

陶柏楠,王咏兰,洪岚,等. 大黄素对人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞自噬的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (1): 1-7.

Tao BN, Wang YL, Hong L, et al. Effects of emodin on autophagy in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 1-7.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.001

大黄素对人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞自噬的影响

陶柏楠,王咏兰,洪 岚,袁 林*

(湖北民族大学,风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室,湖北 恩施 445000)

【摘要】 目的 基于 cGAS/STING 信号通路研究大黄素对人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 (MH7A) 自噬的潜在作用。**方法** 采用 CCK-8 法检测 MH7A 细胞增殖的结果,并根据细胞存活率筛选出药物的浓度,并加入自噬抑制剂 3-MA 进一步验证大黄素对自噬的影响;采用 MDC 法检测 MH7A 细胞自噬情况;采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 cGAS、STING、p-STING、LC3-I、LC3-II、P62 和 Beclin-1 的蛋白表达水平。**结果** MDC 染色结果提示,大黄素能够增强 MH7A 细胞自噬;Western blot 结果提示,大黄素可降低 MH7A 细胞自噬相关蛋白 cGAS、STING、p-STING 和 P62 的表达,增加 LC3-II 和 Beclin-1 的表达。加入自噬抑制剂 3-MA 后,MH7A 细胞 P62 蛋白表达达升高,LC3-II 和 Beclin-1 蛋白表达降低。**结论** 大黄素可能通过下调 cGAS/STING 信号通路加速自噬,抑制 MH7A 细胞增殖。

【关键词】 大黄素;MH7A 细胞;cGAS/STING 信号通路;自噬;类风湿关节炎

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0001-07

Effects of emodin on autophagy in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis

TAO Bonan, WANG Yonglan, HONG Lan, YUAN Lin*

(Hubei Minzu University, Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Enshi 445000, China)

【Abstract】 Objective To study the cGAS/STING signaling pathway and investigate the potential effect of emodin (EMD) on autophagy of human rheumatoid arthritis fibroblast synovial cells (MH7A). **Methods** CCK-8 method was used to detect MH7A cell proliferation, and the experimental concentration of EMD was screened according to cell survival rate. Then, autophagy inhibitor 3-MA was added to further verify the effect of EMD on autophagy. Autophagy of MH7A cells was detected via the monodansylcadaverine staining method. Protein expression levels of cGAS, STING, p-STING, LC3-I, LC3-II, P62 and Beclin-1 were detected by Western blot. **Results** Monodansylcadaverine staining indicated that EMD enhanced the autophagy of MH7A cells. Western blot indicated that EMD decreased the expression of autophagy related proteins cGAS, STING, p-STING and P62, and increased that of LC3-II and Beclin-1 in MH7A cells. After addition of the autophagy inhibitor 3-MA, the expression of P62 protein in MH7A cells increased, while that of LC3-II and

【基金项目】 国家自然科学基金 (81860757)。

【作者简介】 陶柏楠 (1996—), 男, 硕士, 研究方向: 中医药防治类风湿关节炎。E-mail: 2373247494@qq.com

【通信作者】 袁林 (1974—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 风湿性疾病。E-mail: 171354806@qq.com

Beclin-1 decreased. **Conclusions** EMD may accelerate autophagy and inhibit MH7A cell proliferation by down-regulating cGAS/STING signaling pathway proteins.

【Keywords】 emodin; MH7A cells; cGAS/STING signaling pathway; autophagy; rheumatoid arthritis

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

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的慢性和全身性自身免疫性疾病,以侵袭性炎症、滑膜组织过度增生和进行性关节侵蚀为特征,最终导致关节功能丧失和畸形^[1]。RA 典型临床特征为关节肿胀、疼痛、晨僵、畸形的对称性,常伴有关节器官受累,RA 被认为是身体残疾的主要来源之一,约占全球人口的 0.5%~1.0%^[2]。然而,到目前为止尚无有效的根治性治疗方法。目前,临床实践中 RA 的治疗策略主要是化学药物,如非甾体抗炎药、疾病修饰抗风湿药物、糖皮质激素和生物制剂等^[3]。然而,这些药物治疗费用昂贵,且经常出现心血管和胃肠道出血、肝肾毒性、感染和肿瘤风险等不良反应^[4]。中医药因其疗效显著和不良反应少而越来越受到关注,中医药可以通过多种成分、多种途径发挥作用,从而发挥预防和治疗风湿性关节炎的作用,且长期的临床应用已证明了其疗效和安全性^[5]。探讨中医药抗 RA 的作用机制对于指导临床用药及开发新的抗肿瘤药物具有积极意义。

大黄素 (emodin, EMD) 是从虎杖、大黄、何首乌等中药中分离得到的活性化合物衍生物,具有抗肿瘤、免疫调节、改善肝肾功能、抗炎、抗氧化及抗菌等较广泛的药理作用^[6-7]。自噬是一种高度保守的由溶酶体介导的胞内降解途径,通过降解异常的细胞器或蛋白质聚集完成细胞的代谢及更新。自噬在 RA 的发生和发展中发挥重要调节作用,研究报告,成纤维滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocyte, FLS) 自噬紊乱会导致滑膜组织过度增生,阻止 FLS 过度自噬可抑制其大量增殖以减缓 RA 的发生发展^[8]。磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶 (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)-干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon gene, STING) 是一条重要的介导免疫应答与自噬的信号通路,在 RA 中通过调节自噬来抑制 RA-FLS 的增殖^[9]。既往研究表明,大黄素通过促进 FLS 凋亡,抑制关节滑膜组织增殖和炎症等途径抗 RA^[10-12],但是否能够通过调控自噬发挥抗 RA 的机制尚不清楚。为进一步阐述大黄素抗 RA 的药理机制,本研究以人类类风湿关节炎成纤维滑膜细胞 MH7A 为研究对象,通过检测 cGAS/STING 信号通

路及自噬标记蛋白的表达,从自噬方面研究大黄素抗 RA 的作用及潜在的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

人类类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞系 (MH7A) 购自 Biovector NTCC 公司,批号为 220303。用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 培养基,于 5% CO₂ 细胞培养箱 37℃ 条件下培养。

1.2 主要试剂与仪器

大黄素购自南京道斯夫生物科技有限公司,批号为 208-258-8; 预染蛋白 Marker (Thermo Fisher, 01081673); 凝胶配制试剂盒 (Beyotime, P0012A); 羊抗兔二抗 (Proteintech, SA00001-2); 羊抗鼠二抗 (Proteintech, SA00001-1); P62 一抗 (Proteintech, 18420-1-AP); LC3 一抗 (Proteintech, 18725-1-AP); Beclin-1 一抗 (Proteintech, 11306-1-AP); β -actin 一抗 (Proteintech, 66009-1-Ig); cGAS (ABclonal, A8335); STING 一抗 (CST, #13647); p-STING 一抗 (CST, #50907); BCA 试剂盒、ECL 化学发光显影液 (武汉科瑞, KR0008、KR0016); DMEM 培养液 (Gibco, 8120481); DMSO (Sigma, RNB9551); 胎牛血清 (广州汉强, SF202104); 0.25% 胰蛋白酶消化液 (赛维儿, CR2109105)。超净工作台 (苏州安泰, 中国); CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Fisher, 美国); 电泳仪、转印仪 (Bio-Rad, 美国); 倒置生物显微镜 (Olympus, 日本); 超纯水制备仪 (上海乐枫, 中国); 高压蒸汽灭菌锅 (SANYO, 日本); 多功能酶标仪 (Thermo Scientific, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

将 MH7A 细胞在含有 DMEM、10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素培养液中培养。根据需要调节细胞浓度,并将细胞置于含有 5% CO₂ 的培养箱中,37℃ 下培养。当细胞生长到对数期时,使用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化,调整细胞密度为 5×10^4 /孔接种于 96 孔板进行细胞增殖实验;细胞密度为 1×10^6 /孔接种于无菌 6 孔板,进行细胞周期及 Western blot 检测。将培养皿置于细

胞培养箱中孵育 24 h,进行后续检测。

1.3.2 CCK-8 法检测 MH7A 细胞增殖

将 MH7A 细胞经过胰酶消化后,调整密度为 5×10^4 /孔接种于 96 孔板中,培养 24 h 实现细胞同步化,0(对照,Control)、2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素浓度梯度大黄素加入到培养基中,每组设置 6 个复孔,干预 24 h 后,每个孔加入 CCK-8 试剂 10 μL ,与培养基比例为 1:10,然后进一步培养 2 h,采用酶标仪在 450 nm 波长下测量每个孔的光密度(OD)。重复 3 次,根据说明书计算细胞存活率。

1.3.3 单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverine,MDC)染色检测 MH7A 细胞自噬

取对数生长期细胞,经过胰酶消化后将细胞接种于无菌 6 孔板中,调整密度为 1×10^6 /孔,将细胞分为 Control 组和大黄素低(10 $\mu\text{mol/L}$)、中(20 $\mu\text{mol/L}$)、高(40 $\mu\text{mol/L}$)剂量组,加入相应培养基培养 24 h 后,加入 0.05 mmol/L MDC 染色液,37℃ 培养箱避光染色 15 min 后,PBS 冲洗 3 次,取出玻片置于载玻片上,避光,荧光显微镜下观察,拍照。

1.3.4 Western blot 法检测 MH7A 细胞的 cGAS/STING 信号通路、自噬、周期标志蛋白表达

取细胞培养板,用含有 1% PMSF 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液于冰上裂解 MH7A 细胞,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清,获得总蛋白裂解液。根据说明书,使用 BCA 蛋白检测试剂盒进行定量。用 SDS-PAGE 蛋白凝胶分离总蛋白,然后用湿法转印仪将蛋白质转移到 PVDF 膜上。用 TBS 缓冲液制备的 5% 脱脂牛奶封闭含有蛋白质的 PVDF 膜,然后与一抗 4℃ 孵育过夜。使用 1:1000 的一抗稀释液 cGAS、STING、p-STING、LC3-I、LC3-II、P62、Beclin-1,与 PVDF 膜孵育过夜后,第 2 天将 PVDF 膜与各自的二抗在室温下孵育。ECL 化学发光系统检测蛋白条带,Image J 软件按照标准方法分析蛋白表达量。

1.4 统计学方法

Image J 软件分析图片,SPSS 20.0 软件分析结果,统计结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较满足正态分布及方差齐时,采用单因素方差分析。组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄素对 MH7A 细胞存活率的影响

与 Control 组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较,不同浓度(2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)大黄素处理组 MH7A 细胞

增殖有明显抑制作用($P<0.05$, $P<0.01$),见图 1。10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素处理组 MH7A 细胞存活率分别为(85.8 ± 1.9)%、(61.9 ± 11.3)%、(40.9 ± 0.3)%。为避免药物毒性对细胞的影响,后续实验以大黄素的浓度 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 作为低、中、高剂量组处理 24 h,见图 1。

2.2 MDC 染色检测大黄素对 MH7A 细胞自噬的影响

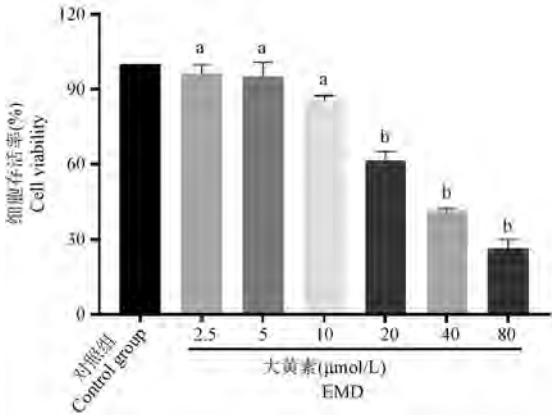
Control 组细胞呈现淡绿色的弱荧光,加入不同浓度的大黄素(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)预处理 24 h 后,绿色荧光强度增加,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),表明细胞的自噬增加,见图 2。

2.3 Western blot 法检测大黄素对 MH7A 细胞自噬标记物的影响

与 Control 组比,加入不同浓度大黄素(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)预处理 24 h 后,MH7A 细胞中 Beclin-1、LC3-II 蛋白表达水平明显升高,呈剂量相关性($P<0.05$, $P<0.01$)。P62 蛋白的表达水平明显降低,呈剂量相关性($P<0.05$, $P<0.01$)。结果提示,大黄素具有增强 MH7A 细胞自噬的作用,见图 3。

2.4 3-MA 验证大黄素对 MH7A 细胞自噬的影响

与 Control 组比较,40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素预处理组 MH7A 细胞绿色荧光强度增加($P<0.01$);与 40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素预处理组比较,5 $\mu\text{mol/L}$ 3-MA 预处理组 MH7A 细胞绿色荧光强度明显降低($P<0.01$),3-MA 联合大黄素预处理组 MH7A 细胞绿色荧光强度降低($P<0.01$);与 5 $\mu\text{mol/L}$ 3-MA 预处理组比较,3-MA 联合大黄素预处理组 MH7A 细胞绿色荧光强度升高($P<0.01$),见图 4。



注:与 Control 组比较, $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ 。

图 1 大黄素对 MH7A 细胞活力的影响

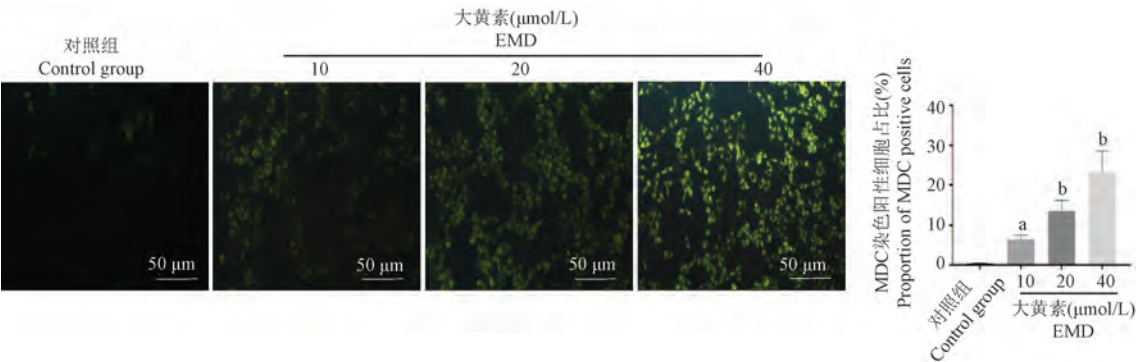
Note. Compared with Control group, $^aP<0.05$, $^bP<0.01$.

Figure 1 Effects of emodin on the viability of MH7A cells

2.5 3-MA 验证大黄素对 MH7A 细胞自噬标记物的影响

与 Control 组比较,40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素预处理组

MH7A 细胞 P62 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与 40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素预处理组比较,5 $\mu\text{mol/L}$ 3-MA 预处理组 MH7A 细胞 P62 蛋白明显升高($P<0.01$),

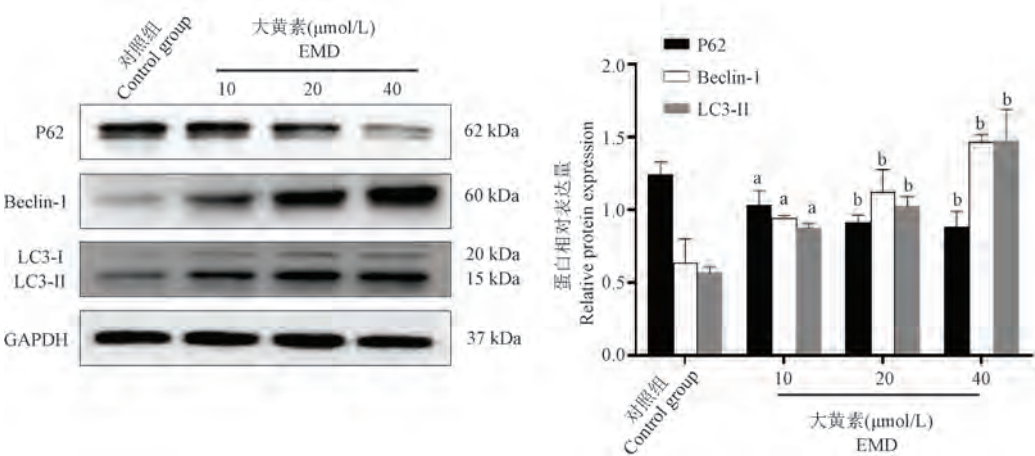


注:与 Control 组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ 。

图 2 MDC 染色检测大黄素对 MH7A 细胞自噬的影响

Note. Compared with Control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

Figure 2 Effect of emodin on autophagy in MH7A cells was examined by MDC staining

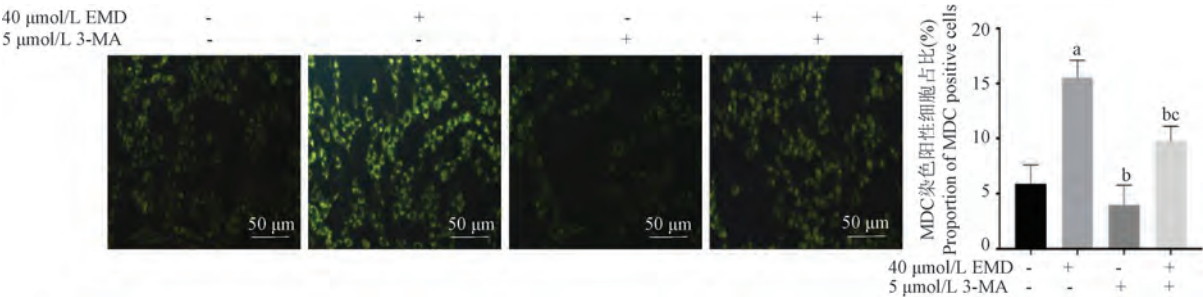


注:与 Control 组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ 。

图 3 大黄素对 MH7A 细胞自噬相关蛋白的影响

Note. Compared with Control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

Figure 3 Effect of emodin on the autophagy-related proteins in MH7A cells



注:与 Control 组比较, ^a $P<0.01$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ EMD 组比较, ^b $P<0.01$;与 5 $\mu\text{mol/L}$ 3-MA 组比较, ^c $P<0.01$ 。

图 4 3-MA 验证大黄素对 MH7A 细胞自噬的影响

Note. Compared with Control group, ^a $P<0.01$. Compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ EMD group, ^b $P<0.01$. Compared with 5 $\mu\text{mol/L}$ 3-MA group, ^c $P<0.01$.

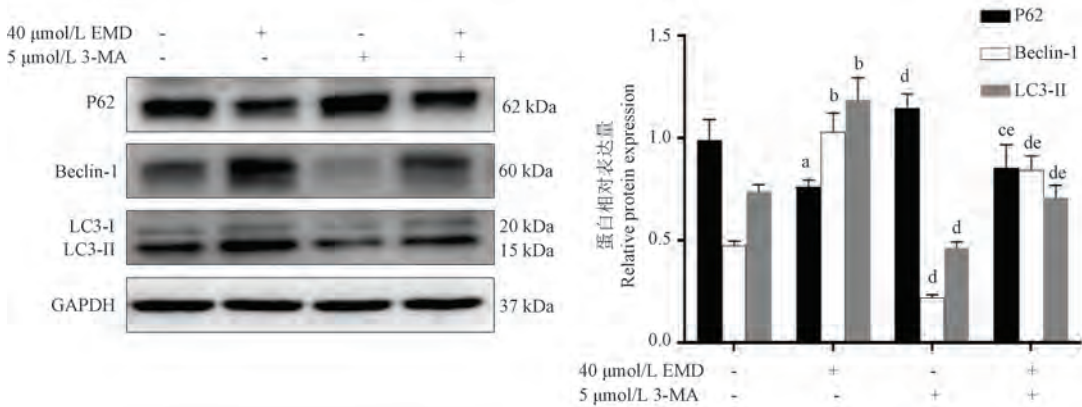
Figure 4 3-MA verified the effect of emodin on autophagy in MH7A cells

3-MA 联合大黄素预处理组 MH7A 细胞 P62 蛋白明显升高($P<0.05$);与 5 $\mu\text{mol/L}$ 3-MA 预处理组比较,3-MA 联合大黄素预处理组 MH7A 细胞 P62 蛋白明显降低($P<0.01$)。与 Control 组比较,40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素预处理组 MH7A 细胞 Beclin-1、LC3-II 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$);与 40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素预处理组比较,5 $\mu\text{mol/L}$ 3-MA 预处理组 MH7A 细胞 Beclin-1、LC3-II 蛋白明显降低($P<0.01$),3-MA 联合大黄素预处理组 MH7A 细胞 Beclin-1、LC3-II 蛋白明显降低($P<0.01$);与 5 $\mu\text{mol/L}$ 3-MA 预处理组比较,3-MA 联合大黄素预处理组 MH7A 细胞 Beclin-1、LC3-II 蛋白明显升高

($P<0.01$)。以上结果进一步反证了大黄素能够增强 MH7A 细胞的自噬作用,见图 5。

2.6 大黄素对 MH7A 细胞 cGAS/STING 信号通路相关蛋白的影响

与 Control 组比较,不同浓度的大黄素(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)预处理 24 h 的 MH7A 细胞中 cGAS、STING 蛋白的表达水平明显降低,且呈剂量相关性,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。10 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素预处理组 MH7A 细胞中 p-STING 蛋白的表达水平无显著差异($P>0.05$),20、40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素预处理组 MH7A 细胞中 p-STING 蛋白的表达水平明显降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),见图 6。

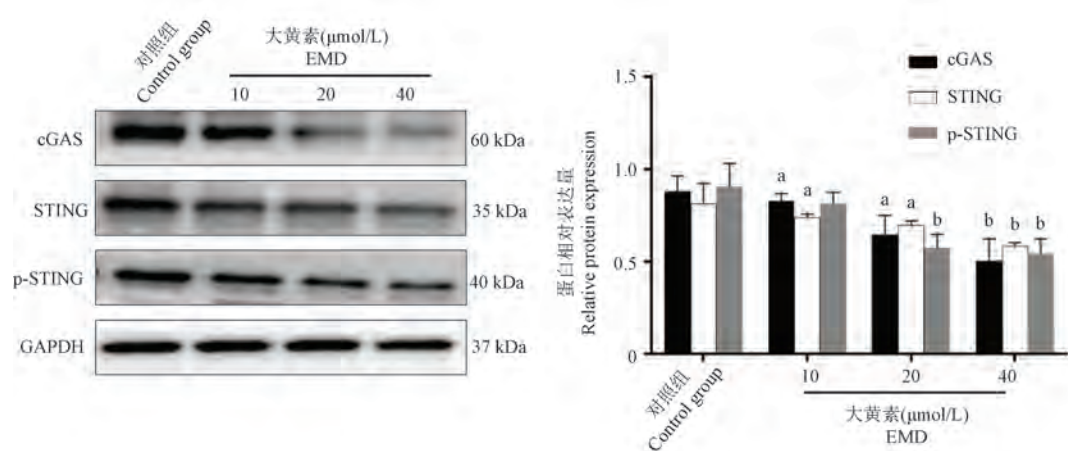


注:与 Control 组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ EMD 组比较, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$;与 5 $\mu\text{mol/L}$ 3-MA 组比较, ^e $P<0.01$ 。

图 5 3-MA 验证大黄素对 MH7A 细胞自噬相关蛋白的影响

Note. Compared with Control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$. Compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ EMD group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$. Compared with 5 $\mu\text{mol/L}$ 3-MA group, ^e $P<0.01$.

Figure 5 3-MA verified the effect of emodin on autophagy-related proteins in MH7A cells



注:与 Control 组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ 。

图 6 大黄素对 MH7A 细胞 cGAS/STING 信号通路蛋白表达的影响

Note. Compared with Control group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

Figure 6 Effect of emodin on the protein expression of the cGAS/STING signaling pathway in MH7A cells

3 讨论

人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 (FLS) 是 RA 患者滑膜组织中的主要细胞类型之一,是 RA 发生发展的关键效应细胞,其生长和自噬发生失衡与 RA 的发生发展密切相关^[13]。FLS 可以从多个方面促进 RA 的发生发展,因此,促进 FLS 的死亡与抑制 FLS 的增殖是预防和治疗 RA 的有效途径。

自噬在 RA 中表现异常活跃,自噬已被报道在 RA 的发生和发展中发挥重要调节作用^[14]。自噬最初被定义为细胞质物质被运送到溶酶体进行降解的过程,并被认为是控制细胞代谢中发挥重要作用,以维持代谢压力下的代谢稳态和细胞存活。例如饥饿、能量缺乏以及感染、炎症等病理过程时,自噬被激活,促使细胞成分被降解以为细胞供给能量和完成细胞更新^[15]。当自噬激活激酶 ULK1 被雷帕霉素复合物 1 (mTORC1) 激活,ULK1 形成 ULK1 复合物,进而激活 VPS34、VPS15、Beclin-1 和自噬相关基因 (ATG) 14L 复合物,然后激活一系列反应,导致形成自噬细胞的双膜结构^[16]。其中,Beclin-1 常被视为自噬起始阶段复合体形成的标志蛋白。随后双膜结构开始不断延伸,微管蛋白 1 轻链 3 的前体分子被 ATG4B 切割剪去 C 端的 5 肽,裂解成胞质形式 LC3-I,与磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE) 形成膜结合形式 LC3-II,并附着到自噬体的膜上,自噬体延伸形成完整的自噬体,并包裹细胞待降解物^[17]。其中,LC3-II 被视为自噬小体形成的标志物,用来衡量自噬水平。自噬体在细胞成分周围形成后,整个细胞器与溶酶体融合,导致其成分降解,溶酶体与自噬体包裹的降解物结合 P62 被蛋白水解酶降解。其中,P62 增多代表自噬受阻,减少代表自噬通畅^[18]。大量研究报道,自噬在 RA 中起着特别重要的作用,激活 RA 滑膜细胞自噬可抑制其增殖以缓解 RA^[19]。

cGAS/STING 信号通路是一条新被发现促进自噬的信号通路,其具有调节固有免疫以及诱导自噬的双重作用,可通过调节自噬抗 RA^[20]。cGAS 是一种胞质 DNA 传感器,通过与细胞质中的异常蛋白或自身 DNA 的结合来检测感染或组织损伤,结合 DNA 后,cGAS 产生第二信使分子 cGAMP,与衔接蛋白 STING 结合进行二聚化,激活自噬^[21]。当 cGAS 结合 cGAMP 后,STING 二聚化后从内质网退出,转移到内质网-高尔基体囊泡,并到达高尔基

体,含 STING 的高尔基体作为 LC3 脂质化的膜源,这是自噬体发生的关键步骤。内质网上的 STING 激活触发内质网应激和 mTORC1 的自噬机制靶标,促使 ULK1 复合物和 Beclin-1 磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 3 型 (PI3KC3) 复合物形成以启动自噬,进一步促进 LC3 与自噬体膜的发生和延伸^[22]。在自噬后期,cGAS/STING 泛素化并与 P62 结合,自噬体形成并最终与溶酶体结合发生自噬性降解。研究报道,cGAS 蛋白在 FLS 中高表达,抑制 cGAS/STING 信号通路可以降低 RA 中炎症因子分泌,缓解 RA 滑膜炎病变^[23-24]。通过抑制 cGAS/STING 信号通路调节 RA 细胞自噬,为 RA 治疗提供了新的方向。

本研究结果表明,在大黄素对 MH7A 细胞的预处理后,MH7A 细胞活力降低,cGAS、STING、p-STING 蛋白的表达水平明显降低,MDC 染色检测到 MH7A 细胞自噬荧光强度增加,Western blot 法检测到 Beclin-1、LC3-II 蛋白表达升高,P62 蛋白表达降低,自噬增强;加入自噬抑制剂 3-MA 后,自噬增强现象被逆转,出现 Beclin-1、LC3-II 蛋白表达降低,P62 蛋白表达升高;大黄素联用 3-MA 干预 MH7A 细胞后发现自噬的抑制现象有所恢复,即 Beclin-1、LC3-II 蛋白表达升高,P62 蛋白表达降低。综上,大黄素可能是通过调节 cGAS/STING 信号通路,调控了自噬的发生,发挥抑制 MH7A 细胞增殖的作用。

综上所述,大黄素可能通过抑制 cGAS/STING 信号通路加速细胞的自噬,来抑制 MH7A 细胞增殖。本研究只完成了初步的体外实验,目前尚未采用动物实验深入探讨;对于信号通路的研究仅借助于单向的 Western blot 结果,未使用抑制剂及其他检测方法进一步验证;并且仅对大黄素作用 24 h 时研究,未对其他时间点对 MH7A 作用进行研究。因此,课题组将进一步深入研究,以期临床提供更有说服力的依据。

参考文献:

- [1] Weyand CM, Goronzy JJ. The immunology of rheumatoid arthritis [J]. Nat Immunol, 2021, 22(1): 10-18.
- [2] Smith MH, Berman JR. What is rheumatoid arthritis [J]. JAMA, 2022, 327(12): 1194.
- [3] Greenblatt HK, Kim HA, Bettner LF, et al. Preclinical rheumatoid arthritis and rheumatoid arthritis prevention [J]. Curr Opin Rheumatol, 2020, 32(3): 289-296.
- [4] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗类风湿关节炎临床应用指南(2022 年) [J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(3): 261-273.

- “Clinical application guidelines for the treatment of superior diseases of proprietary Chinese medicine” standardization project team. Guidelines for clinical application of Chinese patent medicine in the treatment of rheumatoid arthritis (2022) [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2023, 43(3): 261–273.
- [5] 刘婷婷, 高维杰, 李玉琦, 等. 常用中医技术治疗类风湿关节炎的证据总结 [J]. 中医药导报, 2019, 25(21): 94–99. Liu TT, Gao WJ, Li YQ, et al. Summary of evidence of commonly used Chinese medicine techniques in treating rheumatoid arthritis [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 25(21): 94–99.
- [6] Dong X, Fu J, Yin X, et al. Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics [J]. Phytother Res, 2016, 30(8): 1207–1218.
- [7] 王玉, 杨雪, 夏鹏飞, 等. 大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4821–4837. Wang Y, Yang X, Xia PF, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of *Rhei Radix et Rhizoma* and predictive analysis on quality markers [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(19): 4821–4837.
- [8] Zhao J, Jiang P, Guo S, et al. Apoptosis, autophagy, netosis, necroptosis, and pyroptosis mediated programmed cell death as targets for innovative therapy in rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2021, 24(12): 809806.
- [9] Hu Y, Chen B, Yang F, et al. Emerging role of the cGAS-STING signaling pathway in autoimmune diseases: Biologic function, mechanisms and clinical prospection [J]. Autoimmun Rev, 2022, 21(9): 103155.
- [10] 金泽旭, 周兵望, 王茂林, 等. 虎杖大黄素对类风湿关节炎大鼠 Bax 及 Bcl-2 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(11): 2572–2575. Jin ZX, Zhou BW, Wang ML, et al. Effect of *Polygonum cuspidatum* emodin on the expression of Bax and Bcl-2 in rheumatoid arthritis rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2018, 29(11): 2572–2575.
- [11] 彭菲菲, 徐艳明, 谭洪发, 等. 大黄素对类风湿关节炎滑膜细胞增殖及转移的抑制作用 [J]. 免疫学杂志, 2017, 33(1): 34–39. Peng FF, Xu YM, Tan HF, et al. The inhibitory effects of emodin on the proliferation and metastasis of synovial cells form rheumatoid arthritis [J]. Immunol J, 2017, 33(1): 34–39.
- [12] 潘书涵, 王永萍, 张阳. 基于 TNF- α -HIF-1 α -iNOS-NO 信号通路探讨大黄素对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞的影响 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(4): 817–820. Pan SH, Wang YP, Zhang Y. Based on TNF- α -HIF-1 α -iNOS-NO signaling pathway, the effect of emodin on fibroblast-like synovial cells of rheumatoid arthritis was discussed [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(4): 817–820.
- [13] Ding JT, Hong FF, Yang SL. Roles of autophagy in rheumatoid arthritis [J]. Clin Exp Rheumatol, 2022, 40(11): 2179–2187.
- [14] Wu DJ, Adamopoulos IE. Autophagy and autoimmunity [J]. Clin Immunol, 2017, 176: 55–62.
- [15] Vomero M, Barbati C, Colasanti T, et al. Autophagy and rheumatoid arthritis: current knowledges and future perspectives [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1577.
- [16] Lee TY, Lu WJ, Changou CA, et al. Platelet autophagic machinery involved in thrombosis through a novel linkage of AMPK-MTOR to sphingolipid metabolism [J]. Autophagy, 2021, 17(12): 4141–4158.
- [17] Peña-Martinez C, Rickman A, Heckmann BL. Beyond autophagy: LC3-associated phagocytosis and endocytosis [J]. Sci Adv, 2022, 8(43): n1702.
- [18] Chadha S, Behl T, Bungau S, et al. Focus on the multimodal role of autophagy in rheumatoid arthritis [J]. Inflammation, 2021, 44(1): 1–12.
- [19] 孙英焕, 吴茜, 李春蒔, 等. 巨自噬及分子伴侣介导自噬在类风湿关节炎中的相互作用及其联系 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(10): 1566–1569. Sun YH, Wu Q, Li CS, et al. Interaction and relationship between macrophage and molecular chaperone mediated autophagy in rheumatoid arthritis [J]. Chin J Immunol, 2016, 32(10): 1566–1569.
- [20] Liu Z, Wang M, Wang X, et al. XBP1 deficiency promotes hepatocyte pyroptosis by impairing mitophagy to activate mtDNA-cGAS-STING signaling in macrophages during acute liver injury [J]. Redox Biol, 2022, 52: 102305.
- [21] Prabakaran T, Bodda C, Krapp C, et al. Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a P62/SQSTM1-dependent autophagy pathway activated by TBK1 [J]. EMBO J, 2018, 37(8): e97858.
- [22] Gui X, Yang H, Li T, et al. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway [J]. Nature, 2019, 567(7747): 262–266.
- [23] Xu A, Yang R, Zhang M, et al. Macrophage targeted triptolide micelles capable of cGAS-STING pathway inhibition for rheumatoid arthritis treatment [J]. J Drug Target, 2022, 30(9): 961–972.
- [24] Li R, Lin W, Kuang Y, et al. cGAS/STING signaling in the regulation of rheumatoid synovial aggression [J]. Ann Transl Med, 2022, 10(8): 431.

[收稿日期] 2023-04-09

吴学海, 杨一言, 王晓堂, 等. 过表达 miR-181a-5p 的口腔癌皮下移植瘤小鼠模型的小肠代谢组学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 8-17.

Wu XH, Yang YY, Wang XT, et al. A subcutaneous transplanted tumor mouse model of oral cancer overexpressing miR-181a-5p study of small intestine metabolomics [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 8-17.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.002

过表达 miR-181a-5p 的口腔癌皮下移植瘤小鼠模型的小肠代谢组学研究

吴学海^{1#}, 杨一言^{2#}, 王晓堂², 陈文璐², 宋晓娜², 王恬¹, 宋国华^{1,2,3*}

(1. 山西医科大学口腔医学院, 口腔疾病防治与新材料山西省重点实验室, 太原 030001;

2. 山西医科大学基础医学院, 太原 030001; 3. 山西医科大学实验动物中心, 实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室, 太原 030001)

【摘要】目的 通过检测口腔癌皮下移植瘤小鼠小肠中代谢物和代谢通路的变化, 分析过表达 miR-181a-5p 对皮下移植瘤小鼠小肠中代谢物和代谢物组的影响。**方法** 实验分为 3 组, 空白对照 (Control) 组、阴性对照 (negative control, NC) 组以及实验 (over expression of miR-181a-5p, OE) 组。将不同组别处理后的细胞混悬液, 通过皮下注射到 M-NSG 重度免疫缺陷雌性小鼠右侧腹股沟中上部, 构建成口腔癌皮下移植瘤小鼠模型。按时记录小鼠体重变化, 对小鼠小肠组织进行 HE 染色, 观察各组病理变化。采用超高效液相色谱-串联飞行时间质谱联用仪和串联 Orbitrap 质谱联用仪检测 NC 组、OE 组和 Control 组小鼠小肠中的代谢物, 使用 XCMS 预分析原始数据, 质量评价样本数据, 鉴定 Control 组与 NC 组、NC 组与 OE 组的差异代谢物, 进行 KEGG 富集分析获取差异代谢通路。**结果** Control 组和 NC 组小肠组织中共鉴定出 170 种差异代谢物。代谢物富集的显著性信号通路包括胆碱代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、 γ -氨基丁酸 (GABA) 神经突触代谢、甘油磷脂代谢、环磷酸腺苷 (cAMP) 信号通路代谢、癌症中心碳代谢以及烟酸和烟碱胺代谢通路。NC 组和 OE 组相比, 小鼠小肠中检测到 VIP (variable importance in the projection) > 2 的差异代谢物有 16 种, 显著性差异代谢物包括甘油磷酸胆碱、棕榈酸、3-羟基丁酰肉碱、 β -羟丁酸等。代谢物富集到的显著性差异通路为胆碱代谢通路。**结论** 口腔癌皮下移植瘤可引起小鼠小肠的代谢物发生变化, 主要改变了小肠中与能量代谢相关的代谢物。过表达 miR-181a-5p 影响口腔癌皮下移植瘤小鼠小肠代谢物, 代谢物富集通路为胆碱代谢通路。

【关键词】 口腔癌; 皮下移植瘤; 小肠; 代谢组学; miR-181a-5p

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0008-10

A subcutaneous transplanted tumor mouse model of oral cancer overexpressing miR-181a-5p study of small intestine metabolomics

WU Xuehai^{1#}, YANG Yiyang^{2#}, WANG Xiaotang², CHEN Wenlu², SONG Xiaona², WANG Tian¹, SONG Guohua^{1,2,3*}

(1. Shanxi Medical University School of Stomatology, Shanxi Provincial Key Laboratory of Oral Disease Prevention and New Materials, Taiyuan 030001, China. 2. Shanxi Medical University School of Basic Medicine, Taiyuan 030001.

3. Shanxi Medical University Experimental Animal Center, Experimental Animals and Animal Models of Human Disease Key Laboratory of Shanxi Province, Taiyuan 030001)

【基金项目】 国家自然科学基金 (31772551); 中央引导地方科技发展资金项目 (YDZJSX2022A060); 山西省回国留学人员科研项目 (2021-086); 山西省科技创新人才团队项目 (202204051002032); 山西省自然科学基金 (20210302124093)。

【作者简介】 吴学海 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 口腔肿瘤疾病机制研究。E-mail: 1936910400@qq.com

杨一言 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: winnter9841@163.com

[#]共同第一作者

【通信作者】 宋国华 (1973—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: ykdsgh@163.com

[Abstract] Objective To analyze the effects of miR-181a-5p overexpression on metabolites in the small intestines of mice with subcutaneous oral cancer by detecting changes in metabolites and metabolic pathways. **Methods** Three groups were included in study: Control group, negative control and miR-181a-5p overexpression group. To establish a subcutaneous oral cancer model in mice, variously treated cell suspensions were subcutaneously injected into the upper right of the groin in female M-NSG severely immunodeficient mice. Changes in pathology and small intestinal tissues were assessed by HE staining. Changes in mouse body weight were also assessed. Tandem orbitrap mass spectrometry and ultra-high performance liquid chromatography-tandem time-of-flight mass spectrometry, were used to examine metabolites in the small intestines. By pre-analyzing the original data and quality rating sample data, XCMS was able to assess which metabolites were different among the groups. To identify unique metabolic pathways, KEGG enrichment analysis was used. **Results** A total of 170 distinct metabolites were found in the small intestinal tissues of Control and NC groups. Choline metabolism, alanine, aspartate, and glutamate metabolism, GABA synaptic metabolism, glycerophospholipid metabolism, cAMP signaling route, cancer center carbon metabolism, and niacin and niacin amine metabolic pathways were important signaling pathways for metabolite enrichment. In the NC group, 16 distinct metabolites with VIP values larger than 2 were found in the small intestines compared with the OE group overexpressing miR-181a-5p. Glycerin phosphorylcholine, palmitic acid, 3-hydroxybutyl carnitine, and β -hydroxybutyric acid were among the metabolites that significantly varied. The primary enhanced metabolic pathway was the choline pathway. **Conclusions** Mouse small intestines underwent slight changes from subcutaneous oral cancer with the greatest effect on metabolites critical for energy metabolism. The choline metabolic pathway was the pathway that selected absolutely metabolites in mouse small intestines with subcutaneous grafts of oral cancer.

[Keywords] oral cancer; subcutaneously transplanted tumor; small intestines; metabolomics; miR-181a-5p

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

口腔癌常发生于患者口腔的舌部、颊部、唇部和腭部,是一种危害性极大的恶性肿瘤^[1]。2022 年中国和美国共报道新发口腔癌病例 56 943 例,在 2020 年的统计中显示其总患病数在恶性肿瘤中位于第 16 位^[2-3]。恶病质是晚期恶性肿瘤进展进程中同时诱发的一种机体的不良状态,致使患者生活质量明显降低,机体健康状况出现急剧恶化^[4]。小鼠模型常常被用于研究各类肿瘤状态下不同组织和器官的病理变化,可作为研究不同器官代谢功能改变的工具^[5-6]。小肠代谢组的变化在口腔癌恶病质状态下具有重要的研究意义,基于此本研究拟利用代谢组学探究皮下移植瘤小鼠模型中小肠的代谢变化。代谢组学能系统全面的分析目标检测物中代谢物组的差异,在医学相关实验中,代谢组学作为挖掘生物各组织样本的代谢差异有重要的作用^[7-8]。微小 RNA (microRNA) 是一类非编码并且起到多种调控功能的小分子,大量研究表明 miR-181a-5p 参与到多种疾病的发生发展,且在口腔癌中参与调控^[9]。为了进一步筛选在口腔癌皮下移植瘤小鼠模型中与小肠代谢相关的差异代谢物,同时分析过表达 miR-181a-5p 对该状态下小肠代谢物和代谢物组的影响,本研究将采用非靶向代谢组学方法,筛选空白对照组与阴性对照组小鼠模型肠道中的差异代谢物与代谢通路,对比阴性对照组和实

验组,探究过表达 miR-181a-5p 对口腔癌皮下移植瘤小鼠模型肠道代谢的影响,阐明口腔癌状态下及 miR-181a-5p 过表达后的小肠代谢物组和代谢标志物的变化,以期患者的营养支持和全身健康的恢复提供帮助。

1 材料和方法

1.1 实验动物

20 只 SPF 级 M-NSG 雌性小鼠,体重(20 $\pm$ 2)g,4~6 周龄,购自上海南模生物科技股份有限公司[SCXK(沪)2019-0002]。动物饲养于山西省人民医院实验动物中心屏障环境动物实验设施中心[SYXK(晋)2019-0003]。环境温度(24 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,环境湿度(40 $\pm$ 10)%,设施内光暗循环昼夜各半。本研究中所有涉及的动物实验均已得到山西医科大学实验动物伦理委员会的批准(2021013),动物实验中的各项操作均符合 3R 原则以遵循实验动物福利伦理。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖液体培养基(批号:PYG0073,武汉博士德公司);胎牛血清(批号:FS301-02,北京塞澳美细胞技术有限公司);双抗(批号:PYG0016,大连美仑生物技术有限公司);甲醇(批号:A456-4,美国 Fisher 公司);乙腈(批号:1499230-935,美国 Merck

公司);乙酸铵(批号:73594,美国 Sigma 公司)。

干燥烘箱(华北实验仪器有限公司);倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);轮转切片机(德国 Leica 公司);高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司);超低温冰箱(日本三洋电器株式会社公司);AB Triple TOF 6600 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪(美国 Agilent 公司);色谱柱(2.1 mm×100 mm column, 1.7 μm , Waters, ACQUITY UPLC BEH Amide)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞悬液制备

培养 CAL-27 细胞以及前期实验构建的过表达 miR-181a-5p 的 CAL-27 细胞,每类各 8 瓶制取细胞悬液。每瓶添加 1 mL 胰酶,然后移置细胞培养箱,时间分别为 NC 组消化 2~3 min,OE 组消化 70 s。培养瓶置于倒置显微镜下观察,待见到胞质回缩,各组细胞悬浮后,在各个培养瓶中加入 1 mL 完全培养基以停止消化。悬浮液是通过对培养瓶中贴壁细胞的充分吹打混合后,置于离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清液后重悬的细胞。细胞计数所得细胞悬液的浓度,目标浓度为 $5\times 10^6/\text{mL}$ 。各组小鼠皮下注射细胞数目设置为 5×10^5 个,接种体积为 0.1 mL。

1.3.2 肿瘤接种分组及体重记录

重度免疫缺陷小鼠(NOD-PrkdcscidIl2rgem1/Smoc, M-NSG)适应设施环境 1 周后,对每只小鼠进行消毒处理,注射提前配备的细胞悬液于小鼠右侧腹股沟中上部。各组小鼠接种分组如下:不进行任何处理的空白对照(Control)组($n=6$)、注射口腔癌 CAL-27 细胞的阴性对照(negative control, NC)组($n=7$)和注射过表达 miR-181a-5p 的 CAL-27 细胞的实验(over expression of miR-181a-5p, OE)组($n=7$)。注射细胞混悬液后,各组小鼠饲养于 IVC 笼具中,记录小鼠活动状态及注射后成瘤进展。注射后的 1 周为成瘤缓冲期,固定每周两次观察记录小鼠成瘤情况,发现瘤体后开始每天称取观察记录小鼠的体重变化。

1.3.3 样本的取材和固定

终止实验使用麻醉试剂安乐死处理 M-NSG 小鼠,迅速取出小肠组织,用 0.9% 生理盐水冲洗干净。小肠样本分为两份,一份用于病理组织染色观察,一份置于液氮中冷冻储存 30 min 后,移置-80℃ 冰箱中存储,后续进行组学分析。

1.3.4 小肠组织苏木素-伊红染色

石蜡包埋小肠组织,并通过石蜡切片机对小肠组织进行切片,切片厚度为 4 μm 。小肠切片经过脱蜡和脱水后,使用苏木素染液和伊红染液对小肠组织进行染色,封片,显微镜下观察组织形态变化。

1.3.5 代谢组学样本制备

所得样本均放置在 4℃ 恒温环境下,缓慢解冻,取合适体积的样本加入已预冷过并按照(2:2:1, v/v/v)配备的甲醇:乙腈:水溶液中,涡旋旋转充分混合,低温超声溶解 30 min,并于-20℃ 的恒温环境中放置 10 min,4℃ 14 000 r/min 离心 20 min,离心完毕后,提取所得上清液,真空下干燥处理。质谱分析时,先添加 100 μL 乙腈水溶液(乙腈:水=1:1, v/v),复溶干燥后的样本,涡旋,14 000 r/min,4℃ 离心 15 min,后续样本分析使用的即为所得上清液。

1.3.6 小肠非靶向代谢组学分析

(1) 样本准备

小肠组织样品通过 Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统(UHPLC)中的 HILIC 色谱柱分离;柱温 25℃,总流速 0.5 mL/min,进样量 2 μL ;两种电离模式流动相成分的构成为 A(水, 25 mmol/L 氨水和 25 mmol/L 乙酸铵)和 B(乙腈),色谱系统设置梯度洗脱条件。系统梯度洗脱的步骤:先 0~0.5 min,95%的 B→0.5~7 min 后,使得 B 从 95%线性下调到 65%→7~8 min 之后,将 B 从 65%线性下调到 40%→8~9 min 之后,将已得 B 维持在 40%;9~9.1 min 之后, B 从 40%线性调整至 95%;9.1~12 min 后,使 B 稳定维持在 95%;整个液相色谱分析和操作的过程中小肠样本均放置在温度为 4℃ 的自动进样器中。为使仪器检测信号稳定减少干扰,随机选择分析后续样本。样品整个操作中通过使用添加使用质量控制(QC)样品的方式,该样品可用于监测系统和评价实验数据是否可靠。

(2) 小肠非靶向代谢组学分析

在 Q Exactive 质谱的条件下,使用 AB Triple TOF 6600 质谱仪收集样本的一级和二级谱图,使用 Agilent 1290 Infinity LC - 超高效液相色谱仪(UHPLC)获取结果。对已有小肠组织样本充分分离处理后,质谱系统使用 Triple TOF 6600-质谱仪(AB SCIEX)、电喷雾电离(ESI)检验样本正离子和负离子模式。ESI 源采用以下设置参数值:辅助加热雾化气体 1(Gas1): 60,辅助加热 2(Gas2): 60,幕气参数(CUR): 30 psi,离子源温度 600℃,喷雾电压(ISVF) ± 5500 V(正负的两种不同模式)。60~1000

Da 作为一阶质荷比所检测时的具体范围,25~1000 Da 作为二阶质荷比所检测时的范围。一次质谱扫描时的所累积的时间具体设置为每谱 0.20 s,二次质谱扫描时的所累积的时间具体设置为每谱 0.05 s。对于二次不同的质谱捕获,采用数据依赖采集型方法(IDA),通过将同位素离子所去除的范围调整为 4 Da 并对每回扫描捕捉的 10 个有关联碎片图来筛选处理峰值强度值。参数设置:去簇电压(DP)为 60 V(+)和-60 V(-);碰撞能量(CE)固定在(35±15) eV。

(3) 小肠非靶向代谢组学数据处理

ProteoWizard MSConvert 系统将初始的 MS 数据再更改转化为 MzXML 类型的文件后,通过 XCMS 程序对已有数据进行分析。在拾取峰值时,各参数分别设置为:厘米波(m/z)10 ppm,峰宽 $c(10,60)$,以及预滤器 $c(10,100)$ 。对于峰值分组, $bw=5$, $mzwid=0.025$, $minfrac=0.5$ 。CAMERA (MEtabolite pRofile 注释的算法集合)被用于同位素和加合物的注释。提取离子特征后变量存在有超过 50% 为非零测量值时对其储存保留至少 1 组。代谢物的化合物鉴定是通过比较准确度 m/z 值(<10 ppm)和 MS/MS 谱与可用的真实标准建立的内部数据库进行的。

整理后的数据再进行求和以及标准化后,通过 R 程序包(ropls)进行多元数据整理,主成分分析(PCA)使用帕累托尺度,并分析正交偏最小二乘判别式(OPLS-DA)。为了对模型稳健性进行综合的评价,通过置换检验对其整理分析。计算 OPLS-DA 模型中变量重要性投影 VIP 值,以表示其对分类的贡献。在对两组独立的样本间进行差异的显著性分析时,采用的是 Student's t 检验的方式进行判别。为了筛选发现样本代谢物之间是否存在较为显著的变化时设置样本的筛选条件为 $VIP>1$ 、 $P<0.05$ 。两个独立变量之间判定是否存在相关性时使用的分析方法为 Pearson 相关分析。

1.4 统计学方法

统计学方法使用 SPSS 23.0 软件分析,数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。单因素方差分析组间数据。独立样本 t 检验进行组内的比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 口腔癌皮下移植瘤小鼠模型小肠组织的病理改变及体重变化

小鼠小肠组织病理切片结果显示,Control 组小鼠小肠绒毛排列规则有序,相邻绒毛间形成界限清

晰的隐窝,并且显示出大量横截的肠绒毛;NC 组小鼠小肠绒毛发生较多脱落,排列疏松无规则,部分上皮层和固有层存在间隙;OE 组小鼠肠绒毛部分连续规则,同时可见较深的肠隐窝(图 1A)。各组小鼠体重有很大变化,Control 组小鼠平均体重在肿瘤成模前后没有显著性差异,NC 组小鼠肿瘤成模后体重明显下降,下降率为 10.27%。OE 组小鼠平均体重在实验开始和结束时没有显著差异(图 1B)。

2.2 代谢组学的多元统计分析

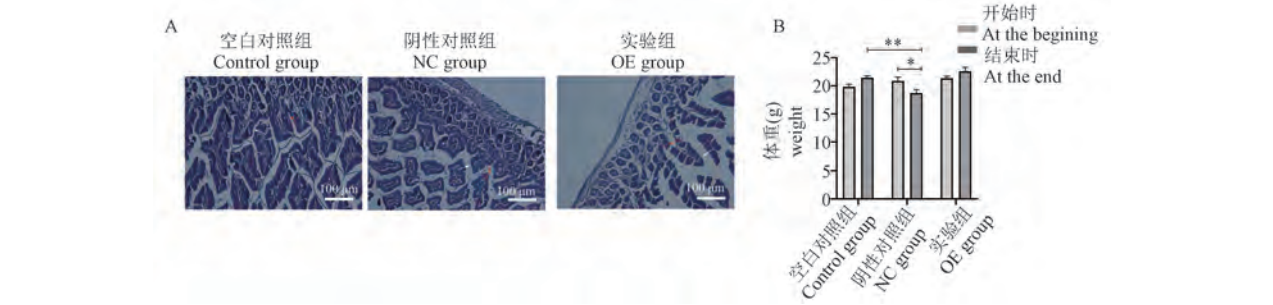
在 PCA 评分图中,Control 组和 NC 组、OE 组和 NC 组之间的代谢轨迹有明显的分离,Control 组和 OE 组的各个检测样本偏离不明显(图 2A~2D)。口腔癌皮下成瘤后使 M-NSG 的代谢网络改变,轨迹发生变化,将 Control 组、NC 组和 OE 组之间的 RT、 m/z 和 ProgenesisQI 预处理峰高强度的广泛多维矩阵导出到 EZinfo 插件中进行模式识别分析。从正离子模式和负离子模式(图 2E~2H)来看,不同组的 OPLS-DA 评分图很好地分离,这表明在 CAL-27 皮下成瘤后和过表达 miR-181a-5p 后,小肠的代谢水平都发生了显著变化。对各组模型使用置换检验检测模型拟合,结果显示模型稳健(图 2I~2L)。

2.3 口腔癌皮下移植瘤小鼠小肠中潜在差异代谢物的检测

Control 组和 NC 组中共检测到 170 种差异代谢物,包括胆碱、谷氨酰胺、3-脱氢胆酸、胆酸、磷酸胆碱、磷酸甘油、3-羟基丁酰肉碱、胆红素、鞘磷脂等。差异代谢物层次聚类热图显示 Control 组和 NC 组代谢物在正离子模式和负离子模式下的改变(图 3A、3B)。显著性差异代谢差异倍数变化(正负模式)结果表明,口腔癌皮下移植瘤小鼠小肠中 3-羟基丁酰肉碱、3-脱氢胆酸、胆酸、磷酸胆碱等代谢改变明显(图 3C、3D)。

2.4 口腔癌皮下移植瘤小鼠模型小肠的差异代谢物通路富集分析

为了了解变化明显的 170 个代谢物在小肠中的代谢途径以及相关网络,将全部生物代谢物导入 Metabo Analyst 4.0 中分析。为了确定显著改变的代谢途径,对差异代谢物进行 KEGG 通路富集分析。分析结果发现主要富集通路为胆碱代谢、丙氨酸代谢、天冬氨酸代谢、谷氨酸代谢、甘油磷脂代谢、GABA 神经突触代谢、cAMP 信号通路代谢、癌症中心碳代谢,其中烟酸和烟碱胺代谢通路是口腔癌皮下移植瘤小鼠模型中筛选到的主要显著性代谢改变通路(图 4)。

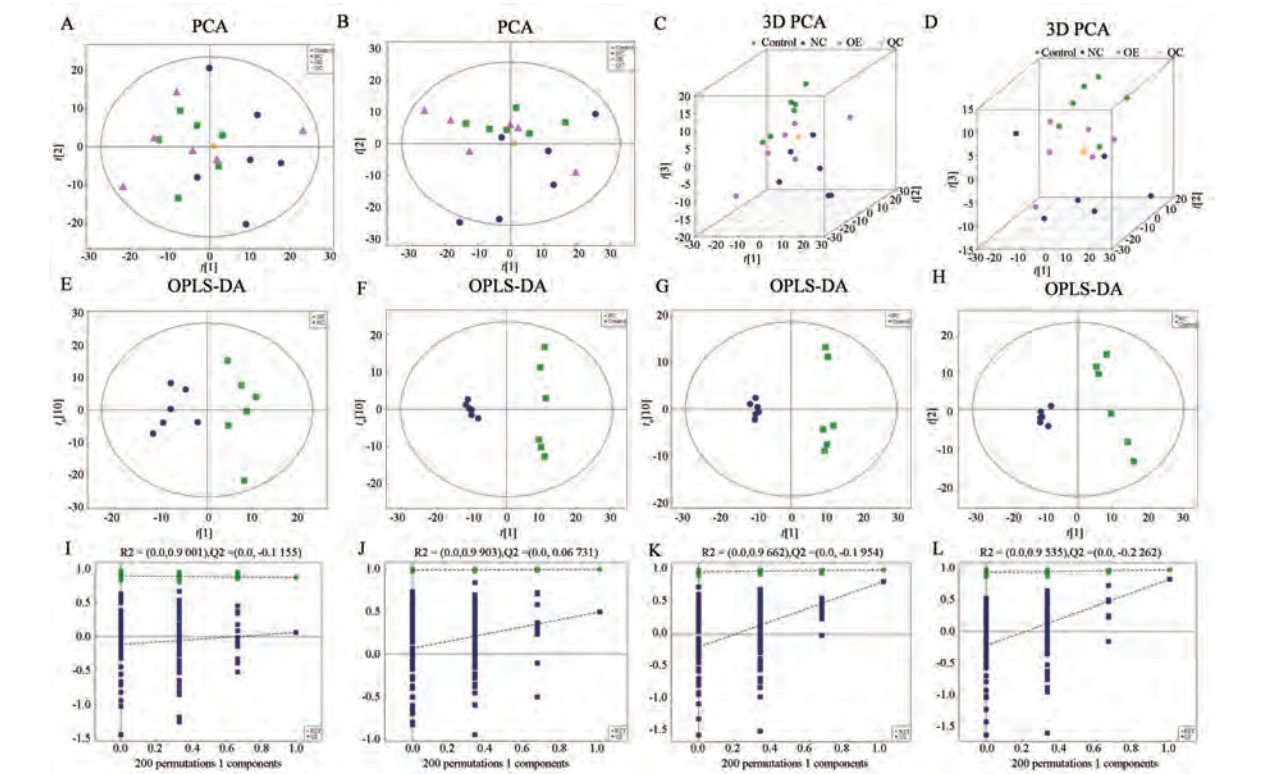


注:白色箭头:肠绒毛;红色箭头:肠隐窝。与不同组别相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 各组小鼠模型小肠组织病理学形态和实验开始时和结束时体重对比

Note. White arrowhead, intestinal villus. Red arrowhead, intestinal crypts. Compared between different groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 1 Comparison of histopathological morphology of small intestine and body weight at the beginning and end of tumorigenesis in mice of each group



注:A:正离子模式总体样本的 PCA 分析;B:负离子模式总体样本的 PCA 分析;C:正离子模式样本的 3D PCA 分析;D:负离子模式样本的 3D PCA 分析;E:OE vs NC 组正离子模式 OPLS-DA 图;F:OE vs NC 组负离子模式 OPLS-DA 图;G:NC vs Control 组正离子模式 OPLS-DA 图;H:NC vs Control 组负离子模式 OPLS-DA 图;I:OE vs NC 组正离子模式 PLS-DA 置换检验;J:OE vs NC 组负离子模式 PLS-DA 置换检验;K:NC vs Control 组正离子模式 PLS-DA 置换检验;L:NC vs Control 组负离子模式 PLS-DA 置换检验。

图 2 各组间的多元统计分析图

Note. A, PCA analysis of total samples in positive mode. B, PCA analysis of total samples in negative mode. C, 3D PCA analysis of total samples in positive mode. D, 3D PCA analysis of total samples in negative mode. E, OE vs NC group positive mode OPLS-DA score plot. F, OE vs NC group negative mode OPLS-DA score plot. G, NC vs Control group positive mode OPLS-DA score plot. H, NC vs Control group negative mode OPLS-DA score plot. I, OE vs NC group positive mode PLS-DA permutation test. J, OE vs NC group negative mode PLS-DA permutation test. K, NC vs Control group positive mode PLS-DA permutation test. L, NC vs Control group negative mode PLS-DA permutation test.

Figure 2 Multivariate statistical analysis chart between groups

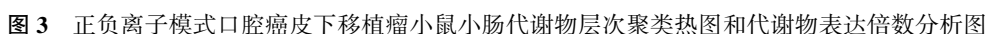


Figure 3 Mice with subcutaneous implanted oral cancer tumors underwent hierarchical clustering heat map and metabolite expression fold analysis both in positive and negative ion modalities

2.5 过表达 miR-181a-5p 对口腔癌皮下移植瘤小鼠小肠组织的代谢组学的影响

通过 Student's *t* 检验进行数据分析,代谢物筛选条件为 VIP>2、*P*<0.05,对比分析 NC 组和 OE 组小肠中明显差异代谢物。小肠组织中代谢物的

结构鉴定,以及代谢物的信息是否匹配都通过对现有数据库的数据进行比对后进行。结果鉴定到 OE 组和 NC 组中共有 16 种显著性差异代谢物,代谢物种类详见表 1。当 VIP>1 时,39 种代谢物被检测到。小肠组织中的差异代谢物热图结果表明

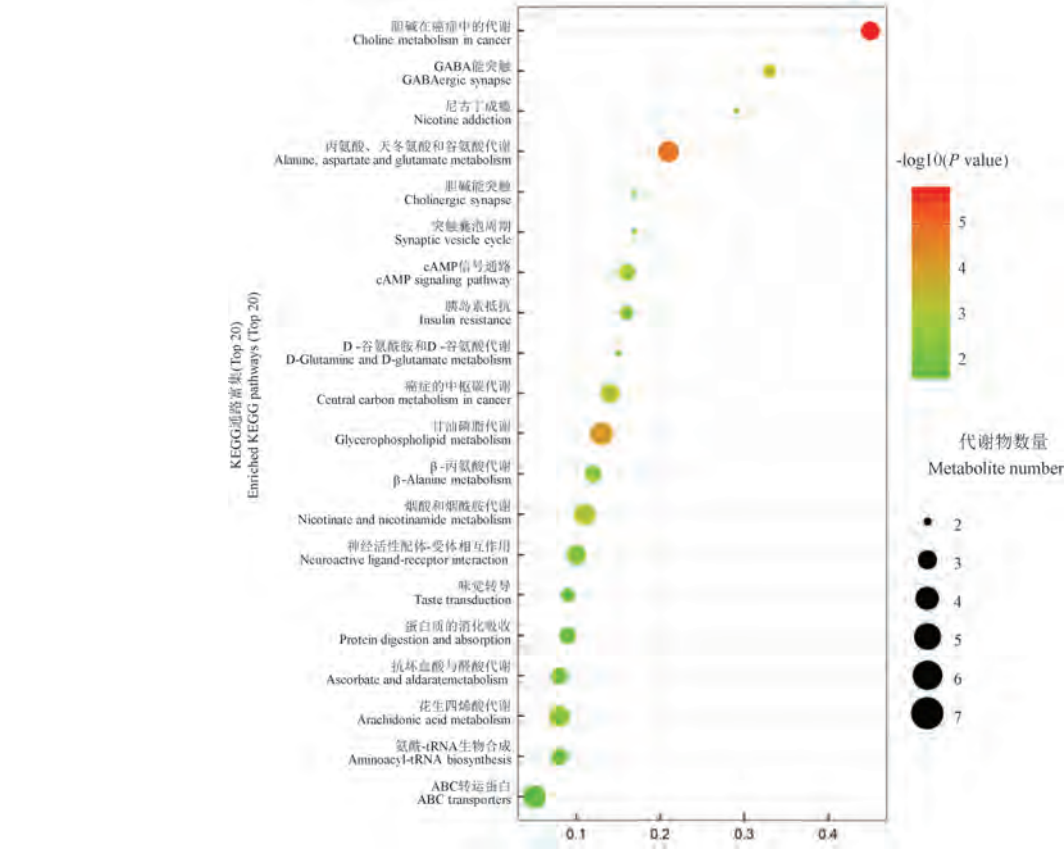


图 4 KEGG 富集通路图(气泡图)

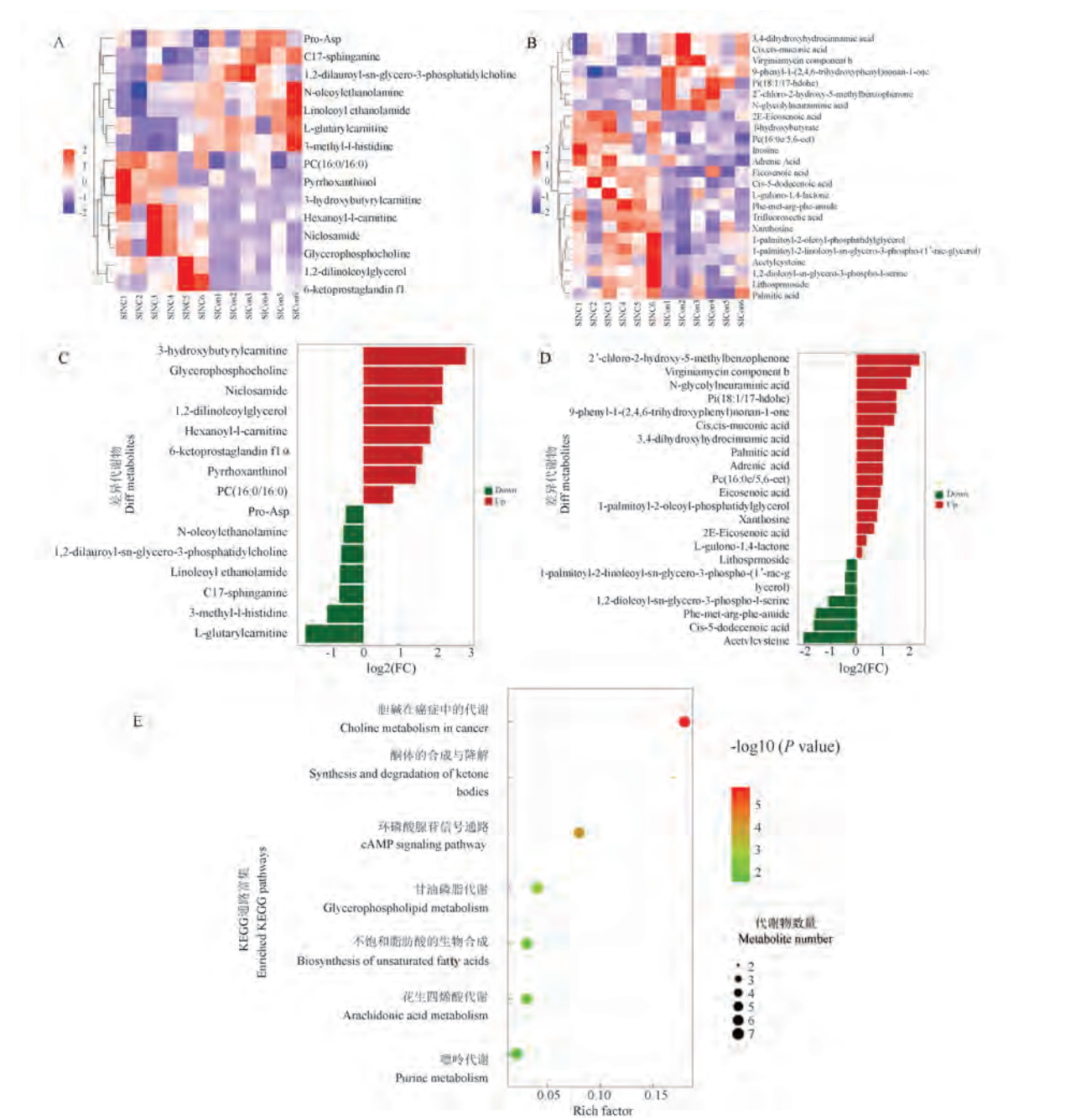
Figure 4 KEGG enrichment pathway diagram (bubble diagram)

表 1 过表达 miR-181a-5p 后口腔癌皮下移植小鼠模型小肠中鉴别到的差异代谢物($\bar{x}\pm s$)

Table 1 After overexpression of miR-181a-5p, different metabolites were discovered in the small intestine in a mouse model for subcutaneous grafted oral cancer						
名称 Name	变量投影重要度 VIP	差异倍数 FC	<i>P</i>	质荷比 m/z	保留时间(s) RT	
甘油磷酸胆碱 Glycerophosphocholine	27.31	4.71	0.02	258.11	360.92	
棕榈酸 Palmitic acid	11.93	1.16	0.03	255.23	44.42	
3-羟基丁酰肉碱 3-hydroxybutyrylcarnitine	6.24	7.35	0.02	248.15	290.43	
顺-粘康酸 Cis-muconic acid	5.43	0.73	0.02	141.02	335.45	
3-甲基-L-组氨酸 3-methyl-L-histidine	4.28	0.49	0.00	170.09	367.33	
三氟乙酸 Trifluoroacetic acid	3.74	3.84	0.01	227.00	165.69	
二十碳烯酸 Eicosenoic acid	2.81	1.74	0.03	309.28	39.50	
黄嘌呤核苷 Xanthosine	2.80	1.91	0.05	283.07	217.64	
Pi (18 : 1/17) Pi (18 : 1/17-hdohe)	2.76	0.47	0.04	923.50	197.94	
C17-二氢(神经)鞘氨醇 C17-sphinganine	2.58	0.62	0.00	288.29	36.00	
1,2-二油酰基-sn-丙三基 3-磷酸-L-丝氨酸 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine	2.53	2.10	0.03	769.50	37.67	
L-古洛诺-1,4-丁内酯 L-gulonono-1,4-lactone	2.40	2.03	0.01	195.05	358.01	
肌苷 Inosine	2.23	4.35	0.04	267.07	214.31	
β-羟丁酸 β-hydroxybutyrate	2.20	5.41	0.02	103.04	234.31	
维吉尼亚霉素组分 b Virginiamycin component b	2.15	0.32	0.01	524.23	38.55	
6-酮前列腺素 f1. α 6-ketoprostaglandin f1. α.	2.06	3.16	0.04	393.22	180.84	

(图 5A、5B), 比较 NC 组小肠组织和 OE 组小肠组织差异代谢物, 在正离子模式中显示 8 种代谢物存在上调, 7 种代谢物存在下调, 在负离子模型中, 有 17 种代谢物存在上调, 7 种代谢物存在下调。正离子、负离子模式下显示代谢物倍数的显著差异分析

显示(图 5C、5D), 在皮下移植瘤中过表达 miR-181a-5p 的小肠中代谢物 3-羟基丁酰肉碱、 β -羟丁酸明显改变。胆碱代谢通路是过表达 miR-181a-5p 后皮下移植瘤小鼠小肠中代谢物富集到的显著性差异通路。



注:A;正离子模式 NC 组和 OE 组层次聚类热图;B:负离子模式 NC 组和 OE 组层次聚类热图;C:正离子模式代谢物表达倍数分析图;D:负离子模式代谢物表达倍数分析图;E:KEGG 富集通路图(气泡图)。

图 5 正负离子模式 OE 组和 NC 组的层次聚类热图和显著差异代谢物倍数分析图

Note. A, Positive ion mode NC group and OE group hierarchical clustering heat map. B, Negative ion mode NC group and OE group hierarchical clustering heat map. C, Positive ion mode metabolite expression multiple analysis diagram. D, Negative ion model metabolite expression multiple analysis diagram. E, KEGG enrichment pathway diagram (bubble diagram).

Figure 5 Hierarchical clustering heat map and significant difference metabolite fold analysis map of positive and negative ion mode OE group and NC group

3 讨论

口腔癌患者晚期较易出现恶病质的不良机体状态,其特征为体重的显著下降和伴发肌肉组织的萎缩,患者极易出现多脏器的能量失衡及细胞组织代谢功能紊乱^[10]。当患者机体体重下降至患病初始状态时的 95% 以下的时候,或者是患者体重指数 (BMI) < 20 kg/m² 并发骨骼肌组织量下降的情况下体重变化达 2% 以上时,该疾病所处状态可被视为存在肿瘤恶病质机体状态^[11]。然而,小肠组织在口腔恶性肿瘤恶病质机体下的代谢物及代谢物组的改变状况尚未可知。

本实验通过皮下注射 CAL-27 细胞和过表达 miR-181a-5p 细胞构建口腔癌皮下移植瘤小鼠,检测到小鼠的体重在第 3 周时下降超过了 20%。小鼠小肠组织样本非靶向代谢组学结果表明,与 Control 组相比,NC 组小鼠小肠组织检测到 170 种显著差异代谢物,如甘油磷酰胆碱、胆酸、谷氨酰胺、谷氨酸和甘油磷脂。差异代谢物显著性富集的通路主要为胆碱、丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和甘油磷脂代谢通路。与 NC 组比较,过表达 miR-181a-5p 的 OE 组在 VIP>1 的条件下鉴定到 39 个代谢物,在 VIP>2 的条件下鉴定到 16 个显著性差异代谢物,其中主要差异代谢分子为甘油磷酰胆碱、棕榈酸、3-羟基丁酰肉碱、 β -羟丁酸。此外,小肠的功能被谷氨酰胺等调节,口腔癌皮下移植瘤小鼠模型小肠组织氨基酸的代谢、脂质的代谢及所参与的代谢通路与小肠的代谢功能密切联系。与 NC 组相比,3-羟基丁酰肉碱、 β -羟丁酸等是小肠模型过表达 miR-181a-5p 后变化的首要代谢物质。

谷氨酰胺是一类重要参与细胞能量代谢的物质,在口腔癌皮下移植瘤小鼠模型的小肠组织中发现谷氨酰胺代谢紊乱,本研究的结果与 Walker 氏肝癌恶病质小鼠模型小肠组织中谷氨酰胺代谢紊乱类似,推测小肠组织中的谷氨酰胺代谢会受到肿瘤生长而产生差异^[12]。谷氨酰胺作为参与生命活动的一类重要的游离氨基酸,它能为肠道中细胞提供能量,同时抑制与肠道炎症反应相关的信号通路,抑制肠道细胞凋亡,同时减少氧化应激的发生以达到保护肠道细胞数目及功能的目的;有研究表明,肠道上皮细胞的增殖、屏障功能、紧密连接蛋白表达的水平和小肠的渗透性都受到谷氨酰胺影响^[13-15]。推测恶病质状态导致的小肠功能受损诱

发了谷氨酰胺的过度消耗。小肠的功能受损和能量的过度消耗与小肠组织病理切片中皮细胞数目减少及小鼠的体重变化相一致,并且谷氨酰胺可能与之相关。

本研究对小肠组织代谢物和代谢物组系统性分析后发现胆酸、牛磺去氧胆酸、 α -鼠胆酸以及 β -鼠胆酸等胆酸相关代谢物存在明显的差异。胆酸是在肝组织中合成的参与组织内分泌的一类重要分子,参与小肠组织中脂溶性相关维生素和脂质物质的吸收及调控。研究发现回肠回收利用了几乎全部的胆酸,和其它小分子营养素一样,胆酸通过肝肠循环抵达肝^[16]。既往研究显示,结肠癌恶病质小鼠模型中,小肠组织中的胆汁酸的重吸收及转运功能下降,肝组织中结合型胆酸含量增加,同时口服牛磺熊去氧胆酸 (TUDCA) 类药物治疗恶病质存在着一定的疗效^[17]。MiR-181a-5p 是一类小分子的非编码 RNA,显示出了对癌症的抑制效果,在口腔癌已有研究发现其可发挥抑癌作用^[18]。和 NC 组比较,在 OE 组小鼠模型的小肠中,甘油磷酰胆碱发生了明显的变化,其作用为参与合成乙酰胆碱和磷脂酰胆碱及构成细胞膜磷脂的一类必需代谢物^[19-20]。胆碱代谢在癌症中的改变,标志着肿瘤的发生和发展^[21]。本研究发现胆碱代谢的改变是 miR-181a-5p 过表达后小肠中主要的代谢改变。有研究报道当肝细胞出现死亡以及骨骼肌组织发生损伤后,常并发胆碱含量的减少^[22]。胆碱的作用很广泛,酮体和脂肪酸等物质的代谢、细胞核和线粒体膜成分的构成,甚至是脂质的代谢,细胞间信号传输和转导,线粒体能量代谢等都受到胆碱的调节^[23-25]。结果提示患者营养状况的改善以及机体功能的恢复或可通过给予胆碱类物质而得以改善。

本实验通过对口腔癌皮下移植瘤小鼠模型小肠组织的差异代谢物和 KEGG 通路富集分析显示小肠中脂肪代谢和氨基酸代谢的显著变化,提示小肠处于氨基酸过度消耗、脂肪过度消耗的状态。然而小肠组织中氨基酸以及脂肪代谢物过度消耗的具体机制尚待进一步的研究。小肠参与着机体多种物质的代谢。本研究为进一步探索肠道功能受损的原因和机理,研究改善口腔癌状态下肠道细胞功能、改善晚期患者的生活质量和给予患者机体营养供应提供了可能依据。基于此,小肠相关代谢物的研究或可作为一个突破口为后续相关研究给予帮助和支持。

参考文献:

- [1] Zhang ZY. Oral maxillofacial surgery 8th ed. [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2020.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. Chin Med J, 2022, 135(5): 584-590.
- [4] Thomson PJ. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention-proliferation, position, progression and prediction [J]. J Oral Pathol Med, 2018, 47(9): 803-807.
- [5] Cui P, Huang C, Guo J, et al. Metabolic profiling of tumors, sera, and skeletal muscles from an orthotopic murine model of gastric cancer associated-*Cachexia* [J]. J Proteome Res, 2019, 18(4): 1880-1892.
- [6] Knudsen LA, Desdorf R, Möller S, et al. Translational potential of metabolomics on animal models of inflammatory bowel disease-a systematic critical review [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21: 11.
- [7] Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(7): 451-459.
- [8] 汤喜兰, 徐国良, 董伟, 等. 异丙肾上腺素诱导心脏肥大大鼠的血清代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 486-493.
Tang XL, Xu GL, Dong W, et al. Serum metabolomics study of cardiac hypertrophy in an isoproterenol-induced rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 486-493.
- [9] 杨一言, 高继萍, 续国强, 等. 非编码 RNA 调控口腔鳞状细胞癌葡萄糖代谢重编程的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 91-97.
Yang YY, Gao JP, Xu GQ, et al. Research progress on the regulation of non-coding RNA in glucose metabolism re-editing in oral squamous cell carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 91-97.
- [10] Biswas AK, Acharyya S. Understanding cachexia in the context of metastatic progression [J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(5): 274-284.
- [11] Fearon K, Strasser F, Anker SD, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus [J]. Lancet Oncol, 2011, 12(5): 489-495.
- [12] Lima MMR, de Mello MAD, Curi R. Walker 256 tumour growth causes marked changes of glutamine metabolism in rat small intestine [J]. Cell Biochem Funct, 2002, 20(2): 107-113.
- [13] Kim MH, Kim H. The roles of glutamine in the intestine and its implication in intestinal diseases [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 1051.
- [14] Wang B, Wu G, Zhou Z, et al. Glutamine and intestinal barrier function [J]. Amino Acids, 2015, 47(10): 2143-2154.
- [15] Kim H. Glutamine as an immunonutrient [J]. Yonsei Med J, 2011, 52(6): 892-897.
- [16] Wang Y, Gao X, Zhang X, et al. Gut microbiota dysbiosis is associated with altered bile acid metabolism in infantile cholestasis [J]. mSystems, 2019, 4(6): e00463-e00419.
- [17] Feng L, Zhang W, Shen Q, et al. Bile acid metabolism dysregulation associates with cancer cachexia: roles of liver and gut microbiome [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2021, 12(6): 1553-1569.
- [18] Rezaei T, Amini M, Hashemi ZS, et al. microRNA-181 serves as a dual-role regulator in the development of human cancers [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 432-454.
- [19] Sonkar K, Ayyappan V, Tressler CM, et al. Focus on the glycerophosphocholine pathway in choline phospholipid metabolism of cancer [J]. NMR Biomed, 2019, 32(10): e4112.
- [20] Levillain O, Schmolke M, Guder WG. Influence of dehydration on glycerophosphorylcholine and choline distribution along the rat nephron [J]. Pflügers Arch, 2001, 442(2): 218-222.
- [21] Ridgway ND. The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013, 48(1): 20-38.
- [22] da Costa KA, Kozyreva OG, Song J, et al. Common genetic polymorphisms affect the human requirement for the nutrient choline [J]. FASEB J, 2006, 20(9): 1336-1344.
- [23] Teodoro JS, Rolo AP, Duarte FV, et al. Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: understanding fatty liver disease progression [J]. Mitochondrion, 2008, 8(5-6): 367-376.
- [24] Fujita Y, Nagakura T, Uchino H, et al. Functional expression of choline transporters in human neural stem cells and its link to cell proliferation, cell viability, and neurite outgrowth [J]. Cells, 2021, 10(2): 453.
- [25] Zeisel SH. Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults [J]. Annu Rev Nutr, 2006, 26: 229-250.

[收稿日期] 2023-01-05

李佳贤,梁丽娜,许凯,等. 针刺干预青光眼动物实验研究报告质量评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 18-33.
Li JX, Liang LN, Xu K, et al. Quality evaluation of animal studies into acupuncture for glaucoma [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 18-33.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.003

针刺干预青光眼动物实验研究报告质量评价

李佳贤,梁丽娜*,许凯,李亚敏,黄子杨,李晓宇,周维,金昱

(中国中医科学院眼科医院,北京 100040)

【摘要】 目的 通过 SYRCLE 动物实验风险评估工具、ARRIVE 2.0 指南和 GSPC 清单评价针刺干预青光眼的动物实验报告质量。**方法** 计算机检索 CNKI、VIP、Wanfang、Sinomed、PubMed、Web of Science、Embase、Cochrane Library 等数据库,寻找针刺干预青光眼的动物研究文章。使用 SYRCLE 工具对纳入研究进行偏倚风险评估,使用 ARRIVE 2.0 指南和 GSPC 清单对研究报告质量进行评价,通过 Excel 和 SPSS 软件进行统计分析。**结果** 共 30 篇文章符合纳入/排除标准被纳入最终的分析,其中 SYRCLE 工具的 10 项条目中有 6 项条目低风险率<50%,非低风险条目主要集中在选择性偏倚、实施偏倚和测量偏倚方面。ARRIVE 2.0 指南的 22 项必备子条目中有 12 项低风险率<50%;16 项推荐子条目中有 9 项低风险率低于 50%。GSPC 清单 19 项子条目中有 12 项子条目低风险率<50%,随机化、盲法、伦理声明、饲养场所和饲养、动物护理和监测以及方案注册是 ARRIVE 2.0 指南和 GSPC 清单的非低风险条目。**结论** 当前公开发表的针刺干预青光眼动物研究方法学质量和实验报告质量普遍不高,对多个条目的描述尚不完善,可能影响读者对实验结果能否进一步转化为临床研究的判断。建议未来的研究严格按照动物实验偏倚风险工具以及报告指南进行,以提高动物实验的设计、实施和报告,保证实验步骤的可重复性及实验结果的再现性,为结果转化到临床提供可靠的证据。

【关键词】 青光眼;针刺;动物研究;方法学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0018-16

Quality evaluation of animal studies into acupuncture for glaucoma

LI Jiaxian, LIANG Lina*, XU Kai, LI Yamin, HUANG Ziyang, LI Xiaoyu, ZHOU Wei, JIN Yu
(Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the quality of animal studies into acupuncture for glaucoma using SYRCLE's risk of bias tool, ARRIVE 2.0 guidelines, and the GSPC checklist. **Methods** Databases from CNKI, VIP, Wanfang, Sinomed, PubMed, Web of Science, Embase and Cochrane Library were searched to find animal research articles on acupuncture for glaucoma. Risk of bias was assessed for the included studies using the SYRCLE's tool, and reporting quality was evaluated using the ARRIVE 2.0 guidelines and GSPC checklist. Statistical analysis was performed by Excel and SPSS software. **Results** Thirty articles met the inclusion/exclusion criteria and were included in the final analysis. Six of the 10 items of the SYRCLE's tool had a low-risk rate of <50%, and the non-low-risk items focused on selectivity bias, implementation bias and measurement bias. Twelve of the 22 essential sub-items of the ARRIVE 2.0 guidelines had a low-risk rate of <50%; 9 of the 16 recommended sub-items had a low-risk rate of <50%; and 12 of the 19 subentries of the GSPC list had a low-risk rate of <50%. Randomization, blinding, ethical statements, housing and husbandry, animal care and monitoring, and protocol registration were the non-low-risk items in the ARRIVE 2.0 guidelines and GSPC list. **Conclusions** The quality of the methodology and experimental reporting of animal studies into acupuncture for glaucoma

【基金项目】 国家自然科学基金(82274589,81973912);中国中医科学院科技创新工程(CI2021A02602);中国中医药循证医学中心“业务研究室主任专项”(2020YJSXZ-2)。

【作者简介】 李佳贤(1993—),男,博士研究生,研究方向:视网膜疾病的基础与临床。E-mail: lijiaxian0729@163.com

【通信作者】 梁丽娜(1971—),女,博士,研究员,主任医师,研究方向:眼底病的基础与临床。E-mail: lianglina163@163.com

are generally low, and the description of several items is not yet complete, which affects the readers' judgment on whether the result of animal studies can be translated to clinical studies. It is advisable to further promote the use of SYRCLE's tool and reporting guidelines for animal experiments to enhance the design, performance, and reporting of animal experiments; ensure the reproducibility of experiments and result; and provide reliable evidence for the translation of result to the clinic.

【Keywords】 glaucoma; acupuncture; animal studies; methodology
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

青光眼是一种导致视神经萎缩、视野缺损的致盲性眼病^[1],它的主要病理基础是视网膜神经节细胞的选择性凋亡^[2]。流行病学研究数据显示,全球 40~80 岁的人口中有 3.5% 患有青光眼,截止 2020 年,全球约有 360 万人为此而失明^[3-4]。长期以来,降低眼压是治疗青光眼行之有效的策略之一。拟胆碱药、 β -肾上腺素受体激动剂、 β -肾上腺素受体阻断剂、 α -肾上腺素受体激动剂、碳酸酐酶抑制剂和前列腺素衍生物是目前最常见的药物治疗方法,但这些药物都存在出现不良反应的可能^[5-6]。青光眼属于中医“五风内障”范畴,几千年来先贤在实践中积累了丰富的临床经验,针刺治疗已被确定为有希望的降眼压和神经保护方案^[7-8],为了促进针刺在青光眼领域的推广和实施,目前仍需进行更多、更深入的动物研究,以阐明其治疗疾病的具体机制。动物实验作为基础研究和临床试验之间的桥梁,其设计和报告的质量会影响各个学科的研究结果^[9]。如果动物实验的方法学质量有缺陷,很可能导致不科学甚至是错误的结论^[10];不充分和不规范的报告可能使读者无法理解研究的真实性和实用性,从而难以为临床试验的开展提供值得信赖的证据。即使是发表于某些著名刊物上的动物实验,其方法学依然存在问题^[11]。

荷兰拉德堡德大学医学中心的 Hooijmans 等^[12]在 Cochrane RoB 工具的基础上创建和开发了 SYRCLE (systematic review center for laboratory animal experimentation) 动物实验偏倚风险工具,旨在提高动物实验结果的内在真实性,并协助加强其在临床实践中的转化。ARRIVE 2.0 指南^[13] (the animals in research; reporting *in vivo* experiments) 和 GSPC 清单^[14] (gold standard publication checklist) 等一些有关动物实验报告规范的发表,不仅为撰写和发表动物实验提供了有效参考清单和写作指南,而且可确保动物实验所提供的信息被充分评估和利用,以促进基础研究评审过程的完整性和透明化,目前已在 EQUATOR 网络中被广泛接受^[15]。这些指南和标准对于鼓励动物实验报告的科学设计、严

格执行和标准化至关重要。

到目前为止,尚未有研究对针刺干预青光眼动物实验的方法和报告质量进行评估。因此,本研究利用 SYRCLE 工具、ARRIVE 2.0 指南和 GSPC 清单,评价针刺干预青光眼临床前研究的方法学质量,旨在发现和总结目前研究中存在的问题,以期能够进一步改进动物实验的设计、实施与报告规范,提高动物研究的严谨性和可重复性。

1 材料和方法

本研究根据 PRISMA^[16] 设计,两个独立的研究人员参与了系统评价的各个阶段(研究检索和选择、数据提取和评估)。

1.1 搜索策略

计算机检索 4 个中文数据库:中国知网 (CNKI)、重庆维普 (VIP)、万方数据库 (Wanfang)、中国生物医学文献服务系统 (Sinomed);4 个英文数据库:PubMed、Web of Science、Embase、Cochrane Library;检索时限从建库至 2022 年 12 月 1 日,以查全为原则。用主题词和自由词构成检索式,中文检索式如下:

(1) 针灸 OR 针刺 OR 电针 OR 穴位
AND
(2) 青光眼 OR 高眼压
AND
(3) 动物 OR 模型 OR 鼠 OR 兔 OR 猴 OR 猪 OR 狗 OR 猫
英文检索式如下:
(1) Acupuncture OR moxibustion OR electroacupuncture OR acupoint
AND
(2) Glaucoma OR ocular hypertension
AND
(3) Animal OR model OR mouse OR rabbit OR monkey OR pig OR dog OR cat OR rat

1.2 纳入和排除标准

纳入标准:(1) 研究类型:国内外公开发表的动

物研究;(2)研究对象:以各种方法建立青光眼或高眼压模型的动物;(3)干预措施:采用针刺治疗,选穴、配伍、疗程不限。

排除标准:(1)综述、会议摘要、临床研究等实验研究以外的文章类型;(2)主要干预手段不是针刺的研究;(3)非体内实验的研究;(4)重复发表,不能提供全文的研究。

1.3 文献筛选和资料提取

文献使用 EndNote X8 软件管理,由两位研究者独立阅读文题及摘要,根据纳入与排除标准筛选文献,并先将数据录入统一的 Microsoft Excel 数据提取表中,再进行交叉核对,若存在争议则由第三位研究者协助解决,必要时可联系作者。

1.4 方法学及报告质量评价

利用 SYRCLE 工具评价纳入研究的偏倚风险,它由 6 个主要领域的 10 项条目组成,每项条目根据文章内容被评价为“低风险”“不确定风险”或“高风险”。使用 ARRIVE 2.0 指南和 GSPC 清单评估纳入研究的报告质量,前者包含 21 项条目(细分为 22 项必备子条目及 16 项推荐子条目),后者由 10 项条目构成,如果在一篇文章中,一项条目的所有细节都被报告,那么这项条目则判定为“低风险”;只报告条目中部分细节的,被判定为“不确定风险”(如 3 项细节中只报告了 1 项);如果没有报告任何细节,这项条目将被判定为“高风险”。若存在争议则由第三位研究者协助解决,必要时可联系作者。

1.5 统计学方法

使用 Microsoft Excel 计算 3 个工具每项条目符合条件的研究数量,并以百分比的形式给出汇总统计;使用 SPSS 25.0 对研究者之间的一致性进行了 kappa 检验,kappa 系数 ≥ 0.80 表明一致性佳。

2 结果

2.1 文献检索与筛选

通过数据库检索共获得原始文献 212 篇,其中中文文献 154 篇,英文文献 58 篇。排除重复文献 93 篇,排除综述及会议摘要 34 篇,阅读文题和摘要排除不相关文献 19 篇,进一步全文阅读剩余 66 篇文献,根据纳排标准排除文献 36 篇,最终纳入文献 30 篇^[17-46],其中中文文献 29 篇,英文文献 1 篇^[29],纳入研究发表年份跨度为 1994 年~2022 年,文献筛选流程及结果见图 1。

2.2 SYRCLE 工具评价结果

SYRCLE 工具是目前唯一专门用于评估动物实

验内部真实性的工具。在纳入的 30 项研究中,SYRCLE 工具的 10 项条目有 6 项低风险率 $<50\%$,其中 3 项 $<10\%$ 。(1)序列生成:10 项研究(33.33%)采用“随机数字表法”或“计算机随机生成器”对动物进行分组,因此被判定为“低风险”;13 项研究(43.33%)只提到“随机”,没有详细说明,被判定为“不确定风险”。(2)基线特征:16 项研究(53.33%)以表格或其他形式描述了纳入动物的基线特征,被判定为“低风险”。(3)分配隐藏性:所有研究提供的信息不足以判断动物分组的不可预测性,所以被评价为“不确定风险”。(4)随机安置:有 4 项研究(13.33%)明确指出将动物安置在相同的饲养条件下,如相同的温度、湿度、光照时间、自由饮水和喂食环境,被评价为“低风险”。(5)盲法(对动物饲养者和研究者施盲)。(6)盲法(对结果评价者施盲):所有研究都没有描述动物饲养者、研究者和结果评估者的盲法,被判断为“不确定风险”。(7)随机结果评估:10 项研究(33.33%)采用正确的随机方法选择实验动物进行结果评估,被判定为“低风险”。(8)不完整的结果数据:30 项研究将所有动物纳入最终分析,故均被判定为“低风险”。(9)选择性结果报告:所有研究中没有发现不完整的数据报告,因此被评价为“低风险”。(10)其他偏倚来源:所有研究均没有其他明显会导致高风险偏倚的问题,因此被判定为“低风险”。Kappa 检验显示,两名研究人员 SYRCLE 工具评价结果一致性佳($\text{kappa}=0.892, P=0.000$),详见表 1。

2.3 ARRIVE 2.0 指南

根据 ARRIVE 2.0 指南的评估,22 项必备子条目中有 12 项低风险率低于 50%,7 项低风险率低于 10%。(1)研究设计:29 项(96.67%)研究提供了研究设计的简要细节,包括被比较组、对照组等;其中一项研究为干预前后对照,因此被判为“不确定风险”。30 项研究均描述了实验单位。(2)样本量:所有研究均提供了各组动物的数量和总数量,但却未解释样本量的确定方法。(3)纳入和排除标准:只有 3 项(10.00%)研究描述了实验过程中纳入或排除动物的标准;所有研究均将全部动物纳入最终分析,并且均给出了各实验组中 n 的确切值。(4)随机化:只有 10 项(33.33%)研究明确提出随机化的方法;2 项(43.33%)报告了采取措施来减少潜在的偏倚。(5)盲法:所有研究都没有描述对动物饲养员、研究人员和结果评估人员的盲法。(6)结果

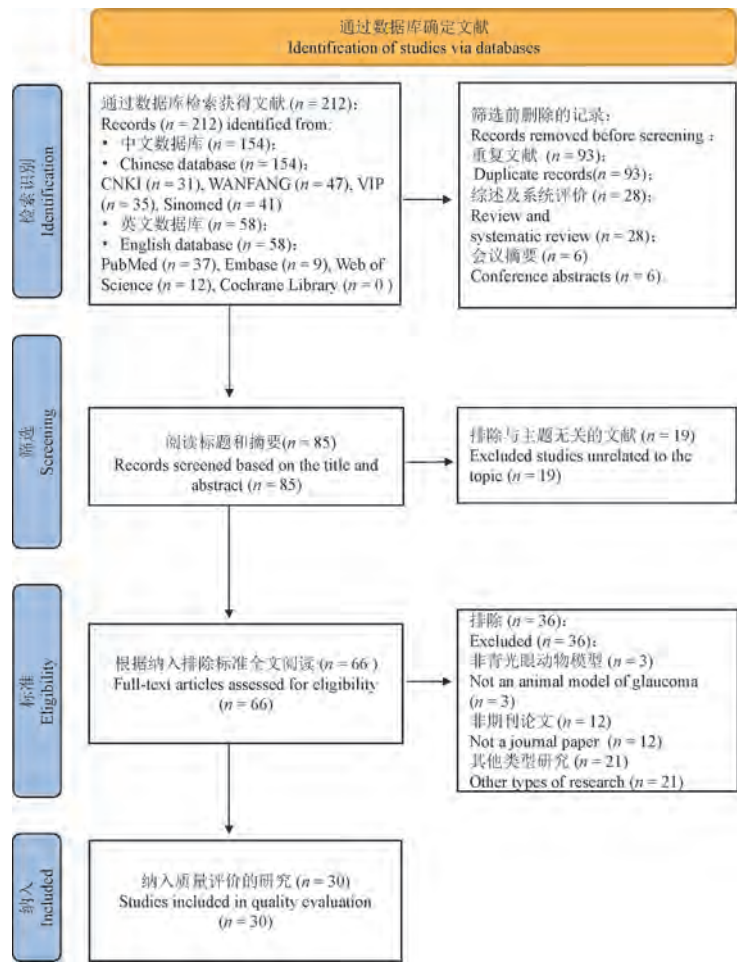


图 1 文献筛选流程及结果

Figure 1 Flow chart of the results according to the search strategies

测量:所有研究均描述了结果测量标准,如眼压值、视网膜神经节细胞数量等,但没有明确区分主要结局指标和次要结局指标。(7)统计学方法:20项(66.67%)研究提供了各项分析所使用统计学方法的细节,包括所使用的软件及具体方法。(8)实验动物:13项(43.33%)研究详细描述了动物种类、品系和亚品系、性别、年龄或发育阶段和体重;14项(46.67%)研究提供了动物的来源、健康/免疫状况、转基因状况、基因型等相关信息。(9)实验步骤:所有研究均记录了具体的操作程序,28项(93.33%)研究报告了干预时间及频率,5项(16.67%)研究记录了实验室等操作场所。(10)结果:所有研究都总结或描述性地统计了各项结果,但没有测量每组实验数据的变异性和置信区间。

根据 ARRIVE 2.0 指南的评估,16 项推荐子条目中有 9 项低风险率低于 50%,其中 6 项低风险率低于 10%,具体如下。(11)摘要:23 项(76.67%)研究按照指南的要求准确描述了摘要,包括目的、方

法、结果、结论。(12)背景:8 项(26.67%)研究提供了充分的科学研究背景;29 项(96.67%)研究详细介绍了动物模型的选择和具体的建模方法。(13)目的:20 项(66.67%)研究明确描述了实验研究问题、研究目标或将被验证的具体研究假设。(14)伦理声明:只有 2 项(6.67%)研究提供了伦理审查委员会的名称、许可证号和符合国家监管原则的描述。(15)住房和饲养:只有 4 项(13.33%)研究提供了饲养场所信息以及饲养条件,如温度、湿度、照明时间和自由饮水摄入量。(16)动物护理和监测:21 项(70.00%)研究描述了实验中采取减少动物疼痛、痛苦和困扰的具体措施;5 项(16.67%)研究报告了研究过程中出现的不良事件。(17)诠释/科学内涵:24 项(80.00%)研究在解释结果时讨论了研究目标、假设、相关研究并提供了参考文献;但所有研究都没有讨论研究的局限性。(18)概括/转换:22 项(73.33%)研究提到研究结果可以转移到其他物种或实验条件中。(19)注册计划书:由于缺乏对

表 1 SYRCLE’s 工具评价结果
Table 1 SYRCLE’s risk of bias tool for included studies

偏倚类型 Type of bias	条目 Item	涉及领域 Domain	描述 Description of domain	低风险(%) Low-risk	不确定风险(%) Uncertain-risk	高风险(%) High-risk
选择性偏倚 Selection bias	1	序列产生 Sequence generation	描述分配序列产生的方法,以评价可比性 Describe the methods used to generate the allocation sequence in sufficient detail	10(33.33)	13(43.33)	7(23.33)
	2	基线特征 Baseline characteristics	为保证实验开始时两组基线可比,需描述所有可能的预后因素或动物特征 Describe all the possible prognostic factors or animal characteristics	16(53.33)	14(46.67)	0
	3	分配隐藏 Allocation concealment	描述分配隐藏的方法,以判断动物入组前/或入组过程中干预分配可见 Describe the method used to conceal the allocation sequence in sufficient detail to determine whether intervention allocations could have been foreseen before or during enrolment	0	30(100.00)	0
实施偏倚 Performance bias	4	动物安置随机化 Random housing	描述动物房中随机安置动物的方法 Describe all measures used to house the animals randomly within the animal room	4(13.33)	26(86.67)	0
	5	盲法 Blinding	描述对动物饲养者和研究者施盲,以避免其知晓动物接受何种干预措施的具体方法;提供所实施盲法的有效性的任何信息 Describe all measures used, if any, to blind trial caregivers and researchers from knowing which intervention each animal received. Provide any information relating to whether the intended blinding was effective	0	30(100.00)	0
测量偏倚 Detection bias	6	随机性结果评估 Random outcome assessment	描述是否随机选择动物进行结果评估,以及使用哪种方法选择动物 Describe whether or not animals were selected at random for outcome assessment, and which methods to select the animals were used	10(33.33)	13(43.33)	7(23.33)
	7	盲法 Blinding	描述对结果评价者施盲,以避免其知晓动物接受何种干预措施的具体方法;提供所实施盲法的有效性的任何信息 Describe all measures used to blind outcome assessors from knowing which intervention each animal received. Provide any information relating to whether the intended blinding was effective	0	30(100.00)	0
失访偏倚 Attrition bias	8	不完整数据报告 Incomplete outcome data	描述每个主要结局数据的完整性,包括失访和在分析阶段排除的数据;说明这些数据是否被报告以及每个干预组下(与最初随机分组的总数相比)失访或排除及任何重新纳入分析的原因 Describe the completeness of outcome data for each main outcome, including attrition and exclusions from the analysis. State whether attrition and exclusions were reported, the numbers in each intervention group (compared with total randomized animals), reasons for attrition or exclusions, and any re-inclusions in analyses for the review	30(100.00)	0	0
报告偏倚 Reporting bias	9	选择性结果报告 Selective outcome reporting	说明如何审查选择性报道结果的可能性及审查结果 State how selective outcome reporting was examined and what was found	30(100.00)	0	0
其他 Other	10	其他偏倚来源 Other sources of bias	说明不包括在上述偏倚中的其他一些重要偏倚 State any important concerns about bias not covered by other domains in the tool	30(100.00)	0	0

动物实验的全面登记,30 项研究无法获得计划书。
(20) 数据共享:所有研究均未描述是否有数据以及在哪里可以获取。
(21) 利益声明:所有研究均未报告潜在的利益冲突;16 项 (53. 33%) 研究提供了资金来源和项目编号,4 项 (13. 33%) 研究只提到了资

金来源而未编号。Kappa 检验显示,两名研究人员的 ARRIVE 2.0 指南评价结果一致性佳 ($\text{kappa} = 0.874, P=0.000$), 详见表 2。

2.4 GSPC 清单

如表 3 所示, GSPC 清单由四部分组成:前言、

表 2 ARRIVE 指南评价结果
Table 2 ARRIVE guidelines for included studies

序号 Number	条目 Item	内容描述 Description	低风险 (%) Low-risk	不确定风险 (%) Uncertain-risk	高风险 (%) High-risk
ARRIVE 10 项基本条目 ARRIVE essential 10					
1	研究设计 Study design	对于每个实验,提供简要的研究设计细节,包括: For each experiment, provide brief details of study design including: 1a. 被比较组,包括对照组。如果没有设置对照组,则应说明理由 1a. Groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated	29(96.67)	1(3.33)	0
		1b. 实验单位(如以单个动物,群组,或动物笼子为单位) 1b. Experimental unit (e.g., a single animal, litter, or cage of animals)	30(100.00)	0	0
2	样本量 Sample size	2a. 详细说明分配到每组实验单位的具体数量及实验单位的总数,以及实验中使用的动物总数 2a. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used	30(100.00)	0	0
		2b. 解释样本量的确定方法,最好提供样本量计算的细节 2b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any a priori sample size calculation, if done	0	0	30(100.00)
3	纳入和排除标准 Inclusion and exclusion criteria	3a. 描述实验纳入和排除动物(或实验单位)的标准和分析过程中使用实验数据的原则 3a. Describe any criteria used for including or excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established a priori	3(10.00)	0	27(90.00)
		3b. 报告每个实验组分析中未包括的动物、实验单位或实验数据,并解释原因 3b. For each experimental group, report any animals, experimental units, or data points not included in the analysis and explain why	30(100.00)	0	0
4	随机化 Randomisation	3c. 报告每个实验组中样本量的精确值 3c. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group	30(100.00)	0	0
		4a. 说明是否使用了随机方法将实验单位分配到控制组和治疗组。如果是,请提供用于生成随机化序列的方法 4a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence	10(33.33)	13(43.33)	7(23.33)
		4b. 描述用于最小化潜在混杂因素的策略,如处理和测量的顺序,或动物/笼子的位置。如果混杂因素未被控制,请明确说明 4b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly	2(43.33)	0	28(93.33)

续表2

序号 Number	条目 Item	内容描述 Description	低风险 (%) Low-risk	不确定风险 (%) Uncertain-risk	高风险 (%) High-risk
5	盲法 Blinding	5. 描述在实验的不同阶段(组间分配、实验过程、结果评估和数据分析期间)清楚组间分配细节的人员 5. Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis)	0	0	30(100.00)
6	结果测量 Outcome measures	6a. 明确界定所有评估的结果措施(如细胞死亡、分子标志物或行为变化) 6a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g., cell death, molecular markers, or behavioural changes) 6b. 对于假设检验的研究,请说明主要结局指标,即用于确定样本量的结局指标 6b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e., the outcome measure that was used to determine the sample size	30(100.00)	0	0
7	统计方法 Statistical methods	7a. 提供每个分析所使用统计方法的细节,包括使用的软件 7a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used 7b. 描述用于评估数据是否符合统计方法的假设的任何方法,以及在不符合假设的情况下采取的措施 7b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met	20(66.67)	0	10(33.33)
8	实验动物 Experimental animals	8a. 提供所用动物的详细资料,包括物种、品系和亚品系、性别、年龄或发育阶段、体重等 8a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight 8b. 提供有关动物进一步的信息,如动物来源、健康/免疫状况、基因修饰状况、基因型和先前的程序 8b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures	13(43.33)	17(56.67)	0
9	实验步骤 Experimental procedures	对于每个实验组,包括对照组,要足够详细地描述其实验步骤,以便其他人能够复制,包括: For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including: 9a. 何法 9a. What was done, how it was done, and what was used 9b. 时间和频率 9b. When and how often 9c. 地点(包括任何适应期的细节) 9c. Where (including detail of any acclimatisation periods) 9d. 何因(提供实验步骤的基本原理) 9d. Why (provide rationale for procedures)	30(100.00)	0	0
10	结果 Results	对于所进行的每个实验,包括重复实验,需报告: For each experiment conducted, including independent replications, report: 10a. 对每个实验组的数据进行总结/描述性统计,并在适用的情况下测量每组实验数据的变异度 10a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable	30(100.00)	0	0

续表2

序号 Number	条目 Item	内容描述 Description	低风险(%) Low-risk	不确定风险(%) Uncertain-risk	高风险(%) High-risk
ARRIVE 推荐条目 ARRIVE recommended set		10b. 如果适用,描述置信区间的大小 10b. If applicable, the effect size with a confidence interval	0	0	30(100.00)
11	摘要 Abstract	11. 对研究目的、动物种类、品系和性别、关键方法、主要结果和研究结论提供准确的总结 11. Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions	23(76.67)	6(20.00)	1(3.33)
12	背景 Background	12a. 包括充分科学的背景,以了解研究的基本原理和背景,并解释实验方法 12a. Include sufficient scientific background to understand the rationale and context for the study, and explain the experimental approach	8(26.67)	22(73.33)	0
		12b. 说明使用的动物种类和模型的选择依据以及该研究与人体生物学的相关性 12b. Explain how the animal species and model used address the scientific objectives and, where appropriate, the relevance to human biology	29(96.67)	0	1(3.33)
13	目的 Objectives	清楚地描述研究问题、研究目标或将被验证的具体研究假设 Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested	20(66.67)	10(33.33)	0
14	伦理声明 Ethical statement	提供批准在研究中使用动物的伦理审查委员会或同等机构的名称,以及任何相关的许可证或协议编号。如果没有寻求或通过伦理批准,请提供理由 Provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study and any relevant licence or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification	2(6.67)	0	28(93.33)
15	饲养场所和饲养 Housing and husbandry	提供包括环境条件在内的饲养场所和条件的详细信息 Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment	4(13.33)	0	26(86.67)
16	动物护理和监测 Animal care and monitoring	16a. 描述在实验方案中采取的任何干预措施或步骤,以减少疼痛、痛苦和苦恼 16a. Describe any interventions or steps taken in the experimental protocols to reduce pain, suffering, and distress	21(70.00)	3(10.00)	6(20.00)
		16b. 报告任何预期或意外的不良事件 16b. Report any expected or unexpected adverse events	5(16.67)	0	25(83.33)
		16c. 描述为研究建立的人道终点和监测的频率 16c. Describe the humane endpoints established for the study, the signs that were monitored, and the frequency of monitoring. If the study did not set humane endpoints, state this	0	0	30(100.00)
17	诠释/科学内涵 Interpretation/ scientific implications	17a. 解释结果时需要考虑研究目的、假设以及文献报道的当前理论和其他相关研究 17a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory, and other relevant studies in the literature	24(80.00)	3(10.00)	3(10.00)
		17b. 讨论研究的局限性,包括潜在的偏倚来源,动物模型的局限性及与结果相关的不精确性 17b. Comment on the study limitations, including potential sources of bias, limitations of the animal model, and imprecision associated with the results	0	2(6.67)	28(93.33)

续表2

序号 Number	条目 Item	内容描述 Description	低风险(%) Low-risk	不确定风险(%) Uncertain-risk	高风险(%) High-risk
18	概括/转换 Generalisability/ translation	评价是否或如何使本研究成果转化到其他物种或实验条件,包括与人体生物学的相关性 Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to generalise to other species or experimental conditions, including any relevance to human biology (where appropriate)	22(73.33)	6(20.00)	2(6.67)
19	注册计划书 Protocol registration	提供声明,说明研究前是否制定了方案(包括研究问题、关键设计特征和分析计划),以及该方案是否在何处注册 Provide a statement indicating whether a protocol (including the research question, key design features, and analysis plan) was prepared before the study, and if and where this protocol was registered	0	0	30(100.00)
20	数据共享 Data access	提供声明,说明研究数据是否可用以及在何处可用 Provide a statement describing if and where study data are available	0	0	30(100.00)
21	利益声明 Declaration of interests	21a. 报告潜在的利益冲突,包括财务和非财务方面的利益冲突。如果不存在,也要予以说明 21a. Declare any potential conflicts of interest, including financial and nonfinancial. If none exist, this should be stated 21b. 列出所有的资金来源(包括赠款标识符)以及出资人在研究的设计、分析和报告中的作用 21b. List all funding sources (including grant identifier) and the role of the funder(s) in the design, analysis, and reporting of the study	0 16(53.33)	0 4(13.33)	30(100.00) 10(33.33)

表 3 GSPC 清单评价结果
Table 3 GSPC checklist for included studies

主题 Content	涉及领域 Domain	条目 Item	内容 Description	低风险(%) Low-risk	不确定风险(%) Uncertain-risk	高风险(%) High-risk
前言 Introduction	背景信息 Background information	1	a. 说明与文章主题相关的文献,包括全球目前已得到什么样的结果; a. Description of the literature concerning the topic of the paper, including a short (global) description about how the results have been achieved/obtained; b. 描述所关注主题当前知识存在的不足; b. Description of the gaps in the current knowledge concerning the topic; c. 本研究的目的或者目标。 c. Aim or objective of the current study.	7(23.33)	22(73.33)	1(3.33)
		2	a. 明确、集中;a. Specific and focused; b. 如果可能,使用 PICO(T). b. Use the PICO(T) mnemonic, if possible. P:患者群体或动物物种 P;Patient group or animal species I:干预措施(或暴露)I;Intervention (or exposure) C:比较/对照组 C;Comparison/control group O:结局指标 O;Outcome measure 如果适用;持续时间 If applicable; Time (duration of intervention)	19(63.33)	11(36.67)	0
	临床或其他研究 相关性 Clinical relevance or other relevance of research	3	a. 选择特定动物模型的依据; a. Reasons why a specific animal model has been chosen; b. 动物模型的具体特点。 b. Specific characteristics of the animal model.	29(96.67)	0	1(3.33)

续表3

主题 Content	涉及领域 Domain	条目 Item	内容 Description	低风险(%) Low-risk	不确定风险(%) Uncertain-risk	高风险(%) High-risk
方法 Methods	实验设计 Experimental design 4 (if possible)	例如: For example:				
		完全随机化设计 Completely randomised design				
		区组设计 Block design	10(33.33)	13(43.33)	7(23.33)	
		析因设计 Factorial design				
		重复测量设计 Repeated measures design				
	实验分组及控制 Experimental groups 5 and controls	顺序设计 Sequential design				
		a. 运送动物设施后的检疫和适应期;物种;品系名称(准确的遗传代码);动物的来源;遗传背景(近亲繁殖、近交繁殖、F1 杂交、突变体、转基因、同种异体等)和繁殖;实验单位的定义(单个动物/一笼动物);每组动物的数量(可能的检验效能和样本量计算);性别;年龄(实验开始和结束时);重量(实验开始时)				
		a. Quarantine and acclimatisation period after transportation to animal facility; species; designation of strain (exact genetic code); origin and source of animals; genetic background (outbred, inbred, F1 hybrid, mutant, transgenic, congenic, consomic, etc.) and generation; definition of the experimental unit (individual animal/animals in one cage); number of animals per group (and possibly power and sample size calculations); sex; age (at the beginning and the end of the experiment); weight (at the start of the experiment)	9(30.00)	21(70.00)	0	
		b. 微生物状况:				
		b. Microbiological status:				
		常规/无特定病原体(SPF)/限菌、无菌 Conventional/specified pathogen-free (SPF)/gnotobiotic, germ-free 保护微生物状况的措施,如开放式系统,封闭系统,独立通风笼架,隔离 Measures to protect microbiological status (for example, open-system, closed-system (SPF), individually ventilated cage racks, isolation unit)	8(26.67)	0	22(73.33)	
	c. 饲养场所:					
	c. Housing-animal room:					
	温度 ± 范围(可调节与否)Temperature ± range (regulated or not)					
	相对湿度 ± 范围(可调节与否)Relative humidity ± range (regulated or not)					
	通风,加压或减压,每小时换气量 Ventilation: over-pressure or under-pressure, air changes per hour					
	灯光;自然光或人工灯光,24 h 光照时间、光强度、开灯时间和光强度的逐渐下降 Lighting: natural or artificial, number of hours light per 24 hours, light intensity, time when light is switched on, transitional decrease in light intensity	4(13.33)	0	26(86.67)		
	噪声(音乐等)Noise (music, etc.)					
	d. 笼子:					
	d. Housing-cages:					
	类型和尺寸 Type and size					
每笼动物数量(独立饲养及原因)Number of animals per cage (and if individually housed, why?)						
垫料(参照或类型)是否有分批次的检验证明 Bedding (reference; if not, type). Is batch analysis certificate available?	0	0	30(100.00)			
有无笼子的排泄物收集和类型 Presence and type of cage-enrichment						
更换笼子的频次 Frequency of cage change						
处理的频次 Frequency of handling						
e. 营养:						
e. Nutrition:						
类型(天然成分的膳食、按化学成分合成的膳食或纯化膳食) Type (natural-ingredient diets, chemically-defined diets or purified diets)						
成分或批号(如可能,需标注参考文献) Composition or batch number (if possible, use a reference)	2(6.67)	2(6.67)	26(86.67)			
预处理 Pre-treatment						
饲养方式(自由采食、饲料喂养和限制喂饲等) Feeding regimes (ad libitum, meal feeding, restricted, etc.). If not ad libitum; amount of food given, frequency and time of feeding.						

续表3

主题 Content	涉及领域 Domain	条目 Item	内容 Description	低风险(%) Low-risk	不确定风险(%) Uncertain-risk	高风险(%) High-risk
			f. 水; f. Water; 类型(分析证书可用与否) Type (analysis certificate available?) 预处理(酸化或氯化的浓度) Pre-treatment (concentration of acidification or chlorination) 饮水时间表,饮水量(随意否),供水频率(如果有限制) Water schedule; Quantity (ad libitum?), frequency of water supply (in case of restriction) 变化频率 Frequency of change 瓶或自动给水系统 Bottles or automatic watering system	4(13.33)	0	26(86.67)
			g. 动物分配的方法;如动物随机分配到某个特定实验组的方法 g. Method of allocation to treatment group; i. e. randomly assigning animals to a specific group	10(33.33)	13(43.33)	7(23.33)
			h. 描述在动物中如何定义疾病和干预措施 h. Description of how the disease or intervention is defined in the animal	29(96.67)	1(3.33)	0
			i. 描述从实验中剔除动物的原因 i. Description of the reasons to exclude animals from the experiment	30(100.00)	0	0
			j. 描述对照组,解释设置该对照组对回答研究问题的重要性 j. Description of the control groups in the experiment, and an explanation of why these specific control groups are important for answering the research question	0	0	30(100.00)
	法规与伦理 Regulations and ethics	6	a. 遵守国家监管原则的说明 a. Description of compliance to national regulatory principles	2(6.67)	0	28(93.33)
			b. 一个独立的组织机构来描述伦理和质量评估(如伦理委员会机构) b. Description of the ethical and qualitative assessment by an independent organisation within the institute (e.g. Institutional Ethics Committee)			
			a. 时间表;实验中干预的时间,在干预与采样或采样过程之间的时间 a. Time schedule; Day and time of intervention within experiment, time between intervention and sampling or processing			
	干预措施 Intervention	7	b. 干预类型 b. Type of intervention	30(100.00)	0	0
			c. 描述操作技术或使用的其他技术和材料 c. Description of operation techniques or other techniques and materials used			
			d. 剂量和(或)干预频率(适用时) d. Dose and/or frequency of intervention (when applicable)			
			e. 给药途径:肠内(口服或直肠)、肠外和经皮 e. Administration route; enteral (oral or via the anus), parenteral and trans-dermal			
			f. 药物和剂量测试(产品名称、制造商、浓度) f. Drugs and dose tested (product name, manufacturer, concentration)			
			g. 其他使用的产品(产品名称、制造商、浓度) g. Other products used (product name, manufacturer, cncentration)			
			h. 采样方法和时间(血、尿等) h. Method and time of sampling (blood, urine, etc.)			
			i. 麻醉(持续时间、用药类型和方法) i. Anaesthesia (duration, type of drug and method)			
			j. 镇痛(用药类型和方法) j. Analgesia (type of drug and method)			
			k. 安乐死(用药类型和方法) k. Euthanasia (type of drug and method)			
			l. 描述动物在干预结束后的总体福利和折中福利 l. Description of general wellbeing of the animal during and at the end of the intervention and in the case of compromised wellbeing			
			m. 补救措施的应用 m. What relieving measures have been taken			

续表3

主题 Content	涉及领域 Domain	条目 Item	内容 Description	低风险(%) Low-risk	不确定风险(%) Uncertain-risk	高风险(%) High-risk
结果 Results	结局指标 Outcome	8	a. 描述目标参数和测定方法;重要的生理参数和参考值来定义动物福利 a. Description of parameters of interest, and the method of determination; Inclusion also of important physiological parameters and reference values to define wellbeing of the animal b. 描述是否或(和)如何对实验工作人员施盲 b. Description whether, or how, the staff was blinded to the treatment modality c. 描述所使用的统计量 c. Description of the statistics used	0	30(100.00)	0
		9	a. 描述主要结果 a. Description of the main results b. 实验中提前死亡动物的数量和原因(尸检结果的简短说明) b. Numbers and reasons of premature deaths during the experiments (short description of autopsy findings) c. 剔除动物(说明数量和原因) c. Excluded animals (numbers and reasons why they were excluded) d. 进入统计分析的动物总数 d. Total numbers of animals included in the statistical analyses e. 简短描述纳入动物的特性 e. Short description/explanation of included animals with peculiarities f. 因患病或剔除动物调整后的效能分析(判定研究的可靠性) f. Power analysis after adjustment for diseased and excluded animals (to determine the reliability of the study) g. 描述干预中最重要的相关生理参数(如温度、体质量和心率等) g. Description of the most important relevant physiological parameters during intervention (like temperature, body weight, heart rate, etc.)	30(100.00)	0	0
讨论 Discussion		10	a. 对主要发现进行讨论 a. Discussion of principal findings b. 讨论结局的(间接)临床意义和整个科学意义 b. Discussion of the (indirect) clinical and overall scientific relevance of the outcome c. 确定是否继续研究的必要性 c. Definition of whether or not follow up studies are necessary	27(90.00)	1(3.33)	2(6.67)

方法、结果和讨论。它包括 10 项条目的 54 项子条目,本研究将其合并为 19 项进行评估。其中有 12 项子条目的低风险率低于 50%,5 项低风险率低于 10%。具体如下。(1)背景信息:7 项(23.33%)研究介绍了针刺干预青光眼的进展,并提供相关参考资料,指出了目前治疗中的不足之处,明确当前研究的目的。(2)研究问题或假设:19 项(63.33%)研究明确指出了问题和假设,或遵循 PICO 原则。(3)研究的临床相关性或其他相关性:29 项(96.67%)研究提供了选择模型的依据或模型的特异性。(4)实验设计:10 项(33.33%)研究报告了实验设计方法,如采用完全随机化设计。(5)实验分组及控制:9 项(30.00%)研究记录了动物的数量、性别、年龄等信息;8 项(26.67%)研究描述了微生物状况,并报告具体动物提供者;4 项(13.33%)研究描述了动物饲养场所的温度、湿度和其他条件;所有研究均未介绍笼子的类型、每个笼子的动物数量等信息;2 项(6.67%)研究介绍了提供给动物营养物质的种类和成分;4 项(13.33%)研究报告了动物饮水的频率时间等信息;10 项(33.33%)研究介绍了将动物

随机分组的方法;29 项(96.67%)研究介绍了如何定义动物的疾病或干预措施,描述了必要时将动物排除在实验之外的原因,但都没有详细说明对照组的重要性。(6)法规与伦理:只有 2 项(6.67%)研究提供了伦理审查机构的名称、许可证号,以及符合国家法规原则的描述。(7)干预措施:所有研究均详细描述了干预措施。(8)结局指标:所有研究都描述了统计结果,但未提到盲法。(9)结果:所有研究均详细描述,包括进入统计分析的动物总数、干预中最重要的相关生理参数等信息。(10)讨论:27 项(90%)研究讨论了主要结论和发现,阐述了结果对临床和整体科学的可能意义,并确定是否需要后续研究。Kappa 检验显示,两名研究人员 GSPC 清单评价结果一致性佳($\kappa = 0.905, P = 0.000$),详见表 3。

3 讨论

在本次纳入的 30 篇针刺干预青光眼的动物研究中,选择性偏倚、实施偏倚和测量偏倚是影响方法学质量的主要方面。通常来说,选择性偏倚与随

机序列产生、基线特征和分配隐藏有关,而纳入的研究对上述三者的实施并不充分,特别是在分配隐藏方面。与临床试验相比,动物研究的样本数量较少,但基线差异却很大^[47],而且“随机分配”并不是动物实验研究中常见的实践模式。因此,实验数据更有可能受到各组动物之间关键基线特征变化的影响^[48],如果能够保证完整的随机序列产生和分配隐藏,则基线特征才具有可比性。因此,为了降低选择性偏倚,未来的研究应关注随机方法和分配隐藏在动物实验研究中的应用和开展,以及基线特征对实验结果的影响,这对于没有随机分组或小样本的研究尤为重要。实施偏倚和测量偏倚主要涉及动物安置随机化、随机性结果评估和盲法(在干预和结果测量阶段),纳入的研究对于上述三者的实施极不充分(低风险:13.33%,33.33%,0%)。与 RCTs 相比,实验结果受动物饲养方式的影响很大,包括光照强度、温度在内的微小变化便能够影响动物行为状态^[49-51],如果未采取随机化安置,研究人员可能会猜测每组动物的行为方式,从而导致实施偏差。同时,大多数生物都表现出昼夜节律现象,如果在测量时不采用随机性结果评估,则可能出现测量偏倚。因此,为了提高动物实验结果的内在可靠性,建议今后的研究注重动物的随机化安置和随机结果的测量偏倚。尽管对动物进行盲法处理对于动物实验并不重要,但大多数研究者同时也是动物饲养员,因此,未施盲可能会导致研究者对预期实验结果出现主观偏见。与此类似,在结果测量时如未实施盲法,也会导致测量偏倚。因此,为了消除实施和测量偏倚,建议未来针刺干预青光眼的动物实验应该注重对实验人员(包括动物饲养员)以及结果评估人员盲法的实施。

动物研究报告质量评价方面,在 30 篇纳入文献中,ARRIVE 2.0 指南 55.26% 的子条目低风险<50%,GSPC 清单为 63.16%,提示目前针刺干预青光眼动物研究报告仍存在诸多缺陷,可能导致研究的可重复性降低。其中除上文提到的随机化和盲法外,伦理声明、饲养场所和饲养、动物护理和监测以及方案注册是高风险领域。综上,建议在以后开展实验及撰写报告时应重点关注以下方面:(1)明确报告动物和数据的纳入和排除标准,以确保研究的科学严谨性和完整性。应提供样本量详细的计算方法,明确实验中的主要和次要结局指标,同时充分详细地描述统计分析的方法,使其他研究人员

能够使用相同的步骤重新分析原始数据并得出相同的结论。(2)动物的特征类似于人类患者的标准化人口统计学,支撑研究结果的内部和外部有效性,因此应详细报告动物种类、品系、亚型、性别、重量和年龄等信息。动物饲养环境影响最终实验结果,因此需要详细报告动物的住房、周围环境和喂养方式,包括温度、相对湿度、通风、空气交换、照明、噪声、笼子、垫料、营养、喂养技术和水供应等方面。(3)重视实验动物的福利伦理既是社会文明的体现,也是对用于人类健康研究的实验动物生命的尊重,因此研究需要通过专业动物伦理委员会的论证和审批,同时应详细报告在实验中使用的安全和有效的镇痛方案,以减少动物的疼痛、痛苦和困扰。此外,任何危及研究中动物福利的不良事件都需要被报告。(4)实验方案注册有助于提升动物研究的公开性,与临床试验相同,它可以提高科学的完整性,使研究人员免于对结果未完全报告的担忧。同时,数据共享声明的公布保证了实验结果的可重复性,并避免了一些不必要的动物使用。

本研究的局限性包括:目前的文章仅限于以中文和英文发表的研究,因此存在语言和地区差异,可能会遗漏以其他语言发表的文献;评价过程具有很强的主观性,不同的评价者对每项条目的风险有不同的判断,结果可能不同;目前文章中收录的研究的偏倚风险评估是基于文献的报道内容,未联系作者核实其实验研究的具体实施细节。

综上所述,针刺干预青光眼的动物研究中,方法学和实验报告质量普遍不高,对于多项条目的实施不够完整,这使读者难以客观准确地评估动物实验可能产生的偏倚风险,甚至可能影响读者对动物研究是否能进一步转化为临床研究的判断。因此建议进一步推广和使用 SYRCLE 偏倚风险工具、ARRIVE 2.0 指南和 GSPC 清单,从而加强动物实验的设计、实施和报告,确保实验和结果的可重复性。

参考文献:

- [1] Li F, Su Y, Lin F, et al. A deep-learning system predicts glaucoma incidence and progression using retinal photographs [J]. J Clin Invest, 2022, 132(11): e157968.
- [2] Fernandez-Albarral JA, Ramírez AI, de Hoz R, et al. Retinal microglial activation in glaucoma: evolution over time in a unilateral ocular hypertension model [J]. Neural Regen Res, 2022, 17(4): 797-799.
- [3] Reis TF, Paula JS, Furtado JM. Primary glaucomas in adults: Epidemiology and public health-a review [J]. Clin Exp

- Ophthalmol, 2022, 50(2): 128-142.
- [4] Tham YC, Li X, Wong TY, et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(11): 2081-2090.
- [5] Mostafa M, Al Fatease A, Alany RG, et al. Recent advances of ocular drug delivery systems: prominence of ocular implants for chronic eye diseases [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(6): 1746.
- [6] Tian B, Kaufman PL. Comparisons of actin filament disruptors and Rho kinase inhibitors as potential antiglaucoma medications [J]. *Expert Rev Ophthalmol*, 2012, 7(2): 177-187.
- [7] 王安莉, 李玉婕, 侯晓璐, 等. 针刺疗法对青光眼黄斑血流和结构的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(3): 1374-1378.
- Wang AL, Li YJ, Hou XL, et al. Effects of acupuncture therapy on macular blood flow and structure in glaucoma [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(3): 1374-1378.
- [8] 陈水龄, 褚利群, 陶方方, 等. 针刺治疗青光眼视神经萎缩: 随机对照试验 [J]. *中国针灸*, 2023, 43(4): 432-436.
- Chen SL, Chu LQ, Tao FF, et al. Acupuncture for glaucoma-induced optic atrophy: a randomized controlled trial [J]. *Chin Acup Moxib*, 2023, 43(4): 432-436.
- [9] 郭萌颖, 董芷函, 张娜娜, 等. 转化医学理念下开放式动物实验学习效果探讨 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(1): 113-114, 121.
- Guo MY, Dong ZH, Zhang NN, et al. Discussion on the study effect of open animal experiment under the concept of transformational medicine [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(1): 113-114, 121.
- [10] 王瑞奇, 黄春华, 吴清忠, 等. 基于 SYRCLE 风险评价工具及实验研究报告规范评价电针干预脊髓损伤后神经源性膀胱动物实验报告质量 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(11): 76-87.
- Wang RQ, Huang CH, Wu QZ, et al. Evaluation of the quality of animal experiment report electroacupuncture intervention for neurogenic bladder after spinal cord injury based on SYRCLE risk assessment tool and experimental research report specification [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(11): 76-87.
- [11] Zhao B, Jiang Y, Zhang T, et al. Quality of interventional animal experiments in Chinese journals: compliance with ARRIVE guidelines [J]. *BMC Vet Res*, 2020, 16(1): 460.
- [12] Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RBM, et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies [J]. *BMC Med Res Methodol*, 2014, 14: 43.
- [13] Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research [J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(7): e3000410.
- [14] Hooijmans C, de Vries R, Leenaars M, et al. The Gold Standard Publication Checklist (GSPC) for improved design, reporting and scientific quality of animal studies GSPC versus ARRIVE guidelines [J]. *Lab Anim*, 2011, 45(1): 61.
- [15] EQUATOR Network. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research [EB/OL]. [2023-01-20]. <https://www.equator-network.org/reporting-guidelines/improving-bioscience-research-reporting-the-arrive-guidelines-for-reporting-animal-research/>.
- [16] Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews [J]. *J Clin Epidemiol*, 2021, 134: 178-189.
- [17] 刘艳艳, 周令娴. 针刺对氯丙嗪实验性高眼压的影响 [J]. *中国中医眼科杂志*, 1994, 4(1): 24-25.
- Liu YY, Zhou LX. Effect of acupuncture on experimental ocular hypertension of chlorpromazine [J]. *J Tradit Chin Ophthalmol*, 1994, 4(1): 24-25.
- [18] 姜俊. 针灸治疗原发性青光眼的临床与实验研究 [J]. *上海针灸杂志*, 1996, 15(S1): 3-4.
- Jiang J. Clinical and experimental study on acupuncture treatment of primary glaucoma [J]. *Shanghai J Acupunct Moxibustion*, 1996, 15(S1): 3-4.
- [19] 周文新, 庄卫. 电针趾间穴对家兔眼压的影响 [J]. *中西医结合眼科杂志*, 1996(3): 129-130.
- Zhou WX, Zhuang W. Effect of electroacupuncture at interphalangeal point on intraocular pressure in rabbits [J]. *Chin J Optom Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 14(3): 129-130.
- [20] 周文新, 庄卫, 孙克兴. 针刺后三里穴对家兔实验性高眼压的影响 [J]. *上海针灸杂志*, 1996, 15(S1): 397-398.
- Zhou WX, Zhuang W, Sun KX. Effect of acupuncture at Housanli point on experimental ocular hypertension in rabbits [J]. *Shanghai J Acupunct Moxibustion*, 1996, 15(S1): 397-398.
- [21] 庄卫. 电针睛明穴对家兔眼压的影响 [J]. *中国中医眼科杂志*, 1996, 6(1): 7-8.
- Zhuang W. Effect of electric acupuncture Jinming acupoint on intraocular pressure in rabbit eyes [J]. *J Tradit Chin Ophthalmol*, 1996, 6(1): 7-8.
- [22] 李志勇, 韩梅, 张广庆. 针刺对家兔高眼压的影响 [J]. *中国中医眼科杂志*, 1998, 8(1): 15-17.
- Li ZY, Han M, Zhang GQ. Effect of acupuncture for ocular hypertension of the rabbits [J]. *J Tradit Chin Ophthalmol*, 1998, 8(1): 15-17.
- [23] 姜俊, 严振国, 郇浩清, 等. 针刺治疗原发性青光眼的临床与实验研究 [J]. *针刺研究*, 1999, 24(2): 95-97.
- Jiang J, Yan ZG, Tai HQ, et al. A study on the acupuncture treatment of primary glaucoma [J]. *Acupunct Res*, 1999, 24(2): 95-97.
- [24] 孙克兴, 杨文英. 电针对急性高眼压家兔视网膜过氧化物损伤的影响 [J]. *中国针灸*, 1999, 19(11): 695-697.
- Sun KX, Yang WY. Effect of electroacupuncture on retinal peroxide injury in rabbits with acute ocular hypertension [J]. *Chin Acup Moxib*, 1999, 19(11): 695-697.
- [25] 郇浩清. 针刺治疗兔青光眼的实验研究 [J]. *安徽中医学院学报*, 2001, 20(6): 29-30.
- Tai HQ. Experimental study on acupuncture treatment of glaucoma in rabbits [J]. *J Anhui Tradit Chin Med Coll*, 2001,

- 20(6): 29-30.
- [26] 周文新, 孙克兴. 电针家兔后三里、睛明、趾间穴对高血压作用的比较 [J]. 甘肃中医, 2001, 14(6): 71-72.
- Zhou WX, Sun KX. Comparison of the effects of electroacupuncture at Housanli, Jingming and Intertoe on ocular hypertension in rabbits [J]. Gansu J Tradit Chin Med, 2001, 14(6): 71-72.
- [27] 李志勇, 张果忠, 张广庆. 针刺对家兔慢性高血压及视网膜超微结构的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2002, 12(3): 135-138.
- Li ZY, Zhang GZ, Zhang GQ. Effect of acupuncture on experimental chronic ocular hypertension and retinal ultrastructure in rabbits [J]. J Tradit Chin Ophthalmol, 2002, 12(3): 135-138.
- [28] 李志勇, 刘岩, 张广庆. 针刺降低兔慢性高血压机理的实验研究 [J]. 中国中医眼科杂志, 2003, 13(4): 195-196.
- Li ZY, Liu Y, Zhang GQ. A study on the mechanism of acupuncture on experimental chronic ocular hypertension in rabbits [J]. J Tradit Chin Ophthalmol, 2003, 13(4): 195-196.
- [29] Chan HH, Leung MC, So KF. Electroacupuncture provides a new approach to neuroprotection in rats with induced glaucoma [J]. J Altern Complement Med, 2005, 11(2): 315-322.
- [30] 汪锐. 针刺对家兔实验性慢性高血压的影响 [J]. 湖北中医杂志, 2005, 27(3): 14-15.
- Wang R. Effect of acupuncture on experimental chronic ocular hypertension in rabbits [J]. Hubei J Tradit Chin Med, 2005, 27(3): 14-15.
- [31] 张慧, 孙河. 针刺对慢性高血压兔视网膜 NO 和 Glu 含量的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2006, 22(10): 47-49.
- Zhang H, Sun H. Effect of acupuncture on NO and Glu contents in retina of rabbits with chronic ocular hypertension [J]. J Clin Acupunct Moxibustion, 2006, 22(10): 47-49.
- [32] 张静. 电针对急性高血压家兔球结膜微循环的调节作用 [J]. 河北中医, 2008, 30(1): 88-89.
- Zhang J. Regulation effect of electric acupuncture on conjunctiva microcirculation of rabbit with acute bulbi hypertonia [J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2008, 30(1): 88-89.
- [33] 朱海, 龙心光, 陈少基, 等. 针刺对慢性高血压家兔眼压及前房角组织病理变化的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2008, 18(4): 213-215.
- Zhu H, Long XG, Chen SJ, et al. Acupuncture effect on experimental chronic ocular hypertension and anterior chamber angle tissue [J]. J Tradit Chin Ophthalmol, 2008, 18(4): 213-215.
- [34] 朱海, 龙心光, 吴海科, 等. 针刺对慢性高血压家兔前房角组织超微结构的影响 [J]. 新中医, 2009, 41(11): 98-100, 140.
- Zhu H, Long XG, Wu HK, et al. Effect of acupuncture on ultrastructure of angle of anterior chamber in rabbits with chronic intraocular hypertension [J]. J N Chin Med, 2009, 41(11): 98-100, 140.
- [35] 孙河, 张慧. 针刺对慢性高血压兔视网膜、视神经超微结构影响的研究 [J]. 针灸临床杂志, 2010, 26(5): 52-55.
- Sun H, Zhang H. The protective effect of acupuncture treatment on retinal and optic nerve axonal ultrastructure in rabbit eyes with chronic elevated IOP [J]. J Clin Acupunct Moxibustion, 2010, 26(5): 52-55.
- [36] 孙河, 张慧, 林柏松. 针刺对慢性高血压兔视网膜 Bcl-xl、BDNF 表达的影响 [J]. 中国针灸, 2010, 30(8): 661-664.
- Sun H, Zhang H. The protective effect of acupuncture treatment on retinal and optic nerve axonal ultrastructure in rabbit eyes with chronic elevated IOP [J]. Chin Acup Moxib, 2010, 26(5): 52-55.
- [37] 张慧, 孙河. 针刺对眼压已控制的慢性高血压兔视网膜保护作用的研究 [J]. 针灸临床杂志, 2010, 26(6): 53-55.
- Zhang H, Sun H. The protective effect of acupuncture treatment on retina in rabbits whose intraocular pressure was reduced to normal after chronic intraocular pressure elevated [J]. J Clin Acupunct Moxibustion, 2010, 26(6): 53-55.
- [38] 路雪婧, 张华, 黄珍珍. 针刺对持续高血压大鼠眼压的影响研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2011, 34(2): 75-76.
- Lu XJ, Zhang H, Huang ZZ. Effect of acupuncture on intraocular pressure in rats with persistent ocular hypertension [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med, 2011, 34(2): 75-76.
- [39] 孙红, 王育良, 柏玉洁, 等. 针刺降低青光眼模型兔眼压的机理探讨 [J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(3): 263-265.
- Sun H, Wang YL, Bai YJ, et al. Study on the mechanism of acupuncture treating experimental acute ocular hypertension of rabbits [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2011, 27(3): 263-265.
- [40] 张华, 黄珍珍, 路雪婧. 针刺对高血压大鼠视网膜神经节细胞凋亡基因 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. 中医眼耳鼻喉杂志, 2011, 1(4): 215-217, 224.
- Zhang H, Huang ZZ, Lu XJ. Effect on expressions of retinal ganglion cell apoptosis gene Bcl-2, Bax in elevated intraocular pressure rats by acupuncture [J]. J Chin Ophthalmol Otorhinolaryngol, 2011, 1(4): 215-217, 224.
- [41] 孙河, 赵晓龙. 针药并用对慢性高血压兔视网膜 NO 和 GLU 含量的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2015, 31(4): 63-66.
- Sun H, Zhao XL. Effects of acupuncture combined with medicine on the contents of NO and glu of retina in rabbits with chronic ocular hypertension [J]. J Clin Acupunct Moxibustion, 2015, 31(4): 63-66.
- [42] 陆欣玲, 杨扬, 俞莹, 等. 针刺对慢性高血压后兔模型 NGF-TrkA 及 AKT 的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(7): 83-87.
- Lu XL, Yang Y, Yu Y, et al. The change of NGF-TrkA and AKT after acupuncture treatment for chronic high intraocular pressure on the rabbit model [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2016, 50(7): 83-87.
- [43] 蔡萧君, 赵晓龙, 孙河. 针刺对慢性高血压后大鼠模型 NGF-TrkA 及 AKT 的影响 [J]. 四川中医, 2017, 35(7): 65-68.

Cai XJ, Zhao XL, Sun H. Impact analysis of acupuncture on NGF-TrkA and AKT in rats with chronic ocular hypertension [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2017, 35(7): 65-68.

[44] 陆欣玲, 李瑞玲, 嵇瑛, 等. 针刺对慢性高眼压后兔模型视网膜细胞凋亡及 ERK1 和 MAPK9 的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(3): 75-80.

Lu XL, Li RL, Ji Y, et al. Effects of acupuncture on retinal cell apoptosis and expressions of ERK1 and MAPK9 in rabbits with chronic intraocular hypertension [J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2017, 31(3): 75-80.

[45] 庞国龙, 赵丽楠, 杜允宏, 等. 针刺小梁网对应区降低大鼠高眼压的实验研究 [J]. 中华眼外伤职业眼病杂志, 2019, 41(8): 789498.

Pang GL, Zhao LN, Du YH, et al. Experimental study of reducing intraocular pressure in rats with acupuncture in the corresponding area of trabecular meshwork [J]. Chin J Ocul Trauma Occup Eye Dis, 2019, 41(8): 580-584.

[46] 郭润杰, 陈平, 符甜甜, 等. δ -阿片受体在电针抗视网膜缺血再灌注致视网膜细胞坏死性凋亡中的作用 [J]. 上海中医药大学学报, 2022, 36(5): 52-59.

Guo RJ, Chen P, Fu TT, et al. Role of δ -opioid receptors in electroacupuncture against retinal ischemia-reperfusion induced retinal cell necroptosis [J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2022, 36(5): 52-59.

[47] Chen X, Yang T, Luo Y, et al. Methodological and reporting quality evaluation of Buyang Huanwu Decoction for experimental cerebral ischemia-reperfusion injury: a systematic review [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2023, 396(5): 831-849.

[48] Shang Z, Li D, Chen J, et al. The role of biodegradable magnesium and its alloys in anterior cruciate ligament reconstruction: a systematic review and meta-analysis based on animal studies [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 789498.

[49] Liu X, Zheng X, Liu Y, et al. Effects of adaptation to handling on the circadian rhythmicity of blood solutes in Mongolian gerbils [J]. Animal Model Exp Med, 2019, 2(2): 127-131.

[50] 程雅欣, 李佳, 刘明玉, 等. 高温高湿环境对大鼠血尿酸水平的影响及其作用机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 905-912.

Cheng YX, Li J, Liu MY, et al. Influence and mechanism of elevated serum uric acid levels in rats in a high temperature-humidity environment [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(7): 905-912.

[51] Dong D, Yang D, Lin L, et al. Circadian rhythm in pharmacokinetics and its relevance to chronotherapy [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 178: 114045.

[收稿日期] 2023-03-06

编者·读者·作者

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

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

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

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

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



王报捷, 苏丽晴, 张志勇, 等. 5-Aza-CdR 通过 Notch1 通路对小鼠海马神经发生的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 34-39.

Wang BJ, Su LQ, Zhang ZY, et al. Effects of 5-Aza-CdR on hippocampal neurogenesis in mice via the Notch1 pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 34-39.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.004

5-Aza-CdR 通过 Notch1 通路对小鼠海马神经发生的影响

王报捷¹, 苏丽晴¹, 张志勇², 闫磊², 王志广², 包素雅³, 邵国^{4*}

(1. 深圳市龙岗区第三人民医院药学部, 深圳 518112; 2. 包头医学院低氧转化医学重点实验室, 内蒙古 包头 014040; 3. 重庆医科大学, 重庆 400016; 4. 深圳市龙岗区第三人民医院转化医学中心, 深圳 518112)

【摘要】 目的 研究 5-Aza-CdR 对 Notch1 通路影响及神经再生的影响, 并通过小鼠主动回避行为实验来探讨 5-Aza-CdR 对小鼠学习记忆能力的影响。**方法** 将 60 只 6~8 周龄 SPF 级 ICR 雄性小鼠分为两组, 通过侧脑室注射 (i. c. v) 给一组小鼠注射 5-Aza-CdR, 另一组注射 BSA 作为对照组。注射后 24 h 通过 Real-time PCR 和 Western blot 检测 Notch1 和 HES1 的 mRNA 和蛋白表达水平; 通过激光共聚焦显微镜观察 5-溴-2'-脱氧尿苷 (BrdU) 阳性细胞和海马 DG 中 Notch1 的表达; 用 MS-PCR 检测 Notch1 甲基化变化; 通过穿梭回避实验来评估小鼠的学习和记忆行为。**结果** 注射 5-Aza-CdR 使海马 Notch1 通路活性增加并促进 DG 区神经细胞再生, 降低 Notch1 启动子区甲基化水平, 小鼠主动回避行为能力得到提升。**结论** 5-Aza-CdR 对小鼠主动回避行为的影响可能与 Notch1 通路影响海马神经再生有关。

【关键词】 5-Aza-CdR; 神经发生; Notch1; 学习和记忆

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0034-06

Effects of 5-Aza-CdR on hippocampal neurogenesis in mice via the Notch1 pathway

WANG Baojie¹, SU Liqing¹, ZHANG Zhiyong², YAN Lei², WANG Zhiguang², BAO Suyu³, SHAO Guo^{4*}

(1. Department of Pharmacy, the Third People's Hospital of Longgang District, Shenzhen 518112, China.

2. Key Laboratory of Hypoxia Translational Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014040.

3. Chongqing Medical University, Chongqing 400016. 4. Center for Translational Medicine, the Third People's Hospital of Longgang District, Shenzhen 518112)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of 5-Aza-CdR on Notch1 pathway and neural regeneration and to explore the effects of 5-Aza-CdR on learning memory ability in mice by exploring active avoidance behavior. **Methods** Sixty 6~8-week-old SPF-grade ICR male mice were divided into two groups. 5-Aza-CdR was administered to one group of mice via lateral ventricular injection, while the control group was injected with bovine serum albumin. Notch1 and HES1 mRNA and protein expression levels were detected by Real-time PCR and Western blot 24 hours after injection; 5-bromo-2'-deoxyuridine-positive cells were observed by laser confocal microscopy, and Notch1 expression in hippocampal dentate gyrus was viewed with laser confocal microscopy. Notch1 methylation changes were detected by methylation-specific PCR, and learning and memory behaviors of mice were assessed by passive avoidance tests and shuttle avoidance assays. **Results** Injection of 5-Aza-CdR increased hippocampal Notch1 pathway activity, promoted neuronal regeneration in the DG region, decreased methylation levels in the Notch1 promoter region, and enhanced the ability of mice to perform active avoidance

【基金项目】 国家自然科学基金 (82060337); 深圳市科技计划项目基础研究面上项目 (JCYJ20220531092412028, JCYJ20230807121306012); 深圳市龙岗区医疗卫生科技计划项目 (LGKCYLWS2021000033, LGKCYLWS2023025)。

【作者简介】 王报捷 (1980—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 药学。E-mail: 908415225@qq.com

【通信作者】 邵国 (1972—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经保护。E-mail: shao_guo_china@163.com

behavior. **Conclusions** The effect of 5-Aza-CdR on active avoidance behavior may be related to the influence of hippocampal neural regeneration through the Notch1 pathway.

【Keywords】 5-Aza-CdR; neurogenesis; Notch1; learning and memory

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

齿状回(dentate gyrus, DG)产生新的神经元,这有助于海马神经元细胞的可塑性^[1],文献报道 DG 中的成年神经发生在记忆任务中起到一定作用^[2]。Notch 信号通路是多细胞生物中起着重要作用的胚胎发育的跨细胞间的信号传递,可调控大多数组织发育与细胞分化、增殖和凋亡等。有研究表明 Notch 信号通路是大脑神经再生的的一条重要通路并参与学习和记忆的发生^[3-4],而 HES1 是 Notch 信号通路下游效应分子中的代表之一,可通过负性反馈机制抑制 Notch 信号通路的激活从而参与到机体调节中^[5]。一些药物改善了成年神经发生,并可能在治疗行为相关疾病方面发挥潜在作用^[6-8]。5-Aza-CdR 处理可降低人髓系白血病细胞系中 Notch1 的 DNA 甲基化水平增加 Notch1 的表达^[9]。阐明 5-Aza-CdR 处理是否可以在大脑神经细胞中增加 Notch1 表达从而促进神经细胞再生而影响学习记忆,这可能为治疗一些影响学习记忆的疾病提供研究思路。

核苷酸类似物 5-Aza-CdR 是一种去甲基化试剂^[10],5-Aza-CdR 已被 FDA 批准直接或间接用于影响基因的疾病治疗^[11-12]。在表观遗传学研究中,它也被广泛用作抑制 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)^[13]。除去甲基化功能,5-Aza-CdR 在诱导细胞周期、分化、细胞死亡和动物行为方面也发挥了重要作用^[14-17]。基因的甲基化水平与表达水平呈负相关:高甲基化降低基因表达和低甲基化增加基因表达^[18]。本研究 5-Aza-CdR 是否通过下调 Notch1 的 DNA 甲基化诱导其表达,从而促进神经再生来影响学习记忆。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60 只 6~8 周龄 ICR 雄性 SPF 级小鼠(18~22 g)由斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]提供。饲养于斯贝福(北京)生物技术有限公司动物房内[SYXK(京)2021-0038],实验温度适宜,动物自由采食饮水。实验中涉及动物的操作程序得到深圳市龙岗区人民医院实验动物伦理委员会批准(2021035DW),本实验所有操作均符合

中华人民共和国《实验动物管理条例》,实验设计及饲养使用过程均遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

5-Aza-CdR、BrdU (Sigma-Aldrich 公司,批号: BCCD66249); TRIzol (Invitrogen 公司,批号: 391303); 反转录试剂盒、2×SYBR Green qPCR Master Mix (TaKaRa 公司,批号: ALF0602A); RIPA 裂解液、ECL 发光液(上海碧云天生物技术有限公司);蛋白酶抑制剂 Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (100×) (Thermo Fisher 公司);BCA 蛋白检测试剂盒(美国 Pierce 公司);兔抗 Notch1 抗体和兔抗 HES1 多克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司);大鼠抗 BrdU 抗体 (Abcam 公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的驴抗兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司);山羊抗兔 Alexa Fluor488 和山羊抗大鼠 Alexa Fluor594 (Invitrogen 公司);DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司);甲基化试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);RIPA 裂解液(碧云天生物技术公司);含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)的封片剂(Vector 公司)。Tanon-IVDT-1 化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);ABI 7900HT 实时 PCR 系统(Applied Biosystems);STT-100 M 穿梭箱测试(成都仪器有限公司);立体定位仪(瑞沃得);激光扫描共聚焦显微镜(尼康 A1)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组

60 只 SPF 级 ICR 雄性小鼠随机分为两组,实验(5-Aza-CdR 处理)组右侧脑室内注射 10 μmol/L 5-Aza-CdR 5 μL^[16],对照(control)组注射相同体积的 10 g/L BSA。小鼠麻醉后用立体定位仪固定,参考小鼠脑图谱,确定前囟,在前囟后 1.7 mm,矢状缝旁开 1.5 mm 处用颅钻打开颅骨,使用显微注射泵以 1 μL/min 的速率注射 5 min,注射后留针 1 min,防止回流。缓慢退针,缝合伤口。注射 24 h 后进行后续实验。

1.3.2 穿梭主动回避试验

条件回避学习测试通过 STT-100 M 穿梭箱进行

测量。在一侧隔室进行 5 min 的适应,声光刺激 10 s,然后立即进行 10 s 的电刺激。当动物穿越到另一个隔间时,一轮任务完成,条件刺激(conditioned stimulus, CS)或非条件刺激(unconditioned stimulus, UCS)期间的穿越分别被视为回避和逃避反应。训练包括为期 1 d 的 25 次试验,24 h 后重复测试。记录主动回避反应次数。实验持续 3 d。

1.3.3 RNA 提取和定量实时 PCR

使用 TRIzol 试剂从小鼠海马分离总 RNA。使用反转录试剂盒进行逆转录 PCR。定量实时 PCR 在 ABI 7900HT 实时 PCR 系统上进行 3 次。使用 $\Delta\Delta CT$ 值法分析结果。引物序列如下: Notch1-F: CCACCCATGACCACTACCCAGTT; Notch1-R: CCCCGGACCAATCAGAGATGTT; HES1-F: ACCGGACAAACCAAAGAC; HES1-R: ATGCCGGGAGCTATCTTTCT; β -actin-F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG; β -actin-R: CCGTGTAACAATGCCATGT。

1.3.4 Western blot 检测

使用含 PMSF 的 RIPA 裂解液从组织分离总蛋白。蛋白用 SDS/PAGE(12%)在 30 mA 分离 2.5 h,然后转移到 PVDF 膜上。将膜在含 5%脱脂牛奶的 TTBS 缓冲液中孵育 1 h,与一抗孵育过夜,然后在室温下与二抗孵育 1 h。用增强型化学发光检测系统(ECL)检测蛋白印迹。用 Image J 软件检测蛋白表达水平的灰度值。

1.3.5 组织免疫荧光

用 BrdU 和 Notch1 免疫荧光染色检测小鼠齿状回(DG)区神经元再生情况。小鼠腹腔连续 3 d 注射 200 mg/kg BrdU 后处死小鼠,固定脑组织。脑组织进行冷冻切片制成厚度 20 μ m 的切片。兔抗 Notch1 抗体和大鼠抗 BrdU 抗体孵育过夜。切片分别用山羊抗兔 Alexa Fluor488 和山羊抗大鼠 Alexa Fluor594 室温孵育 2 h,用 DAPI 染色。在激光扫描共聚焦显微镜下检查免疫荧光图像。

1.3.6 甲基化特异性 PCR

DNA 提取试剂盒从组织中分离总 DNA。用甲基化试剂盒对 DNA 进行亚硫酸氢盐处理,用 PCR 扩增 1 μ g 修饰 DNA。每个样品分别用两组甲基化 DNA(methylated MS-PCR)和未甲基化 DNA(unmethylated MS-PCR)引物进行扩增。用于甲基化和非甲基化 Notch1 基因启动子区域的引物如下: Notch1-MF: TGATTTTAAACGATGATGGC; Notch1-

MR: AAAAATCGAAAACGCAATCTA; Notch1-UMF: GTTTGATTAAATGATGATGGT; Notch1-UMR: ACTAA AAATCAAAAACACAATCTA。用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离 Notch1 甲基化和非甲基化的 PCR 产物。

1.4 统计学方法

实验数据用平均数 $\pm$ 标准误差($\bar{x}\pm s\bar{x}$)表示。行为检验采用重复测量单因素方差分析和 Man-Whitney U 检验。其余结果采用单因素方差分析(one-way ANOVA)或双侧 t 检验(SPSS 软件)完成。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR 对小鼠海马组织 Notch1 和 HES1 表达的影响

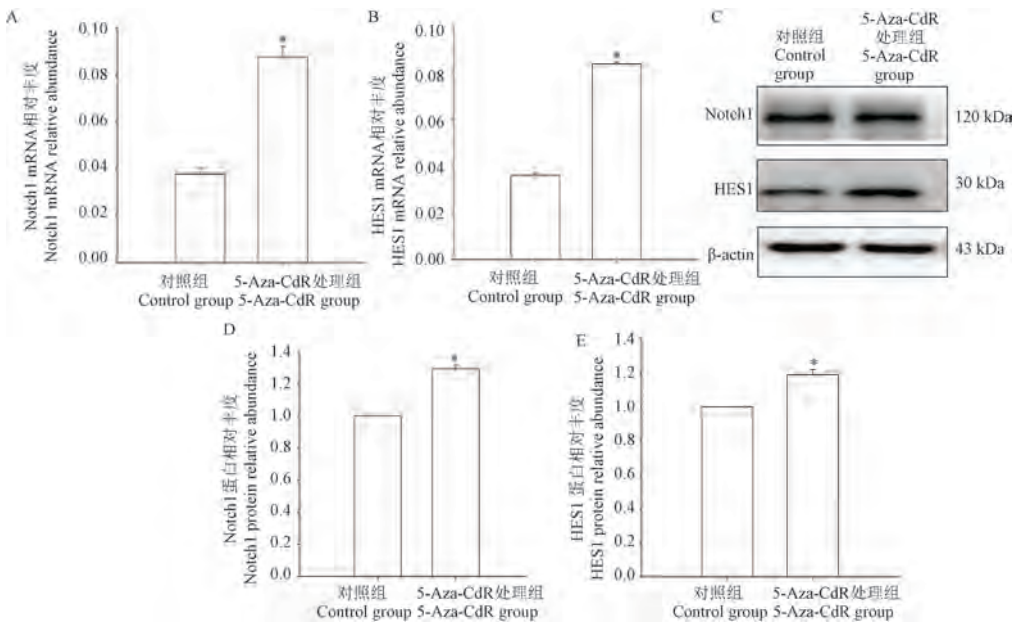
如图 1A、1B 所示,5-Aza-CdR 处理后,通过 Real-time PCR 检测小鼠海马组织 Notch1 和 HES1 mRNA 转录水平。与对照组相比,5-Aza-CdR 处理组 Notch1 和 HES1 mRNA 水平均显著升高($P<0.05, n=3$),这提示 5-Aza-CdR 诱导 Notch1 和 HES1 mRNA 基因表达增加,Western blot 实验用相应抗体检测 5-Aza-CdR 处理组和对对照组 Notch1 和 HES1 蛋白水平(1C)。与对照组相比,海马组织 Notch1 和 HES1 蛋白均显著升高(图 1D、1E, $P<0.05$),提示 5-Aza-CdR 发挥作用,影响小鼠海马组织 Notch1 和 HES1 表达。

2.2 5-Aza-CdR 促进小鼠海马 DG 区神经元再生

为了进一步研究 5-Aza-CdR 对小鼠海马中与记忆相关的神经元细胞再生的影响,用免疫荧光标记法检测海马 DG 中 Notch1 和 BrdU 阳性细胞。免疫荧光染色显示,与对照组相比,5-Aza-CdR 处理组的 BrdU 和 Notch1 显著增加(图 2A~2D, $P<0.05$)。BrdU 与 Notch1 呈正相关,有统计学意义(图 2E, $r=0.927, P<0.05$)。这说明 5-Aza-CdR 可促进神经发生。

2.3 5-Aza-CdR 对小鼠海马 Notch1 启动子甲基化水平的影响

用 MS-PCR 检测 Notch1 的甲基化水平。与对照组 Notch1 启动子未甲基化水平($17.9\%\pm 2.95\%$)相比,5-Aza-CdR 处理组($56.2\%\pm 3.2\%$)显著升高($P<0.05$);与对照组 Notch1 启动子甲基化水平($82.1\%\pm 2.95\%$)相比,5-Aza-CdR 处理组($43.8\%\pm 3.2\%$)显著下降($P<0.05$)。处理组的甲基化与未甲基化水平均和对照组有显著性差异($P<0.05$,图 3)。

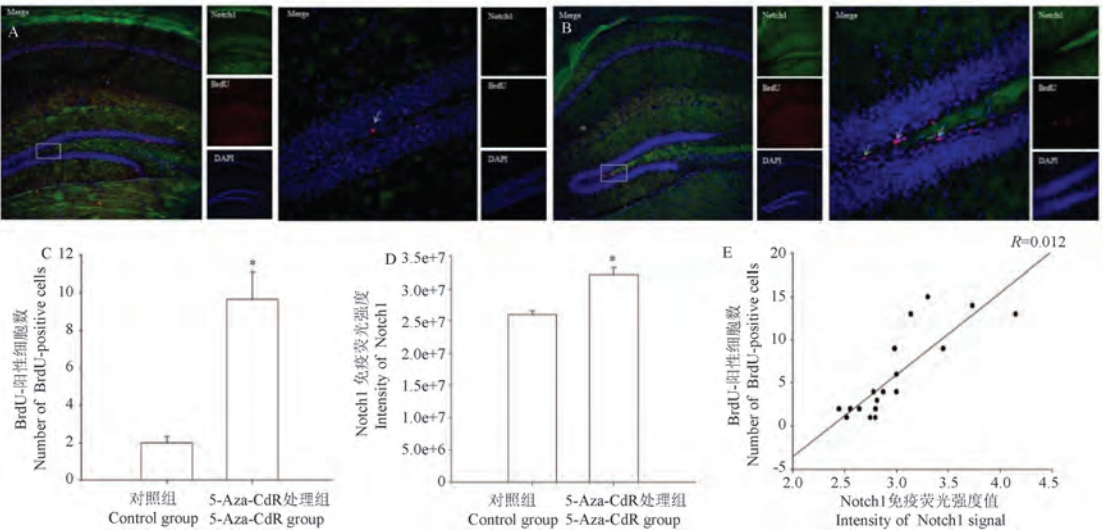


注:A:Notch1 mRNA 相对丰度值;B:HES1 mRNA 相对丰度值;C:Notch1、HES1 和 β -actin 免疫印迹图;D:Notch1 蛋白相对丰度值;E:HES1 蛋白相对丰度值。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 5-Aza-CdR 处理提高小鼠海马 Notch1 和 HES1 mRNA 和蛋白表达($n=3$)

Note. A, Notch1 mRNA relative abundance value. B, HES1 mRNA relative abundance value. C, Immunoblot of Notch1, HES1 and β -actin. D, Notch1 protein relative abundance value. E, HES1 protein relative abundance value. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 1 5-Aza-CdR treatment increases Notch1 and HES1 mRNA and protein expression in mouse hippocampus



注:A:对照组小鼠海马 DG 中 Notch1 和 BrdU 阳性细胞;B:5-Aza-CdR 处理组小鼠海马 DG 中 Notch1 和 BrdU 阳性细胞;C:小鼠海马 DG 中 BrdU 阳性细胞数;D:小鼠海马 DG 中 Notch1 免疫荧光强度值;E:BrdU 阳性细胞数和 Notch1 免疫荧光强度值相关性。通过检测 BrdU 阳性细胞数代表神经细胞新生,启动子甲基化和非甲基化水平,与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

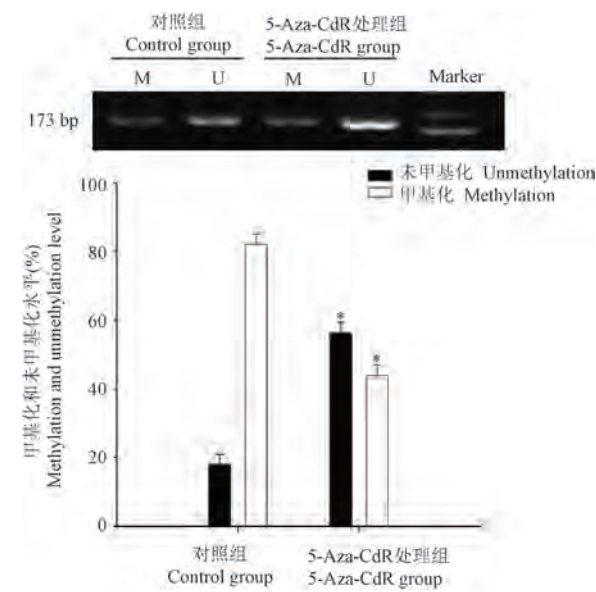
图 2 激光共聚焦分析 5-Aza-CdR 处理对小鼠海马 DG 脑区神经元新生和 Notch1 表达的影响($n=5$)

Note. A, Notch1 and BrdU-positive cells in the hippocampal DG of control mice. B, Notch1 and BrdU-positive cells in the hippocampal DG of 5-Aza-CdR-treated mice. C, Number of BrdU-positive cells in the hippocampal DG of mice. D, Immunofluorescence intensity values of Notch1 in the hippocampal DG of mice. E, Correlation between BrdU-positive cell number and Notch1 immunofluorescence intensity values. The number of BrdU-positive cells represents neuronal cell neoplasia, promoter methylation and non-methylation levels by assay. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Laser confocal analysis of the effects of 5-Aza-CdR treatment on neuronal neogenesis and Notch1 expression in mouse hippocampal DG brain regions

2.4 5-Aza-CdR 影响小鼠学习记忆能力

通过条件回避学习测试,发现侧脑室注射 5-Aza-CdR 的实验组小鼠在实验过程中主动回避行为能力得到提升(图 4),提示 5-Aza-CdR 发挥作用,影响小鼠学习记忆能力。

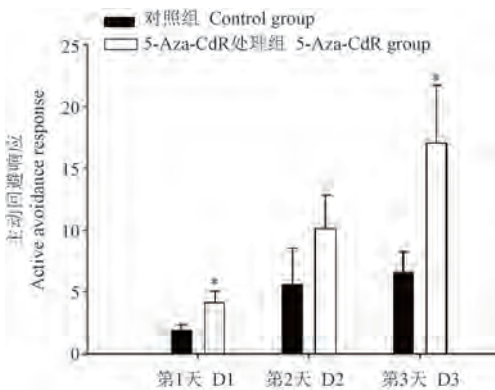


注:与对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 3 5-Aza-CdR 处理对小鼠海马 Notch1 记忆启动子区 DNA 甲基化的影响($n=3$)

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

Figure 3 Effect of 5-Aza-CdR treatment on DNA methylation in the Notch1 memory promoter region of mouse hippocampus



注:实验分成训练和测试两个阶段,两个阶段间隔 24 h,测试 3 d。与对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 4 5-Aza-CdR 处理增加小鼠条件回避学习能力($n=20$)

Note. Experiment was divided into two phases, training and testing, with 24 h between phases and 3 days of testing. Compared with control group, * $P<0.05$.

Figure 4 5-Aza-CdR treatment increases conditioned avoidance learning in mice

3 讨论

在本研究中,5-Aza-CdR 处理可降低海马中 Notch1 启动子 DNA 甲基化水平,增加 Notch1 和 HES1 的表达。5-Aza-CdR 可与 DNA 结合或改变 DNMTs 表达,降低细胞 DNA 甲基化水平^[15]。5-Aza-CdR 治疗可降低人髓系白血病细胞系 Notch1 DNA 甲基化水平^[9]。Chen 等^[19]报道 Ten-11 易位(Tet)蛋白降低 Notch1 启动子 DNA 甲基化水平和激活 Notch 信号。DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 获批用于临床治疗。因此利用 5-Aza-CdR 处理可以增加神经细胞 Notch1 的表达,为其在神经系统治疗与 Notch1 通路有关疾病进行探索。

Notch 信号通常与海马神经干细胞(neural stem cell, NSCs)增殖有关。Notch1 信号的激活对海马 DG 神经元增殖分化有显著影响^[20]。同时,BrdU 阳性细胞数量可用于评估 NSCs 的增殖^[21]。本实验研究结果显示,免疫荧光显示 5-Aza-CdR 处理组 DG 中的神经发生细胞(BrdU⁺细胞)数量明显高于对照组 DG。同时,BrdU⁺细胞数量与 Notch1 免疫荧光信号呈正相关。本实验研究结果表明,5-Aza-CdR 诱导的 Notch1 信号的增加可能有助于小鼠海马 DG 区神经发生。Guentchev 等^[22]报道显示,低水平的 Notch1 活性形式促进干细胞增殖。因此,5-Aza-CdR 脑室注射实验结果表明 Notch1 信号上调有助于小鼠神经发生。

DNA 甲基化在学习和记忆中发挥作用^[23-24]。DNMTs 可通过催化 CpG 二核苷酸中胞嘧啶核苷酸 5-C 位置的 DNA 甲基化来影响基因表达^[25]。DNMTs 以细胞和神经环路等方式促进学习和记忆^[26]。Argyrousi 等^[26]发现,试验前给药 DNMT 抑制剂 RG108 可导致剂量依赖性的短程学习记忆增加,处理 48 h 后 DNMT 抑制剂 RG108 不再起作用。侧脑室内注射 5-Aza-CdR 可提高小鼠的空间认知能力和恐惧规避能力^[16,27],Hernaiz 等^[28]表明,杏仁核(LA)内外侧核灌注 5-Aza-CdR 会提升恐惧记忆。而本研究发现 5-Aza-CdR 增加了条件回避学习记忆能力,这种能力可能与 DNA 甲基化调节 Notch1 活性,进而增加神经细胞再生有关。

综上所述,本研究证明侧脑室注射 5-Aza-CdR 可以激活海马脑区 Notch1 信号通路并增加小鼠海马 DG 区神经细胞的再生,Notch1 信号通路变化与 Notch1 启动子区甲基化水平有关。此外,5-Aza-CdR

可以促进小鼠主动回避的行为。本研究为 5-Aza-CdR 治疗神经系统与学习记忆相关的疾病提供了思路。总之,本实验研究结果表明,5-Aza-CdR 改善海马神经发生可能与促进某些记忆任务的 Notch1 信号通路有关。

参考文献:

- [1] Cameron HA, Glover LR. Adult neurogenesis; beyond learning and memory [J]. *Annu Rev Psychol*, 2015, 66: 53–81.
- [2] Schoenfeld TJ, Swanson C. A runner's high for new neurons? potential role for endorphins in exercise effects on adult neurogenesis [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1077.
- [3] Alberi L, Hoey SE, Brai E, et al. Notch signaling in the brain; in good and bad times [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(3): 801–814.
- [4] Imayoshi I, Kageyama R. The role of Notch signaling in adult neurogenesis [J]. *Mol Neurobiol*, 2011, 44(1): 7–12.
- [5] Acar N, Soylu H, Avci S, et al. Expressions of Notch signalling pathway members during early pregnancy in mice [J]. *J Mol Histol*, 2023, 54(4): 297–312.
- [6] Piermartini TCB, dos Santos B, Barros-Aragão FGQ, et al. Guanosine promotes proliferation in neural stem cells from hippocampus and neurogenesis in adult mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(9): 3814–3826.
- [7] Cai NN, Wang ZZ, Zhu XC, et al. Schisandrin A and B enhance the dentate gyrus neurogenesis in mouse hippocampus [J]. *J Chem Neuroanat*, 2020, 105: 101751.
- [8] Yuan L, Sun S, Pan X, et al. Pseudoginsenoside-F11 improves long-term neurological function and promotes neurogenesis after transient cerebral ischemia in mice [J]. *Neurochem Int*, 2020, 133: 104586.
- [9] Gawlitz AL, Speith J, Rinke J, et al. 5-azacytidine modulates CpG methylation levels of EZH2 and NOTCH1 in myelodysplastic syndromes [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(11): 2835–2843.
- [10] Desjobert C, El Maï M, Gérard-Hirne T, et al. Combined analysis of DNA methylation and cell cycle in cancer cells [J]. *Epigenetics*, 2015, 10(1): 82–91.
- [11] Dastjerdi MN, Babazadeh Z, Salehi M, et al. Comparison of the anti-cancer effect of Disulfiram and 5-Aza-CdR on pancreatic cancer cell line PANC-1 [J]. *Adv Biomed Res*, 2014, 3: 156.
- [12] Yang X, Lay F, Han H, et al. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31(11): 536–546.
- [13] Frühwald MC, Plass C. Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential [J]. *Mol Genet Metab*, 2002, 75(1): 1–16.
- [14] Zhu WG, Hileman T, Ke Y, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell

- proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(15): 15161–15166.
- [15] Yang J, Tian X, Yang J, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine, a DNA methylation inhibitor, induces cytotoxicity, cell cycle dynamics and alters expression of DNA methyltransferase 1 and 3A in mouse hippocampus-derived neuronal HT22 cells [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2017, 80(22): 1222–1229.
- [16] Zhang Z, Yang J, Liu X, et al. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine on expression of PP1γ in learning and memory [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 277–283.
- [17] Cisneros FJ, Branch S. Transplacental exposure to the DNA demethylating agent, 5-AZA-CdR, affects the sexual behavior of CD-1 male mice [J]. *Neurotoxicology*, 2004, 25(3): 411–417.
- [18] Meller R, Pearson A, Simon RP. Dynamic changes in DNA methylation in ischemic tolerance [J]. *Front Neurol*, 2015, 6: 102.
- [19] Chen W, Liu N, Shen S, et al. Fetal growth restriction impairs hippocampal neurogenesis and cognition via Tet1 in offspring [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(5): 109912.
- [20] Zhuang J, Wei Q, Lin Z, et al. Effects of ADAM10 deletion on Notch-1 signaling pathway and neuronal maintenance in adult mouse brain [J]. *Gene*, 2015, 555(2): 150–158.
- [21] Takemura S, Kayama T, Kuge A, et al. Correlation between copper/zinc superoxide dismutase and the proliferation of neural stem cells in aging and following focal cerebral ischemia [J]. *J Neurosurg*, 2006, 104(1): 129–136.
- [22] Guentchev M, McKay RD. Notch controls proliferation and differentiation of stem cells in a dose-dependent manner [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23(9): 2289–2296.
- [23] Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation [J]. *Neuron*, 2007, 53(6): 857–869.
- [24] Luo C, Hajkova P, Ecker JR. Dynamic DNA methylation; in the right place at the right time [J]. *Science*, 2018, 361(6409): 1336–1340.
- [25] Bayraktar G, Kreutz MR. Neuronal DNA methyltransferases: epigenetic mediators between synaptic activity and gene expression? [J]. *Neuroscientist*, 2018, 24(2): 171–185.
- [26] Argyrousi EK, de Nijs L, Lagatta DC, et al. Effects of DNA methyltransferase inhibition on pattern separation performance in mice [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2019, 159: 6–15.
- [27] Zhang X, Xie Y, Xu W, et al. Effects of 5-Aza on p-Y1472 NR2B related to learning and memory in the mouse hippocampus [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 701–707.
- [28] Hernaiz A, Sentre S, Betancor M, et al. 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine in Scrapie-Infected Sheep and Mouse Brain Tissues [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1621.

宋梦煜,郭怡君,赵雪榕,等. 探究社会性不同的犬的认知能力是否存在差异 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 40–51, 113.

Song MY, Guo YJ, Zhao XR, et al. Cognitive differences among dogs with different sociability [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 40–51, 113.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.005

探究社会性不同的犬的认知能力是否存在差异

宋梦煜, 郭怡君, 赵雪榕, 白 静, 周子娟, 王靖宇*

(大连医科大学, 实验动物中心, 辽宁 大连 116044)

【摘要】 目的 探究社会性不同的拉布拉多犬认知能力是否存在差异。**方法** 参照瑞典工作犬协会 (the Swedish Working Dog Association) 创建的犬气质评估测试 (dog mentality assessment, DMA), 使用 DMA 测试中的社会接触、游戏 I、距离游戏、扮鬼和游戏 II 5 个子测试中的 12 个行为变量来评估犬的社会性, 根据评分标准对中国导盲犬大连培训基地提供的 49 只拉布拉多犬的社会性行为变量进行评分, 使用聚类分析将其分为社会性高分组 ($n=15$) 和低分组 ($n=34$)。根据 Bray 等的犬认知发展系列测试 (dog cognitive development battery, DCDB) 建立了新的犬认知能力测试体系, 对犬的社会线索使用、无法解决任务、抑制控制、认知灵活、工作记忆和多步骤解决任务等不同领域的认知能力进行测试, 记录犬在测试中的行为表现及持续时长, 统计分析社会性不同的犬认知能力是否存在差异。**结果** 社会性高分组与低分组的犬在无法解决任务、抑制控制测试和多步骤解决任务中的行为变量上存在显著差异。在无法解决任务中, 社会性高分组的犬注视人时长显著高于社会性低分组的犬 ($P=0.008$), 注视人潜伏时长显著低于社会性低分组的犬 ($P=0.0001$)。在抑制控制测试中, 社会性高分组的犬选择正确率显著高于社会性低分组的犬 ($P=0.034$), 选择时长显著低于社会性低分组的犬 ($P=0.039$)。在多步骤解决任务中, 社会性高分组的犬完成木桩任务数量显著高于社会性低分组的犬 ($P=0.044$); 操作木桩时长占比显著低于社会性低分组的犬 ($P=0.05$); 完成骨头盘任务平均时长显著高于社会性低分组的犬 ($P=0.037$); 操作骨头盘时长占比显著低于社会性低分组的犬 ($P=0.038$)。涉及可操作仪器的测试中, 社会性高分组的犬注视人时长高于社会性低分组的犬, 操作仪器时长低于低分组的犬, 但经统计无显著差异 ($P>0.05$)。**结论** 社会性不同的犬的认知能力存在差异。社会性好的拉布拉多犬表现出更强的认知能力, 它们在测试时抑制冲动的能力更强, 完成多步骤解决任务的能力更强, 在遇到无法解决任务时更倾向于转变策略向人寻求新线索而不是执着于操作仪器。

【关键词】 拉布拉多犬; 认知; 社会性; 抑制控制; 多步骤解决任务

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0040-12

Cognitive differences among dogs with different sociability

SONG Mengyu, GUO Yijun, ZHAO Xuerong, BAI Jing, ZHOU Zijuan, WANG Jingyu*

(Laboratory Animal Center, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

【Abstract】 Objective Explore differences in the cognitive abilities of socially different Labradors. **Methods** The dog mentality assessment (DMA) test created by the Swedish Working Dog Association was modified to employ 12 behavioral variables from five subtests of the DMA test, social contact, play I, distance-play, ghosts and play II, to assess sociability of the dogs. In accordance with the scoring criteria, 49 labradors provided by the China Guide Dog Training Centre in Dalian were scored on the social behavioral variables and classified into high ($n=15$) and low ($n=34$) sociability groups by cluster analysis. A new system to test canine cognitive ability was developed using the dog cognitive

【基金项目】 国家重点研发计划 (2019YFF0303305)。

【作者简介】 宋梦煜 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物行为学。E-mail: 2315216490@qq.com

【通信作者】 王靖宇 (1964—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物行为学。E-mail: wangjingyus@163.com

development battery, which tests various domains of cognitive ability such as social cue use, unsolvable task, inhibitory control, cognitive flexibility, working memory, and multistep problem solving task. The dogs' behavioral performance and duration of the test were also recorded. Statistical analysis was performed to determine assess differences in the cognitive abilities of socially diverse dogs. **Results** Dogs in the high and low social subgroups differed significantly in behavioral variables of the unsolvable task, inhibitory control test, and multistep problem solving task. In the unsolvable task, dogs in the high social group looked at people for significantly longer than dogs in the low social grouping ($P=0.008$) and looked at people with significantly less latency time than dogs in the low social group ($P=0.0001$). In the inhibitory control, dogs in the high social group chose significantly more correctly than dogs in the low social group ($P=0.034$) and chose for significantly less time than dogs in the low social group ($P=0.039$). In the multistep problem solving task, for dogs in the high social group, successfully completed number of stakes was significantly higher than for dogs in the low social group ($P=0.044$). The percentage of operation pale time was significantly lower than for dogs in the low social group ($P=0.05$). The average latency time to solve the bone task was significantly higher than for dogs in the low social group ($P=0.037$). Moreover, the percentage of operation bone time was significantly lower than for dogs in the low social group ($P=0.038$). In tests involving a manipulable apparatus, dogs in the high social group spent more time looking at people than dogs in the low social group and less time manipulating the apparatus than dogs in the low subgroup, but no statistically significant differences were observed ($P>0.05$). **Conclusions** Highly sociable labradors have a greater cognitive ability, they are more able to suppress impulses during tests, more able to complete the multistep problem solving task, and more inclined to change strategies to seek new cues from people rather than obsessing over manipulating the apparatus when they are unable to solve a problem.

[Keywords] labrador retriever; cognitive; sociability; inhibitory control; multistep problem solving task

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

与其他动物相比,犬能更好地适应人类社会环境,更好地运用人类提供的交流线索进行互动,与人类形成密切关系^[1]。正因如此,犬在人类社会中也扮演着各种不同的角色,如搜救犬、伴侣犬、导盲犬、缉毒犬和治疗犬等。现代社会中由于犬的高度社会化,在宠物犬、工作犬中均能观察到其丰富的情绪变化及鲜明的气质特征,且存在明显的个体差异。动物的行为在时间和环境中具有一致性,多个行为特征的一致性加权被称为气质特征,也就是犬的“性格”。气质特征具有规律性和稳定倾向性的特点,能够持续地决定其在不同环境下的行为特征。在实验中,通常通过动物对惊吓刺激的应激反应^[2]或身处新环境中的行为表现^[3]来衡量其气质特征。Svarthberg 等^[4]发现犬存在 5 种气质特征,包括社会性、攻击性、好奇/无畏、游戏性和追逐倾向。有研究表明,社会性良好的犬更容易培训成为工作犬^[5]。幼犬时期经历了良好社会化的犬在成年后很少出现行为问题(如胆小和攻击性等),并且能够积极地与人类建立良好的合作关系。本研究使用瑞典工作犬协会(the Swedish Working Dog Association)建立的犬气质评估测试(dog mentality assessment, DMA)来评估犬的社会性^[4],该测试用于工作犬种的筛选,已被证明可用于多个犬种的气

质特征评估。

认知行为学是由唐纳德·格里芬发起的研究领域,研究动物在正常生活中和自然环境下各种行为时的心理反应^[6]。认知是动物从环境中获取、处理和储存信息的心理过程^[7],包括知觉、记忆、注意、思维和想象等多个领域,不能用“智力”这样的单一结构来解释种内或种间的认知表型变化^[8-9]。目前对动物认知的报道较少,对犬认知能力的研究集中在犬的个体差异比较以及在各认知领域建立有效的测试方法上。有报道发现认知的部分领域也可用于评估和筛选工作犬,在无法解决任务中,注视人时间越长的犬培训成为检测犬的可能性越大^[10]。在多步骤解决任务中,坚持操作仪器的时间越短、完成任务的时间越短的犬培训成为导盲犬的可能性越大^[11]。Bray 等^[11]建立了犬的认知发展系列测试(dog cognitive development battery, DCDB),与其他评估认知单一领域的测试相比,该测试能够从社会线索使用、与人的注视交流、执行能力(抑制控制、认知灵活和工作记忆)和感官知觉(嗅觉、听觉和视觉)等多个领域较为全面的评估犬的认知能力。

有研究认为动物的气质特征与其认知能力有关。Benson-Amram 等^[12]认为小鼠的探索性、胆量

会影响其在认知测试中的行为表现^[13],在解决问题任务中,大胆且探索性强的动物能够积极地进行仪器操作从而有更多解决问题的机会,而过于胆小的动物由于不敢接近仪器,大大降低了成功解决问题的机会。在对小鼠^[14]、大鼠^[15]和人类^[16]的研究中发现攻击性与抑制控制能力较差有关^[17]。在关于犬的研究中也发现了气质对认知能力的影响,与家养的犬相比,统一饲养于犬舍经历较少社会化的犬在面对无法解决任务时,注视人的时间更短且注视人的潜伏时间更长^[18]。Zaine 等^[19]发现统一饲养于犬舍经历较少社会化的犬社会线索使用能力较差。而犬社会性对其他认知能力领域的影响尚未见报道。

本研究对 49 只拉布拉多犬的社会性进行评估,借鉴 Bray 等^[20-21]建立的 DCDB 测试,建立了新的认知行为学测试体系,并分析犬认知能力的不同领域,探究社会性不同的犬的认知能力是否存在差异。

1 材料和方法

1.1 实验对象

中国导盲犬大连培训基地(以下简称基地)提供的 49 只拉布拉多犬,其中雄性 26 只,雌性 23 只。进行 DMA 测试和认知测试时犬的平均月龄为(16±0.2),在认知测试前 3 h 内不进食,以确保测试中犬的积极性。测试中所用的犬通过了中国导盲犬大连培训基地伦理委员会的审查(DLGD-2021006),所有测试均为无创的行为学测试。

1.2 实验场地及设备

DMA 测试场地:12.4 m×4.35 m 的长方形室内场地,29.6 m×6.4 m 的半封闭室外场地,场地内均设置 TL 数字监控摄像头。

认知测试场地:围栏围出的 1.5 m×2 m 的室内场地,场地内均设置 TL 数字监控摄像头。

测试用具:蓝色不透明塑料杯子(9.5 cm×12.5 cm)、黄色立方体物块(5 cm×4 cm×2.5 cm)、黑色不透明挡板(53.5 cm×19.5 cm)、带盖透明塑料立方容器(15.1 cm×10.8 cm×6.9 cm)、亚克力定制透明四面立方体(33 cm×27 cm×27 cm,底座架高 15 cm)、犬益智玩具木桩(23 cm×23 cm×6 cm)、犬益智玩具骨头盘(28 cm×24 cm×6 cm)。滋滋巅峰牛肉犬粮、派膳师鸡肉冻干。

1.3 实验方法

1.3.1 社会性测试

本研究采用瑞典工作犬协会建立的 DMA 测试

中的社会接触、游戏 I、距离游戏、扮鬼和游戏 II 共 5 项子测试来评估犬的社会性,测试内容及行为变量如表 1 所示,测试方法及评分标准参照文献^[22]进行。使用 Pearson 相关性检验对两个评分者对犬社会性行为测试的 12 个变量得分进行了相关性分析,评分者间一致性>0.7,结果表明犬社会性的测试评分标准信度较高。

1.3.2 认知测试

本研究选取并改良了 Bray 等^[20]建立的 DCDB 测试中的子测试,包括线索标记选择、手势指向选择、无法解决任务、抑制控制测试、认知灵活测试、工作记忆测试和多步骤解决任务共 7 项子测试 24 个变量。由两名实验人员完成,实验人员 2 号作为固定人员进行测试。测试全程约 45 min 监控摄像进行记录,测试后由实验人员 2 号进行视频分析,记录各行为变量正确率及时长。测试具体内容如下:

(0)熟悉阶段。该阶段为犬建立条件反射:犬使用鼻头或爪子触碰杯子时,可获得倒置的杯子下面放置的零食奖励,从而为后续测试奠定基础。测试场地如图 1 所示,实验人员 1 号(以下简称为 E1)

表 1 犬社会性的子测试及变量

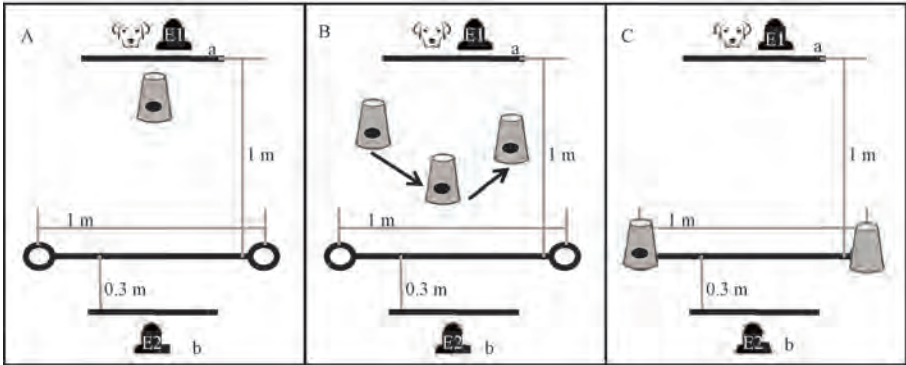
Table 1 Subtests and variables of canine sociability	
子测试 Subtests	行为变量 Behavior variables
社会接触(social contact),测试了犬对陌生人的反应。 Dog's reaction to a stranger is tested and described.	问候反应 Greetings
	合作性 Cooperation
	触摸反应 Handling
距离游戏(distance-play),测试了犬对远距离举止古怪的陌生人的反应,及其邀请游戏时犬的行为表现。 Dog's reaction to a play-inviting and oddly behaving unfamiliar person at a distance away from handler is tested and described.	探索行为 Exploration
	拔河 Tug-of-war
	游戏邀请 Play invitation
游戏 I(play I),测试了犬与陌生人玩耍的兴趣。 Dog's interest to play with a stranger is tested and described.	玩耍 Interest in play
	抓取 Grabbing
	拔河 Tug-of-war
扮鬼测试(ghosts),测试了犬对慢慢接近它的两个恐怖假人的反应。 Dog's reaction to two slowly approaching persons covered in white sheets (ghosts) is tested and described.	与鬼的接触 Greeting with ghosts
游戏 II(play II),测试了犬与陌生人再次玩耍的兴趣。 Dog's interest to play again with a stranger is tested and described.	玩耍 Interest in play
	抓取 Grabbing

牵引犬于 a 点等待,实验人员 2 号(以下简称为 E2)于 b 点进行测试,往后所有测试实验人员和犬的位置均是如此。测试内容为 E2 从身后取出零食吸引犬(向犬展示或让犬闻嗅),然后将零食放于倒置的杯子下方,E2 发出“吃吧!”口令,同时 E1 松开牵引链,当犬用鼻头或爪子触碰杯子时 E2 拿起杯子让犬获得零食。该阶段包括 3 个熟悉任务:①杯子放置于靠近犬的位置,获得 1 次零食(图 1A),②杯子放置于 a~b 点之间任意位置并连续获得零食 3 次(图 1B),③杯子放置于圆圈中(后续测试的位置,图 1C),两侧分别获得 2 次零食。

(1)线索标记选择。为了测试犬使用以交流方式放置的标记物获取线索的能力。如图 2 所示,E1 牵引犬于 a 点等待,E2 在 b 点用零食吸引犬后放入其中一个倒置的杯子下方,此过程用挡板遮挡,然后撤掉挡板把杯子移向两侧圆圈中,E2 向像犬展示标记物后,放入藏有零食的杯子旁,此时 E2 双手背后头自然下垂看向地面(避免与犬目光接触)发出

“吃吧!”口令,同时 E1 松开牵引链,当犬根据标记选择正确后,E2 拿起杯子让犬获得零食,选择错误则回到 A 点。两个杯子内壁上均粘有零食作为气味控制,藏零食的杯子进行左右平衡,保证同一个杯子最多连续选择两次。进行 12 次,记录选择正确率以及选择时长。

(2)手势指向选择。为了测试犬使用人的手势来获取信息的能力。如图 3 所示,E1 牵引犬于 a 点等待,E2 在 b 点用零食吸引犬后放入其中一个倒置的杯子下方,此过程用挡板遮挡,然后撤掉挡板把杯子移向两侧圆圈中,E2 一只手指向藏有零食的杯子,另一只手背后头自然下垂看向地面(避免与犬目光接触),发出“吃吧!”口令,同时 E1 松开牵引链,当犬根据手势选择正确后,E2 拿起杯子让犬获得零食,若选择错误则犬直接回到 a 点。两个杯子内壁上均粘有零食作为气味控制,藏零食的杯子进行左右平衡,保证同一个杯子最多连续选择两次。进行 12 次,记录选择正确率以及选择时长。



注:A:杯子位置靠近犬;B:一个杯子连续三个位置;C:测试时杯子的位置。

图 1 熟悉阶段示意图

Note. A, Cup near the dog. B, One cup goes three times in a row. C, Test position of cup.

Figure 1 Warm-up trials diagram

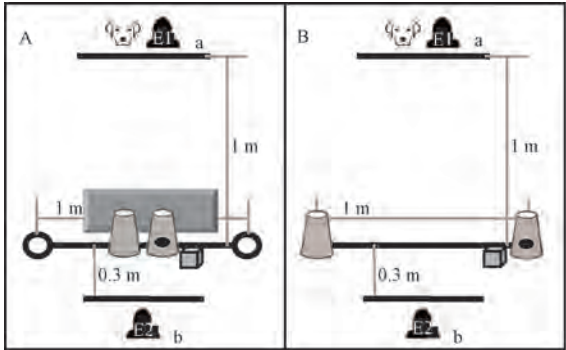
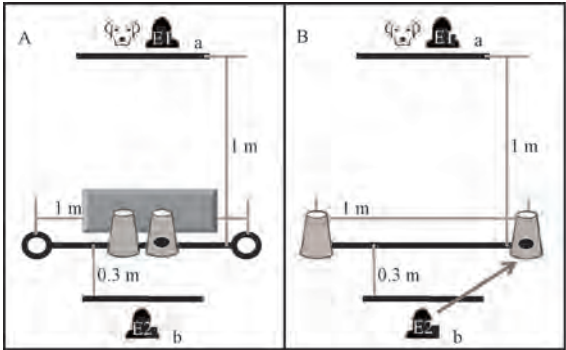


图 2 线索标记选择示意图

Figure 2 Communicative marker diagram



注:箭头表示实验人员 2 号手指指向。

图 3 手势指向选择示意图

Note. Arrow indicates that experimenter 2 points.

Figure 3 Arm pointing diagram

(3)无法解决任务,为了测试犬在面对无法解决事情时的倾向,是坚持操作仪器还是注视人。

熟悉:如图 4 所示,E1 牵引犬于 a 点等待,E2 在 b 点用零食吸引犬后放入带盖的透明容器中,将盖子挂在容器的边上(0/3 处),此时 E2 发出“吃吧!”口令,同时 E1 松开牵引链,犬移开盖子吃到零食。盖子挂在容器的 1/3、2/3 和 3/3 处同理,共进行 4 次,为了让犬熟悉移开盖子即可获得零食。

测试:E1 牵引犬于 a 点等待,E2 在 b 点用零食吸引犬后放入带盖的透明容器中,用盖子盖紧(不是挂在容器上,此时犬无法移开盖子),E2 发出“吃吧!”口令,同时 E1 松开牵引链,犬自行探索容器 30 s,时间到 E2 打开盖子,犬获得零食。测试 4 次,记录注视人的时长,注视人的潜伏时长,操作容器的时长。

(4)抑制控制测试,为了测试犬在面对不可为事情时控制自己的能力。

熟悉:如图 5A 所示,为了让犬熟悉从不透明立方体的左右(c、d)两侧均可获得零食。完成两项熟悉任务:①E1 牵引犬于 a 点等待,牵引绳处于自然下垂松弛状态,E2 用零食引诱犬从 a 点走到不透明的立方体一侧(c、d),并引诱犬使其脑袋伸入立方体中,然后 E2 发出“吃吧!”的口令,同时犬获得零食,c、d 两侧各引诱 1 次。②E1 牵引犬于 a 点等待,E2 用零食吸引犬后放入不透明立方体中,发出“吃吧!”的口令,同时 E1 松开牵引绳,犬从立方体的两侧(c、d)均可获得零食。共进行 4 次,E2 将零食放入透明立方体的方向(c、d)进行平衡。

测试:如图 5B 所示,换用透明立方体,E1 牵引犬于 a 点等待,E2 在 b 点用零食吸引犬后放入透明立方体中发出“吃吧!”的口令,同时 E1 松开牵引绳,犬从立方体的两侧(c、d)均可获得零食。此时犬直面立方体里的食物,与熟悉阶段建立从 c、d 两侧获得零食之间产生竞争,所以犬需控制自己直接触碰透明立方体,绕至立方体的两侧(c、d)获得食物。测试 8 次,E2 将零食放入透明立方体的方向(c、d)进行平衡。记录犬选择正确率、选择时长、选择方向偏好和选择错误所触碰的立方体的部位。

(5)认知灵活测试,为了测试犬的灵活性。如图 6 所示,E1 牵引犬于 a 点等待,E2 在 b 点用零食吸引犬后放入透明立方体中,将上一个测试(抑制控制测试)中犬的选择方向偏好用透明挡板挡住,然后发出“吃吧!”口令,同时 E1 松开牵引链,此时犬无法从偏好方向获得零食,必须灵活转向另一侧

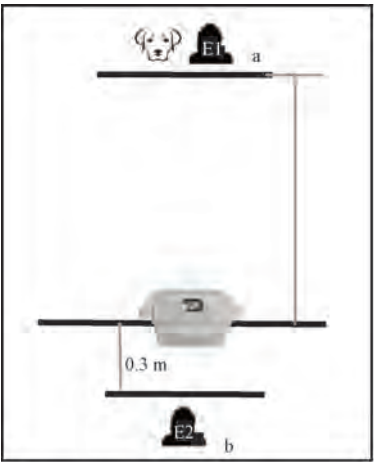
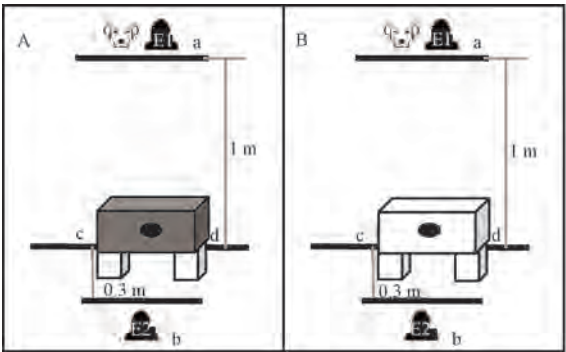


图 4 无法解决任务示意图
Figure 4 Unsolvable task diagram

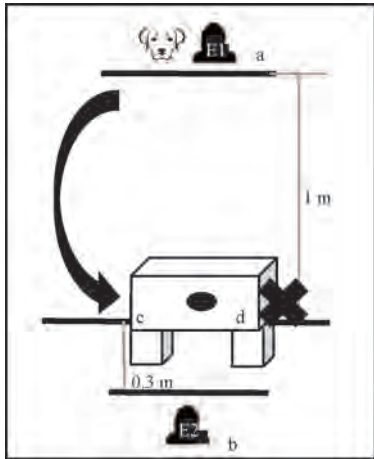


注:A:熟悉阶段不透明立方体;B:测试时透明立方体。四面立方体,没有左右两个侧面。

图 5 抑制控制测试示意图

Note. A, Warm-up phase is opaque cube. B, Test phase is transparent cube. Cube no left and right sides

Figure 5 Inhibitory control diagram



注:立方体右侧面被挡板挡住。

图 6 认知灵活测试示意图

Note. Right side of the cube is blocked.

Figure 6 Cognitive flexibility diagram

获得(偏好方向是立方体的 d 侧,犬需绕至 c 侧获得零食)。测试 8 次,E2 将零食放入透明立方体的方向(c、d)进行平衡。记录选择正确率、首选正确率、迂回选择正确率和选择时长。

(6)工作记忆测试,为了测试犬在不同延迟条件后的记忆。

熟悉:为了让犬熟悉杯子位置以及如何获得零食。如图 7 所示,3 个间隔 0.5 m 的进行气味控制的不透明塑料杯子,E1 牵引犬于 a 点等待,E2 在 b 点用零食吸引犬后放于其中 1 个倒置的杯子下方,然后发出“吃吧!”的口令,同时 E1 松开牵引链,犬用鼻头或爪子触碰杯子来获得零食。3 个杯子各进行 2 次,共 6 次,放零食位置进行平衡,确保同一位置没有连续选择两次。

测试:E1 牵引犬于 a 点等待,E2 在 b 点用零食吸引犬后放于其中 1 个倒置的杯子下方,犬进行 20 s 和 40 s 两个条件的等待,E1 用秒表计时,时间到后松开牵引链犬进行选择,整个过程不进行遮挡,实验人员在延迟等待过程中双手背后头自然下垂看向地面。每个条件分别进行 6 次,放零食的位置进行平衡,确保同一位置没有连续选择两次,记录每个延迟条件的选择正确率。

(7)多步骤解决任务,为了测试犬完成复杂取食任务的能力。

道具一木桩如图 8A 所示,熟悉:9 孔的木桩盘内只摆一个木桩,E1 牵引犬于 a 点等待,E2 在 b 点用零食吸引犬后放入木桩下面,发出“吃吧!”的口令,同时 E1 松开牵引链,犬需移走木桩获得零食,熟悉两次,两次木桩位于不同孔位置。测试:将 9 孔的木桩盘摆满,E1 牵引犬于 a 点等待,E2 在 b 点用

零食吸引犬后放入其中 4 个木桩下面,此过程无须遮挡,E2 发出“吃吧!”的口令,同时 E1 松开牵引链,犬需在 2 min 内移走放有零食的木桩,同时获得零食奖励。记录移走正确和错误的木桩数量,完成任务所用时间,操作仪器时长和注视人时长。

道具二骨头盘如图 8B 所示,熟悉:为了让犬熟悉转动盘子或移走骨头可获得零食奖励,犬需完成 2 个熟悉任务:①E1 牵引犬于 a 点等待,E2 在 b 点用零食吸引犬后放入骨头盘中,转动盘子盖住零食,然后发出“吃吧!”的口令,同时 E1 松开牵引链,犬需转动盘子获得食物,熟悉两次,两次藏食物的位置不同;②E2 向犬展示零食放入骨头盘中,用骨头盖住零食,说“吃吧!”同时 E1 松开牵引链,犬需移走骨头获得食物,熟悉两次,两次藏食物的位置不同。测试:犬进行以下 3 个不同难度的取食任务,①E2 向犬展示零食后放入骨头盘中,转动盘子盖住零食,同时用一个骨头卡住零食所在位置的相邻位置,发出“吃吧!”的口令,同时 E1 松开牵引绳,犬独立完成取食任务。②E2 向犬展示零食后放入骨头盘中(零食位置与①相同),转动盘子盖住零食,同时用一个骨头卡住零食所在位置的另一个相邻位置(骨头位置与①不同),发出“吃吧!”的口令,同时 E1 松开牵引绳,犬独立完成取食任务。③E2 向犬展示零食后放入骨头盘中(零食位置与①相同),转动盘子盖住零食,同时用两个骨头卡住零食所在位置的相邻位置(①和②卡骨头的位置),发出“吃吧!”的口令,同时 E1 松开牵引绳,犬独立完成取食任务。3 个任务均需犬在 120 s 内完成,按顺序进行,若出现任务没有完成情况则测试结束。记录犬成功完成任务的数量,完成任务所用时长,操作

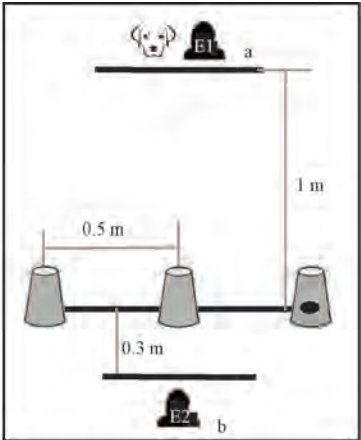
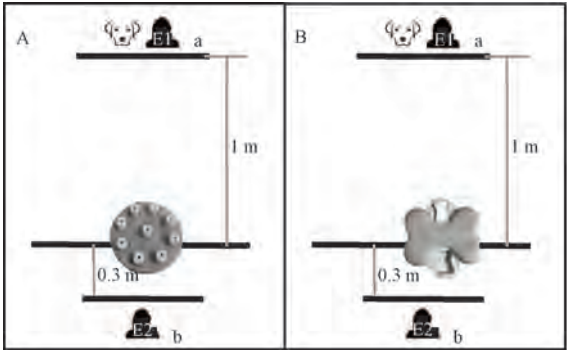


图 7 工作记忆测试示意图
Figure 7 Working memory diagram



注:A:木桩;B:骨头盘。
Note. A, Pole. B, Bone plate.
图 8 多步骤解决任务示意图
Figure 8 Multistep problem-solving task

仪器时长和注视人时长。

1.4 统计学方法

本研究使用 Pearson 相关性分析,将两个评分者对犬社会性行为测试的 12 个变量得分进行了相关性分析,对犬的社会性得分使用聚类分析(cluster analysis),将犬分为社会性高分组和社会性低分组。使用单因素 AVOVA 检验对不同性别犬的社会性、不同性别犬的认知能力以及不同社会性犬的认知能力进行差异性分析, $P<0.05$ 为具有显著性差异。数据分析采用 SPSS 26.0。

2 结果

2.1 不同性别的犬社会性行为评分的差异性分析

使用单因素方差检验对不同性别的犬进行社会性变量差异性分析,如表 2 所示不同性别的犬在子测试游戏 I 中的玩耍变量得分上存在显著差异,雌性犬的得分显著高于雄性犬($P=0.023$),其他子测试各变量在不同性别上无显著差异($P>0.05$),雌性和雄性犬在社会性总得分上无显著差异($P>0.05$),因此后续分析对社会性的分组不考虑性别因素。

2.2 不同社会性的犬分组结果

使用聚类分析,将 49 只犬根据其社会性得分分成高分组和低分组,如表 3 所示,其中高分组有 15 只,低分组有 34 只。

2.3 不同性别的犬认知能力的差异性分析

使用单因素方差检验对不同性别的犬认知测试各变量进行差异性分析,如表 4 所示,结果表明在工作记忆测试中,雄性犬的熟悉次数显著高于雌性犬($P=0.04$),其他测试的各变量在不同性别上无显著差异($P>0.05$)。

2.4 社会性不同的犬的认知能力差异性分析

根据犬的社会性分组将其认知测试各变量进行单因素方差检验,如表 5 所示,社会性不同的犬在无法解决任务中的注视人平均时长变量和注视人平均潜伏时长变量上存在显著差异(图 9A),社会性高分组的犬注视人时长显著高于社会性低分组的犬($P=0.008$),注视人潜伏时长显著低于社会性低分组的犬($P=0.0001$)。社会性不同的犬在抑制控制测试中的正确率变量和选择平均时长变量上存在显著差异(图 9B),社会性高分组的犬选择正确率显著高于社会性低分组的犬($P=0.034$),选择时长显著低于社会性低分组的犬($P=0.039$)。在多步骤解决任务中的是否完成木桩任务变量、木桩操作仪器时长占比变量(图 9C),骨头盘完成时长变量和骨头盘操作仪器时长占比变量上存在显著差异(图 9D),社会性高分组的犬完成木桩任务数量显著高于低分组的犬($P=0.044$);操作木桩时长占比显著低于低分组的犬($P=0.05$);完成骨头盘任务时长显著高于低分组的犬($P=0.037$);操作骨

表 2 不同性别犬的社会性差异性检验结果
Table 2 Results of social differences tests for dogs of different sexes

行为变量 Behavior variables	全部犬 All puppy	雄性($n=26$) Male	雌性($n=23$) Female	F	P
社会性 Sociability	43.5±0.75	43.7±0.92	43.39±1.24	0.03	0.86
问候反应 Greetings	4.14±0.11	4.12±0.13	4.17±0.20	0.07	0.80
合作性 Cooperation	3.98±0.11	4.15±0.14	3.78±0.15	3.13	0.08
触摸反应 Handling	3.92±0.09	3.92±0.09	3.91±0.15	0.003	0.96
玩耍 I Interest in play I	3.59±0.12	3.35±0.15	3.87±0.17	5.52	0.023 *
游戏 I 抓取 Grabbing in play I	4.08±0.10	4.00±0.12	4.17±0.17	0.69	0.41
距离游戏拔河 Tug-of-war in distance-play	3.27±0.17	3.38±0.19	3.13±0.29	0.56	0.46
探索行为 Exploration	4.20±0.15	4.31±0.18	4.09±0.24	0.54	0.46
游戏 I 拔河 Tug-of-war in play I	3.06±0.17	3.04±0.23	3.09±0.27	0.02	0.89
游戏邀请 Play invitation	1.76±0.17	1.73±0.22	1.78±0.27	0.02	0.88
与鬼的接触 Greeting with ghosts	3.71±0.20	3.96±0.24	3.43±0.33	1.76	0.19
玩耍 II Interest in play II	3.61±0.10	3.54±0.14	3.70±0.15	0.61	0.44
游戏 II 抓取 Grabbing in play II	4.20±0.10	4.15±0.14	4.26±0.14	0.28	0.60

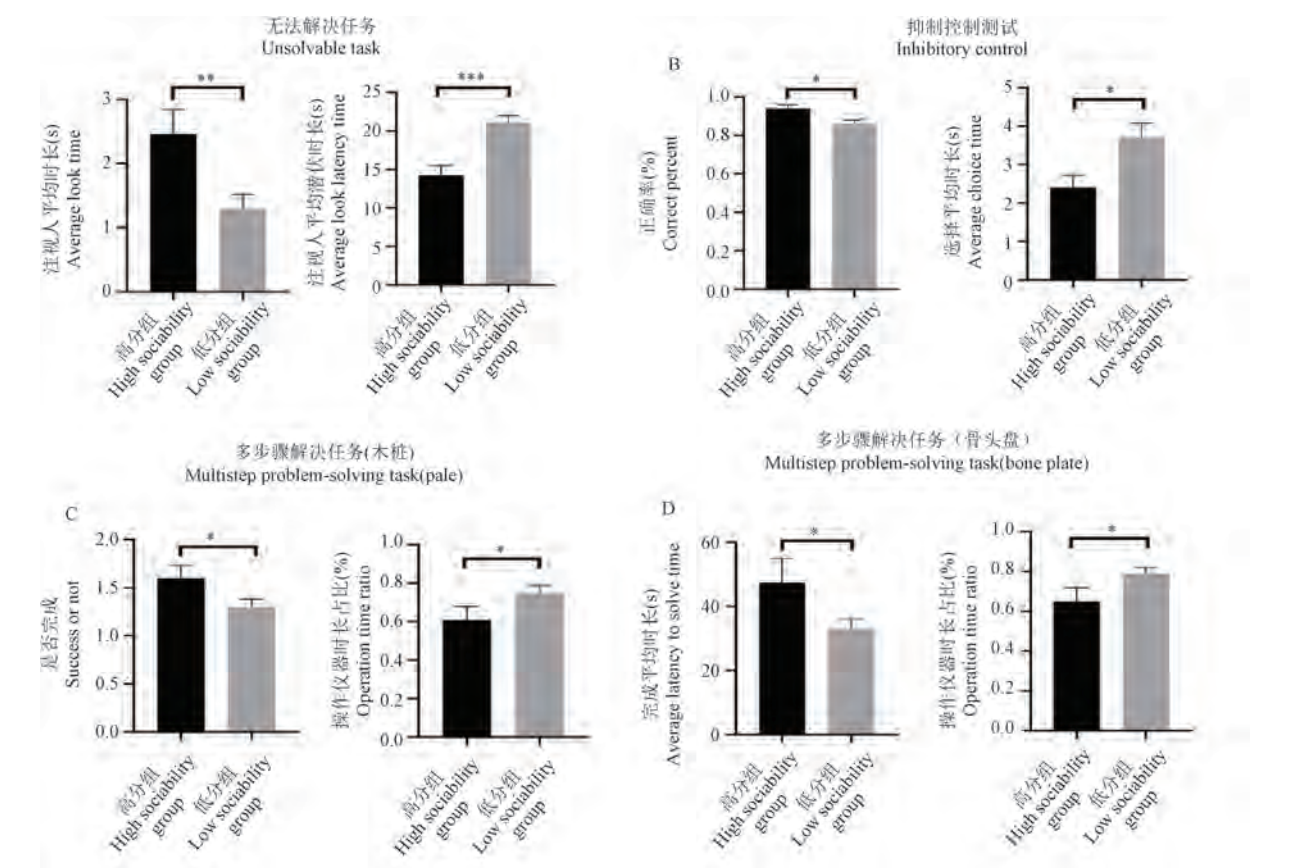
注:不同性别犬相比, * $P<0.05$ 。
Note. Compared between different sexes of dogs, * $P<0.05$.

头盘时长占比显著低于低分组的犬 ($P = 0.038$)。除抑制控制测试中的正确率变量外,其他测试中不同社会性犬的正确率较接近;涉及操作仪器的测试中,存在社会性高的犬操作仪器时长均低于社会性低的犬,注视人时长均高于社会性低的犬的趋势,但经统计无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 3 不同社会性的犬的分组结果

Table 3 Grouping results of dogs with different sociability

分组 Group		得分 Score	<i>n</i>	月龄 Age
社会性高分组 High sociability	全部犬 All puppy	49.67±0.63	15	15.33±0.41
	雄性 Male	49.43±0.95	7	15.43±0.75
	雌性 Female	49.88±0.90	8	15.25±0.45
	全部犬 All puppy	40.82±0.62	34	16.32±0.26
社会性低分组 Low sociability	雄性犬 Male	41.52±0.76	19	16.16±0.37
	雌性犬 Female	39.93±1.02	15	16.53±0.36



注:A:无法解决任务;B:抑制控制测试;C:多步骤解决任务(木桩);D:多步骤解决任务(骨头盘)。不同社会性犬相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 9 社会性不同的犬认知测试的差异性检验结果

Note. A, Unsolvable task. B, Inhibitory control. C, Multistep problem-solving task (pale). D, Multistep problem-solving task (bone plate). Compared between different sociability of dogs, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 9 Results of cognitive test differences tests for dogs of different sociability

表 4 不同性别犬的认知测试各变量差异性检验结果

Table 4 Results of cognitive test behavior variables differences tests for dogs of different sexes

子测试 Subtests	行为变量 Behavior variables	全部犬 All puppy	雄性犬 (<i>n</i> =26) Male	雌性犬 (<i>n</i> =23) Female	<i>F</i>	<i>P</i>
线索标记选择 Communicative marker	正确率 (%) Correct	0.78±0.02	0.81±0.03	0.76±0.04	1.13	0.29
	选择平均时长 (s) Average choice	5.04±0.38	5.13±0.53	4.95±0.55	0.06	0.81
	正确率 (%) Correct	0.77±0.14	0.74±0.18	0.80±0.02	4.03	0.05
手势指向选择 Arm pointing	选择平均时长 (s) Average choice	4.10±0.29	4.01±0.41	4.20±0.42	0.11	0.74
	注视人平均时长 (s) Average look	1.66±0.20	1.64±0.31	1.68±0.26	0.01	0.93
	注视人平均潜伏时长 (s) Average look latency	18.99±0.87	19.77±1.28	18.11±1.16	0.91	0.35
无法解决任务 Unsolvable task	操作仪器平均时长 (s) Average operation	6.49±0.47	6.36±0.69	6.65±0.64	0.10	0.76
	熟悉次数 (<i>n</i>) Familiarization trials	6.77±0.16	7.08±0.23	6.43±0.19	4.64	0.04*
	20 s 正确率 (%) 20 s correct	0.72±0.03	0.74±0.42	0.68±0.04	1.04	0.31
工作记忆测试 Working memory	40 s 正确率 (%) 40 s correct	0.61±0.03	0.65±0.04	0.57±0.05	1.75	0.20
	正确率 (%) Correct	0.89±0.02	0.87±0.03	0.91±0.02	1.39	0.24
	选择平均时长 (s) Average choice	3.26±0.29	3.71±0.51	2.77±0.23	2.69	0.11
抑制控制测试 Inhibitory control	正确率 (%) Correct	0.88±0.03	0.87±0.04	0.89±0.04	0.16	0.69
	首选正确率 (%) First side correct	0.54±0.03	0.54±0.05	0.55±0.05	0.02	0.89
	迂回选择正确率 (%) Reversal side correct	0.34±0.03	0.33±0.05	0.35±0.04	0.08	0.78
认知灵活测试 Cognitive flexibility	选择平均时长 (s) Average choice	6.97±0.44	6.72±0.52	7.25±0.74	0.34	0.56
	是否完成 Success or not	1.39±0.07	1.27±0.09	1.52±0.11	3.37	0.07
	完成时长 (s) Latency to solve	94.96±3.92	89.96±5.85	100.61±4.96	1.87	0.18
多步骤解决任务 (木桩) Multistep problem-solving task (pale)	注视人时长占比 (%) Look time	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.14	0.71
	操作仪器时长占比 (%) Operation time	0.71±0.03	0.70±0.05	0.71±0.04	0.05	0.83
	完成任务数量 (<i>n</i>) Successful trials	2.47±0.13	2.46±0.18	2.48±0.19	0.00	0.95
多步骤解决任务 (骨头盘) Multistep problem-solving task (bone plate)	完成平均时长 (s) Average latency to solve	37.41±3.19	34.49±4.34	40.71±4.70	0.95	0.34
	注视人时长占比 (%) Look time	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01	0.94
	操作仪器时长占比 (%) Operation time	0.75±0.03	0.76±0.05	0.73±0.04	0.34	0.57

注:不同性别犬相比, * *P*<0.05。

Note. Compared between different sexes of dogs, * *P*<0.05.

表 5 社会性不同的犬认知测试各变量的差异性检验结果

Table 5 Results of cognitive test behavior variables differences tests for dogs of different sociability

子测试 Subtests	行为变量 Behavior variables	社会性高分组 (<i>n</i> = 15) High sociability	社会性低分组 (<i>n</i> = 34) Low sociability	<i>F</i>	<i>P</i>
线索标记选择 Communicative marker	正确率(%) Correct	0.77±0.04	0.79±0.03	0.25	0.62
	选择平均时长(s) Average choice	4.84±0.71	5.13±0.45	0.12	0.73
	正确率(%) Correct	0.76±0.24	0.77±0.18	0.06	0.80
手势指向选择 Arm pointing	选择平均时长(s) Average choice	4.21±0.63	4.05±0.32	0.07	0.80
	注视人平均时长(s) Average look	2.46±0.38	1.3±0.22	7.66	0.008**
	无法解决任务 Unsolvable task	14.23±1.28	21.10±0.92	17.92	0.0001***
工作记忆测试 Working memory	操作仪器平均时长(s) Average operation	5.56±0.47	6.91±0.63	1.82	0.18
	熟悉次数(<i>n</i>) Familiarization trials	6.53±0.24	6.90±0.20	1.06	0.30
	20 s 正确率(%) 20 s correct	0.69±0.06	0.72±0.03	0.28	0.60
抑制控制测试 Inhibitory control	40 s 正确率(%) 40 s correct	0.57±0.05	0.64±0.04	1.10	0.30
	正确率(%) Correct	0.94±0.02	0.86±0.02	4.75	0.034*
	选择平均时长(s) Average choice	2.40±0.32	3.70±0.38	4.52	0.039*
认知灵活测试 Cognitive flexibility	正确率(%) Correct	0.84±0.04	0.89±0.03	0.72	0.40
	首选正确率(%) First side correct	0.50±0.06	0.56±0.04	0.59	0.45
	迂回选择正确率(%) Reversal side correct	0.34±0.06	0.34±0.04	0.004	0.95
多步骤解决任务(木桩) Multistep problem-solving task(pale)	选择平均时长(s) Average choice	7.17±0.86	6.90±0.52	0.09	0.77
	是否完成 Success or not	1.60±0.13	1.30±0.08	4.29	0.044*
	完成时长(s) Latency to solve	102.6±6.70	91.59±4.68	1.70	0.20
多步骤解决任务 (骨头盘) Multistep problem-solving task(bone plate)	注视人时长占比(%) Look time	0.01±0.01	0.00±0.00	1.29	0.26
	操作仪器时长占比(%) Operation time	0.61±0.07	0.75±0.04	4.05	0.05*
	完成任务数量(<i>n</i>) Successful trials	2.27±0.27	2.56±0.14	1.12	0.30
多步骤解决任务 (骨头盘) Multistep problem-solving task(bone plate)	完成平均时长(s) Average latency to solve	47.35±7.61	33.02±2.93	4.61	0.037*
	注视人时长占比(%) Look time	0.01±0.01	0.00±0.00	0.21	0.65
	操作仪器时长占比(%) Operation time	0.65±0.07	0.79±0.03	4.58	0.038*

注:不同社会性犬相比, * *P*<0.05, ** *P*<0.01, *** *P*<0.001。
Note. Compared between different sociability of dogs, * *P*<0.05, ** *P*<0.01, *** *P*<0.001.

3 讨论

本研究用 DMA 行为学测试评估犬的社会性,根据 Bray 等^[20]的 DCDB 测试建立了新的犬认知测试体系。该体系包括线索标记选择、手势指向选择、无法解决任务、抑制控制测试、认知灵活测试、工作记忆测试和多步骤解决任务 7 项子测试。本研究的目的是探究社会性不同的犬的认知能力是否存在差异。结果表明,社会性不同的犬的认知能力存在差异。社会性高的犬在无法解决任务和多步骤解决任务中,注视人的时间更长,操作仪器的时间更短,并且会更快地看向人。这与 D' Aniello 等^[18]的研究一致,家养经历较多社会化的犬比统一饲养于犬舍的犬在面对无法解决任务时,注视人的时间更长且注视人的潜伏时长更短。犬长时间暴露于人类环境下,在与人类进行交流时通过凝视行为理解人类的意图^[23]。本研究认为犬在测试时试图通过看向人来获得解决问题的线索,也有研究认为犬在面对无法解决的事情时,通过看向人来寻求帮助^[24],这些都是犬在遇到困难任务时的一种解决策略。在多步骤解决任务中,社会性高的犬完成用时更长,本研究认为这是对于同一任务,社会性高的犬会花更多时间在注视人上。社会性不同的犬平均可以完成三个骨头盘道具任务中的两个,而社会性高的犬能更好的完成木桩道具的任务,因此我们认为社会性高的犬解决多步骤任务的能力更强。

本研究发现社会性高的犬在测试时可以抑制自己触碰立方体直接获取食物的冲动,转而寻找正确的路径来获得零食奖励,其抑制控制能力更强。有研究表明,社会性与攻击行为呈负相关^[25],而攻击行为与抑制控制能力较低有关^[14-16],因此本研究从侧面验证了两者的推论。大脑与行为可塑性研究的基本假设认为,如果动物行为发生了变化,那么产生行为的神经回路会发生一定的变化。反之,如果神经网络被影响,那么动物的行为也会发生改变^[26]。本研究认为社会化的过程使得犬的大脑神经网络发生改变,从而影响犬控制冲动的能力。同时 Gathercole 等^[27]认为,注意缺陷多动障碍(ADHD)的深层原因是抑制控制能力的缺陷,而患有 ADHD 的儿童或青少年存在社交障碍^[28],并表现出攻击行为。因此社会化的缺失与 ADHD 患者的抑制控制能力较差有关,本研究也发现社会性低的犬抑制控制能力较差。有研究认为工作记忆能力

较差的儿童或青少年表现出更高的攻击行为^[29],而青少年的社会性与攻击行为呈负相关^[30]。认知灵活性差与强迫症(PCD)、自闭症(ASD)等心理障碍有关,ASD 的特征是社交障碍以及存在单一且重复的行为模式^[31]。因此推测社会性低与较差的工作记忆以及缺乏认知灵活有关,但本研究中不同社会性的犬在工作记忆测试和认知灵活测试中均无显著差异,对此我们认为由于本研究对象是导盲犬预备犬,根据《寄养家庭手册》的要求,寄养家庭需在幼犬时期对犬进行特定的社会化训练,因此犬社会性的平均水平较高。这两方面仍需进一步研究对该结果进行验证。此外,我们发现所有实验犬的工作记忆正确率均随着延迟等待的秒数增多而下降,并且多数犬会选择上一次零食所在的位置而导致本次的选择错误。本研究认为这是犬已经在某个固定位置获得零食后,将此位置与零食奖励联系在了一起。犬在延迟等待 40 s 条件下的正确率比 20 s 条件下更低,对此结果本研究推测是长时间的延迟等待增大了犬分心的可能性,或是犬对于更短时间内的记忆能力更好,正如导盲犬随着路径的延长错误行为会增加一样^[32]。

线索标记选择和手势指向选择两个测试均反映了犬的社会线索使用能力,Udell 等^[33]发现接受过社会化的犬在手势指向选择测试中能更好地利用手势线索完成任务,本研究与该结果不同,我们发现社会性不同的犬在社会线索使用能力上并没有显著差异。与 Udell 采用的测试方法不同,本研究中实验人员持续地提供手势指向直至犬选择完毕。大部分的犬均能使用手势线索找到藏有零食奖励的杯子,本研究认为此种结果与导盲犬预备犬普遍在幼犬时期学习坐、卧、等待等基本指令有关,寄养家庭对犬进行基本训练时会根据《寄养家庭手册》的要求采用手势指令,这使得本研究中的犬对人的手势普遍具有较好的理解能力。此外,Bary 等^[20]的研究表明犬在发育早期就可以很好地适应人类手势所表达出来的信息,手势指向对犬来说是一种相对容易理解的社会线索。Albuquerque 等^[34]认为犬可以从人的情绪表达中获取相关信息,利用情绪线索完成测试任务,后续在进行社会线索使用能力评估的测试时或可采用人的眼神线索或情感线索进行测试。

综上所述,长期以来人们一直使用特定的测试来独立研究动物的气质特征或认知能力,很少研究

两者之间的关系,而本研究的结果表明犬的认知能力受到气质影响。社会性好的犬其认知能力更好,它们在面对冲动时能更好地控制自己,完成多步骤解决任务的能力更强,在遇到无法解决问题时更倾向于转变策略向人寻求线索而不是执着于操作仪器。因此,幼年时期较好的社会化有助于犬形成更好的认知能力。

参考文献:

- [1] MacLean EL, Herrmann E, Suchindran S, et al. Individual differences in cooperative communicative skills are more similar between dogs and humans than chimpanzees [J]. *Animal Behav*, 2017, 126: 41-51.
- [2] King T, Hemsworth PH, Coleman GJ. Fear of novel and startling stimuli in domestic dogs [J]. *Appl Animal Behav Sci*, 2003, 82 (1): 45-64.
- [3] Brown C, Jones F, Braithwaite V. *In situ* examination of boldness-shyness traits in the tropical poeciliid, *Brachyraphis episcopi* [J]. *Animal Behav*, 2005, 70(5): 1003-1009.
- [4] Svartberg K, Forkman B. Personality traits in the domestic dog (*Canis familiaris*) [J]. *Appl Animal Behav Sci*, 2002, 79(2): 133-155.
- [5] Batt L, Batt M, Baguley J, et al. The effects of structured Sessions for juvenile training and socialization on guide dog success and puppy-raiser participation [J]. *J Vet Behav*, 2008, 3(5): 199-206.
- [6] Ristau CA. Cognitive ethology [J]. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*, 2013, 4(5): 493-509.
- [7] Shettleworth S. Fundamentals of comparative cognition 1st ed. [M]. New York: Oxford University Press; 2013.
- [8] MacLean EL, Matthews LJ, Hare BA, et al. How does cognition evolve? Phylogenetic comparative psychology [J]. *Anim Cogn*, 2012, 15(2): 223-238.
- [9] Hare B, Brown M, Williamson C, et al. The domestication of social cognition in dogs [J]. *Science*, 2002, 298(5598): 1634-1636.
- [10] Lazarowski L, Strassberg LR, Waggoner LP, et al. Persistence and human-directed behavior in detection dogs; Ontogenetic development and relationships to working dog success [J]. *Appl Anim Behav Sci*, 2019, 220: 104860.
- [11] Bray EE, Sammel MD, Cheney DL, et al. Effects of maternal investment, temperament, and cognition on guide dog success [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(34): 9128-9133.
- [12] Benson-Amram S, Holekamp K. Innovative problem solving by wild spotted hyenas [J]. *Proc Royal Soc B*, 2012, 279: 4087-4095.
- [13] Guido JM, Biondi LM, Vasallo AI, et al. Neophobia is negatively related to reversal learning ability in females of a generalist bird of prey, the Chimango *Caracara*, *Milvago chimango* [J]. *Anim Cogn*, 2017, 20(4): 591-602.

- [14] Sallinen J, Haapalinna A, Viitamaa T, et al. Adrenergic $\alpha 2C$ -receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(8): 3035-3042.
- [15] Homberg J, Pattij T, Janssen M, et al. Serotonin transporter deficiency in rats improves inhibitory control but not behavioural flexibility [J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 26(7): 2066-2073.
- [16] Poland S, Monks C, Tsermentseli S. Cool and hot executive function as predictors of aggression in early childhood: Differentiating between the function and form of aggression [J]. *Br J Dev Psychol*, 2016, 34(2): 181-197.
- [17] Foraita M, Howell T, Bennett P. Working memory and inhibition in 7.5-week-old Seeing Eye Dog puppies [J]. *Appl Animal Behav Sci*, 2021, 241: 105394.
- [18] D'Aniello B, Scandurra A. Ontogenetic effects on gazing behaviour: a case study of kennel dogs (Labrador Retrievers) in the impossible task paradigm [J]. *Anim Cogn*, 2016, 19(3): 565-570.
- [19] Zaine I, Domeniconi C, Wynne CDL. The ontogeny of human point following in dogs: when younger dogs outperform older [J]. *Behav Process*, 2015, 119: 76-85.
- [20] Bray EE, Gruen ME, Gnanadesikan GE, et al. Cognitive characteristics of 8- to 10-week-old assistance dog puppies [J]. *Anim Behav*, 2020, 166: 193-206.
- [21] Bray EE, Gruen ME, Gnanadesikan GE, et al. Dog cognitive development: a longitudinal study across the first 2years of life [J]. *Anim Cogn*, 2021, 24(2): 311-328.
- [22] 李雅娟. 导盲犬培训对犬社会性和胆量的影响研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2017.
Li YC. The influence of guide dog training on the sociality and nerve of dogs [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2017.
- [23] Nagasawa M, Mitsui S, En S, et al. Social evolution. Oxytocin-gaze positive loop and the coevolution of human-dog bonds [J]. *Science*, 2015, 348(6232): 333-336.
- [24] Mendes JWW, Resende B, Savalli C. A review of the unsolvable task in dog communication and cognition: comparing different methodologies [J]. *Anim Cogn*, 2021, 24(5): 907-922.
- [25] Appleby D, Bradshaw J, Casey R. Relationship between aggressive and avoidance behaviour by dogs and their experience in the first six months of life [J]. *Vet Rec*, 2002, 150(14): 434-438.
- [26] Kolb B. Brain plasticity and behavior [M]. Mahwah, N. J. : Lawrence Erlbaum Associates; 1995.
- [27] Gathercole SE, Alloway TP, Kirkwood HJ, et al. Attentional and executive function behaviours in children with poor working memory [J]. *Learn Individ Differ*, 2008, 18(2): 214-223.
- [28] Klinkeit E, Graham C, Lee P, et al. Children should be seen and heard: self-report of feelings and behaviors in primary-school-age children with ADHD [J]. *J Atten Disord*, 2006, 10(2): 181-191.

彭冬冬,陈相池,唐梓宁,等. 口腔菌群参与槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 52-59.

Peng DD, Chen XC, Tang ZN, et al. Involvement of oral flora in the role of betel nut-extract-induced ulcers in rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 52-59.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.006

口腔菌群参与槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡的作用研究

彭冬冬^{1,2}, 陈相池^{1,2}, 唐梓宁^{1,2}, 刘学武^{1,2}, 袁湘中^{1,2}, 李 萌^{1,2}, 厉 巧^{1,2}, 章泽恒^{3*}

(1.湖南普瑞玛药物研究中心有限公司,长沙 410329;2.新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,长沙 410329;
3.湖南省药品审评与不良反应监测中心,长沙 410000)

【摘要】 目的 通过槟榔提取物构建大鼠口腔溃疡模型,观察口腔内菌群结构变化及多样性特征,探索口腔菌群和局部炎性因子参与槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡的发病作用机制研究,为临床防治口腔溃疡提供理论支持。**方法** 将 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、药物治疗组(桂林西瓜霜,8 mg/d,连续 7 d),10 只/组。大鼠口腔黏膜经皮下注射 10 g/mL 的槟榔提取物,复制大鼠口腔溃疡模型。通过观察溃疡面积、溃疡评分、局部组织口腔肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-2 (interleukin-2, IL-2)、IL-8 水平,并取口腔黏膜组织进行 HE 染色,观察其组织形态学的变化,采用高通量测序方法分析口腔微生物菌群结构分布及微生物群落多样性。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠溃疡面积显著增大,溃疡评分显著上升 ($P<0.01$),口腔黏膜组织 TNF- α 、IL-2、IL-8 水平均显著升高 ($P<0.01$),大鼠口腔唾液的链球菌属 (*Streptococcus*, $P<0.05$)、韦荣球菌属 (*Veillonella*, $P<0.001$) 均显著减少,模型组大鼠口腔黏膜上皮细胞增生或局灶性坏死,黏膜固有层水肿、出血,并伴有大量的中性粒细胞和单核细胞浸润;与模型组比较,药物治疗组大鼠溃疡面积显著减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),溃疡评分显著减少 ($P<0.05$),口腔黏膜组织 TNF- α ($P<0.01$)、IL-2 ($P<0.05$)、IL-8 ($P<0.05$) 水平均显著降低,大鼠口腔唾液的链球菌属 (*Streptococcus*, $P<0.001$)、韦荣球菌属 (*Veillonella*, $P<0.01$) 显著增加,葡萄球菌属 (*Staphylococcus*, $P<0.01$) 显著减少,口腔黏膜组织病变程度有明显改善。**结论** 槟榔提取物可成功复制大鼠口腔溃疡模型,其发病机制可能与口腔正常菌群水平降低,潜在致病菌水平升高,破坏其口腔菌群微生物平衡,进而破坏机体免疫系统,引起局部促炎因子升高有关。

【关键词】 槟榔提取物;口腔溃疡;口腔菌群;炎性因子;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0052-08

Involvement of oral flora in the role of betel nut-extract-induced ulcers in rats

PENG Dongdong^{1,2}, CHEN Xiangchi^{1,2}, TANG Zining^{1,2}, LIU Xuewu^{1,2}, YUAN Xiangzhong^{1,2}, LI Meng^{1,2},
LI Qiao^{1,2}, ZHANG Zeheng^{3*}

(1. Hunan Prima Drug Research Center Co. Ltd, Changsha 410329, China. 2. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410329. 3. Drug Evaluation and Adverse Drug Reaction Monitoring Center of Hunan Province, Changsha 410000)

【基金项目】 湖南普瑞玛新药非临床研究创新创业团队(2021)。

【作者简介】 彭冬冬(1990—),男,在职硕士研究生,研究方向:新药药效与安全性评价。E-mail: pengdongdong@hnse.org

【通信作者】 章泽恒(1970—),男,副主任药师,研究方向:临床药理学和药品监督管理。E-mail: 719563428@qq.com

[Abstract] Objective A model for studying oral ulcers induced by betel nut-extract was constructed in rats. Changes in the structure and diversity of oral flora were observed to explore the involvement of oral flora and local inflammatory factors in the pathogenesis of oral ulcers induced by betel nut-extract and to provide theoretical support for the prevention and treatment of oral ulcers in the clinic. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into normal, model and intervention groups (Guilin watermelon cream, 8 mg/d for 7 days), with 10 rats/group. The oral mucosa of rats was subcutaneously injected with 10 g/mL of betel nut-extract to generate an oral ulcer model. The histomorphological changes were observed, and ulcer area and ulcer scores were assessed. Local oral tissue tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-2 and IL-8 levels were determined. Oral mucosal tissues were sampled for HE staining and analyzed for the structural distribution of oral flora and the diversity of microbial communities using high-throughput sequencing method. **Results** Compared with rats in the normal group, those in the model group had an increased ulcer area, significantly increased ulcer scores ($P < 0.01$), and significantly increased levels of TNF- α , IL-2 and IL-8 in the oral mucosal tissues ($P < 0.01$). The amount *Streptococcus* ($P < 0.05$) and *Veillonella* ($P < 0.001$) in the oral saliva of the model group rats was significantly reduced. The model group rats showed oral mucosal epithelial cell hyperplasia or focal necrosis, mucosal lamina propria edema, and hemorrhage accompanied by mass neutrophil and monocyte infiltration. Compared with the model group rats, the intervention group rats had significantly reduced ulcerated area ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and ulcer scores ($P < 0.05$). And oral mucosal tissue levels of TNF- α ($P < 0.01$), IL-2 ($P < 0.05$) and IL-8 ($P < 0.05$), as well as significantly increased *Streptococcus* ($P < 0.001$) and *Veillonella* ($P < 0.01$) and significantly reduced *Staphylococcus* ($P < 0.01$) in the oral saliva. The degree of lesions in the oral mucosal tissues was significantly improved in the intervention group. **Conclusions** Betel nut-extract can be used to successfully reproduce a rat model of oral ulcer, and it is speculated that the development of oral ulcers after exposure to betel nut-extract may be related to an imbalance in the oral flora and local tissue inflammatory mediators.

[Keywords] betel nut-extract; oral ulcer; oral flora; inflammatory factors; rat

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

口腔溃疡是一种常见的口腔黏膜疾病,在口腔疾病中发病率很高,健康人群口腔微生物种群数量大、种类多,大部分属于口腔中正常微生物,当口腔菌群失衡、局部炎性因子水平发生改变时,常诱导机体发生口腔溃疡,其发病特点以红肿为主,逐渐发展为白色荚膜形成溃疡,造成局部组织炎症和坏死^[1-5]。口腔溃疡不仅影响患者的生活质量,而且会给患者带来肉体上的痛苦,更是世界卫生组织公认的口腔癌前病变。当前有报道称口腔溃疡与咀嚼槟榔、免疫功能、遗传、机械损伤等因素有关^[6]。槟榔为棕榈科植物槟榔的干燥成熟种子,具有杀虫消积、行气利水、截疟的功效,其主要活性成分有槟榔碱、槟榔次碱、去甲基槟榔次碱。研究表明,槟榔碱对口腔黏膜具有一定的毒性,当口腔反复咀嚼槟榔时,可引起口腔上皮层萎缩,促进上皮细胞凋亡,进而形成口腔黏膜溃疡,而口腔菌群在槟榔提取物诱发口腔溃疡发病机制方面鲜有报道^[7]。为验证槟榔提取物可通过破坏口腔菌群稳态平衡及局部炎性因子水平而诱导口腔溃疡的发生,本研究采用槟榔提取物构建大鼠口腔溃疡模型,通过观察模型动物溃疡面积、溃疡评分、口腔黏膜病理变化并结合口腔微生物菌群及局部组织促炎因子水平,从口

腔微生物的变化角度探索槟榔提取物诱发口腔溃疡的发病机制,对临床上防治口腔溃疡提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,体重 180~220 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004],饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司屏障环境动物实验室[SYXK(湘)2020-0015]。饲养期间大鼠自由饮水,饲喂 SPF 鼠料(⁶⁰Co 消毒)由科奥协力(天津)饲料有限公司提供[SCXK(津)2020-0004]。饲养环境:昼夜各半循环照明,温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%。动物实验均按照湖南普瑞玛药物研究中心有限公司动物伦理与福利委员会的指导方针和批准进行(IACUC-2022(3)022),实验遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

槟榔提取物,规格:每袋 100 g,批号:RH11042412,每克提取物含有 20 g 生药,有效期至:2024-04,生产单位:四川海澳斯生物科技有限公司,HPLC 测得槟榔提取物中槟榔碱含量为 43 mg/

g。桂林西瓜霜,规格:每瓶 3.5 g,1 瓶/盒,批号:220825,生产厂家:桂林三金药业股份有限公司,功能主治:清热解毒,消肿止痛,可用于治疗牙龈炎、口腔溃疡、咽喉肿痛等。

大鼠 IL-2 酶联分析 ELISA 试剂盒、TNF- α 酶联分析 ELISA 试剂盒、IL-8 酶联分析 ELISA 试剂盒,批号均为:202208,有效期至:2023-04,生产厂家:黄石市艾恩斯生物科技有限公司。DMIL 倒置显微镜(德国 Leica 公司);DFC 420C 病理成像系统(德国 Leica 公司);Spectra Max i3x 型多功能酶标仪(上海奥地利美谷光子公司);MG96+型 PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司);DYY-6C 型双稳定时电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);NanoDrop 2000 型微量分光光度计(Thermo fisher scientific);Biotek elx800 型酶标仪(Biotek)等。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与造模

选取检疫合格 SPF 级 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,按性别和体重随机分为正常组、模型组、药物治疗组(桂林西瓜霜喷剂),每组 10 只。造模方法:采用乙醚将模型组和药物治疗组大鼠轻微麻醉后,在大鼠口腔中上端黏膜皮下注射 10 g/mL 的槟榔提取物,每只左右侧各 0.1 mL,复制大鼠口腔溃疡模型,正常组动物不做处理。药物治疗组大鼠经口腔黏膜喷入桂林西瓜霜,每喷约 4 mg,覆盖局部溃疡区域,每侧每喷 1 次,每天 2 次,连续给药 7 d,大鼠每次喷入后应平躺 10~15 s,并在干预 30 min 内禁食禁水以便药物吸收。

1.3.2 一般临床观察

每天观察各组动物行为活动、精神状况及粪便、尿液等情况。

1.3.3 溃疡面积测定及评分

分别于造模后第 1、2、3、5、7 天(D1、D2、D3、D5、D7)对各组动物口腔黏膜进行外观评分,参照文献^[8]进行项目评分及等级。分别造模后 D1、D2、D3、D5、D7 在同一角度同一标尺拍照,采用 Image J 软件测量各组大鼠溃疡面积,并计算愈合率。溃疡愈合率(%)=(初始溃疡面积-当天溃疡面积)/初始溃疡面积。

1.3.4 口腔黏膜局部组织 TNF- α 、IL-8、IL-2 检测

于造模后 D7,取各组动物口腔黏膜左侧造模部位及周围局部组织,采用 0.9%氯化钠注射液洗去残留血液,将称量组织重量与 0.9%氯化钠注射液

体积按 1:9 加入 EP 管中,采用组织匀浆机对口腔黏膜组织匀浆,3000 r/min 离心 10 min 取上清液,采用大鼠 ELISA 试剂盒检测上清液中 TNF- α 、IL-8、IL-2 水平。

1.3.5 口腔菌群分析

于造模后 D7,上、下午各 1 次,采用一次性无菌咽拭子对各组动物进行口腔拭取(多次采集混合),采集口腔菌群,拭取部位为口腔黏膜溃疡周边,动作以不损伤伪膜为准,直至唾液完全浸润咽拭子,拭取后装入无菌 EP 管中,-20℃保存。选择 16S V3-V4 区引物(338F:ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 和 806R:GGACTACHVGGGTWTCTAAT)进行扩增;PCR 扩增体系为:5×FastPfu Buffer 4 μ L,2.5 mmol/L dNTPS 2 μ L,Forward Primer(5 μ mol/L)0.8 μ L,Reverse Primer(5 μ mol/L)0.8 μ L, FastPfu Polymerase 0.4 μ L,BSA 0.2 μ L,Template DNA 10 ng,补 ddH₂O 至 20 μ L;反应条件:95℃ 3 min、95℃ 30 s、53℃ 30 s、72℃ 40 s、72℃ 10 min,29 个循环;扩增后使用 Illumina 进行测序及口腔菌群分析。

1.3.6 组织病理学检查

于造模后 D7,取各组动物口腔黏膜右侧造模处部位及周围局部组织,10%中性福尔马林溶液固定,切片,石蜡包埋,HE 染色,进行口腔黏膜组织病理学检查,显微镜下观察其组织病理学变化。

1.4 统计学方法

采用 UPARSE 软件(version 7.1)进行菌群分析,并基于菌属级别进行比较。根据 97%的相似度对序列进行 OTU 聚类,并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体。采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,所有数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验或非参数检验。均以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床观察

如图 1 所示,造模后各组动物嘴角均出现肿胀,并伴有流涎,口腔黏膜出现不规则的溃疡面,其创面边缘与周围正常皮肤形成较明显的界线,同时伴有自主活动和摄食减少。药物治疗组动物随着给药时间延长,口腔黏膜溃疡创面逐渐愈合。

2.2 溃疡面积、愈合率测定及评分

如表 1、图 2 所示,与正常组比较,模型组造模后 D1、D2、D3、D5、D7 口腔溃疡评分均显著升高;与

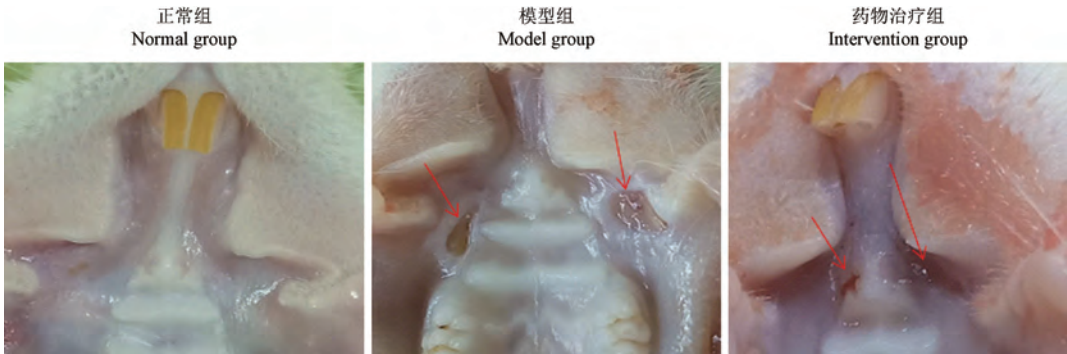
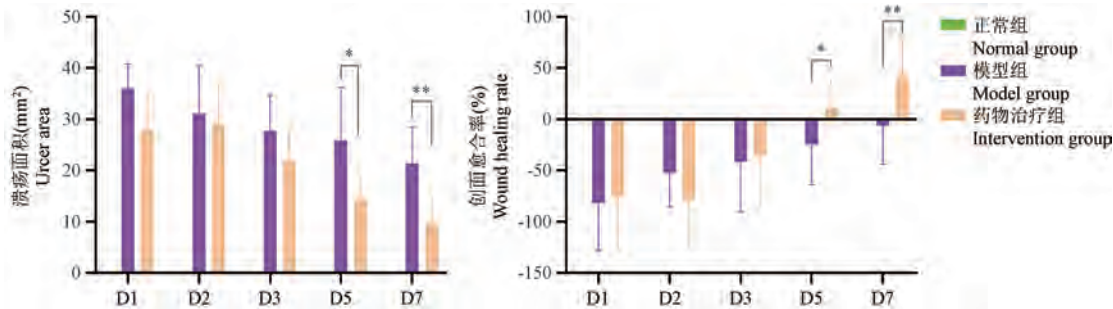


图 1 槟榔提取物对大鼠口腔黏膜创面的影响
Figure 1 Effect of betel nut-extract on oral mucosal wound in rats



注:与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图 2 槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡创面面积及愈合率的影响 ($n=10$)
Note. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 Effect of betel nut-extract on oral ulcer wound area and healing rate in rats

表 1 槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡评分 ($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 1 Oral ulcer score induced by betel nut-extract in rats

组别 Groups	溃疡评分 Oral ulcer score				
	造模后 D1 D1 after molding	造模后 D2 D2 after molding	造模后 D3 D3 after molding	造模后 D5 D5 after molding	造模后 D7 D7 after molding
正常组 Normal group	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
模型组 Model group	9.2±1.5 ⁺⁺	8.8±1.2 ⁺⁺	8.5±1.3 ⁺⁺	8.6±1.8 ⁺⁺	7.2±1.5 ⁺⁺
药物治疗组 Intervention group	8.2±1.0	8.0±1.1	7.1±1.3	5.2±1.2 [*]	4.2±0.9 [*]

注:与正常组比较, ⁺⁺ $P<0.01$;与模型组比较, ^{*} $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, ⁺⁺ $P<0.01$. Compared with model group, ^{*} $P<0.05$.

模型组比较,药物治疗组造模后 D5、D7 溃疡面积和口腔溃疡评分显著减少 ($P<0.05, P<0.01$)、愈合率显著增大 ($P<0.05, P<0.01$),提示槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡模型构建成功,且桂林西瓜霜喷剂干预可对症状起到治疗作用。

2.3 口腔黏膜组织细胞因子检测

如图 3 所示,与正常组比较,模型组口腔黏膜组织中 IL-8、IL-2、TNF- α 均显著增加 ($P<0.01$);与模型组比较,药物治疗组口腔黏膜组织中 IL-8、IL-2、TNF- α 均显著减少 ($P<0.05, P<0.01$),提示槟榔提取物会引起大鼠局部组织炎症因子升高,当给予药物治疗后炎症水平明显降低。

2.4 口腔菌群分析

2.4.1 DNA 的质检、PCR 扩增和测序

如图 4 所示,采用 NanoDrop 2000 对 30 只大鼠的 DNA 进行检测, DNA 浓度为 1.08~10.41 ng/ μ L。用 338F (ACTCTACGGGAGGCAGCAG)、806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) 进行 PCR 扩增,扩增结果合格。大鼠的口腔唾液即可进行测序和口腔菌群分析。

2.4.2 口腔菌群组成分析

如图 5 所示,菌群分布图显示了菌群结构属水平的变化及相对丰度,其中正常组大鼠口腔中的优势菌主要是链球菌属 (*Streptococcus*)、韦荣球菌属

(*Veillonella*),而葡萄球菌属(*Staphylococcus*)占比较少,与健康人群的口腔微生物中菌群分布基本一致,经槟榔提取物干预后,大鼠口腔菌群发生明显变化,其中以 *Streptococcus*、*Veillonella*、*Staphylococcus*、*Rothia* 变化最为明显,表明槟榔可能会引起大鼠口腔菌群失调。

2.4.3 对大鼠口腔菌群 α 多样性及菌属差异的影响

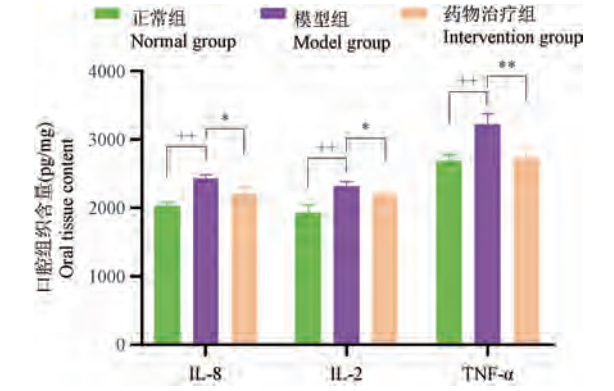
如图 6 所示,与正常组比较,模型组大鼠口腔唾液的 shannon 指数显著增大 ($P<0.05$),simpson 指数均显著减小 ($P<0.01$),提示模型组大鼠口腔菌群生物多样性升高,物种间差异增大,均一性降低;与模型组比较,药物治疗组 shannon 指数显著减小 ($P<0.05$),simpson 指数显著增大 ($P<0.01$),提示通过桂林西瓜霜干预后,能明显调节大鼠口腔菌群多样性,减少物种间差异。

如图 7 所示,与正常组比较,模型组大鼠口腔唾液中 *Streptococcus*、*Veillonella* 均显著减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),*Staphylococcus* 虽无统计学差异,但有增加的趋势;与模型组比较,药物治疗组 *Streptococcus* 显著增加 ($P<0.01$),*Staphylococcus* 显著减少 ($P<0.01$),*Veillonella* 虽无统计学差异,但有明显增加的趋势。上述结果表明槟榔提取物能引起大鼠口腔唾液中 *Streptococcus*、*Veillonella*、*Staphylococcus* 菌属序列比例变化,通过药物治疗后,能调节大鼠口腔唾液中菌属序列比例。

2.5 组织病理学镜下观察

如图 8 所示,正常组镜下可见大鼠口腔黏膜组织层结构完整清晰,无炎性细胞浸润;模型组大鼠经槟榔提取物诱导后,可见大鼠上皮细胞增生或局灶性坏死,黏膜固有层水肿、出血,并伴有大量的中性粒细胞和单核细胞浸润;药物治疗组可见大鼠口腔黏膜上皮细胞增生,黏膜少量中性粒细胞浸润,

提示桂林西瓜霜能明显改善模型大鼠口腔黏膜上皮细胞坏死、水肿等病变,并显著减轻大鼠口腔黏膜组织炎性细胞浸润程度。



注:与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 3 槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡局部组织细胞因子 IL-8、IL-2 和 TNF-α 水平的影响 ($n=10$)
Note. Compared with normal group, ** $P<0.01$. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Effects of betel nut-extract on the levels of cytokines IL-8, IL-2 and TNF-α in the local tissues of rat oral ulcer

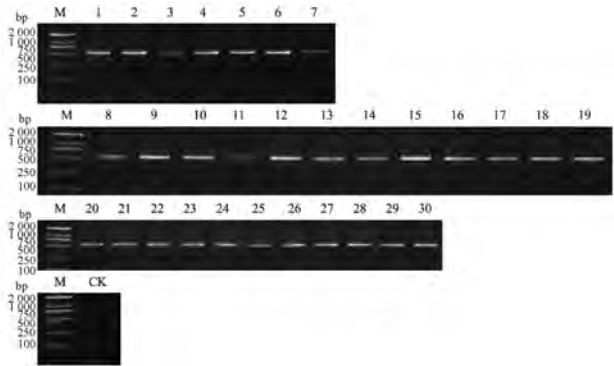


图 4 PCR 扩增结果

Figure 4 PCR amplification results

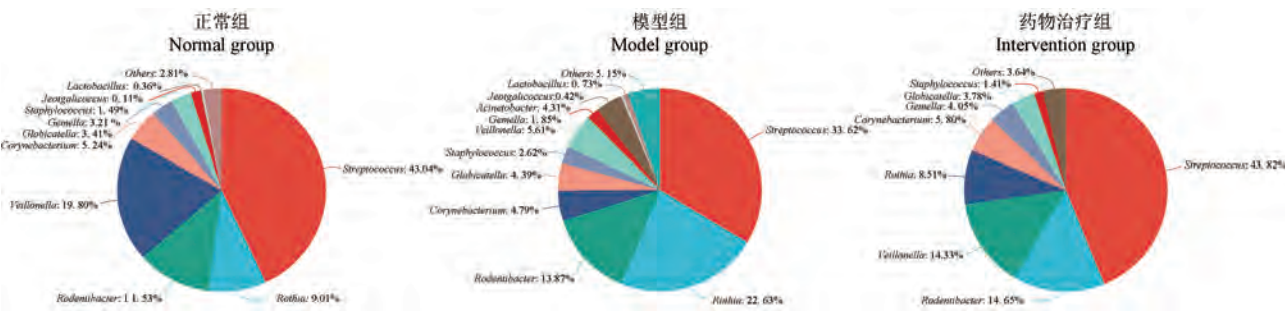
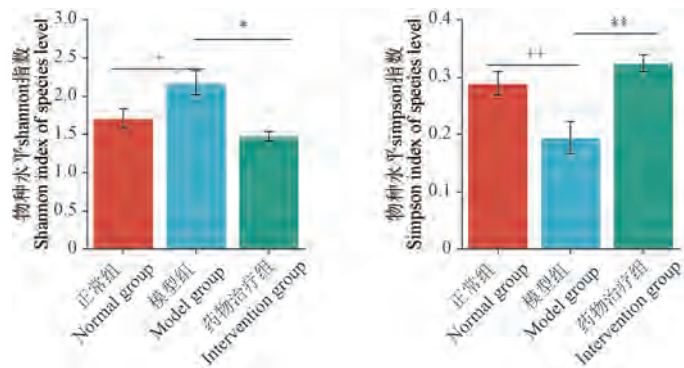


图 5 大鼠口腔唾液菌群分布(层级聚类分析,属水平)

Figure 5 Distribution of oral salivary flora in rats (hierarchical cluster analysis, genus level)

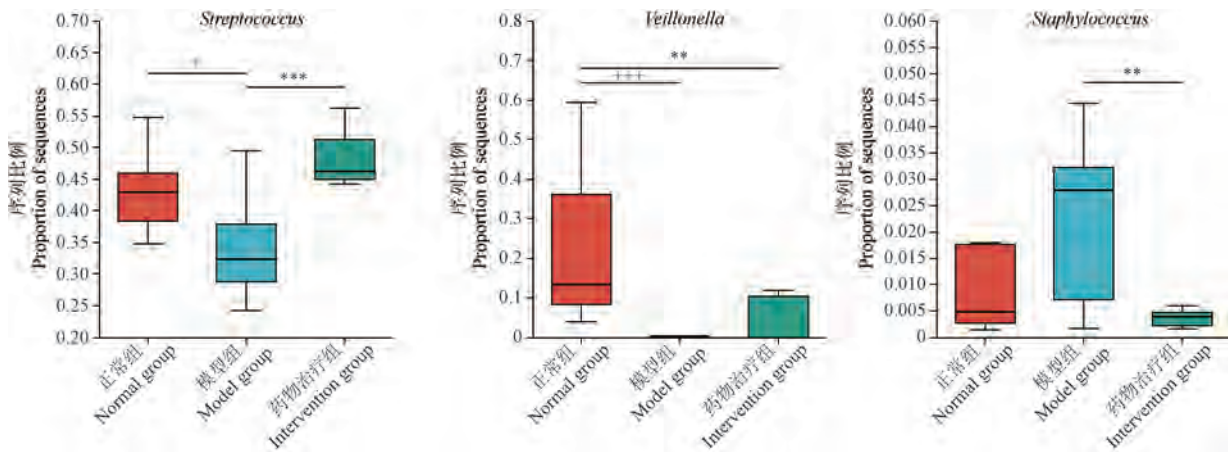


注:与正常组比较, $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.01$;与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图 6 槟榔提取物诱导大鼠口腔菌群 shannon 和 simpson 指数的影响 ($n=10$)

Note. Compared with normal group, $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.01$. Compared with model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 6 Effect of betel nut-extract induced shannon and simpson indices of oral flora in rats



注:与正常组比较, $^{+}P<0.05$, $^{+++}P<0.001$;与模型组比较, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图 7 槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡唾液菌群分析的影响 ($n=10$)

Note. Compared with normal group, $^{+}P<0.05$, $^{+++}P<0.001$. Compared with model group, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 7 Effect of betel nut-extract on salivary flora of rat oral ulcer

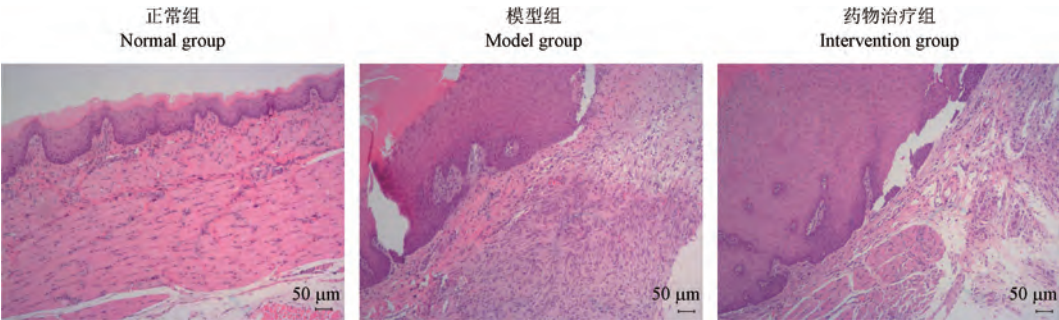


图 8 大鼠口腔黏膜组织病理切片(HE 染色)

Figure 8 Pathological sections of rat oral mucosa (HE staining)

3 讨论

口腔溃疡是一种发生于口腔黏膜上的表浅溃疡性疾病,多见于嘴唇内侧、舌头、舌腹、颊黏膜等部位,临床表现为口腔灼烧痛、溃烂,呈周期性、游走性反复发作,严重者可直接影响患者的饮食、吞咽和语言交流等日常行为^[9]。虽然目前临床上已有多种口腔溃疡动物模型用于实验研究,如机械损

伤法、化学灼烧法和细菌感染法等,但模型大多以病理性为主,极少有模型可完全复制疾病发生发展的自然进程^[10]。槟榔提取物诱导口腔溃疡模型是持续而自然的过程,与传统机械损伤、化学灼烧和细菌感染等口腔溃疡模型构建方式相比,更具均一性与可控性,且不会因造模力度不同或试剂外溢等情况而致模型差异病损各不相同。大量研究证实槟榔可造成牙齿与牙周黏膜损伤,引起口腔溃疡及黏膜纤维化,产生一系列牙周疾病,但发病机制尚不清晰^[11]。本研究构建与临床病症特点吻合度高且复制简单的口腔溃疡动物模型,揭示槟榔诱发口腔溃疡的发病机制,通过观察各组大鼠体征、口腔溃疡面积和口腔黏膜组织病理变化对不同处理组大鼠造模情况进行评价,根据口腔黏膜局部组织炎症因子水平、口腔菌群结构变化以及多样性特征,揭示口腔微生物群与黏膜细胞因子间动态关系,探索口腔菌群参与槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡的发病机制,特设桂林西瓜霜作为药物治疗组,观察模型组大鼠口腔创面愈合后口腔菌群和局部细胞因子水平的变化,进一步验证口腔菌群和局部细胞因子与槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡发病机制的关系^[12-13]。

本研究发现,在槟榔提取物干预后大鼠均出现口腔溃疡创面,且结合病理可见大鼠口腔黏膜明显病变,该症状与邢国征等^[14]诱导大鼠口腔溃疡模型症状一致,提示槟榔提取物诱发大鼠口腔溃疡模型构建成功。当动物经药物干预后,药物治疗组大鼠口腔溃疡程度随着给药时间的延长呈愈合趋势,而模型组动物仍处于严重阶段,提示模型动物尚未出现自愈趋势,各组动物于给药末期进行口腔黏膜炎症因子检测及口腔菌群高通量测序对于揭示槟榔提取物参与口腔溃疡发病机制具有重要意义。

研究表明,口腔溃疡的发生发展与细胞因子网络失衡密切相关,其中 IL-2、IL-8 和 TNF- α 均为参与口腔溃疡的重要促炎因子;而微生物菌群失调会破坏免疫系统,进而导致促炎因子上调及抗炎因子下调,因此口腔溃疡的发生发展与口腔菌群稳态及细胞因子水平密切相关^[14-17]。有报道称,口腔中较高丰度的葡萄球菌属会提高口腔黏膜感染风险,而链球菌属和韦荣氏菌属等唾液菌群作为口腔中的正常菌群与宿主间保持动态平衡,从而发挥保护宿主的作用,维持口腔内环境的稳定性,当其含量下降时,口腔黏膜稳定性破坏,也会导致口腔溃疡的

发生^[18-20]。本研究使用槟榔处理模型组大鼠后采用细菌 16S rDNA 进行口腔菌群高通量测序, α 多样性分析结果显示,模型组大鼠口腔唾液的 shannon 升高、simpson 降低,提示槟榔提取物可导致大鼠口腔菌群组成和结构发生改变,打破口腔菌群平衡。在已知检出的高丰度菌群中,研究发现模型组大鼠口腔唾液 *Streptococcus*、*Veronella* 数量显著降低,*Staphylococcus* 数量显著增加,且口腔黏膜组织中促炎因子 TNF- α 、IL-2、IL-8 水平均显著上调;而经药物干预后模型大鼠口腔黏膜创面逐渐愈合,*Streptococcus*、*Veronella* 数量显著升高,*Staphylococcus* 数量显著减少,口腔黏膜组织中促炎因子 TNF- α 、IL-2、IL-8 水平均显著下调,提示模型大鼠在口腔黏膜创面好转的情况下,其口腔菌群失衡情况和炎症因子水平得到明显改善。综上所述,槟榔提取物可引起动物口腔正常菌群水平降低,潜在致病菌水平升高,破坏其口腔菌群微生物平衡,进而破坏机体免疫系统,引起炎症因子风暴,导致口腔溃疡的发生。

本研究使用槟榔提取物诱导大鼠口腔溃疡模型,可引起大鼠口腔菌群中链球菌属、韦荣氏菌属数量减少,葡萄球菌属数量增多,局部促炎因子水平升高,口腔溃疡面积增大,口腔溃疡评分上升。因此,我们推测槟榔提取物诱发口腔溃疡疾病发展可能与口腔菌群稳态破坏,引起促炎因子含量升高有关,这一发现对研究槟榔提取物诱导口腔溃疡发病机制及靶向药物开发具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 张怡, 逯茂洋. 口腔菌群与口腔疾病的关系的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(80): 99-100.
Zhang Y, Lu MY. Research progress on the relationship between oral flora and oral diseases [J]. World Latest Med Inf, 2018, 18(80): 99-100.
- [2] 葛林虎, 苏汉福. 口腔菌群多样性与菌株基因组多态性 [J]. 口腔医学研究, 2019, 35(10): 915-918.
Ge LH, Su HF. Oral microbiota diversity and bacterial genomic polymorphism [J]. J Oral Sci Res, 2019, 35(10): 915-918.
- [3] 贾新斌. 复发性口腔溃疡患者口腔微生物菌群检验情况分析 [J]. 基层医学论坛, 2020, 24(35): 5117-5118.
Jia XB. Analysis of oral microbial flora test in patients with recurrent oral ulcer [J]. Med Forum, 2020, 24(35): 5117-5118.
- [4] Han N, Jia L, Guo L, et al. Balanced oral pathogenic bacteria and probiotics promoted wound healing via maintaining mesenchymal stem cell homeostasis [J]. Stem Cell Res Ther,

- 2020, 11(1): 61.
- [5] 王宁, 丁志锋. 肿节风分散片联合雷尼替丁治疗复发性口腔溃疡的疗效及对患者炎性因子的影响研究 [J]. 中国基层医药, 2021, 28(3): 349–352.
- Wang N, Ding ZF. Efficacy of Zhongjiefeng dispersible tablets combined with ranitidine in the treatment of recurrent oral ulcer and its effect on inflammatory factors [J]. Chin J Prim Med Pharm, 2021, 28(3): 349–352.
- [8] 马静, 李雪丽, 韩旭, 等. 牙痛停滴丸治疗口腔溃疡的药效学研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(3): 492–497.
- Ma J, Li XL, Han X, et al. Therapeutic effect of Yatongting Dropping Pills on oral ulcer in rats [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(3): 492–497.
- [9] 肖开, 闫欣, 苗明三. 两面针外用对豚鼠口腔溃疡模型的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(5): 533–537.
- Xiao K, Yan X, Miao MS. Effect of external use of *Zanthoxylum nitidum* on guinea pig model of oral ulcer [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2012, 23(5): 533–537.
- [6] 邵小钧, 王金竹, 林小臻, 等. 三亚市居民食用槟榔及相关口腔疾病的流行状况调查 [J]. 中国热带医学, 2018, 18(10): 994–998, 1028.
- Shao XJ, Wang JZ, Lin XZ, et al. Epidemiological investigation and analysis of betel nut chewing and related oral diseases in Sanya [J]. China Trop Med, 2018, 18(10): 994–998, 1028.
- [7] 聂安政, 高梅梅, 钞慧艳, 等. 槟榔药理毒理探讨与合理用药思考 [J]. 中草药, 2020, 51(12): 3329–3336.
- Nie AZ, Gao MM, Chao YH, et al. Discussion and consideration on pharmacology and toxicology of *Areca catechu* and its rational application [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(12): 3329–3336.
- [10] 祝红, 黄胜楠, 苗明三. 口腔溃疡动物模型造模方法及临床吻合度分析 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(5): 1750–1756.
- Zhu H, Huang SN, Miao MS. Modeling method and clinical fit analysis of oral ulcer animal model [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2023, 25(5): 1750–1756.
- [11] 莫愁. 槟榔提神, 但请远离 [J]. 江苏卫生保健, 2022, 24(10): 55.
- Mo C. Betel nut is refreshing, but please stay away [J]. Jiangsu J Health Care, 2022, 24(10): 55.
- [12] 刘蓉, 李丹, 马骁, 等. 康复新液对比西瓜霜喷剂治疗复发性口腔溃疡的 Meta 分析 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(2): 229–233.
- Liu R, Li D, Ma X, et al. A meta-analysis of kangfuxin liquid vs watermelon frost spray in the treatment of recurrent aphthous ulcer [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(2): 229–233.
- [13] 范中凯. 锌剂对复发性口腔溃疡患儿免疫功能和口腔菌群的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2022, 37(15): 2823–2826.
- Fan ZK. Effect of zinc on immune function and oral flora in children with recurrent oral ulcer [J]. Metern Child Health Care China, 2022, 37(15): 2823–2826.
- [14] 邢国征, 王长娜, 田旭彤, 等. 蜘蛛毒素口腔溃疡散对口腔溃疡模型大鼠的治疗作用及其机制研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(8): 1043–1048.
- Xing GZ, Wang CN, Tian XT, et al. Therapeutic effects of spider toxin oral ulcer powder on oral ulcer model rats and its mechanism study [J]. China Pharm, 2019, 30(8): 1043–1048.
- [15] Do T, Sheehy EC, Mulli T, et al. Transcriptomic analysis of three *Veillonella* spp. present in carious dentine and in the saliva of caries-free individuals [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5: 25.
- [16] 杨明燕, 张帆, 赵蕾. 口腔菌群变化影响放射治疗和化学治疗相关性口腔黏膜炎病程的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志, 2023, 50(1): 43–51.
- Yang MY, Zhang F, Zhao L. Research progress on oral flora changes affecting the course of radiotherapy and chemotherapy-related oral mucositis [J]. Int J Stomatol, 2023, 50(1): 43–51.
- [17] 林冬佳, 杨利洒, 王智. 口腔微生物与免疫细胞及上皮屏障互作在口腔黏膜稳态维持及疾病发生中的作用研究进展 [J]. 四川大学学报(医学版), 2022, 53(2): 188–193.
- Lin DJ, Yang LS, Wang Z. Research updates: the role of interaction between oral microbiota, immune cells, and epithelial barrier in oral mucosal homeostasis and pathogenesis [J]. J Sichuan Univ Med Sci, 2022, 53(2): 188–193.
- [18] McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, et al. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? [J]. Am J Infect Control, 2015, 43(1): 35–37.
- [19] 陈杰, 丁维俊. 复发性口腔溃疡微生物及免疫学机制与中医相关性探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13): 202–207.
- Chen J, Ding WJ. Correlation between microbial and immune mechanisms of recurrent oral ulcer and traditional Chinese medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(13): 202–207.
- [20] Cabras M, Carrozzo M, Gambino A, et al. Value of colchicine as treatment for recurrent oral ulcers: a systematic review [J]. J Oral Pathol Med, 2020, 49(8): 731–740.

[收稿日期] 2023-04-17

陈园园,曾亚南,杜小浪,等. 复方木姜叶柯活性茶对高尿酸血症肾病小鼠尿酸和肾功能的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 60–68.

Chen YY, Zeng YN, Du XL, et al. Effects of compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* on uric acid and renal function in mice with hyperuricemia nephropathy [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 60–68.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.007

复方木姜叶柯活性茶对高尿酸血症肾病小鼠尿酸和肾功能的影响

陈园园¹, 曾亚南¹, 杜小浪¹, 慕泽涇¹, 廖成东², 章常华^{1*}, 曹 岚^{1*}

(1.江西中医药大学,南昌 330004;2.井冈山市木姜叶柯农林开发有限公司,江西 井冈山 343604)

【摘要】 目的 探究复方木姜叶柯活性茶对高尿酸血症肾病小鼠的尿酸和肾功能的影响,为开发治疗高尿酸血症肾病的药物和功能性食品提供实验依据。**方法** 采用氧嗪酸钾联合腺嘌呤建立高尿酸血症肾病小鼠模型。小鼠随机分为空白组、模型组、阳性组(10 mg/(kg·d))、复方茶高、中、低剂量组(10 g/(kg·d)、3.33 g/(kg·d)、1.11 g/(kg·d))。末次给药 1 h 后,取尿液,采用 CBB 法测定尿蛋白(UP),脲酶法检测尿液尿素氮(UUN);眼眶取血,采用酶比色法检测尿酸(UA)含量,脲酶法检测血清尿素氮(BUN)含量,酶联免疫法检测白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)含量;取肾组织,荧光定量分析法检测尿酸盐转运蛋白 1(URAT1)及葡萄糖转运体 9(GLUT9)含量,HE 染色观察肾组织病理变化情况。**结果** 与空白组相比,模型组小鼠中 UP、UUN、UA、BUN、IL-6、URAT1、GLUT9 及 TNF- α 水平显著增高($P<0.01$, $P<0.05$),肾组织结构正常。与模型组相比,阳性组中 UP、UUN、UA、BUN、URAT1、IL-6、TNF- α 水平显著降低($P<0.01$, $P<0.05$),肾组织有少量肾小球萎缩变形,偶见肾小管扩张,无炎性细胞浸润。与模型组相比,复方茶高剂量组中 UP、UUN、UA、BUN、IL-6、URAT1、TNF- α 水平显著降低($P<0.01$, $P<0.05$);复方茶中剂量组中 UP、UUN、UA、IL-6、URAT1、GLUT9、TNF- α 水平显著降低($P<0.01$, $P<0.05$);复方茶低剂量组中 UP、UUN、UA、IL-6、URAT1、BUN、TNF- α 、GLUT9 水平显著降低($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论** 复方木姜叶柯活性茶能降低高尿酸血症肾病小鼠的尿酸,且对肾组织具有一定的保护作用,其机制可能与抑制尿酸重吸收有关,具体机制有待进一步研究。

【关键词】 复方木姜叶柯活性茶;高尿酸血症肾病;尿酸;肾功能;尿酸转运蛋白

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0060-09

Effects of compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* on uric acid and renal function in mice with hyperuricemia nephropathy

CHEN Yuanyuan¹, ZENG Yanan¹, DU Xiaolang¹, MU Zejing¹, LIAO Chengdong², ZHANG Changhua^{1*}, CAO Lan^{1*}

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China. 2. Jinggangshan Mujiangyeke Agriculuture and Forestry Development Co., Ltd, Jinggangshan 343604)

【Abstract】 Objective To explore the effect of compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* on uric acid levels and kidney function of mice with hyperuricemia nephropathy and to provide an experimental basis for the development of

【基金项目】 江西省现代农业产业技术体系建设专项(JXARS-11);江西中医药大学创新创业项目(202210412065,202210412336);赣鄱俊才-江西省主要学科学术和技术带头人培养项目(领军人才-学术类)(20232BCJ22022)。

【作者简介】 陈园园(1999—),女,硕士,研究方向:中药资源与民族药。E-mail: 2643247452@qq.com

【通信作者】 章常华(1977—),男,博士,教授,研究方向:中药药理学。E-mail: zhangch@126.com

曹岚(1970—),男,硕士,副教授,研究方向:中药资源与民族药。E-mail: 674179402@qq.com

* 共同通信作者

hyperuricemia nephropathy drugs and functional food. **Methods** A mouse model of hyperuricemia nephropathy was established by administering potassium oxazinate with adenine. Mice were randomly divided into common, model, positive drug (10 mg/(kg · d)) and compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* high-, middle-and low-dose groups (10 g/(kg · d), 3.33 g/(kg · d) and 1.11 g/(kg · d), respectively). One hour after the last gavage, urine protein (UP) was measured by CBB method, urea nitrogen (UUN) was measured by urease method. Orbital blood pampling, blood was collected for uric acid (UA) analysis by enzyme ratio method, urea nitrogen (BUN) was measured by urease method. The serum contents of interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF-α) were measured by ELISA. Take kidney tissue, levels of urate transporter 1 (URAT1) and glucose transporter 9 (GLUT9) were measured by quantitative fluorescence, kidney histopathological changes were observed by HE staining. **Results** Compared with the control group, the model group's levels of UP, UUN, UA, BUN, IL-6, URAT1, ULUT9 and TNF-α were significantly increased ($P<0.01$, $P<0.05$), and the renal tissue structure was normal. Compared with the model group, the positive group's levels of UP, UUN, UA, BUN, IL-6 and TNF-α were significantly decreased ($P<0.01$, $P<0.05$), there was little glomerular atrophy or deformation in the kidneys, kidney tubular dilatation was occasionally seen, but there was no inflammatory cell infiltration. Compared with the model group, the high-dose compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* group's UP, UUN, UA, BUN, IL-6, URAT1, TNF-α and GLUT9 levels were significantly decreased ($P<0.01$, $P<0.05$). The middle-dose compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* group's UP, UUN, UA content, IL-6, URAT 1, GLUT9, BUN and TNF-α were significantly decreased ($P<0.01$, $P<0.05$). The low-dose compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* group's UP, UUN, UA, IL-6, URAT1, BUN, TNF-α and GLUT9 levels were significantly decreased ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusions** Compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* can reduce uric acid in mice with hyperuricemia nephropathy and has a certain protective effect on the kidneys. The mechanism may be related to the inhibition of uric acid reabsorption, and the specific mechanistic details should be further investigated.

[Keywords] compound active tea of *Lithocarpus litseifolius*; hyperuricemic nephropathy; uric acid; renal function; uric acid transporter

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

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)为嘌呤代谢紊乱所致尿酸产生过多或者排泄不良引起的代谢性疾病,是继高血压、高血脂、高血糖“三高”之后的第四高^[1]。以血循环中尿酸含量异常升高为特征的 HUA 导致尿酸微盐结晶在肾沉积引发肾间质炎性反应、肾小管堵塞以及肾单位丧失,从而导致高尿酸血症性肾病(hyperuricemic nephropathy, HN)^[2],HN 是 HUA 最常见的靶器官损伤^[3],高尿酸血症患病率的升高直接导致高尿酸血症肾病发病率的上升^[4-7]。

现代医学治疗 HN 主要通过降低尿酸的合成与促进尿酸的排泄来保护肾,从而达到治疗的目的,但有较强的毒副作用,停药后血尿酸反弹明显^[8-11]。研究发现 HN 主要属于中医学的“痹症”“历节”“肾劳”“关格”等范畴,其病变之本多为肝脾肾亏虚,基本病机为气阴两虚,治则当以补益肝脾肾为主,清热利湿、活血化瘀为要,并随证施治^[8-11]。

复方木姜叶柯活性茶由木姜叶柯叶、黄精、黄芪与平卧菊三七 4 种中药在中医药理论指导下进行配伍后采用现代制药技术制备而成。其中木姜叶柯叶别名甜茶,为新食品资源(卫计委公告 2017 年

第 7 号),其叶在中国民间具有悠久的茶用历史,全国第四次中药资源普查中发现,木姜叶柯叶是江西省遂川和井冈山等地客家人日常用茶,德兴畲族村(兰村)村民也有饮用木姜叶柯叶茶的习惯,且民间用于辅助治疗痛风;现代药理研究表明,木姜叶柯叶中的酮类物质具有降血糖作用,三叶苷和根皮苷具有降血脂、降血糖、抗氧化、抗肿瘤、抑菌、抗病毒、预防、治疗血管疾病等生物活性^[12-15]。黄精为药食同源中药(卫法监发[2002]51 号),具有补气养阴、健脾、润肺、益肾之效,现代研究表明黄精治疗痛风、高尿酸血症及顽咳效著^[16]。黄芪为药食两用物质(国家卫生健康委员会、国家市场监督管理总局 2023 年第 9 号),具有补气升阳,固表止汗,利水消肿等功效,主要用于气虚乏力,食少便溏,中气下陷等症^[17],现代研究表明以黄芪为主的黄芪保心汤、防己黄芪汤、黄芪四妙散等多个组方在治疗高尿酸血症上效果显著^[18-20]。平卧菊三七为新资源食品(卫生部公告 2012 年第 8 号),其醇提物具有抗炎、降糖、治疗酒精性肝损伤、提高免疫力等多种保健功能^[21-22],现代研究证明平卧菊三七具有显著的降 UA 作用^[23]。因此本研究探讨自制的复方木

姜叶柯活性茶对 HN 小鼠的尿酸和肾功能的影响,为后续研制以木姜叶柯叶等药食同源中药为原料的养生产品提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性 KM 小鼠,6 周龄,体重 25~30 g,36 只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004]。动物饲养于江西中医药大学动物实验中心[SYXK(赣)2023-0001],小鼠适应性喂养后开始实验,饲养室相对湿度为 70%,温度为(23±2)℃。实验由江西中医药大学伦理委员会批准(JZSYDWLL20200507),实验过程中对动物遵循 3R 原则。

1.1.2 药物及制备

复方木姜叶柯活性茶原料药材由研究团队采自或购自江西、甘肃等地,并经江西中医药大学慕泽泾副研究员鉴定为木姜叶柯 *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun(批号:20211211,购自江西省井冈山市柏露镇井冈山市木姜叶柯农林开发有限公司种植基地);平卧菊三七 *Gynura procumbens* (Lour.) Merr(批号:20211201,购自江西省信丰县铁石口镇江西华紫仁农业开发有限公司种植基地);黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge(批号:20211101,购自甘肃省陇西县首阳镇陇西县义诚药业有限公司种植基地);多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua(批号:20210110,购自江西省乐安县招携镇江西省思乡赣品绿色食品有限公司)。样品保存于江西中医药大学中药资源与民族药研究中心标本室。

取复方木姜叶柯活性茶煎煮浓缩至含生药量 0.5 g/mL 的高剂量流浸膏、含生药量为 0.17 g/mL 的中剂量浓度及 0.06 g/mL 的低剂量浓度,4℃ 冷藏备用,以下简称复方茶。

1.2 主要试剂与仪器

氧嗪酸钾、腺嘌呤(Macklin,批号:C12977932, C12642924);苯溴马隆片(德国赫曼大药厂,批号:2001179);异丙醇、三氯甲烷、无水乙醇(广州化学试剂厂,批号:1710181,1712092,2110099);苏木素伊红(HE)染色液(北京雷根生物技术有限公司,批号:DH0006);羟甲基纤维素钠(CMC-Na)(Macklin,批号:C804625);TRIzol Reagent(Ambion,批号:

343906);PrimeScript^{RT} reagent kit(TaKaRa,批号:AL50946A);TB GreenPremix Ex Taq(TaKaRa,批号:AL14419A);β-action、尿酸盐转运蛋白 1(URAT1)和葡萄糖转运体 9(GLUT9)引物(上海生工生物有限公司);肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α, TNF-α)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)ELISA 试剂盒(CUSABIO,批号:X10026021, T11026022);尿素氮(脲酶法, BUN/UUN)、尿酸(酶比色法, UA)、尿蛋白(CBB 法, UP)定量测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:C013-2-1, C012-1-1, C035-2-1)。

-80℃ 冰箱(日本 SOYO 公司);Agilent 2100 bioanalyzer(美国 Agilent 公司);DZKW-D-2 型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);F6/10 手持式高速匀浆机(上海净信实验设备科技部);Neofuge13R 型台式低温高速离心机(Heal Force 公司);VARIOSKAN FLASH 多功能酶标仪(Thermo Fisher);NanoDrop 型核酸浓度测定仪(Thermo 公司);Lightcycler 96 荧光定量 PCR 仪(Roche 公司);石蜡包埋机 EG1150(徠卡);石蜡切片机 RM2016(徠卡);明美 MF43 显微镜(广州市明美光电技术有限公司);明美 MC50 数码成像测量分析系统(广州市明美光电技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模、分组及给药

36 只雄性 SPF 级 KM 小鼠可以自由进食、饮水,光照 12 h/d。小鼠随机分为空白(common)组、模型(model)组、苯溴马隆阳性(R)组(10 mg/(kg·d))、复方茶高(H)、中(M)、低(L)剂量组(10 g/(kg·d)、3.33 g/(kg·d)、1.11 g/(kg·d)),每组 6 只。实验期间,除空白组以外,其余各组动物每天灌胃氧嗪酸钾(500 mg/kg)和腺嘌呤(24 mg/kg)混悬液(溶剂为 0.5% CMC-Na),空白组给予相同体积的 0.5% CMC-Na 溶液,连续 21 d。通过观察小鼠的一般情况及测定尿酸水平,确定该高尿酸血症模型成功建立。造模第 8 天开始给予药物,空白组、模型组每天给予相同体积的纯水。给药体积均为 1 mL/100 g。末次给药 1 h 后取得实验样本。

1.3.2 一般情况观察

实验期间,每天观察并记录各组小鼠的精神状态、毛色、进食及垫料等情况,每 3 d 称量并记录小鼠体重。

1.3.3 小鼠尿液指标测定

末次给药前 1 d,通过反射排尿采集尿液,CBB

法测定小鼠最后一次 24 h 尿液中 UP 含量,脲酶法检测 UUN 含量。

1.3.4 小鼠血清生化指标测定

末次给药 1 h 后,眼眶取血,离心机分离血清(3500 r/min,4℃,15 min),-80℃ 保存待测。酶比色法检测 UA 含量,脲酶法检测 BUN 含量,酶联免疫法检测 IL-6、TNF-α 含量。

1.3.5 Real-time PCR 检测肾组织中 URAT1、GLUT9 mRNA 水平

用总 RNA 提取试剂提取肾组织 RNA,采用逆转录 PCR 两步法,根据逆转录试剂盒说明书逆转录 RNA,得到 cDNA,然后以 cDNA 为模版进行扩增目的基因。反应体系为 20 μL,设置反应条件:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 15 s,60℃ 30 s 后读板,40 个循环后,对实验所得 CT 值(每个样本每个基因的循环阈值),按公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行数据分析,计算相对表达量。从 NCBI 网站搜索以下基因 mRNA 序列,由生物工程(上海)股份有限公司设计合成,序列详见表 1。

1.3.6 小鼠肾组织病理观察

取小鼠肾组织,去除肾薄膜并纵切,肉眼观察并拍照记录各小鼠肾组织形态。

1.3.7 HE 染色病理学检测

取小鼠肾组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中,进行石蜡包埋及切片,HE 染色,在光学显微镜下观察肾组织病理形态。

表 1 qRT-PCR 所用基因引物序列

Table 1 Gene primer sequences for Real-time PCR		
引物 Primers	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	长度(bp) Length
URAT1	F:GACCTTGGACCCGATGTTCTTCTG	117
	R:CGTGCCGTGGACTCTGTAAGC	
GLUT9	F:CGGATACCCTGACTCTGCTCTGG	86
	R:AATCATCTTCACCATCAGCGTTCCC	

1.4 统计学分析

采用 GraphPadPrism 8.0 统计软件包对实验数据进行分析、处理和统计。两组间数据的比较采用 *t* 检验。数值以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察

空白组小鼠精神状况良好,饮水、进食变化不大,大小便颜色正常,毛色光滑均匀;模型组小鼠精神萎靡,饮水、进食量下降,大小便增多,大便多不成型,毛色发黄;与模型组相比,复方茶高剂量组小鼠毛色略有打结、大便少见不成形,饮水、进食量变化不大;复方茶中剂量组小鼠毛色光滑正常,大小便、饮水、进食量变化不大;复方茶低剂量组小鼠大便多不成形、毛色脏污、精神萎靡,饮水、进食量减少(实验流程见图 1)。

2.2 复方木姜叶柯活性茶对高尿酸血症肾病小鼠体重的影响

实验期间,空白组小鼠在第 5 天后体重持续稳定增长。与空白组相比,模型组小鼠体重呈波浪形浮动,且在造模前 9 d,体重持续下降;与模型组相比,复方木姜叶柯活性茶高剂量组小鼠在实验第 13 天体重下降,复方茶中剂量组小鼠第 17 天体重略有下降,复方茶低剂量组小鼠体重持续增长,阳性组小鼠体重呈波浪线增长趋势(见图 2)。

2.3 复方木姜叶柯活性茶对高尿酸血症肾病小鼠尿液中 UP、UUN 含量的影响

与空白组相比,模型组小鼠尿液 UP 含量均显著增加($P<0.01$);与模型组相比,复方茶高、中、低剂量组与阳性组 UP 含量均显著降低($P<0.01$)。与空白组相比,模型组小鼠尿液 UUN 含量显著增加($P<0.01$);与模型组相比,复方茶高、中、低剂量组

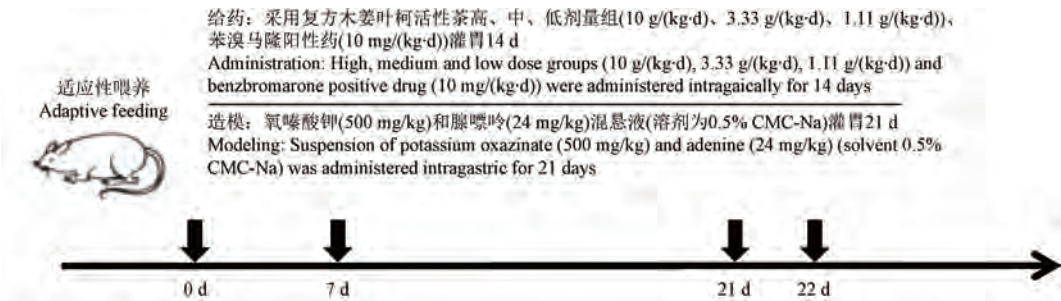


图 1 复方木姜叶柯活性茶实验流程

Figure 1 Flow of compound active tea of *Lithocarpus litseifolius*

与阳性组 UUN 含量显著降低($P<0.01$)(见图 3)。

2.4 复方木姜叶柯活性茶对高尿酸血症肾病小鼠血清中 UA、BUN、IL-6 及 TNF-α 水平的影响

与空白组相比,模型组小鼠 UA 含量显著增加($P<0.01$),可见高尿酸血症肾病的模型成功构建;与模型组相比,复方茶高、中、低剂量组与阳性组 UA 含量显著降低($P<0.01$)。与空白组相比,模型组小鼠 BUN 含量显著增加($P<0.01$);与模型组相比,复方茶高、低剂量组与阳性组均显著降低($P<0.01,P<0.05$)。与空白组相比,模型组小鼠血清中 IL-6 水平显著增加($P<0.01$);与模型组相比,复方茶高、中、低剂量组与阳性组的 IL-6 水平均显著降低($P<0.01,P<0.05$)。与空白组相比,模型组小鼠血清中 TNF-α 水平显著增加($P<0.05$);与模型组相比,复方茶高、中、低剂量组及阳性组的 TNF-α 水平均显著降低($P<0.05$)。结果显示,复方木姜叶柯活性茶可以显著降低尿酸水平,对高尿酸血症肾病小鼠的高尿酸具有一定的改善作用(见图 4)。

2.5 复方木姜叶柯活性茶对高尿酸血症肾病小鼠肾组织中 URAT1、GLUT9 表达水平的影响

与空白组相比,模型组小鼠肾组织中 GLUT9 表达水平显著增加($P<0.01$);与模型组相比,复方茶中、低剂量组肾组织中的 GLUT9 表达水平显著降低($P<0.01,P<0.05$)。与空白组相比,模型组小鼠肾组织中 URAT1 表达水平显著增加($P<0.01$);与模型组相比,复方茶高、中、低剂量组肾组织中 URAT1 表达水平显著降低($P<0.01$)(见图 5)。

2.6 复方木姜叶柯活性茶对高尿酸血症肾病模型小鼠肾组织形态的影响

肉眼观察到,空白组小鼠的肾组织表面光滑,呈规则的淡粉色,剖面输尿管颜色浅白;模型组小鼠肾组织外形略苍白,表面颜色不均匀,纵切面肾组织呈现病态的棕黄色;阳性组小鼠肾组织外形颜色略淡;复方茶高剂量组小鼠肾组织表面粗糙,外形略苍白,表面颜色不均匀,纵切面肾组织少量呈现病态的棕黄色;复方茶中剂量组小鼠肾组织外形略呈不均匀的淡粉色;复方茶低剂量组小鼠肾组织外形略呈不均匀的淡粉色,纵切面少量呈现病态的棕黄色(见图 6)。

HE 染色显示,空白组小鼠的肾组织结构正常,肾小管排列整齐,上皮细胞未见变性,无炎性细胞浸润;模型组小鼠肾可见部分肾小球萎缩变形,大

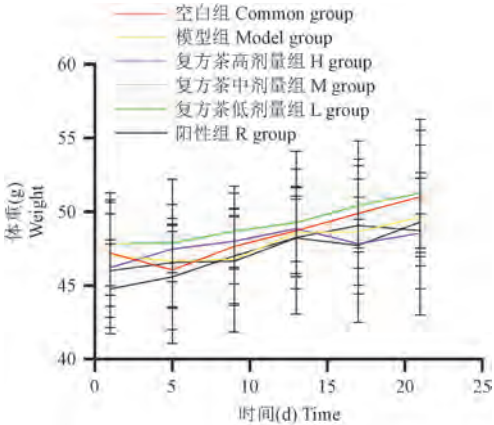
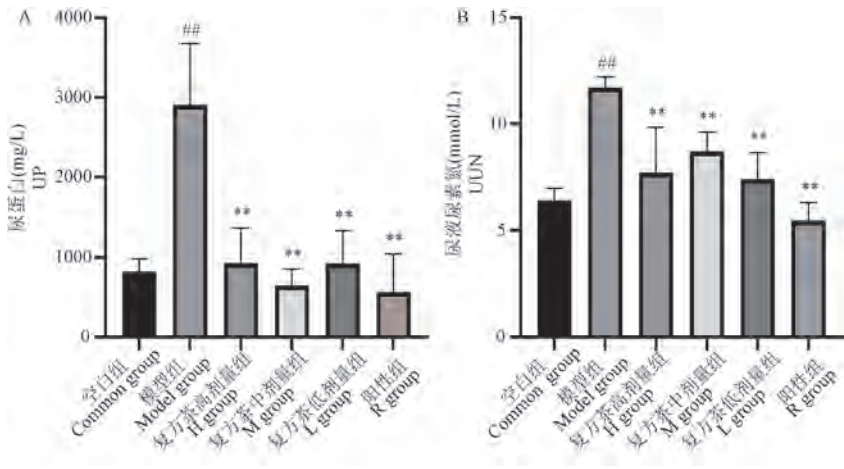
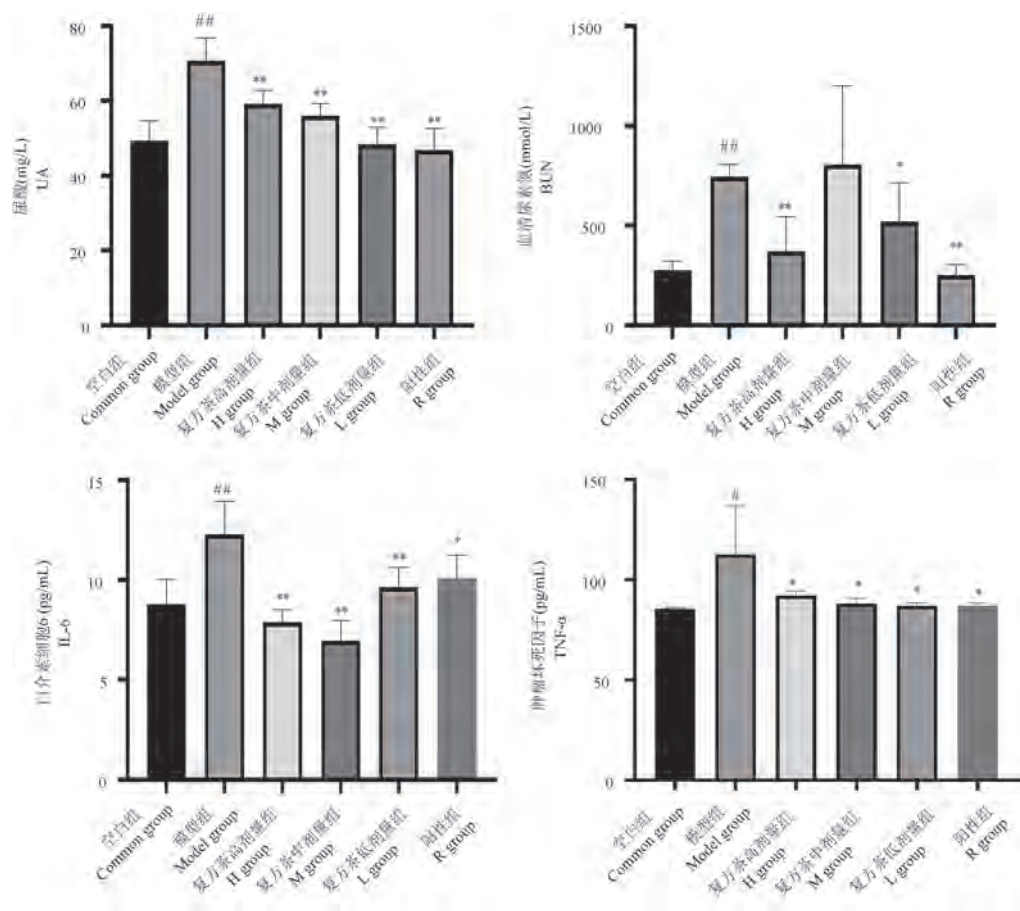


图 2 复方木姜叶柯活性茶对 HN 小鼠体重的影响($n=6$)
Figure 2 Effects of compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* on body weight in HN model mice



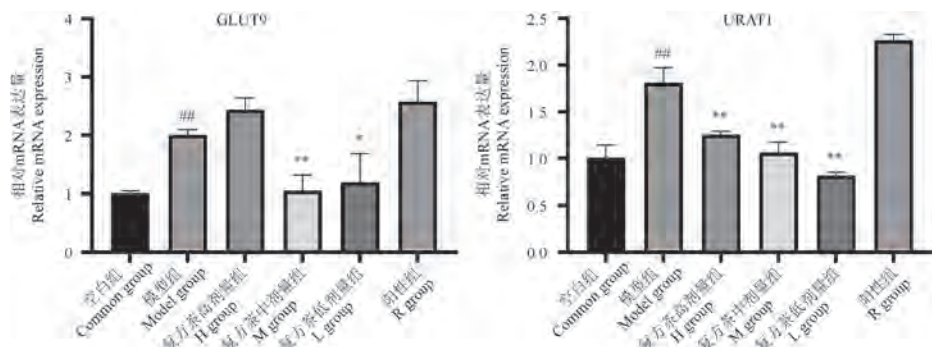
注:与空白组相比,### $P<0.01$;与模型组相比,** $P<0.01$ 。
图 3 复方木姜叶柯活性茶对 HN 小鼠尿液中 UP 及 UUN 含量的影响($n=6$)
Note. Compared with common group, ### $P<0.01$. Compared with model group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Effects of compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* on UP and UUN content in urine of HN model mice



注:与空白组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图 4 复方木姜叶柯活性茶对 HN 小鼠血清中 UA、BUN、IL-6 及 TNF- α 含量的影响($n=6$)
Note. Compared with common group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 4 Effects of compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* on UA, BUN, IL-6 and TNF- α in serum of HN model mice



注:与空白组相比, ## $P<0.01$;与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图 5 复方木姜叶柯活性茶对 HN 小鼠肾 GLUT9 及 URAT1 水平的影响($n=3$)
Note. Compared with common group, ## $P<0.01$. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Effects of compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* on GLUT9 and URAT1 in kidney of HN model mice

量肾小管扩张,上皮细胞排列紊乱、脱落、增生明显,有大出血,大量炎性细胞浸润;阳性组小鼠肾组织有少量肾小球萎缩变形,肾偶见肾小管扩张,无炎性细胞浸润;复方茶高剂量组,部分肾小球萎缩变形,较多肾小管扩张,上皮细胞排列紊乱、脱落,有少量炎性细胞浸润;复方茶中剂量组,部分肾小球萎缩变形,偶见肾小管扩张,少量上皮细胞脱落、轻微增生,有少量炎性细胞浸润;复方茶低剂量组,部分肾小球萎缩变形,可见肾小管扩张,上皮细胞排列紊乱、脱落,有大量炎性细胞浸润(见图 7)。

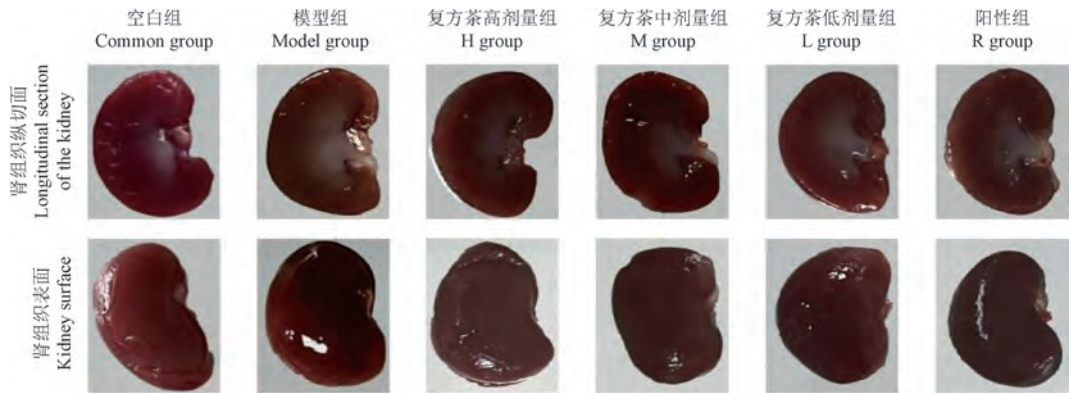


图 6 复方木姜叶柯活性茶对 HN 小鼠肾组织病理形态

Figure 6 Effects of compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* in pathological morphology of kidney tissue in HN model mice

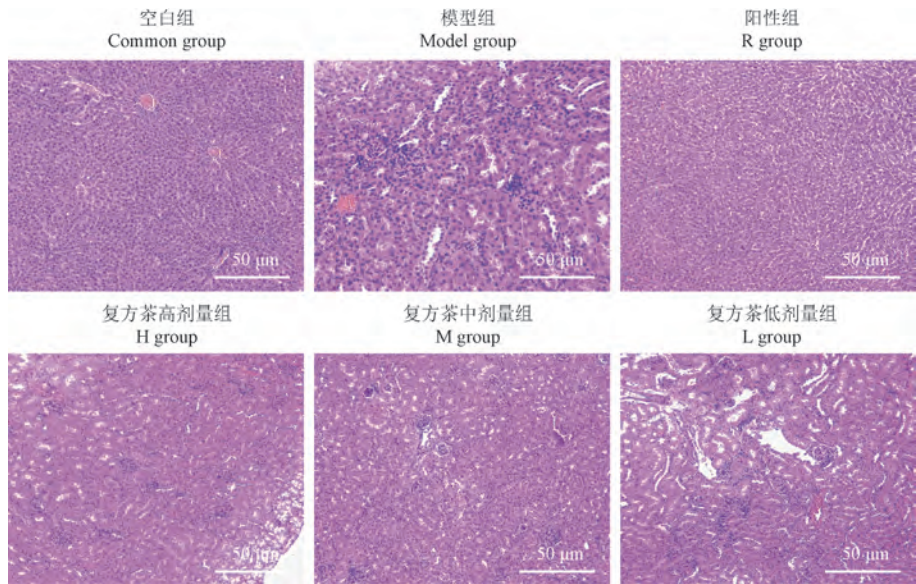


图 7 HE 染色观察复方木姜叶柯活性茶对 HN 小鼠肾组织形态的影响

Figure 7 Effects of compound active tea of *Lithocarpus litseifolius* on the morphology of kidney tissue in HN model mice by HE staining

3 讨论

本研究采用氧嗪酸钾联合腺嘌呤建立小鼠高尿酸血症肾病模型,该造模方法在建立 HN 模型上得到了广泛使用^[24-26],有助于建立稳定、持续的高尿酸血症肾病模型^[27]。

实验过程中通过对各组小鼠的一般日常状态观察记录,发现复方木姜叶柯活性茶高、中剂量组小鼠后期体重呈现下降趋势,结合这两组小鼠精神多萎靡、毛色脏污、大小便增多且大便多不成形,我们推测木姜叶柯可以促进肠道反应,后续可以进一步以复方木姜叶柯活性茶低剂量为基础开展研究。

UP 反映了肾小管间质受到的损害情况^[28]; BUN 是检测肾功能的灵敏指标,反映了肾小球功能是否正常。实验结果显示,模型组小鼠尿液中 UP、

血清中的 UA、BUN 含量均显著升高,病理学检测部分肾小球萎缩变形,大量肾小管扩张,上皮细胞排列紊乱、脱落、增生明显,有大出血,大量炎性细胞浸润,表明该模型可造成肾损伤;复方木姜叶柯活性茶高、中、低剂量组中 HN 小鼠尿液中 UP 及血清中的 UA、BUN 含量均降低,HE 染色病理观察肾小球萎缩改善,炎性细胞浸润减少,肾小管上皮细胞状态均有所改善,表明复方木姜叶柯活性茶对 HN 小鼠的肾具有一定的保护作用。

炎症反应是高尿酸血症肾病的重要病理机制,研究表明炎症因子 IL-6 与 TNF-α 参与了尿酸导致的肾小球和肾小管损伤^[29]。持续性的高尿酸水平会导致单核细胞分泌 IL-6、TNF-α 等致炎因子,并诱导固有免疫细胞启动下游炎症通路,同时促进炎症因子的生成。IL-6 与 TNF-α 的表达增加加重了肾

的局部炎症,导致肾小球硬化。本实验结果表明,复方木姜叶柯活性茶可以显著降低高尿酸血症肾病小鼠的 IL-6 与 TNF- α 水平,有效减轻肾炎症。

HN 主要是由于 HUA 所导致的慢性肾病,与体内尿酸的合成增多或排泄减少密切相关,研究表明,尿酸排泄障碍最初是由近端小管中尿酸转运体的表达异常引起的^[30]。URAT1 为尿酸盐转运蛋白,是参与尿酸从肾向血液转运的重要基因,是调节血尿酸水平的主要机制,也是苯溴马隆片和氯沙坦等降尿酸药物的重要靶点^[31]。URAT1 在肾近端小管上皮细胞的刷状缘表达,当有机阴离子积聚在近曲肾小管上皮细胞内时,因与 URAT1 有很高的亲和力,故细胞内的阴离子会与管腔中的尿酸盐相交换,在电化学梯度的作用下,尿酸从肾小管的管腔被吸收回细胞中,导致尿酸重吸收增加。GLUT9 是一种高容量的葡萄糖转运体,主要利用 GLUT9 对尿酸较强的亲和力,将管腔内的尿酸重吸收到细胞内,将细胞内的尿酸转运到肾间质,从而完成尿酸吸收入血的过程^[32-33]。因此,在 URAT1 与 GLUT9 的配合下,完成了尿酸由尿液入血的重吸收过程。通过对小鼠肾匀浆中 URAT1、GLUT9 表达量的检测可知,HN 模型组小鼠肾匀浆中 GLUT9、URAT1 蛋白表达量显著升高,表达异常;复方木姜叶柯活性茶高、中、低组小鼠肾匀浆中 GLUT9、URAT1 蛋白表达量显著降低,进一步降低了这种表达。

综上所述,本研究自制的复方木姜叶柯活性茶可降低 HN 模型小鼠尿酸且对肾组织具有一定的保护作用,其机制可能与抑制尿酸重吸收有关。该研究可为 HN 治疗药物或辅助治疗 HN 的功能性食品研究开发提供实验依据。

参考文献:

[1] 郭立新. 从《高尿酸血症和痛风治疗中国专家共识》谈高尿酸血症的治疗 [J]. 药品评价, 2014, 11(1): 21-23, 31.
Guo LX. Treatment of hyperuricemia through Chinese expert consensus about hyperuricemia and gout treatment [J]. Drug Eval, 2014, 11(1): 21-23, 31.

[2] 聂秀玲, 宋林凌, 李明珍, 等. 住院痛风患者并发慢性肾病的危险因素分析 [J]. 中国医师杂志, 2021, 23(5): 707-710, 715.
Nie XL, Song LL, Li MZ, et al. Risk factors analysis for chronic kidney disease among hospitalized gout patients [J]. J Chin Physician, 2021, 23(5): 707-710, 715.

[3] Fathallah-Shaykh SA, Cramer MT. Uric acid and the kidney [J]. Pediatr Nephrol, 2014, 29: 999-1008.

[4] 方宁远, 吕力为, 吕晓希, 等. 中国高尿酸血症相关疾病诊疗

多学科专家共识 [J]. 中华内科杂志, 2017, 56(3): 235-248.

Fang NY, Lyu LW, Lyu XX, et al. Chinese multi-disciplinary consensus on the diagnosis and treatment of hyperuricemia and its related diseases [J]. Chin J Intern Med, 2017, 56(3): 235-248.

[5] Cui LF, Meng LM, Wang GY, et al. Prevalence and risk factors of hyperuricemia; results of the Kailuan cohort study [J]. Mod Rheumatol, 2017, 27: 1066-1071.

[6] 周晓燕, 赵琦, 王娜, 等. 上海市松江区社区居民高尿酸血症与慢性肾病的相关性研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2019, 23(3): 278-282, 293.
Zhou XY, Zhao Q, Wang N, et al. Relationship between hyperuricemia and chronic kidney disease in adult residents of communities in the Songjiang district, Shanghai [J]. Chin J Dis Contr Prev, 2019, 23(3): 278-282, 293.

[7] 李少峰, 陈燕, 董陆玲, 等. 河北省张家口地区高尿酸血症流行现状及影响因素分析 [J]. 医学动物防制, 2018, 34(5): 455-457.
Li SF, Chen Y, Dong LL, et al. Epidemiological status and influencing factors of hyperuricemia in Zhangjiakou of Hebei Province [J]. J Med Pest Contr, 2018, 34(5): 455-457.

[8] Strilchuk L, Fogacci F, Cicero AF. Safety and tolerability of available urate-lowering drugs: a critical review [J]. Expert Opin Drug Saf, 2019, 18: 261-271.

[9] 袁永华. 中西医结合治疗尿酸性肾病 60 例疗效观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(9): 803-804.
Yuan YH. Clinical observation on 60 cases of uric acid nephropathy treated by combination of traditional Chinese and Western medicine [J]. Chin J Integr Tradit West Nephrol, 2010, 11(9): 803-804.

[10] 郭爱涛, 杨进, 丁谊, 等. 中医药治疗尿酸性肾病辨证及用药分析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(4): 9-10.
Guo NT, Yang J, Ding Y, et al. Analysis on common used syndromes and herbs on clinical therapy of uric acid nephropathy [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2011, 13(4): 9-10.

[11] 廖国华, 冯春俭, 蒋敏, 等. 中西医结合治疗痛风性肾病 56 例临床研究 [J]. 江苏中医药, 2014, 46(4): 25-27.
Liao GH, Feng CJ, Jiang M, et al. Clinical study on 56 cases of gouty nephropathy treated by combination of traditional Chinese and Western medicine [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2014, 46(4): 25-27.

[12] 王慧莹. 多穗柯根皮苷的提取纯化研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2014.
Wang HY. Studies on extraction and purification of phlorizin in *Lithocarpus polysachyus* rehd [D]. Changsha: Central South University, 2014.

[13] Cheng YB, Liu FJ, Wang CH, et al. Bioactive triterpenoids from the leaves and twigs of *Lithocarpus litseifolius* and *L. corneus* [J]. Planta Med, 2018, 84(1): 49-58.

[14] Hou SZ, Chen SX, Huang S, et al. The hypoglycemic activity of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. leaves in the experimental hyperglycemic rats [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(1): 142-149.

- [15] Hou SZ, Xu SJ, Jiang DX, et al. Effect of the flavonoid fraction of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. on spontaneously hypertensive and normotensive rats [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143: 441–447.
- [16] 孙咸茂. 黄精治疗痛风、高尿酸血症及顽咳效著 [J]. 中医杂志, 2001, 73(1): 13.
Sun XM. *Polygonatum sibiricum* is effective in treating gout, hyperuricemia and intractable cough [J]. J Tradit Chin Med, 2001, 42(1): 13.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部 [M]. 北京: 中国医药出版社; 2015.
National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; 1st edition [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2015.
- [18] 王星, 薛宁, 李洪雷, 等. 防己黄芪汤对高尿酸血症小鼠降尿酸及肾保护作用机制的研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5248–5255.
Wang X, Xue N, Li HL, et al. Study on mechanism of Fangji Huangqi Decoction on hypouricemic effect and renal protection in hyperuricemia mice [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(21): 5248–5255.
- [19] 刘贺, 李志刚, 张培影. 黄芪保心汤治疗慢性心力衰竭合并高尿酸血症临床观察 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(9): 1651–1654.
Liu H, Li ZG, Zhang PY. C linical observation of Huangqi Baoxin Decoction on chronic heart failure complicated with hyperuricemia [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2017, 26(9): 1651–1654.
- [20] 钟云良, 詹利霞, 余远青. 黄芪四妙散治疗高尿酸血症 50 例 [J]. 江西中医药, 2014, 45(7): 57–58.
Zhong YL, Zhan LX, Yu YQ. Treatment of 50 cases of hyperuricemia with Huangqi Simiao Powder [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2014, 45(7): 57–58.
- [21] 许溪, 何鹿玲, 王木兰, 等. 平卧菊三七各提取物抗痛风作用的实验研究 [J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(2): 82–85, 90.
Xu X, He LL, Wang ML, et al. Experimental study of *Gynura procumbens* for gout in each extract [J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 2018, 30(2): 82–85, 90.
- [22] 吴磊, 曹明原, 吴静, 等. 平卧菊三七的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 现代食品科技, 2022, 38(8): 334–351.
Wu L, Cao MY, Wu J, et al. Research progress on chemical constituents and biological activities of *Gynura procumbens* [J]. Mod Food Sci Technol, 2022, 38(8): 334–351.
- [23] 彭宝莹, 李欣, 黄俊明, 等. 平卧菊三七固体饮料的抗高尿酸血症作用及机制研究 [J]. 华南预防医学, 2021, 47(12): 1540–1544.
Peng BY, Li X, Huang JM, et al. Anti-hyperuricemia effect and its mechanism of solid beverage of *Gynuraprocumbens* (Lour.) Merr [J]. South China J Prev Med, 2021, 47(12): 1540–1544.
- [24] Li H, Liu X, Lee MH, et al. Vitamin C alleviates hyperuricemia nephropathy by reducing inflammation and fibrosis [J]. J Food Sci, 2021, 86(7): 3265–3276.
- [25] Liu N, Wang L, Yang T, et al. EGF receptor inhibition alleviates hyperuricemic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(11): 2716–29.
- [26] Fang C, Chen LY, He MZ, et al. Molecular mechanistic insight into the anti-hyperuricemic effect of *Eucommia ulmoides* in mice and rats [J]. Pharm Biol, 2019, 57(1): 112–119.
- [27] Wen S, Wang D, Yu H, et al. The time-feature of uric acid excretion in hyperuricemia mice induced by potassium oxonate and adenine [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5178.
- [28] 张为垣, 袁建洋, 张富春. 尿蛋白与尿微量白蛋白水平检测在糖尿病肾病诊断中的应用 [J]. 糖尿病新世界, 2023, 26(16): 57–60.
Zhang WY, Yuan JY, Zhang FC. Application of urinary protein and urinary microalbumin detection in diagnosis of diabetic nephropathy [J]. Diabetes N World, 2023, 26(16): 57–60.
- [29] 路巍, 颜刚, 阎胜利, 等. 高尿酸血症血尿酸与 TNF- α 、IL-6 的关系 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2007, 23(2): 160–161.
Lu W, Wang YG, Yan SL, et al. Association of blood uric acid with TNF- α and IL-6 in patients with hyperuricemia [J]. Chin J Endocrinol Metab, 2007, 23(2): 160–161.
- [30] Pan J, Shi M, Li L, et al. Pterostilbene, a bioactive component of blueberries, alleviates renal fibrosis in a severe mouse model of hyperuricemic nephropathy [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1802–1808.
- [31] 呼琴, 金华, 陈诺, 等. 清补通络方治疗尿酸性肾病临床观察及其对血清 URAT1、GLUT9 的影响 [J]. 山西中医, 2023, 39(1): 21–23.
Hu Q, Jin H, Chen N, et al. Efficacy observation of Qingbu Tongluo formula on uric acid nephropathy, and its effect on serum URAT1 and GLUT9 [J]. Shanxi J Tradit Chin Med, 2023, 39(1): 21–23.
- [32] 张凤阳, 邢志华, 申光焕, 等. 基于尿酸转运蛋白的中药治疗高尿酸血症的研究进展 [J]. 中南药学, 2022, 20(5): 1123–1128.
Zhang FY, Xing ZH, Shen GH, et al. Research progress in traditional Chinese medicine treatment based on uric acid transporter for hyperuricemia [J]. Cent South Pharm, 2022, 20(5): 1123–1128.
- [33] 白莉, 刘广运, 张晓萍, 等. 牡丹花总黄酮对高尿酸血症大鼠降尿酸作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(18): 38–45.
Bai L, Liu GY, Zhang XP, et al. Effect of total flavonoids in flower of *Paeonia suffruticosa* on uric acid in rats with hyperuricemia [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(18): 38–45.

[收稿日期] 2023–05–08

李轶辉, 彭浩, 许玉春, 等. 通过加权基因共表达网络构建结肠癌的预后风险标志物及其临床意义 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 69-79.

LI YH, Peng H, Xu YC, et al. Development of a prognostic risk marker of colon adenocarcinoma based on a weighted gene co-expression network and its clinical significance [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 69-79.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.008

通过加权基因共表达网络构建结肠癌的预后风险标志物及其临床意义

李轶辉*, 彭浩, 许玉春, 郭蓉, 龚维

(中国人民解放军联勤保障部队第九二一医院普通外科, 长沙 410003)

【摘要】目的 结肠癌(colon adenocarcinoma, COAD)患者预后较差。因此筛选结肠癌预后相关基因, 建立结肠癌新的预后风险评估模型。**方法** 基于癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)和基因表达综合(gene expression omnibus, GEO)数据库中结肠癌相关数据, 分别作为训练集和验证集。采用加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)、Cox 回归模型结合最小绝对值选择与收缩算子(least absolute selection and shrinkage operator, LASSO)回归分析筛选结肠癌预后相关基因并构建预后模型, 受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)结合生存曲线验证模型的准确性, 并建立列线图。根据中位值将患者分为两组, 免疫细胞阳性比例分数(immune cell proportion score, IPS)评估两组患者免疫治疗反应。**结果** 最终筛选出 15 个特征基因, 以此建立结肠癌患者预后预测模型的 ROC 曲线下面积(area under the curve, AUC), AUC>0.6, 高风险组生存率显著低于低风险组($P<0.05$), 该模型可较好地地区分高、低风险组结肠癌患者。低风险组患者拥有较高的免疫细胞阳性比例(immune cell proportion score, IPS)评分($P=0.026$), 对免疫治疗反应效果更好。**结论** 建立的结肠癌预后模型对结肠癌高风险和低风险人群的生存情况具有较好的预测能力。

【关键词】 结肠癌; 预后; 转录组学; 癌症基因组图谱; 加权基因共表达网络

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0069-11

Development of a prognostic risk marker of colon adenocarcinoma based on a weighted gene co-expression network and its clinical significance

LI Yihui*, PENG Hao, XU Yuchun, GUO Rong, GONG Wei

(Department of General Surgery, the 921st Hospital of PLA, Changsha 410003, China)

【Abstract】Objective Because of the poor prognosis of colon adenocarcinoma (COAD), it is necessary to screen prognosis-related genes in COAD patients and establish a new prognostic risk assessment model. **Methods** COAD-related data from the cancer genome atlas (TCGA) and gene expression omnibus (GEO) were used as training and validation sets, respectively. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA), a Cox regression model and least absolute selection and shrinkage operator (LASSO) regression analysis were used to screen prognosis-related genes of COAD and establish a prognostic model. A receiver operating characteristic (ROC) curve was combined with a survival curve to verify the model accuracy, and a nomogram was constructed. Patients were divided into two groups by the median risk score. The immune cell proportion score (IPS) was used to evaluate the immunotherapy response of the two groups. **Results** A total

【基金项目】 湖南省教育厅科学研究项目(20C1116)。

【作者简介】 李轶辉(1973—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 胃肠道肿瘤。E-mail: liyih098@163.com

of 15 feature genes were screened. The area under the ROC curve in the predictive model of COAD patients was >0.6 , and the survival rate of the high-risk group was significantly lower than that of the low-risk group ($P<0.05$), suggesting a good distinguishing ability for high- and low-risk COAD patients. Patients in the low-risk group had a higher IPS ($P=0.026$), indicating a better response to immunotherapy. **Conclusions** The model developed for COAD in this study has a good ability to predict the survival of patients at high and low risk of COAD.

[Keywords] colon adenocarcinoma; prognosis; transcriptomics; the cancer genome atlas; weighted gene co-expression network

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

结肠癌(colon adenocarcinoma, COAD)由于侵袭性和复发率极高,是全球造成死亡的主要原因之一。目前,结肠癌手术根治性切除是结肠癌治疗的首选方法,但由于结肠癌发病症状不明显,一些患者在确诊时就已经发生了肿瘤转移,即使接受了全身治疗,患者 5 年生存率也不足 15%^[1]。不仅如此,早期结肠癌患者在接受治疗后出现肿瘤转移的风险仍然很高^[2]。目前,TNM 分子为临床上广泛被应用的预后评估标志物,但由于结肠癌具有高度异质性,TNM 分子不能揭示其生物异质性^[3]。因此,迫切需要寻找能够结合临床特征的新的生物标志物来预测结肠癌患者的预后。

随着各种生物信息学工具以及公共数据库的出现,利用生物信息学分析方法挖掘肿瘤的治病基因及其调控机制对肿瘤的研究起到巨大的推动作用。加权基因共表达网络(weighted gene co-expression network, WGCNA)是寻找高度相似基因模块的有力工具,目前已被广泛应用于寻找相关生物标志物。比如,基于 WGCNA 方法确定了胆管癌中与总生存期和组织学肿瘤分级显著相关的基因模块,最终得到特征基因,作为治疗胆管癌的预后生物标志物^[4]。本研究旨在通过利用 WGCNA 结合其他生物信息学方法,构建结肠癌的预后模型,并获得可能作为结肠癌预后及治疗靶点的标志物。

1 材料和方法

1.1 数据集下载

本研究从癌症基因组图谱计划(the cancer genome atlas, TCGA)数据库([https:// portal. gdc. cancer. gov/](https://portal.gdc.cancer.gov/))中搜索癌症类型结肠癌(TCGA-COAD),选择文件数据类型 RNA-seq,直接下载表达数据,单碱基变异(single nucleotide variants, SNV)数据,以及与患者相关的临床数据,使用 perl 脚本和 python 脚本对数据整合提取。共下载到 41 个正常样本以及 473 个肿瘤样本。结合临床数据剔除生存

时间 <30 d 的患者样本,进行后续分析。本研究以 TCGA-COAD 数据集作为训练集用于预后模型分析。与之对应,从美国国家生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)的高通量芯片表达谱数据库(gene expression omnibus database, GEO, [https://www. ncbi. nlm. nih. gov/geo/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/))中获取结肠癌的 GSE103479 数据集,以 GSE103479 数据集作为验证集进行后续分析和模型验证。

1.2 实验方法

1.2.1 不同生存期 COAD 患者表达谱差异分析

在 TCGA-COAD 队列中,为了识别 COAD 中癌症相关的差异表达基因(DEGs),使用 R 包 edgeR 对肿瘤组和正常组织中的 mRNA 的 count 数据进行了差异表达分析以获取 COAD 中癌症相关的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。筛选差异表达的阈值是 $|\log_{FC}| > 1$ 且 $FDR < 0.05$ 。

1.2.2 单样本基因集富集分析

为了探究其中患者的肿瘤免疫活性差异,运用 R 包 GSVA 对肿瘤样本进行单样本基因集富集分析(single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA),获取每个肿瘤样本中 29 种免疫细胞相关基因集表达差异以评估肿瘤患者的肿瘤微环境免疫细胞浸润水平,以此作为临床表征进行后续相关性分析。

1.2.3 加权基因共表达网络分析

运用 R 包 WGCNA 进行对 1.2.1 中 TCGA 队列中 COAD 相关的 DEGs 进行基因模块聚类,评估各模块特征基因(module eigengene, ME)与临床表征的相关性。选择 $\beta = 5$ 作为软阈值以确保无尺度网络,使用 blockwiseModules 函数构建聚类树状图,通过动态树剪切法将聚类树的分支合并为不同的基因模块,将最小基因数设置为 100,相异性阈值设置为 0.25。利用模块特征基因表达谱(module

eigengene E) 与临床表征进行 Pearson 相关性分析, 最终选择与免疫细胞相关性最高的基因模块, 并使用 R 包 pheatmap 将临床表征数据与基因模块的相关性可视化。

1.2.4 建立预后预测模型

在 TCGA-COAD 队列中, 利用 R 包 survival 将 1.2.3 中与免疫显著相关的基因模块内基因进行单因素 Cox 回归分析, 筛选 COAD 中与生存显著相关的基因 ($P < 0.05$)。为了防止模型过度拟合, 利用 R 包 glmnet 对其进行 LASSO Cox 回归分析进一步缩小范围, 选择最佳的惩罚参数 λ 以实现交叉验证图中最小部分似然偏差。最后, 利用 R 包 survival 对 LASSO Cox 回归分析获得的基因进行多因素 Cox 回归分析, 筛选 COAD 中与预后显著相关的基因 ($P < 0.05$), 最终构建了 COAD 预后风险评估模型。

1.2.5 验证预后预测模型

利用风险评估模型, 计算 TCGA-COAD 队列中肿瘤样本的风险评分, 以中位值为阈值将患者分为高风险组和低风险组, 利用 R 包 ggplot2 绘制患者的生存状态散点图展示不同风险评分患者随着时间变化的生存状态。为了评估高风险组和低风险组之间的预后差异, 利用 R 包 survival 绘制高风险组和低风险组的 Kaplan-Meier 生存曲线。同时, 利用 R 包 timeROC 绘制风险评分预测患者 1 年、3 年和 5 年生存的受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线并计算 ROC 曲线下面积 (area under the curve, AUC) 值。最后, 用独立数据集 GSE103479 进行验证。

1.2.6 验证预后预测模型独立性

结合预后风险评分以及 COAD 患者的年龄、病理分级、T、N 分期等临床病理信息, 利用 R 包 survival 进行 Cox 回归分析, 验证风险评分是否可作为 COAD 患者的独立预后模型。利用 R 包 rms 绘制列线图预测 COAD 患者 1 年、3 年和 5 年生存率, 并绘制校正曲线验证列线图性能。

1.2.7 高、低风险组富集分析

利用 R 包 clusterprofiler 对短生存期组上调基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 以确定在 3 个类别如生物学过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 中过度表达的功能富集以

及过度表达的 KEGG 通路。显著性功能和通路富集阈值参照其他人的研究^[5]。 $P < 0.05$ 和 $FDR < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.2.8 高、低风险组肿瘤突变分析

利用 TCGA-COAD 队列患者的 SNV 突变数据, 对高风险组和低风险组基因突变数据进行统计, 使用 R 包 GenVisR 绘制突变排名前 30 基因的瀑布图并选取高风险组和低风险组中突变频率前 5 的基因进行 χ^2 检验。

1.2.9 高、低风险组免疫表型评分差异分析

为了评估高风险组和低风险组对免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 治疗反应, 从癌症免疫图谱 (the cancer immunome atlas, TCIA, <https://tcia.at>) 下载结肠癌的免疫细胞阳性比例 (immune cell proportion score, IPS) 评分。IPS 评分越高, 肿瘤的免疫原性越高^[6], 表明免疫治疗反应越好。

1.3 统计学方法

利用 R 软件 (4.2.1 版) 进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。符合正态分布的数据采用配对样本 t 检验, 采用 Log-rank 比较两组间患者的总生存率差异。

2 结果

2.1 加权基因共表达网络分析

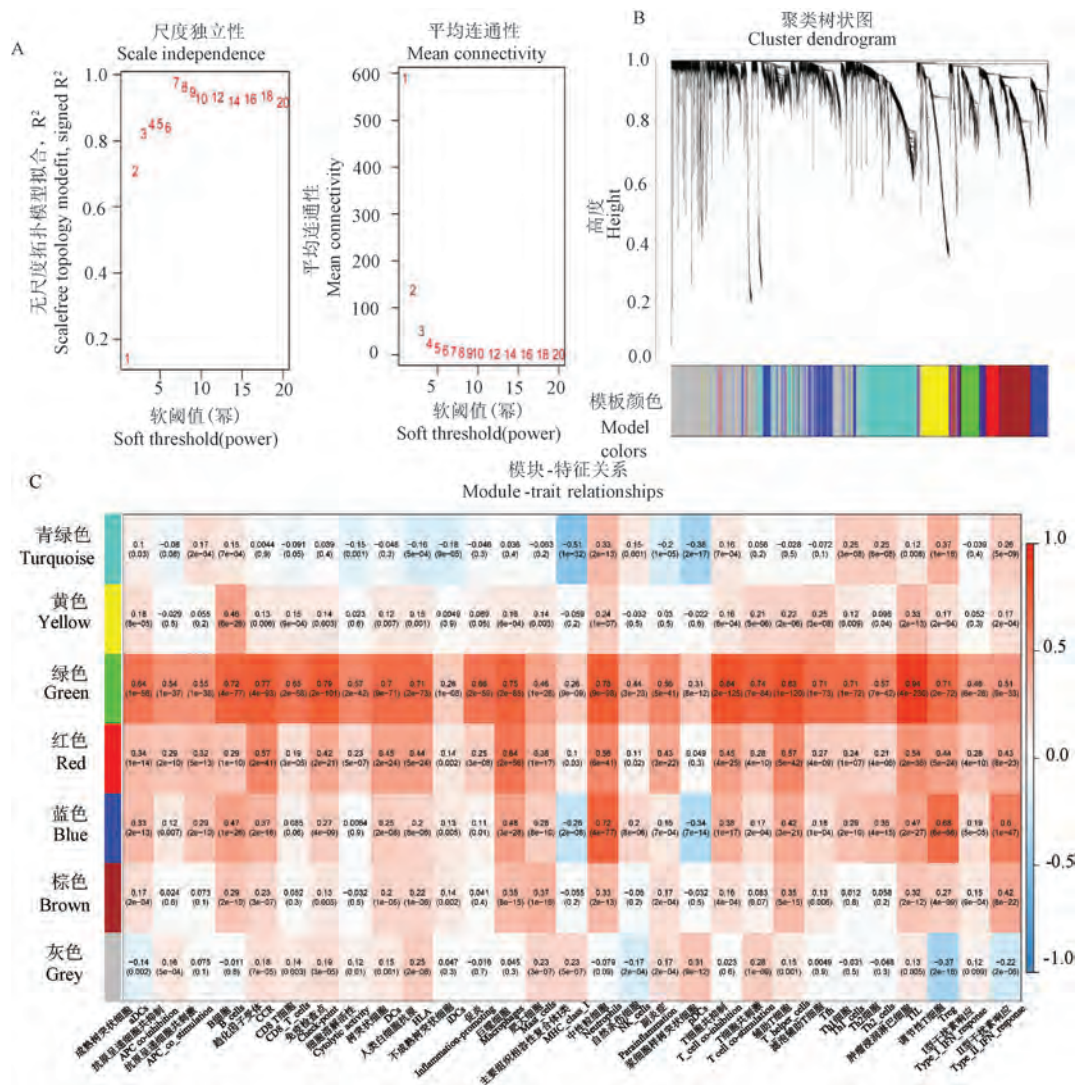
通过对 TCGA-COAD 队列中 41 个正常样本以及 473 个肿瘤样本进行差异分析, 总计筛选出 5414 个 COAD 相关的差异表达基因 DEGs。随后, 课题组基于 5414 个 COAD 相关的 DEGs 进行了加权基因共表达网络分析, 将软阈值参数 β 设置为 5 (图 1A、1B)。随后构建聚类树状图, 通过动态树剪切法将聚类树的分支合并为 7 个基因模块进行后续分析 (图 1C)。为了识别与患者免疫显著相关的基因模块, 课题组进行了单样本基因集富集分析, 获取了 COAD 患者中 29 种免疫相关基因集的表达水平, 用于评估 COAD 患者免疫微环境状态, 并以此作为临床表征与 7 个基因模块的 ME 进行 Pearson 相关性分析。最终筛选出与巨噬细胞免疫浸润显著相关的红色、绿色、蓝色以及棕色模块作为重要模块共计 1621 个基因进行 COAD 预后预测模型构建。

2.2 COAD 患者预后预测模型构建

根据 1621 个基因的表达量数据, 与 TCGA 数据库患者临床数据结合, 根据生存时间, 剔除生存时

间<30 d 的患者($n=417$),课题组对 1621 个基因进行了单因素 *Cox* 回归分析,以便分析单个基因与患者生存时间的相关性,以 $P<0.05$ 为筛选条件, P 值越小,该基因与患者生存时间相关性越显著,最终筛选得到 129 个与 COAD 患者生存显著相关的候选基因。随后为了降低模型的拟合度,对 129 个 COAD 生存相关基因进行 LASSO *Cox* 回归分析。LASSO 为每个基因计算一个系数,之后惩罚参数 λ 作为筛选阈值,随着惩罚参数 λ 变大,每个基因的

系数发生变化,当系数变为 0,则被认为该基因的变化不会影响样品的风险值(图 2A),根据最小 λ 值(左边虚线)选择最佳惩罚参数 λ (纵坐标最小的位置对应的 $\log(\lambda)$),一般选择左边虚线对应的 $\log(\lambda)$,得到对应的基因数,即 31 个重要的特征基因(图 2B)。最后,对这 31 个基因进行多因素 *Cox* 回归分析,分析多个基因共同与患者生存时间的相关性。在进行多因素 *Cox* 回归分析时,纳入的基因为:单因素分析时,差异有统计学意义的基因,以及差



注:A:基于TCGA-COAD中RNA-seq表达数据的软阈值;B:基因聚类树状图;C:树图形左侧的色块表示由动态树切割方法识别的模块,模块内基因呈高度相关模块与临床表征的相关性热图。色块中上面的数字代表相关性,下面的数字代表 P 值;红色呈正相关,蓝色呈负相关。

图1 加权基因共表达网络分析

Note. A, Soft threshold determination based on RNA-seq expression data in TCGA-COAD. B, Gene clustering tree. C, The color blocks on the left of the tree pattern represent the modules identified by the dynamic tree cut method, and the genes in the modules are highly correlated heatmap of the modules with clinical features. The top numbers in the color block represent correlations, and the bottom numbers represent P values, with red representing positive correlation and blue representing negative correlation.

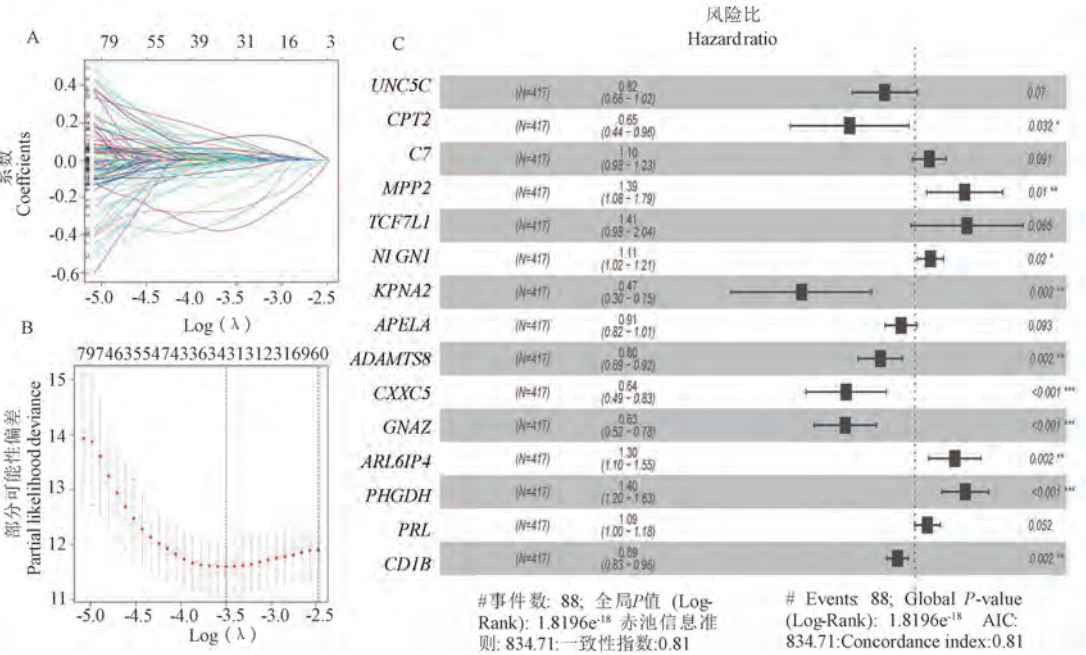
Figure 1 Weighted gene co-expression network analysis

异无统计学意义,但临床上认为与生存显著相关的基因,因而课题组选择 $P<0.1$ 的基因,最终获得 15 个与 COAD 预后相关的基因,分别为 *UNC5C*、*CPT2*、*C7*、*MPP2*、*TCF7L1*、*NLGN1*、*KPNA2*、*APELA*、*ADAMTS8*、*CXXC5*、*GNAZ*、*ARL6IP4*、*PHGDH*、*PRL*、*CD1B*。其中 *C7*、*MPP2*、*TCF7L1*、*NLGN1*、*ARL6IP4*、*PHGDH*、*PRL* 等 $HR>1$, 作为风险因素, *UNC5C*、*CPT2*、*KPNA2*、*APELA*、*ADAMTS8*、*CXXC5*、*GNAZ*、*CD1B* 等 $HR<1$, 作为保护因素(图 2C)。最终建立的 COAD 患者预后风险评估模型为: $Riskscore = -0.1977 \times UNC5C - 0.4287 \times CPT2 + 0.0962 \times C7 + 0.3297 \times MPP2 + 0.3445 \times TCF7L1 + 0.1034 \times NLGN1 - 0.7456 \times KPNA2 - 0.09 \times APELA - 0.2265 \times ADAMTS8 - 0.4511 \times CXXC5 - 0.4568 \times GNAZ + 0.2645 \times ARL6IP4 + 0.3332 \times PHGDH + 0.0833 \times PRL - 0.1132 \times CD1B$ 。

2.3 COAD 预后预测模型准确性验证结果

利用该模型,计算 TCGA-COAD 队列中肿瘤样

本的风险评分,根据中位风险将样本划分为高风险组和低风险组(图 3A)。接下来为了评估患者生存状况与风险评分的关系,课题组利用 R 包绘制了生存状态散点图,结果显示,随着患者的风险评分增加,患者的死亡率增加(图 3B)。随后为了评估高风险组和低风险组患者预后差异,绘制了 Kaplan-Meier 生存曲线,其结果显示,高风险组患者预后不佳,中位生存时间较短(图 3C)。ROC 曲线显示在 TCGA-COAD 队列中,预测患者 1 年、3 年、5 年生存的 AUC 值分别为 0.83、0.84、0.83(图 3D)。最后在独立数据集 GSE103479 中进行了验证,结果显示低风险组拥有较好预后(图 3E),在 GSE103479 队列中,风险评估模型预测 COAD 患者 1 年、3 年、5 年生存的 AUC 值分别为 0.81、0.73、0.62(图 3F)。综上,本研究建立的 COAD 患者的预后风险评估模型对高、低风险组患者预后拥有较好的预测能力。

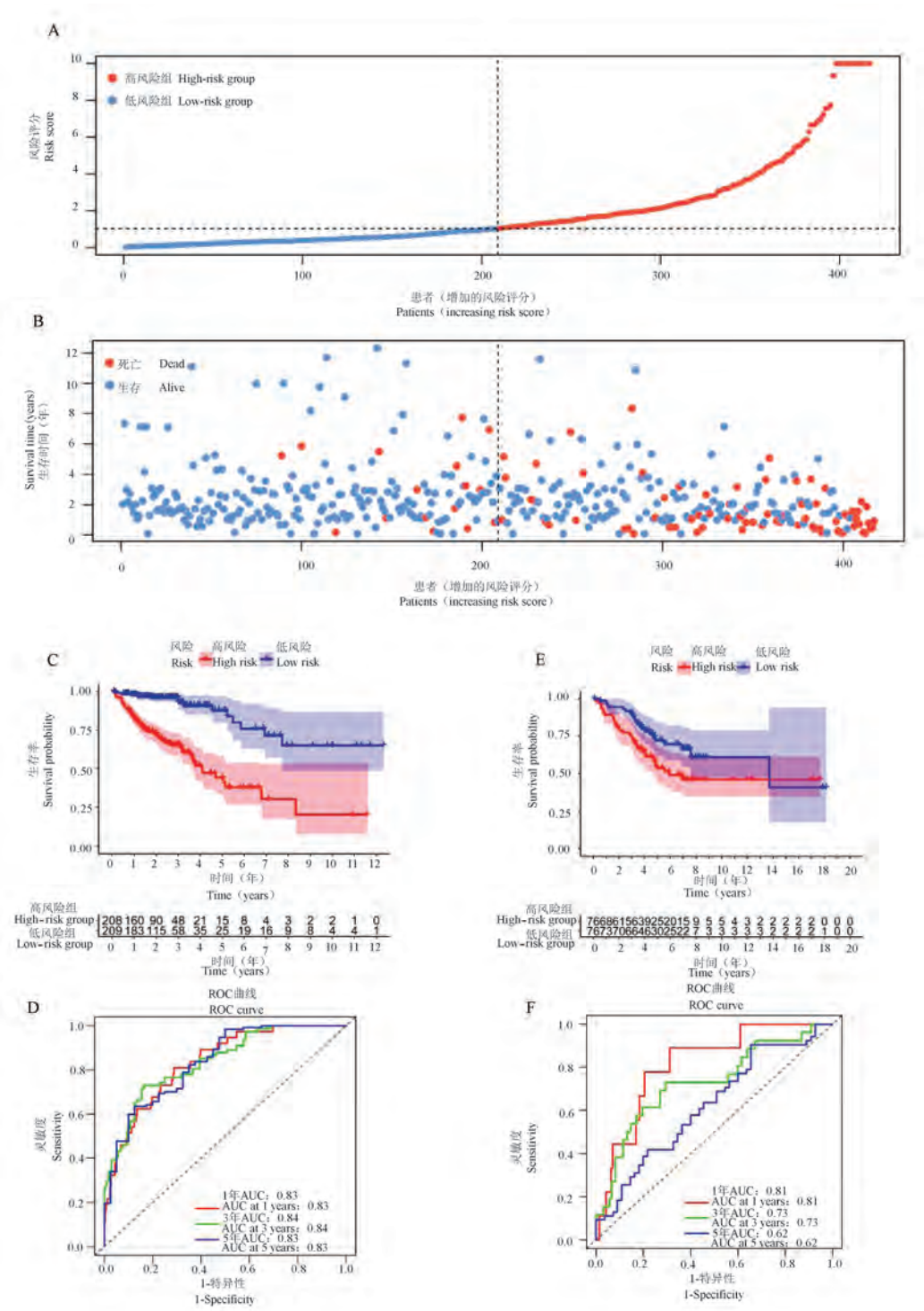


注: A: 129 个与 COAD 生存相关的基因的 LASSO 系数分布图, 每条曲线代表一个基因, 当调整参数(λ)变化时, 非零系数随之变化纵坐标表示系数, 上横坐标表示基因数, 下横坐标表示惩罚参数 λ ; B: 最佳惩罚参数 λ 选择; C: 多因素 Cox 回归分析森林图。与零假设比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 表示该基因是患者之间生存期不同的主要基因。

图 2 COAD 患者预后预测模型构建

Note. A, LASSO coefficient distribution of 129 genes associated with COAD survival, with each curve representing a gene. When adjusting the parameter (λ), the non-zero coefficient changes accordingly. The vertical axis represents the coefficient, the upper horizontal axis represents the gene number, and the lower abscissa represents the penalty parameter λ . B, Optimal penalty parameter λ . C, Forest map of multivariate Cox regression analysis. Compared with the null hypothesis, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, indicating that this gene is the main gene responsible for the difference in survival between patients.

Figure 2 Construction of prognosis prediction model for COAD patients



注:A:高、低风险组样本排布图;B:TCGA-COAD 患者生存状态散点图;C:TCGA-COAD 队列中,高、低风险组患者 Kaplan-Meier 生存曲线;D:TCGA-COAD 队列中,预测患者 1 年、3 年和 5 年生存的 ROC 曲线;E:GSE103479 队列中,高、低风险组患者 Kaplan-Meier 生存曲线;F:GSE103479 队列中,预测患者 1 年、3 年、5 年生存的 ROC 曲线。

图 3 COAD 预后预测模型准确性验证结果

Note. A, Sample layout diagram of high- and low-risk groups. B, Scatter plot of survival status of TCGA-COAD patients. C, Kaplan-Meier survival curves for patients in the high- and low-risk groups in the TCGA-COAD cohort. D, ROC curves predicting 1 year, 3 years and 5 years survival in the TCGA-COAD cohort. E, Kaplan-Meier survival curves for high- and low-risk patients in the GSE103479 cohort. F, ROC curves predicting 1 year, 3 years and 5 years survival in the GSE103479 cohort.

Figure 3 Validation results of the COAD prognosis prediction model

2.4 15-基因预测模型独立性验证

为了评估 15-基因模型的预后独立性,课题组结合了 TCGA-COAD 队列患者的年龄、病理分级、T、N 分期等临床病理信息进行了 *Cox* 回归分析。单因素 *Cox* 回归分析的结构显示,riskscore 是 COAD 患者独立的预后因素 (HR = 1.086, 95% CI = 1.063 ~ 1.095, *P* < 0.001) (图 4A)。同样的,多因素 *Cox* 回归分析显示,riskscore 同样可以作为 COAD 患者的独立预后因素 (HR = 1.086, 95% CI = 1.068 ~ 1.105, *P* < 0.001) (图 4B)。最后结合患者临床病理信息和 riskscore,课题组绘制了用于评估患者 1 年、3 年和 5 年生存率的列线图 (图 4C),同时绘制了校正曲线评估预测生存率和实际生存率差异,结果显示,预测生存率和实际生存率拟合度较高 (图 4D ~ 4F)。综上所述,课题组构建的 COAD 预后风险评估模型可以作为临床独立预后因素用于预测其生存状态。

2.5 高、低风险组富集分析结果

为了评估高、低风险组患者生物学功能以及所参与的信号通路差异,课题组对高、低风险组样本间进行了差异分析,筛选获得 733 个差异表达基因,随后课题组对这些基因进行了 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析结果显示这些基因大多富集在膜电位调节、肌肉系统过程、突触前、神经元细胞体、信号

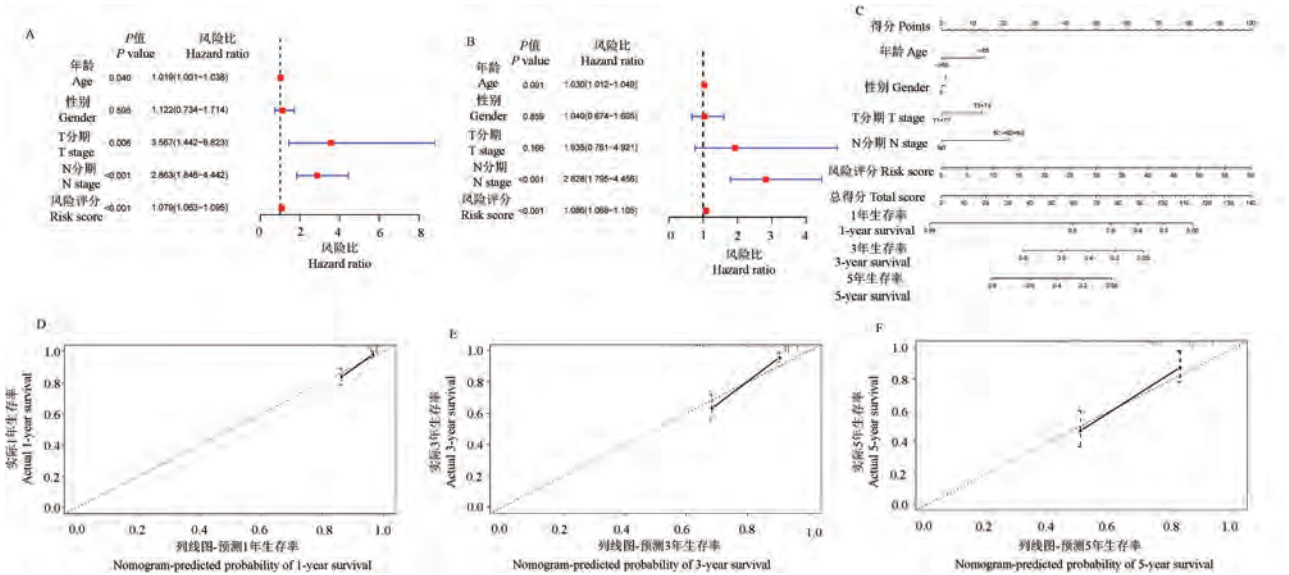
受体激活剂活性、受体配体活性等 GO 条目上 (图 5A)。KEGG 富集分析结果显示这些基因大多数富集在神经活性配体-受体相互作用、系统性红斑狼疮、中性粒细胞胞外陷阱形成、钙信号通路等通路上 (图 5B)。

2.6 高、低风险组免疫表型评分分析

为了评估 15-基因预后评估模型可否用于指导 COAD 患者免疫治疗效果,本研究从 TICA 数据库中下载了 COAD 患者的免疫细胞阳性比例 (immune cell proportion score, IPS) 评分,IPS 是用于评估患者免疫检查点抑制剂响应的指标,IPS 评分越高表明免疫治疗的反应越好。如图 6 所示课题组绘制了 TCGA-COAD 队列中高风险组、低风险组中 IPS、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (CLTA4)、程序性死亡受体 1 (PD-1)、程序性死亡配体 1 (PD-L1) 以及程序性死亡配体 2 (PD-L2) 四种 IPS 评分差异图。结果显示低风险组 IPS 评分显著高于高风险组。由此可见,在 COAD 治疗中,低风险组的癌症患者可能更容易在免疫治疗中获益。

2.7 高、低风险组 SNV 突变分析

本研究利用 TCGA 数据库中 COAD 患者的 SNV 突变数据,对高、低风险组基因突变情况进行分析并绘制瀑布图展示其结果。结果显示,高风险组中

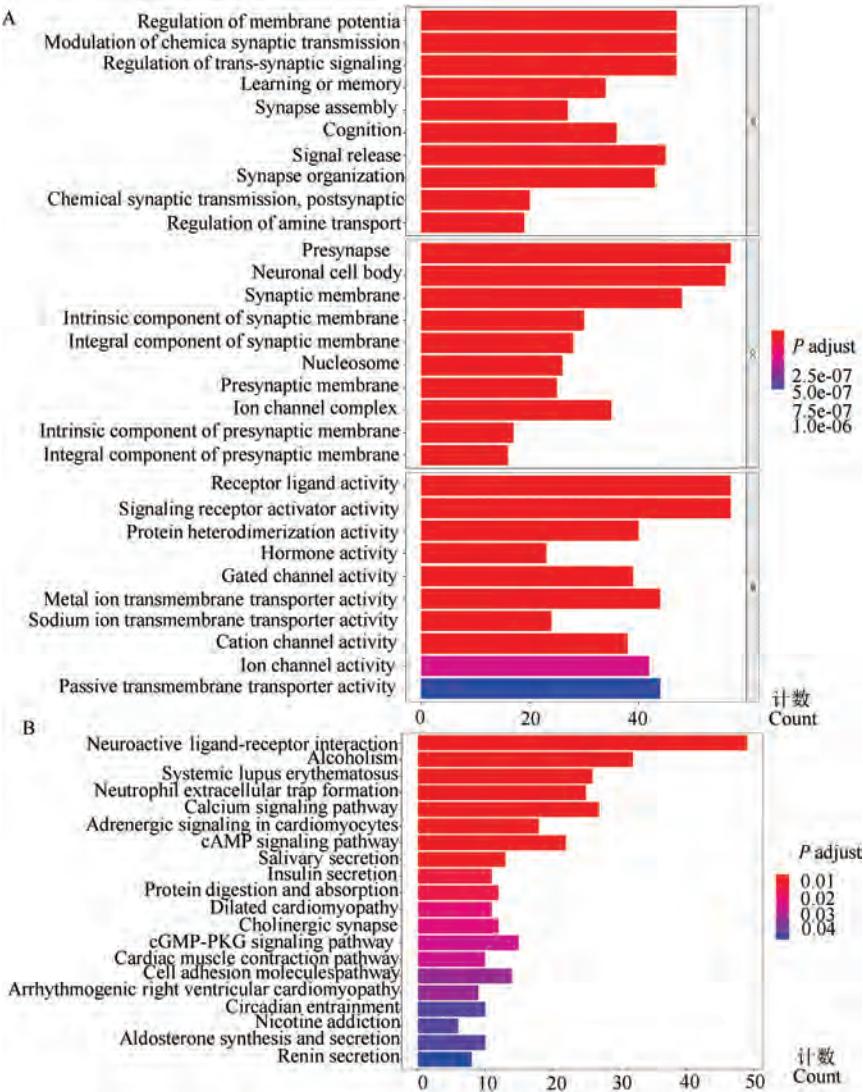


注:A:临床信息单因素 *Cox* 回归分析;B:临床信息多因素 *Cox* 回归分析;C:预测 COAD 患者 1 年、3 年和 5 年生存的列线图;D:1 年生存的校正曲线;E:3 年生存的校正曲线;F:5 年生存的校正曲线。

图 4 15-基因预测模型独立性验证

Note. A, Univariate *Cox* regression analysis of clinical information. B, Multivariate *Cox* regression analysis of clinical information. C, Nomogram predicting 1 year, 3 years and 5 years survival of COAD patients. D, Calibration curve for 1 year survival. E, Calibration curve for 3 years survival. F, Calibration curve for 5 years survival.

Figure 4 Validation of independence of the 15-gene prediction model

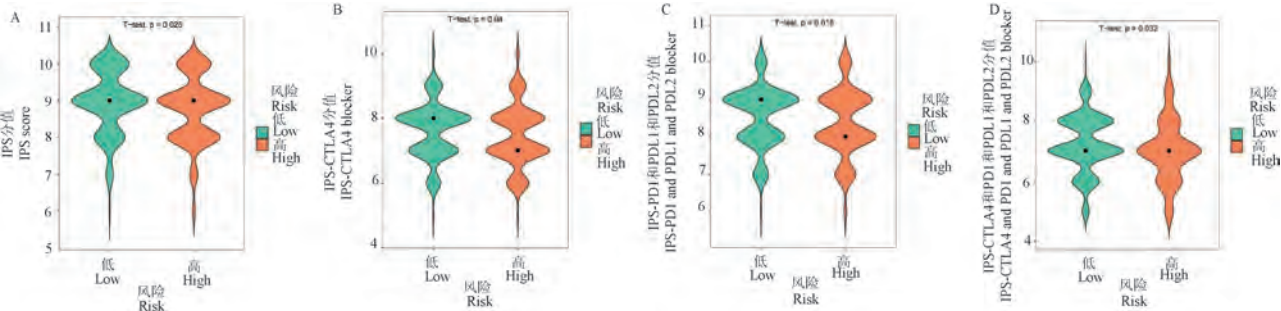


注:A:GO 富集分析结果;B:KEGG 富集分析结果。

图 5 高、低风险组富集分析结果

Note. A, GO enrichment results. B, KEGG enrichment results.

Figure 5 Enrichment analysis results of high- and low-risk groups

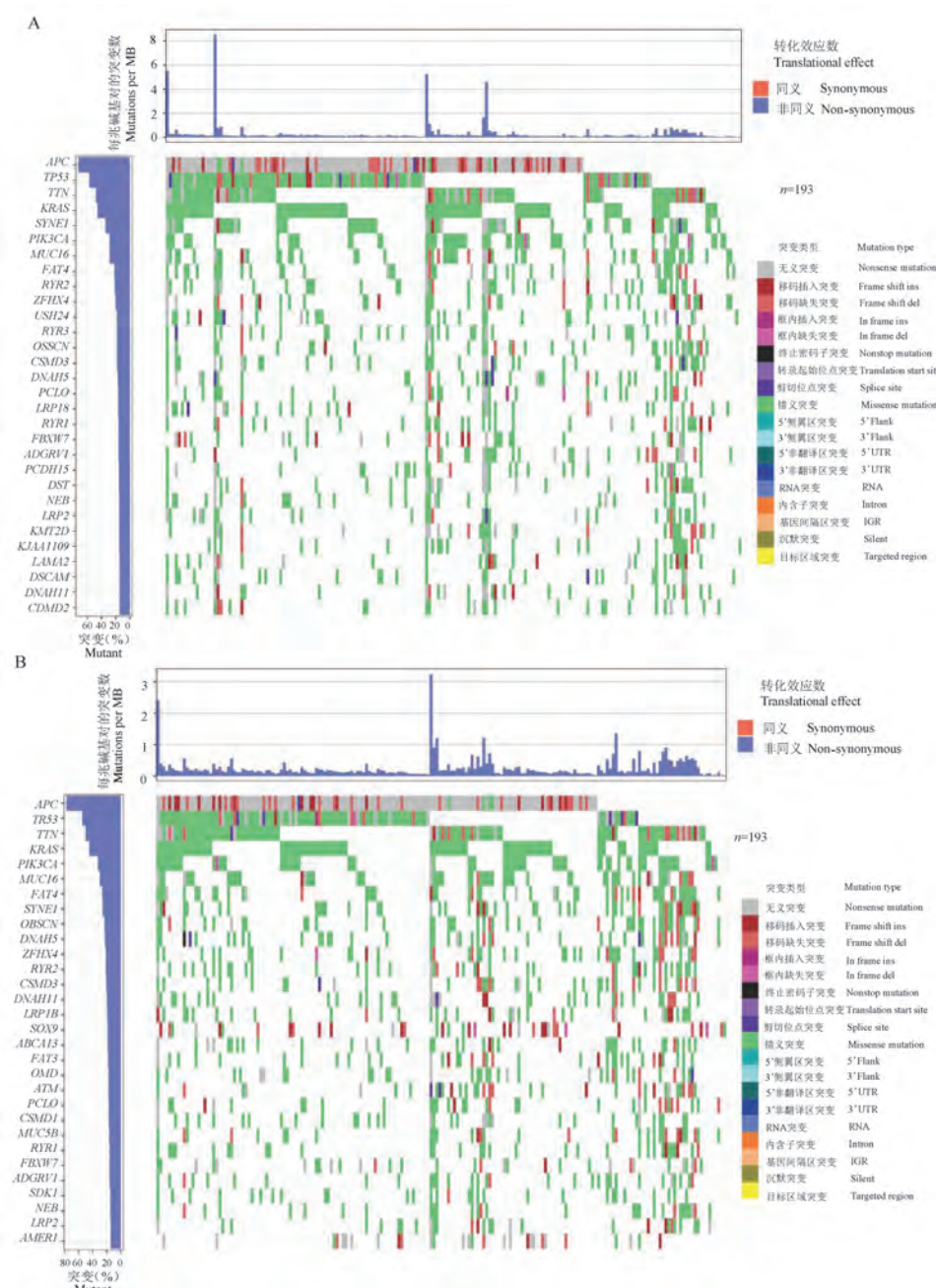


注:A:高、低风险分组的IPS 评分;B:高、低风险分组的IPS-CTLA4 评分;C:高、低风险分组的IPS-PD1/PDL1/PDL2 评分;D:高、低风险分组的IPS-CTLA4/PD1/PDL1/PDL2 评分。

图 6 高、低风险组免疫表型(IPS)评分分析

Note. A, IPS of high-risk and low-risk groups. B, IPS-CTLA4 scores of high-risk and low-risk groups. C, IPS-PD1/PDL1/PDL2 scores of high-risk and low-risk groups. D, IPS-CTLA4/PD1/PDL1/PDL2 scores of high-risk and low-risk groups.

Figure 6 IPS analysis of high- and low-risk groups



注:A:高风险组突变前 41 基因 TMB 瀑布图;B:低风险组突变前 41 基因 TMB 瀑布图。

图 7 CODA 患者不同风险组 SNV 突变分析

Note. A, TMB waterfall of the top 41 mutated genes in high-risk group. B, TMB waterfall of the top 41 mutated genes in low-risk group.

Figure 7 Analysis of SNV mutations in different risk groups of CODA patients

基因突变频率更高,其中高风险组中突变排名前 5 的基因分别为 *APC*、*TP53*、*TTN*、*KRAS*、*PIK3CA* (图 7A),低风险组中突变排名前 5 的基因分别为 *APC*、*TP53*、*TTN*、*KRAS*、*SYNE1* (图 7B)。

3 讨论

目前,免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICI) 治疗是结肠癌患者的有效治疗手段

之一^[7]。但结肠癌患者对 ICI 治疗的总体反应率较低,因此确定患者是否在 ICI 治疗中能够缓解患者病情是重中之重。肿瘤和宿主免疫系统相互作用会影响肿瘤的进展以及患者的生存情况^[8]。虽然近几年课题组对能够预测结肠癌患者的生物标志物进行不断的探索,但目前为止,仍缺少能够有效预测结肠癌患者预后以及 ICI 治疗响应的生物标志物,这也突出了寻找能有助于结肠癌免疫治疗的预

后生物标志物的必要性。

肿瘤微环境中含有多种免疫细胞,以巨噬细胞为代表的先天性免疫细胞异质亚群,在组织稳态、促炎、抗微生物反应以及伤口修复中发挥着重要的作用^[9-10]。本研究利用 WGCNA 将结肠癌中的基因表达数据进行分析,选取巨噬细胞相关基因模块,并对此进行后续分析,创新性的筛选到 15 个特征基因 (*UNC5C*、*CPT2*、*KPNA2*、*APELA*、*ADAMTS8*、*CXXC5*、*GNAZ*、*CD1B*、*C7*、*MPP2*、*TCF7L1*、*NLGN1*、*ARL6IP4*、*PHGDH*、*PRL*) 并由此构建了预后风险评估模型。这 15 个特征基因与其他有关结肠癌预后的特征基因不同。其中保护因素有 8 个,包括 *UNC5C*、*CPT2*、*KPNA2*、*APELA*、*ADAMTS8*、*CXXC5*、*GNAZ*、*CD1B*。*UNC5C* 是 *UNC5* 家族成员,是 Netrin-1 的跨膜受体,在没有 Netrin-1 的情况下可以诱导细胞凋亡。Yuan 等^[11]发现 *UNC5C* 可以通过 integrin $\alpha 6/\beta 4$ 信号通路抑制乳腺癌的恶性进展。*CPT* 家族与 *CPTs* 系统相关,是线粒体定位酶,参与 *FAO* 调控^[12]。Li 等^[13]发现 *CPT2* 可以通过抑制 ROS 的产生,抑制 *wnt/ β -catenin* 信号通路诱导的糖酵解,从而抑制结直肠癌的细胞干性和奥沙利铂耐药性。*KPNA2* 是核转运蛋白家族成员之一,与多种癌症相关蛋白的核质转运途径有关^[14]。Liang 等^[15]研究发现,抑制 *KPNA2* 可以抑制结肠癌细胞的细胞活力、DNA 复制能力,促进细胞凋亡,同时还能降低肿瘤细胞对葡萄糖的消耗量以及 ATP 的生成能力。

风险因素包括 7 个,分别是 *C7*、*MPP2*、*TCF7L1*、*NLGN1*、*ARL6IP4*、*PHGDH*、*PRL*。*NLGN1* 是兴奋性谷氨酸能突出受体中的主要基因,编码一种反式突触蛋白,其作为突触后粘附分子参与谷氨酸能传递的调节^[16]。Yu 等^[17]的研究,将公共数据库中数据和临床数据相结合进行分析,发现 *NLGN1* 在结直肠癌中高表达,且 *NLGN1* 高表达组患者的预后较差。*PHGDH* 与丝氨酸的形成有关,已有研究证明丝氨酸的生物合成会促进肿瘤的发展。Montrose 等^[18]研究发现,*PHGDH* 在结肠癌前期腺瘤性息肉中的表达量显著增加,抑制 *PHGDH* 的表达,可以抑制丝氨酸的合成,延缓肿瘤的进展。*PRL* 家族蛋白酪氨酸磷酸酶参与免疫、代谢、血管生成等多种生理过程^[19-20],是多种恶性肿瘤的潜在生物标志物和治疗靶点。Lian 等^[21]研究发现,*PRL-3* 可以与 *JAM2* 相结合,促进结肠癌细胞的迁移能力和细胞粘附能力。综合以上结论可以看出,课题组用于构

建预后模型的特征基因,不但可以作为结肠癌的生物标志物,还有作为治疗结肠癌靶点的潜力。

为了验证本研究构建的 15-基因预后风险评估模型对免疫治疗的预测能力,课题组对不同风险评分组的患者进行 IPS 打分,发现高风险评分组患者的 IPS 评分要显著低于低风险评分组患者。肿瘤患者的免疫治疗主要是通过调节患者体内的先天性免疫应答。大多数先天性免疫细胞以及相关通路有助于患者的免疫治疗的响应。而巨噬细胞的抗肿瘤活性和促肿瘤活性与巨噬细胞所处环境的氧气含量相关^[22]。Martins 等^[23]发现在缺氧环境下,结肠癌患者中的巨噬细胞会分化呈促炎表型,同时会增加抗肿瘤免疫细胞的浸润情况,患者的预后更好。无独有偶,Forssell 等^[22]发现结肠肿瘤部位巨噬细胞的浸润程度与结直肠癌患者的预后呈正相关,浸润程度越高,患者预后越好。结合研究结果,课题组筛选的基因模块与巨噬细胞免疫浸润程度呈正相关,本研究中利用与免疫高度相关的基因模块构建的预后风险评估模型可能可以用于临床上 COAD 患者预后指导以及免疫治疗响应指导。

综上所述,本研究采用 WGCNA 等生物信息学方法对 TCGA 数据库中的 RNA-seq 数据和 COAD 患者的临床数据进行分析,成功建立了基于 15-基因特征的预后风险评估模型。15-基因模型的预后预测能力良好,表明其具有作为 COAD 新型预后指标的潜力。但本研究仍然有一些局限性。首先,本研究仅利用 TCGA 数据库内的数据进行生物信息与分析,虽然 TCGA 数据库在数量和规模上都很大,但它主要针对高加索人种,因此该模型的适用性需要在更大范围的数据上进行验证。此外,本研究的结果仍需要结合细胞实验以及小鼠实验进行完善和验证,探究本研究筛选到的特征基因对结肠癌发生发展的调控机制。总体而言,本研究为 COAD 的基础研究提供了思路和方向,为临床上 COAD 患者的预后判断提供参考。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] Qiu H, Cao S, Xu R. Cancer incidence, mortality, and burden in China: a time-trend analysis and comparison with the United States and United Kingdom based on the global epidemiological data released in 2020 [J]. Cancer Commun, 2021, 41(10): 1037-1048.
- [3] Rong Z, Rong Y, Li Y, et al. Development of a novel six-

- miRNA-based model to predict overall survival among colon adenocarcinoma patients [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 26.
- [4] Xu L, Xiao T, Xu L, et al. Identification of therapeutic targets and prognostic biomarkers in cholangiocarcinoma via WGCNA [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 977992.
- [5] Wang Y, Li Z, Zhang Z, et al. Identification ACTA2 and KDR as key proteins for prognosis of PD-1/PD-L1 blockade therapy in melanoma [J]. *Animal Model Exp Med*, 2021, 4(2): 138–150.
- [6] Charoentong P, Finotello F, Angelova M, et al. Pan-cancer immunogenomic analyses reveal genotype-immunophenotype relationships and predictors of response to checkpoint blockade [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(1): 248–262.
- [7] Lichtenstern CR, Ngu RK, Shalapour S, et al. Immunotherapy, inflammation and colorectal cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 618.
- [8] Upadhyay S, Sharma N, Gupta K, et al. Role of immune system in tumor progression and carcinogenesis [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119: 5028–5042.
- [9] Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 58.
- [10] Salah A, Li Y, Wang H, et al. Macrophages as a double-edged weapon: the use of macrophages in cancer immunotherapy and understanding the cross-talk between macrophages and cancer [J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(3): 429–440.
- [11] Yuan M, Xie F, Xia X, et al. UNC5C-knockdown enhances the growth and metastasis of breast cancer cells by potentiating the integrin α 6/ β 4 signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(1): 139–150.
- [12] Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, et al. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects [J]. *Mol Aspects Med*, 2004, 25(5–6): 495–520.
- [13] Li H, Chen J, Liu J, et al. CPT2 downregulation triggers stemness and oxaliplatin resistance in colorectal cancer via activating the ROS/Wnt/ β -catenin-induced glycolytic metabolism [J]. *Exp Cell Res*, 2021, 409(1): 112892.
- [14] Han Y, Wang X. The emerging roles of KPNA2 in cancer [J]. *Life Sci*, 2020, 241: 117140.
- [15] Liang YC, Su Q, Liu YJ, et al. Centromere protein A (CENPA) regulates metabolic reprogramming in the colon cancer cells by transcriptionally activating karyopherin Subunit α 2 (KPNA2) [J]. *Am J Pathol*, 2021, 191(12): 2117–2132.
- [16] Hannou L, Bélanger-Nelson E, O'Callaghan EK, et al. Regulation of the neuroligin-1 gene by clock transcription factors [J]. *J Biol Rhythms*, 2018, 33(2): 166–178.
- [17] Yu Q, Wang X, Yang Y, et al. Upregulated NLGN₁ predicts poor survival in colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 884.
- [18] Montrose DC, Saha S, Foronda M, et al. Exogenous and endogenous sources of serine contribute to colon cancer metabolism, growth, and resistance to 5-fluorouracil [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(9): 2275–2288.
- [19] Bernard V, Young J, Chanson P, et al. New insights in prolactin: pathological implications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(5): 265–275.
- [20] Zhao H, Gong S, Shi Y, et al. The role of prolactin/vasoinhibins in cardiovascular diseases [J]. *Animal Model Exp Med*, 2023, 6(2): 81–91.
- [21] Lian S, Meng L, Xing X, et al. PRL-3 promotes cell adhesion by interacting with JAM2 in colon cancer [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 1661–1666.
- [22] Forsell J, Oberg A, Henriksson ML, et al. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(5): 1472–1479.
- [23] Martins F, Oliveira R, Cavadas B, et al. Hypoxia and macrophages act in concert towards a beneficial outcome in colon cancer [J]. *Cancers*, 2020, 12(4): 818.

[收稿日期] 2023-03-08

杜晓霜,刘萍,邓映,等. 基于 Nrf-2/HO-1 探究甘草锌对黄褐斑小鼠的治疗作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 80-87.

Du XS, Liu P, Deng Y, et al. Exploring the therapeutic effect of licorice zinc on chloasma mice via the Nrf-2/HO-1 pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 80-87.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.009

基于 Nrf-2/HO-1 探究甘草锌对黄褐斑小鼠的治疗作用

杜晓霜,刘萍,邓映,杨洪秋,杜宇*

(西南医科大学附属中医医院医学美容中心,四川 泸州 646000)

【摘要】目的 探讨甘草锌对黄褐斑的治疗作用。**方法** 将 36 只 BALB/c 小鼠平均分为空白组、模型组、甘草锌低剂量组、甘草锌中剂量组、甘草锌高剂量组和氨甲环酸组,用 100 mJ/cm² UVB 照射联合 15 mg/kg 黄体酮注射进行黄褐斑造模,后对小鼠进行氨甲环酸(0.065 g/kg)与甘草锌低(0.65 g/kg)/中(1.3 g/kg)/高(2.6 g/kg)剂量连续治疗 14 d。取皮肤进行 HE、Masson-Fontana 染色;并检测皮肤和外周血中 SOD、MDA、GSP-Px、TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 含量;皮肤组织中浆蛋白 Nrf-2、核蛋白 Nrf-2、HO-1 表达水平。**结果** 与模型组相比较,高剂量甘草锌组黑色素细胞形成、胶原细胞坏死与炎症浸润减少($P<0.01$),MDA、IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 表达和浆蛋白 Nrf-2 表达降低($P<0.01$),GSP-Px、SOD 表达和核蛋白 Nrf-2、HO-1 表达增加($P<0.01$)。**结论** 甘草锌激活 Nrf-2/HO-1 通路启动 HO-1、SOD 和 GSP-Px 高表达抗氧化应激,从而减少黑色素形成。

【关键词】 甘草锌;Nrf-2/HO-1 通路;黄褐斑;氧化应激;炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0080-08

Exploring the therapeutic effect of licorice zinc on chloasma mice via the Nrf-2/HO-1 pathway

DU Xiaoshuang, LIU Ping, DENG Ying, YANG Hongqiu, DU Yu*

(Medical Cosmetic Center, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

【Abstract】Objective To investigate the therapeutic effect of licorice zinc on melasma. **Methods** Thirty-six BALB/c mice were equally divided into blank group, model group, licorizinc low-dose group, licorizinc medium-dose group, licorizinc high-dose group and tranexamic acid group. Melasma was induced by 100 mJ/cm² UVB irradiation combined with 15 mg/kg progesterone injection. Mice were treated with tranexamic acid (0.065 g/kg) and low (0.65 g/kg), medium (1.3 g/kg), or high (2.6 g/kg) doses of zinc licorice for 14 days. Skin was taken for HE and Masson-Fontana staining and measurement of SOD, MDA, GSP-Px, TNF- α , IL-1 β , IL-6, plasma protein Nrf-2, nuclear protein Nrf-2 and HO-1 expression levels. **Results** Compared with model group, high-dose licorice zinc group showed decreased melanocyte formation, collagen cell necrosis, and inflammatory infiltration ($P<0.01$); decreased MDA, IL-6, IL-1 β , TNF- α and plasma protein Nrf-2 expression ($P<0.01$); and increased GSP-Px, SOD and nuclear protein Nrf-2 and HO-1 expression ($P<0.01$). **Conclusions** Zinc licorice activates the Nrf-2/HO-1 pathway to initiate high expression of HO-1, SOD and GSP-Px and fight oxidative stress, thereby reducing melanogenesis.

【Keywords】 licorice zinc; Nrf-2/HO-1 pathway; chloasma; oxidative stress; inflammation

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

[基金项目] 泸州市科技局(2019-SYF-42)。

[作者简介] 杜晓霜(1989—),女,硕士,研究方向:中医美容。E-mail: ymzx2516303@163.com

[通信作者] 杜宇(1970—),女,硕士,主任医师,研究方向:皮肤美容。E-mail: Duyu5035@126.com

黄褐斑是女性颜面常发的获得性色素增多性皮肤病,其病因及发病机制复杂,与光老化和激素相关。目前其治疗仍是皮肤科的难题之一。黄褐斑可引起表皮角质层变薄,皮肤屏障受损,继发炎症致使黑色素细胞含量增加。而黑色素合成涉及一系列的氧化反应。研究表明,Nrf-2/HO-1 通路与炎症和氧化应激有着千丝万缕的关系,因此该通路于黄褐斑研究是一个合适的靶点^[1]。甘草锌是甘草酸与锌结合的有机制剂,同时具备抗炎、抗氧化、促进愈合、调节免疫等作用。广泛应用于痤疮、糙皮病等皮肤病。因此,本研究将基于 Nrf-2/HO-1 通路研究甘草锌对黄褐斑小鼠的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 36 只,体重(20±2)g,6~8 周龄。购于成都达硕生物科技有限公司[SCXK(川)2020-0030],饲养于西南医科大学实验动物中心[SYXK(川)2023-0065]。本动物实验研究经过西南医科大学实验动物福利伦理委员会的批准(20220112-001),实验动物饲养和实验过程中严格遵守 3R 原则,给予动物人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

氨甲环酸(sigma 公司,货号:2207452);甘草锌颗粒(南京瑞年百思特制药有限公司,国药准字 H20153318);苏木精染液(武汉塞维尔生物科技有限公司,CR22002071);伊红染液(合肥博美生物科技有限责任公司,YE2080);IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、GSH-Px、MDA、SOD 等 ELISA KIT(上海茁彩生物科技有限公司,货号依次为 ZC-37974、ZC-37988、ZC-39024、ZC-38196、ZC-38015、ZC-38036);Nrf2 兔抗(Abcam 公司,Ab62352);HO-1 兔抗、生物素化山羊抗兔 IgG(H+L)(affinity 公司,货号:AF5393、s0001);Lamin B1 和 β -actin 抗体(abclonal 公司,货号:A1910、AC026);细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(beyotime 公司,P0027);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(beyotime 公司,P0009)。透射电子显微镜(日本电子(JEOL),型号:JEM-1400FLASH);组织处理机、玻璃制刀机和超薄切片机(徠卡,型号依次为:EM TP、EM KMR3 和 EM UC7);酶标仪(美谷分子仪器有限公司,型号:SpectraMAX Plus384);FLUKO 超细匀浆器(弗鲁克(上海)流体机械制造有限公司,型号:F6/10-10G)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立

将 36 只雌性 BALB/c 小鼠随机均分为 6 组,每组 6 只。每只小鼠背部除毛约 3 cm×3 cm 区域,每周除毛 1 次,共 4 次。一组空白小鼠正常饲养,其余 5 组小鼠建立黄褐斑模型^[2],在小鼠后肢肌肉内注射 15 mg/kg 黄体酮,每天 1 次,连续 30 d,期间每隔 1 d 以 100 mJ/cm² 波长(波长 312 nm)的 UVB 照射 1 h。以此诱导小鼠皮肤色素沉着,造模小鼠黄褐斑。

1.3.2 分组及给药

甘草锌成人剂量为 5 g/70 kg(每天 2 次),根据成人到小鼠的换算系数 9.1,算得小鼠的等效剂量为 0.65 g/kg,作为甘草锌低剂量组,将等效剂量的 2 倍(1.3 g/kg)和 4 倍(2.6 g/kg)剂量作为甘草锌中、高剂量组。氨甲环酸颗粒成人剂量为 500 mg/70 kg,换算成小鼠等效剂量为 0.065 g/kg。BALB/c 小鼠黄褐斑造模完成后,氨甲环酸组小鼠灌服氨甲环酸 0.065 g/kg,每天 1 次;甘草锌低剂量组小鼠灌服甘草锌 0.65 g/kg,每天 2 次;甘草锌中剂量组小鼠灌服甘草锌 1.3 g/kg,每天 2 次;甘草锌高剂量组小鼠灌服甘草锌 2.6 g/kg,每天 2 次;模型组与空白组不予给药,灌服等量生理盐水。连续进行 14 d。

1.3.3 采集标本

小鼠眼眶后静脉丛采血,4℃放置 1 h 后于 3000 r/min 离心 15 min,分离血清并于-20℃保存。小鼠背部除毛,采用断颈处死小鼠,用 75%乙醇消毒除毛区域。无菌剪刀采集 1 cm×1 cm 小鼠除毛区域色素沉着处皮肤,一部分用甲醛固定用于组织染色切片,另一部分剪碎并研磨至匀浆状态,后按照 1:9 的比例加入生理盐水制备成 10%的皮肤组织匀浆,充分混匀,4000 r/min 离心 10 min,取上清置于 4℃备用。

1.3.4 Masson-Fontana 染色检测黄褐斑小鼠皮肤黑色素细胞形成

肉眼观察鼠背部裸露皮肤红斑、色素沉着、毛发光泽度等状态,各组小鼠皮肤组织取下后用 40%甲醛水溶液固定,脱水处理后用石蜡包埋切片,脱蜡后进行 Masson-Fontana 染色,显微镜下观察并保存图片,并利用 Imagine 6.0 图像处理软件对黑色素颗粒进行计数。

1.3.5 HE 染色观察小鼠皮肤病理改变

各组小鼠皮肤组织取下后用 40%甲醛水溶液固定,脱水处理后用石蜡包埋切片,脱蜡后进行 HE

染色,通过 HE 染色切片观察甘草锌处理后对小鼠黄褐斑皮肤病理的影响。

1.3.6 ELISA 检测小鼠皮肤匀浆氧化应激指标和炎症指标含量

采用 ELISA 检测皮肤匀浆和外周血中氧化应激指标(SOD、MDA 及 GSP-Px)及炎症指标(TNF-α、IL-1β 及 IL-6)含量。将目标抗体包被于 96 孔微孔板中,制成固相载体,向微孔中分别加入标准品或者样本,其中的目标连接于固相载体上的抗体结合,然后加入过氧化物酶标记的抗体,将未结合的抗体洗净后再次加入 TMB 底物显色。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),并计算样品浓度。

1.3.7 Western blot 检测小鼠皮肤 Nrf-2/HO-1 通路相关蛋白的表达

采用 Western blot 测定小鼠皮肤组织中 Nrf-2、HO-1 等 Nrf-2/HO-1 通路相关蛋白的表达水平。按照蛋白提取试剂盒说明书分别提取组织细胞中的核蛋白和浆蛋白,后用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度;蛋白经过变性、上样、电泳、转膜、封闭后,依次加入一抗,4℃孵育过夜,加入二抗,室温孵育 2~3 h;ECL 显色,用天能 GIS 机箱控制软件 V2.0 对条带进行曝光扫描,结果以目的蛋白相对表达量表示。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad Prism 9.0.1 软件进行作图与统计,两组比较采用 *t*-test 方法进行,多组之间比较用 One-way ANOVA。以 *P*<0.05 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 甘草锌颗粒对黄褐斑小鼠皮肤外观的影响

通过小鼠皮肤外观图片结果可知(图 1),与空白组相比,模型组小鼠背部出现大片褐色色素沉着斑。与模型组相比,甘草锌治疗组治疗 14 d 后,小鼠背部色斑随着甘草锌剂量的增高而减淡;氨甲环酸干预后小鼠背部色斑减淡较显著。

2.2 甘草锌颗粒对黄褐斑小鼠皮肤黑色素细胞形成的影响

UVB 照射后小鼠皮肤开始出现红斑,而后变为褐色,着色较深,手感较硬。Masson-Fontana 染色结果显示(图 2),模型组对比空白组黑素细胞明显生成,UVB 照射小鼠诱导皮肤黑素细胞产生的模型成立。通过对小鼠皮肤组织中黑色素颗粒计数,结果显示空白组小鼠皮肤组织中黑色素细胞无显著变化,模型组小鼠皮肤组织中黑色素细胞显著增加(14.00±1.00);与模型组相比,甘草锌低剂量(10.00±1.00)、甘草锌中剂量(6.67±0.58)、甘草锌高剂量(5.33±0.58)和氨甲环酸组(2.67±0.58)中黑色素细胞显著降低。可知黑色素细胞数目随甘草锌浓度增加而减少,且氨甲环酸抑制黑色素细胞形成的能力高于甘草锌。

2.3 甘草锌颗粒对小鼠皮肤病理的影响

相比于空白组,模型组表皮有所增厚,棘细胞层数增加;真皮层较多胶原纤维坏死,坏死区见少量炎性细胞浸润及纤维组织增生。低剂量和中剂

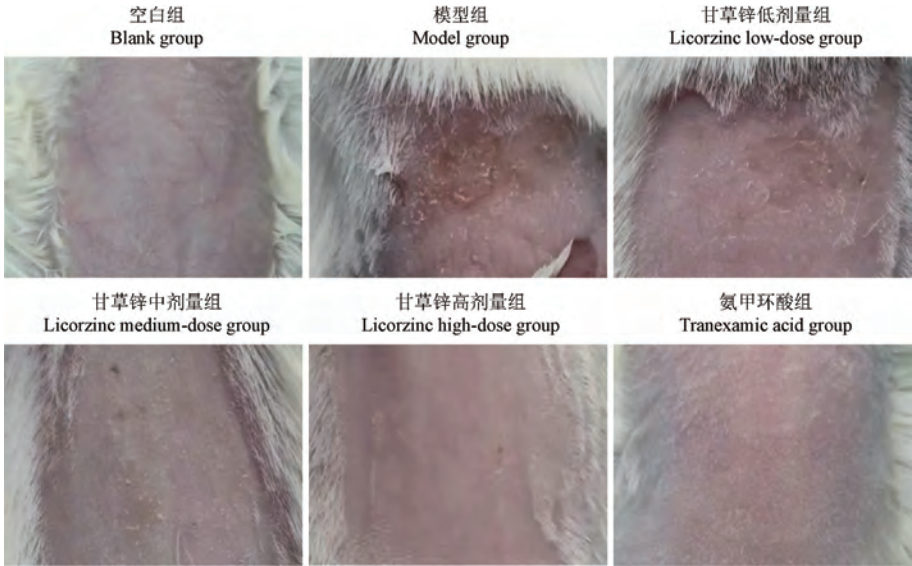


图 1 各组小鼠背部皮肤外观图

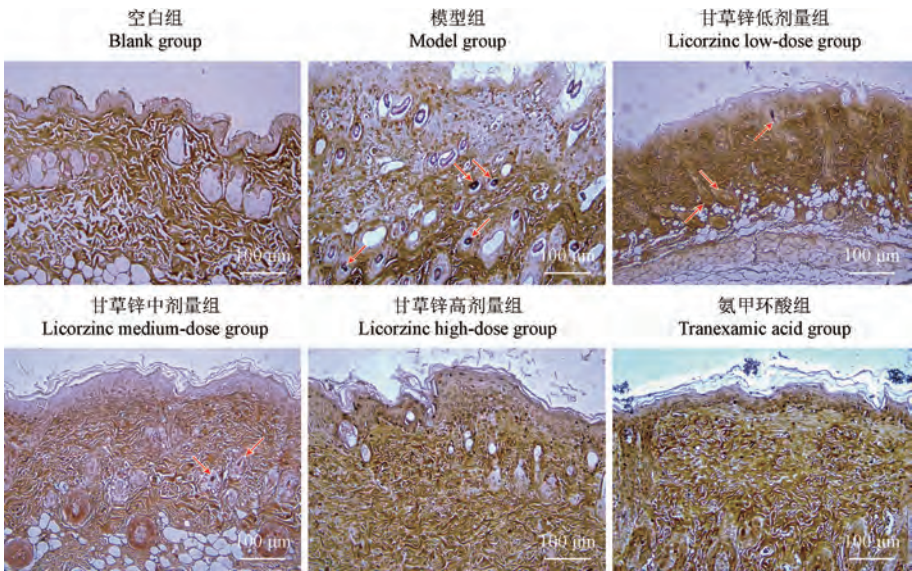
Figure 1 Appearance diagram of back skin of mice in each group

量甘草锌治疗后,无明显炎性细胞浸润,真皮层胶原纤维坏死及纤维组织增生减少,但表皮增厚现象无明显改善。高剂量甘草锌与氨甲环酸治疗后,炎性细胞浸润、表皮增厚现象及真皮层胶原纤维组织增生减少,各治疗组组织病理情况相同,损伤程度不同(图3)。

2.4 甘草锌颗粒对小鼠皮肤匀浆及外周血中氧化应激指标的影响

氧化应激指标含量测定结果如表1、表2所示,

黄褐斑造模后,GSP-Px 在小鼠皮肤组织和外周血中含量下降($P<0.05$),MDA 含量增加($P<0.001$);与模型组相比,高剂量甘草锌明显升高小鼠皮肤组织和外周血中 GSP-Px、SOD 含量($P<0.05$),降低 MDA 含量($P<0.05$),并表现明显的剂量依赖;此外,氨甲环酸干预后,MDA 含量显著降低($P<0.01$)。与空白组相比,模型组小鼠皮肤 SOD 含量显著下降($P<0.01$);而几组药物干预组中,只有高剂量甘草锌治疗后 SOD 含量明显增加($P<0.05$)。

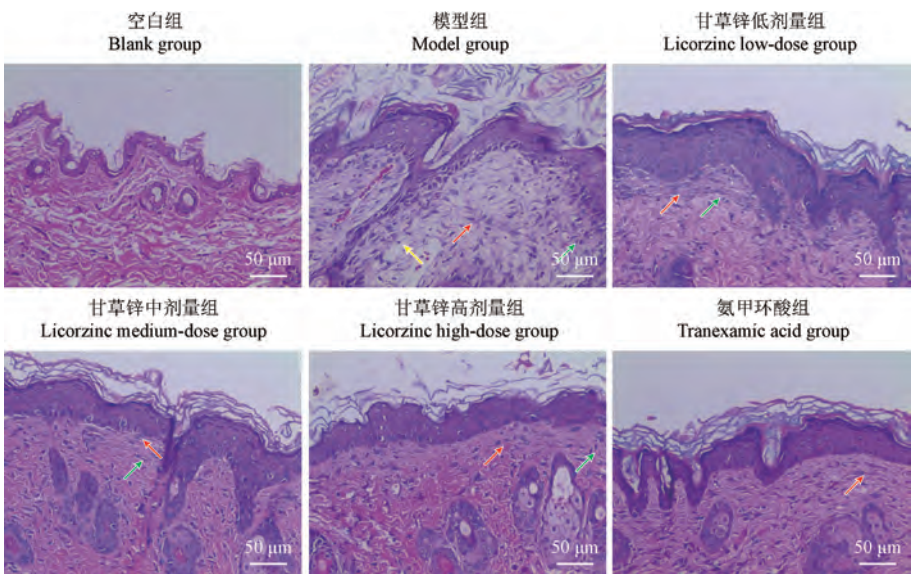


注:红色箭头表示黑色素颗粒。

图2 各组对黑色素细胞形成的影响

Note. Red arrows indicate melanin granules.

Figure 2 Effect of each group on melanocyte formation



注:红色箭头表示成纤维细胞;绿色箭头表示纤维细胞;黄色箭头表示淋巴细胞。

图3 各组小鼠皮肤组织病理 HE 染色

Note. Red arrows indicate fibroblasts. Green arrows indicate fibrocytes. Yellow arrows indicate lymphocytes.

Figure 3 HE staining of skin histopathology of mice in each group

2.5 甘草锌颗粒对小鼠皮肤匀浆及外周血中炎症指标的影响

小鼠皮肤组织及外周血中炎症指标含量测定结果如表 3、表 4 所示,研究发现,与空白组相比,模型组 IL-1 β 、IL-6 与 TNF- α 含量均显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比,甘草锌低剂量组小鼠皮肤

中 IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 含量变化不具有统计学意义,血液中 IL-6、IL-1 β 含量降低 ($P < 0.05$);甘草锌中剂量组小鼠皮肤和外周血中 IL-6 与 IL-1 β 含量均有所下降 ($P < 0.05$);而甘草锌高剂量组小鼠皮肤和外周血中 IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 均下降 ($P < 0.01$);氨甲环酸组 IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 均下降 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠皮肤氧化应激指标含量 ($n = 6$)
Table 1 Contents of oxidative stress indicators in skin of mice in each group

组别 Groups	GSP-Px (U/mL)	MDA (nmol/mL)	SOD (ng/mL)
空白组 Blank group	51.70 $\pm$ 5.94	0.59 $\pm$ 0.20	2.222 $\pm$ 0.08
模型组 Model group	35.07 $\pm$ 4.89 [*]	1.66 $\pm$ 0.07 ^{***}	1.53 $\pm$ 0.15 ^{**}
甘草锌低剂量组 Licorzinc low-dose group	39.32 $\pm$ 5.21	1.21 $\pm$ 0.24 [#]	1.71 $\pm$ 0.16
甘草锌中剂量组 Licorzinc medium-dose group	42.66 $\pm$ 2.98	1.12 $\pm$ 0.24 [#]	1.83 $\pm$ 0.12
甘草锌高剂量组 Licorzinc high-dose group	46.20 $\pm$ 3.93 [#]	0.70 $\pm$ 0.09 ^{###}	1.94 $\pm$ 0.16 [#]
氨甲环酸组 Tranexamic acid group	43.80 $\pm$ 4.52	0.95 $\pm$ 0.21 ^{##}	1.85 $\pm$ 0.16

注:与空白组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ 。
Note. Compared with the blank group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$.

表 2 各组小鼠外周血中氧化应激指标含量 ($n = 6$)
Table 2 Content of oxidative stress indicators in peripheral blood of mice in each group

组别 Groups	GSP-Px (U/mL)	MDA (nmol/mL)	SOD (ng/mL)
空白组 Blank group	53.32 $\pm$ 3.09	0.79 $\pm$ 0.057	0.92 $\pm$ 0.05
模型组 Model group	22.20 $\pm$ 1.99 ^{***}	1.84 $\pm$ 0.10 ^{***}	0.52 $\pm$ 0.06 ^{**}
甘草锌低剂量组 Licorzinc low-dose group	33.78 $\pm$ 1.57 [#]	1.54 $\pm$ 0.10 [#]	0.66 $\pm$ 0.05 [#]
甘草锌中剂量组 Licorzinc medium-dose group	43.43 $\pm$ 3.57 ^{###}	1.33 $\pm$ 0.16 ^{##}	0.76 $\pm$ 0.10 ^{##}
甘草锌高剂量组 Licorzinc high-dose group	50.86 $\pm$ 4.66 ^{###}	1.06 $\pm$ 0.15 ^{###}	0.88 $\pm$ 0.04 ^{##}
氨甲环酸组 Tranexamic acid group	48.00 $\pm$ 5.38 ^{###}	1.17 $\pm$ 0.13 ^{##}	0.84 $\pm$ 0.03 ^{##}

注:与空白组比较, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ 。
Note. Compared with the blank group, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$.

表 3 各组小鼠皮肤炎症指标含量 ($n = 6$)
Table 3 Contents of skin inflammatory indicators in mice of each group

组别 Groups	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
空白组 Blank group	18.36 $\pm$ 1.89	11.99 $\pm$ 0.99	82.71 $\pm$ 3.25
模型组 Model group	26.50 $\pm$ 1.03 ^{***}	17.30 $\pm$ 1.27 ^{**}	114.8 $\pm$ 9.76 ^{***}
甘草锌低剂量组 Licorzinc low-dose group	24.11 $\pm$ 2.51	16.46 $\pm$ 0.99	111.1 $\pm$ 2.38
甘草锌中剂量组 Licorzinc medium-dose group	22.49 $\pm$ 1.07 [#]	15.10 $\pm$ 0.58 [#]	102.2 $\pm$ 8.89
甘草锌高剂量组 Licorzinc high-dose group	21.22 $\pm$ 1.19 [#]	13.59 $\pm$ 0.98 ^{##}	95.88 $\pm$ 7.01 ^{##}
氨甲环酸组 Tranexamic acid group	22.22 $\pm$ 2.23 [#]	14.59 $\pm$ 0.82 [#]	98.67 $\pm$ 5.85 [#]

注:与空白组比较, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the blank group, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

2.6 甘草锌颗粒对小鼠皮肤 Nrf-2/HO-1 通路的影响

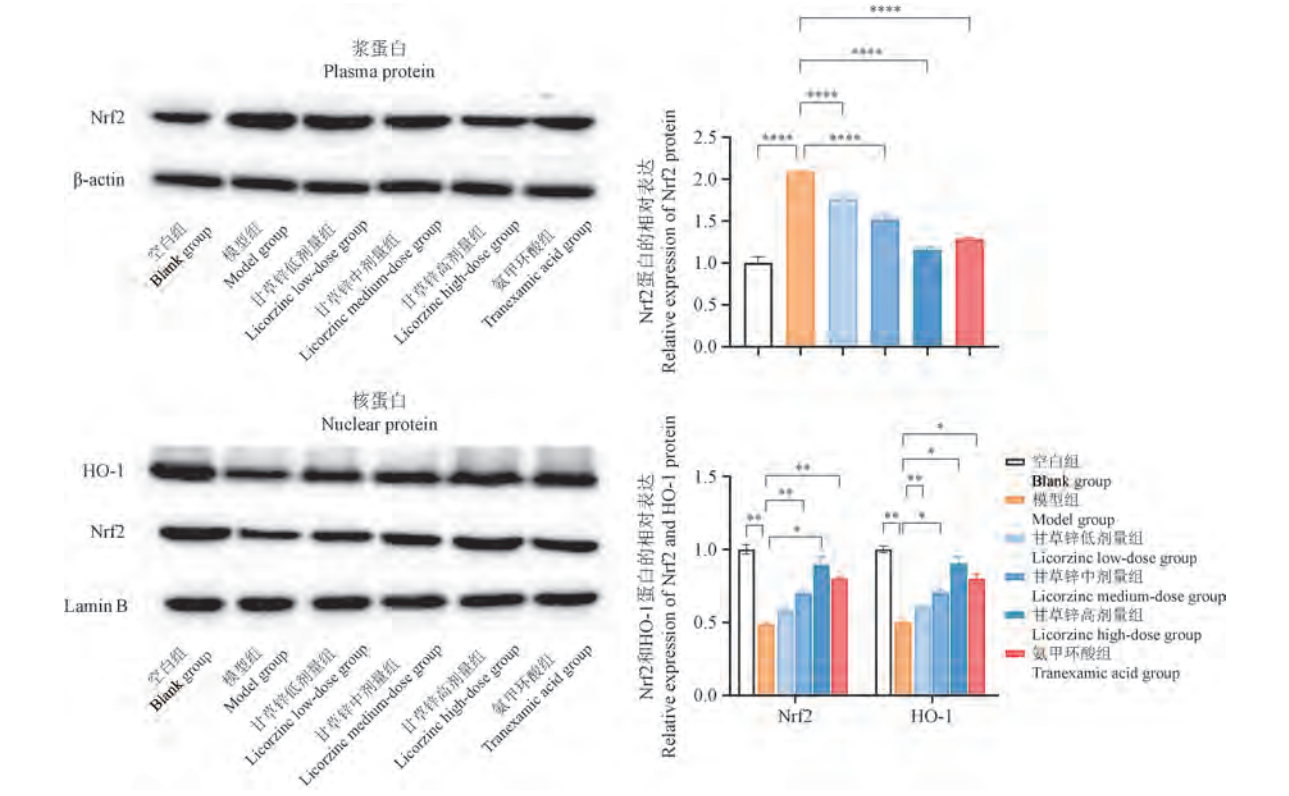
浆蛋白中以 β -actin 为内参, Western blot 方法测定 Nrf2 蛋白含量;核蛋白中以 Lamin B 为内参,测定 Nrf2 与 HO-1 含量(图 4)。结果显示相比于空白组,模型组浆蛋白中 Nrf2 蛋白的含量显著增加($P<0.0001$);而核蛋白中 Nrf2 蛋白的含量显著降低($P<0.01$)。相比于模型组,各治疗组中浆蛋白的

Nrf2 含量显著降低($P<0.0001$),其中以甘草锌高剂量组下调浆蛋白中 Nrf2 表达最为明显,氨甲环酸次之,中、低剂量甘草锌再次之;各治疗组相比于模型组,各治疗组中核蛋白的 Nrf2 与 HO-1 含量明显升高,具有统计学意义($P<0.05$)。甘草锌高剂量治疗组上调核蛋白中 Nrf2 与 HO-1 表达最为明显,氨甲环酸次之,中、低剂量甘草锌再次之。

表 4 各组小鼠外周血炎症指标含量($n=6$)

Table 4 Contents of inflammatory indicators in peripheral blood of mice in each group			
组别 Groups	IL-1 β (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
空白组 Blank group	11.70 $\pm$ 0.51	8.70 $\pm$ 0.545	57.94 $\pm$ 7.94
模型组 Model group	22.08 $\pm$ 0.65 ^{***}	15.51 $\pm$ 0.80 ^{***}	92.62 $\pm$ 3.94 ^{***}
甘草锌低剂量组 Licorzinc low-dose group	19.60 $\pm$ 1.02 [#]	13.27 $\pm$ 0.69 [#]	85.72 $\pm$ 5.65
甘草锌中剂量组 Licorzinc medium-dose group	17.99 $\pm$ 0.38 ^{##}	11.85 $\pm$ 0.65 ^{##}	76.39 $\pm$ 4.51 [#]
甘草锌高剂量组 Licorzinc high-dose group	15.00 $\pm$ 0.92 ^{###}	10.46 $\pm$ 0.95 ^{###}	65.88 $\pm$ 2.12 ^{###}
氨甲环酸组 Tranexamic acid group	15.71 $\pm$ 0.79 ^{###}	10.65 $\pm$ 1.06 ^{###}	68.58 $\pm$ 4.31 ^{##}

注:与空白组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$,^{###} $P<0.001$ 。
Note. Compared with the blank group, *** $P<0.001$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, ^{###} $P<0.001$.



注:两组间相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,**** $P<0.0001$ 。

图 4 各组小鼠皮肤检测浆蛋白 Nrf2 和核蛋白 Nrf2 和 HO-1 的表达水平

Note. Compared between two groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

Figure 4 Expression levels of plasma protein Nrf2 and nuclear proteins Nrf2 and HO-1 were detected in the skin of mice in each group

3 讨论

黄褐斑的发病涉及多种因素和多个环节。研究发现黄褐斑的发生与多种因素相关,包含遗传、紫外线照射、氧自由基与氧化应激、情绪变化、内分泌失调、机体系统性病变等因素。常采用肌内注射黄体酮、紫外线照射和紫外联合肌内注射黄体酮 3 种方法建立黄褐斑小鼠模型^[3]。紫外线作为一种具有提高酪氨酸酶活性而刺激黑色素细胞分裂的外源性刺激因素,还能促进黑色素细胞中黑素小体的分泌导致皮肤色素沉着^[4]。而黄体酮具有促进黑色素细胞的增殖和合成黑色素的重要作用,最终导致色素沉着而加剧黄褐斑^[5]。众多研究证实黄体酮联合紫外线作用小鼠能够兼顾黄褐斑形成的内外因素,是稳定建立黄褐斑小鼠模型的重要方法之一。研究表明,参与黄褐斑的发生及发展的重要环节包含酪氨酸酶活性增高、血管反应性增强、微循环障碍、炎症反应及氧化和抗氧化失衡等过程^[6-7]。针对不同黄褐斑形成及发病环节,国内外多采用系统或局部应用氨甲环酸、维生素 C 等药物^[8-10];辅以激光、强脉冲光、微针、中医疗法等方式综合治疗,以抑制酪氨酸酶活性、阻碍黑素的生成和转运、促进已生成的黑色素代谢,从而改善黄褐斑^[11-13]。

目前,甘草锌在治疗黄褐斑尚无研究,但因为甘草锌的抗炎、抗氧化效果与黄褐斑的治疗原则相符,本研究便通过小鼠黄褐斑造模,以阳性药物氨甲环酸和不同剂量甘草锌进行治疗,研究甘草锌的治疗效果及可能的作用靶点。研究表明,甘草锌也具备抑制黑素细胞形成的能力,但其能力明显弱于氨甲环酸;病理结果显示,甘草锌和氨甲环酸均显著缓解皮肤角质层增厚,减少炎性细胞浸润,对黄褐斑形成区的淋巴细胞具有清除作用。但对坏死区已形成的成纤维细胞核纤维细胞无明显改善。

从分子生物学角度来看,ELISA 结果显示,高剂量甘草锌显著增强氧化应激指标中 GSP-Px 和 SOD 的表达,显著降低 MDA 的表达。GSP-Px 是动物体内的一种过氧化物分解酶,胞浆 GSP-Px 能清除在细胞呼吸代谢过程中产生的过氧化物和羟自由基,从而减轻细胞膜多不饱和脂肪酸的过氧化作用;SOD 是一种能够通过清楚 ROS 保护细胞免受损伤的抗氧化剂;而 MDA 是一种能引起细胞代谢及功能障碍的脂质过氧化产物,能够加速机体衰

老^[14-15]。因此 GSP-Px 和 SOD 的表达上调和 MDA 的下调反映了甘草锌强大的抗氧化作用,且高剂量的甘草锌抗氧化能力强于氨甲环酸。与此同时,炎症指标中 IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 均有明显下降,中剂量的甘草锌就能达到较好的抗炎效果,但高剂量的甘草锌抗炎效果仍不如氨甲环酸。因此笔者认为甘草锌的抗氧化能力应作为甘草锌药物的主要开发靶点,而非抗炎作用。

Nrf-2/HO-1 通路是动物机体内抗氧化应激通路,研究表明当细胞产生氧化应激或暴露在外源性有毒物质时,细胞浆中的 Nrf2 进入细胞核内与抗氧化反应元件 ARE 结合,诱导下游多种保护性基因表达,如 GSH-Px、SOD 与 HO-1 等,这些基因表达的蛋白最终通过抗氧化应激来保护细胞^[16-17]。本研究发现造模后浆蛋白中 Nrf2 的表达水平明显升高,而核蛋白中的 Nrf2 和 HO-1 表达显著降低;在甘草锌与氨甲环酸处理后的模型中,浆蛋白中 Nrf2 的表达水平明显降低,而核蛋白中的 Nrf2 和 HO-1 表达显著升高。Nrf2 在核内才能激活 Nrf2/ARE 通路,HO-1 是 Nrf2/ARE 通路下游抗氧化系统的重要组成部分,同时也是核内表达的抗氧化酶^[18]。本研究结果提示甘草锌能促进 Nrf2 侵入核内激活 Nrf2/ARE 通路,最终靶向 GSH-Px、SOD 与 HO-1,大大提高细胞的抗氧化能力。高剂量甘草锌提高 GSH-Px、SOD 与核内 Nrf2、HO-1 表达的能力强于阳性药物氨甲环酸,因此甘草锌在抑制黑色素生成、细胞抗氧化方面的药物开发大有可为。本研究评估了甘草锌治疗黄褐斑的可行性,为黄褐斑的治疗提供参考,具有十分重要的临床意义。

参考文献:

[1] Li Y, Zhu Z, Zhang T, et al. Ligustrazine attenuates inflammation and oxidative stress in a rat model of arthritis via the Sirt1/NF- κ B and Nrf-2/HO-1 pathways [J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(9): 824-831.

[2] 苗明三,付珍娜,曹利华. 黄褐斑动物模型制备规范(草案) [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5): 649-653.

Miao MS, Fu ZN, Cao LH. Standard specification for animal models of chloasma (draft) [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2017, 28(5): 649-653

[3] 武晏屹,田硕,苗明三. 基于数据挖掘的黄褐斑动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 70-75.

Wu YY, Tian S, Miao MS. Analysis of the use of animal models of chloasma based on data mining [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 70-75.

[4] Yang J, Zeng J, Lu J. Mechanisms of ultraviolet - induced

- melasma formation; a review [J]. J Dermatol, 2022, 49: 1201–1210.
- [5] Im S, Lee ES, Kim W, et al. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocytes [J]. J Korean Med Sci, 2002, 17(1): 58–64.
- [6] Sheth VM, Pandya AG. Melasma; a comprehensive update: part I [J]. J Am Acad Dermatol, 2011, 65(4): 689–697.
- [7] Arrowitz C, Schoelermann AM, Mann T, et al. Effective tyrosinase inhibition by thiamidol results in significant improvement of mild to moderate *Melasma* [J]. J Invest Dermatol, 2019, 139(8): 1691–1698, e6.
- [8] Akl EM. Liposomal azelaic acid 20% cream vs hydroquinone 4% cream as adjuvant to oral tranexamic acid in melasma; a comparative study [J]. J Dermatolog Treat, 2022, 33(4): 2008–2013.
- [9] Badran Aya Y, Ali Ahmed U, Gomaa Ahmed S. Efficacy of topical versus intradermal injection of Tranexamic Acid in Egyptian melasma Patients; a randomised clinical trial [J]. Australas J Dermatol, 2021, 62(3): e373–e379.
- [10] Menon A, Eram H, Kamath PR, et al. A split face comparative study of safety and efficacy of microneedling with tranexamic acid versus microneedling with vitamin C in the treatment of melasma [J]. Indian Dermatol Online J, 2019, 11(1): 41–45.
- [11] Elmorsy E, Aboukhadr N, Tayyeb M, et al. Low-power fractional carbon dioxide laser followed by jessner’s peel versus jessner’s peel alone for the treatment of *Melasma* [J]. J Clin Aesthet Dermatol, 2021, 14(2): 61–67.
- [12] Adel S, Serri A, Abd El-Raheem T. Study of autologous platelet-rich-plasma versus its combination with intense pulsed light in treatment of melasma [J]. Dermatol Ther, 2021, 34(4): e15008.
- [13] Ustuner P, Balevi A, Ozdemir M. A split-face, investigator-blinded comparative study on the efficacy and safety of Q-switched Nd:YAG laser plus microneedling with vitamin C versus Q-switched Nd:YAG laser for the treatment of recalcitrant melasma [J]. J Cosmet Laser Ther, 2017, 19(7): 383–390.
- [14] 王彩霞. 美肤散对黄褐斑模型小鼠 SOD、MDA、TYR、LF 和黑色素细胞的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(23): 5394–5396.
- Wang CX. Effects of meifu powder on SOD, MDA, TYR, LF and melanocytes in chloasma model mice [J]. Chin J Gerontol, 2021, 41(23): 5394–5396.
- [15] 王花, 乜国雁, 张萍, 等. 高原药食两用植物羌薹醚提取物对衰老小鼠免疫器官和 SOD、MDA、GSH-Px 水平的影响 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 58–60.
- Wang H, Nie GY, Zhang P, et al. Effects of plateau region plant Brassica rapa ether extracts to immune organ and SOD, MDA and GSH-Px of the aging-model mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2014, 25(1): 58–60.
- [16] 刘薇, 王红霞, 王立魁, 等. COX-2/Nrf2/ARE 信号通路 with 体内外的抗炎、抗氧化作用机理 [J]. 生命科学, 2011, 23(10): 1027–1033.
- Liu W, Wang HX, Wang LK, et al. COX-2 and Nrf2/ARE signaling pathways in anti-inflammation and antioxidation in vivo and in vitro [J]. Chin Bull Life Sci, 2011, 23(10): 1027–1033.
- [17] Luo C, Urgard E, Vooder T, et al. The role of COX-2 and Nrf2/ARE in anti-inflammation and antioxidative stress; aging and anti-aging [J]. Med Hypotheses, 2011, 77(2): 174–178.
- [18] Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat; role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes [J]. Mutat Res Toxicol Environ Mutagen, 2010, 696(1): 69–80.

[收稿日期] 2023-03-26

吴旭颖,陈敏,田玉书,等. 探究不同类型饮水对小鼠生长和粪便菌群的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 88-95.
Wu XY, Chen M, Tian YS, et al. Effects of different types of drinking water on growth and fecal flora of mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 88-95.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.010

探究不同类型饮水对小鼠生长和粪便菌群的影响

吴旭颖,陈 敏,田玉书,李 斌,张文明,刘云波*

(北京华阜康生物科技股份有限公司,北京 102200)

【摘要】 目的 探讨不同类型饮水对小鼠的生长和粪便菌群的影响。**方法** 选取 SPF 级 NIH 小鼠,分成 5 组,每组 32 只,雌雄各半,分别饲喂纯净水(对照组)、酸化水、碱化水、弱酸水和固体水,连续监测 20 d 饮食和体重,实验结束后取动物粪便样本,用细菌 16S rDNA 通用引物扩增 V3-V4 区域,采用 Illumina Miseq 高通量测序平台进行测序,使用生物信息学方法进行微生物群落分析、 α 多样性分析和 β 多样性分析。**结果** 在体重方面,不同 pH 的饮水,雌性小鼠中弱酸水组高于对照组,其他组均低于对照组 ($P>0.05$);雄性小鼠中仅酸化水组的体重高于对照组,其他组均低于对照组,但组间无统计学差异 ($P>0.05$);固体形态水的雌性和雄性小鼠的体重均低于对照组的体重 ($P<0.05$)。在采食和饮水量方面,碱化水组的雌性小鼠饮水和采食量低于其他组,固体水组的饮水量,雌性和雄性小鼠均低于其他组。经 OTU 聚类分析,稀释性曲线说明本次测序的数据量合理。NIH 小鼠粪便菌群共分成五个门,其中拟杆菌门和厚壁菌门占主要地位,属水平上主要是 *Unclassified Porphyromonadaceae*、乳酸杆菌属和另枝菌属。5 种类型饮水的粪便菌群丰度和多样性存在差异, α 分析结果显示,在菌群的丰度和多样性上,酸化水组最高,而在菌群的多样性上,固体水组最低。 β 分析结果显示,固体水组和对照组的粪便菌群最接近,其次分别为碱化水组、酸化水组和弱酸水组。**结论** 通过对不同类型饮水的探索,揭示了固体形态饮水方式对小鼠体重、采食量、饮水量和粪便菌群影响较大,而不同 pH 的饮水影响小鼠的粪便菌群丰度和多样性,尤其是酸化水对小鼠粪便菌群的影响更大。

【关键词】 pH;饮水;高通量测序;粪便菌群

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0088-08

Effects of different types of drinking water on growth and fecal flora of mice

WU Xuying, CHEN Min, TIAN Yushu, LI Bin, ZHANG Wenming, LIU Yunbo*
(Beijing HFK Bioscience Co., Ltd., Beijing 102200, China)

【Abstract】 Objective To explore the effects of different types of drinking water on the growth and fecal flora of mice. **Methods** Specific pathogen-free NIH mice were randomly divided into five groups, 32 mice each group, with half males and half females in each group. The group were given either purified water (control group), acidified water, alkalized water, weakly acidic water or solid water. Diet and body weight were monitored continuously for 20 days. After the experiment, animal fecal samples were collected, and the V3-V4 region was amplified with bacterial 16S rDNA universal primers. An Illumina Miseq high-throughput sequencing platform was used for high-throughput sequencing, and microbial community, α diversity and β diversity were analyzed by bioinformatics method. **Results** The body weight of

female mice given different pH values of weakly acidic water was higher, while the weight of the other groups was lower, than that of the control group ($P>0.05$). The body weight of male mice in the acidified water group was higher, while that of other groups was lower, than that of control group, but there was no statistical difference between the groups ($P>0.05$). The body weights of male and female mice in the solid water group were lower than those in the control group ($P<0.05$). The food and water intake of the female animals in the alkaline water group and the water intake of female animals in the solid water group were lower than those of the other groups. OTU clustering analysis showed that the data volume of the sequencing was reasonable, and the fecal flora species of NIH mice were divided into five phyla, among which *Bacteroides* and *Firmicutes* were dominant. *Unclassified Pseudopurpuromonas*, *Lactobacillus* and *Alistipes* were the main genera. There were differences in fecal flora abundance and diversity among the mice given the five drinking water types. α analysis showed that the acidified water group had the highest flora abundance and diversity, while the solid water group had the lowest flora diversity. β analysis showed that the fecal flora composition in the solid water group was the closest to that of the control group, followed by the alkalized water group, acidified water group and weakly acidic water group. **Conclusions** Through an exploration of the effects of consuming different forms of water, this study revealed that solid water consumption had the greatest effects on body weight, feed intake, water consumption, and fecal flora of mice. The abundance and diversity of fecal flora in mice were affected by different pH values of drinking water, especially acidified water.

[Keywords] pH; drinking water; high-throughput sequencing; fecal flora
 Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

我国实验动物饮水是参照人的饮用水标准,普通级实验动物饮水应符合国家标准《生活饮用水卫生标准》(GB 5749),清洁级和无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级实验动物饮水要求无菌^[1]。为保障实验动物饮水质量,很多单位普遍采用加酸或碱的方式来控制微生物污染。饮用酸化水是否对实验动物的繁殖性能产生影响有不同的报道^[2],也有研究证实,酸化水可调节动物胃肠道pH从而发挥抑菌作用,达到提高生产效益的作用^[3]。在实验动物运输过程中,饮水主要靠添加固体形态的水,但对固体形态水与正常饮水的区别研究较少。本研究对两种类型的饮水做了初步探讨。

随着基因测序、生物信息学等分析工具的广泛使用,对动物肠道微生物的认识和了解越来越多,已有大量文献报道肠道菌群从消化、营养、吸收、能量供应、脂肪代谢、免疫调节、药物代谢和毒性等诸多方面影响宿主的健康状况^[4]。据尹业师等^[5]对影响ICR小鼠肠道菌群的六类影响因素的研究报道,饲养环境和饲料是主要影响小鼠肠道菌群变化的因素,而品种、个体和性别等因素的影响较小,年龄因素仅在动物生长发育早期有表现。水也是动物体所需的最基础和重要的营养元素^[6-7],参与机体的新陈代谢、维持水和电解质的平衡、调节机体体温和润滑等多种生理功能^[8-9],据Bowyer等^[10]对英国85对同卵双胞胎的饮用水、饮水习惯及肠道菌群关系的研究,发现饮用水成分与人体的肠道菌群组成有关,水中的钠离子、氯化物和硫酸盐与肠道

菌群有显著关联。另外,据周坤^[11]和Dias等^[12]的报道也证实不同类型饮水可影响小鼠肠道菌的组成。2022年Vanhaecke等^[13]在营养学杂志发表关于4种饮用水(瓶装水、自来水、过滤水和井水)及饮水量与粪便肠道菌群的关系,发现井水饮用者 α 多样性最高,瓶装水饮用者较自来水饮用者的毛螺菌科显著增加,饮水量低组比饮水量高组有更高比例的弯曲杆菌属。

综上所述,不同类型饮水可引起机体粪便菌群变化,且饮水的水质也是引起肠道菌群变化的关键因素之一。针对不同形态、pH饮用水与小鼠粪便菌群的关联研究还很少。因此,本研究在饲养环境和饲料相同的情况下,探究不同类型及pH饮水对实验小鼠生长、饮水量、采食量和粪便菌群的影响,为实验动物的饲养、运输以及肠道菌群研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF级NIH小鼠160只,体重(11 ± 0.5)g,17~18日龄,雌雄各半,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供[SCXK(京)2019-0008]。NIH小鼠均饲养在公司屏障设施内的隔离器[SYXK(京)2019-0022],洁净度为5级,温度(23 ± 3)℃,相对湿度($50\%\pm10\%$),换气次数每小时不低于20次,明暗照明周期为12h/12h。每笼动物4只,自由采食和饮水。饲料为⁶⁰Co照射的小鼠维持料(京饲证(2019)

06076),营养成分:粗蛋白 20.0%、粗脂肪 4.7%、粗灰分 6.6%、粗纤维 3.8%、水分 8.5%、钙 1.18%、磷 0.92%、赖氨酸 1.02%、蛋氨酸 0.5%、胱氨酸 0.35%。每周更换 1 次垫料,进出隔离器的物品严格消毒。本实验方案按照“3R”原则获得北京华阜康生物科技股份有限公司实验动物福利和伦理委员会批准(HFK-AP-20230118)。

1.1.2 受试水样

(1)纯净水(对照):通过亿佰利 YL-100BU-D(V3)制水机对自来水过滤、净化、反渗透等手段来获得 pH=7.0~7.2,电导率 2.0 $\mu\text{s}/\text{cm}$ 。

(2)酸化水:在纯净水的基础上添加分析纯浓盐酸,调整 pH=2.5~2.7。

(3)碱化水:在纯净水的基础上添加分析纯次氯酸钠,调整 pH=8.5~8.7。

(4)弱酸水:在纯净水的基础上添加分析纯浓盐酸,调整 pH=6.5~6.7。

(5)固体水:在纯净水的基础上添加适量琼脂粉,形成的固态水(每个 60 g),pH=7.1~7.3。

1.2 主要试剂与仪器

分析纯浓盐酸(国药集团化学试剂北京有限公司);分析纯次氯酸钠(西陇科学股份有限公司);营养琼脂(北京陆桥技术股份有限公司);E. Z. N. A™ Mag-Bind Soil DNA Kit(OMEGA, M5635-02);Qubit dsDNA HS 分析试剂盒(ThermoFisher, Q32854);2×Hieff® Robust PCR Master Mix (Yeasten, 10105ES03);Hieff NGS™ DNA Selection Beads (Yeasten, 12601ES56)。亿佰利 YL-100BU-D(V3)制水机;上海卓精千分之一电子天平;Pico-21 Thermo Fisher 台式离心机;GL-88B 漩涡混合器;TND03-H-H 混匀型干式恒温器;DYY-6C 电泳仪电源;DYCZ-21 电泳槽;FR-1000 凝胶成像系统;Q33238 ThermoFisher Qubit® 4.0 荧光计;ETC 811 PCR 仪;Research plus 0.5~10 μL Eppendorf 移液器。

1.3 实验方法

1.3.1 饮水饲喂试验

选取 160 只 17~18 日龄 NIH 小鼠,平均体重(11±0.5)g,随机分为 1 个对照组和 4 个试验组,每组 32 只,雌雄各半。对照组饲喂纯净水,试验组分别饲喂酸化水、碱化水、弱酸水和固体水,饮用 20 d,每天称量动物体重、饲料采食量和饮水量。

1.3.2 粪便样本采集

在生物安全柜内,分别对每组 NIH 小鼠无菌操

作采集粪便样本于无菌 1.5 mL EP 管中,粪便重量为 100~200 mg,采集完后立即将所有的样本冻存于-80℃冰箱内。小鼠粪便样本编号为对照组(C2)、酸化水组(S2)、碱化水组(J2)、弱酸水组(R2)、固体水组(G2)。

1.3.3 粪便样本细菌多样性检测

小鼠粪便样本的 16S rDNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成,具体步骤如下,根据试剂盒说明书,使用 E. Z. N. A™ Mag-Bind Soil DNA Kit 对样本进行基因提取,提取的核酸作为 DNA 模板,并使用 Qubit 4.0(Thermo, USA)测量 DNA 浓度以确保已经提取了足够数量的高质量基因组 DNA。根据细菌 16S rDNA V3-V4 区域设计特异引物序列,第一轮采用通用引物进行 PCR 扩增,反应体系为样本 DNA(10 ng/ μL)2 μL ,引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1 μL ,2×Hieff® Robust PCR Master Mix 15 μL ,后补加无菌水到 30 μL ,反应程序为 95℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 20 s,55℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 30 s,反应进行 5 个循环,后 72℃ 延伸 5 min。第二轮扩增,引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物,反应体系为 PCR 产物 20~30 ng,引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1 μL ,2×Hieff® Robust PCR Master Mix 15 μL ,后补加无菌水到 30 μL ,反应程序为 95℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 20 s,55℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 30 s,反应进行 5 个循环,72℃ 延伸 5 min,10℃ 保存。

1.3.4 高通量测序及生物信息学分析

PCR 产物采用 Illumina Miseq 高通量测序平台进行测序,通过质控过滤去除不符合要求的序列,对所得的 5 组样品进行 OTU 聚类分析、菌群多样性分析、菌群群落结构等分析。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 19.0 软件分析,数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异比较采用 *T* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同类型饮水对小鼠体重影响

在实验开始时,雌性小鼠体重平均为 11.2 g,标准差为 0.2 g,雄性小鼠体重平均为 11.8 g,标准差为 0.19 g,方差分析表明无统计学差异,说明动物分组是均衡的。

由表 1 可见,不同 pH 的饮水,对于雌性小鼠,R2 组高于 C2 组,其他组均低于 C2 组;对于雄性小

鼠,仅 S2 组的体重高于 C2 组,其他组均低于 C2 组,无显著差异($P>0.05$)。不同形态饮水,G2 组的小鼠体重,雌性和雄性小鼠都显著低于 C2 组的体重($P<0.05$)。

2.2 小鼠的饮水量和采食量

由表 2 可见,G2 组雌性和雄性小鼠的饮水量均显著低于其他组($P<0.05$)。J2 组雌性小鼠的饮水和饲料采食量低于其他组。

2.3 不同类型饮水对小鼠粪便菌群的影响

2.3.1 等级丰度曲线

使用 usearch 软件对 reads 在 97.0% 的相似度水平下进行聚类,获得 OTU。5 个样品进行处理共获得 395 519 个有效序列,平均每个样品 65 919 个序列,平均每个样品获得 287 个 OTU,表明样品序列的聚类结果比较可靠,可用于下一步样品序列的注释,并且表明本次实验的测序质量比较高。

为验证样品的测序多样性(丰富和均匀程度)是否达到实验要求,基于样品中的 OTU 序列数,将 OTUs 按丰度由大到小等级排序,再以 OTU 等级为横轴,以每个 OTU 中所含的序列数为纵轴来构建 Rank-Abundance 曲线,物种的丰富程度由曲线在横轴上的长度来反映,曲线越宽,表示物种的组成越丰富;物种组成的均匀程度由曲线的形状来反映,曲线越平坦,表示物种组成的均匀程度越高,结果显示所有样品的曲线都趋于平缓(图 1),说明本次

测序的数据量合理,能够覆盖样本的绝大部分微生物。

2.3.2 稀释曲线

稀释曲线是从样本中随机抽取一定数量的序列,统计这些序列对应样本的 α 多样性指数,以抽取的数据量为横轴,以 α 多样性指数值为纵轴绘制曲线,根据曲线是否达到平缓来判断本次测序数据量是否足够。若曲线急剧上升表明测序量不足,需要增加序列条数;反之,则表明样品序列充分,可以进行数据分析。由图 2 可知,本次样品序列充分,后续数据分析可以进行。

2.3.3 粪便菌群结构分析

从门水平聚类分析,NIH 小鼠粪便菌群主要分为拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、糖化细菌门(*Candidatus saccharibacteria*)、其他(other)五个门,其中拟杆菌门和厚壁菌门占主要地位,除 G2 组,其他 4 组这两门占 90% 以上。变形菌门在 G2 组较其他各组占据较高的比例。

从属水平聚类分析,除未分类的菌属,NIH 小鼠粪便中共分成 19 个属,其中 *Unclassified Porphyromonadaceae* 所占比例最高,其次较多的是乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、另枝菌属(*Alistipes*)、*Unclassified Lachnospiraceae*、巴恩斯氏菌属(*Bamesiella*)、拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)、拟杆

表 1 不同 pH 饮水对小鼠体重的影响($n=16,g$)

Table 1 Effects of drinking water at different pH values on animal body weight

组别 Groups	实验开始 Start of experiment		实验结束 End of experiment	
	♀	♂	♀	♂
对照组 C2	11.31±0.26	11.71±0.36	26.40±1.90	34.27±1.36
酸化水组 S2	11.19±0.25	11.87±0.37	25.82±0.85	34.70±1.60
碱化水组 J2	11.23±0.30	11.93±0.16	25.41±1.41	33.13±1.61
弱酸水组 R2	11.18±0.29	11.80±0.31	26.75±1.21	33.19±1.89
固体水组 G2	11.07±0.28	11.63±0.39	25.01±0.63 ^a	31.93±1.26 ^b

注:雌性小鼠,与对照组相比,^a $P<0.05$;雄性小鼠,与对照组相比,^b $P<0.05$ 。
Note. Female mice, compared with C2, ^a $P<0.05$. Male mice, compared with C2, ^b $P<0.05$.

表 2 小鼠饮水量和采食量($n=16$)

Table 2 Water intake and food intake of mice

组别 Groups	♀		♂	
	饮水量 (mL) Water intake	饲料量 (g) Food intake	饮水量 (mL) Water intake	饲料量 (g) Food intake
对照组 C2	2710±9.12	2805±12.03	3355±10.20	2987±13.45
酸化水组 S2	2690±7.19	2818±11.89	3310±9.34	3032±12.74
碱化水组 J2	2510±8.25 ^a	2719±11.30 ^a	3340±9.41	2981±12.46
弱酸水组 R2	2735±9.01	2791±12.05	3460±10.03	2996±11.09
固体水组 G2	1890±8.75 ^a	2773±11.03	2820±9.02 ^b	2899±11.32

注:雌性小鼠,与对照组相比,^a $P<0.05$;雄性小鼠,与对照组相比,^b $P<0.05$ 。
Note. Female mice, compared with C2, ^a $P<0.05$. Male mice, compared with C2, ^b $P<0.05$.

菌属 (*Bacteroides*)、*Unclassified Clostridiales*、*Saccharibacteria genera incertae sedis*、*Unclassified Bacteroides*、*Clostridium XIVa*;而 G2 组的不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 属于优势菌,而其他各组所占比例极低。

2.3.4 α 多样性变化分析

α 多样性可以反映微生物群落的丰度和多样性,其中 shannon 与 shannoneven 指数代表着物种的多样性,物种多样性越高,指数越大,反之越小。Ace 和 chao 指数代表着物种丰度,物种丰度越高,ace 和 chao 指数越大。

由表 3 可见,反映样本的物种多样性 shannon 和 shannoneven 值,G2 和 R2 组的多样性数值最小,说明这两组的多样性较其他组低。而代表着物种丰度的 ace 和 chao 值,可见 S2 组的数值最大,说明此组样本丰度最高,C2 组的值最低,丰度也最低。各组样本的 coverage 值均达到了 1.0,说明样本测序覆盖率较高,实验数据可靠。

2.3.5 β 多样性分析

为研究各组粪便样本菌群物种多样性的差异,对数据进行主坐标分析 (principal co-ordinates

analysis,PCoA),通过 PCoA 可以观察各组间的差异,如果样品距离越接近,表示物种组成结构越相似,群落结构相似度高的样品倾向于聚集在一起,群落差异很大的样品则会远远分开。如图 3 所示,5 组样本可显著区分,其中固体水、碱化水组与对照组最接近,而弱酸水、酸化水组与对照组较远。

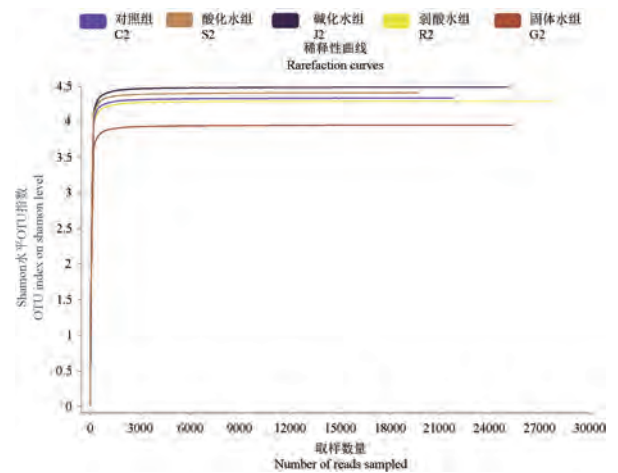


图 2 5 组样本粪便菌群稀释曲线
Figure 2 Fecal flora rarefaction curve of 5 groups of samples

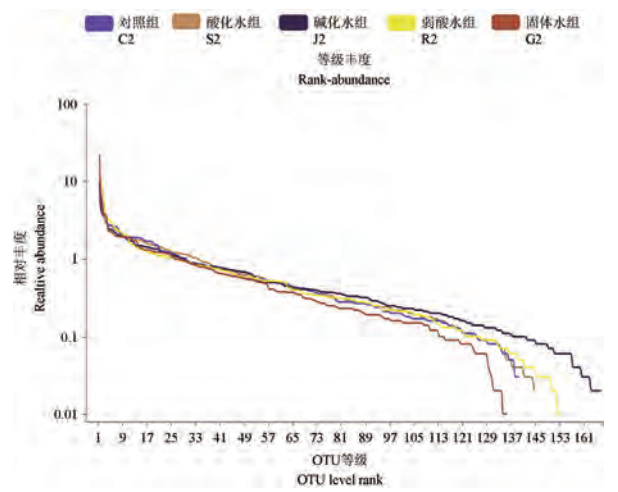


图 1 5 组样本粪便菌群 Rank-Abundance 曲线
Figure 1 Rank-Abundance curve of fecal flora in 5 groups

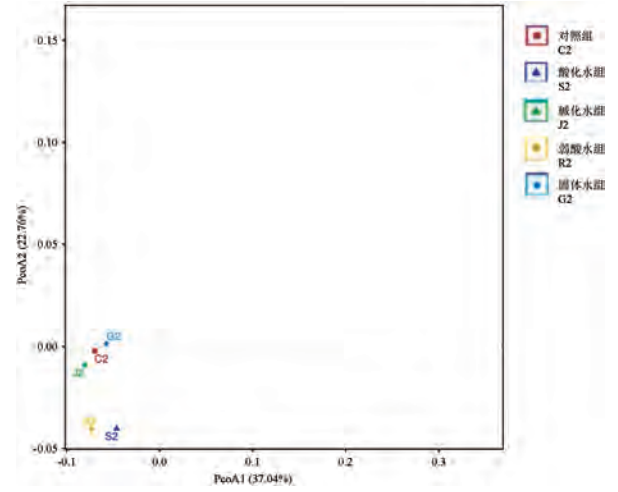


图 3 5 组样本 PCoA 分析图
Figure 3 PCoA analysis of 5 groups of samples

表 3 各组 α 多样性指数统计表
Table 3 α diversity index of each group

组别 Groups	OTU	Shannon	Shannoneven	Ace	Chao	Coverage
对照组 C2	278	4.05	0.72	289.98	293.33	1.00
酸化水组 S2	289	4.07	0.72	304.66	305.92	1.00
碱化水组 J2	291	4.11	0.72	301.44	302.55	1.00
弱酸水组 R2	289	3.85	0.68	297.35	294.70	1.00
固体水组 G2	284	3.42	0.60	297.47	298.29	1.00

3 讨论

3.1 不同 pH 和形态的饮水探讨

通过对 NIH 小鼠的体重、饮水量和采食量的监测,不同 pH 的饮水,R2 组的雌性小鼠体重高于其他各组,S2 组的雄性小鼠体重也高于其他各组,可能与盐酸刺激胃液的消化有关。从生理上看,动物在消化过程中,主要靠胃蛋白酶,而胃的主细胞产生胃蛋白酶原,胃蛋白酶原需经盐酸激活后才能转化为胃蛋白酶,由胃蛋白酶发挥消化作用,而胃蛋白酶原被激活的最佳酸性环境为 $\text{pH} = 1.5 \sim 2.5$ ^[14],实验所采用的酸化水为 $\text{pH} = 2.5$,可能促进了胃蛋白酶原的激活,从而达到促进消化的作用。J2 组较其他组略低,也可能与胃所需要的酸性消化环境有关,但动物自身通过调节也能满足消化。通过表 1 可见,动物饮水的 pH 对其体重的影响较小,是否会对动物存在其他方面的影响需进一步研究探索。

在饮水形态上,通过表 1 可见,G2 组的小鼠体重显著低于 C2 组,且其饮水量和采食量也低于其他液体形态水组。固体形态水虽然能锁住 99% 的水分,但是与液态形式饮水方式还存在差异,可能与其形态增加动物胃肠饱腹感有关,导致其饮水和采食量较其他组低。另外,也有可能动物自身的不适应性,前期需要一段时间的适应,影响其前期体重的增长,导致其后期体重低于其他组。

3.2 5 种饮水的粪便菌群探讨

3.2.1 粪便菌群的丰度和多样性

粪便菌群变化可反映肠道菌群的状态,本研究通过 Illumina Miseq 高通量测序技术对 5 组饮水类型的 NIH 小鼠粪便菌群的丰度和多样性进行整体分析。结果显示,在菌群的丰度上,S2 组的丰度最高,而在菌群的多样性上,S2 组也较高,G2 组最低。故降低水的 pH 可促进肠道菌群的数量和多样性增加,肠道菌群数量增加的同时也抑制肠道致病菌的繁殖,对维持小鼠肠道健康是有益的。另外,G2 组小鼠粪便菌群的多样性明显较其他组低,此种饮水方式可能影响到小鼠肠道微生物的动态平衡。

3.2.2 在门、属水平探讨粪便优势菌群

小鼠肠道优势菌群以拟杆菌门和厚壁菌门为主,这与文献报道结果一致^[15-16]。从门水平上看,C2 组的拟杆菌门菌群比例最高,其他各组都低于 C2 组,尤其是 G2 组出现显著下降。拟杆菌门是一类能促进碳水化合物发酵,参与糖类、胆汁酸和类

固醇代谢如分解蛋白胨或葡萄糖,产生诸如乙酸、甲酸、乳酸和丙酸等代谢产物的菌群,主要功能在于吸收和降解多糖^[17],保护肠道菌群健康和复杂稳态^[18],通过丙酮酸途径产生乙酸、丙酸来抑制肠道炎症的发生^[19]。厚壁菌门主要包括芽孢杆菌目和乳杆菌目,也是维持动物肠道健康的重要菌群。通过菌群门水平分析可见,G2 组的菌群比例也显著低于其他各组。而变形菌门在 G2 组显著增加,变形菌门是主要引发致病的细菌,主要包括大肠杆菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、幽门螺旋杆菌等,其物种丰度增加,常会引发动物的损伤,以致出现腹泻症状,在实验动物运输过程,经常用固体形态水来补充水分,偶尔会发现个别动物出现腹泻,可能与其肠道菌群的变化有关。

NIH 小鼠粪便菌群在属水平上,菌群以 *Unclassified Porphyromonadaceae*、乳酸杆菌属、另枝菌属、*Unclassified Lachnospiraceae*、巴恩斯氏菌属、拟普雷沃氏菌属等为主。*Unclassified Porphyromonadaceae*,S2 组和 R2 组的比例较 C2 组高,而 G2 组显著低于 C2 组,J2 组与 C2 组无差异。乳酸杆菌属具有改善肠道屏障功能的作用,对肠道菌群结构、肠绒毛结构、上皮细胞通透性和 TJS、粘液的分泌和免疫功能有调节作用^[20],从而达到抵抗致病微生物侵袭并增强肠道屏障功能的作用^[21],通过菌群的分析,可见 S2 组和 R2 组的乳酸杆菌属显著高于 C2 组和 J2 组,而 G2 组低于其他各组。另枝菌属和拟杆菌属,各组饮水都低于 C2 组。*Unclassified Lachnospiraceae*,S2 组和 R2 组显著低于 C2 组,J2 组和 G2 组略高于 C2 组。巴恩斯氏菌属可以抑制肠道中有害菌的生长^[22],但 G2 组显著降低。拟普雷沃氏菌属,J2 组与 C2 组一致,其他各组均显著低于 C2 组。不动杆菌属是主要的条件致病菌,但 G2 组却显著增加。

3.3 动物饮水福利

动物福利要求实验动物享有不受饥渴的权利,要求在实验和饲养过程中为动物提供清洁的饮用水,饮水应确保新鲜、充足,经过净化、灭菌或酸化处理,保证饮水质量^[23],但对饮水的适口性研究较少。通过对 5 种类型饮水的摸索发现,NIH 小鼠偏好弱酸水,其次为纯净水、酸化水和碱化水,而对固体形态水最不喜欢。据李红瑞等^[24]对饮用水的口感及影响因素的研究,发现水中的无机成分和有机成分共同决定水的口感,无机成分中阳离子决定了

主要味调,阴离子发挥协调作用,离子含量处于中低平时口感较好。本实验的小鼠偏好弱酸水,可能与其口感有关,酸化水和碱化水中的离子浓度过高,导致其失去水中原有的味道,且带有刺激性气味,导致动物对其不喜好。

本研究揭示了 5 种饮水类型 NIH 小鼠的生长、粪便菌群的变化,发现提高饮水的酸度能改善小鼠粪便菌群的丰度和多样性,且固体形态的饮水方式对小鼠的体重和肠道菌群均有影响,且会增加致病菌的比例。从饮水口感上看,小鼠更喜好 pH 值偏弱酸和中性的水。本实验仅从饮水的 pH 值和形态上进行了比对,具有一定的局限性,希望能为小鼠生产繁育和科研使用的研究者提供参考依据。

参考文献:

[1] 赵明海, 张潇, 谭德讲, 等. 实验动物饮用水质量控制及处理方式的一些探讨 [J]. 实验动物科学, 2008, 25(1): 58-63.
Zhao MH, Zhang X, Tan DJ, et al. Discussion on quality control and treatment of drinking water for experimental animals [J]. Lab Anim Sci, 2008, 25(1): 58-63.

[2] 陈文文, 余强, 王志远, 等. 不同 pH 值饮用水对 SD 大鼠生长发育及血清生化的影响 [J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(1): 61-64, 70.
Chen WW, Yu Q, Wang ZY, et al. Effects of drinking water with different pH values on growth and development and serum biochemistry of SD rats [J]. Lab Anim Comp Med, 2015, 35(1): 61-64, 70.

[3] van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, et al. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy [J]. Avian Pathol, 2006, 35(3): 182-188.

[4] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine [J]. Cell, 2006, 124(4): 837-848.

[5] 尹业师, 王欣. 影响实验小鼠肠道菌群的多因素比较研究 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(4): 12-18.
Yin YS, Wang X. Comparative study for factors that affect microbiota colonization in experimental mice [J]. Lab Anim Sci, 2012, 29(4): 12-18.

[6] Manz F, Wentz A, Sichert-Hellert W. The most essential nutrient: defining the adequate intake of water [J]. J Pediatr, 2002, 141(4): 587-592.

[7] Jéquier E, Constant F. Water as an essential nutrient: the physiological basis of hydration [J]. Eur J Clin Nutr, 2010, 64(2): 115-123.

[8] 马冠生. 水合状态与健康[A]. 2019 中国浙江宁波达能营养中心第二十二届学术会议[C]; 2019.
Ma GS. Hydration status and health[A]. The 22nd Academic

Conference of Danone Nutrition Center, Ningbo, Zhejiang, China [C]; 2019.

[9] 马冠生. 水合状态与健康 [J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(4): 337-341.
Ma GS. Hydration status and health [J]. Chin J Prev Med, 2019, 53(4): 337-341.

[10] Bowyer RCE, Schillereff DN, Jackson MA, et al. Associations between UK tap water and gut microbiota composition suggest the gut microbiome as a potential mediator of health differences linked to water quality [J]. Sci Total Environ, 2020, 739: 139697.

[11] 周坤. 连续多代饮用四种饮用水对小鼠肠道菌群影响的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
Zhou K. The research of the effects on gut microbiota in mice induced by feeding with four kinds of drinking water in several consecutive generations [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.

[12] Dias MF, Reis MP, Acurcio LB, et al. Changes in mouse gut bacterial community in response to different types of drinking water [J]. Water Res, 2018, 132: 79-89.

[13] Vanhaecke T, Bretin O, Poirel M, et al. Drinking water source and intake are associated with distinct gut microbiota signatures in US and UK populations [J]. J Nutr, 2022, 152(1): 171-182.

[14] 张廷燕. 胃蛋白酶合剂中稀盐酸的用量 [J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(5): 318.
Zhang TY. The dosage of dilute hydrochloric acid in pepsin mixture [J]. Chin J Hosp Pharm, 1999, 19(5): 318.

[15] Bezirtoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) [J]. Anaerobe, 2011, 17(6): 478-482.

[16] 曲巍, 张智, 马建章, 等. 高通量测序研究益生菌对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 食品科学, 2017, 38(1): 214-219.
Qu W, Zhang Z, Ma JZ, et al. Effect of probiotics on gut microbiota in mice evaluated by high-throughput sequencing [J]. Food Sci, 2017, 38(1): 214-219.

[17] 杨新宇, 崔嘉, 陈小凤, 等. 应用 Illumina-HiSeq 高通量测序技术分析氨气对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39(5): 948-955.
Yang XY, Cui J, Chen XF, et al. Effects of ammonia on intestinal microbiota diversity of mice analyzed by Illumina-Hiseq high-throughput sequencing technology [J]. Chin J Vet Sci, 2019, 39(5): 948-955.

[18] Zhu S, Ding S, Wang P, et al. Nlrp9b inflammasome restricts rotavirus infection in intestinal epithelial cells [J]. Nature, 2017, 546(7660): 667-670.

[19] Serino M. SCFAs—the thin microbial metabolic line between good and bad [J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(6): 318-319.

[20] Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system [J]. Nature, 2012, 489(7415): 231-241.

[21]

Guilloteau P, Martin L, Eeckhaut V, et al. From the gut to the peripheral tissues; the multiple effects of butyrate [J]. Nutr Res Rev, 2010, 23(2): 366-384.

[22]

吕歌, 张智, 杨可心, 等. 高通量测序分析益生菌对冷食小鼠肠道菌群的干预 [J]. 现代食品科技, 2019, 35(4): 50-55.

Lyu G, Zhang Z, Yang KX, et al. High-throughput sequencing analysis of probiotics intervention in intestinal flora of cold-fed mice [J]. Mod Food Sci Technol, 2019, 35(4): 50-55.

[23]

关宝生, 白雪, 祝丽玲, 等. 影响医学实验动物福利的因素及改善措施 [J]. 黑龙江医药科学, 2014, 37(4): 86-87.

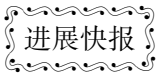
Guan BS, Bai X, Zhu LL, et al. Factors affecting the welfare of medical laboratory animals and improvement measures [J]. Heilongjiang Med Pharm, 2014, 37(4): 86-87.

[24]

李红瑞, 袁梓屹, 王昆朋, 等. 饮用水口感及影响因素分析综述 [J]. 给水排水, 2022, 58(2): 143-151.

Li HR, Yuan ZY, Wang KP, et al. A review of the influence factors on flavor of drinking water [J]. Water Wastewater Eng, 2022, 58(2): 143-151.

[收稿日期]2023-04-14



胰腺导管腺癌类器官模型的建立及个体化治疗策略的筛选

近年来,胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma,PDAC)的发病率明显上升,且PDAC发病隐匿、恶性程度高、化疗反应差异大,导致五年相对生存率低。对癌症患者进行个体化针对性的治疗,可以较大程度改善临床患者预后。类器官(patient-derived organoid,PDO)是由干细胞增殖和分化形成的组织或器官样结构,是近年来新兴的体外3D培养模型。肿瘤PDO模型可以较好地维持原发瘤的组织形态特征。其构建策略是从患者肿瘤组织中提取原代细胞,利用生长因子和基质胶来创建模拟人体内的三维生长环境。类器官能在体外模拟肿瘤细胞的病理状态,与人体临床试验中的药物反应具有更高的相关性,可应用于临床患者的药物筛选,为肿瘤患者的个体化治疗提供了良好的实验平台。此外,通过深度测序或表型分析发现的基因突变和药物治疗靶点,对研究PDAC的发病机制和耐药性具有重要意义。在本研究中,作者重点探索了PDAC类器官模型的培养条件和构建方法,分析了影响类器官模型成功率的主要因素,同时利用病理分析和DNA测序证明了PDAC类器官保持了原发肿瘤组织的生物学特征。进一步选择了四种临床常用的化疗药物进行单一或联合治疗,分析药物在PDO模型中的敏感性,为PDO模型广泛应用于胰腺导管癌患者个体化药物筛选提供思路。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(5): 409-418. <https://doi.org/10.1002/ame2.12352>)。

叶倩宸,徐丹,文富强,等.用于多重免疫荧光染色的小鼠肺组织冰冻切片制备方法优化研究[J].中国比较医学杂志,2024,34(1):96-102.

Ye QC, Xu D, Wen FQ, et al. Optimization of preparation method for lung tissue cryosections for multiplex immunofluorescence staining [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 96-102.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.011

用于多重免疫荧光染色的小鼠肺组织冰冻切片 制备方法优化研究

叶倩宸^{1,2}, 徐丹¹, 文富强^{1,3}, 陈俊¹, 汪涛^{1*}

(1.四川大学华西医院/华西临床医学院呼吸病学研究室,成都 610041;2.四川大学华西医院临床研究管理部,成都 610041;
3.四川大学华西医院呼吸与危重症医学科,成都 610041)

【摘要】 目的 优化小鼠肺组织冰冻切片制作方法,提高肺组织冰冻切片质量,有利于提高免疫荧光染色的特异性,获得更准确可靠的实验结果。**方法** 使用 C57BL/6 小鼠,分别采用传统冷冻后固定法、冷冻前固定法、改良灌注冷冻前固定法 3 种方法制作冰冻切片,经免疫荧光染色后使用激光扫描共聚焦荧光显微镜观察肺组织染色情况。使用荧光显微镜对肺组织切片进行全片扫描,计算单位面积内完整气道数量。**结果** 传统冷冻后固定法制作的小鼠肺组织冰冻切片,肺泡结构破坏,气道壁断裂严重,存在非特异性染色;冷冻前固定法制作的小鼠肺组织切片,肺泡和气管结构相对完整,但肺泡塌陷,部分气道结构破坏;改良灌注冷冻前固定法制作的小鼠肺组织切片,肺泡和气管结构形态均完整、清晰,多重免疫荧光染色定位准确。改良灌注冷冻前固定法制作的小鼠肺组织冰冻切片单位面积内完整气道(直径 $\geq 100\ \mu\text{m}$)数量高于冷冻前固定法($(0.66\pm 0.15)/\text{mm}^2$ vs $(0.33\pm 0.14)/\text{mm}^2$, $P<0.05$),也显著高于传统冷冻后固定法($(0.66\pm 0.15)/\text{mm}^2$ vs $(0.02\pm 0.04)/\text{mm}^2$, $P<0.01$)。**结论** 使用改良灌注冷冻前固定法制作冰冻切片,利于保持小鼠肺组织形态完整,利于获得高质量的多重免疫荧光染色结果。

【关键词】 小鼠;肺组织;冰冻切片;免疫荧光

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0096-07

Optimization of preparation method for lung tissue cryosections for multiplex immunofluorescence staining

YE Qianchen^{1,2}, XU Dan¹, WEN Fuqiang^{1,3}, CHEN Jun¹, WANG Tao^{1*}

(1. Laboratory of Pulmonary Diseases, West China Hospital/West China School of Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China. 2. Department of Clinical Research Management, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041. 3. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041)

【Abstract】 Objective Optimizing the preparation method to improve the quality of mouse lung cryosections to help enhance the specificity of immunofluorescence staining and obtain more accurate and reliable experimental result. **Methods** C57BL/6 mouse lung tissue was used to make cryosections via the traditional post-freezing fixation method, pre-freezing fixation method, and a modified perfusion pre-freezing fixation method. A laser-scanning confocal microscope was used to observe lung tissue immunofluorescence staining. Whole areas of mouse lung slices were scanned by fluorescence microscope, and the numbers of intact airways per unit area of lung tissue were calculated. **Results** In the lung

【基金项目】 国家自然科学基金(81800015)。

【作者简介】 叶倩宸(1992—),女,硕士,研究实习员,研究方向:呼吸系统疾病发病机制研究。E-mail:yeqianchen@wchscu.cn

【通信作者】 汪涛(1979—),女,博士,高级实验师,研究方向:呼吸系统疾病的基础与应用基础研究。E-mail:tao.wang@scu.edu.cn

cryosections made via the traditional post-freezing fixation method, the alveoli structure was damaged, the airway wall was seriously disrupted, and there was non-specific staining. Lung cryosections made via the pre-freezing fixation method showed relatively intact alveolar and airway structures but collapsed alveoli and several destroyed airways. In the lung cryosections obtained via the modified perfusion pre-freezing fixation method, the structure and morphology of the alveoli and airways were intact and clear. Additionally, the locations of multiple proteins targeted with immunofluorescence staining were accurate. The number of intact airways (diameter $\geq 100 \mu\text{m}$) per unit area in the lung cryosections obtained via the modified perfusion pre-freezing fixation method was higher than that from cryosections made using the pre-freezing fixation method ($(0.66 \pm 0.15)/\text{mm}^2$ vs $(0.33 \pm 0.14)/\text{mm}^2$, $P < 0.05$) and was also significantly higher than that from sections made using the traditional post-freezing fixation method ($(0.66 \pm 0.15)/\text{mm}^2$ vs $(0.02 \pm 0.04)/\text{mm}^2$, $P < 0.01$).

Conclusions The modified perfusion pre-freezing fixation method for cryosections is conducive to maintaining the integrity of mouse lung tissue morphology and obtaining high-quality multiplex immunofluorescence staining result.

[Keywords] mice; lung tissue; cryosections; immunofluorescence

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

石蜡切片和冰冻切片均可用于免疫荧光染色^[1]。石蜡切片用于免疫荧光染色时,需要经过脱蜡、抗原修复等复杂的步骤,自发荧光较重^[2-3]。样本固定时间的长短、不同的抗原修复方法、非特异抗原的封闭条件和缓冲液的成分都会影响抗原的完整性,甚至导致假阳性或假阴性结果^[4]。冰冻切片用于多重免疫荧光染色时,操作快速简便,无须经过乙醇、二甲苯等有机试剂处理,能更好地保存酶活性和抗原免疫活性^[5]。小鼠是构建疾病模型的常用实验动物,将小鼠肺组织冰冻切片用于多重荧光染色也是研究呼吸系统疾病常用的实验技术方法^[6-7]。与心脏、肝、肾等实体器官不同,肺组织含有特殊的支气管腔、肺泡腔等气体空腔结构^[8]。冰冻切片本身容易出现切片不完整、刀痕、冰晶、皱褶等常见问题^[9],由于肺组织内的空腔结构没有支撑物,切片时缺乏足够的支撑力,更难以获得组织形态完整的肺切片。因此,普通的冰冻切片制备方法并不适用于肺组织,需探索新的方法来最大限度保持小鼠肺组织形态的完整,避免肺组织出现气道撕裂、肺泡塌陷、组织变形等问题,尽可能精确还原不同实验因素在肺组织内产生的病理变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 C57BL/6 雄性小鼠 9 只,体重 20~22 g,8 周龄,来源于成都药康生物科技有限公司[SCXK(川)2020-0034],在四川大学华西医院实验动物中心屏障动物实验设施进行实验[SYXK(川)2018-0119]。动物实验经华西医院动物伦理委员会批准

(2018049A),实验过程遵循“3R”原则给予动物福利保护。

1.2 主要试剂与仪器

多聚甲醛(Aladdin, A1829035); TritonX-100(Sigma, T8787); OCT(opti-mum cutting temperature compound)冷冻包埋剂(Thermo Fisher 6502); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA; Biofroxx, EZ3412D306); 含 DAPI 封固剂(Abcam, ab104139); Anti-RAGE(receptor for advanced glycation end-products)抗体(Abcam, ab3611); α -SMA(α -smooth muscle actin)抗体(Thermo Fisher, 14-9760-37); CC10(clara cells 10 KD protein)多克隆抗体(R&D system, MAB4218); 山羊抗兔 IgG H&L(Alexa Fluor[®] 488)预吸附二抗(Abcam, ab150081); 山羊抗小鼠 IgG H&L(Alexa Fluor[®] 568)预吸附二抗(Abcam, ab175701); 山羊抗大鼠 IgG H&L(Alexa Fluor[®] 647)预吸附二抗(Abcam, ab150167)。免疫组化笔(Vector, H-4000); 冰冻切片机(Leica, CM3050S); 正置激光扫描共聚焦显微镜(Nikon, A1RMP+); 全自动正置荧光显微镜(Nikon, Ni-E)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠实验前准备

小鼠称重后经腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉,采取仰卧位,四肢固定在解剖台上,喷洒 75%酒精进行体表消毒。剪开小鼠胸腹部皮肤,分离皮下组织,暴露胸腔,心脏穿刺采血。剪断下腔静脉,从小鼠右心室灌注磷酸缓冲盐(phosphate buffer saline, PBS)溶液,去除组织内剩余的血液。剪下心脏,游离组织,充分暴露肺部。

采用以下 3 种方法制备肺组织冰冻切片(每组 3 只)。

1.3.2 传统冷冻后固定法

按 1.3.1 处理后,用显微止血夹夹闭左肺支气管,剪下左肺肺叶,迅速置于液氮中冷冻保存。

1.3.3 冷冻前固定法

按 1.3.1 处理后,用显微止血夹夹闭左肺支气管,剪下左肺肺叶,置于 4% 中性多聚甲醛中 4℃ 固定 12 h,30% 蔗糖溶液脱水 48 h。

1.3.4 改良灌注冷冻前固定法

按 1.3.1 处理后,剪开小鼠颈部皮肤,分离皮下组织,暴露小鼠气管。气管远心端用手术钳夹闭(避免灌注的液体从小鼠口鼻部流出),同时夹闭右肺支气管,从气管软骨环间隙朝向心端插入留置针。从留置针处注入 OCT 冷冻包埋剂和 4% 中性多聚甲醛的混合溶液(1:1, v/v) 至左侧肺叶鼓起(约 200 μL),用手术缝线将左肺肺门扎紧,防止灌注的液体漏出。取下左肺,置于 4% 中性多聚甲醛溶液中 4℃ 固定 6 h,30% 蔗糖溶液脱水 48 h。

1.3.5 冰冻切片

经上述三种方法处理的肺组织置于冰冻切片专用圆形底托上,涂抹 OCT 冷冻包埋剂,经低温凝固后进行切片。肺组织厚度为 5 μm,用粘附玻片吸附。冷冻前固定法和改良灌注冷冻前固定法的组织切片用 PBS 溶液清洗,每次 5 min,清洗 3 次。传统冷冻后固定法的组织切片立即放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 15 min,再用 PBS 溶液清洗 3 次,每次 5 min。

1.3.6 免疫荧光

吸水纸吸干载玻片上组织周围的液体,用免疫组化笔在组织周围画 1 个圈,将 1×PBS/0.3% TritonX-100/5%BSA 混合溶液滴在组织上,室温封闭 1 h。封闭结束后,加入一抗(RAGE 稀释比例 1:600,α-SMA 稀释比例 1:200,CC10 稀释比例 1:50)4℃ 孵育过夜。用 PBS 溶液清洗 3 次,每次 5 min。加入荧光二抗(稀释比例 1:500),室温孵育 2 h。用 PBS 溶液清洗 3 次,每次 5 min。用含有 DAPI 的封固剂封片,随后用透明指甲油固定。使用正置激光扫描共聚焦显微镜观察组织切片。

1.3.7 单位面积内完整气道数量

通过全自动正置荧光显微镜观察组织切片,使用配套软件进行全片采图和肺组织面积计算。按

以下方法统计每平方毫米完整气道(直径 ≥ 100 μm)数量。

单位面积内完整气道数量 = 全片完整气道数量/全片肺组织面积

1.4 统计学方法

所有数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计,采用 Tukey's 检验进行两两比较(GraphPad Prism 9.0)。经统计学处理 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同制备方法获得的小鼠肺组织形态

获取小鼠肺组织时,改良灌注冷冻前固定法需要通过气管灌注 OCT 冷冻包埋剂和 4% 多聚甲醛的混合溶液(后简称包埋固定混合液),冷冻前固定法和传统冷冻后固定法中取肺组织的操作方法是相同的,均无需灌注。改良灌注冷冻前固定法取得的小鼠肺叶组织如图 1 左侧所示,冷冻前固定法和传统冷冻后固定法取到的小鼠肺叶如图 1 右侧所示。由图 1 可知,不同方法获取的肺组织呈现出干净的白色,未夹杂血色,说明肺组织里的血液已基本清除干净,这能有效避免因红细胞产生的非特异性荧光带来的干扰^[10]。改良灌注冷冻前固定法(图 1 左侧)获得的肺组织和另外两种方法获得的肺组织(图 1 右侧)形态相比,改良灌注冷冻前固定法因使



注:左:改良灌注冷冻前固定法获得小鼠肺组织形态;右:传统冷冻后固定法、冷冻前固定法获得小鼠肺组织形态。

图 1 不同制备方法获得的小鼠肺组织形态

Note. Left, Mouse lung tissue morphology obtained by modified perfusion pre-freezing fixation method. Right, Mouse lung tissue morphology obtained by traditional post-freezing fixation method or pre-freezing fixation method.

Figure 1 Mouse lung tissue morphology obtained by different preparation methods

用包埋固定混合液进行灌注,支撑了肺组织内的空腔组织,形态更加充盈饱满,颜色更为通透。

2.2 小鼠肺组织冰冻切片免疫荧光结果

晚期糖基化终末产物受体(RAGE)特异性表达于 I 型肺泡上皮细胞^[11], Clara 细胞 10 kDa 蛋白(CC10)是 Clara 细胞分泌的主要蛋白,特异性表达于气道上皮^[12], α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)为平滑肌标志蛋白,在肺部主要分布于气道平滑肌和肺血管平滑肌^[13],通过这 3 种肺组织常用的标志蛋白的表达情况来评判 3 种方法制备的肺组织冰冻切片的质量。采集的免疫荧光图片中,绿色荧光指示 I 型肺泡上皮细胞标志物 RAGE,红色荧光指示气道平滑肌标志物 α -SMA,紫色荧光指示气道上皮标志物 CC10,蓝色荧光 DAPI 指示细胞核。

不同呼吸系统疾病的病理机制不同,研究者关注的肺组织病理结构也不同,有的侧重大气道病变,有的侧重小气道病变。因此,选取小鼠肺组织冰冻切片中大气道和小气道的免疫荧光结果来比较 3 种方法制备的肺组织冰冻切片的质量。小鼠肺组织冰冻切片小气道(直径<300 μm 无软骨的气道^[14])的免疫荧光结果如图 2 左侧所示,改良灌注冷冻前固定法制备的冰冻切片,肺组织形态结构完整,肺泡分布均匀,形态舒展;气道平滑肌和柱状排列的气道上皮形态清晰可辨,气道结构完整,呈现光滑的闭环结构,染色平整延续,可视度较好。冷冻前固定法制备的冷冻切片肺泡和气道的形态结构都被破坏,虽然分布的位置较为准确,但肺泡相互挤压融合,塌陷破裂,聚集成团,部分气道上皮细

胞破碎脱落,气道平滑肌断裂并向内凹陷,气道结构不延续,无法连接成光滑环状结构。传统冷冻后固定法所制备的冰冻切片肺泡壁破裂融合,气道上皮、平滑肌、细胞核分布散乱,肺组织形态结构被严重破坏。大气道的免疫荧光结果如图 2 右侧所示,改良灌注冷冻前固定法制备的冰冻切片,气道和肺泡原本的形态结构保留得比较完整, I 型肺泡上皮细胞、气道上皮、气道平滑肌位置清晰可辨,气道平滑连续;冷冻前固定法制备的冰冻切片,气道平滑肌出现部分撕裂,气道不连续,气道上皮辨识具有难度,肺泡塌陷和挤压变形,聚集成团。传统冷冻后固定法制备的冰冻切片,气道撕裂非常严重,肺泡塌陷变形,形态已经完全改变,难以辨识。

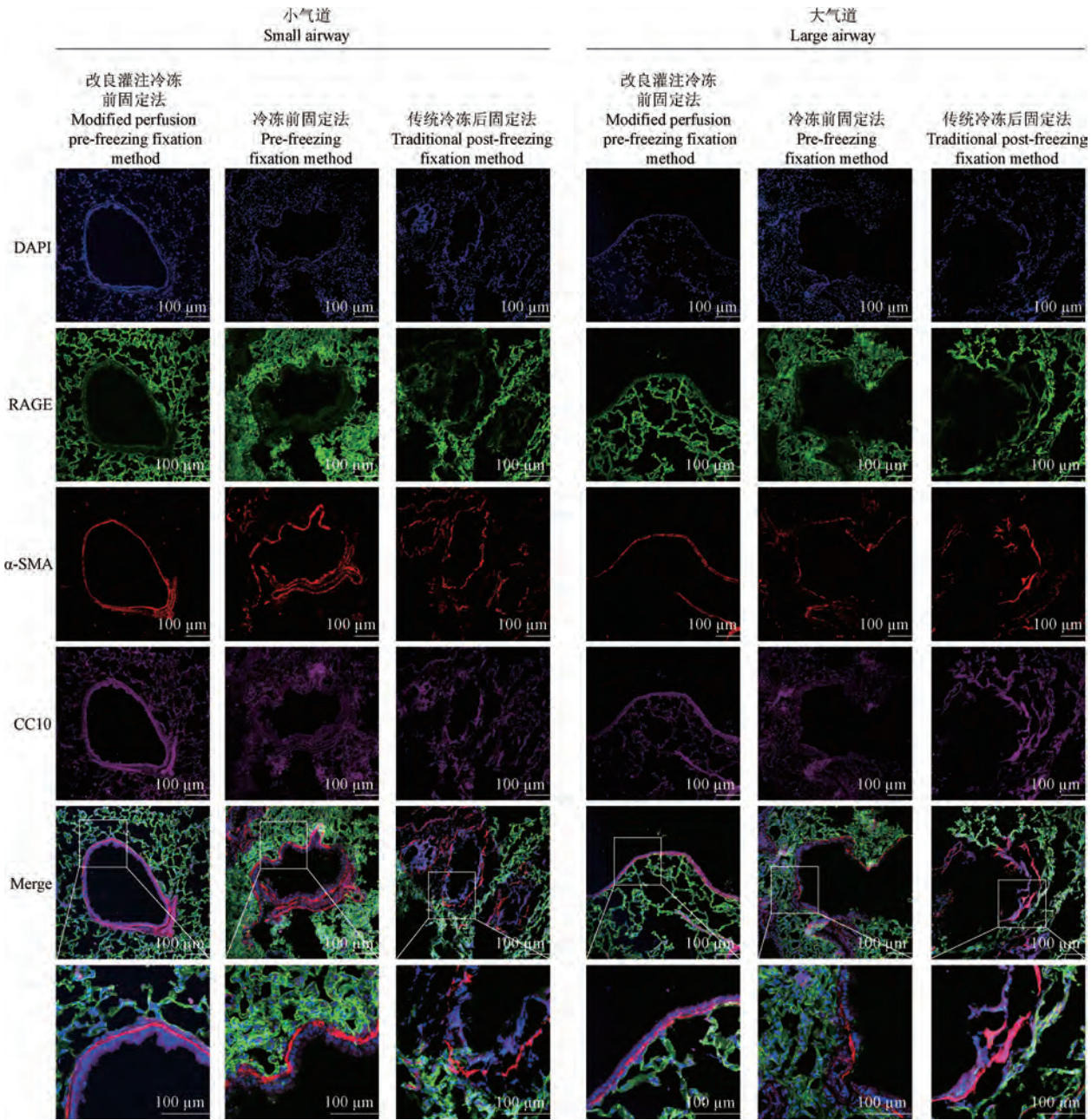
从图 2 可知,冷冻前固定法和传统冷冻后固定法制备的小鼠肺组织冰冻切片,由于没有支撑物,大气道往往容易被切断,而小气道则易出现塌陷。改良灌注冷冻前固定法制备的肺组织冰冻切片,通过免疫荧光染色后均能观察到完整的肺组织形态结构,肺泡形态舒展,气道光滑延续。不同冰冻切片制作方法获得的冰冻切片多重免疫荧光结果中气道和肺泡组织形态差异在表 1 中进行列举。不论是从大气道还是小气道的肺组织冰冻切片的多重免疫荧光结果,均表明改良灌注冷冻前固定法优于冷冻前固定法,而冷冻前固定法优于传统冷冻后固定法。

2.3 小鼠肺组织单位面积内完整气道数量

通过计算每平方毫米小鼠肺组织的完整气道

表 1 不同方法制备小鼠肺组织冰冻切片免疫荧光结果比较

Table 1 Comparison of immunofluorescence results of mouse lung tissue cryosections prepared by different methods			
肺组织结构分类 Types of lung tissue	改良灌注冷冻前固定法 Modified perfusion pre-freezing fixation method	冷冻前固定法 Pre-freezing fixation method	传统冷冻后固定法 Traditional post-freezing fixation method
肺泡结构 Alveolar structure	肺泡结构保存得比较完整 Alveolar structure was well preserved	肺泡塌陷,聚集成团 Alveoli were collapsed and clumped into dense masses	肺泡塌陷,破坏严重 Alveoli were collapsed and seriously damaged
气道上皮 Airway epithelium	气道上皮细胞形态完整 Airway epithelial cells were morphologically intact	部分气道上皮细胞破碎脱落 Airway epithelial cells were partially broken off	气道上皮破坏严重,难以辨别 Airway epithelium was seriously damaged and difficult to identify
气道平滑肌 Airway smooth muscle	形态完整,呈连续光滑环状 Airway smooth muscle was intact, showing a continuous ring structure	部分断裂,呈非连续环形结构 Airway smooth muscle was partially broken, showing a discontinuous ring structure	破坏严重,难以辨认位置和结构 Airway smooth muscle was seriously damaged, and difficult to identify the location and structure



注:小气道直径<300 μm;大气道直径≥300 μm。

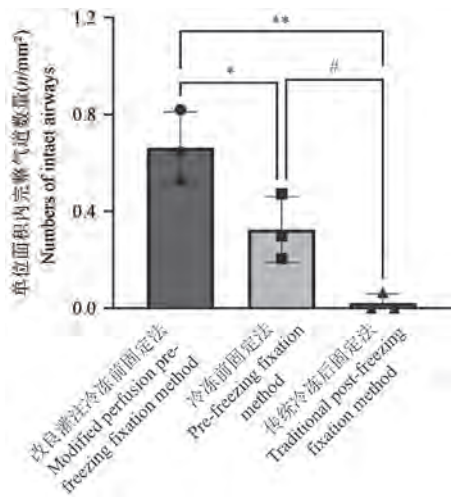
图 2 不同方法制备小鼠肺组织冰冻切片免疫荧光结果

Note. Diameter of small airway <300 μm. Diameter of the large airway ≥300 μm.

Figure 2 Immunofluorescence results of mouse lung tissue cryosections prepared by different methods

(直径≥100 μm)的数量,比较 3 种方法制备的肺组织冰冻切片的差异。改良灌注冷冻前固定法制备的肺组织冰冻切片单位面积(1 mm²)下的完整气道数为每平方毫米(0.66±0.15)个,冷冻前固定法制备的肺组织冰冻切片单位面积完整气道数为每平方毫米(0.33±0.14)个,传统冷冻后固定法制备的肺组织冰冻切片单位面积完整气道数为每平方毫米(0.02±0.04)个。如图 3 所示,改良灌注冷冻前

固定法制备的小鼠肺组织冰冻切片单位面积内完整气道数量高于冷冻前固定法((0.66±0.15)/mm² vs (0.33±0.14)/mm², *P*<0.05),也显著高于传统冷冻后固定法((0.66±0.15)/mm² vs (0.02±0.04)/mm², *P*<0.01)。而冷冻前固定法制备的小鼠肺组织冰冻切片单位面积内完整气道数量高于传统冷冻后固定法((0.33±0.14)/mm² vs (0.02±0.04)/mm², *P*<0.05)。



注:与改良灌注冷冻前固定法组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与冷冻前固定法组相比, # $P<0.05$ 。

图 3 不同方法制备的小鼠肺组织单位面积内完整气道数量($n=3$)

Note. Compared with the modified perfusion pre-freezing fixation method group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the pre-freezing fixation method group, # $P<0.05$.

Figure 3 Numbers of intact airways per unit area of mouse lung tissue cryosections prepared by different methods

3 讨论

3.1 不同制备方法的主要差异

3 种制备小鼠肺组织冰冻切片方法最大的差异是,改良灌注冷冻前固定法是在取出肺组织前,通过气管灌注包埋固定混合液,随后浸泡在 4%多聚甲醛溶液中进行固定;冷冻前固定法是将肺组织浸泡在 4%多聚甲醛溶液中进行固定;传统冷冻后固定法是将肺组织直接用液氮冷冻,切片后再进行固定。不论是冷冻前固定还是改良灌注冷冻前固定法制作的肺组织冰冻切片多重免疫荧光结果的质量都高于传统冷冻后固定法,说明在肺组织冷冻前进行固定能更好地保持组织的形态。

改良灌注冷冻前固定法在肺组织取出前进行灌注,包埋固定混合液同时含有 OCT 冷冻包埋剂和 4%多聚甲醛溶液固定液,既充当了肺内空腔组织的填充物,又能同时从气道、肺泡内部进行快速固定。肺组织经过蔗糖溶液脱水后,气管内留存的 OCT 冷冻包埋剂在组织切片前经低温冷冻成固体,能较好地填充肺组织内部的空腔组织,切片时提供了良好的支撑力。由于灌注的包埋固定混合液在较短时间内使组织从内部得到充分固定,也节省穿透组织所需的时间。虽然操作相对复杂一些,但改良灌注

冷冻前固定法能有效避免在切片时空腔组织相互挤压变形,气道塌陷断裂的现象,较大幅度保持了肺组织的完整形态结构。

3.2 展望

多重免疫荧光技术在临床上和科学研究中可用于病理分型和生物标志物的评估^[15-17],小鼠肺组织冰冻切片免疫荧光染色技术操作简便,常用于呼吸系统疾病的发病机制研究。例如,探究目标蛋白在肺泡中的定位和促凋亡机制^[18-19],调控损伤气道的修复再生^[20]、肺血管周纤维化或者血管新生通路的激活^[21-22]等。对于荧光标记的工具鼠,因石蜡包埋技术自身的背景较高,且操作过程中需经不同的温度和试剂处理,进一步造成荧光蛋白信号丢失^[23]。因此 GFP 标记的转基因小鼠^[21]或者携带荧光的 siRNA 纳米颗粒药物传递系统^[24]都有采用冰冻切片免疫荧光来同时观察目标蛋白的定位和表达。

正因为小鼠肺组织冰冻切片免疫荧光染色技术在呼吸系统疾病的发病机制研究中发挥着重要的作用,优化小鼠肺组织冰冻切片制备方法,保留肺组织完整的形态结构,提高免疫荧光染色结果的质量显得非常有意义。这有利于科研工作研究者探究气道上皮、气道平滑肌、肺泡上皮、肺血管等的生物标记物或者关键调控基因的表达、定位和分布,进一步精确探索呼吸系统疾病发生发展过程中产生的生理病理变化。

参考文献:

[1] Mohammadzadeh S, Aghakhaninejad F, Azad F, et al. Diagnostic accuracy of direct immunofluorescence test on paraffin-embedded blocks in comparison with frozen section blocks in renal biopsies [J]. Int J Nephrol, 2022, 2022: 4974031.

[2] Viratham Pulsawatdi A, Craig SG, Bingham V, et al. A robust multiplex immunofluorescence and digital pathology workflow for the characterisation of the tumour immune microenvironment [J]. Mol Oncol, 2020, 14(10): 2384-2402.

[3] Im K, Mareninov S, Diaz MP, et al. An introduction to performing immunofluorescence staining [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1897: 299-311.

[4] Zaqout S, Becker LL, Kaindl AM. Immunofluorescence staining of paraffin sections step by step [J]. Front Neuroanat, 2020, 14: 582218.

[5] 房彬彬, 孙立, 刘芬, 等. 正交试验设计探索小鼠不同组织冰冻切片的优化制备方法 [J]. 实验动物科学, 2021, 38(2): 48-52.

Fang BB, Sun L, Liu F, et al. Improvement of the preparation

- method of frozen sections for different tissues of mice by orthogonal design [J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(2): 48–52.
- [6] Wang K, Wang Y, Cao Y, et al. Lumican is elevated in the lung in human and experimental acute respiratory distress syndrome and promotes early fibrotic responses to lung injury [J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 392.
- [7] Xia L, Zhang C, Lv N, et al. AdMSC-derived exosomes alleviate acute lung injury via transferring mitochondrial component to improve homeostasis of alveolar macrophages [J]. Theranostics, 2022, 12(6): 2928–2947.
- [8] Hsia CC, Hyde DM, Weibel ER. Lung structure and the intrinsic challenges of gas exchange [J]. Compr Physiol, 2016, 6(2): 827–895.
- [9] 黄小雨, 仲欢欢, 付琳琳, 等. 固定组织的冰冻切片技术探讨 [J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(8): 988–990.
Huang XY, Zhong HH, Fu LL, et al. Discussion on frozen section technology of fixed tissue [J]. J Shanxi Med Univ, 2018, 49(8): 988–990.
- [10] Whittington NC, Wray S. Suppression of red blood cell autofluorescence for immunocytochemistry on fixed embryonic mouse tissue [J]. Curr Protoc Neurosci, 2017, 81: 2.28.1–2.28.12.
- [11] Mukherjee TK, Malik P, Hoidal JR. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its polymorphic variants as predictive diagnostic and prognostic markers of NSCLCs: a perspective [J]. Curr Oncol Rep, 2021, 23(1): 12.
- [12] Broeckaert F, Clippe A, Knoops B, et al. Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker [J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 923: 68–77.
- [13] Liang M, Dang H, Li Q, et al. Effects of rapamycin and OSI-027 on α -SMA in lung tissue of SD rat pups with hyperoxic lung injury [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 556: 39–44.
- [14] Tiendrébogo AJF, Soumagne T, Pellegrin F, et al. The telomerase activator TA-65 protects from cigarette smoke-induced small airway remodeling in mice through extra-telomeric effects [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 25.
- [15] Zhu MM, Niu BW, Liu LL, et al. Development of a humanized HLA-A30 transgenic mouse model [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(4): 350–361.
- [16] 徐纪伟, 孙丹华, 陈旭东, 等. MST1/2 抑制剂促进大鼠脊髓损伤修复的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 942–948.
Xu JW, Sun DH, Chen XD, et al. MST1/2 inhibitor for spinal cord injury repair in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 942–948.
- [17] 邓书伟, 杜春静, 张玥, 等. 肺孢子菌肺炎小鼠模型建立及免疫学评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 20–26.
Deng SW, Du CJ, Zhang Y, et al. Establishment and immunological evaluation of *Pneumocystis murina* pneumonia mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 20–26.
- [18] Ohta H, Chiba S, Ebina M, et al. Altered expression of tight junction molecules in alveolar septa in lung injury and fibrosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(2): L193–L205.
- [19] Sherman MA, Suresh MV, Dolgachev VA, et al. Molecular characterization of hypoxic alveolar epithelial cells after lung contusion indicates an important role for HIF-1 α [J]. Ann Surg, 2018, 267(2): 382–391.
- [20] Fang S, Zhang S, Dai H, et al. The role of pulmonary mesenchymal cells in airway epithelium regeneration during injury repair [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 366.
- [21] Cao Z, Lis R, Ginsberg M, et al. Targeting of the pulmonary capillary vascular niche promotes lung alveolar repair and ameliorates fibrosis [J]. Nat Med, 2016, 22(2): 154–162.
- [22] Ghouse SM, Vadrevu SK, Manne S, et al. Therapeutic targeting of vasculature in the premetastatic and metastatic niches reduces lung metastasis [J]. J Immunol, 2020, 204(4): 990–1000.
- [23] Jiang X, Kalajzic Z, Maye P, et al. Histological analysis of GFP expression in murine bone [J]. J Histochem Cytochem, 2005, 53(5): 593–602.
- [24] Zhang M, Jiang H, Wu L, et al. Airway epithelial cell-specific delivery of lipid nanoparticles loading siRNA for asthma treatment [J]. J Control Release, 2022, 352: 422–437.

[收稿日期] 2023-03-24

徐晓,陈琦. 机器学习在实验动物设施管理中的应用进展与展望 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 103-113.

Xu X, Chen Q. A review and promising future directions of machine learning in laboratory animal facility management [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 103-113.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.012

机器学习在实验动物设施管理中的应用进展与展望

徐 晓*, 陈 琦

(华中科技大学实验动物中心, 武汉 430030)

【摘要】 随着我国实验动物设施智能化水平逐步提升, 积累了大量能够反映设施运行真实状态的数据。由于分析手段的缺乏, 数据价值未得到充分的挖掘。在大数据背景下, 机器学习(machine learning)已经在生物医疗、建筑科学等领域取得了显著的成果, 也为其在实验动物设施管理中的应用提供了参考。本文对国内外机器学习应用于实验动物设施各系统中的内容、方法和模式进行了综述与展望。

【关键词】 机器学习; 实验动物设施; 屏障设施

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0103-11

A review and promising future directions of machine learning in laboratory animal facility management

XU Xiao*, CHEN Qi

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

【Abstract】 As the intelligence level gradually improves in domestic laboratory animal facilities, a large amount of valuable data have been accumulated. These data have not been fully exploited because of the lack of analytical method. In the context of big data, machine learning has achieved remarkable result in biomedicine, building science, and other fields, and provides a reference for its application in laboratory animal facility management. In this article, the contents, methods and models of machine learning applied to various systems of laboratory animal facilities at home and abroad are reviewed and discussed.

【Keywords】 machine learning; laboratory animal facility; barrier facility

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

实验动物设施是实验动物饲养及实验的主要场所, 也是保障实验动物饲育质量的重要基础和支撑条件。目前, 实验动物设施的大部分系统及设备中都应用了传感器及物联网技术, 积累了大量的运行数据, 能够直接反映实验动物设施最真实的状态^[1]。这些运行数据有着数量大、维度多的特点, 常规分析手段无法充分挖掘其数据价值。机器学习(machine learning), 是从数据中学习特定任务的计算机算法, 非常适合用于对大量数据进行分析, 发现数据之间隐藏的潜在规律。

通过调研已有的研究文献, 按照实验动物设施的主要系统分类, 归纳了机器学习分别在 5 个方面

的应用, 即能效评价与系统建模、气流组织数值模拟、空调运行控制优化、系统故障诊断及其他系统, 同时也对机器学习在实验动物设施管理领域未来的应用与发展方向做出展望。

1 机器学习及其应用于实验动物设施管理的概述

机器学习一般被认为包括回归、分类、聚类分析、关联分析等多种算法, 机器学习按照对数据标签的需求可以大致分为有监督学习和无监督学习, 按照算法的复杂程度可以大致分为机器学习和深度学习。常见的机器学习数据处理流程如图 1 所示, 可以分为数据预处理、数据集划分、数据标签处

理、模型选择及训练、知识发现等步骤。

实验动物设施在功能上属于洁净室,对温湿度、压差、尘埃粒子数、换气次数等指标有严格要求,按功能类型可以分为暖通空调系统(HVAC 系统)、空气处理系统、水处理系统、辅助系统等(压缩空气系统、照明系统)。机器学习在各系统中的主要应用如表 1 所示。

2 基于机器学习的能效评价与系统建模

实验动物设施在运行时,通常是不惜代价保证功能,以至于其节能潜力也非常可观^[2]。节能潜力的评估依赖于使用能耗标准值与实际情况进行对比。当前,现行的实验动物设施能效评价相关的标准有国家标准 GB/T 36527-2018《洁净室及相关受控环境节能指南》及国际标准 ISO 14644-16:2019《洁净室及相关受控环境 第 16 部分:洁净室和隔离设备的能效》等。由于不同实验动物设施因工艺参数设置不同,造成区别极大,因此现行标准中并未明确给出能效基准参考值^[3],而是采用同类比较方法,即“比对样本可以是另一个相似的洁净室设施、以前经过优化的能源性能调试数据或基于以前经验的计算比对样本”^[4]。

因此,从机器学习的角度出发,实验动物设施的能效评价,是从现有数据中发现标准值的过程。即对系统的能耗进行准确预测,通过分析预测值与测量值之间的差值用于评价系统的能效。机器学习算法在系统能耗的预测上的应用非常成熟且广泛,常用的算法包括线性回归、支持向量机、决策树与随机森林、人工神经网络、深度神经网络等^[5-6]。

Ciulla 等^[7]、Bilous 等^[8]采用多元线性回归进了建筑物的长、短期负荷预测;Liu 等^[9]、Wang 等^[10]、

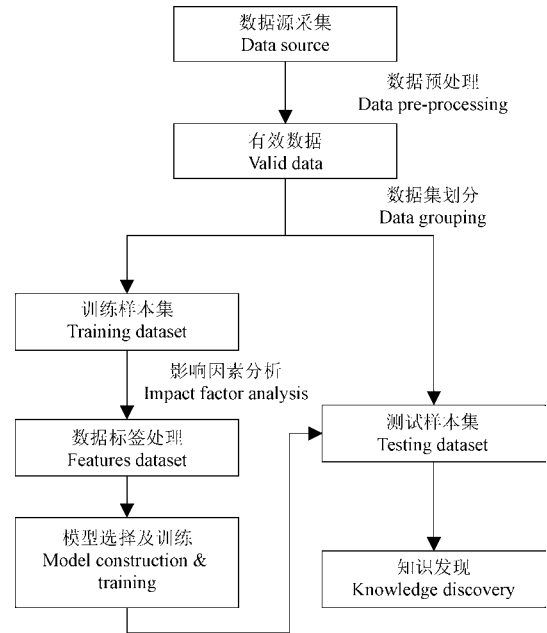


图 1 常见的机器学习数据处理流程

Figure 1 Machine learning common workflow

Seyedzadeh 等^[11]、Wang 等^[12]比较了多种模型包括极端梯度提升(XGBoost)、随机森林、多层神经网络、梯度提升决策树和支持向量回归(SVR)等算法在可解释性、准确性、稳健性和效率方面的情况;Pham 等^[13]、Zhou 等^[14]采用多元线性回归、随机森林、支持向量机(SVM)和 BP 神经网络等方法进行了建筑物的超短期功率预测。由于实验动物设施包含有多个子系统,其能耗、负荷与各种影响因素之间存在复杂的非线性关系,因此非线性算法在系统能耗预测上具有明显优势。

人工神经网络(ANN)是典型的非线性算法之一,在建筑能耗上得到了非常广泛的应用。Alamin 等^[15]采用 ANN 模型实现了分钟级的空调系统能耗

表 1 机器学习在实验动物设施各系统中的主要应用

Table 1 Main applications of machine learning in laboratory animal facilities

系统类型 Type of system	主要应用目的 Main purpose of algorithm application
暖通空调系统(HVAC 系统) Heating, ventilation, air-conditioning and cooling system (HVAC system)	优化运行控制、负荷预测及建模、设备故障诊断 Optimize operational control, load forecasting & modeling, device fault diagnosis
空气处理系统 Air handling systems	气流组织模拟优化 Simulation optimization of airflow organization
水处理系统 Water treatment system	水质分类、质量参数预测、用水量预测 Water quality classification, quality parameter prediction, water consumption forecasting
辅助系统等(压缩空气系统、照明系统) Auxiliary systems, etc. (Compressed air systems, lighting systems)	设备故障诊断 Device fault diagnosis

预测;Almalaq 等^[16]、Somu 等^[17]采用卷积-长短期记忆神经网络(CNN-LSTM)模型实现了建筑的短期、中长期能耗预测;Fan 等^[18]使用结合循环神经网络(RNN)实现了建筑能耗预测;Kim 等^[19]提出了一种结合循环神经网络(RNN)和改进卷积神经网络(1-D CNN)的短期能耗预测模型,用于预测 3~7 d 的建筑物中央空调系统能耗;Cai 等^[20]提出了一种带有门控的递归神经网络模型(Gated-RNN),并实现了建筑物的超短期能耗预测。

虽然神经网络模型充分证明了其在预测方面的价值,但由于缺乏可解释性,应用受到一定的限制^[21]。许多研究开始着眼于修改神经网络的结构,以提高可解释性。Shan 等^[22]将具有物理意义的重力模型(GRA)与门控循环单元(GRU)模型集成在一起,用于建筑能耗预测;Kim^[23]修改了传统的卷积神经网络(CNN),并通过在 CNN 中添加时间卷积和池化层,提出了用于室内人类活动检测的可解释 CNN(I-CNN);也可以引入先验知识,Drgoña 等^[24]提出可以使用热动力学知识来指导的递归神经网络(RNN)模型的设计,具有良好的泛化效果。

上述研究表明,机器学习算法用于能耗预测及系统建模的技术已经十分成熟,也是其在实验动物设施管理中最重要应用之一。不同的机器学习算法在适用范围、预测尺度上存在不同的特点,应当结合具体情况选用,以上研究情况汇总见表 2。

3 基于机器学习的气流组织数值模拟

实验动物设施一般是通过机械通风系统提供恒定甚至过量的新风量,以满足换气次数等环境控制要求。气流组织形式会直接影响通风效率及冷量/热量需求,传统计算流体力学方法(computational fluid dynamics, CFD)是气流组织设计最为常用的手段^[25]。周斌等^[26]、欧少华等^[27]、杨五强等^[28]使用 CFD 方法对实验动物设施的气流组织进行了优化设计,证明了其在实验动物设施管理中的适用性。

然而,传统 CFD 方法受限于算力及计算时间问题,主要被使用在离线仿真计算中,参与实验动物设施的前期设计。随着环境参数的大量快速监测及获取,数值模拟的预测精度要求和实时性要求越发显著^[29]。机器学习算法由于其处理非线性高维的能力,开始被大量的引入 CFD 中。

机器学习算法在气流组织模拟中主要有两个

方向:(1)用作 CFD 的辅助工具,以提高准确性;(2)替代 CFD 用于更快地预测。常用的算法主要是人工神经网络及深度学习算法。

3.1 辅助 CFD 计算

在辅助 CFD 方面,Zhou 等^[30]利用 CFD 数值模拟结果构建训练数据集,使用神经网络模型实现了二维非等温条件下的室内气流和温度预测,结果显示预测所需时间大幅缩短,平均值的预测误差控制在 5% 以内;Kim 等^[31]利用人工神经网络模型结合 CFD 设计了一种分阶段的预测方法,相比于传统单层预测方法,表现出更好的准确性,并减轻对于大型训练数据样本集的需求;Li 等^[32]提出了一种基于 CFD 的 BP 神经网络结合粒子群优化器(PSO)算法,可以快速预测室内环境空气参数,CFD 计算时间缩短 23.53%;Nina 等^[33]采用梯度提升回归(GBR)结合 CFD 建立了一种室内空气参数实时预测模型,实现使用温度和气流速度的数据即预测与舒适相关的流量参数,实现了 CFD 仿真输入参数的优化;Ren 等^[34]建立基于降维线性通风模型的人工神经网络模型,实现了以通风模式、换气次数和污染源位置作为输入标量的室内污染物浓度场“超实时”预测,并能够根据预测结果实现最优换气次数和通风模式的可视化与调控。

3.2 替代 CFD 计算

在替代 CFD 方面,Zhou 等^[35]提出一种创新的耦合仿真框架,使用神经网络模型替代 CFD 预测不均匀的室内空气分布并与 BES 程序相结合,与传统 CFD 和 BES 之间的耦合仿真相比,计算时间减少约 94%;Guo 等^[36]开发了一种卷积神经网络(CNN)算法,该算法的执行速度比等效的 CFD 解决方案快至少两个数量级;Wei 等^[37]引入物理信息神经网络(PINN)基于测量数据重建室内气流场,与传统的 CFD 相比,PINN 可以直接根据测量数据重建详细的气流场,并且误差较 ANN 模型更小;Fresca 等^[38]提出了一种基于深度学习的降阶模型(DL-ROM),将不同的模型组合在一起以初始化算法的参数,从而显著提高 CFD 离线训练的速度;Wang 等^[39]提出了一种基于长短期记忆网络-循环神经网络(LSTM-RNN)架构的深度学习模型,结合正交分解降维,能够以不到 1/1000 的 CPU 成本完成 CFD 计算,并保持较好的计算精度;Shin 等^[40]提出了一种基于全卷积网络(FCN)的深度学习回归模型,实现了对传统深度神经网络(DNN)架构的优化与改进,与传统深

表 2 机器学习算法在建筑能效评价与系统建模领域的应用

作者, 年限 Author, Year	机器学习方法 Machine learning algorithms	研究对象 Object of study	预测尺度 Prediction scale
Ciulla, et al. 2019 ^[7]	多元线性回归 Multiple linear regression	冷热负荷预测 Prediction of building heating and cooling loads	长期预测(年度) Long-term prediction (annual)
Bilous, et al. 2018 ^[8]	多元线性回归 Multiple linear regression	房间空气温度预测 Room air temperature prediction	短期预测(小时) Short-term prediction (hours)
Liu, et al. 2021 ^[9]	随机森林 Random forest	空调系统能耗预测 Energy prediction for air-conditioning system	长期预测(年度) Long-term prediction (annual)
Wang, et al. 2019 ^[10]	极端梯度提升 XGBoost	考虑气象数据的空调系统供暖能耗预测 Energy prediction of air-conditioning system considering meteorological data	中长期预测(天) Medium- and long-term prediction (days)
Seyedzadeh, et al. 2019 ^[11]	随机森林、支持向量机(SVM) Random forest, support vector machine	考虑建筑维护结构特性的建筑冷热负荷预测 Prediction of building heating and cooling loads considering building maintenance structure characteristics	长期预测(年) Long-term prediction (annual)
Wang, et al. 2022 ^[12]	多层神经网络、线性回归、极端梯度提升 Multi-layer perceptron, linear regression, XGBoost	空调系统冬季供暖及生活热水供应能耗预测 Energy prediction of heating and hot water supply of the air-conditioning system	长期预测(年) Long-term prediction (annual)
Pham, et al. 2020 ^[13]	随机森林 Random forest	建筑物每小时能耗预测 Energy prediction for buildings	短期预测(小时) Short-term prediction (hours)
Zhou, et al. 2020 ^[14]	多元线性回归、支持向量机(SVM)和BP神经网络 Multiple linear regression, support vector machine, back propagation neural network	建筑物每小时能耗预测 Energy prediction for buildings	短期预测(小时) Short-term prediction (hours)
Alamin, et al. 2018 ^[15]	人工神经网络(ANN) Artificial neural network	空调每小时能耗预测 Hourly energy prediction for air-conditioning system	短期预测(小时) Short-term prediction (hours)
Almalag, et al. 2019 ^[16]	卷积神经网络-长期短期记忆神经网络(CNN-LSTM) Convolutional neural network-long short-term memory	建筑能耗预测 Energy prediction for buildings	短期预测(小时) Short-term prediction (hours)
Somu, et al. 2021 ^[17]	卷积神经网络-长期短期记忆神经网络(CNN-LSTM) Convolutional neural network-long short-term memory	建筑能耗预测 Energy prediction for buildings	中长期预测(天) Medium- and long-term prediction (days)
Fan, et al. 2019 ^[18]	递归神经网络(RNN) Recurrent neural network	建筑能源预测 Energy prediction for buildings	短期预测(小时) Short-term prediction (hours)
Kim, et al. 2019 ^[19]	递归神经网络(RNN)、递归初始卷积神经网络(RICNN) Recurrent neural network, recursive initial convolutional neural network	建筑能耗预测 Energy prediction for buildings	中长期预测(天) Medium- and long-term prediction (days)
Cai, et al. 2019 ^[20]	带门控的递归神经网络、卷积神经网络(CNN) Gated recurrent neural network, convolutional neural network	建筑能耗预测 Energy prediction for buildings	短期预测(小时) Short-term prediction (hours)

度学习 DNN 回归模型相比,在均值绝对误差和均方根误差两方面的预测误差分别降低了 43.14% 和 34.77%。

综上,机器学习无论是辅助 CFD 还是替代 CFD,其目的都是为了实现更好更快的计算。相比

于传统 CFD 优化方法,机器学习的速度优势明显,也能够无任何先验物理知识的情况下获得结果。

4 基于机器学习的空调运行控制优化

暖通空调(heating, ventilation and air conditioning,

HVAC) 系统能耗一般占实验动物设施能耗的 50% 以上^[2], 做好暖通空调系统运行控制优化, 对实验动物设施的节能至关重要。实际工程中实验动物设施的暖通空调一般带有自动控制系统, 如常见的空调群控或变频/变流量控制, 一般采用传统 PID 控制或基于规则的控制方法 (rule based control, RBC)^[41-42], 均属于反馈控制, 存在一些缺点, 包括实时响应速度差、规则通常由专家经验决定等^[43], 导致暖通空调系统未运行在最佳状态。

4.1 模型预测控制

近年来, 在暖通空调 (HVAC) 控制领域, 越来越多研究开始采用前馈控制思想, 并结合机器学习的模型预测控制 (model predictive control, MPC)^[44-45]。模型预测控制是通过建立一个系统模型来预测未来状态, 结合时变的约束条件, 产生对应动态控制策略的方法^[42], 其核心是系统建模与预测。

Kathirgamanathan 等^[46] 根据数据获取的充实程度, 将暖通空调系统建模划分为基于白箱、黑箱和灰箱的模型。黑箱/灰箱模型结合机器学习算法, 因其易用性得到了更广泛的研究与应用^[46-51]。Yue 等^[52] 借助云计算平台, 利用机器学习方法预测了室内平均温度, 使用 MPC 控制, 实现了冷水机组的群控运行控制优化, 在不同典型日下系统能耗降低了 37.3%、10.6% 和 23.7%; Maddalena 等^[53] 采用基于非线性回归方法, 使用 MPC 对中央空调系统进行仿真, 在三种不同典型日下使系统运行效率分别提升了 2.29%、3.13% 和 4.76%; Chen 等^[54] 提出一种由数据驱动模型结合优化算法机器学习-模型预测控制 (MLB-MPC) 框架, 其系统节能率可达 7.1%; Afram 等^[55] 采用人工神经网络 (ANN) 设计了一处带有热回收/储热装置的地源热泵系统的 MPC 控制, 能够根据季节节省 6%~73% 的运营成本。

深度学习算法由于其面对多时间尺度和复杂性表现更好的特点, 也开始被采用到模型预测控制中。Fang 等^[56] 基于深度 Q 学习 (DQN) 的多目标最优控制策略, 用于温度设定点实时复位, 以平衡能耗和室内空气温度; Deng 等^[57] 提出了一种非平稳 DQN 方法, 结合主动建筑环境变化检测, 空调系统节能率提高 13%; Fu 等^[58] 提出了一种事件驱动的深度 Q 网络 (ED-DQN) 方法, 能够有效捕捉热舒适性的动态非线性特征; Arroyo 等^[59] 采用强化学习, 提出了一种 RL-MPC 控制框架, 在不确定性和持续学习上具备更强的可能性。

4.2 模型预测控制 (MPC) 的性能优化

模型预测控制的问题是实时性一般较差, 许多研究开始结合机器学习算法优化模型结构, 以显著增强模型预测控制在暖通空调系统控制中的适用性。Yang 等^[60] 提出了一种基于机器学习的瞬时线性化 (IL) 的 MPC 控制架构, 将优化问题从非凸问题转换为凸问题, 在保留计算精度的同时显著降低计算量; Gao 等^[61] 提出了一种基于物理模型的强化学习算法, 在 MPC 控制上可以实现一样的控制性能, 并且训练时间更短; Chen 等^[62] 提出了一种基于集成多时间尺度深度学习的自适应模型预测控制 (EMA-MPC) 系统, 针对空调系统短期和长期时间尺度上的预测需求, 采用了两个 LSTM 模型的组合方法, 在预测方面有效地提升了速度。

总之, 模型预测控制能够让实验动物设施的暖通空调系统实现精细化调控与节能运行。机器学习已经被证明非常适合用于这种非线性程度高、物理结构复杂系统的建模与预测, 具有极大的价值。

5 基于机器学习的系统故障检测诊断

实验动物设施中的简易故障可以依靠经验快速实现诊断, 而传感器等精密元件出现量程失准、精度下降等故障, 不易直接判别^[63]。研究表明, 采用机器学习算法的传感器故障检测与诊断 (fault detection and diagnosis, FDD), 几乎不需要先验知识, 还可以以相对较低的成本提升检测覆盖率和诊断准确性。不仅能保障系统的安全高效运行, 还可以降低约 5%~30% 的系统能耗^[64]。一种常见的机器学习 FDD 方法流程如图 2 所示。

5.1 使用带标记的数据集进行故障诊断

机器学习算法在 FDD 领域比较直接的应用是使用有监督算法开发分类模型, 模型输入是故障相关的影响因素, 输出是故障结果 (数据样本是正常还是故障) 或用于故障诊断的特征 (数据样本是否对应于正常或特定的故障操作条件)。常用的算法有决策树与随机森林、支持向量机和贝叶斯网络。

Yao 等^[65] 使用 3 种基于树的集成学习方法建立暖通空调系统中冷水机组故障的参考和 FDD 模型, 结果表明, 所提方法能有效识别 88 种常见故障; Movahed 等^[66] 使用随机森林算法建立了用于诊断空气处理机组和屋顶机组故障的双层机器学习框架。Li 等^[67] 提出一种改进的基于决策树的实用可变制冷剂流量 (VRF) 空调系统的故障诊断方法。

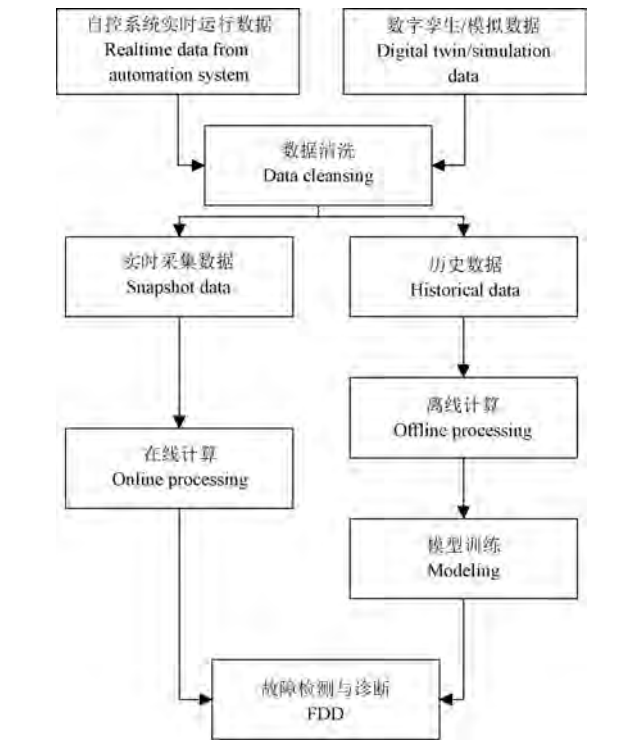


图2 常见的机器学习 FDD 方法流程

Figure 2 Machine learning algorithm common workflow for FDD

Madhikermi 等^[68]采用 SVM 算法将异常数据与正常数据进行分类,实现了热回收机组的故障诊断;Montazeri 等^[69]使用 SVM 结合 PCA、核主成分分析(KPCA)和径向基函数(RBF),提出一种同时诊断空气处理机组系统中传感器和执行器故障的方法;Li 等^[70]基于冷水机组测试数据集不同的特征输入开发了 4 个 SVM 模型,并分析了不同条件下模型对于故障诊断的性能;Yan 等^[71]构建了基于 SVM 的暖通空调系统中故障诊断模型,以评估和比较不同特征选择策略的成本。

Wang 等^[72]基于实验数据提出了一种用于冷水机组故障诊断的贝叶斯网络特征选择方法;该模型在特征选择后达到了 99.2% 的最高精度;Chen 等^[73]开发了一种离散贝叶斯网络方法来诊断 HVAC 系统/设备两级故障;Melani 等^[74]提出了一个基于移动窗口主成分分析和贝叶斯网络的混合框架用于故障诊断;Ng 等^[75]使用贝叶斯网络进行了传感器故障检测,同时表明贝叶斯网络在数据缺失状态下具有优越的性能。

5.2 直接使用运行数据进行诊断

实际工程中收集的运行数据多数是未标记的,数据标记工作本身又非常耗时。无监督算法可以使用未标记的数据集,表现出了极大的应用潜力,

常用的算法有主成分分析(PCA)及聚类算法。

Madhikermi 等^[76]使用主成分分析(PCA)结合逻辑回归方法来检测空气处理机组的热回收故障。Chen 等^[77]使用基于天气和时间表的模式匹配(WPM)和基于特征的主成分分析(FPCA)的方法来检测 HVAC 的整体故障。Zhou 等^[78]提出了一种主成分分析-合成少数过采样技术(PCA-SMOTE)方法,用以增强在 VRV 空调系统训练数据集不完整情况下故障诊断的准确性;Li 等^[79]结合基于密度聚类(DBSCAN)与 PCA 方法,提高了故障检测和诊断的灵敏度和可靠性及传感器故障估计的准确性。

Aguilar 等^[80]使用 K-Means 聚类方法对 HVAC 常见故障进行划分,用于进行故障识别与诊断;Dey 等^[81]采用改进 K-Means 聚类对 HVAC 系统终端单元的特征进行提取后,应用于 HVAC 系统的故障监测和诊断;Gunay 等^[82]使用分层聚类,结合专家经验,识别出了现有 FDD 方法中被忽略的故障;Xu 等^[83]使用了分层聚类、K-Means 聚类和 PAM 聚类,对比 HVAC 运行记录,有效地进行了误操作及系统故障识别;Zhou 等^[84]提出了一种基于信息熵的分层聚类算法,对比常规特征参数分层聚类法和 K 均值聚类法,有效地提高了故障识别的精度。

神经网络由于其特性,也被广泛地应用于 FDD 中^[85],并常与其他方法结合进行使用。Ding 等^[86]结合决策树与神经网络、Shi 等^[87]结合 PCA 与神经网络、Guo 等^[88]结合关联规则分析与神经网络、Sun 等^[89]结合 ICA 与神经网络对 VRF 系统进行了故障诊断并提高了效能。此外,也有较多研究使用人工神经网络(ANN)预测故障并进行诊断^[90-92]。神经网络的变体,如深度神经网络^[93]、递归神经网络^[93]、生成对抗网络^[94]和卷积神经网络^[95]等,也被证明可以在 FDD 中达到非常高的精度。

上述研究表明,根据实际获取数据集标注的丰富程度,合理地选择算法至关重要。基于机器学习的智能化、自动化的故障诊断方法与系统,是实验动物设施实现高效运行管理的重要基础。

6 基于机器学习的其他系统应用

机器学习算法在实验动物设施其他系统上的应用也十分广泛,如纯水、照明、空压机系统等。

6.1 纯水系统的水质监测及评估

Ap 等^[96]在监测水质变化的同时,使用线性回归模型算法根据消耗率预测未来的水位。Ahmed

等^[97]利用 K-Means 和人工神经网络(ANN)机器学习算法实时监测水质,并使用机器学习算法来预测 3 个月的用水需求。Sukor 等^[98]在监测 pH、电导率、温度和总溶解固体等参数的基础上,使用人工神经网络(ANN)、支持向量机(SVM)和决策树三种算法对水质进行分类。

6.2 照明系统

Motta Cabrera 等^[99]采用数据关联挖掘算法与照明能耗规律结合,对学校教室的照明能耗异常进行诊断,最高可以节约 70% 的用电量;Norouziasl 等^[100]采用支持向量机(SVM)的方法建立了一种针对照明能耗影响因素的预测框架,用于准确了解照明系统能耗的变化趋势并采取合理的节能措施;Şahin 等^[101]采用人工神经网络(ANN)用于估计建筑照明系统中随时间变化的能量损失,并提出了改进措施从而避免能源浪费。

6.3 空压机系统

Wu 等^[102]使用人工神经网络(ANN)结合空压机的历史用电数据进行负荷预测,对制定空压机的优化运行策略提供了参考。McLaughlin 等^[103]采用 5 种机器学习算法建立了一个用于诊断空压机压缩空气是否泄漏的模型,有效地指导空压机的实际运维工作。

上述研究表明,机器学习可以很好地应用于实验动物设施各类系统的量化研究中,帮助研究人员理解实验动物设施运行的特性和规律,为保障系统安全高效运行提供新的角度和思路。

7 结论与展望

近年来,我国实验动物设施的智能化程度快速提高,积累了大量的运行数据。机器学习也已经十分成熟,在建筑智能化、生物医疗等领域中均取得了显著的成果。两者相结合,机器学习在实验动物设施管理上存在广阔的应用前景。

本文广泛综述了机器学习在实验动物设施管理中的应用,总结如下:

(1)机器学习在实验动物设施管理中最成熟的应用是系统能耗预测与评价建模。机器学习可以有效并准确地采用历史数据/相关因素来预测不同时间尺度下的系统能耗,用于建立能效基准、能耗指标及评价体系等。能够有效地解决现行标准中能效基准值未明确给定的问题,帮助实验动物设施进行明确的能效量化评价及异常识别。

(2)机器学习可以在实验动物设施管理中发挥节能提效作用。在设计、建设、改造等阶段,机器学习结合常用的流体力学 CFD 方法,能够显著提升气流组织模拟的速度与精度。在运行、管理等阶段,机器学习结合前馈控制思想,采用模型预测控制(MPC),能够准确地制定暖通空调系统、空气处理系统等的优化运行控制策略,实现系统节能提效运行。

(3)机器学习可以在实验动物设施管理中发挥安全保障作用。面对复杂系统,在缺乏物理先验知识的条件下,机器学习能够以相对低的成本快速准确地进行传感器故障检测与诊断(FDD),保障系统安全稳定运行。机器学习也能够用于实验动物设施各类子系统的量化研究中,从新的角度提供思路与方法。

同时,机器学习在实验动物设施管理方面存在需要进一步研究的内容,总结如下:

(1)机器学习的适用性和泛化性需要进一步提高。多数研究关注于某种算法或某几种算法的结合在单一环境条件下的精度/性能等,少有研究着眼于迁移至不同环境下方法的适用程度。从算法的角度来讲,泛化能力的研究十分重要,也必然是未来的重点研究方向。

(2)实际应用中数据缺乏的问题需要从算法方面克服。常见的现象包括:仅安装自动控制所必需的传感器,传感器数据不存储上传、数据缺乏标准化归集方式等,导致数据严重缺乏。机器学习如何选择研究必需的数据,如何在缺乏数据的情况下进行有效地工作,甚至如何有效地处理与生成数据,都是亟待研究的问题。

(3)机器学习在实验动物设施管理中的工程应用需要进一步得到加强。多数研究基于模拟数据或典型样本数据集进行离线仿真计算,部分研究通过机器学习算法结合理论与实际,建立了实时气流模拟系统及在线故障诊断系统等。未来,机器学习算法在实验动物设施管理的工程实践中有望进一步得到广泛的应用。

参考文献:

- [1] 李可欣, 张凤梅, 杨根岭, 等. 实验动物屏障设施系统自动化控制技术体系应用探索 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 102-107.
- Li KX, Zhang FM, Yang GL, et al. Application of an automated control system to specific pathogen-free barrier facilities for

- laboratory animals [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(12): 102–107.
- [2] 唐利军, 徐国景, 张金明, 等. 实验动物建筑设施节能技术探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(1): 73–78.
- Tang LJ, Xu GJ, Zhang JM, et al. Research for energy-saving technologies of laboratory animals building facilities [J]. Chin J Comp Med, 2010, 20(1): 73–78.
- [3] Cleanrooms and associated controlled environments-part 16: energy efficiency in cleanrooms and separative devices; ISO 14644: 16[S]. 2019.
- [4] 张彦国. ISO 14644-16: 2019《洁净室及相关受控环境——第 16 部分: 洁净室和隔离设备的能效》简介 [J]. 暖通空调, 2021, 51(11): 1–5.
- Zhang YG. Introduction of ISO 14644-16: 2019 Cleanrooms and associated controlled environments-part 16: energy efficiency in cleanrooms and separative devices [J]. Heat Vent Air Cond, 2021, 51(11): 1–5.
- [5] Wei Y, Zhang X, Shi Y, et al. A review of data-driven approaches for prediction and classification of building energy consumption [J]. Renew Sustain Energy Rev, 2018, 82: 1027–1047.
- [6] Chen Y, Guo M, Chen Z, et al. Physical energy and data-driven models in building energy prediction: a review [J]. Energy Rep, 2022, 8: 2656–2671.
- [7] Ciulla G, D'Amico A. Building energy performance forecasting: a multiple linear regression approach [J]. Appl Energy, 2019, 253: 113500.
- [8] Bilous I, Deshko V, Sukhodub I. Parametric analysis of external and internal factors influence on building energy performance using non-linear multivariate regression models [J]. J Build Eng, 2018, 20: 327–336.
- [9] Liu Y, Chen H, Zhang L, et al. Enhancing building energy efficiency using a random forest model: A hybrid prediction approach [J]. Energy Rep, 2021, 7: 5003–5012.
- [10] Wang R, Lu S, Li Q. Multi-criteria comprehensive study on predictive algorithm of hourly heating energy consumption for residential buildings [J]. Sustain Cities Soc, 2019, 49: 101623.
- [11] Seyedzadeh S, Rahimian FP, Rastogi P, et al. Tuning machine learning models for prediction of building energy loads [J]. Sustain Cities Soc, 2019, 47: 101484.
- [12] Wang M, Wang Z, Geng Y, et al. Interpreting the neural network model for HVAC system energy data mining [J]. Build Environ, 2022, 209: 108449.
- [13] Pham AD, Ngo NT, Ha Truong TT, et al. Predicting energy consumption in multiple buildings using machine learning for improving energy efficiency and sustainability [J]. J Clean Prod, 2020, 260: 121082.
- [14] Zhou Y, Zheng S. Machine-learning based hybrid demand-side controller for high-rise office buildings with high energy flexibilities [J]. Appl Energy, 2020, 262: 114416.
- [15] Alamin YI, Álvarez JD, del Mar Castilla M, et al. An Artificial Neural Network (ANN) model to predict the electric load profile for an HVAC system [J]. IFAC-PapersOnLine, 2018, 51(10): 26–31.
- [16] Almalaq A, Zhang JJ. Evolutionary deep learning-based energy consumption prediction for buildings [J]. IEEE Access, 2018, 7: 1520–1531.
- [17] Somu N, Raman MRG, Ramamritham K. A deep learning framework for building energy consumption forecast [J]. Renew Sustain Energy Rev, 2021, 137: 110591.
- [18] Fan C, Wang J, Gang W, et al. Assessment of deep recurrent neural network-based strategies for short-term building energy predictions [J]. Appl Energy, 2019, 236: 700–710.
- [19] Kim J, Moon J, Hwang E, et al. Recurrent inception convolution neural network for multi short-term load forecasting [J]. Energy Build, 2019, 194: 328–341.
- [20] Cai M, Pipattanasomporn M, Rahman S. Day-ahead building-level load forecasts using deep learning *vs.* traditional time-series techniques [J]. Appl Energy, 2019, 236: 1078–1088.
- [21] Naser MZ. An engineer's guide to eXplainable Artificial Intelligence and Interpretable Machine Learning: Navigating causality, forced goodness, and the false perception of inference [J]. Autom Constr, 2021, 129: 103821.
- [22] Shan S, Cao B, Wu Z. Forecasting the short-term electricity consumption of building using a novel ensemble model [J]. IEEE Access, 2019, 7: 88093–88106.
- [23] Kim E. Interpretable and accurate convolutional neural networks for human activity recognition [J]. IEEE Trans Ind Inform, 2020, P1: 1.
- [24] Drgoña J, Tuor AR, Chandan V, et al. Physics-constrained deep learning of multi-zone building thermal dynamics [J]. Energy Build, 2021, 243: 110992.
- [25] Deng HY, Feng Z, Cao SJ. Influence of air change rates on indoor CO₂ stratification in terms of Richardson number and vorticity [J]. Build Environ, 2018, 129: 74–84.
- [26] 周斌, 赵勇, 汪亚兵, 等. 两种不同类型实验动物屏障设施的气流组织计算流体力学模拟技术分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(3): 252–258.
- Zhou B, Zhao Y, Wang YB, et al. Analysis on air distribution by computational fluid dynamics simulation in two types of laboratory animal barrier facilities [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(3): 252–258.
- [27] 欧少华, 周斌, 刘吉宏. 某 GLP 实验动物设施空调及通风系统设计研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(4): 110–116.
- Ou SH, Zhou B, Liu JH. Discussion of an HVAC system design for a good laboratory practice lab animal vivarium [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(4): 110–116.
- [28] 杨五强, 潘杰, 李勋. 屏障系统回风口布置方式对气流组织的模拟分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(5): 384–387.
- Yang WQ, Pan J, Li X. Simulation and analysis of air distribution in specific pathogen free air return layout [J]. Lab

- Anim Comp Med, 2010, 30(5): 384–387.
- [29] Cao SJ. Challenges of using CFD simulation for the design and online control of ventilation systems [J]. Indoor Built Environ, 2019, 28(1): 3–6.
- [30] Zhou Q, Ooka R. Influence of data preprocessing on neural network performance for reproducing CFD simulations of non-isothermal indoor airflow distribution [J]. Energy Build, 2021, 230: 110525.
- [31] Kim M, Park HJ. Application of artificial neural networks using sequential prediction approach in indoor airflow prediction [J]. J Build Eng, 2023, 69: 106319.
- [32] Li L, Zhang Y, Fung J, et al. A coupled computational fluid dynamics and back-propagation neural network-based particle swarm optimizer algorithm for predicting and optimizing indoor air quality [J]. Build Environ, 2022, 207: 108533.
- [33] Nina M, Xavier TF, Roser C, et al. A CFD-based surrogate model for predicting flow parameters in a ventilated room using sensor readings [J]. Energy Build, 2022, 266: 112146.
- [34] Ren C, Cao SJ. Development and application of linear ventilation and temperature models for indoor environmental prediction and HVAC systems control [J]. Sustain Cities Soc, 2019, 51: 101673.
- [35] Zhou Q, Ooka R. Implementation of a coupled simulation framework with neural network and Modelica for fast building energy simulation considering non-uniform indoor environment [J]. Build Environ, 2021, 211: 108740.
- [36] Guo X, Li W, Iorio F. Convolutional neural networks for steady flow approximation [A]. Proceedings of the proceedings of the ACM SIGKDD international conference on knowledge discovery and data mining [C]. San Francisco United States: Association for Computing Machinery; 2016.
- [37] Wei C, Ooka R. Indoor airflow field reconstruction using physics-informed neural network [J]. Build Environ, 2023, 242: 110563.
- [38] Fresca S, Manzoni A. POD-DL-ROM: enhancing deep learning-based reduced order models for nonlinear parametrized PDEs by proper orthogonal decomposition [J]. Comput Methods Appl Mech Eng, 2022, 388: 114181.
- [39] Wang Z, Xiao D, Fang F, et al. Model identification of reduced order fluid dynamics systems using deep learning [J]. Int J Numer Methods Fluids, 2018, 86(4): 255–268.
- [40] Shin S, Baek K, So H. Rapid monitoring of indoor air quality for efficient HVAC systems using fully convolutional network deep learning model [J]. Build Environ, 2023, 234: 110191.
- [41] Maddalena ET, Lian Y, Jones CN. Data-driven methods for building control-a review and promising future directions [J]. Control Eng Pract, 2020, 95: 104211.
- [42] Drgoña J, Arroyo J, Cupeiro Figueroa I, et al. All You need to know about model predictive control for buildings [J]. Annu Rev Control, 2020, 50: 190–232.
- [43] Saloux E, Candanedo J. Optimal rule-based control for the management of thermal energy storage in a Canadian solar district heating system [J]. Sol Energy, 2020, 207: 1191–1201.
- [44] Zhan S, Chong A. Data requirements and performance evaluation of model predictive control in buildings: a modeling perspective [J]. Renew Sustain Energy Rev, 2021, 142: 110835.
- [45] Yao Y, Shekhar DK. State of the art review on model predictive control (MPC) in Heating Ventilation and Air-conditioning (HVAC) field [J]. Build Environ, 2021, 200: 107952.
- [46] Kathirgamanathan A, De Rosa M, Mangina E, et al. Data-driven predictive control for unlocking building energy flexibility: a review [J]. Renew Sustain Energy Rev, 2021, 135: 110120.
- [47] Zhang X, Pipattanasomporn M, Chen T, et al. An IoT-based thermal model learning framework for smart buildings [J]. IEEE Internet Things J, 2020, 7: 518–527.
- [48] Maher A, Mohammed R, Abbod Maysam F, et al. Data-driven based HVAC optimisation approaches: a systematic literature review [J]. J Build Eng, 2022, 46: 103678.
- [49] Löwenstein KF, Bernardini D, Fagiano L, et al. Physics-informed online learning of gray-box models by moving horizon estimation [J]. Eur J Control, 2023, 2023: 100861.
- [50] Pratyush K, Rawlings James B, Wenzel Michael J, et al. Grey-box model and neural network disturbance predictor identification for economic MPC in building energy systems [J]. Energy Build, 2023, 286: 112936.
- [51] Li Y, O'Neill Z, Zhang L, et al. Grey-box modeling and application for building energy simulations-A critical review [J]. Renew Sustain Energy Rev, 2021, 146: 111174.
- [52] Yue B, Su B, Xiao F, et al. Energy-oriented control retrofit for existing HVAC system adopting data-driven MPC-Methodology, implementation and field test [J]. Energy Build, 2023, 295: 113286.
- [53] Maddalena E, Muller SA, Santos R, et al. Experimental data-driven model predictive control of a hospital HVAC system during regular use [J]. Energy Build, 2022, 271: 112316.
- [54] Chen S, Ding P, Zhou G, et al. A novel machine learning-based model predictive control framework for improving the energy efficiency of air-conditioning systems [J]. Energy Build, 2023, 294: 113258.
- [55] Afram A, Janabi-Sharifi F, Fung AS, et al. Artificial neural network (ANN) based model predictive control (MPC) and optimization of HVAC systems: a state of the art review and case study of a residential HVAC system [J]. Energy Build, 2017, 141: 96–113.
- [56] Fang X, Gong G, Li G, et al. Deep reinforcement learning optimal control strategy for temperature setpoint real-time reset in multi-zone building HVAC system [J]. Appl Therm Eng, 2022, 212: 118552.
- [57] Deng X, Zhang Y, Zhang Y, et al. Towards optimal HVAC control in non-stationary building environments combining active change detection and deep reinforcement learning [J]. Build Environ, 2022, 211: 108680.
- [58] Fu Q, Li Z, Ding Z, et al. ED-DQN: an event-driven deep reinforcement learning control method for multi-zone residential

- buildings [J]. *Build Environ*, 2023, 242: 110546.
- [59] Arroyo J, Manna C, Spiessens F, et al. Reinforced model predictive control (RL-MPC) for building energy management [J]. *Appl Energy*, 2022, 309: 118346.
- [60] Yang S, Wan MP. Machine-learning-based model predictive control with instantaneous linearization-A case study on an air-conditioning and mechanical ventilation system [J]. *Appl Energy*, 2022, 306: 118041.
- [61] Gao C, Wang D. Comparative study of model-based and model-free reinforcement learning control performance in HVAC systems [J]. *J Build Eng*, 2023, 74: 106852.
- [62] Chen EX, Han X, Malkawi A, et al. Adaptive model predictive control with ensembled multi-time scale deep-learning models for smart control of natural ventilation [J]. *Build Environ*, 2023, 242: 110519.
- [63] Borgstein EH, Lamberts R, Hensen JLM. Mapping failures in energy and environmental performance of buildings [J]. *Energy Build*, 2018, 158: 476–485.
- [64] Li Y, O'Neill Z. A critical review of fault modeling of HVAC systems in buildings [J]. *Build Simul*, 2018, 11(5): 953–975.
- [65] Yao W, Li D, Gao L. Fault detection and diagnosis using tree-based ensemble learning methods and multivariate control charts for centrifugal chillers [J]. *J Build Eng*, 2022, 51: 104243.
- [66] Movahed P, Taheri S, Razban A. A bi-level data-driven framework for fault-detection and diagnosis of HVAC systems [J]. *Appl Energy*, 2023, 339: 120948.
- [67] Li G, Chen H, Hu Y, et al. An improved decision tree-based fault diagnosis method for practical variable refrigerant flow system using virtual sensor-based fault indicators [J]. *Appl Therm Eng*, 2018, 129: 1292–1303.
- [68] Madhikermi M, Malhi AK, Främling K. Explainable artificial intelligence based heat recycler fault detection in air handling unit [A]. *Proceedings of the Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)* [C]. Montreal Canada: Springer Verlag; 2019.
- [69] Montazeri A, Kargar SM. Fault detection and diagnosis in air handling using data-driven methods [J]. *J Build Eng*, 2020, 31: 101388.
- [70] Li X, Liu J, Liu B, et al. Impacts of data uncertainty on the performance of data-driven-based building fault diagnosis [J]. *J Build Eng*, 2021, 43: 103153.
- [71] Yan K, Ma L, Dai Y, et al. Cost-sensitive and sequential feature selection for chiller fault detection and diagnosis [J]. *Int J Refrig*, 2018, 86: 401–409.
- [72] Wang Z, Wang Z, Gu X, et al. Feature selection based on Bayesian network for chiller fault diagnosis from the perspective of field applications [J]. *Appl Therm Eng*, 2018, 129: 674–683.
- [73] Chen Y, Wen J, Pradhan O, et al. Using discrete Bayesian networks for diagnosing and isolating cross-level faults in HVAC systems [J]. *Appl Energy*, 2022, 327: 120050.
- [74] Melani AHDA, Michalski MADC, da Silva RF, et al. A framework to automate fault detection and diagnosis based on moving window principal component analysis and Bayesian network [J]. *Reliab Eng Syst Safe*, 2021, 215: 107837.
- [75] Ng K, Yik F, Lee P, et al. Bayesian method for HVAC plant sensor fault detection and diagnosis [J]. *Energy Build*, 2020, 228: 110476.
- [76] Madhikermi M, Yousefnezhad N, Främling K. Heat recovery unit failure detection in air handling unit [A]. *Proceedings of the IFIP Advances in Information and Communication Technology* [C]. Seoul South Korea: Springer New York LLC; 2018.
- [77] Chen Y, Wen J, Lo J. Using weather and schedule based pattern matching and feature based principal component analysis for whole building fault detection—part II field evaluation [J]. *J Eng Sustain Bldgs Cities*, 2022, 3(1): 011002.
- [78] Zhou Z, Chen H, Li G, et al. Data-driven fault diagnosis for residential variable refrigerant flow system on imbalanced data environments [J]. *Int J Refrig*, 2021, 125: 34–43.
- [79] Li G, Hu Y. Improved sensor fault detection, diagnosis and estimation for screw chillers using density-based clustering and principal component analysis [J]. *Energy Build*, 2018, 173: 502–515.
- [80] Aguilar J, Ardila D, Avendaño A, et al. An autonomic cycle of data analysis tasks for the supervision of HVAC systems of smart building [J]. *Energies*, 2020, 13(12): 13123103.
- [81] Dey M, Rana SP, Dudley S. Smart building creation in large scale HVAC environments through automated fault detection and diagnosis [J]. *Future Gener Comput Syst*, 2020, 108: 950–966.
- [82] Gunay HB, Shi Z. Cluster analysis-based anomaly detection in building automation systems [J]. *Energy Build*, 2020, 228: 110445.
- [83] Xu Y, Yan C, Shi J, et al. An anomaly detection and dynamic energy performance evaluation method for HVAC systems based on data mining [J]. *Sustain Energy Techn*, 2021, 44: 101092.
- [84] Zhou X, Yang T, Liang L, et al. Anomaly detection method of daily energy consumption patterns for central air conditioning systems [J]. *J Build Eng*, 2021, 38: 102179.
- [85] Yun WS, Hong WH, Seo H. A data-driven fault detection and diagnosis scheme for air handling units in building HVAC systems considering undefined states [J]. *J Build Eng*, 2021, 35: 102111.
- [86] Ding X, Guo Y, Liu T, et al. New fault diagnostic strategies for refrigerant charge fault in a VRF system using hybrid machine learning method [J]. *J Build Eng*, 2021, 33: 101577.
- [87] Shi S, Li G, Chen H, et al. An efficient VRF system fault diagnosis strategy for refrigerant charge amount based on PCA and dual neural network model [J]. *Appl Therm Eng*, 2018, 129: 1252–1262.
- [88] Guo Y, Li G, Chen H, et al. Optimized neural network-based fault diagnosis strategy for VRF system in heating mode using data mining [J]. *Appl Therm Eng*, 2017, 125: 1402–1413.

[89]Sun S, Li G, Chen H, et al. A hybrid ICA-BPNN-based FDD strategy for refrigerant charge faults in variable refrigerant flow system [J]. Appl Therm Eng, 2017, 127: 718–728.

[90]Fan C, Xiao F, Zhao Y, et al. Analytical investigation of autoencoder-based methods for unsupervised anomaly detection in building energy data [J]. Appl Energy, 2018, 211: 1123–1135.

[91]Loy-Benitez J, Li Q, Nam K, et al. Sustainable subway indoor air quality monitoring and fault-tolerant ventilation control using a sparse autoencoder-driven sensor self-validation [J]. Sustain Cities Soc, 2020, 52: 101847.

[92]Choi Y, Yoon S. Autoencoder-driven fault detection and diagnosis in building automation systems; residual-based and latent space-based approaches [J]. Build Environ, 2021, 203: 108066.

[93]Lee KP, Wu BH, Peng SL. Deep-learning-based fault detection and diagnosis of air-handling units [J]. Build Environ, 2019, 157: 24–33.

[94]Yan K, Chong A, Mo Y. Generative adversarial network for fault detection diagnosis of chillers [J]. Build Environ, 2020, 172: 106698.

[95]Cheng F, Cai W, Zhang X, et al. Fault detection and diagnosis for Air Handling Unit based on multiscale convolutional neural networks [J]. Energy Build, 2021, 236: 110795.

[96]Ap BL, Yadav A, Pandey A, et al. IoT based WSN ground water monitoring system with cloud-based monitoring as a service (maas) and prediction using machine learning [J]. Int J Innov Technol Explor Eng, 2019, 9(1): 816–821.

[97]Ahmed SS, Bali R, Khan H, et al. Improved water resource management framework for water sustainability and security [J]. Environ Res, 2021, 201: 111527.

[98]Sukor ASA, Muhamad MN, Wahab MNA. Development of *in situ* sensing system and classification of water quality using machine learning approach [A]. Proceedings of the 2022 IEEE 18th International Colloquium on Signal Processing & Applications (CSPA) [C]. Selangor Malaysia: Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc; 2022.

[99]Motta Cabrera DF, Zareipour H. Data association mining for identifying lighting energy waste patterns in educational institutes [J]. Energy Build, 2013, 62: 210–216.

[100]Norouzasl S, Jafari A. Identifying the most influential parameters in predicting lighting energy consumption in office buildings using data-driven method [J]. J Build Eng, 2023, 72: 106590.

[101]Şahin M, Oğuz Y, Büyüktümtürk F. ANN-based estimation of time-dependent energy loss in lighting systems [J]. Energy Build, 2016, 116: 455–467.

[102]Wu DC, Bahrami AB, Razban A, et al. Air compressor load forecasting using artificial neural network [J]. Expert Syst Appl, 2021, 168: 114209.

[103]McLaughlin E, Choi JK. Utilizing machine learning models to estimate energy savings from an industrial energy system [J]. Resour Environ Sustain, 2023, 12: 100103.

[收稿日期]2023-08-01

(上接第 51 页)

[29]Granvald V, Marciszko C. Relations between key executive functions and aggression in childhood [J]. Child Neuropsychol, 2016, 22(5): 537–555.

[30]罗娟, 王桂梅, 徐芸, 等. 青少年攻击行为及其影响因素分析 [J]. 当代护士 (下旬刊), 2021, 28(5): 44–47.

Luo J, Wang GM, Xu Y, et al. Analysis of adolescent aggressive behavior and its influencing factors [J]. Mod Nurse (next ten-day issue), 2021, 28(5): 44–47.

[31]Mansour R, Dovi AT, Lane DM, et al. ADHD severity as it relates to comorbid psychiatric symptomatology in children with Autism Spectrum Disorders (ASD) [J]. Res Dev Disabil, 2017, 60: 52–64.

[32]Gaunet F, Besse S. Guide dogs ’ navigation after a single journey: a descriptive study of path reproduction, homing, shortcut and detour [J]. PLoS One, 2019, 14(7): e0219816.

[33]Udell MAR, Dorey NR, Wynne CDL. The performance of stray dogs (*Canis familiaris*) living in a shelter on human-guided object-choice tasks [J]. Animal Behav, 2010, 79 (3): 717–725.

[34]Albuquerque N, Mills DS, Guo K, et al. Dogs can infer implicit information from human emotional expressions [J]. Anim Cogn, 2022, 25(2): 231–240.

[收稿日期]2023-04-18

徐国恒. 对我国生物医学和实验动物科学及科研伦理工作边界的认识和建议 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 114-120.

Xu GH. Suggestions for the institutions and laboratory animal units and scientific community in China [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 114-120.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.013

对我国生物医学和实验动物科学及科研伦理 工作边界的认识和建议

徐国恒^{1,2}

(1.北京大学医学部实验动物科学部,北京 100191;
2.北京大学医学部基础医学院生理学与病理生理学系,北京 100191)

【摘要】 基于现代医学和实验动物科学发展长期遭受动物福利权益主义势力羁绊影响的历史和现状,结合我国的相关现实情况,呼吁和建议我国实验动物工作者、使用实验动物的科研工作者思考辨识我们的专业工作边界:第一,不组织不参与源于动物福利权益主义倡导的所谓世界动物日或实验动物日活动;第二,不组织不参与源于日本特殊鬼神文化相关的所谓动物慰灵碑活动。这两种活动与生物医学、实验动物科学及科研伦理的专业内容无任何交集,本质上是反医学和反对实验动物科学的,更与中华优秀传统文化格格不入。第三,坚持医学和实验动物科学发展观,辨别动物福利权益主义观点主张,厘清与民间动物福利权益活动的界限,推进实验动物使用与管理及科研伦理工作科学化,支持我国生物医学研究发展。

【关键词】 实验动物科学;实验动物使用与管理;专业边界;动物福利;动物权益主义

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0114-07

Suggestions for the institutions and laboratory animal units and scientific community in China

XU Guoheng^{1,2}

(1. Department of Laboratory Animal Science, Peking University Health Sciences Center, Beijing 100191, China.

2. Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medicine, Peking University Health Science Center, Beijing 100191)

【Abstract】 Based on the development history that the modern medicine and laboratory animal science have long been hindered by animal welfare groups and animal-rights activists in Western countries, and considering the relevant circumstance in China, the author appeals and recommends that the laboratory animal practitioners and biomedical researchers, the scientific community in China should recognize and identify the boundaries of our professional activities. Firstly, do not participate in the activity related to so called “World (Lab) Animal Day” that is said in some Chinese websites, to originate from NAVS, an antivivisection society Ltd., London. Secondly, do not participate in the activity related to so called “animal memorial stone” that was originated in Japan. These movements have nothing to do with biomedicine and laboratory animal sciences, and fundamentally are antiscientific and are incompatible to traditional Chinese culture. Thirdly, distinguish the standpoints of laboratory animal science from various viewpoints of animal welfare/rights activists, promote scientific management of the institutional animal care and use for better supporting biomedical research in China.

【作者简介】 徐国恒(1964—),博士,教授,博士生导师,实验动物科学部常务副主任,研究方向:医学生理学,脂肪代谢调节。

E-mail: xug@bjmu.edu.cn

[Keywords] laboratory animal science; animal care and use; professional boundary; animal welfare; animal-rights activism

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

一百多年前英国首先兴起动物权益主义运动 (animal-rights movements) 并迅速扩散到欧洲和美国,宗旨是反对和禁止医学动物实验研究。动物权益主义运动采用各种极端手段,从制造信息操纵媒体、组织游行示威活动、破坏实验室财产,到威胁动物从业者和科研人员的人身安全,因而一些极端的动物福利权益组织被英国警察总局和美国联邦调查局认定为恐怖组织,其活动被认定为非法的恐怖主义活动。概括而言,在西方这是极其敏感甚至不愿触及的话题,欧美国家的高校院所及其实验动物部门和科研单位避之不及,不会以官方名义举办任何与其相关的所谓纪念活动。

在我国,不存在西方动物福利权益运动赖以发酵发展的人文宗教政治因素的土壤。我国现代医学发展较晚,实验动物科学的全面发展起步更晚,对西方国家一百多年来动物权益主义势力采取各种方式反对动物实验并深深影响现代医学和实验动物发展的历史背景了解不多。随着我国社会的全面发展,包括动物科学和产业、医学和实验动物科学等的蓬勃发展,近二三十年来一些中文网络介绍动物保护权益主义观点内容及相关活动报道忽然呈现增多趋势,其观点不仅渗透影响着我国社会民众,也渗透影响着实验动物从业者和使用者,值得我国高校院所的实验动物从业人员和科学研究人员警戒思考。

本文针对所谓的世界实验动物日和所谓的实验动物慰灵纪念碑石现象及其可能的背景,结合欧美科学界与动物福利权益主义反对医学动物实验的势力长期斗争的历史背景进行分析讨论,结合中华文明传统祭祀礼仪制度进行分析讨论,对我国生物医学机构尤其实验动物业务部门及科研伦理工作的专业边界,提出工作建议。

1 第一条建议:不宣扬、不组织、不参与所谓的世界动物日或世界实验动物日活动

所谓的世界动物日或世界实验动物日,中文字面意思具有极大误导性和欺骗性。但必须指出其来历不明不白、不含有任何纪念实验动物的本义、与世界各国和我国生物医学机构受法规调控的实验动物使用管理及科研伦理工作在专业上没有任

何渊源及交集。本文明确指出,它不应该被科学机构和实验动物部门用于纪念动物或实验动物。世界卫生组织、西方各国高校院所和实验动物部门从来都没有设置过、使用过实验动物纪念日之类的称谓或举行过相关活动。外文生物医学与实验动物科学论文著作和管理文档也查不到相关记载。用权威的生物医学文献检索引擎 PubMed 或 Google Scholar 及用“百度学术”检索该纪念日,得到专业文献的数目为零,除了在“中国知网”检索到极少数中文短文。它主要在某些中文网页出现,已难以考究其初始来源。我国生物医学高校院所的实验动物部门,不应与来历不明的所谓纪念日发生工作关联。

按照许多中文网页描述,该纪念日是英国以反对医学动物实验为宗旨的动物权益组织 (National Anti-Vivisection Society Ltd., London., NAVS) 在 1979 年为纪念其创始人设立的,但 1948 年 NAVS 已被英国宣布为不是动物慈善组织,而是政治性组织并因此活动受限,1979 年已不复存在;另一些中文网页描述来自罗马天主教主纪念日;一些中文网页宣称该日被联合国认可,但检索联合国官方网站的国际纪念日名单,并没有任何动物日或实验动物日信息。如此来历不明不白,却日益扩散到越来越多的中文网页,并非一般网民发动推广,这很值得深思。

根据收集到的资料,西方国家有个别的动物权益组织网站推广动物日,但均无实验动物日说法,其所谓动物日的来历也是说法不一,可与一些中文网站的说法相互翻译。从目的和活动内容来看,英文网站所述动物日均与动物权益组织有关,与正规的生物医学高校院所实验动物专业工作无关。

以下从几个方面作进一步分析讨论。

网络传说与动物日有关的 NAVS 是什么组织?是世界上成立最早、最激进、也是早被取缔的动物福利权益组织。世界上凡是具有类似 Anti-vivisection 冠名和宗旨的都是非常激进的动物权利组织。它们具有十分明确的宗旨和目标,即反对医学动物实验、取消和禁止一切动物实验。从权威的 PubMed 到 Google Scholar 及用“百度学术”输入该纪念日英文和 NAVS 简称或全称,得到的专业文献的数目为零,表明中文网络所述并非真实。只检索

NAVS 或全称,有很少几篇 1900 年时期医学期刊关于 NAVS 诉讼医学界的报道。笔者阅读的医学史和实验动物科学史文章讨论过 NAVS,却不能被检索,表明 NAVS 相关词语已被 PubMed 过滤屏蔽。

19 世纪 50 年代前,英国社会用语和词典中尚不存在“动物福利 伦理”(animal welfare / ethics)词汇。根据医学史和实验动物科学史文献介绍,从 19 世纪 70 年代起至 20 世纪 20 年代,首先在英国继而蔓延至欧美国家爆发了关于支持医学动物实验(当时的专用术语是 vivisection)与反对动物实验(anti-vivisection)的大辩论。最初,对实验动物的组织取材过程被称为 vivisection。这一词汇的直白含义是“切入活体”。随后英国词典收录该词,释意为“the practice of subjecting living animals to cutting operations, esp. in order to advance physiological and pathological knowledge”^[1-2]。笔者中译:“对活体动物进行手术操作,尤其是为了发展生理学和病理学知识”;可见 vivisection 词义涵盖在动物身上进行的所有实验,尤其指探究生理学和病理学的动物实验,无论是手术还是非手术操作^[1-2]。

当时的专业文献和书籍报纸所指 vivisectionist 主要是生理学、病理学等实验医学家及支持医学发展的社会人士,而反对派(antivivisectionist)多是具有天主教和政治保守势力特征的现代医学反对者及其同情者^[1-6]。大辩论持续近半个世纪(大约 1870~1920 年),是激烈的、全方位的、不只涉及动物实验与现代科学和现代医学,更涉及到西方人文哲学、宗教和社会政治的许多方面包括世界观、价值观和人生观等重大分歧,并持续影响至今。就大辩论的深度和广度而言,可以说后无来者,只余复述或换个角度复述。对中华文化者而言可能难以理解,但却颇为值得我国医学界和实验动物科学界了解思考和参考;我们无须拾人牙慧再进行无谓的关于动物福利权益的争论或辩论,因为西方社会一百年前就已经充分辩论过几乎所有可辩论的话题,包括我们能想到的和更多难以想象的话题。

在那近半个世纪期间,西方主要国家几乎大部分著名大学和医学机构、医学家和科学家都卷入了大辩论。一个典型例子是 1880 年创刊的著名科学期刊 *Science* (1881 Jun 25; 2(53): 293)发表了达尔文明确支持医学动物实验(vivisection)的信,宣告 *Science* 杂志始终支持动物实验的立场。达尔文与众多信奉达尔文进化论的科学家及支持者在相当

长时期是坚决支持医学动物实验的领军人物(vivisectionists)。总体结局是,动物实验和医学发展得到广泛的理性支持,同时也激发了更为激进的动物福利权益主义运动。NAVS 在伦敦成立,是世界第一个以反对医学动物实验为宗旨的动物福利权益组织,随之欧洲大陆和美国出现了更多的类似于 NAVS 以 anti-vivisection 冠名的动物福利权益组织和抗议运动,他们从来不隐瞒其宗旨是反对一切动物实验、目标是取消和禁止一切动物实验^[1-5]。基于保守的哲学文化和宗教世界观背景,动物福利权益主义者不仅反对所有动物实验,并且反对达尔文进化论,反对现代医学预防治疗人体疾病,诸如反对疫苗接种、龋齿防治,反对外科手术、妇产科剖宫产和人工流产术,反对临床用药治疗及临床药物试验。在不久前的新冠大流行期间,西方社会一些民众为何不愿接受甚至明显反对疫苗、口罩、隔离等科学防治措施?了解相关历史背景并不难理解。欧美医学及实验动物科学史家明确指出,尽管当代动物权力主义运动改头换面、以各种貌似温和的形式呈现,但其秉承反科学、反医学和反对动物实验的基本宗旨从未改变。相关的专业回顾性综述参见本文文献及其所引文献^[1-6]。

因为过于激进,1948 年英国上议院认定 NAVS 不是动物保护慈善组织,而是目标明确的政治性组织,随后被取缔,认为其禁止动物实验的主张不利于人类健康和医疗防治^[3-5]。自 20 世纪 20 年代陷入低潮四十余年之后,在 20 世纪 60 年代欧美动物权益运动借势反战、人权、女权和同性恋运动再度高涨,约持续到 20 世纪 90 年代后期。1981 年当时尚名不见经传而今为世界最大的动物福利权益组织派人以志愿者名义打入马里兰州某医学研究所实验室内部,制造了轰动美国和世界医学界的银泉镇实验猴(Silver Spring Monkey)新闻和诉讼事件,导致世界第一例科学家被逮捕和实验室关闭,该研究所也不复存在;随后相继发生宾州大学狒狒实验手术事件、欧美多地医学实验室打砸事件^[3-4,7-8]。已被取缔的“动物解放阵线(Animal Liberation Front)”领导人 Tom Dale 曾在谈到动物权利运动时表示“我完全支持汽油燃烧弹和枪击”,在谈到动物研究人员时说“他被杀死得越早越好”(“I will totally defend petrol bombing and shooting... The sooner he is killed, the better” in reference to an animal researcher)^[5],可见其激进的程度。1980~

1990 年英国警察总局和美国联邦调查局将很多动物福利权益活动认定为非法的恐怖主义活动。

针对动物福利权益主义主张,1989 年美国医学协会(the American Medical Association)代表生物医学科学界发布《动物研究白皮书》,简释版见参考文献^[5],向美国社会各界和民众介绍实验动物研究对现代医学发展的重要性、反驳动物福利权利组织的观点主张、坦率分析在医学研究中使用动物的争议,为支持医学动物实验作了立场鲜明的辩护。美国医学协会声明,美国将一如既往的致力保护和支持医学动物实验研究,因为其对维护和改善人类健康至关重要,不可或缺和替代。美国医学会还特别指出,尽管很多参与动物权利活动的人是善良的,关爱动物,捐款给动物权益组织用于收容动物,但捐助者未曾意识到其捐款并没有用于保护动物,而是用于支持非法的恐怖主义活动和反科学活动^[5]。笔者记得 2000 年前后在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)工作的几年间,每年春季都有大批的动物权益活动者从美国各州群集到首都华盛顿特区,在欣赏樱花之余伺机窜入大学研究机构进行抗议破坏活动,甚至打砸实验室和威胁研究人员。作为世界最大的医学研究机构的 NIH 主校区,涉及动物实验的楼层实验区域(笔者所在实验室即是)配备武装警察站岗巡查。NIH 研究人员均会收到电子邮件和书面通知,在工作单位或下班回家可能遇到激进动物活动者跟踪威胁,勿与纠缠,立即报警。

西方国家的动物福利权益组织资金雄厚,通过政治献金和说客联结政府政客,善于巧妙地利用媒体(they are very well-financed, have politically connected lobbyists, use the media skillfully^[5])。通常以公司形式运作,低成本,高收益。一般运作流程是注册公司、开通网站、提供募捐账户、以动物权益保护名义制造新闻事件、渲染活动信息,号召大众参加和捐款,收取捐款,但从不开公开账目资金使用流向。在欧美这类活动是合法的,只要活动不那么激进,但不激进则难以引起公众注意和捐款。按照美国农业部主导的联邦《动物福利法》规定,私立的动物福利权益组织(公司)只要不将收容的动物进行商业出售、并且在 2 周内将动物送养或安乐死即为合法。多半个世纪的数据表明,只有极其少数收容动物被领养(领养者通常都会被募捐),因而处死绝大部分收容动物是必然的结局,也是最经济的

结局^[6-7]。显然与大多数人捐款收容动物的初衷背道而驰。需要指出的是,不同于正规生物医学机构实验动物部门按照法规建立的 IACUC 动物管控机制,美国农业部《动物福利法》中由动物福利权益团体推动的条款并不要求动物福利权益组织设立 IACUC 动物监管机制,因而真实世界中动物福利权益组织大规模处死收容动物的过程不受独立的 IACUC 监管。以某一个动物福利组织一年的募捐收入远超 5 亿人民币看^[7-8],那么多的动物福利组织产业合力,经济势力可以解决相当多的动物福利问题,但并没有,以后也不会有。

曾被美国联邦调查局 FBI 列为恐怖主义禁止活动的动物权益组织 NAVS 和 PETA 的相关资讯,2010 年后忽然频现中文网络媒体。随后一些城市地区频繁发生民间人士组织参加截留拯救流浪狗、猫的事件,一些中文网络图文并茂,推波助澜,造成较大舆情和社会影响。例如,网络大肆渲染某地举办狗肉节大会,很多人将慕名赴会大快朵颐;半夜忽然截留一两车流浪狗(那些组织自己准备,白天不易办,深夜便于导演);网络媒体图文并茂渲染;呼吁爱心募捐,捐款越多越好。政府官方媒体辟谣当地历史上从没有什么狗肉节,但声音被淹没。最终结局,捐款不知何所用,收容动物不知何所终。

今天用百度搜索诸如“世界动物日”“世界实验动物日”“动物慰灵碑”等,前几十个页面竟然有高校院所实验动物部门组织参与相关活动的报道,而且近年来呈现活动数量增加、规格规模和媒体关注度升高的趋势。这种现象是不应该的。当然,很可能是并不了解所谓动物日尤其是所谓“慰灵碑”一词的特殊涵义,因此有必要介绍给实验动物从业者和使用者,包括社会大众。

2 第二条建议:不设立、不宣传、不参与所谓的实验动物“慰灵碑”活动

搜索中文网页,所谓的实验动物“慰灵碑”及相关活动报道屡见不鲜,某度百科也设有同名条目。必须指出,“慰灵碑”是日文特有词语或其汉译。该一词三字的任意组合,在古今中文语境中从不见用,或罕见使用。中华文化传统称碑、墓、志、铭,现代亦称纪念碑,但古今绝无“慰灵碑”说法。“慰灵碑”三字冠名者,皆与日本相关。冠名“慰灵碑”的数量日本位于第一,作为日本前殖民地的韩国位居第二,其他遭日侵占国或多或少亦有之,此外世界其他国家没有。

日语“慰灵碑”其意若何? 无需考其源头, 因与本文主题不甚相干。概括而言, 日本明治维新以前尚不流行, 是日本一百多年前兴起的一种鬼神参拜习俗, 为非自然死亡或非正常死亡的人或动物的亡灵设立慰灵碑举行参拜。但必须明确指出, 其与医学和实验动物科学没有任何渊源, 从未被国际(甚至包括日本)生物医学和实验动物科学专业文献记载和描述过, 更与中国传统文化格格不入。

在日语的语境里, “慰灵”与中文语境的追悼怀念之意不同, 更多的是镇魔、超度、祈祷非正常死亡的怨鬼亡灵原谅安息的意味。对非正常死亡的人、动物、飞鸟, 甚至对杀灭的昆虫之类都可以设立慰灵碑、石, 或插个简陋的木牌, 就可以进行参拜祈祷。通俗意思大概是“不幸死了, 但事情发生了, 已经过去了, 就请忘记原谅吧”。今天日本的很多动物园和水族馆设有动物慰灵碑。需要特别指出的是, 在第二次世界大战期间及战后的几十年间, 日本在本国和前侵占国建立了数万个日军战亡军人、军马、军犬之类的“慰灵碑石”。日本在本国有几处安置高级别亡灵者的地方, 称为某某“神社”, 定期获得日本中央政府和地方政府的高级别参拜。日本厚生省承担诸如“日本遗族会”海外慰灵碑活动三分之一的费用, 用于寻找日军阵亡遗骸建立慰灵碑, 以“和平友好”的名义定期进行海外慰灵参拜, 掩盖和美化侵略战争罪行。

基于上述历史背景, 将源自日本特殊鬼神文化的慰灵碑石参拜形式, 移植运用到实验动物纪念, 是遭受过日本侵略国家的人民难以接受的。中国高校院所的公共场所不可立动物慰灵碑, 成狂悖妄滥之祭。

更重要的是, 即使不考虑上述日本鬼神文化因素和历史背景, 为动物或实验动物设立纪念碑石与中华文明传统文化的祭祀礼仪制度格格不入。在官办高校院所的公共场所设立动物纪念碑, 按古籍文献的记载, 属于妄滥之祭。

在我国, 立碑建庙, 祭祀祷告, 对于国家社会、家庭个人都是大事; 千百年来形成了固定的社会神系和家族先祖的祭祀礼仪制度, 其间没有俗神野鬼的位置。以史为鉴, 《左传》记载“国之大事, 在祀与戎”; 《管子》“鬼神不明, 陋民不悟”; 《孔子》“非其鬼而祭之, 谄也”; 《礼记·曲礼》“非其所祭而祭之, 名曰淫祀(淫: 过度, 过分), 淫祀无福”; 《资治通鉴》卷 192“唐立国未久, 诏令, 民间不得妄立妖祠”;

[唐]赵璘《因话录》卷五记载很详细“若妖神淫祠, 无名而设, 苟有职者, 固当远之。虽岳海镇渎, 名山大川, 帝王先贤, 不当所立之处, 不在典籍, 则淫祠也。昔之为, 人, 生无功德可称, 死无节行可奖, 则淫祠也。当斧之, 火之, 以示愚俗, 又何谒而祀之哉”。为吏宜鉴之。

古籍说得很明白, 不应该祭的而祭之, 是无节制的祭祀, 这种祭祀不会降福。即使对帝王先贤, 在不当立之处而立的, 没有列入国家祀典的, 则不合礼制, 属于无节制的祭祀; 至于妖神淫祠, “当斧之, 火之”, 古代公职人员不可“谒而祀之”, 今之何如?

民间巫觋信仰是蒙昧落后时代的普遍社会现象。中国古代也不乏淫祠巫庙、河伯山神。若不加节制任其兴起泛滥, 延续累积势必加重社会及人民财物负担, 导致流弊丛生, 危害国家社会。千百年来历代中央政府和地方守吏都有清醒的认识, 都是持禁绝拆除改造的态度。历代国史古籍文献记载甚多, 如《史记》列传西门豹治邺, 投巫婆三老于漳河、革除“河伯娶妇”陋习而兴修水利的故事, 一直是小学《语文》统编教科书课文。

3 第三条建议: 辨别动物权益主义观点与实验动物科学使用和管理的专业界限

西方国家的动物权益主义势力具有复杂社会人文和宗教政治背景, 具有强大影响力。1989 年 Behar R 在《财富》杂志发表报道, 美国参与动物权益运动的人数达 1000 万人, 约 7000 个动物福利权益组织团体, 年度经费预算从 2 亿到 10 亿美元不等^[5]。他们不仅在欧美国家各州地活动, 并以精明的策略一步一个脚印向世界其他国家渗透和发展, 但从未忘记取消和禁止动物实验的宗旨目标。

动物福利权益势力一直伴随并影响着现代医学和实验动物科学发展和格局。正如医学家和医学史家指出的那样^[4-5], 动物福利权益组织采取各种策略和方式, 致力推动在联邦或州法案中加入不必要的动物保护条款(to add unnecessary federal or state regulations)限制动物使用、干扰动物科研、推高原本已经昂贵的动物研究成本; 英美国家颁布的许多动物保护法规条款都是动物福利组织团体极力推动的结果(while it should be said that many of the early regulations were a result of efforts of animal welfare groups); 每当成功推动一项动物立法, 动物权益组织集团又将开始煽动发起新的动物保护立

法提案(all of these new regulations and the continuing barrage of proposed legislation instigated by animal activist groups)^[5]。

最新近的例子是 2022 年 12 月底美国通过食品药品管理局现代化法案(FDA Modernization Act 2.0),对于申请进入或进行临床试验(preclinical trials)的新药或仿制药物,允许只进行离体细胞或类器官试验、计算机模拟试验等来代替动物试验,一定程度上放松了对药物进入临床前必须进行动物试验来评估安全性和有效性的强制性要求,打开了一个豁口。该法案受到欧美和世界各地动物福利权益团体的热烈欢迎和庆祝,声明“该法案是动物福利行业长期坚持斗争 80 多年以来取得的巨大胜利”。动物福利行业宣称“斗争 80 多年”说法的背景为何?笔者注:1938 年美国药商采用二甘醇代替乙醇作为溶剂配制抗生素磺胺的口服酞剂导致 105 人死亡,美联邦第一次立法规定新药上市前要(但尚不是强制性必须)进行动物试验检测药物的安全性,并成立 FDA 接管农业部主管的食品药品安全;1962 年因为抗妊娠呕吐反应的药物“反应停”导致全球 1.2 万多名“海豹肢”畸形婴儿事件,不包括后续数万名较轻程度的异常发育婴儿,是全世界迄今为止最严重的药物毒性悲剧事件。美国因有 1938 年法案受害最轻,促使美国联邦批准 FDA Drug Amendment 及修正案强制要求所有药物在进入人体临床试验前,必须进行动物试验证明药物的安全性和有效性,也称为 FDA 药物动物实验法则(FDA animal rules,可称为 1.0 版,相对于 2022 年推出的 2.0 放水版)。从 1938 到 2022 年,相距 84 年。2022 年 12 月底 FDA Modernization Act 2.0 法案公布至今,美国 and 世界各国医学科学界保持相当沉默的态度,或者说无奈。

长期以来国内外医学科学界的基本共识是,目前还没有公认可靠的其他评价方法可以取代动物试验用于评估药物对人体的安全性和有效性,尤其对新药的毒理学安全性评价。笔者十分认同,为了人类健康和生命安全,动物试验对临床前药物研发是必要的、不可或缺、不可替代。如果该法案全面宽松实施,确实可以大幅度减少用于药物试验的动物,实现动物福利权益团体追求的减少试验动物目的,但那不是人类之福;人类重回以身试药时代,付出多大代价尚未可知,但早晚要付出代价。

笔者对此进一步解读, FDA Modernization Act

2.0 法案确实开了个口子,“允许”离体细胞和类器官试验、计算机模拟计算来替代动物试验,但该法案没有任何“取消”或“禁止”动物实验的法律术语涵义。欧盟此前也推出过类似法案,但药物审批并没有发生实质改变,新药和仿制药的动物试验数据仍不可少,直接后果是药物研发所需的动物实验研究变得十分困难。预见在将来相当长时期美国 FDA 不会“取消”也不会放松新药临床前动物试验评价,但对于某些类型的药物或既往具备动物试验数据的仿制药可能会放宽。预见中国的新药和仿制药的临床前动物试验评价政策,将不会随其改变。

值得注意和思考的是,大部分中文网络在报道介绍美国 FDA Modernization Act 2.0 法案时采用中文翻译“终止动物试验”加以渲染,给读者的印象是美国“禁止动物试验”,但不提供相关背景和法案条文信息。逐条对照法案的英文看,可以说中文网页翻译介绍很多是错误的,要么是无知,要么是别有用心误导。

FDA Modernization Act 2.0 法案作为最新的鲜活例子,展示了西方动物权益组织集团、大药厂利益集团、政治集团之间的博弈。其中,动物福利权益组织集团成功推进减少动物试验入法,实现了其一贯追求的减少动物实验的阶段目标,是赢家;一些大药厂在 1938 年和 1962 年 FDA 制订动物试验规则时就持反对态度甚至起诉美国政府,因为动物试验增加药物开发成本,现在能够减少动物试验成本自然乐见其成甚至乐助其成。但应该指出很多大药厂的药物研发工作者秉持科学态度,对该法持反对或保留态度;政治集团将会获得动物权益组织的民意支持和更多的政治捐款;未来的科学史将描述医学科学团体的努力;沉默的民众将承担可能的后果。

他史为鉴,吾史为鉴。中华文明文化不存在西方动物权益主义赖以发酵发展的人文宗教土壤。然而,动物福利权益主义势力目标坚定,资金雄厚,善于运作和渗透发展。中文网络不乏出现以西方社会的动物福利权益主义观点主张,迥异于中华传统文化世界观和价值观,迥异于现代生物医学及实验动物科学史,不应任其渗透影响我国社会和公众包括生物医学界及实验动物科学界。

为此,提出第三条工作建议,我国实验动物科学工作者要与国内外形形色色的动物福利权益主义观点划清专业界限,不入其藩篱羁绊,坚守医学

实验动物为人类健康和医学发展服务的宗旨,务实推进实验动物的科学使用和管理及相关科研伦理工作,支持我国生物医学研究发展。

4 结语

基于现代医学和实验动物科学发展史,结合我国的现实情况,呼吁和建议我国实验动物科学工作者思考认识我们的专业工作边界:不宣扬、不组织、不参与所谓的动物日或实验动物日以及所谓实验动物慰灵碑活动,厘清实验动物科学与动物福利权益主义观点的界限。

从国家政策讲,我国对于在公共场所和工作区域修建纪念设施、塑像和纪念碑亭等,1988 年发布《中共中央办公厅、国务院办公厅关于严格执行建立纪念设施有关规定的通知》(中办发〔1988〕9 号),此后中办和各部委相继发布过多个关于纪念设施及相关管理规范的通知文件,一直有效。

从中华优秀传统文化讲,我国千百年来形成了社会和家族祭祀礼仪制度,自古以来官学机构从没有为动物设立纪念日或纪念碑石之说。通俗地讲,在公共场所设立任何碑石纪念,都应该先问答一些问题:为什么立?由谁立?立在哪?别人不认同怎么办?会不会被他人推倒移除?谁批准?谁主持纪念?什么人来参加纪念?纪念什么?不认同或反对怎么办?

最后,从所谓实验动物纪念日和碑石的思维逻辑演绎推测来讲,中西方畜牧业动物、水产动物立否?各类动物养殖基地、屠宰厂立否?喜食生蚝海鲜鱼虾蟹的家庭人士,何以处之?无数动物献身人类衣食健康,粉身碎骨,赴汤蹈火,功莫大焉,全产业链条到百姓厨房遍地立碑纪念否?显然不可能。

既不为这些动物立,实验动物何得独享!

参考文献:

[1] Key JD, Rodin AE. William Osler and Arthur Conan Doyle versus the antivivisectionists: some lessons from history for today [J]. Mayo Clin Proc, 1984, 59(3): 189-196.

[2] Finn MA, Stark JF. Medical science and the Cruelty to Animals Act 1876: A re-examination of anti-vivisectionism in provincial Britain [J]. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci, 2015, 49: 12-23.

[3] Matfield M. Animal experimentation: the continuing debate [J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(2): 149-152.

[4] Traystman RJ. The goal of animal welfare, animal "rights", and antivivisectionist groups in the United States [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 1990, 2(3): 153-158.

[5] Loeb JM, Hendee WR, Smith SJ, et al. Human vs animal rights. In defense of animal research [J]. JAMA, 1989, 262(19): 2716-2720.

[6] Bruno Atalić, Stella Fatović-Ferencić. Emanuel Edward Klein- the father of British microbiology and the case of the animal vivisection controversy of 1875 [J]. Toxicol Pathol, 2009, 37(6): 708-713.

[7] 徐国恒. 美国卫生署与国立卫生研究院 NIH 主导的实验动物管理体系的演变和启示 [J]. 中国实验动物学报. 2023, 31(1): 134-140.

Xu GH. PHS/NIH policy on laboratory animal care and use in the United States [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 134-140.

[8] 徐国恒. 美国农业部主导的实验动物管理政策演变和启示 [J]. 中国实验动物学报. 2023,31(1): 129-133.

Xu GH. U. S. federal law: animal welfare act and animal welfare regulations and enlightenment [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 129-133.

[收稿日期]2023-10-31

周晓辉. 基于对生命的尊重: 略谈实验动物纪念日与纪念碑 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 121-124.

Zhou XH. Based on respect for life: A brief talk about Laboratory Animal Memorial Day and Monuments [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 121-124.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.014

基于对生命的尊重: 略谈实验动物纪念日与纪念碑

周晓辉

(复旦大学附属上海市公共卫生临床中心, 上海 201508)

【摘要】 实验动物作为生命科学、医学、药学等领域研究的基础载体和关键条件, 对现代科学的发展发挥了极其重要的作用。动物福利伦理建立于人类文明道德基础之上, 是社会、经济发展到一定阶段的产物。从科学角度看, 善待动物既是人道主义的需要, 也是科学实验的需要。本文从实验动物福利伦理的发展历程及法规政策内容、是否需要设立及如何设立实验动物纪念日和纪念碑等几个方面阐述实验动物福利的作用和意义, 呼吁实验人员遵循“3R”原则并增强责任感和规范意识。

【关键词】 实验动物; 动物伦理; 实验动物纪念日; 实验动物纪念碑

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0121-04

Based on respect for life: A brief talk about Laboratory Animal Memorial Day and Monuments

ZHOU Xiaohui

(Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China)

【Abstract】 As the basic carrier and key condition for research in the fields of life science, medicine and pharmacy, laboratory animals have played an extremely important role in the development of modern science. Animal welfare ethics is built on the moral foundation of human civilization and is a product of social and economic development to a certain stage. From a scientific point of view, treating animals well is both a humanitarian need and a need for scientific experiments. This paper elaborates the role and significance of laboratory animal welfare from the aspects of the development of laboratory animal welfare ethics and the content of regulations and policies, whether and how to establish a memorial day and monument for laboratory animals, and calls on experimental personnel to follow the “3R” principle and enhance their sense of responsibility and awareness of norms.

【Keywords】 experimental animals; animal ethics; Laboratory Animal Memorial Day; Laboratory Animal Monument

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

据粗略估计, 全世界每年有数以亿计的动物被用于科学实验^[1]。

实验动物 (laboratory animal) 是支撑生命科学研究和发展的重要基础和关键条件, 现代医学和生命科学的起源和发展很大部分是基于动物实验的研究结果而来的。生物医学发展到今天, 人类对生命的认识深入到了分子水平; 我们战胜了天花等瘟

疫, 在结核、肝炎、艾滋病、新冠等新发和重大传染病的防治方面也取得长足的进步, 离癌症的攻克又近了一大步, 器官移植等复杂手术的发展、各类新药和疫苗研发等方面的进展也突飞猛进; 现代生物医学已被推进到了前所未有的高度。这一切的进步都离不开一个默默献身却无法为自己发声的群体——实验动物。

在过去的 100 年里,有 75% 以上的诺贝尔生理学或医学奖研究成果是通过实验动物和动物实验获得的。英国皇家学会等动物实验支持者更认为,实际上 20 世纪的每一项医学成就都依赖于某种方式的动物使用。1947 年基于针对“二战”中纳粹对人类进行不人道实验的纽伦堡审判,国际社会制定了人体试验的《纽伦堡守则》(Nuremberg Code)成为后来国际通行的人体临床试验准则^[2];其中第三条要求开展人体试验应先基于动物试验的结果。

正是由于实验动物对人类社会的巨大牺牲和对科学进步的巨大贡献,关于实验动物相关的伦理与福利也越来越受到人们的重视。与动物实验伦理审查相关的“3R”“4R”原则、动物福利保护相关的“5F”“5D”观念等相继被提出。

1959 年动物学家 Russell WMS 和微生物学家 Burch RL 发表了《人道主义实验技术原理》(the Principles of Human Experimental Technique)一书^[3],系统地提出了 Reduction(减少)、Replacement(替代)和 Refinement(优化)的“3R”理论;1993 年美国芝加哥伦理化研究国际基金会在“3R”的基础上提出了“4R”原则,增加了“Responsibility”作为第四个原则,要求人们在生物学实验中增强伦理观念,呼吁实验者对人类和动物都要有责任感^[4]。2016 年美国德克萨斯理工大学 Curzer HJ 等提出了另一种第四个“R”—Regulation,要求机构的动物使用与伦理委员会(IACUC)应对实验动物无结果方案“拒绝”^[5],以强调对实验动物的责任以及对动物实验的社会价值与科学价值的评价。

1964 年英国露丝·哈里逊在《动物机器》中描述了农场动物所需的 5 种基本行为自由,1979 年英国皇家防止虐待动物协会(RSPCA)提出了动物的“5F”(Five Freedoms),即不受饥渴、生活舒适、免受痛苦伤害和疾病、无恐惧和无悲伤、可表达天性的五大自由;后被考林·斯伯丁写入 2000 年出版的《动物福利》(Animal Welfare)一书^[6]。2016 年新西兰梅西大学的 David Mellor 教授提出“5D”(Five Domains)理论,要求从两个维度 5 个方向(包括生理/功能维度的 4 个方向:营养、环境、生理/健康和行为,以及精神维度的 1 个方向:情绪)达到良好的动物福利状态^[7]。然而,关于实验动物是否应完全享有五大自由,科学界也还存在一些争议。

我国自 1988 年起由科技部颁布了《实验动物管理条例》等法规性文件,2006 年又发布了《关于善

待实验动物的指导意见》^[8]。2018 年以后 GB/T 35892-2018《实验动物 福利伦理审查指南》^[9]等实验动物福利伦理相关的推荐性国家标准以及团体标准发布,标志着经过三十多年的发展,我国实验动物行业在动物福利伦理的理念和规范上已逐步与国际接轨。目前,我国大多数涉及实验动物的单位均成立了 IACUC 或类似的动物伦理委员会组织;有很多单位树立了实验动物纪念碑和“慰灵石”等,而且在每年 4 月 24 日左右举行实验动物纪念活动。

然而,关于实验动物纪念日 and “慰灵石”的设立也存在一些争议。有部分科研工作者认为,所谓“世界实验动物日”是由反对使用动物进行研究的组织倡议建立的,旨在停止一切动物实验;而“慰灵石”源于日本特殊鬼神文化;因此,他们反对设立实验动物纪念日和实验动物“慰灵石”。本人拟就这两个观点尝试进行一点初步的探讨。以下仅为个人浅见,权当抛砖引玉,以待商榷。

1 关于实验动物纪念日

英国反活体解剖协会(NAVS)是世界上第一个反对动物实验的组织^[10]。1875 年由 Miss Frances Power Cobbe 在伦敦发起成立,“二战”后英国空军上将 Sir Hugh Dowding 成为该协会会长,他曾在英国上议院针对动物实验发言。1973 年 NAVS 启动了一个专门的基金会,试图证明动物实验在医药和科学研究中并非必需,是可以被替代的;宣传倡导不使用动物的科学研究。1979 年 4 月 24 日(Dowding 的生日)NAVS 发起设立了“世界实验动物日(the World Lab Animal Day)”,前后 1 周则被称为“世界实验动物周”。NAVS 和其他反对动物研究的团体声称,“世界实验动物日”得到了联合国的认可。然而,4 月 24 日这天并未被列入联合国正式纪念活动名单中^[11]。

各大洲的反活体解剖者每年都会在该纪念日集会,标志性活动是反对动物实验的团体举行示威和抗议活动。1980 年,由善待动物组织(PETA)创始人英格丽德·纽柯克领导 PETA 在美国组织了第一次“世界实验动物日”抗议活动。2010 年 4 月,抗议者在伦敦市中心游行呼吁停止在研究中使用动物,2012 年伯明翰和 2014 年诺丁汉也发生了类似的游行。

“世界实验动物日”活动也引起了捍卫在科学研究中使用动物的科学团体的关注。2009 年 4 月

22 日加州大学洛杉矶分校的支持动物试验组织 UCLA Pro-Test 成员举行了一次集会,申明支持利用动物开展生物医学研究,并谴责动物权利组织对 UCLA 教员 David Jentsch 教授(使用动物的生物医学研究者)的暴力和骚扰^[12-13]。

由上可知,在英美等主要西方国家,4 月 24 日的“世界实验动物日”的确是动物权利组织发起的以反对使用动物进行研究为宗旨的活动;而美国支持动物试验组织 UCLA Pro-Test 则曾经在 4 月 22 日抗议过前者的活动。我国实验动物从业者大多数在 4 月 24 日开展针对实验动物的纪念宣传活动,在与英美等西方世界交流时,的确有让他们产生我们反对动物实验的错误印象的可能。

虽然当前国际上有一些呼吁停止/禁止动物实验的声音,但在目前乃至相当长远的未来,人类的科学进步仍然离不开实验动物这一人类“替身”的参与。特别是在新发与再现传染病、肿瘤、心血管病和脑病等重大疾病的机制研究,各类新药和疫苗安全性和有效性评价,以及航天与太空医学的发展等方面,都必须在动物实验的基础上才可能实现突破。美国国家科学院实验动物研究所认为,即使是复杂的计算机模型也无法取代动物研究,因为这些模型无法处理分子、细胞、组织、器官、生物体以及环境之间极其复杂的相互作用^[14]。

作为生物医学领域的科研工作者,支持动物实验是我们的基本立场。另一方面,鉴于实验动物为人类福祉和文明进步所作出的巨大牺牲和重大贡献,更是基于对生命尊重的人道主义精神,我们有必要开展实验动物相关的宣传和纪念活动。当然,这种活动需要体现出科学精神与人文精神的交融。

本人建议:为避免不必要的误解,可避开 4 月 22 日和 4 月 24 日,在一年中选择某个其他的特定日期,设立 1 个“中国实验动物科学日/纪念日”,来倡导对实验动物和动物实验的正确态度,不应反对必要的动物实验,但应提倡动物福利和加强动物实验的伦理审查。通过科学日/纪念日这种仪式感强的活动,有利于让社会公众了解实验动物科学,同时促使实验动物从业人员遵循“3R”原则并增强责任感和规范意识,在实际工作中切实保障动物福利。而实验动物从业人员强调对动物福利的重视,也是应对极端动物权利主义者的有力武器。

2 关于实验动物纪念碑及“慰灵石”等

西方国家没有设立过专门针对实验动物的纪

念碑,但有针对性宠物或其他动物的纪念公园和纪念碑。例如,美国加州的涌泉宠物纪念公园、波士顿城麻雀纪念碑、犹他州盐湖城圣殿广场海鸥纪念碑;新西兰汉博港海豚纪念碑;法国巴黎的鸽子纪念碑、救冻犬纪念碑;德国巴伐利亚的鹤纪念碑;希腊罗德岛的鹿纪念碑;荷兰吕伐登市的牛纪念碑;意大利罗马的驴纪念碑;澳大利亚毛虫纪念碑等。

俄罗斯设立有实验动物纪念塑像。俄罗斯科学院西伯利亚分院细胞和遗传学研究所前有一个青铜实验鼠纪念塑像,描绘了一只鼠科学家正在编织双链 DNA 的形象。在圣彼得堡有一个由前苏联时期应巴普洛夫要求而建立的狗纪念碑。2008 年 4 月 11 日在莫斯科建立首只太空犬莱卡的纪念碑石。

目前实验动物“慰灵石/碑”或纪念碑等主要分布在日本、中国、韩国等东亚地区国家的医学院和一些机构中。这些院校和机构一般都有一年一度的动物纪念活动,以纪念那些研究中牺牲的动物。

日本“动物慰灵碑”多用以纪念因人类而牺牲生命之动物的灵魂。据日本学者依田贤太郎的研究,日本“动物慰灵碑”的习俗可追溯到绳文人有立“动物冢”的习性,后来也受到中国儒家、道教以及日本自身神道教等思想和信仰的影响;主要针对的动物可分成三类,分别为“被人类使用过的动物”、“食用动物”和“已神格化的动物”,实验动物属于第一类^[15]。日本近代方始的实验动物慰灵碑,最早是由北里柴三郎在大正二年(1914 年)于旧东京大学附设传染病研究所建立的“家畜群灵塔”。日本至今仍有这个传统,建有动物实验室的医学院校和科研单位,基本上都要为实验中死去的动物立碑,并有一年一度的追悼活动(“抚灵祭”),用于纪念在医学院牺牲的动物。

在中国的文化中没有“慰灵”这样的词汇,而且大多数科研工作者都是唯物主义者。但抛开宗教的色彩,设立实验动物纪念碑仍有其重要的意义。为了纪念人世间的英雄我们可以设立纪念碑;对于为人类健康福祉和科学进步而献身的实验动物,也应该设立一个纪念碑(可以不叫慰灵石,以避免“源自日本鬼神文化”的误解)。设立这样一个纪念碑,实际上是对我们过往作为的一种反思,更重要的是对后来者的一种告诫;通过设立纪念碑和开展有仪式感的纪念活动,让动物实验研究者对牺牲的动物怀有一定的感激之情,让每一位实验动物从业者产生一种戒慎的意识;在自己的实际工作中应考虑如

何尽量善待动物,并努力让牺牲了的生命在科学或医学上具有更大的价值。

3 结语

许多使用动物开展研究而取得硕士或者博士学位的研究生,在他们学位论文的谢辞中都感谢了在其研究实验中献出宝贵生命的实验动物。的确,每一个生命个体都非常可贵。数以亿计的实验动物为了人类医药事业的发展“向死而生”,担当了人类“替难者”。人类应该感恩它们的奉献,回馈它们的牺牲。支持设立实验动物纪念日和实验动物纪念碑,既是致敬实验动物为人类所做出巨大贡献和牺牲的感恩之举,也是对实验动物从业人员一种心理精神上的舒缓和慰藉。

如何对待动物,反映了人类对世界的认识层次,也表明了人类对生命的根本态度。作为实验动物科学工作者,尤其应该爱护动物、珍惜生命。为了人类的健康福祉和科学进步,我们不得不开展动物实验,但是应该尽最大的努力减少实验动物的使用。人类在享受实验动物在各领域带来福利的同时,也应该尽可能地人道地对待实验动物。遵循“3R”原则并增强责任感和规范意识、切实保障实验动物的福利,这不仅关乎个人的道德水平,更能彰显社会的文明程度。

“落其实者思其树,饮其流者怀其源。”我始终坚信,在大自然和浩瀚宇宙的面前,善待动物就是善待人类自己。基于对生命的尊重,谨此向所有为人类健康福祉和科学进步而牺牲的实验动物致敬!

参考文献:

[1] Cohn M. Alternatives to animal testing gaining ground [N]. The Baltimore Sun. August 26, 2010.

[2] Shuster E. Fifty years later: the significance of the Nuremberg Code [J]. N Engl J Med, 1997, 337(20): 1436-1440.

[3] Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique [M]. London: Methuen; 1959.

[4] Ogden BD. Principles of animal research: replacement, reduction, refinement, and responsibility [J]. Anim Law Rev,

1996, 2: 167-170.

[5] Curzer HJ, Perry G, Wallace MC, et al. The three Rs of animal research: what they mean for the institutional animal care and use committee and why [J]. Sci Eng Ethics, 2016, 22(2): 549-565.

[6] Colin Spedding. Animal welfare [M]. London: Routledge; 2000.

[7] Mellor DJ, Reid C. Concepts of animal well-being and predicting the impact of procedures on experimental animals. In: Improving the Well-Being of Animals in the Research Environment. Glen Osmond, SA: WellBeing International (1994). p. 3-18. Available online at: <https://www.wellbeingintludiesrepository.org/exprawel/7/>

[8] 国家科技部. 关于善待实验动物的指导性意见(国科发财字[2006]398号)[Z]. 2006-09-30. Ministry of Science and Technology. Guidance on kindness to laboratory animals (2006) No. 398 [Z]. 2006-09-30.

[9] 国家标准化管理委员会.《实验动物福利伦理审查指南》GB/T35892-2018[S]. 2018-09-01. National Standardization Administration Committee. Guidelines for ethical review of laboratory animal welfare GB/T35892-2018 [S]. 2018-09-01.

[10] Rawlings BB. The anti-vivisection societies and the hospitals [J]. Hospital (Lond 1886), 1895, 19(479): 154-155.

[11] Leech K. World Day for Laboratory Animals [J]. Lab Anim (NY), 2016, 45(6): 235.

[12] Ebright O, Liponi K. West Side Story: Scientists vs. Activists [EB/OL]. [2009-04-22]. <https://www.nbclsanjeles.com/news/local/west-side-story-scientists-activists-face-off-at-ucla/1878196/>

[13] Gordon L, Abdulrahim R. Scientists, supporters rally at UCLA for animal research [EB/OL]. [2009-04-23]. <https://www.latimes.com/archives/la-xpm-2009-apr-23-me-animals23-story.html>

[14] National Research Council of the National Academies. Science, medicine, and animals [M]. Washington, DC: National Academies Press; 2004.

[15] 依田贤太郎. “動物塚考”-動物の墓と慰霊碑 [J]. LABIO 21, 2008, 31: 18-22. Yoda Kentaro. “Animal mound study”-Animal graves and memorial monument [J]. LABIO 21, 2008, 31: 18-22.

[收稿日期]2023-09-18

刘云波. 以人为核心认识实验动物福利与伦理 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 125-126.

Liu YB. Human-centered understanding of laboratory animal welfare and ethics [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 125-126.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.015

以人为核心认识实验动物福利与伦理

刘云波

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京)

【摘要】 本文通过对实验动物福利内涵的理解阐明在生命科学研究中实验动物福利与伦理应该做到以人为核心, 态度端正、积极负责。

【关键词】 实验动物; 马斯洛层次需求理论; 福利与伦理

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0125-02

Human-centered understanding of laboratory animal welfare and ethics

LIU Yunbo

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100020, China)

【Abstract】 This review clarifies that laboratory animal welfare and ethics in life science research should be human-centered, positive and responsible through the understanding of the connotation of laboratory animal welfare.

【Keywords】 laboratory animal; Maslow's hierarchical needs theory; welfare and ethics

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

实验动物作为生命科学研究中的“活的试剂”, 是食品、药品评价中的“活的天平”, 是医学、药学、航空航天、疾病防控研究中的“人类替难者”, 是人类健康与安全的“活的屏障”, 是“最后一道防线”。实验动物的作用随着科学的进步日显重要, 从开始的生命科学的支撑条件, 成为生命科学进步的驱动力, 甚至现在可以说, 已经成为生命科学突破的引领者。利用实验动物解决生命科学的重大问题, 保护人类健康成为了全世界的共识。利用实验动物, 通过动物实验才能更好地理解生命现象、了解生命机制、明晰疾病发生与防治、测试物质的效果(力)、测试物质的毒性, 才能保障人类的生存与健康。在 2003 年的 SARS 和 2020 年的新冠防治过程中, 凸显的实验动物的不可或缺, 就是最好的例证。

正是因为实验动物应用越来越广泛, 对于是否使用实验动物、怎样使用实验动物、如何对待使用

过程中的实验动物这些问题, 除了专业人士以外, 社会各界也越来越关心, 实验动物福利与伦理问题引起了全社会的重视。

那么, 如何理解实验动物福利的内涵呢? 实际上, 实验动物福利是人类给予实验动物的措施以保障实验动物的生存与健康以及适当的舒适。按照马斯洛层次需求理论^[1-3], 实验动物福利可以保障到第三级的水平, 生存、健康与舒适, 即为实验动物生命延续提供所需要的营养和生存条件, 为实验动物健康提供良好的保障措施, 为实验动物的舒适提供必要的条件。具体来说, 上述这些条件和措施, 就是提供足够的营养全面的食物和饮水、良好的温度和湿度等环境条件, 以保证实验动物的生理需求、健康需求、行为需求, 没有饥饿、没有伤害、没有疾病、没有恐吓、没有悲伤、生活舒适、可表达天性。实验动物福利所有的表述和内涵最后都集中到实

验动物从业人员如何善待实验动物,因而,可以理解为实验动物福利本身就是实验动物伦理的重要组成部分,是人对待实验动物的态度的外在表现。

基于实验动物福利内涵的认识,很容易理解,提倡实验动物福利就代表了人们对于实验动物和动物实验的态度。而所谓的实验动物伦理,严格地说,是指人类对待实验动物和动物实验遵循的社会道德标准和原则。因为是一种态度,就会涉及思想和理念的思考和碰撞,也就会涉及人类的责任,因而就会引起动物实验必要性和动物权利的思考,尤其是动物在地球上是否具有跟人类同等的权利。动物权利主义者会认为,动物跟人类一样在地球上拥有同等的权利,反对开展动物实验,经常会看到西方动物权利主义者破坏动物实验设施、放掉实验中动物的事件发生的报道。之所以出现上述状况,是人们还缺乏一个共识,开展动物实验的目的是为人类健康与安全服务的!不论是研究生命现象、研究人类疾病、开发新药,实验动物扮演了人类替难者的角色,它的存在就是要解决人类健康和安全问题的。实验动物的角色决定了它不可能跟人类拥有同样的权利,这应是人们对待动物实验态度的一

个方面。另一方面,动物实验既然是为人类健康与安全服务,而且是好的服务,那必然要求要将实验动物做成好的标准化的“活的试剂”“活的天平”,必然要给与实验动物好的食物、好的条件,也就是人类善待实验动物的一面,也就是要给予实验动物好的福利。

综上所述,重视实验动物福利与伦理,其实就是要以人为核心,端正人类对于实验动物和动物实验的态度,正确理解实验动物福利伦理的内涵,既要认识到实验动物和动物实验对于人类健康与安全的重要性和必要性,也要善待实验动物,给予实验动物良好的福利,为人类健康与安全更好的服务。

参考文献:

[1] Maslow AH. A theory of human motivation [J]. Psychol Rev, 1943, 50(4): 370.
[2] Maslow, AH. Motivation and personality (3rd ed.) [M]. Delhi: Pearson Education; 1987.
[3] Maslow, AH. Religions, values, and peak experiences [M]. New York: Penguin; 1970.

[收稿日期] 2023-10-23

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》2024 年征订启事

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

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

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行
帐号:11220201040003764
单位抬头全称:中国实验动物学会

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

杜小燕. 关于实验动物福利伦理实践中主体责任的思考 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 127-129.

Du XY. Consideration about subject responsibility in practice of laboratory animal ethics and welfare [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 127-129.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.016

关于实验动物福利伦理实践中主体责任的思考

杜小燕

(首都医科大学基础医学院, 北京 100069)

【摘要】 在实验动物福利伦理实践中, 3R 原则是其核心内容。作为这一实践活动主体的实验动物工作者在其中发挥主导作用, 应承担起相应的主体责任。本文从主体责任的提出、贯彻福利原则的需要、福利伦理技术方法的需要、开发福利新产品的需要、福利伦理相关政策执行的需要以及设立实验动物纪念日和纪念碑以体现主体责任等几个方面阐述了主体责任在实验动物福利伦理实践中的作用、实现途径和意义。

【关键词】 实验动物福利; 责任; 主体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0127-03

Consideration about subject responsibility in practice of laboratory animal ethics and welfare

DU Xiaoyan

(Capital Medical University, School of Basic Medical Sciences, Beijing 100069, China)

【Abstract】 In the practice of laboratory animal ethics and welfare, 3R is the core of contents. As the subject in this process, individuals working in laboratory animal field play a leading role and should take corresponding responsibility. In this article, the author discussed the function, realized route, and significance of subject responsibility in the practice of laboratory animal ethics and welfare by following aspects: proposal of subject responsibility, requirements of responsibility in the implementation of ethics and welfare regulation, in the application of ethics and welfare technique and method, in the development of ethics and welfare products, in the management and monitoring of ethics and welfare application, as well as establishing an anniversary and cenotaphs to embody subject responsibility.

【Keywords】 laboratory animal welfare; responsibility; subject

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

随着科学技术的进步, 人们在使用实验动物进行各类科研实践的同时, 也越来越关注实验动物福利伦理。1959 年, 实验动物福利的核心内容“3R”原则 (Replacement, Reduction, Refinement) 由 William Moy Stratton Russell 和 Rex Leonard Burch 在《the Principles of Humane Experimental Technique》一书中第一次正式提出, 成为之后实验动物福利伦

理的通用准则^[1]。1988 年我国第一部实验动物法规《实验动物管理条例》发布, 其中第二十七条涉及了实验动物福利的内容, 即规定“从事实验动物工作的人员对实验动物必须爱护, 不得戏弄或虐待”, 后修订时增加了“禁止虐待动物, 减少动物不必要的痛苦, 开展动物替代方法研究等”内容; 2018 年发布并实施的中华人民共和国国家标准 GB/T 35892-

2018《实验动物福利伦理审查指南》,进一步从人员资质、设施条件、动物来源、饲养、使用、运输和职业健康与安全的角度对动物福利伦理提出了规范要求^[2]。回顾这些历史我们不难发现,我国实验动物福利实践从实现最低要求(禁止虐待动物)发展到更高层次(人道终点、正确实施安死术等),取得长足进步。作为这一认识和实践过程的主体——人发挥了重要的主观能动性。在此,本文将从以下几个方面分享从业近 20 年来在教学和科研工作中践行实验动物福利伦理时,对主体责任的一点思考。

1 “4R”原则提出主体责任

主体(subject)和客体(object)是实践与认识领域的一对哲学概念。所谓主体,就是具有积极主动性的实体。主体是认识和改造客体的实践活动的物质承担者。传统哲学认为,只有人类是主体^[3]。在实验动物科学实践活动中,实验动物工作者是主体,相应的客体是实验动物和动物实验。我们可以清晰看到,实验动物福利伦理的核心内容“3R”原则是针对实验动物或动物实验这一客体而言。例如,Reduction 是研究如何减少动物数量,Replacement 是研究可以用哪些低等、无生命的替代高等或有生命的动物;而 Refinement 所采取的方式方法既是减少动物痛苦,更是为了实验结果的准确性。以“3R”原则为核心的实验动物福利伦理,没有包括或者强调实验动物从业人员、研究者、科学家作为这项工作的主体所发挥的作用。因此,美国芝加哥“伦理化研究国际基金会”提出第 4 个原则 Responsibility,将原有的“3R”原则扩展为“4R”,呼吁实验者对人类和动物都要有责任感,首次体现了主体的作用,这对于实验动物福利伦理的实践活动,具有重要意义。

2 贯彻福利伦理原则需要主体责任

作为主体的人在实践中具有自我意识,能够自觉地认识和改造客体,使客体朝着有利于人类生存发展的方向转化。在贯彻实验动物福利伦理的过程中,实验动物从业人员作为主体是占主导地位的,其责任心或者是对实验动物福利伦理的重视程度,决定是否真正能实现动物福利伦理。我们要通过教育、培训、宣传、奖励等多个层面,激发主体责任心,从而在实验动物科学实践尤其是动物实验中体现福利伦理原则。这些教育、培训、宣传不应

仅限于学术会议、各类实验动物从业人员培训,还应该包括科普活动等受众范围更广的渠道。

3 采用符合规定的技术方法需要主体责任

实现实验动物福利伦理的核心内容是“3R”原则,其是否能真正实施从某种程度上讲完全取决于主体的责任心。要实现实验动物使用数量的减少,需要实验的设计者和实践者作为主体富有责任心,在动物实验设计之初,利用统计学、文献等多种途径实现 Reduction;动物实验中的 Refinement 策略之一是使用麻醉品减少动物痛苦,提高实验数据可靠性,但选择什么样的麻醉品更适合动物实验,需要主体具有相应的知识。例如,有多个杂志^[4-5]反复强调水合氯醛不允许用于麻醉动物的情况,但 2023 年的今天,课题申请书中还不乏研究者用该麻醉品进行动物手术麻醉。再如,小鼠眼眶静脉丛采血是一种常用的方法,是否每一位操作者在实施过程中均能做到应用局部麻醉药来减少动物痛苦呢?这恐怕要打个问号。“3R”原则应该体现在动物实验全过程中,包括采用怎样的术式、观察动物的疼痛表现、术后护理等,均依赖于主体责任和主体对专业知识的掌握。采用替代方法,推动更多的实验动物福利技术的研究也需要主体承担其责任^[6]。

4 开发实验动物福利新产品需要主体责任

要实现实验动物福利,相关产品的开发商也需要具有主体责任。近年来我国非常重视实验动物福利,在改善环境条件、环境丰荣度方面做了大量的努力。例如,为了模拟动物的自然生活环境,让动物生活在一个利于表达天性的环境中,保持心情愉悦、情绪稳定,开发了很多附加的装置、器具、材料和玩具^[7]。这些产品有的发挥了很好的作用,例如多种小鼠筑巢材料,能够显著提高小鼠的繁殖性能 and 安全感;有的则仅凭生产商的主观臆想而制,比如为小鼠制作啃咬棒、五颜六色的玩具(其实有的动物根本无法识别颜色)等,并未发挥应有的作用。这让我想起一个故事,有人想驯化蛇,为了模拟其冬眠环境,采取挖洞、放各种树枝等策略,但均未成功。其原因在于我们开发实验动物福利新产品时,作为主体的人,常常依据自己的主观臆断行事,但是系统性研究不足,忽略了作为客体的实验动物的真实反应和感受。

5 实验动物福利伦理政策的执行需要主体责任

为了实现实验动物福利伦理,我国已经相继出台了多项政策法规,各单位也成立了实验动物管理委员会,建立兽医巡查制度,对实验过程中福利伦理原则的实施进行监督管理。在实验动物研究项目申请、实施之初,很多单位都进行福利伦理审查,对实验技术方案中为什么使用动物、用多少动物、采取什么措施减少动物痛苦等进行全过程审查。但是,即使通过实验动物福利伦理审查的项目,常常也不能让动物获得本应有的“福利”。因此,各单位管理者在实验动物福利伦理实践中的主体责任非常重要,只有对项目进行全方位、全过程的管理监督,才能真正实现实验动物福利。

6 设置实验动物纪念日来体现主体责任

实验动物学科在生命科学的发展中发挥重要的支撑作用。各种各样的实验动物作为人类的替难者,为生命科学的发展做出了重要贡献。那么,如何体现作为主体的人,对作为客体的动物所承担的责任呢?本人认为可通过设置实验动物纪念日来体现。这个纪念日可以和亚洲各国根据共同的文化传统来设置,也可以根据我国自己的国情来设置,并非激进动物保护主义倡导的所谓世界实验动物日。设置实验动物纪念日,既是实验动物从业者作为主体的责任心、爱心和感恩的体现,也是提高公众对实验动物科学认识、进行科普的好机会。

7 实验动物纪念碑是主体责任的承载

在纪念和感恩实验动物为人类做出贡献时,可能需要形式上的承载。目前很多单位会为实验动物树立慰灵碑以示纪念。为此笔者查了日文维基百科,其中对慰灵碑的解释为“为了纪念因事故、战争、灾难等而死去的人与动物的亡灵而建立的石碑”。慰灵碑有抚慰灵魂、告诫人们不要让这样的事情再次发生的意思,还有警告的意思,遵循这些意思的文字会刻成碑文。如果是灾害致人死亡的话,也可以兼作灾害纪念碑,例如日本广岛的和平纪念公园里有纪念遇难者的慰灵碑,手柄山中央公园有纪念太平洋战及全国战灾都市空难死者的慰灵塔,在某些神社中,所树立的也是慰灵碑。虽然日文维基百科中慰灵碑对应的英文是 cenotaph,但

这个英文词语多指中文所说纪念碑或衣冠冢之意,尤其指为安葬于别处的死者所立的纪念碑,如雅典人为诗人欧里庇得斯建立的 cenotaph,佛罗伦萨教堂为但丁、尼可罗·马基亚维利、伽利略等名人树立的 cenotaph,即为中文所指纪念碑。因此,我们纪念实验动物所需要的载体称之为纪念碑即可,不宜再用慰灵碑这样可能产生歧义的词语。

参考文献:

- [1] 李长龙, 尚书江, 朱德生. 科技进步与实验动物福利 [J]. 科技导报, 2017, 35(24): 32-40.
Li CL, Shang SJ, Zhu DS. Advancement of science and technology and laboratory animal welfare [J]. Sci Technol Rev, 2017, 35(24): 32-39.
- [2] 王贵平, 周正宇. 关于我国实验动物福利伦理的思考及建议 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(4): 683-640.
Wang GP, Zhou ZY. Reflections and suggestions on the ethics and welfare of laboratory animals in China [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 683-689.
- [3] 王鹏伟, 贺兰英. 主体、主观性与客体、客观性的厘定 [J]. 新乡学院学报, 2020, 37(2): 5-8.
Wang PW, He LY. Redefinition of subject, subjectivity, object and objectivity [J]. J Xinxiang Univ, 2020, 37(2): 5-8.
- [4] 编辑部.《实验动物科学》不再接收使用水合氯醛进行动物麻醉文章(2019 年 8 月 18 日起)[J]. 实验动物科学, 2023, 40(4): 38.
Editorial office. "Experimental Animal Science" no longer accepts articles on animal anesthesia using chloral hydrate (from August 18, 2019) [J]. Lab Anim Sci, 2023, 40(4): 38.
- [5] 编辑部.《中国组织工程研究》杂志不接收使用水合氯醛进行动物麻醉文章的说明 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(15): 1.
Editorial office. "Chinese Journal of Tissue Engineering Research" does not accept the description of articles on animal anesthesia with chloral hydrate [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2023, 27(15): 1.
- [6] 刘晓宇, 卢选成, 鹿双双, 等. 实验动物科学 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 38(2): 61-66.
Liu XY, Lu XC, Lu SS, et al. Laboratory animal science [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 38(2): 61-66.
- [7] 梁磊, 恽时锋. 丰富环境在啮齿类实验动物中的应用及研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(2): 71-78.
Liang L, Yun SF. The application and research status with laboratory rodents on environmental enrichment [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(2): 71-78.

[收稿日期]2023-10-17

桑加拉,李姗姗,崔鑫,等. 鸢尾素及其上下游抗抑郁的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 130-138.

Sang JL, Li SS, Cui X, et al. Progress in irisin and its upstream and downstream antidepressants [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 130-138.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.017

鸢尾素及其上下游抗抑郁的研究进展

桑加拉¹, 李姗姗¹, 崔鑫¹, 任晴晴¹, 侯瑞铃¹, 潘兴芳^{1,2}, 王慎军^{1,2}, 赵美丹^{1,3*}

(1.天津中医药大学实验针灸灸学研究中心,天津 301617;2.天津中医药大学针灸推拿学院,天津 301617;
3.天津中医药大学医学技术学院,天津 301617)

【摘要】 抑郁症是主要的致残原因之一,对人们带来不利影响。尽管抗抑郁药种类较多,但临床上抑郁症治疗效果依然欠佳。因此,目前仍需要探索新的抗抑郁机制。鸢尾素对神经系统的有益作用逐渐被阐明,研究发现鸢尾素具有抗抑郁的作用,其或将成为治疗抑郁症的新靶点。本研究旨在探讨鸢尾素及其上下游抗抑郁的作用机制,通过查阅现有的研究阐释鸢尾素与抑郁症之间的联系,提出 SIRT1/PGC-1 α 可能介导 FNDC5/鸢尾素调控脑源性神经营养因子(BDNF)促进神经发生,改善抑郁症的潜在机制,为鸢尾素及其上下游抗抑郁的研究提供新思路。

【关键词】 抑郁症;鸢尾素;脑源性神经营养因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0130-09

Progress in irisin and its upstream and downstream antidepressants

SANG Jiala¹, LI Shanshan¹, CUI Xin¹, REN Qingqing¹, HOU Ruiling¹, PAN Xingfang^{1,2},
WANG Shenjun^{1,2}, ZHAO Meidan^{1,3*}

(1. Research Center of Experimental Acupuncture Science, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China. 2. School of Acupuncture & Moxibustion and Tuina, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617. 3. School of Medical Technology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

【Abstract】 Depression is a major cause of disability and has adverse effects. Despite the many types of antidepressants, clinical treatments of depression remain poor. Therefore, novel anti-depressant mechanisms need to be explored. The beneficial effects of irisin on the nervous system are gradually being elucidated, and studies have found that irisin has an anti-depressant effect, which may become a new treatment for depression. This study explored the mechanism of irisin and its upstream and downstream anti-depressants by reviewing the existing studies explaining the link between irisin and depression, and proposes that SIRT1/PGC-1 α may mediate FNDC5/irisin to regulate BDNF to promote neurogenesis and improve depression, which provides a new idea to study irisin and its upstream and downstream antidepressants.

【Keywords】 depression; irisin; BDNF

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

抑郁症是重要的致残原因之一,给全球造成沉重的负担^[1-2]。据世界卫生组织(World Health

Organization,WHO)报道,2030年抑郁症将成为全球第一大负担疾病。目前,全球约3.4亿人患有抑郁

【基金项目】 国家自然科学基金(81804186,81503637)。

【作者简介】 桑加拉(1998—),男,硕士研究生,研究方向:抑郁症致病机制研究。E-mail: Sunjray@163.com

【通信作者】 赵美丹(1987—),女,硕士,讲师,研究方向:抑郁症致病机制研究。E-mail: zhaomeidan2012@163.com

症,其中有 2/3 的人产生过自杀的念头^[3]。抑郁症发病率逐年增高^[4],但临床上仍不能充分治疗抑郁症^[5]。目前主流的抗抑郁药物大多数是基于单胺类神经递质假说^[6],例如早期的三环类抗抑郁药(tricyclic antidepressive agents, TCAs)、单胺氧化酶抑制剂(monoamine oxidase inhibitors, MAOIs)以及新型抗抑郁药选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs)。新型抗抑郁药对患者副作用更小,但其疗效依然欠佳,只有 1/3 的患者在第一次治疗后抑郁症状得到缓解^[7]。因此,探索新的抑郁症治疗方案非常迫切。随着研究的深入,鸢尾素在心理疾病中的作用逐渐被阐明。2016 年, Wang 等^[8]研究发现鸢尾素与抑郁症相关,鸢尾素在慢性不可预测应激(chronic unpredictable stress, CUS)抑郁模型大鼠海马中的水平下降,外周注射鸢尾素后 CUS 模型大鼠抑郁样行为得到改善。随后,一系列新的研究进一步证实了鸢尾素和抑郁之间的相关性。然而,关于鸢尾素与抑郁及其可能的上下游相关研究仍未见系统报道。基于此,本研究旨在探讨鸢尾素及其上下游抗抑郁的作用机制。

1 鸢尾素与抑郁症

2012 年,发表在 *Nature* 上的一项研究首次报道了鸢尾素^[5]。运动后,骨骼肌会分泌过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子 1(peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 α , PGC-1 α),该蛋白调控的下游肌肉因子纤连蛋白 III 型结构域蛋白 5(fibronectin type-III domain-containing protein 5, FNDC5)可以在细胞膜上发生水解生成鸢尾素^[9]。鸢尾素是 FNDC5 裂解的产物,在心脏、骨骼肌以及脊髓中高表达^[10]。鸢尾素可以调节能量代谢^[11-12],在脂肪组织中,鸢尾素可诱导白色脂肪组织褐变,并促进能量消耗^[13]。鸢尾素在大脑中也有表达,如中脑和海马体^[10],其可以减轻神经炎症、记忆缺陷,对记忆相关的大脑区域具有积极影响。FNDC5/鸢尾素的过表达与神经可塑性有关,因其可以调节神经元的增殖^[14]。病理条件下鸢尾素发挥了较强的抗炎、抗凋亡、抗氧化作用^[15]。鸢尾素在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)中也起到有益作用, FNDC5/鸢尾素水平在 AD 模型小鼠海马体和脑脊液中降低,敲低大脑中 FNDC5/鸢尾素后会损害小鼠的新型物体识别记忆。外周递送

FNDC5/鸢尾素可以提高大脑中 FNDC5/鸢尾素水平,从而改善 AD 模型小鼠的突触可塑性和记忆力^[16]。Guo 等^[17]发现鸢尾素可以改善血脂参数,降低甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平,并且可以增加能量消耗,从而改善代谢功能障碍。

临床研究发现,抑郁症患者血清鸢尾素水平低于非抑郁症患者^[18],老年抑郁症患者脑脊液中的鸢尾素水平低于非抑郁患者^[19],患者大脑中鸢尾素水平与轻度抑郁呈负相关^[20]。有临床报道,在人类受试者中中枢鸢尾素和血清鸢尾素之间呈正相关,这表明在中枢中发现的鸢尾素可能来源于外周^[21]。多发性硬化症患者血液中鸢尾素水平在运动疗法后提高,可以起到抗抑郁、缓解疲劳的作用^[22]。临床研究结果提示鸢尾素可能参与抑郁症的治疗。在动物研究中, CUS 抑郁模型大鼠海马中 FNDC5/鸢尾素蛋白含量降低^[23]。在啮齿动物中,通常使用以下几种行为学检测其抑郁样行为,如强迫游泳测试、旷场测试、糖水偏爱测试、悬尾试验等^[24]。运动可缩短抑郁模型小鼠在悬尾试验和强迫游泳试验中的不动时间^[25],并提高小鼠海马中 FNDC5/鸢尾素的表达,从而改善小鼠抑郁样行为。同样的,鸢尾素在体内过表达也有抗抑郁的效果,外周注射鸢尾素^[8,26-27]和中枢注射鸢尾素^[28]都可以缓解小鼠的抑郁样行为,从而起到抗抑郁的作用。最近一项研究表明,短期皮下注射鸢尾素可以缩短年轻小鼠悬尾试验和强迫游泳试验的不动时间,发挥抗抑郁效应^[29]。综上所述,初步推断鸢尾素可能来源于外周,通过血脑屏障作用于海马,从而减轻抑郁模型动物的抑郁样行为。

2 鸢尾素上下游在抑郁症中的作用机制

2.1 SIRT1 在抑郁症中的治疗作用

沉默信息调节器 1(NAD-dependent deacetylase sirtuin-1, SIRT1)是消耗 NAD 的脱乙酰酶,参与基因沉默^[30]、脂肪和葡萄糖代谢、细胞氧化应激和衰老^[31]。研究表明, SIRT1 水平的变化会改变突触可塑性和学习能力^[32]。牛津大学、弗吉尼亚联邦大学、华大基因和中国五十多家医院组成的国际联盟(CONVERGE)通过与中国 58 家医院的合作招募了 11 670 名汉族女性,对 4509 例患有严重抑郁症亚型忧郁症的病例进行分析,发现 SIRT1 位点的遗传信号增加^[33]。日本的一项病例对照研究表明, SIRT1

基因中的 rs10997875 可能在日本人群抑郁症的病理生理学中发挥作用^[34]。此外,该研究表明,抑郁症患者外周血中的 SIRT1 表达明显低于健康受试者。同样,与健康受试者相比,抑郁症患者血液中 SIRT1 表达明显降低^[35]。基于上述研究,SIRT1 在抑郁症中起着重要作用。最近的抑郁症动物研究还发现,SIRT1 信号失调在小鼠抑郁样行为中起着关键作用。慢性压力抑郁模型降低了小鼠海马齿状回中的 SIRT1 活性,海马中 SIRT1 被抑制会导致抑郁样行为加重。当 SIRT1 被激活时,可以阻断慢性应激诱导的抑郁相关表型和异常树突结构的发展^[36]。白藜芦醇是一种 SIRT1 激动剂,腹腔注射白藜芦醇可以改善大鼠的抑郁样行为^[37-38]。在最近一项研究中,SIRT1 被白藜芦醇激活并通过增强海马神经发生来逆转脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的抑郁样行为^[39-40]。这些证据表明 SIRT1 激活后可以通过促进海马神经发生来改善抑郁症样行为。

2.2 PGC-1 α 在抑郁症中的作用

PGC-1 α 对中枢神经系统具有许多有益作用,包括线粒体生物发生、抗氧化和抗炎症^[41]。临床研究发现,抑郁患者血清中 PGC-1 α 水平降低^[42],经过 12 周运动训练后骨骼肌中 PGC-1 α 的基因表达增加,患者的抑郁情绪得到改善^[43]。此外,越来越多的证据表明 PGC-1 α 在抑郁症中具有潜在治疗作用,国外有研究发现全身性 PGC-1 α 缺陷小鼠与野生小鼠相比在悬尾试验中不动时间更长,表现出显著的抑郁样行为^[44]。邓宇辉等^[45]发现海马注射 PGC-1 α 沉默病毒敲低 PGC-1 α 后,小鼠糖水偏爱率降低,强迫游泳试验中小鼠不动时间增加,因此敲低海马中 PGC-1 α 会诱导小鼠出现抑郁样行为;而海马注射 PGC-1 α 过表达病毒后,小鼠在强迫游泳试验中不动时间减少,因此激活海马中 PGC-1 α 会改善小鼠的抑郁样行为,起到抗抑郁的作用。慢性轻度应激(chronic mild stress, CMS)模型小鼠经过运动训练后骨骼肌中的 PGC-1 α 基因表达量增加,减少了 CMS 小鼠在强迫游泳试验中的不动时间,增加了 CMS 小鼠的糖水偏爱率^[46],因此骨骼肌中的 PGC-1 α 被激活也会改善 CMS 小鼠抑郁样行为。这些证据表明 PGC-1 α 水平降低可以诱导抑郁的发生,而 PGC-1 α 水平的升高可以起到抗抑郁的作用。

2.3 BDNF 对抑郁症的影响

抑郁症的神经营养假说认为,神经营养缺失会

导致神经元萎缩、减少神经新生和破坏胶质细胞^[47],而抗抑郁药物会减弱或逆转这些病理生理过程。其中,最广为接受的假说涉及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF),部分抗抑郁药物与激活 BDNF 系统相关^[48-49]。BDNF 是一种具有神经营养作用的蛋白质,在神经系统中广泛表达。患者突触可塑性损伤与抑郁症的发生有着紧密的联系^[50],抑郁患者在特定区域 BDNF 的水平和功能方面也会发生改变。例如,有研究者在抑郁患者海马和内侧面额叶皮层中观察到 BDNF 水平下调^[51]。研究发现,益生菌可以显著增加抑郁症患者血清中 BDNF 的水平,进而改善患者的抑郁情绪^[52]。在动物研究中,限制神经发生会导致类似抑郁的症状^[53],CMS 抑郁模型小鼠海马中 BDNF 水平较空白对照组降低^[54]。BDNF 的异常也会导致抑郁回路中星形胶质细胞和小胶质细胞的功能障碍^[55]。有证据表明,BDNF 水平的升高有助于提高突触可塑性、促进对神经元损伤的修复,从而缓解抑郁^[56-57]。在 CMS 小鼠体内注射 BDNF 病毒会增强海马 BDNF 的水平,降低 CMS 小鼠在强迫游泳试验中的不动时间,进而改善 CMS 小鼠的抑郁样行为^[58]。这些证据表明抑郁的发生会导致体内 BDNF 水平降低,相反,BDNF 水平升高会促进神经发生改善抑郁症状。

2.4 FNDC5/鸢尾素上调 BDNF 水平促进神经发生改善抑郁

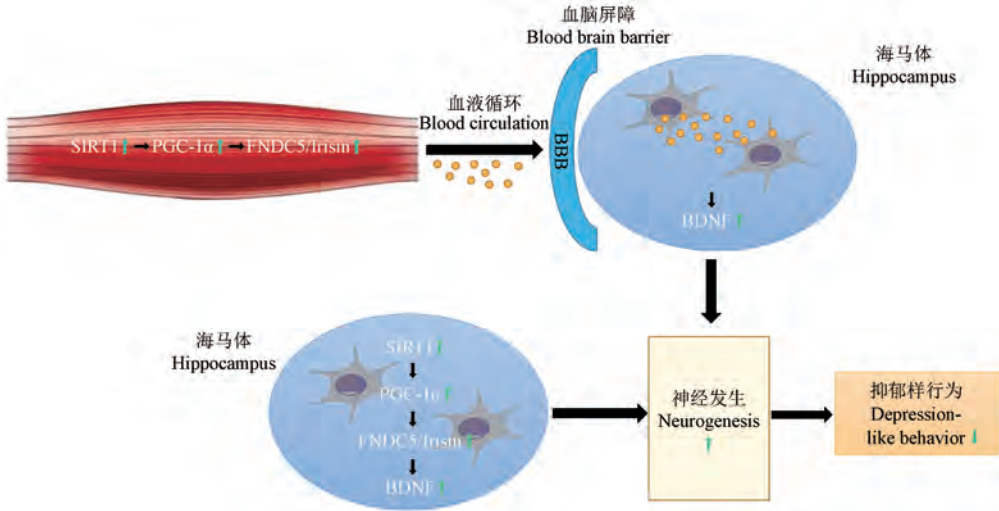
近年来,越来越多的研究证明 FNDC5/鸢尾素可以上调大脑中 BDNF 的水平,而大脑中的 BDNF 水平变化与抑郁症密切相关。FNDC5 过表达可增加神经元前体标志物和成熟神经元标志物,促进神经分化^[59]。并且, FNDC5 在初级皮层神经元中的过表达可增加 BDNF 的表达,而 FNDC5 敲低则可降低 BDNF 的表达^[60]。在小鼠体内,外周递送腺病毒载体 FNDC5 也可以增加海马中 BDNF 的表达,起到神经保护的作用^[60]。有研究发现,系统注射鸢尾素可显著诱导小鼠脑中 BDNF^[61-62]以及胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors-1, IGF-1)的基因表达,起到抗抑郁的作用^[27]。糖尿病模型大鼠在注射鸢尾素-shRNA 敲低鸢尾素后,大鼠血清 BDNF 水平显著降低,海马 BDNF 蛋白含量也显著降低^[63]。体外实验证明,原代大鼠海马神经元在转染鸢尾素过表达病毒后,BDNF 水平显著增高^[64]。临床研究发现,患者体内鸢尾素水平与 BDNF 水平呈正相

关^[65-66]。这些证据表明 BDNF 水平受鸢尾素的调控。AD 模型小鼠海马中 FNDC5/BDNF 途径也可被运动激活,经过运动训练后,AD 模型小鼠海马当中 FNDC5/BDNF 基因表达量以及蛋白含量增加,进而对 AD 模型小鼠起到神经保护的作用^[67]。最近一项研究发现,肌酸慢性给药通过调节 FNDC5/BDNF 介导的小鼠海马信号通路产生抗抑郁样作用^[68]。综上所述, FNDC5/鸢尾素过表达可能使大脑中 BDNF 表达增加,促进神经发生,起到抗抑郁的作用。

3 SIRT1/PGC-1α 介导 FNDC5/鸢尾素调控 BDNF 促进神经发生改善抑郁症

SIRT1 被白藜芦醇激活可减少海马中的神经变性,防止学习障碍,并降低 PGC-1α 的乙酰化,促进线粒体生物发生,从而起到神经保护的作用^[69]。此外,SIRT1 特异性激动剂(SRT1720)增加了帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型中的 PGC-1α 水平,促进线粒体生物发生^[70]。SIRT1 抑制剂 EX527 的应用不仅可降低 PGC-1α 的活性,而且进一步加重线粒体功能障碍^[71]。可见,PGC-1α 受 SIRT1 调控,激活 SIRT1 可增加 PGC-1α 水平,而敲低 SIRT1 则降低 PGC-1α 的水平。FNDC5 也受到 SIRT1 的调控,在 SIRT1 敲低后 FNDC5 基因表达量降低^[72]。敲低海马神经元 PGC-1α 后,蛋白印迹显示 FNDC5/BDNF 含量降低^[73]。PGC-1α 可在体外和体内调节神经元 FNDC5/鸢尾素的基因表达, FNDC5/鸢尾素

可正向调节 BDNF 的表达^[60]。FNDC5/鸢尾素的外周过表达可挽救 AD 模型小鼠记忆障碍促进神经发生,而阻断外周或脑 FNDC5/鸢尾素可减弱体育锻炼对 AD 模型小鼠的突触可塑性和记忆的神经保护作用^[16]。此外,有研究发现 SIRT1 激动剂白藜芦醇可以使高脂肪饮食(high-fat diet, HFD)所诱导的肥胖模型老年小鼠海马当中的 SIRT1/PGC-1α/FNDC5/BDNF 蛋白表达增加,从而减轻小鼠记忆丧失起到神经保护的作用^[74]。体育锻炼可以预防、减弱并可能逆转抑郁症引起的生化和行为的负面变化^[75]。运动后, CUS 大鼠海马 PGC-1α/FNDC5/BDNF 蛋白含量增加,强迫游泳试验不动时间减少,大鼠抑郁样行为得到改善^[23]。Apelin-13 是一种新型神经肽,其受体可以改善大鼠的认知障碍和抑郁样行为^[76], apelin-13 通过 PGC-1α/FNDC5/BDNF 途径改善慢性不可预测轻度应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)小鼠的抑郁样行为。近年有研究发现, CUMS 抑郁模型小鼠海马 miR-138 基因表达升高,而小鼠海马注射 miR-138 过表达病毒后海马中 SIRT1/PGC-1α/FNDC5/BDNF 基因相对表达量和蛋白含量均降低,诱导小鼠发生抑郁样行为^[77]。综上所述, SIRT1/PGC-1α 可能介导 FNDC5/鸢尾素调控 BDNF 促进神经发生改善抑郁症。鸢尾素及其上下游抗抑郁可能形成的作用机制见图 1, 鸢尾素及其上下游靶点和途径见表 1。



注:↑代表激活或升高,↓代表抑制或减弱,●代表鸢尾素。
Figure 1 Mechanism of action of irisin and its upstream and downstream antidepressants
Note. ↑ represents an activation or an elevation, ↓ represents either inhibition or weakening, ● represents irisin.

表 1 鸢尾素及其上下游靶点和途径
Table 1 List of irisin and its upstream and downstream targets and pathways

研究者 Investigator	动物模型 Animal model	干预措施 Intervention study	调控途径 Regulatory pathway	作用部位 Site of action	作用靶点 Action target	作用 Effects
Wrann, et al [60]	野生小鼠 Wild mouse	尾静脉注射腺病毒 FNDC5 Tail vein injection of adenovirus FNDC5	FNDC5/ Irisin ↑	海马 Hippocampus	BDNF ↑	神经保护 ↑ Neuroprotection ↑
	体外实验 Experiment <i>in vitro</i>	转染腺病毒 PGC-1α Transfection of adenovirus PGC-1α	PGC-1α/ FNDC5 ↑	海马神经元 Hippocampal neurons	BDNF ↑	
Kim, et al [62]	野生小鼠 Wild mouse	腹腔注射鸢尾素 Intraperitoneal injection of irisin	Irisin ↑	海马 Hippocampus	BDNF ↑	神经保护 ↑ Neuroprotection ↑
Huang, et al [63]	糖尿病模型大鼠 Diabetes model rats	海马注射鸢尾素-shRNA Hippocampal injection of irisin-shRNA	Irisin ↓	海马 Hippocampus	BDNF ↓	认知功能 ↓ Cognitive function ↓
Lourenco, et al [64]	体外实验 Experiment <i>in vitro</i>	转染鸢尾素病毒 Transfection of iris virus	Irisin ↑	海马神经元 Hippocampal neurons	BDNF ↑	
Belviranlı, et al [67]	AD 模型小鼠 AD model mice	运动训练 Exercise	FNDC5 ↑	海马 Hippocampus	BDNF ↑	神经保护 ↑ Neuroprotection ↑
Cunha, et al [68]	抑郁模型小鼠 Depression model mice	口服肌酸 Oral creatine	FNDC5 ↑	海马 Hippocampus	BDNF ↑	抑郁样行为 ↓ Depression-like behavior ↓
Kim, et al [69]	AD 模型小鼠 AD model mice	侧脑室注射白藜芦醇 Lateral ventricular injection of resveratrol	SIRT1 ↑	海马 Hippocampus	PGC-1α ↑	神经保护 ↑ Neuroprotection ↑
Ye, et al [71]	体外实验 Experiment <i>in vitro</i>	EX527	SIRT1 ↓	HK-527 细胞 HK-527 cells	PGC-1α ↓	线粒体功能 ↓ Mitochondrial function ↓
El Hayek, et al [72]	野生小鼠 Wild mouse	腹腔注射乳酸 Intraperitoneal injection of lactic acid	SIRT1/ PGC-1α/ FNDC5 ↑	海马 Hippocampus	BDNF ↑	学习和记忆能力 ↑ Learning and memory capacity ↑
Hu, et al [73]	抑郁模型大鼠 Depression model rats	侧脑室注射 apelin-13 Lateral ventricular injection of apelin-13	PGC-1α/ FNDC5 ↑	海马 Hippocampus	BDNF ↑	抑郁样行为 ↓ Depression-like behavior ↓
Zhao, et al [74]	肥胖模型老年小鼠 Obesity model of older mice	腹腔注射白藜芦醇 Intraperitoneal injection of resveratrol	SIRT1/ PGC-1α/ FNDC5 ↑	海马 Hippocampus	BDNF ↑	神经保护 ↑ Neuroprotection ↑
Babaei, et al [23]	抑郁模型大鼠 Depression model rats	运动 Exercise	PGC-1α/ FNDC5 ↑	海马 Hippocampus	BDNF ↑	抑郁样行为 ↓ Depression-like behavior ↓
Li, et al [77]	抑郁模型小鼠 Depression model mice	海马注射 miR-138 病毒 Hippocampal injection of miR-138 virus	SIRT1/ PGC-1α/ FNDC5 ↓	海马 Hippocampus	BDNF ↓	抑郁样行为 ↑ Depression-like behavior ↑

注: ↑代表激活或升高, ↓代表抑制或减弱。
Note. ↑ represents an activation or an elevation, ↓ represents either inhibition or weakening.

4 小结与讨论

抑郁症患者人数逐年增长, 现有的单胺类抗抑郁药仍不能有效治疗抑郁症, 迫切需要探索新的抗

抑郁治疗方法。鸢尾素在抑郁症中有潜在的治疗作用, 或将成为抑郁症的治疗靶点。本文综述了鸢尾素对抑郁症的影响, 提出鸢尾素可能来源于外周, 通过血脑屏障作用于海马, 从而减轻抑郁模型

动物的抑郁样行为。本文探讨了鸢尾素及其上下游可能的抗抑郁效应机制,初步推断 SIRT1/PGC-1 α 可能介导 FNDC5/鸢尾素调控 BDNF,促进神经发生,改善抑郁症,为抑郁症治疗提供了新思路。近些年,关于鸢尾素与抑郁症的发病机制有了新的探索,有研究显示炎症也可能是抑郁症的诱发原因之一^[78]。部分抑郁患者表现出更高的循环促炎细胞因子水平,包括白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)^[79]。近期有研究报道了鸢尾素与炎症有着密切相关性,外周注射鸢尾素可以抑制脑组织中 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达^[80]。无论体外或者在体内,鸢尾素均可下调 IL-1 β 的表达^[81-83]。在缺乏鸢尾素的小鼠中,IL-6 和 TNF- α 的水平也有所增加^[84]。可见,鸢尾素可以下调促炎细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的水平,起到抗炎的作用,进而改善炎症引发的抑郁症。敲低 SIRT1 会引起 LPS 诱导的 IL-1 β 分泌增加^[85],而 SIRT1 的过表达会抑制 IL-1 β 诱导的细胞凋亡起到抗炎的作用^[86]。SIRT1 激动剂 SRT1720 可以降低 TNF- α 的水平^[87],SIRT1 抑制剂 EX527 会使 TNF- α 的水平增高^[88]。同时,SIRT1 激动剂 SRT1720 可以抑制卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导的哮喘小鼠模型中 IL-6 的产生^[89],而 SIRT1 抑制剂 EX527 消除了这种作用^[90]。同样的,PGC-1 α 与炎症因子也具有相关性,PGC-1 α 的水平与促炎细胞因子 IL-1 β ^[91]、TNF- α ^[92] 和 IL-6^[93] 呈负相关。综上所述,鸢尾素及其上下游可能通过 BDNF 促进神经发生改善抑郁,也可能通过抗炎作用改善抑郁症状。然而,鸢尾素及其上下游与炎症如何影响抑郁的问题依然有待于进一步探讨。总之,鸢尾素在抑郁症中的影响受到越来越多的关注,本研究将为鸢尾素抗抑郁的机制研究提供新的思路,也可能为抑郁症的临床治疗和药物研发提供潜在靶标。

参考文献:

[1] 罕园园,代解杰. 抑郁症动物模型与其发病机制研究的进展 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 321-326.
Han YY, Dai JJ. Research progress in animal models and mechanism of depression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24 (3): 321-326.

[2] 吕金芝,向玉仙,王丹,等. 抑郁症啮齿动物模型的建立及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(5): 93-103.
Lyu JZ, Xiang YX, Wang D, et al. Establishment and evaluation of rodent models of depression [J]. Chin J Comp

Med, 2023, 33(5): 93-103.

[3] Malhi GS, Mann JJ. Depression [J]. Lancet, 2018, 392 (10161): 2299-2312.

[4] Samuel B, Wang H, Shi C, et al. The effects of coloring therapy on patients with generalized anxiety disorder [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(6): 502-512.

[5] McCarron RM, Shapiro B, Rawles J, et al. Depression [J]. Ann Intern Med, 2021, 174(5): ITC65-ITC80.

[6] 陈亚婷,雷梦珠,张波,等. 慢性应激诱导动物抑郁样行为机制研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 811-819.
Chen YT, Lei MZ, Zhang B, et al. Research progress on mechanisms underlying chronic-stress-induced depressive-like behavior in animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 811-819.

[7] Gonda X, Petschner P, Eslzari N, et al. Genetic variants in major depressive disorder: from pathophysiology to therapy [J]. Pharmacol Ther, 2019, 194: 22-43.

[8] Wang S, Pan J. Irisin ameliorates depressive-like behaviors in rats by regulating energy metabolism [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 474(1): 22-28.

[9] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis [J]. Nature, 2012, 481(7382): 463-468.

[10] Phillips C, Baktir MA, Srivatsan M, et al. Neuroprotective effects of physical activity on the brain: a closer look at trophic factor signaling [J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 170.

[11] Erickson HP. Irisin and FNDC5 in retrospect: An exercise hormone or a transmembrane receptor [J]. Adipocyte, 2013, 2 (4): 289-293.

[12] Grygiel-Gómiak B, Puszczewicz M. A review on irisin, a new protagonist that mediates muscle-adipose-bone-neuron connectivity [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(20): 4687-4693.

[13] Wu J, Boström P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human [J]. Cell, 2012, 150(2): 366-376.

[14] Moon HS, Dincer F, Mantzoros CS. Pharmacological concentrations of irisin increase cell proliferation without influencing markers of neurite outgrowth and synaptogenesis in mouse H19-7 hippocampal cell lines [J]. Metabolism, 2013, 62 (8): 1131-1136.

[15] Askari H, Rajani SF, Poorebrahim M, et al. A glance at the therapeutic potential of irisin against diseases involving inflammation, oxidative stress, and apoptosis: an introductory review [J]. Pharmacol Res, 2018, 129: 44-55.

[16] Lourenco MV, Frozza RL, de Freitas GB, et al. Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models [J]. Nat Med, 2019, 25(1): 165-175.

[17] Guo M, Yao J, Li J, et al. Irisin ameliorates age-associated sarcopenia and metabolic dysfunction [J]. J Cachexia Sarcopenia

- Muscle, 2023, 14(1): 391–405.
- [18] Tu W, Qiu H, Liu Q, et al. Decreased level of irisin, a skeletal muscle cell-derived myokine, is associated with post-stroke depression in the ischemic stroke population [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 133.
- [19] Gonçalves RA, Sudo FK, Lourenco MV, et al. Cerebrospinal fluid irisin and lipoxin A4 are reduced in elderly Brazilian individuals with depression: insight into shared mechanisms between depression and dementia [J]. Alzheimers Dement, 2023, 19(6): 2595–2604.
- [20] Mucher P, Batmyagmar D, Perkmann T, et al. Basal myokine levels are associated with quality of life and depressed mood in older adults [J]. Psychophysiology, 2021, 58(5): e13799.
- [21] Piya MK, Harte AL, Sivakumar K, et al. The identification of irisin in human cerebrospinal fluid: influence of adiposity, metabolic markers, and gestational diabetes [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014, 306(5): E512–E518.
- [22] Bilek F, Cetisli-Korkmaz N, Ercan Z, et al. Aerobic exercise increases irisin serum levels and improves depression and fatigue in patients with relapsing remitting multiple sclerosis: a randomized controlled trial [J]. Mult Scler Relat Disord, 2022, 61: 103742.
- [23] Babaei A, Nourshahi M, Fani M, et al. The effectiveness of continuous and interval exercise preconditioning against chronic unpredictable stress: involvement of hippocampal PGC-1 α /FND5/BDNF pathway [J]. J Psychiatr Res, 2021, 136: 173–183.
- [24] 薛涛, 邬丽莎, 刘新民, 等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3): 321–326.
Xue T, Wu LS, Liu XM, et al. Research progress on animal models of depression and their evaluation methods [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(3): 321–326.
- [25] Siteneski A, Olescowicz G, Pazini FL, et al. Antidepressant-like and pro-neurogenic effects of physical exercise: the putative role of FND5/irisin pathway [J]. J Neural Transm, 2020, 127: 355–370.
- [26] Hou Z, Zhang J, Yu KK, et al. Irisin ameliorates the postoperative depressive-like behavior by reducing the surface expression of epidermal growth factor receptor in mice [J]. Neurochem Int, 2020, 135: 104705.
- [27] Pignataro P, Dicarlo M, Zerlotin R, et al. Antidepressant effect of intermittent long-term systemic administration of irisin in mice [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(14): 7596.
- [28] Siteneski A, Cunha MP, Lieberknecht V, et al. Central irisin administration affords antidepressant-like effect and modulates neuroplasticity-related genes in the hippocampus and prefrontal cortex of mice [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2018, 84(Pt A): 294–303.
- [29] Pignataro P, Dicarlo M, Suriano C, et al. Once-daily subcutaneous irisin administration mitigates depression- and anxiety-like behavior in young mice [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7): 6715.
- [30] 郭小丽, 杨昌明, 王婵, 等. 基于 Sirt1/FoxO1 通路探讨瑞马唑仑减轻脓毒症小鼠脑损伤的机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 82–90.
Guo XL, Yang CM, Wang C, et al. Mechanism of remazolam in reducing brain injury in sepsis mice based on Sirt1/FoxO1 pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 82–90.
- [31] 田河, 王志龙, 张智慧, 等. 白藜芦醇通过靶向 SIRT1 激活 Keap1-Nrf2-HO-1 途径发挥对草酸钙肾结石形成的调控作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 77–83.
Tian H, Wang ZL, Zhang ZH, et al. Resveratrol plays a regulatory role in the formation of calcium oxalate kidney stones by targeting SIRT1 to activate the Keap1-Nrf2-HO-1 pathway [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 77–83.
- [32] Michán S, Li Y, Chou MMH, et al. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity [J]. J Neurosci, 2010, 30(29): 9695–9707.
- [33] Consortium C. Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder [J]. Nature, 2015, 523(7562): 588–591.
- [34] Kishi T, Yoshimura R, Kitajima T, et al. SIRT1 gene is associated with major depressive disorder in the Japanese population [J]. J Affect Disord, 2010, 126(1–2): 167–173.
- [35] Liu S, Xiu J, Zhu C, et al. Fat mass and obesity-associated protein regulates RNA methylation associated with depression-like behavior in mice [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 6937.
- [36] Abe-Higuchi N, Uchida S, Yamagata H, et al. Hippocampal sirtuin 1 signaling mediates depression-like behavior [J]. Biol Psychiatry, 2016, 80(11): 815–826.
- [37] Hurley LL, Akinfiresoye L, Kalejaiye O, et al. Antidepressant effects of resveratrol in an animal model of depression [J]. Behav Brain Res, 2014, 268: 1–7.
- [38] Finnell JE, Lombard CM, Melson MN, et al. The protective effects of resveratrol on social stress-induced cytokine release and depressive-like behavior [J]. Brain Behav Immun, 2017, 59: 147–157.
- [39] Chen WJ, Du JK, Hu X, et al. Protective effects of resveratrol on mitochondrial function in the hippocampus improves inflammation-induced depressive-like behavior [J]. Physiol Behav, 2017, 182: 54–61.
- [40] Ge L, Liu L, Liu H, et al. Resveratrol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior, neuroinflammatory response, and CREB/BDNF signaling in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 768: 49–57.
- [41] Peng K, Yang L, Wang J, et al. The interaction of mitochondrial biogenesis and fission/fusion mediated by PGC-1 α regulates rotenone-induced dopaminergic neurotoxicity [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(5): 3783–3797.
- [42] Ryan KM, Patterson I, McLoughlin DM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha in depression and the response to electroconvulsive therapy [J]. Psychol Med, 2018, 49(11): 1859–1868.
- [43] Allison DJ, Nederveen JP, Snijders T, et al. Exercise training

- impacts skeletal muscle gene expression related to the kynurenine pathway [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(3): C444–C448.
- [44] Szalardy L, Molnár M, Zádori D, et al. Non-motor behavioral alterations of PGC-1 α -deficient mice-A peculiar phenotype with slight male preponderance and No apparent progression [J]. *Front Behav Neurosci*, 2018, 12: 180.
- [45] 邓宇辉, 罗艳敏, 梁芯, 等. 海马 PGC-1 α 对小鼠抑郁样行为及海马各亚区星形胶质细胞数量的影响 [J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(10): 975–983.
- Deng YH, Luo YM, Liang X, et al. Effects of hippocampal PGC-1 α on depression-like behaviors and number of astrocytes in hippocampal subregions in mice [J]. *J Army Med Univ*, 2022, 44(10): 975–983.
- [46] Agudelo LZ, Femenía T, Orhan F, et al. Skeletal muscle PGC-1 α modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression [J]. *Cell*, 2014, 159(1): 33–45.
- [47] 赵婷婷, 朱涛, 张捷, 等. 电针对抑郁大鼠海马组织 CREB/BDNF/TrkB 信号通路的影响 [J]. 海南医学院学报, 2023, 29(7): 516–522.
- Zhao TT, Zhu T, Zhang J, et al. Electroacupuncture on hippocampal CREB/BDNF/TrkB in depressive rats effects of signaling pathways [J]. *J Hainan Med Univ*, 2023, 29(7): 516–522.
- [48] Li Z, Ruan M, Chen J, et al. Major depressive disorder: advances in neuroscience research and translational applications [J]. *Neurosci Bull*, 2021, 37(6): 863–880.
- [49] Ayaz A, Zeng G, Mudassar A, et al. Combination of Shengmai San and *Radix puerariae* ameliorates depression-like symptoms in diabetic rats at the nexus of PI3K/BDNF/SYN protein expression [J]. *Animal Model Exp Med*, 2023, 6(3): 211–220.
- [50] Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders [J]. *Biol Psychiatry*, 2006, 59(12): 1116–1127.
- [51] Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(2): 238–258.
- [52] Kim CS, Cha L, Sim M, et al. Probiotic supplementation improves cognitive function and mood with changes in gut microbiota in community-dwelling older adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2021, 76(1): 32–40.
- [53] Kraus C, Castrén E, Kasper S, et al. Serotonin and neuroplasticity-Links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 77: 317–326.
- [54] Prochnik A, Burguenio AL, Rubinstein MR, et al. Sexual dimorphism modulates metabolic and cognitive alterations under HFD nutrition and chronic stress exposure in mice. Correlation between spatial memory impairment and BDNF mRNA expression in hippocampus and spleen [J]. *Neurochem Int*, 2022, 160: 105416.
- [55] Rial D, Lemos C, Pinheiro H, et al. Depression as a glial-based synaptic dysfunction [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 521.
- [56] Teixeira AL, Barbosa IG, Diniz BS, et al. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor: correlation with mood, cognition and motor function [J]. *Biomark Med*, 2010, 4(6): 871–887.
- [57] Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression [J]. *Nature*, 2008, 455(7215): 894–902.
- [58] Ma XC, Liu P, Zhang XL, et al. Intranasal delivery of recombinant AAV containing BDNF fused with HA2TAT: a potential promising therapy strategy for major depressive disorder [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22404.
- [59] Forouzanfar M, Rabiee F, Ghaedi K, et al. Fndc5 overexpression facilitated neural differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(5): 629–637.
- [60] Wrann CD, White JP, Salogiannis J, et al. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FND5 pathway [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(5): 649–659.
- [61] Natalicchio A, Marrano N, Biondi G, et al. Irisin increases the expression of anorexigenic and neurotrophic genes in mouse brain [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2020, 36(3): e3238.
- [62] Kim MH, Leem YH. The effects of peripherally-subacute treatment with irisin on hippocampal dendritogenesis and astrocyte-secreted factors [J]. *J Exerc Nutr Biochem*, 2019, 23(4): 32–35.
- [63] Huang L, Yan S, Luo L, et al. Irisin regulates the expression of BDNF and glycometabolism in diabetic rats [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 1074–1082.
- [64] Lourenco M, de Freitas GB, Raony Í, et al. Irisin stimulates protective signaling pathways in rat hippocampal neurons [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 953991.
- [65] Briken S, Rosenkranz SC, Keminer O, et al. Effects of exercise on Irisin, BDNF and IL-6 serum levels in patients with progressive multiple sclerosis [J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 299: 53–58.
- [66] Glazachev OS, Zapara MA, Kryzhanovskaya SY, et al. Whole-body repeated hyperthermia increases irisin and brain-derived neurotrophic factor: a randomized controlled trial [J]. *J Therm Biol*, 2021, 101: 103067.
- [67] Belviranlı M, Okudan N. Exercise training protects against aging-induced cognitive dysfunction via activation of the hippocampal PGC-1 α /FND5/BDNF pathway [J]. *Neuromol Med*, 2018, 20(3): 386–400.
- [68] Cunha MP, Pazini FL, Lieberknecht V, et al. Subchronic administration of creatine produces antidepressant-like effect by modulating hippocampal signaling pathway mediated by FND5/BDNF/Akt in mice [J]. *J Psychiatr Res*, 2018, 104: 78–87.
- [69] Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis [J]. *EMBO J*, 2007, 26(13): 3169–3179.

- [70] Chao CC, Huang CL, Cheng JJ, et al. SIRT1720 as an SIRT1 activator for alleviating paraquat-induced models of Parkinson's disease [J]. Redox Biol, 2022, 58: 102534.
- [71] Ye P, Li W, Huang X, et al. BMAL1 regulates mitochondrial homeostasis in renal ischaemia-reperfusion injury by mediating the SIRT1/PGC-1 α axis [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(7): 1994–2009.
- [72] El Hayek L, Khalifeh M, Zibara V, et al. Lactate mediates the effects of exercise on learning and memory through SIRT1-dependent activation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [J]. J Neurosci, 2019, 39(13): 2369–2382.
- [73] Hu S, He L, Chen B, et al. Apelin-13 attenuates depressive-like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress via activating AMPK/PGC-1 α /FND5/BDNF pathway [J]. Peptides, 2022, 156: 170847.
- [74] Zhao Z, Yao M, Wei L, et al. Obesity caused by a high-fat diet regulates the Sirt1/PGC-1 α /FND5/BDNF pathway to exacerbate isoflurane-induced postoperative cognitive dysfunction in older mice [J]. Nutr Neurosci, 2020, 23(12): 971–982.
- [75] Schuch FB, Vancampfort D, Richards J, et al. Exercise as a treatment for depression: a meta-analysis adjusting for publication bias [J]. J Psychiatr Res, 2016, 77: 42–51.
- [76] Tian SW, Xu F, Gui SJ. Apelin-13 reverses memory impairment and depression-like behavior in chronic social defeat stressed rats [J]. Peptides, 2018, 108: 1–6.
- [77] Li C, Wang F, Miao P, et al. miR-138 increases depressive-like behaviors by targeting SIRT1 in hippocampus [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2020, 16: 949–957.
- [78] Carrera-González MP, Cantón-Habas V, Rich-Ruiz M. Aging, depression and dementia: the inflammatory process [J]. Adv Clin Exp Med, 2022, 31(5): 469–473.
- [79] Tanaka M, Tóth F, Polyák H, et al. Immune influencers in action: metabolites and enzymes of the tryptophan-kynurenine metabolic pathway [J]. Biomedicines, 2021, 9(7): 734.
- [80] Vadalà G, di Giacomo G, Ambrosio L, et al. Irisin recovers osteoarthritic chondrocytes *in vitro* [J]. Cells, 2020, 9(6): 1478.
- [81] Wang FS, Kuo CW, Ko J, et al. Irisin mitigates oxidative stress, chondrocyte dysfunction and osteoarthritis development through regulating mitochondrial integrity and autophagy [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(9): 810.
- [82] Jin Z, Guo P, Li X, et al. Neuroprotective effects of irisin against cerebral ischemia/reperfusion injury via Notch signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109452.
- [83] Li X, Jamal M, Guo P, et al. Irisin alleviates pulmonary epithelial barrier dysfunction in sepsis-induced acute lung injury via activation of AMPK/SIRT1 pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109363.
- [84] Luo Y, Qiao X, Ma Y, et al. Disordered metabolism in mice lacking irisin [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 17368.
- [85] Park S, Shin J, Bae J, et al. SIRT1 alleviates LPS-induced IL-1 β production by suppressing NLRP3 inflammasome activation and ROS production in trophoblasts [J]. Cells, 2020, 9(3): 728.
- [86] Shen J, Fang J, Hao J, et al. SIRT1 inhibits the catabolic effect of IL-1 β through TLR2/SIRT1/NF- κ B pathway in human degenerative nucleus pulposus cells [J]. Pain Physician, 2016, 19(1): E215–E226.
- [87] Wen Q, Wang Y, Pan Q, et al. MicroRNA-155-5p promotes neuroinflammation and central sensitization via inhibiting SIRT1 in a nitroglycerin-induced chronic migraine mouse model [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 287.
- [88] Qian Y, Xin Z, Lv Y, et al. Asiatic acid suppresses neuroinflammation in BV2 microglia via modulation of the Sirt1/NF- κ B signaling pathway [J]. Food Funct, 2018, 9(2): 1048–1057.
- [89] Tomomi I, Ryuji H, Kensuke S, et al. Sirtuin 1 activator SRT1720 suppresses inflammation in an ovalbumin-induced mouse model of asthma [J]. Respirol Carlton Vic, 2013, 18(2): 332–339.
- [90] Xu C, Song Y, Wang Z, et al. Pterostilbene suppresses oxidative stress and allergic airway inflammation through AMPK/Sirt1 and Nrf2/HO-1 pathways [J]. Immun Inflamm Dis, 2021, 9(4): 1406–1417.
- [91] Wang Y, Guan X, Gao CL, et al. Medioresinol as a novel PGC-1 α activator prevents pyroptosis of endothelial cells in ischemic stroke through PPAR α -GOT1 axis [J]. Pharmacol Res, 2021, 169: 105640.
- [92] Xie S, Jiang X, Doycheva D, et al. Activation of GPR39 with TC-G 1008 attenuates neuroinflammation via SIRT1/PGC-1 α /Nrf2 pathway post-neonatal hypoxic-ischemic injury in rats [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 226.
- [93] Yang B, Yang X, Sun X, et al. IL-6 deficiency attenuates skeletal muscle atrophy by inhibiting mitochondrial ROS production through the upregulation of PGC-1 α in septic mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 9148246.

[收稿日期]2023-03-27

朱紫约,王路,姚俊鹏,等. 2型糖尿病周围神经病变动物模型评价的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 139-145, 157.

Zhu ZY, Wang L, Yao JP, et al. Research progress in evaluation of type 2 diabetic peripheral neuropathy animal model [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 139-145, 157.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.018

2型糖尿病周围神经病变动物模型评价的研究进展

朱紫约¹, 王 路¹, 姚俊鹏¹, 刘辉麟¹, 李艳秋¹, 李 瑛², 张 微^{3*}

(1.成都中医药大学针灸推拿学院, 成都 610075; 2.成都中医药大学研究生院, 成都 610075;
3.成都中医药大学资产与实验室管理处, 成都 611137)

【摘要】 糖尿病周围神经病变是糖尿病常见并发症之一, 目前对其发病机制的认识不够明确, 且缺乏有效治疗手段, 需要利用动物实验进行深入研究。造模成功与否的判定标准和周围神经功能恢复的评价方法是开展糖尿病周围神经病变动物实验的关键, 但对于2型糖尿病周围神经病变模型评价方法的整理分析较缺乏。因此笔者查阅近年资料, 从小神经纤维和大神经纤维两方面总结分析了2型糖尿病周围神经病变动物模型评价方法, 并提出未来可能的发展方向, 以期为相关研究提供参考。

【关键词】 糖尿病周围神经病变; 动物模型; 评价; 研究进展; 综述

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0139-07

Research progress in evaluation of type 2 diabetic peripheral neuropathy animal model

ZHU Ziyue¹, WANG Lu¹, YAO Junpeng¹, LIU Huilin¹, LI Yanqiu¹, LI Ying², ZHANG Wei^{3*}

(1. School of Acupuncture-Moxibustion, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China.

2. Graduate School, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075. 3. Office of Asset and Laboratory Management, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137)

【Abstract】 Diabetic peripheral neuropathy is a common diabetic complication. Presently, our understanding of its pathogenesis is incomplete, and there are no effective treatment options. In-depth research requires the use of animal experiments. The criteria for modeling success and the evaluation method for peripheral nerve function recovery are critical for carrying out animal experiments into type 2 diabetic peripheral neuropathy. However, but there has been a lack of systematic interrogation and analysis of the evaluation method used with type 2 diabetic peripheral neuropathy models. Therefore, the author reviewed the recent data, summarized and analyzed the evaluation method used for animal models of type 2 diabetic peripheral neuropathy of small and large nerve fibers, and proposed future directions for development, providing a reference for related research.

【Keywords】 diabetic peripheral neuropathy; animal model; evaluation; research progress; review

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

糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是糖尿病常见并发症之一, 会影

响约50%糖尿病患者^[1]。由于对周围神经产生损害, 患者常会因感觉异常、运动能力下降等而影响

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金 (81603706); 四川省自然科学基金 (2023NSFSC5364)。

【作者简介】 朱紫约 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 循证医学与针灸临床疗效评价。E-mail: 2274826024@qq.com

【通信作者】 张微 (1985—), 女, 博士, 高级实验师, 研究方向: 针刺防治周围神经病变的作用机制。E-mail: 745507756@qq.com

日常生活,甚至出现远端肢体溃烂。然而,糖尿病特征(如高血糖、高血脂等)与神经病变间复杂的机制关系尚不明确,且缺乏有效的治疗手段,尤其对于 2 型 DPN,改善生活方式和严格控制血糖等传统治疗手段的效果仍不能令人满意^[2]。因此需要利用动物实验深入研究 2 型 DPN 发生发展机制,寻找效果更好的治疗方法。

动物实验的开展需要科学合理的动物模型评估体系,其是判定造模成功与否和干预手段疗效的关键。2 型 DPN 动物模型评价包括 2 型糖尿病成模检测和周围神经病变成模检测,前者大多以空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG) ≥ 11.1 mmol/L,结合胰岛素敏感指数下降为标准^[3]。后者的标准种类繁多且各实验间并不统一,缺乏相关文章对其进行归纳总结。故笔者查阅近年资料,基于受损神经纤维直径的不同,从小神经纤维和大神经纤维两方面将周围神经病变的评价方法综述如下,以期为今后研究提供参考。

1 小神经纤维的评估

1.1 伤害性刺激测试

小神经纤维指直径 $< 7 \mu\text{m}$,包括薄髓鞘 A δ 、无髓鞘 C 的一类神经纤维,其源于背根神经节发出的感觉神经,能接收并传导外界对皮肤的刺激。糖尿病早期常累及周围小神经,使局部炎症因子大幅释放促进外周敏化,并改变电压门控离子通道表达,导致受损纤维和相邻未受损神经纤维异位放电^[4],从而降低伤害感受器激活阈值,表现出痛觉过敏/超敏、感觉异常等现象。目前根据伤害刺激类型的不同,主要分为机械刺激、温度刺激、电流刺激和化学刺激 4 种。

1.1.1 机械刺激

外周 C 纤维受损会诱导负责低阈值轻触觉的 A β 纤维,从脊髓背角深层芽生至浅层,并在此处与传导痛觉的 C 纤维相连的突触建立新的连接,使轻触觉异常感知为机械性痛觉,从而表现为机械痛觉敏感^[5]。Von Frey 细丝试验是目前 2 型 DPN 机械痛觉评价中应用最广的方法,将使老鼠出现缩后爪反应的细丝重量定义为缩爪阈值,其下降体现机械痛觉过敏。但各实验间所选择的记录标准并不统一。有实验仅记录第一次满足阳性条件的阈值^[6],也有实验计算多次测量的平均值作为缩爪阈值^[7]。

1.1.2 温度刺激

冷热觉分别由 A δ 纤维和 C 纤维传导,冷热痛

觉由 A δ 纤维和 C 纤维共同传导,其中热痛更多由 C 纤维负责,因此温度刺激的方法也可衡量小神经纤维功能,主要包括甩尾实验、平板实验和 Hargreaves 法。甩尾实验^[8-9]以水温测试甩尾潜伏期(tail flick latency, TFL)即甩尾动作出现的时间;平板实验^[10-11]将动物置于温度恒定的平板上观测缩爪潜伏期(paw withdrawal latency, PWL)即后爪缩爪或挣扎出现的时间;Hargreaves 法^[12-13]以热辐射为热源,TFL 和 PWL 均可通过此方法观测。糖尿病周围神经病变模型动物常表现为 TFL 和 PWL 的显著下降。但部分实验观察到热刺激感受减退^[14],这可能与其造模时间较长有关。此外,有学者根据丙酮极易挥发带走热量的特点,用来评估小鼠的冷觉感受,将丙酮施加于后爪观察大鼠首次出现伤害性反应所需的时间^[15]。综上所述,温度刺激的方法种类繁多,寻找一种更具优势的评价方法有利于统一各实验间的选择,增强结果的可比性。有研究显示尾部是测量热敏感性行为更理想的部位^[16],但测量甩尾潜伏期时需束缚小鼠,易出现由于应激而产生的混杂因素,因此权衡好二者之间的利弊关系或许是未来的发展方向之一。

1.1.3 电流刺激

电流感觉阈值测定是临床上一种神经感觉测定方法,通过测定引起感觉的最小电流强度定量评估神经纤维状态,可调整正弦交流电的频率激活特定类型神经纤维产生动作电位^[17],从而特异性地研究某一类或几类纤维的感觉变化。通过比较引起动物出现伤害性反应的最小电流强度可判断 2 型 DPN 模型是否出现痛觉过敏现象。有研究发现在 2 型 DPN 模型中,用 250 Hz 电流刺激 A δ 纤维时始终可观察到痛觉过敏现象,但用 5 Hz 电流刺激 C 纤维时,造模一段时间后观察到模型痛觉显著减退,这提示由痛觉过敏到痛觉减退,纤维的特异性机制可能比时间依赖性转变更为重要^[18]。这也侧面反映出特异电流刺激在研究 2 型 DPN 机制时存在巨大潜力。

1.1.4 化学刺激

福尔马林可打开瞬时受体电位香草酸 1 型通道增加神经元的敏感性,而诱导疼痛^[19]。记录注射福尔马林后 60 min 爪退缩的次数,也可作为一种伤害性反应的评估方法^[20]。

1.2 小神经纤维病理变化观察

1.2.1 表皮内神经纤维密度测定

表皮内神经纤维(intraepidermal nerve fiber,

IENTF),由真皮神经丛向上发出穿过真皮-表皮交界处而形成,在周围神经受损初期 IENTF 密度即可下降,被认为是评估小神经纤维病变的金标准^[21]。又因其能反映 2 型糖尿病中胰岛 β 细胞损伤情况^[22],故在 2 型 DPN 模型小纤维的评价中有重要意义。PGP 9.5 是一种泛素羧基水解酶,广泛存在于神经元、神经纤维、神经内分泌细胞等处,利用抗 PGP 9.5 抗体能标记所有无髓鞘和有髓鞘 PGP 9.5 阳性纤维,从而观察组织切片中 IENTF 密度。Li 等^[23]线性定量 2 型 DPN 小鼠后爪足垫 IENTF 密度,观测到其较对照组显著下降。

1.2.2 角膜神经纤维定量测定

由于角膜缺乏直接的血管供应,使得存在其中的大量小神经纤维极易遭受代谢紊乱、免疫反应等的破坏^[24]。角膜共聚焦显微镜 (corneal confocal microscopy, CCM) 使用激光为光源,利用共聚焦原理和装置使照明点和探测点共焦,阻挡除该探测点以外的所有光线,从而提高图像质量,是一种非侵入无创、重复性好、精确灵敏的观测角膜神经纤维方法,已被证明可作为临床上诊断 2 型糖尿病小神经纤维病变的合理指标^[25],其诊断参数主要为角膜神经纤维密度、角膜神经纤维长度、角膜神经分支密度和角膜神经纤维迂曲度。有学者利用此技术观察到 2 型 DPN 造模后动物角膜上皮下神经纤维长度和密度出现显著下降^[26-27]。

2 大神经纤维的评估

2.1 行为学改变

大神经纤维由轴突、髓鞘、神经膜构成,按功能可分为运动神经和感觉神经。运动神经将中枢神经系统发出的信息传递至外周,可以支配神经末端相连的肌肉等组织器官;感觉神经将来自肌肉、肌腱、关节等的电信号经薄束和楔束上传至大脑而形成平衡觉、位置觉等深感觉。2 型 DPN 中大神经纤维轴突和髓鞘结构因氧化应激反应、微循环障碍等而损伤,导致大神经传导功能障碍,使动物出现运动能力下降、平衡感失常的行为学改变,可用高粱测试^[28]与旋转杆测试^[29]观察。患病动物常表现为动物通过高空中横梁的时间显著增加和在不断旋转的杆上站立的时间下降。值得关注的是,在测试前需对动物进行适应和引导训练。

2.2 神经传导速度检测

轴突上钠、钾离子通道的开关是神经动作电位产

生的分子基础,动作电位产生后沿髓鞘间的无髓鞘郎飞结处跳跃式传导,极大地提高了有髓神经传导速度。通过神经电生理技术测定动作电位波幅、潜伏期,并利用动作电位传导的距离除以潜伏期计算神经传导速度,病理状态下传导速度的减慢可反映轴突和髓鞘损失情况,常作为评价 2 型 DPN 的重要指标。

2.2.1 运动神经传导速度

运动神经传导速度 (motor nerve conduction velocity, MNCV) 通过刺激神经近端并在远端支配的肌肉处观察复合肌肉动作电位 (compound muscle action potential, CMAP) 潜伏期来计算。但 CMAP 潜伏期不仅包括神经传导时间,还有神经肌肉接头传递时间和肌肉纤维上的传导时间,故大多实验在距离记录电极一近一远两点进行刺激,通过刺激电极间距离除以两点潜伏期差值计算 MNCV^[30],以避免非神经传导时间对结果的影响。但也有实验仅使用单个刺激电极,于踝关节坐骨神经处记录动作电位,直接计算传导速度,也能良好地识别 2 型 DPN 造模后 MNCV 的下降^[31]。这可能是因为踝关节解剖位置明确,记录电极易直接定位于坐骨神经上,所记录的动作电位潜伏期不包括神经肌肉接头和肌肉纤维上的时间^[32]。此外,还有学者将坐骨神经分离,在神经干上直接测定传导速度^[33],这种方法最为直观、准确,但不适用于需多次观测的实验。

2.2.2 感觉神经传导速度

与运动潜伏期不同,感觉潜伏期只包括动作电位在感觉纤维上传导的时间,因此在测定感觉神经传导速度 (sensory nerve conduction velocity, SNCV) 时只需一个刺激点和一个记录点。根据电极摆放的位置,可分为正向测定和逆向测定。正向测定即沿感觉神经传导的生理方向测定,刺激电极置于远端而记录电极置于近端,逆向测定中电极的摆放则相反。在 2 型 DPN 中二者均可评估 SNCV^[34-35]。与正向测定相比,逆向测定可以诱发更大的感觉神经动作电位 (sensory nerve action potential, SNAP) 幅度,但其也会因同时诱发 CMAP 和 SNAP 而破坏远端反应的测定,故在测量时需仔细观察波形的特征及持续时间以避免其影响结果^[36]。

2.3 病理学观察

施万细胞形成的髓鞘包绕大神经纤维轴突,具有保护神经纤维、促进轴突再生等作用。有学者用光镜观察 2 型 DPN 坐骨神经组织病理变化,发现模型组神经纤维数量减少,神经内膜水肿,髓鞘损失、

施万细胞数量减少^[29];在电镜下观察其超微结构,发现髓鞘薄片分层,轴突萎缩和神经纤维变形。此外,除定性的病理描述,还可利用轴突与髓鞘间面积的比值、直径与外径的比值来客观定量地分析大神经纤维病理变化^[37-38],在 2 型 DPN 中可见前者减小,后者增加。

3 讨论

3.1 评价 2 型 DPN 模型的标准

通过查阅整理文献发现,部分实验在 Von Frey 细丝试验中明确了具体的刺激部位(表 1),实验前后刺激相同部位可以避免因刺激位置不同而产生的可能混杂因素。然而,短时间内对同一部位的重复刺激、不同部位的痛阈差异是否会对结果产生一定影响,尚需验证。未来可根据后爪的解剖特点、神经分布、活动着力点等,结合适宜的刺激间隔时间,探索更完善的伤害性刺激方法。此外,部分实验在检测感觉神经传导功能时,并未选择常见的坐骨神经(表 2),这可能具备以下优势。第一,神经位置较浅,电极更易接近神经;第二,肌肉浅薄,可一定程度避免 CMAP 对 SNAP 的影响;第三,位于坐骨神经远端,或可更早表征出 2 型 DPN 动物异常的神经传导功能。最近的研究发现,尾神经因长度和位置最远端,在表征轴突损伤的长度依赖性和严重程度具备独特优势^[46],且其神经结构简单,更能准确地测量刺激电极与记录电极间的距离以便于计算 NCV,因此尾神经或许是未来发展更精准测量方法的潜在方向。而在追求客观精准的评价方法时,也应注意其是否具有普及性。如前所述的 CCM,虽然兼具即时观测、无创、精确等优势,但其仪器造价昂贵且操作难度高,很难在

动物实验中广泛应用,因此需要利用其优势寻找可推广的替代评价方法,平衡好精确性与普及性。如利用高渗滴眼液评估角膜敏感性以反映角膜神经纤维变化^[47]。

值得注意的是,各实验观察记录的时间节点有所区别^[48-49],而研究发现,2 型 DPN 鼠的疼痛行为会因时间的不同而发生变化^[50],这提示观察记录时间应尽量统一。此外,在记录动物行为学情况时,应注意记录标准对结果的影响,如阳性反应的界定等。有国外学者制定了评估小鼠冷觉感受的评分系统,这使得对动物行为学变化的观察记录更加稳定可控,有利于统一各实验间的评价标准^[51]。

综上所述,目前各实验间存在评价同一变化但选择的方法不同,选择了同一方法但记录标准不同的问题,这降低了实验的可比性和可重复性,尚需要摸索出一套科学、统一的评价体系。

3.2 小结

目前,评估 2 型 DPN 大小神经纤维情况的方法以行为学观察、病理变化观察、电生理检测为主,评价较单一,缺乏深度。未来可从以下角度入手探索更为丰富、科学的评价方法。第一,寻找客观的生物指标。2 型 DPN 起病隐匿,在发病早期常无明显症状,寻找相关的生物指标在临床早期诊断及预防上存在一定价值,相关研究进展见表 3。而动物实验中,合适的生物指标可使模型评价方法更为客观具体,但目前相关研究较为缺乏。有研究认为血脂对 2 型 DPN 进展十分重要,早在血糖明显升高之前小神经纤维就已出现损伤,这可能与血脂异常密切相关^[59]。因此血脂或许不应只局限为评价 2 型糖尿病的辅助指标,研究血脂与 2 型 DPN 发生的相关性,对于更早地量化评估神经纤维损伤情况具有一

表 1 Von Frey 细丝试验刺激部位
Table 1 Stimulation site of Von Frey test

品种 Species	刺激位置 Stimulation site
SD 大鼠、C57BL/6 小鼠 ^[39-40] Sprague Dawley (SD) rats, C57BL/6 mice	后爪足底中心 Middle of the plantar surface of the hind paw
SD 大鼠 ^[13] Sprague Dawley (SD) rats	足底脚跟的脂肪部分 Fat part of both plantar heels
SD 大鼠 ^[41] Sprague Dawley (SD) rats	后爪食物垫的掌部区域 Planter region of hind paw food pad
db/db 小鼠、C57BL/6J 小鼠 ^[42] db/db mice, C57BL/6 mice	后爪掌腹内侧的足底表面 Plantar surface of the ventral-medial hind paw
SD 大鼠 ^[43] Sprague Dawley (SD) rats	第三和第四跖骨间 Between the third and fourth metatarsus of the hind paw

表 2 感觉神经传导检查测量位置
Table 2 Measured site for sensory nerve conduction test

刺激位置 Stimulation site	记录位置 Recorded location	测量神经 Measured nerve
脚踝处 ^[44] Ankle	足背处 Dorsum of the foot	腓肠神经 Sural nerve
尾基底部远端 3.5 cm 处 ^[45] 3.5 cm segment from the base of the tail	尾基底部 Base of the tail	尾神经 Caudal nerve
第二脚趾 ^[28] Second toe	内踝后方 Behind the median malleolus	趾神经 Digital nerve

表 3 临床相关生物学指标
Table 3 Clinically relevant biomarkers

生物指标 Biomarker	水平 Level	相关病理表现 Associated pathological manifestations	可能机制 Potential mechanisms
甘油三酯 ^[52] Triglycerides	↑	腓总神经、腓肠神经、胫神经 NCV ↓、动作电位 ↓ Peroneal nerve, sural nerve, tibial nerve NCV ↓, action potential ↓	微血管或神经内脂质沉积 Microvascular or intraneural lipid deposition
胆固醇 ^[53] Cholesterol	↓	腓总神经、腓肠神经、胫神经 NCV ↓、动作电位 ↓; 胫骨近端神经 MCA ↑ Peroneal nerve, sural nerve, tibial nerve NCV ↓, action potential ↓; MCA of the proximal tibial nerve ↑	外周神经再生受损 Percussion of peripheral nerve regeneration
游离三碘甲状腺原氨酸 ^[54] FT3	↓	尺神经、正中神经、腓总神经、腓浅神经、胫神经 NCV ↓, 振幅 ↓ Ulnar nerve, median nerve, peroneal nerve, superficial peroneal nerve NCV ↓, amplitude ↓	微血管内皮细胞变性 Endothelial cells of micro-vessels degeneration
转化生长因子 β1 ^[55] TGF-β1	↑	尺神经、腓总神经、胫后神经 NCV ↓ Ulnar nerve, peroneal nerve, posterior tibial nerve NCV ↓	诱导施万细胞凋亡 Induction of Schwann cell apoptosis
镁水平 ^[56] Magnesium levels	↓	尺神经、腓肠神经、胫神经振幅 ↓ Ulnar nerve, sural nerve, tibial nerve amplitude ↓	诱发轴突变性 Induction of axonal degeneration
高敏肌钙蛋白 T ^[57-58] High-sensitivity Troponin T	↑	腓总神经、腓肠神经、胫神经 NCV ↓、动作电位 ↓、振幅 ↓; 坐骨神经 FA ↓; 外周神经灌注 ↓ Peroneal nerve, sural nerve, tibial nerve NCV ↓, amplitude ↓; FA of the sciatic nerve ↓; peripheral nerve perfusion ↓	神经毛细血管通透性降低及毛细血管外细胞间隙容积分数下降 Decrease in nerve capillary permeability and reduction of the extracapillary extracellular volume fraction

注:MCA:mean cross-sectional area,平均横截面积,表示神经肿胀程度;FA:fractional anisotropy,部分各向异性分数,表示神经结构完整程度。
Note. MCA, Mean cross-sectional area,expressing the degree of neural swelling. FA, Fractional anisotropy, expressing the degree of neural structural integrity.

定意义,并可能为 DPN 的机制研究、治疗方式带来新的途径。但由于雌激素水平等因素,雌、雄鼠间脂质代谢紊乱的发展进程有所差异,故在研究时需注意性别的影响^[60]。此外,肠道菌群与机体代谢关系密切,且有证据支持其通过调节代谢影响 2 型 DPN 的发生发展^[61],因此推测相关菌群在评估,尤其是预防、干预糖尿病及其并发症中可能存在巨大潜力。第二,结合患者的常见症状。如 DPN 患者常伴抑郁焦虑样表现,尤其对于神经性疼痛明显的患者^[62],因此在评价 DPN 模型时也可引入心理相关的行为学检测。第三,落实于更微观的分子层面。

有研究发现来自不同供货商的相同品系小鼠由于遗传差异而出现不同的疼痛行为学改变^[63],提示未来或可从基因组学、转录组学、蛋白组学等新兴组学技术入手深入挖掘该差异背后机制,为后续 2 型 DPN 动物模型相关研究提供参考。

参考文献:

[1] Iqbal Z, Azmi S, Yadav R, et al. Diabetic peripheral neuropathy: epidemiology, diagnosis, and pharmacotherapy [J]. Clin Ther, 2018, 40(6): 828-849.
[2] Elafros MA, Andersen H, Bennett DL, et al. Towards prevention of diabetic peripheral neuropathy: clinical

- presentation, pathogenesis, and new treatments [J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(10): 922-936.
- [3] 王璇, 徐斌. 2 型糖尿病周围神经病变动物模型的建立及检测指标分析 [J]. *中国医学科学院学报*, 2020, 42(5): 658-666.
- Wang X, Xu B. Establishment and validation of animal models of peripheral diabetic neuropathies [J]. *Acta Acad Med Sin*, 2020, 42(5): 658-666.
- [4] 薛松, 孙涛. 小胶质细胞介导脊髓损伤后神经病理性疼痛机制研究进展 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2022, 28(3): 165-172.
- Xue S, Sun T. Research progress on the mechanism of microglia in neuropathic pain after spinal cord injury [J]. *Chin J Pain Med*, 2022, 28(3): 165-172.
- [5] 黄响, 张雅君. 错误连接和终末器官靶向异常导致的神经病理性疼痛 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2023, 29(1): 2-5.
- Huang Y, Zhang YJ. Neuropathic pain caused by misconnection and abnormal end organ targeting [J]. *Chin J Pain Med*, 2023, 29(1): 2-5.
- [6] Lin JY, He YN, Zhu N, et al. Metformin attenuates increase of synaptic number in the rat spinal dorsal horn with painful diabetic neuropathy induced by type 2 diabetes: a stereological study [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(12): 2232-2239.
- [7] Sajic M, Rumora AE, Kanhai AA, et al. High dietary fat consumption impairs axonal mitochondrial function *in vivo* [J]. *J Neurosci*, 2021, 41(19): 4321-4334.
- [8] 杨丹, 崔雅忠, 张倩, 等. 1 型与 2 型糖尿病大鼠周围神经病变的比较 [J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(1): 27-31.
- Yang D, Cui YZ, Zhang Q, et al. Comparison of peripheral neuropathy between type 1 and type 2 diabetes mellitus rats [J]. *Basic Clin Med*, 2019, 39(1): 27-31.
- [9] 何洋, 黄源达, 关焕玉, 等. 复方龙芪汤对 2 型糖尿病大鼠周围神经病变的作用和机制 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(11): 2694-2698.
- He Y, Huang YD, Guan HY, et al. Effect of compound Long-Qi decoction on peripheral neuropathy in type 2 diabetic rats [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2019, 37(11): 2694-2698.
- [10] Wu Y, Gu Y, Shi B. miR-590-3p Alleviates diabetic peripheral neuropathic pain by targeting RAP1A and suppressing infiltration by the T cells [J]. *Acta Biochim Pol*, 2020, 67(4): 587-593.
- [11] Ma J, Yu H, Liu J, et al. Metformin attenuates hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 764: 599-606.
- [12] Tsybalyuk O, Gerzanich V, Mumtaz A, et al. SUR1, newly expressed in astrocytes, mediates neuropathic pain in a mouse model of peripheral nerve injury [J]. *Mol Pain*, 2021, 17: 17448069211006603.
- [13] Chandrasekaran K, Najimi N, Sagi AR, et al. NAD⁺ precursors repair mitochondrial function in diabetes and prevent experimental diabetic neuropathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4887.
- [14] Jolivalt CG, Aghanoori MR, Navarro-Diaz MC, et al. Enhancement of mitochondrial function by the neurogenic molecule NSI-189 accompanies reversal of peripheral neuropathy and memory impairment in a rat model of type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Res*, 2022, 2022: 8566970.
- [15] Naseem N, Ahmad MF, Malik S, et al. The potential of esculin in ameliorating-type-2 diabetes mellitus induced neuropathy in Wistar rats and probing its inhibitory mechanism of insulin aggregation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 242 (Pt 1): 124760.
- [16] Schaumburg HH, Zotova E, Raine CS, et al. The rat caudal nerves: a model for experimental neuropathies [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2010, 15(2): 128-139.
- [17] Shimo K, Ogawa S, Niwa Y, et al. Inhibition of current perception thresholds in a-delta and C fibers through somatosensory stimulation of the body surface [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 13705.
- [18] Ueda H, Neyama H, Matsushita Y. Lysophosphatidic acid receptor 1- and 3-mediated hyperalgesia and hypoalgesia in diabetic neuropathic pain models in mice [J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1906.
- [19] Guo Z, Li HL, Cao Z, et al. Spinophilin negatively controlled the function of transient receptor potential vanilloid 1 in dorsal root Ganglia neurons of mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 863: 172700.
- [20] García G, Gutiérrez-Lara EJ, Centurión D, et al. Fructose-induced insulin resistance as a model of neuropathic pain in rats [J]. *Neuroscience*, 2019, 404: 233-245.
- [21] Preguiça I, Alves A, Nunes S, et al. Diet-induced rodent models of diabetic peripheral neuropathy, retinopathy and nephropathy [J]. *Nutrients*, 2020, 12(1): 250.
- [22] Guo D, Mizukami H, Osonoi S, et al. Beneficial effects of combination therapy of canagliflozin and teneligliptin on diabetic polyneuropathy and β -cell volume density in spontaneously type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *Metabolism*, 2020, 107: 154232.
- [23] Li J, Liu HQ, Li XB, et al. Function of adenosine 2A receptor in high-fat diet-induced peripheral neuropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 7856503.
- [24] Petropoulos IN, Ponirakis G, Khan A, et al. Corneal confocal microscopy: ready for prime time [J]. *Clin Exp Optom*, 2020, 103(3): 265-277.
- [25] Jin Y, Wang W, Chen W, et al. Corneal confocal microscopy: a useful tool for diagnosis of small fiber neuropathy in type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Investig*, 2021, 12(12): 2183-2189.
- [26] Coppey LJ, Shevalye H, Obrosova A, et al. Determination of peripheral neuropathy in high-fat diet fed low-dose streptozotocin-treated female C57BL/6J mice and Sprague-Dawley rats [J]. *J Diabetes Investig*, 2018, 9(5): 1033-1040.
- [27] Yorek MS, Obrosova A, Shevalye H, et al. Early vs. late intervention of high fat/low dose streptozotocin treated C57BL/6J mice with enalapril, α -lipoic acid, menhaden oil or their combination: effect on diabetic neuropathy related endpoints [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 116: 122-131.

- [28] Haddad M, Eid S, Harb F, et al. Activation of 20-HETE synthase triggers oxidative injury and peripheral nerve damage in type 2 diabetic mice [J]. *J Pain*, 2022, 23(8): 1371–1388.
- [29] Abdelkader NF, Elbaset MA, Moustafa PE, et al. Empagliflozin mitigates type 2 diabetes-associated peripheral neuropathy: a glucose-independent effect through AMPK signaling [J]. *Arch Pharm Res*, 2022, 45(7): 475–493.
- [30] Paeschke S, Baum P, Toyka KV, et al. The role of iron and nerve inflammation in diabetes mellitus type 2-induced peripheral neuropathy [J]. *Neuroscience*, 2019, 406: 496–509.
- [31] 徐利娟, 冯程程, 阿曼古丽·苏力唐, 等. 温通活血乳膏对 2 型糖尿病周围神经病变模型大鼠背根神经节 ERK1/2 及 p-ERK1/2 的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(1): 112–115, 261.
Xu LJ, Feng CC, Amanguli SLT, et al. Treatment of hyperalgesia by Wentong Huoxue cream for type 2 diabetes peripheral neuropathy model rat dorsal root ganglion ERK1/2 and p-ERK1/2 [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2019, 37(1): 112–115, 261.
- [32] 姚鸿萍, 封卫毅, 魏友霞, 等. 大鼠坐骨神经传导速度测定的方法学考察 [J]. *中国药房*, 2011, 22(1): 18–20.
Yao HP, Feng WY, Wei YX, et al. Methodology of the determination of sciatic nerve conduction velocity in rats [J]. *China Pharm*, 2011, 22(1): 18–20.
- [33] 梁晓莹, 肖叶玉, 廖中曦, 等. ¹H-MR 波谱检测腓肠肌细胞内脂质浓度用于早期诊断 2 型糖尿病模型大鼠周围神经病变 [J]. *中国介入影像与治疗学*, 2022, 19(6): 365–369.
Liang XY, Xiao YY, Liao ZX, et al. Intramyocellular lipid concentration of gastrocnemius measured with ¹H-MR spectroscopy for early diagnosis of diabetic peripheral neuropathy in rat models of type 2 diabetes mellitus [J]. *Chin J Interv Imag Ther*, 2022, 19(6): 365–369.
- [34] Wang L, Chopp M, Szalad A, et al. Exosomes derived from schwann cells ameliorate peripheral neuropathy in type 2 diabetic mice [J]. *Diabetes*, 2020, 69(4): 749–759.
- [35] Sirisha A, Gaur GS, Pal P, et al. Effect of honey and insulin treatment on oxidative stress and nerve conduction in an experimental model of diabetic neuropathy Wistar rats [J]. *PLoS One*, 2021, 16(1): e0245395.
- [36] Tavee J. Nerve conduction studies: basic concepts [J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 160: 217–224.
- [37] Wang R, Wang L, Zhang C, et al. L-carnitine ameliorates peripheral neuropathy in diabetic mice with a corresponding increase in insulin-like growth factor-1 level [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1): 743–751.
- [38] Wang L, Chopp M, Szalad A, et al. Phosphodiesterase-5 is a therapeutic target for peripheral neuropathy in diabetic mice [J]. *Neuroscience*, 2011, 193: 399–410.
- [39] Li Z, Wang W, Meng F, et al. Analgesic and neuroprotective effects of Baimai Ointment on diabetic peripheral neuropathy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 292: 115122.
- [40] Tian J, Song T, Wang H, et al. Toll-like receptor 2 antagonist ameliorates type 2 diabetes mellitus associated neuropathic pain by repolarizing pro-inflammatory macrophages [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(9): 2276–2284.
- [41] Oza Manisha J, Kulkarni Yogesh A. Formononetin ameliorates diabetic neuropathy by increasing expression of SIRT1 and NGF [J]. *Chem Biodivers*, 2020, 17(6): e2000162.
- [42] Griggs RB, Santos DF, Laird DE, et al. Methylglyoxal and a spinal TRPA1-AC1-Epac cascade facilitate pain in the db/db mouse model of type 2 diabetes [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 127: 76–86.
- [43] Sun M, Zhang M, Yin H, et al. Long non-coding RNA MSTRG-81401 short hairpin RNA relieves diabetic neuropathic pain and behaviors of depression by inhibiting P2X4 receptor expression in type 2 diabetic rats [J]. *Purinergic Signal*, 2023, 19(1): 123–133.
- [44] O'Brien PD, Hinder LM, Rumora AE, et al. Juvenile murine models of prediabetes and type 2 diabetes develop neuropathy [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(12): dmm037374.
- [45] Leal-Julìà M, Vilches JJ, Onieva A, et al. Proteomic quantitative study of dorsal root Ganglia and sciatic nerve in type 2 diabetic mice [J]. *Mol Metab*, 2022, 55: 101408.
- [46] Pozzi E, Monza L, Ballarini E, et al. *Morpho*-functional characterisation of the rat ventral caudal nerve in a model of axonal peripheral neuropathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1687.
- [47] Yorek MS, Davidson EP, Poolman P, et al. Corneal sensitivity to hyperosmolar eye drops: a novel behavioral assay to assess diabetic peripheral neuropathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(6): 2412–2419.
- [48] Pérez-Martínez IO, Cifuentes-Mendiola SE, Solís-Suárez DL, et al. Moderate intensity aerobic training reduces the signs of peripheral sensitization in a mouse model of type 2 diabetes mellitus [J]. *Exp Brain Res*, 2022, 240(10): 2747–2756.
- [49] Li S, Sun C, Rong P, et al. Auricular vagus nerve stimulation enhances central serotonergic function and inhibits diabetic neuropathy development in Zucker fatty rats [J]. *Mol Pain*, 2018, 14: 1744806918787368.
- [50] Akamine T, Kusunose N, Matsunaga N, et al. Accumulation of sorbitol in the sciatic nerve modulates circadian properties of diabetes-induced neuropathic pain hypersensitivity in a diabetic mouse model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(1): 181–187.
- [51] Hiyama H, Yano Y, So K, et al. TRPA1 sensitization during diabetic vascular impairment contributes to cold hypersensitivity in a mouse model of painful diabetic peripheral neuropathy [J]. *Mol Pain*, 2018, 14: 1744806918789812.
- [52] Jende JME, Groener JB, Oikonomou D, et al. Diabetic neuropathy differs between type 1 and type 2 diabetes: insights from magnetic resonance neurography [J]. *Ann Neurol*, 2018, 83(3): 588–598.

黄舒宁,蔡宏文. 细胞焦亡与动脉粥样硬化关系进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 146-150.

Huang SN, Cai HW. Progression of research into the relationship between pyroptosis and atherosclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 146-150.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.019

细胞焦亡与动脉粥样硬化关系进展

黄舒宁¹, 蔡宏文^{2*}

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 杭州 310053; 2. 浙江省中医院心血管内科, 杭州 310006)

【摘要】 细胞焦亡是一种程序性死亡方式,活化的天冬氨酸酶-1 (caspase-1) 可以诱导焦亡的发生,促进炎症因子的释放,引发剧烈的炎症反应。根据依赖的 caspase 不同,细胞焦亡可分为 caspase-1 介导的典型炎症小体途径和人 caspase-4/5 (或小鼠 caspase-11) 介导的非典型炎症小体途径。近年来研究发现细胞焦亡与动脉粥样硬化的发生、发展、转归密切相关。本文分别从内皮细胞、血管平滑肌细胞和巨噬细胞三种细胞焦亡在动脉粥样硬化发生发展中的作用和机制作一综述,旨在为动脉粥样硬化发病机制和诊断治疗提供新的研究思路。

【关键词】 动脉粥样硬化; 细胞焦亡; 内皮细胞; 血管平滑肌细胞; 巨噬细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0146-05

Progression of research into the relationship between pyroptosis and atherosclerosis

HUANG Shuning¹, CAI Hongwen^{2*}

(1. the First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medicinal University, Hangzhou 310053, China.

2. Department of Cardiology, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006)

【Abstract】 Pyroptosis is a programmed mode of cell death. Activated caspase-1 can induce the occurrence of pyroptosis, promote the release of inflammatory factors, and trigger a violent inflammatory response. Depending on the type of caspase involved, pyroptosis can be divided into a caspase-1-mediated typical inflammasome pathway and a human caspase-4/5 (or mouse caspase-11)-mediated atypical inflammasome pathway. In recent years, studies have found that pyroptosis is closely related to the occurrence, development, and prognosis of atherosclerosis. This article reviews the roles and mechanisms of endothelial cells, vascular smooth muscle cells, and macrophage cells in the occurrence and development of atherosclerosis, with the aim of promoting new ideas for research into the pathogenesis, diagnosis, and treatment of atherosclerosis

【Keywords】 atherosclerosis; pyroptosis; endothelial cell; vascular smooth muscle cell; macrophage cell

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

随着社会经济的发展和人民生活水平的提高, 心血管疾病已成为影响我国居民健康的“头号杀

手”, 而动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 相关的心血管疾病占其中最大的比例。细胞焦亡 (pyroptosis)

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (81973579); 浙江省公益技术应用研究 (实验动物) 项目 (2017C37182); 浙江省中医药科研基金 (2016ZA073, 2019ZB037, 2023ZL422)。

【作者简介】 黄舒宁 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 冠心病基础与临床。E-mail: huangshuning2022@163.com

【通信作者】 蔡宏文 (1978—), 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 冠心病基础与临床。E-mail: chwzju2002@163.com

是细胞的一种程序性死亡方式,其特点是质膜的通透性改变及炎症因子的释放。已知炎症反应与动脉粥样硬化的发生发展密切相关,而细胞焦亡作为机体炎症反应的重要原因,必然会影响到 AS 各个阶段^[1]。因此,阐明细胞焦亡在 AS 发生机制和防治研究中的角色及作用,将有助于为 AS 相关疾病的防治研究提供新思路,同时也将有助于加深对细胞焦亡这一特殊死亡方式的认识。本文就细胞焦亡在 AS 发生发展的研究进展作一综述。

1 细胞焦亡

细胞焦亡是一种细胞程序性死亡方式,焦亡发生后会造成质膜孔,引起细胞肿胀和溶解,随后细胞膜破裂,促炎细胞因子释放,从而诱导和放大炎症反应^[2]。在最初的认知中,焦亡的特征是 caspase-1 介导并对应于某些细菌的刺激,然而随着研究的深入发现焦亡不仅是由 caspase-1 特征性触发的, caspase-11/4/5 通过识别细胞内脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 也可诱导焦亡的发生。根据 caspase 的不同可将细胞焦亡分为依赖 caspase-1 的典型炎症小体途径和依赖 caspase-4/5 (或小鼠 caspase-11) 的非典型炎症小体途径。

在焦亡的典型途径中,由激活的炎症小体发出的 caspase-1 激活导致的焦亡,炎症小体检测病原体相关分子模式和危险相关分子模式,一旦模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR) 识别到感染或免疫挑战的信号,它将通过下游分子介导炎症小体的组装。组装的炎症小体复合物与 caspase-1 的前体 (前 caspase-1) 结合,并释放活化的 caspase-1,最终导致焦亡^[3]。然而近期研究发现,小鼠巨噬细胞对革兰氏阴性菌感染的反应死亡与 caspase-11 密切相关,死亡的巨噬细胞形态与 caspase-1 诱导的细胞死亡的形态相似,这种巨噬细胞死亡已被证明是由非典型炎症小体途径引起的焦亡,进一步研究发现,人类的 caspase-4/5 似乎与小鼠的 caspase-11 有相同的功能,前者通过识别革兰氏阴性菌细胞壁中的 LPS 介导焦亡,后者则通过直接与 LPS 结合而导致焦亡^[4]。在焦亡的非典型途径中, caspase-11/4/5 以高特异性和亲和力直接结合 LPS 分子, caspase-11 上的半胱天冬酶激活和募集结构域 (caspase activation and recruitment domains, CARD) 可能是识别 LPS 的位点,多个 CARD 肽段与 LPS 结合形成了活化形式的 caspase-1,经寡

聚后被活化诱导焦亡,而 CARD 结构域缺陷时对 LPS 没有反应^[5]。除此之外,活化的 caspase-11/4/5 可以直接裂解 gasdermin D (GSDMD),在细胞膜上形成释放炎症介质的管道,大量炎症因子被释放,促进细胞焦亡^[6]。

2 细胞焦亡与动脉粥样硬化的关系

AS 是一种血管的慢性炎症性疾病,其特征是由于过多的脂质和炎性细胞累积于血管壁形成斑块而导致血管腔狭窄,其中炎症反应又是引发 AS 的主要病理生理机制,贯穿 AS 发生发展的整个过程^[7]。而细胞焦亡作为机体炎症反应的重要病因和组成部分,与 AS 发生发展一定是密不可分的^[1]。在细胞焦亡期间,白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白介素-18 (interleukin-18, IL-18) 的分泌促进了白细胞的浸润和活化,细胞裂解后将炎症介质释放到细胞外,通过激活 PRR 刺激促炎细胞因子的产生,过度焦亡的细胞会增加炎症介质 IL-1 β 、IL-18 和高迁移率族蛋白 B1 的大量释放,从而引发剧烈的炎症反应^[8]。以炎症为桥梁,AS 与细胞焦亡存在千丝万缕的联系,其中内皮细胞 (endothelial cells, ECs)、血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 和巨噬细胞是参与 AS 各类细胞死亡方式和炎症反应的主要细胞类型,但三者 in AS 的进展中发挥着不同的作用。现将三种细胞焦亡参与 AS 的作用和其中的机制分别介绍如下。

2.1 内皮细胞焦亡与动脉粥样硬化

众所周知,ECs 是血液和血管壁之间的天然屏障,ECs 损伤或血管内膜完整性的丧失是引发 AS 的最早期机制。Caspase-1 依赖性 ECs 细胞焦亡可引发剧烈的炎症反应,导致血管内皮细胞完整性丧失,触发 AS 的发生^[8]。在血脂异常和炎症的背景下,ECs 中的 caspase-1-炎症小体通路可以感知升高的脂质或损伤相关的分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMP) 和其他炎症介质,并激活 ECs 焦亡,这是 AS 进展的首要步骤。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3),这是组装炎症小体的细胞质感受器。NLRP3 是一个广谱感受器,它能识别病原体相关和 DAMP。最近的研究表明,NLRP3 介导的经典通路是 ECs 细胞焦亡在 AS 发生中的主要机制。Wu 等^[9]研究发现,在高脂饮食喂养 3 周后,选择载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠的 caspase-1 激活来

促进 ECs 的激活和死亡,与 ApoE^{-/-}小鼠相比, ApoE^{-/-}和 caspase^{-/-}基因敲除小鼠主动脉窦区域中 AS 的面积减少了 44%,抗体阵列的比较显示,17 种细胞炎症因子和趋化因子,如细胞间粘附分子-1 和白介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α),在 ApoE^{-/-}和 caspase^{-/-}小鼠的表达低于 ApoE^{-/-}小鼠。最近 Xing 等^[10]在对高脂蛋白喂养 12 周的 ApoE^{-/-}小鼠体内发现脂质沉积和斑块形成显著增加,免疫荧光显示细胞死亡主要发生在 ECs。随着研究不断的深入,作为一种经典的炎症信号通路,核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路已被证明参与 AS 中 ECs 的焦亡。Zeng 等^[11]报道,经 NF- κ B 抑制剂 BAY 11-7082 处理 2 h 后,氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 培养的 ECs NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 表达水平显著降低,PI 染色结果显示,BAY 11-7082 预处理也降低了死亡细胞的比例。相应地,Meng 等^[12]研究发现,褪黑素通过抑制 NF- κ B 介导的 ECs 焦亡来缓解高脂饮食喂养的 ApoE^{-/-}小鼠的 AS。众所周知,线粒体损伤和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生足以激活 NF- κ B 信号,通过总结现有的数据发现,ox-LDL、三甲基胺 N-氧化物 (trimethylamine oxide, TMAO) 和血液低剪应力促进 NLRP3 介导的 ECs 焦亡机制都与线粒体损伤和 ROS 产生有关。TMAO 通过线粒体呼吸复合物 II 亚基琥珀酸脱氢酶 B (succinate dehydrogenase B, SDHB) 氧化诱导的 ROS 水平增加,促进 ECs 焦亡,从而促进 AS 的发展,而转染 SDHB 的短发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 可消除 TAMO 诱导的人脐静脉内皮细胞焦亡^[13]。SDHB 抑制蛋白 TET-胞嘧啶加氧酶 2 表达下调参与了低剪应力和 ox-LDL 引起的焦亡^[11,14]。低剪应力可通过 miR-181b-5p/STAT-3 轴促进 ECs 焦亡,造成血管壁损伤和组织重塑,从而导致 AS 的发生和发展^[15]。最近的一项研究表明,三甲胺氧化氮通过调节 SDHB 和 ROS 诱导 ECs 焦亡来促进 AS 的进展^[16]。上述研究表明,ROS/NF- κ B/NLRP3 信号轴在 AS 发生发展过程中的 ECs 焦亡这一起始环节中发挥着重要作用。另一方面,现有研究发现,多种药物和基因,如褪黑素、红景天苷、雌激素、邻苯三酚-间苯三酚-6,6-联苯醚和成纤维细胞生长因子 21 等多种药物通过抑制体内的 ECs 焦亡而抑制 AS 斑块^[12]。综上所述,高脂血症、氧化应激和线粒体损伤等因素可通过激活 ROS/NF- κ B/NLRP3 信号通

路,诱发 ECs 损伤,增加细胞粘附因子和炎症因子的大量分泌,触发剧烈炎症反应,导致细胞焦亡,引起血管内膜完整性破坏,并最终导致 AS 的发生。

2.2 血管平滑肌细胞焦亡与动脉粥样硬化

AS 斑块的稳定性在很大程度上取决于 VSMCs 产生的覆盖脂质池和坏死核心的纤维帽厚度。VSMCs 的非正常死亡可导致纤维帽显著变薄、胶原和细胞外基质的损失以及严重的血管炎症,加重斑块的不稳定性,引发斑块破裂,从而导致各种急性血栓事件发生。除细胞凋亡,VSMCs 的焦亡也与 AS 的发病机制有关。在人和小鼠 AS 斑块中,检测了活跃的焦亡指标,包括 caspase-1 和 IL-1 β ,它们与 VSMCs 标记物 α 平滑肌肌动蛋白重叠,提供了 VSMCs 焦亡参与 AS 并导致斑块不稳定的证据^[17]。随着研究的不断深入,NLRP3 介导的 VSMCs 焦亡在 AS 发生中的机制逐渐被发现,只有低浓度的 ox-LDL 刺激才足以将 VSMCs 转化为促炎表型,其表达更多的炎症因子和更少的收缩蛋白^[18]。Li 等^[17]发现,ox-LDL 可通过激活焦亡炎症介质的 NLRP3 进而诱导 VSMCs 焦亡,而作为 caspase-1 的特异性抑制剂,VX-765 可抑制 VSMCs 的焦亡并减缓 AS 斑块的进展,而不影响血浆中脂蛋白水平。此外,ox-LDL 通过黑色素瘤缺乏因子 2 (absent in melanoma 2, AIM2) 炎症小体诱导焦亡,Pan 等^[19]发现喂食高脂饮食的 ApoE^{-/-}小鼠在斑块中 AIM2 和 GSDMD 的表达升高,AIM2 的过度表达加重了病变负担和 VSMCs 焦亡。进一步实验研究表明,ox-LDL 通过激活 NF- κ B 促进 AIM2 的表达,AIM2 炎性小体通过 VSMCs 中的凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC)-caspase-1 途径刺激 GSDMD 活性和焦亡,从而加速 AS 的进展。Wortmann 等^[20]进一步研究发现,在 AIM2^{-/-}小鼠中以及 AIM2 的药理学抑制实验中,抑制 AIM2 表达可减少细胞焦亡,AIM2 低表达刺激损伤性胶原沉积、纤维帽增厚、坏死核心尺寸减小、VSMCs 死亡减少,延缓不稳定斑块形成,进而延缓 AS。牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, Pg) 在 AS 的发生发展中具有关键作用,Liu 等^[21]研究发现,环状 RNA 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 PP1 γ 催化亚基通过 HMGB-1/TLR9/AM2 途径竞争性结合 miRNA-103a-3p 和 miRNA-107 而缓解 Pg-LPS 诱导的 VSMCs 焦亡,在不稳定斑块中,促进 VSMCs 增殖并抑制其焦亡,促进纤维帽的形成及稳定,从而有助于减少斑

块的破裂。总之,VSMCs 焦亡作为 VSMCs 细胞死亡的一种形式,会削弱 AS 斑块纤维帽的厚度,导致斑块易损和破裂。

2.3 巨噬细胞焦亡与动脉粥样硬化

连续性焦亡是巨噬细胞对 ox-LDL 或胆固醇晶体的一种病理性反应,其中一个巨噬细胞无法消化晶体,并通过焦亡死亡,另一个巨噬细胞吞噬相同的晶体,并通过反复的焦亡死亡,这种循环破坏了正常细胞的数量和结构,通过从焦亡细胞中释放炎症介质,周而复始的导致炎症反应的无限放大。越来越多的证据表明,巨噬细胞的焦亡增加了 AS 斑块破裂的风险^[22]。一项关于尼古丁加剧 AS 的研究表明,细胞内 ROS 的增加导致巨噬细胞焦亡,表现为 NLRP3 炎症小体的组装、caspase-1 的裂解以及 IL-1 β 、IL-18 和 GSDMD 生成的增加^[23]。除此之外,Wang 等^[24]首次发现多溴二苯醚醌类代谢物暴露会通过 CD36 介导脂质积累,导致 NLRP3 炎症小体活化和巨噬细胞焦亡,进而加剧 AS。p65 是 NF- κ B 途径的关键蛋白,其核转位促进巨噬细胞中烟碱诱导的焦亡,当 p65 被 siRNA 沉默时,巨噬细胞中烟碱诱导的裂解 caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达显著降低^[25]。此外,另有研究证实,ox-LDL 激活巨噬细胞中 NLRP3 介导的焦亡途径,同时 NLRP3 炎症小体相关成分的上调与斑块稳定性密切相关,这表明 NLRP3 炎症小体激活有可能促进斑块的不稳定性,抑制 NLRP3 表达,减少巨噬细胞焦亡可以稳定 AS 斑块^[26]。这无疑暗示了阻断焦亡的潜在治疗价值。Peng 等^[27]报道线粒体外膜蛋白 NIX 通过激活线粒体自噬,抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡,线粒体自噬通过维持线粒体膜电位和减少 ROS 产生抑制巨噬细胞中 caspase-1 的激活和 IL-1 β 的成熟。当 AS 危险因素刺激时,线粒体有一种机制来维持自身的稳定性以抵抗巨噬细胞焦亡。总之,巨噬细胞焦亡与 AS 斑块稳定性密切相关,但其中的作用机制还需要更多的研究去发现。

3 结语

AS 相关心血管疾病目前仍是世界各地居民死亡的主要原因,而针对 AS 机制的研究依旧是一个历久弥新的话题。已有研究表明,细胞焦亡与 AS 的发生发展密切相关。在 AS 的进程中,高脂血症、氧化应激等危险因素诱发 ECs 损伤,引起细胞炎症因子的分泌导致 ECs 焦亡,血管内膜完整性遭到破

坏,这是 AS 发生的初始阶段;VSMCs 焦亡引起纤维帽变薄,胶原和细胞外基质的损失以及血管炎症,加剧斑块的不稳定性,促进 AS 的进展;巨噬细胞焦亡可引发连续性焦亡,释放大量炎症介质并进一步加剧体内炎症反应,增加 AS 斑块破裂的风险,这是 AS 后期阶段。因此,研究 AS 发生发展中各类细胞焦亡的作用和机制对于 AS 防治具有极其重要的意义,抑制细胞焦亡和其引发的炎症反应也将是一种非常有前景的治疗选择。因此,仍需要进一步研究焦亡促进 AS 的详细机制,以找到 AS 干预的更好靶点,为开发更有效的针对细胞焦亡的药物提供坚实的理论依据。

参考文献:

- [1] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(3): 486–541.
- [2] 尤越, 李玲美, 李磊, 等. 细胞焦亡与心血管疾病的关系及中医药干预研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 97–108.
You Y, Li LM, Li L, et al. Relationship and Traditional Chinese Medicine intervention of pyroptosis and cardiovascular diseases [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 97–108.
- [3] Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death [J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(4): 245–254.
- [4] Wandel MP, Kim BH, Park ES, et al. Guanylate-binding proteins convert cytosolic bacteria into caspase-4 signaling platforms [J]. Nat Immunol, 2020, 21(8): 880–891.
- [5] Shi J, Zhao Y, Wang Y, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS [J]. Nature, 2014, 514(7521): 187–192.
- [6] Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation [J]. Nat Rev Immunol, 2020, 20(3): 143–157.
- [7] 梁紫君, 张雪儿, 黄健, 等. miRNA 在缺血性脑血管病中作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 132–137.
Liang ZJ, Zhang XE, Huang J, et al. Research progress of miRNA in ischemic cerebrovascular disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 132–137.
- [8] Xu YJ, Zheng L, Hu YW, et al. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis [J]. Clin Chim Acta, 2018, 476: 28–37.
- [9] Wu X, Zhang H, Qi W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 171.
- [10] Xing SS, Yang J, Li WJ, et al. Salidroside decreases atherosclerosis plaque formation via inhibiting endothelial cell

pyroptosis [J]. Inflammation, 2020, 43(2): 433–440.

[11] Zeng ZL, Chen JJ, Wu P, et al. OxLDL induces vascular endothelial cell pyroptosis through miR-125a-5p/TET2 pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 7475–7491.

[12] Meng Q, Li Y, Ji T, et al. Estrogen prevent atherosclerosis by attenuating endothelial cell pyroptosis via activation of estrogen receptor α -mediated autophagy [J]. J Adv Res, 2021, 28: 149–164.

[13] Wu LM, Wu SG, Chen F, et al. Atorvastatin inhibits pyroptosis through the lncRNA NEXN-AS1/NEXN pathway in human vascular endothelial cells [J]. Atherosclerosis, 2020, 293: 26–34.

[14] Chen J, Zhang J, Wu J, et al. Low shear stress induced vascular endothelial cell pyroptosis by TET2/SDHB/ROS pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 162: 582–591.

[15] Xu X, Yang Y, Wang G, et al. Low shear stress regulates vascular endothelial cell pyroptosis through miR-181b-5p/STAT-3 axis [J]. J Cell Physiol, 2021, 236(1): 318–327.

[16] Wu P, Chen J, Chen J, et al. Trimethylamine N-oxide promotes apoE^{-/-} mice atherosclerosis by inducing vascular endothelial cell pyroptosis via the SDHB/ROS pathway [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(10): 6582–6591.

[17] Li Y, Niu X, Xu H, et al. VX-765 attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice by modulating VSMCs pyroptosis [J]. Exp Cell Res, 2020, 389(1): 111847.

[18] Kiyani Y, Tkachuk S, Hilfiker-Kleiner D, et al. oxLDL induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with CD36 and TLR4 [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 66: 72–82.

[19] Pan J, Lu L, Wang X, et al. AIM2 regulates vascular smooth muscle cell migration in atherosclerosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 497(1): 401–409.

[20] Wortmann M, Peters AS, Erhart P, et al. Inflammasomes in the pathophysiology of aortic disease [J]. Cells, 2021, 10(9): 2433.

[21] Liu J, Wang Y, Liao Y, et al. Circular RNA PPP1CC promotes *Porphyromonas gingivalis*-lipopolysaccharide-induced pyroptosis of vascular smooth muscle cells by activating the HMGB1/TLR9/AIM2 pathway [J]. J Int Med Res, 2021, 49(3): 300060521996564.

[22] Lu LQ, Tian J, Luo XJ, et al. Targeting the pathways of regulated necrosis: a potential strategy for alleviation of cardio-cerebrovascular injury [J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(1): 63–78.

[23] Mao C, Li D, Zhou E, et al. Nicotine exacerbates atherosclerosis through a macrophage-mediated endothelial injury pathway [J]. Aging, 2021, 13(5): 7627–7643.

[24] Wang Y, Fang C, Xu L, et al. Polybrominated diphenyl ether quinone exposure induces atherosclerosis progression via CD36-mediated lipid accumulation, NLRP3 inflammasome activation, and pyroptosis [J]. Chem Res Toxicol, 2021, 34(9): 2125–2134.

[25] Xu S, Chen H, Ni H, et al. Targeting HDAC6 attenuates nicotine-induced macrophage pyroptosis via NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. Atherosclerosis, 2021, 317: 1–9.

[26] Lin Y, Liu M, Chen E, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells microvesicles stabilize atherosclerotic plaques by inhibiting NLRP3-mediated macrophage pyroptosis [J]. Cell Biol Int, 2021, 45(4): 820–830.

[27] Peng X, Chen H, Li Y, et al. Effects of NIX-mediated mitophagy on ox-LDL-induced macrophage pyroptosis in atherosclerosis [J]. Cell Biol Int, 2020, 44(7): 1481–1490.

[收稿日期] 2023-03-31

胡凌峰,柳洁,范胜涛. NHP 实验动物在神经科学领域的应用及挑战 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 151-157.
Hu LF, Liu J, Fan ST. Application and challenges of NHP laboratory animals in neuroscience [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 151-157.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.020

NHP 实验动物在神经科学领域的应用及挑战

胡凌峰,柳洁,范胜涛*

(中国医学科学院医学生物学研究所,药物安全性评价研究中心,昆明 650118)

【摘要】 目前,非人灵长类动物(NHP)在实验动物中的地位越来越重要,尤其是在神经科学领域的运用越来越被重视,包括在大脑发育研究、神经退行性疾病以及精神疾病等领域,凭借这种实验动物取得了许多重大的突破,但是随着其养殖和运用范围的增长,其生物安全问题和动物伦理问题应当被重视,本文从 NHP 的概述、在神经科学领域运用、养殖与操作和动物伦理几个方面归纳总结了非人灵长类实验动物在神经科学领域中的应用以及面临的挑战。

【关键词】 非人灵长类动物;神经科学;实验动物;动物伦理

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0151-07

Application and challenges of NHP laboratory animals in neuroscience

HU Lingfeng, LIU Jie, FAN Shengtao*

(Center for Drug Safety Evaluation and Research, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Non-human primates (NHP) are becoming increasingly important laboratory animals, especially in the field of neuroscience, where many significant breakthroughs have been made, including research on brain development, neurodegenerative diseases, and psychiatric disorders. However, as their breeding and use grows, biosafety and animal ethics issues should be considered. This review summarizes the application and challenges of NHP laboratory animals in the neuroscience field from the aspects of an NHP overview, feeding and operation, biosafety, and animal ethics.

【Keywords】 non-human primates; neuroscience; laboratory animals; animal ethics

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

非人灵长类动物(non-human primates, NHP), 属于哺乳纲、灵长目,灵长目下分猿猴亚目和猴亚目,猿亚目按分布规律可分为新大陆猴和旧陆猴两类^[1]。虽然几种不同类型的灵长类动物都有被用作实验动物,但旧陆猴特别是恒河猴,在所有 NHP 中是养殖最丰富且最常用的,其次为食蟹猴、狨猴等。NHP 与人类在病理生理学之间具有很强的相似性,作为转化医学、药物临床前研究的重要组成部分和重要实验动物^[2-3],其基因相似程度达到

75.0%~98.5%。在某些情况下,NHP 是研究复杂代谢、神经科学和传染性疾病最合适甚至唯一的动物模型^[3-4]。啮齿类动物(大鼠、小鼠)虽仍是在生物学以及医学研究中应用最广泛的实验动物,并且在过去以及现在为许多科学问题的研究做出了卓越的贡献,但因为在生理形态、大小、代谢系统、免疫系统与人类存在较大差异,作为动物模型存在一定的局限性。例如,在感染性疾病的研究中,许多病原体如 HIV 及新型冠状病毒等,对各自的宿主

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(CIFMS2021-I2M-1-024);生物医药领域科技计划(202002AA100009);云南省技术创新人才项目(202005AD160006);云南省基础研究重点项目(202001AS070047)。

【作者简介】 胡凌峰(1998—),男,硕士研究生,研究方向:神经生物学。E-mail: 13187715267@163.com

【通信作者】 范胜涛(1981—),男,副研究员,硕士生导师,研究方向:动物疾病模型及药物评价。E-mail: fst@imbcams.com.cn

和受体呈高度专一性,用小鼠等啮齿动物不能有效地构建感染性疾病模型,由此需要更加接近人类的实验动物^[5],在神经科学或者是行为学研究中,小型的啮齿动物相较于人类而言,大脑结构和功能的复杂性差异较大,特别是在社交行为、心理疾病、精神疾病的建模中,啮齿动物往往难以构建和复制复杂的动物模型^[6],并且与实际情况存在差距,不能真实地反映出人类的真实行为和疾病表现,而 NHP 有着与人类更接近、更复杂的大脑功能,具有极高的学习能力,能够很好地模拟和构建复杂的行为学和精神疾病模型。

1 NHP 实验动物在神经科学领域的应用

NHP 广泛用于各种疾病动物模型,包括癌症、感染、老化以及神经疾病等^[7-12]。尤其在 2019 年爆发的新型冠状病毒肺炎疫情中,NHP 作为最重要的疾病动物模型在新型冠状病毒病理学研究和疫苗研发中发挥了重大作用^[13-14],是抗击疫情不可缺少的重要助力,可以得知,NHP 实验动物在预防、整治、研究人类新发传染性疾病中十分关键。除此之外,NHP 是人类衰老研究中最重要模型,虽然多种不同的动物模型已被用于探索衰老过程和原因(如酵母、蛔虫、果蝇、大鼠),但包括小鼠在内的常用实验动物由于种属差异、自身形态、生理的局限性,并不能有效地还原人类衰老的过程,尤其是大脑和神经元的变化过程,而 NHP 与人类在发育上的高度相似以及在衰老过程中能够自发的出现与人类相同或相似的疾病,并且在寿命方面也较为适中^[9]。同时,NHP 还是研究人类神经系统疾病,尤其是脑相关疾病的首选,因为其大脑体积以及结构与人类更为接近,并且能够完成多种复杂的行为学分析,在研究神经系统致病机制和药物靶点开发中发挥着重要的作用^[15-16]。

1.1 神经退行性疾病 NHP 模型

虽然啮齿类或者是其他小型动物仍是研究神经科学经典的模式动物,但 NHP 已经应用在许多神经疾病研究中。帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种典型的神经退行性疾病,在我国帕金森病患者已经超过 300 万,并且随着老龄化加剧,预计患者数量在未来仍会有较大的增长。在帕金森相关研究中就有使用 NHP 构建模型,通过 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导 NHP 建模是构建 NHP-PD 模型的金标准,这种 NHP-PD 模型能够表

现出与人一样的症状,如左旋多巴胺缺乏导致的震颤麻痹等,并且能够很好地表达和检测到 α -突触核蛋白^[17]——一种在 PD 诊断和治疗中被证明有前景的生物标志物^[18],并且 NHP 还是研究 PD 相关药物或治疗方法的重要模型,可用 NHP 震颤动物模型筛选抗震颤性麻痹的药物,此外 PD 的干细胞疗法也可以在 NHP 模型中进行疗效和安全性验证^[19]。

除 PD,在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)研究中 NHP 也是极为重要的模型,AD 是世界第一大神经退行性疾病,目前尚无一款针对 AD 确切有效的药物上市,绝大部分的药物申报都终止在临床二期,虽然少部分进入了临床三期,但是基本上都因为疗效欠缺而失败^[1,20-21],AD 的发病机制和确切的病因至今仍未完全被证实,但目前已提出多种假说,验证出了多个基因参与疾病的整个发生发展过程,如 Apoe、Trem2 中某些突变型会导致 AD 发病率增加 2~4 倍^[22-24],因此需要更好的更具有代表性的 AD 动物模型,从而加快 AD 药物研发、发现新的生物标志物及相应发病机制研究。AD 研究中应用最多的模型是转基因小鼠或大鼠,转基因动物因为携带了 AD 的遗传相关发病基因,在模拟 AD 时一定程度上能够代表家族性 AD^[25-26](通常发病年龄<65 岁),但对于真实世界中发病占比较多的散发性 AD(通常发病年龄>65 岁),啮齿动物转基因模型由于动物本身的寿命较短,且转基因模型发病较快,通常能在早期检测到 A β 斑块的快速积累^[27],而散发性 AD 一般都是晚发的,因此不是最佳的 AD 模型^[12,28]。针对一些假说而言,NHP 比啮齿类有着天然的优势,自由基假说表明,老年人中老化的线粒体会产生过度的活性氧(ROS)而导致大量的自由基破坏细胞膜,最终导致细胞凋亡。老年动物中能够发现一些出现认知障碍的自然衰老的动物模型,出现于超过 2 年的大鼠或者 16 岁以上的猴中^[29]。老年猴具有更加明显的 AD 行为学特征,对其进行学习能力和认知能力的检测更加准确,与人类的情况更相似,但由于猴资源的稀缺,并且长时间养殖所花费的资金和人力较多,导致老年猴在市场上价格也是极高的。NHP 模型在开发 AD 药物中有很高的价值,在 AD 药物开发中一些候选药物在啮齿动物模型中有效且不同程度地延缓了疾病进展^[21],但这些看似有希望的抗 AD 药物的疗效基本不能在人身上复现,这种现象可能是由于啮齿动物与人类的差异导致的,在基因层面上,啮齿类动物

与人类的基因差异并非特别大,但在生理和组织结构上却有巨大的差异,并且在认知学习能力训练中较为困难,可能正是这些差异导致了 AD 药物临床试验的失败,而 NHP 除了在生理和组织结构上更加接近人类以外,由于它们的视觉和大脑更加发达,能够训练其在 AD 临床评估中完成更加复杂的任务,采用更多的检测方法^[30]。通过注射 A β 寡聚物或其他方法诱导 NHP 的 AD 模型中,出现了较为完整的 AD 病理表现,包括斑块的出现、Tau 蛋白的过度磷酸化、神经元丢失、胶质细胞活化、突触营养不良等^[31](表 1)。

1.2 NHP 的精神疾病模型

动物模型在探索精神疾病的潜在机制方面发挥了至关重要的作用。精神疾病的发病机制在此前一直困扰着我们,经过多年的探索和研究,精神疾病已经从一种单纯的心理疾病成为了具有神经递质等分子调控以及具有一定遗传因素而产生的疾病^[35-36],相较于啮齿动物,NHP 有着更复杂的社会行为,并且能够表现出与人类更加相似的心理症状,是研究神经分裂症、抑郁症、自闭症等疾病的重要模式动物。胡新天团队通过 4 种刺激源(空间限制、恐吓、长时间照明、禁食)构建了慢性压力下导致的青春期抑郁样行为恒河猴模型,揭示了早期逆境环境会对神经系统造成潜在损害,并在成人或青少年时期经历慢性压力时导致进一步的抑郁症状^[37]。此外,抑郁症研究表明,大约在一半的抑郁患者中是由基因介导疾病发生的^[38],这说明通过转基因或者是基因编辑等技术产生动物模型是研究精神疾病的可行性手段和工具,值得进一步的开

发。自闭症是一种具有很强的与遗传相关的疾病^[39-40],中国科学院深圳先进技术研究院、麻省理工学院、中山大学和华南农业大学合作开发出了一种通过 CRISPR 基因编辑技术突变 *Shank3* 基因的自闭症食蟹猕猴模型,这种模型出现了大脑神经元功能连接减少,个体表现出社交回避、刻板行为等自闭症症状,将在未来进一步开发治疗自闭症的药物中起到重要作用^[41]。

1.3 NHP 的成瘾性模型

非人灵长类因为药物代谢与人类相似且寿命长,适用于药物滥用以及成瘾性行为和评价等研究^[42],猴对镇静剂及麻醉药品的依赖性与人较为接近,戒断症状较明显并易于观察,新型镇静剂在临床前研究中常用猴进行实验,以获得更加安全的剂量便于未来在人类受试者中开展临床研究^[43-44]。包括阿片类药物以及酒精等导致的成瘾现象,都可以通过使用 NHP 来研究其成瘾机制、损伤,开展治疗药物评价等^[42,45]。

1.4 NHP 的脑血管疾病模型

脑血管疾病有着进展迅速、高发病率、高致残率、高死亡率的特点,其中又以脑缺血性血管病最为多见,严重危害人类健康,开发更加合理、科学的脑血管疾病动物模型及卒中药物评价模型对攻克缺血性脑病有重要意义^[46]。细胞模型以及啮齿类动物模型是开发卒中药物的主要模型,但许多在这两个模型中获得的候选药物在后续临床表现不佳,因此引入 NHP 模型对于开发卒中药物以及手术验证十分关键^[47-49]。例如,Meloni 等^[50]通过短暂大脑中动脉闭塞(MCAO)手术方式对食蟹猴造模,验

表 1 散发型 NHP-AD 模型的建立以及表现
Table 1 Establishment and performance of a sporadic NHP-AD model

方法 Method	表现 Performance
16~17 岁恒河猴脑内注射 A β 42 (1 mg/mL) 和噻吩 (2 mg/mL) ^[32] Intracerebral injection of A β 42 (1 mg/mL) and thiophene (2 mg/mL) in rhesus monkeys aged 16~17 years	细胞内 A β 积累,神经元变性,胶质细胞增生,接受同样手术(空白)和实验组行为学表现无差异。 Intracellular A β accumulation, neuronal deformation, glial cell hyperplasia and no difference in behavioural performance between the group receiving the same surgery (blank) and the experimental group.
13~14 岁猕猴脑内共同注射脂多糖 (LPS) 与 A β 原纤维 ^[33] Intracerebral co-injection of lipopolysaccharide (LPS) with A β protofibrils in 13~14-year-old marmosets	2/3 的共注射猕猴中出现了慢性炎症和斑块,而只注射 A β 的没有出现斑块。 Chronic inflammation and plaque developed in two-thirds of co-injected marmosets, while no plaque developed in those injected with A β only.
给予年轻恒河猴(5~8 岁,无 AD 相关突变)连续 12 个月脑室内注射甲醛 ^[34] Young rhesus monkeys (5~8 years old, no AD-related mutations) were given intracerebroventricular injections of formaldehyde for 12 consecutive months	淀粉样蛋白 A β 阳性,神经炎样斑块,神经原纤维缠结(NFT)形成,Tau 蛋白过度磷酸化,神经元丢失和胶质细胞增生。 Amyloid β positivity, neuritis-like plaques, neurogenic fibrillary tangle (NFT) formation, Tau protein hyperphosphorylation, neuronal loss and glial cell proliferation.

证聚精氨酸肽-18 是否能够改善缺血性脑损伤后的恢复状况。

2 NHP 实验动物应用面临挑战

NHP 在实验动物中有着重要地位的同时,其生物安全也更加重要,以猿猴为代表的 NHP 相较于常用的啮齿类小鼠、大鼠,体积更大,活动空间更广,食物种类更加复杂,养殖难度更高,相关的实验技术和人员的要求也更为严格和复杂,并且其携带的疾病和病毒对人类具有高度的威胁性,因此在养殖培育、实验操作以及实验后处置等过程中尤其需要注重生物安全。与人体研究不同,非人灵长类动物研究允许完全控制实验环境,包括居住环境条件、饮食和行为互动包括群体间的社会行为,可能是因为人类与该模型在系统发育等密切相关,包括老年动物的处置以及后期的继续使用或者是养殖,需要专门的护理,包括涉及基因实验和生殖实验的实验体,其使用的高成本以及潜在的生物安全和伦理问题都受到人们的着重关注^[51]。

2.1 疫病监测安全

猕猴、食蟹猴等猕猴属动物是医学研究不可缺少的重要实验动物。自 1990 年以来,随着国际实验猴供求关系的转变和国内医学研究对实验猴需求量的加大,我国实验猴驯养繁殖进入快速发展阶段,实验猴驯养繁育种群数量不断增长,到目前已初具规模,而实验猴的养殖与培育存在相关的生物安全风险。根据不同种类实验猴的大小及生活习性,需安排相应的养殖空间、食物、温度和湿度等,并且需严格区别区分这些实验猴的身份,包括进行过实验的(造模、感染、疾病治愈等)和未实验的猴,新进入的动物应进行防疫隔离,NHP 的隔离时间一般为 40~60 d,确认不携带人兽共患病原后才可接收。养殖过程中需要进行严格的记录以满足相应的法规要求,包括动物医疗记录、繁殖记录、实验诱发疾病、研究记录等^[52]。并且在养殖中的管理人员、兽医人员以及饲养人员都需要经过严格的培训后才可上岗。非人灵长类由于在进化上与人类亲缘关系极为相近,因此人猴之间存在较多的人畜共患病,根据清华大学实验动物中心数据显示,与常用的啮齿类实验动物小鼠和大鼠相比,人与 NHP 间存在更多的共患疾病(表 2)。

规范的 SOP 和检疫流程是防止相关人畜共患疾病传播的关键,此前有报道动物园中养殖的猿猴

携带病毒,导致少数的饲养人员血清中猴泡沫病毒抗体检测阳性^[1],虽然实验猴养殖与动物园中猿猴的养殖模式和管理规范不同,但也要加强防范,定期检查养殖相关人员的健康状况。

2.2 实验操作安全

实验猴的使用有着严格的规定,并且要做好相应的记录。由于 NHP 相较于其他啮齿类小动物来说体型较大,具有一定的攻击性,需要由专业的人员捕捉并且配备大小合适的猴架,以固定住实验动物便于后续的给药操作或麻醉手术操作。特别是涉及感染性的操作时,应在符合相应的生物安全等级的实验室中进行,如动物感染性疾病模型^[53]。此外涉及转基因或基因编辑操作的实验猴或胚胎需

表 2 猴与大、小鼠人畜共患疾病种类及严重程度
Table 2 Varieties and severity of zoonotic diseases in monkeys, rats and mice

疾病 Diseases	猴 Monkey	大、小鼠 Rats, mice	严重程度 Severity
沙门菌病 Salmonellosis	√	√	低 Low
雅巴病及塔纳痘 Yaba disease and tana pox	√		低 Low
麻疹 Measles	√		低 Low
SV40	√		低 Low
鼠咬热 Rat-bite fever		√	低 Low
结核 Tuberculosis	√		中 Medium
病毒性肝炎 Viral hepatitis	√		中 Medium
细菌性痢疾 Bacterial dysentery	√		中 Medium
疟疾 Malaria	√		中 Medium
阿米巴痢疾 Amoebic dysentery	√		中 Medium
脑炎、心肌炎 Encephalitis, myocarditis		√	中 Medium
马尔保病 Marburger's disease	√		高 High
B 细胞感染症 B-cell infections	√		高 High
狂犬病 Rabies	√		高 High
淋巴细胞性脉络丛脑膜炎 Lymphocytic choroid plexus meningitis		√	高 High
流行性出血热 Epidemic haemorrhagic fever		√	高 High

注:√指有此种人畜共患病,严重程度分为低、中、高三级。
Note. √ refers to the presence of such zoonotic diseases and is classified as low, medium or high in severity.

要在特定的实验室或胚胎室进行实验。

2.3 实验后安全

通常大部分实验动物在实验后被处死,然而一些疾病模型需要研究治疗后观察其恢复情况,或是在一些疫苗的有效性安全性研究中,实验动物在免疫后需要长时间进行采样和健康监测,大部分都被重新饲养直至死亡。感染性疾病模型的动物需要证实其疾病已被完全治疗或者是失去感染力才能重新放回养殖地^[8]。转基因以及基因编辑得到的实验动物需要单独放回养殖或者是阻断其生育能力后再放回,避免非必要的子代出现或在整个群落中传递转入和编辑的基因^[54-55]。

2.4 NHP 使用伦理问题

动物福利和伦理问题一直是进行动物实验必须遵守和考量的,开展动物实验时应当向研究机构所在的实验动物福利伦理委员会提交审查后再进行。与啮齿类、鱼类等实验动物不同,NHP 与人类具有密切相关性,这种特性一方面对于科学,尤其对医学和生物学研究具有极大的推进和帮助,但同时也受到了动物福利和保护组织以及民众的关注,因此 NHP 的运用面临许多伦理和社会层面的压力与挑战。当需要使用 NHP 进行实验时,需要提供更充分的科学依据,并且开展伦理会进行讨论研究,最终得到伦理委员会的批准才能开始试验^[56]。开展伦理研究前必须充分考量这项研究运用 NHP 的必要性和意义,是否考虑到了 3R 原则,评估研究的伤害/受益比,在研究结束后,实验动物是否能得到很好的处置等。目前,国际上对使用 NHP 的标准并没有统一的规定,为了实现 NHP 运用的合理化,保护动物福利,同时实现科学研究的严谨性和创新性,在国际交流与合作上还需要更多地努力,进一步地减少实验动物运用中的不合理和违法行为,最终建立获得国际上认可的规范和法规^[57]。

3 结语

NHP 实验动物在未来将会持续发展,为我们解决更多小动物模型不能解决的科学问题,它们将会是我们探索和揭开大脑秘密的重要助力,同时 NHP 实验动物的运用也会面临挑战,生物安全和伦理问题都不能被忽视,随着相关的法律法规进一步的发展和完善,NHP 实验动物的潜力也会进一步被挖掘出来,解决更多神经科学领域的重要问题。

参考文献:

[1] Sandstrom PA, Phan KO, Switzer WM, et al. Simian foamy

virus infection among zoo keepers [J]. Lancet, 2000, 355 (9203): 551-552.

[2] Chen ZY, Zhang Y. Animal models of Alzheimer's disease: applications, evaluation, and perspectives [J]. Zool Res, 2022, 43(6): 1026-1040.

[3] Bliss-Moreau E, Amara RR, Buffalo EA, et al. Improving rigor and reproducibility in nonhuman primate research [J]. Am J Primatol, 2021, 83(12): e23331.

[4] Lu S, Zhao Y, Yu W, et al. Comparison of nonhuman Primates identified the suitable model for COVID-19 [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 157.

[5] 黄涛, 张海涛, 李志雄, 等. 非人灵长类动物在病毒感染模型中的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 248-255.

Huang T, Zhang HT, Li ZX, et al. Research progress in non-human primate virus infection models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 248-255.

[6] Leblanc H, Ramirez S. Linking social cognition to learning and memory [J]. J Neurosci, 2020, 40(46): 8782-8798.

[7] Dewi FN, Cline JM. Nonhuman primate model in mammary gland biology and neoplasia research [J]. Lab Anim Res, 2021, 37(1): 3.

[8] Jiang W, Wei C, Mou D, et al. Infant rhesus macaques as a non-human primate model of *Bordetella pertussis* infection [J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 407.

[9] Colman RJ. Non-human Primates as a model for aging [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(9): 2733-2741.

[10] Le Bras A. A NHP model of congenital Zika virus infection [J]. Lab Anim, 2022, 51(5): 128.

[11] Giffin MJ, Cooke K, Lobenhofer EK, et al. AMG 757, a half-life extended, DLL3-targeted bispecific T-cell engager, shows high potency and sensitivity in preclinical models of small-cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(5): 1526-1537.

[12] Sasaguri H, Hashimoto S, Watamura N, et al. Recent advances in the modeling of Alzheimer's disease [J]. Front Neurosci, 2022, 16: 807473.

[13] Trichel AM. Overview of nonhuman primate models of SARS-CoV-2 infection [J]. Comp Med, 2021, 71(5): 411-432.

[14] Corbett KS, Nason MC, Flach B, et al. Immune correlates of protection by mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates [J]. Science, 2021, 373 (6561): eabj0299.

[15] van Dam D, De Deyn PP. Non human primate models for Alzheimer's disease-related research and drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2017, 12(2): 187-200.

[16] Croll L, Szabo CA, Abou-Madi N, et al. Epilepsy in nonhuman Primates [J]. Epilepsia, 2019, 60(8): 1526-1538.

[17] Purisai MG, McCormack AL, Langston WJ, et al. Alpha-synuclein expression in the substantia nigra of MPTP-lesioned non-human Primates [J]. Neurobiol Dis, 2005, 20(3): 898-906.

- [18] Brooks D, Tambasco N. Imaging synucleinopathies [J]. *Mov Disord*, 2016, 31(6): 814–829.
- [19] Chen ZZ, Niu YY. Stem cell therapy for Parkinson's disease using non-human primate models [J]. *Zool Res*, 2019, 40(5): 349–357.
- [20] van Bokhoven P, de Wilde A, Vermunt L, et al. The Alzheimer's disease drug development landscape [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2021, 13(1): 186.
- [21] Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, et al. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development [J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(7): 702–716.
- [22] Wingo AP, Liu Y, Gerasimov ES, et al. Integrating human brain proteomes with genome-wide association data implicates new proteins in Alzheimer's disease pathogenesis [J]. *Nat Genet*, 2021, 53(2): 143–146.
- [23] Zhou X, Chen Y, Mok KY, et al. Identification of genetic risk factors in the Chinese population implicates a role of immune system in Alzheimer's disease pathogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(8): 1697–1706.
- [24] Jia L, Li F, Wei C, et al. Prediction of Alzheimer's disease using multi-variants from a Chinese genome-wide association study [J]. *Brain*, 2021, 144(3): 924–937.
- [25] Myers A, McGonigle P. Overview of transgenic mouse models for Alzheimer's disease [J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2019, 89(1): e81.
- [26] Pang K, Jiang R, Zhang W, et al. An App knock-in rat model for Alzheimer's disease exhibiting A β and tau pathologies, neuronal death and cognitive impairments [J]. *Cell Res*, 2022, 32(2): 157–175.
- [27] Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(2): 155–175.
- [28] Alzheimer's association. 2022 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2022, 18(4): 700–789.
- [29] Hollander CF, Mos J. The old animal as a model in research on brain aging and Alzheimer's disease/senile dementia of the Alzheimer type [J]. *Prog Brain Res*, 1986, 70: 337–343.
- [30] Scott JT, Bourne JA. Modelling behaviors relevant to brain disorders in the nonhuman primate: are we there yet? [J]. *Prog Neurobiol*, 2021, 208: 102183.
- [31] Forny-Germano L, Lyra e Silva NM, Batista AF, et al. Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid- β oligomers in nonhuman Primates [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(41): 13629–13643.
- [32] Li W, Wu YE, Min F, et al. A nonhuman primate model of Alzheimer's disease generated by intracranial injection of amyloid- β_{42} and thiorphan [J]. *Metab Brain Dis*, 2010, 25(3): 277–284.
- [33] Philippens IH, Ormel PR, Baarends G, et al. Acceleration of amyloidosis by inflammation in the amyloid- β marmoset monkey model of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 55(1): 101–113.
- [34] Zhai R, Rizak J, Zheng N, et al. Alzheimer's disease-like pathologies and cognitive impairments induced by formaldehyde in non-human primates [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2018, 15(14): 1304–1321.
- [35] Zwicker A, Denovan-Wright E, Uher R. Gene-environment interplay in the etiology of psychosis [J]. *Psychol Med*, 2018, 48: 1925–1936.
- [36] Howes OD, McCutcheon R, Owen MJ, et al. The role of genes, stress, and dopamine in the development of schizophrenia [J]. *Biol Psychiatry*, 2017, 81(1): 9–20.
- [37] Zhang ZY, Mao Y, Feng XL, et al. Early adversity contributes to chronic stress induced depression-like behavior in adolescent male rhesus monkeys [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 306: 154–159.
- [38] Flint J, Kendler KS. The genetics of major depression [J]. *Neuron*, 2014, 81(3): 484–503.
- [39] Thapar A, Rutter M. Genetic advances in autism [J]. *J Autism Dev Disord*, 2021, 51(12): 4321–4332.
- [40] Manoli DS, State MW. Autism spectrum disorder genetics and the search for pathological mechanisms [J]. *Am J Psychiatry*, 2021, 178(1): 30–38.
- [41] Zhou Y, Sharma J, Ke Q, et al. Atypical behaviour and connectivity in SHANK3-mutant macaques [J]. *Nature*, 2019, 570(7761): 326–331.
- [42] Ding H, Ko M. Translational value of non-human Primates in opioid research [J]. *Exp Neurol*, 2021, 338: 113602.
- [43] Creeley C, Dikranian K, Dissen G, et al. Propofol-induced apoptosis of neurones and oligodendrocytes in fetal and neonatal rhesus macaque brain [J]. *Br J Anaesth*, 2013, 110(Suppl 1): i29–i38.
- [44] Marion BM, Ghering JM, Dixon BC, et al. Comparison of alfaxalone-midazolam, tiletamine-zolazepam, and KetamineAcepromazine anesthesia during plethysmography in *Cynomolgus* macaques (*Macaca fascicularis*) and *Rhesus* macaques (*Macaca mulatta*) [J]. *Comp Med*, 2022, 72(4): 248–256.
- [45] Jimenez VA, Grant KA. Studies using macaque monkeys to address excessive alcohol drinking and stress interactions [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 122: 127–135.
- [46] Cook DJ, Tymianski M. Nonhuman primate models of stroke for translational neuroprotection research [J]. *Neurotherapeutics*, 2012, 9(2): 371–379.
- [47] Wu D, Chen J, Wu L, et al. A clinically relevant model of focal embolic cerebral ischemia by thrombus and thrombolysis in rhesus monkeys [J]. *Nat Protoc*, 2022, 17(9): 2054–2084.
- [48] Gao Y, Wu D, Liu D, et al. Novel acute retinal artery ischemia and reperfusion model in nonhuman Primates [J]. *Stroke*, 2020, 51(8): 2568–2572.
- [49] Sorby-Adams AJ, Vink R, Turner R. Large animal models of stroke and traumatic brain injury as translational tools [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2018, 315(2): R165–R190.

[50]Meloni BP, Chen Y, Harrison KA, et al. Poly-arginine peptide-18 (R18) reduces brain injury and improves functional outcomes in a nonhuman primate stroke model [J]. Neurotherapeutics, 2020, 17(2) : 627-634.

[51]Feng G, Jensen FE, Greely HT, et al. Opportunities and limitations of genetically modified nonhuman primate models for neuroscience research [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(39) : 24022-24031.

[52]Jeffrey D, Fortman TAH, Lisa C, et al. The laboratory nonhuman primate, 2nd edition [M]. Boca Raton: CRC Press; 2017.

[53]魏强, 秦川. 感染性疾病动物模型-观点与思考 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(1) : 1-4.
Wei Q, Qin C. Animal models for infectious diseases-perspective and thinking [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(1) : 1-4.

[54]许建香, 李宁. 转基因动物生物安全研究与评价 [J]. 生物工程学报, 2012, 28(3) : 267-281.
Xu JX, Li N. Biosafety assessment of genetically engineered animals: a review [J]. Chin J Biotechnol, 2012, 28(3) : 267-281.

[55]Liang W, He J, Mao C, et al. Gene editing monkeys: retrospect and outlook [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 913996.

[56]Prescott MJ. Ethics of primate use [J]. Adv Sci Res, 2010, 5(1) : 11-22.

[57]Mitchell AS, Hartig R, Basso MA, et al. International primate neuroscience research regulation, public engagement and transparency opportunities [J]. Neuroimage, 2021, 229: 117700.

[收稿日期]2023-04-19

(上接第 145 页)

[53]Jende JME, Groener JB, Rother C, et al. Association of serum cholesterol levels with peripheral nerve damage in patients with type 2 diabetes [J]. JAMA Netw Open, 2019, 2(5) : e194798.

[54]Zhu F, Yang LZ. The association between the levels of thyroid hormones and peripheral nerve conduction in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2018, 126(8) : 493-504.

[55]Hussain G, Rizvi SA, Singhal S, et al. Serum levels of TGF-β1 in patients of diabetic peripheral neuropathy and its correlation with nerve conduction velocity in type 2 diabetes mellitus [J]. Diabetes Metab Syndr, 2016, 10(1 Suppl 1) : S135-S139.

[56]Chu C, Zhao W, Zhang Y, et al. Low serum magnesium levels are associated with impaired peripheral nerve function in type 2 diabetic patients [J]. Sci Rep, 2016, 6: 32623.

[57]Jende JME, Groener JB, Kender Z, et al. Troponin T parallels structural nerve damage in type 2 diabetes: a cross-sectional study using magnetic resonance neurography [J]. Diabetes, 2020, 69(4) : 713-723.

[58]Jende JME, Mooshage C, Kender Z, et al. Troponin T is negatively associated with 3 tesla magnetic resonance peripheral nerve perfusion in type 2 diabetes [J]. Front Endocrinol, 2022,

13: 839774.

[59]Andreassen LJ, Kirk RK, Fledelius C, et al. Insulin treatment attenuates small nerve fiber damage in rat model of type 2 diabetes [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 9626398.

[60]Elzinga SE, Savelieff MG, O'Brien PD, et al. Sex differences in insulin resistance, but not peripheral neuropathy, in a diet-induced prediabetes mouse model [J]. Dis Model Mech, 2021, 14(4) : dmm048909.

[61]Oana IC, Aimee S, Mihai C. Gut microbiota and complications of type-2 diabetes [J]. Nutrients, 2021, 14(1) : 166.

[62]Jain R, Jain S, Raison CL, et al. Painful diabetic neuropathy is more than pain alone: examining the role of anxiety and depression as mediators and complicators [J]. Curr Diab Rep, 2011, 11(4) : 275-284.

[63]Cooper MA, O'Meara B, Jack MM, et al. Intrinsic activity of C57BL/6 substrains associates with high-fat diet-induced mechanical sensitivity in mice [J]. J Pain, 2018, 19(11) : 1285-1295.

[收稿日期]2023-04-18

李书灵,李智伟. 外泌体对细菌感染免疫调节机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 158-164.

Li SL, Li ZW. Research progress into the mechanisms of exosome immunoregulation of bacterial infection [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 158-164.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.021

外泌体对细菌感染免疫调节机制的研究进展

李书灵¹, 李智伟^{2*}

(1.新疆医科大学, 乌鲁木齐 830000; 2.新疆维吾尔自治区人民医院, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 外泌体是由脂质双分子层包裹的一种细胞外囊泡 (EVs), 包含蛋白质、脂质、DNA、RNA、miRNA、lncRNA 等多种物质。外泌体参与细菌感染过程中的病原识别、抗原呈递、自噬调节、免疫激活和免疫抑制。研究表明外泌体 miRNA、lncRNA 和蛋白质在调节机体抗菌反应中发挥重要作用。本文综述了外泌体对几种胞内菌和胞外菌感染的免疫调节作用, 为研究外泌体与细菌感染之间的相互作用提供依据。

【关键词】 细菌; 外泌体; miRNA; lncRNA; 蛋白质; 免疫调节

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0158-07

Research progress into the mechanisms of exosome immunoregulation of bacterial infection

LI Shuling¹, LI Zhiwei^{2*}

(1. Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China. 2. Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi 830000)

【Abstract】 Exosomes are small endosomally derived extracellular vesicles with a lipid bilayer structure, and they contain substances, such as proteins, lipids, DNA, RNA, micro(mi)RNA, and long non-coding(lnc)RNA. Exosomes participate in pathogen recognition, antigen presentation, autophagy regulation, immune activation and immunosuppression in bacterial infections. Studies have shown that miRNA, lncRNA, and proteins in exosomes play important roles in regulating antibacterial reactions in organisms. We reviewed the immunomodulatory effects of exosomes on several intracellular and extracellular bacterial infections to provide a reference for those studying the interactions between exosomes and bacterial infections.

【Keywords】 bacteria; exosomes; miRNA; lncRNA; protein; immunoregulation

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

外泌体是由脂质双分子层包裹的一种细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs)。外泌体的前体称作多泡体 (multivesicular body, MVB), 多泡体与细胞膜融合的过程中外泌体被释放到胞外^[1]。外泌体包含蛋白质、脂质、DNA、RNA、miRNA、lncRNA 等

多种物质, 直径通常为 30~150 nm, 在免疫反应、信号转导、抗原呈递等方面发挥着重要作用^[2-3]。

根据细菌在宿主的寄生部位, 可将细菌分为胞内菌和胞外菌。机体对二者的免疫应答有所不同, 对胞内菌感染的防御主要靠细胞免疫, 而对胞外菌

【基金项目】 新疆维吾尔自治区自然科学基金杰出青年科学基金 (2022D01E30); 自治区区域协同创新专项 (科技援疆计划) (2022E02118); 天山英才培养计划 (2022TSYCCX0102)。

【作者简介】 李书灵 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 布鲁氏菌感染与免疫研究。E-mail: 2334431788@qq.com

【通信作者】 李智伟 (1981—), 男, 博士, 副教授, 副主任技师, 硕士生导师, 研究方向: 细菌感染与免疫研究。

E-mail: 13899994455@163.com

的免疫应答主要依赖体液免疫。如结核分枝杆菌和鸟分枝杆菌主要寄生在宿主巨噬细胞的吞噬体中,对于这类细菌的免疫主要依赖致敏淋巴细胞释放各种淋巴因子,激活吞噬细胞,促进其吞噬消化能力来抑制病原体在吞噬细胞内生存。与之不同的是胞外菌如金黄色葡萄球菌、幽门螺杆菌进入机体后激活抗体和补体为主的体液免疫,通过抗体和补体的调理作用发挥杀菌作用。

外泌体调节机体对细菌感染的免疫反应,参与感染过程中的病原识别、抗原呈递、自噬调节、免疫激活和免疫抑制。外泌体 miRNA、lncRNA 和蛋白质在以上环节发挥重要作用。如外泌体 miR-18a 负调控自噬相关基因 *ATM* (ataxia telangiectasia mutated gene, *ATM*)^[4]、miR-130c 和 miR-82a 负调控自噬蛋白 12 (autophagy related 12, *ATG12*)、自噬相关 5 样蛋白 16 (autophagy related 5-like 16, *ATG5L16*) 的表达抑制了自噬介导的胞内细菌清除^[5];外泌体 lnc-AFTR 通过抑制 TNF 信号通路和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, *MAPK*) 信号通路的激活来抑制金黄色葡萄球菌诱导的细胞凋亡和炎症反应^[6];外泌体 ADAM10 蛋白 (recombinant A disintegrin and metalloprotease 10, *ADAM10*) 中和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌产生的 α -穿孔毒素,增强靶细胞对细菌的抗性^[7]。近年来有关外泌体的研究几乎都集中在抗肿瘤和抗病毒领域,关于外泌体在细菌感染方面的报道相对较少。本文综述了外泌体对几种胞内菌和胞外菌感染的免疫调节作用,为研究外泌体与细菌感染之间的相互作用提供依据。

1 外泌体对胞内菌感染的免疫调节作用

寄生在宿主细胞内的细菌称为胞内菌。由于抗体不能进入胞内,体液免疫的作用受到限制,所以对胞内菌感染的防御主要依赖细胞免疫。

胞内菌进入机体后,先由吞噬细胞吞噬。若吞噬细胞无法杀死胞内菌,则会导致其在胞内进行生存和繁殖。特异性细胞免疫在抗胞内菌感染中发挥主要作用。特异性细胞免疫应答主要通过辅助性 T (Th) 细胞和细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocytes, *CTL*) 发挥作用。Th 细胞释放白介素-2 (interleukin-2, *IL-2*)、 γ 干扰素 (interferon- γ , *IFN- γ*) 等细胞因子活化巨噬细胞发挥其杀菌效应;CTL 释放颗粒酶和穿孔素破坏被感染细胞,使细菌释放

到胞外,再通过抗体或补体的调理作用促进吞噬细胞的吞噬消灭。

外泌体参与了胞内菌感染中的病原识别、免疫细胞激活或抑制并且能转运干扰素诱导跨膜蛋白抑制胞内菌的存活和增殖。外泌体 miRNA 通过抑制自噬相关基因 *ATM* 负调节自噬过程来促进细菌的胞内存活。布鲁氏菌甚至能利用外泌体的前体多泡体 (multivesicular body, *MVB*) 来转移出胞并引发新的感染^[8]。此外,外泌体可能通过携带胞内菌相关抗原和蛋白诱导机体产生特异性抗体,这为疫苗研发提供了新思路。

1.1 分枝杆菌

1.1.1 结核分枝杆菌

外泌体参与结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*) 感染中的病原识别并激活免疫细胞,同时在激活幼稚巨噬细胞和自噬调节中发挥双向作用。

Bhatnagar 等^[9]研究发现受感染巨噬细胞释放外泌体携带病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, *PAMP*),此外,有研究证实结核分枝杆菌感染巨噬细胞释放的外泌体和微囊泡中的 *MHC-II* 可以将抗原呈递到 T 细胞^[10],表明外泌体促进结核分枝杆菌的抗原识别。

Singh 等^[11]研究发现结核分枝杆菌感染细胞释放外泌体在体内外招募巨噬细胞并诱导肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*) 和 *IL-12* 的产生。此外有研究表明结核分枝杆菌感染巨噬细胞释放的外泌体能激活 *CD4⁺* 和 *CD8⁺* T 细胞^[10]。另外一项研究发现从用结核分枝杆菌培养物滤液蛋白 (culture filtrate protein, *CFP*) 处理的巨噬细胞中纯化的外泌体可激活分泌 *IL-2* 的 *CD2⁺* 和 *CD4⁺* T 细胞^[12]。Smith 等^[13]研究证实外泌体在 *Mtb* 感染期间增强 T 细胞活化并介导免疫系统激活。

含结核分枝杆菌病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, *PAMP*) 的外泌体通过 Toll 样受体 (Toll-like receptors, *TLR*) 和髓系分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, *MYD88*) 依赖性方式激活幼稚巨噬细胞促炎反应^[9]。与之相反的是,另一项研究表明结核分枝杆菌感染细胞释放的外泌体可以抑制 *IFN- γ* 介导的幼稚巨噬细胞活化,并抑制小鼠巨噬细胞表面 *MHC II* 和 *CD64* 分子的表达,且这种抑制作用也依赖于 *TLR2* 和 *MYD88* 方式^[14]。以上结果表明外泌体在激活幼稚巨噬细

胞的促炎反应中发挥双向作用。

有研究发现结核分枝杆菌感染的中性粒细胞释放的外泌体通过早期超氧阴离子产生和自噬诱导激活巨噬细胞并促进细胞内结核分枝杆菌的清除^[15]。与之相反的是,另一项研究表明结核分枝杆菌感染时诱导的 miR-18a,包括外泌体 miR-18a 通过抑制自噬相关基因 *ATM* 负调节自噬过程来促进巨噬细胞中的结核分枝杆菌存活。*ATM* 基因通过激活 LKB1/AMPK/TSC2 信号通路并抑制负调节因子 mTORC1 来维持自噬途径,miR-18a 可以通过抑制 *ATM* 来负调节自噬^[4]。外泌体参与结核分枝杆菌感染过程中的自噬调节,并且也发挥了双向作用。

1.1.2 鸟分枝杆菌

外泌体在鸟分枝杆菌感染的病原识别和激活巨噬细胞中也发挥着重要作用。Bhatnagar 等^[16]的研究表明鸟分枝杆菌感染巨噬细胞释放含有细菌胞壁主要致病成分的糖肽脂 (glycopeptidolipids, GPLs) 的外泌体,并同样以依赖于 TLR2、TLR4 和 MYD88 途径刺激静息巨噬细胞的促炎反应。Wang 等^[17]的研究同样证实了鸟分枝杆菌感染巨噬细胞分泌的外泌体可以促进巨噬细胞表达 CD195、HLA-DR、CD40、CD80、CD81、CD86 并刺激分泌 IL-6、IL-8、IL-10、INF- γ 、TNF- α 等细胞因子。另一项研究表明鸟分枝杆菌亚种鸟分枝杆菌副结核亚种感染巨噬细胞分泌的外泌体激活静息巨噬细胞,并促进了巨噬细胞 CD80 和 CD86 的表达以及 TNF- α 和 INF- γ 的分泌^[18]。

外泌体参与了分枝杆菌感染中的抗原呈递、激活免疫细胞并促进炎症因子的分泌,Cheng 等^[12]研究表明携带分枝杆菌抗原的外泌体可以保护小鼠免受结核分枝杆菌感染,表明外泌体可能成为新型预防结核病感染的疫苗。另外有研究表明,外泌体的蛋白质和 miRNA 可以作为结核病诊断中潜在的生物标志物^[19-21]。

1.2 布鲁氏菌

布鲁氏菌通过劫持 MVB 来排出胞外并引发新的感染,同时外泌体转运干扰素诱导跨膜蛋白抑制布鲁氏菌的胞内存活和增殖。

此前有文献报道,布鲁氏菌通过选择性破坏自噬复合物来抑制宿主细胞的清除并促进感染^[22]。在此基础上,Spera 等^[8]的研究表明布鲁氏菌利用 MVB 排出宿主细胞并引发新的感染,此外,应用促进或抑制多泡体的药物分别增加或减少细胞外细

菌的数量。

Yi 等^[23]通过动物实验研究表明马耳他布鲁氏菌 M5 株 (*Brucella melitensis* strain M5) 可以刺激巨噬细胞分泌大量外泌体,并在马耳他布鲁氏菌 M5 株感染细胞的外泌体鉴定出富含干扰素诱导的跨膜蛋白 3 (interferon-inducible transmembrane protein 3, IFITM3)。这些外泌体可以将 IFITM3 从一个细胞传递到另一个细胞,从而有效抑制布鲁氏菌的胞内存活。干扰素诱导的跨膜蛋白 3 (interferon-inducible transmembrane protein 3, IFITM3) 属于 IFN 刺激基因 (ISG) 家族^[24],它们是宿主先天免疫系统的关键抗病毒效应物^[25],在抑制细胞内细菌存活中可能也起关键作用^[23]。此外,该研究还发现,与缺乏 IFITM3 的外泌体相比,含有 IFITM3 的外泌体可以更有效地减少小鼠布鲁氏菌感染过程中的脾损伤和菌落总数,证实了含 IFITM3 的外泌体可能是改善免疫应答和抑制布鲁氏菌增殖的治疗方法之一^[23]。

1.3 沙门氏菌

外泌体参与沙门菌感染中的巨噬细胞活化,刺激多种炎症因子分泌,诱导特异性 Th1 型反应,并使可能携带沙门氏菌蛋白诱导的小鼠产生特异性抗体。

Bhatnagar 等^[9]研究表明沙门菌感染的巨噬细胞外泌体含有细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS),并且可能是巨噬细胞活化的主要介质。Hui 等^[26]的研究证实了鼠伤寒沙门菌感染的巨噬细胞和 DC 产生的外泌体激活幼稚巨噬细胞,并促进 DC 以 TLR4 依赖方式释放 TNF- α ,同时也刺激 RANTES、IL-1RA、MIP-2 细胞因子的分泌。在此基础上,该团队的另一项研究表明沙门氏菌感染巨噬细胞分泌的外泌体传递细菌抗原并促进小鼠脾内 CD4⁺T 细胞分泌 Th1 型细胞因子来刺激特异性 Th1 型反应,同时使巨噬细胞向 M1 极化并增加了前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 的生物合成^[27]。该研究还证明将来自受感染巨噬细胞的外泌体鼻内递送至小鼠能够刺激抗沙门氏菌 IgG 抗体的产生,为研发针对沙门菌感染的疫苗研究提供新思路。

2 外泌体对胞外菌感染的免疫调节作用

胞外菌寄生在宿主细胞外,对胞外菌的免疫应答主要依赖体液免疫。胞外菌感染首先激活固有免疫系统,包括巨噬细胞吞噬细菌、补体蛋白形成

膜攻击复合物破坏细菌、自然杀伤细胞消灭细菌感染细胞,随后细菌抗原激活特异性体液免疫。胞外菌的荚膜多糖、脂多糖、聚合鞭毛素等大多属于胸腺非依赖性抗原(TI-Ag),能直接刺激B细胞产生特异性IgM抗体;而大部分细菌蛋白是胸腺依赖性抗原(TD-Ag),在抗原提呈细胞(APC)参与和Th2细胞辅助下,先产生IgM抗体,接着转换成以IgG为主并包含IgA或IgE的抗体。IgM和IgG抗体结合细菌后可激活补体系统,形成攻膜复合物(MAC),破坏细菌胞壁结构;IgG和C3b协同发挥调理作用可增强吞噬细胞的吞噬功能。抗体还能抑制细菌粘附并中和外毒素发挥保护性作用。

外泌体参与胞外菌感染中的多个环节。外泌体miRNA介导幽门螺杆菌相关血管内皮损伤^[28]并参与调节炎症反应;外泌体lncRNA抑制细菌感染引起细胞凋亡和炎症反应;外泌体蛋白能中和细菌毒素,保护宿主细胞。

2.1 幽门螺杆菌

外泌体在幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染中发挥着双向作用。一方面外泌体携带Hp相关毒力因子进入循环,促进Hp相关胃内外疾病的发生;另一方面通过miR-155参与调节细胞的炎症反应抑制Hp感染。

幽门螺杆菌感染后外泌体可以携带Hp毒力因子细胞毒素相关蛋白(cytotoxin associated protein A, CagA)进入循环,并将CagA递送到远处的器官和组织。外泌体参与CagA阳性幽门螺杆菌感染相关的胃外疾病的发展^[29]。Xia等^[30]的研究证实了这一观点,幽门螺杆菌定植人胃上皮细胞后,细胞分泌携带CagA的外泌体进入循环,作用于血管内皮细胞,使其功能受损,但机制尚不清楚。Li等^[28]通过实验进一步发现Hp感染胃上皮细胞分泌外泌体中的miRNA-25升高,miRNA-25通过miR-25/KLF2轴介导了Hp相关血管内皮损伤。miR-25/KLF2轴通过调节NF-κB信号通路增加了IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和细胞间粘附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达介导血管内皮细胞的损伤。miR-25/KLF2轴可能是幽门螺杆菌相关冠脉粥样硬化的潜在治疗靶点。

幽门螺杆菌感染巨噬细胞释放的外泌体中装载的miR-155促进了炎症相关因子包括TNF-α、IL-

6、IL-23、CD40、CD63、CD81和MCH-I的表达,同时MYD88、NF-κB的表达被下调。体外或体内实验表明,miR-155通过调节细胞的炎症反应,促进巨噬细胞杀死幽门螺杆菌,以防止幽门螺杆菌感染引起的胃炎^[31]。

外泌体miRNA参与幽门螺杆菌感染的相关血管内皮损伤、巨噬细胞活化并刺激促炎细胞因子的分泌。且有研究表明外泌体miRNA可作为胃癌诊断和预后评价的潜在生物标志物和治疗靶点^[32]。

2.2 金黄色葡萄球菌

外泌体长非编码RNA和诱饵蛋白抑制金黄色葡萄球菌的感染。Lnc-AFTR是一种长非编码RNA,在金黄色葡萄球菌感染细胞外泌体和乳腺炎组织中显著下调。Chen等^[6]的研究表明外泌体lnc-AFTR通过抑制TNF信号通路和MAPK信号通路的激活来抑制金黄色葡萄球菌诱导的细胞凋亡和炎症反应。

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)通过分泌α-穿孔毒素与靶细胞表面的金属蛋白酶ADAM10结合,破坏靶细胞膜,引起细胞膨胀和溶解^[33]。此前的研究表明,自噬相关蛋白16样1(autophagy related 16-like 1, ATG16L1)保护靶细胞免受α-穿孔毒素的攻击^[34]。在此基础上,Keller等^[7]研究证实了自噬蛋白ATG16L1和其他自噬蛋白通过自噬途径增加含有ADAM10蛋白外泌体的释放来中和细菌产生的α-穿孔毒素,增强靶细胞对细菌的抗性。同时,细菌DNA和CpG DNA可诱导小鼠分泌ADAM10阳性的外泌体并在体外结合多种毒素,提高了MRSA感染小鼠的存活率。该研究揭示了宿主细胞能够利用含有ADAM10蛋白外泌体作为诱饵,中和细胞膜表面的成孔毒素等毒力因子来抵御感染。这是一种全新的宿主细胞主动防御机制,为MRSA感染患者的治疗提供新思路。

2.3 大肠杆菌

大肠杆菌感染宿主细胞释放外泌体中miRNA能抑制自噬促进炎症反应。Larabi等^[5]的研究表明粘附侵袭性大肠杆菌(adhesive invasive *Escherichia coli*, AIEC)感染肠上皮细胞(intestinal epithelial cell, IEC)促进其分泌装载miR-130c和miR-82a的外泌体,这些miRNA转移到受体肠上皮细胞,通过靶向负调控ATG12和ATG5L16的表达来抑制自噬介导的胞内细菌清除。

Xu 等^[35] 使用泌尿道致病性大肠杆菌 (pathogenic *Escherichia coli* of urinary tract, UPEC) 诱导的睾丸炎模型分离外泌体,并在体外证实外泌体增加了 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达并促进巨噬细胞 M1 活化,且这种促炎反应与外泌体中高表达的 miR-155-5p 密切相关。

Imamiya 等^[36] 通过实验观察到一个有趣的现象,将大肠杆菌外膜囊泡 (outer membrane vesicle, OMV) 中的促炎蛋白 CirA 蛋白 C 末端装载到巨噬细胞分泌的外泌体中,促进了未感染巨噬细胞分泌的外泌体介导的炎症反应。表明来自大肠杆菌 OMV 诱导的巨噬细胞外泌体向未感染的巨噬细胞传递促炎信号。细菌可能通过外膜囊泡将生物信号传递给宿主细胞外泌体。

3 外泌体调控机体对胞内菌和胞外菌免疫应答的方式不同

胞内菌和胞外菌的致病作用有所不同,外泌体调控机体对两类细菌免疫应答的方式也有所不同。胞内菌在宿主细胞内存活并增殖,病原分子与免疫系统的接触相对有限,不利于免疫系统的识别,外

泌体通过携带病原相关分子模式弥补了胞内菌病原识别中的缺陷;宿主细胞通过自噬等多种途径抑制胞内菌的存活,外泌体一方面通过转运干扰素诱导跨膜蛋白抑制胞内菌感染,另一方面通过 miRNA 抑制自噬过程来促进细菌的胞内存活;针对胞内菌的免疫应答主要依赖特异性细胞免疫,外泌体参与调控免疫细胞的激活或抑制。

胞外菌寄生在宿主细胞外,机体对抗胞外菌感染主要依赖体液免疫。外泌体 miRNA、lncRNA 和蛋白质在胞外菌感染免疫调节中发挥重要作用。外泌体 miRNA-25 通过 miR-25/KLF2 轴介导幽门螺杆菌相关血管内皮损伤^[28];miR-155 调节细胞的炎症反应促进巨噬细胞抑制或杀死幽门螺杆菌,以防止幽门螺杆菌感染引起的胃炎^[31];UPEC 诱导的睾丸炎模型分离外泌体中高表达的 miR-155-5p 促进炎症因子分泌和巨噬细胞 M1 活化^[35]。外泌体 lnc-AFTR 抑制金黄色葡萄球菌诱导的细胞凋亡和炎症反应^[6]。外泌体 ADAM10 蛋白增强靶细胞对 MRSA 的抗性^[7](表 1)。

表 1 外泌体对几种细菌的免疫调节作用汇总
Table 1 Summary of immunomodulatory role of exosomes on several bacteria

细菌类型 Bacterial type	细菌名称 Bacterial name		外泌体的免疫调节作用 Immunomodulatory role of exosomes
胞内菌 Intracellular bacteria	分枝杆菌 <i>Mycobacterium</i>	结核分枝杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(1) 参与抗原识别 Participate in antigen recognition (2) 激活免疫细胞(T 细胞) Activate immune cells (T cells) (3) 促进/抑制幼稚巨噬细胞的活化 Promote/inhibit the activation of naive macrophages (4) 促进/抑制自噬 Promote/inhibit autophagy
		鸟分枝杆菌 <i>Mycobacterium avium</i>	(1) 参与抗原识别 Participate in antigen recognition (2) 激活巨噬细胞 Activate macrophages
	布鲁氏菌 <i>Brucella</i>		(1) 多泡体促进细菌感染 MVB promote bacterial infection (2) 外泌体转运 IFITM3 抑制细菌的胞内存活和增殖 Exosomes transport IFITM3 to inhibit intracellular viability and proliferation of bacteria
		沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	(1) 激活巨噬细胞 Activate macrophages (2) 刺激炎症因子分泌 Stimulates secretion of inflammatory factors
胞外菌 Extracellular bacteria	幽门螺杆菌 <i>Helicobacter pylori</i>		(1) 外泌体 miRNA-25 通过 miR-25/KLF2 轴介导 Hp 相关血管内皮损伤 Exosomal miRNA-25 mediates Hp-associated vascular endothelial injury via the miR-25/KLF2 axis

续表

细菌类型 Bacterial type	细菌名称 Bacterial name	外泌体的免疫调节作用 Immunomodulatory role of exosomes
		(2) 外泌体 miRNA-155 调节炎症因子分泌,促进巨噬细胞的杀菌作用 Exosomal miRNA-155 regulates the secretion of inflammatory factors and promotes the bactericidal effect of macrophages
	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	(1) 外泌体 lnc-AFTR 抑制 TNF、MAPK 信号通路的激活从而抑制细菌诱导的细胞凋亡和炎症反应 Exosomal lnc-AFTR inhibits the activation of TNF and MAPK signaling pathways thereby suppressing bacterial-induced apoptosis and inflammatory responses
		(2) 外泌体 ADAM10 蛋白中和 α -穿孔毒素抵御细菌感染 Exosomal ADAM10 protein neutralizes α -toxin to resist bacterial infection
	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	(1) 外泌体 miRNA-130c 和 miRNA-82a 抑制自噬 Exosomal miRNA-130c and miRNA-82a inhibit autophagy
		(2) 外泌体 miR-155-5p 促进炎症因子分泌和 M1 型巨噬细胞活化 Exosomal miR-155-5p promotes inflammatory factors secretion and M1-type macrophage activation

4 总结与展望

外泌体拥有双层膜囊泡结构,可作为传递抗菌蛋白和药物的天然载体。含 IFITM3 和 ADAM10 蛋白的外泌体可能成为布鲁氏菌病和 MRSA 患者的治疗方法之一。外泌体蛋白质和 miRNA 可以作为多种疾病诊断和预后的生物标志物,如 miR-421 上调可能是胃癌的早期诊断标志物^[37],miR-185-5p 可能作为结核病诊断的生物标志物^[38]。此外,外泌体可能携带细菌相关抗原和蛋白诱导机体产生特异性抗体,为疫苗研发提供新思路。外泌体作为一种细胞外囊泡在感染性疾病、肿瘤、冠心病、哮喘、COPD 等多种疾病中发挥着重要作用,是目前研究的热点之一。有关外泌体如何调节机体对细菌感染的免疫反应机制的研究仍处在发展阶段。外泌体在细菌感染中的诊断、治疗和预后判断潜力都值得进一步发掘。

参考文献:

[1] Suchorska WM, Lach MS. The role of exosomes in tumor progression and metastasis (Review) [J]. Oncol Rep, 2016, 35 (3): 1237-1244.

[2] Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential [J]. Cell Biosci, 2019, 9: 19.

[3] Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation

and analysis [J]. Cells, 2019, 8(7): 727.

[4] Yuan Q, Chen H, Yang Y, et al. MiR-18a promotes Mycobacterial survival in macrophages via inhibiting autophagy by down-regulation of ATM [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(2): 2004-2012.

[5] Larabi A, Dalmasso G, Delmas J, et al. Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* [J]. Gut Microbes, 2020, 11(6): 1677-1694.

[6] Chen Y, Yang J, Huang Z, et al. Exosomal lnc-AFTR as a novel translation regulator of FAS ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced mastitis [J]. Biofactors, 2022, 48(1): 148-163.

[7] Keller MD, Ching KL, Liang FX, et al. Decoy exosomes provide protection against bacterial toxins [J]. Nature, 2020, 579 (7798): 260-264.

[8] Spera JM, Guaimas F, Czibener C, et al. *Brucella* egresses from host cells exploiting multivesicular bodies [J]. mBio, 2023, 14 (1): e0333822.

[9] Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, et al. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo* [J]. Blood, 2007, 110(9): 3234-3244.

[10] Ramachandra L, Qu Y, Wang Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis* synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation [J]. Infect Immun, 2010, 78(12): 5116-5125.

[11] Singh PP, Smith VL, Karakousis PC, et al. Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells *in vitro* and *in vivo* [J]. J

Immunol, 2012, 189(2): 777-785.

[12] Cheng Y, Schorey JS. Exosomes carrying mycobacterial antigens can protect mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Eur J Immunol, 2013, 43(12): i-ii.

[13] Smith VL, Cheng Y, Bryant BR, et al. Exosomes function in antigen presentation during an *in vivo* *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Sci Rep, 2017, 7: 43578.

[14] Singh P, Lemaire C, Tan J, et al. Exosomes released from *M. tuberculosis* infected cells can suppress IFN- γ mediated activation of Naïve macrophages [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18564.

[15] Alvarez-Jiménez VD, Leyva-Paredes K, García-Martínez M, et al. Extracellular vesicles released from *Mycobacterium tuberculosis*-infected neutrophils promote macrophage autophagy and decrease intracellular mycobacterial survival [J]. Front Immunol, 2018, 9: 272.

[16] Bhatnagar S, Schorey JS. Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory [J]. J Biol Chem, 2007, 282(35): 25779-25789.

[17] Wang J, Yao Y, Xiong J, et al. Evaluation of the inflammatory response in macrophages stimulated with exosomes secreted by *Mycobacterium avium*-infected macrophages [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 658421.

[18] Wang JJ, Chen C, Xie PF, et al. Proteomic analysis and immune properties of exosomes released by macrophages infected with *Mycobacterium avium* [J]. Microbes Infect, 2014, 16(4): 283-291.

[19] Mortaz E, Alipoor SD, Tabarsi P, et al. The analysis of exosomal micro-RNAs in peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages after infection with bacillus Calmette-Guérin by RNA sequencing [J]. Int J Mycobacteriol, 2016, 5: S184-S185.

[20] Mehaffy C, Dobos KM, Nahid P, et al. Second generation multiple reaction monitoring assays for enhanced detection of ultra-low abundance *Mycobacterium tuberculosis* peptides in human serum [J]. Clin Proteomics, 2017, 14: 21.

[21] Kruh-Garcia NA, Wolfe LM, Chaisson LH, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* peptides in the exosomes of patients with active and latent *M. tuberculosis* infection using MRM-MS [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e103811.

[22] Starr T, Child R, Wehrly TD, et al. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle [J]. Cell Host Microbe, 2012, 11(1): 33-45.

[23] Yi J, Wang Y, Zhang H, et al. Interferon-inducible transmembrane protein 3-containing exosome as a new carrier for the cell-to-cell transmission of anti-*Brucella* activity [J]. Front Vet Sci, 2021, 8: 642968.

[24] Fredy S, Martin E, Ulrich C. The small interferon-induced transmembrane genes and proteins [J]. J Interf Cytok Res, 2011, 31(1): 183-97.

[25] Wong MT, Chen SSL. Emerging roles of interferon-stimulated genes in the innate immune response to hepatitis C virus infection [J]. Cell Mol Immunol, 2016, 13(1): 11-35.

[26] Hui WW, Hercik K, Belsare S, et al. *Salmonella enterica* serovar typhimurium alters the extracellular proteome of macrophages and leads to the production of proinflammatory exosomes [J]. Infect Immun, 2018, 86(2): e00386-e00317.

[27] Hui WW, Emerson LE, Clapp B, et al. Antigen-encapsulating host extracellular vesicles derived from *Salmonella*-infected cells stimulate pathogen-specific Th1-type responses *in vivo* [J]. PLoS Pathog, 2021, 17(5): e1009465.

[28] Li N, Liu SF, Dong K, et al. Exosome-transmitted miR-25 induced by *H. pylori* promotes vascular endothelial cell injury by targeting KLF2 [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 366.

[29] Polakovicova I, Jerez S, Wichmann IA, et al. Role of microRNAs and exosomes in *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus associated gastric cancers [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 636.

[30] Xia X, Zhang L, Chi J, et al. *Helicobacter pylori* infection impairs endothelial function through an exosome-mediated mechanism [J]. J Am Heart Assoc, 2020, 9(6): e014120.

[31] Wang J, Deng Z, Wang Z, et al. microRNA-155 in exosomes secreted from *Helicobacter pylori* infection macrophages immunomodulates inflammatory response [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(9): 3700-3709.

[32] Shin VY, Chu KM. MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(30): 10432-10439.

[33] 孙建林, 吕新翔. 金黄色葡萄球菌的致病机制 [J]. 医学综述, 2022, 28(12): 2363-2367.

Sun JL, Lyu XX. Pathogenic mechanism of *Staphylococcus aureus* [J]. Med Recapitul, 2022, 28(12): 2363-2367.

[34] Maurer K, Reyes-Robles T, Alonzo F, et al. Autophagy mediates tolerance to *Staphylococcus aureus α -toxin [J]. Cell Host Microbe, 2015, 17(4): 429-440.*

[35] Xu J, He C, Fang YW, et al. Testicular exosomes disturb the immunosuppressive phenotype of testicular macrophages mediated by miR-155-5p in uropathogenic *Escherichia coli*-induced orchitis [J]. Asian J Androl, 2023, 25(3): 389-397.

[36] Imamiya R, Shinohara A, Yakura D, et al. *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles relay inflammatory responses to macrophage-derived exosomes [J]. mBio, 2023, 14(1): e0305122.

[37] Jiang Z, Guo J, Xiao B, et al. Increased expression of miR-421 in human gastric carcinoma and its clinical association [J]. J Gastroenterol, 2010, 45(1): 17-23.

[38] Kaushik AC, Wu Q, Lin L, et al. Exosomal ncRNAs profiling of mycobacterial infection identified miRNA-185-5p as a novel biomarker for tuberculosis [J]. Brief Bioinform, 2021, 22(6): bbab210.

任群利, 罗倩, 刘华倩, 等. 朱砂根抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 165-170.

Ren QL, Luo Q, Liu HQ, et al. Antitumor mechanism of *Ardisia Crenata* Radix [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 165-170.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.022

朱砂根抗肿瘤作用研究进展

任群利¹, 罗倩², 刘华倩², 吴发明³, 何芋岐³, 刘建国¹, 王倩^{1*}

(1. 遵义医科大学口腔医学院, 贵州省普通高等学校微生物资源及药物开发特色重点实验室, 贵州 遵义 563000;

2. 遵义医科大学基础医学院, 贵州 遵义 563000; 3. 遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563000)

【摘要】 朱砂根是中国传统中药, 属于紫金牛科植物, 其主要成分为香豆素类、皂苷类、黄酮类和挥发油等。随着对朱砂根抗肿瘤作用的深入研究, 其活性抗癌化合物有岩白菜素、朱砂根皂苷 A、B、百两金皂苷 A、B 和蒽贝素, 主要通过诱导肿瘤细胞凋亡、增加肿瘤细胞毒性抑制细胞增殖、抑制肿瘤细胞转移和迁徙等多种途径在口腔癌、鼻咽癌、肝癌、结肠癌、膀胱癌、宫颈癌和白血病等肿瘤中显示出很高的抗肿瘤潜力。然而, 朱砂根的抗肿瘤机制临床前实验数据缺乏高质量、多样本、多重复的随机对照试验, 临床研究数据缺乏肿瘤预后及药效学和药代动力学相关试验数据, 应设计精准研究实验和临床试验进一步探索挖掘朱砂根的药理作用。

【关键词】 朱砂根; 岩白菜素; 肿瘤; 抗癌化合物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0165-06

Antitumor mechanism of *Ardisia Crenata* Radix

REN Qunli¹, LUO Qian², LIU Huaqian², WU Faming³, HE Yuqi³, LIU Jianguo¹, WANG Qian^{1*}

(1. Microbial Resources and Drug Development Key Laboratory of Guizhou Tertiary Institution, School of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China. 2. School of Basic Medical, Zunyi Medical University, Zunyi 563000.

3. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000)

【Abstract】 *Ardisia Crenata* Radix is a traditional Chinese medicinal plant that belongs to the Myrsinaceae family, and its main active components are coumarins, saponins, flavonoids, and volatile oil. Bergenin, ardisicrenoside A, ardisicrenoside B, ardisiacripin A, ardisiacripin B, and embelin were identified as active anticancer compounds in in-depth studies into the anti-tumor effects of *Ardisia Crenata* Radix. They show high therapeutic potential in oral cancer, nasopharyngeal carcinoma, liver cancer, colon cancer, bladder cancer, cervical cancer, and leukemia, mainly by inducing tumor cell apoptosis, increasing tumor cytotoxicity, inhibiting cell proliferation, inhibiting tumor cell metastasis and migration, and inducing cell regulatory enzyme cascade reactions. However, most preclinical experimental data on cinnabar root's anti-tumor mechanism have not been verified in high-quality, multi-sample, and repeated randomized controlled trials, and there are a lack of clinical research data on tumor prognosis, pharmacodynamics, and pharmacokinetics. Accurate research experiments and clinical trials should be designed to further explore the pharmacological effects of *Ardisia Crenata* Radix.

【Keywords】 *Ardisia Crenata* Radix; bergenin; tumor; anticancer compound

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

【基金项目】 贵州省教育厅乡村振兴示范村建设项目(黔教技[2022]037号); 遵义市科技局计划项目(遵市科合 HZ 字(2020)60 号, 遵市科合 HZ 字(2020)55 号); 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2018]5772-067, 黔科合平台人才[2018]5772-062)。

【作者简介】 任群利(1991—), 女, 实验师, 硕士, 研究方向: 药物开发与口腔微生态。E-mail: 1121681907@qq.com

【通信作者】 王倩(1985—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 头颈部鳞状细胞癌。E-mail: qianwang07@126.com

朱砂根 *Ardisia Crenata* Radix 是紫金牛科植物朱砂根 *Ardisia Crenata* Sims 的干燥根, 别名红铜盘、大罗伞八角金龙、黄金万两等, 主产于亚洲, 我国分布在贵州、云南、四川、浙江、安徽、江西、湖南、湖北、重庆、广东和广西等地, 为我国民间常用传统药材之一^[1]。也是苗族喉科良药、贵州省特色民族药材八爪金龙来源之一, 被用作治疗呼吸道感染、关节炎、牙痛和月经紊乱的传统药物^[2]。朱砂根收录于《中国药典》2020 年版, 岩白菜素不得少于 1.5%^[3], 其味微苦、辛, 性平, 归肺、胃经, 主要含香豆素类、皂苷类、黄酮类、挥发油、环肽、酚类和糖类等多种化学成分, 具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、降血糖、保肝、抗生育、镇咳和保护神经等药理作用^[4-5]。肿瘤, 一项威胁人类生命健康的疾病, 严重影响人类生活质量, 虽然肿瘤死亡率正在经历全球下降趋势, 但治疗后的转移和复发以及生存率低仍然与预后不良相关, 并且成为该疾病治疗中最重要的挑战^[6]。目前, 传统中药因含有许多生物活性成分, 已被广泛用于治疗肿瘤。但对于朱砂根及其主要活性成分的抗肿瘤作用尚缺乏系统性的综述, 因此, 本文就朱砂根抗肿瘤活性成分, 体内、体外抗肿瘤的作用机制作一综述, 以期对朱砂根实验研究和临床应用提供更多参考依据。

1 朱砂根抗肿瘤活性成分

朱砂根主要活性成分香豆素类、皂苷类和醌类具有抗肿瘤作用, 活性抗癌化合物包括岩白菜素^[7] (bergenin)、朱砂根皂苷^[8] (ardicrenin)、朱砂根皂苷 A^[8] (ardisicrenoside A)、朱砂根皂苷 B^[9]

(ardisicrenoside B)、百两金皂苷 A^[9] (ardisiacrispin A)、百两金皂苷 B^[10] (ardisiacrispin B) 和蓼贝素^[11] (embelin) 等, 化学结构如图 1, 朱砂根的学名是通过世界植物在线 | 邱园科学网站检索 Plants of the World Online | Kew Science website (<https://powo.science.kew.org/>), 化学结构通过 ChemSpider 检索 (<http://www.chemspider.com>)^[12]。研究发现, 岩白菜素能诱导膀胱癌细胞 RT4 和 TCCSUP 凋亡、抑制增殖和迁移^[7], 还能抗肝癌细胞 HepG2^[13]; 朱砂根皂苷和朱砂根皂苷 A 对人肺癌细胞 A549、乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231、肝癌细胞 HepG2 毒性显著^[8]; 朱砂根皂苷 B、百两金皂苷 A 和百两金皂苷 B 可抑制乳腺癌细胞 MCF-7、肺癌细胞 NCI-H460、人神经胶质瘤细胞 SF-268、肝癌细胞 HepG2 和肝癌细胞 Hep3B 的细胞 G0/G1 期, 诱导细胞凋亡^[9]; 百两金皂苷 A 还可诱导人结直肠癌细胞 HCT-15 受损, 发生核染色质浓集、固缩、碎裂, 诱导细胞凋亡^[14]。有趣的是, 百两金皂苷 A 和百两金皂苷 B 以 2:1 的优势比例混合后, 对人肝癌细胞 Bel-7402、鼻咽癌细胞 KB、宫颈癌细胞 HeLa、卵巢癌细胞 SKOV-3、胃癌细胞 BGC823 和乳腺癌细胞 MCF-7 具有细胞毒性, 对 Bel-7402 细胞有显著的抗癌活性, 可以使膜通透性增强、核浓缩诱导癌细胞凋亡, 分解微管抑制癌细胞的增殖^[15]。体内实验结果表明, 百两金皂苷 A 还可以缩小 HCT-15 肿瘤裸鼠移植瘤体积, 抑制肿瘤生长^[14]。蓼贝素减少肝癌细胞 G2/M 期导致癌细胞凋亡^[13], 也可在体内和体外与辐射结合有效抑制前列腺癌细胞 PC-3 增殖, 促进细胞凋亡, 抑制血管生成^[16]。

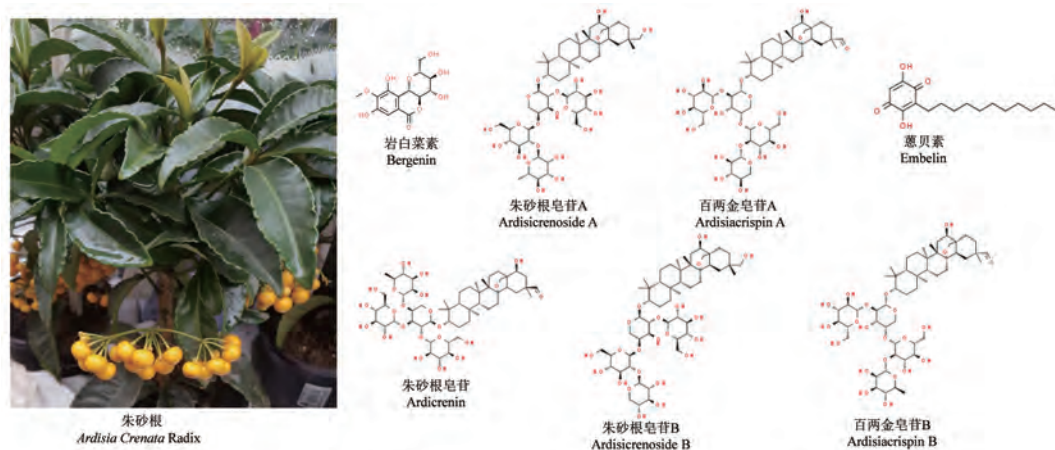


图 1 朱砂根及其活性化合物

Figure 1 *Ardisia Crenata* Radix and its active compounds

2 朱砂根抗肿瘤机制

朱砂根及活性成分能调控细胞周期,抑制肿瘤细胞增殖和诱导细胞凋亡,还能抑制肿瘤细胞转移和侵袭,对肿瘤具有较强的细胞毒性,从而发挥抗肿瘤的作用(图 2)。

2.1 诱导肿瘤细胞凋亡

肿瘤是多基因变化导致细胞周期发生紊乱、细胞生长失控的一类细胞周期性疾病^[17],朱砂根中活性成分可通过调控细胞周期,阻滞细胞周期诱导细胞凋亡达到抗肿瘤作用。岩白菜素、蒽贝素和槲皮素使癌细胞聚集在 G1 期,并使 G2/M 期减少,导致肝癌细胞凋亡和死亡^[13]。百两金皂苷 A 和百两金皂苷 B 对肿瘤细胞的生长具有很强的抑制活性,可使肿瘤细胞周期受阻,肿瘤细胞的生长停留在 G0/G1 期,从而诱导肿瘤细胞凋亡^[9]。此外,细胞膜通透性改变,细胞固缩与细胞死亡相关。朱砂根总皂苷作用人肺巨细胞 PG、Bel-7402、KB、人结肠癌 HCT、HeLa、人白血病细胞 HL-60 后,癌细胞内胞浆内脂滴增多,细胞形态变小,核固缩,随后可见细胞死亡^[18],百两金皂苷 A 使人结肠癌细胞 HCT-15 发生了同样的变化,核染色质浓集、固缩、碎裂,诱导细胞凋亡^[14];百两金皂苷 A 和百两金皂苷 B 以 2 : 1 的比例混合,对 Bel-7402 细胞有显著的抗癌活性,可以使膜通透性增强、核浓缩诱导癌细胞凋亡,分解微管抑制癌细胞的增殖^[15]。此外,细胞凋亡还通过一种被称为 caspase 的丝氨酸蛋白酶和 Bcl-2 家族基因发挥作用^[19],岩白菜素可升高 Bax 和裂解的 caspase 3 蛋白水平,降低 Bcl-2 水平从而诱导膀胱癌细胞 RT4 和 TCCSUP 凋亡^[7]。



图 2 朱砂根调节细胞增殖、细胞周期、凋亡、转移和侵袭
Figure 2 *Ardisia Crenata Radix* regulates the cell proliferation, cell cycle, cell apoptosis, metastasis and invasion

2.2 抑制细胞增殖

朱砂根对肿瘤细胞表现出较强细胞毒性,可抑制肿瘤细胞增殖。体外实验研究表明,朱砂根的乙醇提取物对肿瘤细胞 MCF-7、人非小细胞肺癌 NCI-H460 和人神经胶质瘤细胞 SF-268 均表现出很强的细胞毒活性,其中百两金皂苷 A、B 的活性最强^[10]。百两金皂苷 A 对黑色素瘤细胞 WM793、HTB140、A375、前列腺癌细胞 DU145、PC3、结肠癌细胞 Caco 2、HT29、HCT-15 和 HepG2 具有较高毒性,百两金皂苷 B 对人回盲肠癌细胞 HCT-8、人肝细胞癌 Bel-7402、胃腺癌细胞 BGC-823、人肺癌细胞 A549、人卵巢腺癌细胞 A2780 和人肾癌细胞 KETR3 有细胞毒性^[14,20-21]。蒽贝素和密花醌对 DU145 细胞有强烈效果,对 WM793 细胞中度毒性^[22]。朱砂根皂苷 C 和朱砂根皂苷 D 抑制环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)和磷酸二酯酶(phosphodiesterases, PDEs)的活性^[23],cAMP 对于细胞活动起着重要的调节作用,这可能成为对抑制肿瘤细胞有作用的途径。朱砂根皂苷 N 和朱砂根皂苷 Q 对 NCI-H460 和 MCF-7 有较弱的细胞毒性,朱砂根皂苷 O 和朱砂根皂苷 P 活性较弱^[2,24]。朱砂根皂苷、朱砂根皂苷 A、朱砂根皂苷 R、朱砂根皂苷 S、ardicrephenin、西克拉敏皂苷元 A(cyclamiretin A)、cyclaminorin 和 ardisimamilloside H 对 A549、MCF-7、HepG2 和 MDA-MB-231 细胞毒性显著^[8]。此外,岩白菜素能显著降低膀胱癌细胞活力,增加 G1 期阻滞,同时降低 Ki67、周期蛋白 D1(Cyclin D1)和周期蛋白 B1(Cyclin B1)的表达^[7],Ki67 是一种增殖细胞的相关抗原,是细胞增殖标记物,Ki67 的高低表示着肿瘤生长速度的快慢;岩白菜素、蒽贝素和槲皮素具有抑制 HepG2 细胞增殖作用^[13];朱砂根总皂苷对 PG、Bel-7402、KB、HCT、HeLa、HL-60 等癌细胞的生长增殖有明显的抑制作用,IC₅₀ 在 7~15 μg/mL 范围内^[18];百两金皂苷 A 对 NCI-H460、MCF-7、HeLa、人口腔上皮癌耐药细胞 KB-V1 具有细胞抑制作用^[21]。此外,朱砂根提取物环状脱脂肽 FR-900359 特异性地阻断细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)和 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP),恢复黑色素细胞分化和抑制具有 Gα_{Q/11} 突变的人葡萄膜黑色素瘤细胞系 Mel270、Mel202、Mel92.1 和 OMM1.3 细胞的增殖^[25]。朱砂根甲醇提取物可通过上调细胞小眼球相关转录因子(microphthalmia associated

transcription factor, MITF) 蛋白的表达,增加酪氨酸酶蛋白 (tyrosinase protein, TP) 的表达,抑制细胞中负向调节黑色素合成的 ERK 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylin-ositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路的激活,从而刺激黑色素生成作用,减少黑色素瘤细胞 B16F10 增殖^[26]。体内实验研究表明,朱砂根对肿瘤的发生发展具有显著抑制作用,裸鼠接种肺癌和结肠癌瘤株,建立荷瘤模型,朱砂根总皂苷对其抑瘤率高达 53%~65%,并呈现正相关剂量依赖性药-效关系^[18];接种人 HCT-15 肿瘤裸鼠移植瘤,百两金皂苷 A 抑制肿瘤生长^[14]。

2.3 抑制肿瘤细胞侵袭和迁移

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 是核受体超家族的配体激活转录因子,已被报道与恶性肿瘤有关,调节细胞分化、增殖、转移和凋亡;上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 也是肿瘤细胞侵袭和转移的关键因素^[27]。膀胱癌中,PPAR γ 通过 Akt/GSK3 β 信号通路抑制细胞的侵袭和迁移^[28]。PPAR γ 被报道调节磷酸酯酶与张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 通路^[29],PTEN 是一种肿瘤抑制蛋白,岩白菜素可以诱导 PPAR γ 的表达^[11],激活 PPAR γ /PTEN/Akt 信号通路,对细胞的侵袭、迁移和 EMT 也有抑制作用,抑制膀胱癌的发展^[7]。朱砂根乙醇提取物具有明显的抗肿瘤转移活性,其中 5-羟甲基-2-呋喃果醛、正丁基- α -D-呋喃果苷、心胞苷 B 具有显著的

抗肿瘤转移活性,当浓度为 0.8 mg/L 时,正丁基- α -D-呋喃果苷对 MDA-MB-231 细胞的转移抑制率为 93.8%^[30]。从朱砂根中分离得到的环状脱脂肽 FR-900359,抑制小鼠黑色素瘤细胞 Hcme12 异源三聚体 G 蛋白亚基 G α_q 活性,抑制致癌突变 G α_{11}^{Q209L} ,它可作为有效的 G $\alpha_Q/11$ 蛋白及其下游靶点抑制因子,抑制肿瘤细胞代谢和迁移^[25]。

3 总结与展望

朱砂根是紫金牛科植物,其变种红凉伞 (*Ardisia crenata* var. *bicolor*) 与朱砂根亲缘关系最为密切,且药理作用相似,经常作为替代来源入药^[21]。目前以朱砂根为原料生产的产品有咽喉清喉片、伤痛酊、肤痣清软膏以及朱砂根肥皂^[1,31],但其作为抗肿瘤临床药物尚未见报道。肿瘤的发生发展和对化疗的抵抗与肿瘤微环境息息相关,主要包括各种免疫细胞、活化的成纤维细胞、基底膜、毛细血管、细胞外基质、肿瘤相关巨噬细胞和微生物等^[32],尽管癌症治疗的改进显著改善了早期疾病患者的结局,但复发和复发导致死亡的风险仍然很高^[33]。因此,掌握抗肿瘤机制从而找到肿瘤治疗的新策略迫在眉睫。表 1 所示,临床前研究表明,朱砂根抗癌活性成分主要是岩白菜素、百两金皂苷 A、B、朱砂根皂苷 A、B 和蒽贝素,通过诱导癌细胞凋亡,抑制癌细胞生长增殖,抑制癌细胞侵袭、迁移对消化道肿瘤、呼吸系统肿瘤、泌尿生殖系统肿瘤、造血系统肿瘤等有很好的抗肿瘤作用。同时,朱砂根皂苷 K 和朱

表 1 朱砂根抗肿瘤作用机制
Table 1 Antitumor mechanism of *Ardisia Crenata* Radix

活性成分 Active ingredient	细胞/动物 Cells/ Animals	剂量 Dosage	主要通路 Main pathway	药理作用 Pharmacology
岩白菜 ^[7] Bergenin	RT4, TCCSUP	0, 3. 12, 6. 25, 12. 5, 25, 50 μ mol/L	G1, Bcl-2 $\downarrow$ Bax, caspase 3, PPAR γ /PTEN/ Akt $\uparrow$	诱导癌细胞凋亡,抑制侵袭和迁移 Induced apoptosis of tumor cells, inhibited invasion and migration
岩白菜、蒽贝 ^[13] Bergenin, embelin	HepG2	18, 120, 145 μ mol/L	G1 $\uparrow$ G2/M $\downarrow$	诱导细胞凋亡 Induced apoptosis of tumor cell
百两金皂苷 A ^[14] Ardisiacrispin A	HCT-15	8 μ mol/L	S $\downarrow$	抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡 Inhibited proliferation and induced apoptosis of tumor cell
百两金皂苷 A + 百两金 皂苷 B (2:1) ^[15] Ardisiacrispin A + ardisiacrispin B (2:1)	裸鼠 Nude mice Bel-7402	60, 50, 40 mg/kg 1~10 μ g/mL	肿瘤体积 $\downarrow$ Tumor volume $\downarrow$ 膜通透性 $\uparrow$ Membrane permeability $\uparrow$ 细胞核,癌细胞内的微管 $\downarrow$ Nucleus, microtubules within tumor cells $\downarrow$	抑制肿瘤增殖 Inhibited proliferation 诱导凋亡,抑制增殖 Induced apoptosis and inhibited proliferation of tumor cell

续表1

活性成分 Active ingredient	细胞/动物 Cells/ Animals	剂量 Dosage	主要通路 Main pathway	药理作用 Pharmacology
百两金皂苷 A、百两金皂苷 B、朱砂根皂苷 B、朱砂根皂苷 I、朱砂根皂苷 J Ardisiacrispin A, ardisiacrispin B, ardisicrenoside B, ardisicrenoside I, ardisicrenoside J	MCF-7, NCI-H460, SF-268, HepG2, Hep3B	5 μg/mL	G0/G1 ↓	诱导癌细胞凋亡 Induced tumor cell apoptosis
朱砂根总皂苷 ^[18] Ardicrenin	PG, Bel-7402, KB, HCT, HeLa, HL-60	7~15 μg/mL	克隆形成能力、癌细胞活力 ↓ Clonality, tumor cell viability ↓	抑制肿瘤细胞增殖, 诱导其癌细胞凋亡 Inhibited proliferation and induced apoptosis of tumor cell
	裸鼠 Nude mice	40 mg/kg	肿瘤体积 ↓ Tumor volume ↓	抑瘤 Inhibited tumors
朱砂根甲醇提取物 ^[26] Methanol extract	B16F10	10, 20, 40 μg/mL	MITF, TP ↑ ERK, PI3K /Akt ↓	降低癌生成 Reduced cancer formation
环状脱脂肽 FR-900359 ^[25] Cyclic degreasing peptide FR-900359	HCmel12, Mel270, Mel202, Mel92. 1, OMM1. 3	/	Gα _q , Gα ₁₁ ^{Q209L} , ERK, YAP ↓	抑制肿瘤细胞增殖、代谢和迁移 Inhibited tumor cell proliferation, metabolism and migration

砂根皂苷 L 对稻瘟病菌具有良好的抑制效果,为初步筛选的抗癌药物检测提供了生物测定系统^[34]。然而,目前机制研究多围绕香豆素类和皂苷类的抗肿瘤作用进行,多为提取物或者综合作用,且报道较少论据不充分,对朱砂根中提取的苯醌、黄酮类和挥发油的作用研究较少,今后的研究需要对朱砂根的抗癌活性物质进行更深入的挖掘。另外,朱砂根抗肿瘤作用机制涉及广泛,涵盖多种肿瘤,但其具体作用机制尚不清楚,需要进一步的研究。临床上,朱砂根抗肿瘤作用的试验欠缺,还需结合临床药代动力学等精准试验以及生存率和预后数据来进一步支持。此外,以靶向肿瘤微环境和微生物来重塑肿瘤微环境从而增强抗原的特异性和免疫原性,并调节肿瘤微环境^[32],将进一步探索朱砂根及其潜在的抗癌活性药物开辟前景。

参考文献:

[1] 余成龙, 宋良科, 吴蜀星, 等. 朱砂根药用资源分布及研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40 (28): 13793 - 13794, 13924.
Yu CL, Song LK, Wu SX, et al. The distribution of the medicinal resource of *Ardisia crenata* Sims and its research progress [J]. J Anhui Agric Sci, 2012, 40 (28): 13793 -

13794, 13924.
[2] Liu DL, Zhang X, Zhao Y, et al. Three new triterpenoid saponins from the roots of *Ardisia crenata* and their cytotoxic activities [J]. Nat Prod Res, 2016, 30: 2694-2703.
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 一部: 2020 年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
National pharmacopoeia committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China One: 2020 edition [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2020.
[4] Kuschak M, Schlegel JG, Schneider M, et al. Sensitive LC-MS/MS method for the quantification of macrocyclic Gα_q protein inhibitors in biological samples [J]. Front Chem, 2020, 8: 833.
[5] 叶晴, 陈金鹏, 凌悦, 等. 朱砂根化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2851-2860.
Ye Q, Chen JP, Ling Y, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Ardisiae Crenatae Radix* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53 (9): 2851 -2860.
[6] Reglero C, Reglero G. Precision nutrition and cancer relapse prevention: a systematic literature review [J]. Nutrients, 2019, 11(11): 2799.
[7] Liu J, Zhang Y, Yu C, et al. Bergenin inhibits bladder cancer progression via activating the PPARγ/PTEN/Akt signal pathway [J]. Drug Dev Res, 2021, 82(2): 278-286.
[8] Song NN, Yang LM, Zhang MJ, et al. Triterpenoid saponins and phenylpropanoid glycoside from the roots of *Ardisia crenata* and

- their cytotoxic activities [J]. Chin J Nat Med, 2021, 19(1): 63–69.
- [9] 刘岱琳. 朱砂根和密花石豆兰活性成分的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- Liu DL. Studies on the bioactive constituents of *Ardisia crenata* Sims and *Bulbophyllum orotissimum* Lindl. [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2004.
- [10] 刘岱, 王乃利, 张雪, 等. 朱砂根的抗癌活性成分研究 [A]. 中国药学会, 第七届全国青年药理学工作者最新科研成果交流会议论文集 [C]; 2004.
- Liu D, Wang NL, Zhang X, et al. Research on anti-cancer active ingredients of Cinnabar root [A]. Proceedings of the 7th national young pharmaceutical workers' latest scientific research exchange meeting, Chinese pharmaceutical society [C]; 2004.
- [11] Wang K, Li YF, Lv Q, et al. Bergenin, acting as an agonist of PPAR γ , ameliorates experimental colitis in mice through improving expression of SIRT1, and therefore inhibiting NF- κ B-mediated macrophage activation [J]. Front Pharmacol, 2018, 8: 981.
- [12] Butnariu M, Quispe C, Sharifi-Rad J, et al. Naturally-occurring bioactives in oral cancer: preclinical and clinical studies, bottlenecks and future directions [J]. Front Biosci (Schol Ed), 2022, 14(3): 24.
- [13] Newell AM, Yousef GG, Lila MA, et al. Comparative *in vitro* bioactivities of tea extracts from six species of *Ardisia* and their effect on growth inhibition of HepG2 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130(3): 536–544.
- [14] 蔡佳仲. 朱砂根和树豆叶的化学成分及抗肿瘤作用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- Cai JZ. Chemical constituents from *Ardisia crenata* and *Cajanus cajan*: isolation, identification, and anticancer effects [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2012.
- [15] Li M, Wei SY, Xu B, et al. Pro-apoptotic and microtubule-disassembly effects of ardisiacrispin (A + B), triterpenoid saponins from *Ardisia crenata* on human hepatoma Bel-7402 cells [J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10(7-8): 739–746.
- [16] Dai Y, Desano J, Qu Y, et al. Natural IAP inhibitor Embelin enhances therapeutic efficacy of ionizing radiation in prostate cancer [J]. Am J Cancer Res, 2011, 1(2): 128–143.
- [17] 李淑贤, 王白燕, 李瑞琴, 等. 华蟾素抗肿瘤机制研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(13): 2461–2464.
- Li SX, Wang BY, Li RQ, et al. Research progress on anti-tumor mechanism of cinobufalatin [J]. J Mod Oncol, 2022, 30(13): 2461–2464.
- [18] 沈欣. 朱砂根总皂苷抗癌作用及作用机理研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2003.
- Shen X. Studies on antineoplastic active components in *Ardisia crenata* Sims [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2003.
- [19] Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials [J]. Biosci Rep, 2019, 39(1): BSR20180992.
- [20] Zheng ZF, Xu JF, Feng ZM, et al. Cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Ardisia crenata* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10(9/10): 833–839.
- [21] Podolak I, Żuromska-Witek B, Grabowska K, et al. Comparative quantitative study of ardisiacrispin A in extracts from *Ardisia crenata* Sims varieties and their cytotoxic activities [J]. Chem Biodivers, 2021, 18(7): e2100335.
- [22] Podolak I, Mynarski A, Wróbel D, et al. Bioactive benzoquinones content variability in red-berry and white-berry varieties of *Ardisia crenata* Sims. and assessment of cytotoxic activity [J]. Nat Prod Res, 2021, 35(1): 157–161.
- [23] Jia Z, Koike K, Nikaido T, et al. Triterpenoid saponins from *Ardisia crenata* and their inhibitory activity on cAMP phosphodiesterase [J]. Chem Pharm Bull, 1994, 42(11): 2309–2314.
- [24] Liu DL, Zhang X, Zhao Y, et al. Three new triterpenoid saponins from the roots of *Ardisia crenata* and their cytotoxic activities [J]. Nat Prod Res, 2016, 30(23): 2694–2703.
- [25] Gaffal E. Research in practice: therapeutic targeting of oncogenic GNAQ mutations in uveal melanoma [J]. J Dtsch Dermatol Ges, 2020, 18(11): 1245–1248.
- [26] Yao C, Jin CL, Oh JH, et al. *Ardisia crenata* extract stimulates melanogenesis in B16F10 melanoma cells through inhibiting ERK1/2 and Akt activation [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 653–657.
- [27] Fedele M, Sgarra R, Battista S, et al. The epithelial-mesenchymal transition at the crossroads between metabolism and tumor progression [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(2): 800.
- [28] Cheng S, Qian K, Wang Y, et al. PPAR γ inhibition regulates the cell cycle, proliferation and motility of bladder cancer cells [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5): 3724–3736.
- [29] Lee SY, Hur GY, Jung KH, et al. PPAR- γ agonist increase gefitinib's antitumor activity through PTEN expression [J]. Lung Cancer, 2006, 51(3): 297–301.
- [30] 王雪, 唐生安, 翟慧媛, 等. 红凉伞抗肿瘤转移化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(7): 881–885.
- Wang X, Tang SA, Zhai HY, et al. Studies on anti-tumor metastatic constituents from *Ardisia crenata* [J]. China J Chin Mater Med, 2011, 36(7): 881–885.
- [31] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志-第二十七卷 [M]. 北京: 科学出版社; 1979.
- Editorial committee of flora of China, Chinese academy of sciences. Flora of China, Vol. 27 [M]. Beijing: Science Press; 1979.
- [32] Jiang J, Mei J, Yi S, et al. Tumor associated macrophage and microbe: the potential targets of tumor vaccine delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2022, 180: 114046.
- [33] Attaran S, Bissell MJ. The role of tumor microenvironment and exosomes in dormancy and relapse [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 78: 35–44.
- [34] Liu DL, Wang NL, Zhang X, et al. Two new triterpenoid saponins from *Ardisia crenata* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2007, 9(2): 119–127.

武雪亮,樊建春,郭飞,等. SHP-2 在肿瘤相关巨噬细胞中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 171-176.
Wu XL, Fan JC, Guo F, et al. Research progress on the role of SHP-2 in tumor-associated macrophages [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 171-176.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.023

SHP-2 在肿瘤相关巨噬细胞中的研究进展

武雪亮^{1,2}, 樊建春³, 郭飞¹, 张琦⁴, 薛军^{1,2*}, 王西墨⁴, 孙光源¹, 刘建玲²,
韩磊¹, 高树全¹

(1.河北北方学院附属第一医院 普通外科,河北 张家口 075000;2.河北北方学院附属第一医院 肿瘤研究所,河北 张家口 075000;3.河北北方学院,河北 张家口 075000;4.天津医科大学附属南开临床学院,天津 300100)

【摘要】 肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)是肿瘤免疫微环境(TIME)中的优势细胞群,是 TIME 中免疫系统抑制和肿瘤细胞增殖最重要的调节细胞。Src 同源 2 蛋白酪氨酸磷酸酶 2(SHP-2)是一种非受体蛋白酪氨酸磷酸酶,该磷酸酶在从细胞表面到细胞核的信号传递中发挥重要作用,且是介导细胞增殖和分化的关键细胞内调节因子,参与多种生长因子和细胞因子的信号通路。最近的研究表明,SHP-2 是决定 TAMs 功能的一个关键酶,但是由于其功能多变,在不同的实体瘤微环境中发挥不同甚至是相反的作用。基于此,本文综述了 SHP-2 在 TAMs 功能及在相关实体瘤中的作用,为肿瘤的免疫和靶向治疗提供坚实的科学依据。

【关键词】 蛋白酪氨酸磷酸酶 2;肿瘤相关巨噬细胞;临床研究;作用机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0171-06

Research progress on the role of SHP-2 in tumor-associated macrophages

WU Xueliang^{1,2}, FAN Jianchun³, GUO Fei¹, ZHANG Qi⁴, XUE Jun^{1,2*}, WANG Ximo⁴,
SUN Guangyuan¹, LIU Jianling², HAN Lei¹, GAO Shuquan¹

(1. Department of General Surgery, the First Hospital Affiliated to Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China.

2. Cancer Research Institute, the First Hospital Affiliated to Hebei North University, Zhangjiakou 075000.

3. Hebei North University, Zhangjiakou 075000. 4. Nankai Clinical College Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300100)

【Abstract】 Tumor-associated macrophages (TAMs) are the predominant cell group in the tumor microenvironment (TME) and are the most important regulatory cells of immune system suppression and tumor cell proliferation in TIME. Src homology-2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) is a non-receptor protein tyrosine phosphatase that plays an important role in the transmission of signals from the cell surface to the nucleus. SHP-2 is a key intracellular regulatory factor mediating cell proliferation and differentiation and is involved in a variety of growth factor and cytokine signaling pathways linking the cell surface to the nucleus. Recent studies have shown that SHP-2 is a key enzyme in determining the function of TAMs, but because of its variable function, it plays different or even opposite roles in different solid TMEs. This paper reviews the function of SHP-2 in TAMs and related solid tumors to provide a comprehensive reference for tumor immunity and targeted therapy research.

【Keywords】 protein tyrosine phosphatase 2; tumor-associated macrophages; clinical research; mechanism of action

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

【基金项目】 2022 年河北省省自然科学基金精准医学联合基金项目 (H2022405033)。

【作者简介】 武雪亮 (1984—),男,博士,副主任医师,副教授,研究方向:消化道肿瘤的基础与临床研究。E-mail:wxlwk@163.com

【通信作者】 薛军 (1965—),男,主任医师,二级教授,硕士生导师,研究方向:消化道肿瘤的基础与临床研究。E-mail:yfyxuejun@163.com

肿瘤免疫微环境 (tumor immune microenvironment, TIME) 是间质细胞和免疫细胞沿细胞外基质建立的相互作用的复杂网络。TIME 中的间质细胞如内皮细胞、周细胞和癌症相关成纤维细胞等在肿瘤血管生成、细胞增殖、侵袭和转移等方面发挥作用^[1]。TIME 中的免疫细胞主要包括肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocyte, TILs)、肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs)、骨髓来源的抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)、自然杀伤细胞 (NK)、粒细胞、树突状细胞 (dendritic cell, DC) 和肥大细胞 (mastocyte, MC) 等^[2-3]。其中, TAMs 实质上是血液中单核细胞通过血管浸润到肿瘤中, 在肿瘤微环境下分化成巨噬细胞。诸多研究表明, TAMs 在肿瘤发育、生长和进展的各个方面发挥了积极的作用, 但是由于受到包括肿瘤细胞、T 细胞、B 细胞以及缺氧环境等多种外部因素刺激的影响, TAMs 会形成具有不同功能的促肿瘤和抗肿瘤的细胞群体^[4]。因而, 如何调控 TAMs 功能使之倾向于抗肿瘤方向发展是目前肿瘤免疫治疗领域中的关键。

在近期对肿瘤发生发展特别是转移机制的研究中, SHP-2 (src homology-2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2) 受到了广泛重视, 是关注的焦点。SHP-2 是一种存在于细胞质的蛋白酪氨酸磷酸酶, 广泛参与细胞增殖和分化过程, 与细胞的存活、凋亡、焦亡等密切相关^[5-7]。多项研究表明, SHP-2 在调节 TIME 中的免疫细胞, 尤其是 TAMs 功能中起着重要作用, 但由于其作用的复杂性, 其在不同实体瘤环境中的功能不同^[8-11]。因此, 本文将深入研究其在 TAMs 中的表达及作用机制, 为相关实体瘤的免疫治疗提供新的方向和思路。

1 SHP-2 概述

1.1 SHP-2 的基因及蛋白结构

SHP-2 是由蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 11 (PTP nonreceptor 11, PTPN11) 基因编码的非受体蛋白酪氨酸磷酸酶, 在人和小鼠多种组织和细胞类型中均有表达, 其共包含两个 src 同源 2 (SH2) 结构域 (N-SH2 和 C-SH2) 和一个蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP) 催化结构域。两个串联排列的 SH2 结构域排列于 SHP-2 的 N 端和 C 端, 而磷酸酶结构域则位于 C 端^[12-13]。N 端的 SH2 结构域是一个可以结合和抑制磷酸酶或结合磷酸化蛋白并激活酶的构象开关,

而 C-SH2 结构域虽然提供结合能量和特异性, 但是 C-SH2 结构域在激活过程中并不起直接作用。此外, 研究者们发现 SHP2 中还含有两个酪氨酸残基 (y542 和 y580), 它们可以在细胞外的刺激下被磷酸化进而发挥功能^[12]。此外, SHP-2 可以通过细胞内液-液相分离 (LLPS) 的行为而被过度激活, 由于 SHP2 在正常情况下是一个重要的生理信号枢纽, 它被过度激活无疑会导致细胞信号平衡的破坏, 导致细胞功能和局部环境紊乱。因此, 在肿瘤的发生发展过程中, LLPS 过度激活的 SHP-2 可能是疾病发生和肿瘤产生化疗耐药的重要驱动因素之一^[14]。

1.2 SHP-2 的功能及作用机制

许多重要的细胞活动, 如细胞增殖、分化和死亡, 都受到细胞信号转导过程的高度控制, 其中蛋白质磷酸化和去磷酸化是中心事件。越来越清楚的是, 这些生化过程是由蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 和蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP) 进行的。蛋白质磷酸化和去磷酸化与信号蛋白的活性密切相关, 直接介导蛋白质间的相互作用^[15-16]。因此, 使酪氨酸磷酸化信号分子去磷酸化的 PTPs 在转导信号流和控制细胞行为方面与 PTKs 起着同样重要的作用。然而, 关于 PTP 的研究相对滞后。SHP-2 是一种含有非跨膜 PTP 的 src 同源 2 (SH2) 结构域, 已被证明参与多种细胞因子和生长因子启动的信号转导过程。越来越多的证据表明, 这种磷酸酶在调节细胞生物过程的多种信号通路中起着重要作用^[17-18]。

巨噬细胞具有高度的可塑性, 在生理微环境的刺激下主要分化为两种表型: 经典激活巨噬细胞即 M1 型巨噬细胞, 由脂多糖 (LPS)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导分化, 其特点是高抗原呈递能力, 可分泌 IL-6、IL-12、IL-23、TNF- α 、IFN- γ 和活性氧 (ROS) 等炎性介质, 主要发挥杀菌、免疫促进和肿瘤杀伤的作用; 替代激活巨噬细胞即 M2 型巨噬细胞, 由 IL-4、IL-10、IL-13 或糖皮质激素诱导分化, 可产生抗炎细胞因子如 IL-10 和转化生长因子 β (TGF- β) 等, 具有免疫抑制、促进血管生成和基质重塑等作用^[19-20]。

目前已经报道了 TAMs 中 SHP-2 调控的几种信号通路, 例如, 在 CSF-1 刺激下, SHP-2 与集落刺激因子受体 (CSF-1R) 复合物结合, 导致 RAS-ERK 信号通路激活, 促进巨噬细胞增殖和 M2 型极化, 证实巨噬细胞中的 CSF-1/CSF-1R 轴在诱导肿瘤细胞存活、增殖和迁移中发挥关键作用^[21-22]。因此, SHP-2

在巨噬细胞中的作用似乎是促进肿瘤的。另一个研究较多的是 CD47,它是信号调节蛋白 α (SIRP α) 的配体。CD47 存在于肿瘤细胞表面,负责肿瘤逃避宿主免疫监视^[23]。在巨噬细胞中,SIRP α 作为一种接头蛋白,可募集特定底物进行 SHP-2 的去磷酸化,从而抑制细胞内信号传导并减少吞噬^[24]。最近, Barkal 等^[25] 研究发现,肿瘤表达的 CD24 与 TAMs 表面的抑制性受体唾液酸结合的 igg 样凝集素 10(Siglec-10)结合可促进肿瘤逃逸,这是通过将 SHP-1 和/或 SHP-2 募集到 Siglec-10 细胞质尾部的 ITIM 基元上触发的。此外,SHP-2 可以抑制 Jak-STAT 信号从而终止细胞因子诱导的细胞因子受体信号通路的活化。例如,SHP-2 可以通过 Jak I 的去磷酸化,下调 STAT 3 的磷酸化水平,从而负调节 IL-6 受体信号转导,TNF- α 激活的 SHP-2 可使 IL-10 信号下游 STAT3 去磷酸化,抑制抗炎因子,加重结肠炎相关结肠癌转化^[26]。这些研究表明 SHP-2 是调节 TAMs 功能的潜在靶点,可用于癌症免疫治疗。靶向巨噬细胞的 SHP-2 可促进 M1 型 TAMs 的极化,形成促进抗肿瘤免疫的微环境,从而控制肿瘤生长^[9]。

但亦有研究报道巨噬细胞中 SHP-2 在抗肿瘤免疫中发挥重要作用,Zhu 等^[27] 研究证实小鼠胰腺导管腺癌模型中,抑制 CSF-1R 信号可以在功能上重编程巨噬细胞,从而增强抗原呈递和增强抗肿瘤 T 细胞反应。阻断 TAMs 中 CSF-1R 信号通路可导致胶质母细胞瘤小鼠的肿瘤消退和生存率提高^[28]。SHP-2 可以负性调控 TRIF 配体蛋白依赖性的 I 型 IFN 和促炎因子的产生,而 I 型 IFN 和巨噬细胞 M1 极化密切相关;亦有研究证实,SHP-2 下调或失活可以诱导 TAMs 向 M2 极化,发挥抗炎、抗肿瘤的作用,但目前仍存在一定的争议^[29]。

2 TAMs 中 SHP-2 在各类实体瘤中的作用

2.1 SHP-2 与结直肠癌

SHP-2 已被报道在结直肠癌中具有肿瘤抑制作用,但 TAMs 中的 SHP-2 在结直肠癌中的研究甚少。研究表明 TAMs 中的 SHP-2 的表达与结直肠癌肝转移呈负相关。从机制上讲,TAMs 中缺少 SHP-2 会激活 p-STAT3 向 M2 表型极化,抑制 p-NF- κ B 和 p65 相关信号通路,进而促进结直肠癌发生,提示 SHP-2 是一个肿瘤微环境中促进 TAMs 抑瘤作用的关键因子^[30]。Li 等^[31] 通过这些生物信息学分析,发现

SHP-2 是影响结直肠癌侵袭和转移的关键基因。SHP-2 低表达促进了 IL-4 诱导的 M2 巨噬细胞中精氨酸-1 和 IL-10 的蛋白水平,同时抑制 IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白水平。此外,SHP-2 的低表达促进 p-PI3K、p-AKT 的表达和外泌体释放。但给予 PI3K 抑制剂 LY294002 后,相关通路蛋白表达被逆转。细胞划痕和 Transwell 实验结果表明,SHP-2 的低表达促进了结肠癌细胞的迁移和侵袭能力。结论证实 SHP-2 低表达可通过 PI3K/AKT 途径诱导 TAMs 向 M2 表型极化和外泌体释放,从而增强结直肠癌细胞的迁移和侵袭能力^[29]。通过采用单细胞测序技术,揭示了一种由蛋白质翻译后修饰拟素化介导的结肠癌免疫逃逸机制,即拟素化通过影响酪氨酸磷酸酶 SHP-2 的活性从而在肿瘤浸润巨噬细胞中激活 CD47/SIRP α 轴促进肿瘤免疫逃逸,从机制上对蛋白质去磷酸化及其与其它修饰的互作在免疫逃逸中的重要调控作用进行了佐证;同时,基于现有免疫疗法联合靶向抑制 SHP-2 重塑肿瘤微环境,实现了对免疫治疗耐受的结肠癌患者的再治疗^[29]。本团队应用 Cre-loxP 基因打靶系统建立巨噬细胞条件性 SHP-2 基因敲除小鼠模型,再利用结肠癌肝转移和腹腔转移瘤造模技术,构建小鼠结肠癌肝转移和腹腔转移模型,从体内和体外实验两方面阐明通过条件性敲除巨噬细胞中 SHP-2 基因,去除 SHP-2 的去磷酸化活性,促进 TEMs 中 Ang/Tie2-PI3K/AKT/mTOR 通路的激活,进而强化微环境下肿瘤微血管生成及肿瘤侵袭和转移,从而为晚期结直肠癌的干预提供了坚实的理论基础^[32]。

2.2 SHP-2 与黑色素瘤

黑色素瘤是最具侵略性和致命性的人类癌症之一。尽管有许多靶向疗法可用,但它们仅对一部分患者有效,并且耐药性的出现通常会降低持久反应。研究证实 SHP-2 介导的 ERK1/2 和 AKT 活化能促进黑色素瘤细胞活力、迁移和集落形成。SHP-2 抑制剂 11a-1 可抑制异种移植黑色素瘤的生长,因而 SHP-2 可作为黑色素瘤的新靶点^[33]。最近的一项研究表明,巨噬细胞中 SHP-2 的缺失通过促进巨噬细胞/CXCL9-Th1 细胞/IFN- γ 反馈回路来抑制黑色素瘤的生长,从而增强 TH1 介导的抗肿瘤免疫微环境^[34]。Ramesh 等^[35] 研究证实载有 CSF1R 和 SHP-2 抑制剂的纳米颗粒可增强肿瘤相关巨噬细胞的细胞毒活性和吞噬作用,这点在高度侵袭性的乳腺癌和黑色素瘤小鼠模型中得以证实。此外,Zhang

等^[36]在人类黑色素瘤标本和小鼠模型的黑色素瘤发展过程中均观察到肿瘤相关 CD4⁺ T 细胞中 p-SHP-2 的水平逐渐降低, SHP-2 的 CD4⁺ T 细胞特异性缺失促进了小鼠黑色素瘤的转移。CD4⁺ T 细胞中的 SHP-2 缺陷导致炎性细胞因子(尤其是 IL-6)释放增加,以及荷瘤小鼠中促瘤 MDSCs 的积累增加。IL-6 中和抗体可减少 CD4⁺ T 细胞特异性 SHP-2 基因敲除小鼠的 MDSCs 积累并抑制肿瘤生长。因而证实 CD4⁺ T 细胞中的 SHP-2 在预防黑色素瘤进展和转移中发挥重要作用。

2.3 SHP-2 与肝癌

SHP-2 在正常肝细胞中作为抑癌分子,但在肝癌细胞中的表达可增强 RAS-ERK 和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,促进肿瘤的发生。Du 等^[37]通过条件性敲除 Kupffer 细胞(KCs)中的 SHP-2 能促进肝肿瘤的生长,而同时敲除 KCs 和肝细胞中的 SHP-2 进一步加剧了这种促肿瘤效应。SHP-2 缺失能诱导 KCs 凋亡并减少其数量,从而诱导骨髓来源的单核细胞代偿性募集到肝肿瘤微环境中。这些新招募的单核细胞分化为具有 TAMs 功能的非 KC 巨噬细胞,通过下调 CD8⁺ T 细胞促进肿瘤的进展。

2.4 SHP-2 与乳腺癌

有研究表明乳腺癌中 TAMs 中 p-SHP-2 表达水平随着肿瘤恶性进展逐渐增加,利用巨噬细胞 SHP-2 条件性敲除小鼠构建荷瘤模型,发现 SHP-2 敲除后肿瘤生长和转移受到显著抑制^[38]。体内外实验发现, p-SHP-2 促进 TAMs 向 M2 型极化,而 SHP-2 敲除后, TAMs 向 M1 型极化增加,抑癌因子分泌增加,促癌因子分泌减少,进而抑制肿瘤恶性进展。机制研究发现 TAMs 中 p-SHP-2 的上调与乳腺癌分泌的 IL-10 相关, IL-10 促进了 p-SHP-2 的表达,促使巨噬细胞往 M2 型极化,进而促进肿瘤进展和转移^[39]。Chen 等^[39]应用系统性 SHP-2 抑制和 SHP-2 的可诱导遗传耗竭来研究 SHP-2 靶向过程中的免疫重编程,结果显示 SHP-2 的药理学抑制通过缓解检查点阻断诱导的 T 细胞衰竭,提高了转移性乳腺癌(MBC)细胞对 α 程序性死亡配体 1(α -PD-L1)抗体治疗的敏感性。此外, SHP-2 的肿瘤细胞特异性耗竭同样减少了肺转移灶,并下调了肿瘤浸润的 CD8⁺、CD4⁺ 细胞及 M2 型 TAMs。因而表明抑制 SHP-2 能通过促进抗肿瘤免疫治疗乳腺癌的转移。

3 SHP-2 的临床应用

临床研究表明,针对 SHP-2 促进肿瘤微环境中

的免疫抑制的特点,利用 RMC-4550 对 SHP-2 的变构抑制可以增加诱导抗肿瘤免疫效果^[40]。在发现第一个 II 型 SHP-2 抑制剂(变构抑制剂)后,诺华公司开发的第一个小分子候选药物; SHP-2 变构抑制剂(SHP099),将 SHP-2 锁定为自动抑制构象,增强抗肿瘤免疫效力来治疗癌症。最近的一项研究报道, SHP-2 的变构抑制导致促肿瘤的 M2 巨噬细胞的直接性和选择性耗尽,进而促进抗肿瘤免疫,这表明了抑制 SHP-2 是一种很有潜力的治疗 RAS 驱动的癌症的方法^[41]。近年来,又逐步发现了另外的变构结合袋/变构抑制剂,如四种 SHP099-相关化合物-JAB-3068(雅各比)、TNO155(诺华)、RMC-4630(赛诺菲)、RLY-1971(Relay Therapeutics)和 PROTAC,它们已进入临床试验以治疗各种实体瘤,但其治疗效果仍有待临床充分评估^[42]。

SHP-2 参与 PD-1/PD-L1 信号通路磷酸酶功能以减轻细胞毒性 T 细胞活性。基于这一发现, SHP-2 抑制剂在 T 细胞增强肿瘤免疫治疗中具有一定潜力。由于重叠许多激酶和 SHP-2 之间的信号通路, SHP-2 抑制剂可能会和激酶抑制剂表现出协同作用,下调相互连接的信号通路^[43]。尽管观察到 SHP-2 在 RAS/Raf 和 PD-1/PD-L1 信号通路中的重要性,仍需更多的研究来阐明 SHP-2 在信号转导中的确切作用。鉴于 SHP-2 作为一种潜在的抗肿瘤靶点, SHP-2 的开发抑制剂,特别是变构抑制剂,在科学界引起了广泛的兴趣。

综上, SHP-2 通过多种信号通路,介导肿瘤相关巨噬细胞发挥致癌/抑癌作用,深入研究其机制,具有潜在的临床治疗意义。

参考文献:

- [1] Ma J, Huang L, Hu D, et al. The role of the tumor microbe microenvironment in the tumor immune microenvironment: bystander, activator, or inhibitor? [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 327.
- [2] Ribatti D, Vacca A. The role of microenvironment in tumor angiogenesis [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 204.
- [3] Lequeux A, Noman MZ, Xiao M, et al. Impact of hypoxic tumor microenvironment and tumor cell plasticity on the expression of immune checkpoints [J]. Cancer Lett, 2019, 458: 13-20.
- [4] Pittet M, Michielin O, Migliorini D. Clinical relevance of tumour-associated macrophages [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19: 402-421.
- [5] Song Z, Wang M, Ge Y, et al. Tyrosine phosphatase SHP₂ inhibitors in tumor-targeted therapies [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(1): 13-29.

- [6] Li S, Wang X, Li Q, et al. Role of SHP₂/PTPN11 in the occurrence and prognosis of cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Oncol Lett*, 2023, 25(1): 19.
- [7] Asmamaw MD, Shi XJ, Zhang LR, et al. A comprehensive review of SHP₂ and its role in cancer [J]. *Cell Oncol*, 2022, 45(5): 729–753.
- [8] Christofides A, Katopodi XL, Cao C, et al. SHP-2 and PD-1-SHP-2 signaling regulate myeloid cell differentiation and antitumor responses [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(1): 55–68.
- [9] Liu Q, Qu J, Zhao M, et al. Targeting SHP₂ as a promising strategy for cancer immunotherapy [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 152: 104595.
- [10] Wang Y, Mohseni M, Grauel A, et al. SHP₂ blockade enhances anti-tumor immunity via tumor cell intrinsic and extrinsic mechanisms [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 1399.
- [11] Zhao M, Guo W, Wu Y, et al. SHP₂ inhibition triggers anti-tumor immunity and synergizes with PD-1 blockade [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(2): 304–315.
- [12] Tripathi R, Ayyannan SR. Emerging chemical scaffolds with potential SHP₂ phosphatase inhibitory capabilities-A comprehensive review [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2020, 97: 721–773.
- [13] Tang X, Qi C, Zhou H, et al. Critical roles of PTPN family members regulated by non-coding RNAs in tumorigenesis and immunotherapy [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 972906.
- [14] Zhu G, Xie J, Kong W, et al. Phase separation of disease-associated SHP₂ mutants underlies MAPK hyperactivation [J]. *Cell*, 2020, 183(2): 490–502.
- [15] Verma S, Sharma S. Protein tyrosine phosphatase as potential therapeutic target in various disorders [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2018, 11(3): 191–202.
- [16] Chen PJ, Zhang YT. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): insights into its new implications in tumorigenesis [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2022, 22(3): 181–194.
- [17] Niogret C, Birchmeier W, Guarda G. SHP-2 in lymphocytes' cytokine and inhibitory receptor signaling [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2468.
- [18] Zhang H, Gao Z, Meng C, et al. Inhibitor binding sites in the protein tyrosine phosphatase SHP-2 [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20(11): 1017–1030.
- [19] Gao J, Liang Y, Wang L. Shaping polarization of tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 888713.
- [20] Zou Z, Lin H, Li M, et al. Tumor-associated macrophage polarization in the inflammatory tumor microenvironment [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1103149.
- [21] Wang L, Iorio C, Yan K, et al. A ERK/RSK-mediated negative feedback loop regulates M-CSF-evoked PI3K/AKT activation in macrophages [J]. *FASEB J*, 2018, 32(2): 875–887.
- [22] Achkova D, Maher J. Role of the colony-stimulating factor (CSF)/CSF-1 receptor axis in cancer [J]. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44(2): 333–341.
- [23] Veillette A, Chen J. SIRP α -CD47 immune checkpoint blockade in anticancer therapy [J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(3): 173–184.
- [24] Vonderheide RH. CD47 blockade as another immune checkpoint therapy for cancer [J]. *Nat Med*, 2015, 21(10): 1122–1123.
- [25] Barkal AA, Brewer RE, Markovic M, et al. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy [J]. *Nature*, 2019, 572(7769): 392–396.
- [26] Xiao P, Zhang H, Zhang Y, et al. Phosphatase Shp2 exacerbates intestinal inflammation by disrupting macrophage responsiveness to interleukin-10 [J]. *J Exp Med*, 2019, 216(2): 337–349.
- [27] Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, et al. CSF₁/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(18): 5057–5069.
- [28] Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression [J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1264–1272.
- [29] Li Z, Xi J, Li B, et al. SHP-2-induced M2 polarization of tumor associated macrophages *via* IL-4 regulate colorectal cancer progression [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1027575.
- [30] Wang S, Yao Y, Li H, et al. Tumor-associated macrophages (TAMs) depend on Shp2 for their anti-tumor roles in colorectal cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(9): 1957–1969.
- [31] Li Z, Xi J, Li B, et al. SHP-2-induced M2 polarization of tumor associated macrophages *via* IL-4 regulate colorectal cancer progression [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1027575.
- [32] Qi J, Sun H, Zhang Y, et al. Single-cell and spatial analysis reveal interaction of FAP⁺ fibroblasts and SPP1⁺ macrophages in colorectal cancer [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1742.
- [33] Wang Y, Salvucci O, Ohnuki H, et al. Targeting the SHP₂ phosphatase promotes vascular damage and inhibition of tumor growth [J]. *EMBO Mol Med*, 2021, 13(7): e14089.
- [34] Xiao P, Guo Y, Zhang H, et al. Myeloid-restricted ablation of Shp2 restrains melanoma growth by amplifying the reciprocal promotion of CXCL9 and IFN- γ production in tumor microenvironment [J]. *Oncogene*, 2018, 37(37): 5088–5100.
- [35] Ramesh A, Kumar S, Nandi D, et al. CSF1R- and SHP₂-inhibitor-loaded nanoparticles enhance cytotoxic activity and phagocytosis in tumor-associated macrophages [J]. *Adv Mater*, 2019, 31(51): e1904364.
- [36] Zhang T, Guo W, Yang Y, et al. Loss of SHP-2 activity in CD4⁺ T cells promotes melanoma progression and metastasis [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 2845.
- [37] Du L, Ji Y, Xin B, et al. Shp2 deficiency in kupffer cells and hepatocytes aggravates hepatocarcinogenesis by recruiting non-kupffer macrophages [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 15(6): 1351–1369.
- [38] 郭乐乐. 乳腺癌恶性进展过程中蛋白磷酸酶 SHP-2 调控 TAM 细胞 M1/M2 极化的初步机制研究 [D]. 南京: 南京大学, 2015.

Guo LL. Preliminary study on the mechanism of protein phosphatase SHP-2 regulating M1/M2 polarization of TAM cells during malignant progression of breast cancer [D]. Nanjing: Nanjing University, 2015.

[39] Chen H, Cresswell GM, Libring S, et al. Tumor cell-autonomous SHP₂ contributes to immune suppression in metastatic breast cancer [J]. Cancer Res Commun, 2022, 2(10): 1104-1118.

[40] Wang RR, Liu WS, Zhou L, et al. Probing the acting mode and advantages of RMC-4550 as an Src-homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase (SHP₂) inhibitor at molecular level through molecular docking and molecular dynamics [J]. J Biomol Struct Dyn, 2020, 38(5): 1525-1538.

[41] Quintana E, Schulze CJ, Myers DR, et al. Allosteric inhibition of SHP₂ stimulates antitumor immunity by transforming the immunosuppressive environment [J]. Cancer Res, 2020, 80(13): 2889-2902.

[42] Zheng M, Liu Y, Wu C, et al. Novel PROTACs for degradation of SHP₂ protein [J]. Bioorg Chem, 2021, 110: 104788.

[43] Toral Keller J, Wuenschel Mark A, Black Esther P. Genomic data from NSCLC tumors reveals correlation between SHP-2 activity and PD-L1 expression and suggests synergy in combining SHP-2 and PD-1/PD-L1 inhibitors [J]. PLoS One, 2021, 16(8): e0256416.

[收稿日期] 2023-05-09



编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》稿约

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

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与比较医学相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究进展、继续教育、设施设备、3R 等。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

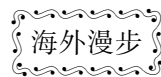
本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswyd.cnjournals.com>

期待您的来稿!



参加第 70 届日本实验动物学会年会 及考察活动汇报

于 品

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

在五月樱花烂漫的季节,我有幸踏上了一场学术之旅,来到了东方的岛国——日本。此次学术的征程,是为了参加第 70 届日本实验动物学会年会及考察活动。

我们代表团的队伍汇聚了来自中国北京、兰州、广州等地的实验动物方面的 18 位专家,汇集了中华大地上最杰出的实验动物领域的学者。于 2023 年 5 月 24 日至 26 日,我们踏上了这场科学考察之旅,了解日本的实验动物科研与技术。

首先,我们来到日本筑波,这座新兴城市位于日本本州岛东部的茨城县,距离东京以北约 50 公里,散发着自然的魅力,湖泊、山脉和公园编织出一幅绚丽的画卷,并且它也是一座被科学之光点亮的城市,被誉为日本的科学城,集中了数十个高级研究机构和两所大学,并以设备精良、人才众多、研究基础雄厚著称。我们参加了在茨城县筑波市筑波国际会议中心举办的第 70 届日本实验动物学会年会,这是一场国际性研讨会,吸引了来自日本、中国、韩国、马来西亚、菲律宾、泰国、美国等地的近 300 位实验动物领域的研究人员、技术人员和从业人员。这个大会以“更广更深地讲述实验动物”为主题,探讨了实验动物在医药品开发、医疗技术、饲养和分析机器的开发等领域的广泛应用,在筑波这片科学的土地上,与会者汇聚在一起,分享着各自领域的精彩瞬间,共同追求科学的深度和广度,会议囊括了实验动物相关领域的方方面面。从最先进的医药品开发到高度医疗技术,从实验动物饲养到分析机器的开发,涵盖着前沿的研究和科技应用。会议分为四大场馆,不仅有主题报告,还设有

海报展示和科技产品展示洽谈区。我深刻领略到了日本实验动物科学在各个学科中的广泛应用,特别是在宇宙生物学方面的前沿实验。他们通过小鼠和大鼠等实验动物的行为观察,研究身体、精神状况和认知功能的变化,确立了简便、正确评价实验动物行为的方法,以最低限度的样本大小得到客观性、再现性高的数据。

在这次学术会议中,我聆听到了来自中国科学工作者的声音。中国实验动物学会推荐的青年科研工作者姜晓亮博士的学术报告《The Construction of Experimental Animal Models for Cardiovascular Diseases and Pathology Mechanism Study》赢得了国际上的认可,并荣获了“2022 年日本实验动物学会国际奖”。这项奖励的获得不仅为中国实验动物学会和中国科研工作者在国际上的声誉锦上添花,同时也为中日两国在实验动物学领域的交流与合作奠定了深厚的基础。

除了年会,我们还踏入了筑波大学生命科学动物资源中心。这是日本最大的实验动物中心之一,这里是实验动物资源的储备库,也是前沿科技的聚集地。研究室墙上挂满了科研成果的图片和海报,每一幅都是对实验动物学研究的一份珍贵见证,整个中心的氛围充满了科学的气息,仿佛每一寸空气都弥漫着科研的热情。我们参观了该中心的设施,各类实验室设备齐全,从基础的实验仪器到高级的基因编辑设备,每一处都展现着筑波大学对于科研的高度重视。通过对中心设施的仔细参观,我们深刻了解了其中所蕴含的先进技术和严谨的管理体制。

接下来,我们来到了日本理化学研究所筑波研究所,高级研究科学家绫部信哉和小林空究教授为我们介绍了该研究所的设施和研究方向。这个研究所涉猎物理、化学、工学、生物学、医学等多个领域,进行基础到应用的研究。我们了解到该研究所从实验动物的繁殖、饲养到健康监测,每一个环节都经过科学仔细的规划。工作人员们用心呵护每一只动物,他们的关爱不仅体现在丰富的饲养环境,更体现在对动物福祉的关切。这种注重动物生活质量的管理方式,让人感受到了人性化管理在实验动物学中的价值。通过参观,我们了解到该中心拥有实验动物、胚胎、细胞、菌毒种等多个资源库,为解决健康、医疗、粮食、环境等问题提供了广泛的研究支持,为科研提供强大支持的平台。

这次访问,让我深刻认识到了日本实验动物学

的先进性,尤其是在高科技领域的应用。他们的科研机构严格的管理、高水平的资源保存和利用也给我留下了深刻印象。这次学术之旅为我开启了新的研究思路和方法,使我受益匪浅。期望未来,中日两国在实验动物学领域能够更紧密地合作,促进学术交流,共同推动科研水平的提升。这是一段跨越国界的科学奇遇,它不仅丰富了我的学术阅历,更为我未来的研究之路描绘出了新的篇章。这次参会和考察活动,让我领略到了实验动物学的无限魅力,也憧憬着未来中日两国在这个领域更加深入的合作,共同推动实验动物学的发展,为全球的科学研究贡献更多的智慧和力量。

[收稿日期] 2024-01-03

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国比较医学杂志》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)综合性医药卫生类的核心期刊!

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

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

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

