型猪 R、G、B 值均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(图 3)。

2.4 小型猪 FBG 测定、糖耐量测定、HbA1C 测定、HOMA-IR 计算结果

结果显示,与正常组相比,模型组小型猪 FBG 第 8 ~ 10 个月 FBG 稳定于 6.9 ~ 7.3 mmol/L 之间,差异具有显著性($P < 0.01$);第 10 个月糖耐量

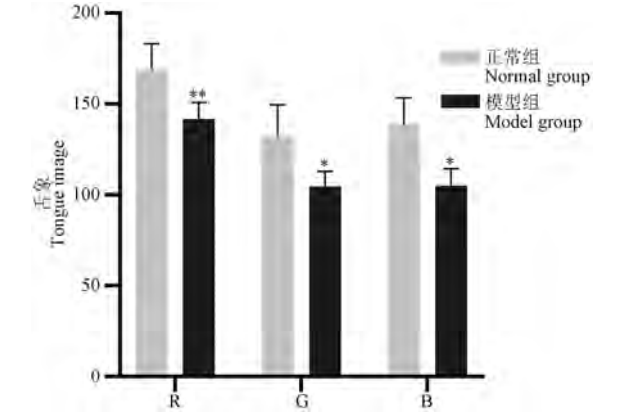


图 3 小型猪舌象分析结果

Figure 3 Analysis results of tongue images in miniature pigs

实验结果:从 60、90、120 min 血糖变化来看,模型组的小型猪葡萄糖的利用率明显降低($P < 0.01$);模型组小型猪的平均 HbA1C 含量是 7.78%,比正常组小型猪显著升高($P < 0.01$);模型组小型猪的 HOMA-IR 比正常组显著升高($P < 0.01$)(图 4)。

2.5 小型猪血脂及凝血功能指标测定结果

结果显示,与正常组相比,模型组小型猪血清 TC、LDL-C 含量显著升高($P < 0.05$),TG 升高($P > 0.05$)、HDL-C 升高($P > 0.05$)。模型组的小型猪血浆 PT、APTT 显著减少($P < 0.01$)(图 5)。

2.6 小型猪血清 CD4⁺、CD8⁺、cAMP、cGMP 含量测定结果及 CD4⁺/CD8⁺、cAMP/cGMP 计算结果

结果显示,与正常组相比,模型组小型猪血清中 CD4⁺含量显著降低($P < 0.01$);CD8⁺含量降低($P > 0.05$);两者比值显著降低($P < 0.05$);血清 cAMP 显著升高($P < 0.01$);cGMP 及两者比值无显著性差异(图 6)。

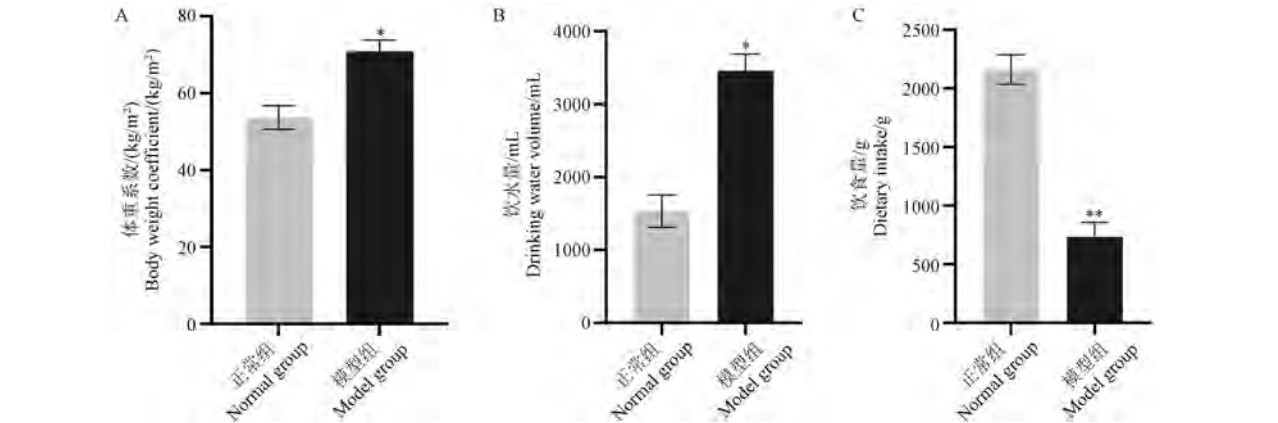


图 2 小型猪体重系数、饮水量和饮食量测定结果

Figure 2 Measurement results of body weight coefficient, water intake and dietary intake of miniature pigs

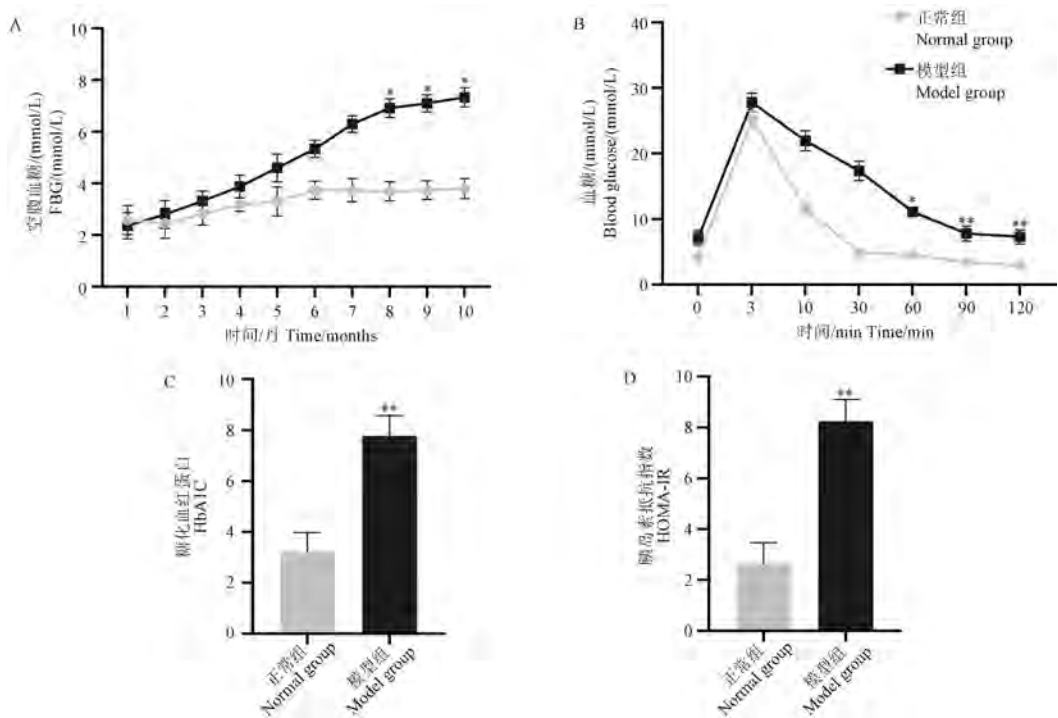


图 4 小型猪空腹血糖、糖耐量测定、糖化血红蛋白和胰岛素抵抗指数结果

Figure 4 FBG, glucose tolerance measurement, HbA1C and HOMA-IR of miniature pigs

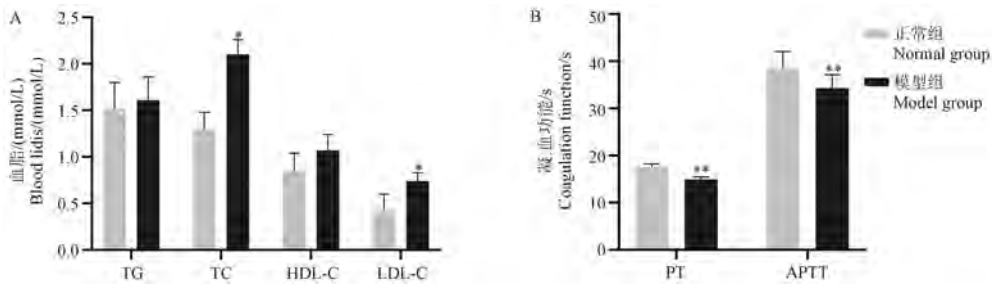


图 5 小型猪血脂及凝血功能指标测定结果

Figure 5 Measurement results of blood lipid and coagulation function indicators in miniature pigs

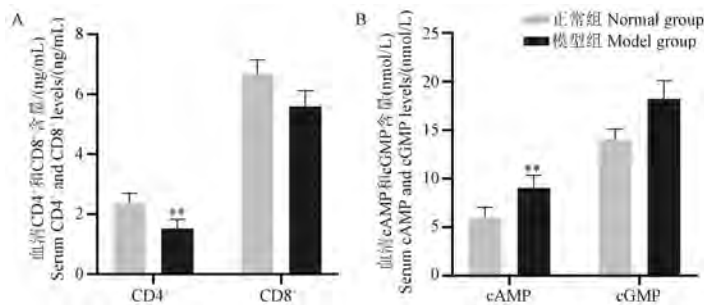


图 6 小型猪血清 CD4⁺、CD8⁺、cAMP 和 cGMP 含量测定结果

Figure 6 Determination results of serum CD4⁺, CD8⁺, cAMP and cGMP levels in miniature pigs

2.7 小型猪胰腺组织 HE 染色结果

结果显示(图 7),正常组小型猪的胰腺组织内胰岛数量丰富,细胞形态正常,胰岛细胞排列疏松。与正常组相比,模型组小型猪的胰腺组织内胰岛数量丰富,体积小,形状不规则,细胞结构不清晰,排

列疏松,少量胰岛细胞坏死,胞核固缩。

结合中医辨证量表、舌象、血液生化指标,模型组小型猪在造模过程中死亡 3 只,经过多次筛选,最终符合 T2DM 气阴两虚证的成模只有 3 只,成模率偏低。

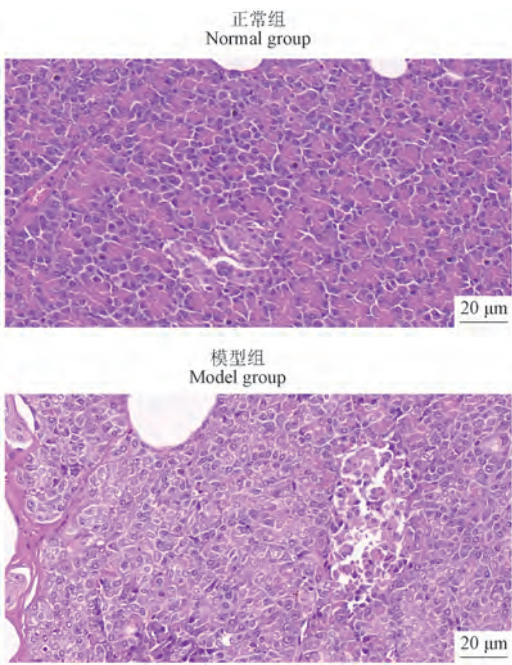


图 7 小型猪胰腺组织病理结果

Figure 7 Pathological results of pancreatic tissue in miniature pigs

3 讨论

DM 是一种由胰岛素分泌缺陷或生物作用受损引起的以高血糖为特征的代谢性疾病。在全球范围内,DM 患者数量逐年增加,根据 2015 ~ 2017 年的 DM 流行病学调查显示,我国 18 岁及以上人群 DM 患病率为 11.2 %^[13]。DM 不仅影响患者的生活质量和健康,还对社会造成负面影响,如增加医疗负担、影响社会经济发展等^[13]。世界卫生组织对于人类 DM 的诊断标准是 FBG ≥ 7.0 mmol/L。根据国家实验动物专家委员会的相关规定,小型猪的 DM 诊断标准是:FBG ≥ 6.77 mmol/L 即为造模成功^[12]。

DM,中医称之为“消渴病”,其基本病理特征在于阴液亏虚和燥热内盛。气阴两虚证在 DM 前期及 DM 中最为常见,DM 患者饮食多偏肥甘膩厚,易致饮食积滯,阻遏脾胃运化失司,脾气不升、胃气不降,化热伤阴耗气,反复循环,致气阴两虚。在 2022 年的《国家糖尿病基层中医防治管理指南》中,DM 的主要中医证型被分为 5 类:热盛伤津证、肝郁脾虚证、痰浊中阻证、气阴两虚证、湿热蕴结证。传统中医学认为久服附子会伤阴,久服青皮会耗气,可能会造成机体的气阴两虚。本研究则采用高脂高糖饲料结合青皮附子水煎剂来饲喂贵州小型猪,能够

建立 T2DM 气阴两虚证动物模型。

T2DM 是因胰岛素抵抗而产生糖脂代谢异常的综合征。本研究建立的 T2DM 模型小型猪 FBG、葡萄糖耐量实验、HbA1c、HOMA-IR 均比正常组明显增高,具有显著性差异。模型组小型猪体质量系数比正常组显著增高,而体型均偏肥且以腹部肥胖为主。模型组的小型猪多次测量 24 h 的饮水量均比正常组偏高,甚至是正常组小型猪饮水量的 2 ~ 3 倍,表明模型组小型猪处于多饮的状态。以上表观观察均表明贵州小型猪 T2DM 模型建立成功。

基于《国家糖尿病基层中医防治管理指南》^[12]、《中药新药临床研究指导原则》^[8]、《中医糖尿病临床诊疗指南》^[9]总结出 T2DM 气阴两虚证的共同表现为:神疲乏力、烦渴欲饮、气短懒言、舌淡红少津、少苔、脉虚无力等主症,小便短少、大便干结等兼证。根据上述表现制定了小便情况、大便情况、行动及精神、对环境反应情况、皮毛鼻盘色泽 5 个有关中医证候的评定量表。与正常组相比,模型组小型猪小便色黄、气味无腥臭、质地较为透明和小便短少的兼证不符合,可能是因为本研究中所造模的小型猪属于脾肾气虚,化源不足,气不摄津所致。与正常组相比,模型组小型猪大便呈球形或者羊屎疙瘩、质地偏硬和大便干结的兼证相符合,是阴虚致肠道津液不足所致。与正常组相比,精神及行动方面模型组小型猪呈现一派神疲乏力、好卧、懒动、精神萎靡、无神之证,与神疲乏力、气短懒言的主症相符合;气虚一般会导致机体神疲乏力、好卧、懒动、精神萎靡。除了以上 T2DM 气阴两虚证的共同表现外,本研究还观察到:与正常组相比,对周围环境的适应及反应情况,模型组小型猪表现为自然情况反应迟钝、蜷缩、少动、甚至无反应;在皮毛鼻盘色泽方面,模型组小型猪表现为皮毛无光泽、灰暗、明显掉毛,鼻盘淡白无华伴轻度青紫。这些可能是由于气虚时机体对周围环境的反应减弱,同时气虚时容易出现皮毛无光泽、灰暗等所致。饮水量方面模型组比正常组显著增高,提示模型组小型猪处于烦渴欲饮状态,是机体燥热伤阴、阴液亏虚引起的。从行为学指标观察来分析,T2DM 气阴两虚证有 6 个主症、2 个兼证。本研究还增加了对周围环境反应(包括自然状态下和敲打笼盒下的不同反应)和皮毛色泽与鼻盘的观察两方面。综合分析所得,本研究所造模型虽不能完全复制 T2DM 气阴两虚证的表现,但能够呈现神疲乏力、烦渴欲饮,气

短懒言,舌红少津、少苔,脉虚无力,小便短少、大便干结,反应迟钝,蜷缩,皮毛无光泽、灰暗,鼻盘淡白无华等 T2DM 气阴两虚证小型猪大部分症状。

舌象是中医诊断中的重要依据之一,通过观察舌头的形态、颜色、舌苔等特征,可以判断机体的健康状况和证候类型。本研究与正常组相比,模型组小型猪的舌象 R、G、B 值均显著降低,表示模型组的小型猪比正常组舌质偏淡,少苔,基本符合气阴两虚证舌象特征。本研究中小型猪舌苔偏少或者苔白可能是高脂高糖饲料喂养所致,相当于长期嗜好肥甘厚腻之品会滞碍脾胃运化,气血生化无源,易致脾气虚弱;再加之青皮附子破气伤阴也会造成气阴两虚的舌象。

气虚是一种元气不足导致的病理状态,主要表现为脏腑机能的衰退和抗病能力的低下,其中包括气的推动、防御、温煦、固摄等功能的减弱^[14]。在现代医学中,这与免疫力低下导致的“亚健康”状态相似。T 淋巴细胞中的 CD4⁺和 CD8⁺细胞作为两个关键的亚群,它们的数量和比例平衡对维持体内免疫功能的稳定至关重要^[15-16]。实验结果显示,与正常组相比,模型组小型猪的血清 CD4⁺水平和 CD4⁺/CD8⁺比值明显降低。这表明模型组小型猪处于气虚状态,其免疫功能受到一定程度的抑制。

阴虚证是指体内阴液不足,无法滋润和制约阳气,导致阴阳失衡,出现一系列症状。相当于现代医学中体液免疫某些功能异常。cAMP 和 cGMP 在细胞内的平衡与互动,类似于中医理论中阴阳的相互制约和转化,共同维持着细胞的内稳态和功能平衡^[17-19]。国内邝安堃教授团队^[20]及夏宗勤等^[21]经过多年研究认为:凡中医辨证阳虚者,cAMP/cGMP 比值明显降低;而辨证为阴虚者则表现为 cAMP 含量升高,cAMP/cGMP 比值无明显降低。因此,测定血清 cAMP 和 cGMP 的含量及其比值可以作为判断阴虚、阳虚的客观指标。本研究结果显示与正常组相比,模型组的小型猪血清 cAMP 含量显著升高;cGMP 含量及两者比值无显著性差异,说明模型组小型猪处于阴虚状态。

本研究中模型组的小型猪血清 TC、LDL-C 比正常组含量明显偏高,符合 T2DM 的血脂异常特点,表明模型组小型猪在胰岛素抵抗状态下处于糖脂代谢紊乱状态。异常的血脂是机体肥甘厚腻之品在血液内累积而成。当机体处于气阴两虚之时,气虚不能推动、阴虚不能流动,机体内的气血循环受阻,

肥甘厚腻之品产生的浊物不能有效排除,化为脂膏。本研究中模型组小型猪血浆中 PT、APTT 比正常组时间明显减少,代表模型组小型猪处于高凝状态,可能与本模型气阴两虚证状态气不摄血而致血瘀有关。

本研究通过给贵州小型猪长期喂食高脂高糖饲料并结合青皮附子水煎剂,成功构建了 T2DM 气阴两虚证模型。本研究还从大体观察、行动和精神状态、二便情况、对周围环境的反应以及皮毛、鼻盘的色泽等方面对两组小型猪进行中医证候辨证。此外,还增加了舌象分析、检测 CD4⁺和 CD8⁺细胞数量及比值、检测 cAMP 和 cGMP 的含量及其比值、血脂四项、凝血功能、FBG、糖耐量实验结果、HbA1c 以及 HOMA-IR 等指标来进行模型的评估。综合分析,通过上述各项指标,证明了本研究所构建的模型是成功的,为相关研究提供了有价值的参考。这一研究方法为未来研究 T2DM 气阴两虚证提供了新的思路 and 工具,有助于深入探讨该病症的发病机制和治疗方法。

参 考 文 献(References)

- [1] 许琳. 糖尿病的形成机理(病因)及其临床诊断标准 [J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(3): 1426-1429.
XU L. Formation mechanism (etiology) and clinical diagnostic criteria of diabetes mellitus [J]. Genom Appl Biol, 2021, 40(3): 1426-1429.
- [2] 杨叔禹. 国家糖尿病基层中医防治管理指南(2022) [J]. 中医杂志, 2022, 63(24): 2397-2414.
YANG S Y. National guideline for management of diabetes prevention and treatment of traditional Chinese medicine at primary level(2022) [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(24): 2397-2414.
- [3] 曾梦莹, 何新苗, 苏比努尔, 等. 定量代谢组学研究气阴两虚糖尿病大鼠血清小分子代谢特征谱 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8): 3313-3317.
ZENG M Y, HE X M, SU B N E, et al. Quantitative metabolomics study on serum small molecules metabolic profiling in diabetes mellitus rats with syndrome of both qi and Yin deficiency [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(8): 3313-3317.
- [4] 侯清涛, 李芸, 李舍予, 等. 全球糖尿病疾病负担现状 [J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 24(1): 92-96.
HOU Q T, LI Y, LI S Y, et al. The global burden of diabetes mellitus [J]. Chin J Diabetes, 2016, 24(1): 92-96.
- [5] 任志鑫, 王雨, 张冰, 等. 代谢性疾病病证结合动物模型的探讨与思考 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 897-908.
REN Z X, WANG Y, ZHANG B, et al. Animal models combining disease and syndromes related to metabolic diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 897-908.

[6] 杨燕, 陈正涛, 肖华胜, 等. 糖尿病大血管病变小鼠模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1194-1205.
YANG Y, CHEN Z T, XIAO H S, et al. Research progress on mouse models of diabetes macroangiopathy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1194-1205.

[7] WU Y, MO J, LIANG J, et al. Multiomic study of the protective mechanism of *Piscaria* capitata (Buch.-Ham. ex D. Don) H. Gross against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in Guizhou miniature pigs [J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155499.

[8] 郑筱蓓. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2002.
ZHENG X Y. Guiding principles for clinical research of new Chinese medicines [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2002.

[9] 中华中医药学会发布. 中医糖尿病临床诊疗指南 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2020.
Chinese Society of Traditional Chinese Medicine. Guide to clinical diagnosis and treatment of diabetes in traditional Chinese medicine [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press; 2020.

[10] 张译心, 王鑫, 刘博, 等. 2 型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 219-229.
ZHANG Y X, WANG X, LIU B, et al. Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi-Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 219-229.

[11] 相波. 巴马小型猪虚寒模型的建立、评价及视网膜血氧饱和度的特征研究 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2018.
XIANG B. Study on establishment, evaluation and retinal oxygen saturation in Bama mini pig and with deficiency-cold model [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM; 2018.

[12] 田威龙, 蔡文晶, 刘笑笑, 等. 小型猪 2 型糖尿病模型肠道微生物分析 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 768-776.
TIAN W L, QI W J, LIU X X, et al. Analysis of intestinal microflora in mini-pigs with type 2 diabetes mellitus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 768-776.

[13] 《中国老年 2 型糖尿病防治临床指南》编写组. 中国老年 2 型糖尿病防治临床指南 (2022 年版) [J]. 中国糖尿病杂志, 2022, 30(1): 2-51.
Compiling Group of Clinical Guidelines for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus in the Elderly in China. Clinical guidelines for prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus in the elderly in China (2022 Edition) [J]. Chin J Diabetes, 2022, 30(1): 2-51.

[14] 陈进成, 刘建勋, 林成仁, 等. 基于“劳则气耗”理论研究气虚证动物模型的建立方法 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2177-2183.
CHEN J C, LIU J X, LIN C R, et al. Study on establishment of an animal model of Qi deficiency syndrome base on theory of over exertion leading to Qi consumption in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 43(11): 2177-2183.

[15] 李宗源, 郝莉雨, 孙建辉, 等. 三种气虚证动物模型的比较与评价 [J]. 中医杂志, 2022, 63(18): 1773-1778.
LI Z Y, HAO L Y, SUN J H, et al. Comparison and evaluation of three animal models of qi deficiency syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(18): 1773-1778.

[16] 甘加宽, 樊憬懿, 王冬芝, 等. 睡眠剥夺诱导小鼠气虚证模型的方法研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(10): 1801-1806.
GAN J K, FAN J Y, WANG D Z, et al. The establishment and evaluation of qi deficiency syndrome of mouse model induced by sleep deprivation [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2016, 18(10): 1801-1806.

[17] 李丽, 范晓旭, 华娟安, 等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 通路探讨白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠的保护作用及机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(3): 341-351.
LI L, FAN X X, HUA J A, et al. Total glucosides of paeony exert protective effects on chemical liver injury with pattern of liver yin deficiency in rats through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2024, 47(3): 341-351.

[18] 黄晓巍, 张思琪, 张译心, 等. 基于转录组学探讨气阴两虚型 2 型糖尿病病证结合大鼠模型证候表现与差异表达基因的关系 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2023, 49(3): 625-633.
HUANG X W, ZHANG S Q, ZHANG Y X, et al. Relationship between syndrome manifestations and differentially expressed genes in rat model of type 2 diabetes mellitus with Qi and Yin deficiency explored through transcriptomics [J]. J Jilin Univ (Med Ed), 2023, 49(3): 625-633.

[19] 谭丹, 曾丹, 唐利东, 等. 基于阴虚证、阳虚证及卵巢功能减退小鼠模型探讨杜仲雄花的补肾功效 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(12): 2875-2878.
TAN D, ZENG D, TANG L D, et al. Medicinal effects of eucommia ulmoides male flowers on mouse models of yin and yang deficiency [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(12): 2875-2878.

[20] 阴建国. CAMP 和 CGMP 的拮抗代谢调节与中医“阴阳”的关系 [J]. 陕西中医学院学报, 1987, 10(1): 51-54.
YIN J G. Understanding the dual regulatory role of CAMP and CGMP in metabolism: Bridging traditional Chinese medicine with modern science [J]. J Shanxi Tradit Chin Med, 1987, 10(1): 51-54.

[21] 夏宗勤, 朱玟, 胡雅儿, 等. 中医“虚证”理论的初步探讨 (阴虚和阳虚病人血浆环核苷酸含量变化的比较) [J]. 中医杂志, 1979, 11: 2-10.
XIA Z Q, ZHU W, HU Y E, et al. Preliminary exploration of the theory of “deficiency syndrome” in traditional Chinese medicine (comparison of changes in plasma cyclic nucleotide content between patients with yin deficiency and yang deficiency) [J]. J Tradit Chin Med, 1979, 11: 2-10.

何宏星,张心恬,章梦涵,等. 抗菌性碳点修饰 PEEK 干预 MRSA 感染环境植入物骨整合性能的体内研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1408-1416.

HE H X, ZHANG X T, ZHANG M H, et al. *In vivo* study of antibacterial carbon dot-modified polyether ether ketone to improve osseointegration of implants for treating MRSA infection environments [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1408-1416.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.005

抗菌性碳点修饰 PEEK 干预 MRSA 感染环境植入物骨整合性能的体内研究

何宏星¹, 张心恬², 章梦涵², 王耀², 邓晓琴², 翁少煌^{2*}

(1. 福建医科大学实验动物中心, 福州 350122; 2. 福建医科大学药学院, 福州 350122)

【摘要】 目的 本研究拟评价抗菌性碳点修饰聚醚醚酮 (polyether ether ketone, PEEK) 在感染性骨缺损环境的骨整合性能。方法 熔融法制备结合透析纯化获得胍基碳点 (guanidine-based carbon dots, G-CDs), 应用聚乙烯醇缩丁醛酯 (polyvinyl butyral, PVB) 通过浸泡-干燥法制备 G-CDs 修饰的 PEEK 植入物 (PEEK/PVB-G-CDs)。将 SD 大鼠分为: PEEK 植入未感染组 (PEEK(-) 组), PEEK/PVB-G-CDs 植入未感染组 (PEEK/PVB-G-CDs(-) 组), PEEK 植入感染组 (PEEK(+) 组), PEEK/PVB-G-CDs 植入感染组 (PEEK/PVB-G-CDs(+) 组)。每组大鼠均于垂直股骨外侧髁处制备一个直径 2 mm、深度 5 mm 的孔洞以模拟骨缺损。将 30 μ L 生理盐水注入 PEEK(-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs(-) 组大鼠骨缺损的骨髓腔内形成未感染组。将 30 μ L 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) 菌悬液 (1.5×10^4 CFU/mL) 注入 PEEK(+) 组和 PEEK/PVB-G-CDs(+) 组大鼠骨缺损的骨髓腔内。植入术后 0、2 和 4 周, 应用动物专用 X 射线机照射各组大鼠植入部位。术后 6 周, Micro-CT 评估植入部位的骨组织特征。骨髓细菌培养、苏木精-伊红染色 (HE staining)、甲苯胺蓝染色 (Toluidine blue staining)、戈德纳三色染色 (Goldner trichrome staining) 及免疫组化染色分析各组大鼠的骨植入部位。结果 (1) X 射线、Micro-CT、骨髓细菌培养和组织病理学分析等结果确定证实了 PEEK(-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs(-) 组未出现感染与骨缺损整合; PEEK/PVB-G-CDs(+) 组发挥抗菌性有效控制 MRSA, 菌株形成的骨髓炎实现骨整合, 而 PEEK(+) 组因持续的感染无法骨整合; (2) 免疫组化染色评价明确 PEEK(+) 组显示出比其他 3 组更低的白细胞介素 (interleukin, IL)-4 和 IL-10 等抗炎因子以及更强的 IL-6 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 等促炎因子表达, 表明 G-CDs 修饰的 PEEK 可抑制 MRSA 感染, 调节局部微环境的炎症水平, 促进骨缺损部位的骨整合。结论 抗菌性碳点修饰 PEEK 具备优异的骨整合性能, 为今后的临床治疗提供了一种候选策略。

【关键词】 抗菌性碳点; 聚醚醚酮; 植入物改性; 骨整合; MRSA 感染

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1408-09

In vivo study of antibacterial carbon dot-modified polyether ether ketone to improve osseointegration of implants for treating MRSA infection environments

HE Hongxing¹, ZHANG Xintian², ZHANG Menghan², WANG Yao², DENG Xiaojin², WENG Shaohuang^{2*}

(1. Laboratory Animal Center, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China;

2. School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China)

Corresponding author: WENG Shaohuang. E-mail: shweng@fjmu.edu.cn

【基金项目】 福建省科技创新联合资金项目 (2021Y9007), 福建省自然科学基金 (2022J01493)。

Funded by the Joint Funds for the Innovation of Science and Technology, Fujian Province (2021Y9007), the National Science Foundation of Fujian Province (2022J01493).

【作者简介】 何宏星, 男, 实验师, 研究方向: 实验动物模型。Email: 1311754246@qq.com

【通信作者】 翁少煌, 男, 教授, 博士, 研究方向: 骨系统疾病新疗法。Email: shweng@fjmu.edu.cn

[Abstract] Objective This study aimed to evaluate the bone integration performance of antibacterial carbon dot (CD)-modified polyether ether ketone (PEEK) in infectious bone defect environments. **Methods** Guanidine-based CDs (G-CDs) prepared by the melting method combined with dialysis purification were used to modify PEEK implants using polyvinyl butyraldehyde (PVB) by the soaking-drying method (PEEK/PVB-G-CDs). SD rats were divided into the following groups: (1) PEEK-implanted uninfected (PEEK(-)), (2) PEEK/PVB-G-CDs-implanted uninfected (PEEK/PVB-G-CDs(-)), (3) PEEK-implanted infected (PEEK(+)), and (4) PEEK/PVB-G-CDs-implanted infected (PEEK/PVB-G-CDs(+)). A hole (diameter 2 mm, depth 5 mm) was drilled at the lateral condyle of the vertical femur in all rats to simulate a bone defect. Rats in the PEEK(-) and PEEK/PVB-G-CDs(-) groups without infection were injected with 30 μ L physiological saline into the bone marrow cavity, and rats in the PEEK(+) and PEEK/PVB-G-CDs(+) groups with infection were injected with 30 μ L MRSA bacterial suspension (1.5×10^4 colony-forming units/mL) into the bone marrow cavity. The implantation site was observed using animal-specific X-ray examination at 0, 2, and 4 weeks after implantation, and the bone tissue characteristics of the implantation site were evaluated by micro computed tomography (CT) at 6 weeks after surgery. The bone implantation sites in each group of rats were examined by bacterial culture of bone marrow and hematoxylin and eosin staining, Toluidine blue, Goldner trichrome, and immunohistochemical staining. **Results** X-ray, Micro-CT, bacterial culture of bone marrow, and histopathological analysis confirmed no signs of infection in the PEEK(-) and PEEK/PVB-G-CDs(-) groups and the implants were integrated with the bone defects. Rats in the PEEK/PVB-G-CDs(+) group showed signs of antibacterial activity that effectively controlled the osteomyelitis caused by MRSA and achieved bone integration, while rats in the PEEK(+) group failed to achieve bone integration because of persistent infection. Immunohistochemical staining confirmed lower levels of anti-inflammatory factors such as IL-4 and IL-10 in the PEEK(+) group, and stronger expression of pro-inflammatory factors such as IL-6 and TNF- α compared with the other three groups, indicating that G-CD-modified PEEK inhibited MRSA infection, regulated inflammation levels in the local microenvironment, and promoted bone integration at the site of bone defects. **Conclusions** Antibacterial G-CDs modified PEEK exhibits excellent bone integration performance, providing a candidate strategy for future clinical treatment of infectious bone defects.

[Keywords] antibacterial carbon dots; PEEK; implant modification; osseointegration; MRSA infection

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

骨植入物是骨科应对各种原因引起骨缺损的主要手段。但是,由于手术引起微环境改变、血行传播以及患者体质差异等因素,使得细菌性感染成为植入物处理骨缺损的最大挑战^[1]。一旦植入物发生感染,尤其是耐药菌感染,将造成骨植入物无法整合而松动,对患者造成灾难性后果。因此,在骨科植入性手术领域,改善并提高植入物抗感染能力是提高植入手术成功率、改善骨整合和长期预后的一个重要途径。对应的,近年来,针对骨植入物的抗菌功能改性以降低骨植入感染的研究呈现出快速发展的趋势^[2-4]。因此,发展设计高效、安全适用于骨植入物抗菌功能改性并适合骨生长要求的新型抗菌药物是其中至关重要的节点。当前,除抗生素改性骨植入物的研究以外,包含纳米材料的非抗生素策略被开发用于骨植入物抗菌功能改性^[5-7]。将抗菌性纳米材料应用于骨植入物改性有望实现持续有效抗菌以及较高的生物安全性。但目前这方面工作仍处于尝试阶段,对于骨植入物抗菌功能改性所要求的抗菌性优异、生物安全性以及

无耐药诱导性等的抗菌纳米材料研发仍是一个重要挑战。因此,设计建立不诱发细菌耐药且具备良好抗菌活性和生物安全性的新型抗菌药物,用于骨植入物抗菌功能改性,并应用于耐药菌感染的骨缺损治疗的研究,对于解决现有植入物耐药菌感染的困境至关重要。

动物感染模型是抗菌药物开发过程的关键组成部分,它提供了有用的临床前研究数据,从而将抗菌药物的体外和临床评估联系起来,以提供一种方法测试抗菌药物在受控环境下单独或组合针对特定病原体的活性^[8-9]。基于上述研究背景以及所设计制备的胍基碳点(guanidine-based carbon dots, G-CDs)的前期体外抗菌性能和体内生物安全性的研究基础,本研究建立了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA)感染的大鼠股骨缺损模型,以 G-CDs 修饰骨植入物干预,从而评估 G-CDs 在细菌感染临床应用中的可行性,为推动抗菌纳米材料在临床细菌感染治疗的应用发挥重要的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性清洁级 7 周龄 SD 大鼠 (12 只), 体重 (270 ± 10) g, 购自福建医科大学实验动物中心【SCXK(闽)2022-0001】。动物饲养于福建医科大学实验动物中心屏障环境【SYXK(闽)2022-0003】。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 相对湿度 40% ~ 70%, 温度控制在 20 ~ 26 ℃。本实验按照《动物实验指南》操作, 所有动物实验经福建医科大学实验动物伦理委员会批准(IACUC FJMU 2023-0149)。

1.1.2 菌株

标准 MRSA 菌株购自上海鲁微科技有限公司, 批号为 ACTT43300。

1.1.3 主要试剂与仪器

盐酸左氧氟沙星 (98%) 购自上海麦克林生化科技有限公司, 小鼠肿瘤坏死因子 (tumor nerosis factor, TNF)- α 和小鼠白细胞介素 (interleukin, IL)-6 ELISA 试剂盒购自 Elabscience 生物技术有限公司, 4%多聚甲醛通用型组织固定液购自广州硕谱生物科技有限公司, Mueller-Hinton (MH) 肉汤和营养琼脂购自青岛海博生物技术有限公司, 聚醚醚酮 (polyether ether ketone, PEEK) ($\Phi 2$ mm $\times$ 5 mm) 购

自德国盖尔公司。

立式压力蒸汽灭菌器 (LDZX-50KB, 上海申安医疗器械厂), 生物安全柜 (BSC-1000 II A2, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂), 生化培养箱 (SHP-250 型, 上海精宏实验设备有限公司), 酶标仪 (1510-04035C, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 全自动血液分析仪 (日本三洋电器股份有限公司), 小动物专用 X 射线机 (Posvet-100HF, 韩国三星集团), Micro-CT (CT-100, 瑞士 SCANCO Medical AG 公司)。

1.2 方法

本研究建立 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型以评估 G-CDs 在控制感染性骨缺损方面应用的可行性。结合课题组前期关于 G-CDs 的研究基础^[10], 采用 PEEK 为骨植入物, PVB 为固定剂, 制备了基于 G-CDs 抗菌涂层改性的骨植入物 (图 1), 并用于 MRSA 感染的骨缺损大鼠的治疗, 从而进一步评估以 G-CDs 作为抗菌剂在骨组织部位的抗菌性能。具体实验流程, 如图 2 所示。

1.2.1 基于 G-CDs 为抗菌涂层改性骨植入物的制备

参考课题组前期的研究^[10]制备 G-CDs: 以无水柠檬酸 (citric acid, CA) 为碳源, 二烯丙基二甲基氯化铵 (diallyldimethylammonium chloride, DDA) 和聚

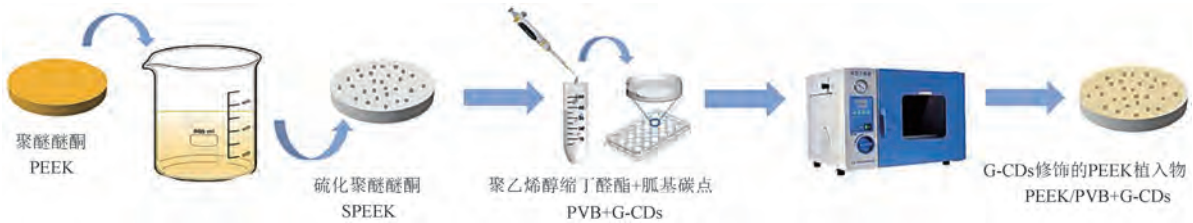


图 1 PEEK/PVB-G-CDs 的制备流程图

Figure 1 Flow chart for the preparation of PEEK/PVB-G-CDs

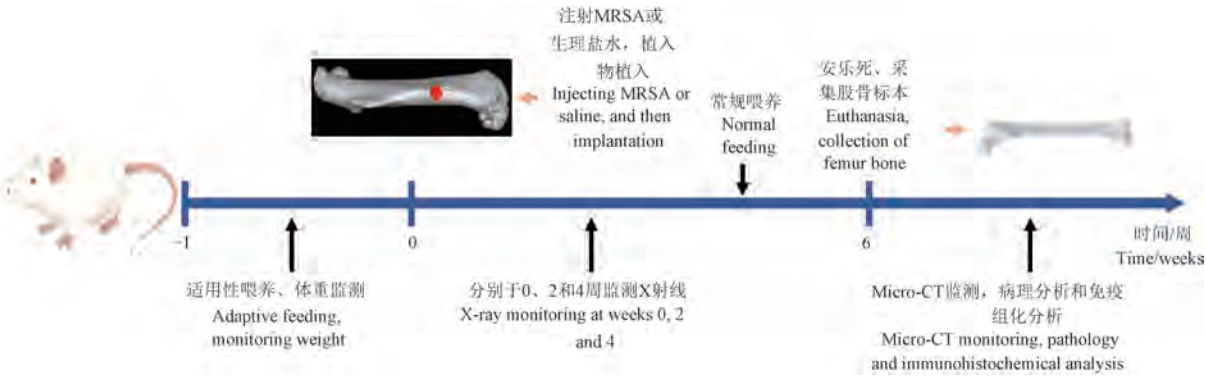


图 2 植入物干预 MRSA 感染的大鼠骨缺损的实验流程图

Figure 2 Experimental flow chart of MRSA infected rat bone defect treated by implants

六亚甲基胍 (polyhexamethylene guanidine, PHMG) 为异原子掺杂来源, 合成得到 G-CDs。具体过程: 精确称量 0.2 g CA 于圆底烧瓶并置于 150 °C 油浴中搅拌加热。待 CA 完全熔融后, 加 2 mL DDA (60% 水溶液), 继续反应 150 min。后加入 1 mL 0.1 g/mL PHMG 水溶液, 于 170 °C 下继续反应 60 min。反应结束后, 将圆底烧瓶置于室温下冷却, 加入 10 mL 超纯水并超声溶解。取上述溶液 0.5 mL 置于纤维素透析袋 (500 ~ 1000 Da) 中, 同时, 在含 1000 mL 去离子水的烧杯中进行透析处理, 每隔 2 h 更换一次去离子水, 透析 48 h。最后, 将透析袋中的液体冷冻干燥得到固体 G-CDs, 置于 4 °C 下保存备用。

G-CDs 为抗菌涂层改性的 PEEK: 将清洗干净的 PEEK 用浓硫酸 (95%) 浸泡 3 min, 超纯水彻底清洗并置于 120 °C 下热处理 4 h, 获得硫化处理的 PEEK (简称为 SPEEK) 样品。将 SPEEK 放置于 24 孔板中, 使用含聚乙炔醇缩丁醛 (polyvinyl butyral, PVB) (5 g/L) 和 G-CDs (0.2 mg/mL) 的 0.20 mL 无水乙醇-乙酸乙酯 (体积比为 9 : 1) 溶液浸泡并置于 60 °C 的烘箱中干燥; 待浸泡液完全干燥后, 换一个孔并置入完成前序操作的植入物, 补充同样的浸泡液; 重复浸泡和干燥操作, 共 3 次, 获得基于 G-CDs 为抗菌涂层改性的骨植入物 (PEEK/PVB-G-CDs)。

1.2.2 MRSA 感染大鼠骨缺损模型的建立

(1) MRSA 菌液的配制: 将 MRSA 菌通过平板划线法接种于血琼脂平板上, 并在生化培养箱中 (35 °C) 培养得到单个菌落, 用接种环挑取单个菌落接种于灭菌生理盐水 (0.9% 氯化钠溶液) 中得到细菌悬液, 通过紫外可见分光光度计测定并调节使菌悬液的 OD₆₀₀ 值为 0.1, 以得到 1.5×10^8 CFU/mL 的菌悬液, 然后将 1.5×10^8 CFU/mL 的菌悬液稀释至 1.5×10^4 CFU/mL 备用。

(2) 大鼠分组建模: 将 12 只大鼠随机分成 PEEK 植入未感染组 (PEEK(-) 组)、PEEK/PVB-G-CDs 植入未感染组 (PEEK/PVB-G-CDs(-) 组)、PEEK 植入感染组 (PEEK(+) 组) 和 PEEK/PVB-G-CDs 植入感染组 (PEEK/PVB-G-CDs(+) 组) 4 组, 每组各 3 只, 依次编号, 称量并记录每只大鼠的体重。在动物中心实验环境下适应性喂养 1 周后, 进行建模。首先分别将各组大鼠麻醉, 清理手术部位的毛发, 用碘伏棉球消毒手术区域并用无菌洞巾覆盖。切开大鼠右下侧后肢上的局部皮肤, 钝性分离肌肉组织, 暴露股骨远端, 用克氏针 ($\Phi 2$ mm) 于垂直股

骨外侧髁处制备一个直径 2 mm、深度 5 mm 的孔洞用以模拟骨缺损。

(3) 分组给药: 取 30 μ L 的 MRSA 菌悬液 (1.5×10^4 CFU/mL), 依据上述分组, 分别注入 PEEK(+) 组和 PEEK/PVB-G-CDs(+) 组大鼠骨缺损部位的骨髓腔内, PEEK(-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs(-) 组大鼠未注射菌悬液。然后分别将 PEEK 和 PEEK/PVB-G-CDs 两种植入物根据 4 组分组编号分别植入对应的组别, 缝合皮肤并用碘伏棉球消毒, 整个手术过程均在无菌操作台上完成, 术毕, 待大鼠苏醒后安放于原饲养笼内, 给予正常喂水和饮食, 观察大鼠的活动状态。

1.2.3 MRSA 感染大鼠骨缺损模型的术后评价

在植入术后 0、2 和 4 周, 应用动物专用 X 射线机照射各组大鼠植入部位, 评估植入部位的炎症反应及骨整合情况。此外, 术后 6 周, 将大鼠麻醉并实施安乐死后, 分离并收集手术部位股骨, 保存于 4% 多聚甲醛通用型组织固定液中以便进一步分析评价。利用 Micro-CT 评估植入部位的骨组织特征。并对股骨组织标本进行骨髓细菌涂板培养、苏木精-伊红染色 (HE staining)、甲苯胺蓝染色 (Toluidine blue staining)、戈德纳三色染色 (Goldner trichrome staining) 和免疫组化染色, 对各组大鼠的骨植入部位进行残余细菌评价、病理分析和免疫组化分析。

1.3 统计学分析

本文中的所有实验均重复 3 次, 数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。统计学比较采用 Graph Pad Prism 8.0 进行单因素方差分析的 Tukey's 多重比较实验。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 G-CDs 修饰 PEEK 在 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型中的 X 射线评价

细菌感染是骨科植入手术失败的重要原因之一。细菌感染的发生, 尤其是耐药菌的感染, 将引起急性/慢性骨髓炎^[11], 导致植入物与周围骨组织结构无法整合, 最终导致植入失败^[12]。首先利用 X 射线评价 G-CDs 修饰的 PEEK 应对 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型中的效果。在植入后第 0、2 和 4 周利用 X 射线评估骨植入部位的动态变化。如图 3 所示, 植入部位以红色箭头指明。在未感染组 (PEEK(-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs(-) 组) 中, 未观察到植入物周围存在或出现异常低密度阴影, 表明

植入材料后无感染产生,证明植入过程及植入后并未受到因手术操作及环境引起的其他感染。并且,与 PEEK(-)组相比,在第 4 周时 PEEK/PVB-G-CDs(-)组植入部位骨生长良好,表明 PEEK/PVB-G-CDs 在未感染环境下具有一定的促骨整合能力。经 MRSA 感染后,PEEK(+)组和 PEEK/PVB-G-CDs(+)组在初始阶段(0 week)均未观察到细菌感染的征象。但在第 2 周时,PEEK(+)组和 PEEK/PVB-G-CDs(+)组的植入部位周围均表现出异常的低密度阴影,并观察到髓内脓腔的形成,说明植入部位

因存在细菌感染形成了急性骨髓炎。植入第 4 周时,PEEK(+)组植入部位的髓内脓腔进一步扩大,说明单纯 PEEK 本身不具备抗菌性能,无法抑制细菌的生长,从而导致了感染情况的加重及恶化。相反,PEEK/PVB-G-CDs(+)组在第 4 周时,几乎没有观察到异常低密度区域的存在,证实了 PEEK/PVB-G-CDs(+)组虽然感染 MRSA 菌株形成了骨髓炎,但经 G-CDs 改性后的 PEEK/PVB-G-CDs 在骨组织部位依然发挥了良好且稳定的抗菌性能,显著抑制了耐药菌的生长繁殖。

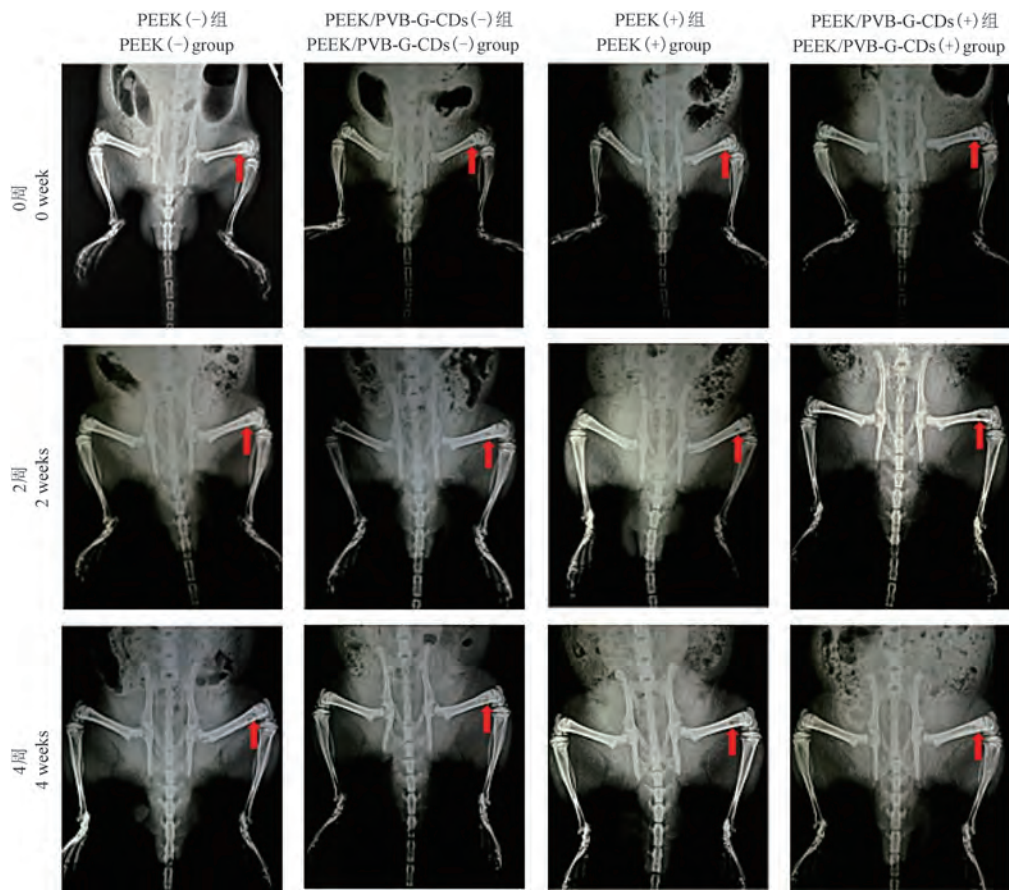


图 3 植入后第 0、2 和 4 周不同分组大鼠的 X 射线图像

Figure 3 X-ray images from different groups of rats at weeks 0, 2 and 4 after implantation

2.2 G-CDs 修饰 PEEK 在 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型中的形态和 Micro-CT 评价

植入 6 周后,分离并收集不同分组大鼠的股骨进行观察。如图 4 所示,PEEK(-)组和 PEEK/PVB-G-CDs(-)组的股骨植入部位未见细菌感染的迹象,植入物与周围骨组织结合牢固,骨皮质连续性完好,并未遭到破坏。然而,PEEK(+)组的植入部位周围出现明显的腐蚀和骨组织结构破坏,且骨皮质和骨松质均被破坏,造成植入物周围大块皮质

骨缺损,严重改变了股骨应力结构,可见植入单纯 PEEK 完全不具备抗菌能力,一旦发生 MRSA 感染,随着时间的延长,细菌将不断扩散,从而导致了股骨结构的严重破坏。而与此相反,PEEK/PVB-G-CDs(+)组表现出与未感染组(PEEK(-)组和 PEEK/PVB-G-CDs(-)组)相似的现象,再次体现了 G-CDs 显著抗菌性能。同时也进一步说明,经 G-CDs 改性可赋予植入物稳定的抗菌功能。

利用 Micro-CT 评价不同分组大鼠植入部位的

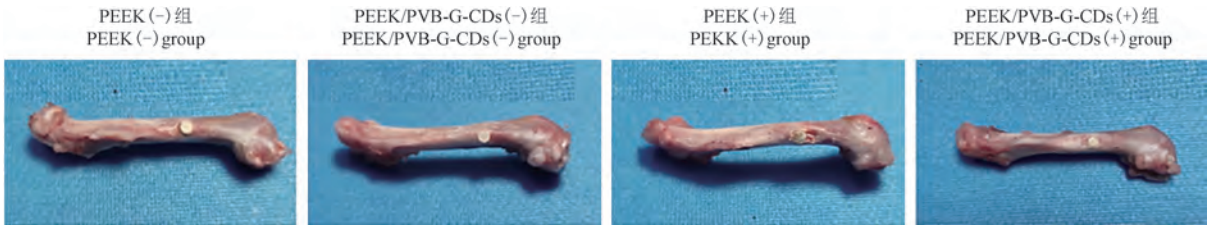


图 4 植入 6 周后不同分组大鼠股骨植入部位图像

Figure 4 Images of the femoral implant site in different groups of rats at 6 weeks after implantation

骨组织特征。如图 5, 植入部位股骨的三维重建和冠状位切面 Micro-CT 图像显示, PEEK (-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs (-) 组的植入物与周围骨组织紧密结合。而注射 MRSA 后, PEEK (+) 组存在明显的感染征象, 不论是股骨的整体重建图亦或者冠状位切面图, 均可发现明显的骨破坏痕迹, 原有的圆柱状骨缺损形状被破坏, 严重毁坏了植入部位的皮质骨连续性。而最终 PEEK (+) 组植入材料表面鲜有新生骨附着, 与 PEEK (-) 组形成了鲜明对比, 进一步证明 PEEK (+) 组感染严重, 极度影响了植入物的

骨整合。而与此相反, 同样经 MRSA 感染过的 PEEK/PVB-G-CDs (+) 组丝毫未见骨质破坏的现象, 表现出光滑且规则的植入物轮廓, 植入物与周围骨组织紧密贴合, 进一步证明了改性植入物稳定的抗菌能力。同时, 植入物的三维重建图像模拟同样反映了植入物周围局部新骨生成的程度。如图 5 所示, PEEK (-) 组、PEEK/PVB-G-CDs (-) 组和 PEEK/PVB-G-CDs (+) 组植入物周围均有大量连续的新骨形成, 几乎完全覆盖植入物表面, 骨结合良好。而 PEEK (+) 组的植入物周围仅有部分新骨覆

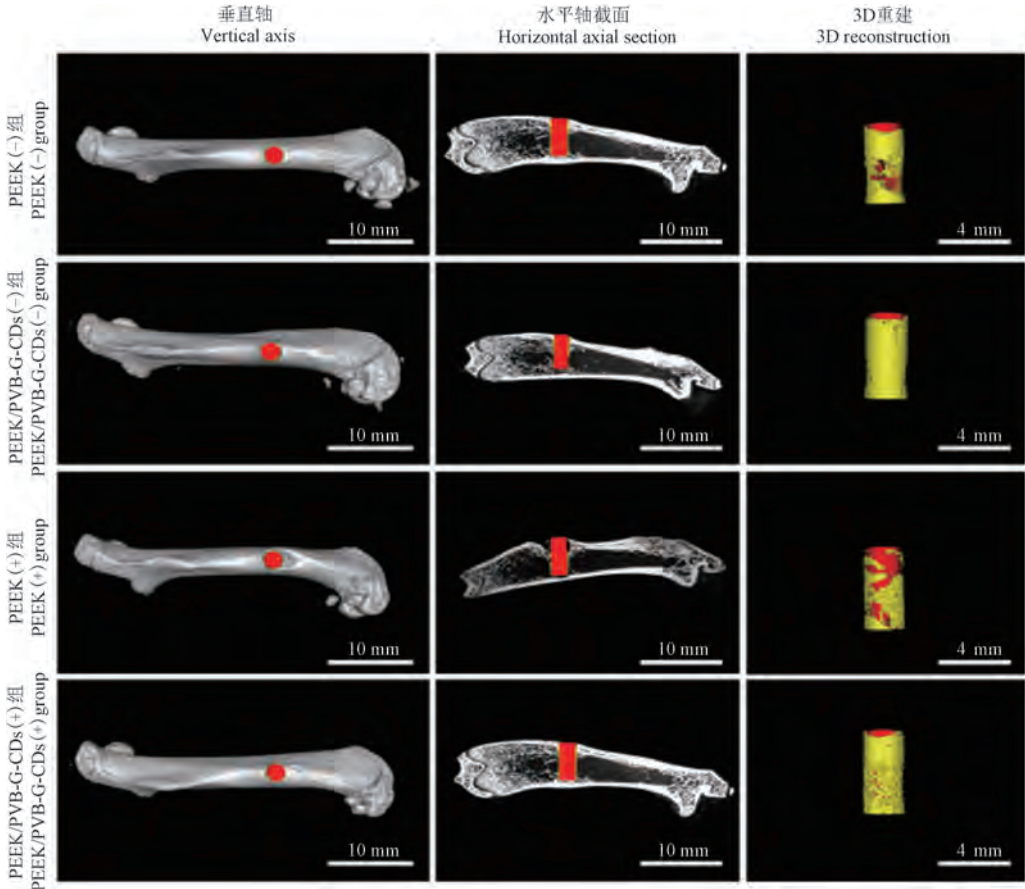


图 5 植入 6 周后不同分组大鼠植入部位股骨的整体三维重建和冠状位切面 Micro-CT 图像及植入物的三维重建图像

Figure 5 Micro-CT images of vertical and horizontal axial sections of the femur and 3D reconstructions of the implants in different groups of rats at 6 weeks after implantation

盖,表明 MRSA 感染后,单纯 PEEK 植入物的骨整合能力较差。综上,已证实 G-CDs 作为抗菌剂改的骨植入物后,不仅可显著抑制耐药菌感染,而且可以促进植入物的骨整合,即便在感染状态下,也依旧可发挥稳定的抗菌促骨整合功能。

2.3 G-CDs 修饰 PEEK 在 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型中的病理分析

细菌培养结果见图 6,病理学结果见图 7,免疫组化结果见图 8。为进一步证明 PEEK(+) 组存在 MRSA 定植感染,进而导致了慢性骨髓炎的发生,研

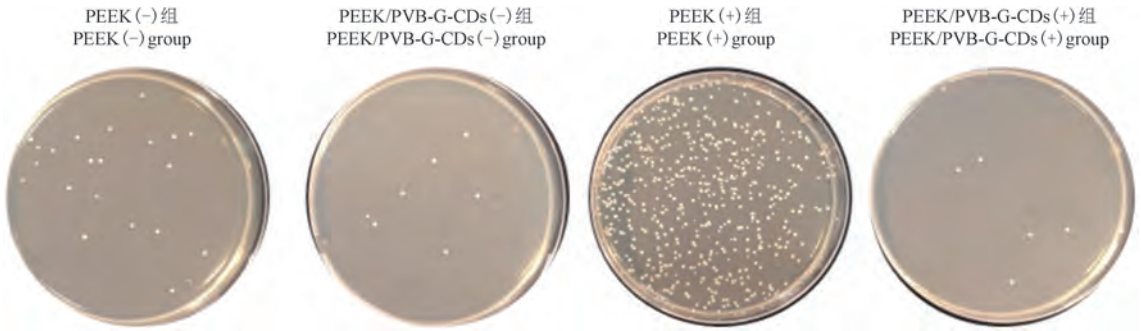


图 6 植入 6 周后不同分组大鼠植入部位骨髓的细菌培养

Figure 6 Bacterial culture of bone marrow of the different groups of rats at 6 weeks after implantation

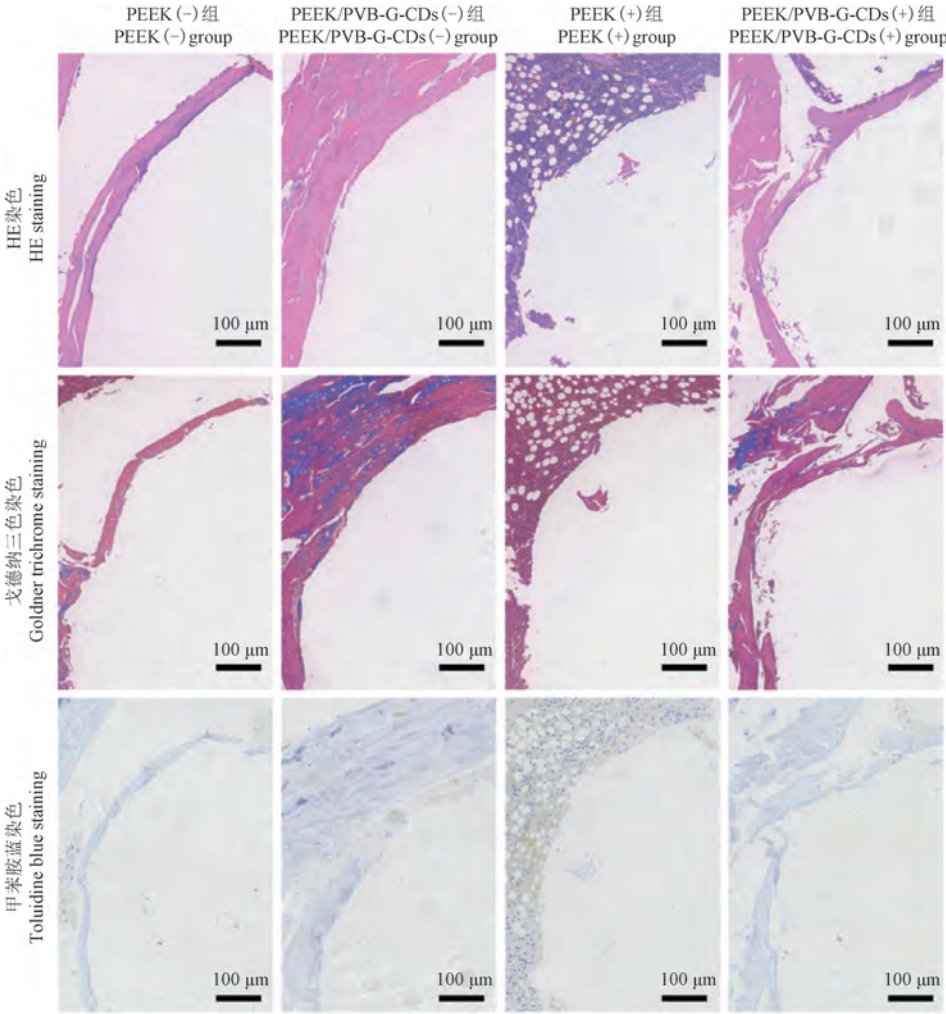
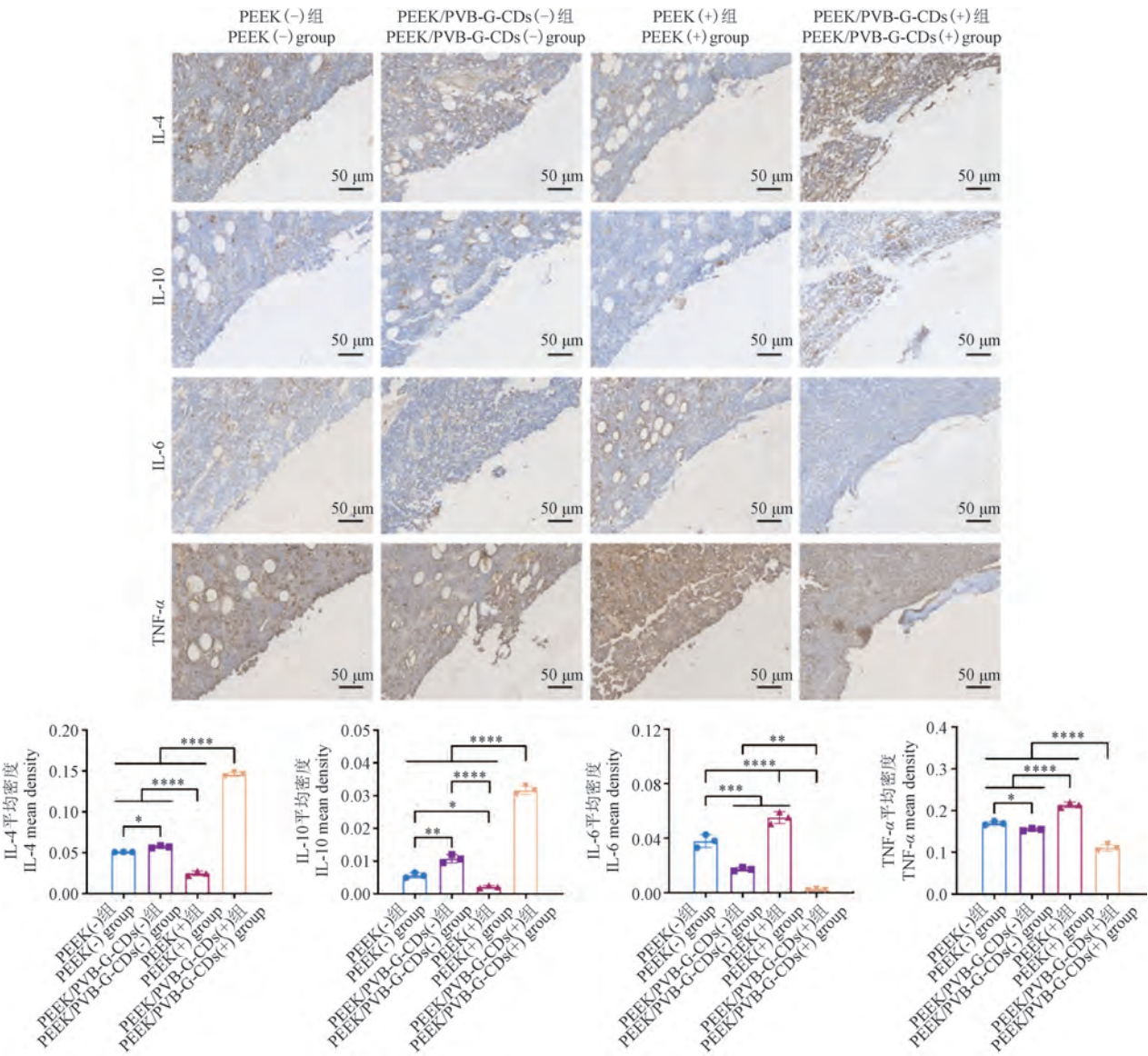


图 7 植入 6 周后不同分组大鼠植入部位的 HE 染色、戈德纳三色染色和甲苯胺蓝染色切片

Figure 7 HE staining, Goldner trichrome staining and Toluidine blue staining sections of the implant sites in different groups of rats at 6 weeks after implantation



注:各组间相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图8 植入6周后不同分组大鼠植入部位的免疫组化染色切片及其根据图像定量结果

Note. Comparison between groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 8 Immunohistochemical staining of sections and quantitative analysis of inflammatory factor levels at the implantation site in different groups of rats at 6 weeks after implantation

究人员在6周时分别取不同分组的股骨骨髓腔内容进行体外细菌培养,以进一步进行验证,结果如图6所示,在PEEK(-)组、PEEK/PVB-G-CDs(-)组几乎无细菌菌落生成,此结果与X射线结果相一致,证明植入过程及植入后并未受到因手术操作及环境引起的其他感染。与此同时,PEEK(+)组骨髓细菌培养后琼脂板长满细菌,而PEEK/PVB-G-CDs(+)组中几乎没有细菌生长。这些结果与Micro-CT结果相一致,进一步证明植入单纯PEEK后,无法发挥有效的抗MRSA作用,最终导致PEEK(+)组感染

严重,而经G-CDs改性后,改性植入物PEEK/PVB-G-CDs具有稳定的抗菌性能,在抗耐药菌促进植入物骨整合极具价值。

进一步通过组织病理学检查,分析植入部位的病理变化情况及植入物与周围骨组织的结合情况。如图7所示,HE染色显示,PEEK(-)组和PEEK/PVB-G-CDs(-)组中,几乎观察不到中性粒细胞,植入部位周围的骨组织呈现正常的组织结构。在PEEK(+)组的植入部位,周围骨组织中可见大量中性粒细胞浸润,在病理切片染色中仅可见大量的炎

症细胞及炎症性细胞凋亡而引起的空泡,无任何新骨形成征象,证明单纯 PEEK 并无抗感染性能,无法抑制 MRSA 的生长繁殖。而骨组织长期处于感染环境进而导致了慢性骨髓炎的产生^[11],但在 PEEK/PVB-G-CDs(+)组中,植入部位周围骨组织仅有极少量的中性粒细胞存在,表明 G-CDs 通过抑制 MRSA 感染,改善了骨组织感染部位的炎症反应。此外,戈德纳三色染色和甲苯胺蓝染色显示,PEEK(-)组和 PEEK/PVB-G-CDs(-)组植入部位周围可见连续性的新骨形成,尤其在戈德纳三色染色结果中,PEEK/PVB-G-CDs(-)组周围除大量红色新生骨外,还显示大量的蓝色矿化骨,并且 PEEK/PVB-G-CDs(-)组周围的新生骨覆盖总面积较 PEEK(-)组明显增多,可见在未感染情况下,G-CDs 改性后的 PEEK/PVB-G-CDs 具有良好的促骨形成能力。然而,PEEK(+)组植入部位周围几乎没有新骨形成,说明长期的细菌感染不利于新骨形成。相比之下,PEEK/PVB-G-CDs(+)组植入部位周围明显可见新骨形成,再次证实了在耐药菌感染情况下,以 G-CDs 为抗菌剂改性的骨植入物具备较强的抗耐药菌性能以及骨整合能力,具有良好的临床应用前景。

此外,利用免疫组化染色评价两种抗炎因子(IL-4、IL-10)和两种促炎因子(IL-6、TNF- α)表达的变化情况,并利用 Image J1.53K 对 4 种炎症因子的阳性表达水平进行定量分析。如图 8 所示,PEEK(+)组显示出比其他 3 组更低的 IL-4 和 IL-10 表达以及更强的 IL-6 和 TNF- α 表达,表明 MRSA 感染使得植入部位股骨的炎症水平升高。PEEK(-)组中 IL-4 和 IL-10 的表达略低于 PEEK/PVB-G-CDs(-)组,IL-6 和 TNF- α 的表达略高于 PEEK/PVB-G-CDs(-)组,表明 G-CDs 可能具有调节局部微环境的能力,从而增强抗炎效果。此外,与其他 3 组相比,PEEK/PVB-G-CDs(+)组中 IL-4 和 IL-10 的表达显著升高,IL-6 和 TNF- α 的表达显著降低,表明 G-CDs 能够通过抑制 MRSA 感染,调节局部微环境,降低局部炎症水平,促进骨缺损部位的骨整合。

3 讨论

本研究建立了 MRSA 感染的大鼠骨缺损模型,利用多种评价手段评估 G-CDs 的体内抗菌性能。结果表明,G-CDs 对 MRSA 感染的骨缺损大鼠表现出优异的治疗效果,明显改善了感染部位的炎症反

应。以 G-CDs 为抗菌剂改性的骨植入物在耐药菌感染模型中的抗菌功效证实了 G-CDs 具备在细菌感染临床应用中的可行性,为今后的临床治疗提供了一种新的选择。

参 考 文 献(References)

- [1] CAPLIN J D, GARCÍA A J. Implantable antimicrobial biomaterials for local drug delivery in bone infection models [J]. Acta Biomater, 2019, 93: 2-11.
- [2] HE M, HUANG Y, XU H, et al. Modification of polyetheretherketone implants: from enhancing bone integration to enabling multi-modal therapeutics [J]. Acta Biomater, 2021, 129: 18-32.
- [3] LU X, WU Z, XU K, et al. Multifunctional coatings of titanium implants toward promoting osseointegration and preventing infection: recent developments [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 783816.
- [4] ZHENG Z, LIU P, ZHANG X, et al. Strategies to improve bioactive and antibacterial properties of polyetheretherketone (PEEK) for use as orthopedic implants [J]. Mater Today Bio, 2022, 16: 100402.
- [5] HUANG J, LIN S, BAI X, et al. Decorated polyetheretherketone implants with antibacterial and antioxidative effects through layer-by-layer nanoarchitectonics facilitate diabetic bone integration with infection [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(47): 52579-52598.
- [6] LIU J, LIU J, ATTARILAR S, et al. Nano-modified titanium implant materials: a way toward improved antibacterial properties [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 576969.
- [7] BAI X, ZHANG X, ZHANG R, et al. Immobilizing enoxacin on implant by polyvinyl butyral coating to promote osseointegration in osteoporosis with infection [J]. Mater Des, 2023, 227: 111749.
- [8] WAACK U, WEINSTEIN E A, FARLEY J J. Assessing animal models of bacterial pneumonia used in investigational new drug applications for the treatment of bacterial pneumonia [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(5): e02242-e02319.
- [9] ZHAO M, LEPAK A J, ANDES D R. Animal models in the pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of antimicrobial agents [J]. Bioorg Med Chem, 2016, 24(24): 6390-6400.
- [10] ZHANG X, BAI X, DENG X, et al. Long-term antibacterial activity of guanidinium carbon dots without detectable resistance for the effective treatment of pneumonia caused by gram-negative bacteria [J]. Carbon, 2023, 213: 118229.
- [11] YU Y J, YAN J H, CHEN Q W, et al. Polymeric nano-system for macrophage reprogramming and intracellular MRSA eradication [J]. J Control Release, 2023, 353: 591-610.
- [12] CROES M, VAN DER WAL B C H, VOGELY H C. Impact of bacterial infections on osteogenesis: evidence from in vivo studies [J]. J Orthop Res, 2019, 37(10): 2067-2076.

谭电波,刘中华,杜青,等. 丹参绞股蓝茶对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤细胞炎症凋亡保护作用 and 机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1417-1423.

TAN D B, LIU Z H, DU Q, et al. Protective effect and mechanism of Salvia miltiorrhiza Bunge gynostemma pentaphyllum tea on apoptosis of mice cells with acute liver injury induced by carbon tetrachloride [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1417-1423. Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.006

丹参绞股蓝茶对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤 细胞炎症凋亡保护作用 and 机制研究

谭电波¹, 刘中华², 杜青¹, 曾宏亮¹, 李跃辉^{1*}

(1. 湖南省中医药研究院, 长沙 410006; 2. 湖南善源生物科技有限公司, 湖南 岳阳 410500)

【摘要】 目的 基于沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1)/高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1)/核转录因子- κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) 信号轴探讨丹参绞股蓝茶对四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 所致小鼠急性肝损伤肝细胞炎症凋亡反应的抑制作用和机制研究。**方法** C57BL/6 小鼠随机分为正常组、模型组、白藜芦醇组、丹参绞股蓝茶低、中、高剂量组、阳性药组, 连续灌胃给药 14 d。采用腹腔注射 0.5% CCl₄ 橄榄油溶液 (5 mL/kg) 的方法建立小鼠急性肝损伤模型。生化法检测小鼠血清中丙氨酸转移酶 (alanine transferase, ALT)、天冬氨酸转移酶 (aspartate transferase, AST)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 及肝组织羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp)、丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 水平; 酶联免疫吸附法检测血清炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 水平; 苏木素-伊红 (HE) 染色和 TUNEL 染色检测肝组织病理形态结构和肝细胞凋亡情况; Western Blot 检测 SIRT1、HMGB1 和 NF- κ B 蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠血清 ALT、AST、LDH 水平和肝组织 Hyp 活性显著升高, 以及肝组织中 MDA 和 SOD 活性明显降低, 血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肝组织存在明显的病理损伤以及肝细胞凋亡情况, 肝组织中 SIRT1 蛋白的表达明显降低, HMGB1 和 NF- κ B 蛋白的表达升高; 与模型组比较, 丹参绞股蓝茶高剂量组和白藜芦醇组小鼠血清肝功能指标 ALT、AST、LDH 水平和肝组织 Hyp 活性显著降低, 以及肝组织中 MDA 和 SOD 活性明显增加, 血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平显著降低, 肝组织的病理损伤以及肝细胞凋亡情况得到明显改善, 肝组织中 SIRT1 蛋白表达增加, HMGB1 和 NF- κ B 蛋白的表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 丹参绞股蓝茶能有效保护急性肝损伤, 其作用机制可能与调控 SIRT1/HMGB1/NF- κ B 信号通路, 减轻肝细胞炎症凋亡有关。

【关键词】 急性肝损伤; 炎症凋亡; 沉默信息调节因子 1; 高迁移率族蛋白 B1; 核转录因子- κ B

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1417-07

Protective effect and mechanism of Salvia miltiorrhiza Bunge gynostemma pentaphyllum tea on apoptosis of mice cells with acute liver injury induced by carbon tetrachloride

TAN Dianbo¹, LIU Zhonghua², DU Qing¹, ZENG Hongliang¹, LI Yuehui^{1*}

(1. Hunan Province Chinese Medicine Research Institute, Changsha 410006, China;

2. Hunan Shanyuan Biotechnology Co., Ltd., Yueyang 410500, China)

Corresponding author: LI Yuehui. E-mail: 410256518@qq.com

【Abstract】 Objective Use of silencing information regulatory factor 1 (SIRT1)/high mobility group protein B1 (HMGB1)/nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) to investigate the inhibitory effect and mechanism of Salvia

【基金项目】 湖南省中医药管理局 (中医药名医方制剂重点研究室)。

Funded by Hunan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (Key Laboratory of Famous Chinese Medicine Prescriptions).

【作者简介】 谭电波, 男, 研究员, 研究方向: 中医药新产品研发。Email: 908191609@qq.com

【通信作者】 李跃辉, 女, 硕士生导师, 研究员, 研究方向: 中药与大健康产品研发。Email: 410256518@qq.com

multiorrhiza Bunge gynostemma pentaphyllum tea on hepatocyte inflammatory apoptosis in mice with carbon tetrachloride (CCl_4)-induced acute liver injury. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into a control group; model group; resveratrol group; Salvia multiorrhiza Bunge gynostemma pentaphyllum tea low-, medium-, and high-dose groups; and a positive drug group. The mice were given continuous intragastric administration of the treatments for 14 days. An acute liver injury model was established by intraperitoneal injection of 0.5% CCl_4 olive oil solution (5 mL/kg). The levels of alanine transferase (ALT), aspartate transferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) in serum and hydroxyproline (Hyp), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) in the liver were determined by biochemical method. Serum levels of inflammatory tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, and IL-1 β were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Eosin-hematoxylin and terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) staining were used to examine the pathological morphology and apoptosis in liver tissues. The protein expression of SIRT1, HMGB1, and NF- κ B were detected by Western Blot. **Results** Compared with those of the control group, the model group's serum ALT, AST, and LDH levels and liver tissue Hyp activity were significantly increased; MDA and SOD activities in liver tissue were significantly decreased; the levels of inflammatory factors TNF- α , IL-6, and IL-1 β in liver tissue were significantly increased; and there were obvious signs of pathological injury and hepatocyte apoptosis in the liver tissue. The expression of SIRT1 protein decreased significantly, while the expression of HMGB1 and NF- κ B proteins increased, in liver tissue. Compared with those of the model group, the Salvia multiorrhiza Bunge gynostemma pentaphyllum tea high group and resveratrol group serum levels of ALT, AST, and LDH and liver tissue Hyp activity were significantly decreased; MDA and SOD activities in liver tissue were significantly increased; the levels of serum inflammatory factors TNF- α , IL-6, and IL-1 β were decreased; and pathological injury to liver tissue and the apoptosis of liver cells were significantly improved. The expression of SIRT1 protein in liver tissue was increased, while the expression of HMGB1 and NF- κ B protein were decreased in the Salvia multiorrhiza Bunge gynostemma pentaphyllum tea high-dose group and resveratrol group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** Salvia multiorrhiza Bunge gynostemma pentaphyllum tea effectively protects against acute liver injury, and its mechanisms may be related to the regulation of the SIRT1/HMGB1/NF- κ B signaling pathway and the alleviation hepatocyte inflammatory apoptosis.

[Keywords] acute liver injury; inflammatory apoptosis; silent information regulator 1; high mobility group protein B1; nuclear transcription factor- κ B

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

急慢性肝病皆可能诱导不可逆的肝损伤,并导致肝功能衰竭,给人类造成了巨大的经济负担和生存健康问题,研制有效预防和治疗肝病的药物显得尤为重要^[1]。肝作为人体最大的代谢器官,常常遭受着包括病毒、创伤、化学试剂等因素的侵袭,这成为诱发各种肝病的主要原因^[2]。化学药物所致的急性肝损伤是临床最为常见诱发严重性肝病的因素之一,极易发展成急性肝功能衰竭危及患者生命。比较经典的建立急性肝损伤的动物模型有四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)诱导的化学药物性损伤。可促使肝细胞膜通透性改变和脂质过氧化,并分泌大量致炎因子,使肝细胞凋亡、坏死^[3]。肝免疫系统紊乱在急性肝损伤的发病机制中扮演了重要角色。丹参绞股蓝茶由黄芪提取物、桑葚提取物、绿茶、绞股蓝、丹参、蒲公英、罗汉果组成,具有明显的增强免疫及化学性肝损伤的辅助保护功能,但作用机制尚未明确。近年来,沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)在肝损

伤中的保护作用被广泛研究, SIRT1 缺陷可触发核转录因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)激活和促炎基因程序, SIRT1 的小分子激活剂构成肝损伤的潜在治疗靶点^[4]。本研究通过建立 CCl_4 诱导的急性肝损伤小鼠模型,以 SIRT1 激动剂白藜芦醇为对照,基于炎症相关信号通路 SIRT1/高迁移率族蛋白 B1(high mobility group protein B1, HMGB1)/NF- κ B 探讨丹参绞股蓝茶对 CCl_4 所致小鼠急性肝损伤肝细胞炎症性凋亡反应的抑制作用和分子机制,为丹参绞股蓝茶保肝作用的推广应用提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选取体重 18 ~ 22 g, 70 只 8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠,从湖南斯莱克景达实验动物有限公司购买【SCXK(湘)2019-0004】,动物饲养在湖南省

中医药研究院实验动物中心【SYXK(湘)2022-0008】，饲养环境：光照为 12 h 明暗交替，实验室相对湿度 40% ~ 70%，温度 20 ~ 26 ℃，允许小鼠自由饮水和摄食。本实验程序经过湖南省中医药研究院实验动物伦理委员会审批(2022-0026)。

1.1.2 主要试剂与仪器

丹参绞股蓝茶(由黄芪提取物、桑葚提取物、绿茶、绞股蓝、丹参、蒲公英、罗汉果组成,长沙清尔康生物科技有限公司),双环醇片(批号:220206,北京协和药厂有限公司),白藜芦醇(批号:R107315,湖南创尔生物科技有限公司),羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号:AF5296-1、AF103F-1、AF1180-1,湖南艾方生物科技有限公司);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)试剂盒(批号:AF2132-A、AF2163-A、AF2040-A,湖南艾方生物科技有限公司),SIRT1、HMGB1、NF- κ B 一抗(批号:AF03448、AF300121、AF300096,湖南艾方生物科技有限公司),GAPDH 一抗(批号:YM3029,Immunoway 公司),丙氨酸转移酶(alanine transferase, ALT)、天冬氨酸转移酶(aspartate transferase, AST)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)(批号:008AS,上海科华生物工程股份有限公司)。核糖苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)检测试剂盒(批号:11684817910, 罗氏公司)。

BX53 生物显微镜(Olympus 公司,日本),Envision2105 型酶标仪(PE 公司,美国),PANNORAMIC 型全景切片扫描仪(3DHISTECH 公司,匈牙利),Gel Doc XR Biorad 凝胶成像仪(Bio-Rad 公司,美国),D3024R 台式高速冷冻离心机(DRAGONLAB 公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组给药与造模

将小鼠按体重随机分为正常组、模型组、白藜芦醇组、丹参绞股蓝茶低、中、高剂量组、阳性药组,每组 10 只,白藜芦醇组和丹参绞股蓝茶各组连续灌胃给予相应剂量药物 14 d,给药体积按照 20 mL/kg 进行,正常组和模型组给予等体积纯净水。末次给药 1 h 后,正常组小鼠腹腔注射等体积橄榄油溶液,

其余各组小鼠均腹腔注射 0.5% CCl₄ 橄榄油溶液(5 mL/kg),复制急性肝损伤小鼠模型。

1.2.2 样本采集

急性肝损伤模型建立 24 h 后,眼眶取血,离心(3500 r/min, 10 min),取上清液, -80 ℃ 冰箱保存待用,处死小鼠,钝性分离出肝组织,4 ℃ 生理盐水冲洗表面残留血液,取两叶肝保存在 10% 中性甲醛固定液中,固定 48 h 后待用;剩余肝组织液氮速冻后, -80 ℃ 冰箱保存待用。

1.2.3 血清和肝生化指标检测

按照试剂盒说明书指导,通过测定各组小鼠血清中 ALT、AST 和 LDH 的活性,肝匀浆 Hyp、MDA 和 SOD 水平,用来评价肝损伤。

1.2.4 血清炎症因子检测

使用酶联免疫吸附法(ELISA),按照试剂盒说明书指导,测定血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。

1.2.5 肝组织病理学检测

取固定在 10% 中性甲醛中相同位置的肝组织样本,包埋在石蜡中,以 5 μ m 厚片进行连续切片并固定,采用苏木素-伊红(HE)染色,封片,在光学显微镜下(400 $\times$)观察肝组织炎性细胞浸润,病理结构改变情况。肝损伤评分采用 5 个指标进行评分:空泡、核固缩、核碎裂、红细胞停滞、炎症细胞浸润,采集 5 个视野中这些细胞变化百分比进行评分:0 = 0%;1 = 0% ~ 10%;2 = 10% ~ 50%;3 = 50% ~ 100%,总分越高,损伤越严重。

1.2.6 肝组织细胞凋亡情况检测

将上述石蜡切片加热(62 ℃, 60 min)脱蜡,二甲苯浸泡,梯度乙醇水化,按照 TUNEL 染色组织凋亡检测试剂盒说明书进行蛋白酶处理和抗原修复,37 ℃ 孵育,DAB 核染,中性树脂封片,荧光显微镜下观察肝细胞凋亡情况,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对以绿色细胞核为特征的 TUNEL 阳性细胞进行计数。

1.2.7 SIRT1/HMGB1/NF- κ B 蛋白表达检测

采用 Western Blot 法检测肝组织中 SIRT1、HMGB1 和 NF- κ B 蛋白表达情况。取冻存的肝组织,按照试剂盒说明书,使用 RIPA 裂解缓冲液提取组织中的总蛋白,每个样品取 30 μ g 蛋白高温变性,通过 SDS-PAGE 进行电泳分离,并转移到 PVDF 膜上。5% 无脂牛奶封闭,1 ~ 2 h, TBST 稀释靶向 SIRT1、HMGB1、NF- κ B 和 actin 的一抗室温孵育

2 h, TBST 洗涤,二抗室温孵育 1 h。通过增强化学发光(ECL)底物来确定蛋白质丰度,GAPDH 用作内标,在暗盒内与 X 胶片曝光 1 ~ 30 min 进行显影,Quantity one V4. 4. 6 专业灰度分析软件进行分析。

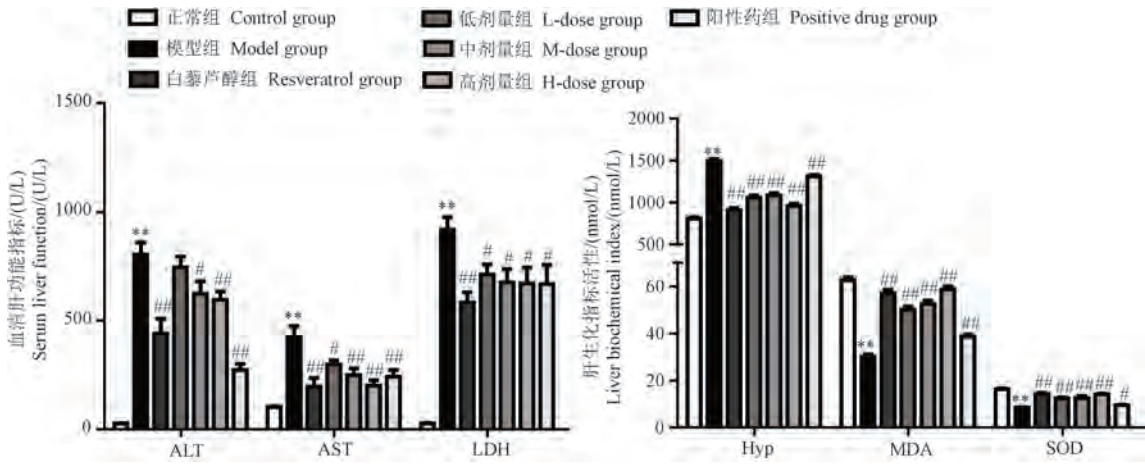
1.3 统计学分析

采用统计软件 SPSS 17.0 进行统计分析,计量资料以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差(One-way ANOVA)分析,不服从正态分布采用非参数检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清肝功能和肝生化指标变化

如图 1 所示,与正常组比较,模型组血清 ALT、AST 和 LDH 水平显著升高($P < 0.01$),肝组织中 Hyp 活性明显升高,MDA 和 SOD 活性明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,丹参绞股蓝茶高、中剂量组小鼠血清 ALT、AST 和 LDH 水平明显降低,以及肝组织中 Hyp 活性减少、MDA 和 SOD 活性明显增



注:与正常组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。(下图同)

Figure 1 小鼠血清肝功能和肝生化指标

Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$. Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

加,具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与激活剂白藜芦醇组和阳性药组作用趋势一致。

2.2 血清炎症因子水平变化

ELISA 检测结果如图 2 所示,与正常组比较,模型组小鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著增多($P < 0.01$);与模型组比较,丹参绞股蓝茶高剂量组和白藜芦醇组小鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),具有显著性差异,这与阳性药组趋势一致。

2.3 肝形态学结构和细胞凋亡情况变化

HE 染色和 TUNEL 染色结果如图 3,4 所示,正常组小鼠肝组织小叶结构清晰完整,无变性坏死,肝细胞间隙紧密,呈现放射状排列,未见明显的病理损伤和肝细胞凋亡坏死;模型组小鼠肝组织结构紊乱,肝细胞排列松散,间隙增大,核固缩或空泡化,形成大量炎性小灶,存在淋巴细胞炎性浸润,肝细胞 TUNEL 阳性率显著增加($P < 0.01$),细胞凋亡增多;丹参绞股蓝茶高剂量组和阳性药组小鼠肝组织结构紊乱得到不同程度的改善,可见少量肝细胞

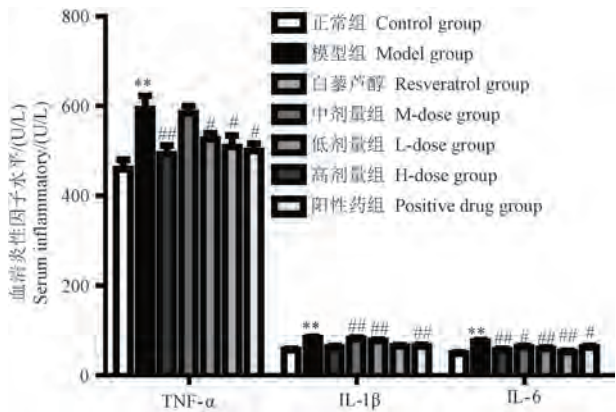


Figure 2 小鼠血清炎症因子水平

Figure 2 Serum inflammatory factors in mice

肿胀和炎性细胞浸润,肝细胞 TUNEL 阳性率显著减少($P < 0.05$),凋亡细胞降低;丹参绞股蓝茶中、低剂量组小鼠肝组织结构紊乱改善不明显,炎性细胞浸润情况类似模型组,肝细胞 TUNEL 阳性率改变无统计学意义。

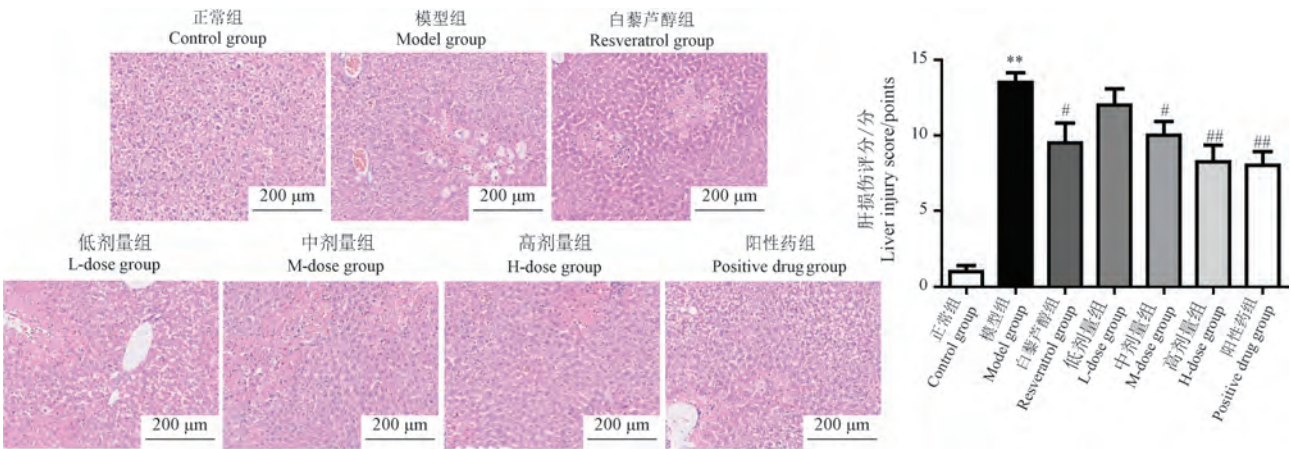


图 3 小鼠肝形态学结构
Figure 3 Liver morphological structure of mice

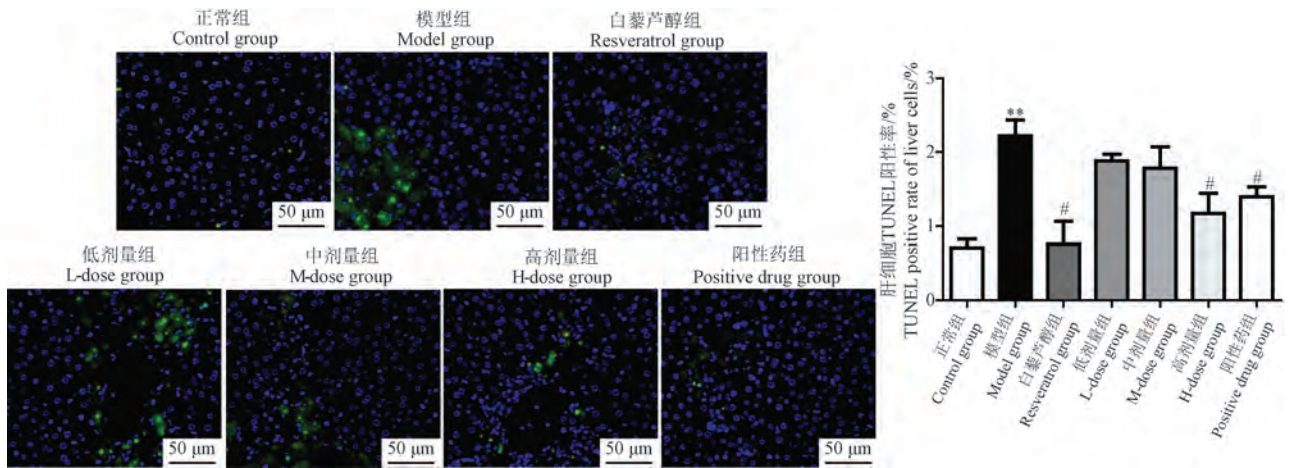


图 4 小鼠肝损伤和细胞凋亡情况
Figure 4 Liver tissue injury and liver morphological cell apoptosis in mice

2.4 肝中 SIRT1/HMGB1/NF-κB 蛋白表达变化

Western Blot 法定量检测结果如图 5 所示,与正常组比较,模型组小鼠肝组织中 SIRT1 蛋白灰度值相对表达量明显降低, HMGB1 和 NF-κB 蛋白灰度值相对表达量明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,

丹参绞股蓝茶高、中剂量组和白藜芦醇组小鼠肝组织中 SIRT1 蛋白灰度值相对表达量明显增加, HMGB1 和 NF-κB 蛋白灰度值相对表达量明显降低 ($P < 0.05$),丹参绞股蓝茶低剂量组上述指标的相对表达量有改变趋势,但无显著性差异。

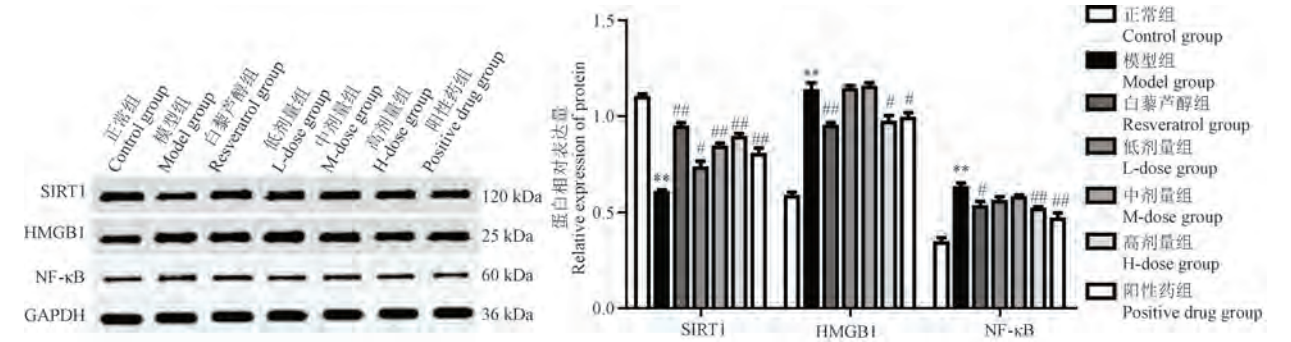


图 5 小鼠肝组织中 SIRT1、HMGB1 和 NF-κB 蛋白相对表达量
Figure 5 Relative expression of SIRT1, HMGB1 and NF-κB protein in liver of mice

3 讨论

肝损伤是各种肝病的共同病理基础,并逐渐年轻化,因其流行性和多样性在人群中广泛传播,一度成为研究的热点。急性肝损伤发病机制复杂,涉及肝细胞氧化应激、炎症效应和凋亡坏死等多个过程的相互作用^[5]。表征肝功能损伤的常见标志性指标包括血清 ALT、AST 和 LDH,当肝细胞膜通透性增加,细胞出现损伤时,这些指标活性被明显改变^[6]。本研究发现,急性肝损伤小鼠的肝组织结构紊乱,肝细胞核固缩肿胀或空泡,可见大量炎症细胞浸润,丹参绞股蓝茶可明显改善肝组织损伤,调控上述指标的变化,研究人员推测其可发挥明显的保护肝损伤的作用。

MDA 和 SOD 是肝中重要的抗氧化酶,是反应体内自由基清除和脂质过氧化程度的关键常见评价指标^[7]。肝毒素 CCl₄ 主要在肝中进行代谢,可诱导的肝氧化应激,如果这种应激反应不能得到有效及时的缓解,可能会促进免疫细胞巨噬细胞等释放大炎症因子,诱导细胞凋亡,同时,作为肝细胞损伤最敏感的指标之一 Hyp 也会升高,诱发肝纤维化进程^[8]。肝中的吞噬巨噬细胞的激活,会导致大量促炎症介质,如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等的释放,并促使其他炎症细胞(浸润性巨噬细胞和中性粒细胞等)的活化,扩大的炎症反应可能导致组织修复异常^[9]。有报道表明,CCl₄ 诱导的急性肝损伤模型表现出明显的血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达激增,并激活下游炎症信号通路^[10]。本研究与上述文献报道^[10]一致,并且在给予丹参绞股蓝茶干预后,肝中的抗氧化酶活性增加,血清中这些炎症因子的表达明显降低,说明丹参绞股蓝茶可以减轻急性肝损伤体内氧化应激损伤,稳定肝细胞结构,减少炎症细胞浸润。基于以上结果,本研究对其具体作用机制进行了进一步探讨。

肝细胞炎症性凋亡会加速肝器官衰竭的可能,其在急性肝损伤过程中发挥关键作用。SIRT1 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)-依赖性组蛋白脱乙酰酶,广泛分布于肝等重要代谢组织,通过调节肝脂质代谢、控制肝氧化应激和脱乙酰化一些转录调节因子,在肝炎症的调节中发挥着有益作用^[11]。研究发现,SIRT1 激活剂白藜芦醇可显著上调肝中 SIRT1 的表达,并减轻脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或 CCl₄ 诱导的急性肝损伤^[12];还可通过介导

HMGB1 核质易位途径保护脓毒症诱导的肝损伤,这是肝损伤的一个新的潜在治疗靶点^[13]。高迁移率族蛋白 1(high mobility group protein 1, HMGB1)作为一种重要的炎症细胞因子,在急性肝损伤中起关键作用的损伤相关分子模式(damage associated molecular pattern, DAMP),可由凋亡或坏死的细胞被动释放,或由活化的免疫细胞主动分泌到细胞外环境,通过结合特定的细胞表面受体,从而启动对损伤的先天炎症反应信号通路,加速炎症过程^[14]。在 LPS 诱导的肝损伤小鼠模型中,肝细胞外 HMGB1 通过激活 TLR4 信号传导并诱导 NF- κ B 的亚单位转移到细胞核,增加促炎症因子的表达而加重肝损伤,阻断 HMGB1 及其受体的信号通路,可以降低肝细胞凋亡反应^[15-16]。

本研究显示,相比模型组,丹参绞股蓝茶各组能明显调控 CCl₄ 诱导的急性肝损伤的肝组织中炎症蛋白 SIRT1、HMGB1 和 NF- κ B 的表达,并且与 SIRT1 激动剂白藜芦醇组和阳性药组作用相似,这进一步证实 SIRT1 在急性肝损伤中的靶点地位。在本研究中,通过检测 C57BL/6 小鼠血清肝生化指标、组织病理结构、分子生物学等多层面指标变化,整体评价丹参绞股蓝茶对急性肝损伤的炎症浸润及肝细胞凋亡保护作用及分子机制,可能与调控信号通路 SIRT1/HMGB1/NF- κ B 有关。丹参绞股蓝茶作为药食两用的绿色健康的保健茶饮,丰富了传统茶类的多样性,本研究为丹参绞股蓝茶的开发运用提供了更加科学和深入的理论支撑。

参 考 文 献(References)

- [1] DAI C, XIAO X, LI D, et al. Chloroquine ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice via the concomitant inhibition of inflammation and induction of apoptosis [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(12): 1164.
- [2] YANG X, JIN Z, LIN D, et al. FGF21 alleviates acute liver injury by inducing the SIRT1-autophagy signalling pathway [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(3): 868-879.
- [3] 张艳,江振洲,张陆勇. 补骨脂素对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的改善作用 [J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(5): 596-602.
ZHANG Y, JIANG Z Z, ZHANG L Y. Ameliorative effect of psoralen on acute liver injury induced by carbon tetra-chloride in mice [J]. J Chin Pharm Univ, 2021, 52(5): 596-602.
- [4] INOUE H, SHIMIZU Y, YOSHIKAWA H, et al. Resveratrol upregulates senescence marker protein 30 by activating ampk/sirt1-foxo1 signals and attenuating H₂O₂-induced damage in FAO rat liver cells [J]. J Nutr Sci Vitaminol, 2023, 69(5): 388-393.

[5] SUN X, WANG P, YAO L P, et al. Paeonol alleviated acute alcohol-induced liver injury via SIRT1/Nrf2/NF-κB signaling pathway [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2018, 60: 110-117.

[6] 杜彤, 王宇, 景婧, 等. 阿魏菇多糖对四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34 (3): 249-253.

DU T, WANG Y, JING J, et al. Hepatoprotective effects of pleurotus ferulae polysaccharide on carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2017, 34(3): 249-253.

[7] ZHANG Q, HU X, HUI F, et al. Ethanol extract and its dichloromethane fraction of *Alpinia oxyphylla* Miquel exhibited hepatoprotective effects against CCl₄-induced oxidative damage *in vitro* and *in vivo* with the involvement of Nrf2 [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 91: 812-822.

[8] 张艳蕾, 崔龙涛, 王琪瑶, 等. 食源性栀子方保护 CCl₄ 诱导小鼠急性和亚急性肝损伤的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(18): 30-37.

ZHANG Y L, CUI L T, WANG Q Y, et al. Mechanism of food-borne gardenia recipe in protecting acute and subacute liver injury induced by CCl₄ in mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(18): 30-37.

[9] EUGENIO-PÉREZ D, MONTES DE OCA-SOLANO H A, PEDRAZA-CHAVERRI J. Role of food-derived antioxidant agents against acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. Pharm Biol, 2016, 54(10): 2340-2352.

[10] CHEN R, LIAN Y, WEN S, et al. Shibi tea (*Adinandra nitida*) and camellianin A alleviate CCl₄-induced liver injury in C57BL-6J mice by attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. Nutrients, 2022, 14(15): 3037.

[11] KADONO K, KAGEYAMA S, NAKAMURA K, et al. Myeloid Ikaros-SIRT1 signaling axis regulates hepatic inflammation and pyroptosis in ischemia-stressed mouse and human liver [J]. J Hepatol, 2022, 76(4): 896-909.

[12] FARGHALI H, KEMELO M K, CANOVÁ N K. SIRT1 modulators in experimentally induced liver injury [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 8765954.

[13] NI YA, CHEN H, NIE H, et al. HMGB1: An overview of its roles in the pathogenesis of liver disease [J]. J Leukoc Biol, 202, 110(5): 987-998.

[14] XU W, LU Y, YAO J, et al. Novel role of resveratrol: suppression of high-mobility group protein box 1 nucleocytoplasmic translocation by the upregulation of sirtuin 1 in sepsis-induced liver injury [J]. Shock, 2014, 42 (5): 440-447.

[15] LUO L, WANG S, CHEN B, et al. Inhibition of inflammatory liver injury by the HMGB1-a box through HMGB1/TLR-4/NF-κB signaling in an acute liver failure mouse model [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 990087.

[16] FANG P, DOU B, LIANG J, et al. Quercetin reduces oxidative stress and apoptosis by inhibiting HMGB1 and its translocation, thereby alleviating liver injury in ACLF rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 2898995.

[收稿日期] 2024-01-30

贾贵阳,倪元萍,王梦茹,等. 熊胆粉及熊去氧胆酸对肝癌癌前病变的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1424-1432.

JIA G Y, NI Y P, WANG M R, et al. Effect of bear bile powder and ursodeoxycholic acid on preneoplastic lesions of hepatocarcinoma [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1424-1432.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.007

熊胆粉及熊去氧胆酸对肝癌癌前病变的作用

贾贵阳¹,倪元萍¹,王梦茹¹,涉谷淳²,金美兰^{1,3*}

(1. 西南大学动物医学院,重庆 400715;2. 东京农工大学农学研究科动物生命科学部
兽医病理学研究室,东京 183-8509;3. 西南大学实验动物中心,重庆 400715)

【摘要】 目的 为了探究熊胆粉(bear bile powder,BBP)及其熊去氧胆酸(chenodeoxycholic acid,UDCA)在肝癌癌前病变的发生发展中的影响,利用短期致癌动物模型探索了BBP和UDCA的抗氧化作用及它在抗癌前病变中的影响。**方法** SPF级SD大鼠40只随机分4组:对照(Control)组,模型(DEN)组,熊胆粉(DEN+BBP)组(200 mg/kg),熊去氧胆酸(DEN+UDCA)组(30 mg/kg),每组10只。实验开始除Control组外所有大鼠腹腔注射100 mg/kg二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine,DEN),每周一次,共3周。从实验开始到结束,DEN+BBP组每天灌胃200 mg/kg BBP水溶剂,DEN+UDCA组每天灌胃30 mg/kg UDCA悬浮溶液。**结果** DEN组,DEN+BBP组,DEN+UDCA组的体重和肝重量,3组之间无显著性差异。DEN组的肝组织中丙二醛(malondialdehyde,MDA)的水平显著增高,谷胱甘肽(glutathione,GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)的水平显著降低。但UDCA处理显著降低了MDA的水平,显著增加了GSH,SOD的水平。相反,BBP处理在血清中发挥同样的作用。DEN+BBP组和DEN+UDCA组的谷胱甘肽-S-转氨酶(glutathione S-transferase,GST-P)阳性病变数量及面积和Ki-67阳性细胞率显著低于DEN组,且在DEN+UDCA组中更为明显。同时,DEN+UDCA组中的Caespase-9表达量显著高于DEN组。**结论** BBP和UDCA对DEN诱导的肝癌癌前病变的发生均发挥显著的抑制作用,且对DEN诱导的氧化应激也有抗氧化作用,但它们的作用方式不同。同时,这些抗氧化作用是否参与抗癌作用需进一步研究。

【关键词】 熊胆粉;熊去氧胆酸;肝癌癌前病变;氧化应激

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)11-1424-09

Effect of bear bile powder and ursodeoxycholic acid on preneoplastic lesions of hepatocarcinoma

JIA Guiyang¹, NI Yuanping¹, WANG Mengru¹, MAKOTO Shibutani², JIN Meilan^{1,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Laboratory of Veterinary Pathology, Division of Animal Life Science, Graduate School, Institute of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 183-8509, Japan; 3. Laboratory Animal Center, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Corresponding author: JIN Meilan. E-mail:meilan0622@swu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of bear bile powder (BBP) and ursodeoxycholic acid (UDCA) on preneoplastic lesions of hepatocarcinoma, using short-term carcinogenesis bioassay models. **Methods** Forty 6-week-old male SD rats were divided randomly into control, diethylnitrosamine (DEN), DEN + BBP (200 mg/kg), and DEN + UDCA (30 mg/kg) groups. All rats, except for the control group, were injected intraperitoneally with 100 mg/kg DEN once a week for 3 weeks. Rats in the DEN + BBP and DEN + UDCA groups also received oral BBP 200 mg/kg or UDCA 30 mg/kg suspended solution, respectively, daily from the beginning to the end of the experiment. **Results** There were no

【作者简介】贾贵阳,男,在读硕士研究生,研究方向:中药抗癌作用机制。Email:15206761100@163.com

【通信作者】金美兰,女,教授,博士,研究方向:中药抗癌作用机制及毒性病理学。Email:meilan0622@swu.edu.cn

significant differences in body or liver weights between the DEN, DEN + BBP, and DEN + UDCA groups. DEN treatment increased the accumulation of malondialdehyde (MDA), decreased superoxide dismutase (SOD), and reduced glutathione (GSH) activities in liver tissue, while UDCA enhanced SOD and GSH activities and decreased MDA accumulation in liver tissue. In contrast, BBP exerted these antioxidant effects in serum. The number and area of glutathione S-transferase placental (GST-P) type-positive lesions and the Ki-67-positive cell ratio were significantly lower in the DEN + BBP and DEN + UDCA groups than in the DEN group, especially in the DEN + UDCA group. UDCA significantly increased *Caspase-9* mRNA expression compared with the model group. **Conclusions** BBP and UDCA have significant inhibitory effects on preneoplastic lesions of hepatocarcinoma induced by DEN, and both have antioxidant effects on DEN-induced oxidative stress. The antioxidant mechanisms of BBP and UDCA differ, however, and further research is needed to determine the roles of the antioxidant effects in their anticancer mechanisms.

[Keywords] bear bile powder; ursodeoxycholic acid; preneoplastic lesions of hepatocarcinoma; oxidative stress

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

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界上最为易发的恶性肿瘤之一,且肝癌死亡率一直居高不下,临床上一直追求更加有效的治疗方式^[1]。在全球范围内肝细胞癌的发病率和死亡率有所上升,其中以中国和发展中国家较为突出。2020 年中国肝细胞癌新增病例 46 万,且有超过 42 万肝癌相关死亡患者,但 HCC 预后效果仍差强人意,五年生存期仅为 14.1%^[2-3]。早期预防和筛查可以降低恶性肿瘤发生的概率,但是肝细胞癌被初诊时往往已进入中晚期^[4]。因此,早期预防和治疗 HCC,降低死亡率尤为重要。

近年来众多传统中药逐渐走上临床治疗一线,中药辅助治疗肝癌逐渐成为热点,熊胆粉 (bear bile powder, BBP) 是传统名贵中药材,最初记载于《新修本草》,我国自 20 世纪 80 年代后采用无管造瘘引流法获得黑熊胆汁干燥后得到 BBP^[5]。BBP 具有清肝利胆、清热解毒和平肝镇惊止血等功效,近年来关于 BBP 的研究发现其具有保肝护胆、抗惊厥、抗病毒、抗肿瘤发生发展等药理作用^[6-7]。熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) 和鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA) 等是 BBP 中的主要活性成分。近年来研究结果表明,BBP 有抑制癌细胞增殖活性、诱导癌细胞凋亡、调节氧化应激因子等作用,从而抑制肿瘤的发生发展。灌胃 200、400、800 mg/kg 的 BBP 可有效抑制肝癌细胞 H22 的生长^[8],促进 *p21* 表达抑制细胞周期 G1/S 期的转变,抑制 *Bcl-2*、*Caspase-3*、*Caspase-8*、*Caspase-9* 表达诱导肝癌细胞凋亡^[9]。同时,BBP 前处理可增加肝细胞中谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的水平,从而降低乙醇诱导的肝细胞脂质过氧化,起到保护肝组织的作用^[10]。前期研究结果提示,BBP 可诱导细胞凋亡,

抑制细胞增殖活性,诱导 DNA 修复相关基因 *JWA* 的表达,抑制肝癌的发生发展^[11-12]。另外,BBP 的主要活性成分 UDCA 可下调 *Bcl-2* 的表达抑制肿瘤细胞生长,可通过改变 *p21*、*p53*、*CDK1*、*Cyclin B1* 等相关因子水平,将细胞分裂阻滞在 G2/M 期^[13]。同时,UDCA 可通过降低细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平、*Bcl-2*、*Bax* 等蛋白表达量,进一步诱导线粒体膜电位下降,膜通透性增加,从而释放细胞色素 c (cytochrome c, cyt c) 到胞浆,激活下游凋亡信号通路,引起 M14 细胞凋亡^[14]。这些研究结果表明,BBP 和 UDCA 均可抑制肝癌的发展,其作用机制中包括抑制细胞增殖活性和诱导细胞凋亡。同时,它们均有抗氧化作用。但 BBP 和 UDCA 是否在早期肝癌发生过程中有抑制作用,且其抗氧化作用是否参与其抗癌作用,尚未清楚。

二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 是遗传毒性致癌物,代谢过程中可产生大量的过氧化产物,引发机体氧化应激引起肝细胞变异进而诱发肿瘤,是建立肝癌模型良好的诱导剂^[15-17]。2000 年 ITO 等^[18]开发了腹腔注射 200 mg/kg DEN 一周后进行 2/3 肝部分切除术的方式成功建立早期肝癌动物模型。诸多研究使用 200 mg/kg DEN 单次腹腔注射后长期饲养或给予促进肿瘤发展的非遗传毒性致癌物诱导肝癌^[19-21]。大鼠肝癌癌前病变生物标记物胎盘型谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione S-transferase placental, GST-P) 阳性病变的检测结果与两年致癌性实验结果具有良好的相关性^[18,22-23]。因此,本研究利用腹腔注射 DEN 的方式诱导建立大鼠早期肝癌癌前病变动物模型,确认 BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导肝癌癌前病变的发生发展过程中的抑制作用及抗氧化作用的基础上,探讨了其抗氧化作用在抗肝癌癌前病变中的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重约 120 g, 共计 40 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】, 饲养在西南大学药学院 SPF 级动物房【SYXK(渝)2020-0006】, 光照条件为循环 12 h 光照/12 h 黑暗, 温度设置为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$, 相对湿度控制在 $55\% \pm 5\%$, 3 ~ 4 只/笼, 动物自由采食和饮水。本实验通过西南大学实验动物伦理审查委员会审查批准(IACUC-20230913-08)。

1.1.2 主要试剂与仪器

BBP(吉林松宝制药, 中国, 延边); UDCA(Aladdin, 中国, 上海); DEN(Bio Ruler, 美国); 封闭用山羊血清(Southern Biotech, 美国); 马血清(Vector Laboratories, 美国); GST-P 抗体(Medical and Biological Laboratories, 日本); Ki-67 抗体[SP6](Abcam, 中国, 上海); Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) Secondary Antibody(Thermo fisher scientific, 美国); Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG H&L (HRP) Secondary Antibody (Vector Laboratories, 美国); vecastain® ABC Reagent (PK-6100, Vector Laboratories, 美国); 增强型 DAB 显色试剂盒(索莱宝, 中国, 北京); TRIzol 试剂(Life technologies, 美国); 逆转录预混液(Thermo fisher scientific, 美国); 乾坤白金 SYBR Green 预混液(Thermo fisher scientific, 美国); 大鼠粉状基础饲料(Ensiveier, 中国, 重庆)。C1000-CFX96 实时荧光定量系统(Bio-Rad Laboratories, 美国); 组织包埋机(浙江科迪 KD-BM III, 中国); 切片机(Leica RM2235, 德国); 生物组织摊烤片机(科迪 KD-TK, 中国); 光学显微镜(Olympus BX53, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 实验设计

40 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为 4 组, 每组 10 只: 对照(Control)组, 模型(DEN)组, 熊胆粉(DEN + BBP)组, 熊去氧胆酸(DEN + UDCA)组。前 3 周除 Control 组以外所有大鼠腹腔注射 100 mg/kg DEN, 每周 1 次。DEN + BBP 组每天灌胃 200 mg/kg 水溶剂, DEN + UDCA 组每天灌胃 30 mg/kg 悬浮溶液, 给药共计 8 周。实验结束后, 称取大鼠体重, 在异氟烷深度吸入麻醉下腹主动脉

采血, 后放血处死。取出肝组织称重后, 取中间叶和左侧外叶固定于福尔马林缓冲液, 剩余的肝组织放置 -80°C 超低温冰箱用于分子生物学分析。

1.2.2 酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

每组随机选取 5 只大鼠腹主动脉采血后离心获得血清, 肝组织匀浆后, 委托上海原鑫生物科技有限公司根据试剂盒说明书检测丙二醛(malondialdehyde, MDA), GSH 和 SOD 水平。标准品孔数值用于绘制回归曲线所有孔加入稀释液后, 加入辣根加入过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记抗体孵育 1 h, 加入底物避光孵育 0.25 h, 终止反应, 在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。以曲线方程计算浓度。

1.2.3 病理组织学和免疫组织学检查

制石蜡切片, 并苏木素-伊红(HE)染色和 GST-P 和 Ki-67 免疫组织学染色。脱蜡脱水后的切片用 0.3% 过氧化氢甲醇溶液通透处理 30 min, Ki-67 免疫染色在柠檬酸缓冲液中高压锅热介导抗原修复处理 15 min, 之后切片由 5% 山羊血清或马血清封闭 30 min, 并加入多克隆抗体 GST-P(1:1000)或重组抗体 Ki-67(1:200) 4°C 16 h 孵育。之后用反应增强剂 vecastain® ABC Reagent 孵育 30 min, DAB 显色后苏木精复染切片。Olympus Cellsens standard V0202 软件统计直径大于 200 μm 的 GST-P 阳性病灶数量及面积, 使用软件 KatiKati 2.0 计算肝组织的阳性细胞率。

1.2.4 抽提总 RNA 和实时荧光定量 PCR 分析

每组随机选取 5 只大鼠, 抽提总 RNA, 逆转录后使用 SYBR Green 预混液检测表达量。在 Pubmed 网站设计引物序列后委托生工生物公司(中国, 成都)合成, 见表 1。

选择内源性参照基因 *GAPDH* 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算各基因的相对表达量。检测体系为 20 μL , SYBR Green PCR Master Mix 10 μL , cDNA 1 μL , Forward Primer 0.4 μL , Reverse Primer 0.4 μL , DEPC 水 8.2 μL 。反应程序为预变性 95°C 2 min, 变性 95°C 15 s, 退火/延伸温度为 $(95^\circ\text{C}$ 15 s, 60°C 1 min) 循环 40 次, 4°C 维持。

1.3 统计学分析

所有数据表示方式为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。用 SPSS 26.0 检查统计学意义和 GraphPad Prism 5.0 软件作图。通过 Dunnett's test 计算 Control 组

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Sequence of primers used for qPCR

基因类型 Gene classification	登录号 Accession no.	基因说明 Gene description	基因名 Gene symbol	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
DNA 损伤修复相关基因 DNA damage repair-related genes	NM_023972.4	ADP 核糖基化因子样 GTPase 6 相互作用蛋白 5 ADP-ribosylation factor like GTPase 6 interacting protein 5	ARL6IP5	F:GGAACAACCGTGTAGTGAGC R:GAAGGGGCTCAGAAACCCAA
	NM_001106318.2	p53 诱导的死亡域蛋白 1 p53-induced death domain protein 1	PIDD-1	F:CCGGTGTTACAGGCTTCAGT R:TGTCATCCCAGGTGCTTGTCTC
凋亡相关基因 Apoptosis-related genes	NM_012922.2	胱天蛋白酶 3 Caspase-3	CAS-3	F:GAGCTTGGAACGCGAAGAAAA R:GAGTCCATCGACTTGCTTCCA
	NM_031632.2	胱天蛋白酶 9 Caspase-9	CAS-9	F:CTTGTCGCGGAACCTGCAAG R:CAGAGCCTGCCCCGCTGAATA
	NM_030989.3	肿瘤蛋白 p53 Tumor protein p53	p53	F:CCCCTGAAGACTGGATAACTGT R:TCTCCTGACTCAGAGGGAGC
氧化应激相关基因 Oxidative stress-related genes	NM_030826.4	谷胱甘肽过氧化物酶 1 Glutathione peroxidase 1	GPX-1	F:TCAGTTCCGACATCAGGAGAAT R:TCACCATTACCTCGCACTT
	NM_012962.1	谷胱甘肽合成酶 Glutathione synthetase	GSS	F:CAGCTGGAAGAGTTGGCACA R:GGCATACGTCACCACGTCAG
	NM_017051.2	超氧化物歧化酶 2 Superoxide dismutase 2	SOD2	F:CGGGGGCCATATCAATCACA R:CCAGCAACTCTCCTTTGGGT
内参基因 Housekeeping gene	NM_017008.4	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	F:CCGCATCTTCTTGTGCACTG R:CGATACGGCCAAATCCGTTCTC

与其他组的显著性差异,使用 Student’s *t*-test 确定 DEN 组与 DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组的显著性差异。以 *P* < 0.05 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 一般状态、体重和肝重

因灌胃失误致 1 只大鼠死亡。DEN 组、DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组的体重和绝对肝重量显著低于 Control 组,但相对肝重量无显著性差异。DEN 组与 DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组之间无显著性差异(表 2)。

2.2 BBP 和 UDCA 对 MDA, GSH 和 SOD 的影响

在肝组织中 BBP 升高了 MDA 的含量,降低了 GSH 水平,UDCA 恢复了 MDA 含量,提升了 DEN 造成的 GSH 水平下降,恢复了 SOD 的水平。在血清中 MDA,GSH 和 SOD 的活性与肝组织呈现相反结果(表 3)。

2.3 病理组织学检查和免疫组织化学检查结果

肝组织病理学检查结果,DEN 组可见轻微的炎性细胞浸润。然而,DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组中该变化明显得到缓解。在肝组织的免疫组织

表 2 SD 大鼠体重和肝重量
Table 2 Body weights and liver weights in SD rats

组别 Groups	Control 组(<i>n</i> = 10) Control group(<i>n</i> = 10)	DEN 组(<i>n</i> = 10) DEN group(<i>n</i> = 10)	DEN + BBP 组(<i>n</i> = 10) DEN + BBP group(<i>n</i> = 10)	DEN + UDCA 组(<i>n</i> = 9) DEN + UDCA group(<i>n</i> = 9)
最终体重/g Final body weights/g	522.00 ± 33.91	447.40 ± 32.90**	426.20 ± 48.90**	444.00 ± 23.64**
肝绝对重量/g Absolute liver weights/g	13.16 ± 1.33	10.74 ± 1.37**	10.32 ± 1.81**	10.62 ± 0.93**
肝相对重量/(g/100g) Relative liver weights/(g/100g)	2.55 ± 0.17	2.36 ± 0.46	2.47 ± 0.39	2.39 ± 0.13

注:与 Control 组相比,***P* < 0.01。(下图/表同)
Note. Compared with control group, ***P* < 0.01. (The same in the following figures and tables)

表 3 ELISA 检测氧化应激的相关指标

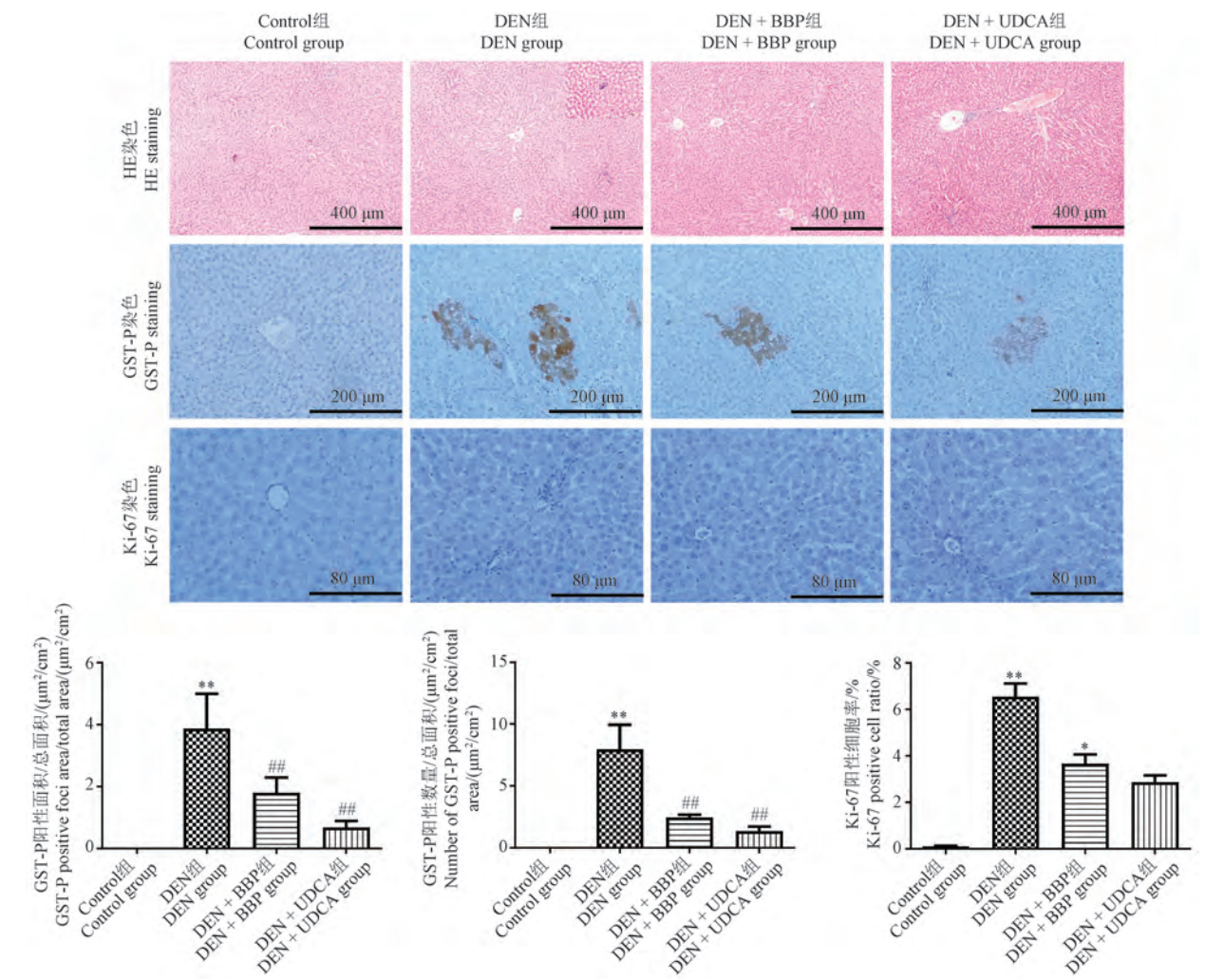
Table 3 Relevant indicators of oxidative stress were detected by ELISA

组织 Tissue	组别 Groups	对照组 Control group	DEN 组 DEN group	DEN + BBP 组 DEN + BBP group	DEN + UDCA 组 DEN + UDCA group
肝组织 Liver	MDA/(nmol/mL)	4. 51 ± 0. 64	5. 78 ± 0. 56 **	7. 06 ± 0. 66 ***	4. 93 ± 0. 56 ***
	GSH/(nmol/mL)	10. 06 ± 0. 38	7. 87 ± 0. 25 **	6. 70 ± 0. 61 ***	9. 18 ± 0. 35 ***
	SOD/(μ/mL)	308. 56 ± 119. 03	236. 06 ± 77. 12 **	216. 78 ± 19. 24 **	294. 68 ± 20. 70 ##
血清 Serum	MDA/(nmol/mL)	8. 64 ± 0. 34	6. 12 ± 0. 48 **	4. 69 ± 0. 17 ***	7. 22 ± 0. 58 ***
	GSH /(nmol/mL)	5. 38 ± 0. 31	7. 81 ± 0. 45 **	9. 26 ± 0. 27 ***	6. 69 ± 0. 80 ***
	SOD/(μ. /mL)	182. 49 ± 10. 36	260. 28 ± 25. 09 **	306. 39 ± 11. 88 ***	220. 07 ± 10. 98 ***

注:与 DEN 组相比,##*P* < 0. 01。(下图同)
Note. Compared with DEN group, ##*P* < 0. 01. (The same in the following figures)

化学检查结果,GST-P 是大鼠肝癌癌前病变生物标记物,DEN 组阳性病变面积和数量显著高于 Control 组,然而 DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组的显著低

于 DEN 组。同时,DEN 组的细胞增殖活性生物标记物 Ki-67 阳性细胞率显著高于 Control 组,然而 BBP 和 UDCA 处理显著降低了阳性细胞率(图 1)。



注:与 Control 组相比, **P* < 0. 05。(下图同)
图 1 BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的组织病理学和免疫组化 (GST-P 和 Ki-67) 变化的影响

Note. Compared with control group, **P* < 0. 05. (The same in the following figures)

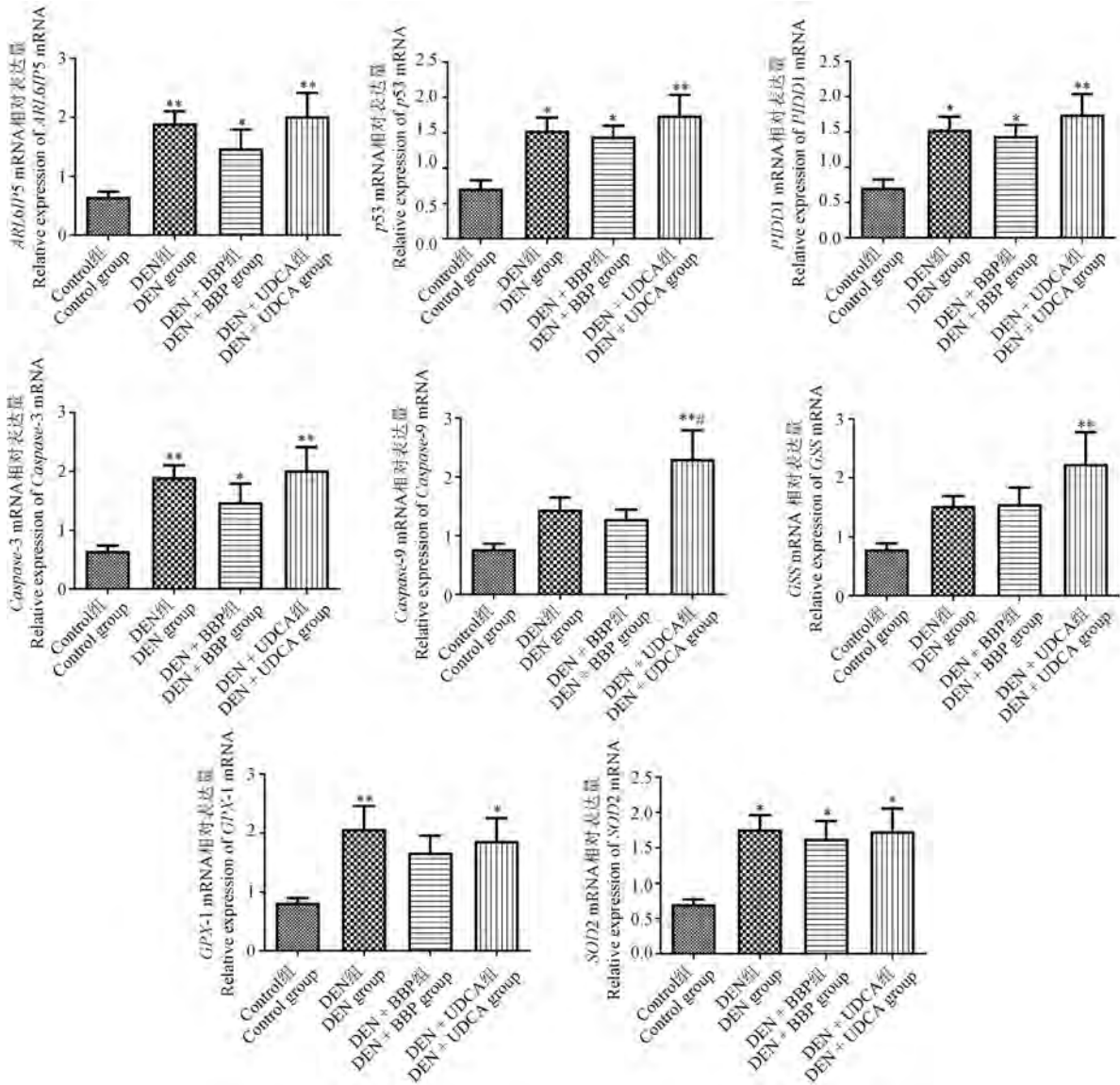
Figure 1 Effects of BBP and UDCA on the histopathological and immunohistochemical (GST-P and Ki-67) changes induced by DEN

同时,这些抑制作用在 DEN + UDCA 组中更显著。

2.4 BBP 和 UDCA 对 DNA 修复、细胞凋亡和氧化损伤相关基因 mRNA 表达水平的影响

利用实时荧光定量 PCR 检测了肝组织中与 DNA 修复、细胞凋亡和氧化损伤相关基因的 mRNA 表达量。结果显示,与 Control 组相比,DEN 组、DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组中的细胞增殖相关的 *PIDD-1*、细胞凋亡相关的 *Caspase-3*、氧化应激相关

的 *GPX-1* 及 *SOD2* 的 mRNA 表达量明显升高,但是 3 组之间无显著性差异。DEN + UDCA 组的 *Caspase-9* 和 *GSS* 表达量显著高于 Control 组,且 *Caspase-9* 的表达量还显著高于 DEN 组。在 DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组中的 *ARL6IP5* (*JWA*) 的表达量与 DEN 组相比有升高趋势,但无显著性差异。另外,细胞凋亡相关基因 *p53* 在各组之间无显著性差异(图 2)。



注:与 DEN 组相比, [#]*P* < 0.05。

图 2 DNA 修复、细胞凋亡和氧化应激相关 mRNA 表达量

Note. Compared with DEN group, [#]*P* < 0.05.

Figure 2 mRNA expression levels in DNA repair, apoptotic proliferation and oxidative stress

3 讨论

肝癌是世界上最致命的恶性肿瘤之一,早期预防和筛查可以降低恶性肿瘤发生的概率^[4]。近年

来众多传统中药逐渐走上临床治疗一线,BBP 作为传统中药,诸多研究证明 BBP 有抗炎、抗氧化和抗肿瘤的功 效,其主要活性成分 UDCA 亦有抗氧化和抗肿瘤的作用,但 BBP 和 UDCA 在体内抗氧化作用

机制以及这些作用是否参与抗肿瘤过程仍未可知^[10]。因此,本研究利用遗传毒性致癌物 DEN 建立大鼠肝癌癌前病变动物模型,确认了 BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的肝癌癌前病变发生发展过程中的抗氧化、抗肿瘤作用,并探讨了 BBP 和 UDCA 的抗氧化作用在抗癌过程中的作用。

本研究中, DEN 组、DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组的体重及绝对肝重量显著性降低,而相对肝重量在各组间无显著性差异。同时,病理组织学检查中未发现肝组织的明显的病理变化。GHUFRAN 等^[24] 2021 年利用 SD 大鼠腹腔注射 30 mg/kg DEN 每周 2 次 10 周后,从 12 ~ 16 周每周注射 1 次的方式建立肝癌模型中,从 12 周开始出现大鼠体重下降及相对肝重量的显著变化。这些结果提示,本实验中的诱导方法不足以影响相对肝重量,绝对肝重量的下降与摄入致癌物导致的体重下降有关。然而, BBP 和 UDCA 的处理显著降低了 DEN 诱导的直径大于 200 μm 的 GST-P 阳性病灶的数量和面积以及 Ki-67 阳性细胞率,且 UDCA 的抑制作用更加明显。GST-P 是胎盘型谷胱甘肽转移酶,是大鼠肝癌癌前病变的生物标志物^[25],在短期致肝癌模型中检测 GST-P 阳性病变可在体内检测受试物的致癌潜在性^[18,22]。MIZUKAMI 等^[26] 2010 年还报道直径大于 200 μm 的 GST-P 阳性病变可有效的发展成肝癌。Ki-67 核抗原是一种增殖活性生物标志物,是体现癌细胞增殖和分化能力的有效指标^[27]。由此可见, BBP 和 UDCA 均可有效的抑制 DEN 诱导的肝癌癌前病变的发生。另外,本实验使用 100 mg/kg DEN 腹腔注射 3 次的方法诱导了肝癌癌前病变,该方法虽然能有效诱导 GST-P 阳性肝癌癌前病变的发生,但因给药剂量较低,给药周期较短对肝组织的重量及病理组织上不呈现明显的变化。

诸多研究表明,熊胆及其主要成分抑制肿瘤细胞增殖和发展。2013 年,赵锦燕等^[28] 通过 Hep G2 肝癌细胞异种皮下移植的裸鼠模型,发现 BBP 治疗促进 p21 的表达从而抑制细胞周期素 E (cyclin E) 和细胞周期素依赖性酶抑制剂 2 (cyclin-dependent kinases 2, CDK2) 结合最终抑制细胞周期从 G1 期到 S 期的转变,引发细胞周期停滞。UDCA 预处理裸鼠,显著抑制接种的肿瘤细胞增殖和细胞团块形成^[29]。另外, UDCA 可以通过抑制蛋白酶体 (deleted in liver cancer 1, DLC1) 非泛素化降解,诱

导 DLC1 蛋白表达,从而抑制细胞增殖^[30]。本课题组在前期研究中也发现早期肝癌促进阶段处理 BBP 可显著抑制 GST-P 阳性病变的发展^[31]。在本实验中 BBP 和 UDCA 的处理不仅显著减少了 Ki-67 阳性细胞率,且显著增高了细胞凋亡相关基因 *PIDD1*、*Caspase-3* 及 *Caspase-9* 的 mRNA 表达量。特别是 DEN + UDCA 组的 *Caspase-9* 的表达量显著高于 DEN 组。半胱天冬酶家族在稳态和细胞程序性死亡中起重要作用^[32], *Caspase-9* 是参与线粒体途径的关键,激活 *Caspase-9* 可以启动细胞凋亡的发生,促进下游效应 *Caspase-3* 发挥作用。不同活性片段的编码 p53 诱导死亡的结构域蛋白 1 (p53-induced death domain protein 1, *PIDD1*) 可以修复 DNA 损伤或激活 *Caspase-2* 介导 DNA 损伤导致的细胞凋亡,以响应 DNA 损伤^[33-34]。p53 可通过 *PIDD-BID* 轴介导 *Caspase-3* 和 *Caspase-9* 诱导的凋亡^[34]。另外,前期课题组研究还发现 BBP 的前期处理可显著增加 DNA 修复相关基因 *JWA* (*ARL6IP5*) 的表达量,从而参与抑制肝癌癌前病变的发生。但是,在本实验中没有发现 *ARL6IP5* 表达量的显著变化。这些结果表明, BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的肝癌癌前病变的发生发展的抑制作用主要与促进细胞凋亡及抑制细胞增殖有关。

DEN 是一种遗传毒性肝致癌物, DEN 不仅以烷基化的方式导致 DNA 损伤,而且在代谢过程中产生大量的氧化应激产物,常应用于化学诱导大鼠肝癌,且诱发肝癌过程相似于人原发性肝癌^[35-36]。熊敏琪等^[37] 报道 BBP 可通过增加 GSH 和 SOD 活性,缓解动脉粥样硬化。此外,注射 BBP 可以降低 MDA 水平和增强 SOD 活性,以降低脑损伤组织中的氧化应激^[38]。2024 年, WANG 等^[39] 报道了 UDCA 显著降低 H_2O_2 损伤的肝细胞氧化应激水平。同时,在各种肝病中 UDCA 处理可提高体内外 SOD、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 的活性和促甲状腺素 (thyrotrophin, TSH)、GSH 的水平,减少细胞内 ROS、MDA 的积累和氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) GSSG/GSH 的速率^[40]。由此可见, BBP 和 UDCA 均具有抗氧化作用,但在 DEN 诱导的氧化应激过程中 BBP 和 UDCA 是否发挥抗氧化作用,且抗氧化作用是否参与抑制肝癌癌前病变作用,尚不清楚。因此,本次实验检测了肝组织和血清中的氧化应激相关酶的水平 and 肝组织中的氧

化应激相关基因水平。实验结果表明, BBP 仅在血清中显著的降低 MDA 水平, 显著增高 SOD 和 GSH 水平发挥抗氧化作用, 在肝组织中反而显著增强氧化应激水平。相反, UDCA 仅在肝组织中显著降低 MDA 水平, 显著增高 SOD 和 GSH 水平, 而在血清中无明显的抗氧化作用。然而, 肝组织中的氧化应激相关基因的表达量, 在 DEN 组和 DEN + BBP 组或 DEN + UDCA 组之间无显著性差异。由此可见, BBP 和 UDCA 均具有抗氧化作用, 但是其作用机制不同, 且 BBP 和 UDCA 的抗氧化作用是否参与抗癌过程及它们的抗氧化作用机制, 有待于进一步研究。

综上所述, 本研究确认了 BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的肝癌癌前病变的作用, 并探讨了它们抗氧化作用对肝癌癌前病变的影响。BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的肝癌癌前病变均有抑制作用, 且 UDCA 的作用似乎优于 BBP。同时, BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的氧化应激均有抗氧化作用, 但它们的作用机制不同。BBP 的抗氧化作用体现在血清中, 而 UDCA 表现在肝组织中。《神农本草经》中说: “上药养命, 中药养性, 下药治病”。BBP 是天然中药, UDCA 是人工合成的主要活性成分, 本实验结果提示中药宏观调节机体的基本功能, 从而达到治病目的的作用机制与靶器官、靶点式调控从而达到治病目的的西药截然不同, 探讨分析中药的治病机制时应关注它的宏观调控机制。BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的肝癌癌前病变的抑制作用主要来自于细胞增殖活性的降低和细胞凋亡的促进, 而其抗氧化作用是否参与抗癌机制需进一步研究。

参 考 文 献(References)

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] HAO X, SUN G, ZHANG Y, et al. Targeting immune cells in the tumor microenvironment of HCC: new opportunities and challenges [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 775462.

[3] HE S, XIA C, LI H, et al. Cancer profiles in China and comparisons with the USA: a comprehensive analysis in the incidence, mortality, survival, staging, and attribution to risk factors [J]. Sci Chin Life Sci, 2024, 67(1): 122-131.

[4] YE Q, LING S, ZHENG S, et al. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 114.

[5] 张启明, 袁惠南. 人工引流熊胆研究概况 [J]. 中国药学杂志, 1993, 28(9): 526-529.

ZHANG Q M, YUAN H N. Overview of artificial pancreatic

drainage in bears [J]. Chin Pharm J, 1993, 28(9): 526-529.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社; 2009.

National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: Chemical Industry Press; 2009.

[7] 王佳婧, 郑勇凤, 秦晶, 等. 熊胆粉的药理作用与新剂型研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(7): 598-602.

WANG J J, ZHENG Y F, QIN J, et al. Advances in pharmacological activities and novel dosage forms of bear bile powder [J]. Chin J Hosp Pharm, 2016, 36(7): 598-602.

[8] 王硕, 睢大贫, 陈志鸿, 等. 熊胆粉对小鼠肝癌 H₂₂ 的抑制作用及量效关系研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2012, 28(2): 202-203.

WANG S, SUI D Y, CHEN Z H, et al. Inhibitory effect of bear bile powder on mouse hepatocellular carcinoma H₂₂ and its dose-effect relationship [J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med, 2012, 28(2): 202-203.

[9] 张梅. 熊胆粉对不同时期 SD 大鼠肝癌的作用及机制的初步探讨 [D]. 重庆: 西南大学; 2020.

ZHANG M. Preliminary discussion of its mechanism and effects of bear bile powder on different stages hepatocarcinogenesis in SD rats [D]. Chongqing: Southwest University; 2020.

[10] 刘菁菁, 肖向红, 薛艺, 等. 熊胆粉抗乙醇诱导的小鼠肝细胞氧化损伤研究 [J]. 野生动物, 2013, 34(4): 223-225, 242.

LIU J J, XIAO X H, XUE Y, et al. Protective effect of bear bile powder on alcohol-induced oxidative damage in mouse primary cultured hepatocytes [J]. Chin J Wild, 2013, 34(4): 223-225, 242.

[11] 董锐. 熊胆粉和熊去氧胆酸对 SD 大鼠肝癌的防治作用和机制探讨 [D]. 重庆: 西南大学; 2023.

DONG R. Preventive and therapeutic effects of bear bile powder and ursodeoxycholic acid on liver cancer in SD rats and its mechanism [D]. Chongqing: Southwest University; 2023.

[12] 洪泽宣. 熊胆粉的安全性及预防治疗肝癌的作用和机制研究 [D]. 重庆: 西南大学; 2021.

HONG Z X. Study on the safety of bear bile powder and its role and mechanism in prevention and treatment of liver cancer [D]. Chongqing: Southwest University; 2021.

[13] AZIZ K, LIMZERWALA J F, STURMLECHNER I, et al. Ccne1 overexpression causes chromosome instability in liver cells and liver tumor development in mice [J]. Gastroenterology, 2019, 157(1): 210-226.

[14] 余焕. 熊去氧胆酸对黑色素瘤细胞 M14 的抑制作用及机理研究 [D]. 厦门: 厦门大学; 2019.

YU H. Inhibitory effect and mechanism of ursodeoxycholic acid on melanoma cell M14 [D]. Xiamen: Xiamen University; 2019.

[15] KURMA K, MANCHES O, CHUFFART F, et al. DEN-induced rat model reproduces key features of human hepatocellular carcinoma [J]. Cancers, 2021, 13(19): 4981.

- [16] RODRÍGUEZ M J, SABAJ M, TOLOSA G, et al. Maresin-1 prevents liver fibrosis by targeting Nrf2 and NF- κ B, reducing oxidative stress and inflammation [J]. Cells, 2021, 10 (12): 3406.
- [17] PARK M K, LEE J C, LEE J W, et al. Effects of fermented rice bran on DEN-induced oxidative stress in mice: GSTP1, LINE-1 methylation, and telomere length ratio [J]. J Food Biochem, 2020, 44(7): e13274.
- [18] ITO N, IMAIDA K, ASAMOTO M, et al. Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats [J]. Mutat Res, 2000, 462(2/3): 209–217.
- [19] DAS B K, CHOUKIMATH S M, GADAD P C. Asarone and metformin delays experimentally induced hepatocellular carcinoma in diabetic milieu [J]. Life Sci, 2019, 230: 10–18.
- [20] KUMAR A, NAITHANI M, KUMAR N, et al. Piperlongumine inhibits diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rats [J]. Hum Exp Toxicol, 2022, 41: 9603271211073593.
- [21] MUGURUMA M, KAWAI M, DEWA Y, et al. Threshold dose of piperonyl butoxide that induces reactive oxygen species-mediated hepatocarcinogenesis in rats [J]. Arch Toxicol, 2009, 83(2): 183–193.
- [22] SHIRAI T. A medium-term rat liver bioassay as a rapid *in vivo* test for carcinogenic potential; a historical review of model development and summary of results from 291 tests [J]. Toxicol Pathol, 1997, 25(5): 453–460.
- [23] OGISO T, TATEMATSU M, TAMANO S, et al. Comparative effects of carcinogens on the induction of placental glutathione S-transferase-positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinomas in a long-term assay [J]. Toxicol Pathol, 1985, 13(4): 257–265.
- [24] GHUFRAN H, AZAM M, MEHMOOD A, et al. Standardization of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma rat model with time based molecular assessment [J]. Exp Mol Pathol, 2021, 123: 104715.
- [25] LIU Y Z, LU H L, QI X M, et al. Aristolochic acid I promoted clonal expansion but did not induce hepatocellular carcinoma in adult rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(12): 2094–2105.
- [26] MIZUKAMI S, ICHIMURA R, KEMMOCHI S, et al. Induction of GST-P-positive proliferative lesions facilitating lipid peroxidation with possible involvement of transferrin receptor up-regulation and ceruloplasmin down-regulation from the early stage of liver tumor promotion in rats [J]. Arch Toxicol, 2010, 84 (4): 319–331.
- [27] WANG L, ZHENG L, WANG S Y, et al. Clonal analysis of gastric carcinoma and precancerous lesions and its relation to Ki-67 protein expression [J]. Neoplasma, 2009, 56(1): 48–55.
- [28] 赵锦燕, 刘丽雅, 万芸, 等. 熊胆粉对肝癌移植瘤裸鼠血管生成和细胞周期的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8 (7): 672–674, 686.
ZHAO J Y, LIU L Y, WAN Y, et al. Impacts of Xiongdanfen on angiogenesis and cell cycle in the nude mice with hepatoma xenograft [J]. World J Integr Tradit West Med, 2013, 8(7): 672–674, 686.
- [29] LIU H, XU H W, ZHANG Y Z, et al. Ursodeoxycholic acid induces apoptosis in hepatocellular carcinoma xenografts in mice [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(36): 10367–10374.
- [30] CHUNG G E, YOON J H, LEE J H, et al. Ursodeoxycholic acid-induced inhibition of DLC1 protein degradation leads to suppression of hepatocellular carcinoma cell growth [J]. Oncol Rep, 2011, 25(6): 1739–1746.
- [31] 董锐, 张梅, 洪泽宣, 等. 熊胆粉对 DEN + PBO 诱发大鼠肝癌早期阶段的影响研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31 (9): 1148–1155.
DONG R, ZHANG M, HONG Z X, et al. Effects of bear bile powder on the early stage of hepatocarcinogenesis induced by DEN + PBO in SD rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31 (9): 1148–1155.
- [32] MCILWAIN D R, BERGER T, MAK T W. Caspase functions in cell death and disease [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(4): a026716.
- [33] JANSSENS S, TINEL A. The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond [J]. Cell Death Differ, 2012, 19 (1): 13–20.
- [34] SHEIKH T I, VASLI N, PASTORE S, et al. Biallelic mutations in the death domain of PIDD1 impair caspase-2 activation and are associated with intellectual disability [J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 1.
- [35] 程延安, 袁利超, 党双锁, 等. 间断小剂量 DEN 诱发大鼠肝癌模型研究 [J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(11): 806–808.
CHENG Y A, YUAN L C, DANG S S, et al. Research of rat hepatocarcinogenesis model induced by low doses of DEN interruptedly [J]. J Qilu Oncol, 2005, 12(11): 806–808.
- [36] VALKO M, RHODES C J, MONCOL J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [J]. Chem Biol Interact, 2006, 160(1): 1–40.
- [37] 熊敏琪, 贾成林, 崔金刚, 等. 熊胆粉在麝香通心滴丸抗动脉粥样硬化中的作用机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(9): 1083–1089.
XIONG M Q, JIA C L, CUI J G, et al. Study on the Mechanism of bear bile powder in anti-atherosclerosis of shexiang tongxin pills [J]. Chin J Integr Med, 2015, 35(9): 1083–1089.
- [38] 张庆镐, 徐惠波, 朴惠善. 注射用熊胆粉对大鼠脑血栓的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1360–1364.
ZHANG Q G, XU H B, PIAO H S. Effect of Fel Ursi powder for injection on cerebral thrombosis in rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2005, 36(9): 1360–1364.
- [39] WANG X, LIANG G, ZHOU Y, et al. Ameliorative effect and mechanism of ursodeoxycholic acid on hydrogen peroxide-induced hepatocyte injury [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 4446.
- [40] LI C, ZHANG S, LI L, et al. Ursodeoxycholic acid protects against arsenic induced hepatotoxicity by the Nrf2 signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 594496.

屈媛媛,冯楚文,孙维伯,等. 近五年慢性疲劳综合征动物模型行为学评价方法应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32 (11): 1433-1444.

QU Y Y, FENG C W, SUN W B, et al. Progress in the application of behavioral evaluation methods for animal models of chronic fatigue syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1433-1444.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.008

近五年慢性疲劳综合征动物模型行为学评价方法应用进展

屈媛媛^{1,2},冯楚文^{1,2},孙维伯³,孙忠人⁴,李彬彬¹,鲁菁⁵,
邵玉莹⁵,郭述豪⁵,陈涛⁶,杨添淞^{1,2*}

(1. 黑龙江中医药大学附属第一医院,哈尔滨 150040;2. 黑龙江省中医药信息学重点实验室,哈尔滨 150040;
3. 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院,哈尔滨 150081;4. 黑龙江中医药大学附属第二医院,哈尔滨 150001;
5. 黑龙江中医药大学第一临床医学院,哈尔滨 150040;6. 黑龙江中医药大学第二临床医学院,哈尔滨 150001)

【摘要】 慢性疲劳综合征 (chronic fatigue syndrome, CFS) 作为发病率逐年增高、临床诊断易忽视、严重影响患者生活质量的疾病,阐明其发病机制,从病因学和症状学双面发力进行治疗,对于 CFS 患者的临床康复至关重要。限于其发病机制未明,针对病因治疗的方法有限,目前治疗方式主要集中在改善临床症状。在此背景下,建立良好的动物模型同时对动物模型进行有效评价尤为重要。本文综合 CFS 诊断标准和基础研究开展情况,总结近 5 年 CFS 基础研究中涉及的模型评价相关的行为学实验方法,首次从一般状态评价、疲劳状态评价、认知功能评价、情绪状态评价和疼痛程度评价 5 方面展开论述,旨在呈现现状、揭露问题、引发思考、推动改进。

【关键词】 慢性疲劳综合征;动物模型;模型评价方法;行为学评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1433-12

Progress in the application of behavioral evaluation methods for animal models of chronic fatigue syndrome

QU Yuanyuan^{1,2}, FENG Chuwen^{1,2}, SUN Weibo³, SUN Zhongren⁴, LI Binbin¹,
LU Jing⁵, SHAO Yuying⁵, GUO Shuhao⁵, CHEN Tao⁶, YANG Tiansong^{1,2*}

(1. First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Key Laboratory of Information Science of Traditional Chinese Medicine in Heilongjiang Province, Harbin 150040, China; 3. Harbin Medical University Cancer Hospital, Harbin 150081, China; 4. Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001, China; 5. the First Clinical Medical College of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 6. the Second Clinical Medical College of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001, China)

Corresponding author: YANG Tiansong. E-mail:958218699@qq.com

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (82074539, 82305394), 黑龙江省自然科学基金项目 (YQ2023H019, LH2020H092), 教育部“春晖计划”合作科研项目 (HZKY20220308-202201357), 黑龙江省中医药科研课题 (ZHY2022-136), 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (CACM-2023-QNRC2-A04), 黑龙江省中医药学会 2022-2024 年度青年人才托举工程项目 (2022-QNRC1-05)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82074539, 82305394), Heilongjiang Provincial Natural Science Foundation (YQ2023H019, LH2020H092), Collaborative Scientific Research Project of the Ministry of Education's "Spring Sunshine Plan" (HZKY20220308-202201357), Heilongjiang Provincial Scientific Research Project on Traditional Chinese Medicine (ZHY2022-136), Youth Talent Support Project of China Association of Chinese Medicine (CACM-2023-QNRC2-A04), Heilongjiang Provincial Association of Chinese Medicine's Youth Talent Support Project for 2022-2024 (2022-QNRC1-05).

【作者简介】 屈媛媛,女,博士,研究方向:针灸治疗慢性疲劳综合征及围绝经期诸症的临床与基础。Email:18804636690@163.com

【通信作者】 杨添淞,女,博士,主任医师,研究方向:针灸治疗功能性神经疾病的临床与基础。Email:958218699@qq.com

[Abstract] The incidence of chronic fatigue syndrome (CFS) has gradually increased in recent years. Although CFS can severely affect patient quality of life, its clinical diagnosis is easily overlooked. Elucidating the pathogenesis of CFS and treating it from both etiological and symptomatological perspectives are crucial for patient recovery; however, its unclear pathogenesis means that etiological treatment options are limited, and current treatments mainly focus on improving clinical symptoms. In this context, there is a need to establish and evaluate a suitable animal model. This article comprehensively integrates the diagnostic criteria of CFS and progress in related basic research. We also summarize the behavioral experimental method used to evaluate CFS models in basic research in the past 5 years and discuss these evaluations from the perspectives of general condition, fatigue state, cognitive function, emotional state, and pain degree. This review aims to present the current situation, expose problems, trigger reflection, and promote improvements in the behavioral evaluation of animal models of CFS.

[Keywords] chronic fatigue syndrome; animal model; model evaluation methods; behavioral evaluation

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

慢性疲劳综合征 (chronic fatigue syndrome, CFS) 是一种会导致衰弱症状的复杂多系统疾病^[1], 包括严重疲劳、运动后不适、睡眠不足和认知缺陷^[2], 严重降低患者学习、工作、社交等方面能力, 导致患者职业和社会功能障碍。同时有研究指出, 一般症状、心理状态、疼痛和活动水平均需纳入对 CFS 患者的临床评价^[3]。国内外学者围绕 CFS 发病机制开展了大量研究, 可能与病毒感染、免疫功能失调、氧化应激、神经-内分泌系统紊乱等原因相关^[4-7], 但发病机制仍未明确。目前 CFS 的治疗主要针对临床症状, 针对病因的治疗较少, 主要原因在于其发病机制不明。而良好的动物模型对于阐释 CFS 发病机理至关重要^[8-9], 其中关键一环就是对于动物模型的有效评价。

动物行为学是生物学的一个重要分支, 专注于系统研究动物的行为模式、探索这些行为产生的生物学机制, 并追踪这些行为在进化历程中的演变规律。通过动物行为学的研究, 科学家能够揭示生物与环境之间的复杂互动关系, 为疾病防控等领域提供科学依据和实用策略, 因此动物行为学对于推动生命科学的发展具有重要意义。如今, 神经科学研究的发展为理解动物行为提供了全新的视角和工具。综合 CFS 诊断标准和基础研究开展情况, 总结近 5 年 CFS 基础研究涉及的模型评价相关的行为学实验方法, 从一般状态评价、疲劳状态评价、认知功能评价、情绪状态评价和疼痛程度评价 5 方面展开论述。

1 一般状态评价方法

在一般状态评价方面, 主要涉及动物的体态、外观、精神、体重、进食量、饮水量。具体情况如下: 钟晓玲等^[10]和冯楚文等^[11]利用《实验大鼠一

般情况半定量评分观察表 (即高怀林“一般情况半定量评分表”)》评定大鼠的一般状态, 造模过程中, 造模组大鼠逐渐出现对抗减少、皮肤松弛、毛发稀疏暗淡、稀便等情况, 评分 ≥ 4 分提示成功建立 CFS 大鼠模型。李超然等^[12]在利用一般情况半定量评分观察表的基础上, 增加了体重、摄食摄水量, 发现造模后大鼠体重明显降低, 摄食水量减少。其他研究均类似, 其中徐小珊等^[13]记录造模期间大鼠的体型、毛色、活动情况、精神状态以及每日饮水情况等一般状态, 同时对大鼠每日摄食量进行测定。朱凤亚^[14]视大鼠的活动、精神、饮食、粪便、毛发、体重为一般状态进行评价。李德华^[15]和耿玉杰等^[16]每天记录大鼠的体重、进食量、饮水量、毛发光泽度及粪便形态。李玲玲等^[17]明确提出以体重作为行为学评估, 与空白组比较, 造模小鼠体重均减轻 ($P < 0.05$)。李艳荣^[18]明确提出将大鼠一般体征表现出明显的疲劳症状 (毛发稀疏泛黄、精神萎靡、背部皮肤松弛、大便稀溏或干结、四肢蜷卧)、体重明显减轻、饮食量减少或旷场实验 (open field test, OFT) 中运动次数明显减少, 视为建模成功的标准。贺恋词^[19]明确提及对脾肾阳虚证候评价, 通过测定大鼠体重、平均日进食量及饮水量变化, 并通过一般情况半定量评分表评估大鼠一般状态, 以判断大鼠是否出现脾肾阳虚证候相关症状。

在诸多一般状态评价方式中, 尤以《实验大鼠一般情况半定量评分观察表》最为常用, 该量表由高怀林等^[20]研究改进而成, 以评分 ≥ 4 分作为 CFS 模型成立的判定标准, 并首次使用该量表评价力竭游泳法建立的 CFS 大鼠模型的一般状态, 结果显示与正常组比较, 模型组大鼠一般情况评分明显升高 ($P < 0.01$)。因其评价标准明确且较细致, 广为应用^[10-11]。总结对模型一般状态的评价方式, 发现存

在评价方式多样且不一的问题,还需进一步规范,建议研究者多使用规范化、可量化的量表对大鼠的体态、外观、精神进行评价,同时结合体重、饮食量、饮水量检测等客观数据,主客观结合进行一般状态综合评价。

2 疲劳状态评价方法

疲劳是 CFS 的必备症状之一,对 CFS 疲劳状态的评价主要包括力竭游泳实验(exhaustive swimming test)、转棒实验(rotarod test)、握力测试(grip strength test)、自发活动实验(spontaneous locomotion test)、力竭跑台实验(exhaustive treadmill test)和活动轮实验(running wheel test),其中以力竭游泳实验最为常用,研究者常以力竭游泳时间评价动物的疲劳状态。具体情况如下:

2.1 力竭游泳实验

力竭游泳实验是将动物放置在透明的水缸中,观察记录其从开始入水到力竭的时间,目前是反映运动耐力^[21]和药物抗疲劳效果^[22]的经典研究方法,包括负重力竭游泳实验和非负重力竭游泳实验。为避免动物之间互相干扰,通常一个水缸一次仅测试一只动物。

力竭游泳实验中以负重力竭游泳在 CFS 基础研究中为多。其中,分歧点主要在负重量。以“动物头部沉入水中超过 10 s 不能浮出水面”为力竭标准的研究中,刘长征等^[23]给予大鼠体重 5% 的负重,李红玉等^[24]给予小鼠体重 7% 的负重,陈春苗等^[25]给予小鼠体重 10% 的负重,谢亚娜等^[26]和李玲玲等^[17]则分别采用 5% ~ 10% 和 10% ~ 15% 的区间负重;上述研究发现造模后动物的力竭游泳时间均较对照组缩短。也有研究者利用负重力竭游泳法评估动物的抑郁状态,如宋琦等^[27]采用冷水力竭游泳测试评估抑郁样行为。

非负重力竭游泳实验应用相对较少,韩玲等^[28]和潘明柱等^[29]利用力竭游泳实验评价动物体力及疲劳程度,以“头部沉入水中 10 s 未浮出水面”为力竭标准,发现模型组的力竭游泳时间较对照组明显缩短($P < 0.01$)。

2.2 转棒实验

转棒实验是一种经典的行为学实验,用于评估实验动物的协调运动、平衡能力和运动耐力等^[30-32]。将动物放置在具有稳定加速度的旋转杆上,并记录跌倒的潜伏期,即在转动圆轮上的停留

时间(在棒时间)。从旋转杆上脱落的平均潜伏期用于评估运动能力。差异主要集中在旋转杆速度和观察时间。

李红玉等^[24]采用转棒实验评价绞股蓝抗疲劳作用,观察记录在棒时间,结果显示造模 21 d 后,模型组在棒时间较对照组显著减少($P < 0.05$)。KWON 等^[33]利用转棒实验进行运动行为分析观察运动表现对疲劳的影响,以 40 r/min 的速度将小鼠保持在杆子上 10 min,小鼠每周进行一次测试,计算 3 次的平均值为平均潜伏期,结果与疲劳对照组相比,500 mg/kg 血红素组($P < 0.01$)和肌酸(creatine, Cr)组($P < 0.01$)的潜伏期明显增加。LEE 等^[34]使用旋转杆机在 4 ~ 40 r/min 加速的转棒上评估小鼠的运动活动,记录 3 次(间隔 20 min)下落的平均潜伏期,结果显示接受双侧肾上腺切除术(adrenalectomy, ADX)的小鼠与对照组相比,从加速旋转杆上坠落的潜伏期降低($P = 0.09$)。SONG 等^[35]记录 1200 s 内小鼠从 3.5 ~ 35 r/min 的加速杆上落下的潜伏期,与对照组相比,利血平建模组小鼠从棒上跌落的潜伏期缩短($P < 0.05$)。

2.3 握力测试

握力测试用于评估实验动物的前肢和后肢握力,反应大小鼠的肌肉力量、神经系统功能和协调性等方面的生理特征^[36-37]。

THAKUR 等^[38]采用数字握力计测试前肢握力,将雄性白化小鼠置于一个位置,使其前肢抓住网格,轻轻拉鼠尾以记录抓地力,CFS 组的握力与对照组相比明显下降($P < 0.001$),提示慢性应激刺激引起握力损伤。张森品^[39]用小鼠抓力仪进行肌肉力量测试,小鼠爪子抓握稳定时向后拉小鼠尾巴,重复测量 3 次取均值,发现小鼠单次腹腔注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)24 h 后小鼠抓力显著下降($P < 0.01$)。LEE 等^[34]使用握力测试装置连接钢丝网和等距力传感器评估肌肉力量,小鼠被允许用前爪抓住栅格,轻轻向后拉鼠尾直到在 3 s 内失去控制,重复测试 3 次(间隔 5 min)取平均值以评估握力,结果显示 ADX 显著降低了最大握力($P < 0.05$)。

2.4 自发活动实验

自发活动实验是一种评估实验动物的活动性和运动行为的实验,可以用来评价实验动物的疲劳状态^[40]。实验动物被放置在一个封闭的箱子中,通过记录其运动轨迹和运动速度等评估其自发活动

水平。自发活动实验和 OFT 都是评估动物运动和探索行为的常用研究方法,但二者在实验装置、实验流程和评估指标等方面存在差异。啮齿类动物静止时间的增加和运动活动的减少也表明疲劳增加^[38]。自发活动实验的差异集中在观察时间。

THAKUR 等^[38]使用活动光度计记录总体运动活动以评估动物的自发活动情况,观察强迫游泳对运动活动的影响,每只动物都在一个正方形(直径 30 cm)的配有红外光敏光电管和数字光度计的封闭平台上接受检查,自发活动由每只动物 10 min 内的总光束计数表示;与对照组相比,CFS 组的运动活动显著降低($P < 0.001$)。LI 等^[41]在疲劳刺激方式干预前后,用红外光束传感器对大鼠疲劳状态进行定量评价,计算单笼中大鼠夜间自发活动,计数每 60 min 累积一次,将自发活动水平标准化为疲劳负荷前 3 d 的平均值,结果疲劳负荷显著降低了夜间自发活动($P < 0.01$)。

2.5 力竭跑台实验

力竭跑台实验是一种用于评估实验动物的耐力水平和疲劳程度的常用实验方法。这种实验通过模拟长时间、高强度的运动状态,观察实验动物在体力达到极限时的表现,评估其耐力水平和疲劳程度。“力竭跑台时间”是实验动物在跑台上持续运动直至达到力竭状态所用时长,与体力状态成正比,这一指标已经在动物运动疲劳评价中应用多年,且评价标准逐步趋于细化:(1)1978 年文献将“伸展动物的后肢以检查是否没有阻力”作为标准^[42];(2)1998 年为“奔跑大鼠在接受刺激后仍跟不上预定速度 33 m/min,大鼠臀部压在跑台后壁,后肢随转动皮带后拖达 30 s”^[43];(3)2012 年有“大鼠不能坚持跑台运动,后肢随转动皮带拖达 30 s,连续给予电刺激或机械刺激 1 min 后无效,行为特征为呼吸深急、精神疲倦、反应迟钝、刺激后无反应”的评价标准^[44];(4)2012、2016 和 2023 年分别有文献将评价标准设计为“动物在不被驱赶的情况下,停止奔跑并在电击器上停留时间超过 5 s 而不试图重新跑步”^[45-47]。

目前仅杨添淞团队在 CFS 基础研究中应用力竭跑台时间评价疲劳状态,以“运动末期大鼠跑步姿势异常,由蹬地式转变为伏地式,滞留跑道后 1/3 不能继续坚持跑步,且驱赶 10 s 仍不能按原速度继续跑步;停止运动后,大鼠呼吸急促,眼神无光,精神萎靡,对刺激反应迟钝,捕捉反应较运动前大幅

下降”为力竭标准,研究发现 CFS 大鼠存在力竭跑台时间缩短,电针干预后回调^[48]。

2.6 活动轮实验

活动轮实验是一种常见的行为学实验,用于评估动物的运动活动水平、兴奋性和行为特征。跑轮主要分为两种:强迫跑轮和自主运动跑轮。

CFS 相关基础研究仅涉及自主运动跑轮实验,如 HE 等^[49]利用自主运动跑轮观察小鼠运动情况,结果 CFS 组小鼠的跑轮活动明显下降,实验结束时仅保持在基线的 51.8%。

除上述评价方式外,有研究者将接受造模后的小鼠置于透明观察笼中,测量其开始梳理毛发(舔和摩擦皮肤/毛发)所需的时间并作为疲劳时间,用以评价疲劳程度^[50]。

3 认知功能评价方法

认知功能是 CFS 的核心症状之一。CFS 基础研究所涉及的相关评价方法主要包括 Morris 水迷宫实验(Morris water maze test, MWM)、Y 迷宫(Y-maze test, Y-Maze)和主动回避测试(active and passive avoidance test),其中以 MWM 最为常用。具体情况如下:

3.1 MWM

MWM 用于研究与空间学习记忆相关的脑区功能评价,是相关研究的经典且首选实验。经典的 MWM 主要包括定位航行实验和空间探索实验两部分,其中定位航行实验历时数天,每天将大鼠面向池壁分别从 4 个入水点放入水中若干次,记录逃避潜伏期。空间探索实验是在定位航行实验后去除平台,然后任选一个入水点将大鼠放入水池中,记录其在一定时间内的游泳轨迹,考察大鼠对原平台的记忆。逃避潜伏期越短、穿越平台次数越多、在目标平台停留时间越长提示动物的空间学习记忆能力越好。

MWM 的差异主要在于实验周期的不同,其中以总周期 6 d 的研究为多,且每次训练时长和学习时间也不尽相同。冯楚文等^[11]和杨燕等^[51]设定测试周期为 6 d,其中前 5 d 为定位航行实验,分 4 个象限,每次训练时间设定为 90 s,引导时间为 10 s,上下午各进行 1 次,记录逃避潜伏期;在第 6 天空间探索实验中记录大鼠在 90 s 内穿越原平台次数。邢圣杰等^[52]和刘长征等^[53]使用 MWM 评估认知行为,定位航行实验 5 d,记录 4 个象限 120 s 内的逃

避潜伏期,引导时间为 15 s;第 6 天进行空间探索实验,记录 120 s 内穿越原平台所在区域的频次及平台象限逗留时间。

WEI 等^[54]设定测试周期为 5 d,前 4 d 为定位航行实验,第 5 天为空间探索实验,观察小鼠在移除平台后 60 s 内进入原平台位置的次数。钟晓玲等^[10]同样设定定位航行实验持续 4 d、第 5 天空间探索,但训练时间和空间探索为 90 s,引导时间为 15 s。

也有研究者将 MWM 整体实验周期设定为 2 d,如郭智宽等^[55]和郭盼盼^[56]。与其他研究者不同的是,郭盼盼^[56]在进行定位航行实验前让大鼠在平台上适应 20 s 后开始测试。陈文钰等^[57]未明确阐明 MWM 持续天数,但是其在最后一次定位航行实验检测中撤掉平台观察 1 min 内潜伏期及运动总距离,空间探索实验记录小鼠平均速度及平台区域运动距离。以上结果均显示 CFS 模型动物的逃避潜伏期延长、穿越平台次数下降。

在 MWM 的结果判读中,研究者以实验组与对照组相比出现统计学意义作为判定标准,测试周期、训练时间和学习时间的选定与造模刺激时间之间并不存在一定的规律性,且针对这一问题并没有研究者对其进行细致的研究。认为根据造模刺激持续时间长短合理设定测试参数更为科学,希望这一问题在今后可以得到解决。

3.2 Y-Maze 实验

Y-Maze 实验能够有效地研究动物的空间学习和记忆能力^[58]。Y-Maze 由 3 个等长的臂组成,这 3 个臂的排列形状类似于字母“Y”,因此得名 Y-迷宫。每个臂的长度和宽度可以根据实验需求和动物的大小进行调整,以适应不同的实验条件。

张森品^[39]用 Y-Maze 实验评估短期记忆能力,训练期间新异臂被隔板挡住,小鼠由起始臂放入,在起始臂和其他臂中自由活动 10 min,训练结束小鼠被放回饲养笼;1 h 后开始测试期,打开新异臂隔板,小鼠由起始臂放入,在 3 个臂中自由活动 5 min,记录 5 min 内在各个臂停留时间和穿梭次数,结果显示利血平有造成小鼠学习记忆损伤的趋势,但无显著性差异($P > 0.05$)。该实验方法在 CFS 的基础研究中应用较少。

3.3 主被动回避实验

主被动回避实验是一种通过恐惧加重测试来评估学习和记忆能力的行为学实验方法。回避实

验是利用动物的好暗避光(明暗穿梭)、对厌恶刺激(如足电击)的恐惧和记忆而建立起来的。根据动物的逃避方式分为主动回避和被动回避。前者要求动物主动从有厌恶刺激的箱中逃离;后者则要求动物遏制自己而不进入有厌恶刺激的箱。根据所用仪器设备的不同又可分为穿梭回避、跳台回避、Y 形迷宫回避。CFS 研究涉及穿梭回避实验和跳台回避实验。

LEE 等^[34]使用带有两个隔间的盒子(一个亮隔间和一个暗隔间通过滑动门连接)的步进式被动回避装置来评估恐惧条件的学习和记忆,在获取实验中,当小鼠进入黑暗的隔室时,对其进行强度 0.4 mA 电击 5 s 的惩罚;24 h 后,将每只小鼠换入光室进行滞留实验;记录 5 min 内进入暗室的潜伏期;结果与对照组相比,LPS 和 poly I:C 注射有增加进入暗区潜伏期的趋势($P = 0.083$),但不明显。刘长征等^[53]采用主动回避测试,先将大鼠放在跳台箱内适应 3 min,然后通电,大鼠受到电击后通常会跳上平台躲避电击;24 h 后测试记录 5 min 内跳台潜伏期及跳台错误次数。结果显示,CFS 模型组大鼠较对照组的潜伏期缩短、错误次数增多($P < 0.05$)。

4 情绪状态评价方法

情绪异常虽然不是 CFS 的必备症状,但是临床研究发现 CFS 患者常常伴有心理问题,而且 2021 年英国国立健康与照护卓越研究院(National Institute for Health and Care Excellence, NICE)指南也指出,因心理状态与预后直接相关,所以是 CFS 临床研究必须观察的指标;同时,“anxiety”“depression”和“mood disorders”均出现在 NICE 指南中^[3],说明 CFS 相关或共病的情绪异常主要为哪一种尚未明确。CFS 基础研究涉及的相关评价方法主要包括 OFT、悬尾实验(tail suspension test, TST)、高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)、强迫游泳实验(forced swim test, FST)和埋珠实验(marble burying test, MBT),其中以 OFT 和 TST 最为常见。具体情况如下:

4.1 OFT

观察啮齿类动物的焦虑状态通常依赖于物种特定的行为^[59]。OFT 是在啮齿类动物中最常用的行为测试之一,是研究动物自发活动、探索行为和焦虑抑郁状态的经典行为学实验。OFT 可获取的实验数据较多,对于其结果呈现的差异,主要集中

在观察活动时间和观察指标的选择。基础研究应用中涉及的主要且较易改进的问题是部分研究未明确说明所选指标代表的实际意义。

谢亚娜等^[26]用 OFT 记录分析大鼠在箱内 3 min 移动总路程和平均速度。郭盼盼^[56]记录大鼠 3 min 内的穿格次数和站立次数。陈文钰等^[57]观察记录小鼠 5 min 内水平得分、垂直得分及平均速度。潘明柱等^[29]计算 5 min 内大鼠水平运动速度。刘佳丽等^[60]观察 5 min 内小鼠活动箱内运动总路程、中央路程、活动箱边上的路程以及小鼠的活动轨迹等。LEE 等^[34]进行 2 次行为学测试,每次 5 min(间隔 1 h),记录中心区停留的时间、穿格次数和运动总路程等参数。WEI 等^[54]记录小鼠在中间格子中停留的时间和 6 min 内的总运动距离。SONG 等^[35]测量 10 min 内小鼠的总移动距离和区域过渡数。

对于指标所提示的异常,谢亚娜等^[26]利用 OFT 探究大鼠的自发运动能力,发现模型组的活动总路程和平均速度明显减少,电针干预出现回调($P < 0.01$)。郭盼盼^[56]未明确说明所选 OFT 参数的代表意义。陈文钰等^[57]评估小鼠的自主探索行为,发现模型组自主探索行为减少,归脾汤干预后回调($P < 0.05, P < 0.01$)。潘明柱等^[29]评估自发活动,发现模型组自发活动减少,推拿干预后回调($P < 0.05$)。查阅文献发现,OFT 自发活动增多可能提示了动物的焦虑水平降低、好奇心和探索欲望增强或空间认知能力提高等。刘佳丽等^[60]未明确说明所选 OFT 参数的代表意义,据文章内容推测,反应的为情绪问题。LEE 等^[34]明确指出利用 OFT 评估模型小鼠的焦虑与运动行为,发现 poly I:C 注射倾向于降低小鼠的运动活动($P = 0.109$),LPS 注射显著减少小鼠中心区域停留时间和穿格次数($P < 0.01$),ADX 小鼠在中心区域停留的时间更长($P < 0.05$)。WEI 等^[54]利用包括 OFT、TST、MWM 在内的抗疲劳抗抑郁药物筛选方法,发现与空白对照组相比,模型组的总移动距离和中央停留时间呈下降趋势($P < 0.05, P < 0.001$),黄芪多糖干预后回调。SONG 等^[35]明确阐明利用 OFT 评估利血平所致 CFS 模型小鼠的抑郁样行为,发现与对照组相比,所有利血平注射组在第 11 天的总运动距离显著减少($P < 0.001$),在第 22 天,与利血平组相比,myelophil 和依米帕明治疗以剂量依赖的方式显著增加($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$),穿格次数也呈现类似趋势,提示模型小鼠出现抑郁样行为。

4.2 TST

TST 是一种经典而又能快速评价抗抑郁药物、兴奋药物、镇静药物药效的方法^[61-63],记录动物静止时间、挣扎次数来反映抑郁状态。同时挣扎次数在一定程度上可以反应体力水平。考虑在 CFS 基础研究中利用 TST 观察情绪状态的研究为多,所以在此处呈现。TST 差异集中在观察记录时间。

宋琦等^[27]和潘明柱等^[29]利用 TST 评估抑郁样行为,记录 5 min 内静止不动时间,结果模型组静止不动时间长于对照组($P < 0.05$)。徐小珊等^[64]和李玲玲等^[17]设定观察时间为 6 min,但是只记录后 4 min 内大鼠挣扎次数与不动时间,发现模型组大鼠挣扎次数显著减少($P < 0.05$)、不动时间显著延长($P < 0.05$);两者均未明确指出观察指标所代表的意义,但是据李玲玲等^[17]的研究推测,其关注的为疲劳和抑郁状态。韩玲等^[28]记录大鼠在 6 min 内的静止时间及挣扎次数观察大鼠的体力状况和情绪状态,发现模型组较对照组的静止时间明显延长、挣扎次数明显减少($P < 0.01$)。

4.3 EPM

EPM 是一种经典的动物行为学实验,观察动物在闭合臂和开放臂中的情况,常用于评估啮齿类动物的焦虑^[65]和抑郁^[66]症状。

THAKUR 等^[38]使用 EPM 评估焦虑状态,观察 5 min 内动物在闭合臂和开放臂中的停留时间,以及进入闭合臂的次数;随着闭合臂的进入次数和持续时间的增加,观察到了焦虑的结果。谢亚娜等^[26]利用 EPM 评估大鼠的焦虑状态,第 22 天将大鼠面向开放臂放置在十字迷宫中央格内,记录 5 min 内大鼠开放臂进入次数和停留时间,发现与对照组比较,模型组大鼠开放臂进入次数和停留时间均明显减少($P < 0.05$)。

4.4 FST

FST 与 TST 统称为绝望测试,原理为让动物处于高压的环境下且让它们无所遁形,动物起初会挣扎并试着脱逃,然而当它们了解到所有作为皆无用时,它们会放弃并停止所有的动作。FST 的差异主要在测试时间的不同。

SONG 等^[35]通过 FST 评估小鼠的抑郁样行为,记录 6 min 测试期间的总静止时间,当每只小鼠停止挣扎并保持静止不动、只做一些必要的运动来保持它的头露出水面时,就被判定为静止;结果显示利血平制模组小鼠静止时间明显高于对照组($P <$

0.05)。THAKUR 等^[38]测量 FST 中的不动期,每天游泳 10 min,持续 21 d,结果 CFS 组的静止时间与对照组相比明显增加,虽未明确指出指标变化所代表的具体意义,但是提出持续强迫游泳导致的长时间不活动被认为是一种类似 CFS 的情况。

4.5 MBT

MBT 通常用于测试焦虑^[67-68]。当放入装有弹珠的笼子中时,具有强迫样症状的小鼠往往会进行高度重复的行为(包括挖掘),而高度焦虑的小鼠则倾向于在新环境中进行高度的挖掘。

SONG 等^[35]利用 MBT 评估小鼠抑郁样行为,在透明聚丙烯笼中,每隔一段时间将 20 颗直径为 1.8 cm 的弹珠放置在 5 cm 高的床上,每只小鼠单独放置 30 min,然后统计隐藏在床上 2/3 深度的弹珠数量;结果与对照组相比,利血平组的埋藏弹珠数量在第 11 天显著减少($P < 0.01$),提示小鼠出现抑郁。MBT 并不是专门用于测量抑郁的,但焦虑和抑郁在临床表现和神经生物学机制上存在一定的重叠和相互作用。因此,在某些情况下,焦虑行为的减少可能间接反映了抑郁症状的改善。

5 疼痛程度评价方法

疼痛被确定为常见但不限于 CFS 的症状之一。2021 年 NICE 指南认为,疼痛是 CFS 的常见症状,在严重或非常严重的 CFS 患者中尤为明显^[3]。CFS 基础研究中疼痛的测量比较少见,涉及的方法有足底热刺激痛觉实验(plantar thermal stimulation test for nociception)、von Frey 测痛实验(von Frey test, VFT)和热板法(hot plate test)。

5.1 足底热刺激痛觉实验

足底热刺激痛觉实验是一种常用的评估动物疼痛感知阈值的实验方法,广泛应用于神经性疼痛研究^[69-70]。

LEE 等^[34]使用 Hargreaves 仪器测试疼痛敏感性,将小鼠放置在单独的有机玻璃隔间中,并在实验前使其适应 15 min,随后将恒定强度的辐射热源(光束直径 0.5 cm,强度 70 I. R.)对准后爪的足底中部区域,记录爪缩回之前的潜伏期(s),结果 ADX 组小鼠的爪子对毒热的退缩潜伏期与对照组相比显著降低($P < 0.05$)。

5.2 VFT

VFT 是一种用于评估动物疼痛敏感性的实验方法^[71]。通过应用不同直径和硬度的细丝或针来

刺激动物的皮肤或黏膜表面,从而测量它们对机械性疼痛刺激的反应阈值。

SONG 等^[35]采用 VFT 测量后爪的机械性超敏反应,用 von Frey 纤维丝每隔 5 s 对双后爪表面施加恒力(1.3 g),在总共 10 次刺激中,舔舐或快速收回后爪的次数被计算在内,结果与对照组相比,利血平组的缩足次数显著增加($P < 0.001$)。YASUI 等^[72]使用 VFT 测量后爪足底表面皮肤的机械缩足反射阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT),细丝以 0.16、0.40、0.60、1、1.4、2、4、6、8 和 10 g 的递增力度顺序应用 10 次,每次间隔 5 s,通过极限法确定阈值;使用 von Frey 麻醉仪测量压痛阈测试中的缩足阈值,使用带有圆形尖端的锥形推动器作用于后腿伸肌腹部,观察到逃避反应时的压力强度被定义为肌肉疼痛压力阈值,共测量 5 次,间隔 30 s,取平均值;结果模型在造模后的第 2 天 PWMT 显著下降($P < 0.001$),在压痛阈测试中,肌肉疼痛压力阈值在造模后立即显著降低($P < 0.001$)。张森品^[39]采用 VFT 测定机械痛阈,用不同强度纤维丝刺激小鼠右足掌(避开足垫),每只动物测不超过 10 次,每次刺激间隔大约 10 s,每天测一次,测 3 d,待痛阈值大概恒定时确定其准确 PWMT,结果表明利血平连续给药可显著增加小鼠对疼痛的敏感性。

5.3 热板法

热板法是镇痛药物筛选中常用的一种方法^[73],对动物组织损伤最小,动物可反复使用,而且痛反应潜伏期较长,便于观察及测出药物之间的较小差异,比较出药物作用的强弱快慢及持续时间,有较广的使用范围^[74]。

SONG 等^[35]利用热板法测定小鼠热超敏反应,将小鼠置于温度为(52 ± 1)℃的加热金属板上,测量 60 s 内的舔、挥、单脚跳等伤害性反应的潜伏期和反应次数;与对照组相比,利血平组在热板上测量热超敏反应的停留潜伏期显著缩短($P < 0.001$)。

综上,CFS 的行为学评价体系逐渐趋于成熟。对于行为学评价方法的选择,研究者多基于 CFS 的临床症状选定,且会根据研究主要关注的症状呈现出一定的选择倾向性,如关注认知障碍则会选择更多的认知相关评价方法。绝大多数研究者的评价方法涵盖了两个及以上的症状维度,且国外研究者选用的评价维度较国内研究者更全面,国内研究者

较少关注到疼痛评价层面。涉及的评价方法中,除一般状态评价方法中的《实验大鼠一般情况半定量评分观察表》外,均来源于其他研究方向,无针对 CFS 所专门研发的客观行为学评价方法,虽然部分研究者会对评价方法做出适当改进,但是否完全适用于 CFS 基础研究仍有待进一步论证。其他问题诸如,检测方法不统一且检测细节不一致,在研究中未明确指出行为学检测方法的选择原因以及其结果提示的实际意义,也需在今后的研究中继续改进。对于同时用于模型建立和模型评价的方法是否存在适应性影响观察结果?如何把握学习记忆评估方法的训练次数?这些问题均需在研究中进一步思考论证。CFS 动物模型的行为学评价尚未建立统一标准,其规范化进程任重道远。

参 考 文 献(References)

- [1] LI B B, FENG C W, QU Y Y, et al. Research progress on central mechanism of acupuncture treatment for chronic fatigue syndrome [J]. *World J Acupunct Moxibustion*, 2023, 33(3): 198-203.
- [2] BATEMAN L, BESTED A C, BONILLA H F, et al. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: essentials of diagnosis and management [J]. *Mayo Clin Proc*, 2021, 96(11): 2861-2878.
- [3] UK N G C. Pharmacological interventions: Myalgic encephalomyelitis (or encephalopathy)/chronic fatigue syndrome: diagnosis and management [M]. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE); 2021.
- [4] 鄢香芸, 姚俊鹏, 席梦含, 等. 基于 CiteSpace 的针刺临床机制研究文献的可视化分析 [J]. *中医杂志*, 2023, 64(14): 1491-1499.
YAN X Y, YAO J P, XI M H, et al. Visual analysis of research literature on acupuncture clinical mechanism based on CiteSpace [J]. *J Tradit Chin Med*, 2023, 64(14): 1491-1499.
- [5] ZHANG Y D, WANG L N. Research progress in the treatment of chronic fatigue syndrome through interventions targeting the hypothalamus-pituitary-adrenal axis [J]. *Front Endocrinol*, 2024, 15: 1373748.
- [6] STALLMACH A, QUICKERT S, PUTA C, et al. The gastrointestinal microbiota in the development of ME/CFS: a critical view and potential perspectives [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1352744.
- [7] NUNES J M, KELL D B, PRETORIUS E. Herpesvirus infection of endothelial cells as a systemic pathological axis in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome [J]. *Viruses*, 2024, 16(4): 572.
- [8] 李亚青, 王灿, 苗明三. 基于数据挖掘的慢性疲劳综合征动物模型的评价 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(4): 54-64.
- LI Y Q, WANG C, MIAO M S. Evaluation of an animal model of chronic fatigue syndrome based on data mining [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(4): 54-64.
- [9] 高冉冉, 申振, 连梦慧, 等. 气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(10): 91-99.
GAO R R, SHEN Z, LIAN M H, et al. Research progress on kidney fibrosis animal models of qi deficiency and dampness stasis syndrome [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(10): 91-99.
- [10] 钟晓玲, 童伯瑛, 杨一涵, 等. 经皮穴位电刺激对慢性疲劳综合征大鼠学习记忆能力的影响及其机制探讨 [J]. *针刺研究*, 2023, 48(4): 317-324.
ZHONG X L, TONG B Y, YANG Y H, et al. Effect of transcutaneous electrical acupoint stimulation on learning and memory ability of chronic fatigue syndrome rats and its mechanisms [J]. *Acupunct Res*, 2023, 48(4): 317-324.
- [11] 冯楚文, 屈媛媛, 孙忠人, 等. 电针抑制 NF- κ B 活性改善慢性疲劳综合征大鼠认知功能障碍的实验研究 [J]. *针刺研究*, 2021, 46(9): 775-781.
FENG C W, QU Y Y, SUN Z R, et al. Electroacupuncture improves cognitive function by inhibiting NF- κ B activity in rats with chronic fatigue syndrome [J]. *Acupunct Res*, 2021, 46(9): 775-781.
- [12] 李超然, 王雪, 冯楚文, 等. 艾灸对慢性疲劳综合征大鼠肠黏膜屏障修复及疲劳改善作用的研究 [J]. *中国中医药科技*, 2022, 29(4): 523-527.
LI C R, WANG X, FENG C W, et al. Improvement effects of moxibustion on intestinal mucosal barrier and fatigue of rats with chronic fatigue syndrome [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol*, 2022, 29(4): 523-527.
- [13] 徐小珊, 田岳凤, 翟春涛, 等. 慢性疲劳综合征大鼠模型的行为学特征研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2022, 20(21): 3906-3912.
XU X S, TIAN Y F, ZHAI C T, et al. Behavioral characteristics of rat model of chronic fatigue syndrome [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2022, 20(21): 3906-3912.
- [14] 朱凤亚. 针刺调节 CFS 免疫异常的临床效应及 miR-184/NFAT2/NKCC 信号通路机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2020.
ZHU F Y. The clinical effect of acupuncture on CFS immunological abnormality and the mechanism of miR-184/NFAT2/NKCC signaling pathway [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM; 2020.
- [15] 李德华. 还阳参对慢性疲劳综合征模型大鼠行为学的影响 [J]. *实用医技杂志*, 2020, 27(3): 319-320.
LI D H. Effect of Huanyangshen on behavior of chronic fatigue syndrome model rats [J]. *J Pract Med Tech*, 2020, 27(3): 319-320.
- [16] 耿玉杰, 金晨曦, 曹小青, 等. 龟鹿益神颗粒对慢性疲劳综合征大鼠行为及相关雄性激素的影响 [J]. *新中医*, 2019, 51(4): 7-11.

- GENG Y J, JIN C X, CAO X Q, et al. Guilu yishen granules have effect on behavior and relevant androgen of rats with chronic fatigue syndrome [J]. J New Chin Med, 2019, 51(4): 7-11.
- [17] 李玲玲, 苏磊, 胡梦圆, 等. 升阳散火汤及其拆方对慢性疲劳综合征小鼠行为学和肠道菌群的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(10): 908-916.
- LI L L, SU L, HU M Y, et al. Analysis of the effects of Shengyang Sanhuo decoction and its disassembled prescriptions on behavior and intestinal flora of mice with chronic fatigue syndrome [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2021, 44(10): 908-916.
- [18] 李艳荣. 有氧运动对慢性疲劳综合征建模大鼠海马 ERK/CREB/BDNF 信号通路的影响 [J]. 山东体育学院学报, 2020, 36(2): 97-105.
- LI Y R. Effects of aerobic exercise on the hippocampal of ERK/CREB/BDNF signaling pathways in chronic fatigue syndrome rats [J]. J Shandong Sport Univ, 2020, 36(2): 97-105.
- [19] 贺恋词. 基于分子对接方法探究药膳神仙粥对慢性疲劳综合征脾肾阳虚证大鼠的免疫调节机制 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2020.
- HE L C. Effects of Shenxianzhou on immunoregulatory mechanism of chronic fatigue syndrome rats with spleen and kidney yang deficiency based on molecular docking [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM; 2020.
- [20] 高怀林, 吴以岭, 朱慧明, 等. 慢性疲劳综合征动物模型的建立及对血管内皮功能的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(12): 904-906, 919.
- GAO H L, WU Y L, ZHU H M, et al. Establishment of animal model with chronic fatigue syndrome and its influence on functions of blood vessel endothelium [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2009, 15(12): 904-906, 919.
- [21] 马若飞, 苏苗, 徐韦玮, 等. 归芪益元膏对气血两虚证模型大鼠的药效学评价 [J]. 医学信息, 2023, 36(16): 72-77.
- MA R F, SU M, XU W W, et al. Pharmacodynamics evaluation of guiqi Yiyuan ointment on model rats with deficiency of both qi and blood [J]. J Med Inf, 2023, 36(16): 72-77.
- [22] 张瀛化, 王莹, 李宏, 等. 注射用益气复脉(冻干)对力竭游泳大鼠的抗疲劳作用研究 [J]. 天津医科大学学报, 2023, 29(1): 51-54.
- ZHANG Y H, WANG Y, LI H, et al. Study on anti-fatigue effect of YiqiFumai lyophilized injection on (carrageenan) exhausted swimming rats [J]. J Tianjin Med Univ, 2023, 29(1): 51-54.
- [23] 刘长征, 雷波. 艾灸神阙穴对慢性疲劳综合征大鼠运动能力的影响 [J]. 右江医学, 2022, 50(9): 653-656.
- LIU C Z, LEI B. Effect of moxibustion at Shenque point on exercise capacity of rats with chronic fatigue syndrome [J]. Chin Youjiang Med J, 2022, 50(9): 653-656.
- [24] 李红玉, 赵冰洁, 李悦宁, 等. 基于网络药理学和动物模型验证探讨绞股蓝治疗慢性疲劳综合征的作用机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(12): 2168-2182, 2153.
- LI H Y, ZHAO B J, LI Y N, et al. Mechanism of *Gynostemma pentaphyllum* against chronic fatigue syndrome based on network pharmacology and animal model validation [J]. Nat Prod Res Dev, 2023, 35(12): 2168-2182, 2153.
- [25] 陈春苗, 田友清, 丁平, 等. 当归多肽抗慢性疲劳效应的实验研究 [J]. 中医药导报, 2023, 29(3): 43-48.
- CHEN C M, TIAN Y Q, DING P, et al. Experimental study of *Angelica sinensis* polypeptide on anti-chronic fatigue effect [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 29(3): 43-48.
- [26] 谢亚娜, 嵇波, 张琴, 等. 电针对肝郁脾虚型慢性疲劳综合征大鼠血清炎症因子及肠道菌群的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(11): 63-68.
- XIE Y N, JI B, ZHANG Q, et al. Effects of electroacupuncture on serum inflammatory cytokines and intestinal flora in chronic fatigue syndrome rats with liver depression and spleen deficiency [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2021, 28(11): 63-68.
- [27] 宋琦, 高强. 野苘蒿提取物对 CFS 大鼠抗疲劳、运动行为能力和免疫力的影响 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(10): 3433-3438.
- SONG Q, GAO Q. Effects of extracts of *Chrysanthemum coronarium* on anti-fatigue, motor behavior and immunity in the CFS rats [J]. Mol Plant Breed, 2023, 21(10): 3433-3438.
- [28] 韩玲, 颜志浪, 胡美凤. 基于 TGF- β /Smad 信号通路研究 NF- κ B 在电针抗慢性疲劳综合征中的作用及机制 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(2): 418-421.
- HAN L, YAN Z L, HU M F. Study on the role and mechanism of NF- κ B in electroacupuncture against chronic fatigue syndrome based on TGF- β /Smad signal pathway [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(2): 418-421.
- [29] 潘明柱, 李建, 荣兵, 等. 腹部推拿疗法对慢性应激所致慢性疲劳综合征模型大鼠海马神经重塑及其海马-HPA 轴的负反馈机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(4): 842-848.
- PAN M Z, LI J, RONG B, et al. Effect of abdominal manipulation on remodeling of hippocampal neurons in chronic stress-induced chronic fatigue syndrome and its mechanism of negative feedback regulation of hippocampus-HPA axis [J]. J Jilin Univ (Med Ed), 2021, 47(4): 842-848.
- [30] 张成才, 宁蓉, 陈娜, 等. 正中神经电刺激对缺血性脑卒中大鼠突触可塑性的影响 [J]. 昆明医科大学学报, 2023, 44(12): 6-12.
- ZHANG C C, NING R, CHEN N, et al. Effect of median nerve electrical stimulation on synaptic plasticity in ischemic stroke rats [J]. J Kunming Med Univ, 2023, 44(12): 6-12.
- [31] 张丽, 李飞. 百香果籽油对帕金森病小鼠的神经保护机制 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(15): 3768-3772.
- ZHANG L, LI F. Neuroprotective mechanism of passion fruit seed oil on Parkinson's disease mice [J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(15): 3768-3772.
- [32] 尤丽丽, 付文亮, 裴洁, 等. Penetratin 复合神经生长因子治疗中度创伤性颅脑损伤小鼠 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(8): 114-121.
- YOU L L, FU W L, PEI J, et al. Treatment of moderate

- traumatic brain injury in mice by coadministration of nerve growth factor and penetratin [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 114-121.
- [33] KWON D A, KIM Y S, KIM S K, et al. Antioxidant and antifatigue effect of a standardized fraction (HemoHIM) from *Angelica gigas*, *Cnidium officinale*, and *Paeonia lactiflora* [J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 391-400.
- [34] LEE J S, JEON Y J, PARK S Y, et al. An adrenalectomy mouse model reflecting clinical features for chronic fatigue syndrome [J]. Biomolecules, 2020, 10(1): 71.
- [35] SONG J H, WON S K, EOM G H, et al. Improvement effects of myelophil on symptoms of chronic fatigue syndrome in a reserpine-induced mouse model [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10199.
- [36] 郑丹萍, 李晓哲, 武文斌, 等. 内源性缩醛磷脂对大鼠脑缺血损伤的保护作用 [J]. 解剖学研究, 2014, 36(6): 451-456.
- ZHENG D P, LI X Z, WU W B, et al. The protection of endogenous plasmalogen on ischemic brain injury in rats [J]. Anat Res, 2014, 36(6): 451-456.
- [37] 姜正飞. 抗阻训练调控 SPARC 对高脂膳食小鼠骨骼肌质量的影响 [D]. 上海: 华东师范大学; 2023.
- JIANG Z F. The effect of resistance training regulating SPARC on skeletal muscle mass in high-fat diet mice [D]. Shanghai: East China Normal University; 2023.
- [38] THAKUR V, JAMWAL S, KUMAR M, et al. Protective effect of hemin against experimental chronic fatigue syndrome in mice; possible role of neurotransmitters [J]. Neurotox Res, 2020, 38(2): 359-369.
- [39] 张森品. 桑叶总黄酮抗疲劳、抗抑郁药理作用及机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2020.
- ZHANG S P. Pharmacological effects and mechanism of total flavonoids from mulberry leaves on fatigue and depression [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2020.
- [40] 张子腾. NLRP3 炎症小体在小鼠疲劳样行为中的作用及机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学; 2018.
- ZHANG Z T. Molecular mechanism study of NLRP3 inflammasome on fatigue-like behaviors [D]. Shanghai: Naval Medical University; 2018.
- [41] LI D, HU D, SHIGETA M, et al. Homeostatic disturbance of thermoregulatory functions in rats with chronic fatigue [J]. Neurosci Res, 2021, 165: 45-50.
- [42] GERALD M C. Effects of (+)-amphetamine on the treadmill endurance performance of rats [J]. Neuropharmacology, 1978, 17(9): 703-704.
- [43] 肖明珠, 郭庆芳. 动物运动性疲劳方法学研究之一——不同刺激方法对大鼠跑台运动疲劳及恢复期糖代谢的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 1998, 17(4): 334-338.
- XIAO M Z, GUO Q F. The effect of different type of stimulation on the glycogen metabolism during treadmill exercise induced fatigue and recovery period in rats [J]. Chin J Phys Med, 1998, 17(4): 334-338.
- [44] 崔建梅, 药宏亮, 刘鸿宇, 等. 雪芙蓉胶囊对大负荷训练大鼠运动能力及大脑伏隔核 c-fos 表达的影响 [J]. 北京体育大学学报, 2012, 35(7): 52-57.
- CUI J M, YAO H L, LIU H Y, et al. Effects of xuefurong capsule on the sports ability and c-fos expression within nac in overload training rats [J]. J Beijing Sport Univ, 2012, 35(7): 52-57.
- [45] HE C, BASSIK M C, MORESI V, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis [J]. Nature, 2012, 481(7382): 511-515.
- [46] FUJIKAWA T, CASTORENA C M, PEARSON M, et al. SF-1 expression in the hypothalamus is required for beneficial metabolic effects of exercise [J]. eLife, 2016, 5: e18206.
- [47] SINGH O, OGDEN S B, VARSHNEY S, et al. Ghrelin-responsive mediobasal hypothalamic neurons mediate exercise-associated food intake and exercise endurance [J]. JCI Insight, 2023, 8(24): e172549.
- [48] 屈媛媛, 冯楚文, 孙忠人, 等. 电针对慢性疲劳综合征大鼠行为学及海马炎症因子的影响 [J]. 针刺研究, 2024, 49(3): 274-282.
- QU Y Y, FENG C W, SUN Z R, et al. Effect of electroacupuncture on behavior and hippocampal inflammatory factors in rats with chronic fatigue syndrome [J]. Acupunct Res, 2024, 49(3): 274-282.
- [49] HE Q, SAWADA M, YAMASAKI N, et al. Neuroinflammation, oxidative stress, and neurogenesis in a mouse model of chronic fatigue syndrome, and the treatment with kampo medicine [J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(1): 110-115.
- [50] OHBA T, DOMOTO S, TANAKA M, et al. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome induced by repeated forced swimming in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(7): 1140-1145.
- [51] 杨燕, 李超然, 王德龙, 等. 电针对慢性疲劳综合征大鼠学习记忆能力及血清细胞因子分泌的影响 [J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(11): 541-543.
- YANG Y, LI C R, WANG D L, et al. Effect of electroacupuncture on learning and memory and secretion of serum cytokine in rats with chronic fatigue syndrome [J]. Neural Inj Funct Reconstr, 2019, 14(11): 541-543.
- [52] 邢圣杰, 金晨曦, 吴明阳, 等. 龟鹿益神颗粒对慢性疲劳模型大鼠认知行为及大鼠皮质和海马神经颗粒素表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(3): 581-584.
- XING S J, JIN C X, WU M Y, et al. Effects of guiluyishen granule on cognitive behavior and neurogranin expression in cortex and hippocampus of chronic fatigue model rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(3): 581-584.
- [53] 刘长征, 雷波, 张鹏. 针刺对慢性疲劳综合征大鼠认知功能及海马神经元的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2021, 36(8): 1009-1011.
- LIU C Z, LEI B, ZHANG P. Effect of acupuncture on cognitive function and hippocampal neurons in rats with chronic fatigue syndrome [J]. Chin J Rehabil Med, 2021, 36(8): 1009

-1011.

[54] WEI X, XIN J, CHEN W, et al. *Astragalus* polysaccharide ameliorated complex factor-induced chronic fatigue syndrome by modulating the gut microbiota and metabolites in mice [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 163: 114862.

[55] 郭智宽, 田捧. 发酵虫草菌粉对慢性疲劳大鼠行为及 ACTH、CORT 的影响 [J]. 光明中医, 2020, 35(15): 2312-2315.

GUO Z K, TIAN P. Effects of fermented *Cordyceps* powder on behavior, ACTH and CORT in chronic fatigue rats [J]. Guangming J Chin Med, 2020, 35(15): 2312-2315.

[56] 郭盼盼. 疏肝理气汤对慢性疲劳综合征大鼠的行为学及免疫功能的影响 [J]. 中医临床研究, 2019, 11(31): 29-31.

GUO P P. Effects of the Shugan Liqi decoction on behavior and immune function in rats with chronic fatigue syndrome [J]. Clin J Chin Med, 2019, 11(31): 29-31.

[57] 陈文钰, 陈言, 司国瑞, 等. 归脾汤对慢性疲劳综合征小鼠认知能力及炎症因子的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(19): 4770-4773.

CHEN W Y, CHEN Y, SI G R, et al. Effect of Guipi decoction on cognitive ability and inflammatory factors in chronic fatigue syndrome model mice [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(19): 4770-4773.

[58] SHENG H, LU D, QI X, et al. A neuron-specific Isca1 knockout rat developments multiple mitochondrial dysfunction syndromes [J]. Anim Model Exp Med, 2023, 6(2): 155-167.

[59] 肖佳妮. 产前应激对仔鼠海马结构和学习记忆能力的影响及其机制 [D]. 长沙: 中南大学; 2022.

XIAO J N. Effects of prenatal stress on hippocampal structure and learning and memory ability of offspring rats and its mechanism [D]. Changsha: Central South University; 2022.

[60] 刘佳丽, 张石蕾, 胡君萍, 等. 肉苁蓉复方对慢性疲劳综合征模型小鼠的药效作用研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2022, 45(12): 1448-1453.

LIU J L, ZHANG S L, HU J P, et al. Study on pharmacodynamic effect of *Cistanche* compound on chronic fatigue syndrome model mice [J]. J Xinjiang Med Univ, 2022, 45(12): 1448-1453.

[61] 周琳. 天麻素对小鼠脓毒症脑病的影响及其机制研究 [D]. 长沙: 中南大学; 2022.

ZHOU L. Effect and mechanism of gastrodin on septic encephalopathy in mice [D]. Changsha: Central South University; 2022.

[62] 刘家辉, 杨超, 顾秋香, 等. 高强度间歇训练对小鼠抑郁行为的作用及机制 [J]. 生理学报, 2022, 74(2): 165-176.

LIU J H, YANG C, GU Q X, et al. Effect of high-intensity interval exercise on depression-related behavior in mice [J]. Acta Physiol Sin, 2022, 74(2): 165-176.

[63] JIA X, WANG Q, JI J, et al. Mitochondrial transplantation ameliorates hippocampal damage following status epilepticus [J]. Anim Model Exp Med, 2023, 6(1): 41-50.

[64] 徐小珊, 马伟, 熊罗节, 等. 隔药灸对慢性疲劳综合征大鼠血乳酸及 AMPK/PGC-1 α 信号通路的影响 [J]. 针刺研

究, 2022, 47(10): 878-884.

XU X S, MA W, XIONG L J, et al. Effect of herbal cake-separated moxibustion on behavioral stress reactions and blood lactic acid level and muscular AMPK/PGC-1 α signaling in rats with chronic fatigue syndrome [J]. Acupunct Res, 2022, 47(10): 878-884.

[65] 方丹, 王芮, 乔虎. 小鼠杏仁中央核内 TRPV1 参与实验性正颌牙移动疼痛和焦虑的研究 [J]. 口腔生物医学, 2023, 14(4): 224-228, 232.

FANG D, WANG R, QIAO H. Study of TRPV1 in the central nucleus of the amygdala participates in pain and anxiety of experimental orthodontic tooth movement in mice [J]. Oral Biomed, 2023, 14(4): 224-228, 232.

[66] 常晓丽, 张海燕, 张丽丽, 等. 慢性内脏痛及诱发负性情绪的神经回路研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2024, 30(1): 57-62.

CHANG X L, ZHANG H Y, ZHANG L L, et al. Research progress on neural circuits of negative emotions induced by chronic visceral pain [J]. Chin J Pain Med, 2024, 30(1): 57-62.

[67] 王皓晨. WNT/ β -catenin 信号通路在大鼠脑外伤后精神障碍中的作用与机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学; 2021.

WANG H C. The role and mechanism of WNT/ β -catenin signaling pathway in regulating psychiatric disorder after traumatic brain injury in rats [D]. Suzhou: Soochow University; 2021.

[68] 肖文一, 蒋宁, 周文霞. 尾静脉注射和鼻腔吸入 SARS-CoV-2 S 蛋白的神经损伤效应 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(7): 553-554.

XIAO W Y, JIANG N, ZHOU W X. Nerve injury effects of tail vein injection and nasal inhalation of SARS-CoV-2 S protein [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2023, 37(7): 553-554.

[69] 吕智桢. 脊柱推拿调控 CLBP 模型大鼠 PKC ϵ -TRPV1 信号通路的抗炎和镇痛机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学; 2021.

LYU Z Z. Study on the anti-inflammatory and analgesic mechanism of spinal manipulative therapy regulating PKC ϵ -TRPV1 signal pathway in CLBP model rats [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; 2021.

[70] 张冰玉. 抑制 JNK 信号通路逆转慢性非特异性腰痛大鼠痛觉过敏和焦虑样行为的初步研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学; 2023.

ZHANG B Y. Inhibiting the JNK signaling pathway reverses hyperalgesia and anxiety-like behavior in a non-specific chronic low back pain model [D]. Hefei: Anhui Medical University; 2023.

[71] 鲁彩霞, 张思敏, 尼格阿依·艾合麦提, 等. 医用臭氧可缓解颞下颌关节骨关节炎的疼痛 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(27): 4300-4305.

LU C X, ZHANG S M, NIGEAYI·A H M T, et al. Medical ozone alleviates pain in temporomandibular joint osteoarthritis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(27): 4300-4305.

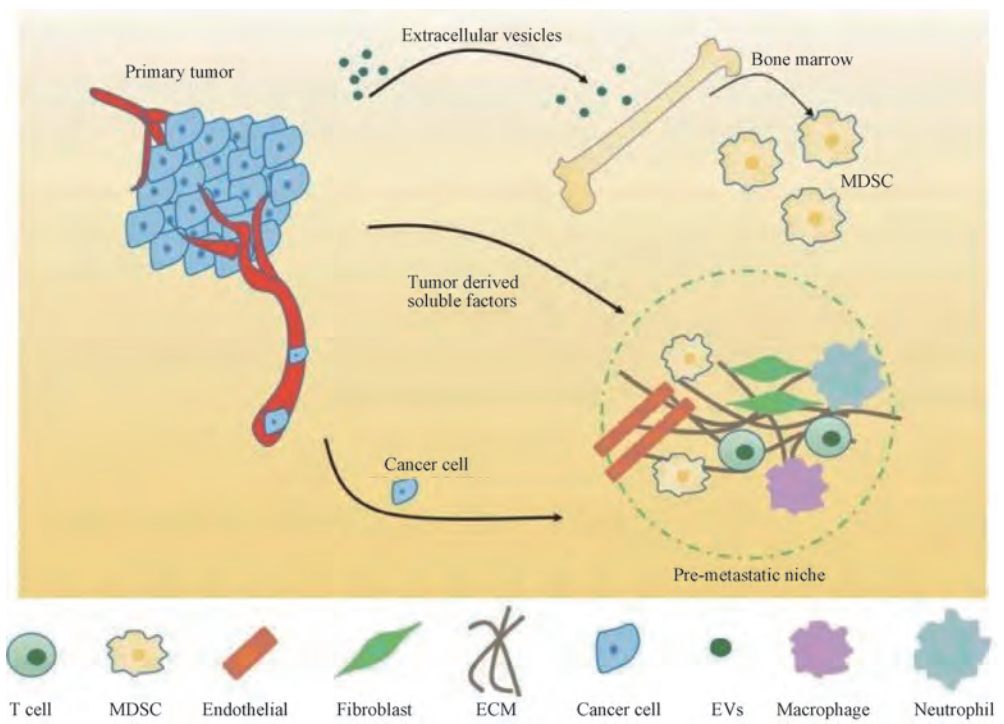
[72] YASUI M, MENJYO Y, TOKIZANE K, et al. Hyperactivation

- of proprioceptors induces microglia-mediated long-lasting pain in a rat model of chronic fatigue syndrome [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 67.
- [73] 陈聚峰, 苏东雪, 黄华珍, 等. 不同炮制工艺制黄草乌毒性及镇痛作用的初步考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(22): 2471-2477.
CHEN J F, SU D X, HUANG H Z, et al. Preliminary investigation on the toxicity and analgesic effects of different processed products of aconiti vil-morinani Radix [J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(22): 2471-2477.
- [74] 周荣. 聚山梨酯 80 修饰的神经毒素纳米粒经鼻腔给药入脑 P-gp 的作用机制研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学; 2016.
ZHOU R. The brain delivering study of Polysorbate 80 modified neurotoxin nanopar ticles after Intranasal administration [D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University; 2016.
- [收稿日期] 2024-06-12

转移前微环境的细胞和分子特征

原发肿瘤衍生分子形成的转移前微环境(premetastatic niches, PMN)能够通过调节远处器官和组织促进肿瘤定植,靶向 PMN 可以在早期预防肿瘤转移。目前,对 PMN 的细胞和分子特征缺乏深入了解。本文总结了近年来 PMN 细胞和分子特征的研究进展,强调 PMN 干预是早期预防肿瘤转移的潜在治疗策略,为未来研究和临床应用提供了有利基础。

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(5): 399-408. doi: 10.1002/ame2.12356)。



邱月清,陈振翼,申晓秋,等. NF- κ B 信号通路与病毒性心肌炎 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1445–1455.
QIU Y Q, CHEN Z Y, SHEN X Q, et al. Nuclear factor κ B signaling pathway in viral myocarditis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1445–1455.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.009

NF- κ B 信号通路 with 病毒性心肌炎

邱月清¹, 陈振翼^{1,2*}, 申晓秋¹, 宋成昊¹, 孔桂选¹, 王振涛^{1,2}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450053; 2. 河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院, 郑州 450053)

【摘要】 病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是心肌炎中最常见的类型,可迁延至慢性心肌炎症甚至心力衰竭,最终导致死亡。核转录因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)是一种多功能转录因子,参与调节广泛的生物过程。现有证据表明,促炎和抗炎之间的平衡对 VMC 的预后起决定性作用,NF- κ B 通路不仅可介导炎症反应,还可调控细胞焦亡、能量代谢、氧化应激、胰岛素抵抗等途径参与 VMC 的病理进展。本文从以上 5 个方面分析与总结 NF- κ B 信号通路调控 VMC 的分子机制,以期为 VMC 未来的基础研究及临床诊治提供参考。

【关键词】 核转录因子 κ B;病毒性心肌炎;炎症反应;细胞焦亡;能量代谢;胰岛素抵抗;氧化应激

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1445-11

Nuclear factor κ B signaling pathway in viral myocarditis

QIU Yueqing¹, CHEN Zhenyi^{1,2*}, SHEN Xiaoqi¹, SONG Chenghao¹, KONG Guixuan¹, WANG Zhentao^{1,2}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China; 2. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine/Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China)

Corresponding author: CHEN Zhenyi. E-mail:303435405@qq.com

【Abstract】 Viral myocarditis (VMC), as the most common type of myocarditis, can progress to chronic myocarditis and even heart failure, ultimately leading to death. Nuclear factor κ B (NF- κ B) is a multifunctional transcription factor involved in regulating a wide range of biological processes. Existing evidence suggests that the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory factors plays a decisive role in the prognosis of VMC. The NF- κ B pathway mediates inflammatory responses and regulates pathways such as cell apoptosis, energy metabolism, oxidative stress, and insulin resistance to participate in the pathological progression of VMC. This article analyzes and summarizes the molecular mechanism of NF- κ B signaling pathway regulation in VMC from the above five aspects, to provide a reference for future basic research and for the clinical diagnosis and treatment of VMC.

【Keywords】 nuclear factor κ B; viral myocarditis; inflammatory response; pyroptosis; energy metabolism; insulin resistance; oxidative stress

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

心肌炎(myocarditis)即心肌弥漫或局部的炎性损伤,临床表现差异大,急性发病患者短期预后通常良好,但部分病例可发展为扩张型心肌病或并发心力衰竭,甚至猝死^[1-2]。在全球范围内,每年每 10

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(81573920),2023 年度河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(232102310432),河南省中医学“双一流”创建科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-1-20)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81573920),2023 Key Research and Development and Promotion Special Project of Henan Province(Science and Technology Research)(232102310432),Special Project for“Double First-Class”Creation Scientific Research of Traditional Chinese Medicine in Henan Province(HSRP-DFCTCM-2023-1-20).

【作者简介】邱月清,女,在读博士研究生,研究方向:中医药防治心血管疾病的临床与基础。Email:3455744907@qq.com

【通信作者】陈振翼,男,主治医师,讲师,博士,研究方向:中医药防治心血管疾病的临床与基础。Email:303435405@qq.com

万人中约有 4 ~ 10 人罹患本病^[3]。由病毒感染引起的心肌炎被定义为病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC), 柯萨奇 B3 病毒 (coxsackievirus B3, CVB3) 是最常见的感染源, 肠道病毒、腺病毒、巨细胞病毒、细小病毒和疱疹病毒等其他多种病毒也可引发本病^[4]。现代医学对 VMC 缺乏特效治疗方法, 仍以对症支持治疗为主, 例如轻症采用营养心肌、抗病毒治疗, 并发急性心衰时使用利尿剂、血管扩张剂、正性肌力药物等, 严重心衰则考虑心脏移植或植入式左心室辅助装置等^[5]。VMC 病理机制尚未完全明确, 当前研究显示, CVB3 等病毒感染后的心肌细胞可损伤或死亡, 并通过释放白介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)、 γ 干扰素 (inducing factor- γ , IFN- γ) 及损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs) 等内源性分子激活免疫反应, 发挥抗病毒作用。但上述信号分子进入体循环后触发骨髓造血生成的单核巨噬细胞也可在脾被 CVB3 感染, 在趋化因子作用下携带病毒的单核巨噬细胞快速向心脏聚集, 进一步加剧心肌炎症^[6-7]。由此可知, VMC 所导致的免疫系统持续激活可逐渐发展为慢性心肌炎症, 造成心功能障碍。此外, 部分病毒并不直接浸润心肌细胞, 而是通过触发免疫反应或细胞因子风暴间接诱导心肌损伤^[8]。

核转录因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 分布广泛, 存在于哺乳动物各个器官组织的细胞内。长期以来, NF- κ B 的激活被认为能够促进炎症因子的释放与免疫细胞的募集, 从而维持或加剧炎症反应。然而 NF- κ B 信号通路调控炎症反应的机制复杂, 可在某些情况下促进免疫细胞的凋亡及其他途径调控炎症反应的程度与持续时间^[9]。VMC 是典型的炎症性疾病, NF- κ B 信号通路不仅可调节 VMC 炎症反应, 还能介导其氧化应激、能量代谢、细胞焦亡、胰岛素抵抗等多个病理过程^[10-11]。本文通过检索现有研究证据, 将 NF- κ B 信号通路在 VMC 中的分子机制进行总结与梳理, 以期对未来基础研究与临床诊治提供参考。

1 NF- κ B 信号通路组成及传导途径

NF- κ B 家族由 5 个成员组成, 分别是 NF- κ B1 (p105/p50)、NF- κ B2 (p100/p52)、p65 (RELA)、V-Rel 网状内皮增生病毒癌基因同源物 B (transcription factor RelB, RELB) 和原癌基因蛋白 c-rel (proto-

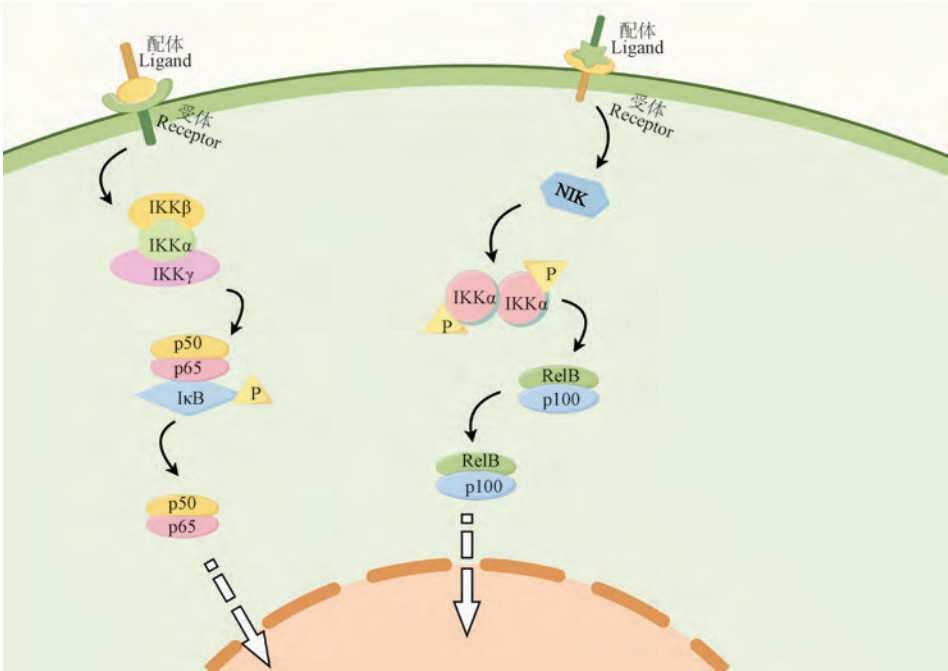
oncogene proteins c-rel, c-REL)。由于共享保守 Rel 同源结构域 (Rel homology domain, RHD), 任意 2 个成员都可以形成同源或异源二聚体入核调控目标基因表达^[12-13]。根据激活方式的不同, 可将 NF- κ B 通路分为经典与非经典两种途径^[14]。经典途径中, NF- κ B 二聚体 (通常由 p50 与 p65 组成) 与 NF- κ B 抑制蛋白 (I- κ B proteins, I κ B) 形成无活性三聚体, 在胞内外因素刺激下 (包括 TNF 超家族蛋白、白介素等炎症因子), I κ B 激酶复合物 (I- κ B kinase, I KK) 被激活, 磷酸化 I κ B 蛋白并使其降解, 释放 NF- κ B p50/p65 二聚体。活化的 NF- κ B p50/p65 二聚体可与其他转录因子组合或单独入核调控目的 DNA 片段转录为 mRNA, 促进蛋白翻译。而非经典途径中是通过激活 NF- κ B 诱导激酶 (Nik related kinase, NIK), 磷酸化 I KK α 复合体, 进而将 NF- κ B p100 磷酸化降解为 NF- κ B p52, 形成有活性的 NF- κ B p52/RELB 二聚体, 入核促进目的基因的转录及蛋白合成, 见图 1。NF- κ B 具有广泛的生物活性, 参与多种疾病的生理病理机制^[11, 15]。

2 NF- κ B 信号与 VMC

炎症反应是 VMC 中的一把双刃剑, 虽有利于病毒的清除和组织修复, 但过度的炎症反应可损害心肌, 造成心功能障碍。现有证据表明, 早期 VMC 病理变化主要是病毒直接诱导的心肌细胞损伤, 而晚期则是病毒激活免疫应答后导致的间接炎症损伤^[16-17]。因此, 促炎和抗炎之间的平衡对 VMC 的预后起决定性作用。研究表明, NF- κ B 通路的激活可诱导 VMC 小鼠为炎性扩张型心肌病 (dilated cardiomyopathy, DCM) 表型^[18-19]。

2.1 NF- κ B 信号与心肌细胞炎症反应

toll 样受体 (toll-like receptor agonist, TLR) 是一种识别危险信号的细胞传感器, TLR3、TLR7、TLR8 和 TLR9 位于内膜上, 专门检测胞内病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) 与危险相关分子模式 (danger-associated molecular patterns, DAMP) 等分子。CVB3 遗传物质为单链 RNA, 其复制过程中产生的双链 RNA (dsRNA) 中间体是一种典型 PAMP, 可被 TLR3 捕捉识别^[20-22]。TLR3 能够通过激活含 tir 结构域的适配器诱导干扰素- β (interferon- β , TRIF)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor-associated factor 6, TRAF6) 及白介素-1 受体相关激酶 1 (interleukin-1



注:在经典 NF-κB 通路中,配体与受体结合后激活 I KK,磷酸化 I κB 蛋白并使其降解,释放 NF-κB p50/p65 二聚体入核调控目的基因;在非经典 NF-κB 通路中,NIK 被激活,磷酸化 I KKα 复合体,将 NF-κB p100 降解为 NF-κB p52,形成活性二聚体,入核调控目的基因。

图 1 经典与非经典 NF-κB 信号通路(由 Figdraw 绘制)

Note. In the canonical NF-κB pathway, after ligands bind to receptors, IKK is activated, phosphorylating the IκB protein and causing its degradation, releasing the NF-κB p50/p65 dimer into the nucleus to regulate target genes. In the non-canonical NF-κB pathway, NIK is activated, phosphorylating the IKKα complex, degrading NF-κB p100 into NF-κB p52, forming an active dimer that enters the nucleus to regulate target genes.

Figure 1 Canonical and non-canonical NF-κB signaling pathways(Drawn by Figdraw)

receptor-associated kinase 1, IRAK1) 激活 NF-κB 信号,从而增加促炎细胞因子、酶、粘附分子的表达^[23-24]。叉头盒转录因子 1 (foxO1 protein, FoxO1) 和 TLR4 在 VMC 小鼠心肌中表达增加,过表达 FoxO1 可升高 TLR4 与 p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白的表达,心肌组织乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶同工酶 (creatine kinase MB form, CK-MB) 与炎症因子肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和 IL-1β 相应提高,由此导致心肌组织炎症损害加剧,凋亡率增加。而沉默 TLR4 能逆转 FoxO1 的上述“恶化”作用^[25]。表明 FoxO1 通过上调 TLR4/NF-κB 信号,加剧 VMC 的心肌细胞凋亡与炎症损害。

钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calcium-calmodulin-dependent protein kinase type 2, CaMK II) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,广泛表达于各种组织中,在氧化应激损伤及细胞凋亡中起到重要作用,敲除 CaMK II 可抑制内质网应激途径诱导的细

胞凋亡^[26-28]。CaMK II 在心脏中主要表达 CaMK II δ 亚型,在 VMC 动物与细胞模型中均显著上调,沉默 CaMK II δ 可缓解炎症损伤减少心肌细胞凋亡^[29]。经 CO-IP 验证发现,CaMK II δ 通过与 toll 样受体家族成员 TOLL/白介素-1 受体相关蛋白 (toll interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein, TIRAP) 直接结合,增强了 TLR4/NF-κB 信号转导,进而加剧 CVB3 诱导的炎症损伤^[29]。另外,胰岛素生长因子 2 mRNA 结合蛋白 (insulin-like growth factor 2 mrna-binding protein 2, IGF2BP2) 是 N⁶-腺苷酸甲基化 (m⁶A) 修饰 (真核生物 RNA 修饰形式之一) 阅读蛋白^[30],可识别经 m⁶A 修饰的 CaMK II δ mRNA 以增强 CaMK II δ 稳定性,有利于增强其活性。但是,CaMK II 的其他亚型 (如 CaMK II γ) 是否在 VMC 中也展现类似机制仍不清楚^[31]。

信号转导子与转录激活子 3 (STAT3 transcription factor, STAT3) 是一种急性反应性因子,在多个器官中表达,参与多种信号级联通路,能调控数百个基因表达,参与细胞生长、凋亡、癌变等多

种生命活动^[32]。就 CVB3 感染 STAT3 特异性敲除 (STAT3cKO) 小鼠实验研究显示, NF- κ B 通路相关炎症因子 (NF- κ B p65、TNF- α 、IL-17) 显著升高, 但抗炎因子白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 与转化生长因子- β (superfamily proteins, TGF- β) 下降, 提示 STAT3 通过抑制 NF- κ B 信号通路和促进抗炎通路减轻 VMC 炎性损害, 保护心肌细胞^[33]。

C1q/TNF 相关蛋白 9 (C1q-TNF-related protein-9, CTRP9) 属于 CTRP 超家族成员, 是一种脂肪因子, 其球形结构域 (活性区) 与脂联素 (adiponectin, APN) 具有高同源性, 参与调节多种心血管疾病病理过程^[34-35]。研究发现, CTRP9 在 VMC 患儿外周血中表达降低, CVB3 感染的 H9c2 心肌细胞中同样呈现低表达^[36]。过表达 CTRP9 可减轻 CVB3 感染后 H9c2 心肌细胞的炎症、凋亡与纤维化, 但同时过表达凝血酶敏感蛋白 1 (thbs1 protein, THBS1) 时上述保护作用被逆转, CO-IP 测定显示 CTRP9 与 THBS1 存在相互作用。与其他疾病中的调节机制一致^[37-38], 即 CTRP9 通过抑制 THBS1 阻断 NF- κ B 与 TGF- β 1/Smad2/3 通路^[36]。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一组短链非编码 RNA, 可通过结合靶 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' UTR)、5' 非翻译区 (5' UTR) 与编码区进行基因转录后调控, 进而在免疫反应、细胞发育及细胞凋亡等多个生物过程中发挥重要作用^[39-42]。最近研究表明, miRNAs 在 VMC 中可通过调控 TLRs/NF- κ B 信号通路发挥抗炎作用。miRNA-146a (miR-146a) 含量在 CVB3 感染的原代心肌细胞中显著升高, 在 CVB3 感染的 Hela 细胞中, miR-146a 靶向 TLR3 与 TRAF6, 抑制 NF- κ B 信号通路, 减少了促炎因子的表达^[43]。这意味着 miR-146a 通过 TLR3/NF- κ B 调节回路, 抑制炎症反应。在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 H9c2 心肌细胞损伤模型中, miR-16 与 miR-27 表达均明显降低, 而上调 miR-16^[44] 或 miR-27^[45] 可减少细胞凋亡并促进增殖, 机制验证显示 miR-16 与 miR-27 均可抑制 NF- κ B 信号通路相关蛋白 (p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 与 I κ B α /p-I κ B α) 表达。另外, 基因分析预测显示 CD40 为 miR-16 靶基因。在 CVB3 感染 H9c2 心肌细胞中, 下调 miR-217 或 miR-543 可降低 IL-6、IL-1 β 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平, 增加超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性, TargetScan 成功预测了沉默信息调节因子 1

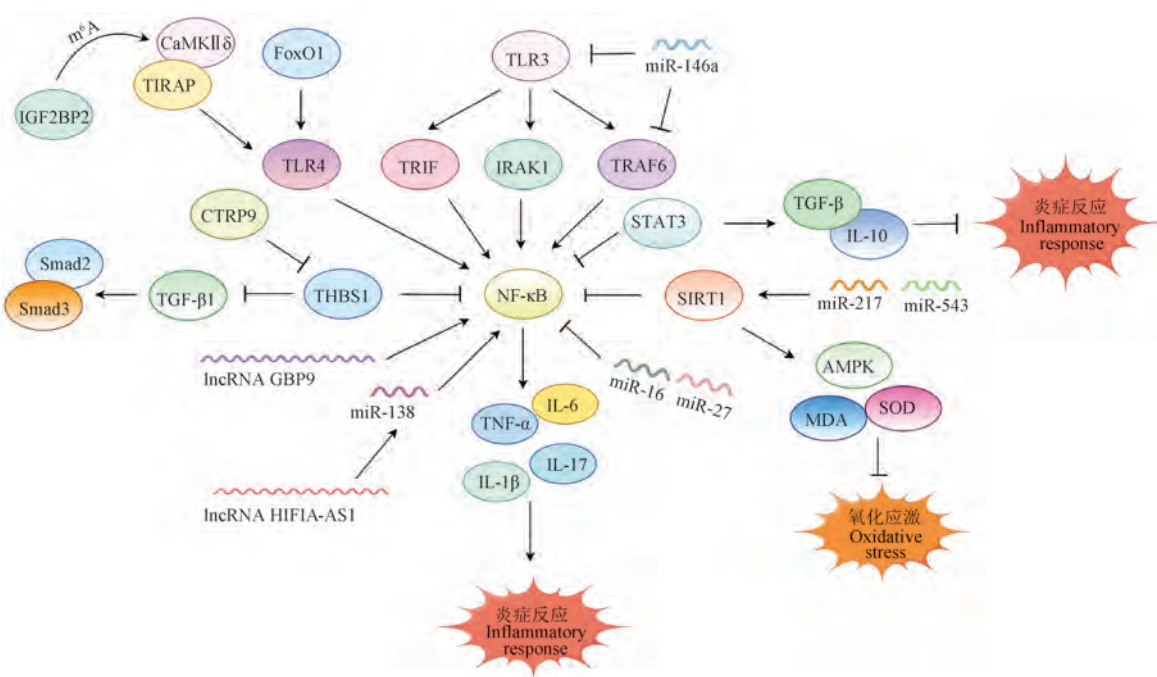
(sirtuin1, SIRT1) 的 3' 非翻译区与 miR-217、miR-543 的结合位点^[46], 而敲除 SIRT1 可逆转 miR-217、miR-543 下调后的心脏保护作用。并且, CVB3 感染不仅降低了 H9c2 细胞的 SIRT1 蛋白与 mRNA 表达, 也降低了磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 α (p-AMP-activated protein kinases α , p-AMPK- α) 水平和 p-AMPK- α /AMPK- α 的比值, 提高了 p-NF- κ B p65 水平和 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 比值, 上述改变同样可因 miR-217 或 miR-543 的下调逆转。因此, miR-217、miR-543 通过靶向 SIRT1/NF- κ B 与 AMPK 信号通路改善 VMC 氧化应激及炎症反应。

长链非编码 RNA (long noncoding RNAs, lncRNAs) 参与了细胞发育、分化与增殖、炎症、凋亡等多种生理病理过程^[47-48]。近年的研究显示, 多个 lncRNAs 在 VMC 中异常表达, 通过调控炎症反应、细胞凋亡、巨噬细胞极化等途径抑制或推动 VMC 的发展^[49-50]。XUE 等^[51] 实验发现, lncGBP9 在急性 VMC 小鼠心肌组织中呈现异常高表达, 敲除 lncGBP9 可改善 VMC 小鼠心功能、缓解心肌组织炎症、抗心肌细胞凋亡, 抑制 NF- κ B 信号通路相关蛋白 (p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 与 I κ B α /p-I κ B α) 表达, 减少促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的产生。故推测 lncGBP9 敲低可抑制 NF- κ B 信号通路, 发挥抗炎、抗细胞凋亡作用, 有望成为新的治疗靶点。CAO 等^[52] 研究得出, 在 CVB3 诱导的原代心肌细胞中, lncRNAs HIF1A-AS1 表达明显升高。沉默 lncRNAs HIF1A-AS1 后可改善细胞凋亡, 减少活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成, 显著降低促炎因子含量, 并可抑制 I κ B α 磷酸化和 NF- κ B 活性, 而 miR-138 模拟物逆转了上述作用。由此可得, lncRNAs HIF1A-AS1 靶向 miR-138 激活 NF- κ B 信号通路, 加重 VMC 炎症损伤, 见图 2。

综上所述, NF- κ B 信号通路在 VMC 中抑制与激活途径多样, 非编码 RNA (lncRNAs 与 miRNAs) 及大量细胞因子均参与 NF- κ B 信号通路的调控, 以精确控制 VMC 时的心肌细胞内的炎症反应程度。

2.2 NF- κ B 信号与非心肌细胞炎症反应

普遍认为, 心肌细胞内炎症反应是 VMC 心功能障碍的主要原因, 但当前研究发现, 免疫细胞与血管内皮细胞等非心肌细胞的炎症反应也与 VMC 中的心肌损伤和心功能障碍紧密相关^[53]。Dpep2 是膜结合二肽酶家族 (dipeptidase, Dpep) 成员, 参与调控炎症性疾病及免疫反应, VMC 时在浸润心肌的巨噬



注:在 VMC 病理状态下,心肌细胞内 TLR3 通过激活 TRIF、TRAF6 及 IRAK1 激活 NF-κB;FoxO1 上调 TLR4/NF-κB 信号;CaMK II δ 直接结合 TIRAP 激活 TLR4/NF-κB 通路,IGF2BP2 可识别经 m⁶A 修饰的 CaMK II δ mRNA 以增强 CaMK II δ 稳定性;STAT3 抑制 NF-κB 通路、激活 TGF-β、IL-10,抑制炎症反应;CTRP9 通过抑制 THBS1 阻断 NF-κB 与 TGF-β1/Smad2/3 通路;miR-146a 靶向 TLR3 与 TRAF6,抑制 NF-κB;miR-16 与 miR-27 均可抑制 NF-κB;miR-217 与 miR-543 均可靶向 SIRT1,抑制 NF-κB,激活 AMPK、MDA、SOD;STAT3 抑制 NF-κB;NF-κB 促进 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-17 的表达促进炎症反应。

图 2 以 NF-κB 信号为中心的心肌细胞炎症反应分子机制(由 Figdraw 绘制)

Note. In the pathological state of VMC, within cardiomyocytes, TLR3 activates NF-κB by activating TRIF, TRAF6 and IRAK1. FoxO1 upregulates the TLR4/NF-κB signal. CaMK II δ directly binds to TIRAP to activate the TLR4/NF-κB pathway, and IGF2BP2 can recognize m⁶A-modified CaMK II δ mRNA to enhance the stability of CaMK II δ. STAT3 inhibits the NF-κB pathway, activates TGF-β and IL-10, and inhibits the inflammatory response. CTRP9 blocks the NF-κB and TGF-β1/Smad2/3 pathways by inhibiting THBS1. miR-146a targets TLR3 and TRAF6 to inhibit NF-κB. miR-16 and miR-27 can both inhibit NF-κB. miR-217 and miR-543 can both target SIRT1, inhibit NF-κB, and activate AMPK, MDA and SOD. STAT3 inhibits NF-κB. NF-κB promotes the expression of TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-17 to promote the inflammatory response.

Figure 2 Molecular mechanism of inflammatory response in cardiomyocytes centered on NF-κB signaling(Drawn by Figdraw)

细胞中呈现高表达^[54-55]。YANG 等^[55]研究显示,特异性敲除小鼠巨噬细胞 Dpep2 可加重 CVB3 感染后的心肌炎症反应,并且,与对照组相比 Dpep2 缺失小鼠的心肌组织中 p-NF-κB p65、I κB、I κB 显著激活,提示 Dpep2 通过调节 NF-κB 信号通路抑制巨噬细胞炎症反应。

脾 CD⁴⁺ T(Th)细胞的分化异常在 VMC 的发病机制中起重要作用,且激活胆碱能抗炎途径(cholinergic anti-inflammatory pathway, CAP)可减轻炎症反应,右颈迷走神经切除术(truncal vagotomy, Vag)则通过抑制 CAP 加剧炎症反应^[56-57]。进一步研究发现,VMC 小鼠进行右颈迷走神经切断术能够调节 Th 细胞分化(增加 Th1/Th17 细胞占比、降低 Th2/Treg 细胞占比),体外实验采用 α7 烟碱乙酰胆碱受体(alpha7 nicotinic acetylcholine receptor,

α7nAChR)拮抗剂 MLA 代替 Vag 可得到相同结果^[58]。体内外机制验证均显示,迷走神经阻断(Vag 或 MLA)可抑制 VMC 状态下 Janus 激酶 2(janus kinase 2, JAK2)和 STAT3 的磷酸化并增强 NF-κB p65 和 I κB 的磷酸化,采用 α7nAChR 激活剂 Pnu 282987 处理可逆转上述效应。其中 JAK-STAT 信号在细胞增殖、分化、迁移和凋亡中的关键作用,而 NF-κB 信号可促进免疫细胞活化及炎性因子的释放^[58]。因此,迷走神经通过 CAP 介导的 Th 细胞分化在早期 VMC 中起到关键抗炎作用,其具体机制与激活 JAK2-STAT3 和抑制 NF-κB 通路有关。

循环中性粒细胞可控制 CVB3 病毒复制,对延缓 VMC 病情进展起到至关重要的作用。然而,中性粒细胞也可向外释放中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs),加剧心肌组织

炎症损伤^[59]。白介素-37 (interleukin-37 protein, IL-37) 是 IL-1 家族成员,可作为免疫反应中的天然保护剂。生理情况下,IL-37 在体内低表达,在炎症状态下其表达量上调,并降低促炎因子水平^[60]。研究发现,IL-37 与 NF-κB 抑制剂 (BAY11-7082) 均可减少 NETs 的形成,缓解 VMC 早期炎症损伤,并且 IL-37 抑制了 NF-κB/ I κBα 蛋白活化,这意味着 IL-37 通过阻断 NF-κB 信号通路抑制 NETs 的形成^[61]。

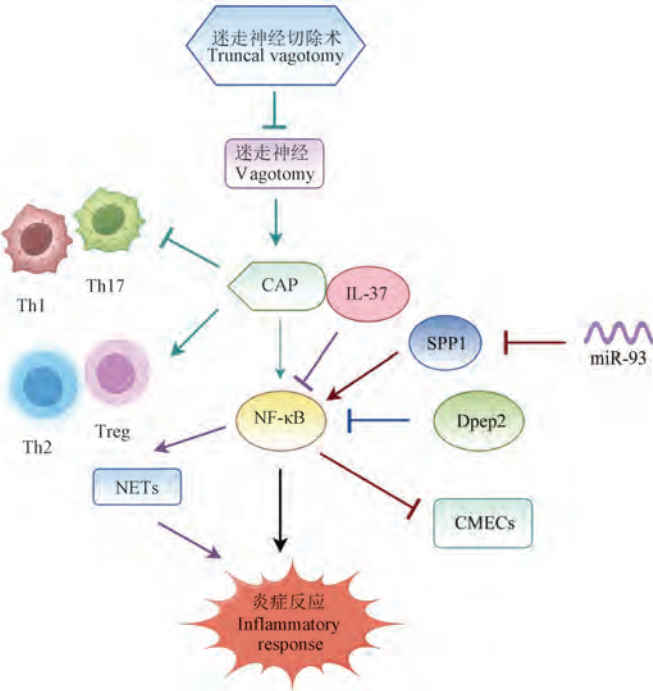
有证据表明,miR-93 具有促进血管生成与增强内皮细胞活性的作用,而心脏微血管内皮细胞 (cardiac microvascular endothelial cells, CMECs) 在心脏微血管生成中起关键作用,失活 NF-κB 信号可抑制 CMECs 凋亡。分泌型磷蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1, SPP1) 是 miR-93 靶基因,上调 miR-93 不仅可降低 SPP1、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGFA) 蛋白及 mRNA 表达,同时可下调 NF-κB 通路相关蛋白,并减少炎症因子分泌^[62]。由此可知,miR-93 通过负靶向 SPP1 抑制 NF-κB 信号通路,减轻 CMECs 炎性

损害,见图 3。
综上,NF-κB 信号通路在 VMC 中介导巨噬细胞、脾 Th 细胞、中性粒细胞及血管内皮细胞的相关炎症反应,调控 VMC 病理进展。

2.3 NF-κB 信号与心肌细胞焦亡

细胞焦亡是一种以炎症小体激活为特征的调节性细胞死亡方式,在免疫应答与炎症反应中发挥重要作用,为 VMC 心肌细胞死亡的主要途径之一^[63]。焦亡可分为半胱天冬酶家族蛋白 (Caspases)-1 依赖的经典途径与 Caspases-4、5、11 依赖的非经典途径,其过程均与炎症小体的激活密切相关,NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3, NLRP3) 是目前研究最充分的炎症小体。WANG 等^[64]首次报道,NLRP3 炎症小体参与了 CVB3 感染诱导的细胞焦亡,而抑制焦亡则能够减轻 VMC 小鼠的心肌炎症损害、改善心功能^[64-66]。

内源性和外源性 IL-37 均被证实可通过抑制炎症介质的产生改善炎症、调节免疫紊乱^[67]。IL-37



注:VMC 病理状态下,迷走神经切断术可调控 Th 细胞分化(增加 Th1/Th17 细胞、减少 Th2/Treg 细胞),激活 NF-κB,促进炎症反应;在中性粒细胞中,IL-37 通过阻断 NF-κB 抑制 NETs 形成;在 CMECs 中,miR-93 负靶向 SPP1 抑制 NF-κB,减轻 CMECs 炎性损害;在巨噬细胞中,Dpep2 可抑制 NF-κB 信号。

图 3 以 NF-κB 信号为中心的非心肌细胞炎症反应分子机制(由 Figdraw 绘制)
Note. In the pathological state of VMC, vagotomy can regulate the differentiation of Th cells (increase Th1/Th17 cells and decrease Th2/Treg cells), activate NF-κB, and promote the inflammatory response. In neutrophils, IL-37 inhibits the formation of NETs by blocking NF-κB. In CMECs, miR-93 negatively targets SPP1 to inhibit NF-κB and alleviate inflammatory damage of CMECs. In macrophages, Dpep2 can inhibit the NF-κB signal.
Figure 3 Molecular mechanism of inflammatory response in non-cardiomyocytes centered on NF-κB signaling(Drawn by Figdraw)

可显著减弱 VMC 心肌组织中 NLRP3 炎症小体 (NLRP3、ASC、Caspase-1) 的激活及焦亡效应蛋白消皮素 D (Gsdmd protein, GSDMD) 的上调,并可减少 NF- κ B 信号的活化,进一步增强 IL-37 与 IL-1R8 的相互作用^[68],由此显著改善了模型小鼠心肌组织的炎性细胞浸润和胶原组织沉积。CVB3 感染 BALB/c 小鼠和 HL-1 心肌细胞的实验显示, MG53 蛋白通过抑制 I κ B α 与 NF- κ B p65 的磷酸化阻断 NF- κ B 信号通路,进而负调控 NLRP3 炎症小体,最终起到减轻 VMC 心肌细胞焦亡,缓解炎症反应的作用^[69]。

由上可得, NF- κ B 信号通路参与调节 VMC 中心肌细胞焦亡,见图 4。

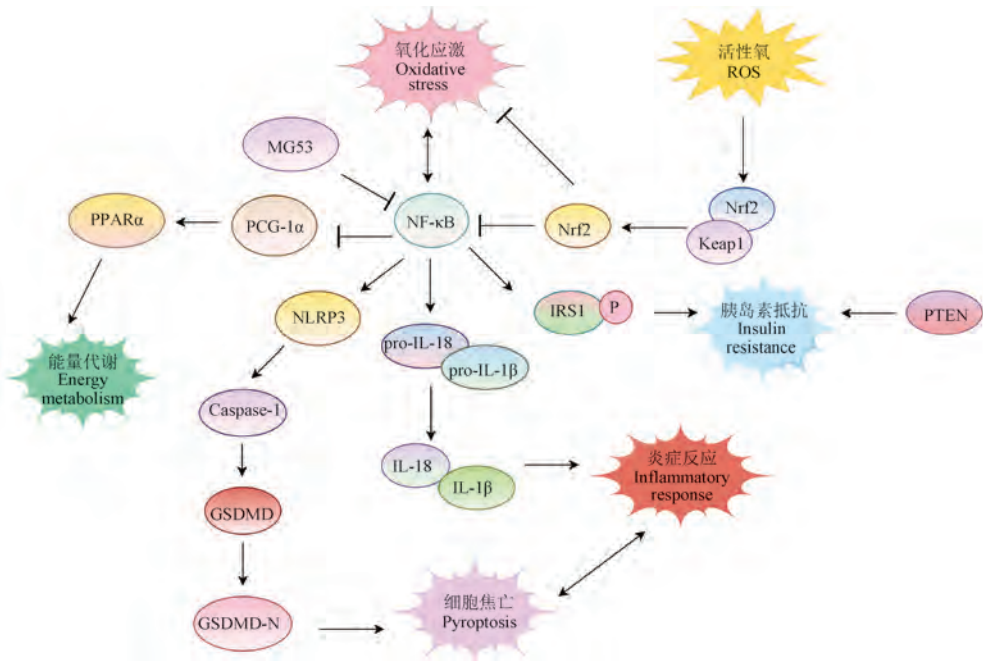
2.4 NF- κ B 信号通路 与胰岛素抵抗

特异性过表达心肌 I KK β 的小鼠模型 (KA 小鼠) 心室壁明显扩张变薄, 心功能障碍 (炎症 DCM

表型)。同时,活化的 I KK β /NF- κ B 通路可磷酸化抑制胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate, IRS1), 从而损害胰岛素信号转导,表现出显著的胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)^[70], 敲除胰岛素信号的负调节因子磷酸酯酶与张力蛋白同源物 (phosphoethanolamine methyltransferase, PETN)^[71] 后可部分逆转 KA 小鼠的上述炎性 DCM 样改变,提示 I KK β /NF- κ B 信号通路介导的胰岛素信号受损与炎性心功能障碍密切相关。

2.5 NF- κ B 信号与线粒体能量代谢

为探究 VMC 中是否存在能量代谢的改变,对 VMC 患者及小鼠模型的心肌组织进行转录组学分析发现,多种线粒体蛋白的表达与活性显著下降,这表明 VMC 时心脏处于“能量饥饿”状态^[19]。后续的机制验证显示,VMC 时能量代谢的失调可能由 NF- κ B 信号通路的激活及过氧化物酶体增殖受体 γ



注:在 VMC 病理状态下, MG53 抑制 NF- κ B,进而负调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路,抑制细胞焦亡,焦亡与炎症反应可相互促进; NF- κ B 磷酸化抑制 IRS1,损害胰岛素信号,导致胰岛素抵抗; PETN 可促进胰岛素抵抗; NF- κ B 抑制 PGC-1 α /PPAR α 通路,影响能量代谢; ROS 的累积促进 Nrf2 从 Nrf2/ Keap1 复合体中降解活化,进而抑制 NF- κ B 信号; NF- κ B 信号与氧化应激反应可相互促进; NF- κ B 信号可促进 pro-IL-18、pro-IL-1 β 转化为 IL-18、IL-1 β ,扩大炎症反应。

图 4 NF- κ B 信号与细胞焦亡、能量代谢、胰岛素抵抗和氧化应激 (由 Figdraw 绘制)

Note. In the pathological state of VMC, MG53 inhibits NF- κ B and thereby negatively regulates the NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway, inhibiting pyroptosis, pyroptosis and inflammatory response can mutually promote each other. Phosphorylation of NF- κ B inhibits IRS1, impairs the insulin signal, and leads to insulin resistance. PETN can promote insulin resistance. NF- κ B inhibits the PGC-1 α /PPAR α pathway and affects energy metabolism. Accumulation of ROS promotes the degradation and activation of Nrf2 from the Nrf2/Keap1 complex, thereby inhibiting the NF- κ B signal. NF- κ B signal and oxidative stress response can mutually promote each other. NF- κ B signal can promote the conversion of pro-IL-18 and pro-IL-1 β to IL-18 and IL-1 β , expanding the inflammatory response.

Figure 4 NF- κ B signaling and pyroptosis, energy metabolism, insulin resistance and oxidative stress (Drawn by Figdraw)

辅激活因子 (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1, PGC-1) 核受体网络的抑制有关^[19]。

2.6 NF- κ B 信号通路与氧化应激

VMC 状态下会产生大量 ROS、超氧阴离子及过氧化氢,ROS 是杀死病原体的效应物,也可介导应激反应,与免疫反应密切相关。同时,抗氧化系统的抑制可损害组织并加剧炎症。因此,持续的氧化应激反应可能是导致 VMC 心脏重塑的机制之一。虽然氧化应激被认为是心肌炎有希望的治疗靶点之一,但抗氧化治疗心肌炎的证据尚不充分。当前的抗氧化治疗策略包括抑制 ROS 的产生、激活抗氧化酶等。ROS 主要由线粒体呼吸链反应、NADPH 氧化酶、环氧合酶和黄嘌呤氧化酶等途径产生。据报道,NF- κ B 与核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 等信号通路也介导了 VMC 中的氧化应激反应^[72]。

3 总结与展望

综上所述,NF- κ B 信号通路主要介导 VMC 中的炎症反应,其在心肌细胞中抑制与激活途径多样,多个 lncRNAs、miRNAs 和大量分子蛋白均参与调控 NF- κ B 信号通路的“激活程度”。同时,NF- κ B 信号通路也可在 VMC 状态下介导巨噬细胞、脾 Th 细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞等非心肌细胞的相关炎症反应。并且,NF- κ B 信号通路也可调控 VMC 中的细胞焦亡、能量代谢、氧化应激及胰岛素抵抗。

NF- κ B 信号通路分子机制庞杂,其在 VMC 中的调控作用仍未完全明确。NF- κ B 信号通路过度激活将造成严重的心肌损害,而 NF- κ B 信号通路过度抑制可能不利于病毒的清除,且 NF- κ B 信号通路可能具有另外的心脏保护作用^[73-74]。因此,以下 3 点或许是未来研究的重点内容:(1) 找到 NF- κ B 信号通路“适度”激活的平衡点,在维持免疫反应充分清除病毒的同时避免心肌损害;(2) 从“抗氧化应激”“抗凋亡”“调节能量代谢”等方面探究 NF- κ B 信号通路是否具有更多的心脏保护作用;(3) 采用更高级、多样的造模方法,将靶向药物抑制与正反向遗传学技术手段相结合,从而得出更具说服力的科学证据。

此外,近年来的大量药理学研究显示,沙库巴曲缬沙坦^[75-76]、伊维菌素^[77]、瑞舒伐他汀^[78]、绿茶有效成分表没食子儿茶素没食子酸酯

(epigallocatechin gallate, EGCG)^[79]、中药制剂(荆防颗粒^[80])及中药有效成分(苦参生物碱与西洋参皂苷组合^[81]、姜黄素^[82])等药物均可在 VMC 中抑制 NF- κ B 信号,减轻炎症反应,有进行更深入实验研究的必要,或具备更长远的临床治疗前景。

参 考 文 献 (References)

- [1] SAGAR S, LIU P P, COOPER L T. Myocarditis [J]. Lancet, 2012, 379(9817): 738-747.
- [2] SOZZI F B, GHERBESI E, FAGGIANO A, et al. Viral myocarditis: classification, diagnosis, and clinical implications [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 908663.
- [3] AMMIRATI E, MOSLEHI J J. Diagnosis and treatment of acute myocarditis: a review [J]. JAMA, 2023, 329(13): 1098-1113.
- [4] SPOTTS P H, ZHOU F. Myocarditis and pericarditis [J]. Prim Care, 2024, 51(1): 111-124.
- [5] NAGAI T, INOMATA T, KOHNO T, et al. JCS 2023 guideline on the diagnosis and treatment of myocarditis [J]. Circ J, 2023, 87(5): 674-754.
- [6] SCHULTHEISS H P, BAUMEIER C, ALESHCHEVA G, et al. Viral myocarditis-from pathophysiology to treatment [J]. J Clin Med, 2021, 10(22): 5240.
- [7] TSCHÖPE C, AMMIRATI E, BOZKURT B, et al. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: current evidence and future directions [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(3): 169-193.
- [8] OLEJNICZAK M, SCHWARTZ M, WEBBER E, et al. Viral myocarditis-incidence, diagnosis and management [J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2020, 34(6): 1591-1601.
- [9] GUO Q, JIN Y, CHEN X, et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications [J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 53.
- [10] YU H, LIN L, ZHANG Z, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 209.
- [11] GULDENPFENNIG C, TEIXEIRO E, DANIELS M. NF- κ B's contribution to B cell fate decisions [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1214095.
- [12] CHENG W, CUI C, LIU G, et al. NF- κ B, A potential therapeutic target in cardiovascular diseases [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2023, 37(3): 571-584.
- [13] AQDAS M, SUNG M H. NF- κ B dynamics in the language of immune cells [J]. Trends Immunol, 2023, 44(1): 32-43.
- [14] BARNABEI L, LAPLANTINE E, MBONGO W, et al. NF- κ B: at the borders of autoimmunity and inflammation [J]. Front Immunol, 2021, 12: 716469.
- [15] VALAPERTI A. Drugs targeting the canonical NF- κ B pathway to treat viral and autoimmune myocarditis [J]. Curr Pharm Des, 2016, 22(4): 440-449.
- [16] GARMAROUFI F S, MARCHANT D, HENDRY R, et al. Cocksackievirus B3 replication and pathogenesis [J]. Future

- Microbiol, 2015, 10(4): 629–653.
- [17] FAIRWEATHER D, ROSE N R. Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity [J]. *Methods*, 2007, 41(1): 118–122.
 - [18] MAIER H J, SCHIPS T G, WIETELMANN A, et al. Cardiomyocyte-specific I κ B kinase (I κ K)/NF- κ B activation induces reversible inflammatory cardiomyopathy and heart failure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(29): 11794–11799.
 - [19] REMELS A H V, DERKS W J A, CILLERO-PASTOR B, et al. NF- κ B-mediated metabolic remodelling in the inflamed heart in acute viral myocarditis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(8): 2579–2589.
 - [20] BLASIUS A L, BEUTLER B. Intracellular toll-like receptors [J]. *Immunity*, 2010, 32(3): 305–315.
 - [21] SESTI-COSTA R, FRANÇOZO M C S, SILVA G K, et al. TLR3 is required for survival following coxsackievirus B3 infection by driving T lymphocyte activation and polarization: The role of dendritic cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185819.
 - [22] FITZGERALD K A, KAGAN J C. Toll-like receptors and the control of immunity [J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1044–1066.
 - [23] TABATABAEI F S, SHAFEGHAT M, AZIMI A, et al. Endosomal toll-like receptors intermediate negative impacts of viral diseases, autoimmune diseases, and inflammatory immune responses on the cardiovascular system [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2024, 20: 1–13.
 - [24] FUKUSHIMA Y, OKAMOTO M, ISHIKAWA K, et al. Activation of TLR3 and its adaptor TICAM-1 increases miR-21 levels in extracellular vesicles released from human cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(3): 744–750.
 - [25] TAO D D, LI Y, TIAN X J, et al. Effect of FoxO1 on cardiomyocyte apoptosis and inflammation in viral myocarditis via modulation of the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int Heart J*, 2023, 64(4): 732–740.
 - [26] LUO H M, WU X, LIU W X, et al. Calcitonin gene-related peptide attenuates angiotensin II-induced ROS-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells by inhibiting the CaMKII/CREB signalling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(2): 285–289.
 - [27] LIM J R, LEE H J, JUNG Y H, et al. Ethanol-activated CaMKII signaling induces neuronal apoptosis through Drp1-mediated excessive mitochondrial fission and JNK1-dependent NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 123.
 - [28] ZHANG T, ZHANG Y, CUI M, et al. CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis [J]. *Nat Med*, 2016, 22(2): 175–182.
 - [29] XIAO Q, LIU L, QIAN W, et al. CaMKII δ , stabilized by RNA N6-methyladenosine reader IGF2BP2, boosts coxsackievirus B3-induced myocardial inflammation via interacting with TIRAP [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2024, 17(3): 540–553.
 - [30] NOMBELA P, MIGUEL-LÓPEZ B, BLANCO S. The role of m6A, m5C and Ψ RNA modifications in cancer: Novel therapeutic opportunities [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 18.
 - [31] REYES GAIDO O E, NKASHAMA L J, SCHOLE K L, et al. CaMK II as a therapeutic target in cardiovascular disease [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2023, 63: 249–272.
 - [32] KURDI M, ZGHEIB C, BOOZ G W. Recent developments on the crosstalk between STAT3 and inflammation in heart function and disease [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 3029.
 - [33] LI Z, WANG C, MAO Y, et al. The expression of STAT3 inhibited the NF- κ B signalling pathway and reduced inflammatory responses in mice with viral myocarditis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107534.
 - [34] 梁翠, 刘源, 高路, 等. 脂肪因子 CTRP9 对异丙肾上腺素诱导小鼠心肌重构的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(37): 3025–3031.
 - LIANG C, LIU Y, GAO L, et al. Effect of lipid factor CTRP9 on myocardial remodelling induced by isoproterenol in mice [J]. *Nation Med J Chin*, 2018, 98(37): 3025–3031.
 - [35] ZHAO D, FENG P, SUN Y, et al. Cardiac-derived CTRP9 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via calreticulin-dependent inhibition of apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(7): 723.
 - [36] LIU K, WANG J, GAO X, et al. C1q/TNF-related protein 9 inhibits coxsackievirus B3-induced injury in cardiomyocytes through NF- κ B and TGF- β 1/Smad2/3 by modulating THBS1 [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 2540687.
 - [37] SU H, YUAN Y, WANG X M, et al. Inhibition of CTRP9, a novel and cardiac-abundantly expressed cell survival molecule, by TNF- α initiated oxidative signaling contributes to exacerbated cardiac injury in diabetic mice [J]. *Basic Res Cardiol*, 2013, 108(1): 315.
 - [38] XING T, WANG Y, DING W J, et al. Thrombospondin-1 production regulates the inflammatory cytokine secretion in THP-1 cells through NF- κ B signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2017, 40(5): 1606–1621.
 - [39] GHOSE J, SINHA M, DAS E, et al. Regulation of miR-146a by RelA/NF κ B and p53 in STHdh (Q111)/Hdh (Q111) cells, a cell model of Huntington's disease [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23837.
 - [40] LABBAYE C, TESTA U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2012, 5: 13.
 - [41] WANG L, QIN Y, TONG L, et al. MiR-342-5p suppresses coxsackievirus B3 biosynthesis by targeting the 2C-coding region [J]. *Antiviral Res*, 2012, 93(2): 270–279.
 - [42] WU J, SHEN L, CHEN J, et al. The role of microRNAs in enteroviral infections [J]. 2015, 19(5): 510–516.
 - [43] FEI Y, CHAULAGAIN A, WANG T, et al. MiR-146a down-regulates inflammatory response by targeting TLR3 and TRAF6 in Coxsackievirus B infection [J]. *RNA*, 2020, 26(1): 91–100.
 - [44] XIANG J F, YU J C, ZHU J Y. Up-regulation of miR-27

- extenuates lipopolysaccharide-induced injury in H9c2 cells via modulating ICAM1 expression [J]. *Genes Genomics*, 2019, 41 (12): 1467–1474.
- [45] LI Q Q, XI J, LI B Q, et al. MiR-16, as a potential NF- κ B-related miRNA, exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced myocarditis via mediating CD40 expression: a preliminary study [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(2): e22426.
- [46] XIA K, ZHANG Y, SUN D. MiR-217 and miR-543 downregulation mitigates inflammatory response and myocardial injury in children with viral myocarditis by regulating the SIRT1/AMPK/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45 (2): 634–646.
- [47] CLARK M B, MATTICK J S. Long noncoding RNAs in cell biology [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2011, 22(4): 366–376.
- [48] XU J, CAO X. Long noncoding RNAs in the metabolic control of inflammation and immune disorders [J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(1): 1–5.
- [49] XUE Y L, ZHANG S X, ZHENG C F, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits M2 macrophage polarization by activating TRAF6 via microRNA-223 down-regulation in viral myocarditis [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12341–12354.
- [50] ZHANG C, XIONG Y, ZENG L, et al. The role of non-coding RNAs in viral myocarditis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 312.
- [51] XUE Y, ZHANG J, KE J, et al. LncGBP9 knockdown alleviates myocardial inflammation and apoptosis in mice with acute viral myocarditis via suppressing NF- κ B signaling pathway [J]. *Inflamm Res*, 2022, 71(12): 1559–1576.
- [52] CAO H, YANG B, ZHAO Y, et al. The pro-apoptosis and pro-inflammation role of LncRNA HIF1A-AS1 in Cocksackievirus B3-induced myocarditis via targeting miR-138 [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10(5): 1245–1255.
- [53] CHEN J, ZHENG J, ZHENG N, et al. MiR-19b-3p/PKNOX1 regulates viral myocarditis by regulating macrophage polarization [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 902453.
- [54] CHEN H H, KEYHANIAN K, ZHOU X, et al. IRF2BP2 reduces macrophage inflammation and susceptibility to atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2015, 117(8): 671–683.
- [55] YANG X, YUE Y, XIONG S. Dpep2 emerging as a modulator of macrophage inflammation confers protection against CVB3-induced viral myocarditis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 57.
- [56] GE L S, ZHAO J L, LIU L, et al. Nicotine inhibits the production of proinflammatory cytokines of mice infected with coxsackievirus B3 [J]. *Life Sci*, 2016, 148: 9–16.
- [57] GE L S, CHEN X X, WU L P, et al. Right cervical vagotomy aggravates viral myocarditis in mice via the cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 25.
- [58] LI Y C, GU X H, GE L S, et al. Vagus nerve plays a pivotal role in CD4⁺ T cell differentiation during CVB3-induced murine acute myocarditis [J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 360–376.
- [59] CARAI P, GONZÁLEZ L F, VAN BRUGGEN S, et al. Neutrophil inhibition improves acute inflammation in a murine model of viral myocarditis [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 118 (17): 3331–3345.
- [60] NOLD M F, NOLD-PETRY C A, ZEPP J A, et al. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11): 1014–1022.
- [61] LI B, CAO X, AI G, et al. Interleukin-37 alleviates myocardial injury induced by coxsackievirus B3 via inhibiting neutrophil extracellular traps formation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113: 109343.
- [62] MA S X, BAI Z F, WANG W, et al. Effects of microrna-93 on mouse cardiac microvascular endothelial cells injury and inflammatory response by mediating SPP1 through the NF- κ B pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 2847–2858.
- [63] YANG Y, LI W, YOU B, et al. Advances in cell death mechanisms involved in viral myocarditis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 968752.
- [64] WANG Y, GAO B, XIONG S. Involvement of NLRP3 inflammasome in CVB3-induced viral myocarditis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 307(10): H1438–H1447.
- [65] WANG Y, QIN Y, WANG T, et al. Pyroptosis induced by enterovirus 71 and coxsackievirus B3 infection affects viral replication and host response [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2887.
- [66] YU Y, SHI H, YU Y, et al. Inhibition of calpain alleviates coxsackievirus B3-induced myocarditis through suppressing the canonical NLRP3 inflammasome/caspase-1-mediated and noncanonical caspase-11-mediated pyroptosis pathways [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(5): 1954–1964.
- [67] CAVALLI G, DINARELLO C A. Suppression of inflammation and acquired immunity by IL-37 [J]. *Immunol Rev*, 2018, 281 (1): 179–190.
- [68] SUN L, YUAN H, ZHAO G. IL-37 alleviates Cocksackievirus B3-induced viral myocarditis via inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 20077.
- [69] XUE Y, SONG T, KE J, et al. MG53 protects against coxsackievirus B3-induced acute viral myocarditis in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via the NF- κ B signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 223: 116173.
- [70] AL-HUSEINI I, HARADA M, NISHI K, et al. Improvement of insulin signalling rescues inflammatory cardiac dysfunction [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 14801.
- [71] SHI Y, WANG J, CHANDARLAPATY S, et al. PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(6): 522–527.
- [72] TADA Y, SUZUKI J. Oxidative stress and myocarditis [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(4): 450–471.
- [73] LUO J L, KAMATA H, KARIN M. I κ B/NF-kappaB signaling: balancing life and death-a new approach to cancer therapy [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2625–2632.
- [74] CUI X, SHEN D, KONG C, et al. NF- κ B suppresses apoptosis and promotes bladder cancer cell proliferation by upregulating

survivin expression *in vitro* and *in vivo* [J]. Sci Rep, 2017, 7: 40723.

[75] LIU C, LONG Q, YANG H, et al. Sacubitril/Valsartan inhibits M1 type macrophages polarization in acute myocarditis by targeting C-type natriuretic peptide [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 174: 116535.

[76] LIANG W, XIE B K, DING P W, et al. Sacubitril/valsartan alleviates experimental autoimmune myocarditis by inhibiting Th17 cell differentiation independently of the NLRP3 inflammasome pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 727838.

[77] GAO X, XUAN Y, ZHOU Z, et al. Ivermectin ameliorates acute myocarditis via the inhibition of importin-mediated nuclear translocation of NF-κB/p65 [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 133: 112073.

[78] ZHUANG J, CHENG G, HUANG J, et al. Rosuvastatin exerts cardioprotective effect in lipopolysaccharide-mediated injury of cardiomyocytes in an MG53-dependent manner [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2022, 22(1): 69.

[79] CHEN B, LI Y F, FANG Z, et al. Epigallocatechin-3-gallate protects sepsis-induced myocardial dysfunction by inhibiting the nuclear factor-κB signaling pathway [J]. Heliyon, 2024, 10(5): e27163.

[80] YAO T, SUN B, LI Y, et al. Integrating network pharmacology and experimental validation to decipher the mechanism of action of Jingfang granule in the treatment of viral myocarditis [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2023, 396(9): 2151-2163.

[81] LIU M, FAN M, XU H, et al. A combination of sophora flavescens alkaloids and Panax quinquefolium saponins attenuates coxsackievirus B3-induced acute myocarditis in mice via NF-κB signaling [J]. Exp Ther Med, 2023, 25(6): 292.

[82] LIU Y, LI X, ZHAO Y. Curcumin alleviated lipopolysaccharide-evoked H9c2 cells damage via suppression of intercellular adhesion molecule 1/CD40/NF-κB signaling [J]. Hum Exp Toxicol, 2022, 41: 9603271211069043.

[收稿日期] 2024-06-19

《中国比较医学杂志》稿约

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

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgsgdw.cnjournals.com/zgbjyxxz/ch/index.aspx>
期待您的来稿!

何佳蕾,何松,张晴,等. 水貂作为新型实验动物模型的应用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1456-1462.
HE J L, HE S, ZHANG Q, et al. Application of mink as a new experimental animal model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1456-1462.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.010

水貂作为新型实验动物模型的应用研究

何佳蕾¹,何松¹,张晴¹,张曦文¹,张贺²,袁宝¹,陈健¹,任文陟¹,胡进平^{1*},丁瑜^{1*}

(1. 吉林大学动物科学学院,长春 130062;2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,哈尔滨 150069)

【摘要】 水貂(mink)作为一种小型珍贵的毛皮动物,不仅在经济上具有显著价值,还因其独特的生物学特征和与人类在呼吸系统、免疫反应等方面的相似性,逐渐展现出作为新型实验动物模型的巨大潜力。本文综述了水貂作为实验动物模型的应用研究,包括流感病毒动物感染、新型冠状病毒肺炎动物、动物行为、犬瘟热动物、呕吐、酶消化、睾丸退化及自伤行为模型中的应用。同时,本文强调了水貂动物福利的重要性,并提出了未来水貂作为实验动物模型在科学研究中的广阔前景,为后续水貂作为新型实验动物模型的广泛应用提供参考。

【关键词】 水貂;实验动物模型;应用研究

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1456-07

Application of mink as a new experimental animal model

HE Jialei¹, HE Song¹, ZHANG Qing¹, ZHANG Xiwen¹, ZHANG He², YUAN Bao¹, CHEN Jian¹,
REN Wenzhi¹, HU Jinping^{1*}, DING Yu^{1*}

(1. College of Animal Science, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Harbin Veterinary
Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

Corresponding author: DING Yu. E-mail: dingyu03@163.com; HU Jinping. E-mail: hujp@jlu.edu.cn

【Abstract】 Mink are small, fur-bearing mammals with significant economic value. They have also recently demonstrated immense potential as novel experimental animal models owing to their unique biological characteristics and similarities with humans in terms of their respiratory systems, immune responses, and other characteristics. This article comprehensively reviews applied research on the use of mink as an experimental animal model, encompassing their use as animal models for influenza virus infection, COVID-19, animal behavior, canine distemper, vomiting, enzyme digestion, testicular degeneration, and self-injurious behavior. The importance of animal welfare is also emphasized, and the broad prospects for the use of mink as an experimental animal model in scientific research are proposed, offering valuable insights and a reference for the extensive application of mink as a novel experimental animal model in the future.

【Keywords】 mink; experimental animal model; applied research

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

实验动物模型是指在实验室条件下,用于模拟人类或其他生物体的生理、病理过程的动物,在医学、生物学、药理学等领域的研究中发挥着关键作

用。这些模型可以是自然存在的,也可以是通过遗传、手术、药物处理等手段人为制造的。它们对于揭示疾病机制、评估药物效果以及开展其他类型的

【基金项目】 国家重点研发计划(2023YFF0724604),吉林省科技发展规划项目(20230505037ZP)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China (2023YFF0724604), Jilin Province Science and Technology Development Plan Project(20230505037ZP)。

【作者简介】 何佳蕾,女,在读硕士研究生,研究方向:动物学。Email:1094874457@qq.com

【通信作者】 丁瑜,女,教授,博士,研究方向:实验动物学。Email:dingyu03@163.com;

胡进平,男,高级实验师,硕士,研究方向:实验动物质量监测。Email:hujp@jlu.edu.cn。

* 共同通信作者

实验研究具有重大的价值^[1]。传统的实验动物模型有啮齿类(如小鼠、大鼠)、果蝇、兔类、犬类和猪类等^[2-3],随着对水貂研究的深入,科学家们逐渐发现水貂在呼吸系统、病理损伤、免疫反应、生理和行为特征等方面与人类存在相似之处,这使得水貂有潜力成为一种新型的实验动物模型并得以广泛应用。

1 水貂的生物学特征

水貂是一种中等体型的食肉动物,其身体细长、全身披毛、头颈宽粗、耳小而圆、尾巴短而灵活。它们主要栖息于温带、寒温带地区的河边和湖边,属于半水生生物,喜欢在夜间活动,以小鱼、虾蟹和鸟类等小型动物为食。在野外,水貂的平均寿命为 1.5 ~ 2.5 年,而在人工饲养环境下,其寿命可延长至 12 ~ 15 年。水貂繁殖能力强,通常于春季交配,可年产两次。

水貂具有极高的经济价值,主要分为黑褐色和彩色两大类,其中黑褐色为标准品种,而彩色水貂则是人工培育的多样化品种,颜色种类丰富,包括本黑、深咖啡、浅咖啡、银蓝、蓝宝石、红眼白、珍珠、黑十字等。这些品种不仅丰富了水貂的观赏价值,也拓宽了其在毛皮工业中的应用范围^[4]。此外,水貂内脏可制成药品,对风湿性心脏病等疾病有治疗效果^[5],且貂油含有丰富的不饱和脂肪酸,具有良好的乳化性能和紫外线吸收性能^[6-7]。值得注意的是,水貂还对如阿留申病毒等特定病毒具有敏感性,并且作为实验动物模型,在医药研发、毒理学研究以及基础生物学研究方面也具有极高的科研价值,尤其在传染病研究^[8]、疫苗药物研发^[9]、神经疾病机制^[10]、代谢生理功能^[11-12]等领域展现出其应用潜能。

因此,水貂不仅具有显著的经济效益价值,水貂动物模型也为科学研究提供了重要的工具和平台。

2 水貂实验动物模型

动物模型被称为“活的试剂”,是模拟人类疾病和生理过程的重要工具,是医学和生物学等科学研究中常用的方法和手段,在解析疾病发生机制和药物临床前测试中具有不可替代的作用,对人类健康做出了巨大贡献。水貂因其独特的生理学特征和病毒敏感性等,有望成为理想的实验动物模型之一。

2.1 流感病毒动物感染模型

流感病毒是一种引起急性呼吸道传染病的病毒,对公共卫生构成重大威胁。建立流感病毒动物感染模型对于深入理解流感病毒致病性、传播性以及宿主对病毒的免疫反应机制有着重要意义^[13]。

水貂作为一种哺乳动物,具有与人类相似的呼吸系统结构和生理功能,这使得它们成为研究流感病毒感染的理想动物模型^[14]。例如,H9N2 是禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)的主要亚型之一,不仅在禽类中流行,也具有感染人和哺乳动物的能力^[15-16]。水貂感染 H9N2 后,引起低致病性呼吸道疾病,与普通流感相似,表现为精神不振、眼角有分泌物、流鼻涕等轻微症状,但 H9N2 传染性强,易感染其他宿主^[17-18]。与每年季节性流行的 A 型(H1N1、H3N2)和 B 型流感相比,人类感染 H9N2 的病例较少,且症状轻、易恢复^[19]。然而,H9N2 却给禽类养殖业造成了巨大的经济损失。值得注意的是,H9N2 单一感染时虽致病性不强,但与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)混合感染时,则会导致水貂出现严重的呼吸道疾病,加剧水貂出血性肺炎^[20-21]。因此,研究 H9N2 和铜绿假单胞菌混合感染的水貂模型,有助于揭示病毒性与细菌性肺炎的共同发病机制。

水貂对流感病毒具有高度易感性和高效传播性,且水貂作为动物模型比啮齿类大,易于监测其体温、脉搏和呼吸频率等生理指标,其感染症状明显,便于观察和记录,有助于评估流感病毒的传播能力和疫苗的免疫保护效力。随着流感病毒感染疾病模型的不断发现和应用,研究人员对其致病机理的认识也在不断深化,为预防和治疗流感提供了更为坚实的科学基础^[22-23]。

2.2 新型冠状病毒肺炎动物模型

近年来,随着新型冠状病毒(COVID-19)的不断传播,引起人们的广泛关注,为了攻克这一难题,新型冠状病毒肺炎动物模型的研究不断发展。水貂肺上皮细胞对 COVID-19 高度易感,病毒可以通过空气和飞沫在水貂间快速传播,被感染的水貂表现出与人类新冠肺炎相似的呼吸系统疾病表现和病理损伤,如鼻腔有粘液、呼吸困难,病毒 RNA 可以在鼻甲、肺、咽、直肠等多个部位中检测到^[24]。新冠病毒感染水貂模型可以良好的模拟临床重型患者,表现为多脏器损伤,伴有强烈的炎症反应^[25],且该模型相较于啮齿类动物,可能表现出更接近人类的康

复过程,而非人灵长类动物虽然更为相似,但实验成本较高,因此,水貂成为模拟新冠病毒感染重要动物模型之一,为科学家揭开这一病毒的神秘面纱提供重要助力。

2.3 动物行为模型

水貂作为一种独特的动物,其行为模型在生物学和生态学等领域具有极高的研究价值。它们的行为特点鲜明,展现出复杂而有趣的行为机制。在捕食、繁殖和社交等方面都表现出独特的行为模式,这些行为不仅受到内在生理因素的调节,还受到外界环境因素的深刻影响。水貂作为哺乳动物模型可用于评估其在不同环境条件下的母性行为,例如,舔食和梳理幼貂的毛发等母性行为对幼貂的生存能力有着显著影响。研究表明,环境温度过高时,母貂的哺乳行为减少,而窝内垫草则可缩短母貂对仔貂尖叫时的响应时间^[26]。事实上,繁殖问题在某些野生物种中非常常见,通过研究水貂动物的母性护理、性行为等方面对于解决某些野生物种的繁殖问题提供重要的参考。水貂动物行为模型的建立,不仅为研究人员提供了一个深入研究动物行为与环境适应关系的窗口,还可能成为研究繁殖问题和濒临灭绝的鼬科动物的良好模型^[27]。

2.4 犬瘟热动物模型

在自然界中狗、狐、貂等犬科、鼬科动物易感染犬瘟热,犬瘟热是由犬瘟热病毒(caninedistempervirus, CDV)引起的一种急性传染病,严重影响着全世界犬业和毛皮动物养殖业的健康发展。犬瘟热发病率和病死率高,无明显季节性,夏秋季多发,不同年龄段均易感,可分为最急性型(神经型)、急性型(卡他型)、慢性型(皮疹型)、顿挫型(非典型)4种类型^[28-29]。犬瘟热严重威胁着毛皮动物养殖业,若在野生动物中出现感染病例则可能会发生野生动物大量死亡甚至危害整个种族^[30]。

水貂感染 CDV 后会出现一系列典型症状,如高温不退、腹泻、呕吐以及鼻孔有分泌物等^[28]。目前,犬瘟热只能通过接种疫苗来免疫预防,尚无特效治疗药物,一旦感染该病,很难治愈。为有效预防和控制犬瘟热在毛皮动物中的流行,科研人员从患有犬瘟热的猴、犬等动物中分离 CDV,并筛选稳定且具有强毒力的犬瘟热毒株,利用水貂作为实验动物,成功建立水貂犬瘟热动物模型,为研制有效的犬瘟热疫苗奠定基础^[31-32]。建立水貂犬瘟热动物

模型相比于狗、狐等大型动物,水貂的饲养成本较低,更适合用于大规模的实验研究,也一定程度减轻伦理和道德的限制,减少对非目标物种的干扰和伤害。

随着环境的变化,新的疾病层出不穷,而一些已知的疾病也在不断地发生变异和进化,这严重影响着动物健康,因此为预防更多疾病的发生,研发新型疫苗迫在眉睫^[33]。在这一过程中,敏感的动物疾病模型不仅是深入研究病毒感染机制的重要手段,同时也是疫苗和药物开发不可或缺的组成部分。

2.5 呕吐模型

水貂可作为一种新型的呕吐动物模型。目前,雪貂一直是理想的呕吐动物模型之一^[34],而水貂与雪貂同属鼬科,均可产生与雪貂呕吐模型类似的恶心、干呕、呕吐等其他一些动物模型不完全具备的反应症状。水貂对多种催吐剂有反应,如 X 射线照射、顺铂、硫酸铜等经典催吐剂^[35],可通过腹腔注射顺铂、胃内注射硫酸铜、皮下注射吗啡等方法,引起水貂强烈呕吐,建立水貂呕吐模型^[36],且相比雪貂,水貂更易饲养、价格便宜、来源广泛,可作雪貂的替代模型,成为可靠的新型动物呕吐模型^[37]。水貂作为动物呕吐模型,不仅可以深入研究呕吐发生机制,还可以为筛选、开发抗呕吐药物提供新的思路和可靠方法。

2.6 酶消化模型

水貂为单胃动物,主要由口腔、咽、食道、胃、小肠、大肠、肛门、肝、胰腺等器官和各种消化腺组成。水貂采食时咀嚼较少,胃肠道较短,只有身体长度的 4 倍,食物在肠道内停留时间短、传输时间快^[38]。但水貂消化力强,对食物的消化主要依靠酶,尤其是消化腺分泌的大量蛋白酶和脂肪酶能高效消化动物性蛋白和脂肪,因此水貂对蛋白质需求高,其饲料必须以蛋白质含量高的动物性饲料为主。通过监测水貂消化道中的蛋白酶活性和 pH 值,可反映水貂消化特点和规律,建立出水貂消化酶消化模型,以探究提高水貂对营养物质的利用率的方法,节约蛋白质饲料,提高水貂的生产性能和经济效益^[39]。

2.7 睾丸退化动物模型

水貂是季节性繁殖动物,雄性水貂睾丸的周期性退化和恢复是一个复杂过程,主要是受到环境、光照和激素水平等因素的影响。在一年里,水貂睾丸在 11 月开始恢复,2 ~ 3 月睾丸发育完成开始交

配,4 ~ 10 月曲细精管的管腔逐渐减小、睾丸发生退化^[40]。水貂睾丸的周期性变化为研究精子发生过程提供了一个良好的动物模型,可便于评估水貂繁殖受到的影响,探究哺乳动物睾丸退化的细胞因素如细胞自噬、细胞凋亡、细胞脱落等,以及其发生机制,从而可作为人类和野生动物繁殖的模型^[41-42]。

2.8 自伤模型

自伤行为是一种没有自杀意图的对身体组织的故意伤害,目前缺乏有效的治疗方法且严重影响全球健康^[43]。目前在自伤行为动物模型的研究主要集中在药物诱导的啮齿类动物和应急刺激的非人灵长类^[44-45]。然而,在水貂中能够观察到典型的自伤行为,如刻板行为和严重咬尾,且与其他啮齿类动物模型相比,水貂属于病理自发,不需要药理学操作,可以作为良好的自伤行为动物模型。此外有研究以水貂为研究对象,发现环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)与 CREB 结合蛋白(CREB binding protein, CBP)相互作用抑制剂能够显著减轻自伤行为的严重程度^[10],表明有自咬症的水貂与神经细胞功能障碍有关系^[46]。因此,水貂可用于探究自伤行为的分子机制,为水貂作为新型自伤模型提供了前期基础。

3 水貂动物福利

在中国,水貂的饲养量居世界首位,推动着养殖业的发展。水貂应用广泛,其不仅在裘皮加工中发挥着重要作用,在养殖业上也为中国带来了经济收益,同时,在生物学领域,水貂亦有药用价值和研究价值。当然,尽管水貂有着重要的作用,但也应关注野生水貂的保护,包括水貂栖息环境的保护和拒绝捕猎等。

在利用水貂进行实验或养殖的过程中,也要注意动物福利。动物福利是指在饲养、管理、运输等过程中,动物享有生活舒适、不受饥渴、不受痛苦伤害疾病、生活无恐惧、表达天性五大基本要素^[47]。所以在水貂养殖、实验过程中应给予水貂适宜的生活环境,避免过度拥挤,减少压力和疾病的传播,既要满足动物福利,也要推进水貂的研究和发展。

动物模型的使用也要遵守严格的伦理和法律标准,在制备水貂动物模型的过程中,要最大限度的关爱实验动物,考虑动物福利和伦理的同时,确保实验设计的合理性和必要性,建立更加道德、人

性化的实验动物模型的构建方法,才能更好促进科学研究的进展和人类文明的进步。

4 前景展望

水貂和雪貂虽都属于鼬科,但在生物学特性上存在显著性差异。水貂是一种半水生动物,主要生活在靠近水源的森林和湿地环境中,拥有强大的游泳能力,是自然界中的顶级捕食者之一。相比之下,雪貂更适应陆地生活,体型较小,性格温顺,常被驯化为宠物。两者在食性、生活习性及行为模式上均有所不同,但这些差异也为它们在不同领域的生物医学研究中提供了独特的应用价值。其中,雪貂作为动物模型早已被广泛应用于流感病毒致病性和传播性的研究^[48],是研究流感的最佳实验动物。同时雪貂模型也被应用于创伤性脑损伤^[49]、内分泌系统和衰老的研究^[50]。早在 2006 年科学家首次获得两只应用成年雪貂体细胞为细胞核供体的克隆雪貂,创立了雪貂体细胞克隆的操作程序^[51],随后构建了人类肺纤维化囊肿疾病雪貂动物模型^[52],之后 YUAN 等^[53]利用转基因雪貂模型揭示了肺离子细胞的多样性和功能,这些研究不仅深化了对肺生理机制的理解,还为疾病模型的建立提供了重要的工具和资源。

相比之下,水貂作为动物模型的研究起步较晚,但考虑到水貂与雪貂同属鼬科,两者在呼吸道解剖、生理以及病毒易感性方面可能存在相似之处。特别地,水貂作为新冠病毒的高效传播者,其感染过程中出现的呼吸道症状与人类新冠肺炎有诸多共通之处,这提示水貂可能在模拟人类肺部疾病方面具有独特的优势。近年来,水貂体细胞克隆技术也取得了一些进展。例如,水貂 IGF- I 基因的克隆、表达、功能检验及多态分析研究表明,IGF- I 基因在水貂的生长调控中起着重要作用。通过克隆和表达水貂 IGF- I 基因,可以观察其对水貂成骨细胞的功能作用,探讨其在提高水貂生长性能方面的应用潜力^[54]。然而,水貂体细胞克隆技术仍面临一些挑战,包括较低的克隆效率、基因编辑技术的局限性,以及对生理学和免疫反应的深入理解不足。随着科学界对水貂的进一步认识和水貂养殖业的发展,水貂动物模型已开始药理学、生殖生理、病毒学、毒理学等多个领域得到应用。通过不断的技术革新和优化,有望逐步克服这些瓶颈,进而推动水貂体细胞克隆和基因编辑技术的前进,充

分挖掘其在科研领域的潜能。

水貂动物模型的建立具有良好的应用前景。在经济上,水貂动物模型有助于提升水貂的生产性能,增强养殖业的经济收益;在传染病研究中,水貂因独特的生理特性有望成为研究如新冠肺炎等传染病的理想模型,为病毒的研究和疫苗开发提供了宝贵的实验平台^[55],通过在水貂模型中测试潜在的药物和疫苗,研究人员能够在进行人体实验之前预测其效果和潜在副作用,进而评估其安全性和有效性;在遗传研究方面,水貂作为重要的毛皮动物,其遗传资源极为丰富。例如,一项基于全基因组测序的研究揭示了不同颜色水貂种群间的遗传差异及选择信号,发现与毛皮质量和毛色相关的基因显著富集在黑色素生成途径中^[56]。另一项研究则利用双酶切限制位点相关 DNA 测序 (ddRAD-seq) 技术,在中国不同颜色水貂种群中发现了 130 多万个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), 并通过遗传结构分析揭示了黑水貂种群与其他颜色水貂种群之间的遗传分化,为水貂的遗传资源保护和利用提供了基础数据^[57]。这些研究不仅加深了对水貂遗传多样性的理解,还为水貂的选择育种和基因组选择育种提供了科学依据。

水貂动物模型在多个研究领域展现出其重要性,但也存在局限性。水貂作为一种特定的动物模型,其生理和免疫系统与人类存在差异,这可能限制了模型的普适性。例如,水貂对某些病原体的反应可能与人类不同,这可能影响疾病机制的准确研究和药物的临床转化。此外,相比小鼠等一些常用的动物模型,水貂的饲养、繁殖和维护需要相对较高的成本和资源,且水貂的生命周期相对较长,这可能导致研究周期延长,增加了研究的时间成本。

5 结论

综上,水貂动物模型在科学研究和医学领域虽具有广阔的应用前景,但在使用过程中需要考虑其局限性和缺点,并采取相应的措施来优化研究设计、提高研究的准确性和可靠性,水貂动物模型有望在未来为人类健康和动物福利做出更大的贡献。

参 考 文 献 (References)

[1] 张连峰, 崔韶. 国内外实验动物模型概览 [J]. 科技导报, 2017, 35(24): 27-31.
ZHANG L F, CUI S. An overview of laboratory animal models at home and abroad [J]. Sci Technol Rev, 2017, 35(24): 27-31.

[2] 王妍, 曹永春, 邢凯. 猪作为模式动物的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1636-1645.
WANG Y, CAO Y C, XING K. Progress in use of pigs as model animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1636-1645.

[3] 郭昊. 医学研究实验动物伦理和福利状况调查——以药学和中药学期刊载文分析为例 [J]. 医学与哲学, 2020, 41(4): 24-27, 34.
GUO H. Survey on experimental animal ethics and welfare in medical research: case study of published papers in Chinese pharmaceutical and traditional Chinese pharmaceutical journals [J]. Med Philos, 2020, 41(4): 24-27, 34.

[4] WANG L, ZHOU S, LIU G, et al. The mechanisms of fur development and color formation in American mink revealed using comparative transcriptomics [J]. Animals, 2022, 12(22): 3088.

[5] 李艳丽, 冯艳忠. 水貂及其经济价值 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011, 12: 114.
LI Y L, FENG Y Z. Mink and its economic value [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2011, 12: 114.

[6] TUCKER R, BERGFELD W F, BELSITO D V, et al. Mink oil [J]. Int J Toxicol, 2023, 42(3): 77S-78S.

[7] 王静, 钟伟, 施佐, 等. 獭油、貂油、貉油的脂肪酸组成及其抗氧化、抑菌性能研究 [J]. 中国油脂, 2021, 46(2): 67-71.
WANG J, ZHONG W, SHI Z, et al. Fatty acid composition, antioxidation and antibacterial properties of *Meles meles* oil, mink oil and raccoon dog oil [J]. Chin Oils Fats, 2021, 46(2): 67-71.

[8] FARID A H, HUSSAIN I, RUPASINGHE P P, et al. Long-term antibody production and viremia in American mink (*Neovison vison*) challenged with Aleutian mink disease virus [J]. BMC Vet Res, 2022, 18(1): 364.

[9] ZHANG H, ZHANG S, FAN S, et al. Identification and primary application of hybridomas cell secreting monoclonal antibodies against mink (*Neovison vison*) interferon-gamma [J]. Cytokine, 2022, 150: 155777.

[10] LIU C, GUO X, SI H, et al. A mink (*Neovison vison*) model of self-injury: Effects of CBP-CREB axis on neuronal damage and behavior [J]. Front Vet Sci, 2022, 9: 975112.

[11] DEAN M, HUNT J, MCDUGALL L, et al. Uterine glycogen metabolism in mink during estrus, embryonic diapause and pregnancy [J]. J Reprod Dev, 2014, 60(6): 438-446.

[12] LUO Y, HUANG Y, DENG L, et al. Metabolomic profiling of female mink serum during early to mid-pregnancy to reveal metabolite changes [J]. Genes, 2023, 14(9): 1759.

[13] 于志君, 孙伟洋, 张醒海, 等. 流感病毒动物感染模型及其应用 [J]. 传染病信息, 2016, 29(3): 133-138.
YU Z J, SUN W Y, ZHANG X H, et al. Animal models of influenza and their application [J]. Infect Dis Inf, 2016, 29(3): 133-138.

[14] MOK C K P, QIN K. Mink infection with influenza A viruses:

an ignored intermediate host? [J]. One Health Adv, 2023, 1(1): 5.

[15] XUE R, TIAN Y, HOU T, et al. H9N2 influenza virus isolated from minks has enhanced virulence in mice [J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65(3): 904–910.

[16] REN W, ZHANG C H, LI G, et al. Two genetically similar H9N2 influenza viruses isolated from different species show similar virulence in minks but different virulence in mice [J]. Acta Virol, 2020, 64(1): 67–77.

[17] ZHAO Y F, DIAO F F, YU J Y, et al. Intraspecies and interspecies transmission of mink H9N2 influenza virus [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 7429.

[18] 殷存文. 流感病毒在水貂中的流行现状 [J]. 特种经济动植物, 2020, 23(5): 8–9.

YIN C W. Current status of influenza virus epidemic in ferrets [J]. Spec Econ Anim Plant, 2020, 23(5): 8–9.

[19] SONG W, QIN K. Human-infecting influenza A (H9N2) virus: a forgotten potential pandemic strain? [J]. Zoonoses Public Health, 2020, 67(3): 203–212.

[20] LI L J, SHUN K, LI Z J, et al. *Klebsiella pneumoniae* infection following H9N2 influenza A virus infection contributes to the development of pneumonia in mice [J]. Vet Microbiol, 2022, 264: 109303.

[21] ZHANG B S, LI L J, ZHU Q, et al. Co-infection of H9N2 influenza virus and *Pseudomonas aeruginosa* contributes to the development of hemorrhagic pneumonia in mink [J]. Vet Microbiol, 2020, 240: 108542.

[22] 王泽华, 闵锐, 周乐, 等. 流感病毒感染动物疾病模型的研究进展 [J]. 病毒学报, 2023, 39(1): 263–269.

WANG Z H, MIN R, ZHOU L, et al. Advances in research on infected animal models of influenza A virus [J]. Chin J Virol, 2023, 39(1): 263–269.

[23] CALABRESE E J, AULERICH R J, PADGETT G A. Mink as a predictive model in toxicology [J]. Drug Metab Rev, 1992, 24(4): 559–578.

[24] 谭婉莹, 扈晓宇, 谭正怀. 新型冠状病毒肺炎动物模型研究进展述评 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(4): 228–235.

TAN W Y, HU X Y, TAN Z H. COVID-19 models in animals: a review [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(4): 228–235.

[25] 宋志琦, 鲍琳琳, 邓巍, 等. 新冠病毒感染水貂模型可以良好的模拟临床重型患者 [A]. 第十六届中国实验动物科学年会论文集 [C]; 2023.

SONG Z Q, BAO L L, DENG W, et al. The ferret model of SARS-CoV-2 infection can well simulate clinical severe patients [A]. The Proceedings of the 16th Annual Conference of the Chinese Association for Laboratory Animal Science [C]; 2023.

[26] 张琳, 赵敏, 陈晓清. 不同窝箱环境对水貂行为和和生产性能的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(12): 43–49.

ZHANG L, ZHAO M, CHEN X Q. The impact of different cage environments on the behavior and productive performance of ferrets [J]. Anim Husb Vet Med, 2013, 45(12): 43–49.

[27] DÍEZ-LEÓN M, MASON G. Effects of environmental enrichment and stereotypic behavior on maternal behavior and infant viability in a model carnivore, the American mink (*Neovison vison*) [J]. Zoo Biol, 2016, 35(1): 19–28.

[28] 孙胜楠, 杨春, 李铁军, 等. 水貂犬瘟热研究概况 [J]. 特产研究, 2020, 42(3): 77–81.

SUN S N, YANG C, LI T J, et al. Research summary of canine distemper in mink [J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res, 2020, 42(3): 77–81.

[29] 李建军, 丁巧玲. 我国犬瘟热研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(1): 34–38.

LI J J, DING Q L. Research progress of canine distemper in China [J]. Chin J Vet Med, 2003, 39(1): 34–38.

[30] 闫曼平, 商金源, 叶京飞, 等. 水貂犬瘟热病毒微滴数字 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 中国兽医学报, 2023, 43(12): 2445–2450.

YAN M P, SHANG J Y, YE J F, et al. Establishment and application of droplet digital PCR method for detection of canine distemper virus in mink [J]. Chin J Vet Sci, 2023, 43(12): 2445–2450.

[31] 冯二凯, 易立, 施鹏飞, 等. 水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗 (CDV₃-CL 株, 悬浮培养) 血清学效力检验及与靶动物免疫保护相关性研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020, 20: 128–131.

FENG E K, YI L, SHI P F, et al. Serological efficacy test of vero cell live vaccine (CDV₃-CL strain, suspension culture) for mink canine distemper virus and correlation study on immune protection of target animals [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2020, 20: 128–131.

[32] 王胜乐, 王铁成, 冯娜, 等. 水貂犬瘟热动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(11): 54–58, 81.

WANG S L, WANG T C, FENG N, et al. The mink model establishment of canine distemper virus [J]. Chin J Comp Med, 2012, 22(11): 54–58, 81.

[33] 廉士珍, 胡博, 张海玲, 等. 毛皮动物疫苗研发现状及重要性分析 [J]. 中国畜禽种业, 2021, 17(9): 8–9.

LIAN S Z, HU B, ZHANG H L, et al. Research and development status and importance analysis of fur animal vaccine [J]. Chin Livest Poult Breed, 2021, 17(9): 8–9.

[34] IRIZARRY K J L, ZHONG W, SUN Y, et al. RNA sequencing least shrew (*Cryptotis parva*) brainstem and gut transcripts following administration of a selective substance P neurokinin NK₁ receptor agonist and antagonist expands genomics resources for *Emesis* research [J]. Front Genet, 2023, 14: 975087.

[35] 马丽娜, 李健, 叶祖光. 常用呕吐动物模型研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 206–213.

MA L N, LI J, YE Z G. Commonly used vomiting animal models [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(13): 206–213.

[36] ZHANG F, WANG L, YANG Z H, et al. Value of mink vomit model in study of anti-emetic drugs [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(8): 1300–1302.

- [37] 王静. 呕吐动物模型研究进展 [J]. 实验动物科学, 2010, 27(5): 66–67.
WANG J. Animal models of vomiting [J]. Lab Anim Sci, 2010, 27(5): 66–67.
- [38] BAHL M I, HAMMER A S, CLAUSEN T, et al. The gastrointestinal tract of farmed mink (*Neovison vison*) maintains a diverse mucosa-associated microbiota following a 3-day fasting period [J]. Microbiologyopen, 2017, 6(3): e00434.
- [39] 刘伟. 水貂胰蛋白酶消化模型的建立及外源酶对水貂消化和生产性能的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院; 2007.
LIU W. Foundation of functionai model of trypsinase and effect of extraneous enzyme to digestibility and production performance of mink [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences; 2007.
- [40] 张宇飞, 曹满园, 王丽英, 等. 水貂睾丸退化期间 TGFB 家族生长因子及其受体基因表达量的变化 [J]. 兽类学报, 2019, 39(2): 191–201.
ZHANG Y F, CAO M Y, WANG L Y, et al. Foundation of functional model of trypsinase and effect of extraneous enzyme to digestibility and production performance of mink [J]. Acta Theriol Sin, 2019, 39(2): 191–201.
- [41] BELTRÁN-FRUTOS E, SECO-ROVIRA V, MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ J, et al. Cellular modifications in spermatogenesis during seasonal testicular regression: an update review in mammals [J]. Animals, 2022, 12(13): 1605.
- [42] ZHANG Y, ZHU Y, CAO X, et al. Cell adhesion function was altered during the seasonal regression of the seminiferous epithelium in the mink species *Neovison vison* [J]. J Anim Sci, 2023, 101: skad190.
- [43] HOOLEY J M, FOX K R, BOCCAGNO C. Nonsuicidal self-injury: diagnostic challenges and current perspectives [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2020, 16: 101–112.
- [44] KASIM S, JINNAH H A. Self-biting induced by activation of L-type calcium channels in mice; dopaminergic influences [J]. Dev Neurosci, 2003, 25(1): 20–25.
- [45] DAVENPORT M D, LUTZ C K, TIEFENBACHER S, et al. A *Rhesus* monkey model of self-injury: effects of relocation stress on behavior and neuroendocrine function [J]. Biol Psychiatry, 2008, 63(10): 990–996.
- [46] 孙得发. 自咬症水貂行为规律及抗氧化系统研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学; 2011.
SUN D F. Study on behavior law and antioxidant system of self-biting mink [D]. Yangling: Northwest A & F University; 2011.
- [47] 刘宗岳, 李虎, 邵西群, 等. 水貂健康养殖与动物福利研究进展 [EB/OL]. [2024–10–26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1258.S.20230509.1633.006.html>.
LIU Z Y, LI H, SHAO X Q, et al. Research progress on healthy breeding and animal welfare of ferrets [EB/OL]. [2024–10–26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1258.S.20230509.1633.006.html>.
- [48] BASU THAKUR P, MROTZ V J, MAINES T R, et al. Ferrets as a mammalian model to study influenza virus-bacteria interactions [J]. J Infect Dis, 2024, 229(2): 608–615.
- [49] SCHWERIN S C, HUTCHINSON E B, RADOMSKI K L, et al. Establishing the ferret as a gyrencephalic animal model of traumatic brain injury: Optimization of controlled cortical impact procedures [J]. J Neurosci Methods, 2017, 285: 82–96.
- [50] BAKTHAVATCHALU V, MUTHUPALANI S, MARINI R P, et al. Endocrinopathy and aging in ferrets [J]. Vet Pathol, 2016, 53(2): 349–365.
- [51] LI Z, SUN X, CHEN J, et al. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer [J]. Dev Biol, 2006, 293(2): 439–448.
- [52] SUN X, YAN Z, YI Y, et al. Adeno-associated virus-targeted disruption of the CFTR gene in cloned ferrets [J]. J Clin Invest, 2008, 118(4): 1578–1583.
- [53] YUAN F, GASSER G N, LEMIRE E, et al. Transgenic ferret models define pulmonary ionocyte diversity and function [J]. Nature, 2023, 621(7980): 857–867.
- [54] 荣敏. 水貂 IGF-I 基因的克隆、表达、功能检验及多态分析 [D]. 北京: 中国农业科学院; 2010.
RONG M. Cloning, expression, functional test and polymorphism analysis of IGF-I gene in mink [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences; 2010.
- [55] SHUAI L, ZHONG G, YUAN Q, et al. Replication, pathogenicity, and transmission of SARS-CoV-2 in minks [J]. Natl Sci Rev, 2021, 8(3): nwaa291.
- [56] VALIPOUR S, KARIMI K, DO D N, et al. Genome-wide detection of selection signatures for pelt quality traits and coat color using whole-genome sequencing data in American mink [J]. Genes, 2022, 13(11): 1939.
- [57] ZHANG T, LI H, LARSEN P F, et al. The genetic diversity of mink (*Neovison vison*) populations in China [J]. Animals, 2023, 13(9): 1497.

[收稿日期] 2024-05-07

刘泽萱,王鑫乐,郑曲,等. 听力损失的动物模型研究现状及展望 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1463-1471.
LIU Z X, WANG X L, ZHENG Q, et al. Research status and future prospects of animal models of hearing loss [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1463-1471.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.011

听力损失的动物模型研究现状及展望

刘泽萱¹,王鑫乐¹,郑曲^{1,2*},戴俭宇^{1,2*}

(1. 辽宁中医药大学,沈阳 110847;2. 辽宁省教育厅针灸生物学重点实验室,沈阳 110847)

【摘要】 听力损失(hearing loss, HL)作为致病因素复杂、发病机制尚不明确的疾病,可以导致患者听力低下,严重影响患者的健康和生存质量。为了更好地探索听力损失发病机制,并为其治疗研究提供依据,建立出能够模拟人类听觉障碍的动物模型具有重要价值。现有经典的造模方法为药物注射,包含腹腔注射顺铂、庆大霉素、线粒体毒素、D-半乳糖、呋塞米和卡那霉素、新霉素以及先天性巨细胞病毒等;物理方式造模包含噪音、颈椎注射硬化剂、缺血再灌注、注射血管加压素等,此外还有基因改造技术等其他新颖造模方式。本文从上述听力损失造模方法优缺点的角度进行综述,希望能够为更加深入研究听力损失造模方式提供基础和依据。

【关键词】 听力损失;动物模型;造模方式

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1463-09

Research status and future prospects of animal models of hearing loss

LIU Zexuan¹, WANG Xinle¹, ZHENG Qu^{1,2*}, DAI Jianyu^{1,2*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 2. Key Laboratory of Acupuncture and Moxibustion Biology in Liaoning Provincial Department of Education, Shenyang 110847, China)

Corresponding author: DAI Jianyu. E-mail: daijy2009boshi@163.com; ZHENG Qu. E-mail: zxyjh-zhengq@lnutcm.edu.cn

【Abstract】 Hearing loss is a disease with complex pathogenic factors and unclear pathogenesis, which can seriously affect patient health and quality of life. There is thus a need for an animal model that can simulate human hearing loss, to allow research into the pathogenesis of hearing loss and provide a basis for its treatment. Existing classical modeling method involve drug injection, including intraperitoneal injection of cisplatin, gentamicin, mitochondrial toxin, D-galactose, furosemide and kanamycin, and neomycin, and congenital cytomegalovirus infection. Physical modeling method include noise, cervical spinal injection of sclerosing agent, ischemia reperfusion, and vasopressin injection. Other novel modeling method also exist, such as genetic modification. In this article, we review the advantages and disadvantages of the above modeling method, with the aim of providing a basis for further research on the modeling method of hearing loss.

【Keywords】 hearing loss; animal model; modeling method

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

听力损失(hearing loss, HL)是临床常见的产生不同程度听力减退的听功能障碍性疾病。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的调查数

据显示:预计到 2050 年致残性听力损失将超过 9 亿,而且 65 岁以上有三分之一的人受到听力损失的影响^[1]。梅尼埃病、糖尿病、肢端肥大症以及精神

【基金项目】 辽宁省自然科学基金面上项目(2024-MS-120)。

Funded by Liaoning Province Natural Science Foundation Surface Project (2024-MS-120).

【作者简介】 刘泽萱,女,在读硕士研究生,研究方向:耳科疾病的中医临床与基础。Email: 1443084703@qq.com

【通信作者】 戴俭宇,男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:耳科疾病的中医临床与基础。Email: daijy2009boshi@163.com;

郑曲,男,博士,讲师,研究方向:耳科疾病的中医临床与基础。Email: zxyjh-zhengq@lnutcm.edu.cn。

* 共同通信作者

疾病均可产生不同程度的听力损失,听力损失不仅影响患者的沟通能力,还会影响患者的情绪^[2-4]。听力依赖于耳蜗内基底膜部位被称为毛细胞的特殊细胞,细胞名字来源于它们表面发现的毛发状纤维束,当声波进入耳朵时,这些纤维会产生移动,这种运动激活了毛细胞,毛细胞再通过突触的接触点向附近的神经元发送信号。毛细胞必须快速、连续地传输信息,才能让人类识别复杂的声音流并听懂语言^[5]。人类听力损失的常见原因主要包括:暴露于噪音或耳毒性药物、先天遗传因素、衰老以及外伤等,其病因较为复杂,且尚不明确,治愈难度高,相关听力损失的机制研究有限,模拟听力损失模型的制作难度较高,不能完全准确地模拟临床患者的症状和发病进程,因此听力损失动物模型的建立对探究听力损失的发病机制和防治方法具有重要意义。目前常见的听力损失造模方式主要有 4 大类:(1)以庆大霉素(gentamicin, GM),顺铂(cisplatin, CDDP)等耳毒性药物为代表的药物性听力损失;(2)噪声,缺血再灌注等物理因素导致的听力损失;(3)基因改造技术模拟先天性听力损失;(4)毛细胞缺失等其他特殊方式导致的听力损失。本文对以上听力损失动物模型进行综述,为建立合理的听力损失动物模型提供参考。

1 药物性听力损失模型

引起听力损失或耳蜗损伤的耳毒性临床常用药物如氨基糖苷类抗生素、水杨酸盐、利尿剂、抗肿瘤药物等均可能导致药物性听力损失^[6]。这类药物均有可能造成内耳微循环障碍、内耳毛细胞变性坏死并最终导致高频听力渐向低频扩展的听力损失。药物可经各种途径进入内耳并在其中长时间停留,从而损伤具有听觉感受器功能的耳蜗毛细胞,造成患者双侧或单侧进行性的不可逆听力损失^[7]。

1.1 注射 GM 建立听力损失模型

GM 是一种重要的氨基糖苷类抗生素,用于治疗革兰氏阴性细菌感染,是临床常用的药物之一,然而高剂量 GM 引起的耳毒性是一个严重的健康问题,内耳的损伤是不可逆转的,GM 的耳毒性主要来自于活性氧的生成,活性氧在内耳造成一系列反应,最终引起毛细胞的凋亡,对全世界数百万人造成严重影响^[8],因此需要建立一个合理的耳毒性动物模型用于研究 GM 的耳毒性对人体的损伤。腹腔

注射是 GM 造模最常见的方式。YU 等^[9]将 8 只 3 月龄的 KM 小鼠每日行腹腔注射 GM 100 mg/kg,连续 10 d 后,造模完成,并通过听觉测试(auditory brainstem response, ABR)值从 60 dB 下降了 10 dB 和细胞染色评估 GM 诱导的听力损失对听觉耳蜗毛细胞数量的影响。腹腔注射 GM 造模方式相对成熟,安全性更高,因此应用较为广泛。BANAKIS HARTL 等^[10]开发了一种龙猫单侧耳聋(single-sided deafness, SSD)动物模型,该物种在听力测量方面与人类相当,耳朵大,易于手术,且听觉早熟,能够使用耳间时间和水平差提示。听力损失模型通过对 6 只成年雌性龙猫进行全身麻醉后行肌内注射盐酸氯胺酮(ketaved), 30 mg/kg 和盐酸甲苯噻嗪(tranquived), 5 mg/kg,同时进行补充注射以维持足够的麻醉水平。其中 4 只接受单侧耳聋手术,用 1.0 mL GM(40 mg/mL)的中耳腔滴注注射一次,其余 2 只用于对照。在滴注 GM 后的 24 h 内同侧诱发 ABR 几乎完全丧失,对侧诱发阈值保持不变,并且毛细胞特异性标记物肌球蛋白 7A 的染色显示未经治疗的耳蜗毛细胞结构正常,化学性听力损失后听力阈值的变化在长达 5 d 的重复测试中依旧是稳定的,没有明显变化,提示造模成功。HARYUNA 等^[11]研究姜黄素对耳毒性褐家鼠的耳蜗成纤维细胞的抗凋亡作用,选取雄性褐家鼠,体重 150 ~ 250 g,为 0.03 ~ 0.05 mL 每只,GM 浓度为 40 mg/mL,总剂量为 0.1 mL,在显微镜的帮助下注射到大鼠的前上鼓膜中,并使用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 原位切口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)测定法测量耳蜗侧壁成纤维细胞中的凋亡指数来判断造模是否成功,耳蜗侧壁成纤维细胞的凋亡指数平均值为 30 提示造模成功。此方法具有良好的成模效果,成模时间短,未出现大鼠死亡,但有感染风险。

1.2 注射 CDDP 诱导建立听力损失模型

CDDP 是一种广泛使用的抗肿瘤药物。耳毒性是 CDDP 的主要副作用。据了解,在接受 CDDP 治疗的患者中,高达 80% 的患者会出现听力损失。CDDP 在注射后积聚在内耳然后被内耳上皮细胞吸收,进而导致毛细胞的死亡。CDDP 引起的耳毒性会导致儿童和成人癌症幸存者不同程度的听力损失^[12]。胡鹏刚等^[13]用外耳道无异常 SD 大鼠,雌雄不限,分 3 组进行实验:CDDP 1 组从大鼠出生 14 d

开始连续 7 d 腹腔注射 CDDP (3 mg/kg), 此阶段大鼠听力发育完全; 对照组为连续 7 d 腹腔注射相应量的生理盐水 (0.3 mL/100 g)。此外, 设立 CDDP 2 组为性成熟大鼠, 连续 7 d 腹腔注射 CDDP (3 mg/kg)。每组 3 只大鼠在测听后取耳蜗进行免疫荧光染色观察。通过 ABR 测试 CDDP 1 组为 60 ~ 80 dB, CDDP 2 组为 40 ~ 60 dB 与对照组 20 dB 的平均值有明显差异提示造模成功, 并且免疫荧光染色观察到 CDDP 组耳蜗外毛细胞大量缺失。CDDP 诱导的耳聋模型稳定, 造模时间短, 此模型更好的诠释了不同周龄的大鼠耳毒性的敏感度不同, 具有较高的临床研究价值, 但临床 CDDP 的使用多为多剂量、多周期给药, 动物模型不能完全反应临床 CDDP 给药方案, 限制了对听力敏感性的长期变化和潜在保护性治疗效果的评估。FERNANDEZ 等^[14]提出了一种优化 CDDP 耳毒性小鼠模型的详细方法, 选用 35 只成年 CBA/CaJ 雌或雄性小鼠 (17.9 ~ 31.3 g) 进行两个独立的实验。小鼠被随机分为对照组和 CDDP 治疗组, 每组保持性别平衡。在 35 只动物中, 23 只用于试剂量的比较研究, 在该研究中, 使用平均体重为 24.8 ± 3.5 g (范围 17.9 ~ 31.3 g) 的小鼠连续 3 个周期共 42 d 接受 2.5、3.0 和 3.5 mg/kg 的 CDDP (1 mg/mL) 腹腔注射, 注射持续 4 d, 随后是 10 d 的恢复期, 恢复期不做干预。所有 CDDP 治疗小鼠每天早上皮下注射 1 mL 0.9% NaCl, 每天下午皮下注射 1 mL 生理盐水。CDDP 治疗组的高频区 (> 32 kHz) ABR 阈值显著升高且 CDDP 治疗的小鼠都显示出畸变产物耳声发射 (distortion product otoacoustic emission, DPOAE) 振幅显著降低或 DPOAE 缺失则提示造模成功。该方法利用多周期给药方案能更好地模拟临床观察到的听力损失类型和程度且死亡率极低。为临床研究 CDDP 引起的听力损失机制以及开发保护接受 CDDP 治疗的癌症患者听力提供新的造模方法。

1.3 注射 D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 诱导建立听力损失模型

D-gal 是动物体内一种普通的代谢产物, D-gal 在体内可氧化产生大量自由基, 使机体抗氧化酶活力下降, 过氧化产物累积, 还可以造成组织细胞内半乳糖醇堆积, 影响正常渗透压, 导致细胞肿胀、功能障碍, 代谢紊乱。还有研究发现 D-gal 具有降低细胞增殖能力, 加速细胞老化作用, 最终加速机体衰老, 并诱导体内多器官发生衰老性疾病^[15-16]。帅

常娟等^[17]选取耳廓反射灵敏、无噪声暴露及耳毒性药物使用史 30 只 4 月龄豚鼠 (体重 230 ~ 400 g), 随机分为对照组、D-gal 模型组 (简称模型组)、D-gal 模型 + 电针组 (简称电针组), 每组 10 只, 18 月龄豚鼠 10 只 (体重 500 ~ 700 g) 作为老年组。模型组及电针组豚鼠行颈背部皮下注射 D-gal 300 mg/(kg·d), 对照组予以注射等量生理盐水, 每天 1 次, 连续 6 周。老年组豚鼠常规饲养, 不作任何处理。造模后检测豚鼠 ABR 阈值, 模型组与老年组的 ABR 阈值显著升高为造模成功, 其中模型组为 (74.5 ± 5.59) dB, 老年组为 (76.5 ± 7.8) dB。D-gal 衰老模型是目前使用较为广泛的一种人工老化模型, 具有衰老变化明显、模型稳定等优点, 但相对于其他造模方式而言, 本造模方式时间周期相对较长, 多为 6 周及以上, 大多用于老年性耳聋模型的建立。小鼠寿命较短, 在系统发育方面与人类有较大差距, 用于模拟人类疾病时, 与年龄相关的病理学与人类有差异性。

1.4 注射卡那霉素 (kanamycin, Kana) 联合呋塞米 (furosemide, FSM) 建立听力损失模型

Kana 是氨基糖苷类抗生素, 可以引起小鼠耳蜗基底膜毛细胞损伤。FSM 是一种利尿剂, 适量的使用可以治疗各种疾病导致的水肿症状, 当使用大剂量的 FSM 同时配合快速静脉注射会引起短暂性的耳鸣或听力损失症状。有研究报道 Kana 联合 FSM 用药可导致耳毒性^[18]。BAKO 等^[19]将 65 只 BFA 浅色豚鼠 ($n = 40$; BFA bunt; 310 ~ 560 g) 分为 3 个小组, 其中 2 个实验组分别肌肉注射枸橼酸芬太尼 0.025 mg/kg, 咪达唑仑 0.2 mg/kg, 和盐酸美托咪定 1 mg/kg, 全麻后通过单侧耳后入路打开大疱, 用一根绝缘金线的裸露尖端放置在圆窗壁龛中, 在听力测试后用 Kana 联合 FSM 溶液 (200 mg/mL 硫酸 Kana 和 50 mg/mL FSM 溶液) 分别填充 (160 ~ 220 μ L) 大疱 1 和 2 h, 术后取出溶液, 用林格溶液冲洗中耳, 对照组未使用任何溶液, 然后闭合大疱, 并对耳后皮肤切口进行皮内闭合, 对照组未做任何处理。在术后的 5、14 和 26 周的不同时间处死动物, 1 周后进行组织学分析。通过测量听神经复合动作电位 (compound action potentials, CAPs) 反应发现所有频率的中度听力损失都可检测到为 31 ~ 79 dB, 更高的频率下则有更严重的听力损伤趋势, 暴露后可以立即看到阈值偏移和最大 CAPs 幅度的恶化, 在以后的测量中没有 CAPs 响应提示造模成功。此

模型可以用于诱导毛细胞再生或向内耳递送神经营养因子等研究,并且是一种可复制、安全的听力损失动物模型。单独使用 Kana 需要重复给药才能实现永久性听力损失,与环路利尿药物联合给药可以增强其效果,且局部用药可以减轻耳毒性还能建立单侧听力损失模型。但是,氨基糖苷类抗生素的肾毒性等副作用也会随着动物和人类环路利尿剂的全身联合给药而增强。肾耳毒性相关研究可应用该类造模方法。

1.5 注射新霉素(neomycin, Neo)诱导建立听力损失模型

Neo 是氨基糖苷类抗生素,在我国广泛用于治疗较为严重的感染,约 5% 的患者在使用此类抗生素时表现出严重的听力损失。特别是与其他氨基糖苷类抗生素相比,Neo 在全球范围内的听力损失发生率更高^[20]。CUTRI 等^[21]将 Neo 悬浮液(500 μL , 50 和 100 mg/mL)单次左耳显微注射到野生型 CBA/CaJ 新生小鼠内淋巴中。通过耳廓正后方的耳后切口暴露出后半规管和耳蜗大泡,进行显微注射。用 Neo(10 : 1 混合 2.5% 快速绿色染料)的悬浮液加载到硼硅酸盐玻璃移液管(1.5 mm 外径(OD) $\times$ 0.86 mm 内径(ID))中,填充隔间,通过成功着色来确认注射成功。注射 4 周后进行 ABR 听力测试,声学信号以音调点的形式呈现,在频率 8、16、24 和 32 kHz 下,上升和下降时间为 0.5 ms,总持续时间为 5 ms,音调点低于阈值,然后以 5 ~ 10 dB 的增量增加,直到达到 100 dB 声压级(sound pressure level, SPL)的最大输出。Neo 组的 ABR 平均峰值阈值在注射后一个月的所有频率(8 ~ 32 kHz)都显著增加,均值在 80 ~ 100 dB,提示造模成功。与局部和全身氨基糖苷类注射相比,该方法通过在新生小鼠中单次输注 Neo 提供了可靠、稳健且快速的耳聋模型,减少因反复注射给药导致基底层出现可变的、有限的损伤,耐受性也更好,听力损失时间也更快速,且 Neo 的临床应用率较高,有较大研究价值。该模型还可以研究听觉成熟过程中内耳损伤的影响。

1.6 注射先天性巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)诱导建立听力损失模型

CMV 感染是新生儿听力损失的重要原因,其引起的感音神经性听力损失是进行性的,但在耳蜗水平上,听力损失背后的解剖病变和病理生理机制仍不清楚。感染 CMV 的新生儿患听力损失等感觉神

经障碍的风险很高,需要广泛关注^[22]。CARRARO 等^[23]在出生后第 3 天的 BALB/c 小鼠的大脑皮层接种 mCMV,向右脑半球注射 2 μL mCMV,剂量 2000 pfu(斑块形成单位)。将小鼠进行麻醉,然后将 30 G 的注射针穿过颅骨插入中顶叶皮层,对照小鼠未接种 mCMV。在 6 周时使用 ABR 和 DPOAE 测量来监测耳蜗功能。在 8 周龄时使用部分腐蚀铸造技术对耳蜗血管系统进行组织学评估。CMV 感染后耳蜗功能障碍在 6 周大时出现明显的 ABR 阈值升高,平均值 60 ~ 80 dB, DPOAE 振幅降低,平均值 60 ~ 80 dB 提示造模成功。CMV 感染诱导小鼠耳聋模型用于模拟新生儿病毒感染后的进行性感音性听力损失技术较为成熟,可以用于神经感觉后遗症的愈后工具的研发,但据研究显示,CMV 感染具有明显的男性偏向性,且母体免疫力和胎龄不同也会导致不同程度的听力损伤。LAZARINI 等^[24]研究 CMV 感染对听力的影响,通过对深度麻醉的妊娠小鼠(E13)进行小鼠 CMV 的子宫内胎盘接种,在妊娠期间,CMV 感染胎盘,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)在所有 W3 新生小鼠的唾液样本中评估 CMV 核酸的存在。由于雌性小鼠的样本量太小,无法达到统计分析所需的能力选择只研究雄性小鼠的听觉。在出生后 4 和 16 d 的 8 只 CMV 雄性小鼠和随机选择的 8 只 CTL 雄性小鼠中用 ABR 测试评估听力,在 4 d 时未见明显差异,16 d 时平均值显著升高达 80 dB,根据母体免疫力和胎龄的不同,其结果各不相同,可以用于母体感染 CMV 后对新生儿的发病研究,及神经感觉后遗症的愈后工具的开发。

2 物理性耳聋模型

2.1 椎动脉型颈椎病(cervial spondylosis of vertebral artery type, CSA)致听力损失模型—兔模型

CSA 是由于颈椎退行性病变导致椎基底动脉供血不足的临床综合征。临床表现以颈性眩晕为主,可伴有头晕、头痛、失眠、耳鸣、视力模糊、恶心、呕吐、颈肩或枕颈疼痛,甚至猝倒等一系列症状^[25]。其发病率随着年龄的增长而增加,中老年人是此疾病的高发群体。近年来,随着人们生活节奏的加快和伏案工作人员比例的提高,其发病率逐年上升,并趋于年轻化,约占颈椎病的 20%^[26]。周翔等^[27]采用注射硬化剂法形成 CSA 进而导致突发性听力

损失的动物模型。将消痔灵注射液 10 mL 注射于新西兰大耳朵兔 (2.62 ± 0.30) kg 颈椎横突旁软组织,注射位置 2 ~ 6 颈椎横突,深度 1 ~ 1.5 cm,一周一次,连续 3 周。造模前及造模后进行经颅多普勒 (transcranial doppler, TCD) 检测,然后随机选取大耳兔进行病理组织检测,如左右椎动脉及基底动脉血流平均速度 (v_{mean} , V_m) 下降,椎动脉阻力指数 (resistance index, RI)、血流灌注指数 (perfusion index, PI) 增加,注射区域颈部组织出现广泛瘢痕化及挛缩,则证明造模成功。注射硬化剂制作的动物模型符合慢性 CSA 临床发病机理,其方法简便、安全,具有很高的科研价值,但家兔与人类的颈椎有一定差异,例如颈椎大小、结构、硬度和易损程度等方面,不能完全模拟人 CSA 导致的听力损失表现,且本模型仅适用于 CSA 导致的听力损失。

2.2 噪音性诱导的听力损失模型

噪声被认为是感音神经性听力损失的主要原因。据报道,大约 16% 的听力损失归因于持续暴露在大噪音中。长期暴露在超过 80 dB 的噪音水平下会增加听力损失的风险^[28]。如果有足够的强度和持续时间的噪音,毛细胞可能会被严重破坏,但具体的强度和时间没有明确规范,因此建立一个合理的噪音性耳聋模型十分必要^[29]。XU 等^[30]将 C57BL/6 小鼠 (8 ~ 12 周龄, 22 ~ 30 g) 放置在具有四个形状隔间的丝网暴露笼中,并且小鼠能够在隔间内移动。笼子被放置在由 Industrial Acoustics 公司设计的 MAC-1 隔音室中,隔音室内衬隔音泡沫,以最大限度地减少反射。小鼠暴露于中心频率 (2 ~ 4 kHz) 为 100 dB SPL (声压级) 的白噪声中,噪声暴露持续 6 h/d, 连续 3 d, 然后测试 ABR 听力阈值,在不同的声音频率下 ABR 阈值正常的 (10 ~ 50 dB SPL) 噪声模型的小鼠表现出听力损失 (70 ~ 90 dB SPL) 为造模成功。此外,LIU 等^[31]发现小鼠模型中,间隙连接蛋白 26 (recombinant connexin 26, Cx26) 异源缺失减少了耳蜗侧壁中耳蜗内电位的产生,并导致外毛细胞电动蛋白 prestin 补偿性上调,从而增加主动耳蜗放大和听力敏感性。主动耳蜗放大的增加也增加了对噪音的敏感度,暴露于日常噪音可能会导致 Cx26^{+/-} 小鼠永久性听力阈值偏移,导致听力损失。此研究表明, Cx26 隐性杂合突变并不像之前认为的那样对听力没有损伤,反而还可能导致听力过度敏感。贾占伟等^[32]将雄性 Wistar 大鼠放置于小笼内 (30 cm × 30 cm × 100 cm),

每笼 2 只,放入暴露舱 (1.0 m × 0.5 m × 1.0 m), 利用 81150A 脉冲函数任意噪声发生器发声,噪音频率 3 kHz,声强 116 dB 声压级,大鼠暴露范围内声扬不均匀度为 ± 2 dB,每天暴露 8 h,共暴露 7 d,造模前及造模结束后,检测各组大鼠 ABR 听力阈值。噪音引起的听力损失是日常生活中常见的病因,广泛存在于工业领域及其他长期受噪声干扰的工作环境,噪音导致的听力损失具有较大研究意义,但动物不能完全模拟人的社会化属性,暴露于相同条件的噪音中,不同人受到的损伤可能不同,这与个体差异或周边因素有关^[33]。

2.3 缺血再灌注耳聋模型

胡莹^[34]对健康的 SD 大鼠 (300 ~ 350 g) 进行麻醉处理。麻醉后在大鼠颈前正中切口,并分离各层组织,进而暴露锁骨下动脉及其分支椎动脉,并分离一侧颈总动脉,灼断双侧椎动脉,用微动脉夹夹闭颈总动脉 1 h,此为缺血时间,1 h 后松开动脉夹,在解剖显微镜下观察到颈总动脉血流复流搏动恢复后计时为再灌注时间,缝合切口。各组大鼠分别于手术造模后 24 h 且未给药前及造模 7 d 后分别依次测量 ABR 阈值,刺激的测试强度由 85 dB SPL 开始,按 5 dB SPL 逐档递减,听阈的判断以 ABR 的 III 波首次消失为准,提示造模成功。内耳缺血再灌注损伤的细胞学和分子学机制已经大致清楚,具有机制明确的优点,用于研究内耳微循环障碍导致的听力损失,且可作为适用于外伤导致的突发性听力损失的研究模型,为临床治疗外伤导致的听力损失提供模型,但手术创伤大,操作复杂,死亡率较高,因此建立一个简单、成功率高的造模方法仍需进一步研究^[35]。

2.4 膜迷路积水导致听力损失—豚鼠模型

膜迷路积水是梅尼埃病 (meniere disease, MD) 的典型特征,MD 主要表现为耳鸣,眩晕,进而形成听力损失,严重影响到患者的社会生活^[36]。WANG 等^[37]选取 18 只健康的红眼豚鼠 (36 耳),体重 200 ~ 350 g,随机分为 3 组,采用注射醋酸去氨加压素 (desmopressin acetate, DDAVP) 进行造模:对照组,连续 7 d 腹腔注射无菌生理盐水 (与其他两组的体积相同); DDAVP-7 d 组,连续 7 d 腹腔注射 10 mg/(mL·kg) 醋酸去氨加压素; DDAVP-14d 组腹腔注射 10 mg/(mL·kg) DDAVP 连续 14 d。成功造模后,处死所有动物,收集耳蜗组织,分别通过逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase

chain reaction, RT-PCR) 和蛋白质印迹检测 (Western Blot) 环磷酸腺苷 1 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP-1) 和 2 直接激活的交换蛋白 (epac1, epac2) 和阻遏物激活蛋白-1 (repressor activator protein-1, rap1) 的 mRNA 和蛋白质表达, 其中 DDAVP-7 d 组耳蜗组织中 epac1、epac2、rap1A 和 rap1B 的相对 mRNA 表达显著高于对照组, 而 Rap1 GTP 酶激活蛋白 (RAP1 GTPase activating protein, rap1gap) mRNA 表达在两组之间无显著性差异, 提示造模成功。腹腔注射 DDAVP 是现如今常见的快速形成内淋巴积水进而导致听力损伤的模型, 其实验方法简单、破坏性小、造模周期短、技术成熟, 造模成功率高, 但豚鼠价格昂贵, 对于气候适应性差, 不方便操作, 病死率高。因此王娜等^[38]改用 3 ~ 6 月龄健康 SD 大鼠, 体重 160 ~ 210 g, 行腹腔注射, 大鼠的使用剂量为 4 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ (DDAVP) 连续注射 7 d 后, 增大剂量至 6 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, 继续连续注射 3 d, 停止用药 7 d 后分别对实验组、对照组 (注射与实验组等量生理盐水) 及未作任何处理的正常组行 ABR 检测。大鼠出现明显行为学改变, 行动迟缓, 出现明显听力下降, 耳蜗切片采用苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色前庭膜变形, 耳蜗中阶 (cochlea media, SM) 与耳蜗中阶加前庭阶 (scala vestibuli, SV) SM + SV 横截面积比值基本等于 1/3, 建立模型率达 90%, 符合建模成功标准。大鼠的环境适应性较强、价格低廉、成模率更高, 但相较于豚鼠, 耳蜗较小, 后期实验动物的取材难度较大。

3 基因敲除技术模型

遗传导致的听力损失是临床上常见的先天性听力损失原因。迄今为止, 已检测出近百种与听力损失相关的基因, 由于基因导致听力损失研究尚且不足, 因此建立与人类近似的动物模型进行模拟研究^[39]。曾华沙^[40]通过体细胞核移植获取母猪卵巢, 采集卵母细胞, 在体外培养至减数第二次分裂中期, 将减数第二次分裂中期的细胞去除细胞核和第二极体, 复苏基因敲除的细胞系, 将不同敲除基因型的细胞混合, 用物理或化学的方法将 (如电脉冲、钙离子载体、乙醇、蛋白酶合成抑制剂等) 激活受体细胞, 使其完成细胞分裂和发育过程。通过电刺激使两种细胞融合, 供体核进入受体卵母细胞, 完成胚胎重组, 体外培养 48 h, 将胚胎移入受体 (代

孕) 母猪体内, 超声波监测代孕母猪怀孕情况。宰杀胚胎移植 37 d 的代孕母猪, 从子宫取出 14 只正常胎猪 (另有 1 只溶血, 3 只吸收, 3 只死胎), 用于制备氧固醇结合蛋白样 2 (oxysterol binding protein-like 2, OSBPL2) 敲除预制前体纤维 (pre-formed fibrils, PFFs)。制备细胞时, 每头胎猪留取部分组织, 提取基因组脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 进行基因型的鉴定。目前基因敲除技术在小鼠模型中已经取得不少的进展, 但由于小鼠模型不能较好的再现人类听力缺陷的病理表型与发病规律, 凭借小型猪模型与人在听觉器官的形态和结构方面具有极高的相似性, 以小型猪为动物模型, 努力寻找到一种手术路径, 既能将耳聋基因高效的转导入靶细胞, 又能导致最小的听力损失^[41]。

4 其他造模方式导致听力损失模型

4.1 一种单纯毛细胞缺失性听力损失模型

单纯毛细胞缺失是指利用耳蜗侧壁打孔经中阶进行内淋巴灌注注射用水或腺病毒液来造正常豚鼠耳蜗毛细胞损害, 引起听力损失。庄文杰等^[42]使用麻醉后的健康花豚鼠 (250 ~ 350 g) 自左侧下颌下缘中点剪开毛皮长约 1.5 cm, 皮下稍加分离后置入撑开器, 提起颈阔肌扩大切口, 沿着咬肌内侧表面向深处分离, 将腺体牵向中线 (灰白色泡膜状), 下颌下腺及颈外静脉在下方也牵向中线, 下方可以看到茎突及前方走向的二腹肌后腹及腱膜, 在咬肌内侧二腹肌深处可以探到一个骨性平面就是骨性听泡, 将肌肉和迷走神经牵向中线就可以看到骨面, 分离骨膜上撑开器, 用血管钳在骨面最突起的后内方夹开少许骨质, 去除后, 撕掉内面的骨膜进入听泡, 可以看到内侧的耳蜗和外侧的鼓膜, 在倒数第二圈 (基本上覆盖 40% ~ 70% 的区域频率在 1000 ~ 8000 Hz 之间的基底膜区) 的中部色素带偏下打孔 (使用自制尖端 0.2 mm 的三棱针)。导入聚亚酰胺微管, 深度在 0.1 ~ 0.2 mm, 另一端连接微量注射泵 (速率为 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$), 药物的容量为 5 μL (含 1 μL 0.25% 快绿生物染料), 使用快绿生物染料作为指示剂, 确定是否位于中介内, 病毒组使用携带增强绿色荧光蛋白基因 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的腺病毒和快绿生物染料混合液, 注射用水组使用商品化的注射用水和快绿生物色素混合液。注射完毕, 用小块颈阔肌封闭骨孔, 用牙科磷酸锌水门汀封闭听泡骨性开口。分层

缝合切口。通过断续骚扰测试 (CLICK) 的豚鼠听阈提高 (92.5 ± 8.22) dB SPL, 鬼笔环肽染色 (phalloidin) 显示清晰, 在灌注的方向上外毛细胞受损严重, 提示造模成功。这种耳聋模型的方法造成了单纯的毛细胞特别是外毛细胞损害, 有利于药物的同期灌注, 并且较以往的耳聋模型对耳蜗的损害轻, 但是造成毛细胞损害的机理尚不明确, 可能和膜迷路的压力增加有关。通过耳蜗侧壁打孔经中阶入路灌注注射用水或病毒液可以引起以外毛细胞为主的损失, 同时这种损害的程度与灌注液体的成分似乎没有直接的影响, 从而获得了一个较为单纯的以外毛细胞损伤为主的耳聋模型。这个模型不仅具有仅造成基底膜单一细胞损害的优点外, 还为中阶内淋巴药物灌注建立了临时通路^[43]。

4.2 2 型糖尿病导致听力损失模型

有研究表明糖尿病 (diabetes, DM) 与听力损失存在相关性, 当人体血糖浓度较高时, 缝隙连接系统会受到破坏, 连接蛋白减少, 进而导致听力损失。DM 患者的听力下降率是非 DM 患者的两倍, 而前 DM 患者的听力下降率则高出 30%。听力下降是否与 DM 的血糖控制仍有待确定^[44]。栾峰等^[45]选用 60 只 ABR 测试正常的雄性 Wistar 大鼠, 体重 160 ~ 200 g, 其中 40 只实验组通过喂食高脂高糖饲料两个月, 对照组 20 只喂食普通饲料。两月后全部禁食不禁水 12 h, 对照组按 30 mg/kg 腹腔注射枸橼酸缓冲液; 实验组按 30 mg/kg 腹腔注射 10 mg/L 小剂量链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 溶液。于第 9 周末取全部大鼠尾静脉全血, 测空腹血糖 > 7.8 mmol/L 为 2 型 DM 模型成功。检测模型成功后第 1、2、3、4、5 月的空腹血糖以及 ABR 测试, 刺激声为 CLINK 短声, 刺激频率每秒 21.1 次, 带通滤宽为 100 ~ 3000 Hz, 最大声刺激强度为 60 dB, 以能分辨出 ABR 的 II 波波形的最低刺激强度作为 ABR 的反应阈值来提示造模成功。此造模方式对研究以 DM 为基础导致的听力损失的作用机制具有重要意义, 并且具有造模方式成熟稳定, 操作简单等优点, 但是相对而言, DM 患者地血糖变化往往具有进行性, 本造模方法不能完整的模拟患者血糖逐渐升高导致的进行性听力损伤, 且造模时间较长^[46]。

5 结语

以上对听力损失造模的实验性研究证实了听力损失的致病原因复杂, 因此造模方式多样, 优缺点

点各异。药物性听力损失大多采用腹腔注射, 肌肉注射以及中耳滴注等操作, 简便易懂, 创伤小, 感染风险低, 技术成熟, 对各种药物毒性具有参考价值, 但很难完全模拟耳毒性药物的进行性损害^[47]。物理性听力损失造模方法为模拟外伤、外界刺激等外源性听力损失提供了良好的方法, 可用于单纯性听力损失的研究, 并且对继发于其他外源性疾病导致的听力损失也具有借鉴意义, 但操作难度相对较大, 感染、死亡风险高, 且具有不确定的社会属性等相关干扰因素^[48-49]。基因敲除及其他基因改造技术的造模成功率高, 对听力损失彻底, 但机制研究尚且较为表浅, 听力损失大多不可逆, 成模及治疗难度高, 有待深入挖掘与研究^[50]。此外, 还有一些新颖的造模方式为听力损失的模型建立提供新的思路, 其成功率及应用价值仍有待考究, 需要通过反复实验, 确定最佳造模条件, 时间等重要因素, 因此在未来, 需要研究人员进一步重视能够模拟听力损失的发病机制及过程, 协同基因, 药物, 环境等因素的模型, 为更好的研究和防治听力损失提供基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] 王敬鑫, 艾丽梅, 李晓明, 等. 中国普通人群听力损失定义及流行特征 [J]. 中国预防医学杂志, 2023, 24(6): 594-601.
WANG J X, AI L M, LI X Y, et al. A systematic review of the definition and epidemiological characteristics of hearing loss in Chinese general population [J]. Chin Prev Med, 2023, 24(6): 594-601.
- [2] GACEK R R. On the nature of hearing loss in méniere's disease [J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2021, 83(3): 144-150.
- [3] BLAZER D G, TUCCI D L. Hearing loss and psychiatric disorders: a review [J]. Psychol Med, 2019, 49(6): 891-897.
- [4] TEIXEIRA L S, SILVA I B O, SAMPAIO A L L, et al. Hearing loss in acromegaly: A review [J]. Int Arch Otorhinolaryngol, 2018, 22(3): 313-316.
- [5] WONG H C, ZHANG Q, BEIRL A J, et al. Synaptic mitochondria regulate hair-cell synapse size and function [J]. eLife, 2019, 14(8): e48914.
- [6] 陈阳. 氨基糖甙类抗生素治疗耳毒性研究 [J]. 中国实用医药, 2019, 14(15): 192-193.
CHEN Y. Study on aminoglycoside antibiotics for ototoxicity [J]. China Pract Med, 2019, 14(15): 192-193.
- [7] 孙丽芳. 靶向外毛细胞 Prestin 的 PLGA 纳米粒拮抗急性听力损失的作用研究 [D]. 广州: 广东药科大学; 2021.
SUN L F. Protective effect of PLGA nanoparticles targeting prestin of outer hair cells against acute hearing loss [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University; 2021.

- [8] 崔静文, 胡慧. 艾灸对庆大霉素致听力损伤豚鼠模型的干预效应及其作用机制 [J]. 环球中医药, 2022, 15(11): 2038–2045.
- CUI J W, HU H. Effect and mechanism of moxibustion on gentamicin-induced hearing loss in guinea pig model [J]. Glob Tradit Chin Med, 2022, 15(11): 2038–2045.
- [9] YU Y, CAO L, GUAN N, et al. Acupuncture attenuates ototoxicity induced by gentamicin in mice [J]. Altern Ther Health Med, 2022, 28(2): 78–83.
- [10] BANAKIS HARTL R M, GREENE N T, BENICHOX V, et al. Establishing an animal model of single-sided deafness in Chinchilla lanigera [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2019, 161(6): 1004–1011.
- [11] HARYUNA T S, PURBA A H, FARHAT F, et al. The antiapoptotic effect of curcumin in the fibroblast of the cochlea in an ototoxic rat model [J]. Iran J Otorhinolaryngol, 2018, 30(100): 247–253.
- [12] ZHANG X, TRENDOWSKI M R, WILKINSON E, et al. Pharmacogenomics of cisplatin-induced neurotoxicities: Hearing loss, tinnitus, and peripheral sensory neuropathy [J]. Cancer Med, 2022, 11(14): 2801–2816.
- [13] 胡鹏刚, 田克勇, 毛小波, 等. 顺铂耳毒性大鼠耳聋模型的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(23): 4412–4416.
- HU P G, TIAN K Y, MAO X B, et al. A study on cisplatin-induced hearing loss in a rat model [J]. Prog Mod Biomed, 2021, 21(23): 4412–4416.
- [14] FERNANDEZ K, Wafa T, FITZGERALD T S, et al. An optimized, clinically relevant mouse model of cisplatin-induced ototoxicity [J]. Hear Res, 2019, 375: 66–74.
- [15] LI C, SHI S. Neuroprotective effect of huperzine A on d-galactose-induced hearing dysfunction [J]. Ear Nose Throat J, 2021, 100(3): 269S–276S.
- [16] PENG Z, ZHAO C, YANG Z, et al. D-galactose-induced mitochondrial oxidative damage and apoptosis in the cochlear stria vascularis of mice [J]. BMC Mol Cell Biol, 2023, 24(1): 27.
- [17] 帅常娟, 刘淑云, 姚宇, 等. 电针耳穴通过 SIRT1/PGC-1 α 途径延缓 D-半乳糖致衰老豚鼠听皮层老化 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2018, 26(2): 167–171.
- SHUAI C J, LIU S Y, YAO Y, et al. Effect of electroacupuncture at Tinggong and Yifeng on D-galactose-induced aging of auditory cortex through SIRT1/PGC-1 α pathway in guinea pigs [J]. J Audiol Speech Pathol, 2018, 26(2): 167–171.
- [18] 董玉梅, 洪玉, 汪朦, 等. 快速建立 CBA 小鼠急性耳毒性模型的研究 [J]. 石河子大学学报 (自然科学版), 2018, 36(2): 234–237.
- DONG Y M, HONG Y, WANG M, et al. Rapid establishment of acute ototoxicity model in CBA mice [J]. J Shihezi Univ (Nat Sci), 2018, 36(2): 234–237.
- [19] BAKO P, GERLINGER I, WOLPERT S, et al. The ototoxic effect of locally applied kanamycin and furosemide in guinea pigs [J]. J Neurosci Methods, 2022, 372: 109527.
- [20] LI W, ZHANG Y, XU J, et al. Fasudil prevents neomycin-induced hair cell damage by inhibiting autophagy through the miR-489/NDP52 signaling pathway in HEI-OC1 cells [J]. Exp Ther Med, 2022, 23(1): 43.
- [21] CUTRI R M, LIN J, NGUYEN N V, et al. Neomycin-induced deafness in neonatal mice [J]. J Neurosci Methods, 2023, 391: 109852.
- [22] ALDÈ M, BINDA S, PRIMACHE V, et al. Congenital cytomegalovirus and hearing loss: the state of the art [J]. J Clin Med, 2023, 12(13): 4465.
- [23] CARRARO M, ALMISHAAL A, HILLAS E, et al. Cytomegalovirus (CMV) infection causes degeneration of cochlear vasculature and hearing loss in a mouse model [J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2017, 18(2): 263–273.
- [24] LAZARINI F, KATSIMPARDI L, LEVIVIEN S, et al. Congenital cytomegalovirus infection alters olfaction before hearing deterioration in mice [J]. J Neurosci, 2018, 38(49): 10424–10437.
- [25] LU J, SONG Q, ZHU Y, et al. The effect of acupuncture used for cervical spondylosis of vertebral artery type: a protocol for systematic review and meta-analysis [J]. Medicine, 2022, 101(8): e28956.
- [26] 王鑫, 李艾琳, 闫绍妹, 等. 平衡针刀联合温针灸治疗椎动脉型颈椎病的疗效观察 [J]. 针刺研究, 2022, 47(7): 625–629.
- WANG X, LI A L, YAN S M, et al. Effect of balance acupotomy combined with warm needling in treatment of cervical spondylosis of vertebral artery type [J]. Acupunct Res, 2022, 47(7): 625–629.
- [27] 周翔, 何嘉莹, 高婷, 等. “平衡复位正骨推拿法”对兔颈源性突发性耳聋模型血流速度及听性脑干反应的影响 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(3): 412–414, 463.
- ZHOU X, HE J Y, GAO T, et al. Effect of bone-setting manipulation on blood flow velocity and auditory brainstem responses of cervicogenic sudden hearing loss model rabbits [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2017, 26(3): 412–414, 463.
- [28] 王华, 刘超, 苏钰, 等. DPOAE 在噪声性听力损失诊断评估中的应用研究进展 [J]. 中华耳科学杂志, 2023, 21(1): 110–114.
- WANG H, LIU C, SU Y, et al. Research progress on application of DPOAEs in the diagnosis and evaluation of noise-induced hearing loss [J]. Chin J Otol, 2023, 21(1): 110–114.
- [29] 崔钟丹, 吴菁, 唐佳, 等. 噪声所致听力损失现象的物种差异及可能生理机制研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48(4): 407–422.
- CUI Z D, WU J, TANG J, et al. Research progress in species differences and underlying physiological mechanism of noise-induced hearing loss [J]. Prog Biochem Biophys, 2021, 48(4): 407–422.
- [30] XU F L, CHENG Y, YAN W. Up-regulation of autophagy and apoptosis of cochlear hair cells in mouse models for deafness [J].

- Arch Med Sci, 2018, 17(2): 535-541.
- [31] LIU L M, LIANG C, CHEN J, et al. Cx26 heterozygous mutations cause hyperacusis-like hearing oversensitivity and increase susceptibility to noise [J]. Sci Adv, 2023, 9(6): eadf4144.
- [32] 贾占伟, 何强, 张玉波, 等. 前列地尔联合针刺对噪音性耳聋大鼠耳蜗毛细胞血管内皮生长因子、Bcl-2 及 Bax 表达的影响 [J]. 川北医学院学报, 2018, 33(3): 388-391.
- JIA Z W, HE Q, ZHANG Y B, et al. Effect of acupuncture combined with Alprostadiol injection on the expression of VEGF, Bcl-2 and Bax in the cochlear hair cells of rats with noise induced deafness [J]. J N Sichuan Med Coll, 2018, 33(3): 388-391.
- [33] LE PRELL C G, HAMMILL T L, MURPHY W J. Noise-induced hearing loss: Translating risk from animal models to real-world environments [J]. J Acoust Soc Am, 2019, 146(5): 3646.
- [34] 胡莹. 泻火化痰通窍法对耳蜗 IRI 模型大鼠 Caspase-9/6 及 Bax/Bcl-2 影响的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2016.
- HU Y. An experimental study on the effect of fire clearing and stasis clearing on cochlear IRI model rats Caspase-9/6 and Bax/Bcl-2 [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2016.
- [35] 吴琳, 吴芳, 刘娅楠, 等. 大鼠脑缺血再灌注模型制作流程详述及经验总结 [J]. 实验动物科学, 2021, 38(3): 62-65.
- WU L, WU F, LIU Y N, et al. Detailed process and experiences of cerebral ischemia-reperfusion model in rats [J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(3): 62-65.
- [36] VAN ESCH B, VAN DER ZAAG-LOONEN H, BRUINJES T, et al. Betahistine in ménière's disease or syndrome: a systematic review [J]. Audiol Neurotol, 2022, 27(1): 1-33.
- [37] WANG C, LI Y, JIANG W, et al. cAMP-Epac1 signaling is activated in DDAVP-induced endolymphatic Hydrops of guinea pigs [J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2023, 89(3): 469-476.
- [38] 王娜, 李旻, 王静, 等. 大鼠膜迷路积水模型的建立及评定 [J]. 中华耳科学杂志, 2021, 19(1): 97-100.
- WANG N, LI M, WANG J, et al. Establishment and evaluation of A rat model of membranous labyrinthine hydrops [J]. Chin J Otol, 2021, 19(1): 97-100.
- [39] 李霄飞. Spag6 基因敲除对小鼠内耳和中耳的影响及相关机制研究 [D]. 济南: 山东大学; 2015.
- LI X F. The effects of deletion of Spag6 gene on the inner and middle ear of mouse and the possible mechanisms underlying such actions [D]. Jinan: Shandong University; 2015.
- [40] 曾华沙. 利用 CRISPR/Cas9 技术建立 OSBPL2 基因敲除耳聋巴马小型猪模型 [D]. 南京: 南京医科大学; 2018.
- ZENG H S. Establishment of OSBPL2-knockout bama miniature pig phenotyping with hearing loss via CRISPR/Cas9 method [D]. Nanjing: Nanjing Medical University; 2018.
- [41] 曾华沙, 姚俊, 王红顺, 等. 人/猪 OSBPL2 同源性比较及猪 PFFs 靶基因敲除细胞系的建立 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(2): 149-154.
- ZENG H S, YAO J, WANG H S, et al. Homology comparison between human and pig OSBPL2 and establishment of pig PFFs with target gene knockout [J]. Acta Univ Med Nanjing (Nat Sci), 2018, 38(2): 149-154.
- [42] 庄文杰, 丛宁, 韩朝. 一种单纯毛细胞缺失豚鼠耳聋模型的建立 [J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2021, 29(2): 81-84, 95.
- ZHUANG W J, CONG N, HAN Z. A new deafness model with only hair cells loss in guinea pigs [J]. Chin J Otorhinolaryngol Integr Med, 2021, 29(2): 81-84, 95.
- [43] 王凯, 罗琳, 何志洲. 听神经病的分子机制 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2019, 54(2): 149-156.
- WANG K, LUO L, HE Z Z. The molecular mechanisms underpinning auditory neuropathy [J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2019, 54(2): 149-156.
- [44] SAMOCHA-BONET D, WU B, RYUGO D K. Diabetes mellitus and hearing loss: a review [J]. Ageing Res Rev, 2021, 71: 101423.
- [45] 栾峰, 张燕, 陈旭真, 等. 缝隙连接蛋白 26 和 30 在大鼠 2 型糖尿病性耳聋模型中的表达 [J]. 解剖学报, 2022, 53(1): 108-113.
- LUAN F, ZHANG Y, CHEN X Z, et al. Expression of connexin 26 and 30 in cochlea in a rat model of type 2 diabetes [J]. Acta Anat Sin, 2022, 53(1): 108-113.
- [46] ELANGO VAN S, SPANKOVICH C. Diabetes and auditory-vestibular pathology [J]. Semin Hear, 2019, 40(4): 292-299.
- [47] HORVATH L, BÄCHINGER D, HONEGGER T, et al. Functional and morphological analysis of different aminoglycoside treatment regimens inducing hearing loss in mice [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(2): 1123-1130.
- [48] 赵超越, 杨金源, 王伟倩, 等. 隐性听力损失小鼠模型的噪声性聋易感性研究 [J]. 中华耳科学杂志, 2023, 21(3): 367-371.
- ZHAO C Y, YANG J Y, WANG W Q, et al. Susceptibility to noise-induced hearing loss in a mouse model of hidden hearing loss [J]. Chin J Otol, 2023, 21(3): 367-371.
- [49] VALENZUELA C V, LEE C, BUCHMAN C A, et al. A revised surgical approach to induce endolymphatic Hydrops in the guinea pig [J]. J Vis Exp, 2020, 160: 10379-10397.
- [50] OMICHI R, SHIBATA S B, MORTON C C, et al. Gene therapy for hearing loss [J]. Hum Mol Genet, 2019, 28(1): R65-R79.

刘星宇,秦靖,胡耀华,等. 靶向 CAF 策略在 PDAC 免疫治疗中的应用研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1472-1481.

LIU X Y, QIN J, HU Y H, et al. Research progress of targeted cancer-associated fibroblast strategy for pancreatic ductal adenocarcinoma immunotherapy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1472-1481.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.012

靶向 CAF 策略在 PDAC 免疫治疗中的应用研究进展

刘星宇^{1,2}, 秦靖², 胡耀华², 郭梦甜², 赵菊梅^{1*}, 师长宏^{2*}

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

【摘要】 胰腺导管癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是一种常见的胰腺癌,其发病隐匿、发展迅速、恶性程度高。传统的治疗方法对其效果不佳,这与 PDAC 具有丰富的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)密不可分,而癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)是 ECM 中最重要的组成部分。CAF 可通过分泌大量效应分子,与肿瘤免疫微环境(tumor microenvironment, TME)内的其他免疫成分相互作用,从而形成免疫抑制性 TME,使癌细胞能够逃避免疫系统的监视,进而促进肿瘤生长、侵袭、转移、ECM 重塑甚至产生耐药性。本文就靶向 CAF 在 PDAC 免疫治疗中的应用研究进展进行综述,重点阐述了通过消耗 CAF、抑制 CAF 分泌效应分子、重编程 CAF、限制 CAF 诱导的 ECM 重塑等方式,促使 TME 由免疫抑制状态转变为免疫激活状态的研究策略,期望产生更加有效的治疗效果,从而为 PDAC 的免疫治疗提供新策略。

【关键词】 胰腺导管癌;癌症相关成纤维细胞;免疫治疗;细胞因子;趋化因子;细胞外基质

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1472-10

Research progress of targeted cancer-associated fibroblast strategy for pancreatic ductal adenocarcinoma immunotherapy

LIU Xingyu^{1,2}, QIN Jing², HU Yaohua², GUO Mengtian², ZHAO Jumei^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China;

2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

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

【Abstract】 Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a common type of pancreatic cancer that is insidious, develops rapidly, and is highly malignant. Traditional treatment strategies are ineffective for PDAC because of its rich extracellular matrix (ECM). Cancer-associated fibroblast (CAF) are the most important component of the ECM, and interact with other immune components in the tumor microenvironment (TME) by secreting numerous effector molecules to form an immunosuppressive TME, which may then allow cancer cells to evade immune system surveillance, promote tumor growth, invasion, and metastasis, and induce ECM remodeling and drug resistance. This review summarizes research progress on the application of targeted CAF in PDAC immunotherapy. We focus on exploring research strategies that promote the transition of TME from an immunosuppressive to an immune-activated state through depleting CAF, inhibiting effector molecules secreted by CAF, reprogramming CAF, and limiting CAF-induced ECM remodeling. This review aims to support the production of more effective therapeutic strategies and provide new method for the immunotherapy of PDAC.

【基金项目】 军队实验动物专项科研课题(SYDW_KY [2021]14)。

Funded by the Special Research Project on Military Experimental Animals (SYDW_KY [2021]14).

【作者简介】 刘星宇,女,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤免疫。Email: excelsior99@qq.com

【通信作者】 赵菊梅,女,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子病理与药物。Email: jmj2003.stu@163.com;

师长宏,男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn。

* 共同通信作者

【Keywords】 pancreatic ductal adenocarcinoma; cancer-associated fibroblast; immunotherapy; cytokine; chemokine; extracellular matrix

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

胰腺导管癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 属于最常见的胰腺癌, 是一种侵袭性和致命性疾病, 5 年生存率低于 10%^[1]。其发展、转移迅速, 是癌症中较难治疗的类型。胰腺导管癌对各种方式的抗癌治疗具有强大的抵抗力, 手术切除及联合药物放化疗是目前 PDAC 治疗的主要方法。常用化疗药物包括吉西他滨, ABRAXANE (白蛋白结合型紫杉醇加吉西他滨), FOLFIRINOX (奥沙利铂、伊立替康、亚叶酸、5-氟尿嘧啶) 等^[2]。尽管早期发现和手术治疗具有一定的效果, 但大多数患者可能会在 4 年内复发, 预后较差^[3]。因而, 寻找新的方案来提高 PDAC 的治疗效果具有重要的临床价值。免疫治疗的出现为肿瘤的治疗带来了新的思路, 其原理是利用特定的免疫细胞或药物来调节自身免疫系统, 使其能够更好地辨识和攻击肿瘤细胞。尽管免疫治疗在血液系统肿瘤和部分实体肿瘤中的治疗取得了显著效果, 然而对胰腺癌难以产生有效的响应。其主要原因在于 PDAC 具有复杂的肿瘤微环境, 效应 T 细胞浸润较少, 具有极强的免疫抑制性^[4]。PDAC 细胞外基质的主要成分为癌症相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblast, CAF)。如果将细胞外基质的 CAF 作为免疫治疗靶点, 调节 PDAC 的基质环境, 促使细胞外基质的大量 T 细胞激活, 可能会增强免疫力进而达到抵抗 PDAC 肿瘤的效果。因此, 靶向 CAF 的免疫治疗策略对于 PDAC 的治疗具有重要的临床意义。本文就 CAF 在肿瘤免疫微环境中的作用以及靶向 CAF 策略在 PDAC 免疫治疗中的应用研究进展进行综述。

1 CAF 在肿瘤免疫微环境中的作用

正常生理条件下, CAF 是间充质来源的静态细胞, 可以维持组织结构的完整性和稳定性。CAF 呈单细胞、细长状态分布。当癌症、自身免疫性疾病或慢性疾病发生时, CAF 将进入激活状态, 导致出现过度激活的 CAF 亚群。这些亚群将位于肿瘤组织内或附近, 从而促进癌症生长、恶性进展和治疗抵抗。CAF 是 PDAC 基质中最丰富的细胞, 其来源于基质中的胰腺星状细胞 (pancreatic stellate cell, PSC)^[3]。因 CAF 产生大量的胶原蛋白和基质蛋白, 过度的基质纤维化和蛋白质交联沉积导致肿瘤

微环境复杂, 不仅对药物运输构成物理屏障, 而且压迫血管, 造成血管卡压, 使药物运输更加困难。同时, CAF 作为肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 的一个组分, 还可通过多种方式促进肿瘤生长, 包括为肿瘤提供氨基酸、脂肪酸和乳酸等代谢物, 还可通过耐药和免疫抑制等各种机制支持肿瘤进展^[5]。当被激活时, CAF 参与肿瘤的侵袭和转移, 同时, CAF 还通过促进免疫抑制环境直接调节肿瘤的免疫环境, 包括趋化因子的产生, 导致单核细胞、髓源性抑制细胞和巨噬细胞聚集到肿瘤微环境, 并将巨噬细胞极化为免疫抑制表型。GORDON 等^[6]利用流式细胞术分析发现, CAF 可以诱导 M2 型巨噬细胞细胞表面程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed death-1, PD-1) 表达升高。KINOSHITA 等^[7]利用组织化学染色证实 Treg 细胞位于 CAF 附近。因此, 靶向 CAF 的免疫治疗具有极其重要的意义。

2 针对 CAF 在 PDAC 中的免疫治疗策略

PDAC 生存率低、预后差, 与肿瘤转移、效应免疫细胞无法充分浸润肿瘤密切相关^[2]。CAF 是 TME 最重要的组成部分, 它与 TME 的相互作用已被确定为促进肿瘤进展的一个关键因素^[3]。PDAC 中的 CAF 通过分泌各种细胞因子、生长因子、趋化因子、外泌体和其他效应分子, 与 TME 中的免疫细胞相互作用, 从而形成免疫抑制性 TME, 使癌细胞能够逃避免疫系统的监视^[6]。在分析人类 PDAC 样本和该疾病的小鼠模型细胞时, 在肿瘤基质中鉴定了很大一部分细胞, 并发现它们主要是由代表不同亚型的 CAF 组成, 剖析 CAF 的功能后发现, 其在肿瘤基质中的存在有助于减少活化的细胞毒性 CD8⁺ T 细胞的数量^[8]。因此深入研究 CAF 在 PDAC 中的复杂机制, 可能为后续的靶向免疫治疗提供新的策略。

2.1 靶向 CAF 直接消耗

在 PDAC 进展中, CAF 发挥重要作用。大量研究证明, 丰富的 CAF 可产生大量的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 以压迫血管并损害化疗

药物的全身递送,CAF 也可通过分泌大量效应分子进而形成免疫抑制微环境,进而促进肿瘤的生长、侵袭和转移^[2]。此外,CAF 可以通过调节髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC),将其募集到肿瘤,并促进 CD8⁺ T 细胞的排斥^[9]。因此若将 PDAC 中的 CAF 作为治疗靶点进行消耗,则可抑制肿瘤细胞生长,减少免疫抑制微环境。但 PDAC 中存在不同的 CAF 亚型。不同的亚型表现出不同的空间分布、分化的表面标志物以及肿瘤促进或限制的矛盾功能。CALIGIURI 等^[10]构建了 PDAC 皮下移植瘤模型,发现 PDAC 肿瘤中 CAF 具有异质性,并鉴定出空间分离且表型不同的 CAF 亚型,且各自拥有不同的表型特征。

2.1.1 靶向不同类型 CAF 消耗

不同类型的 CAF 会发挥不同的作用^[7],了解不同 CAF 在 PDAC 中的功能,进而有针对性的消耗,在临床上更具参考价值。CAF 在 PDAC 中可分为免疫抑制亚型和免疫刺激亚型。在大部分病例中,免疫抑制亚型占优势地位。KPC 小鼠(小鼠自发胰腺癌模型)和人胰腺癌 CAF 最初根据生物标志物、功能和位置分为 3 种类型:肌成纤维细胞 CAF(myofibroblast CAF, myCAF)、炎性 CAF(inflammatory CAF, iCAF)和抗原呈递 CAF(antigen-presenting CAF, apCAF)^[10]。myCAF 常位于肿瘤深处,通常与缺氧区域的癌细胞相邻;iCAF 具有炎症表型,通常位于肿瘤外周^[11];apCAF 高度表达主要组织相容性复合物 II 类和 CD74 的水平,且它可直接与幼稚 CD4⁺ T 细胞结合,诱导它们以抗原特异性方式分化为调节性 T 细胞。3 种 CAF 亚型都可能导致免疫抑制性 TME^[2]。CAF 可以通过机制重塑或肿瘤代谢重编程直接支持肿瘤进展,也可以通过抑制免疫反应和促进血管生成间接作用于其他基质成分来支持肿瘤进展。因此,靶向消耗 CAF 进而减弱免疫抑制微环境具有重要意义。

不同分型 CAF 在肿瘤的发生发展中也具有不同作用,myCAF 被认为是抑制癌症的 CAF,同样 apCAF 可具有肿瘤抑制作用,iCAF 被认为是促进癌症进展的 CAF^[12]。因此靶向消耗 CAF 应根据分型后选择 iCAF 分型进行消耗,以便在减弱免疫抑制微环境的同时,也减弱了癌症的发生发展。FUENTES 等^[11]研究发现,缺氧诱导的缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)确定为 PDAC 中 iCAF 表型的关键调节因子,在缺氧条件

下,HIF-1 α 介导 JAK/STAT 自分泌信号通路会协同上调 iCAF 的表达。同时,缺氧条件下,CAF 将会从 myCAF 向 iCAF 的转变。因而,调控肿瘤微环境的氧含量对抑制向 iCAF 的转变有一定的意义^[11]。值得注意的是,这些 CAF 亚型的特征是动态的,受内在信号通路和外部环境因素的影响。BIFFI 等^[13]在 2019 年发现转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)通过下调白细胞介素 1 受体(interleukin-1 receptor 1, IL1R1)表达促进成纤维细胞转化为 myCAF 抑制成纤维细胞转化为 iCAF。因而,也可采用此方法消耗 PDAC 中的 iCAF 亚型,其可在减轻免疫抑制 TME 的同时,降低肿瘤细胞的增殖。综上,了解 CAF 异质性将有助于靶向治疗 PDAC。

2.1.2 靶向 CAF 生物标志物消耗

在对 CAF 的进一步研究发现,CAF 还存在丰富多样的生物标志物。已发现的 CAF 标志物有成纤维细胞激活蛋白(fibroblast activation protein- α , FAP)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、血小板衍生生长因子受体(platelet-derived growth factor receptors, PDGF-R)、白细胞分化抗原-105(cluster of differentiation 105, CD-105)、富含亮氨酸重复序列 15(leucine rich repeat containing 15, LRRC15)、轴突生长诱导因子 G1(netrin G1, NetG1)、磷脂酶 A2 II A 组(phospholipase A2 group IIA, PLA2G2A)、细胞视黄酸结合蛋白 2(cellular retinoic acid-binding proteins 2, CRABP2)等。不同标志物的 CAF 具有不同的作用。如含 FAP、NetG1、PDGFR、CD-105 标志物的 CAF 在 PDAC 中更易形成免疫抑制微环境促进肿瘤发生发展,形成耐药环境;而含 α -SMA 和 LRRC15 标志物的 CAF 在 PDAC 中,可减弱免疫抑制微环境、提高生存率。重要的是,FAP⁺ CAF 耗竭并没有改变 α -SMA⁺ CAF 的数量,进一步证实了 FAP⁺ CAF 和 α -SMA⁺ CAF 为不同功能的细胞亚群^[14]。因此,应将靶向含 FAP、PDGFR、CD-105 等标志物的 CAF 进行消耗。

大量研究发现 FAP 型的 CAF 是 PDAC 内在免疫耐药的主要原因之一。FAP 表达与肿瘤浸润、调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)发展呈正相关,与肿瘤浸润 CD8⁺ T 细胞呈负相关。因此靶向耗竭 FAP⁺ CAF 细胞是一种较好的治疗选择^[8]。研究表明,靶向 FAP⁺ CAF 消耗可抑制肿瘤生长,基质细胞中 FAP 蛋白的缺失会延迟小鼠 PDAC 疾病的进

展^[14]。FEIG 等^[15]发现,在小鼠 PDAC 皮下肿瘤模型中,通过诱导快速缺氧,消耗 FAP⁺ CAF 可以降低肿瘤负荷并减轻免疫抑制,延长 PDAC 患者生存期。长期以来,MCANDREWS 等^[14]在 PDAC 小鼠肿瘤模型中采用 FAP 靶向药物,包括双特异性抗体;抗体-药物偶联物;疫苗和嵌合抗原受体 T 细胞等,都旨在消除 FAP⁺ CAF 细胞。然而,一些研究发现当耗竭 FAP⁺ CAF 时会出现肌肉损失、骨毒性、恶病质甚至死亡。这表明表达 FAP 的细胞在维持正常肌肉质量和造血方面的重要性。因此,FAP⁺ CAF 在 PDAC 发生消耗时,应密切注意患者变化,需谨慎耗竭^[16]。PDGFR⁺ CAF 与 FAP 作用相同,其可参与免疫调节,将 TME 中巨噬细胞向 M2 型调节,形成免疫抑制微环境^[17]。采用谱系标记 CD105 用于质谱术区分 CAF 亚群,发现 CD105⁺ CAF 对肿瘤生长作用不显著,但 CD105⁻ CAF 可促进效应性 T 细胞浸润、T 细胞记忆前体发育、树突状细胞浸润和抗原呈递,从而发挥强大的肿瘤抑制作用。KRISHNAMURTY 等^[18]发现,LRRC15⁺ CAF 可以直接抑制 CD8⁺ T 细胞活化和功能,限制其对治疗的反应。LRRC15⁻ CAF 可增强 CD8⁺ T 细胞功能,并改善对抗细胞程序性死亡-配体 1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 治疗的反应性。研究发现 NetG1⁺ CAF 通过 NetG1 介导的谷氨酸/谷氨酰胺代谢作用支持 PDAC 存活,NetG1⁺ CAF 具有内在的免疫抑制作用,可抑制自然杀伤细胞介导的肿瘤细胞杀伤。采用中和抗体阻断 NetG1 可以阻碍肿瘤的进程以及减轻免疫抑制作用^[19]。因此,同 FAP 消耗方法相同,也可靶向消耗表达 PDGFR、CD105、LRRC15 以及 NetG1^[19] 阳性的 CAF。与 FAP⁺ CAF 相比, α -SMA⁺ CAF 在 PDAC 中发挥相反作用。 α -SMA⁺ CAF 已被证明在 PDAC 的基因工程小鼠模型中抑制肿瘤起作用,并有助于极化肿瘤浸润 T 细胞^[14]。免疫标志物的多重免疫组织化学分析, α -SMA⁺ CAF 的耗竭降低了效应 T 细胞 (effector T cell, Teff) 与 Treg 的比率^[14]。ÖZDEMİR 等^[20]证明,胰腺癌中 α -SMA⁺ CAF 的缺失导致侵袭性、未分化的肿瘤增多,动物存活率降低,同时癌症干细胞数量增加。同时发现 α -SMA⁺ CAF 缺失,PDAC 上皮细胞-间充质细胞发生改变,进而使癌症干细胞表型改变,使 PDAC 免疫浸润整体降低,增强 Treg,进而增加 PDAC 侵袭性、降低生存率。因此靶向消耗 CAF 时,可不消耗 α -SMA⁺ CAF。研究发现 NetG1⁺

CAF 同 α -SMA⁺ CAF 一致,可显著抑制肿瘤生长,并减轻免疫抑制。因而可不消耗具有 NetG1⁺ CAF。综上,不同亚型、不同生物标志物的 CAF 在 PDAC 进展中具有不同作用^[19]。应在确定具体分型后,根据其在肿瘤及免疫之中不同的作用进行有针对性的消耗,如消耗具有 FAP、PDGFR、CD105 阳性标志的 CAF,可以提高治疗的精确度和效果。

2.2 靶向 CAF 分泌的效应分子

在 PDAC 发生发展中,其微环境中丰富的效应分子发挥着重要作用,细胞间的相互作用受可溶性因子 (如细胞因子和趋化因子) 的分泌控制^[12]。CAF 分泌的效应分子在 PDAC 中具有不同作用,根据分泌效应分子的不同,其在肿瘤的发生发展、转移以及免疫中发挥不同作用。

2.2.1 靶向 CAF 分泌的细胞因子

CAF 可分泌大量细胞因子 (cytokine, CK), 该类因子属于能在细胞间传递信息、具有免疫调节及效应分子的小分子多肽和蛋白质。在 PDAC 中,CAF 分泌的 CK 格外丰富^[12]。CAF 通过 CK 的分泌,直接调节免疫细胞功能,从肿瘤中排除抗肿瘤免疫细胞或将免疫抑制细胞募集到肿瘤来发挥免疫抑制作用^[19],从而发挥致癌作用以及免疫抑制微环境的形成,如 IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-17 和 IL-33 等。CAF 所分泌的 CK 已被证明可以促进单核细胞的募集并向 M2 巨噬细胞转化^[20],也可上调其他细胞上的检查点分子,如 TME 中的肿瘤细胞和免疫细胞,间接对 T 细胞功能和抗肿瘤反应产生抑制作用^[21]。因此,CK 在 PDAC 进展中发挥着不利的作用。有研究报道,在 PDAC 小鼠自发模型中,CAF 分泌的 IL-6 可以促进胰腺癌细胞对于吉西他滨的耐药性,诱导产生免疫抑制微环境,这种耐药性可通过 SOM230 类似物 (帕瑞泰) 逆转,该类似物抑制 mTor/4E-BP1 通路和 IL-6 合成^[22]。当 PDAC 环境中缺乏 IL-6 时,大量实验发现可提高吉西他滨与抗 PD-1 免疫疗法协同作用,显著提高 PDAC 小鼠存活率^[14]。靶向细胞因子受体抑制剂如托珠单抗,可靶向 CK 受体如 IL-6 受体 (IL-6Ra) 及 CK 下游信号通路,进而抑制 CAF 分泌的细胞因子与细胞因子受体结合,从而提高 PDAC 患者的治疗效果。因而,针对 PDAC 的治疗,可采用以上抑制 CAF 分泌的细胞因子或细胞因子受体两方面靶向 CAF 分泌的细胞因子,进而发挥抗肿瘤,提高免疫力的作用^[23]。

2.2.2 靶向 CAF 分泌的趋化因子

趋化因子 (chemokine) 为小分子量的结构相关多肽,其可调节细胞的趋化活性。根据主要蛋白结构的前两个半胱氨酸残基位置分为 4 类: C、CC、CXC 和 CX3C(X: 任何的氨基酸)^[24]。这 4 类趋化因子在协调 PDAC 免疫反应起一定的作用。其中, CC 和 CXC 两类趋化因子发挥主要作用,大部分由 CAF 分泌,影响免疫细胞及其他细胞(上皮细胞和内皮细胞)的迁移,导致 PDAC 的早期播散和侵袭性,可通过诱导体内 Tregs 等细胞的募集降低免疫力,也可限制免疫效应细胞(如 CD8⁺ T 细胞)向肿瘤组织募集^[25]。如 TME 中 CAF 分泌的 CX3CL1、CXCL12、CCL2、CCL5、CCL20 和 CXCL12 参与了间充质干细胞的募集和转化。WANG 等^[26]在原位小鼠 PDAC 模型中发现,CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞向 CAF 的募集也依赖于 CCL5,CD4⁺ CD25⁺ Treg 的关键转录因子叉头盒蛋白 P3 (forkhead box protein P3, FOXP3)在 PDAC 中高度表达,进而上调 CAF 分泌 CCL5 的表达。若将 CCL5 或 FOXP3 进行消耗,可明显减少原位小鼠 Pan-02 PDAC 肿瘤的肿瘤负荷和 Treg 浸润。KOCHER 等^[27]发现,干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)处理降低了 PDAC 小鼠模型中 CAF 产生 CXCL8 的表达,增强抗 PD1 治疗的疗效,是通过减轻 CD68⁺ M2 巨噬细胞的瘤内浸润。实验发现,接受 CXCR4 抑制剂 AMD3100 以及接受 CXCR2 拮抗剂 CCX872-B 的患者,分别与 FOLFIRINOX 联合治疗后,免疫应答在病灶中均有所增强,进而在 PDAC 治疗中有一定的疗效^[25]。因而,靶向抵抗 CAF 分泌趋化因子或拮抗趋化因子配体可以改善 PDAC 中免疫抑制的微环境,也可将抗 PD-L1 和趋化因子受体联合使用,提高治疗效果。(见表 1)。

2.2.3 靶向 CAF 分泌的生长因子

CAF 可分泌大量的生长因子 (growth factor, GF),如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、TGF- β 、基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 等,这些因子在促进 PDAC 肿瘤生长、增殖、迁移、侵袭、转移中发挥重要作用。当前已揭示了 PDAC 患者在接受化疗后,可上调胎盘生长因子 (placental growth factor, PLGF),其可直接激活 CAF 在 PDAC 中产生大量细

胞外基质,也可以诱导 VEGF 的生成^[37]。PDAC 肿瘤的生长和进展在很大程度上依赖于血管生成,而血管生成是由 VEGF 来支持的,因此抑制 PLGF 和 VEGF 的产生在 PDAC 治疗中发挥重要作用^[37],可采用 PLGF (如 Ate-Grab 单药治疗)和 VEGF 阻断剂^[38]。CAF 也可通过分泌成纤维细胞生长因子,以此反馈增加趋化因子 CXCL8 的表达^[38]。CAF 分泌 SDF-1,可上调胰腺癌中的 SATB-1 表达,从而导致吉西他滨耐药和胰腺肿瘤恶性进展^[39]。此外,CAF 衍生的 HGF 有助于胰腺癌细胞的上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT),导致内在的吉西他滨耐药^[40]。在 PDAC 自发小鼠模型中发现,CAF 分泌 TGF- β 1,从而激活胰腺癌中的 SMAD2/3-ATF4 轴,导致 ATP 结合盒亚家族 C 成员 1 (ATP binding cassette subfamily C member 1, ABCC1)的转录增加,ABCC1 泵出细胞内吉西他滨,减少其在癌细胞中的积累,最终导致治疗耐药,因此可采用抑制 TGF- β 的药物,如靶向 TGF- β 表达的反义核苷酸链^[41]。TME 中大量分布的趋化因子不仅在肿瘤发生发展中发挥作用,同时也可形成免疫抑制环境。因此,抑制生长因子的产生在 PDAC 治疗中具有重要意义。

2.3 失活 PSC 进而重编程 CAF

PSC 是一种常驻胰腺间充质细胞,是肿瘤微环境的主要细胞成分,可导致 PDAC 结缔组织增生^[42]。PSC 具有两种表型:静止型和激活型。健康状态下的 PSC 处于静止状态,静止型 PSC 呈纺锤形或星形,位于胰腺腺泡细胞的基质外侧,围绕于血管周围和导管周围,是一种富含维生素脂滴的细胞,且只能产生较少的 ECM。当静止型 PSC 受到一些病理因素刺激时,通过降低脂质储存和脂质代谢相关基因的表达,丢失胞质脂滴转化成肌成纤维样细胞,并表达成纤维细胞活化标志^[43]。CAF 主要来源于激活的 PSC,PSC 失活可能导致 CAF 无法生成。因此,可采用一系列方法将 PSC 进行失活,从而抑制 CAF 的产生以及 CAF 对 PDAC 进展的作用,此过程称为重编程 CAF^[44]。PSC 在缺氧条件下,当暴露于肿瘤衍生的细胞因子时,会逐渐上调表达 iCAF 的标志物^[11]。研究表明,胰岛素样生长因子-1 (insulin like growth factor-1, IGF-1) 信号的刺激与 PSC 激活相关,因此可采用拮抗 IGF-1 试剂以此抵消 PSC 的进一步激活^[45]。全反式视黄酸 (all-trans-retinoic acid, ATRA) 和维生素 D 类似物可使 PSC 失

表 1 PDAC 中趋化因子分类及其功能

Table 1 Classification and function of chemokines in PDAC

分类 Classify	种类 Class	受体 Receptor	功能 Function	策略 Strategy	参考文献 Reference
C	XCL1 XCL2	XCRI	活化 T 细胞和免疫细胞分泌； 介导抗原呈递细胞与 T 细胞间的相互作用； 抗肿瘤 Activation of T cells and secretion of immune cells; Mediate the interaction between antigen-presenting cells and T cells; Anti-tumor	PDAC 中发挥有利作用 Play a favorable role in PDAC	[24]
CC	CCL1-28; CCL9; CCL10	CCR1-10	大部分由成纤维细胞分泌； 促肿瘤； 募集抑制细胞,如 MDSCS 和 Tregs; CCL2-CCR2:作用于 CD8T 细胞,进而抑制免疫抑制功能； CCL3-CCR1/3/9:增强免疫抑制； CCL5-CCR5:增加 Tregs 细胞募集 Most of it is secreted by fibroblasts; Promoting tumors; Recruiting inhibitory cells; CCL2-CCR2: acting on CD8T cells, thereby immunosuppressive function; CCL3-CCR1/3/9: enhancing immune suppression; CCL5-CCR5: increase recruitment of Tregs cells	阻断 CCR 受体； CC 基因敲除； Tregs 的关键转录因子可促进 CAF 产生 CC,进行消融,从而抑制 CC 的产生 Blocking CCR receptors; CC gene knockout; Key transcription factors of Tregs can promote the production of CC in CAF, facilitate ablation, and thus inhibit the production of CC	[27-29]
CXC	CXCL1-17	CXCR1-7	大部分由成纤维细胞分泌； 促肿瘤； 调节免疫抑制微环境； CXCL1/2/5-CXCR2:促进中性粒细胞募集和免疫抑制,且中性粒细胞可产生肿瘤坏死因子； CXCL10-CXCR3:下调 CD8T 细胞数量； CXCL12-CXCR4:也称基质衍生因子； CXCL13-CXCR5:作用于 CD8T 细胞 CXCL14:可杀伤单核细胞、树突状细胞和自然杀伤细胞； CXCL16-CXCR6:促进抗肿瘤免疫 Most of it is secreted by fibroblasts; Promoting tumors; Regulating the immunosuppressive microenvironment; CXCL1/2/5-CXCR2: promote neutrophil recruitment and immune suppression, and neutrophils can produce tumor necrosis factor; CXCL10-CXCR3: downregulation of CD8T cell count; CXCL12-CXCR4: also known as matrix derived factors; CXCL13-CXCR5: acting on CD8T cells; CXCL14: can kill monocytes, dendritic cells, and natural killer cells; CXCL16-CXCR6: promote tumor immunity	阻断 CXCR 受体； CXC 基因敲除； IFN-γ 治疗抑制 CXC Blocking CXCR receptors; CXC gene knockout; IFN-γ therapy inhibits CXC	[30-33]
CX3C	CX3CL1	CX3CR1	促肿瘤 Promoting tumors	阻断 CX3CR1 受体 Blocking CX3CR1 receptors	[34-36]

活,从而增加 PDAC 瘤内吉西他滨水平并减少肿瘤体积。维生素 D 代谢物(1,25-二羟基维生素 D3 或卡泊三醇)已被证明可将活化的 CAF 逆转为静止成纤维细胞,激活维生素 D3 成纤维细胞上的受体导致胰腺纤维化的减少,并且还增加了小鼠胰腺癌模型中对化疗药物的反应^[27]。LUONG 等^[46]发现,单核细胞 C-C 趋化因子受体 2 信号转导可诱导 CCR2⁺

单核细胞迁移至胰腺并分化为 PSC,而 PSC 是 CAF 的前体,若将单核细胞迁移通路进行阻断,则可有效阻断 PSC 向 CAF 的分化。因此,使 PSC 失活从而导致重编程 CAF,从而减少免疫抑制微环境、提高治疗效果,在 PDAC 治疗中具有重要意义。

2.4 限制 CAF 诱导的 ECM 重塑

PDAC 中丰富的 ECM 造成了免疫抑制微环境

和 T 细胞浸润不良^[12],而 CAF 可诱导胰腺癌内部和周围组织纤维化或纤维增生,是 ECM 形成的主要来源。CAF 及其产生的相关细胞外成分(如胶原蛋白、纤连蛋白和基质金属蛋白酶等)可以重塑 TME,并产生物理屏障,阻止效应 T 细胞归巢到肿瘤组织^[47]。同时,致密的胶原网络限制了 PDAC 基质中游离 T 细胞分布。与松散纤连蛋白相比,富含纤连蛋白的区域具有较低的 T 细胞浓度。同样,在密集致密区,T 细胞运动明显降低。ECM 的主要成分胶原蛋白-I 可增强 PDAC 细胞的转移潜力,该通路受多个途径调控,如磷酸肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI₃Ks)信号传导和 SIP₁介导的 E-钙黏蛋白下调^[48]。在自发性 PDAC 小鼠模型中,CAF 分泌的胶原蛋白可通过募集骨髓来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC_s)和减少 CD8⁺ T 细胞来增强免疫抑制,进而加快 PDAC 进展。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)在 PDAC 转移期间调节免疫抑制的作用得到证实,MMP9 在 NK 细胞功能障碍和免疫抑制中起着关键作用。用 MMP9 阻滞剂处理 NK 细胞,发现可增强 NK 细胞分泌穿孔素和颗粒酶 B,表明 MMP9 抑制可以逆转其诱导的免疫抑制作用并增强 NK 细胞的效应功能^[48]。已确定 IPI-926(一种消耗 CAF 相关基质组织的药物)联合给药可改善 PDAC 中的递送和疗效^[49];血管紧张素氯沙坦,可抑制 PDAC 中 CAF 产生胶原,从而减少 COL1 的沉积进而减少耐药。另外,PEGPH20 作为一种聚乙二醇化的重组人透明质酸酶用于 PDAC 小鼠模型,可快速持续的降解基质中的透明质酸,进而减少胶原合成,消耗硫酸软骨素,并重塑肿瘤基质,调节 PDAC 信号传导作用,增强免疫抗肿瘤效应记忆 T 细胞浸润。且与单独使用吉西他滨相比,PEGPH20 联合吉西他滨治疗可显著降低转移发生并提高了动物存活率^[50]。4-甲基伞形酮(4-methylumbelliferone, MU)为一种选择性透明质酸抑制剂,可降低小鼠体内 PDAC 肿瘤大小,促进 T 细胞增殖和向肿瘤组织浸润,进而抑制肿瘤生长迁移^[50]。因而,通过抑制 CAF 分泌细胞外基质成分,提高免疫,抑制肿瘤转移的发生。与此同时,ECM 中另一重要成分基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)则是降解 ECM 成分的酶,其过表达可以通过降解 ECM 和改变 ECM 动力学来驱动 PDAC 的进展^[51]。因此,在 ECM 重塑时,应该注意不能过度

减少,因为其会造成基质疏松进而促进肿瘤的转移。

3 展望

3.1 提高 CAF 分型及标志物的鉴定

CAF 免疫反应的复杂性值得进一步研究,不同亚型和标志物的 CAF 在 PDAC 肿瘤进展及免疫中发挥不同的作用。如今仍缺乏特异性标志物,无法确定 PDAC 中主要 CAF 亚群中的哪些亚群与特定的免疫细胞类型相互作用,因此,鉴定 CAF 的亚型及标志物具有重要意义。在 PDAC 治疗时,重点是对免疫不利、促进肿瘤发展的 CAF 亚型进行靶向消耗。如在 PDAC 小鼠自发胰腺癌模型中联合使用美登素和 FAP-DM1(一种新型 FAP 单克隆抗体)可持续抑制肿瘤生长,甚至完全消退^[20]。因而,提高 CAF 的分型鉴定技术对于提高 PDAC 的治疗效果具有重要意义。

3.2 开发关于针对 CAF 治疗的新方法

通常 PDAC 临床治疗为手术切除和单药辅助放疗等,包括吉西他滨、卡培他滨以及吉西他滨加白蛋白结合型紫杉醇^[49]。但预后效果均不理想,与 PDAC 致密的细胞外基质有着密切的关系。当前针对 CAF 的治疗方法层出不穷,而寻找更高效的方法尤为重要。有研究报道借助嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, car-T)可特异性靶向 CAF。比如,CD70 在 CAF 上表达,研究表明,CD70⁺ CAF 可促进 Treg 的积累促进肿瘤迁移并调节免疫逃逸,可用装载 IL-15 的 NK 细胞特异性识别 CAF 上的 CD70,从而达到裂解 CAF 的效果^[52]。另外,针对 FAP CAF 的 car-T 疗法也可消耗 CAF^[53],同时不会影响 PDAC 中其他亚型 CAF 的含量,通过免疫非依赖性作用抑制肿瘤生长,减少肿瘤血管密度以及减少细胞外基质沉积。目前已设计出了基于 HSV-1 的小鼠 OX40L 表达溶瘤病毒(OV-mOX40L),其可表现出局部和全身肿瘤抑制,单细胞 RNA 测序显示,OV-mOX40L 重塑基质细胞(CAF),从而促进 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞浸润,以延长 PDAC 小鼠存活率^[54]。另外,关于针对 CAF 的特异性疫苗的研发也有一定的临床意义,基于口服 FAP 的 DNA 疫苗,发现 PDAC 微环境中 CD8⁺ T 细胞浸润增加。总之,应寻找更多针对 CAF 的治疗方法,以达到缓解微环境免疫抑制状态,进而增强免疫,减少肿瘤转移发生^[19]。

3.3 干预发生免疫抑制的 CAF 信号通路

HIF、TGF- β 、Notch、Hippo、STAT 以及 Wnt 等信号通路,与促进 PDAC 免疫抑制和转移有关,在促进肿瘤进展方面发挥重要作用^[48]。在 PDAC 免疫抑制性 CAF 中,STAT 等信号通路被激活,有助于形成免疫屏障,抑制 CD8⁺ T 细胞浸润到 TME 中。GAUTAM 等^[48]发现,在 PDAC 的自发小鼠模型中,缺氧环境改变了 PDAC 所有细胞的代谢特性,缺氧诱导因子(HIF-2 α)通过增加 CAF、M2 型肿瘤相关巨噬细胞(M2-TAMS)和 Tregs 的募集在促进免疫抑制方面发挥主要作用。此外,他们还发现 HIF-2 α 的缺失也减少了纤维化,表明 HIF-2 α 在免疫抑制和纤维化中发挥作用。这有助于癌细胞进行免疫逃避和转移。因而,改善 PDAC 缺氧环境、干预 HIF-2 α 的产生可减少 CAF 的增加,减轻免疫抑制微环境,提高 PDAC 治疗效果。Notch 信号在诱导 PDAC 免疫抑制中也发挥重要作用,最新研究发现,PDAC 中,Notch 信号增强可增加 CAF、髓系细胞,会提高 PDAC 细胞系中 PD-L1 含量,使肿瘤微环境形成一个免疫抑制状态。当采用 Notch 抑制剂与抗 PD-L1 联合使用可使 CD8⁺ T 细胞浸润增加,Ki67 染色减少,从而降低免疫抑制提高抗肿瘤疗效^[48]。因此,有效的通路抑制剂可减少 CAF 等细胞生成,减轻免疫抑制状态,提高 PDAC 的治疗效果。

4 总结

PDAC 基质是复杂的、动态的,在肿瘤的进展和转移中起着重要的作用。许多研究发现,CAF 与 PDAC 的发生发展密切相关,因此针对 CAF 的靶向治疗仍在不断开展。特别是已有的文献报道不同来源的 CAF 具有不同的功能,因此,需要追溯 CAF 的亚型,这可能为胰腺癌的治疗提供有效的策略。而现有的研究只发现了 CAF 亚型的存在和部分功能,无法将其精确分型。

总之,直接消耗 CAF、靶向消耗 CAF 分泌效应分子,失活 PSC 到 CAF 的转化,限制 CAF 诱导的 ECM 均可减缓 PDAC 进展,从而实现对胰腺癌的治疗。相信随着 CAF 分型鉴定能力的提升以及 CAF 相关通路的解析,可能会建立针对 CAF 治疗胰腺癌的有效方法。但值得思考的是,每种 CAF 在什么条件下存在于体内?能否通过条件转化改变 CAF 的类型,从而改善 PDAC 微环境,减缓肿瘤进展?未来的研究需要进一步探索每种 CAF 亚型的功能以及

与 PDAC 中其他细胞、信号通路之间的联系。由于 CAF 在胰腺癌中富集的特殊性,靶向 CAF 可能是一个很有前景的治疗方向。虽然目前还尚无批准靶向基质治疗胰腺癌的临床方案,但一些临床试验正在进行中。可以尝试设计以 CAF 为靶点,与目前已有的临床治疗方法联合使用可能为 PDAC 患者带来更好的希望。

参 考 文 献(References)

[1] NAKAZAWA Y, MIYANO M, TSUKAMOTO S, et al. Delivery of a BET protein degrader via a CEACAM6-targeted antibody-drug conjugate inhibits tumour growth in pancreatic cancer models [J]. Nat Commun, 2024, 15: 2202.

[2] NICHETTI F, ROTA S, AMBROSINI P, et al. NALIRIFOX, FOLFIRINOX, and gemcitabine with nab-paclitaxel as first-line chemotherapy for metastatic pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Netw Open, 2024, 7(1): e2350756.

[3] YAO H, HUANG C, ZOU J, et al. Extracellular vesicle-packaged lncRNA from cancer-associated fibroblasts promotes immune evasion by downregulating HLA-a in pancreatic cancer [J]. J Extracell Vesicles, 2024, 13(7): e12484.

[4] ZHOU H, WANG W, CAI Z, et al. Injectable hybrid hydrogels enable enhanced combination chemotherapy and roused anti-tumor immunity in the synergistic treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. J Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 353.

[5] ZHENG S, HU C, LIN Q, et al. Extracellular vesicle-packaged PIAT from cancer-associated fibroblasts drives neural remodeling by mediating m5C modification in pancreatic cancer mouse models [J]. Sci Transl Med, 2024, 16(756): eadi0178.

[6] GORDON S R, MAUTE R L, DULKEN B W, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity [J]. Nature, 2017, 545(7655): 495-499.

[7] KINOSHITA T, ISHII G, HIRAOKA N, et al. Forkhead box P3 regulatory T cells coexisting with cancer associated fibroblasts are correlated with a poor outcome in lung adenocarcinoma [J]. Cancer Sci, 2013, 104(4): 409-415.

[8] ASSOULINE B, KAHN R, HODALI L, et al. Senescent cancer-associated fibroblasts in pancreatic adenocarcinoma restrict CD8 + T cell activation and limit responsiveness to immunotherapy in mice [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 6162.

[9] ARPINATI L, SCHERZ-SHOUVAL R. From gatekeepers to providers: regulation of immune functions by cancer-associated fibroblasts [J]. Trends Cancer, 2023, 9(5): 421-443.

[10] CALIGIURI G, TUVESON D A. Activated fibroblasts in cancer: perspectives and challenges [J]. Cancer Cell, 2023, 41(3): 434-449.

[11] FUENTES N R, TANIGUCHI C M. Turning down oxygen to turn up inflammation in CAFs [J]. Cancer Res, 2023, 83(10): 1560-1562.

- [12] SCHWÖRER S, CIMINO F V, ROS M, et al. Hypoxia potentiates the inflammatory fibroblast phenotype promoted by pancreatic cancer cell-derived cytokines [J]. *Cancer Res*, 2023, 83(10): 1596–1610.
- [13] BIFFI G, ONI T E, SPIELMAN B, et al. IL1-induced JAK/STAT signaling is antagonized by TGF- β to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(2): 282–301.
- [14] MCANDREWS K M, CHEN Y, DARPOLOR J K, et al. Identification of functional heterogeneity of carcinoma-associated fibroblasts with distinct IL6-mediated therapy resistance in pancreatic cancer [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(6): 1580–1597.
- [15] FEIG C, JONES J O, KRAMAN M, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(50): 20212–20217.
- [16] KARAMITOPOULOU E, WENNING A S, ACHARJEE A, et al. Spatially restricted tumour-associated and host-associated immune drivers correlate with the recurrence sites of pancreatic cancer [J]. *Gut*, 2023, 72(8): 1523–1533.
- [17] SHI A, LIU Z, FAN Z, et al. Function of mast cell and bile-choleangiocarcinoma interplay in choleangiocarcinoma microenvironment [J]. *Gut*, 2024, 73(8): 1350–1363.
- [18] KRISHNAMURTY A T, SHYER J A, THAI M, et al. LRRC15 + myofibroblasts dictate the stromal setpoint to suppress tumour immunity [J]. *Nature*, 2022, 611(7934): 148–154.
- [19] FRANCESCONE R, BARBOSA VENDRAMINI-COSTA D, FRANCO-BARRAZA J, et al. Netrin G1 promotes pancreatic tumorigenesis through cancer-associated fibroblast-driven nutritional support and immunosuppression [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(2): 446–479.
- [20] ÖZDEMİR B C, PENTCHEVA-HOANG T, CARSTENS J L, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival [J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(6): 831–833.
- [21] DUPÉRÉ-RICHER D, RIVA A, BARWICK B G, et al. KDM6A regulates immune response genes in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2024, 144(14): 1508–1520.
- [22] DULUC C, MOATASSIM-BILLAH S, CHALABI-DCHAR M, et al. Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance [J]. *EMBO Mol Med*, 2015, 7(6): 735–753.
- [23] CHOI B R, JOHNSON K R, MARIC D, et al. Monocyte-derived IL-6 programs microglia to rebuild damaged brain vasculature [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(7): 1110–1123.
- [24] KAWASAKI K, OHTA Y, CASTRO C D, et al. The immunoglobulin J chain is an evolutionarily co-opted chemokine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121(3): e2318995121.
- [25] BHATIA R, BHYRAVBHATLA N, KISLING A, et al. Cytokines chattering in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor microenvironment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(2): 499–510.
- [26] WANG X, LI X, WEI X, et al. PD-L1 is a direct target of cancer-FOXP3 in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), and combined immunotherapy with antibodies against PD-L1 and CCL5 is effective in the treatment of PDAC [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 38.
- [27] KOCHER H M, BASU B, FROELING F E M, et al. Phase I clinical trial repurposing all-trans retinoic acid as a stromal targeting agent for pancreatic cancer [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4841.
- [28] PANGILINAN C, KLIONSKY D J, LIANG C. Emerging dimensions of autophagy in melanoma [J]. *Autophagy*, 2024, 20(8): 1700–1711.
- [29] DONG S, GUO X, HAN F, et al. Emerging role of natural products in cancer immunotherapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(3): 1163–1185.
- [30] PRINCIPE D R, NARBUTIS M, KUMAR S, et al. Long-term gemcitabine treatment reshapes the pancreatic tumor microenvironment and sensitizes murine carcinoma to combination immunotherapy [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(15): 3101–3115.
- [31] ZHANG M, HUANG L, DING G, et al. Interferon gamma inhibits CXCL8-CXCR2 axis mediated tumor-associated macrophages tumor trafficking and enhances anti-PD1 efficacy in pancreatic cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000308.
- [32] SUN X, HE X, ZHANG Y, et al. Inflammatory cell-derived CXCL3 promotes pancreatic cancer metastasis through a novel myofibroblast-hijacked cancer escape mechanism [J]. *Gut*, 2022, 71(1): 129–147.
- [33] JUNG Y, KIM J K, SHIOZAWA Y, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1795.
- [34] CHAO T, FURTH E E, VONDERHEIDE R H. CXCR2-dependent accumulation of tumor-associated neutrophils regulates T-cell immunity in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(11): 968–982.
- [35] BIANCHI A, DE CASTRO SILVA I, DESHPANDE N U, et al. Cell-autonomous Cxcl1 sustains tolerogenic circuitries and stromal inflammation via neutrophil-derived TNF in pancreatic cancer [J]. *Cancer Discov*, 2023, 13(6): 1428–1453.
- [36] KEMP S B, CARPENTER E S, STEELE N G, et al. Apolipoprotein E promotes immune suppression in pancreatic cancer through NF- κ B-mediated production of CXCL1 [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(16): 4305–4318.
- [37] GUINN S, KINNY-KÖSTER B, TANDURELLA J A, et al. Transfer learning reveals cancer-associated fibroblasts are associated with epithelial-mesenchymal transition and inflammation in cancer cells in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2024, 84(9): 1517–1533.
- [38] KIM D K, JEONG J, LEE D S, et al. PD-L1-directed PIGF/VEGF blockade synergizes with chemotherapy by targeting

CD141⁺ cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 6292.

[39] ZHANG Z, YU Y, ZHANG Z, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived CXCL12 enhances immune escape of bladder cancer through inhibiting P62-mediated autophagic degradation of PDL1 [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 316.

[40] GUAN X. Cancer metastases: challenges and opportunities [J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5(5): 402–418.

[41] LU Y, XU D, PENG J, et al. HNF1A inhibition induces the resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine by targeting ABCB1 [J]. EBioMedicine, 2019, 44: 403–418.

[42] YU S Y, LUAN Y, TANG S, et al. Uncovering tumor-promoting roles of activin A in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Adv Sci, 2023, 10(16): e2207010.

[43] XIE Z, GAO Y, HO C, et al. Exosome-delivered CD44v6/C1QBP complex drives pancreatic cancer liver metastasis by promoting fibrotic liver microenvironment [J]. Gut, 2022, 71(3): 568–579.

[44] ZHU Y, FANG S, FAN B, et al. Cancer-associated fibroblasts reprogram cysteine metabolism to increase tumor resistance to ferroptosis in pancreatic cancer [J]. Theranostics, 2024, 14(4): 1683–1700.

[45] ENE-OBONG A, CLEAR A J, WATT J, et al. Activated pancreatic stellate cells sequester CD8⁺ T cells to reduce their infiltration of the juxtatumoral compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Gastroenterology, 2013, 145(5): 1121–1132.

[46] LUONG T, GOLIVI Y, NAGARAJU G P, et al. Fibroblast heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma; Perspectives in immunotherapy [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2022, 68: 107–115.

[47] LI M, FREEMAN S, FRANCO-BARRAZA J, et al. A bioprinted sea-and-island multicellular model for dissecting human pancreatic tumor-stroma reciprocity and adaptive metabolism [J]. Biomaterials, 2024, 310: 122631.

[48] GAUTAM S K, BATRA S K, JAIN M. Molecular and metabolic regulation of immunosuppression in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 118.

[49] BLAIR A B, KIM V M, MUTH S T, et al. Dissecting the stromal signaling and regulation of myeloid cells and memory effector T cells in pancreatic cancer [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(17): 5351–5363.

[50] WENG C C, HSIEH M J, WU C C, et al. Loss of the transcriptional repressor TGIF1 results in enhanced Kras-driven development of pancreatic cancer [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 96.

[51] ZHONG T, ZHANG W, GUO H, et al. The regulatory and modulatory roles of TRP family channels in malignant tumors and relevant therapeutic strategies [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(4): 1761–1780.

[52] VAN DEN EYNDE A, GEHRCKEN L, VERHEZEN T, et al. IL-15-secreting CAR natural killer cells directed toward the pan-cancer target CD70 eliminate both cancer cells and cancer-associated fibroblasts [J]. J Hematol Oncol, 2024, 17(1): 8.

[53] WEHRLI M, GUINN S, BIROCCHI F, et al. Mesothelin CAR T cells secreting anti-FAP/anti-CD3 molecules efficiently target pancreatic adenocarcinoma and its stroma [J]. Clin Cancer Res, 2024, 30(9): 1859–1877.

[54] LIU S, LI F, MA Q, et al. OX40L-armed oncolytic virus boosts T-cell response and remodels tumor microenvironment for pancreatic cancer treatment [J]. Theranostics, 2023, 13(12): 4016–4029.

[收稿日期] 2024-06-20

陶诗怡,于林童,李军,等. 基于中西医临床病证特点的扩张型心肌病动物模型分析 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1482-1492.

TAO S Y, YU L T, LI J, et al. Analysis of dilated cardiomyopathy animal models based on clinical characteristics of traditional Chinese and Western medicines [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1482-1492.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.013

基于中西医临床病证特点的扩张型心肌病 动物模型分析

陶诗怡^{1,2}, 于林童¹, 李军^{2*}, 杨德爽³, 吴佳芸⁴, 黄力³, 邵明晶³, 黄炫淳²

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 3. 中日友好医院, 北京 100029; 4. 北京中医药大学深圳医院(龙岗), 广东 深圳 518000)

【摘要】 扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是导致心力衰竭、心律失常和猝死的常见疾病之一。DCM 病因复杂多样,机制尚未完全阐明,现有干预措施对患者的预后改善有限,10 年存活率不足 25%。本研究基于 DCM 动物模型国内外研究成果,结合西医临床诊断标准与中医辨证分型,总结 DCM 动物模型构建特征并评价模型中西医临床吻合度。研究发现,DCM 造模方法主要涉及基因编辑、药物诱导、免疫诱导、病毒感染、快速起搏诱导等,实验动物主要包括鼠、斑马鱼、果蝇、猪等,以小鼠和大鼠为主。基因编辑是最常用的 DCM 造模方法,其次是阿霉素诱导造模。目前同一类型 DCM 动物模型所选实验动物、实验用药及其单次或累积剂量、给药方式、造模周期等均有差异,中西医临床吻合度水平参差不齐,同一模型中医临床吻合度普遍较西医临床吻合度低。此外,DCM 动物模型成模标准多以西医理论为基础,而中医证候模型辨证标准及四诊信息采集标准尚未规范统一,未来有待建立稳定、均一、临床吻合度高的病证结合动物模型,为 DCM 机制研究和新药研发提供依据。

【关键词】 扩张型心肌病;中西医结合;病证结合;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1482-11

Analysis of dilated cardiomyopathy animal models based on clinical characteristics of traditional Chinese and Western medicines

TAO Shiyi^{1,2}, YU Lintong¹, LI Jun^{2*}, YANG Deshuang³, WU Jiayun⁴, HUANG Li³,
SHAQ Mingjing³, HUANG Xuanchun²

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China; 3. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 4. Shenzhen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine (Longgang), Shenzhen 518000, China)

Corresponding author: LI Jun. E-mail: gamyylj@163.com

【Abstract】 Dilated cardiomyopathy (DCM) is a common disease leading to heart failure, arrhythmia, and sudden death. The etiology of DCM is complex and diverse, and the mechanisms have not been fully elucidated. Conventional interventions have a limited ability to improve the prognosis of patients, who have a 10-year survival rate of less than 25%. This study aimed to summarize the construction and characteristics of a DCM animal model and evaluate the clinical compatibility of the model with traditional Chinese and Western medicines. Analysis was based on domestic and overseas research into DCM animal models, Western clinical diagnostic criteria, and traditional Chinese medicine syndrome

【基金项目】 中央高水平中医医院临床科研业务费(HLCMHPP2023065),国家重点研发计划(2022YFC3500102)。

Funded by the High Level Chinese Medical Hospital Promotion Project(HLCMHPP2023065), the National Key Research and Development Program of China(2022YFC3500102)。

【作者简介】 陶诗怡,女,在读博士研究生,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。Email: shiyi975411@163.com

【通信作者】 李军,男,博士,主任医师,博士生导师,博士后合作导师,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。Email: gamyylj@163.com

differentiation. The DCM modeling method mainly involved gene editing, drug induction, immune induction, viral infection, and rapid pacing induction. Experimental animals included muroids, zebrafish, *Drosophila*, and pigs, of which mice and rats were most commonly used. Gene editing was the most commonly used method for modelling DCM, followed by doxorubicin-induction. In the literature, the experimental animals, drugs, single or cumulative doses, administration method, and modeling period used varied among studies involving DCM animal models. The level of clinical anastomosis according to traditional Chinese and Western medicines varied considerably, being generally lower in traditional Chinese medicine than Western medicine in the same model. In addition, the modeling standards for DCM animal models were mostly based on Western medicine theories. The differentiation of syndrome models and information collection for the four diagnoses have not been standardized and unified. In the future, stable and homogeneous animal models of high clinical consistency combining both disease and syndrome need to be established to provide a basis for DCM mechanism research and drug development.

【Keywords】 dilated cardiomyopathy; combination of Chinese traditional and Western medicine; combination of disease and syndrome; animal model

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

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是由遗传因素和(或)非遗传因素作用所致的异质性心肌病,发病率约 1/2500^[1-2]。病机复杂,心肌纤维化是 DCM 的重要病理特点,临床表现主要为进行性心力衰竭^[1,3]。现代医学治疗研究取得了较大进展,药物治疗、免疫吸附、超滤技术、左室辅助装置、心脏移植等治疗措施极大地延长了患者寿命,但治疗副作用、疗效不稳定、低依从性等局限性一定程度上影响了治疗效果,患者预后改善有限。研究显示,DCM 的 5 年死亡率为 15% ~ 50%,严重危害人类健康^[4]。中医药在 DCM 领域的认识和研究不断发展进步,稽其病机,以本虚标实为要,多为正气亏虚,复感邪毒、痰瘀、水湿,分早、中、晚 3 期辨证论治。发病之初,邪盛则以祛邪之品以折其势,或合养心育阴之药以护其心;病久而深者,邪入血络、痰瘀胶着、阳气衰微、五脏俱虚,惟化痰祛瘀、理气通滞、培补脾肾、温振心阳,其证可愈^[5-6]。研究表明,中医药对改善 DCM 心室重构^[7]、心功能^[8]、免疫功能^[9]等均有积极作用。

疾病的发生发展复杂难测,直接以人本身作为实验对象来探索疾病的发生机理和演变趋势十分困难。疾病动物模型是利用模式动物来模拟人体各种复杂的生物学问题及疾病特征和过程,可通过基因编辑、药物诱导、免疫诱导、病毒感染、快速起搏诱导等方法构建,对明确疾病的基本规律和研发新药有重要意义^[10-11]。故本研究通过梳理文献,参考西医临床诊断标准与中医辨证分型标准,依据动物模型评价新方法,总结 DCM 动物模型构建特征,并评价模型中西医临床吻合度,以期对 DCM 动物模型的合理选用和设计优化提供借鉴。

1 扩张型心肌病病因病机

1.1 中医病因病机

传统医学中无对 DCM 病名的明确记载,根据历代医家学者对 DCM 的认识,可将其归属于心胀、心水、怔忡、心悸、喘证、水肿、胸痹心痛等范畴。《灵枢·胀论》记载:“夫心胀者烦心短气,卧不安”^[12]。《金匱要略·水气病脉证并治》中对心水描述如下:“心水者,其身重而少气,不得卧,烦而躁,其人阴肿”^[13]。《素问·评热病论篇》记载:“诸水病者,故不得卧,卧则惊,惊则咳甚也”^[14]等表现与 DCM 的临床症状表现极为类似。虽历代学者医家对 DCM 的病机演变认识不完全一致,然主要思想可概括为:DCM 发病基础是先天不足或正气亏虚,复感六淫邪气,或因饮食不节、情志失调、劳逸失度等,致气血阴阳虚衰,脏腑功能失调,心失所养,心血不运,痰饮、瘀血、水湿阻遏心阳^[15-16]。疾病本质为本虚标实,病位在心,五脏相关。病程初期以心气亏虚、痰瘀阻络为主,中期多为心肾两虚、阳虚水泛,后期则五脏阴阳俱损,证候多虚实夹杂,各证型间可相互转化^[16-17]。

1.2 现代医学认识

DCM 的病因主要涉及遗传因素和非遗传因素 2 部分。遗传因素在各年龄段的发病中都占据重要地位^[18-19]。临床筛查证据表明,20% ~ 35% DCM 患者存在家族性传播倾向^[20-22]。约 60% 的家族性 DCM 患者显示与 DCM 相关的 60 个基因之一的遗传学改变,其中肌联蛋白基因(titin, TTN)突变频率达 25% ~ 30%^[23-24]。非遗传因素包括感染、药物、毒素以及内分泌紊乱等^[3]。在儿童中,DCM 的常见

病因是基因突变、心肌炎和先天性代谢缺陷^[25-26]。此外,围生期心脏病发生于妊娠最后 1 个月或分娩后 5 个月内,发病机制不明,50%以上的患者病情逐渐加重,康复比例不到 1/4^[27],多见于撒哈拉以南非洲地区^[28]。

2 扩张型心肌病动物模型评价标准

2.1 中医辨证分型与临床表现

目前 DCM 辨证分型尚无统一标准,本研究参照《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[29]、《中医内科学》^[30]及《中医病证诊断疗效标准》^[31-34]辨证分型标准,将 DCM 分为心肺气虚证、气阴两亏证、心肾

阳虚证、气虚血瘀证、阳虚水泛证、痰饮阻肺证、阴竭阳脱证 7 种证型,见表 1。依据动物模型评价新方法^[11],中医临床诊断标准分为主症和次症,中医吻合度权重各占 60%和 40%。主症包括:(1)心悸气短,或喘息不得卧;(2)神疲乏力,精神萎靡;(3)畏寒肢冷;(4)胸腹水;每项赋值 15%。次症包括:(1)尿少肢肿;(2)胁下痞硬;(3)唇甲青紫或毛发枯槁;(4)燥热多饮;每项赋值 10%,总分值 100%。

2.2 西医诊断标准与临床表现

参照《中国扩张型心肌病诊断和治疗指南(2018)》^[24]和《2023 年 ESC 心肌病管理指南》^[35],拟定 DCM 动物模型西医诊断标准,见表 2。依据动

表 1 DCM 中医辨证分型
Table 1 Syndrome differentiation of dilated cardiomyopathy

证型 Pattern type	主症 Primary symptom	次症 Secondary symptom	舌脉 Tongue and pulse
心肺气虚证 Heart and lung qi deficiency	心悸,气短,乏力,活动后加重 Palpitations, shortness of breath, weakness, aggravation after activity	神疲咳嗽,面色苍白 Fatigued spirit, panting and cough, somber white facial complexion	舌质淡或边有齿痕,脉沉细或虚数 Pale tongue with tooth marks on the margins of the tongue, heavy and fine pulse, or vacuous and rapid pulse
气阴两亏证 Qi and Yin deficiency	胸闷气短,心悸,神疲乏力,自汗或盗汗 Chest tightness, shortness of breath, palpitations, fatigue, spontaneous or night sweats	五心烦热,口干,两颧潮红,头晕耳 鸣,或尿少肢肿 Vexing heat in chest, palms and soles, dry mouth, tidal reddening of the cheeks, dizziness and tinnitus, scant urine and swollen limbs	舌红少苔或少津,脉细数无力或结代 Red tongue with less moss or scant liquid, fine and weak pulse, or bound and intermittent pulse
心肾阳虚证 Heart and kidney Yang deficiency	心悸,短气乏力,动则气喘,身寒腹冷 Palpitation, shortness of breath, asthma, fear of cold and cold abdomen	尿少肢肿,腹胀便溏,面色灰青 Scant urine and swollen limbs, abdominal distention and loose stool, green-blue facial complexion with gray tinge	舌淡胖或有齿印,脉沉细或迟 Pale and enlarged tongue with tooth marks on the margins of the tongue, heavy and fine pulse, or slow pulse
气虚血瘀证 Qi deficiency and blood stasis	胸闷气短,神疲乏力,胸胁作痛,胁下 痞块,下肢浮肿 Chest tightness, shortness of breath, fatigue, pain and lump glomus in the rib- side, edema of the lower extremities	面色晦暗,唇甲青紫 Somber facial complexion, green- blue or purple lips and nails	舌质紫暗或有瘀点、瘀斑,脉沉细或涩 或结代 Dark purple tongue or petechiae, ecchymosis, heavy and fine pulse, or rough pulse, or bound and intermittent pulse
阳虚水泛证 Yang deficiency and water widespread	心悸,喘息不得卧,神疲乏力,面肢浮 肿,尿少,咯吐泡沫痰,畏寒肢冷 Palpitations, hasty panting with inability to lie down, fatigued spirit and lack of strength, puffy face and swollen limbs, scant urine, frothy expectoration, fear of cold and cold limbs	颜面灰白,口唇青紫,腹胀,或胁下 痞块坚硬,颈脉显露 Gray face, green-blue or purple lips, abdominal distension, hard glomus in the rib-side, the neck pulse is revealed	舌暗淡或暗红,苔白滑,脉细促或结代 Dark purple tongue with glossy white tongue fur, fine and skipping pulse, or bound and intermittent pulse
痰饮阻肺证 Phlegm and drink obstruct lung	心悸气急,喘息不得卧,咯白痰或痰黄 粘稠,胸脘痞闷 Palpitations, rapid breathing, hasty panting with inability to lie down, white sticky phlegm or thick yellow phlegm, glomus and oppression in the chest and stomach duct	头晕目眩,尿少肢肿,或伴痰鸣,或 发热口渴 Dizziness, scant urine and swollen limbs, phlegm rale, heat and thirst	舌暗淡或绛紫,苔白腻或黄腻,脉弦滑 或滑数 Purple or crimson tongue with slimy white tongue fur or slimy yellow tongue fur, stringlike and slippery pulse, or slippery and rapid pulse
阴竭阳脱证 Yin exhaustion and yang withdrawal	喘悸不休而不得卧,张口抬肩,烦躁不 安,大汗淋漓或额汗如油,四肢厥冷 Hasty panting with inability to lie down and catch breath, gaping mouth and raised shoulders, agitated vexation, dripping great sweat or putting forth oily sweat, reversal cold of the limbs	精神萎靡,颜面发绀,唇甲青紫,尿 少或无尿肢肿 Lethargy, purple facial complexion, green-blue or purple lips and nails, scant urine, anuria, swollen limbs	舌淡胖而紫,脉微细欲绝或疾数无力 Pale, enlarged, and purple tongue, faint pulse verging on expiry, or racing and weak pulse

物模型评价新方法^[11], 西医诊断指标分为核心指标、直接相关指标和间接相关指标, 西医吻合度占比分别为 60%、30%、10%。其中, 影像与病理①②③每项赋值 20%, 实验室检查①②③每项赋值 10%, 临床表现每项赋值 5%, 总分值 100%。

3 扩张型心肌病动物模型分析

3.1 模型动物的选择

目前用于制备 DCM 动物模型的实验动物有小鼠、大鼠、斑马鱼、果蝇、兔、犬、羊、猴和猪等。由于方法简单、成模率高、重复性强等优势, 啮齿类动物是构建 DCM 模型最主要的实验动物, 以小鼠和大鼠最为常见, 其中 Wistar 大鼠、SD 大鼠、C57BL/6J 小鼠、BALB/c 小鼠、Lewis 大鼠等品种已被成功用于构建 DCM 模型^[36]。

3.2 动物模型与临床吻合度

DCM 造模方法主要包括基因编辑、药物诱导、

免疫诱导、病毒感染、快速起搏诱导等, 其中以基因编辑最为常用, 实验动物主要包括小鼠、大鼠、斑马鱼、果蝇、猪等, 而药物诱导、免疫诱导与病毒感染动物模型的实验动物以小鼠和大鼠为主, 快速起搏诱导法多适于犬、猪和羊等大型动物^[36]。除应用基因编辑模型的研究外, 其余动物模型相关研究均详细描述了具体造模过程, 动物模型与中西医临床病证吻合度见表 3。

结果表明, 阿霉素诱导制备 DCM 动物模型最为常见, 造模周期 2 ~ 8 周, 此模型成本低、操作简单、模型稳定、成模率高、重复性强, 其中以 SD 大鼠 DCM 动物模型的中西医临床吻合度最高。然而, 目前同一类型 DCM 动物模型所选实验动物、实验用药及其单次或累积剂量、给药方式、造模周期等均有差异, 中西医临床吻合度水平参差不齐, 同一模型西医临床吻合度普遍高于中医临床吻合度。

表 2 DCM 西医诊断标准
Table 2 Diagnostic criteria for dilated cardiomyopathy

级别 Level	指标 Indicators	表现 Manifestation
核心指标 Core indicator	影像与病理 Imaging and pathology	①超声心动图:提示心脏扩大、或合并二尖瓣和三尖瓣反流及肺动脉高压,左室壁运动减弱,室壁变薄,左室收缩功能下降、左室射血分数和短轴缩短率降低,或有附壁血栓等;②病理学检查:心肌组织病理学诊断提示心肌损伤,炎症细胞浸润,心肌细胞肥大、变形、间质纤维化等;③其他:(1)心脏磁共振:提示左心室腔扩大、室壁变薄及运动功能减低伴室间隔壁间强化。(2)胸部 X 线检查:提示心影扩大,心胸比 > 0.5。(3)心电图:提示心律失常(期前收缩、心房颤动、传导阻滞及室性心动过速等),或 ST-T 改变、低电压、R 波递增不良,少数可见病理性 Q 波。(4)心脏放射性核素扫描:核素血池扫描可见舒张末期和收缩末期左心室容积增大、左心室射血分数降低 ① Echocardiography: indicated that the heart was enlarged, or combined with mitral and tricuspid regurgitation and pulmonary hypertension, left ventricular wall motion was weakened, ventricular wall was thinner, left ventricular systolic function was decreased, left ventricular ejection fraction and short axis shortening rate were decreased, or mural thrombosis was present, etc. ② Pathological examination: myocardial histopathological diagnosis suggests myocardial injury, inflammatory cell infiltration, cardiomyocyte hypertrophy, deformation, interstitial fibrosis, etc. ③ Others: (1) Cardiac magnetic resonance: indicated left ventricular cavity enlargement, ventricular wall thinning, and reduced motor function with interventricular septal strengthening. (2) Chest X-ray examination: indicating enlargement of the heart shadow, cardiothoracic ratio > 0.5. (3) Electrocardiogram: indicates arrhythmia (premature contraction, atrial fibrillation, conduction block and ventricular tachycardia, etc.), or ST-T changes, low voltage, poor R-wave increase, and a few pathological Q waves. (4) Cardiac radionuclide scanning: nuclide blood pool scanning showed increased left ventricular volume and decreased left ventricular ejection fraction in end-diastolic and end-systolic periods
	直接相关指标 Directly related indicators	①遗传标记物;②免疫标记物;③心肌酶谱、炎症因子 ①Genetic marker. ②Immune marker. ③Myocardial enzyme profile, inflammatory factors
	间接相关指标 Indirectly related indicators	①症状:疲劳、乏力、心悸、活动时呼吸困难、活动耐力下降,夜间阵发性呼吸困难、端坐呼吸,食欲下降、水肿等;②体征:心界向左下及双侧扩大,第一心音低钝,可闻及第三心音或第四心音奔马律,或双肺底湿啰音、颈静脉怒张、腹水、肝大等 ① Symptoms: fatigue, weakness, palpitations, dyspnea during activity, decreased activity tolerance, paroxysmal dyspnea at night, upright breathing, decreased appetite, edema, etc. ② Signs: the heart boundary is enlarged to the left lower and bilateral, the first heart sound is low and blunt, and the third or fourth heart sound can be heard, or the wet rales of the bottom of the lungs, the jugular vein irritation, ascites, liver enlargement, etc

表 3 药物诱导、免疫诱导、病毒感染与快速起搏诱导 DCM 动物模型与中西医临床病证吻合度

Table 3 Animal models of DCM induced by drugs, immunity, viral infection and rapid-pacing and the consistency with clinical diseases of traditional Chinese and Western medicine

模型方式 Moulding methods	实验动物 Animal species	造模方法 Specific methods	造模周期 Molding cycle	临床病证吻合度 Clinical disease coincidence
阿霉素诱导 Doxorubicin induced	Wistar 大鼠 Wistar rat	腹腔注射浓度 1 mg/mL 阿霉素溶液 2.5 mg/kg, 1 次/周, 累积剂量 15 mg/kg ^[37] Rats were injected intraperitoneally with a Dox solution at a concentration of 1 mg/mL at one week 2.5 mg/kg for a total dose of 15 mg/kg ^[37]	6 周 6 weeks	符合西医核心指标①②和间接相关指标①, 吻合度 45%; 符合中医主症①②, 吻合度 30% In line with the core indicators ①②, indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 45%; In line with the primary symptoms ①② of TCM, the coincidence rate was 30%
	SD 大鼠 SD rat	腹腔注射阿霉素溶液 1 mg/kg, 2 次/周 ^[38] Rats were injected intraperitoneally with Dox solution twice a week at 1 mg/kg ^[38]	6 周 6 weeks	符合西医核心指标①②③, 直接相关指标①③和间接相 关指标①②, 吻合度 90%; 符合中医主症①②④和次症 ①②③, 吻合度 75% In line with the core indicators ①②③, directly related indicators ①③ and indirectly related indicators ①② of Western medicine, the coincidence rate was 90%; In line with the primary symptoms ①②④ and secondary symptoms ①②③ of TCM, the coincidence rate was 75%
	BALB/c 小鼠 BALB/c mice	腹腔注射阿霉素溶液, 3 次/周, 累积剂量 15 mg/kg ^[39] Mice were injected intraperitoneally with Dox solution three times a week for a total dose of 15 mg/kg ^[39]	2 周 2 weeks	符合西医核心指标①②, 直接相关指标③和间接相关指 标①, 吻合度 55%; 符合中医主症①②, 吻合度 30% In line with the core indicators ①②, directly related indicators ③ and indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 55%; In line with the primary symptoms ①② of TCM, the coincidence rate was 30%
	C57BL/6J 小鼠 C57BL/6J mice	尾静脉注射浓度 1 mg/mL 阿霉素溶液 5 mg/kg, 1 次/周, 累积剂量 15 mg/kg ^[40] Mice were injected in the tail vein with a Dox solution at a concentration of 1 mg/mL once a week for a total dose of 15 mg/kg ^[40]	3 周 3 weeks	符合西医核心指标①②, 直接相关指标①③和间接相关 指标①, 吻合度 65%; 符合中医主症①②, 吻合度 30% In line with the core indicators ①②, directly related indicators ①③ and indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 65%; In line with the primary symptoms ①② of TCM, the coincidence rate was 30%
	新西兰兔 New Zealand rabbit	耳缘静脉注射浓度 1 mg/mL 阿霉素溶液 1 mg/kg, 2 次/周 ^[41] New Zealand rabbits were injected intravenously at the ear margin with Dox solution at a concentration of 1 mg/mL twice a week at 1 mg/kg ^[41]	8 周 8 weeks	符合西医核心指标①②, 直接相关指标①③和间接相关 指标①②, 吻合度 70%; 符合中医主症①②③④和次症 ①③, 吻合度 80% In line with the core indicators ①②, directly related indicators ①③ and indirectly related indicators ①② of Western medicine, the coincidence rate was 70%; In line with the primary symptoms ①②③④ and secondary symptoms ①③ of TCM, the coincidence rate was 80%
	比格犬 Beagle	左主干注射阿霉素溶液 0.7 mg/kg, 1 次/周 ^[42] Beagles were injected weekly into the left main coronary artery with Dox solution at 0.7 mg/kg ^[42]	5 周 5 weeks	符合西医核心指标①②, 直接相关指标③和间接相关指 标①, 吻合度 55%; 符合中医主症①②, 吻合度 30% In line with the core indicators ①②, directly related indicators ③ and indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 55%; In line with the primary symptoms ①② of TCM, the coincidence rate was 30%
柔红霉素 诱导 Daunorubicin induced	新西兰兔 New Zealand rabbit	耳缘静脉注射浓度 4 mg/mL 柔红霉素, 每 周 4 mg/kg ^[43] Daunorubicin at a concentration of 4 mg/mL was administered intravenously at the ear margin at 4 mg/kg per week ^[43]	6 周 6 weeks	符合西医核心指标②和间接相关指标①, 吻合度 25%; 符合中医主症符合中医主症①②, 吻合度 30% In line with the core indicators ②, indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 25%; In line with the primary symptoms ①② of TCM, the coincidence rate was 30%
呋喃唑酮 诱导 Furazolidone induced	Wistar 大鼠 Wistar rat	自主饮用 70% 呋喃唑酮水溶液 ^[44] Self-administered 70% furazolidone aqueous solution ^[44]	10 周 10 weeks	符合西医核心指标①②, 直接相关指标①和间接相关指 标①, 吻合度 55%; 符合中医主症①②, 吻合度 30% In line with the core indicators ①②, directly related indicators ① and indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 55%; In line with the primary symptoms ①② of TCM, the coincidence rate was 30%

续表 3

模型方式 Moulding methods	实验动物 Animal species	造模方法 Specific methods	造模周期 Molding cycle	临床病证吻合度 Clinical disease coincidence
免疫诱导 Immunological induced	SD 大鼠 SD rat	自主饮用 70%呋喃唑酮水溶液 ^[45] Self-administered 70% furazolidone aqueous solution ^[45]	10 周 10 weeks	符合西医核心指标①②,直接相关指标③和间接相关指标①,吻合度 55%;符合中医主症①②,吻合度 30% In line with the core indicators ① ②, directly related indicators ③ and indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 55%; In line with the primary symptoms ① ② of TCM, the coincidence rate was 30%
	BALB/c 小鼠 BALB/c mice	第 0 天和第 7 天皮下注射浓度 2 mg/mL 猪心肌肌球蛋白乳化液,累积剂量 0.2 mg ^[46] Mice were subcutaneously injected with porcine myocardial myocardin emulsion at a concentration of 2 mg/mL at day 0 and day 7 for a total dose of 0.2 mg ^[46]	8 周 8 weeks	符合西医核心指标①②和间接相关指标①,吻合度 45%;符合中医主症①②,吻合度 30% In line with the core indicators ① ②, indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 45%; In line with the primary symptoms ① ② of TCM, the coincidence rate was 30%
	Lewis 大鼠 Lewis rat	第 0 天和第 7 天皮下注射浓度 5 mg/mL 猪心肌肌球蛋白乳化液 ^[47] Rats were subcutaneously injected with porcine myocardial myocardin emulsion at a concentration of 5 mg/mL at day 0 and day 7 ^[47]	4 周 4 weeks	符合西医核心指标①②,直接相关指标①和间接相关指标①,吻合度 55%;符合中医主症①②,吻合度 30% In line with the core indicators ① ②, directly related indicators ① and indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 90%; In line with the primary symptoms ① ② of TCM, the coincidence rate was 30%
	BALB/c 小鼠 BALB/c mice	腹腔注射柯萨奇病毒 B3 型(CVB3),每月每次 100 L ^[48] Intraperitoneal injection of CVB3 at 100 L per month ^[48]	24 周 24 weeks	符合西医核心指标②,直接相关指标①和间接相关指标①,吻合度 35%;符合中医主症①②,吻合度 30% In line with the core indicators ②, directly related indicators ① and indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 35%; In line with the primary symptoms ① ② of TCM, the coincidence rate was 30%
病毒感染 Viral infections	杂种犬 Canine	希氏束消融制备Ⅲ度房室传导阻滞模型后植入永久起搏器,快速心室起搏,起搏频率每分钟 250 次 ^[49] After the complete atrioventricular block model was prepared by radio frequency catheter ablation to His bundle, a permanent pacemaker was implanted and rapid ventricular pacing was performed at a pacing rate of 250 bpm ^[49]	3 周 3 weeks	符合西医核心指标①②和间接相关指标①②,吻合度 50%;符合中医主症①②④和次症①②③,吻合度 75% In line with the core indicators ① ②, indirectly related indicators ①② of Western medicine, the coincidence rate was 50%; In line with the primary symptoms ①②④ and secondary symptoms ①②③ of TCM, the coincidence rate was 75%
快速起搏诱导 Rapid pacing induced	约克夏猪 Yorkshire pig	快速心房起搏,起搏频率每分钟 240 次 ^[50] Rapid atrial pacing was performed at a pacing rate of 240 bpm ^[50]	3 周 3 weeks	符合西医核心指标①和间接相关指标①,吻合度 25%;符合中医主症①②,吻合度 30% In line with the core indicators ①, indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 25%; In line with the primary symptoms ①② of TCM, the coincidence rate was 25%
	绵羊 Sheep	快速心室起搏,起搏频率每分钟 230 次 ^[51] Rapid ventricular pacing was performed at a pacing rate of 230 bpm ^[51]	(2 ± 1) 周 (2 ± 1) weeks	符合西医核心指标①②和间接相关指标①,吻合度 45%;符合中医主症①②,吻合度 30% In line with the core indicators ① ②, indirectly related indicators ① of Western medicine, the coincidence rate was 45%; In line with the primary symptoms ①② of TCM, the coincidence rate was 30%

4 讨论

现代医学对 DCM 的治疗研究取得了一定成果,目前治疗原则主要包括改善心肌损害、控制心衰和心律失常、预防猝死和栓塞以及提高患者生活质量

及生存率等^[24]。虽 DCM 发病率较低,但由于 DCM 病因复杂多样,机制尚未被完全阐明,现有干预措施对患者的预后改善有限,10 年存活率甚至不足 25%,给患者的生活和经济带来严峻考验^[52]。因此,探索 DCM 的内在机制和潜在治疗靶点是亟需解

决的重点问题。动物模型在疾病发病机制解析、预防、药物筛选与治疗评价、诊断标志物的发现等方面有巨大贡献,是生物医学的基础和重要组成部分^[11]。模型临床吻合度是评估模型与临床模拟效果一致性的重要方法,对确立成熟、理想的 DCM 动物模型,以及对未来 DCM 的深入研究具有重要意义。

本研究通过梳理文献,依据动物模型评价新方法^[11],总结现有 DCM 动物模型构建特征,并评价模型中西医临床吻合度。研究结果表明,啮齿类动物是构建 DCM 模型最主要的实验动物,以小鼠和大鼠最为常见。文献显示^[36],小鼠与人的基因同源性高达 90%,具有环境适应性强、饲养成本低、繁殖周期短、可遗传操纵等诸多优势,是人类心血管研究中应用最为普遍的动物模型,其中最常见的小鼠品种是 C57BL/6J 小鼠和 BALB/c 小鼠,均属遗传背景稳定的近交系小鼠;大鼠作为疾病动物模型在人类心血管研究中的应用仅次于小鼠,目前 Wistar 大鼠、SD 大鼠、Lewis 大鼠等品种已被成功用于构建 DCM 模型。斑马鱼模型也被广泛应用于人类心脏研究。斑马鱼基因组包含大量 DCM 变异体的同源基因,与人类基因同源性高,且主要细胞类型和信号通路高度保守,具有饲养成本低、发育周期短、繁殖能力强等优势。果蝇的遗传背景简单、基因编辑技术成熟、具有开放的循环系统,在 DCM 研究中具有独特优势。此外,兔、犬、羊、猴和猪等中、大型动物亦可用于 DCM 等心血管疾病的研究,其电生理状态、解剖结构与人类更为接近。然而,由于存在成本高、技术复杂、操作难度大、重复性较差等局限性,中、大型动物在 DCM 的研究中应用相对较少。

DCM 造模方法主要包括基因编辑、药物诱导、免疫诱导、病毒感染、快速起搏诱导等。其中,基因编辑是最常用的 DCM 造模方法,因其在 DCM 病因、发病机制、疾病发展等进程中与人 DCM 相似,故能够构建出较为理想的 DCM 动物模型。基因编辑涉及的修复途径主要为 CRISPR-Cas9 系统、Cre-LoxP 重组酶系统及 TALEN 核酸酶系统,实验动物主要包括小鼠、大鼠、斑马鱼、果蝇、猪等^[36],目前已构建 *LMNA*^[53]、*NEXN*^[54]、*TBX5*^[55] 基因敲入小鼠模型, *SORBS2*^[56]、*JARID2*^[57]、*FLNC*^[58]、*BAG3*^[59]、*NEXN*^[60]、*SRF*^[61]、*ORAI1*^[62]、*ORAI3*^[63]、*CAP2*^[64]、*NMRK2*^[65] 基因敲除小鼠模型, *BAG3*^[66]、*FLNC*^[67] 基因敲低和 *NEXN* 基因敲除^[68] 斑马鱼模型, *STIM* 和

ORAI 基因敲低果蝇模型^[69] 以及 *RBM20* 基因突变猪模型^[70] 等。药物诱导、免疫诱导与病毒感染动物模型实验动物以小鼠和大鼠为主,快速起搏诱导法多适于犬、猪和羊等大型动物。研究结果显示,以阿霉素诱导制备 DCM 动物模型最为常见,造模周期 2 ~ 8 周,此模型成本低、操作简单、稳定性强、成模率高、重复性强,其中以 SD 大鼠 DCM 动物模型的中西医临床吻合度最高。阿霉素属蒽环类药物,能激活氧化应激,促进心肌细胞凋亡、结缔组织增生,导致心肌纤维化,具有不可逆的心脏毒性^[71-73]。阿霉素诱导的心脏毒性主要分为急、慢性 2 种,单次、大剂量阿霉素用于建立急性心脏毒性模型,虽成模周期短,但动物死亡率相对高^[74];慢性心脏毒性模型建立则是通过小剂量、重复多次给药直至累积剂量,具有成模率高、稳定性好、重复性强等优势^[75]。同时,研究表明,阿霉素具有多器官毒性,不同累积量会导致成模率和死亡率有较大差异,阿霉素低于 10 mg/kg 时不易成模,超过 20 mg/kg 则死亡率显著升高,实验剂量需进行严格把控^[76]。尾静脉注射方式可有效避免腹腔黏连、腹膜炎、血性腹水等后果,且药物吸收率高,相比腹腔注射能更好地模拟临床给药方式。此外,呋喃唑酮可抑制儿茶酚胺清除,显著升高交感活性,导致心肌细胞极度兴奋、变性、坏死,具有强烈的心脏毒性;免疫诱导则是通过外源性抗原诱发自身免疫反应,介导心肌损伤;萨奇病毒 B3 型反复感染能够诱发代谢紊乱、炎症反应和免疫反应,进而造成心肌损伤;快速起搏诱导是通过持续性心动过速导致心肌细胞收缩功能和储备能力降低、心肌血流减少、超微结构破坏及心肌细胞凋亡,最终致使心脏重构^[1,36]。

DCM 中医辨证分型标准尚未确立,本研究通过文献总结得到心肺气虚证、气阴两亏证、心肾阳虚证、气虚血瘀证、阳虚水泛证、痰饮阻肺证、阴竭阳脱证 7 种证型,依据动物模型评价新方法^[11],提取主症和次症,评价模型中医临床吻合度。中医吻合度较高的模型有阿霉素诱导新西兰兔模型、快速起搏诱导杂种犬模型、阿霉素诱导 SD 大鼠模型;西医吻合度较高的造模方法有阿霉素诱导 SD 大鼠、阿霉素诱导新西兰兔、阿霉素诱导 BALB/c 小鼠、阿霉素诱导比格犬、呋喃唑酮诱导 SD 大鼠、免疫诱导 Lewis 大鼠等。然而,DCM 动物模型与中医诊断标准吻合度整体水平偏低,溯源发现,目前同一类型 DCM 动物模型所选实验动物、实验用药及其单次或

累积剂量、给药方式、造模周期等均有差异,尚无统一规范,一定程度上影响了各类模型临床吻合度的一致性。目前,DCM 动物模型成模标准多以西医理论为基础,而中医证候模型辨证标准及四诊信息采集标准尚未规范统一,不同文献记录的表征信息缺乏中医特色及特异性,导致 DCM 动物模型中西医临床吻合度水平参差不齐,同一模型中医临床吻合度普遍较低。

综上,DCM 造模方法主要包括基因编辑、药物诱导、免疫诱导、病毒感染、快速起搏诱导等,实验动物以小鼠和大鼠为主。基因编辑是最常用的 DCM 造模方法,其次是阿霉素诱导造模。值得注意的是,同种 DCM 动物模型造模方法未达统一,中西医临床吻合度水平参差不齐,中医临床吻合度整体偏低,提示造模过程中在注重西医病理机制和临床特征的同时,应兼顾中医病因病机、中医表观特征观察以及证候相关理化指标等,加强疾病与证候的关联性,优化造模因素和统一操作流程,建立更完善的符合中西医临床特点的 DCM 病证结合模型,规范动物模型评价体系,促进科学探索疾病病理机制和有效拓展治疗策略。

参 考 文 献(References)

[1] WEINTRAUB R G, SEMSARIAN C, MACDONALD P. Dilated cardiomyopathy [J]. Lancet, 2017, 390(10092): 400-414.

[2] BROWNRIGG J R, LEO V, ROSE J, et al. Epidemiology of cardiomyopathies and incident heart failure in a population-based cohort study [J]. Heart, 2022, 108(17): 1383-1391.

[3] MARON B J, TOWBIN J A, THIENE G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American heart association scientific statement from the council on clinical cardiology, heart failure and transplantation committee; quality of care and outcomes research and functional genomics and translational biology interdisciplinary working groups; and council on epidemiology and prevention [J]. Circulation, 2006, 113(14): 1807-1816.

[4] KOMAJDA M, JAIS J P, REEVES F, et al. Factors predicting mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. Eur Heart J, 1990, 11(9): 824-831.

[5] 谭元生, 邓圣明. 扩张型心肌病治疗思路探讨 [J]. 中医杂志, 2003, 44(10): 784-785.

TAN Y S, DENG S M. Discussion on the treatment of dilated cardiomyopathy [J]. J Tradit Chin Med, 2003, 44(10): 784-785.

[6] 许振亚, 徐振荣. 扩张型心肌病辨治经验 [J]. 中医杂志, 1998, 8: 464-465.

XU Z Y, XU Z R. Experience in the differentiation and treatment of dilated cardiomyopathy [J]. J Tradit Chin Med, 1998, 8:

464-465.

[7] 杨阳, 金明磊, 宋灵燕, 等. 芪苈强心胶囊治疗扩张型心肌病的抗心室重构作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 99-104.

YANG Y, JIN M L, SONG L Y, et al. Effect research antivenricular remodeling of Qili Qiangxin capsules in treating dilated cardiomyopathy [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(13): 99-104.

[8] 卢磊, 夏伟, 徐重白, 等. 心衰合剂联合西药治疗扩张型心肌病伴心力衰竭患者 43 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2015, 56(13): 1124-1127.

LU L, XIA W, XU C B, et al. Clinical observation on Xinshuai Heji combined with western medicine for 43 dilated cardiomyopathy patients with heart failure [J]. J Tradit Chin Med, 2015, 56(13): 1124-1127.

[9] 马宾, 牛小麟, 王明霞, 等. 参麦注射液对扩张型心肌病患者免疫功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(4): 320-323.

MA B, NIU X L, WANG M X, et al. Effect of Shenmai injection on immunologic function in patients with dilated cardiomyopathy [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2005, 25(4): 320-323.

[10] RECCHIA F A, LIONETTI V. Animal models of dilated cardiomyopathy for translational research [J]. Vet Res Commun, 2007, 31(1): 35-41.

[11] 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.

[12] 张南峭, 封银曼. 黄帝内经灵枢 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社; 2022.

ZHANG N Q, FENG Y M. The inner canon of the yellow emperor: miraculous pivot [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press; 2022.

[13] 徐成贺. 金匱要略 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社; 2019.

XU C H. The essentials from the golden cabinet [M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press; 2019.

[14] 张南峭, 封银曼. 黄帝内经素问 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社; 2022.

ZHANG N Q, FENG Y M. The inner canon of the yellow emperor: plain questions [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press; 2022.

[15] 尚雨, 赵明君, 李舒钰, 等. 中医药治疗扩张型心肌病述评 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(7): 1205-1207, 1223.

SHANG Y, ZHAO M J, LI S Y, et al. Review on the treatment of dilated cardiomyopathy with traditional Chinese medicine [J]. J Basic Chin Med, 2023, 29(7): 1205-1207, 1223.

[16] 柳强, 薛雪, 张晓星. 张晓星论治扩张型心肌病经验 [J].

- 中医杂志, 2019, 60(3): 199–201.
- LIU Q, XUE X, ZHANG X X. ZHANG xiaoxing's experience in treating dilated cardiomyopathy [J]. J Tradit Chin Med, 2019, 60(3): 199–201.
- [17] 钱真真, 张苑桐, 杨巧宁, 等. 基于验案探讨翁维良辨治扩张型心脏病心力衰竭经验 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(1): 224–229.
- QIAN Z Z, ZHANG W T, YANG Q N, et al. Exploring Weng Weiliang's experience in the treatment of heart failure in dilated cardiomyopathy based on an effective case [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2020, 22(1): 224–229.
- [18] CHEN S N, MESTRONI L, TAYLOR M R G. Genetics of dilated cardiomyopathy [J]. Curr Opin Cardiol, 2021, 36(3): 288–294.
- [19] FURQUIM S R, LINNENKAMP B, OLIVETTI N Q S, et al. Challenges and applications of genetic testing in dilated cardiomyopathy: genotype, phenotype and clinical implications [J]. Arq Bras Cardiol, 2023, 120(10): e20230174.
- [20] MICHELS V V, MOLL P P, MILLER F A, et al. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. N Engl J Med, 1992, 326(2): 77–82.
- [21] GRÜNIC E, TASMAN J A, KÜCHERER H, et al. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy [J]. J Am Coll Cardiol, 1998, 31(1): 186–194.
- [22] TAYLOR M R, CARNIEL E, MESTRONI L. Cardiomyopathy, familial dilated [J]. Orphanet J Rare Dis, 2006, 1: 27.
- [23] PÉREZ-SERRA A, TORO R, SARQUELLA-BRUGADA G, et al. Genetic basis of dilated cardiomyopathy [J]. Int J Cardiol, 2016, 224: 461–472.
- [24] 中华医学会心血管病学分会, 中国心肌炎心肌病协作组. 中国扩张型心肌病诊断和治疗指南 [J]. 临床心血管病杂志, 2018, 34(5): 421–434.
- Chinese Society of Cardiology, Chinese Myocarditis Cardiomyopathy Collaboration Group. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of dilated cardiomyopathy [J]. J Clin Cardiol, 2018, 34(5): 421–434.
- [25] TOWBIN J A, LOWE A M, COLAN S D, et al. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children [J]. JAMA, 2006, 296(15): 1867–1876.
- [26] HSU D T, CANTER C E. Dilated cardiomyopathy and heart failure in children [J]. Heart Fail Clin, 2010, 6(4): 415–432.
- [27] PEARSON G D, VEILLE J C, RAHIMTOOLA S, et al. Peripartum cardiomyopathy: national heart, lung, and blood institute and office of rare diseases (national institutes of health) workshop recommendations and review [J]. JAMA, 2000, 283(9): 1183–1188.
- [28] HILFIKER-KLEINER D, SLIWA K, DREXLER H. Peripartum cardiomyopathy: recent insights in its pathophysiology [J]. Trends Cardiovasc Med, 2008, 18(5): 173–179.
- [29] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则: 试行 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2002.
- ZHENG X Y. Guiding principles for clinical research of new traditional Chinese medicine: trial implementation [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2002.
- [30] 张伯礼, 吴勉华, 林子强. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2019.
- ZHANG B L, WU M H, LIN Z Q. Internal medicine of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine; 2019.
- [31] 国家中医药管理局. 喘病的诊断依据、证候分类、疗效评定——中华人民共和国中医药行业标准《中医内科病证诊断疗效标准》. 非书资料: ZY/T001.1–94 [S]. 1994.
- National Administration of Traditional Chinese Medicine. Diagnostic basis, syndrome classification and efficacy evaluation of asthma-traditional Chinese medicine industry standard of the People's Republic of China 《Criteria of diagnosis and therapeutic effect of internal diseases and syndromes in traditional Chinese medicine》: ISO ZY/T001.1 – 94 [S]. 1994.
- [32] 国家中医药管理局. 胸痹心痛的诊断依据、证候分类、疗效评定——中华人民共和国中医药行业标准《中医内科病证诊断疗效标准》. 非书资料: ZY/T001.1–94 [S]. 1994.
- National Administration of Traditional Chinese Medicine. Diagnostic basis, syndrome classification and efficacy evaluation of chest bi and heartache-traditional Chinese medicine industry standard of the People's Republic of China 《Criteria of diagnosis and therapeutic effect of internal diseases and syndromes in traditional Chinese medicine》: ISO ZY/T001.1 – 94 [S]. 1994.
- [33] 国家中医药管理局. 不寐的诊断依据、证候分类、疗效评定——中华人民共和国中医药行业标准《中医内科病证诊断疗效标准》. 非书资料: ZY/T001.1–94 [S]. 1994.
- National Administration of Traditional Chinese Medicine. Diagnostic basis, syndrome classification and efficacy evaluation of insomnia-traditional Chinese medicine industry standard of the People's Republic of China 《Criteria of diagnosis and therapeutic effect of internal diseases and syndromes in traditional Chinese medicine》: ISO ZY/T001.1 – 94 [S]. 1994.
- [34] 国家中医药管理局. 水肿的诊断依据、证候分类、疗效评定——中华人民共和国中医药行业标准《中医内科病证诊断疗效标准》. 非书资料: ZY/T001.1–94 [S]. 1994.
- National Administration of Traditional Chinese Medicine. Diagnostic basis, syndrome classification and efficacy evaluation of edema-traditional Chinese medicine industry standard of the People's Republic of China 《Criteria of diagnosis and therapeutic effect of internal diseases and syndromes in traditional Chinese medicine》: ISO ZY/T001.1 – 94 [S]. 1994.
- [35] ARBELO E, PROTONOTARIOS A, GIMENO J R, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies [J]. Eur Heart J, 2023, 44(37): 3503–3626.
- [36] 金佳敏, 巩倩, 庄乐南. 扩张型心肌病动物模型及治疗的研

- 究进展 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2024, 50(1): 1-11.
- JIN J M, GONG Q, ZHUANG L N. Advances in animal models and treatment of dilated cardiomyopathy [J]. J Zhejiang Univ (Agric Life Sci), 2024, 50(1): 1-11.
- [37] 吴琼, 董艺丹, 王佑华, 等. 扩心方通过调节 TGF- β 1/Smad2 通路改善扩张型心肌病大鼠心肌纤维化 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(1): 243-251.
- WU Q, DONG Y D, WANG Y H, et al. Improvement effect of Kuoxin recipe on myocardial fibrosis in rats with dilated cardiomyopathy through TGF- β 1/Smad2 pathway [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 24(1): 243-251.
- [38] 孔令晶, 沈丽娟, 陆曙, 等. 参芪养心汤对扩张型心肌病大鼠 Ang II-ROS-HMGB1 通路的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(4): 446-453.
- KONG L J, SHEN L J, LU S, et al. Effects of Shenqi Yangxin Decoction on Ang II-ROS-HMGB1 singal pathways in rats with dilated cardiomyopathy [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2019, 39(4): 446-453.
- [39] XIA Y, CHEN Z, CHEN A, et al. LCZ696 improves cardiac function via alleviating Drp1-mediated mitochondrial dysfunction in mice with doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 108: 138-148.
- [40] 施洋, 侯宝林, 樊官伟, 等. 芪参益气滴丸通过调控 TLR-4/NF- κ B 信号通路对阿霉素所致小鼠心脏毒性的保护作用 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(8): 1689-1696.
- SHI Y, HOU B L, FAN G W, et al. Cardioprotection of Qishen Yiqi Dropping Pills on adriamycin induced cardiotoxicity in mice through TLR-4/NF- κ B signaling pathway [J]. Drugs Clin, 2022, 37(8): 1689-1696.
- [41] 李雅, 魏佳明, 李玉莹, 等. 益心泰有效组分对扩张型心肌病心力衰竭兔心肌组织 CaN, SERCA2a mRNA 及蛋白表达水平的影响研究 [J]. 中国全科医学, 2021, 24(32): 4086-4093.
- LI Y, WEI J M, LI Y Y, et al. Effects of effective components of yixintai on CaN and SERCA2a mRNA and protein expression levels in myocardial tissue of a rabbit model of heart failure due to dilated cardiomyopathy [J]. Chin Gen Pract, 2021, 24(32): 4086-4093.
- [42] 张冬, 朱瑾彦, 张敏, 等. 扩张型心肌病动物模型的建立与评估 [J]. 实验动物科学, 2023, 40(4): 55-61.
- ZHANG D, ZHU J Y, ZHANG M, et al. Establishment and evaluation of an animal model of dilated cardiomyopathy [J]. Lab Anim Sci, 2023, 40(4): 55-61.
- [43] ISAKA M, ARAKI R, UENO H, et al. Intestinal fatty acid-binding protein and osteoprotegerin in anthracycline-induced rabbit models of dilated cardiomyopathy [J]. Res Vet Sci, 2021, 140: 185-189.
- [44] 刘舜禹, 李巧稚, 芮浩森, 等. 抗纤益心方对扩张型心肌病模型大鼠心肌纤维化相关因子及心肌组织 β -catenin/PPAR γ 信号通路的影响 [J]. 中医杂志, 2021, 62(3): 259-265.
- LIU S Y, LI Q Z, RUI H M, et al. Effects of Kangxian Yixin recipe on myocardial fibrosis related factors and β -catenin/PPAR γ signaling pathway in myocardial tissue of dilated cardiomyopathy model rats [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 62(3): 259-265.
- [45] 常红波, 王振涛, 黑炫鼎, 等. 抗纤益心方对扩张型心肌病大鼠心肌能量代谢和解偶联蛋白 2 的影响 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 166-170.
- CHANG H B, WANG Z T, HEI X D, et al. Effects of Kangxian Yixin Decoction on energy metabolism and uncoupling protein 2 in rats with dilated cardiomyopathy [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(3): 166-170.
- [46] JIN B, SHI H, ZHU J, et al. Up-regulating autophagy by targeting the mTOR-4EBP1 pathway: a possible mechanism for improving cardiac function in mice with experimental dilated cardiomyopathy [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2020, 20(1): 56.
- [47] CHEN Q, ZENG Y, YANG X, et al. Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by regulating Sirt1/Smad3 deacetylation pathway in rat model with dilated cardiomyopathy [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2022, 22(1): 17.
- [48] KONG Q, GU J, LU R, et al. NMR-based metabolomic analysis of sera in mouse models of CVB3-induced viral myocarditis and dilated cardiomyopathy [J]. Biomolecules, 2022, 12(1): 112.
- [49] 白融, 吕加高, 卜军, 等. 快速心室起搏制备扩张型心肌病心力衰竭犬模型的方法学探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(3): 159-162.
- BAI R, LYU J G, BU J, et al. Improvement in method of preparing canine model with rapid-pacing induced cardiomyopathic congestive heart failure [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2004, 12(3): 159-162.
- [50] DIXON J A, GOODMAN A M, GAILLARD W F 2nd, et al. Hemodynamics and myocardial blood flow patterns after placement of a cardiac passive restraint device in a model of dilated cardiomyopathy [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 142(5): 1038-1045.
- [51] STEPHENS E H, TIMEK T A, DAUGHTERS G T, et al. Significant changes in mitral valve leaflet matrix composition and turnover with tachycardia-induced cardiomyopathy [J]. Circulation, 2009, 120(11): S112-S119.
- [52] 葛均波, 徐永健. 内科学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社; 2013.
- GE J B, XU Y J. Internal medicine [M]. 8th edition. Beijing: People's Medical Publishing House; 2013.
- [53] YANG L, SUN J, CHEN Z, et al. The LMNA p. R541C mutation causes dilated cardiomyopathy in human and mice [J]. Int J Cardiol, 2022, 363: 149-158.
- [54] LIU C, SPINOZZI S, FENG W, et al. Homozygous G650del nexilin variant causes cardiomyopathy in mice [J]. JCI Insight, 2020, 5(16): e138780.
- [55] MIYAO N, HATA Y, IZUMI H, et al. TBX5 R264K acts as a modifier to develop dilated cardiomyopathy in mice independently

- of T-box pathway [J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0227393.
- [56] MCLENDON J M, ZHANG X, MATASIC D S, et al. Knockout of sorbin and SH3 domain containing 2 (Sorbs2) in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy in mice [J]. J Am Heart Assoc, 2022, 11(13): e025687.
- [57] CHO E, KANG H, KANG D K, et al. Myocardial-specific ablation of *Jumonji and AT-rich interaction domain-containing 2* (*Jarid2*) leads to dilated cardiomyopathy in mice [J]. J Biol Chem, 2019, 294(13): 4981–4996.
- [58] POWERS J D, KIRKLAND N J, LIU C, et al. Subcellular remodeling in filamin C deficient mouse hearts impairs myocyte tension development during progression of dilated cardiomyopathy [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(2): 871.
- [59] FANG X, BOGOMOLOVAS J, WU T, et al. Loss-of-function mutations in co-chaperone BAG3 destabilize small HSPs and cause cardiomyopathy [J]. J Clin Invest, 2017, 127(8): 3189–3200.
- [60] AHERRAHOU Z, SCHLOSSAREK S, STOELTING S, et al. Knock-out of nexilin in mice leads to dilated cardiomyopathy and endomyocardial fibroelastosis [J]. Basic Res Cardiol, 2016, 111(1): 6.
- [61] ANGELINI A, GOREY M A, DUMONT F, et al. Cardioprotective effects of α -cardiac actin on oxidative stress in a dilated cardiomyopathy mouse model [J]. FASEB J, 2020, 34(2): 2987–3005.
- [62] HORTON J S, BUCKLEY C L, ALVAREZ E M, et al. The calcium release-activated calcium channel Orai1 represents a crucial component in hypertrophic compensation and the development of dilated cardiomyopathy [J]. Channels, 2014, 8(1): 35–48.
- [63] GAMMONS J, TREBAK M, MANCARELLA S. Cardiac-specific deletion of Orai3 leads to severe dilated cardiomyopathy and heart failure in mice [J]. J Am Heart Assoc, 2021, 10(8): e019486.
- [64] PECHE V S, HOLAK T A, BURGUTE B D, et al. Ablation of cyclase-associated protein 2 (CAP2) leads to cardiomyopathy [J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(3): 527–543.
- [65] TANNOUS C, DELOUX R, KAROUI A, et al. *NMRK2* gene is upregulated in dilated cardiomyopathy and required for cardiac function and NAD levels during aging [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3534.
- [66] NORTON N, LI D, RIEDER M J, et al. Genome-wide studies of copy number variation and exome sequencing identify rare variants in BAG3 as a cause of dilated cardiomyopathy [J]. Am J Hum Genet, 2011, 88(3): 273–282.
- [67] BEGAY R L, THARP C A, MARTIN A, et al. *FLNC* gene splice mutations cause dilated cardiomyopathy [J]. JACC Basic Transl Sci, 2016, 1(5): 344–359.
- [68] HOFEICHNER J, GAHR B M, HUBER M, et al. CRISPR/Cas9-mediated nexilin deficiency interferes with cardiac contractile function in zebrafish *in vivo* [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 22679.
- [69] PETERSEN C E, WOLF M J, SMYTH J T. Suppression of store-operated calcium entry causes dilated cardiomyopathy of the *Drosophila* heart [J]. Biol Open, 2020, 9(3): bio049999.
- [70] SCHNEIDER J W, OOMMEN S, QURESHI M Y, et al. Dysregulated ribonucleoprotein granules promote cardiomyopathy in *RBM20* gene-edited pigs [J]. Nat Med, 2020, 26(11): 1788–1800.
- [71] CHANDY M, CONKLIN D J. Recent advances in the cardiotoxicity of anti-cancer drugs: Navigating the landscape of anthracycline-induced cardiotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2024, 482: 116791.
- [72] SUN Y, GUO D, YUE S, et al. Afzelin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by promoting the AMPK α /SIRT1 signaling pathway [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2023, 477: 116687.
- [73] ZHANG H, WENG J, SUN S, et al. Ononin alleviates endoplasmic reticulum stress in doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating SIRT3 [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2022, 452: 116179.
- [74] ZHOU D P, DENG L C, FENG X, et al. FGF10 mitigates doxorubicin-induced myocardial toxicity in mice via activation of FGFR2b/PHLDA1/AKT axis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(10): 2004–2018.
- [75] PANG X, GUAN Q, LIN X, et al. Knockdown of HDAC6 alleviates ventricular remodeling in experimental dilated cardiomyopathy via inhibition of NLRP3 inflammasome activation and promotion of cardiomyocyte autophagy [J]. Cell Biol Toxicol, 2023, 39(5): 2365–2379.
- [76] TERAOKA K, HIRANO M, YAMAGUCHI K, et al. Progressive cardiac dysfunction in adriamycin-induced cardiomyopathy rats [J]. Eur J Heart Fail, 2000, 2(4): 373–378.

[收稿日期] 2024-01-23

赖琴,郭雪,王梅英. 系统性红斑狼疮动物模型及研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1493–1504.

LAI Q, GUO X, WANG M Y. Study on animal models of systemic lupus erythematosus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1493–1504.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.014

系统性红斑狼疮动物模型及研究进展

赖琴^{1,3,4}, 郭雪^{2,3}, 王梅英^{1,3*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530000; 2. 深圳大学, 深圳 518000; 3. 深圳大学第一附属医院风湿免疫科, 深圳 518000; 4. 松山湖材料实验室, 东莞 523808)

【摘要】 系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 动物模型主要分为自发性、诱导性、人源化和基因敲除模型 4 类, 狼疮动物模型对于研究 SLE 的病因、发病机制和治疗具有重要意义。本文通过对各种狼疮动物模型进行评述和比较, 阐明不同类型 SLE 模型的主要特征和优缺点, 为研究者在探索 SLE 的机制和治疗过程中选择合适的模型提供参考。

【关键词】 系统性红斑狼疮; 动物模型; 自身抗体; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1493-12

Study on animal models of systemic lupus erythematosus

LAI Qin^{1,3,4}, GUO Xue^{2,3}, WANG Meiyang^{1,3*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China; 2. Shenzhen University, Shenzhen 518000, China; 3. Department of Rheumatology and Immunology, the First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518000, China; 4. Songshan Lake Materials Laboratory, Dongguan 523808, China)
Corresponding author: WANG Meiyang. E-mail: wmy99wmy99@163.com

【Abstract】 Systemic lupus erythematosus (SLE) models are divided into four major categories: spontaneous, induced, humanized and gene knockout models. Lupus animal models are of great significance for studying the etiology, pathogenesis, and treatment of SLE. By reviewing and comparing various lupus animal models, we aim to elucidate the main features, advantages, and disadvantages of different types of SLE models. This review provides a reference for researchers aiming to select appropriate models for the exploring genetic and environmental factors, pathogenic mechanisms, and therapeutic modalities of SLE.

【Keywords】 systemic lupus erythematosus; animal model; autoantibodies; mouse

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

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种累及多个器官的慢性系统免疫性疾病, 其特征是免疫系统过度激活, 导致致病性自身抗体

产生及免疫复合物形成和沉积, 最终导致多器官损伤和慢性炎症, 甚至死亡^[1-2]。SLE 的发病机制很复杂, 涉及先天免疫和适应性免疫失调、I 型干扰

【基金项目】 深圳市科技计划项目 (JCYJ20200109140412476, JCYJ20190809095811254, GCZX2015043017281705), 深圳市高水平医院建设基金 (2024), 深圳市临床研究项目 (20213357002, 20213357028), 深圳市第二人民医院 (深圳大学第一附属医院) “有组织医学科学研究基金” (2024YZZ06)。

Funded by the Shenzhen Science and Technology Program (JCYJ20200109140412476, JCYJ20190809095811254, GCZX2015043017281705), Shenzhen High-Level Hospital Construction Fund (2024), the Clinical Research Project in Shenzhen (20213357002, 20213357028), Shenzhen Second People's Hospital (First Affiliated Hospital of Shenzhen University) Team-Based Medical Science Research Program (2024YZZ06)。

【作者简介】 赖琴, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 风湿免疫学。Email: 1040753873@qq.com

【通信作者】 王梅英, 女, 主任医师, 博士, 研究方向: 系统性红斑狼疮与免疫生殖。Email: wmy99wmy99@163.com

素 (type I interferon β , IFN-I) 异常升高、凋亡细胞清除缺陷、线粒体 DNA 损伤等^[3-4]。SLE 临床特征复杂性表明存在多个 SLE 亚群, 具有疾病通路、基因、环境因素、感染和其他免疫调节因素的潜在独特组合^[2,5]。近几十年来, SLE 小鼠模型的研究, 为阐明 SLE 的发病机制和病因做出了巨大贡献。在这些模型中, 可以观察到与 SLE 患者相似的疾病表型, 包括 T 细胞和 B 细胞免疫反应失衡, 多种自身抗体的产生和大量的促炎细胞因子, 以及对多个器官的损害, 但是目前尚无单一的 SLE 小鼠模型可以完美地概括人类 SLE 疾病。因此, 本文通过总结不同狼疮小鼠模型之间的几个关键差异, 强调了一些特征。这些特征可帮助研究人员根据所提出的科学问题选用合适的模型。例如, 最新的人源组织异体移植狼疮小鼠 (简称人源化狼疮小鼠) 模型有利于研究临床相关机制并促进体内人类特异性疗法的发展, 还可以提高转化医学研究 (如新药发现等) 的成功率等。此外, 研究人员还可通过比较常用的狼疮动物模型与人类疾病的主要临床特征, 评估某类药物在 SLE 小鼠模型中的作用是否适用于人类狼疮。

1 自发性狼疮动物模型

自发性狼疮动物模型是指实验动物未经任何有意识的人工处置, 在自然情况下发生的狼疮, 其优点是其疾病发生、发展和某些临床症状与人类相似。这类小鼠遗传背景清楚, 有良好的遗传稳定性, 适合于各类基础和临床研究, 但基因表型和发病机制与人 SLE 患者也有所区别。表 1 总结了自发性狼疮动物模型的发病机制、主要特点、模型应用、治疗靶点机制及局限性。

1.1 NZB x NZW F1 小鼠

NZB x NZW F1 小鼠是新西兰黑鼠 (New Zealand black mouse, NZB) 与新西兰白鼠 (New Zealand white mouse, NZW) 品系杂交产生的最古老的狼疮经典模型, 具有明显自身免疫性疾病特征, 类似人的 SLE, 被认为是人类自身免疫病的最佳天然模型动物, 自 20 世纪 60 年代初以来, 已经被广泛用作自身免疫性疾病的研究, 此模型只用 F1 代^[13]。其发病机制是主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 介导的抑制性 T 细

表 1 自发性狼疮动物模型特点及应用

模型 Model	发现时间 Discovery time	发病机制 Mechanisms	主要表现 Main outcome	应用 Application	靶点机制 Treatment mechanisms	局限 Limitations
NZB/NZW F1 小鼠 NZB/NZW F1 mice	1966 年 1966 year	遗传易感性; MHC 介导抑制性 T 细胞功能减退或丧失 Legacy susceptibility; MHC-mediated suppressive T-cell hypoplasia or loss of function	蛋白尿 $\uparrow$ 、免疫复合物沉积在肾小球和 ANA 及抗 ds-DNA 抗体 $\uparrow$ Proteinuria $\uparrow$, immune complexes deposited in glomeruli, ANA and anti-dsDNA $\uparrow$	适用于探索肾炎及血管炎的研究、雌激素在 SLE 中机制以及狼疮易感基因分析 Suitable for exploring nephritis and vasculitis research, oestrogen mechanisms in SLE and lupus susceptibility gene analysis	pCons 肽疗法, 肽诱导的免疫耐受下调了 B 细胞的活化、IFN 和 Bcl2 表达 ^[6] pCons peptide therapy, peptide-induced immune tolerance downregulates B cell activation, IFN and Bcl2 expression ^[6]	疾病发展缓慢, 需要两种鼠株的杂交才能产生狼疮易感小鼠 Disease develops slowly and requires crossing of two mouse strains to produce lupus-susceptible mice
MRL/lpr 小鼠 MRL/ lpr mice	1978 年 1978 year	Fas 介导的细胞凋亡缺陷; EGR2 蛋白诱导 DNA 去甲基化 IFN- γ 的产生 ^[7] Defective Fas-mediated apoptosis; EGR2 protein induces DNA demethylation IFN- γ production	肾炎、狼疮脑病、淋巴结及脾肿大、神经精神症, 存在 DNT 细胞, ANA、抗 dsDNA、抗 ssDNA 和 Sm 抗体 $\uparrow$ Nephritis, lupus encephalopathy, lymph node and splenomegaly, neuropsychiatric disorders, presence of DNT cells, ANA, anti-dsDNA, anti-ssDNA and anti-Sm $\uparrow$	适用于探索 DNT 与 SLE 的关联、FasL/Fas 与 SLE 关联性、研究 EGR2 在 SLE 中机制及靶点以及作为神经精神性狼疮动物模型 Suitable for exploring the association between DNT and SLE, the association between FasL/Fas and SLE, investigating the mechanisms and targets of EGR2 in SLE, and as an animal model of neuropsychiatric lupus	EZH2 抑制剂可调节 DNA 甲基化和抑制干扰素信号通路 ^[8] EZH2 inhibitors modulate DNA methylation and inhibit the interferon signalling pathway ^[8]	Fas 突变不会驱动人类 SLE; DNT 细胞、淋巴结肿大、脾肿大在人狼疮中少见 Fas mutations do not drive human SLE; DNT cells, enlarged lymph nodes, splenomegaly rare in human lupus

续表 1

模型 Model	发现时间 Discovery time	发病机制 Mechanisms	主要表现 Main outcome	应用 Application	靶点机制 Treatment mechanisms	局限 Limitations
BXSB/MpJ 小鼠 BXSB/MpJ mice	20 世纪 70 年代初 Late 1970s	Yaa 相关主要致病基因是 TLR7 过表达, 诱导 IFN 产生 ^[9] Main Yaa-related pathogenic gene is TLR7 overexpression, which induces IFN production ^[9]	增殖性肾小球肾炎、淋巴样增生和 ANA ↑、抗 dsDNA 抗体 ↑ Proliferative glomerulonephritis, lymphoid hyperplasia and ANA ↑, anti-dsDNA ↑	研究 TLR7 驱动 SLE 机制及抑制 TLR7 治疗 SLE 效果和浆细胞抑制性受体 Gp49B 在 SLE 中的致病作用 Investigation of TLR7-driven SLE mechanism and the effect of inhibition of TLR7 in the treatment of SLE and the pathogenic role of plasma cell inhibitory receptor Gp49B in SLE	BTK 抑制剂阻断免疫细胞群的 FcR 激活, 减少 IC 沉积和抑制 TLR 信号传导 ^[10] BTK inhibitors block FcR activation, reduce IC deposition and inhibit TLR signalling in immune cell populations ^[10]	雄性占主导地位并不能反映人类系统性红斑狼疮 Male dominance does not reflect human SLE
TC 小鼠 TC mice	2007 年 2007 year	高免疫代谢; IL-6 和 IFN 过表达及 Tfh 细胞自发扩增 High immune metabolism; IL-6 and IFN overexpression and spontaneous expansion of Tfh cells	致命性肾小球肾炎、蛋白尿 ↑、脾肿大、脱毛和皮肤溃烂和 ANA 及抗 dsDNA 抗体 ↑ Fatal glomerulonephritis, proteinuria ↑, splenomegaly, hair loss, skin ulcers, ANA and anti-dsDNA ↑	研究代谢抑制药物在 SLE 中应用、作为慢性皮肤型狼疮动物模型、研究 Tfh 细胞与自身免疫性疾病关系、研究狼疮小鼠在疾病发作前 IFN 的表达特征 ^[11] Study of metabolism-suppressing drugs in SLE, as an animal model of chronic cutaneous lupus, study of the relationship between Tfh cells and autoimmune diseases, and study of the expression profile of IFN in lupus mice prior to the onset of disease ^[11]	代谢抑制剂通过阻断葡萄糖代谢, 抑制靶向 T 细胞的活化 ^[12] Metabolic inhibitors inhibit activation of targeted T cells by blocking glucose metabolism ^[12]	实验周期长, 过程相对不可控 Long experimental period and relatively uncontrollable process

注: ↑: 升高。(下表同)
Note. ↑. Increase. (The same in the following tables)

胞功能减退或丧失。狼疮样表现包括皮肤狼疮、狼疮性肾炎、精神性狼疮、血清 ANA 抗体、抗 dsDNA 升高, 肾病理可见免疫复合物沉积并常伴有新月体形成, 小鼠 5 ~ 6 月龄时其狼疮症状变得明显, 10 ~ 12 月龄因肾衰竭死亡。与 SLE 患者及 MRL/lpr 和 BXSB/Yaa 小鼠模型不同, NZB/NZW F1 小鼠缺乏针对含 RNA 复合物的自身抗体^[14-15]。有研究表明此模型小鼠是多基因疾病, 是小鼠 1 号染色体的 *Sle1a*、*1b*、*1c* 基因突变, 导致其自身抗体产生, *Sle1d*、*FCgr2b* 基因与肾小球肾炎发生相关, *Sle2*、*Sle3*、*Sle5* 基因突变与淋巴细胞增殖相关^[16]。该模型的优点是雌鼠发病严重, 临床及病理表现与人类更为相似, 缺点是来源困难、价格昂贵、疾病发展缓慢。

1.2 雌性 MRL/lpr 小鼠

国际上常用的 SLE 模型是雌性 SPF 级 MRL/lpr

小鼠, 亦是最为经典的动物模型。1978 年由 MURPHY 等^[17] 建立此模型, 是 C3H/HeDi、LG/J、AKR/J 和 C57BL/6J 品系小鼠交配至 12 代时发生自发的常染色体(19 号染色体)隐性突变而产生的, 并且与 NZB/NZW F1 小鼠不同, 雄性和雌性都受到显著影响^[17-18]。CD95 受体(Fas)是一种表面结合受体, 属于肿瘤坏死因子受体(TNF-R)家族, 在与其配体 FasL 相互作用时诱导细胞快速凋亡, 在调节 B、T 细胞寿命中发挥重要作用^[19]。此品系小鼠 19 号染色体 *lpr* 基因突变改变了 Fas 的转录^[20], 由于 Fas 转录缺陷, 导致细胞凋亡缺陷, 从而引起大量淋巴细胞异常增殖, 产生与人类 SLE 相似的特异性自身抗体^[21]。但人类中, Fas 信号转导缺陷并不会驱动人类 SLE 发生发展, 而是导致自身免疫性淋巴组织增生综合征(autoimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS)^[22]。但该模型小鼠临床病症与人

类狼疮高度吻合,主要表现为淋巴结病、脾肿大、皮肤狼疮及免疫复合物介导的肾小球肾炎,并且发病早期有神经精神症状和行为学的改变,血清 ANA 抗体、抗 dsDNA、抗 ssDNA 和 Sm 抗体显著升高^[23-24]。据研究报道,EGR2 表达增加被认为与人类狼疮易感性有关^[25],且发现 EGR2 在人和小鼠狼疮细胞中高度升高并正调控狼疮 CD4 T 细胞中 IFN- γ 的产生^[26],相对于其他狼疮小鼠模型,MRL-lpr 小鼠在 5 周龄时 EGR2 mRNA 表达水平显著上调,在 14 ~ 15 周龄时脾 CD4 T 细胞中 EGR2 表达显著增加,体外抑制 EGR2 可减 MRL-lpr 狼疮小鼠脾 CD4 T 细胞中 IFN γ 的产生^[27]。因此除用作 SLE 脑病动物模型和确定 SLE 病因并评估治疗的模型,还可作为研究 EGR2 在小鼠狼疮 T 细胞中的表达和炎症调节作用的模型^[28-29]。缺点是来源困难,成本较高。

1.3 BXSb/MpJ 小鼠

BXSb/MpJ 小鼠是由 C57BL/6J 雌鼠和 SB/Le 雄鼠杂交后培育的重组近交系,于 20 世纪 70 年代后期发现^[30],其遗传发病机理非常明确,是此类雄鼠的 Y 染色体存在着加速自身免疫反应的基因,称为 Yaa 基因,由 X 染色体端粒向 Y 染色体的易位形成,导致至少 16 个基因的重复^[31],因此在雄性中发病早且严重,不受性激素影响。近 100% 的 BXSb/MpJ 小鼠发展为狼疮样症状,包括继发性淋巴组织增生、膜性增殖性肾小球肾炎、单核细胞增多症、高丙种球蛋白血症、血清 ANA 抗体、抗 dsDNA、抗 ssDNA 抗体升高^[30]。雄性小鼠平均生存期约为 5 个月,雌小鼠性平均生存期约为 14 个月,主要死因是增殖性肾小球肾炎^[32],可用于 SLE 病因、发病机制、自身免疫性疾病的免疫调节、基因定位以及治疗 SLE 药物的药效学研究以及膜性增殖性肾小球肾炎的模型。缺点:实验周期长、过程不易控制、易受环境因素影响、雄鼠发病率高且病情严重,是重症 SLE 模型,而雌性相对病情较轻,与人类疾病发病状况相反。

1.4 B6.NZMSle1/2/3 小鼠(简称 TC 小鼠)

TC 小鼠是由 C57BL/6(简称 B6)小鼠与狼疮 NZM2410 小鼠多代杂交后建立的纯合遗传性自发性狼疮小鼠,是 C57BL/6 同源小鼠,其表达 3 个狼疮易感位点(*Sle1*, *Sle2*, *Sle3*)^[33-34]。研究发现是由于 TC 小鼠体内树突状细胞产生高水平的 IL-6 和 IFN- γ ,导致 B 细胞大量活化,产生致病性自身抗体,引起狼疮样症状,包括严重狼疮性肾炎和抗

dsDNA 抗体升高^[34-35]。有研究发现,该品系小鼠从 40 周龄开始出现脱毛和皮肤溃烂等症状,且随着周龄增大,其皮肤病变逐渐加重,且血清自身抗体水平较之前升高,病理发现皮炎部位的真皮层存在大量淋巴细胞浸润,考虑老龄 TC 小鼠的皮肤病变与自身免疫有着密切关系,因此,老龄 TC 小鼠还可作为研究皮肤型红斑狼疮(cutaneous lupus erythematosus, CLE)发病机理和新药物治疗的动物模型^[36]。其缺点是实验的周期长,过程相对不可控。

2 诱导性狼疮动物模型

近年来,人们建立了由外源物质诱发的狼疮鼠模型,与自发性狼疮小鼠相比,该模型可直接用于实验,且诱发性小鼠模型成本较低,也可良好地模拟 SLE 的临床特征,同时与人类 SLE 患者和 NZB x NZW F1 模型一样,外源物质诱导的狼疮在雌性中比在雄性中更严重,但要获得较高成模率和良好的模型一致性,对研究者的实验操作和实验环境也有较高的要求。表 2 总结了诱导性狼疮动物模型发病机制、主要表现、模型应用、靶点分子机制及局限。

2.1 淋巴细胞活性染色质诱导 SLE 小鼠模型

常以 BALB/c 品系小鼠作为受试对象,以刀豆蛋白 A(concanavalin A, ConA)活化的近交系小鼠脾淋巴细胞作为抗原免疫同系小鼠^[42],据研究,活化的淋巴细胞衍生 DNA(ALD-DNA)可驱动巨噬细胞向 M2b 极化,产生炎症细胞因子并诱导炎症^[37],提示其在 SLE 发病过程中发挥重要作用。该模型小鼠狼疮样症状主要表现为肾小球肾炎、肾功能下降及蛋白尿,血清抗 dsDNA 抗体、抗核抗体、IL-17 升高等,肾病理可见抗原抗体复合物沉积于肾组织^[43],有研究报道该模型小鼠 IL-17 表达水平与狼疮性肾炎的严重程度呈正相关^[44]。优点:造模时间短、发病迅速、病变特征典型、造模成功率高。缺点:所用动物品系、ConA 剂量以及成模时间差异很大,需严格控制注射物的数量,实验环境要求高。

2.2 Pristane 诱导小鼠模型

多以 BALB/c 小鼠或 C57BL/6 小鼠为受试对象,降植烷(pristane)是中等长度的烷链,其作用机制与佐剂类似,采用一次腹腔注射 0.5 mL 降植烷制备 SLE 模型,其机制是降植烷可诱导产生脂肪肉芽肿,脂肪肉芽肿内巨噬细胞和腹腔内巨噬细胞分泌 IL-6 等细胞因子,并可通过线粒体途径诱导腹腔内细胞凋亡产生自身抗原,进而导致 T、B 细胞等异常

表 2 诱导性狼疮动物模型特点及应用

Table 2 Characteristics and application of animal models of induced lupus

模型 Model	发现时间 Discovery time	发病机制 Mechanisms	主要表现 Main outcome	应用 Application	靶点机制 Treatment mechanisms	局限 Limitations
淋巴细胞 活性染色 质诱导 Lymphocyte activated chromatin induction	19 世纪末 End of the 19th century	ALD-DNA 可诱导巨噬细胞向 M2b 极化,产生炎性细胞因子病诱导炎症 ALD-DNA induces macrophage polarisation towards M2b and production of inflammatory cytokines disease induced inflammation	肾小球肾炎,肾功能↓,蛋白尿↑,抗 dsDNA 及抗核抗体↑ Glomerulonephritis, renal function ↓, proteinuria ↑, anti-dsDNA and ANA ↑	研究巨噬细胞代谢调节在 SLE 中作用,例如葡萄糖代谢抑制 ^[37] Investigating the role of macrophage metabolic regulation in SLE, e. g. glucose metabolism inhibition ^[37]	间充质干细胞的细胞外囊泡通过调节 SLE 小鼠的巨噬细胞抗炎极化表型来缓解 SLE 相关肾炎 ^[38] , EVs 的免疫抑制作用可作为无细胞治疗 SLE 的潜在途径 Extracellular vesicles of mesenchymal stem cells alleviate SLE-associated nephritis by modulating macrophage anti-inflammatory polarisation phenotype in SLE mice ^[38] , and the immunosuppressive effect of EVs could be a potential avenue for cell-free treatment of SLE	ConA 剂量以及成模时间差异大 Wide variation in ConA dose and moulding time
Pristane 诱导 Pristane induced	1994 年 1994 year	IL-6 和 IFN-α 过表达 IL-6 and IFN-α overexpression	肾小球肾炎,关节炎,肺血管炎,抗 dsDNA 及抗核抗体↑ Glomerulonephritis, arthritis, pulmonary vasculitis, anti-dsDNA and ANA ↑	探索体内 IFN 过表达在 SLE 中的机制及抑制 IFN 治疗 SLE 的效果 Exploring the mechanism of IFN overexpression in SLE and inhibition of IFN in the treatment of SLE	I 型 IFN 受体拮抗剂抑制所有 I 型 IFN 的信号转导 Type I IFN receptor antagonists inhibit all type I IFN signal transduction	起效缓慢;狼疮症状相对较轻 Slow-acting; relatively mild lupus symptoms
同种异体 肝细胞质 蛋白/肽免 疫诱导兔 模型 Rabbit model of immunoin- duction by allogeneic hepatic cytoplasmic proteins/ peptides	21 世纪初 Early 21st century	异体抗原诱导产生自身抗体;BAFF 及受体表达水平高 Autoantibody production induced by alloantigen; high expression levels of BAFF and its receptor	肾炎,IC 在肾小球沉积,蛋白尿↑,抗 dsDNA 抗体↑ Nephritis, IC deposition in glomerulus, proteinuria ↑, anti-ds-DNA ↑	兔遗传和免疫反应异质性大,能够更好地反映具有家族遗传模式的 SLE 等疾病的复杂性;适用于探索阻断 BAFF 通路或 BAFF-R 研究 ^[39] Rabbits have a high degree of heterogeneity in genetic and immune responses, which better reflects the complexity of diseases such as SLE with a familial inheritance pattern; suitable for exploring blockade of the BAFF pathway or BAFF-R studies ^[39]	BAFF 单克隆抗体抑制 BAFF 来缓解狼疮症状 ^[39] BAFF monoclonal antibody inhibits BAFF to relieve lupus symptoms ^[39]	个体差异大 Large individual variations
CJ 诱导 CJ induced	20 世纪 90 年代初 Early 1990s	细菌成分作为交叉抗原打破小鼠的免疫耐受状态,诱导自身抗体产生 Bacterial components act as cross-antigens to break immune tolerance in mice and induce autoantibody production	肾炎,ANA 和抗 ds-DNA 抗体↑ Nephritis, ANA and anti-dsDNA ↑	国内多用于中成药对狼疮治疗研究 Mostly used domestically in studies of proprietary Chinese medicines for the treatment of lupus	-	模型维持时间短 Short duration of model maintenance

续表 2

模型 Model	发现时间 Discovery time	发病机制 Mechanisms	主要表现 Main outcome	应用 Application	靶点机制 Treatment mechanisms	局限 Limitations
LPS 诱导 LPS induced	20 世纪 90 年代初 Early 1990s	LPS 通过与 TLR4 结合来诱导 NF-κB 和 TNF-α、IL-6 等炎症细胞因子大量释放 LPS induces massive release of NF-κB and inflammatory cytokines such as TNF-α and IL-6 by binding to TLR4	肾功能 ↓, 蛋白尿 ↑, IC 沉积于肾小球, 抗 Sm 和抗 dsDNA 抗体 ↑ Renal function ↓, proteinuria ↑, IC deposition in glomeruli anti-Sm and anti-dsDNA ↑	探索抑制 TLR4 信号转导通路治疗 SLE 的效果 Exploring the effects of inhibiting the TLR4 signal transduction pathway for the treatment of SLE	TAT-CLs-DHA/siRNA 阻断了 TLR4 信号通路中 NF-κB 和促炎因子活性 ^[40] TAT-CLs-DHA/siRNA blocks NF-κB and pro-inflammatory factor activity in the TLR4 signalling pathway ^[40]	模型维持时间短 Short duration of model maintenance
cGVHD 狼疮样小鼠模型 cGVHD lupus-like mouse model	1968 年 1968 year	T 细胞介导的慢性移植宿主反应 T cell-mediated chronic graft-versus-host response	肾小球肾炎和淋巴样增生, ANA、抗 dsDNA 和抗 Sm 抗体 ↑ Glomerulonephritis and lymphoid proliferation, ANA, anti-dsDNA and anti-Sm ↑	探索评估 T 细胞驱动 SLE 机制及抑制慢性移植宿主反应治疗 SLE 效果 Exploration to assess the mechanism of T-cell-driven SLE and the inhibition of chronic graft-versus-host response for the treatment of SLE	B7 抗体可抑制 B7/CD28 共刺激信号通路, 来抑制 CD4T 细胞活化和自身抗体的产生 ^[41] B7 antibody inhibits the B7/CD28 co-stimulatory signalling pathway to suppress CD4T cell activation and autoantibody production ^[41]	严重狼疮肾炎但其他狼疮症状相对较轻 Severe lupus nephritis with relatively mild other lupus symptoms

注: ↓: 下降。(下表同)
Note. ↓. Decrease. (The same in the following tables)

活化以及产生自身抗体,同时未成熟的 Ly6C 单核细胞产生大量的 IFN-α,IFN-α 可以促进树突状细胞(DC 细胞)成熟进而打破免疫耐受,进一步活化自身反应性 T、B 细胞,最终出现组织器官的炎症损伤^[14,45-46]。该模型小鼠狼疮样症状表现为类风湿性关节炎、皮肤红斑及脱毛、蛋白尿和肾小球肾炎,血清 ANA 抗体、抗-dsDNA 抗体及抗 Sm 抗体、IFN-α 升高,肾病理可见肾小球 IgG 蛋白沉积^[47]。此类小鼠与人类 SLE 发病性别一致,可通过干扰素产生的协同异常、凋亡细胞清除缺陷和过度活跃的 B 细胞信号传导来模拟人类 SLE,IFN 的产生对该疾病的发展至关重要^[48],可能是研究细胞因子失调的一个很好的模型。优点:价格低廉、实验环境要求低、操作简单、造模成功率高,可作为较理想的 SLE 疾病研究模型,也是唯一可以模拟 SLE 患者体内 IFN 过表达的小鼠模型。缺点:造模时间长、实验周期长,需 6 ~ 8 个月才能诱导出狼疮性肾炎。

2.3 同种异体肝细胞质蛋白诱导免疫模型

以家兔为受试对象,发病机制是以异体抗原诱导产生自身抗体,用同种异体肝细胞质蛋白免疫家兔,狼疮样症状表现为血清抗 dsDNA 及抗 sm/nRNP 抗体增高、肾功能异常及蛋白尿、皮肤的病变(表现为红斑及趾端溃疡)等,且皮肤症状早于肾功能异常,临床表现及病程发展与人类 SLE 患者相似,且抗体水平及组织病理损害出现时间相对大部分鼠、兔模型早,肾病理可见免疫复合物 IgG 沉积于肾小

球系膜^[49]。优点:此模型制作简单、成本低廉、稳定性高、周期短及死亡率低,可用以研究 SLE 发病机制及自身免疫性肾炎等。缺点:兔属于远交系,个体差异较大,实验设计时应加以考虑,皮肤病变明显,但皮肤免疫组化未见明显的 IgG 特异性沉积^[49]。

2.4 空肠弯曲菌诱导小鼠模型

以 BALB/c 小鼠为受试对象,空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*, CJ)是一种人兽共患病病原菌。采用甲醛化空肠弯曲杆菌(CJ-S131)与弗氏完全佐剂(Freunds complete adjuvant, FCA)感染小鼠, CJ-S131 具有与机体自身抗原相似的抗原表位,细菌成分作为交叉抗原进入体内,产生应激,引起一系列免疫反应, T 细胞活化后通过旁途径辅助 B 细胞多克隆激活,引起自身抗体的产生,使得 CJ-S131 打破小鼠的免疫耐受状态^[50-51],诱导小鼠形成具有典型的狼疮样症状,狼疮样症状表现为血清 ANA 抗体、抗 ds-DNA、抗 ss-DNA 和组蛋白等自身抗体升高、肾功能异常和蛋白尿等,肾病理表现为肾小球肿大,肾小球系膜增厚、细胞增生、炎症细胞浸润和肾小管水肿样变性等异常病理现象^[52-53]。优点:CJ-S131 与 FCA 诱导的 SLE 小鼠模型与人类 SLE 相似性强、实验周期短、经济易行、较为稳定。缺点:模型维持时间较短,多在 35 ~ 40 d,此后自身抗体水平会下降,可通过增加免疫和致敏次数来延长模型的维持时间^[54]。

2.5 脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 诱发狼疮模型

多以 BALB/c 或 MRL/lpr 小鼠为受试对象,多克隆细胞激活剂 LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁主要成分,作为 TLR4 的配体,介导 TLR4 为媒介的信号转导通路,从而启动相关的下游信号转导途径,导致 TNF- α 、IL-6 等炎症因子大量释放,导致全身组织器官的炎症损伤^[55]。给予上述品系小鼠单次腹腔注射 LPS,2 ~ 4 周后血清即可检测抗 Sm 抗体、抗 dsDNA 升高、肾功能异常及蛋白尿,肾活检可见免疫复合物沉积于肾小球^[56]。优点:方案简便、造模时间短、模型成功率高,可用于深入研究 SLE 发病机制及治疗方案。缺点:模型维持时间短。

2.6 慢性移植抗原宿主病 (chronic graft-versus-host disease, cGVHD) 狼疮样小鼠模型

目前该模型的原理是将同种小鼠亲代脾 CD4 T 淋巴细胞注入到 F1 小鼠体内,使其产生 cGVHD,是在 1968 年由 LEWIS 等^[57]首先建立的,模型使用的供者鼠多为 DBA/2 小鼠或 BLAB/c 小鼠,受者鼠为雌性 DBA/2 和雄性 C57BL/10 的杂交 F1 代或雌性 BLAB/c 小鼠和雄性 A/J 小鼠杂交 F1 代。发病机理为亲代和子代之间主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 的部分不相容。与 pristane 诱导的模型一样,这些模型只需要单次注射供体细胞即可诱导狼疮样综合征,包括血清 ANA、抗 dsDNA 和抗 Sm 自身抗体升高和狼疮性肾炎^[14,58]。有研究发现该模型小鼠疾病严重程度与同种异体移植细胞的数量相关,而且选择雌性亲代鼠和雌性子代鼠成模率较高,如果将亲代雄性作为供者将会出现子代受者发生急性移植抗原宿主病反应,从而使模型失败^[58-60]。优点:建模时间短,诱导后 10 ~ 14 d 即可检测到自身抗体,而在其他的自发性狼疮模型中,相同的表型可能需要出生后数周至数月才能形成。此外,由于供体 T 细胞经历活化和扩增,因此它们相对容易通过流式细胞术观察,从而可以研究各种修饰对供体和宿主细胞的影响^[60-61]。缺点:实验环境要求高、操作复杂。

3 人源化狼疮小鼠模型

目前,构建 SLE 人源化小鼠模型的方法主要有两种,包括将人外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 或外周血淋巴细胞 (peripheral blood lymphocyte, PBLs) 从 SLE 患者转

移到重度免疫缺陷 (severe combined immune-deficiency, SCID) 小鼠,或将人造血干细胞 (haematopoietic stem cells, HSCs) 转移到免疫缺陷小鼠身上,然后腹腔内注射 pristane 诱导狼疮,实现人体免疫系统在免疫缺陷小鼠的重建^[62-65]。其中 PBLs 或 PBMCs 人源化小鼠模型被广泛应用,该模型可以检测到 dsDNA、RNP、抗 La 等抗体,能较好地研究人 T 细胞在 SLE 发病过程的作用,但 SLE 患者的个体差异往往导致模型参数一致性差,且该模型中 B、NK 和髓系细胞的重建效率并不理想,用 SLE 患者的 PBLs/PBMCs 移植的免疫缺陷小鼠通常在 4 周后自发死亡,其寿命和生存率明显低于自发或诱导狼疮易感小鼠模型,这可能导致观察或治疗时间较短^[64-66]。有研究发现,移植高狼疮活性 PBMC 的免疫缺陷小鼠存活率低,移植低狼疮活性 PBMC 的存活率高^[65]。最新研究发现,将活动性狼疮患者的 PBMCs 植入免疫缺陷小鼠,可以建立一种新的人源化 CLE 小鼠模型,这些小鼠在合适的 UVB 照射下发生狼疮样皮肤病变,且狼疮皮肤表现出高表达的人 IL-21。这些人源性 IL-21 细胞因子在驱动年龄相关 B 细胞 (age-associated B cells, ABCs) 分化中起重要作用,包括促进 CD11b 和转录因子 T-bet 的表达。该模型适用于探索皮肤狼疮发病机制、靶向免疫治疗的转化研究^[67-68]。HSCs-pristane 人源化小鼠模型实现了良好的人体免疫系统重建,12 周时血液中的重建水平 (42.1%),组织中的重建水平更高,包括脾 (82.8%)、肠系膜淋巴结 (97.4%) 和肝 (89.0%)。随后,将 pristane 腹腔注射到 12 ~ 13 周龄的人源化 HSCs 小鼠中,该小鼠体内显示 CD4 和 CD8 T 细胞的激活,产生自身抗体和促炎细胞因子,检测到人免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) G 和 IgM 以及人抗核自身抗体 (例如抗 dsDNA 抗体、抗组蛋白抗体、抗 RNP70 抗体抗 SM 抗体) 升高,血浆和腹膜灌洗液中促炎细胞因子 (例如 IFN- γ 、IL8、IL-6、MCP-1) 的血清水平也显著升高,其狼疮样表现为严重的狼疮性肾炎和肺浆膜炎,免疫复合物在肾小球中的沉积和白细胞浸润^[62-64]。该模型更符合 SLE 患者的临床特征,反映了各种免疫细胞的相互作用,是理想的小鼠狼疮模型,但此类研究较少。此类狼疮模型适用于人类 SLE 靶向免疫疗法的开发和评估的转化研究,为人体免疫性的体内研究提供可能。缺点:细胞移植效率低、价格昂贵。表 3 总结了人源化 SLE 小鼠的构建方式、特点、应用及优势。

表 3 人源化狼疮小鼠特点及应用

Table 3 Characteristics and application of humanised lupus mice		
模型 Model	PBMCs/PBLs 人源化小鼠 PBMCs/PBLs humanized mouse model	HSCs-pristane 人源化小鼠 HSCs-pristane humanized mouse model
发现时间 Discovery time	20 世纪 90 年代末 Late 1990s	21 世纪 10 年代初 Early 21st century decade
构建方式 Construction	将 SLE 患者的 PBMCs/PBLs 移植到 SCID 小鼠 PBLs/PBMCs from patients with SLE were transplants into SCID mice	将人 HSCs 转移到 SCID 小鼠身上,然后腹腔内注射 pristane 诱导狼疮 Human HSCs were injected intravenously into SCID mice, followed by intraperitoneal injection of pristane induced lupus
主要表现 Main outcome	肾小球肾炎,蛋白尿↑,抗 dsDNA ↑ Glomerulonephritis, proteinuria ↑, anti-dsDNA ↑	ANA、抗 ds-DNA 抗体↑,促炎细胞因子水平升高、蛋白尿、肺损伤 ANA, anti-dsDNA antibody ↑,elevated levels of pro-inflammatory cytokines, proteinuria, lung injury
优势 Advantage	样本易取,移植方法相对简单,高效稳定的 T 细胞移植 Easy access to samples, relatively simple transplantation method, efficient and stable T-cell transplantation	多系造血细胞发育,包括 T、B、髓系和 NK 细胞;减少 GVHD;寿命相比较长(10 ~ 12 周) Multi-lineage haematopoietic cell development, including T, B, myeloid and NK cells; reduction of GVHD; longer lifespan comparison (10 ~ 12 weeks)
应用 Application	用于研究抗自身抗体和抗促炎细胞因子在 SLE 中的疗效,例如抗 ANX A1 抗体、靶向 MDSCs 或 Arg-1、抗人 DNA 样嵌合型抗体、hCDR1 肽、抗 IL-6 单克隆抗体等 ^[64] Used to study the efficacy of anti-autoantibodies and anti-pro-inflammatory cytokines in SLE, e. g. anti-ANX A1 antibodies, targeting MDSCs or Arg-1, anti-human DNA-like chimeric antibodies, hCDR1 peptide, anti-IL-6 monoclonal antibodies, etc. ^[64]	
局限 Limitations	缺乏 NK 和其他免疫细胞;可能诱发 GVHD;大量注射人体细胞会导致 EBV 相关的淋巴组织增生性;寿命短,平均移植 4 周后死亡 Lack of NK and other immune cells; may induce GVHD; large amounts of injected human cells can lead to EBV-associated lymphoid tissue hyperplasia; short lifespan, with death occurring after an average of 4 weeks after transplantation	样本来源有限;小鼠研究的不可重复性,供体不同 Limited sample sources; non-reproducibility of mouse studies with different donors

表 4 常见狼疮基因敲除小鼠动物模型概况

Table 4 Summary of common lupus knockout mouse animal models				
模型 Model	机制 Mechanisms	品种品系 Breed strains	临床表现 Clinical manifestation	应用 Application
TLR7 ^{-/-} [70-72]	TLR7 募集 MyD88 并通过激活干扰素调节因子 7 和 NF-κB 启动信号级联反应,分别驱动 IFN 和炎性细胞因子的产生 TLR7 recruits MyD88 and initiates a signalling cascade through activation of interferon regulatory factor 7 and NF-κB to drive IFN and inflammatory cytokine production, respectively	TLR7Y264H 型突变小鼠或 MRL/lpr 小鼠 TLR7Y264H mutant mice or MRL/lpr mice	敲除 TLR7Y264H 型突变小鼠的 ABCs 细胞的数量显著减少,狼疮样疾病症状显著缓解 Knockout TLR7Y264H mutant mice have significantly reduced numbers of ABCs cells and significant lupus-like disease symptoms	探索 TLR7/MyD88 轴抑制剂在 SLE 中的疗效 Exploring the efficacy of TLR7/MyD88 axis inhibitors in SLE
	干扰素基因缺失会导致持续性 IFN 信号转导和自身免疫性炎症 Interferon gene deletion leads to persistent IFN signalling and autoimmune inflammation	MRL/lpr 小鼠 MRL/lpr mice	STING 缺陷的小鼠加重了狼疮小鼠模型的狼疮样症状表现,且小鼠寿命明显缩短 STING-deficient mice exacerbate the manifestation of lupus-like symptoms in a mouse model of lupus and have a significantly shorter lifespan	研究干扰素基因刺激因子作为 SLE 治疗新的靶点 Investigating interferon gene-stimulating factor as a new target for SLE treatment
PD-1H ^{-/-} [75]	PD-1H 激动作用抑制 T 细胞受体信号传导及减少了中性粒细胞和浆细胞样树突状细胞产生的促炎细胞因子,包括 IFN-α PD-1H agonism inhibits T-cell receptor signalling and reduces the production of pro-inflammatory cytokines, including IFN-α, by neutrophils and plasmacytoid dendritic cells (pDC)	B6 小鼠 B6 mice	B6 PD-1H 缺陷小鼠会发展为类似于狼疮的自发性皮肤和全身性自身免疫性疾病 B6 PD-1H-deficient mice develop a spontaneous cutaneous and systemic autoimmune disease similar to lupus	研究 PD-1H 激动剂作为治疗皮肤和系统性狼疮的潜在靶点 Investigating PD-1H agonists as potential targets for the treatment of skin and systemic lupus

续表 4

模型 Model	机制 Mechanisms	品种品系 Breed strains	临床表现 Clinical manifestation	应用 Application
CD38 ^{-/-} [76-78]	CD38 通过激活淋巴细胞触发信号级联反应和细胞内钙的动员,并调节细胞因子和趋化因子的凋亡、增殖和产生,同时调节免疫细胞的增殖、分化和凋亡	lpr 小鼠或 C57BL/6J 小鼠 lpr mice or C57BL/6J mice	CD38 缺乏使没有明显遗传背景的动物模型容易产生自身免疫,加剧了有自身免疫倾向的背景小鼠模型的狼疮样症状表现 CD38 deficiency predisposes animal models with no apparent genetic background to autoimmunity and exacerbates lupus-like symptoms in background mouse models with autoimmune predisposition	研究 CD38 靶向抗体对 SLE 患者潜在治疗效果 Investigating the potential therapeutic effect of CD38-targeted antibodies in SLE patients
	CD38 triggers signalling cascades and intracellular calcium mobilisation through activation of lymphocytes and regulates apoptosis, proliferation and production of cytokines and chemokines, as well as regulating proliferation, differentiation and apoptosis of immune cells			

4 基因敲除狼疮小鼠模型

目前该模型的原理基于基因同源重组交换或是以噬菌体 Cre/loxp 系统、CRISPR/Cas9 以及 TP901-1/att 技术为基础的条件性基因敲除,人为地在所有组织或选定的组织或细胞中敲除特定基因,通过改变细胞遗传特性进而研究某个基因在疾病发展中的作用,可研究基因过表达或敲除后机体内的生物学效应以及新的治疗靶点^[69],其缺点是建模复杂,费用昂贵。表 4 列举几种目前常见的狼疮基因敲除小鼠模型。

5 小结

动物模型为 SLE 发病机制研究和新药的开发做出了巨大贡献,但 SLE 异质性表现以及背后具有复杂的免疫机制,而相同的治疗可以对不同的小鼠模型产生不同的影响,因此限制了人类 SLE 靶向治疗的发展。自 20 世纪 50 年代以来,治疗 SLE 治疗标准的许多药物一直在使用,尽管许多生物制剂和免疫抑制剂已经在狼疮动物模型中进行了测试,但自 2013 年来,关于治疗 SLE 新药物,仅有 BAFF 单克隆抗体(贝利尤单抗)、I 型干扰素受体拮抗剂(阿尼利尤单抗)和新型钙调磷酸酶抑制剂(voclosporin 伏环孢素)获得 FDA 批准进入市场^[78-79]。尽管有了新的治疗方法,但 SLE 患者的预后仍然很差。因此需要增强对 SLE 发病机制理解及新的临床药物的开发。本文较其他的中文综述^[80-81]新增了人源化狼疮小鼠及基因敲除狼疮小鼠模型,可以更好地模拟人类 SLE,为研究人类 SLE 和测试治疗靶点提供了有力工具。每一个狼疮动物模型都与人 SLE 存在某个相似的特征,例如,

Pristane 诱导小鼠的 IFN 过表达。此外,每一个模型都提供了狼疮发病机制的不同方面。综上,研究人员可以依据不同的研究目的选择不同的动物模型。但狼疮动物模型仍存在许多的局限性,需要不断完善各种模型来更好地模拟狼疮患者的遗传性和病理异质性以及确保药物在更复杂的人类遗传背景上的适用性。总之,SLE 小鼠模型将继续成为研究 SLE 的病因和机制以及开发靶向 SLE 疗法不可或缺的一部分。

参 考 文 献(References)

[1] ZUCCHI D, ELEFANTE E, SCHILIRÒ D, et al. One year in review 2022: systemic lupus erythematosus [J]. Clin Exp Rheumatol, 2022, 40(1): 4-14.

[2] KIRIAKIDOU M, CHING C L. Systemic lupus erythematosus [J]. Ann Intern Med, 2020, 172(11): 81-96.

[3] ACCAPEZZATO D, CACCAVALE R, PAROLI M P, et al. Advances in the pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7): 6578.

[4] LIU W, ZHANG S, WANG J. IFN-γ, should not be ignored in SLE [J]. Front Immunol, 2022, 13: 954706.

[5] NANDAKUMAR K S, NÜNDEL K. Editorial: systemic lupus erythematosus-predisposition factors, pathogenesis, diagnosis, treatment and disease models [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1118180.

[6] SINGH R P, HAHN B H, BISCHOFF D S. Cellular and molecular phenotypes of pConsensus peptide (pCons) induced CD8⁺ and CD4⁺ regulatory T cells in lupus [J]. Front Immunol, 2021, 12: 718359.

[7] MENDES K, SCHMIDHOFER S, MINDERJAHN J, et al. The epigenetic pioneer EGR2 initiates DNA demethylation in differentiating monocytes at both stable and transient binding sites [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1556.

[8] MIRANDA T B, CORTEZ C C, YOO C B, et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation [J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(12): 2051-2061.

- 2009, 8(6): 1579–1588.
- [9] FAIRHURST A M, HWANG S H, WANG A, et al. Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7 [J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(7): 1971–1978.
- [10] BENDER A T, PEREIRA A, FU K, et al. Btk inhibition treats TLR7/IFN driven murine lupus [J]. *Clin Immunol*, 2016, 164: 65–77.
- [11] SRIRAM U, VARGHESE L, BENNETT H L, et al. Myeloid dendritic cells from B6. NZM Sle1/Sle2/Sle3 lupus-prone mice express an IFN signature that precedes disease onset [J]. *J Immunol*, 2012, 189(1): 80–91.
- [12] LI W, QU G, CHOI S C, et al. Targeting T cell activation and lupus autoimmune phenotypes by inhibiting glucose transporters [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 833.
- [13] Dubois EL, Horowitz RE, Demopoulos HB, et al. NZB/NZW mice as a model of systemic lupus erythematosus [J]. *JAMA*, 1966, 195(4): 285–289.
- [14] PERRY D, SANG A, YIN Y, et al. Murine models of systemic lupus erythematosus [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 271694.
- [15] DENT E L, TAYLOR E B, SASSER J M, et al. Temporal hemodynamic changes in a female mouse model of systemic lupus erythematosus [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 318(5): F1074-F1085.
- [16] MOORE E, PUTTERMAN C. Are lupus animal models useful for understanding and developing new therapies for human SLE? [J]. *J Autoimmun*, 2020, 112: 102490.
- [17] MURPHY E D, ROTH S J B. A single gene model for massive lymphoproliferation with immune complex disease in new mouse strain MRL [J]. *Excerpta Med*, 1978, 415: 69–72.
- [18] CABANA-PUIG X, BOND J M, WANG Z, et al. Phenotypic drift in lupus-prone MRL/lpr mice: potential roles of microRNAs and gut microbiota [J]. *Immunohorizons*, 2022, 6(1): 36–46.
- [19] HAYMOUR L, JEAN M, SMULSKI C, et al. CD95 (Fas) and CD95L (FasL)-mediated non-canonical signaling pathways [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(6): 189004.
- [20] WATSON M L, RAO J K, GILKESON G S, et al. Genetic analysis of MRL-lpr mice: relationship of the Fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci [J]. *J Exp Med*, 1992, 176(6): 1645–1656.
- [21] TOMALLA V, SCHMEISSER M J, WEINMANN-MENKE J. Mouse models, antibodies, and neuroimaging: current knowledge and future perspectives in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NPSLE) [J]. *Front Psychiatry*, 2023, 14: 1078607.
- [22] MATSON D R, YANG D T. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: an overview [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2020, 144(2): 245–251.
- [23] CHEN K, DENG Y, SHANG S, et al. Complement factor B inhibitor LNP023 improves lupus nephritis in MRL/lpr mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113433.
- [24] DIAMOND B, VOLPE B T. A model for lupus brain disease [J]. *Immunol Rev*, 2012, 248(1): 56–67.
- [25] MYOZEN K, KOCHI Y, SHIMANE K, et al. Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(11): 2313–2320.
- [26] MORITA K, OKAMURA T, SUMITOMO S, et al. Emerging roles of Egr2 and Egr3 in the control of systemic autoimmunity [J]. *Rheumatology*, 2016, 55(2): ii76-ii81.
- [27] DAI R, HEID B, XU X, et al. EGR2 is elevated and positively regulates inflammatory IFN γ production in lupus CD4⁺ T cells [J]. *BMC Immunol*, 2020, 21(1): 41.
- [28] KARNOPP T E, CHAPACAI S F, FREITAS E C, et al. Lupus animal models and neuropsychiatric implications [J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40(7): 2535–2545.
- [29] MORITA K, OKAMURA T, INOUE M, et al. Egr2 and Egr3 in regulatory T cells cooperatively control systemic autoimmunity through Ltbp3-mediated TGF- β 3 production [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(50): E8131-E8140.
- [30] ANDREWS B S, EISENBERG R A, THEOFILOPOULOS A N, et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains [J]. *J Exp Med*, 1978, 148(5): 1198–1215.
- [31] MCPHEE C G, BUBIER J A, SPROULE T J, et al. IL-21 is a double-edged sword in the systemic lupus erythematosus-like disease of BXSB. Yaa mice [J]. *J Immunol*, 2013, 191(9): 4581–4588.
- [32] 周素荣, 刘传玉, 徐世正, 等. SLE 的 BXSB 小鼠模型病情进展状况的研究 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2002, 18(2): 112–114.
- ZHOU S R, LIU C Y, XU S Z, et al. The study of pathological severity in lupus-prone BXSB mice [J]. *Chin J Lepr Skin Dis*, 2002, 18(2): 112–114.
- [33] WAN S, XIA C, MOREL L. IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4⁺ CD25⁺ T cell regulatory functions [J]. *J Immunol*, 2007, 178(1): 271–279.
- [34] 邹桂香, 段新旺, 牛海涛. 系统性红斑狼疮小鼠肠道微生物与抗 dsDNA 抗体水平的相关性 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(2): 195–200.
- ZOU G X, DUAN X W, NIU H T. Correlation between gut microbiota and anti-dsDNA antibody in the mouse model of systemic lupus erythematosus [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(2): 195–200.
- [35] SANG A, ZHENG Y Y, YIN Y, et al. Dysregulated cytokine production by dendritic cells modulates B cell responses in the NZM2410 mouse model of lupus [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e102151.
- [36] 钟荣玉, 段新旺, 牛海涛. 一种皮肤型狼疮小鼠模型的鉴定 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(2): 187–192.
- ZHONG R Y, DUAN X W, NIU H T. Identification of a new mouse model of cutaneous lupus erythematosus [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(2): 187–192.
- [37] ZHAO H, WEN Z, XIONG S. Activated lymphocyte-derived

- DNA drives glucose metabolic adaptation for inducing macrophage inflammatory response in systemic lupus erythematosus [J]. *Cells*, 2023, 12(16): 2093.
- [38] SUN W, YAN S, YANG C, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes ameliorate lupus by inducing M2 macrophage polarization and regulatory T cell expansion in MRL/lpr mice [J]. *Immunol Invest*, 2022, 51(6): 1785–1803.
- [39] YANG J, POSPISIL R, RAY S, et al. Investigations of a rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) model of systemic lupus erythematosus (SLE), BAFF and its receptors [J]. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8494.
- [40] DIAO L, TAO J, WANG Y, et al. Co-delivery of dihydroartemisinin and HMGB1 siRNA by TAT-modified cationic liposomes through the TLR4 signaling pathway for treatment of lupus nephritis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 8627–8645.
- [41] SHEN L, ZHU Y, HAN L, et al. A novel monoclonal antibody against human B7-1 protects against chronic graft-vs.-host disease in a murine lupus nephritis model [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(5): 14.
- [42] 力弘, 章蕴毅, 黄晞益, 等. 小鼠系统性红斑狼疮样综合征的诱导及病变特征 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2004, 23(8): 480–484.
- LI H, ZHANG Y Y, HUANG X Y, et al. Induction and characteristics of systemic lupus erythematosus syndrome in mice [J]. *Chin J N Drugs Clin Remed*, 2004, 23(8): 480–484.
- [43] QIAO B, WU J, CHU Y W, et al. Induction of systemic lupus erythematosus-like syndrome in syngeneic mice by immunization with activated lymphocyte-derived DNA [J]. *Rheumatology*, 2005, 44(9): 1108–1114.
- [44] KOGA T, ICHINOSE K, KAWAKAMI A, et al. Current insights and future prospects for targeting IL-17 to treat patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 624971.
- [45] RUIZ J T, LUJÁN L, BLANK M, et al. Adjuvants- and vaccines-induced autoimmunity: animal models [J]. *Immunol Res*, 2017, 65(1): 55–65.
- [46] ASCHMAN T, SCHAFFER S, BINIARIS GEORGALLIS S I, et al. Interferon lambda regulates cellular and humoral immunity in pristane-induced lupus [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11747.
- [47] PANNU N, BHATNAGAR A. Oxidative stress and immune complexes: pathogenic mechanisms in pristane induced murine model of lupus [J]. *Immunobiology*, 2020, 225(1): 151871.
- [48] LEE P Y, WEINSTEIN J S, NACIONALES D C, et al. A novel type I IFN-producing cell subset in murine lupus [J]. *J Immunol*, 2008, 180(7): 5101–5108.
- [49] 罗彦彦, 林有坤, 黄翠丽, 等. 肝细胞浆蛋白诱导系统性红斑狼疮兔模型的实验研究 [J]. *免疫学杂志*, 2011, 27(8): 710–714.
- LUO Y Y, LIN Y K, HUANG C L, et al. A rabbit model of systemic lupus erythematosus induced by immunization of hepatic cytoplasmic protein [J]. *Immunol J*, 2011, 27(8): 710–714.
- [50] 臧星星, 马宝骊, 柏峻, 等. 空肠弯曲菌 HSP43 诱导自身抗体产生 [J]. *中国免疫学杂志*, 1996, 17(5): 279–282.
- ZANG X X, MA B L, BAI J, et al. *Campylobacter jejuni* HSP43 induces autoantibody production [J]. *Chin J Immunol*, 1996, 17(5): 279–282.
- [51] 陈海霞, 李雯, 周春骄, 等. 柴胡多糖对空肠弯曲菌离体再刺激狼疮样小鼠脾细胞作用研究 [J]. *药学报*, 2016, 51(7): 1098–1104.
- CHEN H X, LI W, ZHOU C J, et al. Effect of *Bupleurum* polysaccharides on splenocytes from lupus like mouse re-challenged with *Campylobacter jejuni*-S131 *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2016, 51(7): 1098–1104.
- [52] 孙兵, 马宝骊, 谢雅莉. 甲醛化空肠弯曲菌(CJ-S131)与佐剂诱导的自身免疫动物模型 [J]. *上海免疫学杂志*, 1991, 11(5): 257–260.
- SUN B, MA B L, XIE Y L. An animal model of autoimmunity induced by formaldehyde treated CJ-S131 and freunds complete adjuvant [J]. *Shanghai J Immunol*, 1991, 11(5): 257–260.
- [53] 刘文斌, 杨秀敏, 周宁, 等. 空肠弯曲杆菌与弗氏完全佐剂诱导系统性红斑狼疮样小鼠模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(5): 341–344.
- LIU W B, YANG X M, ZHOU N, et al. Establishment of a mouse model of systemic lupus erythematosus induced by *Campylobacter jejuni* and complete friend's adjuvant [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2009, 17(5): 341–344.
- [54] 陆叶, 欧颖烨, 力弘. 空肠弯曲菌诱导系统性红斑狼疮样小鼠模型的优化 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2014, 23(6): 343–348.
- LU Y, OU Y Y, LI H. Optimization of a mouse model of systemic lupus erythematosus induced by *Campylobacter jejuni*-S131 [J]. *Chin J Clin Pharm*, 2014, 23(6): 343–348.
- [55] 张娟, 尚德静. Toll 样受体 4 (TLR4) 信号通路及其靶向药物的研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2021, 37(7): 657–662.
- ZHANG J, SHANG D J. Research progress of TLR4 signaling pathway and its targeted drugs [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2021, 37(7): 657–662.
- [56] 孙丹, 黄旭光, 王大宁, 等. LPS 诱导 MRL/lpr 小鼠系统性红斑狼疮模型的建立 [J]. *武警后勤学院学报(医学版)*, 2018, 27(10): 810–814.
- SUN D, HUANG X G, WANG D N, et al. Establishment of systemic lupus erythematosus model induced by LPS in MRL/lpr mice [J]. *J Logist Univ PAP (Med Sci)*, 2018, 27(10): 810–814.
- [57] LEWIS R M, ARMSTRONG M Y, ANDRÉ-SCHWARTZ J, et al. Chronic allogeneic disease. I. Development of glomerulonephritis [J]. *J Exp Med*, 1968, 128(4): 653–679.
- [58] 韩莲花, 蔡磊, 朱莹, 等. 慢性移植植物抗宿主病狼疮样肾炎小鼠模型的建立及免疫病理学鉴定 [J]. *现代免疫学*, 2014, 34(2): 115–119.
- HAN L H, CAI L, ZHU Y, et al. Development of, and

- pathological evaluation of murine lupus nephritis model of chronic graft-versus-host disease [J]. *Curr Immunol*, 2014, 34(2): 115–119.
- [59] VIA C S. Advances in lupus stemming from the parent-into-F1 model [J]. *Trends Immunol*, 2010, 31(6): 236–245.
- [60] LI W, TITOV A A, MOREL L. An update on lupus animal models [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2017, 29(5): 434–441.
- [61] HALKOM A, WU H, LU Q. Contribution of mouse models in our understanding of lupus [J]. *Int Rev Immunol*, 2020, 39(4): 174–187.
- [62] GUNAWAN M, HER Z, LIU M, et al. A novel human systemic lupus erythematosus model in humanised mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16642.
- [63] CHEN J, LIAO S, XIAO Z, et al. The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1007579.
- [64] CHEN J, LIAO S, ZHOU H, et al. Humanized mouse models of systemic lupus erythematosus: opportunities and challenges [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 816956.
- [65] ANDRADE D, REDECHA P B, VUKELIC M, et al. Engraftment of peripheral blood mononuclear cells from systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome patient donors into BALB-RAG-2^{-/-} IL-2R γ ^{-/-} mice; a promising model for studying human disease [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(9): 2764–2773.
- [66] DUCHOSAL M A, MCCONAHEY P J, ROBINSON C A, et al. Transfer of human systemic lupus erythematosus in severe combined immunodeficient (SCID) mice [J]. *J Exp Med*, 1990, 172(3): 985–988.
- [67] ZHOU S, LI Q, ZHOU S, et al. A novel humanized cutaneous lupus erythematosus mouse model mediated by IL-21-induced age-associated B cells [J]. *J Autoimmun*, 2021, 123: 102686.
- [68] LI Z Y, CAI M L, QIN Y, et al. Age/autoimmunity-associated B cells in inflammatory arthritis: an emerging therapeutic target [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1103307.
- [69] 王超玄, 孙航. 基因敲除小鼠技术的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2019, 35(5): 784–794.
WANG C X, SUN H. Progress in gene knockout mice [J]. *Chin J Biotech*, 2019, 35(5): 784–794.
- [70] CANCRO M P. Age-associated B cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2020, 38: 315–340.
- [71] WANG M, PENG Y, LI H, et al. From monogenic lupus to TLR7/MyD88-targeted therapy [J]. *Innovation*, 2022, 3(5): 100299.
- [72] NICKERSON K M, CHRISTENSEN S R, SHUPE J, et al. TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus [J]. *J Immunol*, 2010, 184(4): 1840–1848.
- [73] SHARMA S, CAMPBELL A M, CHAN J, et al. Suppression of systemic autoimmunity by the innate immune adaptor STING [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(7): E710–E717.
- [74] CHYUAN I T, TZENG H T, CHEN J Y. Signaling pathways of type I and type III interferons and targeted therapies in systemic lupus erythematosus [J]. *Cells*, 2019, 8(9): 963.
- [75] HAN X, VESELY M D, YANG W, et al. PD-1H (VISTA)-mediated suppression of autoimmunity in systemic and cutaneous lupus erythematosus [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(522): eaax1159.
- [76] DETERRE P, BERTHELIER V, BAUVOIS B, et al. CD38 in T- and B-cell functions [J]. *Chem Immunol*, 2000, 75: 146–168.
- [77] DOMÍNGUEZ-PANTOJA M, LÓPEZ-HERRERA G, ROMERO-RAMÍREZ H, et al. CD38 protein deficiency induces autoimmune characteristics and its activation enhances IL-10 production by regulatory B cells [J]. *Scand J Immunol*, 2018, 87(6): e12664.
- [78] PAVÓN E J, ZUMAQUERO E, ROSAL-VELA A, et al. Increased CD38 expression in T cells and circulating anti-CD38 IgG autoantibodies differentially correlate with distinct cytokine profiles and disease activity in systemic lupus erythematosus patients [J]. *Cytokine*, 2013, 62(2): 232–243.
- [79] MORAND E F, FERNANDEZ-RUIZ R, BLAZER A, et al. Advances in the management of systemic lupus erythematosus [J]. *BMJ*, 2023, 383: e073980.
- [80] 阎雨, 方莲花, 杜冠华. 系统性红斑狼疮动物模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(4): 428–433.
YAN Y, FANG L H, DU G H. Research progress of animal models of systemic lupus erythematosus [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2015, 23(4): 428–433.
- [81] 吴岚, 蔡同凯, 张立超, 等. 系统性红斑狼疮动物模型及其发病机制研究进展 [J]. *药实践杂志*, 2018, 36(6): 481–483, 492.
WU L, CAI T K, ZHANG L C, et al. Study on animal models and mechanisms of systemic lupus erythematosus [J]. *J Pharm Pract*, 2018, 36(6): 481–483, 492.

[收稿日期] 2024-01-30